



## *Streptococcus macedonicus* LC743으로 제조된 모짜렐라 치즈의 면역증진 및 이화학적 특성

한누리 · 박선영 · 임상동\*

한국식품연구원

### Physicochemical Characteristics and Immunomodulating Activity by Mozzarella Cheese made with *Streptococcus macedonicus* LC743

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

Korea Food Research Institute

#### Abstract

The aim of this study was to evaluate physicochemical characteristics of the Mozzarella cheese produced by *Streptococcus macedonicus* LC743 with immunomodulating activity. The Mozzarella cheese produced by *S. macedonicus* LC743 has contents of water, protein and fat 53.16%, 53.16% and 20.52%, respectively. In case of nitrogen composition, water soluble nitrogen (WSN), trichloroacetic acid soluble nitrogen (TCASN), phosphotungstic acid soluble nitrogen (PTASN) has the value of 0.384%, 0.051% and 0.060 Nmg/g, respectively. Total amino acid of Mozzarella cheese produced by *S. macedonicus* LC743 has the higher contents of amino acid than Mozzarella cheese produced by commercial starter except for cysteine. The Mozzarella cheese has immunomodulating activity on IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , NO with the value of >2,000 pg/mL, 743.38 pg/mL and 8.31  $\mu$ M, respectively. The immunomodulating activity of Mozzarella cheese produced by *S. macedonicus* LC743 was higher than domestic of imported cheese.

**Keywords:** *Streptococcus macedonicus*, physicochemical characteristics, immunomodulating activity, Mozzarella cheese

#### 서 론

모짜렐라 치즈는 원산지가 이탈리아이고, 연질 치즈 중 비숙성 치즈로 분류되며, 피자 토핑에 주로 이용되는 것으로 미국, 캐나다, 호주 및 프랑스 등 전 세계에서 제조되고 있는 치즈이다(Fox *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2013). 최근 웰빙 열풍으로 건강기능 식품 시대의 도래와 함께 첨단 기능성 소재들이 등장됨에 따라 유업계에서 이들 소재를 응용한 연구개발과 공정개선을 통한 신제품을 출시하고 있다. 치즈의 경우, 우유를 소화하지 못하는 사람들에게도 칼슘과 단백질 등

의 영양을 보충할 수 있는 우유 대체식품으로 각광을 받고 있다. 또한 와인 시장 팽창에 편승, 피자 등 서구 음식을 선호하는 식문화의 변화와 우유 소비의 한계점 등으로 인해 우유 대체 식품으로 맛과 종류가 다양한 치즈로 소비자 선호가 전환되는 사례가 증가됨에 따라 치즈 소비량이 계속 증가되고 있다(Ahn *et al.*, 2011). 그러나 국내 치즈의 생산은 오히려 감소 추세이며, 수입치즈가 크게 증가되는 경향을 보이고 있다. 최근에는 우루과이, 아르헨티나 등 중남미 국가에서 모짜렐라 치즈의 수입이 늘고 있어, 국내 피자시장에서의 국산치즈 수요가 줄고 있으며, 고급 치즈의 인기가 날로 증가해 가는 가운데 수입치즈의 싼 가격은 국내 치즈 제조 기업들에게 위협이 되고 있다. 또한 국내 치즈 인지도가 약한 가운데 경기 위축에 따른 소비 감소와 더불어 수입업체

\* 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

를 통해 수입치즈가 대거 유입돼 가격경쟁력에서 밀려난 것으로 보인다.

치즈에서 젖산균은 종균으로 사용되며, 건강에 유익한 특징을 갖고 있으며, 특히 면역학적인 효과에 관심이 집중되고 있다. 젖산균은 macrophage와 lymphocyte 활성화, T-cell과 B-cell 증식, natural killer cell 기능 등 면역기능을 자극한다(Arunachalam et al., 2000; Kim, 2009). Medici 등(2004)의 보고에 따르면, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* 및 *L. paracasei*로 제조된 프로바이오틱 후레쉬 치즈가 장내에서 중요한 면역활성을 발휘할 수 있는 유제품임을 BALB/c mouse 실험을 통해 입증하였다.

현재 모짜렐라 치즈의 스타터는 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주를 사용하여 젖산생성 목적에 사용되고 있으나, 건강기능성이 있는 젖산균을 이용한 치즈제품은 전무하다.

본 연구는 면역기능이 있는 젖산균인 *Streptococcus macedonicus* LC743을 이용하여 제조한 모짜렐라 치즈의 면역증진 및 이화학적 특성을 연구하여 기능성 치즈 개발 가능성을 모색하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용균주

본 실험에서 사용된 균주는 원유로부터 분리한 면역활성능을 가진 *S. macedonicus* LC743 균주와 대조구로서 상업용 균주 TCC-3(*Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합균주, CHR. HANSEN A/S)을 살균한 원유에 배양하여 사용하였다. 또한 *S. macedonicus* LC743 균주를 상업용 균주 TCC-3와 혼합하여(1:1) 사용하였다.

### 2. 모짜렐라 치즈 제조

63°C에서 30분간 살균한 원유를 32°C까지 냉각 후 starter인 *S. macedonicus* LC743을 원유의 2% 접종하였다. 30분간 교반한 후 렌넷을 230  $\mu$ L/kg을 첨가한 다음 4~5분간 교반하였다. 염화칼슘을 원유에 대해 약 0.01~0.02% 첨가하고, 25~35분간 정지하여 커드를 형성시켰다. 유청의 적정산도가 0.1~0.12%일 때(81분 소요) 약 1.6~1.9 cm 간격으로 커드를 자르고 가운데 여 유청온도를 43°C까지 상승시켰다. 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 18~20보메, 온도는 12°C, 염지 시간은 20분 정도로 하였으며, 건조 시 상대습도는 80~90%, 온도 및 시간은 10°C/2~3일로 하였다.

