

## 내냉성 미생물인 *Acinetobacter* genomospecies 10과 *Serratia liquefaciens*가 원유의 품질에 미치는 영향

신용국<sup>1</sup> · 오남수<sup>1</sup> · 이현아<sup>1</sup> · 남명수\*

충남대학교 농업생명과학대학 동물바이오시스템과학과, <sup>1</sup>서울우유협동조합중앙연구소

### Effects of Psychrotrophic Bacteria *Acinetobacter* genomospecies 10 and *Serratia liquefaciens* on Raw Milk Quality

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

Department of Animal Biosystem Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

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

#### Abstract

This study was conducted to investigate effect of psychrotrophic bacteria on the quality of raw milk. *Acinetobacter* genomospecies 10 was selected as lipolytic species, and *Serratia liquefaciens* as proteolytic species. Lipase present in inoculated raw milk with *Acinetobacter* genomospecies 10 did not affect total solid and fat contents. However, the free fatty acid (FFA) content, especially short chain FFAs, of milk with *Acinetobacter* genomospecies 10 was dramatically increased. FFAs produced by lipolysis of milk fat are important in flavor of dairy products, excessive lipolysis occurring in milk and dairy products could cause off-flavor, and produced FFAs may have an underivable effect on their flavor. In addition, protease influenced the quality of inoculated raw milk with *Serratia liquefaciens*. In degradation patterns of casein by SDS-PAGE analysis from inoculated raw milk with *Serratia liquefaciens*, casein content was gradually decreased during storage at 4°C, and extensive degradation of  $\kappa$ -casein was observed on the storage day of 13. The free amino acids such as leucine, valine, arginine, and tyrosine were dramatically increased, which causes bitter taste in raw milk. These excessive peptides in dairy products, produced by psychrotrophic bacteria, can be possible to develop off-flavors and be responsible for gelling of milk by degradation.

**Key words:** psychrotrophic bacteria, lipase, protease, free fatty acid, free amino acid

#### 서 론

집유과정에서 내냉성 미생물에 오염된 원유는 공장서 저온저장 중 내냉성 미생물의 증식으로 인하여 유제품의 품질이 저하되는 주요한 원인이 되고 있다. 내냉성 미생물은 살균처리과정에서 대부분 사멸하지만 생성된 내열성 효소는 활력을 유지할 수 있으며, 제품의 제조 이후에도 우유단백질과 지질을 분해하여 off-flavor, bitter taste 및 rancidity 등의 좋지 않은 풍미를 생성하고 원유와 유제품의 보존성을 저하시킨다(Rowe *et al.*, 2001). 내냉성 미생물과 원유의 품질과의 상관관계에 관한 연구는 현재까지 지속적으로 활발하게 연구되고 있는데, 대량생산된 원유로부터 분

리한 저온성 미생물의 46%가 *Pseudomonas* 속이며, 그 중 77%는 지방을 분해하고 85%는 케이션을 분해한다고 보고하였다(Bockelmann, 1970). 내냉성 미생물이 생산하는 지방분해효소는 유지방을 분해하여 유리지방산을 생성하며, 지나친 지방의 분해는 원유와 유제품의 rancidity를 초래한다. Kosikowski와 Iwaski(1975)는 원유 내 *P. fluorescens*가 생성한 지방분해효소는 치즈 제조 후에도 잔존하여 중쇄지방산(medium chain fatty acids)을 유리시켜 심각한 off-flavor를 발생시키고, *P. fluorescens*가 생성한 단백질분해효소는  $\kappa$ -casein을 분해하여 para- $\kappa$ -casein의 생성에 의해 멸균유의 gel화를 초래하며, 유단백질에서 유래된 쓴맛아미노산들에 의하여 bitterness와 off-flavor 현상을 나타낸다고 보고하였다. Chung(2000)은 내냉성 미생물이 생산하는 단백질 분해효소를 첨가한 원유로 제조한 Cheddar cheese의 숙성기간 중 쓴맛아미노산의 급격한 증가에 따른 관능상의 bitterness 증가를 보고하였으며, 또한 *Alcaligenes metalcaligenes*와

\*Corresponding author: Myoung Soo Nam, Department of Animal Biosystem Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea. Tel: 82-42-821-5782, Fax: 82-42-823-2766, E-mail: namsoo@cnu.ac.kr

*Pseudomonas viscosa*는 Cottage cheese의 점질막을 형성하여 유제품의 변패에 관여한다고 보고하였다.

본 연구는 오염된 내냉성 미생물이 원유의 품질에 미치는 영향을 연구하기 위하여 지방분해효소와 단백질분해효소의 활성이 높은 균주로 선발된 균주를 원유에 접종하여 저장 중 원유의 품질에 미치는 영향을 조사하는 데 있다.

## 재료 및 방법

### 내냉성 미생물의 배양과 세균수의 측정

내냉성 미생물이 원유에 미치는 영향을 조사하기 위해서 균을 접종하지 않은 대조군과 지방분해효소활성이 높은 균주로 선발된 *Acinetobacter genomospecies* 10과 단백질분해효소활성이 높은 균주로 선발된 *Serratia liquefaciens* (Shin et al., 2013)를 원유에 접종하였다. 원유의 균질은 수행하지 않고 75°C에서 15초간 살균하였고, *Acinetobacter genomospecies* 10은 5.00 Log CFU/mL의 농도로 접종하였으며, *Serratia liquefaciens*는 2.00 Log CFU/mL와 5.00 Log CFU/mL의 농도로 접종한 후 4°C에서 냉장저장하면서 실험을 수행하였다. 원유 내 일반세균수 측정(Wehr and Frank, 2004)은 접종 0일, 3일, 5일, 7일 및 10일에 실시하였다.

