

## 초고온 살균유의 저장 중 겔 형성 거동

조 영 희 · 홍 윤 호  
전남대학교 식품영양학과

### Gelation Behavior of Ultra High Temperature Pasteurized Milk during Storage

Young-Hee Cho and Youn-Ho Hong

Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

#### Abstract

In order to examine physicochemical gelation behavior of ultra high temperature(UHT) pasteurized milk during storage at 4°C and 25°C, pH, electrophoresis, alcohol test, sialic acid contents and free amino groups contents were biweekly determined. The pH of UHT pasteurized milk decreased with increasing storage time. Gelation of the UHT milk occurred faster at 25°C than at 4°C with larger decreasing rate of pH. The alcohol test showed positive results at lower pH than 6.5, which could indicate the casein instability and beginning of gelation. The electrophoretic patterns showed a decrease in the concentrations of all caseins. Degradation of  $\kappa$ -casein was faster in all cases, while  $\alpha$ -casein and  $\beta$ -casein were also extensively degraded later. The sialic acid contents of the samples increased gradually during storage, and the increasing rate was higher before gel formation. The free amino groups of the samples increased gradually during storage. The increasing rate of free amino groups was faster at 25°C than at 4°C. The samples stored at 25°C gelled earlier than those stored at 4°C, with corresponding increase of free amino groups. The residual proteolytic enzymes, which survived during the UHT heat treatments and were reactivated during storage, could be responsible for UHT pasteurized milk gelation during storage. It is assumed that proteolytic degradation of caseins followed by aggregation would be attributable to complicated reaction mechanism.

Key words : UHT milk, gelation, pH, alcohol test, electrophoresis, sialic acid, free amino group.

#### 서 론

원유의 살균처리 방법 중에서 초고온(ultra high temperature, UHT) 살균 처리는 미생물학적으로 위생적이고 식품영양학적으로 내용물의 손실이 적으며 경제적으로 생산비를 절감할 수 있는 장점이 있기 때문에 세계적으로 널리 사용되고 있다<sup>(1)</sup>. 초고온 살균유는 많은 장점들을 가지고 있음에도 불구하고 원료유의 품질 상태, 열처리 방법, 포장시 제 오염, 저장 온도 및 방법 등에 따라서 저장 중에 예기치 않은 겔 형성, 지방질의 분리, 향미의 저하, 미생물학적 오염 등 품질의 하자가 지적되고 있다<sup>(2)</sup>.

그 중에서도 저장 중의 겔 형성은 우유로서의 품질에 결정적으로 부정적인 결과를 초래하고 소비자가 이용할 수 없기 때문에 생산자에게도 경제적 손실은 물론 회사의 이미지에도 좋지 않은 영향을 줄 수 있다. 날씨가 더운 계절에는 초고온 살균유의 법적 보존 기간내에도 부패, 악취, 겔 형성 등 품질 변화로 인한 반품과 소비자들의 배상요구 등이 발생하고 있으므로 이에 대한 근본적 대책이 필요한 것으로 알려져 있다. 초고온 살균 및 멸균유의 저장 중 야기되는 겔 형성에 관한 많은 연구들<sup>(3~5)</sup>은 내열성 단백질 분해 효소에 의한 단백질 분해<sup>(4,6,7)</sup>와 우유 성분들간의 이화학적 반응<sup>(5,8)</sup>이 겔 형성에 중요한 역할을 할 것이라고 추정했다. 그러나, 아직까지 초고온 살균유의 저장시 야기되는 겔형성을 추적할 수 있는 인자들과 명확하고 체계적인 겔 형성 메커니즘에 관한 연구는

Corresponding author : Youn-Ho Hong, Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea.

