

우유 유청으로부터 분리한 α -락트알부민의 기능적 특성

기 해 진 · 홍 윤 호
전남대학교 식품영양학과

Functional Properties of α -Lactalbumin Separated from Bovine Whey

Hae-Jin Kee and Youn-Ho Hong

Department of Food and Nutrition, Chonnam National University

Abstract

This study was performed to obtain a large quantity of α -lactalbumin(α -LA) from milk by an improved separation and purification method. Functional properties-solubility, viscosity, emulsifying activity, foamability, surface hydrophobicity and gelation-of the purified α -LA were investigated. α -LA was purified in a large quantity by DEAE-Sephacel chromatography using 0.15 M NaCl in 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.2), as an eluent. The yield and purity of the purified α -LA were 23.6%, 92.5%, respectively. The solubility, viscosity and emulsifying activity of the purified α -LA were $92.2 \pm 2\%$, 3.46 ± 0.19 cP, and 345 ± 5.0 m²/g, respectively. The foamability of α -LA was 762 after 5min whipping, which was lower than that of WPC, and showed decreasing tendency with whipping time. The relative surface hydrophobicity of the α -LA was 43.9 ± 2.7 compared to 1,000 for bovine albumin. An opaque gel of the α -LA was formed, when a 10% α -LA solution containing 100 mM NaCl and 20 mM CaCl₂ was heated at 92°C for 40min. The α -LA gel showed 31.5 as hardness, and showed low springiness and cohesiveness.

Key words : α -lactalbumin, separation, DEAE-Sephacel column chromatography, functional properties.

서 론

우유 유청에는 β -락토글로불린(β -lactoglobulin, β -LG), α -락트알부민(α -lactalbumin, α -LA), 혈청알부민(bovine serum albumin, BSA), 면역글로불린(immunoglobulin, Ig), 락토페린(lactoferrin, LF), 트랜스페린(transferrin) 등과 무기질들이 함유되어 있다⁽¹⁾. Heine 등⁽²⁾은 유아 영양에서의 α -LA의 중요성에 대해 재검토하였는 바, 인유는 고농도의 유청 단백질(전체 단백질의 70%)을 가지고 있고 이중 α -LA는 유청의 41%, 총 단백질의 28%를 차지하는 반면에 우유에서는 총 단백질 중 3%로 적게 함유되어 있어 인유와 우유의 아미노산 조성 차이가 생긴다고 했다. 그러므

로, 상업적으로 우유의 α -LA를 이용할 때 인유의 아미노산 조성과 매우 유사하게 만들 필요가 있다고 제안하였다. 많은 연구자들이 우유의 유청 단백질을 음이온 교환 크로마토그래피법 또는 겔여과법에 의해 분리, 정제하는 연구^(3~6)는 수행하였으나 유청 단백질 중 α -락트알부민만을 대량으로 분리하는 데는 어려움이 있었음을 보고하였다. 저렴한 가격으로 순도 높은 제품을 대량으로 상품화할 수 있는 기술은 국내외에 거의 없으므로 이들의 제품화 기술 개발이 요망되며, 이를 우유로부터 대량 생산하여 식품 첨가물 또는 의약품의 원료⁽⁷⁾로 판매될 경우 그 부가가치는 매우 높고 낙농가와 낙농식품 산업계는 경제적으로 큰 도움이 될 것이다. Slack 등⁽⁸⁾은 pH 3~9범위에서 α -LA가 강화된 분획의 용해성은 100%였다고 보고하였다. de Wit 등⁽⁹⁾은 유청 단백질 분리물 중 BSA와 Ig-G가 유화성이 좋지 않은 반면에 α

Corresponding author : Youn-Ho Hong, Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Kwangju 500-757, Korea.

-LA가 pH 6.5에서 65%의 가장 좋은 유화 특성을 나타냈다고 하였다. Kato 등⁽¹⁰⁾은 α -LA의 천연분자는 표면 소수성이 낮은 것으로 밝혀졌지만 좋은 유화 성질과 거품 특성을 가지고 있다고 보고하였다. Calvo 등⁽¹¹⁾은 α -LA의 열에 의한 응고에 다른 유청 단백질이 미치는 영향에 대해 조사하였고, Legowo 등⁽¹²⁾은 글루타치온 존재시에 α -LA와 β -LG의 혼합물이 열처리에 의해 형성되는 겔의 거동에 대해 조사하였다. 유청 단백질 겔 형성에 미치는 인자들과 기능적인 특성에 대한 연구는 많이 진행되었으나^(9, 13~15) 실험실용 α -LA의 겔 텍스처 특성 및 첨가물질이 겔의 S-S-결합 함량에 관한 연구는 박과 홍^(16~17)의 연구 등으로 제한되어 있고 여전히 연구가 미진한 편이다. 또한 α -LA를 유청에서 대량 분리하여 그 기능성을 조사한 연구결과는 거의 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 우유를 이용하여 가제인 제조시에 생기는 부산물인 유청으로부터 WPC를 제조한 후 트립신을 처리하고 산처리하여 DEAE-Sephacel을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 α -LA를 대량 분리하였다. 또한 대량 분리한 α -LA의 기능성들로 용해성, 점성, 유화성, 기포성, 소수성, 겔 형성 등을 측정하였다.

