

천연 글루텐 필름의 기계적 물성 향상 연구

김학선 · 강호종[†]

단국대학교 고분자공학과

(2015년 11월 4일 접수, 2015년 12월 15일 수정, 2015년 12월 19일 채택)

Enhancement on the Mechanical Properties of Natural Gluten Film

Hak Seon Kim and Ho-Jong Kang[†]

Department of Polymer Science and Engineering, Dankook University, Gyeonggi-do 16890, Korea

(Received November 4, 2015; Revised December 15, 2015; Accepted December 19, 2015)

초록: 글루텐 단백질 구성 성분이 천연 글루텐 필름 물성에 미치는 영향을 확인하여 보았다. 글루텐/에틸알코올 수용액 원심분리에 의하여 글리아딘/글루테닌 조성비가 다른 글루텐을 얻어 천연 글루텐 필름을 제조하였다. 일반 글루텐 필름에 비하여 고분자량 글루테닌이 제거된 글루텐 필름은 신율이 증가되며 아울러 광투과 특성이 현저히 증가함을 알 수 있었다. 글루텐 필름의 가공 특성 증가를 위해 사용된 글리세린은 필름 신율을 증가시키는 반면 인장 강도는 감소시킴을 확인하였다. 이러한 감소는 L-cysteine을 가교제로 사용하여 이황화 결합에 의한 글루텐 가교를 촉진시켜 최소화될 수 있으며 고분자량 글루테닌을 다소 함유하고 있는 글루텐 필름에서 그 효과가 두드러짐을 알 수 있었다.

Abstract: The effect of chemical composition of gluten protein on physical properties of natural gluten film was studied. The various glutes having different gliadin/glutenin compositions were obtained by the centrifugation of gluten/ethyl alcohol aqueous solution and then natural gluten films were produced from obtained glutes. It was found that both elongation at break and optical transmittance were enhanced in the film made by glutes without high molecular weight glutenin. The applied glycerin for processing aid resulted in increasing of elongation at break but the lowering of tensile strength was found. This tensile strength decrease might be minimized using L-cysteine as a crosslinking agent which caused the disulfide bonding between gluten molecules, specially for gluten having high molecular weight glutenin.

Keywords: gluten, gliadin, glutenin, natural polymeric film, disulfide bonding.

서 론

최근 단백질을 고분자 소재로 이용하는 연구가 천연 고분자 개발에 관심 대상이 되고 있다.¹ 실크와 같은 천연 단백질 고분자는 일반 고분자에 비하여 가격이 비싸 한정된 용도로만 사용되고 있지만 옥수수, 밀 등과 같은 곡류와 대두콩, 땅콩 등과 같은 두류에 10~40% 정도 함유되어 있는 글루텐 단백질은^{2,3} 대량 생산과 동시에 저가로 공급이 가능하여 이를 천연 고분자 소재로 응용하는 연구가 활발히 진행되고 있다.^{4,5}

글루텐은 알코올 수용액에 용해되는 물질인 상대적으로 저분자량인 글리아딘과 불용성인 고분자량 글루테닌으로 구성된다.^{6,7} 글리아딘은 28000-55000 dalton의 분자량을 가지며 α -, β -, γ -, ω -gliadin으로 나누어진다. 화학구조 차이점은 ω -

글리아딘은 아미노산 시스테인(cysteine) 잔기가 없는 반면 α -, β -글리아딘은 6개, γ -gliadin에는 8개의 시스테인이 각각 존재하며 수분 존재 하에 이황화 결합(inter- and intra-molecular disulfide bond)을⁸⁻¹⁰ 유발시켜 글루텐 점탄성 특성에 영향을 미친다. 글루테닌은 글리아딘보다 큰 분자량인 70000-100000 dalton인 고분자량 글루테닌 서브유닛(HMW-GS)과 분자량 20000-45000 dalton인 저분자량 글루테닌 서브유닛(LMW-GS)으로 구성된다.¹¹⁻¹³ 이들은 분자간 또는 분자 내 이황화 결합에 의해 거대 중합체를 형성하게 되어 천연 고분자 소재로서의 응용이 가능하다. 따라서 글루텐의 기본 성분인 글리아딘과 글루테닌 조성은 글루텐으로 제조되는 고분자 성형 물성에 커다란 영향을 미칠 것으로 예측된다.

