



*Lactobacillus rhamnosus*_p1을 이용한 절단형 고다치즈 제조방법 및 숙성 중 품질특성

박종혁^{1*} · 정후길¹ · 문혜정¹ · 오전희¹ · 이주희¹ · 김명곤² · 나상언³ · 김윤정³ · 황영태⁴

¹임실치즈과학연구소, ²전북대학교 바이오식품공학과,
³전라북도보건환경연구원 식약품분석과, ⁴우리춘

Manufacture of Cutting-Gouda Cheese using *Lactobacillus rhamnosus*_p1 and the Physicochemical Properties of Gouda Cheese during Ripening Periods

Jong-Hyuk Park^{1*}, Hoo-Kil Jung¹, Hye-Jung Moon¹, Jeon-Hui Oh¹, Joo-Hee Lee¹, Myung-Kon Kim²,
Sang-Eon Na³, Youn-Jeong Kim³ and Young-Tae Hwang⁴

¹*Imsil Research Institute of Cheese Science, Imsil 566-881, Korea*

²*Dept. of Bio Food Technology, Chonbuk National University, Iksan 570-752, Korea*

³*Division of Food and Drug Analysis, Jeollabuk-Do Institute of Health & Environment Research, Imsil 566-806, Korea*

⁴*Woorichon Co., Imsil 566-861, Korea*

Abstract

The aim of this study was to manufacture Cutting-Gouda cheese and to investigate the change in physicochemical properties of Cutting-Gouda cheese made with *Lactobacillus rhamnosus*_p1. Lactic acid bacteria were isolated from Gouda cheese ripened for more than 1 year. They were identified as 2 strains of *L. rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, and *Staphylococcus saprophyticus* by 16S rDNA sequencing and named *L. rhamnosus*_p1, *L. casei*_p2, *L. curvatus*_p3, *L. rhamnosus*_p4 and *S. saprophyticus*_p5. The proteolytic activities of isolated strains against casein were measured using prepared skim milk agar plates. *L. rhamnosus*_p1 showed the highest proteolytic activity. Cutting-Gouda cheese was made with *L. rhamnosus*_p1, and its physicochemical properties (moisture, protein, fat, ash and free amino acid content) were measured during ripening periods. Because of the modified atmosphere packaging (N₂), there was no change in moisture, protein, fat, and ash in the experimental group. The total amount of free amino acids in the control and experimental group gradually increased during ripening periods. The sensory evaluation showed that the experimental group was preferable to the control group. This result suggests that *L. rhamnosus*_p1 has potential to be developed as a new starter for Gouda cheese.

Keywords: Gouda cheese, lactic acid bacteria, *Lactobacillus rhamnosus*, proteolysis

서론

치즈(Cheese)란 생우유, 저지방유, 탈지유 또는 크림 등에 유산균, rennet, 산 등을 첨가하여 casein을 응고시켜 유청을 제거한 후 압축, 성형 등의 처리에 의하여 만들어진

* Corresponding author: Jong-Hyuk Park, Imsil Research Institute of Cheese Science, Imsil 566-881, Korea. Tel: +82-63-644-2181, Fax: +82-63-644-2185, E-mail: jjong6643@irics.re.kr

신선한 응고물 또는 발효 숙성 유제품을 말한다(Lee and Nam, 1996). 치즈의 품질은 치즈 제조 시 사용되는 원료유, 미생물, 응유효소 및 제조공정 등에 따라서 차이가 난다고 보고되어 있다(Lee and Nam, 1996). 치즈의 독특한 풍미성분 생성 및 조직의 형성은 rennet의 작용에 의한 curd 형성 단계와 미생물 또는 미생물 분비효소들에 의한 숙성단계가 있으며, 이러한 숙성은 치즈를 일정한 조건하에서 보존하면서 치즈의 조직과 풍미를 갖도록 하는 제조 과정 중의 하나로 단백질, 지방분해 등의 생화학적 및 효소학적 그리고 미생물학적 변화가 일어나, 부드럽고 유연한 조직과 고유의 풍미를 준다고 보고되어 있다(Visser, 1977). Gouda cheese는 네덜란드 남부의 Gouda 지방이 원산지이며, 담황색 또는 버터 황색의 원반형이 많고, 수분함량이 30~40%인 경질 cheese로 세계적으로 널리 알려진 네덜란드 타입의 cheese이며, 주로 사용되는 starter bacteria로는 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* 등이 사용되며, 단독균주 또는 복합균주로 사용하여 제조된다(Van den Berg *et al.*, 2004). Gouda cheese의 풍미에 영향을 주는 주요 휘발성 향기성분으로는 지방유래 휘발성 성분(methyl ketons, 유리지방산, lactones 및 ethyl ester)보다는 단백질 분해효소에 의해 단백질의 분해로 생성되는 아미노산에 의한 영향을 많이 받는 것으로 보고되어 있다(Van Kranenburg *et al.*, 2002). Grappin 등(1985)은 숙성이 진행됨에 따라 수용성 질소, 비단백질 질소 및 아미노산 질소 함량이 증가한다고 하였으며, Yamauchi 등(1986)은 이러한 증가는 단백질분해효소 시스템에 기인한 것으로 보이며, 이러한 기작은 사용되는 rennet 및 starter bacteria에 의해서 다양한 풍미가 형성된다고 보고하였다. Gouda cheese의 풍미 향상을 위해 starter bacteria의 변화, 유지방성분의 변화 및 rennet 첨가량의 변화 등의 연구가 진행되어 왔으나, 상업적 이용은 미비한 실정이다(Visser and De Groat-Mastert; 1977, Visser, 1977; Exterkate *et al.*, 1987). Starter bacteria에 의한 단백질 분해 작용을 강화하거나 유리아미노산을 첨가하여 치즈 내에서 유리아미노산의 함량을 증가시키는 방법으로는 cheese의 풍미 향상에 영향을 주지 않는 것으로 보고되어 있으며(Visser, 1977; Wallace and Fox, 1997), Yvon and Rijnen(2001)는 유산균이나 *Brevibacterium linens*와 같은 starter bacteria 이외의 치즈 숙성 중 관여하는 비의도적 미생물에 의한 아미노산 이화작용을 연구함으로써 치즈 풍미 성분 생성을 촉진시키는 방법을 제시하였다. 그러나 Gouda cheese는 염지 후 표면을 수용성 plastic coating 처리를 함으로써 비의도적 미생물의 오염을 최소로 하면서 치즈 숙성을 진행하는데, 이때 표면은 딱딱하고 내부는 부드러운

