

고정화 Mucor SPP L42 응유효소를 이용한 치즈커드 형성에 관한 연구

박 종 래

慶北大學校 農科大學 酪農學科

Studies on coagulation of cheese curd by immobilized Mucor spp L42 milk clotting enzyme

Park, Jong Lae

Dept. of Dairy Science, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

In order to study of practical purpose of immobilized Mucor spp L42 milk clotting enzyme on activated succinylamino-propyl glass beads with glutaraldehyde in continuous curd coagulation, acidified milk(pH5.6,8°C) was treated through reactor packed with immobilized beads, and warmed at 30°C and allowed to coagulation for the determination of enzyme stability, deactivation of milk clotting ability by continuous reaction, the beads treatment conditions, and contact time of milk and beads in reactors.

The results obtained were summarized as follow ;

- 1) After 3 month's storage, activity of immobilized Mucor spp L42 milk clotting enzyme in 0.2M phosphate buffer(pH 4.6) with 0.06% sodium azide was only 80% of initial activity.
- 2) Milk clotting activity of the beads was decreased by continuouse exposure on acidified skim milk. Nitrogen accumulation on the beads paralld loss of the activity in initial reaction stage.
- 3) After 6 hours continuous treatment of the beads at 60 sec/ml surface time, the milk-clotting activity of the beads was about 70% of initial activity.
- 4) Bead reactor and shaking bed reactor were more effective than column reactor on continuouse skim milk coagulation.

서 론

치즈 제조과정에 커드를 형성하기 위하여서는 전통적으로 이유전 송아지의 4위 조직에서 추출된 렌닌(E.C. 3.4.23.3)을 사용하여 왔으나 치즈의 생산량이 증가함에 따라 급증하는 응유효소의 수요를 충족시키기 위하여 렌닌 대신으로 사용될수 있는 대용 응유효소에 대하여 많은 관심을 가지게 되었고, 특히 미생물 효소로서 Mucor pusillus, Mucor miehei, Endothia parasitica 등에서 분리되는 산성 단백질 분해 효소들은 대용 응유효소로서 치즈 제조산업에 널리 사용되고 있다.

(Arima 등, 1967 ; Annstrop 등, 1976 ; Sardinass 등, 1966).

치즈 제조과정에 첨가된 응유효소는 대부분이 유청에 용해 상태로 존재함으로 유청으로 부터 분리하여 재이용하는것은 거의 불가능하며, 일부 응유효소는 치즈의 조직중에 잔존하면서 숙성과정에 치즈케이신을 지나치게 분해시킴으로 치즈의 조직과 풍미를 나쁘게 하는 원인이 되고 있다. (Taylor & Olson 1979)

최근에는 효소의 새로운 이용방법으로 용해상태의 효소를 불용해성이고 취급하기에 편리한 지지체에 absorption, entrapping, covalent bonding

등의 방법으로 고정화 효소를 만들어 사용함으로써 여러분야의 발효산업에서 효소의 재이용을 가능하게 하였고 효소와 생산물을 쉽게 분리할 수 있어 품질관리가 용이하며, 효소의 사용범위가 넓어지는 등 용해성 효소에 비해 많은 이점이 있는 것으로 보고되었다.(Mosbaeh, K. 1976)

유가공 분야에서는 β -galactosidase, catalase, peroxidase, sulfur hydroxydase 등을 고정화 효소로 만들어 유제품 제조과정에 이용함으로써 유제품의 품질개선, 유가공 기술의 개선, 새로운 유제품 개발 등에 공헌하여 왔고 앞으로도 더 많은 분야에 이용될수 있는 가능성을 시사하고 있다.(Cheryan 등, 1975).

치즈 커드 형성과정에 고정화 응유효소의 이용 가능성은 커드의 형성과정이 케이신 마이셀의 최외곽에 위치하고 있는 K-casein의 일부가 효소적 작용에 의하여 가수분해되어 불용해성인 para-k-casein과 용해성인 macro peptide로 분해되는 과정(1단계작용)과 불용해성의 para-k-caseinate가 2가의 양이온을 bridge로 하여 중합되어 gel을 형성하는 과정(2단계작용)으로 구분되고 1단계작용의 온도에 대한 Q10 Value는 1.5인데 비하여 2단계 작용의 Q10 Value는 11-12로 그 차이가 크기 때문에 처리온도를 다르게 함으로서 효소적작용과 gel 형성작용을 분리하여 일어나게 할 수 있으므로 고정화 응유효소를 치즈 커드 형성 과정에서의 이용을 가능하게 하였다.(Taylor 와 Richardson 1976).

