

식품 유화액 시스템에서 락토페린의 유화 특성

배재석 · 김정원 · 정용선 · 이의석 · 홍순택[†]

충남대학교 농업생명과학대학 식품공학과 식품에밀전 실험실
(2013년 12월 16일 접수; 2013년 12월 27일 수정; 2013년 12월 27일 채택)

Emulsifying Properties of Bovine Lactoferrin in Food Emulsion System

Jae-Seok Bae · Jeong-Won Kim · Yong-Seon Jeong · Eui-Seok Lee · Soon-Taek Hong[†]

*Food emulsion laboratory, Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture
and Life Science Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
(Received December 16, 2013 ; Revised December 27, 2013 ; Accepted December 27, 2013)*

요약 : This study aimed to investigate the emulsifying properties of bovine lactoferrin in food emulsion system. First, lactoferrin solution was prepared to study its surface activities, such as surface adsorption characteristics and ζ -potential. Second, some physicochemical properties of lactoferrin emulsion which resulted from variations of environmental conditions (i.e., pH or NaCl addition) were determined. As for surface adsorption characteristics evaluated by surface tension, it was decreased with increasing lactoferrin concentration in solution (1×10^{-5} →0.2 wt%) and showed a plateau (≈ 44 mN/m) above 0.01 wt%. It was also changed with pH and the minimum value of 53.8 mN/m was observed at pI of lactoferrin. This was related to changes in ζ -potential of the lactoferrin solution with respect to pH. Fat globule size of lactoferrin emulsion was decreased with increasing lactoferrin concentration and a stable emulsion was formed above 0.5 wt% lactoferrin in emulsion with fat globule size d_{32} of ca. $0.33 \mu\text{m}$ as confirmed by creaming stability experiment (i.e., Turbiscan). As with surface tension, fat globule size of lactoferrin emulsion also changed with pH and showed a maximum value at pI. As evaluated by Turbiscan, in the presence of NaCl, the lactoferrin emulsion showed instability in particular above 10 mM.

주제어 : 락토페린, 표면장력, 유화 특성, 제타포텐셜

1. 서론

유화액 시스템(emulsion system)은 2가지 이상의 서로 섞이지 않는 상(phase)이 균일하게 혼합되어있는 시스템으로, 구성 성분 간의 높은 표면

자유에너지(surface free energy)로 인하여 열역학적으로 불안정한 시스템이다[1]. 식품 유화액의 경우 주로 극성지질(polar lipids)의 계면활성제를 첨가하여 구성 성분(물/기름) 간의 표면자유에너지를 낮추어 일정기간 동안 시스템의 안정화를 유도하게 된다[1]. 따라서 유화액 시스템에 적합한 계면활성제를 사용하는 것은 유화액 안정도 측면에서 매우 중요한데, 최근에는 생리기능성을

[†]Corresponding author
(E-mail: Hongst@cnu.ac.kr)

갖는 지용성 물질(e.g., lycopene, DHA 등의 고도 다불포화 지방산 etc)을 유상에 용해하여 제조하는 기능성 유화액 (functional emulsions) 및 이와 유사한 구조의 약물전달시스템(drug delivery system) 제조 등에 계면활성제로 적용할 수 있는 새로운 식·의약품 기능성 단백질에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다.

락토페린(lactoferrin)은 포유동물의 초유에 많이 포함되어 있는 당단백질로서 분자량은 약 80 kDa이며 703개의 아미노산으로 구성되어 있다 [2]. 락토페린은 포유동물의 젖 이외에도 눈물, 콧물, 타액, 담즙 및 정액 등의 분비액에서 확인되고 있으며, 초유에 약 7g/L, 눈물에 2mg/L 정도 함유되어 있음이 보고되었다[3]. 락토페린의 구조는 철 이온과 결합할 수 있는 두 개의 로브(lobe)를 갖고 있으며, 각 로브는 미생물의 생장에 필요한 Fe^{3+} 과 결합하여 미생물의 생장을 억제하는 정균작용을 나타내며, 이외에도 면역계 조절, 세포증식 조절, 철 흡수 조절작용 등 많은 생리활성 기능을 보유한 것으로 보고되었다[4]. 락토페린은 1939년 처음 발견된 이후, 여러 분야에서 많은 연구가 진행되었으며, 특히 화장품(skin care), 구강 질환에 관련된 연구가 다수 수행되었고, 식품분야에서는 영아용조제분유(infant formula), 요구르트(yogurt), 보충제(supplemental tablet) 등과 관련한 연구 및 제품개발이 이루어졌다[5].

최근에는 전술한 생리기능성 이외에 계면활성제로서 락토페린의 기능성이 주목받고 있다[6, 7]. 특히, 락토페린은 다른 구상 단백질과는 달리 등전점이 알칼리 지역($pI > 8$)[8]에 있어서 중성 부근에서는 양이온을 띄게 되며, 따라서 락토페린이 흡착된 양이온성 유화 지방구는 수용액 중에 있는 Fe 등의 양이온성 금속 이온과 결합하지 않으므로 락토페린 유화액은 지방 산화에 대하여 높은 안정성을 보유하게 된다[9, 10]. 또한, 최근에는 약물전달시스템과 관련하여 환경적 요인(e.g., pH, 염 등)에 저항할 수 있는 다층유화액 (multilayer emulsions) 형성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, Ye 등[11]은 중성 부근에서 락토페린의 양이온성을 기초로 하여 β -lactoglobulin 및 락토페린으로 구성된 다층유화액을 제조하였으며, 이 유화액은 칼슘이온 존재 하에서도 일정 이상의 안정도를 유지하였다고 하였다. 또한 락토페린은 다당류인 chitosan과 함께 electrostatic deposition 방법을 이용한 기능성의

다층유화액 형성에 적합한 물질로 보고하였다 [12].

