

## 산에 의한 응고화에 영향을 미치는 인자들과 형성된 응고물의 물리학적 특징

배혁진 · 김병용 · 김명환\*

경희대학교 식품가공학과, \*단국대학교 식품공학과

**초록 :** 우유 단백질이 산에 의해 일어나는 응고의 시점과 응고가 일어나는 속도를 점도 변화와 혼탁도 변화로서 각각 측정하였고, 산성화의 변화에 따라 나타나는 입자의 크기는 상대점도로서 비교하였다. 우유 단백질의 응고화는 pH 5.0~5.2에서 일어났음을 급격한 점도 변화에서 알 수 있고 산성화시키는 온도에 따라서 그 정도가 변하였다. 산에 의해 응고가 시작되는 pH와 응고속도는 온도가 증가함에 따라서 또 예열 처리하였을 때 촉진되었고 염의 첨가시에는 감소한 반면, 상대 점도값은 같은 조건들 하에서 반대였다. 이는 산성화 온도를 증가할수록, 등전점의 pH에서, 또 우유를 예열했을 때 입자가 커지는 것을 나타내며, 생성되는 입자의 크기는 응고속도와 밀접한 관계가 있는 것을 알 수 있다(1992년 2월 6일 접수, 1992년 3월 4일 수리).

Casein의 산성화로 인한 응고 현상은 casein의 분리, 정제, 조제 과정에 있어서 매우 중요한 부분을 차지하며 배합 조제된 식품에 있어서 유화제, thickening 혹은 거품 안정제로서 이용되고 있다.<sup>1-3)</sup> 일반적으로 casein은 우유 단백질의 80%를 차지하고 있으며 casein micelle의 집합체로 존재하며 colloidal calcium phosphate(CCP)에 의해 matrix를 형성하고 있다. 각 micelle들은 calcium cross bridging과  $\kappa$ -casein의 coating에 의해 안정되어 있고, charge repulsion이나 수화에 의해 micelle 끼리의 결합체 형성은 방지되고 있다.<sup>4,5)</sup> 그러나 이와같은 micelle의 안정성은 산의 첨가에 의해 응고화(coagulation)라는 동적인 변화(dynamic process)를 겪게 된다. 즉, pH가 낮아짐에 따라 CCP의 micelle로부터 용해, 이온 강도의 증가, casein micelle의 구조 불안정, 수소 이온의 교환, micelle의 붕괴, coagulum이나 gel의 조직형성과 같은 일련의 과정이 나타난다.<sup>6-8)</sup> 이 결과 어느 한 가지의 속도변화(rate)도 다른 변화에 영향을 미치면 생성물의 물리적인 성질이나 수율 등에 변화를 일으킨다. 예를 들면 산성화를 시키는 속도에 따라 gel-like 구조나 coagulum 형태의 구조가 나타나며, 이러한 속도는 온도나 열 전처리와 같은 외부조건에 크게 영향을 받게 된다. 이와같이 산성화의 조건이나 열처리 등은 응고시의 kinetic에 영향을 미치며 결국 형성된 입자의 크기, 조직,

수율의 정도를 결정하게 되나 이에 대한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다.

본 연구에서는 우유 단백질의 coagulation을 야기시키거나 그 속도에 영향을 미치는 인자(pH, 온도, 열처리, 이온)의 효과를 연구하면서, 이러한 조건에 따라 형성된 coagulum의 입자에 따른 수율을 예측하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

본 연구에 사용된 신선한 우유는 매일 수원 농협에서 구입하였으며 acid precursor로서 0.1 N HCl를 사용하였고 열처리시(heat treatment)에는 우유를 90 °C에서 5분간 가열시킨 후 10 °C이하로 냉각시켜 사용하였다.

#### Viscosity measurement

0.1 N HCl를 사용하여 여러 pH 범위(4.2~5.4)로 산성화시킨 우유(100 ml)의 apparent viscosity는 Brookfield rotational viscometer(Model : LVT)를 사용하여 1.256 sec<sup>-1</sup>의 전단 속도(shear rate)에서 측정하였다. 침전으로 인한 오차를 피하기 위해 점도계에 산성화시킨 우유를 설치 후 정확히 5분 후에 점도를 측정하였고 이렇게 측정된 우유의 점도변화를 일정 온도에서의 coagu-

lum 형성의 지표로 삼았다.

