

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 우유 단백질과 물리화학적 특성의 변화

이설희¹ · 김건^{1,2} · 박영서^{1*}
¹가천대학교 식품생물공학과, ²BK bio

Changes of Proteins and Physicochemical Properties of Cow's Milk by High Voltage Pulsed Electric Field Treatment

Sulhee Lee¹, Gun Kim^{1,2}, and Young-Seo Park^{1*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University
²BK bio, Co., Ltd.

Abstract

Raw milk, skim milk, HTST-, LTLT-, and UHT-milk were treated with pulsed electric field (PEF) process and the changes in proteins and physicochemical properties of milk were examined. When protein profiles in samples were identified by SDS-PAGE, the denaturation of milk proteins by PEF treatment was not observed. When the denaturation temperature (Td) of milk proteins was analyzed with a differential scanning calorimetry (DSC), the Td of skim milk treated with PEF at 65°C increased from 87.66 to 97.18°C, which indicated that PEF treatment affected the denaturation of milk protein. The PEF treatment of raw milk and skim milk resulted in the decrease of alkaline phosphatase activity, whereas protease and lactoperoxidase activities were not affected. Raw milk treated with PEF at 65°C showed more browning reaction than non-treated raw milk. The pH and titratable acidity of milk were not affected by PEF treatment.

Key words: pulsed electric field, milk protein, non-thermal sterilization

서 론

우유는 완전식품이라 불리는 영양학적 가치가 높은 식품 중 하나이고, 그 외에도 면역글로블린, 락토페린 등을 비롯한 여러 생리활성 물질을 함유하고 있는 식품이다(Kim, 1997). 국내에서 원유는 보통 ultra high temperature(UHT) 처리 후 포장되거나 무균상태에서 포장되는 우유가 있는데, 무균포장의 경우 국내 6 주, 외국에서 최대 6 개월까지 보존이 허용된다(Yoon et al., 1990). 그러나 일반적으로 우유는 불안정한 보존성으로 인하여 유통기한이 길지 않고, UHT, high temperature short time(HTST), low temperature long time(LTLT) 등 현재 우유의 살균법은 가열공정이 포함되므로 유용한 기능성 단백질의 불활성화가 우려된다.

최근 신선식품의 소비가 높아지고, 건강에 대한 인식이 향상됨에 따라 식품의 영양적 성분과 더불어 관능적 특성

을 변화시키지 않는 비가열 살균법의 관심이 증대되고 있는데(Park et al., 2010; Lim et al., 2012a), 현재 식품에 사용되는 비가열 살균기술에는 이온화조사, 여과살균, 화학제, 고전압 펄스 전기장(high voltage pulsed electric fields, PEF), 오존살균, 광펄스, 감압방전플라즈마 살균, 초고압 등이 있다(Park et al., 2006; Park et al., 2010; Choi & Lee, 2012; Mok & Jeon, 2013). 현재 PEF는 식품산업에서 비가열 살균 처리 기술로 다른 살균법과 병용 처리하여 문제점을 극복하고 있다(Min et al., 2003). PEF를 식품에 이용하게 된 기간은 길지 않지만 영양적 손실을 최소화할 수 있는 특성을 응용하여 적용하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있는데, 아직까지 식품 산업 분야에서는 액상식품에 한정되어 적용되고 있다(Lim et al., 2012). PEF는 살균과 추출 같은 다양한 공정에 응용되고 있는데, Shin & Shin (2007)은 자색 고구마로부터 색소 추출에 PEF를 이용하여 추출효율을 연구하였고, Lim et al.(2012b)은 수삼에 PEF 처리하여 건조시간을 단축시켰고, 가용성 고형분의 추출시간을 감소시킬 수 있는 연구를 진행하였으며, Son & Shin (2008)는 PEF 처리 시 *Saccharomyces cerevisiae*의 사멸에 미치는 영향에 대해서 조사하였는데, 산성식품, 2가 이온이 포함된 식품의 살균에 PEF 처리가 효과적임을 보고하였다.

*Corresponding author: Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea
Tel: +82-31-750-5378; Fax: +82-31-750-5273
E-mail: ypark@gachon.ac.kr
Received July 31, 2013; revised August 13, 2013; accepted August 13, 2013

현재 우유의 살균은 열처리 방법을 사용하고 있는데, 이러한 열처리로 인하여 향미성분이 증진되고, 점도나 저장성 등이 향상된다(Kim et al., 1992). 그러나 우유를 가열 살균하였을 때, 고온에서 일어나는 화학적 변화가 일어나게 되고 우유의 단백질 변성에도 영향을 끼친다는 연구결과가 보고되었다. Kim et al.(1992)은 우유의 가열처리에 따른 지표물질의 변화를 확인하였고, Chung & Kim(1994)은 콩우유와 우유를 혼합한 음료에 있어 혼합유의 가용성 단백질에 있어 가열온도가 미치는 영향을 조사하였다.

본 연구는 비가열 살균방법인 PEF를 사용하여 살균 공정 별로 우유를 처리하였을 때, 우유 단백질의 변화를 파악하고 분석하여, 기존의 가열 살균 우유와 병용처리 시 어떠한 특성이 변화하는지 파악하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

사용 시료

본 연구에 사용된 균질화된 원유와 유지방 함량이 0.03%(w/v) 이하인 탈지유, 원유를 75°C에서 15초간 살균한 HTST 우유, 원유를 135°C에서 3초간 처리한 UHT 우유는 서울우유협동조합으로부터 공급받았으며, LTLT 우유는 65°C에서 30분간 저온 살균된 시판 우유를 시중 마트에서 구입하여 사용하였다.

우유의 펄스전기장(PEF) 처리

우유 시료의 PEF 처리는 중앙대학교 식품공학과에서 보유하고 있는 펄스 제네레이터(Pulse generator, DIL, Germany)를 이용하였다.

