

치이즈 熟成에 關한 研究

第5報 Gouda-type 치즈의 窒素化合物의 變化

金 榮 教 · 金 鍾 式

高麗大學校 畜産學科

(1976年 2月 28日 受理)

Studies on Cheese Ripening

Part V. Degradation of Nitrogenous Compounds During the Ripening of Gouda-type Cheese

Yong-Kyo Kim and Jong-Shik Kim

Dept. of Animal Science, Korea University

(Received February 28, 1976)

Abstract

This experiment has been carried out to study the changes of caseins in Gouda-type cheese during ripening by the use of DEAE-cellulose column and polyacrylamide gel electrophoresis.

The results obtained were as follow:

1. The amount of water soluble nitrogenous compounds in the cheese ripened for 2 and 4 months was 19.03% and 30.61% for total nitrogen in the cheese, respectively. On the other hand, the amount of 5% NaCl soluble nitrogenous compounds in the cheese increased to 41.13% for 2 months ripening, but it decreased to 22.61% at 4th month.
2. By DEAE-cellulose column, various nitrogenous compounds of Gouda-type cheese were fractionated into 5 major and several minor peaks. The proportion of some fraction areas to the whole increased with the ripening period and the others decreased.
3. Electrophoretic patterns of various nitrogenous compounds in a 4-month-old cheese showed 5 and 8 bands, respectively.
4. Sixteen amino acids were identified in soluble and precipitable compounds at 12% TCA in a 4-month-old cheese.

結 論

前報^(1,2,3,4)에서 Brick 치즈와 Cheddar 치즈의 熟成中에 일어나는 各種 窒素化合物들의 變化形態를 報告하였으며, 本 實驗에서는 Gouda-type 치즈의 熟成中에 일어나는 乳蛋白質의 理化學的 變化를 究明하

고자 總窒素化合物, 5% NaCl 可溶性窒素化合物 및 水溶性窒素化合物를 anion exchange인 DEAE-cellulose 와 polyacrylamide gel electrophoresis를 使用하여 치즈 蛋白質의 分解過程의 究明과 分解物의 分別을 試圖하였으며 水溶性窒素化合物과 12% TCA 可溶性窒素化合物의 아미노酸을 分析하였다.

材料 및 方法

1. 치즈 製造

本實驗에서 使用한 치즈는 畜產試驗場에서 搾乳한 牛乳 100kg을 65°C, 30分 동안 殺菌하여 4°C로 冷却한 것을 原料乳로 하여 *Streptococcus cremoris*와 *Streptococcus lactis*를 각각 分離培養하여 原料乳의 0.5%, Hansen's rennet powder(力價 1:5,000)를 1%(W/V)溶液으로 原料乳의 0.02% 添加하여 Gouda-type 치즈를 Kosikowski⁽⁵⁾의 方法으로 製造하였으며 10±2°C, 90±5% RH의 조건에서 4個月 동안 熟成시켰다.

2. 化學分析

1) 窒素定量

總窒素, 5% NaCl 可溶性窒素, 水溶性窒素, 12% TCA 可溶性窒素의 量을 前報⁽⁴⁾와 같은 方法으로 試料를 調製하여 Kjeldahl 方法으로 定量하였다.

2) DEAE(diethyl aminoethyl) cellulose column chromatography

前報⁽⁴⁾와 같은 方法으로 하였으며 總窒素化合物은 製造直後, 熟成 2個月, 熟成 4個月에 각각 分別하였으며 5% NaCl 可溶性窒素化合物과 水溶性窒素化合物은 製造直後와 熟成 4個月에 각각 分別하였다.

Buffer는 總窒素化合物과 5% NaCl 可溶性窒素化合物의 分別에는 Tris-Citrate-Urea(TCU) buffer(pH 8.6, 0.005M tris, 6 M Urea), 水溶性窒素化合物의 分別에는 Tris-Citrate(TC) buffer(pH 8.6, 0.005 M tris)를 각각 使用하였다.

위의 方法에 따라 溶出된 各種 窒素化合物은 280 nm 또는 230 nm에서 測定하였다.

