

pH, 전해질의 농도 및 알긴산 분자량이 분리콩단백질의 표면소수성에 미치는 영향

임영선 · 유병진

강릉원주대학교 식품영양학과

Effects of pH, Electrolyte Concentrations, and Alginate Molecular Weights on Surface Hydrophobicity of Soy Protein Isolates

Yeong-Seon Lim and Byung-Jin Yoo

Department of Food and Nutrition, Gangnung-Wonju National University

ABSTRACT Changes in surface hydrophobicity of soy protein isolate (SPI), which plays an important role in the functional characteristics of protein, were measured according to various SPI concentrations, pH levels, electrolytes concentrations, and alginate molecular weights by using 1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid as a fluorescent probe. SPI surface hydrophobicity decreased as SPI concentrations increased. SPI surface hydrophobicity reached a maximum at pH 7.0. SPI surface hydrophobicity rapidly increased as the NaCl concentration of SPI solution increased up to 100 mM, and showed no large increases above 100 mM. However, SPI surface hydrophobicity radically decreased until the CaCl₂ concentration reached 50 mM and revealed no large variations above 50 mM. A similar trend was exhibited in the case of MgCl₂. As both the concentration and molecular weight of sodium alginate increased, SPI surface hydrophobicity decreased. The increasing rate of SPI surface hydrophobicity decreased as the molecular weight of sodium alginate increased.

Key words: protein surface hydrophobicity, soy protein isolate (SPI), alginates, 1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid, electrolytes

서 론

식품 내에서 단백질은 다당류와 같은 식품성분과 상호 반응하여 단백질 혹은 다당류의 기능성을 변화시키며(1), 다당류와 단백질 모두를 내포하는 식품에서 전체적인 구조와 기능성과의 상관관계는 개개의 생체고분자의 성질뿐만 아니라 생체고분자의 상호작용과 이러한 작용력의 세기에 따라 달라진다(2). 유제품에 있어서 필요한 기능성을 부여하기 위해 0.005~3% 정도의 다당류를 첨가하며(3), κ-carrageenan과 같은 다당류는 우유단백질과 직접 상호작용하여 우유제품의 안정성을 부여한다(4). 또한, 단백질과 다당류의 복합체는 열에 대하여 이온 효과 때문에 안정되므로 단백질과 다당류 복합체 사이의 공유결합을 형성하기 위한 상호반응은 바람직하다고 보고하고 있다(5). 그러므로 단백질의 성질에 미치는 다당류의 영향을 조사하는 것은 단백질과 다당류의 복합체인 식품에서 중요한 연구 분야로 알려져 있다.

일반적으로 분리콩단백질(SPI, soy protein isolate)은 콩을 조쇄, 탈피하고 지방을 제거한 후 단백질의 함량이 90% 이상 되도록 제조한 것으로 식품 첨가물, 환자용 유동식 및 우유 단백질의 대체품 등으로 사용되고 있다(6). SPI의 성질에 영향을 미치는 요인으로 pH(7), 가열(8) 및 다당류와의 상호반응(5) 등에 관한 연구가 보고되어 있으며, SPI의 용해도와 겔화 성질에 영향을 미치는 인자로는 소수성과 총 전하량 및 탈지방법(9,10) 등이 알려져 SPI의 기능성과 성질에 영향을 미치는 여러 요인 중 SPI 소수성의 중요성이 강조되어왔다. 단백질의 표면과 에멀전 성질은 단백질 구조와 밀접하게 관련이 있으며(1,11), 단백질의 구조와 단백질과 다른 성분과의 상호 반응에 영향을 미치는 변수로 단백질의 소수성과 입체적인 인력이다(12). 그리고 단백질 분자의 유연성과 안정성에 영향을 미치는 요인으로는 pH, 온도, 이온 조건 및 disulfide bond 등으로 보고(13,14)되어 있다. 또한, 단백질 성질과 구조를 관계하는 입체적 인력, 정전기적 결합 및 주변 환경과의 수소결합 등은 단백질의 소수성에 영향을 미치며 이 소수성은 또한 단백질의 여러 기능성에 영향을 미치는 것(12)으로 알려져 있다.

그러므로 단백질의 소수성을 측정하는 것은 주변 환경에 따른 단백질의 성질을 예측할 수 있는 중요한 요인이다. 단

Received 16 May 2016; Accepted 20 July 2016

Corresponding author: Byung-Jin Yoo, Department of Food and Nutrition, Gangnung-Wonju National University, Gangneung, Gangwon 26403, Korea

E-mail: ybjin@gwnu.ac.kr, Phone: +82-33-640-2331

백질의 소수성을 측정하는 방법으로는 단백질을 구성하고 있는 소수성 아미노산의 일종인 트립토판이 주위 환경의 미세한 변화에 형광의 변화를 일으키는 것을 측정하는 방법과 식품 단백질에 외부에서 형광을 내는 물질인 ANS(1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid)를 첨가하여 단백질이 주변 환경에 따라 변하는 미세한 구조의 변화에 따라 달라지는 형광의 정도를 측정하는 방법 등이 있으며, 특히 ANS를 형광탐침물질로 사용하면 단백질의 표면소수성의 변화를 측정하는 데 유용한 것으로 보고되었다(15).

본 연구는 SPI로 즉석 두부 제조 가능성의 기초자료를 얻기 위하여 두부 제조 시 응고제로 사용되는 다가전해질과 겔화에 영향을 미치는 고분자 전해질인 alginates 첨가 및 pH 등이 SPI의 표면소수성에 미치는 영향을 ANS를 탐침물질로 이용하여 측정하였으므로 보고하는 바이다.

재료 및 방법

SPI의 조제

SPI는 강원도 강릉시 콩(광안콩, 2013년 영월생산)을 17~20°C에서 10시간 물에 불린 후 콩의 4배량의 물을 가하여 마쇄하고 95~97°C에서 교반하면서 10분간 가열하고 광목 천으로 여과하여 제조한 두유를 저온(8±2°C) 상태로 운반하여 진공 동결 건조한 다음 20 mesh로 분쇄하였다. 그리고 분쇄된 시료는 n-hexane으로 3회 반복 처리하여 지질성분을 제거한 후 상온에서 풍건하여 시료로 사용하였다.