본 실험에서는 박과 김(1982)등이 대용 응유효소로서 Mucor spp L42 응유효소를 생산 정제한 바 있고, 박과 이(1986)등이 동응유효소를 porous glass bead에 cross linking 시켜 고정화 효소로 제조한 바 있는 고정화 Mucor spp L42 응유효소를 치즈 제조 과정에 커드 형성에 이용할 수 있도록 하기 위하여 적절한 반응장치, 반응조건, 재이용성 등을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 시험 재료

1) 신선한 우유: 경북대학교 농과대학 낙농학과 부속 목장에서 생산되는 홀스타인유를 착유직후 4°C로 냉각하여 24시간 이내에 시험용으로 사

용하였다.

2) Mucor spp L42응유효소: 박과 김(1982)등의 방법에 따라 생산하고 정제한 것을 사용하였다.

3) 시약: porous glass bead (150/200, Sigma), 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma), succinic anhydride (Sigma), EDC(I-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)-carbodiimide(Sigma), glutaraldehyde (Sigma)을 사용하였다.

2. 시험 방법

1) Mucor spp L42 응유효소의 고정화: Weetal 등(1970)의 방법에 따라 porous glass bead을 Silanization, Succinylation 시킨 Succinylamino propyl glass bead 1 gr을 Taylor와 Swaisgood 등(1978)의 방법에 따라 0.1M EDC용액으로 활성화 시킨후, 정제된 Mucor spp L42 응유효소액 20ml (단백질 5mgr/ml)와, 10% glutaraldehyde 용액 5ml을 reactor에 동시에 넣고 박(1986)이 사용한 것과 동일한 순환 장치를 사용하여 24시간 동안 연속으로 고정화하고 보존하였다.

2) 고정화 Mucor spp L42 응유효소의 활력측정: 고정화 효소 100 μ l을 박(1986)과 같은 반응조에 넣고 헤모그로빈 용액 (단백질 5mg/ml, pH 4.0) 5.0ml을 연속 순환시키면서 일정간격으로 500 μ l을 취하여 12% TCA 용액 2.5ml에 혼합한후 침전물을 여과하고 여과액중의 질소화합물의 양을 분석하여 효소의 활력으로 표시하였다.

3) 고정화 Mucor spp L42 응유효소의 응유력 측정: 고정화 효소 1gr을 충전한 반응조를 통하여 홀러보넨 탈지유 일정양을 예열된 시험관에 넣고 30°C 항온수조내에 시험관의 목 부분까지 잠기도록 하여 서서히 회전시키면서 (100-150 rpm) 시험관벽에 케이신 입자가 나타날때까지의 시간을 측정하여 응유력으로 표시하였다.

4) 커드의 장력: 용수철을 부착한 원형으로 된 예리한 칼날을 이용하여 커드를 자를때 받는 힘의 크기로서 커드의 장력을 비교하였다.

5) 단백질의 분석: 마이크로젤달 방법과 Habeib 등(1965) 방법으로 분석하였다.

6) 전기영동: Antion(1962)의 방법에 따라 6%

polyacrylamidegel을 제조하고 Triscitrate buffer (pH 8.7)을 이용하여 분리하였고 Coomassie brilliant blue R-250으로 단백질을 고정하였다.

결과 및 고찰

1. 고정화 Mucor spp L42 응유효소의 활력의 변화

정제된 Mucor spp L42 응유효소를 succinylamidopropyl glass bead에 glutaraldehyde를 사용하여 covalent bonding 방법으로 고정화시킨후 0.2M phosphate buffer (pH 4.0)에 sodium azide 0.06%를 첨가한 액에 침지한 상태로 보존하면서 저장기간별로 고정화 효소의 활력을 헤모그로빈의 가수분해로 생성되는 12% TCA 용해성 질소 화합물의 생성량으로 표시하고, 효소의 활력 변화의 정도를 상대적으로 비교하였던바 그림1에서 보는바와 같이 5°C 이하에서 보존할 경우에 3개월 까지는 활력의 약83%가 남아 있어 대체적으로 안전하게 보존할 수 있는 것으로 나타났으나 그 이후에는 효소의 활력이 변화하는 속도가 빨라지는 경향을 나타내었고, 실온(18-20°C)에서 보존할 경우에는 1개월 보존한후의 효소의 활력은 70%로 감소하였고, 25°C에서 보존할 경우에는 보존기간 2주일 이내에 효소의 활력이 70% 이하로 감소하였다.

