

발간등록번호

11-1543000-000827-01

## 펄스 전기장 기술을 이용한 고부가가치 유제품의 개발

(Development of value-added dairy products  
using pulsed electric field (PEF) technology)

(주)비케이바이오

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “펄스 전기장 기술을 이용한 고부가가치 유제품의 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 1 월 23 일

주관연구기관명 : (주)비케이바이오

주관연구책임자 : 최 혁 준

세부연구책임자 : 최 혁 준

연 구 원 : 한 복 경

연 구 원 : 박 수 범

연 구 원 : 김 건

연 구 원 : 정 중 기

협동연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 이 동 언

협동연구기관명 : 가천대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 박 영 서

협동연구기관명 : 서울우유 협동조합

협동연구책임자 : 강 신 호



## 요 약 문

펄스 전기장 기술의 산업화 적용을 위한 품질기준 마련과 공정 연구를 통해 우유 살균의 산업화 가능성을 확인하였다. 우유의 PEF 살균의 국내외 현황을 검토하고 미국이나 유럽의 주스살균 제품의 유통을 확인하여 우유의 살균 가능성을 확인하였다. 우유의 살균을 위한 최적의 PEF 조건을 설정하기 위해 기기 및 공정 연구를 수행하였으며, 그에 따른 실험실적 기기와 공정을 완성하였다. 제품의 관리 규격 기준 및 규격 표준화를 위해 축산물 위생관리기준 등을 활용한 성분규격 기준을 마련하였고, 우유 가열에 의한 변성 물질 및 변성도에 대한 표준화를 마련하였다. 주요 타깃 미생물은 일반세균, 대장균군, 진균으로 선정하였으며, 기능성 단백질은 유청 단백질, 카제인, 면역 단백질 등을 선정하여 각 규격에 대한 평가법을 확립하였다. 초기 우유 살균 연구에서 PEF 조건은 20 L/h의 유속으로 70% of out voltage, 25 us of pulse width에서 처리하여 최종 우유의 온도가 PEF 처리를 통해 50, 65°C로 처리되는 공정을 세팅하였다. 살균 제어 및 영양원 보존을 위한 최적 공정 설계를 통해 공정 최적화 및 단계별 scale up 연구를 진행하였고, 상품화를 위한 연구를 위탁기관과 공동연구로 수행하였다. 공정을 최적화하기 위해 표준용액을 이용하여 연속식 처리를 10 kV/cm of Field strength에서 100, 150, 200, 250 kJ/L of energy의 PEF 공정변수를 주어 최적의 공정변수를 찾고자 하였다. 위에서 설정한 공정변수에 기존의 가열살균공정(LTLT, HTST)을 적용하여 시판하는 저지방우유에 타깃 미생물 4종(*S. cerevisiae*, *E. coli*, *L. brevis* 및 *L. plantarum*)을 접종 후 적용하는 연구와 원유에 적용하는 연구를 통해 단백질 보존과 미생물의 저감을 위한 최적의 공정으로 가열살균(LTLT, HTST)과 PEF 조건을 200, 250 kJ/L로 하여 병용하는 공정으로 설정하였다. 마련된 최적의 PEF 및 가열살균공정에 대해 시생산을 통한 상업화 및 법제화 추진을 위해 시생산 공정 라인 적용 연구를 실시하였다. 선정된 가열살균공정은 HTST였으며, 이에 따른 PEF의 시생산 최적의 공정은 100 L/h of flow rate, 16 kV/cm of field strength 및 250 kJ/L of energy로 처리하는 공정이었다. 원유를 위 공정과 같이 처리 시 4°C의 원유가 승온을 통해 30°C로 상승하고 PEF 처리를 통해 75°C 까지 상승한다. 그 후 HTST 처리 후 냉각 및 포장이 되어 냉장 보관 상태로 저장성 실험 결과 일반 HTST 처리 우유에 비해 미생물의 저장성은 더 우수하며, 기능성 단백질의 보존은 HTST 처리 우유와 유의적인 차이가 없었음을 확인할 수 있었다. 또 유제품으로 저지방우유, 초코우유 및 아메리카노의 시생산 공정라인의 최적화 공정을 마련하였다.

펄스전기장 기술을 우유 및 유제품의 살균에 적용하기 위한 기초 및 응용연구를 수행하였다. 펄스전기장 처리의 변수로는 Electric field strength (kV/cm), Pulse width ( $\mu$ s), Pulse frequency (Hz), Treatment time (s) 가 있으며, 이들 변수의 조합을 통해 다양한 펄스 처리가 가능하다. 펄스처리가 우유의 부패 미생물에 미치는 영향을 확인하기 위해 *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*을 모델 균주로 선정하고 Batch chamber 에서 펄스전기장 조건에 따른 사멸특성을 확인하였다. *S. cerevisiae* 와 *Lactobacillus* 의 경우, 펄스전기장 처리에 의해 보다 쉽게 사멸되어 10

kV/cm 이상의 전기장에서 빠르게 사멸 되는 것이 확인되었으나, *E.coli*의 사멸에는 경우 15 kV/cm 이상의 전기장 조건이 요구되었다. Batch 조건에서 확인된 펄스처리 기술의 산업화 적용을 위해 연속식 처리가 가능한 파일럿 스케일의 실험을 수행하였다. 펄스처리 파일럿 장치는 30 L/h의 유속을 처리할 수 있도록 구성되었으며 온도조절 장치를 통해 펄스처리 초기온도의 설정이 가능하였다. 파일럿 처리 장치는 Batch 처리장치에 비해 상대적으로 낮은 전기장 세기인 10 kV/cm를 사용하였으나 pulse frequency의 증가를 통해 시료에 펄스 에너지를 250 kJ/L까지 가해줄 수 있었다. 저지방 우유에 모델 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*를 접종하고 연속식 펄스처리를 수행하였을 경우 150 kJ/L 이상에서 모델 균주의 사멸이 관찰되었으며 200 kJ/L 이상의 에너지 수준에서는 모든 균주의 생균수가 4 decimal reductions 이상 감소하였으며, 4°C에서 15일간 저장 시 균수의 증가도 억제된 채로 유지되어 처리초기온도 30°C, 펄스에너지 200 kJ/L의 조건이 펄스 전기장을 이용한 저지방 우유 살균조건으로 제시되었다. 제시된 펄스 처리조건을 활용하여 커피우유, 딸기우유, 바나나우유 등의 가공유 제품살균에 펄스전기장 처리를 적용하였다. 펄스전기장 적용 시 호기성 미생물은 최대 1.0 decimal reduction, Yeast의 경우 최대 3.0 decimal reductions 수준의 감균 효과를 나타냈다. 감균 효과가 미생물 접종 후 처리한 이전 실험에 비해 상대적으로 낮은 이유는 이들 가공유의 원부재료인 탈지분유와 커피, 과일 농축액 제조 공정이 높은 열에너지를 동반하는 공정으로 구성되어 자연적으로 존재하는 미생물 중 내열성이 강한 부분이 살아남아 과점하고 있기 때문으로 판단되었다. 펄스 전기장 처리에 따른 가공유 제품의 물리, 화학, 향기성분은 일정하게 유지되었다.

비가열 살균법인 펄스 전기장 기술을 활용한 우유 내의 기능성 단백질의 보존성 확보 기술을 구축하기 위하여 살균 공정 별로 우유를 처리하였을 때 나타나는 우유 단백질의 변화를 파악하고 분석하였고, 기존의 가열 살균과 PEF를 병용처리 하였을 때 우유 내의 기능성 단백질의 보존성을 연구하였다. 원유, 탈지유 HTST 우유 및 LTLT 우유를 PEF 처리한 후 우유 중에 존재하는 단백질의 변성 여부를 DSC, SDS-PAGE 및 HPLC를 이용하여 조사한 결과 PEF의 처리 조건(50°C, 65°C)에 관계없이 PEF 처리가 우유 중에 존재하는 단백질을 변성시키지 않았다. 또한 살균 공정별로 PEF 처리한 우유의 탁도시험에 의해서도 PEF 처리가 우유 단백질을 변성시키지 않았고, pH, 산도, alcohol test, 색도 및 갈색화 반응을 분석한 결과 LTLT나 HTST 및 UHT 처리와 비교할 때 PEF 처리가 우유의 물리화학적 성질을 크게 변화시키지 않았다. PEF의 에너지가 증가할수록 IgG, IgA,  $\beta$ -lactoglobulin, lactoferrin의 농도는 유의적으로 감소하였으나,  $\alpha$ -lactalbumin이나 TGF- $\beta$ 1의 감소는 유의적이지 않았다. PEF와 LTLT를 병용 처리한 우유를 16일간 저장하였을 때, IgG,  $\beta$ -lactoglobulin, lactoferrin,  $\alpha$ -lactalbumin은 각각의 농도는 저장기간에 따라 크게 영향을 주지 않는 범위 내에서 감소하였으나, IgA만이 PEF 에너지의 양에 관계없이 그 농도가 유의적으로 감소하였다. 같은 가열처리 방식이라도 면역단백질의 농도에 있어서 장시간 가열하는 LTLT 살균방식이 단시간 가열 살균인 HTST보다 면역단백질의 손상에 영향을 끼치는 것으로 판단할 수 있었다. PEF 처리 시, 여러 가지 생리활성이 높은 lactoferrin은 기존의 살균방법보다 면역활성이 높았고,  $\alpha$ -lactalbumin에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 확인하였다. 저장 중 원유의 면역단백질의 농도는 처음 1주일에 1차로 급격한 감소율을 보였고, 1개월이 경과한 후 2차로 급격한 감소율을 보였다. 반면에 PEF를 처리한 시료나 기존 살균방법의 단독처리나 PEF 병용처리 시료의 경우 점진적으로 면역단백질의 농도가 감소하였고, 1개월이 경과한 후는 원유를 비롯한 다른 시료간의 차이가 크지 않았다. PEF 처리에 따른 우유 내의 면역단백질은 기존의 살균방법인 LTLT, HTST를 병용처리하였

을 때 그 효과가 초기에는 PEF를 단독으로 처리한 우유보다 좋지 않았으나, 기존의 살균방법과 병용처리한 우유가 단백질의 보존성에 있어 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

우유는 단백질, 탄수화물, 비타민, 무기질 등을 함유하고 있어 미생물이 성장할 수 있는 이상적인 조건을 가지고 있으며 저장성을 향상시키고 우유의 변질을 초래하는 효소를 파괴하기 위해 열처리방식의 살균공정을 실시하고 있으나 열에 의해 발생하는 영양성분의 파괴, 향미의 손실, 색택의 변화, 조직감의 변화가 발생하며 이러한 문제를 해결하기 위하여 저온살균공법(LTLT) 및 감마선 조사 등 우유에 열을 적게 가하는 방법을 이용한 살균법에 관한 시도가 이루어져 왔으나, 아직까지는 기존의 살균 방법인 UHT를 대체할 수 있는 효과적인 저온 살균법에 관한 뚜렷한 해결책은 찾지 못하고 있다. 이에 한 가지 대안으로 PEF 비가열적 살균방법을 사용하여 3종의 시작품을 제작하여 고전압 처리할 경우 온도가 거의 상승하지 않으며, 처리시간이 짧고 대부분 연속처리가 가능하며, 처리 후에도 식품의 물리적, 화학적 및 영양학적 특성들을 거의 변화시키지 않는 것을 확인하였다.

## SUMMARY

Application of pulsed electric field technology (PEF) industrialization confirmed the possibility of milk sterilization, through the quality standards established for the industrialization process research. The potential of PEF sterilization of milk was confirmed through reviewing the status of the distributed juice pasteurized products of US or Europe. The apparatus and process study was carried out to establish the optimum conditions for the sterilization of milk PEF, which resulted in the completion of the process and laboratory apparatus accordingly. For standardized management specification standards and specifications of the product, standard for denatured and denatured material also by heating milk were prepared. The main target microorganisms were selected for bacteria, coliform bacteria, and fungi, the functional protein was whey protein, casein, and immune protein, and such as an evaluation method was established for the respective standards. Initial studies in the sterilization of milk by PEF treatment conditions in 70% of out voltage, 25 us of pulse width at a flow rate of 20 L / h was set to process the temperature of the milk to be processed by the end 50, 65 °C through the PEF treatment. The scale up research through the optimal process design for insect control, and nutrient conservation, research institutions was proceeding step-by-step process optimization with collaboration. In order to optimize the continuous process, using the standard solution, in 10 kV/cm of field strength, in 100, 150, 200, 250 kJ/L of energy of given process parameters, the PEF was to find the optimal process parameters. By heat sterilization processes in process parameters set above (LTLT, HTST) low-fat milk, inoculated by four kinds of target microorganisms (*S. cerevisiae*, *E. coli*, *L. brevis* and *L. plantarum*), the effect after vaccination optimal process for protein and reduction of microorganisms through applying the heat sterilization (LTLT, HTST) and PEF 200, to 250 kJ / L, were set by the process used in combination. For legislation promoting the commercialization, prototype production were applied with the optimum PEF and heat sterilization processes. As the results, heat sterilization process is selected HTST, thus the process of the optimum PEF prototype production was 100 L / h of flow rate, 16 kV / cm of field strength, and 250 kJ / L of the step of treatment with energy. The temperature of milk was raised to 30 °C of 4 °C during processing as shown in the above process, and raised to 75 °C through the PEF treatment. After HTST treatment then cooled and packaged sample compared to the results in general HTST treatment of milk was better in cold storage, and in the view of preservation of functional protein, the HTST treatment of milk and HTST-PEF milk were no significant difference. In addition to low-fat dairy milk, the optimization process of

prototype production line of chocolate milk and Americano were prepared.

Pulsed electric field (PEF) technology was applied to pasteurize milk and dairy products. The processing parameters of PEF were electric field strength (kV/cm), pulse width ( $\mu$ s), pulse frequency (Hz), and treatment time (s). *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* were selected as test microorganisms for PEF treatment. In batch type experiments, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* were more susceptible to PEF treatments, and inactivation of them were initiated by the electric field strength of 10 kV/cm. *Escherichia coli* required 15 kV/cm for inactivation. The microbial inactivation by PEF treatment was confirmed by continuous, pilot scale experiments. The PEF pilot could process sample flow of 30 L/h. Low fat milk was inoculated with test microorganisms and PEF was applied to the samples with different energy level. The total energy inputs were from 100 to 250 kJ/L. The microbial inactivation was increased as the increase of energy inputs. We suggest the PEF energy of 200 kJ/L with inlet temperature of 30°C as industrial processing condition. The suggested processing condition reduced the microbial counts of test microorganisms more than 4 decimal reductions. The suggested PEF processing condition was applied to 3 different dairy products such as coffee milk, strawberry milk, and banana milk. PEF treatments showed restricted effects against normal flora of aerobic counts, but normal flora of yeasts were reduced by 3 decimal reductions. The application PEF treatments on dairy products results in little changes in color, pH, particle size distribution, and flavor profiles.

To construct the preservative technology of functional proteins in bovine milk using pulsed electric fields (PEF) technology as a non-thermal sterilization, the changes of bovine milk proteins were examined when bovine milk was heat-sterilized, and the preservation of functional proteins of bovine milk was studied when the milk was treated with the conventional thermal sterilization process in combination with PEF. When the denaturation of proteins in PEF-treated raw milk, skim milk, HTST- and LTLT-milk were examined by SDS-PAGE, differential scanning calorimetry (DSC) and HPLC, bovine milk proteins did not denature regardless of PEF's treatment condition (50 and 60°C). PEF treatment did not denature milk proteins in PEF-treated-milk at different sterilization process and physicochemical properties of milk proteins were not considerably changed compared with LTLT-, HTST- or UHT-sterilization when turbidity, pH, titratable acidity, alcohol test, and browning test were carried out. As an energy of PEF treatment increased, the amounts of IgG, IgA,  $\beta$ -lactoglobulin and lactoferrin significantly decreased, but the amounts of  $\alpha$ -lactalbumin or TGF- $\beta$ 1 were not significantly decreased. When PEF and LTLT combination milk was stored at 16 days, the amounts of IgG,  $\beta$ -lactoglobulin, lactoferrin and  $\alpha$ -lactalbumin decreased a little during the storage period. However the amount of only IgA significantly decreased regardless of an energy of PEF treatment. The damage of immunoproteins was affected by the thermal sterilization process with long time, a LTLT, more than the thermal sterilization with short time, a HTST. When milk was

treated with PEF, lactoferrin which has various multifunctional activity retained higher immune-activity than when treated with the conventional sterilization methods. Also PEF treatment did not effect on the immune-activity of  $\alpha$ -lactalbumin. The amounts of immunoproteins of raw milk rapidly decreased at the first 1 week, and secondly these rapidly decreased over a month. On the other hand, the amounts of immunoproteins of PEF-treated-milk, only treatment of conventional sterilization or PEF combined with the conventional sterilization methods milk gradually decreased and there were little difference between the other milks, including raw milk, after a month. These results showed that the effect of PEF combined with the LTLT- or HTST-milk was worse than only PEF treatment milk, but the effect of preservation of immunoproteins, the conventional sterilization combined with the PEF treatment milk was better.

Milk contain protein , carbohydrate , vitamins, minerals and a lot of minerals, but it is vulnerable to heat damage during pasteurization processes. The pasteurization or sterilization process can destroy the enzyme which results in the deterioration of milk such as destruction of nutrients, loss of flavor, change of colors and texture change. Various means have been used to extend the shelf life of dairy products such as high-pressure processing, irradiation, ohmic heating and pulsed electric field(PEF) technologies. of these technics, We have prepared three kinds of prototypes using PEF in the high voltage and very short time treatment conditions. and very reasonable results were obtained. PEF technologies will be potential alternatives to traditional thermal milk pasteurization, owing to their advantages in minimizing sensory, physico-chemical and nutritional damage.

# CONTENTS

## Chapter 1. Summary of the research and development project

## Chapter 2. Situation of the technology in domestic and foreign

## Chapter 3. Contents and results of the research and development

Paragraph 1. Main project: Studies on process research and quality standards for the industrial application of a pulsed electric field technology

1. Process and quality standards of a pulsed electric field technology for the industrial application
2. The optimum process design for microorganism's control, and nutrient conservation
3. Commercialization and legislation promotion
4. Conclusion

Paragraph 2. Collaborative project: The construction of secure technologies of microorganism safety utilizing a pulsed electric field

1. Established of spoilage microorganism inactivation kinetics using a batch PEF chamber
2. Established of spoilage microorganism inactivation kinetics using a continuous PEF treatment
3. Study of dairy type PEF sterilization process

Paragraph 3. Collaborative project: The construction of maintain technologies of functional proteins utilizing a pulsed electric field

1. Instruction
2. Method of study
3. Research result
4. Conclusion

Paragraph 4. Commissioned project: Research process and quality assurance through the pilot test of the pulse electric field technology

1. Present dairy pasteurization regulations in our nation and PEF as a new method of validation
2. Combination of traditional thermal treatment and PEF in the various milk products.
3. Complete PEF applies to development

## Chapter 4. The attainment of the goal and contribution for related field

Chapter 5. The results of the research and development and the application plan

Chapter 6. Foreign technology information obtained during the project

Chapter 7. References

# 목 차

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 세부과제 : 펄스 전기장 기술의 산업화 적용을 위한 품질기준 마련과 공정 연구

1. 펄스 전기장 기술의 산업화 적용을 위한 품질 기준 마련과 공정연구
2. 살균 제어 및 영양원 보존을 위한 최적 공정 설계
3. 시생산을 통한 상업화 및 법제화 추진

제 2 절 협동과제 : 펄스 전기장 기술을 활용한 미생물학적 안전성 확보 기술 구축

1. Batch PEF chamber를 이용한 비병원성 부패 미생물의 inactivation kinetics 확립
2. 연속형 PEF 처리를 이용한 부패 미생물의 살균
3. 유제품 유형별 PEF 살균공정 연구

제 3 절 협동과제 : 펄스 전기장 기술을 활용한 기능성 단백질의 보존성 확보 기술 구축

1. 서론
2. 연구 방법
3. 연구결과
4. 결론

제 4 절 위탁과제 : 펄스 전기장 기술의 pilot test를 통한 공정 및 품질 검증 연구

1. PEF법 적용 유제품의 관련 법규 검토
2. PEF법과 기존 우유 살균 처리법과의 병행 검토
3. PEF법 적용 제품 개발 완료

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 제 7 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

- 우유는 세균증식에 있어 중요한 수분, 단백질, 탄수화물, 비타민, 무기질 등을 함유하고 있어 미생물이 성장할 수 있는 이상적인 조건을 가지고 있기 때문에 원유에 존재하는 병원균 및 부패균을 사멸시켜 제품의 저장성을 향상시키고 우유의 변질을 초래하는 효소를 파괴하기 위해 살균공정을 실시하고 있음.
- 현재 우리나라에서 이용되는 일반적인 열처리에 의한 우유의 살균 방법으로는 저온장시간 살균법(LTLT: Low Temperature Long Time, 63-65°C, 30분), 고온단시간살균법(HTST: High Temperature Short Time, 72-75°C, 15-20초) 및 초고온순간살균법(UHT: Ultra High Temperature, 130-150°C, 0.5-5초) 등이 있음.
- 각종 살균법에 의한 세균의 사멸율은 일반적으로 LTLT법은 97.3-99.9%, HTST법은 95.9-99.8%, UHT법은 99.99-100%라고 알려져 있음.
- 원유의 UHT 처리는 국내에서 일반적으로 사용되고 있는 방법으로서 UHT 처리 후 일반포장되는 우유와 무균상태에서 포장되는 롱라이프(long life) 우유가 있음.
- UHT 처리 시스템에서는 우유의 미생물이 거의 다 사멸되어 세균의 사멸율이 99.99%에 달하지만, UHT 살균유의 경우 멸균되지 않은 용기에 충전 포장하므로 용기에 의한 세균의 2차 오염으로 인한 고미, 이상품미, 점질화 등이 제품의 저장 중에 발생하여 문제시되고 있음.
- 따라서 일반포장 제품은 열처리 직후 무균상태이나 충전 포장되는 과정에서 세균의 2차 오염 때문에 보존기간이 냉장상태에서 10일 이내인 반면 무균포장 제품은 보존기간이 국내에서는 6주, 외국에서는 최장 6개월까지 보존이 허용되고 있음.
- 그러나 강력한 가열공정이라도 원유에서 유래하는 포자와 세균을 완전히 제거할 수는 없으며, 초고온 멸균제품에서도 1 L 용량의 제품 1,000개당 1제품 이하가 세균을 함유하여 상온에서의 저장과 수송 중의 변패를 일으킬 수 있음이 지적되고 있음.
- 또한 식품공전 상 미생물적 규격은 일반세균수 20,000 cfu/mL 이하, 대장균군은 2 cfu/mL 이하로 규정하고 있어 온도 관리와 미생물의 오염 정도가 시유의 품질에 큰 영향을 초래함을 시사하고 있음.
- UHT 처리 우유는 가열처리 과정에서 세균은 모두 사멸되었다 하더라도 일부 내열성이 강한 저온세균 효소가 잔존하여 우유의 gel화를 일으키거나, 단백질 및 지방 등을 분해하여 제품의 품질저하를 초래할 수 있음.

- UHT 멸균유에 대한 보존성 실험에서 4°C 저장의 경우 저장기간이 길어질수록 침전되는 큰 단백질 입자가 증가한다고 하였으며, 우유 저장 중 casein과 whey protein의 중합정도는 UHT 처리에 의한 변화보다 더 크다는 보고도 있음.
- 또한 UHT 가공은 우유의 관능적인 면에서 악영향을 미치는데, 가열에 따른 Maillard 갈변화에 의한 생성물은 가열처리된 유제품의 풍미에 부정적으로 작용하며, 유청 단백질의 변성에 의한 황화합물의 생성 또한 우유의 변패취를 발생하게 함.
- 우유는 냉장 보존 시에 7°C 또는 그 이하에서 생육하는 저온세균의 증식으로 우유의 풍미 변화를 가져오며, 이러한 균이 생산하는 protease나 lipase 등의 내열성 효소의 작용으로 우유의 풍미와 보존성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있음.
- 고온에서 일어나는 많은 화학변화는 Maillard reaction을 비롯하여 lactuloselysine, lysinoalanine, fructoselysine, furosine, pyridosine 생성반응 등과 같은 바람직하지 못한 측면도 보고되어 있음.
- 우리나라에서는 1980년대부터는 거의 대부분의 유업체에서 유통과정상 보존성이 좋은 UHT 처리법을 주로 이용하고 있으나 우유의 열처리 조건이 우유의 품질 즉, 성분 및 영양에 미치는 영양에 대해서는 논쟁이 분분하여 왔음.
- 우유 중 단백질( $\beta$ -락토글로블린)은 열에 의해 변성되는데, HTST에서는 20%, UHT 우유에서는 70-80%(간접 가열법), 40-60%(직접가열법)가 변성되는 것으로 알려짐.
- 대부분 우유의 비타민은 열에 안정적이며, 비타민 A, D, E, riboflavin, pantothenic acid, biotin, niacin 등은 UHT 처리 시에는 별 영향을 받지 않음. 그러나 비타민 B1, B6, B12, folic acid, 비타민 C 등은 HTST 우유에서는 10%, UHT 우유에서는 20% 정도 소실되는 것으로 알려짐.
- 위와 같은 문제를 해결하기 위한 방법으로 저온살균공법(LTLT) 및 감마선 조사 등 우유에 열을 적게 가하는 방법을 이용한 살균법에 관한 시도가 이루어져 왔으나, 아직까지는 기존의 살균 방법인 UHT를 대체할 수 있는 효과적인 저온 살균법에 관한 뚜렷한 해결책은 찾지 못하고 있는 실정임.
- 본 연구에서는 우유의 PEF 살균을 통하여 기존의 저온살균 공정의 대체 가능성을 파악하고, HTST 방법과 PEF의 방법을 병용하여 살균처리 함으로써 UHT 살균의 대체 가능성뿐만 아니라 UHT 처리법에 의한 살균효과보다 더욱 효과적인 살균처리 방법을 개발하고자 함.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 펄스 전기장에 의한 액체 식품의 살균

- 펄스 플라즈마 장치의 핵심이라 할 수 있는 펄스 발생 장치를 이용한 비열 살균장치의 개발은 독일, 미국, 일본 등 기술 선진국에서 1990년대부터 본격적으로 연구되기 시작하였으며, 가열 조작에 의한 에너지 손실을 방지할 수 있고 식품이 변질되지 않는 특징을 가지고 있어 앞으로 실용화가 가장 기대되는 새로운 살균 기술임.
- 펄스 전기장은 미생물을 불활성화할 수 있는 연구결과를 바탕으로 식품살균에 직접적으로 적용하는 실험들이 이루어지고 있음. 지금까지의 식품살균에의 적용을 보면 미국의 Maxwell Lab.은 과일 주스나 액란의 살균, 연세대학교에서는 당근주스, 전주대학교에서는 김치소스와 같은 식품의 살균에 대한 연구결과를 발표하였음.
- 독일의 Krupp Maschinenteknik GmbH에서는 ELSTERIL이란 펄스 전기장에 의한 살균 공정을 개발하였으며, 동 연구팀과 FML Europe N.V, Berlin 대학과 공동 연구로 연속식 살균 장치를 개발하고 신선한 오렌지 주스를 펄스 전기장으로 처리한 결과 신선한 착즙 주스의 품질을 거의 손상시키지 않으면서 오렌지 주스의 균수를 3 log 정도 감소시킬 수 있었음.
- 미국 Washington 주립대학의 Barbosa 등은 사과 주스의 초기 *Saccharomyces cerevisiae*의 농도가  $10^6$  cell/mL인 경우에 40 kV/cm에서 10 Hz로 펄스를 반복 처리함으로써 1 CFU/mL까지 감소시킬 수 있었다고 하였음. 또한 Grahl은 우유, 오렌지 주스를 펄스 전기장을 이용하여 살균한 결과 미생물에 20 kV/cm 이상의 전기장을 걸어주면 효과적으로 사멸시킬 수 있었다고 보고하였음.
- Ohio 주립대학의 Zhang 교수 연구팀에서는 시간당 2,000 L를 처리할 수 있는 pilot 규모의 연속식 PEF 처리장치와 무균 포장장치를 연결하여 오렌지 주스를 생산하는 실험을 실시한 바 있으며, 우유 살균의 경우 3단계의 펄스 전기장 처리가 필요하였으며, 각 단계에서 16 pulse 처리를 하여 2-3 log 정도의 균수를 감소시켰음.
- 또한 독일 Berlin 대학의 Knorr 교수 그룹의 미발표된 자료에 의하면 초고온 살균한 우유에 *Pseudomonas fluorescences*를 현탁시키고 7-22.5 kV/cm 범위의 펄스 전기장으로 20 pulse 처리하였을 때 전계 강도를 증가시키면 따라 최대 4 log까지 균수를 감소시킬 수 있었다고 보고하였음.
- 일본 君馬大學의 佐藤교수는 맥주 효모를  $10^6$  cell/mL 정도로 맥아즙과 맥주에 현탁시키고 펄스 전기장 처리를 한 결과 13 kV/cm 이상에서 효모가 사멸되기 시작하여 전계강도가 증가함에 따라 비례적으로 감소한다고 하였음. 또한 *Lactobacillus brevis*를 맥주에  $2 \times 10^2$

cell/mL 현탁시키고 전계 강도 20 kV/cm, 체류시간 11분, 450 pulse/min를 걸어 주었을 때 완전히 사멸되었으며, 이 경우 맥주의 품질은 일반적인 성분 분석 값 및 시음 테스트 결과 처리 전후에 변화가 없다고 기술하였음.

- PEF 처리를 한 대부분의 식품은 기존의 열처리 공정을 거친 식품과 품질 비교를 하였을 경우 거의 차이가 없거나 우수한 것으로 평가됨.

## 2) 펄스 전기장 발생장치

- 미생물 살균에 가장 효과적인 것으로 알려져 있는 square wave pulse를 적용할 경우에는 transmission line의 impedance의 특성과 식품의 저항을 일치시키는 것이 문제이며, 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 특수한 pulse forming network(PFN)를 설계 제작하여야 함.
- 펄스 전기장을 이용한 살균 장치의 개발에서 pulse generator로부터 발생하는 펄스를 식품으로 매우 빠르게 방전하는 switching 장치가 중요함.
- 1990년대 초반까지는 spark gap switch를 주로 사용하였으나, 1995년 미국 Ohio 주립대학의 Zhang 등은 thyatron switch를 사용하였으며, 미국의 Purepulse 사에서는 이 기술을 이용하여 사업화를 목표로 하여 Coolpure라는 장치를 개발하기 시작하였음.

## 3) 에너지 절약 효과

- 펄스 전기장에 의한 살균공정의 에너지 효율은 연구자에 따라 다소 차이는 있으나 현저히 에너지가 절약되는 것으로 보고되고 있음.
- 미국 Washington 대학의 사과 주스 살균 공정에 대한 에너지 효율 분석 결과에 의하면 사과 주스 중의 *Saccharomyces cerevisiae*를 6 log 감소시키기 위하여 전계강도 35-50 kV/cm, 2-8 pulse(pulse duration 2.5  $\mu$ s)의 펄스 전기장을 걸어 주었을 때 사과 주스의 온도는 22-34 $^{\circ}$ C까지 상승하며, 이 때 에너지 소비량은 28-62 J/mL인 것으로 계산됨. 그러나 가열 살균 공정의 열효율은 40-50%이므로 실제 소요 에너지는 360-900 J/mL 범위가 될 것으로 추정됨. 이와 같은 점을 종합해 볼 때 펄스 전기장 살균은 재래 가열 살균에 비하여 1/6-1/30 정도 에너지가 절약되는 것으로 추정됨.
- 식품의 살균에 적용하기 위해 Ohio 주립대학 연구팀은 PEF 공정을 위한 식품의 조건 및 PEF system의 경제성을 분석하였음. PEF 살균기술이 적용 가능한 식품은 액체식품, 고체 입자 함유 식품, 일부 고형 식품 등으로, 연속 시스템의 도입을 위해서는 pumping이 가능하고 고형분이 포함되어 있을 경우에는 고른 분산이 가능하여야 하며, 크기에 제한이 있음.
- 또한 고형식품의 경우에는 회분식 처리만이 가능하며, 두께 30 mm 이하의 균일한 크기를 갖고 충분한 수분을 가져야 함. 경제성 분석 결과에 의하면 효모를 기준으로 50 $^{\circ}$ C를 넘지

않는 범위에서 5 log의 사멸을 얻기 위해서는 100 J/mL의 에너지, 0.17 cent/L가 필요하며, 전기적 에너지에 의한 온도의 상승을 막기 위한 냉각 시스템에는 약 170 J/mL, 0.22 cent/L 정도가 필요한 것으로 분석됨. Table 1에는 약 2,000 L/hr의 용량을 처리하기 위한 PEF 장비를 구축하는데 필요한 예상 경비를 정리하였음.

Table 1. Cost analysis for scale-up of PEF system with co-field chamber

	Liquid foods	Liquid food with particles	
		particle size = 1.25 cm	particle size = 2.5 cm
No. of Chamber	6	6	6
Electrodes gap	1.27 cm	5 cm	10 cm
Resistance ( $\Omega$ /chamber)	10	90	45
Peak Voltage (kV)	48	192	385
Peak Current (kA)	0.82	2.12	8.5
Velocity (cm/s)	784	50	12
System Cost (1,000 \$)	200-400	500-1,000	1,000-2,000

\* Average electric field strength 35 kV/cm, treatment time 50  $\mu$ s, Electrical resistance 200  $\Omega \cdot \text{cm}$

#### 4) 처리용기 디자인

- 펄스 전기장 처리를 위한 chamber는 기본적으로 식품과 접촉하는 2개의 전극과 전극 사이의 간격으로 이루어져 있으며, 식품과 접촉하는 전극 면적에 비하여 전극 사이의 간격이 아주 작아야 함.
- 처리 용기에는 기본적으로 static chamber와 continuous chamber의 두 가지 형태가 개발되고 있음. Static chamber는 실험실에서의 기초 연구에 적합하고 pilot plant 또는 상업용 장치 개발을 위해서는 continuous chamber를 개발하여야 함.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 세부과제 : 펄스 전기장 기술의 산업화 적용을 위한 품질기준 마련과 공정 연구

#### 1. 펄스 전기장 기술의 산업화 적용을 위한 품질 기준 마련과 공정연구

가. 국내외 관련 기술 및 시장 조사와 개발상황, 산업화 사례, 법령검토

(1) 비가열 살균 식품의 시장

(가) 비가열 살균

현재 식품분야의 최대 화두는 안전한 먹거리와 웰빙이다. 웰빙에 대한 소비자의 관심이 꾸준히 증가하면서 친환경, 유기농, 등의 신선식품을 선호하는 소비자가 증가하는 추세이다. 식품 섭취의 간편화, 시간 절약 등의 문화적 트렌드가 신선편이식품, 완전조리식품 같은 간편하고 신선한 식품으로 소비자들의 관심이 몰리고 있다.

신선식품은 원료 고유의 맛은 최대한 살리고 첨가물을 최소화하여 단기간 내 완성하여 즐길 수 있어야 하므로 생산, 유통, 판매가 쉽지 않다. 이러한 신선식품을 장기간 보존하고 유통하기 위해 영양소 파괴는 최소화 하며 유통기간을 연장하기 위하여 식품 가공업체는 비가열 살균에 많은 관심을 쏟고 있다.

대부분의 식품 살균에 있어서 가열 살균(UHT, HTST, LTLT 등) 처리를 하여 저장성을 늘리는데, 일반적으로 가열 처리는 미생물의 생육을 억제할 뿐 아니라 식품 자체의 품질(영양소 파괴, 향미 및 조직감 손실 등)에도 영향을 미칠 수 있다. 그러나 비가열 살균은 열로 인한 품질저하는 최소화 하며, 부패 및 병원성 미생물을 억제함으로써 저장성을 늘릴 수 있는 장점이 있다. 이와 관련하여 기존 가열 살균공정을 대체 또는 부분적으로 대신할 수 있도록 식품의 살균을 목적으로 비가열 살균이 이용되고 있다.

비가열 살균은 열을 가할 수 없는 식품이나 고유의 영양 및 기타 열에 민감한 성분을 함유한 식품, 음료 등에 오염된 미생물을 살균하기에 적합하다. 주로 음료 제조공정 또는 주스에서 보존성 향상을 위해 비가열 살균방법을 사용하는데 짧은 가공시간과 에너지 효율 그리고 생산수율 면에서 많은 이점이 있다.

살균 방법에 따라 다르지만 대부분의 비가열 살균의 특징은 에너지 절감, 강력한 살균력, 성분변화의 최소화, 갈변/탁도 발생 억제, 대용량 처리, 공정의 간편화, 연속식 생산 등이 있다.

식품/음료산업에서의 비가열 살균방법으로는 이온화조사(ionizing radiation), 여과살균(filter sterilization), 화학제(chemical agent), 고전압펄스 전기장(high voltage pulsed electric fields, PEF), 오존살균(ozone disinfection), 전기분해수(electrolyzed water), 광펄스(high-intensity pulsed light), 이산화티탄 광산화(TiO<sub>2</sub> photocatalytic oxidation), 초고압(high hydrostatic pressure, HHP) 등이 있다.

자외선 살균은 테프론 코일(Teflon-coil) UVC 시스템을 이용해 표면 살균 또는 투명한 액상 제품의 살균에 주로 사용한다. 증류수와 식염수, 당근주스, 사과주스, 포도주스를 대상으로 테프론 코일 UVC 시스템의 대장균(*E. coli* O157:H7), 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*), 맥주효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)의 살균효과를 분석한 결과 증류수와 식염수는 100% 처리된 반면 당근, 사과, 포도 주스의 경우 대장균은 99.5-100%의 살균력을 보인데 비해 살모넬라균과 효모균은 사과 주스에서 50-60%, 당근포도주스에선 거의 죽지 않았다.

방사선 조사(gamma irradiation)는 코발트60 동위원소에서 발생하는 고에너지 이온화 방사선에 식품을 노출시켜 전체 또는 일부의 미생물과 해충을 파괴하는 방법이다. 미생물에 의한 부패가 제한 요소인 식품의 보존기간을 연장하고 과일과 채소의 숙성 및 발아를 지연하기 위한 목적으로 일부 선진국의 경우 살충제등 농약과 발암유발 물질인 메틸브로마이드 및 에틸렌 옥사이드의 대체제로 사용한다. 인체 유해성이 전혀 없는데도 불구하고 방사선 조사 라벨 표시 제도화로 인한 소비자의 부정적 시각이 높다.

전자빔 조사(electron beam irradiation)는 전기장 내에서 광속에 가깝도록 가속화된 전자를 사용해 살균하는 방법으로, 감마선이나 X선보다 높은 양을 조사할 수 있다. 전자는 7 cm이상 침투할 수 없는 것이 큰 단점이다. 방사선 조사와 마찬가지로 국제적으로 공인된 Radura 로고를 표시해야 한다.

여과살균(filter sterilization)은 박테리아 크기의 미생물을 걸러낼 수 있을 정도로 작은 구멍 크기를 가진 여과장치를 사용해 살균 및 제균하는 방법으로, 주로 맥주제품에 적용한다.

화학제 살균제(chemical disinfectant)는 주로 과일이나 야채 등 신선편이식품에 사용하는데, 흔히 락스라고 부르는 차아염소산 나트륨과 칼슘염, 이산화염소, 과산화수소, 오존, 과초산, 유기산 등이 있다. 양상추 등 채소를 중심으로 한 샐러드 등 신선편이(Ready to Eat)식품은 염소수로 세척 살균 후 MA(가스치환방식)포장으로 유통시키는 염소살균법이 적용되고, 오존살균은 오존(O<sub>3</sub>)이 세포막 내 불포화지질을 분해하고 세포 내 물질의 산화에 의해 미생물을 파괴하는 힘을 이용해 그람 음성균의 살균에 사용한다.

이외에도 전기분해수를 이용한 살균이 있으나 그 효과는 그다지 높지 않고, 이산화티탄(TiO<sub>2</sub>)광촉매 반응(photocatalytic reaction)을 이용해서는 과일 채소의 부패를 방지하고 저장기간을 연장한다. TiO<sub>2</sub>-UV광촉매 살균시스템은 차아염소산나트륨보다 10배 이상 효과가 있는데다 무독성이며 화학적으로도 안정하고, 반복사용이 가능하며 폐기물이 발생하지 않는 장점이 있다.

초고압기술(high hydrostatic pressure technology, HHP)은 포장 또는 무포장 상태의 액체나 고체 식품을 살균하는 방법이다. 40-1000 MPa의 압력(상업시스템은 400-700 MPa)으로 10-20분간 처리해야 하므로 용기는 수많은 공정 사이클 동안 높은 압력을 안전하게 견디도록 특수 디자인해야 하며 경제성을 고려해 처리시간을 20분 이하로 조절하는 것이 필요하다. HHP기술은 초기 설비투자비용이 크고 공장 내 차지하는 면적이 넓으며 기존 설비에 적용하여 사용하는데 어려움이 있다. 또한 배치시스템으로 연속식 처리가 불가능한 단점이 있다(Fig. 1-1).

고전압 펄스 전기장 발생장치(Pulsed electric fields, PEF)는 기본적으로 2개의 전극 사이에 식품을 넣고 10 kV/cm 이상의 고전압 전기장을 순간적으로 방전시킬 수 있는 시스템으로 구성되어 있다. 일반적으로 액체 식품은 자신이 갖고 있는 이온 때문에 식품 내에 고전압 펄스를 걸어 주면 순간적으로(수  $\mu$ s) 용기내의 식품 속으로 고전류가 흐르게 된다. 이때 식품에 펄스를 반복 처리하여도 실제 처리시간은 매우 짧기(1 ms- $\mu$ s 이하) 때문에 식품은 거의 가열되지 않는다(Fig. 1-2).

PEF는 살균에 열을 이용하지 않는 비가열 공정으로서 영양 손실이 적고 안전한 제품을 생산할 수 있다는 점에서 다양한 비가열 살균법과의 차별성을 가지고 있다.

PEF 기술은 미생물을 선택적으로 사멸시킬 수 있으며, 상온의 영역에서 살균되므로 열처리에 의해 품질의 특성이 열화되는 유제품, 과일·야채 음료를 비롯하여 식초음료, 막걸리 등 발효식품의 살균에 효과적으로 확대되어 사용될 수 있다.

PEF 기술은 액상제품의 연속적 처리가 가능하며 미립자를 포함한 액상제품부터 고상의 제품에까지 널리 적용 가능한 장점이 있다.

PEF 장치설비의 경우 전기발생 장치 이외에 특별히 별도의 설비가 필요치 않아 간단하게 현장 적용이 가능하며, 기기장치의 도입 비용도 저렴하고 처리비용도 1-2 €/t 수준으로 저렴하여 열에너지에 대한 절약 효과가 뛰어나며, 연속적 공정으로 사용이 가능하여 식품 가공 기술로서 다양한 적용을 시도할 수 있다.

현재 알려진 PEF의 이용 목적은 액상 식품의 미생물 오염 제거, 5-7 log cycle 범위의 병원균 및 부패 유기물의 불활성, 제품의 유통기한 증가, 비타민, 단백질 등 영양성분의 유지 등 제품의 기능적 특성에 영향을 끼치지 않아 신선 주스, 유제품, 영양강화 음료 및 화장품 등 열에 민감한 여러 제품에 효과적으로 적용 가능한 연구 결과와 사례들이 나오고 있다. 본 연구를 통해 PEF를 활용한 새로운 비열 살균 유제품의 개발로 과도한 가열처리에 따른 영양소 손실을 방지하며, 신선하고 품질이 우수한 신선유제품의 개발을 목적으로 한다.



Fig. 1-1. 초고압 살균장치(HHP)



Fig. 1-2. 고전압 펄스 장기자장 발생장치(PEF)

(나) 국내외 비가열살균 식품

PEF는 독일에서 처음 개발되어 유럽의 많은 나라들이 이를 식품에 적용하여 시장을 형성하고 있다. PEF를 활용한 제품을 생산하는 기업과 국가는 다음과 같다. Wernsing GmbH(German), Cosun(NL), Orchard House(UK), Hoogesteger(NL), FruityKing(NL), Lassonde(Canada), Uelzena(German) 등 음료 및 과일 주스 시장이 주를 이룬다(Fig. 1-3).



Fig. 1-3. PEF 적용 제품 해외사례

국내에는 비가열살균으로서 PEF를 활용한 제품은 없으며, 초고압살균을 이용한 과일 주스 및 음료 제품으로 국한되어 있다(Fig. 1-4).



Fig. 1-4. 국내 생산 비가열살균식품

국내에는 비가열 제품이 많이 생산되고 있지 않은 실정으로 그나마도 초고압 살균장치를 이용한 제품이 대부분이며, 가열과 병용한 초고압살균을 이용한 즉석밥, 커피음료 등이 있다.

앞으로 식품 살균기술은 건강한 식품, 신선한 음료 시장에 더욱 활성화되어야 할 것이며, 특히 PEF를 활용한 비가열 식품은 국내에 없는 시장으로서 활용 가능한 분야가 다양하고 설비비용 및 처리비용이 저렴하여 쉽게 접근가능 할 것으로 여겨진다.

## (2) 우유의 살균기술 변화

우유는 단백질이 풍부한 완전식품으로서 전 세계적으로 애용하는 식품이다. 그러나 우유의 풍부한 영양분은 미생물이 생육하기 좋은 환경이 되며 미생물의 증식으로 인한 보존성이 떨어지는 문제가 있다. 우유의 보존성을 높이기 위해 각 나라별 가공품을 만들어 저장하는 방법을 택해 왔으며 오래전부터 치즈, 버터, 요거트 등으로 가공하여 섭취해왔다.

우유의 살균은 근대에 발전하기 시작하여 그 역사가 매우 짧다. 우유가 산업화되기 전 유통은 농장에서 우유를 짜내어 배달하는 형식이었다. 당시 품질에 대한 기준과 규격이 없어 식중독과 같은 피해는 불가피 했다.

해외의 우유 살균기술은 1860년 Louis Pasteur에 의해 저온살균이론이 정립되면서부터 시작되어 산업적인 살균 공정에 이르기 까지 발전하였다(Table 1-1).

Table 1-1. 국외 우유살균의 역사

연도(년)	내용	연도(년)	내용
1860	Louis Pasteur, 살균이론 정립	1927	HTST 살균법 등장
1870	Fjord, 우유에 살균법을 적용	1932	용기내 멸균법 실용화
1888	A. Callie, 멸균기 개발	1949	간접식 UHT 열교환기 실용화 보급
1893	125°C, 5분 연속살균법 개발	1951	무균포장법 개발
1894	스팀주입식 직접살균법 개발, 병장멸균법	1952	무균충전용 UHT 처리시스템 개발
1912	130-140°C 초고온 순간 연속식 살균법 특허	1961	VTIS 공법, Tetra-Pak 시스템
1914	뉴욕시, 61.1-62.7°C 30분 살균법 고시	1991	캐나다, MF-ESL 우유 생산 Tetra-Pak, UHT-ESL 우유생산

국내에는 1933년 일본으로부터 LTLT 살균법을 도입하였으며, 이 기술을 토대로 1937년 경성우유협동조합을 설립하였다. 1957년 일본으로부터 UHT 멸균법을 도입하여, 1974년에 최초로 멸균우유를 생산하였다. 그 후 UHT-ESL 우유 생산, 튜브식 열교환기 도입 등 우유 살균역사가 발전하게 되었다. 지금까지 우유의 살균은 UHT를 통해 유해균을 사멸시키고 저장성을 증진시키는 방향으로 발전해 왔다.

최근 소비자의 식품에 대한 관심은 건강과 안전이며, 가능한 천연 상태의 물질을 유지한 제품을 요구하고 있다. 식품 본연의 품질을 유지하면서 유통기간 중 안전성을 확보하는 기술이 필요하다고 할 수 있다. 따라서 우유의 천연 영양성분은 보존한 채로 UHT 살균에 준하는 저장기간의 안정성을 갖추어 소비자의 니즈를 충족시킬 필요가 있다. 그 일환으로서 본 연구는 PEF를 우유 살균에 적용하여 비가열로서 부패·식중독 미생물로부터 안전성을 확보하고, 영양이 보존된 신선한 유제품을 개발할 수 있도록 적용 가능한 공정과 이를 규명하기 위한 기준을 정하여 표준화하였다.

### (3) PEF 살균 기술의 연구개발 현황

펄스 발생 장치를 이용한 비열 살균장치의 개발은 독일, 미국, 일본 등 기술 선진국에서 1990년대부터 본격적으로 연구되기 시작하였으며, 가열 조작에 의한 에너지 손실을 방지할 수 있고 식품이 변질되지 않는 특징을 가지고 있어 앞으로 실용화가 가장 기대되는 새로운 살균 기술이다.

펄스 전기장은 미생물을 불활성화할 수 있는 연구결과를 바탕으로 식품살균에 직접적으로 적용하는 실험들이 이루어지고 있다. 지금까지의 식품살균에의 적용을 보면 미국의 Maxwell Lab.은 과일 주스나 액란의 살균, 연세대학교에서는 당근주스, 전주대학교에서는 김치 소스와 같은 식품의 살균에 대한 연구결과를 발표하였다.

독일의 Krupp Maschinentechnik GmbH에서는 ELSTERIL이란 펄스 전기장에 의한 살균 공정을 개발하였으며, 동 연구팀과 FML Europe N.V, Berlin 대학과 공동 연구로 연속식 살균 장치를 개발하고 신선한 오렌지 주스를 펄스 전기장으로 처리한 결과 신선한 착즙 주스의 품질을 거의 손상시키지 않으면서 오렌지 주스의 균수를 3 log 정도 감소시킬 수 있었다.

미국 Washington 주립대학의 Barbosa 등은 사과 주스의 초기 *Saccharomyces cerevisiae*의 농도가  $10^6$  cfu/mL 인 경우에 40 kV/cm에서 10 Hz로 펄스를 반복 처리함으로써 1 cfu/mL 까지 감소시킬 수 있었다고 하였다. 또한 Grahl은 우유, 오렌지 주스를 펄스 전기장을 이용하여 살균한 결과 미생물에 20 kV/cm 이상의 전기장을 걸어주면 효과적으로 사멸시킬 수 있었다고 보고하였다.

Ohio 주립대학의 Zhang 교수 연구팀에서는 시간당 2,000 L를 처리할 수 있는 pilot 규모의 연속식 PEF 처리장치와 무균 포장장치를 연결하여 오렌지 주스를 생산하는 실험을 실시한 바 있으며, 우유 살균의 경우 3단계의 펄스 전기장 처리가 필요하였으며, 각 단계에서 16 pulse 처리를 하여 2-3 log 정도의 균수를 감소시켰다.

또한 독일 Berlin 대학의 Knorr 교수 그룹의 미발표된 자료에 의하면 초고온 살균한 우유에 *Pseudomonas fluorescences*를 현탁시키고 7-22.5 kV/cm 범위의 펄스 전기장으로 20 pulse 처리하였을 때 전계 강도를 증가시킴에 따라 최대 4 log까지 균수를 감소시킬 수 있었다고 보고하였다.

일본 君馬大學의 佐藤교수는 맥주 효모를  $10^6$  cfu/mL 정도로 맥아즙과 맥주에 현탁 시키고 펄스 전기장 처리를 한 결과 13 kV/cm 이상에서 효모가 사멸되기 시작하여 전계 강도가 증가함에 따라 비례적으로 감소한다고 하였다. 또한 *Lactobacillus brevis*를 맥주에  $2 \times 10^2$  cfu/mL 현탁 시키고 전계 강도 20 kV/cm, 체류시간 11분, 450 pulse/min를 걸어 주었을 때 완전히 사멸되었으며, 이 경우 맥주의 품질은 일반적인 성분 분석 값 및 시음 테스트 결과 처리 전후에 변화가 없다고 기술하였다.

연구결과를 토대로 PEF 처리를 한 대부분의 식품은 기존의 열처리 공정을 거친 식품과 품질 비교를 하였을 경우 거의 차이가 없거나 우수한 것으로 평가됨과 동시에 미생물 살균 효과가 탁월함을 확인하였다.

#### (4) PEF처리 우유제품의 전망

우유는 세균증식에 있어 중요한 수분, 단백질, 탄수화물, 비타민, 무기질 등을 함유하고 있어 미생물이 성장할 수 있는 이상적인 조건을 가지고 있기 때문에 원유에 존재하는 병원균 및 부패균을 사멸시켜 제품의 저장성을 향상시키고 우유의 변질을 초래하는 효소를 파괴하기 위해 살균공정을 실시하고 있다. 현재 우리나라에서 이용되는 일반적인 열처리에 의한 우유의 살균 방법으로는 저온장시간 살균법(LTLT: Low Temperature Long Time, 63-65°C, 30분), 고온단시간살균법(HTST: High Temperature Short Time, 72-75°C, 15-20초) 및 초고온순간살균법(UHT: Ultra High Temperature, 130-150°C, 0.5-5초) 등이 있다. 각종 살균법에 의한 세균의 사멸율은 일반적으로 LTLT법은 97.3-99.9%, HTST법은 95.9-99.8%, UHT법은 99.99-100%라고 알려져 있다.

원유의 UHT 처리는 국내에서 일반적으로 사용되고 있는 방법으로서 UHT 처리 후 일반 포장되는 우유와 무균상태에서 포장되는 롱라이프(long life) 우유가 있다. UHT 처리 시스템에서는 우유의 미생물이 거의 다 사멸되어 세균의 사멸율이 99.99%에 달하지만, UHT 살균유의 경우 멸균되지 않은 용기에 충전 포장하므로 용기에 의한 세균의 2차 오염으로 인한 고미, 이상풍미, 점질화 등이 제품의 저장 중에 발생하여 문제시되고 있다. 따라서 일반포장 제품은 열처리 직후 무균상태이나 충전 포장되는 과정에서 세균의 2차 오염 때문에 보존기간이 냉장상태에서 10일 이내인 반면 무균포장 제품은 보존기간이 국내에서는 6주, 외국에서는 최장 6개월까지 보존이 허용되고 있다.

그러나 강력한 가열공정이라도 원유에서 유래하는 포자와 세균을 완전히 제거할 수는 없으며, 초고온 멸균제품에서도 1 L 용량의 제품 1,000개당 1제품 이하가 세균을 함유하여 상온에서의 저장과 수송 중의 변패를 일으킬 수 있음이 지적되고 있다. 또한 식품공전 상 미생물적 규격은 일반세균수 20,000 cfu/mL 이하, 대장균군은 2 cfu/mL 이하로 규정하고 있어 온도 관리와 미생물의 오염 정도가 시유의 품질에 큰 영향을 초래함을 시사하고 있다.

UHT 처리 우유는 가열처리 과정에서 세균은 모두 사멸되었다 하더라도 일부 내열성이 강한 저온 세균 및 효소가 잔존하여 우유의 gel화를 일으키거나, 단백질 및 지방 등을 분해하여 제품의 품질저하를 초래할 수 있다. UHT 멸균유에 대한 보존성 실험에서 4℃ 저장의 경우 저장기간이 길어질수록 침전되는 큰 단백질 입자가 증가한다고 하였으며, 우유 저장 중 casein과 whey protein의 중합 정도는 UHT 처리에 의한 변화보다 더 크다는 보고도 있다.

또한 UHT 가공은 우유의 관능적인 면에서 악영향을 미치는데, 가열에 따른 Maillard 갈변화에 의한 생성물은 가열처리된 유제품의 풍미에 부정적으로 작용하며, 유청 단백질의 변성에 의한 황화합물의 생성 또한 우유의 변패취를 발생하게 한다.

우유는 냉장 보존 시에 7℃ 또는 그 이하에서 생육하는 저온세균의 증식으로 우유의 풍미변화를 가져오며, 이러한 균이 생산하는 protease나 lipase 등의 내열성 효소의 작용으로 우유의 풍미와 보존성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

고온에서 일어나는 많은 화학변화는 Maillard reaction을 비롯하여 lactuloselysine, lysinoalanine, fructoselysine, furosine, pyridosine 생성반응 등과 같은 바람직하지 못한 측면이 보고되어 있다.

우리나라에서는 1980년대부터는 거의 대부분의 유업체에서 유통과정상 보존성이 좋은 UHT 처리법을 주로 이용하고 있으나 우유의 열처리 조건이 우유의 품질 즉, 성분 및 영양에 미치는 영양에 대해서는 논쟁이 분분하여 왔다.

우유 단백질( $\beta$ -lactoglobulin)은 열에 의해 변성되는데, HTST에서는 20%, UHT 우유에서는 70-80%(간접 가열법), 40-60%(직접가열법)가 변성되는 것으로 알려져 있다.

대부분 우유의 비타민은 열에 안정적이며, 비타민 A, D, E, riboflavin, pantothenic acid, biotin, niacin 등은 UHT 처리 시에는 별 영향을 받지 않는다. 그러나 비타민 B1, B6, B12, folic acid, 비타민 C 등은 HTST 우유에서는 10%, UHT 우유에서는 20% 정도 소실되는 것으로 알려져 있다.

위와 같은 문제를 해결하기 위한 방법으로 저온살균공법(LTLT) 및 감마선 조사 등 우유에 열을 적게 가하는 방법을 이용한 살균법에 관한 시도가 이루어져 왔으나, 아직까지는 기존의 살균 방법인 UHT를 대체할 수 있는 효과적인 저온 살균법에 관한 뚜렷한 해결책은 찾지 못하고 있는 실정이다.

##### (5) 관련법규 및 규정

『축산물의 가공기준 및 성분규격』에서 축산물의 가공기준에는 ‘축산물 처리·가공 중 건조, 농축, 열처리, 냉각 또는 냉동 등의 공정은 제품의 영양성, 안전성을 고려하여 적절한 방법으로 실시하여야 한다.’라고 명시되어 있다.

『살균과 멸균에 관련된 가공기준』으로 ‘유가공품의 살균 또는 멸균 공정은 따로 정하여진 경우를 제외하고 저온장시간살균법(63-65℃에서 30분간), 고온단시간 살균법(72-75℃에서 15-20초간), 초고

온순간처리법(130-150℃에서 0.5-5초간) 또는 이와 동등 이상의 효력을 가지는 방법으로 실시하여야 한다. 그리고 살균제품에 있어서는 살균 후 즉시 10℃이하로 냉각하여야 하고, 멸균제품은 멸균한 용기 또는 포장에 무균공정으로 충전·포장하여야 한다.'고 되어있다.

Table 1-2에서 우유 제품으로써 갖추어져야 할 규격을 보여준다. PEF 처리유의 기준 또한 항목에 적합한지 연구를 통해 검토해야하며, 가열과 PEF를 병용 처리 후 기본적인 규격은 이 성분규격에 따를 것이다.

Table 1-2. 우유류의 기준 및 규격(축산물의 가공기준 및 성분규격, 2001)

항목	성분규격
성상	유백색-황색의 액체로서 이미·이취가 없어야 한다.
비중(15℃)	1.028-1.034
산도(%)	0.18 이하(젖산으로서)
무지유고형분(%)	8.0 이상
유지방(%)	3.0 이상
세균수	1 mL 당 20,000 이하(멸균제품의 경우 55℃에서 1주 또는 30℃에서 2주 보관 후 표준평판배양법에 의한 때 음성이어야 한다. 단, 유산균첨가제품의 경우 유산균수를 제외한다.)
대장균군	n=5, c=2, m=0, M=10(멸균제품의 경우 음성이어야 한다.)
포스파타제	음성이어야 한다(저온장시간 살균제품, 고온단시간 살균제품에 한한다.).
유산균수	1 mL 당 1,000,000 이상(단, 유산균 첨가제품에 한한다.)

『지정검역물의 멸균·살균·가공의 범위와 기준』에 멸균에 대한 기준에는 “멸균”이라 함은 습열(121℃ 15-20분, 또는 115℃ 35분), 건열(160-170℃에서 1-2시간) 또는 이와 동등이상의 효력이 있는 방법으로 처리하여 가축의 전염병병원체가 사멸된 것으로서 재오염 되지 않도록 조치한 상태의 것을 말한다.'고 명시되어있다.

『살균에 대한 기준』에 “살균”이라 함은 유가공품에 대하여 적용하는 것으로 72℃ 15초 이상 처리 또는 이와 동등이상의 효력이 있는 방법으로 처리한 것을 말한다.'고 명시되어있다.

『유제품의 살균 범위와 기준』에서 구제역 청정국과 비 청정국으로 나뉘어져 있는데 우리나라가 해당되는 비 청정국 기준에는 ‘국제기준(OIE)에 의하여 살균처리(HTST, UHT)한 유가공품’으로 기준을 두고 있다. 구제역 청정국의 기준으로는 ‘살균처리(UHT, HTST, LTLT)한 유가공품’으로 기준을 두고 있다.

IDF(국제낙농연맹)에 따르면, '살균이란 제품에 대한 화학적, 물리적 및 관능적 변화가 최소가 되도록 열처리를 가함으로 우유에 관련되는 병원 미생물에 의해 일어날 수 있는 건강장해를 최소화하는 것을 목적으로 하며, 멸균이란 100℃가 넘는 열처리를 가함으로써 모든 미생물을 제거하는 것을 목적으로 하는 열처리 방법이다.'고 규정하였다.

CODEX의 우유의 위생관련 규범 부록 B에서 electromagnetic energy treatment는 microwave energy, radio-frequency energy, high electric field pulses를 포함하고 있다. 이 treatment는 세포막에 전기적 충격이 세포벽의 구멍을 형성하여 세포를 파괴하는 방법이라고 기술되어 있다. 또한 가열살균(HTST, LTLT, UHT)은 특정 온도와 시간으로 처리하는 것 또는 그에 해당하는 살균효과를 가지는 방법이라고 명시되어 있다.

이상 『축산물관리기준』과 CODEX 규정 및 IDF 등의 법령 검토를 통한 가열살균의 기준을 검토한 바 법령기준에 준하는 살균기술 중 가장 일반적으로 사용되는 가열살균기술은 UHT 살균이며, 이는 과도한 가열처리로 인해 저장기간을 늘릴 수 있는 장점은 있으나 영양성분 및 관능적 열변성을 초래하는 단점을 가지고 있다. 그에 비해 HTST 살균은 UHT 살균에 비교하여 비교적 낮은 온도에서 살균이 진행되기 때문에 영양소나 관능적 변화는 보다 더 안정되고 품질이 좋으나 저장기간이 UHT에 비해 짧다는 단점을 가지고 있다.

한편 PEF의 경우에는 비가열 살균 기술로서 HTST 보다 현저히 낮은 온도에서 살균이 진행되기 때문에 영양성분의 변화를 최소화할 수 있는 살균 공정이다. 때문에 HTST와 PEF 살균을 병행할 경우 UHT 살균 공정과 유사하거나 그 이상의 살균 효과를 가져 올 수 있을 것이라 판단되며, 법령 및 기준에 준하는 수준의 살균효과를 낼 수 있으며 동시에 영양성분의 변성이나 품질변화를 최소화하여 살균처리를 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 나. 기기 도입 및 부대 시설 설계와 공정연구

### (1) PEF 정의

#### (가) PEF system의 구성과 원리

고전압 펄스 전기장의 발생장치는 기본적으로 2개의 전극 사이에 식품을 두고 10 kV/cm 이상의 고전압 전기장을 순간적으로 방전시킬 수 있는 시스템으로 구성되어 있다.

이 장치의 기본적인 요소는 Fig. 1-5와 같이 직류 전원 장치(DC power supply), 에너지를 저장하기 위한 축전기(capacitor), 저장된 에너지를 순간적으로 방전하는 switching 장치, 그리고 식품의 처리를 위한 용기(chamber)로 구성되어 있다.

일반적으로 액체 식품은 자신이 갖고 있는 이온 때문에 식품 내에 고전압 펄스를 걸어 주면 순간적으로(수  $\mu$ s) 용기내의 식품 속으로 고전류가 흐르게 된다. 이때 식품에 펄스를 반복 처리하여도 실

제 처리시간은 매우 짧기(1 ms- $\mu$ s 이하)때문에 식품은 거의 가열되지 않는다.

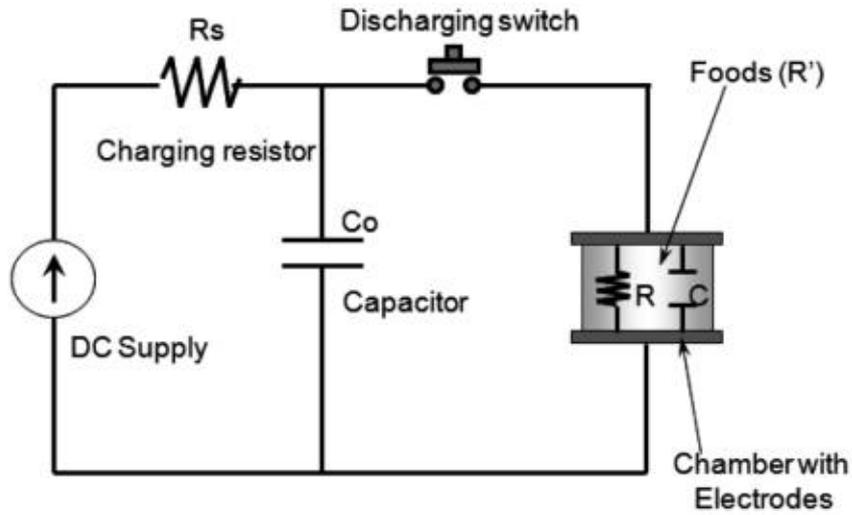


Fig. 1-5. Schematic diagram of high voltage pulsed electric field system(신정규 외 2010).

(나) 불활성화 기작

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 미생물의 살균기작은 비가역적인 electroporation이며 이러한 현상은 주로 세포막의 압축(compression)에 의한 것으로 알려져 있다. 세포에 고전압 전기장을 걸어주면 세포막 표면에 발생된 전하는 반대전하를 갖고 따라서 두 전하사이에 인력이 작용하게 된다. 이 힘은 세포막을 압축시키고 막의 두께를 감소시키게 된다. 그리고 임계전계강도( $E_c$ )를 넘게 되면 세포막에 비가역적인 세공(pore)이 형성되어 투과성이 증가되고 세포는 사멸하게 된다는 것이다(Fig. 1-6).

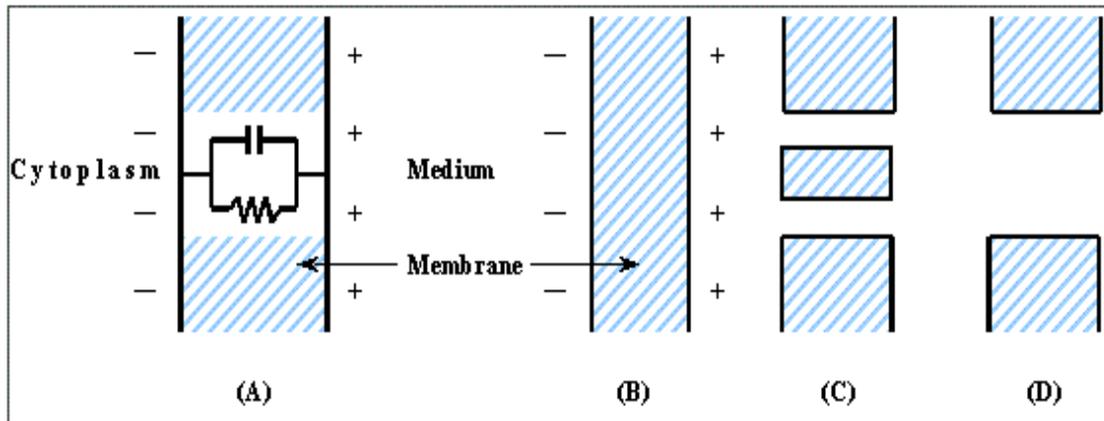


Fig. 1-6. Electroporation of cell membrane due to compression when exposed to high intensity electric fields(신정규 외, 2000).

- (A) in the absence of electric field  $E=0$
  - (B) in the presence of electric field  $E < E_c$
  - (C) in the presence of electric field  $E > E_c$
  - (D) in the presence of electric field  $E \gg E_c$
- $E_c$  represents the critical electric field.

(다) 펄스 전기장 발생장치

미생물 살균에 가장 효과적인 것으로 알려져 있는 square wave pulse를 적용할 경우에는 transmission line의 impedance의 특성과 식품의 저항을 일치시키는 것이 문제이며, 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 특수한 pulse forming network(PFN)를 설계 제작하여야 한다.

펄스 전기장을 이용한 살균 장치의 개발에서 pulse generator로부터 발생되는 펄스를 식품으로 매우 빠르게 방전하는 switching 장치가 중요하다. 1990년대 초반까지는 spark gap switch를 주로 사용하였으나, 1995년 미국 Ohio 주립대학의 Zhang 등은 thyatron switch를 사용하였으며, 미국의 Purepulse 사에서는 이 기술을 이용하여 사업화를 목표로 하여 Coolpure라는 장치를 개발하기 시작하였다.

(라) 에너지 절약 효과

펄스 전기장에 의한 살균공정의 에너지 효율은 연구자에 따라 다소 차이는 있으나 현저히 에너지가 절약되는 것으로 보고되고 있다.

미국 Washington 대학의 사과 주스 살균 공정에 대한 에너지 효율 분석 결과에 의하면 사과 주스 중의 *Saccharomyces cerevisiae*를 6 log 감소시키기 위하여 전계강도 35-50 kV/cm, 2-8 pulse(pulse duration 2.5  $\mu$ s)의 펄스 전기장을 걸어 주었을 때 사과 주스의 온도는 22-34 $^{\circ}$ C까지 상승하며, 이 때 에너지 소비량은 28-62 J/mL인 것으로 계산된다. 그러나 가열 살균 공정의 열효율은

40-50% 이므로 실제 소요 에너지는 360-900 J/mL 범위가 될 것으로 추정된다. 이와 같은 점을 종합해 볼 때 펄스 전기장 살균은 재래 가열 살균에 비하여 1/6-1/30 정도 에너지가 절약되는 것으로 추정된다.

식품의 살균에 적용하기 위해 Ohio 주립대학 연구팀은 PEF 공정을 위한 식품의 조건 및 PEF system의 경제성을 분석하였다. PEF 살균기술이 적용 가능한 식품은 액체식품, 고체입자 함유 식품, 일부 고형 식품 등으로, 연속 시스템의 도입을 위해서는 pumping이 가능하고 고형분이 포함되어 있을 경우에는 고른 분산이 가능하여야 하며, 크기에 제한이 있다.

또한 고형식품의 경우에는 회분식 처리만이 가능하며, 두께 30 mm 이하의 균일한 크기를 갖고 충분한 수분을 가져야 한다. 경제성 분석 결과에 의하면 효모를 기준으로 50°C를 넘지 않는 범위에서 5 log의 사멸을 얻기 위해서는 100 J/mL의 에너지, 0.17 cent/L가 필요하며, 전기적 에너지에 의한 온도의 상승을 막기 위한 냉각 시스템에는 약 170 J/mL, 0.22 cent/L 정도가 필요한 것으로 분석된다.

#### (마) 처리용기 디자인

펄스 전기장 처리를 위한 chamber는 기본적으로 식품과 접촉하는 2개의 전극과 전극 사이의 간격으로 이루어져 있으며, 식품과 접촉하는 전극 면적에 비하여 전극 사이의 간격이 아주 작아야 한다.

처리 용기에는 기본적으로 static chamber와 continuous chamber의 두 가지 형태가 개발되고 있다. Static chamber는 실험실에서의 기초 연구에 적합하고 pilot plant 또는 상업용 장치 개발을 위해서는 continuous chamber를 개발하여야 한다.

#### (2) PEF 처리가 우유에 미치는 영향

연구 가능성을 뒷받침하기 위하여 국내·외의 문헌을 조사한 결과, 우유를 대상으로 PEF 기술을 이용하여 살균 처리하였을 때 식중독 미생물의 저감화 효과가 두드러지게 나타남이 확인되었고 PEF 기술을 이용한 살균 적용 가능성이 높게 나타났다.

우유의 초기 온도 조절에 따른 *L. innocua*의 살균 효과를 관찰한 결과 53°C 이상의 온도에서 우유 속 *L. innocua*의 불활성이 효과적으로 관찰되었는데, 3 pulses, 40 kV, 초기온도 53°C의 조건에서 *L. innocua*가 4.3 log 감소되었다(Milk thermalization by pulsed electric fields (PEF) and electrically induced heat. J. Food Eng. 100: 56-60 (2010)).

HTST와 PEF 살균을 병행한 결과 HTST 처리하였을 때 저장기한이 14-21일인 것과 비교하여 PEF 처리를 복합 처리하였을 때 44일로 저장기한이 연장되었다(Shelf life of whole milk processed by pulsed electric fields in combination with PEF-generated heat., Food Sci. Technol. 42: 735-739 (2009)).

UHT 처리된 우유에 *E. coli*, *P. fluorescens*, *B. stearothermophilus*를 주입하여 PEF를 처리한 결과, 60 kV/cm, 50°C, 210  $\mu$ s의 조건에서 *E. coli*, *P. fluorescens*가 8 log cycle 감소, *B. stearothermophilus*가 3 log cycle 저하된 결과를 나타내었다(Application of pulsed electric fields with square wave pulse to milk inoculated with *E. coli*, *P. fluorescens* and *B. stearothermophilus*. Food Sci. Biotechnol. 16(6) 1082-1084 (2007))

### (3) 우유의 살균공정

일반적인 우유의 생산 공정은 Fig. 1-7과 같이 6단계로 진행되어진다.

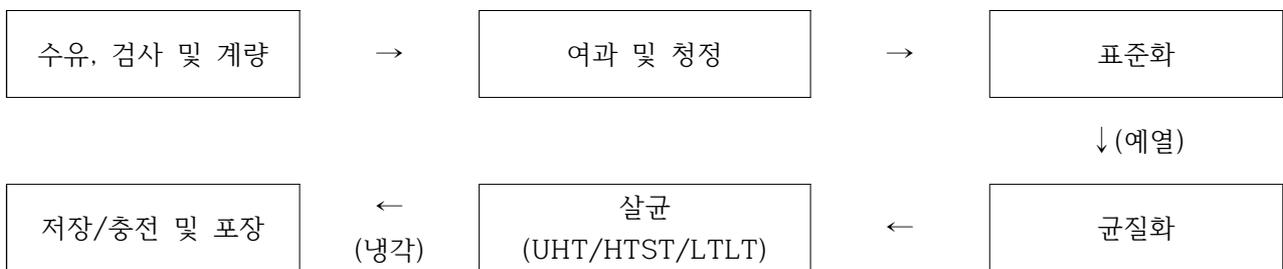


Fig. 1-7. 우유의 살균공정

#### (가) 수유, 검사 및 계량

수유의 과정은 우유 통, 또는 탱크 수송차로부터 우유를 받아서 품질을 조사하고 계량하여 시유나 유제품의 원료로 저장하기까지의 작업이며, 생유통이나 수송탱크의 세척과 살균처리도 작업에 속하고 있다.

검사는 외관과 풍미(색상, 응고, 분리, 향취), 비중검사, 알코올검사, 산도검사, 침전물검사, 세균수, 향생물질 검출, 조성분 함량분석(유지방, 단백질, 무지고형분) 등이 포함된다. 물론 검사의 정밀성, 신속성 그리고 방법의 간편과 측정비용을 위해 자동계기를 이용하기도 한다.

#### (나) 여과 및 청정

원유를 저장하는 동안에 풍미의 변화나 미생물의 증식을 예방하기 위하여 크림분리기와 같은 원리로 크림이 분리되지 않을 정도의 속도로 회전시켜 원심력에 의해 비중이 큰 먼지, 탈락세포는 물론 보통의 여과법으로는 제거되지 않는 이물이나 응고단백질, 백혈구, 적혈구 또는 세균의 일부까지도 제거하는 것을 여과(filtration) 및 청정(clarification)이라 한다. 대규모 공장에서는 원심력을 이용하여 여과와 청정의 두 기능을 하는 청정기(clarifier)를 사용한다.

청정 및 여과가 끝난 원유는 다음 공정에 넘어가기 전까지 냉장온도의 저유탱크에서 일정 시간동안 저장할 수 있다. 저유탱크의 온도는 장시간 저장의 경우 4°C 이하로 저장하고, 단 시간의 경우는

10°C 이하로 저장한다.

(다) 표준화(standardization)

생산하려는 제품의 종류와 규격에 따라 원유의 지방, 무지 고형분(solids-not-fat), 강화성분 등을 조정하고, 기타 첨가되는 원료의 적당량을 결정하여 완제품의 조성분 규격에 맞도록 하는 작업이다.

(라) 균질

우유 중의 지방구(fat globule)에 물리적 충격을 가해 지방의 크기를 0.1-2.2  $\mu\text{m}$  정도의 크기로 작게 분쇄하는 작업을 균질(homogenization) 이라고 한다. 원유 안에는 비교적 큰 지방구들이 있다. 유지방 비중은 전체 우유의 비중보다 낮아서 지방구는 위로 떠올라 크림층(cream line, cream layer)을 형성하여 분리되므로 물리적 충격으로 균질해야 한다. 이러한 균질에 의한 효과는 조직을 균일하게 하고 점도를 증가시키며, 또 커드의 장력을 줄여 부드러운 커드를 만들기 때문에 소화율을 높이는 효과가 있다.

(마) 살균

우유의 살균과정은 크게 가열과 유지가 있다. 즉 원하는 온도까지 가열하고 그 가열한 온도에서 원하는 시간까지 유지하는 것이다.

살균의 방법에는 다음과 같은 3가지로 분류할 수 있다.

- 1) 저온장시간 살균법(Low temperature long time, LTLT)
- 2) 고온단시간 살균법(High temperature short time, HTST)
- 3) 초고온 살균법(Ultra high temperature, UHT)

(바) 충전 및 포장

(4) 우유 살균공정에 PEF 적용

살균은 UHT를 포함하여 HTST, LTLT를 가열하는 온도와 시간을 조절함으로써 변환이 가능한 공정이며, 균질화와 살균 공정에 적용하기 위해 원유는 적합한 예열과정을 거치게 된다. 따라서 PEF를 UHT를 제외한 저온살균(HTST, LTLT)에 병용적용하기 위한 공정을 균질화 후 살균 전 공정에 적용한다면 PEF 처리를 통한 약간의 온도상승이 살균 공정으로 바로 이어질 수 있을 정도의 예열과정을 포함하게 되어 연속적으로 처리가 가능할 것으로 보인다. 이러한 설계로 도식화한 결과는 Fig. 1-8에 나타내었다.

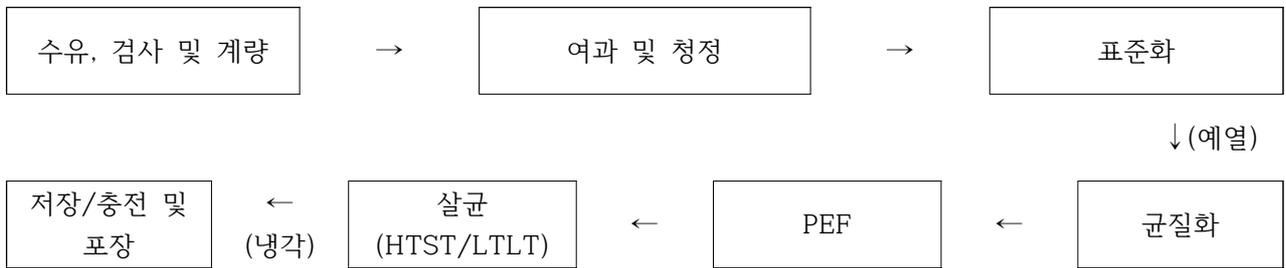


Fig. 1-8. PEF를 병용한 우유의 살균공정

(5) Pilot scale 공정

PEF의 적용 가능성을 알아보기 위하여 원유를 각 열처리 단계별로 처리 후 PEF 적용을 Fig. 1-9와 같이 설계하였다.

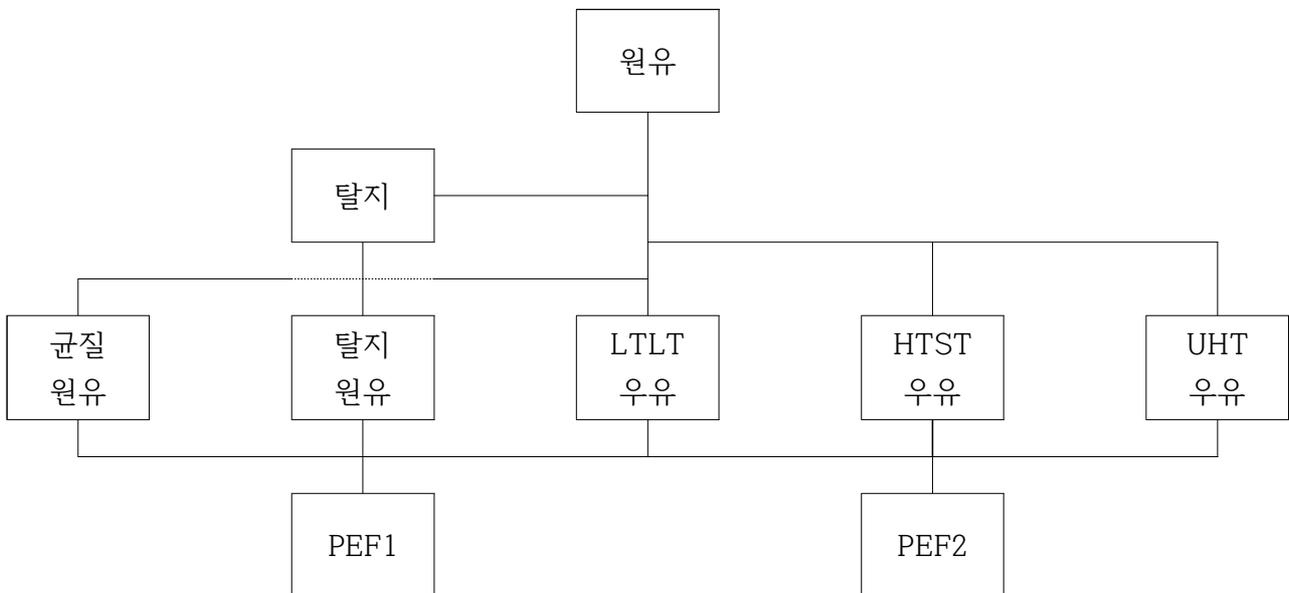


Fig. 1-9. 원유 PEF 처리 공정도

(가) 샘플 처리

모든 우유샘플은 균질화 과정을 거쳐 starter로 사용하였다. 탈지원유는 탈지과정을 거쳐 지방함량 0.03% 이하의 원유를 사용하였으며, HTST 우유는 75°C에서 15초 처리, UHT 우유는 135°C에서 3초 처리한 우유를 제1위탁기관으로부터 제공받아 PEF 처리하였다. LTLT 우유는 시판하는 65°C 30분 처리 우유를 구매하여 PEF 처리하였다.

## (나) PEF 조건

본 연구에서 우유의 PEF 처리는 5 kW 급 펄스 제네레이터(Pulse generator, DIL, Germany)를 사용하여 Co-linear chamber를 이용해 20 L/h로 연속식 처리하였다. 각 우유 샘플별 PEF 공정변수는 Table 1-4과 같은 조건으로 설정하여 진행하였다.

다. 목적 제품의 관리 규격 기준 및 규격 표준화

### (1) 우유의 성분규격

축산물의 가공기준 및 성분규격에서 정한 우유류의 성분규격으로는 유백색-황색의 액체로서 이미·이취가 없는 정상, 15℃에서 1.028-1.034의 비중을 가지며, 젖산으로서 산도 0.18% 미만, 무지유고형분 8% 이상, 유지지방 3% 이상, 세균수 1 mL 당 20,000 이하, 대장균군 2 이하, 포스파타제 음성의 기준을 명시하고 있다.

본 연구에서 PEF 적용된 우유의 성분규격도 위 성분규격을 따르고 위 기준에 준하는 우유를 선정하도록 한다.

### (2) 가열살균 시 우유에 미치는 영향

여러 유제품의 원료가 되는 우유는 소화율이 높고 인체에 필요한 모든 영양소를 균형 있게 함유하고 있어 최고의 자연식품으로 자리를 차지해 왔다. 필수 아미노산이 풍부한 양질의 단백질과 칼슘의 좋은 급원 식품으로써 성장기 어린이뿐만 아니라 성인과 노인에게도 권장되는 완전한 영양식품이다. 그러나 원유는 음용을 위해 반드시 병원성 미생물의 사멸과 유해효소를 불활성화 시키는 가열 살균 과정을 필요로 한다. 우유의 열처리 방법에는 LTLT(low temperature long time), HTST(high temperature short time) 그리고 UHT(ultra high temperature)방법이 있다. LTLT는 62.8-65.6℃에서 30분간 가열한 후 냉각시키는 것이고, HTST는 71.7℃에서 15초 동안 처리하며, UHT는 137.8℃에서 1-3초 가열 살균하는 방법이다. 우리나라의 경우 우유의 살균 처리방법은 LTLT에서 HTST을 거쳐 현재는 거의 UHT를 도입, 이용하고 있는 실정이나 국내 시판되고 있는 우유들의 열처리 조건에는 차이가 많다.

Kwon(1998)은 국내에서 판매되고 있는 시유 중 저온장시간 살균 시유, 고온단시간살균 시유, 초고온순간살균 시유의 저장기간 중 미생물의 변화를 확인한 결과 저온장시간살균 시유는 제조 당일 10,000-90,000 cfu/mL 이었으며, 10일간 냉장저장 후  $10^6$  cfu/mL 이상 증가하였고, 고온단시간살균 시유와 초고온살균 시유는 제조 당일 세균이 검출되지 않았으며, 냉장 저장 후에는 초고온순간살균 시유는 세균이 증가하지 않았지만 고온단시간살균 시유는 9,000-100,000 cfu/mL 까지 증식한 것을 확인하였다. 또한 저온장시간살균 시유와 고온단시간살균 시유의 가용성 유청단백질이 많이 함유되어 있었고, 초고온순간살균 시유와 고온단시간살균시유 일부는 열처리에 의해 다량의 유청단백질이 변성되었다고 하였다.

가열처리는 병원성미생물의 사멸과 유해효소 불활성화에 그 목적이 있으나 이러한 가열 과정에서 우유 성분의 손실이 따르게 된다. 우유의 열처리로 인한 변화는 유청 단백질이 열에 의해 변성되거나 비타민과 칼슘함량 등의 변화, pH 변화, Maillard 갈변화 등의 변화가 나타나 우유의 품질에 영향을 미치게 된다.

우유 본연의 풍부한 영양소는 그대로 유지하면서 안전하고 신선한 우유를 생산하기 위해서는 가열 살균(UHT)으로는 한계가 있다. PEF처리는 펄스 전기장을 방출하여 미생물을 사멸하기 때문에 온도상승을 최소화하여 열에 의한 단백질 및 기타 비타민, 무기질 등의 변성 및 손실을 억제할 수 있다.

### (3) 지표물질의 표준화

우유의 가열살균처리에 따른 지표물질의 변화는 우유에 가해진 열적 스트레스를 판단하는 수단이 될 수 있다. 우유의 단백질과 미생물 지표를 제외한 열처리 정도를 파악하는 지표설정을 위한 유효성분을 표준화하기 위하여 LTTL, HTST, UHT 처리 우유와 PEF 처리 우유의 pH 및 적정산도, 색도, 갈색도, 유효성 lysine 함량, HMF 함량과 lactulose 함량 등의 항목을 볼 수 있다. 그 중 본 연구에서에서 표준화를 위해 실험한 항목으로는 pH 및 적정산도, turbidity, 효소활성, alcohol test, 갈색도, 색도를 통해 표준화 할 수 있는 항목을 선정하고 또 각 살균정도 별 수치의 양상을 통해 규격화 하였다(Table 1-3).

Table 1-3은 제2협동기관의 연구를 통해 각 지표물질들의 가열과 PEF 처리에 따른 변화를 종합하였다. 연구 결과에 의해 가열처리에 따른 지표물질로서 protease, lactoperoxidase, 갈색화 정도, pH, alcohol test, 색도로 기준으로 삼았다.

(가) 지표물질의 변화 연구

Table 1-3. 가열 처리 및 PEF 처리에 따른 지표물질의 변화

Sample		Enzyme activity(U/mL)		갈색화	pH	alcohol test
		Protease	Lactoperoxidase			
Raw milk	untreated	0.87	0.11	69.70	6.40	+++*
	PEF 100 kJ	0.87	0.10	81.13	6.51	+++
	PEF 130 kJ	0.85	0.10	122.43	6.50	+++
LTLT milk	untreated	0.89	-	149.80	7.00	-
	PEF 100 kJ	0.78	-	155.70	7.00	-
	PEF 130 kJ	0.77	-	165.10	6.98	-
HTST milk	untreated	0.79	0.05	156.40	6.67	-
	PEF 100 kJ	0.80	0.04	162.40	6.66	-
	PEF 130 kJ	0.75	0.04	167.10	6.66	-
UHT		0.80	-	208.30	6.97	-

\*Alcohol test에 의해 응고된 정도를 +(양성)와 -(음성)로 표시

우유의 열처리에 의한 변화 중 효소의 열변성은 두 가지 측면에서 중요하다. 하나는 유제품의 안정성을 증가시키며, 둘째로 가열처리의 지표로서 이용되고 있기 때문이다. Alkaline phosphatase는 HTST 살균에 의해 불활성화 되며, lactoperoxidase는 80-90°C에서 불활성화 된다. 효소의 지표 중 alkaline phosphatase는 성분규격에서 이미 불검출로 기준을 잡았기 때문에 protease와 lactoperoxidase를 통해 기준 규격을 정하였다.

Protease의 경우 raw milk에서 0.85-0.87 U/mL의 활성을 가지고 있지만 열처리 과정을 거친 HTST와 UHT의 경우 0.75-0.80 U/mL의 활성을 보여주어 열에 안정하지만 어느 정도의 활성이 줄어드는 모습을 볼 수 있었다. 또한 PEF 처리에 의해서도 약간의 불활성 효과가 있는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서 protease의 활성을 0.75-0.80 U/mL로 범위를 설정하였다. 한편 lactoperoxidase는 열에 매우 민감하여 가열 살균의 지표가 되는 효소이므로 불검출 혹은 0.05 U/ml 까지 허용으로 기준을 잡았다.

우유의 Maillard 반응은 카르보닐기(유당)와 아미노기의 결합으로 글리코사민을 형성한다. 이러한 글리코사민은 Amadori 재배열을 통해 1-amino-2-keto sugar로 된다(Amadori compound). 이 반응은 염기 조건에서 촉매되며 1차 반응이다. Maillard 반응은 유제품에서 갈변화, 이취, 라이신의 감소로 인한 영양적 가치 감소, 분유의 용해도 감소가 일어나게 된다. 우유의 열처리 정도에 따라 갈변화 정도를 측정함으로써 그 기준을 잡을 수 있는데 본 연구에서 갈변정도를 측정하는 도구로 420 nm 흡광도의 측정을 통해 확인하였다.

420 nm 흡광도는 가열 처리를 통해 raw milk 보다 높은 수치의 흡광도가 측정되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 가열의 정도가 커질수록, PEF 처리 정도가 커질수록 흡광도 수치도 높게 측정되었다. 이 수치를 통해 갈변화가 가장 많이 진행된 UHT의 갈변화 값을 기준으로 그 이하로 설정하였다. 즉 420 nm에서의 흡광도 기준은 208.30 이하이다.

pH는 가열이나 PEF 처리에 의해 변성되는 것을 확인하지 못하였다. 따라서 신선한 우유의 pH 인 6.6-6.8로 기준을 정하였다.

Alcohol test에 의해 응고된 우유는 산패된 우유이므로 alcohol test에 의한 기준은 음성으로 한다.

본 기준을 통해 HTST와 PEF를 병용처리 한 우유는 모두 표준화가 완료된 우유로 판정되었다. 다만 lactoperoxidase의 활성이 남아 있는 것으로 보아 이후의 연구에서는 PEF 처리 강도를 130 kJ 이상을 주어 lactoperoxidase의 활성을 보다 낮추거나 음성이 될 수 있도록 해야 할 것이다.

Table 1-4. 각 우유 샘플 별 PEF 공정변수

Sample	Conductivity (S/m)	Flow rate (L/h)	Out voltage (%)	Pulse width (μs)	Frequency (Hz)	Field Strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet temperature (°C)	Out temperature (°C)	
균질 원유	PEF1	0.535	24.5	70	25	50	16	102	29	54
	PEF2	0.535	24.5	70	25	65	16	136	29	62
탈지 원유	PEF1	0.558	24.5	70	25	51	16	102	29	54
	PEF2	0.558	24.5	70	25	65	16	133	29	62
LTLT 우유	PEF1	0.530	25	70	25	54	17	100	27	51
	PEF2	0.530	25	70	25	68	17	132	27	59
HTST 우유	PEF1	0.506	25	70	25	53	17	100	27	50
	PEF2	0.506	25	70	25	68	17	132	27	60

PEF 1와 PEF 2의 공정 변수는 최종 결과물의 온도가 각각 100 kJ과 130 kJ의 에너지를 주었을 때 50°C와 65°C로 상승할 정도의 전기장 강도이며, 이 설정 기준은 샘플의 전처리 과정인 균질화 온도(50°C)와 탈지온도(65°C)에 기인하였다. Table 1-4과 같은 조건에서의 미생물 살균효과와 단백질 등의 물질들의 변화를 확인하여 PEF 처리 후 우유의 규격 기준 및 규격 표준화를 하였다.

라. 주요 타깃 제어 미생물 및 기능성 단백질의 선정 및 평가법과 기준 확립

(1) 우유의 주요 병원성 미생물 및 식중독균

병원성 미생물은 섭취시 식중독이나 각종 질병을 유발하는 병원성을 띤 미생물을 가리킨다. 식품공전에서 관리하는 식중독 관련 병원성미생물은 살모넬라(*Salmonella spp.*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 예시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 등이 있다. 특히 결핵균

(*Mycobacterium tuberculosis*)은 사람이 감염되면 폐결핵을 유발하고 그 밖에 수막염, 속립결핵, 림프절염, 신결핵, 방광결핵, 장결핵 등 질병을 유발한다. 우유의 결핵균은 60℃로 10분간 가열해주면 모두 사멸하기 때문에 우유 살균의 기준이 되는 병원성 세균이다.

식품이 미생물의 작용으로 악취, 색, 맛 등 관능적인 성질에 변화를 받아 섭취하기 어려운 현상을 부패라 칭하고 있다. 그리고 식품에 오염되어 증식한 다음 부패에 주로 관여하는 세균을 부패 세균이라고 말하고 있다. 부패 세균이라고 하더라도 특정한 세균을 가리키고 있는 것이 아니고 신선식품과 가공식품에서 각각 우세하게 발육하여 그 식품 성분의 분해성이 강한 것이 그 식품의 부패 세균이 된다. 또한 미생물의 증식은 온도에 의해서 영향을 받지만 신선식품 등에서도 그 보존, 유통온도에 따라 균 총이 달라진다. 어패류, 식육 혹은 우유와 같이 저온 유통하는 식품에서는 저온에서 증식하는 저온 세균(psychrophiles)이 부패에 주역이다.

우유의 부패·변패에 관여하는 세균으로서 지표는 *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Bacillus*, Gram(-)간균 등을 대상으로 하고 본 연구에서는 *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*를 대상으로 부패 미생물의 살균효과를 제1협동기관의 연구결과를 토대로 확인하였다.

지표 부패세균들을 0.019 S/m의 전기전도도를 갖는 standard solution에  $10^7$  cfu/mL이 되도록 희석 후 PEF 공정변수로서 frequency와 pulsed width를 30  $\mu$ s와 50 Hz로 고정 후 out voltage와 pulse number의 변화에 따른 처리가 세균의 사멸정도에 미치는 영향을 확인하였다.

*S. cerevisiae*은 15 kV/cm에서 150 pulse, 20 kV/cm에서 100 pulse일 때 검출되지 않았으며, *E. coli*는 20 kV/cm에서 200 pulse를 가하여도 3.6 log cycle 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. *Lactobacillus brevis*는 20 kV/cm에서 100 pulse를 가하여 균이 검출되지 않았으며, *Lactobacillus plantarum*은 15.0 kV/cm 에서는 150 pulses, 20.0 kV/cm에서는 100 pulses 에서 균이 검출되지 않았다.

결과적으로 *E. coli*를 제외한 세 종의 균에 대한 멸균 공정변수는 20 kV/cm, 100 pulse 인 것을 확인하였고, *E. coli*의 경우 효과적으로 살균하기 위해 더 높은 에너지가 필요하다는 것을 알았다. 따라서 다음 연구에는 PEF 조건과 flow rate 등을 조절하여 더 높은 강도에서 처리하는 실험이 필요할 것이다.

## (2) 우유의 주요 기능성 단백질

우유에는 약 3%의 단백질을 함유하고 있으며 이는 카제인과 유청 단백질로 나누어진다. Table 1-5에 카제인과 유청 단백질의 비율을 나타내었고 Table 1-6은 각 단백질의 기능성을 보여준다.

Table 1-5. 우유 단백질 종류와 전단백질에 대한 비율

우유단백질 종류		비율(%) [*]
카제인	$\alpha$ s1-카제인	31
	$\alpha$ s2-카제인	8
	$\beta$ -카제인	28
	$\gamma$ -카제인[**]	3
	$\kappa$ -카제인	10
	계	80
웨이(유청)단백질	혈청알부민	1
	$\beta$ -락트글로브린	10
	$\alpha$ -락트알부민	4
	면역글로브린	2
	프로티오스, 펩틴 외	3
	계	19
지방구피막단백질		1

※ 1. P. Walstra & R. Jenness 1984

2. [\*]는 각종 문헌에 의한 평균치를 수단백질 100에 대한 비율

3. [\*\*] $\gamma$ -카제인은  $\beta$ -카제인 분해물

전지우유를 비중의 차이에 따라 지방을 분리하고 난 탈지유의 pH를 4.6으로 조정할 때 응고되는 흰색의 침전물을 카제인이라 하고, 카제인을 분리하고 난 상정액을 유청이라 하며, 유청에 용해되어 있는 질소화합물들을 카제인과 구분하여 비카제인태 질소화합물 또는 유청 단백질이라 한다.

우유 단백질에는 필수아미노산인 리진과 메티오닌 등과 같이 식물성 단백질에 부족하기 쉬운 아미노산이 많아서 곡물을 많이 먹는 사람들에게 더욱 가치가 높은 단백질이다.

Table 1-6. 우유 단백질에서 유래하는 기능성 물질 및 생리적 역할(이수원 저, 2005)

단백질 성분	기능성 물질	생리적 역할
Casein	Casein phosphopeptide(CPP)	칼슘 흡수 촉진, 무기물 운반
	Opioid agonist peptide(OPP)	진통, 호흡, 박동, 체온조절, 호르몬 분비 조절, 진정, 안정작용
	$\beta$ -Casomorphin-7	
	$\beta$ -Casomorphin-6	
	$\beta$ -Casomorphin-5	
	$\beta$ -Casomorphin-4	
	Exorphins	
	Morphiceptin	
	Casoxins	
	ACE-inhibition peptide	항고혈압 작용
Casoplatelins	항혈전증 작용	
Glucosmacropeptides	장내 비피더스균의 증식, 정상기능	
Immunopeptides	면역력 증진	
Angiotensin 전환효소 저해제	혈압의 정상 유지	
Phagocytosis peptides	면역기능 증강, 식세포 기능	
Antithrombic peptides	항응혈작용 촉진	
$\alpha$ -Lactalbumin	Opioid peptide	진통작용, 호르몬 분비 촉진
	$\alpha$ -Lactorphin	호르몬 분비 조절, 소화관 기능촉진
$\beta$ -Lactogloblin	Opioid peptide	진통작용, 호르몬 분비촉진
	$\beta$ -Lactorphin	호르몬 분비 조절, 소화관 기능촉진
	평활근 수축 peptide	평활근 수축 활성 촉진
Lactoferrin	Lactoferricin	철분 흡수 촉진, 혈압강하 작용, 진통작용, 항균작용, 세균성 설사방지
면역글로블린 (Immunoglobulins)	Immunoglobulin A,E,G,M	면역기능, 건강유지

우유의 단백질은 열에 의해 쉽게 변성이 되기 때문에 가열살균 시 높은 열로 살균하는 UHT 살균의 경우 단백질의 변성이 불가피하다. 이러한 기능성을 가진 단백질의 보존을 확인할 수 있는 평가법과 기준을 확립한다면 본 연구에서 목적하고자 하는 저온살균과 PEF의 병용처리가 기존 UHT살균 생산 우유에 비해 단백질의 함량이 어느정도 보존이 되는지 확인할 수 있을 것이다. 이는 각 단백질의 함량을 연구하는 직접적인 방법과 우유의 열처리에 의해 변하는 기타 지표물질 변화를 간접적으로 확인하는 방법이 있을 수 있다.

각 살균 처리 별 단백질 양을 비교하기 위해 DSC, HPLC, SDS-PAGE를 통해 단백질의 함량을 확인하고 그 기준을 아래와 같이 설정하였다.

Casein은 상대적으로 소수성 분자이며, 열 안정성이 뛰어나다. 따라서 140℃에서 1시간 가열해도 이 화학적 변화는 크게 나타나지 않는 단백질이다. 반면 우유단백질의 20%를 차지하고 있는 유청 단백질은 가열 등 여러 가지 처리에 의한 변성이 민감한 단백질이다. 유청 단백질의 열변성에서 매우 중요한 결과는 이들 단백질이 열에 노출된 SH기나 S-S 결합을 통해 생기는 것이다. S-S결합의 상호 교환 반응이 일어나  $\beta$ -Lactoglobulin과  $\kappa$ -Casein 간 S-S 결합이 형성되어 렌넷 응고나 열 안정성 등에 영향을 미친다. 또한 활성화된 SH기는 분해되어 H<sub>2</sub>S와 H<sub>3</sub>C-S-CH<sub>3</sub>가 형성되며, 이는 과도한 열처리 시 가열취의 원인이 된다.

시차주사열량계는 standard solution과 시료에 일정한 속도로 온도를 변화시켜 standard와 시료간의 온도차를 zero로 유지하기 위한 에너지를 측정함으로써 단백질 변성을 정량적으로 측정할 수 있다.