부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 초고온 살균유의 저장 시 야기되는 겔 형성을 추적할 수 있는 인자들과 체계적인 겔 형성 기작을 규명하기 위하여 이에 관련된 요소들을 추적하고자 하였다. 초고온 살균유를 4°C와 25°C에 저장하면서, 저장 중 품질 저하를 초래하는 겔 형성 시 일어날 수 있는 이화학적 변화 및 상호 관련성을 확인하기 위하여 전기영동, 알코올 테스트 등을 실시하고 pH, sialic acid 함량, 유리 아미노기 함량을 2주 간격으로 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

본 연구에 사용된 초고온 살균유는 각각 A(130°C, 2초간 살균), B(130°C, 2초간 살균), C(135°C, 2초간 살균) 회사별로 대리점에서 구입하여 4°C(냉장보관) 및 25°C(실온)에 저장하면서 2주 간격으로 시료로 사용하였다.

### 실험 방법

#### 1) pH 측정

우유의 pH는 25°C(실온)에서 pH-meter(model 420A, Orion Co., U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

#### 2) 알코올 안정성 측정

시료의 알코올 안정성은 Kotterer와 Muench의 방법<sup>(9)</sup>에 따라서 측정하였다. 시료 5ml에 동량의 68% 에탄올을 첨가하여 10초 동안 흔든 다음 60초 후에 측정하였다. 응고가 일어나면 positive(+), 응고가 일어나지 않으면 negative(-)로 표시하였다.

#### 3) 전기영동

시료 중 단백질의 이동성은 Laemmli 방법<sup>(10)</sup>에 따라서 15% acrylamide gel로 실시하였다.  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein을 혼합하여 1 mg/ml 용액을 만든 후 전기영동 표준시료로 사용하였다. 전기영동용 우유 시료는 20배 희석(시료 0.05ml에 증류수 0.95ml를 혼합)하여 사용하였다.

#### 4) Sialic acid 함량 측정

우유 중의 sialic acid의 함량은 Warren의 방법<sup>(11)</sup>에 따라서 측정하였다.

#### 5) 유리 아미노기 함량 측정

유리 아미노기 함량의 검량선은 1.5 mM leucine을 제조하여 0~1.5mM로 희석하여 표준검량선을 얻었고, 우유 중 유리 아미노기의 함량은 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)시약을 사용한 Fields 방법<sup>(12)</sup>을 일부 개량한 Nissen의 방법<sup>(13)</sup>에 따라서 borate 완충용액 대신 인산 완충용액을 사용하였고, 시료들은 측정 전에 SDS에 분산시킨 후 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 초고온 살균유의 pH

초고온 살균유의 저장 중 pH 변화는 Fig. 1과 같다. 구입 직후 시료 A, B, C의 pH는 각각 6.74, 6.77, 6.73이었다. 4°C에 저장했을 때 저장 기간이 길어짐에 따라서 pH가 점차적으로 감소했는데 시료 A와 C의 경우엔 9주 째에, 시료 B의 경우엔 11주 째에 pH가 다소 증가하였으나 다시 감소하여 13주 째에 감소 폭이 커졌고 겔이 형성되었을 때(15주)의 시료 A, B, C의 pH는 각각 6.21, 6.05, 6.25이었다. 25°C에 저장했을 때 시료 A, B, C 모두 pH의 감소를 보였는데 시료 A의 경우는 pH의 감소 폭이 컸고 겔이 형성되었을 때(5주)의 pH는 4.88이었다. 시료 B는 서서히 감소하였고 겔이 형성되었을 때(5주)의 pH는 5.84이었다. 시료 C는 5주 째부터 급격한 감소를 보였고 겔이 형성되었을 때(7주)의 pH는 6.18이었다. 본 실험에서 초고온 살균유의 pH는 4°C와 25°C에 저장 시 모두 저장 기간이 길어짐에 따라서 감소하였다. Fox<sup>(14)</sup>는 제1 또는 제2 calcium phosphate가 제3의 phosphate로 침전하면서 H<sup>+</sup>의 방출과 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>의 침전이 초고온 처리 후 pH의 감소를 야기한다고 하였다. 한편, Walstra와 Jenness<sup>(15)</sup>는 유당으로부터 개미산(HCOOH)을 비롯한 유기산들이 생성되어 pH를 감소시킨다고 주장하였다.

