KFAS 한국수산과학회지 Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences
한수지 54(4), 543-551, 2021

Original Article
Korean J Fish Aquat Sci 54(4),543-551,2021

글루텐의 표면소수성에 미치는 전해질, pH 및 다시마(*Sacchrina japonicas*) 알긴산나트륨의 분자량의 영향

임영선 · 유병진*

강릉원주대학교 식품영양학과

Effect of pH, Electrolytes, and Molecular Weights of Sodium Alginate (Prepared from *Sacchrina japonicas*) on Gluten Surface Hydrophobicity

Yeong-seon Lim and Byung-jin Yoo*

Department of Food and Nutrition, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

Changes in gluten surface hydrophobicity, which play an important role in the functional characteristics of protein, were measured according to various protein concentrations, pH levels, electrolytes concentrations, and alginate molecular weights using 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) as a fluorescent probe. Gluten surface hydrophobicity decreased as gluten concentration increased, reaching a maximum pH of 7.0. The effects of alginate molecular weights and alginate concentration on the surface hydrophobicity, emulsifying activity index (EAI), and emulsion stability index (ESI) of gluten-sodium alginate dispersion (GAD) were measured. Gluten surface hydrophobicity rapidly increased the asl NaCl concentration of gluten solution up to 300 mM and showed no significant increase above 300 mM. However, gluten surface hydrophobicity notably decreased until the concentration of $CaCl_2$ and $MgCl_2$ reached 30 mM, indicating no significant variations above 30 mM. GAD surface hydrophobicity increased as the concentration and molecular weight of sodium alginate increased, however, gluten concentration increased as the GAD surface hydrophobicity decreased. The EAI and ESI of GAD increased as both molecular weight and concentration of sodium alginate increased.

Keywords: 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid, Emulsifying activity index, Emulsion stability index, Gluten-alginate dispersion, Surface hydrophobicity

서 론

다당류와 단백질 모두를 내포하는 식품에서는 각각의 생체고분자의 자체 성질뿐만 아니라 생체고분자의 상호작용과 이러한 작용력의 세기에 따라 생체 고분자의 전체적인 구조와 기능성과의 상관관계는 달라지기 때문에(Damodaran, 1996), 식품 내에서 단백질은 다당류와 같은 식품성분과 상호 반응하여 단백질 혹은 다당류의 기능성을 변화시킨다(Galazka et al., 1999). 또한 단백질과 다당류의 복합체는 이온 효과로 인해 열에 안정하므로 단백질과 다당류 복합체 사이의 공유결합을 형성하기 위한 상호 반응은 바람직하다고 보고하고 있다(Frederick, 1994). 이러한 성질을 산업적으로 이용한 예로 유제품은 필요한 기능성을 부여하기 위해 다당류를 첨가하며(Thomas, 1992), κ-carrageenan과 같은 다당류는 우유단백질과 직접 상호작용하여 우유제품의 안정성을 부여하는 것으로 알려져 있다(Drohan et al., 1977). 그러므로 단백질의 성질에 미치는 다당류의 영향을 조사하는 것은 단백질과 다당류의 복합체인 식품에서는 중요한 연구 분야로 알려져 있다.

밀가루 단백질인 gluten은 polypeptide chain이 disulfide bond에 의해서 형성된 거대 분자이며, 비교적 넓은 범위의 분자량을 가지고 있다. Gliadin은 분자내부에 disulfide bond에 의해 소수성 polypeptides로 형성된 단쇄 단백질이다(Wrigley, 1996). Glutenin과 gliadin은 반죽의 안정성과 noodle의 조직감에 영향을 미치고(Barak et al., 2003), 이러한 두 단백질이

***Corresponding author:** Tel: +82. 33. 640. 2331 Fax: +82. 33. 640. 2330
E-mail address: ybjin@gwnu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Licens (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0543
Korean J Fish Aquat Sci 54(4), 543-551, August 2021
Received 24 March 2021; **Revised** 3 May 2021; **Accepted** 29 June 2021
저자 직위: 임영선(강사), 유병진(교수)

gluten의 망상구조를 형성하며 이러한 구조가 반죽과 noodles의 점탄성에 영향을 미치며 거대 분자인 glutenin은 gluten의 탄성을 주고 반면 gliadin은 gluten의 점성에 관여한다(Gianibelli et al., 2001). 그리고 gluten, glutenin, gliadin 모두 알칼리에 의해서 소수성 상호작용과 수분-고체간의 상호작용을 촉진한다고 보고하고 있으므로(Han et al., 2020), pH가 밀가루 단백질의 물리화학적 성질에 큰 영향을 미친다.

단백질의 성질에 영향을 미치는 요인으로 pH, 다당류와의 상호반응, 단백질의 소수성 및 표면전하 등이 알려져 있어(Hayakawa and Nakai, 1985; Gennadios et al., 1993; Frederick, 1994), gluten의 기능성과 성질에 영향을 미치는 여러 요인들 중 소수성의 중요성을 강조하였다. 또한 단백질의 표면과 에멀젼 성질은 단백질구조와 밀접한 관련이 있으며(Dickinson and Stainsby, 1988; Damodaran, 1996), 단백질의 구조와 단백질과 다른 성분과의 상호 반응에 영향을 미치는 변수로서는 단백질의 소수성과 입체적인 인력이며(Nakai,1983), 단백질 분자의 유연성과 안정성에 영향을 미치는 요인으로는 pH, 온도, 이온조건 및 disulfide bond 등으로 보고되어 있으므로(Harwalker and Ma, 1989; Koning and Visser, 1992) 단백질의 소수성은 단백질의 성질과 구조를 관계하는 입체적 인력, 정전기적 결합 및 주변 환경과의 수소결합 등은 단백질의 소수성에 영향을 미치며 이 소수성은 또한 단백질의 여러 기능성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Nakai,1983).

그러므로 단백질의 소수성을 측정하는 것은 주변 환경에 따른 단백질의 성질을 예측할 수 있는 중요한 요인이다. 단백질의 소수성을 측정하는 식품단백질에 외부에서 형광을 내는 물질인 ANS (8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid)를 첨가하여 단백질이 주변 환경에 따라 미세한 구조의 변화하므로 달라지는 형광의 정도를 측정하는 방법이 사용되고 있는데 단백질의 표면소수성의 변화를 측정하는데 유용한 것으로 보고되었다(Bonomi et al., 2004).