시차주사열량계를 통해 측정된 각 우유 별 Td 값을 통해 원유와 가열살균유 간 20℃ 이상의 차이를 보였고, 가열살균 별 UHT, LTLT, HTST 우유의 Td 값은 서로 유사한 값을 나타내었다. 또한 원유, LTLT, HTST 우유의 PEF를 통한 Td 값의 차이는 나타나지 않는 것으로 확인되었다(Table 3-2). 이로써 목적으로하는 유제품의 DSC에 의한 Td 값은 단백질의 변성이 가장 많이 진행되었을 것이라고 예상되는 UHT 우유의 값인 108.08℃ 이하여야 한다는 결론을 얻었다.

SDS-PAGE를 통한 단백질의 열변성 측정은 SDS-PAGE 상 변성되지 않은 단백질 band의 intensity를 Image J program을 통해 수치화하여 정량화하였다(Fig 3-7, 3-9, 3-10). 하지만 값은 상대적인 수치로서 절대적인 기준치를 정하기는 어려울 것으로 보이며, 원유에서 PEF 처리 혹은 가열 처리 후 PEF 처리 시 PEF에 의한 단백질 변성의 정도를 판단하는 기준이 될 수 있을 것이다. 따라서 SDS-PAGE의 intensity를 통한 규격은 PEF 처리 전과 후의 차이가 유의적인 차이가 있는 지에 따라 판단해야 할 것으로 보이며, 기준은 '유의적인 차이가 없음'으로 한다.

RP-HPLC(Reverse phase High performanse liquid chromatography)는  $\alpha$ -casein 및  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein,  $\beta$ -lactoglobulin를 분리 정량할 수 있다(Table 1-7).  $\beta$ -lactoglobulin의 경우 원유에서 0.99  $\mu$ g/mL 이며 열처리 정도에 따라 LTLT는 0.11  $\mu$ g/mL, HTST는 0.39  $\mu$ g/mL, UHT는 검출되지 않았다. UHT의 높은 온도에 의해  $\beta$ -lactoglobulin은 모두 열변성 된 것으로 보이며, PEF 처리에 의한  $\beta$ -lactoglobulin의 변화는 원유를 제외하고 나타나지 않았다. Casein의 경우는  $\beta$ -lactoglobulin에 비해 높은 열 안정성을 보여주었으며, PEF 처리에 의한 변성도 안정한 것으로 확인되었다. 따라서 HPLC를 통해 HTLT와 PEF 병용 처리에 의한 단백질의 지표로  $\beta$ -lactoglobulin가 적합하며 그 기준을 130 kJ 처리 조건에서 0.40  $\mu$ g/mL로 정하였다.

Table 1-7. RP-HPLC를 통한 casein과 whey protein의 정량

Sample	Compound	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	µg/ml	Sample	Compound	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	µg/ml
원유	κ-CN	16.87	1871.62	8.29	0.43	HTST	κ-CN	16.37	1784.86	26.85	0.41
	α-CN	21.28	11756.81	27.69	1.19		α-CN	21.13	12014.26	180.20	1.21
	β-CN	22.57	12694.56	88.18	1.62		β-CN	22.40	8969.76	150.91	1.15
	β-Lg	27.02	8746.20	52.16	0.99		β-Lg	26.68	3496.75	35.52	0.39
원유 100 kJ	κ-CN	16.70	1559.54	24.28	0.36	HTST 100 kJ	κ-CN	16.42	1615.14	26.91	0.37
	α-CN	21.07	6650.38	176.39	0.67		α-CN	21.05	6999.20	141.34	0.71
	β-CN	22.30	13910.39	177.31	1.78		β-CN	22.15	11739.03	144.92	1.50
	β-Lg	26.72	5067.78	57.96	0.57		β-Lg	26.85	3550.89	38.08	0.40
원유 130 kJ	κ-CN	16.48	1792.94	30.59	0.41	HTST 130 kJ	κ-CN	16.38	1523.11	22.89	0.35
	α-CN	21.10	8727.42	181.38	0.88		α-CN	21.17	5224.00	110.40	0.53
	β-CN	22.27	14011.87	185.93	1.79		β-CN	22.47	12239.16	153.49	1.56
	β-Lg	26.95	4939.84	51.10	0.56		β-Lg	26.67	3553.52	35.98	0.40
LTLT	κ-CN	16.33	1334.43	23.09	0.30	UHT	κ-CN	16.35	1377.50	21.60	0.31
	α-CN	21.30	8103.22	165.89	0.82		α-CN	21.10	7799.08	150.96	0.79
	β-CN	22.30	11176.72	150.73	1.43		β-CN	21.98	11854.77	152.74	1.51
	β-Lg	26.72	941.83	10.29	0.11		β-Lg	25.88	18.85	0.67	0.00
LTLT 100 kJ	κ-CN	16.43	1052.70	16.51	0.24						
	α-CN	21.05	7208.37	176.95	0.73						
	β-CN	22.23	11917.18	147.39	1.52						
	β-Lg	26.98	1016.13	11.70	0.11						
LTLT 130 kJ	κ-CN	16.37	1216.61	20.77	0.28						
	α-CN	21.13	8289.88	184.65	0.84						
	β-CN	21.82	11751.44	137.04	1.50						
	β-Lg	26.85	989.02	11.67	0.11						

(κ-CN: κ-casein, α-CN: α-casein, β-CN: β-casein, β-Lg: β-Lactoglobulin)

## 2. 살균 제어 및 영양원 보존을 위한 최적 공정 설계

### 가. 연구방법

#### (1) 시료준비

본 연구에 사용된 우유는 원유, 저지방우유, 고온살균유(High Temperature Short Time, HTST)를 사용하였으며, buffer를 이용한 실험은 ringer tablet을 증류수에 희석하여 우유와 같은 전도도상태에서 연구를 진행 하였다. 원유 및 HTST 우유는 위탁기관인 서울우유로부터 제공받았다. 원유의 경우 펄스전기장 처리를 위해 균질화 공정이 필요하다는 것은 1차년도 연구를 통해 확인된 바 38℃에서 150 bar 조건으로 균질화 된 원유를 제공받았고, HTST 우유는 균질화된 원유를 85℃에서 15초간 열처리한 우유를 실험재료로 사용하였다. 저지방 우유는 지방이 1% 함유된 서울우유의 저지방 우유를 실험당일 구매하여 사용하였다. 우유 외 유제품 적용 검토에 사용된 시료는 커피, 비타민강화우유, 초코우유를 서울우유의 기존제품의 formular를 제공받아 재료로 사용하였다.

#### (2) 원유 및 우유의 펄스전기장(pulsed electric field, PEF) 처리

본 실험에 사용한 펄스전기장 장치는 제1협동기관인 중앙대에서 보유하고 있는 5 kW 급 펄스발생 장치를 사용하였다(Fig 1-10). 연속식 chamber에 사용된 펄스의 형태는 bipolar square 형태의 펄스가 사용되었다. PEF 처리는 buffer 및 원유, 우유를 20-40 L/h의 속도로 chamber를 통과하도록 펌프를 이용해 속도를 조절하였으며, 처리 시 line이 water bath를 통과하는 동안 시료의 시작온도가 30℃가 되도록 조절하였다. PEF의 기기적 공정변수는 Table 1-8과 같다.



Fig 1-10. 5 kW급 펄스전기장 발생장치(Pulsed electric field, PEF)

Table 1-8. 최적화 공정을 위한 공정변수 설정

Out voltage (%)	Pulse width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Flow late (L/h)
70	15	67	30
		98	
		120	
70	20	45	
		65	
		77	
70	25	33	
		45	
		57	
50	20	100	
		135	
		181	
		210	

펄스전기장 처리가 끝난 시료는 50 mL tube에 담아 냉장 및 LTLT 과정을 거치며 각각 ice bath에서 방치, 65°C에서 30 분간 유지하는 상태로 나누어 수거하였다.

### (3) Strain

우유의 PEF 살균효과를 확인하기 위해 살균된 우유에 균을 접종하여 실험을 진행하였다. 접종에 사용한 균주는 효모로서 *Saccharomyces cerevisiae*, 세균으로서 *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis* 및 *Lactobacillus plantarum* 4가지 균주를 사용하였다. 각 균주의 생육 특성을 고려하여 *S. cerevisiae*의 경우 10% 주석산을 첨가한 potato dextrose broth에 30°C, 48 시간 진탕 배양하였으며, *E. coli*는 nutrient broth에 30°C, 24 시간, *L. brevis*와 *L. plantarum*의 경우 0.1% tween 80을 첨가한 Lactobacilli MRS broth에 30°C, 24 시간 진탕 배양한 배양액을 원유의 1%(V/V)를 접종하여 펄스전기장 처리를 실시 하였다.

### (4) 생균수 측정

펄스 전기장 처리 전후의 미생물 생균수를 비교하기 위하여 접종 전, 접종 후, 단계별 펄스전기장 처리 후로 나누어 생균수 측정을 실시하였다. 멸균된 0.85% NaCl 9 mL에 각 시료 1 mL을 알맞은 배수까지 10진 희석하였으며, *S. cerevisiae*의 확인은 10% 주석산과 1.5% agar를 첨가한 PDA에 희석액 100  $\mu$ L 분주 후 도말하여 33°C에서 48-72 시간 배양, *E. coli*의 확인은 1.5% agar를 첨가한 nutrient agar에 희석액 100  $\mu$ L 분주 후 도말하여 36°C에서 24-48 시간 배양, *L. brevis* 및 *L.*

*plantarum*은 0.1% tween 80과 1.5% agar를 첨가한 MRS agar에 희석액 100  $\mu$ L 분주 후 도달하여 36°C에서 48 시간 배양 후 colony를 계수하였다. 각 희석액은 3개의 배지에 동일하게 실험하여 약 30-300 사이의 colony만 계수하였으며, 3개의 배지에 형성된 colony 수를 합하여 나온 평균을 생균수로 하였다. 펄스 전기장 처리 후 shelf life를 확인하기 위해 4°C 냉장 보관하고 5일 단위로 총 20일까지 균의 증식을 관찰하였다.

#### (5) 갈색화 안정성 측정

갈색화에 대한 안정성을 보기 위하여 420 nm에서의 흡광도와 색도를 측정하였다. 흡광도는 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 단계 희석된 시료의 420 nm의 흡광도를 측정하였다. Blank와 희석액은 3차 증류수를 사용하였으며, O.D value가 1을 넘지 않도록 시료를 희석하여 측정 후 희석 배수를 곱하여 산출하였다. 색도는 spectrophotometer를 사용하여 시료 10 mL의 L(명도), a(적색도), b(황색도) 값을 측정하였다.

#### (6) pH

우유 시료를 pH meter를 이용하여 pH를 측정하였다.

#### (7) 산도 측정

우유의 산도를 측정하기 위해 적정 산도법을 이용하였다. 우유시료 9 g을 정확히 칭량하여 beaker에 10 mL의 증류수와 혼합하였다. 희석된 우유에 0.1% phenolphthalein 용액을 0.5 mL 첨가 후 0.1 N NaOH로 적정하였다. 적정은 분홍색이 30 초 동안 사라지지 않고 유지되는 시점을 종말시점으로 보고 적정된 0.1 N NaOH의 적정량(mL)을 기록하여 아래의 식에 대입하여 산도 %를 계산하였다.

$$\text{산도 (\%)} = 0.1 \text{ N NaOH 적정량 (mL)} / 10$$

#### (8) 우유의 Alcohol test

우유 시료를 샬레에 5 mL을 분주하고 동량의 70% ethyl alcohol을 섞어주어 응고가 생기는지를 육안으로 관찰하여 응고물이 생기는 정도를 -(없음), +(거의없음), ++(중간정도), +++(매우많음) 단계로 평가하였다.

#### (9) Turbidity test

Test tube에 시료 20 mL을 취하고 ammonium sulfate 4.0 g을 가하여 ammonium sulfate가 완전히 용해될 때까지 흔들여 혼합한 후, 5분간 실온에 방치하고 filter paper로 여과하여 빠져나온 여과물 5 mL를 test tube에 취하여 끓는 물에 5 분간 방치하였다. 이 후 즉시 차가운 물로 냉각한 후 test tube를 흔들면서 turbidity 여부를 육안으로 판정하여 그 정도를 -(없음), +(거의없음), ++(중간정도), +++(매우많음)로 평가하였다.

나. 연구결과

(1) 최적화 공정 설정

(가) Buffer를 이용한 공정변수 설정

앞선 연구에서 원유의 100 kJ 및 120 kJ 연속식 펄스전기장 처리를 통해 저온살균(Low Temperature Long Time, LTLT), 고온살균(High Temperature Short time, HTST), 초고온 살균(Ultra High Temperature, UHT) 처리한 우유와의 비교 실험을 하였다. 하지만 120 kJ의 펄스전기장 처리는 단백질의 보존력은 우수하나 미생물 안정성이 현저히 낮은 결과를 가져왔다. 따라서 본 연구에서 우유에 가하는 energy를 충분히 높이고 손실되는 기능성분들의 손실을 줄이며, 대량 생산을 위한 준비 단계로써 공정변수의 재설정과 세분화 과정을 거쳤다. 가해질 수 있는 energy의 한계를 알아보기 위해 energy, 상승온도(dT)에 가장 영향을 많이 미치는 전기전도도를 우유와 같도록 (0.52 S/m) buffer를 제작하여 공정변수를 설정하였다(Table 1-9).

Table 1-9. Buffer를 이용한 공정변수 설정

Field strength (kV/cm)	Out voltage (%)	Pulse width (μs)	Frequency (Hz)	Energy (kJ/L)
16	70	15	67	100
			98	150
			120	187
14	70	20	45	100
			65	150
			77	186
12	70	25	33	100
			45	150
			57	191
10	50	20	100	100
			135	150
			181	200
			210	250

(Condition : 0.52 S/m linger solution, 30 L/h flow rate, 30°C inlet temperature)

Field strength에 따른 energy의 한계를 알아보기 위해 10-16 kV/cm를 out voltage와 pulse width의 변화로 고정을 한 후 flash over가 될 때까지 frequency를 상승시켰다. 그 결과 12 kV/cm 이상 조건에서는 energy가 200 kJ/L에 도달하지 못하고 flash over가 되었으며, 10 kV/cm에서는 265 kJ/L 까지 energy가 상승하는 것을 확인하였다. 본 실험을 통해 우유에 적용하여 충분한 살균효과를 가질 수 있는 조건을 설정하기 위해서는 10 kV/cm의 field strength에서 각 energy 단계별로 실험을 진행해 볼 필요성이 있다고 판단되었다.

(나) Low fat milk에 적용

위 결과를 바탕으로 설정된 공정변수를 미생물적 안전성과 지방에 의한 간섭이 적은 저지방 우유에 먼저 적용하여 보았다(Table 1-10). 국내 시판되고 있는 저지방 우유는 멸균우유가 존재하지 않으나 UHT 공정에 의해 생산되었고 초기 미생물이 0 cfu/mL 인 것을 확인하였다. 앞서 설정한 공정변수의 미생물 사멸효과를 보기 위하여 이전 연구를 통해 제1협동기관에서 선정된 부패 미생물 4종을 접종하여 생균수를 측정함으로써 에너지에 따른 미생물의 저감효과를 확인하고자 하였다. 저지방 우유의 conductivity는 0.56 S/m로 ringer solution의 conductivity였던 0.52 S/m와 유사하므로 공정변수에 있어서 동일한 조건으로 연구를 진행 하였다. 온도의 상승은 초기 30°C에서 100 kJ 처리 시 21.1°C 상승한 51.1°C 였으며, 150 kJ, 200 kJ, 250 kJ에서 각각 29.6°C, 39.2°C, 46.5°C 상승한 59.6°C, 69.2°C, 76.5°C 였다.

Table1-10. 저지방우유 PEF 처리 공정변수

Field strength (kV/cm)	Out voltage (%)	Pulse width (μs)	Frequency (Hz)	Energy (kJ/L)	Outlet Temperature (°C)	dT
10	50	20	100	100	51.1	21.1
			135	150	59.6	29.6
			181	200	69.2	39.2
			220	250	76.5	46.5

(Condition : 0.56 S/m low fat milk, 30 L/h, 30°C)

Table 1-11. 저지방유에서의 접종균 PEF 살균효과

Sample	생균수(LOG cfu/mL)			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>
Negative control	ND <sup>1)</sup>	ND	ND	ND
Positive control	6.11 ± 0.02	7.50 ± 0.02	7.68 ± 0.06	7.79 ± 0.06
PEF 100 kJ	5.40 ± 0.02	7.44 ± 0.01	7.39 ± 0.05	7.39 ± 0.08
PEF 150 kJ	3.19 ± 0.03	7.15 ± 0.01	5.63 ± 0.00	6.42 ± 0.03
PEF 200 kJ	ND	3.01 ± 0.04	2.43 ± 0.04	3.87 ± 0.24
PEF 250 kJ	ND	ND	1.44 ± 0.06	1.30 ± 0.24

1) ND : Not detected

우유에 접종 시 미생물의 생균수는 약 10<sup>7</sup> cfu/mL가 될 수 있도록 배양 시간과 배양액의 양을 조절하였다. 진핵세포인 *S. cerevisiae*의 경우 200 kJ 수준에서 6.11 log 감소하였고, 원핵세포인 *E. coli*는 250 kJ에서 7.5 log 감소하였으며, 유산균인 *L. brevis*와 *L. plantarum*은 각각 250 kJ에서 6.21 log, 6.49 log 감소하는 것을 확인하였다(Table 1-11). 모든 접종 균 공통으로 100-150 kJ에서 효과가 미비 하였으며, 200 kJ 부터 급격한 감소를 보였다. PEF와 LTLT 및 HTST와의 병용처리 시 기준이 될 에너지는 200 kJ 이상이 될 것이라는 것을 예상할 수 있다.

#### (다) 가열살균 병용공정 설정

우유의 살균은 우유의 품질과 보존성을 떨어뜨리는 미생물을 제어함과 동시에 인체의 건강을 위협하는 병원성 균을 사멸시키는 목적으로 행해지고 있다. 전통적인 우유의 살균방법은 열을 이용하며 주요한 인자로 온도와 유지시간으로 살균법을 구분한다. 대표적인 살균방법으로는 열처리 방법에 따라 저온 장시간 살균법(LTLT, 60-65°C, 30분), 고온 단시간 살균법(HTST, 72-75°C, 15초) 및 초고온 살균법(UHT, 130-150°C, 2-5초)이 있으며, 현재 국내에서 시판되는 우유는 대부분 초고온 살균법을 이용하여 생산하고 있다.

우유는 열처리로 인해 소화와 소비자 기호도에 유용한 측면도 있으나 고온에 노출되어 일어나는 변화는 바람직하지 못한 측면도 보고되어 왔다. 따라서 PEF와 pasteurization을 병용함으로써 미생물에 대한 안정성, 저장성을 향상시키고, 가열처리에 의한 이점을 가진 채, 영양성분 및 이화학적 성분의 변화가 거의 없는 우유를 생산할 수 있다. 또 기존 UHT보다 낮은 에너지와 비용을 사용하여 기존 LTLT나 HTST보다 우수한 살균유를 생산할 수 있는 이점이 있다.

PEF와 상업적 가열살균의 병용처리 및 시판제품 생산에 있어 법적인 문제는 앞선 연구를 통해 밝힌 바 있다. 『축산물의 가공기준 및 성분규격』에서 축산물의 가공기준에는 ‘축산물 처리·가공 중 건조, 농축, 열처리, 냉각 또는 냉동 등의 공정은 제품의 영양성, 안전성을 고려하여 적절한 방법으로 실시하여야 한다.’라고 명시되어 있다.

또 『살균과 멸균에 관련된 가공기준』으로 ‘유가공품의 살균 또는 멸균 공정은 따로 정하여진 경우를 제외하고 저온장시간살균법(63-65℃에서 30분간), 고온단시간 살균법(72-75℃에서 15-20초간), 초고온순간처리법(130-150℃에서 0.5-5초간) 또는 이와 동등 이상의 효력을 가지는 방법으로 실시하여야 한다.

그리고 살균제품에 있어서는 살균 후 즉시 10℃이하로 냉각하여야 하고, 멸균제품은 멸균한 용기 또는 포장에 무균공정으로 충전·포장하여야 한다.’고 되어있다. 그러므로 PEF 단독으로 살균 시에는 살균공정으로써 장벽이 있지만 법적으로 인정한 HTST, LTLT 공정에 PEF 공정을 추가하는 것은 문제가 되지 않는다.

또 국제낙농연합회(International Dairy Federation , IDF)에 따르면, ‘살균이란 제품에 대한 화학적, 물리적 및 관능적 변화가 최소가 되도록 열처리를 가함으로 우유에 관련되는 병원 미생물에 의해 일어날 수 있는 건강장해를 최소화하는 것을 목적으로 하며, 멸균이란 100℃가 넘는 열처리를 가함으로써 모든 미생물을 제거하는 것을 목적으로 하는 열처리 방법이다.’고 규정하고 있다.

CODEX의 우유의 위생관련 규범 부록 B에서 electromagnetic energy treatment는 microwave energy, radio-frequency energy, high electric field pulses를 포함하고 있다. 이 treatment는 세포막에 전기적 충격이 세포벽의 구멍을 형성하여 세포를 파괴하는 방법이라고 기술되어 있다. 또한 가열살균(HTST, LTLT, UHT)은 특정 온도와 시간으로 처리하는 것 또는 그에 해당하는 살균효과를 가지는 방법이라고 명시되어 있다.



일반적인 우유의 가공은 크게 수유, 균질, 살균, 충전 및 포장 순으로 단계를 나눌 수 있다.

PEF를 도입하기 위해 고려해야 할 사항은 이물이 없어야 하며, 최적의 펄스전기장 처리를 위해서 지방구가 균질화가 되어있는 상태여야 한다는 것을 앞선 연구를 통해 경험하였다. PEF 설비는 공간을 크게 차지하지 않고 기존의 라인에 연결만으로 바로 적용이 가능하기 때문에 공정의 순서를 정하는 것에 제약이 없다.

균질은 1-10  $\mu\text{m}$  크기의 지방구를 0.1-2.2  $\mu\text{m}$  정도의 크기로 균일하고 미세하게 분산시켜 비중이 낮은 지방이 크림층으로 분리되는 것을 방지하는 과정이다. 이 과정을 통해 원유는 약 50-60 $^{\circ}\text{C}$ 로 예열된 상태로 균질기의 미세한 구멍을 고압으로 통과하여 지방구가 파괴된다. 이미 50-60 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도를 품고 있기에 균질화 공정을 거치고 바로 PEF 공정으로 진입을 할 수 있으며, 바람직하게는 30 $^{\circ}\text{C}$ 까지 냉각을 하거나 균질화 예열온도를 40 $^{\circ}\text{C}$  이하로 낮추어 진행 후 PEF 공정을 진입 한다면 과도한 승온에 의한 유용성분의 손실을 줄일 수 있을 것이다.

또 고려해야할 사항은 살균공정 즉, LTLT나 HTST 공정을 먼저 겪는다면 PEF 공정 진입까지 냉각 공정을 거쳐 PEF로 보내야하기 때문에 불필요한 에너지의 손실을 피할 수 없다. 따라서 기존의 가열처리 공정과 PEF의 병용처리를 위한 방법은 균질화의 예열온도를 30 $^{\circ}\text{C}$  가까이 조절한 상태에서 균질을 실시하고 펄스전기장 처리 후 LTLT나 HTST 살균을 하는 것이 바람직하다고 판단된다 (Fig 1-11).

본 연구에서는 균질화한 원유를 시작온도 30 $^{\circ}\text{C}$ 로 PEF를 30 L/h로 100-250 kJ/L 까지 펄스 전기장 처리 후 가열살균(LTLT, HTST)과 병용하였다. 최적의 살균 공정을 찾기 위해 각 시료들을 일반세균과 대장균, 기능성 단백질, 일반성분 분석을 제1협동, 제2협동, 제1위탁기관의 도움을 받아 분석을 진행하였다.

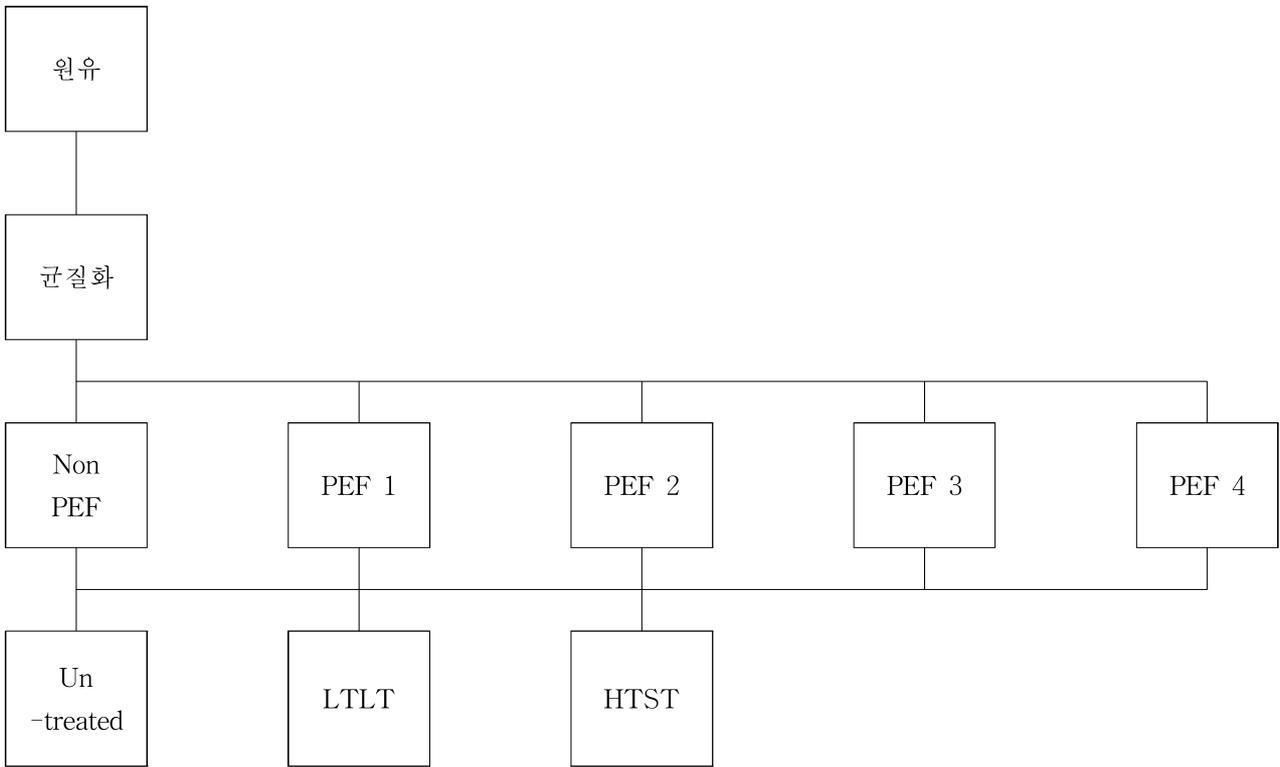


Fig 1-11. 우유의 PEF 및 가열살균 병용처리 공정도

(라) 원유의 PEF 및 가열살균 병용처리 적용

축산물의 가공기준 및 성분규격에 따르면 살균우유의 성분규격은 세균으로써 1 mL 당 20,000이하, 대장균군으로써 n=5, c=2, m=0, M=10으로 규정하고 있다.

본 연구에서는 원유의 PEF 및 가열살균 병용처리를 통해 우선 미생물에 대한 안전성을 고려하였으며, 4°C 저장 중에도 충분한 안전성을 확보한 샘플을 선정하고자 하였다.

1) 원유의 PEF, LTLT, HTST 병용에 의한 미생물 사멸 효과

원유는 38°C에서 150 bar의 압력으로 균질화 된 원유를 제1협동기관으로부터 제공받아 실험의 재료로 사용하였다. 원유의 경우 일반세균은  $4.7 \times 10^5$  cfu/mL, 대장균군은  $3.2 \times 10^2$  cfu/mL이 존재했으며, LTLT 처리 시 대장균군 음성, 일반세균은  $1.2 \times 10^3$  cfu/mL, HTST 처리 시 대장균군, 일반세균이 음성이었다(Table 1-12, 13). 20일 저장기간 중 대장균군이 발견된 시료는 PEF 처리하지 않은 공정에서 무처리군과 LTLT 단독만 검출되었고, PEF 단독처리군에서는 100, 150, 200 kJ에서 대장균군이 검출되었다. LTLT와 PEF의 병용처리에서 100 kJ PEF 처리한 군이 저장기간 중 대장균군이 검출되었으며, 150 kJ은 5일째 저장 중 대장균군이 검출되어 대장균군 오염이 의심이 되는 군이다.

Table 1-12. 원유의 살균 공정변수에 따른 저장기간 중 일반세균 생균수 변화

(Log cfu/mL)

시료 \ 날짜(day)	0	5	10	15	20
<b>Raw milk</b>					
Untreated	5.61 ± 0.01	6.55 ± 0.05	7.70 ± 0.01	7.72 ± 0.01	TNTC <sup>1)</sup>
100 kJ	4.32 ± 0.03	4.88 ± 0.02	7.77 ± 0.02	7.80 ± 0.01	TNTC
150 kJ	3.06 ± 0.61	3.74 ± 0.04	4.16 ± 0.04	4.17 ± 0.01	5.91 ± 0.02
200 kJ	2.67 ± 0.11	2.81 ± 0.03	2.77 ± 0.06	2.83 ± 0.03	3.65 ± 0.01
250 kJ	2.20 ± 0.05	2.26 ± 0.07	2.23 ± 0.17	2.22 ± 0.05	2.38 ± 0.03
<b>LTLT</b>					
Untreated	3.08 ± 0.00	3.52 ± 0.01	3.59 ± 0.03	3.92 ± 0.06	4.95 ± 0.01
100 kJ	2.91 ± 0.01	2.99 ± 0.03	3.24 ± 0.06	3.73 ± 0.02	3.84 ± 0.04
150 kJ	2.66 ± 0.05	3.02 ± 0.04	2.90 ± 0.05	2.36 ± 0.06	2.83 ± 0.01
200 kJ	2.57 ± 0.05	2.67 ± 0.03	2.74 ± 0.02	2.72 ± 0.03	3.00 ± 0.01
250 kJ	0.87 ± 0.75	1.32 ± 0.06	1.94 ± 0.05	2.03 ± 0.04	2.13 ± 0.08
<b>HTST</b>					
Untreated	ND <sup>2)</sup>	1.11 ± 0.03	1.67 ± 0.08	1.89 ± 0.03	2.52 ± 0.07
100 kJ	ND	1.11 ± 0.09	1.76 ± 0.12	1.77 ± 0.03	2.45 ± 0.03
150 kJ	ND	0.70 ± 0.17	1.39 ± 0.20	1.37 ± 0.14	1.34 ± 0.07
200 kJ	ND	ND	ND	ND	0.39 ± 0.36
250 kJ	ND	ND	ND	ND	ND

1) TNTC : Too Numerous To Count

2) ND : Not Detected

PEF 단독 처리 군은 최소 1.29 log에서 최대 3.41 log 감소하는 효과를 보였다. 이는 LTLT 및 HTST 단독처리와 비교해보면 LTLT 단독은 2.53 log, HTST 단독은 음성으로 250 kJ energy 수준으로 PEF 단독처리 했을 경우가 LTLT 단독 보다는 좋은 결과를 보여주었다.

HTST와 PEF의 병용처리군은 모두 대장균군 음성이며, 일반세균은 모두 3 log 이하로 매우 안정적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 HTST와 PEF 250 kJ 처리한 시료는 20일 저장기간 중 일반세균이 검출되지 않아 미생물적으로 매우 안정적이었다.

본 저장성 실험을 통해 식품 위생법에 준하는 우유의 미생물 기준인 일반세균 20,000 cfu/mL, 대장균군 n=5, c=2, m=0, M=10에 준하는 처리군은 PEF 250 kJ, LTLT와 병용처리 한 150 kJ, 200 kJ, 250 kJ, HTST와 병용처리 한 모든 시료 총 10개 군이다.

Table 1-13. 원유의 살균 공정변수에 따른 대장균 살균효과

		(Log cfu/mL)				
시료	날짜(day)	0	5	10	15	20
	<b>Raw milk</b>					
Untreated		2.51 ± 0.01	5.58 ± 0.05	TNTC <sup>1)</sup>	-	-
100 kJ		1.94 ± 0.06	5.68 ± 0.05	5.94	TNTC	-
150 kJ		ND <sup>2)</sup>	1.58 ± 0.17	ND	3.19 ± 0.01	3.60 ± 0.06
200 kJ		ND	ND	ND	2.32 ± 0.01	4.34 ± 0.56
250 kJ		ND	ND	ND	ND	ND
<b>LTLT</b>						
Untreated		ND	0.67 ± 0.58	ND	4.77 ± 0.05	TNTC
100 kJ		ND	0.33 ± 0.58	ND	3.66 ± 0.04	TNTC
150 kJ		ND	0.33 ± 0.58	ND	ND	ND
200 kJ		ND	ND	ND	ND	ND
250 kJ		ND	ND	ND	ND	ND
<b>HTST</b>						
Untreated		ND	ND	ND	ND	ND
100 kJ		ND	ND	ND	ND	ND
150 kJ		ND	ND	ND	ND	ND
200 kJ		ND	ND	ND	ND	ND
250 kJ		ND	ND	ND	ND	ND

1) TNTC : Too Numerous To Count

2) ND : Not Detected

## 2) 원유의 PEF, LTLT, HTST 병용에 의한 품질의 변화

### 가) 산도 및 pH

우유를 페놀프탈레인 지시약으로 0.1 N NaOH로 중화적정 한 값을 적정산도(산도)라 하고 신선유는 보통 0.05-0.18%의 적정산도를 가진다. 이는 주로 우유속의 단백질과 무기염에서 유래한 것이므로 고형분 함량에 의해 영향을 받는다. 우유는 보존기간 중 세균에 의해 산이 생성되어 산도가 올라가므로 우유의 신선도를 측정하는 방법으로 산도 측정을 하기도 한다. 우유의 pH는 통상 6.5-6.7이다.

본 연구에서는 원유가 0.175%로 가장 높은 산도를 나타냈으며, pH는 5.92로 가장 낮은 수치를 나타냈다(Table 1-14). 이는 살균이 진행되지 않아 미생물에 의한 산의 생성으로 인한 것으로 판단된다.

가열 온도에 따른 변화는 pH가 두드러져 보이는데, pH가 무처리군, LTLT군, HTST 군 순으로 높아지는 경향을 보이며, PEF의 유무나, 강도에 의한 차이는 미비했다. 산도도 마찬가지로 가열처리 수준에 따라 높은 온도일수록 산도가 낮아지는 경향을 보이며, PEF에 의한 영향은 없는 것으로 보인다.

Table 1-14. 원유의 살균 공정변수에 따른 산도와 pH의 변화

	산도(%)	pH
Raw milk		
Untreated	0.175 ± 0.00	5.92 ± 0.01
100 kJ	0.134 ± 0.01	6.11 ± 0.00
150 kJ	0.118 ± 0.01	6.15 ± 0.01
200 kJ	0.110 ± 0.00	6.25 ± 0.01
250 kJ	0.106 ± 0.00	6.24 ± 0.01
LTLT		
Untreated	0.152 ± 0.00	6.27 ± 0.02
100 kJ	0.119 ± 0.00	6.27 ± 0.01
150 kJ	0.111 ± 0.00	6.28 ± 0.02
200 kJ	0.119 ± 0.00	6.28 ± 0.02
250 kJ	0.105 ± 0.00	6.26 ± 0.01
HTST		
Untreated	0.109 ± 0.00	6.46 ± 0.02
100 kJ	0.108 ± 0.00	6.46 ± 0.02
150 kJ	0.107 ± 0.00	6.47 ± 0.02
200 kJ	0.109 ± 0.00	6.45 ± 0.00
250 kJ	0.107 ± 0.00	6.47 ± 0.02

#### 나) 갈색화 반응

우유의 단백질과 유당은 60℃ 이상에서 30분 또는 100℃ 이상에서 수 분간 가열에 의해 갈변화가 시작되는 것으로 보고되어있다. 즉, 우유 중의 단백질 말단 NH<sub>2</sub>기 중 유당의 carvonyl기가 결합하여 당단백질 분자내 N-lactoside나 N-lactulosid를 생성하고 2차적으로 생성된 단백질이 분해되어 oxy-methylene glycoaldehyde란 갈색 물질을 생성하여 우유의 색을 갈변시킨다.

가열살균이나 PEF의 병용에 의한 갈변반응을 알아보기 위하여 spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 측정된 흡광도와 색차계를 이용한 L, a, b value를 측정하였다(Table 1-15). 가열에 의한 갈색도는 원유에 비해 가열단계가 높아질수록 그리고 PEF의 단계가 높아질수록 420 nm에서의 흡광도가 높게 나오는 경향을 보였다. 색도 측정 결과 명도를 나타내는 L 값은 LTLT 처리군과 HTST 처리군이 raw milk 군에 비해 낮은 L 값을 나타내었고 LTLT 처리군보다 HTST 처리군이 높은 L 값을 가지는 것을 확인하였다. 적색도를 나타내는 a 값에서도 가열처리한 LTLT와 HTST의 처리군이 가열처리하지 않은 원유군보다 낮은 a 값을 가졌고, PEF 처리 단계에 따라서도 낮아지는 경향을 확인하였다. 황색도를 나타내는 b 값에서는 가열처리나 PEF 처리에 의해 영향을 받지 않았다.

LTLT와 HTST 처리군 사이에서는 상대적으로 높은 온도에서 처리하는 HTST 보다 LTLT 처리군이 갈색도가 더욱 진행이 된 것으로 확인되었는데 이는 가열처리 온도는 HTST 보다 낮아도 처리 시간에 의한 영향이 많이 받은 것으로 판단된다.

Table 1-15. 원유의 살균 공정변수에 따른 흡광도와 색도의 변화

	흡광도 O.D value(420 nm)	색도		
		L	a	b
Raw milk				
Untreated	174.00 ± 0.00	21.15 ± 0.01	4.61 ± 0.01	31.35 ± 0.10
100 kJ	191.33 ± 0.58	21.53 ± 0.00	4.19 ± 0.01	32.22 ± 0.01
150 kJ	196.33 ± 0.58	21.63 ± 0.00	3.74 ± 0.02	32.22 ± 0.03
200 kJ	194.33 ± 0.58	21.24 ± 0.00	3.17 ± 0.01	31.82 ± 0.01
250 kJ	211.33 ± 0.58	21.73 ± 0.02	2.79 ± 0.00	31.17 ± 0.03
LTLT				
Untreated	184.33 ± 0.58	20.16 ± 0.01	3.14 ± 0.01	30.51 ± 0.02
100 kJ	189.33 ± 1.15	20.30 ± 0.01	3.05 ± 0.00	30.72 ± 0.02
150 kJ	192.00 ± 1.00	20.48 ± 0.01	2.79 ± 0.01	30.93 ± 0.01
200 kJ	207.67 ± 2.08	20.59 ± 0.00	2.76 ± 0.01	31.03 ± 0.01
250 kJ	229.00 ± 1.73	20.58 ± 0.00	2.56 ± 0.00	30.92 ± 0.02
HTST				
Untreated	195.00 ± 3.46	20.75 ± 0.01	4.15 ± 0.02	30.24 ± 0.00
100 kJ	205.67 ± 1.15	20.93 ± 0.02	3.07 ± 0.00	30.76 ± 0.02
150 kJ	223.33 ± 6.66	21.21 ± 0.01	2.94 ± 0.01	30.75 ± 0.01
200 kJ	219.00 ± 5.20	21.09 ± 0.01	2.85 ± 0.01	30.68 ± 0.01
250 kJ	240.00 ± 0.00	21.23 ± 0.01	2.71 ± 0.01	30.71 ± 0.01

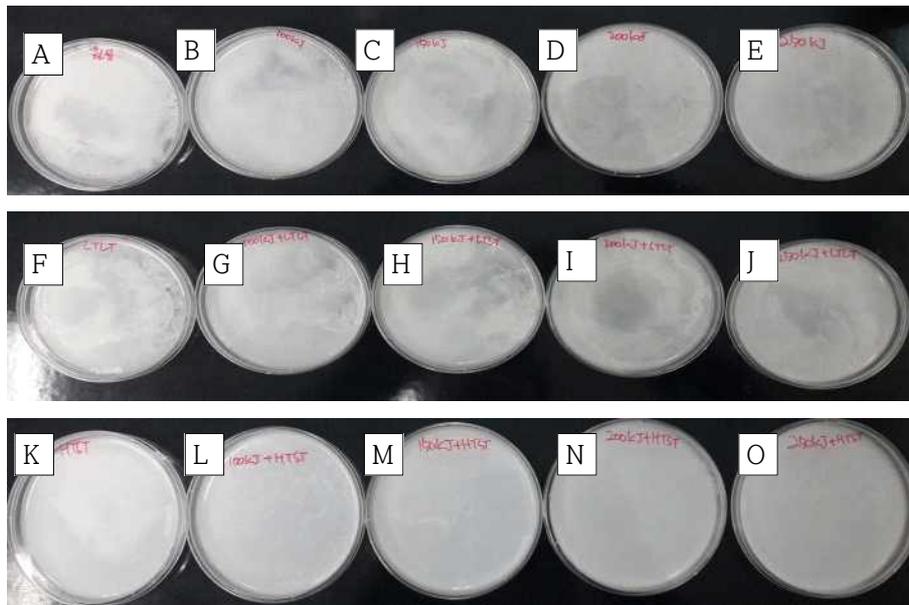
#### 다) Alcohol test

원유의 유질검사에 실시하는 alcohol test는 70% ethyl alcohol에 동량의 우유를 혼합하여 응고정도를 측정한다. 오래되어 산성화된 우유나 초유, 유방염유 등과 같은 이상유는 양성의 응고반응을 보인다. 응고는 alcohol의 탈수작용으로 일어나는 것으로서 alcohol 불안정유라고 부른다.

본 연구에서 alcohol에 대한 응고정도를 +로 정도에 따라 최고 +++까지 등급을 평가하였다(Table 1-16). 연구결과 원유의 응고가 가장 많았으며, 원유를 PEF 처리한 우유는 원유에 비해 응고정도가 비교적 낮았다. 살균되지 않은 원유의 유산균 등이 산을 형성하여 alcohol에 의해 응고되어진 것으로 판단되었다. LTLT 병용처리 한 시료 보다 HTST 병용처리 한 시료가 응고가 적었으며, HTST에 PEF 250 kJ 처리한 우유의 경우 전혀 응고가 생기지 않았다. Alcohol test에 대한 적합성은 PEF 단독처리에서는 150 kJ 이상과 LTLT, HTST 병용처리 시 모두 적합하다고 판단되었다.

Table 1-16. 원유의 살균 공정변수에 따른 alcohol test 변화

Milk type	Alcohol test	Milk type	Alcohol test	Milk type	Alcohol test
Raw milk		LTLT		HTST	
Untreated	+++	Untreated	++	Untreated	+
100 kJ	+++	100 kJ	++	100 kJ	+
150 kJ	++	150 kJ	++	150 kJ	+
200 kJ	++	200 kJ	++	200 kJ	-
250 kJ	++	250 kJ	++	250 kJ	-



(A : Raw milk, B : PEF 100 kJ, C : PEF 150 kJ, D : PEF 200 kJ, E : PEF 250 kJ)

(F : LTLT milk, G : PEF 100 kJ+LTLT, H : PEF 150 kJ+LTLT, I : PEF 200 kJ+LTLT, J : PEF 250 kJ+LTLT)

(K : HTST milk, L : PEF 100 kJ+HTST, M : PEF 150 kJ+HTST, N : PEF 200 kJ+HTST, O : PEF 250 kJ+HTST)

#### 라) 우유의 turbidity test

유청단백질은 체 단백질의 75%를 차지하는 근육조직의 아미노산중 식품에 부족되기 쉬운 Tryptophan, Lysine, Methionine, Isoleucine등이 충분히 들어있다. 그러나 유청 단백질은 casein과

달리 열에 예민하게 반응한다. 이러한 성질은 유청 단백질이 Cystein과 Methionine의 함량이 높은 대신 Proline 의 함량이 낮고 인(Phosphorus)의 결여에서 기인한다. 유청 단백질중의 하나인  $\beta$ -Lactoglobulin은 유리 -SH기를 갖는 Cystein의 함량이 높아 열을 받으면 단백질의 3차 구조를 안정화시키는 수소결합과 disulfide결합이 파괴되어 단백질의 펩타이드 고리가 풀리고 풀려진 펩티드 고리들이 궁극적으로 서로 엉겨 붙는 새로운 결합들이 만들어져  $\beta$ -Lactoglobulin의 변성을 일으키게 된다.

열처리에 의한 단백질 변성을 나타내는 실험인 백탁실험 (Turbidity Test) 에서 63°C에서 30분간 저온 살균한 우유에서는 백탁현상을 일으키나 132°C에서 2-4초간 초고온 살균한 우유에서는 유청 단백질 변성으로 백탁현상이 일어나지 않는다.

Table 1-17에 원유, PEF 및 가열 살균한 우유의 turbidity test 결과를 나타내었다. 원유 및 HTST 우유는 열에 의한 변성이 적어 turbidity 양성의 결과가 나타났고, 반면 LTLT 우유는 장시간 가열 처리에 의한  $\beta$ -Lactoglobulin의 변성으로 약한 양성이 나타났다. 이전 turbidity test 연구결과에 의하면 UHT 우유는 강한 열처리에 의한  $\beta$ -Lactoglobulin의 변성으로 turbidity가 음성으로 나타났는데 이는 충분한 가열살균처리에 의한 결과로 열처리 정도에 살균지표로 사용되고 있다. 한편 각 살균처리군의 PEF 병용처리 시 turbidity에 영향을 주지 않는 것으로 나타내는데 이는 간접적으로는 PEF 처리가 우유의 단백질 변성에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다.

Table 1-17. 원유의 살균 공전변수에 따른 turbidity의 변화

Milk type	Turbidity	Milk type	Turbidity	Milk type	Turbidity
Raw milk		LTLT		HTST	
Untreated	+++	Untreated	+	Untreated	+++
100 kJ	+++	100 kJ	+	100 kJ	+++
150 kJ	+++	150 kJ	+	150 kJ	+++
200 kJ	+++	200 kJ	+	200 kJ	+++
250 kJ	+++	250 kJ	+	250 kJ	+++

## (2) 공정가이드 제시

이상 PEF 및 가열살균에 따른 우유의 살균지표 변화를 종합하면 가장 중요한 요소인 대장균군의 경우 음성을 목표로 할 때 LTLT 살균과 PEF 200, 250 kJ/L을 병용 살균한 우유와 HTST 살균과 PEF 100, 150, 200, 250 kJ/L을 병용살균 한 우유만을 고려해야 할 필요가 있다.

우유의 살균지표 뿐만 아니라 미생물 사멸 그리고 단백질의 보존성을 고려한 PEF와 가열살균의 바람직한 병용처리 공정을 찾기 위해 제1협동기관과 제2협동기관의 연구 결과를 활용하였다. 본 연구

를 통해 제1협동기관에서는 멸균우유에 4종의 미생물을 접종하여 각 공정변수 별 미생물의 사멸 효과를 검증하였으며, 제2협동기관은 PEF 공정변수별 그리고 LTLT 병용살균을 포함하여 기능성 단백질의 보존을 확인하였다.

제1협동기관의 연구 결과에 따르면 4개의 미생물 최적 살균조건은 초기온도 30℃, field strength 10 kV/cm, flow rate 30 L/h 조건에서 energy 200 kJ/L에서 살균효율이 높았다. 제2협동기관의 연구결과에서는 LTLT 살균에 의한 변화는 IgA와 lactoferrin이 두드러진 감소를 보였다. PEF와의 병용 처리에서는 가열살균에 비해 그 변화가 거의 없었으며, PEF 단독으로 처리 시 lactoferrin을 제외한 타겟 단백질들의 감소는 미비했다. 제2협동기관의 결과에서 PEF energy를 200 kJ/L 이상 병용처리를 하더라도 UHT 살균에 비하면 상당량의 단백질들이 보존될 수 있다는 결론을 내릴 수 있었다. 각 기관의 연구결과를 종합하여 볼 때 pilot plant 생산에 있어서 대량생산의 최적의 공정변수는 Table 1-18와 같이 설정하였다.

Table 1-18. 각 공정별 최적화 설정

공정명	상세공정
균질화	38℃, 150 bar
PEF	초기온도 30℃, field strength 10 kV/cm, flow rate 100-150 L/h, 200-250 kJ/L
포장	CIP 실에서 무균 충전
LTLT	PEF 처리 후 온도 유지(65℃ bath, 30분)
HTST	PEF 처리 후 온도 유지(75℃ bath, 15초)

시제품 생산을 위한 대량생산을 위해서 기존 flow rate 30 L/h에서 100, 150 L/h로 변경하여 적용 실험이 필요하다. Scale up 실험에 사용되는 기기는 제1협동기관에서 보유하고 있는 5 kW 급 펄스 발생 장치와 동일한 장비로 bipolar square 형태의 펄스가 사용되는 연속식 chamber이다. 유속은 50-200 L/h 까지 조절이 가능한 펌프가 사용되며, PEF 투입 전 승온과 처리 후 냉각이 가능하며 처리가 끝난 시료는 따로 분리된 포장실로 라인이 연결되어 병입이 가능하다. PEF 처리 전 후의 CIP(Clean In Place)는 100℃ 이상의 증기를 라인으로 투입하여 살균을 하고 있다. 원유를 원료탱크에 투입을 하면 그 밖에 외부 오염 요소가 없으므로 pilot plant scale up 연구를 위해서 적합하다고 판단된다.



①



②



③



④



⑤

Fig 1-12. Plant 생산을 위한 공정 설비

(①: 원료탱크, ②: 펌프 및 가열/냉각 장치, ③: PEF 기기, ④: 포장실 이송라인, ⑤: 포장실)

### 3. 시생산을 통한 상업화 및 법제화 추진

#### 가. 최적 생산을 위한 pilot plant 설계 최적화공정 확립

이전 연구에서 검토한 시생산 라인적용 우유에 대한 lab scale 상 최적의 공정을 확립하기 위해 LTLT와 HTST 병용 process를 재검토 하고자 하였다.

LTLT 병용은 살균 진행 상 회분식으로 진행을 하기에 연속식 공정에 제약이 있어 HTST 병용처리 군과의 상대비교를 위해 실시하였다.

#### (1) 살균 공정 단계별 scale up test 및 control point & factor 설립

##### (가) 실험방법

##### 1) 원료

원료인 원유는 위탁기관인 서울우유로부터 제공받았다. 38℃, 150 bar 수준에서 균질 된 원유를 5℃ 이하의 냉장상태로 overnight 후 제공받아 실험 원료로 사용하였다.

##### 2) PEF process

원유를 LTLT와 HTST 처리 수준을 달리하여 PEF 처리를 진행하였다. LTLT를 진행할 원유는 PEF 처리 후 최종온도가 65℃ 내외로 처리가 되는 공정변수를 설정하였으며, HTST를 진행할 원유는 PEF 처리 후 최종온도가 75℃ 내외가 되도록 공정변수를 설정하였다. 그 결과 Table 1-19와 같은 PEF 공정변수를 설정하게 되었다.

Table 1-19. PEF process parameters in accordance with the sterilization process

조건	PEF 조건					온도변화(℃)		
	Out voltage (%)	Pulse width (μs)	Field strength (kV/cm)	Frequenc-y (Hz)	Energy (kJ/L)	Inlet Temp.	Outlet Temp.	dT
65℃ 기준	50	20	10.8	125	180.5	35	66.8	31.8
75℃ 기준	50	20	10.9	170	232.2	35	75.6	40.6

우유의 conductivity는 0.525 S/m, 유속 30 L/h로 PEF 처리 하였으며, 에너지를 최대 높이기 위해 outlet valve에 역압 밸브를 설치하고 1 bar의 back pressure를 걸어주었다. Field strength를 10 kV/cm 내외로 고정을 하고, 최종제품의 온도가 65, 75°C가 되는 에너지 수준은 각각 180, 232 kJ/L 임을 확인하였다.

### 3) 가열살균 공정

#### 가) LTLT 공정

LTLT 살균은 50 mL tube에 원유 50 mL 투입 후 68°C로 세팅된 water bath 상에 shaking을 하면서 원유의 심부 온도가 65°C 도달 한 순간부터 30분간 진행하였다. 살균을 마친 시료는 즉시 ice chamber에 넣어 냉각을 실시하였다.

PEF 65°C 기준으로 처리한 우유의 LTLT 병용은 PEF 처리되어 나온 우유를 50 mL tube에 50 mL 받은 즉시 68°C로 세팅된 water bath 상에 shaking을 하면서 30분간 살균을 진행하고, 살균이 끝난 tube는 즉시 ice chamber로 옮겨 냉각을 하였다.

#### 나) HTST 공정

HTST 살균은 Fig. 1-13과 같은 HTST 살균기를 이용하여 실시하였으며, 4°C의 원유가 chamber 안의 코일을 30 L/h의 flow rate로 통과할 때 75°C로 15초 동안 살균이 진행되도록 설계를 했다. HTST 살균이 끝난 우유는 즉시 ice chamber로 연속적으로 이송되어 냉각이 진행되고 50 mL tube에 50 mL을 충전 하였다.

PEF 75°C 기준으로 처리한 우유의 HTST 병용은 PEF 처리 후 연속적으로 HTST chamber로 이동되어 살균 후 냉각하여 위와 같은 방법으로 충전 하였다.



Fig. 1-13. 연속식 PEF 및 HTST system

#### 다) 생균수 측정

원유, LTLT 단독, HTST 단독, PEF 65°C 기준 단독, PEF 75°C 기준 단독, PEF 65°C, PEF 65°C 기준 처리 후 LTLT 살균, PEF 75°C 기준 처리 후 HTST 살균시료는 일반세균, 대장균군, 진균을 대상으로 생균수를 측정하였다.

처리 직후 각 시료 원액 혹은 멸균된 0.85% NaCl에 10단계 희석된 희석액을 일반세균은 일반세균용 건조필름 3장에 1 mL 씩 접종 후 36±1°C 배양기에서 24시간 배양 하였다. 배양 후 집락수를 더하여 평균을 내고 희석배수를 곱하여 생균수를 환산하였다.

대장균군의 경우 위 시료 및 희석액을 대장균/대장균군용 건조필름 3장에 1 mL 씩 접종 후 36±1°C 배양기에서 24-48시간 배양 하였다. 배양 후 대장균군 고유의 집락을 더하여 평균을 내고 희석배수를 곱하여 생균수를 환산하였다.

진균의 경우 위 시료 및 희석액을 효모/곰팡이용 건조필름 3장에 1 mL 씩 접종 후 25±1°C 배양기에서 72시간 배양 하였다. 배양 후 진균 고유의 집락을 더하여 평균을 내고 희석배수를 곱하여 생균수를 환산하였다.

(나) 실험결과

1) LTLT 병용실험

우유의 LTLT 병용 공정의 최적화를 위하여 공정 단계별 미생물의 저감효과를 확인하기 위해 원유(control)를 LTLT 단독(LTLT only), PEF 65°C 기준 처리(PEF 65°C), PEF 65°C 기준 처리 후 LTLT 처리(LTLT after PEF 65°C) 우유를 대상으로 일반세균, 대장균군, 진균의 생균수를 측정하였다(Table 1-20).

Table 1-20. LTLT 처리 공정 별 생균수 측정

Sample	Aerobic plate count	Coliform	Yeast & mold
Control	13,133.3 ± 679.87	1,023.3 ± 155.85	250.0 ± 43.20
LTLT only	80.7 ± 10.34	ND	ND
PEF 65°C	27.0 ± 3.74	ND	ND
LTLT after PEF 65°C	1.7 ± 0.47	ND	ND

모든 처리에서 원유에 존재하는 대장균군(1,023.3 cfu/mL)과 진균(250.0 cfu/mL)은 모두 사멸하였으며, 일반세균수의 경우 원유에 비해 LTLT 단독 처리군은 2.2 log 수준 감소로 일반세균 살균효과가 다른 살균처리군에 비해 가장 적었으며, PEF 단독과 PEF와 LTLT 병용처리군은 각각 2.7, 3.9 log 수준 감소로 일반세균 살균효과에 유의적인 차이가 없었다. 미생물적인 측면만 고려하면 본 실험에서 가장 우수한 처리군은 PEF와 LTLT 병용처리군이 가장 우수한 것으로 확인 되었다.

2) HTST 병용실험

연속식 HTST 처리 공정을 완성하기 위하여 HTST 살균기로 진입하는 coil의 재질과 직경, 길이를 선정하였다. 재질은 외부의 온도를 가장 잘 전달할 수 있는 동관을 사용하였으며, 기성품 중 내경이 0.952 cm 인 구리관을 총 부피가 0.142 L가 되도록 길이를 200 m로 절단하였다. 내열성 tube를 이용하여 PEF와 ice chamber로 직접 연결하였다. 세팅된 공정에서 우유를 30 L/h로 흘려주었을 때 HTST chamber에 체류하는 시간이 17초 내외인 것을 확인하였다. Chamber 진입 전 후의 파이프에 연결된 온도계를 통해 시료의 온도변화를 확인해 본 결과 chamber의 온도는 80°C로 세팅할 때 우유가 75°C 이상 온도에서 15초 유지되는 것을 확인하였다. 또 ice chamber를 통과하는 coil은 stainless steel로 0.71 cm 내경, 1400 cm 길이, 총 부피 0.554 L로 설계하였으며, 1°C chamber를 7 5°C 우유가 30 L/h의 유속으로 지나면서 최종 2-4°C 제품이 나오는 것을 확인하였다.

Line의 CIP(Clean in place)는 실험 전 후 80°C의 1% NaOH와 증류수 각 10 L 씩을 번갈아가며 3 차례 흘려주어 내부를 씻어주었다.

세팅된 HTST system을 원유(control), HTST only, PEF 75°C, HTST after PEF 75°C 처리군으로 나누어 살균을 실시하고, 이에 따른 미생물의 저감효과를 일반세균, 대장균군, 진균을 대상으로 확인하였다(Table 1-21).

Table 1-21. HTST 처리 공정 별 생균수 측정

Sample	(cfu/mL)		
	Aerobic plate count	Coliform	Yeast & mold
Control	46,500.0 ± 6,940.22	1,740.0 ± 66.83	753.3 ± 24.94
HTST only	213.3 ± 40.28	ND	ND
PEF 75°C	4.0 ± 0.82	ND	ND
HTST after PEF 75°C	5.0 ± 2.16	ND	ND

모든 처리에서 원유에 존재하는 대장균군(1740.0 cfu/mL)과 진균(753.3 cfu/mL)은 모두 사멸하였으며, 일반세균수의 경우 원유에 비해 HTST 단독 처리군은 2.4 log 수준 감소로 일반세균 살균효과가 다른 살균처리군에 비해 가장 적었으며, PEF 단독과 PEF와 LTLT 병용처리군은 각각 4.1, 4.0 cfu/mL 수준 감소로 일반세균 살균효과에 유의적인 차이가 없었다. 미생물적인 측면만 고려하면 본 실험에서 가장 우수한 처리군은 PEF 단독과 PEF와 LTLT 병용처리군이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

(2) 살균 공정에 대한 PEF 및 가열살균 조합에 의한 process flow & instrument design

시생산 공정에 적용하기 위해 scale up 된 공정에서 저장 안전성 및 단백질 보존성을 재검토 해 봐야하기에 현장에 맞는 공정 세팅이 필요했다. LTLT 살균은 회분식으로 적용에 문제가 많아 고려된 연속식공정은 HTST 살균공정으로 원료투입부터 포장까지 일련의 과정에 대한 점검과 문제점이 있는지 확인 하였다. 이 과정에서 사용된 HTST 살균은 PEF 처리 후 냉각을 거치지 않고 판형 열교환기로 이어져 살균이 진행되었다. 실험에 사용된 시료는 총 4가지로 우유로 균질원유, 저지방우유가 사용됐으며, 유제품으로 초코우유, 아메리카노 제품으로 구성되었다.

(가) 우유의 시생산 PEF 공정변수 확립

우유는 앞서 lab scale에서 공정을 확립한 균질원유를 사용하였다. 균질원유 200 L을 공급받아 원료 tank에 투입 전 원료 tank에서부터 병입 라인까지 100°C 이상의 증기로 CIP를 진행하였으며, 제품이 투입되는 용기는 초산으로 1차 살균 후 자외선으로 2차 살균을 진행하였다. 시생산 라인은 100 L/h의 유속을 기준으로 하였으며, 이때 가능한 최대의 공정변수는 Table 1-22와 같이 설정 할 수 있었다.

Table 1-22. 시생산 line에서의 PEF 공정변수 확립

Out voltage (%)	Pulse width (μs)	Frequency (Hz)	Field strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet Temp. (°C)	Outlet Temp. (°C)	dT
60	30	70	16	250	32	75	43

기존 lab scale 공정과 flow rate, out voltage, pulse width, Frequency를 제외한 모든 공정변수는 동일하게 진행하였다. Flow rate은 30 L/h에서 100 L/h로, out voltage는 50%에서 60%로, pulse width는 20 μs에서 30 μs로 증가하였으며, frequency는 170 Hz에서 70 Hz로 감소하였다. 이에 따라 출력되는 field strength와 energy는 각각 10 kV/cm에서 16 kV/cm로, 232 kJ/L에서 250 kJ/L로 증가하였고, PEF 후 최종 온도는 75°C 내외로 동일하였다. 확립된 공정변수에서의 최종 공정은 Fig. 1-14와 같이 진행하였다.

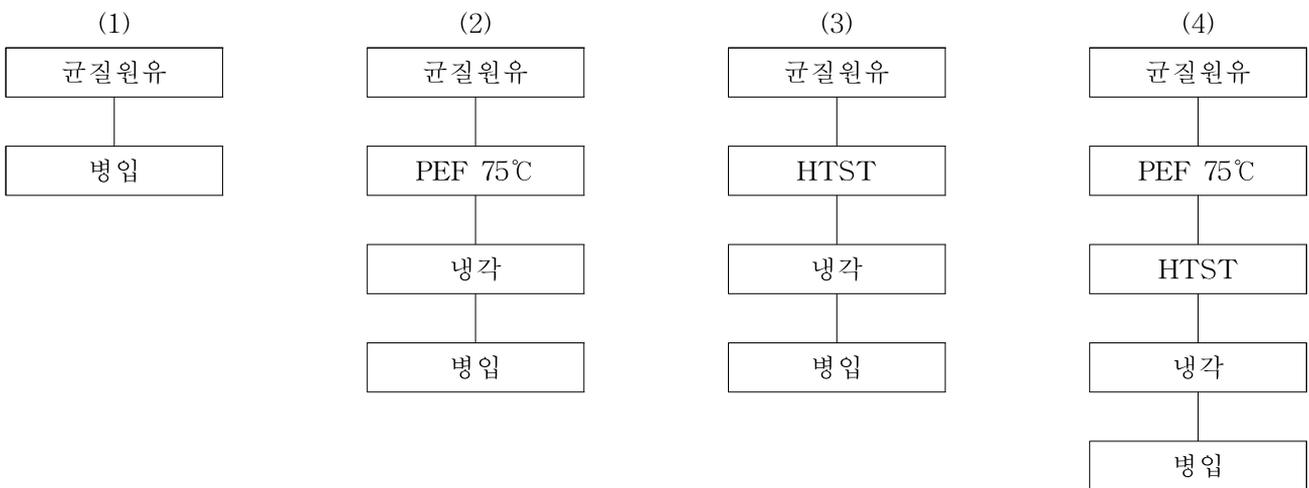


Fig. 1-14. 시생산 우유 PEF 적용 생산공정

### (3) 적용 pilot plant 점검 및 추가 필요설비 발주 및 설치

기존 lab scale 공정과 달라진 pilot plant 공정에서 우유의 품질 변화에 영향을 미치는지 미생물적, 이화학적 변화를 확인하였다.

#### (가) 실험방법

##### 1) 미생물 저장 안전성

Pilot plant 공정에서 생산된 우유 제품은 일반세균, 대장균군, 진균을 대상으로 생균수를 측정하였

다.

생산공정에서 얻은 제품은 각 시료 원액 혹은 멸균된 0.85% NaCl에 10단계 희석된 희석액을 일반 세균은 일반세균 용 건조필름 3장에 1 mL 씩 접종 후 36±1℃ 배양기에서 24시간 배양 하였다. 배양 후 집락수를 더하여 평균을 내고 희석배수를 곱하여 생균수를 환산하였다.

대장균군의 경우 위 시료 및 희석액을 대장균/대장균군용 건조필름 3장에 1 mL 씩 접종 후 36±1℃ 배양기에서 24-48시간 배양 하였다. 배양 후 대장균군 고유의 집락을 더하여 평균을 내고 희석배수를 곱하여 생균수를 환산하였다.

진균의 경우 위 시료 및 희석액을 효모/곰팡이용 건조필름 3장에 1 mL 씩 접종 후 25±1℃ 배양기에서 72시간 배양 하였다. 배양 후 진균 고유의 집락을 더하여 평균을 내고 희석배수를 곱하여 생균수를 환산하였다.

각 시료는 5℃ 이하 냉장보관하며 30일간 주 2회 생균수 측정을 반복하였다.

## 2) 색도 안정성

처리된 각 시료를 spectrophotometer를 이용하여 L, a, b값을 측정하여 처리 후 색가의 변화가 있는지 관찰하였다. 또한 5℃ 이하 냉장보관하며 30일간 주 2회 색가를 측정하여 저장 안정성을 확인하였다. 측정한 색가는 아무 처리도 하지 않은 control 샘플을 기준으로 저장기간별 색공간의 차이(색차, ΔE)를 아래 식을 통해 확인하였다.

$$\Delta E(L^*, a^*, b^*) = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{1/2}$$

## 3) Brix 안정성

처리된 각 시료를 potable Brix meter를 이용하여 Brix를 측정하여 처리 후 Brix의 변화가 있는지 관찰하였다. 또한 5℃ 이하 냉장보관하며 30일간 주 2회 Brix를 측정하여 저장 안정성을 확인하였다.

## 4) pH 안정성

처리된 각 시료를 pH meter를 이용하여 pH를 측정하여 처리 후 pH의 변화가 있는지 관찰하였다. 또한 5℃ 이하 냉장보관하며 30일간 주 2회 pH를 측정하여 저장 안정성을 확인하였다.

## (나) 실험결과

### 1) 미생물 저장 안전성

#### 가) 시생산 우유의 일반세균 저장 안전성

우유의 시생산 라인 안정 확인을 위하여 일반세균의 저장 안정성을 확인하였다. 시생산 라인에서 처리 공정 별 생산된 제품을 4℃ 냉장 보관하며 주 2회 총 31일간 일반세균의 변화를 Fig. 1-15와 같이 관찰하였다.

초기균수는 아무처리도 하지 않은 원유인 control은 4.1 log cfu/mL의 일반세균이 존재하였으며, 시간이 지남에 따라 점점 증가하다 31일 최종 8.4 log cfu/mL 까지 일반세균이 증식하였다. HTST 만 단독으로 처리한 우유의 경우 초기 일반세균이 1.3 log cfu/mL 수준으로 존재하다 시간이 지남에 따라 31일 최종 점점 증식을 하다 31일 최종 4.4 log cfu/mL 까지 증식을 하였다. PEF 단독 처리군은 초기 일반세균이 1.2 log cfu/mL 으로 HTST와 유의적인 차이가 없었으나 31일 저장기간 동안 14일 차에서 3.0 log cfu/mL 까지 증식을 하였고, 31일 차에는 2.6 log cfu/mL 까지 증식을 하였다. 마지막으로 PEF와 HTST를 병용처리 한 우유의 경우 초기 일반세균 수준이 유의적으로 가장 낮은 0.4 log cfu/mL 수준에서 31일 저장기간 동안 일반세균의 변화는 1.2-1.6 log cfu/mL 수준을 유지하였다.

일반세균을 대상으로 저장성 실험을 한 결과 가장 적합한 시생산 공정은 PEF 단독 처리군과 PEF와 HTST를 병용한 처리군이 가장 저장 안전성이 우수하였다. HTST 단독 처리 우유의 경우 31일 저장기간 동안 일반세균이 총 1,915 cfu/mL 수준으로 규격을 초과하지는 않았지만 저장실험 환경이 4℃는 실제 유통환경에서 유지하기 어려운 실정이므로 HTST 단독처리군은 제외하기로 결정하였다. 또한 PEF 단독처리하는 우유의 살균법에 어긋나기 때문에 제외할 수밖에 없었고, 최종적으로 일반세균에서 가장 적합한 살균법은 PEF와 HTST를 병용살균 한 공정을 선택할 수 있었다.

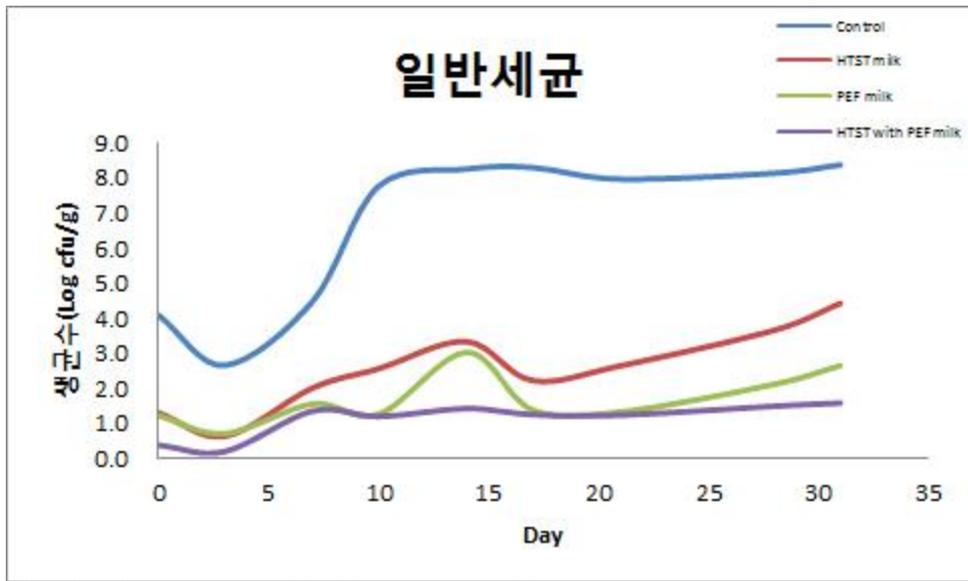


Fig. 1-15. 처리공정 및 저장기간에 따른 일반미생물의 변화

나) 시생산 우유의 대장균군 및 진균 저장 안전성

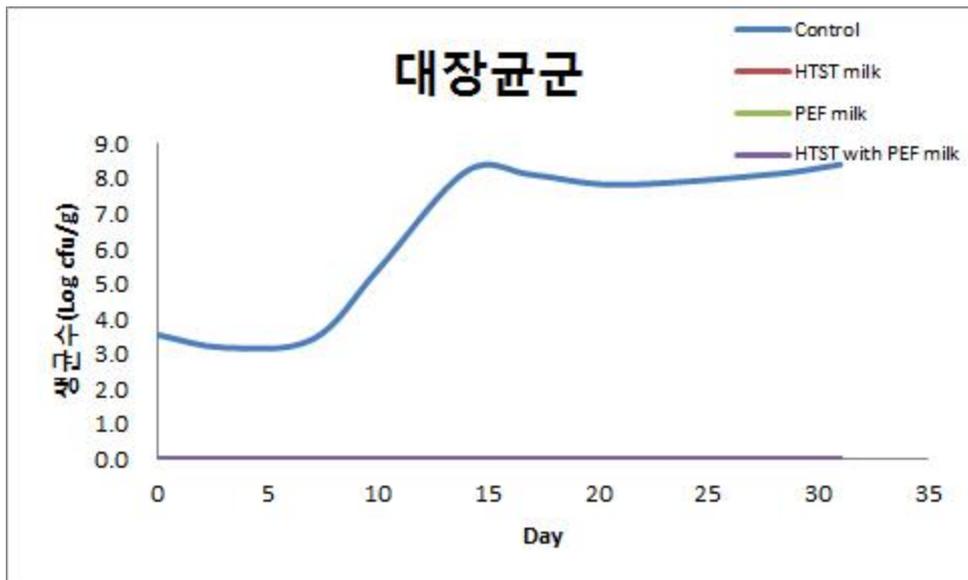


Fig. 1-16. 처리공정 및 저장기간에 따른 대장균군의 변화

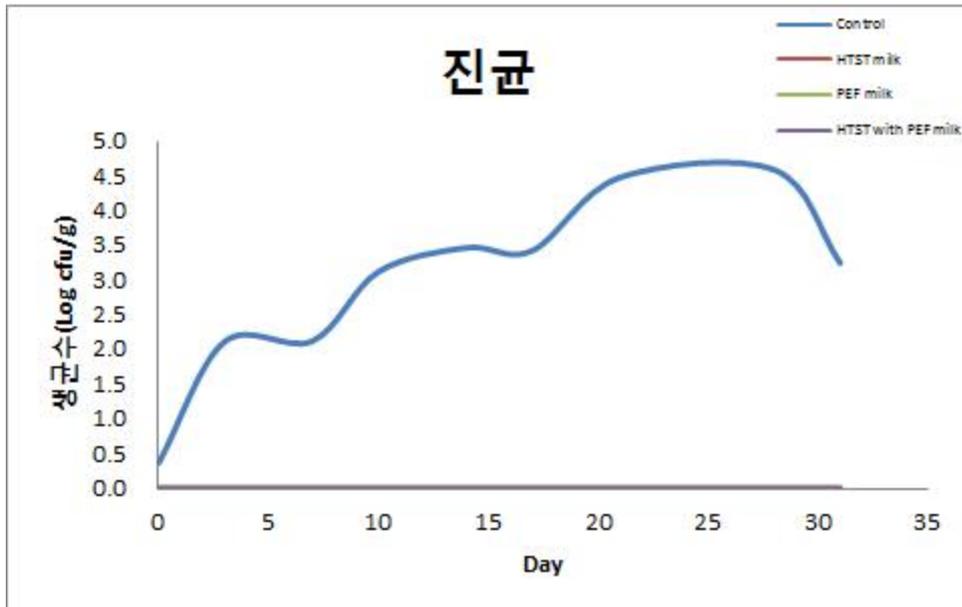


Fig. 1-17. 처리공정 및 저장기간에 따른 진균의 변화

우유의 시생산 라인 안정 확인을 위하여 대장균군 및 진균의 저장 안정성을 확인하였다. 시생산 라인에서 처리 공정 별 생산된 제품을 4°C 냉장 보관하며 주 2회 총 31일간 대장균 및 진균의 변화를 각각 Fig. 1-16, 17과 같이 관찰하였다.

초기 대장균군은 아무처리도 하지 않은 원유인 control은 3.5 log cfu/mL가 검출되었으며, 시간이 지남에 따라 점점 증가하다 14일 차에 8.2 log cfu/mL 까지 대장균군이 증가하다 8.0-8.4 log cfu/mL 수준을 유지하고 31일차 최종 대장균군은 8.4 log cfu/mL 까지 증식하였다. Control을 제외한 모든 처리공정에서 대장균군은 모두 제어가 되었으며, 저장기간 동안에도 대장균군은 검출되지 않았다.

초기 진균은 아무처리도 하지 않은 원유인 control은 0.4 log cfu/mL 검출되었으며, 시간이 지남에 따라 점점 증가하다 28일 차에 4.6 log cfu/mL 까지 증가하였고 최종 31일차에는 3.2 log cfu/mL 수준으로 검출되었다. Control을 제외한 모든 처리공정에서 진균은 모두 제어가 되었으며, 저장기간 동안에도 진균은 검출되지 않았다.

## 2) 색도 안정성

시생산 된 우유에 대해 열에 의한 갈변 영향을 확인하기 위하여 그리고 저장기간 동안 원유와 얼마나 색의 차이가 나는지 확인하기 위하여 L, a, b 값을 색차계를 통해 측정하고, 이 값들을 이용해 ΔE 값을 Fig. 1-18, 19, 20, 21을 통해 확인하였다.

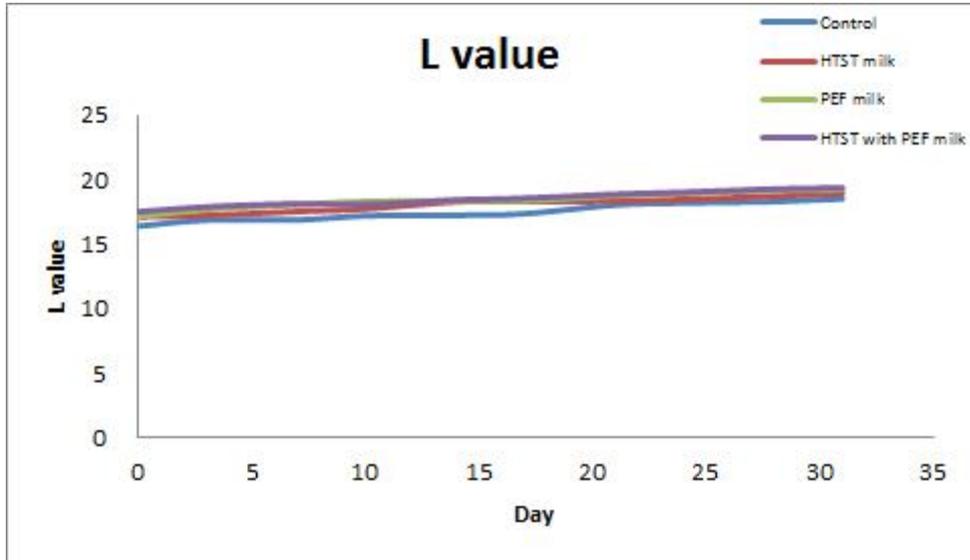


Fig. 1-18. 처리공정 및 저장기간에 따른 색도(L-value) 안정성

처리 직후의 L 값은 control, HTST 단독, PEF 단독 및 PEF와 HTST 병용 처리군이 각각 순서대로 16.40, 17.12, 17.13 및 17.52로 점점 처리 열처리 수준이 높아질수록 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1-18). 저장기간 동안 L 값은 증가하는 경향을 보였으며 최종 31일 저장기간 동안 control, HTST 단독, PEF 단독 및 PEF와 HTST 병용 처리군이 각각 18.52, 18.93, 19.23 및 19.36으로 초기보다 L 값이 모두 상승하였다. 하지만 모든 군에서 육안상의 차이는 없으며, L 값으로 차이가 있다고 보기에는 어려웠다.

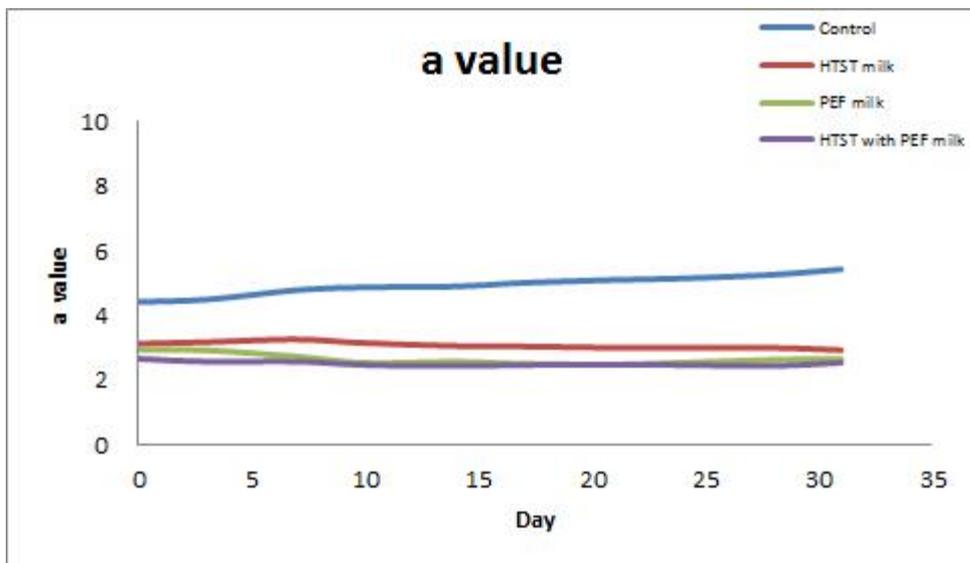


Fig. 1-19. 처리공정 및 저장기간에 따른 색도(a-value) 안정성

적색도를 나타내는 a 값에서는 초기 control, HTST 단독, PEF 단독 및 PEF와 HTST 병용 처리군이 각각 4.40, 3.11, 2.92 및 2.64로 열처리 강도에 따라 점차 감소하는 경향을 보여주었으며, control은 나머지 공정들과 유의적인 차이를 보여주었다(Fig. 1-19). 31일 저장기간 동안 HTST 단독, PEF 단독 및 PEF와 HTST 병용 처리군이 2.91, 2.64, 2.52로 약간의 감소를 보여주는 반면 control은 5.41로 약간의 증가하는 추세를 보여주어 다른 양상으로 진행됨을 확인하였다.

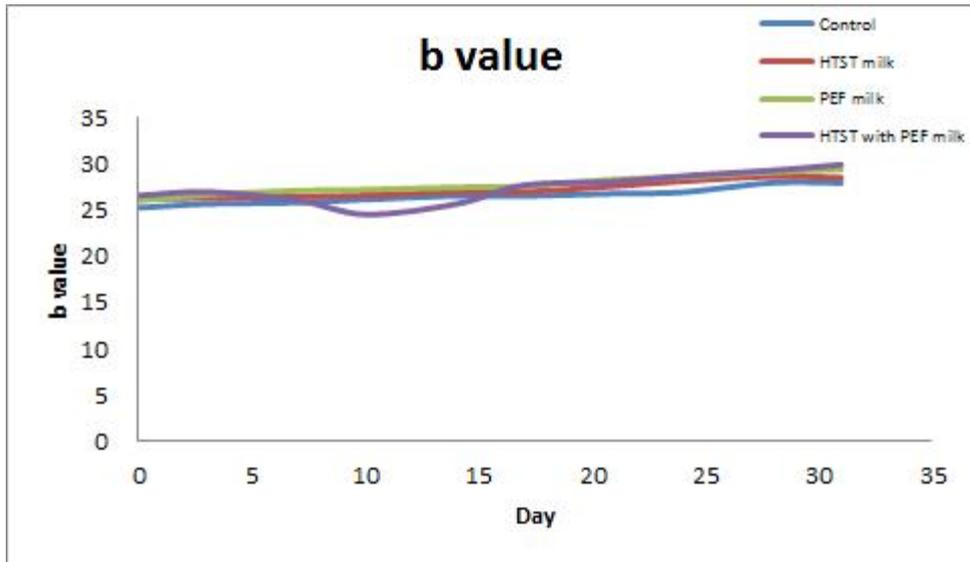


Fig. 1-20. 처리공정 및 저장기간에 따른 색도(b-value) 안정성

황색도를 나타내는 b 값에 있어서는 초기 control, HTST 단독, PEF 단독 및 PEF와 HTST 병용 처리군이 각각 25.16, 26.09, 25.93 및 26.48로 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 31일 저장기간 동안 최종 31일차에 각각 27.84, 28.39, 29.28 및 29.81로 전반적인 상승을 보여주었고, 유의적인 차이는 없었다(Fig. 1-20).

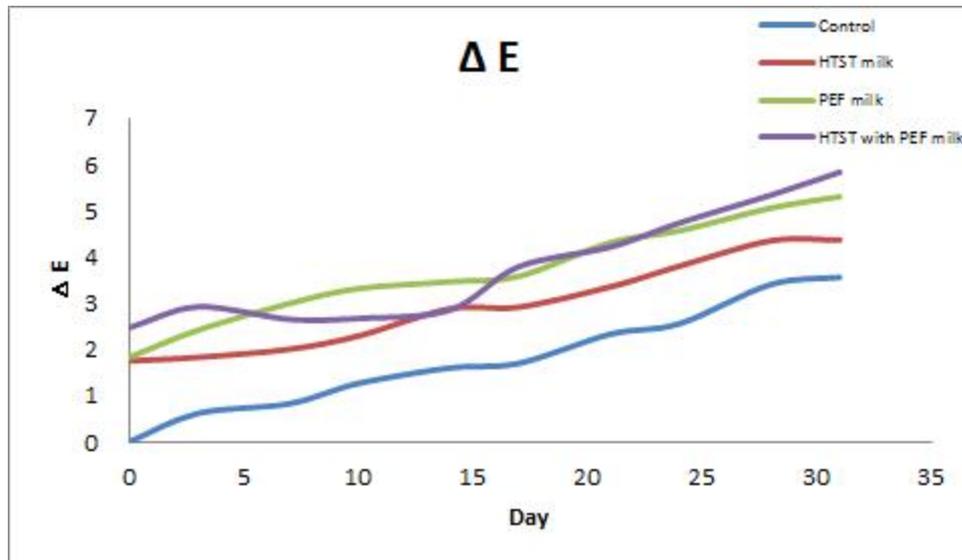


Fig. 1-21. 처리공정 및 저장기간에 따른 색차( $\Delta E$ ) 안정성

색의 차를 나타내는  $\Delta E$ 을 저장기간 동안 확인한 것을 Fig. 1-21에 나타내었다. 초기 0일차의 control 인 원유를 기준으로 얼마나 색의 변화가 있는지를 상대적인 수치로 나타낸 값으로 초기 색의 차는 control, HTST 단독, PEF 단독 및 PEF와 HTST 병용 처리군이 각각 0, 1.75, 1.83, 및 2.47로 PEF와 HTST 단독 간 차이가 없었으나 PEF와 HTST를 병용처리 한 샘플의 경우 색차가 가장 높았다. 색차는 저장기간 동안 점점 값이 높아 졌으며, 최종 31일차에는  $\Delta E$  값이 각각 3.56, 4.36, 5.30 및 5.83으로 PEF와 HTST를 병용처리 한 처리군이 가장 높았다.

색차계를 활용한 우유의 색의 변화에는 원유에 비해 처리가 가미된 HTST, PEF 및 PEF와 HTST를 병용처리 한 샘플의 색의 변화가 a value와  $\Delta E$  value에서 확인되었으며, L value와 b value에서는 유의적인 차이가 발견되지 않았다.

### 3) Brix 안정성

시생산 처리공정에 의해 생산된 우유의 Brix 저장 안정성을 확인하기 위해 각 처리 공정별 시료를 31일 4°C 저장기간 동안 측정된 결과를 Fig. 1-22에 나타냈다. 초기 Brix는 control이 유의적으로 가장 높게 측정이 되었으나, 31일 저장기간 동안 Brix 값이 점점 낮아져 저장기간 동안 일정한 값을 유지한 살균처리 군 보다 낮은 수치를 나타내었다. 따라서 살균처리가 Brix의 안정성에 크게 기여하는 것을 확인하였으며, 모든 살균 처리군 간의 유의적인 차이는 발견할 수 없었다. 이는 살균에 의해 미생물 적으로 안전해 지면서 Brix의 안정성에 기여했다고 유추해 볼 수 있다.

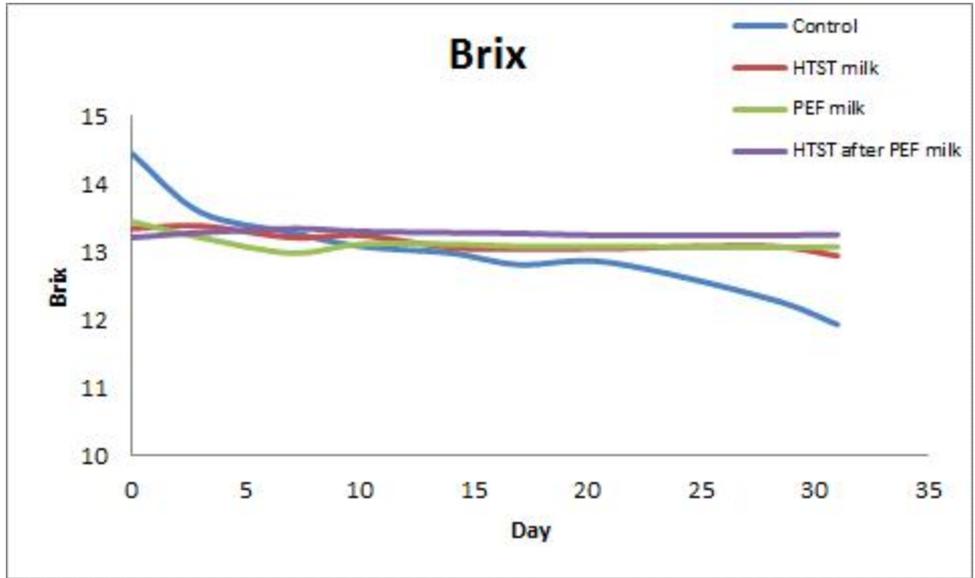


Fig. 1-22. 처리공정 및 저장기간에 따른 Brix의 안정성

#### 4) pH 안정성

시생산 처리공정에 의해 생산된 우유의 pH 저장 안정성을 확인하기 위해 각 처리 공정별 시료를 31일 4°C 저장기간 동안의 pH 측정 결과를 Fig. 1-23에 나타냈다. Brix 결과와 마찬가지로 원유인 control 만이 살균 처리군과 다른 양상으로 pH가 변해가는 양상을 확인할 수 있었다. control 처리군은 pH가 점점 낮아져 최종 31일차에는 5.3의 pH를 나타냈다. 반면 살균 처리군 간의 pH의 유의적인 차이는 없었으며, 저장기간 동안의 소폭의 감소만 발견되었다.

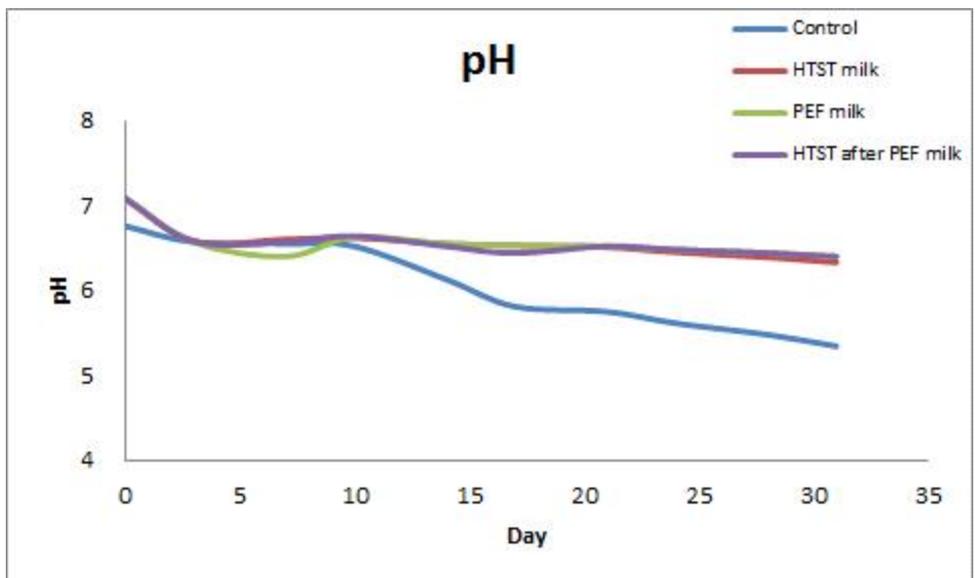


Fig. 1-23. 처리공정 및 저장기간에 따른 pH의 안정성

#### (4) 시운전 및 시제품 생산

PEF 적용 우유 및 유제품의 시제품 생산을 위해 우유 및 유제품을 일반우유, 저지방 우유, 초코 우유, 아메리카노로 선정하였다. 일반우유는 앞서 연구한 바와 같이 PEF 75℃ 기준으로 처리 후 바로 HTST 공정을 거쳐 냉각 및 포장되는 공정이며, 유제품은 각 제품 별 PEF 최대 처리 공정변수로 설정 후 처리하여 냉각 및 포장되는 공정으로 생산하였다.

##### (가) 시생산 제품 공정

시생산에 사용된 PEF 기기는 실험실에서 진행한 PEF 기기와 같은 5 kW 급 장비로 voltage를 0-1,100 V 까지 공급이 가능한 파워 서플라이를 가지고 있다. 원유는 교반이 가능한 tank에 충전되며, PEF chamber로 우유 및 유제품을 보내주는 pump는 최대 500 L/h의 속도로 pumping이 가능하고, 열교환기를 통해 chamber 통과 전 승온이 가능하며, chamber 통과 후 판형 HTST 기기를 통과하여 열교환기를 거쳐 냉각을 한 후 capping 기기에서 충전 및 포장이 이루어진다.

##### 1) 원유

원유는 위탁기관인 서울우유로부터 균질된 원유를 사용하였다. 시생산 제품 수량을 고려하여 200 kg의 원유를 제공 받았다.

##### 2) 저지방 우유, 초코 우유, 아메리카노

시생산에 사용된 저지방 우유, 초코 우유 및 아메리카노는 위탁기관인 서울우유로부터 포물러를 제공받아 Table 1-23, 24, 25과 같은 배합비율로 혼합 후 사용하였다. 저지방 우유와 초코 우유의 경우 배합 시 45℃의 정제수를 사용하여 원료들이 잘 녹을 수 있도록 하였으며, 원료탱크에 교반기를 이용하여 충분히 교반하여 분유가 전부 녹을 수 있도록 시료를 준비하였다.

Table 1-23. 저지방 우유의 배합비율

성분	배합비(%)	중량(kg)
탈지분유	8.9	22.4
정제수	91.1	227.6
총합	100	250

Table 1-24. 초코 우유의 배합비율

성분	배합비(%)	중량(kg)
탈지분유	7.156	17.89
설탕	3	7.5
고과당	4.37	10.925
코코아파우더	1.1	2.75
초코안정제	0.026	0.065
초코향료	0.005	0.0125
바닐라향료	0.011	0.0275
정제수	84.332	210.83
총합	100	250

Table 1-25. 아메리카노 배합비율

성분	배합비(%)	중량(kg)
커피농축액(41 Brix)	3.66	9.15
설탕	4	10
정제수	92.34	230.85
총합	100	250

### 3) PEF process

시생산에 사용된 원료들의 PEF 공정변수는 우유의 경우 앞서 실험한 데이터를 토대로 진행하였으며, 저지방 우유, 초코 우유, 아메리카노의 경우 각 원료의 최대 에너지를 기준으로 진행하였다. 각 원료들의 PEF 공정변수는 Table 1-29 와 같이 진행하였다.

Table 1-26. 우유 및 유제품의 시생산 PEF 공정변수

	Out voltage (%)	Pulse width (µs)	Frequency (Hz)	Field strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet Temp. (°C)	Outlet Temp. (°C)	dT
우유	60	30	70	16	250	32	75	43
저지방 우유	65	20	280	12	140	48	68	20
초코 우유	65	20	230	12.5	116	45.5	63	17.5
아메리카노	65	20	300	16	100	48	62	14

(Conductivity - 우유 : 0.525 S/m, 저지방 우유 : 0.427 S/m, 초코 우유 : 0.433 S/m, 아메리카노 : 0.182 S/m)

모든 원료는 살균이 진행되는 동안 100 L/h의 유속으로 흘러주었으며, 역압밸브를 통해 1 bar의 back pressure를 걸어주었다. 우유는 초기 열교환기를 통해 30℃로 승온 시키고 PEF 처리를 통해 최종 75℃ 까지 오르도록 되도록 공정변수 기준을 설정하였으며, 유제품의 경우 최대로 걸어 줄 수 있는 전기장의 세기와 에너지가 적용되도록 설정하였다. 저지방 우유의 경우 약 12 kV/cm 전기장 세기에 140 kJ/L의 에너지가, 초코 우유의 경우 12.5 kV/cm 전기장 세기에 116 kJ/L의 에너지가, 아메리카노의 경우 16 kV/cm 전기장 세기에 100 kJ/L의 에너지가 적용되었다.

#### 4) HTST system

우유의 HTST 병용처리를 위해 판형 HTST의 살균기를 PEF 처리 후 75℃의 우유가 100 l/h의 속도로 통과할 때 15초 동안 온도가 유지되도록 설정하였다. HTST 처리 후 우유는 열교환기를 통해 즉시 냉각되어 충전 및 포장되었다.

#### 5) Capping system

PEF 혹은 PEF와 HTST를 병용처리 한 우유 및 유제품 들은 열교환기를 거쳐 냉각이 이루어진 후 충전 및 포장 공정을 거쳤다. 충전에 쓰이는 용기는 200 mL 들입 플라스틱 용기로 충전 전 초산으로 1차 살균을 진행하고 건조 후 UV를 통과하며 2차 살균을 진행하였다. 살균을 마친 용기는 병입라인으로 투입되어 200 mL 씩 충전 후 capping하여 출하되었다.

#### 6) CIP system

원료 tank를 포함한 모든 공정 라인은 한번에 CIP를 진행하였다. 시생산 전과 후 멸균수를 충분히 흘려준 후 100℃ 이상의 증기로 남아있는 미생물을 사멸시켰다.

#### 나. 시생산 제품의 기존 제품과의 경제성 검토

비케이바이오는 PEF 녹색기술 인증을 완료함으로써 기존 가열살균과의 에너지 및 탄소 발생량 비교를 완료하였다. PEF 살균공정의 kg 당 사용되는 에너지는 가열살균공정과 비교하여 289 kJ/kg에서 150 kJ/kg으로 절감이 가능하다. 이를 100 kg 생산 시 에너지(전기) 소요량으로 비교해보면 8.03 kWh에서 4.16 kWh으로 절감이 가능하며, 비용으로 환산 시 771.7원에 399.8원으로 51.8% 절감되는 셈이다. 하루 생산량으로 비교하게 되면, 총 생산량 40,000 kg을 기준으로 할 때, 총 가공비 308,068원에서 159,920원으로 148,760원이 절감되는 효과를 가지고 있다.

다. 생산된 상품으로 사업화 추진

(1) 제품 홍보물 기획 및 제작 : catalogue, leaflet, pop

당 과제를 통해 시제품화 된 제품 3종을 대상으로 제품 홍보를 위한 디자인 자료를 하기와 같이 제작을 하였으며, 제품과 더불어 PEF설비에 대한 이해도 증대를 위해 별도의 설비 전용 포스터와 상세 설명을 위한 카다로그와 리플렛 디자인을 제작하였다.



[PEF 설비 홍보 자료]

**비가열 살균장치 "PEF"**  
( Pulsed Electric Field Generators )

펄스 전기장을 이용한 비가열 살균 시스템  
선선주스, 유가공제품, 초유제품, 비가열 살균 및 추출제품

비가열 살균  
정선도 증가, 영양소 보존  
면역관용력 효용성  
저에너지 소비를 통한 비용절감

How does Bleach help the washing process, correct? In order to meet specific needs, Bleach is available for several production rates. The device can be powered by different types of generators.

Power (kW)	200	300	500
Flow (L/h)	200	250	300
Energy (kWh)	200	1,200	1,500
Capacity (L/h)	1,000	1,500	1,800

**CELL DISINTEGRATION AND MICROBIAL DECONTAMINATION**

(주) BKH이코  
http://www.bkh.co.kr 0715 8241 8242 8243 8244 8245 8246 8247 8248 8249 8250 8251 8252 8253 8254 8255 8256 8257 8258 8259 8260 8261 8262 8263 8264 8265 8266 8267 8268 8269 8270 8271 8272 8273 8274 8275 8276 8277 8278 8279 8280 8281 8282 8283 8284 8285 8286 8287 8288 8289 8290 8291 8292 8293 8294 8295 8296 8297 8298 8299 8300 8301 8302 8303 8304 8305 8306 8307 8308 8309 8310 8311 8312 8313 8314 8315 8316 8317 8318 8319 8320 8321 8322 8323 8324 8325 8326 8327 8328 8329 8330 8331 8332 8333 8334 8335 8336 8337 8338 8339 8340 8341 8342 8343 8344 8345 8346 8347 8348 8349 8350 8351 8352 8353 8354 8355 8356 8357 8358 8359 8360 8361 8362 8363 8364 8365 8366 8367 8368 8369 8370 8371 8372 8373 8374 8375 8376 8377 8378 8379 8380 8381 8382 8383 8384 8385 8386 8387 8388 8389 8390 8391 8392 8393 8394 8395 8396 8397 8398 8399 8400 8401 8402 8403 8404 8405 8406 8407 8408 8409 8410 8411 8412 8413 8414 8415 8416 8417 8418 8419 8420 8421 8422 8423 8424 8425 8426 8427 8428 8429 8430 8431 8432 8433 8434 8435 8436 8437 8438 8439 8440 8441 8442 8443 8444 8445 8446 8447 8448 8449 8450 8451 8452 8453 8454 8455 8456 8457 8458 8459 8460 8461 8462 8463 8464 8465 8466 8467 8468 8469 8470 8471 8472 8473 8474 8475 8476 8477 8478 8479 8480 8481 8482 8483 8484 8485 8486 8487 8488 8489 8490 8491 8492 8493 8494 8495 8496 8497 8498 8499 8500 8501 8502 8503 8504 8505 8506 8507 8508 8509 8510 8511 8512 8513 8514 8515 8516 8517 8518 8519 8520 8521 8522 8523 8524 8525 8526 8527 8528 8529 8530 8531 8532 8533 8534 8535 8536 8537 8538 8539 8540 8541 8542 8543 8544 8545 8546 8547 8548 8549 8550 8551 8552 8553 8554 8555 8556 8557 8558 8559 8560 8561 8562 8563 8564 8565 8566 8567 8568 8569 8570 8571 8572 8573 8574 8575 8576 8577 8578 8579 8580 8581 8582 8583 8584 8585 8586 8587 8588 8589 8590 8591 8592 8593 8594 8595 8596 8597 8598 8599 8600 8601 8602 8603 8604 8605 8606 8607 8608 8609 8610 8611 8612 8613 8614 8615 8616 8617 8618 8619 8620 8621 8622 8623 8624 8625 8626 8627 8628 8629 8630 8631 8632 8633 8634 8635 8636 8637 8638 8639 8640 8641 8642 8643 8644 8645 8646 8647 8648 8649 8650 8651 8652 8653 8654 8655 8656 8657 8658 8659 8660 8661 8662 8663 8664 8665 8666 8667 8668 8669 8670 8671 8672 8673 8674 8675 8676 8677 8678 8679 8680 8681 8682 8683 8684 8685 8686 8687 8688 8689 8690 8691 8692 8693 8694 8695 8696 8697 8698 8699 8700 8701 8702 8703 8704 8705 8706 8707 8708 8709 8710 8711 8712 8713 8714 8715 8716 8717 8718 8719 8720 8721 8722 8723 8724 8725 8726 8727 8728 8729 8730 8731 8732 8733 8734 8735 8736 8737 8738 8739 8740 8741 8742 8743 8744 8745 8746 8747 8748 8749 8750 8751 8752 8753 8754 8755 8756 8757 8758 8759 8760 8761 8762 8763 8764 8765 8766 8767 8768 8769 8770 8771 8772 8773 8774 8775 8776 8777 8778 8779 8780 8781 8782 8783 8784 8785 8786 8787 8788 8789 8790 8791 8792 8793 8794 8795 8796 8797 8798 8799 8800 8801 8802 8803 8804 8805 8806 8807 8808 8809 8810 8811 8812 8813 8814 8815 8816 8817 8818 8819 8820 8821 8822 8823 8824 8825 8826 8827 8828 8829 8830 8831 8832 8833 8834 8835 8836 8837 8838 8839 8840 8841 8842 8843 8844 8845 8846 8847 8848 8849 8850 8851 8852 8853 8854 8855 8856 8857 8858 8859 8860 8861 8862 8863 8864 8865 8866 8867 8868 8869 8870 8871 8872 8873 8874 8875 8876 8877 8878 8879 8880 8881 8882 8883 8884 8885 8886 8887 8888 8889 8890 8891 8892 8893 8894 8895 8896 8897 8898 8899 8900 8901 8902 8903 8904 8905 8906 8907 8908 8909 8910 8911 8912 8913 8914 8915 8916 8917 8918 8919 8920 8921 8922 8923 8924 8925 8926 8927 8928 8929 8930 8931 8932 8933 8934 8935 8936 8937 8938 8939 8940 8941 8942 8943 8944 8945 8946 8947 8948 8949 8950 8951 8952 8953 8954 8955 8956 8957 8958 8959 8960 8961 8962 8963 8964 8965 8966 8967 8968 8969 8970 8971 8972 8973 8974 8975 8976 8977 8978 8979 8980 8981 8982 8983 8984 8985 8986 8987 8988 8989 8990 8991 8992 8993 8994 8995 8996 8997 8998 8999 9000

[Catalogue]

## PEF Technology

With treatment times measured in seconds and with continuous operation and energy efficiency, PEF delivers more by doing less. The cell membranes of microorganisms, plant or animal tissue can be made permeable by using Elex PEF technology.

