



## 치즈 부산물인 유청과 유청 제품에 감염된 박테리오파지 제거를 위해 새롭게 개발된 기술: 총설

\*김동현<sup>1</sup> · \*천정환<sup>1</sup> · \*김현숙<sup>2</sup> · \*김홍석<sup>1</sup> · 송광영<sup>1\*</sup> · 황대근<sup>1</sup> · 임진혁<sup>1</sup> · 강일병<sup>1</sup> · 이수경<sup>1</sup> · \*서건호<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>건국대학교 수의과대학 및 KU 식품안전연구소, <sup>2</sup>건국대학교 수의과대학 수의생리학전공

### New Technologies for the Removal of Bacteriophages Contaminating Whey and Whey Products as Cheese by-Products: A Review

\*Dong-Hyeon Kim<sup>1</sup>, \*Jung-Whan Chon<sup>1</sup>, \*Hyun-Sook Kim<sup>2</sup>, \*Hong-Seok Kim<sup>1</sup>, Kwang-Young Song<sup>1\*</sup>,  
Dae-Geun Hwang<sup>1</sup>, Jin-Hyuk Yim<sup>1</sup>, Il-Byung Kang<sup>1</sup>, Soo-Kyung Lee<sup>1</sup> and \*Kun-Ho Seo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>KU Center for Food Safety and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

#### Abstract

In general, whey obtained from various cheese batches is being reused, so as to improve the texture and to increase the yield and the nutrient value of the various final milk-based products. In fact, re-usage of whey proteins, including whey cream, is a common and routine procedure. Unfortunately, most bacteriophages can survive heat treatments such as pasteurization. Hence, there is a high risk of an increase in the bacteriophage population during the cheese-making process. Whey samples contaminated with bacteriophages can cause serious problems in the cheese industry. In particular, the process of whey separation frequently leads to aerosol-borne bacteriophages and thus to a contaminated environment in the dairy production plant. In addition, whey proteins and whey cream reused in a cheese matrix can be infected by bacteriophages with thermal resistance. Therefore, to completely abolish the various risks of fermentation failure during re-usage of whey, a whey treatment that effectively decreases the bacteriophage population is urgently needed and indispensable. Hence, the purpose of this review is to introduce various newly developed methods and state-of-the-art technologies for removing bacteriophages from contaminated whey and whey products.

Keywords: cheese, whey, bacteriophage, thermal treatment, UV light, membrane filtration

#### 서 론

박테리오파지가 일으키는 발효 실패를 최소화시키기 위한 목적으로 유청은 여러 가지 방법을 도입해왔다(Marco *et al.*, 2012). 정해진 온도/시간 결합법 열처리하는 우유, 유청, 유청

제품 내에 존재하는 내열성 파지를 불활성시키기 위해 사용되어왔다(Atamer and Hinrichs, 2010). 오늘날 치즈의 영양가를 높이고 치즈 생산의 경제적 효율을 위해 유청 성분(예; 미립자 형태의 유청 단백질, 유청크림)은 치즈 제조과정 중에 재활용되며, 또한 치즈우유와 혼합시킨다(Hinrichs, 2001). 그러나 자연산 유청을 발효유 제품의 재료로 재사용할 경우, 아직까지 제품이 파지에 의해 감염될 위험이 있으므로 유청을 재활용하거나, 유청 분말을 요구르트, 신선한 치즈와 같은 발효 제품으로 사용할 경우에는 파지의 제거가

\* These authors contributed equally to this study.

\* Corresponding author: Kwang-Young Song, KU Center for Food Safety and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: +82-2-450-4121, Fax: +82-2-3436-4128, E-mail: drkysong@gmail.com

중요하다(Tamime and Robinson, 1999). 발효과정 중에 발생하는 문제점은 예측이 불가능하기 때문에 유제품의 생산 과정은 불안정하다. 혼합균주 starter culture와 culture rotation regime을 사용하면 발효배치의 전체과정이 실패하는 상황은 발생하지 않지만 생산지연과 제품품질의 변화가 종종 일어날 수 있다(Atamer *et al.*, 2013). 또한 파지에 의해 감염된 보충물을 사용하면 부피가 20,000~50,000 L의 배치를 포함하고 있는 발효조는 심각한 피해를 입을 수 있다(Kleppen *et al.*, 2011). 유청과 유청 제품 내에 존재하는 파지를 제거하기 위해서는 내열성 파지의 완전한 불활성화와 자연산 유청 단백질의 보존은 앞으로 해결해야 될 과제이다. 또한 최근 한국과 미국, 유럽 등과의 FTA 체결로 낙농선진국에서 수입되는 다양한 유청 제품들의 안전성에 관심도 함께 높아지고 있는 것이 사실이다. 따라서 현재의 낙농제품인 유청에서의 박테리아 파지에 대한 현황과 새롭게 개발된 박테리아 파지 제거에 대한 것들을 소개하는데 그 목적이 있다. 본 총설논문의 모든 자료들은 이미 발표된 다양한 문헌 등을 정리하여 서술하였다.

