최 종
연구보고서

풍미증진 효소를 이용한 치즈의 숙성기간 단축과 제조원가 절감 효과에 관한 연구

Development of the Accelerated Ripening of Cheese by Flavor Enhancing Enzymes and the Economical Effects on the Cheese Production

연 구 기 관
국립한경대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "**풍미증진효소를 이용한 치즈의 숙성기간 단축과 제조원가 절감효과에 관한 연구**" 과제 (주관연구과제 : 치즈 휘발성 및 수용성 풍미성분의 기기분석적 연구 제 1 협동연구과제 : 단기숙성치즈, EMC치즈 제조기술개발에 관한 연구, 제 2 협동연구과제 : 풍미증진효소의 생산)의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 30.

주관연구기관명 :한경대학교

총괄연구책임자 : 허 강 칠

연 구 원 : 김 선 기

연 구 원 : 전 영 길

협동연구기관명 : 연암축산원예대학

협동연구책임자 : 박 승 용

연 구 원 : 김 종 원

협동연구기관명 : 충청대학

협동연구책임자 : 신 중 엽

연 구 원 : 김 종 욱

요 약 문

Ⅰ. 제 목

총괄연구과제 : 풍미증진효소에 의한 치즈의 숙성기간 단축과 제조원가 절감효과에 관한 연구

주관연구과제 : 치즈 휘발성 및 수용성 풍미성분의 분석적 연구

제 1 협동과제 : 단기숙성치즈, EMC치즈 제조기술 개발에 관한 연구

제 2 협동과제 : 풍미증진효소의 생산

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 제 2 협동연구과제 : 본 연구에서 필요로 하는 치즈 숙성기작을 이해하고 또한 숙성기술로 확립하기 위한 기초적 연구부분으로서 풍미증진효소를 생산하는 우수균주를 선발하여 확보하고, 대량생산을 위한 최적조건을 연구하여 저렴한 비용으로선 발된 균주로부터 효소를 생산, 분리 정제하는 공정을 검토하고자 하는 데 연구목적이 있으며, 대량생산을 위해 자체개발한 생장배지의 가격과 효소정제과정을 단순화함으로서 얻어지는 효소생산비의 절감은 본 연구를 현실적으로 활용하는데 있어서 핵심이 되는 결과로 매우 중요한 과제라고 생각된다.

2. 제 1 협동연구과제 : 치즈 제조 및 가공기술중 핵심기술이라고 할 수 있는 치즈숙성을 원하는 방향으로 유도하고 단기간에 숙성을 진행시키는 단기숙성치즈 제조기술을 개발하는 내용을 연구하였으며, 단백분해 효소의 종류, 사용수준 등에 따라서 생성하는 쓴맛의 정도가 각각 다르기 때문에 선발된 젖산균의 펩타이드 분해효소를 사용하여 상업용 단백분해효소가 생성하는 쓴 맛 펩타이

드를 효과적으로 제거할 수 있는 조건을 찾아내며, 그 조건에 맞는 EMC치즈 제조기술을 개발하고 EMC치즈를 응용한 몇 가지 치즈제품을 제조하여 산업적 평가를 위한 목적으로 실시하였다. 개발된 제조기술의 경제성 분석을 위해 국내외의 치즈도·소매가격을 수집하여 비교하며, 치즈제조가격에 미치는 원재료비와 냉동비 및 인건비 등의 제조경비를 정상적인 숙성방법과 단기숙성방법을 비교함으로써 단기숙성치즈 제조기술의 중요성을 부각시키고자 하였다.

3. 주관연구과제 : 치즈 숙성 중 지방산과 수용성 단백질의 변화가 풍미의 큰 영향 요인으로 작용한다는 것은 이미 많은 연구보고에 의해 밝혀졌으나, 풍미물질의 추출 및 정제과정이 복잡하고 분석기기의 선택에 따라 발현되는 물질의 동정작업이 난해하고, 재현성 등에 많은 문제점이 야기되고 있다. 주관연구과제에서는 풍미증진효소를 이용하여 제조된 ARC치즈와 EMC치즈의 숙성 중 휘발성 및 수용성 풍미성분의 기기분석적 기술연구를 위해 GC와 GC/MS 및 HPLC 분석을 실시하였으며, SPME(Solid Phase Micro extraction), Pyrolysis /GC/MS 등의 신속 숙성도 측정법의 적용성을 검토하고, 숙성 진단용 marker탐색, 단기숙성 체다치즈 및 상업용 치즈의 풍미성분을 신속한 치즈숙성도 측정법으로 분석하고 주요 휘발성과 수용성 풍미물질을 동정하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 제 2 협동연구과제 : 국외에서 상업적으로 생산되는 단백분해효소들을 이용하여 생산하는 EMC치즈는 쓴 맛이 심하며 쓴 맛을 주는 펩타이드를 분해하면 풍미가 증진되는 기초적 연구를 실시한 바 있어 이를 위해 선발된 젖산균을 대량생산하는 기술과 젖산균으로부터 펩타이드 분해효소들을 분리정제기술, 그리고 그 효소들의 효소학적 특성을 밝히며, 아울러 제 1 협동과제에서 필요로 하는 효소를 제공하는 것을 연구범위로 하였다.

2. 제 1 협동연구과제 : 치즈숙성과정에서 일어나는 주요 생화학적 변화들이 유당분해, 단백분해, 지방분해효소들의 종합적인 작용에 의해서 일어나는 것이기 때문에 체다치즈 제조공정중 제 2 협동연구과제에서 개발한 비스타아터 젖산균의 풍미증진효소를 함유하는 효소액을 사용하는 단기숙성치즈 제조기술을 개발하였다. 효소 첨가단계를 여러 단계로 나누어 제조실험한 단기숙성치즈의 관능평가와 조직특성을 비교하여 제조방법의 타당성을 확인하고자 하였다.

또한 본 연구에서는 치즈의 활용방안중 비 낙농식품제조에 사용되는 여러 가지 종류의 식품류에 치즈맛을 부여하기 위한 EMC 치즈를 제조함에 있어 본 연구진이 선발한 젖산균으로부터 추출한 aminopeptidase가 심한 단백분해 결과 생성되는 쓴 맛을 제거하는 역할을 충분히 발휘할 수 있는가를 치즈 단백질을 사용하여 확인하고, 그 능력을 충분히 발휘할 수 있도록 실제 제조조건을 맞추어 제조공정을 개발하는 것과, 그리고 개발된 제조공정에 맞추어 EMC치즈를 제조하여 관능평가를 실시하며, 최종적으로 EMC치즈를 응용한 몇종의 치즈제품을 제조하여 그 활용가능성을 연구하였다.

3. 주관연구과제 : 제 1 협동연구기관에서 숙성기간 단축을 목적으로 풍미증진효소 등 여러가지 처리에 의해 제조된 치즈를 제공받아 각각의 치즈 풍미성분을 분석하였으며, 전통적인 방법으로 제조된 국산과 수입산 Cheddar치즈의 GC/MS에 의해 지방산의 조성을 분석, 동정하여 비교하였다. 단기숙성치즈의 신속한 숙성진단을 위해 최근에 소개되고 있는 간편한 전처리 과정을 요하는 SPME분석기법과 전처리과정이 필요치 않는 Pyrolysis/GC/MS분석기법의 실용화를 시도하였다. 동시에 HPLC를 이용하여 위와 같은 방법으로 제조된 치즈의 수용성 분획 구성과 숙성 중 변화를 조사하였다.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 제 2 협동연구과제

풍미증진효소를 생산을 위한 우수균주를 선발하기 위하여Lactobacillus속의 균주중에서 aminopeptidase, X-prolyl-dipeptidyl peptidase, esterase 등의 활성이 높은 균주를 *L. acidophilus*(KCTC 3111, KCTC 1120), *L. casei*(LLG, KCCM 35465, KCTC 3110, 3260, KCTC 3510), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*(KCCM 35463, 40266), *L. helveticus* (ATCC 15009, CNRZ 32)를 MRS 배지에 배양하여 얻은 균체의 조효소액을 APLZYM 검사와 세 효소의 효소역가를 측정하여 검토한 결과 풍미증진효소 생산균주로 선발하고, 선발된 균주를 *Lactobaclus casei* FEPB-5라 명명하였으며, 그로부터 추출한 효소의 역가를 상품효소인 Flavourzyme과 효소역가를 비교한 결과 aminopeptidase는 다소 낮았지만, X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase와 esterase는 높았다.

풍미증진효소 생산균주로 선발된 *Lactobacillus* FEPB-5의 세포내 효소중 aminopeptidase, esterase, 및 X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase를 Fast Protein Liquid Chromatograph(FPLC)에 의하여 분리를 실시하였다. 사용된 방법은 조효소액을 황산암모늄에 의해 염석하여 40-90% 황산암모늄 분획을 얻은 후에 음이온교환 크로마토그라피(Mono Q HR 5/5컬럼), 소수성크로마토그라피(Phenyl Superose HR 5/5컬럼) 및 젤여과크로마토그라피(Superose 12 10/30 컬럼)에 의해 분리정제를 실시하였다.

분리 정제된 효소들의 효소학적 특징은 최적온도와 pH가 모두 37℃ 와 pH 7.0이었으며, 세효소 모두 CO^{2}에 의해 활성화가 되었으나, aminopeptidase는 CO^{2}에 의해 활성의 저해를 받았다. Ethtylene-diaminetetraacetic acid(EDTA)는 aminopeptidase를 완전히 저해하였으며, Diisopropyl fluorophosphate(DFP)는 esterase 와 X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase를 저해하였다.

풍미증진효소 우수균주로 선발된 *L. casei* FEPB-5를 이용한 풍미증진 효소의 대량생산을 위하여 MRS배지, 탈지우유 배지, 유청배지에서 배양조건과 생산공정을 검토하였다. 배양 결과 MRS배지에서 균체량과 세 효소의 활성이 가장 높았다. 따라서 생산비용을 절감하기 위하여 MRS배지 조성을 기본으로 하고 재료

를 국산재료로 교체함으로서 재료원가를 10%까지 감소시킬 수 있었다. 제조공정 중의 하나인 한외여과 공정은 분자량 30 400 KDa의 범위의 한외여과막을 이용하여 효소역가의 3배 농축이 가능하였다.

나. 제 1 협동연구과제 : 단기숙성치즈(ARC)의 실제월령과 숙성월령을 비교하였을 때 ARC 1,2,4는 5 6개월령의 숙성도를 보이고 있으며, ARC 3은 12개월령 수준의 숙성도를 보이는 것으로 나타났다. 단기숙성치즈는 쓴맛이 느껴지기는 하나 대조치즈인 국내산 치즈에 비하여 쓴맛이 훨 씬 덜하였으며, 그중에서 *L. casei* FEPB5 생균 첨가구와 조효소액 첨가구가 쓴맛이 느껴지지 않을 정도였으며, 끝 맛에는 체다치즈의 온화한 맛이 적절하게 나타났으며 외국산 치즈 8개월령에 가까운 맛이었다. Neutrase를 사용하여 제조된 단기숙성치즈는 동일 제조된 정상숙성치즈와 조직상의 특성을 비교하였을 때 단기숙성 치즈에 비하여 모든 특성이 숙성월령이 많은 정상 숙성치즈에 가까운 결과를 얻었다. EMC치즈에 관한 연구결과로는 선발된 젖산균의 aminopeptidase는 EMC 제조과정중 가장 중요한 단계인 치즈단백 분해과정에서 flavourzyme 또는 Neutrase 등이 심한 단백분해를 초래함으로서 생성되는 쓴 맛 펩타이드를 잘 분해하는 것으로 나타났으며, 그 조건은 단백분해효소를 가열처리에 의하여 불활성화 시켰을 때인 것으로 나타났다. 지방분해효소로는 역겨운 풍미를 주지않는 *Aspergillus niger* 또는 *Penicillium roqueforti*에 의해서 생산된 상업용 지방분해효소가 좋았던 것으로 나타났다.

개발된 기술에 의해 제조된 EMC 치즈는 쓴 맛의 제거가 완전치는 못하였으나, 응용제품에 첨가하는 첨가물질들에 의해 masking 되어 첫 맛 또는 끝 맛에서 약간 감지될 수 있는 수준으로 평가되었으며, 응용제품중에서 참치, 땅콩, 마늘/고추맛을 혼합한 3가지 치즈스프레드 제품은 국내에 수입되는 가공크림치즈 제품들보다 훨씬 선호도가 높은 것으로 나타나 EMC치즈의 활용가능성을 한층 높여주었다.

치즈제조원가를 분석한 결과, 국외에서 추정한 냉동비용을 제조원가에 책

정시켰을 때, 약 8개월간의 숙성비용은 총제조원가의 3.96%를 차지하는 것으로 나타났다. 반면, 본 연구진에 의해 개발된 제조기술에 의하여 숙성기간을 3개월로 단축시킬 경우에는 총 제조원가의 1.46%로 감소시킬 수 있었다. 정상치즈 제조원가는 8,408,640원/톤, 단기숙성치즈는 8,344,508원/톤으로서 효소제품의 사용으로 인한 제조원가 상승요인이 발생되었으나 약간의 제조비용 감소(64,132원/톤)효과가 있었다.

다. 주관연구과제 : GC/MS에 의해 3개월 숙성된 전통적인 Cheddar 치즈분석을 통해 Caproic acid 등의 포화지방산과 불포화지방산인 Tetradecenoic acid(C14:1), Hexadecenoic acid(C16:1), Oleic acid (C18:1)를 확인하였다.

제 1 협동연구기관에서 제조한 단기숙성치즈(3주 숙성)와 국산 Cheddar 치즈(3개월 숙성), 수입 Cheddar 치즈(4개월 숙성)의 지방산 조성은 큰 차이가 없었으며, 저급지방산과 중급 이상 지방산 비율도 각각 10.30:89.70, 10.56:89.37으로 비슷한 경향을 보였다. 수입 Cheddar 치즈는 Palmitic acid(C16)의 함량이 적고 Stearic acid (C18)가 높았다.

L. casei FEPB-5의 생균, 조효소, 부분정제효소를 처리하여 제조된 단기숙성치즈의 처리구간에 지방산 조성차이는 나타나지 않았으며, 각 처리구의 저급지방산과 중급 이상의 지방산 비율도 유사한 경향을 보였다. 단, 생균 처리구의 경우 저급지방산(C12 이하)의 함량이 적고 고급지방산의 함량이 높은 경향을 보였다.

조효소(CFE), 상업용 효소(Neutrase), CFE+Neutrase 처리한 단기숙성치즈도 저급지방산과 중급 이상의 지방산 비율에 있어 처리간 없었으며, CFE+Neutrase 처리구의 지방산 분해가 많이 이루어 진 것으로 나타났다. CFE 처리구, Neutrase 처리구 와 CFE+Neutrase 처리구의 Stearic acid(C18)농도는 각각 41.04%, 38.73%, 35.89%로서 CFE 처리구가 가장 높았으며, Palmitic acid도 유사한 경향을 보였고, Neutrase 처리구에서 Tetradecenoic acid(C14:1)가 6.54% 농도로 검출되었다.

SPME/GC/Mass로 분석을 통하여 Heptaminol 등 11개의 휘발성 물질이 검출하였다. SPME 분석법은 Head space 분석법보다 간편하고 단순하나 흡착소재의 선택, 재현성 등에서 문제점이 나타났다.

단기숙성 Cheddar치즈의 수용성 분획을 HPLC로 분석한 결과, Retention time 별로 볼 때 분획은 5분이전과 5-10분사이, 10분이후의 peak로 구분되었으며 약 14개의 peptide peak를 보였다.

조효소 처리, Neutrase 처리, 조효소+Neutrase 처리하여 제조된 단기숙성치즈의 peptide peak 수는 각각 14개, 14개, 22개로 나타났으며, Retention time과 Area(%)는 조효소 처리구에서 3-4분대에서 16.07%, 5-9분대에서 20.96%, 10분대 이상에서 62.97%로 나타났다. Neutrase 처리구와 조효소+Neutrase 처리구의 경우 10분대 이상의 peak 분해가 많았으며, 10분대 이후에 peak가 겹쳐나오는 현상을 보이고 있는데 이는 시료 전처리시 prep. LC 등을 사용하여 수용성 분획의 분리를 확실하게 해주지 못한데서 기인된 것으로 판단된다.

생균 처리, 조효소 처리, 정제된 효소 처리하여 제조된 단기숙성치즈(3개월 숙성)의 peak 수는 각각 13개, 14개, 16개로 나타났으며, Retention time과 Area(%)는 생균 처리구의 경우 3 4분대에서 13.04%(Area), 5 9분대에서 20.65%, 10분대 이상에서 66.32%로 나타났으며, 조효소 처리구도 유사한 경향을 보였다.

상업용 효소로 제조한 EMC치즈의 수용성 분획은, Protamex-EMC는 3-4분대(Retention time)에서 17.39%(Area), 5 9분대에서 38.97%, 10분대 이상에서 44.87%로 나타났다. Flavourzyme-EMC는 각각 22.75%, 32.76%, 44.49%, Neutrase-EMC는 각각 15.28%, 38.14%, 46.57%로 나타났으며, 지방분해효소인 Palatase-EMC는 각각 20.10%, 39.73%, 40.17%,로 나타났다. 상업용 효소를 처리한 EMC 치즈의 경우 초기 10분대 이하에서 분획의 높이와 면적이 크고 넓게 나타나 초기 peptide의 분해가 많이 이루어 졌음을 확인할 수 있었다.

Protamex-ARC 치즈는 Retention time이 3 4분대에서 16.73% (Area), 5 9분대에서 35.52%, 10분대 이상에서 47.75%로 나타났으며, Flavozyme-ARC는 각

각 22.98%, 43.00%, 34.02%, Neutrase-ARC는 각각 13.74%, 37.76%, 48.49%, Palatase-ARC는 각각 16.91%, 30.69%, 52.39%,로 나타났다.

2. 연구결과 활용 및 건의

가. 제 2 협동과제 : Aminopeptidase, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, esterase 등의 활성이 높은 풍미증진 효소 생산균주인 Lactobacillus casei FEPB-5를 선발하여 효소를 생산하였다. 풍미증진효소 생산균주에 의해 생산된 조효소액을 이용하여 제조한 풍미증진 효소 시제품을 상품효소인 Flavourzyme과 비교한 결과 치즈 숙성기간을 단축하고 풍미를 개선하는 효소로서 활용 가능성이 있다고 사료된다. 한편 본 연구 진행중 개발된 FPLC에 의한 효소의 분리정제 기술 및 한외여과법에 의한 효소생산 기술의 조건은 풍미증진 효소 생산공정을 Scale-up하는데 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 효소 생산공정 중에 균체 파괴의 한 방법인 Microfluidizer의 사용이 적용된다면 효소생산 수율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

한편, 본 연구과제의 목표에 부응하는 연구성과를 이루었지만, 제한된 연구기간과 연구비로 인해 풍미증진 효소생산균주의 유전공학에 의한 개발 육종을 시도하지 못한 것이 아쉽게 생각된다. 현재 낙농 선진국에서도 이와 같은 연구개발에 집중투자하고 있는 실정이므로 기술개발 경쟁에서 낙후되지 않기 위해서는 상기 과제의 연구가 지속되어야 한다고 생각된다, 이는 차후 다음 연구과제에서 진행할 수 있을 것으로 기대하며, 만약 다음 기회에 유전공학기술을 본 과제에서 확보된 우수균주와 효소 생산 분리정제기술에 접목하여 연구가 진행된다면, 본 연구과제를 통해 확보된 기술과 우수균주의 활용 및 개발은 물론이고 낙농가공산업에 있어서 세계적인 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

나. 제 1 협동연구과제 : 단기숙성치즈의 제조기술은 숙성기간을 약 3분의 1

로 단축함으로써 제조원가 절감효과는 물론 자금회수기간 단축효과와 에너지 사용량 감소효과를 기대할 수 있었다. EMC치즈는 낙농 및 각종의 비낙농식품의 풍미첨가물로 사용할 만한 가치가 있는 것으로 평가되어 유제품 소비확대에 기여할 것으로 생각된다. 그 외에도 효소생산산업의 기회부여로 인한 간접적인 산업기술축적 효과와 수입대체, 그리고 그에 따른 고용창출효과가 예상된다. 그러나, 이정도의 제조원가 절감효과로는 국내 유가공산업체에서 체다치즈 생산재개 의욕을 발생시킬 만한 효과는 아닌 것으로 보이며, 치즈용 원료유에 대한 보조금 지급 등과 같은 정책적 차원의 지원방안이 필요한 것으로 생각된다.

다. 주관연구과제 : 치즈 풍미에 관여하는 많은 요인들을 추적, 탐색하는 작업은 치즈 제품의 기호성을 결정하는데 가장 중요한 일이다. 신속한 숙성진단법의 한 모델을 이 연구를 통해 밝혀 보고자 하였으며, 이러한 시도는 유제품, 특히 발효 유제품의 경우 제품의 마켓팅 차원에서 매우 유익한 것이며, 이 기술들을 식품 전반, 특히 김치와 같은 우리 고유의 식품을 세계에 홍보하는데 필요하며, 각 나라 국민의 기호성 파악 및 구매가 가능한 제품을 제조하는데 중요한 기초자료를 마련해 줄 수 있으리라 판단된다.

SUMMARY

Subject 1. Production of flavour enhancing enzymes

1. The purpose of study : The unpleasant bitter taste of EMC cheeses imported from abroad, which was produced by the commercial proteinases, have been considered as an important problem in dairy food industries. The intracellular enzymes from lactic acid bacteria have been studied by the authors that is capable to degrade the bitter peptides. This study is to select lactic acid bactera having the enzyme appropriate for flavour enhancing as well as debitering activities, to accumulate data for development of technologies about mass production of cells and about the isolation and purification by studying the enzymatic characteristics of the flavour enhancing enzymes

2. Results and conclusions : To select the strain of Lactobacilli which has the high activities of flavor enhancing enzymes; aminopeptidase, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, esterase, the crude enzyme extracts from various strains of Lactobacilli incubated in MRS medium, were detected by APIZYM system and the activities of aminopeptidase, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, esterase were determined. The selected strain was named *Lactobacillus casei* FEPB-5. Enzyme activities of *L. casei* FEPB-5 were compare with those of commercial enzyme product, Flavourzyme. Aminopeptidase activity of *L. casei* FEPB-5 was lower, X-prolyl-depeptidyl peptidase activity and esterase activity were higher than those of commercial enzymes.

Intracellular aminopeptidase, esterase, X-prolyl dipeptidyl

aminopeptidase of *L. casei* FEPB-5 selected from various strains of *L.casei* sp were partially purified by a Fast Protein Liquid Chromatograph (FPLC) system consisted of an ion-exchange, hydrophobic, and gel-filtation chromatography.

Intracellular aminopeptidase, esterase, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase of *L. casei* FEPB-5 could be separated from the active fractions by ion-exchange, hydrophobic, and gel-filtration chromatography.

The optimal temperature and pH for the activities of aminopeptidase, esterase and X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase were 37℃ and pH 7.0. All of these enzymes were activated by Co^{2}, but aminopeptidase was strongly suppresed by Cu^{2}. Ethtylenediaminetetraacetic acid(EDTA) inhibited aminopeptidase completely and Diisopropylfiuorophosphate(DFP) inhibited Esterase and X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase.

To accumulate data for the mass prodution of flavor enhanching enzymes from *L. casei* FEPB-5, the cultural conditions of the cells and the purification process of enzymes were investigated. Biomass production and the activities of enzymes were the highest in MRS medium when *L. casei* FEPB-5 was cultivated in MRS medium, skim milk and whey medium. The various growth media were tested for the production of the flavor enhancing enzymes in lower price. The production costs were decreased by 10% of the price of the commercial MRS medium(Difco. co. USA) when the ingredients of MRS media was replaced with the domestic raw materials. An ultrafiltration process with the molecular size ranged from 10 kDa to 400 kDa for enzyme purification was successfully concentrated the enzyme by 3 folds.

Subject 2. Development of production process of accelerated ripening of cheese and enzmye modified cheese

1. The purpose of study : This experiment was conducted whether the bitter taste of accelerated ripened cheese(ARC) and enzyme modified cheese(EMC), which was produced by a severe degradation of cheese proteins, could be degraded or not by the hydrolytic action of aminopeptidase and X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *L. casei* FEPB-5. The practical conditions and technology for production of ARC cheese and EMC cheese were also studied. The flavour characteristics of ARC cheese was compared with those of normal ripened Cheddar cheese and the processed cheese products using the EMC cheese prepared experimentally were evaluated by the trained students and the industrial staffs.

2. Results and conclusions : The degree of ripening of ARC cheese made experimentally according to the methods developed by this study was different with the ripening periods. The degree of ripening of three of four ARC ripened for 2 months were close to that of medium cheese, while one of them was close to that of extra old cheese. The bitter taste of ARC was left, but lesser than that of Korean cheddar cheese. Two ARC cheeses with the live cell and the crude enzyme of *L. casei* FEPB-5 were ripened withour bitternes and produce the full flavour of old cheese(8 month lod). The textural properties of ARC ripened for three months with a commercial proteinase, Neutrase, were close to those of old cheese rather than of mild cheese. The debittering actions of the aminopeptidases from *L. casei* FEPB-5 were verified when bitter taste was

produced in hydrolysis of cheese protein by the severe action of Neutrase and flavourzyme, which has been considered as one of the important processing steps in making EMC. The debittering action of aminopeptidase was found when commercial endopeptidases were inactivated by heating at 80℃. Commercial lipases contributed to produce acceptable flavour without flavour defects. The taste of EMC prepared has not been disappeared completely, but it could be masked by the tastes of other ingredients and was evaluated as the acceptable level of taste.

On comparing thee different type of processed cheese spreads with two commercial cream cheeses which were imported, The process cheese spreads containing EMC as well as tuna, peanut and a combination of garlic and red pepper seed oil, respectively, were preferred to the cream cheeses.

Subject 3 : Development of analytical methods for FFAs, volatile compounds and water-soluble fractions of cheeses.

1. Purpose of study : In order to develop the rapid analytical methods for FFAs, volatile compounds and water-soluble fractions of various kinds of cheeses including EMC, ARC cheeses.

2. Result and conclusion : Saturated fatty acids including caproic acid(C6) and unsaturated fatty acids like as tetradecenoic acid(C14:1), hexadecenoic acid (C16:1), and oleic acid(C18:1) in 3 month aged traditional Cheddar cheese were identified by GC/MS analysis.

There was no different domestic and foreign Cheddar cheese between experimental Cheddar cheese made by co-workers, and showed the same FFAs contents. The ratio of short chain FFAs and middle/long chain FFAs was

also the same with the ratio was 10.56:89.37, 10.30:89.70 respectively. Foreign Cheddar cheese was increased the stearic acid(C18) contents and decreased the palmitic acid(C16) contents. But, domestic Cheddar cheese showed the middle contents of FFAs between the Foreign Cheddar cheese and 3 weeks aged accelerated ripening Cheddar cheese.

On comparing to the 4 types of Cheddar cheese treated with microbial cell, crude enzyme, and partially purified enzyme, there was no different in FFAs compositions and FFAs contents and the ratio of short chain FFAs and middle/long chain FFAs, especially in case of lactic cells treated Cheddar cheese had tendency to decreased the short chain FFAs while increasing in long chain FFAs.

Also, it was found that the FFAs contents and the ratio of short chain FFAs and middle/long chain FFAs showed the same patterns among the Cheddar cheeses treated with cell free extracts, Neutrase, and CFE+Neutrase. CFE+Neutrase treated Cheddar cheese was degraded the FFAs more than other treated Cheddar cheeses.

Amounts of Stearic acid(C18) in Cheddar cheese treated with CFE, Neutrase and CFE+Neutrase were 41.04%, 38.73%, 35.89% respectively, and also, showed the same tendency in Palmitic acid. Especially 6.54% of Tetradecenoic acid(C14:1) was found in Neutrase treatment.

WSFs(Water Soluble Fractions) in traditional Cheddar cheese by HPLC analysis had 14 of peaks and the peak groups were appeared around 5 min, 5-10 min, and 10 min after injection.

Three types of Cheddar cheese treated with crude enzyme, Neutrase, and crude enzyme+Neutrase had the 14, 14, 22 of peak numbers, respectively. Peak areas of the cheese with crude enzyme were 14.16% at 3-4 min of retention time(RT), 21.84% at 5-9 min, 64.00% at 10 min after injection,

and showed the same pattern with those of control cheese. Degradation of peptides were more severely arisen from after 10 min in Neutrase and Neutrase+ crude enzyme treatment than other treatments.

There were no differences within each treatments. And it showed the overlapped peaks 10 min after injection in HPLC chromatograms of cheeses. It was because prep-LC, which is used to separate easely the WSFs, was not used for this analysis.

Three types of 3 month aged Cheddar cheese treated with lactic cell, crude enzyme, and partially purified enzyme had the 13, 14, 16 of peak numbers respectively, Peak areas of the cheese with crude enzyme were 13.04% at 3-4 min, 20.65% at 5-9 min, 66.32% at 10 min after injection, and showed the same pattern to those of control cheese.

In case of ARC cheese treated with Protamex, Peak areas were 16.73%(3-4 min), 35.52%(5-9 min), and 47.75% (10 min after). Those of Palatase treated cheese were 16.91%, 30.69%, and 52.39%, and those of Flavozyme treated cheese were 22.98%, 43.00%, and 34.02%, and those of Neutrase treatment were 13.74%, 37.76%, and 48.49%, respectively. Palatase treated cheese showed the same pattern with traditional Cheddar cheese.

When analyse the EMC cheese treated with commercial enzymes, Peak areas of Protamex treatment were 17.39%(3-4 min), 38.97%(5-9 min), and 44.87%(10 min after injection). Those of Palatase treatment at same retention time were 20.10%, 39.73%, and 40.17%, and those of Flavozyme treatment were 22.75%, 32.76%, and 44.49%, and those of Neutrase treatment were 15.28%, 38.14%, and 46.57%, respectively.

Subject 4. Economical analysis of production cost of cheese by accelerated ripening

1. The purpose of study : The economical effects of accelerated ripening technology of cheese was studied by making a comparison between foreign and domestic retailing and wholesale prices. Refriger□tion cost as well as the prices of raw materials and labour expenses were also compared with the normal ripening and the impact to the total production cost. The main advantages of this technology and additional adventages was eventually investigated.

2. Result and conclusion : Refrigeration cost would not be calculated in the price of cheese products including dairy products in domestic dairy company. The cost of refrigeration is divided evenly to all the dairy products stored in the warehouse. Cheddar cheese is not produced any more by the domestic cheese company and the imported Cheddar cheese was stored in the rental warehouse.

It was reported to cost $40 per ton of cheese per month in Australia. When the cost for ripening of cheese during eight months was applied to the production cost of Korean Mozzarella cheese, 3.96% of total production cost is increased. However, only 1.46% is increased leaving savings by 64,132 won/ton of cheese spite of additional use of enzyme.

Therefore, the economical effects of this ripening technology of cheese comes mainly from the shortening of periods stacked in warehouse, rapid circulation the capitals, and energy savings. Industrial advances in enzyme technology and replacing of imported cheese with domestic cheese, and new job opportunity would be considered as additional advantages.

The reduction of production cost was not satisfied by this study, but new payment system for raw milk or a subsidy for raw milk for making cheese was considered to be necessitate.

CONTENTS

목 차

제 5 장 단기숙성치즈 제조원가 절감효과 분석

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

국내에 소비시장은 존재하나 국내에서는 생산이 중단된 이유의 하나로서 숙성치즈의 제조원가가 수입치즈에 비하여 2배 이상 요구되는 실정을 감안해 볼 때 제조원가를 감소시킬 수 있는 방법을 연구하는 것은 매우 바람직하다. 그 첫째 방안은 치즈제조용 원유생산을 장려하는 의미에서 무지고형분에 의한 유대지급방안을 검토해야 할 것이며, 이와 더불어 젖소의 유전형질에 따른 치즈수율에 관한 연구도 병행되어야 할 것이다. 둘째 방법은 제조원가중 장기간의 숙성기간에 소요되는 냉동비의 절감과 자본 회전율의 둔화 등도 상당한 영향을 줄 것이므로 숙성기간을 단축시키는 방안에 대한 연구가 요청된다고 생각된다. 세째 방법은 치즈제조용 원유에 대한 정부의 장려금지급 방안도 검토되어야 한다고 생각된다.

본 연구에서는 치즈 제조 및 가공기술중 핵심기술이라고 할 수 있는 치즈숙성을 단기간에 진행시키는 단기숙성치즈 제조기술을 개발하는 내용을 연구하였으며, 단백분해 효소의 종류, 사용수준 등 에 따라서 생성하는 쓴맛의 정도가 각각 다르기 때문에 선발된 젖산균의 풍미증진효소 생산기술을 확보하고, 이를 사용하여 상업용 단백분해효소가 생성하는 쓴 맛 펩타이드를 효과적으로 제거할 수 있는 조건을 찾아내며, 그 조건에 맞는 EMC치즈 제조기술을 개발하고 EMC치즈를 응용한 치즈제품을 제조하여 산업적 평가를 실시하고자 하였다. 이와 관련된 분석기술로서 치즈 숙성 중 변화하는 지방산과 수용성 단백질의 등의 풍미물질 분석을 시료의 전처리가 간편한 SPME(Solid Phase Micro extraction)분석기법과 시료의 전처리가 필요없는 Pyrolysis /GC/MS 분석기법을 활용하여 치즈의 숙성도를 신속하게 측정할 수 있는 분석학적 기술을 연구하기 위하여 본 연구과제를 실시하였다.

제 2 절 연구개발의 범위

제 2 협동과제에서는 국외에서 상업적으로 생산되는 단백분해효소들을 이용하여 생산하는 EMC치즈는 쓴 맛이 심하며 쓴 맛을 주는 펩타이드를 분해하면 풍미가 증진되는 기초적 연구를 실시한 바 있어 이를 위해 선발된 젖산균을 대량생산하는 기술과 젖산균으로부터 펩타이드 분해효소들을 분리정제기술, 그리고 그 효소들의 효소학적 특성을 밝히며, 아울러 제 1 협동과제에서 필요로 하는 효소를 제공하는 것을 연구범위로 하였다.

제 1 협동과제에서는 치즈숙성과정에서 일어나는 주요 생화학적 변화들이 유당분해, 단백분해, 지방분해효소들의 종합적인 작용에 의해서 일어나는 것이기 때문에 체다치즈 제조공정중 제 2 협동연구과제에서 개발한 비스타아터 젖산균의 단백분해효소를 함유하는 효소액을 사용하여 숙성기간을 단축하는 제조기술과 치즈풍미 첨가제로서 사용되는 EMC(enzyme- modified cheesefmf 개발하고자 하였다. 상업용 단밸분해효소외 지방분해효소, 그리고 펩타이드 분해효소(풍미증진효소) 등을 여러 단계로 나누어 첨가하면서 제조실험한 단기숙성치즈와 EMC를 응용하여 제조한 몇종의 가공치즈류 등의 관능평가를 비롯한 조직특성을 비교하여 제조방법의 타당성을 확인하고자 하였다. 또한 단기숙성치즈의 제조원가를 분석하여 국외에서 추정한 냉동비용을 제조원가에 책정시켰을 때, 숙성기간 단축에 의한 원가절감효과가 효소첨가제의 추가사용에 의한 원가상승요인을 상쇄시킬 수있는가에 대하여 검토하였다.

주관연구과제에서는 제 1 협동연구기관에서 숙성기간 단축을 목적으로 단백분해효소, 지방분해효소, 풍미증진효소 등 여러 가지 처리에 의해 제조된 단기숙성 치즈를 제공받아 풍미성분을 분석하였으며, 단기숙성치즈의 숙성도를 신속히 측정하기 위해 SPME와 Pyrolysis/GC/MS 등의 분석기법을 확립하고자 하였다. 동시에 HPLC분석기술에 의하여 치즈의 수용성 단백질 분획 구성과 숙성중 변화를 연구하였다.

제 2 장 풍미증진효소의 생산

제 1 절 풍미증진효소 우수 균주 선발

1. 서 론

유산균은 여러 종류의 식품을 제조하는데 널리 이용되고 있으며, 특히 유제품의 발효에 관여하는 중요한 세균이다. 이중에서 치즈제조의 경우에서 처럼 주요성분으로 단백질을 함유하는 환경속에서 자라는 유산균도 있는데, 이 균들은 단백질분해시스템을 가지고 있어서 우유의 단백질을 분해하여 생육에 필요한 성분을 만들고, 또 제품의 레올로지 및 관능적 특성을 부여하는 역할도 하고 있다. 치즈의 숙성에 관여하는 유산균으로는 Lactococci가 스타아터로서 주요균이지만(El Soda, 1993 ; Kok, 1993 ; Visser, 1993), Lactobacilli는 여러 치즈에서 비스타아터균(Non-Starter Lactic Acid Bacteria ; NSLAB)으로서 치즈의 텍스츄어, 풍미에 관여하는 것으로 알려져 있다(El Soda, 1978 a,b ; Broome 등, 1990 ; Peterson 등, 1990).

유산균은 생육하기 위한 필수 아미노산들을 우유 중에서 합성할 수 없기 때문에 우유 단백질을 분해하는 단백질 분해 시스템이 필요하다.(Law 등, 1997). 유산균의 단백질 분해 시스템은 세포외 단백질분해효소에 의해 카제인을 올리고 펩타이드로 분해하고 세포내 펩티다아제에 의해 아미노산까지 분해하여 분해된 아미노산을 흡수하는 시스템으로 구성되어 있다(Kunji 등, 1996).

유산균 중 Lactobacilli는 생육에 가장 다양한 아미노산들을 요구하는 미생물로 우유의 카제인을 가수 분해하고 세포내로 제공하는 단백질 분해 시스템이 발달되어 Peptidase의 활성이 Lactococci보다 높다는 보고(Hickey 등, 1983)가 있으며, 치즈 숙성 후기에 우세한 microflora를 갖는다. 그러므로 Lactobacilli는 치즈의 단백분해에 관여하여 치즈의 독특한 풍미(Hickey 등,

1983 ; Ezzat 등, 1986 ; Lee 등,1986)를 생성하는데 중요한 역할을 한다.