**Coagulation rate measurement**

우유단백질의 온도와 pH에 따른 coagulation rate 변화는 김 등<sup>9)</sup>의 방법으로 측정하였다. 즉 증류수로 우유를 1000배로 희석하여 cuvette에 3 ml를 취하고, 0.1 N HCl 용액 0.1~0.9 μl를 첨가하여 여러 pH 범위에서 산성화시켰다. 400 nm에서 turbidity의 변화를 pH의 함수로써 기록하였으며 일정 시간에서의 turbidity의 변화로부터 coagulation rate를 얻었다. Coagulation rate에 대한 염효과를 측정하기 위해 200 ml 비이커에 여러 농도(5~20 mM)의 염용액을 첨가하여 증류수를 이용하여 1000배로 희석시킨 후 위와 같은 방법으로 coagulation rate를 측정하였다.

**Relative viscosity measurement**

산성화에 의해 생성된 입자의 크기는 Cannon-fenske viscometer(100)를 사용하여 측정하였다.<sup>10)</sup> 즉 증류수를 이용하여 200배로 희석한 우유를 0.1 N HCl를 이용하여 일정한 pH(4.2~4.8)로 산성화시킨 후 온도를 20~50℃

로 증가시켜 10분 후 상대점도를 측정하였으며, 이 우유의 상대점도 값으로 입자크기를 상대 비교하였다.

$$\eta_r = \eta_s / \eta_0$$

$\eta_0$  : 희석된 우유의 점도,  $\eta_s$  : 산성화 후의 우유의 점도,  $\eta_r$  : 상대점도

또한, preheating(90℃에서 5분)에 따라서, 또 여러 CaCl<sub>2</sub>의 농도에 의하여(5~20 mM) 변하는 상대점도를 비교하였으며, Coulter counter를 사용하여 실제적으로 형성된 입자의 분포 및 평균 size를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**산성화 후 우유의 온도와 pH에 따른 apparent viscosity 변화**

일정한 온도 범위에서(20~50℃) 산성화된 우유의 pH 변화에 따른 apparent viscosity의 변화는 Fig. 1에 나타나 있다. 20℃에서 산성화시킨 우유의 점도는 pH 5.0에서 최대치(6 mPa·sec)를 나타내었고 계속적으로 pH를 떨어뜨림에 따라 최대치에서 점차적으로 점도의 감소가 일어났다. 온도를 상승시켜 산성화시켰을 때에는 전반적인 점도의 증가를 가져왔으나 최대 점도를 나타내는 pH에는 변함이 없었다. 즉, 40℃와 50℃에서 산성화시킨 우유의 점도는 pH 5.0에서 각각 최대치(6.6과 9.1 mPa·sec)를 나타내었고, 그 이후의 pH에서 산성화된 우유의 점도 변화는 20℃와 마찬가지로, pH가 더욱 낮아짐에 따라 최대치에서부터 점차 점도의 감소가 일어났다. 일반적으로 pH 감소에 의해서 CCP가 용해되고 casein micelle이 붕괴되며 coagulation이 일어난다.<sup>6-8)</sup> 이러한 casein들의 aggregation에 의해서 산성화시킨 우유의 점도 증가가 급격히 일어나는 것으로 여겨진다. 또한 entanglement를 거친 casein들의 상호간의 electrostatic 결합에 의해서 재배열에 의한 새로운 조직을 형성하기 때문에 hydrodynamic volume이 감소하게 되며 최대의 점도를 나타낸 후에 점도가 점차 감소하는 것으로 추정된다.<sup>11)</sup>

Scanning electron microscopy를 이용하여 casein micelle의 변화를 연구한 Heertje 등<sup>6)</sup>에 따르면 30℃에서 산성화시켰을 때 casein micelle은 pH 6.0~5.5까지는 안정성을 유지하며, pH 5.2에서 안정성을 상실하게 되지만 여전히 균일한 입자 분포를 보인다고 보고하였으며, 또한 pH 5.2~5.0에서는 이들 casein micelles들의 응고화가 일어나고, pH 5.0~4.8에서는 응고된 caseins들이 재배열을 일으킨다고 보고하였다. 이처럼 electron microscope로 관찰한 casein micelle의 구조변화는 pH 5.2~

