

Transglutaminase를 처리한 분말 유제품의 특성

정지은 · 홍윤호*

전남대학교 식품영양학과 · 생활과학연구소 · 바이오식품연구센터

Properties of Transglutaminase Treated Milk Product Powders

Ji-Eun Jeong and Youn-Ho Hong*

Department of Food and Nutrition, Chonnam National University ·
Human Ecology Research Institute · BioFood Research Center

Physicochemical properties and functionalities of sodium caseinate, whey protein, skim milk, and whole milk with or without transglutaminase (TGase, 200 : 1) at 38°C were determined. After crosslinking by TGase, whey protein was effective in improving heat stability compared to native protein at over 70°C. Whole milk was stable with lower turbidity compared to native solution. Whey protein showed low hydrolysis degree, lower than sodium caseinate, during early activation time and increased slightly thereafter. Emulsifying activities of sodium caseinate at pH 2 and 8, and whey protein at pH 7 and 8 improved. Emulsion stability of sodium caseinate improved at entire pH range studied. Foam expansion and foam stability of samples improved with TGase-treatment. Viscosities of TGase-treated samples were higher than those of untreated ones.

Key words: transglutaminase, cross-linking, sodium caseinate, whey protein

서 론

분리 정제된 식품단백질의 기능적 특성을 향상시키기 위한 연구는 다양한 방법을 이용하여 광범위하게 진행되고 있다. 이중 단백질의 구조를 변형시켜 그 기능성을 향상시키려는 시도가 주류를 이루고 있다. 단백질의 구조를 변형시키는 방법으로 인체에 무해한 효소를 이용한 방법이 선호되고 있는 실정이다(1). 근래에 식품단백질의 기능성을 변형하기 위해 사용되고 있는 효소 중 가장 주목 받고 있는 것은 transglutaminase(TGase, protein glutamine γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13)이며 *Streptovorticillium mobaraense*의 변종으로부터 유도된 미생물에 의해 생성되는 효소이다(2). TGase는 glutaminyl 잔기의 γ -carboxamide group과 다양한 1차 아민 사이에 acyl transfer 반응을 촉매한다. 반응계에 아민이 존재하지 않으면 glutaminyl 잔기의 γ -carboxamide group의 가수분해를 촉매한다(3). Lysyl 잔기의 ϵ -amino group이 기질로써 사용될 때 peptide chain은 ϵ -(γ -glutamyl) lysine 결합을 통해 이루어진다. 이러한 가교결합은 단백질 구조를 변형시키고 단백질 식품의 기능적 특성을 변화시킴으로써 다양한 물성의 변화를 일으킨다(2). 선행된 연구에 의하면, TGase에 의한 새로운 가교결합의 도입은 단백질의 열안

정성, 응고력, 유화력, 물성, 겔형성, 수화작용, 용해성 등을 향상시켜 기능적 특성을 변형시킬 수 있다고 알려져 있다(4). 현재까지 대부분의 연구는 분리된 유단백질을 가지고 진행되어 왔으나 TGase처리를 이용하여 향상된 기능성을 가진 유제품 첨가물을 제조하려는 시도는 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 분리된 우유단백질과 탈지 및 전지분유에 TGase를 처리한 후 유제품 및 일반 식품에 보다 효과적으로 응용하기 위하여 이화학적 및 기능적 특성을 분석, 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 TGase는 Ajinomoto사(Tokyo, Japan)로부터 기증을 받았고, 유청단백질은 Armor Proteines S.A.S.사(Saint Brice en Cogies, France)로부터 구입하였으며 카제인 나트륨, 탈지분유 그리고 전지분유는 시판되는 것들을 구입하여 사용하였다. 기타 실험용 시약들은 화학실험용 특급을 사용하였다.

시료의 조제 및 TGase가 처리된 분말의 제조

카제인 나트륨, 유청 단백질, 탈지분유 그리고 전지분유를 증류수에 넣고(15%, w/v) 1 M HCl 또는 1 M NaOH를 이용하여 pH 7.0로 조정한 후 충분히 용해시켜 10분간 38°C 항온수조에서 정치한 다음 200:1 비율로 TGase를 첨가하였다. 이 시료들을 30분간 교반하였으며 2시간 반응 후 85°C에서 5분간 가열하여 불활성화하였다. 유청단백질의 경우에는 70°C에서 5분 동

*Corresponding author: Youn-Ho Hong, Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, 300, Yongbong-dong, Bukgu, Gwangju, Korea
Tel: 82-62-530-1333
Fax: 82-62-530-1339
E-mail: yhhong@chonnam.ac.kr

안 가열한 후 투석하였다. 그 후 시료들을 동결 건조하여 분쇄하였다.

일반성분 분석

수분함량은 100±5°C 오븐에서 상압가열건조법, 회분은 550°C 전기로를 이용한 직접회화법, 조단백질은 Lowry 분석법(5)을 이용하였다. 지방함량은 chloroform-methanol 추출법(6), 당질은 유당을 기준으로 하여 페놀-황산법(7)으로 분석하였다.