Lactobacilli의 펩티다아제에 관한 연구로는 *Lactobacillus casei*(El soda 1978a,b) *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bugaricus* B14(Wohlrab and Bockelmann, 1993), *Lactobacillus casei* ATCC 393(Hegazi and Abo- Elnaga, 1987), *Lactobacillus bugaricus*(Atlan 등, 1989), *Lactobacillus casei* (El soda 등, 1993), *Lactobacillus delbruckii* subsp. *latics*와 *Lactobacillus helveticus*(Kok 등, 1995), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LLG와 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*(Arora and Lee, 1992, 1994), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* UL21과 LLG(El-Abboudi 등, 1992b ; Habibi 등, 1994)가 있다.

지방 분해 작용과 치즈의 풍미와의 관계는 명확히 규명되어 있지는 않지만, Lactobacilli의 esterase가 숙성과정 중 치즈 풍미에 관여하는 풍미를 생성한다는 보고(Morichi 등, 1968, ; Reiter 등, 1966)가 있다. 또한 *Lactobacillus* 속 젖산균의 lipase와 esterase에 관한 연구로는 *Lactobacil- lus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus fermentum* (El Soda 등, 1986a), *Lactobacillus helveticus, Lactobacil- lus bulgaricus, Lactobacillus lactis* 및 *Lactobacillus acidophilus* (El Soda 등, 1986b), *Lactobacillus case*i supsp. *casei*(Lee 등, 1990a, Castillo 등, 1999), *Lactobacillus helveticus*와 *Latobacillus delbrueckii* ssp. bulgarius (Khalid 등, 1990ㅊ) *Lactobcillus plantarum*(Gobbetti 등, 1996, 1997a), *Lactobacillus fermentum*(Gobetti 등, 1997b) 등이 있다.

Lactobacilli는 단백질분해시스템을 가지고 있어서 치즈의 숙성을 촉진하는 역활을 한다. Lactobacilli는 일반적으로 proteinase보다는 pepti- dase인 aminopeptidase나 dipeptidase의 활성이 높으므로(El Soda 등, 1982 a,b), peptidase가 치즈 숙성에 더욱 깊은 관계가 있다.

*Lactobacillus helveticus*를 Swiss cheese, Parmesan cheese, Cheddar cheese에 첨가하여 숙성시켰더니 풍미가 좋아 졌으며, 가열 또는 동결처리한

*Lactobacillus helveticus*를 첨가하여 숙성시켰더니 풍미가 좋아졌으며, 가열 또는 동결처리한 *Latobacillus helveticus*를 첨가하였을 때 숙성이 촉진되었다 (Frey 등, 1986a,b ; Bartels 등, 1987 ; Ardo 등, 1988) 이에 관련된 *Lactobacillus casei*를 그대로 또는 가열처리한 후 첨가하여 치즈를 숙성시켰더니 유리아미노산이 증가하고 texture가 개량되었다.(El Soda 등, 1991 ; Trepanier등, 1991 ; El Abboudi 등, 1992), *Latobacillus casei* ssp *casei* LLG와 ATCC 393은 쓴맛을 지닌 pro-phe과 pro-ile에 대하여 활성이 강하므로 숙성치즈 중에 있는 쓴맛의 생성을 방지할 수는 균으로 선발되었다(Arora 등, 1990a). 이외에도 Lactobacilli를 이용한 치즈숙성에 관한 연구(El Soda 등, 1981,1992 ; Marhaly 등, 1986 ; Puchades 등, 1989 ; Broome 등, 1990, 1991c ; Lee 등, 1990b)가 있으며, 이중 *Latobacillus casei* ssp *casei* LLG의 조효소 추출물을 EMC제조에 이용하였을 때 쓴맛과 산패취를 없앨 수 있었다(Park 등, 1993).

따라서 본 연구에서는 Lactobacillus속의 균주중에서 Aminopep- tidase, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, caprylate esterase 등의 활성이 높은 균주를 선발하기 위하여 풍미증진효소를 생산을 위한 기초 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 균주

한국종균협회(KCCM), 생명공학연구소(KCTC) 및 캐나다 맥길대학교로 부터 분양받은 표1의 *Lactobacillus acidophilus*(KCTC 3111, KCTC 1120), *Lactobacillus casei*(LLG, KCCM 35465, KCTC 3110, 3260, KCTC 3510), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*(KCCM 35463,40266), *Lactobacillus helveticus*(ATCC 15009, CNRZ 32)를 사용하였다.

표 1. 사용된 *Lactobacillus*속 균주

균주명	
Lactobacillus acidophilus	KCTC 3111
	KCTC 1120
Lactobacillus casei	LLG
	KCCM 35465
	KCTC 3110
	KCTC 3260,
	KCTC 3510
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*	KCCM 35463
	KCCM 40266
Lactobacillus helveticus	ATCC 15009
	CNRZ 32

나. 균주의 배양과 회수

사용균주는 10% skim milk 배지에서 배양한 후 -30℃에서 보관하면서, MRS 배지에서 30 ℃, 16시간 2회 계대배양한 후, 원심분리(10,000×g, 15분간 4℃)하여 얻은 균체를 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.8)으로 상온에서 2시간동안 진탕하면서 세포외추출물을 추출한 후, 원심분리(10,000×g, 15분간, 4℃)하여 균체를 회수하였다.

표 2. MRS 배지의 조성

Bacto Proteose Peptone No.3	10 g
Bacto Beef Extract	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
Bacto Dextrose	20 g
Tween 80	1 g
Ammonium Citrate	5 g
Sodium Acetate	5 g
Magnesium sulfate	0.1 g
Manganese sulfate	0.05 g
Dipotassium Phosphate	2 g
D.W.	1ℓ
pH	6.8

다. 조효소액의 조제

회수한 균체를 0.1 mm glass beads(Biospec Products,USA)와 함께 Mini-Beadbeater((Biospec Products,USA)로 균체세포를 마쇄한 후 0.5mM CaCl2를 포함한 0.01M Tris-HCl(pH 7.5)완충용액에 현탁한 후 원심분리(10,000 × g, 20분간, 4℃)하여 상등액을 취하여 조효소액을 얻는다.

라. APIZYM검사

APIZYM kit(Bio-Merieux SA., France) 스트립의 오목한 곳에 조효소액 25ul씩을 떨어뜨린 후 37℃에서 4시간 배양한다. 반응액에 12.5 ul의 시약 A[증류수 1 ml 중 Tris(hydroxymethyl) aminomethane; 250mg, HCl(37%) ; 110 ul, SDS ; 10ml 함유]와 시약 B[2-methoxy ethanol 1 ml중 Fast Blue BB ; 3.5 mg 함유]를 떨어뜨린 후 5분 후에 나타난 반응색을 기준색표와 비교하여 효소력을 조사하였다. 활성이 없는 것은 0, 활성이 가장 강한 것은 5로 표시한다.

마. 효소역가의 측정법

Aminopeptidase 활성의 측정은 Arora 등(1992)의 방법을 사용하였다. 즉 16.4mM Alanine-p-nitronilide, Arginine-p-nitroanilide, Leucine-p-nitroanilide, Lysine-p-nitroanilide, Proline-p-nitroanilide의 MeOH용액 300㎕와 50mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.0) 300㎕와 조효소액 300㎕를 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응시킨다. 반응액에 30% acetic acid 용액 100㎕를 가한 후 410nm 에서 흡광도를 측정하였다. 효소역가 1 단위는 분당 410nm에서의 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 규정하였다.

Esterase 활성의 측정은 Lee 등(1990a)의 방법을 사용하였다. 즉 1.5 mM p-nitrophenyl acetate(C2), p-nitrophenyl butylate(C4), p-nitrophenyl caprolate (C6), p-nitro- phenyl caprylate(C8)의 MeOH용액 300㎕와 50mM 인산나트륨 완충용액(pH7.0) 300㎕와 조효소액 300㎕를 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응시킨다. 반응액에 30% acetic acid 용액 100㎕를 가한 후 반응액의 흡광도를 410nm에서 측정하였다. 효소역가 1단위는 분당 410nm에서의 흡광도 0.1을 증가시키는데 필요한 효소량으로 규정하였다.

X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase 활성의 측정은 Khalid등(1990b)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 6.4mM Arg-pro-p-nitroanilide, Gly-pro-p-nitroanilide의 MeOH용액 300㎕와 50mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.0) 300㎕와 조효소액 300㎕를 혼합한 후 37℃에서 30 분간 반응시킨다. 반응액에 30% acetic acid용액 100㎕를 가한 후 410nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소역가 1 단위는 분당 410nm에서의 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 규정하였다.

바. 단백질의 정량

시료의 단백질 정량은 BCA(Bicinchoninic acid) 단백질측정액 (Pierce Chemcal Co., USA)을 이용하여 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 풍미증진 효소생산 우수균주의 선발

한국종균협회(KCCM), 생명공학연구소(KCTC) 및 캐나다 맥길대학교로부터 분양받은 표1의 *Lactobacillus acidophilus*(KCTC 3111, KCTC 1120), *Lactobacillus casei*(LLG, KCCM 35465, KCTC 3110, 3260, KCTC 3510), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*(KCCM 35463, 40266), *Lactobacillus helveticus*(ATCC 15009, CNRZ 32)를 MRS배지에서 배양하여 얻은 무세포추출액을 대상으로 APIZYM검사와 Aminopeptidase, Esterase, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase의 활성을 측정하여 얻은 결과는 표3과 표4와 같다.

상기의 결과로 볼 때 APIZYM 검사의 경우는 Esterase Lipase(C8)와 Leucine aminopeptidase의 값이 모두 5점인 균주 FEPB-5와 FEPB-12를 풍미증진효소 생산 대상균주로 선발하였다.

APIZYM 검사의 결과를 확인하기 위하여 Aminopeptidase의 각종 기질 [Alanine-p-nitro-nilide, Arginine-p-nitroanilide, Leucine-p- nitroanilide, Lysine-p-nitroanilide, Proline-p-nitroanilide]과 Esterase의 각종 기질 [p-nitrophenyl acetate(C2), p-nitrophenyl butylate(C4), p-nitrophenyl caprolate(C6), p-nitrophenyl caprylate (C8)] 및 X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase의 각종 기질[Arg-pro-p-nitroanilide, Gly-pro-p-nitro- anilide]에 대한 효소활성을 측정한 결과, Leucine-p-nitroanilide에 대한 aminopeptidase의 경우는 FEPB-5〉 FEPB-6〉 FEPB-7 순으로 활성역가를 나타냈으며, p-nitrophenyl caprylate(C8)에 대한 esterase의 경우는 FEPB-5〉 FEPB-12〉 FEPB-10 순으로, Gly-pro-p-nitroanilide에 대한 X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase의 경우는 FEPB-11〉 FEPB-5〉 FEPB-10 순으로 활성역가를 나타냈다.

표 3 APIZYM에 의한 효소학적 특성

균주 NO / 효소명	FEPB-1	FEPB-2	FEPB-3	FEPB-4	FEPB-5	FEPB-6	FEPB-7	FEPB-8	FEPB-9	FEPB-10	FEPB-11	FEPB-12
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acid Phosphatase	5	1	4	3	2	1	3	2	4	2	3	1
Esterase(C4)	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1
Esterase Lipase(C8)	2	1	4	3	5	3	4	3	2	3	4	5
Lipase(C14)	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
Leucine aminopeptidase	5	5	5	5	5	4	5	4	4	5	4	5
Valine aminopeptidase	5	5	5	4	4	5	4	5	5	4	5	4
Cystine aminopeptidase	5	1	1	2	4	1	2	1	2	3	2	3
Trypsin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chymotrypsin	5	1	5	3	2	3	2	1	3	2	2	3

표 4. *Lactobacillus*속 균들의 각종 효소역가

균주No.	FEPB-1	FEPB-2	FEPB-3	FEPB-4	FEPB-5	FEPB-6	FEPB-7	FEPB-8	FEPB-9	FEPB-10	FEPB-11	FEPB-12
Aminopeptidase												
Ala-pNA	1.9	0.9	0.9	0.5	3.1	2.5	0.2	0.9	0.9	0.2	2.0	0.9
Arg-pNA	2.0	4.0	2.6	1.9	3.4	0.5	0.2	3.2	2.3	5.4	0.5	1.8
Leu-pNA	1.9	1.5	2.2	1.6	8.9	5.6	3.2	1.6	3.4	1.2	0.5	0.5
Cys-pNA	2.8	3.2	1.4	0.1	5.7	0.8	1.8	0.3	2.5	2.2	0.4	3.4
Pro-pNA	0.2	0.1	0.1	0.7	0.8	1.0	0.3	1.1	0.2	0.4	1.2	0.2
p-Nit개phenyl C2	1.6	7.5	1.8	0.5	4.1	3.7	6.4	11.2	4.3	8.8	6.7	4.8
p-Nitrophenyl C4	2.2	1.3	1.8	1.5	7.2	0.8	1.0	3.5	3.6	6.5	5.0	6.9
p-Nitrophenyl C6	2.7	0.6	3.5	0.3	8.9	1.2	0.8	4.1	2.2	3.0	3.5	0.1
p-Nitrophenyl C8	1.2	3.1	2.4	1.0	9.1	1.3	2.2	3.4	5.2	6.2	3.1	7.0
X-PDP												
Arg-Pro-pNA	1.8	1.0	2.4	1.9	7.2	2.0	0.3	2.5	5.1	8.1	4.4	8.3
Gly-Pro-pNA	1.8	0.9	1.8	1.1	3.5	2.1	0.5	0.9	1.1	1.5	3.7	3.0

이상의 결과를 종합적으로 검토한 결과 균주 FEPB-12보다는 균주 FEPB-5가 세효소에 대한 효소역가가 높아 이 균주를 풍미증진효소 생산균주로 선발하였다.

나. 상업용 효소와의 비교

시판중인 풍미증진효소의 하나인 Flavourzyme(Novo Nordisk, Denmark)과 우수균주로 선발된 FEPB-5로부터 얻은 조효소액의 효소활성을 측정한 결과는 표 5와 같다.

표 5 조효소액과 상품효소의 효소역가

[Unit/단백질량(g)]

효소 종류	조효소액	Flavourzyme
Leucine aminopeptidase	1,312	1,485
Esterase	1,207	1,025
X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase	1,444	1.056

상기의 결과를 볼 때, 조효소액의 단백질당 효소역가가 Leucine aminopeptidase는 시판제품에 비해서 낮았으나, Esterase와 X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase는 시판제품에 비해서 높았다. 따라서 두효소의 치이즈 제조시의 풍미증진 효과에 대해서는 면밀한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

4. 적요

풍미증진효소를 생산을 위한 우수균주를 선발하기 위하여 Lactobacillus속의 균주중에서 aminopeptidase, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, esterase 등의 활성이 높은 균주를 *Lactobacillus acidophilus*(KCTC 3111, KCTC 1120), *Lactobacillus casei*(LLG, KCCM 35465, KCTC 3110, 3260, KCTC 3510), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*(KCCM 35463, 40266), *Lactobacillus helveticus* (ATCC 15009, CNRZ 32)를 MRS배지에 배양하여 얻은 균체의 조효소액을 APLZYM 검사와 세 효소의 효소역가를 측정하여 검토한 결과 풍미증진효소 생산균주로 선발하고, 선발된 균주를 *Lactobacillus casei* FEPB-5라 명명하였으며, 상품효소인 Flavourzyme과 효소역가를 비교한 결과 aminopeptidase는 다소 낮았지만, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase와 esterase는 높았다.

제 2 절 풍미증진효소의 분리정제 및 특성연구

1 서론

Lactobacilli는 여러 치즈에서 비스타아터균(Non-Starter Lactic Acid Bacteria ; NSLAB)으로서 치즈의 텍스츄어, 풍미등에 관여하는 것으로 알려져 있다(El Soda, 1978 a,b ; Broome 등, 1990 ; Peterson 등, 1990) 유산균 중 Lactobacilli는 치즈 숙성 후기에 우세한 microflora를 갖으며, 치즈의 단백분해에 관여하여 치즈의 독특한 풍미(Hickey 등, 1983 ; Ezzat 등, 1986 ; Lee 등, 1986)를 생성하는데 중요한 역할을 한다.

Lactobacilli의 aminopeptidase의 분리정제에 관하여는 *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32 (Khalid 등, 1990a), *Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG로부터 분리된 aminopeptidase (Arora 등, 1992)가 있으며, *Lacto- bacillus casei* subsp.*rhamnosus*(Arora 둥, 1994), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* UL21과 LLG(El-Abboudi등, 1992b)에 대한 연구가 있다.

Lactobacillus속의 lipase와 esterase의 분리 정제에 관한 연구로는 *L. casei* supsp. *casei*(Lee 등, 1990a ; Castillo 등, 1999), *L. helveticus*와 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*(Khalid 등, 1990) *L. plantarum*(Gobbetti등, 1996, 1997a), *L. fermentum*(Gobetti 등, 1997b)에 관한 것이 있다.

X-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase의 분리정제에 대해서는 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397(Atlan 등, 1990 ; Khalid, 1990b) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBU-147 (Miyakawa등, 1991), *L. casei* (El Soda등, 1991 ; El Abboudi 등, 1992 b, c), *L. casei* subsp. *casei* LLG(Habibi 등, 1994) 등의 연구가 있다. 따라서 본 연구에서는 선발된 우수 균주로부터 얻은 조효소액을 FPLC 시스템을 활용하여 효소의 분리정제기술을 개발하고, 효소학적 특성을 검토한다.

2. 재료 및 방법

가. 균체의 배양 및 회수.

유산균중 APIZYM검사와 Aminopeptidase, Esterase, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase의 활성을 측정하여, 선발된 *Lactobacillus casei* FEPB-5를 10% skim milk 배지에서 배양한 후 -30℃에서 보관하여 사용하였다. 선발 균주를 MRS배지(Difco제, USA)에 접종하여, 37℃에서 16~18시간 정치배양하고, 배양액의 600㎚에서의 O.D가 1.0인 대수증식기 후기의 균체를 원심 분리(10,000 × g 15분, 4℃)에 의하여 집균한다, 얻어진 균체에 50㎖의 20mM CaCl2를 함유한 20mM β-glycero-phosphate(pH 7.0) 완충용액으로 두 번 세척하여 균체를 회수하였다.

나. 세포내 조효소액의 조제.

분리정제용 조효소액은 회수한 균체를 같은 양의 0.5mM CaCl2를 포함한 0.01M Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액에 현탁한 후 현탁액 약 10㎖를 -10℃ 냉매로 냉각하면서 초음파파쇄기(Fisher Model 550, Sonic dismembrator)로 30분간 처리하여 균체를 파쇄한 후 원심분리(15,000×g, 35분간, 4℃)하여 상등액을 취하여 얻었다.

다. 효소역가의 측정.

1) Aminopeptidase 활성의 측정

Arora등(1992)의 방법을 사용하였다. 즉 16.4mM Leucine-p-nitro- anilide의 MeOH용액 75ul에 효소액 75ul 가하고, 37℃에서 30분간 반응 후, 405㎚에서의 반응액의 흡광도를 Microplate Reader Model 550 UV (Bio-Rad Lab.제, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때 효소역가 1 단위는 분당 405㎚에서의 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 규정하였다.

2) Esterase의 활성의 측정

Lee 등(1990a)의 방법을 사용하였다. 즉 1.5mM p-nitrophenyl caprylate의 MeOH용액 75ul와 조효소액 75ul를 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 405㎚에서의 반응액의 흡광도를 Microplate Reader Model 550 UV(Bio-Rad Lab. 제, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때 효소역가 1 단위는 분당 0.1을 증가시키는데 필요한 효소량으로 규정하였다.

3) X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase의 활성의 측정

Khalid 등(1990b)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 6.4mM Gly-pro-p-nitroanilide의 MeOH용액 75ul와 효소액 75ul와 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 405㎚에서의 반응액의 흡광도를 Microplate Reader Model 550 UV (Bio-Rad Lab. 제, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때 효소력 1 단위는 분당 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 규정하였다.

라. 단백질량의 측정.

FPLC이용시의 단백질량은 280㎚의 흡광도로 나타냈고, 시료의 단백질량은 BCA(Bicinchoninic acid) 단백질측정액(Pierce Chemcal Co., USA)을 이용하여 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다.

마. 분리 정제.

1) 황산암모늄에 의한 염석

얻어진 조효소액에 대해 황산암모늄을 40%가 되게 첨가하여 원심분리에 의해 40%의 황산암모늄에 의해 침전된 단백질을 제거하였다. 그리고 황산암모늄이 90%가 되게 첨가하여 40-90 %황산암모늄 분획을 얻었다.

2) 음이온교환크로마토그라피에 의한 정제

상기의 40-90% 황산암모늄 분획을 20mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 용해

하여, Sephadex G-25(PD-10)(Phamacia제, 스웨덴)으로 처리한 후,0.22㎛ 필터를 통과시켰다. 음이온교환수지인 Mono Q HR 5/5컬럼 (Phamacia제,스웨덴)을 20mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화한 후, 조제한 시료를 흡착시켰다. 20mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)을 이용하여, 유속을 분당 0.5mL으로 하여 NaCl의 농도를 0에서 1M의 농도균배로 용출시켰다. 용출액은 1mL씩 분획하여 효소활성을 측정하여 활성이 있는 분획은 분자량 30,000의 한외여과막으로 탈염 및 농축하고 사용할 때까지 -40℃로 동결 보존하였다.

3) 소수성크로마토그라피(Hydrophobic interaction chromatogrphy)에 의한 정제

황산암모늄 40-90% 범위에서 염석하여 얻은 침전물을 20mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 용해하고 Sephadex G-25(PD-10) (Phamacia, 스웨덴)으로 처리하여 같은 부피의 3.0M 황산암모늄 용액을 혼합하여 최종농도 1.0M의 황산암모늄을 포함하도록 시료를 조제하여 0.22㎛ 필터를 통과시켰다. Phenyl Superose HR 5/5 컬럼(Phamacia, 스웨덴)을 1.5M 황산 암모늄을 포함한 20mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화한 후, 조제한 시료를 흡착시켰다. 용출은 유속을 분당 0.2mL으로 하여 완충용액중의 황산암모늄농도를 직선적으로 1.5M에서 0으로 감소시키면서 완충용액 용출하였다. 용출액은 1mL씩 분획하여 효소활성을 측정하여 활성이 있는 분획은 분자량 30,000의 한외여과막으로 탈염 및 농축하고 사용할 때까지 -40℃로 동결 보존하였다.

4) 겔여과크로마토그라피에 의한 정제

상기의 40-90% 황산암모늄 분획을 20mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 용해하여, Sephadex G-25(PD-10)(Phamacia제, 스웨덴)으로 처라한 후, 0.22㎛ 필터를 통과시켰다. Superose 12 10/30 컬럼(Phamacia, 스웨덴)에 조제한 시료를 흡착시켰다. 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화한 후, 조제한 시료를 흡착시켰다. 용출은 유속을 분당 0.3mL으로 하여 완충용액을 용출하였다. 용출액은 1.5 mL씩 분획하여 효소활성을 측정하여 활성이 있는 분획은 분자량

30,000의 한외여과막으로 탈염 및 농축하고 사용할 때까지 -40℃로 동결 보존하였다.

바. 효소의 특성.

1) pH와 온도의 영향.

pH의 영향은 조효소액과 0.05 M acetate acetate(pH5.5-6.0), 0.05M sodium phosphate(pH 6.5-7.0) 및 0.05M Tris-HCl (pH 7.5-8.0) 완충용액으로 조제된 기질의 적당한 양이 37℃에서 반응을 시킨 후 효소활성을 측정한다. 또한 온도의 영향은 0.05M sodium phosphate(pH 6.5)완충용액으로 조제된 기질과 효소액의 적당한 양을 다른 온도(25-75℃)에서 반응시킨 후 효소활성을 측정한다.

2) 2가 양이온과 저해제의 영향

2가 양이온의 영향은 0.05M sodium phosphate(pH 6.5)완충용액으로 용해한 양이온들(Ca^{2+}, Co^{+2}, Cu^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}, Zn^{+2})의 최종농도가 1mM이 되게 효소액과 37℃에서 30분간 예비반응을 시킨후 기질과 반응시켜 효소활성을 측정한다. 저해제의 영향은 저해제들(EDTA, cysteine, PCMB, DFP)의 최종농도가 1mM이 되게 효소액과 37℃에서 30분간 예비반응을 시킨후 기질과 반응시켜 효소활성을 측정한다.

3. 결과 및 고찰

가. 효소 추출 및 분리정제

MRS 배지에서 배양된 균체를 파쇄하여 얻은 조효소액을 FPLC에 의해 분리한 결과는 다음과 같다. 음이온교환크로마토그라피인 Mono Q HR 5/5컬럼(Phamacia제, 스웨덴)을 통과한 용액의 효소 활성을 측정한 결과는 그림 1과 같이 Aminopeptidase, X-proly dipeptityl aminopeptidase 및 Esterase 순으로 나타나 서로 분리가 가능함을 나타냈다. 또한 소수성크로마토그라피인 Phenyl Superose HR 5/5 컬럼(Phamacia제, 스웨덴)을 통과한 용액의 효소 활성을 측정한 결과는 그림 2와 같이 Aminopeptidase, Esterase 및 X-prolyl dipeptityl aminopeptidase 순으로 나타나 서로 분리가 가능함을 나타냈다. 겔여과크로마토그라피인 Superose 12 10/30 컬럼(Phamacia제, 스웨덴)을 통과한 용액의 효소 활성을 측정한 결과는 그림 3과 같이 Esterase, Aminopeptidas 및 X-prolyl dipeptityl aminopeptidase 순으로 나타나 서로 분리가 가능함을 나타냈다. 세 효소에 대한 분자량에 관한 연구로는 *Lactobacillus helve- ticus* CNRZ 32로부터 분리한 aminopeptidase의 분자량은 97KDa이며 (Khalid등, 1990a), *Lactobacillus. casei* ssp. *casei* LLG로부터 분리된 aminopep- tidase는 분자량이 87KDa라고(Arora 등, 1992) 보고한 연구가 있다.

Lactobacillus helveticus CNRZ 32로부터 분리된 X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase는 분자량이 72KDa이고(Khalid 등, 1990a), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397로부터 분리된 X-PDAP는 분자량이 82KDa이며(Atlan 등, 1990), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBU-147로부터 분리된 X-PDAP는 90KDa의 분자량을 가졌다고 (Miyakawa 등, 1991) 보고하였다.

Lactobacillus casei 유래의 esterase 분자량은 105KDa, subunit는 38KDa로 추정되었다(Castillo 등, 1999)

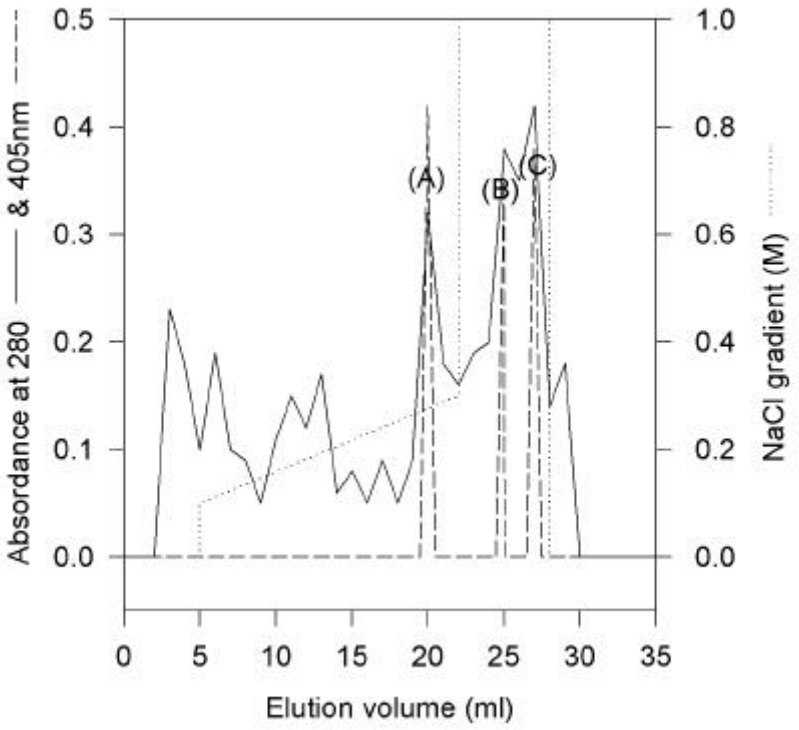


그림 1. MONO-Q 컬럼을 통과한 *Lactobacillus casei* FEPB-5의 조효소액의 크로마토그램

(A)Aminopeptidase (B) X-PDAP (C) Esterase

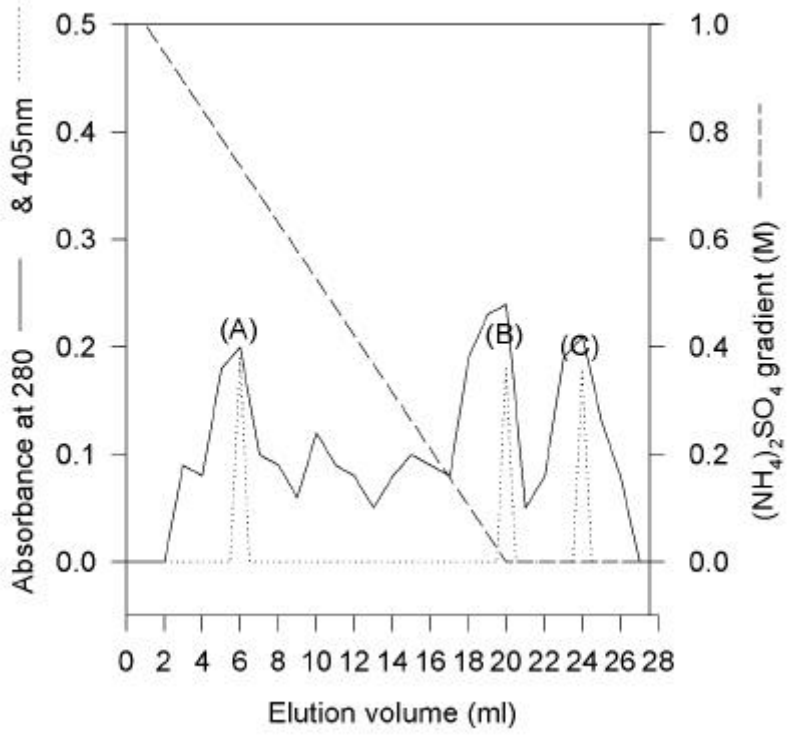


그림 2. Phenyl Superose 컬럼을 통과한 *Lactobacillus casei* FEPB-5의 조효소액의 크로마토그램

(A) Aminopeptidase (B) Esterase (C) X-PCAP

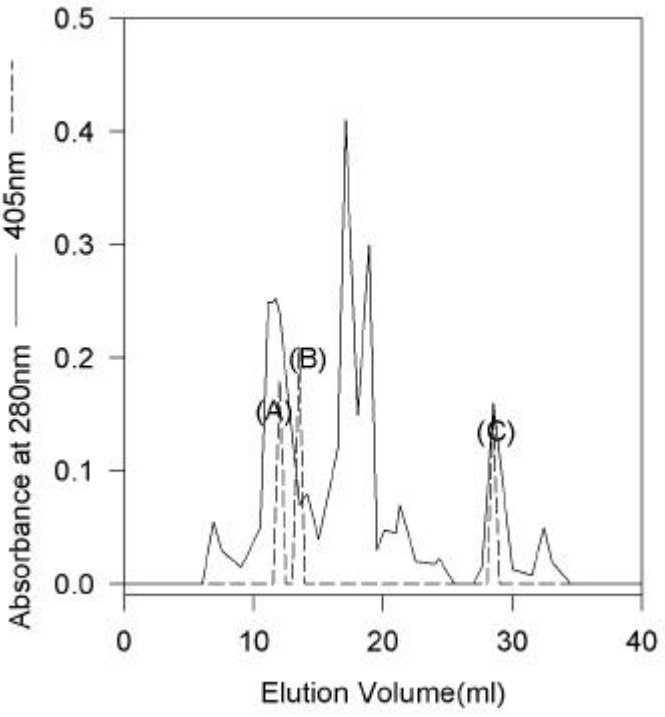


그림 3. Superose 컬럼을 통과한 *Lactobacillus casei* FEPB-5의 조효소액의 크로마토그램

(A)Esterase (B) Aminopeptidase (C) X-PCAP

다. 풍미증진효소의 특성

1) 온도와 pH의 영향

우수균주로 선발한 *Lactobacillus casei* FEPB-5의 조효소액의 효소학적 특성을 조사한 결과는 그림 4와 그림 5와 같다. Aminopeptidase, Esterase, X-prolyl dipeptidyl aminppeptidase의 활성이 모두 37℃ 와 pH 6.8-7.0에서 최적이었다. 이세효소에 대한 다른 연구로는 *Lactobacillus. casei* ssp. *casei* LLG로부터 분리된 aminopeptidase는 최적 pH와 온도는 pH 7.0과 39℃이었으며 (Arora 등, 1992), *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32로부터 분리된 X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase는 최적온도와 pH가 40℃와 pH 7.0이었고 (Khalid 등, 1990a), *Lactobacillus casei*로부터 분리된 X-PCAP를 부분정제하여 얻은 효소의 최적온도와 pH는 40-50℃와 pH 7.0이었으며(El Soda 등, 1991), *Lactobacillus casei* 두균주로부터 X-PCAP를 각각 분리하여 정제한 효소의 최적온도와 pH는 45℃와 pH7.0으로 두균주가 동일하였다는(El Abboudi 등, 1992a) 보고가 있다.

Lactobacillus fermentum DT 41의 esterase는 pH7.0와 30-35℃에서 상당한 활성을 나타내었다(Gobbetti등, 1997b).

2) 2가 양이온과 저해제의 영향

우수균주로 선발한 *Lactobacillus casei* FEPB-5의 조효소액의 효소학적 특성을 조사한 결과 Aminopeptidase, Esterase, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase의 활성이 모두 2가 양이온 중 Co^{+2}에 의해 모두 활성화 하였고, 저해제의 영향은 Aminopeptidase에서는 EDTA, Esterase와 X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase에는 DFP가 크게 저해를 일으켰다.

이 세효소에 대한 연구로는 *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32로부터 분리한 aminopeptidase은 EDTA에 의해 활성에 저해를 받았으며(Khalid 등, 1990a),

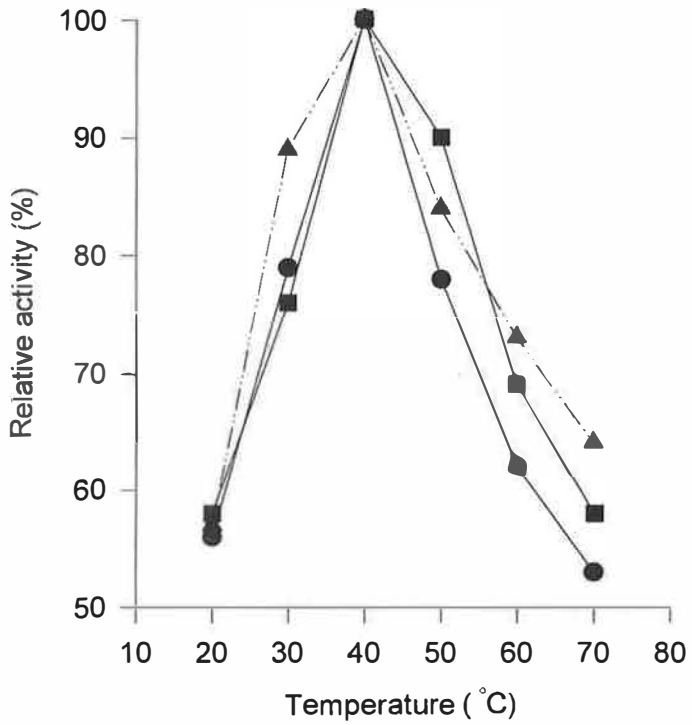


그림 4. *Lactobacillus* FEPB-5의 aminopeptidase, esterase, X-PDP에 미치는 온도의영향

● Aminopeptidase ■ esterase ▲ X-PDAP

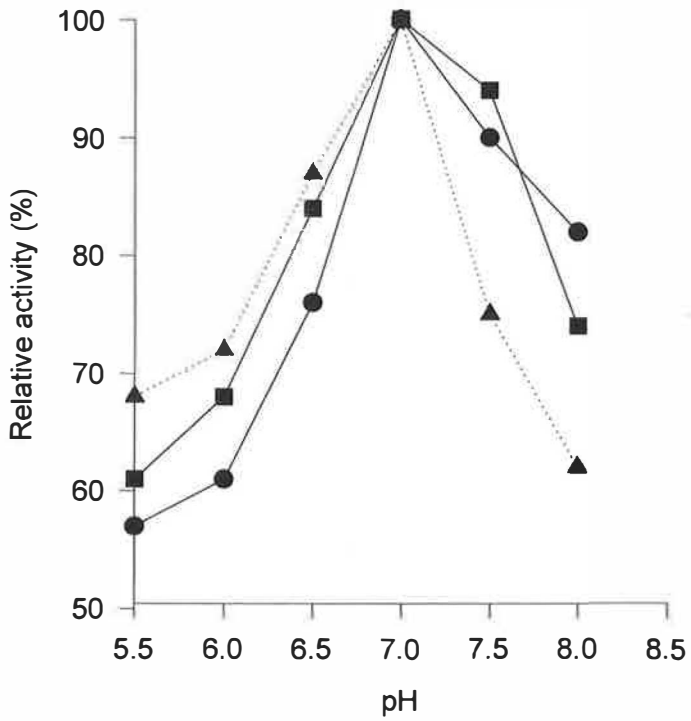


그림 5. *Lactobacillus* FEPB-5 의 Aminopeptidase, esterase, X-PDAP 에 미치는 pH의영향

● Aminopeptidase ■ esterase ▲ X-PDAP

Lactobacillus. casei ssp. *casei* LLG로부터 분리된 amino peptidase는 EDTA와 1.10-phenanthroline에 의해 활성이 저해를 받았고(Arora 등,1992), *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32로부터 분리된 X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase는 DFP에 의해 활성에 저해가 일어났으며 (Khalid 등, 1990b), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397로부터 분리된 X-PDAP는 PMSF에 저해를 받았다는(Atlan 등, 1990)보고가 있다.