이전 연구에 의하면 단백질 유화액의 안정화는 주로 단백질로 코팅(protein-coated)된 유화 지방구 간에 정전기적 (electrostatic) 및 steric 반발력 등이 연합하여 달성되는 것으로 알려져 있다[13, 14]. 따라서 단백질 유화액은 pH 변화, NaCl 등 염의 존재에 의해서 전술한 반발력의 크기가 감소될 수 있으며, 그 결과 단백질 유화액의 안정도 특성이 변화될 수 있다. 한편, 전술한 바와 같이 이전 연구를 통하여 락토페린의 우수한 생리 기능성 및 유화 기능성에 기초하여 유화액 구조를 갖는 다양한 시스템에서 락토페린의 적용 가능성을 조사하였으나, 락토페린 자체의 유화성질에 대한 폭넓은 연구는 수행되지 않은 것으로 조사되었다. 따라서 본 연구에서는 락토페린의 표면 흡착 성질을 조사하고, 이를 근거로 하여 락토페린을 이용하여 수중유적형 유화액을 제조하며, pH 변화 및 NaCl 첨가 등의 외부 환경 변화에 대한 락토페린 유화액의 이화학적 특성 변화 등을 조사하고자 한다. 본 실험의 결과는 락토페린을 이용한 유화액 형태의 전달 시스템 (emulsion-based delivery system)을 설계하는데 유용한 자료가 될 것으로 기대한다.

2. 실험

2.1. 실험재료

본 실험에 사용된 락토페린은 MECO Co., Ltd (purity : 95~96%, Melbourne, Australia)에서 구입하여 냉장(4°C) 보관하여 사용하였고, 락토페린 수용액 및 유화액 제조는 초순수 장치 (MILLI-Q, MILLI-PORE, Milford, USA)에서 얻은 초순수를 이용하였다. Bis-tris buffer(MW : 209.24), sodium azide(purity : 98%)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, Mo, USA)에서 구입한 것을 사용하였으며, soybean oil은 (주)오뚜기 (Pyeong Taek, Korea)제품을 시중에서 구입하여 사용하였다. 이외에 실험에 사용된 모든 시약은 일급 이상의 등급을 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 락토페린의 표면흡착특성

락토페린의 표면흡착특성 조사는 Dickinson &

Pawlowsky 등[15]의 방법에 따라서 수행하였다. 먼저 초순수(Millipore, Milli-Q, Milford, USA)에 bis-tris를 용해하여 완충액을 제조한(5 mM, pH 7) 후 여기에 락토페린 단백질을 농도 별 ($1 \times 10^{-5} \sim 0.2$ wt%)로 첨가·용해하여 표면장력 측정용 시료로 하였으며, 표면장력 측정장치(K10ST, KRÜSS GmbH, Hamburg, Germany)를 이용하여 plate 법으로 표면장력을 측정하였다. 또한, 1×10^{-3} wt%의 단백질 수용액을 시료로 하여 pH 변화(3.0~10.0)에 따른 표면장력의 변화를 조사하였다.

2.2.2. 락토페린 수용액의 ζ -potential 측정

2.2.2.1. 락토페린 수용액 제조

락토페린 수용액은 초순수에 락토페린을 첨가한(0.1 wt%) 후 sonicator(Power Sonic 420, Hawshin Technology, Seoul, Korea)에서 30 분간 용해하여 제조하였다. 이후 이 수용액을 glass filter(0.22 μ m, Millipore, USA)를 사용하여 여과한 후 0.01N NaOH 혹은 0.01N HCl을 가하여 용액의 pH를 조절하였다(pH 2.0~11.0).

2.2.2.2. 락토페린 수용액의 ζ -potential 측정

락토페린 수용액을 ζ -potential 측정용 cell(folded capillary cell, Malvern co., Worcestershire, UK)에 기포가 생기지 않도록 채우고 Zetasizer(Nano ZS90, Malvern co., Worcestershire, UK)를 이용하여 락토페린 수용액의 ζ -potential 측정하였다. 측정은 3회 실시하였으며 결과는 평균값 \pm 표준편차로 나타내었다.

2.2.3. 락토페린의 유화특성

2.2.3.1. 락토페린 유화액 제조

유화액은 Hong 등[16]의 방법을 변형하여 제조하였다. 수상으로 완충액(20 mM bis-tris, pH 7)에 일정량의 락토페린을 첨가하여 용해한 후 유상(soy bean oil)과 9:1의 중량 비율로 혼합하였다. 이 혼합물을 Silverson mixer(L4RT, Silverson machine Ltd., Chesham, UK)를 사용하여 5,000 rpm에서 2분간 예비 유화한 후 고압 균질기(110-Y, Microfluidics, Newton, USA)에서 2회 균질(3,000 psi)하여 락토페린 유화액(lactoferrin 0.15~2.0 wt%, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7)을 제조하였다.

2.2.3.2. 락토페린 유화액의 지방구 크기 측정

유화액 중의 지방구 크기 측정은 입도분석기(Mastersizer S, Malvern co., Worcestershire, UK)을 이용하여 presentation code 3 NAD에서 측정하였으며 측정결과는 volume-surface mean diameter(d_{32}), weight mean diameter(d_{43})로 표시하였다. 또한, 유화액의 pH 변화에 따른 지방구 크기 변화를 조사하기 위하여 락토페린 유화액에 0.1N NaOH 혹은 0.1N HCl을 가하여 용액의 pH를 조절(pH 2.0~10)한 후 지방구 크기를 측정하였다.

$$d_{32} = \frac{\sum d_i^3 n_i}{\sum d_i^2 n_i} \quad (n_i : \text{numbers of particle on size } d) \quad (1)$$

$$d_{43} = \frac{\sum d_i^4 n_i}{\sum d_i^3 n_i} \quad (n_i : \text{numbers of particle on size } d) \quad (2)$$

2.2.3.3. 락토페린 표면흡착량 측정

유화액 중의 지방구에 흡착된 락토페린의 표면 흡착량(lactoferrin load)은 'depletion method'를 이용하여 측정하였다[17]. 제조한 유화액 중 일정량을 시험관에 취한 후 원심분리(12,000 \times g, 20 min)하여 수상과 크림 층을 분리하였다. 분리된 수상은 주사기를 이용하여 흡입하고 여과(0.22 μ m)하여 락토페린 분석용 시료로 하였다. 수상 중의 락토페린의 함량은 비색정량법인 Lowry 등의 방법[18]에 의하여 정량하였으며, 지방구 표면에 흡착된 락토페린 흡착량은 다음의 식으로 계산하였다[17].

