

Transglutaminase 처리로 제조된 탈지유 분말의 기능적 특성

임 지 영

한국식품개발연구원

Transglutaminase 처리로 제조된 탈지유 분말의 기능적 특성

임 지 영
한국식품개발연구원

I. 서 론

Pourel-EI (1981)은 식품의 기능성 (functionality)을 식품이나 그 구성성분의 영양적 측면을 제외한 그 밖의 모든 이용에 영향을 미치는 성질로 정의하였다. 기능성은 식품의 품질을 결정짓는데 중요한 역할을 담당하며 식품의 구성성분 중 단백질은 기능성을 결정짓는 중요한 인자이다. 식품단백질의 기능성은 근본적으로 단백질을 구성하는 아미노산의 조성이나 분포 그리고 단백질의 구조에 따라 달라진다. 또 식품단백질이 분리, 제조될 때까지 거치게 되는 여러 가지 공정도 기능성에 영향을 미치며 단백질을 식품에 이용될 때의 온도, pH 같은 외적 요인이나 다른 식품 구성성분과의 상호작용도 식품의 제조 시 기능성을 유지하기 위하여 반드시 고려해야 할 사항이다.

현재 분리 정제된 식품단백질의 기능적 특성을 향상시키기 위한 연구는 다양한 방법을 이용하여 광범위하게 진행되고 있다. 이중 단백질의 구조를 변형시켜 그 기능성을 향상시키려는 시도는 주류를 이루고 있다. 단백질의 구조를 변형시키는 방법은 크게 효소처리를 이용한 방법과 물리 화학적 처리를 이용하는 방법으로 구분할 수 있다. 화학적 처리에 의한 단백질 구조의 변형은 효과적이긴 하나 식품의 안정성에 문제를 발생시킬 수 있으므로 인체에 무해한 효소를 이용한 방법이 선호되고 있는 실정이다. 근래에 식품단백질의 기능성을 변형하기 위해 사용되고 있는 효소 중 가장 주목 받고 있는 것은 transglutaminase (TGase) 이다. TGase는 단백질의 glutamine 잔기와 amine 사이에서 lysine 잔기가 acyl 기의 수용체로 작용하는 경우 단백질 분자내 혹은 분자간에 ϵ -(γ -glutamyl) lysine cross link의 형성을 촉매하는 효소로서 (Nonaka 등, 1996), 1990년대 들어 미생물 발효에 의해 Ca^{2+} -independent TGase의 대량생산이 가능해진 이후로 TGase는 다양한 식품에 응용 가능성을 제시하였다.

단백질의 TGase에 대한 반응성은 glutamine 잔기의 분포뿐만 아니라 단백질의 2, 3차 구조에도 영향을 받는다 (Matsumura 등, 1996). 우유단백질중 casein은 TGase가 작용하기 쉬운 기질로 알려져 있으며 우유단백질을 TGase로 변형하여 우유단백질의 젤 형성능력과 젤의 점탄성을 변형시키려는 연구가 진행되어 왔다 (Dickinson과 Yamamoto, 1996; Faergemend와 Qvist 1997a;

Faergemend와 Qvist 1997b). 선행된 연구에 의하면 TGase에 의한 새로운 cross link의 도입은 유단백질의 젤 형성능력을 향상시키는 것으로 알려져 있으나 보수력 (water binding property)에 미치는 효과에 대한 보고는 훨씬 제한적이다. 보수력은 젤 matrix의 특성과 밀접한 관계를 가지며 젤 matrix의 고유한 성질에 영향을 미치는 TGase에 의한 단백질 구조의 변형은 보수력의 변화를 초래할 것으로 생각된다. 산에 의한 우유젤의 보수성은 요구르트의 제조에서 나타나는 syneresis에 대한 민감성을 반영한다고 할 수 있으므로 향상된 보수력은 syneresis 저하를 의미할 수 있다.