글루텐으로 만든 고분자 제품은 탄성과 기계 차단성이 우수하며 무엇보다 생분해가 쉬워 사용 후 처리가 편리하다는 장점이 있다. 그러나 가공특성, 기계적 특성 및 물에 대한 안정성이 부족하여 글루텐의 물리적, 화학적 변형을 시도하는 연구가 진행되고 있다.^{14,15} 이와 함께 글루텐 성분이 이들 특성

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: hjkang@dku.edu

©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

에 미치는 영향에 대한 연구 또한 함께 진행되고 있다.^{16,17} 글리아딘과 글루테닌을 분리하지 않은 글루텐을 사용할 경우 제조된 필름이 brittle하여 물리적 및 기계적 특성 특히, 신율이 좋지 않으며 색이 불투명하다는 단점을 가진다. 이를 극복하기 위하여 글루텐에서 글리아딘 만을 분리하여 이를 이용한 필름 개발에 대한 연구가 활발히 이루지고 있다.^{18,19}

본 연구에서는 알코올 수용액의 알코올 함량에 따라 글루텐이 글리아딘과 글루테닌으로 선택적 분리가 가능함을 이용하여 다양한 글리아딘과 글루테닌 조성을 갖는 글루텐을 제조하고 이를 이용한 천연 고분자 필름의 제조 후, 글루텐 성분이 필름 물성에 미치는 영향과 첨가된 가소제 및 가교제에 따른 필름 물성 변화를 함께 살펴보았다.

실 험

재료. 본 연구에 사용된 글루텐은 Guanxian Ruixiang biotechnology development Co.Ltd.로부터 구매하여 사용하였다. 필름에 첨가한 글리세린은 LG 생활건강에서 구입하였으며 가교제로 사용한 L-cysteine은 Sigma Aldrich에서 구입하였다. Figure 1에 이들의 화학 구조를 나타내었다.

글루텐으로부터 글리아딘과 글루테닌을 분리하기 위하여 글루텐 100 g을 에탄올 수용액 20, 30, 40, 50, 60, 80%(v/v) (W20(water content 20%)~W80(water content 80%)) 400 mL에 넣고 상온에서 24시간 교반하였다. 교반 후 4000 rpm 회전속도로 원심분리기((주)자이로젠사, LaboGene 1580)를 사용하여 불용성인 고분자량 글루테닌을 제거하였다. 남은 상청액에 포함된 글리아딘과 저분자량 글루테닌은 30 °C에서 건조하여 글리아딘/글루테닌 조성이 다른 글루텐을 제조하였다.

제조된 글루텐은 sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE: 전기영동)를²⁰ 이용하여 이들의 구성 성분을 확인하여 Figure 2에 나타내었다. SDS-PAGE는 12% separating gel과 5% stacking gel에 running buffer액을 채우고 size marker와 원심분리기로부터 얻어진 글리아딘/글루테닌을 에탄올(70% v/v) 수용액으로 1/6 배로 희석한 후 sample buffer(SDS, Glycerol, Tris-HCl pH6.8)와 함께

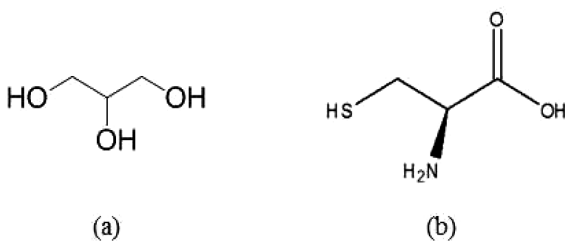


Figure 1. Chemical structures of materials: (a) glycerin; (b) L-cysteine.