제형이 나타나게 된다. 딱딱해진 표면은 섭취가 어려워 표면을 제거해야 하는 문제점이 발생하게 됨으로써 Gouda cheese 제조 시 성형 방법을 개선할 필요가 있다고 보여진다.

따라서 본 연구는 고다치즈의 숙성기간 단축 및 풍미 향상을 위하여 1년 이상 숙성된 고다치즈에서 단백질분해능이 우수한 유산균주를 screening 하여 *L. rhamnosus_p1*을 분리·동정하였으며, 이 균주를 이용하여 성형방법을 개선한 고다치즈를 제조하고, 숙성기간에 따른 품질변화를 측정하여 국내산 고다치즈의 풍미 향상을 위한 기초자료로 사용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

유산균 분리를 위하여 1년 이상 숙성된 고다치즈는 이플 영농조합법인(Imsil, Korea), 치즈가(Imsil, Korea) 및 Westlann kaasexport사(Zuiderzee, Holland)에서 제조된 시판제품을 구입하여 실험에 사용하였다. 고다치즈 제조에 사용된 원유는 임실지역 낙농가에서 착유하여 사용하였으며, 상업용 균주는 Chr. Hansen사(Hørsholm, Denmark)의 Flora Danica 50을 이용하였으며, 구성 균주는 *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*로 구성되어 있다. Starter 배양을 위한 배지로는 환원 탈지유(Seoul Milk Co., Ltd., Korea)를 10% 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 유산균 분리 및 배양

1년 이상 숙성된 고다치즈 시료를 각각 25 g과 멸균생리 식염수 225 mL를 sterile filter bag에 넣고 stomacher(Easy Mix, AES chemunex, France)를 이용하여 혼합하였다. 여기서 액상부분 1 mL를 취하여 십진 희석법으로 희석한 후 100 µL를 취해 MRS agar(Lactobacilli MRS agar, Difco, USA)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 각 시료별 배지에서 형태가 다른 단일 colony를 1차 분리하였다. 1차 분리된 균주들을 BCP agar(Eiken chemical Co., Ltd., Japan)에 희석평판법으로 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 노란색을 보이는 colony를 2차 분리하였다. 이플 올드 고다치즈 제품으로부터 2종, 치즈가 고다치즈 제품으로부터 2종, 올드 암스테르담 제품으로부터 1종이 분리되었으며, 이를 MRS agar에 접종하여 37°C에서 24~72시간 배양 후 4°C로 냉장 보관하면서 사용하였다.

3. 분리된 유산균의 단백질 가수분해능 실험

치즈 단백질의 대부분을 차지하는 casein을 가수분해할

수 있는지 측정하기 위하여 nutrient agar 23 g과 skim milk 50 g을 증류수 100 mL에 녹인 후 멸균한 다음 plate에 20 mL로 분주 후 굳혔다. 그 후 분리된 유산균주를 백금으로도말하여 균체주위에 투명환이 나타나는지 측정하였다.

4. 내산성 측정

1 N HCl를 사용하여 pH 2.5로 조정된 MRS broth(Lactobacilli MRS broth, Difco, USA)를 사용하여 내산성을 측정하였다. 분리된 유산균을 MRS broth에서 37°C로 24시간 배양한 후 4,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액을 버리고 균을 회수하였다. pH 2.5로 조정된 MRS broth 10 mL에 회수한 균 1%를 접종하여, 37°C에서 2시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

5. 분리 균주의 동정

분리균은 16S rRNA 결정법으로 동정하였으며, 염기서열 분석회사인 (주)Macrogen(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 균의 16S rRNA를 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR(DNA engine tetrad 2 peltier thermal cycler, Bio-rad lab., USA)을 수행하여 증폭시켰다. PCR 산물은 BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems, Belgium)를 이용하여 ABI Prism 3730XL analyzer(Applied Biosystems, Belgium)로 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 NCBI BLASTN 프로그램(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 사용하여 유산균을 동정하였다.