$$\text{LF load}(\text{mg m}^{-2}) = P \times (P_a / \text{SP.S.A}) \times (D / F_m) \times 1000 \quad (3)$$

(P : 유화액 100 g 중 단백질 무게, P_a : 지방구에 흡착된 단백질 분율, SP.S.A: 유화액의 비표면적(입도분석기로부터 얻음), D : 기름 비중, F_m : 유화액 100 g 중 oil 무게)

2.2.3.4. 락토페린 유화액의 크리밍 안정도

유화액 중 단백질 농도(0.25~2.0 wt%) 혹은 NaCl 첨가(0~400 mM)에 따른 락토페린 유화액의 크리밍 안정도를 Turbiscan (Turbiscan Lab., Formulation, l'Union, France)을 이용하여 측정하였다[19]. 시료 유화액을 시료병 (dia: 27.5 mm, height: 50 mm)에 충전하여 크리밍 측정장치(Turbiscan)에 넣고 상온에서 72 시간동안 크리밍 특성을 조사하였으며, 결과는 크리밍 프로파

일[유화액 높이에 대한 후방산란 강도(backscattering intensity)]로 표현하였다. 이 장치는 유화액 시료에 532 nm의 laser를 조사하여 시간의 변화에 따른 유화액 중 지방구에 의한 후방산란 강도의 변화를 측정함으로써 콜로이드 시스템의 분산 안정도를 측정할 수 있다[20].

2.2.4. 통계처리

실험을 통하여 얻어진 결과는 SAS package(Statistic Analysis System, ver.9.2 SAS Institute Inc.)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며, 각 변수에 대해 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 사후검정으로 Duncan's multiple range test를 적용하여 통계적으로 유의적 차이를 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 락토페린의 표면흡착특성

3.1.1. 농도의 영향

농도에 따른 락토페린 수용액의 표면장력 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 락토페린 1×10^{-5} , 1×10^{-4} wt% 농도에서 표면장력은 56~58 mN/m 범위로 높게 나타났으며, 이후 농도의 증가와 더불어 표면장력은 급격히 감소하여 0.01 wt% 이상의 농도에서는 일정 수준(44~45 mN/m)의 비교적 낮은 표면장력 값을 나타내었다. 이는 BSA 수용액의 표면장력과 유사한 수준으로[15], Graham과 Philips[21]은 단백질 용액(β -casein, BSA) 중의 단백질 분자가 물/공기 표면(혹은 계면)에 흡착됨에 따라 표면장력이 감소하고 그 감소 정도는 bulk phase 중 단백질 농도에 비례하였으며, Nino와 Patino[22]은 물/공기 표면이 흡착물질인 단백질로 포화되었을 때 표면장력에 있어서 더 이상의 감소는 관찰되지 않았음을 보고하였다. 따라서 본 실험에서 관찰된 수용액 중 단백질 농도의 증가에 따른 표면장력의 감소는 락토페린 분자의 물/공기 표면에서 흡착을 의미하며, 일정 농도 이상($\geq 0.01\%$)에서는 물/공기 표면이 단백질로 포화되었음을 시사하고 있다. 한편, 단백질은 구성 아미노산에 의해 결정되는 극성(polar)의 폴리펩타이드와 비극성(non-polar) 폴리펩타이드 등이 상호 결합하여 단백질 분자를 구성하는데, 수용액 중에서 극성부

분은 물과 수화되어 단백질 분자 표면에 위치하고 비극성부분은 소수성 효과(hydrophobic effect)에 의해 단백질 분자 내부에 위치한다[23]. 공기/물 system에서 단백질 수용액 중 단백질 분자는 시간의 경과와 더불어 부분적으로 개열(unfolding)되어 내부의 소수성 부분이 공기/물의 표면(계면)에서 표면으로 확산·흡착하며, 이 결과 표면장력은 낮아지게 된다[24].

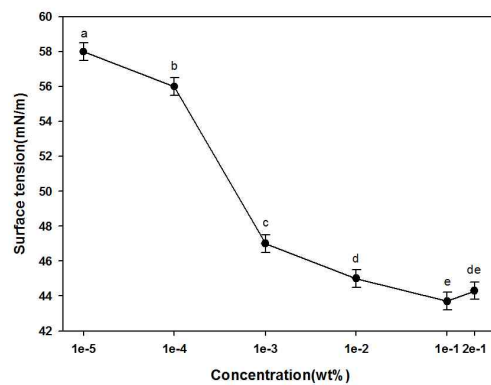


Fig. 1. Changes in surface tensions of a diluted lactoferrin solution(5mM bis-tris, pH 7, 25°C) with respect to concentration.

a~e Means with the same letter are not significantly different by duncan's multiple range test($p < 0.05$).

3.1.2. pH 영향

pH 변화에 따른 락토페린 수용액의 표면장력 변화는 Fig. 2에 나타내었다(단백질 농도 : 1×10^{-3} wt%). pH 3에서 표면장력은 약 57.3 mN/m로 측정되었으며, pH의 증가와 더불어 표면장력은 점차 낮아져서 pH 8.5에서 가장 낮은 53.7 mN/m였고, 이후 pH의 증가와 더불어 표면장력은 높아져 pH 9.5에서 약 56.8 mN/m를 나타내었다. 일반적으로 단백질은 등전점(pI)을 중심으로 양전하($<pI$) 혹은 음전하($>pI$)를 띄게 되는데, 이러한 단백질의 표면전하(surface potential)는 단백질이 표면에 흡착할 경우 단백질 분자 간에 정전기적 반발력을 유발하여 흡착에 대한 장벽(barrier) 역할을 하여 표면장력 값에 영향을 미친다[23]. 따라서 본 실험에서 관찰된 pH 변화에 따른 표면장력의 변화는 단백질 표면 흡착량의 변화에 의한 것으로 사료되었다.

