

## 상업적 응유효소의 탈지유에 대한 단백질 분해 작용

신현수\*\* · 김상범\* · 임종우\*

경상대학교 농과대학 축산과학부\*, 남양유업(주) 중앙연구소\*\*

## Comparative Study of Proteolytic Activities of Some Commercial Milk Clotting Enzymes on Bovine Skim Milk

H. S. Shin\*\*, S. B. Kim\* and J. W. Lim\*

Division of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University\*,  
Nam Yang Research & Development Center\*\*

### ABSTRACT

Proteolytic activities of some commercial milk clotting enzymes(rennet, trypsin, pepsin, papain W-40, neutrase 1.5 and protease S) in bovine skim milk containing 0.02% CaCl<sub>2</sub> were determined by measuring DH(Degree of Hydrolysis), NPN(Non Protein Nitrogen) and by comparing patterns of SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). The DH of microbial enzymes(neutrase 1.5 and protease S) and trypsin in bovine skim milk were higher than those of pepsin and papain W-40. The amounts of NPN in the milk treated with trypsin and the other animal enzymes(rennet and pepsin) showed the highest and lowest degrees of proteolysis, respectively. SDS-PAGE showed that trypsin and protease S hydrolyzed α-lactalbumin and papain W-40 hydrolyzed β-lactoglobulin slightly, while neutrase 1.5 hydrolyzed both α-lactalbumin and β-lactoglobulin after treating for 90 min. Trypsin and protease S easily hydrolyzed α<sub>1</sub>-casein and β-casein, which were not hydrolyzed by rennet. Papain W-40 hydrolyzed κ-casein more than rennet as shown in SDS-PAGE. Based on the results of the experiments, the DH and NPN of trypsin, neutrase 1.5 and protease S were shown to be higher than those of the other enzymes. The SDS-PAGE patterns of papain W-40 and neutrase 1.5 were similar with that of rennet.

(Key words : Bovine skim milk, Milk clotting enzyme, Proteolysis)

### I. 서 론

치즈는 인류의 문화형성과 더불어 시작된 오랜 전통식품으로 우유를 유산균에 의하여 발효시키거나 효소를 가하여 응고시킨 유제품이다(Lampert, 1975). 우리나라에서의 치즈 소비는 지속적인 증가 추세를 나타내어 1990년에 6,713

M/T에서 2000년에는 43,033 M/T을 소비하고 있으며, 10년 동안 약 6배의 소비 증가율을 나타내고 있다(한국유가공협회, 2001).

일반적으로 우유 응고는 산, 알콜, 가열, rennet 및 염류 등과 관련이 있으며, 우유 단백질 중 주로 casein의 불안정화에 의한 응집으로 친수성의 감소나 casein micelle로부터 κ-casein

Corresponding author : J. W. Lim, Division of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Republic of Korea.

( $\kappa$ -CN)의 분해가 중요한 원인이 된다(McMahon과 Brown, 1984). 우유의 응고는 생후 3~5주 되는 송아지 제4위에서 추출되어 제조된 rennet을 사용하고 있으나, 송아지를 죽여야 하는 폐단과 세계적으로 치즈 생산의 증가로 rennet 공급량이 줄어들면서 rennet 대용응유효소의 필요성이 증대되고 있다(Lopes 등, 1998). Rennet는 casein micelle의  $\kappa$ -CN의 Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> 결합을 절단하는 제한된 단백질 분해 효소로서 chymosin에 의하여 친수성의 glycomacropeptide (GMP)와 불용성의 Ca-paracaseinate로 분리되며,  $\kappa$ -CN의 casein micelle 보호작용이 상실되어 응고한다(Dalgleish, 1987).

일반적으로 rennet 대용응유효소의 개발을 위하여 동물성 유래의 pepsin, fungi(*Endotia parasitica*, *Mucor pusillus* var, *Mucor miehei* 등) 유래의 효소, 미생물(*Bacillus subtilis* 등) 유래의 효소 및 식물성 유래의 papain 등의 단백질 분해 효소에 관한 연구가 보고 되어왔다(Wong 등, 1988). 최근에는 온도와 화학적 안정성이 개선된 고정화 단백질 분해 효소(Shah 등, 1995), *Solanum dobium*(Yousif 등, 1996)과 papilionidae 종 등의 새로운 식물 유래 효소(Lopes 등, 1998) 및 단백질 분해 효소의 혼합 사용(Picon 등, 1995) 등의 노력이 계속되고 있다. 그러나 대용응유효소는 단백질분해활성도/응유활성도의 비가 커서 curd의 수율은 낮으며, 숙성기간 중 치즈 단백질의 추가적 분해 기능 및 치즈의 일반적인 결점의 하나인 고미 생성의 촉진 등으로 단백질 분해 효소의 우유 단백질 분해 성질은 유제품의 개발 및 가공방법에 영향을 미치는 주요한 요인이다(Zdenko, 1969; Sullivan 등, 1973; Sood와 Kosikowski, 1979).

