

## 육종 균주에 의한 치즈의 지방산 성분 변화에 관한 연구

송재철<sup>†</sup> · 김정순 · 박현정 · 신완철

울산대학교 식품영양학과

### Change of Fatty Acid in Cheese Ripening by New Development of Lactic Acid Bacteria

Jae-Chul Song<sup>†</sup>, Jeong-Soon Kim, Hyun-Jeong Park and Wan-Chul Shin

Dept. of Food Science and Nutrition, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

#### Abstract

This study was carried out to elucidate the utility of fusant for shortening the ripening time of imitation processed cheese. *L. bulgaricus* exhibited the highest protease and lactase activity and *L. helveticus* revealed the highest lipase activity. Fusant was shown to be high in the activity of protease and lactase. The total volatile free fatty acid produced by the cheese treated with *L. helveticus* was markedly increased after four ripening days and was gently increased after nine ripening days. However, *L. bulgaricus* significantly increased the total volatile free fatty acid between four and nine ripening days. In the case of fusant, the amount of total volatile free fatty acid was observed to increase at a constant rate relative to the ripening time. In free fatty acid production at different ripening times, *L. bulgaricus* generated caproic acid and caprylic acid abundantly while it produced a poor quantity of capric acid, lauric acid, and myristic acid. In the cheese sample treated with *L. helveticus*, the amount of caproic acid and caprylic acid was on increase as the ripening time increased. The amount of caproic acid and caprylic acid produced by fusant was less than that produced by the other two starters. In the panel sensory evaluation, the flavor intensity and preference increased as the ripening time increased. The cheese sample treated with fusant showed the highest flavor intensity at 7 days, whereas cheese treated with *L. helveticus* exhibited the highest flavor intensity at 15 or 30 days. The cheese treated with *L. helveticus* showed the highest preference at 7 days, but cheese treated with fusant exhibited the highest preference at 30 days.

**Key words:** IPC, fusant, ripening, free fatty acid

#### 서 론

유산균은 가장 오래전부터 인간이 이용한 발효 유제품 제조균으로 요구르트, 버터, 치즈와 같은 유제품 제조에 중요한 역할을 담당하여 왔다. 유산균에 의하여 생성되는 젖산은 우유단백질의 소화성을 개선하며 포도당이나 유당을 분해하여 장내물의 pH를 낮추어서 칼슘, 인, 철분 등의 흡수를 좋게 해 주며 위액의 분비를 촉진시키고 장내 콜레스테롤 양을 감소시킨다는 사실이 밝혀졌다(1,2). 특히 유산균은 장내 유해세균의 증식을 억제하고 정상적인 일반 세균의 유기산 합성 기작에도 기여하는 것으로 알려져 있다. 유제품 중 고도의 기술을 요하는 발효치즈는 종류가 다양하여 일반

적인 숙성기간이 길 뿐만 아니라 넓은 숙성장소, 까다로운 숙성조건이 필요하며 숙성기간에 소요되는 가공 원가가 많이 요구되는 발효 형식을 갖는 발효제품으로 지금까지 치즈 제조의 효율화를 위하여 우선 숙성기간을 단축하여야 한다는 결론에 이르고 이를 해결하기 위하여 많은 학자들이 이 분야에 연구를 경주하여 왔다(3).

치즈의 숙성기간을 단축시키는 방법에는 숙성온도를 높이는 방법, 숙성효소를 첨가하는 방법 그리고 효소 분해능력이 강한 미생물을 접종하는 방법. 또는 이들 각 조건들을 병용하는 방법 등이 있는데 이러한 방법들은 숙성기간을 획기적으로 단축하기에는 매우 기술적 문제가 수반되어야 한다. 만약 각 조건들이 적절히 조절되지 않을 경우에는 유성분의 과다한 분해로

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

조직 및 향미가 나빠지게 된다. 일반적으로 발효치즈를 만들 경우에는 단백질 및 지방 분해력이 강한 미생물을 접종하게 되는데 그것은 이들 미생물이 생성하는 각종 효소가 치즈의 주성분인 단백질과 지방을 분해하여 치즈 특유의 향미와 조직을 만들기 때문이다. 이 과정에서 보다 유용한 미생물을 개발하여 사용한다면 치즈 숙성기간의 단축은 물론 품질도 우수한 치즈도 생산할 수 있게 된다. 이미 설명한 바와 같이 치즈의 향미와 조직은 숙성기간 중 치즈의 주성분인 단백질과 지방이 이화학적, 미생물학적인 복잡한 변화과정을 거치면서 치즈 특유의 향미와 조직을 형성하여 치즈의 품질과 품질에 큰 영향을 미치게 되는데(4-9) 숙성된 치즈에서 생기는 전형적인 향미는 'Component Balance Theory'에 의해 생성된다(10).

일반적으로 치즈의 숙성과정에서의 독특한 향미물질들은 주로 숙성효소인 lactase와 protease 그리고 lipase에 의해서 생성되는데 lactase는 유당을 분해하여 프락탄을 생성하고 포도당은 각종 효소에 의해 lactic acid와 치즈 숙성 flavor를 생성하게 된다(11). Protease 역시 peptide와 amino acid, 기타 단백질 분해 중간물, 황화수소, methanethiol, dimethyl sulfide 등의 저분자 유효화합물, 그리고 diacetyl 등의 flavor 성분들을 생성하여 숙성과정에서의 특징적인 치즈 향미를 제공하게 된다. 그렇지만 대부분의 유산균은 전체적으로 단백질 분해효소인 protease 활성이 낮아 충분한 향기 생성에 미흡하지만 *Lactobacillus bulgaricus*는 그 가운데서 protease 활성이 가장 높은 것으로 알려져 있어 공업적으로 많이 사용되고 있으며 대부분 *Streptococcus*속과 혼합하여 치즈 품질을 높이고 있다(12). Lipase에 의한 유지방에서의 지방산 조성은 아미노산과 같이 치즈의 품질과 관련하여 치즈의 숙성에 큰 영향을 미치는 성분으로 이 성분의 생성여부와 양이 치즈 숙성기간의 단축에 결정적인 역할을 하게 된다. 일반적으로 생성된 유리지방산의 종류와 함량에 따라 치즈의 향미정도가 달라지는데 일반적으로 지방분해효소에 의한 flavor 생성은 치즈 원료인 지방산 사슬길이, glyceride 분자 type, 기질의 물리적 상태 그리고 방향성 물질의 생성 등에 따라 치즈의 향미는 달라지게 된다(13). 특히 구성 지방산의 탄소수가 적은 유지방 조성에서는 lipase에 의한 유리지방산류가 보다 독특하고 강한 flavor를 생성하는데 butyric acid를 비롯한 저급 지방산( $C_4 \sim C_6$ ) 등이 치즈 향미에 결정적인 기여를 하게 된다. 이러한 이유로 butyric acid 함량을 치즈 향미 정도를 나타내는 지표로 이용되고 있다(14).