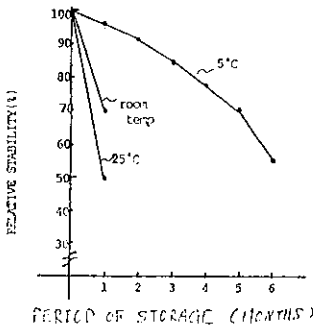


Fig. 1. Stability of immobilized Mucor spp L42 milk-clotting enzyme in 0.2M phosphate buffer pH4.6 with 0.06% sodium azide at different temperature.

고정화 효소들의 저장성에 대하여서는 Ferrier와 Richardson (1971)등이 amino-propyl glass bead에 펩신을 고정화 시켰을때 5°C 이하에서는 1개월 이상 저장해도 90% 이상의 우유응고력

을 나타내었다고 보고하였으며 Cheryan 나 Van Wyk (1975) 등은 protein coated porous glass bead에 펩신을 고정화 한 효소를 완충액의 pH를 다르게 하여 저온에서 보존했을때 pH 3.0에서는 3개월 보존후에도 효소활력의 70% 이상 유지되었다고 보고하였다.

고정화 효소의 저장중 활력의 변화는 저장액의 온도, pH 등에 의하여 많은 영향을 받으며 효소의 고정화의 방법에 따라서도 저장성에 영향을 미치는 것으로 설명할 수 있으나 저온에서 효소의 적정 pH 범위내에서는 3개월까지 보존해도 효소의 활력을 80% 이상 유지할수 있는 것으로 설명할 수 있다.

고정화 Mucor spp L42 응유효소를 계속하여 커드형성과정에 이용했을때 응유력의 변화 정도를 조사하기 위하여 bead 1.0gr을 충전시킨 반응조를 통하여 살균후 8°C로 냉각한 탈지유 (pH 5.6)을 계속 흘려 보내면서 (1.0ml/min) 일정간격으로 우유의 응고시간을 측정하였던 바 그림2에서 보는 바와 같이 처음 1시간동안에는 응유력이 빠른 속도 감소하였으며 1시간 이후에는 응유력이 감소하기는 하나 그 변화 속도가 대단히 느리게 나타나는 것을 볼 수 있다.

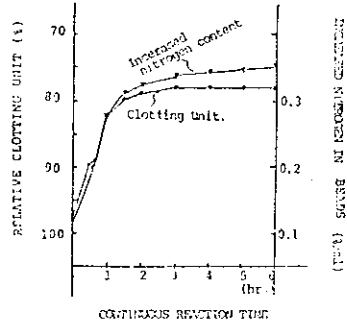


Fig. 2. Relationship of milk clotting activity and accumulation of nitrogen on immobilized Mucor spp L42 milk clotting enzyme.

고정화 효소를 연속적으로 사용할 경우에 효소의 활력 손실에 대하여 Havewala와 Pitcher (1974) 등은 고정화 효소를 제조하는 과정에 효소가 지지체에 결합상태가 약하여 물리적인 작용에 의하여 지지체에 결합된 효소의 일부가 분리되어 효소반응 생산물과 같이 유실되는 경우와 고정화 효소를 연속적으로 사용하는 과정에 고정화된 효소의 변성에 의하여 고정화 효소의 활력이 낮아

질수 있다고 보고하였고, Pitcher (1975)는 고정화 효소를 장기간 사용하는 동안에 미생물의 오염으로 인하여 고정화 효소의 변성은 더욱 촉진된다고 보고하였다.

Ferrier 등(1972), Cheryan과 Van Wyk(1975) 등은 고정화 펩신을 사용하여 탈지유를 응고시킬 때 초기에 고정화 효소의 응유력이 급격히 떨어지는 현상은 탈지유중의 케이신의 분해산물인 용해성 peptide 나 sialic acid가 고정화 효소를 결합하고 있는 지지체에 결합하기 때문인 것으로 보고하였다.