This process of electropermeabilization is suitable for use in broad range of food and bio-process using low levels of energy.

Diffusion processes, like water removal from plant or animal tissue or the absorption of marinades, spices and auxiliary substances are accelerated thereby saving valuable time in the production process.

**GENERATORS TECHNOLOGY**

[leaflet]

## PEF Technology



PEF works by puncturing the cell membrane, whatever the size of cell. The process is targeted, gentle and clean.

- Dramatic increases in yield, preservation of pigments, antioxidants and vitamins
- Healthy products last longer

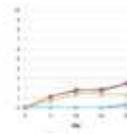
### Products that work with PEF

- Microalgae, Kelp & Seaweed
- Vegetable oil, Herbal extracts
- Flower- and Flavour extracts
- Food supplements
- Nutrient media
- Pharmaceuticals
- Process water, cooling water
- Seafood & Fish
- Dairy products
- Marinades, sauces & dressings

- 펄스에너지를 발생시켜 식품 중의 미생물 살균 및 상육 억제
- 펄스에너지로 식물 및 동물의 세포벽을 파괴시켜 추출 수율 증대 및 조직감 개선
- 농림부로부터 에너지 및 탄소발생 20% 절감 효과의 녹색 기술 인증 획득



- > 친환경 농식품 분야
- > 저에너지/저탄소 식품(7090502)
- > 에너지 및 탄소발생 20% 절감 효과



[PEF를 이용한 유제품 및 음료의 살균 기술]

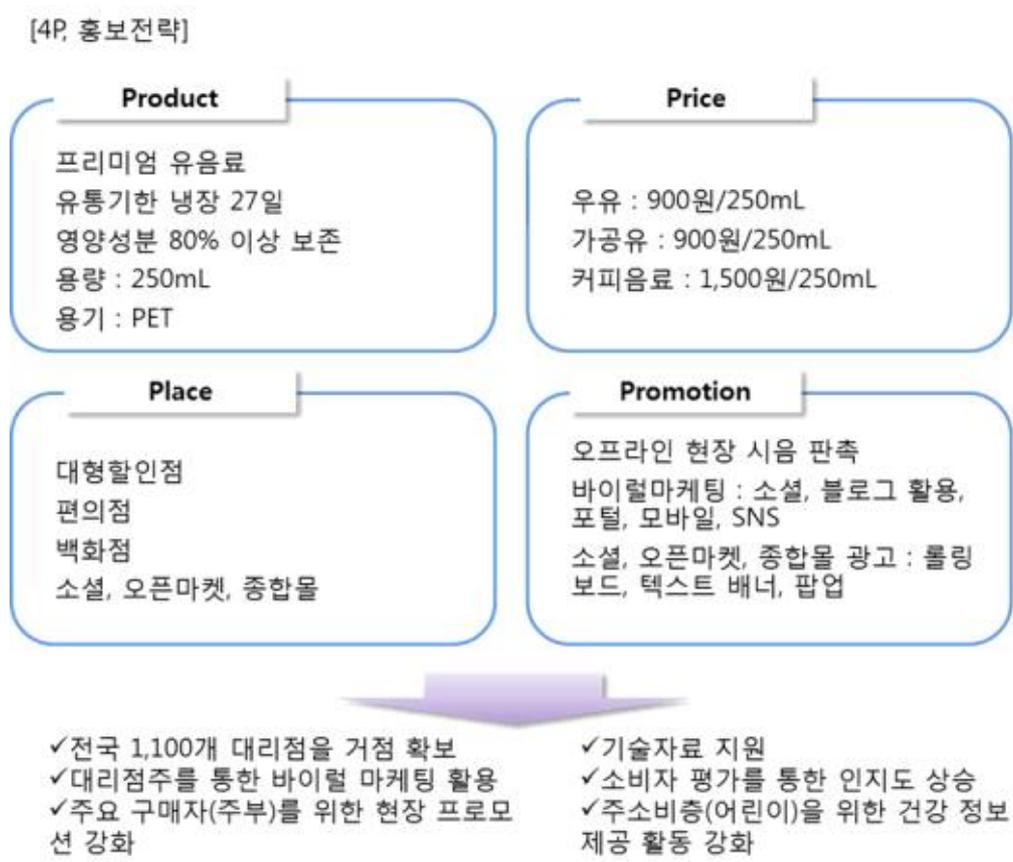
[PEF와 HTST공법 공정을 통한 선도유치]



www.bkbio.com 경기도 성남시 중원구 상대원동 3435-1 스타우드빌딩 405호 031-743-7363

(2) 타깃 소비자, 시장조사를 통한 marketing mix 분석 및 판매전략 수립

당 과제를 통해 시제품화 된 제품 3종의 4P와 판매 전략을 다음과 같이 수립하였으며, 참여 위탁업체에서의 주 생산품과 상이한 segmentation이 아닌 유사 제품군으로 구분하여 정의하였으며, 판매 전략 또한 제품 품질의 우수성을 강조하면서 기보유하고 있는 유통 특성에 적합한 매스티지 제품군으로의 접근이 바람직하다 판단하였다, 따라서 기존 제품들의 주요 소비자인 주부, 어린이와 유아, 20대 여성을 주요 소비자 및 구매자로 선정하여 판매 전략을 수립하였다.



상기의 판매 전략은 참여 위탁기업이 보유한 전국 1,100개의 국내 최대 규모 유통망을 통한 대형할인점, 편의점, 대형수퍼 등의 신유통 진출 및 로드샵, 각종 온라인몰에 이르기 까지 판매 및 유통 활성화에 전국적 파생효과를 가져올 것이라 기대하고 있다.

(3) 기존 보유 판매망을 통한 test marketing 및 전시회를 통한 홍보 추진

개발된 제품은 신선 냉장유통시장에서 유통기한 연장이 가능하여 프로모션 기회가 증대될 뿐 아니라 제품 고급화 포트폴리오 강화에 도움이 될 것이라 판단하고 있다. 특히 냉장 유통의 경우 참여 대기업이 국내 최대의 전국 1,100개 규모의 냉장 유통망을 보유하고 있어 대형할인점, 편의점, 대형수퍼 등의 신유통 뿐만 아니라 소셜, 오픈마켓, 종합몰 등의 온라인 마켓에서도 판촉활동에 짧은 유통기한이라는 제약이 완화되어 홍보의 파급 효과가 클 것으로 예상된다.

해외시장에서의 사업 지속시장을 위해 최근 국내 관광 시장이 급성장하고 있는 중국, 일본, 동남아 등의 신마켓 대륙에 집중 판촉 전략을 수립하고, 특히 최근 기하급수적으로 증가하는 중국 관광객에게 해외 전시회 참가를 통해 적극 홍보함으로써 현재 보유 중인 중국 유통라인의 확대를 꾀하며 개발 제품으로 해외시장 진출을 통한 시장 확대를 추진할 예정이다.

우선, 과제 종료 후 사업화를 구체화하기 위해 국내 시장에서의 출시 및 안착을 위해 다음의 표와 같은 홍보 전략을 제시할 수 있다. 또한 신제품 출시 후 제품포트폴리오를 재구성하고 참여기관들과의 협업을 중심으로 기술적 업그레이드와 판매망 확대를 통해 신유통 시장을 중심으로 고급화 신선 냉장우유 품목의 다각화를 추진할 계획이다.

Table 1-27. 홍보 전략 안

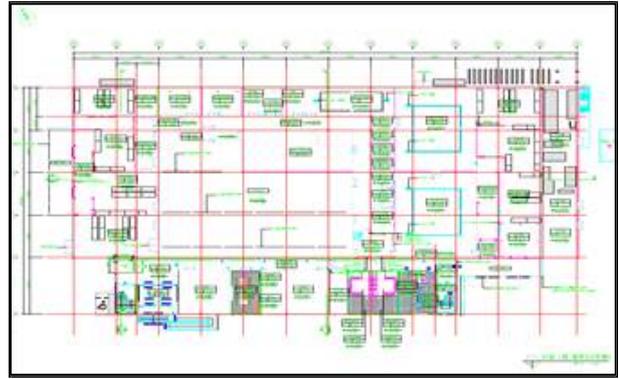
	구분	추진계획	비고
1차	시장조사	FGI 실시	
2차	전시회 참가	국내 식품전시회 참가	
	공급/유통 채널 개척	- 조합의 1,100개 전문 냉장유통 고객센터 활용 - 유통사업본부를 통한 대형마트, 백화점 개척 - 특판대리점을 활용한 CVS 공략 - 특수거래처 유통 탐색	
	On-Line 홍보활동	바이럴마케팅을 통한 고객 입소문 확장 - 온라인 포털 및 모바일, SNS 채널 활용 - 롤링보드, 텍스트 배너, 팝업 등 소셜커머스 판매를 통한 제품 인지도 확대	
3차	유통채널 확대판매	특수거래처 판로개척 및 판매	
	Off-Line 홍보활동	유통점별 시음행사 및 샘플링	

#### (4) 사업화 진행상황

사업화 기술이전 및 실시 2건에 대한 성과 달성을 위하여 내부적으로 비케이바이오 1건, 서울우유 1건의 기술실시를 진행하고자 하였으나, 서울우유는 신공장 건축과 희우유 산업의 정체 등의 내부적인 요인으로 인하여 사업화 진행 상 시간이 소요됨에 따라 비케이바이오 자체적으로 사업화를 결정하였다. 비케이바이오는 유제품에 대한 경험부족과 적용 용이성, 시장 논리를 고려하여, 펄스전기장 살균기술을 적용한 주스제품 2종의 개발을 결정하였다.

사업화의 기반으로 비케이바이오는 2015년 7월 제주도 용암해수단지 내 생산 공장 완공 예정이며, 관련 기술을 적용할 수 있는 생산 설비인 펄스 전기장 처리장치를 도입할 예정이다.

주스는 제주소재의 감귤 베이스, 당근 베이스로 포물러 개발 및 공정연구 진행중에 있으며, 관련 제품의 생산은 2015년 상반기 위탁생산(청아람, 과일렛 설비 갖춤)으로 제품 2종 출시를 목표로 하고 있으며, 하반기 공장 완공 후 관련 기술을 이용하여 자체 사업화를 진행할 목표를 가지고 있다.



제주공장 조감도(2015년 완공예정)

#### 라. 법령 초안 마련 및 법제화 추진

##### (1) 안전성 입증 및 자료화, CODEX 및 IDF의 규정 검토

PEF의 안전성에 대한 근거 자료 마련을 위해 현재 산업화 사례, PEF 기술에 대한 text 자료, PEF의 식품 가공 기술, 규정, PEF처리 시 식품 성분의 변화가 없다는 기술자료 등을 중심으로 조사를 하였다.

산업화 사례의 경우 네델란드의 Hoogesteger, Albert Hejin, Fruity King, Cosun가 있으며, 주요 생산품은 과일주스 살균가 감자 가공 생산을 하고 있다, 영국의 경우 Marks, Spencer, Orchard House사, 독일의 경우 True fruits , Wernsing GmbH, Uelzena사가 있으며, 캐나다 Lassonde사에서 감자가공을 하고 있으며, 한국의 경우 청아람에서 과일주스를 생산하고 있다.



Fig. 1-24. PEF 산업화 설비의 사용 현황, 2014년



Fig. 1-25. 네델란드 hoogesteger 사, 과일주스



Fig. 1-26. 네델란드, Fruity King 사, 과일주스, 스무디



Fig. 1-27. 한국, 청아람, 과일주스

Codex 규정의 경우 전기장 처리 살균기에 대한 정의 및 가이드가 제시되고 있으며, Codex 예시 중 'high electric field pulses(10-50 kV/cm, non-thermal effects)로써 하기와 같이 설명하고 있다.

Examples of typical microbiocidal control measures include the following:	
Centrifugation:	The removal of microbial cells of high density from milk using high centrifugal forces. Most efficient against microbial cells of high density, notably bacterial spores and somatic cells
Commercial sterilization:	The application of heat at high temperatures for a time sufficient to render milk or milk products commercially sterile, thus resulting in products that are safe and microbiological stable at room temperature.
Competitive microflora:	The reduction of the number of undesirable microorganisms by lowering the pH, consumption of nutrients, and production of bacterial antimicrobial substances (such as nisin, other bacteriocins and hydrogen peroxide). Usually, this microbiological control measure is applied by choice of starter cultures. The efficiency is determined by many factors, including the speed and level of pH-reduction and variations in the pH level.
“Cooking” of cheese curd:	The application of heat to cheese curd, mainly for technical purposes. The heat treatment has a lower intensity than thermization but stresses microorganisms to become more susceptible to other microbiological control measures.
Electromagnetic energy treatment:	Electromagnetic energy results from high voltage electrical fields, which alternate their frequency millions of times per second ( $< 10^8$ MHz). Examples are microwave energy (thermal effect), radio-frequency energy (non-thermal effects) or high electric field pulses (10 - 50 kV/cm, non-thermal effects). The treatment destroys cells by establishing pores in the cell walls due to the build up of electrical charges at the cell membrane.
High-pressure treatment:	Application of high hydrostatic pressures to irreversibly damage the membranes of vegetative cells.
Microfiltration:	Removal of microbial cells, clumps and somatic cells by recirculation over a microfilter. Normally, a pore size of ~0.6-1.4 $\mu\text{m}$ is sufficient to separate most bacteria. Synergy in combination with heat treatment.
Pasteurization:	The application of heat to milk and liquid milk products aimed at reducing the number of any pathogenic microorganisms to a level at which they do not constitute a significant health hazard.

Fig.1-28. Codex 규정 중 미생물 제어를 위한 처리법 제시

## (2) 법령 작성을 위한 기반 자료 문서화

국내에서 PEF설비에 대한 이용 적절성에 대한 자료로서 해외에서의 규정과 국내 식품공전에서  
서의 가이드를 조사해 보았다.

미국의 경우 US FDA에서 PEF설비에 대해 'FDA letter of no objection (1996)'로 보고되고  
있다, PEF에서 대한 FDA에서의 소개 가이드 자료는 다음의 url에서 확인할 수 있으며, 하기  
와 같이 제시하고 있다.

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm101662.htm>,  
: Preservation of Foods with Pulsed Electric Fields, Book by Barbosa-Canovas,  
Gongora-Nieto, Pothakamury, Swanson, Academic Press, 1997.

### **B. Letters of No Objection from the FDA**

Under current regulations, it would not be necessary to "file a process" because of the potential indirect food additive issue (due to electrode erosion). In this case a letter of no objection for each PEF process is recommended. An example of this occurred in July of 1995 when the FDA cleared the CoolPure cold-pasteurization process developed by PurePulse Technologies for the antimicrobial treatment of liquids and pumpable foods.

The following are suggested steps to obtain a "no objection" letter:

1. Contact the office of premarket approval at the FDA.
2. Schedule a preliminary meeting in Washington, D.C.
3. Establish a confidential file after describing the intent and testing protocol.
4. Record data, including specific information about the physical and microbiological characteristics of the product to be treated.
5. Record the PEF treatment operation conditions and physical and microbiological characteristics of the treated product, as well as the refrigerated product.
6. Contact the office of premarket approval at the FDA and schedule a follow-up meeting.
7. Create a letter describing how the process will be monitored and controlled, what conditions and material handling techniques will be used, the impact of processing on the product, and conclusions.
8. Present the results and conclusions, answer the questions from the FDA, and submit your letter to the confidential file.

EU에서도 'According to available scientific papers: no novel food approval required'라 보고되고 있으며, 다음과 같이 제시하고 있다.



## Pulsed electric field food cooking

### Identification

<b>Key words</b>	Pulsed electric field cooking, e-cooking, PEF food preparation
<b>Latest version</b>	2013/01/16
<b>Completed by</b>	DIL

### How does it work?

<b>Primary objective</b>	Quick food preparation using electric pulses and a slight increase in product temperature
<b>Working principle</b>	<p>PEF ( Pulsed Electric Fields) requires short bursts of electric power on the food placed between electrodes (2). The application of PEF causes a slight increase in product temperature dependent on the energy input which in comparison to thermal processing is quite low (60-80°C) and in general will not affect the functional and nutritional value (e.g. vitamin content) of the food in contrast to higher temperatures applied in traditional cooking (3). The process of cooking using PEF technology is based on another principle in comparison to thermal cooking. Thermal heating always includes a temperature gradient, which causes areas of high temperature at the surface resulting in an overtreatment. Using PEF for cooking, the applied energy causes a temperature increase, which is a volumetric heating. Areas of high temperatures on the surface and the related long temperature holding time can be avoided by using PEF for cooking.</p> <p>Due to the heat and the electric pulses, the vegetative microorganisms in the food are inactivated (1). Compared to a thermal pasteurization process, the same shelf life can be achieved, but using a lower temperature and a shorter time. The process can be used for liquids, also containing particles. Field strength of about 20 kV/cm depending on the product and 3.000 to 6.000 very short pulses (microseconds) results in a slight increase of temperature and a decrease of processing time. In comparison to a thermal process (e.g. UHT/HTST), the processing time can be decreased depending on the temperature/holding of the thermal process.</p>
<b>Images</b>	
<b>Additional effects</b>	Pasteurization, softening the texture, leakage of the cellular contents and more flavor retention in comparison to thermal methods
<b>Important process parameters</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• temperature</li> <li>• pulse shape (square wave pulses are most effective)</li> <li>• electric field strength</li> <li>• specific energy</li> <li>• treatment time</li> </ul>
<b>Important product parameters</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• conductivity</li> <li>• composition</li> <li>• pH value</li> <li>• water activity</li> </ul>

## What can it be used for?

<b>Products</b>	Meat, fish and vegetable products.
<b>Operations</b>	Processing, preparation, cooking, heating
<b>Solutions for short comings</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Microbiologically safe PEF processing</li><li>• Reduction in spoiling food</li><li>• Reduction in energy use</li></ul>

## What can it NOT be used for?

<b>Products</b>	In case of application in solid foods, it should be floating in a liquid medium. Additionally the food product size should be appropriate for the device capacity (at the moment 60 ml).
<b>Operations</b>	Limited inactivation of enzymes
<b>Other limitations</b>	Investment and maintenance cost.
<b>Risks or hazards</b>	Electrode erosion

## Implementation

<b>Maturity</b>	The commercially available unit has a working volume of 60 ml, but other sizes may be possible in the future.
<b>Modularity /Implementation</b>	Processing in a range of seconds to minutes
<b>Consumer aspects</b>	Accepted as environmental friendly, but consumer are slightly scared, when they hear the product has been treated by pulsed electric field (because of the electricity)[3,4]
<b>Legal aspects</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <u>US: FDA letter of no objection (1996)</u></li><li>• <u>EU: According to available scientific papers: no novel food approval required</u></li></ul>
<b>Environmental aspects</b>	Energy-efficient, waste-free technique

## Facilities that might be interesting for you

<b>Title</b>	<b>Institute/company</b>
Elea	Elea
PEF Pilot System FBR	Wageningen UR - FBR
PEF Pilot scale IRTA	IRTA
Pulsed electric field lab scale system - KEKI	NAIK EKI

## Further Information

<b>Institutes</b>	Wageningen UR - FBR
<b>Companies</b>	IXL Netherland

or mineral content occurred after a treatment of apple juice even for energy input levels of up to 70 kJ/kg [1]. No changes in the amino acid content was observed. These results are confirmed by additional studies on orange and carrot juices at high dose treatment [2-4, 7].

When applying PEF electrochemical reactions are of particular concern, which might cause oxidation/reduction reactions within the product and/or processing water and/or electrode erosion. All electrochemical reactions are dependent on the total charge transferred and the energy input applied. To evaluate the extent of product oxidation the anti-oxidative potential of the juice after a high dose treatment was detected. No significant decrease was observed, indicating a low level of oxidation reactions [1]. If oxidation or radical formation would occur a decrease of anti-oxidative potential or a reduction of ascorbic acid content would be observed.

With regard to electrode corrosion the metal release into fruit juices was measured for high treatment dose applications. The levels of iron (50 ng/l) as well as other metal particles release was far below the limits given in the tap water directive when using stainless steel electrodes for orange juice preservation [5, 6].

In summary no significant changes of the composition or structure, affecting nutritional value, metabolism or level of undesired substances have been shown for high dose treatments.

#### References

1. Schilling, S., et al., *Comparative study of apple juice preservation by exposure to pulsed electric fields and thermal processing with respect to juice quality-related parameters and enzyme inactivation*. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2008. **56**(12): p. 4545-54.
2. Rivas, A., et al., *Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice*. LWT - Food Science and Technology, 2006. **39**(10): p. 1163-1170.
3. Elez-Martínez, P. and O. Martín-Belloso, *Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup*. Food Chemistry, 2007. **102**(1): p. 201-209.
4. Cserhalmi, Z., et al., *Study of pulsed electric field treated citrus juices*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2006. **7**: p. 49-54.
5. Roodenburg, B., et al., *Metal release in a stainless steel pulsed electric field system. Part I. Effect of different pulse shapes; theory and experimental method*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2005. **6**(3): p. 327-336.
6. Roodenburg, B., et al., *Metal release in a stainless steel pulsed electric field system. Part II. The treatment of orange juice; related to legislation and treatment chamber lifetime*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2005. **6**(3): p. 337-345.
7. Vervoort, L., et al., *Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011(12): p. 466-477.

또한 유럽에서 PEF 처리에 의해 식품 고유의 성분에 변화가 없다는 기술자료로 다음과 같이 설명하고 있다.

### **Overview on PEF related effects on product quality and Novel Food Legislation**

The Novel Food Legislation applies to food products and ingredients placed on the market within the European community which not hitherto been used for human consumption to a significant degree and which fall under certain categories (EG 258/97). With regard to new production processes category (e) is of relevance and cited below

"(f) foods and food ingredients to which has been applied a production process not currently used, where that process gives rise to significant changes in the composition or structure of the foods or food ingredients which affect their nutritional value, metabolism or level of undesirable substances."

Therefore, for fruits and vegetables processed by Pulsed Electric Fields the extent of changes in the composition or structure, affecting nutritional value, metabolism or level of undesired substances has to be determined. Only if significant changes are observed, an approval or notification is required.

Based scientific literature available the extent of undesired changes can be estimated. For PEF treatment the pulse characteristics (electric field strength, pulse shape, pulse width, pulse number) and treatment temperature have been reported as important processing parameters. Pulse shape, width and number applied are typically summed up in the specific energy input as a treatment dose parameter. The treatment dose required is dependent on the type of application. Whereas for tissue softening of potato tubers or vegetables an energy input in a range of 0.1 – 5 kJ/kg is applied, the use as a preservation technique for fruit juices requires an energy input of up to 100 kJ/kg. Most of the scientific reports on PEF impact on product quality parameters have been focusing on high treatment dose preservation applications. With regard to treatment of fruit mashes and juices no significant change of nutrient value, pH, total soluble solids, organic acid, sugar

## References

1. U. Zimmermann, Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion, 1986; Reviews of physiology biochemistry and pharmacology, 105, 175-256.
2. S. Toepfl, V. Heinz and D. Knorr, Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment, 2003; Innovative Food Science and Emerging Technologies 4; 167-175.
3. Olsen, N.V., Klaus Grunert, Anne-Mette Sonne, Jul. 2010. Consumer acceptance of high-pressure processing and pulsed-electric field: a review. Trends in Food Science & Technology, 21 (2010), 464-472.
4. Nielsen, H.B., Sonne, A.-M., Grunert, K.G., Banati, D., Pollák-Tóth, A., Lakner, Z., Olsen, N.V., Žontar, T.P., Peterman, M., Consumer perception of the use of high-pressure processing and pulsed electric field technologies in food production, Appetite 52 (2009) 115-126.

Source:

<http://www.foodtech-portal.eu/index.php?title=Special:PdfPrint&page=Pulsed+electric+field+food+cooking>

한국의 경우 식품공전에서 식품 가공설비 중 식품에 직접 닿아 사용될 수 있는 부분은 식품위생법 제9조에 따른 현행 「기구 및 용기·포장의 기준 및 규격」 중 해당 재질의 기준 및 규격에 적합하여야 하고, 같은 기준 및 규격 중 II. 1. 바. “전류를 직접 식품에 통하게 하는 장치를 가진 기구의 전극은 철, 알루미늄, 백금, 티타늄 및 스테인리스 이외의 금속을 사용하여서는 아니된다.” 등의 규정이 있다. 즉, 전극을 활용한 식품의 가공은 안전하다는 것으로 가이드 하고 있으며, PEF설비의 경우 전극이 식품용기재질로 적합한 티타늄이나 스테인레스로 구성되어 있으므로 식품가공용으로 적합하다고 해석할 수 있다.

또한 식품위생법 제8조 “~ 식품 또는 식품첨가물에 직접 닿으면 해로운 영향을 끼쳐 인체의 건강을 해칠 우려가 있는 기구 및 용기·포장을 판매하거나 판매할 목적으로 제조·수입·저장·운반·진열하거나 영업에 사용하여서는 아니 된다.”에 준하여 미국 FDA나 EU가이드에서와 같이 PEF 가공설비가 식품 등에 해로운 영향을 끼쳐 인체의 건강을 해치는 보고가 되어 있지 않으므로 식품가공용으로 적합하다고 해석할 수 있다.

식품위생법 제7조에 따른 현행 「식품의 기준 및 규격」에 “식품제조·가공에 사용되는 기계·기구류와 부대시설물은 항상 위생적으로 유지·관리하여야 하며, 식품 제조·가공 및 조리 중에는 이물의 혼입이나 병원성 미생물 등의 유해물질이 오염되지 않도록 하여야 한다.”에 준하여 PEF설비는 살균의 기능을 기본 기능으로 수행하는 제품이며, 구조상 식품이외에 외부 물질의 혼입이 불가능한 구조로 되어 있어 식품 처리 시 위생적으로 운전 및 관리가 가능하여 식품가공용으로 적합하다고 해석할 수 있다.

## 라. 결론

본 연구를 통해 펄스 전기장 처리의 산업화 적용을 위한 우유 및 유제품의 품질 평가 지표와 공정을 연구하고 제품화까지의 과정을 개발하였다. 우유에 대한 관련 기술 적용은 없었으나 미국이나 유럽의 유사 제품(주스, 스무디 등)의 사업화 사례와 법적으로 문제가 없음을 확인하였고, 시제품 생산까지의 부대시설 설계와 공정을 완성하였다.

초기연구에서는 우유의 PEF 적용 가능성을 시험하는 수준의 연구를 진행하였고, 그에 따른 PEF의 공정변수는 100, 130 kJ/L 수준 처리로 LTLT 및 HTST와 병용하여 진행하였다. 각 협동기관 및 위탁기관의 도움으로 얻은 미생물 및 일반성분의 변화에서는 가열살균(LTLT, HTST)에 의한 원유와의 차이는 발견할 수 있었지만 PEF에 의한 영향은 거의 없었음을 확인하였다.

이후 scale up을 위한 최적의 공정을 설정하기 위한 연구를 진행하였다. 우유와 같은 수준의 conductivity를 갖는 buffer solution을 이용하여 10 kV/cm 전기장 세기로 0, 100, 150, 200, 250 kJ/L 에너지를 주어 가열살균(LTLT, HTST)와 병용하는 공정 선정하였고, 이 공정변수를 시판우유에 미생물 접종하여 처리하는 방식으로 검증하였다. 그 결과 200 kJ 이상 수준에서 효과가 있음을 확인하였고, 원유에 같은 조건으로 연구를 진행한 결과 미생물 사멸 측면, 기능성 단백질 보존 측면에서 가열살균과 PEF 200 kJ 이상의 수준 처리가 가장 이상적임을 확인하였다. 또한 scale up을 위한 생산설비를 설계하였다.

최종 시제품 생산 연구를 통해 생산 scale에서의 최적 공정변수를 적용한 결과 PEF 16 kV/cm 전기장 세기에 250 kJ/L의 에너지를 줄 수 있음을 확인하였고, 이에 따른 미생물의 저장성과 일반성분 및 기능성 단백질의 보존을 확인한 결과 최종제품에 HTST 수준의 영양보존과 UHT 수준의 미생물 안전성을 확보한 결과를 얻었다. 또한 유제품으로 저지방 우유와 초코 우유, 아메리카노의 시생산 공정변수를 확보하여 다양한 유제품의 생산이 가능함을 확인하였다.

## 제 2 절 협동과제 : 펄스 전기장 기술을 활용한 미생물학적 안전성 확보 기술 구축

### 1. Batch PEF chamber를 이용한 비병원성 부패 미생물의 inactivation kinetics 확립

#### 가. 논문 조사를 통한 식품 유형에 따른 미생물 PEF 살균 조건 확인

Science direct를 이용한 PEF/Microorganism 관련 논문 검색 결과 1000개 이상의 연구결과를 확인하였으며 국내 연구 수준은 상대적으로 미미함을 확인하였다.

검색된 연구논문 중 연구과제와 관련성이 높은 연구논문을 아래 Table 2-1에 정리하였다.

펄스전기장 처리의 경우, 최대전압(Peak voltage, kV/cm), 전류(Current, A), 펄스폭(Pulse width,  $\mu$ s), 펄스빈도(Frequency, Hz) 등의 공정변수가 존재하며 연속식 처리방식일 경우, 유량(Flow rate, L/min)을 고려하여 계산하면 시료에 가해진 전기적 에너지(Specific energy, kJ/L)를 계산할 수 있다.

논문 조사에 따르면 처리조건과 사용된 미생물에 따라 1-6 decimal reduction 수준의 미생물 저감화를 기대할 수 있으며, 가열살균에서 관찰되는 3-4 decimal reduction 수준의 미생물 저감화를 일반적으로 기대할 수 있다.

기존 연구결과의 경우, 모든 공정변수를 공개하지 않고 있으므로 각각의 처리조건에 따른 전기적 에너지의 절대량을 비교할 수 없는 경우가 대부분임. 또한 펄스전기장 장치의 구조(Electric chamber design)가 미생물 사멸 효과에 큰 영향을 끼치는 것으로 판단되나 실험실에 따라 자체 제작한 챔버를 사용하므로 실험결과 사이의 비교를 어렵게 한다.

따라서 펄스전기장 처리의 산업적 적용을 위해서는 산업화 적용에 사용될 생산용 장비와 유사한 조건을 갖는 파일럿 규모의 장치를 이용하여 초기처리온도(Inlet temperature,  $^{\circ}$ C), 최대전압 등 전기적 변수를 통합할 수 있는 전기적 에너지(Specific energy), 시료의 전기적 물성(Electrical conductivity, S/m) 등을 명확히 정의한 상태에서 시스템적인 실험을 수행하는 것이 필수적으로 판단되었다.

Table 2-1. Effects of PEF treatments on various microorganisms (Data compiled from reference).

Microorganisms	Medium	Processing Parameters	Decimal Reduction	Reference
<i>Escherichia coli</i>	Milk	28.6 kV/cm; 42.8°C 23 pulses; 100 $\mu$ s	3D	Dunn and Pearlman (1987)
<i>Salmonella dublin</i>	Milk	36.7 kV/cm; 63°C 40 pulses; 100 $\mu$ s	3D	Dunn and Pearlman (1987)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Milk	22 kV/cm; 45–50°C 20 pulses; 20 $\mu$ s	4.6D	Crahl (1992)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milk	3.0 V/ $\mu$ m; 50°C 1.5 $\mu$ s; 1700 Hz flow rate 7 ml/s (600 $\mu$ s treatment time)	4D	Reina <i>et al.</i> (1998)
<i>Staph. aureus</i>	Milk	25–35 kV/cm; 25°C 8 $\mu$ s; 100 Hz	4.5D	Sobrino-Lopez <i>et al.</i> (2006)
<i>Escherichia coli</i>	Skim milk	45 kV/cm; 35°C 1.8–6 $\mu$ s; 64 pulses	2D	Martin <i>et al.</i> , (In press)
<i>Listeria innocua</i>	Skim milk	5.0 V/ $\mu$ m; 36°C 2 $\mu$ s; 32 pulses 3.5 Hz	2.5D	Calderon-Mirand (1999a)
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Skim milk	35–55 kV/cm 0.25–3 $\mu$ s	1.4D	Floury <i>et al.</i> , (2006)
<i>P. fluorescens</i>	Skim milk	24–31kV/cm 2 $\mu$ s; 20 pulses	>5D	Craven <i>et al.</i> , (2008)
<i>Pseudomonads</i>	Skim milk (Raw)	28–37 kV/cm 2 $\mu$ s; 20 pulses	2.1–5.9D	Shamsi <i>et al.</i> , (2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Yoghurt	23–38 kV/cm; 63°C 100 $\mu$ s; 20 pulses	2D	Dunn and Pearlman (1987)

Microorganisms	Medium	Processing Parameters	Decimal Reduction	Reference
<i>Escherichia coli</i> <i>O157:H7</i>	Apple juice	2.9 V/ $\mu$ m 4 $\mu$ s; 1000 Hz flow rate 1.4 mL/s	5D	Evrendilek <i>et al.</i> , (1999)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Apple juice	5.0 V/ $\mu$ m; 29.6°C 2.5 $\mu$ s; 2 pulses,	6.3D	Qin <i>et al.</i> , (1995)
<i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i>	Apple juice	35 kV/cm; <40°C 4 $\mu$ s; 80 - 110 mL/min	4.3D	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> (2008b)
<i>E. coli</i> <i>O157:H7</i>	Apple juice	20-30 kV/cm; <55°C 5 - 125 $\mu$ s; 3 L/h	3.6D	Saldana <i>et al.</i> (2011)
<i>E. coli</i> <i>O157:H7</i>	Apple juice + LAE	20-30 kV/cm; <55°C 5 - 125 $\mu$ s; 3 L/h	6.7D	Saldana <i>et al.</i> (2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Orange juice	6.7 kV/cm; 45-50°C; 20 $\mu$ s; 5 pulses	5D	Crahl (1992)
<i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i>	Orange juice	35 kV/cm; <40 °C 4 $\mu$ s; 80 - 110 mL/min	5.2D	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> (2008b)
<i>E. coli</i> <i>ATCC 8739</i>	Orange juice-milk beverage	15-40 kV/cm, 2.5 $\mu$ s; 0-700 pulses	3.8D	Rivas <i>et al.</i> , (2006)
<i>Total plate</i> <i>count</i>	Cranberry juice	4.0 V/mm; 2 $\mu$ s; 1000 Hz; 24 mL/min (150 $\mu$ s treatment time)	3.8D	Jin and Zhang (1999)
<i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i> <i>NCTC 9001</i>	Watermelon juice	35 kV/cm 4 $\mu$ s; 2000 pulses	4.3D	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> (2007)
<i>S. cerevisiae</i>	Grape juice	35 kV/cm; 5 $\mu$ s 303 Hz; 3.3 mL/s	3.9D	Marselles-Fontanet <i>et al.</i> (2009)
<i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i>	Strawberry juice	35 kV/cm; <40°C 4 $\mu$ s; 80-110 mL/min	4.4D	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> (2008b)
<i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i>	Pear juice	35 kV/cm; <40°C 4 $\mu$ s; 80-110 mL/min	4.87D	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> (2008b)

Microorganisms	Medium	Processing Parameters	Decimal Reduction	Reference
<i>E. coli</i>	Liquid egg	25.8 kV/cm; 37°C 4 $\mu$ s; 100 pulses	6D	Martin <i>et al.</i> , (In press)
<i>E. coli</i> <i>Bacillus sub</i>	Pea soup	25-33 kV/cm; 53-55°C; 10-30 pulses; 2 $\mu$ s	4.4D	Vega-Mercado (1997)
<i>Bacillus sub</i> <i>NCTC 10073</i>	Citrate phosphate buffer	25 kV/cm 2 $\mu$ s; 50-300 pulses	2.5-3.5D	Garcia <i>et al.</i> , (2005)
<i>Lactobacillus.</i> <i>plantarum</i> <i>ATCC</i> <i>14917</i>	Citrate phosphate buffer	25 kV/cm, 50-300 pulses	1.2-1.5D	Garcia <i>et al.</i> , (2005)
<i>Staphylococcus</i> <i>ureus</i>	Citrate phosphate buffer	15-28 kV/cm 2 $\mu$ s; 50-400 pulses	1.5-4D	Rodriguez-Calleja <i>et al.</i> , (2006)
<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> <i>ATCC 9610</i>	Citrate phosphate buffer	12-25 kV/cm 2 $\mu$ s, 20-400 pulses	4-6D	Garcia <i>et al.</i> , (2005)
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> <i>ATCC 13311</i>	Citrate phosphate buffer	12-25 kV/cm 2 $\mu$ s, 20-400 pulses	1-3D	Garcia <i>et al.</i> , (2005)
<i>Salmonella</i> <i>Senftenberg</i> <i>ATCC 43485</i>	Citrate phosphate buffer	12-25 kV/cm 2 $\mu$ s, 20-400 pulses	1-4.5D	Garcia <i>et al.</i> , (2005)
<i>L. plantarum</i>	0.6% peptone water	20-28 kV/cm; 10 - 35°C 2.5 $\mu$ s; 30-240 pulses	4.9D	Rodrigo <i>et al.</i> (2003b)
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Buffered peptone water	31 kV/cm 2.5 $\mu$ s; 50-190 pulses	1D	Selma <i>et al.</i> , (2006)
<i>Salmonella</i> <i>Senftenberg</i>	McIlvaine buffer	12-28 kV/cm 1-15 $\mu$ s; 1-5 Hz 0 - 600 pulses	6.5D	Raso <i>et al.</i> (2000)

나. 미생물 살균을 위한 Batch 방식에서의 PEF 공정변수 확립

미생물 살균을 위한 펄스전기장의 형성은 파일럿 스케일의 처리가 가능한 5 kW급 펄스 제네레이터(Pulse generator, DIL, Germany)를 사용하였다.

실험에 사용된 펄스 제네레이터는 축전부분, 고전압 스위칭 시스템, 펄스 트랜스포머 및 데이터 로거 등으로 구성되며 3상 400 V 의 교류전압을 공급 받아 25 kV 의 출력전압(직류)을 형성 할 수 있다(Fig. 2-1, 왼쪽).

펄스 제네레이터를 통해 조절할 수 있는 PEF 공정변수는 Pulse power (1-100%), Pulse width (4-30  $\mu$ s), Pulse frequency (1-1000 Hz), Treatment time (s) 이며 Batch 형태로 적용할 경우, Pulse frequency와 Treatment time을 조절하여 적용 펄스 수 (Total pulse number)를 결정할 수 있다.

펄스 제네레이터를 통해 생성된 고전압 펄스는 Batch형 Treatment chamber에 전류를 전달할 수 있는 모듈을 통해 Treatment chamber에 전달된다(Fig. 2-1, 오른쪽).

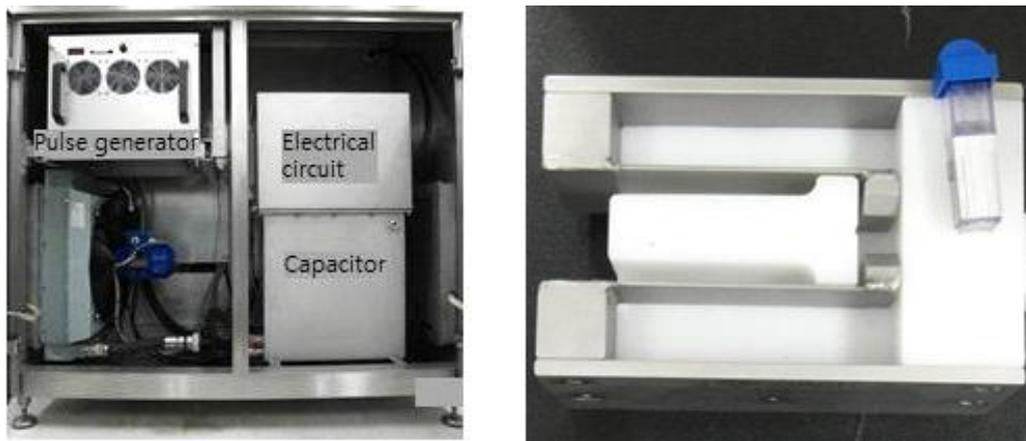


Fig. 2-1. Inside view of 5 kW pulse generator (Left) and batch chamber module with commercial 400  $\mu$ L scale batch chamber (Right).

펄스전기장의 Batch형 적용을 위한 공정변수 확립을 위한 Ringer's Solution을 이용하여 일정한 전기적 특성을 갖는 standard solution을 제조하였다(Table 2-2).

Table 2-2. Concentration of Ringer's solution and corresponding electrical conductivity

Conductivity	% Ringer's Solution
0.069 S/m	6.25%
0.139 S/m	12.5%
0.263 S/m	25%
0.513 S/m	50%
1.070 S/m	100%

다양한 전기적 특성을 갖는 표준 용액에서 펄스 제네레이터의 출력(% Power)과 펄스폭(Pulse width)를 조절하여 treatment chamber 안에서 형성되는 펄스 전기장의 세기(Peak voltage, kV/cm)를 측정하여 2D contour plot 형태로 작성하였다(Fig. 2-2).

펄스전기장의 Batch형 적용을 위해서는 5 kW 급 펄스 제네레이터 출력의 15% 이내의 운용이 가능하였으며 출력 조절을 통해 5-25 kV/cm 의 peak voltage 형성이 가능함을 확인하였다.

펄스전기장의 폭(Pulse width)의 경우, 5-30  $\mu$ s 의 영역에서 조절이 가능하나 20 kV/cm 이상의 peak voltage 를 얻기 위해서는 20  $\mu$ s 이상의 pulse width 가 필요함을 확인하였다.

Fig. 2-2에서 확인할 수 있는 펄스 전기장의 전기적 특성은 대상 용액의 전기적 전도도가 0.019 S/m일 경우 해당하는 것으로 용액의 전도도가 달라질 경우 형성되는 전기장의 전기적 특성은 변화하였다.

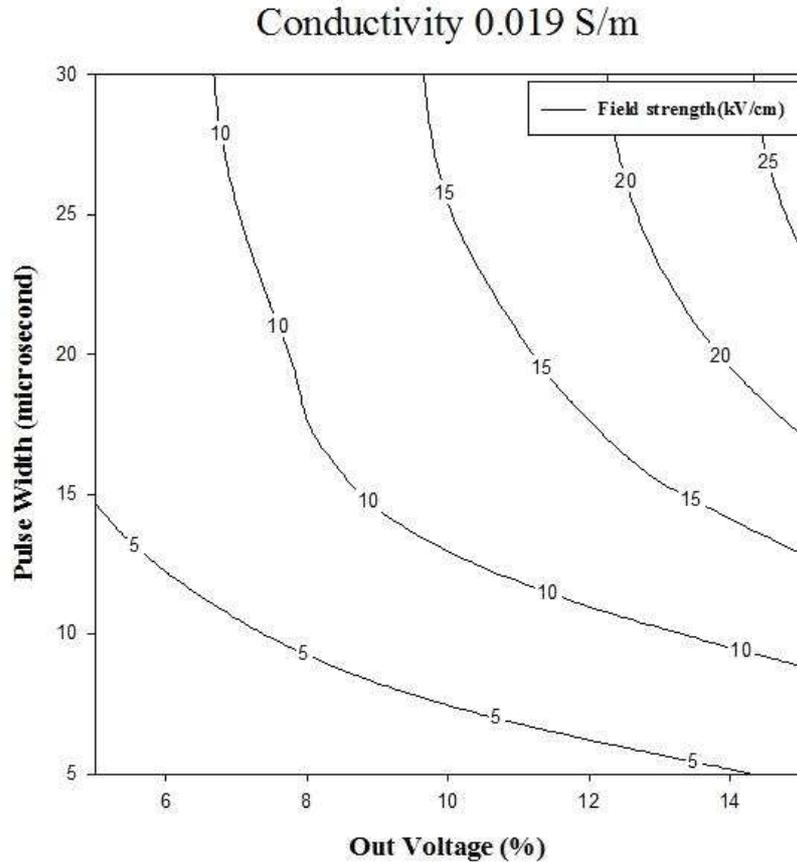


Fig. 2-2. Contour plot of peak voltages depending on the pulse width and output voltage

일반적으로 펄스처리를 하고자 하는 액상식품의 conductivity가 높으면 chamber에 걸리는 전기적 에너지가 전압화 되지 못하고 전기전도도가 높은 액상식품의 전하를 따라서 같이 흘러가기 때문에 전압에 의해 처리되는 효과가 감소하였다.

이에 따라 고전압펄스처리장치는 conductivity에 의해 영향을 많이 받으며, conductivity가 지나치게 높은 샘플을 펄스처리를 하면 전압이 걸리지 않으며 energy만 소비하게 됨. 따라서 우유를 포함하는 액상 식품의 전기전도도는 펄스전기장 처리에 따른 효과를 결정할 수 있는 주요한 요인이다.

따라서 우유를 포함하는 다양한 액상식품을 구입하여 상온에서의 전기 전도도를 측정하였다 (Table 2-3).

시판 액상 제품의 전기 전도도 측정 결과 알로에 주스가 가장 낮은 전기전도도를 갖고 있어서 펄스 전기장 형성에 가장 적합하였으며, 야채 녹즙의 전기전도도가 가장 높아 펄스 전기장 형성에 가장 부적합 하였다. 우유의 경우 전지우유나 탈지우유 모두 0.5 S/m 수준의 전기 전도도를 갖고 있어 펄스 전기장 처리에 대해 중간 정도의 가공적성을 갖고 있는 것으로 판단되었다.

Table 2-3. Electrical conductivities of various liquid foods in local market

Samples	Conductivity[S/m]	Samples	Conductivity[S/m]
Aloe juice	0.091±0.001	Whole milk	0.535±0.013
Blueberry juice	0.125±0.001	Low-fat milk	0.513±0.021
Strawbery juice	0.136±0.001	Non-fat milk	0.504±0.001
Grape juice	0.229±0.001	Strawberry milk	0.369±0.003
Apple juice	0.248±0.004	Coffee milk	0.384±0.001
Kiwi juice	0.327±0.001	Dark beer	0.178±0.001
Tomato juice	0.368±0.025	Draft beer	0.184±0.001
Orange juice(squeezed)	0.390±0.002	Rice wine	0.091±0.002
Orange juice	0.424±0.002	Pasteurized R.W	0.096±0.002
Carrot juice	0.585±0.006	Mango yogurt	0.448±0.003
Mixed vegetable juice	0.521±0.003	Green vegetable juice	1.662±0.005

향후 산업화 적용을 위해서는 연속식 형태의 treatment chamber 적용이 필수적이며 연속식 형태의 경우, 1 cm 내외의 지름을 갖는 파이프 형태의 co-linear chamber design 적용이 예상된다.

따라서 연속식 chamber 와 형태적으로 유사한 1 mL급 PEF chamber를 제작하여 적용함 (Fig. 2-3). 제작된 1 mL급 PEF chamber는 Stainless 재질의 Electrode (Gap size = 8.0 mm) 를 갖추고 있으며 electrode 이외의 표면은 투명 아크릴로 제작하였다.

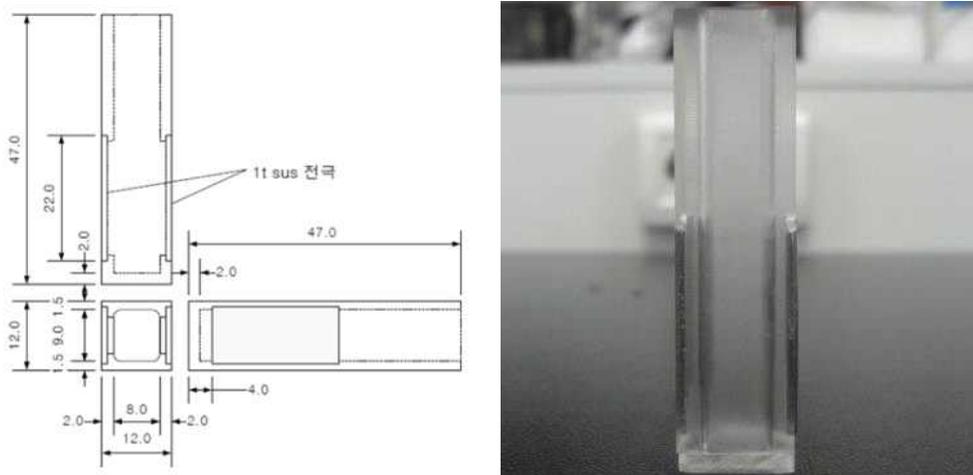


Fig. 2-3 Development of batch PEF chamber (1mL scale) with stainless electrode

다. 우유 부패와 관련된 미생물의 펄스전기장 적용 및 효과 검증

파일럿 스케일의 펄스전기장처리장치를 이용하여, batch형 펄스처리장치의 공정변수 확립과 *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*을 접종하여 펄스전기장 처리 후 살균 효과를 확인하였다.

실험에 사용된 standard solution의 conductivity는 0.019 S/m이며 frequency, pulsed width는 고정된 후 out voltage의 변화에 따른 field strength와 pulse Number의 횟수에 따른 *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*의 살균효과를 확인하였다 (Fig. 2-4, 5, 6, 7).

실험에 사용된 모든 미생물의 사멸 효과는 가해진 PEF energy 가 증가함에 따라 증가함. 하지만 미생물 종류에 따른 PEF 적용 효과는 차이를 보임. 예를 들어, *Saccharomyces* 와 *Lactobacillus*의 경우, PEF 처리에 의해 효과적으로 사멸되어 15 kV/cm, 혹은 10 kV/cm 의 비교적 낮은 peak voltage에서도 높은 수준의 효과를 기대할 수 있었지만 *E. coli*의 경우, 20 kV/cm 이상의 peak voltage에서 일정수준 이상의 펄스처리를 받아야 사멸을 기대할 수 있었다.

따라서 다음 연구에서 수행될 PEF의 연속식 적용에서 *E. coli*를 효과적으로 사멸하기 위해서는 최소 20 kV/cm의 조건에서 150 pulse 이상의 처리를 받을 수 있도록 PEF 처리 조건과 Flow rate를 조절하는 것이 필요하다.

#### (1) *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* (KCCM 32016) 는 한국 미생물보존센터에서부터 공급 받아 single colony를 Potato Dextrose Broth 배지에 접종하여 진탕 배양기에서 30°C, 150 rpm 으로 2일간 배양한 후, 초기 균수 10<sup>7</sup> CFU/mL수준에서 고전압펄스처리 장치의 처리 조건 (Table 2-4) 에서 처리 후 Standard solution에서 희석 한 후 Potato Dextrose Agar 배지에 접종 후 32°C 에서 72 hr 배양 후 미생물 살균 효과 확인 하였다 (Fig. 2-4).

*S. cerevisiae*의 경우, 30  $\mu$ s, 50 Hz 에서 최소 10.0 kV/cm 일 때 4.2 log cycle 감소하며, 15.0 kV/cm에서는 150 pulse, 20.0 kV/cm에서는 100 pulses 에서 균이 검출되지 않았다 (Detection limit<1.0 log CFU/mL).

Table 2-4. PEF processing conditions for the inactivation test of *S. cerevisiae*

Field strength(kV/cm)	Out voltage(%)	Pulse width( $\mu$ s)	Frequency(Hz)	Pulse number
10	10	30	50	50
				100
				150
				200
15	14	30	50	50
				100
				150
				200
20	19	30	50	50
				100
				150
				200

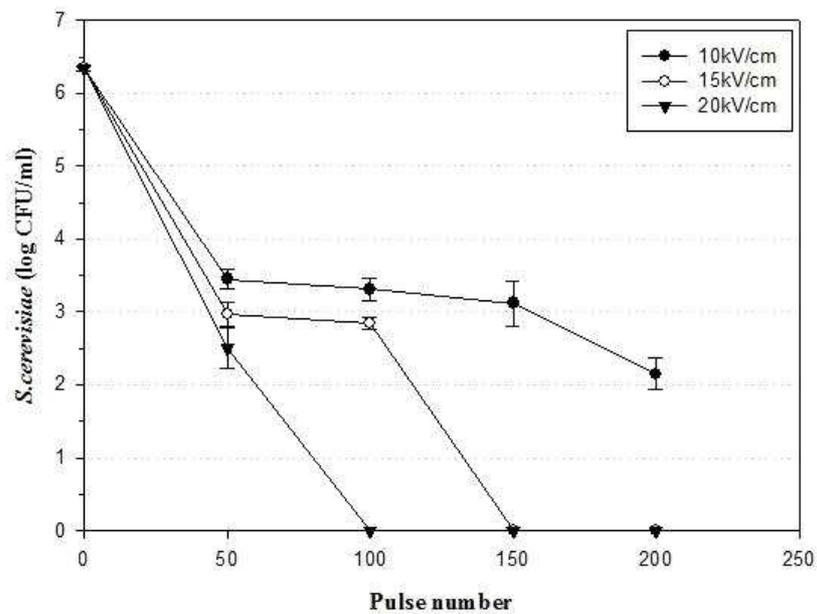


Fig. 2-4. Inactivation of *S. cerevisiae* by PEF treatments

(2) *Escherichia coli*

*Escherichia coli*(KCCM 12181) 는 한국 미생물보존센터에서부터 공급 받아 single colony를 nutrient broth 배지에 접종하여 진탕 배양기에서 30°C, 150 rpm 으로 1일간 배양 후 초기 균 수  $10^7$  CFU/mL수준에서 고전압 펄스처리 장치의 처리 조건(Table 2-5)에서 처리 후 standard solution에서 희석한 후 nutrient agar배지에 접종 후 36°C에서 1일 배양 후 미생물 살균 효과

를 확인하였다.

*E. coli* 의 경우 30  $\mu$ s 에서 최소 10.0 kV/cm 일 때 0.3 log cycle 감소하며, 15.0 kV/cm에서는 1.4 log cycle, 20.0 kV/cm에서는 3.6 log cycle 살균 효과를 나타냈다 (Detection limit < 1.0 log CFU/mL).

Table 5. PEF processing conditions for the inactivation test of *E. coli*.

Field strength(kV/cm)	Out voltage(%)	Pulse width( $\mu$ s)	Frequency(Hz)	Pulse number
10	10	30	50	50
				100
				150
				200
15	12	30	50	50
				100
				150
				200
20	15	30	50	50
				100
				150
				200

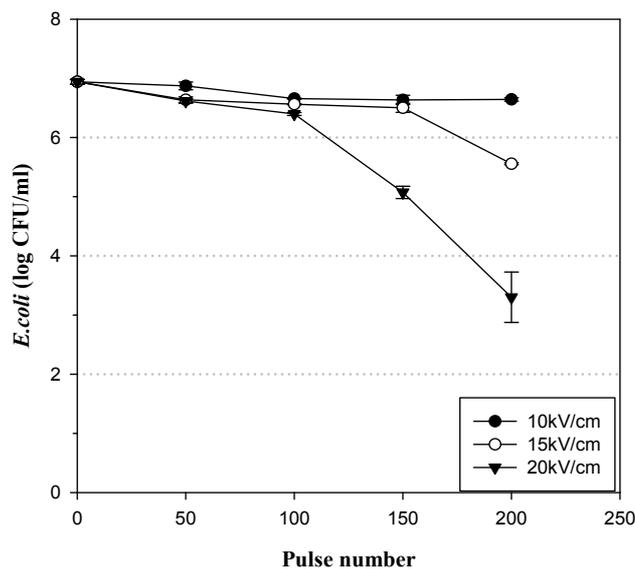


Fig. 2-5. Inactivation of *E. coli* by PEF treatments

(3) *Lactobacillus brevis*

*Lactobacillus brevis*(KCCM 11904)는 한국 미생물보존센터에서부터 공급 받아 single colony를 Man Rogosa Sharpe broth 배지에 접종하여 진탕 배양기에서 30°C, 150 rpm 으로 1일간 배양 후 초기 균수 10<sup>7</sup> CFU/mL 수준에서 고전압 펄스처리 장치의 처리 조건(Table 2-6)에서 처리 후 standard ringer solution에서 희석한 후 Man Rogosa Sharpe Agar 배지에 접종 후 36°C에서 1일 배양 후 미생물 살균 효과 확인하였다.

*Lactobacillus brevis*의 경우, 30 μs 에서 최소 10.0 kV/cm 일 때 3.2 log cycle 감소하며, 20.0 kV/cm 에서 100 pulses 에서 균이 검출되지 않았다(Detection limit<1.0 log CFU/mL).

Table 2-6. PEF processing conditions for the inactivation test of *Lactobacillus brevis*

Field strength(kV/cm)	Out voltage(%)	Pulse width(μs)	Frequency(Hz)	Pulse number
10	10	30	50	50
				100
				150
				200
15	14	30	50	50
				100
				150
				200
20	19	30	50	50
				100
				150
				200

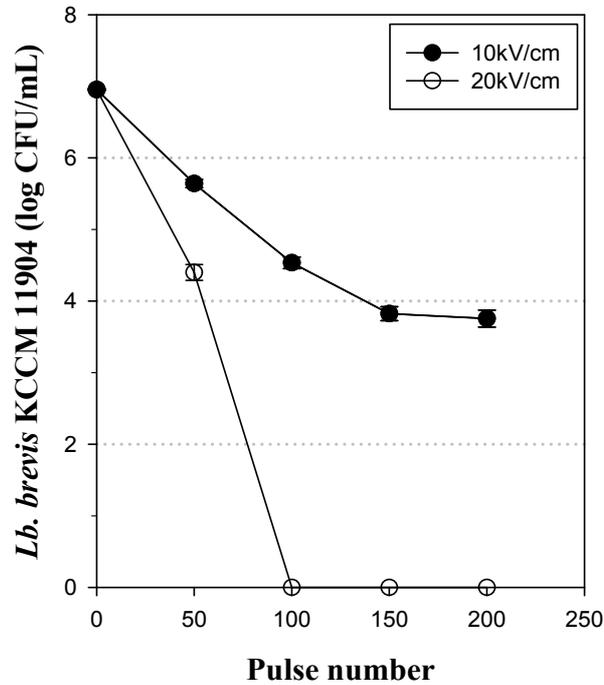


Fig. 2-6. Inactivation of *Lactobacillus brevis* by PEF treatments

(4) *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum*(KCCM 11322)는 한국 미생물보존센터에서부터 공급받아 single colony를 Man Rogosa Sharpe broth 배지에 접종하여 진탕 배양기에서 30°C, 150 rpm 으로 1 일간 배양 후 초기 균수  $10^7$  CFU/mL 수준에서 고전압 펄스처리 장치의 처리 조건(Table 2-7)에서 처리 후 standard ringer solution에서 희석한 후 Man Rogosa Sharpe Agar 배지에 접종 후 36°C에서 1일 배양하여 미생물 살균 효과 확인하였다.

*Lactobacillus plantarum* 의 경우, 30  $\mu$ s 에서 최소 10.0 kV/cm 일 때 4.1 log cycle 감소하며, 15.0 kV/cm 에서는 150 pulses, 20.0 kV/cm에서는 100 pulses 에서 균이 검출되지 않았다 (Detection limit<1.0 log CFU/mL).

Table 2-7. PEF processing conditions for the inactivation test of *Lactobacillus plantarum*

Field strength(kV/cm)	Out voltage(%)	Pulse width( $\mu$ s)	Frequency(Hz)	Pulse number
10	10	30	50	50
				100
				150
				200
15	14	30	50	50
				100
				150
				200
20	19	30	50	50
				100
				150
				200

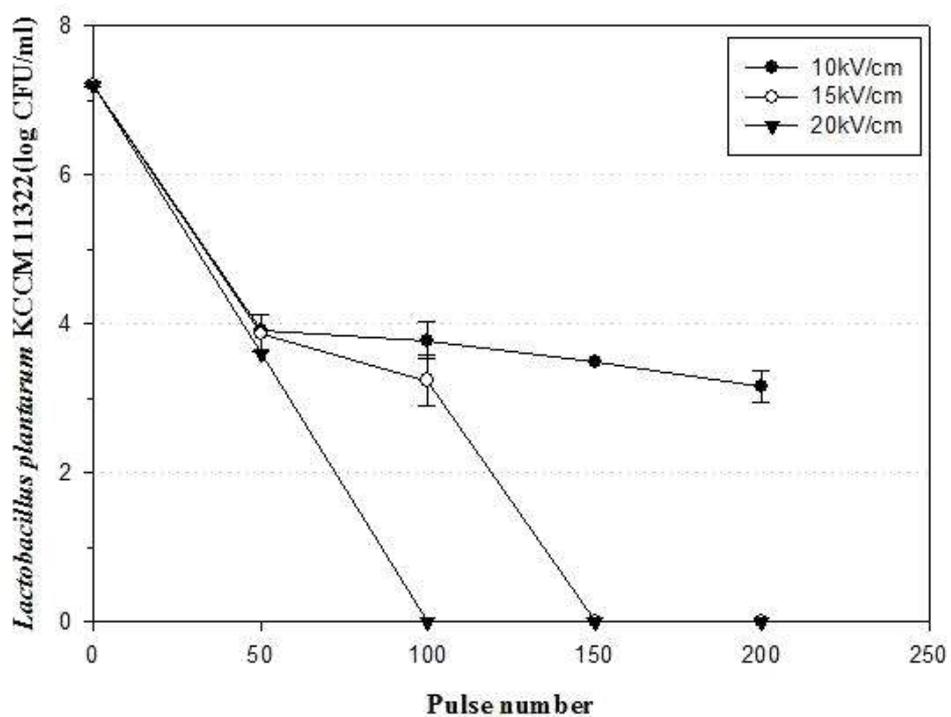


Fig. 2-7. Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by PEF treatments

## 2. 연속형 PEF 처리를 이용한 부패 미생물의 살균

### 가. 연속형 PEF 장치의 처리조건 설정

이전 과제에서 PEF Batch형 실험을 통해 4 종의 미생물의 비활성 되는 조건을 확립하였다. Batch형 조건을 고려하여 파일럿 스케일의 펄스전기장 처리장치의 PEF 공정변수 확립하는 실험을 진행하였다. 우유와 유사한 conductivity 0.51 S/m의 standard solution을 제조하여 field strength와 energy의 조건을 Table 2-8 과 같이 확립하였다.

Table 2-8. PEF continuous processing conditions for standard solution (Flow rate 30L/h, Inlet temperature 30°C).

Field strength(kV/cm)	Out voltage(%)	Pulse width( $\mu$ s)	Frequency(Hz)	Energy(kJ/L)
10	50	19	107	100
			130	150
			160	180
			180	200
12	70	15	67	100
			98	150
			120	189
14	70	20	45	100
			65	150
			77	186
16	70	25	33	100
			45	150
			57	192

Out volatage를 고정 시킨 후 pulse widht와 frequency를 조절하여 field strength와 energy의 조건을 확립한다. Energy가 높아질수록 outlet temperature가 상승하는 효과도 확인 해보았다. 최대 상승온도는 16 kV/cm, 192 kJ/L일 때 최대 38°C 상승하는 것을 확인 하였다. 최적의 살균조건을 조사 한 결과 생산 효율을 고려하여 outlet temperature가 가열온도까지 상승하지 않는 범위에서 생산 효율을 고려하여 10 kV/cm으로 고정하고 실험을 진행하였다.

나. 파일럿 스케일, 연속형 PEF 처리를 통한 저지방 우유 중 미생물 살균효과 검증 : 펄스처리 조건 및 초기온도의 영향

Standard solution으로 연속시 처리 조건을 설정 한 후, 파일럿 스케일의 펄스전기장처리장치의 연속식 처리하여, 저지방 우유속의 부패미생물 4종의 *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*을 접종하여 펄스전기장 처리 후 살균 효과를 확인하였다. 13 5°C에서 3초간 가열 살균한 서울우유의 저지방우유를 사용하였다.

(1) *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae*(KCCM 32016)는 한국 미생물보존센터에서부터 공급받아 single colony를 Potato Dextrose Broth 배지에 접종하여 진탕 배양기에서 30°C, 150 rpm 으로 2일간 배양한 후, 초기 균수 10<sup>7</sup> CFU/mL 수준에서 저지방우유에 100배 희석하여 접종한 후 고전압 펄스처리 장치의 처리 조건(Table 2-9)에서 에너지를 최대 250 kJ/L까지 처리하였다. 고전압 펄스 전기장 처리 이 후 Potato Dextrose Agar 배지에 접종 하여 32°C에서 72 hr 배양 후 미생물 살균 효과 확인하였다.

저지방우유에 *S. cerevisiae*를 접종 한 후 field strength를 10 kV/cm로 고정 시킨 후 inlet temperature를 30, 40°C 로 다르게 조건을 설정 한 후 frequency를 변화주어 100, 150, 200, 250 kJ/L의 energy를 처리 한 후 살균 효과를 확인 하였다. Inlet temperature 30°C 에서 *S. cerevisiae*의 비활성 정도는 100 kJ/L에서 1 log cycle, 150 kJ/L에서는 3 log, 200 kJ/L 이후에 서는 균이 검출 되지 않았다. Inlet temperature 40°C에서는 100 kJ/L에서부터 30°C 보다 더 비활성이 되는 것을 확인 할 수 있었으며, 30°C 와 마찬가지로 200 kJ/L 이후부터 균이 검출 되지 않았다.(Fig. 2-8).

Table 2-9. Pilot scale, continuous type PEF processing conditions for low fat milk inoculated with *S. cerevisiae*(Flow rate 30 L/h).

Field strength(kV/cm )	Out voltage(%)	P u l s e width(μs)	Frequency(Hz)	Energy(kJ/L)	Inlet Temperature(°C)
10	50	20	100	100	30
			135	150	
			181	200	
			220	250	
	50	20	100	100	40
			135	150	
			181	200	
			212	240	

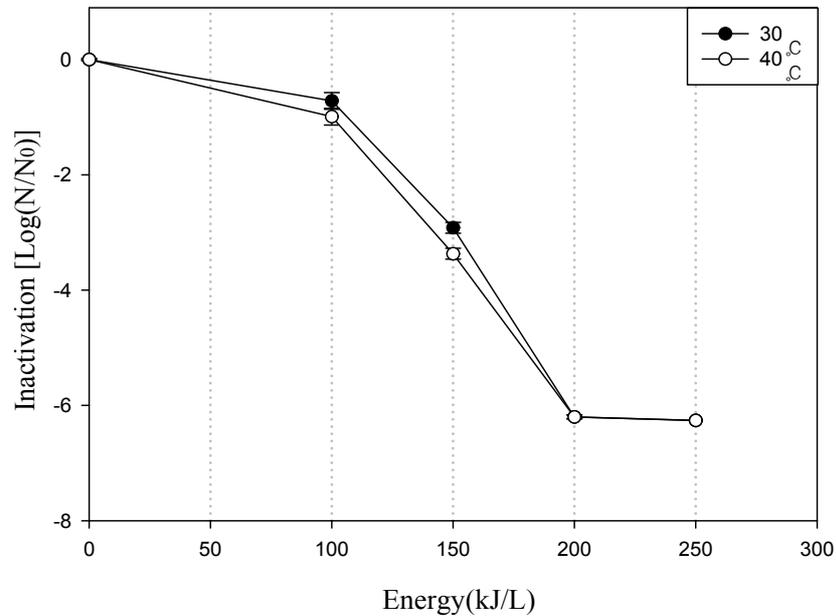


Fig. 2-8. Inactivation *S. cerevisiae* inoculated in low-fat milk after continuous PEF continuous treatment (Black: Inlet temperature=30°C, White: Inlet temperature=40°C)

## (2) *Escherichia coli*

*Escherichia coli*(KCCM 12181)는 한국 미생물보존센터에서부터 공급받아 single colony를 Nutrient broth 배지에 접종하여 진탕 배양기에서 30°C, 150 rpm 으로 1일간 배양 하였다. 초기 균수 10<sup>7</sup> CFU/mL 수준에서 저지방우유에 100배 희석하여 접종한 후 고전압펄스처리 장치의 처리 조건(Table 2-10)에서 에너지를 최대 250 kJ/L까지 처리하였다. 고전압 펄스 전기장 처리 이 후 Nutrient agar 배지에 접종 하였다. 36°C에서 1일 배양 후 미생물 살균 효과를 확인하였다.

저지방우유에 *E. coli*를 접종 한 후 Field strength를 10 kV/cm로 고정 시킨 후 inlet temperature를 30, 40°C 로 조건을 다르게 설정 한 후 frequency를 변화주어 100, 150, 200, 250 kJ/L의 energy를 처리 한 후 살균 효과를 확인 하였다. Inlet temperature 30°C에서 *E. coli* 의 비활성 정도는 100, 150 kJ/L에서는 미비하였지만 200 kJ/L에서 5 log cycle reductions의 비활성을, 250 kJ/L에서는 균이 검출 되지 않았다. Inlet temperature 40°C 에서는 150 kJ/L에서 2.5 log, 200 kJ/L에서 5.2 log, 250 kJ/L에서는 균이 검출 되지 않았다(Fig. 2-9).

Table 2-10. Pilot scale, continuous type PEF processing conditions for low fat milk inoculated with *E. coli*(Flow rate 30 L/h).

Field strength(kV/cm)	Out voltage(%)	P u l s e width( $\mu$ s)	Frequency(Hz)	Energy(kJ/L)	Inlet Temperature( $^{\circ}$ C)
10	50	20	100	100	30
			135	150	
			181	200	
			220	250	
			100	100	
	50	20	135	150	40
			181	200	
			212	240	

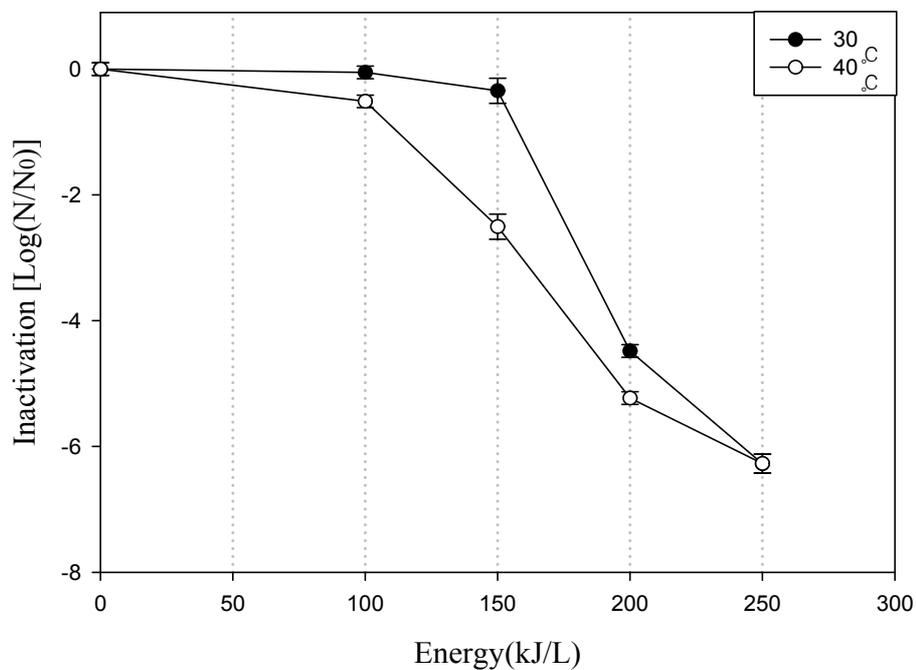


Fig. 2-9. Inactivation *E. coli* inoculated in low-fat milk after continuous PEF continuous treatment (Black: Inlet temperature=30°C, White: Inlet temperature=40°C).

(3) *Lactobacillus brevis*

*Lactobacillus brevis*(KCCM 11904)는 한국 미생물보존센터에서부터 공급받아 single colony를 Man Rogosa Sharpe broth에 접종하여 진탕 배양기에서 30°C, 150 rpm 으로 1일간 배양하였다. 초기 균수 10<sup>7</sup> CFU/mL 수준에서 저지방우유에 100배 희석하여 접종한 후 펄스전기장 처리조건 (Table 2-11) 으로 처리하였다. 펄스전기장 처리 이후 Man Rogosa Sharpe Agar에 접종하여 36°C 에서 1일 배양 후 미생물 살균 효과를 확인하였다.

저지방우유에 배양한 *Lactobacillus brevis* 를 접종 한 후 field strength를 10 kV/cm로 고정시킨 후 inlet temperature를 30, 40°C 로 조건을 다르게 설정 한 후 frequency를 변화주어 100, 150, 200, 250 kJ/L 의 energy를 처리 한 후 살균 효과를 확인 하였다. Inlet temperature 30°C에서의 비활성 정도는 100, 150 kJ/L 에서는 미비하였지만 200 kJ/L 에서 5 log cycle reductions, 250 kJ/L 에서는 6.3 log 비활성을 보였다. Inlet temperature 40°C에서는 150 kJ/L 에서 2.4 log, 200 kJ/L에서 5.8 log, 250 kJ/L에서는 6.4 log reductions의 비활성을 보였다 (Fig. 2-10).

Table 2-11. Pilot scale, continuous type PEF processing conditions for low fat milk inoculated with *Lactobacillus brevis*(Flow rate 30 L/h).

Field strength(kV/cm)	Out voltage(%)	P u l s e width( $\mu$ s)	Frequency(Hz)	Energy(kJ/L)	Inlet Temperature(°C)
10	50	20	100	100	30
			135	150	
			181	200	
			220	250	
			100	100	
	50	20	135	150	40
			181	200	
			212	240	

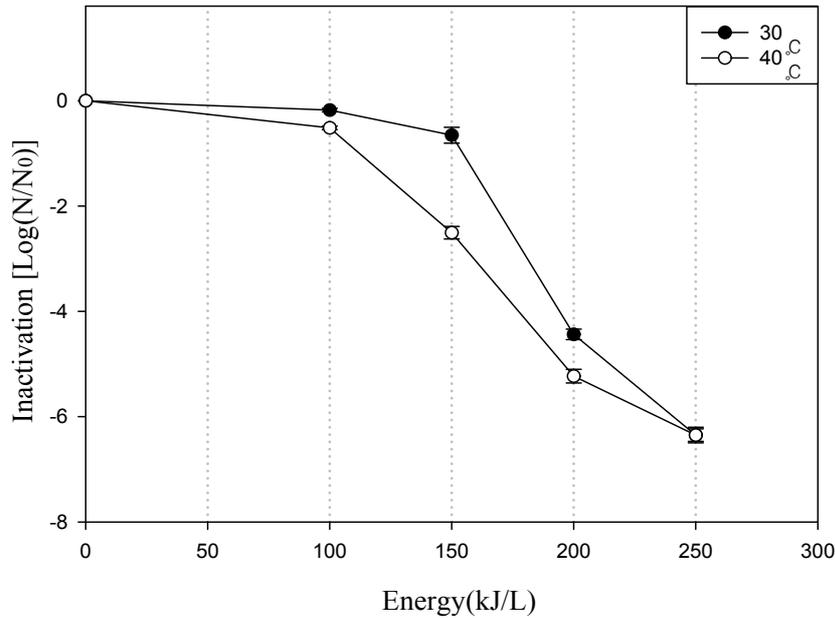


Fig. 2-10. Inactivation *Lactobacillus brevis* inoculated in low-fat milk after continuous PEF continuous treatment (Black: Inlet temperature=30°C, White: Inlet temperature=40°C).

#### (4) *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum*(KCCM 11322)는 한국 미생물보존센터에서부터 공급받아 single colony를 Man Rogosa Sharpe broth에 접종하여 진탕 배양기에서 30°C, 150 rpm으로 1일간 배양하였다. 초기 균수 10<sup>7</sup> CFU/mL 수준에서 저지방우유에 100배 희석하여 접종한 후 고전압 펄스처리 장치의 처리 조건(Table 2-12)으로 처리하였다. 펄스전기장 처리 이후 Man Rogosa Sharpe Agar에 접종하여 36°C에서 1일 배양 후 미생물 살균 효과 확인하였다.

저지방우유에 배양된 *L. plantarum*을 접종 한 후 field strength를 10 kV/cm로 고정 시킨 후 inlet temperature를 30, 40°C로 조건을 다르게 설정 한 후 frequency를 변화주어 100, 150, 200, 250 kJ/L 의 energy를 처리 한 후 살균 효과를 확인 하였다. Inlet temperature 30°C에서 *L. plantarum*의 비활성 정도는 100, 150kJ/L 에서는 미비하였지만 200 kJ/L에서 6 log reductions, 250 kJ/L에서는 6.3 log reductions의 비활성을 보였다. Inlet temperature 40°C에서는 150 kJ/L에서 1.8 log, 200 kJ/L 에서 6.1 log, 250 kJ/L 에서는 6.4 log reductions의 살균효과를 보였다(Fig. 2-11).

Table 2-12. Pilot scale, continuous type PEF processing conditions for low fat milk inoculated with *Lactobacillus plantarum*(Flow rate 30 L/h).

Field strength(kV/cm)	Out voltage(%)	P u l s e width( $\mu$ s)	Frequency(Hz)	Energy(kJ/L)	Inlet Temperature( $^{\circ}$ C)
10	50	20	100	100	30
			135	150	
			181	200	
			220	250	
			100	100	
	50	20	135	150	40
			181	200	
			212	240	

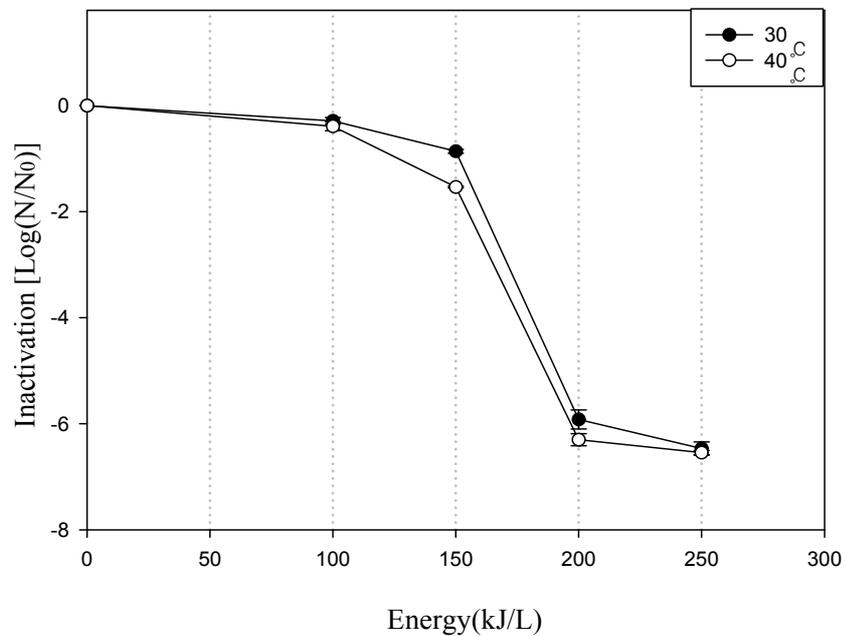


Fig. 2-11. Inactivation *Lactobacillus plantarum* inoculated in low-fat milk after continuous PEF continuous treatment (Black: Inlet temperature=30°C, White: Inlet temperature=40°C).

다. 파일렛 스케일, 연속형 PEF 처리를 통한 저지방 우유 중 미생물 살균효과 검증 : 공정조건 제시 및 저장 효과검증

저지방우유에 접종한 4종의 미생물 살균 효과를 기준으로 최적화 조건을 알아보았다. 4종의 미생물 살균 실험을 통해 제시된 살균조건은 inlet temperature 30°C, field strength 10 kV/cm, energy 200 kJ/L이다. 10 kV/cm, 200 kJ/L의 조건에서 *S. cerevisiae*는 6.2 log cycle reductions, *E. coli*는 4.5 log, *L. brevis*는 4.3 log, *L. plantarum* 은 5.9 log cycle reductions 의 불활성화 결과를 얻었다.

앞서 실험한 4종의 미생물을 저지방우유에 접종 한 후 제시된 PEF 처리공정에 따라 inlet temperature 30°C, field strength 10 kV/cm, energy 150, 200, 250 kJ/L의 조건으로 처리 한 후 4°C에서 15일 동안 저장하며 미생물의 증식정도를 확인하였다.

(1) *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae*의 4°C에서의 shelf test 결과 150 kJ/L에서 처리 경우 3일에서 급격히 증가 하는 것을 확인 할 수 있었으며, 200, 250 kJ/L에서는 균들이 매우 서서히 증가하는 걸 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해서 200 kJ/L 이 후부터 효과적인 살균력을 확인 할 수 있었다(Fig. 2-12).

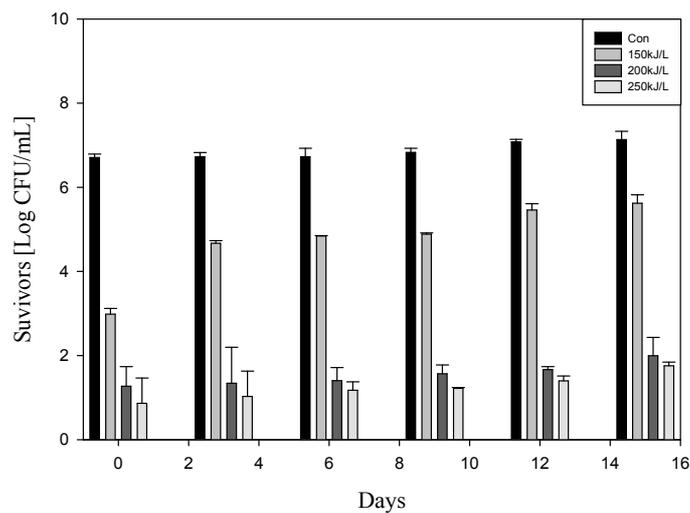


Fig. 2-12. Inactivation and rowth of *S. cerevisiae* after continuous PEF treatments in low fat milk during the storage at 4°C(Inlet temp = 30°C).

(2) *Escherichia coli*

*E. coli* 의 4°C에서의 shelf test 결과 150 kJ/L에서 살균력은 미비한 것을 알 수 있으며, 200 kJ/L의 경우, 3일 이후 점차 *E. coli* 수가 증가 하는 것을 확인 할 수 있었으며, 250 kJ/L에서는 *E. coli*가 12일 이후부터 점차 증가하는 걸 알 수 있었다. 이 결과를 통해서 250 kJ/L 이후부터 효과적인 살균력을 확인 할 수 있었다(Fig. 2-13).

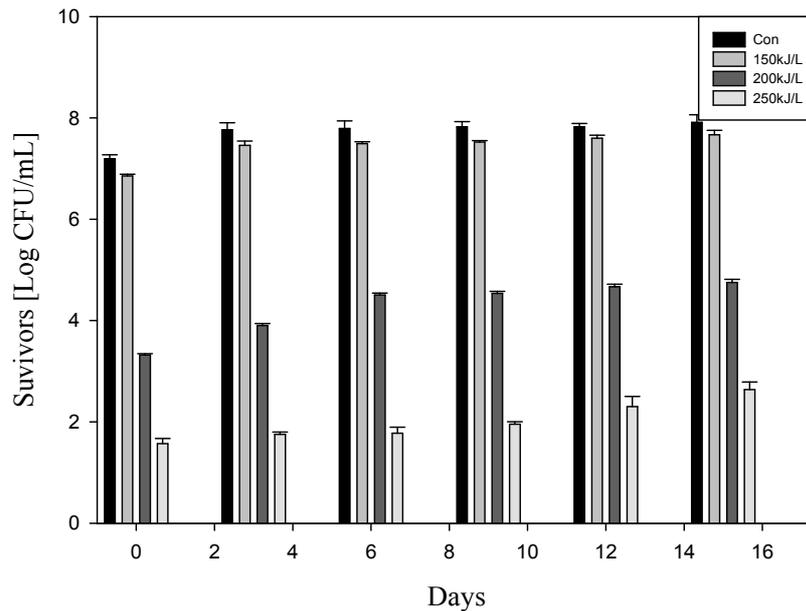


Fig. 2-13. Inactivation and growth of *E. coli* after continuous PEF treatments in low fat milk during the storage at 4°C (Inlet temp = 30°C).

(3) *Lactobacillus brevis*

*L. brevis*의 4°C에서의 shelf test 결과 150 kJ/L에서 살균력은 미비한 것을 알 수 있으며, 200 kJ/L에서 처리한 *L. brevis* 의 경우, 균수의 증가는 매우 느리게 나타나고, 250 kJ/L에서 처리한 경우 *L. brevis* 가 약 12일 이후부터 점차 증가하는 걸 알 수 있었다. 이 결과를 통해서 200 kJ/L 이후부터 효과적인 살균력을 확인 할 수 있었다(Fig. 2-14).

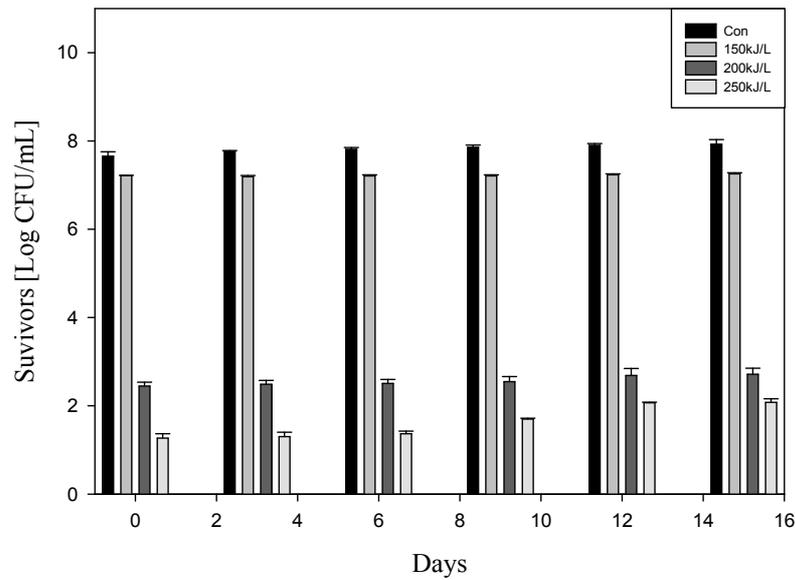


Fig. 2-14. Inactivation and growth of *L. brevis* after continuous PEF treatments in low fat milk during the storage at 4°C(Inlet temp = 30°C).

#### (4) *Lactobacillus plantarum*

*L. plantarum*의 4°C 에서의 shelf test 결과 150 kJ/L에서 살균력은 미비한 것을 알 수 있으며, 200 kJ/L에서의 *L. plantarum* 의 수는 12일 이후부터 점차 증가하는 것이 확인되었다. PEF 처리 에너지가 250 kJ/L 인 경우에는 *L. plantarum* 의 증식을 12일 이후부터 미미하게 증가하는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해서 200 kJ/L 이 후부터 효과적인 살균력을 기대 할 수 있었다 (Fig. 2-15).

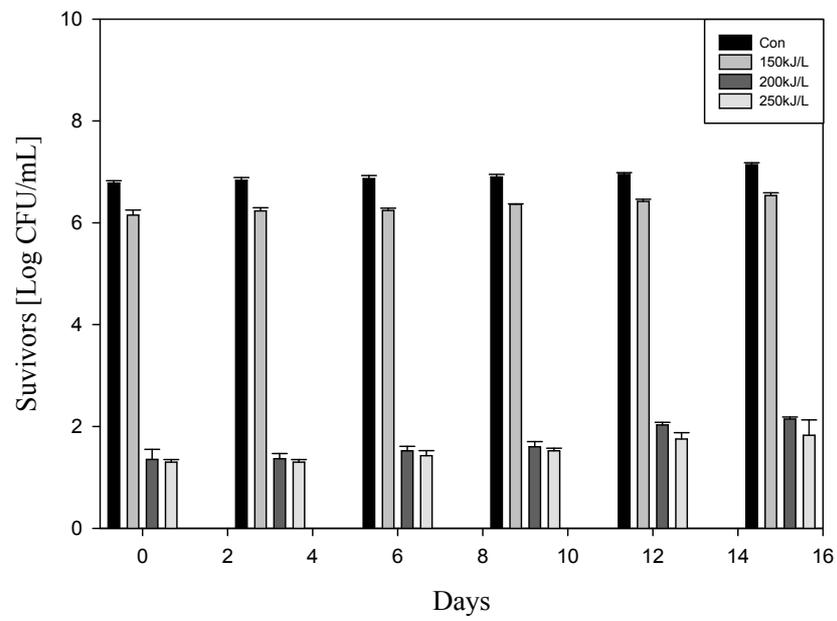


Fig. 2-15. Inactivation and growth of *L. plantarum* after continuous PEF treatments in low fat milk during the storage at 4°C(Inlet temp = 30°C).

### 3. 유제품 유형별 PEF 살균공정 연구

#### 가. 연구방법

##### (1) 시료준비

본 연구에 사용된 우유는 탈지분유 4.1 g에 물 35 mL를 섞는 비율로 탈지분유를 환원하여 사용하였다. 탈지분유는 서울우유 제품을, 더치커피는 더치원 제품을 구입하여 사용하였다. 커피 우유는 탈지분유 환원법에 따라 13.5 L의 탈지분 유유를 제조 한 뒤 더치커피 1.5 L를 섞어 총 15 L를 제조하여 실험재료로 사용하였다. 커피우유 외 바나나우유, 딸기우유는 서울우유의 기존제품의 포물라를 제공받아 재료로 사용하였다.

Table 2-13. (더치)커피 우유 배합표

구분	단위	15 L 당
탈지분유유	g	1,582
더치커피	L	1.5
정제수	L	13.5

Table 2-14. 바나나 우유 배합표

구분	단위	20 kg 당
탈지분유유	g	18,000
설탕	g	1,400
바나나농축액	g	130
정제수	g	456

Table 2-15. 딸기 우유 배합표

구분	단위	20 kg 당
탈지분유	g	18,000
설탕	g	1,400
딸기과즙	g	130
구연산나트륨	g	4
정제수	g	452

(2) 유제품의 파일럿 스케일 펄스전기장 처리

본 연구에 사용한 펄스전기장 장치는 5 kW 급 펄스발생 장치를 사용하였다. 우유의 연속식 처리를 위한 시스템은 1) Service tank 2) 시료이송장치 3) 초기온도조절장치 4) PEF system 5) Back pressure valve 6) 시료 받는 부분 순으로 구성되어 있다. 연속식 chamber에 사용된 펄스의 형태는 bipolar square 형태의 펄스가 사용되었다. PEF 처리는 커피우유, 바나나우유, 딸기우유를 25-30 L/h의 속도로 chamber를 통과하도록 펌프를 이용해 속도를 조절하였다.



Fig. 2-16. PEF production line(left) and continuous chamber(right)

### (3) 생균수 측정

(더치)커피우유, 바나나우유, 딸기 우유의 생균수 측정은 total aerobes, yeast & mold 총 2종류의 균수를 측정하여 진행하였다. 시료 1 mL를 취해 9 mL 멸균수에  $10^1 \sim 10^4$  까지 연속적으로 희석한 다음 생균수를 측정하였다. Total aerobes 생균수 측정에는 AC 3M Petrifilm을 사용하여 32°C에서 24-48 시간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다. Yeast 생균수 측정에는 YM 3M Petrifilm을 사용하여 25°C에서 72시간 배양한 후 형성된 colony 수를 계수하였다. 각 시료는 2개의 배지에 동일하게 실험하여 약 30-300 사이의 colony만 계수하였으며, 형성된 colony 수의 평균을 생균수로 하였다.

### (4) pH

(더치)커피우유, 바나나우유, 딸기 우유의 pH 측정은 pH meter(SevenEast, Metler Toledo, Swizerland)를 사용하여 측정하였다.

### (5) Electrical Conductivity

(더치)커피우유, 바나나우유, 딸기 우유의 conductivity 측정은 conductivity meter(CM-21P, DKK-TOA, Japan)을 사용하여 측정하였다.

### (6) 색도

다른 DSF 샘플의 색은  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  color system을 이용하여 color differentiation meter(UltraScan Pro, Hunter Lab, USA)로 측정하였다. L-value가 밝기 또는 휘도에 대한 정보를 주었고,  $a^*$  value는 녹색부터 붉은색의 강도에 대한 정보,  $b^*$  value는 진한 파란색부터 노란색의 강도를 정의 하였다. Color differentiation meter는 표준 검정 판 다음 표준 백색 판으로 교정되었다. 샘플은 색 측정 셀에 붓고 측정 시, 색 분화는 자동으로 계산되었다.

### (7) 입도분포 (Particle size distribution)

DSF 샘플의 입도 분포를 습식 방법 설정으로 laser diffraction particle size analyzer (Mastersizer 300. Malvern Instrument Limited, United Kingdom)으로 측정하였다. 샘플은 적절한 압력(6-20%)에 도달할 때까지 분산시키며 탈 이온수에 부었다. 측정은 각 샘플마다 3 반복을 시행하였다.

### (8) 향기성분분석

향기성분 분석은 성균관대학교에 분석을 맡겨서 진행하였다. 제조한 커피우유, 딸기우유, 바나나우유의 향기성분을 측정하기 위해, 시료 5 mL를 취하여 Headspace vial(23×75, Sigma-Aldrich)에 넣은 후 cap으로 밀봉하여 GC/MS분석 시료로 사용하였다. GC/MS에 의한 Headspace 분석은 Lee JS

등(2011)의 방법을 변형하여 실험에 사용하였다.

커피우유의 경우 SPME fiber(57348-U, Supelco, Bellefonte, PA, USA)는 50/30  $\mu\text{m}$ 로 Divinylbenzen/ carboxen/polydimethylisoxane(DVB/CAR/PDMS)가 혼합된 fiber를 사용하였다. Fiber에 향기성분을 흡착시키기 전 시료를 평형시키기 위해 커피우유 시료 5 mL을 넣은 vial을 60°C에서 10분간 headspace를 형성시킨 후 10분간 흡착시킨 후에 GC/MS로 분석하였다.

바나나우유와 딸기우유의 경우 Fiber에 향기성분을 흡착시키기 전 시료를 평형시키기 위해 바나나우유와 딸기우유 각 시료 5 mL을 넣은 vial을 70°C에서 20분간 headspace를 형성시킨 후 GC/MS로 분석하였다.

Table 2-16. GC/MS conditions for analysis of Coffee milk flavor compounds.

Condition	
instrument (GC/MS)	Agilent 7890 A, Santa Clara, CA, USA
column	HP-5MS (30m×0.25mm, thickness 0.25 $\mu\text{m}$ )
Fiber type	50/30 $\mu\text{m}$ DVB/Carboxen/PDMS
Incubation Temp	60°C
Incubation Time	10 min
Extraction Temp	10 min
Desorption Temp	720 s
sample 양	5 mL

Table 2-17. GC/MS conditions for analysis of Banana milk and Strawberry milk flavor compounds.

Condition	
instrument (GC/MS)	Agilent 7890A, Santa Clara, CA, USA
column	HP-FFAP fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm, thickness 0.25 μm)
Oven	50°C/7 min, 10°C/min, 90°C, 20°C/min, 210°C/10 min
Incubation Temp	70°C
Incubation Time	20 min
Volume	1 mL
sample 양	5 mL

나. 연구결과

(1) 커피우유의 펄스전기장 살균 및 물리·화학적 특성변화

(가) 펄스전기장 처리에 의한 커피 우유의 살균

최근 소비자의 관심이 증가하고 있는 더치커피(더치원, 대구)와 탈지분유(서울우유, 안산)를 이용하여 시판 커피우유와 유사한 조성의 커피우유를 제조한 후 파일럿 스케일의 펄스전기장 처리장치를 이용하여 처리 후 살균효과를 확인하였다(Fig.2-17).

Table 2-18. (더치)커피 우유의 펄스전기장 처리조건

Run	Field strength (kV/cm)	Pulse width (μs)	Frequency (Hz)	Energy (kJ/L)
PEF-1	10.0	30	180	200
PEF-2	15.2	30	70	200

(Inlet Temp.=30°C, Flow=30 L/h)

더치커피를 탈지 환원유에 혼합하여 실험실에서 조제하였을 때 일반세균의 경우,  $1.55 \times 10^4$  CFU/mL 수준이었으며 효모는  $2.04 \times 10^3$  CFU/mL 검출 되었다. 더치커피에 존재하는 미생물의 숫자가 예상외로 적었기 때문에 커피 우유에 존재하는 대부분의 미생물은 탈지 환원유에서 기인한 것으로 여겨졌으며 따라서 탈지분유의 제조 중 원심분리, 분무건조기 등에 가해지는 열에너지를 고려할 때 일정 수준의 내열성을 갖는 미생물들이 살아남았을 것으로 생각되었다.

펄스전기장 처리는 이전 연구에서 설정된 처리 수준에 따라 처리되었으며 구체적인 처리조건은 Table 2-18에 나타내었다. PEF-1 과 PEF-2 는 electric field strength 와 pulse frequency 조건에는 차이가 있으나 펄스전기장이 가해준 총 에너지는 200 kJ/L로 동일하게 설정되었다.

펄스처리 결과, 일반 호기성 세균의 경우 미생물 불활성화 정도가 1 log cycle 이내로 나타났다. 음료의 제조와 유통에 문제가 되는 Yeast의 경우, PEF-1 처리조건인 경우 약 1 log cycle 정도, PEF-2 처리조건인 경우 약 1.5 log cycles 정도의 감균 효과를 확인하였다.

### Coffee milk

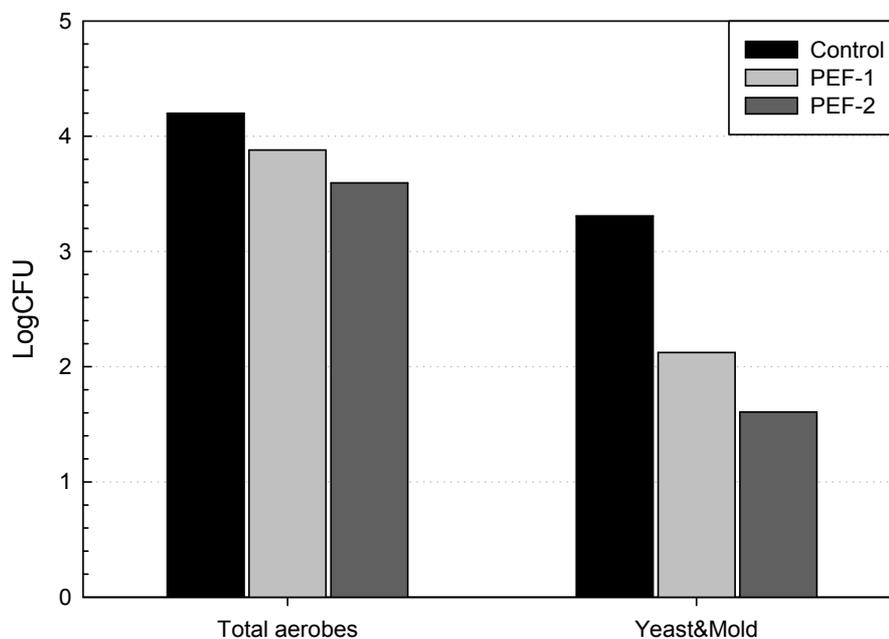


Fig. 2-17. 펄스전기장 처리에 의한 (더치)커피우유 중 미생물의 살균

#### (나) 펄스전기장 처리에 의한 커피 우유의 물리적 특성 변화

펄스전기장 처리가 커피 우유의 물리적 특성에 미치는 영향을 확인하기 위해 펄스전기장 처리 전후 electrical conductivity(S/m), pH, Hunter color L\*, a\*, b\* 값을 측정하였다(Table 2-19).

Electrical conductivity의 경우 control 과 PEF-1, PEF-2 처리군 모두 0.57 S/m 수준으로 일정했으며 pH 값의 경우에도 control 과 PEF-1, PEF-2 처리군 모두 6.5 수준으로 일정하게 유지되었다.

Hunter L\*, a\*, b\* 값을 측정된 색상의 변화에서는 PEF 처리에 의해 L\*, a\*, b\* 값에서 약간의 변화가 측정 되었으나 이들 색상 변화의 정도를  $\Delta E$  값을 통해 정량화 한 결과  $\Delta E = 0.31-0.41$  정도로 매우 미미한 색상변화가 일어났으며 실험자의 눈으로 관찰하였을 때도 색상의 변화를 인지할 수는 없었다.

따라서 투입된 펄스 에너지가 200 kJ/L 정도인 PEF-1 과 PEF-2 처리 조건은 electrical conductivity(S/m), pH, Hunter color L\*, a\*, b\* 값 모두 변화를 일으키지 않음을 확인 할 수 있었다.