따라서 본 연구는 상업적 단백질 분해 효소의 우유 단백질의 분해 특성을 비교하기 위하여 탈지유에 0.02%의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 응유 활성화를 시킨 후 각각의 단백질 분해 효소 및 가수분해 시간에 따른 우유 단백질의 분해 특성을 검토하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료 및 처리(탈지유 및 단백질 분해 효소)

본 실험의 공시재료는 경상대학교 부속목장에서 착유한 신선한 생유를 저온 살균(L.T.L.T)한 후 4,000×g, 4℃에서 25분간 2회 원심분리하여 유지방을 제거한 탈지유를 실험전까지 -20℃에서 보관하면서 사용하였다.

우유의 응고에 사용되는 단백질 분해효소는 Chr. Hansen社(Denmark)의 rennet powder(Stamix 1150), Novo社(Denmark)의 pancreas trypsin과 *Bacillus subtilis* 유래의 Neutrase 1.5, Amano社(Japan)의 Carica papaya 유래의 Papain W-40과 *Bacillus stearothermophilus* 유래의 Protease S 및 porcine 유래의 pepsin(1:10,000; Junsei, Japan)을 사용하였다.

### 2. 탈지유의 가수분해

탈지유의 가수분해는 Steffl 등(1999)의 방법을 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 시료의 응유 활성화를 위해 CaCl<sub>2</sub>의 최종농도를 0.02%가 되도록 첨가하여 용해시킨 후 기질과 효소의 단백질 비율이 300:1(w/w)이 되도록 효소를 잘 혼합한 다음 35℃ 온탕수조에서 3시간동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후 100℃ 온탕수조에서 2분간 열처리하여 가수분해를 정지시켰다.

효소 반응이 종료된 후 반응액을 4,000×g에서 25분간 원심분리한 다음 상등액과 침전물을 각각 회수하여 침전물은 7 M urea(pH 8.8)에 용해 후 분석에 이용하였다.

### 3. 가수분해도(Degree of Hydrolysis : DH)의 측정

효소의 반응시간에 따른 탈지유의 가수분해도는 TNBS법(Alder-Nissen, 1979)에 의해 측정하였다. 탈지유 가수분해물 0.25ml를 1% SDS 0.75ml에 혼합한 시료액 중의 0.25ml를 0.215M

phosphate buffer(pH 8.2) 2ml와 혼합한 후 0.1% TNBS 용액 2ml를 첨가하여 50℃ 온탕수조에서 1시간 동안 빛을 차단한 상태에서 반응시켰다. 반응 후 0.1 N HCl 4ml로 반응을 종결시키고 30분간 실온에서 냉각한 후 340nm에서 흡광도를 측정(Perkin Elmer Lambda EZ201, U.S.A.)하였다.

α-amino group의 정량을 위한 표준물질로서는 L-leucine(Sigma Co., U.S.A.)으로 작성하였으며 DH(%)는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$DH(\%) = \frac{\text{Free amino group in sample} - \text{Free amino group in control}}{\text{Total free amino group}} \times 100$$

#### 4. NPN(Non protein nitrogen)의 측정

효소의 탈지유 분해 작용 결과, 12% trichloroacetic acid(TCA)에 가용성인 NPN의 유리 생성량은 Lowry 등(1951)의 방법에 의해 측정하였다.

효소 반응 기질 여액 0.2ml에 alkaline copper 시약 1ml를 혼합하여 실온에서 15분간 정치한 다음, 2배 희석한 folin-ciocalteu phenol reagent 0.1ml를 교반하면서 첨가하고 실온에서 45분간 방치한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5. SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

효소 처리에 의한 탈지유의 상등액과 침전물의 분자량 변화를 살펴보기 위하여 효소 반응 종료 후 원심분리하여 분리된 상등액과 침전물을 acrylamide gel 15%와 10%를 각각 사용하여 Laemmli(1970)의 방법에 따라 전기영동을 실시하였다.

