

열처리로 야기되는 우유 유청 단백질의 반응

이 유 라 · 홍 윤 호
전남대학교 식품영양학과

Heat-Induced Reaction of Bovine Whey Proteins

You-Ra Lee and Youn-Ho Hong

Department of Food and Nutrition, Chonnam National University

Abstract

Using differential scanning calorimetry (DSC), changes underwent by a mixture of α -lactalbumin (α -La) and β -lactoglobulin (β -Lg) during heat treatment were studied, yielding useful information for the dairy industry.

Results of the DSC showed that the heat denaturation temperature of the holo- α -La was higher than that of apo- α -La, suggesting holo- α -La's greater stability. The denaturation temperature of a mixture of holo- α -La and β -Lg was also slightly lower than that of holo- α -La alone. The denaturation temperature of an apo- α -La and β -Lg mixture was higher than that of holo- α -La and β -Lg, suggesting that the heat stability of apo- α -La was increased by β -Lg. Based on these results, it is possible to conclude that a mixture of holo- α -La and β -Lg is more intensively affected by an increase in temperature than other samples, and that free sulphhydryl groups seem to take part in this heat-induced denaturation.

Key words : α -lactalbumin, β -lactoglobulin, differential scanning calorimetry, heat treatment.

서 론

유청 단백질은 우유 단백질의 약 20%를 차지하고 있으며, α -lactalbumin (α -La)이 약 22%, β -lactoglobulin (β -Lg)은 약 50%를 포함하고 있다. 그 외의 단백질로는 immunoglobulin (Ig), proteose peptone (PP), bovine serum albumin (BSA) 등이 각각 12%, 10%, 5% 존재하여 생명체에 필요한 여러 가지 기능을 수행한다 (Wong, et al., 1996). 특히 유청 단백질의 대부분을 차지하고 있고, 낙농 식품학적으로 중요하며 기능적으로 우수한 성분인 α -La과 β -Lg에 관련된 연구가 많이 진행되어 왔다(Hong, 2000).

α -La은 123개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, 분자량은 14 kd이다. 이 단백질은 함황 아미노산을 내포하며 분자간 이황화 결합의 형성에 관여하고 달걀의 lysozyme과 유

사하며 4개의 이황화 결합으로 열 변성에 저항성을 나타낸다 (Ruegg et al., 1977). α -La은 또한 금속 결합 단백질로서 칼슘 이온이 α -La에 강하게 결합되어 있는 holo-form과 칼슘 이온이 결합되어 있지 않은 apo-form으로 구분된다 (Hiraoka et al., 1980).

β -Lg은 162개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, 분자량은 18.3 kd이다. 이 단백질은 2개의 내부사슬로 된 이황화 화합물 (S-S)과 1개의 티올 (thiol, SH)기를 함유하며, 상호반응은 pH와 온도에 의존적이다. 산에 상당히 안정하여 pH 2.0에서도 잘 변성되지 않으나, 다른 조건에서 고온으로 가공 또는 저장하는 동안 분자간 공유 이황화 결합의 형성에 의해 단백질의 중합을 촉진시킨다고 알려져 있다(Hoffmann and van Mil, 1997; Morr and Ha, 1993).

이와 같은 유청 단백질의 열 변성은 등전점에서의 용해도 검사, 전기영동, 시차 주사 열량계(differential scanning calorimetry, DSC) 등에 의해 측정할 수 있는데, 그 중에서도 DSC는 단백질의 열 변성에 대한 연구의 부가적인 수단이며, 단백질 변성의 정량적 정보를 획득하는데 유익한 기술로서 많은 연구에서 이용되어 왔다 (Boye and Alli, 2000; de Wit

Corresponding author : Youn-Ho Hong, Department of Food and Nutrition Chonnam National University, 300 Yongbong-Dong, Buk-gu, Gwangju, 500-757, Korea. Tel: 82-62-530-1333, Fax: 82-62-530-1339, E-mail: yhhong@chonnam.ac.kr

and Swinkels, 1980; de Wit, 1981; John and Shastri, 1998; McPhail and Holt, 1999; Relkin et al, 1993).