3) 電氣泳動

脂肪을 제거한 試料를 TCU buffer에 24時間 透析시킨 다음 前報⁽⁴⁾와 같이 6% polyacryl amide gel을 製造하여 18 mA로써 6時間 전개시켰다.

4) 아미노酸 分析

Gouda-type 치즈의 水溶性窒素化合物에 最終濃度가 12% 되도록 60% TCA를 添加하여 약 30分間 靜置한 다음 濾過하여 12% TCA에서 沈澱하는 部分과 可溶性인 部分을 分離한 다음 沈澱部分은 24時間 동안 加水分解한 것을 可溶性 部分은 加水分解하지 않은 것을 Varian Aerograph, Model 204의 Gas chromatogram에 의해서 아미노酸을 分析하였다.

結果 및 考察

熟成期에 따라 定量한 各種 窒素量은 Table 1과 같다.

Table 1. Changes of nitrogenous compounds in Gouda-type cheese during ripening

(N mg/g of cheese)

N compounds Months of ripening	Total N	Water soluble N	5% NaCl soluble N	12% TCA soluble N
0	39.02	2.01(5.13)*	4.20(10.76)*	0.83(2.13)*
2	39.10	7.44(19.03)	16.08(41.13)	3.02(7.72)
4	40.25	12.32(30.61)	9.20(22.86)	4.72(11.73)

*Number in parenthesis is percentage of soluble N for total N.

위에서 보는 바와 같이 水溶性窒素를 總窒素에 대한 比로써 表示한 바 製造直後, 熟成 2個月, 熟成 4個月에 5.13%, 19.03%, 30.61%로 각각 增加하였고 12% TCA 可溶性窒素 또한 2.13%, 7.72%, 11.72%로 각각 增加하였다.

그러나 5% NaCl 可溶性窒素는 製造直後 10.76%에서 熟成 2個月에 41.13%로 增加하였는데 熟成 4개월에는 22.86%로 減少하였다. 이와 같이 5% NaCl 可溶性窒素가 熟成에 따라 增加하였다가 減少한다는 것은 Van Slyke의 報告⁽⁶⁾와 같으나 그 原因은 究明하지 못하였으며 치즈의 風味와 關聯하여 보다 깊은 研究가 필요하다고 생각된다.

熟成期에 따라서 치즈 casein을 DEAE-cellulose를

使用하여 分別한 結果 Fig. 1과 같으며 分別된 各 fraction의 面積比는 Table 2와 같다.

그림에서 fraction A-I 즉 void volume은 TS-casein 혹은 para-κ-casein으로⁽⁷⁾ 생각되며 面積比는 19.7%, 23.2%, 30.0%로 熟成에 따라 增加된 것으로 보아 Gouda-type 치즈 casein에 있어서 熟成中에 casein의 分解物質들이 DEAE-cellulose에 吸着되지 않는 性質의 것으로 變化되었다고 할 수 있다. Fraction A-II와 A-IV를 비교해 보면 A-II의 面積比가 19.9%, 22.8%, 28.3%로 熟成에 따라 增加하였으며 A-IV는 44.4%, 38.0%, 27.0%로 減少하였다. 이것은 A-IV의 化合物이 分解되어 그 總量이 작아졌으며 分解된 物質들이 다른 fraction 즉 A-I 혹은 A-II로 나타났다고 생각된다.

