



ARTICLE

비살균 원유로 제조된 다양한 Gouda 치즈의 미생물 안전성

최철^{1,2†} · 김동현^{2†} · 임현우^{2†} · 천정환^{2†} · 송광영^{2,3*} · 김세형² · 김현숙⁴ · 서건호^{1,2†}

¹건국대학교 농축대학원 응용수의학과, ²건국대학교 수의과대학 식품안전건강연구소
³연변대학 과학기술학원 생물공정전업, ⁴한양대학교 생활과학대학 식품영양학과

Microbiological Safety of Various Gouda Cheeses Produced from Raw Milk

Cheol Choi^{1,2†}, Dong-Hyeon Kim^{2†}, Hyun-Woo Lim^{2†}, Jung-Whan Chon^{2†}, Kwang-Young Song^{2,3*}, Se-Hyung Kim², Hyunsook Kim⁴, and Kun-Ho Seo^{1,2†}

¹Dept. of Applied Veterinary Medicine, Graduate School of Agriculture and Animal Science, Konkuk University, Seoul, Korea

²Center for One Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea

³Dept. of Biological Engineering, Yanbian University of Science & Technology, Yanji, China

⁴Dept. of Food & Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, Seoul, Korea



Received: June 10, 2018

Revised: June 20, 2018

Accepted: June 20, 2018

†These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author :
Kwang-Young Song
Center for One Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea, and Dept. of Biological Engineering, Yanbian University of Science & Technology, Yanji, China.
Tel : +82-2-450-4121
Fax : +82-2-3436-4128
E-mail : drkysong@gmail.com

Copyright © 2018 Korean Society of Milk Science and Biotechnology.

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.

ORCID

Cheol Choi
0000-0002-9672-426X

Dong-Hyeon Kim
0000-0003-0585-2432

Hyun-Woo Lim
0000-0001-6013-8106

Jung-Whan Chon
0000-0003-0758-6115

Kwang-Young Song
0000-0002-5619-8381

Se-Hyung Kim
0000-0003-4747-7394

Hyunsook Kim
0000-0001-7345-4167

Kun-Ho Seo
0000-0001-5720-0538

Abstract

Since 2018, the production and sales of raw-milk cheese ripened for over 60 days has been permitted in South Korea. Hence, this study aimed to examine the microbiological changes in 7 different types of Gouda cheese. During the aging period, traditional raw-milk Gouda Cheeses 1 and 2 did not contain *Salmonella* spp. during the 60-day storage period and no *E. coli* after 20-day storage. Coliform bacteria were not detected in Cheese 1 after 40 days; however, they were detected in Cheese 2 up to 60 days. *Salmonella* spp. were inhibited during the 60-day storage period in Cheese 3 (*Salmonella* spp.-contaminated raw-milk Gouda cheese), Cheese 4 (Cheese 3 contaminated with lactic acid bacteria DH 5 isolated from Kefir) and Cheese 5 (Cheese 3 contaminated with lactic acid bacteria DN1 isolated from Kefir). In particular, inhibition of *Salmonella* spp. was more prominent in Cheese 4 and Cheese 5 than in Cheese 3. During 60-day storage, Cheese 6 had a significantly reduced lactic acid bacteria. Furthermore, in Cheese 7, *E. coli*, *E. Salmonella* ssp. were rarely detected, and lactic acid bacteria were slightly greater in Cheese 7 than in other cheeses during the 60-day period. Moreover, all samples from Cheese 1 to Cheese 7 were not contaminated with *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, and *E. coli* O157:H7.

Keywords

raw milk Gouda cheese, microbial safety, *Salmonella* spp.-contaminated raw milk, lactic acid bacteria, 60 day ripening

서론

네델란드 Rotterdam 부근 Gouda 지방에서 전통적인 방식으로 제조되는 Gouda 치즈는 네델란드의 주요 수출 농산품의 하나로서 자연치즈이다(Van Hoorde *et al.*, 2008; Gill and Oudit, 2015). 일반적으로 담황색의 파라핀이나 왁스 등으로 포장된 Gouda 치즈의 단백질은 22%부터 35%까지이고, 지방은 25%에서 46%까지이며, 수분은 42%에서 55%까지이고, 염(salt)은 1.0%에서 1.5%까지이다(Van Hoorde *et al.*, 2010ab; McCollum *et al.*, 2012).

또한 Gouda 치즈는 소비자의 기호에 맞는 풍미형성과 전형적인 조직을 얻기 위하여 최소한 2~6개월 이상 장기간 숙성기간이 필요하며, 이렇게 숙성된 자연치즈인 Gouda 치즈는 약간 딱딱한 원형의 모양으로 노란색을 가진 표면에 고유의 신맛(sour flavor)과 고릿한 향(rancid flavor)이 있다 (Yang, 2009; Colonna *et al.*, 2011; McCollum *et al.*, 2012; 서와 송, 2017).

한국농촌경제연구원의 2014년 보고에 의하면 FTA 특혜관세를 적극 활용한 미국산과 EU산 치즈는 현재 한국 시장의 81.9%를 차지한 상태이다(Korea Rural Economic Institute, 2014). 더 나아가서, 세계적인 명품 치즈로 알려진 많은 치즈들의 대부분은 비살균원유로 제조되고 있다는 것은 비살균원유 치즈의 중요성을 직접적으로 대변하고 있다(Kim *et al.*, 2015; Song and Seo, 2017). 2016년 4월 4일 한국식품의약품안전처 공고 제2016-126호 축산물의 가공기준 및 성분규격 일부 개정고시에서 행정예고를 하였는데, 이것의 주요 목적은 살균하지 않은 원유로 만든 치즈를 제조 및 수입할 수 있도록 가공기준을 개정하여 국제기준과 조화를 이루고, 수출 및 수입 관련무역마찰 해소 그리고 다양한 제품을 생산할 수 있는 기반 조성으로 축산물가공업 활성화를 도모하기 위해서이다. 그리고 2016년 12월 29일에 한국식품의약품안전처고시 제2016-154호 식품의 기준 및 규격 전부개정고시에 하였다. 2018년부터 적용되는 개정된 식품공전의 치즈류의 제조 및 가공기준에서 60일 숙성치즈의 경우 비살균원유의 사용을 허용하였다(Song and Seo, 2017). 한국에서 비살균원유를 이용하여 다양한 치즈를 제조한 후 최소 60일 이상 숙성을 하면 합법적인 판매를 할 수 있기에 소비자들의 다양한 요구를 만족시킬 수 있을 뿐만 아니라, 치즈산업을 활성화시킬 수 있는 좋은 기회라고 생각된다. 하지만 과학적인 방법에 근거하여 다양한 처리법을 발전시켜 공중위생을 보호하고, 치즈 제조 전문가들의 엄격한 관리 및 감독을 통한 다양한 비살균 치즈의 독특한 특성과 전통을 지속적으로 전수 및 보존되어야 할 것이다(Song and Seo, 2017).

