

# 가자미피 젤라틴의 효소적 수식에 의한 유화제의 시제

김세권 · 전유진

부산수산대학교 자연과학대학 화학과

## A Trial for Utilizing Flounder Skin Gelatin as an Emulsifier through Enzymatic Modification

Se-Kwon KIM and You-Jin JEON

Department of Chemistry, College of Natural Science

National Fisheries University of Pusan

Pusan 608-737, Korea

In order to effectively utilize the by-products of sea-food, the utilization of enzyme-modified flounder(*Limanda aspera*) skin gelatin as an emulsifier was investigated.

In the experiment, the gelatin was extracted from the flounder skin with the heat-treatment at 60°C and in pH 5.0 for 3 hrs with four volumes of distilled water and emulsifiers were enzymatically modified L-leucine alkyl esters(L-leucine-OC<sub>n</sub> ; n=2, 4, 6, 8 and 10) to the gelatin(EMFSG-C<sub>2</sub>, EMFSG-C<sub>4</sub>, EMFSG-C<sub>6</sub>, EMFSG-C<sub>8</sub>, EMFSG-C<sub>10</sub>) for improving the functional properties such as emulsifying activity, emulsifying viscosity, whippability, electric conductivity, critical micelle concentration and interface tension, etc. Also, the functional properties of the L-leucine alkyl ester modified gelatins were compared with those of Tween-60 as reference.

Molecular weights of the enzymatically modified flounder skin gelatin(EMFSG) were 20.5 kDa. in EMFSG-C<sub>2</sub>, 19.5 kDa. in EMFSG-C<sub>4</sub> and 16.5 kDa. in EMFSG-C<sub>6</sub>, EMFSG-C<sub>8</sub> and EMFSG-C<sub>10</sub>. respectively.

Emulsifying activity and emulsifying viscosity in the modified gelatins were risen with increase of carbon number of the introduced L-leucine alkyl esters. Among the modified gelatins, EMFSG-C<sub>6</sub> exhibited the highest emulsifying stability and foaming stability, whereas EMFSG-C<sub>8</sub> showed the highest whippability.

The electric conductivities of the all EMFSG-C<sub>n</sub> were linearly risen to critical micelle concentration(CMC), therefore EMFSG-C<sub>10</sub> exhibited the lowest CMC value and interface tension, and dense particles in the microscopic observation.

In conclusion, the best quality in functional properties was assured on EMFSG-C<sub>10</sub>.

### 서 론

가능성이 뛰어난 단백질의 수요가 늘어남에 따라 단백질의 기능성을 개량하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다(Kinsella, 1976; Feeney, 1977; Whitaker, 1977; 김 등, 1988). 그리고 단백질의 기

능성은 주로 아미노산 조성이나 아미노산 배열 순서에 의해서 좌우되는데 이러한 것을 위해서 아미노산 조성 혹은 배열 순서를 변화시키는 연구도 보고된 바 있다(Kinsella, 1982; Feeney 등, 1982). 최근 단백질을 이용한 유화제 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. Takehara(1985)는 아

미노산 유도체의 유화제에 관하여, Hidaka 등(1985)은 2-hydroxyalkyl기를 갖는 새로운 양성 계면활성제에 대하여, Mita(1986)는 유화성에 관련된 단백질의 계면활성제에 대하여 연구한 바 있다. 특히, 단백질을 효소적으로 수식하여 계면성(유화성과 포말성)을 증가시키는 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다(Toiguchi 등, 1982; Watanabe 등, 1981a, 1982; Shimada 등, 1982; Kato 등, 1983b; Yazawa 등, 1984). 또, Shimizu 등(1985)은  $\beta$ -lactoglobulin의 유화성과 단백질 구조 사이의 성질에 대한 관계를 연구하였고, 단백질-다당류 혼합물이 O/W 형태의 유화안정성에 미치는 효과에 대하여 보고된 바 있다(Hansen 등, 1972; Kato 등, 1988; 1989). 그러나 어피 젤라틴을 이용하여 유화제로서 기능성 개선을 시도한 연구는 아직 진행되어 있지 않았으므로 본 실험에서 검토하였다.

우리나라 수산물의 총 생산량(1989년도)은 331만 9천톤이고 여기에 수입량은 합치면 총 공급량은 392만 2천톤이었다. 이 중 가공원료로 이용된 것은 총 공급량의 85.1%, 선어로 유통된 것은 14.9%로 가공율이 매년 현저하게 높아가고 있다(박, 1991). 가공시 약 30만톤의 어피가 폐기되어 대부분 사료 또는 비료로 이용되거나 일부는 폐기되어져 환경오염을 야기시키고 있다. 따라서 가공잔사의 보다 효율적인 회수 이용, 혹은 그 처리를 위한 연구가 절실히 요망되고 있는 실정이다. 어피는 단백질 중 콜라겐이 80% 이상 함유되어 있으므로 이를 열수 추출법을 통해서 쉽게 젤라틴으로 추출할 수 있다.

본 연구는 어류의 가공 부산물 중 이용 가능한 부분을 회수하여 이용하기 위한 목적으로 시도하였으며, 우선 어피를 보다 효율적으로 이용할 목적으로 가자미 피에서 젤라틴을 추출한 다음, 젤라틴을 leucine alkyl ester로써 유도체화하여 소수성을 증가시킴으로써 유화성과 같은 기능성을 개선코자 실험하였기에 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 1. 원료 어피

본 실험에 사용된 가자미(*Limanda aspera*) 피(皮)는 부산시 사하구 장림동 소재 대경수산(株)에서 구입하여 가로세로 1cm 정도로 자른 다음, 차가운 물로 5회 수세한 후 -60℃에서 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

### 2. 젤라틴 추출

젤라틴 추출은 예비실험을 통하여 다음과 같은 조건에 따라 실시하였다. 어피를 1%  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  용액에 1일간 침적시켜서 비콜라겐 물질과 이물질 제거하고 난 다음 cheesecloth로 여과하여 첨가수량 4배, 반응시간 3시간, 반응온도 60℃, 반응 pH 5로 하여 추출하였다. 추출된 젤라틴 용액은 여과(Whatman No. 1)한 후 활성탄으로 처리하여 정제한 다음 열풍건조(50℃, 3일간)하여 젤라틴을 제조하였다(Fig. 1). 제조된 젤라틴은 2℃에서 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

