

## 분리완두단백으로부터 제조된 열 유도 겔의 구조 및 유변학적 특성 조사

하주연<sup>1</sup> · 이근곤<sup>2</sup> · 박성훈<sup>3,4</sup> · 박혜령<sup>5</sup> · 조연지<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup>강릉원주대학교 웰니스바이오산업학과, <sup>2</sup>강릉원주대학교 해양바이오식품학과,

<sup>3</sup>강릉원주대학교 식품영양학과, <sup>4</sup>강릉원주대학교 해람제빵연구소,

<sup>5</sup>수원여자대학교 호텔외식조리과

### Rheological and Microstructural Characterization of Heat-Induced Gels from Pea Protein Isolates

Ju Yeon Ha<sup>1</sup>, Geun-Gone Lee<sup>2</sup>, Sung Hoon Park<sup>3,4</sup>, Hye Ryung Park<sup>5</sup>, and Yeon-Ji Jo<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Wellness-Bio Industry, Gangneung-Wonju National University

<sup>2</sup>Department of Marin Bio Food Science, Gangneung-Wonju National University

<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition, Gangneung-Wonju National University

<sup>4</sup>Haeram Institute of Bakery Science, Gangneung-Wonju National University

<sup>5</sup>Department of Hotel Foodservice & Culinary Art, Suwon Women's University

#### Abstract

This study focuses on heat-induced gelation of pea (*Pisum sativum* L.) proteins to assess the potential of pea protein aggregates (PPA) as novel plant-based meat alternatives. The microstructural (SEM, CLSM), mechanical (TPA analysis), and rheological properties ( $G'$ ,  $G''$ ) of heat-induced gels at pH 2 were systematically investigated as a function of a different pea protein concentration (7.5, 10, 12.5%) and a varying heating time (1, 3, 6, 16 h). The result showed that PPA formation at higher protein concentration and heating time contributed to a homogenous and compact heat-induced gel formation. Such gel network strengthened mechanical properties in terms of high gel hardness ( $-40$  g) and elastic texture ( $-2.7$  mm springiness). For the rheological studies, the storage modulus ( $G'$ ) showed an increase during both the heating and cooling phases and then stabilized during the cooled-holding phase. This suggested that the formation of durable and stable gel was induced due to the decreased mobility of protein aggregates at low temperatures. Therefore, the PPA is indicated as a potential additive for enhancing the food texture quality in the plant-based meat food industry.

**Keywords:** pea protein, protein aggregates, heat-induced gel, microstructure, rheological properties

## 서 론

단백질은 생체의 생명 활동을 유지하기 위한 필수 영양소로, 양질의 단백질 자원 개발과 공급 문제는 전 세계적인 화두로 부각되고 있다. 이에 대해 육고기의 대체식품 개발과 지속가능한 소비층대가 해결안으로 제시되면서, 동물성 단백질 대체 소재로서 식물성 단백질, 식용곤충, 해조류, 미생물, 배양육 등의 활용방안이 쟁점으로 떠오르고 있다(Lee et al., 2021). 특히, 식물성 단백질 원료들은 동물성 원료에 비하여 저지방, 저칼로리에 영양적으로 손색이

없으면서도 동물성 단백질에는 존재하지 않는 폴리페놀 및 각종 생리활성 물질이 함유되어 건강상 유익하다는 장점이 있다(Cho & Ryu, 2022). 건강, 환경 및 윤리적인 이유로 인해 식물성 대체육에 대한 관심이 증가하면서 이러한 식물성 식재료를 이용하여 만든 식물성 고기나 배양육 등의 대체육 산업이 성장하였다(Rajpurohit & Li, 2023). 대체육은 질감, 향미, 외관과 같은 육류의 심미적, 화학적, 영양적 특성이 육류와 유사한 식품을 말하며, 특히 가장 많이 알려져 있는 것은 식물성 대체육으로 특히 콩단백질을 활용한 식물성 대체육의 연구가 활발하게 진행되고 있다(Jeong & Jo, 2018, Cha et al., 2020, Zhan et al., 2022).

완두(*Pisum sativum* L., Pea)는 콩과에 딸린 한해살이 또는 두해살이 식물로서 부족한 영양분을 보충하고 각종 생리활성기능으로 다양한 면에서 우수한 효과를 나타내어 식품학적 관심도가 높아지고 있다(Lam et al., 2018). 완두는 수분 8.1 g, 단백질 20.7 g, 지질 1.3 g, 회분 2.8 g 및 탄수

\*Corresponding author: Yeon-Ji Jo, Department of Marin Bio Food Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Gangwon 25457, Republic of Korea  
Tel: +82-33-640-2962; Fax: +82-33-640-2498  
E-mail: joyeonji@gwnu.ac.kr  
Received August 21, 2023; revised September 24, 2023; accepted October 4, 2023