### 3. 일반성분 및 pH, 적정산도 측정

Cheese 및 유청의 일반성분은 A.O.A.C(1980) 및 Kosikowski (1982)의 방법으로 분석하며, cheese의 pH는 pH meter를 사용하여 측정하였다. 적정산도는 시료액 10 mL를 취하여 증류수를 가하여 100 mL로 하고, 그 20 mL를 페놀프탈레인 지시약 2~3방울을 가해 0.1 N NaOH로 적정한 후 acetic acid 함량으로 환산하였다(1 mL=0.06 g CH<sub>3</sub>COOH).

### 4. 치즈의 수율

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

### 5. 젖산균수 측정

젖산균 및 구균은 시료 11 g을 무균적으로 채취하여 99 mL 0.1% 펄톤용액에 넣어 7초 동안 30 cm 간격으로 25회 세계 흔들어진 후 십진법으로 희석하고, BCP 평판측정용 배지에 희석시료를 접종한 후, 35°C에서 72시간 동안 호기 또는 혐기배양한 후 발생한 황색의 집락을 계측하였다. 비피더스균은 BS배지를 이용하여 37°C에서 48~72시간 혐기배양하며, 이하 축산물의 가공기준 및 성분규격(2010)에 따랐다.

### 6. 수용성 질소화합물 정량

Kim(1976)의 방법에 따라 cheese 5 g에 증류수 20 mL를 넣고 분쇄 및 균질화 한 다음, 4,000  $\times$  g에서 20분간 원심분리기(Sigma 2-16K, Sigma Zentrifugen, Osterode am Harz, Germany)로 원심분리하여 지방을 제거하고, Whatman No.2 여과지로 여과하며, 이러한 과정을 반복하여 최종량이 50 mL가 되도록 한 후 Kjeldahl 방법으로 정량하였다.

### 7. 비단백태 질소화합물 정량

Vanderpoorten(1972)의 방법에 따라 cheese 5 g을 증류수 10 mL에 분쇄 및 균질화 하고, 4,000  $\times$  g에서 20분간 원심분리하여 지방을 제거하고 상정액을 동량의 24% Trichloroacetic acid (TCA) 용액과 잘 혼합한 후, Whatmant No.2 여과지로 여과한 용액을 Kjeldahl 방법으로 정량하였다.

### 8. 아미노태 질소화합물의 정량

아미노태 질소화합물의 정량은 Jarrett 등(1982)의 방법을 변경시켜서 다음과 같이 실시하였다. 세절한 cheese 5 g에 2% sodium citrate 용액 25 mL를 가하고, homogenizer를 사용하여 균질시킨 다음 0°C에서 20분간 10,000  $\times$  g으로 원심분리하고 지방층을 제거한 상정액을 cheese 균질액으로 하였다. Cheese 균질액 5 mL에 15.8 M sulphuric acid 3.5 mL와 33.3%

phosphotungstic acid(PTA) 1.5 mL를 가하고 vortexing하여 혼합한 다음, 4°C에서 하룻밤 정치하여 단백질을 완전히 침전시켰다. 이 추출물을 Whatman 542 여과지로 여과하여 여액 중의 질소량을 Kjeldahl 방법으로 분석하고, cheese 1 g당 nitrogen (mg)으로 표시하였다.

### 9. Cheese casein의 전기영동

전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 전기영동시 resolving gel을 만드는데 필요한 gel buffer는 tris 18.15 g을 증류수 50 mL에 용해시킨 후 1N HCl로 적정하면서 pH 8.8로 조정하고, 최종량을 100 mL로 하여 4°C에 보관하면서 사용하였다. Stacking gel buffer는 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8을 사용하였다. Running buffer는 tris 12 g, glycine 57.6 g, 10% SDS 용액 40 mL를 증류수에 용해시키면서 pH를 8.8로 조절한 다음, 최종량을 4 L로 하여 4°C에 보관하면서 사용 시에 증류수로 4배 희석하였다. 시료는 2-mercaptoethanol 10%를 함유하는 sample treatment buffer(tris-HCl-buffer, 20% glycerol, 4% SDS, pH 6.8, 0.2% bromophenol blue)에 절단 전 커드는 1:12로, 치즈커드는 1:96으로 희석해 시료로 사용하였다.

Separating gel은 resolving gel buffer 5 mL와 30% acrylamide-0.8% N,N'-methylene bisacrylamide 8 mL를 섞은 다음 촉매제로 10% ammonium persulfate 용액 150 µL를 첨가하고, 10% SDS 200 µL와 TEMED(N,N,N',N'-tetramethy ethylene diamide) 20 µL를 넣고 최종량이 20 mL가 되도록 증류수로 조절한 후 충분히 혼합시켜서 전기영동용 유리관에 주입하여 gel을 형성시켰다. Gel을 굳힌 후 30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide 1.3 mL와 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 buffer, 10% SDS 100 µL, 10% ammonium persulfate 70 µL, TEMED 10 µL를 넣은 후 최종량을 증류수로 조절한 다음, 충분히 섞은 Stacking gel을 separating gel위에 주입하고 comb을 꽂아 well을 형성하였다. 전기영동은 준비된 gel을 전기영동장치(AE 6450, ATTO, Japan)에 설치하고, running buffer를 채운 다음 준비된 시료중 5 µL를 gel 상단에 투입하고, 유리관 당 5 mA의 일정한 전류로 4시간 동안 영동시켰다. 염색은 전기영동이 끝난 후 gel을 유리관으로부터 분리시켜 1%의 Commassie blue R-250 용액으로 1시간 염색시킨 다음 탈색용액(50% methanol, 10% acetic acid)에 침지하여 탈색시킨 gel을 사진 촬영하였다.

