

## Changes in Fat in Gouda Cheese by the Psychrotrophic Bacterium *Acinetobacter* Genomospecies 10

Yong Kook Shin<sup>1</sup>, Nam Su Oh<sup>1</sup>, Hyun Ah Lee<sup>1</sup> and Myoung Soo Nam<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>R&D Center, Seoul Dairy Cooperative, Ansan, Kyunggi-Do 425-839, Korea

<sup>2</sup>Laboratory of Milk Food Biochemistry and Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received November 28, 2014 / Revised December 29, 2014 / Accepted December 31, 2014

The presence of psychrotrophic bacteria downgrades the quality of dairy products. This study evaluated the effect of lipolytic psychrotrophic bacteria on the chemical properties of Gouda cheese made from raw milk experimentally inoculated with a psychrotrophic bacterium (*Acinetobacter* genomospecies 10). Raw milk experimentally inoculated with *Acinetobacter* genomospecies 10 and refrigerated at 4 °C for 3 or 6 days produced a 6-week ripened Gouda cheese with a significant decrease in total solids ( $p<0.05$ ) or an increased fat content ( $p<0.05$ ), respectively. Raw milk inoculated with *Acinetobacter* genomospecies 10 and refrigerated for 3 days had higher ( $p<0.05$ ) SCFFA (1.35 times), MCFFA (1.42 times), and LCFFA (1.44 times) than the control 6-week ripened Gouda cheese. The cheese manufactured from the inoculated and refrigerated raw milk had higher ( $p<0.05$ ) total free fatty acids (1.68 times) compared with the control. Raw milk inoculated with *Acinetobacter* genomospecies 10 and refrigerated for 6 days had increased SCFFA (1.45 times), MCFFA (1.28 times), and LCFFA (1.38 times) compared with the control 6-week ripened Gouda cheese. The 6-week ripened Gouda cheese manufactured from this inoculated milk had higher ( $p<0.05$ ) total free fatty acids (1.34 times) compared with the control. The results indicated that the production of excessive free fatty acids in dairy products by psychrotrophic bacteria can be critical in predisposing dairy products to off-flavors and in turn degrading their quality.

**Key words :** *Acinetobacter* genomospecies 10, free fatty acids, gouda cheese, off-flavors, psychrotrophic bacteria

### 서 론

0°C에서 성장하는 미생물을 1902년에 Schmidt-Nielsen가 최초로 내냉성미생물(psychrophiles)라고 정의하였는데[20], 이 용어는 cold를 의미하는 그리스어 psychros와 loving을 의미하는 philos에서 유래된 것으로 psychro-philos는 cold loving을 의미한다. 그동안 내냉성 미생물을 지칭하는 용어가 학자들의 주장에 따라 차이를 보여왔으나, 1968년 국제낙농연맹(International Dairy Federation, IDF)에서 “내냉성미생물(psychrotrophic)이란 최적 성장온도와는 관계없이 7°C 또는 그 이하에서 성장가능한 미생물로 한다”고 정의하였다. 온도는 미생물의 생장에 영향을 미치는 가장 중요한 요인 중 하나이다. 내냉성 미생물은 비록 0°C에서 생장이 가능하지만, 최적

성장온도는 이보다 훨씬 높다[12, 26]. 내냉성 미생물의 최적 성장온도는 대부분 20~30°C이며[7], 최저 성장온도는 -10°C이다[8, 22]. 낮은 온도일수록 산소의 용해도와 효율도가 증가하기 때문에, 내냉성 미생물은 중온성 미생물에 비해 더 호기적인 환경을 선호한다[9]. 또한 내냉성 미생물은 중온성 미생물에 비해 세포막에 지방의 함유량이 높아 세포막의 면적이 더 넓기 때문에 영양분을 흡수하기 더 용이하고 낮은 온도에서도 막수송이 가능하여 0°C의 환경에서도 성장가능한 것으로 밝혀졌다[19].

원유와 유제품의 내냉성 미생물 중 대부분은 토양, 물, 채소 등으로부터 유래한 것이며, 토양, 목초 및 건초는  $1 \times 10^7$  CFU/g의 내냉성 미생물을 포함하고 있다[25]. 물은 원유와 유제품에 있어서 내냉성 미생물의 오염원이며, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* 및 *Flavobacterium* 속이 대부분을 차지하고, *Chromobacterium*과 *Bacillus* 속은 극소수를 포함하고 있다[24]. 원유의 내냉성 미생물 오염은 착유과정에서 사용되는 물과 유방 및 유두 표면, 흙, 농장의 집유탱크나 펌프 및 파이프 라인에 생성되는 유석 및 가공과정에서의 기기표면으로부터 발생한다고 보고하였다[15]. 가축의 분뇨는 내냉성 미생물의 서식처로 알려져 있으며, 착유우의 유방이 분뇨에 오염되어

#### \*Corresponding author

Tel : +82-42-821-5782, Fax : +82-42-823-2766

E-mail : namsoo@cnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

원유 내로 유입된다[17, 26]. 착유우의 유방과 유두를 소독제의 농도를 높여 소독하였을 경우 내생성 미생물의 수가 현저히 감소된다. 노후화되고 낙후된 비위생적인 목장과 유가공시설은 내생성 미생물의 주요 오염원이 된다[16].