우유의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동

우유 시료 중에 존재하는 단백질의 정량은 Bradford (1976) 방법을 이용하였다. SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 실시하였으며, 이 때 separating gel의 농도는 12.5%로 하였다. 전기영동 후 band의 정량적 분석은 Image J 프로그램(Wayne Rasband, the Research Services Branch of the National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 수행하였다.

시차주사열량계를 이용한 단백질의 열변성도 측정

우유 시료 내에 존재하는 단백질의 열변성 정도는 가천대학교 나노입자지역혁신센터에 의뢰하여 시차주사열량계(differential scanning calorimetry, DSC, SDT Q600 V20.9 Build 20, DSC-TGA, TA Instruments, New Castle, DE, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정을 위한 단백질은 30 mg을 사용하였으며 N₂ gas의 유속은 100 mL/min로 하였고 실온에 150°C까지 5°C/min의 속도로 온도를 상승시키면서 이에 따른 단백질의 열변성 정점 온도(denaturation

temperature, Td)를 측정하였다.

효소활성 측정

우유 중에 존재하는 alkaline phosphatase, protease, lactoperoxidase 활성은 원심분리를 통해 지방을 제거한 우유를 사용하여 측정하였다. Alkaline phosphatase의 활성측정은 100 mM glycine 완충용액(100 mM glycine, 1.0 mM magnesium chloride, 1.0 mM zinc chloride, pH 10.4) 2.6 mL와 60 mM *p*-nitrophenyl phosphate 용액 0.3 mL를 cuvette에 취하여 550 nm에서 흡광도의 값이 안정화가 될 때까지 방치한 후 공시험의 경우에는 0.1 mL의 1.0 mM MgCl₂ 용액을, 본 시험의 경우 0.1 mL의 우유를 가한 뒤 5분간 흡광도를 기록하여 최대 직선기울기로 변화량을 측정하여 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Alkaline phosphatase (Unit/mL)} = \frac{(\Delta A_{405 \text{ nm/min Test}} - \Delta A_{405 \text{ nm/min Blank}})(3)(df)}{(18.5)(0.1)}$$

여기서 3은 활성 측정을 위한 반응 용액의 총 부피(mL)이고, df는 희석배수, 18.5는 405 nm에서 *p*-nitrophenol의 흡광계수, 0.1은 사용한 효소의 부피(mL)이다.

Protease 활성은 Vazquez Peyronel & Cantera(1995)의 방법을 변형하여 측정하였으며, 기질로는 azo-casein(Sigma, St. Louise, MO, USA)을 사용하였다. Azo-casein 2 g을 100 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0) 100 mL에 용해한 후, azo-casein 기질용액 0.5 mL에 우유 시료 용액 0.05 mL와 혼합하여 40°C에서 24시간 반응시켜 azo기를 유리시켰다. 여기에 12%(w/v) trichloroacetic acid 1 mL를 가하여 잔존활성을 실험시키고 반응하지 않은 azo-casein은 4°C에서 30분간 침전시킨 후 9,950×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액 500 μL를 취한 후 동량의 0.5 M NaOH 용액을 가하여 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소 활성 1 unit은 분당 440 nm에서의 흡광도를 0.001 증가시키는 양으로 정하였다.

Lactoperoxidase의 측정은 3.0 mL의 1 mM ABTS(sodium phosphate 완충용액, pH 7.0)과 0.1 M PBSG(0.1% gelatin을 함유하는 PBS, pH 7.0)로 5 배 희석한 우유 시료를 0.1 mL 혼합한 후 0.1 M 과산화수소 용액을 0.1 mL 가하여 2분간 412 nm에서의 흡광도를 기록하였다. 공시험으로는 0.1 M 과산화수소 용액을 첨가하지 않고 ABTS 용액과 우유 시료만을 혼합한 용액을 사용하였다. 효소 활성 1 unit은 주어진 조건에서 분당 1 μmol의 ABTS를 산화시키는 효소의 양으로 정하였으며 아래 식을 사용하여 활성을 계산하였다.

$$\text{Lactoperoxidase activity (Unit/mL)} = \frac{\Delta 412 \text{ nm} \times 3.2}{32.4 \times 0.1 \times 2}$$

여기서 3.2는 반응용액의 총 부피(mL)이고, 32.4는 흡광

계수(1 mmol/Lcm), 0.1은 측정 한 효소의 양(mL), 2는 반응 시간(min)이다.

적정 산도와 pH의 측정

우유 시료 9 mL에 10 mL의 증류수를 가하여 희석한 후, 0.1% 페놀프탈레인 용액 0.5 mL를 첨가한 다음, 30초 동안 미홍색이 없어지지 않을 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 그 소비량을 % 적정 산도로 나타내었다. 산도는 유산(0.1 N NaOH 1 mL = 유산 0.009 g)으로 표시하였다. 우유의 pH는 pH meter(FE-20K, METTLER TOLEDO, Columbus, OH, USA)를 사용하여 측정하였다.

우유의 갈색도 및 색도의 측정

우유의 갈색도를 측정하기 위하여 우유 시료를 적당량 희석한 후 420 nm에서의 흡광도를 분광광도계(Shimadzu, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 우유의 색도는 색도계(Minolta CR-200, Konica Minolta Holdings, Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 Hunter 값인 L*(명도), a*(적색도), b*(황색도) 값을 측정하였다.

통계분석

모든 실험은 3 번 반복하여 평균과 표준편차를 구하였으며, 얻은 실험값의 통계분석은 SAS ver. 9.2(2008)를 이용하였으며 Duncan의 중범위검정($\alpha = 0.05$)을 실시하여 유의차를 분석하였다.