## 유제품 파지의 내열성

*Lactococcus lactis* 파지는 내열성이 뛰어나며, 이 파지의 역가(tiers)는 저온살균처리의 영향을 받지 않는다고 보고되어 있다(Capra *et al.*, 2013). 여러 현탁 배지(우유, 유청, 유청 제품)내에 존재하는 열에 민감한 *L. lactis* 파지와 내열성 파지(파지 680)에 열처리를 가했을 경우에 일어나는 불활성을 Fig. 1에 나타냈으며, microparticulation 공정, 유청 크림의 열처리, 우유의 고온단시간살균(HTST)에 대한 상대적인 온도/시간 영역 또한 방향을 나타내기 위해 Fig. 1에 나타냈다.

72°C 열처리로 우유 내에 존재하는 파지를 99% 감소시키기 위해서는 장시간(200~300분) 동안 열처리를 해야 한다(Marvig *et al.*, 2011). 여러 유산균이 72°C에서 열처리 되었을 경우에 2-log 감소에 대한 실험 자료는 Table 1에 요약되었다.

Lactococcal 파지는 저온 살균한 후, 분문 건조처리 후에도 검출될 수 있다. 9개월 동안 저장한 분유로부터 파지 역가의 감소는 발견되지 않았으며, 건조분말 기반 내에 존재하는 파지 수가 매우 안정적인 것으로 나타났다(Chopin, 1980). 우유 내에 파지 형성은 방지하는 예방효과가 이전에 보고된 적이 있다(Muller-Merbach *et al.*, 2005; Atamer *et al.*, 2013). *Leuconostoc* 파지에 대한 연구에서 우유 속에 부유하고 있는 실험파지 P808을 70°C에서 1분 동안 열처리 하였을 경우, 파지 역가(예: 1 log unit)가 약간 감소하였지만, 물

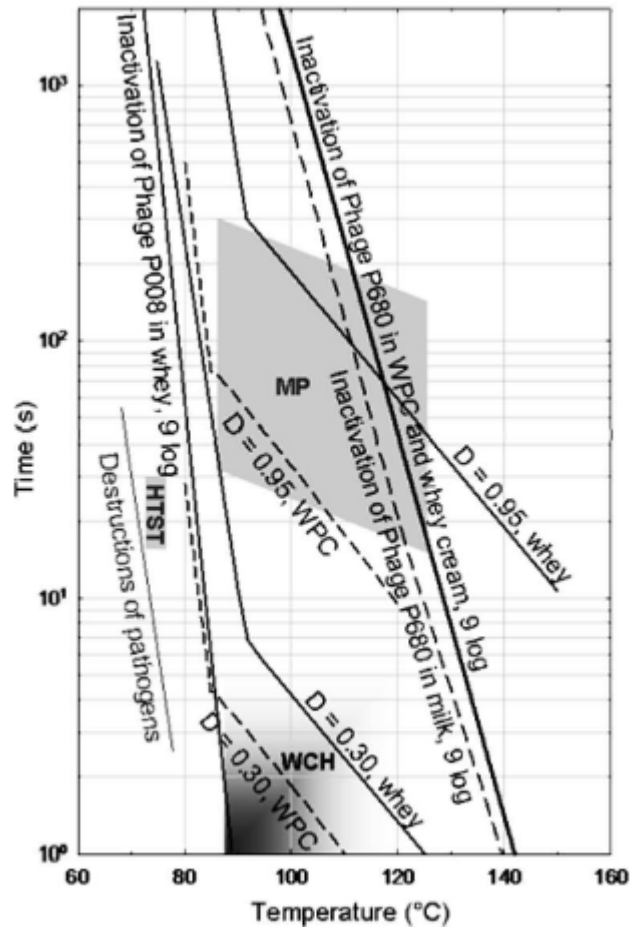


Fig. 1. Time-Temperature graph of heat treatment of whey protein concentrate with 5.3% protein and skim milk required or 9-log inactivation of *Lactococcus lactis* phages P680 (heat-resistant) and P008 (heat-sensitive) (Atamer and Hinrichs, 2010; Atamer *et al.*, 2013). Degree of  $\beta$ -lactoglobulin B denaturation (D), High temperature/short time pasteurization (HTST), Microparticulation process of whey proteins (MP), Whey cream heating (WCH), and Whey protein concentrate (WPC).

속에 떠 있는 파지를 똑 같은 조건에서 열처리 하였을 경우 높은 파지 역가(예: 4 log unit)가 감소하였다(Atamer *et al.*, 2011). 우유와 유청을 열처리한 후에 파지의 불활성화 정도를 비교한 결과로부터 유청 단백질, 농축물, 유청크림 내에 존재하는 lactococcal 파지의 불활성화 정도는 우유 내의 파지가 제거된 수치와 비슷했다(Atamer and Hinrichs, 2010). Fig. 1에 나타난 자료로부터 요구르트를 제조하기 위해 유청 분말을 첨가한 우유(예: 90~100°C에서 5분간) 또는 신선한 치즈(예: 85~95°C에서 3~5분간) 생산에 사용하는 열처리 조건은 유청 분말로부터 생성된 내열성 파지에게 사용할 경우, 완전히 비활성화 시킬 수 없는 것을 알 수 있다(Kessler,