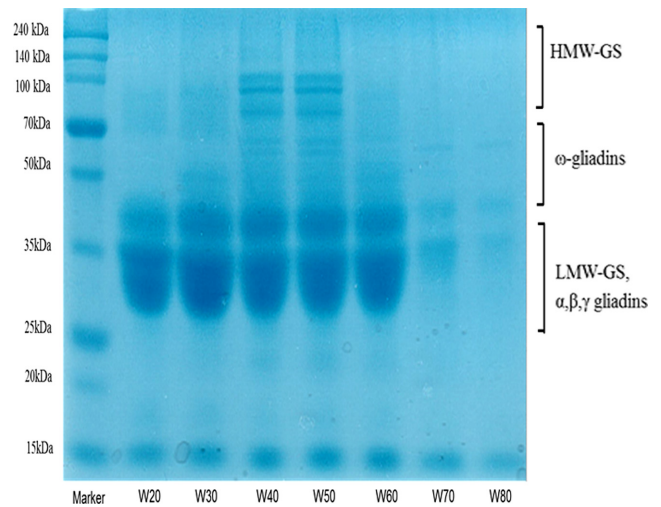


Figure 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of gluten extract by centrifugation.

100 °C의 끓는 물에서 30분 동안 끓여 5분 동안 원심분리한 후 sample를 로딩한 후 gel tank와 power supply를 연결하여 80 volt에서 30분간 단백질이 일직선상에 위치하도록 하였다. 그 후 전압을 120 volt로 높여 또 30분 동안 전기영동하였다. 두 번의 전기영동이 끝난 후 gel을 frame에서 분리하여 coomassie blue 50 mL에 gel을 담근 후, 30분 동안 shaker에서 염색하였다. Coomassie blue를 제거하고 de-staining 용액으로 1시간 washing한 후 탈색액을 제거하고 dH₂O로 5분 shaking gel을 확인하여 Figure 2와 같은 SDS-PAGE 패턴을 얻었다.

글루텐 필름 제조. 얻어진 글루텐은 각각의 글루텐 추출 시 사용했던 에탄올 수용액에 넣어 8 wt% 농도가 되도록 용액을 제조하고 magnetic bar를 이용하여 교반하면서 가공 첨가제(가소제)로 글리세린 30-50 wt% 첨가한 후, 2시간 이상 교반하여 글루텐 필름 제조용 dope를 제조하였다. L-cysteine 가교제가 첨가된 필름을 얻기 위해서는 글리세린을 첨가한 뒤 용액을 55 °C로 가열한 후 1 wt%의 가교제를 첨가하여 같은 온도를 유지시키며 1시간 교반하여 가교제가 첨가된 필름 제조용 dope를 함께 제조하였다. 만들어진 dope 10 g을 60×15 mm의 polystyrene petri dish에 담고 30 °C의 오븐에서 2일 이상 건조시켜 두께가 0.5 mm인 글루텐 필름을 제조하였다.

글루텐 필름 특성 분석. 제조된 글루텐 필름의 기계적 물성은 100N load cell이 장착된 Lloyd 사의 인장시험기(Model: LR30K Pus)를 이용하여 측정하였다. 시편 크기는 10×30 mm²로 10 mm/min의 속도로 pre-load가 0.03 N일 때까지 유지하다 50 mm/min의 속도로 당겨 인장강도 그리고 신율을 측정하였다. 광 투과도는 Perkin-Elmer 사의 UV-Visible spectroscopy(Lambda 950)로 380~780 nm의 파장 영역에서 transmi-

ttance를 측정하고 540 nm의 transmittance 값을 필름의 광 투과도로 비교하였다.