또한, 락토페린의 등전점은 pH 8~9 부근으로 알려져 있으며[8, 12], 등전점에서 단백질 분자 표면의 실제 전하(net potential)는 '0'에 근접하여 단백질 분자간의 정전기적 반발력이 최소로 되고, 이 결과 더 많은 단백질의 흡착이 용이하게 되어 가장 낮은 표면장력을 나타내게 된다.

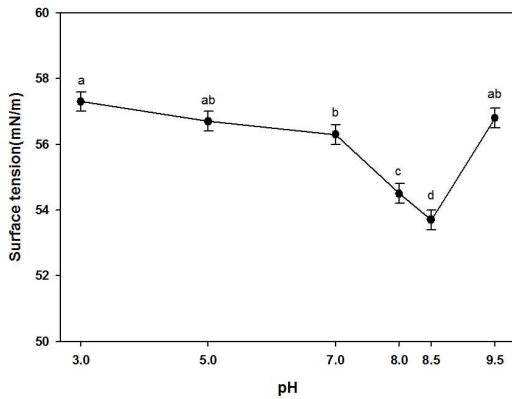


Fig. 2. Changes in equilibrium surface tension of lactoferrin solution(1×10^{-3} wt% protein, 5mM bis-tris, pH 7, 25°C) with respect to pH. An equilibrium surface tension denotes a surface tension measured at 180 min after setting the interface.
a~d Means with the same letter are not significantly different by duncan's multiple range test($p < 0.05$).

3.2. 락토페린 수용액의 ζ -potential

pH 변화(pH 2~10)에 따른 락토페린 수용액 (protein 0.1 wt%, 5 mM bis-tris)의 ζ -potential 을 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었다. pH 2에서 ζ -potential은 약 +35 mV로 측정되었으며, pH가 높아짐에 따라 ζ -potential의 값은 점차 낮아져서 락토페린의 등전점인 pH 8~9 부근에서 '0'에 근접하였고 이후 ζ -potential 값은 마이너스 값으로 변하여 pH 11에서 약 -33 mV를 나타내었다. Fig. 3의 pH 변화에 따른 락토페린 수용액의 ζ -potential 변화는 Bengoechea[25]들의 연구결과와 매우 유사한 것으로, 일반적으로 단백질 수용액의 pH가 낮을 경우(ie., pH < pI) 단백질 분자를 구성하는 아미노 그룹(amino groups)은 양전하($-\text{NH}_3^+$)을 띠고 (카르복실 그룹은 중성), 반면에 pH가 높을 경우

(ie., pH > pI) 카르복실 그룹(carboxyl groups)은 음전하($-\text{COO}^-$)를 나타내게 된다(아미노 그룹은 중성). 따라서 본 실험에서 관찰된 락토페린 수용액의 pH에 변화에 따른 ζ -potential의 변화는 아미노 그룹 혹은 카르복실 그룹의 이온화에 기인된 것으로 사료되었다. 또한, pH 8~9에서 ζ -potential이 '0' 부근으로 측정된 것은 락토페린의 등전점으로 인한 것으로 사료되었다[26].

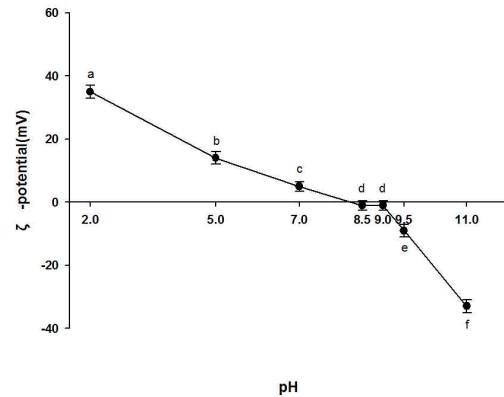


Fig. 3. Changes in ζ -potential of lactoferrin solution(0.1 wt% protein, 25°C) with respect to pH.
a~f Means with the same letter are not significantly different by duncan's multiple range test($p < 0.05$).

3.3. 락토페린의 유화액 성질

3.3.1. 락토페린 농도에 따른 지방구 크기 변화

유화액 중의 락토페린 농도 변화(0.15~2.0 wt%)에 따른 지방구 크기(d_{32}) 변화를 조사하였다(Fig. 4). Fig. 4에서 관찰된 바와 같이 락토페린 농도가 낮은 범위(≤ 0.5 wt%)의 경우 단백질 농도의 증가와 더불어 지방구 크기는 작아졌으며 [1.15 μm (0.15 wt%) \rightarrow 0.33 μm (0.5 wt%)], 0.5 wt% 이상의 농도에서는 유화액 중 지방구 크기는 유의적으로 변화하지 않았다. 이러한 결과는 유화액(기름 30 wt%, pH 7) 중 락토페린 농도가 1% 이상 되었을 때 지방구 크기는 단백질의 농도에 큰 영향을 받지 않는다는 Ye와 Singh[11]의 연구결과와 정성적으로 일치하고 있다. 일반적으로 유화액 중 임계지방구크기(critical fat globule size)는 동일한 균질 압력 하에서는 첨가한 계면활성제의 종류 및 농도에 의존하는 것

로 알려져 있으며[27], 또한 단백질 유화액의 경우 첨가된 단백질 농도가 안정한 유화액 형성에 필요한 유효 농도보다 낮을 경우 지방구에 흡착된 단백질 간에 가교결합이 형성되고 그 결과 유화 지방구는 응집될 수 있다[28]. 따라서 Fig. 4에서 단백질 농도가 낮은 경우(<0.5 wt%) 관찰된 큰 지방구는 지방구에 흡착된 단백질 간의 가교결합에 의한 지방구 응집의 결과로 사료된다.