재료 및 방법

재료

우유는 성분이 조정되지 않은 것으로, 고온순간살균(72°C, 15초)하고 균질화된 후 냉장시판되고 있는 유통기간 내의 신선한 제품으로 구입하였다. 표준물질로 사용된 α -LA, β -LG, BSA, 전기영동용 시약, 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid(ANS), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, 트립신, 트립신 억제제 등은 Sigma사(St., Louis, U.S.A.)에서 구입하였고 prestained protein molecular standards는 GIBCOBRL(U.S.A.)에서 구입하였다. 기타 시약들은 화학실험실용 특급시약을 사용하였다.

유청 단백질 농축물의 제조

우유로부터 유청 단백질 농축물(whey protein concentrate, WPC)의 제조는 기와 홍⁽¹⁸⁾

의 방법에 따라 실시하였다.

DEAE-Sephacel을 이용한 α -락트알부민의 대량 분리

α -LA의 대량 분리는 기⁽¹⁹⁾의 방법에 따라 수행하였다.

전기영동

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)와 Native PAGE

SDS-PAGE는 Laemmli법⁽²⁰⁾에 준하여 17.5%의 분리겔을 사용하여 실시하였다. 전기영동은 20 mA의 전류에서 60분간 실온에서 수행한 후, 겔을 0.25% Coomassie brilliant blue (R-250)로 염색시킨 다음 10% acetic acid와 45% methanol이 함유된 탈색액으로 탈색하였다. Native PAGE는 표준 Laemmli SDS-PAGE 방법에서 SDS와 환원제를 넣지 않고 sample buffer와 겔 및 electrode buffer를 만들었고 시료는 가열하지 않았다.

정제한 α -LA의 수율 및 순도 측정

대량 정제한 α -LA의 수율은 WPC 중의 α -LA에 대해 이온 교환 크로마토그래피에 의해 대량 정제한 α -LA의 양의 백분율로 계산하였다. 대량 정제한 α -LA 및 Sigma사의 α -LA의 순도는 SDS-PAGE를 실시한 후 CSC Camera로 자료를 분석하여 Tina 2.0 Users(Japan)로 각 단백질띠의 농도(density)를 측정하였다.

α -LA의 기능성

1) 용해성

대량 정제한 α -LA와 WPC를 0.05%가 되도록 0.1 N NaCl 용액에 용해시킨 후 0.1 N NaOH로 pH를 7.0으로 조정하고 5분간 교반한 다음 불용성 단백질을 침전시키기 위해서 48, 400×g로 4°C에서 30분간 원심분리하였다. 총 단백질 용액과 상등액 분획의 단백질 농도는 Lowry⁽²¹⁾ 방법에 의해 용해성을 측정하였다.

2) 점도

점도는 오스트왈드 점도계를 사용하여 다음

과 같이 측정하였다⁽²²⁾. 오스트왈드 점도계에 증류수 10ml을 피펫으로 주입하고 일정한 온도(18°C)가 유지되게 평형화시킨 다음 고무관을 측정하고자 하는 표선보다 위까지 액을 빨아 올려서 측정구를 가득 채웠다. 고무관을 빼고 측정하고자 하는 표선부터 아래 표선까지의 유출시간을 재고 이 조작을 4회 반복해서 평균값을 구하였다. 시료인 WPC와 분리한 α -LA는 pH 7.0인 10% 용액이 되도록 제조하였고 위의 방법과 같이 측정하여 점도를 계산하였다.

3) 유화력

유화력은 Pearce와 Kinsella⁽²³⁾의 탁도방법을 일부 수정하여 측정하였다. 0.1% 단백질 용액(0.1 M 인산완충액, pH 7.0) 30ml과 10ml의 옥수수 기름(pure refined corn oil)을 13,000 rpm에서 1분간 균질기(Homogenizer, X520D, Tool T30, Germany)로 균질화 하였다. 균질화한 후, 즉시 각각의 유화액 100 μ l를 0.1% SDS를 함유한 인산완충액으로 100:1 (v/v)이 되게 희석하였고 흡광도는 분광광도계(Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard 8452A, U.S.A.)를 이용하여 500nm에서 측정하였다. 유화력은 단백질 1g당 형성된 유화액의 계면적으로 계산하였다.

4) 기포성

기포 형성능력(overrun)은 Phillips 등⁽²⁴⁾의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 5g의 WPC와 α -LA를 소량의 증류수에 유리막대로 녹인 후 전체 부피가 약 75ml이 되도록 증류수를 넣고 교반하였다. 시료의 pH가 7.0이 되도록 조정된 후 100ml이 되도록 증류수를 첨가하였다. 기포성의 측정은 5% 시료용액 50ml을 플라스틱 보울에 넣고 거품기(Bosch, Germany)를 사용하여 최대 속도로 5분간 휘핑하여 미리 무게를 잰 100ml 용기에 거품을 넣고 윗면을 평평하게 한 후 무게를 측정하였다. 그 후 5분 간격으로 10분, 15분 휘핑이 되게 반복하여 기포성을 계산하였다.