SDS-PAGE는 각각 15%와 10% acrylamide gel, 0.1% SDS를 함유한 0.025M Tris, 0.192M glycine buffer(pH 8.3)를 조제하여 각각 25 mA와 15 mA로 전기영동하였다. 또한 gel 염색은 0.2% comassie brilliant blue R-250(w/v)을 함

유한 acetic acid/methanol/water (1:1:5, v/v/v) 용액에 염색하였다. 가수분해 탈지유의 전기영동상을 확인하기 위하여 표준단백질은 broad range standard(Bio-Rad, U.S.A.)를 사용하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 효소의 탈지유 분해 작용

각종 상업적 단백질 가수분해 효소를 CaCl<sub>2</sub>의 최종 농도가 0.02%가 되도록 첨가한 탈지유에 반응시킨 결과, 가수분해도의 변화는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 가수분해 20분까지 급격히 증가하였고, 가수분해 시간이 경과할수록 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다. 단백질 분해 효소별로는 가수분해 3시간째에 trypsin(46.24%), neutrase 1.5(44.73%) 및 protease S(44.60%)가 높게 나타났으며, rennet(25.31%)과 pepsin(22.71%)이 낮게 나타났다.

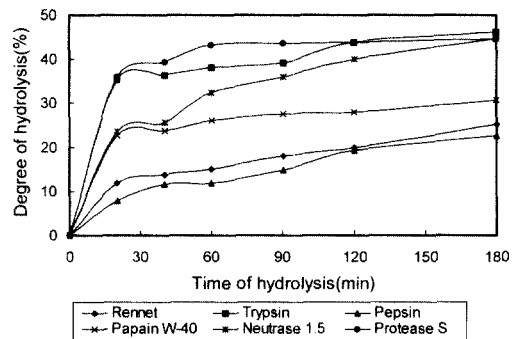


Fig. 1. Degree of hydrolysis(DH) of skim milk treated with milk clotting enzymes at 35℃.

본 실험의 결과 단백질 분해 효소 등을 β-lactoglobulin(β-LG)에 37℃에서 4시간 반응시킨 결과 papain W-40보다 trypsin이 가수분해도가 높았다는 Otte 등(1997)의 보고와 일치하였으며, 농축 유청단백질을 37℃에서 8시간 가수분해한 결과 neutrase 1.5와 trypsin의 가수분해도에 큰 차이가 없었다는 Smyth와 FitzGerald(1998)의 보고와 caseinate에 50℃에서 3시간 가수분해한 결과 가수분해도에 큰 차이가 없었다

는 McDough와 FitzGerald(1998)의 보고와 비슷한 경향을 나타내었다. 반면 casein에 45℃에서 4시간 가수분해한 결과 trypsin(31.5%) 보다 neutrase 1.5(44.1%)가 높았다는 최 등(1997)의 보고와는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

미생물에서 유래하는 단백질 분해 효소인 neutrase 1.5와 protease S는 식물성 유래 단백질 분해 효소인 papain W-40보다는 가수분해도가 높았고 포유동물의 생체내 단백질 가수분해 효소인 trypsin 보다는 가수분해도가 다소 낮았으나, rennet과 pepsin 보다는 높았다.

이러한 결과는 미생물체에서 유래하는 단백질 분해 효소는 생체내 소화 효소와 같이 특이한 효소의 기질 특성을 나타내는 것이 아니라 미생물 세포내에 존재하는 효소의 복합체로서 무작위로 단백질을 가수분해하는 능력을 가지고 있으므로 가수분해도가 높았으며 기질 특이성이 강한 포유동물의 단백질 분해 효소인 trypsin 이외에 chymotrypsin과 pepsin은 상대적으로 가수분해도가 낮게 나타났다. Trypsin은 우유 단백질에 많이 함유되어 있는 lysine과 arginine의 carboxyl group을 연결하는 peptide bond에 강한 특이성을 가지고 있으므로 다른 포유동물의 단백질 분해 효소보다 가수분해도가 높게 나타났다(Monti와 Jost, 1978).

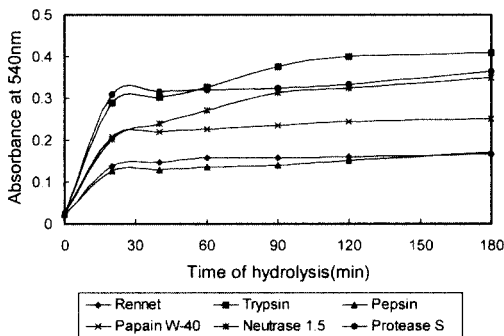


Fig. 2. Non protein nitrogen soluble in 12% trichloroacetic acid released from skim milk hydrolyzed by milk clotting enzymes at 35℃.