### 10. 아미노산 분석

#### 1) 총아미노산

Cheese의 아미노산 분석은 White 등(1986)의 PICO-TAG method에 따라 다음과 같이 HPLC를 이용하여 분석하였다. 유리관(25 × 150 mm)에 40 mg의 단백질 함량이 되도록 시료를 취하고,

6 N HCl 15 mL를 첨가한 후 30초간 질소가스로 치환하고, 즉시 마개를 닫아 110°C의 오븐에서 24시간 가수분해시키고 냉각한 다음 시료 1 nL를 취하여 0.45 µm syringe filter로 여과하여 아미노산 분석용 시료로 사용하였다. 유리관(6 × 50 mm)에 여과된 시료 50 µL를 취하여 관 밑바닥에 조심스럽게 담고, workstation에서 gauge torr가 50~60 mm torr가 될 때까지 건조시킨 다음, methanol 200 µL, H<sub>2</sub>O 200µL, trimethylamine 100 µL를 혼합한 용액을 30 µL씩 가하고 vortex하여 workstation에서 50 mm torr가 되도록 재건조한 다음 유도체 시약(methanol 350 µL, H<sub>2</sub>O 50 µL, trimethylamine 50 µL, phenyl-isothiocyanate (PITC) 50 µL의 혼합액) 30 µL를 첨가하고, vortex한 후 상온에서 10~20분간 정치하였다가 workstation에서 다시 건조한 다음 methanol 30 µL를 첨가하여 vortex한 후 재차 건조시켰다. 건조된 시료에 PICO-TAG sample diluent 200 µL를 첨가하여 교반하고, 10 µL를 취하여 HPLC에 분석용으로 주입하였다. 16종의 아미노산(2.5 µmol/mL)과 cysteine(1.25 µmol/mL)이 함유되어 있는 표준용액을 0.1 N HCl 용액으로 10배 희석하여 20분간 초음파처리하고 0.45 µm syringe filter로 여과하여 10 µL를 HPLC에 주입하였다. 이동상으로 사용한 eluent A는 0.14 M sodium acetate trihydrate와 0.05% TEA(triethyl amine)에 HPLC용 증류수를 가하여 1 L로 정용한 다음 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>로 pH 6.4로 조정한 후 여과하였다. 분석이 끝나고 다른 시료를 주입하기 전의 세척용 eluent B는 60% acetonitrile을 사용하였다. 분석 시 칼럼의 온도는 40°C로 조정하였으며, attenuation 128, chart speed 1.0이었고, 주입한 시료량은 10 µL였다. 분석에 사용한 기기는 Table 1과 같다.

#### 2) 유리아미노산

균질한 검체 약 1 g을 정밀히 달아 약 10배량을 물을 가해 비등 수욕상에서 가열하여 응고시킨 다음 여과하여 물 층을 취하였다. 잔사는 2~3회 소량의 물로 세정하고, 세액은 앞서의 물과 합하였다. 지방이 있는 경우에는 에테르로 추출하여 제거하였다. 물 층을 감압 하에 농축 건조하여 얻은 잔사를 0.2 N 구연산나트륨 완충액(pH 2.2) 또는 0.02 N 염산으로 용

Table 1. Instruments used for amino acid analysis

Instrument	Jasco HPLC system
High pressure gradient module	Jasco HG-980-30
Pump	Jasco PU-980
Autosampler	Jasco 851-AS
Intergrator	Jasco 807-IT
Column	Waters Pico-Tag column (3.9 × 150 mm, Φ 4 µm)
Detector	Jasco UV-975 UV/Vis (254 nm)

해하여 일정량으로 하여 0.45  $\mu\text{m}$  filter를 사용하여 여과하였다.

### 11. 유기산

Marsili 등(1981)의 방법에 따라 분석하였으며, 진처리 및 HPLC 분석조건은 다음과 같다. 5 g의 시료에 5 mL의 deionized water, 20 mL의 acetonitrile을 가하여 50 mL 원심분리관에서 2분간 흔들여 준 다음, 7,000  $\times$  g에서 5분간 원심분리한 다음 상정액을 0.2  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 하였다. 유기산 분석은 Table 2의 조건에 따라 분석하며, 분석된 chromatogram은 표준용액의 머무름 시간과 면적을 비교하여 함량을 계산하였다.

### 12. 반응성 질소종 분비능

96-well plate에 시료 20  $\mu\text{g}$  및 RAW264.7( $2 \times 10^5$ /well) 100  $\mu\text{L}$ 를 넣고 48시간 동안  $\text{CO}_2$  incubator에서 37 $^\circ\text{C}$ 를 유지하면서 배양하였다. 배양액 중의 NO 농도는 microplate assay를 이용하여 측정하였다. 먼저 48시간 동안 배양한 후 상정액 50  $\mu\text{L}$  aliquots를 취하여 같은 용량의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride in 2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )을 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. 이 때 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였다.