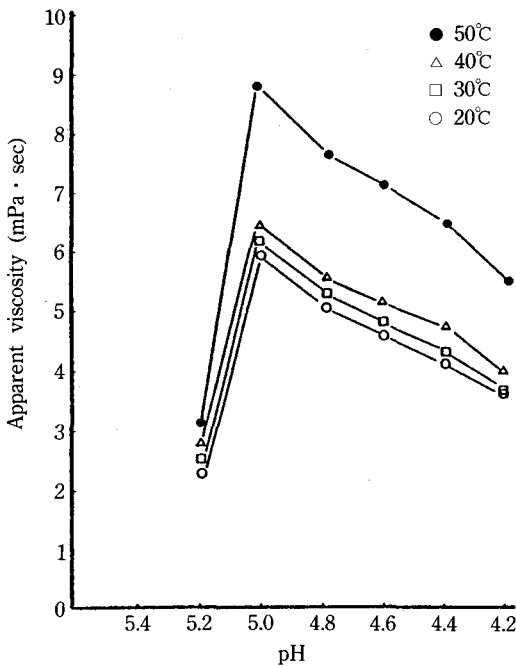


Fig. 1. Effect of temperature upon the apparent viscosity of milk at various pH values. Viscosity was measured using a Brookfield viscometer at 1.256 sec<sup>-1</sup> shear rate.

5.0에서의 급격한 점도 증가와 pH 5.0~4.8에서의 점도의 감소 등과 같은 입자에 의한 점도 변화와도 일치함을 보여주었다. 또한 온도 상승에 따라서 hydrophobic interaction이 증가되어 casein의 aggregation을 촉진시킴으로써 온도 상승에 따라 전체적인 점도의 증가가 일어나는 것으로 여겨진다.

응고화의 속도에 대한 온도, 예열처리 및 염의 영향

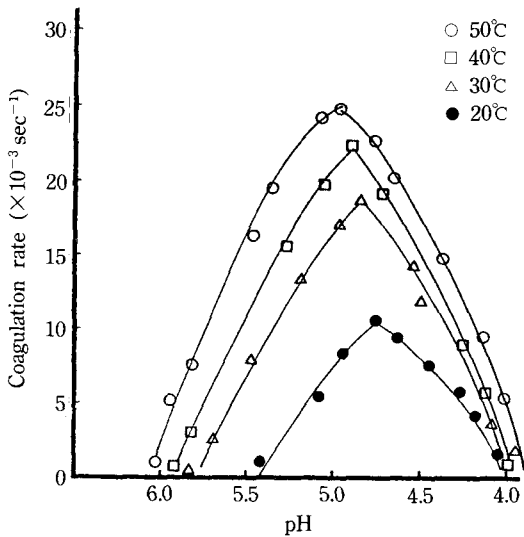


Fig. 2. The relationship between temperature and pH on coagulation rates of acidified milk protein.

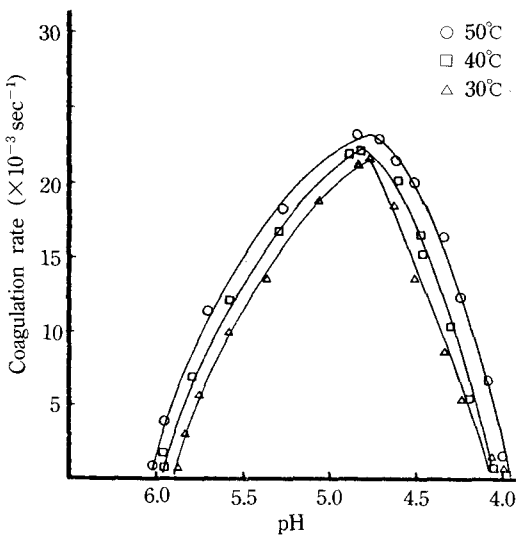


Fig. 3. Effect of preheating treatment(90 °C/5 min) upon coagulation rate of milk protein.