6. 분리 균주를 이용한 고다치즈 제조

치즈제조용 starter는 MRS broth에 2회 계대배양한 선발 균주를 10%(w/v) 환원탈지유에 1%(v/v) 접종하여 10^8 CFU/mL 이상으로 배양한 후 4°C로 냉장보관하며 사용하였다. 상업용 균주인 Flora Danica 50을 상기와 동일한 방법으로 배양하여 사용하였다. 대조균은 Flora Danica 50 만을 starter로 사용하였고, 실험균은 Flora Danica 50을 이용하여 치즈를 만든 후 최종제품을 세절하고 분리균주를 1×10^8 CFU/mL 농도로 조정하여 분무기로 세절한 Gouda cheese 표면에 3초간 분사한 다음, 건조 후 질소치환 포장을 하여 14°C 저온 저장고에서 5개월간 숙성하면서 1개월마다 시료를 채취하여 이화학분석시료로 사용하였다(Fig. 1).

7. 일반성분 분석

AOAC법에 따라서 수분, 단백질, 지방과 회분 함량을 측정하였으며, 1개월 간격으로 총 5개월 동안의 변화를 측정

하였다(AOAC, 1990).

8. pH 측정

pH는 시료를 10 g 취하여 멸균생리식염수 20 mL로 균질화 시킨 다음, pH meter(UB-10, Denver Instrument Co., Ltd., USA)를 이용하여 1개월 간격으로 총 5개월 동안의 변화를 측정하였다.

9. 유리아미노산 분석

유리아미노산의 정량 분석은 소요시간이 상대적으로 짧은 Waters AccQ-tag 방법을 이용하여 분석하였다. HPLC(Waters e2695, Waters Co., USA)의 분석조건은 Table 1과 같으며, 17종의 아미노산 표준품으로 aspartic acid(Asp), serine(Ser), glutamic acid(Glu), glycine(Gly), histidin(His), arginine(Arg), threonine(Thr), alanine(Ala), proline(Pro), cysteine(Cys), tyrosine(Tyr), valine(Val), methionine(Met), lysine(Lys), isoleucine(Ile), leucine(Leu), phenylalanine(Phe)과 AccQ-Fluor reagent 및 Borate buffer는 Waters사 제품을 사용하였다.

10. 유산균수 측정

고다치즈의 숙성 중 유산균수의 변화는 1개월 간격으로 시료를 채취하여 멸균식염수에 십진 희석법으로 희석한 뒤, BCP 한천배지를 이용하여 평판배양법으로 37°C에서 48시간 배양하였다. 그 후 나타난 노란색 colony 수를 측정하여 log CFU(colony forming unit)/mL로 나타내었다.

11. 고다치즈의 관능검사

관능검사요원 15명을 대상으로 색(color), 향(flavor), 맛(taste), 조직감(texture) 및 전반적인 기호도(overall acceptability)를 5점 척도법으로 평가하도록 하였다.

결과 및 고찰

1. 스타터 제조를 위한 유산균 분리 및 동정

고다치즈 제조를 위한 유산균주의 분리원은 1년 이상 숙성된 고다치즈를 사용하였으며, MRS agar를 이용하여 총 5종의 균주를 분리하였다(Table 2). 분리 유산균주는 이플 고다치즈에서 분리한 *L. rhamnosus*, *L. casei* 2종과 치즈가 고다치즈에서 분리한 *L. curvatus*, *L. rhamnosus* 2종, 올드 암스테르담에서 분리한 *S. saprophyticus* 1종이 분리되었으며, 16s rDNA의 염기서열을 표준 균주와 비교하여 작성한 계통수 결과, 각각의 균주는 표준균주와 모두 98% 이상 일치하였고, 각각 *L. rhamnosus_p1*, *L. casei_p2*, *L. curvatus_p3*, *L. rhamnosus_p4* 및 *S. saprophyticus_p5*로 명명하였다.