결과 및 고찰

SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용한 우유 단백질 변성 측정

우유 시료를 가열처리 시 열에 의한 단백질의 변성이 발생되면 해당 단백질은 3 차구조가 파괴됨에 따라 응집 침전되어 SDS-PAGE 상에서 band로 나타나지 않게 된다. Fig. 1의 panel A는 원유와 50°C와 65°C에서 각각 PEF 처리를 한 원유에 대한 SDS-PAGE 사진이고, panel B는 SDS-PAGE에 나타난 단백질 band들에 대하여 Image J를 이용하여 densitogram을 나타내었다. SDS-PAGE 상에서 분자량 30 kDa 주변에서 주요 band로 나타나는 단백질들은 α -casein과 β -casein이며, 19 kDa의 단백질 band는 γ -casein, κ -casein, β -lactoglobulin이 겹쳐 나타나는 것으로 판단되었다. 또한 α -lactalbumin과 bovine serum albumin이 각각 14.1과 69 kDa 위치에서 나타났으며, 고분자량 단백질 band가 bovine serum albumin band 위에 나타났는데 이들은 우유 내에 존재하는 소량 단백질들로 여겨진다. Fig. 2에는 탈지유와 50°C와 65°C에서 각각 PEF 처리를 한 탈지유에 대한 SDS-PAGE 결과를 나타내었는데, 원유에서와 같이 PEF 처리에 의해 단백질의 열변성은 발생하

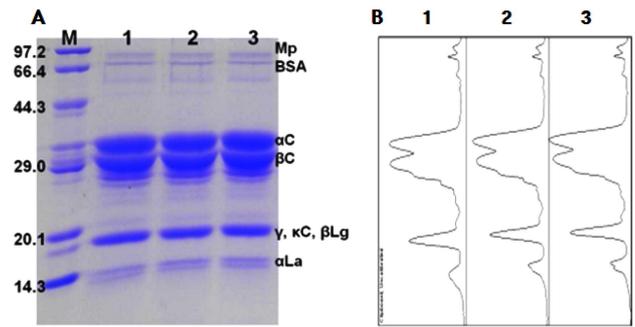


Fig. 1. Analysis of SDS-PAGE of raw milk treated with PEF. Panel A. SDS-PAGE: Lane M, molecular weight marker; 1, untreated; 2, treated with PEF at 50°C; 3, treated with PEF at 65°C. Panel B. Densitogram of SDS-PAGE: 1, untreated; 2, treated with PEF at 50°C; 3, treated with PEF at 65°C.

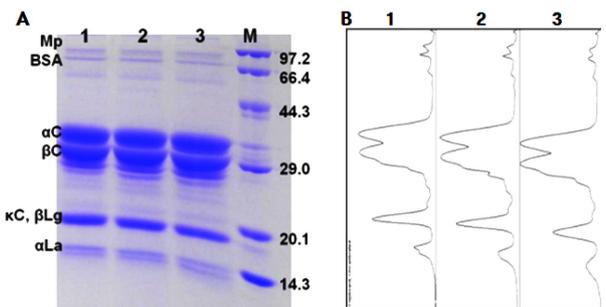


Fig. 2. Analysis of SDS-PAGE of skim milk treated with PEF. Panel A. SDS-PAGE: Lane M, molecular weight marker; 1, untreated; 2, treated with PEF at 50°C; 3, treated with PEF at 65°C. Panel B. Densitogram of SDS-PAGE: 1, untreated; 2, treated with PEF at 50°C; 3, treated with PEF at 65°C.

지 않는 것이 확인되었다. Fig. 3은 50°C와 65°C에서 각각 PEF 처리를 한 HTST 우유에 대한 SDS-PAGE 결과를 나타내었는데 50°C에서 PEF 처리한 시료의 경우 β -casein band 하단에 다수의 단백질 band가 나타났는데 65°C에서 PEF 처리한 시료에서는 나타나지 않은 것으로 미루어 볼 때 50°C PEF 처리 시료는 PEF 처리에 의해 분해된 것이 아니라 시료 자체의 문제로 분해된 것으로 판단된다. Fig. 4에는 LTLT 우유와 50°C와 65°C에서 각각 PEF 처리를 한 LTLT 우유에 대한 SDS-PAGE 결과를 나타내었는데, 원유나 탈지유와 유사하게 단백질은 PEF에 의한 영향을 받지 않았다. Lin et al.(2010)은 원유와 가열 온도 및 시간을 달리한 우유와 시판되고 있는 UHT 우유를 SDS-PAGE로 단백질의 band를 확인하였는데, 가열 온도와 시간을 증가시킬수록 β -lactoglobulin, BSA, α -lactalbumin의 band가 점차 없어지는 것을 관찰할 수 있었다. 본 연구결과는 비가열 처리이기 때문에 원유, HTST, LTLT 우유에 존재하는 단백질들은 PEF 처리에 의해 열변성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다.

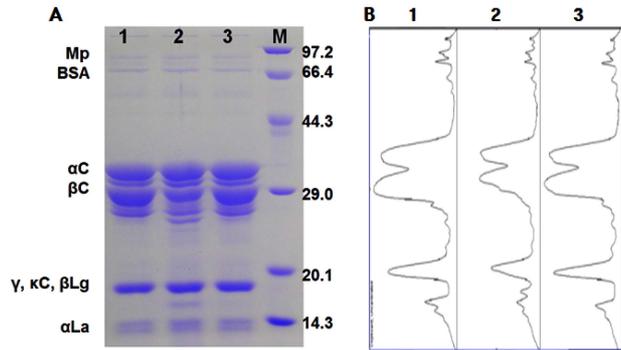


Fig. 3. Analysis of SDS-PAGE of HTST milk treated with PEF. Panel A. SDS-PAGE: Lane M, molecular weight marker; 1, untreated; 2, treated with PEF at 50°C; 3, treated with PEF at 65°C. Panel B. Densitogram of SDS-PAGE: 1, untreated; 2, treated with PEF at 50°C; 3, treated with PEF at 65°C.