화물 65.1 g로 구성된다(RDA, 2016). 일반적으로 식물성 단백질의 이용은 현재 동물성 단백질에 비해 상대적으로 물리적 기능성(유화, 겔화, 거품형성능 등)이 떨어지기 때문에 식품산업에서 제한적이지만, 완두콩 단백질은 다른 두류에 비하여 비교적 높은 겔화 능력과 유화 안정성으로 인해 상업적 이용가능성, 저렴한 가격, 낮은 알레르기 유발성 그리고 우수한 지속가능성을 가진 재료로 알려져 있다(Shand et al., 2007; Lam et al., 2018). 따라서 완두콩 단백질의 높은 영양 가치와 그에 상응하는 기능적 특성(특히, 향상된 겔화 능력)을 개발함으로써 현재 식품산업에서 동물성 단백질뿐만 아니라 대두 단백질의 대안으로 고려되고 있다.

일반적으로 단백질의 열 유도 겔화는 싸이올(-SH), 소수성, 수소결합 및 정전기적 그룹의 상호작용 부위를 노출시키는 천연 단백질 구조의 열 유도 전개, 소수성 상호작용을 통한 전개된 단백질 분자의 응집 및 이황화 결합의 형성, 3차원 네트워크를 형성하는 단백질 응집체의 결합에 의해 이루어진다(Nicolai & Chassenieux, 2019). 최근 콩류 단백질(완두, 렌틸 등)의 구조화 기반 겔화식품은 대체육 제품 개발에 대한 관심을 끌고 있으나, 대두 단백질에 비해 겔화 능력이 현저히 낮다는 단점이 있다(Shand et al., 2007). 이는 낮은 함량의 시스테인 아미노산으로 인해 콩류 단백질 겔에서 이황화 결합이 적게 형성되는 것이 단백질 겔화능력을 감소시키는 것으로 나타났다(O'Kane et al., 2004; Shand et al., 2007). 단백질 구조의 변화는 단백질을 안정화하려는 힘과 불안정화하려는 힘 간의 균형의 결과물이며, 단백질 변성을 통해 생성된 응집체는 단백질의 소수성을 증대시켜 겔화 능력을 향상시킬 수 있다. 이러한 식품 단백질의 겔화 능력은 단백질 입자의 구조화를 이용하여 개선될 수 있으며, 개발된 변형 단백질 소재는 식품 및 생체활성 물질의 질감 개선뿐만 아니라 캡슐화의 목적으로 이용될 수 있다.

따라서 이 연구에서는 pH, 단백질 함량 및 가열시간에 따라 분리완두단백으로부터 제조된 열 유도 겔의 구조적 및 물성학적 특성을 조사하여 새로운 식물성 단백질 기반 대체육류의 대안으로서의 완두콩 단백질 응집체의 잠재력 여부를 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 열 유도 분리완두단백 응집체 및 겔 형성

분리완두단백(Pea protein isolate: PPI, >80% on dry basis)은 PEVESA BIOTECH S.A. (El Viso del Alcor, Sevilla, Spain)에서 제공받았다. 분리완두단백(7.5%, 10%, 12.5%, w/v)은 3차 증류수와 혼합하고, 단백질 부패방지를 위해 0.02% (w/v) sodium azide (Sigma-Aldrich, USA)를 첨가한 뒤 하루동안 실온에서 교반하였다. 다음날 초음파

분산기(ultrasonication, VCX-500, Sonics & Materials, USA)를 이용하여 40 Hz에서 5분(10 s ON, 5 s OFF) 동안 용액을 균질화 한 후 6 M HCL을 이용하여 pH 2로 적정하였다. 그 후 혼합물은 겔 형성을 유도하기 위해 90°C에서 16 시간동안 300 rpm으로 교반하며 가열하였다. 실온(25°C)에서 식힌 뒤 냉장고(4°C) 하루동안 안정화시켰다.

### 분리완두단백 응집체의 미세구조 관찰: TEM

분리완두단백 응집체의 미세구조는 투과전자현미경(FE-TEM; JEOL, JEM-2000EX, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 각 pH가 조절된 증류수를 이용하여 100배 희석한 응집체 용액 한 방울을 투과전자현미경용 그리드(Support Films Grid, TED PELLA, USA)에 30초간 고정시킨 후 2% uranyl acetate를 이용하여 30초간 음성 염색시켜 준비하였다.

### 열 유도 분리완두단백 겔의 미세구조 관찰: SEM과 CLSM

단백질 겔의 미세구조는 Zeiss EVO MA 10 주사전자현미경(FE-SEM; Inspect-F, FEI, Finland)을 사용하여 20 kV의 가속 전압에서 관찰하였다. 제조된 겔을 액체 질소에서 동결시키고 동결 건조한 후 겔의 단면을 금으로 코팅하여 관찰하였다.