본 연구는 빵과 noodle의 조직감과 친유성을 향상시키기 위한 기초자료를 얻기위하여, gluten의 농도, pH, 다가전해질 종류와 농도 그리고 다시마 알긴산나트륨의 농도와 분자량이 밀가루 단백질인 gluten의 표면소수성에 미치는 영향을 탐침물질인 ANS를 이용하여 측정하였으므로 보고하는 바이다.

재료 및 방법

Gluten

본 연구에 사용한 gluten은 밀가루로부터 추출한 Sigma-Aldrich (No. G5004; St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

알긴산나트륨의 추출, 정제, 저분자화 및 물리적 특성 측정

강원도 강릉시 주문진에서 2014년 8월에 채취하여 건조한 다시마를 40 mesh로 분쇄하여 알긴산나트륨의 추출용으로 사용하였다. 알긴산나트륨의 추출은 You et al. (1997)의 방법에 따라 간조 다시마 분말에 10배량의 3% Na_2CO_3을 가하여 60°C에서 5시간 동안 추출한 후 원심분리를 하였다. 얻어진 상층액에 95% 이상의 에탄올을 가하여 침전하고 다시 원심분리하여 얻어진 침전물을 증류수를 가하여 녹이고 95% 이상의 에탄올을 가하여 침전하는 조작을 2회 더 반복하여 정제한 후 진공동결건조하여 알긴산나트륨의 시료로 사용하였다. 알긴산나트륨의 저분자화와 분자량별 분리는 Lim and Yoo (2005)의 방법에 따라 건조한 알긴산나트륨을 탈이온수에 녹여 1% 용액으로 제조하고 각각 HCl과 구연산 용액으로 pH 0.5-5.0로 조절한 후 20-121°C에서 10-120분 동안 가수분해하였다. 가수분해한 알긴산나트륨은 MW cut-off 500, 300, 100 및 50 kDa의 한외여과막(Amicon model UF Membranes; Millipore Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 N_2 gas를 이용하는 최대압력 75 psi (5.3 kg/cm^2)의 한외여과기(Amicon Stirred Cell 8200; Millipore Co., St. Louis, MO, USA)로 각각 분획하였다. 각 분액의 평균분자량(average molecular weight, AMW)은 중합도(degree of polymerization, DP)와 분자량(molecular weight, MW)과의 관계를 나타낸 You and Lim (2003)의 MW=0.194 (DP) 식에 따라 계산하였으며, DP는 알긴산나트륨의 uronic acid 함량에 대한 환원당 함량의 비로 측정하였다.

표면소수성의 측정

Lim and Yoo (2016)의 방법에 따라 gluten의 농도가 gluten-alginate 분산액(GAD)의 표면소수성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 gluten의 농도를 탈이온수로 각각 1, 3, 5, 7 및 10%로 희석하여 제조하였고, 분자량 973, 513, 245 및 161 kDa의 알긴산나트륨은 0.1 M sodium phosphate 완충용액에 녹여 각각 0, 0.1, 0.5 및 1.0%의 농도가 되도록 제조하였으며, gluten과 알긴산나트륨 용액을 농도 별로 혼합하고 pH 7.0으로 조정하여 시료 용액으로 사용하였다. GAD의 표면소수성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 1% gluten 용액을 1 M HCl과 1 M NaOH 용액으로 pH 2-12로 조절하여 시료 용액으로 하였다. 전해질의 종류와 농도의 영향은 1% gluten 용액에 각각 NaCl의 농도가 0-1,000 mM, $CaCl_2$와 $MgCl_2$의 농도가 0-100 mM이 되도록 제조하여 pH 7.0으로 조절한 후 시료 용액으로 하였다. 제조된 시료 용액의 표면소수성은 측정은 Kato and Nakai (1980)의 방법을 약간 변형하여 실험하였다. 즉, pH 7.0 phosphate buffer 용액에 시료용액을 희석시킨 후 일정량의 희석 용액을 3 mL취하여 20 mM의 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS; A1028; St. Louis, MO, USA) 25 μL를 첨가한 후 형광분광광도계(RF-5301PC; Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 들뜬파장 375, 390 nm, 흡수파장 470 nm, slit width 3.0과 1.5 nm에서 형광강도를 측정하였다. 측정된 형광강도에서 ANS를 첨가하지 않은 gluten 시료 용액의 형광 강도를 감하

여 순수한 형광 세기를 구하고, 각각의 gluten 농도에 대한 순수한 형광 세기의 기울기를 구하여 표면소수성의 지표로 사용하였다.

O/W Emulsion의 조제

Emulsion은 대두유(CJ cheiljedang Co., Incheon, Korea) 10 mL와 gluten 용액(10 mg/mL in 1/100 M sodium phosphate buffer, pH 7.0) 30 mL, 알긴산나트륨 용액 30 mL를 잘 혼합하여 25°C, 24,000 rpm으로 90초간 균질기(T-25 apparatus and S25N10G device; IKA Labortechnik, Karlsruhe, Germany)를 사용하여 제조하였다.

GAD 에멀젼의 유화활성 및 유화안정성의 측정

유화활성과 유화안정성은 Pearce and Kinsella (1978)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 유화 후 즉시 O/W (oil/water) emulsion 중 일정량을 취하고 0.1% SDS 용액으로 희석하여 분광광도계(UV-1800; Shimadzu Co., Tokyo, Japan) 500 nm에서 흡광도를 측정하여 유화활성지표(emulsifying activity index, EAI)로 표시하였으며, 25°C에서 300분 동안 방치하면서 10분 간격으로 500 nm에서 흡광도를 측정하여 시간 당 붕괴되는 유화활성의 기울기 값을 통해 얻어진 유화활성의 안정도 상수를 유화안전성지표(emulsifying stability index, ESI)로 표시하였다.

