



## 면역 활성능을 가진 *Streptococcus macedonicus* LC743을 이용한 모짜렐라 치즈 제조의 최적 배양조건 확립

박선영 · 한누리 · 임상동\*

한국식품연구원

### Establishment of the Optimum Culture Conditions for Mozzarella Cheese manufacturing by *Streptococcus macedonicus* LC743 with Immunomodulating Activity

Sun-Young Park, Noori Han and Sang-Dong Lim\*

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

#### Abstract

This study aimed to establish the optimum culture conditions for Mozzarella cheese by using *Streptococcus macedonicus* LC743, a strain selected for its immunomodulatory activity. For process optimization, 1.0% and 2.0% strain was inoculated and incubated at 32°C and 35°C, respectively. The general components, bacterial count, total solids, yields, and immunomodulatory activity of the Mozzarella cheese were investigated. When the strain was inoculated at 2.0% and incubated at 32°C, the product quality and immunomodulatory activity was optimal and required minimal processing time. Therefore, 2.0% of *S. macedonicus* LC743 starter culture was added to milk at 32°C, after pasteurization at 63°C for 30 min, and agitated for 4~5 min after addition of 230 µL/kg of rennet. Curd was made by setting the milk 25~35 min after addition of 0.01~0.02% calcium chloride. The curd was cut at 0.1~0.12% acidity (81 min later) and after heating the cheese to up to 43°C. Whey was removed at an acidity of 0.17~0.18% by agitation for 53 min. Next, cheddaring for 210 min up to an acidity of 0.6~0.65%, stretching at 72~75°C, and molding at 65~70°C were performed, and the product was allowed to cool down to 5°C. Salting was done with a solution of 18~20 °Bé at 12°C for 20 min and drying occurred at 80~90% relative humidity at 10°C for 2~3 days.

Keywords: *Streptococcus macedonicus*, immunomodulation activity, Mozzarella cheese, optimum culture condition

#### 서 론

Probiotics는 숙주동물의 건강에 매우 유익한 효과를 주는 살아있는 유익한 미생물로, 고혈압 조절, 혈중 콜레스테롤 저하, 과민성 대장증후군 같은 위장관 질환의 개선효과, 암 예방, 면역체계 조절, 지질대사 개선 등의 연구결과가 보고되고

있다(Bhathena *et al.*, 2009; Lye *et al.*, 2009; Rafter *et al.*, 2004; Baken *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2013). 치즈에서 젖산균은 종균으로 사용되며, 몇몇 젖산균이 선천적 또는 후천적 면역을 조절하는 능력이 있음이 많은 동물 실험을 통해 입증됨에 따라, 젖산균의 면역학적인 효과에 대한 관심이 집중되고 있다(Baken, 2006). 우리의 몸은 음식물과 함께 병원균이나 바이러스 등 이물질이 들어오면 IgA 항체가 이들을 공격하거나, 이들이 만들어내는 독소를 무독화하는데, 몇몇 젖산균은 이 IgA 항체의 생산을 돕는 작용이 있

\* Corresponding author: Sang-Dong Lim, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea. Tel: +82-31-780-9082, Fax: +82-31-780-9160, E-mail: limsd@kfri.re.kr

다. 특정 젖산균은 비특이적 숙주 방어를 방어하는 중요한 주요 세포일 수 있는 복막의 대식세포 활성을 유도하기도 한다 (Perdigon *et al.*, 1986). 또한, 젖산균과 젖산균이 생성하는 물질이 대식세포나 T-cell과 같은 면역세포와 작용하였을 때, 면역, 비면역 세포에 다양하게 영향을 미치는 사이토카인의 생성을 불러올 수 있다(Nussler and Thomson, 1992). Marin 등 (1997)의 연구에 의하면, 자극 받지 않은 RAW 264.7 cell에서 대부분의 lactobacilli는  $10^6$ ~ $10^8$  CFU/mL 농도에서 대조구와 비교할 때 최대 411배까지 TNF- $\alpha$ 를 생산하였고,  $10^8$  CFU/mL 농도에서는 88배까지 IL-6이 생산되었다고 하였다. 또한 lipopolysaccharide로 RAW 264.7을 동시 자극을 하면 각각 4.2~10.6배와 1.8~8.7배 향상되었다고 하였다. Tejada-Simon과 Pestka (1999)는 열로 사멸시킨 *Bifidobacterium*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. reuteri*와 *Streptococcus thermophilus* 등의 cell, 이들의 cell wall, 세포질 추출물이 *in vitro* 상에서 RAW 264.7 macrophage cell line에서 cytokine과 nitric oxide(NO) 생성 및 증식에 대해 조사한 결과, 젖산균 cell wall과 세포질 fraction은 macrophage를 자극시켜 TNF- $\alpha$ , IL-6와 NO를 유의성 있게 생성함으로써 젖산균은 macrophage와 기타 면역세포에 자극을 주어 cytokine과 NO를 생성하고, 이들 cell wall과 세포질 역시 기여한다고 하였다.