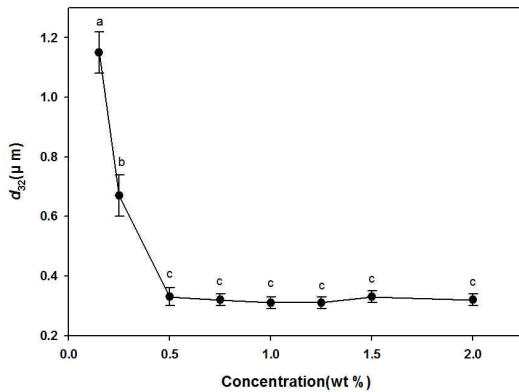


Fig. 4. Mean droplet size d_{32} of lactoferrin emulsions(0.15~2.0 wt% protein, 20mM bis-tris, pH 7, 25°C). a~c Means with the same letter are not significantly different by duncan's multiple range test($p < 0.05$).

3.3.2. 락토페린 표면 흡착량의 변화

Fig. 5에 나타난 바와 같이 유화 지방구 표면에 흡착된 단백질 양(mg/m^2)은 단백질 첨가농도가 낮을 경우(≤ 0.5 wt%)에서는 일정수준으로 유지하다가, 이후 단백질 농도의 증가와 더불어 비례적으로 증가하였다[0.85 mg/m^2 (0.25 wt%) \rightarrow 4.48 mg/m^2 (2.0 wt%)]. 이 결과는 카제인 유화액에 있어서 표면흡착량 특성을 보고한 Perrechil과 Cunha[32]의 결과와 매우 유사한 경향으로 단백질 첨가 농도가 낮을 경우(≤ 0.5 wt%) 표면 흡착 단백질은 계면에서 포화단분자층을 형성하여 일정한 표면흡착량을 나타내게 되며, 농도의 증가와 더불어 유화지방구 표면에 다층의 흡착 단백질이 형성되어 표면흡착 단백질 양이 증가하게 된다[29].

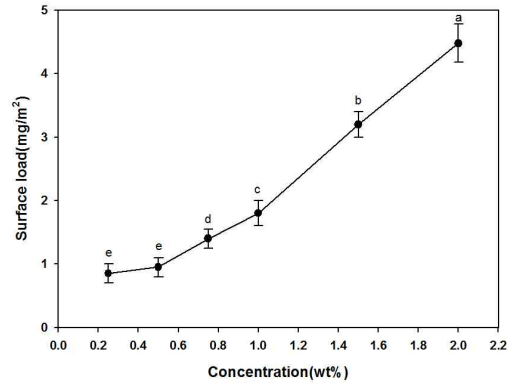


Fig. 5. Protein surface load at the oil droplet with respect to lactoferrin concentration in emulsions(10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7). a~e Means with the same letter are not significantly different by duncan's multiple range test($p < 0.05$).

3.3.3. pH 변화에 따른 유화 지방구 크기 변화

pH 변화(2.0~1.0)에 따른 락토페린 유화액의 지방구 크기의 변화는 Fig. 6에 나타내었다. 락토페린 등전점 이하에서는 pH가 상승(2.0 \rightarrow 6.5)함에 따라 지방구 크기는 약간 상승하였지만 크게 변화하지 않았으며 0.33 \rightarrow 0.40 μm , 반면에 유화액의 pH가 락토페린의 등전점 부근(pI = 8.0~9.0) [8, 12]인 pH 8인 경우 pH 2와 비교하여 2배 정도 증가하였고(d_{32} : 0.65 μm), pH 9 이상에서는 지방구 크기는 다시 작아져 0.4 μm 정도로 다시 회복되었다. 이러한 변화 경향은 유화에 사용된 락토페린 수용액의 pH에 따른 ζ -potential 값과 관련이 있는 것으로 전술한 바와 같이(Fig. 3) 락토페린 등전점 부근에서 ζ -potential 값이 '0'에 근접함에 따라 락토페린 분자간의 정전기적 반발력이 감소하여 표면흡착 단백질 간의 결합이 발생하고 따라서 지방구 응집에 의한 지방구 크기가 증가하며, pH 9이상에서는 락토페린 분자의 표면전하가 음으로 전환되고 따라서 분자간 정전기적 반발력이 증가하여 지방구 응집이 억제되어 작은 지방구 크기를 나타내게 된다. 한편, 락토페린은 분자량이 비교적

큰 당단백질(mw: 80 kDa)인데 표면흡착 단백질이 수용액상으로 당 잔기를 노출(protruding)함으로써 지방구 간에 작용하는 steric repulsive potential을 더욱 증가시키고 따라서 다른 단백질에 비해 pH 변화에 따른 유화액 중 지방구 크기 변화폭이 비교적 낮다고 하였으며[30, 31] 본 실험에서도 이런 경향이 관찰되었다.

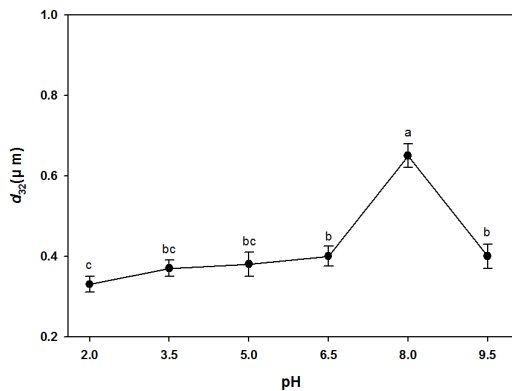


Fig. 6. Mean droplet size d_{32} of lactoferrin-stabilized emulsions(lactoferrin 0.5 wt%, 20 mM bis-tris, 25°C) at various pH(2~10).
a~c Means with the same letter are not significantly different by duncan's multiple range test($p < 0.05$).