추가적으로 공초점 현미경(Confocal laser scanning microscope) (CLSM, Stellaris5, Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 겔의 미세구조를 분석하였다. 염색재료로 형광염료인 Nile red (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 isopropyl alcohol에 1 mg/mL의 농도로 희석하여 분리완두 단백질 용액과 혼합하여 위의 방법에 따라 겔을 제조한 후, 488 nm 및 argon laser 조건에서 시료를 분석하였다.

### Texture analysis profile (TPA)

제조된 단백질 겔의 텍스처 특성은 CTX texture analyzer (Brookfield Engineering Labs Inc., Stoughton, USA)를 사용하여 분석하였다. 제조된 겔(두께 10 mm, 지름 13 mm)은 5 kg load cell과 a flat stainless-steel plate probe (TAAACC36)를 이용하여 deformation 50% 및 test speed 1 mm/min 조건에서 2번 압축하였다. 얻어진 힘-시간 그래프로부터 텍스처 변수인 hardness (경도), springiness (탄력성) 및 cohesiveness (응집성)을 계산하였다. 각 시료의 측정치는 8 회 이상 반복 측정하여 평균값과 표준편차 값으로 나타내었다.

### 보수력(water holding capacity)

보수력은 Lee and Jo (2023)의 방법을 이용하여 측정하였다. 제조된 단백질 겔 2±0.1 g을 ultrafiltration tube (Vivaspin Turbo 50, MWCO 5 kDa, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany)에 넣고, 원심분리기(LaboGene 1736R, GYROGEN, Daejeon, Korea)를 이용하여 4,000

rpm으로 25°C에서 10분간 처리하였다. 원심분리 전과 후의 시료의 무게를 측정하여 다음의 식을 이용하여 보수력을 계산하였다.

$$\text{WHC (\%)} = \frac{\text{원심분리 후 시료 무게 (g)}}{\text{원심분리 전 시료 무게 (g)}} \times 100$$

**유변학적 특성 조사**

pH 2에서 분리완두단백 현탁액의 열 유도 겔화 거동을 PP 50 (Parallel plate 직경: 50 mm, 간격: 1 mm)이 장착된 레오미터(MCR 302e, Anton Paar GmbH, Granz, Austria)를 이용하여 분석하였다. 온도는 Peltier 시스템을 사용하여 조절하였으며, 측정 중 탈수를 방지하기 위해 실리콘 오일을 사용하였다. 시간-온도 변화시험은 1 Hz의 진동수와 1%의 변형률을 사용하여 저장계수(G')와 손실계수(G'')를 기록하였다. 먼저, 20°C에서 90°C까지 2°C/min의 속도로 증가시킨 후 90°C에서 1시간 동안 유지한 다음 4°C/min의 속도로 90°C에서 4°C로 냉각하였다. 그 후 1시간 동안의 냉각유지 단계를 거쳐 시간-온도 변화시험을 완결하였다. 추가적으로 레오미터 내에서 형성된 겔의 서로 다른 온도에서의 안정성을 확인하기 위해 4°C, 25°C 또는 37°C에서 진동수 변화시험(Frequency sweep test: 0.01-10 Hz)을 수행하였다.

변형률 변화시험(Strain sweep test)은 제조된 겔 시료 제조된 겔(두께 10 mm, 지름 13 mm)를 PP 25 (Parallel plate 직경: 25 mm, 간격: 1 mm)이 장착된 레오미터를 이용하여 분석하였다. 제조된 겔은 레오미터 내에서 원래 높이의 90%로 압축하여 PP 25 사이에 빈 공간 없이 위치시켰으며, 변형률은 0.1%에서 100%까지의 수준으로 수행하였다.

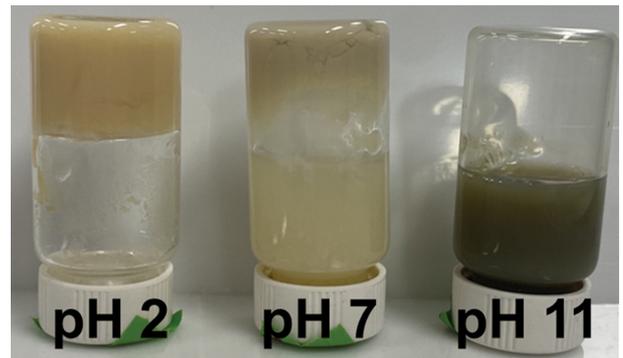
**통계분석**

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 24.0 IBM., Chicago, IL, USA)을 사용하였으며, 시료간 유의적 차이를 검증하기 위해 일원 배치분산분석 후, Duncan's multiple range test에 따라 사후검증을 실시하여 p<0.05 유의수준에서 시료간의 유의성을 검증하였다.