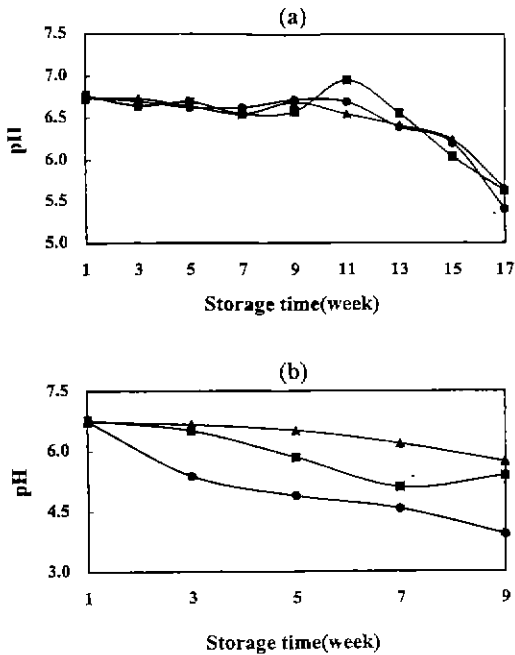


Fig. 1. Changes of pH in UHT pasteurized milk during storage at 4°C (a) and 25°C (b). A: 130, 2sec pasteurized milk, B: 130°C, 2sec pasteurized milk, C: 135°C, 2sec pasteurized milk  
 ●—A, ■—B, ▲—C

#### 초고온 살균유의 알코올 안정성

저장 기간에 따른 알코올 안정성 실험 결과는 Table 1과 같다. 본 실험에서는 시료들에 따라서 차이를 보이지만 pH 6.5 이하로 감소되었을 때부터 양성 반응을 나타내기 시작하였다.

초고온 살균유를 4°C에 저장했을 경우, 시료 A, B, C의 pH가 각각 초기의 pH 6.74, 6.77, 6.73에서 6.40, 6.56, 6.42로 감소한 13주 쯤부터 양성 반응을 보이기 시작하였다. 25°C에 저장했을 경우 pH의 감소 폭이 커서 시료 A와 B의 경우는 3주 쯤부터, C의 경우는 5주 쯤부터 양성 반응을 나타냈다. Zadow<sup>(16)</sup>는 알코올 안정성은 pH에 의존적이고, pH 6.6 이하에서는 급격하게 감소하였다고 보고하였다. 알코올에 의한 우유침전은 (-)로 하전된 micelle 사이의 반발력을 조절하는 유리 Ca함량에 의하여 알코올의 역할은 매체의 유전 상수를 감소시켜 응고를 막는 에너지 장벽을 감소시키는 것이라고 알려졌다<sup>(15)</sup>. 본 실험에서 pH 6.5 이하에서부터 양성 반응이 나타난 것은 phosphate의 이온화 때문인 것으로 사료된다. 알코올 안정성 시험에서 시료들은 젤 형성되기 전 pH의 감소와 함께 회합이 일어나면서부터 양성 반응을 나타낸 것으로 보인다.

#### 전기영동 양상

초고온 살균유의 저장 중의 전기영동 양상은 Fig. 2 및 3과 같다. 4°C에 저장했을 때 시료 A, B, C 모두 저장 초기엔  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein,  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG의 단백질 밴드가 뚜렷하게 나타났으나 저장 기간이 길어짐에 따라서 상대적으로  $\kappa$ -casein이 먼저 분해가 되고  $\beta$ -casein,  $\alpha$ -casein 순으로 분해가 일어나 casein 단백질 밴드가 점차 희미해졌다. 젤이 형성되었을 때 casein과 유청 단백질 밴드는 희미해졌다. 25°C

Table 1. Results fo alcohol test of UHT pasteurized milk during storage at 4°C and 25°C

Sample	Storage condition	Storage time(week)								
		1	3	5	7	9	11	13	15	17
A	4°C	- <sup>1)</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+
B		-	-	-	-	-	-	+	+	+
C		-	-	-	-	-	-	+	+	+
A	25°C	-	+ <sup>2)</sup>	+	+	+	· <sup>3)</sup>	·	·	·
B		-	+	+	+	+	·	·	·	·
C		-	-	+	+	+	·	·	·	·