일정한 온도 범위에서(20 °C~50 °C) pH 변화에 따라 예열 처리하지 않은 우유 단백질의 응고속도의 변화는 Fig. 2에 나타나 있다. 일반적으로 온도가 상승함에 따라 최대 coagulation rate는 크게 증가하였고 응고가 시작되는 pH도 온도가 증가함에 따라 높아졌다. 즉 20에서 50 °C로 온도가 증가하였을 때 최대 응고속도는  $10.6 \times 10^{-3}$ 에서  $25.0 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 로 증가하였으며, 응고가 시작되는 pH도 5.5에서 5.9로 나타났다. 이와같이 온도가 상승함에

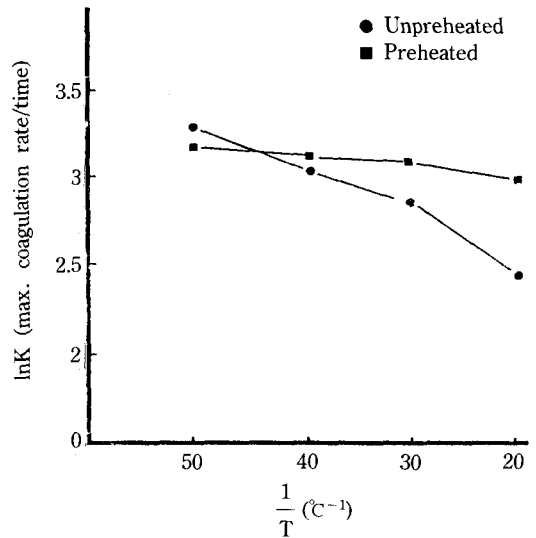


Fig. 4. Temperature dependence on the maximum coagulation rate of the unheated and preheated milk.

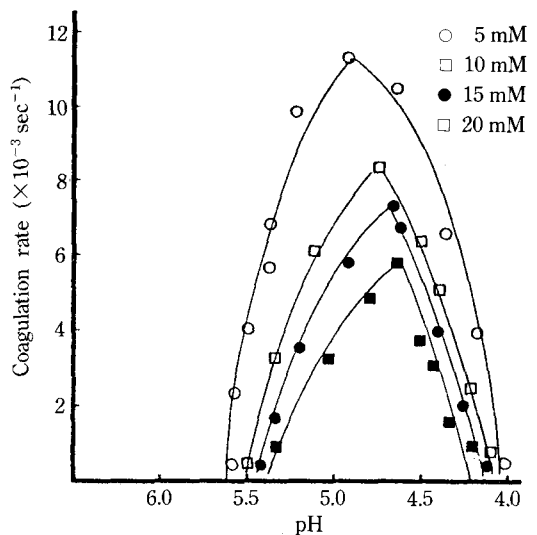


Fig. 5. Effect of salt(CaCl<sub>2</sub>) concentration on the coagulation rate of milk protein at various pH values.

따라 응고속도의 증가는 hydrophobicity의 증가에 따른 casein micelle들의 접촉의 증가때문으로 여겨진다.<sup>12)</sup>

90 °C에서 5분간 예열시킨 후 산성화시 우유의 coagulation rate 변화의 결과는 Fig. 3과 같다. 90 °C로 예열한 우유의 최대 응고속도는 각각  $22 \times 10^{-3}$ 에서  $26 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 로서 각각의 온도(30~50 °C)에서 최대 응고속도는 유의차를 나타내지 않았으며( $p < 0.05$ ) 응고가 시작되는 pH도 거의 변화가 없었다. 일반적으로 우유를 가열하면  $\kappa$ -casein과  $\beta$ -lactoglobulin간의 상호 결합이 형성되어 casein 표면에 hydrophobicity가 증가되어 casein의 응고화를 방해하는 hydration barrier가 낮아지게 되며 casein micelles간의 상호 작용이 촉진되는 것으로 알려져

있다.<sup>4,6,8)</sup> 예열한 우유와 예열하지 않은 우유의 최대 응고속도를 Arrhenium plot에 적용하여 최대 응고 속도에 대한 온도 효과를 살펴 보았을 때 우유보다 예열 처리 않은 우유에 필요한 에너지가 더 많이 필요하다는 것이 나타났다(Fig. 4).