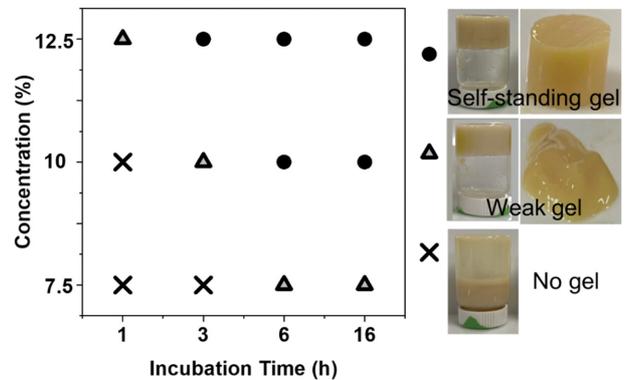
**결과 및 고찰**

**열 유도 분리완두단백 겔 형성능력 확인**

분리완두단백기반 하이드로겔의 형성을 확인하고 물성학적 특성을 조사하기에 앞서, 서로 다른 pH에서의 겔화 능력을 확인하기 위하여 분리완두단백 10% 용액을 pH 2, pH 7 및 pH 11에서 6시간 동안 가열 후의 겔화 능력을 평가하였다(Fig. 1). 그 결과, pH 2에서는 단백질 겔 형성을 확인하였으며, pH 7에서는 약한 겔이, pH 11에서는 겔



**Fig. 1. Appearance of heat-induced gels (10% protein) prepared at p H 2, pH 7 and pH 11. All gels were prepared at heating time of 6 h.**



**Fig. 2. Phase diagram of heat-induced gels prepared with PPI at different PPI concentration and heating time. Image of gels prepared at 3 h heating time and at different PPI concentration: (X: 7.5% PPI) aggregates (liquid), (Δ: 10% PPI) weak-gel, (●: 12.5% PPI) gel.**

형성이 진행되지 않은 것을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서는 pH 2의 산성조건에서 서로 다른 단백질 농도(7.5%, 10%, 12.5%) 및 가열시간(1, 3, 6, 16시간)에 따른 분리완두단백 겔 형성 능력을 비교 분석하였다.

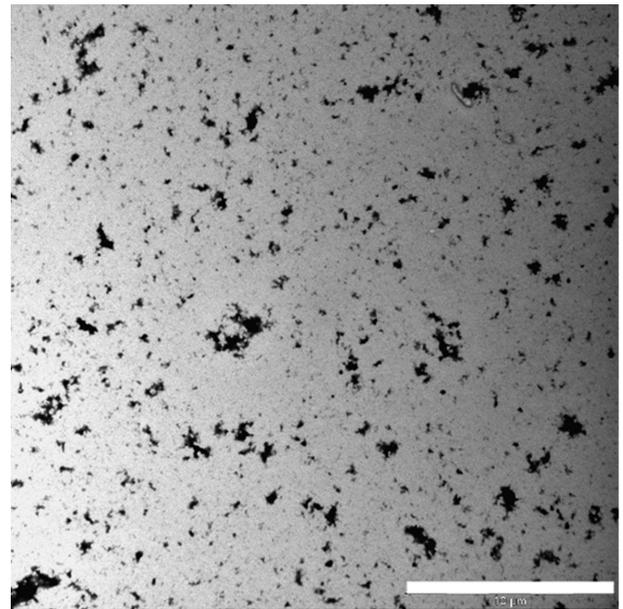
Fig. 2는 시각적 튜브반전법(visual tube-inversion method)으로 분리완두단백으로부터의 겔 형성 능력을 나타낸 결과이다. 일반적으로 단백질 기반 하이드로겔은 단백질의 일정농도 이상에서 형성되며, 이 때의 농도를 단백질 임계농도(critical protein concentration)라 하며 겔화 능력의 지표로 사용한다. 단백질 임계농도가 낮을수록 겔을 형성하는데 필요한 단백질 함량이 적다는 것을 의미한다(Nicolai & Chassenieux, 2019; Jo et al., 2020). Fig. 2에 제시한 대로 pH 2에서 분리완두단백의 겔화를 위한 임계농도는 10% 이상(가열시간 6시간)으로 보이며, 가열시간이 증가함에 따라 겔화를 위한 단백질 임계농도는 감소하는 것으로 나타났다. 즉, 가열 시간이 6시간에서 3시간으로 감소함에 따라 분리완두단백 겔 형성에 요구되는 단백질 농도가 10%에서 12.5%으로 증가하였다. 따라서, 자립형 겔(self-standing gel) 형성

을 위해서는 최소 10% 이상의 분리완두단백과 최소 3시간 이상의 가열시간이 필요함을 시사한다. 이는 단백질 변성 온도에서 단백질 농도와 가열시간이 상호 의존성이 있기 때문에 분리완두단백 겔화는 pH뿐만 아니라 단백질농도와 가열시간을 동시에 고려해야 한다는 것을 의미한다.