본 연구에서는 지금까지 단백질과 지방의 분해력이

각기 다른 *L. bulgaricus*와 *L. helveticus*, 이들의 융합주를 사용하여 모방치즈(imitation processed cheese)를 제조하여 숙성과정에 나타나는 지방산의 변화를 관찰하여 숙성기간 단축을 위한 육종균주의 이용 가능성을 규명하는데 연구목적을 두고 있다.

## 재료 및 방법

### 균주와 균 배양방법

본 연구에 사용된 균주인 *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953은 종균협회에서 분양받고 *Lactobacillus helveticus* IAM 12090은 일본 동경대학에서 분양받았다. *Lactobacillus bulgaricus*와 *Lactobacillus helveticus*의 균주들의 융합주(Fusant)는 부산대학교 미생물학과에서 분양받았다. 이 균주들은 냉동 보존시켰으며 균을 MRS천자 배지에 접종하여(15) 37°C에서 24~48시간 배양한 후 40°C에 보관하면서 2주간마다 계대 배양하였다(Table 1). 본 연구에 사용된 시약은 특급(Sigma Chemical Co.)을 사용하고 sodium caseinate는 Denmark산, 크림은 비락우유에서 제공받아 사용하였으며 이들의 조성은 Table 2와 같다.

배양방법은 새로 계대 배양한 공시 균주를 10ml의 MRS broth에 천자배지에서 1백금이를 접종하여 37°C에서 10시간 전(前) 배양한 다음 배양액 0.1ml를 새로운 MRS broth에 재접종하여 37°C에서 9~12시간 정지 배양하였다. 또한 생육도를 판정하기 위해 MRS broth

Table 1. Composition of MRS medium

Ingredient	MRS medium (%)
Peptone	1
Meat extract	1
Yeast extract	0.5
Glucose	2
Tween 80	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
Sodium acetate	0.5
Diammonium citrate	0.2
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.005
Agar	1.5
pH 6.2~6.6	

Table 2. Composition of cheese ingredient

	(unit : % (w/w))			
	Moisture	Protein	Fat	Lactose
Na-caseinate	6.0	91.5	0.86	-
Cream	50.0	1.7	43.5	2.7

에 배양액(0.1%, v/v)을 접종하여 37°C에서 정치 배양하면서 3시간 간격으로 흡광도를 측정하여(UV-120-02, Shimadzu) 생육곡선을 작성하였다.

조효소액 조제 및 역가측정

각 균주를 MRS broth에 12시간 정치 배양한 후 배양액을 10,000×g에서 30분간(4°C) 원심분리(SCPH 70H, Hitachi koki Co, Ltd)하여 사용하였다. 단백질의 역가 측정은 Lin 등(16)과 Argyle 등(17)의 방법을 변형하였으며 기질은 따로 제조하지 않고 직접 N,N-dimethyl casein을 기질로 하여 standard assay방법으로 측정하였다. 활성화 효소없이 sample과 같은 성분으로 반응시킨 것을 blank로 하여 비교하였으며 역가는 1분간 1 nmol의 peptide bond를 분해할 때까지의 초기 반응속도로 나타내었다. 지방의 역가 측정 Stead(18)의 방법을 변형하여 측정하였으며 1분 동안 4-MU(4-methylumbelliferone) 1 nmol을 유리시키는데 필요한 효소량을 1unit 효소 역가로 표시하였다.

치즈의 제조

치즈 숙성기간 동안의 성분 변화를 검토하기 위해 Song(19)의 방법으로 치즈를 제조하였다(Fig. 1). 치즈의 제조과정을 단축시키기 위해 원유에서 얻은 커드대

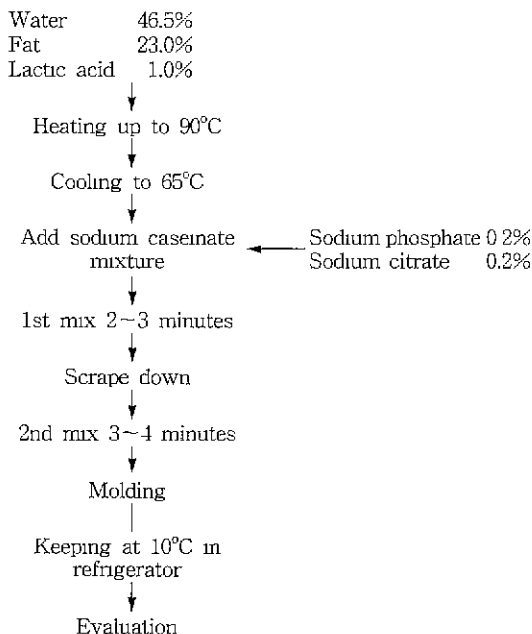


Fig. 1. Manufacture process of the imitation processed cheese analogs preparation.

