

Sialic acid 의 감소가 탈지분유의 단백질 용해도에 미치는 영향

송재철 · 박현정* · 이재영**

울산대학교 식품영양학과, *부산대학교 미생물학과, **성균관대학교 낙농학과

Effect of Reduction in Sialic acid on Solubility of Non Fat Dry Milk Protein Isolates

Jae-Chul Song, Hyun-Jeong Park* and Jae-Yeoung Lee**

Department of Food and Nutrition, University of Ulsan, Ulsan

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan

** Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University, Suwon

Abstract

The milk protein portion contains sialic acid which may be used as an index for *k*-casein. In comparison with non fat dry milk (NFDM) and calcium caseinate, the solubility of NFDM protein isolates at the various pH was inferior. Another consideration for the low solubility relates to the possibility that *k*-casein may have been extracted or possibly modified by the action of alcohol. The *k*-casein is the principal stabilizing fraction for casein micelle and any changes which result in its destruction or removal would be expected to have potent results. During solvent treatment, 16.5% of sialic acid was extracted in the first extraction solvent, whereas the second treatment caused only a 4.0% loss, based on sialic acid analysis. A study was conducted on the effect of concentration of methanol on loss of sialic acid. The loss of sialic acid decreased as the concentration of methanol increased to above 62% in both the first and second extracted solvent. It appears that loss of sialic acid is attributed to the water fraction rather than the methanol fraction. The effect of addition of the dried extracted solids on solubility was investigated. Protein solubility of NFDM protein isolates was sharply increased by 10% addition of the extracted solids and, thereafter, decreased. Efforts to restore solubility by feeding-back the extracted material supported the concept that removal of surface *k*-casein may have been a possible factor.

서 론

카제인은 모방치즈(imitation processed cheese, IPC)¹⁾를 비롯한 다양한 모방유제품의 주요 단백질원료²⁾로 특유의 물리·화학적^{4,5)} 및 기능적 특성^{6,7)}이 있는 우수한 단백질 성분으로 오랫동안 사용되어 왔다. 특히 모방치즈 소비량의 증가추세에 있으므로 이에 따른 카제인 수요가 증가되어⁸⁾ 카제인 대체원료 개발에 관한 관심이 높아져 탈지분유(non fat dry milk, NFDM)에 의한 탈지분유 농축단백질(NFDM protein isolates, NFDMPPI)의 분리제조에 대한 연구가 극히 일부에서 진행되어 왔다.⁹⁾ 일반적으로 탈지분유 자체는 유당함량이 높고 기능적 특성결함으로 모방치즈등 모방유제품에 단백질원료로는 직접 사용할 수 없으므로 탈지분유의 용매처리로 유당을 제거하고 카제인-유청단백질의 혼합분을 분리하여 이를 카제인단백질의 대체용

로 이용코저 하나 분리한 탈지분유 단백질의 용해도가 카제인단백질보다 낮은 실정으로 저용해도 요인¹⁰⁾은 주로 1) 용매처리에 의한 유청단백질의 변성 2) 강한 소수(hydrophobic) 그룹의 상호작용 3) 무기염과 단백질과의 반응등으로 추정할 수 있다. 그러나 저용해도 요인중 아직 연구되고 있지 않은 요인은 용매에 의한 *k*-casein의 release와 더불어 카제인 micelle의 주요 stabilizing fraction¹¹⁾인 *k*-casein 표면가용성물질^{12,13)}의 손실이다. *k*-casein은 D-mannosamine의 유도체인 glycomacropeptide(GMP)를 분획¹⁴⁾으로 하고 이 GMP는 당 아미노산의 일종인 sialic acid(N-acetylneuraminic acid, NANA)¹¹⁻¹⁴⁾를 포함하고 있기 때문에 용매처리시 *k*-casein의 표면가용성 부분의 추출 정도의 지표로서¹⁴⁾ sialic acid를 이용한다. 본 연구에서는 탈지분유 단백질의 기능특성중 용해도 저하요인으로 추정되어온 이론 가운데 아직 연구된 적이 많지

많은 *k*-casein의 손실 즉 sialic acid의 손실여부가 탈지분유 단백질 용해도에 어떤 영향을 미치는가를 규명하여 탈지분유 단백질 분리공정 조건결정에 기초자료로 이용하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

탈지분유는 pasteurized grade "A" low-temperature spray 한 제품(Vally Lea Dairies Inc.)이며 칼슘카제인은 분무건조한 것으로 모방치즈용(HPD #113, New Zealand Inc.)이며 sialic acid는 "A" grade로 Calbiochem Inc. 제품을 사용하였으며 각종 기타 시약은 G. R.의 것을 사용하였다.