Table 1. Profile of thermal-resistance of bacteriophages infecting various lactic acid bacteria

Reference	Host species	Phage	$t_{99}$ at 72°C (= 2·; D72°C) (min)*	Heating medium
Capra <i>et al.</i> (2004)	<i>Lactobacillus paracasei</i>	PL-1	~2	Reconstituted non-fat milk
Capra <i>et al.</i> (2004)	<i>Lactobacillus casei</i>	J-1	~2	Reconstituted non-fat milk
Ebrecht <i>et al.</i> (2010)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Cb1/204a	2.4	Reconstituted non-fat milk
Quiberoni <i>et al.</i> (2003)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ib3	2.9	Reconstituted non-fat milk
Müller-Merbach <i>et al.</i> (2005)	<i>Lactococcus lactis</i>	P008	8.4	Skim milk
Binetti and Reinheimer (2000)	<i>Streptococcus thermophilus</i>	0BJ	12	Reconstituted non-fat milk
Marvig <i>et al.</i> (2011)	<i>Lactococcus lactis</i>	P635	17	Skim milk
Suárez and Reinheimer (2002)	<i>Lactococcus lactis</i>	001	20	Reconstituted non-fat milk
Quiberoni <i>et al.</i> (1999)	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CNRZ 832-B1	21	Reconstituted non-fat milk
Atamer <i>et al.</i> (2011)	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	P793	259	Skim milk
Atamer <i>et al.</i> (2009)	<i>Lactococcus lactis</i>	P680	300	Skim milk

\* $t_{99}$ , time to achieve 99% inactivation (2-log reduction;  $t_{99} = 2 \cdot; D72^\circ\text{C}$ ).

2006). 중온성 및 호열성 스타터 컬처(mesophilic and thermophilic starter culture)는 종종 내열성 파지의 침해를 받기 때문에 이 조건은 이와 같은 종류의 starter culture 에 특히 문제가 된다(Capra *et al.*, 2013).

## 유청 재활용

중온성 및 호열성 starter culture 는 여러 종류의 치즈(예: 모짜렐라, 반경질 치즈, 경질 치즈)생산에 사용된다. 치즈로부터 그 종류에 따라 약 3~13 L/kg의 유청이 생성된다(Table 2). 신선한 치즈로부터 생성되는 유청의 pH는 4.6 이하("sour whey")이며, 이 유청에서 발견되는 유청 단백질 수치는 숙성된 치즈(보통 pH 6.3 이상)의 제조과정 중에 생성되는 "sweet whey"이 함유하고 있는 유청 단백질 수치보다 낮다(Walstra *et al.*, 2006). 단, 유청은 비교적 많은 유청 단백질을 함유하고 있기 때문에 다른 유청 제품으로 가공된다(Hinrichs, 2001). 주요한 치즈정제과정은 유청이 치즈 우유로 재활용되거나, 다른 제품으로 가공되기 전까지이다. 우선

필터와 디켄터(decanter)를 사용하여 생성된 가공하지 않은 유청으로부터 치즈가루를 제거한다. 그 다음 과정에서 유청과 크림을 분리하고, 마지막으로 제품을 열처리(후에 저장 및 유청 가공과정에 발생하는 산화 방지)하여 유청 내에 존재하는 유산균을 불활성시킨다(Atamer *et al.*, 2013).

유청은 흔히 파지에 의해 감염된다(Atamer *et al.*, 2011). 파지는 원유 공장에서 주로 발견되며, 또한 starter culture 내에서도 생성될 수 있다(Marco *et al.*, 2012). 내열성 파지가 널리 분포되어 있으며, 유제품 공장 내에 존재하는 파지의 한 종류라고 보여준 바가 있다(Atamer *et al.*, 2009). 유제품 공장에서 발견되는 파지는 주로 원유로부터 생성된다. 원유는  $10^4$  파지/mL까지 감염될 수 있으며(McIntyre *et al.*, 1991), 유청 내에 존재하는 파지의 수치는  $10^9$  pfu/mL까지 도달 할 수 있다(Atamer *et al.*, 2009, 2011). 이 수치는 유청을 농축시킨 후에 10배까지 증가하여 파지 역가가  $10^{10}$  pfu/mL까지 도달할 수 있으며, 따라서 농축물 내의 파지 제거를 더욱 힘들게 한다. 유청 단백질과 유청지방은 최종 생산물의 산출량을 증가시키거나 질감을 개선시키기는 목적으로 치즈

Table 2. Percentage of whey drained from different type of various cheese making (Atamer *et al.*, 2013)

Type	Liter milk for 1,000 g cheese (Liter)	Drained whey (Liter)	Drained whey (Percentage)
Fresh	4~5	3~4	75~80
Sour milk	5~6	4~5	80~83
Cheese	Soft	8~9	86~89
	Semi-hard	12~13	91~92
	Hard	13~14	92~93

가공 과정 중에 재활용될 수 있다(Kosikowski, 1979; Lawrence *et al.*, 1987, 1993; Hinrichs, 2001, Atamer *et al.*, 2013). 재활용과정에서는 추가적인 가공 전의 유청은 저장하기 위해 선택적 열처리를 한다. 그 후, 유청은 유청크림으로부터 분리되어 새로운 치즈우유 배지에 첨가되기 전에 다시 한 번 열처리한다. 유청 단백질을 치즈와 혼합시키기 위해서 무지방 유청은 한외여과(ultrafiltration)으로 10% 단백질 이상 농축되며, 그 후에 열처리와 전단가공으로 미립자 형태로 만들어진다(Atamer *et al.*, 2013).