고정화 *Mucor spp* L42 응유효소로 탈지유를 처리했을 때 처음 1시간 동안의 급격한 응유력의 변화와 bead에 결합된 질소화합물이 증가하는 경향을 비교해 볼때(그림2) Ferrier 등(1972)이 보고한 바와 같이 bead에 결합된 질소화합물은 고정화 *Mucor spp* L42 응유효소의 우유 응고력을 방해하는 것으로 설명할 수 있고, 1개월 이후에 고정화 효소의 응유력은 서서히 감소하는데 비하여 beads에 결합된 질소화합물의 양은 거의 변화하지 않는 것으로 보아 고정화 *Mucor spp* L42 응유효소는 장기간 사용하더라도 고정화된 효소가 물리적인 작용에 의하여 유실되는 것이 아니라 사용기간중에 효소단백질의 변성에 기인되는 것으로 설명할 수 있다(Hvewala와Pitcher, 1972).

2. 치즈커드의 형성

그림3에서는 치즈커드 형성과정에 효소적 작용만을 분리처리할 수 있도록 하기 위하여 탈지유(pH 5.6, 8°C)를 고정화 *Mucor spp* L42 응유효소를 충전시킨 칼럼(0.9 x 5cm)을 통하여 유속을 다르게 하여 반응시켰을때 12% TCA 용해성 질

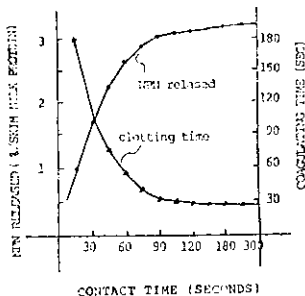


Fig. 3. Relationship of NPN released, coagulation time and contact time of immobilized *Mucor spp* L42 milk clotting enzyme.

소의 생성량의 변화를 나타낸 결과이다.

탈지유중의 12% TCA 용해성 질소의 생성량과 커드형성 시간과의 관계는 그림3에서 보는 바와 같이 12% TCA 용해성 질소의 생성량이 2.0%에서 부터 응고 현상이 나타나기 시작하였고 3.2%일때 응고가 가장 빨리 일어났으며 그 이후에는 응고시간과는 무관한 것으로 나타났다.

탈지유중의 12% TCA 용해성 질소화합물의 생성량과 우유응고와의 관계에 대하여서는 Weelock와 Knight(1969) 등은 탈지유중의 2% TCA 용해성 NPN의 생성량이 탈지유중의 전체질소중의 2.0% 이거나 케이신 질소의 3.0%이상일때 부터 우유의 응고 현상이 관찰되었다고 보고하였고 Hicks 와 Ferrier(1974)등은 고정화 펩신을 사용할 경우에 2% TCA soluble NPN의 양이 전체 질소의 2.1%, 케이신의 4.1%일때 커드 응고 현상이 관찰되었다고 보고하였으며 Yun 과 Kunio (1981)등은 응유효소의 종류에 따라 NPN 생성량과 curd 형성되는 시간간에 차이가 있으며, 커드형성될 때 까지는 NPN의 생성량이 증가하나 커드가 형성된 후에도 NPN의 생성량이 증가하기는 하나 그양이 미미하다고 보고한바 있고, 이들의 연구결과로 본 시험의 결과와 같은 경향을 나타내고 있다.

그림4에서는 탈지유중의 NPN의 생성량에 따라 케이신의 가수분해 상태를 전기영동방법으로 비교하기 위하여 칼럼을 통과한 탈지유를 비커에 넣고 30°C 항온수조에서 커드를 형성시킨후 유청을 분리 제거한 렌넷케이신을 8M urea에 용해시켜 6% polyacrylamide gel을 이용하여 Tris-citrate buffer (pH 8.6)으로 분리한 결과이다.

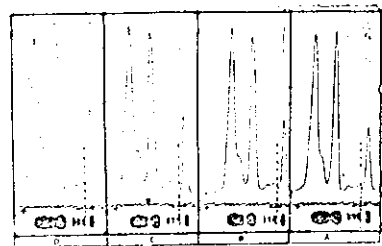


Fig. 4. Electrophoretic diagrams of rennet casein from skim milk treated by immobilized *Mucor spp* L42 enzyme. A : contact time 30 sec. (NPN 2.0%). B : contact time 60 sec.(NPN 2.8%). C : contact time 90 sec. (NPN 3.0%) D : contact time 200 sec. NPN : 3.5%.

