KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 30, No. 5, pp. 1035~1039 (1998)

카제인-알긴산 혼합물의 비혼합성

최문정 · 황재관
연세대학교 생물산업소재연구센터

Incompatibility of Casein-Alginate Mixtures

MoonJung Choi and Jae-Kwan Hwang
Bioproducts Research Center, Yonsei University

Abstract

Phase separation is the typical phenomenon in protein-polysaccharide mixtures because of thermodynamic incompatibility between two macromolecules. Phase separations of casein-alginate-water systems were investigated by using phase diagram under varying pH (6, 8 and 10) and NaCl concentrations (0, 0.25 and 0.5 M). Incompatibility decreased with increasing pH and decreasing NaCl concentration. Molecular weight of alginates did not significantly affect the phase diagram of casein-alginate-water systems. The results strongly suggested that compatibility of casein and alginate involved electrostatic interactions.

Key words: casein, alginate, incompatibility, phase diagram

서 론

단백질과 탄수화물은 식품의 대표적인 거대분자들로서, 식품내에서 이들 성분의 기능 및 상호작용은 식품의 관능성에 큰 영향을 미친다. 단백질과 탄수화물의 혼합용액은 그 농도가 매우 낮은 경우를 제외하고는, 일반적으로 열역학적 비혼합성(thermodynamic incompatibility)에 의하여 상분리가 진행되어 각각의 상에 둘 중 한 성분의 농도가 증가하게 된다. 이와 같은 현상을 이용하여 고안된 것이 무막삼투(membraneless osmosis)이다. 무막 삼투현상은 탈지우유로부터 단백질을 농축하는데 처음으로 사용되었는데, 펙틴, CMC, arabinogalactan, gum arabic 등을 이용하여 단백질을 20~40%의 농도로 농축하였다[1,2]. 농축된 우유단백질 용액은 좋은 유화제이므로 소시지와 저지방 버터를 만들 때 extender로 쓸 수 있다. 최근에는 젤라틴과 갈락토만난 혼합물의 열역학적 비혼합성을 이용한 지방대체제가 개발된 바 있다[3].

탄수화물과 단백질 혼합용액에서 분리된 각상의 화학적 조성을 분석하므로써 평형 상도해(equilibrium phase diagram)를 그릴 수 있다[4-8]. 상도해에는 binodal curve, critical point, phase separation threshold, tie-line, rectilinear diameter 등을 나타낼 수 있다(Fig. 1). Binodal curve는 두 상으로 분리된 상태에서의 조성을 나타내며, 혼합용액은 binodal curve를 경계로 단일상과 두 상 용액으로 나뉜다. Tie-line은 평형상태에서 위의 상과 아래 상의 조성을 나타내는 binodal points를 연결하는 선이며, tie-line들의 중간을 지나는 선을 rectilinear diameter라고 한다. Critical point는 rectilinear diameter와 binodal curve가 만나는 점이며, 여기서 두 상은 같은 부피와 조성을 갖는다. Phase separation threshold는 상

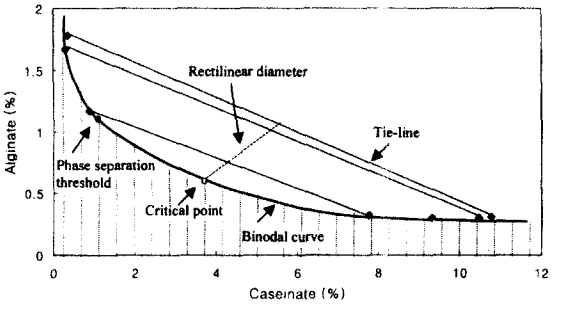

Fig. 1. Phase diagram of casein-alginate (Kelgin LV)-water system at pH 8 and 0.5 M NaCl. The region under the binodal curve (▦): one-phase mixed solutions, The region above the binodal curve (□): two-phase systems.

Corresponding author: MoonJung Choi, Bioproducts Research Center, College of Engineering B-521, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

분리가 일어날 수 있는 고분자들의 최소 농도이다. 여러 종류의 생고분자들 사이의 혼합성(compatibility)에는 상당한 차이가 있다[1,6,8]. Phase separation threshold 값이 클수록, 또는 critical point값이 높을수록, 그리고 binodal curve 아래 부분이 넓을수록, 두 고분자들의 혼합성은 더욱 증가한다.