우유의 열 처리는 우유의 기능적 특성을 변화시키고, 다양한 유제품의 생산에 널리 이용된다. 이러한 열 처리는 우유 성분에 영향을 미쳐 우유의 관능적, 영양적 품질에 변화를 주게 되므로 최종 산물의 특성에 중요하다. 우유에서 열 처리로 인한 성분의 변화는 유청 단백질의 열 유도성 상호작용과 열 안정성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Morales et al., 2000). 시판용 우유에서는 유제품의 기능성에 영향을 미치는 유청 단백질의 반응의 정도를 조절하는 것이 매우 중요하다. 이러한 유청 단백질의 변성은 열 처리 생산물의 기능적 성질을 결정짓는데 중요한 역할을 하기 때문이다.

본 연구에서는 유청 단백질 α -La, β -Lg, α -La과 β -Lg의 혼합물의 열 처리 시 반응 양상을 알아보고 유가공 업계에 필요한 기초 자료를 제공하기 위하여 DSC를 이용해서 관찰하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용된 α -La는 Ca-bound holo-form (L-5385)과 Ca-free apo-form (L-6010)이었으며, β -Lg (L-6879)과 같이 Sigma Chemical사 (St. Louis, USA)로부터 구입하였다.

시료 준비 및 열 처리

Holo- α -La과 apo- α -La는 각각 2.0 mg/ml의 농도로 0.2 M 인산완충 용액 (pH 6.8)에 용해시켰으며, α -La과 β -Lg의 혼합물 역시 1:1 (w/v)로 2.0 mg/ml의 농도로 하여 0.2 M 인산완충 용액 (pH 6.8)에 용해시켰다.

DSC에 의한 가열 특성 검사

각 시료 중 25 μ l를 준비된 DSC pan에 넣고 봉인하여 무게를 칭량한 후 DSC에 넣고 25 $^{\circ}$ C에서 100 $^{\circ}$ C의 온도 범위에서 3 $^{\circ}$ C/min의 가열 속도로 열 처리하여 DSC thermogram을 구하였다. 시료는 모두 완충용액에 용해시켰으며, reference는 완충용액만을 주입하였다. DSC는 인디움 표준물로 검량하였다. 변성 정점 온도(Td)와 전이열 또는 엔탈피(ΔH)는 각각의 온도 곡선으로부터 컴퓨터로 환산하였다. 엔탈피 (ΔH) 값은 단백질 용액의 총량에 근거하였다.

결과 및 고찰

α -La의 열 변성

Fig. 1의 A, B, C는 각각 holo- α -La, apo- α -La, holo-와 apo- α -La의 혼합물 (α -La)의 열 변성을 DSC로 측정된 결과

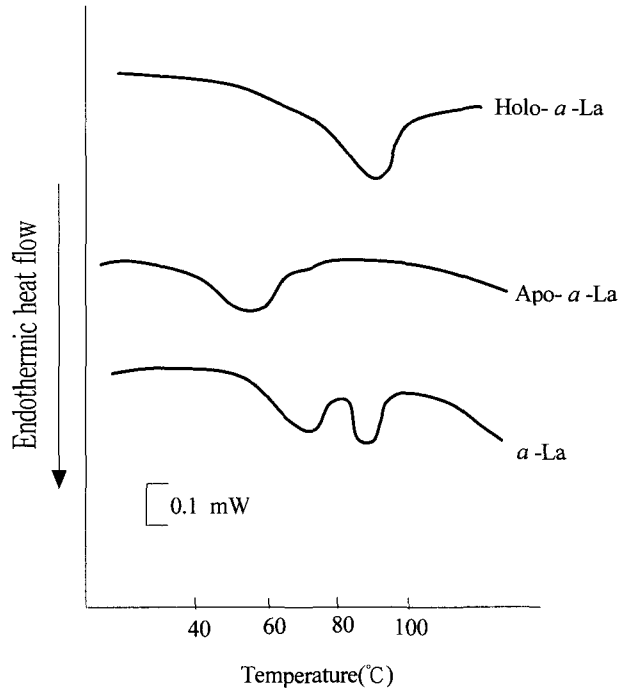


Fig. 1. DSC thermogram of holo- α -La, apo- α -La and α -La, (2% w/v) heated from 25 to 100 $^{\circ}$ C. Heating rate was 3 $^{\circ}$ C/min. (A); holo- α -La, (B); apo- α -La, (C); α -La.