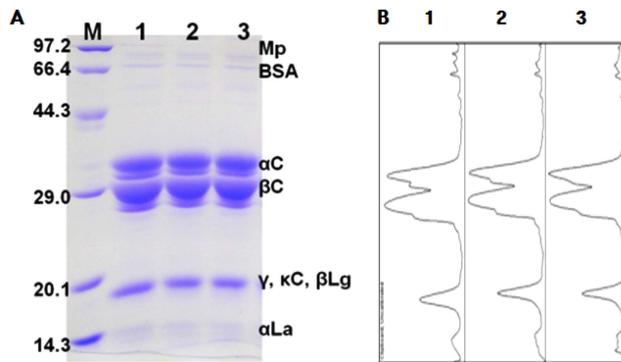


Fig. 4. Analysis of SDS-PAGE of LTLT milk treated with PEF. Panel A. SDS-PAGE: Lane M, molecular weight marker; 1, untreated; 2, treated with PEF at 50°C; 3, treated with PEF at 65°C. Panel B. Densitogram of SDS-PAGE: 1, untreated; 2, treated with PEF at 50°C; 3, treated with PEF at 65°C.

시차주시열량계를 이용한 우유 단백질 변성 측정

우유의 살균 공정 별 단백질의 변성을 측정하기 위해 DSC를 이용하여 우유의 열변성 정점 온도(denaturation temperature, Td)를 측정하여 분석하였다. 각 공정 별 Td를 Table 1에 나타내었는데, 원유를 각각 50°C와 65°C에서 PEF 처리한 시료를 분석한 결과 PEF 처리를 하지 않은 원유의 Td는 79.65°C와 114.54°C로 나타났고, 50°C에서 PEF 처리를 한 원유의 Td는 80.88°C, 104.89°C로 계산되었으며, 65°C에서 PEF 처리를 한 원유의 Td는 80.34°C, 109.45°C로 계산되었다. PEF 처리를 하지 않은 원유와 PEF 처리한 원유의 Td가 큰 차이를 나타내지 않았는데 이는 PEF 처리가 원유 내에 존재하는 단백질들의 구조 변화 또는 열변성 특성에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단하였다. 탈지유의 Td는 87.66°C, 50°C와 65°C에서 PEF 처리를 한 탈지유의 Td는 각각 88.89°C, 97.18°C로 계산되어 50°C에서의 PEF 처리는 탈지유에 존재하는 단백질의 Td에 영향을 미치지 못하였으나 65°C에서 PEF 처리한 우유의

Table 1. Denaturation temperature of proteins in milk treated with PEF.

Milk type	Denaturation temperature (°C)
<i>Raw milk</i>	
Untreated	79.65, 114.54
Treated with PEF at 50°C	80.88, 104.89
Treated with PEF at 65°C	80.34, 109.45
<i>Skim milk</i>	
Untreated	87.66
Treated with PEF at 50°C	88.89
Treated with PEF at 65°C	97.18
<i>HTST milk</i>	
Untreated	107.98
Treated with PEF at 50°C	107.78
Treated with PEF at 65°C	108.20
<i>LTLT milk</i>	
Untreated	108.24
Treated with PEF at 50°C	110.48
Treated with PEF at 65°C	106.40
<i>UHT milk</i>	
	108.08

Td는 약 10°C 가까이 증가하여 탈지유에 존재하는 단백질의 구조에 미약하지만 약간의 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 한편 HTST 우유의 Td는 107.98°C로 계산되었고, 50°C와 65°C에서 PEF 처리를 한 HTST 살균 우유의 Td는 각각 107.78°C와 108.20°C로 계산되어, HTST 살균 우유도 원유와 같이 PEF 처리에 의해 단백질의 구조가 변화하지는 않는 것으로 확인되었다. 또한 LTLT 우유의 Td는 108.24°C로 계산되었고, 50°C와 65°C에서 PEF 처리를 한 LTLT 살균 우유의 Td는 각각 110.48°C와 106.40°C로 계산되어, LTLT 살균 우유도 PEF 처리가 우유 내에 존재하는 단백질의 구조를 변화시키지 않는 것으로 확인되었다. 한편 원유와 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유의 Td를 비교하였을 경우, 원유와 원유 이외의 우유와는 Td의 개수에 차이가 나타났는데 이는 탈지유의 경우 우유에 존재하는 지방을 제거하여 지방과 단백질과의 상호작용 및 열 전달에 영향을 받았기 때문일 것으로 사료되고, HTST 우유와 LTLT 우유 및 UHT 우유의 Td가 열처리를 하지 않은 원유나 탈지유의 Td와 20°C 이상의 차이를 나타내어 HTST, LTLT 또는 UHT 살균에 의해 우유 내에 존재하는 단백질의 구조에 많은 변화가 있는 것으로 판단되었다. 본 연구의 대조구 시료로 사용된 UHT 우유의 경우에는 Td가 108.08°C로 HTST 우유, LTLT 우유의 Td와 유사한 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. Lee and Hong(2002)은 holo- α -lactalbumin, apo- α -lactalbumin, holo- α -lactalbumin과 apo- α -lactalbumin의 혼합물의 열변성을 DSC로 측정한 결과 holo- α -lactalbumin의 Td는 92.98°C, apo- α -lactalbumin의 Td는 54.43°C였으며, 이들 혼합물의 Td는 각각 74.29°C와 89.52°C를 나타내었다고 보고하였다. 이들의 결과는