**열 유도 분리완두단백 응집체 및 겔의 미세구조 관찰: TEM, SEM, CLSM**

Fig. 3는 열 유도 분리완두단백 응집체의 미세구조를 나타낸 TEM 이미지이며, 이는 단백질 농도 7.5%에서 가열시간 3시간 동안 처리되었다. 이 조건에서 단백질 분자는 변성되고 응집되며, 그 결과 5 nm 크기 내외의 불균일한 구형의 응집체(aggregates) 분산이 관찰되었다. 이러한 응집체는 가열시간의 증가로 인해 충분한 단백질 풀림(unfolding)을 일으키고, 활성 그룹이 노출되어 상호 연결된 3차원 하이드로겔 형성하게 된다(Jo et al., 2020).

서로 다른 단백질 농도(10%, 12.5%) 및 가열시간(3, 6, 16시간)에 따른 분리완두단백 겔의 미세 구조(CLSM 및 SEM 이미지)를 Fig. 4에 제시하였다. Fig. 4A에 나타낸 SEM 이미지의 경우, 같은 가열 시간 하에 겔의 단백질 농도가 10%에서 12.5%로 증가함에 따라 더욱 조밀하고 균일한 기공 분포를 가진 미세 구조가 형성되었다. 이는 높은 단백질 농도가 보다 우세한 단백질-단백질 사이에 상호 작용을 증가시켜 고도로 연결된 겔 네트워크 구조를 나타냄을 의미한다(Jo et al., 2020). 또한, 예상한 바와 같이 같은 단백질 농도에서 겔의 가열 시간이 3시간에서 6시간, 16시간으로 차례로 증가함에 따라 매우 균질하고 상호 연결된 겔 네트워크가 형성됨을 확인하였다. 이러한 SEM 이미지 결과는 Fig. 4B에 제시된 CLSM 이미지 결과와 유사하게 나타났다. CLSM 이미지에서 붉은색 점으로 표시된 것이 단백질 입자들의 분포 형태를 의미하며, 단백질 겔 네트워크의 밀도가 단백질 농도 및 가열시간과 비례 관계가 있음을 나타낸다. 즉, 단백질 농도 및 가열시간이 증가

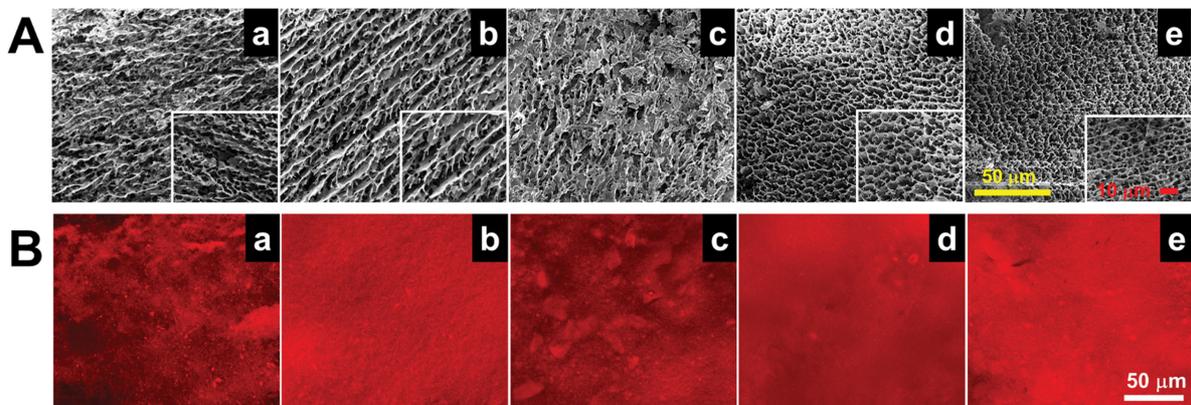


**Fig. 3. TEM image of heat-induced aggregates prepared with pea protein isolate at 7.5% PPI 3 h- heating time. Scale bar: 10  $\mu$ m.**

함에 따라 겔을 형성하고 있는 단백질 입자(응집체)가 매우 고르게 분포하여 겔의 네트워크의 균질성을 보여준다. 본 연구결과는 쿵, 렌틸 및 녹두 단백질로부터 열 유도된 하이드로겔의 미세구조 특성과 동일한 결과를 나타내었다(Jo et al., 2020; Lee & Jo, 2023). 따라서, 이는 단백질 농도 및 가열 시간의 증가가 균일하고 조밀한 겔 미세구조 형성에 영향을 미친다는 것을 시사하며, 겔 미세구조의 특성은 겔의 기계적 강도 및 물성학적 영향에도 영향을 미칠 것이라 판단된다.