5) 표면 소수성

표면 소수성은 Kato와 Nakai⁽²⁵⁾의 방법을 일부 수정하여 소수성 탐침 ANS를 이용한 방법으로 측정하였다. Bovine albumin, WPC,

Sigma사의 α -LA와 β -LG, 대량 정제한 α -LA와 실험실에서 정제한 β -LG의 농도를 각각 1 μ g/ml에서 5 μ g/ml가 되도록 0.1 M 인산완충액을 이용하여 제조하였다. 이 시료를 8 mM ANS 형광 probe 10ml을 각각의 단백질 용액 2ml에 혼합한 후 형광강도를 여기파장 390nm 그리고 방출파장 470nm를 사용하여 형광광도계(Kontron Instruments, Model SFM 25, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 표면 소수성 지수는 형광강도와 단백질 농도의 그래프의 기울기로서 측정하였고 4회 반복하였다.

6) 겔 형성과 겔의 텍스처 특성

겔 형성은 Morr와 Foegeding⁽²⁶⁾의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 대량 정제한 α -LA를 10%가 되게 0.1 M NaCl 용액(pH 7.15)과 20 mM CaCl₂에 녹인 후 1cm×1cm×3cm의 시험관에 0.785ml씩 넣고 랩으로 덮은 다음 테프론으로 밀봉하였다. 92°C 수조에서 40분간 가열처리한 후 실온에서 1시간 냉각한 다음 방치하였다. α -LA 겔의 텍스처는 Szczeniak의 방법⁽²⁷⁾에 의거하여 Rheometer(Sun Rheometer, CR-100D, Sun Scientific Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 즉, α -LA의 겔(1cm×1cm×1cm)을 50% 압착하였을 때 얻어지는 force distance curve로부터 텍스처를 측정하였다. α -LA 겔의 텍스처 측정조건으로 mastication test⁽²⁸⁾를 실시하였으며 probe 속도는 60mm/min, 그리고 chart 속도는 120mm/min이었다.

결과 및 고찰

DEAE-Sephacel을 이용한 α -락트알부민의 대량 분리

WPC에 트립신을 1/500(w/w) 처리하고 pH 3.0에서 NaCl을 9% 첨가하여 얻은 침전물을 투석한 후 DEAE-Sephacel column chromatography를 실시하여 α -LA를 대량 분리한 결과는 Fig. 1과 같다. 또한 각각의 분획을 SDS-PAGE한 결과는 Fig. 2에 나타냈다. 분획 40번부터 79번까지는 β -LG와 BSA가 약간 혼합된 α -LA로 구성되어 있었고 분획 80번부터 176번까지는 β -LG가 거의 없지만 소량의 BSA는 α -LA와 함께 용출되었다. 0.15 M

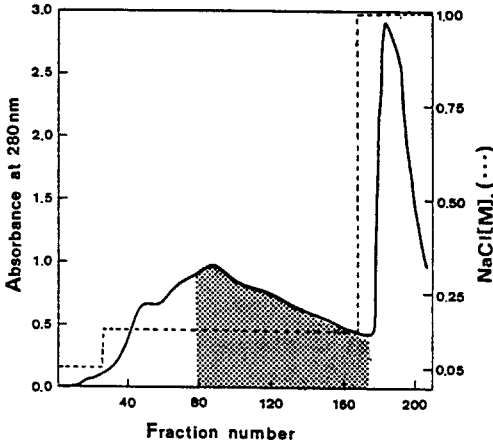


Fig. 1. Scale-Up of α -LA purification from trypsin-acid treated WPC¹ on DEAE-Sephacel chromatography.

Stepwise gradient of 20 mM Tris-HCl buffer containing 0.05 M NaCl in 1 bed volume, 0.15 M NaCl in 6 bed volume. Washing of 20 mM Tris-HCl buffer containing 1.0 M NaCl in 1.5 bed volume, polishing of 20 mM Tris-HCl buffer in 2 bed volume.

Sample¹ : WPC(enzyme : protein=1 : 500, wt/wt, pH 3.0, NaCl 9%)

Gel : DEAE-Sephacel, Column : XK 50/18.3, Flow rate : 1.5ml/min.

NaCl의 완충액으로 흘려보낼 때 2/3되는 지점부터 α -LA 부분을 회수하여 염을 제거한 다

음 동결건조시켰다.

대량 정제한 α -LA의 수율 및 순도

WPC로부터 DEAE-Sephacel column chromatography를 실시하여 정제한 α -LA의 수율은 Table 1에 나타냈다. 저온 살균한(72°C, 15초) 우유 1ℓ로부터 제조한 WPC는 4.30g이었다. 5% WPC 용액에 해당하는 시료를 SDS-PAGE한 후 Tina 2.0 Users를 사용하여 진하기를 측정된 결과 WPC 중 실제로 α -LA는 1.40g을 함유하였다. WPC를 사용하여 DEAE-Sephacel chromatography한 후 얻은 α -LA 단백질은 0.33g이었고 수율은 23.6%로 나타났다. 우유 1ℓ에서 분리, 정제한 α -LA는

Table 1. Yield of α -LA from by DEAE-Sephacel chromatography

Purification step	Total α -LA protein (g) ¹	Yield (%)
WPC	5.0	100
DEAE-Sephacel column chromatography	—	0.33

¹ : 5g WPC actually contains 1.40g α -LA by density measurement using Tina 2.0 Users. 4.3g WPC was obtained from 1 L milk by DEAE-Sephacel chromatography. Therefore, it corresponds to 284mg of α -LA.