또한 탈지유에 상업적 단백질 분해 효소를 반응시켜 12% TCA에 가용성인 NPN의 유리

생성량을 조사한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 가수분해 3시간 후 trypsin, protease S 및 neutrase 1.5가 높게 나타났으며 rennet과 pepsin이 낮게 나타났다. 이는 Fig. 1과 같이 가수분해 시간에 따른 가수분해도의 결과와 유사한 경향이였다. 그러나 Krause 등(1998)은 단백질 분해 효소 등을 β-casein에 반응시킨 결과 유리되는 NPN의 비율은 chymosin 보다는 pepsin이 높게 나타난 결과와는 상이하였으나, casein의 가수분해시 유리되는 non-casein nitrogen(NCN)의 비율이 pepsin 보다 chymosin이 다소 높은 결과와는 유사하였다.

12% TCA 가용성 질소화합물은 주로 소형 분자량의 peptide 결합물이며, 탈지유에 대한 단백질 분해 효소의 작용으로 생성된 것으로서 이 NPN량의 증가는 치즈의 숙성도와 관련 (Rank 등, 1985)이 있다.

## 2. 효소 반응 시간별 전기영동 pattern의 변화

탈지유에 우유 응유효소를 각 시간별로 반응시킨 후 원심분리하여 얻은 상등액을 15% polyacrylamide gel 농도에서 전기영동을 실시한 결과 Fig. 3과 같다.

Rennet과 pepsin의 전기영동 pattern의 변화를 보면 α-lactalbumin(α-LA)과 β-LG band가 존재하고 분자량 30.1~36.8 KD 사이의 단백질 band가 rennet에서는 나타났으나, pepsin에서는 나타나지 않았다. Bovine serum albumin은 유청 단백질 중에서 가장 쉽게 분해되며 acid protease인 rennet는 α-LA과 β-LG의 분해에 영향을 미치지 않았다는 Jost 등(1976)의 보고와 일치하였고 pepsin도 acid protease로서 유청 단백질의 분해에 영향을 미치지 못하였다. 그리고 trypsin과 protease S는 β-LG band가 나타난 반면 α-LA는 일부 분해되어 희미한 band가 잔존하였다. 효소 반응이 진행되어 감에 따라 papain W-40은 β-LG의 분해가 미약하였으며, neutrase 1.5는 효소 반응 90분 이후부터 α-LA과 β-LG이 분해되었다.

본 실험의 결과 유청 단백질을 50℃에서 150

Fig. 3. SDS-PAGE electrophoretograms of supernatant from skim milk hydrolyzed by a) rennet, b) trypsin, c) pepsin, d) papain W-40, e) neutrase 1.5 and f) protease S at 35°C for 20, 40, 60, 90, 120 and 180 min(lanes 1-6).

A. Standard broad range marker(Bio-Rad, U.S.A.) ; myosin(205 KD),  $\beta$ -galactosidase(119 KD), bovine serum albumin(98 KD), ovalbumin(52.3 KD), carbonic anhydrase(36.8 KD), soybean trypsin inhibitor(30.1 KD), lysozyme(22 KD), aprotinin(7.6 KD)

B. Standard bovine whey(Sigma Co., U.S.A.).

분간 *Bacillus subtilis* 유래 protease로 반응시켰을 때  $\alpha$ -LA과  $\beta$ -LG이 분해되어 전기 영동상에 낮은 농도의 단백질이 존재하였다는 Castro 등(1996)의 보고와 papain 으로 분해한 결과  $\beta$ -LG이 일부 분해되었다는 Lieske와 Konrad (1996)의 보고와 일치하였다.

또한 Otte 등(1997)은  $\beta$ -LG에 papain, pepsin 및 trypsin으로 가수분해시켰을 때 pepsin은 분해가 없었고 papain은 일부 분해되어 Fig. 3과 유사한 경향을 나타내었으나, trypsin은 30분 이후부터 분해시켰다는 보고와는 다소 차이가 있었다.

Fig. 4는 효소 처리에 의한 탈지유의 침전물을 7 M urea(pH 8.8)로 용해시킨 후 10% polyacrylamide gel 농도에서 전기영동 하여 얻은 결과이다.

