

蛋白質分解 酵素 活性이 Cheddar Cheese의 品質에 미치는 影響

金 珉 培
順天大學校

Effect of Proteinase Activity on the Cheddar Cheese Quality

M. B. Kim
Suncheon National University

ABSTRACT

This study aimed increase the quality during ripening of Cheddar cheese made with proteinase-negative mutant of *Streptococcus lactis* KCTC 1913 selected by curing. The degradation of protein during cheese ripening were investigated by electrophoresis and chromatography.

The results were summarized as follows :

1. The number of lactic acid bacteria decreased with the ripening stage, and that of the control cheese decreased faster than that of the cheese made with mutant.
2. Polyacrylamide gel electrophoretic analysis of cheese caseins revealed no difference between the cheese made with mutant and the control cheese, but differences along with the ripening stage were evident.
3. On Sephadex G-25 column chromatography, the extracts of bitter components from the green cheese and 3 month ripended cheese were fractionated into 3 fractions. With the progress of ripening, bitter peptides were degraded to rather small peptides or free amino acids.
4. Sensory evaluation of the 3 month ripended Cheddar cheese found no significant differences in color but the cheese made with mutant evidenced higher palatability in flavor and better texture than the control cheese.
5. The yields of thr cheddar cheese made with mutant was 0.14% higher than that of the control cheese.

I. 緒 論

Cheese의 숙성중 蛋白質 분해는 微生物學的, 生化學的 및 化學的 變化에 의하여 cheese 특유의 風味와 조직의 특성을 나타낸다. (Creamer 등, 1982; McMahan과 Brown, 1984)

Cheese에서 蛋白質 分解정도는 조직의 형성에 매우 중요하며, cheese의 主蛋白質인 casein은 蛋白質分解 酵素(Proteinase)의 작용에 의해 疏水成이 감소하고 endopeptidase에 의해 蛋白質, 乳糖, 脂肪이 각각 아미노산, 乳酸, 脂肪酸으로 변화하는 1차 分解가 일어나고 exdopeptidase의 酵素 작용에 의해 이들 1차 생성화합물이 다시 변화하

는 2차 分解가 일어나는데 이러한 2차 分解에 의해 cheese의 形態와 品質이 결정된다. (Rank 등, 1985)

Torrie 등(1983)과 Toyoda와 Kikuchi(1983) 등은 proteinase-negative(prt⁻)變異株가 protease-positive(prt⁺) 菌株에 비하여 苦味の 발생이 감소되어 風味가 좋은 cheese를 만들 수 있다 하였고 O'Leary와 Hicks(1982)는 prt⁻變異株로 제조한 Cheddar cheese의 생산수율이 prt⁺균주로 제조한 것보다 높다 하였다. 또한 Kosikowski와 Iwaki(1975), Toyoda와 Kikuchi(1983) 및 Richardson 등(1983)은 이러한 proteinase의 특성을 이용하여 cheese의 숙성을 조절하는 새로운 cheese제조방법을 개발한바 있다.

따라서 本 研究에서는 *Streptococcus lactis*의 protease-negative 變異株로 제조한 Cheddar cheese의 숙성중 蛋白質 變化를 비교 검토함으로써 蛋白質分解 酵素 活性이 Cheddar cheese의 品質에 미치는 影響에 대하여 조사하였다.

II. 材料 및 方法

1. Cheddar cheese의 製造

각종 原乳 檢査에 합격한 新鮮한 牛乳를 65℃에서 30분간 低溫 殺菌하여 前報(金, 1991)의 Prt⁺ 菌株과 Prt⁻ 變異株를 사용하여 常法에 따라 제조하였다.

2. Cheese의 特性分析

1) 젖산 bacteria數 調査

숙성중 cheese의 젖산 bacteria數 측정은 0.1% peptone 용액에 稀釋한 cheese를 0.002% NaN₃와 0.004% bromcresolpurple을 添加한 M17-glucose배지에 接種한 후 48時間 平板培養하여 blue color를 yellow color로 환원시키는 젖산bacteria數를 조사하였다.

2) Cheese casein의 電氣泳動

Cheese casein을 Davies(1964)의 方法에 따라 polyacrylamide gel 電氣泳動 하였다.