### 13. Interleukin-1 $\alpha$ 분비능

RAW264.7( $2 \times 10^5$ /well) 100  $\mu\text{L}$ 와 시료 20  $\mu\text{g}$ 를 96-well plate에 넣어 37 $^\circ\text{C}$ , 5%의  $\text{CO}_2$  incubator에서 48시간 동안 배양한 후 상정액을 취해 대식세포가 분비하는 Interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )을 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 0.01 M PBS(PBST, pH 7.4) 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 세척한 plate에 biotinylated anti-mIL-1 $\alpha$  항체를 50  $\mu\text{L}$ 씩 넣고, 표준 IL-1 $\alpha$  또는 배양한 시료액을 50  $\mu\text{L}$ 씩 well에 주입하고, 25 $^\circ\text{C}$ 에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 3회 세척하고, 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 streptavidin-conjugated

Table 2. Analytical conditions of HPLC for organic acid

Instrument	JASCO HPLC system
Column	$\text{C}_{18}$ (3.9 $\times$ 150 mm)
Mobile phase	0.008 N $\text{H}_2\text{SO}_4$
Flow rate	0.6 mL/min
Detector	UV detector at 210 nm (Gilson)

horse reddish peroxidase 100  $\mu\text{L}$ 씩 가한 다음 25 $^\circ\text{C}$ 에서 30분 반응시킨 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 여기에 발색기질용액(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine)을 100  $\mu\text{L}$  첨가하여 25 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 발색반응을 시킨 후 1.0 N sulfuric acid를 100  $\mu\text{L}$ 씩 가해 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader(Molecular device, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선에서 IL-1 $\alpha$  함량을 계산하였다.

### 14. Tumor necrosis factor 분비능

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

### 15. 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. Cheese의 일반성분 및 수율

Cheese의 일반성분은 Table 3과 같다. 수분 함량은 B제품이 53.16%로 가장 높았으며, A와 C제품에 비해 유의차가 있었으며, 단백질 함량은 유의차는 없었지만 B제품이 26.42%

Table 3. Chemical composition of cheese

Cheese	Moisture(%)	Protein(%)	Fat(%)
A	51.45 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	23.64 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	23.06 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>
B	53.16 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	26.42 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	20.52 $\pm$ 0.38 <sup>c</sup>
C	50.75 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>	24.43 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	24.64 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>

A: Mozzarella cheese made with commercial starter (FD-DVS TCC-3: Mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, HR.HANSEN A/S).

B: Mozzarella cheese made with *Streptococcus macedonicus* LC743

C: Mozzarella cheese made with commercial starter and *S. macedonicus* LC743 by the ratio 1:1.7

로 가장 높았다. 그러나 지방 함량은 C제품이 24.64%로 가장 높은 것으로 나타났다. Cha 등(1996)에 의하면 국내 모짜렐라 치즈의 평균 일반 조성은 수분 49.01%, 지방 22.54%, 지방 44.16%, 단백질 24.36%로 나타난 결과, B제품이 총 평균보다 수분과 단백질은 높게 나온 반면, 지방은 낮은 값을 보였다. 수율의 경우, 상업균주에 의해 제조된 A제품이 가장 높은 반면, B제품이 9.98%로서 가장 낮은 값을 보였다.

## 2. Cheese의 pH, 적정산도 및 젖산균수

C제품은 젖산균 증식이 높고 산 생성이 다른 제품에 비해 높기 때문에 pH 값이 가장 낮고, 적정산도는 높은 결과를 얻은 반면, B제품은 가장 낮은 결과를 얻었다(Table 4).

## 3. Cheese의 질소화합물

각 치즈에 존재하는 질소화합물을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 수용성 질소화합물의 대부분이 커드 내에 잔존하는 렌넷의 작용에 의해 생성된다(Farkye et al., 1990; Lynch et al., 1997; Song et al., 2011). 또한 치즈 숙성이 진행됨에 따라 치

Table 4. pH, TA and count of lactic acid bacteria in cheese

Cheese	pH	Titrateable acidity (%)	Lactic acid bacteria (cfu/g)
A	4.7	0.68	$5.7 \times 10^7$
B	4.9	0.65	$5.1 \times 10^7$
C	4.6	0.72	$6.0 \times 10^7$

A: Mozzarella cheese made with commercial starter (FD-DVS TCC-3: Mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophiles*, HR.HANSEN A/S).

B: Mozzarella cheese made with *Streptococcus macedonicus* LC743

C: Mozzarella cheese made with commercial starter and *S. macedonicus* LC743 by the ratio 1:1.7

Table 5. Nitrogen composition of cheese

Cheese	WSN (%N)	TCASN (%N)	PTASN (%N)
A	0.479±0.01 <sup>a</sup>	0.030±0.00 <sup>b</sup>	0.080±0.00 <sup>a</sup>
B	0.384±0.02 <sup>b</sup>	0.051±0.00 <sup>a</sup>	0.060±0.00 <sup>c</sup>
C	0.404±0.01 <sup>b</sup>	0.036±0.00 <sup>b</sup>	0.069±0.00 <sup>b</sup>

WSN: Water soluble nitrogen

TCASN: Trichloroacetic acid soluble nitrogen

PTASN: Phosphotungstic acid soluble nitrogen

A: Mozzarella cheese made with commercial starter (FD-DVS TCC-3: Mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophiles*, HR.HANSEN A/S).