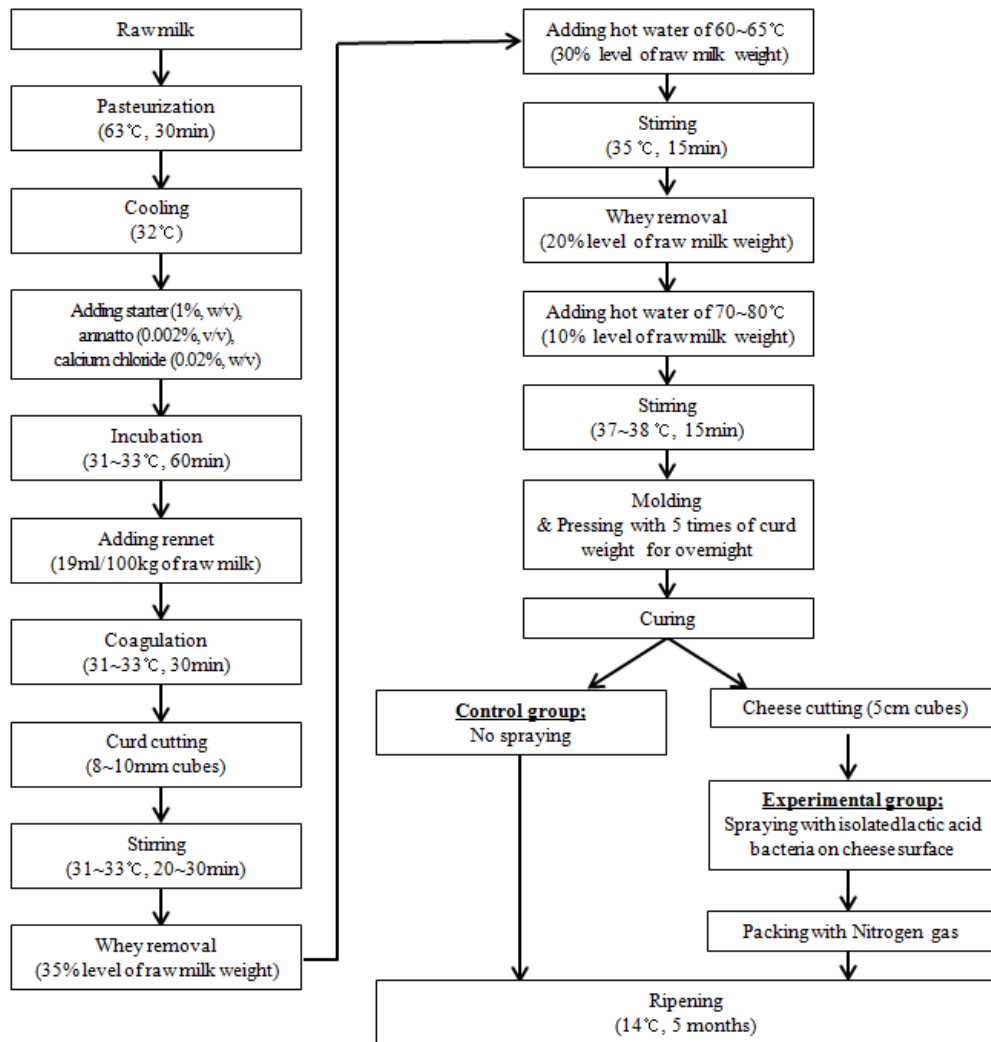


Fig. 1. The manufacturing process of Gouda cheese.

2. 분리된 유산균의 단백질 가수분해능

선택된 유산균주 *L. rhamnosus_p1*, *L. casei_p2*, *L. curvatus_p3*, *L. rhamnosus_p4* 및 *S. saprophyticus_p5*의 단백질 가수분해능을 측정하기 위하여 각각의 균주는 1.0×10^8 CFU/mL로 조정하여 skim milk에 대한 가수분해능을 조사하였다 (Table 3). 선택된 유산균주 *L. rhamnosus_p1*, *L. casei_p2*, *L. curvatus_p3*, *L. rhamnosus_p4* 및 *S. saprophyticus_p5* 각각은 13, 8, 7, 9 및 0 mm의 투명환을 보였다. *L. rhamnosus* 치즈의 풍미 및 조직감에 중요하게 작용하는 유산균으로 여겨지며, Back 등(1983)의 연구결과 *L. casei* YIT 9018은 37°C 및 pH 7.0에서 casein 분해 능력이 우수하다고 보고하였으며, 본 연구에서는 *L. rhamnosus_p1*의 casein 분해능이 제일 우수하게 나타났다.

3. 분리된 유산균의 내산성

분리된 유산균이 probiotics 및 발효유 starter가 되기 위한 필수조건으로 위장관 상부의 산성 조건 및 담즙이 존재하는 환경에서의 생존되어야 장내에 부착되어 기능성을 나타낸다고 보고되어 있다(Ouweland *et al.*, 1999). 유산균주의 내산성을 확인한 결과(Table 4), 생존율은 *L. rhamnosus_p1* 및 *p4*가 82%로 가장 높았으며, 그 다음으로 *L. casei_p2*, *L. curvatus_p3* 및 *S. saprophyticus_p5* 각각 77, 71 및 35%로 나타났다. *S. saprophyticus_p5*를 제외하고, 모두 70% 이상의 내산성을 확인하였다. You 등(2005)은 kefir에서 분리한 *L. rhamnosus*의 내산성 분석 결과, pH 5에서는 2×10^9 CFU/mL, pH 2에서는 7×10^8 CFU/mL로 약 38% 감소하였다고 보고하였으며, 본 연구에 있어서도 *L. rhamnosus_p1*, *p4* 및 *L. casei_p2*가 이와 유사한 내산성을 나타내었다. 사람의 분비위액의 pH는 1~2 정도이지만 침과 음식의 섭취에 의해 희석되므로, 위에서의 *L. rhamnosus_p1*, *p4* 및 *L.*

Table 1. HPLC operating conditions for free amino acids analysis in cheese

Items	Conditions		
Mobile phase	A: Aqueous buffer, Waters AccQ-Tag Eluent A B: 60% acetonitrile		
Column	Nova-PAK™ C ₁₈ , 4 μm		
Column temperature	37°C		
Flow rate	1 mL/min		
Detector	Excitation wavelength : 250 nm Emission wavelength : 395 nm		
Time(min)	Flow rate	A(%)	B(%)
Initial	1.0	100	0
0.5	1.0	98	2
15	1.0	93	7
19	1.0	90	10
32	1.0	67	33
33	1.0	67	33
34	1.0	0	100
37	1.0	0	100
38	1.0	100	0
64	1.0	100	0
65	1.0	0	100
100	1.0	0	100