3) Sephadex G-25 column chromatography

Harwalkar와 Elliot(1971)의 方法에 따라 苦味成分을 추출한후 Sephadex G-25 column으로 苦味成分을 分別하였다.

4) 官能檢査

3개월 熟成시킨 Cheddar cheese를 혼련된 20명의 官能 檢査 要員에게 風味의 強度와 組織 特性 및 色澤에 대해 Davies와 Law(1984)의 方法에 따라 官能檢査를 실시하였다.

5) Cheese의 生産收率

Cheese의 生産 수율은 AOAC(1990) 및 Kosikowski(1977)의 方法으로 조사 하였다.

III. 結果 및 考察

1. 젖산 bacteria數의 變化

野生型 菌株과 變異株로 제조한 Cheddar cheese의 숙성중 젖산bacteria數의 變化는 Fig. 1과 같다.

젖산 bacteria의 數는 熟成시작시 野生型 菌株과 變異株로 제조한 cheese에 각각 7.8×10^8 cfu/ml과 3.8×10^8 cfu/ml로 野生型 菌株로 제조한 cheese에 變異株로 제조한 cheese보다 2배 이상 많았으나, 숙성 3개월째에 野生型 菌株로 제조한 cheese는 1.2×10^6 cfu/ml로 현저한 減少를 나타내었으며, 變異株로 제조한 cheese는 3.2×10^6 cfu/ml로 完만한 減少를 나타내었다. 이는 野生型 菌株과 變異株가 cheese 내의 環境條件下에서의 그 生長이 다르기 때문이며, 또한 兩 菌株의 營養要求性과 食鹽耐性 등이 각각 틀리기 때문이라 사료되며 *S. cremoris*의 蛋白質分解 高活性株와 低活性株로 제조한 Gouda cheese숙성중 젖산 bacteria數가 高活性株로 제조한 cheese의 경우에는 현저히 감소하였고 低活性株로 제조한 경우에는

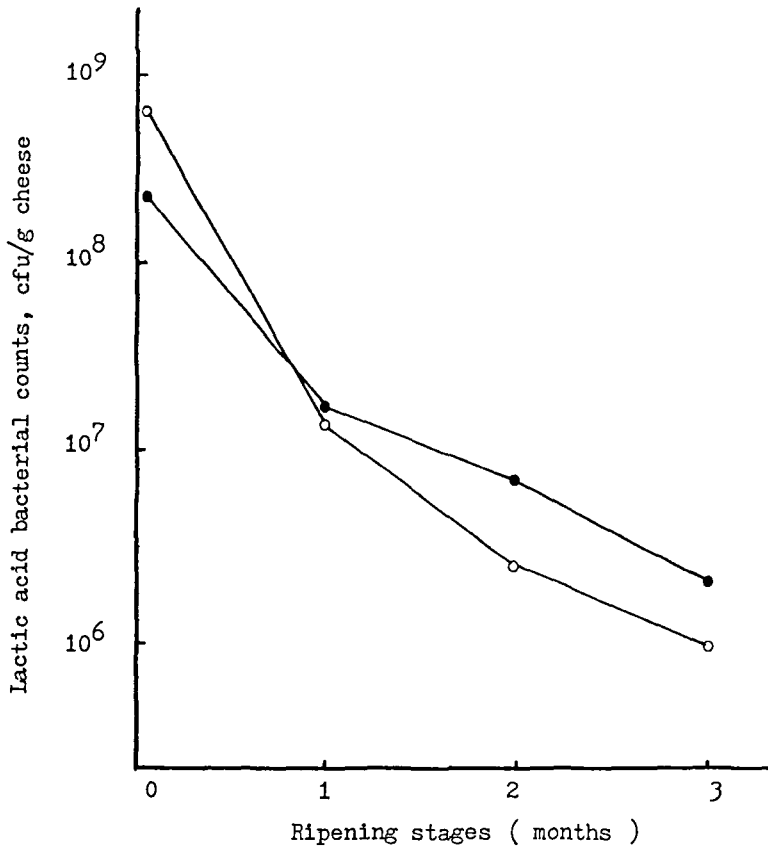


Fig. 1. The variation of lactic acid bacterial counts in Cheddar cheese at different ripening stage.

○ - ○ : *S. lactis* 1913, ● - ● : *S. lactis* 1913 C-1

완만한 감소를 보였다고한 Toyoda와 Kikuchi (1983)의 보고와도 같은 결과를 나타내었다.