B: Mozzarella cheese made with *Streptococcus macedonicus* LC743

C: Mozzarella cheese made with commercial starter and *S. macedonicus* LC743 by the ratio 1:1.7

즈 내에서 효소 작용을 받은 각 casein의 분해산물에 의해 증가되고, 스타터 균주의 단백질 분해 효소에 의한 생성이 대부분이다(Galan et al., 2008; Prados et al., 2007). 비단백태 질소화합물은 우유 중의 저온균이 생성하는 단백질 분해효소에 의해 유단백질이 분해되어 생성되는 물질이다. 수용성 질소화합물과 아미노태 질소화합물의 경우, A제품이 0.479%와 0.08 Nmg/g으로서 B, C제품에 비해 유의성이 있는 반면, 비단백태 질소화합물은 B제품이 0.051%로서 유의성을 보였다. Renner (1983)의 결과에 의하면, 비단백태 질소화합물 함량이 0.06% 정도가 되면 쓴맛을 유발한다고 하였으나, A, B, C제품 모두 0.06% 미만의 함량을 나타내었다.

## 4. Cheese의 아미노산 함량

각 cheese에 존재하는 구성 아미노산을 분석한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같다. 구성 아미노산은 B제품이 32,396.37 mg%로서 가장 많은 양의 아미노산을 함유하고 있고, A와 B제품이 각각 29,145.31 mg%와 28,832.38 mg%로서 비슷한 양을 함유하고 있었다. 모든 cheese에 공통적으로 많이 함유하고 있는 아미노산은 Glutamine, Proline, Leucine 및 Lysine이었으며, Cysteine을 제외하고는 B제품이 가장 많은 아미노산을 함유하였다. 치즈에서 총 유리 아미노산은 숙성의 지표로 사용되고 있다(Puchades et al., 1989; McSweeney and Fox, 1997). 각 cheese에 존재하는 유리 아미노산을 분석한 결과는 Table 7에서 보는 바와 같다. 총 유리아미노산은 C제품이 141.29 mg%로서 가장 많은 양의 유리아미노산을 함유하고 있었고, B제품이 10.51 mg%로서 가장 적은 양을 함유하고 있었다. Cheese에 공통적으로 많이 함유하고 있는 아미노산은 Glutamine이었으며, 아미노산 중 Alanine, Leucine, Lysine, Arginine은 A제품에서, Alanine, Phenylalanine, Arginine은 B제품에서, Alanine, Leucine, Phenylalanine, Lysine, Proline은 C제품에서 각각 가장 많이 함유하고 있는 반면, Cysteine은 3종류의 cheese에서 공통적으로 함유하고 있지 않았다. A제품은 Methionine이 상대적으로 적었고, B제품은 Glycine, Methionine, Histidine이 함유되어 있지 않았으며, C제품은 Methionine이 상대적으로 적었다.

## 5. Cheese의 유기산 함량

각 cheese에 존재하는 유기산을 분석한 결과는 Table 8 및 Fig. 1과 같다. 치즈의 숙성 중 발생하는 생화학적 변화는 제조 후 잔류하는 유당의 대사로 시작되는 lactic acid 및 citric acid의 대사와 지방 및 단백질의 가수분해로 크게 구분된다(Shin et al., 2011). Marsil 등(1981)에 의하면 Cottage cheese의 경우 Orotic, Citric, Lactic, Uric, Hippuric acid 등이 분리되었다고 보고한 것과는 달리 Lactic acid만 분리되었다. 함량간

Table 6. Total amino acid and free amino acid composition in cheese

Cheese	Total amino acid			Free amino acid			
	A	B	C	A	B	C	C
Asp	1,990.57	2,184.76	1,950.71	1.15	0.30		1.27
Thr	1,033.27	1,135.87	1,013.49	1.17	0.43		1.64
Ser	1,590.68	1,761.95	1,569.40	0.95	0.31		0.88
Glu	6,416.34	7,133.01	6,355.42	16.77	3.08		22.67
Pro	2,991.49	3,340.64	2,984.04	1.08	-		1.00
Gly	505.33	553.22	496.37	10.80	1.29		11.20
Ala	766.03	829.66	756.11	2.29	0.28		3.74
Cys	29.96	23.65	21.94	-	-		-
Val	1,830.35	2,032.08	1,808.07	0.43	-		0.71
Met	790.38	888.09	786.56	1.08	0.13		1.61
Ile	1,323.56	1,466.47	1,307.50	13.63	0.56		23.27
Leu	2,769.75	3,074.99	2,734.53	7.03	0.72		9.06
Tyr	1,561.66	1,758.27	1,555.77	9.90	1.14		13.41
Phe	1,452.74	1,626.34	1,442.68	17.22	0.38		21.64
Lys	2,226.27	2,503.68	2,198.86	5.03	-		5.54
His	821.58	918.56	815.40	10.45	1.12		13.27
Arg	1,045.35	1,165.13	1,035.53	9.49	0.77		10.38
Total	29,145.31	32,396.37	28,832.38	108.47	10.51		141.29

\* : Units: mg/100 g

All values are the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates.

A: Mozzarella cheese made with commercial starter (FD-DVS TCC-3: Mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophiles*, HR.HANSEN A/S).

B: Mozzarella cheese made with *Streptococcus macedonicus* LC743

C: Mozzarella cheese made with commercial starter and *S. macedonicus* LC743 by the ratio 1:1.7

Table 7. Organic acid contents of cheese

Cheese	Lactic acid (mg/mL)
A	809.80 $\pm$ 72.41 <sup>a</sup>
B	668.09 $\pm$ 31.26 <sup>b</sup>
C	725.84 $\pm$ 61.28 <sup>ab</sup>

A: Mozzarella cheese made with commercial starter (FD-DVS TCC-3: Mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophiles*, HR.HANSEN A/S).

