

## HPLC에 의한 열처리된 우유중 $\alpha$ -lactalbumin의 정량

기해진 · 홍윤호

전남대학교 식품영양학과

### Determination of $\alpha$ -lactalbumin in Heated Milks by HPLC

Hae-Jin Kee and Youn-Ho Hong

Department of Foods and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju, Korea

#### Abstract

The  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ -la) concentration in raw and laboratory-heated milks by HPLC was 1.20 mg/ml (unheated), 1.17 mg/ml (63°C, 30 min), 1.13 mg/ml (72°C, 15 sec) and 0 mg/ml (100°C, 10 min), respectively. Whereas,  $\alpha$ -lactalbumin concentration ranges of commercial milks were 1.00~1.02 mg/ml (pasteurized), 0.23~0.68 mg/ml (UHT-pasteurized) and 0.77~0.89 mg/ml (UHT-sterilized), respectively. It was supposed that the  $\alpha$ -lactalbumin content of sterilized milk will be lower than that of UHT milk, but the opposite occurred. This discrepancy would be caused by the different heating system in the milk plants, where indirect UHT-treatment had more heat intensity than direct UHT-processing. The HPLC determination of  $\alpha$ -lactalbumin may be an indicator to evaluate correctly and rapidly heated milks.

Key words: HPLC,  $\alpha$ -lactalbumin, raw milks, LTLT-pasteurization, UHT-pasteurization, UHT-sterilization

## 서 론

치즈제조시 혹은 우유에서 산이나 효소처리하여 카제인을 분리하고 얻은 후에 남은 유청을 예전에는 가축의 사료에 응용하거나 폐기하였으나 유청에는 기능성 및 영양적으로 가치가 있는 단백질, 유당, 무기질, 비타민 등이 들어있기 때문에 기술의 향상과 함께 식품산업에의 이용이 점차 증가되고 있다<sup>(1,2)</sup>. 많은 연구자들이 우유의 영양적인 면에 영향을 미치는 인자로서 열처리 정도를 알아보는 실험을 하였는데, Kjeldahl법, 유청단백질 지수산출법, 열량측정법을 이용하여 열처리된 우유중 유청단백질의 변성정도를 확인하였다<sup>(3-5)</sup>. 최근에는 보다 간편하고 신속하며 재현성이 높은 고성능 액체 크로마토그래피법(HPLC)을 이용하여 변성된 단백질을 측정하였고<sup>(6,9)</sup> 분유의 열처리 정도를 분류하였다<sup>(8, 11)</sup>. Parris 등<sup>(10)</sup>은 역상 크로마토그래피법으로 온도를 달리한 조건에서 불변성 유청단백질이 온도의 증가에 따라 감소됨을 알 수 있었으며 Kjeldahl법에 준한 결과와 잘 일치하며 신속한 측정이 가능하다고 보고하였다.

지금까지 보고된 대부분의 연구들은 주로 분유 또는 분말 유청 제품의 열처리 정도 파악에 주안점을 두었으나 Duranti 등<sup>(12,13)</sup>은 액상 우유중의  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ -la)을

면역전기영동법<sup>(12)</sup>과 ELISA 방법<sup>(13)</sup>으로 정량하여 변화를 추적하였는데 실험수행의 장기간 소모, 복잡성과 번거로움이 노정되었다.

본 연구에서는 역상 HPLC법을 이용하여 우유 유청중의  $\alpha$ -lactalbumin을 정량하여 열처리 방법에 따른 차이를 신속, 정확하게 구분하고자 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

표준물질인  $\alpha$ -lactalbumin은 Sigma사(U.S.A.)에서 구입했고 다른 시약들은 1등급 시약을 사용하였다. 원유는 호남유업의 냉각탱크에 수집된 것을 얻었으며, 시판되고 있는 우유는 열처리 방법과 제조일자가 다른 저온 살균우유(A), 고온순간 살균우유(B), 초고온(Ultra-High Temperature, UHT) 살균우유(C, D, E, F, G, H, I, J), 초고온(UHT) 멸균처리하여 6주간 저장가능한 2개 회사제품(c, d)을 백화점 및 슈퍼마켓에서 무작위로 평균 5회 구입하여 냉장보관하였다.