2. Cheese casein의 電氣泳動

Cheddar cheese의 숙성중 蛋白質 分解를 polyacrylamid gel 전기영동에 의해 조사한 결과는 Fig. 2와 같다.

제조직후의 cheese casein은 11개의 band로分離되었는데 α_{s1} -casein이 분해작용 받아 생성되는 α_{s1} -I casein 위치에 새로운 분리대가 2개 형성되었으며, β -casein보다 移動度가 느린 위치에 4개의 새로운 분리대가 나타난 것을 관찰할 수 있었다.

1개월 숙성후에는 α_{s1} -casein이 좀더 많이 분해

되어 α_{s1} -I의 濃度가 더욱 짙어졌으며 숙성 2개월에는 14개의 band로 분리되었으며 숙성 3개월에는 16개의 band가 관찰되었다. 이러한 결과는 α_{s1} -I casein은 rennet나 starter bacteria의 蛋白質 分解酵素에 의해 分解되어 低分子 물질로 된다는 Marcos 등(1979)의 보고와 β -casein은 매우 서서히 분해되며 분해속도는 cheese의 수분함량과 pH에 좌우된다는 Creamer(1975)의 보고와도 경향을 같이 하였다.

한편 變異株와 野生型 菌株 제조한 cheese casein의 電氣泳動圖상에 별다른 차이점을 발견하지 못하였는데 이는 Farkye 등(1990)의 *L. lactis* ssp. *cremoris* UC 317과 그 prt- 變異株로 제조한 cheese casein은 電氣泳動度상에 차이가 나타나지

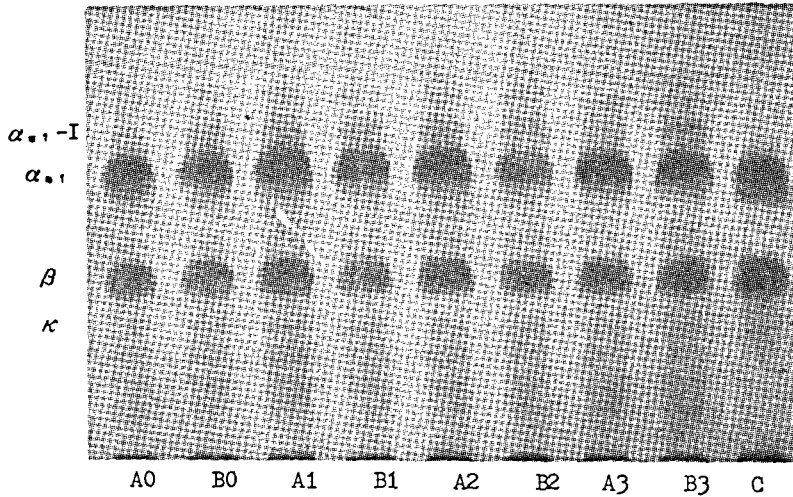


Fig. 2. Electrophoretic patterns of casein in Cheddar cheese on polyacrylamide gel electrophoresis at different ripening stage.

A0: Green cheese made with *S. lactis* 1913

B0: Green cheese made with *S. lactis* 1913 C-1

A1: 1 month ripened cheese made with *S. lactis* 1913

B1: 1 month ripened cheese made with *S. lactis* 1913 C-1

A2: 2 month ripened cheese made with *S. lactis* 1913

B2: 2 month ripened cheese made with *S. lactis* 1913 C-1

A3: 3 month ripened cheese made with *S. lactis* 1913

B3: 3 month ripened cheese made with *S. lactis* 1913 C-1

C : Acid casein in raw milk

않는다는 보고와 崔(1986)의 *S. lactis* CH-1과 그 prt- 變異株 添加가 숙성중 cheese casein의 일반적인 蛋白質分解에는 큰 영향을 미치지 않는다는 보고 등과도 동일한 경향을 나타 내었다.

3. Sephadex G-25 column chromatography

Sephadex G-25 column으로 cheese 숙성중 苦味成分을 分別한 결과는 Fig. 3 및 4와 같다.