국내 치즈 시장을 보면 건강 기능성이 있는 젖산균을 이용한 치즈 제품은 거의 찾아볼 수가 없다. 국내의 치즈제품은 검은콩, 시금치, 당근을 소재로 한 가공치즈와 칼슘, DHA 첨가 등 청소년 중심의 가공치즈가 주류를 이루고 있으나, 가공치즈의 원료인 자연치즈는 대부분 수입에 의존하기 때문에, 국내 원유 소비 촉진을 위해 국내 원유를 이용한 치즈 개발의 필요성이 요구되고 있다. 따라서, 본 연구는 원유로부터 분리되고, 면역활성 능력이 있다고 선발된 *Streptococcus macedonicus* LC743 균주를 이용하여 면역활성 능력이 있는 기능성 모짜렐라 치즈를 개발하기 위해 모짜렐라 치즈 제조의 최적 배양 조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. *Streptococcus macedonicus* LC743

본 실험에 사용된 균주는 원유로부터 분리한 균주 중 반응성 질소산화물(NO) 분비능과 IL-1 $\alpha$  및 TNF- $\alpha$  시험을 통해 면역활성능이 높은 균주로 선발된 *Streptococcus macedonicus* LC743 균주(Cho 등, 2010)를 탈지유에 배양하여 사용하였다.

### 2. 모짜렐라 치즈의 제조

젖산균의 최적배양조건을 설정하기 위하여 배양조건별 면역증진을 측정하였다. 원유를 살균(72~73℃)하고, 온도별(32℃,

35℃)로 냉각한 다음 선발된 젖산균을 접종(1.0%, 2.0%)하여, 30분간 교반한 후 렌넷을 첨가한 다음 4~5분간 교반하였다. 염화칼슘을 원유에 대해 약 0.01~0.02% 첨가하고, 25~35분간 정치하여 커드를 형성시켰다. 유청의 적정산도가 0.1~0.12% 일 때 커드를 자르고 가온하여, 유청온도를 43℃까지 상승시켰다. 2시간 정도 교반하면서 유청산도가 0.17~0.18%가 되면 유청을 배출하고, 43℃에서 2시간 동안 퇴적시켜 응집된 커드에서 용출되는 유청산도가 0.6~0.65%가 되게 한 다음 72~75℃의 열수로 스트레칭과 65~70℃에서 성형한 후 5℃로 냉각하였다. 염지는 염농도가 18~20보메, 온도는 12℃, 염지시간은 20분 정도로 하며, 건조 시 상대습도는 80~90%, 온도 및 시간은 10℃/2~3일로 하였다. 시료는 동결건조하여 PBS에 녹인 후 121℃, 15 min 멸균한 후 면역증진 시료로 사용하였고, 이때 시료농도는 100  $\mu$ g/mL와 1,000  $\mu$ g/mL로 하였다.

### 3. 일반성분 분석

원유, Cheese 및 유청의 일반성분은 A.O.A.C(1980) 및 Kosikowski(1982)의 방법으로 분석하였다.

### 4. 총균수 및 젖산균수 측정

시료 11 g을 무균적으로 채취하여 99 mL의 펩톤용액에 넣어 7초 동안 30 cm 간격으로 25회 세계 흔들어준 후 십진법으로 희석하고, PCA(plate count agar), BCP(brom cresol purple) 평판측정용 배지에 희석시료를 넣어 35℃에서 48시간 배양한 다음, PCA 배지에서 발생한 집락을 총균수로, BCP 배지에서 발생한 황색의 집락을 유산균의 집락으로 계측하였다.

### 5. 적정산도

시료를 철저히 혼합한 다음, 37 $\pm$ 1℃로 가온한 뒤 시료 9 g에 증류수 18 mL를 가하여 희석하고, 1% 페놀프탈레인 용액 0.5 mL를 첨가한 다음, 0.1 N NaOH 용액으로 30초간 분홍색이 지속될 때까지 적정하였다.