신에 Na-caseinate를 사용하여 치즈의 일반성분을 첨가한 모방치즈를 제조하여 각 균주의 조효소액에 3분간 침지한 후 알루미늄호일에 싸서 10°C(RH 75%) 냉장실에서 숙성시켰다.

치즈의 지방산 분석

치즈 숙성 중 일반 성분의 변화는 AOAC 상법(20)을 이용하고 총 휘발성 유리지방산은 유 등(21), Cottyn과 Boucuqe(22), Ottenstein과 Bartley(23)의 방법을 사용하여 측정하였다(Fig. 2). 치즈의 지방산 분석은 Folch 등(24)의 방법으로 총 지질을 추출하여 A.O.A.C 방법으로 methyl esterification하여 가스 크로마토그래피에 의해 분석하였다. 총 지질 추출은 치즈 5g을 chloroform-methanol (2 : 1, v/v %) 혼합용액 100ml와 혼합하여 5분간 균질한 다음 증류수 20ml로 씻고 진탕용 삼각플라스크에 옮겨 진탕하여 혼합한 후 하룻밤 동안 방치한다. 방치한 sample의 chloroform 하층을 회수하여 Wh-atman No.3으로 여과한 다음 rotary evaporator(30°C) (EYELA NEW ROTARY VACUUM EVAPORATOR

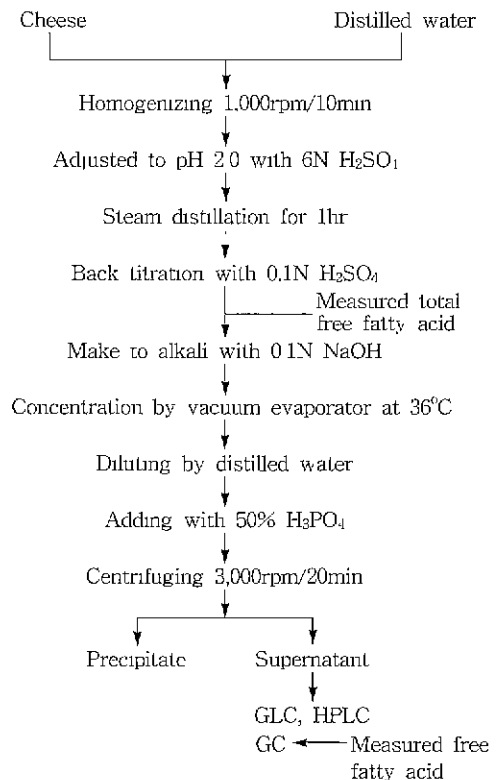


Fig. 2. Extraction of volatile fatty acid from imitation processed cheese.

NE-1 EYELA)에서 용매를 제거하여 총 지질을 얻었다.

지방산 메틸에스테르화 조제용 시약(sulfuric acid, benzene, methanol, ethyl ether, anhydrous sodium sulfate, 1% methyl orange, sulfuric acid-methanol, benzene, standard fatty acid methyl ester)과 분석장치 및 실험 조건(Instrument: Hewlett packard 5890, detector: FID, column: 50m×ID 0.2mm×0.30um stainless steel methyl silicon packed, column 온도: 115~250°C, injection 온도: 300°C, injection 부피: 10ul, carrier: 헬륨가스 30ml/min., 수소가스 5ml/min., 공기 350 ml/min., chart speed: 0.2cm/min.)을 정한 후 지방산을 메틸에스테르화하였는데 Folch 등의 방법(24)에 의해 얻은 지질 0.5g을 ester화용 flask에 취하고 sulfuric acid-methanol 혼합액 50ml와 benzene 30ml를 가하여 우선 녹인다. 이 반응 flask에 환류 냉각기를 붙이고 water bath에서 65°C로 가열하여 약 2시간 동안 비등시킨 후 냉각한다. 이 반응액을 분액 깔대기에 옮기고 에틸에테르와 증류수 30~50ml를 가하여 1분간 진탕하고 10분간 방치하여 추출한다. 이 추출액에 증류수 30~50ml를 넣어 methyl orange 지시약이 증성을 나타낼 때까지 씻고 anhydrous sodium sulfate로 탈수한 후 rotary vacuum evaporator에서 용매를 제거한 후 분석용 시료로 하였다. 지방산의 동정 및 정량은 표준품과 비교하여 분석하였는데 gas chromatograph상의 각 지방산의 peak 동정은 표준품의 retention 시간과 비교하였으며 각 지방산의 조성율은 GC에 연결된 compating integrator에 의해서 계산된 각 peak의 면적비로부터 백분율로 결정하였다.

관능검사

30일간 숙성시킨 치즈의 관능검사는 9명에 의해 실시되었으며 preference는 전체적 선호도를, intensity는 치즈 향기의 강도를 나타내었다. 5점 채점 척도시험 방법(25)에 따라 5점: 아주 좋다, 4점: 좋다, 3점: 보통이다, 2점: 나쁘다, 1점: 아주 나쁘다로 표시하였다. SAS (statistical analysis system)를 사용하여 분산분석을 실시하여 각 균주간, 숙성기간간의 치즈 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

유산균주의 효소 역가 비교

유산균주가 분비하는 효소는 주로 lactase, protease 및 lipase 이외 기타 효소들이 있다. 본 실험에서 치즈 숙성과 관련된 균주들이 분비하는 주요 효소들의 활성

Table 3. Enzyme activities of test strains

Strain	Activity		
	Lactase <sup>1)</sup>	Protease <sup>2)</sup>	Lipase <sup>3)</sup>
<i>L. bulgaricus</i>	1,102	6.42	1,050
<i>L. helveticus</i>	953	6.03	1,890
Fusant	1,047	6.16	780

<sup>1)</sup>Specific activity was expressed as nanomoles of o-nitrophenol liberated from ONPG or ONPG-6-P per milligram of enzyme protein per minute