3.4. 락토페린 유화액의 안정도 특성

3.4.1. NaCl 첨가에 따른 유화액의 크리밍 안정도

Fig. 7(a~g)은 락토페린 유화액에 NaCl의 농도를 달리하여 첨가한 뒤 Turbiscan에 의한 light scattering 법으로 측정된 시간 경과에 따른 후방산란 강도(backscattering intensity)의 변화 프로파일이다. Fig 7의 X축은 유화액을 담은 시료병의 높이로서 0~45 mm까지 나타내었고 Y축은 시간에 따른 후방산란강도(%)를 -80~+30% 까지 표시하였다. 유화액에 크리밍이 발생하면 시료병 하부의 지방구 농도는 낮아져 유화액 표면으로 이동하여 하부의 후방산란 강도 (backscattering intensity)는 감소하고(serum층 발생), 이에 따라

시료병 상부의 지방구 농도는 증가하여 후방산란 강도는 증가한다[32, 19]. Fig. 7에 의하면, NaCl 첨가 농도와 관계없이 모든 유화액 시료에서 시간 경과와 더불어 serum층과 크림층(cream layer)이 동시에 발생되었다. 그러나 그 정도는 NaCl 첨가농도에 따라 다르게 나타났는데, NaCl 10 mM을 경계로 하여 발생 정도가 뚜렷하게 구분되었다. 즉, 시료 a(NaCl 0 mM) 및 b(NaCl 10 mM)의 경우 시간의 경과에 따라 시료병 0~10 mm 높이에서 serum층이 관찰되고 시료병 35~45 mm 높이에서는 크림층(cream layer)이 발생하였으나, 그 정도는 후술하는 경우(≥ 25 mM)에 비교하여 상당히 낮은 정도였다. NaCl 첨가량 25 mM이 되는 시료(c)부터 400 mM 시료(g)까지 크리밍 프로파일은 a, b의 경우와 다른 형태를 보이는데, 시간의 경과에 따라 시료병 상부에서 크리밍층이 서서히 두껍게 형성되고, 또한 시료병 하부 0~20 mm에서 serum 층이 생기는 형태가 실험 초기부터 분명하게 시간의 함수로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 이러한 시간의 경과에 따른 안정도 변화는 생식의 분산 안정성을 시간의 함수로 조사한 Lee와 Mok[32]의 연구 결과와 정성적으로 잘 일치하고 있다. 시간 경과에 따른 유화액의 안정도 변화를 보다 세밀하게 관찰하기 위해 Fig. 8에 나타낸 바와 같이 시료병 0~20 mm의 높이에서 serum 층의 발생 속도(즉, 후방산란 강도 변화의 평균값)를 시간의 함수로 표현하였다. Fig. 8에 의하면, Fig. 7의 결과와 유사하게 NaCl 첨가량 10 mM을 경계로 하여 후방산란값이 시간의 경과와 더불어 크게 낮아지는 것을 관찰 할 수 있는데, 이는 NaCl 첨가(> 10 mM)에 의하여 serum층 형성이 촉진되며, 따라서 creaming 속도가 더욱 빨라진다는 것을 의미한다. 이와 같은 결과는 단백질 유화액에 있어서 지방구 간에 작용하는 정전기적 반발력이 NaCl의 첨가량의 증가와 더불어 ion screening effect에 의해 낮아짐으로서[33] 유화액 중의 지방구 응집에 의한 크기가 증가하고 이에 따라서 Stokes' law에 근거한 크리밍 발생이 촉진되어 나타난 것으로 사료되었다.