0.1 N NaOH 용액 1 mL = 0.009 g 젖산

$$\text{적정산도(젖산\%)} = (0.1 \text{ N NaOH 적정량(mL)} \times 0.009 / \text{시료량(g)}) \times 100$$

### 6. 총 고형분 및 수율 측정

Cheese의 수율은 얻어진 curd의 양을 사용된 탈지유의 양으로 나누어 계산하였다. 또한 실제 curd 양을 계산하기 위해 container의 무게를 빼어줌으로써 계산하였다.

총 고형분 함량을 구하기 위해, 칭량관에 정제해사 15 g과 작은 유리봉을 넣고, 105 $\pm$ 1℃의 건조기(Circulation air cool sterilize oven, Seoul Scientific Co., Korea)에서 항량이 될 때까지 건조

한 다음, 데시케이터에 방냉하여 무게를 잰 후, 시료 약 4 g을 정확히 달아 앞의 칭량관에 넣고, 수욕조상에서 내용물을 때 때로 저어 섞으면서 가열하였다. 대부분의 수분을 증발시킨 후 앞의 건조기에 옮겨 3시간 건조시킨 후 칭량관을 꺼내어 데시케이터에 30분간 방냉하고 무게를 재었다. 이 조작을 여러 번 반복하고, 반복 간의 무게 차이가  $\pm 1$  mg 이하가 될 때를 최종무게로 하였다.

시료 중 고형분(%) =  $100 - [(W_1 - W_0)/W \times 100]$

W : 시료의 사용량(g)

W<sub>0</sub> : 칭량관의 무게(g)

W<sub>1</sub> : 건조 후 시료가 들어 있는 칭량관의 무게(g)

## 7. 면역 활성 측정

### 1) 세포 배양

세포 배양 시 사용된 배지는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, with or without phenol red, Gibco)을 사용하였다. 배지는 3차 증류수로 용해한 후 sterilized filter(0.22  $\mu$ m pore size)로 여과하여 멸균한 다음, 10% fetal bovine serum과 1% streptomycin-penicillin를 첨가하여 이용하였으며, 세포 세척 및 계대배양 시 37°C를 유지하면서 사용하였다.

세포는 배양 플라스크 바닥에 confluent하게 자랐을 때 부착된 세포를 분리하여 이용하였다. DMEM이 담긴 배양 플라스크에 세포를 각각 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 유지하면서 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. Anchorage-dependent한 세포는 배지를 제거하고, trypsin-EDTA(0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA · 4Na)를 37°C에서 5분간 처리하였다. 이들 세포를 분리한 후, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상정액을 제거하고, 다시 배지를 넣어 원심 분리하는 과정을 3번 반복하였다. 이렇게 얻어진 세포를 배지에 분산시킨 후, 일정한 세포수로 맞추어 사용하였다. 세포는 freezing용 배지를 첨가하여 -70°C liquid nitrogen tank에 보관한 후 사용직전에 해동하여 배양하였다.

### 2) 반응성 질소종(NO) 분비능

96-well plate에 시료 20  $\mu$ L 및 RAW 264.7( $2 \times 10^5$ /well) 100  $\mu$ L를 넣고, 48시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C를 유지하면서 배양하였다. 배양액 중의 NO 농도는 microplate assay를 이용하여 측정하였다. 먼저 48시간 동안 배양한 후 상정액 50  $\mu$ L aliquots를 취하여 같은 용량의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride in 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 넣고, 실온에서 10분간 반응시켰다. 이 때 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였다.