표 6. 2가양이온과 저해제가 *Lactobacillus* casei FEPE-5의 효소활성에 미치는 영향

Compounds	농도(mM)	Relative activity(%)		
		Aminopeptidase	Esterase	X-PDP
Control	1	100	100	100
CaCl2	1	89	115	105
CoCl2	1	160	130	110
CuCl2	1	28	101	80
MnCl2	1	98	96	95
MgCl2	1	95	113	90
ZnCl2	1	73	103	80
EDTA	1	0	85	95
Cysteine	1	103	119	90
PCMB	1	88	54	97
DFP	1	85	15	30

EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid, PCMB = ρ-chloromercuribenzoate

DFP = diisopropylfluorophosphate

Lactobacillus fermentum DT 41의 esterase는 phenyl methylsulfonyl fluoride 및 Hg^{2+}, Ag^{+}에 의해 저해되나 Ca^{2+}와 Mg^{2+}에 의해 활성이 촉진되었다 (Gobbetti, 1997b).

4. 적요

풍미증진효소 생산균주로 선발된 *Lactobacillus* FEPB-5의 세포내 효소중 aminopeptidase, esterase, 및 X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase를 Fast Protein Liquid Chromatograph(FPLC)에 의하여 분리를 실시하였다. 사용된 방법은 조효소액을 황산암모늄에 의해 염석하여 40-90 %황산 암모늄 분획을 얻은 후에 음이온교환크로마토그라피(Mono Q HR 5/5컬럼), 소수성크로마토그라피(Phenyl Superose HR 5/5 컬럼) 및 겔여과크로마토그라피(Superose 12 10/30 컬럼)에 의해 분리정제를 실시하여 세방법 모두 세효소의 분리 순서는 차이가 있지만 분리는 할 수 있었다.

세효소의 효소학적 특징은 최적온도와 pH가 모두 37℃ 와 pH 7.0이었으며, 세효소 모두 Co^{2+}에 의해 활성화가 되었으나, amino peptidase는 Cu^{2+}에 의해 활성의 저해를 받았다. Ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)는 aminopeptidase를 완전히 저해하였으며, Diisopropylfluorophosphate(DFP)는 Esterase 와 X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase를 저해하였다.

제 3 절 효소 생산 최적화 조건 및 대량 생산 기술의 개발

1. 서론

최근에는 치즈생산을 위해 최종적인 풍미의 특성에는 차이가 없으면서 치즈 숙성기간을 단축시킬 수 있는 적합한 방법을 모색하게 되었다. 숙성촉진방법에 따라서 Temperature elevation, Increasing of cell numbers, Addition of enzymes 및 Slurry system 등으로 나누어 볼 수 있는데, 이중 효소첨가에 의한 치즈 숙성방법은 가장 가능성이 있는 숙성촉진방법으로 인정되고 있는 것은 치즈숙성과정에서 일어나는 주요 생화학적 변화들이 유당분해, 단백분해, lypolitic 및 esterolytic 효소들의 종합적인 작용에 의해서 일어나는 것이기 때문일 것이다.

체다치즈의 숙성촉진을 위한 효소로서는 *Eacillus subtilis*로부터 생산되는 Neutrase가 있으나, 이 효소는 단백분해력이 매우 강하여 종종 쓴맛(bitter flavor)을 생산하는 특성이 있다. 쓴맛을 제거하는데 유용한 peptidase와 함께 조제된 Accelase는 복합효소(enzyme cocktails)로 상품화 되어 있다. 강한 단백분해 효소 작용에 의해 나타나는 쓴맛의 제거에는 aminopeptidase나 X-PDAP가 중요한 역할을 담당하는 것으로 인정되고 있다. X-PDAP는 aminopeptidase에 의해서 분해되기 어려운 X-Pro-의 잔기를 갖는 아미노산이나 Pro-Pro결합을 분해하는 효소이며, proline을 함유하는 펩타이드들이 비교적 Q-value가 높기 때문에 이들 효소가 쓴맛의 제거에 매우 효과적인 것으로 밝혀지고 있다.

유산균의 효소를 이용한 치이즈 숙성에 관한 연구가 이루어졌다. *L. helveticus*로 숙성시켰더니 풍미가 좋아졌으며, 가열 또는 동결 처리한 *L. helveticus*로 숙성시켰더니 풍미가 좋아졌으며, 가열 또는 동결처리한 *L. helveticus*를 첨가하였을 때 숙성이 촉진되었다(Frey 등, 1986 a.b ; Eartels 등, 1987, Ardo 등, 1988). 또한 *L.casei*를 그대로 또는 가열처리한 후 첨가하여 치즈를 숙성시켰

더니 유리아미노산이 증가하고 texture가 개량 되었다.(El Soda등, 1991 ; Trepanier등, 1991 ; El Abboudi등, 1992), *L. casei* ssp *casei* LLG와 ATCC 393은 쓴맛을 지닌 pro-phe과 pro-ile에 대하여 활성이 강하므로 숙성치즈 중에 있는 쓴맛의 생성을 방지할 수는 균으로 선발되었다 (Arora등, 1990). 이외에도 Lactobacilli를 이용한 치즈숙성에 관한 연구(El Soda 등, 1981,1992 ; Marhaly 등, 1986 ; Puchades 등, 1989 ; Broome 등, 1990, 1991 ; Lee 등, 1990 a,b)가 있으며, 이중 *L. casei* ssp *casei* LLG의 조효소추출물을 EMC제조에 이용하였을 때 쓴맛과 산패취를 없앨 수 있었다는 연구(Park 등,1993)가 있다. 그러나 효소생산에 관한 연구로는 *L.casei* ssp. *casei*를 Skim Milk, Whey Permeate(SMWP)에 배양하여 Aminopeptidase 생산에 관한 연구(Choi 등, 1995, 1996, 1997)가 있다.

본 연구에서는 선발된 우수 균주의 배양조건 및 효소 생산성과 효소의 대량생산을 위한 유산균 배양 최적조건과 효율적인 효소 생산기술을 개발하여 풍미증진효소의 생산을 위한 자료를 얻고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 균주의 배양

균주는 10% skim milk 배지에서 배양한 후 -30℃에서 보관하였으며, 균주는 MRS배지에서 30℃, 16시간 2회 계대배양한 후 실험배지에 접종하였다. 즉 5 L 발효조(한국발효기제, 한국)에 배지 3 L에 사용균주 2%를 접종하여 37℃에서 70 100rpm으로 교반하면서 16시간을 배양하였다. 이때 20% NH_4OH로 용해한 20% Na_2CO_3 용액으로 pH를 6.0으로 유지하였다.

나. 균체의 회수

배양이 끝난 균체를 원심분리(10,000 × g 15분, 4℃)에 의하여 집균한다, 얻어진 균체에 50㎖의 20mM $CaCl_2$를 함유한 20mM β-glycero -phosphate(pH 7.0) 완충용액으로 두 번 세척하여 균체를 회수하였다.

다. 조효소액의 조제.

회수한 균체를 같은 양의 0.5mM $CaCl_2$를 포함한 0.01M Tris-HCl (pH7.5) 완충용액에 현탁한 후 현탁액 약 20㎖를 -10℃ 냉매로 냉각하면서 초음파파쇄기 (Fisher Model 550, Sonic dismembrator)로 30분간 처리하여 균체를 파쇄한 후 원심분리(15,000×g, 35분간, 4℃)하여 상등액을 취하여 얻었다.

라. 효소역가의 측정법

1) Aminopeptidase 활성의 측정

Arora등(1992)의 방법을 사용하였다.즉 16.4mM Leucine-p-nitroanilide의 MeOH용액 300㎕와 50mM 인산나트륨 완충용액(pH7.0) 300㎕와 조효소액 300㎕를 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응시킨다. 반응액에 30% acetic acid 용액 100㎕를 가한 후 410㎚에서 흡광도를 측정하였다. 효소역가 1 단위는 분당 410㎚에서의 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 규정하였다.

2) Esterase 활성의 측정

Lee 등(1990a)의 방법을 사용하였다. 즉 1.5 ㎜ p-nitrophenyl caprylate(C8)의 MeOH용액 300㎕와 50㎜ 인산나트륨 완충용액(pH 7.0) 300㎕와 조효소액 300㎕를 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응시킨다. 반응액에 30% acetic acid 용액 100㎕를 가한 후 반응액의 흡광도를 410㎚에서 측정하였다. 효소역가 1단위는 분당 410㎚에서의 흡광도 0.1을 증가시키는데 필요한 효소량으로 규정하였다.

3) X-prolyl dipeptidyl peptidase 활성의 측정

Khalid등(1990b)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 6.4㎜ Gly-pro-p-nitroanilide의 MeCH용액 300㎕와 50㎜ 인산나트륨 완충용액(pH 7.0) 300 ㎕와 조효소액 300㎕를 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응시킨다. 반응액에 30% acetic acid용액 100㎕를 가한 후 410㎚에서 흡광도를 측정하였다. 효소역가 1단위는 분당 410㎚에서의 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 규정하였다.

마. 단백질량의 측정.

시료의 단백질량은 BCA(Bicinchoninic acid) 단백질측정액(Pierce Chemcal Co., USA)을 이용하여 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다.

바. 균체량의 측정

균체를 원심 분리(10,000 × g 15분, 4℃)에 의하여 집균한다, 얻어진 균체에 50㎖의 20㎜ CaCl2를 함유한 20㎜ β-glycero- phosphate(pH 7.0) 완충용액으로 두 번 세척하여 얻어진 균체의 무게를 측정한다.

3. 결과 및 고찰

가. 효소생산의 최적화

1) *Lactobacillus* FEPB-5의 효소생산 배지 조건

효소생산을 위한 배지의 경제성을 조사하기 위하여 MRS배지, 10% 탈지유배지, 7.5 % 유청 기초배지들이 각 효소역가에 미치는 영향을 조사한 결과는 표1과 같다. 탈지유를 이용하거나 유청을 사용하여 배지를 만드는 경우, 효소에 따라 차이는 있으나 가능성이 나타났다.

표 1. 배지종류가 *Lactobacillus casei* FEPB-5의 균체량과 조효소 액의 효소역가에 미치는 영향

	MRS배지	탈지유배지	유청배지
균체량	15.4	12.0	7.2
Aminopeptidase (Leu pNA)	700	780	670
Esterase (p-nitrophenyl C6)	760	620	510
X-PCAP (Gly-pro pNA)	480	320	640

* 효소역가는 단백질 g당 효소단위로 표시

* X-PCAP : X-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase

표 1에서와 같이 조효소액의 효소역가중 Aminopeptidase는 탈지유 배지에서 높았으나, 균체량과 Esterase와 X-PCAP은 MRS배지에서 높았다.

2) 대량생산용 배지의 조성

대량생산을 위한 배지조건은 여러 가지 생장급원물질 등을 사용하여 최적

조건을 찾을 수도 있겠으나, 우선 배지의 가격을 고려하여 결정해야 한다. 따라서, 선발된 균주를 표2의 유청배지에 배양하여 다른 조성의 배지의 경우와 비교한 결과는 표 3과 같다.

표 2. 유청배지의 조성

Components	Amount
Whey powder	1.0%
Molasses	2.0%
Dextrose	0.4%
MgSO4	0.08%
KH2PO4	0.4%

표 3. 배지 조성에 따른 *Lactobacillus* FEPE-5의 균체량

(g/L)

배지명	균체량
MRS 배지	15.4
유청배지	6.0
유청배지 + peptone(0.25%)	6.7
유청배지 + MRS(0.4%)	10.4

표 3에서와 같이 MRS배지에 비하여 유청배지가 균체의 생산량이 낮은 수준임을 알 수 있었다. 그러므로 MRS배지의 조성을 토대로 각 성분의 단가를 낮추기 위한 연구가 수행되어야 할 것이다.

나. 대량 생산기술 연구

1) 생산배지

표 1과 표 3의 결과를 볼 때 MRS 배지가 가장 적합한 배지로 판단되나 시판품인 동결건조 분말 형태의 배지는 가격이 비싸기 때문에 MRS 배지조성의 변화와 사용원료의 대체를 통하여 배지 가격이 저렴한 MRS변형 배지에 관한 연구를 한 결과는 표 4와 같다.

2) 효소의 대량생산

(1) 균체 배양 및 회수

우수균주로 선발된 *Lactobacillus casei* FEPB-5균주를 MRS와 동일한 조성을 갖도록 조제한 medium에 접종한 500L fermenter에서 30℃에서 72시간 배양한 후, 5 ℃에서 17,000 × g로 30분간 원심분리하여 냉장상태의 10mM 의 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 2회 세척한다. 다시 균체는 동일 완충용액을 등량 첨가하여 희석하여 균체 현탁액을 얻는다. 필요에 따라 -20℃에서 보관한다.

표 4. 여러종류의 MRS 배지의 조성 및 효소 생산성

종류 / 조성	MRS(시판)	MRS(조제)	개변MRS
Peptone	10	10	10
Yeast extract	5	5	5
Beef extract	10	10	5
Glucose	20	20	20
β-Glycerophosphate			2
Tween 80	1	1	1
Triammonium citrate	5	2	2
Sodium acetate	5	5	3
K2HPC4	2	2	
MnSC4	0.05	0.05	
MgCl2			0.1
MgSC4	0.1	0.1	
CaCl2			2
D.W,	1ℓ	1ℓ	1ℓ
Aminopeptidase	1,312	1,287	927
Esterase	1,207	1,107	1,033
X-PCAP	1,444	1,257	1,168

(2) 균체파괴

고압균질기(Model 15MR, AFV Gaulin)를 사용하여 600kg/cm2의 압력으로 4회 전하여 균체를 파괴하였다. 고압균질기에서 유출되는 세포분쇄 추출액은 매 cycle마다 순환냉각기(Chiller-20, 오페론)를 통과시켜 추출액의 온도가 4℃가 유지되도록 냉각시켰다.

(3) 원심분리

회수한 파괴된 세포 현탁액을 5℃에서 17,000 × g로 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 얻었다.

(4) 황산암모늄에 의한 염석

얻어진 조효소액에 대해 황산암모늄을 40 %가 되게 첨가하여 원심분리에 의해 40%의 황산암모늄에 의해 침전된 단백질을 제거하였다. 그리고 황산암모늄이 90%가 되게 첨가하여 40-90% 황산암모늄 분획을 얻었다.

(5) 한외여과

상기 조효소액을 부분정제 및 농축하기 위하여 효소의 분자량에 의한 분리방법인 Ultrafiltration법의 조건을 검토하기 위하여 Microsep concentrator (Pall Gelman Sci., USA)를 이용하여 실험한 결과 분자량 30 200 kDa의 범위에서 분획하여 Aminopeptidase, Esterase, X-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase 모두를 분리할 수는 있었다, 이는 제2절의 겔여과크로마토그라피인 Superose 12 10/30 컬럼(Pharmacia, 스웨덴)을 통과한 용액의 효소 활성을 측정한 결과에 의해 얻은 분자량에 관한 결과와도 일치하는 결과로서 상기의 결과로부터 얻은 분자량의 결과와 향후 scale-up을 고려하여 MiniKros Sampler System (Spectrum,USA)에 의 해 10 - 400 kDa의 범위의 분자량을 갖는 단백질을 한외여과에 의해 얻었다.

그림 6. 풍미증진 효소제품

(A : 풍미증진효소액, B : 풍미증진효소분말)

(6) 효소제품 제조

한외여과를 한 효소액의 상품화를 위하여 액상 및 분말상의 풍미증진용 효소제품을 제조하였다.(그림 6 참조)

A B

(가) 풍미증진 효소액 B

한외여과를 한 효소액을 안정제인 glycerol를 50%되게 첨가하여 조제하여 풍미증진 효소액을 제조하였다.

(나) 풍미증진 효소분말

한외여과를 한 효소액에 sodium caseinate 20 - 40 %, Sucrose fatty acid ester 2 - 4 %, 덱스트린 20 - 40 %, 유당 20 - 40 %, NaCl 1 - 2 %를 첨가하여 풍미증진 효소분말 을 제조하였다.

다. 효소 제조원가

1) 생산배지 가격

유산균 생장용 배지인 MRS를 국내산 원재료들을 사용하여 400리터의 배양액을 제조하는데 소요되는 원료 원가는 표 5의 산출근거에 의해 400L의 배지로 배양을 하는데 소요되는 재료원가가 평균 340,940원이었다.

표 5. 원가절감용 대량생산 배지

원료명	제조 및 구입처	사용량	소요비용		비고
		400L	단가(원/kg)	금액	
Peptone	수입품	4kg	28,500	114,000	MRS베지(Difco, USA)을 사용하는 경우 : 가격 95,000원/500g 사용량 55g/L이므로 약10회(10L)물량 400L 배양시 금액 : 95,000원/통×배지40통 =3,800,000원 소요됨
Beef extracts	아이작식품	4kg	28,500	114,000	
yeast extracts	조흥화학	2kg	10,500	21,000	
제1인산칼륨	서도화학	400g	2,400	1,920	
제2인산칼륨		400g	2,400		
포도당	시중구입	8kg	1,500	3,000	
Tween 80	세운기계	400ml	36,000	14,400	
Ammonium citrate		800g	18,000	4,400	
Sodium Acetate		2kg	6,800	3,600	
MgSO4		40kg	24,000	960	
MnSO4		2g	30,000	600	
스타아터				43,960	
계				340,940	

이 결과는 3회의 생산과정을 통하여 얻은 결과로서 시판품인 MRS(Difco제, USA)에 의한 경우보다 배지단가가 90 %이상 절감 효과가 있었다. 이때 생산된 유산균 균체 50g에 600ml의 완충용액을 넣어 용해후 균질시켜 동량의 조효소액을 얻었으며, 이 조효소액을 400 90% 황산암모늄처리 후 원심분리하여 80%정도(약500ml)가 회수된다. 이를 다시 한외여과하여 농축하면 약30%의 retentate를 회수(약 150ml) 하였다. 따라서. 총 400 L의 배양액으로부터 약 30리터의 효소액을 얻게 되었다.

10,000g(총세포생산량)/50g(cell) x 150ml(UF완료후 효소액) = 30,000ml

2) 효소의 분리정제 비용 추정

한국생명과학연구소에 효소의 분리정제를 의뢰하는 경우 임가공비를 110만

원을 요구한다. 이 공정은 ① 균체농축, ② 세척, ③ 원심분리 ④ 균체파괴, ⑤ 원심분리, ⑥ 염석, ⑦ 한외여과에 의한 농축 등과 같은 공정을 거치게 된다. 자체생산비를 추정하기 위하여 유산균의 배지가격과 제조비용, 그리고 효소의 분리정제비용을 합산하면 총 1,566,280원이 소요되었다. 이때 효소생산량이 30L 이므로 효소의 가격은 52,209원/L인 것으로 계산되었다. 이때 제조경비는 인건비, 전기, 수도 등 제잡비를 포함한 비용이다.

4. 적요

풍미증진효소 우수균주로 선발된 *Lactobacillus casei* FEPB-5를 이용한 풍미증진 효소의 대량생산을 위하여 MRS배지, 탈지우유 배지, 유청배지에서 배양조건과 생산공정을 검토하였다.

배양 결과 MRS배지에서 균체량과 세 효소의 활성이 가장 높았다. 따라서 생산비용을 절감하기 위하여 MRS배지 조성을 기본으로 하고 재료를 교체함으로서 재료원가를 10%까지 감소시킬 수 있었다.

제조공정 중의 하나인 한외여과 공정은 분자량 10 - 400 KDa의 범위의 한외여과막을 이용하여 실시하였다.

제 4 절 참고문헌

Ardo, Y. and Pettersson, H. E.(1988) Accelerated cheese ripening with heat treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme. J. Dairy Res. 55:239-245.

Arora, G. and Lee, B. H.(1990a) Comparative studies on peptidase of *Lactobacillus casei* subspecies. J. Dairy Sci. 73, 274-279

Arora, G. and Lee, B. H.(1992) Purification and charactrization of

aminopeptidase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG. J. Dairy Sci. 75, 700-710

Arora,G. and Lee, B. H. (1994) Purification and characterization of aminopeptidase from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* s93. Biotech- nol. Appl.Biochem. 19:179-192.

Atlan, D. Laloi, P. and Portalier, R. (1989) Isolation and characterization of aminopeptidase-deficient *Lactobacillus bulgaricus* mutants. Appl. Environ. Microbiol. 55:1717-1723.

Atlan, D., Laloi, P. and Portalier, R. (1990) X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* : characterization of the enzyme and isolation of deficient mutants. Appl. Environ. Microbiol. 56:2174-2179.

Bartels, H. J., Johnson, M. E. and Olson, N. F. (1987) Accelerated ripening of Gouda cheese. I. Effect of freeze-shocked thermophilic lactobacilli and streptococci on proteolysis and flavor development. Milchwissenschaft. 42:83-88.

Broome, M. C. and Hickey, M. W. (1991a) Peptidase activity of non-starter lactobacilli. Aust. J. Dairy Techonl. May:19-23.

Broome, M. C. and Hickey, M. W. (1991b) Proteinase activity of non-starter lactobacilli. Aust. J. Dairy Technol.,May:12-18

Broome, M. C., Krause, D. A., and Hickey, M. W. (1990) The use of non-starter Lactobacilli in cheddar cheese manufacture. Aust. J. Dairy Technol.,Nov.:67-73.

Broome, M. C., Krause, D. A., and Hickey, M. W. (1991c) The use of proteinase negative starter and Lactobacilli in cheddar cheese manufacture. Aust. J. Dairy Technol.,May:6-11.

Castillo, I., Requena, T., Fernandez de Palencia, Fontecha J., and Gobbetti M.(1999) Isolation and characterization of an intracellular esterase from Lactobacillus casei subsp. casei IFPL 731. J. Applied Microbilolgy, 86:653-659

Choi H., Laleye L., Amantea G. F., and Simard R. E. (1996) Production of Aminopeptidase from Skim Milk Whey Permeate Medium by *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. J. Dairy Sci. 79:956-963.

Choi H., Laleye L., Amantea G. F., and Simard R. E.(1995). Enzymatic method to determine biomass in skim milk whey permeate medium. Biotechnology techniques. J Dairy Sci. 9(2):139-144.

Choi H., Laleye L., Amantea G. F., and Simard R. E.(1997) Release of aminopeptidase from *Lactobacillus casei* sp. *casei* by cell dist- ruption in a Microfluidizer. Biotechnology Techniques, 11(7), July:451-453

El Abboubi, M., El Soda, M., Pandian, S., Barreau, M., Trepanier, G., and Simard, R. E. (1992) Peptidase activities in debittering and nondebittering strains of lactobacilli and their implication in the cheddar cheese flavor development. Int. Dairy J. 2:55.

El Abboudi M., El Soda M., Pandian S., Simard R. E., and Olson N. F. (1992a) Purification of x-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus casei* subspecies. Int. J. Food Microbiol. 14:87-98.

El Abboudi M., El Soda M., Pandian S., Simard R., and Olson, N. F. (1992b) Partial purification and characterization of aminopeptidases from debittering and non-debittering strains of *Lactobacillus casei*. Milchwissenschaft 47:366-370.

El Abboudi, M., El Soda, M., Pandian, S., Simard, R. E. and Olson, N. F. (1992c) Purification of x-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus casei* subspecies. Int. J. Food Microbiol. 14:87-98.

El Abboudi, M., Lee, B. H.,and Simard, R.,(1992d) Accelerated maturation of cheddar cheese : Influence of added lactobacilli and comerciai protease on composition and texture. J. Food Sci. 57:898-902.

El Soda, M, Berger, J. L. and Desmazeaud, M. J.(1978b) Detection and localization of peptide hydrolase in *Lactobacillus casei*. J. Dairy Res., 45:519-524.

El Soda, M, Desmazeaud, M. J. and Berger, J. L.(1978a) Peptide hydrolase of *Lactobacillus casei* : Isolation and general properties of various peptidase activities. J. Dairy Res. 45: 445-455.

El Soda, M. (1993) The role of lactic acid bacteria in accelered cheese ripening. FEMS Microbiol. Rev. 12:239-252.

El Soda, M., and Desmazeand, M. J.(1982) Les peptide-hydrolases des lactobacilles du groupe Thermobacterium. I. Mise en evidence de ces activites chez *Lactobacillus helveticus, L. acidophilus. L. lactis* et *L. bulgaricus*. Can. J. Microbiol. 28:1181-1187.

El Soda, M., Desmazeaud, M., Abou Donia, S. & Kamai, N. (1981) Acceleration of cheese ripening by the addition of whole cells or cell-free extract from L. casei to the cheese curd. Milchwi- ssenschaft, 36:140-142.

El Soda, M., El Wahab, H.A., Ezzat, N., Desmazeaud, M. J. and Ismail, A.(1986a) The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. II. Detection of the esterase system of *Lactobacillus helveticus, L. bulgaricus, L. lactis* and *L. acidophilus*. Lait, 66:431-443.

El Soda, M., Fathallah, S., Ezzat, N., Desmazeaud, M. J. and Aboudonia S. (1986b) The esterolytic and lipolytic activities of lactobacilli. Detection of the esterase systems of *Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis* and *Lactoba- cillus fermentum*. Sci.

Aliments, 6:245-557.

El-Soda, M., Hantira, A. A., Ezzat, N. I., and El-Shafei, H. K. (1992) Accelerated ripening of Ras cheese using freeze-shocked mutant strains of Lactobacillus casei. Food Chemistry, 44, 179-184.

El Soda, M., Macedo, A., and Olson, N. (1991) Aminopeptidase and dipeptidyl peptidase activities of several cheese related micro-organisms. Milchwissenschaft. 46:223-226.

El Soda, M., Zeyada, N., Desmazeaud, M. J., Machaly, R., and Ismail, A. (1982b) The peptide hydrolases of the lactobacilli from the betabacterium group:Detection in *Lactobacillus brevis, Lacto- bacillus fermentum, Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus cellobiosus*. Sci. Aliment. 2:261.

Ezzat,N., El Soda, M., Desmazeaud, M. and Ismail, A.(1986) Peptide hydrolases from the Thermobacterium group of lactobacilli. II.Cheracterization of the intracellular exopeptidases. Le Lait 66:445-451.

Frey, J. P., Marth, E. H., Johnson, M. E. and Olson, M. F. (1986) Heat and freeze-shocking cause changes in peptidase and protease activity of *Lactobacillus helveticus*. Milchwissenschaft. 41:681-685.

Frey, J. P., Marth, E. H., Johnson, M. E., and Olson, M. F. (1986) Peptidases and proteases of lactobacilli associated with cheese. Milchwissesschaft 41:622-624.

Gobbetti, M. Fox, P.F. and Stepaniak, L.(1996) Esterolytic and lipolytic activities of mesophilic and thermophilic Lactobacilli Italian J. of Food Sci. 2:127-135.

Gobbetti, M., Fox, P.F. and Stepaniak, L (1997a) Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum*

2739. J. Dairy Sci. 80:3099-3106

Gobbetti, M. Smaccht,F. and Corseti, A.(1997b) Purification and characterisation of a cell surface-associated esterase from *Lactobacillus fermentum* DT41. Int. Dairy J. 7:13-21.

Habibi, M. B.and Lee B. H.(1994) Purification and characterization of X-prolyl dipeptidyl peptidase from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LLG Appl. Microbiol Biotechnol. 42:280-286

Hegazi, F. Z. and Abo-Elnaga, I. G. (1987a) Factors affecting the casenolytic activity of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. Nahrung, 31:199-206.

Hickey, M. W., Hillier, A. J. and Jago, G. R. (1983) Peptidase activities in lactobacilli. Aust. J. Dairy Technol. 38:118.

Khalid, N. M. and Marth, E. H. (1990a) Partial purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. Syst. Appl. Microbiol. 13:311-319.

Khalid, N. M., and Marth, E. H. (1990b) Purification and Partial Characterization of a Prolyl-Dipeptidyl Aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. Appl. Environ. Microbiol. 56:381-388.

Khalid, N. M., El Soda, M. and Marth, E. H. (1990c) Esterases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Dairy Sci. 73:2711-2719.

Khalid, N. M., El Soda, M., and Marth, E. H. (1991) Peptide hydrolases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Dairy Sci. 74:29-45.

Kok, J. (1993) Genetic of proteolytic enzymes of lactococci and their role in cheese flavor develcpment. J. Dairy Sci., 76: 2056-2064.

Kok, J. and Venema, G. (1995) Genetic manipulation of the peptidolytic

system in lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 5:737-755.

Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W. N. (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. In Lactic acid Bacteria : Genetics, Metabolism and Applications,eds, G.Verema, J.H.J. Huis in't Veld, and J. Jugenholz, Kluwer Academic Publisheres, Dordrecht,:91-125

Law, J. and Haandrikman, A. (1997) Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 7:1-11.

Lee, B. H., Hache, S., and Simard, R.E.(1986) A rapid method differentiation of dairy lactic acid bacteria by enzyme systems. J. Ind. Microbiol. 1:209-213.

Lee, B. H., Laleye, L. C., Simard, R. E., Holley, R. A., Emmons, D. B.and Ciroux, R. N. (1990b) Influence of homofermentative lactobacilli cultures on the physico-chemical and sensory properties of cheddar cheese. J. Food Sci., 55:386-390.

Lee, S. Y. and Lee, B. H. (1990a) Esterolytic and lipolytic activities of *Lactobacillus casei* subspecies. J. Food Sci. 55:119-122 & 126.

Marhaly, R., Ezzat, N., El-Soda, M., El Deeb, S., and Mostafa, F. (1986) Acceleration of Domiati cheese ripening by the addition of cell-free extracts from *L. casei* to the cheese curd. Indian J. Dairy Sci., 39:426-430.

Miyakawa H., Hashimoto I., Nakamura T., Ishibashi S. and Igoshi K.(1994) Purification and characterzation of prolyl aminopeptidase From *Lactobacillus helveticus* LHE-511. Milchwissenschaft 49.(11): 615-619.

Morichi, T., Sharpe, M. E., and Reiter, B. (1968) Esterase and other soluble proteins of some lactic acid bacteria. J. Gen. Microbiol. 53:405.

Park, S. Y., Arora, G., and Lee, B. H. (1993) Characterization of

Enzyme-Modified Cheese (EMC) flavor/aroma compounds. J. Dairy Sci. Supple. 1. 76:145.

Peterson, S. D. and Marshall, R. T. (1990) Nonstarter lacobacilli in cheddar cheese. A review, J. Dairy Sci. 73:1395-1410.

Puchades, R., Lemieux, L. and Simard, R. E. (1989) Evolution of free amino acids during the ripening of cheddar cheese containing added Lactobacilli strains. J. Food Sci. 54:885-888 & 946.

Trepanier, G., Simard, R., and Lee, B.H. (1991) a Effect of added lautobacilli on composition texture of cheddar cheese during accelerated maturation. Lactic acid bacteria relation to accelerated maturation. J. Food Sci., 56:696-700.

Visser, S. (1993) Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor. An overview. J. Dairy Sci. 76:329-350.

Wohlrab, Y. and Bockelmann, W. (1993) Purification and characterization of second aminopeptidase (pepC-like) from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B14. Int. Dairy J. 3:685-701.

제 3 장 단기숙성 치즈 및 EMC 치즈의 제조기술 개발에 관한 연구

제 1 절 단기숙성 치즈 제조기술 개발

1. 서론

1950년대초부터 경제적인 치즈생산을 위해 최종적인 풍미의 특성에는 차이가 없으면서 치즈 숙성기간을 단축시킬 수 있는 적합한 방법을 모색하게 되었다. 지난 50여 년간 이루어진 연구결과들을 숙성촉진방법에 따라서 Temperature elevation, Increasing of cell numbers, Addition of enzymes 및 Slurry system 등으로 나누어 살펴보면 아래의 표와 같다.

Temperature elevation방법은 치즈 원료유를 살균처리한 후 16℃이하의 온도에서 3 4개월간 숙성하는 방법으로서, 32주간 숙성시킨 대조구 치즈와 비교해 볼 때 단백분해수준은 12주간, 풍미생성과 조직발생은 20주간 지나서 같은 수준이 되었다고 한다(Aston, *et al*. 1985). 이 방법을 적용하기 위해서는 원료유의 품질이 매우 우수한 것을 사용하여야 하며, 병원성 미생물의 성장 가능성이 있다는 것이 문제점으로 지적되고 있다. 스타아터 또는 NSLAB 등의 생균 첨가수준을 높이는 방법은 강한 산풍미를 발생하는 문제점이 있어 산생성력을 억제하기 위한 방법으로서 heat-shock 또는 freeze-shock, spray dried cells 또는 lactose-negative strains의 이용 등의 attenauation방법들을 중심으로 연구가 이루어져 왔다.

그 중에서 가장 일반적인 방법으로는 heat shocking 방법이며, *L. helveticus*는 59 69℃에서, lactococci는 56.5℃에서 17초간 약 93 97% 의 산생성량 감소효과가 있었으며, 이때에 cell-wall proteinase나 aminopeptidase 등의 치즈단백분해 및 풍미물질생성에 관여하는 효소들은 15 30%의 활성감소가 있었다고 한다.

< 체다치즈숙성촉진방법 >

기간별	숙성촉진방법			
	Elevated temperature	Increased cell numbers	Addition of enzymes	Slurry systems
1975년 이전	Pasteurized milk, matured at 15℃	Living cells	Free enzymes	Anaerobic incubation (4 5 days at 30℃)
1975년 1995년	Pasteurized milk, Matured at 15℃ (1985)	Attenuated cells	Free enzymes (cheese related or non-cheese related) Encapsulated enzymes	Proteinase/ peptidase Lipase/lipolytic cream

*Lactobacillus*를 연속식 살균법으로 64℃에서 18초간 열처리하는 것이 적합하며, 이보다 2℃의 온도만 상승하여도 cell-wall proteinase나 aminopeptidase의 활성히 급격히 감소한다(Castaneda *et al*. 1990)고 하였고, 67℃에서 22초 열처리하면 단백분해효소계에는 거의 영향없이 24시간 동안 산생성이 지연된다(El Abboudi *et al*. 1991)고 하였다. Gouda치즈의 숙성에 freeze-shocking시킨 streptococci와 내열성 lactobacilli의 cell을 첨가한 결과 숙성 전 기간중 flavor intensity의 향상 뿐 만 아니라 bitterness의 감소효과도 수반되었다고 한다. Intracellular enzyme활성은 보유하지만 non-viable한 상태의 cell을 spray drying법으로 제조하여 실용화 되고 있으며, 추가적으로 첨가하는 미생물에 의한 치즈제조 공정의 변화를 방지하기 위해서 유당분해력이 없는 균종을 선발하여 캡슐화 시키기도 한다(Coulson, 등 1992).

산생성력을 소실한 유전적 변이균주도 치즈숙성 촉진의 한 방법으로 연구되었으며, 유당분해력 소실균주, 단백질 분해력 소실균주 및 peptidase분해력 소

실균주 등의 사용방법이 검토되었다. 그중에서 X-prolyl- dipeptidyl aminopeptidase (XPDP)소실 균주와 무소실 균주를 각각 치즈커드에 첨가한 후 숙성시켰을 때 수용성 질소화합물의 생성량이 60%이상 많았으나, TCA 또는 PTA 가용성 질소의 수준에는 차이가 없었으며, 관능점수에 있어서는 차이가 있었다고 하였다.

Slurry 제조에 의한 치즈풍미향상은 숙성촉진용 효소들의 능력을 알아보기위한 방법의 하나로 이용되기도 하였지만, 가공치즈, 스낵류, 제과 및 제빵 등의 풍미증진을 위해 첨가되는 첨가물질로서 이용되는 enzyme-modified cheese(EMC)의 생산방법으로 활용된다. Slurry 제조에 사용하는 방법으로서는 30℃에 가까운 온도에서 배양하는 과정중 오염미생물의 생장가능성 때문에 혐기적 상태에서의 배양해야 하는 등의 까다로운 조건을 요구한다.

효소첨가에 의한 치즈 숙성방법은 가장 가능성이 있는 숙성촉진방법으로 인정되고 있는 것은 치즈숙성과정에서 일어나는 주요 생화학적 변화들이 유당분해, 단백분해, lipolytic 및 esterolytic 효소들의 종합적인 작용에 의해서 일어나는 것이기 때문일 것이다. 슬라이스 치즈나 다른 식품의 풍미강화를 목적으로 제조하는 EMC치즈에 필요한 강한 풍미를 얻기 위해서는 조직이 crumbly해도 무관하기 때문에 효소를 사용하여 숙성을 촉진시키면 3개월 숙성된 치즈 풍미는 28일에, 12개월된 치즈(SSA가용성 질소 33㎎/DM g)는 46일만에(31㎎/DM g) 얻을 수 있다고 한다.

본 연구에서는 상업용 단백분해효소들과 선발된 젖산균을 대량생산하여 분리정제한 풍미증진 효소를 사용하는 단기숙성치즈 제조기술을 개발하고자하였으며, 효소 첨가단계를 나누어 제조실험한 단기숙성치즈의 관능평가와 조직특성을 비교하여 제조방법의 타당성을 확인하고자 하였다.

< 치즈숙성을 위해 고안된 방법들 >

	Heat-shock	Freeze-shock	Spray-dried cells	Modified strains
실험적 방법		*Lb.heveticus* (Khalid, 등. 1991)	균체외 효소를 가진 사균체 (Johnson와Etzel., 1991)	XPDP*-부재균주 (El Aboudi, 등. 1987)
실제적 방법	*Lb. heveticus* (Pettersson와 Sjostrom,1975) Lactococci (Exterkate, 등, 1987) *Lactobacillus* (Castaneda, 등, 1990; El Abboudi, 등, 1991)	Gouda cheese에 적용 (Bartels, 등.1987)		캡슐화한 lactose-negative strains (Coulson, 등. 1992)

* XPDP : X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase

2. 재료 및 방법

가. 원료유

Cheddar cheese 제조용 원료유로는 연암축산원예대학 실습농장 초식가축과에서 생산하는 아침착유 우유와 저녁착유 우유를 혼합사용하였으며, 실험목적에 따라서 개체우별 우유, 혼합유 또는 저녁착유 우유를 사용하였다.