### 일반 성분의 분석

원유의 수분, 조지방 및 조단백질 함량 분석은 식품공전(식품의약품안전처, 2010)의 일반성분시험법에 따라 수행하였다. 원유 내 수분, 조지방 및 조단백질 측정은 접종 0일차와 14일차에 실시하였다.

### 유리지방산의 분석

유리지방산의 분석은 De Jong과 Badings(1990)의 방법을 변형하여 FFAP column(50 m × 0.25 mm, 0.25 μm)이 장착된 Agilent model 6890 GC-FID(Agilent, USA)을 사용하였다. Carrier gas(nitrogen)의 유속은 2 mL/min이고, 오븐 온도는 최초 65°C에서 분당 10°C로 높이고 240°C까지 승온시켜 분석하였다. 검출기의 온도는 250°C, 주입구의 온도는 260°C로 조정하여 사용하였다. 유리지방산 분석을 위한 전처리 는 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 표준물질용액을 첨가하였다. 내부표준물질은 enantiic acid(C7:0)와 margaric acid(C17:0)를 사용하였다. 혼합액은 3 mL의 ether/heptane(1:1, v/v) 용액으로 추출하여 2,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 취하였다. 유리지방산의 분리는 anion-exchange method를 사용하였고, aminopropyl column(Waters, USA)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 최종시험용액으로

사용하였다. 원유 내 유리지방산의 분석은 접종 0일, 7일 및 14일에 실시하였고, 최종시험용액은 1 μL 주입하여 유리지방산을 정량하였다.

### SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법(1970)을 변형하여 실시하였다. Gel의 구성은 15%의 resolving gel과 4%의 stacking gel로 사용하였고, 각 lane별로 단백질 20 μg씩 첨가하였다. 단백질 정량은 BCA protein assay kit(Thermo Fisher scientific, USA)를 사용하여 실시하였으며, 표준곡선은 bovine serum albumin으로 작성하였다. SDS-PAGE용 시료는 62.5 mM Tris-HCl(pH 6.8), 2% SDS, 25% glycerol, 0.01% bromophenol blue를 함유한 Laemmli sample buffer(Bio-Rad, USA)와 β-mercaptoethanol (Bio-Rad, USA)을 함께 혼합하여 100°C에서 5분 동안 가온하여 준비하였다. SDS-PAGE는 mini-PROTEIN Tetra Cell(Bio-Rad, USA)을 이용하여 70 V로 전류를 흘려주어 실시하였으며, SDS-PAGE가 끝난 gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250(Bio-Rad, USA)으로 염색하여 밴드를 확인하였다.

### 유리아미노산의 분석

단백질 분해효소활성이 높은 *Serratia liquefaciens*를 5.00 Log CFU/mL의 농도로 접종한 후 4°C에서 냉장저장하면서 실험을 수행하였다.

유리아미노산의 전처리는 AQC-precolumn derivatization 방법(Hong, 1994)으로 실시하였으며, HPLC-FLD(Waters, USA)와 Waters AccQ. Tag amino acid analyzing column(Nova-Pak C<sub>18</sub>, 150 mm × 3.9 mm, 4 μL)을 장착하여 분석하였다. 분석한 아미노산의 종류는 aspartic acid(Asp), serine(Ser), glutamic acid(Glu), glycine(Gly), histidine(His), arginine(Arg), threo-nine(Thr), alanine(Ala), proline(Pro), cysteine(Cys), tyrosine(Tyr), valine(Val), methionine(Met), lysine(Lys), isoleucine(Ile), leucine(Leu) 및 phenylalanine(Phe)로 17종의 아미노산을 분석하였으며, 아미노산 표준물질로 hydrolysate standard(Waters, USA)와 내부표준물질인 aminobutyric acid를 사용하여 유리아미노산을 정량하였다. 표준 시료용액은 아미노산 표준용액(Waters, USA) 40 μL를 취하여 3차증류수 960 μL를 첨가하여 사용하였으며, 내부표준용액(internal standard)은 gamma-aminobutyric acid(Sigma, USA)를 0.1 M HCl에 2.5 mM의 농도로 첨가하여 조제하였다. 시료의 유도체화는 6-aminoquinolyl-N-hydroxy succinimidylcarbamate(AQC), 0.2 M borate buffer 및 DNA-grade acetonitrile로 구성된 유도체화시약 kit(Waters, USA)를 사용하였으며, 유도체시약인 AQC는 acetonitrile을 첨가한 후 55°C에서 10분 동안 가열하며 용해하여 사용하였다. 표준용액의 유도체화는 내부표준용액 40 μL와 아미노산 표준용액 40 μL에 물 920 μL를 첨가한 용액을 10 μL 취하여 0.2 M

borate buffer 70  $\mu$ L를 첨가한 후 수 초간 잘 혼합하고 여기에 AQC용액 20  $\mu$ L를 첨가한 후 실온에서 1분 동안 방치하고, 55°C에서 10분 동안 가열하여 유도체화한 후 표준용액으로 하였다. 시료의 전처리 시료 0.5 g에 증류수 5 mL를 첨가한 후 혼합액에 1 g의 sulphosalicylic acid(Sigma, USA)를 첨가하고 100°C에서 30분 동안 가열하였다. 이후 3,500 g로 15분 동안 원심분리하고 그 상정액을 0.45  $\mu$ m membrane filter(Pall corporation, USA)로 여과한 후 감압농축하여 1 mL의 0.1 N HCl에 녹인 시험용액을 표준용액과 동일한 방법으로 유도체화하였다. 원유 내 유리아미노산 분석은 접종 0일, 7일 및 14일에 실시하였다.