첨가한 염용액이 우유단백질의 응고속도에 미치는 영향을 살펴보았을 때  $\text{CaCl}_2$  용액의 농도를 증가시키에 따라 최대 응고속도는 감소함을 나타내었다(Fig. 5). 이는  $\text{CaCl}_2$  농도를 증가시키에 따라서  $\text{Ca}^{++}$  이온들이 casein의 음전하를 띤 원자들과 결합하여 casein micelles간의 repulsive force를 증가시켜 응고 과정을 억제 하기 때문인 것으로 생각된다.<sup>13)</sup> 그러나 이와같은  $\text{Ca}^{++}$  이온의 응고속도에 대한 효과는 D-glucon- $\delta$ -lactone을 첨가하여 일어나는 우유 단백질의 gelation 현상에서의 역할과는 반대되는 것을 보여주며<sup>14)</sup> 이에 대한 연구가 더 필요한 실정이다.

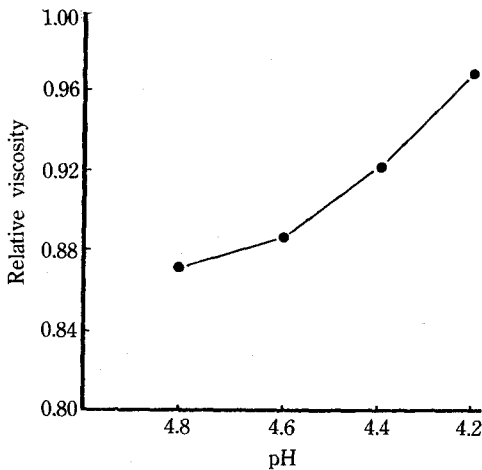


Fig. 6. Effect of pH on the relative viscosity of milk acidified at 40 °C.

#### 상대점도에 대한 온도, 예열처리 및 염의 영향

여러 pH에서 산성화시킨 우유에서 형성된 입자의 크기를 상대점도로서 측정하여 비교한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 일정한 온도(40 °C)에서 산성화시킨 우유의 pH가 4.8에서 4.2로 낮아졌을 때 상대점도 값은 0.87에서 0.96으로의 증가를 나타내었다. 즉, pH 4.8~4.6에서 가장 큰 입자를 형성하였으며 pH가 더욱 더 낮아짐에 따라 형성되는 입자가 작아지는 것을 알 수 있다. 산성화시킨 우유의 입자 크기는 단백질 분자의 net charge에 의해서

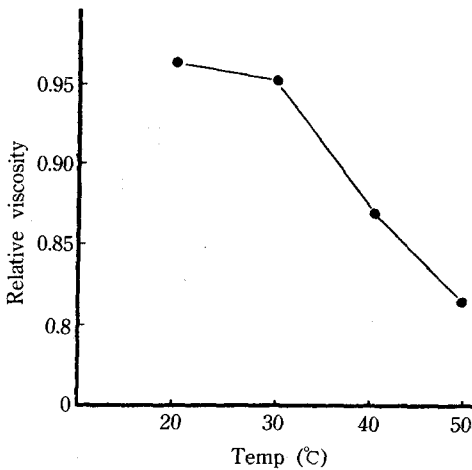


Fig. 7. Effect of temperature upon the relative viscosity of milk acidified at pH of 4.8.

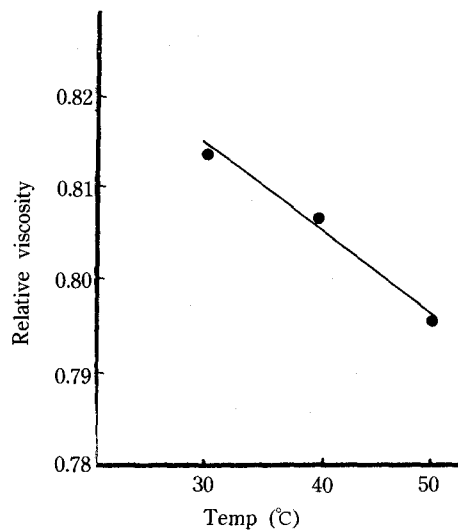


Fig. 8. Effect of preheating treatment upon relative viscosity of milk acidified at pH of 4.8.