Table 2. Results of 16S rRNA sequencing of isolates from cheese

Strains	Query		Subject					Score			Identities		
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)
A ¹⁾	3	1474	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM8649	AB690234.1	1509	7	1465	2579	1396	0.0	1450	1473	98
B	4	1514	<i>Lactobacillus casei</i> BD-II, complete genome	CP002618.1	3069926	256173	257682	2761	1495	0.0	1508	1513	99
C	1	1499	<i>Lactobacillus curvatus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni998	AB600200.1	1531	17	1514	2761	1495	0.0	1498	1499	99
D	1	1506	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 8649	AB690234.1	1509	7	1509	2750	1489	0.0	1501	1506	99
E	3	1496	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 DNA, complete genome	AP008934.1	2516575	743737	745224	2715	1470	0.0	1487	1494	99

¹⁾ A: *L. rhamnosus* isolated from Gouda cheese (이플), B: *L. casei* isolated from Gouda cheese (이플), C: *L. curvatus* isolated from Gouda cheese (치즈가), D: *L. ?* isolated from Gouda cheese (치즈가), E: *S. saprophyticus* isolated from Gouda cheese (Westlan kaas export).

Table 3. Proteolytic activities of isolated strains against casein

Indicator	Activity				
	<i>L. rhamnosus</i> _p1	<i>L. casei</i> _p2	<i>L. curvatus</i> _p3	<i>L. rhamnosus</i> _p4	<i>S. saprophyticus</i> _p5
Casein	++ ¹⁾	+	+	+	-

¹⁾ Degree of clarity of clear zone by proteolysis: -, none, +; below 10 mm, ++; above 10.1 mm.

Table 4. Survival rate of isolated strains after 2 hr in MRS broth (pH 2.5)

Strain	Before incubation (log CFU/mL)	After incubation (log CFU/mL)	Survival rate(%)
<i>L. rhamnosus</i> _p1	7.1	5.8	82
<i>L. casei</i> _p2	7.0	5.4	77
<i>L. curvatus</i> _p3	7.2	5.1	71
<i>L. rhamnosus</i> _p4	7.3	6.0	82
<i>S. saprophyticus</i> _p5	7.1	2.5	35

*casei*_p2이 균의 생존율은 크게 나쁘지 않은 것으로 추정되며, 본 연구에서는 casein의 분해효과가 높고 내산성이 우수한 *L. rhamnosus*_p1 균주를 우선적으로 선정하여 고다치즈 제조하였다.

4. 선택된 유산균주에 따른 Gouda cheese의 이화학적 특성 변화

선택된 유산균주 *L. rhamnosus*_p1을 이용하여 Gouda cheese를 제조하였으며, 대조구는 상업적 균주 Flora Danica 50을 사용하여 숙성 중 이화학적 특성을 비교하였다. 숙성 초기 대조구의 수분, 단백질, 지방 및 회분의 함량은 각각 43.1,

20.1, 31.2 및 3.6%이었고, *L. rhamnosus_p1*을 처리한 실험구는 각각 44.2, 21.0, 30.9 및 3.5%로 측정되어 제조 직후의 일반성분 함량의 차이는 나타나지 않았다(Table 5). 숙성기간에 따른 수분, 단백질, 지방 및 회분의 변화는 대조구의 경우, 숙성기간 증가할수록 수분함량이 감소하였으며, 이에 따라 지방, 단백질 및 회분의 함량이 증가하였고, *L. rhamnosus_p1*을 처리한 실험구는 숙성기간에 따른 일반성분 함량의 변화가 없는 것으로 나타났다. Lee와 Nam(1996)은 Gouda cheese 숙성 중 일반성분은 수용성 plastic coating 처리시 숙성기간이 증가할수록 단백질, 지방 및 회분의 함량은 증가하는 반면, 수분의 함량은 감소한다고 하였고, 이

는 수분의 감소에 따른 타 고형분의 상대적인 증가 때문이라고 보고하였으며, 진공포장의 경우는 수분 및 기타 고형분의 함량 변화는 없는 것으로 보고하여 본 연구에 있어서도 질소포장의 경우와 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 2). Gouda cheese 숙성 과정 중의 pH 변화는 Fig. 3에 나타내었다. 대조구는 숙성 초기 5.30에서 숙성 3개월째 5.20으로 감소하였다가 그 후 숙성기간 동안 증가하여 5.52까지 증가하였고,

Table 5. Physicochemical characteristics of Gouda cheese with *L. rhamnosus_p1*

Treatment	(%)			
	Moisture	Protein	Fat	Ash
Control ¹⁾	43.1±0.8 ²⁾	20.1±1.2	31.2±0.3	3.6±0.2
GCL	44.2±1.2	20.9±0.3	31.5±0.7	3.3±0.1

¹⁾ Control: Gouda cheese with commercial starter, GCL: Gouda cheese with *L. rhamnosus_p1*

²⁾ Mean±SD.

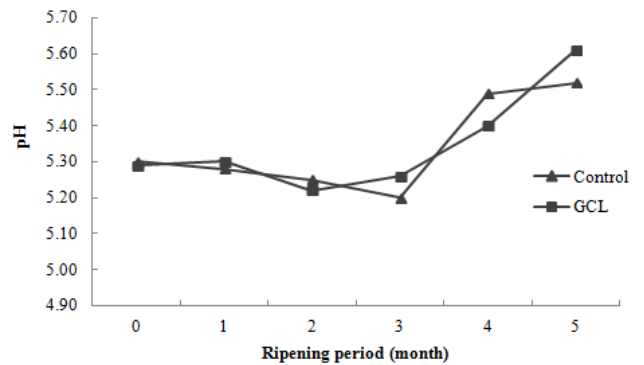


Fig. 3. Change in pH of Gouda cheese during ripening periods. Control: Gouda cheese with commercial starter, GCL: Gouda cheese with *L. rhamnosus_p1*