집유과정에서 내생성 미생물에 오염된 원유는 공장에서의 저온저장 중 내생성 미생물의 계속되는 증식으로 인하여 유제품 품질 저하의 주요한 원인이 되고 있다. 내생성 미생물은 살균처리 과정에서 대부분 사멸하지만 생성된 내열성 효소는 활력을 유지할 수 있으며, 제품 제조 이후에 우유 단백질과 지질을 분해하여 off-flavor, bitter taste 및 rancid 등의 풍미를 생성하고 원유와 유제품의 보존성을 저하시킨다[18]. 내생성 미생물이 생산하는 지방분해효소는 유지방을 분해하여 유리 지방산을 생성하며, 지나친 지방의 분해는 원유와 유제품의 rancidity를 초래한다. 내생성 미생물의 단백질분해효소를 첨가한 원유로 제조한 Cheddar cheese의 숙성기간 중 쓴맛 아미노산의 급격한 증가에 따른 관능상의 bitterness 증가를 보고하였으며, 또한 *Alcaligenes metalcaligenes*와 *Pseudomonas viscosa*는 Cottage cheese의 점질막을 형성하여 유제품의 변패에 관여한다고 하였다[3]. 본 연구는 국내 원유 내 존재하는 내생성 미생물이 Gouda cheese의 품질에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 지방분해효소의 활성이 높은 균주(*Acinetobacter genomospecies 10*)를 분리 및 동정[21, 22, 23] 하였고, 이 균주를 원유에 접종하여 제조한 Gouda cheese의 숙성중 지방의 변화를 고찰하기 위함이다.

## 재료 및 방법

### Gouda cheese의 제조

Gouda cheese는 내생성미생물인 *Acinetobacter genomospecies 10*을 5.00 log CFU/ml로 접종하여 3일과 6일 동안 저장한 원유 7 kg을 사용하여 제조하였다. 사용된 복합균주인 FD-DVS CHN-11 (*Lactococcus lactis* sp.cremoris, *Leuconostoc mesenteorides* sp. cremoris, *Lactococcus lactis* sp.lactis, *Lactococcus lactis* sp. lactis biovar diacetylactis)은 Chr. Hansens A/S (Horsholm, Denmark)에서 공급받아 사용하였다. 원유는 72 °C에서 15초 동안 살균처리하였으며, 살균된 원유(7 kg)는 31 °C 치즈베트에서 복합균주를 75 unit로 농도를 조정하여 접종하였으며, 0.005~0.01% 범위의 산도 증가를 기준으로 약 60분 동안 정치하였다. 멸균된 증류수에 10배의 농도로 희석된 렌넷은 0.26 ml/kg의 농도로 첨가하였으며, 10분 동안 약하게 교반한 후 50분 동안 정치시켜 커드를 제조하였다. 제조한 커드는 5~7 mm 큐브 크기로 절단하여 31 °C에서 25분 동안 교반하여 pH를 6.4~6.5로 조정하였다. 이후 약 40% 가량의 유청을 제거한 후 최종 37~38 °C가 되도록 20분 동안 60 °C의 물을 가수한 후 15분 동안 교반하였다. 제조한 커드는 28 psi의 압력으로 5시간 동안 압착하였으며, 압착 후 pH는 5.3~5.5로 하였다.

압착한 커드는 20% 소금물에 20시간 동안 염지하였으며 pH는 5.15~5.25로 조정하였다. 제조한 치즈는 최초 15 °C에서 2주 동안 숙성하였으며, 이후 4주 동안 10 °C에서 숙성하였다. 분석을 위한 시료는 염지 직후(0일), 2주 숙성 및 6주 숙성 후에 각각 채취하여 실시하였다. 분석에 사용된 치즈 시료는 각각 두 번씩 제조하여 분석 일정에 따라 절단한 후 개별 진공 포장하여 사용하였다.

### 일반성분의 분석

내생성 미생물인 *Acinetobacter genomospecies 10*을 접종 후 냉장보관 3일과 6일이 경과한 원유로 각각 제조한 Gouda cheese를 0일과 6주 동안 숙성시킨 다음 치즈 내 수분, 조지방을 분석하였다. Gouda cheese의 총고형분과 지방 함량 분석은 시료별 3회 반복 실험 하였다[1].