영향을 받으며 전기적인 반발력이 최저인 pH(등전점)에서 큰 입자를 형성하게 된다. 이 범위에서는 산성화된 우유 입자들 사이의 응고력이 최대가 되는 pH 범위이며 casein들 사이에 적용하는 zeta potential이 최소가 되는 pH 범위가 된다.<sup>6,15)</sup>

일정한 pH 4.8에서 상대 점도에 대한 온도의 효과를 Fig. 7에 나타내었다. 30℃까지는 상대점도의 값이 거의 변화가 없었으나(0.95~0.96), 40℃와 50℃에서는 그 값이 각각 0.87과 0.81로써 20℃와 30℃에 비해 크게 감소함을 나타내었다. 이로써 20에서 50℃로의 온도 상승에 따라 응고 현상이 촉진되고 평균입자가 더 커지는 것으로 알 수 있다.<sup>7,16)</sup> 즉, 산성화시킨 우유의 입자 크기는 등전점 가까이에서 또한 온도를 상승시킴에 따라 최대가 되는 것을 알 수 있다. 우유를 90℃에서 5분간 예열시키고 냉각 후 산성화시키는 온도에 따라 변하는 상대점도를 측정 한 결과는 Fig. 8에 나타내었다. 예열 처리한 우유의 상대점도값은 30, 40, 50℃에서 각각

0.813, 0.8067, 0.798을 나타냈고 예열 처리 하지않은 우유와 비교시(Fig. 7), 예열 처리에 의해서 우유의 입자 크기가 더 커지는 것을 알 수 있다. Coulter counter를 사용하여 실제 형성된 우유의 입자 크기를 측정 한 결과 (Fig. 9와 10) 예열 처리 하지않은 우유와 예열 처리한 우유의 평균 입자 크기는 각각 1.75 μm와 2.45 μm로써 예열 처리한 우유의 입자가 더 큰 것을 알 수 있다.

일정한 온도(40℃)와 pH(4.8)에서 첨가한 CaCl<sub>2</sub>의 염 농도가 우유단백질의 상대 점도에 미치는 영향을 살펴 보았을 때(Fig. 11), CaCl<sub>2</sub> 농도를 5에서 20 mM로 증가 시킴에 따라서 입자가 작아짐을 보여 주었으며 일반적으로 생성된 입자의 크기는 산성화시키는 응고 속도와 긴밀한 관계가 있는 것으로 나타났다.