따라서 본 연구의 목적은 비살균 Gouda 치즈의 60일 숙성기간 동안 다양한 미생물들의 변화와 관찰 및 병원균인 *Salmonella* spp.로 오염시킨 원유로 제조한 비살균 Gouda 치즈의 미생물학적 안전성을 평가하기 위해서이다. 또한 궁극적인 목적은 한국의 비살균 치즈 기준의 적합성을 살펴볼 뿐만 아니라, 비살균 Gouda 치즈의 안전성과 관련된 기초적인 자료를 제시하고 본 실험이 진행되었다.

재료 및 방법

1. 다양한 Gouda 치즈의 제조

본 실험에서는 Fig. 1과 같이 다양한 Gouda 치즈가 건국대학교 수의과대학의 Center for One Health에서 제조되었다. 먼저 세균수 3만 이하의 1A와 체세포수 20만 미만의 1등급의 양질의 원유는 경기도 연천군에 위치한 애심목장에서 생산된 것을 구입하여 사용하였다. 응유효소인 rennet는 Mysecoren Animal Rennet(Maysa GIDA, Turkey)와 혼합균주(*Str. thermophilus*, *Str. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. casei*)로 구성된 유산균은 Lyofast YAB 450 AB(Sacco srl., Codaragok, Italy) 제품을 사용하였다. 본 실험을 위해서 제조된 다양한 Gouda 치즈들은 온도가 $10 \pm 2^\circ\text{C}$ 그리고 상대습도가 $85 \pm 5\%$ 인 숙성실에서 60일 이상 숙성시키면서 공시재료로 사용하였다.

특히 본 실험에서 Gouda 치즈 제조시에 유산균은 Lyofast YAB 450 AB를 사용하였으며, Kefir에서 분리한 유산균인 DH5와 DN1의 향미생물 활력을 측정하기 몇 개의 대조군 비살균 Gouda 치즈에 추가적으로 첨가하였다. 유산균인 DH5와 DN1는 MRS(Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 36°C 에서 48시간 배양 후 MRS broth에 계대하여 사용하였다.

본 실험에서는 비살균 Gouda 치즈의 미생물의 안전성과 특성을 알아보기 위해서 총 7종류의 다양한 Gouda 치즈가 제조되었으며, Fig. 2에 각 Gouda 치즈의 특성이 자세하게 정리되어 있다.

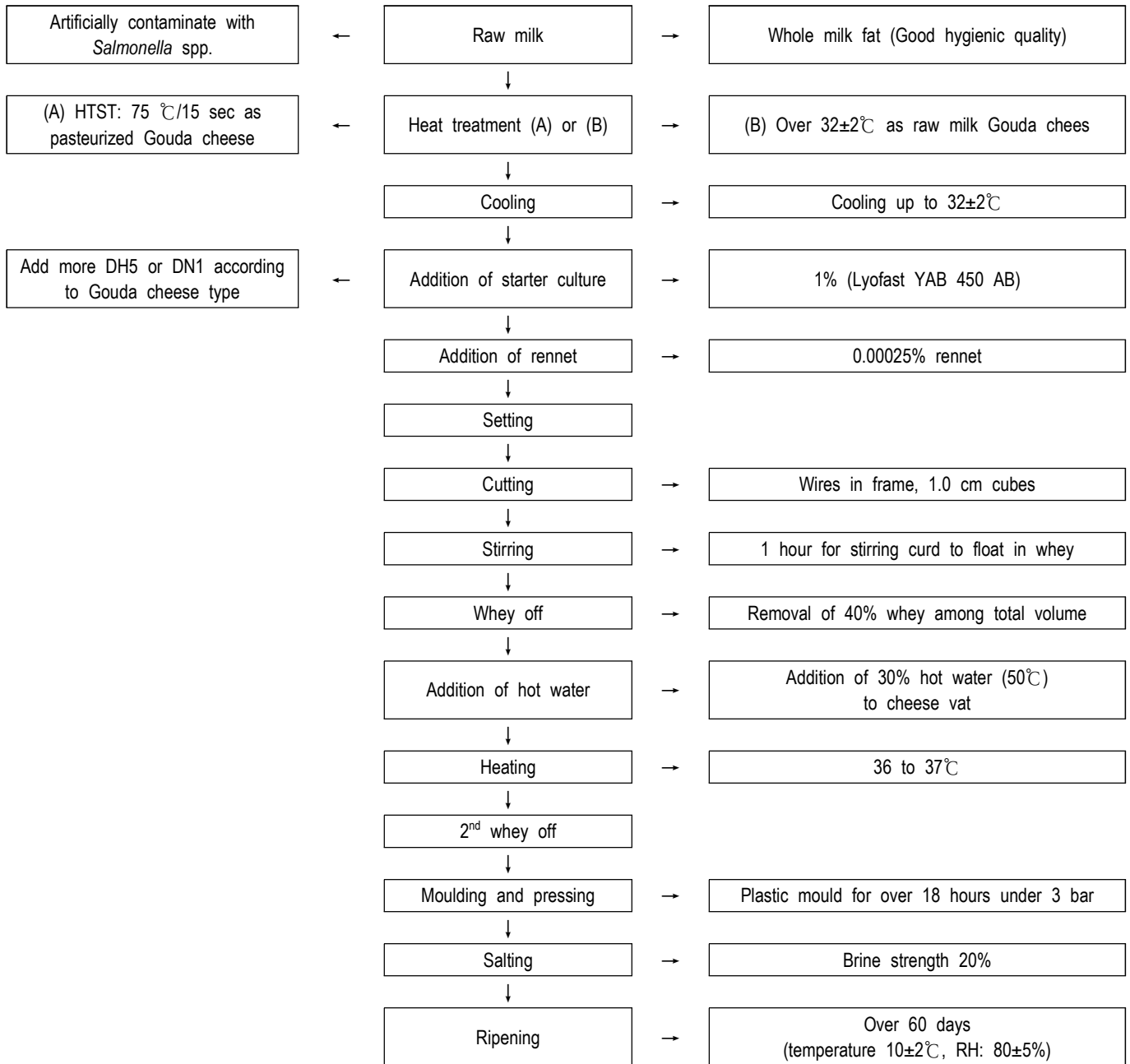


Fig. 1. The manufacturing method for traditional or raw milk Gouda cheese as control.

2. 미생물 배양 및 검사

1) 접종 실험에 사용된 *Salmonella* spp. 균주

Salmonella spp.는 미국 FDA(CFSAN, College Park, Maryland, USA)에서 분양받아 실험실에서 보유하고 있던 식품분리균주를 사용하였으며, -70°C에 보관하여 필요할 때마다 균주를 해동하고 사용하였다. Nutrient agar(Oxoid, Hampshire, U.K.)에 해동된 균주를 도말하여 37°C에서 호기적으로 24시간 배양하였다. 배양된 집락 중 단일집락을 선택하여 Tryptic Soy Broth(Oxoid)가