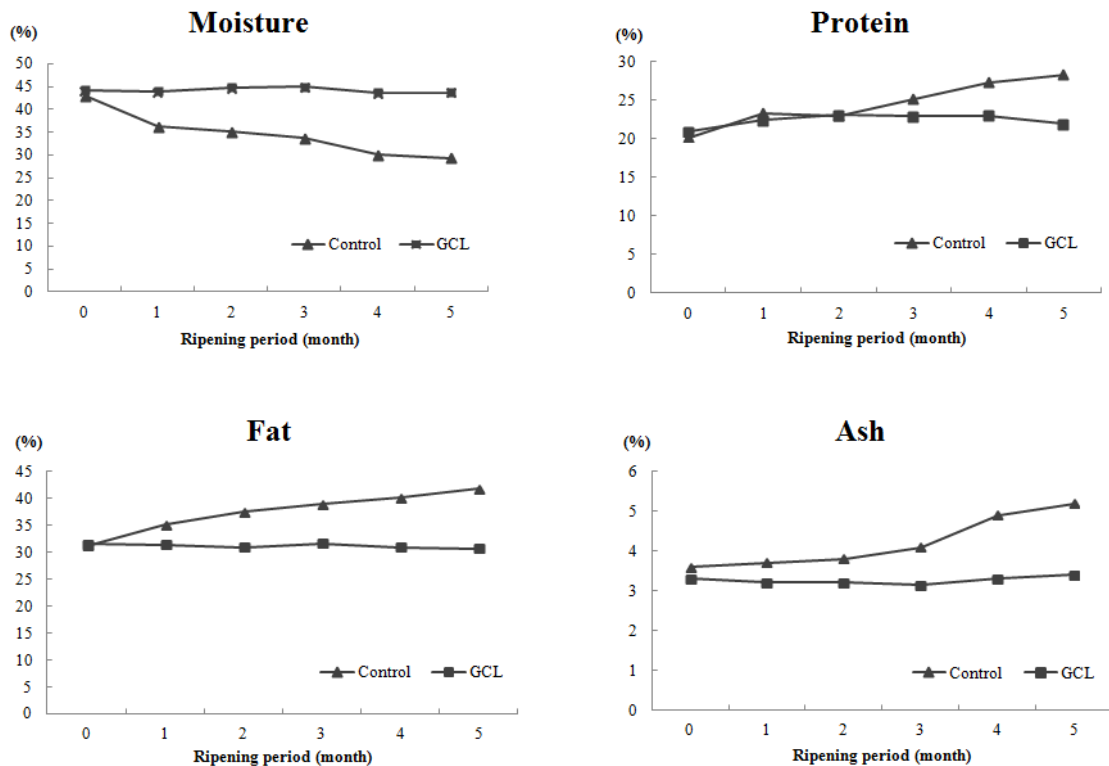


Fig. 2. Change in general components of Gouda cheese during ripening periods. Control: Gouda cheese with commercial starter, GCL: Gouda cheese with *L. rhamnosus_p1*

*L. rhamnosus_p1*을 처리한 실험구는 숙성 초기 5.29에서 숙성 2개월까지 약간 감소하여 5.22였다가 숙성 3개월째부터 증가하여 숙성 5개월째에 5.61까지 증가하였다. Lee와 Nam(1996)은 숙성 초기 curd 내에 잔존하는 lactose 분해에 따른 lactic acid의 생성으로 인해 pH가 감소하고, 그 후 pH의 상승은 단백질 분해와 암모니아 생성에 따른 상승이라고 보고하였다. 또한 cheese 내 pH의 증가 이유를 lactic acid의 분해, 비활성 성분, 치환물의 생성, acetic acid, carbonic acid와 같은 약하거나 완전 해리되지 않은 산의 생성 등과 단백질 분해에 의한 알칼리 물질의 유리 등이라고 보고한 연구도 있다(Visser and De Groat-Mastert, 1977; Visser, 1977). 본 연구에 있어서도 *L. rhamnosus_p1*을 첨가한 실험구는 대조구에 비해 1개월 빠르게 pH가 증가하였으며, *L. rhamnosus_p1* 첨가에 따른 유리아미노산이 증가하여 숙성 후반의 pH 증가한 것으로 생각된다.

5. 선택된 유산균주에 따른 Gouda cheese의 유리아미노산 변화

Gouda cheese의 숙성 중 유리아미노산의 변화를 Table 6 및 Table 7에 나타내었다. 대조구 및 *L. rhamnosus_p1*을 첨가