12% TCA 용해성 질소의 양과 케이신 분리대의 양상에는 큰 차이를 발견할 수 없었으나 slot 에서 "+" 방향으로 나타나는 para-k-casein 에서는 용해성 질소의 생성량이 증가함에 따라 분리대의 농도가 높아지는 경향으로 관찰되었고 2% TCA 용해성 질소의 양이 3% 이상에서는 α s-casein 위치에 나타나는 분리대의 양상이 다소 넓어진 것으로 관찰되었다. 2% TCA 용해성 질소 생성량의 변화와 케이신의 전기영동 결과로 볼때 탈지유층의 용해성 질소 화합물의 생성량은 케이신의 마이셀의 구성성분인 k-casein의 가수 분해 결과로 생성되는 para-k-casein의 생성량과 관계가 있는 것으로 설명되고 시료 C와 D 에서 α s-casein 위치의 분리대 양상이 다소 넓게 나타난 것을 유속을 느리게 하여 고정화 효소와 탈지유의 접촉시간을 길게 함으로서 α s- 위치에 나타나는 케이신의 일부가 변성되어 나타나는 것으로 볼수 있다.

3. 반응조의 선택

고정화 효소의 반응속도는 지지체에 고정화된 순수한 효소의 활력 이외에 지지체의 물리적 상태, 기질과의 접촉방법, 반응장치의 구조등에 의하여 서도 영향을 받게 됨으로 (Lee, 1974), 고정화 Mucor spp L42 응유효소를 치즈 커드 형성에 사용하기에 편리한 반응장치를 선택하기 위하여 packed column reactor (Lee, 1974), fluidized bed (Lee, 1974)와 일정한 속도로 흔들어 주면서 탈지유를 통과시키게 하는 shaking fluidized bed 등 3종류의 반응조에 고정화 bead을 일정양씩 넣고 (pH 5.6, 8°C) 유속을 다르게 하여 반응시킨후 12% TCA 용해성 질소의 양을 측정하였던 바 그림5에서 보는 바와 같이 반응장치간 반응속도가 다른 것으로 나타났다. 커드형성 시간이 가장 짧은 12% TCA 용해성 질소의 생성량이 3.0%가 될때의 유속을 볼때 packed column은 3.5ml, fluidized bed는 3.2ml, Shaking fluidized bed는 3.0ml로 나타났다. Lee (1974)등에 의하면 고정화 펠스의 fluidized bed가 packed column reactor 보다 반응속도는 빨랐다고 보고하였고 Shipe등 (1972)은 bead와 기질의 접촉을 돕기 위하여 paddle를 부착하여 연속적으로 저어주면서 반응시키는 Paddle wheel reactor가 고정화 효소의 반응조로서 적절하였다고 보고하였으나 고정화에

사용된 bead가 반응과정에 물리적인 충격에 의하여 파괴될 수 있는 위험이 따른다고 보고 하였다.

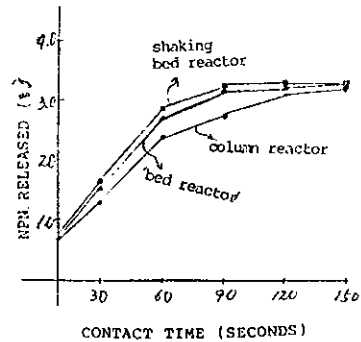


Fig.5 Effect of flow rate on several kind of reactor of the hydrolysis of skim milk by glass-bound Mucor spp L42 Milk clotting enzyme.

적 요

활성화시킨 Succinylaminopropyl glass beads 에 glutaraldehyde을 사용하여 고정화시킨 Mucor spp L42 응유효소를 치즈 커드 형성과정에 이용하고자 고정화 효소의 안정성, 재이용성, 반응의 조건, 반응조의 형태등에 대하여 탈지유 (pH 5.6, 8°C)를 사용하여 반응시킨후 30°C 항온 수조내에서 커드의 형성 상태를 조사하였던바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 고정화 Mucor spp L42 응유효소를 0.2M phosphate buffer (pH 4.6)에 0.06% sodium azide을 첨가한 액에 침지한 상태로 5°C 이하에서 보존할 경우 3개월 후에도 활력의 80%가 유지되었다.