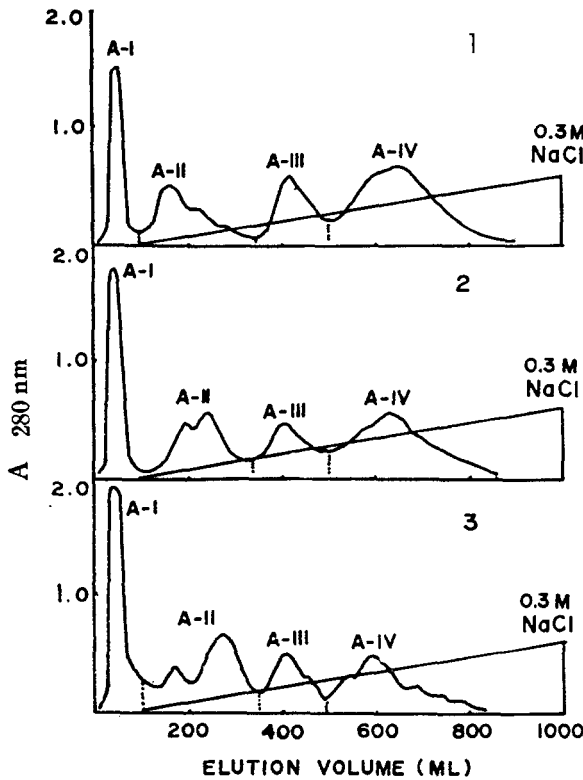


Fig. 1. Elution pattern of casein in Gouda-type cheese from DEAE-cellulose column with TCU buffer, pH 8.6, containing 2-mer captoethanol.

1. initial of ripening
2. 2 months of ripening
3. 4 months of ripening

Table 2. Variations in fraction area of cheese casein upon DEAE-cellulose column chromatography during ripening.

Fraction No.	A-I (void volume)			
	A-II	A-III	A-IV	(%)
Months of ripening				
0	19.7	19.9	16.0	44.4
2	23.2	22.8	16.0	38.0
4	30.0	28.3	14.7	27.0

다. Rose⁽⁷⁾에 의한 酸 casein의 分別에 따르면 fraction A-IV는 α_s -casein의 위치이므로 치즈中 α_s -casein은 熟成함에 따라서 점점 分解되어 그 分解物이 낮은 濃度の NaCl에서 溶出되거나 또는 DEAE-collulose에 吸着되지 않는 性質의 것으로 變化되었다고 볼 수 있다. 그러나 fraction A-III는 面積比가 16.0%, 16.0%.

14.7%로 다른 것보다 極히 적게 減少하였다. 이 結果는 A-III의 窒素化合物은 A-IV의 窒素化合物보다 적게 分解되었다고 볼 수 있다. Rose에 의한 酸 casein의 分別에 따르면 A-III는 β -casein의 위치이므로 치즈中 β -casein은 α_s -casein 보다 상당히 적게 分解되었다고 할 수 있다. 이와 같은 見解는 치즈 熟成에 關한 電氣泳動的 研究에서 볼 수 있는데 즉 치즈 casein은 熟成함에 따라 α_s -casein band가 점점 작아져서 주위에 여러개의 작은 band를 形成하고 結局에는 1년 이상된 치즈에서는 α_s -casein band 위치에서는 band를 거의 찾아 볼 수 없으며 반면에 β -casein은 長期間의 熟成後에 分解되어 電氣泳動移動도가 β -casein 보다 작은 여러개의 band가 나타났다고 한 報告^(8,9,10,11,12,13)와 같은 傾向을 나타내었다. 製造直後와 熟成 4個月된 Gouda-type 치즈의 5% NaCl 可溶性窒素化合物을 分別한 結果 Fig. 2와 같으며 각 fraction의 面積比는 Table 3과 같다.

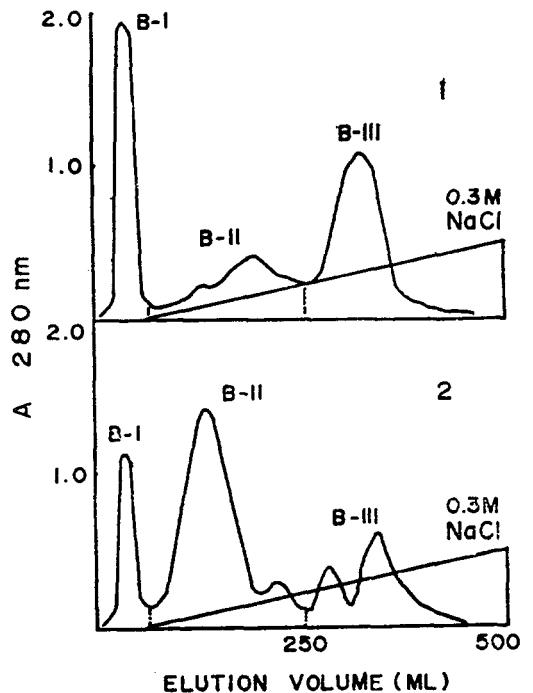


Fig. 2. Elution pattern of 5% NaCl soluble nitrogenous compounds in Gouda-type cheese from DEAE-cellulose column with TCU buffer, pH 8.6, containing 2-mercaptoethanol.