### 감사의 말

이 연구는 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의

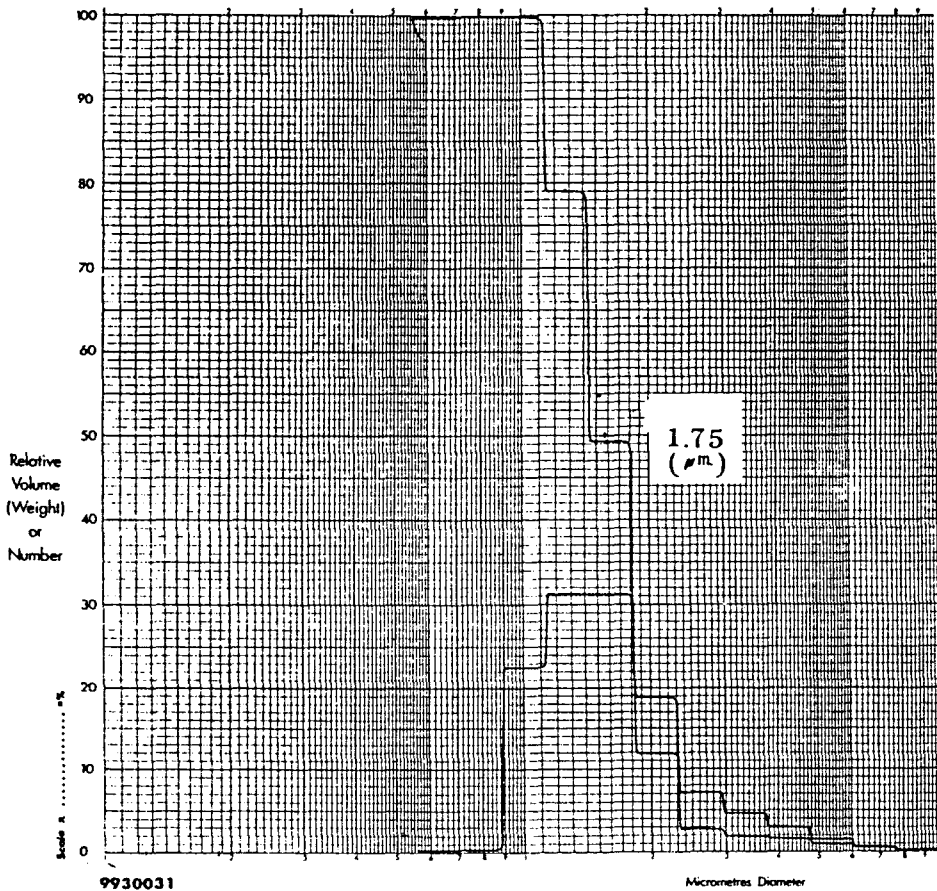


Fig. 9. Particle size distribution of unheated milk acidified at pH of 4.8.

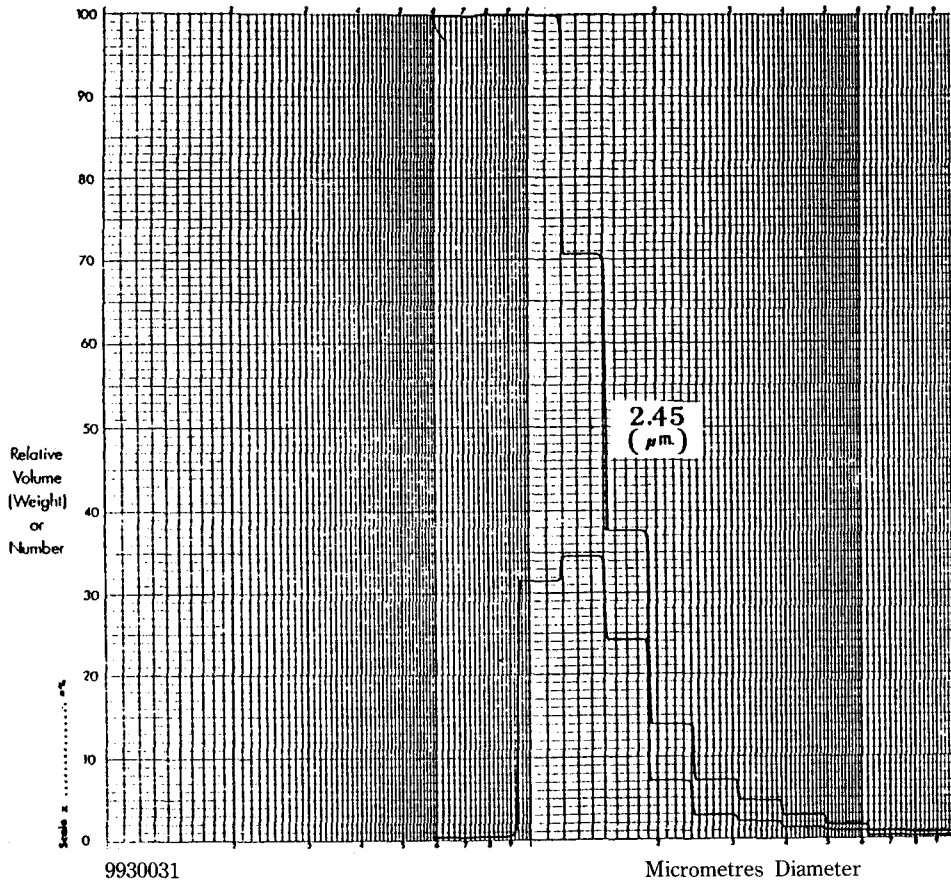


Fig. 10. Particle size distribution of preheated milk acidified at pH of 4.8.