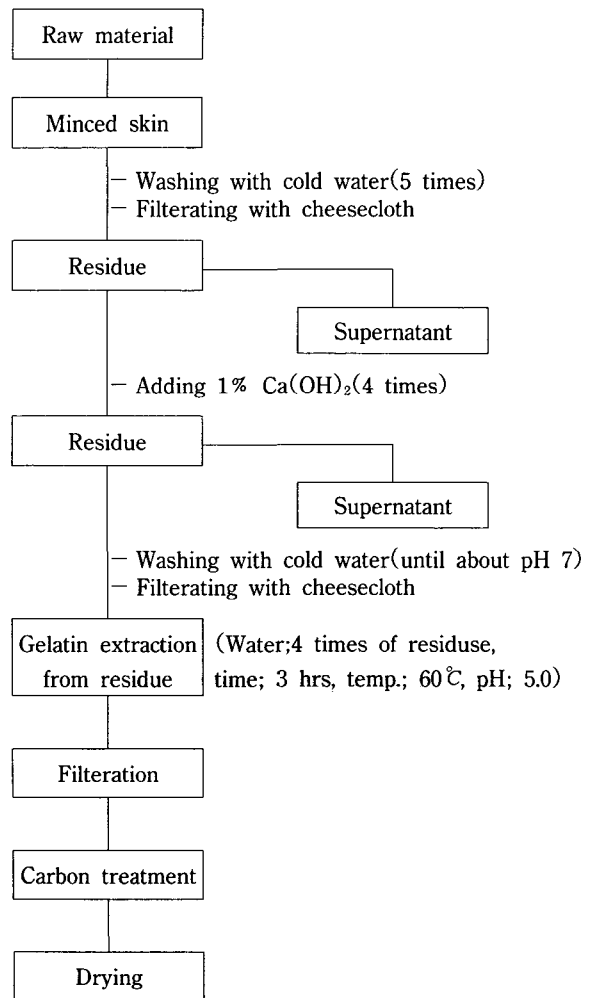


Fig. 1. Procedure for extraction of gelatin

### 3. L-Leucine alkyl ester의 합성

L-Leucine alkyl ester의 합성은 Kato 등(1962)의 방법에 따라 합성하였다. 즉, L-leucine(Sigma 제

품) 0.05mol, p-toluene sulfonic acid 0.055mol, alcohol(ethanol, butanol, hexanol, octanol, decyl alcohol) 20ml 및 CCl<sub>4</sub> 100ml의 혼합물을 자비환류(ethyl, butyl ester:115℃±5℃; hexyl, octyl, decyl ester: 125℃±5℃)하여 균일한 용액으로 만들었다. 이 용액을 12~24시간 동안 반응시킨 후 감압 농축하여 ethyl ester는 ethanol-ether, butyl ester는 acetone-ether 그리고 hexyl, octyl, decyl ester는 acetone-petroleum ether로 각각 재결정시켰다. 합성한 L-leucine alkyl ester(ethyl, butyl, hexyl, octyl, decyl ester)는 n-butanol:acetic acid:H<sub>2</sub>O(4:1:2)을 전개 용매로 한 TLC(Sigma 제품) 상에서 분리 동정하여 확인한 결과, L-leucine ethyl ester의 R<sub>f</sub>값은 0.81, L-leucine butyl ester부터 L-leucine octyl ester까지는 0.80, 그리고 L-leucine decyl ester는 0.78였다.

#### 4. Papain에 의한 flounder skin gelatin(FSG)과 L-leucine-OC<sub>n</sub>(n; 2, 4, 6, 8, 10)의 합성

FSG와 L-leucine-OC<sub>n</sub> 합성은 Watanabe(1981a)의 방법에 따라 합성하였다. 가자미피 젤라틴 20g을 250 ml 비이커에 취하고, 2 mM-mercaptoethanol이 포함된 1M carbonate buffer(pH 9.0)와 acetone을 80:20으로 혼합한 용액을 기질 농도가 33%(w/w)가 되도록 가하여 교반한 다음 L-leucine alkyl ester 0.02 mole과 papain(13 units/mg, Sigma 제품) 1% (E/S)를 첨가한 혼합물을 37℃에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 papain의 불활성화를 위하여 1N HCl 용액을 반응물 부피의 약 2배 가량 가한 다음 이 반응물을 2℃에서 증류수로 3일간 투석한 후 동결 건조(DURA-DRY, F. T. S. System Inc.)하여 유화제로 사용하였다.

#### 5. 분자량 측정

젤라틴 가수분해물(Gelatin hydrolysate, GH)과 효소적으로 수식된 젤라틴(enzymatically modified flounder skin gelatin, EMFSG)의 분자량 측정은 Weber와 Osborn(1969)의 측정 방법에 따라 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 측정하였다. Polyacrylamide gel 농도를 15%로 하여 pH 7.0에서 각 sample 당 8 mA의 전류를 12시간 통과시킨 후 고정액(메탄올:빙초산:물=400 ml:70 ml:530 ml)과 염색액(고정액 500 ml속에 Coomassie brilliant blue R 1.25 g) 및 탈색액(메탄올 50 ml, 빙초산 75 ml를 1 l로 정용)에 차례로 넣어서 marker protein과 비교하여 분자량을 측정하였다. Marker protein은 carbonic anhydrase(29 kDa),

cytochrome C(12.4 kDa), aprotinin(6.5 kDa), insulin(5.7 kDa) 등을 사용하였다.

#### 6. 기능성

##### 1) 포말성 및 포말안정성

포말성과 포말안정성은 Johnson 등(1983)과 Watanabe 등(1981a)의 방법에 따라 실시하였다. 각각의 EMFSG를 1% 분산액 20 ml로 만들어 20℃에서 20분간 교반하여 완전히 녹인다. 그 용액을 균질기(Ace Homogenizer AM-7)로 3분간 10,000rpm에서 포립시킨 후 즉시 250 ml 메스실린더에 옮긴 다음 30초 후에 전체량, 거품량 및 물층의 부피를 각각 측정하여 계산하였다.

$$\text{포말성} = \frac{\text{전체부피}(ml) - \text{물층부피}(ml)}{\text{전체부피}(ml)}$$

포말안정성은 포립된 각 시료를 250 ml 메스실린더에 옮긴 후 20℃에서 30분간 정치시킨 후 남아 있는 물층을 측정하여 포말 안정성을 계산하였다.

$$\text{포말안정성} = \frac{\text{전체부피}(ml) - \text{물층부피}(ml)}{\text{최초부피}(ml)}$$

##### 2) 유화성 및 유화안정성

유화성은 Watanabe 등(1981a)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 1% 분산액을 20분간 충분히 교반한 다음 분산액 10 ml와 대두유(동방유량 Co.) 10 ml를 섞어서 균질기(Ace Homogenizer, AM-7)로 12,000rpm에서 5분간 균질화시켰다. 이 유화액을 즉시 원심관(12 mm×110 mm)에 넣고 원심분리(3,000×g)하여 전체 높이와 유화된 층의 높이(크림층)를 측정하여 계산하였다.

$$\text{유화성} = \frac{\text{유화된 층의 높이}(cm)}{\text{시험관 내의 총내용물의 높이}(cm)}$$

유화안정성은 Shimada 등(1984)의 방법에 따라 실시하였다. 유화성과 같은 방법으로 균질화시킨 유화액을 즉시 메스실린드(100 ml)에 넣고 20℃에서 4시간 동안 방치한 후 유화되어 있는 부분의 부피를 측정하여 계산하였다.

$$\text{유화안정성} = \frac{\text{유화된 부피}(ml)}{\text{전체부피}(ml)}$$

##### 3) 점도 및 유화점도

각각의 EMFSG를 1% 분산액으로 만들어 1N HCl과 1N NaOH로 pH를 3~11까지 맞추어(pH 증가는 2) 2시간 동안 방치한 후 20℃에서 측정하였다. 측정은 Ostwald viscometer로 물과 비교하여 측정하였다.