野生型 菌株과 變異株로 제조한 cheese는 제조 직후와 숙성 3개월제에 각각 3개의 fraction으로 分別되었으며, 제조 직후의 cheese에 비하여 3개월 숙성시킨 cheese에서는 分子量이 비교적 큰 물질이 流出되는 fraction A부분이 감소하는 반면 分子量이 비교적 적은 물질이 流出되는 fraction

B와 C부분이 증가하는 현상을 볼 수 있었으며 제조 직후에 비하여 3개월 숙성시킨 cheese에서 fraction A가 野生型 菌株로 제조한 cheese에서 각각 감소한 반면 fraction B와 C부분은 각각 증가하였다.

이러한 결과는 숙성이 진행됨에 따라 分子量이 비교적 큰 bitter peptide가 分解를 받아 分子量이 1,000~5,000dalton 정도의 비교적 작은 bitter peptide나 遊離아미노산으로 전환된다는 Gripon 등(1977)과 文(1980)의 보고와도 동일한 결과를 나타내었다. 또한 동일 숙성기에 野生型 菌株로 제조한 cheese는 fraction A부분의 면적이 變異株로 제조한 cheese보다 넓었으나, fraction B와 C는 적어지는 현상을 볼 수 있는데, Harwalker (1972) 등이 cheese의 苦味와 떫은 맛은 fraction

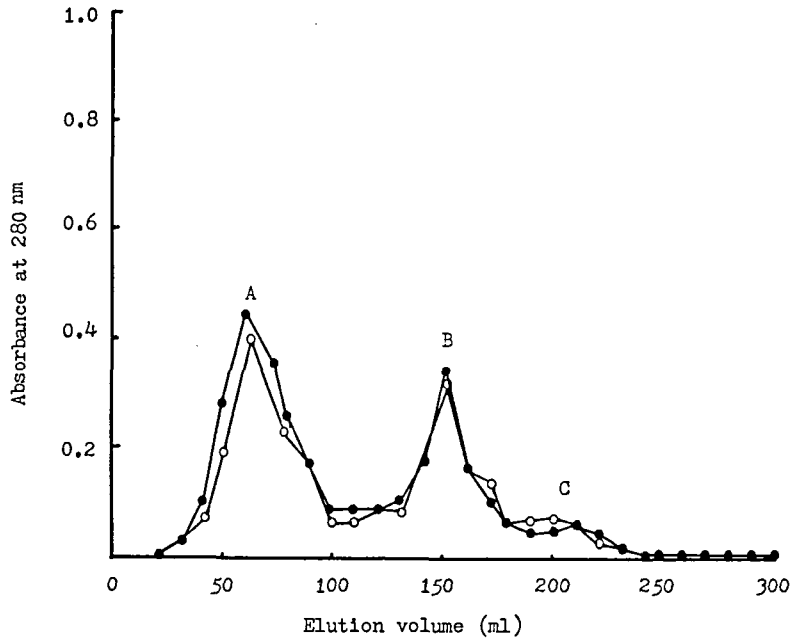


Fig. 3. Elution pattern of bitter extracts in Cheddar cheese from Sephadex G-25 column with 0.005M phosphate buffer, pH 7.0.

○ - ○ : *S. lactis* 1913, ● - ● : *S. lactis* 1913 C-1

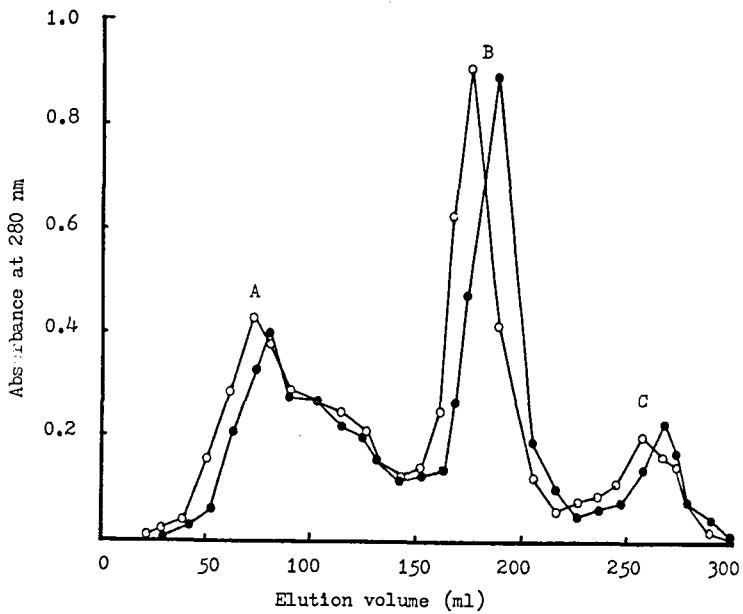


Fig. 4. Elution pattern of bitter extracts in Cheddar cheese from Sephadex G-25 column with 0.005M phosphate buffer, pH 7.0, at the 3 month ripening.