현재까지 대부분의 연구는 분리된 유단백질을 가지고 진행되어 왔으며 TGase 처리를 이용하여 향상된 기능성을 가진 탈지유 분말 (TG-SMP)을 제조하려는 시도는 이루어진 바 없다. 만약 TG-SMP가 탈지유에 TGase를 따로 처리한 것과 동일한 기능성을 나타낸다면 TG-SMP는 TGase를 개별 처리 시 필요한 효소작용시간이나 효소처리 후 효소 불활성화를 위한 가열처리가 필요 없다는 장점을 가질 수 있다. 본 연구의 목적은 TG-SMP를 제조하고 그 기능성의 변화 중 젤의 형성능력 및 보수력에 미치는 효과를 조사하고자 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. 효 소

Ajinomoto U.S.A.에서 제공한 Ca^{2+} 에 비의존적인 microbial transglutaminase (ACTIVA TG-TI)를 이용하였으며 TGase의 declared activity는 약 100 units/g 이었다.

2. TGase처리에 의해 제조된 탈지유 분말(TG-SMP)의 제조

슈퍼마켓에서 구입한 신선한 탈지유를 30분간 40°C 항온수조에서 정치한 후 TGase를 첨가하였다. TGase의 첨가 후 균일한 혼합을 위하여 30분간 탈지유는 교반되었으며 3시간의 효소반응 후 85°C에서 5분간 가열하여 TGase를 불활성화하였다. 처리된 탈지유는 동결건조 후 분쇄하였다. 대조구인 C-SMP는 가열 변성시킨 TGase를 이용하여 동일한 과정으로 제조되었다.

3. 가열에 의해 형성된 젤의 강도와 보수력(WHC)의 측정

TG-SMP와 C-SMP를 환원하여 (6~10% protein, w/v) 10 g 씩 30 mL의 beaker에 넣고 vacuum chamber에서 공기방울을 제거한 후 90°C의 항온수조에서 30분간 가열하여 젤을 형성하였다. 가열동안 aluminium foil로 덮어 수분증발을 방지하였고, 가열 후 시료는 8~10°C의 찬물에 넣어 냉각한 후 젤의 강도를 측정하기 전까지 5°C의 저온실에서 보관하였다. 젤의 강도는 Instron Universal Testing Machine을 이용하여 80% penetration시 나타난 peak force를 젤의 강도로 측정하였다. 보수력은 젤을 1 g 정도의 직사각형으로 절단한 후 미리 무게를 측정한 여과지위에 놓은 후 10,000 × g에서 원심분리하였다. 원심분리 시 여과지위에 polyester mesh를 놓아 시료와 여과지와의 직접적인 접촉을 방지하였으며 다만 유리된 수분만이 여과지 내로 흡수되도록 하였다. 보수력은 다음과 같이 계산하였다.

$$WHC (\%) = (W_0 - W_1) \times 100 / W_0$$

W_0 = 초기 시료의 무게 (g) , W_1 = 여과지의 무게 증가 (g)

4. 산에 의해 형성된 젤(acid gel)의 보수력 측정

TG-SMP와 C-SMP를 증류수와 탈지유에 각각 환원하여 최종 고형분 함량이 12, 14, 16% (w/v) 인 환원 용액을 만들고 glucono- δ -lactone (GDL)을 2.9~3.55% 첨가하여 42°C 항온수조에서 40 분간 정치하였다. 각 시료의 pH는 40분 정치에 의하여 6.65~6.7로부터 4.6~4.55로 감소하여 젤을 형성하였다. WHC는 3,000×g에서 15분간 원심분리 후 (4°C) 상등액을 제거한 후 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{WHC (\%)} = (\text{원심분리 후 시료의 무게} / \text{원심분리 전 시료의 무게}) \times 100$$

5. 젤의 물성

젤의 점탄성은 Bohlin CVO Rheometer를 이용하여 측정하였다. 가열에 의한 젤은 13 mL의 10% (w/v protein) 시료용액을 Couette cell (C25)에 넣은 후 90°C까지 1°C/min의 속도로 가온하고, 90°C에서 20분간 유지 후 다시 25°C로 냉각하여 형성하였다. 점탄성의 측정은 온도가 70°C에 도달 시 0.1 Hz의 주파수를 이용하여 1%의 maximum strain에서 실시하였다. 산에 의한 젤의 물성은 16% 고형분 함량을 가진 시료용액에 3.55%의 GDL 첨가 후 2 분간 혼합하여 Couette cell (C25)에 넣고 42°C에서 40 분간 0.1 Hz의 주파수와 1%의 maximum strain으로 측정하여 pH 변화에 따른 storage modulus (G')의 변화를 관찰하였다. 물성의 측정동안 시료의 표면은 낮은 점도를 가진 silicon oil로 덮어 표면으로부터의 수분증발을 억제하였다.