### 통계분석

본 실험은 3반복으로 수행하였으며 실험결과는 SAS 프로그램(2010)을 이용하여 분산분석을 실시하고 Duncan의 다중검정법을 통해 5% 수준에서 처리구 평균값 간의 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 내생성 미생물의 지방분해효소가 원유의 품질에 미치는 영향

#### 일반 성분

선발된 균주(Shin *et al.*, 2013)인 *Acinetobacter* genomospecies 10을 접종한 원유와 접종하지 않은 원유의 총 고형분과 유지방의 함량은 Table 1에 나타내었다. 접종 0일에는 원유의 총 고형분 함량은 12.20%이었으며, 접종 후 14일에 12.45%로서 유의적인 함량 차이가 없는 것으로 나타났다. 유지방의 함량 또한 접종 후 0일에 3.79%이었으며, 접종 후 14일에 3.67%로서 유의적 차이가 없었다. 대조구 역시 접종한 원유와 동일한 경향의 함량 변화를 나타내었다. 따라서 *Acinetobacter* genomospecies 10은 14일의 냉장보관 중 일반 성분의 변화에는 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

**Table 1. Compositional concentrations of inoculated raw milk**

Composition (%)		0 day	14 days
Control	Total solid	12.25±0.18 <sup>a</sup>	12.43±0.07 <sup>a</sup>
	Fat	3.79±0.13 <sup>a</sup>	3.66±0.20 <sup>b</sup>
	Protein	3.19±0.38 <sup>a</sup>	3.17±1.05 <sup>a</sup>
Sample	Total solid	12.20±0.09 <sup>a</sup>	12.45±0.05 <sup>a</sup>
	Fat (5.0 log CFU/mL)	3.79±0.38 <sup>a</sup>	3.67±0.63 <sup>b</sup>
	Protein (5.0 log CFU/mL)	3.20±1.01 <sup>a</sup>	3.18±0.60 <sup>a</sup>

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

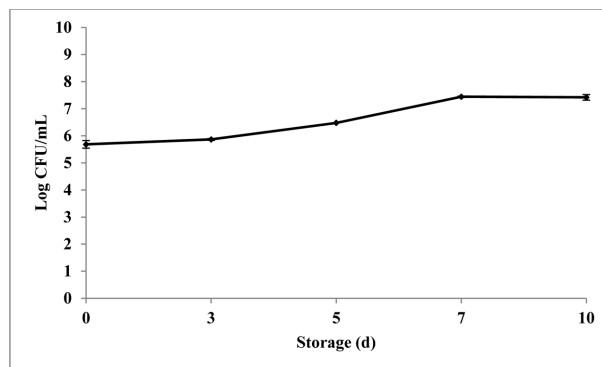
Values were expressed as mean±standard deviation(S.D.)(n=3).

#### 일반 세균수

지방분해효소의 활성이 높은 *Acinetobacter* genomospecies 10을 살균한 원유에 5.00 Log CFU/mL로 접종하여 냉장보관하는 동안 일반 세균수의 변화를 나타낸 것은 Fig. 1과 같다. 접종 후 냉장보관 3일, 5일 및 7일차 원유에서 각각 5.86 Log CFU/mL, 6.48 Log CFU/mL 및 7.44 Log CFU/mL로 점점 증가하는 경향을 나타내었고, 냉장보관 10일째 원유에서는 7.42 Log CFU/mL로 7일차 원유에 비해 큰 변화는 관찰되지 않았다. Sasano 등(1977)은 원유에서 분리한 내생성미생물인 *Pseudomonas A*, *Pseudomonas B*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*를 케이션마이셀용액에 배양하였는데, 그 결과 배양 3일째 6-7 Log CFU/mL로 증식하였고, 5일째는 8 Log CFU/mL로, 10일째는 9 Log CFU/mL까지 증가하였다. 이는 본 연구에서 원유에 접종한 *Acinetobacter* genomospecies 10의 균수 결과보다는 높은 것으로 보고하였는데 이는 내생성 미생물의 종류가 다르기 때문으로 판단된다.

#### 유리지방산

*Acinetobacter* genomospecies 10을 접종한 원유와 접종하지 않은 대조구의 유리지방산 함량은 Table 2와 같다. 생성된 개별 지방산의 특성을 확인하기 위하여 short-chain free fatty acids(SCFFA, C4:0-C8:0), medium-chain free fatty acids(MCFFA, C10:0-C12:0) 및 long-chain free fatty acids(LCFFA, C14:0-C18:2)로 구분하여 나타내었다. *Acinetobacter* genomospecies 10의 접종에 따른 냉장보관기간 중 원유 내 유지방 함량의 변화는 없었던 반면, 이로부터 생성된 지방분해효소의 활성으로 인하여 지방산의 조성은 크게 변화하는 것을 확인하였다. 최초 내생성 미생물의 접종 후 유리지방산(C4:0-C18:2)의 함량은 163.7 mg/kg이었으며, 냉장저장 7일 후에는 185.6 mg/kg으로 증가하였다. 분석종료시점인 14일째의 총 유리지방산은 454.9 mg/kg으로서 냉장저장 7일 이후 약 2.5배 증가하였다. 총 14일의 냉장저장기간 중 SCFFA는 15.8 mg/kg에서 59.1 mg/kg으로 3.7배가 증가하여 가장 높은 증가율을 나타냈으며, MCFFA는 14.0 mg/kg에서 33.1 mg/kg으로 2.4배가 증가하였으며, LCFFA는 133.9 mg/