열역학적 비혼합성은 해당 고분자의 전하, pH, 이온강도, 온도, 분자량, 고분자들의 세부적 분자구조에 의해 많은 영향을 받는다[8]. Antonov 등[5]은 펙틴과 알긴산의 구조가 젤라틴과의 열역학적 혼합성에 미치는 영향에 대하여 연구하였으며, Michon 등[9]은 iota-carrageenan과 젤라틴의 혼합성에 관하여 연구하였다. 또한, Antonov 등[4]은 다양한 종류의 단백질과 탄수화물을 사용하여 상도해를 제시하였다. 이때 사용된 탄수화물로는, 알긴산, CMC, 아밀로펙틴, 펙틴, 덱스트란, gum arabic 등이 있으며, 단백질로는 카제인, 젤라틴, 대두단백질, BSA, 난백단백질 등을 사용하였다. Kasapis 등[10]은 maltodextrin과 젤라틴 혼합용액에 관하여, 그리고 Semenova 등[11]은 serum albumin과 pectinate 혼합용액에 관하여 연구하였다.

본 연구에서는 대표적인 식품단백질과 탄수화물 고분자인 카제인과 알긴산을 이용하여 상분리 현상을 연구하였다. 분자량이 다른 두 종류의 알긴산을 사용하였으며, pH와 염농도가 두 거대분자의 혼합성에 미치는 영향을 상도해를 통하여 알아보았다. 상도해는 주어진 조건에서 알긴산이 존재할 때 카제인의 용해도 변화(solubility profile)로 생각할 수 있다. 카제인은 수분흡착성(water binding), whitening, 유화성, 포말성 등의 기능성을 가지며, 커피크림, 가공육제품, 디저트 등에 사용된다. 식품에서 카제인이 유화제로 작용하는 경우에 카제인과 비혼합적인 탄수화물을 첨가하면 유화안정성이 증가된다고 알려져 있으므로[12], 본 연구는 카제인-알긴산 혼합물의 비혼합성과 유화특성과의 관계를 이해하는데 기초자료로 사용될 수 있다.

재료 및 방법

재료

카제인은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA: C-8654)로부터 구입하였다. 분자량이 다른 2종류의 알긴산(Kelgin XL, Kelgin LV)은 Kelco Co. (San Diego, CA, USA)로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 황 등[13]은 고유점도 측정에 의한 Mark-Houwink 관계식을 통하여 Kelgin XL과 Kelgin LV의 분자량을 각각 1.64×10^5, 1.95×10^5으로 보고하였다.

카제인-알긴산 혼합용액의 제조

NaCl 0, 0.25, 0.5 M을 포함하는 pH 6, 8, 10의 buffer를 이용하여, 7%, 10%의 카제인용액과 2%, 3%의 알긴산 용액을 제조하였다. 카제인 용액과 알긴산 용액을 같은 부피로 섞은 뒤 1시간 동안 교반하여 혼합용액을 제조하였다.

상도해의 작성

카제인-알긴산 혼합용액을 20°C에서 7000 rpm으로 1시간 동안 원심분리하였다(Sorvall RC-5C Plus, DuPont, Newtown, CT, USA). 윗상과 아랫상을 각각 조심스럽게 취하여 단백질과 다당류의 농도를 측정하였다. 단백질농도는 Bio-Rad 단백질 분석kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용한 Bradford 비색법[14]으로 측정하였으며, 다당류 농도의 측정에는 phenol-sulphuric acid법[15]을 이용하였다. x축을 카제인 농도(%), y축을 알긴산 농도(%)로하여 각 pH와 염농도, 알긴산 종류에 따른 상도해를 작성하였다. 이들 상도해로부터 critical point와 phase separation threshold를 구하였다.