한 실험구의 유리아미노산의 총 함량은 숙성 초기 각각 16.63 및 16.01 mg/100 g에서 숙성기간이 증가함에 따라 숙성 3개월째 각각 40.80 및 54.70 mg/100 g으로 증가하였고, 숙성 5개월째에 71.55 및 77.12 mg/100 g으로 증가하였다. 주요 유리아미노산으로는 glutamin acid, leucine 및 phenylalanine으로 대조구는 각각 14.32, 10.26 및 6.25 mg/100 g으로, *L. casei_p2*를 첨가한 실험구는 각각 16.33, 12.31 및 5.80 mg/100 g으로 나타났다. 유리아미노산은 starter bacteria 및 비의도적 미생물에 의하여 단백질 분해 작용의 결과로 cheese 숙성이 진행되는 과정에서 cheese의 풍미에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있으며(Lee and Nam, 1996), cheese의 풍미에 영향을 주는 주요 아미노산으로 methionine, cysteine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, valine 및 leucine으로 보고되어 있으며(Van Kranenburt *et al.*, 2002; Yvon and Rijnen, 2001), 본 연구에 있어서도 glutamic acid, leucine 및 phenylalanine이 아미노산의 주요 성분으로 나타났다. *L. rhamnosus_p1*을 첨가한 실험구는 대조구에 비해 숙성 초기에는 유리아미노산의 총 함량은 차이가 없다가 숙성 3개월째부터 증가하기 시작하였으며, 이로 인해 *L. rhamnosus_p1*을 첨가한 실험구의 pH는 숙성 3개월째 증가하는 것으로 보여진다.

Table 6. Free amino acid composition of Gouda cheese during ripening periods

FAA ¹⁾	Ripening periods (month)					
	0	1	2	3	4	5
Asp	0.49	0.77	0.90	1.02	1.80	2.61
Ser	0.60	1.18	1.19	1.42	1.76	2.91
Glu	3.33	6.87	7.60	7.74	10.99	14.32
Gly	0.30	0.63	0.70	0.87	1.01	2.12
His	0.85	0.98	1.27	1.55	1.27	2.20
Arg	0.54	0.44	1.17	1.16	0.80	1.48
Thr	1.06	2.27	2.45	2.76	2.82	4.44
Ala	0.53	0.97	0.95	1.26	1.30	2.37
Pro	0.59	1.02	0.89	1.43	1.62	3.76
Cys	0.76	1.16	1.30	1.52	1.79	2.95
Tyr	1.04	1.86	1.88	2.39	1.01	3.04
Val	1.11	2.45	2.60	2.89	3.59	5.33
Met	0.33	0.62	0.81	1.24	1.98	2.33
Lys	0.21	0.41	0.66	0.89	1.21	1.58
Ile	0.41	1.01	1.05	1.26	1.79	3.60
Leu	2.56	6.09	6.26	6.88	8.24	10.26
Phe	1.92	3.66	3.86	4.52	4.69	6.25
Total	16.63	32.39	35.54	40.80	47.67	71.55

¹⁾ FAA: Free amino acid

Table 7. Free amino acid composition of Gouda cheese with *L. rhamnosus_p1* during ripening periods

FAA ¹⁾	Ripening periods (month)					
	0	1	2	3	4	5
Asp	0.51	0.85	1.59	2.68	2.94	3.12
Ser	0.55	1.33	1.38	2.68	2.79	3.04
Glu	3.32	6.82	7.45	7.89	11.32	16.33
Gly	0.22	0.63	0.68	0.93	1.02	2.33
His	0.75	1.52	1.99	2.54	2.45	2.134
Arg	0.45	0.99	1.85	1.97	2.09	2.23
Thr	0.98	2.35	2.54	3.04	3.11	4.374
Ala	0.49	0.59	1.11	1.42	1.66	2.75
Pro	0.52	1.65	1.88	2.89	3.21	3.51
Cys	0.55	1.38	1.75	2.09	2.41	2.57
Tyr	1.22	1.79	1.89	2.09	2.63	3.63
Val	1.82	2.44	2.51	3.88	3.96	4.02
Met	0.29	0.57	0.92	2.11	2.59	3.15
Lys	0.25	0.33	1.12	1.52	1.69	2.13
Ile	0.4	1.11	1.32	2.45	2.99	3.69
Leu	2.41	6.22	6.85	8.64	8.96	12.31
Phe	1.28	3.66	3.82	5.88	5.99	5.8
Total	16.01	34.23	40.65	54.70	61.81	77.12

¹⁾ FAA: Free amino acid

6. 선택된 유산균주에 따른 Gouda cheese의 관능검사

Gouda cheese의 숙성 중 맛, 향기, 조직감 및 전체적인 기호도를 5점 척도법으로 실시하였으며, 대조구는 각각 4.2, 4.0, 4.6 및 4.3로, *L. rhamnosus_p1*을 첨가한 실험구는 각각 4.8, 4.6, 4.8 및 4.7로 나타났다(Table 8). 관능검사 결과, 대조구에 비해 맛, 향기, 조직감 및 전체적인 기호도는 우수한 것으로 보이며, 고다치즈의 향기성분은 지방 분해, 단백질 분해 및 유당의 대사물 등에 의해 영향을 받으며, Alewijn 등(2005)은 지방 유래의 향기성분 물질인 ketones보다는 단백질 유래 대사산물에 의해서 영향을 받는다고 하였고,

특히 Mariley와 Casey(2004)은 황함유 아미노산에 의해서 풍미가 증가된다고 보고하였다.