**Fig. 1. Total bacterial counts from inoculated raw milk with *Acinetobacter* genomospecies 10 during storage at 4°C.**

**Table 2. Concentrations of free fatty acid in inoculated raw milk**

Fatty acid (mg/kg)	0 day	7 days	14 days
C4:0	5.6±0.1 <sup>a</sup>	5.6±0.0 <sup>a</sup>	5.6±0.0 <sup>a</sup>
C6:0	5.0±0.1 <sup>a</sup>	5.0±0.1 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>
C8:0	5.2±0.1 <sup>a</sup>	5.1±0.0 <sup>a</sup>	5.1±0.1 <sup>a</sup>
C10:0	7.1±0.1 <sup>a</sup>	7.2±0.1 <sup>a</sup>	7.2±0.1 <sup>a</sup>
C12:0	6.7±0.4 <sup>a</sup>	6.7±0.1 <sup>a</sup>	7.0±0.1 <sup>a</sup>
C14:0	9.4±0.1 <sup>a</sup>	9.2±0.4 <sup>a</sup>	9.3±0.2 <sup>a</sup>
C16:0	56.4±2.3 <sup>a</sup>	56.6±1.6 <sup>a</sup>	56.5±1.4 <sup>a</sup>
C18:0	34.1±1.1 <sup>a</sup>	35.4±1.4 <sup>a</sup>	36.2±1.6 <sup>a</sup>
C18:1	37.2±0.9 <sup>a</sup>	35.4±1.0 <sup>b</sup>	35.5±0.3 <sup>b</sup>
C18:2	6.4±0.0 <sup>a</sup>	6.3±0.0 <sup>a</sup>	6.3±0.1 <sup>a</sup>
SCFFA	15.8±0.0 <sup>a</sup>	15.8±0.1 <sup>a</sup>	15.7±0.2 <sup>a</sup>
MCFFA	13.8±0.4 <sup>a</sup>	13.9±0.2 <sup>a</sup>	14.2±0.1 <sup>a</sup>
LCFFA	143.5±4.3 <sup>a</sup>	142.9±3.3 <sup>a</sup>	143.7±3.2 <sup>a</sup>
Total FFA	173.1±4.1 <sup>a</sup>	172.6±3.4 <sup>a</sup>	173.7±3.2 <sup>a</sup>
C4:0	5.6±0.0 <sup>a</sup>	9.7±0.1 <sup>b</sup>	33.3±0.0 <sup>c</sup>
C6:0	5.0±0.1 <sup>a</sup>	7.4±0.1 <sup>b</sup>	15.5±0.1 <sup>c</sup>
C8:0	5.2±0.1 <sup>a</sup>	6.3±0.1 <sup>b</sup>	10.2±0.1 <sup>c</sup>
C10:0	7.2±0.1 <sup>a</sup>	8.3±0.2 <sup>b</sup>	16.3±0.1 <sup>c</sup>
C12:0	6.8±0.1 <sup>a</sup>	6.8±0.2 <sup>a</sup>	16.8±0.1 <sup>b</sup>
C14:0	8.9±5.1 <sup>a</sup>	8.7±0.5 <sup>a</sup>	29.5±0.4 <sup>b</sup>
C16:0	52.5±2.7 <sup>a</sup>	56.9±0.4 <sup>a</sup>	107.9±2.6 <sup>b</sup>
C18:0	32.2±2.1 <sup>a</sup>	35.3±0.4 <sup>a</sup>	66.6±1.8 <sup>b</sup>
C18:1	33.3±0.9 <sup>a</sup>	39.2±0.4 <sup>b</sup>	141.3±1.5 <sup>c</sup>
C18:2	7.0±0.6 <sup>a</sup>	7.0±0.2 <sup>a</sup>	17.6±0.2 <sup>b</sup>
SCFFA	15.8±0.2 <sup>a</sup>	23.4±0.3 <sup>b</sup>	59.1±0.2 <sup>c</sup>
MCFFA	14.0±0.2 <sup>a</sup>	15.1±0.3 <sup>b</sup>	33.1±0.2 <sup>c</sup>
LCFFA	133.9±5.3 <sup>a</sup>	147.0±1.8 <sup>b</sup>	362.8±5.9 <sup>c</sup>
Total FFA	163.7±5.1 <sup>a</sup>	185.6±2.3 <sup>b</sup>	454.9±5.8 <sup>c</sup>

<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)

kg에서 362.8 mg/kg으로 2.7배가 증가하였다. 개별 유리지방산의 함량은 LCFFA가 가장 높게 나타났으며, SCFFA에서는 butyrate(C4:0)가 LCFFA에서는 palmitate(C16:0), stearate(C18:0) 및 oleate(C18:1)가 주요 지방산이었다. Ouattara 등(2004)은 13종의 내냉성 미생물을 접종한 원유의 냉장저장기간(10일) 중 유리지방산의 변화를 관찰한 결과 모든 유리지방산이 증가하였으며, 그중 특히 SCFFA의 butyrate(C4:0)와 LCFFA의 oleate(C18:1)가 가장 많이 증가하여 본 연구와 유사한 경향의 결과를 나타내었다. Walstra와 Jenness (1984)는 유지방은 비교적 많은 양의 SCFFA를 포함하고 있으며, 총 지방산 중 SCFFA는 21%를 차지하고 butyrate(C4:0)는 8.5%를 차지하는데, 이러한 SCFFA 중 97%의 butyrate(C4:0)와 84%의 caporate(C6:0)는 triglyceride의 sn-3에 위치한다고 보고하였다(Weihrach, 1988). 본 연구에서 가장 높은 증가율을 보인 SCFFA의 유리지방산은 butyric acid(C4:0)