탈지분유 단백질 제조와 sialic acid 정량

탈지분유 단백질은 송 등⁽¹⁵⁾의 방법에 의해서 제조되었고 사용한 용매는 탈지분유 단백질수율이 가장 높은 62% 메탄올을 사용하였으며^(9,16)탈지분유 단백질은 냉동건조 하였고 추출용매를 용도에 따라 1차, 2차로 분리 또는 혼합한 후 농축, 냉동건조하여 분말 extracted solid로써 feed-back 실험에 첨가 사용하였다. 추출 용매속의 sialic acid 정량은 Warren TBA assay 법⁽¹⁷⁾에 의하였으며 용해도 측정은 Lu 등⁽¹⁸⁾과 Akobundu 등⁽¹⁹⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 원심분리는 3,000rpm을 이용하였다.

paper chromatography에 의한 sialic acid 정성

용매에 의해 추출된 sialic acid 정성은 Whatman No. 1의 one dimensional paper chromatography 기법을 이용하였으며 ethyl-acetate: pyridine: water(2:1:1 vol./vol)를 전개용매로, 0.5% 4-dimethylamino benzaldehyde로 검출하였다.

결과 및 고찰

탈지분유 단백질 용해도

탈지분유의 용매처리시 sialic acid 손실이 탈지분유 단백질의 용해도 변화에 미치는 영향을 검토하기 위해 우선 탈지분유 단백질을 탈지분유와 모방치즈 주 단백질 원료로 사용되고 있는 칼슘카제인 용해도와 비교하였다(Fig.1). 용해도는 25°C에서 pH3에서 10까지 검토하였는바 탈지분유 단백질의 용해도는 칼슘카제인 용해도보다 등전점 부근을 제외하고는 전반적으로 낮았으며 모두 등전점에서 최저용해도를 나타내었다. 또 탈

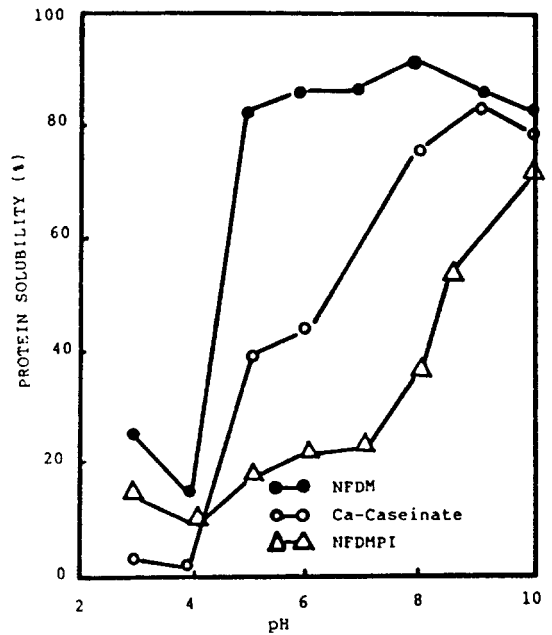


Fig. 1. Effect of pH on solubility

지분유의 용해도는 등전점에서 탈지분유 단백질의 용해도와 비교하여 50%정도 높은 것은 등전점에서 침전되지 않는 비변성유청단백의 존재 때문으로 용매처리시 용매에 의한 유청단백의 변성이 용해도 저하요인이 됨을 입증한 결과로 사료된다. 따라서 탈지분유 단백질을 카제인 대체원으로 사용시 용해도 저하가 기능특성의 제한요인이 됨을 예상할 수 있었다.

Sialic acid의 용매처리시 손실

탈지분유단백질 용해도의 저하요인을 유청단백질 변성만으로 설명할 수 없으므로 본 연구에서는 용매추출시 *k*-casein의 가용성 물질 즉 sialic acid의 손실여부와 손실현상이 탈지분유 단백질 용해도에 미치는 영향을 검토하기 위하여 sialic acid의 표준곡선(Fig.2)과 용매처리에 따른 sialic acid 손실정도를 측정하였다(Table 1). 제1차 용매처리시 sialic acid는 16.5% 손실되었으며 제2차 용매처리시 4.0%손실되어 전체 20.5%가 용매처리 공정중 손실되었다. 잔손실량의 약 80.5%가 제1차 용매처리시 손실되어 대부분 sialic acid가 용매와의 첫반응에서 용해 추출됨을 나타내었으며 paper chromatography에 의해 손실정도가 정성적으로 확인되었다(Fig.3). 또 sialic acid는 카제인 micelle이 stabilizing fraction으로 처리용매농도에 따라 민감한 용해효과를 나타내었다(Fig.4). 탈지분유단백제조의 최적 메탄올 농도인 62%를 중심으로 메탄올