<sup>2)</sup>One unit of protease is defined as the activity showing an initial reaction rate of 1 nmol peptide bonds cleaved per minute

<sup>3)</sup>One unit of enzyme activity was defined as the amount required to liberate 1nmol 4-MU(methyl umbelliferone) 1 nmol per minute

정도를 비교, 검토하기 위하여 발효 후 조효소액에 함유된 각 효소의 역가를 측정하였다. 그 결과(Table 3) *L. bulgaricus*는 lactase와 protease 역가가, *L. helveticus*는 lipase의 역가가, 융합주는 lactase, protease 역가가 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *L. bulgaricus*와 *L. helveticus*, 이들의 융합주의 효소역가 실험을 한 박(3)의 보고와 다소 차이가 있었는데 박의 보고에서는 융합주의 생성력이 우수한 것으로 나타났으나 본 연구에서는 융합주의 역가가 다소 낮게 나타났다. 그러나 protease와 lactase의 생성력은 우수하여 박의 보고와 비슷한 양상을 보였다. 이러한 연구 결과 *L. bulgaricus*는 protease, *L. helveticus*는 lipase 생성력이 우수한 균주로 확인되었으며 융합주의 역가도 비교적 양호하여 이들 균주가 치즈 숙성에 보편적으로 이용될 수 있을 것으로 추측되었다.

치즈의 총휘발성 유리지방산 변화

총 휘발성 유리지방산은 치즈 향기와 관련된 성분으로 대부분 효소의 작용으로 생성되는데 숙성기간 중의 총 휘발성 유리지방산 생성의 변화는 Fig. 3과 같다. 숙성기간이 경과됨에 따라 대부분의 균주는 총 휘발성 유리지방산 생성량이 증가하였으며 대조구는 완만한 증가를 나타내었다. *L. helveticus* 작용 치즈는 숙성 4일 이후 급격히 증가하고 9일 후는 완만한 증가를 나타내었고 *L. bulgaricus* 작용 치즈는 숙성 4~9일 사이에 급격히 증가하였다. 융합주의 경우에는 비교적 일정한 속도로 숙성기간이 경과함에 따라 총 휘발성 유리지방산 생성량도 증가하였다. 특히 *L. helveticus*로 처리된 치즈의 총 휘발성 유리지방산 생성량이 많게 나타난 것은 lipase 역가와 관련된 것으로(26) Hwang 등(10)이 발표한 국산 체다치즈의 숙성 중 총 휘발성 유리지

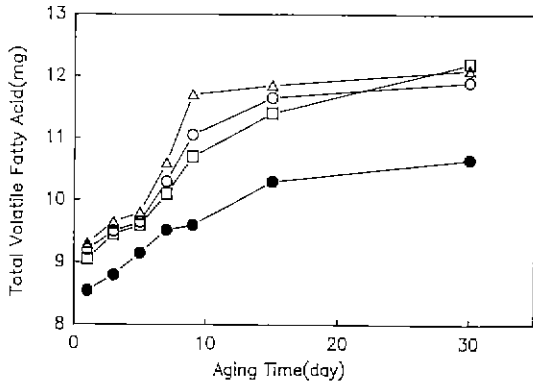


Fig. 3. Change of total volatile free fatty acid in imitation processed during ripening time.  
 ●: Control, ○ *L. bulgaricus*  
 △: *L. helveticus*, □ Fusant

방산의 연구 결과에 따르면 숙성 초기에는 6.5mg 정도 생성되었으나 6개월 숙성 후에는 11.0mg로 크게 증가한 것으로 나타났다. 본 연구 결과에서도 숙성 초기에는 생성량이 8.28mg 정도이었으나 숙성 30일 후에는

11.9~12.2mg으로 크게 증가하여 Hwang 등의 연구 결과와 유사하였다. 단약 치즈의 숙성기간 동안 지방분해 효소의 역가가 떨어지면 치즈의 전형적인 풍미는 생성되지 않고 오히려 이상취인 2차 알코올류, 알데히드류와 메틸케톤류 등이 발생하게 된다(11). 본 연구에서는 융합주를 사용할 경우에는 다른 두 종류의 유산균과 비교했을 때 숙성 30일 이후에는 비슷한 양의 총 휘발성 유리지방산이 생성되는 것으로 보아 치즈의 숙성기간 단축에 융합주의 응용 가능성이 있는 것으로 생각된다.

숙성기간별 생성된 지방산의 종류와 양

10°C에서 숙성기간 1개월 동안 변화하는 유리지방산의 양과 사용 균주와의 상관관계를 숙성 1, 7, 15, 30일 후로 구분하여 분석한 결과(Fig. 4) 치즈 숙성 1일 후 caproic, caprylic, capric, lauric acid 등은 *L. helveticus* 균주가 많은 양을 생성시켰고 그 다음은 *L. bulgaricus*. 융합주 순으로 적게 유리되었다. Myristic acid는 *L. helveticus*가 많이 생성시켰으며 palmitic, stearic, oleic acid 생성량은 *L. bulgaricus*, 융합주, *L. helveticus*