요 약

본 연구는 숙성기간 단축 및 최종 제품의 소비자 편의를 높이기 위한 방법으로 1년 이상 숙성된 고다치즈에서 단백질 분해능이 우수한 유산균주를 screening하여 단백질분해능 및 내산성이 높은 *L. rhamnosus_p1*을 분리·동정하였으며, 이 균주를 이용한 고다치즈를 제조하여 숙성기간에 따른 품질 변화를 측정하였다. 1년 숙성된 고다치즈 3개 제품에서 분리해낸 유산균주는 총 5종이며, 16S rDNA의 염기서열을 표준 균주와 비교하여 작성한 계통수 결과, *L. rhamnosus* 2종, *L. casei*, *L. curvatus* 및 *S. saprophyticus*로 판명되었고, 이 중 단백질분해능과 내산성이 높은 *L. rhamnosus_p1*을 우선적으로 선정하여 절단형 고다치즈 제조 후 질소포장하여 숙성기간 중 이화학적 변화 및 아미노산 변화를 측정하였다. 숙성기간에 따른 수분, 단백질, 지방 및 회분의 변화는 대조구의 경우, 숙성기간이 증가할수록 수분함량이 감소하여 이에 따른 지방, 단백질 및 회분의 함량이 증가하였고, *L. rhamnosus_p1*을 처리한 실험구는 숙성기간에 따른 일반성

Table 8. Sensory characteristics of Gouda cheese with *L. rhamnosus_p1* (n=15)

Items	Control ¹⁾	GCL
Taste	4.2±0.642 ²⁾	4.8±0.72
Flavor	4.0±0.44	4.6±0.38
Texture	4.6±0.64	4.8±0.31
Overall acceptability	4.3±0.39	4.7±0.46

¹⁾ Control: Gouda cheese with commercial starter, GCL: Gouda cheese with *L. rhamnosus_p1*

²⁾ Mean±SD.

분 함량의 변화 없는 것으로 나타났다. 대조구 및 *L. rhamnosus_p1*을 첨가한 실험구의 유리아미노산의 함량은 숙성 초기 각각 16.63 및 16.01 mg/100 g에서 숙성기간이 증가함에 따라 숙성 3개월째 각각 40.80 및 54.70 mg/100 g 증가하였고, 숙성 5개월째에 71.55 및 77.12 mg/100 g으로 증가하였다. 주요 유리아미노산으로는 glutamic acid, leucine 및 phenylalanine으로 대조구는 각각 14.32, 10.26 및 6.25 mg/100 g으로, *L. casei_p2*를 첨가한 실험구는 각각 16.33, 12.31 및 5.80 mg/100 g 나타났다. 관능검사 결과, 맛, 향기, 조직감 및 전체적인 기호도에 있어서 대조구보다는 *L. rhamnosus_p1*을 첨가한 실험구가 우수한 것으로 보이며, 향후 복합균주에 대한 연구가 추가적으로 진행된다면 Gouda cheese 제조를 위한 스타터로서의 이용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 전라북도테크노파크 지역기반육성사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Alewijn, M., Sliwinski, E. L. and Wouters, J. T. M. 2005. Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese. *Int. Dairy J.* 15:733-740.
2. AOAC. 1990. Official methods of analysis. 13th ed, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, pp. 125-139.
3. Back, Y. J., Yoon, K. B., Yoon, Y. H. and Kim, H. U. 1983. Studies on the intracellular proteinase of *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Korean J. Ani. Sci.* 25:1-7.
4. Exterkate, F. A., de Veer, G. J. C. M and Stadhouders, J. 1987. Acceleration of the ripening process of Gouda cheese by using heat-treat mixed-strain starter cells. *Neth. Milk and Dairy J.* 41:307-320.
5. Grappin, R., Rank, T. C. and Olson, N. F. 1985. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *J. Dairy Sci.* 68:531-540.
6. Lee, S. W and Nam, M. S. 1996. Change in the casein, free amino acid and textures during ripening of Gouda cheese. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 16:35-40.
7. Lee, S. W. and Nam, M. S. 1996. Change in chemical composition and nitrogenous compounds during ripening of Gouda cheese. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 16:41-46.
8. Marilley, L. and Casey, M. G. 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90:139-159.
9. Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C. and Salminen, S. 1999. Probiotics; mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9:43-52.
10. Van den Berg, G., Meijer, W. C., Dusterhoft, E. M. and Smit, G. 2004. Gouda and related cheeses. 3rd ed. pages 103-135 in Major cheese groups: Vol. 2. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. P. F. Fox, ed. Elsevier Academic Press, London. UK.
11. Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Van Hylckama Vlieg, J., Ursing, B. M., Boekhorst, J., Smit, B. A., Ayad, E. H. E., Smit, G. and Siezen, R. J. 2002. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *Int. Dairy J.* 12:111-121.
12. Visser, F. M. W. 1977. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 2. Development of bitterness and cheese flavour. *Neth. Milk and Dairy J.* 31: 188-209.
13. Visser, F. M. W. 1977. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 3. protein breakdown : analysis of the soluble nitrogen and amino acid nitrogen fractions. *Neth, Milk and Dairy J.* 31:247-264.
14. Visser, F. M. W. and De groat-Mastert, A. E. A. 1977. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown : a gel electrophoretical study. *Neth. Milk and Dairy J.* 31:247-264.
15. Wallace, J. M. and Fox, P. F. 1997. Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. *Int. Dairy J.* 7:157-167.
16. Yamaguchi, K., Igoshi, K. and Kaminogawa, S. 1986. Purification and property of proteinases with an optimum pH at 8.0 from Gouda type cheese and its comparison with milk proteinases. *Jpn. J. Zootech Sci.* 58: 516-527.
17. You, S. J., Cho, J. K., Hwang, S. G. and Heo, K. C. 2005. Probiotic characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from Kefir. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 25:357-364.
18. Yvon, M. and Rijnen, L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* 11:185-201.