나. 숙성촉진 효소

협동과제 연구기관(충청대학)으로부터 MRS broth에서 생육시킨 *Lactobacillus casei* FEFB-5균주로부터 추출한 ammonium sulfate 침전처리한 후 salting out시킨 조효소액을 공급받아 -20℃로 보관하면서 사용하였다. 숙성촉진효소 첨가방법은 상기의 조효소액을 1℃의 얼음냉각수에서 해동하여 제다치즈 제조공정중 체다링된 커드매트를 2 3㎝ 크기로 분쇄한 후 커드의 온도가 30℃를 유지하는 상태에서 가염하기 직전 치즈 10kg당 20㎖ (효소활성 3,000 unit)를 가하여 골고루 혼합한다. 가급적 빠른 시간내에 가염완료된 치즈를 hooping하여 예비압착을 실시하였다. 그후 일반 치즈제조공정과 동일한 방법으로 plastic flm으로 진공포장하였다.

다. 단기숙성치즈 제조법

200L 용량의 pilot용 치즈 배트에 원유 100L 내지 200L를 여과시켜 채운 후 65℃에서 25분간 저온살균처리하여 남양유업(주)의 체다치즈 제조공정에 준하여 제조하였다. 압착 15시간 후 치즈를 mould에서 꺼내어 표면을 잘 다듬고 plastic film으로 진공포장하고 5℃의 저온 숙성실에서 숙성을 진행 시켰다

원유살균 63℃ 25분 LTLT

⇑

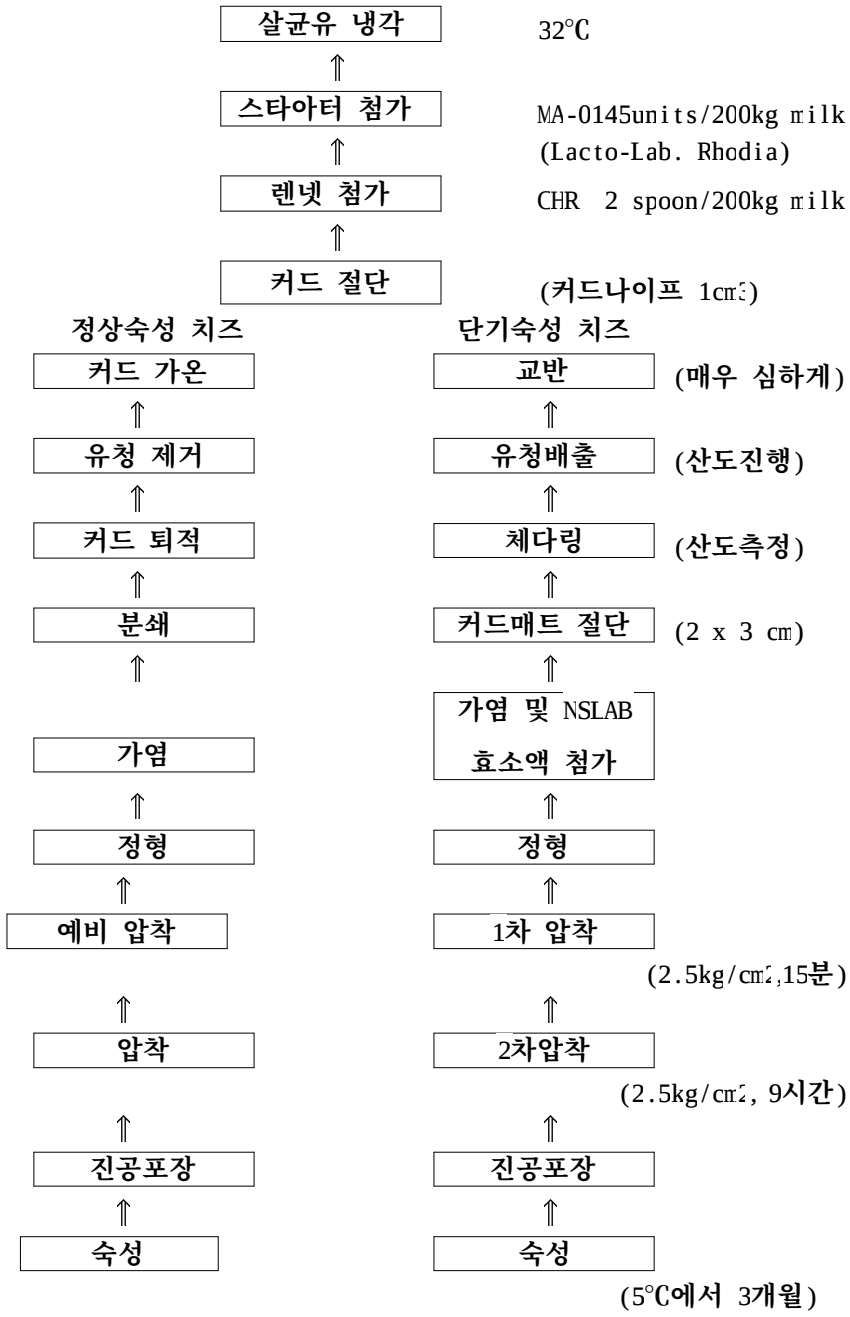


Figure 1. Flow chart for making the accelerated ripening of cheese

라. 분석방법

1) 원유 및 유청의 성분분석

적외선 유성분 자동분석기(Bentley 150)를 40℃로 가온한 10% RBS35 용액으로 4-5회 세척한 후 다시 가온한 증류수로 3회이상 세척하였다. 염점조정은 증류수를 3회 분석하여 얻은 결과의 허용오차 0.05%이내의 범위내에 들어올 때 우유시료를 분석하였다. 분석이 완료되면 다시 10% RBS35 용액과 증류수로 세척하였다. 자동분석된 유지방, 유단백질, 유당 이외의 성분인 무기물, 무지고형분, 총고형분의 함량과 Casein/Fat ratio는 분석기에 입력된 계산공식에 의하여 얻어진 결과를 사용하였다.

2) 치즈의 건물량 분석

적외선 수분 측정기(FD-600, Kett)를 사용하여 175℃에서 5분간 건조시킨후 수분함량을 구하여 치즈 건물량을 계산하였다.

3) 미생물 측정

원유의 미생물 수 측정은 원유 1㎖를 취하여 십진희석 한 후 표준한천배지(standard plate agar)에 접종하여 32 ℃의 온도에서 48시간 동안 배양하였을 때 균락을 형성하는 중온균의 수를 우유에 존재하는 총 미생물 수로 환산하였다.

치즈와 유청의 젖산균의 수는 MRS배지 또는 NaN_3를 함유하는 MRS배지상에 출현하는 전형적인 균락의 수로 표현하였으며, 총균수는 표준한천배지(standard plate agar)에 접종하여 32 ℃의 온도에서 48시간 동안 배양하였을 때 균락의 수를 계수하였다.

4) 치즈 숙성도 검사

치즈 숙성지표를 신속하게 결정하는데에는 Shilovich의 Ripening Index방법을 따랐다. 분쇄한 치즈 5g을 증류수 50㎖에 넣어 2 3분간 균질하고 Whatman

No. 40 여지로 여과 시켜 냉각하고, 10㎖ 분획에는 thymolpthalein(500㎎/100㎖ ethyl alcohol) 1㎖을, 다른 10㎖ 분획에는 phenolphthalein(250㎎/100㎖ ethyl alcohol) 0.5㎖과 각각 첨가하였다. 각 삼각 flask에 들어 있는 용액을 0.1N NaCH용액으로 각각 blue color 및 pink color로 변색될 때까지 적정하여 두 용액의 적정량의 차로 숙성지표를 삼았다.

5) pH 및 적정산도의 측정

콤비네이션 유리전극(Model Accumet)이 달린 마이크로프로세서 pH/millivolt meter(Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 치즈슬러리 및 EMC치즈의 pH를 측정하였고, 콤비네이션 spear-tip 전극(Kinhe 7120BN, Orion Research Inc.)을 장착한 pH meter(Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 단기숙성 체다치즈의 pH를 측정하였다. 제공된 송곳으로 치즈에 hole을 낸 후 약 20㎜ 깊이로 전극을 삽입하여 측정하였으며 3회 측정한 평균값을 구하였다.

치즈제조용 우유 및 커드절단후에 생산되는 유청 등은 FAC의 적정산도 측정법에 준하여 9㎖의 시료중 함유된 젖산의 함량을 우유 또는 유청 100㎖중 젖산의 g수로 표현하였다.

6) 소금농도 측정

Chloride전극을 장착한 휴대용 salt meter(Ebro)를 사용하여 치즈, 치즈 슬러리, EMC치즈 등의 소금농도를 구하였다.

7) Proximate 분석

표면으로부터 1㎝지점 및 심층내부 두 부위의 치즈시료를 치즈나이프로 베어낸후 알루미늄 호일에 약 0.5 1.0g 정도를 넣고 반을 접어서 둥근 유리봉을 굴려서 알루미늄막에 얇게 편 후 적외선 수분측정기(FD-600, Kett)에서 170℃에서 5분간 가열하여 제거되는 수분함량을 측정하였다.

8) 치즈 조직측정

TPA(texture profile analysis), 압착력(compression force), 시험을 Texture analyser (TA-XT2i, Stable micro systems Ltd. UK)를 이용하여 측정하였다. 모든 시험항목에는 5kg의 load cell를 사용하였다.

시료처리는 7종의 치즈를 직경 16㎜의 staninless steel 관을 이용하여 원통형으로 치즈를 뽑아낸 후 길이를 2㎝로 동일하게 잘라 5반복하여 실험을 실시하였다. TPA 실험은 직경 5㎜인 cylinder probe (P/5)를 이용하였고, 압착력은 sms p/35를 이용하여 실험을 실시하였다. 측정 조건은 Mode; TPA, Pretest speed; 5㎜/s, Test speed; 2㎜/s, Posttest speed; 5㎜/s, Distance: 10㎜, 15㎜ Trigger type; Auto, Trigger type force; 5g으로 하였다. TPA 측정항목으로서 Hardness (g), adhesiveness (g*s), springiness, cohesiveness, gumminess, chewiness, resiliense는 MHK Trading Co.(UK)에서 제공한 texture analyser software(version 1.12)를 이용하여 계산하였다. Gel strength는 TPA에 의해 형성된 첫 번째 curve에서 최초 peak까지의 힘(g)과 이때까지 이동된 거리(㎝)를 곱한 값으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 체다치즈의 특성

체다치즈의 영양적, 물리적 특성은 치즈 숙성월령에 따라서 변하게 된다. 체다치즈의 숙성월령에 따른 종류는 young, medium, old 체다치즈로 구분되지만, 체다치즈의 숙성월령에 대하여는 가공치즈 생산회사들 이외에는 국내 일반 소비자들의 판별능력은 매우 낮은 편이다. 따라서, 본 연구진행에 필요한 숙성월령 평가에 필요한 panel요원의 훈련과 향후 진행될 단기숙성치즈의 숙성지표로 사용하고자 선택한 Shilovich ripening index에 의한 숙성도 구분표를 작성하였다.

1) 관능검사요원들의 훈련

차후 단기숙성치즈의 숙성월령을 평가하기 위한 panel 요원들의 훈련을 위하여 실험생산된 체다치즈는 물론 제조처가 다르고 숙성연령도 다른 4 종류의 치즈에 대한 관능평가를 실시한 결과는 표1과 같다.

맛, 향미, 조직 등에 관한 관능검사의 결과를 보면, 맛에 있어서 숙성월령에 따른 차이를 인식하고 있는 것으로 나타났으며, 향미에 있어서는 숙성월령에 따른 향미의 강도는 인정했으며 선호도에서는 숙성월령이 진행될수록 높아지는 것으로 나타났고, 조직중 외관이나 저작감에 있어서 국산치즈나 실험제조된 치즈보다는 4개월 숙성된 외국산의 것이 우수한 것으로 평가 되었다. 동일한 월령의 체다치즈를 국내산과 국외산으로 비교한 결과 국외산 체다치즈에 대하여 1순위로 선택한 평가자들이 많았다. 이 결과는 실험용 체다치즈의 제조공정뿐만 아니라 단기숙성 방법에 고려해야할 사항으로 평가된다.

Table 1 Evaluation of the taste of Cheddar cheese with different

manufacturer by pannelist

관능 점수	호주체다 (4개월)	국산체다 (4개월)	연암체다 (3개월)	연암체다 (1주일)
맛	88	64	49	51
냄새	66	69	60	43
조직	43	33	33	34
순위	1	2	3	4

* 각 항목별 관능점수는 총 관능평가자의 점수를 합산한 것임.

2) 치즈 숙성지표의 설정

치즈 숙성도는 숙성월령에 의해서 결정되는 것이 지만 숙성조건에 따라 변화될 수 있다. 따라서, 단기숙성용 치즈를 제조하는데 있어서 숙성도를 객관적으로 확인해야 할 필요가 있게 된다. 그 방법으로서 SRI(Shilovich의 Ripening Index)법을 신속 숙성지표 설정수단으로 설정하여 숙성개월령이 각기 다른 치즈의 숙성지표를 측정한 결과는 표 2와 같다.

이 결과로부터 얻은 회귀직선식을 이용하여 SRI값이 0.5 이하인 경우는 young cheese, 0.5 이상 0.8이하인 경우 medium cheese, 0.8이상 1.0 범위의 치즈는 old cheese, 1.0이상인 경우에는 extra-old cheese로 분류할 수 있었다.

나. 단기숙성치즈 제조기술 개발

지난 50여 년간 이루어진 연구결과들을 숙성촉진방법에 따라서 온도상향조정법(Temperature elevation), 생균첨가방법(Increasing of cell numbers), 효소첨가방법(Addition of enzymes) 및 슬러리법(Slurry system) 등으로 나누어 볼 수 있다(박, 1999). 여러 방법들 중에서 효소첨가에 의한 치즈 숙성방법은 가장 가능성이 있는 숙성촉진방법으로 인정되고 있다.

Table 2. Ripnening ages of accelerated ripened Cheddar cheese by

Shilovoch ripening index

개월령	제조일	A	B	숙성지표 (A-B)	숙성도
1개월이내	99/3/15	1.30	1.20	0.1	young cheese
1개월	2/28	1.32	1.07	0.25	young cheese
2개월	1/27	1.44	1.00	0.44	young cheese
3개월	98/12/27	1.80	1.26	0.54	medium cheese
4개월	11/25	2.20	1.63	0.57	medium cheese
5개월	10/7	2.30	1.55	0.75	medium cheese
6개월	9/2	2.80	1.87	1.05	extra old cheese
7개월	8/25	2.50	1.63	0.87	old cheese
8개월	7/19	2.80	1.87	0.93	old cheese

* A : Thymolphthalein을 지시약으로 할 때 0.1NaOH의 적정량(ml수)

** B : Phenophthalein을 지시약으로 할 때 0.1NaOH의 적정량(ml수)

그 이유는 치즈숙성과정에서 일어나는 주요 생화학적 변화들이 유당분해, 단백분해, 지방분해효소들의 종합적인 작용에 의해서 일어나는 것이기 때문이다.

효소첨가에 의한 단기숙성치즈의 제조법은 Hansens'사의 Flavour Age법과 Miles사의 Nature Age법과 같이 살균이 끝난 치즈원료유에 첨가하는 방법이 있으며, 다른 방법은 Imperial Biotech사의 Accelase나 Novo사의 Neutrase 사용방법으로서 체다링이 끝난 후 가염과 동시에 효소를 첨가하는 방법이 일반적으로 실시되고 있다(이, 1999).

1) 제조공정 변화에 의한 단기숙성치즈제조기술

체다치즈 제조공정에 새로운 공정을 추가하는 것보다는 공정을 약간 수정한 후 효소를 첨가하는 방법을 모색하였다. 효소 첨가단계는 첨가 단계를 여러 단계로 나누어 제조실험함으로써 단기숙성치즈의 제조방법을 개발하고자 시도하

였다.

2) EMC용 효소를 이용한 숙성촉진 실험

EMC제조용 4종류의 대상효소를 체다치즈 제조중 압착 직전 과정에 첨가하여 숙성촉진효과를 확인하였다.

Table 3 Modification of processing steps for making the accelerated ripened cheese

공정	내용		효소종류	내용	
	수정전	수정후		수정전	수정후
교반시간	60분 90분	단축	실험생산 효소	무첨가	생균
커드절단	무첨가	생균/효소첨가			조효소
					부분정제효소
매트절단	무첨가	생균/효소첨가	상업용 효소	무첨가	Neutrase

이들 4종류의 단기숙성치즈들은 신속 숙성도 측정법에 의한 숙성촉진치즈의 숙성월령을 조사하여 관리기법으로서의 적합성을 계속 확인중에 있다. 표 3-9는 제조한 단기숙성치즈(ARC)의 실데월령과 숙성월령을 비교한 것으로서 ARC1,2,4는 5 6개월령의 숙성도를 보이고 있으며, ARC3은 12개월령 수준의 숙성도를 보이는 것으로 나타났다.

다. 단기숙성치즈의 이화학적/관능적 특성

1) 물리화학적 변화

4가지 다른 처리를 한 단기숙성치즈의 물리화학적 변화들은 다음의 그림 2, 그림 3, 및 그,림 4에 각각 정리하였다. PH의 변화, 수분함량,소금함량등은 숙성기간중 정상숙성치즈와 유사한 경향들을 보였다.

Table 3. SRI index of experimental accelerated ripened cheese

항목		정상숙성치즈		단기숙성치즈			
		2/23제조	3/22제조	ARC1	ARC2	ARC3	ARC4
숙성도	실제월령	2개월	1개월1주	2개월	2개월	2개월	2개월
	SRI	0.3	0.18	0.65	0.75	1.15	0.70
	숙성월령	young	young	medium	medium	extra old	medium
수분함량		41.2%	41.5%	43.7%	41.4%	42.5%	39.3%
pH		5.01	5.10	4.95	5.01	5.00	4.98
NaCl		1.07	1.13	1.10	1.12	1.12	1.14

Figure 2 The changes of pH of ARC cheese during accelerating ripening

Figure 3 The changes of moisture content of ARC cheeses during accelerated ripening

Figure 4 The changes of salt content of ARC cheeses during accelerated ripening

2) **미생물학적 변화**

Figure 5 The changes of total bacterial counts of ARC cheeses during accelerated ripening

Figure 6 The changes of lactic acid bacteria of ARC cheeses during accelerated ripening

생균을 첨가한 단기숙성치즈는 *L. casei* LLG의 생균이 단기숙성에 관여하는가를 간접적으로 확인하기 위하여 총균수(그림 5)와 젖산균수의 변화를 조사하고, 스타아터 젖산구균과 non-스타아터 젖산간균의 치즈커드와 유청용액중의 분포율을 추적해 본 결과 표 6과 그림7과 같이 젖산구균은 유청용액에서 주로 발견된 반면, 젖산간균은 치즈커드에서 많이 발견된 사실로 보아 젖산간균이 숙성에 관여하고 숙성촉진에 도움을 줄 수 있을 것으로 나타났다.

Table 4 Portion of lactobacilli and lactococci in lactic acid bacteria in cheese curd and whey after addition of *L. casei* LLG

Cell counts (cfu/ml)	원유	커드		유청	
	SPC Agar	MRS	MRS+NaN3	MRS	MRS+NaN3
Total counts	2.4 x 106	7.8 x 106	11.6 x 106	1.7 x 106	1.6 x 106
Lactobacilli	7/10	9/10*	9/9	2/7	9/10
Lactococci	3/10	1/10	0/9	5/7	1/10

* 각 배지로부터 임의로 선정한 10colony를 그람염색하여 현미경으로 확인한 간균과 구균임.

그림 7은 치즈커드에 출현한 미생물중 총균수와 젖산균의 비율을 나타내주고 있다. 대조구에서는 5주까지 젖산균의 분포가 높았다가 7주후부터 급속하게 저하아였으며, 젖산균의 생균을 첨가한 치즈에서는 8주 이상까지 젖산균의 다른 실험구에 비하여 높은 수준을 유지하고 있었다.

Figure 7 The changes of ratio of lactobacilli and

lactococci of cheese curd.

3) 관능적 특성

다음의 관능검사는 각기 다른 숙성월령의 치즈를 사용하여 관능검사를 실시하였으며, 정상적인 체다치즈의 맛을 갖고 있는 외국산 체다치즈와 국내산 치즈를 각각 99년 1월 구입한 이후 동일한 숙성실에서 숙성하면서 8개월령때에 실시한 결과이다. 관능검사는 치즈의 맛(taste), 풍미(flavor), 및 조직(taste)에 대하여 실시하여 비교하였으며, 분석학적 비교는 주관과제연구기관에서 실시되었다.

단기숙성 체다치즈의 맛은 일반 효소숙성촉진치즈에서 결점으로 나타나는 쓴맛의 형성과 체다치즈 본래의 온화한 맛을 가지고 있는가를 중심으로 검사하였다. 표 5에서 볼 수 있는바 와 같이 외국산 치즈가 정상적인 맛을 지니고 있는데 반하여 국내산 체다는 효소의 첨가없이도 매우 쓴 맛을 나타낸 결과 점수가 가장 낮았으며, 단기숙성치즈의 경우 쓴맛이 느껴지기는 하나 대조치즈에 비하여 쓴맛이 훨 씬 덜하였으며, 그중에서 생균첨가구와 조효소액 첨가구가 쓴맛이 느껴지지 않을 정도였으며, 끝맛에는 체다치즈의 온화한 맛이 적절하게 나타났으며, 그 정도는 외국산 치즈 8개월령에 가까운 맛이었다.

Table 5 Pannel test for accelerated ripened cheese

숙성월령	치즈 종류							
	외국 치즈	국내 치즈	단기숙성치즈					
			대조구	생균	조효소	정제 효소	상업용 효소	혼합
1 주일	-	-	-	-	-	-	-	-
2 개월	-	-	-	-	-	-	3	3
3 개월	3	2	2	4	4	3		
4 개월	-	-						
8 개월	5	1						

*점수의 배정 : 1점 매우 좋지않음 - 5점 매우 좋음의 순으로 평가하였음.

단기숙성치즈의 향미(flavor)의 관능검사결과는 표 6과 같다. 향미특성은 숙성도의 진행에 따라 좋아지는 국외산 체다에 비하여 국산체다는 향미가 증가하지 않았다. 3개월된 단기숙성치즈는 맛과 조직특성에서는 숙성치즈와 같이 증가하는 경향이었으나, 향미의 진행은 비교적 낮은 편이었다.

Table 6 Pannel test for flavour of accelerated ripened cheese

숙성월령	치즈 종류							
	외국 치즈	국내 치즈	단기숙성치즈					
			대조구	생균	조효소	정제 효소	상업용 효소	혼합
1 주일	-	-	-	-	-	-	-	-
2 개월	-	-	-	-	-	-	3	3
3 개월	3	2	2	3	3	3		
4 개월	-	-						
8 개월	5	2						

*점수의 배정 : 1점 매우 좋지않음 - 5점 매우 좋음의 순으로 평가하였음

Table 6 Pannel test for mouth feeling of accelerated ripened cheese

숙성월령	치즈 종류							
	외국산 치즈	국내산 치즈	단기숙성치즈					
			대조구	생균	조효소	정제 효소	상업용 효소	혼합
1 주일	-	-	-	-	-	-	-	-
2 개월	-	-	-	-	-	-	3	3
3 개월	4	1	2	4	4	2		
4 개월	-	-						
8 개월	5	1						

*점수의 배정 : 1점 매우 좋지않음 - 5점 매우 좋음의 순으로 평가하였음

숙성중인 단기숙성치즈의 입안에서의 조직특성 결과는 표 7와 같다. 가장 좋은 입안내 조직특성을 갖는 치즈는 8개월된 국외산 체다치즈였으며, 국산체다치즈는 숙성월령에 관계없이 모두 가장 저조하였다. 실험생산된 단기숙성치즈들은 제조방법에 따라 약간의 차이를 보였으며, 그중에서 생균과 조효소를 첨가한 실험구가 대조구에 비해서 좋은 조직특성을 보였다.

4) 조직특성의 변화

R. Scott에 의하면 체다치즈의 전형적인 특성은 단단한 몸체(firm body), 치밀한 조직(close texture), 틈새가 없이 고른 절단면(uniformly free from slits or round holes), (깨끗한 견과향의 향미)Clean nutty flavor, 고른색상(even color), 질지않은 진흙(Pug not wet)같으며 고무같지도 않으며{nor rubbery(sweet)}, or 산이 많아 조각으로 흩어지지 않는{chalky(acid)}, 또는 지방이 적어 코르크같이 푸석한 조직이 아닌{corky(short of fat)}것으로 언급하였다.

치즈의 조직특성을 기기학적 분석결과로 구한 결과는 표 3-14와 3-15와 같다. 표 8의 결과는 각각 제조일자가 다른 체다치즈들의 여러항목의 조직측정치를 보여주고 있다. 압착력(compress), 견고성(hardness), 부서짐성(fractuability), 점질성(gumminess), 및 저작성(chewiness)은 숙성 주수가 지남에 따라 감소하였지만, 21주된 체다의 조직특성은 다른치즈의 숙성월령과 많은 차이를 보여주고 있다.

표 9의 결과는 단기숙성치즈의 하나인 Neutrase를 사용하여 제조된 것으로서 동일자에 제조된 정상숙성치즈와의차이점을 보여 주고 있다. 단기숙성 치즈는 정상 숙성치즈에 비하여 모든 특성이 숙성월령이 많은 치즈에 가까운 측정값을 보여주고 있다.

Table 8 The changes of textural properties during ripening periods for accelerattion of ripening of cheese

숙성 주수	Compress (g*cm)	Hardness (g)	Fracturability (g)	Adhesiveness (g*s)	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness	Resilience
4주	1290.4 ±249.7	582 ±59.4	642.9 ±30.6	-425.1 ±153.7	0.89 ±0.06	0.24 ±0.01	133.5 ±14.8	121.2 ±10.2	0.02 ±0.00
21주	1198.4 ±35.8	442.8 ±11.5	442.8 ±11.5	-1238.9 ±123.2	0.98 ±0.01	0.53 ±0.05	234.6 ±18.3	230.9 ±18.8	0.03 ±0.00
27주	375.2 ±13.7	305.7 ±49.6	318.4 ±54.8	-57.9 ±11.2	0.75 ±0.12	0.12 ±0.02	32.8 ±9.5	25.3 ±9.1	0.02 ±0.00
31주	709.7 ±79.1	344.7 ±48.4	344.7 ±48.4	-120.1 ±16.8	0.72 ±0.08	0.10 ±0.02	36.5 ±6.2	25.6 ±1.5	0.02 ±0.00

Table 9. Textural properties of ARC prepared with Neutrase

숙성 방법	Compress (g*cm)	Hardness (g)	Fracturability (g)	Adhesiveness (g*s)	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness	Resilience
단기 숙성	195.5 ±62.5	168.3 ±27.6	169 ±28	-198.6 ±23.6	0.67 ±0.11	0.19 ±0.02	28.6 ±2.3	21.2 ±3.4	0.02 ±0.00
정상 숙성	709.7 ±79.1	344.7 ±48.4	344.7 ±48.4	-120.1 ±16.8	0.72 ±0.08	0.1 ±0.02	36.5 ±6.2	25.6 ±1.5	0.02 ±0.00

4. 적요

체다치즈 제조에 사용하는 스타아터 유산균 및 외래의 non-starter 유산균총들에 의한 다양한 단백분해시스템에 의하여 체다치즈의 숙성이 이루어지고 있다. 숙성과정중 이들의 균형있는 작용을 유지하면서 치즈의 숙성기간을 단축하고자 하는 연구를 실시하였다.

적용한 단기숙성치즈 제조기술로 여러 종류의 단기숙성치즈(ARC)를 제조하여 정상숙성치즈와 비교하였을 때 제조방법에 따라 차이가 있으나 2개월령의 실제월령과 숙성월령을 비교하였을 때 ARC 1,2,4는 5 6개월령의 숙성도를 보이고 있으며, ARC 3은 12개월령 수준의 숙성도를 보이는 것으로 나타났다. 단기숙성치즈는 쓴맛이 느껴지기는 하나 대조치즈인 국내산 치즈에 비하여 쓴맛이 훨씬 덜하였으며, 그중에서 3개월령된 *L.casei* FEPE5 생균 첨가구와 조효소액 첨가구가 쓴맛이 느껴지지 않을 정도였으며, 끝 맛에는 체다치즈의 온화한 맛이 적절하게 나타났으며 외국산 치즈 8개월령에 가까운 맛이었다. Neutrase를 사용하여 제조된 단기숙성치즈는 동일 제조된 정상숙성치즈와 조직상의 특성을 비교하였을 때 단기숙성 치즈에 비하여 모든 특성이 숙성월령이 많은 정상 숙성치즈에 가까운 결과를 얻었다.

제 2 절 EMC 제조기술 개발

1. 서 론

EMC(enzyme modified cheese)치즈는 잘 숙성된 natural 치즈의 풍미를 갖도록 정상적인 제조방법이외의 추가적인 가공공정 또는 첨가물의 사용으로 제조되는 다른 형태의 치즈의 한 부류라고 보기도 하며, 또는 치즈향을 가진 식품첨가물로서 간주되기도 한다. EMC치즈의 제조방법은 정상적인 치즈제조과정중 다종류의 효소나 스타아터를 사용하는 공정으로 변형시켜 전통적인 숙성과정중에 일어나는 변화를 촉진시키는 조절된 숙성법을 적용하여 일정한 풍미를 균형있게 생산토록 한다. 이때에, 치즈의 형태중에서 조직상으로는 냉장온도중에서도 페이스트상이며, 건조한 분말의 형태로 제조되기도 한다.

EMC치즈를 응용하는 방안으로는 가공치즈의 풍미를 향상시켜 주는 목적으로 사용되거나 모조치즈 치즈스프레드 치즈딥(Cheese dips)에서 치즈풍미를 가해주는 목적으로 사용되며, 치즈sauce, 샐러드 드레싱, 베이커리용(스낵류, 크랙커, 비스켓), 건조치즈분말, 피자 sauce 등의 가공식품조제용으로 사용된다. 이러한 용도로 사용될 때에는 고형분으로서 보다는 적은 양(대략 0.5% 2.0%)의 치즈 사용에 따른 풍미감소를 만회할 목적으로 사용된다고 볼 수 있다.

EMC치즈 제조에 있어서 산업적 문제로 지적되는 것은 강한 단백질 분해효소 사용에 의해서 생성되는 쓴 맛(bitter taste)에 관한 것이다. 쓴 맛을 구성하는 물질들은 아미노산, 아민류, 아마이드류, 케톤류 등에 의한 것으로 보고되고 있다(Ney, 1979). 쓴 맛이라는 개념의 정립은 아미노산 잔기가 에탄올로부터 물로 전이되는 자유에너지(free energy of transfer)로부터 계산하기 시작하였고(Tanford, 1962), 그 계산값에 대하여 소수성이라는 표현을 사용하였으며(Cumhill, 1962), 현재에는 Q-value라는 개념을 사용하고 있다(Ney, 1971).

쓴 맛 펩타이드는 치즈단백질중 β-casein 또는 α-casein의 분해산물로서 생성되며, leucine, proline, phenylalanin, tyrosin, isoleucine, tryptophan등이 2400cal/mol의 높은 자유 전이에너지를 갖고있는 아미노산의 함량이 높거나, 아미노산 구조에 있어서 분해하기 어려운 구조를 갖고 있으며, 분자량은 100에서 6000달톤에 이르는 아미노산이 대부분을 차지한다.

본 연구에서 사용하는 Neutrase에 의해 생성되는 치즈의 쓴 맛 펩타이드의 구조적 특성에 대하여는 이미 밝혀져 있으며(박 등, 1995; 신과 박, 1998), 단백분해 효소의 종류, 사용수준 등 에 따라서 생성하는 쓴맛의 정도가 각각 다르기 때문에 본 연구에서는 제 2협동연구과제에서 선발한 젖산균의 펩타이드 분해효소를 사용하여 상업용 단백분해효소가 생성하는 leucine 과 proline을 함유하는 쓴 맛 펩타이드를 효과적으로 제거할 수 있는 조건을 찾아내며, 그 조건에 맞는 제조기술을 개발하고 실제로 제조된 EMC치즈를 관능적으로 평가하고, EMC치즈를 응용한 몇가지 치즈제품을 제조하여 산업적 평가를 하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 효소생산균주

제1협동과제 연구기관인 충청대학 연구진이 국내외에서 수집한 젖산간균중 peptidase활성이 가장 높은 *Lactobacillus casei* CC와 *Lactobacillus casei* LLG균주를 효소생산용 젖산균으로 선발하여 냉동건조한 것을 -18℃의 냉동실에 보관하였다. 사용하기 전에는 3회 계대배양하여 활력을 회복시킨 후 본 배양액에 접종하였다.

나. 사용 효소

1) 단백분해효소(endopeptidase)

*Eacillus subtilus*에서 추출한 상업용 효소인 Neutrase, *Aspergilus oryzae*로부터 추출한 복합단백질효소인 Flavourzyme, 그리고 Protamex 등의 3효소를 Novo Nordisk사로부터 구입하여 사용하였다.

2) 실험생산효소(exopeptidase)

가) 젖산균의 배양

실험생산효소는 제1협동과제 연구기관인 충청대학으로 전해받았다. 젖산균은 MRS와 동일한 조성을 갖도록 조제한 배지를 멸균시켜 500L fermenter에서 32℃에서 72시간 배양하였다. 배지의 멸균은 원료를 용해시킨 배양액을 발효탱크에 공급한 후 다시 98℃에서 30분간 가열처리 하였고 배양탱크 쟈켓에 냉각수(지하수 12℃)를 공급하여 32℃로 냉각시켰다.

실험실에서 배양한 400 ml의 *Lactobacillus casei* FEPB-5균주의 접종액(2%)을 본 배양액에 접종시키고 교반기로 처음 10분간 분당 30rpm으로 회전시킨 후 배양액의 온도가 32℃를 유지할 수 있도록 하여 72시간 배양시켰다.

나) 조효소의 생산

회수된 wet cell은 0.05M phosphate buffer용액(pH 6.8)으로 3회 이상 washing한 후 200ml 원심분리병에 나누어 저온원심분리하여 (Model Vision과학) washing된 cell을 다시 회수하였다. 약 8kg정도의 wet cell은 2kg씩 보관용기에 나누어 냉동실에 보관하면서 필요시 마다 해동시켜 동량의 0.05M phosphate buffer용액(pH 6.8)에 희석한 후 고압균질기(Model 15MR, APV Gaulin)를 사용하여 600kg/cm²의 압력으로 4회전하여 균체를 파괴하였다. 고압균질기에서 유출되는 세포분쇄 추출액은 매 cycle마다 순환냉각기(Chiller-20, 오페론)를 통과시켜 추출액의온도가 4℃가 유지되도록 냉각시켰다.

위와 같은 방법으로 준비된 조효소액은 ammonium sulfate 50% 농도에서 침전되는 분획은 버리고 60 90%농도의 ammonium sulfate용액에 침전되는 분획을 수집한 후 동시에 10개의 PD-10column (Phamacia)으로 탈염시켜 exopeptidase의 조효소액을 제조하였다.

다) 조효소의 부분정제

조효소액은 다시 Ultrafiltration technique를 사용하여 쓴맛을 제거하는데 관여하는 aminopeptidase 및 X-prolyldipeptidase, 그리고esterlorytic acitivity가 발견되는 효소의 분자량을 포함하는 30,000에서 100,000 kDa의 크기를 갖는 단백질 분획을 얻었다. 이 조효소액은 Leu- 및 Val- aminopeptidase 효소활성을 확인하여 사용하였다. 효소의 활성은 제 2 협동연구과제에서 실시한 방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

3) 지방분해효소(lipase)

Palatase (20,000L)는 NOVO Nordisk사의 것을 사용하였으며, Amano사의 *Fenicillium roqueforti*의 하면배양액으로부터 추출한 지방분해효소인 Lipase R 제품과 *Aspergillus niger*로부터 추출한 지방분해효소인 Lipase A 제품을 사용하였다.

다. 효소의 사용방법

단백분해효소(endopeptidase), 실험생산효소(exopeptidase), 지방분해효소(lipase) 등을 각각 단독 사용하고 동시에 실험생산효소+단백분해효소+지방분해효소 등을 혼합하여 사용하였다. 사용수준은 0.5 2.% 범위내에서 예비적으로 실험을 거친 뒤 관능적으로 가능한 수준을 정하였다. 효소의 사용순서는 단백분해효소, 펩타이드 분해효소, 지방분해효소의 순으로 첨가하였다.

라. EMC 체다치즈 제조공정도

Raw Cheese	4kg Green cheese curd(45% DM)
⇧	
Grinding	Grinder
⇧	
Formulation	water and emulsifying salts
⇧	
Emulsification	cooking at 80℃ for 7min
⇧	
Enzyme Addition & Fermentation	at 40℃ for 24 hr with endopeptidase
⇧	
Inactivation	at 80℃ for 5 min
⇧	
Cooling	down to 45℃

1) 원료치즈

EMC제조용 원료치즈는 연암축산원예대학 축산가공실에서 1차년도에 제조하여 숙성 1개월 이내에 냉동보관한 것을 냉장숙성실에서 1주일간 해동시킨 체다치즈를 사용하였다.

2) 원료치즈의 분쇄 및 용융

원료치즈를 분쇄하여 가공치즈 용융솥(Eastern사)에서 간접스팀과 직접스팀을 사용하여 용융시켰다.

3) 치즈 슬러리의 배양

용융된 치즈슬러리는 선정된 3종류의 효소를 사용하여 각각의 첨가량, 반응온도 및 반응시간 등을 고려하여 배양시켰다.

4) EMC 치즈 ingredients 의 제조

EMC 치즈를 응용한 제품들을 제조하기 위하여 배합표를 결정하여 EMC ingredients를 제조하였다. Paste상태의 EMC ingredients는 50℃의 열탕 에서 가온시키고 고압균질기(Model 15MR, APV Gaulin)를 사용하여 175kg /㎠의 압력으로 3회전하여 균질시켰다.

5) 치즈 및 EMC ingredients의 분말화

Taste 및 풍미의 표준이 되는 typical cheddar 치즈 및 균질시킨 EMC를 45%의 고형분농도가 되도록 당액을 첨가하고 분무건조기로 분말화 하였 다.