B: Mozzarella cheese made with *Streptococcus macedonicus* LC743

C: Mozzarella cheese made with commercial starter and *S. macedonicus* LC743 by the ratio 1:1.7

비교를 보면 A제품이 809.80 mg/mL로서 가장 많은 함량을 나타낸 반면, B제품이 668.09 mg/mL로 가장 낮은 함량을 보였다.

## 6. Cheese casein의 전기영동

Polyacrylamide gel 전기영동에 의해 조사한 절단 전 커드와 모짜렐라 치즈 casein의 변화는 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

Table 8. The comparison of immunomodulating activity of Mozzarella cheese manufactured by selected and commercial strains

Sample	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 $\alpha$ (pg/mL)	NO ( $\mu$ M)
A	1,518.33 $\pm$ 116.81 <sup>c</sup>	186.39 $\pm$ 17.50 <sup>d</sup>	3.22 $\pm$ 0.83 <sup>d</sup>
B	>2,000 <sup>a</sup>	743.38 $\pm$ 8.77 <sup>a</sup>	8.31 $\pm$ 1.92 <sup>a</sup>
C	1,820.00 $\pm$ 38.41 <sup>b</sup>	535.82 $\pm$ 5.49 <sup>b</sup>	8.70 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
D	1,181.46 $\pm$ 10.01 <sup>e</sup>	83.53 $\pm$ 10.60 <sup>e</sup>	4.97 $\pm$ 1.22 <sup>c</sup>
E	1,829.02 $\pm$ 15.68 <sup>b</sup>	98.33 $\pm$ 4.70 <sup>e</sup>	5.75 $\pm$ 0.37 <sup>bc</sup>
F	>2,000 <sup>a</sup>	481.18 $\pm$ 29.25 <sup>c</sup>	6.08 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
G	1,200.88 $\pm$ 18.90 <sup>c</sup>	171.61 $\pm$ 16.15 <sup>d</sup>	5.97 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
H	1,392.71 $\pm$ 27.83 <sup>d</sup>	96.51 $\pm$ 7.55 <sup>e</sup>	4.77 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>

All values are the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates.

A: Mozzarella cheese made with commercial starter (FD-DVS TCC-3: Mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophiles*, HR.HANSEN A/S).

B: Mozzarella cheese made with *Streptococcus macedonicus* LC743.

C: Mozzarella cheese made with commercial starter and *S. macedonicus* LC743 by the ratio 1:1.7.

D-H: Domestic or Imported cheese.

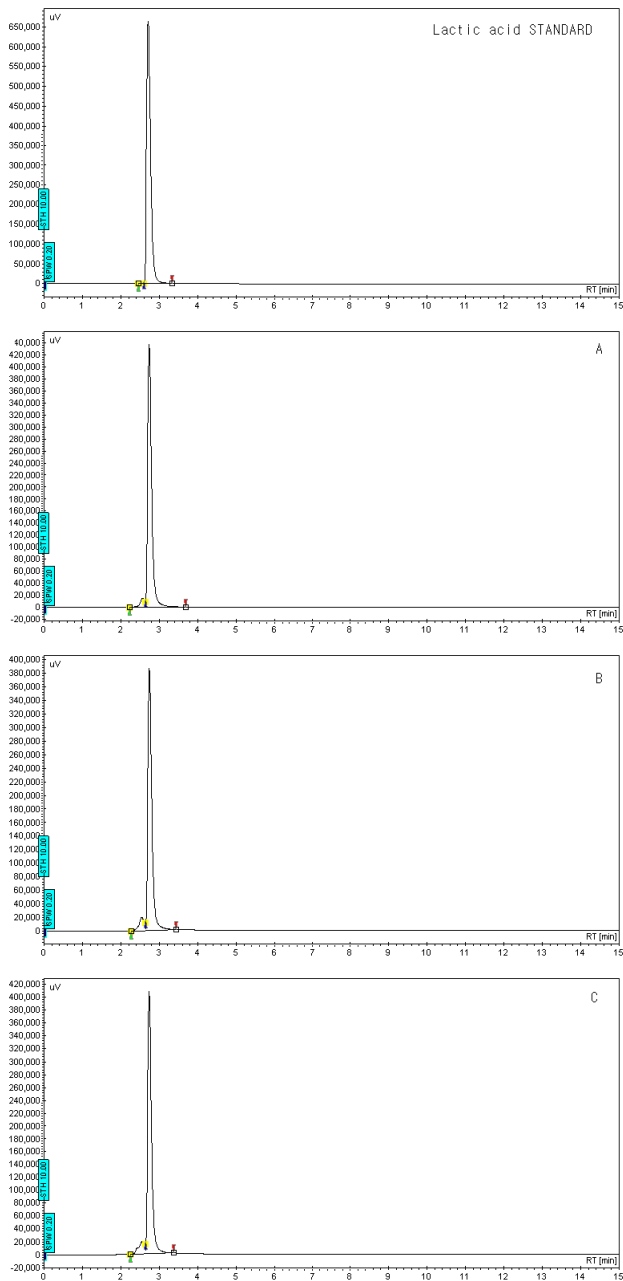


Fig. 1. Chromatogram of organic acid contents in Mozzarella cheese.  
 A: Mozzarella cheese made with commercial starter (FD-DVS TCC-3: Mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, HR.HANSEN A/S).  
 B: Mozzarella cheese made with *Streptococcus macedonicus* LC743.  
 C: Mozzarella cheese made with commercial starter and *S. macedonicus* LC743 by the ratio 1:1.7.