### 유청 내 파지의 막분리

막분리법은 우유 가공에 수십 년간 사용되어 왔으며, 오늘날에는 정밀여과시스템이 널리 시행되고 있다. 우유 내의 현탁 입자와 미생물을 분리하기 위해서는 구멍 크기가 약 1  $\mu\text{m}$ 인 막이 사용되지만, 우유 단백질을 카세인과 유청 단백질로 분리하기 위해서는 구멍 크기가 0.05~0.2  $\mu\text{m}$ 의 막이 필요하다(Heino, 2009; Schmidt *et al.*, 2012). 최근 Piry 등 (2012)은 정밀여과를 사용하여 유청 단백질 농축물의 미생물적 품질을 향상시키는 연구를 진행하고 있다. 이 연구를 통해 무기물질과 미생물을 유청으로부터 분리하였을 경우, 막에 층(단백질 집합체, 식물성 미생물, 유청 내의 포자로부터 생성된)이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이 발견은 유청 단백질의 변성을 피하면서 막여과 기술을 사용하여 유청으로부터 유제품 내의 파지 분리 실험을 가능하도록 했다. 여과 기술을 연구하는 또 다른 이유는 심한 열처리, 고압처리, 자외선 조사법 등의 대체 기술은 단백질 활성을 회복 불가능한 상태로 만들기 때문이다(Atamer *et al.*, 2013).

일반적으로 한외여과는 유청 단백질을 농축시키는 목적으로 사용되며, 범위가 20~40 kDa의 cut-off value가 주로 사용된다(Heino, 2009). Lactococcal 파지에 대한 여과 효율성을 평가하기 위해서 여러 종류의 형태와 크기의 파지 종이 고려되어야 한다. 각각 다른 크기(지름 약 50~75 nm)의 장형 모양의 머리를 가진 대표적인 파지를 등축도법으로 나타낼 수 있다. (비수축성) 파지 꼬리와 평균 구조(꼬리 길이 120~450 nm)에 대한 형태와 크기의 비슷한 변화 또한 나타내었다. 파지입자의 크기는 주요 유청 단백질인  $\beta$ -lactoglobulin과  $\alpha$ -lactalbumin 단편의 크기(3~6 nm)보다 크지만, 우유 내의 카세인 마이셀(casein micelle)의 크기(약 50~300 nm)와는 비슷하다(Walstra *et al.*, 2006; Atamer *et al.*, 2013). 따라서 우유 단백질(카세인과 유청 단백질 단편 포함)뿐만 아니라, cut-off value가 20 kDa인 한외여과로 처리한 후에 남아있는 파지입자 또한 고려해야 된다(Mistry and Kosikowski, 1986). 따라서 이 농축물이 재활용될 경우,

파지가 치즈 우유 내로 따라 들어갈 위험이 있다(Atamer *et al.*, 2013).

정수처리 시설에서 한외여과(cut-off: 30 kDa, polysulfone 막)를 사용하여 물로부터 poliovirus 입자(직경 28~30 nm, 초기값:  $10^4/\text{mL}$ )를 완전히 분리시키는 것을 보여준 바가 있다(Madaeni *et al.*, 1995). 같은 연구에서 구멍크기가 0.2  $\mu\text{m}$ 인 정밀여과막을 사용했을 경우에는 poliovirus 입자를 완전히 분리시킬 수 없었다. 특히, 보존 효율은 유입 용액 내에 존재하는 생물량(*E. coli* 세포)에 의해 향상시킬 수 있다. Madaeni 등(1995)은 박테리아 생물량이 막 구멍을 막는다는 결론을 내렸다. 박테리아 표면에 흡착되어 있는 바이러스 입자의 불특정 흡착은 막 표면의 2차 층으로써 확실히 효과적인 여과 장벽을 형성한다.

박테리오파지  $\lambda$ 의 숙주인 *E. coli* 세포에 대한 연구를 통해 박테리아/파지 상호작용은 구멍 크기가 0.2  $\mu\text{m}$ 인 미세여과 막을 사용하여 바이러스 입자를 제거하는데 중요한 역할을 한다고 나타냈다(Madaeni and Khodadadi, 2004). 따라서 유입용액이 파지와 박테리아 숙주 세포를 모두 포함하고 있을 경우, 더 많은 바이러스를 보존할 수 있었다. 최적 보존을 위해서는 파지의 표면 전하와 막여과의 전하가 서로 반대되어야 하거나, 크기가 작아야 한다. 탈지 우유 내에 존재하는 여러 형태를 가진 lactococcal 파지의 보존 성질은 구멍크기가 0.1- $\mu\text{m}$ 인 막을 통해 분석되었으며, 높은 파지 보존율은 파지 역가와 상관없다고 나타났다(Gautier *et al.*, 1999). 집중된 파지의 낮은 수치(0.4~0.14%)만 여전히 카세인이 걸여된 우유의 여과된 액체에서 검출되었다.