통계분석

5회 반복 측정한 모든 실험결과는 IBM SPSS statistics program 23 (IBM Co., New York, NY, USA)의 one-way ANOVA test를 실시하여 분산분석을 통해 평균±표준오차를 구하였으며, 평균간의 유의성은 95% 유의수준(P<0.05)에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

Gluten의 농도가 gluten 표면소수성에 미치는 영향

Gluten의 농도변화에 따른 표면형광도(relative fluorescence intensity, RFI) 세기의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. NaCl을 첨가하지 않은 그래프를 보면 gluten 농도가 1.0%에서 RFI 값이 205.6이었던 것이 10.0%에서는 46.4로 유의적으로(P<0.05) 급격히 감소하였다. Gluten 농도와 RFI 값의 관계식은 y=16.971x+223.229로 나타나 gluten 농도가 증가할수록 RFI 값은 거의 직선적으로 감소하였다. 본 연구에서 gluten의 농도가 10%까지 증가할 경우에는 gluten의 표면소수성이 감소함을 알 수 있다. 즉, 수분량이 증가하면 gluten의 표면소수성이 증가함을 보여준다. RFI값은 fluorescence probe를 둘러싸고 있는 미세 환경의 극성을 나타내 gluten의 표면소수성의 정도를 나타내는 것이며(Winnick, 1993), 세몰리나와 밀가루 단백질의 수분량이 증가함에 따라 형광도의 세기가 증가하는데 이것은

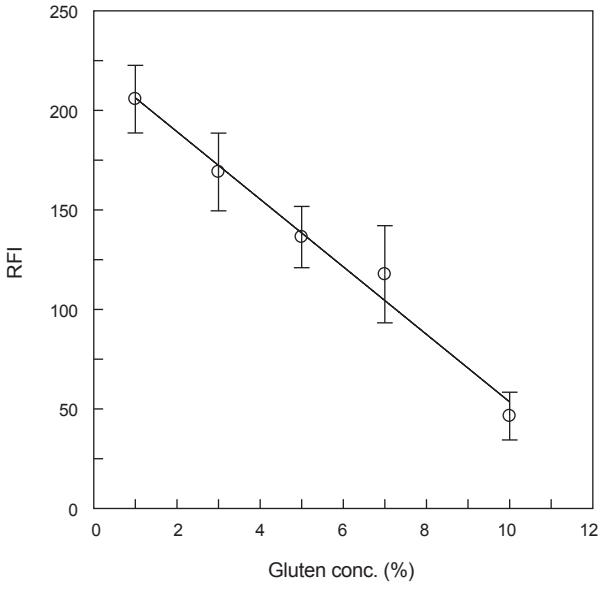

Fig. 1. Effect of gluten concentration on the front-surface hydrophobicity of gluten dispersion at pH 7.0. All data (mean±standard deviation of 5 replications) with difference superscripts were significantly difference at P<0.05. The relative fluorescence intensity (RFI) for the gluten concentration are given in equation of y=-16.971x+223.229, r^2=0.983.

단백질이 수분에 의해 용매화되어 구조적으로 단백질의 재배열이 용이하게 되므로 소수성 영역이 표면으로 드러나기 때문으로 알려져 있다(Bonomi et al., 2004). 또한 단백질은 용해도가 감소하면 단백질의 표면소수성이 증가하며(Li-Chen et al., 1984), ovalbumin과 lysozyme 등과 같은 단백질의 표면 소수성에 관한 연구 결과(Nakai, 1983)와 soy protein isolate (SPI)의 표면소수성 연구(Lim and Yoo, 2016)에서도 같은 경향을 보고하였다. 이러한 연구를 고려하면 본 실험의 결과에 나타났듯이 gluten 농도가 낮은 곳에서부터 10%까지 증가함에 따라 gluten의 RFI 값이 감소한 것은 수분의 량이 충분한 환경에서는 gluten 단백질 분자의 용매화가 충분히 일어나 단백질 구조의 유연성이 증가하여 단백질 분자 내부에 존재하는 소수성 영역이 표면으로 나타나지만 수분의 함량이 감소하면 단백질 구조의 유연성이 낮아지므로 단백질 분자 내부에 존재하는 소수성 영역이 표면으로 드러나는 것이 억제되기 때문으로 볼 수 있다.

Gluten의 표면소수성에 미치는 pH의 영향

Fig. 2는 pH가 gluten의 표면소수성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. pH 2.0일 때 RFI 값이 67.3이었던 것이 pH가 증가할수록 증가하여 pH 7.0에서는 205.6으로 최대값을 나타내었다가 pH가 7.0 이상으로 증가함에 따라 RFI 값이 감소하여 pH 12.0에서는 77.1을 나타내었다. 이와 같이 gluten의 표면 소수성이 pH 7.0에서 최대값을 나타내었다가 pH가 7.0을 기준으로 증가

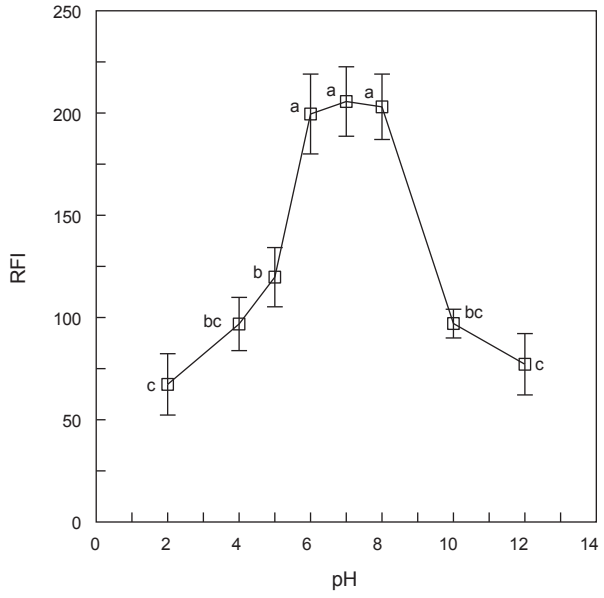

Fig. 2. Effects of pH on the front-surface hydrophobicity of 1% gluten dispersion. All data (mean±standard deviation of 5 replications) with difference superscripts were significantly difference at P<0.05. RFI, relative fluorescence intensity.