젖산균 종류별로 절단 전 커드와 치즈에서  $\alpha_{s1}$ -casein 및  $\beta$ -casein은 거의 영향을 받지 않았는데, 이는 숙성치즈가 아니기 때문에 분해가 일어나지 않은 것으로 보인다.

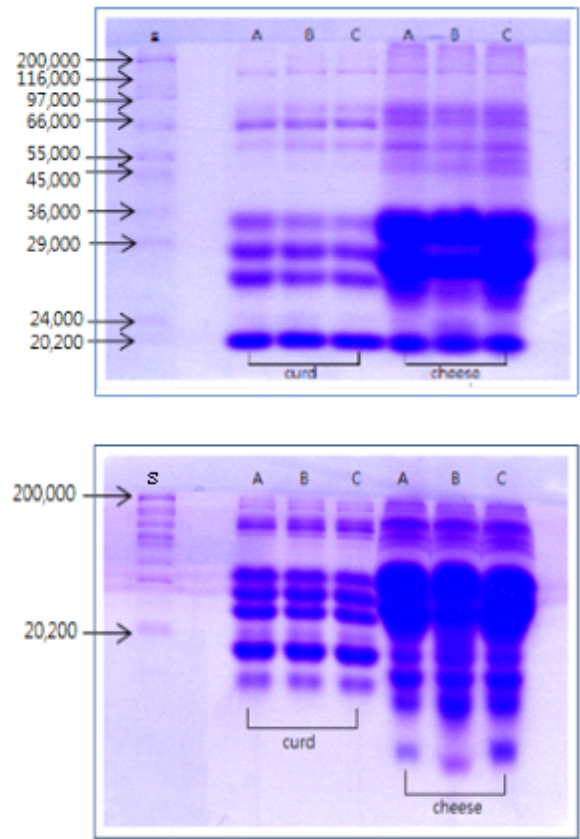


Fig. 2. Electrophoretic patterns of milk protein in curd before cutting and cheese on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.  
 \* S: molecular weight standard

### 7. Cheese의 면역증진

젖산균은 면역계에 관여하는 세포에서 분비되는 단백질인 사이토카인(cytokine)을 분비하여 하는 것으로 알려져 있고, 대식세포를 활성화 시켜서 NO 생성과 사이토카인의 한 종류인 TNF- $\alpha$ 의 생성을 촉진하는 것으로 나타났다. Nitric oxide (NO)는 신경, 면역, 혈관 시스템에서 생물학적 활성을 조절하는데 중요 분자이고, 동물 또는 인간의 여러 병리학적 측면에 연루되어 있다. 또한 IL-1 $\alpha$ 는 면역반응, 염증, 생체방어기전 등의 조절에 관련되어 있다(Moncada, 1999; Chen *et al.*, 2003; Zeidler *et al.*, 2004; Guzik *et al.*, 2003; Boje, 2004; Zucker *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2007). *S. macedonicus* LC743 균주로 제조된 모짜렐라 치즈의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , NO 값이 각각 2,000 pg 이상/mL, 743.38 pg/mL, 8.31  $\mu$ M로 상업용 스타터로 제조된 모짜렐라 치즈보다 면역활성능이 우수한 것으로 나타났다. 또한 *S. macedonicus* LC743 균주를 상업균주와 혼합하여도 면역활성능이 상업용 균주로 제조된 모짜렐라 치즈보다 우수한 것으로 나타났으며, 시중제품 및 외국제품에 비해서는 면역분비능이 월등히 높은 것으로 나타났다.

## 요 약

본 연구는 원유로부터 면역효능이 우수한 젓산균 *Streptococcus macedonicus* LC743을 분리하였고, 이 균으로 제조한 모짜렐라 치즈와 상업균주로 제조한 모짜렐라 치즈에 대해 이화학적 특성을 비교시험하였다. *S. macedonicus* LC743을 이용한 치즈의 일반성분 결과, 수분 53.16%, 단백질 26.42%, 지방 20.52%였다. *S. macedonicus* LC743을 이용한 치즈의 질소화합물 중 수용성 질소는 0.384%, 비단백태질소 0.051%, 아미노태질소는 0.060 Nmg/g으로서 상업균주를 이용한 치즈에 비해 수용성 질소 및 아미노태질소의 함량은 적은 반면, 비단백태 질소 함량은 높았다. 각 치즈에 존재하는 유기산 분석 결과 상업균주로 제조한 치즈가 809.80 mg/mL로서 가장 많은 함량을 나타낸 반면, *S. macedonicus* LC743으로 제조한 치즈는 668.09 mg/mL로 가장 낮은 함량을 보였다. *S. macedonicus* LC743을 이용한 치즈의 총 아미노산은 Cysteine을 제외하고는 모든 아미노산에서 상업균주를 이용한 치즈에 비해 높은 함량을 차지하였다. *S. macedonicus* LC743 균주로 제조된 모짜렐라 치즈는 상업용 스타터로 제조된 모짜렐라 치즈, 시중 제품 및 외국제품에 비해 면역분비능이 높은 것으로 나타났으며, *S. macedonicus* LC743 균주를 상업균주와 혼합하여도 면역활성능이 우수한 것으로 나타났다.