A: 130°C, 2sec, B: 130°C, 2sec, C: 135°C, 2sec

<sup>1)</sup> -: negative

<sup>2)</sup> +: positive

<sup>3)</sup> ·: not determined

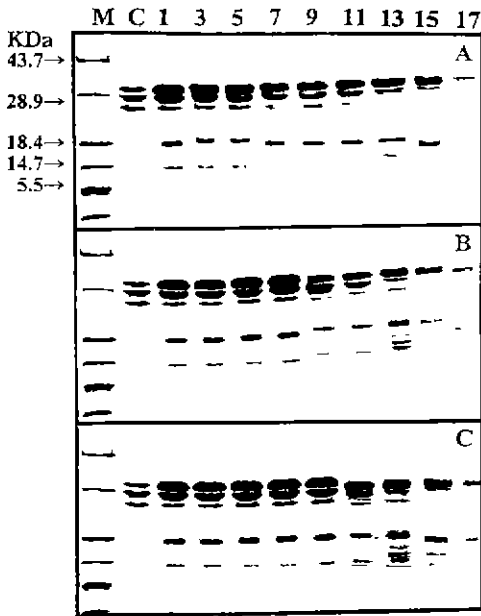


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of UHT pasteurized milk during storage at 4°C. A: 130°C, 2sec, B: 130 °C 2sec, C: 135°C, 2sec.

15% acrylamide gel, loading volume : 10 μl  
 M : low molecular weight marker  
 C : α, β, κ-casein standard(from top position) lane 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 : storage time(week)

에 저장했을 때도 4°C와 마찬가지로 저장 기간이 길어짐에 따라 casein 분획들의 농도는 감소하였고 그 감소 속도는 4°C에 저장시보다 빨랐다. 4°C와 25°C 모두 casein 분획의 농도는 감소하였고 저장 중에 추가적인 띠들이 나타나기도 했다. 이것은 우유 중 분비된 plasmin 또는 *Pseudomonas fluorescence* 등의 저온성 미생물(psychrotrophs)들이 분비한 단백질 분해 효소들이 UHT 살균과정에서 완전히 실활되지 않고 잔존하여 야기시키는 것으로 유추된다. 저장 중 casein의 분해 양상은 우유가 렌넷(chymosin)에 의해서 κ-casein의 Phe(105)-Met(106) 결합이 분해되어 para-κ-casein(비용해성)과 glycomacropeptide(GMP)로 분리되는 생화학적 현상(biochemical phase)과 유사한 것으로 추정된다. 그리고 이 비 용해성 para-κ-casein 입자들이 응집되어 curd 형태를 이루는 이화학적 현상(physicochemical se-

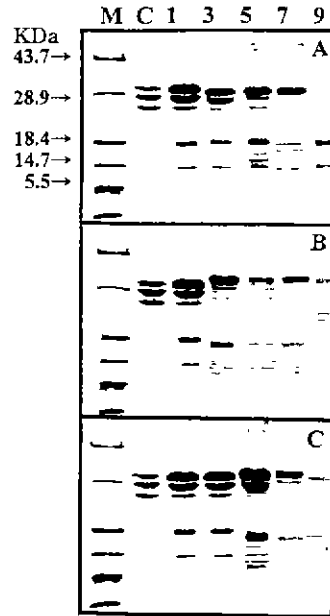


Fig. 3. SDS-PAGE pattern of UHT pasteurized milk during storage at 25°C. A: 130°C, 2sec, B: 130 °C 2sec, C: 135°C, 2sec.

15% acrylamide gel, loading volume : 10 μl  
 M : low molecular weight marker  
 C : α, β, κ-casein standard(from top position) lane 1, 3, 5, 7, 9 : storage time (week)

secondary phase)으로 겔이 형성되는 것으로 생각된다.