Alginates 추출 정제 및 저분자화

강원도 명주군 주문진에서 2014년 8월에 채취하여 건조한 다시마를 40 mesh로 분쇄하여 alginates 추출용으로 사용하였다. Alginates는 Chapman(16)의 방법을 수정한 방법(17)으로 추출하고 투석막(D0655, MW cut off: 13,000, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 투석하여 정제하였다. 정제된 alginates는 진공 동결 건조하였다.

정제한 alginates를 저분자화하고 분자량별로 분리하기 위하여 가수분해 한 후 하룻밤 동안 완전히 동결한 다음 해동속도에 따라 평균분자량을 513, 245 및 161 kDa으로 분리하고 투석 조각으로 정제하였다(18,19).

일반성분 측정

Alginates의 일반성분 함량은 Meloan과 Pomeranz(20)의 방법으로 측정하였다.

Alginates의 총당과 환원당의 측정

Alginates의 총당 측정은 phenol-sulfuric acid의 방법(20)에 준하여 실험하였으며, 환원당 함량은 Somogyi-Nelson법(21)에 따라 측정하였다.

Alginates의 분자중합도와 평균분자량 측정

Alginates의 분자중합도(DP, degree of polymerization)는 총당 함량에 대한 alginates의 환원당 함량의 비로 계산하였으며(22), 평균분자량(AMW, average molecular weight)은 MW와 DP의 상관관계식 $AMW=0.194(DP)$ 를 이용하여 계산하였다(18).

SPI의 표면소수성의 측정

SPI 농도가 SPI의 표면소수성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SPI의 농도를 탈이온수로 1, 3, 5, 7, 10, 15 및 20%로 제조하고, pH 7.0으로 조절하여 시료로 사용하였으며, pH의 영향을 조사하기 위하여 1% SPI 용액을 1 M HCl과 1 M NaOH 용액으로 pH 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0 및 12.0으로 조절하여 시료용액으로 하였다. 전해질의 종류와 농도에는 1% SPI 용액에 NaCl의 농도가 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 및 1,000 mM이 되도록 각각 제조한 뒤 pH 6.0으로 조절하여 시료용액으로 하였으며, CaCl₂와 MgCl₂는 1% SPI 용액에 CaCl₂와 MgCl₂의 농도가 0, 1, 3, 5, 7, 10, 30, 50, 70 및 100 mM이 되도록 각각 제조한 뒤 pH 6.0으로 조절하여 시료용액으로 하였다.

SPI-alginates 혼합액은 SPI를 탈이온수로 희석하여 1.0, 5.0 및 10.0% SPI 용액을 제조하고, alginates도 각 분자량에 따라 0.1 M sodium phosphate buffer로 희석하여 0.0, 0.1, 0.5 및 1.0% alginates를 제조한 다음, SPI와 alginates 용액을 농도별로 혼합하여 pH를 6.0으로 조정 후 표면소수성을 측정용 시료용액으로 하였다.

NaCl를 첨가한 SPI-alginates 혼합액은 위에서 언급한 SPI-alginates 혼합액에 0.5 M이 되도록 NaCl을 첨가하여 시료를 제조한 후 pH를 6.0으로 조정 후 표면소수성 측정용 시료용액으로 하였다.

위에서 제조된 시료용액의 표면소수성 측정은 Kato와 Nakai(23)의 방법을 약간 변형하여 실험하였다. 즉 pH 7.0 phosphate buffer 용액에 시료용액을 희석한 후 일정량의 희석용액을 3 mL 취하여 20 mM의 ANS 25 μL를 첨가한 형광분광광도계(RF-5301PC, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 들뜬과장 375, 390 nm, 흡수과장 470 nm, slit width 3.0과 1.5 nm에서 형광강도를 측정하였다. 측정된 형광강도에서 ANS를 첨가하지 않은 SPI 시료용액의 형광강도를 감하여 순수한 형광세기를 구하고, 각각의 SPI 농도에 대한 순수한 형광세기의 기울기를 구하여 표면소수성의 지표로 사용하였다.

통계분석

5회 반복 측정된 모든 실험 결과는 SPSS program 12.0(24)의 one-way ANOVA test를 실시하여 분산분석을 통해 평균±표준오차를 구하였으며, 평균 간의 유의성은 95% 유의수준($P<0.05$)에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

Table 1. The proximate composition of soybean protein isolate used in this study (% , dry basis)

Moisture	Ash	Crude protein	Crude lipid	Carbohydrate	
				Total sugar	Reducing sugar
4.5±0.1	6.3±0.1	70.6±0.3	3.7±0.1	18.7±0.2	1.6±0.1

All data shows mean±standard error of triplicate determinations.

결과 및 고찰

SPI와 alginate의 일반성분

본 실험에서 사용한 SPI와 alginate의 일반성분의 함량을 Table 1과 2에 나타내었다. SPI의 일반성분 중 가장 높은 함량을 나타낸 것은 조단백질로 그 함량은 70.6%였으며 탄수화물은 18.7%로 그다음 순이었다. Alginate의 회분과 환원당의 함량은 alginate의 평균분자량이 973 kDa일 때 각각 8.4 g/100 g 및 18.1 mg/100 g이었던 것이 161 kDa일 때 각각 19.1 g/100 g과 95.6 mg/100 g으로 평균분자량이 감소함에 따라 증가하였다. 또한, alginate의 회분에 존재하는 미량금속의 함량을 alginate 분자량에 따라 분석한 결과를 Table 3에 표시하였는데 미량금속 중 90% 이상을 차지하는 것은 sodium이었다. Alginate의 분자량이 감소함에 따라 회분 함량이 증가하고 그 회분의 대부분인 sodium의 함

Table 2. The proximate compositions of alginates used in this study

AMW ¹⁾ (kDa)	Moisture (g/100 g)	Ash (g/100 g)	Carbohydrate	
			Total sugar (g/100 g)	Reducing sugar (mg/100 g)
973±15	4.7±0.2	8.4±0.3 ^{d2)}	89.9±0.6 ^a	18.1±7.8 ^d
513±23	5.1±0.4	9.6±0.2 ^c	88.5±0.5 ^b	33.5±2.5 ^c
245±7	5.7±0.2	15.3±0.3 ^b	83.4±0.6 ^c	66.2±2.6 ^b
161±6	5.5±0.1	19.1±0.2 ^a	78.9±0.7 ^d	95.6±5.6 ^a

¹⁾The AMW indicates average molecular weight.