**Texture analysis profile (TPA)와 보수력(water holding capacity)**

Fig. 5는 단백질 농도 변화(10%, 12.5%)와 가열 시간 변



**Fig. 4. SEM images (A) and CLSM images (B) of heat-induced PPI gels with different PPI concentration (10%: a, b; 12.5%: c, d, e) and heating time (3 h: c; 6 h: a, d; 16 h: b, e).**

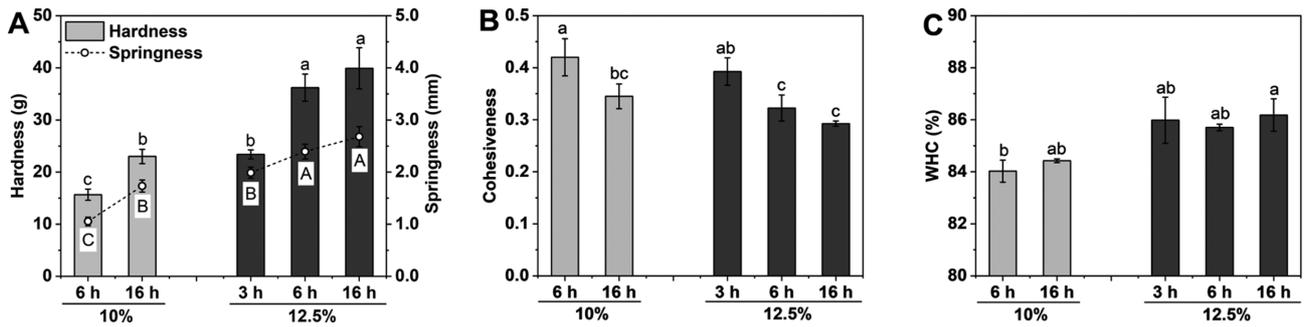


Fig. 5. Mechanical properties (A: hardness, springiness) and water-holding capacity (WHC) (B) of heat-induced PPI gels with different heating PPI concentration (10% and 12.5%) and heating time (3 h, 6 h and 16 h). Different letters (A-C, a-c) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

화(3-16 h)에 따른 분리완두단백 열 유도 겔의 기계적 특성 (Fig. 5A and B)과 보수력(Fig. 5C)을 나타낸 결과이다. 일반적으로 조직감과 보수력은 겔화 식품을 섭취하였을 때 혀와 치아에 의해 다즙성 및 용이한 섭취능력을 비교하는 평가하는 기준이 된다(Lee & Jo, 2023). Fig. 5A와 같이 단백질 농도가 증가할수록 겔 강도는 유의적인 증가를 보였으며, 이는 높은 단백질 농도에서 우세한 단백질 입자간 상호작용에 의해 조밀한 겔 네트워크 형성을 유도하였음을 의미한다. 예측한바와 같이 가열시간의 증가에서도 겔 강도를 증가시키는 경향을 보였으며, 이는 완두단백질 분자의 활성그룹의 전개에 의해 응집체 형성이 유도되었고, 그 결과 높은 겔 강도를 갖는 안정적이고 단단한 겔이 제조되었음을 나타낸다. 이러한 겔 강도 증가에 따른 결과는 SEM 결과와 일치한다. 게다가, 제조된 겔의 탄력성 또한 겔의 강도와 유사한 경향성을 나타내었다. 탄력성은 겔에 가해진 힘이 제거된 후 처음 높이를 회복하는 정도를 나타내며, Fig. 5A에서 보는 바와 같이, 단백질 함량이 높을수록 가열시간이 길수록 겔의 탄력성이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 10% 단백질/16 h 가열시간의 겔 시료와 12.5% 단백질/3 h 가열시간의 겔 시료의 겔 강도 및 탄력성이 유사한 것으로 나타났다. 그러나 겔 미세구조에서는 비교적 낮은 단백질 함량이라도 높은 가열시간에서 제조된 겔의 미세구조가 더욱 균일하게 관찰되었다.

겔의 응집성은 겔 내부의 결합의 강도를 나타내는 지표이며, 이는 겔 네트워크 구조를 형성하는 연속성과 밀접한 관련이 있다(Lee & Jo, 2023). 따라서, 응집성은 응력에 저항할 수 있는 구조가 필요한 식품제형의 중요한 특성을 나타낸다. Fig. 5B에 보는 바와 같이, 겔의 응집성은 단백질 함량 및 가열시간이 증가함에 따라 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이는 높은 단백질 함량과 가열시간으로 제조된 겔의 경우 겔의 내부 결합이 약해지면서 구조가 많이 파괴되어 취성(부서지는 성질)의 특성이 우세하게 나타남을 의미한다. 이러한 결과는 분리완두단백으로 제조된 겔의 특성과 동일하다(Lee & Jo, 2023).