#### Sialic acid 함량

Sialic acid는 우유 당 단백질(특히, κ-casein)에 존재하므로 유리 sialic acid의 분석은 κ-casein의 분해 정도를 확인하는 척도로 이용될 수 있다<sup>(11)</sup>. Sialic acid 함량을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 초기의 초고온 살균유 시료 A, B, C의 sialic acid 함량은 각각 7.0 mg/L, 6.9 mg/L, 7.8mg/L로 Zalazar 등<sup>(17)</sup>이 보고한 8.6 mg/L보다 다소 낮은 값을 보였다. 4°C에 저장했을 때 시료 A와 C는 저장기간이 길어짐에 따라서 서서히 증가하였다. 겔이 형성되었을 때의 시료 A, B, C의 sialic acid 함량은 각각 15.9mg/L, 16.1mg/L, 15.5mg/L로 초기보다 2.3배, 2.3배, 2.0배 증가하였다. 25°C에 저장했을 때 시료 A, B, C 모두 sialic acid 함량의 증

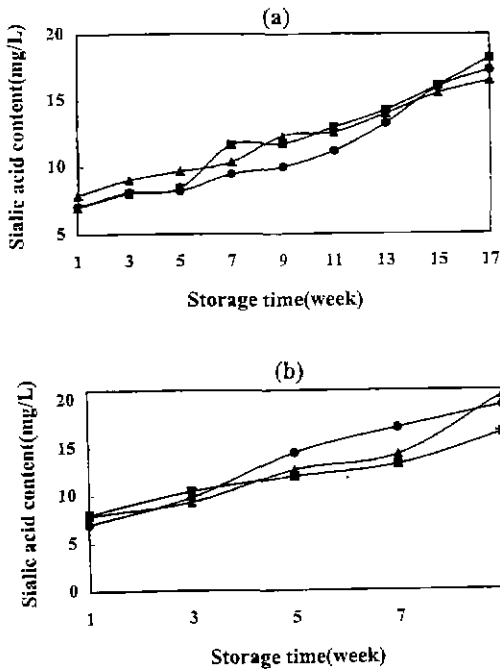


Fig. 4. Changes of sialic acid contents in UHT pasteurized milk during storage at 4°C (a) and 25°C (b). A: 130°C, 2sec, B: 130°C, 2sec, C: 135°C, 2sec.

● A, ■ B, ▲ C

가폭은 컸으며 겔이 형성되었을 때의 sialic acid 함량은 각각 14.4mg/L, 12.0mg/L, 14.2 mg/L로 초기보다 2.1배, 1.7배, 1.8배 증가하였다. 우유에 존재하는 plasmin은  $\kappa$ -casein에 대한 활성이 낮은 것으로 보고되었는데 오염된 미생물로부터 생성된 단백질 분해효소들은 내열성이 강하여 잔존 시 저장 중에  $\kappa$ -casein을 용이하게 분해하여 유리 아미노기 및 sialic acid를 생성하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 sialic acid 함량은 저장 기간이 길어짐에 따라서 점차적으로 증가하였는데, 이는 우유에 존재하는 내열성 protease가 작용하여 glyco-macropetide같은 탄수화물을 함유한 pepetide를 생성시켜 유리 sialic acid의 source로서 작용을 하고 casein micelle의 안정성을 감소시켜 겔 형성을 야기하는 것으로 사료된다.

유리 아미노기 함량

TNBS방법으로 측정된 저장 기간에 따른 초고온 살균유의 유리 아미노기 함량의 변화는

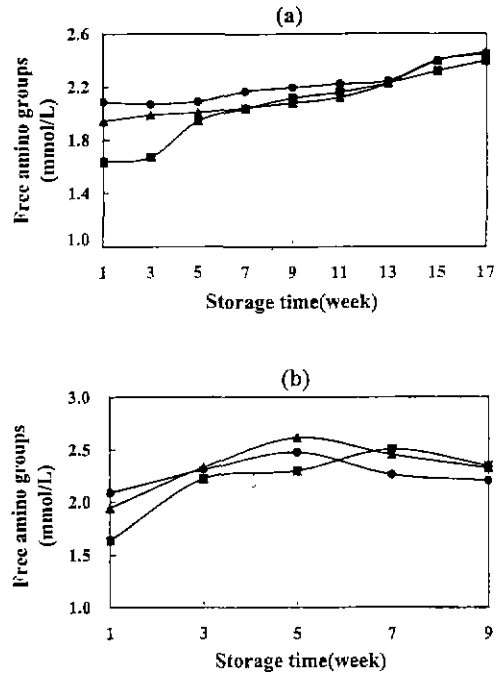


Fig. 5. Changes of free amino groups in UHT pasteurized milk during storage at 4°C (a) and 25°C (b). A: 130°C, 2sec, B: 130°C, 2sec, C: 135°C, 2sec.