6. 결과 분석

SAS를 사용하여 분산분석을 행한 후 유의성을 Student-Newman-Keuls test를 통하여 확인하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. TGase의 처리농도가 가열에 의해 형성된 젤의 강도와 보수력에 미치는 영향

가열에 의해 형성된 젤의 강도는 처리된 TGase 농도에 의하여 현저한 변화를 나타내었다 (Fig. 1). TGase의 처리 농도가 5 U/g protein 보다 큰 경우 TG-SMP는 시료의 단백질 함량이 7%이상부터 젤을 형성한 반면, C-SMP는 측정 가능한 젤을 형성하기 위하여 10%의 시료단백질이 필요하였다. TG-SMP의 젤 강도는 TGase의 처리농도가 10 U/g protein 에서 최대치를 나타냈으며 그 이상에서는 오히려 감소되었다. 이와 같은 경향은 Sakamoto 등(1994) 에 의해 보고된 바 있으며 과다한 가교의 형성은 규칙적인 gel protein matrix의 형성을 저해할 수 있는 것으로 판단된다.

TGase 처리는 Table 1에서 나타난 바와 같이 보수력도 함께 증진시켰으며 젤 강도와 보수력간에는 높은 상관관계 ($r^2 = 0.936$)가 발견되었다. 따라서 가열에 의해 생성되는 젤의 강도와 보수력의 증진을 위하여 유단백질을 변형시키어 적절한 TGase 의 처리농도는 10 U/g protein으로 설

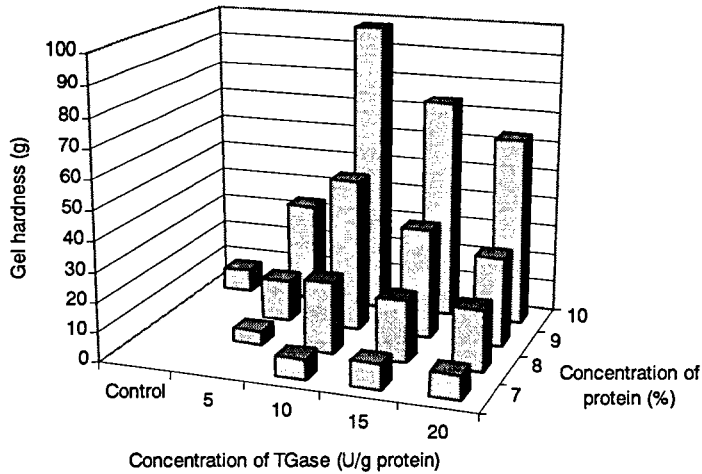


Fig. 1. Hardness of heat-induced gels as influenced by concentration of sample and pretreated TGase.

Table 1. Effect of TGase concentrations on hardness and WHC of heat-induced gels

Concentration of TGase (U/g protein)	Gel hardness(g)	WHC(%)
15	33.7 ^d	41.6 ^d
10	98.3 ^a	69.7 ^a
15	74.3 ^b	64.7 ^b
20	63.5 ^c	57.9 ^c

Means with different letters within column are significantly different ($P < 0.05$).

Gels were prepared by heating reconstituted TGase-treated skim milk powder (10% protein, w/v) at 90 °C for 30 min.

정하였으며, 이후의 실험에 사용된 TG-SMP의 제조에 사용하였다.