holo- α -lactalbumin의 Td는 64.3°C, apo- α -lactalbumin의 Td는 35.0°C였다는 Boye and Alli(2000)의 연구결과와 비교하였을 때 Td에서는 다소 차이가 있었으나 holo- α -lactalbumin의 Td가 apo- α -lactalbumin의 Td보다 높은 경향은 유사하였다. 이러한 Td의 차이는 실험에 사용된 시료의 농도와 측정기기의 종류 및 측정 조건 등이 기인하는 것으로 사료된다(Lee and Hong, 2002). Holo- α -lactalbumin의 Td가 apo- α -lactalbumin의 Td보다 2 배 가까이 높아 열변성에 저항성이 있음을 보여주고 있는데, 이는 Holo- α -lactalbumin에 Ca²⁺ 이온이 결합되어 3 차 구조의 열안정성을 증진시키기 때문이라고 보고된 바 있다(Relkin, 1996, Parris et al., 1991). 또한 Lee and Hong(2002)은 holo- α -lactalbumin과 apo- α -lactalbumin의 혼합물에 대한 Td를 측정한 결과, apo- α -lactalbumin은 단독으로 열처리했을 때보다 Td가 약 20°C 상승하였고, holo- α -lactalbumin은 약 3°C 가량 저하되었는데, 이는 apo- α -lactalbumin이 열에 더 안정한 holo- α -lactalbumin의 영향을 받아 Td가 더 상승하면서 열에 조금 더 안정한 상태가 된 것이라고 설명하였으며, apo- α -lactalbumin이 holo- α -lactalbumin보다 열처리 시 더 불안정하고 열에 의한 영향을 더 많이 받는다고 판단하였다. Lee and Hong(2002)은 β -lactoglobulin의 Td가 91.9°C이며, α -lactalbumin과 혼합되었을 때 α -lactalbumin의 열변성에 영향을 주고 열에 더 불안정하게 된다고 보고하였다. pH에 의존적인 β -lactoglobulin은 산성 조건에서 열에 매우 안정하지만, pH 7에서는 51°C에서부터 변화가 일어나고 pH 9에서는 47°C에서부터 열에 의한 변성이 시작된다고 알려져 있다(Boye and Alli, 2000). Park and Lund(1984)는 DSC를 이용하여 β -lactoglobulin의 열안정성을 측정하였는데, pH 4.0이나 9.0보다 5.0부터 8.0까지에서 열에 의한 변성이 더욱 심하며, lactose에 의해 열변성 정도가 감소한다고 보고하였다. Antoine and De Souza(2007)도 DSC를 이용하여 유청 단백질의 열안정성을 측정한 결과, pH 3.8에서 95°C로 5분간 유청 단백질을 가열하며 광범위한 단백질의 응집이 발생하고, pH 3.5에서 β -lactoglobulin의 Td는 81.9°C로 계산되었으며, α -lactalbumin의 Td는 pH에 상관없이 61.5°C에서 58.6°C로 β -lactoglobulin보다 낮았다고 보고하였다.

우유의 살균공정별 잔존 효소활성 측정

우유의 가열 시 대부분의 효소는 불활성화되거나 효소활성이 급격하게 감소하는데, 본 연구에서는 alkaline phosphatase, protease, lactoperoxidase를 측정하여 분석하였다. Table 2에 원유, 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유와 이들 우유를 50°C 또는 65°C에서 PEF 처리를 한 시료, UHT 우유에 대하여 alkaline phosphatase, protease, lactoperoxidase의 효소활성을 측정한 결과를 나타내었다. Alkaline phosphatase는 원유의 경우 PEF 처리에 의해 효소활성이 감소하였는데

Table 2. Enzyme activities in milk sterilized with various sterilization processes.

Milk type	Enzyme activity (U/mL)		
	Alkaline phosphatase	Protease	Lactoperoxidase
<i>Raw milk</i>			
Untreated	0.88±0.05 ^{a1)}	0.87±0.03 ^b	0.11±0.01 ^a
Treated with PEF at 50°C	0.73±0.03 ^b	0.87±0.05 ^b	0.10±0.00 ^c
Treated with PEF at 65°C	0.50±0.05 ^c	0.85±0.08 ^b	0.10±0.01 ^c
<i>Skim milk</i>			
Untreated	0.41±0.07 ^{cd}	0.83±0.25 ^b	0.11±0.01 ^{ab}
Treated with PEF at 50°C	0.35±0.07 ^d	0.81±0.41 ^b	0.12±0.01 ^a
Treated with PEF at 65°C	0.32±0.08 ^d	0.85±0.19 ^b	0.10±0.01 ^{bc}
<i>HTST milk</i>			
Untreated	- ²⁾	0.79±0.02 ^b	0.05±0.00 ^d
Treated with PEF at 50°C	-	0.80±0.05 ^b	0.04±0.00 ^c
Treated with PEF at 65°C	-	0.75±0.04 ^b	0.04±0.00 ^{de}
<i>LTLT milk</i>			
Untreated	-	0.89±0.08 ^b	-
Treated with PEF at 50°C	-	0.78±0.01 ^b	-
Treated with PEF at 65°C	-	0.77±0.04 ^b	-
<i>UHT milk</i>			
Untreated	-	0.80±0.08 ^b	-

¹⁾Means in a column with same superscript letter(s) are not significantly different ($p > 0.05$).