용해성과 열안정성 측정

시료의 용해성은 Babiker 등(8)의 방법에 따라 측정하였으며, 열 안정성은 Kato 등(9)의 방법에 준하여 측정하였다.

단백질 가수분해율 측정

단백질의 가수분해 정도는 OPA/NAC 용액(50 mM OPA, 50 mM NAC, 5% SDS, 0.1 M borate buffer pH 9.5) 2.4 mL와 가수분해된 시료 20 µL를 첨가하여 가수분해되지 않은 시료의 경우는 2분, 가수분해된 시료는 10분 동안 방치한 다음 분광광도계(Spectrophotometer, GENE Spec III, CA, USA)를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

pH에 따른 유화능력과 유화 안정성

유화능력과 유화 안정성은 Faergemand 등(10)과 Flanagan 등(11)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다.

pH에 따른 거품형성 능력과 안정성

거품형성 능력과 안정성은 Slattery와 FitzGerald(12)의 방법에 따라 pH 2에서부터 pH 10까지의 범위에서 측정했다.

점도

시료에 증류수를 첨가한(20%, w/v) 다음 1 N HCl 또는 1 N NaOH를 이용하여 pH 6.5로 조정된 후 혼합물 30 mL를 내열성 유리관에 넣은 후 각각 1분 동안 초음파 균질기를 이용하여 산소를 제거했다. 그 다음 유리관은 85°C로 맞춰 놓은 항온 수조에서 30분간 열처리하였다. 유리관을 4°C에서 24시간 냉장하였고 측정하기 20분 전에 꺼내어 실온에 방치한 후 원통형에 로터(No. 3)를 이용하여 12 rpm에 일정 속도로서 회전시키면서 액체의 점도를 측정하였다.

결과 및 고찰

일반성분 함량

카제인 나트륨, 유청 단백질, 탈지분유 및 전지분유의 일반성분을 분석한 결과, 단백질의 경우 Table 1과 같이 카제인 나트륨과 유청 단백질에서 86% 이상으로 가장 많이 함유되어 있었으며, TGase에 의한 가교결합 후 일반성분의 큰 차이는 나타나지 않았다. 카제인 나트륨과 탈지분유의 경우 Lorenzen(13)이 보고한 88.1%, 38.1% 보다 다소 높은 수준이었으며, 유청 단백질의 경우 90% 보다는 약간 낮은 함량이 관찰되었다. 이는 각 제품의 제조공정, 성분조성, 시료 타입의 차이일 것으로 사료된다.

용해성과 열안정성

카제인 나트륨, 유청 단백질, 탈지분유 및 전지분유에 있어서 TGase 무첨가군과 첨가군의 용해성에 대한 pH 의존도의 실험 결과는 Fig. 1과 같다. 높은 흡광도에서는 높은 혼탁도가 관찰되었고 결과적으로 용해성이 감소되었는데 카제인 나트륨의 경우에는 등전점인 pH 4부근에서 회합, 침전되어 분산되지 않아 낮은 용해성이 관찰되었다. TGase에 의한 중합화 과정 후 pH 2 및 pH 8-10에서 용해도가 증가되었다. 또한 유청 단백질은 알칼리성 pH에서 잘 용해되었으며 중합화 과정 후 pH 4에서 용해성이 향상되었다. 탈지분유도 효소첨가 후 pH 4에서 더 잘 용해되었다. 전지분유의 경우 pH 4에서 침전되었고 나머지 pH 범위에서 잘 용해되지 않았으며 효소첨가 후 대부분의 pH 범위에서 용해도의 증가가 관찰되었다. TGase 첨가군인 탈지분유의 경우에는 혼탁도가 높게 그리고 전지분유에서는 낮게 나타났다. 이는 지방함량이 다른 두 용액이 중합화 과정에서 응집의 정도가 달라 차이를 나타낸 것으로 판단된다. 단백질의 용해성 거동은 시료의 TGase 첨가 유무, 시료간의 특성 차이와 용액의 pH에 따라 매우 다른 것으로 나타났다.

열처리시 온도변화 50-90°C에 따른 시료의 열안정성에 관한 실험 결과는 Fig. 2와 같다. 카제인 나트륨은 70°C에서 열처리한 경우 효소처리 전과 비교하여 안정함을 나타내었고, 유청 단백질의 경우 열처리 온도가 70°C 이상에 도달하였을 때 변성되어 응고가 시작되었으며, 이에 따라 혼탁도는 급격히 증가하였고, TGase 처리된 유청 단백질과 비교하였을 때 상대적으로 높은 혼탁도 및 낮은 열안정성을 나타내었다. 이와 비슷한

Table 1. Proximate compositions of milk proteins and milk product powders with or without TGase