결과 및 토론

Figure 3에 글루텐/알코올 수용액을 원심분리하여 얻어진 상층액 고형분을 알코올 수용액의 물 함량에 따라 나타내었다. 원심분리에 의하여 상대적으로 분자량이 큰 글루테닌(HMW-GS)은 불용성인 침전물로 분리되고 글리아딘과 저분자량 글루테닌(LMW-GS)은 상층액에 용해된 상태로 잔유하게 되어 건조 후, 고형분으로 남게 된다. 글루텐은 물이 존재하면 분자 내 혹은 분자간의 이황화 결합을 형성한다. 이황화 결합은 cysteine이 존재하는 α , β , γ -글리아딘과 고분자량 글루테닌의 결합을 유발시켜 network 구조를 형성하게 되며 이러한 network 구조는 분자량을 증가시켜 원심분리 시 침전물로 분리된다. 그림에서 보는 바와 같이 순수 물과 알코올 상태에서는 상층액에 잔유 글루텐이 전혀 존재하지 않으며 모두 침전되는 반면 알코올의 양이 증가될수록 상층액에 포함된 글루텐 양이 증가하며 50/50 에틸알코올 수용액에서 가장 많은 글루텐이 존재함을 알 수 있다. 이는 글리아딘의 알코올 용해성에 의하여 에틸알코올 농도 증가에 따라 고분자량 글루테닌과의 이황화 결합이 최소화되어 침전되지 않고 상층액에 존재하기 때문임을 알 수 있다.

Figure 2에 각 에틸알코올 수용액 상층액으로부터 얻은 글루텐 고형분의 SDS-PAGE 결과를 나타내었다. 본 실험에서 사용한 stained gel size 영역에서 발현된 band marker의 분자량 범위인 15부터 240 kDa와 비교하여 보면 에틸알코올 수용액에 포함되어 있는 대부분의 글루텐 분자량은 45에서 28 kDa에 밴드가 집중되어 있음을 알 수 있다. 이는 Peter R. Shewry의 연구 결과에서¹¹ 확인한 바와 같이 상층액으로부터 얻어진 글루텐이 α , β , γ -글리아딘과 저분자량의 글루테닌

(LMW-GS)임을 확인할 수 있었다. 이와 함께 30-60% 알코올 수용액 영역에서는 ω -글리아딘에 해당되는 40-60 kDa 영역의 밴드를 갖는 것으로 보아 상층액에 상대적으로 분자량이 큰 ω -글리아딘이 포함되어 있음을 알 수 있다. 또한 40, 50% 알코올 수용액에서는 70에서 100 kDa 밴드가 발현됨을 보이는데 이는 상층액에 고분자량 글루테닌(HMW-GS)도 소량 포함되어 있음을 의미한다. 이러한 결과로부터 에틸알코올 수용액 농도에 따라 글리아딘/글루테닌의 조성이 다른 다양한 글루텐을 얻을 수 있음을 확인하였으며 이러한 조성의 다양성은 글루텐 필름 성형성 및 물성에도 영향을 미칠 것으로 판단된다. 특히, 40-50 wt% 에틸알코올 수용액에 포함된 소량의 고분자량 글루테닌은 필름의 기계적 물성과 직접적인 연관관계가 있을 것으로 판단된다.

Figure 4에 글리아딘/저분자량 글루테닌/고분자량 글루테닌을 모두 포함하고 있는 일반 글루텐(water content: 0%)과 에탄올 수용액(water content: 30-50%)으로 고분자량 글루테닌을 대부분 제거한 글루텐에 가공 첨가제로 글리세린을 35 wt%

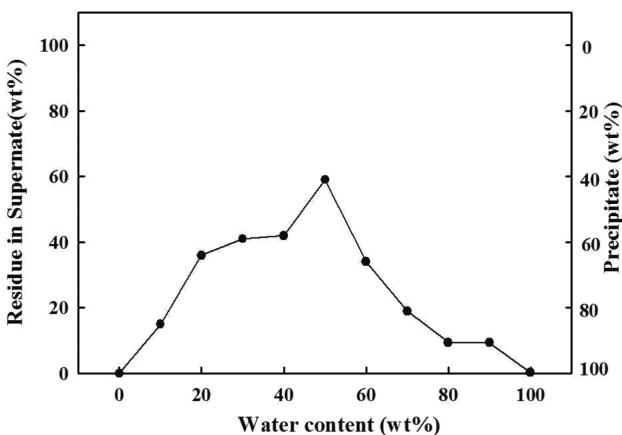


Figure 3. Extraction as a function of water content in gluten(10 g)/alcohol aqueous solution by centrifugation.