1. initial of ripening
2. 4 months of ripening

Table 3. Variations in fraction area of 5% NaCl soluble nitrogenous compounds upon DEAE-cellulose column chromatography during ripening.

Months of ripening	Fraction No.		
	B-I (void volume)	B-II	B-III
0	32	25	43
4	17	58	25

위에서와 같이 fraction B-III의面積比가 43%에서 25%로減少하였으나 B-II는 25%에서 58%로 상당히增加하였다. 이와 같은 결과는 5% NaCl 可溶性窒素化合物은 熟成됨에 따라 分解되어 낮은濃도의 NaCl에서 溶出되는性質의 것으로 變化되었다고 볼 수 있다.

製造直後와 熟成 4個月된 Gouda-type 치즈의 水溶性窒素化合物을 分別한 결과는 Fig. 3과 같으며 각 fraction의面積比는 Table 4와 같다. 水溶性窒素化合物은 相當量이 透析性物質이며⁽¹⁾ 여기서 分別한 水溶性窒素化合物은 非透析性物質이다.

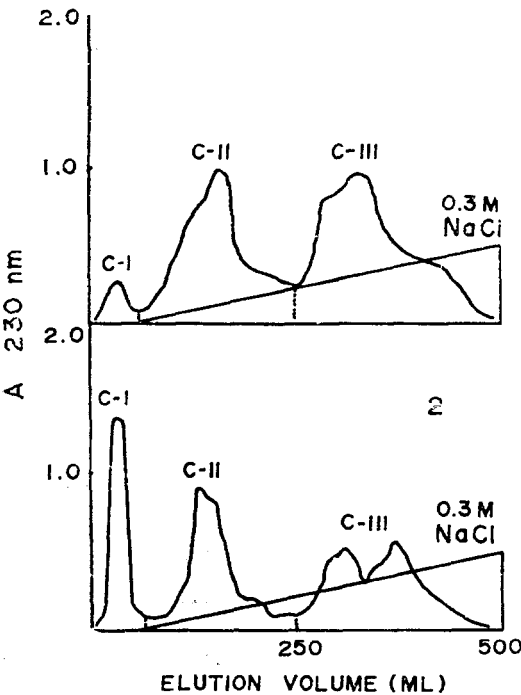


Fig. 3. Elution pattern of water soluble nitrogenous compounds in Gouda-type cheese from DEAE-cellulose column with TC buffer, pH 8.6.

1. initial of ripening
2. 4 months of ripening

Table 4. Variations in fraction area of water soluble nitrogenous compounds upon DEAE-cellulose column chromatography during ripening.

Months of ripening	Fraction No.		
	C-I (void volume)	C-II	C-III
0	1	42	57
4	27	33	40

水溶性窒素化合物의 일부는 280 nm에서는 吸光度를 거의 나타내지 않았으나 230 nm에서는 측정할 수 있었으며 5% NaCl 可溶性窒素化合物과는 상당히性質이 다른 것으로 볼 수 있다. 分別된 fraction面積比는 C-III과 C-II가 57%에서 40%로, 42%에서 33%로 각각 熟成에 따라減少하였으며 void volume은 1%에서 27%로 熟成에 따라서增加를 보였다. 이 결과는 水溶性窒素化合物은 熟成함에 따라 分解되어 DEAE-cellulose에 吸着되지 않는性質의 것으로 變化되었다고 볼 수 있다.

熟成 4個月된 Gouda-type 치즈를 電氣泳動한 결과는 Fig. 4와 같다.

치즈 casein은 α_s -, β -, κ -casein band 위치를 비롯하여 모두 8개의 band가 나타났다. 그러나 acid casein에 rennet를 12시간 작용시킨 것은 κ -casein band 위치에는 band가 보이지 않았으며 α_s -, β -casein band 위치를 비롯하여 모두 8개의 band가 나타났다. 이 결과는 acid casein에서는 κ -casein이 rennet작용을 받아 모두 para- κ -casein으로 變化하였다고 보며 치즈 casein의 경우 κ -casein band 위치에 나타난 band가 일면 α_s -, β -casein이 熟成중에 分解된物質이 이 위치에 나타났거나 또는 κ -casein이 物理的 조건에 의해서 그 일부만 rennet 작용을 받아서 para- κ -casein으로 變하고 나머지의 κ -casein이 泳動上에 나타난 것이라고도 생각할 수 있다.