Table 2-19. (더치)커피 우유의 펄스전기장 처리조건

Run	Conductivity (S/m)	pH	Color			$\Delta E$
			$L^*$	$a^*$	$b^*$	
Control	0.570±0.004	6.58±0.01	0.46±0.05	0.72 ± 0.10	0.57 ± 0.08	-
PEF-1	0.576±0.001	6.57±0.01	0.36±0.04	0.94 ± 0.08	0.27 ± 0.14	0.41 ± 0.15
PEF-2	0.578±0.003	6.54±0.01	0.39±0.04	0.69 ± 0.08	0.39 ± 0.09	0.31 ± 0.13

펄스전기장 처리가 커피 우유의 입도 특성에 미치는 영향을 확인하기 위해 펄스전기장 처리 전후 Sauter diameter(D[3,2]), Volume mean diameter(D[4,3]), Mean particle diameter(D50)를 측정하였다(Table 20).

커피우유의 평균입도는 D50으로 판단하였을 때 0.33  $\mu\text{m}$ (330 nm)의 값을 가졌으며 PEF-1, PEF-2 처리에 의해서 평균입도가 증가하거나 감소하지 않았다. 일반 Full-fat 시유의 경우 우유에 수-수십  $\mu\text{m}$  크기의 지방구가 상당량 포함되어 있으나 실험에 사용된 커피 우유의 경우 탈지분유를 사용하여 환원하였기 때문에 포함되어 있는 입자의 크기가 상대적으로 작음을 확인할 수 있었다. 커피우유에 혼합되는 더치커피의 경우, 저온에서 용출되는 수용성 성분만을 포함하며 추출 후 필터를 통과하기 때문에 커피우유 제조 후 시료에 포함된 입자의 크기에는 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

커피 우유에 포함된 입자의 크기분포는 span value를 통해 예측할 수 있으며 대조군과 PEF-1, PEF-2 처리군 모두 유사한 입도 분포를 보여주었다. Span value 값이 1.0 부근이면 비교적 homogeneous 한 입도분포를 가지고 있는 것으로 판단할 수 있다.

대조군, PEF-1, PEF-2 처리군의 평균입도와 입도 분포값이 유사하였으므로 모든 커피우유 시료의 Specific surface area도 유사한 값을 나타내었다.

따라서 투입된 펄스 에너지가 200 kJ/L 정도인 PEF-1 과 PEF-2 처리 조건은 탈지환원유와 더치커피 추출물로 이루어진 커피우유의 평균입도, 입도분포 및 Specific surface area 값에 모두 변화를 일으키지 않음을 확인 할 수 있었다.

Table 2-20. 펄스 전기장 처리에 의한 커피 우유의 입도 변화

Run	D <sub>[3,2]</sub>	D <sub>[4,3]</sub>	D <sub>50</sub>	span	Spesific surface area (m <sup>2</sup> /kg)
Control	0.332 ± 0.001	2.017 ± 0.119	0.334 ± 0.001	1.104 ± 0.010	18077.00 ± 55.08
PEF-1	0.335 ± 0.000	0.909 ± 0.007	0.338 ± 0.000	1.056 ± 0.001	17926.67 ± 5.77
PEF-2	0.333 ± 0.001	0.759 ± 0.069	0.337± 0.001	0.995 ± 0.017	18023.33 ± 55.08

(다) 펄스전기장 처리에 의한 커피 우유의 향기성분 특성 변화

향기성분은 Table 2-21와 같다. 동정된 모든 향기성분의 retention time (이하 RT)과 성분명을 나타내었다. 실험 결과 Control에서는 Table 2-21과 같은 향기성분들이 동정되었으며, PEF-1 을 처리한 결과 Table 2-22에서 알 수 있듯이 RT에서 약간의 차이는 있었으나 Control과 동일하게 동정되었다. 하지만, PEF-2를 처리한 결과(Table 23) Butanal, 3-methyl-은 동정되지 않았다.

이들 향기성분 중 전체 향기성분에서 차지하는 비율이 40%를 초과하는 주된 향기성분을 살펴 보면 Pyridine 이다. 원두커피와의 향기성분 차이는 acetic acid에서 찾을 수 있는데, 여기서 acetic acid는 sour flavor를 나타내는 성분이다. Acetic acid는 원두커피에서는 주된 성분이었지만 더치커피를 사용한 이번 실험에서는 발견되지 않았다.

Baik HJ와 Ko YS(1996)의 경우 원두에서 추출한 커피의 주된 향기 성분이 acetone, Acetaldehyde, 2-methyl furan, isobutyl-aldehyde, 2-methyl butanol, isovaleraldehyde 로 보고 하였는데 이번 실험과 성분의 차이가 있었지만 추출한 커피에서 acetic acid가 발견되지 않았다는 공통점은 존재했다.

Table 2-21. Flavor compounds and retention time(RT) in Dutch coffee

No	RT (min)	Compounds
1	2.517	Furan, 3-methyl-
2	3.005	Butanal, 3-methyl-
3	3.099	Butanal, 2-methyl-
4	4.581	Pyridine
5	14.457	2-Furanmethanol

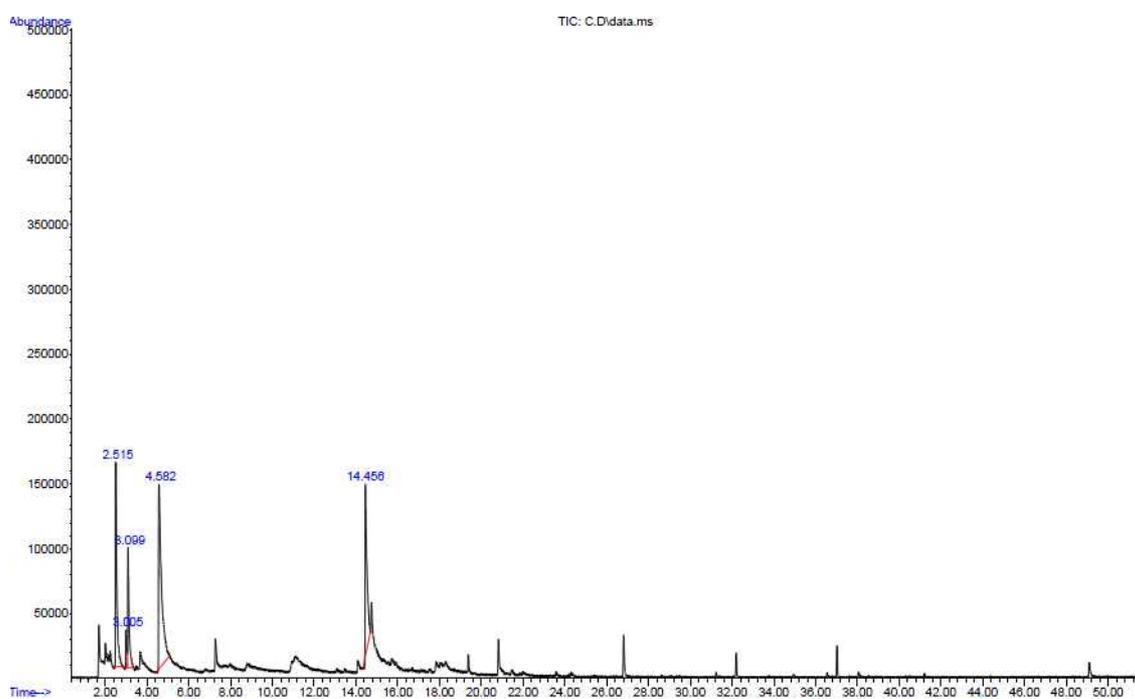


Fig. 2-18. GC pattern of flavor compounds in Dutch coffee

Table 2-22. Flavor compounds and retention time(RT) in Dutch coffee

No	RT (min)	Compounds
1	2.505	Furan, 3-methyl-
2	2.993	Butanal, 3-methyl-
3	3.093	Butanal, 2-methyl-
4	4.569	Pyridine
5	14.457	2-Furanmethanol

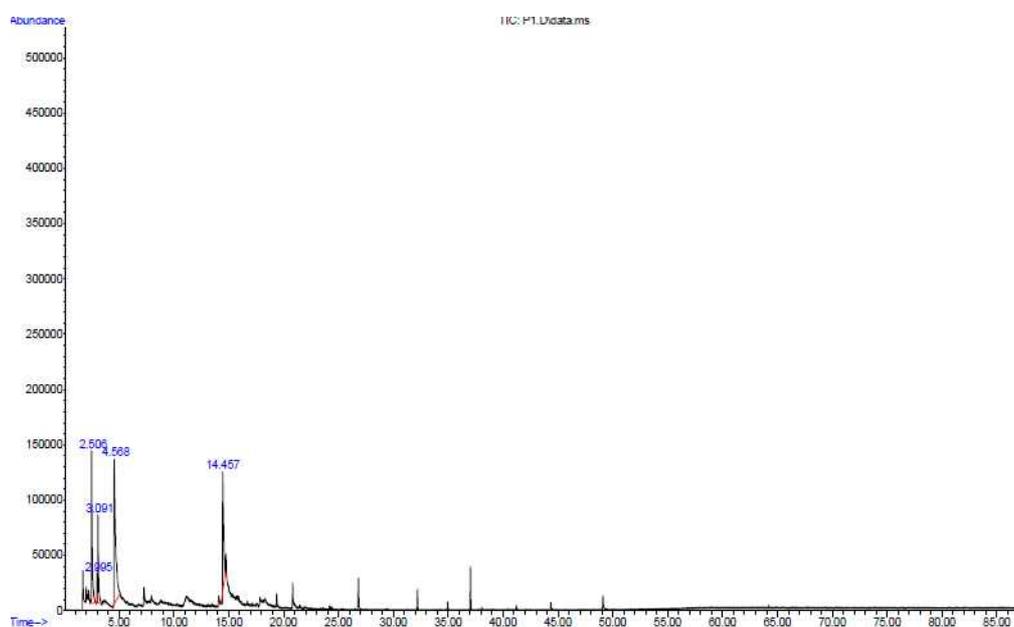


Fig. 2-19. GC pattern of flavor compounds in Dutch coffee after PEF-1

Table 23. Flavor compounds and retention time(RT) in Dutch coffee

No	RT (min)	Compounds
1	2.505	Furan, 3-methyl-
2	3.087	Butanal, 2-methyl-
3	4.563	Pyridine
4	14.463	2-Furanmethanol

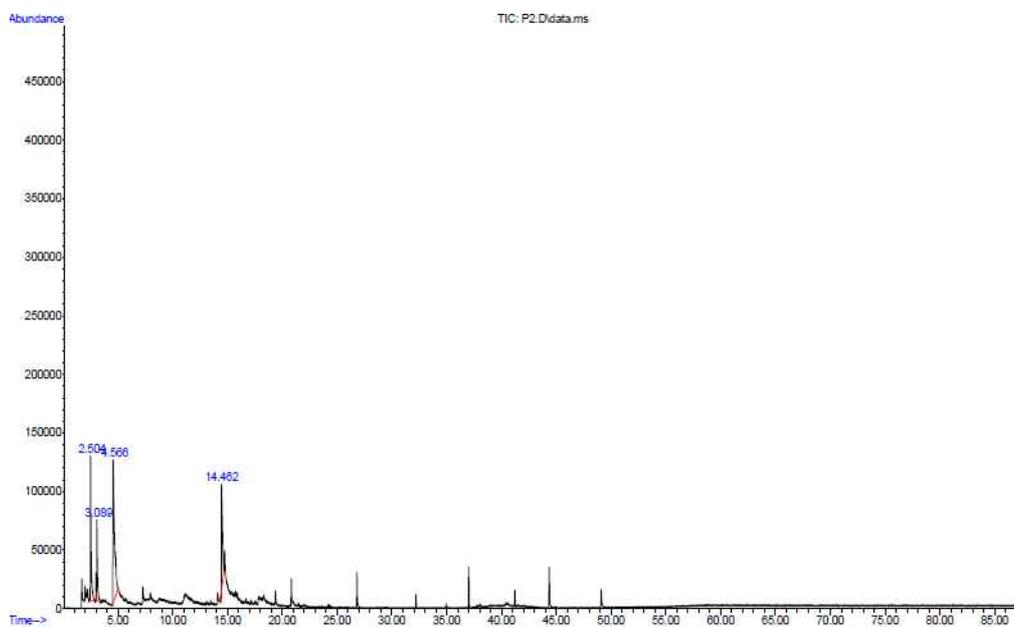


Fig. 2-20. GC pattern of flavor compounds in Dutch coffee after PEF-2

(2) 딸기우유의 펄스전기장 살균 및 물리·화학적 특성변화

시중에 많이 유통되는 시판 딸기우유와 유사한 조성의 딸기우유를 제조한 후 파일럿 스케일의 펄스전기장 처리장치를 이용하여 처리 후 살균효과를 확인하였다 (Fig. 2-21).

Table 2-24. 딸기 우유의 펄스전기장 처리조건

Run	Field strength (kV/cm)	Pulse width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Energy (kJ/L)
PEF-1	10.2	30	150	160.0
PEF-2	16.0	30	60	160.0

(Inlet Temp.=30°C, Flow=30 L/hr)

(가) 펄스전기장 처리에 의한 딸기 우유의 살균

딸기과즙을 탈지 환원유에 혼합하여 실험실에서 조제하였을 때 일반세균의 경우,  $3.60 \times 10^3$  CFU/mL 수준이었으며 효모는  $4.69 \times 10^2$  CFU/mL 수준으로 나타났습니다. 커피 우유의 실험 데이터와 마찬가지로 딸기 우유에 존재하는 대부분의 미생물은 탈지 환원유 에서 기인한 것으로 여겨졌으며 따라서 탈지분유의 제조 중 원심분리, 분무건조기 등에 가해지는 열에너지를 고려할 때 일정 수준의 내열성을 갖는 미생물들이 살아남았을 것으로 생각되었다.

펄스전기장 처리는 이전 연구에서 설정된 처리 수준에 따라 처리되었으며 구체적인 처리조건은 Table 2-24에 나타내었다. PEF-1 과 PEF-2 는 electric field strength 와 pulse frequency 조건에는 차이가 있으나 펄스전기장이 가해준 총 에너지는 160.0 kJ/L로 동일하게 설정되었다.

펄스처리 결과, 일반 호기성 세균의 경우, PEF-1 처리조건인 경우 1 log cycle 이내, PEF-2 처리조건인 경우 약 1 log cycles 정도의 감균 효과를 확인하였다. 음료의 제조와 유통에 문제가 되는 Yeast의 경우, PEF-1 처리조건인 경우 약 2 log cycle 정도, PEF-2 처리조건인 경우 약 2.5 log cycles 정도의 감균 효과를 확인하였다.

## Strawberry milk

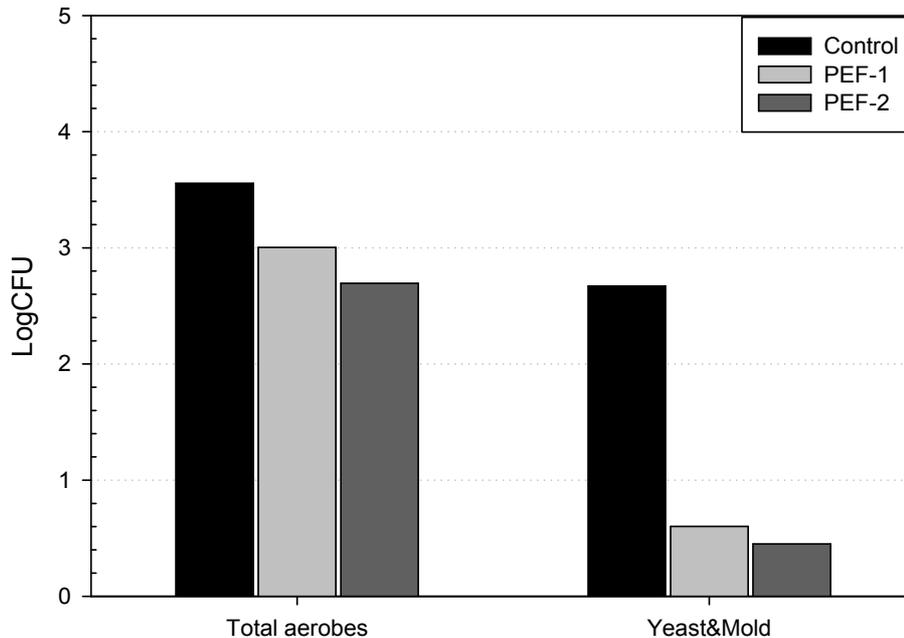


Fig. 2-21. 펄스전기장 처리에 의한 딸기우유 중 미생물의 살균

### (나) 펄스전기장 처리에 의한 딸기 우유의 물리적 특성 변화

펄스전기장 처리가 딸기 우유의 물리적 특성에 미치는 영향을 확인하기 위해 펄스전기장 처리 전후 electrical conductivity(S/m), pH, Hunter color L\*, a\*, b\* 값을 측정하였다(Table 2-25).

Electrical conductivity의 경우 control 과 PEF-1, PEF-2 처리군 모두 0.44 S/m 수준으로 일정했으며 pH 값의 경우에도 control 과 PEF-1, PEF-2 처리군 모두 6.4-6.5 수준으로 일정하게 유지되었다.

Hunter L\*, a\*, b\* 값을 측정한 색상의 변화에서는 PEF 처리에 의해 L\*, a\*, b\* 값에서 약간의 변화가 측정 되었으나 이들 색상 변화의 정도를  $\Delta E$  값을 통해 정량화 한 결과  $\Delta E = 0.63-0.69$  정도로 매우 미미한 색상변화가 일어났으며 실험자의 눈으로 관찰하였을 때도 색상의 변화를 인지할 수는 없었다.

따라서 투입된 펄스 에너지가 160 kJ/L 정도인 PEF-1 과 PEF-2 처리 조건은 electrical conductivity(S/m), pH, Hunter color L\*, a\*, b\* 값 모두 변화를 일으키지 않음을 확인 할 수 있었다.

Table 2-25. 딸기 우유의 펄스전기장 처리조건

Run	Conductivity (S/m)	pH	Color			$\Delta E$
			$L^*$	$a^*$	$b^*$	
Control	0.441±0.003	6.46±0.03	6.41±0.14	1.34 ± 0.13	8.79 ± 0.38	-
PEF-1	0.440±0.000	6.52±0.05	6.22±0.12	1.56 ± 0.18	8.33 ± 0.11	0.63 ± 0.27
PEF-2	0.443±0.001	6.54±0.02	5.85±0.09	1.76 ± 0.29	7.87 ± 0.37	0.69 ± 0.16

펄스전기장 처리가 딸기 우유의 입도 특성에 미치는 영향을 확인하기 위해 펄스전기장 처리 전후 Sauter diameter(D[3,2]), Volume mean diameter(D[4,3]), Mean particle diameter(D50)를 측정하였다(Table 2-26).

딸기우유의 평균입도는 D50으로 판단 하였을때 0.33  $\mu\text{m}$ (330 nm)의 값을 가졌으며 PEF-1, PEF-2 처리에 의해서 평균입도가 증가하거나 감소하지 않았다. 일반 full-fat 시유의 경우 우유에 수-수십  $\mu\text{m}$  크기의 지방구가 상당량 포함되어 있으나 실험에 사용된 딸기 우유의 경우 탈지분유를 사용하여 환원하였기 때문에 포함되어 있는 입자의 크기가 상대적으로 작음을 확인할 수 있었다. 딸기우유에 혼합되는 딸기과즙의 경우, 저온에서 용출되는 수용성 성분만을 포함하며 추출 후 필터를 통과하기 때문에 딸기우유 제조 후 시료에 포함된 입자의 크기에는 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

딸기 우유에 포함된 입자의 크기분포는 span value를 통해 예측할 수 있으며 대조군과 PEF-1, PEF-2 처리군 모두 유사한 입도 분포를 보여주었다. Span value 값이 1.0 부근이면 비교적 homogeneous 한 입도분포를 가지고 있는 것으로 판단할 수 있다.

대조군, PEF-1, PEF-2 처리군의 평균입도와 입도 분포값이 유사하였으므로 모든 딸기우유 시료의 Specific surface area도 유사한 값을 나타내었다.

따라서 투입된 펄스 에너지가 160 kJ/L 정도인 PEF-1 과 PEF-2 처리 조건은 탈지환원유와 딸기과즙으로 이루어진 딸기우유의 평균입도, 입도분포 및 Specific surface area 값에 모두 변화를 일으키지 않음을 확인 할 수 있었다.

Table 2-26. 펄스 전기장 처리에 의한 딸기 우유의 입도 변화

Run	D <sub>[3,2]</sub>	D <sub>[4,3]</sub>	D <sub>50</sub>	span	Specific surface area (m <sup>2</sup> /kg)
Control	0.307 ± 0.005	0.336 ± 0.005	0.325 ± 0.005	0.819 ± 0.005	19567.00 ± 291.61
PEF-1	0.326 ± 0.004	1.545 ± 1.139	0.332 ± 0.002	1.044 ± 0.066	18410.00 ± 233.88
PEF-2	0.326 ± 0.004	1.780 ± 0.874	0.332 ± 0.003	1.032 ± 0.056	18410.00 ± 204.21

(다) 펄스전기장 처리에 의한 딸기 우유의 향기성분 특성 변화

과즙은 종류에 따라 각종의 케톤, 알콜, 에스테르, 유기산 등의 방향성분과 포도당, 과당 등의 단당류를 함유가 있다. 이번 향기성분 분석결과 딸기우유에서는 ethanol만 동정되었다. 여기서 ethanol은 발효에 의해서도 생성되기 때문에 일부는 딸기과즙에서 유래되었다고 본다.

(3) 바나나우유의 펄스전기장 살균 및 물리·화학적 특성변화

(가) 펄스전기장 처리에 의한 바나나 우유의 살균

시중에 많이 유통되는 시판 바나나우유와 유사한 조성의 바나나우유를 제조한 후 파일럿 스케일의 펄스전기장 처리장치를 이용하여 처리 후 살균효과를 확인하였다(Fig. 2-22).

Table 2-27. 바나나 우유의 펄스전기장 처리조건

Run	Field strength (kV/cm)	Pulse width (μs)	Frequency (Hz)	Energy (kJ/L)
PEF-1	10.1	30	150	160.0
PEF-2	15.7	30	60	160.0

(Inlet Temp.=30°C, Flow=30 L/hr)

바나나농축액을 탈지 환원유에 혼합하여 실험실에서 조제하였을 때 일반세균의 경우,  $7.85 \times 10^4$  CFU/mL 수준이었으며 효모는  $5.29 \times 10^2$  CFU/mL 수준으로 나타났습니다. 커피 우유의 실험 데이터와 마찬가지로 바나나 우유에 존재하는 대부분의 미생물은 탈지 환원유에서 기인한 것으로 여겨졌으며 따라서 탈지분유의 제조 중 원심분리, 분무건조기 등에 가해지는 열에너지를 고려할 때 일정 수준의 내열성을 갖는 미생물들이 살아남았을 것으로 생각되었다.

펄스전기장 처리는 이전 연구에서 설정된 처리 수준에 따라 처리되었으며 구체적인 처리조건은 Table 2-27에 나타내었다. PEF-1 과 PEF-2 는 electric field strength 와 pulse frequency 조건에는 차이가 있으나 펄스전기장이 가해준 총 에너지는 160.0 kJ/L로 동일하게 설정되었다.

펄스처리 결과, 일반 호기성 세균의 경우, PEF-1 처리조건인 경우 약 0.5 log cycle 정도, PEF-2 처리조건인 경우 약 1 log cycles 정도의 감균 효과를 확인하였다. 음료의 제조와 유통에 문제가 되는 Yeast의 경우, PEF-1 처리조건인 경우 약 2.5 log cycle 정도, PEF-2 처리조건인 경우 약 3 log cycles 정도의 감균 효과를 확인하였다.

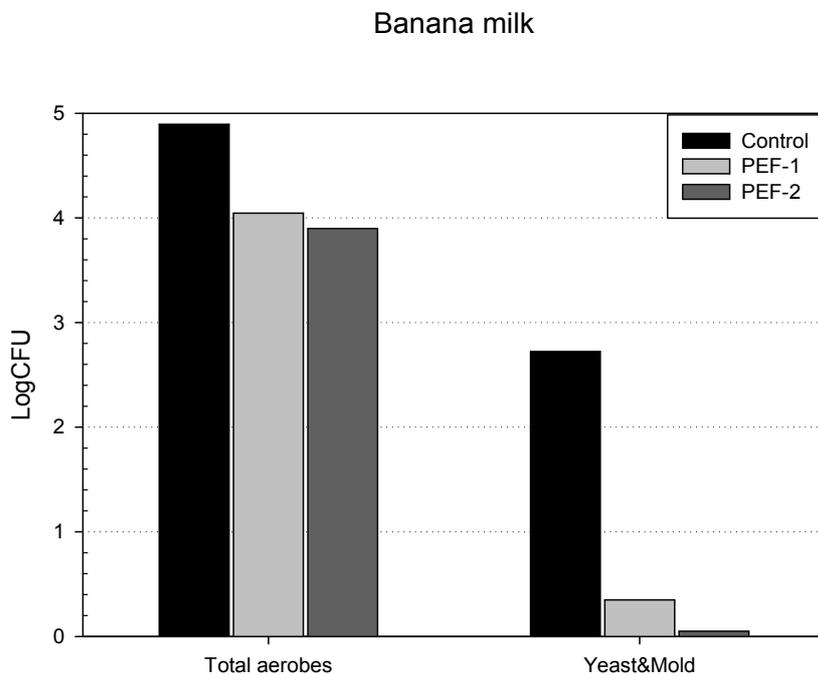


Fig. 2-22. 펄스전기장 처리에 의한 바나나우유 중 미생물의 살균

(나) 펄스전기장 처리에 의한 바나나 우유의 물리적 특성 변화

펄스전기장 처리가 바나나 우유의 물리적 특성에 미치는 영향을 확인하기 위해 펄스전기장 처리 전후 electrical conductivity (S/m), pH, Hunter color L\*, a\*, b\* 값을 측정하였다(Table 28).

Electrical conductivity의 경우 Control 과 PEF-1, PEF-2 처리군 모두 0.45 S/m 수준으로 일정했으며 pH 값의 경우에도 Control 과 PEF-1, PEF-2 처리군 모두 6.5 수준으로 일정하게 유지되었다.

Hunter L\*, a\*, b\* 값을 측정된 색상의 변화에서는 PEF 처리에 의해 L\*, a\*, b\* 값에서 약간의 변화가 측정 되었으나 이들 색상 변화의 정도를  $\Delta E$  값을 통해 정량화 한 결과  $\Delta E = 0.29-0.41$  정도로 매우 미미한 색상변화가 일어났으며 실험자의 눈으로 관찰하였을 때도 색상의 변화를 인지할 수는 없었다.

따라서 투입된 펄스 에너지가 160 kJ/L 정도인 PEF-1 과 PEF-2 처리 조건은 electrical conductivity(S/m), pH, Hunter color L\*, a\*, b\* 값 모두 변화를 일으키지 않음을 확인 할 수 있었다.

Table 2-28. 바나나 우유의 펄스전기장 처리조건

Run	Conductivity (S/m)	pH	Color			$\Delta E$
			$L^*$	$a^*$	$b^*$	
Control	0.452±0.005	6.54±0.03	7.68±0.07	0.47 ± 0.43	10.51 ± 0.21	-
PEF-1	0.450±0.002	6.56±0.02	7.62±0.12	0.33 ± 0.16	10.50 ± 0.20	0.29 ± 0.15
PEF-2	0.462±0.003	6.56±0.02	7.41±0.05	0.50 ± 0.25	10.47 ± 0.22	0.41 ± 0.14

펄스전기장 처리가 바나나 우유의 입도 특성에 미치는 영향을 확인하기 위해 펄스전기장 처리 전후 Sauter diameter(D[3,2]), Volume mean diameter(D[4,3]), Mean particle diameter(D50)를 측정하였다(Table 2-29).

바나나우유의 평균입도는 D50으로 판단 하였을때 0.34  $\mu\text{m}$ (340 nm) 의 값을 가졌으며 PEF-1, PEF-2 처리에 의해서 평균입도가 증가하거나 감소하지 않았다. 일반 full-fat 시유의 경우 우유에 수~수십  $\mu\text{m}$  크기의 지방구가 상당량 포함되어 있으나 실험에 사용된 바나나 우유의 경우 탈지분유를 사용하여 환원하였기 때문에 포함되어 있는 입자의 크기가 상대적으로 작음을 확인할 수 있었다. 바나나우유에 혼합되는 바나나농축액의 경우, 저온에서 용출되는 수용성 성분만을 포함하며 추출 후 필터를 통과하기 때문에 바나나우유 제조 후 시료에 포함된 입자의 크기에는 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

바나나 우유에 포함된 입자의 크기분포는 span value를 통해 예측할 수 있으며 대조군과 PEF-1, PEF-2 처리군 모두 유사한 입도 분포를 보여주었다. Span value 값이 1.0 부근이면 비교적 homogeneous 한 입도분포를 가지고 있는 것으로 판단할 수 있다.

대조군, PEF-1, PEF-2 처리군의 평균입도와 입도 분포값이 유사하였으므로 모든 바나나우유 시료의 Specific surface area 도 유사한 값을 나타내었다.

따라서 투입된 펄스 에너지가 160 kJ/L 정도인 PEF-1 과 PEF-2 처리 조건은 탈지환원유와 바나나농축액으로 이루어진 바나나우유의 평균입도, 입도분포 및 specific surface area 값에 모두 변화를 일으키지 않음을 확인 할 수 있었다.

Table 2-29. 펄스 전기장 처리에 의한 바나나 우유의 입도 변화

Run	D <sub>[3,2]</sub>	D <sub>[4,3]</sub>	D <sub>50</sub>	span	Spesific surface area (m <sup>2</sup> /kg)
Control	0.331 ± 0.001	1.427 ± 0.229	0.336 ± 0.000	1.031 ± 0.014	18113.00 ± 46.19
PEF-1	0.334 ± 0.002	1.737 ± 0.331	0.336 ± 0.001	1.119 ± 0.055	17983.33 ± 120.14
PEF-2	0.336 ± 0.001	2.017 ± 0.045	0.337 ± 0.001	1.222 ± 0.074	17876.67 ± 58.595

(다) 펄스전기장 처리에 의한 바나나 우유의 향기성분 특성 변화

과즙은 종류에 따라 각종의 케톤, 알콜, 에스테르, 유기산 등의 방향성분과 포도당, 과당 등의 단당류를 함유가 있다. 이번 향기성분 분석결과 바나나우유에서는 ethanol만 동정되었다. 여기서 ethanol은 발효에 의해서도 생성되기 때문에 일부는 바나나과즙에서 유래되었다고 본다.

### 제 3 절 협동과제 : 펄스 전기장 기술을 활용한 기능성 단백질의 보존성 확보 기술 구축

#### 1. 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). 그러나 우유는 세균증식에 있어 중요한 수분, 단백질, 탄수화물, 비타민, 무기질 등을 함유하고 있어 미생물이 성장할 수 있는 이상적인 조건을 가지고 있기 때문에 원유에 존재하는 병원균 및 부패균을 사멸시켜 제품의 저장성을 향상시키고 우유의 변질을 초래하는 효소를 파괴하기 위해 살균공정을 실시하고 있다.

현재 우리나라에서 이용되는 일반적인 열처리에 의한 우유의 살균 방법으로는 저온장시간 살균법(LTLT: Low Temperature Long Time, 63-65°C, 30분), 고온단시간살균법(HTST: High Temperature Short Time, 72-75°C, 15-20초) 및 초고온순간살균법(UHT: Ultra High Temperature, 130-150°C, 0.5-5초) 등이 있다. 우유는 냉장 보존 시에 7°C 또는 그 이하에서 생육하는 저온세균의 증식으로 우유의 풍미변화를 가져오며, 이러한 균이 생산하는 protease나 lipase 등의 내열성 효소의 작용으로 우유의 풍미와 보존성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, 고온에서 일어나는 많은 화학변화는 Maillard reaction을 비롯하여 lactuloselysine, lysinoalanine, fructoselysine, furosine, pyridosine 생성반응 등과 같은 바람직하지 못한 측면도 보고되어 있다.

우리나라에서는 1980년대부터는 거의 대부분의 유업체에서 유통과정상 보존성이 좋은 UHT 처리법을 주로 이용하고 있으나 우유의 열처리 조건이 우유의 품질 즉, 성분 및 영양에 미치는 영양에 대해서는 논쟁이 분분하여 왔다. UHT 처리 우유는 가열처리 과정에서 세균은 모두 사멸되었다 하더라도 일부 내열성이 강한 저온세균 효소가 잔존하여 우유의 gel화를 일으키거나, 단백질 및 지방 등을 분해하여 제품의 품질저하를 초래할 수 있다. 국내에서 원유는 보통 UHT 처리 후 포장되거나 무균상태에서 포장되는 우유가 있는데, 무균포장의 경우 국내 6주, 외국에서 최대 6개월까지 보존이 허용된다(Yoon et al., 1990). 그러나 일반적으로 우유는 불안정한 보존성으로 인하여 유통기한이 길지 않고, UHT, HTST, LTLT 등 현재 우유의 살균법은 가열공정이 포함되므로 유용한 기능성 단백질의 불활성화가 우려되는 실정이다.

우유 중 단백질( $\beta$ -lactoglobulin)은 열에 의해 변성되는데, HTST에서는 20%, UHT 우유에서는 70-80%(간접가열법), 40-60%(직접가열법)가 변성되는 것으로 알려져 있다. 대부분 우유의 비타민은 열에 안정적이며, 비타민 A, D, E, riboflavin, pantothenic acid, biotin, niacin 등은 UHT 처리 시에는 별 영향을 받지 않는다. 그러나 비타민 B1, B6, B12, folic acid, 비타민 C 등은 HTST 우유에서는 10%, UHT 우유에서는 20% 정도 소실되는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 문제를 해결하기 위한 방법으로 저온살균공법(LTLT) 및 감마선 조사 등 우유에 열을 적게 가하는 방법을 이용한 살균법에 관한 시도가 이루어져 왔으나, 아직까지는 기존의 살균 방

법인 UHT를 대체할 수 있는 효과적인 저온 살균법에 관한 뚜렷한 해결책은 찾지 못하고 있는 실정이다.

최근 신선식품의 소비가 높아지고, 건강에 대한 인식이 향상됨에 따라 식품의 영양적 성분과 더불어 관능적 특성을 변화시키지 않는 비가열 살균법의 관심이 증대되고 있는데(Park et al., 2010; Lim et al., 2012a), 현재 식품 사용되는 비가열 살균기술에는 이온화조사, 여과살균, 화학제, 고전압 펄스 전기장(high voltage pulsed electric fields, PEF), 오존살균, 광펄스, 감압방전 플라즈마 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)는 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.

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 연구 결과가 보고되었다. Kim et al.(1992)은 우유의 가열처리에 따른 저Table물질의 변화를 확인하였고, Chung & Kim(1994)는 콩우유와 우유를 혼합한 음료에 있어 혼합우유의 가용성 단백질에 있어 가열온도가 미치는 영향을 조사한 보고가 있다.

본 연구는 비가열 살균방법인 PEF를 사용하여 살균 공정 별로 우유를 처리하였을 때, 우유 단백질의 변화를 파악하고 분석하여, 기존의 가열 살균 우유와 병용처리 시 기능성 물질의 보존을 통한 고부가가치 우유 및 가공유의 개발을 위하여 진행되었다.

## 2. 연구 방법

### 가. 시료

1차년도 본 연구에 사용된 우유는 균질화된 원유와 유지방 함량이 0.03% 이하인 탈지유, 원유를 75°C에서 15초간 살균한 HTST 우유, 원유를 135°C에서 3초간 처리한 UHT 우유는 위탁기관인 서울우유로부터 공급받았으며, LTLT 우유는 시판되는 65°C에서 30분간 저온살균된 우유를 구입하여 사용하였다. 이를 제1협동기관인 중앙대학교가 보유하고 있는 펄스제네레이터(pulse generator, DIL, Germany)를 이용하여 50, 65°C의 처리온도에서 진행하였다.

2차년도 본 연구에 사용된 우유는 위탁기관인 서울우유로부터 공급받은 균질화된 우유(원유, raw milk)와 이를 사용한 PEF 처리조건은 100, 150, 200, 250 kJ로 각 처리된 우유는 바로 냉각을 하거나 65°C로 설정된 water bath에서 30분간 방치 후 냉각하여 저온살균효과를 가지도록 하였다.

3차년도 PEF와 LTLT, HTST의 병용처리 공정을 최적화하기 위한 실험의 시료로서, PEF(180 kJ) 처리한 후, 포장과 68°C의 항온수조에서 30분간 LTLT 처리 공정을 병용하여 냉각하였고, 같은 방식으로 PEF(200 kJ) 처리 후 HTST 살균기 통과한 뒤 냉각코일을 거치는 연속식 공정으로 진행하였다.

### 나. 단백질 정량

우유 시료 중에 존재하는 단백질을 정량하기 위하여 시료를 일정 배수로 희석하여 1.2 mL이 되도록 하고, 0.3 mL의 protein assay reagent(Bio-Rad)를 가하여 혼합한 후, 실온에서 5분간 방치한 다음 595 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도를 계산하기 위한 Table준물질로는 bovine serum albumin을 사용하여 Table준곡선을 작성하였다.

### 다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

우유 시료 중에 존재하는 단백질을 관찰하기 위하여 Laemmli(1970)의 방법에 따라 다음과 같이 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다. 전기영동 완충용액으로는 0.025 M Tris base, 0.192 M glycine, 0.1% SDS 용액을 사용하였으며, SDS separating gel은 10%의 농도로 30% acrylamide(29.2% acrylamide, 0.8% *N,N'*-methylene-bisacrylamide) 5.0 mL, d-H<sub>2</sub>O 6.25 mL, lower gel buffer(1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS) 3.75 mL, 10% ammonium persulfate 50 µL, TEMED 10 µL의 조성으로 조제하였다. SDS stacking gel의 조성은 30% acrylamide 0.65 mL, d-H<sub>2</sub>O 3.05 mL, upper gel buffer(0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS) 1.25 mL, 10% ammonium persulfate 50 µL, TEMED 10 µL의 조성으로 조제하였다. 시료는 6×SDS sample buffer(30%(w/v) glycerol, 9.3% DTT, 1%(w/v) SDS, 70%(w/v) upper gel buffer, 0.012% bromophenol blue)를 동량 첨가하여 혼합한 후 100°C에서 5분간 가열하여 변성시킨 다음 원심분리하여 그 상등액을 취해 loading하였다. 전기영동은 dye front가 stacking

gel을 지날 때까지 50 V로 행하였고, separating gel부터 100 V로 행하였다. 전기영동 후 gel을 Coomassie blue solution(0.05% Coomassie brilliant blue R-250, 50% methanol, 10% acetic acid)으로 2시간 염색하였다. 염색된 gel은 5% methanol, 7% acetic acid 용액으로 탈색하였다.

#### 라. DSC를 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, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정을 위한 단백질은 30 mg을 사용하였으며 N<sub>2</sub> gas의 유속은 100 mL/min로 하였고 실온에 150°C까지 5°C/min의 속도로 온도를 상승시키면서 이에 따른 단백질의 변성온도(denaturation temperature, T<sub>d</sub>)를 측정하였다.

#### 마. HPLC를 이용한 단백질의 변성도 측정

우유 내의 단백질 중 casein( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -casein)과 유청 단백질의 함량을 구하기 위하여 고속액체 크로마토그래피(reversed-phase high-performance liquid chromatography, HPLC, YL 9100, 영린기기, Korea)를 이용하여 단백질을 정량하였다. HPLC는 컬럼은 C<sub>18</sub> column을 사용하였으며, injection volume 20  $\mu$ L를 1 ml/min 유속으로 샘플을 흘려주어 220 nm로 측정하였다.

##### (1) 이동상

이동상의 조성은 acetonitrile과 distilled water, trifluoroacetic acid가 이동상 A는 100:900:1의 비율로 혼합하였고, 이동상 B는 900:100:1로 혼합하였다. 각 조성별 혼합 후 여과과정을 거친 후 sonication하여 탈기하였다. 또한 샘플의 희석액은 이동상 A와 이동상 B의 혼합액(7:3 v/v)을 사용하여 Table준물질 및 샘플의 희석액으로 사용하였다.

##### (2) Gradient

컬럼에 흘려주는 초기 gradient는 이동상 A와 이동상 B가 초기 80, 20%로 시작하여 30분까지 점차적으로 이동상 A와 이동상 B가 54, 46%로 이동상 B가 점점 증가하도록 설정하였다. 그 후 초기 gradient로 돌아가기 위해 5분 동안 이동상 A와 이동상 B가 80%, 20%로 돌아오도록 설정하였고, 그 상태로 5분을 지속하여 총 분석시간은 샘플 당 40분으로 설정하였다.

##### (3) Table준물질

Table준물질로서  $\kappa$ -casein,  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\beta$ -lactoglobulin을 사용하였으며 각각의 농도를 2.08-0.92  $\mu$ g/mL, 2.02-0.90  $\mu$ g/mL, 1.99-0.88  $\mu$ g/mL, 2.01-0.89  $\mu$ g/mL로 희석하여 컬럼에 흘려주어 측정된 area값으로 정량곡선을 그렸다.

#### (4) 시료

우유 샘플을 각각 희석액에 5배 희석 후 컬럼에 흘려주었다. 측정된 area값으로 각 Table준물질 별 정량곡선에 대입하여 샘플 중 단백질의 양을 환산하여 구하였다.

#### 바. 우유의 탁도

우유 20 mL에 ammonium sulfate 4.0 g을 가하여 ammonium sulfate가 완전히 용해될 때까지 흔들여 혼합한 후, 5분간 실온에 방치하고 filter paper로 여과하여 빠져나온 여과물 5 mL를 시험관에 취하여 끓는 물에 5 분간 방치하였다. 이 후 즉시 차가운 물로 냉각한 후 시험관을 흔들면서 탁도 여부를 육안으로 판정하였다.

#### 사. 효소 활성 측정

우유가 지니고 있는 효소 활성의 측정은 원심분리를 통해 지방을 제거한 우유를 사용하였다.

#### (1) Alkaline phosphatase

우유를 원심분리하여 지방을 제거하고, 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 흡광도를 측정할 수 있는 큐벳에 취하여 550 nm에서 흡광도의 값이 안정화가 될 때까지 방치한 후 공시험의 경우에는 0.1 mL의 1.0 mM magnesium chloride 용액을, 본 시험의 경우 0.1 mL의 우유를 가한 뒤 5분간 30초 간격으로 흡광도를 기록하여 최대 직선기울기로 변화량을 측정하여 계산하였다.

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

여기서 3 = Volume (in mL) of assay

df = Dilution factor

18.5 = Millimolar extinction coefficient of *p*-nitrophenol at 405 nm

0.1 = Volume (in mL) of enzyme used

#### (2) Protease

Protease 활성 측정을 위한 기질로는 azo-casein(Sigma, St. Louis, USA)을 사용하였다. Azo-casein 2 g을 100 mM sodium phosphate buffer(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 실

활시키고 반응하지 않은 azo-casein은 4°C에서 30분간 침전시킨 후 9,950×g에서 10분간 원심 분리하였다. 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.

### (3) Lactoperoxidase

우유의 lactoperoxidase의 활성 측정을 위해 3.0 mL의 1 mM ABTS(in sodium phosphate buffer, pH 7.0)과 0.1 M PBSG(phosphate buffered saline containing 0.1% gelatin, pH 7.0)로 5배 희석한 우유 시료를 0.1 mL 혼합한 후 0.1 M hydrogen peroxide 용액을 0.1 mL 가하여 2분 동안 10초 간격으로 412 nm에서의 흡광도를 기록하였다. Blank로는 0.1 M hydrogen peroxide 용액을 첨가하지 않고 ABTS 용액과 우유 시료만을 혼합한 용액을 사용하였다. 효소 활성 1 unit은 주어진 조건에서 분당 1 µmol of ABTS를 산화시키는 효소의 양으로 정하였으며 아래의 식을 사용하여 활성을 계산하였다.

$$\frac{\Delta 412 \text{ nm} \times 3.2}{32.4 \times 0.1 \times 2}$$

여기서  $\Delta 412 \text{ nm}$  = Change in absorbance at 412 nm

3.2 = Assay volume (mL)

32.4 = Extinction coefficient (mmol/L·cm)

0.1 = Sample volume (mL)

2 = Time (min)

#### 아. 적정 산도

우유 시료 9 mL에 10 mL의 증류수를 가하여 희석한 후, 0.1% phenolphthalein 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 Table시하였으며 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Titrateable acidity (\%)} = \frac{0.1 \text{ N NaOH (mL)} \times \text{factor} \times 0.009 \times 100}{\text{Sample weight (g)}}$$

#### 자. pH

우유의 pH는 pH meter(FE-20K, Mettler Toledo, USA)를 사용하여 측정하였다.

#### 차. 우유의 alcohol 시험

우유 5 mL을 Petri dish에 취하고, 70% ethanol을 동량 가한 후 바로 섞어 주어 응고물 생성 유무를 육안으로 확인하여 판정하였다.

### 카. 우유의 갈색도

우유의 갈색도를 측정하기 위하여 우유 시료를 적당량 희석한 후 420 nm에서의 흡광도를 spectrophotometer(Shimatzu, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

### 타. 색도

우유 시료의 색도 측정은 색도계(Minolta CR-200, Konica Minolta Holdings, Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 Hunter 값인 L(명도), a(적색도), b(황색도) 값을 측정하였다.

### 파. Western blot

전기영동이 끝난 gel과 nitrocellulose membrane(HYBOND, UK), 6장의 3MM Whatman paper (USA)를 15분간 transfer buffer(25 mM Tris, 192 mM glycine, 20%(v/v) methanol)에 담근 후, Fig. 3-1과 같이 Hoefer semi-dry system(MA, USA)을 이용하여 45 mA로 1시간 transfer 하였다.

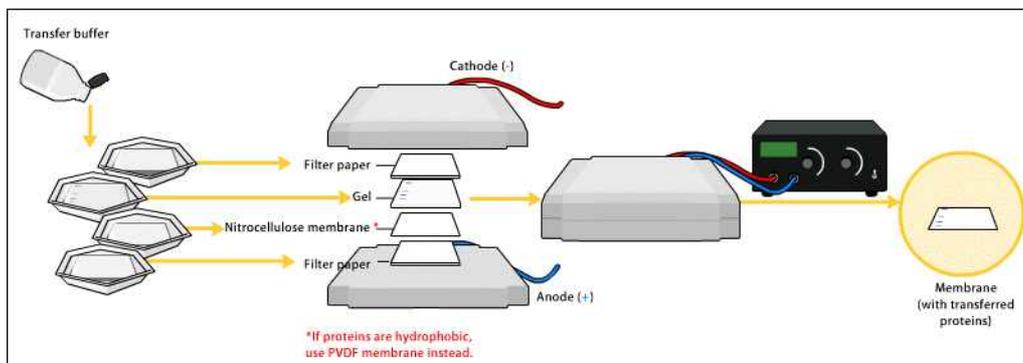


Fig. 3-1. Western blot 수행 시 membrane으로 transfer하는 방법.

Transfer가 끝난 nitrocellulose membrane을 blocking buffer(10% skim milk in 100 mM TBS buffer)에 옮기고, 실온에서 1시간 동안 platform shaker에서 blocking시켰다. Blocking이 끝난 membrane은 blocking buffer에 1,000배 희석한 1차 항체(Ca. No. ab112893, rabbit polyclonal,  $\beta$ -lactoglobulin, abcam, UK) 용액에서 1시간 동안 항체를 부착시켰다. 1시간 뒤 TTBS (0.1% Tween 20 in TBS buffer)로 15분간 4번 shaking하여 membrane을 세척하였다. iBlot<sup>®</sup> Western Detection Kit(Ca. No. CB7410-02, Invitrogen, CA, USA)의 antibody diluent에 2차 항체를 100배 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. Washing buffer를 1배로 희석하여 5분간 3번 세척하고, 증류수를 이용하여 5분간 세척하였다. Chromogenic detection은 세척이 끝난 membrane에 chromogenic substrate 5 mL를 첨가하고 암실에서 band가 나타날 때까지 방치한 후, membrane의 색이 흰색일 때 증류수로 2분간 2번 세척하여 자연건조한 뒤 결과를 확인하였다.

하.  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, lactoferrin의 정량

우유 시료 중에 존재하는 면역단백질을 정량하기 위하여 Bethyl Laboratories사(Montgomery, TX, USA)의 정량 set를 사용하여 측정하였다.  $\alpha$ -Lactalbumin은 Bovine Alpha-Lactalbumin ELISA Quantitation Set(Cat. No. E10-128)을 이용하였고, 96-well microplate에 affinity purified bovine  $\alpha$ -lactalbumin coating antibody를 antibody coating buffer(0.05 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6)에 100배 희석하여 각 well에 100  $\mu$ L씩 분주하여 실온에서 1시간 방치한 후, 반응 후 용액을 제거하였다. 각 well의 세척단계는 ELISA washing solution(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)를 이용하여 200  $\mu$ L씩, 다섯 번 세척을 진행하고, 200  $\mu$ L의 blocking solution(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)을 분주하여 30분간 실온에서 blocking하였다. 상기 방법으로 well을 세척하고, sample/conjugate diluent(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 100,000배 희석한 시료를 100  $\mu$ L씩 분주하고, 실온에서 1시간 반응시켰다. 상기 방법으로 well을 세척하고, HRP conjugated bovine  $\alpha$ -lactalbumin detection antibody를 100,000배로 희석하여 100  $\mu$ L를 분주하여 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 상기 방법으로 세척 후, TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenziden)-One component HPR Microwell Substrate(E102, Bethyl Lab.)을 100  $\mu$ L 분주하고, 암소에서 30분간 발색시킨 후, 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 반응 정지하였다. 반응 정지 후, 2시간 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Table 3-1과 같이 Table준정량곡선은 bovine  $\alpha$ -lactalbumin calibrator를 이용하여 상기 방법 중 시료 대신 희석배수별로 희석한 calibrator로 측정하였다.

Table 3-1. Table준정량곡선을 작성하기 위한  $\alpha$ -lactalbumin의 농도

Standard	ng/mL	Bovine $\alpha$ -lactalbumin calibrator (RC10-128-5)	Sample diluent
Initial	1000	5 $\mu$ L	20 mL
1	50	5 $\mu$ L from initial	500 $\mu$ L
2	25	5 $\mu$ L from standard 1	500 $\mu$ L
3	12.5	5 $\mu$ L from standard 2	500 $\mu$ L
4	6.25	5 $\mu$ L from standard 3	500 $\mu$ L
5	3.125	5 $\mu$ L from standard 4	500 $\mu$ L
6	1.56	5 $\mu$ L from standard 5	500 $\mu$ L
7	0.78	5 $\mu$ L from standard 6	500 $\mu$ L
8	0	Blank	500 $\mu$ L

$\beta$ -Lactoglobulin은 Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin ELISA Quantitation Set(Cat. No. E10-125)을 이용하였고, 96-well microplate에 affinity purified bovine  $\beta$ -lactoglobulin coating antibody를 antibody coating buffer(0.05 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6)에 100배 희석하여 각 well에 100  $\mu$ L씩 분주하여 실온에서 1시간 방치한 후, 반응 후 용액을 제거하였다. 각 well의 세척단계는 ELISA washing solution(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)를 이용하여 200  $\mu$ L씩, 다섯 번 세척을 진행하고, 200  $\mu$ L의 blocking solution(50 mM Tris, 0.14 M

NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)을 분주하여 30분간 실온에서 blocking하였다. 상기 방법으로 well을 세척하고, sample/conjugate diluent(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 50,000배 희석한 시료를 100  $\mu$ L씩 분주하고, 실온에서 1시간 반응시켰다. 상기 방법으로 well을 세척하고, HRP conjugated bovine beta-lactoglobulin detection antibody를 75,000배로 희석하여 100  $\mu$ L를 분주하여 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 상기 방법으로 세척 후, TMB-One component HPR Microwell Substrate(E102, Bethyl Lab.)을 100  $\mu$ L 분주하고, 암소에서 30분간 발색시킨 후, 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 반응 정지하였다. 반응 정지 후, 2시간 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Table 3-2와 같이 Table준정량곡선은 bovine  $\beta$ -lactoglobulin calibrator를 이용하여 상기 방법 중 시료 대신 희석배수별로 희석한 calibrator로 측정하였다.

Table 3-2. Table준정량곡선을 작성하기 위한  $\beta$ -lactoglobulin의 농도

Standard	ng/mL	Bovine $\beta$ -lactoglobulin calibrator (RC10-125-7)	Sample diluent
Initial	250	5 $\mu$ L	20 mL
1	125	500 $\mu$ L from initial	500 $\mu$ L
2	62.5	500 $\mu$ L from standard 1	500 $\mu$ L
3	31.25	500 $\mu$ L from standard 2	500 $\mu$ L
4	15.625	500 $\mu$ L from standard 3	500 $\mu$ L
5	7.8	500 $\mu$ L from standard 4	500 $\mu$ L
6	3.9	500 $\mu$ L from standard 5	500 $\mu$ L
7	1.95	500 $\mu$ L from standard 6	500 $\mu$ L
8	0	Blank	500 $\mu$ L

Lactoferrin은 Bovine Lactoferrin ELISA Quantitation Set(Cat. No. E10-126)을 이용하였고, 96-well microplate에 affinity purified bovine lactoferrin coating antibody를 antibody coating buffer(0.05 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6)에 100배 희석하여 각 well에 100  $\mu$ L씩 분주하여 실온에서 1시간 방치한 후, 반응 후 용액을 제거하였다. 각 well의 세척단계는 ELISA washing solution(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)을 이용하여 200  $\mu$ L씩, 다섯 번 세척을 진행하고, 200  $\mu$ L의 blocking solution(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)를 분주하여 30분간 실온에서 blocking하였다. 상기 방법으로 well을 세척하고, sample/conjugate diluent(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 500배 희석한 시료를 100  $\mu$ L씩 분주하고, 실온에서 1시간 반응시켰다. 상기 방법으로 well을 세척하고, HRP conjugated bovine lactoferrin detection antibody를 200,000배로 희석하여 100  $\mu$ L를 분주하여 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 상기 방법으로 세척 후, TMB-One component HPR Microwell Substrate(E102, Bethyl lab.)을 100  $\mu$ L 분주하고, 암소에서 30분간 발색시킨 후, 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 반응 정지하였다. 반응 정지 후, 2시간 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Table 3-3과 같이 Table준정량곡선은 bovine lactoferrin calibrator를 이용하여 상기 방법 중 시료 대신 희석배수별로 희석한 calibrator로 측정하였다.

Table 3-3. Table준정량곡선을 작성하기 위한 lactoferrin의 농도

Standard	ng/mL	Bovine lactoferrin calibrator (RC10-126-7)	Sample diluent
1	500	5 $\mu$ L	10 mL
2	250	500 $\mu$ L from standard 1	500 $\mu$ L
3	125	500 $\mu$ L from standard 2	500 $\mu$ L
4	62.5	500 $\mu$ L from standard 3	500 $\mu$ L
5	31.25	500 $\mu$ L from standard 4	500 $\mu$ L
6	15.625	500 $\mu$ L from standard 5	500 $\mu$ L
7	7.8	500 $\mu$ L from standard 6	500 $\mu$ L
8	0	Blank	500 $\mu$ L

거. IgG, IgA의 정량

IgG는 Bovine IgG ELISA Kit(Cat. No. E11-118)을 이용하였고, sample을 1× dilution buffer C에 5,000배로 희석하여, IgG가 pre-coating되어 있는 strip에 100  $\mu$ L를 분주한 후, 실온에서 1시간동안 반응시키고 용액을 제거하였다. 각 well의 세척 단계는 1×로 희석한 wash buffer를 이용하여 200  $\mu$ L씩, 네 번 진행한 후, 100  $\mu$ L의 Anti-IgG detection antibody를 분주하여 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 상기 방법으로 세척 후, HRP solution C를 100  $\mu$ L 넣고, 30분간 실온에서 반응시킨 후, 세척하였다. TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenziden)-One component HPR Microwell Substrate(E102, Bethyl Lab.)를 100  $\mu$ L 분주하고, 암소에서 30분간 발색시킨 후, 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 반응 정지하였다. 반응 정지 후, 2시간 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Table준정량곡선은 Bovine IgG standard를 이용하여 상기 방법 중 시료 대신 500 ng의 IgG standard vial에 1× dilution buffer C 1 mL을 넣고 최종 농도가 500 ng/mL가 되도록 한 후, 167, 55.6, 18.5, 6.17, 2.06, 0.69, 0 ng/mL로 순차적으로 희석(1:3)하여 Table준정량곡선을 작성하였다. IgA는 Bovine IgA ELISA Kit(Cat. No. E11-121)을 이용하였고, 시료를 1× dilution buffer C에 5,000배로 희석하여, IgA가 pre-coating되어 있는 strip에 100  $\mu$ L를 분주한 후, 실온에서 1시간동안 반응시키고 용액을 제거하였다. 각 well의 세척 단계는 1×로 희석한 wash buffer를 이용하여 200  $\mu$ L씩, 네 번 세척을 진행한 후, 100  $\mu$ L의 Anti-IgA detection antibody를 분주하여 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 상기 방법으로 세척 후, HRP solution C를 100  $\mu$ L 넣고, 30분간 실온에서 반응시킨 후 세척하였다. TMB(3,3',5,5'-tetramethyl benziden)-One component HPR Microwell Substrate(E102, Bethyl Lab.)을 100  $\mu$ L 분주하고, 암소에서 30분간 발색시킨 후, 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 반응 정지하였다. 반응 정지 후, 2시간 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Table준정량곡선은 Bovine IgG standard를 이용하여 상기 방법 중 시료 대신 1,000 ng의 IgG standard vial에 1× dilution buffer C 1 mL을 넣고 최종 농도가 1,000 ng/mL가 되도록 한 후, 333.3, 111.1, 37, 12.3, 4.1, 1.37, 0 ng/mL로 순차적으로 희석(1:3)하여 Table준정량곡선을 작성하였다.

너. TGF-β1의 정량

TGF-β1은 Invitrogen사(Camarillo, CA, USA)의 ELISA Kit(Cat. No. KAC1688)을 이용하였고, 시료는 300 μL의 Extraction solution과 100 μL의 우유 시료를 1.5 mL polypropylene tube에서 30분간 실온에서 격렬하게 진탕한 후, 1,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 standard diluent buffer로 10배 희석하여 사용하였다(총 희석배수 40배). TGF-β1이 pre-coating되어 있는 strip에 standard diluent buffer 200 μL를 blank로 하여, sample을 200 μL씩 분주하였다. Blank를 제외하고 biotinylated anti-TGF-β1(biotin conjugate)를 50 μL를 넣고, 살짝 tapping하여 3시간동안 실온에서 반응시킨 후, washing buffer를 이용해 400 μL씩 4번 washing하였다. Blank를 제외하고, 100 μL의 streptavidin-HRP를 분주하여 30분간 실온에서 방치하고, washing한 후, stabilized chromogen을 100 μL를 넣어 암소에서 30분간 실온에서 반응시켰다. Stop solution 100 μL로 반응 정지시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Table 3-4와 같이 Table준정량곡선은 TGF-β1 standard를 이용하여 상기 방법 중 시료 대신 희석배수별로 희석한 standard로 측정하였다.

Table 3-4. Table준정량곡선을 작성하기 위한 TGF-β1의 농도

Standard	pg/mL	TGF-β1 standard	Standard diluent Buffer
1	2000	200 μL of 10,000 pg/mL	800 uL
2	1000	500 μL from standard 1	500 μL
3	500	500 μL from standard 2	500 μL
4	250	500 μL from standard 3	500 μL
5	125	500 μL from standard 4	500 μL
6	62.5	500 μL from standard 5	500 μL
7	31.2	500 μL from standard 6	500 μL
8	0	Blank	500 μL

더. 통계분석

모든 실험은 3번 반복하여 평균과 Table준편차를 구하였으며, 얻은 실험값의 통계분석은 Windows용(ver. 9.2) SAS(Statistical Analysis Software, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) program을 이용하였으며 Duncan의 중범위검정( $p=0.05$ )과 IBM SPSS 프로그램(v19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 대응Table본분석을 실시하여 유의차를 분석하였다.

### 3. 연구결과

#### 가. 살균 공정별 유청 단백질의 열변성 특성 검토

우유의 단백질은 casein이 83%, 유청단백질이 17%로 구성되어 있다. Casein은 원유를 pH 4.6으로 조정하면 응고되는 단백질이며,  $\alpha$ s-casein이 55%,  $\beta$ -casein이 21%,  $\kappa$ -casein이 12%,  $\gamma$ -casein이 4% 존재한다. Casein은 비교적 열에 안정하여 100°C까지의 가열에서는 거의 변화가 없고, 125°C 가열에 의해 변성되는 것으로 알려져 있다(Table 3-5).

Table 3-5. 우유 내의 단백질의 양

Component	% Total	% Casein	% Whey	Molecular weight (kDa)
<b>Caseins</b>	83			
Alpha s1 casein	36	44		23.5
Alpha s2 casein	9	11		25.2
Beta casein	21	25		24
Kappa casein	12	14		19
Gamma casein	4	5		20
<b>Whey</b>	17			
Beta-lactoglobulin	10		58	18.3
Alpha-lactalbumin	2		13	14.1
Immunoglobulins	2		12	20-25, 50-70
Serum albumin	1		6	69
Minor proteins	2		12	

(J. Dairy Sci., 68: 2195-2205, 1985)

유청 단백질은 우유에서 casein을 제외한 것을 말하며 60°C 이상 가열에 의해 변성된다. 여기에 속하는 단백질로서  $\beta$ -lactoglobulin이 우유 전체의 10%,  $\alpha$ -lactalbumin이 우유 전체의 2%, immunoglobulin이 우유 전체의 2%, bovine serum albumin이 우유 전체의 1%, proteose-peptone fraction이 우유 전체의 2%를 차지한다.  $\alpha$ -Lactalbumin은 123개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 14 kDa으로 함황 아미노산을 포함하며 분자 간 이황화 결합의 형성에 관여하고 계란의 lysozyme과 유사하며, 4개의 이황화결합으로 열변성에 저항성을 나타낸다(Ruegg et al., 1977).  $\alpha$ -Lactalbumin은 또한 금속 결합 단백질로서 칼슘 이온이  $\alpha$ -lactalbumin에 강하게 결합되어 있는 holo-form과 칼슘 이온이 결합되어 있지 않은 apo-form으로 구분된다(Hiraoka et al., 1980).  $\beta$ -Lactoglobulin은 162개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 18.3 kDa이다. 이 단백질은 2개의 내부사슬로 된 이황화 화합물과 1개의 thiol기를 함유하며, 상호반응은 pH와 온도에 의존적이다. 산에 상당히 안정하여 pH 2.0에서도 잘 변성되지 않으나, 다른 조건에서 고온으로 가공 또는 저장하는 동안 분자 간 공유 이황화 결합의 형성에 의해 단백질의 중합을 촉진시킨다고 알려져 있다(Hoffmann & van Mil, 1997).  $\beta$ -Lactoglobulin

은 유청 단백질의 58% 정도를 차지하며 열에 민감하기 때문에 우유의 가열 변화에 가장 중요한 역할을 한다(Wong et al., 1996). 또한 casein은 우유의 정상적인 살균처리 또는 UHT 처리에 의해서 화학적 변화를 별로 받지 않으나 유청 단백질은 casein에 비해 인을 함유하고 있지 않으며 proline 함량이 낮고 cysteine과 methionine 함량이 높아 열변성을 받기 쉬운 특징이 있고 가열에 의해 그 구조의 규칙성이 다양하게 변화된다(Renner, 1988).

#### (1) 시차주사열량계를 이용한 단백질의 열변성 측정

우유 중에 존재하는 단백질의 열 변성은 SDS-PAGE, HPLC, 시차주사열량계(differential scanning calorimetry, DSC) 등에 의해 측정할 수 있다.

시차주사열량계는 시료와 기준물질의 온도를 프로그램에 의하여 일정한 속도로 변화시키면서 둘 사이의 온도차를 zero로 유지하기 위하여 필요한 에너지(enthalpy)의 양을 측정하여 열의 흐름을 온도의 함수로 나타내어 얻어진 피크의 위치, 모양 및 수로부터 시료의 정성적인 분석과 또한 시료 변성 시 피크의 넓이 변화로부터 시료의 열에 대한 엔탈피 변화 등에 대한 변수들을 정량적으로 측정할 수 있는 분석법으로, 단백질 변성의 정량적 정보를 획득하는데 유용한 기술이다(Boye & Alli, 2000, McPhil & Holt, 1999, John & Shastri, 1998).

원유와 원유를 50°C, 65°C에서 PEF 처리한 시료를 시차주사열량계로 분석한 결과 Fig. 3-2와 같이 PEF 처리를 하지 않은 원유의 열변성 정점 온도(denaturation temperature, Td)는 79.65°C와 114.54°C로 나타났고(A), 50°C에서 PEF 처리를 한 원유의 Td 값은 80.88°C, 104.89°C로 계산되었으며(B), 65°C에서 PEF 처리를 한 원유의 Td 값(C)은 80.34°C, 109.45°C로 계산되었다. PEF 처리를 하지 않은 원유와 PEF 처리한 원유의 Td 값이 큰 차이를 나타내지 않았는데 이는 PEF 처리가 원유 내에 존재하는 단백질들의 구조 변화 또는 열변성 특성에 크게 영향을 주지 않음을 의미한다.

Fig. 3-3에는 탈지유와 탈지유를 50°C, 65°C에서 PEF 처리한 시료를 시차주사열량계로 분석한 결과이다. 탈지유의 Td 값은 87.66°C(A), 50°C와 65°C에서 PEF 처리를 한 탈지유의 Td 값은 각각 88.89°C(B), 97.18°C(C)로 계산되어 50°C에서의 PEF 처리는 탈지유에 존재하는 단백질의 Td 값에 영향을 미치지 못하였으나 65°C에서 PEF 처리한 우유의 Td 값은 약 10°C 가까이 증가하여 탈지유에 존재하는 단백질의 구조에 미약하지만 약간의 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

한편 HTST 살균 우유와 50°C, 65°C에서 PEF 처리한 HTST 살균 우유를 시차주사열량계로 분석한 결과, Fig. 3-4과 같이 HTST 살균 우유의 Td 값은 107.98°C(A)로 계산되었고, 50°C와 65°C에서 PEF 처리를 한 HTST 살균 우유의 Td 값은 각각 107.78°C(B)와 108.20°C(C)로 계산되어, HTST 살균 우유도 원유와 같이 PEF 처리에 의해 단백질의 구조가 거의 변화하지 않는 것으로 확인되었다.

또한 LTLT 살균 우유와 50°C, 65°C에서 PEF 처리한 LTLT 살균 우유를 시차주사열량계로

분석한 결과, Fig. 3-5와 같이 LTLT 살균 우유의 Td 값은 108.24°C(A)로 계산되었고, 50°C와 65°C에서 PEF 처리를 한 LTLT 살균 우유의 Td 값은 각각 110.48°C(B)와 106.40°C(C)로 계산되어, LTLT 살균 우유도 PEF 처리가 우유 내에 존재하는 단백질의 구조를 변화시키지 않는 것으로 확인되었다.

한편 원유와 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유의 Td값을 비교하였을 경우, 원유와 원유 이외의 우유와는 Td의 개수에 차이가 나타났는데 이는 탈지유의 경우 우유에 존재하는 지방을 제거하여 지방과 단백질과의 상호작용 및 열전달에 영향을 받았기 때문일 것으로 사료되고, HTST 우유와 LTLT 우유 및 UHT 우유의 Td 값이 열처리를 하지 않은 원유나 탈지유의 Td 값과 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 Fig. 3-6에 나타난 바와 같이 Td 값이 108.08°C로 HTST 우유, LTLT 우유의 Td 값과 유사한 값을 나타내었으며, Table 3-6에 각 우유 시료의 Td 값을 정리하였다.

Lee & Hong(2002)은 holo- $\alpha$ -lactalbumin, apo- $\alpha$ -lactalbumin, holo- $\alpha$ -lactalbumin과 apo- $\alpha$ -lactalbumin의 혼합물의 열변성을 DSC로 측정한 결과 holo- $\alpha$ -lactalbumin의 Td는 92.98°C, apo- $\alpha$ -lactalbumin의 Td는 54.43°C였으며, 이들 혼합물의 Td는 각각 74.29°C와 89.52°C를 나타내었다고 보고하였다. 이들의 결과는 holo- $\alpha$ -lactalbumin의 Td는 64.3°C, apo- $\alpha$ -lactalbumin의 Td는 35.0°C였다는 Boye & Alli(2000)의 연구결과와 비교하였을 때 Td에서는 다소 차이가 있었으나 holo- $\alpha$ -lactalbumin의 Td가 apo- $\alpha$ -lactalbumin의 Td보다 높은 경향은 유사하였다. 이러한 Td의 차이는 실험에 사용된 시료의 농도와 측정기기의 종류 및 측정 조건 등이 기인하는 것으로 사료된다(Lee & Hong, 2002). Holo- $\alpha$ -lactalbumin의 Td가 apo- $\alpha$ -lactalbumin의 Td보다 2배 가까이 높아 열 변성에 저항성이 있음을 보여주고 있는데, 이는 Holo- $\alpha$ -lactalbumin에  $Ca^{2+}$  이온이 결합되어 3차구조의 열안정성을 증진시키기 때문이라고 보고된 바 있다(Relkin, 1996, Parris et al., 1991). 또한 Lee & Hong(2002)은 holo- $\alpha$ -lactalbumin과 apo- $\alpha$ -lactalbumin의 혼합물에 대한 Td를 측정한 결과, apo- $\alpha$ -lactalbumin은 단독으로 열처리했을 때 보다 Td가 약 20°C 상승하였고, holo- $\alpha$ -lactalbumin은 약 3°C 가량 저하되었는데, 이는 apo- $\alpha$ -lactalbumin이 열에 더 안정한 holo- $\alpha$ -lactalbumin의 영향을 받아 Td가 더 상승하면서 열에 조금 더 안정한 상태가 된 것이라고 설명하였으며, apo- $\alpha$ -lactalbumin이 holo- $\alpha$ -lactalbumin보다 열처리 시 더 불안정하고 열에 의한 영향을 더 많이 받는다고 판단하였다.

deWit & Swinkel(1980)은  $\beta$ -lactoglobulin의 열변성임계온도(critical temperature)는 70°C라고 보고하였고 Lee & Hong(2002)은  $\beta$ -lactoglobulin의 Td가 91.9°C이며,  $\alpha$ -lactalbumin과 혼합되었을 때  $\alpha$ -lactalbumin의 열변성에 영향을 주고 열에 더 불안정하게 된다고 보고하였다. pH에 의존적인  $\beta$ -lactoglobulin은 산성 조건에서 열에 매우 안정하지만, pH 7에서는 51°C에서부터 변화가 일어나고 pH 9에서는 47°C에서부터 열에 의한 변성이 시작된다고 알려져 있다(Boye & Alli, 2000).

Park & Lund(1984)는 DSC를 이용하여  $\beta$ -lactoglobulin의 열안정성을 측정하였는데, pH 4.0이나 9.0보다 5.0부터 8.0까지에서 열에 의한 변성이 더욱 심하며, lactose에 의해 열변성 정도가

감소한다고 보고하였다. Antoine & 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  $\beta$ -lactoglobulin의 Td 값은 81.9°C로 계산되었으며,  $\alpha$ -lactalbumin의 Td 값은 pH에 상관없이 61.5°C에서 58.6°C로  $\beta$ -lactoglobulin보다 낮았다고 보고하였다.

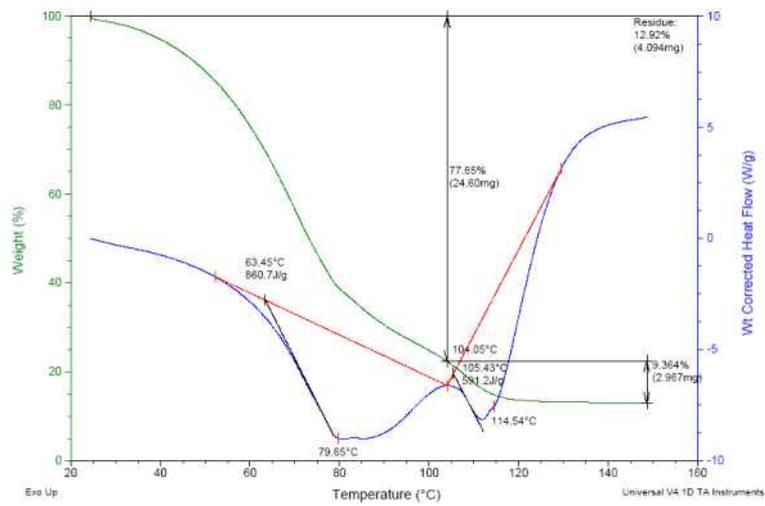
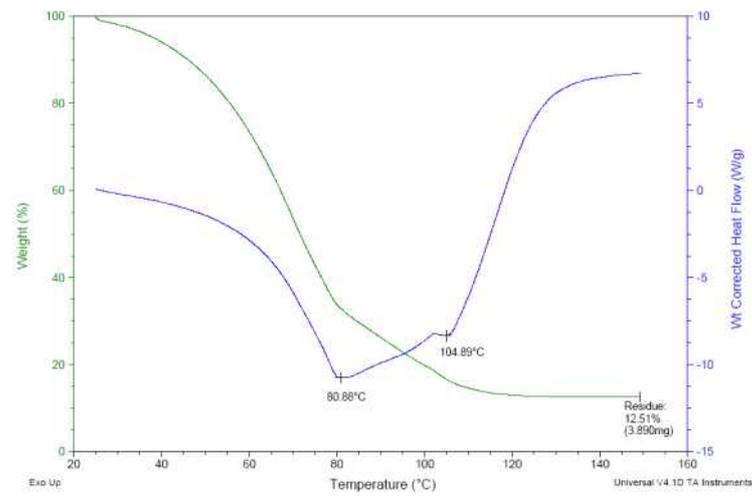
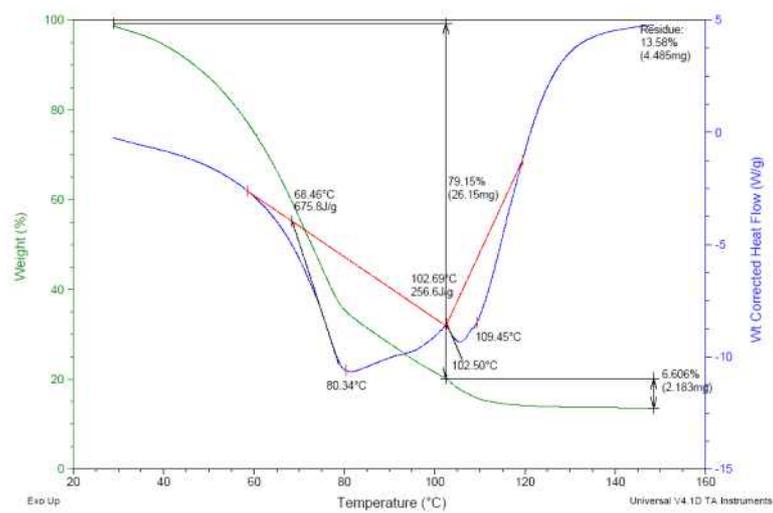
**A****B****C**

Fig. 3-2. 원유의 PEF 처리시 DSC thermogram.

A, raw milk; B, raw milk treated with PEF at 50°C; C, raw milk treated with PEF at 65°C.

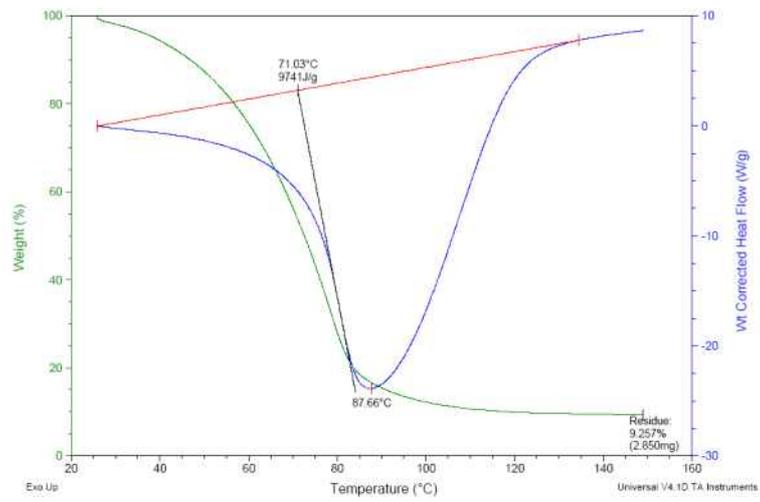
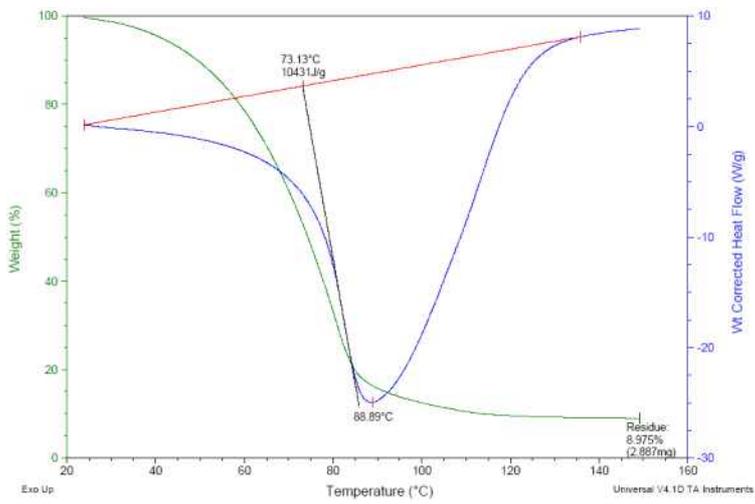
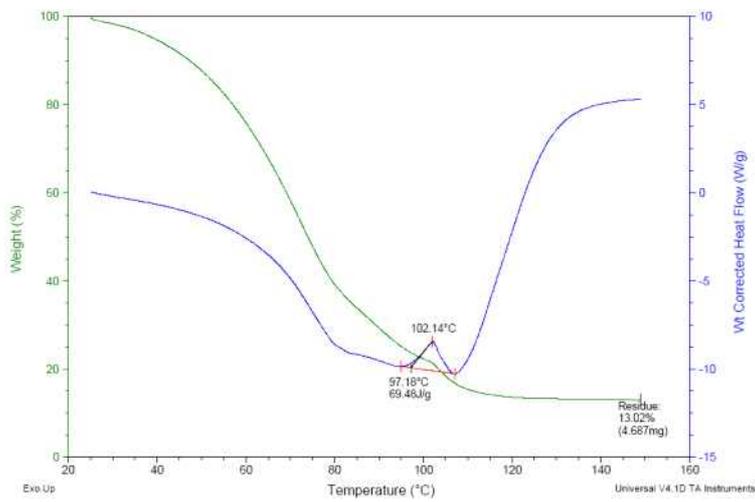
**A****B****C**

Fig. 3-3. 탈지유의 PEF 처리시 DSC thermogram.

A, skim milk; B, skim milk treated with PEF at 50°C; C, skim milk treated with PEF at 65°C.

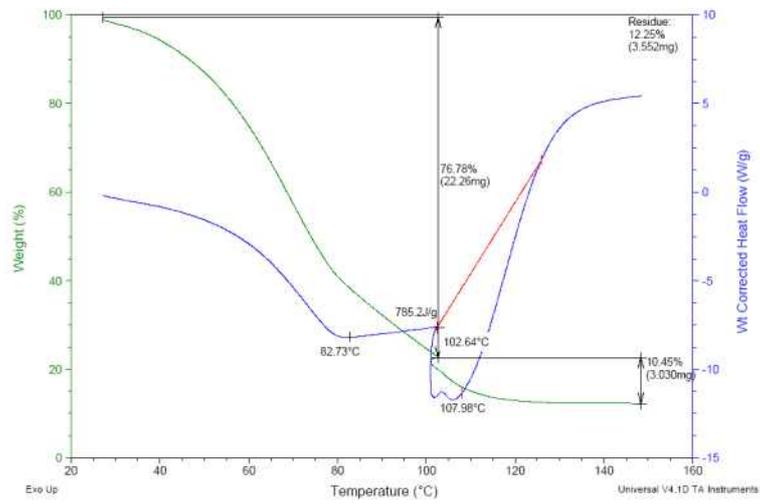
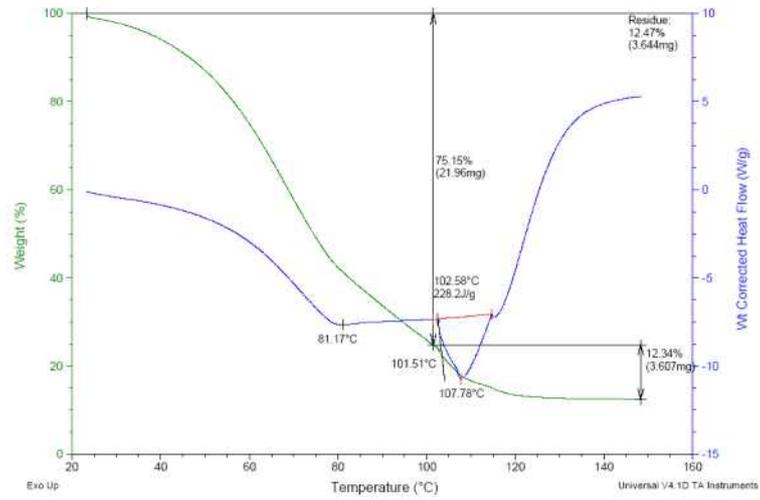
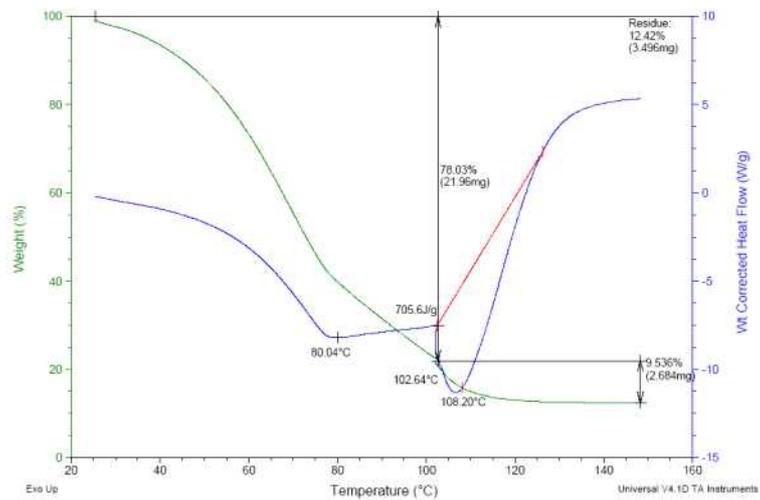
**A****B****C**

Fig. 3-4. HTST 살균 우유의 PEF 처리시 DSC thermogram.

A, HTST milk; B, HTST milk treated with PEF at 50°C; C, HTST milk treated with PEF at 65°C.

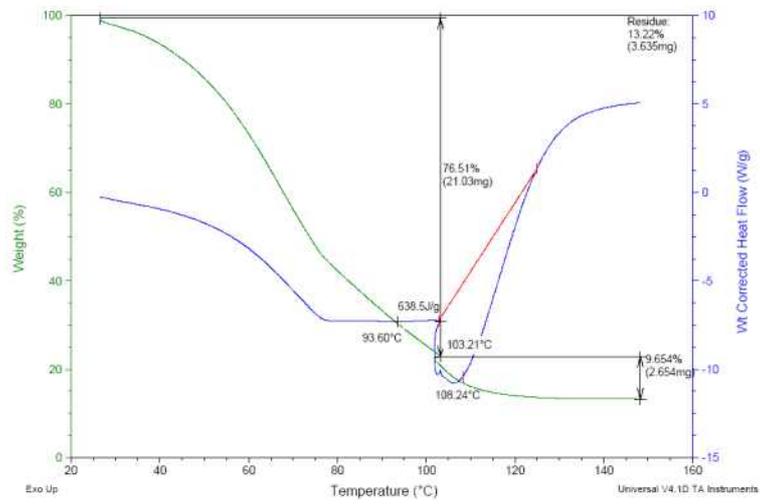
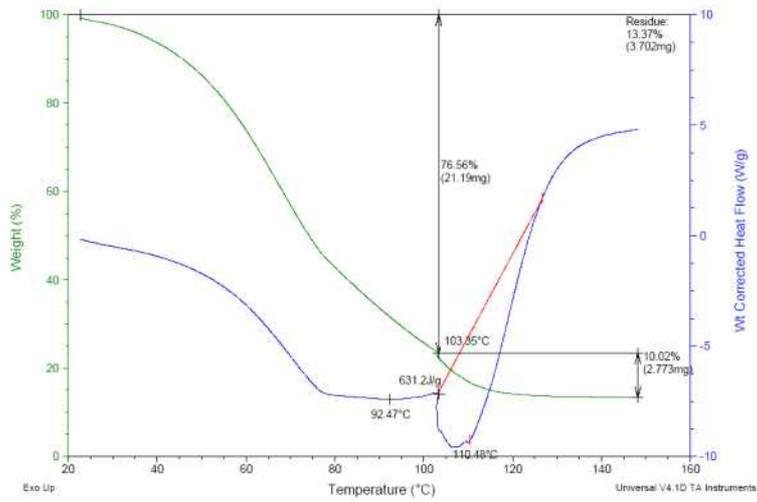
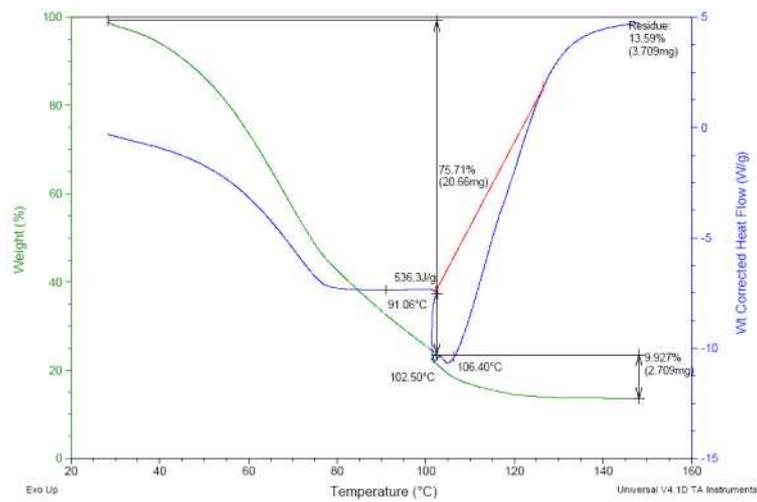
**A****B****C**

Fig. 3-5. LTLT 살균 우유의 PEF 처리시 DSC thermogram.

A, LTLT milk; B, LTLT milk treated with PEF at 50°C; C, LTLT milk treated with PEF at 65°C.

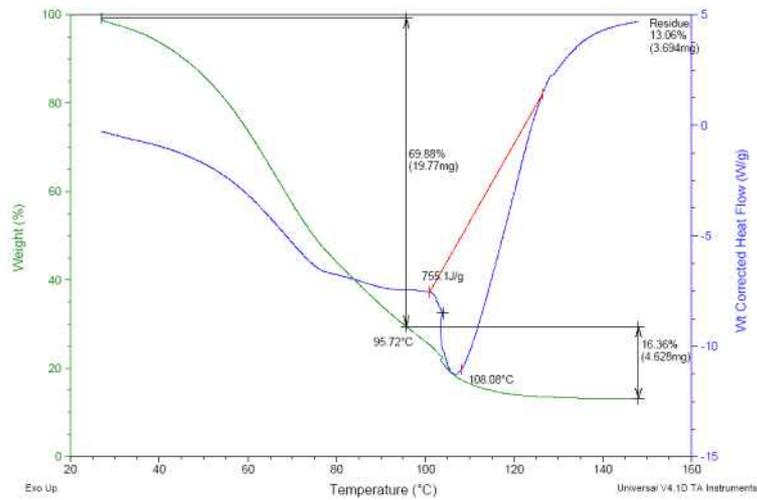


Fig. 3-6. UHT 살균 우유의 PEF 처리시 DSC thermogram.

Table 3-6. PEF를 처리한 우유 내의 단백질의 변성 온도

Milk type	Denaturation temperature (°C)
Raw milk	
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
Skim milk	
untreated	87.66
treated with PEF at 50°C	88.89
treated with PEF at 65°C	97.18
HTST milk	
untreated	107.98
treated with PEF at 50°C	107.78
treated with PEF at 65°C	108.20
LTLT milk	
untreated	108.24
treated with PEF at 50°C	110.48
treated with PEF at 65°C	106.40
UHT milk	108.08

## (2) SDS-PAGE를 이용한 단백질의 열변성 측정

단백질의 열변성 여부를 측정할 수 있는 방법 중의 하나로 SDS-PAGE를 이용할 수 있다. 우유 시료를 가열처리 시 열에 의한 단백질의 변성이 발생되면 해당 단백질은 3차 구조가 파괴됨에 따라 응집 침전되어 SDS-PAGE 상에서 band로 나타나지 않게 된다. Fig. 3-7은 대표적인 우유 단백질인  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein과 유청 단백질인  $\alpha$ -lactalbumin과  $\beta$ -lactoglobulin의 Table준물질을 SDS-PAGE를 실시하여 나타내었다.

Fig. 3-8의 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 J program을 이용하여 densitogram화한 것이며, 각 단백질 band들의 intensity를 수치화한 것을 panel C에 나타내었다. SDS-PAGE 상에서 분자량 30 kDa 주변에서 major band로 나타나는 단백질들은  $\alpha$ -casein과  $\beta$ -casein이며, 19 kDa의 단백질 band는  $\gamma$ -casein,  $\kappa$ -casein,  $\beta$ -lactoglobulin이 겹쳐 나타나는 것으로 판단된다. 또한  $\alpha$ -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. SDS-PAGE 상의 단백질 band들에 대한 intensity를 densitography를 통하여 수치화한 결과 panel C에 나타낸 바와 같이 모든 단백질 band들의 intensity가 PEF 처리 여부와 관계없이 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. 이 결과로서 원유에 50°C 또는 65°C로 PEF 처리를 할 경우 단백질의 열변성은 나타나지 않음을 확인하였다.

Fig. 3-9에는 탈지유와 50°C와 65°C에서 각각 PEF 처리를 한 탈지유에 대한 SDS-PAGE 결과를 나타내었는데, 원유에서와 같이 PEF 처리에 의해 단백질의 열변성은 발생하지 않는 것이 확인되었다.

Fig. 3-10에는 HTST 우유와 50°C와 65°C에서 각각 PEF 처리를 한 HTST 우유에 대한 SDS-PAGE 결과를 나타내었는데, 원유나 탈지유와 유사하게 SDS-PAGE 상에서 나타난 단백질들의 intensity가 PEF에 의한 영향을 받지 않았다. 이 결과로 HTST 우유에 존재하는 단백질들은 PEF 처리에 의해 열변성이 발생하지 않음을 알 수 있었다. SDS-PAGE 상에서 50°C에서 PEF 처리한 시료의 경우  $\beta$ -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. 3-11에는 LTLT 우유와 50°C와 65°C에서 각각 PEF 처리를 한 LTLT 우유에 대한 SDS-PAGE 결과를 나타내었는데, 원유나 탈지유와 유사하게 SDS-PAGE 상에서 나타난 단백질들의 intensity가 PEF에 의한 영향을 받지 않았다. 이 결과로 LTLT 우유에 존재하는 단백질들은 PEF 처리에 의해 열변성이 발생하지 않음을 알 수 있었다.

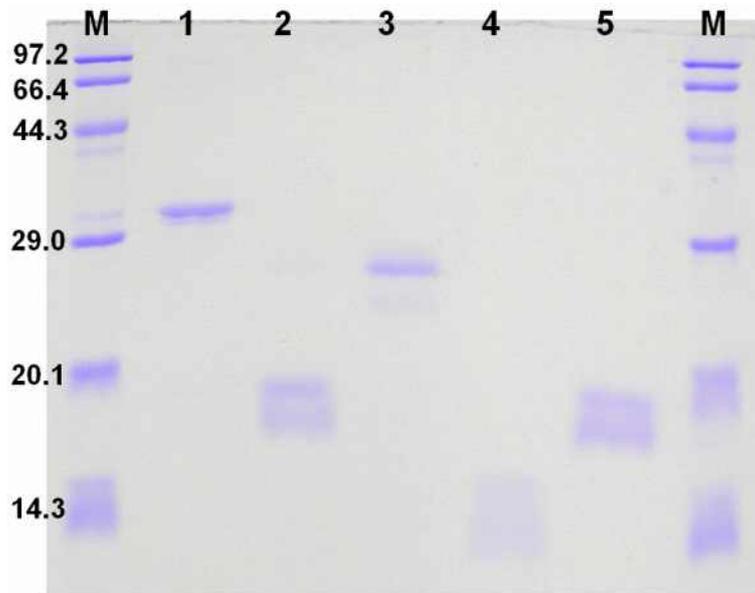
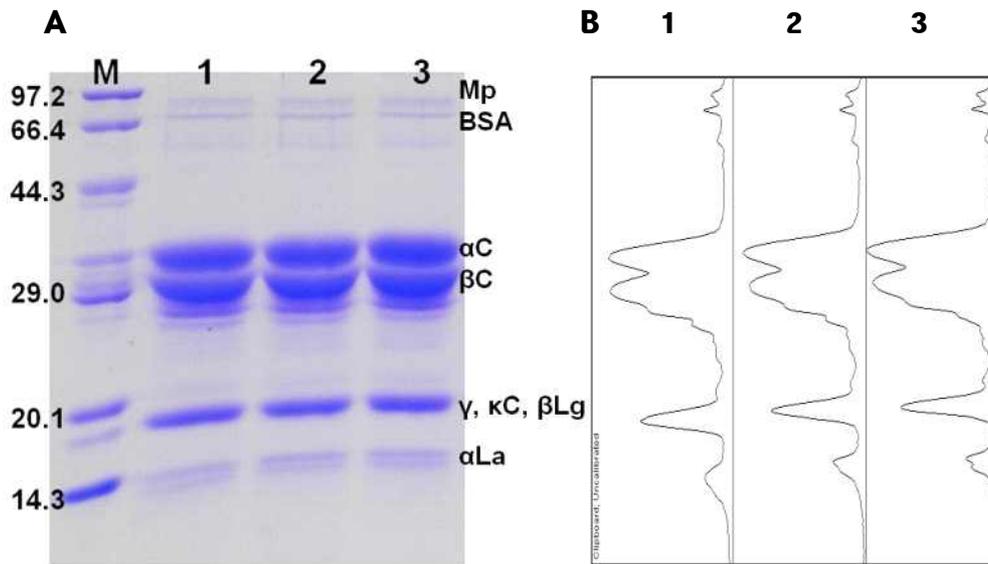


Fig. 3-7. Table준 우유 단백질의 SDS-PAGE 결과.

Lane M, molecular weight marker; 1,  $\alpha$ -casein; 2,  $\beta$ -casein; 3,  $\kappa$ -casein; 4,  $\alpha$ -lactalbumin; 5,  $\beta$ -lactoglobulin.



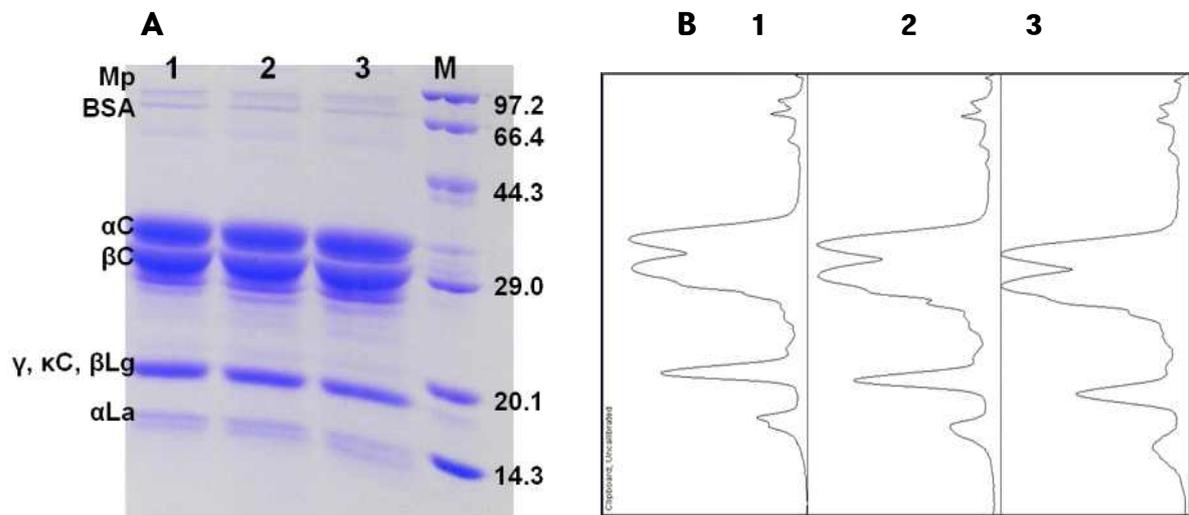
**C**

Raw milk	$\alpha$ -Lactalbumin	$\beta$ -Lactoglobulin & $\gamma$ , $\kappa$ -Casein	$\alpha$ -Casein & $\beta$ -Casein	BSA	Minor proteins
Untreated	896 <sup>1)</sup>	3,228	15,060	120	67
Treated with PEF at 50°C	866	3,099	14,730	143	101
Treated with PEF at 65°C	898	3,172	15,880	109	112

<sup>1)</sup>Relative density of protein band stained within Coomassie brilliant blue R-250.

Fig. 3-8. PEF 처리한 원유의 SDS-PAGE 분석결과.

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. Panel C. Relative amount of milk proteins.



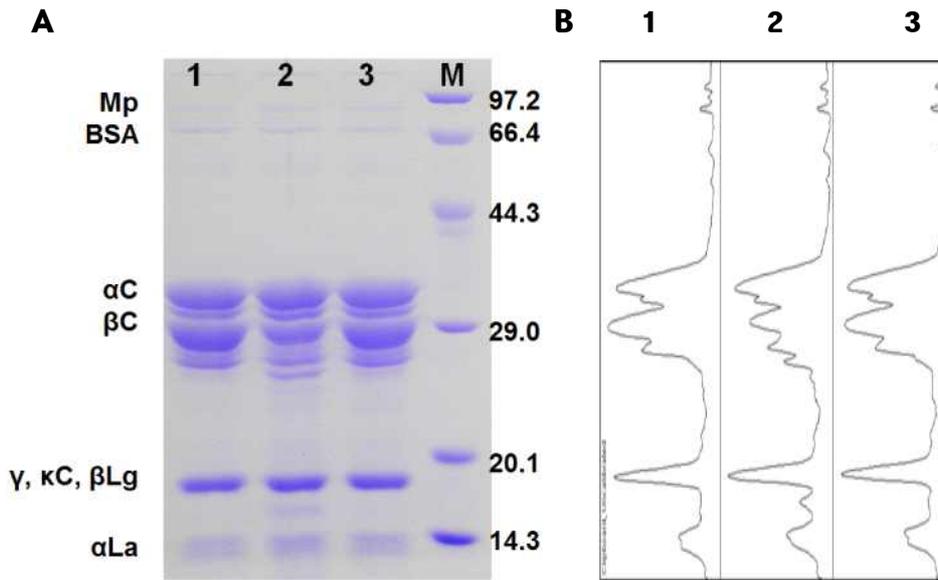
**C**

Skim milk	$\alpha$ -Lactalbumin	$\beta$ -Lactoglobulin & $\gamma$ , $\kappa$ -Casein	$\alpha$ -Casein & $\beta$ -Casein	BSA	Minor proteins
Untreated	1,048 <sup>1)</sup>	3,778	17,180	137	104
Treated with PEF at 50°C	1,116	3,826	18,080	162	99
Treated with PEF at 65°C	1,028	3,463	18,770	103	77

<sup>1)</sup>Relative density of protein band stained within Coomassie brilliant blue R-250.

Fig. 3-9. PEF 처리한 탈지유의 SDS-PAGE 분석결과.

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. Panel C. Relative amount of milk proteins.



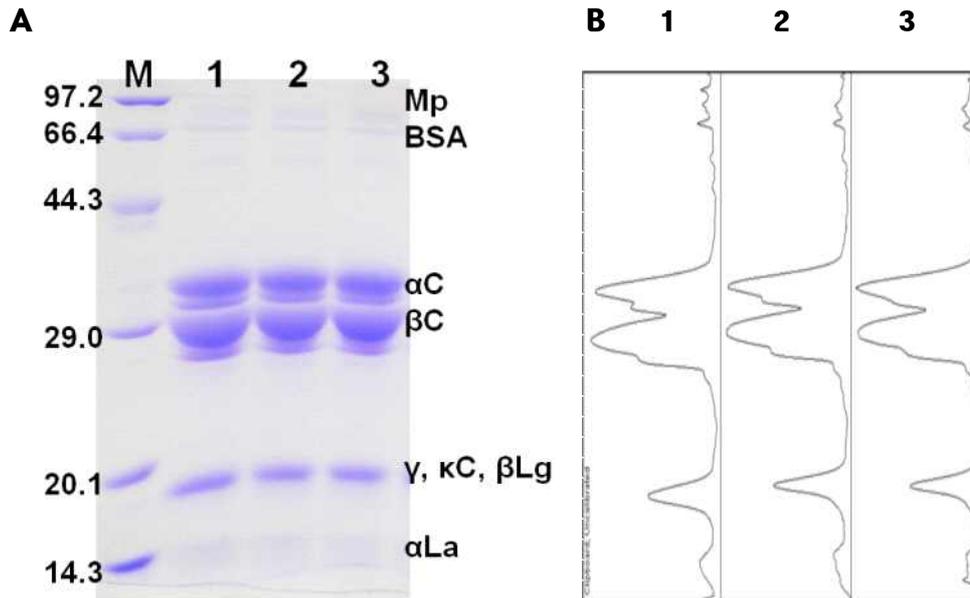
**C**

HTST milk	$\alpha$ -Lactalbumin	$\beta$ -Lactoglobulin & $\gamma$ , $\kappa$ -Casein	$\alpha$ -Casein & $\beta$ -Casein	BSA	Minor proteins
Untreated	2,080 <sup>1)</sup>	3,524	15,216	140	36
Treated with PEF at 50°C	2,190	3,524	13,077	123	22
Treated with PEF at 65°C	2,294	3,839	15,233	136	27

<sup>1)</sup>Relative density of protein band stained within Coomassie brilliant blue R-250.