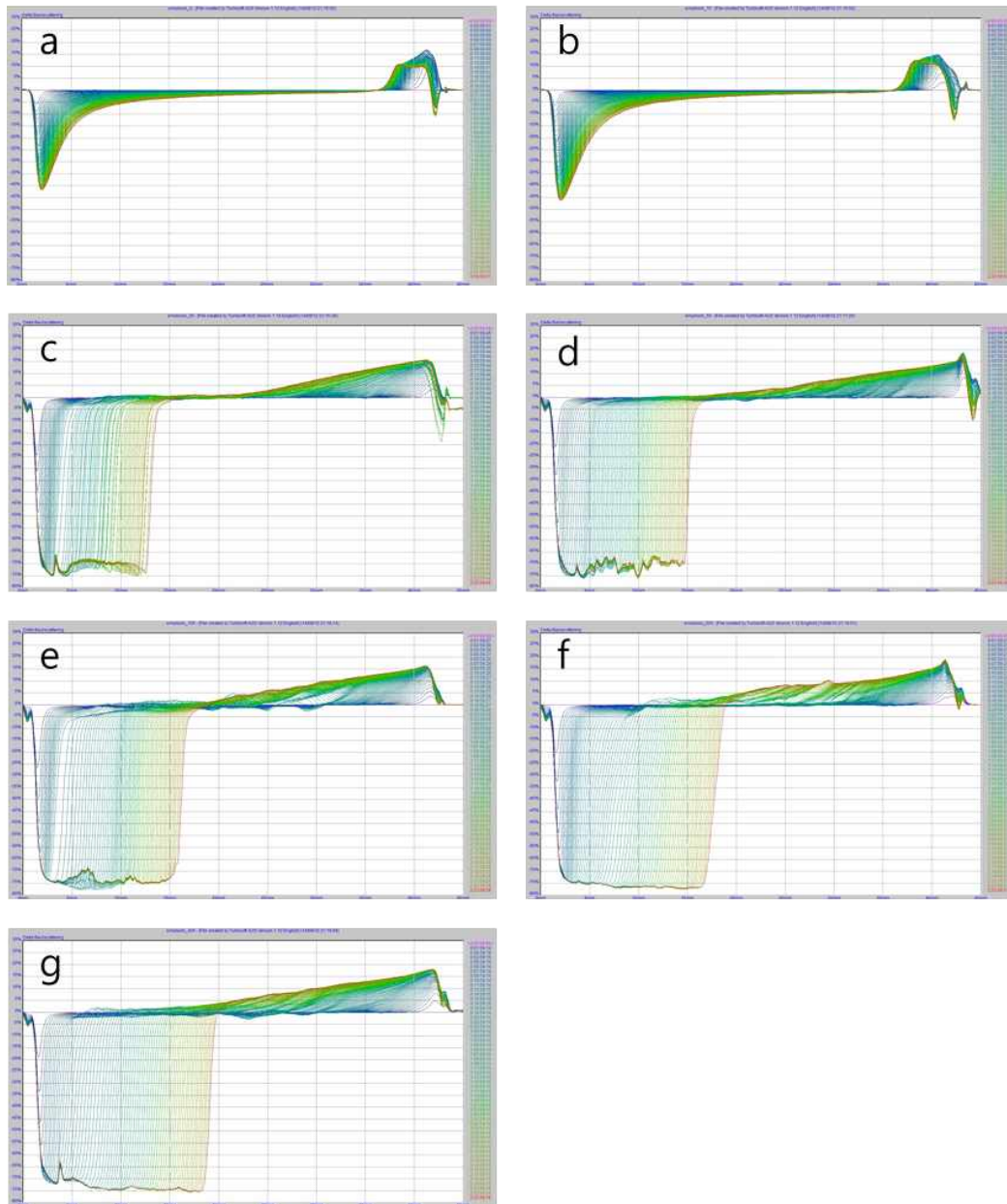


Fig. 7. Creaming profile of LF-stabilized emulsions (0.5 wt% protein, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7) containing various concentrations of NaCl. (a) 0 mM (b) 10 mM (c) 25 mM (d) 50 mM (e) 100 mM (f) 200 mM (g) 400 mM.

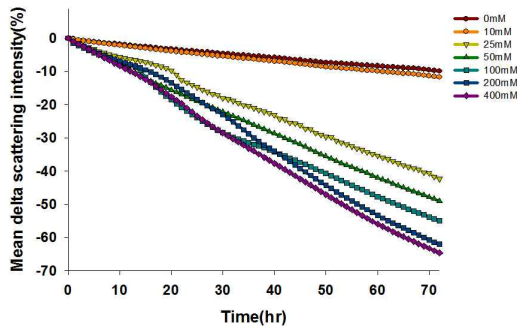


Fig. 8. Clarification kinetics of emulsions(0.5 wt% lactoferrin, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7) containing various concentrations of NaCl. Each line denotes the NaCl concentration in emulsions.

3.4.2. 단백질 농도에 의한 영향

단백질 첨가 농도에 따른 락토페린 유화액의 크리밍 안정도를 Turbiscan을 이용하여 평가하였다. Fig. 9는 시료병 하부(0→20 mm)에서 측정된 serum 층의 발생 속도(즉, 후방산란 강도 변화의 평균값)를 시간의 함수로 표현하였다. Fig. 9에 의하면 락토페린 유화액의 안정도는 첨가 단백질 농도에 따라 크게 변화함을 알 수 있는데, 유화액 중 단백질 농도가 낮은 경우 (i.e., 0.25 wt%) 시간 경과에 따라 시료병 하부의 후방산란 강도가 급격히 낮아져서 저장 70 시간 후 강도는 약 -60% 정도로 관찰되었고, 반면 단백질 농도가 0.5 wt% 이상일 경우 저장 기간에 따른 후방산란 강도는 거의 변화가 없었으며 유화액 시료 간의 차이도 나타나지 않았다. 전술한 바와 같이 (Fig. 4) 유화액 중 단백질 농도가 <0.5 wt%의 경우 유화 지방구를 완전히 encapsulation 할 수 있는 유효 단백질 농도에 미치지 못하여 지방구 간에 단백질의 가교결합이 형성되고 유화액 중 지방구는 응집하게 된다[28, 33]. 이 경우 응집된 지방구는 hydrodynamic radius가 커지며 Stokes' law에 근거하여 크리밍 안정도는 낮아지고[34], 결과적으로 serum층 형성에 의한 시료병 하부에서 후방산란 강도 값은 낮아지게 된다. 한편, 유화액 중 단백질 농도가 0.5 wt% 이상 첨가되었을 경우 Fig. 4에서 언급한 바와 같이 유화 지방구 계면은 단백질로 포화 혹은 다층(multilayer)을 형성하게 되며, 그 결과 유화액은 크리밍에

대하여 높은 안정도를 나타내게 된다.

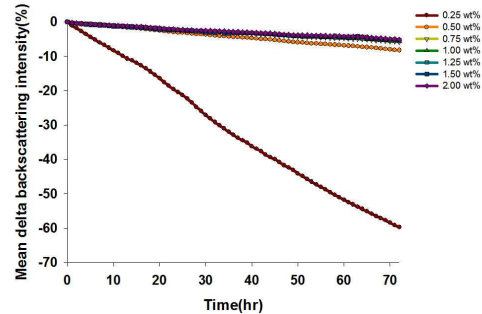


Fig. 9. Clarification kinetics of emulsions(0.25 ~2.00 wt% lactoferrin, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7). The clarification kinetics was measured by using a Turbiscan at 25°C. Each line denotes the protein concentration in emulsions.

4. 결론

본 연구는 락토페린의 유화 특성을 조사하기 위하여 수행하였다. 먼저, 락토페린 수용액을 이용하여 락토페린의 표면활성(표면흡착특성, ζ-potential 등)을 조사하였으며, 이어서 락토페린으로 안정화된 유화액을 제조하고 이의 이화학적 성질을 조사하였다. 락토페린의 표면흡착특성에 있어서 수용액 중 락토페린 농도의 증가(1×10^{-5} →0.1 wt%)와 더불어 표면장력은 낮아졌으며 0.01 wt% 이상의 농도에서는 일정한 값(≈44 mN/m)을 나타내었다. pH의 변화에 따른 락토페린 수용액(1×10^{-3} wt% 단백질, 5 mM bis-tris, 25°C)의 표면장력은 등전점(pH ≈ 8~9) 부근에서 가장 낮은 표면장력 값(53.8 mN/m)을 나타내었으며, 이는 락토페린 수용액의 pH 변화에 따른 ζ-potential 측정 결과와 유사한 경향으로, 등전점에서 락토페린 수용액은 ζ-potential 값은 '0'으로 나타났다. 한편, 락토페린을 이용하여 유화액을 제조한 결과, 첨가 농도의 증가와 더불어 지방구 크기는 감소하였으며, 유화액 중 락토페린의 농도가 0.5 wt% 이상일 경우 일정한 지방구 크기(0.33 μm)의 안정한 유화액을 형성하였고, Turbiscan을 이용한 유화안정도 평가에서도 이와 유사한 안정도 변화 경향을 확인할 수 있었다. 락토페린 유화액 중 지방구 크기는 pH에 의존하

였는데 락토페린의 등전점에 가까울수록 크기는 증가하여 등전점에서 지방구 크기는 pH 2의 경우와 비교하여 약 2배 정도 증가한 것으로 관찰되었다. 또한, Turbiscan을 이용하여 NaCl 첨가에 대한 락토페린 유화액의 안정도를 평가한 결과, 낮은 첨가 농도($\leq 10\text{mM}$)에서 비교적 안정하였으나, 이후 고농도에서는 첨가 농도의 증가와 더불어 락토페린 유화 안정도는 낮아지는 것으로 나타났다.