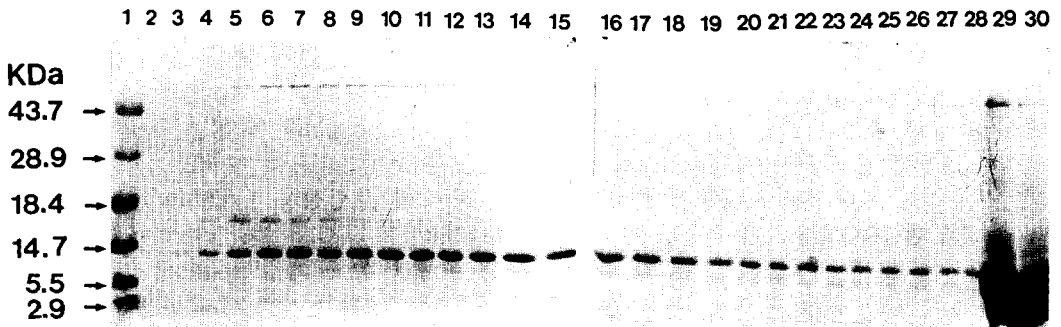


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of α -LA using trypsin-acid treated WPC by DEAE-Sephacel chromatography.

lane 1 ; low molecular weight marker

lane 2~30 ; fraction number of 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 176, 180, 185.

284mg이었는데 이 값은 Gordon과 Ziegler⁽²⁹⁾가 탈지유로부터 β -LG를 결정화시키고 남은 액 중에서 한번 결정화시켜 얻은 α -LA의 수율 360mg / l 보다 낮았다. Aschaffenburg-Drewry⁽³⁰⁾, Robbins-Kronman 등⁽³¹⁾의 방법은 여러번의 재결정화로 α -LA를 분리, 정제하였으나 본 실험방법에서는 순도가 높으면서 대량 생산을 목적으로 하였기 때문에 분리절차를 줄여 한번의 DEAE-Sephacel chromatography로 대량 정제하였다. 대량 정제한 α -LA의 순도는 SDS-PAGE, CSC 카메라 및 Tina 2.0 Users로 분석한 결과 92.5%였다.

α -LA의 기능성

1) 용해성

대량 정제한 α -LA의 용해성은 Lowry법⁽²¹⁾에 의해 측정된 결과, Table 2에 제시한 바와 같이 $92.2 \pm 2.2\%$ 였다. WPC의 용해성은 $101.9 \pm 1.7\%$ 로 α -LA보다 용해성이 높았다. Lee 등⁽³²⁾은 95% 단백질을 포함하는 유청 단백질 분리물(whey protein isolate, WPI)의 용해성을 25°C 실온에서 pH 6.0, 7.0, 8.0일 때 같은 방법으로 측정된 결과 각각 $92.6 \pm 1.4\%$, $94.5 \pm 4.8\%$, $103.9 \pm 7.4\%$ 로 중성 근처에서 pH가 증가할수록 용해성이 증가함을 나타냈다. Kim 등⁽¹³⁾도 유청으로부터 동결건조시킨 WPC의 용해성을 pH 3.0과 7.0에서 각각 $87.8 \pm 2.7\%$, $99.7 \pm 1.2\%$ 였다고 보고했다. Pearce⁽³³⁾는 WPC의 용해성이 pH에 의존적이고 용해성은 pH가 약 7에서 5 또는 4로 감소함에 따라 작아졌다고 했다. WPC의 용해성은 노출된 소수성 아미노산에 의해 크게 영향을 받는다고 하였다⁽³⁴⁾. Gonzalez와 Damodaran⁽³⁵⁾은 β -LG가 pH 3~9 범위에서 매우 용해성이 높았다고 보고하

였다.

2) 점도

Table 2에 나타난 바와 같이 일정한 온도(18°C)에서 pH 7.0인 10% WPC와 10% α -LA의 점도는 각각 2.60 ± 0.98 cP, 3.46 ± 0.19 cP로 α -LA의 점도가 WPC보다 더 높았다. Lewis⁽³⁶⁾는 20°C에서 전유, 탈지유 그리고 유청의 점도가 각각 2.12, 1.74, 1.26 mPa · s (dynamic viscosity)라고 보고하였다. Sienkiewicz와 Riedel⁽³⁷⁾은 산성 유청과 감성 유청의 점도는 낮은 편이고 pH에 따라 점도가 다른데 알칼리성일수록 점도가 컸다고 하였다. 또한 유청 단백질의 점도는 분자의 크기 및 모양뿐만 아니라 고형 성분과 용액의 단백질 함량, pH와 이온강도 및 온도에 따라 다르다고 하였다. Rattray와 Jelen⁽³⁸⁾은 20°C에서 유청 단백질 농축물의 점도 양상을 살펴보았는데 pH 6.8~4.0에서 점도가 비교적 낮은 편이었고 특히 pH 4.0 이하에서는 칼슘을 첨가하고 분산시간을 오래 방치하면 점도가 증가되었다고 보고하였다.