2) 고정화 Mucor spp L42 응유효소를 탈지유 (pH 5.6, 8°C)로 반응시켰을때 반응 초기에는 고정화 효소의 활력이 급격히 감소하였고, 이것은 bead에 결합되는 질소화합물과 효소의 활력간에 관계가 있는 것으로 나타났다.

3) 고정화 Mucor spp L42 응유효소에 bead와 탈지유의 접촉시간을 60 sec/ml로 하여 탈지유 (pH 5.6, 8°C)를 연속적으로 반응시켰을때 6시간 이후에도 bead의 활력의 70%가 유지할수 있었다.

4) Fluidized bed와 shaking fluidized bed을 사용하는 것이 충전반응조 보다 탈지유의 반응속도가 높았다.

1. Annstrp, K. 1968. Improvement in relating to the preparation of milk-caagulating enzyme. Dairy Sci. Abstr. 30 : 2596.
2. Arima, K., S. Iwasaki, and G. Tamura, 1967. Milk-clotting enzyme from microorganisma part 1. Screening test and identification of the potant fungus. Agr. Biol. Chem. 31(5) : 540-545.
3. Cheryan, M., P.J. Van Wyk, N.F. Olson and T. Richardson. 1975. Continuous coagulation of milk using immobilized enzymes in fluidilized-bed reactor. Biotechdogy and Bioengineering. 17 : 585-598.
4. Cheryan, M., P.J. Van Wyk., T. Richardson and N.F. Olson, 1975. Stability of characteristics of pepsin immobilized on protein-coated glass used for continuous milk coagulation. Biotechnology and Bioengineering. 18 : 273-279.
5. Ferrier, L. K., T. Richardson, N. F. Olson and C. L. Hick. 1971. Characteristic of insoluble pepsin used in a continuous milk lottting system. J. of Dairy Sci. 55(6) : 726-734.
6. Hicks, C.L., L. K. Ferrier, N.F. Olson, and T. Richardsion, 1974. Immobilized pepsin treatment of skim milk and skim milk fraction. J. Dairy Sci. 58(1) : 19-24.
7. Lee, Y. K. and G. T. Tsao. 1974. Mass transfer characteristic of immobilized enzymes. J. of Food Sci. 39 : 661-667.
8. Lee, E. C., G. F. Senyk and w. F. Shipe, 1974. Trypsin immobilized on porous glass : Preservation and choice of reactor. J. of Food Sci. 39 : 1124-1126.
9. Lee, H. J., N. F. Olson and T. Richardson. 1977. Peptide release from milk during treatment with immobilized pepsin and totality of clotting of treated milk. J. of Dairy Sci. 60(11) : 1683-1688.
10. Park, J. L. and H. U. Kim. 1982. Purification of acid protease produced by Mucor, spp L42. Korean J. of Dairy Sci. 4(2) : 151-156.
11. Park, J. L. J. Y. Lee, and Y. S. Ko. 1986. Immobilization and properties of Mucor spp L42 milk-clotting enzyme. Korean J. of Dairy Sci. 8(3) : 185-193.
12. Sardinias, J. L. 1972. Microbial rennet. Adu. in Applied Microbiology. 15 : 39-73.
13. Taylor, M. J., N. F. Olson and T. Richardson, 1979. Coagulation of skim milk with immobilized proteases. Process Biochemistry 1979(2) : 11-15.
14. Taylor, M. J., T. Richardson and N. F. Olson. 1976. Coagulation of milk with immobilized proteases : A Review. J. Milk Food Technology 39(12) : 864-871.
15. Weetal, H. H. & N. B. Havewala. 1972. Continuous production of dextrose from corn starch. A study of reactor parameters necessary for commercial application. In Enzyme engineering Ed. Wingard. JB. Jr. P. 241. Interscience publishers. New York.
16. Yun Se-ok, K. Ohmia, T. Kobayashi and S. Shimizu. 1981. Increase in curd tension of milk coagulum prepared with immobilized proteases. J. of Food Sci. 46 : 705-707.