마. 분석방법

1) pH 및 적정산도의 측정

콤비네이션 유리전극(Model Accumet)이 달린 마이크로프로세서 pH /millivolt meter(Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 치즈슬러리 및 EMC치즈의 pH를 측정하였고, 콤비네이션 spear-tip 전극(Kniphe 7120BN, Crion Research Inc.)을 장착하여 단기숙성 체다치즈의 pH를 측정하였다. 제공된 송곳으로 치즈에 hole을 낸 후 약 20㎜ 깊이로 전극을 삽입하여 측정하였으며 3회 측정한 평균값을 구하였다.

치즈제조용 우유 및 커드절단후에 생산되는 유청 등은 FAC의 적정산도 측정법에 준하여 9㎖의 시료중 함유된 젖산의 함량을 우유 또는 유청 100㎖중 젖산의 g수로 표현하였다.

2) 소금농도 측정

Chloride전극을 장착한 휴대용 salt meter(Ebro Inc.)를 사용하여 치즈, 치즈 슬러리, EMC치즈 등의 소금농도를 구하였다.

3) Proximate 분석

표면으로부터 1㎝지점 및 심층내부 두 부위의 치즈시료를 치즈나이프로 베어낸후 알루미늄 호일에 약 0.5 1.0g 정도를 넣고 반을 접어서 둥근 유리봉을 굴려서 알루미늄막에 얇게 편 후 적외선 수분측정기(FD-600, Kett)에서 170℃에서 5분간 가열하여 제거되는 수분함량을 측정하였다.

4) 적외선 우유분석기

단백분해효소들에 의해 분해된 EMC 치즈는 paste상이 되어 지방과 수분이 분리되므로 175kg/㎠의 압력으로 균질을 실시하여 Bently사에서 제시한 시료처리 방법에 따라서 다음과 같이 준비하였고, 적외선 우유측정기의 menu program중 치즈품목에 해당되는 program으로 분석하였다.

분석시료의 측정과 보정은 Bentley 150 적외선 우유분석기내에 입력된 치즈

분석용 calibration을 사용하여 시료를 측정하였으므로 모든 성분에 대한 희석 배수 보정은 별도로 실시하지 않도록 되어 있으므로 display된 측정값을 그대로 사용하였다.

바. 관능검사

관능검사는 일반 관능 평가자들에 의한 검사와 산업체 해당업무 담당자들에 의한 검사로 나누어 실시하였다. 일반 관능요원들은 중앙대학교 대학원생, 한경대학교 대학원생, 연암축산원예대학에서 유가공학을 수강하는 학생들중에서 치즈제조실습을 3회 이상 실시한 재학생들중 관능검사를 자원하는 학생을 대상으로 실시하였다. 치즈산업체 종사자들은 치즈분말 제조업체, 스낵 제조업체, 치즈 유통업체에 종사자들로서 EMC치즈에 대한 기본이해가 있는 업무담당자들이었다.

EMC가 제조가 완료되어 충분한 냉각숙성이 이루어진 후 사전에 준비한 관능검사양식에서 종류별 맛, 냄새, 조직감 등의 차이를 구별할 수 있는가를 확인한 후 각 개별 시료에 대한 관능을 기술하게 하고 선호도를 표기토록 하였다. 선호도는 좋아하는 순서 또는 1점부터 5점까지 배점하여 가장 좋은 점수를 얻는 시료를 1점으로 하는 방법으로 정하였다. 관능검사결과는 통계적 처리에 의한 객관적 평가보다는 주관적 평가에 비중을 높이 두었다.

3. 결과 및 고찰

가. EMC치즈 제조용 효소의 선정

1) Endopeptidase의 선정

선정실험에 사용한 Neutrase는 *Eacillus subtilus* 또는 *Eacillus amyloliquefaciens*로부터 추출한 단백분해효소로서 45 55℃의 온도와 pH 5.5 7.5에서 활성이 높으며, 중성의 pH에서 80℃에서 4분이상 가열하면 실활되는 특성을 가지고 있다. Flavourzyme은 *Aspergillus oryzae*로부터 추출한 fungal protease와 peptidase의 혼합제품으로서 가수분해도를 약하게 하여(사용량 5-10 LAPU/g) 쓴맛을 제거하도록 하거나 가수분해도를 심하게 하여(사용량 10-50 LAPU/g) 강한풍미를 갖도록 하는 상업용 효소이다. 효소의 특성은 pH 5.0 7.0이 혼합효소 작용에 최적이며, exopeptidase로서는 pH 7.0, 온도 50℃의 최적조건을 갖고 있다.

Table 1. Endopeptidase의 종류에 따른 EMC의 특성

숙성기간	항목	Endopeptidase의 종류*		
		Protemax	Flavozyme	Neutrase
1주 후	Flavour	매우 미약	매우 미약	매우 미약
	Taste	강한 쓴 맛	강한 쓴 맛	강한 쓴 맛
4주 후	Flavor	미약함	우수함	우수함
	Taste	강한 쓴 맛	쓴맛이 있으나, 치즈 맛이 있음	약한 쓴맛
종합결과		부적합	가능성 높음	가능성 있음

* 각 효소들은 0.5ml을 0.1M Phosphate buffer(pH6.8)로 10배 희석하여 500g의 치즈커드에 첨가하였음.

이 endopeptidase들은 EMC치즈 제조에 사용되는 효소들이지만 Neutrase는 단독 단백질 분해효소이고, Flavourzyme은 exopeptidase와 혼합된 복합효소이다. 따라서 이 효소들의 적절한 수준에서 사용하면 강한 쓴 맛을 초래하지 않을 가능성이 높은 효소들이다.

3 종류의 상업용 endopeptidase를 대상으로 선정실험을 하였다. 선정방법은 EMC slurry를 제조한 후 4주간 숙성한 후 flavor와 taste를 관능검사하여 선정하였다. 표 1에서 선정을 위한 관능검사 결과를 보면 예상돠 같이 flavozyme이 EMC치즈 제조에 가장 가능성 있는 exopeptidase로 선정되었으며, 그 다음은 Neutrase도 가능성이 높았다. 이러한 결과는 Flavourzyme이 보유하는 강한 endopeptidase활성으로 인하여 생성된 자유 전이에너지 수준이 높은 강한 쓴맛 펩타이드가 exopeptidase의 활성에 의해 자유 전이에너지 수준이 낮은 펩타이드나 아미노산으로 분해된 결과로 사료된다.

2) Exopeptidase의 선정

제2협동연구과제에서 선발된 2종류의 젖산간균으로부터 자체추출한 aminopeptidase(exopeptidase)를 대상으로 선정하는 실험을 실시하였다. Aminopeptidase에 대한 효소학적 특성을 제 2 협동연구과제의 결과에서 보면, Leucine-aminopeptidase활성이 높고 동시에 우유단백질에 많이 함유되어 있는 X-prolyldipeptidyl aminopeptidase의 활성도 비교적 높기 때문에 보통의 aminopeptidaserk 분해할 수 없는 쓴맛 펩타이드의 분해가 가능할 것으로 예상되므로 Flavourzyme 및 Neutrase로 제조한 EMC에 각각의 aminopeptidase를 첨가한 뒤 쓴 맛의 감소현상을 관능평가 방법으로 확인하였다. 그 결과 표 2와 같이 생산균주가 다른 두종류의 aminopeptidase를 첨가한 EMC들은 첨가하지 않은 것에 비하여 쓴맛이 다소 감소하였으나, 두 종류의 젖산균간 차이도 크지 않았다.

Table 2. Debittering effects of EMC prepared with different source of exopeptidase(LLG and FEPE-5)

관능특성	Flavourzyme			Neutrase		
	무첨가	LLG	FEPE-5	무첨가	LLG	FEPE-5
쓴 맛의 정도	치즈 맛이 있으나 쓰다	끝 맛이 씁쓸하다	끝 맛이 씁쓸하다	전체적으로 매우 쓰다	처음에만 쓴맛이 느껴진다	처 음 에 쓴 맛이 느껴진다
쓴 맛의 차이	-	적다	적다	-	있다	있다

3) Lipase의 선정

위의 실험에서 선정된 2종류의 단백분해효소들과 *L. casei* CC로부터 추출한 aminopeptidase로 제조한 EMC에 3종류의 상업용 lipase를 첨가하여 풍미증가효과를 알아보았다.

Palatase는 역겨운 풍미를 나타내어 가장 적합치 못한 것으로 나타났다. Amano사의 두 종류의 lipase는 Palatase보다 풍미의 발생은 약하지만 역겨운 풍미가 아닌 비교적 양호한 것이어서 가능성이 높았다.

나. EMC치즈 제조기술

1) EMC치즈 제조공정 개발

EMC치즈의 제조는 단백분해효소와 지방분해효소에 의해서 결정된다. 또한 이미 상품화된 EMC제조용 단백분해효소 제품들은 각각의 권장 제조방법이 제공되고 있다.

Table 3 Crpanoleptic evaluation of EMC prepared with different source of lipases

숙성기간	항목	Lipase의 종류*		
		Palatase	Lipase A	Lipase R
1주 후	flavor	불쾌한 냄새가 느껴짐	미약한 풍미	매우 미약
	taste	쓴맛	처음에만 쓴맛이 감지됨	처음에만 쓴맛이 감지됨
4주 후	flavor	입안에서 나오는 냄새가 매우 불쾌함	약한 치즈풍미	비교적 약한 치즈풍미
	taste	쓴 맛은 감지되나 역겨운 풍미에 의해 더욱 강하게 느껴짐	쓴맛이 있으나, 치즈 맛이 있음	쓴맛이 감지되나 치즈 맛이 느껴짐
결과		부적합	가능성 높음	가능성 있음

실제의 제조과정에서 오염기회의 부여라는 측면에서 모든 종류의 효소를 동시에 첨가하도록 되어 있다. 그러나, 예비적인 실험에서 동시첨가보다는 단계별 첨가가 쓴 맛 제거의 목적을 달성하는 데에는 더욱 효과적인 것으로 판정되었다. 또한 EMC치즈의 조직특성은 제조과정에 의해서 변화가 가능하지만, 단백분해에 의한 변화는 body의 상실을 초래하기 때문에 지방, 수분, 단백질의 분리현상이 초래된다. 따라서, 단백분해와 가열을 위한 열처리후 균일한 body를 갖게 하는데 균질과정을 거치는 공정을 추가하였다. 개발된 전체 제조공정의 흐름도는 그림 1 과 같다.

가) 치즈슬러리의 제조

EMC치즈 제조를 위한 첫 단계는 원료치즈를 잘게 분쇄하는 공정이다. 분쇄된 원료치즈는 가공치즈 용융솥(Eastern사)에서 직접스팀과 간접스팀을 사용하여 용융시켜야 한다(사진 1). 원료 체다치즈 사용량, 용융염의 사용량 및 용융솥

의 운전조건은 각각 아래의 표 4와 표 5와 같이 결정되었다.

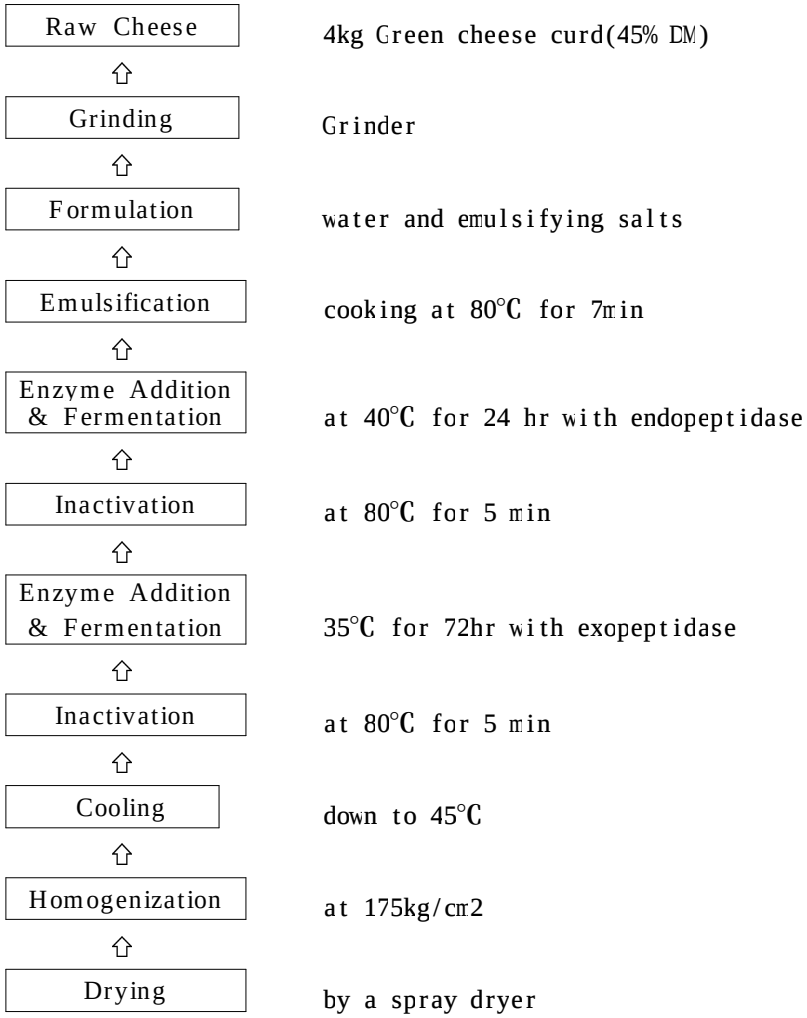


Figure 1 Flow chart of preparation of EMC cheese.

나) 치즈 슬러리의 분해

용융된 치즈슬러리는 효소들을 사용하여 분해과정을 거치게 되는데 분해과정은 EMC치즈 제조에 있어서 가장 중요한 공정이다.

Table 4. Formulaion for emulsifying of raw cheese

원료 명		첨가량	사용비율(%)	비고
체다치즈		5,000g	94.78	숙성 1개월이내
용융염	Joha C	45g	0.85	숙성도에 따라서 조정 (final pH 5..50)
	Joha T	30g	0.57	
물	응축수	100㎖	1.90	
	첨가수	100㎖	1.90	
계		5.275kg	100.00	

제조에 사용한 효소의 종류, 첨가량, 반응온도 및 반응시간 등의 조건은 표 6과 같이 결정되었다.

Table 5. Operation conditions of preparation of EMC slurry

운전단계	가열온도	가열시간	교반속도
Kettle 살균	스팀온도 100 ℃	10분	
원료치즈 첨가		2분	저속
용융염 첨가		30초	중속
1차 용융	치즈온도 85℃	1분30초	중속
정제수 첨가			
2차 용융	치즈온도 85℃	2분	고속

표 6에서 단백분해효소의 첨가단계와 peptidase와 lipase의 첨가단계를 나누어 단백분해효소를 열처리에 의하여 불활성화 시킴으로서 효소단백의 분해를 방지하였다. 효소단백의 분해는 쓴 맛을 제거하거나, 풍미의 균형에 필요한 유리지방산의 생성에 요구되는 효소의 활성을 낮추는 작용을 한다. 가열과정은 또한 높은 온도에서 반응하는 기간중 오염균의 생장을 억제하는 효과도 얻을 수 있는 잇점이 있다. 반응시간을 8시간으로 비교적 짧은 반응시간을 사용한 것은 장시간의 효소반응으로 인한 심한 단백분해로 인하여 생성되는 쓴 맛 펩타이드의 대량생성을 피할 수 있도록 하기 위한 것이다. 반응조건중에서 진공상태를 제공하는 것은 비교적 현장적용상 어려운점이 있으나, 가능한 탈기상태에서 반응시키는 것이 효과적인 것으로 인정되었기 때문이다.

2) EMC의 제조

Flavourezyme + CC + Lipase A, Flavourzyme + CC + Lipase A, Neutrase + CC + Lipase R, Neutrase + CC + Lipase R 등 6종류의 효소를 달리 조합하여 상기한 제조공정을 통해 완성된 4종류 EMC치즈를 제조하였다. 제조한 EMCC치즈의 주요 성분을 적외선 우유분석기로 분석한 결과는 표 7과 같다.

Table 6. Reaction parameters of enzymatic treatment for EMC preparation

배양단계	첨가량	온도	시간	비고
Proteinase	각각 0.2 0.5%	45℃	8시간	진공하에서 정치 또는진탕배양(rpm 30)
효소 불활성화		80℃	15분	
Peptidase 및 lipase	2% 수준 0.2 0.5%	35℃	72시간	진공하에서 정치 또는 진탕배양(rpm 30)
효소 불활성화		80℃	15분	
냉각		5℃		

Table 7. Composition of EMC cheese prepared with differen combination of flavor enhancing enzymes.

EMC종류*	Fat (%)	Protein (%)	Moisture (%)	pH	FDM** (%)
1	25.7	21.0	43.8	6.19	45.7
2	24.5	19.9	46.0	6.12	45.4
3	24.8	21.6	46.0	5.92	45.9
4	24.2	19.5	46.4	6.05	45.1

*1Flavourezyme+CC+Lipase A, 2Flavourzyme+CC+Lipase R, 3Neutrase+CC+ Lipase A,4Neutrase+CC+Lipase R, ** FDm : Fat in Dry matter

나) EMC치즈의 관능평가

전형적인 체다치즈를 12개월 숙성시킨 후 분무건조시킨 치즈분말을 관능검사의 기준으로 정하고 *L. casei* FEPB-5로부터 추출한 농축 aminopeptidase로 제조한 EMC치즈들의 건조분말의 관능수준을 비교한 결과는 표 8과 같다.

치즈응용제품을 사용하는 스낵류 제조회사의 개발팀에서 실시한 결과, 12개월 숙성된 체다치즈가 풍부한 맛이 우수하며, 풍미가 매우 강하지 않은 것으로 나타났다. 관능을 실시한 Gouda, St. Paulin, Guryere 등의 외국산 치즈중에서 가장 높은 평가를 받은 것이었다.

그러나 체다치즈는 냉동보관중인 것을 해동하였기 때문에 조직은 부서짐성이 높아진 결과 조직항목에서는 제일 낮게 평가되었다. 동일한 체다치즈를 치즈슬리리로 용융한 후 건조시킨 분말치즈는 자연상태보다 관능결과가 다소 낮게 평가되었다.

Table 8. Organoleptic evaluation of four different EMCs prapared by aminopeptidase from *L. casei* FEPB-5.

치즈 종류		풍미	맛	조직	관능종합
Cheddar 치즈	건조전	매우 우수	매우풍부	동결후 해동	매우 우수
	건조후	우수	풍부하며 쓴맛 없음	미세분말	우수
EMC*	1	다소 약함	풍부하나 끝에 다소 쓴 맛	미세분말	보통
	2	양호함	풍부하며 약한 쓴 맛	미세분말	우수
	3	다소 약함	처음에 다소 강한 쓴 맛	미세분말	보통
	4	양호함	처음에 다소 강한 쓴 맛	미세분말	보통

4 종류의 EMC치즈는 80℃에서 1시간 살균후 균질처리하여 상(phase)의 분리를 억제한 paste상태에서 관능검사를 실시한 결과이다. 4종류의 EMC치즈에 모두 *L. casei* CC로부터 추출한 aminopeptidase가 첨가되었지만 처음과 끝에서 약한 쓴맛을 감지할 수 있는 정도로 나타났다. Paste상태의 EMC를 분말화 하여 응용제품으로 사용하기 위한 베합중에 첨가하는 물질들에 의한 masking효과가 없다면 소비자들이 감지할 만한 수준이 될 것으로 보인다.

다. EMC를 응용한 제품 제조

1) EMC 응용제품 제조용 배합표

EMC치즈를 응용한 제품들을 제조하기 위한 배합은 표 9와 같이 정하였다.

2) EMC 응용제품의 평가

EMC치즈는 용도에 따라 반죽, 분말 등의 형태로 제조하는 것이 가능하다. 치즈 크래커용은 주로 치즈 슬러리를 분무건조 시켜 약 30%정도의 치즈 고형분 사용량을 감소 시키면서 나타나는 치즈의 풍미강도(intensity)를 높이는 목적으로 사용된다. 이러한 EMC 응용제품들은 모두 쓴맛이 없어야 하며, 페이스트 제품은 냉장온도에서 부드럽고 전연성이 좋아야 하며, 분말제품은 인스탄트성이 좋도록 과립화 시켜야 한다.

가공치즈 flavor boosting용 EMC는 가공치즈배합에 0.5 2.0%의 첨가수준에서 치즈고형분 사용량의 감소를 가능케 하는 효과와 치즈 맛과 향의 강도증진 목적으로 사용된다(사진 5. 사진 6. 사진 7).

Table 9. Formulations of dairy products using EMC cheese

원료 명	응용제품			
	Cheese paste	Pizza sauce	Snack powder	Cheese spread
EMC slurry	+	+	+	+
체다치즈	+	+	+	40%
Italian 치즈		5%		
Cream 치즈				15%
Lipase		+		
참치				+
땅콩페이스트				+
마늘+고추씨기름				+
스파이스			+	+
용융염	+	+		1.5%
색소	+	+	+	+
정제수				+

EMC를 첨가한 가공치즈 스프레드 3종류를 제조하여 성분을 분석하였다(표 10). 참치paste를 첨가한 치즈, 땅콩버터를 첨가한 치즈, 마늘분말과 고추씨 기름을 첨가한치즈 등 실험제조한 치즈들과 시중에서 구입한 외국산 새우맛 크림치즈와 햄을 첨가한 크림치즈 등 2종류의 치즈들과 관능검사를 실시한 결과는 표 11과 같다. 표 11에 의하면 맛에 있어서 EMC에서 유래하는 약간의 쓴맛을 감지함에도 불구하고 땅콩과 마늘 맛 치즈를 선호하였으며, 풍미에 있어서는 외국산 크림치즈의 새우와 햄의 훈연향을 좋아하지 않는 것으로 조사되었다. 조직은 크림치즈의 연한 조직을 가공치즈 스프레드의 비교적 단단한 조직보다 선호하였다..

Table 10. Moisture contents, pH, and salt contents of processed cheese spreads prepared with 2% EMC cheese and three different additives

첨가물	수분함량(%)	pH	염도(%)
참치	41.2	6.04	1.49
땅콩	41.8	6.00	1.40
마늘+고추씨 오일	47.1	6.05	1.40

종합적으로 볼 때, 국내에서 수입증가가 꾸준히 증가하고 있는 크림치즈보다 EMC를 첨가한 가공치즈스프레드가 가장 좋았다는 빈도에서 모두 좋은 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서 개발한 EMC치즈는 다른 식품과 조화를 이룰 수 있는 가공치즈 스프레드제품에 응용한다면 높은 기호도를 기대할 수 있는 것으로 보인다

Table 11. Organoleptic comparision of experimentally prepared cheese spreads with commercial flavored cream cheese

치즈 종류	첨 가 물	풍미	맛	조직	관능종합
대조치즈	새우	새우/젖갈냄새를 느낌	새우 또는 멸치맛으로 느껴짐	부드럽다	보통
		(1/15)	(2/15)	(5/15)	(8)
	햄	훈연냄새가 바람직하지 않음	중간에 나타 나는 햄맛이 좋음	부드럽다	저조함
		(0/15)	(2/15)	(1/15)	(3)
실험치즈	참치	참치냄새가 양호한 수준임	연한 참치맛 약간 쓴맛이 감지됨	조금 단단함	양호함
		(6/15)	(2/15)	(3/15)	(11)
	땅콩	땅콩향이 강함	고소한 맛이 느껴짐	부드럽다	우수함
		(5/15)	(5/15)	(2/15)	(12)
	마늘+고추	향신료냄새/과일향이 약간	마늘맛을 느낀 후 끝맛이 쓰다.	매우 단단함*	양호함
		(3/14)	(4/15)	(4/15)	(11)

*마늘+고추 첨가 실험치즈가 가장 단단한 것은 사용한 용융염을 high melting용 의 것을 사용하였기 때문임.**( )안의 값은 1순위 빈도를 나타냄.

4. 적 요

본 연구에서는 치즈의 활용방안중 비 낙농식품제조에 치즈맛을 부여하기 위한 EMC 치즈를 제조함에 있어 본 연구진이 선발한 풍미증진효소가 심한 단백분해 결과 생성되는 쓴 맛을 제거하는 역할을 충분히 발휘할 수 있는가를 확인하고, 그 능력을 충분히 발휘할 수 있도록 실제 제조공정을 개발하는 것과, 그리고 EMC치즈를 제조하여 관능평가를 실시하며, EMC치즈를 응용한 몇종의 치즈제품을 제조하여 그 활용가능성을 연구하였다.

본 연구결과로는 선발된 젖산균의 aminopeptidase는 EMCC제조과정중 가장 중요한 단계인 치즈단백 분해과정에서 flavourzyme 또는 Neutrase와 같은 심한 단백분해를 초래함으로서 생성되는 쓴 맛 펩타이드를 잘 분해하는 것으로 나타났으며, 그 조건은 단백분해효소를 가열처리에 의하여 불활성화 시켰을 때인 것으로 나타났다. 지방분해효소로는 역겨운 풍미를 주지않는 *Aspergillus niger* 또는 *Penicillium roqueforti*에 의해서 생산된 상업용 지방분해효소가 좋았던 것으로 나타났다.

개발된 제조기술에 의해 제조된 EMC 치즈는 쓴 맛의 제거가 완전치는 못하였으나, 응용제품에 첨가하는 첨가물질들에 의해 masking 되어 첫 맛 또는 끝 맛에서 약간 감지될 수 있는 수준으로 평가되었으며, 응용제품중에서 치즈스프레드 참치, 땅콩, 마늘/고추맛을 혼합한 3가지 제품은 국내에 수입되는 가공크림치즈 제품들보다 훨씬 선호도가 높은 것으로 나타나 EMC치즈의 활용가능성을 높여주었다.

제 3 절 참고문헌

Kasik, R.L., and Luksas. 1971 Preparation of an elastic cheese product. US Patent No.3.579.354.

Luksas, A. J. 1972. Rapid production of a Cheddar cheese flavored product. US Patent No.3.689.286.

Robert. M. J. 1972. Making American cheese from heat treated milk. US Patent No.3.650.768.

Robertson, P.S., and K.C.Perry. 1961. Enhancement of flavor of Cheddar cheese by adding a strain of *Micrococcus* to the milk J. Dairy Res. 28:245.

Law, B. A., M. Castanon, and M. E. Sharpe. 1976. The effect of nonstarter bacteria on the chemical composition and the flavor of Cheddar cheese. J. Dairy Res. 43:117.

Alford. J. A., and W. C. Frazier. 1950. Effect of micrococci on the development of flavor when added to cheddar cheese made from pasteurized milk. J. Dairy Sci. 33:115.

Dacre, J. C. 1953. Cheddar cheese flavor and its relation to tyramine production by lactic acid bacteria. J. Dairy Res. 20:217.

Deane, D. D., and T. G. Anderson. 1942. Comparative studies on Cheddar cheese prepared and with certain pure culture. J. Dairy Sci. 25:729.

Stadhonders, J., and H. Mulder. 1958. Fat hydrolysis and cheese flavor. II. Microorganisms involved in the hydrolysis of fat in the interion of the cheese. Neth. Milk. Dary J. 12:238.

MacDonald, I. J. 1962. Location of proteinase in cells of a species of *Micrococcus*. Can. J. Microbiol. 8:785.

Bhowmik T., and E. H. Marth. 1989. Purification and partial characterization of an aminopeptidase from M. *freudenreichii*. Syst. Appl. Microbiol. 12:112.

Desmazeaud. M., and J. Hermier. 1968, Isolation, purification of an extracellular proteinase from M. *caseolyticus*. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 8:565.

Mills, C., and J. N. Compbell. 1974. Production and control of extracellular enzymes in M. *sodonesis*. Can. J. Microbiol. 20:51.

Prasad, R., R. K. Malik, and D. K. Mathur. 1984. Purification and characterization of extracellular caseinolytic enzyme of *Micrococcus* sp. MCC 315 isolated from Cheddar cheese. J. Dairy Sci. 69:633.

Moreno, V., and F. V. Kosikowski. 1973. Degradation of β-casein by micrococci cell-free preparation. J. Dairy Sci. 56:33.

Moreno, V. and F. V. Kosikowski. 1973. Peptides, amino acids and amines liberated from β-casein by micrococcal cell-free preparations. J. Dairy Sci. 56:39.

Nath, K. R., and R. A. Ledford. 1972. Caseinolytic activity of micrococci isolated from Cheddar cheese. J. Dairy Sci. 10:124.

Ehommik, T., and E. H. Marth. 1988. Protease and peptidase activity of *Micrococcus* species. J. Dairy Sci. 71:2358.

Tzanetakis, N. and E. Litopoulou-Tzanetaki. 1989. Biochemical activities of *Pediococcus pentosaceus* isolated of dairy origin. J. Dairy Sci. 72:859.

Ehommik. T., and E. H. Marth 1990. Peptide hydrolyzing enzyme of *Fediococcus* species. Microbios. 61:__ .

Franklin J. G. & Sharpe, M.E. 1963. The incidence of bacteria in cheese milk and Cheddar cheese and their association with flavor. J. Dairy Res., 30:87-99.

Reiter, B. and M. E. Sharpe. 1971. Relationship of the microflora to the flavour of Cheddar cheese. J. Appl. Bact. 34:63.

Chapman, H. R. and M. E. Sharpe. 1981. Microbiology of cheese. Chap. 5 in"Dairy Microbiology, Vol. 2R. K. Robinson, Ed.. Applied Science Pub. London. p157.

Martley, F. G. & V. L. Crow, 1993. Interactions between Non-starter Microorganisms during Cheese Manufacture and Ripening. Int. Dairy J. 3, 461-483.

Hoglund, G. F., T. F. Fryer, & J. Gilles. 1972. The influence of lactobacillion open texture in Cheddar cheese. NZ. J. Dairy Sci. Technol. 7:159.

Fryer, T. F., M. E. Sharpe, & B. Reiter. 1970 Utilization of milk citrate by lactic acid bacteria and "blowing" of film wrapped cheese. J. Dairy Res. 37:17..

Naylor, J. and M. E. Sharpe. 1958. Lactobacilli in Cheddar cheese. I. The ise of selective media for isolation and of serological typing for identification. J. Dairy. Res. 25:92.

Aston, Y. W., J. E. Giles, I. G. Durward, and J. R. Dulley. 1985. Effect of elevated ripening temperture on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. J. Dairy Res. 52:565.

Bhowmik, T. and E L. Marth. 1990. Role of Micrococcus and Pediococcus species in Cheese rioening: A. review. J. Dairy Sci. 73:859-866.

Arora, G. and Lee, B. H. 1992. Purification and characterization of aminopeptidase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG. *J. Dairy Sci.*, 75, 700.

Habibi-Najafi, M. B. and Lee, B. H. 1994. Purification and characterization of x-prolyl dipeptidyl peptidase from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LLG. *Appl. Microbio Biotechnol.*, 42, 280.

Habibi-Najafi, M. B. and Lee, B. H. 1995 Purification and

characterization of proline iminopeptidase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG. *J. Dairy Sci.*, 78:251.

Lee, S. Y. and Lee, B. H. 1990 Esterolytic and lipolytic activities of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LLG. *J. Food Sci.*, 55:119.

El Soda. M., J-L Berger and M. J. Desmazeaud. 1978. Detection and localization of peptide hydrolases in *Lactobacillus casei*. J. Dairy Res. 45:519.

Coulson, J. D. Pawlett, R. Wivell. 1992. Accelerated ripening of Cheddar cheese. IDF Bulletin 269. p.29.

Thomas, T. D. 1986. Oxidatice activity of bacteria from Cheddar cheese. NZ. J. Dairy Sci. Technol., 21:37.

제 4 장 치즈 휘발성 및 수용성 풍미성분의 기기 분석적 기술 연구

제 1 절 치즈 휘발성 풍미성분의 기기분석적 연구

1. 서 론

풍미란 소비자가 낙농식품의 선택이나 기호도에 있어 가장 중요한 요인의 하나이다. 체다치즈 풍미는 가장 널리 연구된 것 중의 하나이며 180여가지 이상의 풍미 화합물의 구조가 밝혀지고 있으나 워낙 복잡한 화합물 구조를 지니고 있기 때문에 체다치즈 풍미의 구성성분과 기원은 50년이 지나도 풀리지 않으리라는 예견도 있다(Aston 과 Culley, 1982).

치즈숙성중 유단백질, 지방 , 유당, 구연산의 분해는 일련의 휘발성과 비휘발성 풍미화합물을 생성한다. 미생물, 효소, 화학적 변화에 의해 생성되는 FFA(유리지방산), 에스테르, 알데하이드, 알코홀, 키톤, 황 화합물 등이 체다풍미의 주성분이며(Moskovitz와 Noelck, 1987), 아미노산, 아민, 미네랄, 염 등의 비휘발성 물질도 풍미에 관여하고(Harper, 1959), 치즈풍미의 강도는 Butyric acid(C_4)의 농도와 밀접한 관계가 있으며, 다른 FFA의 상대적 비율도 영향을 준다(Corradini와 Neviani, 1994).

치즈숙성 촉진은 숙성의 조건을 조절하거나 미생물, 효소, 치즈 발효액, 풍미성분의 화합물을 이용함으로서 숙성촉진을 유도할 수 있으며, 치즈숙성의 중요한 조건은 온도와 습도이며, pH, 염, 삼투압, 산화환원 전위차 등이 주요인으로 작용한다(Lee 등, 1978). Roberts(1972)는 *Micrococcus*와 *Lactobacillus*로 예비 배양한 우유로 치즈를 제조하면 숙성을 촉진하고 풍미를 증진시킬 수 있다고 하였으며, Stadhouders(1961)는 *Lactococcus*를 미리 배양시킨 우유(pH 6.6으로 조절)로 Edam치즈를 제조한 결과 정상커드보다 산성화 후 미생물의 수가 5배 이상 증가되고, 총 질소 중 아미노태 질소함량이 대조구(7.5-10%) 보다 높은 비율(15-19%)을 얻었으며, 5개월 숙성치즈가 1년 숙성된 치즈와 같은 flavor를 생성한다고 하였다.

지방산은 lactone의 전구물질로서 Blue치즈의 flavor 화합물에 중요한 역할

을 하며, lactone은 치즈숙성을 촉진하고 뛰어난 풍미를 부여한다(Cort와 Riggs, 1967). Lipase 나 esterase의 첨가는 이태리안치즈나 체다치즈 제조에 널리 이용되는 방법이며, lipase는 American치즈의 숙성촉진에 사용되며, pregastric esterase의 첨가로 많은 량의 지방산을 얻을 수 있다고 하였으며 (Roberts, 1972), Contarini와 Toppino(1995)는 lypolysis의 정도가 숙성시 FFAs 농도의 증가와 밀접한 관계가 있다고 하였다.

치즈 숙성시 지질분해가 체다flavor에 중요하며 Butyric acid, Caproic acid 와 Caprylic acid가 체다aroma에 결정적인 역할을 한다. 유리지방산과 다른 flavor 물질사이의 균형이 지방산의 농도보다 체다flavor에 더 중요하며 특히, 휘발성 유리지방산은 체다치즈의 aroma와 flavor에 중요하다(Patton, 1963).

지질유도체인 aldehyde, methyl ketones, esters 등이 Cheddar치즈에서 분리한 휘발성분에 존재하는 주된 aroma 성분이며, alcohol과 hydrocarbon은 체다 풍미에 크게 관여하지 않는다(Arora 등, 1995). Vandeweghe와 Reineccius(1990)는 Cheddar 풍미성분 중 처음으로 2-propanol, 1,3 butandeiol, δ-undecalactone, γ-decalactone을 분리하였으며, 분석기기상에서 검출이 안되는 농도에 존재하는 체다flavor와 aroma에 관여하는 몇몇 odor-active 화합물을 찾아냈다.

비록 이들 화합물이 체다치즈의 특징적인 aroma를 대표하는 것은 아니지만, 체다flavor의 강도와 methanethiol, decanoic 혹은 butenoic acid의 결합농도 간에 유의성이 있으며, methanethiol의 농도가 낮을수록 저지방 체다치즈의 풍미가 약한 것이 이를 증명한다(Limos 등, 1996).

FFA 단독으로는 치즈flavor에 직접적으로 기여하지 않지만 FFA가 모여 질적인 관능검사 부분에서 체다 aroma에 중요한 역할을 한다(Woo와 Linsay, 1982; de Jong과 Badings, 1990). 전형적인 체다flavor는 FFAs의 양적인 균형과 관련있으며(Ohren과 Terkey, 1969), 낙산발효에 기인한 butyric acid는 양이 많아도 바람직하지 않다고 하였다(Engels 등, 1997). FFA의 양적인 불균형과 마찬가지로 지나친 량의 FFA도 산패형 off-flavor를 일으키며, 저급 지방산 특히,

가수분해에 의한 산패취에 관여하는 Butyric acid의 농도가 적을수록 깨끗한 체다flavor가 생성되며(Wood와 Lindsay, 1982), 총 FFA 농도와 각각의 FFA 농도와 관련된 전형적인 오래된 치즈에서 여러가지 산패취가 나며, 산패된 치즈에서 Butyric acid에서 linolenic acid까지의 유리지방산이 거의 10배 이상 증가하는데 비해 Acetic acid는 같은 수준을 유지하였으며(Woo 등, 1984), 치즈 숙성중 중급 지방산이 많아지면 전형적인 체다 flavor의 특징을 나타낸다고 하였다(Peterson과 Johnson, 1949).

VFA(Volatile fatty acid)는 숙성된 치즈의 aroma 보다 맛에 관여하는 소량의 스타터미생물에 의해 생성되며(Manning과 Price, 1977), 젖산균의 lipolytic, esterolytic 활성은 제한되어있으나 치즈flavor의 기본을 이루는 유리지방산의 량에 영향한다(Olson, 1990).

Law(1984)는 체다치즈의 스타터가 균형적인 flavor를 생성하지만 flavor 의 결점(예를 들어 효모냄새, 과일향, 신냄새 등)이 있음에도 불구하고 non-starter bacteria가 체다flavor를 빠르게 생성한다고 하였다.