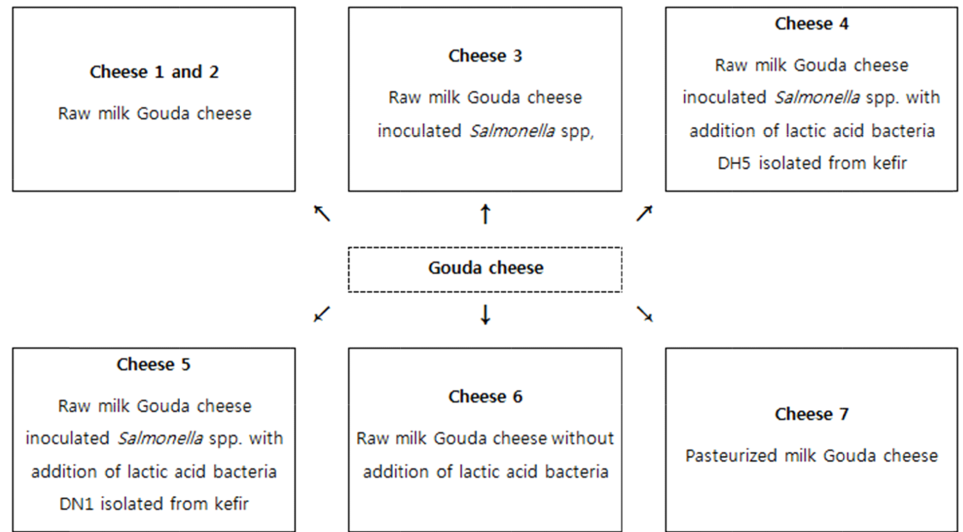


Fig. 2. Seven different type of Gouda cheeses made in this study.

37°C에서 24시간 배양하였으며, 3번 이상 계대배양한 균액을 희석하여 접종액으로 사용하였다. 본 실험에는 원유를 살균하여 제조한 Gouda 치즈가 대조구로 하였으며, 실험구로는 비살균 원유로 Gouda 치즈를 제조하였다. 비살균원유로 제조된 Gouda 치즈에 다양한 농도의 병원성균인 *Salmonella* spp.를 접종하여 60일 이상 저장기간 동안의 변화를 관찰하였다.

2) 미생물검사

미생물의 검사는 한국식품의약품안전처에 제시된 공인방법에 의해서 진행되었다.

(1) 유산균수(Lactic acid bacteria) 측정

치즈 샘플 25 g에 인산염완충희석액 225 mL를 첨가하여 stomacher blender인 Bag mixer (Interscience, USA)를 이용하여 1분간 균질화하고, 100 μ L를 취하여 10배수로 희석한 희석액을 MRS(Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 36°C에서 48시간 배양 후 흰색콜로리 집락을 계수하여 유산균수를 측정하였다.

(2) 대장균(*E. coli*) 측정

치즈 샘플 25 g에 인산염완충희석액 225 mL를 첨가하여 stomacher blender인 Bag mixer (Interscience, USA)를 이용하여 1분간 균질화하고, 1,000 μ L를 취하여 10배수로 희석한 희석액을 대장균균 건조필름(3M Petrifilm, USA)에 도말하여 36°C에서 24~48시간 배양 후 생성된 푸른 집락중 주위에 기포를 형성하고 있는 집락수를 계산하고 그 평균집락수에 희석배수를 곱하여 대장균수를 측정하였다.

(3) 대장균군(Coliform) 측정

치즈 샘플 25 g에 인산염완충희석액 225 mL를 첨가하여 stomacher blender인 Bag mixer(Interscience, USA)를 이용하여 1분간 균질화하고, 1,000 μ L를 취하여 10배수로 희석한 희석액을 대장균균 건조필름(3M Petrifilm, USA)에 도말하여 36°C에서 24~48시간 배양 후 붉은 집락중 주위에 기포를 형성하고 있는 집락수를 계산하고, 그 평균집락수에 희석배수를 곱하여 대장균수를 측정하였다.

(4) 일반세균수(Aerobic count) 측정

치즈 샘플 25 g에 인산염완충희석액 225 mL를 첨가하여 stomacher blender인 Bag mixer (Interscience, USA)를 이용하여 1분간 균질화하고, 1,000 μ L를 취하여 10배수로 희석한 희석액을 Aerobic Count Plate(3M Petrifilm, USA)에 도말하여 36°C에서 24시간 배양 후 생성된 붉은 집락을 계수하여 그 평균집락수에 희석배수를 곱하여 일반세균수로 측정하였다.

(5) *Salmonella* spp. 균수 측정

치즈 샘플 25 g에 인산염완충희석액 225 mL를 첨가하여 stomacher blender인 Bag mixer (Interscience, USA)를 이용하여 1분간 균질화하고, 100 μ L를 취하여 10배수로 희석한 희석액을 xylose lysine deoxycholate agar(Oxoid)에 도말하여 36°C에서 24시간 배양 후 붉은 색 집락을 계수하여 *Salmonella* spp. 균수를 측정하였다.

(6) *Esherichia coli* O157:H7 측정

치즈 샘플 25 g에 인산염완충희석액 225 mL를 첨가하여 stomacher blender인 Bag mixer (Interscience, USA)를 이용하여 1분간 균질화하고, 100 μ L를 취하여 10배수로 희석한 희석액을 sorbitol MacConkey agar(SMAC; BD Difco, NJ, USA)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양 후 집락을 계수하여 *Esherichia coli* O157:H7 수를 측정하였다.

(7) 리스테리아 모노사이토제니스(*Listeria monocytogenes*) 측정

치즈 샘플 25 g에 인산염완충희석액 225 mL를 첨가하여 stomacher blender인 Bag mixer (Interscience, USA)를 이용하여 1분간 균질화하고, 100 μ L를 취하여 10배수로 희석한 희석액을 Oxford agar(Oxoid, Basingstoke, UK)에 도말하여 30°C에서 48시간 배양 후 집락 주위에 검은색 환을 가지고 있는 수를 계수하여 *Listeria monocytogenes* 수를 측정하였다.

(8) 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 측정

치즈 샘플 25 g를 취하여 225 mL의 10% NaCl 첨가한 TSB 배지에 가한 후 35~37°C에서 18~24 시간 증균배양을 하였다. 분리배양으로 증균배양액을 Baird-Parker 한천배지에 접종하고, 35~37°C에서 18~24시간 배양하여 황색불투명 집락을 확인하였다. 확인시험으로 분리배양된 평판배지상의 집락을 보통 한천배지에 옮기고 35~37°C에서 18~24시간 배양하였다. 그람염색을 실시하여 포도상의 배열을 갖는 그람양성 구균 확인 후 coagulase 시험을 실시(24시간 이내에 응고 유무 판정) 하였다.

(9) 클로스트리움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 측정

증균배양으로 시험용액 1 mL를 Cooked Meat 배지의 아랫부분에 접종하고, 35~37°C에서 18~24 시간 동안 혐기배양하였다. 분리배양으로 카나마이신을 200 μ g/mL의 농도로 가한 난황을 첨가하고 *Clostridium perfringens* 한천배지(또는 난황첨가 TSC 한천배지)에 증균배양액을 접종하고, 35~37°C에서 18~24시간 혐기배양하였다. *Clostridium perfringens* 한천배지에서 직경 2 mm 정도의 약간 돌기된 유향색으로 주변에 불투명한 백색환이 있는 집락(또는 TSC 한천배지에서 불투명한 환을 가지는 황회색 집락)은 확인시험을 실시하였다. 확인시험으로 분리배양된 평판배지상의 집락을 보통한천배지에 옮기고 35~37°C에서 18~24시간 혐기배양한 후 그람염색을 실시하였다. 동시에 보통한천배지를 35~37°C에서 18~24시간 호기 배양하여 균의 비발육을 확인하였다. 그람양성간균으로 확인된 집락은 glucose, lactose, inositol, raffinose를 1% 가한 4종의 GAM 배지에 옮겼다.