를 나타내고 있다. Holo- α -La의 변성 정점 온도 (Td)는 92.98 $^{\circ}$ C, apo- α -La의 Td는 54.43 $^{\circ}$ C였으며, 이들 혼합물의 Td는 각각 74.29 $^{\circ}$ C와 89.52 $^{\circ}$ C를 나타냈다. 이 결과를 holo- α -La은 64.3 $^{\circ}$ C, apo- α -La은 35.0 $^{\circ}$ C에서 peak가 형성되었다는 Boye와 Alli (2000)의 보고와 비교했을 때, 변성 온도에서는 다소 차이가 있었으나 holo- α -La의 변성 온도가 apo- α -La의 변성 온도보다 높은 경향은 유사한 것을 알 수 있었다. 이러한 변성 온도의 차이는 실험에 사용된 시료의 농도와 측정기기의 종류 및 측정 조건 등에 기인하는 것으로 생각된다.

Holo- α -La의 경우 Td가 apo- α -La에 비해 2배 가까이 높아 열 변성에 저항성을 나타냄을 알 수 있었다. 이는 Holo- α -La에 Ca²⁺ 이온이 결합되어 3차 구조의 열 안정성을 증진시킨다는 Bernal과 Jelen (1984)을 비롯한 Hiraoka 등 (1980), Parris 등 (1991), 그리고 Relkin 등 (1993; Relkin, 1996)의 주장을 뒷받침해 주는 것이다.

Holo- α -La과 apo- α -La를 혼합 (α -La)하여 Td를 측정된 결과, apo- α -La은 하나만을 열 처리했을 때보다 Td가 약 20 $^{\circ}$ C가량 상승하였고, holo- α -La은 약 3 $^{\circ}$ C가량 저하되었는데, 이는 apo- α -La이 열에 더 안정한 holo- α -La의 영향을 받아 Td가 더 올라가면서 열에 조금 더 안정한 상태가 된 것으로 보인다.

이와 같은 결과로 미루어 apo- α -La이 holo- α -La보다 열 처리 시 더 불안정하고 열에 의해 더 많은 영향을 받는다고

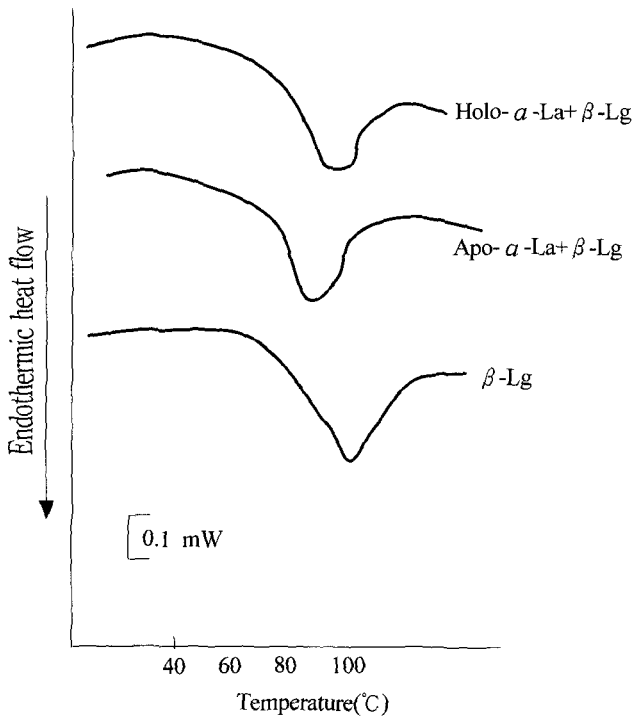


Fig. 2. DSC thermogram of holo-, apo- α -La and β -Lg mixtures, β -Lg(ratio 1:1, 4% w/v) from 25 to 100°C. Heating rate was 3°C/min. (A); holo- α -La and β -Lg, (B); apo- α -La and β -Lg, (C); β -Lg.

생각된다. 유사한 결과가 전기영동을 이용한 실험에서도 확인되었다 (Hong and Creamer, 2002; Lee and Hong, 2002).