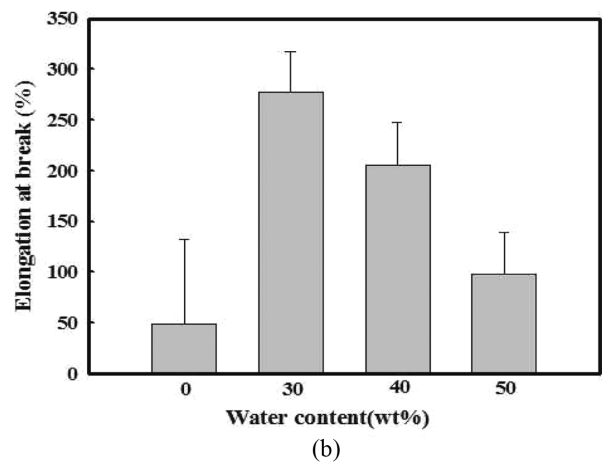
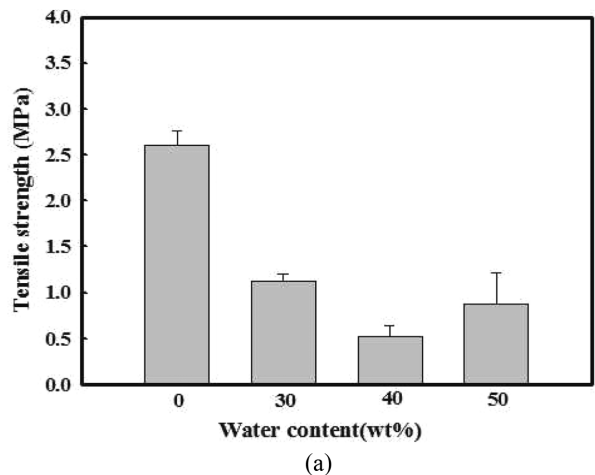
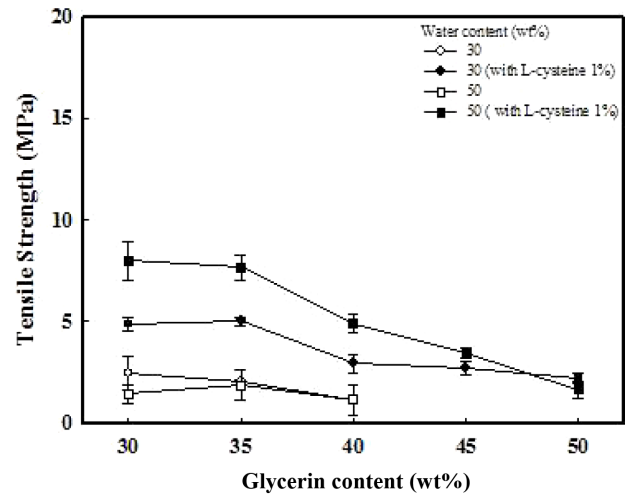


Figure 4. Mechanical properties of gluten films: (a) tensile strength; (b) elongation at break.