35~37°C에서 3일간 배양 후 BTB-MR 지시약을 가해서 붉은 색으로 변하는 것을 양성으로 판정하였다. 운동성은 GAM 배지에서 35~37°C에서 1~2일간 배양하여 운동성의 유무를 관찰하였다. Glucose, lactose, inositol과 raffinose를 분해하며 운동성이 없는 것을 확인하면 Lecithinase 억제 시험을 실시한다. 난황이 포함된 TSC 한천배지에 접종하여 35~37°C에서 24시간 혐기배양한 후 2~4 mm 불투명한 환을 가지는 황회색 집락을 양성으로 판정하였다.

3. 통계분석

본 연구에서 얻어진 결과의 통계분석은 통계프로그램인 GraphPad Instat(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 Fisher's exact test로 통계학적인 유의차 ($p < 0.05$)를 분석하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 제조되어진 비살균 Gouda 치즈의 숙성중 미생물학적 변화는 Fig. 3에서 Fig. 7에 자세하게 나타나 있다.

총 7종류의 Gouda 치즈가 조사되었는데, Cheese 1과 2는 전통적인 비살균 Gouda 치즈이며, Cheese 3은 원유에 인위적으로 *Salmonella* spp.를 오염시킨 후 제조된 비살균 Gouda 치즈이다. Cheese 4와 5는 Cheese 3의 조건에서 추가적으로 유산균 DH5와 DN1을 각각 첨가하였다. Cheese 6은 유산균의 첨가없이 제조된 비살균 Gouda 치즈이며, Cheese 7은 살균된 원유로 제조된 Gouda 치즈이다.

Gouda 치즈가 제조된 당일을 1 day로 하여 매 20일인 20 day, 40 day, 60 day에 대장균 및 대장균군, 일반세균(AC), 유산균(LAB), *Salmonella* spp.를 검사하였다. 60 day에는 추가적으로 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* O157:H7를 조사하였다.

일반적으로 치즈에 있어 잠재적으로 건강에 위험을 줄 수 미생들을 살펴보면 다음과 같다. *Salmonella* spp.와 *Staphylococcus aureus* 그리고 다른 대장균들은 상당히 자주 발생하고, 중간 정도의 질환을 유발한다. 드물게 발생하는 *Listeria monocytogenes*는 심한 질환을 유발하지만 반면 효모도 드물게 발생하지만 질환을 전혀 유발하지 않는다. *Mycobacteria*(결핵균들)와 브루셀라(*Brucella abortus*)는 거의 발생하지 않지만 만약 발생하면 심한 질환을 유발하고, Mycotoxin(곰팡이독)과 바이러스도 거의 발생하지 않지만 만약 발생하면 중간 정도의 질환을 유발한다(Bryan *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2015).

Cheese 1과 2에 있어서 미생물학적인 변화를 분석해 보면, 60일 저장기간 동안 *Salmonella* spp.는 전혀 검출되지 않았으며, *E. coli*는 20 day 부터는 검출되지 않았다(Fig. 3).

대장균군은 Cheese 1에서 40 day부터 검출되지 않았지만 Cheese 2에서는 60 day까지 검출되었다. Cheese 1과 Cheese 2는 비살균 Gouda 치즈이기에 약간의 차이는 있었지만 전반적으로 비슷한 경향을 보였다(Fig. 4).

일반세균수(Aerobic count)는 Cheese 7을 제외하고 Cheese 1부터 6까지는 저장기간 동안 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

Cheese 6는 유산균첨가 없이 제조된 비살균 Gouda 치즈인데 저장기간이 길어질수록 유산균수가 다른 것들에 비해서 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 6).

Cheese 3, Cheese 4와 Cheese 5에 있어서 미생물학적인 변화를 분석해 보면, 60일 저장기간 동안 *Salmonella* spp.의 저해가 관찰되었다(Fig. 7). 특히 Cheese 4와 Cheese 5에 추가적으로 첨가된 DH5와 DN1은 kefir에서 분리한 유산균으로서 이미 생리활성 능력이 검증되었다. 본 실험에서

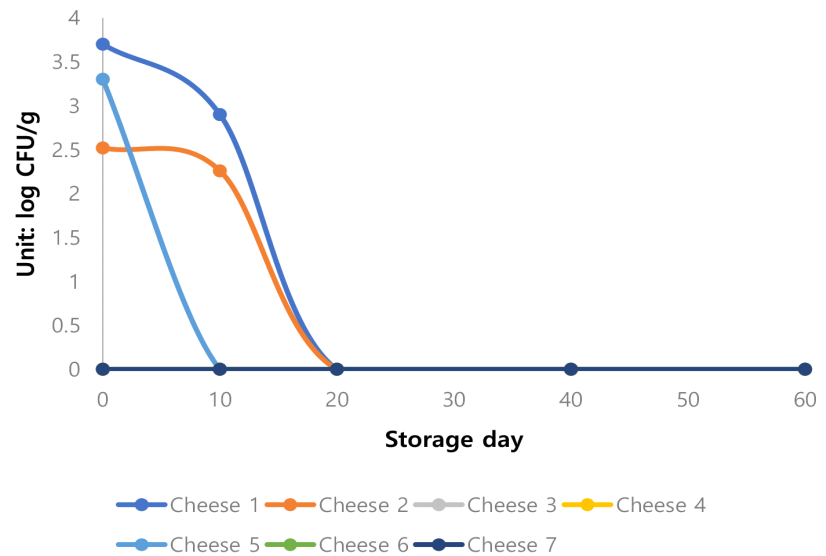


Fig. 3. Comparison of *E. coli* of various raw milk Gouda cheeses during 60 day storage. Cheese 1 and 2 were raw milk Gouda cheeses; Cheese 3 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp.; Cheese 4 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp. with addition of lactic acid bacteria DH5 isolated from kefir; Cheese 5 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp. with addition of lactic acid bacteria DN1 isolated from kefir; Cheese 6 was raw milk Gouda cheese without addition of lactic acid bacteria; and Cheese 7 was Gouda cheese from pasteurized milk.