이었으며, caporate(C6:0)가 두번째로 나타났다. 따라서 원유에 접종한 *Acinetobacter* genomospecies 10이 생성한 지방분해효소는 sn-3에 위치한 지방산의 분해에 특이성이 있는 것으로 사료되었다. 또한 균주를 접종하지 않은 원유의 대조구는 살균 후 총 유리지방산의 함량이 173.1 mg/kg이었고, 냉장저장 14일째는 173.7 mg/kg으로 나타나 유의적인 함량 변화가 없는 것으로 나타났다( $p<0.05$ ). 원유 내 지방분해의 발생원은 indigenous lipase, lipoprotein lipase(LPL) 등이 대표적이며, 지방분해효소는 triacylglyceride의 ester 결합으로부터 유리지방산과 mono 및 diglyceride를 생성하는 반면, LPL은 열에 매우 불안정하여, HTST 살균(72°C, 15 초)에 의하여 거의 불활성화되는 것으로 알려져 있다(Beuivier and Buchin, 2004; Farkye *et al.*, 1995). 시료로 사용된 원유는 지방분해효소활성이 높은 균주의 접종 전 HTST 수준의 살균처리를 하였기 때문에 다른 잡균 없이 오직 원유에 접종된 *Acinetobacter* genomospecies 10에 의해 지방분해효소가 유지방을 분해하여 SCFFA, MCFFA 및 LCFFA의 생성에 직접적인 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 접종한 균주의 지방분해효소가 생성한 원유 내 총 유리지방산의 함량은 정상 원유인 대조구와 비교하여 약 2.6배 이상 높게 나타났다. 생성된 개별 유리지방산의 조성비와 함량은 정상 원유인 대조구와 비교하여 SCFFA, MCFFA 및 LCFFA가 모두 높은 함량을 나타내었으며 이중 특히 SCFFA의 증가율이 가장 높은 것으로 나타났다. 유리지방산은 치즈 등의 풍미를 형성하는 방향성 물질 생성에 직접적인 전구물질로서 매우 중요한 반면, 원유 내의 지나친 지방분해는 지방의 산화에 의한 off-flavor의 발생과 연관되며, 생성된 유리지방산은 중성 지질보다 더욱 산화되기 쉬운 것으로 알려져 있다(Aubourg, 2001). 특히 단쇄지방산과 중쇄지방산의 생성은 강한 풍미의 발생으로 우유의 풍미에 부정적인 영향을 주게 되며, 증가된 유리지방산의 함량이 1.5 mM 이상일 경우 대부분의 소비자에게 거부감을 유발하는 것으로 보고하였다(Urbach, 1993). 따라서 실험에 사용된 *Acinetobacter* genomospecies 10은 원유 내 지방분해를 일으켜 SCFFA와 MCFFA를 현저하게 증가시켰으며, 이로 인하여 이상 풍미 등의 생성에 직접적으로 관여하여 시유의 품질 저하에 영향을 크게 미칠 것으로 사료된다.

### 내냉성 미생물의 단백질분해효소가 원유의 품질에 미치는 영향

#### 일반 성분

단백질 분해활성이 높은 *Serratia liquefaciens*를 접종한 원유와 접종하지 않은 원유의 조단백질 함량은 Table 1에 나타내었다. 접종 0일에 원유의 조단백질 함량은 3.20%로 나타났으며, 접종 후 14일째는 3.18%로서 유의적인 함량 차이가 없는 것으로 나타났다. 대조구 역시 접종한 원유와 동

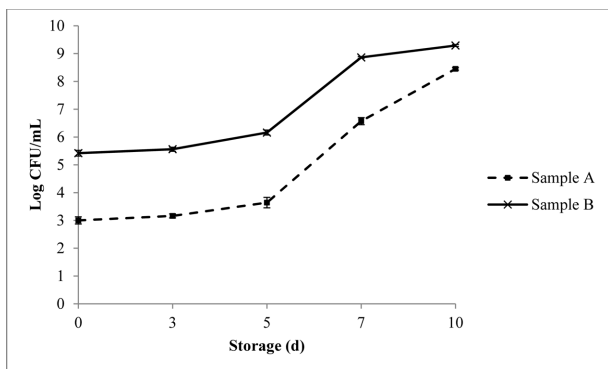


Fig. 2. Total bacterial counts from inoculated raw milk with *Serratia liquefaciens* during storage at 4°C. Sample A; inoculated raw milk with *Serratia liquefaciens* 1×10<sup>2</sup> CFU/mL, Sample B; inoculated raw milk with *Serratia liquefaciens* 1×10<sup>5</sup> CFU/mL.

일한 경향의 함량 변화를 나타내었다. 따라서 *Serratia liquefaciens*는 14일의 냉장보관 중 조단백질 함량의 변화에 영향이 없는 것으로 확인되었다.