²⁾All data (mean±SE with 5 replications) within a column with different letters are significantly different at $P<0.05$.

Table 3. The contents of minerals in alginates in this study (g/100 g, dry basis)

AMW ¹⁾ (kDa)	Sodium	Potassium	Calcium	Magnesium	Ash
973±15	7.7±0.4 ^{d2)} (91.7) ³⁾	0.5±0.1 ^c (6.0)	0.1±0.04 ^b (1.2)	<0.05 ^{NS4)} (<0.6)	8.4±0.3 ^d (100.0)
513±23	8.8±0.4 ^c (91.7)	0.6±0.1 ^c (6.3)	0.1±0.02 ^b (1.0)	<0.05 (<0.5)	9.6±0.2 ^c (100.0)
245±7	14.0±0.6 ^b (91.5)	0.9±0.2 ^b (5.9)	0.2±0.06 ^a (1.3)	<0.08 (<0.5)	15.3±0.3 ^b (100.0)
161±6	17.5±0.2 ^a (91.6)	1.2±0.2 ^a (6.3)	0.2±0.04 ^a (1.0)	<0.12 (<0.6)	19.1±0.2 ^a (100.0)

¹⁾The AMW indicates average molecular weight.

²⁾All data (mean±SE with 5 replications) within a column with different letters were significantly different at $P<0.05$.

³⁾The values of parenthesis were expressed the percentage of each mineral content of ash content.

⁴⁾The NS within a column with letters were not significantly different at $P<0.05$.

량이 증가한 것은 alginate의 분자량이 작아질수록 Na_2CO_3 에 의한 이온교환의 정도가 증가하여 sodium이 alginate의 구성당인 uronic acid의 carboxyl group의 수소원자 대신 많이 치환되었음을 의미한다. 이것은 alginate를 분자량 크기 별로 제조한 Lim과 You(25)의 결과와도 비슷한 결과를 나타내었다.

SPI의 표면소수성에 미치는 농도의 영향

SPI의 농도 변화에 따른 표면형광도(RFI) 세기의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. SPI 농도가 1.0%에서 RFI 값이 79.0이었던 것이 10.0%에서는 20.0으로 유의적으로($P<0.05$) 급격히 감소하였고 15% 이상의 농도에서는 큰 감소를 나타내지 않는 것으로 나타났다. SPI 농도와 RFI 값의 관계식은 $y=106.850\exp(-0.098x)-13.754$ 로 나타나 SPI 농도가 증가할수록 RFI 값은 감소하였다. RFI 값이 fluorescence probe를 둘러싸고 있는 미세 환경의 극성을 나타내며 RFI 값이 SPI의 표면소수성의 정도를 나타내는 것(26)이므로 본 연구에서 SPI의 농도가 15%까지 증가할 경우에는 SPI의 표면소수성이 증가하며 15% 이상의 농도에서는 큰 변화를 나타내지 않음을 알 수 있다. 단백질의 구조적인 변형에는 단백질을 기계적으로 유연할 수 있도록 수분의 양이 충분해야 하는 것이 필수적이며 ANS를 이용하여 세몰리나와 밀가루 단백질의 수분량에 따른 소수성의 변화를 측정할 결과에

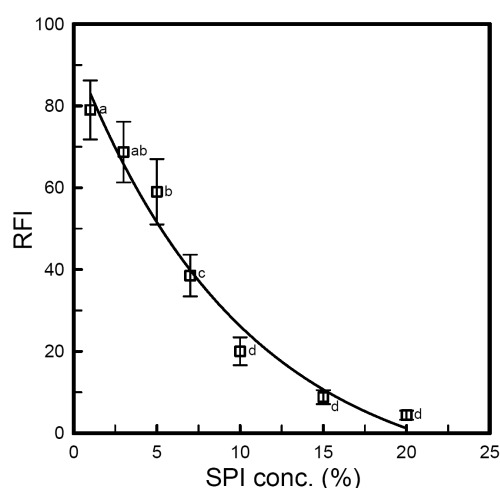


Fig. 1. Changes of the front-surface hydrophobicity according to added concentrations of SPI at pH 7.0. All data (mean±standard error of triplicate determinations) with different letters were significantly different at $P<0.05$. The relative fluorescence intensity (RFI) for the SPI conc. (%) is given in equation of $y=106.859\exp(-0.098x)-13.754$, $r^2=0.975$.

의하면 첨가한 수분량이 증가함에 따라 형광도의 세기가 증가하는 것은 단백질이 수분에 의해 용매화되어 구조적으로 단백질의 재배열이 용이하게 되므로 소수성 영역이 표면으로 드러나기 때문(15)으로 알려져 있다. 이러한 연구를 고려하면 본 실험에서 SPI 농도가 낮은 곳에서부터 15%까지 증가함에 따라 SPI의 RFI 값이 뚜렷하게 감소한 것은 수분의 양이 충분한 환경에서는 SPI 단백질 분자의 용매화가 충분히 일어나 단백질 구조의 유연성이 증가하여 단백질 분자 내부에 존재하는 소수성 영역이 표면으로 나타나기 때문으로 해석할 수 있다. SPI의 농도가 15% 이상에서 RFI 값의 변화가 크게 나타나지 않는 것은 이 농도 이상에서는 SPI의 구조 유연성이 낮아져 소수성 영역이 표면으로 노출되는 정도가 매우 낮다는 것을 알려준다. 이와 같은 결과는 ovalbumin과 lysozyme 등과 같은 단백질의 표면소수성에 관한 연구 결과(12)와 같은 경향을 나타낸다. 염용성 단백질을 용해도가 감소하면 단백질의 표면소수성이 증가한다(27)고 하여 본 실험에서 나타난 수분 함량에 따른 SPI의 표면소수성의 변화로 SPI의 용해도를 예측할 수 있다.