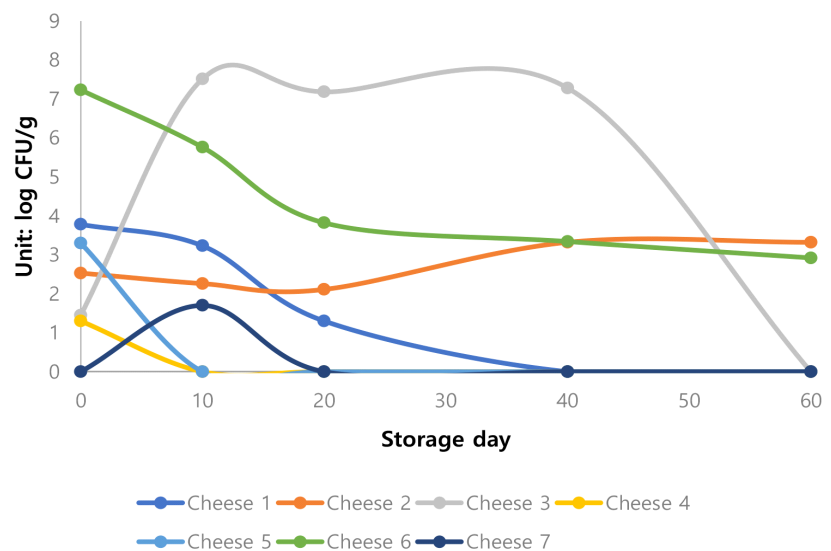


Fig. 4. Comparison of Coliform of various raw milk Gouda cheeses during 60 day storage. Cheese 1 and 2 were raw milk Gouda cheeses; Cheese 3 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp.; Cheese 4 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp. with addition of lactic acid bacteria DH5 isolated from kefir; Cheese 5 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp. with addition of lactic acid bacteria DN1 isolated from kefir; Cheese 6 was raw milk Gouda cheese without addition of lactic acid bacteria; and Cheese 7 was Gouda cheese from pasteurized milk.

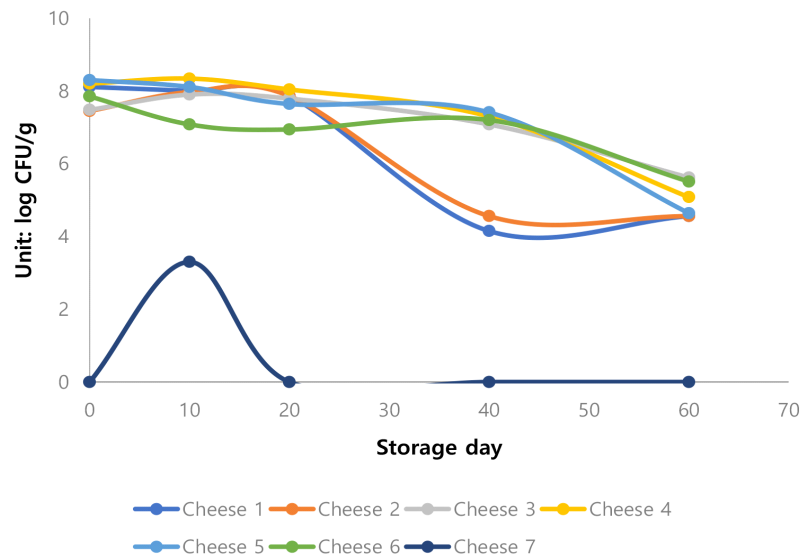


Fig. 5. Comparison of Aerobic count of various raw milk Gouda cheeses during 60 day storage. Cheese 1 and 2 were raw milk Gouda cheeses; Cheese 3 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp.; Cheese 4 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp. with addition of lactic acid bacteria DH5 isolated from kefir; Cheese 5 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp. with addition of lactic acid bacteria DN1 isolated from kefir; Cheese 6 was raw milk Gouda cheese without addition of lactic acid bacteria; and Cheese 7 was Gouda cheese from pasteurized milk.

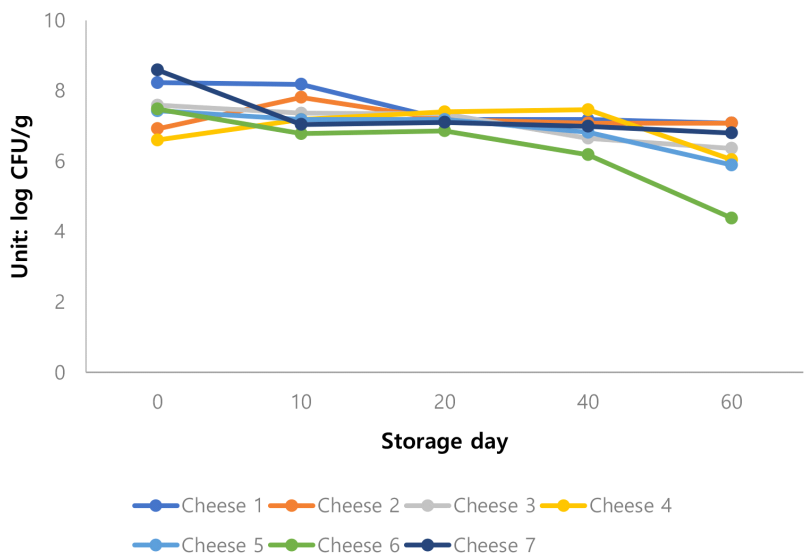


Fig. 6. Comparison of lactic acid bacteria of various raw milk Gouda cheeses during 60 day storage. Cheese 1 and 2 were raw milk Gouda cheeses; Cheese 3 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp.; Cheese 4 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp. with addition of lactic acid bacteria DH5 isolated from kefir; Cheese 5 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp. with addition of lactic acid bacteria DN1 isolated from kefir; Cheese 6 was raw milk Gouda cheese without addition of lactic acid bacteria; and Cheese 7 was Gouda cheese from pasteurized milk.

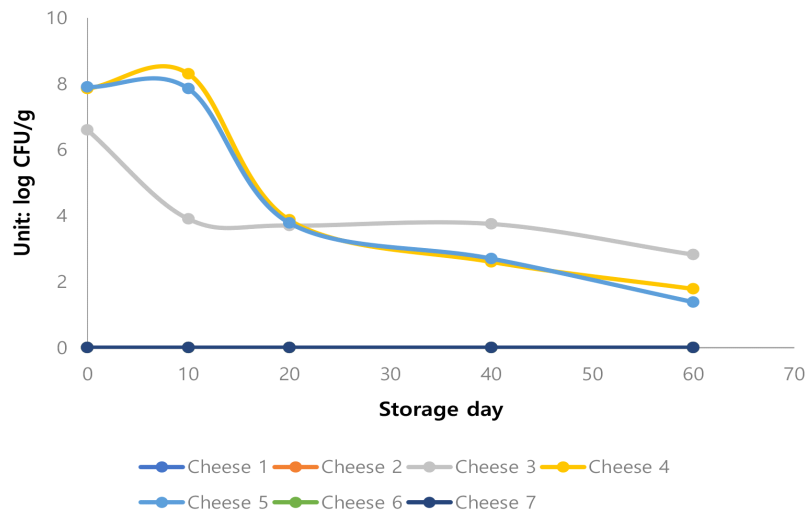


Fig. 7. Comparison of *Salmonella* spp. of various raw milk Gouda cheeses during 60 day storage. Cheese 1 and 2 were raw milk Gouda cheeses; Cheese 3 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp.; Cheese 4 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp. with addition of lactic acid bacteria DH5 isolated from kefir; Cheese 5 was raw milk Gouda cheese inoculated *Salmonella* spp. with addition of lactic acid bacteria DN1 isolated from kefir; Cheese 6 was raw milk Gouda cheese without addition of lactic acid bacteria; and Cheese 7 was Gouda cheese from pasteurized milk.