일반 세균수

높은 단백질 분해효소의 활성을 나타낸 *Serratia liquefaciens*를 농도별로 접종하여 냉장저장하는 동안 일반 세균수의 변화는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 접종 농도는 2.00 Log CFU/mL와 5.00 Log CFU/mL의 두 가지 조건으로 설정하였으며, 2.00 Log CFU/mL로 접종한 시료의 경우 접종 후 냉장저장 3일, 5일, 7일 및 10일째 원유에서 각각 3.16 Log CFU/mL, 3.64 Log CFU/mL, 6.57 Log CFU/mL 및 8.45 Log CFU/mL로 증식하였으며, 5.0 Log CFU/mL로 접종한 시료는 각각 5.56 Log CFU/mL, 6.16 Log CFU/mL, 8.86 Log CFU/mL 및 9.29 Log CFU/mL로 증식함을 알 수 있었다. 두 시료 모두 냉장보관 5일까지는 균이 서서히 증가하다가 5일

이후부터 급격히 증가함을 알 수 있었으며, 2.00 Log CFU/mL로 접종한 시료의 경우에는 냉장저장 7일 이후부터 다시 완만한 증가 추세를 나타내었다.

단백질의 조성

단백질 분해효소의 활성이 높은 *Serratia liquefaciens*를 농도별로 접종한 원유의 단백질 조성변화를 분석하기 위하여 SDS-PAGE를 수행한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 2.00 Log CFU/mL의 농도로 접종한 원유의 냉장저장에서 10일까지는 원유의 케이스린 조성에 큰 변화가 나타나지 않았으나, 저장 13일째부터는 α-케이스린 및 κ-케이스린의 밴드가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 5.00 Log CFU/mL의 농도로 접종한 원유의 저장기간 중 변화는 저장 10일까지는 큰 변화가 없었으나, 저장 13일째 시료에서는 κ-케이스린의 밴드가 거의 사라진 것으로 확인되었다. 따라서 내생성 미생물, 특히 *Serratia liquefaciens*가 생성한 단백질 분해효소는 κ-케이스린을 분해하여 전체적인 케이스린마이셀구조의 안정성에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 이는 Fajardo-Lira 등(2000)의 보고와도 유사한 결과로 *Pseudomonas fluorescens* M3/6 균주를 우유에 접종하여 7°C에서 저장하면서 SDS-PAGE를 통해 케이스린과 유청분획으로 나누어 단백질 조성을 비교분석하였다. 그 결과, 접종 3일째 시료에서 케이스린이 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며 이는 본 연구의 *Serratia liquefaciens*를 접종한 저장 13일째 원유에서 κ-케이스린이 분해되는 시기보다는 더 짧은 시간이었다. Fairbairn과 Law(1986)는 대표적인 내생성 미생물의 하나인 *Pseudomonas* 속의 경우, 대부분의 단백질 분해효소는 κ-케이스린과 para-κ-케이스린을 분해하여 케이스린마이셀을 불안정화시켜 우유의 응고작용에 영향을 미친다고 보고하였다. 또한 Barnes 등(1999)은 원유 내 내생성 미생물에 의한 단백질 분해는 유단백질 중 특히 κ-케이스린과 β-케이스린에서 발

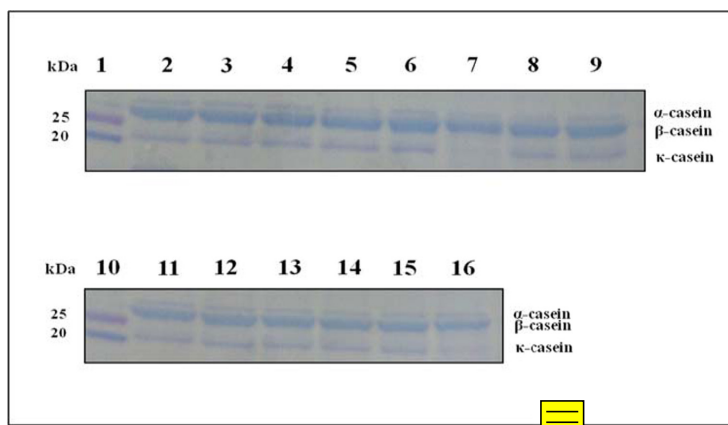


Fig. 3. Changes pattern of casein from inoculated raw milk inoculated with *Serratia liquefaciens* during storage at 4°C. Lane 1,10; prestained molecular mass standard (kilodalton), Lane 2; 0 day, Lane 3; 3 days, Lane 4; 5 days, Lane 5; 7 days, Lane 6; 10 days, Lane 7; 13 days, Lane 2~7; inoculated 10<sup>2</sup> CFU/mL, Lane 8; uninoculated raw milk, Lane 9; pasteurized milk, Lane 11; 0 day, Lane 12; 3 day, Lane 13; 5 day, Lane 14; 7 day, Lane 15; 10 day, Lane 16; 13 day, Lane 11~16; inoculated 10<sup>5</sup> CFU/mL.

생한다는 연구결과를 발표하였다. Sasano 등(1977)은 4종의 원유에서 분리한 내냉성 미생물, 즉 *Pseudomonas A*, *Pseudomonas B*, *Flavobacterium* 및 *Klebsiella*에 의한 유단백질 조성 변화에서 *Pseudomonas A*는 우유에 접종한 지 5일만에, *Pseudomonas B*와 *Flavobacterium*은 접종 10일만에  $\alpha_s$ -케이신과  $\beta$ -케이신이 완전히 분해되었으며, 4종 중 *Pseudomonas B*와 *Flavobacterium* 균종만이 접종 10일 후에  $\beta$ -락토글로불린이 분해되었다고 보고하였다. 또한 Kikuchi와 Matsui(1974)는 원유에서 분리한 내냉성미생물을 케이신배양액에 7°C로 배양한 결과, 배양 10일째 케이신이 22.7%가 분해되었고, 20°C인 경우 배양 2일째 20.2%가 분해되었다. 지방분해활성은 7°C에서 배양 10일째 지방이 22.3%가 분해되었고, 20°C에서는 배양 2일째 22.2%가 분해되었다고 보고하였다. Miura 등(1977)은 내냉성미생물인 *Flavobacterium*과 *Pseudomonas* 균의 케이신 분해활성을 비교한 결과, *Flavobacterium*의 활성이 더 높은 것을 확인하였고, 5°C에서 배양하였을 때 14일 후부터 케이신이 현저히 감소하여 28일째에는 대부분 분해되었음을 확인하였다.