3) 유화력

α -LA의 유화력은 Table 2에 제시한 바와 같이 $345 \pm 5.0\text{m}^2/\text{g}$ 였는데 WPC의 유화력은 $319 \pm 10.6\text{m}^2/\text{g}$ 로 α -LA의 유화력이 WPC보다 약간 높았다. Beuschel 등⁽³⁹⁾은 0.5% WPC(98% 용해성)를 0.1 M 인산완충액(pH 7.0)에 녹인 후 유화력을 측정된 결과 $371\text{m}^2/\text{g}$ 로 나타났는데 본 실험값보다 다소 높았다. 또한 WPC의 용해성이 낮을수록 유화력은 증가하는 경향을 나타냈다. Leman과 Kinsella⁽⁴⁰⁾는 0.5% 농도가 되도록 pH가 8.0인 인산완충액을 사용하여 유화력을 측정된 결과 β -LG는

Table 2. Solubility, viscosity and emulsifying activity indices of α -LA and WPC

Sample	Solubility(%) ¹	Viscosity(cP) ²	Emulsifying activity indices(m ² /g) ³
α -LA	92.2 ± 2.2	2.60 ± 0.98	345 ± 5.0
WPC	101.9 ± 1.7	3.46 ± 0.19	319 ± 10.6

¹ : Sample concentration was 0.05% in 0.1 M NaCl solution(pH 7.0).

The concentration of protein was measured by Lowry method.

² : Sample concentration was 5% solution(pH 7.0).

³ : Emulsification was performed at pH 7.0. Emulsion contains 25% oil(v/v) and 0.075% protein (w/v).

Each value is an average of 4 replications \pm standard deviation.

153m²/g였으며 유청 단백질 분말은 101~142 m²/g였다. Shimizu 등⁽⁴¹⁾은 β -LG가 pH 3.0에서 유화력은 낮았지만 pH 9.0으로 증가되었을 때는 유화력이 증가했다고 보고했다.

4) 기포성

Fig. 3에 제시한 바와 같이 pH 7.0에서 5% WPC 용액과 α -LA 용액의 기포 형성 능력을 휘핑시간에 따라 조사하였는 바, 시간의 증가에 따라 기포 형성 능력이 감소하는 경향을 나타냈다. WPC와 α -LA는 휘핑 5분에 최대 기포 형성 능력을 나타냈다. 본 실험결과, α -LA의 기포성은 762로 de Wit 등의 측정치보다 낮았는데 이는 단백질 함량의 차이 및 거품기의 속도 차이 그리고 열처리 여부에 따른 결과로 사료된다. de Wit 등⁽⁹⁾은 3% 단백질 용액을 5분간 최대속도로 휘핑하여 기포성(overrun)을 측정된 결과 α -LA는 1,360으로 나타났고 여러 방법으로 처리하여 제조한 유청단백질의 기포성값은 다양하였다. Sienkiewicz와 Riedel⁽³⁷⁾은 유청 단백질의 기포 형성은 열변성, 남아있는 지방과 인지질 함량 및 칼슘 함량 그리고 pH와 단백질의 효소 가수분해 정도에 의존한다고 하였다. 또한 지방을 제거한 유청 단백질 시료의 최대 기포성은 등전점 부근이라고 보고하였다.

5) 표면 소수성

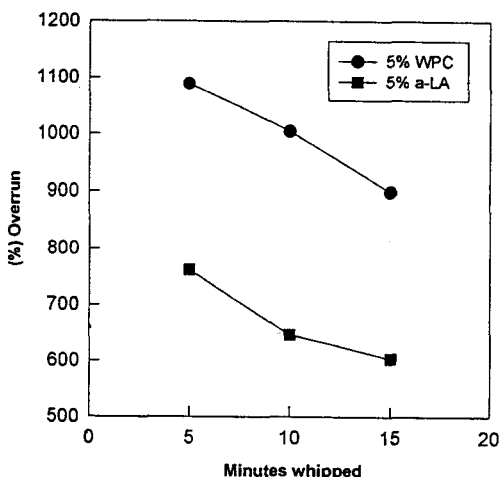


Fig. 3. Overrun patterns of 5% dispersions of WPC and purified α -LA.

Table 3. Surface hydrophobicity indices¹ of the purified α -LA and other milk protein

Sample	Surface hydrophobicity indices
Albumin	1000
WPC	108.5 ± 4.2
β -LG(Sigma)	63.6 ± 2.5
β -LG(purified)	49.8 ± 0.6
α -LA(Sigma)	17.9 ± 0.2
α -LA(purified)	43.9 ± 2.7

¹ : The measurement of surface hydrophobicity indices was performed using ANS probe.

Surface hydrophobicity indices were expressed relatively to 1000 for bovine albumin, for comparison. Protein concentration was 1~5 μ g/ml.

Each value is an average of 4 replications \pm standard deviation.