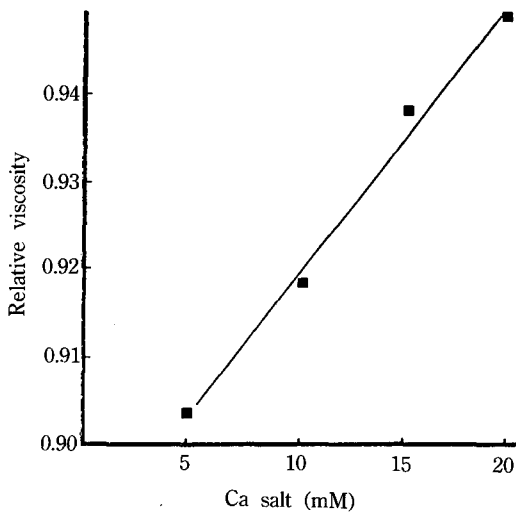


Fig. 11. Effect of salt(CaCl<sub>2</sub>) concentration on the relative viscosity of milk acidified at pH of 4.8.

자유공모제 학술연구조성비에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Muller, L.L. : Manufacture of casein, caseinates and co-precipitates, in Developments in dairy chemistry-1. Edited by Fox, P.F., Applied Science Publishers, England, p. 315(1982)
2. Little, L. : J. Dairy Science, 50 : 434(1967)
3. Lillford, P.J. : Texturization of proteins in Functional properties of food macromolecules. Edited by Mitchell, J.R. and Ledward, D.A., Elsevier Applied Sci. Publ., N.Y., p. 36(1986)
4. Walstra, P. and Jenness, R. : Dairy chemistry and physics, John Wiley and Sons., p. 279(1984)
5. Schmidt, R.M. and Morris, H.A. : J. Food Tech., 38 : 85(1984)

6. Heertje, I., Visser, J. and Smits, P. : Structure formation in acid milk gels. *Food Microstructure*, 4 : 267(1985)
7. Jablonka, M.A. and Munro, P.A. : *J. Dairy Research*, 52 : 419(1985)
8. Roefs, S.P.F.M., Walstra, P., Dalgleish, D.G. and Horne, D.S. : *Neth. Milk Dairy J.* 39 : 119(1985)
9. 김병용, 김명환, Kinsella, J.E. : *한국식품과학회지*, 24 : 2(1992)
10. Chang, R. : *Physical chemistry with applications to biological systems* Macmillan Pub. Co., p. 592 (1981)
11. Hayes, J.F., Southby, P.M. and Muller, L.L. : *J. Dairy Research*, 35 : 31(1968)
12. Dalgleish, D.G. : *J. Dairy Research*, 50 : 331(1983)
13. Bringe, N.A. : Ph. D. Thesis, Cornell University, Ithaca, N.Y., (1988)
14. Kim, B.Y. and Kinsella, J.E. : *J. Food Science*, 54 : 894(1989)
15. Chan, M.Y.Y., Bell, D.J. and Dunhill, P. : *Biotech. and Bioeng.*, 24 : 1897(1982)
16. Dalgleish, D.G. and Paquin, P. : *J. Dairy Research*, 54 : 39(1987)

---

**The rate and extent of acid induced coagulation of milk protein and physical characteristics of resultant coagulum.**

Hyuk-Jin Bae, Byung-Yong Kim and Myung-Hwan Kim\*(Department of Food Processing, Kyung-Hee University, Kyungki-do 449-701, Korea, \*Department of Food Engineering, Dan Kook University, Seoul 140-714, Korea)

**Abstract :** Viscosity changes of acidified milk at the various pH ranges(5.2~4.2) was measured as a function of temperature. The rate and extent of acid-induced coagulation of milk protein were monitored by turbidity changes as a function of temperature, preheating and salt. Relative viscosities of acidified milk were also measured. The coagulation of casein occurred in a specific pH range and was accompanied by a sharp increase in viscosity at pH of 5.0~5.2, depending on the heating temperatures. Onset pH of coagulation and maximum coagulation rate were enhanced by increasing temperatures and preheating process and reduced by addition of salt. Relative viscosity of acidified milk was reversed at the same conditions, reflecting the size of casein coagulum formed was related to the coagulation rate.