SPI의 표면소수성에 미치는 pH의 영향

Fig. 2는 pH가 SPI의 표면소수성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. pH 2.0일 때 RFI 값이 11.1이었던 것이 pH가 증가할수록 증가하여 pH 7.0에서는 79.0으로 최대값을 나타내었다가 pH가 7.0 이상으로 증가함에 따라 RFI 값이 감소하여 pH 12.0에서는 10.0을 나타내었다. 이처럼 SPI의 표면소수성이 pH 7.0에서 최대값을 나타내었다가 pH가 이보다 증가 혹은 감소함에 따라 감소하는 경향을 나타낸 것은 pH가 7.0에서 SPI의 외부로 나타났던 소수성 잔기들이 pH가 변함에 따라 전하를 띠는 아미노산의 잔기들에 의해 생성되는 SPI 단백질 분자 간의 정전기적 결합으로 인한 단백질 분자 간 결합이 증가하므로 단백질의 표면에 나타났던 소수

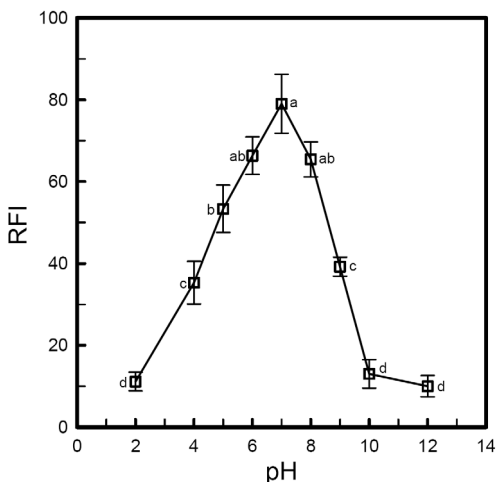


Fig. 2. Effect of pH on the front-surface hydrophobicity in 1% SPI dispersion. All data (mean±standard error of triplicate determinations) with different letters were significantly different at $P<0.05$.

성 잔기들이 단백질 내부로 함몰되기 때문으로 생각된다. 완두콩 분리 단백질을 가열 변성시켰을 때 pH 5.6에서 최대의 표면소수성을 나타내었다가 이 pH보다 감소하거나 증가하면 감소한다는 결과(28)는 본 실험에서 나타난 특정한 pH에서 최대의 표면소수성을 나타내었다가 그 pH를 기준으로 증가 혹은 감소함에 감소하는 경향이 같음을 나타내었다.

SPI의 표면소수성에 미치는 전해질 농도의 영향

pH 7.0에서 NaCl의 농도가 SPI의 표면소수성에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 이 그림에서 알 수 있듯이 NaCl이 5 mM일 때 RFI 값이 89.0이었던 것이 100 mM일 때 153.2로, NaCl의 농도가 100 mM에 이를 때까지 급격히 증가하였으나 NaCl의 농도가 1,000 mM에 이르러서는 RFI 값이 182.3을 나타내 그 증가율이 유의적($P<0.05$)으로 현저히 낮아지는 경향을 나타내었다. 그리고 SPI의 RFI 값과 NaCl의 농도와의 관계식은 $y=18.000\ln x+65.282$ 로 나타났다. ANS는 단백질의 소수성 개별 잔기와는 결합하지 않고 소수성 잔기들의 다발(영역)과 결합한다고 보고한 것(29)과 단백질의 용해도에 영향을 미치는 중요한 인자로 단백질 분자의 총 전하량이며, 이 전하량은 pH에 의하여 직접적인 영향을 받아 등전점에서의 용해도는 매우 낮게 나타난다(30). 그러나 실제 식품의 단백질은 등전점이 서로 다른 여러 종류의 단백질로 구성되어 있으므로 단백질의 기능적 성질에 영향을 미치는 전하 효과를 pH의 함수로 나타내기 어려워 제타전위로써 나타내는 것이 유용하다(9)고 하였다. 그리고 콩 단백질 입자크기는 제타전위와 깊은 상관관계가 있으며(31), 콩 단백질 입자의 크기는 제타전위가 0에 가까울수록 증가하고 단백질의 불용해성은 제타전위가 감소하면 증가하는 것으로 보고(9)하고 있다. 또한, 단백질의 전하에 영향을 미치는 전해질의 농도에 따라 단백질의 구조에

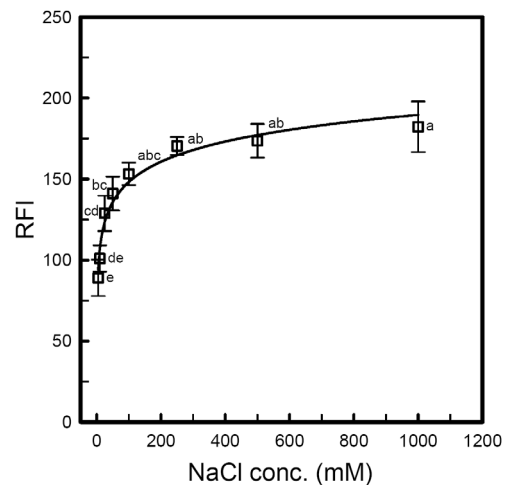


Fig. 3. Effect of NaCl concentrations on the front-surface hydrophobicity in 1% SPI dispersion at pH 7.0. All data (mean±standard error of triplicate determinations) with different letters were significantly different at $P<0.05$. The RFI for the NaCl conc. (mM) is given in equation of $y=18.000\ln x+65.282$, $r^2=0.970$.