효소 반응이 진행됨에 따라 trypsin은  $\alpha_s$ -casein( $\alpha_s$ -CN)과  $\beta$ -casein( $\beta$ -CN)이 분해되어 희미한 band가 잔존하였고, pepsin은 효소 반응 120분 이후부터  $\alpha_s$ -CN과  $\beta$ -CN의 분해가 진행되어 band가 일부 잔존하였으며,  $\kappa$ -CN은 rennet 가수분해물과 유사하게 분해 후 단일 band로 잔존하였다. 이는 El-Shibiny와 El-Salam(1977)의 37°C(pH 6.6)에서 240 분간 rennet과 pepsin

Fig. 4. SDS-PAGE electrophoretograms of the precipitate resuspended in 7M urea(pH 8.8) from skim milk hydrolyzed by a) rennet, b) trypsin, c) pepsin, d) papain W-40, e) neutrase 1.5 and f) protease S at 35°C for 20, 40, 60, 90, 120 and 180 min(lanes 1-6).

A and B : See the Fig. 3.

으로 반응시킨 결과  $\alpha$ s-CN의 분해가 없었다는 보고와 일치하였으며, pH 5에서 10분 이후부터  $\alpha$ s-CN과  $\beta$ -CN이 일부 분해된다는 Guo 등 (1995)의 보고와는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

*Bacillus* 유래의 단백질 분해 효소인 neutrase 1.5는 protease S와 상이하게  $\beta$ -CN의 분해가 일어나지 않았으나 분해된  $\kappa$ -CN은 동일하게 두 개의 band로 잔존하였고, papain W-40은 특이적으로  $\kappa$ -CN을 분해하였다. 또한 rennet과 neutrase 1.5는  $\alpha$ s-CN과  $\beta$ -CN의 분해가 일어나지 않았으며, 분자량 7.6~22 KD 사이의 단백질 band가 rennet과 pepsin을 제외한 단백질 분해 효소에서 존재하였다.

Sood와 Kosikowski(1979)는 각종 미생물 유

래 protease가  $\beta$ -CN을 다른 casein 성분 보다 더 많이 분해하여 치즈의 숙성을 촉진시킨다고 하였으며,  $\kappa$ -CN의 분해 성질은 우유의 응고성 증대에 영향이 크므로 이것은 rennet 대용 응유 효소의 여부를 결정짓는 중요한 성질이 된다고 하였다. 본 실험에 사용된 효소와 rennet과의 비교시  $\kappa$ -CN의 분해 pattern은 생체내 소화 효소인 pepsin과 유사하였고,  $\beta$ -CN의 분해 pattern은 pepsin과 neutrase 1.5와 유사하게 나타났다. Picon 등(1995)은 chymosin, pepsin 및 neutrase를 혼합 사용시 우유 응고 시간을 줄일 수 있다고 보고된 점으로 미루어 보아 pepsin과 neutrase 1.5는 rennet의 보조효소로서의 가능성이 기대된다.

#### IV. 요약

상업적 단백질 분해 효소에 0.02% CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 응유 활성화를 시킨 탈지유에 대한 분해 작용의 결과를 요약하면 다음과 같다.

다양한 효소별 가수분해 시간에 따른 가수분해도는 미생물 유래 효소와 trypsin은 pepsin과 papain W-40보다 높은 분해도를 나타냈다. 12% TCA 용액에 가용성인 NPN의 양은 trypsin이 가장 높은 분해도를 나타내었고 rennet과 pepsin이 가장 낮은 분해도를 보였다. 전기영동에 있어서 trypsin과 protease S는  $\alpha$ -lactalbumin을 분해하였고 papain w-40은  $\beta$ -lactoglobulin을 미약하게 분해하였으며 neutrase 1.5는 90분 이후부터  $\alpha$ -lactalbumin과  $\beta$ -lactoglobulin을 분해하였다. Rennet과 비교한 전기영동상에서는 rennet에 의해 분해 되지 않은  $\alpha$ -casein과  $\beta$ -casein을 trypsin과 protease S가 다량 분해하였고  $\kappa$ -casein은 rennet에 비해 papain W-40이 상당 수준의 분해상을 나타내었다. 이상의 결과 가수분해도 및 NPN 양은 trypsin, neutrase 1.5 및 protease S가 다른 효소에 비해 높게 나타났으며, 전기영동상에서는 pepsin과 neutrase 1.5가 rennet과 유사한 경향을 나타내었다.