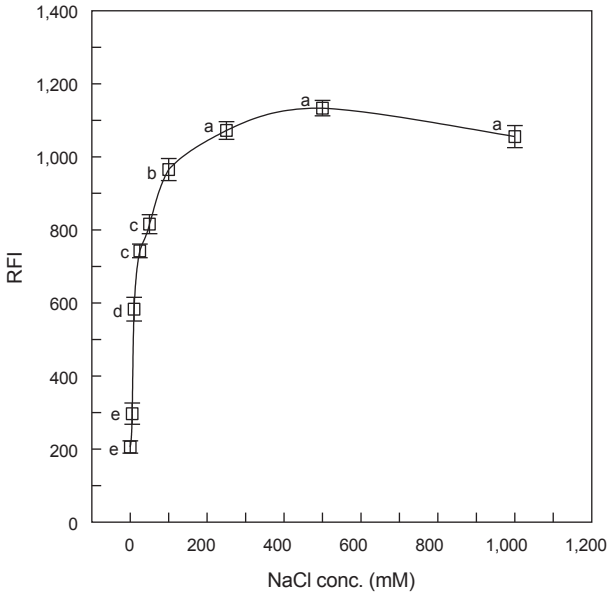

Fig. 3. Effects of NaCl concentrations on the front-surface hydrophobicity of 1% gluten dispersion at pH 7.0. All data (mean±standard deviation of 5 replications) with difference superscripts were significantly difference at P<0.05. RFI, relative fluorescence intensity.

혹은 감소함에 따라 표면 소수성이 감소하는 경향을 나타낸 것은 gluten의 외부로 나타났던 소수성 잔기들이 pH가 7.0에서 감소 혹은 증가하여 산성 혹은 알칼리성 영역으로 이동함에 따라 gluten 단백질 분자 간에 전하를 띠는 아미노산의 잔기들에 의해 생성되는 정전기적 결합이 강해지므로 단백질 구조가 변하여 단백질의 표면에 나타났던 소수성 잔기들이 단백질 내부로 함몰되기 때문으로 생각된다. pH가 SPI의 표면소수성에 미치는 영향에 대한 결과에서도 비슷한 보고를 하고 있으며(Lim and Yoo, 2016), Wang et al. (2017)은 밀가루 단백질인 gluten이 pH 7.0에서 가장 용해도가 낮다고 발표하여 pH 7.0에서 표면소수성이 가장 크게 나타난 본 실험의 결과를 뒷받침하고 있으며, 완두콩 분리 단백질을 가열 변성시켰을 때 pH 5.6에서 최대의 소수성을 나타내었다가 이 pH보다 감소하거나 증가하면 감소한다(Winnick, 1993)는 결과는 본 실험에서 나타난 특정한 pH에서 최대의 표면 소수성을 나타내었다가 그 pH를 기준으로 증가 혹은 감소함에 감소하는 경향이 같음을 나타내었다.

Gluten의 표면 소수성에 미치는 전해질 농도의 영향

pH 7.0에서 NaCl의 농도가 gluten의 표면 소수성에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 이 그림에서 알 수 있듯이 NaCl이 5mM일 때 RFI 값이 296.8이었던 것이 100 mM일 때 965.0로, NaCl의 농도가 300 mM에 이를 때까지 급격히 증가하였으나, NaCl의 농도가 500 mM에 이르러 최고치인 1133.3에 도달하였다가 1,000 mM에 이르러서는 RFI 값이 1055.5을 나타내 유의적(P<0.05)으로 약간 낮아졌다. 그리고 gluten의 RFI 값과 NaCl의 농도와의 관계식은 y=18.000 lnx+65.282로 나타났다. ANS는 단백질의 소수성 개별 잔기와는 결합하지 않고 소수성 잔기들의 다발(영역)과 결합한다고 보고한 것(Kundu and Guptasarma, 2002)과 단백질 분자의 총 전하량이 단백질의 용해도에 영향을 미치는 중요한 요인이라고 하였으며(Wolf, 1970), 콩 단백질 입자크기는 제타전위와 깊은 상관관계가 있으며(Chan et al., 1982), 실제 서로 다른 여러 종류의 단백질로 구성된 식품의 단백질의 등전점이 단백질의 기능적 성질에 영향을 미치는 전하 효과는 제타전위로써 나타내는 것이 유용하며 콩 단백질 입자의 크기는 제타전위가 0에 가까울수록 증가하므로 단백질의 불용해성은 제타전위가 감소하면 증가하는 것으로 보고하고 있다(Hayakawa and Nakai, 1985). 그리고 단백질의 전하에 영향을 미치는 전해질의 농도에 따라 단백질의 구조에 관여하고 있는 정전기적 결합이 변하여 단백질 분자의 내부 혹은 외부에 존재하던 소수성 잔기와 영역이 노출 혹은 함몰되므로 카놀라 분리단백질의 표면 소수성이 변한다(Uruakpa and Arntfield, 2006)고 발표한 연구결과를 미루어 보면, gluten의 표면 소수성이 NaCl의 농도가 200 mM까지 증가함에 따라 급격히 증가하는 이유는 gluten 단백질 분자간의 극성 결합, 정전기적 결합, 혹은 수소결합에 의해서 folding되어 있던 단백질이 전해질인 NaCl이 첨가되어 제타전위가 변하므로 단백질 분자간 이러한 결합의 전기적 성질이 변하여 이 결합이 약해지거나