관여하고 있는 정전기적 결합이 변하여 단백질 분자의 내부 혹은 외부에 존재하던 소수성 잔기와 영역이 노출 혹은 함몰되므로 카놀라 분리단백질의 표면소수성이 변한다고 발표하였다(32). 이러한 연구 결과를 미루어 보면 본 연구에서 SPI의 표면소수성이 NaCl의 농도가 100 mM까지 증가함에 따라 급격히 증가하지만 더 이상의 농도에서 변화가 거의 없는 결과는 SPI 단백질 분자 간 극성결합, 정전기적 결합, 혹은 수소결합 때문에 folding 되어 있던 구조가 전해질인 NaCl이 첨가되어 제타전위가 변하므로 단백질 분자 사이 결합의 전기적 성질이 변하여 약해지거나 붕괴됨으로써 단백질이 unfolding 되므로 단백질 내부에 존재하던 소수성 영역이 표면으로 나타나기 때문에 표면소수성이 증가하는 것으로 생각된다. 그리고 NaCl의 농도가 100 mM 이상으로 증가하여도 SPI의 표면소수성이 크게 증가하지 않는 것은 100 mM 이상에서는 단백질 표면과 용매 사이의 제타전위가 0에 가까워져 있어 folding에 관여한 단백질 분자 사이의 결합, 즉 정전기적 결합에 더 이상 크게 영향을 미치지 않으므로 단백질 내부에 존재하던 개별 소수성 잔기들은 표면에 노출되지만 소수성 잔기들의 다발은 단백질의 표면으로 많이 노출되지 않기 때문으로 생각된다. NaCl의 농도가 100 mM 농도까지 증가함에 따라 SPI의 표면소수성이 급격히 증가하지만, 더 이상의 농도에서는 변화가 거의 없는 것으로 보아 SPI 단백질의 표면에 나타난 총 전하량과 같은 전하량을 가지는 NaCl의 농도, 즉 1% SPI 용액의 제타전위가 0에 도달하는 NaCl의 농도는 100 mM 정도임을 나타낸다. Fig. 2에서 언급하였던 pH 7.0에서 NaCl을 첨가하지 않은 조건에서 SPI의 표면소수성은 RFI 값이 79.0으로 가장 높게 나타난 것에 비하여 같은 조건에서 NaCl을 100 mM 농도로 첨가하였을 때 SPI의 RFI 값이 153.2로 훨씬 높은 값을 나타내었다. Fig. 4와 5는 pH 7.0에서 CaCl₂와 MgCl₂의 농도가 SPI

표면소수성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. CaCl₂의 농도가 0 mM일 때 RFI 값이 79.0이었던 것이 CaCl₂의 농도가 50 mM에 이르렀을 때는 17.3으로 급격하게 감소하였다가 그 이상의 농도에서는 감소속도가 완만하게 나타났다. 또한, MgCl₂의 경우도 CaCl₂와 비슷한 경향을 나타내었는데 다만 RFI 값이 급격한 감소를 한 농도가 CaCl₂는 50 mM인데 비하여 MgCl₂의 경우 30 mM이었다. CaCl₂와 MgCl₂의 농도가 SPI 표면소수성과의 관계식은 각각 $y=59.782\exp(-0.111x)+17.555$ 와 $y=53.180\exp(-0.08x)+25.080$ 로 나타났다. 이와 같은 결과는 Fig. 3에서 보여준 것과는 전혀 다른 양상을 나타내었는데 CaCl₂와 MgCl₂의 농도가 일정한 농도까지 증가할수록 표면소수성이 급격히 감소하는 결과를 나타내었다. 단백질의 응집을 일으키는 것은 다가 전해질과 단백질 사이의 정전기적 상호작용뿐 아니라 단백질 사이의 소수성 결합에 의한 것이라고 보고(33)하고, 이러한 단백질의 결합은 다가 전해질과 결합한 단백질이 주변에 가장 가까이에 존재하는 다른 단백질과 소수성 결합을 촉진하기 때문(34)이다. 그러므로 Fig. 3에서 표면소수성이 감소한 것은 Ca²⁺와 Mg²⁺는 단백질 분자 간에 가교결합을 형성하여 단백질의 응집을 일으킬 때 단백질 분자의 표면에 이미 나타난 소수성 영역들 사이에 상호 반응하여 소수성 결합이 촉진되어 단백질 분자 내부로 함몰되므로 ANS와 결합하는 SPI의 표면소수성 영역이 감소하기 때문으로 생각된다.

Alginate의 첨가량이 SPI의 표면소수성에 미치는 영향

Table 4는 pH 7.0에서 Na-alginate의 첨가 농도와 SPI의 농도에 따른 SPI의 표면소수성 변화를 Na-alginate의 평균분자량별로 나타낸 자료이며 이것을 3차원 그래프로 나타낸 것이 Fig. 6이다. 평균분자량이 973 kDa인 Na-alginate를 첨가할 때(Fig. 6a), SPI 농도가 1% 용액에 Na-al-

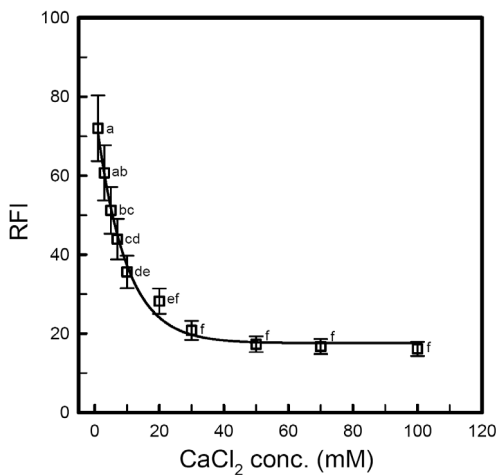


Fig. 4. Effect of CaCl₂ concentrations on the front-surface hydrophobicity in 1% SPI dispersion at pH 7.0. All data (mean±standard error of triplicate determinations) with different letters were significantly different at $P<0.05$. The RFI for the CaCl₂ conc. (mM) is given in equation of $y=59.782\exp(-0.111x)+17.555$, $r^2=0.993$.