Samples	pH	Moisture (%)	Ash (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Lactose (%)
Na-caseinate-	9.36	6.2±0.18	3.3±0.02	88.8±0.51	1.5±0.12	0.2±0.02
Na-caseinate+	7.03	6.0±0.19	3.2±0.03	88.7±0.48	1.8±0.25	0.2±0.01
WPI-	6.80	4.3±0.05	4.6±0.05	86.8±0.26	1.1±0.11	0.3±0.05
WPI+	7.08	4.6±0.06	3.7±0.04	86.3±0.35	0.9±0.09	0.3±0.05
SMP-	6.65	5.5±0.07	7.4±0.03	58.3±0.22	0.8±0.04	26.5±0.53
SMP+	7.05	5.1±0.06	7.3±0.01	60.3±0.17	0.95±0.03	25.7±0.65
WMP-	6.77	3.3±0.18	4.1±0.08	41.7±0.38	26.8±0.15	24.1±0.60
WMP+	7.11	3.3±0.19	3.6±0.10	39.2±0.51	27.0±0.13	24.3±0.53

Data were shown average ± S.D.

Number of samples n=4.

Na-caseinate : sodium caseinate.

WPI: whey protein isolate.

SMP: skim milk powder.

WMP: whole milk powder.

- and + mean transglutaminase untreated (-) and treated (+), respectively.

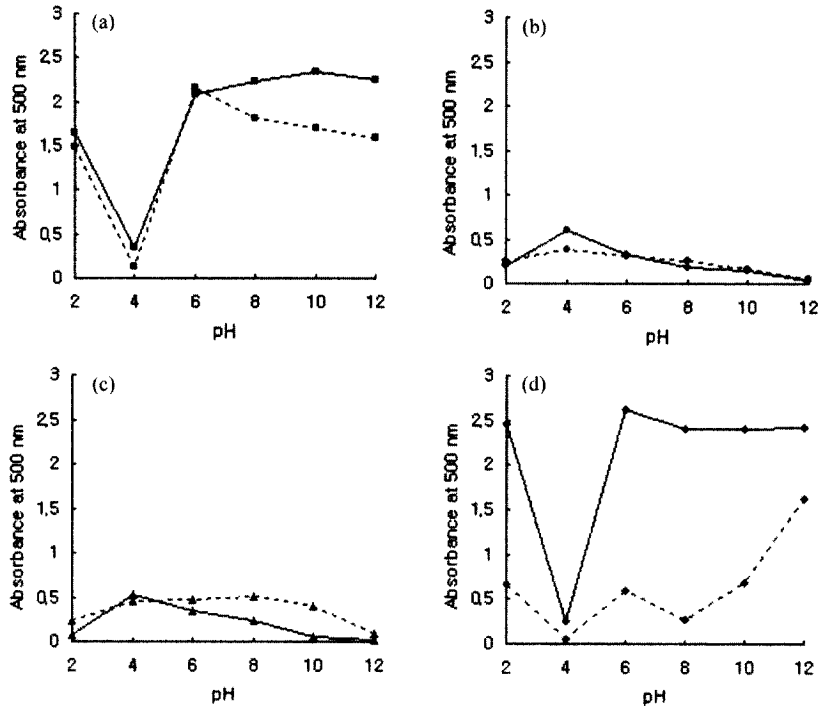


Fig. 1. Effect of pH on solubilities of Na-caseinate (a), WPI (b), SMP (c), and WMP (d) with (···) or without (—) TGase.

결과로 De Wit(14)에 의하면 유청 단백질을 70°C에서 열처리 시 용해성이 떨어지며, 높은 혼탁도에 의해 불안정하였다고 보고하였다. 본 실험결과 90°C에서 열처리했을 경우 효소처리하지 않은 시료의 혼탁도가 2.617이었으나 효소첨가 후 0.886으로 낮게 나타나 안정성을 보였다. 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에 탈지분유를 첨가했을 때 전지분유보다 훨씬 잘 분산됨에 따라 더 낮은 혼탁도를 야기했으며, 용해성의 결과와 유사하게 TGase 첨가군인 탈지분유의 경우에는 혼탁도가 높게 그리고 전지분유에서는 낮게 나타났다.

단백질 가수분해정도

시료의 TGase 첨가군에 단백질 가수분해효소인 pepsin을 처리한 가수분해정도는 Fig. 3과 같다. 카제인 나트륨을 pepsin으로 처리한 경우 반응시간 60분까지는 가수분해정도가 증가하다가 시간의 경과에 따라 그 증가 속도가 완만해졌다. 유청 단백질은 반응초기에 가수분해정도가 낮았으며 그 후 다소 증가되었으나 카제인 나트륨 보다는 낮았다. 탈지분유의 경우 초기 반응시간부터 20분 동안 가수분해 정도가 급격히 증가했고 지방함량이 높은 전지분유의 경우에는 타 시료에 비하여 상대적으로 천천히 가수분해되어 3시간 이후에는 높은 가수분해 정도를 나타내었다.