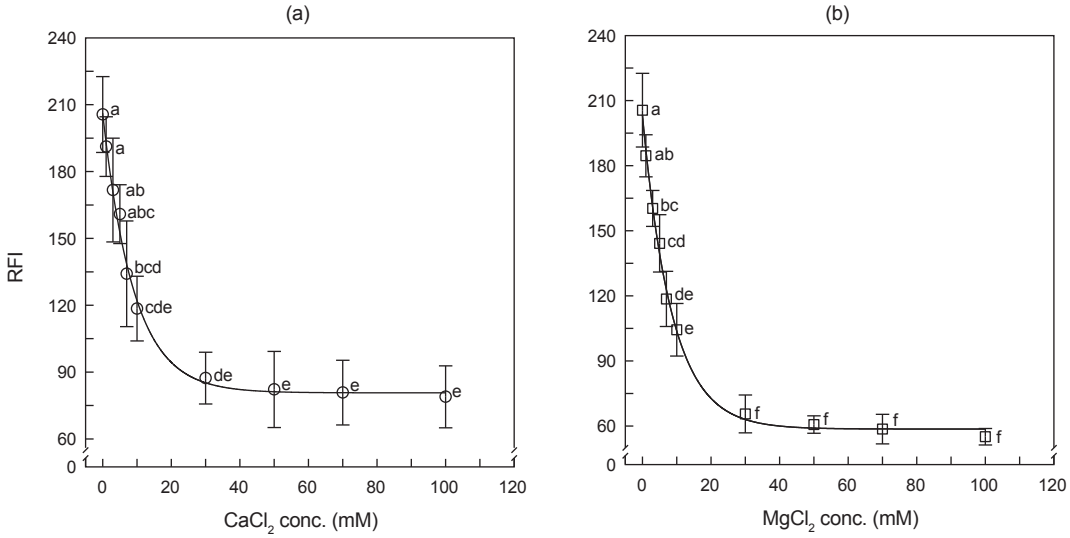

Fig. 4. Effects of $CaCl_2$ (a) and $MgCl_2$ (b) concentrations on the front-surface hydrophobicity of 1% gluten dispersion at pH 7.0. All data (mean±standard deviation of 5 replications) with difference superscripts were significantly difference at $P<0.05$. The RFI for the $CaCl_2$ (a) and $MgCl_2$ (b) conc. (mM) are given in equation of (a) $y=125.490\exp(-0.111x)+80.691$, $r^2=0.995$ and (b) $y=144.855\exp(-0.116x)+58.632$, $r^2=0.997$, respectively. RFI, relative fluorescence intensity.

붕괴됨으로 단백질 구조가 unfolding되어 단백질 내부에 존재하던 소수성 영역이 표면으로 나타나기 때문에 표면 소수성이 증가하는 것으로 생각되며, 그 이상의 농도, 즉, NaCl의 농도가 500 mM 이상으로 증가하여도 gluten의 표면 소수성이 다소 감소하는 이유는 이 농도 이상에서는 단백질표면과 용매 사이의 제타전위가 0에 가까워져 있어 folding에 관여한 단백질 분자 사이의 결합인 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. Fig. 4는 pH 7.0에서 $CaCl_2$와 $MgCl_2$의 농도가 gluten 표면소수성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. $CaCl_2$의 농도가 0.0 mM일 때 RFI 값이 205.6이었던 것이 $CaCl_2$의 농도가 10.0 mM에 이르렀을 때에는 118.5으로써 급격하게 감소하였다가 그 이상의 농도에서는 감소 속도가 완만하게 나타났다. 또한 $MgCl_2$의 경우도 $CaCl_2$와 비슷한 경향을 나타내었으며 $CaCl_2$와 $MgCl_2$의 농도가 gluten과의 표면소수성과의 관계식은 각각 $y=125.490\exp(-0.111x)+80.691$와 $y=144.855\exp(-0.116x)+58.632$로 나타나 $CaCl_2$와 $MgCl_2$의 농도가 일정한 농도까지 증가할수록 표면 소수성이 급격히 감소하는 결과를 나타내었다. 단백질의 응집을 일으키는 것은 다가 전해질과 단백질 사이의 정전기적 상호작용 뿐 아니라 단백질 사이의 소수성 결합에 의한 것이라고 보고하고(Goddard, 1986), 이러한 단백질의 결합과정은 다가 전해질과 결합한 단백질이 다른 단백질과 주변에 가장 가까이에 존재하는 단백질과 소수성 결합을 촉진하기 때문이라는(Ren et al., 2006) 연구를 미루어 보면 Ca^{2+}와 Mg^{2+}는 단백질 분자간에 가교 결합을 형성하여 단백질의 응집을 일으킬 때 단백질 분자의 표면에 이미 나타난 소수성 영역들 사이에 상호 반응하여 소수성 결합이 촉진되어 단백질 분자 내부로 함몰되므로 ANS와 결합하는 gluten의 표면 소수성 영역이 감소하기 때문으로 생각된다.

알긴산나트륨의 첨가량이 GAD의 표면소수성에 미치는 영향

pH 7.0에서 알긴산나트륨의 첨가 농도와 gluten의 농도에 따른 GAD의 표면 소수성 변화를 알긴산나트륨의 평균분자량 별로 3차원 그래프로 나타낸 것이 Fig. 5이다. 평균분자량이 973 KDa인 알긴산나트륨의 농도를 달리하여 첨가할 때 (Fig. 5a), gluten 농도가 1% 용액에 알긴산나트륨을 첨가하지 않았을 경우 GAD의 RFI값이 205.6이었던 것이 알긴산나트륨의 첨가농도가 증가함에 따라 유의적으로($P<0.05$) 증가하여 알긴산나트륨의 첨가농도가 1.0%일 때에는 이 용액의 RFI 값이 1,159.0에 이르렀다. 이때 GAD가 나타내는 RFI 값과 gluten 농도 및 알긴산나트륨의 첨가농도와의 관계식은 $y=-49.911x_1+391.747x_2+383.195$ (y, RFI 값; x_1, gluten 농도; x_2, 알긴산나트륨의 농도)로 나타났다. 평균분자량이 513, 245 및 161 KDa인 알긴산나트륨을 각각 농도를 달리하여 첨가할 경우(Fig. 5b-5d)에도 평균분자량이 973 KDa인 알긴산나트륨을 첨가할 때와 같은 경향을 나타내었으며 이 때 GAD가 나타내는 RFI 값과 gluten 농도 및 알긴산나트륨의 첨가농도와의 관계식은 각각 $y=-64.503x_1+478.731x_2+530.990$, $y=-90.946x_1+562.790x_2+685.005$ 및 $y=-111.324x_1+630.930x_2+844.750$로 나타나 알긴산나트륨 평균분자량의 증가와 gluten 농도와 알긴산나트륨 농도의 증가에 따라 GAD의 표면소수성이 감소하였다. Uruakpa and Arntfield (2006)에 의하면 카놀라 단백질에 카라기난을 첨가