도 Cheese 3보다 유의적으로 *Salmonella* spp.의 저해를 보였다(Fig. 7). 향후 비살균 치즈 제조시에 첨가될 수 있는 항미생물활력이 우수한 유산균을 사용하여 원유에 오염된 또는 치즈 제조시 오염될 수 있는 다양한 병원성 식중독 미생물 저해에 관한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다. 그리고 Cheese 7는 전통적인 방법인 살균한 원유로 제조한 Gouda 치즈인데, 대장균 및 대장균군, *Salmonella*는 거의 검출되지 않았으며, 유산균은 다른 것들에 비해서 약간 높게 나타났으며, 일반세균수는 20일 검출되고, 그외는 검출되지 않았다(Fig. 3 to Fig. 7).

60일에 Cheese 1부터 Cheese 7까지의 모든 샘플에 대한 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* O157:H7 검사에서 모두 음성으로 판명되었다(data not shown).

우유는 완전식품으로 널리 이용되고 있는 매우 유용한 음식자원 중의 하나이지만, 우유의 품질상 외부의 환경에 매우 쉽게 영향을 받는 식품이기도 하다(Johnson, 2002). 따라서 원유를 살균하지 않고 비살균 치즈 제조시에는 더욱더 엄격한 관리감독이 요구되어지는 것은 사실이다. 최근 Lee와 Yoon(2017)은 미생물학적, 물리적, 그리고 화학적 위해요인이 어떻게 원유 및 치즈에 다양한 오염을 유발할 수 있는지를 보고하였다. 그 중에서 먼저 미생물학적 위해요인을 살펴보면 여기에는 효모, 곰팡이, 병원성 미생물 등이 포함되는데, 특히 높은 치사율을 가지고 있는 세균인 *Listeria monocytogenes* 그리고 *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*는 우유, 치즈, 육류 등 축산물에 주로 존재하는 것으로 알려져 있다(Gohar et al., 2017; Lee and Yoon, 2017). 원유에서는 0.1~20% 그리고 치즈에서는 1.1~26.7% 정도 *L. monocytogenes*가 검출되었다(Seyoum et al., 2015). 원유 및 치즈에서 10.3~76.4% 정도 *E. coli*가 검출되었다(Ombarak et al., 2016). *E. coli* O157:H7은 매우 낮은 0.5~3.8% 정도가 보고되었지만, *E. coli* O157:H7은 Shiga toxin을 생산하는 *E. coli*로, 용혈성 요독증후군(hemolytic uremic syndrome), 출혈성 대장염(hemorrhagic colitis) 등의 심각한 질병을 유발하는 중요한 병원성 세균이다(Ahmed and Shimamoto, 2014; Kiros et al., 2016). 또한 *Salmonella*는 자연계에 널리 존재하는 세균으로 건강한 사람에게에는 치사율이 1% 정도

에 불과하지만, 면역력이 약한 집단(노인, 아이 등)에게는 매우 위험하다(CFSPH, 2013). 원유에서 0.5~6.1% 그리고 치즈에서 0.5~4.3% 정도 *Salmonella*가 검출되었다(Almeida *et al.*, 2007; Ahmed and Shimamoto, 2014). 일반적으로 독소를 생산하기 위해서는 최소 10^5 CFU/g 이상의 *S. aureus*는 균체가 존재하여야 하며, 만약 이 독소를 사람들이 섭취하였을 때 식중독을 유발하는 병원성 세균이다(Rola *et al.*, 2016). 특히 *S. aureus*는 사람의 손, 코 점막, 타액 등에 주로 존재하기 때문에, 작업자들에 의해 원유 및 치즈에 상호 교차오염될 수 있어 특별한 주의가 요구되며, 다른 세균들보다 *S. aureus*는 원유에서는 46.2~73.5%, 치즈에서는 6.3~75%로 높게 검출되었다(André *et al.*, 2008; Kiros *et al.*, 2016; Rola *et al.*, 2016; Lee and Yoon, 2017).

또한 D'Amico 등(2008)은 가공 후 과정을 오염시키는 물질이 *Listeria monocytogenes* 경우에는 60일 숙성과정으로는 살균(또는 비살균) 우유로 제조된 surface-mold-ripened 연질 치즈의 안전성을 보장할 수 없다고 보고하였다. 연구자들은 “이 종류의 치즈는 숙성이 아닌 다른 방법을 사용해서 안정성을 추구해야 되기 때문에 현재 연방 규정을 개정할 필요성이 있다”라고 결론을 내렸다. FDA는 *Listeria monocytogenes* 오염에 중점을 두고 치즈의 안정성에 대한 전국적인 조사를 시행했다(Gould *et al.*, 2014). 이 조사에는 치즈 제조 시설의 규모와 상관없이 살균 및 비살균 치즈 제품을 생산하는 모든 시설이 포함되었다. 11월에 비살균 우유로 제조되었고, 규정에 따라 60일간 숙성시킨 Gouda 치즈에 의한 38건의 질병의 발생을 CDC가 보고한다(US CDC, 2010).

D'Amico 등(2010)의 2012년 12월에 숙성된 Gouda 치즈와 stirred-curd 체다치즈 내에 생존하는 *E. coli* O157:H7 제거에 대한 연구에서 숙성조건이 60일 때 체다치즈의 *Brucella abortus*는 제거할 수 있었지만, 비살균 Gouda 치즈 또는 비살균 stirred-curd 체다치즈 내의 살아있는 *E. coli* O157:H7는 완전히 제거할 수 없다고 보고하였다.

다음으로 물리적 위해요인에는 매우 다양한 것으로 알려져 있지만 충분히 교육을 통해서 예방할 수 있다(Lee and Yoon, 2017). 마지막으로 농약, 항균물질, 호르몬제, 곰팡이 독소 등이 화학적 위해요인이다(Lee and Yoon, 2017). 부적절한 숙성으로 치즈에 ochratoxin A, aflatoxin M1과 같은 곰팡이독소가 오염될 수 있기 때문에 주의해야 한다고 Hymery 등(2014)은 발표하였다. 일반적으로 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*가 생성하는 Aflatoxin 독소는 발암물질 1급으로 IARC(국제암연구소)의해 분류되고 있으며, 특히 Aflatoxin은 열이나 산에도 내성을 가지고 있어 원유에 존재할 경우 매우 위험하다(Anfossi *et al.*, 2012). 왜냐하면 Aflatoxin은 원유나 치즈에 파괴되지 않은 상태로 존재하기 때문이다(Anfossi *et al.*, 2012). Aflatoxin M1의 검출보고에 의하면 우유에서는 21.6~100% 그리고 치즈에서는 47.6~55.0%의 높은 수준을 보였다(Kamkar *et al.*, 2011). 반면 Ochratoxin A는 우유와 치즈에서 각각 4.8%, 32.6%의 비율로 검출되었다(Dall'Asta *et al.*, 2008; Mohajeri *et al.*, 2013). 또한 Dokuzlu와 Tayar(2001) 그리고 Fontaine 등(2015)은 항생제인 penicillin, tetracycline, roquefortine C와 mycophenolic acid, 중금속인 철, 구리 등이 원유와 치즈에서 자주 검출되었다고 보고하였다.