²⁾Not detectable

50°C보다 65°C에서 활성이 더욱 감소하여 온도의 영향을 많이 받음을 알 수 있었다. 탈지유의 경우에는 PEF 처리에 의해 효소활성이 약간 감소하였으며 50°C와 65°C PEF 처리는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 한편 HTST 우유, LTLT 우유와 UHT 우유에서는 효소 활성이 완전히 소실되었다. Lorenzen et al.(2010)의 연구에서 가열 처리하지 않은 원유의 alkaline phosphate 효소활성은 1.126 U/mL이었고, LTLT 살균에 해당하는 62°C에서 30분, 65°C에서 32분간 가열하였을 때, 각각 0.318, 0.042 U/L로 측정되어 효소활성이 급격히 감소하였으며, HTST 살균에 해당하는 75°C에서 28초간 가열하였을 때, 0.946 U/mL이었던 효소활성이 0.026 U/L로 보고하였다. 본 연구결과에서 원유와 탈지유를 PEF 처리하였을 때, 효소활성의 큰 변화가 없는 것으로 관찰되어 PEF 처리가 효소활성에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단하였다. Protease는 열에 상당히 강하여 HTST나 LTLT 또는 UHT 살균에 의해 효소활성이 소실되지 않았으며, PEF 처리에 의해서도 효소 활성이 소실되지 않음을 알 수 있었다. Lactoperoxidase는 LTLT 살균에 의해 불활성화되지만 PEF 처리에 의해서는 효소활성이 소실되지 않는 것으로 나타났다. 그에 반해 원유, 탈지유, HTST 우유는 효소활성이 0.12-0.04 U/mL로 관찰되었는데, Fonteh et al.(2002)은 우유와 염소유에 함유되어 있는 lactoperoxidase와 thiocyanate를 연구한 결과 우유에서 측정된 lactoperoxidase의 효소활성은 1.5-2.7 U/mL로 측정되었

고, Dumitrascu et al.(2012)의 연구에서는 염소, 양, 소의 원유를 시료로 lactoperoxidase의 효소활성을 측정하였는데, 그 중 소의 우유의 효소활성은 0.97 U/mL로 보고하여 본 연구결과와는 약 10 배의 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Dumitrascu et al.(2012)은 우유를 74°C까지 올렸을 때, 효소활성이 50% 감소하였는데, 본 연구결과에서 나타난 바와 같이 효소활성이 나타나지 않은 LTLT, UHT 우유와 활성이 적게 측정된 HTST 우유와 유사한 결과를 보여주었다.

우유의 살균 공정별 유당의 갈색화 반응 측정

Table 3에는 원유, 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유와 이들 우유를 50°C 또는 65°C에서 PEF 처리를 한 시료, UHT 우유에 대하여 갈색화 반응 여부를 420 nm에서의 흡광도로 표시하였다. 원유와 탈지유를 비교할 경우 탈지유의 갈색화 정도가 유의적으로 낮게 나왔는데 이는 지방의 제거에 의해 우유에 대한 빛의 흡수도가 달라졌기 때문으로 판단된다. HTST 우유, LTLT 우유, UHT 우유는 가열 살균에 의해 원유보다 매우 높은 갈색화 수치를 나타내었다. HTST 우유는 LTLT 우유보다 높은 갈색화 수치를 나타내었으나, 유의적인 차이는 보여주지 않았다. UHT 우유의 경우에는 원유 등 다른 우유에 비해 유의적으로 높은 갈색화 수치를 나타내었으며 이는 높은 온도에 의해 Maillard 반응이 더욱 발생하였기 때문으로 사료된다. 우유에서 Maillard 반응은 유당과 우유 단백질의 lysine 잔기의 ϵ -amino group이 반응하여 이루어지기 때문에 고온에서 열처리 에 의해 Maillard 반응이 발생하여 lysine이 손실된다

Table 3. Browning reaction of milk sterilized with various sterilization processes.

Milk type	Absorbance at 420 nm
<i>Raw milk</i>	
Untreated	69.70±5.35 ^{d1)}
Treated with PEF at 50°C	81.13±12.41 ^d
Treated with PEF at 65°C	122.43±29.26 ^c
<i>Skim milk</i>	
Untreated	11.50±0.72 ^e
Treated with PEF at 50°C	13.73±2.25 ^e
Treated with PEF at 65°C	15.53±0.35 ^e
<i>HTST milk</i>	
Untreated	156.40±7.20 ^b
Treated with PEF at 50°C	162.40±2.50 ^b
Treated with PEF at 65°C	167.10±5.47 ^b
<i>LTLT milk</i>	
Untreated	149.80±5.67 ^b
Treated with PEF at 50°C	155.70±4.71 ^b
Treated with PEF at 65°C	165.10±4.37 ^b
<i>UHT milk</i>	
	208.30±6.59 ^a

¹⁾Means in a column with same superscript letter(s) are not significantly different ($p > 0.05$).

(Shimamura & Ukeda, 2012). HTST 우유와 LTLT 우유의 경우 50°C PEF 처리한 것보다 65°C에서 PEF 처리한 것이 갈색화 수치가 약간 높아졌으나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 원유의 경우에는 50°C PEF 처리한 것보다 65°C에서 PEF 처리한 것이 갈색화 정도가 유의적으로 높았으나 HTST 우유나 LTLT 우유 또는 UHT 우유보다는 낮은 갈색화 수치를 나타내었다.

우유의 살균 공정별 산도와 pH의 변화량

우유의 pH는 통상적으로 25°C의 온도에서 pH 6.5-6.7을 나타낸다. 본 연구에서 사용한 원유, 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유와 이들 우유를 50°C 또는 65°C에서 PEF 처리를 한 시료, UHT 우유의 pH와 산도를 Table 4에 나타내었다. 탈지유와 HTST 우유, LTLT 우유 및 HTS 우유는 원유에 비해 유의적으로 높은 pH 값을 나타내었으며, 이에 따라 산도는 낮은 수치를 나타내었다. pH는 HTST 우유가 pH 7.03-7.08로 가장 높았으며 UHT 우유와 LTLT 우유, 탈지유의 순으로 높은 값을 나타내었다. 산도는 원유가 0.33-0.35%로 가장 높은 값을 나타내었으며 그 다음으로 탈지유가 높았고, HTST 우유, LTLT 우유 및 HTST 우유는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이들 우유를 50°C 또는 65°C에서 PEF 처리하였을 경우 산도의 변화는 관찰되지 않았고 pH의 경우에도 PEF 처리 여부에 따라 유의적인 차이는 있었으나 크게 변화하지는 않았다. Jung(1999)은 PEF처리 후, pH는 6.5-6.7사이의 값을 유지하였으며, 적정 산도의 경우 0.16-0.17%의 값을 유지하며 유의할 만한 변화가 없는 것을 보고하여, PEF로 우유를 처리했을 때 우

Table 4. pH and titratable acidity of milk sterilized with various processes.