○ - ○ : *S. lactis* 1913, ● - ● : *S. lactis* 1913 C-1

A 부분에서 濾過되는 물질에 주로 存在한다는 보고와 比較하여 볼 때, 野生型 菌株로 제조한 cheese가 變異株로 제조한 cheese보다 苦味를 더 많이 생성한다고 사료되며, Torrie 등(1983)이 보고한 prt⁻ 變異株가 prt⁺ 菌株에 비해 苦味生成이 減少되었다는 보고와도 동일한 결과를 나타내었다.

4. 官能檢査

野生型 菌株와 變異株로 제조하여 3개월 숙성시킨 Cheddar cheese를 官能檢査한 결과는 Table 1과 같다.

Cheese의 色澤에서는 큰 차이가 없었으나 組織(p<0.05)과 風味(p<0.01)는 變異株가 野生型 菌株로 제조한 cheese보다 有意性이 있었고 嗜好性도 좋았다. 이러한 결과는 野生型 菌株로 제조한 cheese의 경우 Harwalker(1972) 및 李(1983)가 보고한 바와 같이 苦味나 馥은 맛이 일부 생성되어서 맛의 嗜好性이 떨어졌고, 과다한 蛋白質 分解로 조직도 약화되어 조직에 대한 嗜好性도 떨어진 것으로 사료된다.

5. 生産收率

Table 1. Sensory characteristics of 3 month ripened Cheddar cheese

Cheese	Sensory category		
	Color	Flavor	Texture
1913	3.45	2.55	3.15
C-1	3.50	3.40**	3.50*

** : p<0.01, * : p<0.05

Table 2. Yields of Cheddar cheese made with different starters

Starter	Raw milk (Kg)	Cheddar cheese (Kg)	
		Yield (%)	
1913	25.0	2.375	9.50
C-1	25.0	2.410	9.64

Cheddar cheese의 生産수율은 Table 2에서와 같이 9.59, 9.64%로 變異株인 *S. lactis* 1913 C-1으로 제조한 cheese가 野生型균주인 *S. lactis* 1913으로 제조한 cheese보다 0.14% 많아 단백질 분해력이 낮은 균일수록 cheese의 生産收率이 높게 나타났다.

IV. 摘 要

Cheddar cheese의 品質을 向上시키기 위하여 *Streptococcus lactis* KCTC 1913으로부터 curing에 의하여 選拔된 proteinase-negative 變異株로 제조한 Cheddar cheese 숙성중의 蛋白質 分解樣相을 電氣泳動 및 액체 chromatography에 의해 연구하였으며, 그 결과를 要約하면 다음과 같다.

1. Starter bacteria의 生菌數는 cheese의 熟成이 進行됨에 따라 減少하였으며 野生型 菌株로 제조한 cheese에서는 급격히 減少했으나 變異株로 제조한 cheese에서는 완만하게 減少하였다.
2. 電氣泳動에 의한 cheese casein의 分離 樣相은 野生型 菌株와 變異株로 제조한 cheese간에는 차이가 없었으나, 熟成 進行 단계에 따라 차이가 나타났다.
3. Sephadex G-25 column에 의해 cheese의 苦味成分 抽出物을 分別한 결과 green cheese와 3개월 熟成시킨 cheese에서 각각 3개의 fraction으로 分別되었으며 熟成이 進行됨에 따라 分子量이 비교적 적은 bitter peptide나 遊離 아미노산으로 轉換되는 傾向을 나타내었다.
4. 3개월 熟成된 cheese를 官能檢査한 결과 色澤에는 별 차이가 없었으나 組織과 風味에 있어서는 變異株로 제조한 cheese가 野生型 菌株로 제조한 cheese보다 嗜好性이 더 좋았다.
5. Cheddar cheese의 生産收率は 變異株 사용시, 野生型균주를 starter로 사용한 것보다 0.14% 높았다.