치즈의 풍미물질 분석기술은 GC/MS(Gas Chromatograph/Mass Spectroscopy)에 의한 Headspace법과 진공증류법(Dimos 등, 1996), GC/MS/Sniffing에 의한 Headspace법(Arora 등, 1995), GC/MS/Sniffing에 의한 용매추출법과 투석법(Vandeweghe와 Reineccius, 1990) 등에 의해 발전되어 왔으며, 이들에 의해 치즈 풍미물질의 일정부분이 밝혀진 상태이다.

식품에서 휘발성분의 추출, 분리 및 동정에 사용되는 방법에는 유기용매 추출법, CO_2를 이용한 초임계(supercritical fluid) 추출법, 증기 증류법, 고진공 증류법, Headspace법 등이 있으며(Bosset와 Gauch, 1993), 원심분리를 통해 얻어진 체다치즈 오일의 직접 injection법(Liebich 등, 1970), Dialysis법(Benkler와 Reineccius, 1979) 등이 체다치즈의 GC profile을 얻는데 사용된다.

우유 지방에서 FFA를 추출하여 이를 정량하는 방법은 분배현상(partitioning effects) 때문에 편차가 심하다(Humbert와 Linsay, 1969). 예를 들어, anion

exchange resin을 이용하여 FFA를 분리하는 방법은 불완전한 회수율, glyceride의 가수분해, 시간소요가 많다는 지적이 있으며(Bills와 Day, 1964), 유기용매에 의한 추출은 양적인 회수율이 떨어지고, FFA를 간섭하는 물질이 함께 추출될 수 있다는 보고(Ledford, 1969), 저급지방산은 GC의 정량이 가능하나 고급지방산의 정량은 어렵다는 보고도 있다(Horwood와 Lloyd, 1980). 이를 극복하기 위해 Wood와 Linsay(1982)는 partition precolumn으로 젖산을 제거한 다음 변형된 silicic acid-KOH arrestant column을 사용하여 GC분석을 한 결과 체다치즈의 Butyric acid에서 linolenic acid까지 정량분석이 가능하였다고 하였다.

저분자량의 휘발성화합물이 치즈 flavor에 중요한 역할을 하여도 Head space 기술이 치즈flavor분석에 일반적으로 사용되는 것은 아니다(Horwood 등, 1981). 최근 Head space법을 개선한 SPME(Solid Phase Micro Extraction)를 이용한 GC분석법이 개발되어 치즈의 휘발성분을 탐색하는데 사용되고 있으며, Chin 등(1996)은 SPME의 흡착소재로 polyacrylate로 코팅된 fibre가 결과가 좋았으며, 휘발성 지방산과 δ-lactone 등의 주요성분은 쉽게 검출되었으나 휘발성 황 화합물 등의 미량성분은 검출되지 않았다고 하였다.

Seble 등(2000)은 Pyrolysis/GC/MS 분석법과 Head space/GC/MS 분석법을 이용하여 체다치즈와 EMC치즈의 지방산, 키톤, 알코홀, 알데하이드, 락톤 등을 분리하였다. Arora 등(1995)은 multidimensional GC/MS/Sniffing 분석법을 이용하여 6개의 Ketones, 8개의 alcohols, 5개의 aldehydes, 3개의 esters, 11개의 hydrocarbons, 3개의 halides, 3개의 sulfur compounds를 동정하였으며, 주된 체다 aroma는 ester, aldehyde, metyl ketone, sulfur compounds 등이고 alcohol, hydrocarbon은 주된 함량을 차지하나, 체다 aroma에는 크게 영향하지 않는다고 하였다.

본 실험은 풍미물질을 탐색하기 위한 전형적인 FFA 추출법인 methylation 방법, Head space를 개선하여 휘발성 풍미물질을 흡착하는 SPME 방법 등의 전처리 방법을 활용하여 GC와 GC/MS에 의해 치즈풍미를 결정하는 휘발성물질 탐

색하는 방법을 개발하고자 하였으며, 제 1 협동연구기관(연암대학)으로부터 풍미증진효소를 이용하여 제조된 ARC(Accelerated Ripening Cheddar)치즈 및 EMC(Enzyme Modified Cheddar)치즈를 제공받아 풍미 및 향미성분을 동정하며, 치즈숙성의 지표로 활용할 수 있는 신속한 치즈숙성도 진단 방법을 개발하여 진단용 marker를 탐색하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시 료

다음과 같이 구입한 치즈 혹은 제 1 협동연구기관(연암대학)에서 제조된 치즈를 시료로 사용하여 치즈 종류와 제조방법에 따른 치즈 풍미와 향미성분의 변화추이를 GC와 GC/MS를 이용하여 분석하였다.

분류 1 : 국산 cheddar cheese와 수입 cheddar cheese
분류 2 : 정제과정 중의 효소를 이용한 단기숙성치즈
(대조구, 생균처리구, 조효소액 처리구, 부분정제 효소처리구)
분류 3 : 여러 효소를 이용한 단기숙성치즈
(대조구, 조효소 처리구, Neutrase 처리구, 조효소+Neutrase처리구,),

나. 시료 전처리

1) FFA(Free Fatty Acid) 추출법 :

Cheese 시료 100mg을 Shoxlet에서 추출한 후 ethanol용매에 1N KCH 15ml를 첨가하여 약 1시간정도 환류냉각기내에서 가열 환류하여 검화하였다. Rotary evaporator를 사용하여 ethanol을 제거하고 증류수 20ml에 용해시킨 다음 20ml ethly ether로 2회 세척하고 1.6ml 6N H_2SO_4를 첨가하고 petrolium ether로 2회 추출한 다음 무수황산나트륨으로 수분을 제거하고 다시 rotary evaporator에서 ether를 제거하고 BF3-MeOH (15%) 1ml를 가한 다음 냉각기가 부착된 추출관에서 80℃ 30분 가열한 다음 NaCl 포화용액 3ml를 첨가하여 BF3를 제거한 다음 N-Hexane 3ml을 첨가하고 교반하여 지방산-methylester를 유도한 다음 분액여두로 옮겨 상층부위를 취하여 무수황산나트륨을 처리하여 수분을 제거한 다음 GC와 GC/MS에 사용하였다.

2) SPME(Solid Phase Micro Extraction) 법 :

Cheese시료 20gram에 1% sodium citrate 20ml를 첨가한 다음 stomacher에서

분쇄한 후 reaction vial(200㎖)에 넣고 40℃로 고정된 magnetic plate에서 교반을 시키면서 Head space를 변형한 SPME system (fiber assembly는 polydimethylsiloxane를 사용)을 이용하여 5분간 치스 방향성분을 추출한 다음 바로 GC에 주입하였다.

3) GC 및 GC/MS 조건

GC 및 GC/MS 기종 및 조건은 표 1. 과 같이 실시하였으며 각 peak의 성분을 GC/MS library를 이용하여 동정하였다.

Instrument :

a : Gas Chromatography(Hewlett Packard 6890, HP 6890 series Injector, Autosampler)

b : Gas Mass (HP5973 Mass selective detector)

Table 1. Condition of GC and GC/MS

Column	HP-HP5(cross-linked PMS), 30㎜x0.32㎜x0.25㎛	Oven temp.	40℃/5min. holding ⇒ 200℃(5℃/ ㎜in.)/5min. holding ⇒ 300℃
Detector temp.	FID detector, 300℃	Carrier gas	H2 flow rate 60㎖/㎜in.
Iniector temp.	250℃	Chart speed	1.0㎝/㎜in.
Split ratio	10 : 1	Sample size	1㎕

3. 결과 및 고찰

가. 치스 FFA 분석

1) GC/MS에 의한 Cheddar cheese의 chromatogram의 profile 분석

제 1 협동연구기관에서 제조된 3개월 숙성된 Cheddar 치즈의 FFA(Free Fatty Acid)의 조성과 성분을 GC/MS로 분석한 profile은 그림 1.과 같으며, 이 profile을 GC/MS library로 분석한 결과 각각의 peak는 다음 표 2.와 같이 동정되었다. Butyric acid는 retention time이 짧아 solvent peak와 겹쳐 나타났으며, 우유에 전형적으로 존재하는 포화지방산인 Caproic acid, Caprylic acid, Capric acid, Lauric acid, Myristic acid, Palmitic acid, Stearic acid와 불포화지방산인 Tetradecenoic acid, Hexadecenoic acid, Cleic acid가 확인되었다.

2) 상업용 치스의 지방산 조성

국산 Cheddar치즈(3개월)와 수입 Cheddar치즈(4개월)를 methylation 으로 전처리 후 유리지방산(FFA)을 분리하여 GC로 분석한 결과는 표 3과 같다.

Table 2. FFA profiles of traditional Cheddar cheese

Peak No.	Retention time(min.)	Molecular	Identified as
1	9.90	$C_6H_{12}O_2$	Caproic acid(C_6)
2	16.74	$C_8H_{16}O_2$	Caprylic acid(C_8)
3	22.52	$C_{10}H_{20}O_2$	Capric acid(C_{10})
4	27.58	$C_{12}H_{24}O_2$	Lauric acid(C_{12})
5	31.83	$C_{14}H_{26}O_2$	Tetradecenoic acid($C_{14:1}$)
6	32.19	$C_{14}H_{28}O_2$	Myristic acid(C_{14})
7	35.81	$C_{16}H_{30}O_2$	Hexadecenoic acid($C_{16:1}$)
8	36.42	$C_{16}H_{32}O_2$	Palmitic acid(C_{16})
9	38.14	$C_{18}H_{34}O_2$	Cleic acid($C_{18:1}$)
10	38.26	$C_{18}H_{36}O_2$	Stearic acid(C_{18})

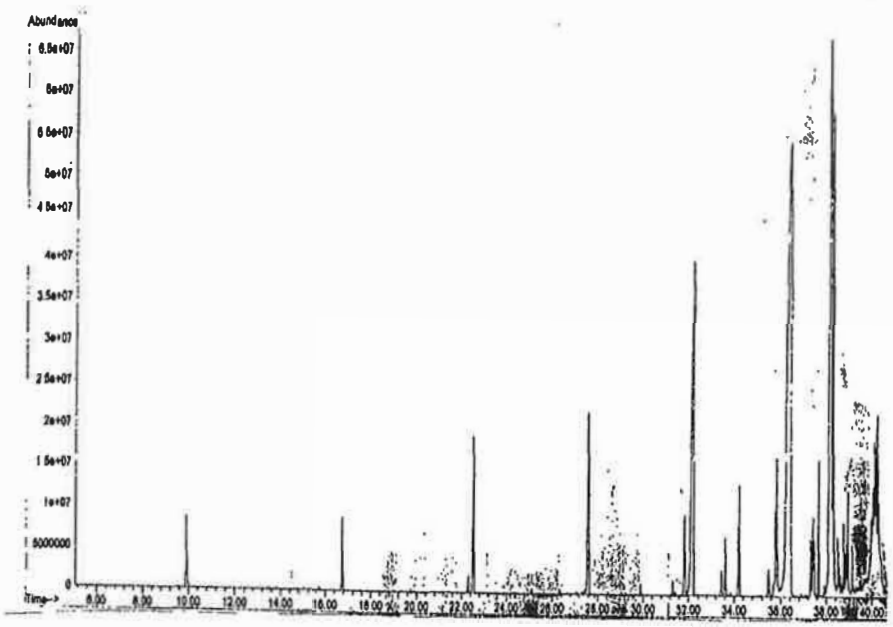


Figure 1. GC/MS chromatograms of traditional Cheddar cheese

상업용 체다치즈도 제 1 협동과제 연구기관에서 만든 단기숙성치즈와 지방산의 조성에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 저급지방산과 중급 이상 지방산 비율을 조사한 결과, 각각 10.56:89.37, 10.30:89.70으로 비슷한 경향을 보였다. 수입산 Cheddar치즈의 경우 Palmitic acid(C_{16})의 함량이 적고 Stearic acid(C_{18})의 함량이 높았다.

Table 3. FFAs profile of Foreign and Domestic Cheddar cheese .

Peak No.	Foreign Cheddar cheese		Domestic Cheddar cheese		Identified as
	Retention time(min.)	Area %	Retention time(min.)	Area %	
1	4.130	1.72	4.103	1.43	Caproic acid(C_6)
2	9.976	1.50	9.961	1.29	Caprylic acid(C_8)
3	13.718	3.33	13.707	3.12	Capric acid(C_{10})
4	16.843	4.10	16.835	4.46	Lauric acid(C_{12})
5	19.649	12.25	19.644	12.59	Myristic acid(C_{14})
6	22.218	30.13	22.218	34.64	Palmitic acid(C_{16})
7	24.204	28.55	24.192	27.04	Cleic acid($C_{18:1}$)
8	24.508	18.44	24.491	15.43	Stearic acid(C_{18})

3) 정제 효소를 이용한 단기숙성치즈의 지방산 조성

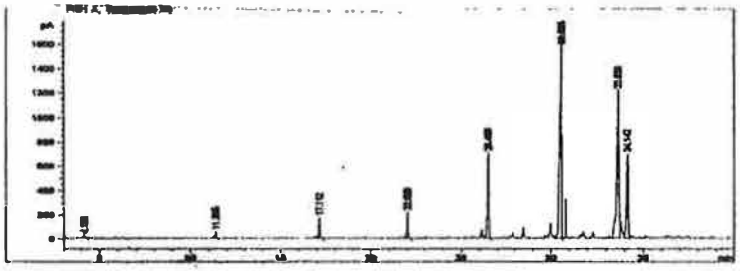
제 1 협동연구기관에서 4가지 방법(대조구, 생균(*L. casei*) 처리구, 조효소 처리구, 부분정제효소 처리구)으로 제조된 Cheddar치즈 지방산의 성분을 GC로 각 성분의 profile을 조사한 결과는 표 4.와 같다.

각 처리구간에 지방산 조성의 차이는 나타나지 않았으며, 각 처리구의 저급지방산과 중급 이상의 지방산 비율을 조사한 결과, 대조구, 생균처리구, 조효소 처리구, 부분정제효소 처리구 각각 8.45:91.54, 6.65:93.34, 8.28:91.72, 8.41:91.59로서 각 지방산간의 함량의 차이를 확인할 수 없었다. 단, 생균 처리구의 경우 저급지방산(C_{12} 이하)의 함량이 적고 고급지방산의 함량이 높은 경향을 보였다. Najim과 White(1990)는 숙성이 안된 Cheddar 치즈에서는 FFA 농도가 낮고, 좋은 풍미를 내는 숙성된 치즈의 FFA의 농도는 중간정도이며 저급 FFA의 량이 적은데 비해 쓴맛과 산패취가 나는 치즈의 FFA 농도가 제일 높았으며 저급과 고급 FFA 모두 높게 나타났다고 보고하여 본 실험에서 저급지방산의 함량이 감소하고 중급이상의 지방산이 증가하여 숙성이 빠르게 진행되었음을 알 수 있었다.

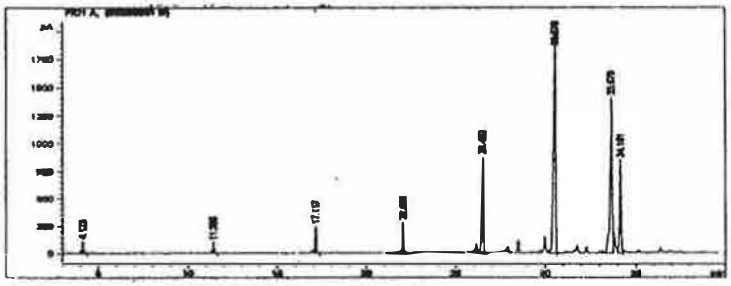
Table 4. FFA profiles of Cheddar cheese with microbial cell and enzymes treatment.

Peak No.	Control		Microbial cell treatment		Identified as
	RT(min.)	Area %	RT(min.)	Area %	
1	4.121	1.31	4.131	0.21	Caproic acid(C6)
2	11.395	1.11	11.395	0.76	Caprylic acid(C8)
3	17.116	2.65	17.112	2.37	Capric acid(C10)
4	22.032	3.38	22.028	3.31	Lauric acid(C12)
5	26.476	11.73	26.469	11.79	Myristic acid(C14)
6	30.565	37.36	30.555	37.98	Palmitic acid(C16)
7	33.671	29.43	33.659	30.31	Cleic acid(C18:1)
8	34.148	13.02	34.142	13.26	Stearic acid(C18)
Peak No.	Crude enzyme treatment		Partially purified enzyme treatment		Identified as
	RT(min.)	Area %	RT(min.)	Area %	
1	4.123	1.06	4.131	1.13	Caproic acid(C6)
2	11.395	1.07	11.395	1.09	Caprylic acid(C8)
3	17.117	2.72	17.112	2.73	Capric acid(C10)
4	22.033	3.43	22.028	3.46	Lauric acid(C12)
5	26.482	11.87	26.469	11.86	Myristic acid(C14)
6	30.578	37.70	30.555	37.41	Palmitic acid(C16)
7	33.679	28.92	33.659	29.28	Cleic acid(C18:1)
8	34.161	13.23	34.142	13.04	Stearic acid(C18)

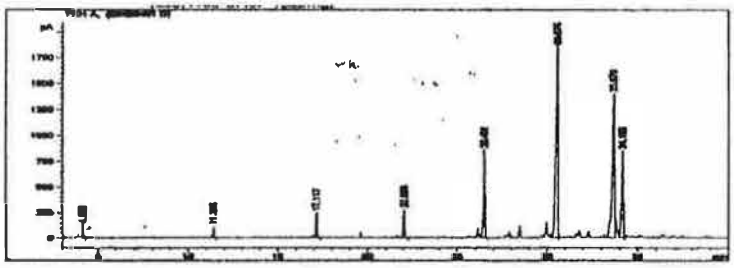
A: control



B: Microbial cells



C : Crude enzyme



D : Partially purified enzyme

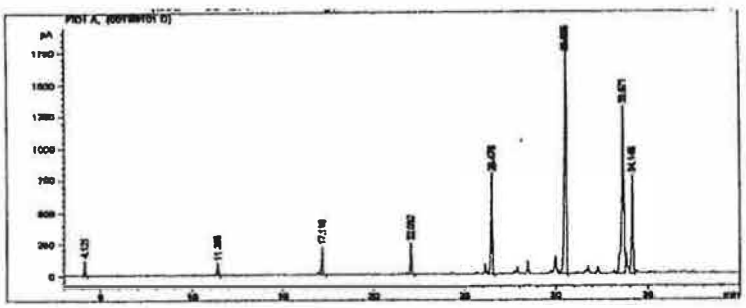


Figure 2. GC chromatograms of FFA with various enzyme treatments

4) 여러 효소를 이용한 단기숙성치즈의 지방산 조성

제 1 협동연구기관에서 조효소(Cell Free Extracts)처리, 상업용 효소(Neutrase) 처리, CFE+Neutrase 처리한 단기숙성치즈의 지방산을 분석한 결과는 표 5.와 같다.

CFE 처리구, Neutrase 처리구와 CFE+Neutrase 처리구의 저급지방산과 중급 이상의 지방산 비율을 조사한 결과, 각각 9.79:90.21, 7.65:92.35, 6.95:93.04로서 처리간 유의성이 인정되진 않았지만 CFE+Neutrase 처리구의 지방산 분해가 많이 이루어 진 것으로 판단된다.

Stearic acid농도는 CFE 처리구, Neutrase 처리구 와 CFE+Neutrase 처리구 각각41.04%, 38.73%, 35.89%로서 CFE 처리구가 가장 높았으며, Palmitic acid도 유사한 경향을 보였다. 전체적으로 특이한 것은 Neutrase 처리구에서 Tetradecenoic acid(C14:1)가 6.54% 농도로 나타난 점이다.

Table 5.FFA profiles of Cheddar cheese with various enzyme treatments

Peak No.	CFE treatment		Neutrase treatment		CFE+Neutrase treatment		Identified as
	R.T (min.)	Area %	R.T (min.)	Area %	R.T (min.)	Area %	
1	3.529	0.49	3.534	0.11	-	-	Butyric acid(C4)
2	10.291	1.63	10.292	0.90	10.293	0.82	Caproic acid(C6)
3	17.526	1.22	17.525	0.92	17.526	0.86	Caprylic acid(C8)
4	23.679	2.87	23.679	2.44	23.680	2.26	Capric acid(C10)
5	29.083	3.58	29.084	3.28	29.085	3.01	Lauric acid(C12)
6	-	-	32.103	6.54	-	-	Tetradecenoic acid(C14:1)
7	32.048	23.36	32.125	20.65	32.154	30.05	Myristic acid(C14)
8	33.948	13.57	33.952	12.69	33.950	11.76	Palmitic acid(C16)
9	34.271	12.24	34.301	13.74	34.324	15.34	Oleic acid(C18:1)
10	38.512	41.04	38.518	38.73	38.515	35.89	Stearic acid(C18)

5) SPME(Solid Phase Micro Extraction) 분석기법 개발

제 1 협동연구기관에서 제조된 치즈 시료를 SPME를 이용하여 방향성물질을 추출한 후 GC/Mass에 주입하여 방향성물질의 chromatogram(그림 3.)과 GC/Mass library를 통해 각 peak 성분을 동정한 결과는 표 6.과 같다.

Chin 등(1996)은 swiss 치즈를 SPME/GC/MS 분석에 사용하였으며, SPME에서 사용한 휘발성물질을 포집하는 fibre coating물질로 polydimetylsiloxane과 polyacrylate로서 민감도에서 polyacrylate가 우수한 것으로 보고하였다. 본 실험에서 사용한 시료는 전통적인 Cheddar 치즈로서 fibre coating 물질로서 carboxen/ polydimetylsiloxane을 사용하였으며 본 실험과 Chin 등(1996)의 실험결과를 비교하기 어렵지만 Chin 등은 15가지의 휘발성 화합물을 동정하였으나, 본 실험에서는 11개의 휘발성 물질이 검출되었으며, elution time 상 5-20분대 peak가 보이지 않아 치즈종류의 특성에 따라 다양한 패턴을 지니고 있음을 알 수 있었다. SPME 분석은 Head space 분석법을 개선하여 실험이 비교적 단순하기는 해도 흡착소재의 선택, 재현성 등에서 약간의 문제점을 보여 앞으로 치즈의 SPME 분석에 필요한 개선된 기술이 도입되어야 할 필요성이 있다고 판단된다.

Table 6. Flavor compounds isolated from SPME using GC/MS

Elution time(min.)	Volatile compounds	Elution time (min)	Volatile compounds
1.213	Heptaminol	2.276	3-Methylbutanal
1.384	Ethanol	2.636	2-Pentanone
1.453	2-Propanone	2.962	2-Butanone, 3-Hydroxy
1.676	2-Methylpentane	21.566	1.2-Benzenedicarboxyl acid,dimetyl ester
1.693	2-Methylpentane	23.795	1.2-Benzenedicarboxyl acid,dimetyl ester
1.847	n-Hexane	41.302	Cyclotrisiloxane
2.036	Methylcyclopentane		

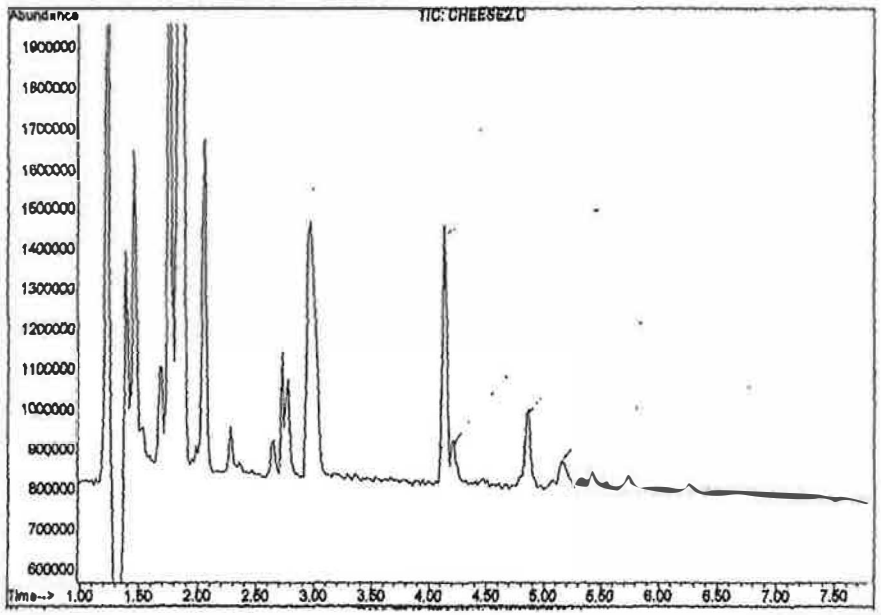


Figure 3. GC/MS chromatograms of flavor compounds of traditional Cheddar cheese isolated by SPME

4. 적요

GC/MS에 의해 3개월 숙성된 전형적인 Cheddar치즈 분석을 통해 포화지방산인 Caproic acid 등과 불포화지방산인 Tetradecenoic acid (C14:1), Hexadecenoic acid (C16:1), Oleic acid(C18:1)를 확인하였다.

국산 Cheddar치즈(3개월 숙성)와 수입Cheddar 치즈(4개월 숙성)의 FFAs의 조성은 제2 협동과제 연구기관에서 만든 치즈와 큰 차이를 보이지 않았다. 저급지방산과 중급 이상 지방산 비율도 각각 10.56:89.37, 10.30:89.70으로 유사한 경향을 보였다. 수입 Cheddar치즈는 Palmitic acid(C16)의 함량이 줄고 Stearic acid(C18)가 증가하였으며, 국산치즈는 수입치즈와 3주된 단기숙성치스의 중간 형태의 지방산조성을 보였다.

무처리, 미생물균체 처리, 조효소 처리, 부분정제효소 처리하여 제조된 Cheddar치즈의 처리구간에 지방산 조성차이는 나타나지 않았으며, 각 처리구의 저급지방산과 중급 이상의 지방산 비율은 각각 8.45:91.54, 6.65:93.34, 8.28:91.72, 8.41:91.59로서 유의성이 인정되지 않았다. 단, 미생물균체 처리구의 경우 저급지방산(C12 이하)의 함량이 줄어들고 고급지방산의 함량이 늘어나는 경향을 보였다.

조효소(Cell Free Extracts)처리, 상업용 효소(Neutrase) 처리와 CFE+Neutrase 처리한 Cheddar치즈의 저급지방산과 중급 이상 지방산 비율은 처리구간 유의성이 인정되진 않았으며, CFE+Neutrase 처리구의 지방산 분해가 많이 이루어 진 것으로 나타났다. CFE 처리구, Neutrase 처리구와 CFE+Neutrase 처리구의 Stearic acid농도는 각각 41.04%, 38.73%, 35.89%로서 CFE 처리구가 가장 높았으며, Palmitic acid도 유사한 경향을 보였고, Neutrase 처리구에서 Tetradecenoic acid(C14:1)가 6.54% 농도로 검출되었다

SPME/GC/Mass로 분석을 통하여 Heptaminol 등 11개의 휘발성 물질이 검출하였다. SPME 분석법은 Head space 분석법보다 간편하고 단순하나 흡착소재의 선택, 재현성 등에서 문제점이 있는 것으로 나타났다.

제 2 절 치즈 수용성 풍미성분의 기기분석적 연구

1. 서 론

Proteolysis는 치즈flavor 생성과 조직감을 결정하는 주요한 과정중의 하나이며, 이는 주로 치즈 제조시 첨가되는 rennet, starter culture 및 치즈숙성중의 젖산균과 이들이 분비하는 효소에 의해 이루어진다.

Proteolysis의 산물인 아미노산과 peptide는 비휘발성 수용성 분획으로 체다 flavor의 강도에 영향을 한다고 알려져 있으며, 치즈조직의 변화에도 관여한다(Cliffe 등, 1993). 그러나 과도한 proteolysis는 쓴맛과 조직의 결점을 갖게 하며, 이를 제어하기 위해 proteinase가 적고 peptidase가 많은 치즈스타터를 요구하게된다(El-Soda 등, 1978).

신선한 커드에 염과 기타 미생물을 첨가하여 30-35℃에서 약 1주일간 배양하여 얻은 치즈 slurry를 가공치즈 혹은 체다치즈에 첨가하여 숙성을 촉진하는 방법이 보고되고 있다. 이 경우 TCA-수용성 질소화합물의 증가에서 나타나듯이 단백질 분해가 강화될 뿐 아니라 치즈 flavor와 치즈조직도 함께 발달한다고 하였다(Dulley, 1976)

지방구로 코팅된 미세캡슐내로 효소와 기질을 고정화하여 치즈풍미 발현을 촉진시키는 보고도 있다(Magee와 Olson, 1981). 그러나 렌넷을 두배 첨가한다고 해서 유리아미노산과 체다치즈 풍미에 아무 도움을 주지 않는다는 보고가 있으며(Yamamoto 등, 1970), 이것은 rennet의 aminopeptidase 활력이 없기 때문이라 하였다(Desmazeud와 Gripon, 1970). *Aspergilus*에서 생성된 protease를 커드에 첨가하면 저분자화합물 특히, 아미노산의 생성에 효과적이며 치즈숙성을 촉진한다고 하였다(Nakanishi와 Itoh, 1974).

Bitterness는 체다치즈의 선호에 결정적인 영향을 미치는 요인으로서 숙성중 proteolysis에 의해 생기는 몇몇 peptide가 이들을 유도한다(Lawrence 등, 1972). Bitterness는 소수성 잔기를 갖는 peptide가 주요인이며, 숙성이 완료된 체다치즈에서 이들 peptide를 분리하였다(Champion과 Stainley, 1982).

Artisanal cheese의 숙성이 진행될수록 소수성 peptide와 친수성 peptide의 비율이 감소하며, 아미노태 질소와 소수성:친수성 peptide 비율은 역의 상관관계(> 0.7)를 갖는다(Gonzales de Llano 등, 1995).

Lee와 Warthesen(1996)은 water extraction, UF(Ultrafiltration) 여과막, RP-HPLC 등을 이용하여 Cheddar치즈에 존재하는 500-3000 Da 과 3,000 Da이상의 분자량을 갖는 bitter peptide를 분리하였으며, 대부분이 glutamic acid/glutamine과 serine 잔기를 갖는 친수성 이미노산 잔기와 leucine, isoleucine, proline 등의 소수성 아미노산 잔기를 함유하였으며, 분리된 bitter peptide를 low fat Cheddar치즈에 첨가하였을 때 일반 Cheddar치즈보다 쓴맛이 훨씬 강하게 나타났다고 하였다. Cliffe 등(1993)은 Gel fitration 후 각 분획의 RP-HPLC peptide 패턴을 조사한 결과 초기 고분자 화합물에서 쓴맛에 관여하는 소수성의 peptide가 발현되고 후반의 저분자화합물에서 상큼한 풍미에 관여하는 친수성 peptide가 발현된다고 하였다.

쓴맛을 제거하는 기작에 관여하는 aminopeptidase의 연구가 진행되고 있으며(Minagawa 등, 1989), Lowrie와 Lawrence(1972)는 Lactococcal protei- nase와 rennet이 체다치즈의 쓴맛 peptide의 생성에 관여하며, 숙성시 젖산구균의 pepetidase가 bitter peptide를 non-bitter peptide와 아미노산으로 분해한다고 하였다.

치즈숙성 중에 생성된 free amino acid group은 치즈단백질의 분해정도를 측정하는데 이용되고 있으며, 유리아미노산과 Gouda 또는 Comte cheese의 flavor 간에 높은 상관성이 있다(Eouton와 Grappin, 1994).

체다치즈의 숙성촉진에 있어 상업용 Bacillus 단백질분해효소와 *Lc. casei* ssp. *casei* LLG에서 추출한 조효소를 함께 사용하면 상승효과가 있으며(Lee 등, 1990), EMC치즈 ingredient 제조에도 효과가 있으나, 이들은 내부 소수성 peptide의 노출로 가수분해가 과도하게 일어나 쓴맛을 유도하기 때문에 일반적인 사용권장량보다 적은량을 사용해야 한다(Park 등, 1995). Cliffe와 Law(1990)는 체다커드에서 semi-liquid slurry를 얻은 다음 *B. subtilis*의

neutral proteinase와 *Lc. lactis*에서 추출한 peptidase를 권장량의 20배를 첨가하여 RP-PHLC상에서 peptide 패턴을 조사한 결과 효소처리 안한 체다치즈에서는 peptide 수가 매우 적었으며, proteinase처리구에서는 bitter taste 형성과 관련있는 peptide가 다량 검출되었다고 보고하여 Park 등(1995)의 연구결과를 뒷받침하였다.

우유케이신의 트립신 분해에 의해 생성된 소수성 peptide의 쓴맛을 제거하기 위해 *Thermus aquaticus*의 aminopeptidase T를 처리하거나(Minagawa 등, 1989), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* WG2의 aminopeptidase PEP N을 처리하였으며(Tan 등, 1992), 스타터로 *Lc. lactis subsp. cremoris* Sk11이 쓴맛을 제거하는 효과가 있으며, 동정한 결과, intracellular peptidase 중 X-prolyl-dipeptidyl amino peptidase가 최고의 효소역가를 보였다고 하였다(Lee 등, 1996).

Lc. casei LLG의 조효소 추출액으로부터 Aminopeptidase와 두개의 proline-specific peptidase의 존재를 확인하고(Lee 등, 1986), 이들을 분리 동정하였으며(Arora 등, 1990), 이들 효소는 유단백질 분해시 생성되는 bitter peptide의 제거에 커다란 관심을 갖게 하였다(Casey와 Meyer, 1985).

치즈 숙성 중 단백질의 분해정도는 전기영동법(Reville과 Fox, 1978), TNBS (trinitrobenzene Sulphonic Acid)과 새로운 용해제를 이용한 단백질 분해도 측정법(Humbert 등, 1990) 등이 있으며, 신속한 acid-base 적정법(Cllikainen, 1990)을 이용한 치즈의 단백질 분해도 측정방법이 보고되고 있다.

HPLC는 치즈의 proteolysis 연구에 가장 널리 사용되는 기기로서 다양성, 짧은 시간, 효율적인 분리, 높은 분해능, 우수한 재현성 등의 특징을 갖고 있어 특히, peptide의 분리 및 특성파악에 효과적으로 사용되고 있으며(Champion과 Stainley, 1982), 발효유제품의 유기산 분석에도 효율적으로 이용되고 있다(Marsili 등, 1981).

효소 처리한 Cheddar치즈의 수용성 분획의 RP-HPLC peptide 패턴은 일반 체다와 상이한 proteolysis 경향을 보여 RP-HPLC를 이용한 PCS(Principal

Component Similarity)분석이 치즈숙성을 평가하는데 유용함을 보고하였으며 (Furtula 등, 1994), Gouldsworthy 등(1996)은 RP-HPLC로 1년 숙성된 Cheddar 치즈의 수용성 분획에서 peptide를 분리하여 MS(Mass Spectometry)를 이용하여 casein에서 유래된 16개의 peptide를 동정하였다.

Frister(1996)는 HPLC, 전기영동, CPA(O-pthaldialdehyde) 등의 방법으로 Edam치즈 casein의 1, 2차 proteolysis를 비교한 결과, RP-HPLC를 이용하여 1-2주 숙성된 Edam치즈에서 αs1-casein의 분해가 50%정도 이루어 진 것을 확인하였으며, 전기영동 결과는 이보다 재현성이 떨어진 것으로 보고하였다.

Singh 등(1995)은 Cheddar 치즈의 수용성 추출물을 diafiltration(10 KDa cut-off 여과막)에 의해 분리하였으며, MS(Mass Spectroscopy)로 동정한 결과, N-terminal 아미노산 sequence로 밝혀졌으며 51의 peptide 중 45개의 diafiltrate retantate가 N-terminal 분자량의 50%에 해당되는 β-casein으로 확인되었다.

Tieleman(1992)은 9개월 숙성된 14개의 각기 다른 Cheddar치즈의 peptide 패턴을 분석한 결과 소금함량, 쓴맛, 풍미 후 쓴맛 등에 의해 현격한 차이를 보고하였으며, 분자량 1,000-10,000사이의 peptide가 bitter peptide로 보고하였다. Cliffe 와 Law(1991)는 치즈의 water-soluble N 분획패턴에 따라 숙성도의 큰 차이를 보이며, 체다풍미 강도와 연관이 있다고 하였다.

본 연구는 치즈의 숙성 중 수용성 풍미성분의 기기분석적 연구를 위해 RP-HPLC를 이용하여 풍미증진효소를 이용하여 제조된 EMC(Emzyme Modified Cheddar)치즈와 ARC(Accelerated ripening Cheddar)치즈의 숙성 중 수용성 단백질 분획의 elution profile의 특징을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시 료

다음과 같이 제 1 협동연구기관에서 제조된 단기숙성형 치즈를 분석에 사용하였다.

분류 1. : 전형적인 cheddar cheese

분류 2 : 여러 효소를 이용한 단기숙성치즈

대조구, 조효소처리구, Neutrase처리구, 조효소+Neutrase처리구

분류 3 : 정제과정 중의 효소를 이용한 단기숙성치즈

생균(*L. casei*) 처리구, 조효소 처리구, 정제된 효소 처리구

분류 4 : 상업용 효소로 처리한 5종류의 EMC 치즈

대조구.

단백질 분해효소: Protamex처리구, Flavozyme처리구, Neutrase 처리구.

지방 분해 효소 : Palatase처리구,

분류 5 : 상업용 효소로 처리한 5종류의 ARC 치즈(EMC치즈 처리와 동일)

나. 시료 처리

치즈의 수용성 단백질을 분리하여 HPLC상에서 패턴을 조사하는 방법은 Smith와 Nakai(1990)의 방법을 변형하여 다음과 같이 사용하였다.

10g의 치즈를 27,000g에서 25℃, 30분간 원심분리 한 다음, 지방과 고체상사이의 액체상 1ml를 취한다. 액체상 1ml에 methanol 1ml, methylene chloride 1ml와 물 0.6 ml을 혼합한다. 위와 같은조건에서 혼합물을 원심분리한다. Methanol/water층을 heating module (45℃)에서 evaporation 하거나 동결건조 후 초순수 물에 환원시킨다음, 농축액을 0.22㎛ syringe membrane 이나 Sep Pack C18 system에서 여과하여 HPLC에 주입한다.

다. HPLC 조건

25㎕ 수용액 시료를 Delta Pak C18 column (30㎜ x 150㎜)에 주입하며, 치즈 peptide는 다음의 binary gradient 조건으로 elution하였다.