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{d_1 t_1}{d_2 t_2} \quad (\eta: \text{점도}, d: \text{밀도}, t: \text{낙하시간})$$

유화점도는 1% 분산액을 점도측정과 같은 방법

으로 pH를 맞추고 대두유와 1:1로 섞어 20 ml로 만든 후 균질기로 12,000rpm에서 3분간 균질화시킨 후 점도 측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

4) 전기 전도율 측정

전기 전도율 측정은 Shimada 등(1984)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 각각의 탈이온수 20 ml에 EMFSG를 0.01%~0.20%까지 가하여 분산액을 만든 다음, 20℃에서 30분간 방치시킨 후 Conductivity Meter(Metrohm Ltd)로 측정하였다.

5) 표면장력의 시간 의존성

각각의 EMFSG를 탈이온수로 0.05%의 분산액을 만들어 시간 변화에 따른 표면 장력을 20℃에서 Du Nouy Tensionmeter(Shimadzu Ltd)로 측정하였다.

6) 표면장력의 농도 의존성

각 EMFSG를 탈이온수에 분산시켜 분산액(1.0×10<sup>-3</sup>~1.0%)을 5)의 결과에 따라 1시간 동안 방치시킨 후 20℃에서 표면장력을 측정하였다. 표면과 잉농도 계산은 표면장력의 농도 변화별 측정에 대한 값을 이용하여 Gibbs의 흡착 등온식(Gibbs' adsorption equation)으로 계산하였다.

$$\Gamma = -1/RT \times d\gamma/d \ln C$$

여기서  $\Gamma$ : 표면과잉농도

C: sample 농도

$\gamma$ : 표면장력(dyne/cm)

T: 절대온도(°K)

R: 기체상수

유화제에 대한 각 분자당 표면적은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$A = 1/(N_A \times \Gamma)$$

여기서, A: 분자당 표면적(Å<sup>2</sup>/molecule), N<sub>A</sub>: Avogadro's Numbers

7) 유화현상 관찰

EMFSG와 대조구인 공업적 유화제, Tween-60을 각각 1% 분산액으로 만들고, 그 분산액과 대두유

를 1:1로 섞어 원심분리(3,000×g)하여 유화액(크림층)을 만들어 전자현미경(Nikon Co.)으로 100배 확대하여 유화현상을 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. Papain에 의한 FSG와 L-leucine-OC<sub>n</sub>(n=2, 4, 6, 8, 10)의 합성

Papain에 의해 합성된 EMFSG의 수율을 Table 1에 나타내었다. L-leucine ethyl ester부터 L-leucine octyl ester까지 도입한 EMFSG의 수율은 78%~81%로서 큰 차이가 없었으며 L-leucine decyl ester를 도입한 EMFSG는 92%, 기질을 papain으로 처리한 가수분해물(GH)의 수율은 98%였다.

Watanabe 등(1981a)은 시판 젤라틴에 leucine ethyl ester를 도입한 결과 15분 반응시켜 수율이 95%였고, 반응시간이 길수록 수율은 급격히 감소하였으며, 반응 후 염기처리로 효소의 불활성화를 시키는 것보다 산처리에 의한 것이 약간의 수율증가를 하였다고 보고하였다. Shimada 등(1982)도 시판 젤라틴에 leucine dodecyl ester를 papain으로 합성한 결과 90%의 수율을 얻었다고 보고한 바 있다.

2. 분자량 측정

가자미피 젤라틴 가수분해물(GH)과 L-leucine alkyl ester를 도입하여 효소적으로 수식된 젤라틴(EMFSG-C<sub>n</sub>)의 분자량을 측정하기 위하여 carbonic anhydrase 29 kDa, cytochrome C(12.4 kDa), aprotinin(6.5 kDa), insulin(5.7 kDa) 등의 marker protein을 대조구로 하여 SDS-PAGE 전기 영동법으로 분석한 결과(Fig. 2), 분자량은 대개 10~50 kDa까지 넓은 범위내에 분포하였는데, 그 이유는 젤라틴

Table 1. Yield and functional properties of gelatin hydrolysate and EMFSG

EMFSG	Emulsion	Emulsion stability	Whippability	Foaming stability	Yield(%)
Gelatin hydrolysate*	0.00	0.00	1.00	0.10	98.00
EMFSG-C <sub>2</sub>	0.53	0.87	1.18	0.15	78.00
EMFSG-C <sub>4</sub>	0.55	0.93	5.00	0.30	82.00
EMFSG-C <sub>6</sub>	0.56	1.00	5.50	0.35	80.00
EMFSG-C <sub>8</sub>	0.57	0.92	5.70	0.20	81.00
EMFSG-C <sub>10</sub>	0.57	0.86	3.40	0.10	92.00

\* Gelatin was incubated with papain in the absent of any L-leucine alkyl ester.

자체의 분자량이 일정하지 않기 때문인 것으로 판단된다. 그러므로 EMFSG의 평균 분자량을 측정하기 위해서 TLC-Scanner(Toyo Kagaku Sangyo Co.)로 570 nm에서 분자량 분포를 측정하였다(Fig. 3).

측정한 평균 분자량은 GH가 21.5 kDa, EMFSG-C<sub>2</sub>와 EMFSG-C<sub>4</sub>가 20.5 kDa, 19.5 kDa였으며, EMFSG-C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>은 모두 16.5 kDa였다.