더 나아가서 2018년부터 적용되는 개정된 식품공전의 치즈류의 제조 및 가공기준을 정확히 이해할 뿐만 아니라, 60일 숙성된 비살균 치즈의 안전성에 관한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다(Fig. 8).

따라서 3가지의 다양한 위해요인뿐만 아니라, 식품공전의 치즈류의 기준규격에 근거하여 비살균 치즈 제조와 판매 그리고 치즈 제조 공장에서 이러한 식중독 세균들을 제어하기 위한 과학적 근거 방안과 관련 연구를 통한 구체적인 방법이 확립되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 비살균 원유로 제조되고 숙성실에서 60일 이상 숙성된 7가지의 다양한 Gouda 치즈의

18-9 치즈류

1) 정의

치즈류라함은 원유 또는 유가공품에 유산균, 응유효소, 유기산 등을 가하여 응고, 가열, 농축 등의 공정을 거쳐 제조·가공한 자연치즈 및 가공치즈를 말한다.

2) 원료 등의 구비요건

3) 제조·가공기준

- (1) 치즈용 원유 및 유가공품은 63~65℃에서 30분간, 72~75℃에서 15초간 이상 또는 이와 동등 이상의 효력을 가지는 방법으로 살균하여야 한다. 다만, 2℃ 이상에서 60일 이상 숙성하는 치즈용 원유 및 유가공품은 위에서 정한 온도 등 살균조건을 적용하지 아니할 수 있다.
- (2) 유산균 접종시 이종 미생물에 2차 오염이 되지 않도록 하여야 한다.
- (3) 발효 또는 숙성시에는 표면에 유해미생물이 오염되지 않도록 숙성실의 온도 및 습도관리를 철저히 하여야 한다.
- (4) 가공치즈의 원료로 사용하는 자연치즈는 분쇄한 후 균일한 조직이 되도록 충분히 교반 유화시켜야 한다.

4) 식품유형

- (1) 자연치즈: 원유 또는 유가공품에 유산균, 응유효소, 유기산 등을 가하여 응고시킨 후 유청을 제거하여 제조한 것을 말한다. 또한, 유청 또는 유청에 원유, 유가공품 등을 가한 것을 농축하거나 가열 응고시켜 제조한 것도 포함한다.
- (2) 가공치즈: 자연치즈를 원료로 하여 이에 유가공품, 다른 식품 또는 식품첨가물을 가한 후 유화 또는 유화시키지 않고 가공한 것으로 자연치즈 유래 유고형분 18% 이상인 것을 말한다.

5) 규격

항목유형	자연치즈	가공치즈
(1) 대장균	n=5, c=1, m=10, M=100	-
(2) 대장균군	-	n=5, c=2, m=10, M=100
(3) 살모넬라	n=5, c=0, m=0/25 g	
(4) 리스테리아 모노사이토제네스	n=5, c=0, m=0/25 g	
(5) 황색포도상구균	n=5, c=2, m=10, M=100	
(6) 클로스트리디움 퍼프린젠스	n=5, c=2, m=10, M=100(비살균원유로 만든 치즈에 한한다.)	
(7) 장출혈성 대장균	n=5, c=0, m=0/25 g(비살균원유로 만든 치즈에 한한다.)	
(8) 보존료(g/kg): 다음에서 정하는 이외의 보존료가 검출되어서는 아니된다.		
데히드로초산나트륨	0.5 이하 (데히드로초산으로서)	
소브산	3.0 이하(소브산으로서 기준하며, 프로피온산칼슘 또는 프로피온산나트륨을 병용할 때에는 소브산 및 프로피온산의 사용량의 합계가 3.0 이하)	
소브산칼륨		
소브산칼슘		
프로피온산	3.0 이하(프로피온산으로서 기준하며, 소브산, 소브산칼륨 또는 소브산칼슘을 병용할 때에는 프로피온산 및 소브산의 사용량의 합계가 3.0 이하)	
프로피온산칼슘		
프로피온산나트륨		

6) 시험방법

제7. 일반시험법에 따라 시험한다.

Fig. 8. 2018년 적용 전부개정 식품공전의 치즈류의 기준규격

(출처: 식품의약품안전처고시 제2016-154호 식품의 기준 및 규격 전부개정고시)

미생물학적 안전성을 실험적으로 검증하기 위해서 저장기간 동안에 다양한 미생물학적 변화를 조사하였다. Cheese 1과 2는 전통적인 비살균 Gouda 치즈에 있어서는 60일 저장기간 동안 *Salmonella* spp.는 전혀 검출되지 않았으며, *E. coli*는 20 day부터는 검출되지 않았다. 대장균군은 Cheese 1에서 40 day부터 검출되지 않았지만, Cheese 2에서는 60 day까지 검출되었다. Cheese 1과 Cheese 2는 비살균 Gouda 치즈이기에 약간의 차이는 있었지만 전반적으로 비슷한 경향을 보였다. Cheese 3(원유에 인위적으로 *Salmonella* spp.를 오염시킨 후 제조된 비살균 Gouda 치즈), Cheese 4(Cheese 3에서 kefir에서 분리한 DH5 유산균 첨가)와 Cheese 5(Cheese 3에서 kefir에서 분리한 DN1 유산균 첨가)에 있어서는 60일 저장기간 동안 *Salmonella* spp.의 저해가 관찰되었다. 특히 Cheese 4와 Cheese 5에 추가적으로 첨가된 Kefir에서 분리한 유산균 DH5와 DN1은 Cheese 3보다 유의적으로 *Salmonella* spp.의 저해를 보였다. Cheese 6(유산균첨가 없이 제조된 비살균 Gouda 치즈)에서는 저장기간이 길어질수록 유산균수가 다른 Cheese들에 비해서 유의적으로 낮게 나타났다. 그리고 Cheese 7(살균한 원유로 제조한 전통적인 Gouda 치즈)에 있어서는 대장균 및 대장균군, *Salmonella* spp.는 거의 검출되지 않았고, 유산균은 다른 Cheese들보다 약간 높게 나타났다. 60일 숙성된 Cheese 1부터 Cheese 7까지의 모든 샘플에 대한 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* O157:H7 검사에서 모두 음성을 보였다. 향후 kefir에서 분리한 유산균 DH5와 DN1의 비살균 원유를 이용한 숙성치즈의 제조에 관한 연구가 필요하겠다. 본 연구에서 *Salmonella* spp.를 인위적으로 접종한 Cheese 4와 5에서 보여준 *Salmonella* spp.의 저해 효과는 비살균 원유를 이용한 숙성치즈의 제조에 보다 큰 안전성을 부여할 것이라 사료된다.

감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2017R1D1A1B03035427).

References

- Ahmed, A. M. and Shimamoto, T. 2014. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.* 168:57-62.
- Almeida, G., Figueiredo, A., Rola, M., Barros, R. M., Gibbs, P., Hogg, T. and Teixeira, P. 2007. Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheeses with reference to food safety. *J. Food Prot.* 70:1710-1716.
- André, M. C. D., Campos, M. R. H., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C. and Serafini, A. B. 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsedfield gel electrophoresis following SmaI digestion. *Food Control* 19:200-207.
- Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., D'Arco, G., Passini, C. and Giraudi, G. 2012. Occurrence of aflatoxin M1 in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. *Food Control* 25:125-130.