### 유청단백질의 분리

유청단백질의 분리를 위해 원유 및 시유를 3000 rpm으로 4°C에서 20분 동안 원심분리시킨 후 유지방을 제거하고 5 ml를 정확히 취해 100 ml 용량플라스크에 넣고 증류수로 대략 80 ml까지 채웠다. 여기에 10% 초산 4 ml를 첨가한 후 5분 동안 실온에서 정치시키고 1 N so-

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

dium acetate 4 ml를 가하였다. 증류수로 표선까지 채운 후 여과지(Whatman No. 2)를 사용하여 여과액을 얻고 HPLC 분석을 위해 0.45  $\mu$ m 여과지로 여과하였다.

#### HPLC 조건

본 실험에서 사용한 HPLC는 injector와 multisolvent delivery system을 갖춘 Waters사(U.S.A.) 제품이었다. Column은 Protein-Park™ 300 SW(7.8×300 mm)이었으며 이동상으로는 0.2 M 인산 완충용액(pH 7.0)을 1 ml/min의 유속으로 하였으며 시료의 주입용량은 50  $\mu$ l이었다.  $\alpha$ -lactalbumin의 정량은 280 nm에서 측정하여 얻은 chromatogram의 peak area를 표준시료와 비교, 환산하였다.

### 결과 및 고찰

시판되고 있는 우유중 유청에 존재하는  $\alpha$ -lactalbumin의 농도를 알아보기 위해 HPLC에 의해 분석한 결과는 Table 1과 같다.

가열처리하지 않은 원유의  $\alpha$ -lactalbumin의 함량은 1.20 mg/ml이었는데, 이 값은 Eigel 등<sup>(14)</sup>이 보고한 0.6~1.7 mg/ml의 범위였으며 Walstra와 Jenness<sup>(15)</sup>의 함량과 일치한다. 원유를 실험실 방법으로 63°C에서 30분간 열처리한 경우  $\alpha$ -lactalbumin의 함량은 1.17 mg/ml로 원유와 거의 차이가 없었으며 72°C에서 15초 처리한 경우는 1.13 mg/ml으로 약간 감소되었는데 저온 및 순간 살균법에 의한 열처리는 유청단백질이 크게 변성되지 않은 것으로 생각된다. 한편, 100°C에서 10분간 가열한 시료에서  $\alpha$ -lactalbumin은 검출되지 않았다.  $\alpha$ -lactalbumin은 고온에서 장시간 가열하면 모두 변성되거나 다른 유청단백질 또는 카제인과 복합체를 형성하기 때문인 것으로 보인다<sup>(16)</sup>.

살균처리된 후 시판되고 있는 우유의  $\alpha$ -lactalbumin 함량은 63°C에서 30분간 열처리한 경우(A)에는 1.02 mg/ml이었고 순간 열처리한 시료(B)에서는 1.00 mg/ml으로 두 시료 사이에는 차이가 별로 없었으나 원유와 실험실에서 동일하게 열처리한 우유에서보다 다소 낮았으며 Duranti 등<sup>(12,13)</sup>이 보고한 0.73~1.50 mg/ml 범위에 들었다. UHT로 살균처리한 우유의 경우, (C-J)회사마다 열처리 조건에 다소 차이가 있었으며  $\alpha$ -lactalbumin 함량은 0.23~0.68 mg/ml로 차이를 보였는데 이것은 회사들이 수집한 원유의 성분 또는 열처리 장치의 차이 등에서 기인하는 것으로 사료된다. Duranti 등<sup>(12,13)</sup>은 이와 유사한 제품의  $\alpha$ -lactalbumin 함량이 0.30~0.74 mg/ml이었다고 보고하였는 바, 본 실험의 결과와 큰 차이가 없었다.