### 3) Interleukin-1 $\alpha$ 분비능

RAW 264.7( $2 \times 10^5$ /well) 100  $\mu$ L와 시료 20  $\mu$ L를 96-well plate에 넣어 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 동안 배양한 후 상정액을 취해 대식세포가 분비하는 Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )를 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA)를 이용하여 측정하였다. 즉, anti-mIL-1 $\alpha$  단일 클론 항체가 코팅된 microtiter plate (Mouse IL-1 $\alpha$  ELISA, comabiotech, KOREA)에 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 blocking 시약(3% BSA 용액, w/v)을 가한 다음, Tween 20이 0.05%(v/v) 함유된 0.01M PBS (PBST, pH 7.4) 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 세척한 plate에 biotinylated anti-mIL-1 $\alpha$  항체를 50  $\mu$ L씩 넣고, 표준 IL-1 $\alpha$  또는 배양한 시료액을 50  $\mu$ L씩 well에 주입하고, 25°C에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 3회 세척하고, 1.5  $\mu$ g/mL 농도의 streptavidin-conjugated horse reddish peroxidase 100  $\mu$ L씩 가한 다음 25°C에서 30분 반응시킨 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 여기에 발색기질용액(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine)을 100  $\mu$ L 첨가하여 25°C에서 30분간 발색반응을 시킨 후, 1.0 N sulfuric acid를 100  $\mu$ L씩 가해 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader (Molecular device, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선에서 IL-1 $\alpha$  함량을 계산하였다.

### 4) Tumor necrosis factor- $\alpha$ 분비능

Microtiter plate(Mouse TNF- $\alpha$  ELISA, Comabiotech)에 표준 TNF- $\alpha$  또는 배양한 시료액 및 biotinylated anti-mTNF을 50  $\mu$ L씩 well에 주입하고, 25°C에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 5회 세척하고, HRP-conjugated anti-mTNF을 100  $\mu$ L씩 넣어 25°C에서 30분 배양한 다음, 세척용 완충액으로 5회 세척하였다. 여기에 기질(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine)을 100  $\mu$ L를 첨가하여 25°C에서 30분간 발색반응을 시킨 후, 1.0 N sulfuric acid를 100  $\mu$ L씩 가해 반응을 정지시킨 다음, ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선에서 TNF- $\alpha$  함량을 계산하였다.

## 8. 통계분석

결과는 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내고, 통계분석은 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, SPSS Inc., USA)로 실시하였다. 유의차는 one-way ANOVA로 통계처리 하였고, Duncan's multiple range tests를 사용하여 유의성 5% 수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 치즈 제조 중 화학적 및 미생물학적 변화

치즈 제조 중 화학적 및 미생물학적 변화는 Table 1과 같다. 치즈 제조에 사용한 원유의 총균수는  $2.9 \times 10^4$  CFU/mL이었고, 살균유에서는  $1.5 \times 10^3$  CFU/mL이었다. 치즈 제조 시 배출 유청 중의 성분 함량을 보면 *Streptococcus macedonicus* LC743 균주를 2.0% 접종하고, 32°C에서 배양할 때 총 고형분 함량이 가장 적음에 따라 치즈 수율이 높을 것으로 예측되었다.

## 2. 제조 시간

모짜렐라 치즈의 각 제조단계별 시간은 Table 2에서 보는

Table 1. Properties of experimental cheese

Starter		<i>Streptococcus macedonicus</i> LC743		
Inoculation(%)		1.0%	2.0%	
Raw milk	Fat(%)	4.60±0.00		
	Protein(%)	3.18±0.01		
	Lactose(%)	4.65±0.02		
	Total solid(%)	13.12±0.01		
Pasteurized milk	Fat(%)	4.60±0.00		
	Protein(%)	3.20±0.01		
	Lactose(%)	4.66±0.01		
	Total solid(%)	13.15±0.02		
Whey	Incubation temp. 32°C	Fat(%)	0.84±0.01	0.78±0.00
		Protein(%)	1.10±0.01	1.00±0.01
		Lactose(%)	4.82±0.00	4.88±0.00
		Total solid(%)	7.47±0.01	7.35±0.01
	Incubation temp. 35°C	Fat(%)	0.70±0.01	0.72±0.01
		Protein(%)	1.07±0.00	1.04±0.01
		Lactose(%)	4.92±0.01	5.01±0.00
		Total solid(%)	7.42±0.01	7.47±0.00
Viable bacterial count	Raw milk (CFU/mL)	$2.9 \times 10^4$		
	Pasteurized milk (CFU/mL)	$1.5 \times 10^3$		

All values are mean ± standard deviation of three replicates.