유화능력 및 유화 안정성

각각의 시료에 TGase 무첨가군과 첨가군의 유화능력과 안정성에 관한 pH 의존도 결과는 Fig. 4와 5에 제시한 바와 같다. 카제인 나트륨은 pH 4.0-5.0에서 3.5 g m⁻² 이하의 유화능력을 나타냈으며 등전점 부근에서 낮은 유화능력과 낮은 안정성을 나타내었다. 이러한 현상은 pH 4.6 근처에서 카제인 단백질의 침전 때문일 것이라고 사료된다. 또한 pH 6 이상에서 점점 증가하다가 pH 7에서 12.56 g m⁻²를 나타내었다. 효소 첨가군의 경우 pH 2와 pH 8 근처에서 22.13 g m⁻²와 17.65 g m⁻²로 향상

된 유화능력을 나타내었으며 안정성은 형성된 유화액을 유지 시키려는 단백질의 특성으로써 카제인 나트륨의 경우 모든 pH에서 증가하였다. 또한 pH 4 범위에서는 큰 차이가 관찰되지 않았다. 유청 단백질의 경우 pH 6과 7에서 높은 유화능력을 보였으며 pH 7, 8과 9에서는 안정하게 나타났다. 반면에 pH 4와 5에서는 부분적으로 침전되어 빈약한 유화능력이 관찰되었고 De Wit (14)이 보고한 결과와 비슷하였다. 효소첨가 후 pH 7과 8에서 각각 19.2 g m⁻² 및 22.2 g m⁻²로 유화능력이 향상되었으며 pH 5를 제외한 모든 pH 범위에서 유화안정성이 다소 개선되었다.

거품형성 능력과 안정성

각 시료에 TGase 무첨가군과 첨가군으로 부터 측정된 거품형성 능력과 안정성에 대한 pH 의존도의 결과는 Fig. 6과 7에 제시한 바와 같다. 카제인 나트륨의 경우 등전점 부근에서 침전되어 매우 낮은 거품형성 능력을 나타낸 반면에 pH 6 이상에서는 높은 거품형성 능력이 관찰되었다. 또한 pH 2와 3에서 거품형성능력은 각각 17.4%와 13.6%를 보였으나 효소 반응 후 40%와 43.07%로 향상되었다. 거품의 안정성은 효소 처리 후 pH 2와 3에서 더 안정함을 보였고 pH 7 이상의 범위에서는 불안정함이 관찰되었다. 유청 단백질의 경우 효소 첨가군에서는 pH 5를 제외하고 5-10%정도 향상된 거품형성 능력을 보였으며 증가된 안정성은 pH 5에서 50% 이상 관찰되었다. 탈지분유의 경우 대부분의 산성 pH에서 0-20% 범위로 거품형성 능력이 매우 낮았으나 pH 7이상에서 41.48%로 향상되었으며 TGase 첨가후 안정성은 pH 4-10 범위에서 큰 변화가 없었다. 그러나 효소반응 후 pH 2-6에서 거품형성 능력이 증가하였지만 안정성의 향상은 관찰되지 않았다. 전지분유의 경우 pH 6-10의 범위에서 4% 내외, pH 8에서 13.7%로 대부분 낮은 거품형성능력을 나타냈다. 또한 효소첨가 후 pH 2-6까지의 범위에서 다소 증가된 결과가 확인되었고 안정성에 대한 변화는 관

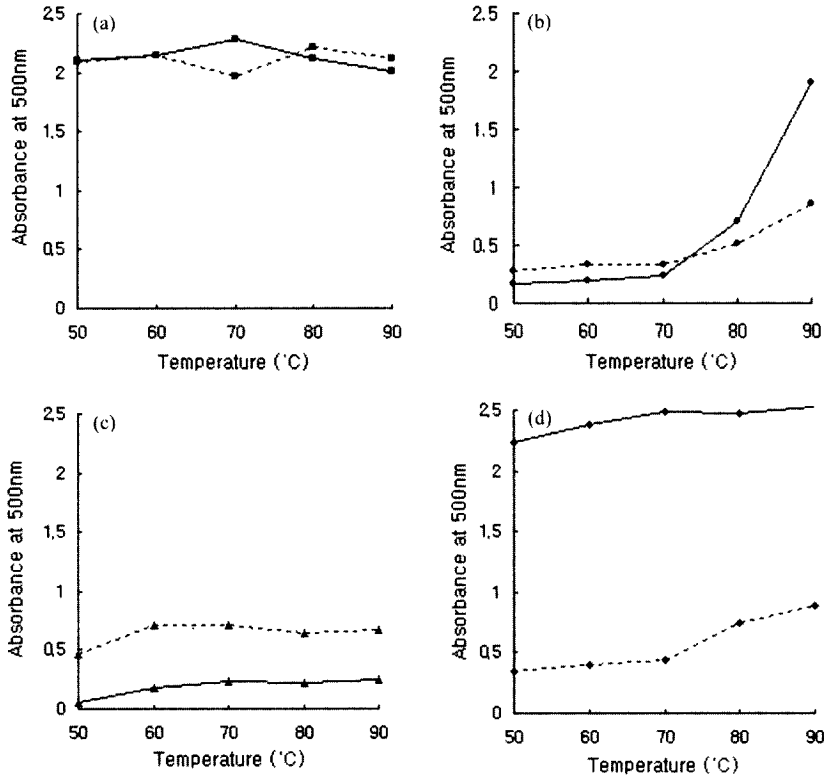


Fig. 2. Effect of temperature on heat stability of Na-caseinate (a), WPI (b), SMP (c), and WMP (d) with (---) or without (—) TGase.