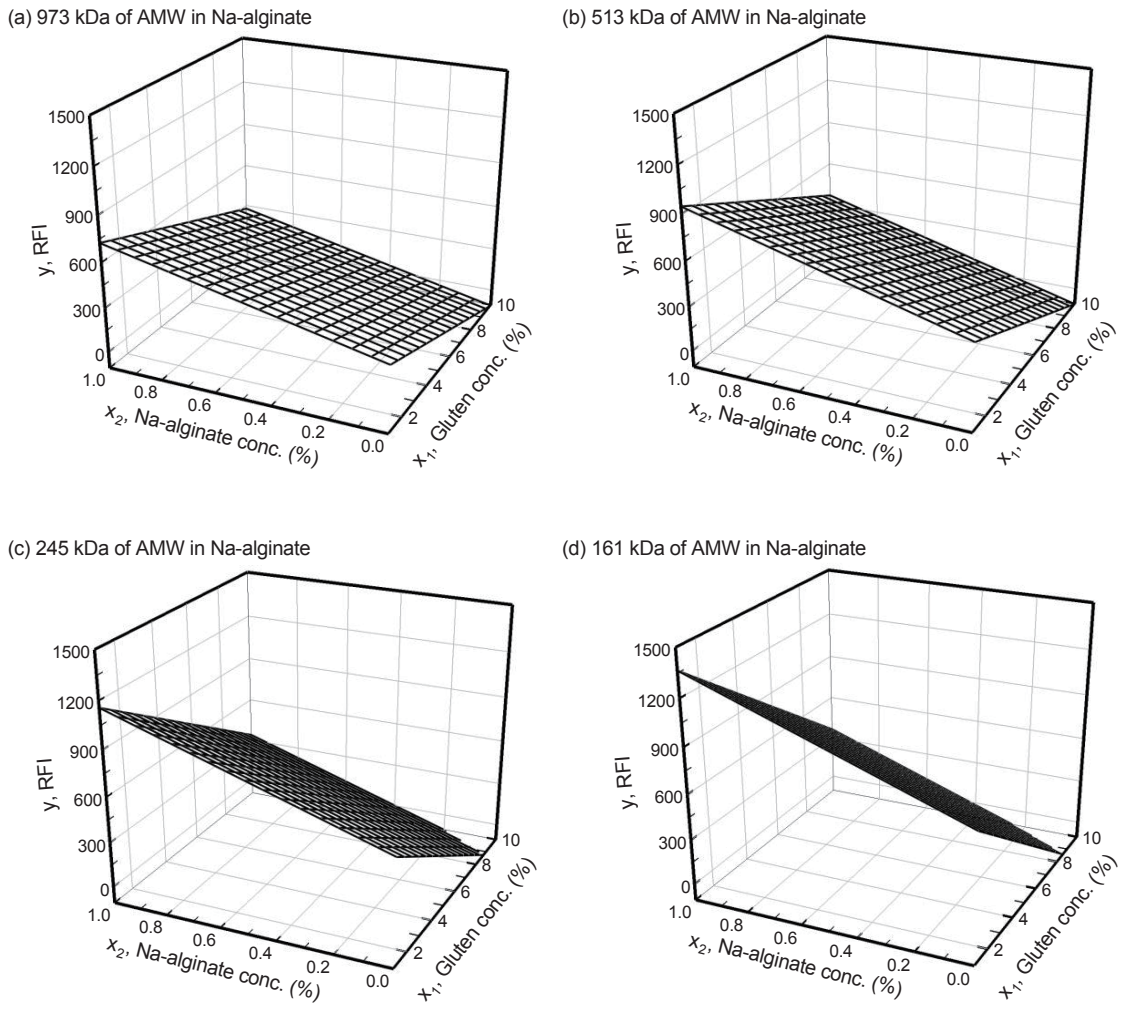

Fig. 5. Mesh plots showing the effects of gluten concentrations and sodium alginate AMWs on the front-surface hydrophobicity of sodium alginate- gluten dispersion at pH 7.0. The significant interaction identified by the one-way ANOVA test at $P<0.05$. a, $y=-49.911x_1+391.747x_2+383.195$, $r^2=0.913$; b, $y=-64.503x_1+478.731x_2+530.990$, $r^2=0.992$; c, $y=-90.946x_1+562.790x_2+685.005$, $r^2=0.919$; d, $y=-111.324x_1+630.930x_2+844.750$, $r^2=0.921$.

하면 카놀라 단백질과 카라기난 사이의 정전기적 결합이 형성되어 이미 카놀라 단백질의 표면에 노출되었던 소수성 영역이 함몰되면서 표면소수성이 감소하며, Fioramonti et al. (2014)은 milk whey protein isolate (WPI)와 알긴산나트륨의 혼합용액에서 WPI와 알긴산나트륨 사이에 회합이 일어나 복합체를 형성하여 소수성 영역이 복합체 내부로 함몰되기 때문에 WPI의 표면 소수성이 감소된다고 하여 다당류와 단백질 사이의 결합이나 회합이 단백질의 표면 소수성을 감소시킨다고 하여 본 연구의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 그리고 Fioramonti et al. (2014)은 알긴산나트륨의 농도가 증가하면 알긴산나트륨의 주변에 존재하는 소수성 pre-micelle 영역이 증가하므로 탐침물질로 사용하는 소수성 물질의 분자가 이 영역으로 이동하여 pre-micelle 영역내부로 이동하기 때문에 소수성이 감소한다고 하였고, Lim and Yoo (2018)는 알긴산나트륨의 분자량이 증가하면 알긴산나트륨 소수성인 premicelle의 생성속도가 늦어지기 때문에 소수성이 강한 pyrene 분자가 premicelle로 이동하는 속도가 늦어진다고 하였다. 그러므로 알긴산나트륨의 농도가 증가함에 따라 GAD의 표면소수성이 감소한 것은 알긴산나트륨과 gluten의 사이에 정전기적 결합이 형성되어 gluten과 알긴산나트륨 사이의 응집으로 인하여 이미 gluten 단백질의 표면에 노출되었던 소수성 영역이 응집체 내부로 함몰되기 때문이며 알긴산나트륨의 분자량이 증가함에 따라 GAD의 표면소수성이 감소한 것은 알긴산나트륨 주변에 존재하는 함몰되어진 소수성 pre-micelle 영역으로 ANS가 이동속도가 감소하기 때문으로 생각된다.