### 유청 열처리 및 유청 내 파지 비활성화

유청크림과 유청 단백질 입자를 치즈우유로 재활용하기 전에 우선 열처리를 하여 물질 안에 남아있는 starter 박테리아와 오염물질을 불활성시킨다. 최근 낙농 공장에서는 열처리와 고 전단처리를 함께 사용하는 “microparticulation”을 도입하여 치즈 유청 내에 존재하는 유청 단백질을 치즈우유나 다른 우유제품으로 재활용 과정에 사용하였다(Atamer *et al.*, 2013). Table 3은 유청과 유청 제품을 열처리하기 위해 갖춰야 할 조건들을 요약하고 있다. ALPMA CreamoProt™, APV LeanCreme™, Tetra Therm MicroPart™ 등의 microparticulation 공정은 액체유청의 변환과 사용에 이용할 수 있으며, 이와 같은 공정은 protein-based food replacer인 Simplex® and Dairy-Lo™ 등의 제품을 생산이 가능해졌다(Atamer *et al.*, 2013). 유청크림 (지방 함유량 25~30%)은 치즈우유를 표준화하기 위해 치즈제조에 사용될 수 있으며, 사용되기 전에는 30분 동안의 열처리(93°C)가 필요하다(Scott *et al.*,

Table 3. Various applied temperature-time treatments for whey and whey products

Raw material	Temperature/ time combination	Reference	pH	Composition	
				Lactose (%)	Protein (%)
Whey	75~150°C / 10s to 150 min	Huss and Spiegel (2000)	5~7	4~5	0.5~2
Whey protein isolate	90~100°C / 50~100 s	Queguiner <i>et al.</i> (1992)	3.5~3.9	0.1	20
Whey protein concentrate	75~130°C / 10s to 150 min	Spiegel and Huss(2002)	3.5~6.7	1~20	5~20
Whey protein concentrate	80~120°C / 4~600 s	Paquin <i>et al.</i> (1993)	2.5~7	<0.2	4~5
Whey protein concentrate	75~90°C / 5~60 s	Asher <i>et al.</i> (1992)	6~6.5	4~5	4~5
Whey protein concentrate	70~120°C / 3s to 20 min	Fang and Snook (1991)	5.5~6.9	5~15	15~25
Whey protein concentrate	80~120°C / 3~300 s	Singer <i>et al.</i> (1988)	3.5~4.5	5	15~25

1998; Bylund, 2003). 따라서 유청에 시행되는 thermal inactivation curve는 microparticulation과 공정의 안정성을 평가하는데 있어서 유용하다. 치즈 제조과정에 재활용되는 유청의 열처리가 부적절하면 유제품과 유제품 공장 내에 파지가 생성될 수 있다. 유청을 재활용한 후에 발효실패의 가능성을 줄이기 위해서 파지의 수치는 9-log 감소시킬 수 있는 열처리가 필요하다. 따라서 유청과 유청 제품의 열처리에 대한 공정을 설계할 때에는 내열성 파지의 9-log 감소를 계산하여야 한다(Atamer and Hinrichs, 2010). 유청 내에 존재하는 2종류의 lactococcal 파지(열에 민감한 파지 P680 vs 내열성 파지 P008) 불활성화 동역학이 자세히 연구되었다(Atamer *et al.*, 2013). 실험으로부터 얻은 결과에 의하면 파지 P008의 9-log 감소는 70°C에서 열처리를 했을 경우 20분이 소요되었으며, 90°C에서 열처리를 하였을 경우 1초가 소요됐다(Atamer *et al.*, 2013). 반대로 P680의 9-log 감소는 100°C에서 열처리를 하였을 경우 20분이 소요되었으며, 140°C에서 열처리를 하였을 경우 2초가 소요됐다(Atamer *et al.*, 2013). 이와 같은 조건에서 열처리를 행하면 제품의 기능에 영향을 미칠 수 있기 때문에 사용하기에 부적합하다(Atamer *et al.*, 2012, 2013). 따라서 파지 제거를 위해서는 비열처리 방법이 필요하다.

### 유청 UV 처리법

미생물 불활성화에 사용되는 UV-C 조사법은 수면, 식수, 폐수 등의 샘플을 살균하기 위해 사용하는 처리법으로 열처리법의 대체 방법으로 제안되었다(Wang *et al.*, 2004; Schmidt and Kauling, 2007). 비전리 UV 방사법(non-ionizing UV radiation)을 사용하여 물에 존재하는 박테리오파지를 불활성화 시키는 실험을 했으며, 그 결과 UV light 750 Jm<sup>-2</sup>가 수돗물 내의 대부분 내열성 파지를 4-log 불활성화시키기 충분하였다(Sommer *et al.*, 2001). 탁한 액체 배지 내에 존재하는 바이러스와 박테리아를 불활성화 시키기 위해 코