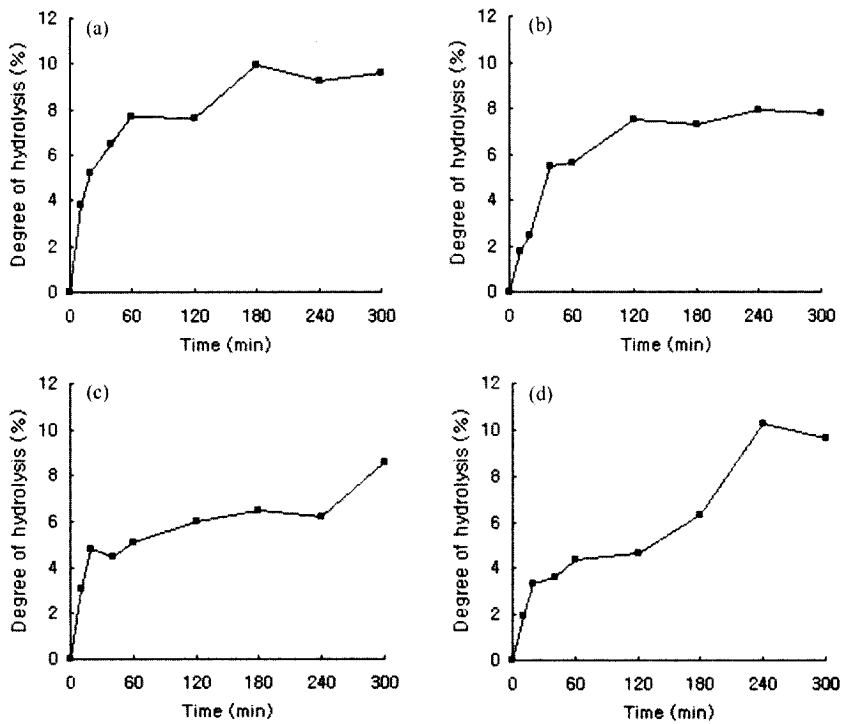


Fig. 3. Degree of hydrolysis (DH, %) of TGase treated Na-caseinate (a), WPI (b), SMP (c), and WMP (d) with pepsin for 5 hr at 37°C, pH 2.0.

찰되지 않았다. 이러한 결과에 관하여 Patel과 Kilara(15)는 유 지방량이 단백질 용액의 거품형성능력을 떨어뜨린다고 보고하였는 바, 전지방분의 높은 지방함량이 기포능력의 손상에 관계하며 이것은 이들의 소수성이 기포 표면의 단백질을 배제하고

스스로는 안정한 피막을 형성하지 못하기 때문일 것으로 판단된다. Patel과 Kilara(15)는 단백질의 용해성이 최대에 가까울 때 기포능력이 대체로 향상될 수 있을 것이라고 주장하였다. 따라서 단백질 및 시료용액의 거품형성과 안정성은 TGase에 의한