6주간 보관할 수 있는 UHT 멸균유, 롱우유(c, d)의  $\alpha$ -lactalbumin 함량은 0.77~0.89 mg/ml로 UHT 살균유(C-J)에서 보다 더 높게 측정되었다. 이것은 측정치에

**Table 1. Concentration of  $\alpha$ -lactalbumin in different milk samples determined by HPLC<sup>1)</sup>**

Milks	$\alpha$ -lactalbumin content (mg/ml $\pm$ SD <sup>2)</sup> )
Raw (untreated)	1.20 $\pm$ 0.23
Laboratory-heated	
63°C, 30 min	1.17 $\pm$ 0.06
72°C, 15 sec	1.13 $\pm$ 0.06
100°C, 10 min	0.00 $\pm$ 0.00
Low pasteurized	
A(63°C, 30 min)	1.02 $\pm$ 0.17
B(72°C, 15 sec)	1.00 $\pm$ 0.16
UHT pasteurized	
(sell by date: 5~7 days)	
C(130°C above, 2 sec)	0.23 $\pm$ 0.16
D(130°C, 2~3 sec)	0.47 $\pm$ 0.18
E(132°C, 3 sec)	0.68 $\pm$ 0.14
F(135°C, 2 sec)	0.35 $\pm$ 0.15
G( " )	0.60 $\pm$ 0.06
H( " )	0.57 $\pm$ 0.06
I( " )	0.48 $\pm$ 0.19
J( " )	0.53 $\pm$ 0.11
UHT sterilized	
(long-life milk; sell by date: 6 weeks)	
c(140°C, 3 sec)	0.89 $\pm$ 0.17
d(140°C, 2~3 sec)	0.77 $\pm$ 0.16

<sup>1)</sup>Number of determinations = 5

<sup>2)</sup>SD: standard deviation

이상이 없는 것을 가정했을 때, 제조회사에서 제시한 표지(labeling)에 따르면 C 회사제품 C가 130°C 이상에서 2초간 살균처리되고 같은 회사제품 c가 140°C에서 3초간 멸균처리되었으며, D회사제품 D가 130°C에서 2~3초간 살균처리되고 같은 회사제품 d가 140°C에서 2~3초간 멸균처리되었으므로 전보<sup>(17,18)</sup>에서도 언급된 바와 같이 해당회사에서 수행한 UHT 살균과 멸균유의 열처리 공정의 차이에서 기인되는 것으로 사료된다<sup>(19,20)</sup>. 즉, UHT 살균처리는 80°C 이상에서 130°C (140°C) 사이, 그 이후 냉각과정까지 오랜시간이 소요되는 간접식으로 그리고 UHT 멸균처리는 시간이 적게 걸리는 직접식으로 이루어지는 경우에 간접식 방법으로 열처리된 UHT 살균유가 열 부담이 더 커서 5-hydroxymethylfurfural과 lactulose의 함량들이 더 많이 측정되어 유사한 경향을 보인 것으로 추정된다.

UHT 멸균유(롱우유)는 실온에서 6주간 보관하여도 품질의 변화가 없어야 하는데, 저장 또는 유통중에 야기되는 노후화(age-thickening) 또는 겔화(gelation)현상은 우유성분의 이화학적 변화 또는 내열성 효소들에 의한 생화학적 요인에 의한다고 보고되었으므로<sup>(21,22)</sup> 이의 방지에는 호냉성 세균 및 효소의 파괴에 유효, 적절한 열처리가 권장된다.

본 실험의 결과, 우유중의  $\alpha$ -lactalbumin 함량의 측정

에 HPLC를 이용할 경우 면역전기영동법, ELISA법, Kjeldahl법 등보다 훨씬 신속하고(소요시간; 약 2시간) 정확한 결과를 얻을 수 있는 장점이 있으므로 낙농식품의 열처리 조절이나 품질관리에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

HPLC에 의한 원유의  $\alpha$ -lactalbumin 농도는 열처리하지 않은 경우, 63°C에서 30분 살균한 경우, 72°C에서 15초 살균한 경우, 100°C에서 10분간 가열한 경우 각각 1.20, 1.17, 1.13, 0.00 mg/ml이었다.

한편, 시판우유 중의  $\alpha$ -lactalbumin 농도 범위는 살균유, UHT 처리유, 멸균유에 있어서 각각 1.00~1.02, 0.23~0.68, 0.77~0.89 mg/ml이었다. UHT 멸균유(콩우유)의  $\alpha$ -lactalbumin 함량이 UHT 살균유보다 더 낮을 것으로 예상되었으나 오히려 더 높게 나타났는데, 이는 유가공 회사에서 수행한 열처리 조건의 차이에서 기인하는 것으로 추정된다. 이 차이는 우유공장에서 다른 열처리 시스템 즉, 간접식 UHT 살균처리법이 직접식 UHT 가공처리법보다 열처리 강도가 더 크기 때문에 야기될 수 있을 것이다. 본 실험결과 HPLC를 이용하여 우유중의  $\alpha$ -lactalbumin을 열처리의 지표물질로써 신속, 정확하게 정량할 수 있을 것으로 사료되었다.