결과 및 고찰

상도해의 작성

본 연구를 통하여 pH, 염농도, 알긴산의 종류에 따라 18개의 상도해를 그릴 수 있다. Fig. 1은 한 예로서 pH 8, NaCl 농도 0.5 M에서 카제인과 알긴산(Kelgin LV) 혼합물의 상도해를 나타낸 것이다. Binodal curve의 바깥쪽 영역의 농도에서는 카제인-알긴산 혼합용액이 완전히 섞인 단일상 용액을 형성하며, 안쪽 영역의 농도에서는 카제인-알긴산 혼합용액이 새로운 두 상으로 나뉘어진다. 대체적으로 1% 이상의 카제인과 1% 이상의 알긴산을 혼합하였을 경우 이들 두 거대분자들은 열역학적 비혼합성으로 인해서 아랫상에는 단백질의 농도가 높고, 반면에 윗상에는 다당류의 농도가 높은 상태로 상분리가 일어난다. 다른 조건에서도 상도해를 그려서(그림 생략) critical point (CP)와 phase separation threshold (ST)를 구하여 Table 1에 정리하였다. 모든 pH에서 0 M NaCl 농도에서의 CP값이 NaCl 농도가 0.25과 0.5 M에서의 CP값보다 높았다. pH 8에서 Kelgin XL의 경우를 제외한 모든 혼합물에서, NaCl 농도가 0 M일 때 ST값이 가장 큰 것을 알 수 있다. 이것은 NaCl 농도가 0 M일 경우에 상분

Table 1. Critical points and phase separation thresholds of casein-alginates-water systems

Conditions			Critical point		Separation threshold		
Alginates	pH	NaCl (M)	Cpr (%)	Cps (%)	Cpr (%)	Cps (%)	Total (%)
XL	6	0	-	-	1.8	1.41	3.21
		0.25	4.4	0.54	1.8	0.86	2.66
		0.5	4.8	0.65	1.7	1.00	2.70
XL	8	0	4.6	0.68	1.7	1.19	2.89
		0.25	4.7	0.52	1.2	1.70	2.90
		0.5	3.8	0.74	1.2	1.38	2.58
XL	10	0	5.8	0.68	3.5	1.04	4.54
		0.25	3.7	0.84	1.9	1.40	3.30
		0.5	3.6	0.58	1.4	0.98	2.38
LV	6	0	4.3	0.72	2.2	1.12	3.32
		0.25	2.9	0.82	1.0	1.15	2.15
		0.5	3.8	0.58	1.2	1.11	2.31
LV	8	0	4.8	0.60	1.6	1.12	2.72
		0.25	5.1	0.42	1.6	0.86	2.46
		0.5	3.2	0.60	1.1	1.09	2.19
LV	10	0	5.1	0.83	2.4	1.50	3.90
		0.25	3.3	0.64	1.7	1.10	2.80
		0.5	2.8	0.88	1.0	1.42	2.42

리가 일어나기까지 더 큰 농도의 카제인과 알긴산을 녹일 수 있다는 것을 의미한다.

Kelgin XL과 Kelgin LV의 ST를 비교해보면 그 차이가 작기는 하나 대체로 Kelgin LV의 경우가 Kelgin XL보다 작은 것을 알 수 있다. 이것은 ST가 분자량이 증가함에 따라 감소한다는 Tolstoguzov[6]의 보고와 일치한다. 또한, Tolstoguzov[6]는 젤라틴은 그 구조가 coil 형태이고 구형 단백질에 비해서 excluded volume이 크기 때문에 젤라틴과 다당류 혼합용액의 ST는 2~4%이며, 구형 단백질과 다당류의 경우에는 보통 4%를 넘는다고 설명하였다. 본 연구에서 pH 10, 0 M NaCl에서 Kelgin XL을 이용하였을 경우를 제외하고는 ST값이 4%이하로 나타났는데, 이는 카제인의 구조가 coil형태에 가깝기 때문이다.

pH에 따른 상도해의 변화

Fig. 2는 pH에 따른 카제인-알긴산(Kelgin XL) 혼합물의 상도해를 나타낸 것이다. 본 실험에서 사용한 pH는 카제인의 pI(pH 4.6)보다 높으므로, 이 조건에서 카제인과 알긴산은 모두 음전하를 띠기 때문에 특정 농도 이상에서 상분리가 일어나는 것은 당연한 현상이다. NaCl 농도가 0 M과 0.25 M에서는 pH 10에서 두 거대분자 사이의 혼합성이 가장 컸다. NaCl 농도가 0 M일 경우에는 카제인의 농도가 낮을수록 즉, 4%이하에서 pH 10의 경우와 pH 6과 pH 8에서의 혼합성의 차이가 더 크게 나타났다. NaCl 농도가 0.5 M인 경우에는 pH에 따른 혼합성의 차이가 뚜렷하지 않았다. 분자량이 다른 알긴산(Kelgin LV)을 사용했을 경우에도 상도해의 양상은 Kelgin XL의 경우와 거의 유사하였다.