### 유리지방산의 분석

유리지방산의 분석은 FFAP column (50 m×0.25 mm, 0.25 μm)이 장착된 Agilent model 6890 GC-FID (Agilent, Chandler, USA)을 사용하였다. carrier gas (nitrogen)의 유속은 2 ml/min이고, 오븐온도는 최초 65 °C에서 분당 10 °C로 높이고 240 °C까지 승온시켜 분석하였다. 검출기의 온도는 250 °C, 주입구의 온도는 260 °C로 조정하여 사용하였다. 유리지방산 분석을 위한 전처리는 균질화된 시료 1 g을 칭량한 후 3 g anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 0.3 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.5 mol/l)와 1.0 ml 표준물질 용액을 첨가하였다. 내부표준물질은 Enantic acid (C7:0)와 margaric acid (C17:0)를 사용하였다. 혼합액은 3 ml의 ether/heptanes (1:1, v/v) 용액으로 추출하여 700x g/min 에서 5분 동안 원심분리하여 상정액을 취하였다. 유리 지방산의 분리는 Anion-Exchange method를 사용하였고, Aminopropyl column (Waters, USA, CA)은 10 ml의 heptane으로 활성화시켜 사용하였다. 추출액에 존재하는 중성지질을 제거하기 위하여 10 ml의 chloroform/2-propanol (2:1, v/v)로 용출시켰으며, 2% formic acid가 포함된 diethyl ether 2.5 ml로 용출한 것을 최종 시험용액으로 사용하였다[16].

### 통계분석

실험결과는 SAS 프로그램을 이용하여 분산분석을 실시하였고 Duncan의 다중검정법을 통해 5% 수준에서 처리구 평균값 간의 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 일반성분

*Acinetobacter genomospecies 10*을 접종한 후 냉장 보관한 원유(0일, 3일, 6일)를 사용하여 제조한 Gouda cheese와 *Acinetobacter genomospecies 10*을 접종하지 않은 원유(0일, 3

일, 6일)를 사용하여 제조한 대조구인 Gouda cheese의 총 고형분과 유지방 함량은 Table 1과 Table 2에 나타난 바와 같다. 접종 후 3일차 원유로 제조한 Gouda cheese의 총고형분은 최초 치즈제조 직후 55.24%에서 숙성 6주 경과후에 54.05%로 소량 감소하였고, 유지방은 최초 26.19%에서 숙성 6주 경과후에 27.59%로 증가하였다. 접종 3일차 원유로 제조한 대조구의 총 고형분은 최초 55.06%이었으며 숙성 6주차에는 54.47%로서 소량 감소하였고, 유지방은 최초 26.51%에서 숙성 6주 경과후에 28.14%까지 증가하였다. 또한 접종 6일차 원유로 제조한 Gouda cheese의 경우 유지방은 최초 26.16%이었으며 숙성 6주 경과 후에는 27.32%로 증가하여 3일차의 원유로 제조한 Gouda cheese의 결과와 동일한 총고형분과 유지방 함량변화의 경향을 나타내었다.

**유리지방산**

유리지방산의 함량은 Table 3와 Table 4에 나타난 바와 같이 *Acinetobacter* genomospecies 10을 원유에 접종 3일 경과후에 제조한 Gouda cheese의 제조 직후 총 유리지방산(C4:0~C18:2)의 함량은 1,910.1 mg/kg이었고, 15°C에서 2주 동안의 숙성 후 2,179.9 mg/kg으로 증가하였다. 이후 10°C에서 6주까지 숙성한 결과 총 유리지방산의 함량은 2,499.8 mg/kg으로서 제조 직후로부터 약 1.31배 증가한 결과를 나타내었다. Gouda cheese의 숙성기간 중 SCFFA, MCFFA 및 LCFFA는 모두 유

Table 1. Compositional concentrations of Gouda cheese made with 3 days-refrigerated raw milk after inoculation

Composition (%)		0 day	6 weeks
Control	Total solid	55.06 <sup>a</sup> ±0.07	54.47 <sup>b</sup> ±0.09
	Fat	26.51 <sup>a</sup> ±0.82	28.14 <sup>b</sup> ±0.72
Sample	Total solid	55.24 <sup>a</sup> ±0.16	54.05 <sup>b</sup> ±0.17
	Fat	26.19 <sup>a</sup> ±0.71	27.59 <sup>b</sup> ±0.95

<sup>a,b</sup>Means with different superscripts within same rows are significantly different, *p*<0.05.

Values were expressed as mean ± standard deviation (S.D.) (n=3).

Table 2. Compositional concentrations of Gouda cheese made with 6 days-refrigerated raw milk after inoculation

Composition (%)		0 day	6 weeks
Control	Total solid	55.06 <sup>a</sup> ±0.33	53.41 <sup>b</sup> ±0.18
	Fat	26.11 <sup>a</sup> ±0.37	27.32 <sup>b</sup> ±0.22
Sample	Total solid	55.42 <sup>a</sup> ±0.23	54.06 <sup>b</sup> ±0.35
	Fat	26.16 <sup>a</sup> ±0.94	27.53 <sup>b</sup> ±0.26

<sup>a,b</sup>Means with different superscripts within same rows are significantly different, *p*<0.05.