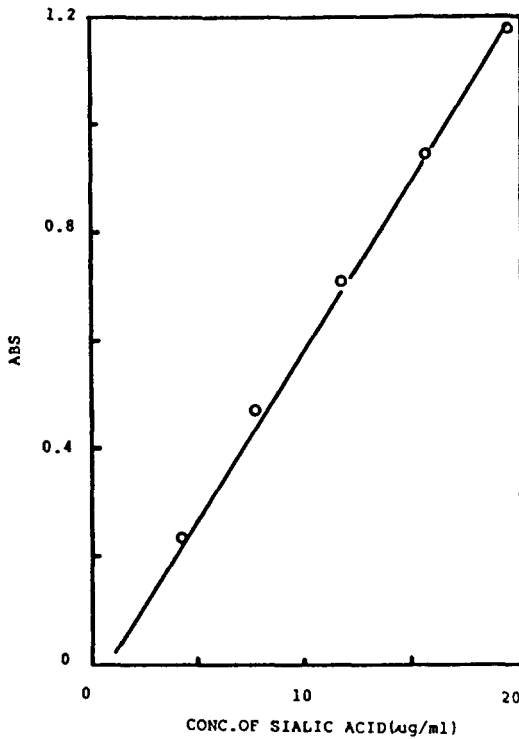


Fig. 2. Standard curve of sialic acid

농도와 sialic acid 손실과의 결과에 의하면 제1차 및 제2차 추출용매에서의 sialic acid 손실은 사용한 메탄올 농도가 증가할수록 감소하였는데 이는 용매성분중 메탄올 성분보다 물성분 fraction에 따라 좌우되었음을 나타낸 것이다. 제1차 추출시 sialic acid는 총 손실량에 대해서 많은 부분이 손실되었으며 제2차 추출시에는 1차보다 손실정도가 낮은 경향으로 Table 1결과와 일치하였다. 결과에 따르면 탈지분유 단백질 제조에 사용한 메탄올 농도가 클수록 sialic acid 손실이 적으므로 용해도에는 긍정적 효과를 나타내지만 62% 이상의 메탄올 농도에서는 단백질이 급격히 증가⁹⁾하므로

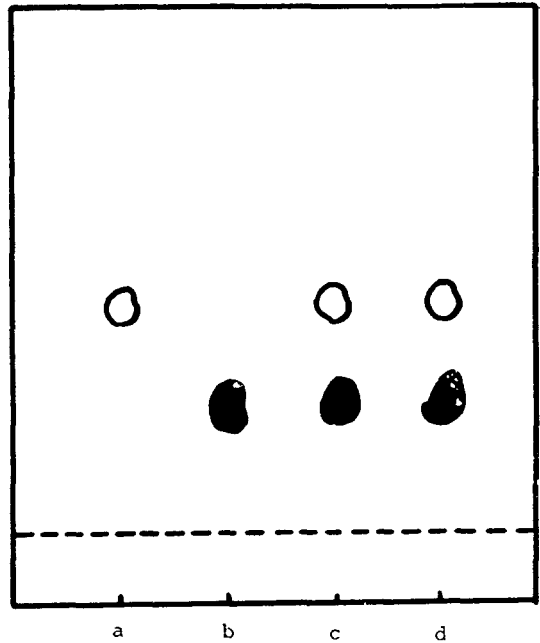


Fig. 3. Paper chromatography of extracted solid
 a. pure lactose b. A grade sialic acid
 c. 1st extracted solid d. 2nd extracted solid

단백손실은 최소화하고 용해도를 최대 하기 위한 조건을 검토하는 것이 차후 연구과제이다.

Sialic acid feed back 효과

Sialic acid 손실이 탈지분유단백의 저용해도의 일부 요인 여부를 확인하기 위해 추출액상부분을 농축, 냉동건조한 분말 extracted solid를 feed-back 하여 탈지분유단백질의 용해도 변화를 검토한 결과(Fig.5) 탈지분유단백질 용해도는 extracted solid(0.116% sialic acid)를 첨가시 증가하였으며 10% 첨가시 최대용해도를 나타내었다. 그러나 첨가량을 10%이상 증가하여도 용해도가 비례적으로 증가하지 못한 것은 extracted