α -La과 β -Lg 혼합물의 열 변성

Fig. 2의 A, B는 각각 holo- α -La과 β -Lg의 혼합물, apo- α -La과 β -Lg의 혼합물의 열 변성을 DSC로 측정된 결과를 나타내고 있다. Holo- α -La과 β -Lg의 혼합물의 Td는 88.81°C, apo- α -La과 β -Lg의 혼합물의 Td는 80.32°C를 나타내었다. Holo- α -La과 β -Lg 혼합물의 경우 holo- α -La만을 열 처리하여 비교했을 때, 92.98°C에서 88.81°C로 Td가 조금 낮아짐으로써 열에 다소 불안정한 상태가 되었으나 β -Lg이 holo- α -La에 그다지 많은 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

그러나 apo- α -La과 β -Lg의 혼합물의 경우는 apo- α -La만을 열 처리 했을 때와 비교하면 54.43°C에서 80.32°C로 Td가 약 30°C 가량 상승되면서 열에 상당히 안정한 상태가 되었음을 알 수 있었다. 이는 apo- α -La이 holo- α -La보다 열 처리 시 β -Lg의 영향을 더 많이 받는다는 것을 시사한다. 이 결과는 Boye와 Alli (2000)의 보고와 비교할 경우 온도에 있어서는 다소의 차이를 보였지만 변성의 경향은 유사성을 나타내는 것이다. 중성 pH 용액에서 α -La와 BSA는 열에 매우 안정하다고 알려져 있다 (Paulsson and Visser, 1992). Havea 등 (2001)은 열처리된 β -Lg의 유리 SH기가 α -La에 있어서 단

위체들, 이합체들, 그리고 다중체들의 형성을 촉매한다고 보고하였다.

β -Lg의 열 변성

Fig. 2의 C는 β -Lg의 열 변성을 DSC로 측정된 결과를 나타내고 있다. β -Lg의 Td는 91.1°C였으며, α -La의 첨가로 인해 열 처리 시 반응 양상이 달라짐을 알 수 있었다. de Wit과 Swinkel (1980)은 β -Lg의 열 변성 임계온도 (critical temperature)는 70°C이며 결빙기 엔탈피는 $\Delta H = 230 \pm 15$ kJ/mol이라고 보고하였다. 위의 α -La과 β -Lg의 혼합물의 열 변성 온도에서 알 수 있듯이 β -Lg은 α -La과 혼합되었을 때 α -La의 열 변성에 영향을 주고 열에 더 불안정하게 되는 것으로 보인다. 이는 β -Lg의 개열(unfolding)을 촉진시키는 β -Lg 분자에 위치한 부위와 변성 초기에 교차결합 상호반응이 일어나서 α -La의 개열을 자극시키는 것으로 추정된다. β -Lg은 내부의 소수성 그룹과 유리 SH기의 반응으로 인하여 40°C 이상이 되면 구조적 변화를 일으키기 시작한다고 보고되었다 (Iametti et al., 1996).

pH에 의존적인 β -Lg은 산성 조건에서 열에 매우 안정하지만, pH 7에서는 51°C에서부터 변화가 일어나고, pH 9에서는 47°C에서부터 열에 의한 변성이 시작된다고 알려져 있다 (Boye and Alli, 2000; Iametti et al., 1996). Holt (2000)는 중성 pH에서 β -Lg의 열변성이 이합체 (dimer)의 분해, 65°C 부근에서 이황화 결합 (S-S)의 응집, 약 77°C에서 유사한 용융 구형 단백질 상태 (molten globule-like)로의 전이, 더 높은 온도에서는 후 용융 구형 단백질 (post molten globule) 상태로의 전이 등을 포함한다고 주장하였다.

요 약

α -La(holo-, apo form)과 α -La과 β -Lg의 혼합물의 열 처리 시 변화의 정도를 DSC를 실시하여 비교하였다. Holo- α -La의 열 변성 정점 온도 (Td)는 apo- α -La에 비해 높게 나타남으로써 열에 의한 변성에 더 안정함을 알 수 있었다. 두 종류 α -La의 혼합물의 경우 Td는 일치하지 않았으며 apo- α -La이 holo- α -La보다 더 낮게 나타났는데 이는 apo- α -La이 열에 더 불안정함을 의미한다. α -La과 β -Lg의 혼합물의 경우 holo- α -La과 β -Lg의 혼합물의 변성 온도는 holo- α -La 하나만을 열처리 했을 때보다 변성 온도가 더 낮아져서, 열에 의한 변성이 β -Lg의 유리 SH기에 의해 촉진되었음을 유추할 수 있었고, apo- α -La과 β -Lg의 혼합물의 경우 변성 온도는 apo- α -La 하나만을 열처리 했을 때보다 변성 온도가 2배 가까이 상승하면서, 열 처리에 더 안정해짐을 보여주었다. β -Lg의 열 변성 양상은 pH 6.8의 조건에서 살펴보았을 때