Milk type	pH	Titratable acidity (%)
<i>Raw milk</i>		
Untreated	6.40±0.01 ^{g1)}	0.35±0.02 ^a
Treated with PEF at 50°C	6.51±0.01 ^f	0.32±0.02 ^a
Treated with PEF at 65°C	6.50±0.01 ^f	0.33±0.03 ^a
<i>Skim milk</i>		
Untreated	6.67±0.01 ^e	0.21±0.23 ^b
Treated with PEF at 50°C	6.66±0.00 ^e	0.20±0.16 ^b
Treated with PEF at 65°C	6.66±0.01 ^e	0.22±0.36 ^b
<i>HTST milk</i>		
Untreated	7.08±0.02 ^a	0.14±0.02 ^c
Treated with PEF at 50°C	7.05±0.02 ^b	0.14±0.03 ^c
Treated with PEF at 65°C	7.03±0.01 ^b	0.16±0.02 ^c
<i>LTLT milk</i>		
Untreated	7.00±0.01 ^c	0.13±0.02 ^c
Treated with PEF at 50°C	7.00±0.02 ^c	0.15±0.01 ^c
Treated with PEF at 65°C	6.98±0.02 ^{cd}	0.14±0.01 ^c
<i>UHT milk</i>		
	6.97±0.03 ^d	0.14±0.01 ^c

¹⁾Means in a column with same superscript letter(s) are not significantly different ($p > 0.05$).

Table 5. Hunter's color value of milk sterilized with various processes.

Milk type	L*	a*	b*
<i>Raw milk</i>			
Untreated	27.78±1.69 ^{b1)}	2.62±0.02 ^c	34.98±0.04 ^d
Treated with PEF at 50°C	28.13±0.02 ^b	2.45±0.01 ^d	35.18±0.02 ^{cd}
Treated with PEF at 65°C	27.79±0.01 ^b	2.42±0.02 ^d	35.18±0.02 ^{cd}
<i>Skim milk</i>			
Untreated	42.09±0.39 ^a	2.31±0.03 ^{de}	36.03±0.03 ^b
Treated with PEF at 50°C	41.87±0.53 ^a	2.29±0.01 ^e	36.19±0.56 ^a
Treated with PEF at 65°C	41.24±1.11 ^a	2.12±0.23 ^f	36.26±0.59 ^{bc}
<i>HTST milk</i>			
Untreated	25.03±5.82 ^{bc}	2.69±0.01 ^c	31.62±0.09 ^f
Treated with PEF at 50°C	20.09±0.14 ^d	3.04±0.02 ^a	30.11±0.20 ^h
Treated with PEF at 65°C	20.56±0.13 ^d	2.88±0.00 ^b	30.73±0.16 ^g
<i>LTLT milk</i>			
Untreated	25.81±0.11 ^{bc}	1.14±0.00 ^{hi}	35.68±0.12 ^b
Treated with PEF at 50°C	25.24±0.08 ^{bc}	1.39±0.01 ^g	35.55±0.11 ^{bc}
Treated with PEF at 65°C	25.65±0.07 ^{bc}	1.21±0.01 ^h	35.79±0.09 ^b
<i>UHT milk</i>			
	23.61±0.13 ^c	1.08±0.01 ⁱ	34.25±0.17 ^c

¹⁾Means in a column with same superscript letter(s) are not significantly different ($p > 0.05$).

우유의 선도와 품질에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 판단할 수 있었다.

우유의 살균 공정에 따른 우유의 색도

Table 5에는 원유, 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유와 이들 우유를 50°C 또는 65°C에서 PEF 처리를 한 시료, UHT 우유에 대하여 Hunter's 색도를 측정하였는데, 밝기를 나타내는 L*값과 적색도를 나타내는 a*값, 청색도를 나타내는 b*값으로 나누어 측정되었다. L*값의 경우 살균에 의하여 L*값의 감소가 나타나는 것을 볼 수 있는데, 원유보다 HTST 우유와 LTLT 우유의 L*값이 낮은 것이 확인되었고, HTST 우유와 LTLT 우유보다 UHT 우유의 L*값이 낮은 것으로 나타났다. 또한 지방을 제거한 탈지유는 다른 우유들보다 월등히 L*값이 높았는데, 이는 지방제거에 의하여 우유의 밝기가 높아진다고 사료된다. HTST 우유를 제외한 원유, LTLT 우유와 UHT 우유에서 50°C와 65°C PEF 처리에 있어서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, a*값의 경우 원유와 HTST 우유와는 유사한 값을 나타내었고 탈지유, LTLT 우유와 UHT 우유는 원유보다 낮은 값을 나타내었다. PEF 처리하였을 경우 살균처리하지 않은 원유와 탈지유는 PEF 처리에 의해 a*값이 유의적으로 증가한 반면, 살균 처리한 HTST 우유, LTLT 우유와 UHT 우유의 값은 감소한 것으로 나타났다. b*값은 모든 우유에 있어서 PEF 처리에 의한 영향을 받지 않았다.

이상의 연구결과를 종합하면 원유, 탈지유 HTST 우유 및 LTLT 우유를 PEF 처리한 후 우유 중에 존재하는 단백질의 변성 여부를 DSC, SDS-PAGE를 이용하여 조사한 결과

PEF의 처리 조건(50°C, 65°C)에 관계없이 PEF 처리가 우유 중에 존재하는 단백질을 변성시키지 않는다는 것을 확인하였다. 또한 살균 공정 별로 PEF 처리한 우유의 pH, 산도, 색도 및 갈색화 반응 결과를 분석한 결과 LTLT나 HTST 및 UHT 처리와 비교할 때 PEF 처리가 우유의 물리화학적 성질을 크게 변화시키지 않는다는 것을 확인하였다.