겔의 보수력은 식품(특히, 육제품)에서 부드러운 수분감을 제공하는 중요한 요소이다. 본 연구 결과, 보수력은 단백질 함량이 10%에서 12.5%로 증가함에 따라서는 유의하게 증가했으나, 가열 가열시간의 증가에 따라서는 유의미한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5C). 수분 함량을 더 잘 유지하는 것에 있어 더 높은 단백질 함량으로 제조된 겔 내부의 더 작고 균일한 기공 크기로 더 많은 수분보유능력을 가질 수 있음을 시사한다. 또한 분리완두단백으로 제조된 겔의 경우 전체적으로 84% 이상의 우수한 겔화 능력을 보여주었으며, 이는 다른 식물성 단백질(예, 콩, 땅콩, 렌틸 단백질)과 유사한 수준으로 나타났다(Jo et al., 2020; Li et al., 2020; Wang et al., 2022).

#### 유변학적 특성 조사

pH 2에서 분리완두단백 현탁액으로부터 겔화 거동을 조사하기 위한 시간-온도 변화에 따른 유변학적 특성을 Fig. 6A에 나타내었다. 유변학적 특성에서 물질의 점탄성 성질을 예측할 때 저장계수( $G'$ )는 탄성, 손실계수( $G''$ )는 점성을 나타내는 물성학적 지표로 사용된다. Fig. 6A에 나타낸 바와 같이,  $G'$ 은 가열단계 ( $20^{\circ}\text{C} \rightarrow 90^{\circ}\text{C}$ )에서 급격한 증가를 보여주고 있으며, 특히  $50^{\circ}\text{C}$  이상에서는  $G'$ 보다  $G''$ 가 더 큰 것으로 보인다. 이는  $50^{\circ}\text{C}$  이상에서 고체 점탄성 ( $G' > G''$ ) 성질이 강하게 나타나 단백질 겔화가 우세하게 작용되었음을 시사한다. 그 후 가열유지단계에서  $G'$ 의 완만한 증가를 보였으며, 5도까지 냉각단계( $90^{\circ}\text{C} \rightarrow 5^{\circ}\text{C}$ )에서도 급격한  $G'$  증가를 나타내었다. 냉각단계동안  $G'$ 의 증가는 겔을 형성하기 위한 단백질 입자(응집체)의 이동성 감소를 인한 것으로 판단된다(Jo et al., 2020). 또한, 냉각유지단계 동안  $G'$ 은 일정하게 나타났으며, 이는 냉각유지단계가 겔의 안정화에 기여할 수 있음을 시사한다.

Fig. 6B는 시간-온도 변화 시험 후에 레오미터 내에서 제조된 단백질 겔의 진동수(frequency) 변화시험을 측정된 결과이다. 진동수 변화시험은 단백질 겔에 변형률을 가하는 시간을 달리했을 때 점탄성 변화를 측정한다. 일반적으로

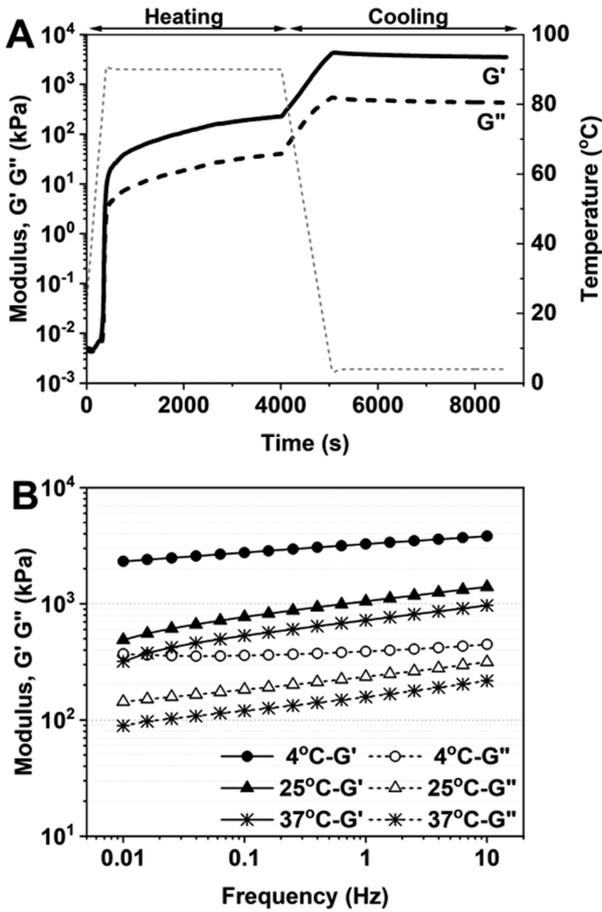


Fig. 6. Rheological properties of PPI suspension (10%, w/v) for the formation of heat-induced gel. (A) A time-temperature gelation profile; (B) Frequency dependence of storage modulus (G') and loss modulus (G'') as a function of cooling time (0, 0.5, 1 h). All samples for heat-induced gelation were heated from 20°C to 90°C at 2°C/min, held at 90°C for 1 h, cooled from 90°C to 5°C at 4°C/min, and held at 4°C for 1 h (frequency of 1 Hz, strain 1%). All frequency sweep measurements performed at different temperature (4, 25, 37°C) after the temperature sweep test. The temperature is depicted in the black dashed line. Full lines indicate storage modulus (G'), and the dashed line indicate loss modulus (G''). The temperature is depicted by the black full line.