Grinberg와 Tolstoguzov[8]는 soy bean globulin과 gum arabic을 사용하여 단백질과 음이온 다당류 사이의 비혼합성이 pH가 증가함에 따라 감소하였다고 보고하였다. 같은 전하를 가진 단백질 분자들 사이의 정전기적 반발력은 pH가 증가함에 따라 더욱 커지므로 단백질 분자들간의 결합을 방해한다. 또한, Polyakov 등[16]은 카제인 중합체(aggregates)의 분자량이 pH를 6.6에서 11.0으로 증가시킴에 따라 120,000에서 30,000으로 감소한다고 보고했다. 이들의 결과는 pH 10에서 가장 혼합성이 크다는 본 연구의 결과를 뒷받침한다.

염농도에 따른 상도해의 변화

Fig. 3은 NaCl 농도가 카제인-알긴산(Kelgin LV) 혼합물의 상도해에 미치는 영향을 보여준다. pH에 관계없이 NaCl 농도가 0 M일 때 가장 혼합성이 컸으며, pH 10에서 NaCl 농도가 0M일 때와 다른 NaCl 농도일 때의 차이가 가장 컸다. 대체적으로 NaCl 농도가 0 M에서 0.25 M로 증가함에 따라 혼합성은 크게 감소하였으며, NaCl 농도가 0.25 M과 0.5 M일 때에는 거의 비슷한 혼합성을 나타냈다. Kelgin XL의 경우에도 Kelgin LV와 마찬가지로 NaCl 농도가 0 M일 경우에 가장 혼합성이 컸다.

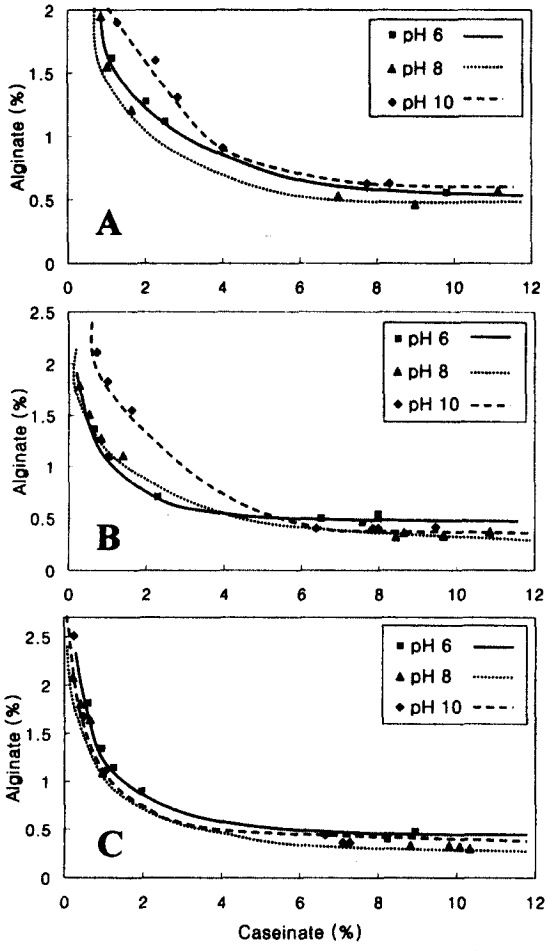

Fig. 2. Phase diagrams of casein-alginate (Kelgin XL)-water systems. A: 0 M NaCl, B: 0.25 M NaCl, C: 0.5 M NaCl