Table 1. Mass balance of sialic acid during methanol extraction

	NFDM	NFDMP1	1st Ext. solvent	2nd Ext. solvent
Yield	1.00g	0.69g	16.00ml	10.00ml
Conc. of Sialic acid	0.12%	0.14%	12.38μg/ml	4.78μg/ml
Wt. of Sialic acid	1.20mg	0.97mg	0.20mg	0.05mg
Loss of Sialic acid	0	19.40%	16.50%	4.00%

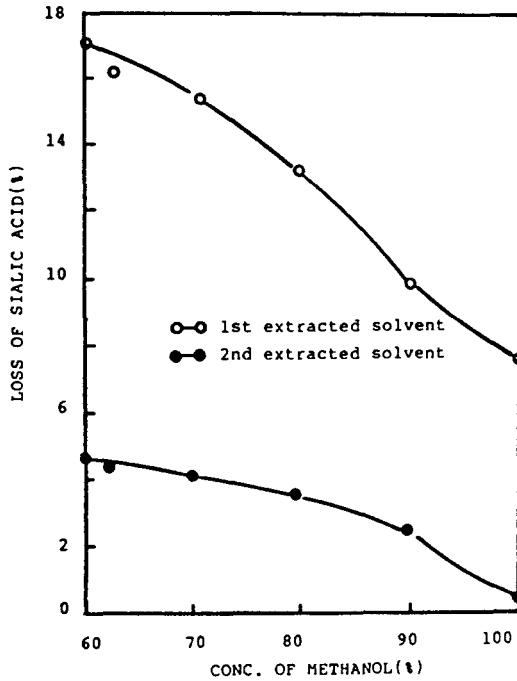


Fig. 4. Effect of concentration of methanol on loss of sialic acid

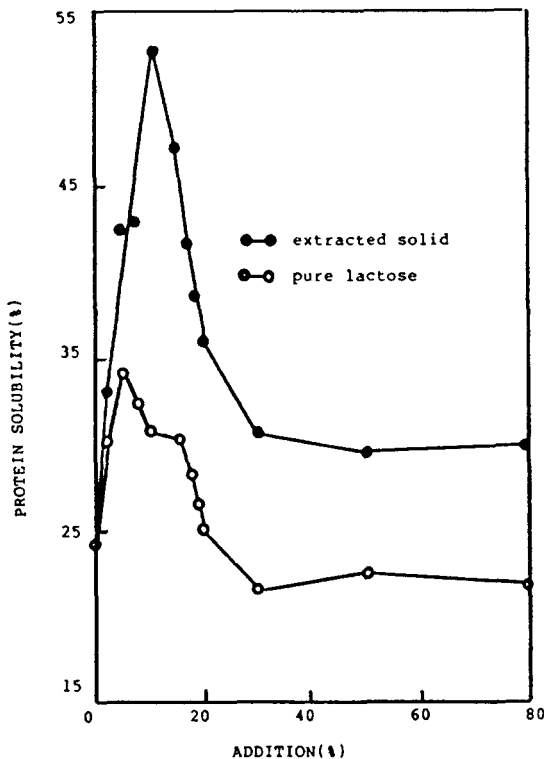


Fig. 5. Effect of feedback of extracted solids on protein solubility of NFDMP1

solid 중 sialic acid 이외 탈지분유의 유당이 추출되어 상당량 함유되어 있어⁹⁾ 탈지분유단백질과의 용해작용 길항으로 용해도가 증가하지 못한것으로 사료된다. 또 순수유당 첨가실험에서 5% 첨가시 용해도가 조금 증가하였는데 이는 탈지분유단백의 단백질수그룹과 첨가한 순수유당의 hydroxyl 그룹, 용매인 물과의 상호 친화력의 증가때문인 것으로 사료되었으며 5%~20% 첨가 경우 용매인 물부분의 용매길항으로 용해도가 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 calcium caseinate 의 용해도 증가에 sucrose 첨가가 큰 영향을 미치지 못한다는 송¹⁹⁾의 연구결과를 근거하여 분석할때 고농도의 당 첨가는 단백질용해도 증가에 영향을 미치지 못하고 있음을 나타내고있다. 이것은 탈지분유단백질과 calcium caseinate 의 단백질구조가 다르다고 해도 일정량 이상의 당농도는 단백질 용해도 변화에 크게 기억하지 못한것으로 분석된다. 또 유당을 17%첨가시까지 전체 용해도가 분말 extracted solid 무첨가 경우(탈지분유단백자체인 NFDMP1)보다 높은 것은 유당을 일정농도까지(17%) 첨가하는 경우 유당의 친수친화력의 일부증가로 유당무첨가 경우보다 용해도가 높은 것으로 사료된다. 따라서 탈지분유단백질의 용해도는 용매처리시 예상되는 유청단백변성, 강한 소수그룹의 상호작용(strong hydrophobic interaction)과 무기염과 단백질의 상호반응에 의한 것과 또 다른 저용해도 요인으로 용매추출시 가용성 물질인 k-casein 의 sialic acid 부분의 손실에 기인한 것으로 사료되며 특히 sialic acid 부분 손실은 casein 모델구조특징²⁰⁾중 가장 표면부분인 k-casein 의 손실과 연관이 있기 때문에 용해도 이외 탈지분유단백질 자체의 또 다른 기능특성의 변화등에 관한 문제점을 차후 연구대상으로 고려해야 할 것 같다.