Time(min)	Flow rate	Solution A	Solution B
0	0.7 ml/min.	100%	0%
2	0.7 ml/min.	60%	40%
40	0.7 ml/min.	10%	90%
45	0.7 ml/min.	10%	90%
45.01	0.7 ml/min.	0%	100%
50	0.7 ml/min.	0%	100%
50.01	0.7 ml/min.	100%	0%
60	0.7 ml/min.	100%	0%

Solution A : Milli Q water contained with 0.1%(v/v) of TFA (trifluoroacetic acid)

Solution B : Mixture of acetonitril(HPLC grade) and Milli Q water(40:60, v/v) contained with 0.08%(v/v) of trifluoroacetic acid(TFA)

3. 결과 및 고찰

가. HPLC에 의한 전형적인 Cheddar cheese의 수용성 분획의 profile.

제 1 협동연구기관에서 제조된 단기숙성치즈(3개월 숙성)의 수용성 분획(Water soluble fractions)을 분석한 profile은 그림 4.와 같다. WSFs은 elution time 별로 볼 때 대략 5분이전과 5-10분사이, 10분이후의 peak로 나누어 볼 수 있었으며, 14개의 peak가 검출되었으나, 각 peak에 대한 peptide의 동정은 규명할 수 없었다.

나. 여러 효소를 이용한 단기숙성치즈의 수용성 분획.

4가지 방법(대조구, 조효소 처리구, Neutrase 처리구, 조효소+Neutrase 처리구)으로 제조된 단기숙성치즈 WSFs의 HPLC chromatogram은 그림 5.와 같다. 대조구의 경우 peak 수가 14개로서 Retention time이 3-4분대에서 14.16% (Area), 5-9분대에서 21.84%, 10분대 이상에서 64.00%로 나타났으며, 조효소 처리구의 경우 14개의 peaks, 3-4분대가 16.07%, 5-9분대가 20.96%, 10분대 이상이 62.97%였다.

Neutrase 처리구의 경우 22개 peak가 나타나 분해된 peptide 수가 대조구와 조효소 처리구보다 많았으며, 10분대 이상의 peak 분해가 많았다. 조효소+Neutrase 처리구의 경우도 Neutrase 처리구와 비슷한 경향을 보였으며, 10분대 이후에 peak가 겹쳐 나오는 현상을 보이고 있는데 이는 시료 전처리시 prep. LC 등을 사용하여 WSFs의 분리를 확실하게 해주지 못한데서 기인된 것으로 판단된다.

다. 정제과정 중의 효소를 이용한 단기숙성치즈의 수용성 분획

제 2 협동연구기관에서 생균 처리, 조효소 처리, 정제된 효소 처리하여 제조한 단기숙성치즈(3개월 숙성)의 WSFs의 HPLC chromatogram은 그림 6.과 같다.

미생물균체를 처리한 경우 peak 수가 13개로서 Retention time이 3-4분대에서 13.04%(Area), 5-9분대에서 20.65%, 10분대 이상에서 66.32%로 나타났으며, 조효소(Cell Free Extracts) 처리구의 경우 14개의 peaks, 3-4분대가 13.06%, 5-9분대가 19.38%, 10분대 이상이 67.57%였다. 정제된 효소 처리구의 경우 16개의 peak가 나타나 분해된 균체나 조효소 처리구보다 많았으며, 5-9분대 peak가 많았으며, 각 처리구 간에 유의성을 인정할 수 없었다.

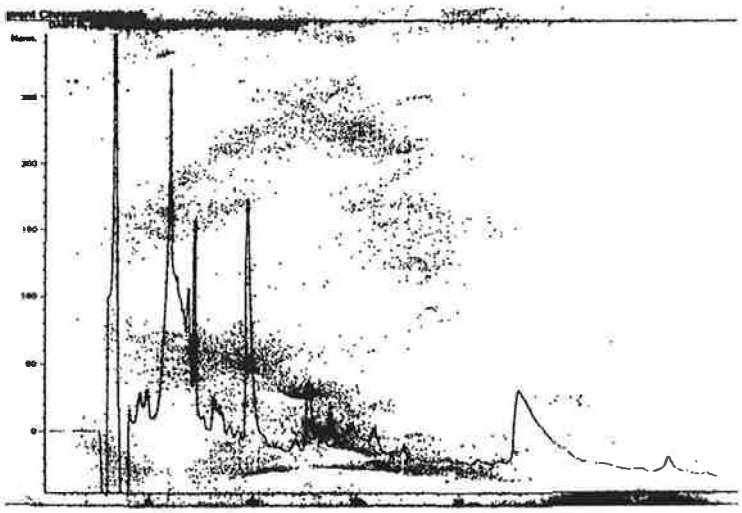


Figure 4. Reverse Phase-HPLC chromatograms of water soluble fractions of traditional Cheddar cheese

라. EMC치즈의 수용성 분획

여러가지 상업용 효소를 처리하여 제조한 EMC치즈의 수용성 분획 HPLC chromatogram은 그림 7.과 같다.

Protamex 처리한 경우 Retention time이 3-4분대에서 17.39%(Area), 5-9분대에서 38.97%, 10분대 이상에서 44.87%로 나타났으며, Palatase 처리구의 경우 3-4분대가 20.10%, 5-9분대가 39.73%, 10분대 이상이 40.17%였다. flavourzyme 처리구의 경우 3-4분대가 22. 75%, 5-9분대가 32.76%, 10분대 이상이 44.49%였

으며, Neutrase 처리구의 경우 3-4분대가 15.28%, 5-9분대가 38.14%, 10분대 이상이 46.57%였다.

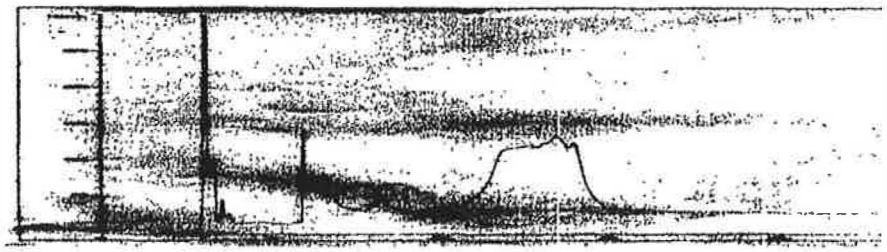
효소처리 없이 제조된 EMC 치즈의 경우 위에서 제조된 일반 Cheddar치즈와 유사한 패턴을 보였으나, 나머지 상업용 효소를 처리한 EMC치즈의 경우 초기 10분대 이하에서 분획의 높이와 면적이 크고 넓게 나타나 초기 peptide의 분해가 많이 이루어 졌음을 보였다.

마. ARC(Accelerated Ripening Cheddar)치즈의 수용성 분획

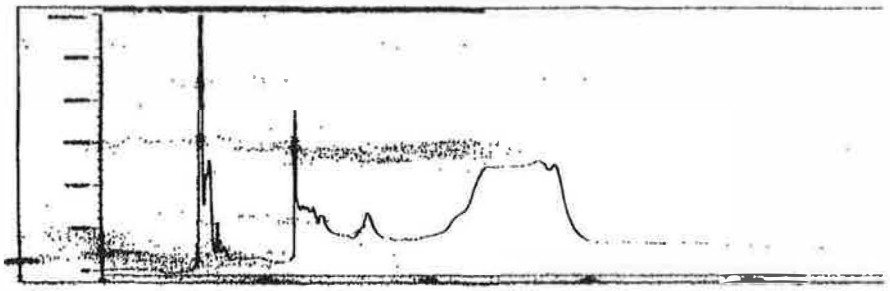
ARC(단기숙성치스)의 수용성 분획의 HPLC chromatogram은 그림 8.과 같다. Protamex 처리한 경우 Retention time이 3-4분대에서 16.73%(Area), 5-9분대에서 35.52%, 10분대 이상에서 47.75%로 나타났으며, Palatase 처리구의 경우 3-4분대가 16.91%, 5-9분대가 30.69%, 10분대 이상이 52.39%였다. flavourzyme 처리구의 경우 3-4분대가 22.98%, 5-9분대가 43.00%, 10분대 이상이 34.02%였으며, Neutrase 처리구의 경우 3-4분대가 13.74%, 5-9분대가 37.76%, 10분대 이상이 48.49%였다.

효소처리 없이 제조된 EMC치즈와 Palatase 처리구의 경우 위에서 제조된 일반 Cheddar 치즈와 유사한 패턴을 보였으나, 나머지 상업용 효소를 처리한 ARC 치즈의 경우 초기 10분대 이하에서 분획의 높이와 면적이 크고 넓게 나타나 초기 peptide의 분해가 많이 이루어 졌음을 보였다.

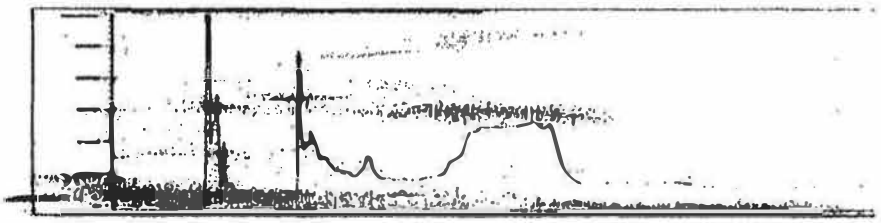
A: Commercial Cheddar cheese



B: CFE



C: Neutrase



D: CFE+Neutrase

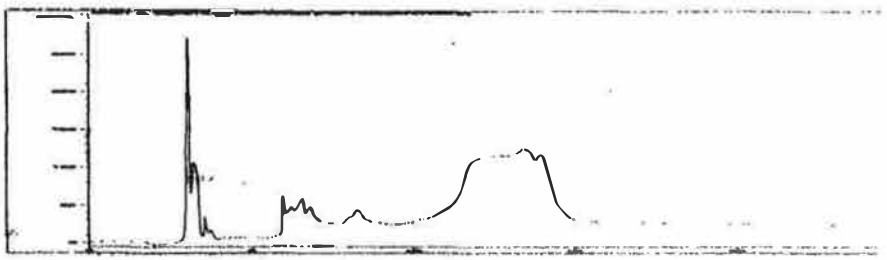
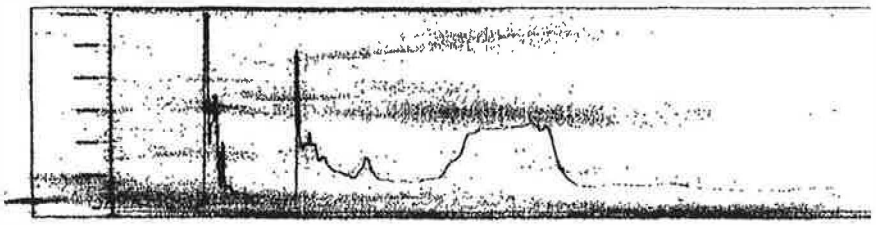
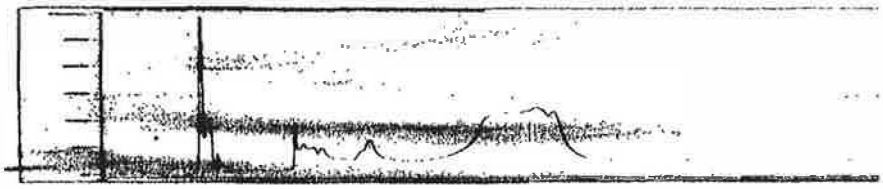


Figure 5. HPLC chromatograms of water soluble fractions of various enzyme treated Cheddar cheese

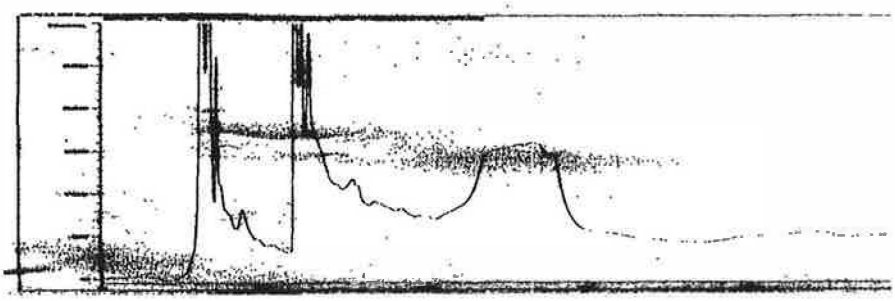
A: Cell culture



B: crude enzyme



C: Partially purified enzyme



D: mixed

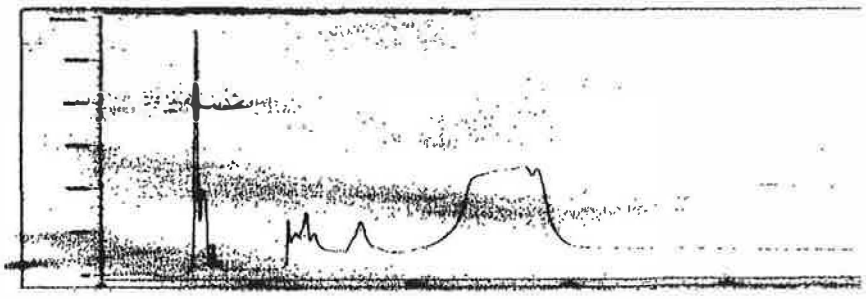
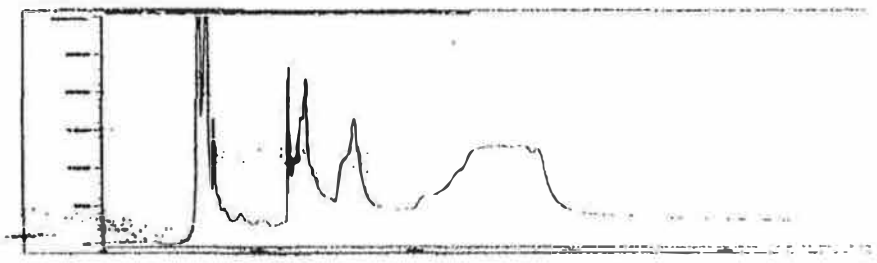
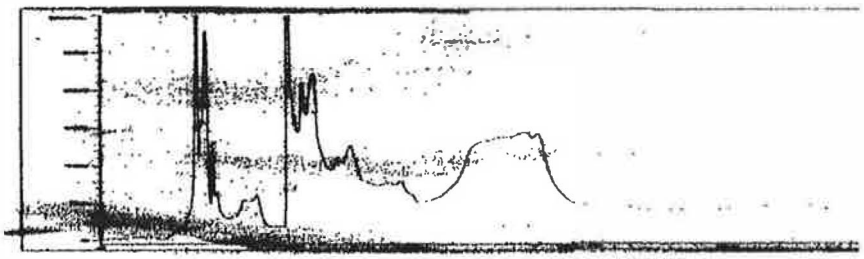


Figure 6. HPLC chromatograms of water soluble fractions of various treatments of Cheddar cheese.

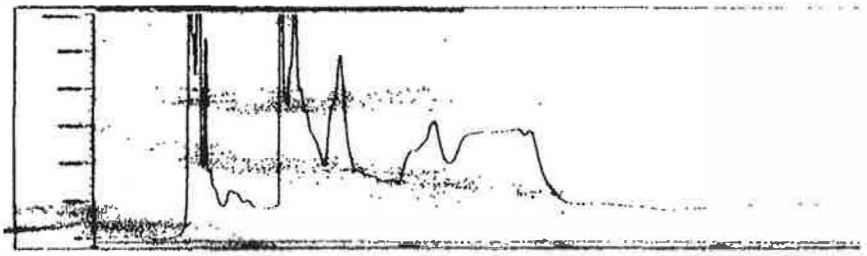
A: Protamex



B: Palatase



C: flavourzyme



D:Neutrase

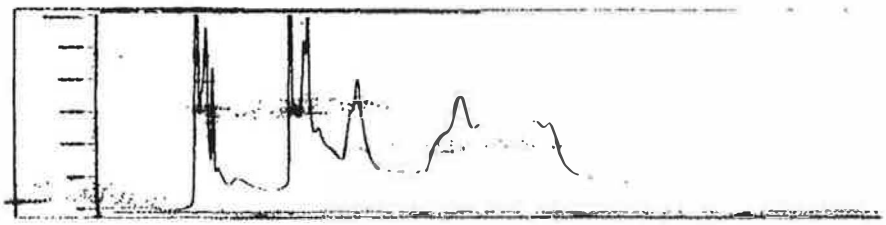
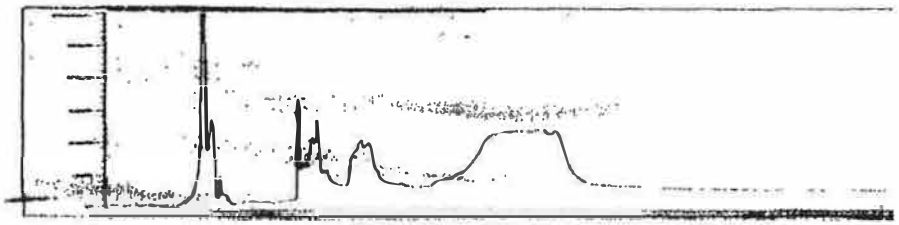
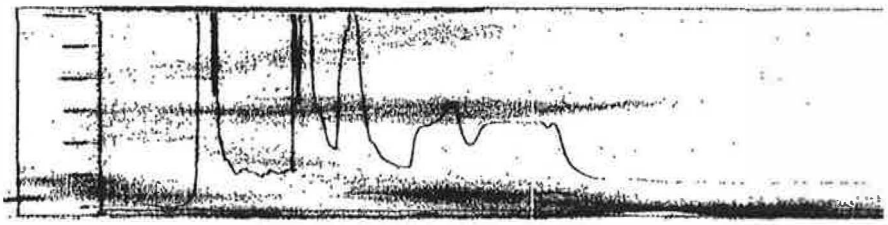


Figure 7. HPLC chromatograms of water soluble fractions of various enzyme treated EMC cheeses.

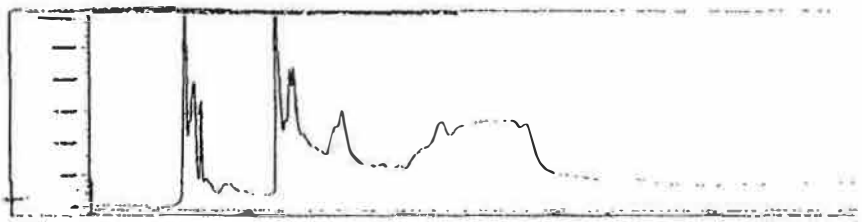
A: Protamex



B: Palatase



C: flavourzyme



D: Neutrase

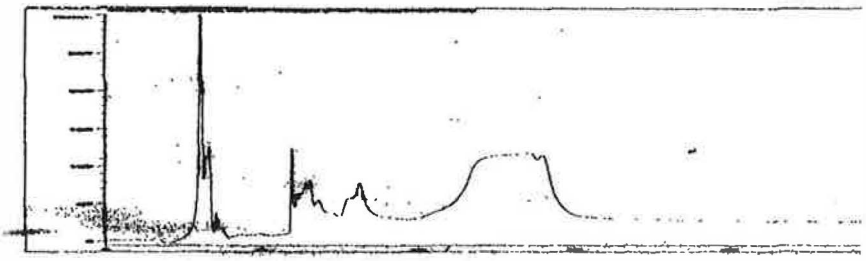


Figure 8. HPLC chromatograms of water soluble fractions of various enzyme treated ARC cheeses.

C: flavourzyme

D: Neutrase

Figure 8. HPLC chromatograms of water soluble fractions of various enzyme treated ARC cheeses.

4. 적요

HPLC에 의한 전통적인 Cheddar치즈의 WSFs은 Retention time 별로 볼 때 대략 5분이전과 5-10분사이, 10분이후의 peak로 나타났으며 약 14 개의 peak를 보였다.

조효소 처리, Neutrase 처리, 조효소+Neutrase 처리하여 제조된 Cheddar치즈의 WSFs를 조사한 결과, peak 수는 각각 14개, 14개, 22개로 나타났다. Retention time과 Area(%)는 대조구에서 3-4분대에서 14.16%, 5-9분대에서 21.84%, 10분대 이상에서 64.00%로 나타났으며, 조효소 처리구도 유사한 패턴을 보였다. Neutrase 처리구와 조효소와 Neutrase 처리구의 경우 10분대 이상의 peak 분해가 많았다. 각 처리구 간에 특별한 차이를 볼 수 없었으며, 10분대 이후에 peak가 겹쳐나오는 현상을 보이고 있는데 이는 시료 전처리시 prep LC 등을 사용하여 WSFs의 분리를 확실하게 해주지 못한데서 기인된 것으로 판단된다.

미생물균체 처리, 조효소 처리, 정제된 효소 처리하여 제조 후 3개월 숙성된 Cheddar치즈의 WSFs를 조사한 결과, peptide peak 수는 각각 13개, 14개, 16개로 나타났다. Retention time과 Area(%)는 미생물균체 처리구의 경우 3-4분대에서 13.04%(Area), 5-9분대에서 20.65%, 10분대 이상에서 66.32%로 나타났으며, 조효소 처리구의 경우도 유사한 경향을 보였다.

상업용 효소를 처리하여 제조한 EMC치즈의 수용성분획을 조사한 결과, Protamex 처리시 3-4분대(Retention time)에서 17.39%(Area), 5-9분대에서

38.97%, 10분대 이상에서 44.87%로 나타났으며, Palatase 처리구는 같은 RT에서 각각 20.10%, 39.73%, 40.17%였다. flavourzyme 처리구도 비슷한 경향을 보였으며, Neutrase 처리구는 15.28%, 38.14%, 46.57%였다. 효소처리 없이 제조된 EMC치즈의 경우 위에서 제조된 일반 Cheddar치즈와 유사한 패턴을 보였으며, 나머지 상업용 효소를 처리한 EMC치즈의 경우 초기 10분대 이하에서 분획의 높이와 면적이 크고 넓게 나타나 초기 peptide의 분해가 많이 이루어 졌음을 보였다.

단기숙성치즈에서 Protamex 처리한 경우 Retention time이 3-4분대에서 16.73%(Area), 5-9분대에서 35.52%, 10분대 이상에서 47.75%로 나타났으며, Palatase 처리구는 같은 RT에서 각각 16.91%, 30.69%, 52.39%였다. flavourzyme 처리구는 22.98%, 43.00%, 34.02%였으며, Neutrase 처리구는 13.74%, 37.76%, 48.49%였다.

효소처리 없이 제조된 단기숙성치즈와 Palatase 처리구의 경우 위에서 제조된 일반 Cheddar치즈와 유사한 HPLC Chromatogram을 보였으며, 기타 상업용 효소를 처리한 단기숙성치즈의 경우 EMC치즈와 유사한 경향을 보였다.

제 3 절 Pyrolysis 분석기법을 이용한 단기숙성 치즈의 신속숙성도 측정

1. 서 론

체다치즈 aroma에 중요한 것은 탄소수 2:, 4:, 6:, 8: 개의 탄소수를 갖는 지방산으로서 특히 acetic acid가 중요하며, acetic acid가 없으면 휘발성 지방산들이 분해성 산패취를 갖게 된다(Patton,1963). Chren과 Tucky(1969)는 유리지방산과 acetate함량이 12 28μmol이며 유리지방산함량(moles)대비 acetate함량(μmol)의 비율이 0.55 1.0일 때 풍미균형이 우수한 체다치즈가 된다는 Balance theory를 주장하였다.

풍미물질 중에는 유지방성분인 β-keto esters가 분해되어 생성되는 극소량의 methyl ketones이 중요하며, 발효유의 풍미물질의 하나인 acetoin이 2,3 butylene glycol로 분해된 후 생성되는 ketones류인 butanone이 있으며, citrate 발효미생물이 생성하는 diacetyl이 있다.

체다치즈에서 발견되는 2차 알코홀류에는 2-butanol과 ethanol이 있으며(Day와 Libbey(1964), ethanol은 EMP나 ED pathway의 최종산물로서, 함량이 높으면 유리지방산의 에스테르화를 촉진하여 ethyl ester의 함량수준이 높아지며, 2-Butanol은 acetoin의 최종산물로서 생성된다(Scapellino와 Kosikowski,

1962). Ethyl butyrate와 ethyl hexanoate의 함량이 정상적인 풍미를 갖는 치즈보다 2배 이상이 되면 체다풍미의 결점으로 과일향의 원인이 되며, ethanol 함량이 6배 이상이 되면 같은 현상이 초래된다고 하였다(Bills 등, 1965).

최근에는 시료의 전처리 없이 극미량의 시료를 취하여 200℃의 고온에서 순간적으로 가열하였을 때 생성되는 마이얄 반응 생성물을 신속하고 편리하게 분석할 수 있는 Pyrolysis/GC-MS spectrometry 방법이 개발되었다. Py/GC-MS spectrometry 분석기법은 각종 polymer들의 Fingerprint identification, 성분분석, 구조결정 및 기계적, 열역학적 연구에 관련하여 응용되고 있으나 아직까지 낙농제품이나 낙농발효제품에 응용되지 않고 있다.

본 연구에서는 이러한 기법들을 응용하여 전형적인 체다치즈의 숙성단계별 standards pyrogram을 구하고 특정 풍미성분들을 분리 동정하여 숙성의 지표(indices 또는 marker)로 설정하고, 단기숙성방법을 통하여 제조한 체다치즈의 숙성도를 판정하는 방법을 정립하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료

단기숙성 체다치즈는 제2 협동연구기관으로부터 공급받아 시료로 사용하였다.

나. Pyrolysis GC/MS spectrometry

1) 사용기기 및 분석조건

Instruments	Analytical conditions
Pyrolysis kits CDS Pyroprobe -2000	Sample loading by quarts tube (0.33mm thickness). Pyroprobe was set at 200℃ at a heating rate of 50℃.ms with a total holding time 20s. Proprobe interface temp. was set at 200℃.
Gas Chromatography HP5890	Column flow rate was 0.8ml/min for a spilt ratio of 92:1 and a septum purge of 3ml.min. Column initial temp. was -5℃ for 2min and was increased to 50℃ at a rate of 30℃/min. and was finally increased to 250℃ at a rate of 8℃/min and kept at 250℃ for 5 min.
Mass spectrometry 5971BMSD	Ionization voltage was 70eV and the electron multiplier was 1,682V. The mass range was 30 300amu. MS interface at 180℃ and ion source temp. at 280℃.

3. 결과 및 고찰

1. Py/GC/MS의 분석기법을 이용한 체다치즈의 숙성도 분별

Py/GC/MS의 분석기법은 시료의 전처리가 매우 간단하여 불필요한 전처리 과정 중 형성되는 artefacts나 휘발성이 강한 성분의 손실을 배제할 수 있는 장점이 있어 낙농제품 및 발효제품에 활용할 수 있는 응용성을 검토할 필요성이 요청되고 있다. 본 실험에서는 이 분석기법을 통하여 치즈숙성의 지표로 할용할 수 있는 특정 풍미성분을 정량분석하거나 다른 종류의 치즈와 분별(discriminative)분석에 이용할 수 있는 가능성을 타진해 보고자 하였다.

본 실험에서는 낙농발효제품으로서는 최초로 Py/GC/MS의 분석기법을 이용하여 숙성 기간이 다른 체다치즈를 분석하였다(그림 10). 숙성 기간이 다른 3종류의 치즈는 정량적 분석으로 숙성도를 뚜렷이 분별할 만한 결과를 보여 주고 있다. 표 7.에 각 치즈들에 함유되어 있는 풍미성분들을 비교한 결과, 검출된 각 풍미성분들은 3종류의 치즈에 모두 함유되어있으며, 단지 그 농도만 다른수준을 나타내었다. 각 풍미성분과 치즈 숙성도와의 관계는 아직 분석학적 기법이 만족할 만한 수준이 아니므로 이에 관하여는 더욱 세밀한 연구가 요청된다.

Figure 10. Pyrograms of Cheddar cheese with different ripening periods.

Table 7. Volatile compounds isolates of Cheddar cheese from different ripening periods

Flavor compounds	Mild Cheddar	Cld cheddar	Extra Cld cheddar
	Area/mg	Area/mg	Area/mg
Acetic acid		4.90E+06	
2-Propanol	4.30E+06		
n-Butyric acid		1.87E+07	1.42E+07
2,3-Butanedione		2.70E+06	
2-Heptanone			2.30E+06
Hexanoic acid	3.80E+06	4.80E+06	5.80E+06
Benzen acetaldehyde	1.20E+06	3.90E+05	5.20E+05
2-Nonanone	9.40E+05	5.30E+05	7.60E+05
Nonanal	2.80E+05	3.50E+05	2.30E+05
Octanoic acid	2.30E+06	2.30E+06	1.10E+06
2-Decenal	2.50E+05	3.00E+05	
2-Undecanone	9.70E+05	3.90E+05	5.40E+05
Decanoic acid	6.40E+06	3.60E+06	5.60E+06
2-Decanoic acid	3.00E+06	1.92E+06	3.20E+07
2-Dodecenal	3.50E+05		
2-Tridecanoic acid	8.90E+05	2.20E+05	4.80E+05
Dodecanoic acid	3.00E+06	1.20E+06	2.30E+06
Propanoic acid	1.40E+06	1.10E+06	1.10E+06
2-Pentadecanone	6.60E+05	1.40E+06	2.90E+05
Tetradecanoic acid			6.70E+05

2. 단기숙성치즈의 풍미성분 비교

분석에 사용한 시료는 일반 체다치즈와 시중에서 구입한 호주산 체다치즈, 처리를 달리한 단기숙성치즈 2 종류 등 모두 4종류의 치즈이다. 단기숙성치즈의 풍미성분을 분석한 결과는 표 8, 9, 10, 및 11.과 같다.

표 8.에서 보는바와 같이 동정된 Aldehyde류 중에서 일반 체다치즈에서 발견된 hexanal과 decanal은 시중구입 체다치즈와 단기숙성치즈에서는 모두 발견되지 않았으며, phylacetaldehyde와 benzene acetaldehyde가 단기숙성치즈에서 각각 발견되었다.

표 9.에 나타난 Ketone류의 풍미성분은 일반 체다치즈와 상업용 및 단기숙성 치즈가 유사한 분석결과를 보였으며, 단기숙성치즈에서 Tetradecanone, tetrahydro-6-pentyl-2H-pyron-2-one이 검출되었다. 표 10.에 나타난 알코홀류의 풍미성분도 모두 5종이 검출되었으며, 단기숙성치즈는 3종류의 알코홀이 검출되었을 뿐이다. 표 11.에서 나타난 지방산들은 4종류의 시료에서 모두 10종류였다. 일반 체다치즈와 한종류의 단기숙성 치즈에서 각각 8종류의 지방산이 검출되었으나 다른종류로 확인되었으며, 다른종류의 단기숙성치즈는 4종류의 지방산이 검출되었다. Manning과 Nursten(1985)는 체다치즈의 휘발성 성분들의 종류와 수는 hydrocarbon 33종, 알코올류 12종, 알데히드 12종, 케톤류 14종, acids류 27종, 에스터류 20종, 락톤류 9종, bases 14종, 황화합물 6종, 에테르류 1종, 할로겐화합물 5종, 아마이드류 6종, 페놀류 1종, dilactide 1종 등 총 161종으로 정리하였다. 이 보고는 pyrolysis에 의해 매우 많은 양의 풍미성분들이 밝혀진 것으로서 시료의 전처리 없이 분석하는 pyrolysis분석법은 다양한 종류의 풍미성분을 정량분석 수준까지 활용하기에는 아직까지 해결해야 할 난제가 남아있는 것으로 사료된다.

Table 8. Comparision of Aldehydes in Cheddar cheeses and ARC cheeses with different treatments

Flavor compounds	Commercial cheese	ARC-1	ARC-2	Control cheese
Phyl acetaldehyde		◇		
Benzene acetadehyde			◇	
Hexanal				◇
Decanal				◇

Table 9. Comparision of Ketones in Cheddar cheeses and ARC cheeses with different treatments

Flavor compounds	Commercial cheese	ARC-1	ARC-2	Control cheese
2-Pyrollydinone	◇		◇	◇
2-Nonanone	◇	◇	◇	◇
2-Undecanone	◇	◇	◇	◇
2-Tridecanone	◇	◇	◇	◇
2-pentadecanone	◇	◇	◇	◇
Tetradecanone		◇		
Tetrahvdro-6-pentyl-2H-pyron-2-one		◇		
γ-Dodecalactone			◇	
Octanone				◇

Table 10. Comparision of Alcohols in Cheddar cheeses and ARC cheeses with different treatments

Flavor compounds	Commercial cheese	ARC-1	ARC-2	Control cheese
Ethanol	◇	◇	◇	◇
3-Methyl-butanol	◇			◇
2,3-Butanediol	◇	◇	◇	◇
2-Propanol	◇	◇	◇	◇
2-Formyl-1-methylpyrol	◇			

Table 11. Comparision of Fatty acids in Cheddar cheeses and ARC cheeses with different treatments

Flavor compounds	Commercial cheese	ARC-1	ARC-2	Control cheese
Acetic acid	◇	◇	◇	◇
Benzoic acid	◇	◇		
Octanoic acid	◇	◇		◇
Decanoic acid	◇	◇	◇	◇
Dodecanoic acid	◇	◇	◇	◇
Tetradecanoic acid	◇	◇	◇	◇
Butanoic acid		◇		
Hexanoic acid		◇		◇
Heptanoic acid				◇
Hexadecanoic acid				◇

4. 적요

Pyrolysis/GC-MS 분석조건에 의하여 숙성월령이 다른 전형적인 체다치즈에서 총 21종류의 성분이 동정되었다. 동정된 성분들은 Aldehydes 4종, Ketones 9종, Alcohols 류 5종, Fatty acids 10종, 기타 성분 2종이었다. 단기숙성용 체다치즈를 제조하여 동정한 풍미성분들을 비교한 결과 제조방법에 따라 다른 성분들이 검출되었다. 이와 같은 결과는 체다치즈의 steam distillates를 분석한 다른 연구결과들과 유사하였다. 그러나, 시료를 가열하는 온도가 매우 고온에서 이루어 졌기 때문에 동정된 성분들이 치즈의 유효 풍미성분인지에 관하여는 해결되어야 할 문제점으로 생각된다.

Py/GC-MS 분석기법은 낙농 및 발효유제품의 풍미성분들을 분석하는데 신속, 편리하게 응용할 수 있을 것으로 판단되며, 특히 discreminatory 분석을 위한 fingerprint identification에 유용하게 활용되리라 생각된다.

제 4 절 Pyrolysis 분석기법을 이용한 EMC 치즈의 신속

숙성도 측정

1. 서 론

숙성실 조건이 다르면 제조일자가 동일하더라도 치즈의 숙성도는 제조일과 반드시 비례하지 않는다. 치즈 숙성도를 신속하게 판정하는 일은 치즈의 숙성 월령을 평가해야할 경우에 매우 중요한 일이 된다. 특히 단기숙성치즈나, EMC 치즈와 같이 정상적인 숙성단계를 거치지 않는 경우에는 숙성도를 판정하는데 어려움이 따르게 된다. 화학적 성분의 증가를 통하여 숙성도를 결정하는 실험 방법들은 대체로 전처리과정이 오랜시간 소요되므로 특별성분을 marker로 하여 신속한 숙성도 진단법을 개발하려는 연구들이 시도되어 왔다.

Banks등(1992)은 체다치즈의 steam distillates의 휘발성 성분들을 정량적 분석으로 31종류의 성분들을 multivariate calibration하여 화학성분들과 풍미 성분들간 관련공식을 유도한 결과, 주관적 평가자료로서 유용하다고 하였다. Eouzas 등(1993)은 체다치즈 숙성지표로서 단백분해도, 총산도, pH, 유당 및 유기산 등의 화학적 지표에 대한 온도와 시간의 영향을 non-linear 통계분석시 각각의 화학지표성분들은 온도와 시간의 영향을 예측할 수 있는 지표로서 회귀 공식을 얻을 수 있었으며, 열전달 모델(heat transfer model)과 결합켜 치즈의 모양, 성분조성 등에 따른 예측까지도 가능하였다고 한다.

Py/GC-MS 분석법은 각종 polymer들의 Fingerprint identification, 성분 분석, 구조결정 및 기계적, 동력학적 연구에 응용되고 있으나 아직까지 낙농제품이나 낙농발효제품의 풍미물질을 정성적 또는 정량적 분석기법으로 확립되지 못한 상태이다.

본 실험에서는 동일 분석기법을 사용하여 본 연구진이 선발한 젖산간균의 exopeptidase와 상업용 endopeptidase를 혼합하여 개발한 EMC치즈의 풍미성분을 분석하여 정상적으로 제조하여 숙성시킨 mild cheddar cheese와 비교하였다. 또한 Dynamic head space GC/MS spertometry로 분석한 Data와 비교함으로

써 정량적 분석 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시 료

제 2 협동연구기관에서 제조한 EMC 치즈를 공급받아 시료로 사용하였다.

나. Pyrolysis GC/MS spectrometry

사용기기 및 분석조건은 제 3장의 조건과 같이 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Py/GC/MS 신속 검출법에 의한 EMC치즈의 풍미성분 분석

그림 1.의 pyrogram을 보면 저분자량의 휘발성 풍미성분들과 Sulphur화합물 등이 검출되지 않았다. 원인은 시료가 250℃에서 20초간 열처리과정에서 가열 분해된 것으로 판단된다. 풍미성분의 정량분석적 응용성 보다 정성분석을 통한 신속한 discrimanative 분석에 중점을 두고 꾸준히 활용성을 연구할 필요성이 있다고 생각된다.

Figure 12. Pyrograms of EMC prapared by combination of Neutrase /exopeptidase from *L. casei*(EMC-NL) and Neutrase/lipase(EMC-NP).

나. EMC 치즈의 풍미성분 비교

Py/GC/MS결과 각각의 시료로부터 aldehydes, ketones alcohols, fatty acids 및 lactone 등의 약 20여 종류, 모두 23여종의 풍미성분이 동정되었다 (표 12, 13, 14, 및 15).