V. 引用文献

1. A. O. A. C. 1990. Official method of analysis 15th ed., Association of official analytical chemists, Washington, D. C.
2. Creamer, L. K. 1975. β -casein degradation in Gouda & Cheddar cheese J. Dairy Sci. 58:287-293.
3. Creamer, L. K., H. F. Zoerb, N. F. Olsen and T. Richardson. 1982. Surface hydrophobicity of α_{s1} -I, α_{s1} -casein A & B its implications in cheese structure. J. Dairy Sci. 65:902-906.
4. Davies, B. J. 1964. Disc gel electrophoresis method & application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 12:404-407.
5. Davies, F. L. and B. A. Law. 1984. Advances in microbiology & biochemistry of cheese & fermented milk food. Elsevier Applied Science Publisher, England.
6. Farkye, N. Y., P. E. Fox, G. F. Fitzgerald and C. Daly. 1990. Proteolysis & flavor development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase-positive or proteinase-negative starters. J. Dairy Sci. 73:874-880.
7. Gripon, J. C., M. J. Desmazeaud, D. L. Barsand and J. L. Bergere, 1977. Role of proteolytic enzymes of *Streptococcus lactis*, *Penicillium roqueforti* and *penicillium caseicolum* during cheese ripening. J. Dairy Sci. 60:1532-1538.
8. Harwalkar, V. R. 1972. Influence of hydrogen ion concentration on extractability and flavor of bitter and astringent flavor components from Cheddar cheese and cultured milks. J. Dairy Sci. 55:742-743.
9. Harwalkar, V. R. and J. A. Elliot. 1971. Isolation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese. J. Dairy Sci. 54:8-13.
10. Kosikowski, F. V. 1977. Cheese and fermented milk foods. 2nd ed. Edwards Brothers, Inc., Ann. Arbor.
11. Kosikowski, F. V. and T. Iwasaki. 1975. Changes in Cheddar cheese by commercial enzyme preparations. J. Dairy Sci. 58:963-970.
12. McMahan, D. J. and Brown. 1984. Enzymatic coagulation of casein micelle. J. Dairy Sci. 67:919-929.
13. Marcos, A., M. A. Esteban, F. Leon and J. Fernandez-Slaguero. 1979. Electrophoretic patterns of European cheese: Comparison and quantitation. J. Dairy Sci. 62:867-890.
14. O'Leary, J. and C. L. Hicks. 1982. Effect of single strain proteolytic negative and proteolytic positive starter cultures on cheese yield. J. Dairy Sci. 65(Suppl. 1):73 (Abstract).
15. Rank, T. C., R. Grappin and N. Olsen. 1985. Secondary proteolysis of cheese during ripening: A review. J. Dairy Sci. 68:801-805.
16. Richardson, G. H., C. A. Erstron, J. M. Kim and C. Daly. 1983. Proteinase negative variants of *Streptococcus cremoris* for cheese starters. J. Dairy Sci. 66:2278-2286.
17. Schormuller, J. 1968. Advances in food research: The chemistry and biochemistry of cheese ripening. Academic press, New York and London. 16:231-232.
18. Torrie, J. P., H. Cholette, D. A. Froehlich and R. C. Mckeller. 1983. Growth of extracellular proteinase-deficient strain of *Pseudomonas fluorescence* on milk and milk proteins. J. Dairy Research. 50:365-374.
19. Toyoda, S. and T. Kikuchi. 1983. Accelerated ripening of cheese. Jpn. J. Dairy Food

- Sci. 34: A279-286.
20. 金珉培. 1991. 젖산 bacteria의 蛋白 分解酵素 活性과 그 Plasmid에 關한 研究. 韓酪誌. 13:14-22.
 21. 文瑤日. 1980. Cheddar cheese 熟成중 苦味成 分 變化에 關한 研究. 高麗大學校 大學院. 碩士學位論文.
 22. 李炯周. 1983. 醱酵 乳製品에서의 쓴맛 펩타이드. 乳加工 研究. 2:69-72.
 23. 崔忠國. 1986. *Streptococcus lactis* 유당 分解力 喪失 變異株를 사용한 Cheddar cheese의 熟 成에 關한 研究. 서울대학교 대학원 博士學位 論文.