Table 2. Time schedule of Mozzarella cheese making with *Streptococcus macedonicus* LC 743

Incubation temp. (°C)	Inoculation vol. (%)	Arrival time of whey TA <sup>1)</sup> (0.1~0.12%)	Arrival time of rum off the whey TA (0.17~0.18%)	Arrival time of whey TA (0.6~0.65%) after cheddaring	Total manufacturing time (min)
32	1.0	90	145	361	411
	2.0	81	134	344	394
35	1.0	80	180	370	420
	2.0	65	150	347	397

<sup>1)</sup> TA: Titratable acidity

바와 같다. *Streptococcus macedonicus* LC743 균주를 1.0%와 2.0%를 접종하여 각각 32°C와 35°C에서 배양하면서 유청의 적정산도가 0.1~0.12%까지 도달하는 시간, 유청 배출 후 적정산도가 0.17~0.18%까지 도달하는 시간, 퇴적 후 유청의 적정산도가 0.6~0.65%까지 도달하는데 걸리는 시간을 측정하여 결과, 32°C와 35°C에서 배양하는 경우 비슷한 시간이 소요되는 것으로 나타났으며, 32°C에서 2% 접종하는 것이 394분으로 제조 시간이 가장 단축되었다.

## 3. 제조과정 중 가공적성

스타터 접종 온도 32°C와 35°C에서 접종량 1.0%, 2.0%일 때 유청 적정산도가 0.1~0.12% 도달 시(Fig. 1 (a), (d), (g), (j)), 유청 배출 적정산도(0.17~0.18%) 도달 직후(Fig. 1 (b), (e), (h), (k)) 및 최종 제품(Fig. 1 (c), (f), (i), (l))의 사진을 촬영하였다. 커드를 자를 때 커드의 strength는 모든 조건에서 적당하였으며, 유청 배출 또한 잘 이루어졌다. 유청 배출 후 커드의 strength는 적절하였으나, 스트레칭 시 초기에 끊어지는 현상이 나타났으나 비교적 잘 이루어졌고, 35°C에서 스타터를 배양한 제품보다는 32°C에서 스타터를 배양한 제품이 더 잘 이루어졌다. 최종 제품 또한 32°C에서 스타터를 배양한 제품이 탄력성과 제품의 외형 면에서 조금 더 나왔다. 수율은 모든 제품에서 비교적 좋은 결과가 나타났다.

## 4. 치즈 제조과정 중 젖산균수의 변화

치즈 제조과정 중 젖산균수의 변화는 Table 3과 같다. *S. macedonicus* LC743 균주는 스타터 첨가 시  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL, cutting 전 커드에서는  $10^7$  CFU/g이었고, 가운 후 커드에서는  $10^8 \sim 10^9$  CFU/g이었으며, 최종 제품에서는  $10^7$  CFU/mL를 나타내었다. *S. macedonicus* LC743 균주를 2.0% 접종하고 32°C 배양할 때, 최종 제품의 젖산균이  $8.6 \times 10^7$  CFU/g으로 가장 높게 나타났다.

## 5. 모짜렐라 치즈의 총고형분 함량과 수율

모짜렐라 치즈의 총고형분 함량과 수율은 Table 4에서 보

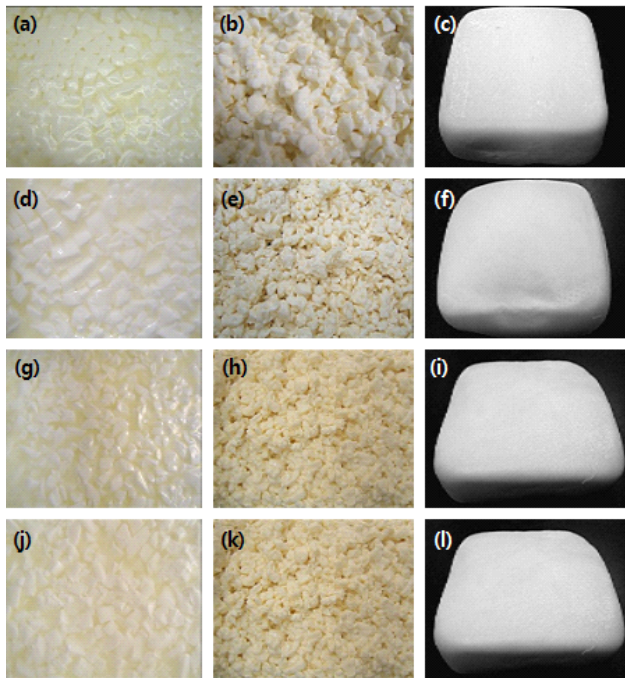


Fig. 1. The photos when TA of the whey has reached 0.1~0.12% (a, d, g, j), when TA after run off the whey gas reached 0.17~0.18% (b, e, h, k), and end products (c, f, i, l). (a~c) incubation temp.: 32°C, inoculation vol.: 1.0%; (d~f) incubation temp.: 32°C, Inoculation vol.: 2.0%; (g~i) incubation temp.: 35°C, inoculation vol.: 1.0%; (j~l) incubation temp.: 35°C, inoculation vol.: 2.0%