요 약

k-casein 은 유단백질 분획으로 GMP 를 포함하고 있으며 GMP 는 sialic acid 를 포함하고 있으므로 k-casein index 로 sialic acid 가 사용될 수 있다. 탈지분유 분리 단백질 용해도는 칼슘카제인 보다 일반적으로 낮으므로 용매처리시 야기되는 k-casein 의 손실과 저용해도와의 관계를 규명하고자 하였다. 특히 용매처리시 주요 stabilizing fraction k-casein 의 손실 혹은 손상을 고려해야만 한다. 용매처리시 sialic acid 는 제1차 추출용매에 16.5%, 제2차 추출용매에 4.0% 손실되어 전체 20.5%가 용매처리시 손실되었다. 또 사용한 메탄올의 농도가 증가할수록 sialic acid 손실이

감소하여 sialic acid 손실은 메탄올분획보다 물분획에 따라 좌우된 것 같다. 따라서 sialic acid를 함유한 분말 extracted solid의 feed back 실험 결과 10%첨가시 최대 용해도를 나타냈으며 유당은 용해도 변화에 기여하지 못하였다. 결론적으로 탈지분유 단백질의 저용해도 현상은 용매처리시 *k*-casein의 가용성 물질 손실에도 일부 기인한 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 울산대학교 대학연구비 지원으로 일부 수행되었으며 이에 깊이 감사를 드립니다.

문 헌

1. Wynn, J.D.: *U.S. Patent*, 4, 104, 413 (1978)
2. Wynn, J.D.: *Process for making a food product resembling cheese*. Brit.patent 1,517,956 (1978)
3. Milner, M., Scrimshaw, N.S. and Wang, D.I.C.: *Protein resources and Technology*, AVI publishing Co., U.S.A., p.379 (1978)
4. Hokes, J.C.: *Ph.D.Thesis*, Ohio State University, Columbus, OH (1982)
5. Hokes, J.C., Mangino, M.E. and Hansen, P.M.T.: *J. Food Sci.*, 47 (4), 1235 (1982)
6. Chakraborty, B.K.: Functional properties of caseinates, UNDP/ICAR, Nat. Workshop, Nat. Dairy Res. Inst., Karnal, India (1981)
7. Southware, T.E.: *Food Prod. Dev.*, 10 (10), 26 (1976)
8. Southward, C.R. and Walker, N.J.: *New Zealand J. Dairy Sci. and Tech.* 15, 201-217 (1980)
9. Song, J.C.: *Ph.D. Theses*, Ohio State University, Columbus, OH (1984)
10. Morr, C.V. and Lin, S.H.C.: *J.Dairy Sci.*, 53, 1162 (1970)
11. Mercier, J.C., Ribadeau-Dumas, B. and Grosclaude, F.: *Neth. Milk Dairy J.*, 27, 313 (1973)
12. Mackinlay, A.G. and Wake, R.G.: *Milk Proteins*, Academic Press, New York, Vol. 2, p. 175 (1971)
13. Tran, V.D. and Baker, B.E.: *J. Dairy Sci.*, 53, 1009 (1970)
14. Aprahamian, V.B.: *M.S. Thesis*, Ohio State University, Columbus, OH (1973)
15. Song, J.C.: University of Ulsan Report, 16 (1), 75 (1985)
16. Leviton, A.: *Ind. Eng. Chem.*, 41 (7), 1351 (1949)
17. Warren, L.: *J. Bill. Chem.*, 234, 1971 (1959)
18. Lu, P.S. and Kinsella, J.E.: *J. Food Sci.*, 37, 94 (1972)
19. Akobundu, E.N.T., Cherry, T.P. and Simmons, J.G.: *J. Food Sci.*, 47, 829 (1982)
20. Rose, D., Brunner, J.R. Kalan, E.B., Larson, B.L., Melnychyn, P., Swaisgood, H.E. and Waugh, D. F.: *J. Dairy Sci.*, 53 (1), 1 (1970) (1986년 10월 27일 접수)