Fig. 3-10. PEF 처리한 HTST 우유의 SDS-PAGE 분석결과.

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. Panel C. Relative amount of milk proteins.



**C**

LTLT milk	$\alpha$ -Lactalbumin	$\beta$ -Lactoglobulin & $\gamma$ , $\kappa$ -Casein	$\alpha$ -Casein & $\beta$ -Casein	BSA	Minor proteins
Untreated	574 <sup>1)</sup>	2,786	16,747	98	77
Treated with PEF at 50°C	410	2,540	16,074	66	105
Treated with PEF at 65°C	448	2,297	15,874	83	221

<sup>1)</sup>Relative density of protein band stained within Coomassie brilliant blue R-250.

Fig. 3-11. PEF 처리한 LTLT 우유의 SDS-PAGE 분석결과.

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. Panel C. Relative amount of milk proteins.

### (3) HPLC를 이용한 단백질의 열변성 측정

우유 내의 casein이나 유청단백질은 reversed phase HPLC에 의해 검출이 가능하므로 가열살균에 의한 우유 단백질의 열변성 정도를 RP-HPLC로 측정하였다.

Fig. 3-12에서 Fig. 3-16에 원유, 탈지유, HTST 우유 및 LTLT 우유와 이들 우유를 50°C와 65°C에서 각각 PEF 처리를 한 시료와 UHT 우유에 대한 HPLC chromatogram을 나타내었으며 Fig. 3-17에는 각 HPLC chromatogram의 단백질 peak의 면적으로부터 계산한 우유 단백질의 농도를 나타내었다. Fig. 3-12에서 3-16의 HPLC chromatogram에서  $\kappa$ -casein,  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\beta$ -lactoglobulin은 각각 17.4, 20.8, 22.1, 25.4분의 retention time을 나타내었다. Fig. 3-17의 panel A에는 원유와 PEF 처리한 원유에서의 각 주요 단백질의 농도를 나타내었는데  $\alpha$ -casein과  $\beta$ -lactoglobulin은 50°C 또는 65°C의 PEF 처리에 의해 단백질 농도가 40% 이상 감소하는 것으로 나타난 반면,  $\kappa$ -casein과  $\beta$ -casein은 변화가 거의 없는 것을 확인하였다. Panel B에는 HTST 우유와 PEF 처리한 HTST 우유에서의 각 주요 단백질의 농도를 나타내었는데 원유와는 달리  $\alpha$ -casein만이 50% 수준의 감소를 나타내었고 다른 단백질의 농도는 감소하지 않았다. LTLT 우유와 PEF 처리한 LTLT 우유의 주요 단백질의 농도는 panel C에 나타내었는데 PEF에 의해 단백질의 감소 현상이 관찰되지 않았다. 한편 UHT 살균에 의해서는 열에 민감한  $\beta$ -lactoglobulin이 관찰되지 않아 가열에 의해 변성되어 소실된 것으로 판단되었다.

Parris & Baginski(1991)은 RP-HPLC를 이용하여 탈지유의 열변성을 조사한 결과 유청 단백질의 변성은 약 40°C에서 개시되어 70°C에서 가속화되며 85°C에서 95%가 변성된다고 보고하였다. Kim et al.(1992)은 undenatured whey protein nitrogen(UWPN) 함량을 측정함으로써 살균방법에 따른 유청 단백질의 변성율을 계산하였는데, LTLT 우유는 9.5%, HTST 우유는 17.1%, UHT는 95%가 변성되었다고 보고하였다. 살균방법에 따른 유청 단백질의 변성율은 연구자에 따라 상이하게 보고되었는데, LTLT 우유의 경우 Ushikawa(1984)는 12-20%, Renner(1988)는 약 20% 변성되었다고 보고하였다. HTST 우유의 경우에는 Ushikawa(1984)는 0.4-4%, Manji & Kakuda(1987)는 30-40% 변성되었다고 하였으며, UHT 우유의 경우에도 Ushikawa는 130°C에서 2초 가열에 62.1%가 변성되었다고 보고하였다.

유청 단백질의 가열에 의한 열변성은 가열온도와 가열 시간에 따라 다르지만 유청 단백질의 열변성에 결정적인 영향을 미치는 것은 가열온도이며, 그중에서도 우유에 가해진 최고온도의 영향이 가장 크다고 보고된 바 있다(Lyster, 1970; Hiller & Lyster, 1979).

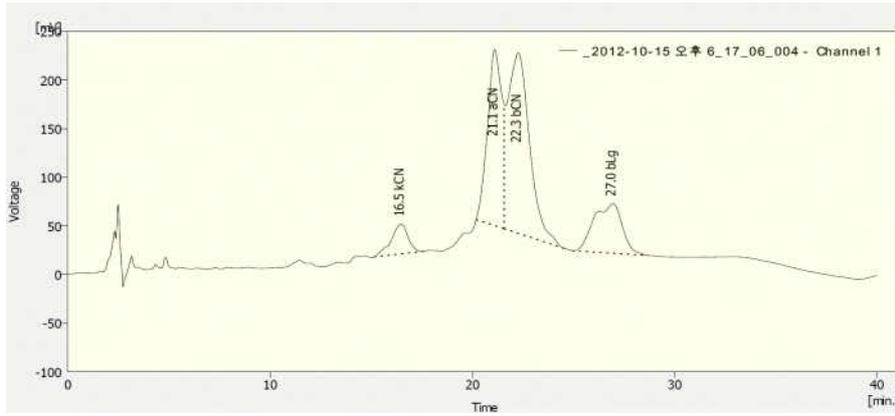
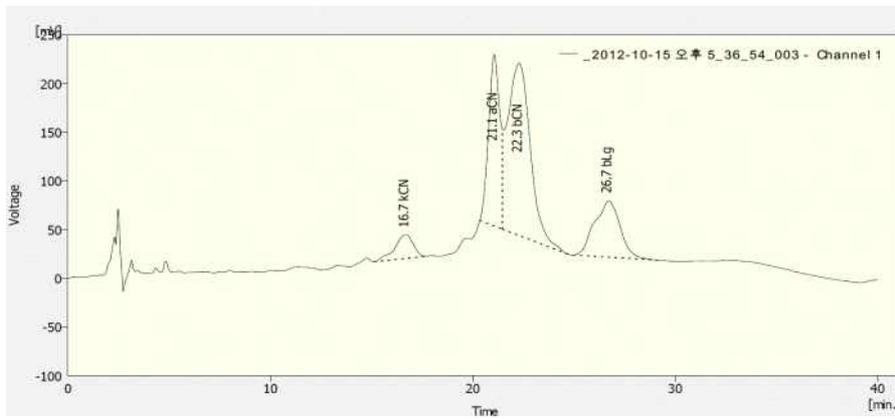
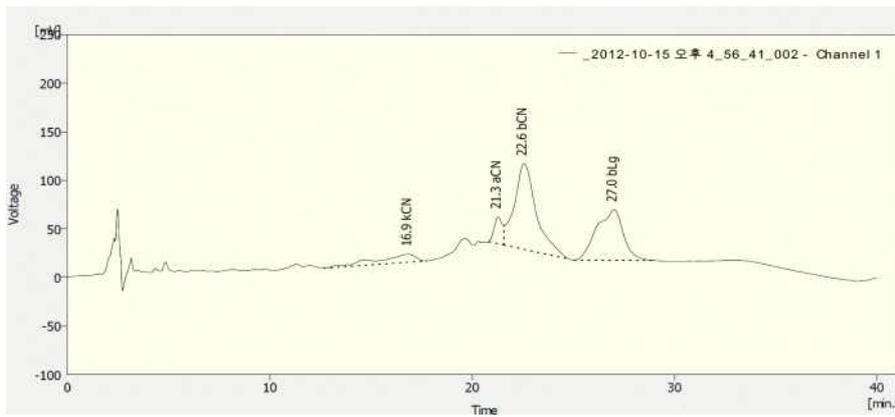
**A****B****C**

Fig. 3-12. PEF처리한 원유의 HPLC 크로마토그램.

A, untreated; B, treated with PEF at 50°C; C, treated with PEF at 65°C.

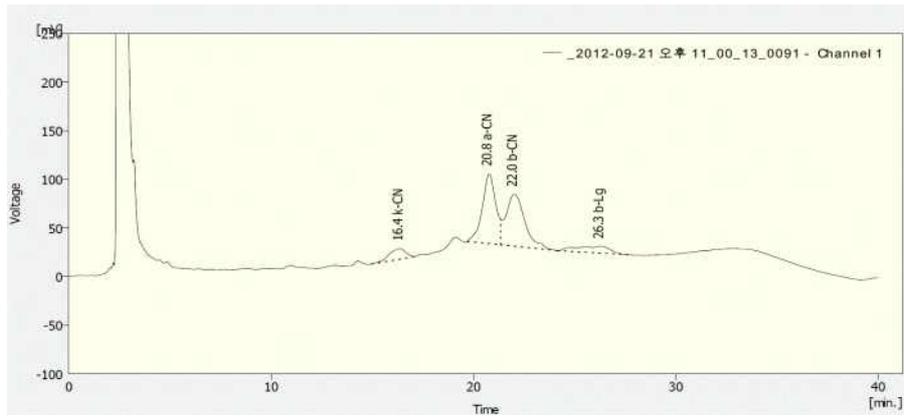
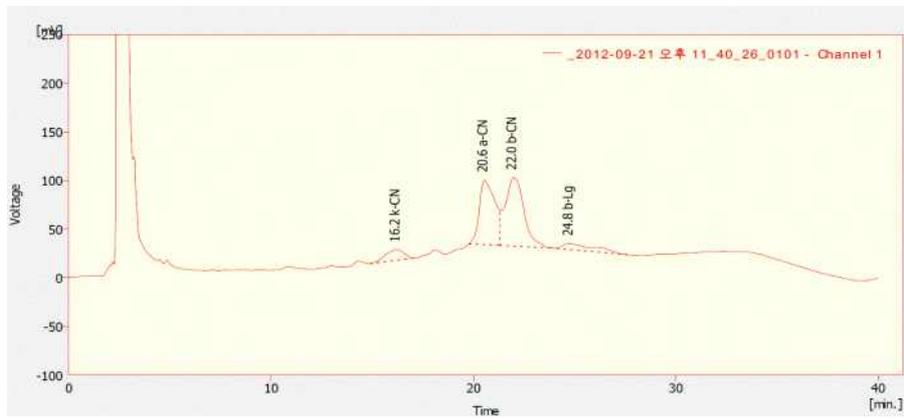
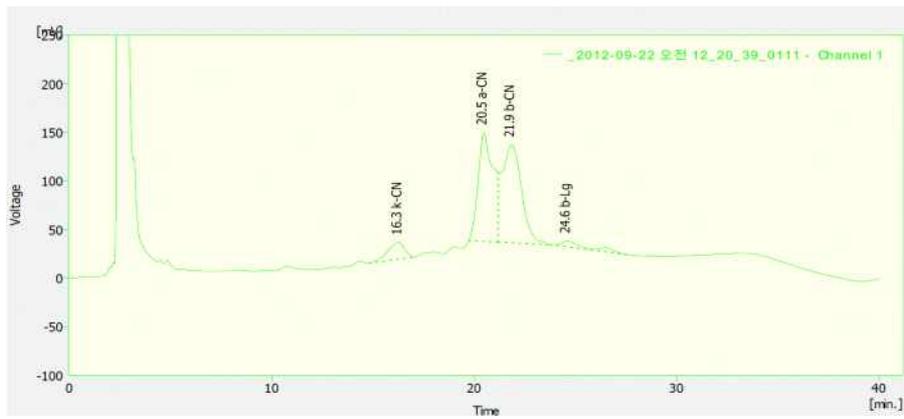
**A****B****C**

Fig. 3-13. PEF처리한 탈지유의 HPLC 크로마토그램.

A, untreated; B, treated with PEF at 50°C; C, treated with PEF at 65°C.

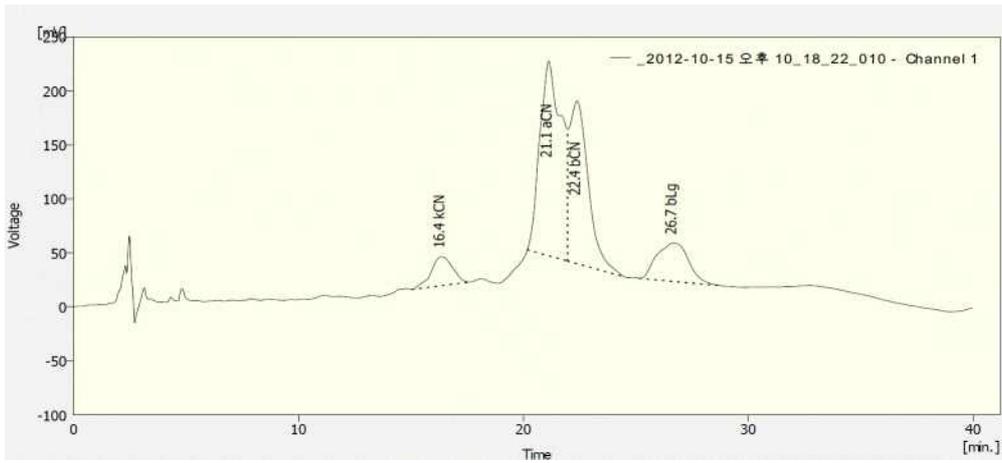
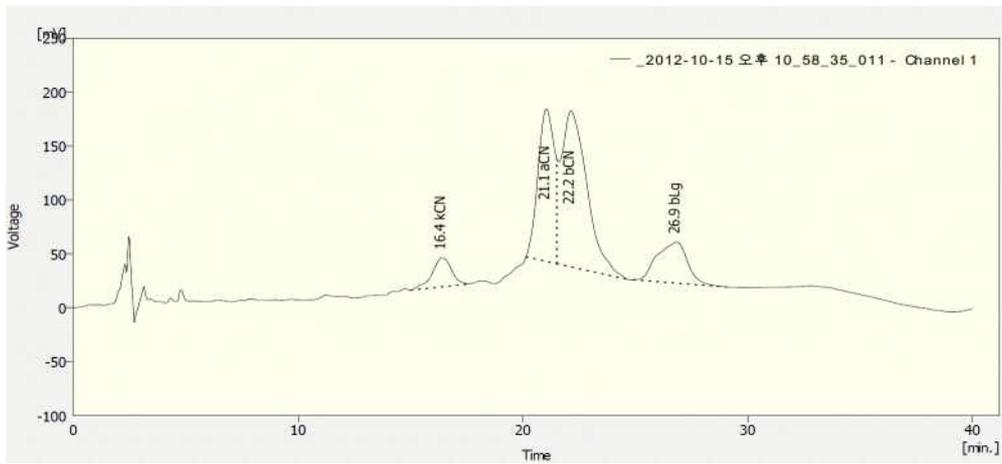
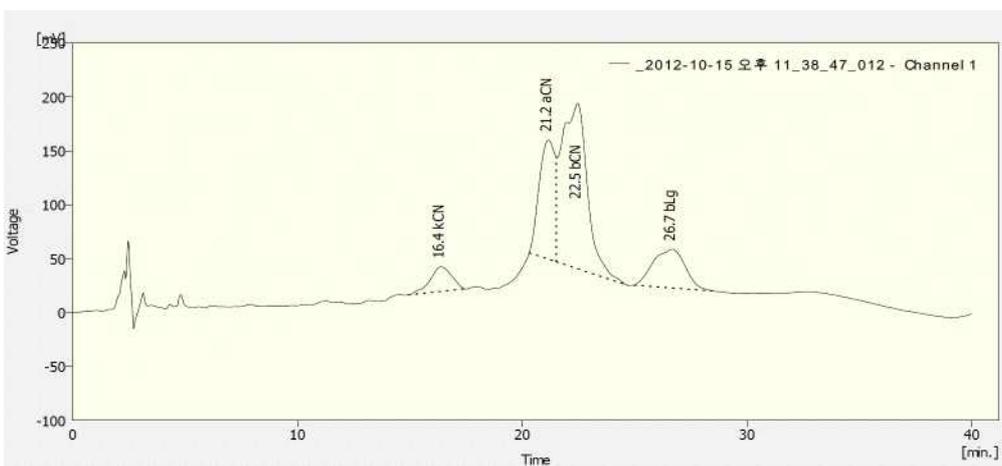
**A****B****C**

Fig. 3-14. PEF처리한 HTST 우유의 HPLC 크로마토그램.  
A, untreated; B, treated with PEF at 50°C; C, treated with PEF at 65°C.

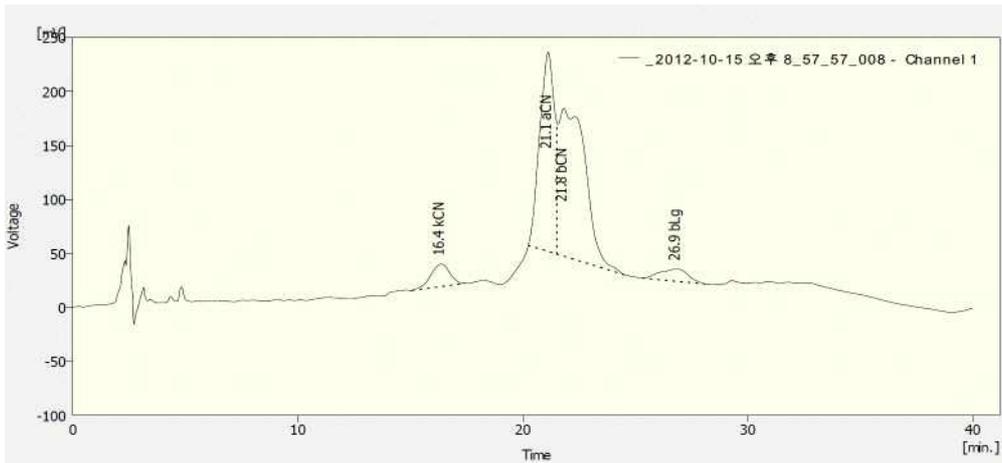
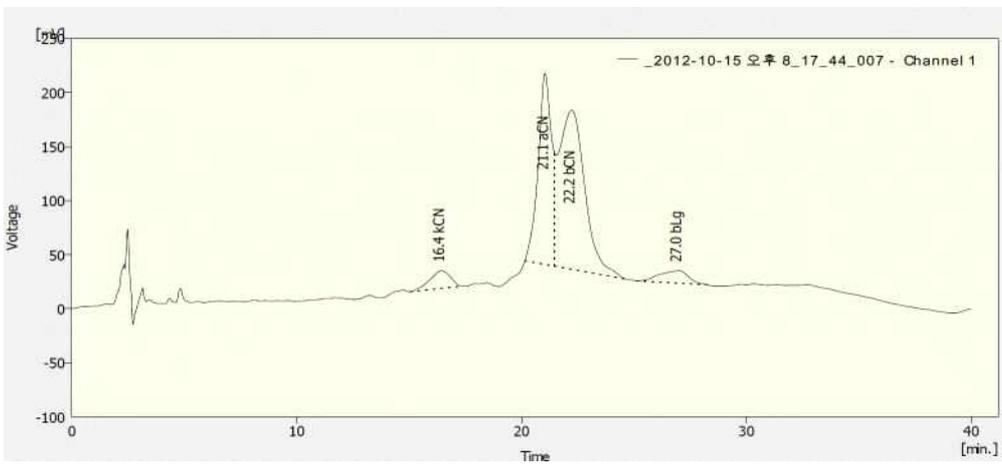
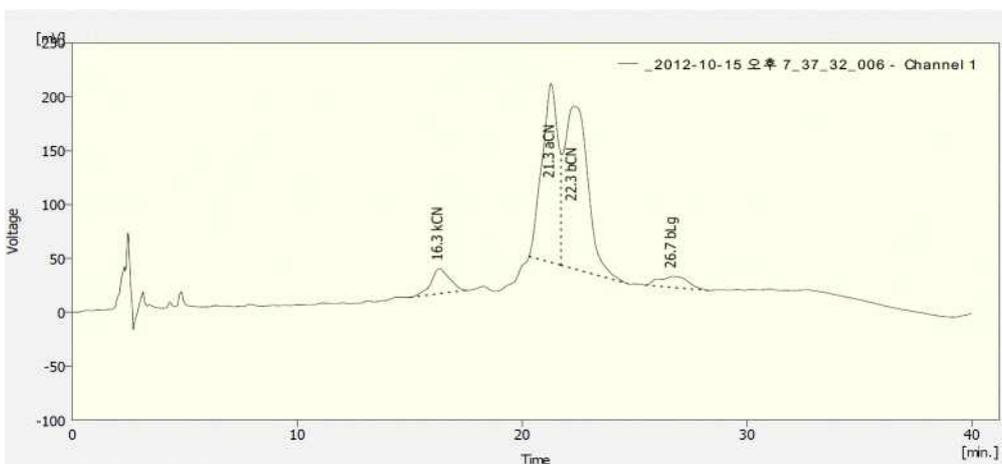
**A****B****C**

Fig. 3-15. PEF처리한 LTLT 우유의 HPLC 크로마토그램.  
 A, untreated; B, treated with PEF at 50°C; C, treated with PEF at 65°C.

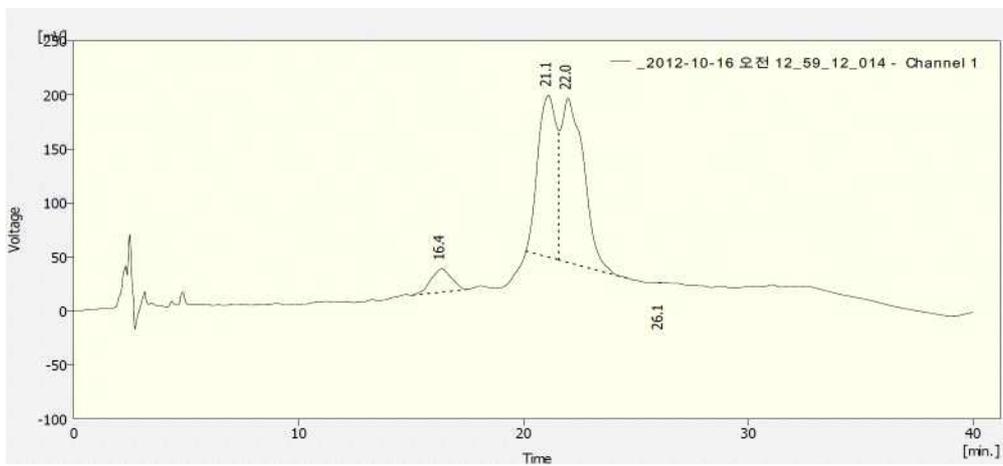


Fig. 3-16. PEF처리한 UHT 우유의 HPLC 크로마토그램.

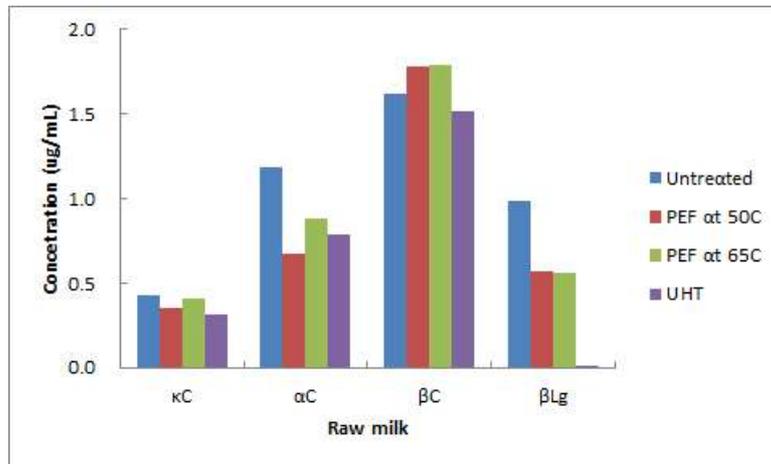
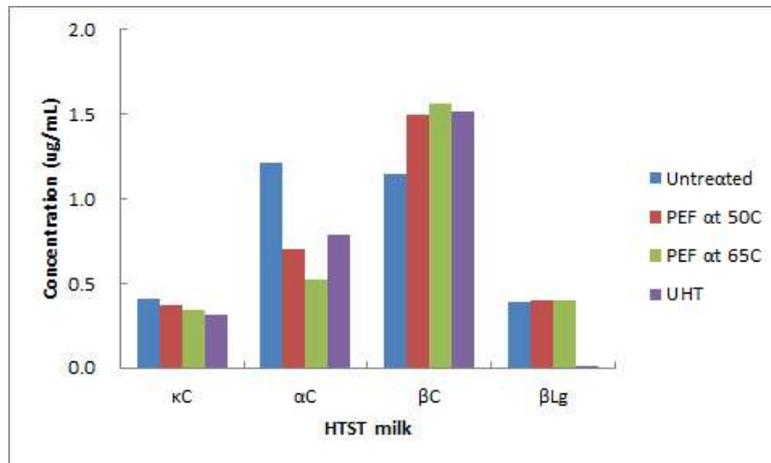
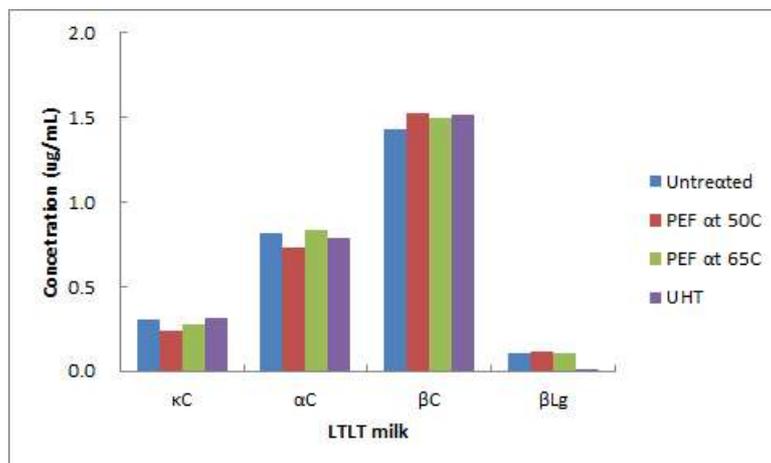
**A****B****C**

Fig. 3-17. HPLC를 이용한 PEF 처리유의 단백질 농도의 정량

A, raw milk; B, HTST milk; C, LTLT milk. κC, kappa casein; αC, alpha casein; βC, beta casein; βLg, beta lactoglobulin.

## 나. 살균 공정별 효소활성 측정 및 원유의 안정성 측정

### (1) 살균 공정별 효소(alkaline phosphatase, protease, peroxidase) 활성 측정

우유를 가열하면 대부분의 효소는 불활성화되거나 효소활성이 급격하게 감소된다. 우유에 존재하는 alkaline phosphatase는 organic phosphate에 작용하여 alcohol 또는 phenol과 phosphoric acid를 생성한다. 이 효소는 대부분이 지방구에 결합되어 있으며 살균처리에 의해 파괴되기 때문에 잔존하는 alkaline phosphatase의 정량으로 적절한 살균처리 여부를 검사할 수 있다. 최적 온도와 pH는 37℃와 pH 9.7이며, 정상 원유에는 0.18-0.27 unit/mL가 함유되어 있다. 이 효소는 62.8℃에서 30분간 또는 71-75℃에서 15-30초간 가열처리하면 불활성화된다.

Protease는 최적 pH가 8.5로 80℃에서 10분간 가열하면 불활성화되며, 산성용액에서는 72℃에서 10분 가열에 의해 불활성화된다. Lactoperoxidase는 최적 pH가 6.8로 보통의 저온 살균공정으로는 파괴되지 않는 열저항성 효소이다. 0.07%의 철을 함유하고 있는 hemeprotein으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 존재하에 guaiaconic acid를 청색으로 변색시킨다. 70℃에서 150분, 80℃에서 2.5초 처리하면 불활성화되므로 고온살균 여부를 판정하는데 사용된다.

Table 3-7에는 원유, 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유와 이들 우유를 50℃ 또는 65℃에서 PEF 처리를 한 시료, UHT 우유에 대하여 alkaline phosphatase, protease, lactoperoxidase의 효소활성을 측정한 결과를 나타내었다. Alkaline phosphatase는 원유의 경우 PEF 처리에 의해 효소활성이 감소하였는데 50℃보다 65℃에서 활성이 더욱 감소하여 온도의 영향을 많이 받을 수 있었다. 탈지유의 경우에는 PEF 처리에 의해 효소활성이 약간 감소하였으며 50℃와 65℃ PEF 처리는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 한편 HTST 우유, LTLT 우유와 UHT 우유에서는 효소 활성이 완전히 소실되었다. 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.

Table 3-7 다양한 살균공정을 이용한 우유 내의 효소의 활성

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

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

<sup>2)</sup>Not detectable

## (2) 살균 공정별 탁도시험

우유의 탁도시험은 가열 살균에 의해 우유 단백질 중에서 albumin이 가열에 의해 변성되었는지 여부를 측정하는 실험법이다. 우유에 무기염이나 산 용액을 첨가하면 albumin은 casein과 분리된다. 즉, 우유에 무기염인 ammonium sulphate를 처리하여 여과한 후 여과액을 가열한다. 가열살균이 불충분하게 된 우유는 albumin이 변성되지 않고 여과액에 존재하기 때문에 여과액의 가열에 의해 혼탁해지는 반면, 가열 살균된 우유는 가열에 의해 albumin이 변성 침전되어 여과지에 걸리지게 되므로 여과액의 탁도에 변화가 없게 된다.

Fig. 3-18에 원유, 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유와 이들 우유를 50℃ 또는 65℃에서 PEF 처리를 한 시료, UHT 우유에 대하여 turbidity test를 실시한 결과를 나타내었다. 그 결과 원유, 탈지유, HTST 우유는 albumin의 존재에 의해 탁도 양성의 결과를 나타내었고 LTLT 우유는 장시간의 가열시간에 의해 albumin이 일부 변성됨에 따라 탁도시험에서 약한 양성 반응을 나타내었다. 한편 UHT 우유에서는 고온 처리에 의해 albumin이 모두 변성됨에 따라 음성 반응을 나타내었다. 이들 우유를 PEF 처리하였을 경우 처리하지 않은 시료와 동일한 결과를 나타내었는데 이는 PEF 처리가 우유 단백질의 변성에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다.

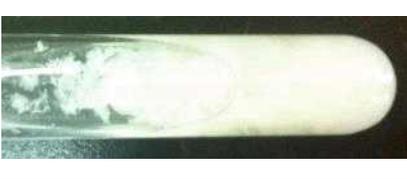
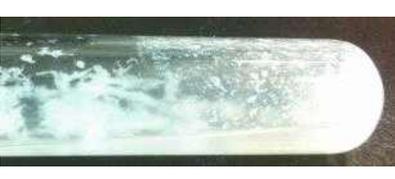
		
Raw milk : +++	Raw milk treated with PEF at 50°C : +++	Raw milk treated with PEF at 65°C : +++
		
Skim milk : +++	Skim milk treated with PEF at 50°C : +++	Skim milk treated with PEF at 65°C : +++
		
HTST milk : +++	HTST milk treated with PEF at 50°C : +++	HTST milk treated with PEF at 65°C : +++
		
LTLT milk : +	LTLT milk treated with PEF at 50°C : +	LTLT milk treated with PEF at 65°C : +
		
UHT milk : -		

Fig. 3-18. 다양한 살균방법에 의한 우유의 탁도시험.

(3) 살균 공정별 산도, pH 변화량

우유의 pH는 25℃에서 6.5-6.7이다. 본 연구에서 사용한 원유, 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유와 이들 우유를 50℃ 또는 65℃에서 PEF 처리를 한 시료, UHT 우유의 pH와 산도를 Table 3-8에 나타내었다.

탈지유와 HTST 우유, LTLT 우유 및 HTST 우유는 원유에 비해 유의적으로 높은 pH 값을 나타내었으며, 이에 따라 산도는 낮은 수치를 나타내었다. pH는 HTST 우유가 가장 높았으며 UHT 우유와 LTLT우유, 탈지유의 순으로 높은 값을 나타내었다. 산도는 원유가 가장 높은 값을 나타내었으며 그 다음으로 탈지유가 높았고, HTST 우유, LTLT 우유 및 HTST 우유는 유의적으로 동일한 값을 나타내었다. 이들 우유를 50℃ 또는 65℃에서 PEF 처리하였을 경우 산도의 변화는 관찰되지 않았고 pH의 경우에도 PEF 처리 여부에 따라 유의적인 차이는 있었으나 크게 변화하지는 않았다.

Table 3-8 다양한 살균방법에 의한 우유의 pH와 적정산도

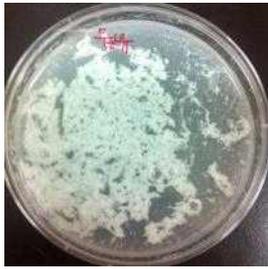
Milk type	pH	Titrateable acidity (%)
Raw milk		
untreated	6.40±0.01 <sup>g1)</sup>	0.35±0.02 <sup>a</sup>
treated with PEF at 50℃	6.51±0.01 <sup>f</sup>	0.32±0.02 <sup>a</sup>
treated with PEF at 65℃	6.50±0.01 <sup>f</sup>	0.33±0.03 <sup>a</sup>
Skim milk		
untreated	6.67±0.01 <sup>e</sup>	0.21±0.23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

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

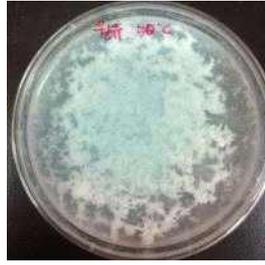
#### (4) 살균 공정 별 우유의 alcohol test

우유 내에 존재하는 casein이 불안정한 상태일 경우 우유에 알코올을 가하면 탈수 작용에 의해 안정성을 잃고 우유가 응고하게 된다. 이 원리에 의해 우유 단백질의 열 안정성을 검사할 수 있다.

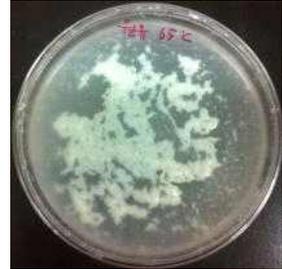
Fig. 3-19는 PEF를 처리한 우유와 처리하지 않은 우유의 alcohol test의 결과를 나타낸 것이다. 원유는 casein의 침전에 따라 양성반응을 나타낸 반면, 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유와 UHT 우유는 음성반응을 나타내었다. 이들 우유에 대하여 PEF 처리를 하였을 경우 alcohol test에 영향을 미치지 않았으므로 PEF 처리가 casein의 안정성에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.



Raw milk : +++



Raw milk treated with PEF at 50°C : +++



Raw milk treated with PEF at 65°C : +++



Skim milk : -



Skim milk treated with PEF at 50°C : -



Skim milk treated with PEF at 65°C : -



HTST milk : -



HTST milk treated with PEF at 50°C : -



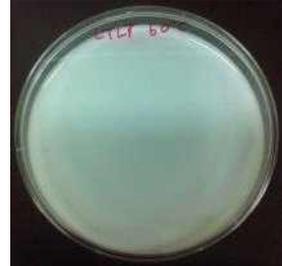
HTST milk treated with PEF at 65°C : -



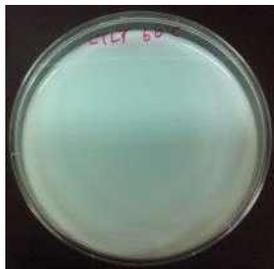
LTLT milk : -



LTLT milk treated with PEF at 50°C : -



LTLT milk treated with PEF at 65°C : -



UHT milk : -

Fig. 3-19. 다양한 살균방법에 의한 우유의 alcohol test.

다. PEF 단독 또는 가열살균 공정과의 병용 처리에 의한 비타민 등 영양성분의 변화 측정

(1) 살균 공정별 유당의 갈색화 반응 측정

우유를 높은 온도에서 가열하면 갈색화 반응 즉, Maillard reaction이 발생하는데 이 반응에는 단백질 중에서도 주로  $\beta$ -lactoglobulin이 부분적으로 lactose와 반응하고 필수아미노산 중에서는 주로 lysine이 관여하여 반응최종산물로서 melanoidin이 생성된다. 우유에 갈색화 반응이 진행된다면 갈변화 부산물들에 의한 이취가 발생하고, lysine의 감소로 인해 영양학적인 문제가 발생되며 분유 제조 시 분유의 용해도가 감소될 수 있다.

Table 3-9에는 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 Table 3-10에 나타내었다. 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. 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.

Table 3-9. 다양한 살균방법에 의한 우유의 갈색화 반응

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

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

## (2) 살균 공정에 따른 우유의 색도

우유의 유백색은 casein과 인산칼슘이 Ca-caseinate phosphate complex를 형성하여 colloid 용액 형태로 분산된 것이 광선에 반사되어 나타나는 것이다. 또한 노르스름한 색은 우유 중에 존재하는 carotene과 riboflavin 때문으로, carotene은 지방 내에 함유되어 있다. 우유의 색상은 젖소에 급여하는 사료 종류와 carotene의 비타민A로의 전환 정도에 달려 있다. 한편 유청의 형광성 녹색은 우유 중에 존재하는 riboflavin에 기인한다.

Table 3-10에는 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 L값과 적색도를 나타내는 a값, 청색도를 나타내는 b값으로 나누어 측정하였다. L값의 경우 살균에 의하여 L값의 감소가 나타나는 것을 볼 수 있는데, 원유보다 HTST 우유와 LTLT 우유의 L값이 낮은 것이 확인되었고, HTST 우유와 LTLT 우유보다 UHT 우유의 L값이 낮은 것으로 나타났다. 또한 지방을 제거한 탈지유는 다른 우유들보다 월등히 L값이 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, a값의 경우 원유와 HTST 우유와는 유사한 값을 나타내었고 탈지유, LTLT 우유와 UHT 우유는 원유보다 낮은 값을 나타내었다. PEF 처리하였을 경우 살균처리 하지 않은 원유와 탈지유는 PEF 처리에 의해 a값이 유의적으로 증가한 반면, 살균처리한 HTST 우유, LTLT 우유와 UHT 우유의 값은 감소한 것으로 나타났다. b값은 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-PAGE 및 HPLC를 이용하여 조사한 결과 PEF의 처리 조건(50°C, 65°C)에 관계없이 PEF 처리가 우유 중에 존재하는 단백질을 변성시키지 않는다는 것을 확인하였다. 또한 살균 공정별로 PEF 처리한 우유의 탁도시험에 의해서도 PEF 처리가 우유 단백질을 변성시키지 않는다는 것을 확인하였으며, pH, 산도, alcohol test, 색도 및 갈색화 반응 결과를 분석한 결과 LTLT나 HTST 및 UHT 처리와 비교할 때 PEF 처리가 우유의 물리화학적 성질을 크게 변화시키지 않는다는 것을 확인하였다.

Table 3-10. 다양한 살균방법을 이용한 우유의 Hunter's 색도

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

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

라. 면역단백질 변성도 측정을 위한 immuno-assay법 확립

(1) 면역분석법의 정의

면역분석법(immunoassay)이란 시료의 분석과정에서 항체를 이용하는 기술을 의미하며, 이 경우 항체는 Table지(labeling)하여 사용하거나 혹은 별도의 Table지 없이 그대로 사용하기도 한다. 초기에는 연구자들이 주로 단백질의 검출이나 정량을 위하여 이 방법을 사용하였으나, 최근에는 항체기술의 발전으로 저분자화합물, 탄수화물, 지질 등의 분석 및 각종 미생물의 분석에도 활용하고 있다. 면역분석법은 그 검출 원리 및 방법에 따라 방사성동위원소를 사용하여 신호를 검출하는 방사면역분석시험법(RIA: radioimmunoassay), 효소에 의한 신호증폭을 사용하는 효소면역측정법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, 혹은 EIA: enzyme immunoassay), 형광을 이용하여 검출하는 형광항체법(FA: fluorescence antibody technique), 화학발광을 사용하는 화학발광면역측정법(CLIA: chemiluminescence immunoassay) 등으로 나눌 수 있으며, 그 밖에도 Table지물질의 사용 방법이나 기질의 종류에 따라 다양한 분류가 가능하다(Moon et al., 1988; Kang et al., 1989; Moon & Kwon, 1989; Lee et al., 1994; Choi et al., 2001; 정유진 외, 2007). Table 3-11은 위에서 언급한 면역분석법의 장단점을 비교한 것이다.

Table 3-11. 주요 면역분석법의 장단점 비교

기술	적용분야	장점	단점
ELISA 혹은 EIA (Enzyme-linked Immunosorbent assay or Enzyme Immunoassay)	모든 질병 검사	- 간편하고 신속함 - 경제적 - 장시간 보존이 가능함	- 항체에 결합시킨 효소가 항원-항체반응을 저해할 가능성이 있음 - 신호가 불안정 - 발암성 기질을 사용
RIA (Radio Immunoassay)	- 암 진단 - 호르몬 진단 - 알러지 진단 - 빈혈 진단	우수한 정량성과 정확성	- 고가의 검사비용 - 짧은 유효기간 - 장시간의 검사기간 - 방사성 동위원소의 유해성
FA (Fluorescence Antibody Technique)	모든 질병 검사	- 정확성 - 간편하고 신속함 - 간단한 Table지물질을 사용하여 자동화가 용이함	비특이적 반응이 존재

(2) 면역분석법의 이론적 배경

단백질 시료에 대한 분석방법은 1960년 방사면역측정법의 도입으로 활성화되기 시작하였으며, 초기 연구는 주로 분석시간의 단축, 사용의 간편성, 재현성, 경제성 등의 향상을 목적으로 연구가 이루어졌다. 그리하여 1971년에는 효소면역측정법이 개발되었고, 1979년에는 형광기질을 사용하여 감도를 증가시킨 형광기반검출방법으로 발전하였다. 최근에는 면역분석법이 나노기술과 융합하여 바이오바코드(bio-barcode)시스템을 도입함으로써 펩토그램(fg)/mL의 농도로 존재하는 단백질을 검출할 수 있는 기술이 개발되었다. 이 새로운 기술은 검출 민감도를 극대화하였을 뿐 아니라 단백질어레이(protein array)기술과 함께 다중분석(multiplex analysis)을 가능

하게 함으로써 고효율(high through-put) 단백질분석을 가능하게 하였는데 더 큰 의미가 있다(Muller, 2006). 지난 50년 동안 면역분석법은 검출감도의 향상 및 다중분석능의 향상에 있어서 눈부신 발전을 거듭했지만, 여전히 분석비용절감, 분석시간의 단축, 민감도 향상 및 재현성 증대라는 기술적 과제에 직면해 있다. 분석대상도 과거 단일 단백질의 검출 및 정량이 목 Table였다면 이제는 단백질 자체는 물론, 단백질의 수식이나 사람과 가축의 건강을 위협하는 미생물은 검출하는 것을 목Table로 하고 있다. 이처럼 분석 대상의 증가를 다른 의미에서 바라보면 면역분석법이 인류의 건강과 바이오기술의 발전에 있어서 점점 더 중요한 위치를 차지해 가고 있다는 것을 의미한다.

### (3) 효소면역측정법의 형태에 따른 분류와 특징

여러 가지 면역분석법 중 현재 가장 많이 사용되고 있는 방법이 효소면역측정법이며, 이 측정법은 항체의 활용 방법에 따라 직접효소면역측정법(direct ELISA), 간접효소면역측정법(indirect ELISA), 그리고 샌드위치효소면역측정법(sandwich ELISA)의 3가지로 세분할 수 있다(Fig. 3-20)(Yolken & Stopa, 1979).

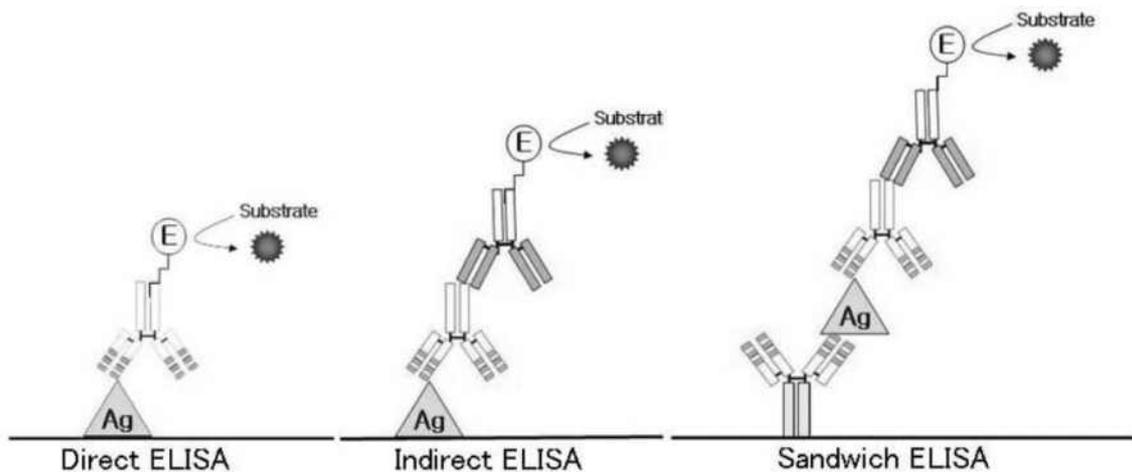


Fig. 3-20. 효소면역측정법의 분류.

직접효소면역측정법은 고체Table면에 고정된 항원에 효소와 연결된 항체(enzyme-linked antibody)가 결합하면 효소가 기질의 반응을 촉매함으로써 신호를 생성하게 된다. 간접효소면역측정법은 1차 항체(primary antibody)가 항원에 특이적인 결합을 하고, 2차 항체(secondary antibody)가 1차 항체를 인식하여 결합한다. 이 상태에서 보조항체에 연결되어 있는 효소가 기질의 반응을 촉매하여 신호를 내게 된다. 끝으로, 가장 널리 사용되는 형태인 샌드위치효소면역측정법은 검출하려는 하나의 항원에 대하여, 항원결정기(epitope)가 다른 2종의 항체를 사용하는 것이며, 검출하고자 하는 항원에 대한 높은 선택성을 나타내어 진단용으로도 많이 사용이 되고 있다. 하지만 이 방법을 사용하는 많은 사람들이 점점 더 높은 검출감도를 요구하고 있으며 이를 만족시키고자 많은 연구가 진행되고 있다.

마. PEF 공정에 의한 우유의 IgG, IgA,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, lactoferrin, 및 TGF- $\beta$  1의 단백질 변성도와 활성 측정

(1) PEF 처리에 따른 IgG의 변성도 측정

(가) IgG의 개요

Immunoglobulin G(IgG)는 인체를 순환하는 면역글로불린 중 약 75%를 차지하는 사람의 주요 면역글로불린으로 사람의 이차 면역 반응에 있어서 가장 중요한 역할을 담당하고 있다. IgG는 1960년 Dray가 3개의 subclass가 있다고 발표한 이후 1964년 Terry, Fahey, Grey, Kunkel이 하나를 더 추가하여 4가지 subclass, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>가 밝혀져 있다(Schur, 1987). 각각의 IgG subclass는 매우 유사한 아미노산 배열을 갖고 있으나 물리화학적 특성과 생물학적 특성은 크게 다르다(Table 3-12). 기본적으로 모든 subclass가 두 개의 동일한 heavy chain과 light chain이 S-S결합에 의하여 연결되어 있고 특히 IgG<sub>3</sub>이 분자량이 가장 크고 S-S결합수도 5-13개로 가장 많으며 반감기도 7-8일로 가장 짧은 특성을 보인다(Schur, 1987).

Table 3-12. IgG subclasses: 물리화학적 특성과 생물학적 특성

	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgG <sub>4</sub>
Heavy chain mol. wt.	51,600	51,600	59,500	51,600
Electrophoresis	cathodal	anodal	cathodal	anodal
Inter-heavy-chain disulfide bonds	2	4	5-13	2
Papain digestion	sensitive	resistant	very sensitive	resistant
Pepsin digestion	resistant	resistant	sensitive	sensitive
Half-life (day)	11-23	11-23	7-8	11-23

사람 혈청 중에 가장 높은 농도(8-15 mg/mL)로 함유되어 있고 혈관 외 체액에서의 농도도 높다. S 글로불린 또는  $\gamma$ G라고도 하며 많은 항체 활성을 가지고 있다. 전기이동도는 가장 느리고 당 함량은 2-3%로 다른 것보다 낮다. IgG는 유일하게 태반을 통과하는 면역글로불린이기 때문에 태아와 신생아를 감염으로부터 방어하는 기능이 있다. IgG<sub>4</sub> 이외의 IgG는  $\gamma$ 쇄의 Fab 영역의 수용체에서 보체와 결합한다.

(나) IgG의 변성도 측정

우유 및 PEF 처리한 우유 내에 함유되어 있는 IgG의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-21에 나타내었으며, 측정 가능한 시료 내 IgG의 농도범위는 0.69-55.6 ng/mL로 확인되었다. Fig. 3-22와 같이 균질화 된 우유를 100, 150, 200, 250 kJ의 에너지로 PEF 처리하였을 때, PEF를 처리하지 않은 원유의 IgG 농도는 86.3  $\mu$ g/mL로 측정되었고, 원유를 100 kJ로 PEF 처리하였을 경우 IgG의 농도는 64.1  $\mu$ g/mL로 원유와 비교하여 26%가 감소하였다. 250 kJ로 PEF 처리하였을 경우에 48.8  $\mu$ g/mL로 측정되어 에너지

가 증가할수록 IgG의 농도가 감소하였으나, 통계적으로 유의적인 변화는 관찰되지 않았다.

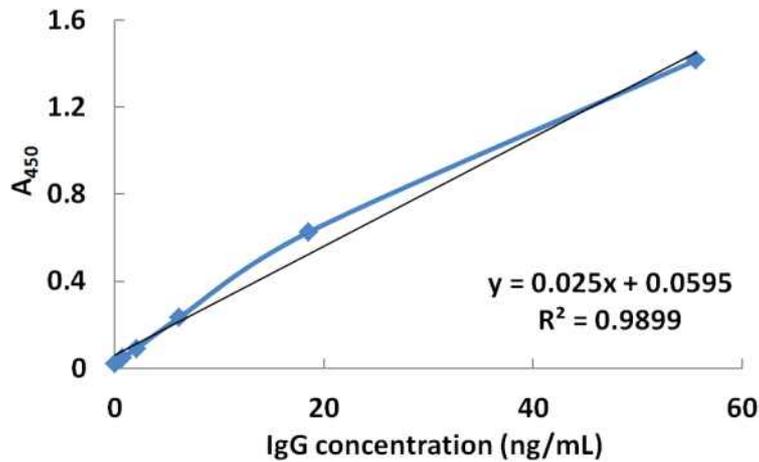


Fig. 3-21. IgG 농도에 따른 Table준정량곡선.

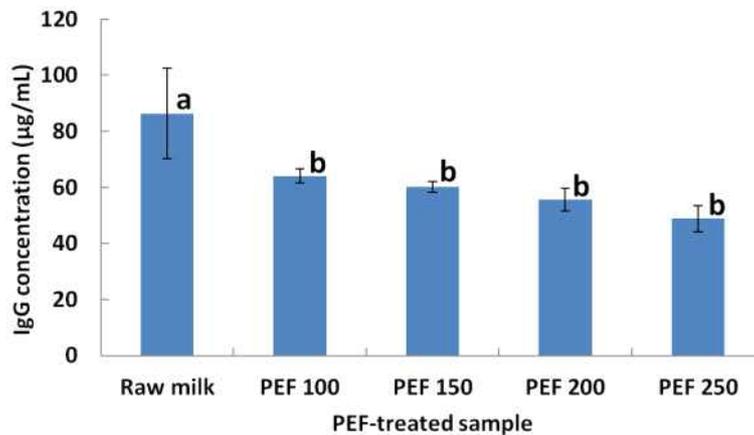


Fig. 3-22. PEF 처리에 따른 IgG의 농도변화.

Different characters on the top of graph are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## (2) PEF 처리에 따른 IgA의 변성도 측정

### (가) IgA의 개요

IgA에는 IgA<sub>1</sub> 및 IgA<sub>2</sub>의 subclass가 있다. 이것은 혈액, 타액, 초유와 같은 장점액성 분비액이나 기관지, 소화관 분비액 중에 고농도로 존재하고 점액Table면에서의 국소면역기구에 관여하며 초유항체로서 중요하다.  $\gamma$ A라고도 하며  $\gamma$ -글로불린의 10-20%를 차지하고 사람 혈청중의 농도는 2-3 mg/mL이다. 혈청 중에서는 기본 글로불린 단위(단량체, 분자량 160,000, 7S)를 보이지만 분비형 IgA는 2개의 단량체가 J쇄에 의해 연결된 이량체(분자량 390,000, 11S)로 되어 있다. 이량체에는 분자량 60,000의 수송단편(t piece)이 Fc 영역에 결합하고 있으며 이것은 IgA

분자를 외분비강으로 운반하는 역할을 한다. 분비형 IgA는 바이러스, 세균 등의 감염에 대한 숙주의 방어기구상 중요하며 항바이러스 활성이 현저하고 장관 내에서도 분해되지 않는다.

(나) IgA의 변성도 측정

우유 및 PEF 처리한 우유 내에 함유되어 있는 IgA의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-23에 나타내었으며, 측정 가능한 IgA의 농도범위는 4.1-111.1 ng/mL로 확인되었다. Fig. 3-24와 같이 원유를 PEF 처리 후 IgA의 농도는 PEF를 처리하지 않은 원유의 경우 28.6 µg/mL로 측정되었고, 100 kJ, 150 kJ로 PEF 처리한 우유의 IgA의 농도는 25.7, 25.9 µg/mL로 원유와 비교하여 유의적인 차이는 보이지 않았다. 반면 250 kJ로 PEF 처리한 우유는 11.6 µg/mL로 원유에 함유되어 있는 IgA의 양이 41% 감소하였고, 이들의 값은 유의적으로 감소하였다.

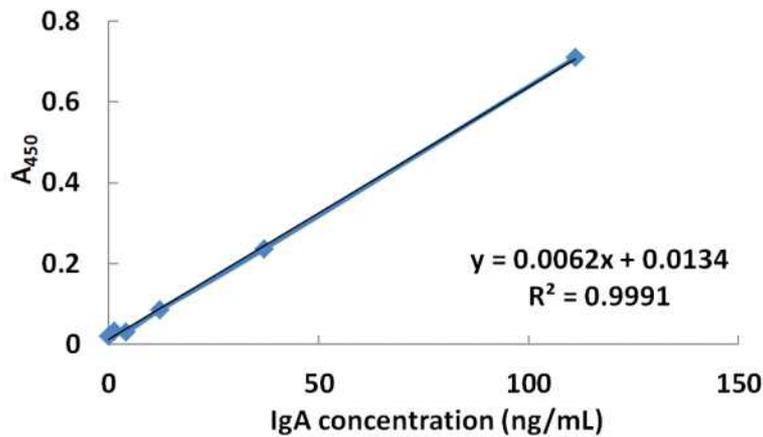


Fig. 3-23. IgA의 농도에 따른 Table준정량곡선.

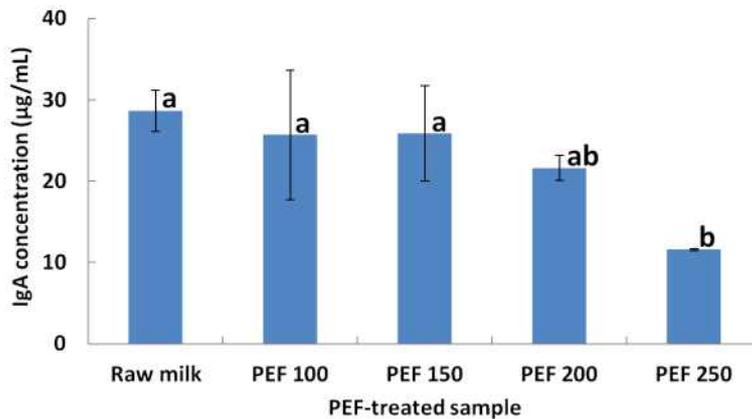


Fig. 3-24. PEF 처리에 따른 IgA의 농도변화.

Different characters on the top of graph are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### (3) PEF 처리에 따른 $\beta$ -lactoglobulin의 변성도 측정

#### (가) $\beta$ -Lactoglobulin의 개요

$\beta$ -Lactoglobulin은 젖에 함유하는 글로불린류 단백질중 하나로, 젖에 함유하는 전체 단백질(약 3.7%) 중의 80%가 casein으로 이것을 제외한 것은 유장이라고 하는데, 그 단백질의 55%가  $\beta$ -lactoglobulin이다. 혈액에서 유래한 면역글로불린도 포함하며 이들을 합하여 lactoglobulin이라 총칭한다. 결정상으로 획득하며 등전점은 pH 5.2인데, 이 pH에서는 주로 2합체 구조를 하고 있고,  $\beta$ -lactoglobulin은 162개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며 분자량은 18,300 Da이다.  $\beta$ -lactoglobulin은 2개의 내부 사슬로 된 이황화 화합물(S-S)과 1개의 티올(thiol, SH)기를 함유하며, 상호반응은 pH와 온도에 의존적이다. 합황 아미노산 잔기는 고온으로 가공 또는 저장하는 동안 분자간 공유 이황화 결합의 형성에 의해 단백질의 중합을 촉진시킨다고 알려져 있다 (Morr & Ha, 1993) 온도에 민감한  $\beta$ -lactoglobulin는 고온에서 반응시켰을 때 분자간 이황화 결합의 형성으로 비가역적 변성과 중합을 한다. 이 단백질의 비 특정적 집합은 가열 시간과 온도에 의존적이며 비가역적이다(Sawyer et al., 1971). Boye & Alli(2000)의 연구에서는 differential scanning calorimetry (DSC)로  $\beta$ -lactoglobulin의 변성 임계 온도를 관찰한 결과 70°C로 나타났다. 유전적으로 결정하는 3종의 다른 분자종 A, B, C가 알려져 있고, 그 중 A는 낮은 pH에서 8합체를 형성한다. 1마리의 소에서 얻을 수 있는 시료에는 그 속의 1종만으로 이루어지는 경우와, 2종이 거의 동량으로 혼합하고 있는 경우가 있다. 3분자종의 차이는 1분자종 2 또는 1개의 아미노산잔기가 치환(A의 Asp, Val이 B에서는 각각 Gly, Ala에, B의 Gln이, C에서는 His에)한 것이라고 여겨진다. 양(羊)의  $\beta$ -lactoglobulin에도 같은 A, B의 양 분자종이 존재한다. 사람의 젖에는  $\beta$ -락토글로불린을 함유하지 않는다. 유청 단백질 가운데에서 가장 함량이 높은 단백질로, 쉽게 결정화시킬 수 있는 단백질에 속하여 단백질 연구에서 standard로 많이 이용된다.  $\beta$ -Lactoglobulin의 열안정성과 casein과의 상호작용이 관련이 깊으며,  $\kappa$ -casein과의 상호작용은 allergy와도 관계되는 것으로 알려져 있다. 영양적 가치 면에서 우유 단백질 중 cysteine 잔기를 가장 많이 갖고 있다는 점에서도 중요하다.

#### (나) $\beta$ -Lactoglobulin의 변성도 측정

우유 및 PEF 처리한 우유 내에 함유되어 있는  $\beta$ -lactoglobulin의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-25에 나타내었으며, 측정 가능한  $\beta$ -lactoglobulin의 농도범위는 3.9-31.25 ng/mL로 확인되었다. Fig. 3-26에 나타낸 바와 같이 PEF를 처리하지 않은 원유는 935.4  $\mu$ g/mL이었고, 150, 200, 250 kJ의 강도로 PEF를 처리하였을 때, 그 값은 각각 679, 635, 603  $\mu$ g/mL로 유의적인 차이로 감소하였다. 반면 100 kJ로 PEF 처리한 우유는 1018  $\mu$ g/mL로 가장 높은 값이 측정되었다.

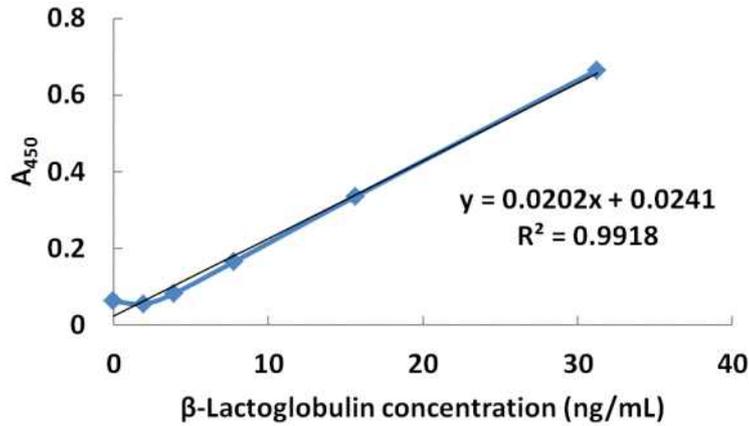


Fig. 3-25. β-Lactoglobulin의 농도에 따른 Table준정량곡선.

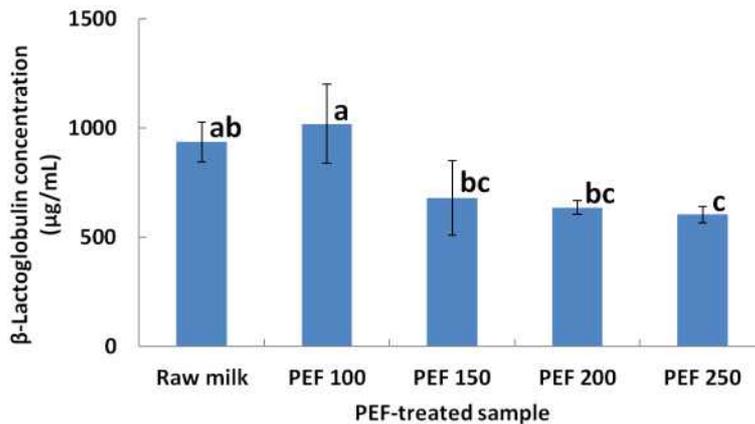


Fig. 3-26. PEF 처리에 따른 β-lactoglobulin의 농도변화.

Different characters on the top of graph are significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### (4) PEF 처리에 따른 lactoferrin의 변성도 측정

##### (가) Lactoferrin의 개요

Lactoferrin은 강한 항바이러스, 항균성 물질로 사람과 젖소의 초유에 가장 많이 들어 있다. Lactoferrin은 철과 결합하고 유리하는 중요한 성질을 지니고 있는데 철과 결합하지 않았을 때는 무색이지만 철과 결합하면서 붉은색을 띤다. 유즙에 함량이 많으며 그 중에서도 초유에 가장 많이 함유되어 있는데 사람의 초유에는 6-8 mg/L가 들어 있고 수유기간에 분비되는 모유에도 약 2 mg/L가 들어 있다. 또한 우유의 초유는 1.2 mg/L, 상유에는 0.1-0.2 mg/L가 들어 있다. 분자량은 8만의 당단백질로 은행잎 모양의 lobe 2개가 빗겨 겹쳐진 모양으로 각 lobe는 한 개의 철과의 결합부위를 갖게 된다. 트랜스페린(철분수송 단백질)보다 260배 정도 강력하게 철분과 결합하는데 이러한 철분과의 작용이 lactoferrin의 주요한 기능이다. 먼저 항균작용을 들 수 있는데, 세균이 철분공급을 받기 전 lactoferrin이 차단해 세균의 증식을 억제하며 사멸시키는 기능을 한다. (-)전하를 띄고 있는 세포의 Table면전하를 중화, 응집시키고 면역글로불린 등과 함께 균을 정화하는데 상승효과를 나타내기도 한다. 또한 인체에 유용한 세균인 bifidus나

lactobacilli는 항균작용을 일으키지 않지만 일반적인 유해세균의 경우는 철분의 흡수를 통한 성장억제뿐만이 아닌 세포막을 직접 뚫고 들어가 사멸시켜버리는 살균작용의 기능을 하기도 한다. 대부분의 면역 세포에서 lactoferrin 친화 수용체를 발견할 수 있다. 철분과의 결합과 유리를 통해 인체 내의 철분의 양을 조절해 빈혈을 예방한다. 또한 lactoferrin은 AIDS(후천성면역결핍) 바이러스(HIV)와, C형 간염(HCV), 헤피스 바이러스(HHV) 등에 항바이러스 성질을 띤다. 인간이나 젖소의 초유에 함유된 순수 자연상태의 lactoferrin은 헤피스(HHV) 바이러스의 퇴치와 에이즈바이러스의 번식 억제 등의 기능을 가지고 있으며 항진균능력도 갖고 있다. 각종 면역세포와의 병합으로 면역력의 증가와 매크로파지(macrophage)의 활성을 높인다. 각종 단백질과의 합성으로 면역 분비 기관의 강화를 돕는다. Lactoferrin과 결합한 철분이 유리되면서 세포에 산소공급의 촉매 역할을 하며 동시에 철분과 항산화 단백질과의 결합을 유도한다. 또한 락토페린 자체로 강력한 항산화 물질로 신체의 방어역할에 큰 도움을 준다. 면역기능 외에도 세포증식, 염증 억제 등의 다양한 기능을 갖고 있어 안약, 임상영양제 등으로 많이 사용된다. 산업, 의료 등 다양한 분야에서 그 이용 폭 및 가치가 높으나 현재 우유에서 lactoferrin을 추출하는 방식으로 생산이 이루어지고 있어 공급이 수요를 충분히 충족시키지 못하고 있다.

(나) Lactoferrin의 변성도 측정

우유 및 PEF 처리한 우유 내에 함유되어 있는 lactoferrin의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-27에 나타내었으며, 측정 가능한 lactoferrin의 농도범위는 3.125-25 ng/mL로 확인되었다. Fig. 3-28에 나타낸 바와 같이 원유의 lactoferrin 농도는 11.2 µg/mL로 나타났고, PEF의 처리 에너지 강도가 높아질수록 함유하고 있는 lactoferrin의 양이 감소하는 것으로 관찰되었다. 100 kJ로 PEF를 처리한 우유는 9.6 µg/mL가 함유되어 있었고, 원유와 유의적인 차이는 없었으나, 150, 200, 250 kJ로 PEF 처리한 우유는 각각 6.9, 5.3, 4.1 µg/mL으로 측정되어 순차적으로 유의적으로 감소한 것으로 판단할 수 있었다.

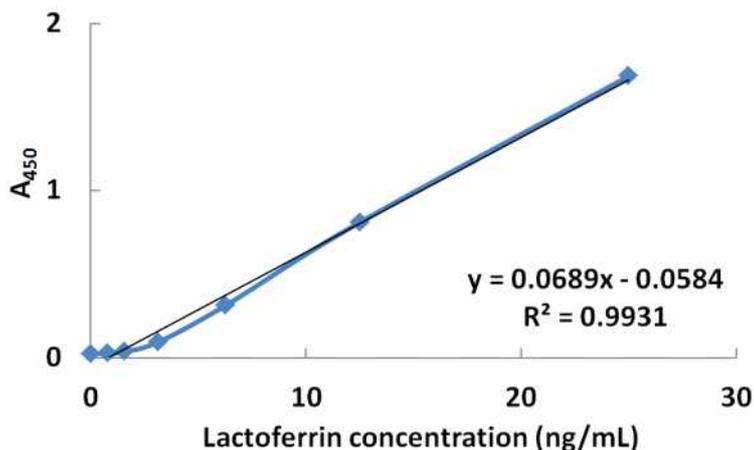


Fig. 3-27. Lactoferrin의 농도에 따른 Table준정량곡선.

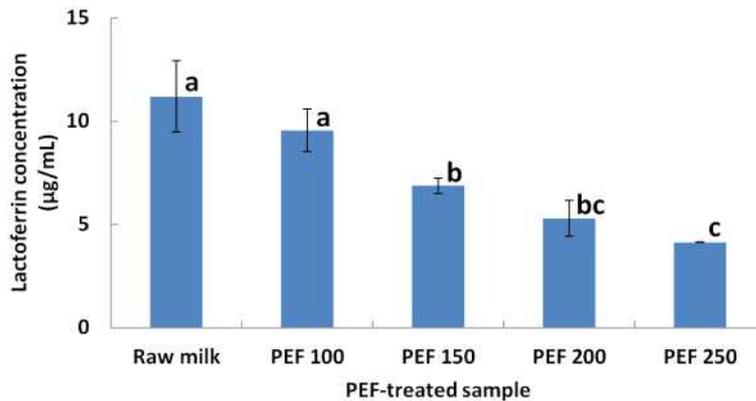


Fig. 3-28. PEF 처리에 따른 lactoferrin의 농도변화.

Different characters on the top of graph are significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### (5) PEF 처리에 따른 $\alpha$ -lactalbumin의 변성도 측정

##### (가) $\alpha$ -Lactalbumin의 개요

유청 단백질 중에서  $\beta$ -lactoglobulin 다음으로 함량이 높은 단백질로, 12%를 차지하는데, lactose 합성효소의 성분이다.  $\alpha$ -Lactalbumin은 14,000 Da의 분자량을 갖는 작은 단백질로, 123개의 아미노산 잔기로 구성되어 있다. 함황 아미노산을 내포하며 분자간 이황화 결합의 형성이 관여하고, lysozyme과 유사하여 4개의 이황화 결합으로 열에 의한 변성에 저항성을 나타낸다. 일반적으로 열에 가장 안정한 유청 단백질로 간주되고, Paulsson et al.(1985)이 DSC로 관찰한 바에 의하면 pH 4-5사이에서  $\alpha$ -lactalbumin의 전이온도는 43, 85°C로 다른 열안정성을 가진 두 개의 형태로 일어났다고 보고하였으며, Ruegg et al.(1977)의 연구에 따르면 pH 6.7에서 65.2°C에서 변성되어, 변성 단백질의 80-90%가 냉각하면 다시 원래 상태로 돌아간다고 보고하였다. Ca 이온은  $\alpha$ -lactalbumin에 강하게 결합되어 있는데, 생리학적 상태에서 결합된 상태로 존재하기 때문에 등전 침전이나 인산완충용액에 의한 투석으로도 제거되지 않는다(Parris et al., 1991). Ca 이온이 결합되면 복합체에서 그 구조를 안정화시키는 경향이 있으나, Ca 이온을 제거한 경우는 열에 의한 변성에 훨씬 민감하지만 냉각시에는 renaturation이 감소된다(Apenten, 1995). 그렇기 때문에 Ca이 제거된 apo- $\alpha$ -lactalbumin의 열 안정성은 자연적인  $\alpha$ -lactalbumin보다 낮은 것으로 보고되어있다(Relkin, 1996). 유당 생성 효소(lactose synthetase)는 2개의 A와 B의 단백질 subunit으로 되어 있고, B subunit이  $\alpha$ -lactalbumin이다. A subunit은 galactosyltransferase로서  $\alpha$ -lactalbumin의 존재하에서 UDP-galactose로부터 galactose를 떼어내어 glucose와 결합시켜 lactose를 합성한다.

##### (나) $\alpha$ -Lactalbumin의 변성도 측정

우유 및 PEF 처리한 우유 내에 함유되어 있는  $\alpha$ -lactalbumin의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-29에 나타내었으며, 측정 가능한  $\alpha$ -lactalbumin의 농도범위는 3.125-25 ng/mL로 확인되었다. Fig. 3-30과 같이 원유의  $\alpha$ -lactalbumin 농도는 1096.6  $\mu$ g/mL로 측정되었고, 100 kJ로 PEF를 처리하였을 때 869.3  $\mu$

g/mL로 원유와 비교해서 유의적으로 감소함을 보였다. 반면에 150, 200, 250 kJ로 처리하였을 때의 원유 내의  $\alpha$ -lactalbumin 농도의 값은 유의적인 차이가 없었다.

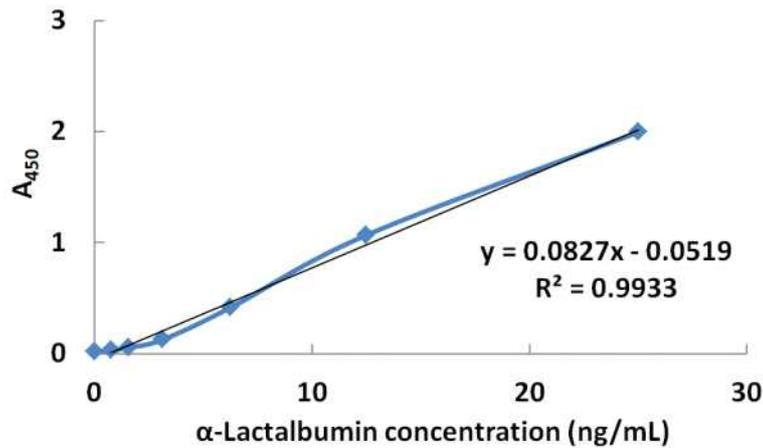


Fig 3-29.  $\alpha$ -Lactalbumin의 농도에 따른 Table준정량곡선.

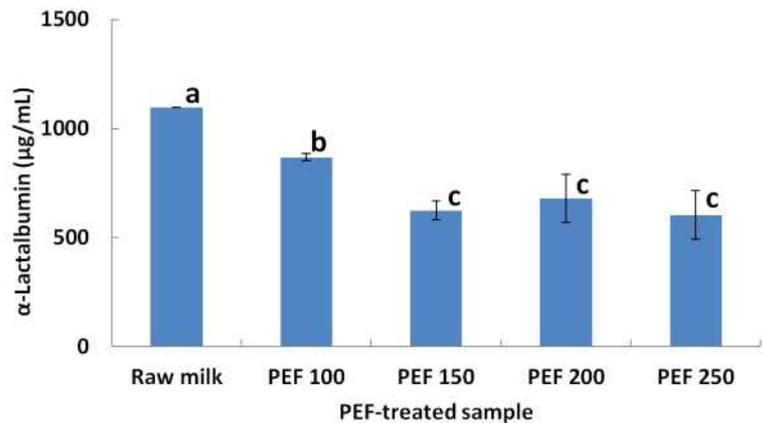


Fig. 3-30. PEF 처리에 따른  $\alpha$ -Lactalbumin의 농도변화.

Different characters on the top of graph are significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### (6) PEF 처리에 따른 TGF- $\beta$ 1의 변성도 측정

##### (가) TGF- $\beta$ 1의 개요

Transforming growth factor인 TGF- $\beta$ 1은 cytokine의 superfamily이다. 세포의 성장이나, 증식, 분열, 및 자살에 관여한다. 25,000 Da의 분자량을 지니고 있고, 포유류에는 구조가 유사한  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3가 존재하며, 혈소판이나 태반, 골격 등 여러 조직에서 생산되고 세포의 성장억제, 세포외기질의 생산, 면역능 억제와 같은 작용을 한다(Nakamura et al., 1985; Lin & Chon,

1992; Alevizopoulos & Mermod, 1997; Massague, 1998; Derneck & Zhang, 2000). TGF-β family는 젖소 초유에 20-40 mg/mL, 우유에 1-2 mg/mL가 함유되어 있다.

(나) TGF-β1의 변성도 측정

우유 및 PEF 처리한 우유 내에 함유되어 있는 TGF-β1의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-31에 나타내었으며, 측정 가능한 TGF-β1의 농도범위는 31.2-1000 pg/mL로 확인되었다. 원유의 TGF-β1 농도는 12.4 ng/mL로 측정되었고, Fig. 3-32의 그래프에서 PEF 처리 후 우유 내 함유농도는 큰 차이가 없었다. 100, 150 kJ로 PEF 처리한 우유는 각각 10.7, 11.5 ng/mL로 원유와 유의적인 차이가 있었으나, 200 kJ로 처리한 우유와 250 kJ로 처리한 우유는 통계적으로 유의적인 차이가 없었다.

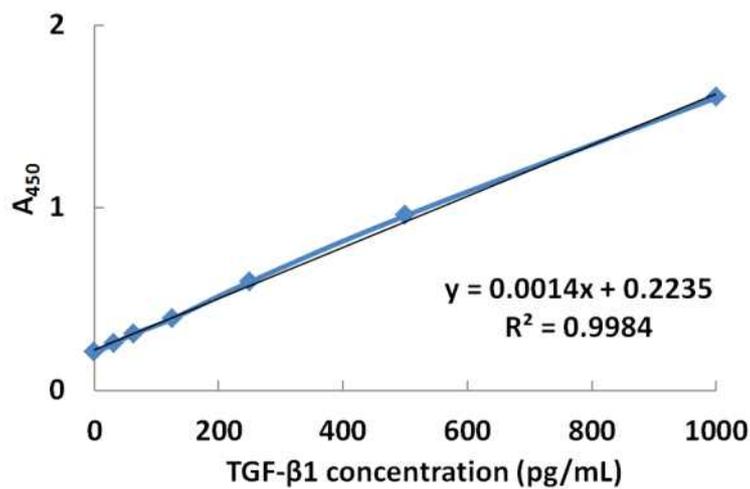


Fig. 3-31. TGF-β1의 농도에 따른 Table준정량곡선.

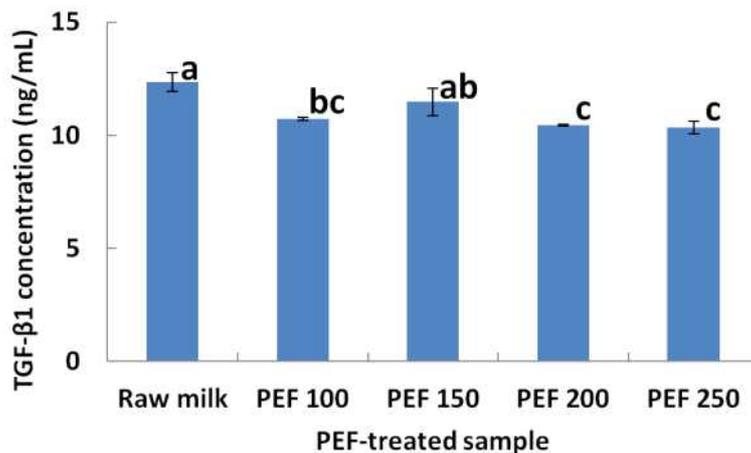


Fig. 3-32. PEF 처리에 따른 TGF-β1의 농도변화.

Different characters on the top of graph are significantly different ( $p < 0.05$ ).

바. 살균 전처리 공정과 살균 공정의 연계와 최적화 작업에 따른 공정 가이드라인 확립

일반적으로 우유는 가열처리에 의하여 살균이 가능하고, 그 방법으로는 LTLT, HTST 및 UHT가 존재하나 현재 상업적으로 UHT가 가장 널리 이용되고 있는 방법이다. LTLT 살균법은 holding pasteurization이라 하며, 일반적으로 batch식의 살균장치를 사용하여 중간에 열수 또는 증기를 통하는 것에 의하여 우유를 63-65℃에서 30분간 가열 살균하는 방법으로 맛과 영양성분의 손실이 적으나, LTLT 살균법은 30분이라는 긴 시간이 소요되며, 세균의 잔존 가능성이 있는 단점이 있다. HTST 살균법은 우유를 tubula형 또는 plate형 열교환기를 통과시킴으로써 우유를 가열살균하는 방법으로 대량의 우유를 연속적으로 처리할 수 있는 장점을 지닌다. HTST 살균은 온화한 풍미를 나타내고 신선한 우유와 같은 외관을 나타내나, 잔존세균으로 인하여 UHT 살균보다 보존성이 떨어지고, 호냉성 세균에 의해 냉장 중에서 며칠 내에 세균이 증식할 수 있는 문제가 있다. UHT 살균법은 우유를 미리 80℃ 정도에서 2-6분간 예비 가열 후 처리하는 방법으로 우유의 미생물은 사멸되고, 보존 수명이 길어지는 장점이 있으나 UHT 처리유의 잔존세균은 주로 호기성 아포균과 호냉성균으로 한정되므로 냉장 중 변패는 일반 세균류와는 달리 단백질 및 지방의 분해와 이에 대한 풍미가 변하고 쓴맛을 낸다. 이러한 가열살균은 우유성분의 파괴, 맛과 색의 변화, 불쾌취 생성 등 우유의 품질 저하를 고려해야만 한다. 따라서 본 연구에서는 LTLT의 단점을 보완하기 위하여 PEF 처리 공정을 연계하여 우유의 살균에 따른 면역 단백질의 활성을 확인하였다.

(1) PEF 처리 후 LTLT 살균 시 잔존하는 IgG의 함량

균질화한 우유를 LTLT 처리하였을 때, IgG의 농도는 55.3 µg/mL로 측정되어 원유(86.3 µg/mL)보다 36%가 감소하였으나, 100, 150, 200 kJ로 PEF 처리 후 LTLT 살균하였을 때 각각 71.7, 56.6, 50.7 µg/mL로 측정된 것으로 보아 LTLT를 처리한 경우 원유 중에 존재하는 IgG가 상당량 소실되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-33). 반면에 LTLT만 처리한 시료와 100, 150, 200 kJ로 PEF 처리한 후 LTLT 살균한 시료의 IgG 농도는 통계적으로 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

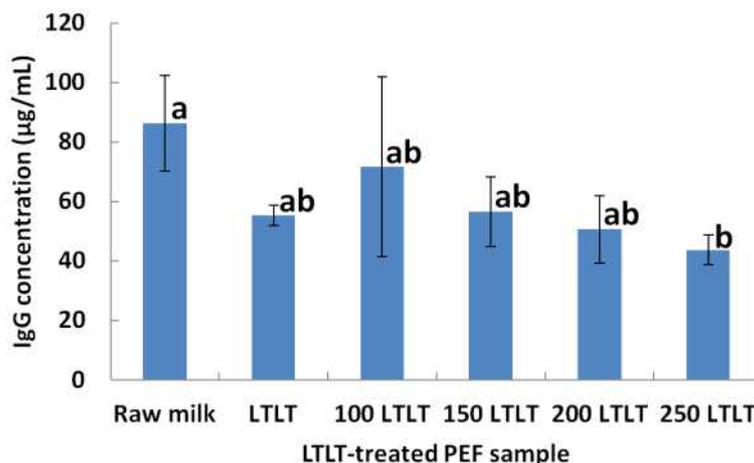


Fig. 3-33. PEF 처리 후 LTLT 살균한 시료의 IgG 농도변화.

(2) PEF 처리 후 LTLT 살균 시 잔존하는 IgA의 함량

Fig. 3-34에 나타낸 바와 같이 PEF 처리 후 LTLT로 살균하여 IgA의 농도변화를 확인하였는데, 원유(28.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 비해 LTLT 처리 시 IgA의 농도는 11.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 50%이상 소실된 것을 알 수 있었다. 반면에 PEF 처리 후 LTLT 살균한 시료의 경우, LTLT만 처리한 시료보다 낮은 농도가 검출되었으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다.

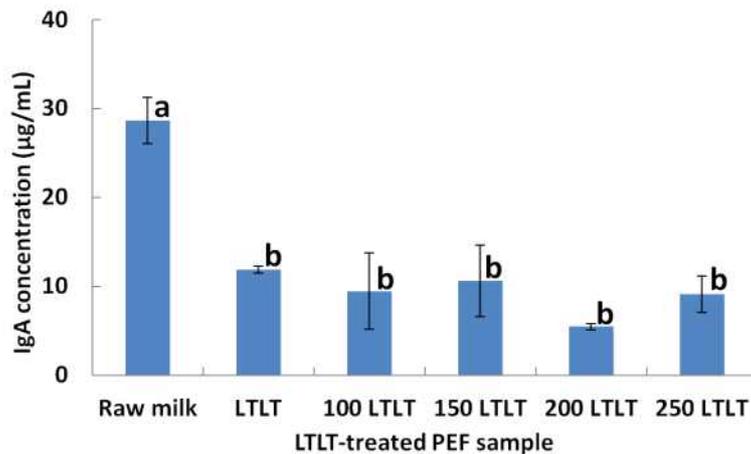


Fig. 3-34. PEF 처리 후 LTLT 살균한 시료의 IgA 농도변화.

(3) PEF 처리 후 LTLT 살균 시 잔존하는  $\beta$ -lactoglobulin의 함량

PEF 처리하지 않은 원유의  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 935  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었으며, LTLT를 처리한 시료의  $\beta$ -lactoglobulin 농도는 666  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 29%가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 100 kJ로 PEF 처리한 후 LTLT 살균한 시료의 경우의 농도는 554  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 원유에 비하여 41% 감소하였다. 150 kJ 이상의 에너지로 처리한 PEF 처리한 후 LTLT 살균한 시료들은 100 kJ로 처리한 후 LTLT 살균한 시료보다 높은 농도를 나타내었으나, 이는 추후 보완 연구를 통하여 밝혀져야 할 것이다.

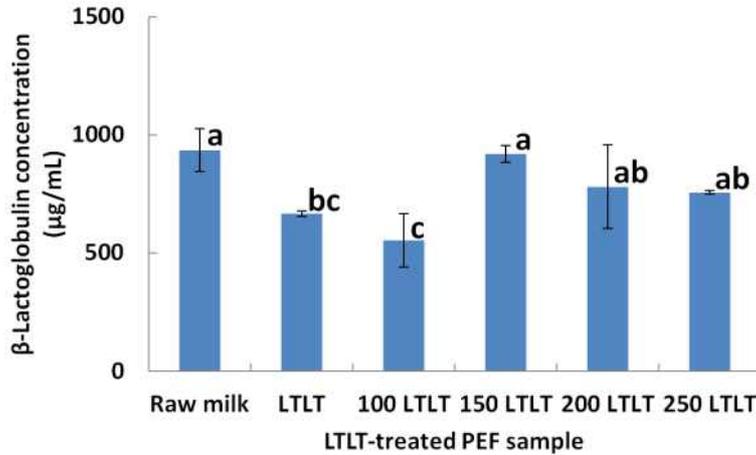


Fig. 3-35. PEF 처리 후 LTLT 살균한 시료의  $\beta$ -lactoglobulin 농도변화.

한편 Fig. 3-36에는 PEF와 LTLT를 병용 처리하였을 경우 우유 내 단백질의 변성정도를 SDS-PAGE와  $\beta$ -lactoglobulin의 변화를 western blot으로 나타내었다. 원유를 100, 130 kJ의 에너지로 PEF 처리하였을 경우, SDS-PAGE 상에서 단백질 band의 양상이 변화되지 않아 PEF 처리에 의해 원유의 단백질은 변성되지 않음을 알 수 있었다(left panel lane 1-3). 원유를 100 kJ 또는 130 kJ로 PEF 처리한 후 LTLT 살균한 우유 역시 원유와 단백질 band 양상이 크게 변화하지 않아, 이들 처리가 우유 단백질의 변성에는 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다(left panel lane 1, 4, 5). 또한 원유를 LTLT 살균을 먼저 실시한 후 100 kJ로 PEF 처리를 하였을 경우에도 단백질 band 양상에는 크게 변화하지 않아, 우유 단백질은 변성되지 않음을 관찰할 수 있었다(left panel lane 1, 6, 7).  $\beta$ -Lactoglobulin의 항체를 이용하여 우유 단백질의 western blot을 실시한 결과  $\beta$ -lactoglobulin의 band는 PEF 또는 LTLT 처리에 의하여 큰 변화가 없는 것으로 나타나 LTLT나 130 kJ의 PEF 처리에 의해서는  $\beta$ -lactoglobulin이 변성되지 않음을 확인하였다.

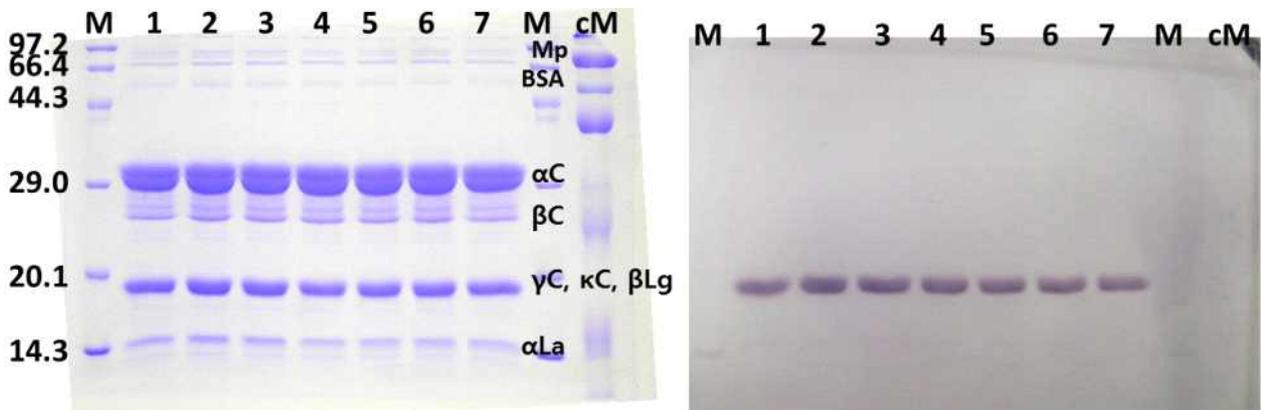


Fig. 3-36. PEF 처리와 LTLT 병용 처리한 우유의 SDS-PAGE와 western blot 결과.

(Lane M, molecular weight marker; 1, raw milk, control; 2, PEF 100 kJ; 3, PEF 130 kJ; 4, LTLT after PEF 100 kJ; 5, LTLT after PEF 130 kJ; 6, LTLT; 7, PEF 100 kJ after LTLT; cM, molecular weight color marker)  
 (SDS-PAGE : 12.5 % Separating gel; Primary antibody : Polyclonal / Rabbit /  $\beta$ -Lactoglobulin)

본 연구에서 실시한 sandwich ELISA 방법에 의하면 원유를 LTLT 처리하였을 때, 또는 PEF 처리 후 LTLT 살균하였을 경우, 일정 수준의 면역단백질들이 감소하는 것으로 나타났는데 이는 sandwich ELISA 방법이 western blot보다 민감한 반응을 나타내기 때문으로 판단된다.

(4) PEF 처리 후 LTLT 살균 시 잔존하는 lactoferrin의 함량

무처리군인 원유의 lactoferrin의 농도는 11.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었으며, LTLT 및 100 kJ 이상으로 PEF 처리 후 LTLT한 시료들은 평균 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 74%가 감소된 것을 확인할 수 있었다. LTLT만 처리한 우유의 경우 lactoferrin의 농도가 2.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 낮았고, 100 kJ 이상으로 PEF 처리한 우유시료들과 PEF를 처리하지 않은 원유와는 통계적으로 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 3-37).

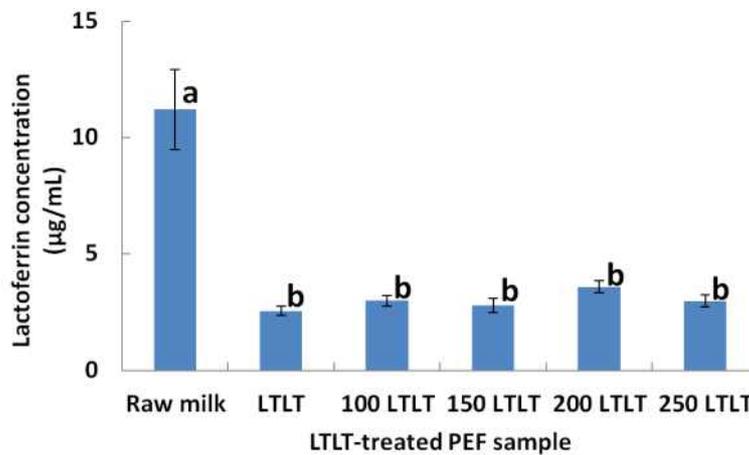


Fig. 3-37. PEF 처리 후 LTLT 살균한 시료의 lactoferrin 농도변화.

(5) PEF 처리 후 LTLT 살균 시 잔존하는  $\alpha$ -lactalbumin의 함량

PEF를 처리하지 않은 원유의 경우  $\alpha$ -lactalbumin의 농도는 1096  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 LTLT를 처리하면서  $\alpha$ -lactalbumin이 감소하는 것을 Fig. 3-38에서 볼 수 있었다. LTLT만 처리한 우유의 경우 631  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 잔류하였고, PEF와 LTLT를 병용 처리한 우유와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 200 kJ의 에너지로 PEF를 처리하고 LTLT 살균한 우유는 다른 시료들보다 높은 값을 나타내었다.

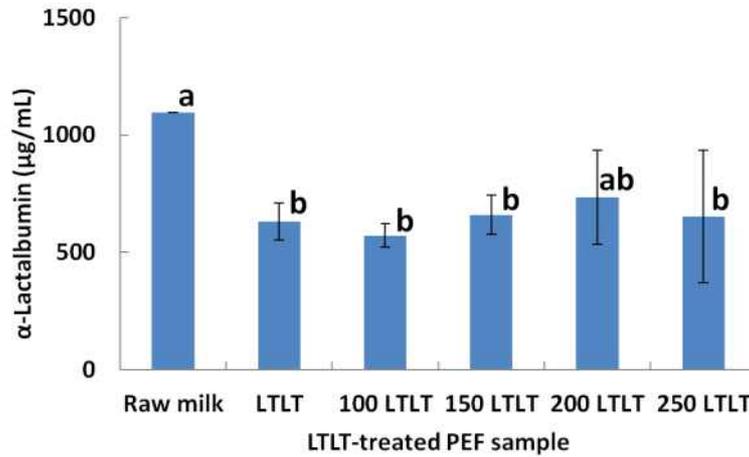


Fig. 3-38. PEF 처리 후 LTLT 살균한 시료의 α-lactalbumin 농도변화.

(6) PEF 처리 후 LTLT 살균 시 잔존하는 TGF-β1의 함량

PEF 및 LTLT 살균하지 않은 원유의 TGF-β1 농도는 12.4 ng/mL로 측정되었고, LTLT를 처리한 우유는 10.5 ng/mL로 나타났으므로, 16%가 소실되었고, 통계적으로 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 반면에 100 kJ 이상으로 PEF 처리한 우유의 경우 LTLT를 처리하지 않은 우유보다 약간 감소한 값이 관찰되었으나, 각 시료마다 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

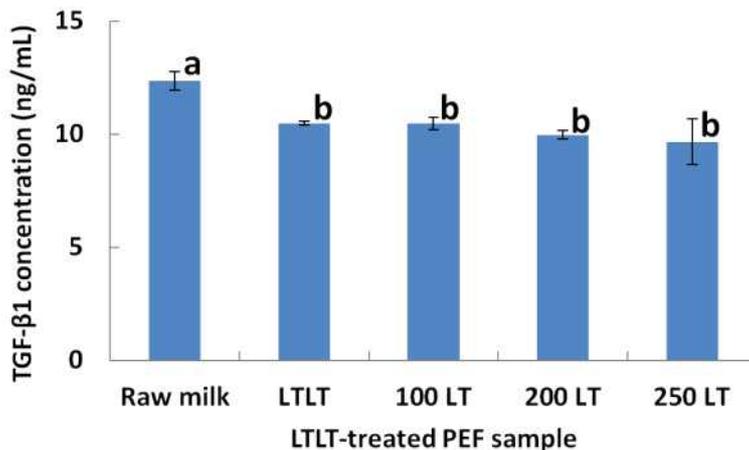


Fig. 3-39. PEF 처리 후 LTLT 살균한 시료의 TGF-β1 농도변화.

사. 최적 살균 공정에 따른 살균 우유의 기능성 단백질 함량 측정 및 저장 중 기능성 단백질의 변성과 유용성분 변화 연구 및 보존성 향상 기술 개발

우유는 각종 영양소를 많이 함유하고 있어 소비자들의 선호도가 높으나 미생물이 성장하기에 최적 조건을 갖추고 있어 살균우유를 실온에 보존할 경우에는 빠른 시일 내에 부패하게 되므로 냉장보관하도록 되어 있다. 우유의 유통기간에 영향을 미치는 주요 요인은 원유의 미생물

오염 수준, 살균 시간과 온도, 살균 후 오염 여부와 정도, 살균에 저항하는 내열성미생물의 수, 살균 후 우유 저장온도 등이 있다. 이러한 요인을 효과적으로 차단하거나 최대 조건으로 처리할 경우에 살균유는 보다 장기간 보존이 가능할 것이다. 2005년 당시 우리나라 살균유의 유통기간은 냉장보관에서 5일로 되어 있으나 학교 급식용 살균우유를 실온에서 5개월 동안 보관해도 상하지 않는다는 민원이 제기되었고, 이의 원인 파악을 위해 우유의 장기간 보관에 따른 품질변화 시험의 필요성이 대두되었다. 또한 우유의 저장기간 및 보관방법에 따른 우유의 품질 및 안전성에 대한 분석자료가 요구되고 있으나, 국내에서는 생산·제조되는 우유의 살균과 멸균방법 및 보관방법에 따른 품질변화 등에 대한 최근 기초자료가 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 PEF 처리한 우유, PEF 처리 후 LTLT 살균한 우유를 4°C에서 저장하면서 저장기간에 따른 면역 단백질의 변화를 확인함으로써 PEF 처리에 의한 우유의 저장성 향상 정도를 조사하였다.

(1) 저장기간에 따른 IgG의 함량 변화

Fig. 3-40에서 볼 수 있듯이, PEF와 LTLT 처리를 하지 않은 원유의 0일차 IgG의 농도는 86.3 µg/mL였고, 16일이 경과한 후 56.9 µg/mL로 35%의 IgG가 소실된 것으로 확인되었다. PEF를 처리한 뒤 저장성에 대한 결과는 Fig. 3-41에 나타내었고, 100, 200, 250 kJ로 PEF 처리한 우유의 IgG의 농도는 0일차와 16일차가 큰 차이를 볼 수 없었다. 반면에 150 kJ로 PEF 처리한 우유는 0일차에 60.2 µg/mL에서 16일 경과 후 44.0 µg/mL으로 감소한 것을 볼 수 있었으나, 결과 간 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다.

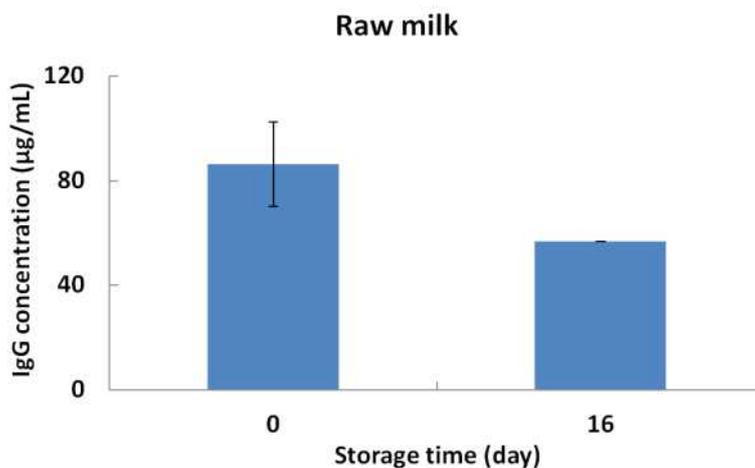


Fig. 3-40. 무처리 원유의 저장기간에 따른 IgG 농도 변화.

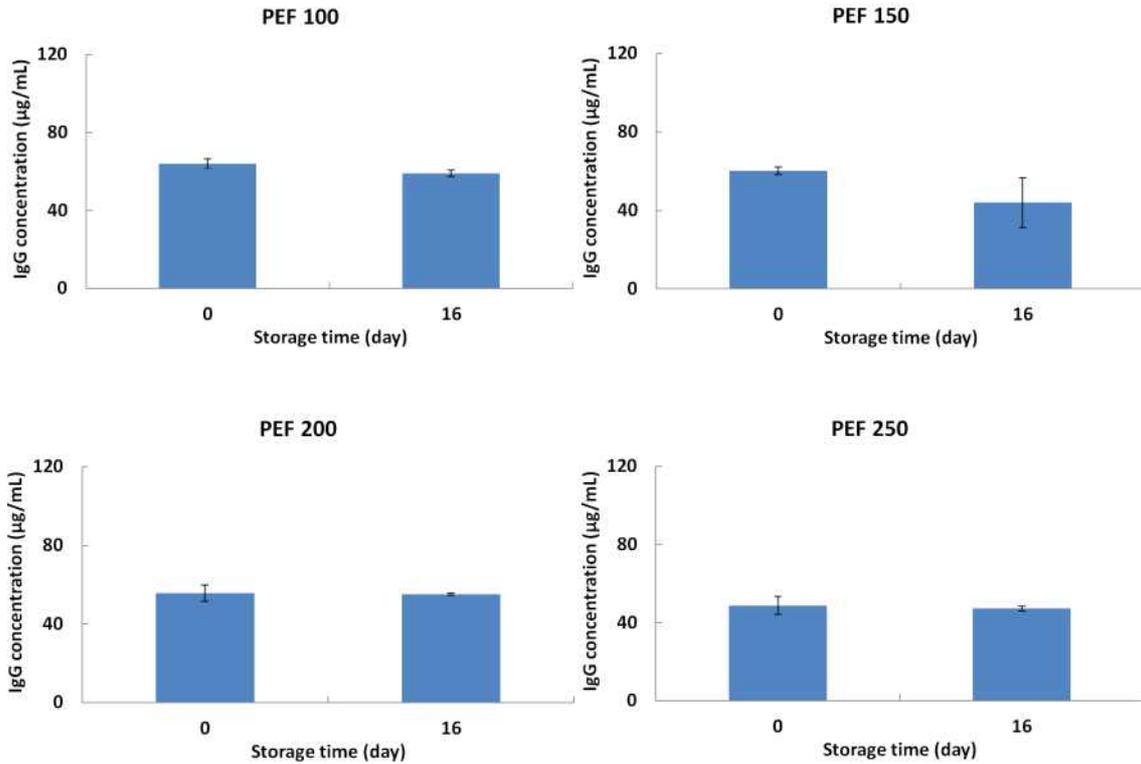


Fig. 3-41. PEF 처리 시료의 저장기간에 따른 IgG 농도 변화.