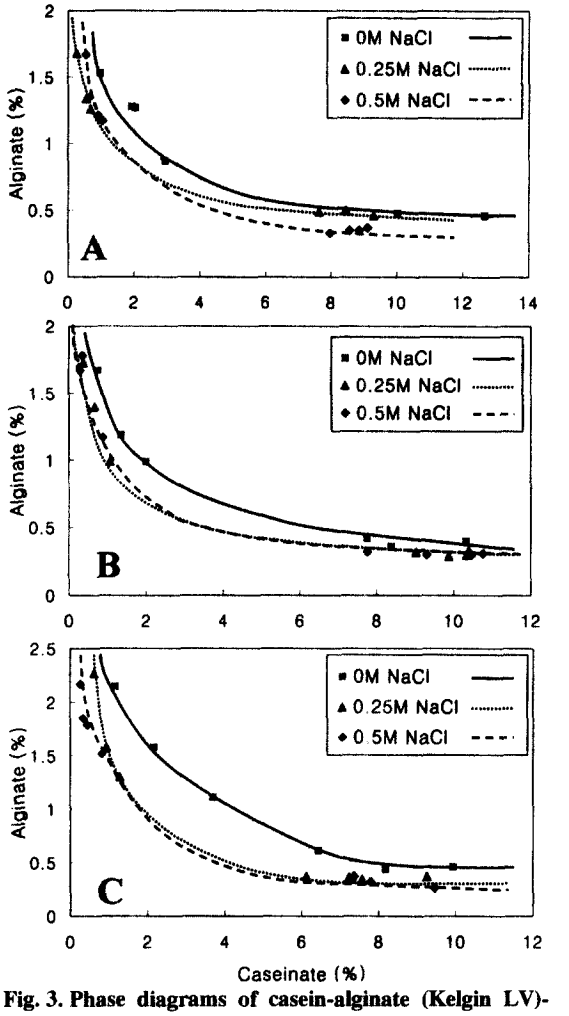

Fig. 3. Phase diagrams of casein-alginate (Kelgin LV)-water systems. A: pH 6, B: pH 8, C: pH 10

일반적으로 염농도가 증가함에 따라 단백질들끼리의 결합도 증가하는데 이는 단백질 분자사이의 정전기적 반발력이 감소하게 되며, 또한 hydrophobic interaction이 증가하기 때문이다. 그러므로 염농도가 높아지면 단백질과 다당류 사이의 정전기적 결합을 막기 때문에 비혼합성이 더욱 현저하게 발생한다고 알려져있다[8,17]. 염농도를 증가시키면 카제인-알긴산 혼합물의 혼합성이 감소하는 것으로 보아, 카제인과 알긴산은 정전기적 작용을 통해서 복합체를 형성하는 것으로 생각된다. 본 실험에서 사용한 pH에서 염농도가 낮을수록 혼합성이 증가하는 것은 알긴산과 카제인 분자들 자신들끼리의 결합력이 낮다는 것을 의미한다. 낮은 염농도에서는 음이온을 띤 카제인과 알긴산 사이의 반발력보다는 수소결합과 분자들내의 반대전하를 띤 부분들 사이의 정전기적 결합으로 혼합성이 증가하는 것으로 생각된다.

알긴산의 분자량에 따른 상도해의 변화

본 실험에서 사용한 pH와 NaCl 농도에서는, Kelgin XL이 Kelgin LV보다 카제인과의 혼합성이 다소 더 크기는 하였으나, 대체적으로 거의 비슷한 양상을 띠었다(그림 생략). Grinberg와 Tolstoguzov[8]도 Flory-Huggins theory를 이용하여 두 거대분자의 분자량이 큰 경우에는 다당류의 분자량이 단백질과 다당류의 비혼합성에 큰 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 알긴산의 종류가 상도해에 미치는 영향을 연구하기 위해서는 알긴산을 분자량별로 정제하고 세부적인 화학구조, 예를 들면 M block과 G block의 비율 등에 대한 지식이 필요하다고 생각된다.