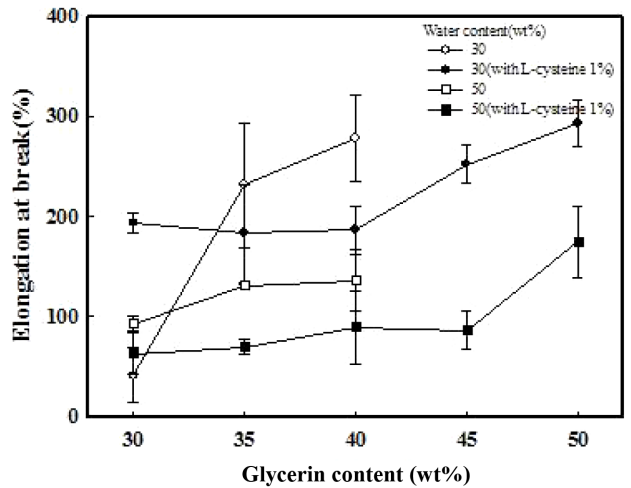
첨가하여 제조된 천연 글루텐 필름의 인장강도와 신율을 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 저분자량 글루테닌과 글리아딘으로 구성된 글루텐으로 제조된 필름의 경우, 일반 글루텐 필름으로 제조된 필름에 비하여 인장강도는 감소하는 반면 신율은 월등히 우수해짐을 알 수 있다. 신율 증가는 Figure 2의 SDS-PAGE 패턴에서 확인된 바와 같이 글리아딘과 저분자량 글루테닌으로 이루어진 글루텐을 이용하여 제조된 필름(water content: 20%)에서 특히 두드러짐을 알 수 있다. 이러한 결과는 일반 글루텐에 포함된 고분자량 글루테닌은 인장강도를 증가시키나 고분자 필름의 주요한 기계적 물성 중에 하나인 신율을 감소시켜 고분자 필름으로서는 치명적인 brittle한 특성을 갖게 된다. 하지만, 고분자량 글루테닌을 제거하는 경우, 인장강도는 감소하나 신율은 현저히 향상시킬 수 있음을 알 수 있다. 40와 50% 에틸알코올 수용액에서 얻어진 글루텐은 Figure 2의 SDS-PAGE 패턴에서 알 수 있듯이 다소간의 고분자량 글루테닌을 함유하고 있음을 알 수 있다. 따라서 신율은 30% 에틸알코올 수용액에서 얻어진 필름보다 다소 감소하는 것을 알 수 있다. 이러한 결과로부터 글루텐에 포함된 고분자량 글루테닌이 글루텐 필름의 기계적 물성에 커다란 영향을 미침을 다시 한 번 확인할 수 있다.

고분자량 글루테닌 제거에 따른 인장강도 감소를 최소화하기 위하여 글루텐에 이황화 결합을 유발시킬 수 있는 L-cysteine를 가교제로 1 wt% 첨가하여 이들이 필름 기계적 물성에 미치는 영향을 Figure 5에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 가교제를 첨가하는 경우, 에틸알코올 수용액 30, 50 wt%로부터 제조된 글루텐으로 만들어진 글루텐 필름 모두 인장강도가 현저히 증가됨을 보이는 반면 신율은 상대적으로 감소함을 알 수 있다. 특히 이러한 인장강도의 증가는 소량의 고분자량 글루테닌이 함유되어 있을 것으로 예측되는 50 wt% 에틸알코올 수용액으로 얻어진 글루텐 필름에서 큰 폭으로 증가됨을 알 수 있다. 또한 이들 필름의 인장강도는 Figure 4(a)의 일반 글루텐 필름보다도 더 큼을 알 수 있어 높은 인장강도와 신율을 동시에 갖는 천연 글루텐 필름을 제조할 수 있음을 알 수 있다. L-cysteine의 첨가에 의한 인장강도의 증가는 L-cysteine이 글루텐 분자 상호간의 이황화 결합을 촉진시킴에 기인된다. 50 wt%로부터 제조된 글루텐의 경우, 글루텐에 소량 포함된 고분자량 글루테닌과 글리아딘 혹은 저분자량 글루테닌간의 이황화 결합을 유발시킴에 따라 인장강도의 증가가 커짐을 알 수 있다.

Figure 5에 가공 첨가제로 사용된 글리세린 함량이 필름 기계적 물성에 미치는 영향도 함께 나타내었다. 가공 첨가제인 글리세린은 Figure 5에서 보는 바와 같이 가교제 첨가 없이 글루텐에 최대 첨가량은 40 wt%임을 알 수 있다. 즉, 40% 이상의 글리세린 첨가는 지나치게 낮은 점도에 의하여 글루텐 필름 가공성을 현저히 감소시켜 글루텐 필름을 제조할 수 없음을 확인할 수 있었다. 반면, 가교제를 첨가하는 경우, 글루



(a)



(b)

Figure 5. Effect of plasticizer(glycerin) and crosslinking agent (L-cysteine) on mechanical properties of gluten films: (a) tensile strength; (b) elongation at break.