## 문 헌

1. Marshall, K.R.: Industrial isolation of milk proteins-whey proteins; In *Developments in dairy chemistry-1*. Fox, P.F. (ed.), Applied Science Publishers, London and New York, p. 339(1983)
2. Dybing, S.T. and Smith, D.E.: Relation of chemistry and processing procedures to whey protein functionality-A review. *Cultured Dairy Products J.*, February, 4(1991)
3. Rüegg, M., Moor, U. and Blanc, B.: A calorimetric study of the thermal determination of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. *J. Dairy Sci.*, 44, 509 (1977)
4. Itoh, T. Wada, Y. and Nakanishi, T.: Differential thermal analysis of milk proteins. *Agr. Biol. Chem.*, 40, 1083(1976)
5. Manji, B. and Kakuda, Y.: Determination of whey protein denaturation in heat-processed milks-comparison of three methods. *J. Dairy Sci.*, 70, 1355(1987)
6. Dalgeleish, D.G.: Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk. *J. Agr. Food*

*Chem.*, 38, 1995(1990)

7. Gupta, B.B.: Determination of native and denatured milk proteins by high-performance size exclusion chromatography. *J. Chrom.*, 282, 463(1983)
8. Kneifel, W. and Ulberth, F.: Zur Methodik der Hitze-kassifizierung von Magermilchpulver unter Beruecksichtigung der HPLC-Analyse. *Milchwiss.*, 40, 265 (1985)
9. Van den Bendem, J.W. and Leenheer, J.: Heat treatment classification of low heat and extra low heat skim milk powder by HPLC. *Neth. Milk Dairy J.*, 42, 345(1988)
10. De Vilder, J., van Renterghem, R. and Moermans, R.: Determinating the heat class of milk powder by means of HPLC. *Belgian J. Food Chem. Biotechnol.*, 43, 1(1988)
11. Parris, N. and Baginski, M.A.: A rapid method for the determination of whey protein denaturation. *J. Dairy Sci.*, 74, 58(1991)
12. Duranti, M., Pagani, S., Iametti, S. and Carpen, A.: Heat-induced changes of milk proteins-rocket immunoelectrophoretic detection of  $\alpha$ -lactalbumin. *Milchwiss.*, 44, 142(1989)
13. Duranti, M., Carpen, A., Iametti, S. and Pagani, S.:  $\alpha$ -lactalbumin detection in heat-treated milks by competitive ELISA. *Milchwiss.*, 46, 230(1991)
14. Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, Jr. H.M., Harwalkar, V.R., Jenness, R. and Whitney, R. Mcl.: Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth Revision. *J. Dairy Sci.*, 67, 1599(1984)
15. Walstra, P. and Jenness, R.: *Dairy chemistry and physics*. Wiley-Interscience Publ., p.162(1984)
16. Brown, R.J.: Milk coagulation and protein denaturation-In *Fundamentals of Dairy Chemistry*. Wong, N.P. (ed.), Van Nostrand Reinhold Co. New York, p.582 (1988)
17. 박영희, 홍윤호 : 국내 시판 우유중의 HMF(5-Hydroxymethylfurfural) 함량. *한국낙농학회지*, 11, 265(1989)
18. 박영희, 홍윤호 : 시판 우유중의 Lactulose 함량. *한국영양식량학회지*, 19, 330(1990)
19. 장성중 : 한국의 우유처리 온도와 시간의 실태조사. *유가공연구*, 6, 131(1989)
20. Jelen, P.: Experience with direct and indirect UHT processing of milk-A Canadian viewpoint. *J. Food Protect.*, 45, 878(1982)
21. 홍윤호 : 초고온 멸균유의 이화학적 변화와 문제점. *유가공연구*, 2, 73(1983)
22. Burton, H.: Ultra high temperature processing of milk and milk products. Elsevier Applied Sci., London and New York, p.272(1988)

(1992년 3월 30일 접수)