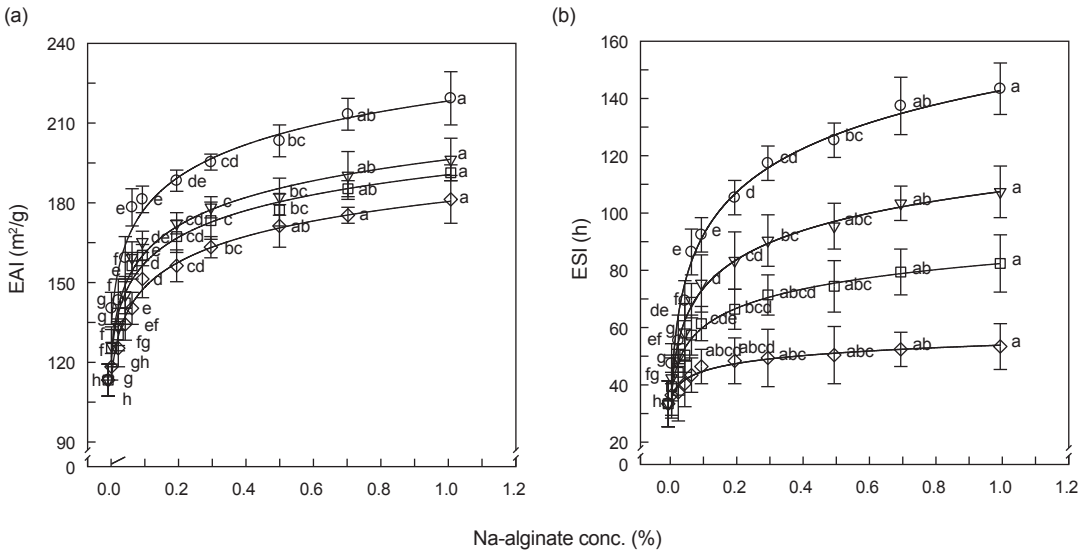

Fig. 6. Changes of emulsifying activity index (EAI; a) and emulsion stability index (ESI; b) of sodium alginate gluten dispersion with various AMWs, average molecular weights of sodium alginate. All data (mean±standard deviation of 5 replications) with difference superscripts were significantly difference at $P<0.05$. The slope of EAI and ESI for the sodium alginate AMW (kda) are given by the following equation, respectively. For 973 kDa (○) of AMW; y=18.165(lnx)+218.108, r^2=0.958 and y=22.435(lnx)+143.319, r^2=0.980. For 513 kDa (□) of AMW; y=15.787(lnx)+196.068, r^2=0.971 and y=15.029(lnx)+108.056, r^2=0.983. For 245 kDa (□) of AMW; y=14.937(lnx)+190.373, r^2=0.968 and y=9.860(lnx)+82.953, r^2=0.984. For 161 kDa (□) of AMW; y=14.487(lnx)+180.275, r^2=0.983 and y=4.040(lnx)+54.452, r^2=0.959.

알긴산나트륨의 첨가량이 gluten의 유화성질에 미치는 영향

Fig. 6은 분자량의 크기가 각각 다른 알긴산나트륨의 첨가량에 따른 GAD의 EAI과 ESI을 나타낸 그림이다. 알긴산나트륨의 분자량이 증가할수록, 첨가농도가 증가할수록 유의적으로 GAD의 유화활성과 유화안정성이 증가하였다. Domenek et al. (2003)은 gluten의 3차원적인 입체의 망상 구조는 disulfide bond에 의해 안정화되고 수소결합, 이온결합 및 소수성 결합과 같은 비공유결합에 의해서 강화된다고 하며, 또한 Tang et al. (2019)의 발표에 의하면 gluten은 수소결합, 정전기적 결합, 소수성 결합을 통하여 carboxymethylcellulose와 보다 강하게 결합한다고 한다. 그리고 Presssini and Sensidoni (2009)는 분자량이 큰 inulin은 gluten 망상구조의 밀도와 균일성을 증가시키며, Morris and Morris (2012)는 inulin의 첨가하면 gluten과 inulin 사이의 여러 결합을 형성하여 단백질과 다당류 사이의 망상구조를 안정화시킨다고 하였다. 이러한 연구발표를 미루어 보면, 본 연구에서 알긴산나트륨의 분자량이 클수록 EAI와 ESI가 증가하는 이유는 알긴산나트륨의 분자량이 클수록 알긴산나트륨의 표면 소수성이 증가하여(Lim and Yoo, 2018) gluten의 소수성 잔기와 소수성 결합이 증가하여 보다 많은 망상 구조의 밀도와 균일성을 증가시켜 GAD의 일정한 공간의 망상구조 속에 oil 입자를 고르게 분포시키므로 EAI를 촉진시킨다. 또한 gluten과 알긴산나트륨과의 망상 구조의 소수성 결합이 견고해지면 망상구조 속의 oil 입자들 사이를 소수성 결합이 강하게 감싸기 때문에 oil의 입자들이 서로 결합하는 것을 차단하므로 ESI를 높이는 것으로 사료된다. Liu et al. (2016)은 gliadin, glutenin 및 gluten에 inulin을 첨가하면 세 종류의 단백질의 유화안정성과 유화 활성을 증가시킨다고 하여 본 실험의 결과를 뒷받침하고 있다

결론적으로 밀가루 단백질인 gluten과 다시마 다당류인 알긴산나트륨 분산액의 소수성과 유화성 변화에 영향을 미치는 여러 요인을 조사함으로 빵과 noodle의 조직감을 향상시키는데 필요한 적정한 크기의 분자량을 지닌 알긴산나트륨의 농도를 결정하는 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

References

Barak S, Mudgil D and Khatkar BS 2003. Effect of compositional variation of gluten proteins and rheological characteristics of wheat flour on the textural quality of white salted noodles. Int J Food Prop 17, 731-740. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.675611.

Bonomi F, Mora G, Pagani MA and Iametti S. 2004. Probing structural features of water-insoluble proteins by front-face fluorescence. Anal Biochem 329, 104-111. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.016.

Chan MYY, Bell DJ and Dunnill P. 1982. The relationship between the zeta potential and the size of soya protein acid precipitate particle. Biotechnol Bioeng 24, 1897-1900. https://doi.org/10.1002/bit.260240817.