Values were expressed as mean ± standard deviation (S.D.) (n=3).

Table 3. Concentrations of free fatty acid in Gouda cheese made with 3 days-refrigerated raw milk after inoculation

Fatty acid (mg/kg)	0 day	2 weeks	6 weeks	
Control	C4:0	38.1 <sup>a</sup> ±0.6	42.3 <sup>b</sup> ±2.2	47.1 <sup>c</sup> ±1.9
	C6:0	35.4 <sup>a</sup> ±0.3	36.1 <sup>a</sup> ±2.9	37.1 <sup>a</sup> ±1.3
	C8:0	39.5 <sup>a</sup> ±0.6	39.6 <sup>a</sup> ±2.3	40.0 <sup>a</sup> ±1.8
	C10:0	61.8 <sup>a</sup> ±0.2	64.2 <sup>a</sup> ±3.2	64.4 <sup>a</sup> ±2.0
	C12:0	61.1 <sup>a</sup> ±1.7	69.4 <sup>b</sup> ±4.3	72.0 <sup>b</sup> ±0.5
	C14:0	83.2 <sup>a</sup> ±1.6	108.6 <sup>b</sup> ±6.0	121.7 <sup>c</sup> ±1.1
	C16:0	451.7 <sup>a</sup> ±8.5	520.0 <sup>b</sup> ±29.9	536.7 <sup>b</sup> ±6.8
	C18:0	373.9 <sup>a</sup> ±3.6	411.7 <sup>b</sup> ±18.0	421.4 <sup>b</sup> ±14.2
	C18:1	277.1 <sup>a</sup> ±1.6	325.5 <sup>b</sup> ±19.0	337.8 <sup>b</sup> ±3.6
	C18:2	63.6 <sup>a</sup> ±0.8	67.4 <sup>a</sup> ±4.1	68.2 <sup>a</sup> ±1.3
	SCFFA	112.9 <sup>a</sup> ±1.5	118.0 <sup>ab</sup> ±7.3	124.3 <sup>b</sup> ±4.9
	MCFFA	122.9 <sup>a</sup> ±1.9	133.6 <sup>b</sup> ±7.4	136.4 <sup>b</sup> ±2.5
	LCFFA	1249.5 <sup>a</sup> ±12.9	1433.2 <sup>b</sup> ±73.6	1485.7 <sup>b</sup> ±20.0
	Total FFA	1485.4 <sup>a</sup> ±14.9	1684.8 <sup>b</sup> ±88.2	1746.4 <sup>b</sup> ±24.0
Sample	C4:0	39.4 <sup>a</sup> ±1.1	51.2 <sup>b</sup> ±1.6	62.1 <sup>c</sup> ±2.8
	C6:0	38.2 <sup>a</sup> ±0.4	44.9 <sup>b</sup> ±0.8	51.2 <sup>c</sup> ±2.1
	C8:0	44.7 <sup>a</sup> ±0.6	50.6 <sup>b</sup> ±0.9	55.5 <sup>c</sup> ±1.6
	C10:0	77.0 <sup>a</sup> ±3.2	84.4 <sup>b</sup> ±1.4	92.3 <sup>c</sup> ±5.1
	C12:0	77.3 <sup>a</sup> ±1.8	86.7 <sup>a</sup> ±3.0	101.5 <sup>b</sup> ±8.3
	C14:0	121.3 <sup>a</sup> ±3.9	163.7 <sup>b</sup> ±4.2	204.4 <sup>c</sup> ±19.4
	C16:0	581.6 <sup>a</sup> ±22.6	680.3 <sup>b</sup> ±16.5	771.2 <sup>c</sup> ±64.2
	C18:0	461.1 <sup>a</sup> ±26.1	487.5 <sup>ab</sup> ±16.3	520.4 <sup>b</sup> ±31.6
	C18:1	393.9 <sup>a</sup> ±27.0	448.4 <sup>a</sup> ±19.5	550.0 <sup>b</sup> ±48.3
	C18:2	75.6 <sup>a</sup> ±3.4	82.3 <sup>a</sup> ±3.2	91.2 <sup>b</sup> ±4.9
	SCFFA	122.3 <sup>a</sup> ±1.1	146.6 <sup>b</sup> ±2.6	168.8 <sup>c</sup> ±6.4
	MCFFA	154.3 <sup>a</sup> ±4.8	171.1 <sup>b</sup> ±4.4	193.8 <sup>c</sup> ±13.3
	LCFFA	1633.4 <sup>a</sup> ±82.6	1862.2 <sup>b</sup> ±59.0	2137.2 <sup>c</sup> ±165.3
	Total FFA	1910.1 <sup>a</sup> ±86.3	2179.9 <sup>b</sup> ±65.5	2499.8 <sup>c</sup> ±184.8

<sup>a,b</sup>Means with different superscripts within same rows are significantly different, *p*<0.05.