텐 상호간의 이황화 결합에 따른 점도 증가에 따라 글리세린의 함량을 최대 50 wt%까지 증가시킬 수 있었다. 또한 가교제가 들어가지 않은 글루텐 필름의 경우, 인장강도는 글리아딘/글루테닌의 조성에 관계없이 글리세린의 함량에 크게 영향을 받지 않는 반면, 가교제가 첨가되는 경우, 글리세린의 함량에 따라 인장강도가 급격히 감소하는 반면 신율은 증가함을 알 수 있다. 특히 이러한 현상은 저분자량인 글리아딘으로 구성된 30% 수용액에서 얻어진 글루텐에서 두드러짐을 알 수 있다. 이상의 결과로부터 가교제의 첨가는 고분자량 글루테닌의 제거로 인한 인장강도 감소를 최소화할 수 있으며 가교제 첨가에 따른 신율의 감소를 글리세린의 함량으로 조절 될 수 있음을 알 수 있었다.

Figure 6에 얻어진 글루텐 필름의 광 투과 특성을 나타내

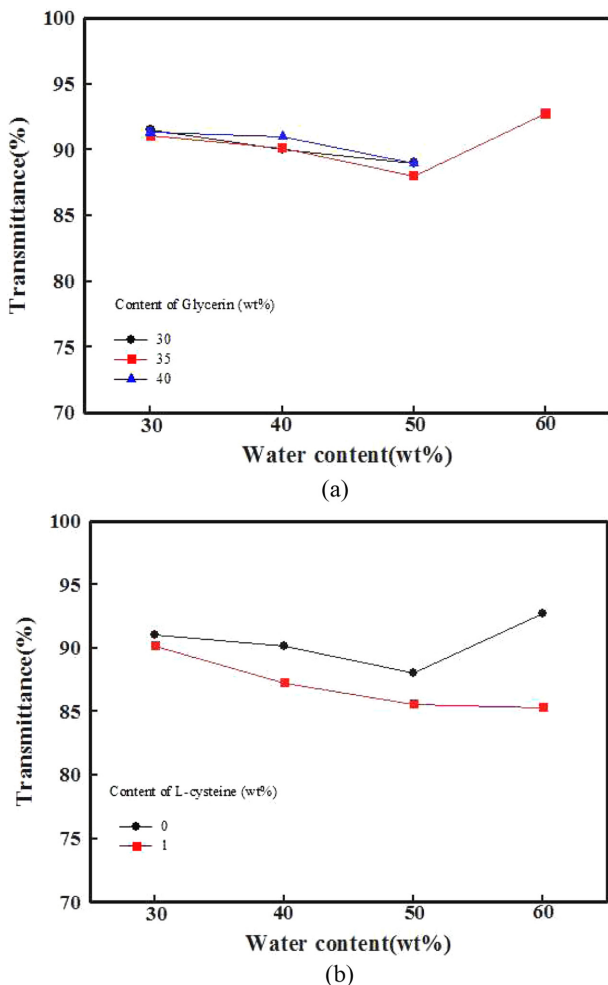


Figure 6. Optical transmittance of gluten film: (a) effect of glycerin; (b) effect of L-cysteine (glycerin: 35 wt%).

었다. 그림에서 보는 바와 같이 저분자량 글리아딘으로 구성된 글루텐 필름의 투과 특성이 가장 우수하며 고분자량 글루테닌의 함량이 증가될수록 광 투과 특성이 낮아짐을 알 수 있다. 그림에서 보는 바와 같이 고분자량 글루텐이 없는 60% 수용액에서 얻어진 필름의 투과도가 증가하는 것으로 보아 투과도의 감소는 고분자량 글루테닌에 따른 결과임을 확인할 수 있었다. 아울러 가소제로 사용된 글리세린은 광투과 특성에는 크게 영향을 미치지 않는 반면, 가교제로 사용된 L-cysteine은 글리아딘과 글루테닌의 이황화 결합에 의하여 광 투과 특성이 현저히 감소함을 알 수 있어 광 투과 특성이 요구되는 글루텐 필름의 경우 그 사용량의 조절이 필요할 것으로 예측된다.