#### 유리아미노산

단백질 분해효소의 활성이 높은 *Serratia liquefaciens*를 접종한 원유의 유리아미노산 조성을 분석한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 균을 접종하지 않은 대조구(A)와 5.00 Log CFU/mL의 조건으로 균주를 접종한 원유(B)의 총 유리아미노산 함량은 각각 188.3 mg/kg과 191.3 mg/kg이었다. 저장 14일후에는 대조구의 총 유리아미노산은 256.4 mg/kg으로 증가하였고, 균주를 접종한 원유의 총 유리아미노산은 719.8 mg/kg으로 증가하여 대조구와 비교하였을 때 2.8배 이상 많은 양이 생성된 것으로 나타났다. 균주 접종 0일의 아미노산 조성은 threonine이 86.7 mg/kg으로 가장 높았으며, proline > arginine > histidine > aspartic acid 순으로 높게 나타났다. 대조구 역시 threonine의 함량이 88.5 mg/kg으로 가장 높았으며, proline > arginine > histidine > aspartic acid 순으로 높게 나타났다. 균주 접종 14일째 원유의 아미노산 조성은 threonine 함량이 201.9 mg/kg으로 가장 높았으며, proline > leucine > lysine > valine 순으로 0일의 조성과는 다른 결과인 반면 대조구는 0일과 동일한 조성을 나타내어 내냉성 미생물을 접종한 원유는 냉장보관 중 소수성으로서 쓴맛을 내는 아미노산인 leucine, lysine 및 valine 등의 뚜렷한 증가를 보여주었다. 내냉성 미생물의 단백질 분해효소는 원유 내 단백질 분해를 통하여 bitter peptide를 생성하여 쓴맛 등의 풍미를 발생시키고, 유리된 아미노산들의 반응은 가운 시 갈변화를 유발하는 등 원유의 품질에 부정적인 영향을 주게 되며, 특히 케이신마이셀의 안정화에 중요한 역할을 하는  $\kappa$ -케이신의 분해는 우유의 응고를 유발하는 주요 원인이 되었다(Punch *et al.*, 1965). Lee 등(1993)은 *Pseudomonas fluorescens*의 단백질 분해효소를 처

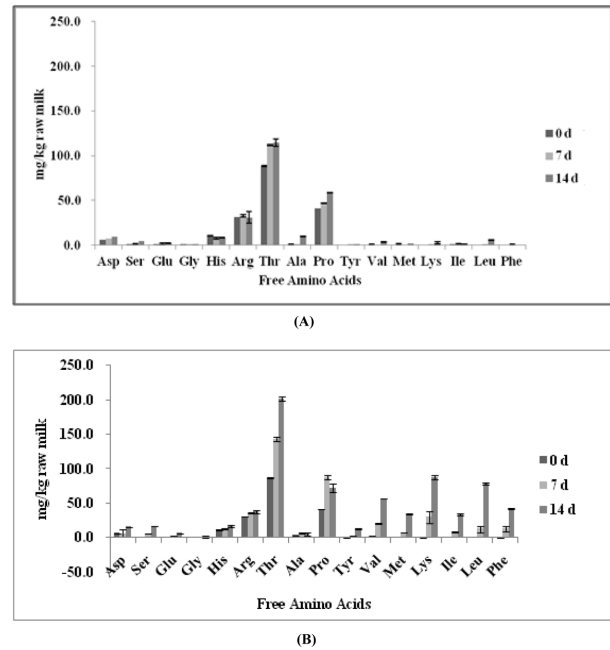


Fig. 4. Concentration of free amino acids in raw milk without (A) and with inoculation (B). Asp;aspartic acid, Ser; serine, Glu;glutamic acid, Gly;glycine, His;histidine, Arg;arginine, Thr;threonine, Ala;alanine, Pro;proline, Cys;cysteine, Tyr;tyrosine, Val;valine, Met;methionine, Lys;lysine, Ile;isoleucine,Leu;leucine, Phe;phenylalanine.

리한 원유를 사용하여 Cheddar cheese를 제조하였을 때 숙성 중 대조군과 비교하여 월등히 많은 양의 쓴맛 아미노산의 증가를 나타내었으며, 특히 valine, phenylalanine, leucine, lysine 등이 많이 생성된다고 보고하였다. 또한 Adams 등(1976)은 그램음성 내냉성미생물의 수가 5 Log CFU/mL 이상이면 상온 저장 7일째에 우유의 응고현상이 관찰된다고 보고하였다. 따라서 냉장저장기간 중 단백질 분해효소활성이 높은 균주를 접종한 원유는 대조구와 비교할 경우 급격한 유리아미노산의 증가를 보여 유단백질의 분해로 인한 우유의 품질 저하와 쓴맛을 내는 아미노산 조성의 증가로 풍미에 매우 나쁜 영향을 끼칠 것으로 판단되었다.