Values were expressed as mean±standard deviation (S.D.) (n=3). SCFFA = Short-chain FFA (sum of C4:0 to C8:0); MCFFA = medium-chain FFA (sum of C10:0 to C12:0); LCFFA = long-chain FFA (sum of C14:0 to C18:2); Total FFA (sum of C4:0 to C18:2)

의적인 증가를 나타내었다(*p*<0.05). 숙성 6주후의 대조구와 비교하면 SCFFA는 124.3 mg/kg에서 168.8 mg/kg으로 1.35배 증가하였고, MCFFA는 136.4 mg/kg에서 193.8 mg/kg으로 1.42배 증가하였으며, LCFFA는 1,485.7 mg/kg에서 2,137.2 mg/kg으로 1.44배 증가하였다. 생성된 개별 유리지방산 중 가장 증가율이 높은 지방산은 palmitate (C16:0), stearate (C18:0) 및 oleate (C18:1)였다. 냉생성미생물을 접종후 3일 동안 저장한 원유로 제조한 Gouda cheese에서 숙성 6주후에 생성된 총 유리지방산은 2,499.8 mg/kg으로서 대조구의 1,485.4 mg/kg과 비교하여 약 1.68배 높은 함량을 나타내었다.

*Acinetobacter* genomospecies 10을 접종하여 냉장 보관 6일차의 원유로 제조한 Gouda cheese의 초기 총 유리지방산 (C4:0~C18:2)의 함량은 1,572.0 mg/kg이었으며, 2주 숙성 후

Table 4. Concentrations of free fatty acid in Gouda cheese made with 6 days-refrigerated raw milk after inoculation

Fatty acid (mg/kg)	0 day	2 weeks	6 weeks
C4:0	37.5 <sup>a</sup> ±3.0	42.3 <sup>b</sup> ±2.9	49.3 <sup>c</sup> ±1.3
C6:0	35.8 <sup>a</sup> ±1.8	36.2 <sup>a</sup> ±2.4	38.6 <sup>a</sup> ±1.0
C8:0	39.9 <sup>a</sup> ±2.1	39.6 <sup>a</sup> ±1.6	42.0 <sup>a</sup> ±1.6
C10:0	60.4 <sup>a</sup> ±2.5	60.7 <sup>a</sup> ±4.0	64.5 <sup>a</sup> ±2.0
C12:0	57.3 <sup>a</sup> ±2.0	59.8 <sup>a</sup> ±1.9	70.6 <sup>b</sup> ±6.0
C14:0	76.0 <sup>a</sup> ±0.9	92.9 <sup>b</sup> ±7.5	107.1 <sup>c</sup> ±2.5
C16:0	402.0 <sup>a</sup> ±8.1	443.4 <sup>b</sup> ±12.0	496.0 <sup>c</sup> ±27.4
C18:0	302.5 <sup>a</sup> ±23.9	326.2 <sup>b</sup> ±11.5	367.4 <sup>c</sup> ±9.7
C18:1	250.0 <sup>a</sup> ±17.4	293.2 <sup>b</sup> ±3.0	315.0 <sup>b</sup> ±11.6
C18:2	61.7 <sup>a</sup> ±0.8	61.5 <sup>a</sup> ±1.5	68.6 <sup>b</sup> ±0.8
SCFFA	113.2 <sup>a</sup> ±6.7	118.1 <sup>a</sup> ±6.7	129.9 <sup>b</sup> ±3.2
MCFFA	117.6 <sup>a</sup> ±4.3	120.5 <sup>a</sup> ±5.6	135.1 <sup>b</sup> ±7.7
LCFFA	1092.21 <sup>a</sup> ±44.1	1217.3 <sup>b</sup> ±43.5	1354.1 <sup>c</sup> ±45.1
Total FFA	1323.0 <sup>a</sup> ±44.1	1455.9 <sup>b</sup> ±43.5	1619.1 <sup>c</sup> ±45.1
C4:0	38.4 <sup>a</sup> ±2.0	50.8 <sup>b</sup> ±0.7	61.6 <sup>c</sup> ±4.5
C6:0	37.6 <sup>a</sup> ±2.0	46.3 <sup>b</sup> ±1.0	53.5 <sup>c</sup> ±3.3
C8:0	41.1 <sup>a</sup> ±1.1	50.9 <sup>b</sup> ±0.6	54.9 <sup>b</sup> ±4.9
C10:0	65.8 <sup>a</sup> ±1.0	76.3 <sup>b</sup> ±2.5	81.7 <sup>b</sup> ±3.1
C12:0	64.2 <sup>a</sup> ±1.7	75.3 <sup>b</sup> ±0.6	86.1 <sup>c</sup> ±5.4
C14:0	94.6 <sup>a</sup> ±6.7	134.1 <sup>b</sup> ±2.7	169.5 <sup>c</sup> ±11.0
C16:0	480.6 <sup>a</sup> ±6.7	566.2 <sup>b</sup> ±10.3	658.3 <sup>c</sup> ±18.0
C18:0	358.1 <sup>a</sup> ±5.1	404.0 <sup>b</sup> ±6.8	451.1 <sup>c</sup> ±26.6
C18:1	323.3 <sup>a</sup> ±13.9	380.1 <sup>b</sup> ±24.2	471.5 <sup>c</sup> ±16.8
C18:2	68.4 <sup>a</sup> ±5.9	75.1 <sup>b</sup> ±6.5	82.3 <sup>c</sup> ±5.7
SCFFA	117.1 <sup>a</sup> ±4.8	147.9 <sup>b</sup> ±0.6	170.0 <sup>c</sup> ±12.2
MCFFA	130.0 <sup>a</sup> ±2.7	151.5 <sup>b</sup> ±1.8	167.7 <sup>c</sup> ±8.2
LCFFA	1324.9 <sup>a</sup> ±17.1	1559.6 <sup>b</sup> ±43.0	1832.7 <sup>c</sup> ±59.3
Total FFA	1572.0 <sup>a</sup> ±10.7	1859.1 <sup>b</sup> ±43.3	2170.5 <sup>c</sup> ±70.6