#### V. 인용 문헌

- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27:1256.
- Castro, S., Peyronel, D. V. and Cantera, A. M. B. 1996. Proteolysis of whey proteins by a *Bacillus subtilis* enzyme preparation. *Int. Dairy J.* 6:285.
- Dagleish, D. G. 1987. The enzymatic coagulation of milk. In *cheese chemistry, physics and Microbiology*. Vol. I. P. F. Fox. Elsevier Applied Science, London. p. 63-96.
- El-Shibiny, S. and El-Salam, H. A. 1977. Action of milk clotting enzymes on  $\alpha$ -caseins from buffalo's milk. *J. Dairy Sci.* 60:1519.
- Guo, M. R., Fox, P. F. and Flynn, A. 1995. Susceptibility of  $\beta$ -lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *J. Dairy Sci.* 78:2336.
- Jost, R., Monti, J. C. and Hidalgo, J. 1976. Natural proteolysis in whey and susceptibility of whey proteins to acidic protease of rennet. *J. Dairy Sci.* 59:1568.
- Krause, W., Partzsch, M., Hasson, Z. M. R. and Haufe, T. 1998. Substrate and binding specificity of aspartic proteases with milk clotting properties. *Nahrung.* 42:162.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(Lond).* 227:680.
- Lampert, L. M. 1975. *Modern dairy products*. Food Trade Press. Third edition. p. 317.
- Lieske, B. and Konrad, G. 1996. Interrelation between pH and availability of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin for proteolysis by papain. *Int. Dairy J.* 6:359.
- Lopes, A., Teixeira, G., Liberato, M. C., Pais, M. S. and Clemente, A. 1998. New vegetal sources for milk clotting enzymes. *J. Molecular Catalysis B : Enzymatic.* 5:63.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- McDonagh, D. and FitzGerald, R. J. 1998. Production of caseinophosphopeptides(CPPs) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparations. *Int. Dairy J.* 8:39.
- McMahon, D. J. and Brown, R. J. 1984. Enzymic coagulation of casein micelles : A review. *J. Dairy Sci.* 67:919.
- Monti, J. C. and Jost, R. 1978. Enzymatic solubilization of heat denatured cheese whey protein. *J. Dairy Sci.* 61:1233.
- Otte, J., Zakora, M., Qvist, K. B., Olsen, C. E. and Barkholt, V. 1997. Hydrolysis of bovine  $\beta$ -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. *Int. Dairy J.* 7:835.
- Picon, A., Medina, M. and Nunez, M. 1995. Prediction of clotting time for milk coagulation by mixtures of proteolytic enzymes. *Food chem.* 52: 411.
- Rank, T. C., Grappin, R. and Olson, N. F. 1985.

- Secondary proteolysis of cheese during ripening ;  
A review. *J. Dairy Sci.* 68:801.
19. Shah, B., Kumar, S. R. and Pevi, S. 1995. Immobilized proteolytic enzymes on resinous materials and their use in milk-clotting. *Process Biochem.* 30:63.
  20. Smyth, M. and FitzGerald, R. J. 1998. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. *Int. Dairy J.* 8:819.
  21. Sood, V. K. and Kosikowski, F. V. 1979. Accelerated cheddar cheese ripening by added microbial enzyme. *J. Dairy Sci.* 62:1865.
  22. Steffl, A., Schreiber, R., Hafenmair, M. and Kessler, H. G. 1999. Influence of whey protein aggregates on the renneting properties of milk. *Int. Dairy J.* 9:403.
  23. Sullivan, J. J., Lynette, M., Rood, J. I. and Jago, G. R. 1973. The enzymic degradation of bitter pephides by starter strephococi. *Aust. J. Dairy Tech.* 28:20.
  24. Wong, N. P., Robert, J., Mark, K. and Flmer, H. H. 1988. *Fundamentals of dairy chemistry*. Third edition. Van Nostrand Reinhold. p. 609-619.
  25. Yousif, B. H., McMahon, D. J. and Shammet, K. M. 1996. Milk-clotting enzymes from *solanum dohium* plant. *Int. Dairy J.* 6:637.
  26. Zdenko, P. 1969. Protease composition of a rennet substitute from *Bacillus subtilis* and properties of its component protease. *J. Dairy Sci.* 52:1372.
  27. 최인욱, 김기성, 임상동, 김희수. 1997. Casein 가수분해물 소재 철분결합 Peptide에 관한 연구. *한국식품과학회지.* 29:1052.
- (접수일자 : 2002. 10. 14 / 채택일자 : 2002. 12. 6)