5% NaCl 可溶性窒素化合物 및 不溶性窒素化合物, 그리고 水溶性窒素化合物은 각각 5, 5, 7개의 band가 나타났으며 확산된 흔적이 보였다.

치즈의 水溶性窒素化合物量은 치즈의 熟成도와 密接한關係가 있으며 金⁽³⁾이 前報에서 報告한 바와 같이 12% TCA 可溶性窒素化合物은 透析性인物質이며 대부분의 遊離아미노酸과 약간의 peptide를 含有하고 있다⁽¹⁴⁾. Table 5.에서 12% TCA에 의한 沈澱部分과 可溶性部分의 아미노酸 組成을 比較해 볼 때 아미노酸의 種類에 따라서는 그 含有率에 差異가 많은 것으로 나타나고 있다. 이와 같은 아미노酸의 組成率이

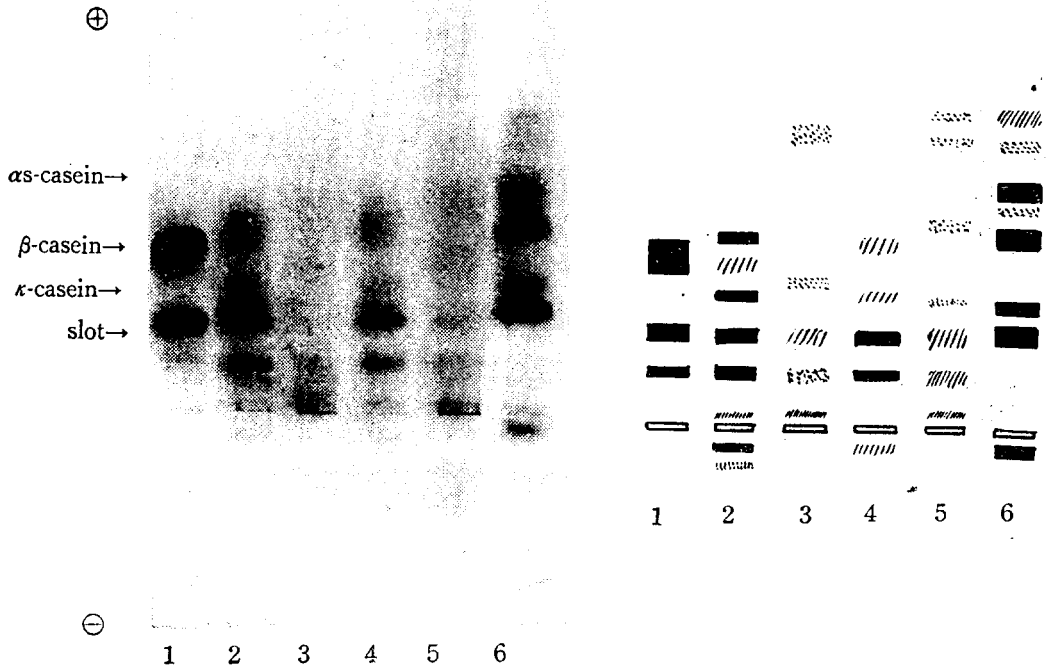


Fig. 4. Electrophoretic patterns of various nitrogenous compounds in 4-month-old Gouda-type cheese on 6% polyacrylamide gel. tris-buffer pH 8.6, 8 M urea, 2-mercaptoethanol, 18 mA. 6-8 hrs.