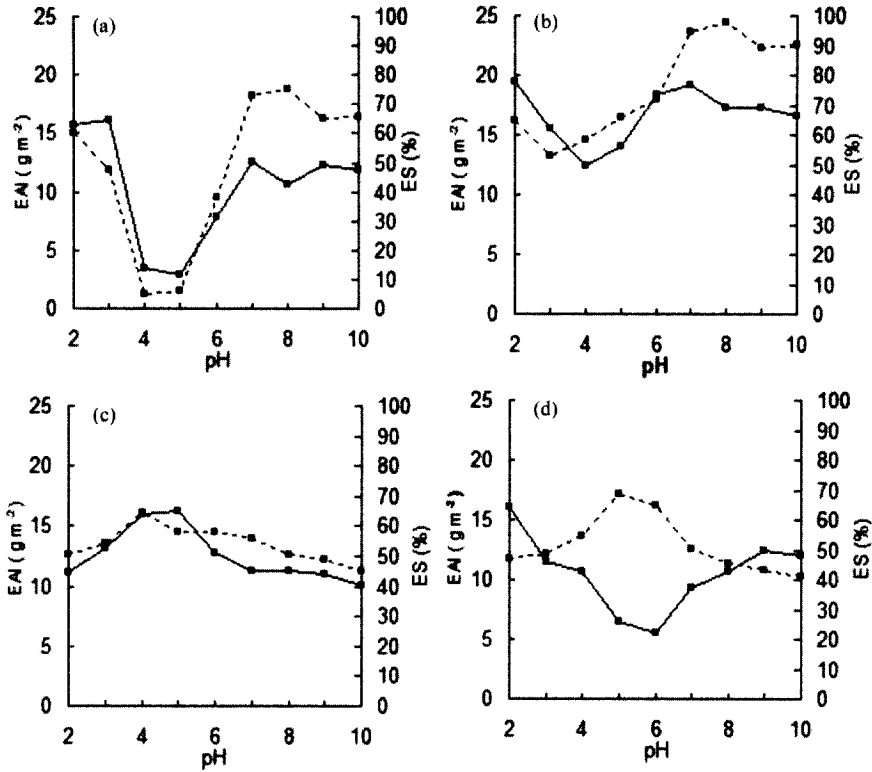


Fig. 4. Effect of pH on the emulsifying activity index (EAI, -) and the emulsion stability (ES, ---) of Na-caseinate (a), WPI (b), SMP (c), and WMP (d).

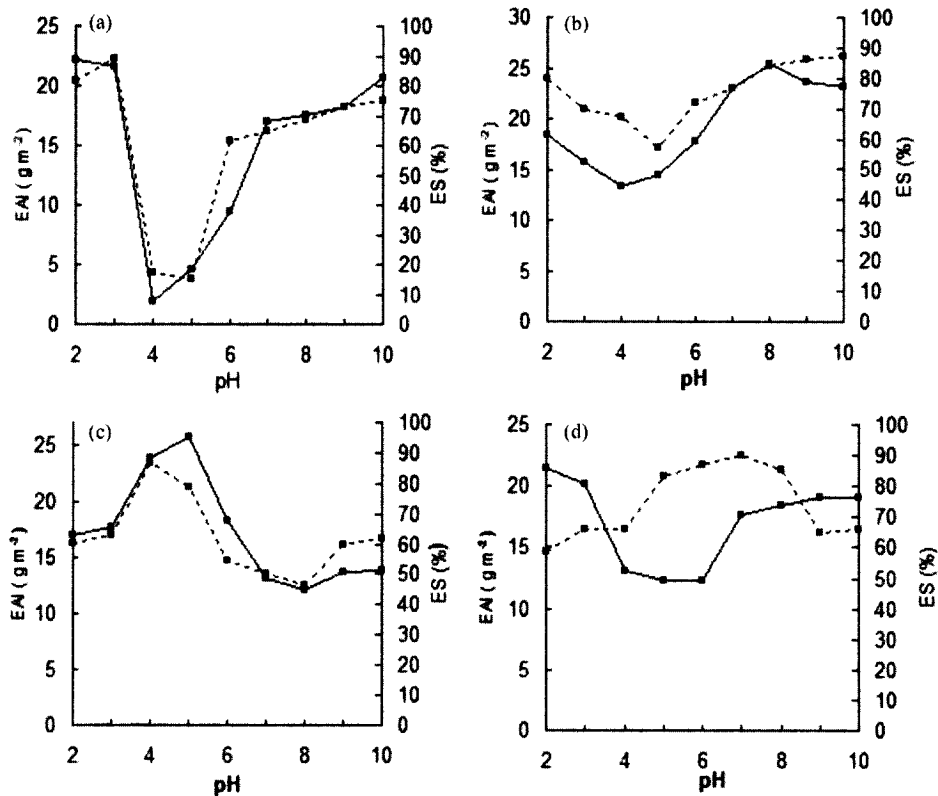


Fig. 5. Effect of pH on the emulsifying activity index (EAI, -) and the emulsion stability (ES, ---) of Na-caseinate (a), WPI (b), SMP (c), and WMP (d) crosslinked with TGase.

변형, 내재성인자, 외부 인자 및 이화학적 변화 등에 의해 영향을 받을 수 있으며, 이들의 연관 관계를 잘 파악함으로써 식

품소재로의 이용, 첨가, 가공 등에 바람직하게 쓰일 것이다.