Watanabe 등(1981a)은 시판 젤라틴으로부터 효

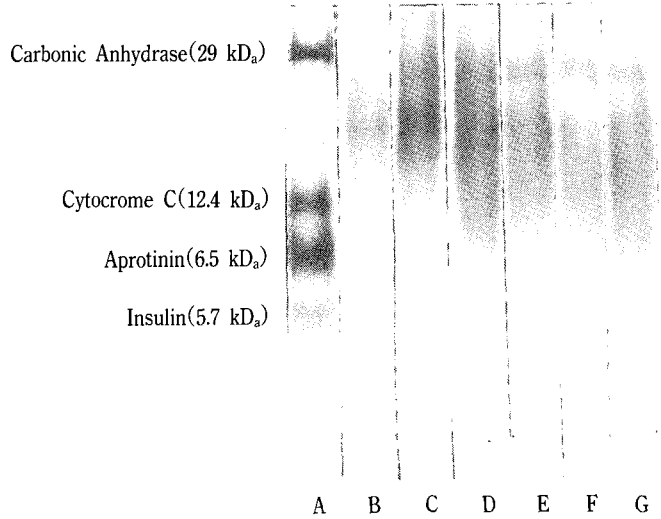


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) for gelatin hydrolysate and EMFSG-C<sub>n</sub> was carried out at pH 7.0 by 8 mA per each sample and in 15% concentration of polyacrylamide gel for 12 hrs. A: Marker protein, B: Gelatin hydrolysate, C: EMFSG-C<sub>2</sub>, D: EMFSG-C<sub>4</sub>, E: EMFSG-C<sub>6</sub>, F: EMFSG-C<sub>8</sub>, G: EMFSG-C<sub>10</sub>

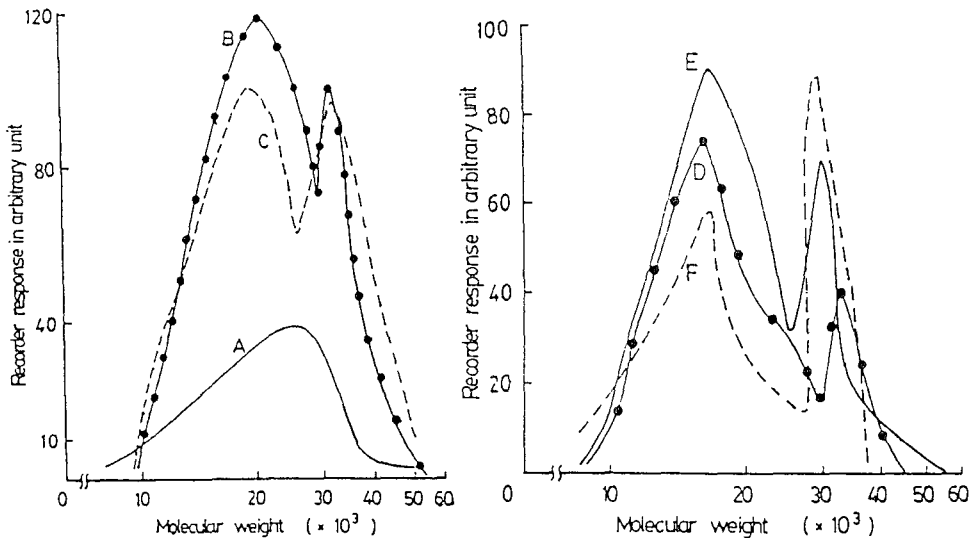


Fig. 3. Molecular weight distribution of gelatin hydrolysate(A), EMFSG-C<sub>2</sub>(B), EMFSG-C<sub>4</sub>(C), EMFSG-C<sub>6</sub>(D), EMFSG-C<sub>8</sub>(E) and EMFSG-C<sub>10</sub>(F). Determined by measuring a TLC-scanner at 570 nm and represented by a recorder response.

소적 수식을 통한 평균 분자량을 측정된 결과, GH는 12 kDa이고 유화제는 7.5 kDa 부근이었다고 보고하였다. 한편, Toiguchi(1982)는  $\alpha_{s1}$ -casein의 효소적 수식에 의해서 반응이 진행되는 동안 기질 단백질의 분자량 변화를 SDS-PAGE로 관찰한 결과, 25 kDa의 기질 단백질들이 반응 시간 5분만에 20 kDa으로 분해되었다고 보고한 바 있다.

### 3. 기능성

#### 1) 포말성 및 포말안정성

각각의 EMFSG를 공업적 유화제인 Tween-60과 비교하여 포말성 및 포말안정성을 측정된 결과, Table 1에 나타난 바와 같이 포말성은 EMFSG-C<sub>8</sub>이 5.5, 그리고 포말안정성은 EMFSG-C<sub>6</sub>가 0.35로서 각각 가장 높았으며, 포말성은 EMFSG-C<sub>6</sub>, 포말안정성은 EMFSG-C<sub>10</sub>을 제외하고는 Tween-60보다 우수하였다. 그리고 Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 포말성은 탄소수가 8개 도입(EMFSG-C<sub>8</sub>)될 때까지, 포말안정성은 탄소수가 6개 도입(EMFSG-C<sub>6</sub>)될 때까지 각각 증가를 보이다가 그 이상 탄소수가 커지면 오히려 감소하는 경향을 보였다. Watanabe 등(1981a)은 포말성에서는 탄소수 8개 도입하는 것이 가장 좋았고, 포말안정성은 탄소수 6개를 도입할 때가 가장 우수하였다고 하였는데, 그 결과는 본 실험결과와 일치하였다. 또 Watanabe 등(1981b)은 젤라틴의 포말성은 succinyl화된 젤라틴보다 다소 감소하였지만 포말안정성은 젤라틴이 0.1인데 비해 succinyl화된 젤라틴은 0인 것으로 보고하였다. 그러나 FPC(Fish protein concentration), SPI(Soybean protein isolate), casein, ovalbumin 등은 succinyl화한 것이 하지 않은 것보다 대체로 높게 나타났다. Shimada 등(1984)은 pH변화에 따라 포말성과 포말안정성을 실험한 결과, 젤라틴에 탄소수 6개가 도입된 유화제는 포말성과 포말안정성이 거의 변화되지 않았지만, 탄소수 12개가 도입된 것에는 포말성은 산성쪽으로, 포말안정성은 염기성쪽으로 갈수록 다소 증가하였다고 보고한 바 있다.

#### 2) 유화성 및 유화안정성

유화성 및 유화안정성을 측정된 결과는 Table 1 및 Fig. 4에 나타난 바와 같이 유화성은 탄소수가 증가할수록 약간 증가하는 경향을 보였지만 유화안정성은 탄소수가 6개 도입될 때까지는 대체적으로 증가를 보인다 그 이상의 탄소수가 결합되면 감소하는 경향을 나타냈다. 포말안정성도 같은 경향을 나타냈는데, 그 이유는 유화안정도에 영향을 미치는 인자(액체 방울이 유합되는 것을 막는 것)와 거품의 안정도에 영향을 미치는 인자(기포의

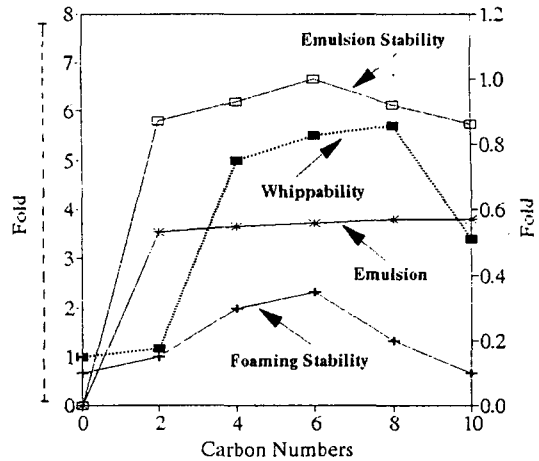


Fig. 4. Functions of EMFSG and gelatin hydrolysate on emulsion, emulsion stability, whippability and foaming stability.