여러 단백질의 표면 소수성을 ANS를 이용하여 형광 측정된 결과를 Table 3에 나타냈다. Bovine albumin의 소수성 지수를 1,000으로 하고 단백질의 상대적인 표면 소수성 지수를 계산하였다. 단백질의 농도가 1~5 μ g/ml일 때 각각의 단백질 표면 소수성을 일부면 1,000에 대한 상대적인 값으로 나타내면 WPC는 108.5 ± 4.2로 α -LA와 β -LG의 17.9~63.6보다 더 높았다. Patel과 Kilara⁽⁴²⁾는 *cis*-parinaric acid를 fluorescence probe로 사용하여 WPC의 표면 소수성을 측정된 결과 105~159로 나타났으며 본 실험결과와 유사하였다. Sigma사에서 구입한 β -LG, α -LA의 각각의 표면 소수성은 63.6 ± 2.5, 17.9 ± 0.2로 나타났고 실험실에서 정제한 β -LG와 α -LA는 각각 49.8 ± 0.6, 43.9 ± 2.7로 측정되었다. 분리, 정제방법과는 관계없이 β -LG가 α -LA보다 표면 소수성이 높음을 알 수 있었다. Bigelow⁽⁴³⁾는 β -LG A의 평균 소수성은 1,230cal./residue로 α -LA의 1,150cal./residue 보다 더 높았다고 보고하였는데 이는 β -LG가 α -LA보다 표면 소수성이 높은 것과 관련이 있는 것으로 사료된다. 그러나, Nakai⁽⁴⁴⁾가 보고한 바에 의하면 알부민을 1,000으로 기준으로 할 때 α -LA와 β -LG의 표면 소수성은 각각 33과 13으로 α -LA가 β -LG보다 높은 것으로 나타나 본 실험결과와는 차이가 있었다.

α -LA의 겔 특성

이온교환 크로마토그래피로 분리한 α -LA의 겔 형성 여부 및 텍스처의 측정 결과를 Table 4에 제시하였다. 정제한 α -LA의 견고성은 31.5, 부착성은 -4.5, 탄력성은 0.29, 응집성은 0.12로 나타났다. 10% α -LA 겔 제조시에 100 mM NaCl을 사용하였을 때는 겔이 형성되지 않았지만 100 mM NaCl과 20 mM CaCl_2 를 첨가하였을 경우에는 불투명한 겔이 형성되었다. 박과 홍⁽¹⁶⁾은 Sigma사의 α -LA를 이용하여 10% 겔을 pH 8.0으로 조정한 후 NaCl을 농도별로 첨가하고 90°C에서 40분간 반응시켰다. 40~80 mM NaCl 농도일 때 α -LA 겔은 최대 강도를 나타냈고 100~200 mM NaCl일 때는 약간 감소하였으며 100 mM NaCl일 때 견고성은 21로 본 실험결과의 36보다 더 낮게 나타났는데 이는 pH와 α -LA 제조방법의 차이로 사료된다.

Schmidt⁽⁴⁵⁾ 그리고 Mulvihill과 Kinsella⁽⁴⁶⁾는 10% WPC에 CaCl_2 를 약 10~11 mM 정도 첨가하였을 경우 겔 강도가 가장 컸음을 보고했고, Mulvihill과 Kinsella⁽⁴⁷⁾는 β -LG의 강도를 측정할 결과 200 mM NaCl인 경우와 10 mM CaCl_2 일 때 최대였다고 했다. Rojas 등⁽⁴⁸⁾은 pH 7.0에서 α -LA가 주로 구성된 α -Fraction과 β -LG가 주로 구성된 β -Fraction의 겔 형성에 요구되는 최소한의 단백질 농도와 온도 변화를 조사하였다. α -Fraction인 경우 85°C에서 130g/L 이상의 농도에서 겔이 형성되었고 β -Fraction은 100g/L(85°C), 110g/L(80°C), 120g/L(75°C), 그리고 140g/L(70°C)에서 겔이 형성되었다고 보고하였다. Shimada와 Chetel⁽⁴⁹⁾은 9% WPI를 80°C에서 열처리하였을 때 pH 7.5에서는 매우 탄성이 있는 겔이 형성되었으나 pH 2.5에서는 탄성이 적은 겔이 형성되었음을 알았다. 또한 이들은 pH 6.5~9.5로 pH가 증가할수록 WPI 겔의 강도는 감소하

였지만 탄성과 용해성은 증가하였음을 보고하였다. Paulsson 등⁽⁵⁰⁾은 WPC 성분 중 BSA, β -LG, α -LA순으로 BSA의 겔 형성이 좋다고 하였으며 α -LA는 1% NaCl, pH 6.6인 조건 하에서 단백질의 농도가 20%일 때에도 겔이 형성되지 않았다고 보고하였다. Smith와 Rose⁽⁵¹⁾는 최적 칼슘 농도 이상으로 많이 들어 있는 WPC 겔의 견고성은 chelating agent를 사용하여 겔의 특성을 증진시킬 수 있다고 하였다.