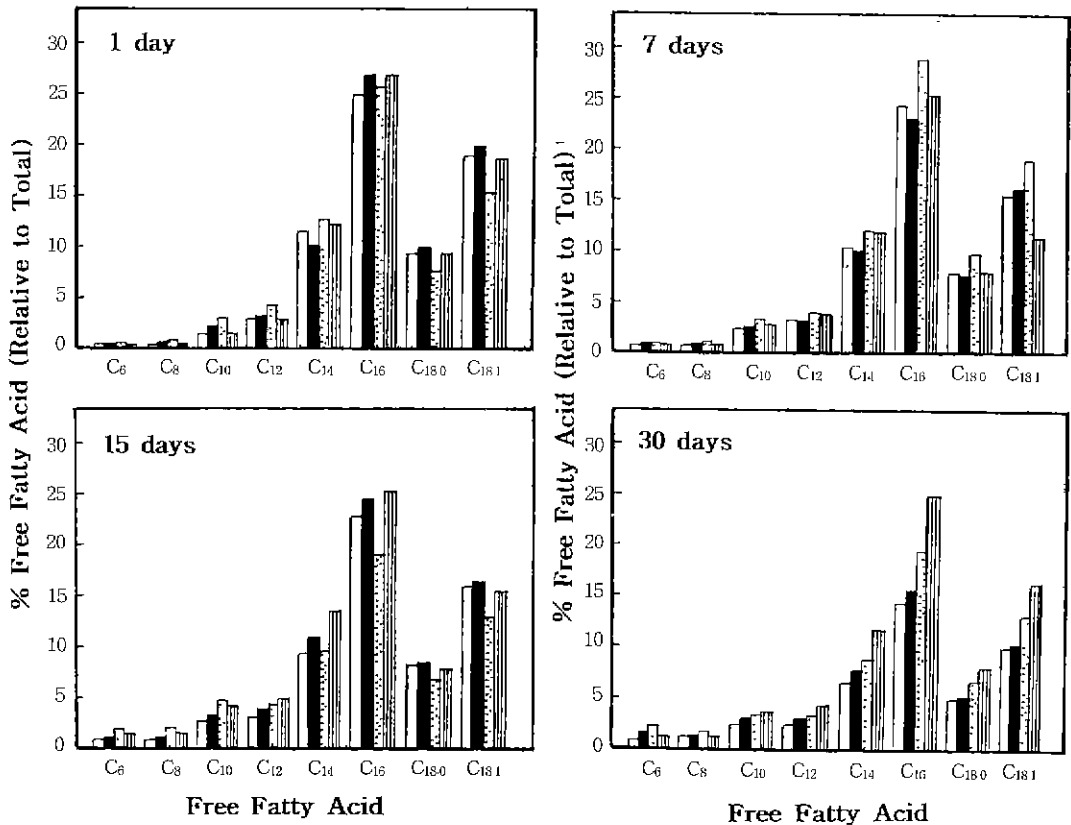


Fig. 4. Free fatty acid profiles of imitation processed cheese at different ripening time.  
 □: Control, ■ *L. bulgaricus*, ▤ *L. helveticus*, ▨ Fusant

cus 균주 순으로 적은 양 유리되었다. 숙성 7일 후 caproic acid는 *L. bulgaricus*와 *L. helveticus*가 융합주에 비해 다소 많은 양의 지방산을 유리시켰고 caprylic acid는 *L. helveticus* 균주가 많이 유리시켰다. 한편 capric, lauric, myristic, palmitic, stearic acid 등은 *L. helveticus*가 비교적 많이 생성시켰고 그 다음 순서는 융합주, *L. bulgaricus*였다. 숙성 15일 후 caproic acid와 caprylic acid 그리고 capric acid는 *L. helveticus*, 융합주, *L. bulgaricus* 순으로 생성량이 감소하였고 lauric, myristic, palmitic acid 생성에서는 융합주가 다른 균주에 비해 많이 유리시켰다. 숙성 30일 후 caproic acid, caprylic acid는 *L. helveticus*가 가장 많이 유리시켰고 그외 다른 모든 지방산은 융합주에 의해서 가장 많이 유리되었으며 *L. bulgaricus*가 가장 적은 양의 지방산을 유리시켰다.

상기의 결과를 분석해 볼 때 치즈가 숙성됨에 따라 유산균의 작용에 따라 유리지방산 함량도 변하는데 *L. helveticus*는 다른 균주에 비해 중간 chain 지방산 함량을 비교적 많이 유리시킨 것으로 나타났다. 전반적으로 사용 균주 모두는 중간 chain 지방산은 소량 생성하고 긴 chain 지방산은 많은 양 유리시킨 것으로 나타났다. 어떤 연구에 의하면(10) *L. casei*를 포함한 54종의 유산균 중 어떤 유산균은 capric acid 이상의 중간, 긴 chain 지방산을 극소량 밖에 유리하지 않았지만 본 실험에서는 중간, 긴 chain 지방산류가 많이 생성된 것으로 나타났다. 이상의 결과는 세 균주가 각각 산 생성에 특징이 있는 균주로 판명되었으며 따라서 그 이용 가능성이 높은 것으로 생각되며 이러한 지방산의 생성이 사용 균주의 효소 역가와도 관련이 있음을 알 수 있다.

사용 균주에 의한 지방산 종류와 생성량의 경시적 변화

각 균주별 유리지방산의 경시적 변화(Table 4)에서 사용한 균주에 따라 지방산 생성량과 종류는 크게 다르게 나타나고 있다. *L. bulgaricus* 효소로 제조한 치즈에서는 caproic acid의 경우 숙성 9일째 1.95%로 최대 값을 나타낸 후 9일 이후에는 다소 생성량이 감소하여 숙성 30일째는 1.64%를 나타내었다. 또 capric acid와 lauric acid는 숙성 5일째를 기준으로 전후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. Myristic acid, palmitic, stearic acid는 숙성 5일 이후 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었으며 불포화지방산인 oleic acid와 linoleic acid 또한 숙성기간에 따라 계속 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 oleic acid와 linoleic acid는 숙성 초기에 비교적 많은 양이 생성되었다. *L. helveticus* 효소로 제조한

치즈에서 caproic acid, caprylic acid, capric acid, lauric acid 함량은 숙성기간에 따라 일반적으로 증가하는 경향을 나타내었으나 숙성 9일이후에는 다소 완만한 감소를 나타내었다. 그러나 myristic acid, palmitic acid, stearic acid 등 포화지방산 생성은 *L. bulgaricus*로 처리한 치즈에서 나타난 바와 비슷한 경향을 보였는데 일반적으로 숙성기간이 경과함에 따라 생성량은 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 또 불포화지방산의 경우에도 숙성기간에 따라 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 융합주의 경우에는 caproic acid와 caprylic acid가 숙성 9일 이후 약간씩 증가하였으나 capric acid와 lauric acid는 뚜렷한 변화를 나타내지 않았다. Myristic acid, palmitic acid, stearic acid는 숙성초기에 다소 증가하였다가 숙성 7일 이후에는 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 유리지방산 중 많은 양을 차지하는 palmitic acid 함량은 숙성 5일째 가장 적었으나 상대적으로 caproic acid와 caprylic acid 지방산은 이 숙성기간 중에 다소 많은 양이 생성되었다. 그러나 불포화지방산인 oleic acid와 linoleic acid는 다른 균으로 처리한 치즈의 경우보다 비교적 많이 유리되었다.