2. NaCl과 CaCl₂ 첨가가 가열형성 젤의 강도와 보수력에 미치는 영향

소금이나 칼슘은 육단백질이나 유단백질이 흔히 접하게 되는 환경으로서, 이들의 존재시 나타나는 젤의 강도와 보수력은 중요한 의미를 지닌다. Table 2에서와 같이 TG-SMP를 환원하여 만든 젤의 강도는 가열전 NaCl이나 CaCl₂의 농도가 증가함에 따라 증가하였다.

한편 TG-SMP의 보수력은 NaCl의 첨가에 의해서는 유의적인 변화를 나타내지 않았으며 첨가된 CaCl₂의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 이 같은 결과는 calcium bridge에 의한 단백질간의 상호작용에 의한 결과로 해석할 수 있으며 과도한 단백질간의 결합에 의한 응집은 불규칙한 protein matrix의 형성을 초래할 수 있다. Barbut (1995)은 칼슘의 농도가 10 mM 정도로 낮은 경우에도 whey protein isolate의 응집된 구조가 관찰 됨을 보고하였고 커다란 응집

Table 2. Effect of NaCl or CaCl₂ on hardness and WHC of heat-induced gels

Concentration (mM)	TG-SM		C-SMP	
	Gel hardness (g)	WHC (%)	Gel-hardness (g)	WHC (%)
NaCl				
0	99.7 ^c	65.2 ^a	7.3 ^b	NM
50	104.3 ^c	66.2 ^a	7.0 ^b	NM
100	125.3 ^b	67.5 ^a	9.3 ^a	NM
150	134.0 ^b	67.4 ^a	8.7 ^{ab}	NM
200	157.7 ^a	66.4	10.3 ^a	NM
CaCl ₂				
0	96.3 ^d	65.3 ^a	7.0 ^c	NM
10	114.0 ^c	66.4 ^a	20.0 ^d	NM
20	139.3 ^b	61.2 ^b	69.0 ^c	58.9 ^a
30	153.0 ^{ab}	59.9 ^{bc}	88.0 ^b	53.4 ^b
40	169.7 ^a	56.8 ^c	101.0 ^a	50.1 ^c

Means with different letters within column in each group are significantly different ($P < 0.05$). NaCl or CaCl₂ was added to the samples prior to heating at 90°C for 30 min. TG-SMP: TGase-treated skim milk powder (10% protein, w/v), C-SMP: control skim milk powder (10% protein, w/v), NM: not measurable because the gel was too soft to be retained on the mesh upon centrifugation.

체의 형성은 그 응집을 일으키는 이온의 종류에 관계 없이 보수력을 저하시킨다고 하였다.

3. 가열에 의해 형성된 젤의 물성

젤의 탄성도를 의미하는 storage modulus (G')는 TG-SMP의 젤에서 빠른 시간내에 현격한 증가를 나타내었으며 C-SMP의 경우 그 증가는 미미하였다 (Fig. 2). TG-SMP와 C-SMP가 모두 동일한 구성 성분을 가지고 있으며 젤 형성을 위한 가열조건 역시 동일한 점을 감안하면 TG-SMP의 젤 형성 능력은 C-SMP에 비하여 월등히 향상되었다. G'의 두드러진 변화는 가열 후 냉각하는 동안 나타났으며, 이 결과는 저온에서 그 힘이 증가하는 분자간의 수소결합이나 정전기적 결합양식이 젤의 탄성도를 증가시키는데 관여함을 의미한다.

4. 산에 의해 형성된 젤(acid gel)의 보수력

Acid gel의 보수력은 TG-SMP와 C-SMP에서 모두 고형분의 함량이 증가함에 따라 그리고 산성화전 가열처리에 의하여 증가하였다. 물을 환원용매로 사용한 경우 TG-SMP로 만든 젤은 각 처리조건에서 모두 C-SMP보다 유의적으로 높은 보수력을 나타내었으나, 탈지유를 환원용매로 사용하여 고형분함량을 높인 경우에는 고형분의 함량이 12%인 경우 보수력의 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Table 3). 통계적인 분석에 의하면 물을 환원용매로 사용한 경우, 효소의 처리 여부가 보수력에 영향을 미치는 가장 큰 요인으로 작용하였으며 고형분함량이나 열처리 유무의 영향은 유의적인 효과를 나타내지 않았으나 탈지유를 환원용매로 사용하여 고형분함량을 높인