- 1. acid casein 2. cheese casein 3. 5% NaCl soluble nitrogenous compounds
- 4. nonsoluble nitrogenous compounds in 5% NaCl
- 5. water soluble nitrogenous compounds 6. acid casein+rennet (12 hrs)

Table 5. Amino acid composition of water soluble nitrogenous compounds in Gouda-type cheese ripened for 4 months

Component	Precipitable part in 12% TCA	Soluble part in 12% TCA
	(%)	(%)
Ala	2.61	1.26
Val	5.43	3.66
Gly	5.70	6.61
Ile	5.02	2.60
Leu	7.33	11.26
Pro	7.74	2.84
Thr	6.25	1.26
Ser	7.88	14.78
Cys	5.84	10.28
Met	Tr	1.75
Pro	Tr	Tr
Phe	4.21	6.33
Asp	6.65	4.61
Glu	20.10	17.24
Tyr	7.20	4.47
Lys	8.01	11.05
Trp	—	—

치이즈 熟成度 및 風味와 어떠한 相關關係가 있는지는 지금까지 明白히 究明되고 있지않으며 치이즈 熟成機構를 解明하는데 있어서 앞으로의 과제라고 할 수 있다.

要 約

本 實 驗 은 Gouda-type 치이즈의 熟成中 casein의 變化를 究明하고자 總窒素, 水溶性窒素, 12% TCA 可溶性窒素 및 5% NaCl 可溶性窒素의 量을 定量하여 比較 하였고 또한 DEAE-cellulose column과 polyacryl amide gel electrophoresis를 使用하여 그 變化를 實驗한 結果 는 다음과 같다.

- 1. 總窒素中 水溶性窒素量은 熟成 2個月과 4個月에 각각 19.03% 및 30.61%이었으며, 12% TCA 可溶性窒素量은 각각 7.72% 및 11.73%이었다.
- 2. 5% NaCl 可溶性窒素量은 總窒素中 製造直後에 10.76%에서 熟成 2個月에는 41.13%로 增加하였으나 熟成 4個月에는 22.86%로 減少하였다.
- 3. 各種 窒素化合物을 分加한 바 각각 모두 5개의 主 peak와 3~4개의 minor peak가 나타났으며 각

fraction의 面積比가 熟成期에 따라서 증가 또는 감소를 나타내었다.

- 4. 4個月 熟成된 치즈를 電氣泳動한 結果 窒素化合物에 따라서 5~8개의 band를 나타내었다.
- 5. 12% TCA에서 沈澱된 部分과 可溶性 部分을 아미노酸 組成을 分析한 바 모두 16개의 아미노酸으로 나타났으나 組成의 比率는 서로 다르게 나타났다.

辭 謝

本 論文은 財團法人 產學協同財團의 研究費에 의한 研究結果의 一部이며 同財團에 대해서 謝意를 表하는 바이다.

References

- 1. 金榮教, 金鍾式: 高麗大學校 農科大學 農林論集, 15, 199(1975).
- 2. 金榮教, 張柱翹, 金鍾式: 韓國畜產學會誌, 17, 643(1975).
- 3. 金榮教: 韓國畜產學會誌, 투고중 (1976).
- 4. 金鍾式, 張柱翹, 金榮教: 韓國畜產學會誌, 투고중 (1976).

- 5. Kosikowski, F.V.: *Cheese and Fermented Milk Foods*, Edwards Brother, Inc., Michigan, p. 224 (1970).
- 6. 乳業技術 講座 編輯 委員會編, 乳業技術 講座 2, 朝倉書店, 東京, p. 95 (1967).
- 7. Rose, D', D.T. Davis and M. Yaguchi: *J. Dairy Sci.*, 52, 8 (1969).
- 8. Creamer, L.K.: *J. Dairy Sci.*, 58, 287 (1975).
- 9. Gupta, S.K., R. M. Whitney and S. L. Tuckey: *J. Dairy Sci.*, 57, 540 (1974).
- 10. Ledford, R.A., A.C. Osullium and K. R. Nath: *J. Dairy Sci.*, 49, 1098 (1966).
- 11. Lindquist, B., and T. Stergards: *Milchwissenschaft*, 12, 467 (1959). [*Chemical Abstract*, 53, 15408 (1959)].
- 12. Melachouris, N.P. and S.L. Tudkey: *J. Dairy Sci.*, 49, 800 (1966).
- 13. Phelen, J.A., J. Guiney and P.F. Fox: *J. Dairy Res.*, 40, 105 (1973).
- 14. Schormüller, J.: *Advances in Food Research*, 16, 244 (1968).