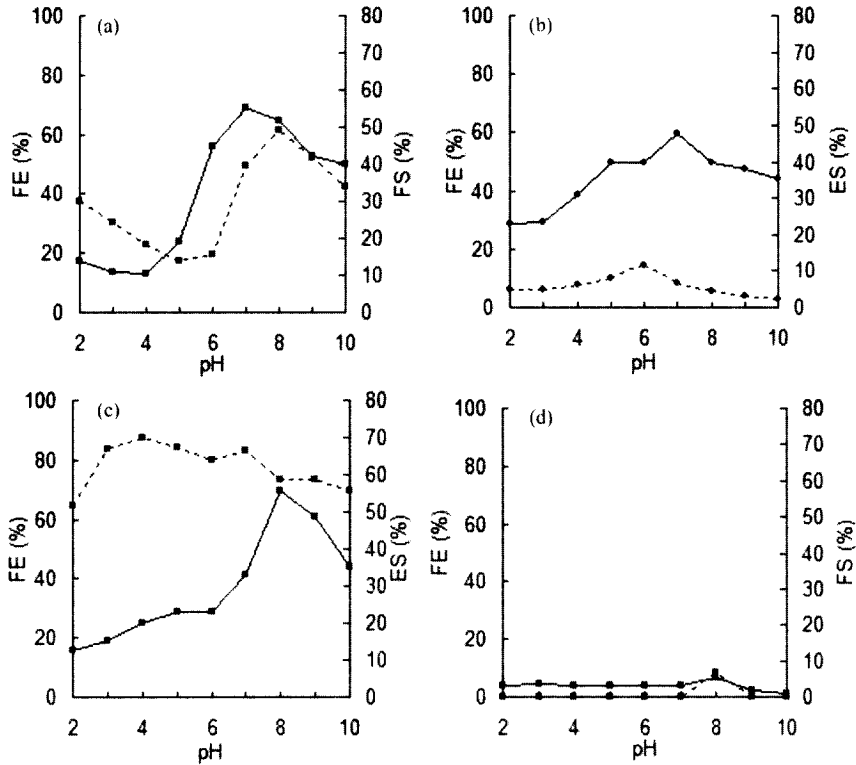


Fig. 6. Effect of pH on the foam expansion (FE, -) and the foam stability (FS, ---) of Na-caseinate (a), WPI (b), SMP (c), and WMP (d).

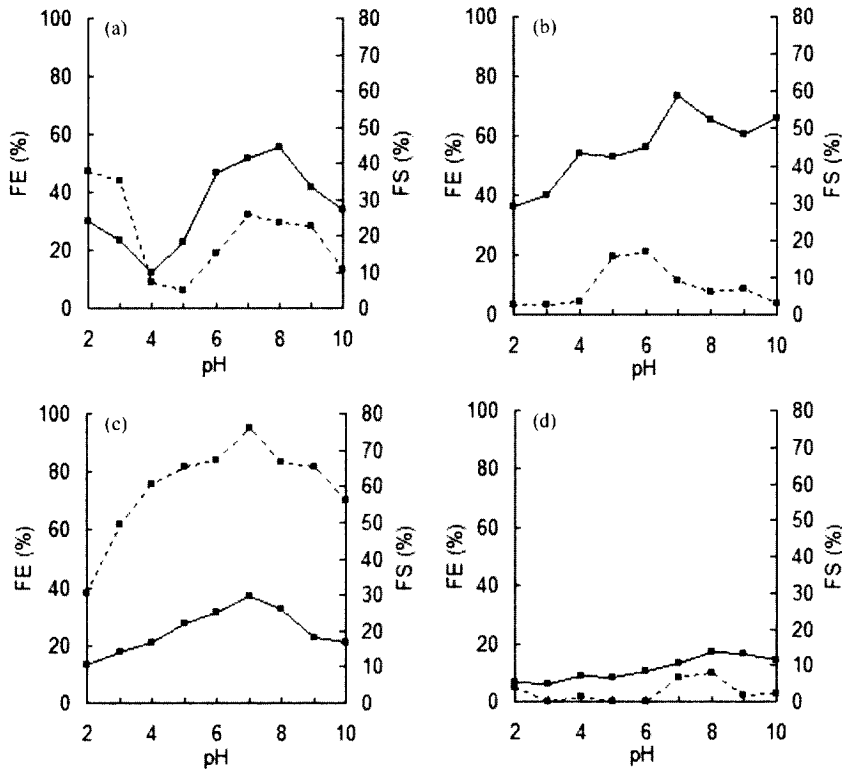


Fig. 7. Effect of pH on the foam expansion (FE, -) and the foam stability (FS, ---) of Na-caseinate (a), WPI (b), SMP (c), and WMP (d) crosslinked with TGase.

점도

가열에 따른 TGase 무첨가군과 첨가군의 단백질 용액의 점도 변화는 Fig. 8과 같다. 카제인 나트륨의 효소 무첨가군의 경

우 18×10^3 cp의 값을 나타내는 점도가 관찰되었고 첨가군에서는 80×10^3 cp로 현저히 높은 점도가 관찰되었다. 이러한 현상에 관하여 Sakamoto 등(16)은 아마도 중합화된 글루타민 잔기

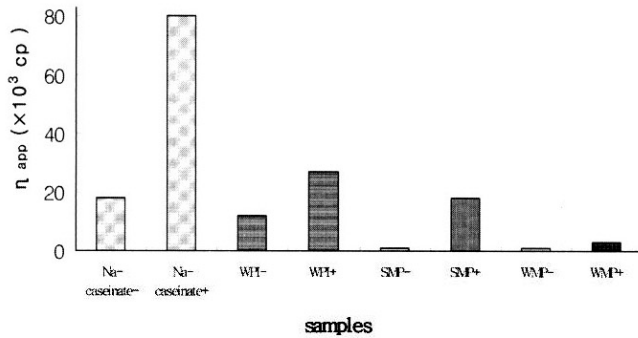


Fig. 8. Apparent viscosity of Na-caseinate, WPI, SMP, and WMP with (+) or without (-) TGase treatment.