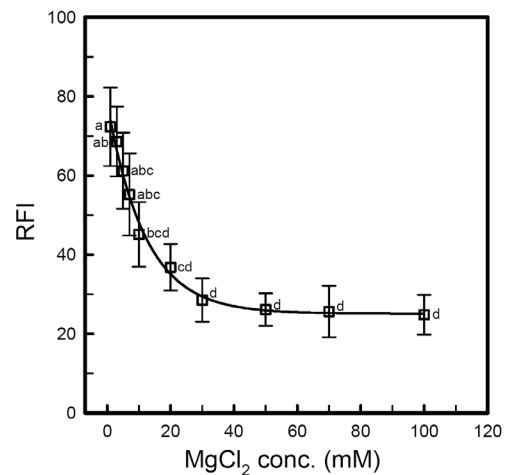


Fig. 5. Effect of MgCl₂ concentrations on the front-surface hydrophobicity in 1% SPI dispersion at pH 7.0. All data (mean±standard error of triplicate determinations) with different letters were significantly different at $P<0.05$. The RFI for the MgCl₂ conc. (mM) is given in equation of $y=53.180\exp(-0.084x)+25.080$, $r^2=0.993$.

Table 4. Changes of the front-surface hydrophobicity by the concentrations of SPI and alginates contained different AMW at pH 7.0

Conc. (%)		RFI			
SPI (x_1)	Alginates (x_2)	AMW of alginates (kDa)			
		973	513	245	161
1	0	79.0±7.2 ^{a1)}	79.0±7.2 ^a	79.0±7.2 ^a	79.0±7.2 ^a
1	0.1	64.5±4.4 ^b	70.7±4.3 ^b	72.2±4.0 ^a	73.5±4.6 ^a
1	0.5	37.2±5.1 ^{cd}	52.9±6.2 ^{cd}	56.8±4.7 ^b	63.7±4.0 ^b
1	1.0	26.2±5.1 ^{de}	43.2±5.4 ^{de}	50.2±4.4 ^{bc}	57.7±4.5 ^{bc}
5	0	59.0±8.0 ^b	59.0±8.0 ^{bc}	59.0±8.0 ^b	59.0±8.0 ^{bc}
5	0.1	44.5±4.8 ^c	50.7±4.7 ^{cd}	52.2±4.4 ^b	53.5±5.0 ^c
5	0.5	16.6±1.1 ^{efg}	34.0±2.9 ^e	37.9±3.1 ^c	39.4±3.1 ^d
5	1.0	9.4±0.5 ^{fg}	19.2±1.4 ^f	20.9±1.4 ^d	21.8±1.7 ^e
10	0	20.0±3.4 ^{ef}	20.0±3.4 ^f	20.0±3.4 ^d	20.0±3.4 ^e
10	0.1	9.5±0.3 ^{fg}	13.2±0.4 ^{fg}	14.8±0.4 ^{de}	17.1±0.6 ^{ef}
10	0.5	6.1±0.2 ^{fg}	8.0±0.3 ^{fg}	8.7±0.2 ^{de}	9.5±0.2 ^{ef}
10	1.0	3.3±0.1 ^g	4.3±0.1 ^g	4.6±0.1 ^e	5.1±0.1 ^f

¹⁾All data (mean±standard error of triplicate determinations) with different letters were significantly different at $P<0.05$.

ginate를 첨가하지 않았을 경우 SPI의 RFI 값이 21.0이었던 것이 Na-alginate의 첨가 농도가 증가함에 따라 유의적으로($P<0.05$) 증가하여 Na-alginate의 첨가 농도가 1.0%일 때는 이 용액의 RFI 값이 73.8로 이르렀다. 이때 이 용액이 나타내는 RFI 값과 SPI 농도 및 Na-alginate의 첨가 농도와의 관계식은 $y=6.793x_1+47.812x_2+20.421$ (y : RFI 값, x_1 : SPI 농도, x_2 : Na-alginate의 첨가 농도)로 나타났다. 평균 분자량이 513, 245 및 161 kDa인 Na-alginate를 각각 첨가할 경우(Fig. 6b, c, d)에도 평균분자량이 973 kDa인 Na-alginate를 첨가할 때와 같은 경향을 나타내었으며 이때 용

액이 나타내는 RFI 값과 SPI 농도 및 Na-alginate의 첨가 농도와의 관계식은 각각 $y=6.793x_1+31.973x_2+17.256$, $y=6.793x_1+25.151x_2+16.660$ 및 $y=6.793x_1+17.409x_2+15.832$ 로 나타나 Na-alginate의 농도와 평균분자량의 증가 및 SPI 농도의 증가에 따라 SPI의 표면소수성이 감소하였다. 다른 연구자들에 의하면 카놀라 단백질에 카라기난을 첨가하면 pH의 조건에 따라 카놀라 단백질과 카라기난 사이의 정전기적인 결합이 형성되어 단백질과 카라기난 사이의 응집으로 인하여 이미 카놀라 단백질의 표면에 노출되었던 소수성 영역이 함몰되면서 표면소수성이 감소한다. 그러나