일형 UV 조사 튜브 반응기가 설계되었다(Schmidt and Kauling, 2007). 자외선은 파지를 비활성화를 강력한 도구지만 탁한 용액을 관통할 수 없기 때문에, 자외선 조사법에는 한계가 있다. UV 기술이 매우 탁한 용액의 경우에도 이용 가능한 새로운 기술인 UVivatec® 공정이 개발되었다. 이 작동원리는 UVivatec 시스템에서 UV 램프는 튜브 중심에 고정되어 있기 때문에 flow가 UV 램프를 선형이 아닌 나선형 모양으로 코일형 채널(coiled channel)을 통과하는 새로운 flow guidance concept을 낳는다(Atamer *et al.*, 2013). 적용법에 관한 규정이 제정된다면 흔히 사용되는 열처리의 대안법으로 UV 기술은 미래의 유청 재활용에 있어서 박테리오파지 비활성에 잠재적인 응용 방법으로 간주되어지고 있다.

### 여러 처리법이 유청 제품 내의 파지 제거에 주는 결합된 영향

열처리는 유청 내의 파지를 비활성시키는 목적으로 유제품 생산 회사가 흔히 사용하는 처리법이다. 그러나 저온/장시간(LTLT) 살균법이나 고온/단시간(HTST) 살균법 조건으로 유제품 내에 존재하는 내열성 파지를 완전히 제거하는 것은 확신할 수 없다(Atamer *et al.*, 2013). 따라서 실용적인 이유에서 극단적인 조건에서 각각의 처리법을 사용하는 것보다 다른 파지 비활성화 방법과 결합시킨 처리법(예: 열처리와 비열처리를 결합시킨 응용)을 사용하는 것이 더 좋다. 막여과 공정을 사용해서 유청 내의 파지 수치를 감소시킬 수 있다. 유산균 숙주세포의 분리를 통해서 파지가 여과막에 증식하는 것을 방지할 수 있다. 유청 내의 박테리아 제거와 유청 내의 파지 역가의 감소(10<sup>3</sup> pfu/mL 수치까지)를 목표로 함으로써 제품에 가해지는 고온을 피하기 위해 필요한 열처리 조건을 감소시킬 수 있다(Bylund, 1995, 2003). 우유의 정밀여과 공정에서 구멍크기가 약 100 nm~1 µm인 막이 주로 사용된다. 구멍크기가 100 nm인 여과 공정은 유산과 몇몇 파지를 남겼다. 주요 유청 단백질(예: β-lactoglobulin

와  $\alpha$ -lactalbumin)은 크기가 더 작기 때문에 미세여과를 통과한다. 여러 비활성 방법을 결합한 연구가 최근에 진행되었는데, 한 가지를 소개하면 다음과 같다. 파지 비활성 모델(phage inactivation model)은 여과 전에 첨가제(예: EDTA, 인산염)를 넣거나, 파지 집합 형성을 막아주는 auxiliary mild heat treatment( $<70^{\circ}\text{C}$ )를 사용함으로써 expand할 수 있다 (Atamer *et al.*, 2010). 처리하기 어려운 lactococcal 파지의 경우 민감한 PCR 파지 검출 시스템을 사용하여 파지 축적을 알아볼 수 있다(Atamer *et al.*, 2009).

## 맺음말

치즈와 발효유의 생산 공정 최적화와 치즈로부터 생성된 유청의 재활용은 유제품 회사가 경제적인 성공을 하기 위한 중요한 요소이다. 유청은 여러 가지 자연산 유청 단백질 첨가제로 변형되거나, 직접 여러 유제품에 사용될 수 있다. 그러나 치즈 유청은 보통 재활용되기 전에 제거되어야 할 미생물을 함유하고 있다. 여러 처리법이 공정 중 파지를 제거하기 위해 사용된다. 열처리는 가장 흔히 사용되는 처리법이나 막분리와 UV 처리 등 비열처리 또한 대체 처리법으로 사용된다. 이와 같은 방법을 각각 따로 사용하기 보다는 결합해서 사용하는 것이 권유된다. 열에 민감한 유청 단백질로 인해 열 처리만은 제한이 있으므로 막분리 공정이 열 공정과 함께 유청 내 내열성 파지를 제거하는데 사용될 수 있을 것이다. 유청 및 유청 단백질 재활용으로 인한 발효과정 중 발생하는 문제를 없애거나 제거하는 것은 생산성과 경쟁성을 강화하기 위해서 중요하다. 따라서 앞으로의 연구는 유청 내의 파지를 분리하기 위한 여과 공정에 앞서 여러 파지를 감소시키는 방법을 통합해야 하는데 초점을 맞춰야 할 것이다.