## 요 약

살균한 원유에 지방분해효소와 단백질 분해효소활성이 가장 높게 나타났던 균주를 접종하고 저장하면서 내냉성미생물이 생성하는 효소가 원유의 품질에 미치는 영향을 조사하였다. 지방분해효소활성이 높은 *Acinetobacter genomospecies 10*은 냉장저장기간 중 총 고형분과 유지방의 함량에 영향을 미치지 않았고, 지방의 분해는 냉장보관 14일째에 대조구와 비교하여 2.6배 이상의 유리지방산을 생성하였다. 생성된 지방산의 조성은 short chain free fatty acid(SCFFA), middle chain free fatty acid(MCFFA) 및 long chain free

fatty acid(LCFFA)를 모두 생성하였으며, 특히 SCFFA와 MCFFA의 증가율이 높았다. 단백질 분해효소활성이 높은 *Serratia liquefaciens*은 원유의 총 고형분과 유단백질 함량에 영향을 미치지 않았고, 단백질 조성의 변화는 냉장저장기간 동안 케이신의 함량이 서서히 감소하다가 10일째부터  $\kappa$ -케이신의 함량이 현저히 감소하였다. 유리아미노산은 대조구와 비교하여 냉장저장 14일째 2.8배 이상 생성되었으며 특히 소수성 아미노산으로 쓴맛을 내는 leucin, valine 등의 함량이 급격히 증가하였다.

### 참고문헌

- Adams, D. M., Barach, J. T., and Speck, M. L. (1976) Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultra high temperature treatment. *J. Dairy Sci.* **59**, 823-827.
- Aubourg, S. P. (2001) Fluorescence study of the pro-oxidant effect of free fatty acids in marine lipids. *J. Sci. Food Agr.* **81**, 385-390.
- Barnes, L. M., Lo, M. F., Adans, M. R., and Chamberlain, A. H. L. (1999) Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microb.* **65**, 4543-4548.
- Beuving, E. and Buchin, S. (2004) Raw milk cheeses. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. and Guinee, T. P. (eds) Academic Press, London, pp. 319-345.
- Bockelmann, I. V. (1970). *Int. Dairy Congr.*, 1E, 106.
- Chung, C. I. (2000) Quality of milk and psychrotrophic bacteria. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* **18**, 38-46.
- Fairbairn, D. J. and Law, B. A. (1986) Proteinases of psychrotrophic bacteria-their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* **53**, 139-177.
- Fajardo-Lira, C., Oria, M., Hayes, K. D., and Nielsen, S. S. (2000) Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. *J. Dairy Sci.* **83**, 2190-2199.
- Farkye, N. Y., Imafidon, G. I. and Fox, P. F. (1995) Thermal denaturation of indigenous milk enzymes. In: Heat induced changes in milk. Fox, P. F. (2<sup>nd</sup>ed.) International Dairy Federation, Brussels, pp. 331-348.
- Hong, J. L. (1994) Determination of amino acids by pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carba-mate and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* **670**, 59-66.
- De Jong, C. and Badings, H. T. (1990) Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Res. Chromatog.* **13**, 94-98.
- Kikuchi, M., and Matsui, Y. (1974b) Transition of the number of bacteria and bacterial flora in bulk-cooled milk. *Jpn. J. Dairy Sci.* **45**, 592-596.
- Kosikowski, F. V., and Iwaski, T. (1975) Changes in cheddar cheese by commercial enzyme preparation. *J. Dairy Sci.* **58**, 963.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, K. W., Suh, D. S., and Kwak, H. S. (1993) Impact of psychrotroph-originated enzyme in accelerated Cheddar cheese ripening. I. Hydrolysis of casein. *Foods Biotech.* **2**, 111-116.
- Miura, H., Mikami, M., and Ishioroshi, M. (1977) Decomposition of casein by psychrotrophic organisms. *Res. Bull. Obihiro Univ.* **10**, 461-470.
- Ouattara, G., Jeon, I., Hart-Thakur, R., and Schmidt, K. (2004) Fatty acids released from milk fat by lipoprotein lipase and lipolytic psychrotrophs. *J. Food Sci.* **69**, 659-664.
- Punch, J. D., Olson, J. C., and Thomas, E. L. (1965) Psychrophilic bacteria. III. Population levels associated with flavor or physical change in milk. *J. Dairy Sci.* **48**, 1179-1183.
- Rowe, M. T., Dunstall, G., Kilpatrick, D., and Wisdomm, G. B. (2001) A study of changes in the psychrotrophic microflora of raw milk during refrigerated storage. *Milchwissenschaft* **56**, 247-250.
- SAS. (2010) SAS/STAT Software for PC. Release 9.1, SAS institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sasano, M., Okada, M., Chonan, T., and Oura, Y. (1977) Proteolysis of milk protein by psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **48**, 403-409.
- Shin, Y. K., Oh, N. S., Lee, H. A., and Nam, M. S. (2013) Seasonal, Regional Distribution and Identification of Psychrotrophic Bacteria in Milk. *CNU J. Agric. Sci.* **40**, 27-34.
- Urbach, G. (1993) Relations between cheese flavor and chemical composition. *Int. Dairy J.* **3**, 389-422.
- Walstra, P. and Jenness, R. (1984) Dairy chemistry and physics. John Wiley and Sons, NY, pp. 465.
- Wehr, H. M. and Frank, J. F. (2004) Standards methods for the examination of dairy products. American public health association, Washinton DC, pp. 153-168.
- Wehrauch, J. (1988) Fundamentals of dairy chemistry. In: Lipid of milk: Deterioration, Wong, N., Jenness, R., Keeney, M., and Marth, E. (eds), Van Nostrand Reinhold Co., NY, pp. 215-278.
- Korean Food Standards Codex. (2010) Ministry of Food and Drug Safety. pp. 10-1-1.1-35.

(Received 2013.4.19/Revised 2013.8.19/Accepted 2013.8.22)