상기 결과를 분석하면 숙성기간에 따른 유리지방산의 생성은 *L. bulgaricus* 효소로 제조한 치즈에서는 caproic acid와 caprylic acid가 숙성기간의 경과에 따라 비교적 증가하였으며 capric acid와 lauric acid, myristic acid는 비교적 적은 양이 유리되었다. *L. helveticus* 효소로 제조한 치즈의 경우에는 caproic acid와 caprylic acid 함량은 숙성기간의 경과에 따라 증가하였으며 긴 chain 지방산은 다른 균주로 제조한 치즈보다 적게 유리되었다. 융합주로 제조한 치즈의 caproic acid와 caprylic acid 함량은 다른 두 균주의 효소로 처리된 치즈와 비교할 때 다소 적게 유리된 경향을 나타내었다.

전체적으로 볼 때 숙성기간이 경과함에 따라 특정한 유리지방산만 증가 또는 감소하는 것이 아니라 유리지방산 대부분이 증가 또는 감소의 경향을 나타내었다. 특히 휘발성이 크고 수용성이며 치즈 향미에 큰 영향을 미치는 짧은 지방산(27)의 경우에는 소량 나타났으며 중간, 긴 chain 지방산들은 상당 부분 생성되었다. 일반적으로 치즈가 숙성됨에 따라 생성 지방산 조성은 변화가 일어나는데 짧은 chain(C<sub>2</sub>~C<sub>4</sub>) 및 중간 chain(C<sub>6</sub>~C<sub>8</sub>)의 지방산이 많이 생기면 치즈는 고유의 독특한 향기를 느끼게 하지만 탄소수 10이상인 지방산이 생기면 이 지방산은 치즈의 풍미에 무관하거나 rancid flavor를 나타내게 된다(28). 본 실험에서 풍미에 영향을 주는 유리지방산 함량은 대부분 지방 분해에 의해서 생성된 복합적 flavor 즉, 짧은-긴 chain 지방산들

Table 4. Composition of free fatty acid in imitation processed cheese treated with *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, fusant and control (unit : %)

Fatty acid		Day of aging	0	1	3	5	7	9	15	30
Caproic Acid	Control		0.54	0.49	0.73	1.07	0.66	0.95	1.07	1.80
	<i>L. bulgaricus</i>		0.54	0.54	1.03	1.59	1.12	1.95	1.21	1.64
	<i>L. helveticus</i>		0.54	0.72	1.48	1.76	1.03	2.30	2.07	2.28
	Fusant		0.54	0.51	0.84	1.62	0.82	1.33	1.37	1.33
Caprylic Acid	Control		0.70	0.47	1.02	1.27	0.80	1.13	1.04	1.30
	<i>L. bulgaricus</i>		0.70	0.65	0.98	2.36	1.06	1.60	1.21	1.45
	<i>L. helveticus</i>		0.70	0.88	1.84	1.63	1.22	2.49	2.09	1.83
	Fusant		0.70	0.50	1.47	1.62	0.97	1.20	1.55	1.39
Capric Acid	Control		2.15	1.37	2.94	3.39	2.46	3.14	2.65	2.46
	<i>L. bulgaricus</i>		2.15	2.17	2.61	5.05	2.60	3.25	3.25	3.20
	<i>L. helveticus</i>		2.15	2.98	5.14	3.37	3.30	4.91	4.64	3.54
	Fusant		2.15	1.51	4.66	3.68	2.92	2.94	4.20	3.66
Lauric Acid	Control		3.16	2.86	3.82	3.76	3.30	3.72	3.14	2.50
	<i>L. bulgaricus</i>		3.16	3.25	3.42	4.99	3.18	3.19	3.92	3.20
	<i>L. helveticus</i>		3.16	4.25	5.58	3.42	4.06	4.67	4.29	3.43
	Fusant		3.16	2.92	5.56	3.66	3.90	3.48	5.12	4.36
Myristic Acid	Control		11.23	11.24	12.59	10.36	10.41	10.75	9.28	6.62
	<i>L. bulgaricus</i>		11.23	10.81	10.73	12.88	10.04	8.10	11.10	7.80
	<i>L. helveticus</i>		11.23	12.69	13.62	9.19	12.07	12.04	9.53	9.01
	Fusant		11.23	12.24	14.23	8.59	11.83	10.15	13.47	11.92
Palmitic Acid	Control		22.93	25.09	29.15	22.93	24.27	27.56	22.84	14.29
	<i>L. bulgaricus</i>		22.93	27.06	23.75	27.53	23.08	17.10	24.42	15.67
	<i>L. helveticus</i>		22.93	25.61	24.81	21.01	27.84	26.19	19.03	19.63
	Fusant		22.93	26.96	26.55	18.38	25.25	23.63	25.29	25.12
Stearic Acid	Control		9.79	9.43	8.60	7.23	7.79	9.24	9.24	5.12
	<i>L. bulgaricus</i>		9.79	27.06	7.66	9.68	7.50	6.11	8.41	5.34
	<i>L. helveticus</i>		9.79	7.53	8.18	7.73	9.59	9.03	6.65	6.72
	Fusant		9.79	9.30	9.26	6.73	7.84	7.94	7.83	8.23
Oleic Acid	Control		20.24	19.13	17.55	14.14	15.54	18.07	16.06	10.11
	<i>L. bulgaricus</i>		20.24	19.77	15.14	19.15	14.81	11.96	16.46	10.48
	<i>L. helveticus</i>		20.24	15.20	16.29	15.21	19.04	18.40	12.98	13.19
	Fusant		20.24	18.68	18.55	13.11	11.27	15.81	15.52	16.48
Linoleic Acid	Control		1.57	1.43	1.40	1.16	1.27	1.47	1.36	0.83
	<i>L. bulgaricus</i>		1.57	1.53	1.23	1.5	1.21	0.99	1.31	0.85
	<i>L. helveticus</i>		1.57	1.22	1.29	1.22	1.55	1.48	1.07	0.08
	Fusant		1.57	1.49	1.45	1.08	1.23	1.28	1.23	1.30