와해를 막는 것)가 어느 정도 비슷하기 때문이다 (이 등, 1981). Watanabe 등(1981a)은 젤라틴에 leucine alkyl ester를 도입한 결과, 탄소수가 증가할수록 유화성이 증가하였다고 보고하였고, 또 반응 시간이 15분까지는 증가하다가 그 이상일 경우에는 유화성의 증가는 없는 것으로 보고하였다. 또 Arai 등(1984)은 효소적으로 수식한 젤라틴의 유화성 및 유화안정성을 온도와 농도변화에 따라 실험한 결과, 온도에는 거의 변화가 없지만, 농도가 증가할수록 유화성과 유화안정성은 증가하였다고 보고한 바 있다. Shimada 등(1984)도 젤라틴에 탄소수 6개와 12개가 각각 도입된 유화제를 비교 실험한 결과, 유화성은 거의 같았으며 유화안정성은 전자가 1.00으로서 후자의 0.8보다 안정하였고, pH변화에 의한 유화성과 유화안정성은 거의 변화가 없는 것으로 보고하였다. Shimizu 등(1984)은  $\beta$ -lactoglobulin이 pH 변화에 따라 유화성을 측정된 결과, pH가 증가할수록 유화성이 증가하였다고 보고하였으며, Sathe 등(1982)도 단백질의 농도 및 pH의 변화에 따른 유화성의 측정에서 pH의 변화요인이 영향을 미친다고 보고한 바 있다. Aoki 등(1980)은 대두 단백질의 유화성과 유화안정성은 등전점부근으로 접근할수록 감소하는 경향을 나타낸다고 보고하였고, Seguro 등(1989)은 대두 단백질을 인산화함으로써 유화성과 유화안정성은 증가하였다고 보고한 바 있다. Kato 등(1983a)은 ovalbumin, 7S globulin 그리고 k-casein 등은 열변성에 의한 유화성이 증가하였고,  $\beta$ -lactoglobulin과 BSA(bovine serum albumin) 등은 감소하였다고

보고하였다.

3) 점도 및 유화점도

점도 및 유화점도를 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 점도는 효소적으로 수식한 EMFSG가 Tween-60보다 약간 높았으며, pH의 변화에 따른 영향은 없었다. 그리고 탄소수의 증가에 의한 영향도 거의 나타나지 않았다. 그러나 유화점도는 탄소수가 증가할 수록 유화점도가 다소 증가하는 경향을 보였는데, 이것은 유화성이 좋은 유화제가 물-기름 계면에서 많은 소수성기를 노출시켜 유화작용을 하고 있기 때문인 것으로 판단된다. 그리고 pH에 의한 영향은 크지 않은 것으로 나타났다.

Shimada 등(1984)도 젤라틴에 효소적으로 수식한 유화제의 점도와 유화점도 등은 pH의 변화에 의해 큰 영향을 받지 않는 것으로 보고하였다. 그리고 Haque(1988) 등은 점도와 유화성과의 관계는 상반적인 관계라고 보고한 바 있다.

4) 전기 전도율 측정

전기 전도율 측정은 Fig. 5에서와 같이 농도의 변화에 따라 전기 전도율이 증가하다가 임계미셀농도(critical micelle concentration, cmc) 지점에서 직선의 증가율이 약간 감소하는 경향을 보였다. 그 이유는 임계미셀농도지점에서 미셀을 형성하여 전기 전도율의 증가 폭을 감소시키는 역할을 하고 있기 때문인 것으로 생각된다. 임계미셀농도는 EMFSG-C<sub>10</sub>이 가장 낮은 0.05에서 미셀이 형성되기 시작하였다. 공업적 유화제인 Tween-60은 전도율이 측정되지 않았다. 젤라틴 가수분해물은 전기 전도율이 비례적으로 증가하였으므로 어떤 농도에서도 미셀이 형성되지 않았다. Shimada(1984) 등은

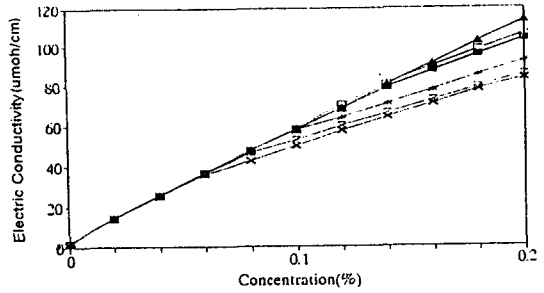


Fig. 5. Electronic conductivity according to concentration for EMFSG and gelatin hydrolysate  
 ■, GH; +, EMFSG-C<sub>2</sub>; \*, EMFSG-C<sub>4</sub>;  
 □, EMFSG-C<sub>6</sub>; ×, EMFSG-C<sub>8</sub>; ▲, EMFSG-C<sub>10</sub>.

젤라틴을 효소적으로 수식한 유화제중 탄소수가 12개 도입된 것이 0.04%의 농도에서 임계미셀농도가 결정되었고, 젤라틴 가수분해물, casein, BSA (bovine serum albumin)에서는 어떠한 임계미셀농도도 나타나지 않았다고 보고하였다.