요 약

우유에서 제조한 유청 단백질 농축물로부터 α -락트알부민(α -lactalbumin, α -LA)을 분리, 정제하기 위해서 효소처리하여 β -락토글로블린(β -lactoglobulin, β -LG)을 상당량 제거하고 낮은 pH에서 NaCl로 염석시켜 대부분의 α -락트알부민을 침전시켜 DEAE-Sephacel chromatography로 대량 정제하였다. 정제한 α -LA의 기능성들로 용해성, 점도, 유화성, 기포성, 표면 소수성, 겔 특성 등을 조사하였다. α -LA는 용리액으로서 0.15 M NaCl을 함유한 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.2)을 사용하여 DEAE-Sephacel chromatography를 수행함으로써 대량 정제하였다. 정제한 α -LA의 수율과 순도는 각각 23.6%와 92.5%였다. 대량 정제한 α -LA의 용해성은 $92.2 \pm 2.2\%$ 로 양호하였고 점성은 3.46 ± 0.19 cP, 유화력은 345 ± 5.0 m²/g였다. α -LA의 기포성은 휘핑 5분에 762로 WPC보다 낮은 편이었고 휘핑시간이 증가함에 따라 감소하였다. 표면 소수성 지수는 bovine albumin의 1,000에 대한 상대적인 값으로 43.9 ± 2.7 이었다. α -LA는 100 mM NaCl과 20 mM CaCl_2 를 첨가하여 10% 용액이 되도록 제조한 후 92°C에서 40분간 열처리하였을 때, 불투명한 겔이 형성되었고 견고성은 31.5였으며 탄력성과 응집성은 낮은 편이었다.

Table 4. Texture properties of 10% α -LA gels¹

	Hardness	Adhesiveness	Spriniginess	Cohesiveness
Purified α -LA	31.5	-4.5	0.29	0.12

¹ : 10% α -LA gel containing 100 mM NaCl(pH 7.15) and 20 mM CaCl_2 was heated at 92°C for 40min. The measurement of texture was performed by 50% compression.

감사의 글

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모 과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Fox, P. F. : The milk protein system. In Developments in Dairy Chemistry-4. Fox, P. F.(ed.), Elsevier Applied Science, London and New York. p. 1(1989).
2. Heine, W. E., Klein, P. D. and Reeds, P. J. : The importance of α -Lactalbumin in infant nutrition. *J. Nutri.*, 121, 277(1991).
3. Hill, A. R., Irvine, D. M., Kakuda, Y. and Manji, B. : Separation and quantification of whey proteins by size exclusion chromatography. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 19(5), 227(1986).
4. Manji, B., Hill, A., Kakuda, Y. and Irvine, D. M. : Rapid separation of milk whey proteins by anion exchange chromatography. *J. Dairy Sci.*, 68, 3176(1985).
5. Yoshida, S. : Isolation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin by gel filtration using Sephacryl S-200 and purification by dimethylaminoethyl ion-exchange chromatography. *J. Dairy Sci.*, 73, 2292(1990).
6. Hill, A. R., Manji, Y., Kakuda, Y., Myers, C. and Irvine, D. M. : Quantification and characterization of whey protein fractions separated by anion exchange chromatography. *Milchwiss.*, 42(11), 693(1987).
7. Dionysius, D. A. : Milk as a source of pharmaceuticals. *The Australian J. Dairy Technol.*, 108(1991).
8. Slack, A. W., Amundson, C. H. and Hill, Jr. C. G. : Nitrogen solubilities of β -lactoglobulin and α -lactalbumin enriched fractions derived from ultrafiltered cheese whey retentate. *J. Food Proc. and Preserv.*, 10, 31(1986).
9. de Wit, J. N., Hontelez-Backx, E. and Adamse, M. : Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 3. Functional properties in aqueous solution. *Neth. Milk Dairy J.*, 42, 155(1988).
10. Kato, A., Komatsu, K., Fujimoto, K. and Kobayashi, K. : Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility. *J. Agric. Food Chem.*, 33(5), 931(1985).
11. Calvo, M. M., Leaver, J. and Banks, J. M. : Influence of other whey proteins on the heat-induced aggregation of α -lactalbumin. *Int. Dairy J.*, 3, 719(1993).
12. Legowo, A. M., Imade, T. and Hayakawa, S. : Heat-induced gelation of the mixtures of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in the presence of glutathione. *Food Res. Int.*, 103(1993).
13. Kim, S. H., Morr, C. V., Seo, A. and Surak, J. G. : Effect of whey pretreatment of composition and functional properties of whey protein concentrate. *J. Food Sci.*, 54(1), 25(1989).
14. Mangino, M. E. : Gelation of whey protein concentrate. *Food Technol.*, 46(1), 114(1992).
15. Boye, J. I., Alli, I., Ismail, A. A., Gibbs, B. F. and Kinishi, Y. : Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation. *Int. Dairy J.*, 5, 337(1995).
16. 박인덕, 홍윤호 : 첨가물질에 따른 α -락트알부민 겔의 텍스처 특성. 한국축산식품학회지, 16(2), 134(1996, A).
17. 박인덕, 홍윤호 : 첨가물질에 따른 α -락트알부민 겔의 총 유리 SH 그룹, Half-Cysteine 및 S-S 결합 함량. 한국식품영양과학회지, 25(6), 922(1996, B).