PEF와 LTLT를 병용처리한 우유의 저장성 결과는 Fig. 3-42와 3-43에 나타내었고, LTLT만을 처리한 우유는 0일차에 55.3 µg/mL, 16일차에 50.1 µg/mL로 신뢰구간 95% 수준에서 유의적으로 감소한 것으로 관찰되었다. 100 kJ의 에너지로 PEF 처리한 후 LTLT 살균한 우유의 경우 0일차와 16일 경과 후 IgG의 농도에 큰 차이가 있었는데, 각각 71.7, 42.1 µg/mL로 42%가 감소하였다. 반면에 150 kJ 이상으로 PEF를 처리하고, LTLT를 병용 처리한 우유의 IgG 농도는 저장 기간 동안 크게 변화하지 않았는데, 250 kJ의 에너지로 PEF를 처리하고 LTLT로 살균한 우유의 경우 43.8 µg/mL에서 35.8 µg/mL로 측정되어  $p < 0.05$  수준에서 유의적으로 감소한 것으로 확인되었다.

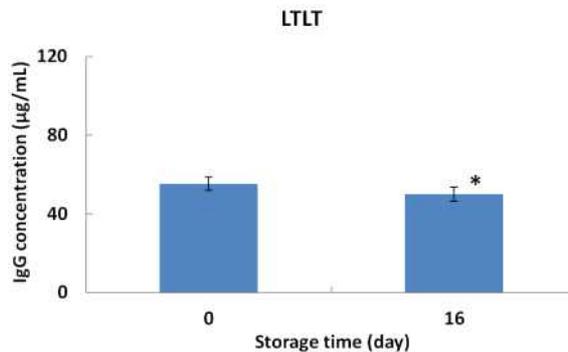


Fig. 3-42. LTLT살균 우유의 저장기간에 따른 IgG 농도 변화.

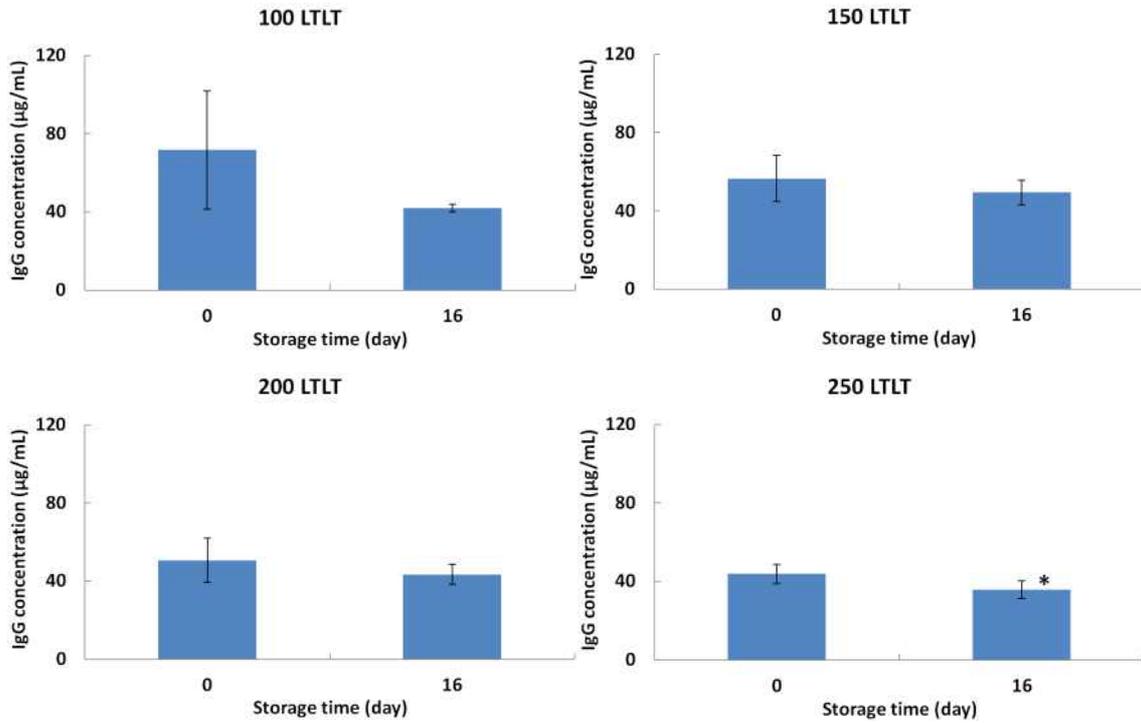


Fig. 3-43. PEF와 LTLT 병용처리 우유의 저장기간에 따른 IgG 농도 변화.

(2) 저장기간에 따른 IgA의 함량 변화

PEF를 처리하지 않은 원유의 IgA의 농도는 28.6 µg/mL에서 16일이 지난 후 16.5 µg/mL로 저장 후 43%가 소실되었으나 통계적으로 유의하지 않았다. Fig. 3-45에 나타낸 바와 같이 100 kJ 이상으로 PEF를 처리한 우유의 IgA의 농도는 근소한 차이로 감소한 반면에 250 kJ의 에너지로 PEF 처리한 우유는 0일차보다 16일 경과의 농도가 증가하였는데, 그 값은 각각 11.6 µg/mL에서 12.4 µg/mL로 7%가 증가하였으나  $p < 0.05$ 수준에서 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타나 저장성의 변화는 없는 것으로 확인되었다.

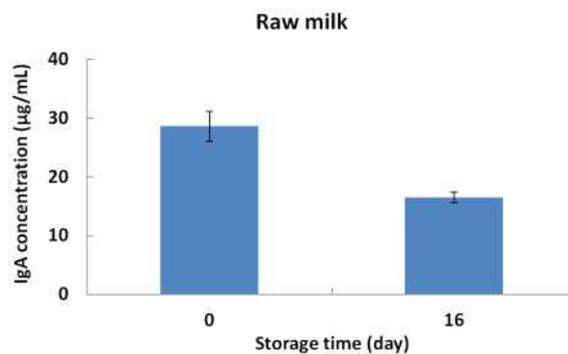


Fig. 3-44. 무처리 원유의 저장기간에 따른 IgA 농도 변화.

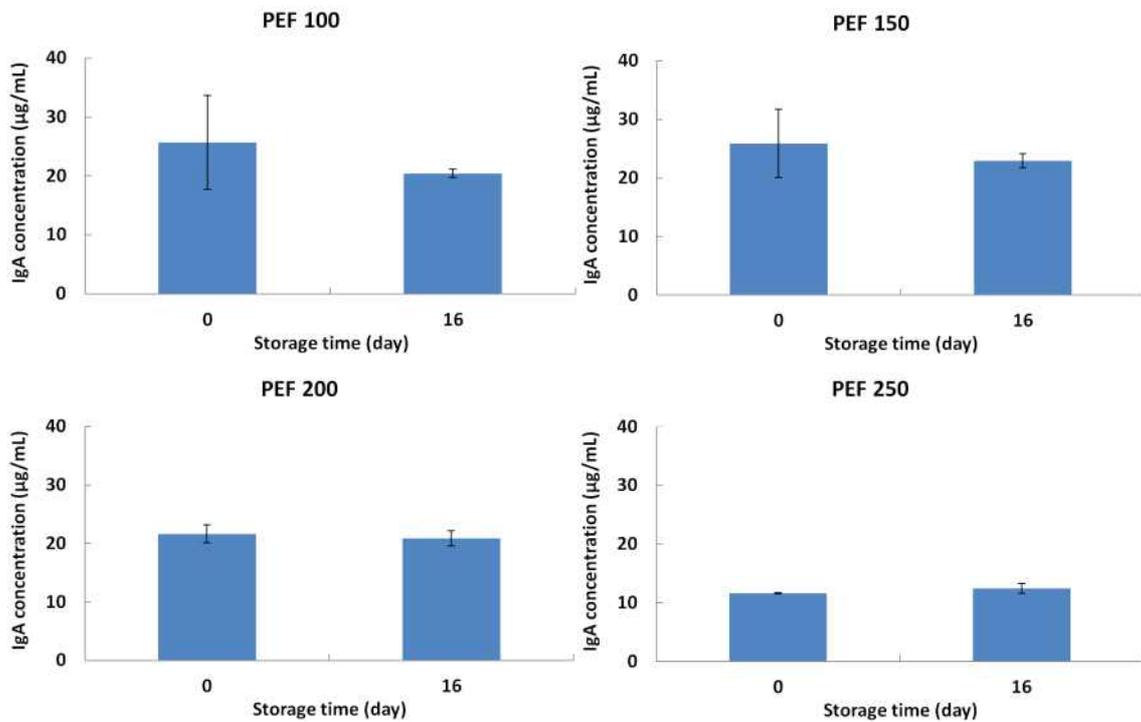


Fig 3-45. PEF 처리 시료의 저장기간에 따른 IgA 농도 변화.

LTLT만 처리한 우유의 경우 Fig. 3-46과 같이 0일차와 16일차의 IgA의 농도는 각각 11.9  $\mu$ g/mL, 13.1  $\mu$ g/mL로 측정되어 저장에 의해 IgA 농도가 증가한 것으로 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다. Fig. 3-47에서 100 kJ 이상의 에너지로 PEF 처리한 후 LTLT 살균한 우유는 조금씩 증가한 것으로 확인되었으나 신뢰구간 95% 수준에서 유의적인 증가는 아닌 것으로 나타났다. 반면에 200 kJ로 PEF 처리하고, LTLT를 병용 처리한 결과는 0일차에서 5.5  $\mu$ g/mL에서 8.9  $\mu$ g/mL로 증가하였고, 통계적으로 확인했을 때  $p < 0.01$  수준에서 유의적인 것으로 확인되었다. 이는 추후 연구가 더욱 필요할 것으로 판단되었다.

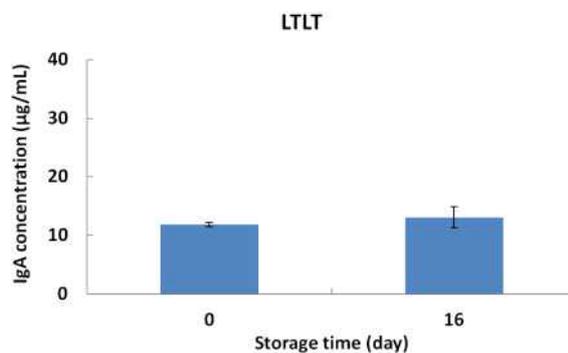


Fig. 3-46. LTLT살균 우유의 저장기간에 따른 IgA 농도 변화.

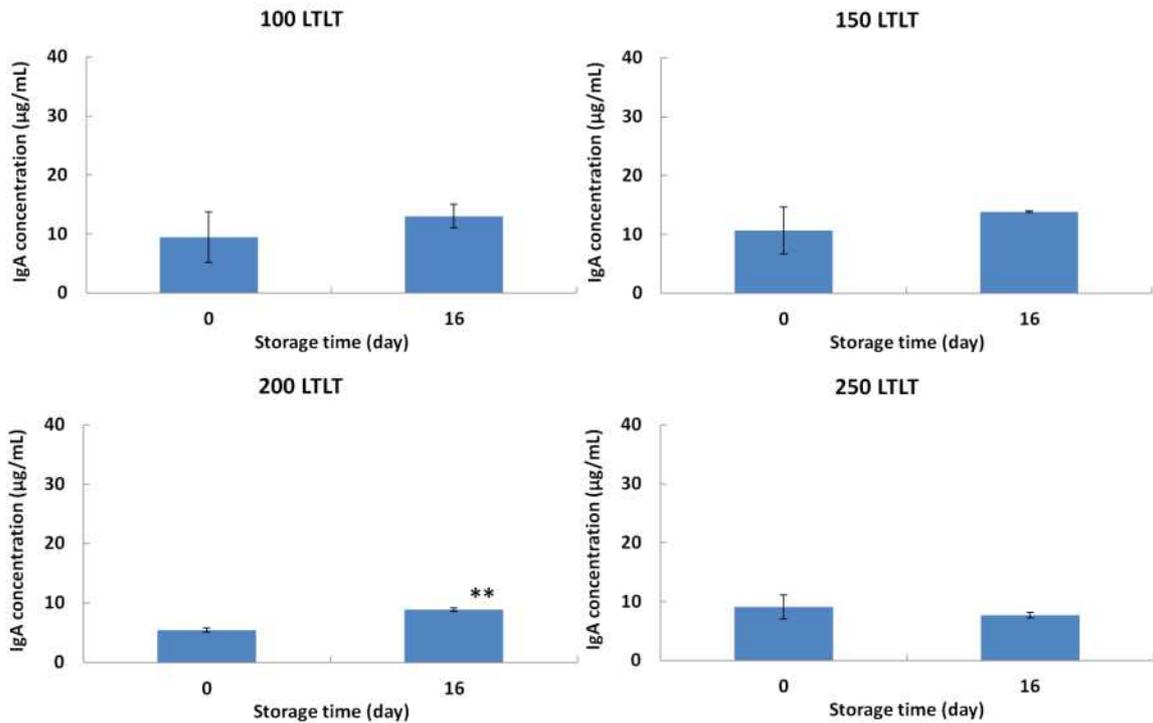


Fig. 3-47. PEF와 LTLT 병용처리 우유의 저장기간에 따른 IgA 농도 변화.

### (3) 저장기간에 따른 TGF-β1의 함량 변화

Fig. 3-48에는 PEF를 처리하지 않은 원유의 16일 경과 후 TGF-β1 농도를 나타내었는데, 0일 차에 12.4 ng/mL로 측정되었고, 16일차에 4.2 ng/mL로 감소하였다. 감소한 TGF-β1의 농도는 저장기간이 증가할수록 TGF-β1은 신뢰구간 95% 수준에서 유의적으로 감소하였다. 유사하게 저장기간에 따라 PEF를 처리한 시료의 결과 또한 감소하였는데, 100, 250 kJ로 PEF 처리한 시료의 경우 99%의 신뢰구간에서 유의적인 차이가 있다고 확인할 수 있었다. 이는 TGF-β1의 경우 16일 경과 후 유의적으로 농도의 감소가 이루어졌다고 판단하였다.

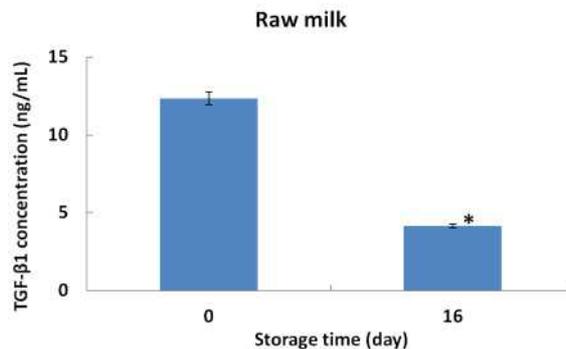


Fig. 3-48. 무처리 원유의 저장기간에 따른 TGF-β1 농도 변화.

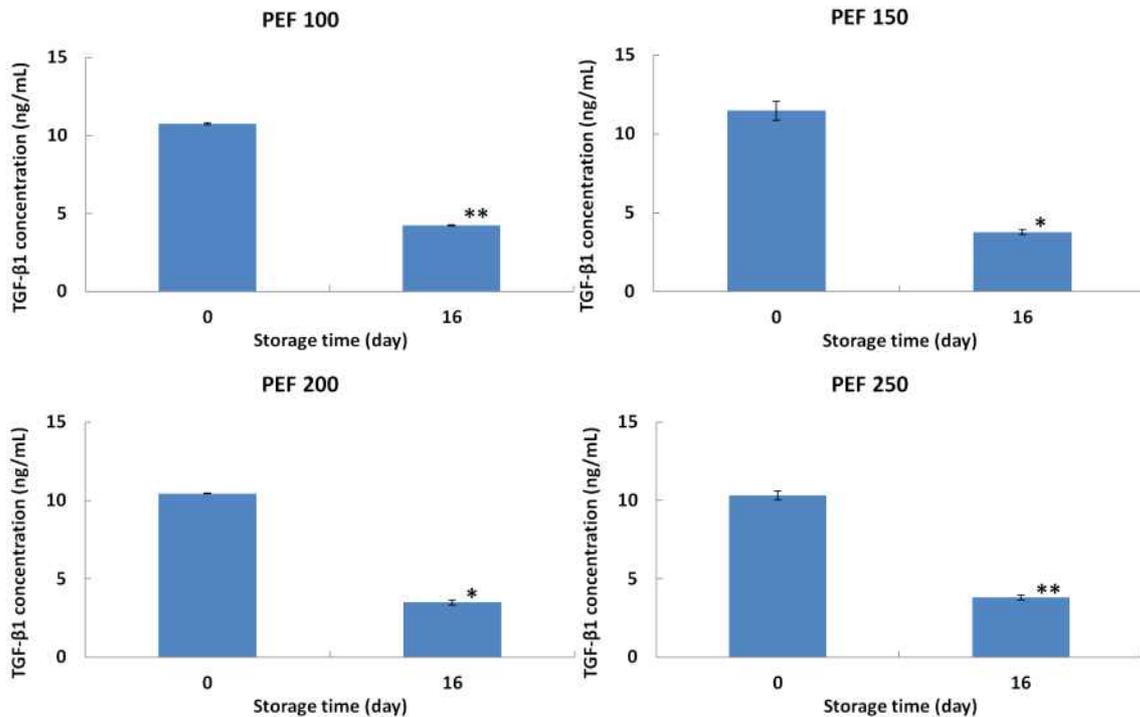


Fig. 3-49. PEF 처리 시료의 저장기간에 따른 TGF-β1 농도 변화.

LTLT를 처리한 후 16일간 TGF-β1의 저장성을 관찰하였는데, 0일차에는 10.5 ng/mL, 16일 경과 후 3.4 ng/mL로 68%가 감소하였고,  $p < 0.01$  수준에서 유의적으로 TGF-β1이 소실되었다. Fig. 3-51에는 PEF 처리 후 LTLT 살균하는 병용 처리로 우유 내 TGF-β1의 농도변화를 나타내었는데, 유사한 결과로 100 kJ 이상의 에너지를 이용한 PEF 처리 후 LTLT 살균한 우유의 경우 16일 경과 후 감소하였다. 250 kJ로 PEF를 처리하고 LTLT한 우유는 9.7 ng/mL에서 4.0 ng/mL으로 TGF-β1의 농도는 감소하였으나 통계적으로 유의하다고 볼 수 없어, 250 kJ로 PEF 후 LTLT 살균은 저장성에서 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 관찰되었다.

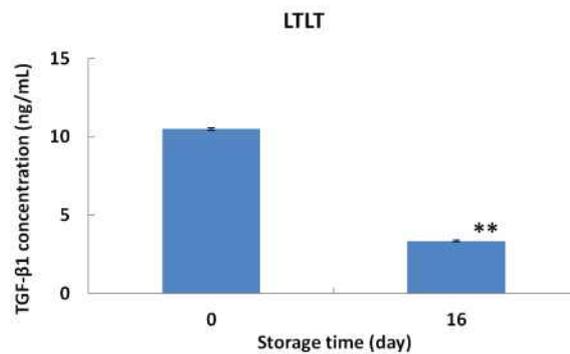


Fig. 3-50. LTLT살균 우유의 저장기간에 따른 TGF-β1 농도 변화.

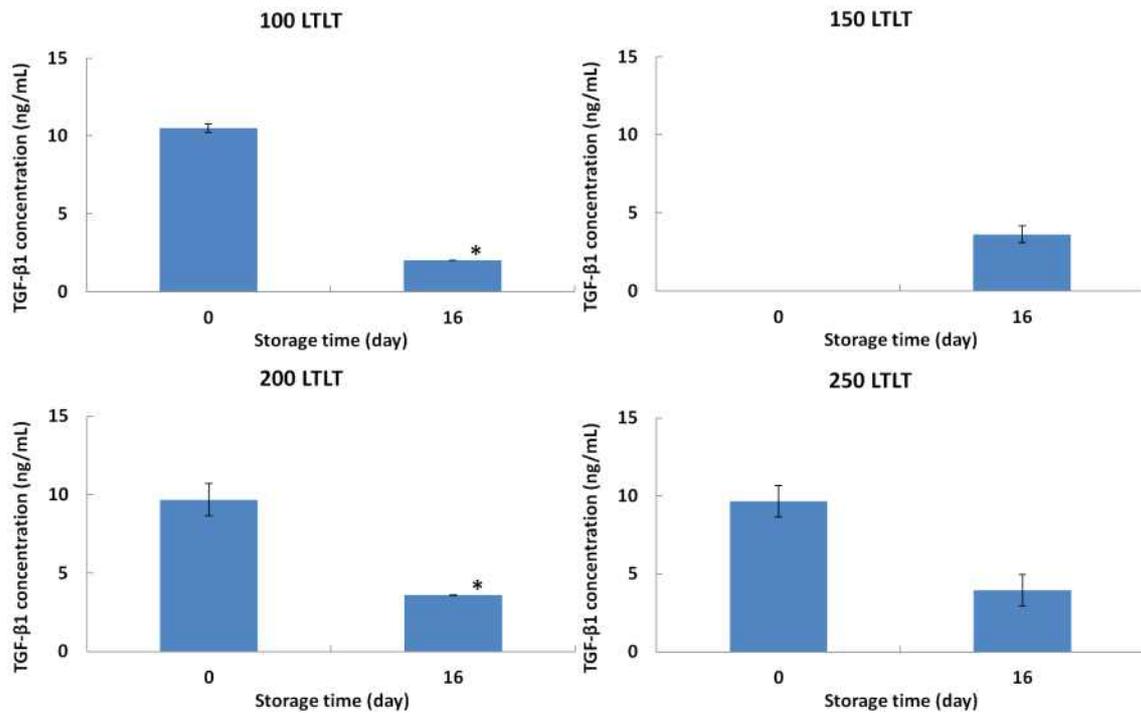


Fig. 3-51. PEF와 LTLT 병용처리 우유의 저장기간에 따른 TGF-β1 농도 변화.

#### (4) 저장기간에 따른 β-lactoglobulin의 함량 변화

Fig. 3-52에 나타낸 바와 같이, PEF 처리하지 않은 원유의 β-lactoglobulin 농도는 0일차에 935.4 μg/mL로 측정되었고, 4, 8, 16일에는 각각 752.2, 702.7, 676.8 μg/mL로 관찰되었다. 4, 8, 16일차의 β-lactoglobulin의 농도는 0일차에 비해 유의적으로 감소한 것으로 확인되었다. 100 kJ로 PEF 처리한 우유는 PEF를 처리하지 않은 원유의 결과와 유사하게 감소하였으나 0-16일간 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다. 150 kJ로 PEF 처리한 우유의 경우 8일차에 β-lactoglobulin의 농도가 829 μg/mL로 증가하였으나, 통계적으로 저장기간에 따라 유의적 차이가 없는 것으로 보아 저장성에 따른 영향이 적은 것으로 판단할 수 있었다. 반면에 200 kJ로 PEF 처리한 우유의 경우에도 0일차 (635.9 μg/mL)보다 8일차 (872.3 μg/mL)으로 28%가 증가하였는데, 이 결과는 통계적으로 유의적인 차이를 보여 추후 연구가 필요할 것이다. β-Lactoglobulin은 저장기간에 따라 감소가 이루어졌으나 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다.

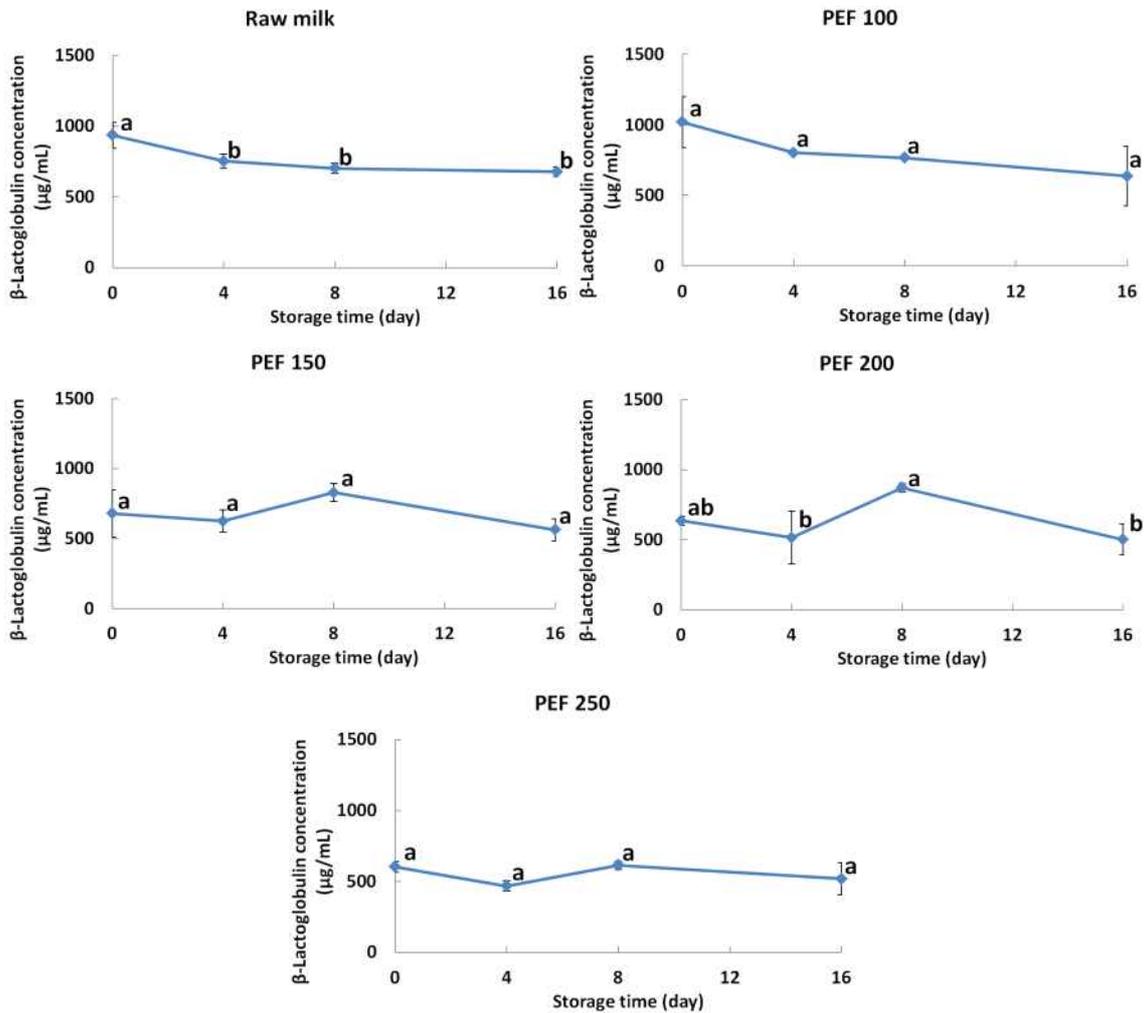


Fig. 3-52. PEF 처리한 우유의 저장기간에 따른 β-lactoglobulin 농도 변화.

LTLT만을 처리한 우유의 경우, 0일차에 β-lactoglobulin의 농도는 666.8 µg/mL로 측정되었고, 4일차에 급격히 감소한 것으로 보이는데, 그 값은 428.0 µg/mL이었다. 0일차와 8, 16일차의 β-lactoglobulin의 농도는 유의적인 차이가 없었으나, 4일차는 유의적으로 감소한 것으로 확인되었다. 반면에 100와 250 kJ의 에너지로 PEF 처리하고 LTLT 살균한 우유는 근소한 차로 8일차에 증가하였으나 통계적으로 유의적인 차이가 없는 것을 관찰할 수 있었다. 150 kJ로 PEF 처리하고 LTLT 처리한 우유는 4, 8, 16일차가 각각 515.8, 575.2, 570.9 µg/mL로 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났고, 0 일차 (919.3 µg/mL)와 비교하면 유의적으로 감소한 것으로 확인할 수 있었다. 반면에 200 kJ로 PEF 처리 후 LTLT 살균한 우유는 0일차에 780.7 µg/mL의 β-lactoglobulin이 측정되었는데, 8일차를 제외하고 4일, 16일차는 각각 541.8, 438.2 µg/mL로, 0 일차에 비해 감소한 것으로 나타났고, 유의적인 차이가 없었다.

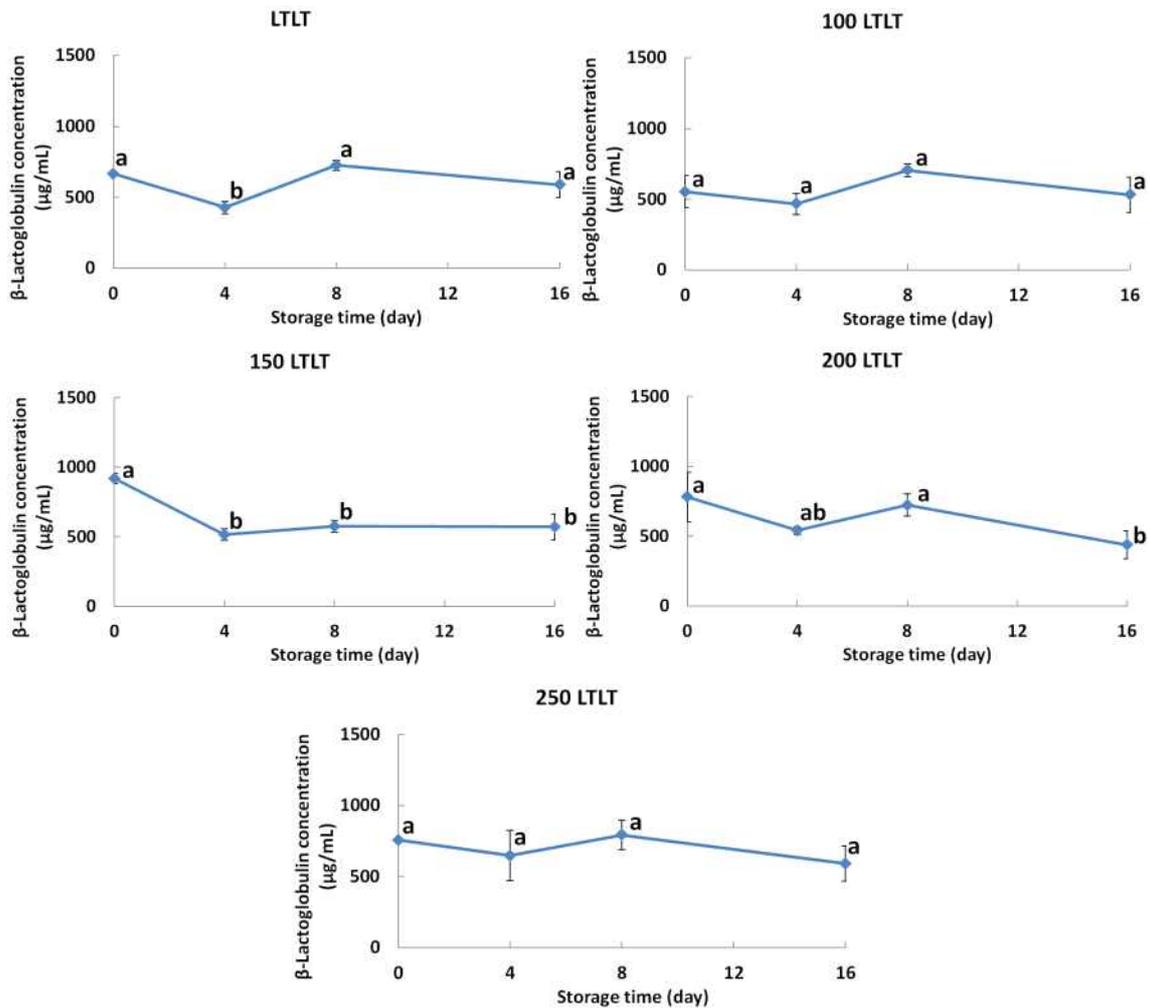


Fig. 3-53. PEF 처리 후 LTLT 살균을 병용 처리한 우유의 저장기간에 따른  $\beta$ -lactoglobulin 농도 변화.

(5) 저장기간에 따른 lactoferrin의 함량 변화

PEF를 처리하지 않은 원유의 lactoferrin 농도는 0일차에 11.2  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났고, 4일차에 7.7  $\mu\text{g/mL}$ 로 급격하게 감소함을 확인할 수 있었고, 8일차에는 7.6  $\mu\text{g/mL}$ 로 4일차에 비해 크게 차이가 나지 않았다. 반면에 16일차에는 4.5  $\mu\text{g/mL}$ 로 0일차에 비하여 60%가 감소하였다. 4, 8, 16일차에 이루어진 감소는 유의적으로 차이가 없는 것으로 확인되었다. 100, 150, 200 kJ로 PEF 처리한 우유는 4일차에 증가하는 값을 나타내지만, 통계적으로 유의적인 차이는 존재하지 않았다. 또한 250 kJ로 PEF 처리한 우유의 경우 0일차에서 4일차는 4.1  $\mu\text{g/mL}$ 에서 3.5  $\mu\text{g/mL}$ 로 감소하였고, 8, 16일차는 3.0, 3.6  $\mu\text{g/mL}$ 으로 관찰되었고 유의적으로 차이가 있음을 확인하였다.

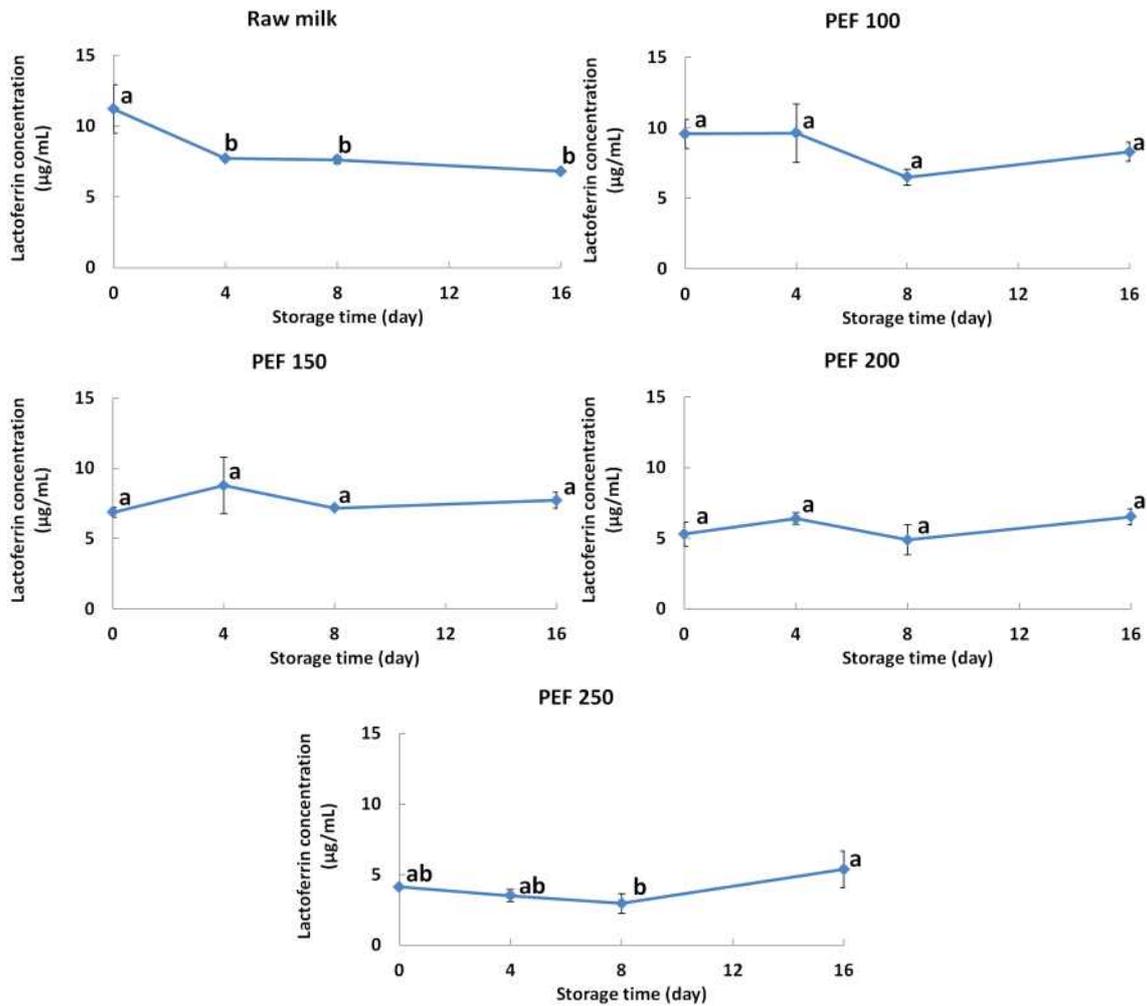


Fig. 3-54. PEF 처리한 우유의 저장기간에 따른 lactoferrin 농도 변화.

PEF 처리하지 않은 LTLT 우유의 경우 0일차의 lactoferrin의 농도는 2.6 µg/mL였고, 8일 차에 2.4 µg/mL로 측정되어 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 100, 150 kJ로 PEF 처리 후 LTLT 살균한 우유는 16일차로 갈수록 근소하게 증가하였으나 통계적으로는 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다. 반면에 250 kJ로 PEF 처리하고 LTLT 살균한 우유의 lactoferrin 농도는 0일차에서 3.0 µg/mL, 4일차에 2.2 µg/mL, 8일차에 2.9 µg/mL, 16일차에 2.5 µg/mL로 측정되었는데, 이와 같은 결과는 저장기간에 따른 lactoferrin의 농도는 크게 변화하지 않는 것으로 확인할 수 있었다.

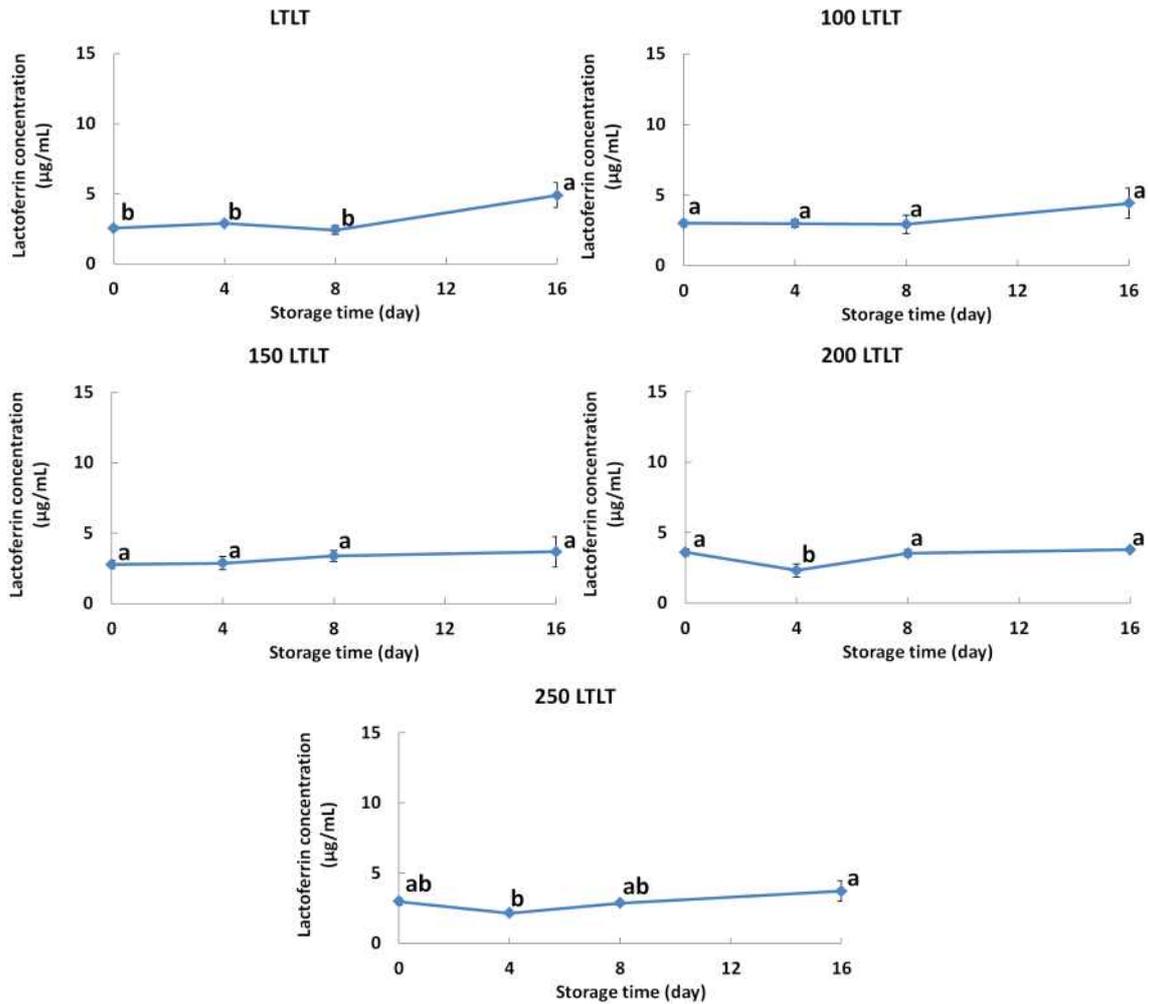


Fig. 3-55. PEF 처리 후 LTLT 살균을 병용 처리한 우유의 저장기간에 따른 lactoferrin 농도 변화.

(6) 저장기간에 따른  $\alpha$ -lactalbumin의 함량 변화

PEF를 처리하지 않은 원유의 경우 0, 4, 8일까지 유의적인 차이가 없이 감소하였지만 16일차에 562.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 0일차(1096.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 비해 49%가 감소하였고, 16일차의  $\alpha$ -lactalbumin 농도는 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 유사하게 PEF를 100 kJ로 처리한 우유 역시 16일차에서 유의적으로 감소하였다. 반면에 150 kJ로 PEF 처리한 우유의 경우 0일차에는 624.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 함유되어 있었으나 16일차에 1103.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되어  $\alpha$ -lactalbumin이 저장기간이 지날수록 증가하는 것으로 관찰할 수 있었는데, 이는 denaturation된  $\alpha$ -lactalbumin이 저온저장함으로써 다시 renaturation된다고 사료되는 바이다. 200 kJ로 PEF 처리한 우유는 0일차에 680.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었고, 4일차에 822.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가하였으나, 8일차에 606.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 0일차보다 농도가 유의적으로 감소하였다. PEF를 250 kJ로 처리한 우유는 유의적으로 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

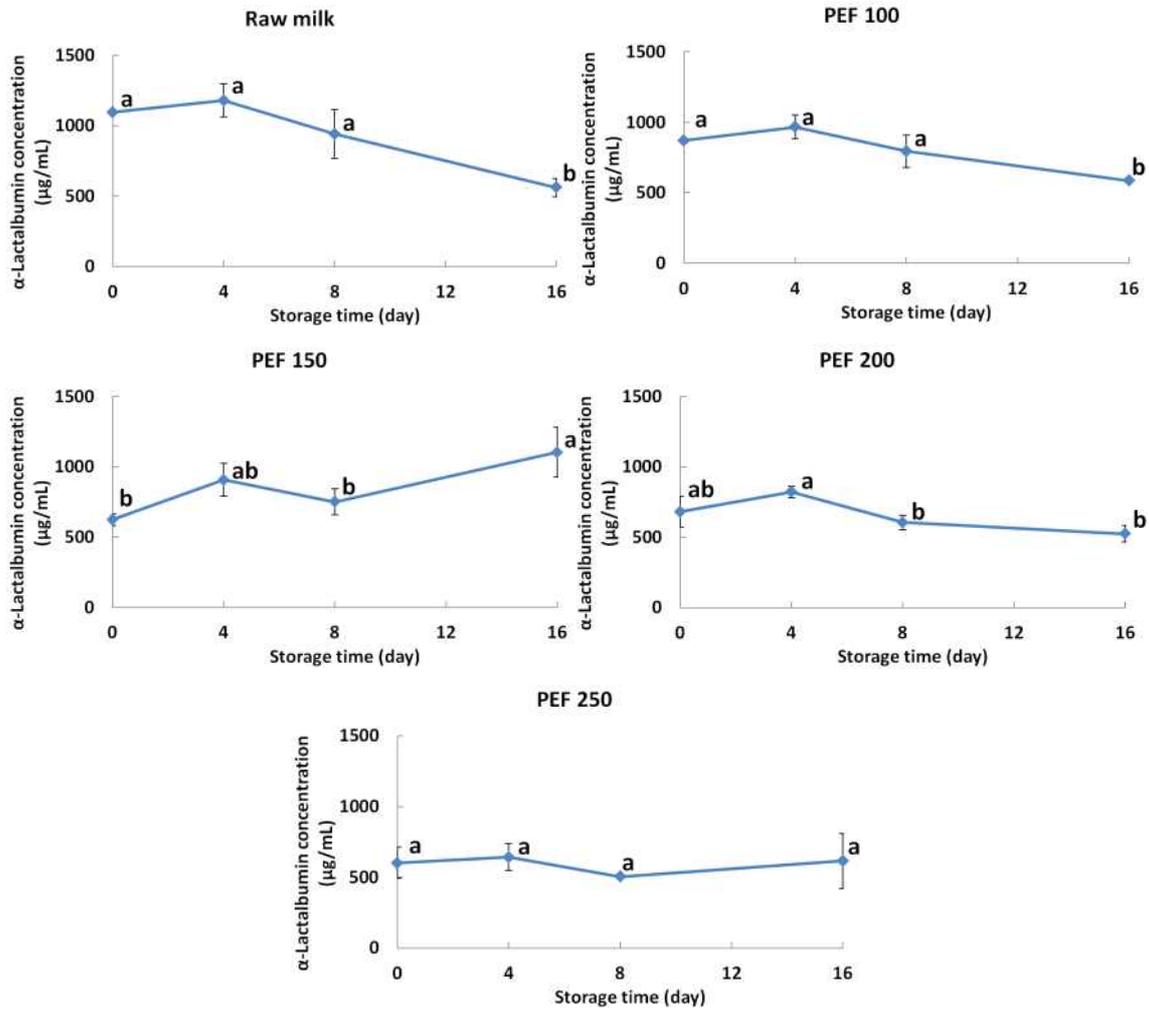


Fig. 3-56. PEF 처리한 우유의 저장기간에 따른 α-lactalbumin 농도 변화.

LTLT만 처리한 우유의 경우 α-lactalbumin의 농도는 0일차에 631.7 µg/mL에서 4일차에 758.0 µg/mL로 증가하였고, 8일차에 다시 535.6 µg/mL로 0일차보다 감소하였으나, 다시 16일 차에 760.1 µg/mL로 증가하였다. 4일차와 16일차는 통계적으로 유의적인 차이가 없었고, 0일차와 8일차가 유의적인 차이가 존재하였다. 100 kJ 이상의 에너지로 PEF 처리 후 LTLT 살균을 병용 처리한 우유의 α-lactalbumin의 농도는 통계적으로 유의적인 차이가 없는 결과로 확인되어 저장기간에 따른 PEF와 LTLT 병용 처리는 α-lactalbumin에 크게 영향을 주지 않는다고 판단할 수 있었다.

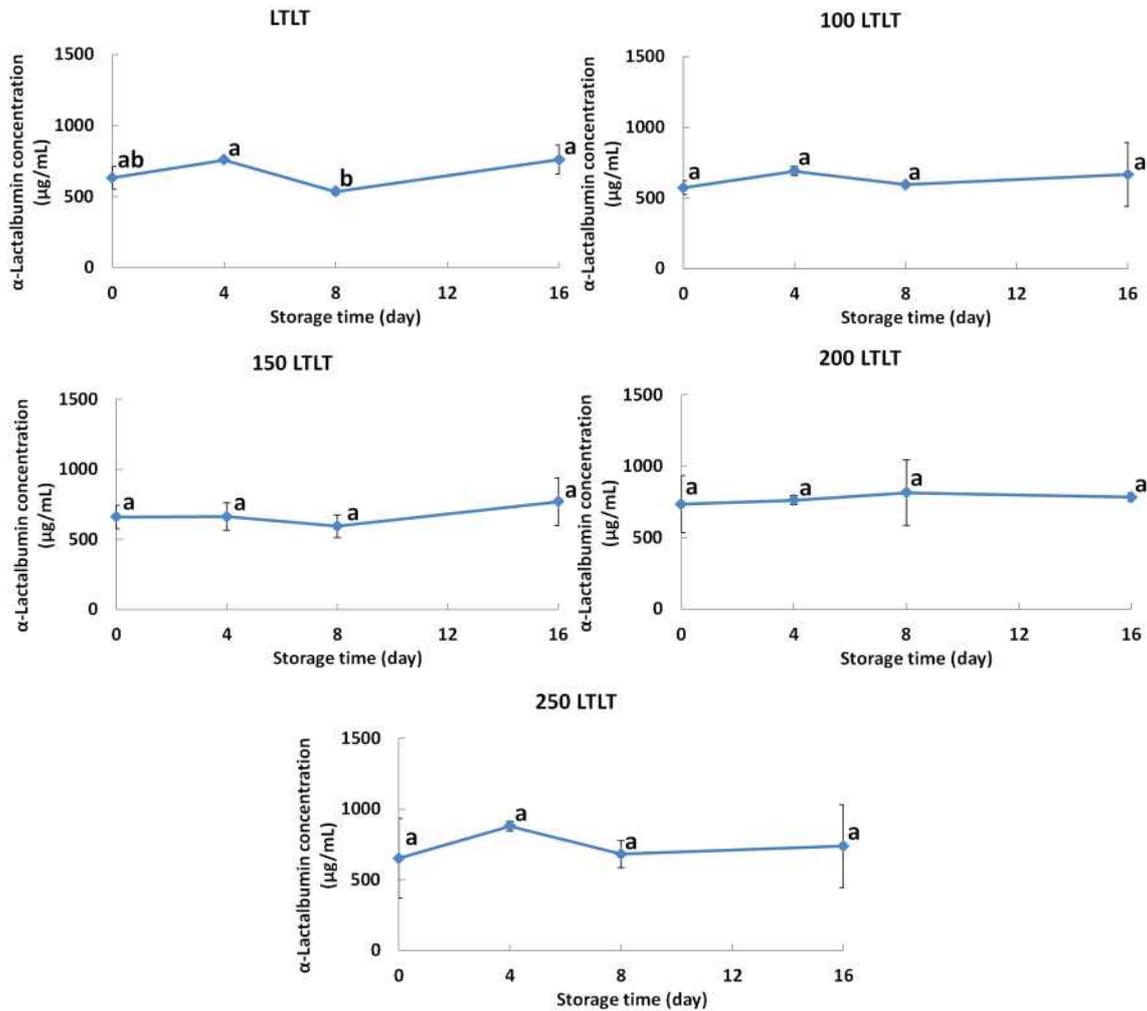


Fig. 3-57. PEF 처리 후 LTLT 살균을 병용 처리한 우유의 저장기간에 따른 α-lactalbumin 농도 변화

아. 원유의 살균에 PEF 단독 살균 또는 기존 가열살균과의 병용처리 공정 확립 및 최적화 연구

(1) 원유의 PEF 처리 후 IgG의 농도 변화

PEF 처리 및 기존 가열살균과 병용처리한 원유 및 가공유 내에 함유되어 있는 IgG의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-58에 나타내었으며, 2 반복하여 평균으로 작성하였다. IgG의 측정 가능한 농도범위는 62.5-500 ng/mL로 확인되었고, 모든 우유시료는 희석한 후 농도를 측정할 수 있었다. Fig. 3-59에 나타낸 바와 같이 원유의 IgG의 농도는 353.69 µg/mL로 측정되었고, PEF와 LTLT 살균을 병용처리한 시료 내의 IgG의 농도는 170.73 µg/mL으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 원유와 PEF 단독 살균한 시료는 유의적으로 차이가 있었고, PEF 처리 후 LTLT 살균의 병용처리 시료와 LTLT 단독으로 처리한 시료는 유의적으로 차이가 없었다. 반면에 HTST 살균의 병용처리 효과를 보기 위한 원유 내의 IgG의 농도는 초기 235.77 µg/mL로 측정되었으나, PEF 단독, HTST 단독 및 병용처리 시

료의 IgG 농도는 각각 186.91, 191.77, 172.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 이러한 결과로 볼 때, 같은 가열처리 방식이라도 IgG의 농도에 있어서 장시간 가열하는 LTLT 살균방식이 단시간 가열 살균인 HTST보다 IgG의 손상에 영향을 끼치는 것으로 판단할 수 있었다.

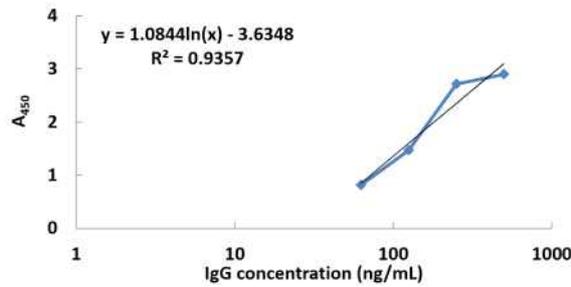


Fig. 3-58. IgG 농도에 따른 Table준정량곡선.

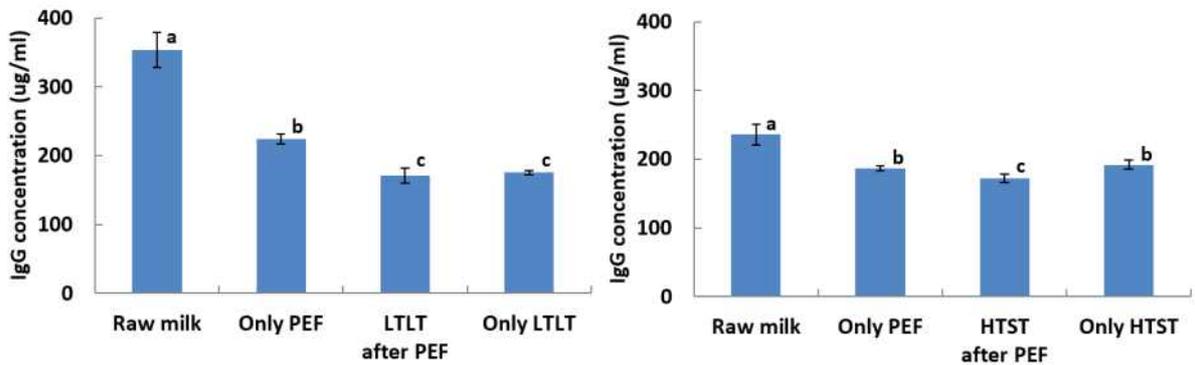


Fig. 3-59. PEF와 LTLT 병용 처리유, HTST 병용 처리유의 IgG 농도.

## (2) 원유의 PEF 처리 후 IgA의 농도 변화

PEF 처리 및 기존 가열살균과 병용처리한 원유 및 가공유 내에 함유되어 있는 IgA의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-60에 나타내었으며, 2 반복하여 평균으로 작성하였다. IgA의 측정 가능한 농도범위는 125-1,000  $\text{ng}/\text{mL}$ 로 확인되었고, 모든 우유시료는 희석한 후 농도를 측정할 수 있었다. Fig. 3-61과 같이 원유의 IgA의 농도는 61.46  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었고, PEF와 LTLT 살균을 병용처리한 시료 내의 IgA의 농도는 10.91  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 낮은 값을 나타내었다. IgG의 경우와 마찬가지로 LTLT 살균을 병용처리한 시료와 LTLT 단독 처리한 시료는 유의적으로 차이가 없었다. 반면에 HTST 살균의 병용처리 효과를 보기 위한 원유 내의 IgA의 농도는 초기 16.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 낮게 측정되었으나, HTST 병용처리나 HTST 단독처리가 각각 9.24, 11.89  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 감소하여 LTLT와 유사한 값을 확인할 수 있었다.

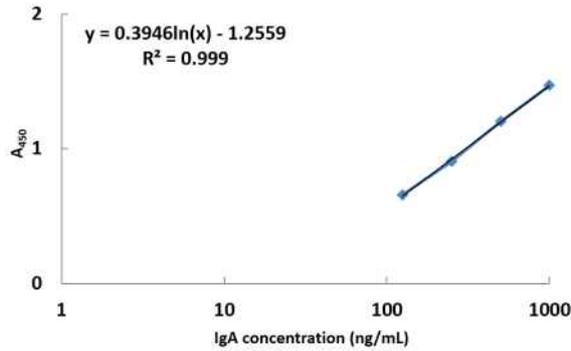


Fig. 3-60. IgA 농도에 따른 Table준정량곡선.

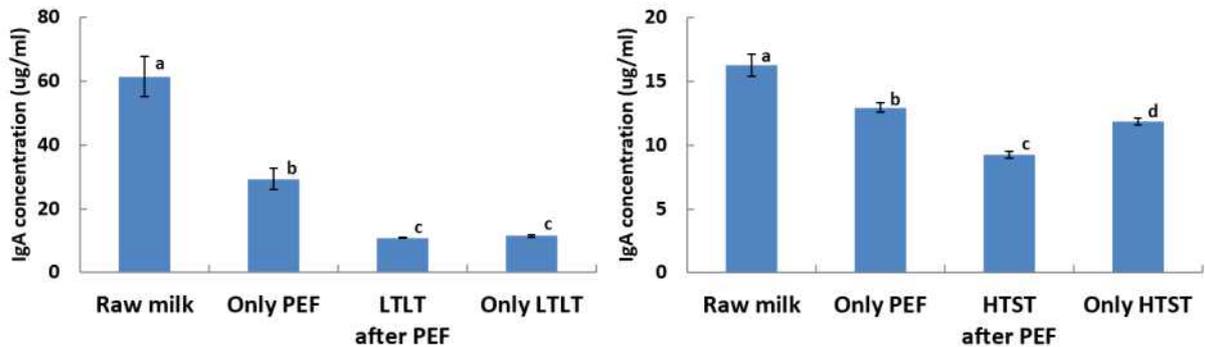


Fig. 3-61. PEF와 LTLT 병용 처리유, HTST 병용 처리유의 IgA 농도.

### (3) 원유의 PEF 처리 후 $\beta$ -lactoglobulin의 농도 변화

PEF 처리 및 기존 가열살균과 병용처리한 원유 및 가공유 내에 함유되어 있는  $\beta$ -lactoglobulin의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-62에 나타내었으며, 2반복하여 평균으로 작성하였다.  $\beta$ -Lactoglobulin의 측정 가능한 농도범위는 15.623-125 ng/mL로 확인되었고, 모든 우유시료는 희석한 후 농도를 측정할 수 있었다. Fig. 3-63에 나타낸 바와 같이 원유의  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 340.47  $\mu$ g/mL로 측정되었고, LTLT만을 단독으로 처리한 시료가 434.54  $\mu$ g/mL으로 가장 높은 값을 나타내었으며 LTLT와 PEF 병용처리한 것과 유의적으로 차이가 있었다. 이러한 경향은 HTST와 PEF를 병용처리한 시료에서도 590.61  $\mu$ g/mL으로 측정된 것을 관찰하였고, HTST 살균한 시료와 유의적으로 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다. 그러나  $\beta$ -lactoglobulin의 경우 다른 면역활성 단백질과는 달리 기존 살균 방법이나 PEF와 병용처리한 방법을 사용하였을 때, 그 농도가 약간씩 증가하는 경향을 보였는데, 이는 열처리에 의한 것으로 판단되나 조금 더 심도있는 연구가 필요하다고 사료되는 바이다.

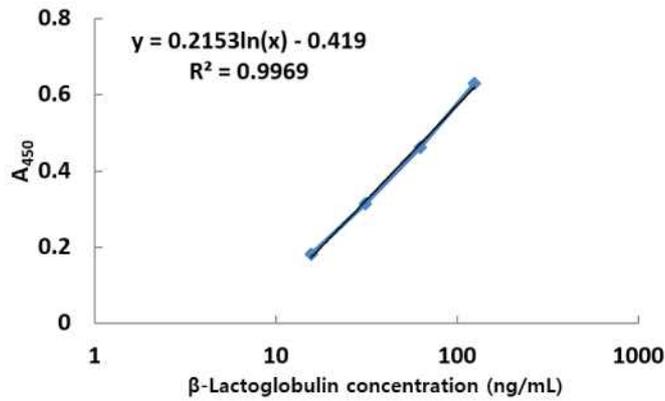


Fig. 3-62.  $\beta$ -Lactoglobulin의 농도에 따른 Table준정량곡선.

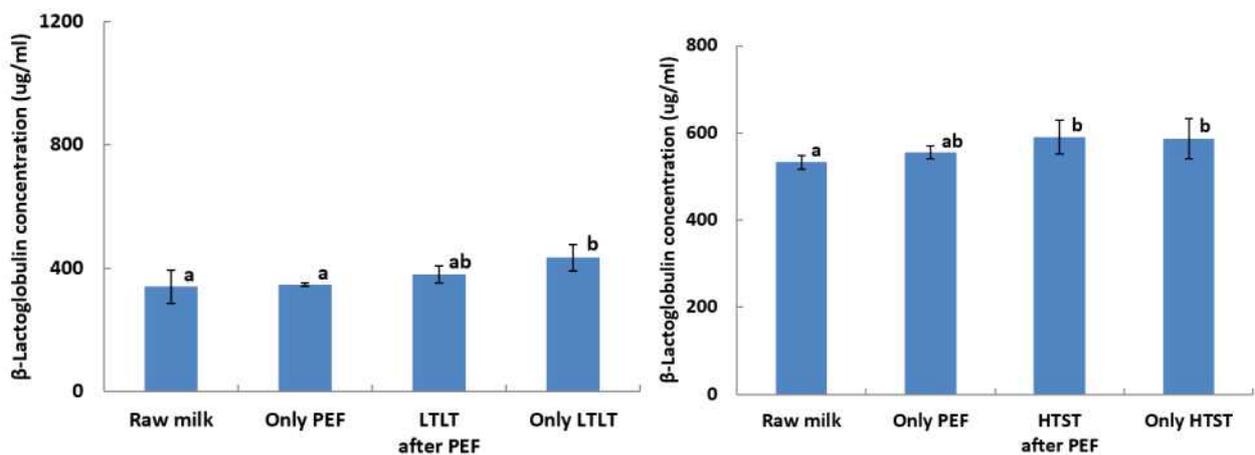


Fig. 3-63. PEF와 LTLT 병용 처리유, HTST 병용 처리유의  $\beta$ -lactoglobulin 농도.

#### (4) 원유의 PEF 처리 후 lactoferrin의 농도 변화

PEF 처리 및 기존 가열살균과 병용처리한 원유 및 가공유 내에 함유되어 있는 lactoferrin의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-64에 나타내었으며, 2반복하여 평균으로 작성하였다. Lactoferrin의 측정 가능한 농도범위는 31.25-250 ng/mL로 확인되었고, 모든 우유시료는 희석한 후 농도를 측정할 수 있었다. Fig. 3-65에 나타낸 바와 같이 원유의 lactoferrin의 농도는 64.06  $\mu$ g/mL로 측정되었고, LTLT를 단독으로 처리한 시료의 농도가 17.69  $\mu$ g/mL로 가장 낮은 농도를 확인할 수 있었다. PEF와 LTLT를 병용처리한 시료의 lactoferrin의 농도는 18.68  $\mu$ g/mL로 LTLT 살균을 단독으로 처리한 시료와 유의적인 차이가 없었고, 원유나 PEF를 단독처리한 시료와는 유의성이 나타났다. 반면에 HTST 살균의 병용처리 효과를 보기 위한 원유 내의 lactoferrin의 농도는 29.06  $\mu$ g/mL로 측정되었고, HTST 단독처리를 하였을 때 21.76  $\mu$ g/mL로 낮은 값을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 병용처리보다는 기존의 살균방법으로 살균을 진행하였을 때, lactoferrin의 농도가 가장 낮은 것을 확인할 수 있었다.

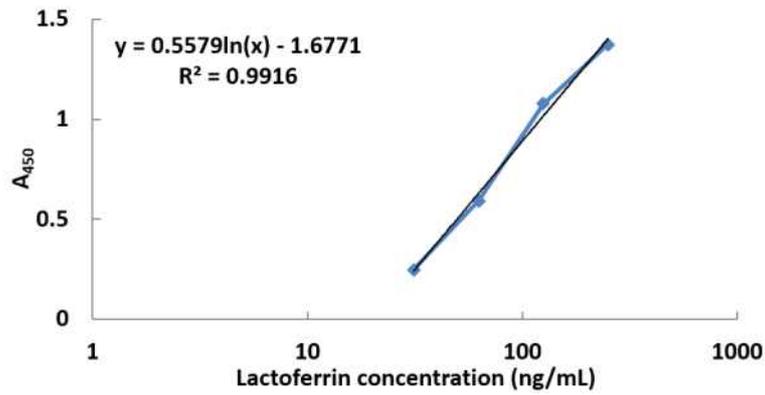


Fig. 3-64. Lactoferrin의 농도에 따른 Table준정량곡선.

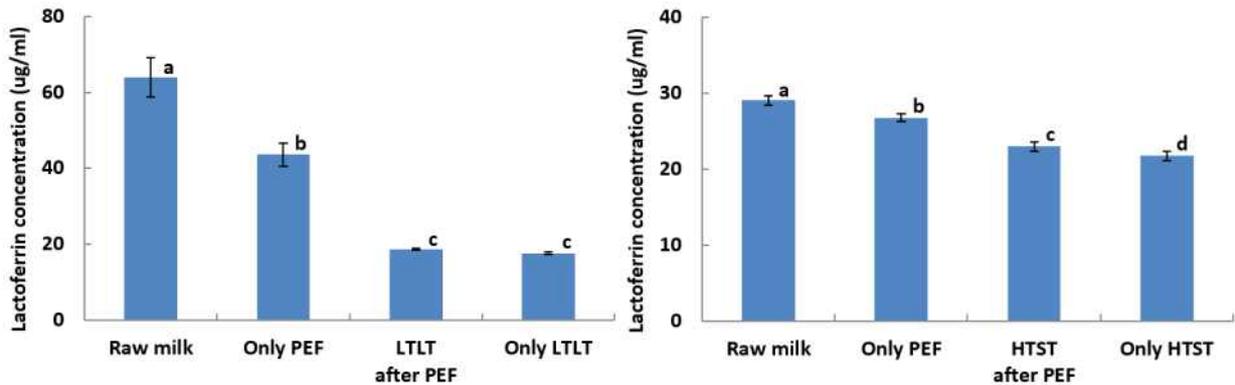


Fig. 3-65. PEF와 LTLT 병용 처리유, HTST 병용 처리유의 lactoferrin 농도.

#### (5) 원유의 PEF 처리 후 $\alpha$ -lactalbumin의 농도 변화

PEF 처리 및 기존 가열살균과 병용처리한 원유 및 가공유 내에 함유되어 있는 lactoferrin의 농도를 측정하기 위하여 sandwich ELISA를 이용한 Table준정량곡선을 Fig. 3-66에 나타내었으며, 2반복하여 평균으로 작성하였다.  $\alpha$ -Lactalbumin의 측정 가능한 농도범위는 6.25-50 ng/mL로 확인되었고, 모든 우유시료는 희석한 후 농도를 측정할 수 있었다. Fig. 3-67과 같이 원유의  $\alpha$ -lactalbumin의 농도는 731.51  $\mu$ g/mL, LTLT 살균을 단독으로 진행하였을 때 663.69  $\mu$ g/mL로 측정할 수 있었다. PEF 단독이나 병용처리한 시료 또한 큰 차이를 보이지 않았다. HTST살균의 경우 LTLT와 마찬가지로 원유의 HTST 단독으로 처리한 시료의 차이가 크지 않았다(558.62, 586.82  $\mu$ g/mL). 또한 통계적인 수준에서 원유와 PEF를 단독처리한 시료가 유의적인 차이가 없었고, LTLT와 PEF를 병용처리한 시료와 LTLT를 단독처리한 시료는 유의적인 차이가 없었다. HTST에 경우에도 4개의 시료간에 유의적인 차이를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 기존의 살균방법과 PEF의 처리는  $\alpha$ -lactalbumin에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

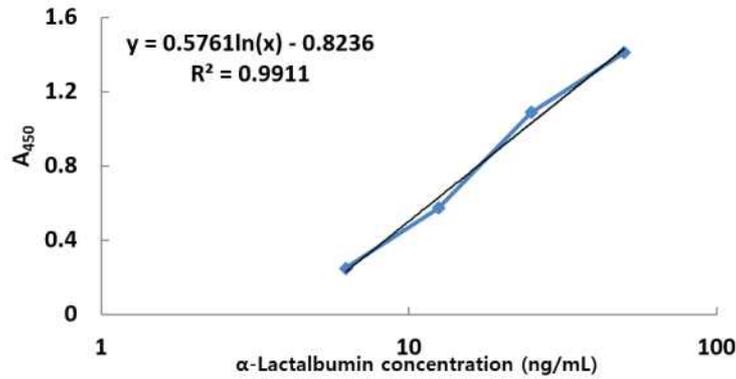


Fig. 3-66.  $\alpha$ -Lactalbumin의 농도에 따른 Table준정량곡선.

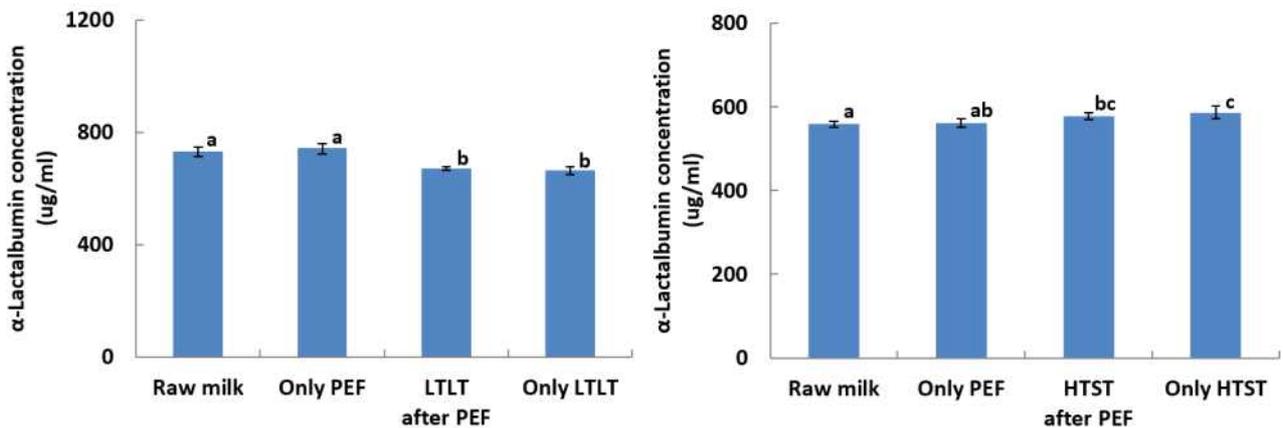


Fig. 3-67. PEF와 LTLT 병용 처리유, HTST 병용 처리유의  $\alpha$ -lactalbumin 농도.

자. 탈지환원유와 가공유의 살균에 PEF 단독 살균 또는 기존 가열살균과의 병용처리 공정 확립 및 최적화 연구

(1) 탈지환원유와 가공유의 PEF 처리 후 IgG의 농도 변화

탈지환원유의 초기 농도는 0.98  $\mu\text{g/mL}$ 와 PEF 단독처리를 하였을 때의 농도는 0.90  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, 가공유 내의 IgG의 농도는 1.02  $\mu\text{g/mL}$ 와 PEF 단독처리 시의 농도는 0.97  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. IgG는 낮은 농도로 인하여 최소 검출한계에 미치지 못하였기 때문에 IgG의 농도를 정확하게 측정할 수 없었다. 이는 탈지환원유와 가공유의 경우 균질화를 비롯한 여러 처리과정에 있어서 IgG의 면역활성이 급격하게 감소된 것으로 판단할 수 있었다(결과 미제시).

(2) 탈지환원유와 가공유의 PEF 처리 후  $\alpha$ -lactalbumin의 농도 변화

Fig. 3-68에 나타낸 바와 같이, 탈지환원유내의  $\alpha$ -lactalbumin 농도는 526.72  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, PEF를 처리하였을 때 493.35  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었다. PEF를 처리하였을 때 기존의 결과와

유사하게 농도의 큰 차이는 보이지 않았으나, 99.9%의 신뢰구간( $p < 0.001$ )에서 유의적인 차이가 있는 것으로 확인되었다. 반면에 탈지환원유를 이용한 가공유의 경우 481.06  $\mu\text{g/mL}$ , PEF 처리 후의  $\alpha$ -lactalbumin의 농도는 482.00  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타나 농도는 유사하였다. 탈지환원유와 달리 유의적인 차이는 보이지 않았고, 가공유의 PEF에 대한 영향은  $\alpha$ -lactalbumin에 있어서 매우 적은 것으로 판단할 수 있었다.

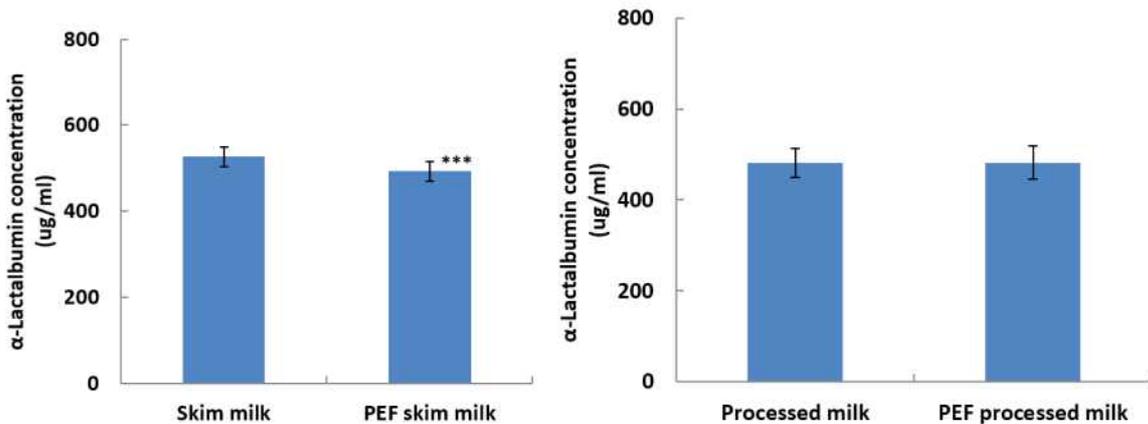


Fig. 3-68. 탈지유와 가공유의 PEF 단독처리시  $\alpha$ -lactalbumin 농도.

### (3) 탈지환원유와 가공유의 PEF 처리 후 $\beta$ -lactoglobulin의 농도 변화

Fig. 3-69와 같이 탈지환원유내의  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 222.08  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, PEF를 처리한 탈지환원유의  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 291.50  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었다. PEF 처리한 탈지환원유가 69.42  $\mu\text{g/mL}$  더 높은 농도로 나타났다. 또한 가공유 내의  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 214.82  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, 이를 PEF 처리한 후  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 278.27  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타나, PEF 처리한 후의  $\beta$ -lactoglobulin의 농도가 더 높아진 것으로 확인되었다. 탈지환원유와 가공유 각각  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  수준에서 유의성이 있는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 상기 가공유가 아닌 LTLT와 HTST의 결과에서도 찾아볼 수 있는 결과로서 심도있는 연구가 필요하다고 판단된다.

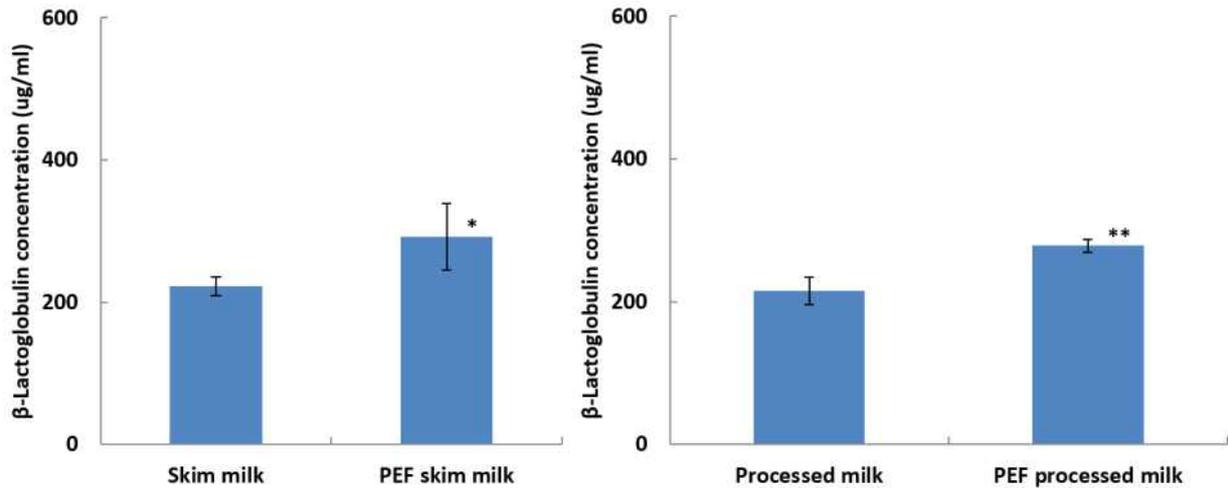


Fig. 3-69. 탈지유와 가공유의 PEF 단독처리시  $\beta$ -lactoglobulin농도

차. 살균공정의 check point와 parameter 설정과 각 parameter별 최적화 연구

살균공정 별 단백질의 보존과 미생물의 저감 효과의 교차점을 찾기 위해 raw milk와 HTST milk, PEF milk, PEF+HTST milk의 변화를 Fig. 3-70에 나타냈다. 미생물의 경우 일반세균, 대장균군, 진균을 대상으로 하였지만 모든 처리 공정에서 control에 존재하는 대장균군과 진균이 사멸되어 일반세균만 고려하여 비교해 보았다. 기능성 단백질은 원유에 존재하는 IgG, IgA, lactoferrin,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin의 보존율을 확인하였다.

각 처리 공정 별 일반세균의 변화는 원유, HTST milk, PEF milk, PEF+HTST milk 순으로 저감되었으며, PEF+HTST milk의 경우 HTST milk 나 PEF milk에 비해 유의적으로 일반세균의 저감에 효과가 있음을 확인하였다.

기능 단백질은 원유에 비해 상대적으로 30% 이상 변성이 된 단백질은 선정 단백질 중 IgA가 유일하였으며, 각 처리 군 별 차이도 가장 심했다. 하지만 HTST milk에 비해 PEF+HTST milk의 IgA 보존율이 크게 낮은게 아니고, IgA를 제외한 모든 단백질에서 HTST milk와 차이가 크지 않았다.

따라서 미생물 기준인 일반세균과 단백질의 보존율을 통해 시생산 공정에 적합한 공정변수는 PEF+HTST milk 였고, 이때의 공정변수는 16 kV/cm, 250 kJ/L PEF 공정과 HTST를 병용하는 공정으로 선정하였다.

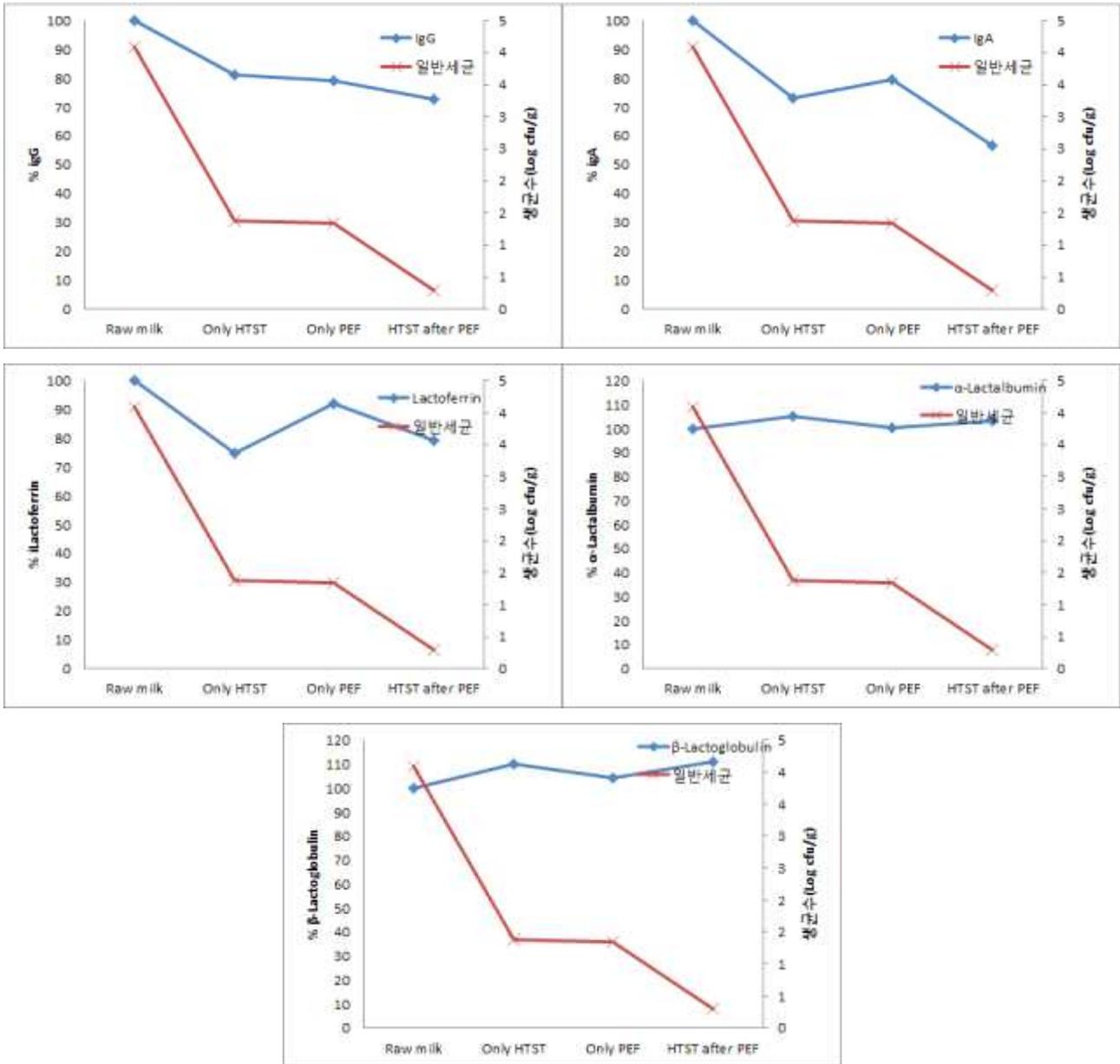


Fig. 1-70. 최적공정 설정을 위한 각 공정별 단백질 보존과 일반세균 저감의 상관관계

### 카. 원유의 저장 중 기능성 단백질의 활성 변화 연구

#### (1) 원유의 저장 중 IgG의 활성 변화 연구

Fig. 3-71에 나타낸 바와 같이 PEF를 처리하지 않은 원유는 초기 353.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 높은 값을 나타내었지만 11일차에 125.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 감소한 228.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 급격하게 농도가 감소하였다. 11일차와 18일차에 감소한 정도는 유의적인 차이가 없었고, 32일차의 원유 내 IgG의 농도는 123.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되어 저장성에 대한 안정성이 낮은 것으로 판단할 수 있었다. 원유를 PEF 단독 처리한 시료의 경우 224.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 시간이 갈수록 점차적으로 감소하였고, 25일차에 267.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 32일차에 98.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되어 1개월이 지나면서 급격한 IgG

의 면역활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. LTLT와 PEF를 병용처리한 시료의 경우 초기 170.73  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 다른 살균방법을 시행한 것보다 가장 낮은 농도가 관찰되었으나, 저장일수가 증가할수록 감소되는 비율은 가장 낮은 비율로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. LTLT를 단독으로 처리한 시료의 경우 PEF를 단독으로 처리한 시료보다 초기 농도가 175.51  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 낮게 측정되었고, PEF와 병용처리한 시료와 유사한 농도로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, PEF와 병용처리한 시료와는 달리 LTLT 단독처리한 시료는 저장일수에 따라 유의성이 있음을 관찰할 수 있었다.

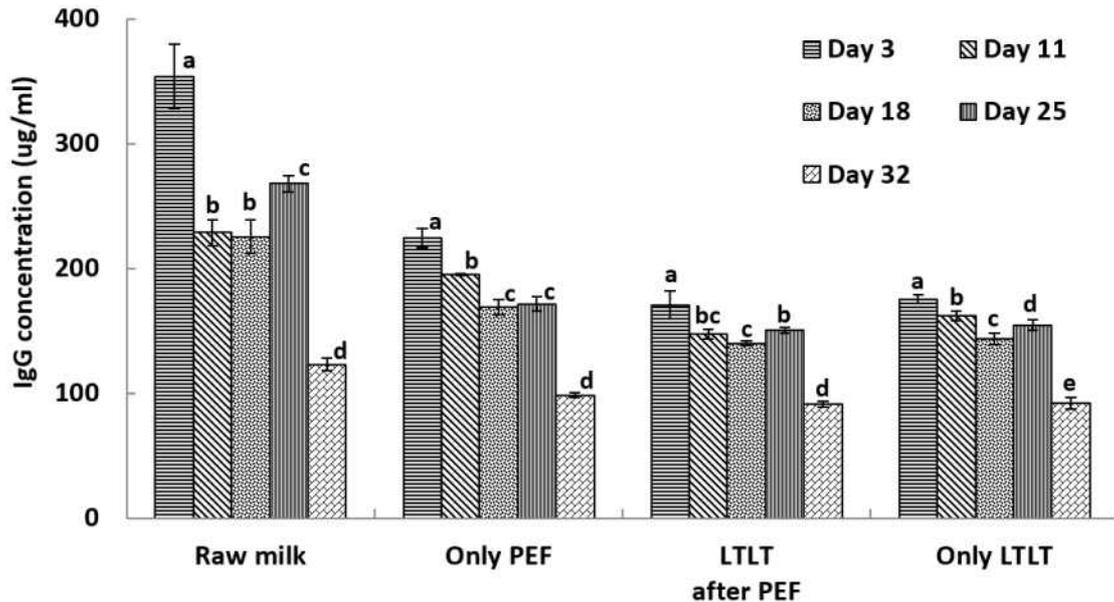


Fig. 3-71. PEF와 LTLT 병용처리한 원유의 저장에 따른 IgG의 면역활성 평가.

Fig. 3-72과 같이 PEF를 처리하지 않은 원유는 초기 235.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 높은 IgG 농도를 보였고, 8일차에서 IgG의 농도는 164.44  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 큰 차이로 감소되는 경향을 볼 수 있었다. 15일차를 제외하고 점차 감소하는 경향을 확인할 수 있었으며, 36일차에는 97.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. PEF만을 단독처리 하였을 때 초기 농도는 189.91  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였고, 감소하는 경향은 PEF를 처리하지 않은 원유와 같이 감소하였다. PEF만을 처리한 것이 면역활성 단백질의 보존성에 있어서 HTST와 병용처리 혹은 HTST 단독처리를 한 것보다 36일차에서 89.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 뛰어났다고 할 수 있다. HTST와 PEF를 병용처리하였을 때 172.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 36일차에 86.59  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 감소하였고, HTST만을 단독으로 처리하였을 때 191.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 36일차에 89.29  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 농도의 차이에 있어서 HTST만을 단독으로 처리한 것 보다는 면역활성 단백질의 보존성이 높은 것으로 판단할 수 있었다. 초기에는 농도가 높았으나 IgG의 농도가 유사한 수준으로 감소된 상태를 보였다.

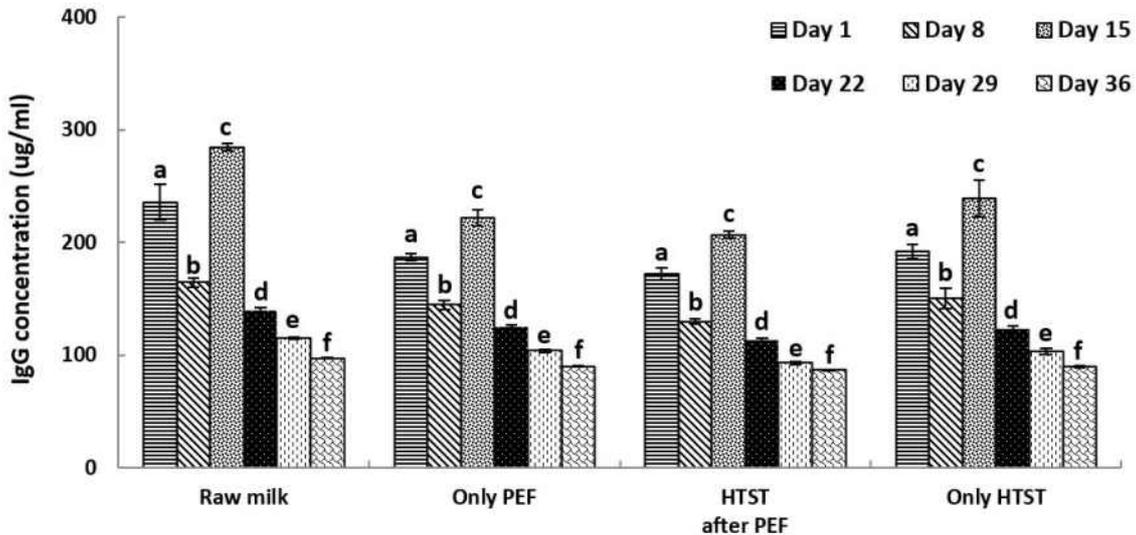


Fig. 3-72. PEF와 HTST 병용처리한 원유의 저장에 따른 IgG의 면역활성 평가.

(2) 원유의 저장 중 IgA의 활성 변화 연구

Fig. 3-73에 나타낸 바와 같이 살균하지 않은 원유의 초기 IgA의 농도는 61.46 µg/mL로 가장 높았으나, 32일까지 저장하면서 IgA의 면역활성이 급격하게 감소되어 저장성은 불안정하다고 판단할 수 있었다. 초기 농도가 다음으로 높았던 PEF 단독처리 시료의 경우 29.35 µg/mL가 측정되었고, 32일차가 되면서 6.12 µg/mL로 감소되었다. 살균하지 않은 원유와 PEF만을 처리한 시료가 저장일수에 따라 유의적인 차이가 있음을 관찰할 수 있었다. LTLT와 PEF를 병용 처리한 시료와 LTLT 살균을 단독으로 실행한 시료의 경우 초기농도가 10.91, 11.50 µg/mL로 측정되었고, 저장 32일차의 IgA의 농도가 각각 4.46, 4.53 µg/mL로 측정되어 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다. 두 그룹에서의 3일차와 11일차에 유의적인 차이가 없었고, 18, 25, 32일차는 서로 유의적임을 확인할 수 있었다.

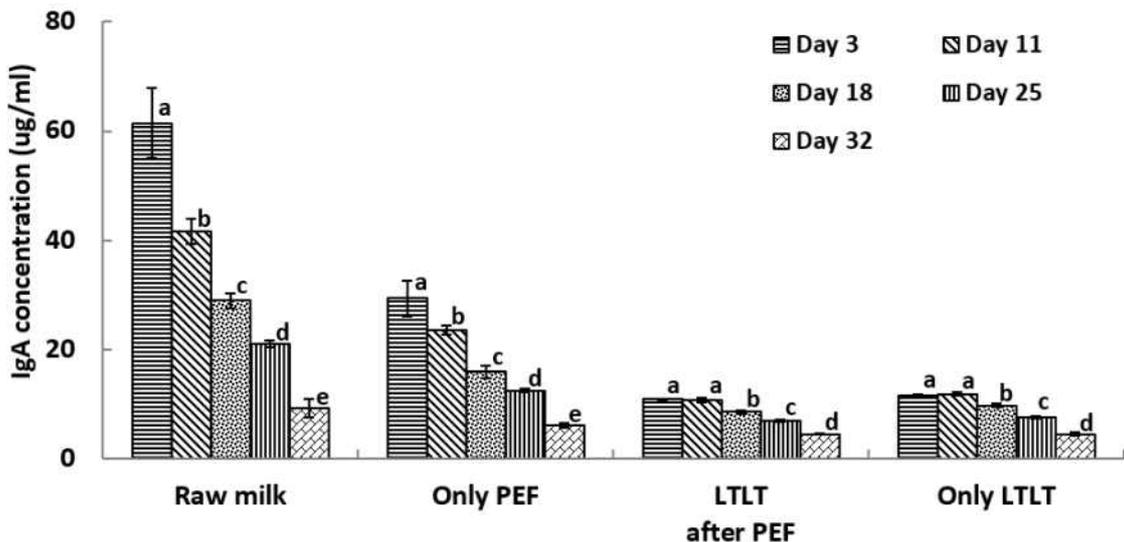


Fig. 3-73. PEF와 LTLT 병용처리한 원유의 저장에 따른 IgA의 면역활성 평가.

Fig. 3-74과 같이 HTST 살균과 PEF 병용처리유 내의 IgA 면역활성은 원유의 경우 16.28  $\mu$ g/mL로 측정되었고, 8일차에 9.83  $\mu$ g/mL로 급격하게 감소한 경향을 보였다. 유난히 농도가 높게 측정된 15일차를 제외하고, 8, 22, 29일의 IgA의 농도는 유의적으로 유사하였고, 다른 시료들과 마찬가지로 36일차에 6.80  $\mu$ g/mL로 농도의 감소가 관찰되었다. PEF를 단독으로 처리한 시료의 경우 초기농도가 12.97  $\mu$ g/mL로 측정되었고, 8, 22, 29일차에 농도가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다. HTST와 PEF를 병용처리한 시료는 HTST를 단독으로 처리한 시료보다 초기보다 36일까지 전체적으로 IgA의 농도가 낮은 것을 확인할 수 있었는데, IgA가 PEF보다 HTST 처리에 영향을 더욱 받은 것으로 판단할 수 있었다.

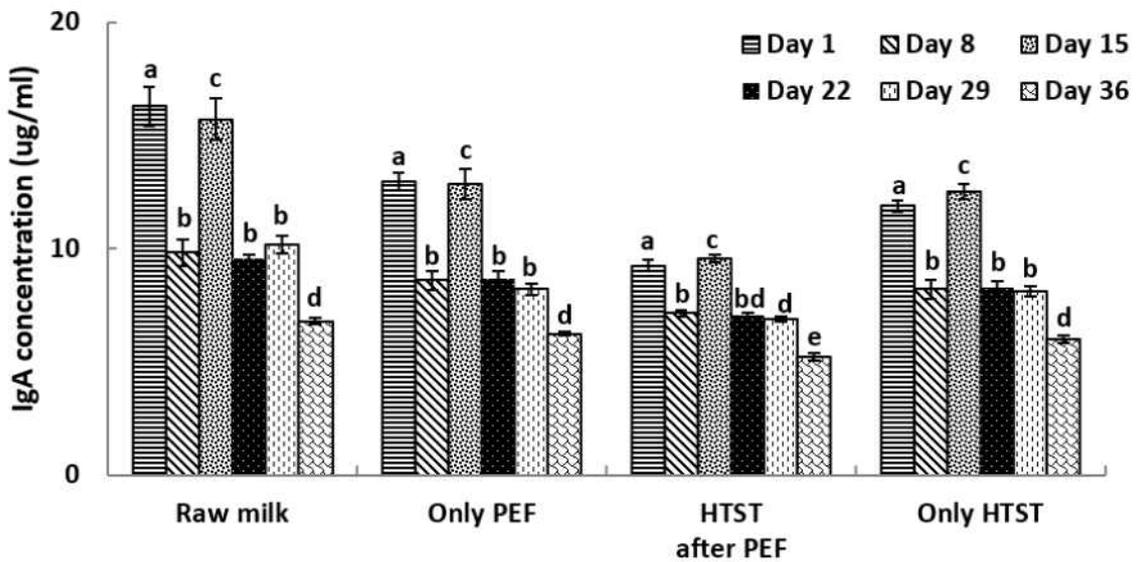


Fig. 3-74. PEF와 HTST 병용처리한 원유의 저장에 따른 IgA의 면역활성 평가

### (3) 원유의 저장 중 $\beta$ -lactoglobulin의 활성 변화 연구

Fig. 3-75에 나타낸 바와 같이 다른 결과와 달리  $\beta$ -lactoglobulin은 LTLT와 PEF 살균이 진행될수록 농도가 높아지는 경향을 보였는데, 초기 원유의 농도는 340.47  $\mu$ g/mL로 측정되었고, 11, 18, 25일차에 각각 334.57, 330.10, 377.33  $\mu$ g/mL로 큰 차이를 보이지 않았다. 32일차가 되면서 210.83  $\mu$ g/mL로 급격하게 감소하였고, 다른 저장일수와 비교하여 유의적으로 감소하였다. PEF 단독살균한 경우, 초기 농도가 347.24  $\mu$ g/mL로 측정되어, 원유와 농도차가 크게 나지 않았고, 32일차 또한 210.08  $\mu$ g/mL로 원유와 유사한 값을 나타내었다. 반면에 LTLT와 PEF를 병용처리한 시료와 LTLT를 단독으로 처리한 시료는 초기 농도가 각각 379.59, 434.54  $\mu$ g/mL로 높게 측정되었고, 18일차에 상승하는 경향을 보이다가 32일차에 각각 245.09, 245.25  $\mu$ g/mL로 급격하게 농도가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 급격한 농도의 감소가 있었으나, 원유나 PEF를 단독으로 처리한 시료에 비해서 35  $\mu$ g/mL정도 높은 잔존  $\beta$ -lactoglobulin의 면역활성을 보였다.

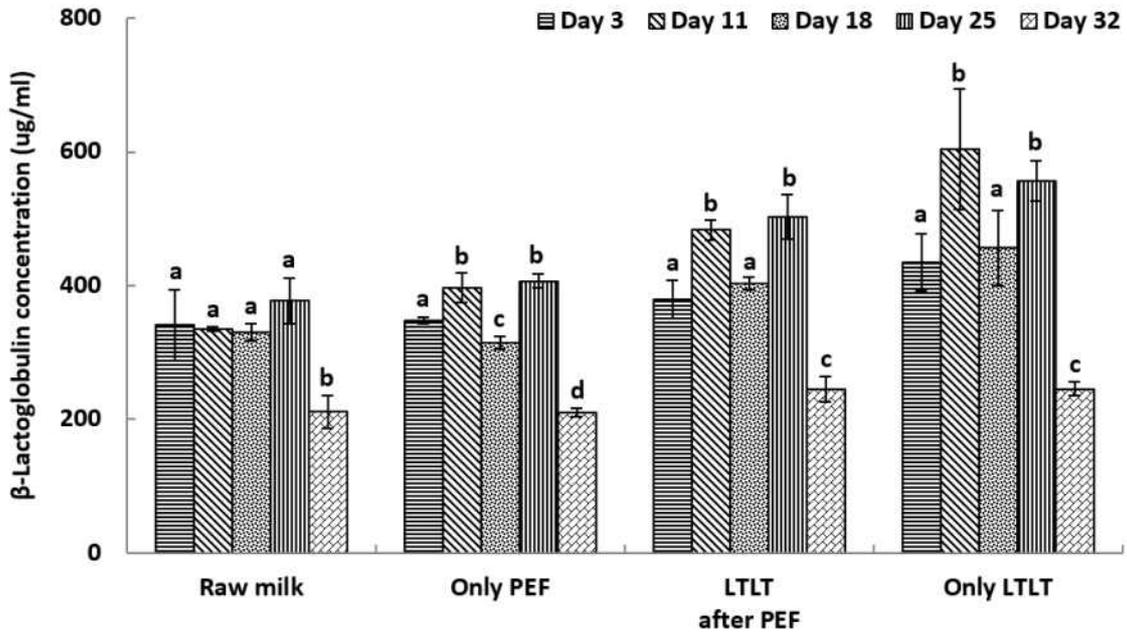


Fig. 3-75. PEF와 LTLT 병용처리한 원유의 저장에 따른  $\beta$ -lactoglobulin의 면역활성 평가.

상기 결과와 유사하게도 Fig. 3-76와 같이 HTST와 PEF의 병용처리 결과를 보기위한 연구에서도 HTST 살균처리를 할수록 농도가 높은 것을 확인할 수 있었는데, 원유가 초기 532.50  $\mu$ g/mL에 비하면, HTST와 PEF를 병용처리한 결과와 HTST를 단독으로 처리한 결과가 각각 590.61, 586.21  $\mu$ g/mL로 측정되었다. PEF를 단독처리한 결과 초기 555.19  $\mu$ g/mL에서 15일차에 362.05  $\mu$ g/mL로 급격하게 감소하였는데, 초기 일주일보다 높은 비율로 감소하였다. 이러한 경향은 모든 시료구에서도 확인할 수 있었다. 초기 일주일간  $\beta$ -lactoglobulin의 안정성이 확보되어 있으나 시간이 지나면서 안정성이 떨어짐을 나타내었다. 저장성 36일차에 모든 시료에 있어서 유사한 수준으로 감소하였는데, 원유는 226.77  $\mu$ g/mL, PEF를 단독처리한 시료는 222.59  $\mu$ g/mL, HTST와 PEF 병용처리한 시료와 HTST 단독처리한 시료는 각각 233.16, 229.28  $\mu$ g/mL로 측정되었다. 잔존  $\beta$ -lactoglobulin의 면역활성은 HTST와 PEF를 병용처리한 시료에서 가장 높은 값을 나타내어, 저장일수가 36일까지 다른 살균방법보다 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

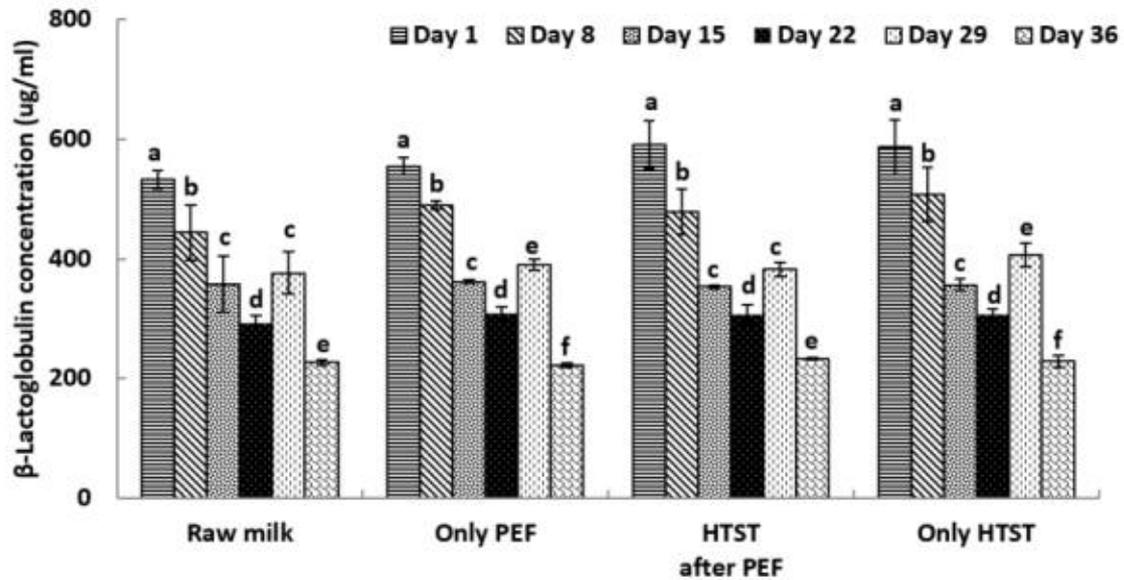


Fig. 3-76. PEF와 HTST 병용처리한 원유의 저장에 따른  $\beta$ -lactoglobulin의 변역활성 평가.