● A, ■ B, ▲ C

Fig. 5와 같다. 시료 A, B, C의 초기 유리 아미노기 함량은 각각 2.09mmol/L, 1.64 mmol/L, 1.94mmol/L였다. 4°C에 저장했을 때 시료 A, B, C 모두 유리 아미노기 함량의 증가폭은 적었다. 시료 A는 점진적인 증가를 보이다가 저장 13주째부터 증가폭이 커졌고 겔이 형성되었을 때는 초기보다 14% 증가한 2.39mmol/L였다. 시료 B는 5주째부터 증가폭이 커졌고 서서히 증가를 보이다가 저장 13주째부터 증가폭이 커졌으며 겔이 형성되었을 때에는 2.32 mmol/L로 42% 증가하였다. 시료 C의 경우에는 증가폭이 아주 적었는데 13주부터 높은 증가를 보이며 겔이 형성되었을 때는 2.39mmol/L로 23% 증가하였다. 유리 아미노기 함량은 25°C에 저장했을 때에는 4°C에 저장했을 때보다 증가폭이 컸다. 시료 A와 B는 3주째에 각각 2.20mmol/L, 2.22mmol/L로 높은 증가를 보이다가 겔이 형성된 5주째부터 일정한 비율로 저장 기간이 길어짐에 따라서 증가하였다. 시료 A와 B의 유리 아미노기 함량은 겔이 형

성되었을 때 각각 2.47mmol/L, 2.29mmol/L로 초기보다 18%, 40% 증가하였다. 시료 C는 5주째에 큰 증가를 보이다가 겔이 형성된 7주째부터 저장 기간이 증가함에 따라서 증가하였다. 겔이 형성되었을 때는 2.45mmol/L로 초기보다 26% 증가하였다. 4°C와 25°C 모두 저장 기간이 길어짐에 따라서 유리 아미노기 함량은 증가하였고 4°C보다는 25°C에 저장했을 때 증가폭이 컸다. 4°C에 저장 시엔 25°C에 저장시보다 겔 형성이 늦게 일어났는데 그에 상응하는 유리 아미노기들의 함량도 서서히 증가하였다.

본 실험 결과 초고온 살균유의 저장 중 겔 형성은 살균 후 잔존하던 단백질 분해효소에 의한 casein 단백질의 가수분해(생화학적 변화)와 이에 따른 응집(이화학적 변화)에 의한 복합적인 반응 기작이 관여하는 것으로 사료된다. 초고온 살균유의 저장 중 겔 형성 가능성은 알코올 테스트 및 전기영동 실시, pH, sialic acid 또는 유리 아미노기의 측정 등으로 예측할 수 있으므로 품질 관리에 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 요 약

초고온 살균유를 4°C와 25°C에 저장하면서 저장 중에 초래되는 이화학적 겔 형성 기작과 거동을 추적하기 위하여 pH 측정, 전기영동, 알코올 테스트 등을 실시하고 sialic acid, 유리 아미노기 등을 일정한 시간 간격으로 측정하였다. 초고온 살균유의 pH는 4°C와 25°C에 저장 시 모두 저장 기간이 길어짐에 따라서 감소하였고 겔 형성 전 회합이 일어나는 시기부터 pH의 감소 폭이 커졌다. 초고온 살균유의 알코올 안정성의 측정 결과, 시료들에 따라 차이를 보이지만 pH 6.5 이하로 감소되었을 때부터 양성 반응을 나타내기 시작하였다. 초고온 살균유를 4°C에 저장했을 경우, 시료 A, B, C 모두 13주째부터 양성 반응을 보이기 시작했고 25°C에 저장했을 경우 pH의 감소 폭이 커져 시료 A와 B의 경우는 3주째부터, 그리고 C의 경우는 5주째부터 양성 반응을 나타냈다. 시료들의 전기영동 실시 결과, 저장 중에  $\kappa$ -casein이 먼저 감소하였고  $\alpha$ -casein과  $\beta$ -casein이 거의 비슷하게 감소하는 경향을 보였다. 초고온 살균유의 sialic acid 함량은 저장 기간이 길어짐에 따