로 구성된 것으로 관능검사에서 판명되었다. 상기 결과로 *L. helveticus*는 치즈의 숙성 중에 지방을 분해하여 특징적인 향기를 생성하는 유리지방산을 많이 생성하는 균주로 사료되며 *L. bulgaricus*와 융합주 또한 유리지방산 생성이 양호하여 각종 지방산 생성이 뛰어난 치즈를 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 관능검사

각 균주에서 조제한 조효소액을 가공치즈와 반응시켜 10°C에서 30일간 숙성시킨 후 치즈 향기강도(flavor intensity)와 전체적인 선호도를 규명하기 위하여 관능

검사를 실시하였다. 그 결과(Table 5) 치즈가 숙성될수록 향기강도가 증가하였는데 숙성 7일에는 융합주로 제조한 치즈의 향기강도가 가장 양호하였고 숙성 15일과 30일에는 *L. helveticus*로 제조한 치즈의 향기강도가 높게 나타났다. 또 *L. bulgaricus*와 융합주로 제조한 치즈의 향기강도도 높게 나타났다. *L. helveticus* 효소로 제조한 치즈의 향기강도가 높은 것은 유리지방산 생성에서 다른 균주의 효소로 제조한 치즈보다 많은 양의 중간 chain 지방산류가 생성되었음과 일치하였다. 구성 지방산의 탄소수가 적은 유리지방산은 lipase에 의해 많이 생성되는데 강력한 치즈향기로는 acetic

Table 5. Effect of mean flavor panel scores of ripened cheese treated with starters(at 10°C, 30 days ripening)

Starters	Ripening time(day)	Preference (1-5) <sup>1)</sup>	SD	Flavor intensity(1-5) <sup>2)</sup>	SD
<i>L. bulgaricus</i>	7	2.44	0.49	2.78	0.78
<i>L. helveticus</i>		2.56	0.68	2.67	0.76
Fusant		2.45	0.49	2.89	0.58
<i>L. bulgaricus</i>	15	3.78	0.78	3.33	0.74
<i>L. helveticus</i>		3.89	0.88	3.56	0.80
Fusant		3.55	0.70	3.44	0.82
<i>L. bulgaricus</i>	30	3.56	0.67	3.67	0.81
<i>L. helveticus</i>		3.44	0.69	3.78	0.79
Fusant		3.67	0.77	3.56	0.83

<sup>1)</sup>Preference: 1-very poor, 3-normal, 5-excellent

<sup>2)</sup>Flavor intensity: 1-very poor, 3-normal, 5-excellent  
SD: standard deviation

acid, butyric acid, caproic acid, caprylic acid 등이 있다. 일반적으로 체다치즈의 경우에는 치즈 숙성초기에는 acetic acid, propionic acid, butyric acid 등이 많이 생성하고 숙성후기에는 caproic acid, caprylic acid, capric acid 등이 많이 생성하는 것으로 알려져 있는데 본 실험에서도 이런 중간 chain 지방산들이 숙성이 진행됨에 따라 많이 생성되어 치즈에 특이한 향기와 향기강도에 큰 영향을 미쳤다. 숙성기간이 경과됨에 따라 전체적인 선호도도 증가하였는데 숙성 7일과 15에는 *L. helveticus* 조효소로 제조한 치즈가, 숙성 30일에는 융합주 효소로 제조한 치즈의 선호도가 가장 양호한 것으로 나타났다. 그리고 15일간 숙성시킨 치즈들에서 전체적인 선호도가 가장 양호하게 나타났다. 관능검사의 결과를 고려하면 치즈를 15일간 숙성시킨 것이 치즈의 특징적인 향기에 영향을 미치는 짧은 지방산 및 중간 지방산류를 많이 생성시킬 수 있는 것으로 사료된다. 분산분석에 의한 관능검사의 결과는 숙성기간과 균주간에 모두 5% 수준에서 유의차가 있는 것으로 나타났다.

### 요 약

본 연구의 목적은 유산균들의 융합주를 사용하여 모방치즈(imitation processed cheese)의 숙성기간 단축을 위한 이용 가능성을 규명하는데 두고 있다. 유산균주가 분비하는 효소의 역가는 *L. bulgaricus*는 lactase와 protease 역가가, *L. helveticus*는 lipase의 역가가, 융합주는 lactase, protease 역가가 높은 것으로 나타났다. *L. helveticus* 작용 치즈는 총 휘발성 유리지방산의 경우 숙성 4일 이후 급격히 증가하고 9일 후는 완만한 증가를 나타내었으나 *L. bulgaricus* 작용 치즈는 숙성 4~9일 사이에 급격히 증가하였다. 융합주의 경우에는