References

1. D. J. McClements, "Food emulsion: principles, practices, and technique", 2nd ed., p. 334, F. L. Boca Raton, Florida (1989).
2. K. S. Hoek, J. M. Milne, P. A. Grieve, D. A. Dionysius, and R. Smith, Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides, *Antimicrob. Agents. Ch.*, **41**, 54 (1997).
3. P. L. Masson, J. F. Heremans, and E. Schonne, Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes, *J. Exp. Med.*, **130**, 643 (1969).
4. J. K. Actor, S. A. Hwang, and M. L. Kruzel, Lactoferrin as a natural immune modulator, *Curr. Pharm. Design*, **15**, 1956 (2009).
5. H. Wakabayashi, K. Yamauchi, and M. Takase, Lactoferrin research, technology and applications, *Int. Dairy J.*, **16**, 1241 (2006).
6. A. Sarkar, K. K. T. Goh, and H. Singh, Colloidal stability and interactions of milk-protein-stabilized emulsions in an artificial saliva, *Food Hydrocolloid.*, **23**, 1270 (2009).
7. A. Sarkar, D. S. Horne, and H. Singh, Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model, *Food Hydrocolloid.*, **24**, 142 (2010).
8. M. Tomita, H. Wakabayashi, K. Shin, K. Yamauchi, T. Yaeshima, and K. Iwatsuki, Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications, *Biochimie*, **91**, 52 (2009).
9. L. Y. Mei, D. J. McClements, and E. A. Dekker, Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets, *J. Agr. Food Chem.*, **47**, 2267 (1999).
10. L. Y. Mei, D. J. McClements, J. N. Wu, and E. A. Dekker, Ion-catalyzed lipid oxidation in emulsion affected by surfactant, pH and NaCl, *Food Chem.*, **61**, 307 (1998).
11. A. Ye, J. Lo, and H. Singh, Formation of interfacial milk protein complexation to stabilize oil-in-water emulsions against calcium, *J. Colloid. Interf. Sci.*, **378**, 184 (2012).
12. E. De Lorenzis, C. Semeraro, M. D. De Blasi, G. Mita, and P. Poltronieri, Emulsions based on the interactions between lactoferrin and chitosans, *Food Biophys.*, **3**, 169 (2008).
13. D. J. McClements, Protein-stabilized emulsions, *Curr. Opin. Colloid. In.*, **9**, 305 (2004).
14. D. G. Dalgleish, Food emulsions stabilized by proteins, *Curr. Opin. Colloid. In.*, **2**, 573 (1997).
15. E. Dickinson and K. Pawlowsky, Influence of κ -carrageenan on the properties of a protein-stabilized emulsion, *Food Hydrocolloid.*, **12**, 417 (1998).
16. S. T. Hong and E. Dickinson, Influence of an anionic surfactant on the rheology of heat-set β -lactoglobulin-stabilized emulsion gels, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **127**, 1 (1997).
17. S. T. Hong, Competitive displacement of methylcellulose from the oil-water interface by various emulsifiers, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**, 1271 (2008).
18. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Bio. Chem.*, **193**, 265 (1951).

19. H. Zhang, Y. H. Lee, J. A. Shin, K. T. Lee, and S. T. Hong, Stability of oil-in-water emulsions with different saturation degrees from beef tallow alcoholysis products, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **42**, 933 (2013).
20. D. J. McClements, Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **47**, 611 (2007).
21. D. E. Graham and M. C. Phillips, Proteins at liquid interfaces: III. Molecular structures of adsorbed films, *J. Colloid. Interf. Sci.*, **70**, 427 (1979).
22. M. R. R. Nino and J. M. R. Patino, Surface tension of protein and insoluble lipids at the air-aqueous phase interface, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 1233 (1998).
23. J. Leman and J. E. Kinsella, Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **28**, 115 (1989).
24. N. Krog, N. M. Barford, and R. M. Sanchez, Interfacial phenomena in food emulsions, *J. Disp. Sci. Tech.*, **10**, 483 (1989).
25. C. Bengoechea, O. C. Jones, A. Guerrero, and D. J. McClement, Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: Factors affecting particle characteristics, *Food Hydrocolloid.*, **25**, 1354 (2011).
26. J. M. Steijns and A. C. M. van Hooijdonk, Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin, *Brit. J. Nutr.*, **84**, 11 (2000).
27. P. Walstra, "Encyclopedia of emulsion technology, basic Theory", 1st ed., vol I, p. 57, P. Becher, New York (1983).
28. E. Dickinson, "An Introduction to Food Colloids. 207 Seiten, zahlr. Abb", p. 514, J. Kroll, Oxford, New York, Tokyo (1992).
29. F. A. Perrechil and R. L. Cunha, Stabilization of multilayered emulsions by sodium caseinate and k-carrageenan, *Food Hydrocolloid.*, **30**, 606 (2013).
30. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 2531 (2005).
31. E. N. Baker and H. M. Baker, A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin, *Biochimie*, **91**, 3 (2009).
32. J. Y. Lee and C. K. Mok, Dispersion stability determination of *saengshik* beverage by optical methods, *Food Eng. Prog.*, **4**, 41 (2010).
33. E. Dickinson, Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments, *J. Dairy Sci.*, **80**, 2607 (1997).
34. H. J. Lee, J. S. Bae, E. S. Lee, H. C. Kang, K. T. Lee, and S. T. Hong, Emulsifying properties of Surface-active substances from defatted rice bran by supercritical carbon dioxide, *Food Eng. Prog.*, **16**, 172 (2012).