5) 표면장력 측정

시간 변화에 따른 표면장력의 측정 결과는 Fig. 6과 같다. EMFSG가 탈이온수 속에서 분산되는 처음의 zero time에서 1시간까지는 표면장력이 급격히 떨어지지만 그 이상의 시간이 경과한 후에는 표면장력의 변화가 거의 없었다. 이것을 통해 유화입자가 표면에 흡착되는데 걸리는 시간을 알 수 있다. 그러므로 표면에 유화입자가 완전히 흡착된 후에는 더 이상의 표면장력이 감소하지 않는 것으로 판단된다. 따라서 농도변화에 따른 표면장력의 측정은 EMFSG 분산액을 1시간 동안 방치시킨 후

Table 2. Viscosity and emulsifying viscosity of gelatin hydrolysate, EMFSG and Tween-60

Item	pH	Sample						
		GH	EMFSG-C <sub>2</sub>	EMFSG-C <sub>4</sub>	EMFSG-C <sub>6</sub>	EMFSG-C <sub>8</sub>	EMFSG-C <sub>10</sub>	Tween-60
Viscosity(Cp)	3	1.12	1.22	1.21	1.20	1.19	1.18	1.12
	5	1.12	1.19	1.19	1.19	1.16	1.14	1.13
	7	1.11	1.18	1.19	1.19	1.13	1.12	1.13
	9	1.11	1.17	1.19	1.18	1.14	1.13	1.12
	11	1.11	1.17	1.17	1.17	1.15	1.13	1.13
Emulsifying viscosity(Cp)	3	-	5.83	5.61	5.83	6.19	6.45	5.04
	5	-	6.58	6.27	6.79	6.95	6.98	4.97
	7	-	6.82	6.79	6.97	7.12	7.36	5.24
	9	-	6.76	6.58	6.44	6.55	7.01	4.77
	11	-	6.66	6.50	6.33	6.53	6.32	4.43

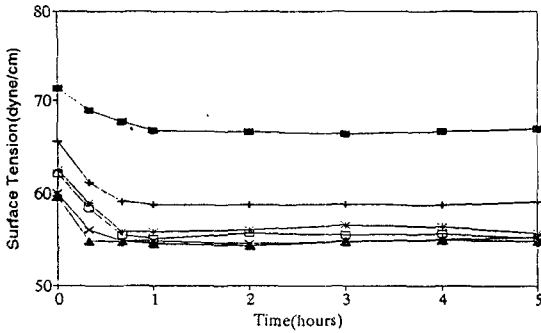


Fig. 6. Surface tension reduction by time-change for EMFSG and gelatin hydrolysate  
 ■, GH; +, EMFSG-C<sub>2</sub>; \*, EMFSG-C<sub>4</sub>;  
 □, EMFSG-C<sub>6</sub>; ×, EMFSG-C<sub>8</sub>; ▲, EMFSG-C<sub>10</sub>.

표면에 유화입자가 완전히 흡착된 다음 측정하였는데, 그 결과는 Fig. 7에서 나타낸 것과 같이 젤라틴 가수분해물의 표면장력은 계속 비례적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 소수성기인 L-leucine alkyl ester를 도입시킨 젤라틴의 EMFSG에는 어느 농도까지는 비례적으로 감소하였으나, 그 이상은 감소가 일어나지 않고 일정한 표면 장력을 나타내었다. 여기서 표면장력이 감소하는 부분의 농도는 표면활성 부분의 농도이고, 일정한 값을 나타내는 부분의 농도는 표면 불활성 부분의 농도가 된다. 그 이유는, 어떤 농도까지는 계속해서 유화입자가 표면에 흡착되지만 그 이상의 농도에서는 더 이상 표면에 흡착될 수 없는 표면 과잉(surface excess) 현상이 일어나므로 수용액 내부에서 미셀을 형성하게 되기 때문이다. 각 EMFSG 시료 중에서 탄소수 10개가 도입된 EMFSG-C<sub>10</sub>의 임계미셀 농도는 0.05이고, 표면장력은 35 dyne/cm로서 가장 낮은 농도와 표면장력을 나타내었다. 그러므로 EMFSG-C<sub>10</sub>이 가장 표면활성이 좋은 것으로 나타났으며, 탄소수가 증가할 수록 표면활성이 증가하는 경향을 보였다. Shimada 등(1984)은 젤라틴에 효소적으로 수식한 유화제 중 탄소수 6개와 탄소수 12개가 도입된 것들의 표면장력을 비교한 결과, 후자가 낮은 임계미셀농도와 표면장력을 나타냈다고 보고하였다. Arai(1984) 등은 유화입자가 분산된 물속에 기름이 첨가될 때의 계면장력은 온도변화에 따라 약간의 차이가 있다고 보고하였으며, Kato 등(1983a)은 공기-물 사이의 표면장력은 기름-물 사이의 계면장력보다 훨씬 크다고 보고한 바 있다.

또, 농도 변화에 따른 표면장력 측정의 결과에 의해 표면과잉 농도와 각 분자당 표면적을 계산한 값들을 Table 3에 나타내었다. 효소적으로 수식한

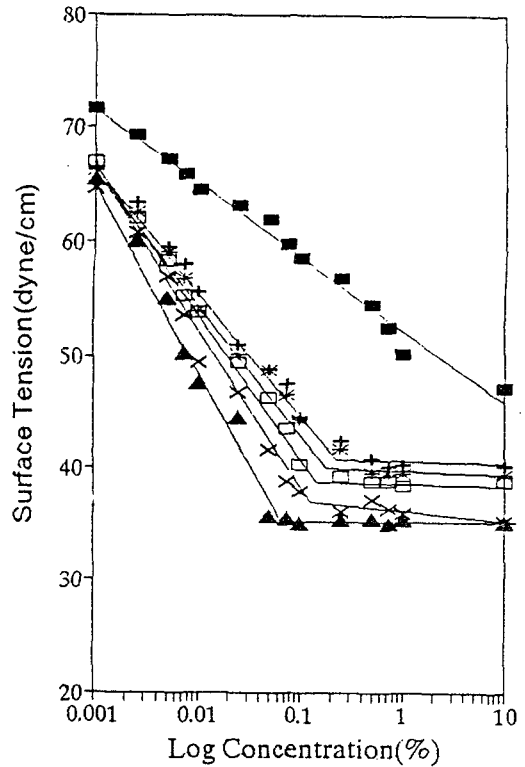


Fig. 7. Surface tension-log concentration relationships for EMFSG and gelatin hydrolysate  
 ■, GH; +, EMFSG-C<sub>2</sub>; \*, EMFSG-C<sub>4</sub>;  
 □, EMFSG-C<sub>6</sub>; ×, EMFSG-C<sub>8</sub>; ▲, EMFSG-C<sub>10</sub>.

Table 3. Surface excess and area requirements for gelatin hydrolysate, EMFSG and Tween-60

Sample	Surface excess* (mole/cm <sup>2</sup> )	Area requirement** (Å <sup>2</sup> /molecule)
GH	1.13 × 10 <sup>-10</sup>	147
EMG-C <sub>2</sub>	1.8 × 10 <sup>-10</sup>	92.3
EMG-C <sub>4</sub>	1.81 × 10 <sup>-10</sup>	91.8
EMG-C <sub>6</sub>	2.2 × 10 <sup>-10</sup>	75.5
EMG-C <sub>8</sub>	2.51 × 10 <sup>-10</sup>	66.2
EMG-C <sub>10</sub>	3.06 × 10 <sup>-10</sup>	54.3
Tween-60	1.68 × 10 <sup>-10</sup>	98.9

\*  $\Gamma = -1/RT \times d\gamma/d \ln C$

where,  $\Gamma$  is surface excess(mole/cm<sup>2</sup>), R is gas constant, T is absolute temperature, C is sample concentration and  $\gamma$  is surface tension(dyne/cm).