- Bryan, F. L., Guzewich, J. J. and Todd, E. C. D. 1997. Surveillance of foodborne disease. III. Summary and presentation of data on vehicles and contributory factors: Their value and limitations. *J. Food Prot.* 60:701-714.
- CFSPH (The Center for Food Security and Public Health). 2013. Salmonellosis. Available at: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseasesInfo/factsheets.php>.
- Colonna, A., Durham, C. and Meunier-Goddik, L. 2011. Factors affecting consumers' preferences for and purchasing decisions regarding pasteurized and raw milk specialty cheeses. *J Dairy Sci.* 94:5217-5226.
- D'Amico, D. J., Druart, M. J. and Donnelly, C. W. 2008. 60-day aging requirement does not ensure safety of surface- mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a postprocessing contaminant. *J. Food Prot.* 71:1563-1571.
- D'Amico, D. J., Druart, M. J. and Donnelly, C. W. 2010. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and Stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. *J. Food Prot.* 73:2217-2224.
- Dall'Asta, C., Lindner, J. D. D., Galaverna, G., Dossena, A., Neviani, E. and Marchelli, R. 2008. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chem.* 106:729-734.
- Dokuzlu, C. and Tayar, M. 2001. The detection of antibiotics in raw milk samples in Bursa region. *Vet. Bil. Derg.* 17:153-157.
- Fontaine, K., Passeró, E., Vallone, L., Hymery, N., Coton, M., Jany, J. L., Mounier, J. and Coton, E. 2015. Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined cheeses. *Food Control* 47:634-640.
- Gill, A. and Oudit, D. 2015. Enumeration of *Escherichia coli* O157 in outbreak-associated Gouda cheese made with raw milk. *J Food Prot.* 78:1733-1737.
- Gohar, S., Abbas, G., Sajid, S., Sarfraz, M., Ali, S., Ashraf, M., Aslam, R., and Yaseen, K. 2017. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products. *Matrix Science Medica.* 1:10-14.
- Gould, L. H., Mungai, E. and Behravesh, C. B. 2014. Outbreaks attributed to cheese: Differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. *Foodborne Pathogens and Disease* 11:545-551.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J. L., Barbier, G. and Coton, E. 2014. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 13:437-456.
- Johnson, M. E. 2002. Cheese products. pages 345-384 in *Applied dairy microbiology*. 2nd Ed. E. H. Marth and J. L. Steele, eds. Ch. 11.
- Kamkar, A., Khaniki, G. R. J. and Alavi, S. A. 2011. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Ardebil of Iran. *Iran. J. Environ. Health.* 8:123-128.
- Kim H. S., Chon, J. W., Lim, J. S., Kim, H., Kim, D. H., Song, K. Y., Kim, S. K. and Seo, K. H. 2015. Safety of various types of cheese manufactured from unpasteurized raw milk: A review. *J. Milk Sci. Biotechnol.* 33:1-15.
- Kiros, A., Aylate, A., Thomas, N., Tadesse, B. and Asmare, A. 2016. Bacteriological quality assessment of raw milk and cheese in selected Woreda of Wolaita zone,

- Ethiopia. *Global J. Sci. Front. Res.* 16:37-42.
- Korea Rural Economic Institute. 2014. The second quarter trend of agricultural imported with FTA partners. Available at: http://www.krei.re.kr/web/www/240?p_p_id=EXT_BBS_&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_EXT_BBS_struts_action=%2Fext%2Fbbs%2Fview_message&_EXT_BBS_sCategory=&_EXT_BBS_sKeyType=&_EXT_BBS_sKeyword=&_EXT_BBS_curPage=1&_EXT_BBS_messageId=403315
- Lee, J. and Yoon, Y. 2017. Microbiological safety concerns with dairy products from farmstead plants. *J. Milk Sci. Biotechnol.* 35:215-220.
- McCollum, J. T., Williams, N. J., Beam, S. W., Cosgrove, S., Ettestad, P. J., Ghosh, T. S., Kimura, A. C., Nguyen, L., Stroika, S. G., Vogt, R. L., Watkins, A. K., Weiss, J. R., Williams, I. T. and Cronquist, A. B. 2012. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with in-store sampling of an aged raw-milk Gouda cheese, 2010. *J. Food Prot.* 75:1759-1765.
- McCollum, J., Williams, N. and Beam, S. 2012. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with in-store sampling of an aged raw-milk Gouda cheese, 2010. *J. Food Prot.* 75:1759-1765.
- Mohajeri, F. A., Ghalebi, S. R., Rezaeian, M., Gheisari, H. R., Azad, H. K., Zolfaghari, A. and Fallah, A. A. 2013. Aflatoxin M1 contamination in white and Lighvan cheese marketed in Rafsanjan, Iran. *Food Control.* 33:525-527.
- Omarak, R. A., Hinenoya, A., Awasthi, S. P., Iguchi, A., Shima, A., Elbagory, A. R. M. and Yamasaki, S. 2016. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.* 221:69-76.
- Rola, J. G., Czubkowska, A., Korpysa-Dzirba, W. and Osek, J. 2016. Occurrence of *Staphylococcus aureus* on farms with small scale production of raw milk cheeses in Poland. *Toxins* 8:62.
- Seyoum, E. T., Woldetsadik, D. A., Mekonen, T. K., Gezahegn, H. A. and Gebreyes, W. A. 2015. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw bovine milk and milk products from central highlands of Ethiopia. *J. Infect. Developing Countries* 9:1204-1209.
- Song, K. Y. and Seo, K. H. 2017. Standard specification of raw milk cheese in amended Korean food code and the results of microbial monitoring in raw milk cheese performed by US FDA. *Safe Food* 12:37-46.
- United States Centers for Disease Control and Prevention (US CDC). 2010. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Cheese. Available at: <http://www.cdc.gov/ecoli/2010/cheese0157/index.html>
- Van Hoorde, K., Heyndrickx, M., Vandamme, P. and Huys, G. 2010a. Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiol.* 27:425-433.
- Van Hoorde, K., Van Leuven, I., Dirinck, P., Heyndrickx, M., Coudijzer, K., Vandamme, P. and Huys, G. 2010b. Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. *Int.*

- J. Food Microbiol. 144:226-235.
- Van Hoorde, K., Verstraete, T., Vandamme, P., and Huys, G. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. Food Microbiol. 25:929-935.
- Yang, A. 2009. Effects of containing Surimi on the quality properties of natural cheese (Cheddar, Berg, Gouda). MS. thesis. Sunchon Natl. Univ., Jeollanamdo, Korea.
- 서건호, 송광영. 2017. 일반인과 함께 하는 가정형 자연치즈 제조기술 워크숍 교재. 건국대학교식품 안전건강연구소.
- 식품의약품안전처. 2016. 식품의 기준및규격 전부개정고시행정예고 (식약처 공고 식품의약품안전처 고시 제2016-154호, '16.12.29).
- 식품의약품안전처. 2016. 축산물의 가공기준 및 성분규격 일부 개정고시(안) 행정예고(식약처 공고 제2016-126호, '16.4.4).