가열 초기 단계부터 다소 불안정한 peak를 보였으며 α -La과 혼합되었을 때 변성을 더 촉진시키면서 열에 불안정해짐을 시사하였다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Bernal, V. and Jelen, P. (1984) Effect of calcium binding on thermal denaturation of bovine α -lactalbumin. *J. Dairy Sci.* **67**, 2452-2454.
- Boye, J. I. and Alli, I. (2000) Thermal denaturation of mixtures of α -lactalbumin and β -lactoglobulin ; a differential scanning calorimetric study. *Food Res. Int.* **33**, 673-682.
- de Wit, J. N. and Swinkels, G. A. M. (1980) A differential scanning calorimetric study of the thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin. *Biochimica Biophysica Acta.* **624**, 40-50.
- de Wit, J. N. (1981) Structure and functional behaviour of whey proteins. *Netherlands Milk Dairy J.* **35**, 47-64.
- Havea, P., Singh, H., and Creamer, L. K. (2001) Characterization of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. *J. Dairy Res.* **68**, 483-497.
- Hiraoka, Y., Segawa, T., Kuwajima, K., Sugai, S., and Murai, N. (1980) α -lactalbumin: a calcium metalloprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1098-1104.
- Hoffmann, M. A. M. and van Mil, P. J. J. M. (1997) Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin ; role of the free thiol group and disulfide bonds. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2942-2948.
- Holt, C. (2000) Molecular basis of whey protein food functionalities. *Australian J. Dairy Technol.* **55**, 53-55.
- Hong, Y. H. (2000) Physicochemical and functional properties of α -lactalbumin and β -lactoglobulin of bovine whey protein. *Home Economics Res. J.* **10**, 45-49.
- Hong, Y. H. and Creamer, L. K. (2002) Changed protein structures of bovine β -lactoglobulin B and α -lactalbumin as a consequence of heat treatment. *Int. Dairy J.* **12**, 345-359.
- Iametti, S., De Gregori, B., Vecchio, G., and Bonomi, F. (1996) Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. *European J. Biochem.* **237**, 106-112.
- John, A. and Shastri, P. N. (1998) Studies on food macromolecules by differential scanning calorimetry : a critical appraisal. *Int. J. Food Sci. Technol.* **35**(1), 1-14.
- Lee, Y. R. and Hong, Y. H. (2002) Electrophoretic properties of heat-induced bovine α -lactalbumin. *J. Food Sci. Nutr.* **7**(1), 48-51.
- McPhail, D. and Holt, C. (1999) Effect of anions on the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin as measured by differential scanning microcalorimetry. *Int. J. Food Sci. Technol.* **34**, 477-481.
- Morales, F. J., Romero, C. and Jimenez-Perez, S. (2000) Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *Int. J. Food Sci. Technol.* **35**, 193-200.
- Morr, C. V. and Ha, E. Y. W. (1993) Whey protein concentrate and isolates : processing and functional properties. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **33**(6), 431-476.
- Parris, N., Purcell, J. M., and Ptashkin, S. M. (1991) Thermal denaturation of whey proteins in skim milk. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 2167-2170.
- Paulsson, M. and Visser, H. (1992) Heat-induced interactions of milk proteins studied by differential scanning calorimetry. In *Protein Interaction*, Visser, H., VCH, Weinheim, pp. 117-134.
- Relkin, P., Launay, B., and Eynard, L. (1993) Effect of sodium and calcium addition on thermal denaturation of apo- α -lactalbumin: a differential scanning calorimetric study. *J. Dairy Sci.* **76**, 36-47.
- Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**(6), 565-601.
- Ruegg, M., Moor, U., and Blanc, B. (1977). A calorimetric study of thermal denaturation of whey protein in stimulated milk ultrafiltrate. *J. Dairy Res.* **44**, 509-520.
- Wong, D. W. S., Cairand, W. M., and Paviath, A. E. (1996). Structure and functionalities of milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**(8), 807-844.

(2002년 3월 13일 접수)