결 론

글루텐 단백질을 이루고 있는 글리아딘과 글루테닌 조성이

글루텐 필름 물성에 미치는 영향을 살펴본 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 알코올 수용액 농도를 조절함에 따라 고분자량 글루테닌의 이황화 결합에 의한 고분자 형성에 따른 침전 현상에 의하여 글리아딘과 저분자량 글루테닌의 조성비가 다른 글루텐을 원심분리에 의하여 얻을 수 있었다.
2. 저분자량 글리아딘으로 이루어진 글루텐 필름은 고분자량 글루테닌을 함유한 글루텐에 비하여 신율과 광 투과도가 매우 우수함을 알 수 있었다.
3. 가교 첨가제로 사용된 글리세린의 가소제 역할에 의하여 글루텐 필름 성형 가공성을 증가시키고 동시에 신율을 현저히 증가시킴을 알 수 있었다.
4. 가교제로 사용된 L-cysteine은 글리아딘과 글루테닌의 이황화결합을 촉진시켜 인장강도를 증가시키며 특히 고분자량 글루테닌을 소량 함유하고 있는 글루텐의 경우 이러한 증가 폭이 월등함을 알 수 있었다. 하지만, 이러한 가교 결합은 신율을 감소 요인이 됨을 알 수 있었다.
5. 가소제로 사용된 글리세린은 광학특성에 영향이 적은 반면 가교제로 사용된 L-cysteine은 글루텐의 이황화 결합에 의하여 광 투과 특성을 현저히 감소시킴을 알 수 있었다.

감사의 글: 본 연구는 2014학년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. A. Rieder, A. K. Holtekjølen, S. Sahlstrøm, and A. Moldestad, *J. Cereal. Sci.*, **55**, 44 (2012).
2. R. Tanner, S. Uthayakumaran, F. Qi, and S. Dai, *J. Cereal Sci.*, **54**, 224 (2011).
3. T. Schober, S. Bean, D. Boyle, and S. Park, *J. Cereal Sci.*, **48**, 755 (2008).
4. Y. Song, L. Li, and Q. Zheng, *J. Food Sci. Biotechnol.*, **18**, 910 (2009).
5. J. Lim and Y. Fujio, *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **33**, 195 (1989).
6. P. R. Shewry, N. G. Halford, P. S. Belton, and A. S. Tatham, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **25**, 133 (2002).
7. J. Lee, Y. Kim, C. Kang, S. Lim, S. Ha, S. Ahn, and Y. Kim, *Kor. J. Breed. Sci.*, **43**, 479 (2011).
8. M. Dahesh, A. Banc, A. Duri, M. Morel, and L. Ramos, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 11065 (2014).
9. P. R. Shewry and A. S. Tatham, *J. Cereal Sci.*, **25**, 207 (1997).
10. G. Bulaj, *Biotechnology. Ad.*, **23**, 87 (2005).
11. P. R. Shewry, Y. Popineau, D. Lafiandra, and P. Belton, *Trends Food Sci. Tech.*, **11**, 431 (2001).
12. H. Pilar, K. Antonis, K. W. Ng. Perry, and G. Rafael, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7647 (2003).
13. M. Lindsay and J. Skerritt, *Trends Food Sci. Tech.*, **10**, 247 (1999).

14. R. Soares and V. Soldi, *Mat. Sci. Eng. C*, **30**, 691 (2010).
15. T. Bourtoom, *Int. Food Res. J.*, **16**, 1 (2009).
16. J. Xu, J. Bietz, and C. Carriere, *Food Chem.*, **101**, 1025 (2007).
17. D. Park, J. Ko, S. Han, S. Oh, J. Hyun, D. Suh, D. Shin, and H. Moon, *Korean J. Breed.*, **34**, 15 (2002).
18. A. Gennadios, C. L. Weller, and R. F. Testin, *J. Cereal Chem.*, **70**, 426 (1993).
19. S. Roy, C. L. Weller, A. Gennadios, M. G. Zeece, and R. F. Testin, *J. Food Sci.*, **64**, 57 (1999).
20. Y. Wan, C. S. Gritsch, M. J. Hawkesford, and P. R. Shewry, *Annals of Botany*, **113**, 607 (2014).