<sup>a,b</sup>Means with different superscripts within same rows are significantly different,  $p < 0.05$ .

Values were expressed as mean ± standard deviation (S.D.) (n=3).

SCFFA = Short-chain FFA (sum of C4:0 to C8:0); MCFFA = medium-chain FFA (sum of C10:0 to C12:0); LCFFA = long-chain FFA (sum of C14:0 to C18:2); Total FFA (sum of C4:0 to C18:2)

1,859.1 mg/kg으로 증가하였다. 숙성 6주 후의 총유리지방산의 함량은 2,170.5 mg/kg이었고, 숙성기간 중 SCFFA, MCFFA 및 LCFFA는 모두 유의적인 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ). SCFFA는 117.1 mg/kg에서 170.0 mg/kg으로 1.45배가 증가하였으며, MCFFA는 130.0 mg/kg에서 167.7 mg/kg으로 1.28배가 증가하였고, LCFFA는 1,324.9 mg/kg에서 1,832.7 mg/kg으로 1.38배가 증가하였다. 반면, 대조구(냉장 보관 6일차 원유 사용)에서 초기 총 유리지방산의 함량은 1,323.0 mg/kg에서 숙성 6주후에 1,619.1 mg/kg으로 증가하였다. Gouda cheese의 제조 직후 총 유리지방산의 함량은 대조구와 비교하여 약 1.2배 높은 함량을 나타내었으며, 6주후에 총유리지방산은 2170.5 mg/kg으로 대조구의 1,619.1 mg/kg와 비교하면

약 1.34배 높은 함량을 나타내었다. 따라서 지방분해효소의 활성이 높은 내냉성미생물인 *Acinetobacter genomospecies* 10이 생산하는 효소에 의해 지방이 분해되어 유리지방산의 함량이 증가된 것을 알 수 있었다.

본 논문의 선행연구로 내냉성 미생물인 *Acinetobacter genomospecies* 10을 원유에 5.00 log CFU/ml로 접종후 4°C에서 저장 3일째는 5.86 log CFU/ml, 5일째는 6.48 log CFU/ml, 7일째는 7.44 log CFU/ml로 증가하였다[22]. 이는 내냉성 미생물인 *Acinetobacter genomospecies* 10이 4°C에서도 저장 시간이 길어질수록 잘 성장하면서 대사산물로 지방분해효소를 생산하여 원유의 품질을 저하시키는 원인을 제공한다.

*Acinetobacter genomospecies* 10이 생산하는 지방분해효소의 활성 측정은 1차로 Agar 확산법으로 활성이 높게 나타난 것을 확인하였고, 2차로 colorimetric 법을 이용하여 생성된 *p*-nitrophenol (*p*-NP)의 농도로 지방분해효소의 활성을 측정하였는데 3.41 µg/ml의 *p*-NP를 생성하면서 다른 균주들에 비해 가장 높은 활성을 나타내었다[24]. *Acinetobacter genomospecies* 10이 생산하는 지방분해 조효소가 반응하는 최적 pH는 8.5로 1.92 µg/ml의 *p*-NP를 생성하였고, 최적온도는 45°C로 2.76 µg/ml의 *p*-NP를 생성하였다. 또한 65, 75, 85°C에서도 효소의 활성은 실행되지 않고 0.3~0.7 µg/ml의 *p*-NP를 생성하였다[24]. *Pseudomonas fluorescens* HU380이 생산하는 지방분해효소의 활성 측정은 최적 pH는 8.5였고 최적 온도는 45°C [11]로 나타나 *Acinetobacter genomospecies* 10과 동일한 결과를 알 수 있었다. 원유에서 분리한 내냉성 미생물인 *Pseudomonas* sp. YJ103에 대한 지방분해효소 활성 측정에서는 pH 7.5, 30°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다고 보고하였다[10].