요 약

수용액상에서 단백질과 다당류 사이의 비혼합성은 일반적인 현상이므로 다양한 조성과 형태의 수용성 거대분자를 포함하는 식품에서 상분리는 매우 전형적인 현상이다. 본 연구에서는 식품원료로 자주 쓰이는 카제인과 알긴산을 이용하여, pH (6, 8, 10), NaCl 농도 (0, 0.25, 0.5 M), 알긴산의 분자량(1.64×10^5, 1.95×10^5)에 따른 상분리현상에 대하여 연구하였다. 식품에서 카제인이 유화제로 작용할 때 알긴산의 첨가에 따른 혼합성의 변화는 카제인의 유화안정성에 영향을 끼치게 된다. 알긴산의 분자량에 따른 혼합성의 차이는 크게 나타나지 않았다. pH가 높을수록, 염농도가 낮을수록 카제인-알긴산 혼합물의 비혼합성은 감소하였다. 이 결과로 보아 카제인과 알긴산 사이의 정전기적 작용이 혼합성에 관련되어 있는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 한국학술진흥재단과 연세대학교의 박사후연수과정 지원사업비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Tolstoguzov, V.B.: Functional properties of proteins-polysaccharide mixtures. In *Functional Properties of Food Macromolecules*, Mitchell, J.R. and Ledward, D.A. (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, p. 385-415 (1986)
2. Antonov, Y.A., Grinberg, V.Y., Zhuravskay, N.A. and Tolstoguzov, V.B.: Concentration of the proteins of skimmed milk by membraneless, isobaric osmosis. *Carbohydr. Polym.*, **2**, 81-90 (1982)
3. Muyldermans, G.: The use of blends as fat mimetics: gelatin/hydrocolloid combinations. In *Handbook of Fat Replacers*, Roller, S. and Jones, S.A. (Ed.), CRC Press, p. 251-263 (1996)
4. Antonov, Y.A., Grinberg, V.Y., Zhuravskay, N.A. and Tolstoguzov, V.B.: Liquid two-phase water-protein-polysaccharide systems and their processing into textured products. *J. Tex. Stud.*, **11**, 199-215 (1980)
5. Antonov, Y.A., Lashko, N.P., Glotova, Y.K., Malovikova, A. and Markovich, O.: Effect of the structural features of pectins and alginates on their thermodynamic compatibility with gelatin in aqueous media. *Food Hydrocoll.*, **10**(1), 1-9 (1996)
6. Tolstoguzov, V.B.: Some physico-chemical aspects of protein processing in foods multicomponent gels. *Food Hydrocoll.*, **9**(4), 317-332 (1995)
7. Tolstoguzov, V.B.: Thermodynamic aspects of dough formation and functionality. *Food Hydrocoll.*, **11**(2), 181-193 (1997)
8. Grinberg, V.Y. and Tolstoguzov, V.B.: Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocoll.*, **11**(2), 145-158 (1997)
9. Michon, C., Cuvelier, G., Launay, B., Parker, A. and Takerkart, G.: Study of the compatibility/incompatibility of gelatin/iota-carrageenan/water mixtures. *Carbohydr. Polym.*, **28**, 333-336 (1995)
10. Kasapis, S., Morris, E.R., Norton, I.T. and Gidley, M. J.: Phase equilibria and gelation in gelatin/maltodextrin systems-Part II. polymer incompatibility in solution. *Carbohydr. Polym.*, **21**, 249-259 (1993)
11. Semenova, M.G., Bolotina, V.S., Dmitrochenko, A. P., Leontiev, A.L., Polyakov, V.I., Braudo, E.E. and Tolstoguzov, V.B.: The factors affecting the compatibility of serum albumin and pectinate in aqueous medium. *Carbohydr. Polym.*, **15**, 367-385 (1991)
12. Tolstoguzov, V.B.: Protein-polysaccharide interactions. In *Food Proteins and Their Application*, Damodaran, S. and Paraf, A. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., p. 171-198 (1997)
13. Hwang, J.K., Choi, M.J. and Kim, J.T.: Emulsion properties of casein-alginate mixtures (in Korean). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**(6), 1102-1108 (1997)
14. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)
15. 주현규, 조홍연, 박충균, 조규성, 채수규, 마상조 : 식품분석법. 학문사. p. 302 (1996)
16. Polyakov, V.I., Kireyeva, O.K., Grinberg, V.Y. and Tolstoguzov, V.B.: Thermodynamic compatibility of proteins in aqueous media. Part I. phase diagrams of some water-protein A-protein B systems. *Nahrung*, **29**, 153-160 (1985)
17. Tolstoguzov, V.B.: Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocoll.*, **4**(6), 429-468 (1991)

(1998년 7월 3일 접수)