(4) 원유의 저장 중 lactoferrin의 활성 변화 연구

Fig. 3-77에 나타낸 바와 같이 LTLT 살균과 PEF 병용처리 효과에 대한 저장성 평가를 위한 시료에서 원유의 경우 초기 농도가 64.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 높은 수치를 기록하였고, 11일까지는 16.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 감소하였고, 18일차까지 45.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 초기 일주일만 크게 감소하였고, 그 다음 일주일만 크게 감소하지 않았다. 그러나 1개월이 되는 날인 저장 32일차에 24.82  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되어 초기 농도보다 61.26%가 감소한 것을 확인할 수 있었다. PEF를 단독으로 처리한 시료의 경우 초기 농도가 43.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었고, 32일차에 감소된 15.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 감소하였으나 유의적인 차이를 보이지 않았다. LTLT와 PEF를 병용처리한 경우 초기 농도는 18.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었고, LTLT를 단독으로 처리한 시료의 초기 농도는 17.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 유사하게 측정되었다. 저장성 시험 32일차에도 11.08, 10.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 유사하게 나타났고, 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 원유에 비해서 LTLT와 PEF 병용처리한 것과 LTLT를 단독으로 처리한 시료의 lactoferrin의 변역활성이 40.69%와 38.27%로 감소되어 안정성에 대한 부분에 있어서 원유보다 안정하다고 판단할 수 있다.

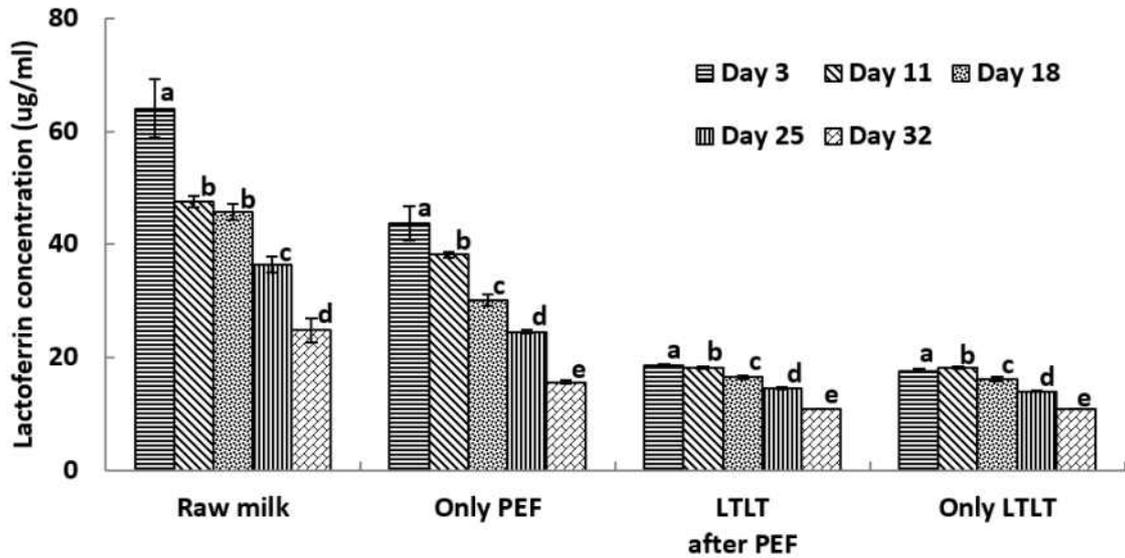


Fig. 3-77. PEF와 LTLT 병용처리한 원유의 저장에 따른 lactoferrin의 면역활성 평가.

Fig. 3-78에 나타낸 바와 같이 HTST와 PEF의 살균효과를 보기위한 시료의 경우, 원유에 있어서 초기 29.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 측정되었고, 36일차에 24.37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 시간이 지나도 큰 차이를 관찰할 수 없었다. 원유는 22, 29, 36일차에 유의적으로 유사한 값을 나타내었다. PEF를 단독으로 처리하였을 때, 초기 26.78  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 36일차에 21.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었는데, 원유와 마찬가지로 22, 29, 36일차의 농도가 유의적으로 유사하였다. 이러한 유의성은 HTST만을 단독처리한 시료에서도 똑같이 관찰되었다. HTST와 PEF를 병용처리하였을 때, 1.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 만이 감소되었는데, 다른 시료보다 낮은 수치로 감소된 것을 확인할 수 있었다. HTST와 PEF를 병용처리한 시료는 lactoferrin의 안정성면에서 HTST 단독이나 PEF를 단독처리하였을 때보다 효과적이라고 판단할 수 있었다.

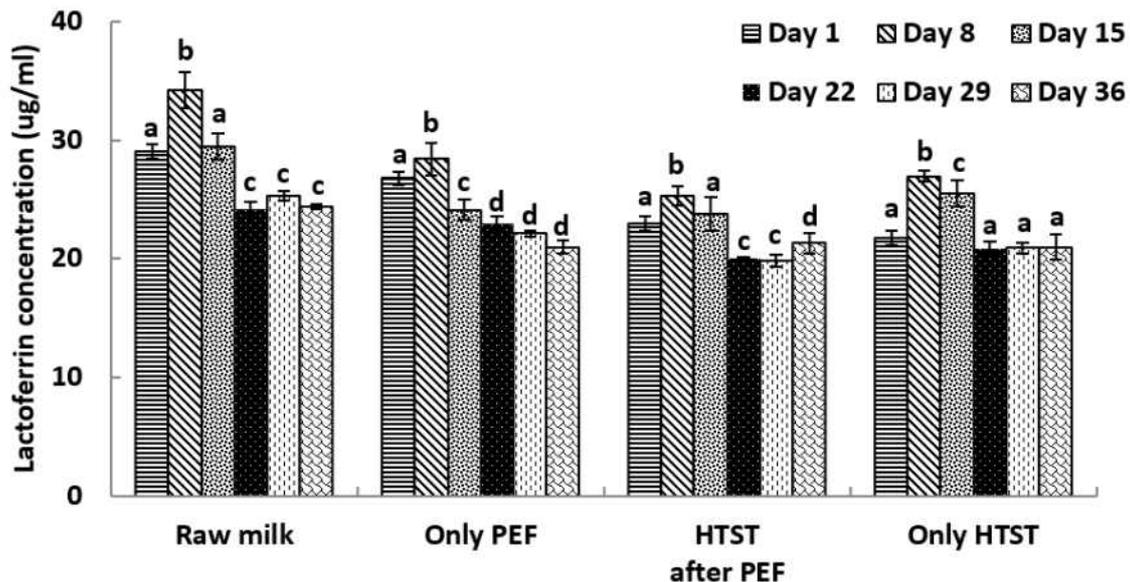


Fig. 3-78. PEF와 HTST 병용처리한 원유의 저장에 따른 lactoferrin의 면역활성 평가.

(5) 원유의 저장 중  $\alpha$ -lactalbumin의 활성 변화 연구

Fig. 3-79에 나타낸 바와 같이 원유를 PEF 혹은 LTLT 단독살균을 진행하거나, LTLT와 PEF를 병용처리한 시료는  $\alpha$ -lactalbumin의 면역활성에 있어서 32일차까지 저장하였을 때 감소 경향이 유사한 것을 확인할 수 있었는데, 원유는 731.51  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 32일차에 519.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었으나 통계적으로 저장일수 간에 유의적으로 감소하였다. PEF를 단독으로 처리한 시료의 경우 초기 농도가 743.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 원유보다 약간 높았으나, 오차범위 내에 있는 것으로 확인되어 원유와 큰 차이로 볼 수는 없었다. 32일차에 506.74  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 감소하였고, 11일차를 제외하고 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. LTLT와 PEF를 병용처리하였을 때 초기 농도는 670.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 32일차에 503.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었다. LTLT를 단독처리하였을 때 11일차를 제외한 3, 18일차와 25, 32일차가 각각 저장일수에 있어서 유의적으로 유사한 값을 보였다.

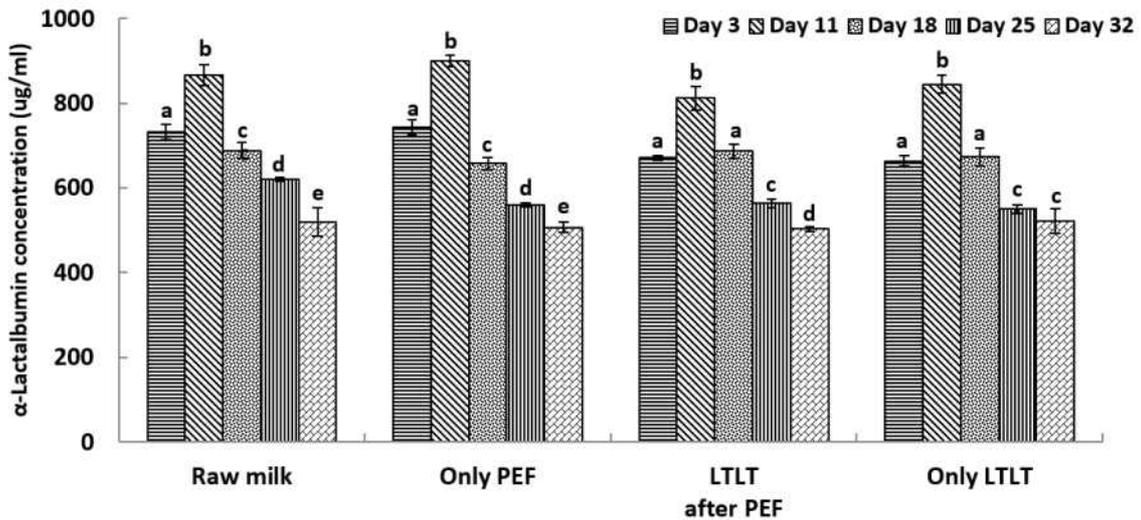


Fig. 3-79. PEF와 LTLT 병용처리한 원유의 저장에 따른  $\alpha$ -lactalbumin의 면역활성 평가

HTST와 PEF의 병용처리 효과를 보기 위한 시료에서는 원유의 초기 농도는 558.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었고, 8일차에 456.47  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 감소하였으나 그 이후 36일차까지 농도에 큰 차이가 없이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-80). PEF 단독처리하였을 때 초기 561.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 일주일 후인 8일차에 461.36  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 감소하였고, 원유와 마찬가지로 큰 감소 없이 농도가 감소한 것을 확인할 수 있었다. HTST와 PEF의 병용처리와 HTST 단독처리에 있어서도 유사한 경향을 보였고, 유의적인 값으로 감소함을 관찰할 수 있었다.

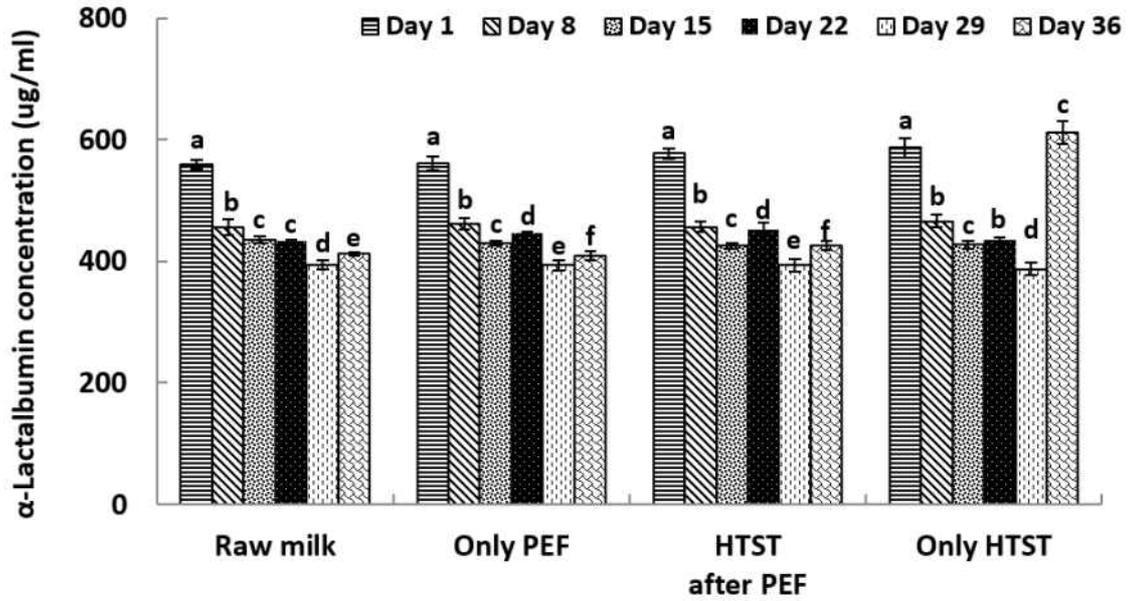


Fig. 3-80. PEF와 HTST 병용처리한 원유의 저장에 따른 α-lactalbumin의 면역활성 평가.

타. 탈지환원유와 가공유의 저장 중 기능성 단백질의 활성 변화 연구

(1) 탈지환원유와 가공유의 저장 중 α-lactalbumin의 활성 변화 연구

탈지환원유의 저장 중 α-lactalbumin의 면역활성은 Fig. 3-81에 나타내었다. PEF를 처리하지 않은 시료의 초기 α-lactalbumin의 농도는 526.72 μg/mL이고, PEF 처리시 493.35 μg/mL로 약간 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 전체적으로 36일까지 PEF를 처리하지 않았을 때와 처리하였을 때의 그 수준의 차가 매우 작은 것으로 관찰할 수 있었다. PEF 처리하지 않는 탈지 환원유는 저장 15일과 22일, 22일과 29일, 29일과 36일이 각각 서로 유의성이 있는 것으로 나타났으며, PEF 처리시 이는 15일과 22일만이 유의적인 차이가 없었다.

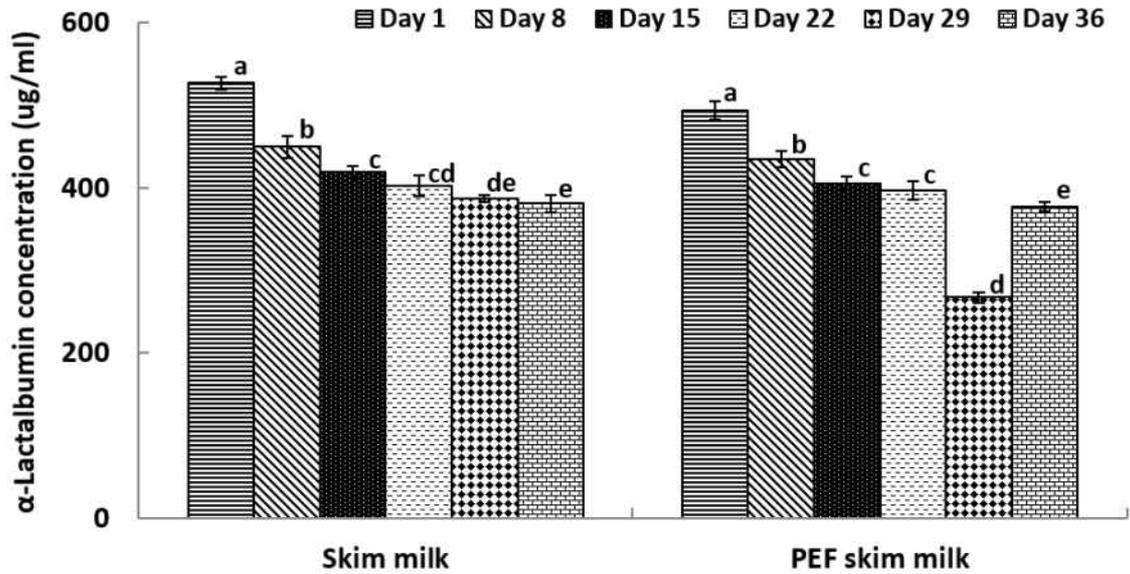


Fig. 3-81. 탈지환원유의 PEF 처리시 α-lactalbumin의 면역활성 평가

가공유와 PEF 처리한 가공유의 α-lactalbumin의 면역활성은 Fig. 3-82에 나타내었는데, 탈지 환원유와 유사한 양상으로 그 수준이 감소함을 확인할 수 있었다. 먼저 가공유의 α-lactalbumin의 초기 농도는 481.06 μg/mL으로 측정되었고, PEF 처리한 가공유의 농도는 482.00 μg/mL으로 큰 차이를 보이지 않았다. 저장 36일차에서도 각각 341.24, 350.52 μg/mL로 측정되어 미미한 차이지만 PEF를 처리한 가공유 내의 α-lactalbumin이 조금 더 보존된 것을 확인할 수 있었다. 가공유는 15, 22, 29일차에 유의적인 차이가 없었고, PEF를 처리한 가공유 또한 같은 저장일수에서 통계적으로 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다.

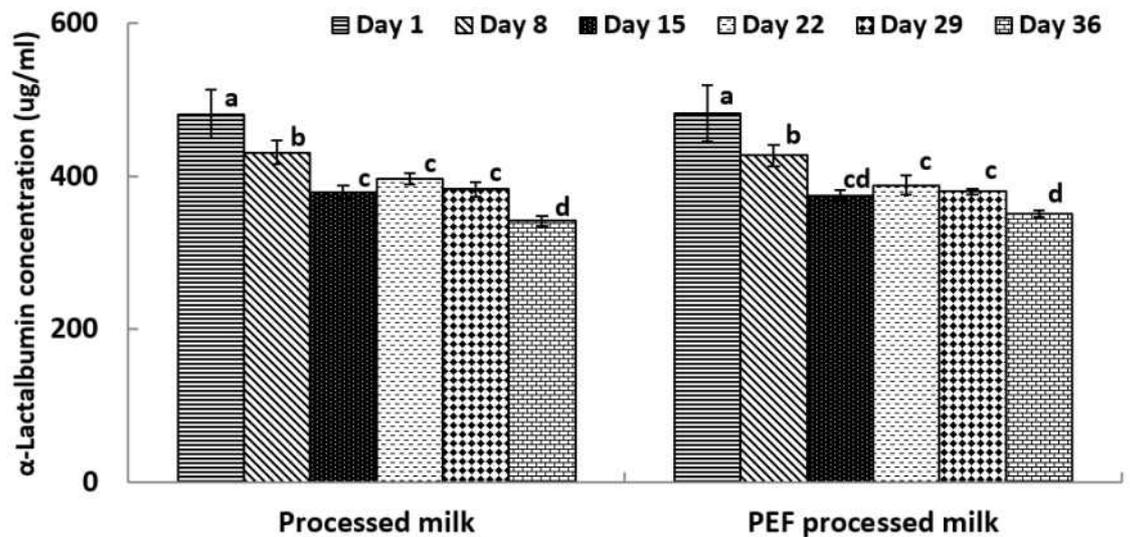


Fig. 3-82. 가공유의 PEF 처리시 α-lactalbumin의 면역활성 평가

(2) 탈지환원유와 가공유의 저장 중  $\beta$ -lactoglobulin의 활성 변화 연구

Fig. 3-83과 같이 탈지환원유와 가공유의 저장 중  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 기존 실험 결과와 유사하게 측정되었는데, 먼저 탈지환원유의 초기 농도는 222.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었고, PEF 처리 후 초기 농도는 PEF 처리 전보다 높은 수치를 나타낸 291.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었다. 각 저장일수간의 유의적인 차이가 있었고, 36일차에 탈지환원유와 PEF 처리한 탈지환원유 내의  $\beta$ -lactoglobulin은 433.12, 380.71  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되어 초기 농도보다 약간 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 탈지환원유와 PEF 처리한 탈지환원유의 15, 29일을 제외하면 8일차에 농도가 상승하고, 그 이후에 계속적으로 농도는 약간씩 떨어지는 것으로 사료된다. 그러나  $\beta$ -lactoglobulin이 PEF나 가열처리시 면역활성에 대하여 증가함을 보이는 것은 더 심도있는 연구가 필요하다고 판단되었다.

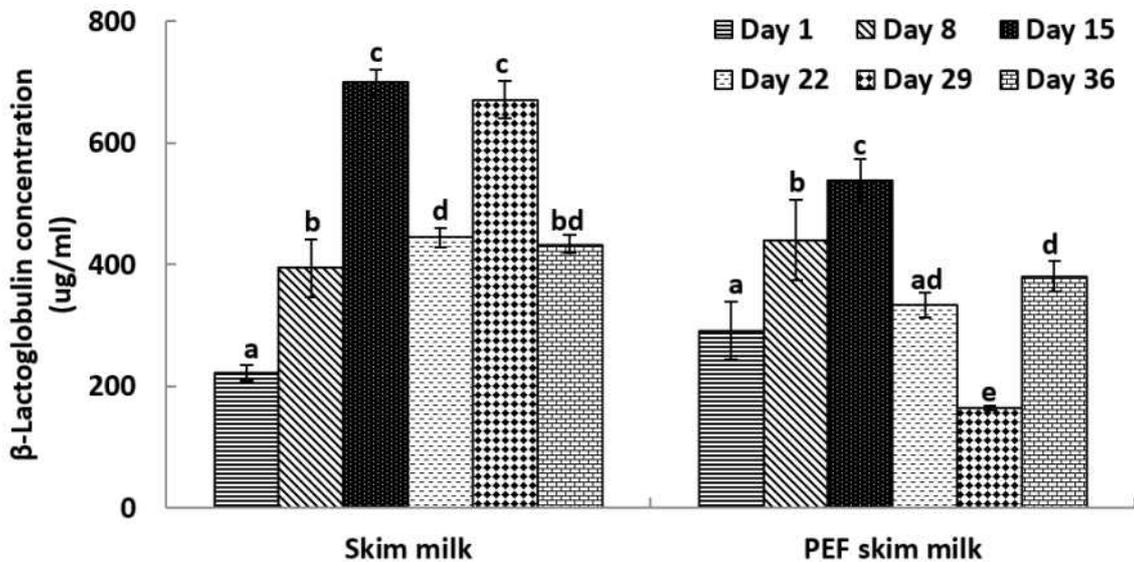


Fig. 3-83. 탈지환원유의 PEF 처리시  $\beta$ -lactoglobulin의 면역활성 평가

Fig. 3-84에 나타낸 바와 같이 가공유의 경우에도 탈지환원유의 결과와 유사하게 나타났다. 먼저 가공유의 초기  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 214.82  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었고, PEF 처리한 가공유는 초기 농도가 278.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 조금 높게 측정되었다. 또한 36일차에 가공유와 PEF 처리 후 가공유 내의  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 각각 329.36, 362.66  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 관찰되어 유사함을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 가공유에 있어서 PEF의 처리는  $\beta$ -lactoglobulin의 면역활성의 보존성을 높여주었다고 판단할 수 있으나, 이 또한 깊이 있는 연구를 통하여 밝혀나가야 할 것이라 사료되는 바이다.

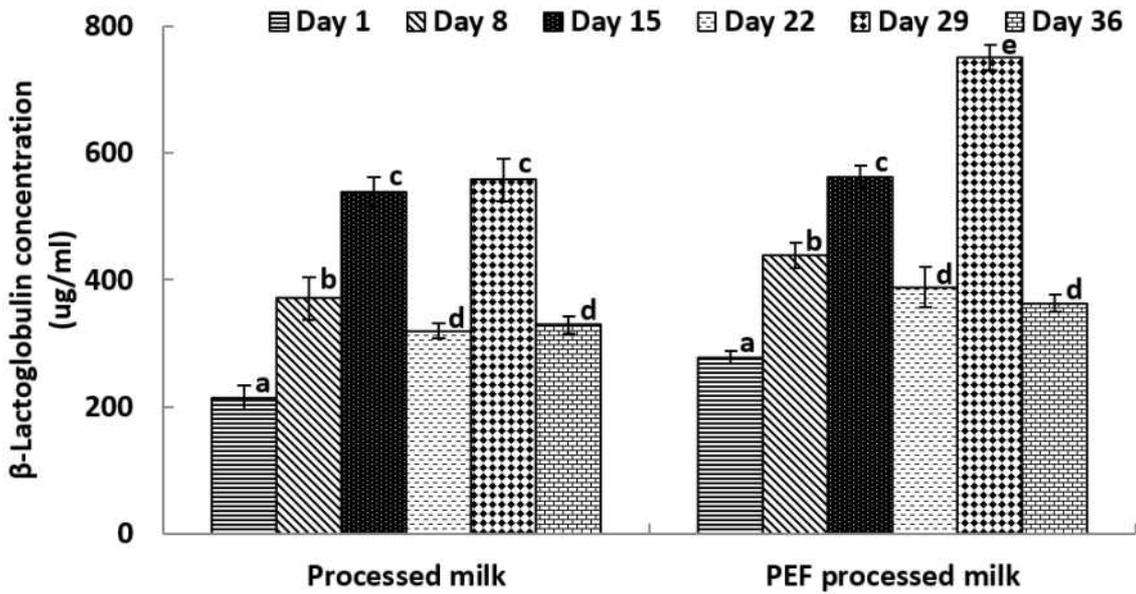


Fig. 3-84. 가공유의 PEF 처리시  $\beta$ -lactoglobulin의 면역활성 평가

#### 4. 결론

비가열 살균법인 펄스 전기장 기술을 활용한 우유 내의 기능성 단백질의 보존성 확보 기술을 구축하기 위하여 살균 공정 별로 우유를 처리하였을 때 나타나는 우유 단백질의 변화를 파악하고 분석하였고, 기존의 가열 살균과 PEF를 병용처리하였을 때 우유 내의 기능성 단백질의 보존성을 연구하였다.

살균 공정별로 우유 내의 단백질의 열변성을 시차주사열량계를 이용하여 측정된 결과, PEF 처리하지 않은 원유와 PEF를 처리한 원유의 Td 값이 큰 차이를 나타내지 않아 원유 내에 존재하는 단백질들의 구조 변화 또는 열변성 특성에 영향을 주지 않았다. 그러나 탈지유의 경우 PEF 처리에 의해 Td 값이 약 10°C가 증가하여 탈지유에 존재하는 단백질의 구조에 미약한 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. LTLT 및 HTST 살균 우유의 경우 PEF 처리에 의해 단백질의 구조가 변화하지 않았다.

우유 내의 단백질의 열변성 정도를 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과, 원유뿐만 아니라 탈지유와 HTST, LTLT 우유에 PEF를 처리하였을 때, 모든 단백질 band들의 intensity가 일정하게 유지되어 단백질의 열변성이 나타나지 않았다.

살균 공정별 우유 내의 단백질 변성도를 HPLC로 확인한 결과, PEF를 처리한 원유의  $\alpha$ -casein과  $\beta$ -lactoglobulin의 농도가 40% 이상 감소한 반면,  $\kappa$ -casein과  $\beta$ -casein은 거의 변화하지 않았다. PEF를 처리한 HTST 우유는  $\alpha$ -casein만이 50% 감소를 나타내었고 다른 단백질은 감소하지 않았다. PEF를 처리한 LTLT 우유는 단백질의 감소 현상이 관찰되지 않았다. 한편 UHT 살균에 의해서는 열에 민감한  $\beta$ -lactoglobulin이 소실되었다.

살균 공정별 우유 내의 alkaline phosphatase는 원유의 경우 PEF 처리에 의해 효소활성이 17% 감소하였고, 탈지유의 경우에는 PEF 처리에 의해 효소활성이 14.7%가 감소하였다. HTST 우유, LTLT 우유와 UHT 우유에서는 효소 활성이 완전히 소실되었다. Protease는 열에 상당히 강하여 HTST나 LTLT 또는 UHT 살균에 의해 효소활성이 소실되지 않았으며, PEF 처리에 의해서도 효소 활성이 소실되지 않았다. Lactoperoxidase는 LTLT 살균에 의해 불활성화되지만 PEF 처리에 의해서는 효소활성이 소실되지 않는 것으로 나타났다.

살균 공정별 탁도의 변화를 연구한 결과 PEF 처리하였을 경우 처리하지 않은 시료와 동일한 결과를 나타내었는데 이는 살균공정에 관계없이 PEF 처리가 우유 단백질의 변성에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타내었다.

pH의 경우 탈지유와 HTST 우유, LTLT 우유 및 HTST 우유를 PEF 처리한 결과 처리하지 않은 시료와 pH가 유의적인 차이는 있었으나 크게 변화하지 않았고, 산도의 경우에도 살균공정에 관계없이 PEF 처리에 의한 산도변화는 관찰되지 않았다.

PEF 처리한 우유의 alcohol 시험의 결과, PEF 처리를 하였을 경우 alcohol 시험에 영향을 미치지 않았으므로 casein의 안정성에 영향을 주지 않음을 알 수 있었으며, 우유의 갈색화는 원유의 경우 PEF 처리에 의해 85.91% 증가하였으나, HTST, LTLT, UHT 처리 우유보다는 낮은 수치를 나타내었다.

살균 공정별로 우유의 Hunter's 색도를 측정된 결과, 살균에 의하여 L값의 감소가 나타났다. 또한 지방을 제거한 탈지유는 다른 우유들보다 월등히 L값이 높아 지방제거에 의하여 우유의 밝기가 높아진 것으로 판단된다. a값의 경우 원유와 HTST 우유가 유사한 값을 나타내었고 탈지유, LTLT 우유와 UHT 우유는 원유보다 낮은 값을 나타내었다. b값은 모든 우유에 있어서 PEF 처리에 의한 영향을 받지 않았다.

PEF 처리에 따른 우유 내의 IgG의 변성도를 측정하였을 때, PEF를 처리하지 않은 원유의 IgG 농도는 86.3  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, 100 kJ과 250 kJ로 각각 PEF 처리하였을 경우에는 64.1  $\mu\text{g/mL}$ 과 48.8  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되어 에너지가 증가할수록 IgG의 농도가 감소하였다.

IgA의 경우에는 원유가 28.6  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, 100 kJ, 150 kJ로 PEF 처리하였을 때 25.7, 25.9  $\mu\text{g/mL}$ 로 원유와 비교하여 유의적인 차이는 보이지 않았으나, 250 kJ로 PEF 처리하였을 경우에는 41% 감소하였다.

PEF를 처리하지 않은 원유 내의  $\beta$ -lactoglobulin은 935.4  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, 150, 200, 250 kJ의 강도로 PEF를 처리하였을 때, 그 값은 각각 679, 635, 603  $\mu\text{g/mL}$ 로 유의적인 차이로 감소하였다.

PEF 처리하지 않은 원유의 lactoferrin 농도는 11.2  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났고, PEF의 처리 에너지 강

도가 높아질수록 lactoferrin의 양이 감소하였다. 100 kJ로 PEF를 처리한 우유는 9.6 µg/mL가 함유되어 있었고, 원유와 유의적인 차이는 없었으나, 150, 200, 250 kJ로 PEF 처리한 우유는 각각 6.9, 5.3, 4.1 µg/mL으로 측정되어 유의적으로 감소하였다.

원유에 함유되어 있는 α-lactalbumin의 농도는 1096.6 µg/mL로 측정되었고, 100 kJ로 PEF를 처리하였을 때 869.3 µg/mL로 원유와 비교해서 유의적으로 감소하였다. 반면에 150, 200, 250 kJ로 처리하였을 때의 원유 내의 α-lactalbumin 농도의 값은 유의적인 차이가 없었다.

원유의 TGF-β1 농도는 12.4 ng/mL로 측정되었고, PEF 처리 후 우유 내 함유농도는 큰 차이가 없었다. 100, 150 kJ로 PEF 처리한 우유는 각각 10.7, 11.5 ng/mL로 원유와 유의적인 차이가 있었으나, 200 kJ로 처리한 우유와 250 kJ로 처리한 우유는 유의적인 차이가 없었다.

살균 공정에 따른 저장 중 면역 단백질의 변화 연구에서는 원유 내의 IgG의 농도는 16일이 경과한 후 35%의 면역활성이 감소되었으나, PEF를 처리한 우유는 큰 차이를 보이지 않았다. LTLT를 단독으로 처리한 우유 내의 IgG의 농도는 16일차에 유의적으로 감소하였고, PEF와 LTLT를 병용처리한 우유는 16일 경과 후 유의적인 변화가 없었다.

PEF를 처리하지 않은 원유의 IgA의 농도는 PEF 처리와 관계없이 저장기간에 따른 변화는 유의적으로 관찰되지 않았다. TGF-β1의 농도는 저장기간과 PEF 에너지의 양이 증가할수록 유의적으로 농도가 감소하였고, LTLT를 단독으로 처리하였을 때 16일차에 68%가 소실되었다. PEF와 LTLT를 병용처리한 우유의 경우 에너지의 양에 관계없이 16일차에 초기보다 감소된 것을 확인할 수 있었다.

PEF 처리하지 않은 원유의 β-lactoglobulin 농도는 저장 기간이 지남에 따라 유의적으로 감소하였다. PEF의 에너지양이 증가할수록, 저장기간이 증가할수록, β-lactoglobulin은 감소가 이루어졌으나 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다. LTLT만을 처리한 우유의 경우, 0일차에 β-lactoglobulin의 농도는 666.8 µg/mL에서 4일이 경과하고 428.0 µg/mL로 급격히 감소하였다. LTLT 처리우유의 경우에는 PEF에 의한 영향이 나타나지 않았다.

PEF를 처리하지 않은 원유의 lactoferrin 농도는 16일차에 60%가 감소하였다. 250 kJ로 PEF 처리한 우유의 경우 0일차에서 4일차는 4.1 µg/mL에서 3.5 µg/mL로 감소하였고, 8, 16일차는 3.0, 3.6 µg/mL으로 관찰되었고 유의적으로 차이가 있음을 확인하였다. 250 kJ로 PEF 처리하고 LTLT 살균한 우유의 lactoferrin 농도는 저장기간에 따른 변화가 없었다.

100 kJ 이상의 에너지로 PEF 처리 후 LTLT 살균을 병용 처리한 우유의 α-lactalbumin의 농도는 통계적으로 유의적인 차이가 없는 결과로 확인되어 저장기간에 따른 PEF와 LTLT 병용 처리는 α-lactalbumin에 크게 영향을 주지 않았다.

PEF와 LTLT 살균을 병용처리한 후 시료 내의 IgG의 농도는 170.73 µg/mL으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 반면에 HTST 살균의 병용처리 효과를 보기 위한 원유 내의 IgG의 농도는 초

기 235.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었으나, PEF 단독, HTST 단독 및 병용처리 시료의 IgG 농도는 각각 186.91, 191.77, 172.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 이러한 결과로 볼 때, 같은 가열처리 방식이라도 IgG의 농도에 있어서 장시간 가열하는 LTLT 살균방식이 단시간 가열 살균인 HTST보다 IgG의 손상에 영향을 끼치는 것으로 판단할 수 있었다.

IgG와 마찬가지로 PEF와 LTLT 살균을 병용처리하였을 때 IgA의 농도가 가장 낮은 값을 나타내었고, HTST 병용처리나 HTST 단독처리가 각각 9.24, 11.89  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 감소하여 LTLT와 유사한 값을 확인할 수 있었다.

$\beta$ -Lactoglobulin의 농도는 LTLT를 단독으로 처리하였을 때 가장 높은 값을 나타내었고, HTST와 PEF를 병용처리하였을 때도 590.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다. 원유와 PEF를 단독으로 처리한 시료는 유의적으로 차이가 없었고, HTST와 PEF를 병용처리한 시료와 단독으로 HTST를 처리한 우유와 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다.

LTLT를 단독으로 처리한 시료 내의 lactoferrin의 농도는 17.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 낮았고, PEF와 LTLT를 병용처리한 시료의 lactoferrin의 농도는 18.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 LTLT 살균을 단독으로 처리한 시료와 유의적인 차이가 없었다. 병용처리보다는 기존의 살균방법으로 살균을 진행하였을 때, lactoferrin의 농도가 가장 낮은 것을 확인할 수 있었다.

LTLT 살균을 단독으로 진행하였을 때  $\alpha$ -lactalbumin의 농도는 663.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정할 수 있었고, PEF 단독이나 병용처리한 시료 또한 큰 차이를 보이지 않았다. HTST살균의 경우 LTLT와 마찬가지로 원유의 HTST 단독으로 처리한 시료의 차이가 크지 않았다(558.62, 586.82  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). 이러한 결과는 기존의 살균방법과 PEF의 처리는  $\alpha$ -lactalbumin에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

가공유 내의  $\alpha$ -lactalbumin의 농도는 481.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PEF 처리 후의  $\alpha$ -lactalbumin의 농도는 482.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타나 농도는 유사하였다. 탈지환원유와 달리 유의적인 차이는 보이지 않았고, 가공유의 PEF에 대한 영향은  $\alpha$ -lactalbumin에 있어서 매우 적은 것으로 판단할 수 있었다.  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 214.82  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었고, 이를 PEF 처리한 후  $\beta$ -lactoglobulin의 농도는 278.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타나, PEF 처리한 후의  $\beta$ -lactoglobulin의 농도가 더 높아진 것으로 확인되었다.

살균 시유의 저장에 따른 각종 면역 단백질의 활성은 전반적으로 1개월이 경과하게 되면 유사한 농도로 감소하였고, 원유의 경우 초기 농도보다 1주일만 경과해도 매우 높은 비율로 감소한 것을 확인할 수 있었다.

초기 면역단백질의 농도는 원유가 가장 높았고, 다른 살균처리보다 열에 의한 손상을 적게 받는 PEF 단독처리한 우유가 초기 농도가 높았다. 기존의 LTLT 혹은 HTST 살균과 PEF를 병용처리하거나 단독살균한 우유의 경우 초기 농도가 유사한 것으로 확인되었다.

저장 중 원유의 면역단백질의 농도는 처음 1주일에 1차로 급격한 감소율을 보였고, 1개월이 경과한 후 2차로 급격한 감소율을 보였다. 반면에 PEF를 처리한 시료나 기존 살균방법의 단독처리나 PEF 병용처리 시료의 경우 점진적으로 면역단백질의 농도가 감소하였고, 1개월이 경과한 후는 원유를 비롯한 다른 시료간의 차이가 크지 않았다.

저장기간 중 가공유 내의 존재하는 면역단백질의 양은 가열처리로 인하여 IgG, IgA, lactoferrin은 매우 낮은 농도로 존재하여 저장성에 의미가 없다고 판단되어 제외하고,  $\alpha$ -lactalbumin과  $\beta$ -lactoglobulin의 농도를 측정할 수 있었다.

가공유를 PEF처리하였을 때와 처리하지 않았을 때  $\alpha$ -lactalbumin의 양은 유사하였고, 감소율과 1개월이 경과한 후에도 그 농도가 크게 감소하지 않았다. 또한  $\beta$ -lactoglobulin의 경우 가공유와 PEF 처리한 가공유의 차이가 크지 않았으나, 저장기간이 증가할수록 초기 농도보다 면역단백질의 농도가 증가하였다.

# 제 4 절 위탁과제 : 펄스 전기장 기술의 pilot test를 통한 공정 및 품질 검증 연구

## 1. PEF법 적용 유제품의 관련 법규 검토

### 가. 국내 유제품의 살균법 검토

#### (1) LTLT, HTST, UHT 및 비가열 유제품 현황

분류	제품	제품명	제조사	특징
LTLT 살균		후레쉬 우유	파스퇴르	세균수: 원유 1급 A 8,000 cfu/mL 미만 살균: 63°C, 30분간 유통기한 8일
		청정저온 살균우유	일동 후디스	세균수: 원유 1급 A 3,000 cfu/ml 미만 살균: 63-65°C, 30분간
		닥터유	건국유업	세균수: 원유 1급 A 5,000 cfu/ml 미만 살균: 63-65°C, 30분
		강성원우유	강성원우유	세균수: 원유 1급 A 3,000 cfu/ml 미만 살균: 65°C, 30분
HTST 살균		덴마크 저지방 우유	덴마크우유	살균: 72-75°C, 15초
		상하이 목장우유	매일유업	유기농 목장으로 인증받은 목장에서 유기농사료를 써서 생산한 우유 살균: 72°C 이상, 15초
		유기농우유	건국유업	세균수: 원유 1급 A 5000 cfu/ml 미만 살균: 72-75°C, 15초

분류	제품	제품명	제조사	특징
Ultra pasteurization		시유 및 가공유	서울우유	살균: 130℃ 이상, 2초
		시유 및 가공유	남양유업	살균: 130℃ 이상, 2초
		시유 및 가공유	매일유업	살균: 130℃ 이상, 2-3초
UHT(Ultra High Temperature)		서울우유 멸균우유	서울우유	살균: 140℃ 이상, 3초
		맛있는우유 GT	남양유업	살균: 135-139℃, 4초 이상
		매일멸균우유	매일유업	살균: 130-150℃, 2초

\* 비가열 유제품은 해당 없음.

## (2) 살균법의 장단점 조사

우유는 위생적인 이용과 보존을 위하여 살균 또는 멸균처리를 실시하게 되며, 가장 통상적인 방법은 가열처리이다.

살균법	온도(℃)	시간
LTLT(Low Temperature Long Time)	63	30 min
HTST(High Temperature Short Time)	72-75	15-20 sec
Ultra pasteurisation	125-138	2-4 sec
UHT(Ultra High Temperature)	135-140	a few seconds
Sterilisation in container	115-120	20-30 min

가열에 의한 미생물의 파괴는 균체성분의 단백질과 핵산의 열에 의한 변성 또는 분해와 이에 따른 효소계의 실활현상에 기인하는 것으로 가열에 의한 살균과 멸균은 가장 경제적이며, 효과적인 방법

으로 현재 일반적으로 활용되는 방법이다.

### (가) 살균법의 장점

LTLT 살균처리의 미생물 사멸 효과 : 저온살균에 있어서 온도와 시간의 조건은 병원균의 사멸을 목적으로 하며 병원균 중 특히 내열성이 있는 결핵균이 사멸조건, 즉 61.1℃, 30분의 조건을 기준으로 하고, 이 조건은 생유의 phosphatase의 실활조건과 일치하므로 저온살균과의 판정에 phosphatase시험이 적용되고 있다. 저온살균의 또 하나의 효과는 우유의 보존성을 높일 수 있는 것으로 이 살균조건하에서 우유에서 유래하는 효소를 파괴할 수 있어 lipase에 의한 우유의 지방분해에 따른 결함을 막을 수 있다.

#### 1) HTST살균처리의 열사멸 효과

HTST살균은 LTLT살균과 비슷한 열사멸효과를 기준으로 삼고 있으며, Dahlberg는 61.1℃, 30분 처리에 있어서는 결핵균의 열사멸효과 조건이 71.1℃에서 16초인 것을 제시하고 있다.

#### 2) UHT 멸균처리의 열사멸 효과

UHT방식에서는 우유의 비점 이상에서 가열하기 때문에 비등 방지를 위하여 가압시키게 되는데 우유의 압력은 3.5-4.5 kg/cm<sup>2</sup>이며 압력제어관에 의하여 조절되게 된다. 또한 UHT 멸균에서는 75-85℃ 부근의 예비가열단계에서 대부분의 세균세포가 사멸하게 되므로 제 2단 가열부에 있어서의 비점 이상의 가열은 주로 세균포자의 파괴를 목적으로 하고 있다.

#### 3) 가열처리에 의한 우유 세균의 사멸률과 잔존 균수

생유 중의 세균류는 LTLT 또는 HTST 살균에 의하여 약 97-99%가 사멸되며, 생균수는 50,000 cfu/mL 이하로 감소된다. 하지만 살균 후의 재오염은 살균유의 생균수를 높이고, 보존 중에도 세균이 증식하여 우유를 변패시키게 되므로 주의를 요한다.

UHT 멸균의 경우는 생유 세균의 사멸률이 거의 100%에 달하나 멸균 후에 무균충전하지 않으면 재오염되어 제품화된 UHT우유 중에는 5 L 중에 여러 개의 포자가 남게 되거나 호냉세균이 혼입하는 경우가 있음을 보고하고 있다.

HTST살균유와 UHT살균유의 잔존세균수를 비교할 때 UHT살균의 조건은 1초로써 표에서 표시한 바와 같이 UHT살균유가 HTST살균유보다 살균효과가 높고, 무균용기 중에 충전하는 경우가 보통 우유병에 담는 경우보다 적었으며, 2℃에 보존할 때의 세균수도 생균수와 호냉세균 수 모두 7일까지는 UHT 살균유가 적었으나 14일 이상냉장 할 때에는 양자 간에 큰 차이가 없었고 다같이 호냉세균 수가 증가하는 것으로 보고하고 있다(Table 4-1).

Table 4-1. 각종 살균 및 멸균법에 따른 생존 균수와 사멸률

가열 처리법	균수 측정 배양 온도(°C)	생균수(cfu/mL)		사멸률 (%)	참고문헌
		처리전	처리후		
저온 살균	30	2,985,000	33,960	97.3	Ashton(1950)
	35	1,600,000	44,000	99.9	Olson 등(1953)
	37	257,000	1,670	99.4	Egdell&Bird(1950)
	37	74,130	1,740	99.7	Alexander & Higginboton(1953)
	35~37	8,000,000	7,500	99.9	田中 등(1955)
HTST 살균	30	2,985,000	58,530	96.7	Ashton(1950)
	37	257,000	2,330	99.1	Egdell&Bird(1950)
	37	74,130	3,200	95.9	Alexander & Higginboton(1953)
	35~37	11,500,000	33,600	99.6	田中 등(1955)
UHT 멸균	35~37	13,000,000	0.5-1	99.99999	中西 등(1959)
	35~37	55,000-250,000,000	0	100	研 등(1958)
	30	5,000 포자/5 L	0.0025 포자/5 L	99.99995	Franklin(1956)
	30	900 포자/5 L	0-3 포자/5 L	≈100	Williams(1955)

#### 4) 살균유 및 멸균유의 품질의 보존성

LTLT 살균이나 HTST 살균된 우유는 온화한 풍미를 나타내고 병장 직후에는 신선한 우유와 같은 외관을 나타낸다. 그러나 잔존세균으로 인하여 보존성이 떨어지고 냉장 중에는 호냉세균의 증식에 의하여 며칠 내에 풍미가 변하게 된다. 반면 UHT 처리유는 처리직후에 가열취와 황화수소취가 나타나며, 유청 단백질의 변성에 의하여 백색이 더 증가되고 저장 중에는 변성단백질의 침전이 생성된다. UHT 처리의 잔존세균은 주로 호기성 아포균과 호냉세균으로 한정되므로 냉장중의 변패는 일반세균유와는 달리 단백질 및 지방의 분해와 이에 따른 풍미의 약변과 쓴맛을 나타내게 되며, UHT 멸균, 무균충전 우유는 수 주간의 높은 보존성을 유지하게 된다.

#### 5) 효소의 불활성

원유 내 효소의 가열처리에 의해 열변성으로 불활성화 된다(Fig. 4-1). 이것은 두가지 점에서 중요하다. 첫째, 유제품의 안정성을 증가시킨다. 지방분해효소는 산패취의 생성이라는 측면에서 볼 때 가장 중요한 효소이다. HTST살균을 통해 완전히 불활성화되지만 지방의 분해를 막기 위하여 78°C에서 10초간의 가열이 필요하다. 둘째, 선택된 효소의 활성화는 가열처리의 지표로 이용되고 있다. 예를 들면, 알칼리성 인산화 효소(alkalin phosphatase, HTST살균),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase(72-80°C의 범위내의 가열의 지표), lactoperoxidase(80-90°C)등이 이용된다.

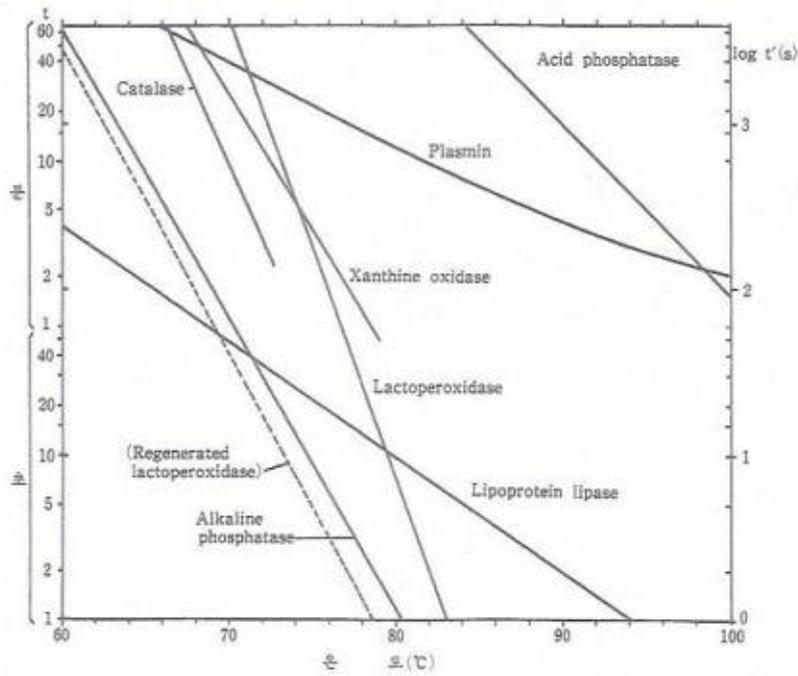


Fig. 4-1. 각종 효소의 불활성화에 대한 우유의 온도와 시간의 연합. 제공(Walstra와 Jemmess,1984)

(나) 살균법의 단점

1) 단백질 변성

우유에 있어 열처리에 의해 민감하게 반응하는 단백질은 유청 단백질(serum albumin, immunoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin)이다. 특히,  $\beta$ -lactoglobulin의 변성은 유제품의 많은 기능적 특성과 강한 상관관계가 있다 (De Wit and Klarenbeek, 1988; Rynne et al. 2004). 예를 들어, 요구르트의 질감이 향상되고(Dannenbergh and Kessler, 1988b), 분유의 용해성은  $\beta$ -lactoglobulin의 변성정도에 따라 감소한다(De Wit and Klarenbeek,1988). 비록 단백질 변성이 많은 반응 단계에서 복잡한 반응으로 알려져 있지만, 그것은 전반적인 반응계에서 정량적으로 설명할 수 있다. 이것은 아래 Table 4-2와 같이 반응속도 상수로서 설명될 수 있다.

Table 4-2. Overview of kinetic constants for reaction in milk

**Table 2** Overview of kinetic constants for reactions in milk.

Component	Product	Concentration (g l <sup>-1</sup> )	Temperature range (°C)	ln k <sub>0</sub>	E <sub>a</sub> (kJ mol <sup>-1</sup> )	n	Reference
<i>Destruction of microorganisms</i>							
<i>Escherichia coli</i>	Milk	-	62-82	132.22	378	1	Evans <i>et al.</i> (1970)
	Cream (40% fat)	-	52-80	132.42	375	1	Reid <i>et al.</i> (1961)
<i>Micrococcus luteus</i>	Milk	-	60-90	112.71	330	1	Peri <i>et al.</i> (1988)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Milk	-	60-90	173.88	498	1	Klijns <i>et al.</i> (2001)
<i>Bacillus cereus</i> Vc1 spores	Milk	-	90-105	56.47	179.4	1	Stadhouders <i>et al.</i> (1980) <sup>a</sup>
<i>Bacillus cereus</i> Vc1 spores	Milk	-	95-110	91.92	294.5	1	Stadhouders <i>et al.</i> (1980) <sup>a</sup>
<i>Bacillus coagulans</i> spores	Milk	-	116-123	151.29	509	1	Hermier <i>et al.</i> (1975)
<i>Bacillus pasteuriphilus</i> spores	Milk	-	100-140	108.15	345.4	1	Peri <i>et al.</i> (1988)
<i>Clostridium botulinum</i> spores	Milk (1.5% fat)	-	104-113	107.50	351	1	Denny <i>et al.</i> (1980)
<i>Inactivation of enzymes</i>							
Catalase	Milk	3 <sup>b</sup>	60-80	180.72	529	1	Walstra and Jenness (1984) <sup>a</sup>
Clypeosin	Milk	-	50-70	134.10	372	1	Luf (1989) <sup>a</sup>
Phosphatase	Milk	-	60-82	95.17	275	1	De Jong and Van den Berg (1993)
Lipase	Milk	-	60-90	53.70	160	1	Walstra and Jenness (1984) <sup>a</sup>
Lipase <i>Pseudomonas</i>	Milk	-	150	22.60	91	1	Adams and Browley (1981)
Lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Milk	-	150	21.16	83	1	Fox and Stepaniak (1983)
Peroxidase	Milk	-	70-90	225.26	663	1	Walstra and Jenness (1984) <sup>a</sup>
Protease	Milk	-	70-150	15.19	64	1	Peri <i>et al.</i> (1988)
Protease <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Milk	-	70-130	24.64	101	1	Driesen (1983)
Xanthine oxidase	Milk	-	60-80	127.29	380	1	Walstra and Jenness (1984) <sup>a</sup>
<i>Denaturation of proteins</i>							
Bovine serum albumin	Skim milk	0.4	60-82	23.68	80	1	De Jong and Van den Berg (1993)
			82-150	13.18	49	1	De Jong and Van den Berg (1993) and Hüller and Lyster (1979)
Immunoglobulin	Milk	0.7	60-76	90.38	275	1	Luf (1989) <sup>a</sup>
			76-82	54.21	170	1	De Jong and Van den Berg (1993)
$\alpha$ -Lactalbumin	Skim milk	1.2	70-85	84.92	269	1	Dannenbergh and Kessler (1988) <sup>a,b</sup>
			85-150	16.95	69	1	Dannenbergh and Kessler (1988) <sup>a,b</sup>
$\beta$ -Lactoglobulin	Skim milk	3.2	70-90	89.43	280	1.5	Dannenbergh and Kessler (1988) <sup>a,b</sup>
			90-150	12.66	48	1.5	Dannenbergh and Kessler (1988) <sup>a,b</sup>
	Milk	3.2	75-85	120.64	374	1.8	De Wit and Klarenbeek (1988)
Lysine (amino acid)	Milk	2.9	130-160	8.77	109	2	Kessler and Fink (1986)
<i>Loss of nutrients</i>							
Thiamin (vitamin B <sub>1</sub> )	Milk	0.0004	120-150	29.78	100.8	0	Kessler and Fink (1986)
<i>Formation of components (i.e. Maillard type)</i>							
Pigment brown	Milk	0 <sup>c</sup>	50-160	29.09	116	0	Kessler and Fink (1986)
Furoin	Milk	0	120-150	16.01	81.6	0	Peri <i>et al.</i> (1988)
5-Hydroxymethylfurfural (HMF)	Milk	0	75-130	30.31	135.1	0	Peri <i>et al.</i> (1988)
			130-160	30.72	139	0	Kessler and Fink (1986)
Lactulose	Milk	0	60-145	30.52	120.2	0	Peri <i>et al.</i> (1988)
Lysinomaline	Milk	0	110-130	18.39	101.4	0	Peri <i>et al.</i> (1988)

<sup>a</sup> Calculated from published experimental data.

<sup>b</sup> Enzyme activity in raw milk is defined as 100%.

<sup>c</sup> 1 = no change in colour (perception threshold); 2 = light ivory; 4 = saffron-yellow; 10 = brown-yellow.

대량처리 시 우유 몇 가지의 성분의 변환은 추가적으로 부정적 영향(열처리 장치내부에 유성분의 침착 등) 나타낸다. 침착물의 정확한 메커니즘은 현재 잘 알려져 있지 않으며, 최적화된 과정을 적용할 수 있는 표면 물리학적 배경으로 하는 수학적 방법이 없다. 그러나 열교환 장치의 부착물과 단백질 변성 사이의 상호작용을 여러 연구원 (Lalande et al., 1985 Dannenberg, 1986; Fryer, 1989; De Jong et al., 1992) 에 의해서 확인 되었다. 이것은 특히  $\beta$ -lactoglobulin 단백질 변성이 열교환 장치의 침착 과정에 중요한 역할을 하는걸 알 수 있다.

단백질과 미네랄 외에 수많은 미생물은 가열 살균 장치의 표면에 부착될 수 있다. *Streptococcus thermophilus* 와 *Bacillus cereus* spores (Te Giffel et al., 1997)는 잘 알려진 예이다. 기계 작동 중 표면에 다량의 미생물은 제품의 유통기한을 줄이는 원인이 될지도 모른다.

## 2) 영양소의 손실

열을 가하여 손실을 있는 주요 영양소는 티아민(비타민 B<sub>1</sub>)이다. 예를 들면, UHT 우유의 경우 티아민의 손실은 3%보다 적게 된다.(Kessler,1996).

Table 4-3. Vitamin content of milk and typical percent losses caused by heat treatment

**Table 3** Vitamin content of milk and typical percent losses caused by heat treatment<sup>1</sup>

Vitamin	Raw milk, content/100 mL	Loss (%)		
		Pasteurized	Sterilized	UHT
Thiamin	45 µg	<10	30	10
Riboflavin	180 µg	ns	ns	ns
Nicotinic acid	80 µg	ns	ns	ns
Vitamin B <sub>6</sub>	40 µg	<10	20	10
Vitamin B <sub>12</sub>	0.3 µg	<10	<90	10
Pantothenic acid	350 µg	ns	ns	ns
Biotin	2.0 µg	ns	ns	ns
Folic acid	5.0 µg	<10	50	15
Ascorbic acid	2.0 µg	20	90	25
Vitamin A	30 µg	ns	ns	ns
Vitamin D	22 ng	ns	ns	ns
Vitamin E	86 µg	ns	ns	ns
B-carotene	17 µg	ns	ns	ns

<sup>1</sup>From Ford and Thompson, 1988. New Monograph on UHT milk.

ns = not significant

Pasteurized = 72°C for 15 seconds; Sterilized = 115°C for 30 minutes

## 3) 새로운 성분의 형성

일반적으로 새로운 성분의 형성은 기대하지 않으며, Maillard 반응에 의해서 만들어진다. Maillard 반응은 유당과 단백질 사이에서 발생하는 반응으로 복잡한 여러 단계적으로 일어난다 (Adrian,1974;Brands,2002). 다양한 경로로 열처리된 우유의 갈색화 반응으로 제품을 나타내게 할 수 있다. 예를들면 커피 크리머 등과 같은 몇몇 가지의 경우 에서 이런 색의 형성은 기대하는 현상이다. HMF(Hydroxymethylfurfural)은 Maillard 반응의 초기 단계에서 나타나며, 우유의 열처리에 강도의 측정 잣대로써 활용할 수 있다.

## 4) 우유 표면반응에서 열 유도반응

대량처리 시 우유 몇 가지의 성분의 변환은 추가적으로 부정적 영향(열처리 장치내부에 유성분의 침착등) 나타낸다. 침착물의 정확한 메커니즘은 현재 잘 알려져 있지 않으며, 최적화된 과정을 적용할 수 있는 표면 물리학적 배경으로 하는 수학적 방법이 없다. 그러나 열 교환 장치의 부착물과 단백질 변성 사이의 상호작용을 여러 연구원(Lalande et al., 1985 Dannenberg, 1986; Fryer, 1989; De Jong et al., 1992)에 의해서 확인 되었다. 이것은 특히 β-lactoglobulin 단백질 변성이 열교환 장치

의 침착 과정에 중요한 역할을 하는걸 알 수 있다.

단백질과 미네랄 외에 수많은 미생물은 가온하는 장치의 표면에 부착될 수 있다. *Streptococcus thermophilus*와 *Bacillus cereus* spores(Te Giffel et al., 1997)는 잘 알려진 예이다. 기계 작동 중 표면에 다량의 미생물은 제품의 유통기한을 줄이는 원인이 될지도 모른다.

## 나. 고전압펄스 기술의 유제품 적용 사례 검토

### (1) 유제품 적용 사례 검토

- 고전압펄스 살균법을 이용한 유제품은 국내·외적으로 사례가 없음
- 고전압펄스에 의한 미생물의 살균은 국내의 경우 일부대학에서 lab scale로 연구하는 수준으로 외국과 기술격차가 큰 편임
- 고전압 펄스 미생물 제어는 우유, 과일주스, 계란, 잼 등의 액체, 고체의 식품 등의 살균에 적용 가능한 것으로 보고되고 있음
- 식품의 영양학적 손실을 최소화하고 고품질 제품을 생산하기 위한 고전압펄스 전기장 처리 기술은 지속적이고 심도 있는 추가 연구가 필요한 실정

### (2) 비가열 살균법 조사 및 상용화 여부, 가능성 검토

#### (가) 펄스전기장(Pulsed electric field, PEF)

펄스전기장 방법은 두 개의 전극을 이용하여, 높은 볼트의 전기장(일반적으로 20-80 kV/cm)을 만들어 식품의 살균이나 멸균에 이용하는 것이다. 펄스전기장 방법은 식품의 열처리에 의한 에너지를 최소화하며, 식품의 바람직하지 않은 관능상의 변화와 물리적 손상을 줄일 수 있으며, 병원성 세균, 효모, 그리고 곰팡이 등을 파괴하는데 효과가 있다. 전기의 높은 볼트 충격은 세포막 안과 밖에 다른 전위를 일으키며, 양쪽에 약 1 V의 정도의 전위 차이가 일어나서 세포막의 파손이 야기된다. 따라서 높은 전극의 강도(10 kV/cm 이상)에서 전기 충격을 받게 되면 미생물 세포는 회복할 수 없을 정도로 세포막 손상을 입게 되며(전기분해) 높은 강도의 전극은 세포막의 이중 지방층이나 단백질을 불안정화시켜 미생물 세포의 파괴를 가져올 수 있다(전기천공). 펄스전기장을 이용한 미생물 제어효과에 영향을 주는 요소로는 전기장의 조건(전기장의 강도, 펄스 넓이, 처리 시간, 온도, 펄스 파장 모양 등), 미생물적 요소(종류, 수, 미생물의 성장 단계 등) 그리고 배지 요소(pH, 항균물질의 유무, 이온 물질, 전도성, 배지의 이온 강도 등) 등이 있다. 현재 상업적 인 시스템이 이용 가능하며, 액체 식품의 경우 입자의 크기로 제한될 수 있다. 실제 사용 예로 과일 주스, 우유, 액상계란 등의 살균에 일부 이용되고 있으며, 미생물 살균뿐 아니라, 채소 및 과일 주스의 추출이나 식물 세포로부터 색소를 추출하는 데에도 유용한 것으로 알려져 있다. 펄스자기장 방법이 식품 보존기술로서 그 가능성을 가지고 있다 하더라도, 아직 대중적인 실용화는 이루어지지 못한 실정이다.

#### (나) 방사선 처리(Irradiation, ionizing radiation)

식품의 방사선조사(Ionizing radiation, 이온화살균)는 주로 가열할 수 없는 식품을 대상으로 하는 살균법이다. 이 기술은 사멸효과가 크고, 선량을 목적에 맞게 조정할 수 있으며 가열살균기술에 비해 식품 중 화학적인 변화가 적다는 장점이 있다. 식품의 최종 포장 후 공정에 사용하여 미생물을 사멸시킴으로써 재오염을 방지할 수 있으며, 식품 자체의 품질과 가공 중 환경에 미치는 영향이 거의 없다는 장점이 있다. 또한 순간적으로 균일하고 깊게 작용하며, 가열에 비해 정확하게 에너지 조절이 가능하고 포장한 채로 살균 할 수 있으며, 연속적으로 대량처리가 가능하며, 가열살균이나 냉동살균에 비해 에너지 소요가 낮아 경제적이다. 그러나 화학적 변화가 양적으로는 극히 적지만 감수성이 큰 식품이나 고선량의 조사식품에서는 바람직하지 않은 관능적인 변화가 일어날 가능성이 있으며 허가된 품목과 선량에 한해서만 조사처리가 가능하다는 단점도 있다.

#### (다) 강력 광 펄스(Intense light pulses)

강력 광 펄스는 넓은 스펙트럼 백색광(white-light)의 강하고 짧은 파의 충격을 이용한 식품 보존 방법이다. 빛의 분광은 적외선(infrared) 근처의 자외선 (ultraviolet, UV) 파장을 포함한다. 무균포장 또는 공기, 물, 염 용액과 같은 유체를 처리할 경우 UV가 많은 광 펄스, 즉 최소한 광에너지의 30%가 300 nm 이하의 파장을 갖는 펄스를 사용한다. UV광 펄스는 광열 및 광화학 기작을 통해 미생물을 살균한다. UV는 최대 흡수파장 260 nm에서 미생물의 DNA에 흡수, 손상을 일으켜 살균력을 나타낸다. 따라서 파장 200~300 nm의 단파장 UV-C가 가장 높은 살균력을 지닌다. UV-C는 세균, 효모, 곰팡이, 바이러스 등 공기 및 표면 미생물에 강한 살균력을 지니므로 식품제조 용수, 생수, 음료 등의 살균, 식품가공 기계기구의 살균, 식품가공 시설 내 공기 살균, 식품가공 폐수 살균처리 등에 널리 사용되고 있는 기술이다. 현재 국내에서의 자외선 살균소독기는 작은 식당에서부터 단체급식소, 대형식품제조업체에 이르기까지 폭 넓게 사용 되고 있으며, 그 용도 또한 컵 살균은 물론 칼, 도마, 행주 등 기구 살균과 위생복, 앞치마, 장화, 고무장갑 등의 개인위생 용구에 이르기까지 다양하다.

#### (라) 초고압처리(High pressure processing, HPP)

초고압 처리기술은 흔히 ultra high pressure(UHP) 혹은 high hydrostatic pressure(HHP)로 불리우며, 열처리를 대체할 수 있는 식품보존법으로 오래 동안 연구되어 왔다. HPP는 일정한 온도에서 식품 전체에 균일하게 높은 정압력을 가하는 기술로서 20세기 초반에 이미 우유 등에서 미생물 살균 효과나 유용한 물질의 추출 향상 등의 기능이 확인된 바 있었으나 본격적으로 식품 산업에 적용된 것은 최근 일이다. HPP는 미생물 세포막에 작용함으로써 살균효과를 나타내는 것으로 알려져 있는데, HPP에 의해 세포막 단백질이 변성되고 인지질의 크기가 감소되어, 세포의 생명 유지에 필수적인 아미노산의 흡수를 억제한다. 이에 따라 대사활동에 관여하는 효소 등 단백질을 불활성화 시켜 미생물의 생육을 저해한다. 식품의 고압처리는 미생물의 저해뿐만이 아니라 단백질 변성 또는 변형, 효소의 활성 혹은 불활성, 효소와 기질의 결합의 변화, 탄수화물과 지방 등의 복합체의 성질 변화, 용액에서 화학반응 정도의 변화 등의 효과도 수반한다. 그러나 이러한 효과는 열처리 보다는 낮은 것으로 알려져 있다. 이 기술은 처리된 식품이 고유의 신선도, 색, 향, 그리고 맛을 유지하고, 크기나

모양, 식품의 구성과 상관없이 적용 될 수 있다는 장점을 갖는다. 압력을 이용한 살균은 상온에서 이용 가능하고, 열처리와 비교해서 에너지를 절약할 수 있다. 처리 온도, 수분의 양과 pH는 HPP 처리 결과에 영향을 주는 주요한 요소이다. 처리 온도 45-50°C에서 식품으로부터 유래하는 식중독균과 부패균의 제어를 향상시킬 수 있으며, 500-700 MPa 압력과 결합된 90-110°C 범위의 온도는 *Clostridium botulinum*과 같은 미생물의 포자도 제어할 수 있다고 한다. HPP 처리된 포장 혹은 미포장 상태의 액체 및 고체식품은 미국, 일본, 프랑스, 스페인 등 국제시장에서 이미 시판되고 있다. 식품의 처리를 위해서는 주로 100-800 MPa의 높은 압력이 이용되며, 압력 처리 시 온도는 0-100°C, 처리시간은 수초에서 20분 이상으로 다양하다. HPP는 열처리를 대체하는 식품보존법으로 오랫동안 주목 되어 왔고, 많은 연구가 이루어졌지만, 아직까지 장치의 높은 비용, 처리에 대한 신뢰성 부족 등으로 산업적 이용이 제한적으로 이루어지고 있다.

#### (마) 진동자기장(Oscillating magnetic field, OMF)

진동자기장 방법은 최근 식품으로부터 미생물을 제어하기 위한 하나의 방법으로서 그 가능성이 대두되고 있다. 진동자 기장이 에너지를 동반한 상태에서 수차례의 발진에 의해 생물분자의 자기 활성 부분으로 침투했을 때 분자 내에 자성 쌍 극자(magnetic dipole)의 수가 많으면 충분한 에너지가 분자에 전달되어 공유결합을 파괴할 수 있는 것으로 알려져 있다. 식품에 진동 자기장의 충격을 주는 시간은 10  $\mu$ s 또는 ms 정도이며, 진동수는 최대 500 MHz이 이용될 수 있다. 하지만, 그 이상의 진동수에서는 미생물의 제어효과가 없으며, 열이 발생하기 시작하는 것으로 알려져 있다. 보통 처리할 식품은 비닐팩으로 봉합되며, 0-50°C의 온도에서 5-500 kHz의 진동수를 가진 자기장이 25-100 ms 동안에 1-100 펄스로 처리된다. 일부 연구에서 진동 자기장이 식품에서의 병원균 제어에 가능성을 보여주었으나, 이 기술이 실용화되기 위해서는 효과에 대한 보다 많은 연구가 선행되어야 한다.

#### (바) 초음파(Ultra sound)

초음파는 20 kHz 이상의 음파 파장으로부터 유래되는 에너지를 말하며, 음파가 발생했을 때, 순식간에 액체배지에서 높은 온도와 압력을 수반하는 공기방울을 발생할 수 있다. 초음파의 항미생물 효과는 추진기 뒤에 생기는 진공현상인 캐비테이션에 기인하여 발생되며, 세포조직과 기능성 요소들을 파괴하며, 결과적으로 세포를 용해시킨다. 이 기술에 영향을 줄 수 있는 요소로는 초음파 파장, 미생물의 종류, 처리되는 식품의 양, 식품의 구성, 온도 등이 있으며 식품에는 주로 20 kHz에서 10 MHz 사이의 초음파가 이용되나 이 방법은 단독으로 처리되었을 때, 미생물에 충분한 피해를 일으키지 못하는 단점이 있으므로, 주로 열처리, 압력, 살균소독제, UV 등 다른 미생물 저해방법과 병용 사용된다. 대표적인 적용으로 양상추에 오염된 *Salmonella*균의 살균을 위해 처리된 염소의 살균력을 증가시키는 병용처리로서 사용된다. 아직 식품 산업에서 미생물의 제어 혹은 효소의 불활성화를 위해 실용적으로 활용되고 있지는 못한 기술이다. 그러나 최근 신선편의 과채류 등의 살균 보조 전처리에 활용이 활발하게 시도되고 있다.

다. 법적 허용 가능성, 표시사항 등 검토

(1) Codex 내 우유와 유제품에 대한 위생 실행 규범 관련

(가) 부록 B. 미생물의 제거 방법들 편에서 서술을 기준으로 하였다.

전자기 에너지법이란? 전자기 에너지법은 높은 전압으로부터 초당 번갈아 나오는 수백만의 전압을 사용한다(<108 MHz). 예시들은 전자레인지 에너지(열처리 효과), 무선 주파수 에너지(비열처리효과), 또는 고전자 파동(10-50 kV/cm, 비열처리 효과)가 있다. 이 방법은 세포막에 전기적 충격이 형성되기 때문에 세포벽에 구멍이 생기고 이를 통해서 세포를 파괴하는 것이다.

우유의 저온살균과 다른 열처리 방식들은 최소한 그것들이 사용된 강도 (충분한 시간/온도 조합들)와 같은 효율성을 가진다. 사용된 강도에서는 실제적으로 특정 병원균들을 제거한다. 그러므로 그것들은 전통적으로 우유의 생산에서 주요한 미생물 제거 제어 방식들로 사용되어 왔다. 비슷한 효과를 가지고 있는 비 열처리 미생물 제거 제어 방식들은 유제품에 안전성을 줄 그런 강도의 적용이 이루어지지 않았다.

Codex 내 규정 검토를 통해, PEF는 우유 보조 살균 방법으로 적용 가능할 것으로 여겨지며, 기존 살균법과의 병용으로 미생물학적, 이화학적 및 영양학적으로 살균 효과를 극대화할 수 있는 연구가 지속되어야 할 것이다.

라. PEF 활용 우유 살균 예비 테스트

(1) 사용 재료 및 방법

(가) 원유 샘플

- 1) 거창공장 탈지유 20 L(65°C, 15초 Thermisation 처리된 유지방함량 0.03% 이하의 탈지유)
- 2) 안산공장 원유 20 L(Pilot 처리(50°C 150 Bar 균질))

(나) 시험설계

1) Skim milk(탈지유)

가) Conductivity: 0.558 S/m

나) Flow rate: 24.5 L/h

Out Voltage (%)	Pulse Width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field Strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet Temperature ( $^{\circ}$ C)	Out Temperature ( $^{\circ}$ C)	비고
70	25	50	16	102	29	54	
70	25	65	16	136	29	62	

2) Raw milk(균질된 원유)

가) Conductivity : 0.535 S/m

나) Flow rate : 24.5L/h

Out Voltage (%)	Pulse Width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field Strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet Temperature ( $^{\circ}$ C)	Out Temperature ( $^{\circ}$ C)	비고
70	25	51	16	102	29	54	
70	25	65	16	133	29	62	

(2) 분석법

일반성분 분석: Near-Infrared(NIR) analyzer(Foss MilkoScan TM FT 6000, Denmark)을 이용하여 총 지방 및 단백질, Lactose, 총고형분 측정하였다.

일반세균수(Total aerobic bacteria) 측정은 시험용액 1 mL와 각 단계 희석액 1 mL를 세균수 건조 필름배지(3M Microbiology. St. Paul, MN, USA)에 접종 한 후 잘 흡수시키고 35 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 24-48시간 배양한 후 생성된 붉은 집락수를 계산하고 그 평균 집락수에 희석배수를 곱하여 일반 세균수로 한다.

보존기간 중 변화 분석은 7 $^{\circ}$ C 냉장보관 중에 pH, 산도 및 일반세균수 변화를 측정하였다.

pH측정은 상온에서 pH meter(Orion Star A 221 Conductivity Meter, Thermo Scientific)를 이용하여 측정하였다.

적정 산도 측정은 검사시료 10 mL에 탄산가스를 함유하지 않은 물 10 mL를 가하고 페놀프탈레인 시액 0.5 mL를 가하여 0.1N 수산화나트륨액으로 30초간 홍색이 지속할 때까지 적정하였다.

0.1N 수산화나트륨액 1 mL = 0.009 g 젓산

$$\text{산도(젓산\%)} = \frac{a \times f \times 0.009}{10 \times \text{검사시료의 비중}} \times 100$$

a : 0.1N 수산화나트륨액의 소비량(ml)

f : 0.1N 수산화나트륨액의 역가

일반세균수(Total aerobic bacteria) 측정은 시험용액 1 mL와 각 단계 희석액 1 mL를 세균수 건조 필름배지(3M Microbiology, St. Paul, MN, USA)에 접종 한 후 잘 흡수시키고 35±1℃에서 24-48시간 배양한 후 생성된 붉은 집락수를 계산하고 그 평균 집락수에 희석배수를 곱하여 일반 세균수로 하였다.

### (3) PEF 처리 후 변화

#### (가) 일반성분 분석

##### 1) Whole Milk

	Fat(%)	Protein(%)	Lactose(%)	Total Solid(%)
PEF 살균전 원유	3.83	3.51	4.8	11.97
PEF 100 kJ 처리	3.80	3.55	4.81	11.92
PEF 130 kJ 처리	3.78	3.53	4.8	11.93

##### 2) Low fat Milk 처리

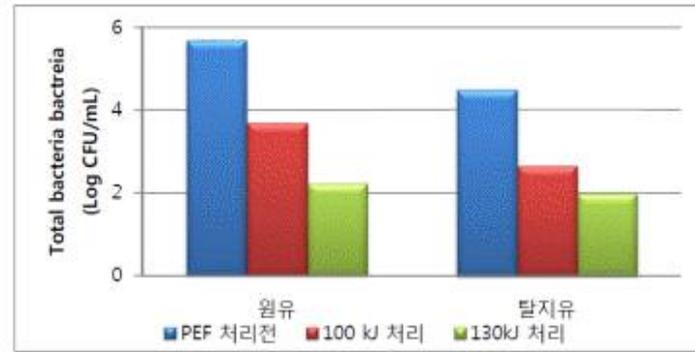
	Fat(%)	Protein(%)	Lactose(%)	Total Solid(%)
PEF 살균전 원유	0.05	3.23	4.82	7.83
PEF 100 kJ 처리	0.05	3.20	4.83	7.78
PEF 130 kJ 처리	0.05	3.22	4.83	7.90

원유와 탈지유 모두 PEF 처리 후에도 일반성분 (총지방 및 단백질, Lactose, 총고형분)의 변화를 관찰할 수 없었다.

#### (나) PEF 처리 후 일반세균수 측정

(단위 : cfu/mL)

	PEF 처리전	100 kJ 처리	130 kJ 처리
원유	4.9 X 10 <sup>5</sup>	5.0 X 10 <sup>3</sup>	1.7 X 10 <sup>2</sup>
탈지유	3.1 X 10 <sup>4</sup>	4.5X 10 <sup>2</sup>	9.6 X 10



원유의 100 kJ의 펄스 자기장 처리를 받고 난 뒤 2 log 감소하였고, 130 kJ의 에너지 처리 때는 초기 시료보다 약 3.4 log 감소하는 것으로 보아, 가해지는 에너지에 따라서도 펄스 자기장의 효과의 상당한 차이가 있음을 확인하였다.

탈지유의 경우도 원유와 마찬가지로 100 kJ을 가해질 때 1.8 log 감소하였고, 130 kJ 가해질 때 2.5log 감소하여 비슷한 양상을 보였다.

#### (4) 저장 기간 중 변화 분석

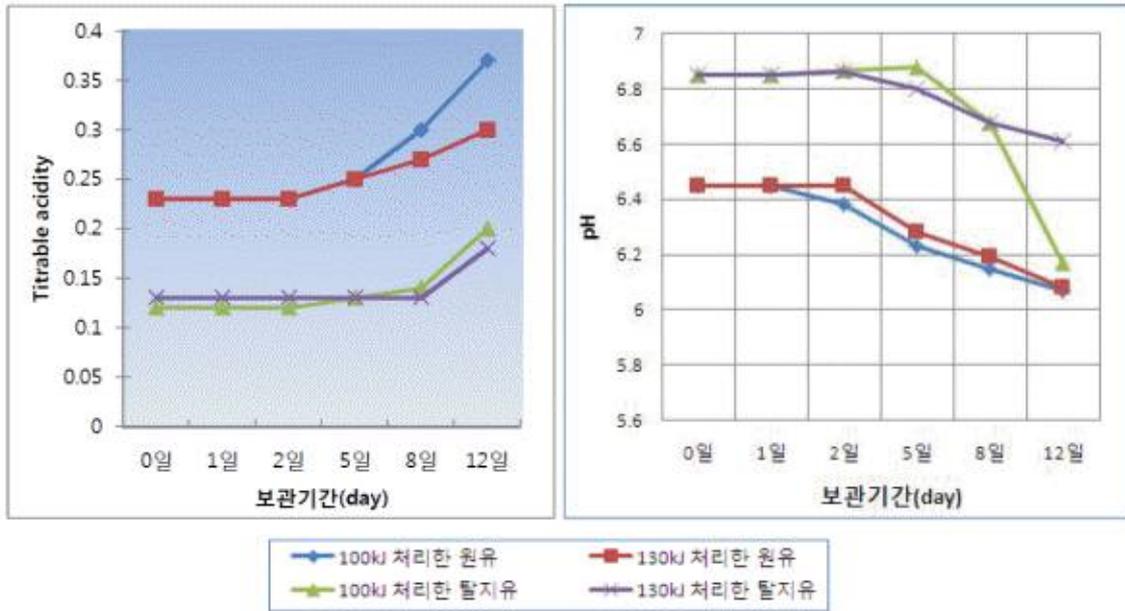
##### (가) pH 및 산도 측정

##### 1) 산도변화

	0일	1일	2일	5일	8일	12일
100 kJ 처리한 원유	0.23	0.23	0.23	0.25	0.30	0.37
130 kJ 처리한 원유	0.23	0.23	0.23	0.25	0.27	0.30
100 kJ 처리한 탈지유	0.12	0.12	0.12	0.13	0.14	0.20
130 kJ 처리한 탈지유	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.18

##### 2) pH 변화

	0일	1일	2일	5일	8일	12일
100 kJ 처리한 원유	6.45	6.45	6.38	6.23	6.15	6.07
130 kJ 처리한 원유	6.45	6.45	6.45	6.28	6.19	6.08
100 kJ 처리한 탈지유	6.85	6.85	6.87	6.88	6.68	6.17
130 kJ 처리한 탈지유	6.85	6.85	6.86	6.80	6.68	6.61



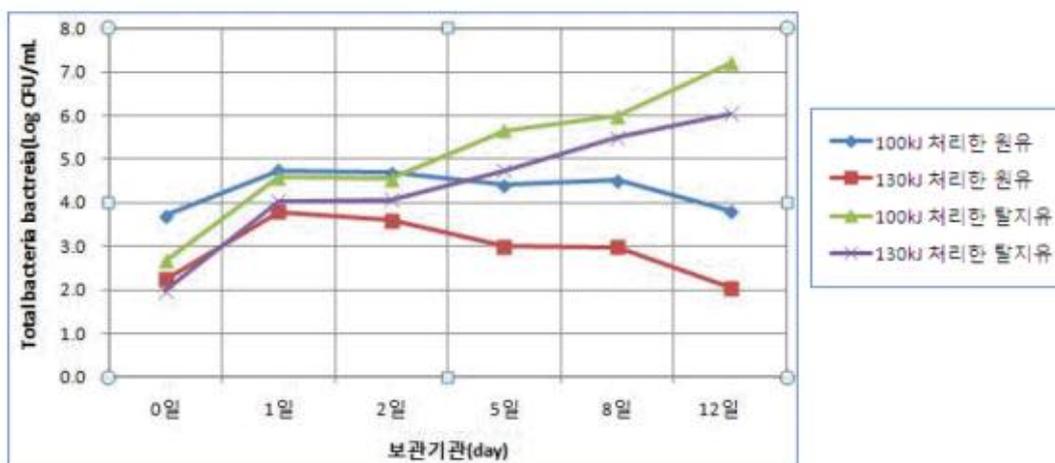
원유는 초기 낮은 산도와 pH의 상태에서 처리하였으며, 산도는 5일 후부터 급격히 높아지기 시작했고, pH는 100 kJ로 처리한 원유는 경과기간 2일 후부터, 130 kJ로 처리한 원유는 5일부터 급격하게 감소하는 것을 확인하였다.

탈지유의 경우 가해지는 에너지에 차이 없이 8일 이후부터 산도는 증가하고 와 pH가 감소하는 것을 확인하였다.

### 3) 일반세균수(Total aerobic bacteria) 측정

(단위:cfu/mL)

	0일	1일	2일	5일	8일	12일
100kJ 처리한 원유	$5.0 \times 10^3$	$5.6 \times 10^4$	$4.8 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$3.3 \times 10^4$	$6.4 \times 10^3$
130kJ 처리한 원유	$1.7 \times 10^2$	$6.2 \times 10^3$	$4.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$9.5 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2$
100kJ 처리한 탈지유	$4.5 \times 10^2$	$3.9 \times 10^4$	$3.6 \times 10^4$	$4.5 \times 10^5$	$9.8 \times 10^5$	$1.6 \times 10^7$
130kJ 처리한 탈지유	$9.6 \times 10$	$1.1 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	$5.5 \times 10^4$	$3.1 \times 10^5$	$1.1 \times 10^6$



7℃ 냉장보관 중 탈지유의 Total aerobic bacteria는 100 kJ 에너지로 처리한 경우 처리 전으로 회복되는 시간은 경과 1일후 이었고, 130 kJ 에너지로 처리한 경우 5일 정도로 130 kJ의 에너지로 처리한 경우가 더 효과적임으로 확인하였다.

원유의 경우 1일후 Total aerobic bacteria가 증식되다가 acidic 한 상태 때문에 2일후부터는 증식이 억제 되는 것을 확인 할 수 있었다.

(5) 우유 살균 예비 테스트 후 향후 진행 방향

우유의 살균의 목적은 미생물을 제거 제어하는 것이다. 이번 실험의 결과 130 kJ로 처리한 결과가 100 kJ로 처리한 결과보다 탁월한 것으로 나타났지만, 비열살균법만으로 우유를 살균하여 제품화하기에는 미흡한 것임을 분명히 볼 수 있었다. 따라서 비열살균법인 PEF처리는 보조적 살균법으로 사용하여 기존 살균법과 병용 적용이 효과적일 것으로 판단된다.

2. PEF법과 기존 우유 살균 처리법과의 병행 검토

커피, 가공우유(초코우유) 및 비타민 강화우유를 PEF 처리에 의한 살균 방식을 적용할 제품으로 선정하였다. PEF 처리에 의한 영양성분 변화, 미생물학적 변화 및 관능적 특성을 파악하기 위해 동일한 배합비를 가졌지만, HTST 살균방식으로 살균 처리한 방식이 다른 제품을 비교대상으로 삼았다. 또한 PEF 단독 처리에 의한 관능적 품질저하를 개선하기 위해 HTST 살균법과 PEF 처리를 병합하여 적용한 제품을 개발하였고, 두 샘플간의 관능검사 결과를 비교분석함으로써 병합살균에 의해 실질적으로 관능적 품질저하가 개선되었는지 살펴보았다.

가. 커피류

(1) 카페라떼

(가) 카페라떼 배합비 및 살균 조건

카페라떼는 아래 Table 4-4에 제시된 배합비율에 따라 조제하였으며, 조제된 샘플은 36-38℃로 가온한 후 150 bar의 압력으로 균질하였다. 카페라떼의 PEF 처리조건은 Table 4-5에 제시하였다.

Table 4-4. 카페라떼 배합비

	원유(%)	설탕(%)	40brix 커피 농축액(%)	정제수(%)	소계(%)
카페라떼	50.0	6.2	3.5	40.3	100.0

Table 4-5. 카페라떼의 PEF 처리 조건

Conductivity (S/m)	Flow rate (L/h)	Out voltage (%)	Pulse width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet temperature (°C)	Outlet temperature (°C)
0.4	20.0	70.0	20.0	75.0	15.6	100.0	32.4	54.0
0.4	20.0	70.0	20.0	88.0	15.6	120.0	32.4	58.3

(나) 카페라떼의 PEF 처리에 의한 미생물 생육 억제 효과

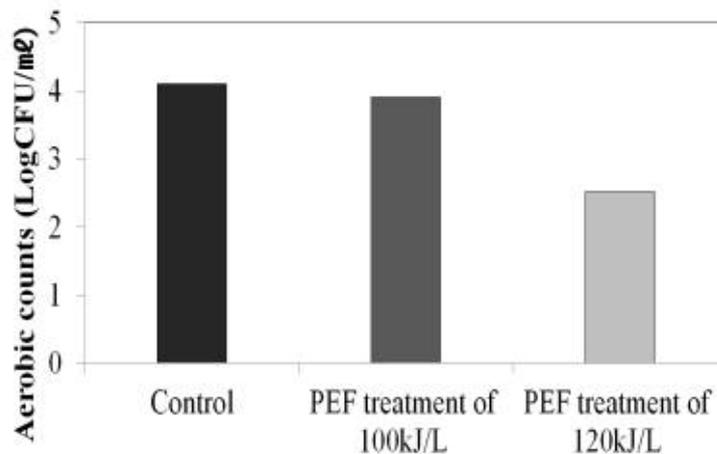


Fig 4-2. 카페라떼의 PEF 처리 전후의 일반세균수 변화

Fig 4-2을 통해 알 수 있듯이, 대조군에 비해 PEF 처리를 하였을 때, 일반세균수가 감소하는 경향을 보였다. 또한 가해주는 에너지가 클수록 미생물 생육 억제 효과가 컸다. 카페라떼에 100 kJ/L의 에너지로 PEF 처리를 했을 때, 일반세균수는 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다. 하지만 120 kJ/L의 에너지로 처리를 했을 때에는, 대조군에 비해 일반세균수가 1.6 log 감소하였다.

(다) 카페라떼의 일반성분 분석 결과

Table 4-6을 통해 알 수 있듯이, 카페라떼는 PEF처리에 따른 일반성분(단백질, 지방, 회분 및 총고형분)의 변화를 보이지 않았다.

Table 4-6. 카페라떼의 일반성분 분석 결과

	단백질(%)	지방(%)	회분(%)	총고형분(%)
Control	1.85	1.96	0.44	13.97
PEF 100 kJ	1.88	1.96	0.45	13.90
PEF 120 kJ	1.86	2.05	0.47	13.96

(라) 카페라떼의 PEF 처리여부에 따른 관능검사 결과

살균 조건에 따른 카페라떼의 관능검사는 총 5가지 항목에 대해 7점 척도법을 통해 평가되었다. 관능검사 결과의 통계처리는 SPSS version 18.0 package program를 통해 시행하였으며, 군간 관능적 특성의 차이를 파악하기 위해 one way ANOVA를 이용하여 분석하였다. 관능검사 결과, 비열처리한 대조군과 PEF 처리군 모두 전반적인 맛에 대한 기호도가 낮게 나타났다. 이는 대조군을 포함한 PEF 처리군에서 느껴진 강한 이미로 인한 것으로 보인다. 이는 공정 중 열처리에 의한 일반적인 살균과정이 생략되어 원유 자체가 가지는 비릿한 향이 그대로 유지되어 나타난 현상으로 보인다. 하지만 대조군에 비해 PEF 처리군에서 원유 자체의 강한 이미가 약간은 masking 되며, 이미의 정도와 맛에 대한 기호도가 약간은 개선된 것을 확인할 수 있었다. 하지만 이는 통계적으로 유의적 차이는 아니었다. 비열처리 카페라떼의 이러한 관능적 특성을 고려할 때, 열처리는 불가피한 공정으로 사료된다. 영양소 파괴를 최소화 할 수 있는 열처리 살균법을 선택하고, 그것을 PEF 처리와 병합하는 것이 바람직할 것이다. 이러한 측면에서 UHT 살균법보다는 HTST 살균법이 PEF 처리와의 병합에 적합할 것이며, 이는 PEF 단독처리에 의한 카페라떼의 관능적 품질저하를 개선할 것이다.

Table 4-7. PEF 처리 여부에 따른 카페라떼의 관능적 특성

	Control	PEF 100 kJ	PEF 120 kJ
커피 맛의 강도	5.22	5.11	5.00
우유 맛의 강도	4.11	4.33	4.22
크림 맛의 강도	5.44	5.44	5.00
이미의 정도	5.89	5.44	4.89
전반적인 맛에 대한 기호도	2.89	3.11	3.67

(2) 아메리카노

카페라떼는 우유를 이용한 대표적 커피 중 하나이다. 제조 시 원유가 함유되므로 가공과정 중 열처리를 하지 않을 경우, 원유 특유의 향과 맛으로 인해 관능적 품질이 떨어질 수 있다. 이러한 점에서 카페라떼는 PEF 단독 살균방식을 적용할 제품으로 적합하지 않다는 결론이 도출되었다. 아메리카노는 에스프레소에 물을 넣어 연하게 마시는 커피로 우유가 첨가되지 않아 커피 본연의 특징을 강조해준다. 아메리카노가 가진 이러한 특성은 비열처리 살균 방식인 PEF 살균방식을 적용하더라도 제품의 관능적 특성에 큰 영향을 주지 못할 것으로 가정하였고, 이를 고려하여 PEF 살균방식을 적용할 커피 제품으로 아메리카노를 선정하였다.

(가) 아메리카노의 배합비 및 살균 조건

아메리카노는 아래 Table 4-8에 제시된 배합비율에 따라 조제하였으며, 조제된 샘플은 36-38℃로 가온한 후 150 bar의 압력으로 균질하였다. 아메리카노의 PEF 처리조건은 Table 4-9에 제시하였다.

Table 4-8. 아메리카노 배합비

	설탕(%)	중조(%)	40 brix 커피 농축액(%)	정제수(%)	소계(%)
아메리카노	4.0	0.06	3.0	92.94	100.0

Table 4-9. 아메리카노의 PEF 처리조건

Conductivity (S/m)	Flow rate (L/h)	Out voltage (%)	Pulse width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet temperature ( $^{\circ}$ C)	Outlet temperature ( $^{\circ}$ C)
0.2	21.0	70.0	25.0	85.0	20.5	100kJ/L	30.2	51.8
0.2	21.0	70.0	25.0	110.0	20.5	140kJ/L	30.2	63.0

(나) 살균방식 차이에 따른 아메리카노의 관능검사 결과

살균 방식에 따른 아메리카노의 관능검사는 총 4가지 항목에 대해 7점 척도법을 통해 평가되었다. 관능검사 결과의 통계처리는 SPSS version 18.0 package program를 통해 시행하였으며, 군간 관능적 특성의 차이를 파악하기 위해 one way ANOVA를 이용하여 분석하였다. 관능검사 결과, 커피맛의 강도 및 단맛의 강도는 군간 차이를 보이지 않았다. 하지만 이미의 정도는 그룹간 유의적 차이를 보였다. 비열처리 및 열처리 제품에 비해 PEF 처리 아메리카노는 이미가 유의적으로 약했다. 전반적인 맛에 대한 기호도는 살균방식에 따른 차이를 보이지 않았지만, PEF 처리 아메리카노의 경

우 비열처리 및 열처리 제품에 비해 기호도가 다소 높은 경향을 보였다. 전반적인 맛에 대한 기호도 평점은 ‘매우 맛있다’로 평가되는 7점을 기준으로 3점 후반에서 4점 중반에 분포했다. 맛에 대한 기호도가 살균처리에 따른 차이를 보이지 않았다는 측면을 고려할 때, 아메리카노의 배합비 조정을 통해 이는 개선될 수 있는 사항으로 보인다. 관능검사 시 ‘대조군 및 실험군의 단맛이 지나치게 강하다’라는 기타 의견이 많았다. 그러므로 배합비 조정을 통해 단맛의 강도를 낮춘다면, 맛에 대한 전반적인 기호도는 높아질 것으로 사료된다.

Table 4-10. 살균방식 차이에 따른 아메리카노의 관능적 특성

	비열처리	열처리(95, 5min)	PEF 100 kJ	PEF 140 kJ
커피맛의 강도	3.93	4.07	3.60	3.67
단맛의 강도	5.00	4.33	3.93	4.20
이미의 정도	4.20	4.40	3.27	3.20
전반적인 맛에 대한 기호도	3.87	3.93	4.67	4.60

#### 나. 비타민 강화우유

PEF 처리는 살균 시 열을 이용하지 않는 비가열 공정으로 미생물적으로 안전성을 보장하면서도, 열처리 살균에 의한 영양 손실을 최소화 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이러한 장점으로 인해 PEF 처리는 열처리에 의해 품질 특성이 저하되는 쉬운 유제품, 과일·야채 음료에 적용 시 효과적인 살균법으로 여겨지고 있다.

우유에 함유되어 있는 대부분의 비타민은 열에 안정적이다. Vitamin A, D, E, riboflavin, pantothenic acid, biotin 및 niacin 등은 UHT 살균처리 시 큰 영향을 받지 않는다. 하지만, vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folate 및 vitamin C 경우, HTST 우유에서는 약 10%, UHT 우유는 약 20% 가량 손실 되는 것으로 알려져 있다. 열처리에 따른 우유 내 비타민 함량 변화는 아래 Table 4-11에 제시하였다(Ford,1988).

우유의 경우, 관능적 측면에서 열처리에 의한 살균방법이 불가피하다. 하지만 PEF 살균법에 의한 영양소 손실 정도를 살펴보기 위해 살균방법에 따른 비타민 강화우유 내 비타민 함량 변화를 살펴보았다. 특히, 열에 민감한 vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>를 중심으로 그 변화를 살펴보았다.

Table 4-11. 열처리에 따른 우유 내 비타민 함량의 변화

Vitamin	Raw milk, content(ug)/100ml	Loss(%)		
		Pasteurized	Sterilized	UHT
Thiamin	45	<10	30	10
Riboflavin	180	ns	ns	ns
Nicotinic acid	80	ns	ns	ns
Vitamin B <sub>6</sub>	40	<10	20	10
Vitamin B <sub>12</sub>	0.3	<10	<90	10
Pantothenic acid	350	ns	ns	ns
Biotin	2.0	ns	ns	ns
Folic acid	5.0	<10	50	15
Ascorbic acid	2.0	20	90	25
Vitamin A	30	ns	ns	ns
Vitamin D	22	ns	ns	ns
Vitamin E	86	ns	ns	ns
β-carotene	17	ns	ns	ns

(1) 비타민 강화우유 배합비 및 살균조건

비타민 강화우유는 아래 Table 4-12에서 제시된 배합비율에 따라 조제되었다. 조제된 샘플은 36-38℃로 가온한 후 150 bar의 압력으로 균질하였으며, PEF 처리조건은 Table 4-13에 제시된 바와 같다. HTST 처리 샘플 및 HTST 및 PEF 병합 살균 샘플은 72℃의 온도에서 15초간 열처리함으로써 HTST 살균 과정을 거쳤다.

Table 4-12. 비타민 강화우유 배합비

비타민 강화우유	
원유(%)	99.71
액상칼슘(%)	0.19
카소락 아연(%)	0.004
인산나트륨(%)	0.029
L-카르니틴(%)	0.001
구연산철암모늄(%)	0.003
식용건조효모(%)	0.004
CPP(%)	0.008
스핑고미엘린(%)	0.006
타우린(%)	0.005
비타민 혼합제제(%)	0.007
CGF2000(%)	0.001
초유단백분말(%)	0.02
천연토코페롤제제(%)	0.004
소계(%)	100

Table 4-13. 비타민 강화우유 PEF 조건

PEF 단독 처리 비타민 강화우유의 PEF 처리 조건								
Conductivity (S/m)	Flow rate (L/h)	Out voltage (%)	Pulse width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet temperature ( $^{\circ}$ C)	Outlet temperature ( $^{\circ}$ C)
0.5	30.0	50.0	20.0	125.0	10.7	133.6	25.0	50.2

PEF 및 HTST(72 $^{\circ}$ C, 15sec) 병합살균 비타민 강화우유의 PEF 처리 조건

Conductivity (S/m)	Flow rate (L/h)	Out voltage (%)	Pulse width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet temperature ( $^{\circ}$ C)	Outlet temperature ( $^{\circ}$ C)
0.5	30.0	50.0	20.0	125.0	10.8	130.4	25.0	49.5

(2) 살균처리에 따른 비타민 강화우유의 비타민 함량 변화

Table 4-14을 통해 알 수 있듯이, 살균 처리 방식에 따른 비타민 강화우유 내 vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 및 B<sub>6</sub> 함량에는 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과가 나타난 데에는 HTST 살균 처리에 의한 영양소 손실이 거의 없었기 때문으로 사료된다. 앞서 살펴본 바와 같이 일반적으로 비타민은 열에 의해 손실되는 경향을 보인다. 하지만 HTST 살균법의 경우, UHT에 비해 낮은 온도에서 비교적 짧은 시간 동안 열처리되므로 그 손실이 미미했던 것으로 사료된다. 제품에 원유가 함유될 경우, 관능적 품질 저하 현상으로 인해 비열처리 살균법이 적용되기 어렵다. 하지만 HTST 살균에 의해 비타민 손실이 거의 나타나지 않았다는 점을 고려할 때, HTST와 PEF의 병합 살균은 비타민 손실에 영향을 미치지 않으면서도 관능적 품질 저하를 개선할 수 있는 좋은 방법임을 시사한다. 또한 제품의 미생물 생육 억제 측면에서도 HTST 단독 살균보다는 PEF 살균법과의 병행이 바람직할 것이다. 강력한 가열공정이라도 원유에서 유래하는 포자와 세균을 완전히 제거하기는 어렵기 때문에 HTST와 PEF 살균공정을 병합하여 적용한다면, 제품의 미생물적인 안전성을 더욱 확보할 수 있을 것이다.

Table 4-14. 살균처리에 따른 비타민 강화우유의 vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 및 B<sub>6</sub> 함량 변화

	HTST 살균처리	PEF 처리	HTST 및 PEF 병합살균처리
Vitamin B <sub>1</sub> (mg/100g)	0.07	0.07	0.06
Vitamin B <sub>2</sub> (mg/100g)	0.21	0.19	0.21
Vitamin B <sub>6</sub> (mg/100g)	0.14	0.13	0.13

(3) 살균처리에 따른 비타민 강화우유의 관능검사 결과

비타민 강화우유의 관능검사는 총 4가지 항목에 대해 실시되었으며, 각 항목은 7점 척도법을 통해 평가되었다. 관능검사 결과의 통계처리는 SPSS version 18.0 package program를 통해 시행하였으며, 군간 관능적 특성의 차이를 파악하기 위해 one way ANOVA를 이용하여 분석하였다. Table 4-15에 제시된 관능검사 결과를 통해 알 수 있듯이, 전반적으로 바람직하지 않은 향미와 조직감 및 강한 이미로 인해 제품에 대한 기호도가 매우 떨어졌다. 이러한 현상은 열처리를 공정이 배제된 PEF 단독 처리 제품에서 두드러지게 나타났다.