또한 지방분해효소를 생성하는 내냉성 미생물인 *Pseudomonas fluorescens*와 *Ps. fragi*.를 10<sup>7</sup> CFU/ml 이상 첨가한 원유로 Cheddar cheese를 제조하여 4개월 동안 저장하였을 때 대조군과 비교하여 3배 이상의 유리지방산을 생성하여 치즈에 rancidity를 발생시키는 것으로 보고하였다[13]. 따라서 Gouda cheese 제조시 살균 처리(72°C, 15초)후에 *Acinetobacter genomospecies* 10이 생성한 지방분해효소는 그 활성이 65, 75, 85°C에서도 실행되지 않고 잔존하기 때문에 치즈 내 지방의 분해에 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며, 특히 SCFFA의 생성에 관여하는 것으로 사료되었다. 적절한 지방분해로 인한 유리지방산의 생성은 치즈의 숙성 중 케톤, 락톤, 에스테르, 알데하이드 등과 같은 방향성 물질생성의 전구물질로서 풍미 등에 많은 기여를 하게되지만 지나친 지방분해는 이상취의 생성으로 치즈품질에 부정적인 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다[3].

치즈제조를 위한 원유의 내냉성 미생물수는 1×10<sup>4</sup>~1×10<sup>6</sup> CFU/ml가 적당하다고 알려져있으며[2, 25], 1×10<sup>3</sup>~1×10<sup>6</sup> CFU/ml 범위의 내냉성 미생물을 포함하고 있는 원유로 만든 Camembert cheese는 별다른 품질의 손상이 발견되지 않았다

는 보고[8]와는 달리 일부 연구자들은 내열성 지방분해효소와 단백질분해효소를 생산하는 내냉성 미생물이 Camembert cheese의 풍미와 조직에 나쁜 영향을 미친다고 보고하였다[4, 6]. 이와 같이 내냉성 미생물에 의해 생산되는 지방분해효소 작용으로 유지방이 가수분해되어 생성되는 유리지방산이 Cheddar cheese의 풍미에 중요한 영향을 미치며, 특히 내열성 지방분해효소에 의해 일어나는 과다한 지방 분해는 off-flavor를 일으킨다[5, 6]. 48시간 냉장 저장한 원유로 만든 치즈는 유리비휘발성 지방산이 높아 맛과 풍미가 결합된 치즈가 되며, 5℃에서 저장한 원유로 만든 연질 치즈는 대조구에 비해 조직이 단단하고, 더 빨리 부패하며 long-chain 포화지방산, 불포화 메틸 케톤 및 휘발성 지방산의 함량이 높았다고 보고하였다[6]. 치즈에서 발생되기 쉬운 rancid, soapy, yeasty, butyric 및 fruity flavor는 원유 또는 치즈내의 지방분해효소의 분해 결과[4, 6, 14]이므로 원유를 착유할 때는 내냉성미생물의 오염을 최소화 할 수 있도록 위생적으로 착유를 하고, 저장기간은 가능한 줄여 내냉성미생물의 증식을 최소화 함으로써 고품질의 원유를 생산할 수 있도록 노력해야만 한다.