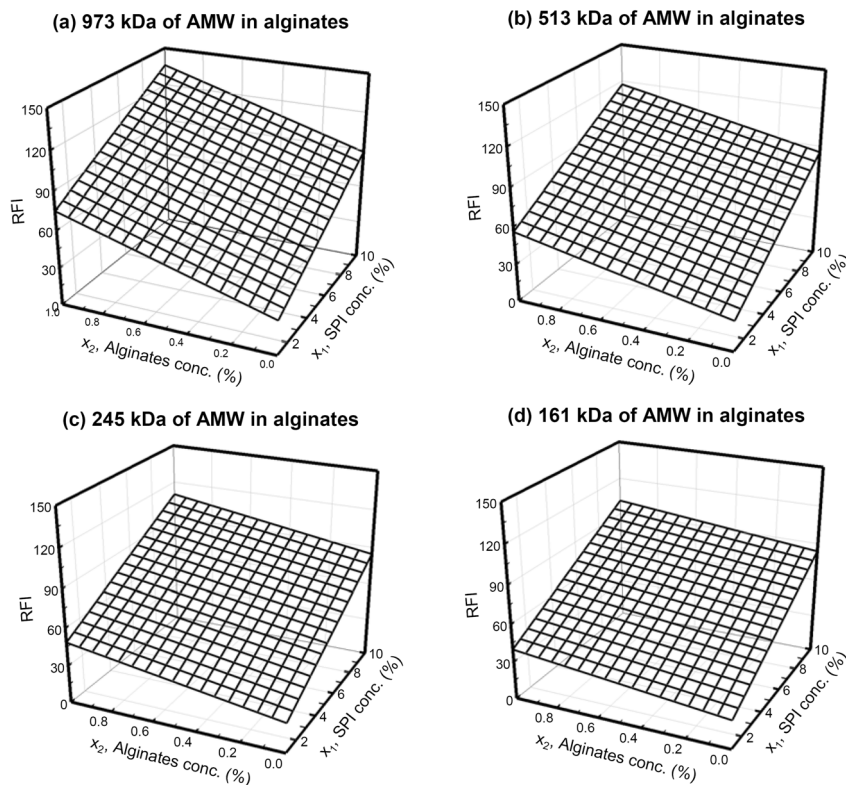


Fig. 6. Mesh plots showing the effects of SPI concentrations and alginates AMWs on the front-surface hydrophobicity of SPI-alginates system at pH 7.0. The significant interaction identified by the one-way ANOVA test at $P<0.05$. (a) $y=6.793x_1+47.812x_2+20.421$, $r^2=0.964$; (b) $y=6.793x_1+31.973x_2+17.256$, $r^2=0.980$; (c) $y=6.793x_1+25.151x_2+16.660$, $r^2=0.981$; (d) $y=6.793x_1+17.409x_2+15.832$, $r^2=0.986$.

카놀라 단백질과 카라기난 사이의 정전기적인 반발이 나타나는 조건에서는 단백질의 표면소수성이 증가한다고 보고하였다(32). 또한, milk whey protein isolate(WPI)와 Na-alginate의 혼합용액에서 WPI와 Na-alginate 사이에 회합이 일어나 복합체를 형성하면 소수성 영역이 복합체 내부로 함몰되기 때문에 WPI의 표면소수성이 감소하며(35), alginates의 농도가 증가하면 alginates에 존재하는 소수성 pre-micelle 영역이 증가하여 탐침물질로 사용하는 소수성 물질의 분자가 이 영역 내부로 이동하기 때문에 소수성이 감소한다(35)고 하였다. 그러므로 Na-alginate의 농도와 분자량의 증가에 따라 SPI의 표면소수성이 감소한 것은 Na-alginate와 SPI의 사이에 정전기적 결합이 형성되어 SPI와 Na-alginate 사이의 응집으로 인하여 이미 SPI 단백질의 표면에 노출되었던 소수성 영역이 응집체 내부로 함몰되기 때문이거나 Na-alginate 주변에 존재하는 소수성 pre-micelle 영역이 증가하기 때문으로 생각된다.

Fig. 7은 일정한 농도의 SPI 용액에 Na-alginate의 농도를 증가시킬 때 Na-alginate의 분자량이 이 용액의 RFI 값의 증가속도에 미치는 영향을 나타낸 그림이다. SPI 용액에 Na-alginate를 첨가하면 이 혼합 용액의 RFI 값의 증가속도는 Na-alginate의 분자량이 증가함에 따라 유의하게($P < 0.05$) 거의 직선적으로 감소하였으며 RFI의 증가속도와 Na-alginate 분자량과의 관계식은 $y = -0.016x - 21.696$ (y : RFI의 증가속도, x : Na-alginate의 평균분자량)으로 나타났다. 고분자 전해질인 alginates는 carboxylic group 사이의 정전기적 상호작용으로 pre-micelle이 생성되며 이러한 pre-micelle은 소수성 영역을 형성하고 alginate 분자 사슬을 따라 형성된 micelle에 탐침물질이 용해되기 때문에 표면소수성이 감소한다(35)고 보고한 것을 고려하면, 본 실험의

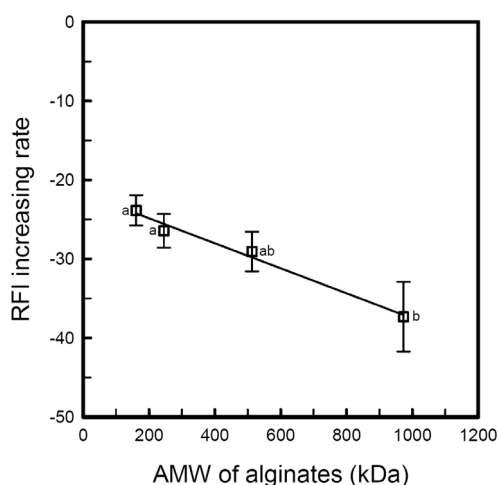


Fig. 7. Effect of alginates AMWs on the front-surface hydrophobicity by concentrations of SPI-alginates system at pH 7.0. All data (mean±standard error of triplicate determinations) with different letters were significantly different at $P < 0.05$. The slope of RFI for the alginates AMW (kDa) is given in equation of $y = -0.016x - 21.696$, $r^2 = 0.985$.

결과에서 나타난 Na-alginate의 분자량이 증가함에 따라 표면소수성의 증가속도가 감소하는 현상은 Na-alginate의 분자량이 증가하면 사슬의 길이가 증가하여 더 많은 소수성 micelle 응집물이 생성되어 여기에 ANS가 용해되어 응집물의 내부로 함몰되기 때문으로 생각된다.

요 약

분리콩단백질(SPI, soy protein isolate) 농도, pH, 전해질의 종류와 농도, alginates의 농도와 분자량이 SPI의 표면소수성에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. SPI 농도가 증가할수록 표면소수성은 감소하였다. SPI의 표면소수성이 pH 7.0에서 최대값을 나타내었다가 pH가 7.0을 기준으로 증가 혹은 감소함에 따라 표면소수성이 감소하는 경향을 나타내었다. SPI의 표면소수성은 NaCl의 농도가 100 mM까지 증가함에 따라 급격히 증가하지만 더 이상의 농도에서는 변화가 없었다. CaCl_2 와 MgCl_2 의 농도가 각각 50 mM과 30 mM까지 증가할수록 SPI의 표면소수성이 급격히 감소하였지만, 그 이상의 농도에서는 큰 변화가 없었다. Na-alginate의 농도와 분자량의 증가함에 따라 SPI의 표면소수성이 감소한 것으로 나타났다. Na-alginate의 분자량이 증가함에 따라 표면소수성의 증가속도가 감소하였다.