\*\*  $A = 1/(N_A \times \Gamma)$

where A is area requirement(Å<sup>2</sup>/molecule) and N<sub>A</sub> is Avogadro's number.

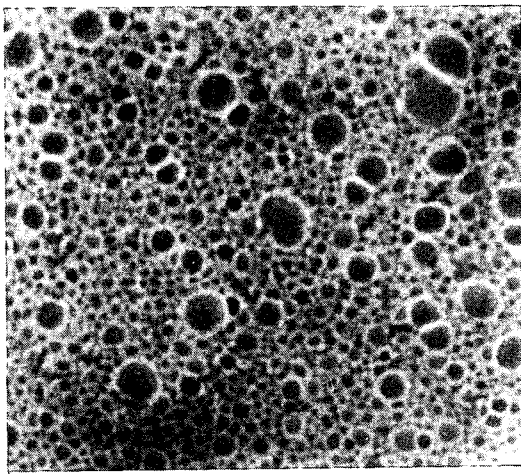


EMFSG는 모두 대조구인 공업적 유화제 Tween-60보다 높은 표면과잉 농도와 낮은 표면적을 차지하였다. 표면에 EMFSG가 흡착된 표면과잉 농도는 EMFSG-C<sub>10</sub>이  $3.06 \times 10^{-10} \text{ mole/cm}^2$ 로서 가장 높았으며, 탄소수가 증가할 수록 증가하는 경향을 보였다. 그리고, EMFSG 1분자당 표면적은 EMFSG-C<sub>10</sub>이  $54.3 \text{ \AA}^2$ 으로 가장 조밀하게 분포되어 있는 것으로 나타났으며, 탄소수가 증가할 수록 조밀하게 나타났다.

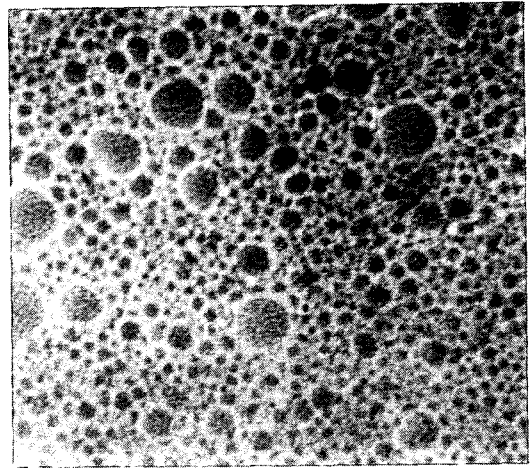
6) 유화현상 관찰

현미경을 통해 유화액을 관찰한 유화현상을 Fig. 8에 나타내었다. EMFSG는 모두 대조구인 Tween-60보다 조밀하게 분포되어 있었으며, 탄소수가 증가할 수록 더욱 더 조밀하게 분포되어 있었다.

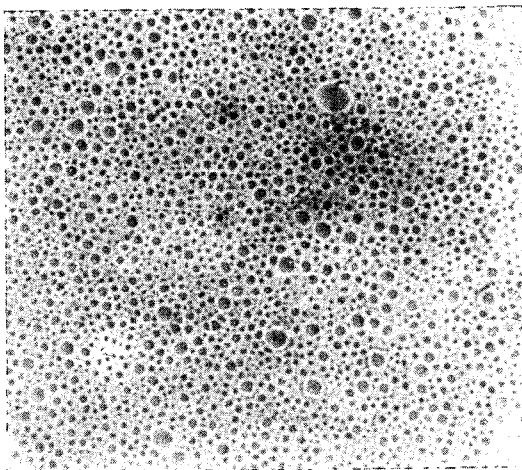
Watanabe 등(1982)은 유화성이 우수한 유화제는 유화막의 모양이 더 조밀하게 분포되어 있다고 보고하였다. 또, Lee 등(1987)은 유화성이 우수한 단백질의 유화현상은 유화막이 두껍고 거칠었으며, 낮은 유화성을 가진 단백질은 얇고 부드러운 막이었다고 보고한 바 있다.



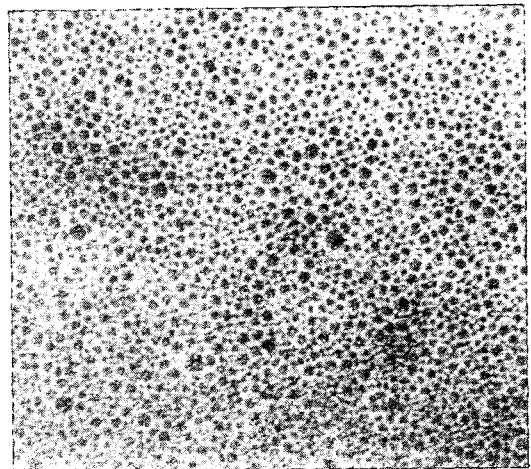
Tween-60



EMFSG-C<sub>4</sub>



EMFSG-C<sub>8</sub>



EMFSG-C<sub>10</sub>

Fig. 8. Microscopic observation(1:100) for emulsion phenomenon by EMFSG and Tween-60(concentration: 3 %)

요 약

어류가공시 부산물로 얻어지는 어피를 보다 효율적으로 이용하기 위하여 가자미피로부터 열수추출법으로 젤라틴을 추출한 후 이의 기능성 개선을 위해 L-leucine alkyl ester를 도입시킨 젤라틴의 기능성을 공업적 유화제인 Tween-60과 비교 검토하였다.