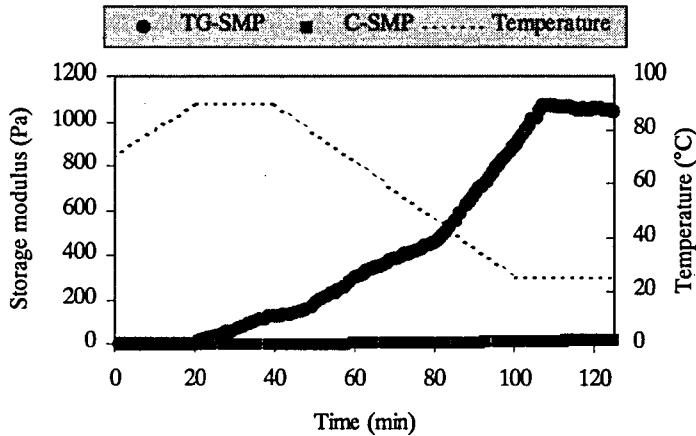


Fig. 2. Changes in storage modulus of reconstituted skin milk prepared from TG-SMP and C-SMP upon heating.

Table 3. Effect of enzyme and heating on WHC of acid gels at three different solid levels

Treatmen	WHC (%)					
	Powder solid level (%)			Skim milk + powder solid level (%)		
	12	14	16	12	14	16
C-SM	34.17 ^d	40.10 ^d	47.76 ^d	33.40 ^c	34.86 ^d	41.43 ^d
Heat + C-SMP	37.50 ^c	45.91 ^c	55.14 ^c	43.32 ^b	48.05 ^b	57.82 ^b
TG-SMP	50.32 ^b	58.89 ^b	67.83 ^b	34.30 ^c	41.78 ^c	52.15 ^c
Heat + TG-SMP	55.31 ^a	66.94 ^a	78.16 ^a	44.85 ^a	56.95 ^a	59.47 ^a

Means with different letters within column are significantly different ($P < 0.05$). TG-SMP: TGase-treated skim milk powder, C-SMP: control skim milk powder. Acidification was done by adding glucono- δ -lactone (GDL) at 2.9~3.55% and incubating for 40 min in a 42°C water bath. The pH of samples after incubation was 4.6~4.55. Heating was done at 90°C for 30 min prior to acidification.

경우에는 고형분함량과 열처리 여부가 모두 유의적인 효과를 나타내었다.

5. 산에 의해 형성된 젤의 물성

TG-SMP로 제조한 acid gel의 탄성도는 C-SMP에 비하여 빠른 시간에 크게 증가하였으며, 가열처리에 의한 G'의 증가폭 역시 C-SMP에 비하여 높게 나타났다. 가열에 의해 일어난 G'의 증가는 변성된 유청단백질이 응집되어 케이신 입자 사이를 연결하며 protein network에 견고성을 부여하기 때문으로 추측할 수 있다. Acid gel의 경우에도 TGase의 처리는 젤의 탄성도를 대조구에 비하여 효과적으로 증진되었다 (Fig. 3).

Fig. 4는 산의 첨가에 의한 phase angle의 변화를 나타낸다. Phase angle의 변화는 두드러진 G'

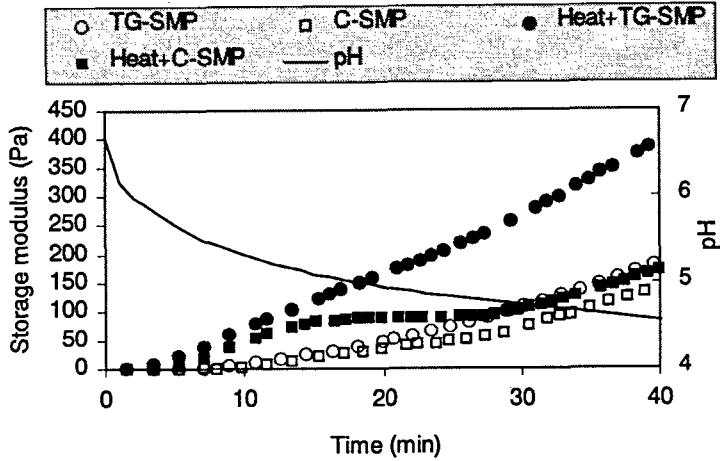


Fig. 3. Changes in storage modulus of TG-SMP and C-SMP during acidification.