는 바와 같다. 수분은 치즈 조직에 영향을 주며, 다른 영양성분의 용해 물질로 쓰이고, 유청으로써 치즈에 여러 가지 물질을 운반하는데, 특히 무기질 성분, 수용성 비타민과 유산성분 등이 이 수분을 통해서 우유에서 치즈로 이동된다(Heo, 1994). 일반적으로 총고형분 함량이 높으면 수율이 낮아지는 경향이 있으며, 조직감에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 전반적으로 총고형분이 50% 전후에서 조직감과 윤기가 있었으며, 고형분 함량이 증가할수록 윤기가 떨어지고 잘 늘어나는 성질이 떨어지며, 딱딱하였다. *S. macedonicus* LC743 균주를 접종하여 배양했을 때에 온도나 접종량 별 큰 차이는 나타나지 않았으나, 균주를 2.0% 접종하고, 32°C 배양할 때 가장 수율이 높은 것으로 나타났다.

Table 4. Total solid and yield rate of Mozzarella cheese with *Streptococcus macedonicus* LC 743

Incubation temp. (°C)	Inoculation vol. (%)	Total solid (%)	Yield rate (%)
32	1.0	46.31±0.03 <sup>a</sup>	10.04
	2.0	45.25±0.03 <sup>b</sup>	10.87
35	1.0	46.84±0.10 <sup>a</sup>	10.15
	2.0	45.37±0.06 <sup>b</sup>	10.47

<sup>a,b</sup> Means values with different superscript within same row are significantly different ( $p<0.05$ ).

### 6. 모짜렐라 치즈의 면역 증진 효과

*S. macedonicus* LC743 균주를 이용하여 제조한 모짜렐라 치즈의 면역증진 효과를 보기 위하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , 반응성 질소산화물(NO) 분비능을 조사하였다(Table 5). 시료농도가 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 전 조건에서 TNF- $\alpha$  값이 2,000  $\text{pg/mL}$  이상을 나타내었으며, IL-1 $\alpha$ 의 경우 균주를 2.0% 접종하고, 32°C에서 배양하여 제조된 치즈에서 815  $\text{pg/mL}$ 로 가장 높은 값을 나타내었다. NO 값은 전반적으로 낮은 값을 보였는데, 균주를 2.0% 접종하고 32°C에서 배양하여 제조된 치즈에서 15.76  $\mu\text{M}$ 으로 가장 높은 값을 나타내었다. Park 등(2005)에 의하면, Raw 264.7 세포에 의한 TNF- $\alpha$ 와 NO의 생성에서 젓산균이 미치는 효과를 조사하기 위해 *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophiles*, *Bifidobacterium bifidum*을 RAW 264.7세포에 처리하여 배양시킨 결과, TNF- $\alpha$ 값은 1,200~1,400  $\text{pg/mL}$ , NO는 9~22  $\mu\text{M}$  값을 나타내었다. 또한 Chang 등(2009)에 의하면, 김치에서 분리한 *Lactobacillus acidophilus* KFRI134 균을 RAW 264.7 세포에 5,000  $\mu\text{g/mL}$ 까지 처리한 결과, NO는 17.68  $\mu\text{g/mL}$ , IL-1 $\alpha$ 는 238.07  $\text{pg/mL}$ 가 생성되었다고 보고하였다. 이러한 연구결과들과 비교해 보았을 때 *S. macedonicus* LC743 균주를 이용하여 제조한 모짜렐라 치즈의 면역증진 물질 생성능은 우수하였다.

### 7. 모짜렐라 치즈의 제조공정 설정

제조 시간, 가공적성, 면역능력 등을 감안하여 불 때 *S. macedonicus* LC743 균주를 2.0% 접종하고, 32°C에서 배양하

Table 3. Lactic acid bacteria count in Mozzarella cheese during making process with *Streptococcus macedonicus* LC 743