## 요 약

치즈시장이 심각한 국제경쟁을 직면하게 되면서 최적화된 생산과정은 유제품회사가 성공하기 위해 더 중요해졌다. 치즈 배치로부터 생성되는 유청(whey)은 최종 생산품의 산출량 증가, 질감 개선, 영양가 증진을 하기 위한 목적으로 유제품 생산과정 중에 종종 재사용된다. 유청크림(whey cream)과 미립자 유청 단백질(particulated whey protein)은 흔하게 재활용된다. 그러나 이 물질들 내에 저온살균 처리 후에도 남아있는 대부분의 박테리오파지(bacteriophage)가 치즈 제조 과정 중에 들어가 높은 수치로 증식할 위험이 있다. 유청분리는 종종 aerosol-borne 파지를 생성하여 공장 생산과정을 오염시키기 때문에, 박테리오파지에 의한 유청오염은

치즈 생산과정에 문제를 일으킬 수 있으며, 또한 치즈주형으로 재사용되는 유청과 유청 단백질 내에는 내열성 파지(thermo-resistant phage)가 존재할 수 있다. 수분이 제거된 치즈로부터 생성된 유청의 경우, 파지에 의해  $10^9$ 파지/mL까지 감염될 수 있다. 유청배치를 농축시켰을 경우에는 파지 역가(phage titer)가 10배까지 증가하게 되는데, 이 수치까지 도달하게 되면 파지를 완전히 제거하는 것은 불가능해진다. 유청 재활용 과정 중에 발생하는 발효실패를 방지하기 위해서는 유청 내 존재하는 파지의 수를 감소시키는 처리법이 필요하다. 따라서 열처리, 자외선(UV), 막여과 등의 기술을 사용하여 유청 내의 파지를 불활성화시키는 처리법에 대해 중점적으로 연구가 진행되고 있는 분야이다. 열로 파지를 불활성화시키는 방법이 가장 흔히 사용되는 처리법이지만 내열성 파지를 열로 불활성화 시킬 경우에 자연산 유청 단백질이 받게 되는 부정적인 영향으로 인하여 처리법의 사용에는 제한이 있다. 따라서 온도를 높이고 시간을 늘리는 방법보다는 다른 결합된 처리법을 사용하여 유청 내의 파지를 제거해야 것이 요구되어진다. 열처리를 막여과 또는 UV와 함께 사용할 경우, 유청 내의 파지 수를 효과적으로 감소시킬 수 있을 것으로 사료되어진다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 수출전략기술개발사업(no. 313010-3)에 의해 이루어졌습니다. 또한 한국연구재단 중견연구자 지원사업(2012R1A2A2A-01015344)의 연구비지원을 받았습니다.

## 참고문헌

1. Asher, Y. J., Mollard, M. A., Thomson, S., Maurice, T. J. and Caldwell, K. B. 1992. Whey protein product method for its production and use thereof in foods. Patent WO92/20239.
2. Atamer, Z., Ali, Y., Neve, H., Heller, K. J. and Hinrichs, J. 2011. Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *Int. Dairy J.* 21:327-334.
3. Atamer, Z. and Hinrichs, J. 2010. Thermal inactivation of the heat-resistant *Lactococcus lactis* bacteriophage P680 in modern cheese processing. *Int. Dairy J.* 20: 163-168.
4. Atamer, Z., Dietrich, J., Müller-Merbach, M., Neve, H., Heller, K. J. and Hinrichs, J. 2009. Screening for and

- characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *Int. Dairy J.* 19:228-235.
5. Atamer, Z., Dietrich, J., Neve, H., Heller, K. J. and Hinrichs, J. 2010. Influence of the suspension media on the thermal treatment of mesophilic lactococcal bacteriophages. *Int. Dairy J.* 20:408-414.
  6. Atamer, Z., Neve, H., Heller, K. and Hinrichs, J. 2012. "Thermal resistance of bacteriophages in the dairy industry," in *Bacteriophages in dairy processing*, eds A. L. Quiberoni and J. A. Reinheimer (New York: Nova Science Publishers), 195-214.
  7. Atamer, Z., Samtlebe, M., Neve, H., Heller, K. J. and Hinrichs, J. 2013. Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Front. Microbiol.* 4:191.
  8. Binetti, A. G. and Reinheimer, J. A. 2000. Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *J. Food Prot.* 63:509-515.
  9. Bylund, G. 1995. *Dairy processing handbook*. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB.
  10. Bylund, G. 2003. *Dairy processing handbook*. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB.
  11. Capra, M. L., Neve, H., Sorati, P. C., Atamer, Z., Hinrichs, J., Heller, K. J. and Quiberoni, A. 2013. Extreme thermal resistance of phages isolated from dairy samples: updating traditional phage detection methodologies. *Int. Dairy J.* 30:59-63.
  12. Capra, M. L., Quiberoni, A. and Reinheimer, J. A. 2004. Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:499-504.
  13. Chopin, M. C. 1980. Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *J. Dairy Res.* 47:131-139.
  14. Ebrecht, A. C., Guglielmotti, D. M., Tremmel, G., Reinheimer, J. A. and Suárez, V. B. 2010. Temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages: comparison of their thermal and chemical resistance. *Food Microbiol.* 27:515-520.
  15. Fang, C. S. and Snook, R. 1991. Proteinaceous fat substitute. Patent WO91/17665.
  16. Gautier, M., Rouault, A., Hervé, C., Sommer, P., Leret, V., Jan, G., Frasin, J. M., Prévot, F. and Coste, A. 1999. Bacteriophages of dairy propionibacteria. *Lait* 79:93-104.
  17. Heino, A. 2009. *Microfiltration in cheese and whey processing*. Ph.D. thesis, Department of Food Technology, University of Helsinki, Helsinki.
  18. Hinrichs, J. 2001. Incorporation of whey proteins in cheese. *Int. Dairy J.* 11:495-503.
  19. Huss, M. and Spiegel, T. 2000. Preparation of an aggregate whey protein product and its use. Patent WO00/48473.
  20. Kessler, H.-G. 2006. *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik*. München: Kessler.
  21. Kleppen, H. P., Bang, T., Nes, I. F. and Holo, H. 2011. Bacteriophages in milk fermentations: Diversity fluctuations of normal and failed fermentations. *Int. Dairy J.* 21: 592-600.
  22. Kosikowski, F. V. 1979. Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.* 62:1149-1160.
  23. Lawrence, R. C., Creamer, L. K. and Gilles, J. 1987. Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 70:1748-1760.
  24. Lawrence, R. J. 1993. "Incorporation of whey proteins in cheese," in *Factors affecting the yield of cheese*, IDF Special Issue No. 9301 (Brussels: International Dairy Federation), 79-87.
  25. Madaeni, S. S. and Khodadadi, B. 2004. Effect of bacteriavirus interaction on mechanism of virus removal using microfiltration membranes. *J. Chin. Chem. Soc.* 51: 187-193.
  26. Madaeni, S. S., Fane, A. G. and Grohmann, G. S. 1995. Virus removal from water and wastewater using membranes. *J. Membr. Sci.* 102:65-75.
  27. Marco, M. B., Moineau, S. and Quiberoni, A. 2012. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2:149-158.
  28. Marvig, C. L., Aideh, B., Neve, H., Heller, K. J., Knöchel, S. and Vogensen, F. K. 2011. Heat tolerance of dairy lactococcal c2 phages. *Int. Dairy J.* 21:556-560.
  29. McIntyre, K., Heap, H. A., Davey, G. P. and Limsowtin, G. K. Y. 1991. The distribution of lactococcal bacteriophage in the environment of a cheese manufacturing plant. *Int. Dairy J.* 1:183-197.
  30. Mistry, V. V. and Kosikowski, F. V. 1986. Influence of milk ultrafiltration on bacteriophages of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 69:2577-2582.
  31. Müller-Merbach, M., Neve, H. and Hinrichs, J. 2005.