시제한 L-leucine alkyl ester가 도입된 젤라틴(EMFSG)의 분자량은 EMFSG-C<sub>2</sub>와 EMFSG-C<sub>4</sub>가 각각 20.5 kDa, 19.5 kDa였으나 EMFSG-C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>은 모두 16.5 kDa이었다. 유화성과 유화점도는 도입된 탄소수가 증가할 수록 증가하는 경향을 보였으나, 유화안정성 및 포말안정성은 EMFSG-C<sub>6</sub>, 포말성은 EMFSG-C<sub>8</sub>가 각각 가장 우수하였다. 전기전도율은 임계미셀농도 지점까지는 비례적으로 증가를 보이다가 그 이후로는 증가율이 감소되었으며, EMFSG-C<sub>10</sub>의 임계미셀농도가 가장 낮았다. 그리고 유화입자가 표면에 흡착되는데는 1시간, 1시간 후의 표면장력은 EMFSG-C<sub>10</sub>의 임계미셀농도가 가장 낮은 농도인 0.05%, 또 가장 낮은 35dyne/cm의 표면장력을 나타내었다. 이러한 표면장력의 측정 결과에 의해서 각 분자당 표면적은 54.3 Å<sup>2</sup>로서 가장 조밀하게 분포되었으며, 현미경 관찰에 의한 결과와 일치함을 확인하였다. 이러한 결과에 의해, EMFSG-C<sub>10</sub>의 기능성이 가장 우수하였으며, 모든 EMFSG는 대체로 대조구인 Tween-60보다 우수하였다. 그러므로 유화제로서의 이용이 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 1990년도 농원문화재단의 연구비 지원에 의하여 수행되었음을 밝히며 아울러 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

Aoki, M., O. Taneyama and M. Inami. 1980. Emulsifying properties of Soy protein: Characteristics of 7S and 11S proteins. J. Food. Sci. 45, 534.  
 Arai, S., M. Watanabe and N. Fujii. 1984. Physicochemical properties of enzymatically modified

gelatin as a proteinaceous surfactant. Agric. Biol. Chem. 48(7), 1861.  
 Feeney, R. E., R. B. Yamasaki and K. F. Geoghegan. 1982. Modification of Proteins, American Chem. Soc. Washington D. C. p. 3.  
 Feeney, R. E. 1977. Food proteins: Improvement through chemical and enzymatic modification. Eds. by Whitaker, J., Adv. Chem. Ser. p. 160.  
 Hansen, P. M. T. and D. H. Black. 1972. Whipping properties of spray-dried complexes from whey protein and carboxymethylcellulose. J. Food Sci. 37, 452.  
 Haque, Z. and J. E. Kinsella. 1988. Emulsifying properties of food proteins: Development of a standardized emulsification method. J. food Sci. 54(1), 39.  
 Hidaka, H., M. Murate and T. Onai. 1985. New amphoteric surfactants containing 2-hydroxy alkyl group. VII thermotropic liquid crystals of amphoteric surfactants. J. Japan Oil Chem. Soc. 34, 58.  
 Johnson, E. A. and C. J. Brække. 1983. Functional properties of acylated pea protein isolates. J. Food Sci. 48, 722.  
 Kato, A., T. Sato. and K. Kobayashi. 1989. Emulsifying properties of protein-polyaccharide complexes and hybrids. Agric. Biol. Chem. 53(8), 2147.  
 Kato, A. K. Murata. and K. Kobayashi. 1988. Preparation and characterization of Ovalbumin-dextran conjugate having excellent emulsifying properties. J. Agric. Food Chem. 36, 421.  
 Kato, A., Y. Osako. N. Matsudomi and K. Kobayashi. 1983a. Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. Agric. Biol. Chem. 47(1), 33.  
 Kato, T., A. Shimada and S. Arai. 1983b. Application of an enzymatically modified protein to bread making. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish, 30, 562.  
 Kato, A and S. Nakai. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. Biochim. Biophys. Acta, 624, 13.  
 Kinsella, J. E. 1982. Food Proteins. Applied Sci. Publishers, England, p. 51.  
 Kinsella, J. E. 1976. Functional properties of pro-

- tein in foods: A survey. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 7, 219.
- Lee, S. W., M. Shimizu, S. Kaninogawa and K. Yamauchi. 1987. Emulsifying properties of a mixture of peptides derived from the enzymatic hydrolysates of Bovine Caseins. Agric. Biol. Chem. 51(6), 1535.
- Mita, J. 1986. Surface-activity of proteins relating to emulsification. J. Japan Oil Chem. Soc. 35, 389.
- Sathe, S. K., S. S. Deshpande and D. K. Salunkhe. 1982. Functional properties of lipid seed proteins and protein concentrates. J. Food Sci. 47, 491.
- Seguro, K. and M. Motoki. 1990. Functional properties of enzymatically phosphorylated Soybean proteins. Agric. Biol. Chem. 54(5), 1271.
- Shimada, A., I. Yamamoto, H. Sase, Y. Yamazaki, M. Watanabe and S. Arai. 1984. Surface properties of enzymatically modified proteins in aqueous systems. Agric. Biol. Chem. 48(11), 2681.
- Shimada, A., E. Yazawa and S. Arai. 1982. Preparation of proteinaceous surfactants by enzymatic modification and evaluation of their functional properties in a concentrated emulsion system. Agric. Biol. Chem. 47, 173.
- Shimiau, N., M. Saito and K. Yamauchi. 1985. Emulsifying and structural properties of  $\beta$ -Lactoglobulin at different pHs. Agric. Biol. Chem. 49(1), 189.
- Takerhara, M. 1985. Amino acid derived surfactant. J. Japan Oil Chem. Soc. 34, 964.
- Toiguchi, S., S. Maeda, M. Watanabe and S. Arai. 1982. Purification and characterization of a surface-active macropeptide produced foam succinylated  $\alpha_{s1}$ -Casein by modification with papain. Agric. Biol. Chem. 46(12), 2945.
- Watanabe, M., M. Fujii and S. Arai. 1982. Characterization of foam-and emulsion-stabilizing functions of enzymatically modified proteins with surfactancy. Agric. Biol. Chem. 46(6), 1587.
- Watanabe, M., H. Toyokawa, A. Shimada and S. Arai. 1981a. Proteinaceous surfactant produced from gelatin by enzymatic modification: Evaluation for their functionality. J. Food Sci. 46, 1467.
- Watanabe, M. A. Shimada. and S. Arai. 1981b. Enzymatic modification of protein functionality: Implantation of potent amphiphilicity to succinylated proteins by covalent attachment of leucine alkyl esters. Agric. Biol. Chem. 45(7), 1621.
- Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406.
- Whitaker, J. R. 1977. Enzymatic modification of proteins applicable to foods. Adv. Chem. Ser. 160, 95.
- Yasawa, E., A. Shimada and S. Arai. 1984. Whipping property of an enzymatically gelatin and its application to a foam containing food. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 31(3), 145.
- 김세권, 광동채, 조덕제, 이응호. 1988. Plastein 반응을 이용한 정어리 단백질의 기능성 개선에 관한 연구. 한국영양식량학회지, 17(4), 312.
- 박영호. 1991. 세계의 수산업 현황과 전망에 관한 국제학술 심포지움: 한국수산업의 현황과 전망, p. 26.
- 이근무, 고광호. 1981. 에멀전과 거품, 콜로이드 및 계면화학, 탐구당, p. 199.
- 加藤哲夫, 牧角啓, 大野素徳, 泉室信夫. 1962. アミノ酸エチルエステルのP-ートルエンスルホン酸鹽 合成. 日本化學雜誌, 83(10), 1511.

1991년 8월 22일 접수

1991년 9월 14일 수리