REFERENCES

1. Damodaran S. 1996. Amino acids, peptides, and proteins. In *Food Chemistry*. Fennema OR, ed. Marcel Dekker, New York, NY, USA. p 321-429.
2. Galazka VB, Smith D, Ledward DA, Dickinson E. 1999. Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chem* 64: 303-310.
3. Thomas WR. 1992. Carrageenan. In *Thickening and Gelling Agents for Food*. Imeson A, ed. Blackie Academic and Professional, Cambridge, MA, USA. p 24-39.
4. Drohan DD, Tziboula A, McNulty D, Home DS. 1977. Milk protein-carrageenan interactions. *Food Hydrocolloids* 11: 101-107.
5. Frederick FS. 1994. Interaction of soy isolate with polysaccharide and its effect on film properties. *J Am Oil Chem Soc* 71: 1281-1285.
6. Noh BS, Kim SS, Jang PS, Lee HG, Park WJ, Song GB, Lee HS, LEE SB, Hwang GT. 2011. Processing soybean. In *Food Processing & Preservation*. 2nd ed. Suhaksa Publishing Company Inc., Seoul, Korea. p 245-270.
7. Gennadios A, Brandenburg AH, Weller CL, Testin RF. 1993. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *J Agric Food Chem* 41: 1835-1839.
8. Campbell LJ, Gu X, Dewar SJ, Euston SR. 2009. Effects of heat treatment and glucono- δ -lactone-induced acidification on characteristics of soy protein isolate. *Food Hydrocolloids* 23: 344-351.
9. Hayakawa S, Nakai S. 1985. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J Food Sci* 50: 486-491.
10. Hua Y, Cui SW, Wang Q, Mine Y, Poysa V. 2005. Heat

- induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours. *Food Res Int* 38: 377-385.
11. Dickinson E, Stainsby G. 1988. Emulsion stability. In *Advances in Food Emulsions and Foams*. Dickinson E, Stainsby E, eds. Elsevier Applied Science, Cambridge, MA, USA. p 1-44.
 12. Nakai S. 1983. Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *J Agric Food Chem* 31: 676-683.
 13. Harwalker VR, Ma CY. 1989. Effects of medium composition, preheating, and chemical modification upon thermal behaviour of oat globulin and β -lactoglobulin. In *Food Proteins*. Kinsella JF, Soucie WG, eds. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA. p 210-251.
 14. Koning MMG, Visser H. 1992. Protein interactions. An overview. In *Protein interaction*. Visser H, ed. VCH Publishers, New York, NY, USA. p 1-24.
 15. Bonomi F, Mora G, Pagani MA, Iametti S. 2004. Probing structural features of water-insoluble proteins by front-face fluorescence. *Anal Biochem* 329: 104-111.
 16. Chapman VJ, Chapman DJ. 1980. Algin and alginate. In *Seaweeds and Their Uses*. Chapman and Hall, New York, NY, USA. p 194-225.
 17. You BJ, Im YS, Jeong IH, Lee KH. 1997. Effect extraction conditions on bile acids binding capacity *in vitro* of alginate extracted from sea tangle (*Laminaria* spp.). *J Korean Fish Soc* 30: 31-38.
 18. You BJ, Lim YS, Ryu HS. 2004. Effects of hot water treatment and dialysis on measuring the average molecular weight of alginates. *J Kor Fish Soc* 37: 1-6.
 19. Lim YS, You BJ. 2006. Effects of hydrolysis pH on distribution of molecular weights of alginates of sea tangle *Laminaria japonica*. *J Kor Fish Soc* 39: 313-317.
 20. Meloan CE, Pomeranz Y. 1973. *Food analysis laboratory experiments*. The Avi Publishing Company Inc., Westport, CT, USA. p 79-110.
 21. Somogyi M. 1952. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195: 19-23.
 22. Hirst EL, Percival E, Wold JK. 1964. The structure of alginic acid. Part IV. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide. *J Chem Soc* 8: 1493-1499.
 23. Kato A, Nakai S. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim Biophys Acta* 624: 13-20.
 24. SPSS. 2004. SPSS base 12.0 for window. SPSS Inc., Chicago, IL, USA.
 25. Lim YS, You BJ. 2007. Effects of hydrolysis temperature on the distribution of the molecular weights of alginates prepared from sea tangle, *Laminaria japonica*. *J Kor Fish Soc* 40: 187-192.
 26. Winnik FM. 1993. Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other organized media. *Chem Rev* 93: 587-614.
 27. Li-Chan E, Nakai S, Wood DF. 1984. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *J Food Sci* 49: 345-350.
 28. Voutsinas LP, Cheung E, Nakai S. 1983. Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *J Food Sci* 49: 26-32.
 29. Kundu B, Guptasarma P. 2002. Use of a hydrophobic dye to indirectly probe the structural organization and conformational plasticity of molecules in amorphous aggregates of carbonic anhydrase. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 572-577.
 30. Wolf WJ. 1970. Soybean proteins: their functional, chemical, and physical properties. *J Agric Food Chem* 18: 969-976.
 31. Chan MYY, Bell DJ, Durnil P. 1982. The relationship between the zeta potential and the size of soya protein acid precipitate particles. *Biotechnol Bioeng* 24: 1897-1990.
 32. Uruakpa FO, Arntfield SD. 2006. Surface hydrophobicity of commercial canola proteins mixed with κ -carrageenan or guar gum. *Food Chem* 95: 255-263.
 33. Goddard ED. 1986. Polymer-surfactant interaction part II. Polymer and surfactant of opposite charge. *Colloids Surf* 19: 301-329.
 34. Ren B, Gao Y, Lu L, Liu X, Tong Z. 2006. Aggregates of alginates binding with surfactants of single and twin alkyl chains in aqueous solutions: Fluorescence and dynamic light scattering studies. *Carbohydr Polym* 66: 266-273.
 35. Fioramonti SA, Perez AA, Aringoli EE, Rubiolo AC, Santiago LG. 2014. Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. *Food Hydrocolloids* 35: 129-136.