- Kinetics of the thermal inactivation of the *Lactococcus lactis* bacteriophage P008. *J. Dairy Res.* 72:281-286.
32. Paquin, P., Lebeuf, Y., Richard, J. P. and Kalab, M. 1993. Microparticulation of milk proteins by high pressure homogenization to produce a fat substitute. International Dairy Federation Special Issue No. 9303. Brussels: International Dairy Federation, 389-396.
33. Piry, A., Heino, A., Kühnl, W., Grein, T., Ripperger, S. and Kulozik, U. 2012. Effect of membrane length, membrane resistance, and filtration conditions on the fractionation of milk proteins by microfiltration. *J. Dairy Sci.* 95:1590-1602.
34. Queguiner, C., Dumay, E., Salou-Cavalier, C. and Cheftel, J. C. 1992. Microcoagulation of a whey protein isolate by extrusion cooking at acid pH. *J. Food Sci.* 57: 610-616.
35. Quiberoni, A., Guglielmotti, D. M. and Reinheimer, J. A. 2003. Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 51-62.
36. Quiberoni, A., Suárez, V. B. and Reinheimer, J. A. 1999. Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *J. Food Prot.* 62: 894-898.
37. Schmidt, S. and Kauling, J. 2007. Process and laboratory scale UV inactivation of viruses and bacteria using an innovative coiled tube reactor. *Chem. Eng. Technol.* 30:945-950.
38. Schmidt, V. S. J., Kaufmann, V., Kulozik, U., Scherer, S. and Wenning, M. 2012. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* 154:1-9.
39. Scott, R., Robinson, R. K. and Wilbey, R. A. 1998. Cheese making practice. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
40. Singer, N. S., Yamamoto, S. and Latella, J. 1988. Protein product base. US patent application 734287.
41. Sommer, R., Pribil, W., Appelt, S., Gehringer, P., Eschweiler, H., Leth, H., Cabaj, A. and Haider, T. 2001. Inactivation of bacteriophages in water by means of non- ionizing (UV-253.7 nm) and ionizing (gamma) radiation: a comparative approach. *Water Res.* 35:3109-3116.
42. Spiegel, T. and Huss, M. 2002. Whey protein aggregation under shear conditions - effects of pH-value and removal of calcium. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37:559-568.
43. Suárez, V. B. and Reinheimer, J. A. 2002. Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. *J. Food Prot.* 65: 1756-1759.
44. Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. 1999. Yoghurt science and technology. Boca Raton: CRC Press.
45. Walstra, P., Wouters, J. T. M. and Geurts, T. 2006. Dairy science and technology. Boca Raton: Taylor & Francis.
46. Wang, J., Mauser, A., Chao, S. F., Remington, K., Treckmann, R. and Kaiser, K. 2004. Virus inactivation and protein recovery in a novel ultraviolet-C reactor. *Vox Sang.* 86:230-238.

---

(Received 11 September, 2014 / Accepted 20 November, 2014)