비교적 일정한 속도로 숙성기간이 경과함에 따라 총 휘발성 유리지방산 생성량도 증가하였다. 숙성기간에 따른 유리지방산의 생성은 *L. bulgaricus* 효소로 제조한 치즈는 caproic acid와 caprylic acid를 다량 생성하였으며 capric acid와 lauric acid, myristic acid는 비교적 적은 양이 유리되었다. *L. helveticus* 효소로 제조한 치즈의 경우에는 caproic acid와 caprylic acid 함량은 숙성기간의 경과에 따라 증가하였다. 융합주로 제조한 치즈의 caproic acid와 caprylic acid 함량은 다른 두 균주의 효소로 처리된 치즈와 비교할 때 다소 적게 유리된 경향을 나타내었다. 관능검사에서는 치즈가 숙성될수록 향기강도와 선호도가 증가하였는데 숙성 7일에는 융합주로 제조한 치즈가, 숙성 15일과 30일에는 *L. helveticus*로 제조한 치즈의 향기강도가 가장 높게 나타났다. 선호도는 숙성 7일과 15에는 *L. helveticus* 조효소로 제조한 치즈가, 숙성 30일에는 융합주 효소로 제조한 치즈가 양호한 것으로 나타났다.

### 문 헌

1. Lockwood, L. B. : Production of organic acids by fermentation. In "Microbial technology" Pepler, H. J. and Perlman, D.(eds.), Academic Press, New York, p.373 (1979)
2. Amer, M. A. and Lammerding, A. M. : Health maintenance benefits cultured dairy products. *J. Cult Dairy Prod.*, **18**, 6(1983)
3. 박현정 . 세포융합에 의한 유산균주 육종에 관한 연구. 부산대학교 박사학위 논문(1990)
4. Forss, D. A. : Mechanisms of formation of aroma compounds in milk and milk products. *J. Dairy Res.*, **46**, 691(1979)
5. Aston, J. W. and Dulley, J. R. : Cheddar cheese flavor *Aust. J. Dairy Tech.*, **37**, 59(1982)
6. Arbige, M. V., Freund, P. R., Silver, S. C and Zelko,



- J. T. : Novel lipase for cheddar cheese flavor development. *J. Food Technol.*, **40**, 91(1986)
7. Harper, W. J. and Kristofferson, T. : Biochemical aspects of flavor development in cheddar cheese slurries. *J. Agr. Chem.*, **18**, 563(1970)
  8. Fryer, T. F. : Microflora of cheddar cheese and its influence on cheese flavor. Abstr *J. Dairy Sci.*, **31**, 471(1969)
  9. McGuagan, W. A., Emmons, D. B. and Larmond, E. : Influence of volatile and nonvolatile fractions on intensity of cheddar cheese flavor. *J. Dairy Sci.*, **62**, 398(1979)
  10. Hwang, J. H., Huh, J. W. and Yu, J. H. : Studies on the flavor during ripening in domestic cheddar cheese. II. The changes of volatile free fatty acids and volatile carbonyl compounds. *Kor. J. Dairy Sci.*, **9**, 110(1987)
  11. Moskowitz, G. J. and Noelck, S. S. : Enzyme-modified cheese technology. *J. Dairy Sci.*, **70**, 1761(1987)
  12. Michell, L. and Sandine, W. E. : Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* : A Review *J. Food Protection*, **47**, 245(1984)
  13. Arnold, R. G., Shahani, K. M. and Dwivedi, B. K. : Application of lipolytic enzyme to flavor development in dairy products. *J. Dairy Sci.*, **58**, 1127(1974)
  14. 이택주, 김중우, 김창한, 김우호, 김중협, 강국희, 한문희, 정기철 : 낙농미생물학. 선진문화사, p.276, 329(1990)
  15. De Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. : A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130(1960)
  16. Lin, J. C., Jeon, I. J., Roberts, H. A. and Milliken, G. A. : Effects of commercial food grade enzymes on proteolysis and textural changes in granular cheddar cheese. *J. Food Sci.*, **2**, 620(1987)
  17. Argyle, P. J., Mathison, G. E. and Chandan, R. C. : Production of cell-bound protease by *Lactobacillus bulgaricus* and its location on the bacterial cell. *J. Appl. Bacteriol.*, **41**, 175(1976)
  18. Stead, D. : A fluorometric method for the determination of *Pseudomonas fluorescens* AR II lipase in milk. *J. Dairy Res.*, **50**, 491(1983)
  19. Song, J. C. : Solvent extraction of lactose from skim milk powder and the application of the protein as a replacement for caseinate. The Ohio State Univ., Ph. D. Thesis(1984)
  20. A.O.A.C. : *Official method of analysis*. 13th ed., Association of official analytical chemists. Washington, D. C.(1980)
  21. 유주현, 中西武雄, 頂山亭三 : 각종 유산균의 품미성분 생성에 관한 연구. I. 각종 유산균의 유산, 비단백태 질소, 아미노테 질소, 또는 유리지방산 생성에 관한 지방의 영향. 일본낙농학회지, **23**, 105(1974)
  22. Cottyn, B. C. and Boucuqe, C. V. : Rapid method for the gas chromatographic determination of volatile fatty acid in rumen fluid. *J. Agr. Food. Chem.*, **16**, 105(1968)
  23. Ottenstein, D. M. and Bartley, D. A. : Improved chromatography separation of free acids C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub> in diluted solution. *J. Dairy Sci.*, **43**, 952(1971)
  24. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497(1957)
  25. 이철호, 채수규, 이신근, 박봉상 : 식품공업품질관리론. 유림문화사, p.98(1990)
  26. 광해수 : 리파제 특성이 케다치즈의 품미향상에 미치는 영향. 식품과학과 산업, **22**, 70(1989)
  27. 신종철, 이정근, 유영진, 박계인 : Gas liquid chromatography에 의한 우유의 지방산 조성에 관한 연구. 한국식품과학회지, **4**, 213(1972)
  28. Bills, D. D. and Day, E. A. : Determination of the major free fatty acids of cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, **47**, 773(1964)

(1997년 8월 8일 접수)