Table 4-15. 살균처리에 따른 비타민 강화우유의 관능적 특성

	HTST 살균처리	PEF 처리	HTST 및 PEF 병합살균처리
향미의 정도	2.31	1.85	3.23
조직감의 정도	3.38	3.23	3.62
이미의 정도	5.69	6.69	5.00
전반적인 맛에 대한 기호도	2.62	1.46	3.00

다. 가공우유\_초코우유

PEF 단독처리 시 원유 특유의 비릿한 향과 맛이 강해 PEF 처리 우유제품에 대한 기호도가 매우 낮은 것으로 드러났다. 이로 인해 우유제품의 경우, 열처리가 불가피 한 것으로 보인다. 하지만 초코우유의 경우, 초콜릿 향과 맛이 강해 우유의 맛이 잘 느껴지지 않는 특성을 가지고 있다. 이러한 특성을 고려하여 PEF처리에 적합한 가공우유로 초코우유를 선정하였다. 또한 초코우유의 경우, 약 1% 가량의 코코아 파우더가 투입된다. 코코아파우더는 포자생성 *Bacillus* 속에 의한 오염 가능성을 높이는 요소 중 하나이다. 따라서 PEF 처리에 의한 관능적 품질 개선 측면과 미생물학적 사멸효과를 동시에 살펴보기 위해 초코 우유를 PEF 적용 제품으로 선택하였다.

(1) 초코우유의 배합비 및 살균 조건

초코우유는 아래 Table 4-16에서 제시된 배합비율에 따라 조제되었다. 조제된 샘플은 36-38℃로 가온한 후 150 bar의 압력으로 균질하였으며, PEF 처리조건은 Table 4-17에 제시된 바와 같다. HTST 처리 샘플 및 HTST 및 PEF 병합 살균 샘플은 72℃의 온도에서 15초간 열처리함으로써 HTST 살균 과정을 거쳤다.

Table 4-16. 초코우유 배합비

초코우유	
원유(%)	35.64
탈지분유(%)	3.69
고과당(%)	8.80
코코아파우더(%)	1.10
초코안정제 카라기난(%)	0.03
초코향료(%)	0.006
바닐라향료(%)	0.01
정제수(%)	50.73
소계(%)	100.0

Table 4-17. 초코우유의 PEF 처리조건

PEF 단독 처리 초코우유의 PEF 처리 조건								
Conductivity (S/m)	Flow rate (L/h)	Out voltage (%)	Pulse width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet temperature ( $^{\circ}$ C)	Outlet temperature ( $^{\circ}$ C)
0.4	30.0	50.0	20.0	140.0	10.8	133.8	25.0	47.4

PEF 및 HTST(72 $^{\circ}$ C, 15sec) 초코우유의 PEF 처리 조건								
Conductivity (S/m)	Flow rate (L/h)	Out voltage (%)	Pulse width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field strength (kV/cm)	Energy (kJ/L)	Inlet temperature ( $^{\circ}$ C)	Outlet temperature ( $^{\circ}$ C)
0.4	30.0	50.0	20.0	140.0	10.8	133.8	25.0	46.9

## (2) 살균 처리에 따른 초코우유의 관능검사 결과

초코우유의 관능검사는 총 4가지 항목에 대해 실시되었으며, 각 항목은 7점 척도법을 통해 평가되었다. 관능검사 결과의 통계처리는 SPSS version 18.0 package program를 통해 시행하였으며, 군간 관능적 특성의 차이를 파악하기 위해 one way ANOVA를 이용하여 분석하였다. 아래 Table 4-18에 제시된 관능검사 결과를 통해 알 수 있듯이, 앞서 살펴본 비타민 강화우유에 비해 향미의 정도, 조직감의 정도, 이미의 정도 및 전반적인 맛에 대한 기호도가 전반적으로 개선되었다. 이는 강한 초콜릿 향과 맛이 원유의 비릿한 맛을 masking하여 나타난 결과로 사료된다. 하지만 여전히 비열처리 살균방식인 PEF 처리만 단독으로 실시한 경우, 초코우유의 관능적 품질이 매우 떨어짐을 확인할 수 있었다. 그러므로 PEF 단독처리보다는 LTLT를 병합한 살균법을 제품에 적용하고, 코코아파우

더, 초코 및 바닐라 향료의 배합비를 늘려 원유의 비릿한 맛을 효과적으로 masking하여 제품의 관능적 특성을 개선시켜야 할 것이다.

Table 4-18. 살균처리에 따른 초코우유의 관능적 특성

	HTST 살균처리	PEF 처리	HTST 및 PEF 병합살균처리
향미의 정도	3.19	3.08	3.85
조직감의 정도	3.54	3.58	3.92
이미의 정도	4.46	6.00	4.46
전반적인 맛에 대한 기호도	3.38	2.00	3.92

#### 라. 향후 진행방향

본 연구를 통해 PEF 살균처리에 적합한 커피제품과 우유제품을 탐색하였다. 제품에 원유가 함유될 경우, PEF 처리 시 원유의 비릿한 맛이 그대로 남아있어 관능적 품질 저하를 유발하였다. 그러므로 원유가 함유되지 않는 아메리카노와 초콜릿향이 강한 초코우유에 PEF를 적용할 수 있을 것이다. 또한 PEF의 단독처리보다는 영양소 파괴를 최소화 할 수 있는 열처리 방법인 HTST 살균법과 병행하는 것이 바람직할 것이다. 3차년도 연구에서는 아메리카노와 초코우유를 대상으로 대량실험을 하고, HTST와 PEF 살균법을 병행하여 제품의 관능적 품질을 개선할 계획이다. 또한 개발한 제품의 산도, pH, 비중 및 침전여부 등의 이화학적 특성을 파악하고, 제품의 미생물학적 안전성과 유통기한 설정 실험을 시행할 계획이다.

### 3. PEF법 적용 제품 개발 완료

#### 가. 신 살균법 적용으로 친환경적 에너지 절감방안모색 및 경제성 검토

문헌 조사를 통하여 식품에 PEF처리의 경제적인 측면에 대해 고찰하였다. 새로운 기술이 공장에 새로 도입되면 많은 불확실성에 직면하게 되는데, 예를 들면 품질의 적합성, 신 기술에 대한 소비자의 수용정도, 기술의 신뢰성, 그리고 투자비용과 운용비 등이 그것이다. PEF는 생물학적 세포의 투과성을 이용한 식품산업에 사용된다. 세포 투과를 위한 전압 또는 전기장의 필요량은 세포의 종류와 투과도의 정도에 달려있다. 미생물의 세포는 불활성화되기 위해서는 2.5-3.5 kV/mm 가 필요하다. 세포가 식물이나 동물세포일 경우 자기장은 10배정도 약해질 수 있다. 투과성과 미생물의 불활성화가 저장목적으로 사용되며, 다른 종류의 세포의 투과성은 대개 추출과 같은 공정에 의해 조정되어진다. PEF의 적용은 전력사용에 따른 에너지 비용을 절감할 수 있으며 기존의 In-line 열처리와 비교하면 다음과 같다.

## (1) 살균으로서의 PEF

### (가) PEF 공정 디자인 : 기본

PEF 살균을 위한 공정의 라인은 기존 열처리 공정과 같아야 하며, 다음 인자들에 근거해야 한다.

- 공정변수
- 제품변수
- 관련 미생물

열처리 공정에서 이들 변수들은 모두 상호 연결되어 있다. PEF의 경우는 관련미생물의 제어에 있어 단위 부피당 펄스의 횟수, 적절한 온도에서 자기장의 강도 등이 그것이다. 자기장 강도와 관의 직경이 전압을 결정한다. 제품의 열전도율(conductivity)이 원하는 전압에서 전력을 얻을 수 있는 전류를 결정한다.

PEF에 의한 살균공정이 연속적 공정일 경우 전형적인 공정흐름도(Fig. 4-3), 예열처리 공정이 필요하다. PEF 처리에 의해 효과적 미생물 사멸이 이루어지기 위해서는 PEF를 적용하려는 제품의 온도가 중요하기 때문이다. 처리하려는 제품의 온도가 높을수록 PEF 처리가 효과적으로 이루어진다. 하지만 PEF 처리 또한 온도를 상승시키는 요인이므로 예열 처리 시 지나치게 온도를 높일 경우, PEF처리보다는 열처리에 의한 미생물의 사멸효과가 더 크게 작용할 수 있으므로 주의가 필요하다.

PEF처리는 제품의 온도를 약 5-15℃ 정도 상승시키며, PEF 처리에 의한 온도 상승 정도는 제품의 전기전도율, 전원공급장치의 진동을 줄 수 있는 능력, 전기장의 균질성 및 타겟으로 하는 미생물의 종류에 따라 달라질 수 있다.

제품의 품질 손실을 최소화하기 위해서는 제품을 PEF처리한 이후, 저장온도로 빠르게 냉각시켜 주는 과정이 필요하다. 열처리 살균에서는 heat recovery system (살균이 끝난 제품이 살균될 제품을 열처리 하는 시스템)이 활용된다. 이것이 경제적으로 이루어지기 위해서는 살균하기 전의 제품온도와 살균 이후의 제품 온도가 유의적으로 차이를 보여야 한다. 하지만 이러한 heat recovery system 이 PEF 설비에서도 적용 가능한지에 대해서는 불확실한 상태이다.

냉각과정 이후에는 무균상태의 buffer tank가 추가적으로 필요하다. 이러한 무균의 buffer tank는 충전 설비가 중단되었을 때를 대비하기 위함이다.

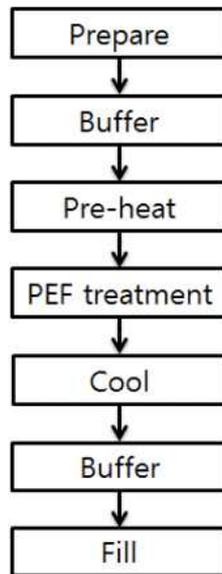


Fig. 4-3. Typical process-flow diagram for PEF pasteurization

(나) PEF 공정 디자인 : 예시

네덜란드의 경우 정부의 지원을 받아 진행된 6년간의 R&D 프로젝트에 의해 산업적 PEF 설비가 개발되었다. 이 프로젝트는 PEF에 의한 미생물 사멸 효과를 검증하는 것에서 시작해서 산업적 시험공장 (Pilot plant)을 설립하고, PEF의 신뢰도 문제를 해결하는 것을 목적으로 하였다. 이러한 목적에 도달하기 위한 첫 단계로 시간 당 400 L를 처리 할 수 있는 PEF 설비를 구축하였고, 이 후에는 시간 당 5,000 L를 취급할 수 있는 설비가 만들어졌다. 이 PEF 설비의 가동조건은 아래와 같다.

- Flow rate: 5,000 L/h
- Process conductivity: 0.2-0.7 S/m
- Field strength: 2.5-3.5 kV/mm
- Pulse duration: 2  $\mu$ s
- Number of pulses: 5
- Total power: 75 kW

이러한 PEF 처리 조건을 기준으로 PEF 설비와 열처리 살균 설비를 비교 분석하여 경제성 검토를 시행하였다.

열처리 공정에 대한 다양한 표준화된 기준이 존재한다. 대표적인 것이 ‘Grade A Pasteurized Milk Ordinance 또는 European hygienic Engineering and Design Group이다. 설비 가동 시, 아래와 같은 실질적인 필수 요건들이 수행되어야 한다.

- 자동적으로 정확하게 시작되어야 함
- 자동 제어 (공정에서 발생할 수 있는 편차를 다룰 수 있어야 함)
- 살균이 제대로 진행되고 있는지 또 정확한 방법으로 행해지는지 확인해야 함

- 처리 후 공정의 가동 중지
- 설비 세척

PEF 설비의 간략한 공정도는 아래의 Fig. 4-4와 같다. 설비 작동 시, 라인이 살균상태는 아니더라도 깨끗한 상태로 유지되어 있어야 한다. 이러한 프로세스는 탱크(T2)를 통해 물이 순환되며 시작된다. 이 후, heater(H)와 2차 냉각기(C2)를 켜서 이 둘 사이의 라인이 살균되게 해야 한다. 라인이 살균되면, 염용액 첨가를 통해 물의 전기전도도를 PEF를 처리할 제품의 전기전도도 수준으로 조정해 준다. 이러한 과정이 끝나면, PEF 설비를 가동시키고, heater의 가동은 중지시킨 다음 제품이 라인에 주입되면, 라인에 채워져 있던 물은 밀려나게 된다. 이 과정에서 일부 제품이 물과 섞이는데, 이는 즉시 배수시켜 라인에서 제거해야 한다. 물을 라인에서 완전히 제거하게 되면, 삼방밸브(Three-way valve)를 충전 설비 쪽으로 열어 생산을 시작하면 된다.

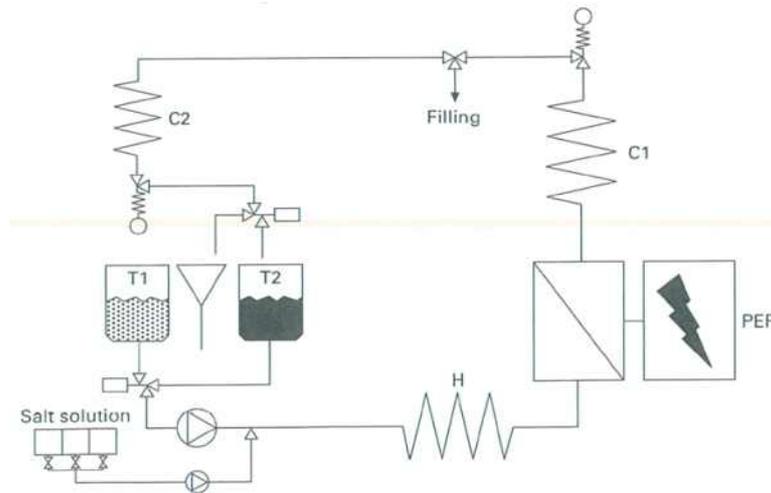


Fig. 4-4. Process design of PEF plant.

경제성 비교를 위해서는 아래의 요소들이 포함되어야 한다.

- 제품 탱크(Product tank)나 물탱크(water tank)와 같은 공급 장치
- 흐름 제어 장치(Flow control)를 포함한 Pump
- 생산과 예비 살균 온도를 조절하는 Heater
- 처리 챔버(Treatment chamber)
- 충전 또는 저장 온도를 통제하는 1차 냉각기
- 생산 및 라인 살균에 이용되는 배압밸브(Back pressure valve)
- 제품이 충전밸브(filler valve)나 준비밸브(Preparation valve)쪽으로 조절하는 밸브군(Valve group)
- 투여 펌프(Dosing pump) (시작 단계에서 세척과 전도율 조절 용도로 쓰임)
- 전기 펄스 장치
- 프로세스 제어(process control)

(다) 투자비용 비교

앞서 언급한 PEF 공정은 일반적인 열처리 공정에 비해 백만 유로(약 13억)가량의 비용이 더 소모된다. 시간 당 5,000 L를 생산하는 PEF 설비가 5년의 감가상각기간을 가지고, 3교대로 연간 5,000 시간 가동된다고 가정할 때, 추가적인 투자비용은 리터당 0.008 유로 (약 10.4원)의 가공비 상승이 유발된다.

(라) 에너지 비용 비교

앞서 언급했듯이, PEF는 일반적인 열처리 살균 공정과 달리 heat recovery system의 적용이 어렵다. Fig. 4-5은 열처리 살균 설비와 PEF 설비의 구간별 온도변화를 간략하게 비교하여 정리한 것이다. 열처리 살균의 온도변화 사이클은 5-65-75-15-5°C로 요약할 수 있다. 5°C에서 65°C로 예비 가열되는 공정은 75°C로 살균된 제품의 열을 빼앗아 가열 되므로 (heat recovery system의 적용) 별도의 에너지가 필요 없다. 즉, 65°C에서 75°C로 제품의 온도를 10°C 상승시키는 데에만 에너지가 소요되게 된다. 또한 살균된 75°C의 제품은 예비 가열되기 위해 새롭게 주입되는 5°C 제품에 열을 전달하여 15°C가 되므로 5°C로 냉각되는데 10°C의 추가적 온도 저하만 이루어지면 된다. PEF 시스템의 온도변화 사이클은 5-35-50-5°C로 요약할 수 있다. PEF 시스템은 heat recovery system을 적용하지 못하기 때문에 5°C의 제품을 35°C로 만드는데 에너지가 소모되며, PEF 처리에 의해 15°C의 추가적 온도상승이 이루어진다. 또한 PEF처리 후 50°C로 가열된 제품을 5°C로 냉각시키는데 45°C 정도의 온도 저하가 필요하게 된다. 에너지 비용적 측면에 따르면, 추가적인 가열 및 냉각 비용은 기존 열처리 살균 방식에 비해 리터 당 0.002 유로 (약 3원) 정도의 비용이 더 소모된다.

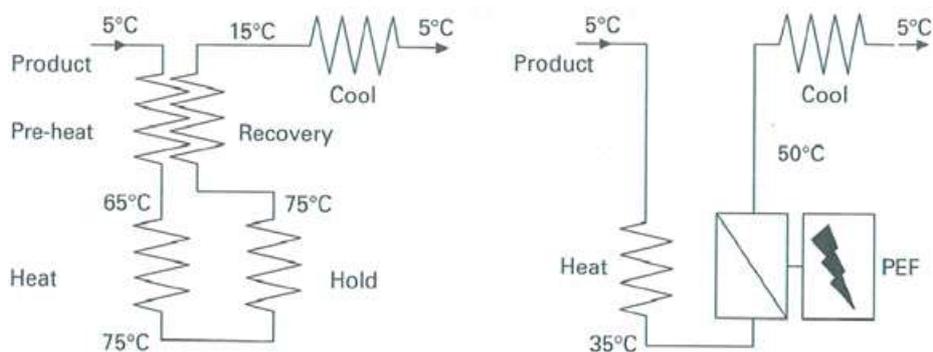


Fig. 4-5. Temperatures in thermal and PEF processing unit

(마) 세척 및 유지 비용

PEF는 비열처리 방식이기 때문에 열처리 살균 방법에 비해 세척비용이 낮고, 기계가 작동하지 않는 시간(down-time)이 짧다.

열처리 살균 방식에서의 세척은 여러 단계로 구성된다. (세척과정: 예비세척→알칼리세척→물세척→산세척→물세척) PEF 살균의 경우, 알칼리 세척이 최소화되며, 산세척은 생략 가능하다. 세척 비용을 결정하는 그 밖의 중요한 요소는 세척 빈도, 수도세, 열처리, 화학물질 비용 및 폐수 처리 비용 등이 있다. 이러한 모든 비용들은 지역 실정에 따라 크게 영향을 받게 된다. 매일 세척을 하고, 한 번의 세척을 통해 50 유로(약 7만원)를 절감할 수 있다고 가정하면, 제품 1리터 당 0.0005유로(약 0.7원)를 절감할 수 있다.

PEF 기술은 발달 초기 단계에 있기 때문에 유지비용은 좀 더 높을 것으로 예상된다. 일반적인 PEF 설비의 경우, 복잡성이 떨어지고, 사용된 부품의 개수가 적어 기계가 작동하지 않는 시간(down-time)이 짧다. 만약, 공장이 풀가동 될 경우, down-time의 감소는 엄청난 돈으로 환산될 수 있다. 예를 들어, 라인을 가동하는데 소요되는 비용이 시간 당 5000 유로(약 670만원)라고 하면, 30분의 down-time 감소는 2500유로(약 335만원)의 비용 절감을 유발할 수 있다는 의미가 된다. [이는 리터 당 0.025유로 (약 34원)의 가공비를 절감할 수 있다는 의미임] 다시 한 번 강조하자면, 이러한 비용은 지역 사정에 크게 영향을 받는다. 전반적인 비용 변화는 아래 Table 4-17과 같다.

Table 4-17. Difference between cost of pasteurization by PEF and by heat.

	Cost difference(PEF-heat) (Eurocent/Litre)
Investment	+ 0.8
Energy	+ 0.2
Cleaning	- 0.05
Maintenance	- 0.05
Downtime	- 2.5
Total	- 1.5

(2) 품질

위에서는 열처리에 의한 살균방식의 대안인 PEF를 비용적 측면에서 논의하였다. PEF를 고려해야 하는 또 다른 이유는 제품의 품질을 개선한다는 것이고, 이것은 제품 가격을 상승 시킬 수 있다는 것을 의미한다. PEF처리는 포자를 제외한 미생물을 불활성화 시키고, 효소에 대해서는 제한적으로 영향을 미칠 수 있다. PEF 처리는 이러한 긍정적 기능을 하면서도 제품의 색, 풍미 및 영양성분 변화에는 영향을 미치지 않는다. 즉, 제품의 냉장 유통기한을 늘리면서도 열처리 살균에 의한 품질 변화를 최소화 할 수 있다는 특징을 가진다. PEF의 적용의 전제조건은 비용적 측면에서 감당할 수 있어야 한다는 것과 바람직하지 않은 부작용이 나타나지 않아야 한다는 것이다. 비용의 적합성은

추가적으로 유입되는 비용의 규모에 의해 결정될 수도 있지만, 또 다른 측면에서는 제품 품질 향상에 의해 정당화 될 수 있는 판매가격 상승과 그로 인한 매출 상승에 의해서도 결정 될 수 있다.

제품의 품질은 이러한 살균과정에 의해서만 결정되는 것은 아니다. 이것에 대한 설명은 Fig. 4-6에 도식화되어 있다. 식품 원자재는 수확 이후부터 품질이 저하되기 시작하여, 전처리 과정에서 그 저하가 가속화된다. 소비자 지각 품질(consumer-perceived quality)은 적절한 원료들은 갖추고, 적절한 공정을 적용함으로써 개선될 수 있다. 예를 들어, 야채의 품질은 약한 불로 블랜칭함으로써 개선될 수 있다. 또한 영양소의 생체이용률은 가공처리 과정에서 높아질 수 있다. 하지만 신선도는 어떠한 형태의 가공과정에 의해서도 저하될 수 밖에 없다. 식품의 유통기한 내의 미생물학적 변질을 막기 위해서는 보존 처리 공정이 추가적으로 필요하다.

수년간에 걸쳐 이러한 총 공정의 최적조건이 확립되어왔다. 소비자 지각 품질에 영향을 주지 않는 범위라면, 가능한 낮은 품질의 싼 원자재를 선택하는 것이 일반적이다. PEF 기술이 도입 될 때에는, 기존의 모든 결정 및 공정의 처리 방식 등에 대해 재고해 볼 필요가 있다. 비열처리 살균방식에 의한 효과를 극대화하기 위해서는 좀 더 나은 원자재(원유)를 선택하는 것이 바람직하다. 식품회사에서는 대개 1년 내내 수급 가능하면서도, 품질 변동이 적은 원자재 사용을 선호한다. 그 결과, 대부분의 원자재를 안정된 상태(예: 냉동상태, 블랜칭 된 상태, 농축된 상태, 살균된 상태, 건조된 상태)로 공급받는 경우가 많다. 원자재의 품질을 향상시킨다는 것은 생산자가 신선한 원자재를 가공하기 시작한다는 것을 의미한다. 또 다른 대안으로는 원자재 공급자가 자재에 비가열 살균공정을 적용하는 방법이 있다. 보통 이러한 방식의 변화가 PEF설비를 설치하는 것보다 사업에 있어 더 강력한 효과를 발휘한다. 소비자 조사자들은 소비자들이 제품의 품질향상에 따라 얼마만큼의 돈을 기꺼이 지불 할 수 있는지 파악할 필요가 있다.

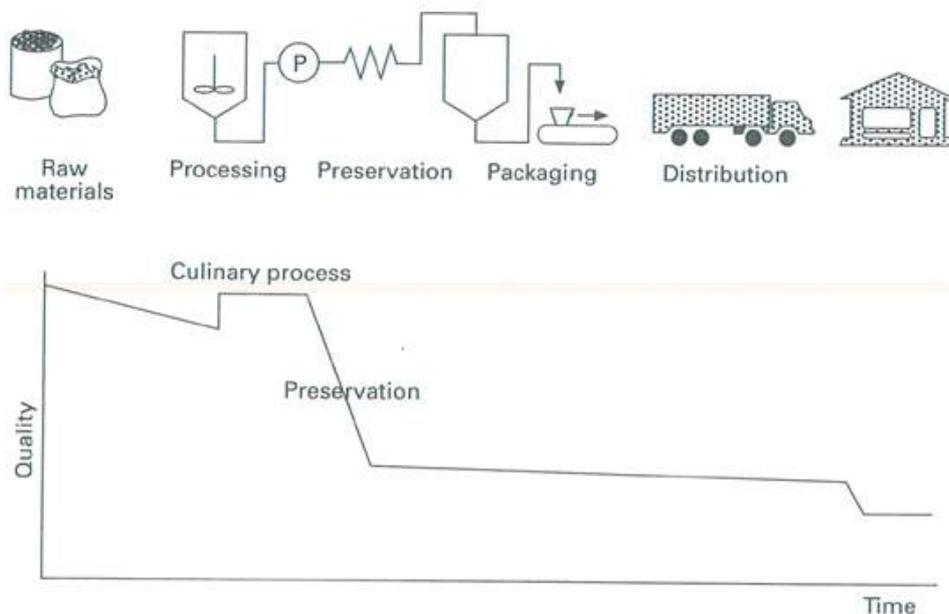


Fig. 4-6. Quality changes from 'Farm to Fork'.

### (3) 경제성 요약

PEF 살균설비에 대한 투자 비용은 크지만, 감가상각비에 비해 PEF 처리를 통해 얻을 수 있는 이익이 큼. 현재에는 투자비용이 비교적 크지만, 이 분야의 기술이 계속해서 발달해감에 따라 그 비용은 감소 할 것으로 예상된다.

살균 목적이 아닌 식품의 가공과정을 단축 또는 촉진시킬 목적으로 PEF가 적용될 때에는 낮은 전기장이 요구된다. 이 경우에는 제품 생산 총비용에 비해 PEF 처리에 소요되는 비용은 무시할 정도이다.

제품의 품질을 향상시키고자 한다면, 비가열 살균에 의한 효과를 극대화 하기 위해 전체적인 원자재 공급망이 재 디자인되어야 할 필요가 있다.

나. 2차년도에서 개발 완료된 제품을 대상으로 대량시험 수행

#### (1) PEF 활용 시작품 제작

##### (가) 사용 재료 및 방법

초코우유, 저지방우유, 아메리카노의 배합비율은 Table 4-18, 19, 20와 같으며 사용된 원료 중 탈지분유는 서울우유 탈지분유를 사용하였으며 코코아파우더는 지방 21%, pH 7, 200 mesh의 파우더, 초코안정제는 카라기난을 이용하였다. 향료는 초코우유에 초코향료와 바닐라향료만 사용하였으며 아메리카노에 사용되는 커피농축액은 콜롬비아 원두를 이용하여 추출 후 41 brix로 농축한 농축액을 이용하였다.

Table 4-18. 초코우유 배합비율

항목	비율(%)	함량(kg)	비고
탈지분유	7.156	17.89	원유 80%
설탕	3	7.5	
고과당	4.37	10.925	
코코아파우더	1.1	2.75	
초코안정제	0.026	0.065	
초코향료	0.005	0.0125	
바닐라향료	0.011	0.0275	
정제수	84.332	210.83	45℃
합계	100	250	

Table 4-19. 저지방우유 배합비율

항목	비율(%)	함량(kg)	비고
탈지분유	8.9446	22.3615	원유 100%
정제수	91.0554	227.6385	45℃
합계	100	250	

Table 4-20. 아메리카노 배합비율

항목	비율(%)	함량(kg)	비고
커피농축액	3.6585364	9.146341	콜롬비아 41 brix
설탕	4	10	
정제수	92.3414636	230.853659	
합계	100	250	

(나) 시험설계

1) 초코우유

가) Conductivity: 0.433 S/m

나) Flow rate: 100 L/h

Out Voltage (%)	Pulse Width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field Strength (kV/cm)	Energy (kJ/l)	Inlet Temperature (℃)	Out Temperature (℃)	비고
65	20	230	12.5	116	45.5	63	

2) 저지방우유

가) Conductivity: 0.427 S/m

나) Flow rate: 100 L/h

Out Voltage (%)	Pulse Width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field Strength (kV/cm)	Energy (kJ/l)	Inlet Temperature (℃)	Out Temperature (℃)	비고
65	20	280	12	140	48	68	

3) 아메리카노

가) Conductivity: 0.182 S/m

나) Flow rate: 100 L/h

Out Voltage (%)	Pulse Width ( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	Field Strength (kV/cm)	Energy (kJ/l)	Inlet Temperature ( $^{\circ}$ C)	Out Temperature ( $^{\circ}$ C)	비고
65	20	300	16	100	48	62	

(다) 제품별 생산 공정

생산공정은 Fig. 4-7, 8, 9과 같이 전일 생산 이후 CIP를 거친 라인을 다시 생산 직전 스팀을 이용하여 라인을 한번 더 살균을 시켜 생산라인으로 인한 2차 오염의 위험을 차단 후 실시하였다.

정확한 계량을 위해 정제수를 포함한 모든 원료를 직접 전자저울에 계량 후 교반기에 투입하여 계량 후 이송과정에서 발생할 수 있는 손실을 최소화 하였으며 특히 초코우유의 경우 안정제로 사용되는 카라기난은 용해를 위하여 70 $^{\circ}$ C의 정제수에서 약 20 min 동안 교반하여 충분히 수화 시킨 용액 코코아 파우더를 추가하여 완전히 분산시킨 후 45 $^{\circ}$ C미만으로 온도를 낮춘 후 사용하였다.



<라인 스팀 살균>



<45℃ 정제수 계량>



<안정제 및 코코아 용해>



<교반>



<PEF살균처리>



<공병투입>



<충전>



<캡핑>



<이송>

Fig. 4-7. 초코우유 생산 공정

또한 저지방 우유와 아메리카노의 경우 초코우유와 같이 스팀을 이용한 라인 살균 후 교반 탱크에 정제수를 투입후 각각 탈지분유와 커피농축액을 Table 4-19, 20과 같은 량을 투입 후 최소 20 min 간 교반 후 PEF 처리를 하였다.



<라인 스팀 살균>



<45°C 정제수 계량>



<계량된 원료 투입>



<교반>



<PEF살균처리>



<공병투입>



<충진>



<이송>



<포장>

Fig. 4-8. 저지방우유 생산 공정



<라인 스팀 살균>



<45°C 정제수 계량>



<원료 계량>



<원료 투입 및 교반>



<PEF살균처리>



<공병투입>



<충진>



<캡핑>



<이송>

Fig. 4-9. 아메리카노 생산 공정

각 시작품은 아래의 디자인을 사용하여 별도 제작된 210 mL PE 병에 개별 포장 되어 개별 용기에 포장하였으며 PE병은 공병 유래의 미생물 적 오염을 방지하고자 0.1 % 농도의 초산에 세척 후 사용하였으며 아래와 같이 디자인된 스티커를 부착하여 생산하였다.



<초코우유 디자인>

<저지방우유 디자인>

<아메리카노 디자인>

Fig. 4-10. 시작품 3종의 제품 디자인

## 다. 제품검사

### (1) 분석법

#### (가) 일반성분 분석

Near-Infrared (NIR) analyzer (Foss MilkoScan TM FT 6000, Denmark)을 이용하여 총 지방 및 단백질, Lactose, 총고형분 측정하였다.

#### (나) 일반세균수(Total aerobic bacteria) 측정

시험용액 1 mL와 각 단계 희석액 1 mL를 세균 수 건조필름배지(3M Microbiology, St. Paul, MN, USA)에 접종 한 후 잘 흡수시키고 35±1°C에서 24-48시간 배양한 후 생성된 붉은 집락수를 계산하고 그 평균 집락수에 희석배수를 곱하여 일반 세균수로 측정하였다.

#### (다) 보존기간 중 변화 분석

10±1°C 냉장보관 중에 pH, 산도 및 일반세균 수 변화를 측정하였다.

### 1) pH측정

상온에서 pH meter(Orion Star A 221 Conductivity Meter, Thermo Scientific)를 이용하여 측정하였다.

### 2) 당도측정

ATAGO社 RX-5000a모형을 이용하여 자동 온도보정 후 당도를 측정하였다.

### 3) 적정 산도 측정

검사시료 10 mL에 탄산가스를 함유하지 않은 물 10mℓ를 가하고 페놀프탈레인시액 0.5 mL를 가하여 0.1 N 수산화나트륨액으로 30초간 홍색이 지속할 때까지 적정하였다.

0.1N 수산화나트륨액 1mℓ = 0.009g 젓산

$$\text{산도(젓산\%)} = \frac{a \times f \times 0.009}{10 \times \text{검사시료의 비중}} \times 100$$

a : 0.1N 수산화나트륨액의 소비량(mℓ)

f : 0.1N 수산화나트륨액의 역가

### 4) 일반세균 수(Total aerobic bacteria) 측정

시험용액 1 mL와 각 단계 희석액 1 mL를 세균 수 건조필름배지(3M Microbiology, St. Paul, MN, USA)에 접종 한 후 잘 흡수시키고 35±1℃에서 24-48시간 배양한 후 생성된 붉은 집락수를 계산하고 그 평균 집락 수에 희석배수를 곱하여 일반 세균수로 하였다.

### 5) 대장균 및 대장균군

Desoxycholate Lactose agar를 이용하여 시험용액 1 mL와 10배 단계 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시에 무균적으로 취하고 약 43-45℃로 유지한 테스옥시콜레이트 유당한천배지 약 15-20 mL를 무균적으로 분주하고 페트리접시 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하면서 회전하여 검체와 배지를 잘 혼합한 후 응고 시킨다. 그리고 그 표면에 동일한 배지 또는 보통한천배지를 3-5 mL를 가하여 중첩시킨다. 이것을 35-37℃에서 24±2 시간 배양 한 후 전형적인 암적색의 집락수를 계산하고 희석배수를 곱하여 대장균수로 하였다.

### 6) 효모 곰팡이

방법은 위의 5)의 방법과 동일하며 다만, 배지는 Potato Dextrose Agar를 사용하여 25℃에서 5-7일 간 배양한 후 발생한 집락수를 계산하고 그 평균 집락수에 희석배수를 곱하여 진균수로 하였다.

(라) 시작품 생산 후 품질

일반성분분석에 따라 초코우유, 저지방우유, 아메리카노의 지표인 산도, 비중 pH, 당도를 측정 한 결과는 아래와 같다.

항목	초코우유	저지방우유	아메리카노
산도	0.082	0.0914	0.1068
비중	1.056	1.034	1.018
pH	6.88	6.87	4.61
당도	14.49	9.66	5.46

라. 내외부 폐널활용 모니터링 관능검사

관능검사는 관능검사 교육을 받은 서울우유 연구원 15명이 참가하여 아래의 검사 양식으로 평가를 실시하였다.

## 시작품의 기호도 및 선호도 검사

검사날짜:      월      일                      성 별 : 남, 여                      성 명:

☞ 왼쪽 검사물부터 드신 후, 해당하는 곳에 3종의 검사물의 (저지방, 초코, 아메리카노)의 명을 적어주십시오.

1. 검사물의 '향미'의 정도는?  
 매우 싫다             보통이다             매우 좋다
2. 검사물의 '조직감' 의 정도는?  
 매우 싫다             보통이다             매우 좋다
4. 검사물의 '이미(off-flavor)' 의 정도는?  
 거의 없다             보통이다             매우 강하다
5. 검사물의 '전반적인 맛'의 기호도는?  
 매우 맛없다             보통이다             매우 맛있다

6. 시작품의 전반적인 점수를 적어 주십시오.  
 (5점= 가장 맛있음, 4점, 3점, 2점, 1점, 0점 =맛없음)

샘플명	초코우유	저지방우유	아메리카노
점수			
'맛'에 대한 기타 의견 (자유롭게 개인적인 의견을 표현해주세요)			

대단히 감사합니다

Table 4-21. 시작품3종 관능검사 결과 평균값

구 분	초코우유	저지방 우유	아메리카노
향 미	5.13	4.27	4.07
조 직 감	4.13	4.13	4.87
이미정도	2.93	3	3.67
맛의 기호도	5.07	4.2	4.13
전반적인 평가	4.67	2.9	2.87

관능검사 결과 초코우유의 향미와 기호도가 일반적인 초코우유의 기준에 비해 높았으며 조직감 적당하고 이미가 적게 느껴지는 결과가 나와서 전반적으로 관능적인 평가에서 좋은 평가가 나왔다.

저지방 우유는 향미와 기호도, 조직감이 일반 시중에 유통되고 있는 우유와 비교했을 때 보통 또는 적당한 수준으로 이미가 덜 느껴지지만 지방을 줄인 저지방 우유의 특성상 전반적인 관능의 결과는 다소 낮은 값이 나왔다.

아메리카노의 경우 관능에서 차지하는 비율이 원두와 로스팅 정도 그리고 추출방법에 따른 향미성분에 따라 많이 부분이 좌우되어 일반적으로 많이 사용되는 콜롬비아산 원두를 이용하여 추출 후 농축한 농축물을 이용하여 향미와 기호도 조직감에서 무난한 점수를 받았으며 기호성이 높은 식품이고 PEF 처리 시 특성상 각종 풍미가 부드러워지는 성향으로 인하여 커피 특유의 쓴맛 등이 부드럽게 되어 개인별 성향에 따라 전반적인 관능 결과는 다소 낮게 나오게 되었다.

3종의 시작품의 관능검사에서 향미, 조직감, 이미정도, 맛의 기호도에서는 기존 유통되고 있는 제품과 비교했을 때 보통이상의 결과가 나왔지만 전반적인 평가에서 낮은 점수가 나온 것은 HTST, UHT 등 열처리 살균 방식에 의한 제품의 풍미 변화에 익숙하기 때문에 원료 그대로의 풍미에 다소 점수를 낮게 평가한 영향으로 분석된다.

#### 마. 유통기간 설정 실험

국내 우유류의 유통기한은 축산물가공처리법 규정에 의거한 국립수의과학검역원 고시에 따라 개정 고시 되어 유통기한이 업체 자율에 따라 설정이 되었으며 축산물의 가공기준 및 성분규격에 따른 “유통기한”은 소비자에게 판매 가능한 최대기간을 말하고 제품의 특성에 따라 설정된 유통기간 내에서 유통기한을 자율적으로 정할 수 있다.

유통기한이 자율화된 우유류의 유통기간은 업체에 따라 다양하게 적용되고 있으며 통상적으로 7-14일 전후로 유지관리 되고 있다.

유통기간을 설정하기 위한 가이드라인에 따르면 제품별 유통기한 설정을 위한 보존 결과에 의거 유통기한을 설정하도록 되어 있으며 생산된 동일날짜의 샘플을 연속 또는 같은 간격으로 무작위로 채취하여 바로 10±1℃에 보관 후 성분규격을 충족시키는 범위 내에서 각제품별 판정기준에 적합한 최종일 중 보존일수가 가장 짧은 일수에 70%를 곱한 일수의 범위에서 유통기간을 설정하고 있다.

#### (1) 초코우유

가공유류에 속하는 저지방가공유는 원유 또는 유가공품을 원료로 하여 이에 다른 식품 또는 식품첨가물 등을 가한 후 살균 또는 멸균 처리한 것이거나, 살균 또는 멸균처리 후 식품 또는 식품첨가물 등을 무균적으로 첨가한 것으로 조지방 0.6~2.6%의 것으로 성분규격은 아래의 Table 4-21와 같다.

Table 4-21. 저지방가공유(초코우유) 성분규격

구분	제품 규격
성상	고유의 색택과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없어야 한다.
무지유고형분(%)	5.5 이상
유지방(%)	저지방가공유 0.6-2.6
세균수 (cfu/mL)	20,000 이하
대장균군 (cfu/mL)	n=5, c=2, m=0, M=10

시작품인 초코우유의 경우 냉장유통 전용 제품으로 생산직후 바로 10±1℃에서 보관 후 약 한달동안 저장 기간별 산도, 비중, pH, 당도 등의 이화학적 변화와 침전발생여부를 확인하였으며 결과는 아래의 Table 4-23.과 같다.

Table 4-23. 저장기간별 PEF처리 초코우유의 이화학적 변화

항목	0일	5일	9일	14일	18일	22일	25일	29일
산도(% l.a.)	0.082	0.082	0.083	0.089	0.091	0.0925	0.093	0.0948
비중(kg/m <sup>3</sup> )	1.056	1.058	1.058	1.058	1.058	1.058	1.058	1.058
pH	6.88	6.94	6.93	6.95	6.95	6.98	7.01	7.01
당도(Brix)	14.49	14.58	14.51	14.5	14.46	14.48	14.46	14.46
침전여부	부	여	여	여	여	여	여	여

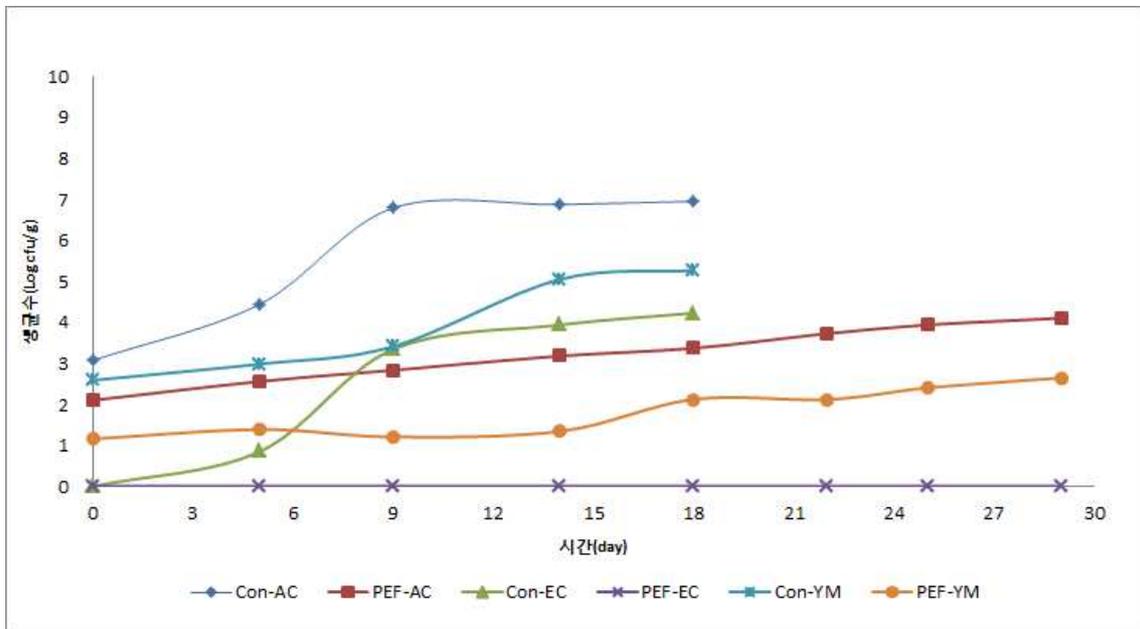


Fig. 4-11. 초코우유의 처리조건 및 저장기간에 따른 미생물의 변화

(Con: PEF 미처리, PEF: PEF 살균처리, AC:일반세균, EC:대장균, YM:효모·곰팡이)

그리고 유통기간 설정에서 가장 중요한 미생물 규격인 일반세균, 대장균과 부수적으로 효모·곰팡이의 저장기간 동안의 변화는 그림9와 같이 대조군(Con, PEF 미처리)의 경우 실험 직후부터 일반세균의 경우 log 3.07로 시작하여 5일차에서 규격이상의 일반세균이 검출되었으며, 대장균은 생산직후 바로 검출이 되는 것을 확인 할 수 있었다.

PEF 처리한 초코우유를 냉장보관하였을 경우 약 한달간 대장균은 음성으로 검출되지 않았으며 일반세균의 경우 Log 2에서 시작하여 29일차까지 log 4.1로 기준규격 이내로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 제품규격과 유통기간설정 방법에 따라 29일에 통상계수인 0.7을 곱하여 유통기간을 설정하게 된다는 최대 20일까지 설정이 가능하지만 제품은 안정성과 유통현장의 조건들을 고려

하였을 경우 14일정도가 무난할 것으로 판단된다.

(2) 저지방우유

우유류 중 저지방우유류는 원유의 유지방분을 부분 제거한 것, 이에 비타민이나 무기질을 강화한 것을 살균 또는 멸균처리한 것, 살균 또는 멸균 후 유산균, 비타민, 무기질을 무균적으로 첨가한 것, 또는 유가공품을 저지방상태로 환원하여 각각 살균 또는 멸균 처리한 것을 말하며 그중 환원저지방 우유는 유가공품으로 저지방우유와 유사하게 환원한 것으로 무지유고형분(탈지분유와 성분 규격이 같은 것) 8%이상인 것으로 성분규격은 아래의 Table 4-24와 같다.

Table 4-24. 저지방우유 성분규격

구분	제품 규격
성상	유백색-황색의 액체로서 이미·이취가 없어야 한다.
비중(15℃)	1.030-1.045
산도(%)	0.18 이하(젖산으로서)
유지방(%)	0.6-2.6

시작품인 저지방우유 또한 냉장유통 전용 제품으로 생산 직후 바로 10±1℃에서 보관 후 약 한달 동안 저장 기간별 산도, 비중, pH, 당도 등의 이화학적 변화와 침전발생여부를 확인하였으며 결과는 아래의 Table 4-25와 같으며 약 한달간 비중은 1.034 kg/m<sup>3</sup>으로 변화가 없었으며 산도는 0.0914에서 0.125% l.a.으로 증가 하였으나 기준규격인 0.18% l.a.이하를 유지함을 볼 수 있었다.

Table 4-25. 저장기간별 PEF처리 저지방우유의 이화학적 변화

항목	0일	5일	9일	14일	18일	22일	25일	29일
산도(% l.a.)	0.0914	0.0916	0.0932	0.0992	0.105	0.112	0.113	0.125
비중(kg/m <sup>3</sup> )	1.034	1.033	1.034	1.034	1.034	1.034	1.034	1.034
pH	6.87	6.85	6.86	6.87	6.91	6.92	6.96	7.07
당도(Brix)	9.66	9.65	9.66	9.67	9.67	9.68	9.68	9.71
침전여부	부	부	부	부	부	부	부	부

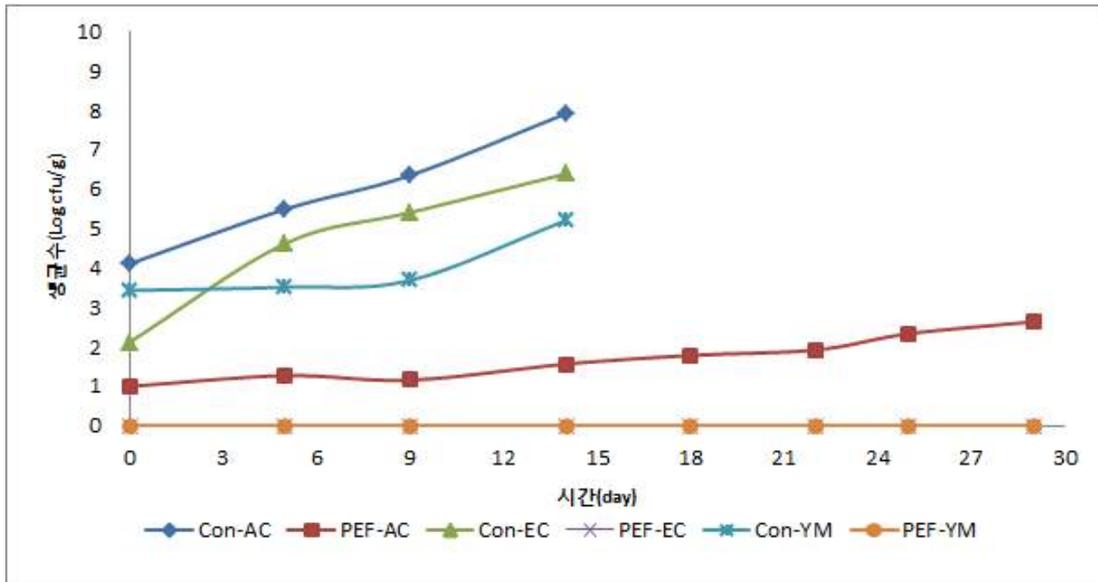


Fig. 4-12. 저지방우유의 처리조건 및 저장기간에 따른 미생물의 변화.  
(Con: PEF 미처리, PEF: PEF 살균처리, AC:일반세균, EC:대장균, YM:효모·곰팡이)

유통기간 설정에서 가장 중요한 미생물 규격인 일반세균, 대장균군과 부수적으로 효모·곰팡이의 저장기간 동안의 변화는 그림과 같이 대조군(Con, PEF 미처리)의 경우 실험 직후부터 일반세균의 경우 log 4.1로 시작하여 5일차에서 log 5.49, 9일차 log 6.34, 2주후인 14일차에서 log 7.92 증가하였으며 PEF 미처리한 대조군의 대장균군의 경우 log 2.11로 생산 직후 바로 검출이 되는 것을 확인 할 수 있었다. 효모·곰팡이의 경우도 log 3.43에서 시작하여 어느정도 비슷한 수준에서 유지되다가 2주 후 log 5.21로 증식된 것을 확인할 수 있었다.

PEF 처리한 저지방우유를 냉장 보관하였을 경우 약 한달 간 대장균군과 효모·곰팡이는 음성으로 검출되지 않았으며 일반세균의 경우 Log 1에서 시작하여 29일차까지 log 2.64로 완만히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 저지방우유 또한 제품규격과 유통기간설정 방법에 따라 29일에 통상계수인 0.7을 곱하여 유통기간을 설정하게 된다는 최대 20일까지 설정이 가능하지만 제품은 안정성과 유통현장의 조건들을 고려하였을 경우 14일정도가 무난할 것으로 판단된다.

### (3) 아메리카노

커피는 커피원두를 가공한 것이거나 또는 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로서 볶은 커피(커피원두를 볶은 것 또는 이를 분쇄한 것), 인스턴트커피(볶은 커피의 가용성추출액을 건조한 것), 조제커피, 액상커피를 말하며 성분규격은 아래의 Table 4-25와 같다.

Table 4-25. 커피 성분규격

구분	제품 규격
납(mg/kg)	2.0 이하
주석(mg/kg)	150 이하
타르색소	불검출
세균수(cfu/mL)	1 mL 당 100 이하 (액상제품에 한한다)
대장균군(cfu/mL)	음성이어야 한다.(액상제품에 한한다.)

시작품인 아메리카노 또한 냉장유통 전용 제품으로 생산 직후 바로 10±1℃에서 보관 후 약 한달 동안 저장 기간별 산도, 비중, pH, 당도 등의 이화학적 변화와 침전발생여부를 확인하였으며 결과는 아래의 Table 4-26과 같으며 약 한달 간 비중은 1.018 kg/m<sup>3</sup>으로 변화가 없었으며 산도는 0.1068에서 0.1121% l.a.으로 증가 하여 관능적인 측면에서 큰 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 또한 비중, pH, 당도 또한 유의적 차이가 없는 정도에서 변화였다.

Table 4-26. 저장기간별 PEF처리 아메리카노의 이화학적 변화

항목	0일	5일	9일	14일	18일	22일	25일	29일
산도(% l.a.)	0.1068	0.1068	0.1072	0.0109	0.1085	0.1123	0.1154	0.1121
비중(kg/m <sup>3</sup> )	1.018	1.018	1.018	1.018	1.018	1.018	1.018	1.019
pH	4.61	4.61	4.62	4.62	6.63	4.65	4.68	4.7
당도(Brix)	5.46	5.46	5.46	5.47	5.46	5.47	5.47	5.49
침전여부	부	부	부	부	부	부	부	부

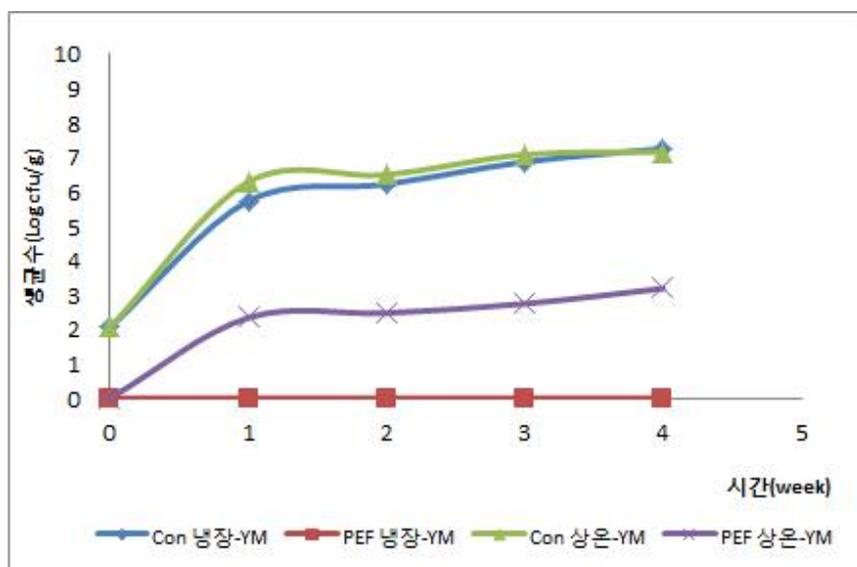


Fig. 4-13. 아메리카노의 처리조건 및 저장기간에 따른 미생물의 변화.

(Con: PEF 미처리, PEF: PEF 살균처리, YM:효모·곰팡이)

Fig. 4-13과 같이 PEF처리 및 미처리 샘플에서 일반세균, 대장균군 모두 음성으로 나왔으며 효모·곰팡이만 그림과 같이 양상을 나타내었다. 2 log 정도의 효모 곰팡이 균이 PEF 처리 시 음성으로 되었으며 이를 냉장 보관한 샘플의 경우 4주간 음성을 유지하였으며 상온 보관 샘플은 1주차 log 2, 4주차에 log 3로 증가됨을 확인 할 수 있었다. 대조군으로 PEF 미처리 샘플의 경우 냉장 및 상온 보관 모두 log 2 정도의 효모 곰팡이균 모두 1주차 이후에 log 7-8로 급증하는 것을 관찰 할 수 있었다.

아메리카노의 경우 저장기간에 따른 이화학적 변화가 거의 없이 일정하게 유지되고 있으며 일반세균과 대장균군의 경우 음성을 유지하고 효모·곰팡이 또한 그림 11.과 같이 미미한 수준을 보았을 때 냉장 유통제품의 경우 장기간 보관이 열처리한 일반적인 아메리카노와 같이 장기 보관이 가능할 것으로 생각이 되나 통상적으로 냉장 아메리카노 제품의 경우 미생물적, 이화학적인 변화 보다는 커피 특유의 향과 풍미의 변화로 인하여 통상적인 냉장제품의 유통기간이 한달이며, 제품은 안정성과 유통현장의 조건들을 고려하였을 경우 유통기간을 30일정도 설정하는 것이 무난할 것으로 판단된다.

#### 바. 결론

PEF 살균을 위한 공정의 라인은 기존 열처리 공정과 같아야 하며 살균공정이 연속적 공정일 경우 일반적인 열처리 공정에 비해 비용이 더 소모되어 가공비 상승이 유발되며, 예열처리 공정이 필요하고 제품의 품질 손실을 최소화하기 위해서는 제품을 PEF처리한 이후 저장온도로 빠르게 냉각시켜주는 과정이 필요하지만 heat recovery system의 적용이 어렵다. 따라서 에너지 비용적 측면에 따르면, 추가적인 가열 및 냉각 비용은 기존 열처리 살균 방식에 비해 비용이 더 소모된다. 하지만 PEF는 비열처리 방식이기 때문에 열처리 살균 방법에 비해 세척비용이 낮고, 기계가 작동하지 않는 시간(down-time)이 짧아서 이부분에서 원가를 절감 할 수 있는 장점을 가지고 있다.

PEF를 고려해야 하는 또 다른 이유는 제품의 품질을 개선한다는 것이고 이는 포자를 제외한 미생물을 불활성화 시키고, 효소에 대해서는 제한적으로 영향을 미칠 수 있다. 또한 제품의 색, 풍미 및 영양성분 변화에는 영향을 미치지 않는다. 즉, 제품의 냉장 유통기한을 늘리면서도 열처리 살균에 의한 품질 변화를 최소화 할 수 있다는 특징을 가진다.

이는 초코우유, 저지방우유, 아메리카노를 PEF처리하여 제작한 3종의 시작품에서도 알수 있듯이 냉장 저장기간동안 이화학적 미생물학적 변화는 기존 열처리 방식의 살균처리방법과 비교하여도 손색이 없이 우수하며 열을 가하지 않았기 때문에 오는 제품 고유의 맛을 그대로 살리는 효과도 볼 수 있었다.

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011 - 2012)	해외 사례와 기술을 분석하여 국내 적용을 위한 공정 가이드 제시 제품 표준화 및 규격 설정위한 표준 마련	국내의 관련 기술 및 시장 조사와 개발 상황, 산업화 사례, 법령검토, CODEX 및 IDF의 규정 검토	100	논문 및 자료 조사를 통해 우유 살균의 산업화 가능성을 확인. 우유의 PEF 살균의 국내외 현황 을 검토하여 기존 사례분석 및 유사 사례를 확인.
		기기 도입 및 부대시설 설계와 공정 연 구	100	우유살균을 위한 최적의 조건을 설정하기위한 기기 및 공정 연 구를 수행
		목적 제품의 관리 규격 기준 및 규격 표준화	100	축산물위생관리기준 등을 활용한 성분규격 기준 마련 우유 가열에 의한 변성 및 변성 도에 대한 표준화
		주요 타깃 제어 미생물 및 기능성 단백 질의 선정 및 평가법과 기준 확립	100	선정된 일반세균수, 부패세균수 및 단백질 함량의 기준을 마련
	PEF 처리에 의한 미생물 살균 특성 컴파일링 Batch PEF chamber를 이용한 비병원성 부패 미생물의 inactivation kinetics 확립	논문조사를 통한 식품 유형별 미생물 살균 특성 조사 및 정리	100	검색 DB (Science Direct)를 이 용한 논문 검색 및 관련논문선정
		논문조사를 통한 식품유형에 따른 미생 물 PEF 살균 조건 DB화	100	식품 유형별, 미생물별, 공정변수 별 살균 특성 조사
		1 mL/4 mL 급 batch chamber 제작 및 PEF 공정변수 확립	100	400 $\mu$ L batch chamber를 이용한 공정변수 확립 및 1 mL chamber 제작
		Buffer 및 우유에 접종한 부패 미생물 의 inactivation kinetics 검증	100	<i>E.coli</i> , <i>Lactobacillus</i> 등 우유의 부패와 관련된 4종의 미생물 PEF 적용 및 효과 검증
		선정된 부패미생물의 PEF 살균을 위한 최소 공정조건 확립	100	실험에 적용된 미생물 중 PEF 저항성이 강한 <i>E.coli</i> 를 기준으로 최소공정조건 설정

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011 - 2012)	펄스 전기장 기술을 활용한 기능성 단백 질의 보존성 확보 기술 구축	살균 공정별 기능성 단백질의 열변성 특성 검토	100	원유, 탈지유, HTST 우유, LTLT 우유와 이들을 50℃ 또는 65℃에 서 PEF 처리한 후 PEF 처리에 의 한 우유 단백질의 열변성 여부를 DSC, HPLC, SDS-PAGE로 확인 함
		살균 공정별 효소활성 측정 및 원유의 안정성 측정	100	살균 공정별, PEF 처리 별 우유에 존재하는 alkaline phosphatase, protease, lactoperoxidase의 효소활 성을 측정하였으며, alcohol test, pH, 산도, turbidity test 등을 통하 여 우유의 안정성을 측정함
		PEF 단독 또는 가열살균 공정과의 병 용 처리에 의한 비타민 등 영양성분의 변화 측정	100	살균 공정별, PEF 처리 별 우유의 갈색화 반응, 색도 등을 측정함으 로써 우유의 영양성분 변화를 측정 함
	PEF법 적용 유제품의 관련 법규검토	국내 유제품 살균법 검토 - LTLT, HTST, UHT 및 비가열살균 유제품의 현황과 장단점 조사	100	○ LTLT, HTST, UHT 및 비가열 유제품 국내현황 조사 - 시유를 중심으로 조사 - 비가열 유제품은 국내에 없음 ○ 살균법의 장단점 조사
		고전압펄스 기술의 유제품 적용 사례 검토 - HPP, PEF, Gamma radiation 등 축 산물에 적용되는 신공법 등과 비교우 위 연구사례를 통한 최적의 살균조건 탐색	100	- 유제품 적용 사례 검토 - PEF, Irradiation, intense light pulses, HPP, OMF, Ultrasound의 비가열 살균법 조사
		법적 허용가능성, 표시사항 등 검토 - 국내 관련기관 질의 및 표시사항에 대한 연구 및 질의	100	○ Codex 규격 선행 조사
		PEF 활용 우유 살균 예비 테스트	100	○ 균질유 와 탈지유를 PEF 처리 - 16kV/cm로 100 kJ/l와 130 kJ/l로 각각 처리 - 미생물 및 일반성분 변화 측정

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012 - 2013)	살균 제어 및 영양 원 보존을 위한 최 적 공정 설계	공정 최적화 및 단계별 scale up	100	PEF와 LTLT 및 HTST를 병용 처리하는 공정의 최적화 가이드 제시 대량생산을 위한 공장설비 구축
		상품화 연구(위탁기관과 공동연구)	100	비타민강화 우유 및 가공음료 3 종의 PEF 살균 최적화 및 관능 검사용 샘플 생산. 품질 및 관능검사-위탁기관
	펄스 전기장 기술을 활용한 미생물학적 안전성 확보 기술 구축	Batch형 실험에서 확립된 처리조건을 pilot scale의 연속형 실험을 통해 확인	100	표준용액(Ringer solution)을 이용 한 펄스전기장 연속식 처리의 조 건 확립 및 공정 가이드 제시
		Inlet temperature 조절을 통한 저온-중 온-고온 영역에서 살균효과 증감 확인	100	저지방 우유에 4종의 부패 미생 물을 접종 후 초기온도(Inlet temperature) 30,40℃에서 펄스전 기장 연속식처리에 따른 살균 효 과 확인
		Pilot scale에서 살균 최적화 및 PEF 공정 가이드라인 제시	100	저지방 우유에 4종의 부패 미생 물 살균효과를 기준으로 펄스전 기장 연속식 처리 후 4℃에서 15 일간 저Shelf-test 실험 및 공정 가이드라인 제시

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012 - 2013)	펄스 전기장 기술을 활용한 기능성 단백 질의 보존성 확보 기술 구축	면역단백질 변성도 측정을 위한 immuno-assay법 확립	100	Sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)방법을 이용 하여 PEF 처리에 따른 우유 내 면 역단백질의 변성도를 확인함
		PEF 공정에 의한 우유의 IgG, $\beta$ - lactoglobulin, $\alpha$ -lactalbumin, lactoferrin, 및 TGF, IGF의 단백질 변 성도와 활성 측정	100	PEF 처리 별 우유에 존재하는 면 역 단백질(IgG, IgA, $\beta$ - lactoglobulin, $\alpha$ -lactalbumin, lactoferrin, TGF- $\beta$ 1)의 농도를 정 량적으로 확인하여 우유 내 단백질 변성도와 활성을 측정함
		살균 전처리 공정과 살균공정의 연계와 최적화 작업에 따른 공정 가이드라인 확립	100	LTLT 살균 공정과 연계하여 PEF 처리 별 우유의 면역 단백질 활성 의 변화를 측정하여 공정의 후처리 가 유의적인 관계가 있는지 확인하 여 최적화함
		최적 살균 공정에 따른 살균 우유의 기 능성 단백질 함량 측정 및 저장 중 기 능성 단백질의 변성과 유용성분 변화 연구	100	에너지 밀도 등 PEF의 처리 조건 과 LTLT 살균 공정에 따른 우유 의 기능성 단백질 함량을 면역 분 석법에 의하여 측정함으로써 단백 질의 변성도를 조사하였음
		PEF 공정에 의한 우유의 면역단백질 변성도 측정과 보존성 향상 기술 개발	100	우유를 PEF 처리한 뒤 4℃에서 보 관하여 변화하는 면역 단백질의 활 성을 측정함으로써 보존성이 가장 우수한 PEF 및 LTLT 처리 조건 을 확립함
	PEF법과 기존 우유 살균 처리법과의 병 행 검토	소량배합시험 기능성우유 및 flavored milk(커피음료 포함)로 이원화 하여 제품 개발	100	비타민 강화 기능성우유 조제 - PEF와 일반살균에 따른 비타민 등 영양소 함량 손실 비교 가공(유)음료3종 (초코, 커피라떼, 아메리카노) 조제
		관능분석 숙련된 패널에 의한 관능분석	100	조제된 샘플에 대한 기호도 등 관 능검사 실시
		적용 가능 다양한 우유류 최종제품 선 정 상기 소량배합시험 및 관능검사에서 적합한 제품을 선정, 최종개발 기존 살균법과 비교 또는 병용 검토	100	○ 관능검사 결과 분석 - 기존 살균법(HTST, LTLT)과 병용 시 관능개선 효과 검증 - 기존 살균법과 병용 시 일반성 분, 성장인자 등 기능성 성분 유지 검토 -3차년도 시험 적용 제품 선정

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2013 - 2014)	시생산을 통한 상업 화 및 법제화 추진	최적 생산을 위한 pilot plant 설계 최적 화 공정 확립	100	시생산 공정 설계 및 PEF와 가열 살균의 공정변수 확립 상용화를 위한 우유 및 유제품 3종 의 시작제품 생산 완료
		생산된 상품으로 사업화 추진	100	catalogue, leaflet, pop을 통한 흥 보물 기획 및 제작 marketing mix 분석 및 판매전략 수립
		법령 초안 마련 및 법제화 추진	100	안정성 입증 및 자료화 CODEX 및 IDF 규정 검토 법령 작성을 위한 기반 자료 문서 화
	유제품 유형별 PEF 제어 공정 연구	다양한 유제품에 대한 적용성 확인	100	(더치)커피우유, 바나나우유, 딸기 우유의 PEF 적용성을 확인함
		우유, 저지방우유, 요구르트, 커피함유 유음료 등에 대한 pilot scale의 PEF 살 균 적성 확인	100	(더치)커피우유, 바나나우유, 딸기 우유의 PEF 처리 후 생균수, pH, 색도, 입도분포, 향기 성분분석을 통해 PEF의 살균적성을 확인함
	유제품 유형별 PEF 살균공정 연구	시유와 가공유의 살균에 PEF 단독 살 균 또는 기존 가열살균과의 병용 처리 공정 확립	100	시생산 공정을 통해 우유의 PEF 및 가열살균 처리한 시료의 단백질 보존성 확인
		시유와 가공유의 살균공정 최적화 연구	100	우유 및 유제품의 최적 살균공정 확립
		살균공정의 check point와 parameter 설정과 각 parameter별 최적화 연구	100	시생산을 위한 최적의 공정을 찾고 각 우유 및 유제품별 적용 test
		살균 시유와 가공유의 저장 중 기능성 단백질의 활성 변화 연구, 유해 단백질 의 생성여부 연구	100	시생산 된 우유 및 유제품의 저장 중 단백질의 보존 확인
	PEF법 적용 제품 개발 완료	신 살균법 적용으로 친환경적 에너지 절감방안 모색 및 경제성 검토	100	가열살균과 PEF법의 경제성 비교
		2차년도에서 개발 완료된 제품을 대상 으로 대량시험 수행	100	2차년도 개발 완료된 제품 중 우 유, 초코우유, 저지방우유, 아메리 카노를 대상으로 대량 시험생산 완 료
		제품검사	100	시생산된 제품의 산도, 비중, pH, 당도, 침전여부, 생균수를 측정함으 로써 유통기한 설정
		내외부 패널활용 모니터링 관능검사	100	시생산된 제품의 출시 가능 여부를 가리기 위해 내부 패널을 활용하여 관능검사 실시

## 제 2 절 관련분야에의 기술발전예의 기여도

### 1. 기술적 측면

- 우유 살균공정에 펄스 전기장 기술 도입을 통하여 최종 유제품의 유통기한 연장과 우유 단백질의 기능성을 보존기술을 마련하였음.
- 우유의 신규 살균법 개발을 통한 기존 제품에 비해 유통기한 연장이 연장된 다양한 제품 생산을 통해 유통이 가능한 제품의 개발로 품목 다양화가 가능하도록 기반연구를 마련함.
- 우유 및 유제품 외 액상 및 반고체 상태의 식품 살균으로 적용 가능한 pilot plant 설비 구축하여 향후 연구 및 제품개발에 활용할 수 있도록 연구자료와 기반을 축적함.

### 2. 경제, 산업적 측면

- 우유의 신규 살균법 개발을 통한 기능성 단백질의 보존으로 우유에 대한 기능성 재고 및 부가가치가 상승한 제품의 산업적 생산이 가능함.
- 우유 단백질의 정량적 분석법 개발을 통한 기능 물질의 규격화 가능하며, 향후 개발제품의 자체 분석을 통해 규격을 설정할 수 있음.
- 개발된 기술은 열에 불안정하거나 신선도를 유지해야 하는 제품의 처리 기술로 활용하여 최종 소비 제품의 품질을 향상할 수 있는 기반 기술 활용할 수 있는 자료를 마련하였음.
- 저비용, 고효율로 산업화가 가능하여 관련 설비에 대한 연계 매출 성과 달성이 가능하도록 설비를 구축하였음.
- 유용 기능성 성분의 효율적인 생산기술 및 최적화 공정 확립을 통해 우유 및 유가공품의 고부가가치와 제품 다양화를 실현하였음.
- 유통기한 연장 및 기능성 강화우유 및 가공유 등으로 다양한 품목 개발이 가능하여 국내외 직접적인 매출 성과 달성 기대할 수 있음.

### 3. 사회, 문화적 측면

- 폭넓은 소비자층을 겨냥한 기능성 우유 및 발효유 제품 개발을 통한 고부가가치를 창출이 가능함..

- 다양한 유통을 통해 기능성을 유지하면서 다양한 유통 채널에서 손쉽게 구매 가능한 제품으로서 폭넓은 소비층 형성이 가능하며, 그에 따른 시장의 확대가 기대됨.
- 면역강화 작용, 항암작용, 성장촉진 작용, 골격 강화 기능, 알러지 억제 작용, 유산균 증식작용효능에 대한 우유에 대한 소비자의 인식이 재고될 수 있는 기틀을 마련함.

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 1. 연차별 연구성과

(단위 : 건수)

구분		(예시)특허		(예시)신품종			(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타	
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호		SCI	비SCI		
						출원					등록
1차 년도	목표	1									
	달성										
2차 년도	목표	1					1				
	달성							1	7		
3차 년도	목표		1						2		
	달성	2							1		
4차 년도	목표		1								
	달성										
계	목표	2	2				1	2			
	달성	2					1	2	7		

## 2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Changes of proteins and physicochemical properties of cow's milk by high voltage pulsed electric field treatment	Sulhee Lee	Young-Seo Park	Gun Kim	Food Eng. Prog.	Vol. 17 (No. 3)	국내	비SCI
2014	우유 및 유제품의 열처리 및 펄스 전기장 살균 최근 연구 개발 동향	강신호		신용국	한국유가공기술 과학회지	Vol. 32.(No. 1)	국내	비SCI
2015 (투고중)	Studies on the changes of microbiology and functional protein in PEF combined HTST treatment milk during storage.	Kyungsu k Choi	Kyungsu k Choi	Geon Kim	Journal of Nutrition	-	국외	SCI

### 3. 특허 성과

특허 출원 성과					
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	비고
2014	고전압 펄스 전기장 처리 및 저온 가열 살균을 이용한 우유의 살균방법 및 이에 따라 살균된 우유	주식회사 비케이바이오	대한민국	제10-2014-0181404호	
2014	고전압 펄스 전기장 처리 및 고온 가열 살균을 이용한 우유의 살균방법 및 이에 따라 살균된 우유	주식회사 비케이바이오	대한민국	제10-2014-0181405호	

### 4 . 학술발표 성과

발표일시	발표제목	학술대회명	개최지
12.11.11	Effects of Pulsed Electric Fields (PEF) on the microbial properties of Whole and skim milk	식품영양과학회	제주
13.05.23	살균 및 PEF 처리 조합에 따른 우유 내 IGF-1의 활성변화	축산식품학회	한국과학기술회관
13.07.14	Sterilization Effect of Pulsed Electric Field Technology on Cow's Milk and Structural Change of Milk Proteins	IFT 2013 Annual Meeting	Chicago
13.08.28	Sterilization Effect of Pulsed Electric Field Technology on Cow's Milk and Structural Change of Milk Proteins	식품과학회	천안
13.08.28	Effects of Pulsed Electric Field (PEF) on the microbial and organoleptic properties of café latte	식품과학회	천안
13.11.21	Changes in the concentration of immunoproteins in cow's milk by pulsed electric field treatment	식품공학회	강릉 원주대
13.11.21	The Study on Sterilization Process of Raw Milk Using Combined with Pulsed Electric Field and Pasteurisation	식품공학회	강릉 원주대

### 5. 실용화 · 산업화 계획

- 제품화 계획
  - 개발 제품의 기술 이전을 통한 시제품의 업그레이드 생산
  - 라벨 및 패키지 개발, 소비자 패턴 및 마케팅 연구를 통한 신제품 시장 진출
  - 최종 소비 제품의 론칭 및 온, 오프라인에서의 판매 촉진 정책 추진
  - 안전성 평가, 기능성 평가 등 추가 효능 연구를 통한 효력 검증으로 품질 업그레이드

- 시제품 및 유통 판매 확보 계획
  - 개발 제품의 기술 자료를 홍보물로 제작하여 기술 영업 자료로 활용
  - 국내외 전시회 및 해외 전시회를 통한 기술 평가와 소비 제품 유통사 소싱
  - 주관기관의 기존 보유 사업의 유통사들과의 인적 인프라를 통해 제품 홍보 및 평가
  - 기타 매체 홍보 준비
  - 소비자에 근접한 제품으로 개발 제품의 수정 및 보완을 통한 업그레이드 제품 생산
  - 국내외 식품 관련 전시회에 적극적 참가 및 홍보
  - 비즈니스 파트너들과의 유통 network를 이용한 홍보와 수출을 위한 co-marketing 추진
  - 국내 식품관련 정부출연기관들의 지원사업을 통한 해외시장 확대 개척

## 6. 교육\*지도\*홍보 등 기술 확산 계획 등.

- 완성된 제품의 영양보존과 안전성에 대한 홍보물을 제작하여 배포하고 소비자에 노출시켜 적극적인 홍보 진행
- 펄스 전기장 처리의 살균관련기술 및 적용에 대한 전시회 참여 및 홍보
- 펄스 전기장 처리 기술이전을 통한 관련기술 교육 및 지도

## 7. 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 본 연구과제를 통해 개발된 살균법은 주스 및 음료에 적용하기 위한 추가 연구개발을 계획 중에 있음.
- Batch type chamber를 이용한 동식물 유래 세포의 조직파괴를 유도하여 천연물의 유용성분 추출 및 고부가가치 농산물을 개발하는 사업을 진행하고 있음.

## 제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

### 1. 국내외 관련분야 환경변화

#### 가. 신선식품의 선호 추세

- 최근 소비자의 식품에 대한 관심은 건강과 안전이며, 가능한 천연 상태의 물질을 유지한 제품을 요구하고 있다. 따라서 소비자의 욕구를 충족시키고 경제·사회적 변화에 적극적으로 대응하기 위하여 제조의 합리화 및 효율화, 노동 절약형 기술의 개발, 에너지 절약형 기술의 개발, 새로운 소재 창출을 위한 기술 개발 등이 활발히 연구되고 있다.
- 날로 까다로워지는 소비자들의 요구와 엄격해지는 식품 제조 규정들은 식품 산업으로 하여금 안전성과 안정성 확보는 물론, 고품질의 식품 생산을 위한 새로운 가공법 개발을 요구하고 있다.
- 즉 “최소가공, 보존제 무첨가”라는 식품 가공기술의 혁신을 요구하고 있고, 새로운 식품제조 규정들도 현재 안전하다고 인정되어 상용되고 있는 보존제들의 사용과 허용 한도를 규정하고 있다.

#### 나. 비가열 식품시장의 변화

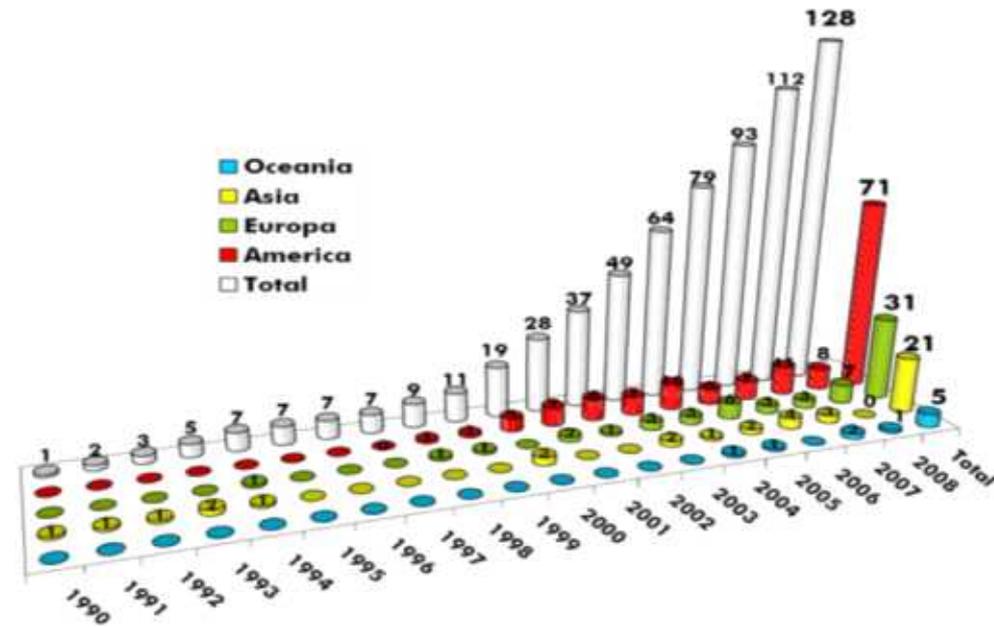
- 원료와 생산품을 고품질의 신선도로 유지하면서 식중독과 부패를 방지하는 기술로 현재 가장 활발히 연구되고 있는 것은 최소가공기술(minimal process technology)이다. 최소가공기술이란, 식품 본래의 신선한 품질을 그대로 유지하면서 식중독 및 부패 미생물을 최소화시켜 저장수명을 연장시키는 최소처리(the least possible treatment) 가공 기술을 말한다.
- 식품의 보존성을 향상시키기 위하여 전통적으로 가열, 건조, 냉동 등의 물리적 방법이나 식품 보존제 첨가와 같은 화학적 방법을 사용하여 왔다. 그러나 가열 공정은 열에 의한 영양 성분의 파괴, 텍스처와 색의 변화, 향기 성분의 손실 등 품질 저하를 피할 수 없다. 냉동이나 건조의 방법은 장기간 저장할 경우 품질과 소비자 기호도를 감소시키며, 식품 보존제의 사용도 점점 기피하고 있다.
- 이에 따라 여러 가지 비가열 가공 기술(non-thermal process)과 무균 포장기술이 활발히 연구되고 있다. 현재 식품 산업에서 개발되고 있는 비가열 가공 기술은 물리적 방법으로 초고압 (high hydrostatic pressure, HHP), 고전압펄스전기장(high-voltage pulsed electric field, PEF), 진동 자기장 (oscillating magnetic fields, OMF), 조사법 (ionizing radiation), 광펄스 (high-intensity pulsed light) 등이 활발히 연구되고 있는 추세이다.

#### 다. 비가열 살균을 활용한 국내외시장 사례

- 초고압 가공기술은 식품 본연의 특성을 유지하고 제품의 보존기간을 연장시키는 동시에 품질과 안전을 보장하는 가공기술이다. 특히 병원성 미생물인 *Listeria*, *Salmonella*, *E.coli* 등에 효과적이

어서 식육의 살균에 사용되어진다. HPP의 응용제품으로는 해산물, 육류, 햄, 음료, 유제품, RTE, 과채류, 소스, 과일주스, 스무디, 두유 등 다양하게 적용할 수 있다.

■ Evaluation of HPP industrial machines installed on continents



<해산물/햄>



<과일 주스>



<유가공품>



<RTE>



<과채류>

- 국내에는 비가열 제품이 많이 생산되고 있지 않은 실정으로 그나마도 초고압 살균장치를 이용한 제품이 대부분이며, 가열과 병용한 초고압살균을 이용한 즉석밥, 과일주스 등이 있다. 국내에는 비가열살균으로서 PEF를 활용한 제품은 없으며, 초고압살균을 이용한 제품으로 국한되어 있다.



<과일 주스>

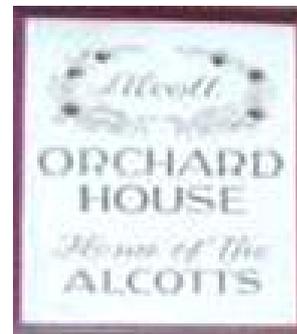


<죽석밥>

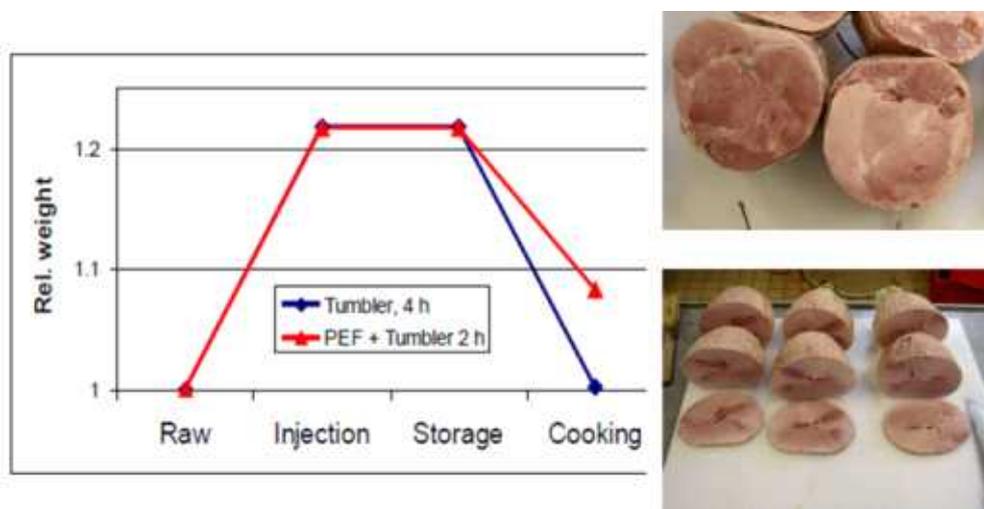
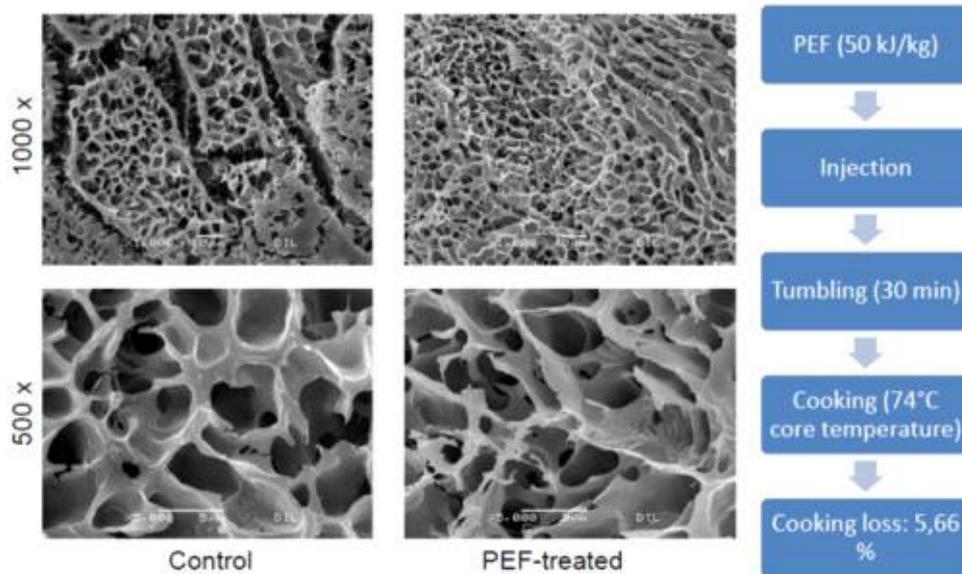
- PEF는 독일 및 미국에서 연구가 시작되었으며, 초고압 기술과 고전압 펄스 살균 기술을 개발하기 위하여 exponential pulse wave를 발생하는 bench scale의 고전압 펄스 발생 장치로 개발된 것이다.
- 미국의 경우 아직 소규모 pilot 고전압 펄스 처리 장치의 수준으로 개발되어 있어 산업 현장 적용에 대한 사례는 없다. 그러나 독일 베를린 공대를 중심으로 PEF의 산업화 연구가 활발히 진행되면서 초고압에 대한 산업화 원천기술을 가지는 독일식품공학연구소(DIL, 독일 Quakenbrug 소재의 민간 연구기관)에서 산업용 설비 개발에 성공하여 산업화 하였다.
- DIL(독일식품공학연구소)에서 생산되는 PEF 설비는 독일, 네덜란드, 영국 등 유럽 지역을 중심으로 보급되어 신선 주스, 스무디 등의 상품군의 살균 공정에 적용되어 제품이 출시되고 있다. 대표적인 적용 생산사로는 Hoogesteger(NL), FruityKing(NL), Wernsing GmbH(German), Cosun(NL), Orchard House(UK), Lassonde(Canada), Uelzena(Germany)이다. 감자의 슬라이싱 가공 적성 증대를 위한 전처리 용도로 적용되고 있는 만큼 적용이 확대되고 있다. 돼지 목심의 PEF 처리를 통한 조리 후 전기전도도 및 drip이 줄어드는 결과가 나왔다.



<PEF의 음료가공>



<감자의 가공적성을 위한 PEF 처리>



<식육의 가공적성을 위한 PEF 처리>

- 현재 PEF가 상업적으로 활성화되지 못하는 이유는 표준화된 상업용 장비의 부족, 살균제품의 물리적 특성의 영향(예로서 우유에 함유된 공기입자의 존재가 살균처리 시 좋지 않은 영향을 미친다.), 전기전도도(낮을수록, 균일할수록 최적), 액체 식품의 입자의 존재로 인한 처리 불가능, 공정을 측정할 기준 부재, 살균 속도론을 표현할 적절한 모델이 부족 등이 있다(식품저장학 박현진 저).
- 비록 PEF 처리 가공기술을 적용한 우유 제품은 없으나 이에 대한 국내외 연구는 활발히 이루어지고 있다. 펄스 전기장에 의한 우유 중 미생물 살균에 관해서는 많은 수의 연구결과가 축적되어 있으며 대표적인 연구결과를 <표>에 정리하였다. 하지만 실험결과는 펄스 전기장 처리장치의 특징에 따라 상이한 결과를 보이고 있는 실정이다.
- 이러한 결과는 펄스 전기장 chamber의 구성 형태(co-field, co-linear, co-axial 등), 펄스의

특성(peak pulse voltage, pulse width, shape of pulse, repetition time 등), 그리고 고전압 펄스 외적 조건(conductivity, pH, inlet temperature) 등의 차이로 여겨지며 따라서 적용 시료와 시스템에 따른 개별적인 확인이 필요하다.

<PEF 처리에 의한 우유 중 미생물 살균도>

Microorganism	Treatment conditions	Decimal reduction	Source
<i>E. coli</i>	PEF energy = 97 kJ/L	9	Zhang et al., 1995
<i>Lactobacillus brevis</i>	45°C, 22 kV/cm, 20 μs, 20 pulses	4.6	Zhang et al., 1994
<i>Listeria monocytogenes</i>	50°C, 30 kV/cm, 400 pulses	4	Bendicho et al., 2002
<i>Listeria monocytogenes</i>	35°C, 22 kV/cm, 800 μs	5.1	Alvarez et al., 2003
<i>Pseudomonas</i> genus	50°C, 60 kV/cm, 210 μs	8	Sampedro et al., 2005

- 펄스 전기장 처리에 의한 우유 중 면역성분에 대한 논문검색 결과는 IgG (4건), IgA(0건), IgM(0건), Lactoglobulin(7건), Lactoalbumin(0건), Lactoferrin(4건), TGF(0건)으로 검색되었다. 논문검색 결과 우유 중 면역성분에 대한 PEF의 영향은 대표적 면역성분에 대해 이루어지고 있음을 알 수 있으며 이 분야의 주도권을 획득하기 위해서는 시급한 연구가 필요한 실정이다.

## 제 7 장 참고문헌

Antoine EM, De Souza CH. Study by differential scanning calorimetry of the thermal stability of whey proteins concentrate. *Biotechnol.* 6: 431-435, 2007.

Apenten RKO. A three-state heat-denaturation of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Chem.* 52: 131-133, 1995.

Boye JI, Alli I. Thermal denaturation of mixtures of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin: a differential scanning calorimetric study. *Food Res. Int.* 33: 673-682, 2000.

Buckow R, Chandry P. S., Ng S. Y., McAuley C. M. and Swanson B. G. 2014 Opportunities and challenges in pulsed electric field processing of dairy products *Int Dairy journal* 34:199-212

Buckow R, Schroeder S, Berres P, BaumannP, Knoerzer K. 2010. Simulation and evaluation of pilot-scale pulsed electric field (PEF) processing. *J. Food Eng.* 101: 67-77

Calderun-Miranda,M. L.,Barbosa-Canovas,G. V.,& Swanson,B. G. (1999). Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol*, 51,19-30.

Choi GH, Lee KH. Effect of ozone treatment for sanitation of egg. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 32: 198-2013, 2012.

Choi JW, Park JH, Lee WC, Oh BK, Min JH, Lee WH. Fluorescence immunoassay of HDL and LDL using protein A LB film. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 979-985, 2001.

Chung CI, King KT, Cho NY, Jung MJ, Oh HS, Lee G. 2002. Comparison of the keeping quality of UHT pasteurized milk in Korea. *Kor. J. Food Sci. Ani. Res.* 22(3): 247-251

Chung NY, Kim WJ. Factors affecting on protein stability of mixed cow and soy milk. *Korean J. Food Nutr.* 7: 345-352, 1994.

Crahl, T., Sitzmann, W. and MarkI, H. (1992) "Killing of Microorganisms in Fluid Media by High-voltage Pulses" in 10th Dechema Biotechnology Conference Series 58 (Kreysa, C. and Drisel, X., eds), pp. 675-478

Craven, H. M., Swiergon, P., Ng, S., Midgely, J., Versteeg, C. Coventry, M. J., &Wan, J.

(2008). Evaluation of pulsed electric field and minimal heat treatments for microbial inactivation of pseudomonads and enhancement of milk shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*,(9), 211-216.

Dunn, I.E. and Pearlman, J.S. (1987) 'Methods and Apparatus for Extending the Shelf-life of Fluid Food Products', United States Patent US 4 695 472

Evrendilek, G. A.,Zhang,Q. H.,& Richter, E. R. (1999). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* 8739 in apple juice by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 62, 793 - .796.

Floury, J., Grosset, N., Leconte, N., Pasco, M., Madec, M. N., & Jeantet, R. (2006). Continuous raw skim milk processing by pulsed electric field at non-lethal temperature: effect on microbial inactivation and functional properties. *Lait*, 86(1), 43-57.

Garcia, D., Gomez, N., Manas, P., Condon, S., Raso, J., & Pagan, R. (2005). Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium ph and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 94-104.

Guerrero-Beltran JA, Sepulveda DR, Gongora-Nieto MM, Swanson B, Barbosa-Canovas B. 2010. Milk thermization by pulsed electric fields(PEF) and electrically induced heat. *J. Food Eng.* 100: 56-60

Hiller RM, Lyster RLJ. Whey protein denaturation in heated milk and cheese whey. *J. Dairy Res.* 46: 95, 1979.

Hiraoka Y, Segawa T, Kuwajima K, Sugai S, Murai N.  $\alpha$ -Lactalbumin: a calcium metalloprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 1098-1104, 1980.

Hoffmann MAM, van Mil PJJM. Heat-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2942-2948, 1997.

Jin,Z. T.,& Zhang,Q. H. (1999). Pulsed electric field inactivation of microorganisms and preservation of quality of cranberry juice. *J. Food Proc. Eng.*, 23,481 - .497.

John A, Shastri PN. Studies on food macromolecules by differential scanning calorimetry: a critical appraisal. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35: 1-14, 1998.

Jung SC, Kim KH, Chung ME, Kim SI, By, Byun SK, Lee DS, Jeong SK, Park SW, Jun

- KS, Lee KH, Cho NI, Lee HG, Kim OK. 2001. A study on the quality changes of the LTLT and HTST treated milk by storage Conditions. Kor. J. Vet. Publ. 25(4)
- Kang CB, Shin JU, Choe SY. Studies on enzyme immunoassay for determining progesterone of bovine plasma and its clinical application. II. Establishment of enzyme immunoassay for progesterone. Korean J. Vet. Res. 1: 21-25, 1989.
- Kim GM, Hong YH, Lee YK. 1992. Changes of indicative substances according to heat treatment of milk. J. Korean Soc. Food Nutr. 21(4): 390-397
- Kim GM, Hong YH, Lee YK. Changes of indicative substances according to heat treatment of milk. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 390-397, 1992.
- Kim GY. Functionality and nutrition of milk. Korean Soybean Digest 14:113-117, 1997.
- Kwon WH, Choi SH. 1998. Changes in bacterial count, shelf life and soluble whey protein content of market milk by heat treatment process and storage temperature. Korean J. Dairy Sci. 20(2): 133-142
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.
- Lee KB, Shim JH, Suh YT. Development of radioimmunoassay (RIA) for residue analysis endosulfan in water and carp (*Cyprinus carpio* L.). Korean J. Environ. Agric. 13: 262-270, 1994.
- Lee YR, Hong YH. Heat-induced reaction of bovine whey proteins. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 22: 179-182, 2002.
- Lelieveld, L. M., Notermans, S. and de Han, S. W. H. 2007. Food preservation by pulsed electric fields -From research to application. chap16. pp. 257-265.
- Lim JH, Ahn SH, Lee DU, Kim YH, Park KJ. Effects of pulsed electric fields on juice expression characteristics of *Malus pumila* fruit. Korean J. Food Preserv. 19: 665-671, 2012a.
- Lim JH, Shim JM, Lee DU, Kim YH, Park. Pulsed electric fields effects on drying of white ginseng and extraction of soluble components. Korean J. Food Sci. Technol. 44: 704-710, 2012b.

Lyster RLJ. The denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in heated milk. *J. Dairy Res.* 37: 233, 1970.

Manji B, Kakuda Y. Determination of whey protein denaturation in heat-processed milks: comparison of three methods. *J. Dairy Sci.* 70: 1355, 1987.

Marselles-Fontanet, A.R., Puig, A., Olmos, P., Minguez-Sanz, S., Martin-Belloso, O., 2009. Optimising the inactivation of grape juice spoilage organisms by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 130 (3), 159 - 165.

Martin, O., Qin, B.L., Chang, F.J., Barbosa-Chnovas, C.V. and Swanson, B.C. "Inactivation of Escherichia coli In Skim Milk by High Intensity Pulsed Electric Fields" In *J. Food Eng* (in press)

Massague J. TGF- $\beta$  signal transduction, *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753-791, 1998.

Min S, Jin ZT, Min SK, Yeom H, Zhang QH. Commercial-scale pulsed electric field processing of orange juice. *J. Food Sci.* 68: 1265-1271, 2003.

Mok CK, Jeon HJ. Low pressure discharge plasma inactivation of microorganisms in black pepper powder. *Food Eng. Prog.* 17: 43-47, 2013.

Moon HJ, Kwon HH. Homologous and heterologous antibody responses of the patients with Aspergillosis against young mycelia of Aspergilli by fluorescence antibody reaction. *Kor. J. Micol.* 17: 82-90, 1989.

Moon JM, Cho SH, Kim DS. A study on the measurement of gonadotrophins by enhanced chemiluminescence immunoassay. *J. Hanyang Med. Coll.* 8: 679-688, 1988.

Morr CV, Ha EYW. Whey protein concentrate and isolates: Processing and functional properties. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33: 431-476, 1993.

Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R. M., & Martin-Belloso, O. (2007). Influence of treatment time and pulse frequency on Salmonella Enteritidis, Escherichia coli and Listeria monocytogenes populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2), 192-200.

Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martin-Belloso, O., 2008b. Nonthermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9 (3), 328 - 340

- Muller UR. Protein detection using biobarcode. *Mol. Biosyst.* 2: 470–476, 2006.
- Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamamoka K, Kaji K, Ichihara A. Inhibitory effect of transforming growth factor- $\beta$  on DNA synthesis of adult hepatocytes in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 1042–1050, 1985.
- Park JY, Na SY, Lee YJ. 2010. Present and future of non-thermal food processing technology. *Food Sci. In.* 43(1)
- Park JY, Na SY, Lee YJ. Present and future of non-thermal food processing technology, *Food Sci. Ind.* 43: 2–20, 2010.
- Park KH, Lund DB. Colorimetric study of thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 67: 1699–1706, 1984
- Park WJ, Jwa MK, Hyun SH, Lim SB, Song DJ. High hydrostatic pressure sterilization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli* in raw oyster. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 935–939, 2006.
- Parris N, Baginski MA. A rapid method for the determination of whey protein denaturation. *J. Dairy Sci.* 74: 58–64, 1991.
- Parris N, Purcell JM, Ptashkin SM. Thermal denaturation of whey proteins in skim milk. *J. Agric. Food Chem.* 39: 2167–2170, 1991.
- Paulsson M, Hegg PO, Castberg HB. Thermal stability of whey proteins studied by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta* 95: 435, 1985.
- Qin, B. L., Chang, F.-J., Barbosa-Ca "Lnovas, G. V., & Swanson, B. G. (1995). Nonthermal inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice using pulsed electric fields. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 28, 564–568.
- Raso, J., Alvarez, I., Condon, S., Trepas, F.J.S., 2000. Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1 (1), 21 - 29
- Reina, L. D., Jin, T., Zhang, Q. H., & Yousef, A. E. (1998). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *J. Food Protect.* 61, 1203–1206.

Relkin P. Thermal unfolding of  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: 565-601, 1996.

Renner E, Dorguth H. Study of protein quality of UHT milk. *Deut. Milchwirt.* 31: 505-512, 1980.

Renner E. Nutritional value of UHT milk. *Korean Dairy Technol.* 6: 87-93, 1989.

Rivas, A., Sampedro, F., Rodrigo, D., Martinez, A., & Rodrigo, M. (2006). Nature of the inactivation of *Escherichia coli* suspended in an orange juice and milk beverage. *European Food Research and Technology*, 223(4), 541-545.

Rodrigo, D., Ruiz, P., Barbosa-Canovas, G.V., Martinez, A., Rodrigo, M., 2003b. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 81 (3), 223 - 229.

Rodriguez-Calleja, J. M., Cebrian, G., Condon, S., & Manas, P. (2006). Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 1054-1062.

Ruegg M, Moor U, Blanc B. A calorimetric study of thermal denaturation of whey protein in stimulated milk ultrafiltrate. *J. Dairy Res.* 44: 509-520, 1977.

Saldana, G., Puertolas, E., Monfort, S., Raso, J., Alvarez, I., 2011. Defining treatment conditions for pulsed electric field pasteurization of apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 151 (1), 29 - 35

Sampedro F, Geveke DJ, Fan X, Zhang HQ. 2009. Effect of PEF, HHP and thermal treatment on PME inactivation and volatile compounds concentration of an orange juice-milk based beverage. *Innovative Food Sci. and Emerging Technol.* 463-469

Sawyer WH, Norton RS, Nichol LW, McKenzie GH. Thermo-denaturation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin kinetics and introduction of  $\beta$ -structure. *Biochem. Biophys. Acta* 243: 19-30, 1971.

Schur PH. IgG subclasses—a review. *Ann. Allergy* 58: 89-96, 1987.

Selma, M. V., Salmeron, M. C., Valero, M., & Fernandez, P. S. (2006). Efficacy of pulsed electric fields for *Listeria monocytogenes* inactivation and control in horchata. *Journal of*

Food Safety, 26(2), 137-149.

Sepulveda DR, Go´ngora-Nieto MM, Guerrero JA, Barbosa-Ca´novas GV. 2009. Shelf life of whole milk processed by pulsed electric fields in combination with PEF-generated heat. Food Sci. and Technol. 42: 735-739

Sepulveda, D. R., Go´ngora-Nieto M. M., Guerrero J. A. and Barbosa-Ca´novas G. V. 2005. Production of extended shelf life milk by processing pasteurized milk with pulsed electric fields. Journal of Food Engineering 672:81-86.

Shamsi, K., Versteeg, C., Sherkat, F., &Wan, J. (2008). Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9, 217-233.

Shin JK, Jung KJ, Pyun YR, Chung MS. 2007. Application of pulsed electric fields with square wave pulse to milk inoculated with E. coli, P. fluorescens, and B. stearothermophilus. Food Sci. Biotechnol. 16(6): 1082-1084.

Shin JK, Shin HH. Effect of high voltage pulsed electric fields on extraction of purple sweet potato pigment. Korean J. Food Preserv. 14: 165-169, 2007.

Sobrino-Lopez, A., Raybaudi-Massilia, R., Martin-Belloso, O., 2006. High-intensity pulsed electric field variables affecting Staphylococcus aureus inoculated in milk. Journal of Dairy Science 89 (10), 3739 - 3748.

Son SM, Shin JK. The effect of environmental factors on inactivation of Saccharomyces cerevisiae by high voltage pulsed electric fields. Food Eng. Prog. 12: 154-162, 2008.

Ushikawa. Changes of whey protein during various dairy products processing. J. Dairy Food Sci. 33: 147, 1984.

Vega-Mercado, H., Martin-Belloso, O., Chang. F.J., Barbosa-Cinovas, G.V. and Swanson, B.C. (1997) ‘‘Inactivation of Escherirhia coliand Bacillus subtilis Suspended in Pea Soup Using Pulsed Electric Fields’’ in J. Food Process. Preserv. 20(6), 501-510

Walkling-Ribero, M., Noci, F., Cronin, D. A., Lyng, J. G. and Morgan, D. J. 2009. Antimicrobial effect and shelflife extension by combined thermal and pulsed electric field treatment of milk. Journal of Applied Microbiology 106:241-248.

Wong DWS, Cairand WM, Paviiath AE. Structure and functoinalities of milk proteins.

Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36: 807-844, 1996.

Yolken RH, Stopa PJ. Enzyme-linked fluorescence assay: ultrasensitive solid phase assay for detection of human rotavirus. Clin. Microbiol. 10: 317-321, 1979.

Yoon YC, Lee JM, Kim NW. Studies on the changes of physicochemical quality in UHT-treatment market milk during storage. Korean J. Dairy Sci. 12: 82-86, 1990.