18. 기해진, 홍윤호 : 유청단백질 농축물로부터 α -락트알부민의 분리 및 정제. 한국낙농학회지, 19(2), 131(1997).
19. 기해진 : 우유로부터 α -lactalbumin의 분리 및 정제방법의 개선과 이화학적 특성. 전남대학교 박사학위논문, p. 37(1998).
20. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227, 680 (1970).
21. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951).
22. 박동기 : 식품종합실험. 유한문화사, p. 115(1987).
23. Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. : Emulsifying properties of proteins ; Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 716(1978).
24. Phillips, L. G., Haque, Z. and Kinsella, J. E. : A method for the measurement of foam formation and stability. *J. Food Sci.*, 52(4), 1074(1987).
25. Kato, A. and Nakai, S. : Hydrophobicity determines by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Bioch. Biophys. Acta*, 624, 13(1980).
26. Morr, C. V. and Foegeding, E. A. : Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates : A status report. *Food Technol.*, 44(4), 100(1990).
27. Szczensniak, A. S. : Classification of textural characteristics. *J. Food Sci.*, 28, 385(1963).
28. Sun Scientific Co. : Sun Rheometer Compac-100 Operation Manual. Tokyo, Japan(1996).
29. Gordon, W. G. and Ziegler, J. : α -lactalbumin. *Biochem. Prep.*, 4, 16(1955).
30. Aschaffenburg, R. and Drewry, H. A. : Improved method for the preparation of crystalline β -lactoglobulin and α -lactalbumin from cow's milk. *Bioch.*, 65, 273 (1957).
31. Robbins, F. M. and Kronman, M. J. : A simplified method for preparing α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cow's milk. *Biochem. Biophys. Acta.*, 82, 186 (1964).
32. Lee, S. Y., Morr, C. V. and Ha, E. Y. W. : Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH. *J. Food Sci.*, 57(5), 1210(1992).
33. Pearce, R. J. : Fractionation of whey proteins. *Int. Dairy Fed. Bul.*, 2112, 150 (1987).
34. Hayakawa, S. and Nakai, S. : Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.*, 50, 486(1985).
35. Gonzalesz, J. M. and Damodaran, S. : Recovery of proteins from raw sweet whey using a solid state sulfitolysis. *J. Food Sci.*, 55, 1559(1990).
36. Lewis, M. J. : Physical properties of dairy products. In Modern Dairy Technology. Robinson, R. K.(ed.), Vol 2, Advances in Milk Products, 2nd Ed., Elsevier Applied Science, London & New York, p. 331(1993).
37. Sienkiewicz, T. and Riedel, C. L. : Whey and whey utilization. 2nd Ed., Verlag Th. Mann, Gllsenkirchen-Buer, p. 89(1990).
38. Rattray, W. and Jelen, P. : Viscous behaviour of whey protein concentrate dispersions. *Int. Dairy J.*, 5, 673(1995).
39. Beuschel, B. C., Culbertson, J. D., Partridge, J. A. and Smith, D. M. : Gelation and emulsification properties of partially insolubilized whey protein concentrates. *J. Food Sci.*, 57(3), 605 (1992).
40. Leman, J. and Kinsella, J. E. : Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins. *Critical*

- Reviews in Food Sci. and Nutr.*, 28(2), 115(1989).
41. Shimizu, M., Saito, M. and Yamauchi, K. : Emulsifying and structural properties of β -lactoglobulin at different pHs. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 189(1985).
 42. Patel, M. T. and Kilara, A. : Studies on whey protein concentrates. 2. Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. *J. Dairy Sci.*, 73, 2731(1990).
 43. Bigelow, C. C. : On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theor. Biol.*, 16, 187(1967).
 44. Nakai, S. : Functionality of proteins in food. Zayas, J. F.(Ed.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, p. 6(1997).
 45. Schmidt, R. H. : Gelation and coagulation. In Protein Functionality in Foods. Cherry, J. P.(Ed.), ACS Symposium Series 147, Washington, DC, p. 131(1981).
 46. Mulvihill, D. M. and Kinsella, J. E. : Gelation characteristics of whey proteins and β -lactoglobulin. *Food Technol.*, 41(9), 102(1987).
 47. Mulvihill, D. M. and Kinsella, J. E. : Gelation of β -lactoglobulin : Effects of sodium chloride and calcium chloride of the rheological and structural properties of gels. *J. Food Sci.*, 53, 231(1988).
 48. Rojas, S. A., Goff, D., Senaratne, V., Dalgleish, D. G. and Flores, A. : Gelation of commercial fractions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin. *Int. Dairy J.*, 7, 79(1997).
 49. Shimada, K. and Cheftel, J. C. : Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 161(1989).
 50. Paulsson, M., Hegg, P. and Castberg, H. B. : Heat-induced gelation of individual whey proteins. A dynamic rheological study. *J. Food Sci.*, 51, 87(1986).
 51. Smith, D. M. and Rose, A. J. : Gel properties of whey protein concentrates as influenced by ionized calcium. *J. Food Sci.*, 59(5), 1115(1994).

(1998년 2월 27일 접수)