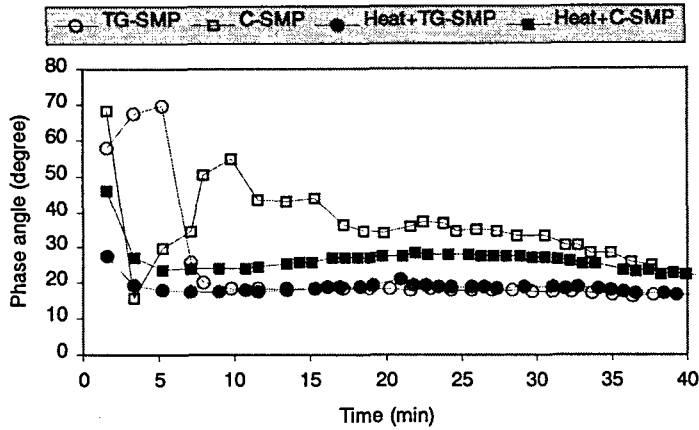


Fig. 4. Changes in phase angle of TG-SMP and C-SMP during acidification with or without prior heat treatment.

의 변화 이전에 관찰되었으며 TG-SMP의 경우 C-SMP에 비하여 보다 낮은 수치로 빠르게 전환되었다. 위의 결과는 TG-SMP의 경우 탄성을 지닌 network으로의 전환이 C-SMP에 비하여 신속하게 일어남을 의미한다. Phase angle의 변화양상은 가열에 의하여 큰 변화를 나타내지는 않았으며 TG-SMP의 phase angle은 가열처리의 유무에 관계없이 각각의 C-SMP보다 낮게 나타났다.

IV. 결 론

TGase의 처리에 의하여 제조한 탈지유분말은 현저히 증가한 젤 형성능력과 보수력을 나타냈으며, TG-SMP는 새로운 가교 (cross linking)의 도입에 의하여 보다 탄력있는 젤을 형성하였다.

TGase 처리에 의하여 제조된 탈지유는 보다 높은 기능성이 요구되는 식품에 이용될 수 있으며, 적은 양의 첨가로도 바람직한 기능성을 부여할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 참고문헌

1. Barbut, S. : Effect of sodium level on the microstructure and texture of whey protein isolate gels. *Food Res. Int.*, 28:437-443 (1995).
2. Chronakis, I. S. : Network formation and viscoelastic properties of commercial soy protein dispersions: effect of heat treatment, pH and calcium ions. *Food Res. Int.*, 29:123-134 (1996).
3. Dickinson, E. and Yamamoto, Y. : Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1371-1377 (1996).
4. Færgemand, M., Otte, J. and Qvist, K. B. : Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca^{2+} - independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. *Food Hydrocoll.*, 11:19-25 (1997a).
5. Færgemand, M. and Qvist, K. B. : Transglutaminase: effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. *Food Hydrocoll.*, 11:287-292 (1997b).
6. Matsumura, Y., Chanyongvorakul, Y., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T. and Mori, T. : Enhanced susceptibility to transglutaminase reaction of α -lactalbumin in the molten globule state. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1292:69-76 (1996).
7. Nonaka, M., Matsuura, Y. and Motoki, M. : Incorporation of lysine- and lysine dipeptides into γ_{s1} -casein by Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60:131-133 (1996).
8. Pourel-El. : Protein functionality: classification, definition and methodology, In "Protein Functionality in Foods, J. P. Cerry (Ed.), p. 1-20. ACS Symposium Series 147. Washington DC. SAS Institute, Inc. 1990. SAS[®] User's Guide: Statistics. SAS Institute, Inc., Cary. NC (1981).