Damodaran S. 1996. Amino acids, peptides and proteins. In: Food chemistry. Fennema OR ed. Marcel Dekker, New York, NY, U.S.A., 321-429.

Dickinson E and Stainsby G. 1988. Emulsion stability. In: Advances in food emulaions and foams. Elsevier, Cambridge, MA, U.S.A., 1-44.

Domenek S, Morel MH, Redi A and Guilbert S. 2003. Rheological investigation of swollen gluten polymer networks, effects of process parameters on cross-link density. Macromol Symp 200, 137-146. https://doi.org/10.1002/masy.200351014.

Drohan DD, Tziboula A, McNulty D and Horne DS. 1977. Milk protein-carrageenan interactions. Food Hydrocoll 11, 101-107. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(97)80016-1.

Fioramonti SA, Perez AA, Aringoli EE and Rubiolo AC. 2014. Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. Food Hydrocoll 35, 129-136. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.05.001.

Frederick FS. 1994. Interaction of soy isolate with polysaccharide and its effect on film properties. J Am Oil Chem Soc 71, 1281-1285. https://doi.org/10.1007/BF02540552.

Galazka VA, Smith D, Ledward DA and 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. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00104-6.

Gennadios A, Brandenburg AH, Weller CL and Testin RF. 1993. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. J Agric Food Chem 41, 1835-1839. https://doi.org/10.1021/jf00035a006.

Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F and Wrigley CW. 2001. Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. Cereal Chem 78, 635-646. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2001.78.6.635.

Goddard ED. 1986. Polymer-surfactant interaction. Part II. Polymer and surfactant of opposite charge. Colloids Surf 19, 301-329. https://doi.org/10.1016/0166-6622(86)80341-9.

Han C, Ma M, Li M and Sun Q. 2020. Further interpretation of th underlying causes of the strengthening effect of alkali on gluten and noodle quality: Studies on gluten, gliadin, and glutenin. Food Hydro 103, 1-11. http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105661.

Harwalker VR and Ma CY. 1989. Effects of medium composition, preheating, and chemical modification upon thermal behavior of oat globulin and β-lactoglobulin. In: Food proteins. Kinsella JF and Soucie WG, eds. The American Oil Soc., Champaign, IL, U.S.A., 210-251.

Hayakawa S and Nakai S. 1985. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. J Food Sci 50, 486-485. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13433.x.

Kato A and Nakai S. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. Biochim Biophys Acta 624, 13-20.

Koning MMG and Visser H. 1992. Protein interactions. An overview. In: Protein interaction. Visser H. ed. VCH Publishers, New York, NY, U.S.A., 1-24.

Kundu B and 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 Com 293, 572-577.

Li-Chen E, Nakai S and Wood DF. 1984. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. J Food Sci 49, 345-350. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb12418.x.

Lim YS and Yoo BJ. 2016. Effects of pH, electrolyte concentrations, and alginate molecular weights on surface hydrophobicity of soy protein isolates. J Kor Soc Food Sci Nutr 45, 1285-1292. https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.9.1285.

Lim YS and Yoo BJ. 2018. Effects of average molecular weights, their concentrations, Ca^{++} and Mg^{++} on hydrophobicity of solution of Na-alginates prepared from sea tangle *Saccharina japonicus* produced in east coast of Korea. Korean J Fish Sci 51, 542-548. https://doi.org/10.5657/KFA.2018.0542.

Lim YS and You BJ. 2005. Effects of hydrolysis time on the molecular weight distribution of alginates prepared from sea tangle *Laminaria japonicas*. Korean J Fish Aquat Sci 8, 113-117. https://doi.org/10.5657/fas.2005.8.3.113.

Liu J, Luo D, Li X, L, Xu B, Zhang X and Liu J. 2016. Effects of inulin on the structure and emulsifying properties of protein components in dough. Food Chem 210, 235-241. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.001.

Morris C and Morris GA. 2012. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplement on the texture, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management. A review. Food Chem 133, 237-248. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.027.

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. https://doi.org/10.1021/jf00118a001.

Pearce KN and Kinsella JE. 1978. Emulsifying properties of protein: evaluation of turbidimetric technique. Agric Food Chem 26, 716-723. https://doi.org/10.1021/jf60217a041.

Pressini D and Sesidoni A. 2009. Effect of soluble dietary fiber addition on rheological and breadmaking properties of wheat doughs. J Cereal Sci 49, 190-201. http://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.09.007.

Ren B, Gao Y, Lu L, Liu X and 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. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.012.

Tang Y, Yang Y, Wang Q, Tang Y, Li F and Zhao J. 2019. Combined effect of carboxymethylcellulose and salt on structural properties of wheat gluten proteins. Food Hydro 97. http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105189.

Thomas WR. 1992. Carrageenan. In: *Thickening and gelling agents for food.* Imeson A ed. Blackie Academic and Professional, Cambridge, MA, U.S.A., 24-39.

Uruakpa FO and Arntfield SD. 2006. Surface hydrophobicity of commercial canola proteins mixed with κ-carrageenan or guar gum. Food Chem 95, 255-263. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.030.

Wang Y, Gan J, Zhou Y, Cheng Y and Nirasawa S. 2017. Improving solubility and emulsifying property of wheat gluten by deamination with four different acids: Effect of replacement of folded conformation by extended structure. Food Hydro 72, 105-114. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.013.

Winnick FM. 1993. Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other organized media. Chemical Rev 93, 587-614. https://doi.org/10.1021/CR00018A001.

Wolf WJ. 1970. Soybean proteins: Their functional, chemical, and physical properties. J Agric Food Chem 18, 969-976. https://doi.org/10.1021/jf60172a025.

Wrigley C.1996. Giant proteins with flour power. Nature 381, 738-739. https://doi.org/10.1038/381738a0.

You BJ, Lim YS, Jeong IH and Lee KH. 1997. Effect of extraction conditions on bile acids binding capacity in vitro of alginate extracted from seatangle (*Laminaria* spp.). Korean J Fish Aquatic Sci 30, 31-38.

You BJ and Lim YS. 2003. Effects of extracting and drying method on physical properties of alginates from sea tangle, *Laminaria japonica*. Korean J Fish Aquatic Sci 36, 340-345. https://doi.org/10.5657/kfas.2003.36.4.340.