## 감사의 글

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

## 참고문헌

- Ahn, S. I., Choi, K. Y. and Kwak, H. S. 2011. Development of functionality in cheese. *Kor. J. Dairy Sci. Technol.* 29:65-73.
- A.O.A.C. 1980. Official methods of analysis. 13th ed., Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Arunachalam, K., Gill, H. S. and Chandra, R. K. 2000. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur. J. Clin. Nutr.* 54:263-267.
- Boje, K. M. 2004. Nitric oxide neurotoxicity in neurodegenerative diseases. *Front. Biosci.* 9:763-776.
- Cha, K. J., Yeon, J. H. and Yu, J. H. 1990. A study on mineral contents in domestic Mozzarella cheese. *Kor. J. Dairy Sci. Technol.* 14:147-155.
- Chen, T., Zamora, R., Zuckerbraun, B. and Billiar, T. R. 2003. Role of nitric oxide in liver injury. *Curr. Mol. Med.* 3:519-526.
- Farkye, N. Y., Fox, P. F., Fitzgerald, G. F. and Daly, C. 1990. Proteolysis and flavor development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase-positive or proteinase-negative starters. *J. Dairy Sci.* 73:874-880.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Coang, T. M. and McSweeney, P. L. H. 2000. Fundamentals of cheese science. An Aspen Publication. USA.
- Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L. and Fernández-Salguero, J. 2008. Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *Int. Dairy J.* 18:93-98.
- Guzik, T. J., Korbut, R. and Adamek-Guzik, T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 54:469-487.
- Jarrett, W. D., Aston, J. W. and Dulley, J. R. 1982. A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 37:55-58.
- Kim, C. 2009. Immunomodulatory effects of lactic acid bacteria and bioactive peptides derived from milk. *Kor. J. Dairy Sci. Technol.* 27:37-43.
- Kim, Y. K. 1976. Studies on cheese ripening; water soluble nitrogenous compounds in Cheddar cheese. *J. Ani. Sci. Technol.* 18:176-181.
- Kosikowski, F. V. 1982. Cheese and fermented milk foods. 2<sup>nd</sup> ed. Edwards Brothers, Inc., Ann. Arbor.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lee, S. H., Song, K. Y., Seo, K. H. and Yoon, Y. C. 2013. Production of Mozzarella cheese analogue by ultrafiltration. *Kor. J. Dairy Sci. Technol.* 31:21-33.
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M. and Drinan, F. D. 1997. Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Le Lait* 77:441-459.
- Marsili, R.T., Ostapenko, H., Simmons, R. E. and Green, D. E. 1981. High performance liquid chromatographic determination of organic acid in dairy products. *J. Food Sci.* 46:52-57.



19. McSweeney, P. L. H. and Fox, P. F. 1997. Indices of Cheddar cheese ripening. Proceed. 5<sup>th</sup> Cheese Sym, National Dairy Products Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co., Cork, Ireland, pp. 73-89.
20. Medici, M., Vinderola, C. G. and Perdogon, G. 2004. Gut mucoal immunomodulation by probiotic fresh cheese. Int. Dairy J. 14:611-618.
21. Moncada, S. 1999. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. J. R. Soc. Med. 92:164-169.
22. Park, S. H., Kim, Y. A., Lee, D. K., Lee, S., Chung, M. J., Kang, B. Y., Kim, K. and Ha, N. J. 2007. Antibacterial activity and macrophage activation of lactic acid bacteria. J. Environ. Toxicol. 22:287-297.
23. Prados, F., Pino, A. and Fernández-Salguero, J. 2007. Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese. Int. J. Food. Sci. Tecnol. 42:556-561.
24. Puchades, R., Lemieux, L. and Simard, R. E. 1989. Evolution of free amino acids during the ripening of Cheddar cheese containing added *Lactobacilli* strains. J. Food Sci. 54:885-888.
25. Renner, E. 1983. Milk and Dairy Products in human nutrition. W-CmbH, Volkswirtschaftlicher Verlag, Munchen.
26. Shin, Y. K., Oh, N. S. and Nam, M. S. 2011. Changes of organic acids and free fatty acids during the ripening of Emmental cheese. Kor. J. Food Sci. Ani. Resour. 6:928-934.
27. Song, K. Y., Lee, J. I., Chon, J. W., Hyeon, J. Y., Seo, K. H. and Yoon, Y. C. 2011. Phsicochemical properties of Mozzarella cheese made by raw milk retentate using ultrafiltration; a review. Kor. J. Dairy Sci. Technol. 29:1-15.
28. Vanderpoorten, R. and Weckx, M. 1972. Breakdown of casein by rennet and microbial milk clotting enzymes. Neth. Milk Dary J. 26:47-59.
29. White, J. A., Hart, R. J. and Fry, J. C. 1986. An evaluation of waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. J. Automat. Chem. 8:170-177.
30. Zeidler, M. R., Kleerup, E. C. and Tashkin, D. P. 2004. Exhaled nitric oxide in the assessment of asthma, Curr. Opin. Pulm. Med. 10:31-36.
31. Zucker, I. H., Schultz, H. D., Li, Y. F., Wang, Y., Wang, W. and Patel, K. P. 2004. The origin of sympathetic outflow in heart failure: the roles of angiotensin II and nitric oxide. Prog. Biophys. Mol. Biol. 84:217-232.
32. 국립수의과학검역원. 2010. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 국립수의과학검역원 고시 제 2010-16호.

---

Received September 30, 2015

Revised October 15, 2015

Accepted November 1, 2015