## References

1. AOAC 2007. Official methods of analysis. 18<sup>th</sup> ed, pp 68-81. Association of official Analytical Chemists. Washington DC.
2. Chapman, H. R., Sharpe, M. E. and Law, B. A. 1976. Some effects of low temperature storage of milk on cheese production and Cheddar cheese flavor. *Dairy Indus. Int.* **41**, 42-45.
3. Chung, C. I. 2000. Quality of milk and psychrotrophic bacteria. *J. Kor. Dairy Technol. Sci.* **18**, 38-46.
4. Cousin, M. A. and Marth, E. H. 1977b. Cheddar cheese made from milk that was precultured with psychrotrophic bacteria. *J. Dairy. Sci.* **60**, 1048-1056.
5. Deeth, H. C. and Fitzgerald, C. H. 1976. Lipolysis in dairy products: A review. *Aust. J. Dairy. Technol.* **31**, 53-64.
6. Dumont, J. P., Delespaul, G., Miguot, B. and Adda, J. 1977. Influence des bacteries psychrotrophes sur les qualités. Organoleptiques de fromages à pâte molle. *Le Lait* **57**, 619-630.
7. Elliot, R. P. and H. D. Michener, H. D. 1965. Factors affecting the growth of psychrophilic microorganisms in foods. A review. *USDA. Technical Bulletin* 23-28.
8. Haisch, K., Hermann, M. and Kiermeier, F. 1971. Suitability of deep-cooled milk for cheesemaking. *Milchwissenschaft* **26**, 6-13.
9. Jay, J. M. 1986. Characteristics and growth of psychrotrophic microorganisms. In *Modern Food Microbiology*, pp.579-592. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
10. Kim, J. W., Shim, Y. S. and Yoon, S. S. 1997. Isolation and purification of a lipase from *Pseudomonas* sp. YJ103 isolated from raw milk. *Kor. J. Dairy Sci.* **19**, 17-24.
11. Kojima, Y. and Shimizu, S. 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 219-226.
12. Kraft, A. A. and Rey, C. R. 1979. Psychrotrophic bacteria in foods: An update. *Food Technol.* **33**, 66-71.
13. Law, B. A., Elisabeth Sharpe, M. and Chapman, H. R. 1976. The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* **43**, 459-468.
14. Law, B. A., Cousins, C. M., Sharpe, M. E. and Davies, F. L. 1979. Psychrotrophs and their effects on milk and dairy products. pp.137-152, A. D. Russell & R. Fuller (eds), In cold tolerant microbes in spoilage and the environment. Academic Press, New York.
15. Meer, R. R., Baker, J., Bodyfelt, F. W. and Griffiths, M. W. 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *J. Food Prot.* **54**, 969-979.
16. Morse, P. M., Jackson, H., McNaughton, C. H., Leggatt, A. G., Landerkin, G. B. and Jouns, C. K. 1968. Investigation of factors contributing to the bacterial count of bulk tank milk. II. Bacteria in milk from individual cows. *J. Dairy Sci.* **51**, 1188-1191.
17. Otte, I., Tolle, A. and Hahn, G. 1979. Zur Analyse der Mikroflora von Milch and Milchprodukten. 2. Miniaturisierte Primärtests zur Bestimmung der Gattung. *Milchwissenschaft* **34**, 152-156.
18. Rowe, M. T., Dunstall, G., Kilpatrick, D. and Wisdom, G. B. 2001. A study of changes in the psychrotrophic microflora of raw milk during refrigerated storage. *Milchwissenschaft* **56**, 247-250.
19. Russell, N. J. and Fukunaga, N. 1990. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**, 171-182.
20. Schmidt-Nielsen, S. 1902. Ueber einige psychrophile Mikroorganismen und ihr Vorkommen. *Zentr Bakteriell Parasitenkd Infektionsk Hyg Abt II* **9**, 145-147.
21. Shin, Y. K., Lee, H. A., Oh, N. S. and Nam, M. S. 2013a. Seasonal, regional distribution and identification of psychrotrophic bacteria in milk. *CNU J. Agri. Sci.* **40**, 27-34.
22. Shin, Y. K., Lee, H. A., Oh, N. S. and Nam, M. S. 2013b. Effects of psychrotrophic bacteria *Acinetobacter* genomospecies 10 and *Serratia liquefaciens* on raw milk quality. *Kor. J. Food Sci. Anim.* **33**, 542-548.
23. Shin, Y. K., Lee, H. A., Oh, N. S. and Nam, M. S. 2013c. Enzyme activity of isolated psychrotrophic bacteria from raw milk of different regions on season. *Kor. J. Food Sci. Anim.* **33**, 772-780.
24. Thomas, S. B. 1966. Sources, incidence and significance of psychrotrophic bacteria in milk. *Milchwissenschaft* **21**, 270-275.
25. Thomas, S. B. 1971. The suitability of refrigerated bulk collected milk for cheesemaking. *Dairy Ind.* **36**, 287-290.
26. Thomas, S. B. and Thomas, B. F. 1973. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk collected raw milk. Part I. *Dairy Ind.* **38**, 11-15.

**초록 : 내냉성미생물인 *Acinetobacter* genomospecies 10에 의한 gouda cheese의 지방의 변화**신용국<sup>1</sup> · 오남수<sup>1</sup> · 이현아<sup>1</sup> · 남명수<sup>2\*</sup>(<sup>1</sup>서울우유협동조합 중앙연구소, <sup>2</sup>충남대학교 농업생명과학대학 동물바이오시스템학과)

본 연구는 내냉성 미생물이 Gouda cheese의 지방 성분에 미치는 영향을 알아보기 위해 수행하였다. 지방분해 효소 활성이 가장 높은 내냉성미생물인 *Acinetobacter* genomospecies 10을 원유에 접종하여 3일과 6일 냉장 보관 후 제조한 Gouda cheese는 숙성 6주 경과후 총고형분과 지방 성분은 대조군에 비해 각각 유의적으로 증가하였다 ( $p < 0.05$ ). 접종 3일후 원유로 제조한 Gouda cheese는 대조군에 비해 SCFFA는 1.35배, MCFFA는 1.42배, LCFFA는 1.44배로 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 또한 총유리지방산 함량은 대조군에 비해 1.68배로 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 접종 6일 후 원유로 제조한 Gouda cheese는 대조군에 비해 SCFFA는 1.45배, MCFFA는 1.28배, LCFFA는 1.38배로 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 또한 총유리지방산 함량은 대조군에 비해 1.34배로 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 내냉성미생물이 생산하는 지방분해효소에 의해 얻어진 지나친 유리지방산은 이취를 유발할 수 있어, 유제품의 품질을 저하시킬 수 있음을 시사한다.