요 약

Pulsed electronic field(PEF) 처리에 의한 우유 단백질과 물리화학적 특성의 변화를 확인하기 위하여 원유, 탈지유, HTST, LTLT, UHT 우유를 PEF 처리하였다. 시료 중의 단백질을 SDS-PAGE로 확인하였을 때, PEF 처리에 의한 우유 단백질의 변성은 관찰할 수 없었다. Differential scanning calorimetry(DSC)로 우유 단백질의 열변성 정점 온도(Td)를 분석한 결과, 탈지유를 65°C에서 PEF 처리하였을 때 Td가 87.66°C에서 97.18°C로 증가하여 PEF 처리가 우유 단백질의 변성에 영향을 미치는 것을 확인하였다. PEF 처리에 의한 alkaline phosphatase, protease, lactoperoxidase의 잔존 효소활성을 측정한 결과, 원유와 탈지유에서 alkaline phosphatase는 PEF 처리에 의해 효소활성이 감소하였다. 또한 protease와 lactoperoxidase의 활성은 PEF 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 65°C에서 PEF 처리한 원유는 처리하지 않은 원유보다 높은 갈색도를 나타내었으나, 기타 우유는 PEF에 의한 유의적인 차이가 없었다. 우유를 PEF 처리하였을 경우 산도의 변화는 관찰되지 않았고 pH의 경우에도 PEF 처리 여부에 따라 유의적인 차이는 있었으나 크게 변화하지는 않았다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Antoine EM, De Souza CH. 2007. Study by differential scanning calorimetry of the thermal stability of whey proteins concentrate. *Biotechnol.* 6: 431-435.
- Boye JI, Alli I. 2000. Thermal denaturation of mixtures of α -lactalbumin and β -lactoglobulin: a differential scanning calorimetric study. *Food Res. Int.* 33: 673-682.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Choi GH, Lee KH. 2012. Effect of ozone treatment for sanitation of egg, *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 32: 198-2013.
- Chung NY, Kim WJ. 1994. Factors affecting on protein stability of mixed cow and soy milk. *Korean J. Food Nutr.* 7: 345-352.

- Dumitrascu L, Stanciu N, Stanciu S, Rapeanu G. 2012. Thermal inactivation of lactoperoxidase in goat, sheep and bovine milk—a comparative kinetic and thermodynamic study. *J. Food Eng.* 113: 47-52.
- Fonteh FA, Grandison AS, Lewis MJ. 2002. Variations of lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cows' and goats' milk throughout lactation. *J. Dairy Res.* 69: 401-409.
- Jung KJ. 1999. Pasteurization of milk using continuous pulsed electric fields system. MS thesis. Yonsei Univ., Seoul, Korea.
- Kim GM, Hong YH, Lee YK. 1992. Changes of indicative substances according to heat treatment of milk. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21: 390-397.
- Kim GY. 1997. Functionality and Nutrition of milk. *Korean Soybean Digest* 14:113-117.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee YR, Hong YH. 2002. Heat-induced reaction of bovine whey proteins. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 22: 179-182.
- Lim JH, Ahn SH, Lee DU, Kim YH, Park KJ. 2012a. Effects of pulsed electric fields on juice expression characteristics of *Malus pumila* fruit. *Korean J. Food Preserv.* 19: 665-671
- Lim JH, Shim JM, Lee DU, Kim YH, Park. 2012b. Pulsed electric fields effects on drying of white ginseng and extraction of soluble components. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 704-710.
- Lin S, Sun J, Cao D, Cao J, Jiang W. 2010. Distinction of different heat-treated bovine milks by native-PAGE fingerprinting of their whey proteins. *Food Chem.* 121: 803-808.
- Lorenzen PC, Martin D, Radecher C, Barth K, Knappstein K. 2010. Activities of alkaline phosphate, γ -glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. *Small Rumin. Res.* 89: 18-23.
- Min S, Jin ZT, Min SK, Yeom H, Zhang QH. 2003. Commercial-scale pulsed electric field processing of orange juice. *J. Food Sci.* 68: 1265-1271.
- Mok CK, Jeon HJ. 2013. Low pressure discharge plasma inactivation of microorganisms in black pepper powder, *Food Eng. Prog.* 17: 43-47.
- Park JY, Na SY, Lee YJ. 2010. Present and future of non-thermal food processing technology, *Food Sci. Ind.* 43: 2-20.
- Park KH, Lund DB. 1984. Colorimetric study of thermal denaturation of β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 67: 1699-1706.
- Park WJ, Jwa MK, Hyun SH, Lim SB, Song DJ. 2006. High hydrostatic pressure sterilization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli* in raw oyster. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 935-939.
- Parris N, Purcell JM, Ptashkin SM. 1991. Thermal denaturation of whey proteins in skim milk. *J. Agric. Food Chem.* 39: 2167-2170.
- Relkin P. 1996. Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: 565-601.
- SAS Institute, Inc. 2008. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA.
- Shimamura T, Ukeda H. 2012. Maillard reaction in milk—effect of heat treatment. In; Milk Protein. Hurley WL. (ed). InTech, Rijeka, Croatia. pp. 147-158.
- Shin JK, Shin HH. 2007. Effect of high voltage pulsed electric fields on extraction of purple sweet potato pigment. *Korean J. Food Preserv.* 14: 165-169.
- Son SM, Shin JK. 2008. The effect of environmental factors on inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by high voltage pulsed electric fields. *Food Eng. Prog.* 12: 154-162.
- Vazquez Peyronel D, Cantera AM. 1995. A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of proteases using azocasein. *Electrophoresis* 16: 1894-1897.
- Yoon YC, Lee JM, Kim NW. 1990. Studies on the changes of physicochemical quality in UHT-treatment market milk during storage. *Korean J. Dairy Sci.* 12: 82-86.