라서 서서히 증가하였다. 초고온 살균유의 유리 아미노기 함량은 저장 기간이 길어짐에 따라서 증가하였고 4°C보다는 25°C에 저장했을 때 증가폭이 컸다. 4°C에 저장 시엔 25°C에 저장시보다 겔 형성이 늦게 일어났는데 그에 상응하는 유리 아미노기들의 함량도 완만한 증가를 보였다. 본 실험 결과 초고온 살균유의 저장 중 겔 형성은 pH의 감소, 전기영동 양상에서  $\kappa$ -casein의 분해, 알코올에 대한 불안정성, sialic acid의 증가, 유리 아미노기의 증가 등으로 미루어 살균 후 잔존하던 단백질 분해효소에 의한 casein 단백질의 가수분해(생화학적 변화)와 이에 따른 응집(이화학적 변화)에 의한 복합적인 반응 기작이 관여하는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 1999년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으므로, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 윤여창, 이종문, 김남옥. : UHT처리 우유의 저장 중 이화학적 품질 변화에 관한 연구. 한국낙농학회지, 12(1), 82 (1990).
2. Zadow, J. G. : The development of UHT processing in Australia. *Aust. J. Dairy Technol.*, 53, 195 (1998).
3. De Koning, D. J., Kaper, J., Rollema, H. S. and Driessen, F. M. : Age-thinning and gelation in unconcentrated and concentrated UHT-sterilized skim milk. Effects of native milk proteinase. *Neth. Milk Dairy J.*, 39, 71 (1985).
4. Mckenna, A. B. and Sinho, H. : Age gelation of UHT-processed reconstituted concentrated skim milk. *J. Food Sci. Technol.*, 26(4), 27 (1991).
5. Manji, B., Kakuda, Y. and Arnott, D. R. : Effect of storage temperature on age gelation of UHT milk processed by direct and indirect heating systems. *J. Dairy Sci.*,

- 69, 2994 (1986).
6. Hill, A. R. : Quality of ultra-high-temperature processed milk. *Food Technol.*, 42(9), 92 (1988).
  7. Grufferty, M. B. and Fox, P. F. : Milk alkaline proteinase. *J. Dairy Res.*, 55, 609 (1988).
  8. Andrews, A. T., Brooker, B. E. and Hobbs, D. G. : Properties of aseptically packed ultra-heat-treated milk. Electron microscopic examination of changes occurring during storage. *J. Dairy Res.*, 44, 283 (1977).
  9. Kotterer, R. and Muench, S. : Untersuchungsverfahren fuer das milch wirtschaftliche Laboratorium. Volkswirtschaftliche Verlag, Kempten p.28 (1972).
  10. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 (1970).
  11. Warren, L. : Thiobarbituric acid assay of sialic acids. Colowick, S. P. and Kaplan, N. D. ed. *Methods in Emzymology*, 6, 463 (1963).
  12. Fields, R. : The measurement of amino groups in proteins and peptides. *Biochem. J.*, 124, 581 (1971).
  13. Nissen, J. A. : Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27(6), 1256 (1979).
  14. Fox, P. F. : Heat-induced changes in milk proceeding coagulation. *J. Dairy Sci.*, 74, 2127 (1981).
  15. Walstra, P. and Jenness. R. : Dairy Chemistry and Physics, John Wiley and Sons, New York, U. S. A. (1984).
  16. Zadow, J. H. : The rate of addition of alcohol has a major effect on the alcohol stability of skim milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, 48, 38 (1993).
  17. Zalazar, C., Palma, S. and Condioti, M. : Increase of free sialic acid and gelation in UHT milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, 51, 22 (1996).
- 
- (1999년 12월 22일 접수)