Incubation temp. (°C)	Inoculation vol. (%)	Starter (CFU/mL)	Curd before cutting (CFU/g)	Curd after cooking (CFU/g)	Final product (CFU/g)
32	1.0	6.9×10 <sup>6</sup>	4.1×10 <sup>7</sup>	9.4×10 <sup>8</sup>	5.1×10 <sup>7</sup>
	2.0	2.3×10 <sup>7</sup>	8.9×10 <sup>7</sup>	1.0×10 <sup>9</sup>	8.6×10 <sup>7</sup>
35	1.0	5.8×10 <sup>6</sup>	3.5×10 <sup>7</sup>	1.3×10 <sup>9</sup>	6.0×10 <sup>7</sup>
	2.0	2.4×10 <sup>7</sup>	9.8×10 <sup>7</sup>	3.1×10 <sup>9</sup>	7.7×10 <sup>7</sup>

Table 5. Immunomodulating activity of Mozzarella cheese with *Streptococcus macedonicus* LC 743

Incubation temp. (°C)	Inoculation vol. (%)	Sample content (µg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-1α (pg/mL)	Nitric oxide (µM)
32	1.0	1,000	>2,000 <sup>a</sup>	743.38±18.34 <sup>b</sup>	8.31±1.92 <sup>c</sup>
		100	741.22±29.75 <sup>b</sup>	126.64±51.82 <sup>ab</sup>	-
	2.0	1,000	>2,000 <sup>a</sup>	815.24±36.53 <sup>a</sup>	15.76±1.03 <sup>a</sup>
		100	946.38±18.32 <sup>a</sup>	141.26±28.07 <sup>a</sup>	-
35	1.0	1,000	>2,000 <sup>a</sup>	602.76±24.90 <sup>c</sup>	8.67±2.09 <sup>c</sup>
		100	582.32±26.04 <sup>c</sup>	98.36±19.34 <sup>c</sup>	-
	2.0	1,000	>2,000 <sup>a</sup>	613.12±27.44 <sup>c</sup>	10.17±1.74 <sup>b</sup>
		100	764.10±11.00 <sup>b</sup>	104.82±11.24 <sup>b</sup>	-

All values are mean ± standard deviation of three replicates. <sup>a-c</sup> Means values with different superscript within same row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

여 제조한 모짜렐라 치즈가 가장 우수함에 따라 다음과 같이 제조공정을 설정하였다(Fig. 2). 원유를 살균(63°C/30분 또는 72~73°C/15초)하고 32°C로 냉각한 다음 젖산균을 2% 접종하며, 30분간 교반한 후 렌넷 230 µL/kg 첨가한 다음 4~5분간 교반하였다. 염화칼슘을 원유에 대해 약 0.01~0.02% 첨가하고, 25~35분간 정치하여 커드를 형성시켰다. 유청의 적정산

도가 0.1~0.12%일 때(약 81분 소요) 커드를 자르고 가운하여, 유청온도를 43°C까지 상승시켰다. 53분 정도 교반하면서 유청산도가 0.17~0.18%가 되면 유청을 배출하였고, 43°C에서 210분 동안 퇴적시켜 응집된 커드에서 용출되는 유청산도가 0.6~0.65%가 되게 한 다음, 72~75°C의 열수로 스트레칭과 65~70°C에서 성형한 후 5°C로 냉각하였다. 염지는 염농도가 18~20보에, 온도는 12°C, 염지시간은 20분 정도로 하였으며, 건조 시 상대습도는 80~90%, 온도 및 시간은 10°C/2~3일로 하였다.

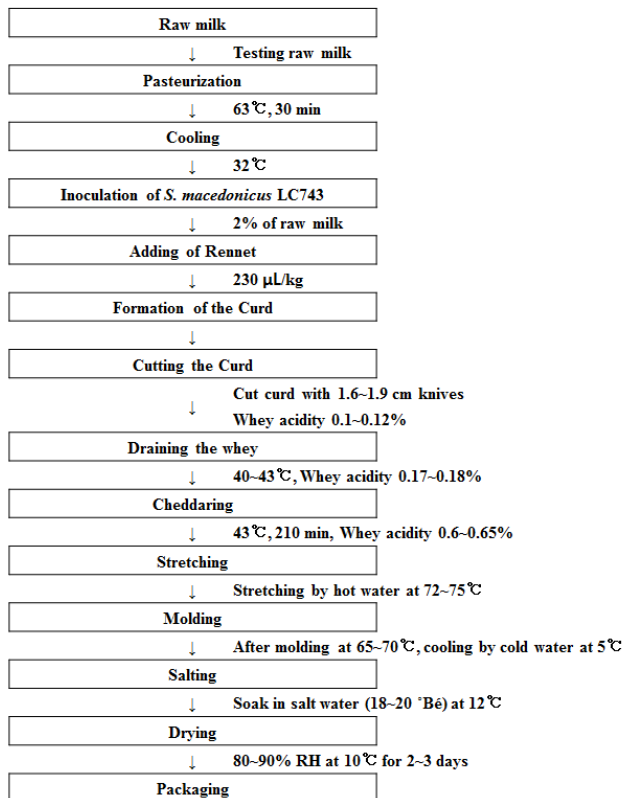


Fig. 2. The production process of Mozzarella cheese by *Streptococcus macedonicus* LC 743.