와 라이신 잔기가 영향을 주어 더 높은 점도를 나타낸다고 보고하였다. 유청단백질은 12×10^3 cp의 점도를 나타냈으며 중합화 과정 후 27×10^3 cp로 증가한 점도가 관찰되었다. 단백질 용액의 겔 형성능력 및 점도는 단백질의 유리 아미노그룹의 수와 열에 유도된 단백질 변성정도에 영향을 받는다고 알려져 있다. 본래의 탈지분유와 전지분유는 측정조건에서 열에 의한 점도차이가 나타나지 않았으나 TGase 첨가로 인하여 각각 18×10^3 cp와 3×10^3 cp로 점도의 증가를 나타냈다.

요 약

본 연구에서는 시판되고 있는 카제인 나트륨, 유청 단백질, 탈지분유 및 전지분유에 TGase를 첨가하여 이화학적 특성 및 식품첨가물 소재로서의 기능적 특성 등을 조사하였다. 카제인 나트륨의 경우 TGase효소 반응 후 pH 2, pH 4와 알칼리 범위에서, 유청 단백질은 pH 4에서 용해성이 향상되었고 탈지분유에서는 pH 4와 전지분유에서는 모든 pH 범위에서 용해성이 향상되었다. TGase를 첨가한 우유 단백질과 우유 분말 제품이 무첨가군에 비하여 pH 의존적으로 용해성, 유화활성 및 거품형성 등에 기능적 특성이 부분적으로 우수함을 알 수 있었다. 또한 TGase 첨가에 따라 일반성분의 변화가 없었으며 인체내 소화효소에 의해 가수분해가 용이하였고 점도의 증가가 관찰되었다. TGase를 첨가한 제품은 이화학적, pH 및 반응시간 등의 특징에 의하여 영향을 받으므로 식품에 응용할 경우 기능성들이 합리적으로 조절되도록 함이 바람직하다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여

연구되었으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Imm JY. Functional properties of transglutaminase treated and processed skim milk powder. pp. 81-88 In: 50th spring symposium. May 19, Konkuk Univ., Seoul, Korea. Korean Dairy Technol. Sci. Assoc., Seoul, Korea (2000)
2. Motoki M, Segura K. Transglutaminase and its uses for food processing. Trends Food Sci. Technol. 9: 204-210 (1998)
3. Nonaka M, Matsumura Y, Motoki M. Incorporation of lysine and lysine dipeptides into α_{s1} -casein by Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase. Biosci. Biotech. Biochem. 60: 131-133 (1996)
4. Motoki M, Nio N. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. J. Food Sci. 48: 561-566 (1983)
5. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RT. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
6. Folch J, Lees M, Slane GH. A simple method for the isolation and purification for total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. 193: 183-191 (1951)
7. James CS. Analytical Chemistry of Foods. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK. pp. 130-131 (1995)
8. Babiker EFE, Khan MAS, Matsudomi N, Kato A. Polymerization of soy protein digests by microbial transglutaminase for improvement of the functional properties. Can. Food Sci. Technol. 29: 627-634 (2000)
9. Kato Y, Aoki T, Kato N, Nakamura R, Matsuda T. Modification of ovalbumin with glucose 6-phosphate by amino-carbonyl reaction. Improvement of protein heat stability and emulsifying activity. J. Agric. Food Chem. 43: 301-305 (1995)
10. Faergemand M, Otte J, Qvist KB. Emulsifying properties proteins cross-linked with microbial transglutaminase. Intl. Dairy J. 8: 715-723 (1998)
11. Flanagan J, Gunning Y, FitzGerald RJ. Effect of cross-linking with transglutaminase on the heat stability and some functional characteristics of sodium caseinate. Food Res. Intl. 36: 267-274 (2003)
12. Slattery H, FitzGerald RJ. Functional properties and bitterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a *Bacillus* proteinase. J. Food Sci. 63: 418-422 (2003)
13. Lorenzen PC. Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk protein. Milchwiss. 55: 667-670 (2000)
14. De Wit JH. Functional properties of whey protein. pp. 258-321 In: Developments in Dairy Chemistry, Series 4. Elsevier Applied Sci. London, UK (1989)
15. Patel MA, Kilara A. Studies on whey protein concentrate. Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. J. Dairy Sci. 73: 2731-2740 (1990)
16. Sakamoto H, Kumazawa Y, Motoki M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. J. Food Sci. 59: 866-871 (1994)

(2005년 1월 24일 접수; 2005년 4월 22일 채택)