EMC-NL의 풍미성분중에는 alcohol류로서 acetone 성분으로부터 유래된 것으로 보이는 2-propanol이 검출되었으며, 대조치즈(mild 체다)에서도 동정된 성분으로서 EMC-NL의 관능이 대조치즈와 유사한 이유중의 하나로 판단된다. 그러나 2-Propanol은 숙성이 진행되면서 분해되어 소멸되는 것으로 보이며, 치즈의 중요한 풍미성분이긴 하지만 지나친 함량에 이르면 바람직하지 못한 풍미의 원인이 되기도 한다. EMC-NP는 지방분해효소이므로 산패취를 내는 위험성도 있으나, 조절된 환경하에서는 강한 치즈풍미를 조화시키기도 한다. 따라서, EMC치즈는 acetic acid와 butyric acid를 제외하고는 mild cheddar 보다는 더욱 숙성된 체다치즈와 유사한 지방산 조성을 보였다.

Table 12. Comparision of Aldehydes in Cheddar cheeses and EMC cheeses with different peptidases

Flavor compounds	Mild Cheddar		EMC-NL		EMC-NP	
	RT(min)	Area/mg	RT(min)	Area/mg	RT(min)	Area/mg
Benzene acetadehyde		1.20E+06	14.44	4.60E+05	-	-
Nonanal		2.80E+05	14.90	1.60E+05	-	-
2-Decenal		2.50E+05	-	-	-	-
2-Dodecanal		3.50E+05	-	-	-	-

Table 13. Comparision of Ketones in Cheddar cheeses and EMC cheeses with different peptidases

Flavor compounds	Mild Cheddar		EMC-NL		EMC-NP	
	RT(min)	Area/mg	RT(min)	Area/mg	RT(min)	Area/mg
2,3-Butanedione		-	10.4	2.20E+06	-	-
2-Nonanone		9.40E+05	14.66	7.80E+05	18.76	1.70E+06
2-Undecanone		9.70E+05	17.97	5.70E+05	-	-
2-Tridecanone		8.90E+05	21.46	6.00E+05	26.63	7.40E+05
2-Pentadecanone		6.60E+05	24.87	5.20E+05	30.16	6.80E+05

Table 14. Comparision of Alcohols in Cheddar cheeses and EMC cheeses with different peptidases

Flavor compounds	Mild Cheddar		EMC-NL		EMC-NP	
	RT(min)	Area/mg	RT(min)	Area/mg	RT(min)	Area/mg
2-Propanol		4.30E+06	12.18	1.50E+07	-	-
1,2-Propnaediol		2.80E+05	-	-	12.79	1.10E+08

Table 15. Comparision of Fatty acids in Cheddar cheeses and EMC cheeses with different treatmens.

Flavor compounds	Mild Cheddar		EMC-NL		EMC-NP	
	RT(min)	Area/mg	RT(min)	Area/mg	RT(min)	Area/mg
Acetic acid			8.7	1.50E+05	11.18	8.20E+06
n-Butyric acid					9.1-10.75	3.00E+07
Hexanoic acid		3.80E+06	11.65	6.00E+06	11.94	2.20E+07
Octanoic acid		2.30E+06	15.59	4.70E+06	20.3-20.4	3.49E+07
Benzoic acid					20.68	2.00E+06
Decanoic acid		6.40E+06	19.02	4.60E+06	24.39	3.60E+07
Undecanoic acid					25.91	3.60E+07
Dodecanoic acid		3.00E+06	22.43	1.92E+06	27.84	3.20E+07
Propanoic acid		1.40E+06			28.34	1.80E+06
Tetradecanoic acid			25.83	6.20E+05	31.28	2.30E+07
Hexadecanoic acid			25.9	1.10E+06		

4. 적 요

.Pyrolysis/GC-MS 분석방법으로 EMC와 Cheddar치즈를 분석한 결과 총 23종류의 풍미성분들이 동정되었다. 동정된 성분들은 Aldehydes 4종, Ketones 5종, Alcohols류 2종, Fatty acids 11종, 기타 성분 1종이었다. 조효소+endopeptidase 처리한 EMC의 풍미성분을 Mild Cheddar치즈와 비교한 결과, 동일한 11종의 성분이외에 acetic acid, 2,3 butanedione, tetradecanoic acid 그리고 tridecanlactone 등이 더 검출되었으며, Exopeptidase 조효소+lipase 처리한 EMC의 경우 동일한 10종의 성분이외에 1,2-propanediol, benzoic acid, undecanoic acid, Tetra- 및 hexanoic acid 등이 더 검출되었다.

제 5 절 참고 문헌

Arora, G., B. H. Lee., and M. Lamoureux. 1990. Characterization of enzyme profiles of *Lactobacillus casei* species by a rapid APIZYM system. J. Dairy Sci., 73: 264-273.

Arora, G., F. Cormier., and B. H. Lee. 1995. Analysis of odor- active volatiles in Cheddar cheese haed space by multidimensional GC/MS/Sniffing. J. Agri. Food Chem. 43:748-752.

Aston, J. W., and J. R. Dulley. 1982. Cheddar cheese flavor. Aust. J. Dairy Technol. 37:59-64.

Banks, J. M., E. Y. Brechany, W. W. Christie, E. A. Hunter, and D. D.

Muir. 1992. Volatile components in steam distillates of Cheddar cheese as indicator indices of cheese maturity, flavour and odour. Food Research International. 25. 365-373.

Benkler, K. F., and G. A. Reineccius. 1979. Separation of flavor compounds from lipids in a model system by means of membrane dialysis. J. Food Sci. 44:1525-1529.

Bills, D. D., and E. A. Day. 1964. Determination of the major free fatty acids of Cheddar cheese. J. Dairy Sci. 47:733-

Bills, D. D., Morgan, M. E., Libbery, L. M. 1965 Identification of compounds responsible for fruity flavor defects of experimental Cheddar cheese. J. Dairy Sci. 48:1168-1176.

Bosset, J. O., and R. Gauch. 1993. Comparison of the volatile flavor compounds of six European "ACC" cheese by using a new dynamic head space GC/MS method. Int. Dairy J. 3:386-377.

Bouton, Y., and R. Grappin. 1994. Measurement of proteolysis in cheese : relationship between phosphotungstic acid-soluble N fraction by kjeldahl and 2, 4, 6-trinitro-benzenesuphonic acid- reactive groups in water soluble N. J. Dairy Res. 61;437-440.

Casey, M. G., and J. Meyer. 1985. Presence of X-prolyl-dipeptidyl peptidase in lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 68:3212-3215.

CDC analytical, INC. 1500GC interface operating manual. Oxford, PA. 19363-20277.

Champion, H. M., and D. W. Stainley. 1982. HPLC separation of bitter peptides from Cheddar cheese. Can. Inst. Fd. Sci. Technol. J. 15:283-291.

Chin, H. W., R. A. Bernhard., and M. Rosenberg. 1996. Solid phase microexatraction for cheese volatile compound analysis. J. Food Sic.

61:1118-1122, 1128.

Cliffe, A. J., B. A. Law. 1990. Peptide composition of enzyme-treated Cheddar cheese slurries, determined by reverse phase HPLC. Food Chemistry. 36:73-80.

Cliffe, A. J., B. A. Law. 1991. A time course study of peptide production in accelerated ripened Cheddar cheese using reverse phase HPLC. Food Biotechnol. 5:1-17.

Cliffe, A. J., J. C. Marks., and F. Mulholland. 1993. Isolation and characterization of non-volatile flavors from cheese ; peptide profile of flavor fractions from Cheddar cheese determined by HPLC. Int. Dairy J. 3:379-387.

Contarini, G., and P. M. Toppino. 1995. Lypolysis in Gorgonzola cheese during ripening. Int. Dairy J. 5:141-155.

Corradini, C., and E. Neviani. 1994. Determination of lipolytic action in cheese. Bulletin of IDF. No. 294:17-18.

Cort, W. M., and L. K. Riggs. 1967. Enzymatic process of making cheese and cheese products. U.S. Patent. 3,295,991.

Day, E. A. and Libbery, L. M. 1964. Cheddar cheese flavor: gas chromatographic and mass spectral analysis of the neutral components of the aroma fraction. J. Food. Sci. 29:583-594.

De Jong, C., and H. T. Badings, H. T. 1990. Determination of free fatty acids in milk and cheese. Procedures for extraction, clean-up and capillary gas chromatographic analysis. J. High Resolution Chromatogr. 13:94-98.

Desmazeud, M. J. and J. C. Gripon. 1970. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. Milchwissenshaft. 32:731-734.

Dimos, A., G. E. Urbach., and A. J. Miller. 1996. Changes in falvor and

volatiles of full-fat and reduced-fat Cheddar cheese during maturation. Int. Dairy Sci. 6:981-995.

Culley, J. R. 1976. The utilization of cheese slurries to accelerate the ripening of Cheddar cheese. Austr. J. Dairy Technol. 31:143-148.

Dwivedi B. K. 1975. The role of enzymes in food flavors, CRC Handbook, Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredents.

El Soda, M, Desmazeaud, M. J., and Berger, J. L., 1978. Peptide hydrolase of Lactobacillus casei: Isolation and general properties of various peptidase activities. J. Dairy Res. 45: 445-55.

Engels, W. J. M., R. Dekker., C. de Jong., R. Netter., and S. Visser. 1997. A comparative study of volatile compounds in the water- soluble fraction of various types of ripened cheese. Int. Dairy J. 7:225-263.

Engels, W. J. M., S. Visser. 1996. Development of cheese flavour from peptides and amino acids by cell-free extracts of Lactococcus lacits subsp.cremoris B78 in a model system. Neth. Milk and Dairy J. 50:3-17.

Frister, H. 1996. Qualitative instrumental analytical assessment of proteolytic cheese ripening. Milchwirtschaft. 47:169-173.

Furtula, V., S. Nakai., G. F. Amantea., and L. Laleye. 1994. RP-HPLC analysis of cheese samples aged by a fast-ripening process. J. Food Sci. 59:528-532, 567.

Gonzales de Llano, D., M. C. Polo., and M. Ramos. 1995. Study of proteolysis in Artisnal cheese : HPLC of peptides. J. Dairy Sci. 78:1018-1024.

Gouldsworthy, A. M., J. Leaver., and J. M. Banks. 1996. Application of a mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in Cheddar cheese. International Dairy J. 6: 781-790.

Harper, W. J. 1959. Chemistry of cheese falvor. J. Dairy Sci. 42:207-215.

Horwood, J. F., and G. T. Lloyd. 1980. A reliable GC method for the determination of the lower free fatty acids in cheese. The Australian J. Dairy Technology. 35:30-41.

Humbert, E. S., and R. C. Linsay. 1969. Comparision of methods to determine the free fatty acid content of butter. J. Dairy Sci. 52:1862-1870.

Humbert, G., M. F. Guingamp., R. Kouomegne., and G. Linden. 1990. Measurment of proteolysis in milk and cheese using trinitrobenzene sulphonic acid and a new dissolving reagent. J. Dairy Res. 57:143-148.

Huygues-Despointes, A., V. A. Yaylayan., and Keyhani, A. 1944. Pyrolysis GC/MS analysis of 1-[(2'-carboxyl pyrrolydinyl)-1-deoxy -D-fructose] (Amadori proline). J. Agric. Food Chem. 42:2519-2524.

Irwin, W. J. 1979. Analytical Pyrolysis - An Overview. J. of Analytic. & Appl. Pyrolysis. 1. 89-122.

Law B. A. 1984. Flavor development in Cheddar cheese. *In* Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Elsevier Applied Science Publishing. London. Eds. pp187-208.

Law B. A., M. J. Castanon., and M. E. Sharpe. 1976. The contribution of starter streptococci to flavor development in Cheddar cheese. J. Dairy Research 43:301-310.

Lawrence, R. C., L. K. Creamer., J. Gilles., and F. G. Martley. 1972. Cheddar cheese flavor 1. The role of starters and rennets. N. Z. Dairy Sci. Technol. 7:32-44.

Ledford,R. A. 1969. Direct GC measurment of acetic, propionic, and butyric acids in milk serum and aqueous extracts of cheese. J. Dairy Sci. 52:949-946.

Lee, B. H., S. Hache., and R. E. Simard. 1986. A rapid method

differentiation of dairy lactic acid bacteria by enzyme systems. J. Ind. Microbiol. 1:209-216.

Lee, H. J., N. F. Olson., and D. B. Lund. 1978. High pressure injection of fluids into cheese. Process Biochem. 13:14-18.

Lee, K. D., C. G. Lo., and J. J. Warthesen. 1996. Removal of bitterness from bitter peptides extracted from Cheddar cheese with peptidases from *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11. J. Dairy Sci. 79:1521-1528.

Lee, K. P. D., and J. J. Warthesen. 1996. Preparative methods of isolating bitter peptides from Cheddar cheese. J. Agri. Food Chem. 44:1058-1063.

Lee. S. Y., and B. H. Lee. 1990. Esterolytic and Lipolytic Activities of *L. casei* subsp. *casei* LLG. J. Food Sci. 55:119-121, 126.

Liebich, H. M., R. D. Duglas., E. Bayer., and A. Zlatkis. 1970. Comparative chracterization of different types of cheese by gas- liquid chromatography. J. Chromatogr. Sci. 8:351-354.

Lowrie, R. J., and R. C. Lawrence. 1972. Cheddar cheese flavor . **IV**. A new hypothesis to account for the development of bitterness. N. Z. J. Dairy Sci. Technol. 7:51-58.

Magee, E. L. Jr., and N. F. Olson. 1981. Microencapsulation of cheese ripening systems ; formation of microcapsules. J. Dairy Sci. 64:600-610.

Manning D. J. H. E. Nursten. 1985. Flavour of milk and milk products *In* Developments in Dairy Chemistry-III. pp.217 238., Elsevier Applied Science, London & New York.

Manning. D. J., and J. C. Price. 1977. Cheddar cheese aroma : The effect of selectively removing specific classes of compounds from cheese headspace. J. Dairy Res.44:357-361.

Marsili R. T., H. Ostapenko., R. E. Simmons, and D. E. Green. 1981. High

performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. J. Food Sci. 46:52-57.

Minagawa, E., S. Kaminogawa., F. Tshukasaki., and K. Yamauchi., 1989. Debittering mechanism in bitter peptidases of enzymatic hydrolysates from milk casein and their chemical structure. Agri. Biol. Chem. 34: 1235-1242.

Mindrup. R. F. 1998. Analyses of flavor and aroma volatiles in whole fruits, using SPME/GC. The Reporter, Recent Developments in Separation Technologies. 17:12-14.

Moskowitz, G. J., and S. S. Noelck. 1987. Enzyme-Modified cheese Technology. J Dairy Sci 70:1761-1769.

Najim, N. H., and C. H. White. 1990. Some factors affecting fatty acid content and quality of Cheddar cheese. Cultured Dairy Products J. 25:5-9, 11, 31.

Nakanishi, T., and M. Itoh. 1974. Application of a protease produced by Aspergillus oryzae B for cheese curd ripening. Chem. Abstr. 80:144471 d.

Chren, J. A. and S. L. Turkey. 1969. Relation of flavor development in Cheddar cheese to chemical in the fat of the cheese. J. Dairy Sci. 52:598-607.

Cllikainen, P. 1990. Titration - a rapid method for the determination of proteolysis in cheese. J. Dairy Res. 57:135-139.

Clson, N. F. 1990. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. FEMS Microbiol. Rev. 87:131-148.

Park, S. Y., B. F. Gibbs., and B. H. Lee. 1995. Effects of crude enzyme of *Lactobacillus casei* LLG on water-soluble peptides of enzyme modified cheese. Food Research International. 28:43-49.

Patton, S. 1963. Volatile acids and aroma of Cheddar cheese. J. Dairy

Sci. 46:856-866.

Peterson, M. H., and M. J. Johnson. 1949. Liberation of fatty acids during making and ripening of Cheddar cheese. J. Dairy Sci. 32:862-870.

Reville, W. J., and P. F. Fox. 1978. Soluble protein in Cheddar cheese : A comparision of analytical method. Ir. J. Fd Sci. 2: 67-76.

Roberts, M. J. 1972. Making American cheese from heat-treated milk. U.S. Patent 3,560,768.

Scarpillino, R., and Kosikovski, F. V. 1962. Evolution of volatile compounds in ripened raw and pasteurized milk Cheddar cheese observed by gas chromatography. J. Dairy Sci., 45. 343.

Seble, S., B. Haileselassie., B. H. Lee., V. A. Yaylayan., and B. Stewart. 2000. Analysis of volatile flavor compounds in Enzyme- Modified cheese and Cheddar cheese by using different methods. *In issueing*.

Singh, T. K., P. F. Fox., and A. Healy. 1995. Water-soluble peptide in Cheddar cheese : Isolation and identification of peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction. J. Dairy Res. 62: 629-640.

Smith, A. M., S. Nakai. 1990. Classification of cheese varieties by multivariate analysis of HPLC profiles. Can. Inst. Food Sci. Technol. 23:53-58.

Stadhouders, J. 1961. The hydrolysis of protein during the ripening of cheese - Some methods to accelerate the ripening. Neth. Milk Dairy. J. 15:151-164.

Tan, P. S. T., T. A. J. M. Van Kessel., F. L. M. Van de Veerdonk., P. F. Zuurendonk., A. P. Bruins., and W. N. Konings. 1992. Chap. IV. Degradation and debittering of tryptic digest from "β-casein by aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WG2. Ph.D

thesis. the University of Groningen. The Netherlands. p53.

Tieleman, A. E. 1992. Chracterization of the proteolytic products in cheese. Univ. Minnesota, Minneapolis, Dissertation Abstract.

Vandeweghe, P., and G. A. Reineccius. 1990. Comparison of flavor isolation techniques applied to Cheddar cheese. J. Agri. Food Chem. 38:1549-1552.

Woo, A. H., S. Kollodge., and R. C. Lindsay. 1984. Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. J. Dairy Sci. 67:874-883.

Wood, A. F., Aston, J. W., and Douglas, G. K. 1994. A cold-trap method for the collection and determination of head headspace compounds from cheese. Aust. J. Dairy Technol.49. 42-47.

Wood, A. H., and R. C. Lindsay. 1982. Rapid method for quantitative analysis of individual free fatty acids in Cheddar cheese. J. Dairy Sci. 65:1120-1109.

Yamamoto, T., K. Takahashi., M. Moshino., and M. Yoshidake. 1970. Effects of the amount of rennet and of temperature on the ripening Ceddar cheese. Dairy Sci. Abstr. 32:1915.

Yang, W. T., and Min. D. B. 1994. Dynamic headspace analysis of volatile compounds of Cheddar cheese and Swiss cheese during ripening. J. Dairy Sci. 59:1309-1312.

제 5 장 단기숙성치즈 제조원가 절감효과 분석

제 1 절 서론

우리나라의 유제품 소비동향을 보면 총 생산원유의 75%는 액상 유제품으로 소비되고 있으며, 나머지 25%는 요구르트, 분유류, 및 치즈로 가공되어 소비되고 있다(표 1). 이러한 소비동향은 아직까지 우리나라의 낙농식품 소비형태가 음료로서 소비되는 형태인 것을 말해주고 있다. 최근과 같이 낙농진흥회의 설립에도 불구하고 과다한 잉여유가 체화되는 것은 유제품의 소비형태의 다양화가 없이는 돌파구를 찾기 어려운 것을 짐작케 해주고 있다.

Table 1. Raw milk production and consumption patterns of milk products in Korea by year

연도	원유생산량 (M/T)	시유류		발효유류		분유류		치즈류	
		M/T	%	M/T	%	M/T	%	M/T	%
1990	1,751,758	1,336,452	76.29	352,896	20.14	59,014	3.37	6,713	0.38
1995	1,998,220	1,568,195	78.48	584,441	29.25	46,961	2.35	12,417	0.62
1999	2,243,941	1,690,445	75.33	558,985	24.91	47,767	2.13	34,957	1.58

(한국 유가공협회 자료, 2000)

우리나라의 치즈 소비동향을 보면, 80년대 초반기에 가공 슬라이스 치즈의 수요가 급증하고 80년대 후반기 부터는 모짜렐라 치즈의 소비가 증가하기 시작하여 93년도 부터는 자연치즈의 소비가 가공치즈의 소비를 앞지르기 시작하였다. 치즈의 소비형태를 보면, 국내에서 생산중인 체다치즈는 자연치즈서 소비되기 보다는 가공치즈의 원료용으로 대부분 사용되고 있으며, 가공치즈 또한 제품의 다양화가 실현되지 못한 채 소비가 정체상태(93년도 대비 105%증가)에 머무르고 있고 자연치즈(증가율 140%)가 치즈 소비증가를 주도하고 있다(표 2).

Table 2 The trends of domestic cheese consumption

연도	가공치즈 (A)	자연치즈 (B)	총소비량 (A+B)	B/(A+B)
93년	3,851톤	4,836톤	8,687톤	50.5%
95년	4,685톤	8,177톤	12,862톤	63.6%
97년	6,189톤	11,636톤	17,825톤	65.3%
소비증가율	60.7%	140.65%	105.2%	93년/97)

최근들어 새로운 종류의 수입 크림치즈의 소비가 서서히 증가하는 추세에 있으나 위의 표 2에서 보는 바와 같이 소비량은 그다지 높은 편은 아니다. 외구산 치즈의 수입은 국내의 소비자들에게 다양한 종류의 치즈제품을 소개하는 역

할을 하였으나, 한국 낙농산업의 위축과 국내 유가공업체의 치즈 생산의욕을 저하시키는 요인으로 작용하였으리라 생각된다.

따라서 단기숙성치즈의 제조기술개발로 숙성기간을 단축함으로써 제조원가 절감효과는 물론 자금회수기간 단축효과와 에너지 사용량 감소효과를 기대할 수 있을 것으로 생각되며, 그 외에도 효소생산산업의 기회부여로 인한 간접적인 산업기술축적 효과와 수입대체, 그리고 그에 따른 고용창출효과가 예상된다. 그러나, 제조원가 절감효과로는 국내 유가공산업체에서 체다치즈 생산재개의욕을 발생시킬 만한 큰 효과는 기대할 수 없겠으나 치즈용 원료유에 대한 보조금 지급 등과 같은 정책적 차원의 지원방안도 모색해야 할 것으로 생각된다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 효소 제품의 가격조사

가. 상업용 효소의 가격조사

상업용 효소들은 공급회사의 견적가격을 토대로 계산하였다.

나. 자체생산 효소의 가격조사

자체생산비용은 젖산균 배양에 소요되는 비용과 젖산균으로부터 효소를 추출하여 부분정제하는데 까지 소용된 비용을 나누어 산출하였으며, 부분정제에 관

련된 단위공정들의 비용은 유전공학연구센터에 임가공하였을 때 요청하는 가격을 적용하였다.

2. 치즈 제조비용의 산출

국내에서 치즈를 생산하는 S유업과 N유업의 제조원가 산출방법을 토대로 작성하였으며, 숙성비용은 외국에서 체다치즈를 숙성하는 비용을 적용하였으며, 숙성기간은 정산숙성 치즈는 8개월, 단기숙성치즈는 3개월로 산출하였다. 제조원가는 숙성비 이전까지의 제조원가와 제조후 숙성비용을 비교 하였으며, 단기숙성을 위해 추가되는 원재료의 상승분과 숙성기간 단축에 따른 비용감소분을 비교하였으며, 숙성기간 장기화에따른 자본 회전율 감소에 의한 손실부분은 감안하지 않았다.

3. 국내 및 국외 치즈가격 조사

국내치즈 및 수입치즈의 국내 소매가격은 직접 대형유통점을 방문하여 조사하였으며, 수입치즈의 국내 유통가격은 수입회사로부터 자료를 구하여 조사하였다. 외국산 치즈의 가격은 외국 방문기회를 통하여 대형 식품점에서 가격과 인터넷 상의 on lie shop의 가격을 조사하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 치즈 판매가격

가. 수입치즈들의 국내 가격

95년도 현재 시중에서 판매되고 있는 치즈제품의 가격은 표 3과 같다. 그중 신선치즈로서 수입 판매되는 크림치즈의 소비자 가격을 보면 국내에서는 치즈가격이 치즈중 수분함량이나 생산수율에 관계없이 높은 가격이 형성되고 있음을 알 수 있다.

Table 3 The wholesale prices of various kinds of cheese in domestic market

품목구분	제품명	가격 (kg당)	소비량(94년)
자연치즈	카멤벨치즈	17,890원	
	브리치즈	17,890원	
	하바티치즈	9,315원	
	엠멘탈치즈	11,180원	
	체다치즈,에담치즈	8,500원	23.3톤
	크림치즈	11,180원	150톤(94년/95년)
피자치즈	블럭	6,500원 7,378원	6,823.9톤
	슈레드	6,200원 8,800원	(블럭+슈레드)
가공치즈	체다슬라이스	6,160원 6,260원	3,460.4톤
	고우다슬라이스	8,415원	6.3톤
	에멘탈슬라이스	7,760원	28.8톤 (95년)
	포션치즈	7,470원	

Table 4 Retailing prices of various kinds of imported cheese and domestic cheeses in supermarket.

제조처	치즈종류	포장단위	유통점 가격(원)	
			까루프	킴스
Buko	Cream cheese (natural)	200g	4,500	3,150
	(pineapple)	140g	3,100	
MD Foods	Camembert	125g	4,600	4,530
	Brie	125g	4,600	4,530
	Havarti	200g	4,600	
	Kids stick	80g	1,800	1,770
Kraft	Philadelphia cream cheese	200g	3,780	
	Parmesan	227g	7,800	
	Cheez whiz	145g	2,250	
Land-O-Lakes	Cheddar(mild)	226g	4,600	
	Parmesan	227g	7,650	
국산	서울체다슬라이스	400g		3,340
	서울앙팡치즈	180g		2,350
	피자치즈	500g		6,200
	피자치즈(슈레드)	500g		5,950

나. 숙성기간에 따른 차등가격

외국에서 판매되는 치즈의 가격은 숙성기간별로 차등단가를 적용하여 숙성비용에 대한 보상을 소매가격에 적용시키고 있다. 표 5에서 2000년 8월 20일 현지가격과 전자상거래를 위한 on-line shopping업체에서 책정한 가격을 보면, 판매방법에 따라 차이가 있으며, mild치즈는 전자상거래 가격이 낮았으나, 숙성기간이 길어지는 medium치즈 이후 부터는 가격이 훨씬 높았다. 숙성월령에 따라 치즈를 구분하였을 때 소매가격은 3단계의 가격 차등을, 전자상거래가격은 4단계의 차등가격을 설정하고 있으며, 가격차이는 소매가격은 파운드당 21센트, 전자상거래가격은 51센트에서 97센트까지 가격이 높은 것을 알 수 있었다. 이와 같은 숙성기간에 따른 소매가격의 상승은 숙성에 소요되는 냉동비용을 적절하게 반영하는 것이라고 볼 수 있다.

Table 5. Prices differences of foreign Cheddar cheese in retail shop and on line shop by ripening periods

치즈구분	파운드당 가격		차액	
	Retail shop*	Cn line shop**	Retail shop	Cn line shop
Mild	$3.56/lb	$3.25	-	-
Medium	$3.77/lb	$3.82	$0.21/lb	$0.57/lb
Old	$3.77/lb	$4.33	-	$0.51/lb
Extra old	$4.01/lb	$5.30	$0.24/lb	$0.97/lb

* 2000년 8월 20일 현지 가격임, **www.frontiernet.net

다. 수입 치즈의 국내단가

수입 체다치즈는 제조국가별로 상단한 차이를 보이고 있다. 호주산 체다치즈는 1톤당 2,200달러로 가장 낮은가격을 형성하고 있고, 미국산 체다치즈는 1톤당 4,000달러로 가장 높은 가격을 유지하고 있다. 그러나, 국내시장에서 출고되는 소매가격은 약 7000원/kg을 유지하여 국내산 가격(8,900원/kg)보다 1,900원 낮은 가격에 유통되고 있다.

2. 국내 치즈생산업체의 제조원가 산출

국내에서 체다치즈의 생산은 완전 중단되어 있으며 전량 수입에 의존하기 때문에, 체다치즈의 제조원가를 산출할 수 없었으며, 따라서, 제조공정이 유사한 모짜렐라치즈 제조원가를 기준으로 산출하였다. 모짜렐라 치즈는 체다치즈와 달리 숙성이 필요치 않으며, 저온에서 건조의 수준으로 약 2주이내 보관한다. 따라서 제조경비중 냉장비용이 적게 책정되었다. 그러나 수입체다치즈를 숙성 또는 냉동하는 비용은 주로 냉장창고 임대비용을 원가에 포함시키고 있는

것으로 나타났다. 따라서, 임대냉장실 숙성을 위한 차량 운행등 추가 비용발생도 예상된다. 원료유 가격은 계절별 원유 조성에 따라 차이가 있으나, 평균단가를 적용하였다.인건비는 98년도 평균 노무비를 적용하였다. 제조경비는 전기, 용수, 냉장 등 모든 utility를 적용한 것이며, 다른 생산품목과 동일하게 적용한 비용이었다.

Table 6. Prodcution costs of domestic cheese of 1 tonne

항목	가격	비율	비고
원재료비	7,569,300원	93.58%	
노무비	429,260원	5.31%	
제조경비	89,780원	1.11%	
총 제조원가	8,088,340원	100%	

2. 단기숙성치즈 제조원가 계산

가. 효소제품의 가격

1) 단백질 분해효소

Novo Nordisk 회사의 Neutrase 0.8L 제품은 가격이 16,000원/kg 이었으며, Flavozyme 1000L 제품은 40,000원/kg, Protamex제품은 58,000원/kg이었다.

2) 쓴맛펩타이드분해효소

본 연구진이 선발한 젖산균으로부터 실험생산공장규모로 젖산균을 배양하고 효소를 추출하여 실제 제조경비를 산출하고자 하였다. 그러나, 대량생산에 비하여 제조경비가 높을 것이라는 가정을 두었다. 효소제조단계중 UF정제후 농축된 효소로서 첨가하게 되므로 첨가량은 단기숙성치즈 1 kg당 4㎖을 사용하게

될 경우 1톤 치즈 제조시 2리터의 농축효소를 사용하게 되어 kg당 효소가격 52,209원을 적용하면 총 104,418원의 효소비용이 소요된다.

가) 부분정제효소 자체생산비

자체생산비는 배지원가, 제조경비, 부분정제를 위한 임가공비로 하였으며, 비용은 각각 340,940원/400리터, 125,330원, 1,100,000원으로서 총 1,566,280원이 소요되었다. 건조전 젖산균세포 생산량은 10kg, 이 균체를 파괴하여 추출한 조효소액을 부분정제한 후 효소생산량이 30kg이므로 효소의 가격은 52,209원/kg인 것으로 계산되었다.

나) 효소제조원가의 계산근거

젖산균 생장용 배지인 MRS를 국내산 원재료들을 사용하여 400리터의 배양액을 제조하는데 소요되는 가격은 340,940원/400리터 이었다. 인건비를 포함한 제조경비는 125,330원으로 하였다. 효소의 추출과 정제비용은 1회의 실험효소 생산과정을 통하여 추정하였다. 효소생산량은 50g 젖산균 세포를 600㎖의 완충액에 용해후 균질시켜서. 동량의 균체파괴액을 얻고 40 90% ammonium sulfate 처리후 원심분리하면 80%정도(약500㎖) 회수되며, 이를 다시 UF농축하면 약30%의 retentate를 회수(약 150㎖)할 수 있었다. 따라서 총 세포 생산량에 대하여 계산하면 약 30리터의 효소액을 얻게된다.

10,000g(총세포생산량)/50g(cell) x 150㎖(UF완료후 효소액) = 30,000㎖

이와 같은 공정을 외부(유전공학연구센터)에 의뢰하는 경우 임가공비를 110만원 요구한다. 이 공정에는 다음과 같은 단위공정을 거치게 된다. ①세포농축, ②완충액으로 세척, ③원심분리 (2와 3공장을 3회 반복),④ 세포파쇄를 위한 고압균질, ⑤ 저온에서 원심분리, ⑥ 효소단백의 염침전, ⑦ 염석 , 및 ⑧ UF분리농축 등이다.

3) 지방분해효소(상업용)

NCVO사의 제품인 Palatase는 국내에 사용한 실적이 없기 때문에 400,000원/kg 이라는 비싼 가격을 제시하였다. 이 가격은 물론 제조원가에 적용하였지만 풍미가 적합치 못하다는 관능검사결과에 따라 실제사용은 불가한 것으로 보인다. 일본 Amano사의 Lipase A와 Lipase R는 각각 20,000원/kg, 47,500원/kg 으로서 10kg을 주문단위로 하였을 때의 가격을 적용하였다.

나. 숙성비

국내에서는 제품별 냉장비용을 별도로 적용하지 않으며, 타 유제품을 포함한 냉장비용을 적용하기 때문에 총 제조원가에 미치는 영향 1.1%인 것으로 밝혀졌다. 그러나 국외에서 추정한 치즈숙성을 가동을 위한 냉동비용을 제조원가로 책정하고 있다. 호주에서는 $40/1톤/1개월로 책정하고 있으며, 이를 국내 치즈 제조원가에 산입할 경우에는 총제조원가의 3.96%(8개월기준)를 차지하는 것으로 나타났으며, 숙성기간을 3개월로 단축시킬 경우에는 총 제조원가의 1.46%로 감소되었다.

4. 정상숙성과 단기숙성 체다치즈의 제조원가 비교

정상치즈 제조 및 숙성원가는 8,568,340원/톤, 단기숙성치즈 제조 및 숙성원가는 8,520,758원/톤으로서 약간의 제조비용감소(64,132원/톤)는 발생되었으나 비용이 크게 감소되지 않았다. 정상숙성 치즈와 단기숙성치즈의 제조원가를 항목별로 비교하면 표 6에서 보는 바와 같다.

Table 6. Comparison of production costs between normal ripened cheese and accelerated ripened cheese

항 목		정상숙성치즈			단기숙성치즈			비 고
구 분	원료명	사용량	가 격	비 율 (%)	사용량	가 격	비 율 (%)	
원자재	원 유	10,000kg	7,300,000		10,000kg	7,300,000		
	스타아터	200kg			200kg			
	렌 넷	1kg			1kg			
	소 계		**7,569,300**	**93.58**		**7,569,300**	**92.03**	
추가 원자재	단백분해 효소				0.5kg	8,000		kg당 16,000원
	펩타이드 분해효소				2.0kg	104,418		kg당 52,209원
	지방분해 효소				0.5kg	23,750		kg당 47,500원
	소 계					**136,168**	**1.66**	
제 조 경 비	전기,용수, 냉장		89,780	1.11		89,780	1.09	피자치즈 기준
노무비			429,260	5.31		429,260	5.21	98년도 기준
소 계			**8,088,340**	**100**		**8,224,508**	**100**	
숙 성 공 정	숙성실 냉동비	8개월	320,000*		3개월	120,000*		$40/톤/월**
총 계			**8,408,640**	**103.96**		**8,344,508**	**101.46**	**- 64,132**

*국내에서는 숙성비용(위국기준 월40불/톤)을 원가에 감안하지 않고 있음.

**1$ = 1,000원 기준으로 하였음

단기숙성치즈 제조원가 상승은 3종류의 효소제제의 추가원자재 비용발생(136,758원/톤, 제조비의_1.66%)에 의한 것이었다. 비용감소부분은 숙성에 필요한 에너지 사용량 감소에 의한 것(360,000원/톤, 제조비외_1.46%)으로 나타났으며, 총 생산비에 대한 숙성실 온도유지에 필요한 냉동기 가동비는 정상치즈(8개월 숙성) 240,000원/톤 으로서 총제조원가의_3.96%를 차지하는 반면에,

단기숙성치즈(3개월 숙성) 120,000원/톤 으로서 총제조원가의_1.4%을 차지하였다.

따라서, 숙성기간을 약 3분의 1로 단축함으로써 제조원가 절감효과는 물론 자금회수기간 단축효과와 에너지 사용량 감소효과를 기대할 수 있었으며, 그 외에도 효소생산산업의 기회부여로 인한 간접적인 산업기술축적 효과와 수입대체, 그리고 그에 따른 고용창출효과가 예상된다.

제 4 절 적요

국내에서는 제조원가에 냉장비용을 제품별로 차등 적용하지 않고 있으며, 기타 유제품을 포함한 냉장비용을 적용하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 국내에서 체다치즈의 생산이 중단되었기 때문에 다른 종류의 치즈(모짜렐라 치즈)의 제조원가에 별도의 숙성비용, 즉 임대냉장비용을 사용하고 있다. 본 연구에서는 국외에서 추정한 냉동비용을 제조원가에 책정시켰으며, 약 8개월간의 숙성비용은 총제조원가의 3.96%를 차지하는 것으로 나타났다. 반면, 본 연구진에 의해 개발된 제조기술에 의하여 숙성기간을 3개월로 단축시킬 경우에는 총 제조원가의 1.46%로 감소시킬 수 있었다.

정상치즈 제조원가는 8,408,640원/톤, 단기숙성치즈는 8,344,508원/톤으로서 효소제품의 사용으로 인한 제조원가 상승요인이 발생되었으나 약간의 제조비용 감소(64,132원/톤)효과가 있었다.

따라서, 숙성기간을 약 3분의 1로 단축함으로써 제조원가 절감효과는 물론 자금회수기간 단축효과와 에너지 사용량 감소효과를 기대할 수 있었으며, 그 외에도 효소생산산업의 기회부여로 인한 간접적인 산업기술축적 효과와 수입대체, 그리고 그에 따른 고용창출효과가 예상된다. 그러나, 이정도의 제조원가 절감효과로는 국내 유가공산업체에서 체다치즈 생산재개 의욕을 발생시킬 만한 효과는 아닌 것으로 보이며, 치즈용 원료유에 대한 보조금 지급 등과 같은 정책적 차원의 지원방안이 팔요한 것으로 생각된다.

제 5 절 참고문헌

1. Fedrick, I. 1987. Technology and economics of the accelerated ripening of cheddar cheese. Australian J. of Dairy Technol. 33 36.

2. 박승용. 1996. 신선치즈의 제조와 이용. 신선유와 신선유제품-한국낙농의 활로. 한국낙농학회 심포지움 proceedings. p53 64.

3. 박승용. 2000. 농가형 유가공장 운영. 2000 농업기술교육교재(농가형 유제품 생산). 강원도 농업기술원. 23 49.

4. 유가공협회 자료. http//www.koreadia.or.kr

5. On line shop. www. frontiernet. net.