## 요 약

면역 활성능이 높은 균주로 선발된 *Streptococcus macedonicus* LC743를 이용하여 모짜렐라 치즈를 제조하기 위해 배양온도 별(32°C, 35°C), 균주의 접종량 별(1.0%, 2.0%)로 모짜렐라 치즈를 제조하여 일반성분, 균수, 총고형분 및 수율 및 면역 활성을 측정하여 최적조건을 설정하였다. *S. macedonicus* LC743 균주를 이용하여 치즈 제조 시 2.0% 접종하여 32°C에서 배양할 경우 가장 제조 시간이 단축되었고, 가공적성 및 면역활성이 우수하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원 농림기술개발사업(No. 107074-3)의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. A.O.A.C. 1980. Official methods of analysis. 13th ed., Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.

2. Baken, K. A., Ezendam, J., Gremmer, E. R., De Klerk, A., Pennings, J. L., Matthee, B., Peijnenburg, A. A. and Van Loveren, H. 2006. Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota: Immune function, autoimmunity and gene expression. *Int. J. Food. Microbiol.* 112:8-18.
3. Bhathena, J., Martoni, C., Kunlamarva, A., Urbanska, A. M., Malhotra, M. and Prakash, S. 2009. Orally delivered microencapsulated live probiotic formulation lowers serum lipids in hypercholesterolemic hamsters. *J. Med. Food.* 12:310-319.
4. Chang, J. H., Shim, Y. Y., Cha, S. K. and Chee, K. M. 2009. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from *kimchi*. *J. Appl. Microbiol.* 109:220-230.
5. Cho, S. A., Kim, K. S., Do, J. R., Kim, S. H. and Lim, S. D. 2010. Physiological characteristics and immunomodulating activity of *Streptococcus macedonicus* LC743 isolated from raw milk. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 30:957-965.
6. Heo, T. R. 1994. Cheese and health. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 14:105-109.
7. Kang, J. H., Yun, S. I., Park, M. H., Park, J. H., Jeong, S. Y. and Park, H. O. 2013. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PLoSOne.* 8.1:e54617.
8. Kim, D. H., Choi, M. R., Hong, J. E., Lee, J. Y., Lee, S. I., Jung, S. H. and Kim, E. J. 2014. Effect of mixture of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 on obesity and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J. Kor. Soc Food Sci Nutr.* 43:1484-1490.
9. Kosikowski, F. V. 1982. Cheese and fermented milk foods. 2nd ed. Edwards Brothers, Inc., Ann. Arbor.
10. Lye, H. S., Kuan, C. Y., Ewe, J. A., Fung, W. Y. and Liong, M. T. 2009. The improvement of hypertension by probiotics: Effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *Int. J. Mol. Sci.* 10:3755-3775.
11. Marin, M. L., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunel, Z. and Pestka, J. J. 1997. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 80:2713-2720.
12. Nussler, A. K. and Thomson, A. W. 1992. Immunomodulatory agents in the laboratory and clinic. *Parasitol.* 105: 5-23.
13. Park, S. H., Chung, M. J., Kim, S. D., Baek, D. H., Kang, B. Y. and Ha, N. J. 2005. Effect of lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*) on the enhancement of the production of nitric oxide and TNF- $\alpha$  in RAQ 264.7 Macrophage cell. *Yakhak Hoeji* 49:459-464.
14. Perdigon, G., de Macias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G. and de Ruiz Holgado, A. P. 1986. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* 53:404-410.
15. Rafter, J. 2004. The effects of probiotics on colon cancer development. *Nutr. Res. Rev.* 17: 277-284.
16. Tejada-Soimon, M. V. and Pestka, J. J. 1999. Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction I murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 62:1435-1444.

Received 15 August, 2015  
Revised 22 September, 2015  
Accepted 25 September, 2015