로 점탄성 성질을 가지는 단백질 겔의 경우 변형이 가해지는 속도가 느리면 액체와 같은 특성을 확인할 수 있고, 변형 속도가 빨라질수록 고체적 성질이 강해지는 것을 관찰할 수 있다(Mezger, 2020). 즉, 점탄성-진동수 그래프의 기울기가 클수록 제조된 단백질 겔이 물리적으로 불안정(액체적 성질이 강함)하며, 기울기가 작을수록 안정(고체적 성질이 강함)함을 의미한다. Fig. 6B는 시간-온도 변화 시험의 냉각유지단계 이후 온도의 변화(4°C, 25°C, 37°C)를 주어 겔의 안정성을 평가하였다. 고체적 성질을 나타내는 물성학적 지표인 G'은 온도가 낮을수록 점탄성의 진동수 의존성이 낮아짐을 보여주었다. 즉 점탄성-진동수 그래프의 기울기가 낮기 때문에 겔의 안정성이 상대적으로 낮

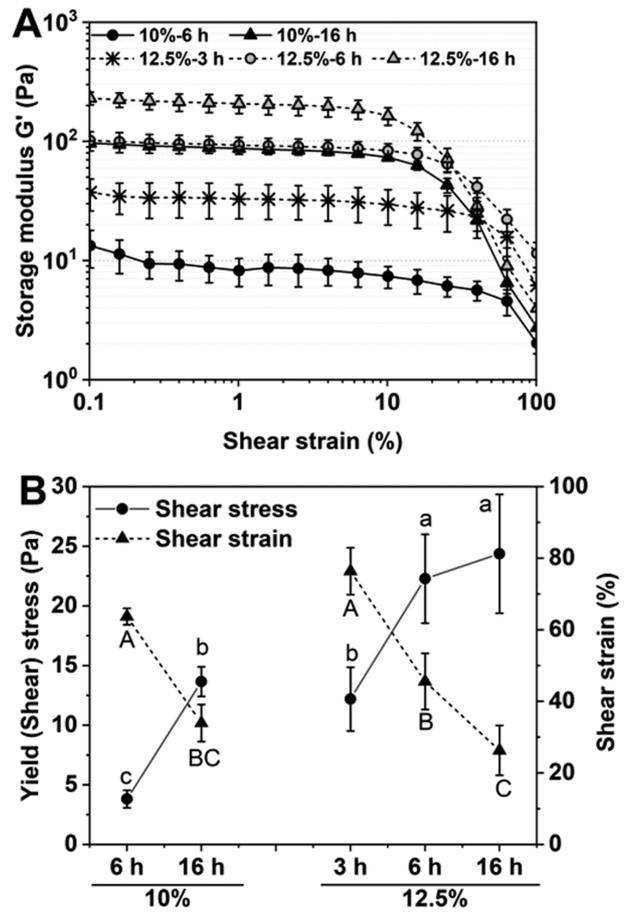


Fig. 7. Storage modulus (G')- strain profiles (A) and yield stress and critical strain (B) of heat-induced gels with different heating PPI concentration (10% and 12.5%) and heating time (3 h, 6 h and 16 h). Different letters (A-C, a-c) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

은 온도(4°C)에서 더 유리함을 보여준다. 이러한 낮은 온도에서의 진동수 변화에 의한 비의존성은 형성된 겔이 수소 결합에 의해 안정화가 이루어지며, 이는 저온에서 더욱 강화될 수 있음을 시사한다.

추가적으로 제조된 분리완두단백 하이드로겔의 파단(fracture) 능력을 평가하기 위하여 변형률(strain) 변화시험을 진행하였다(Fig. 7). 변형률 변화시험은 일반적으로 식품 가공 및 섭취에 실질적인 영향을 미치고, 겔을 파괴할 수 있는 임계 응력(break to critical stress)을 측정할 수 있다(Alavi et al., 2020). 이 때, 항복응력(yield stress)은 손실계수가 저장계수보다 우세하는 지점(즉,  $\tan \delta > 1.0$ )의 탄젠트( $\tan \delta$ ) 값 분석에 의해 결정된다(Jo & Chen, 2023). Fig. 7A에 나타난 바와 같이, 변형률(Strain%)를 증가시키면서 점탄성을 측정함으로써 일정한 선형 점탄성 구간을 얻을 수 있다. 이 때 이 선형구간이 짧을수록 고체의 성질이 강하며, 선형구간이 길수록 액체의 성질을 나타내는데(Mezger, 2020), 단백질 농도가 낮을수록 가열시간이 짧을수록 선형

구간이 길어져 액체적 성질을 강하게 나타내는 것으로 나타났다(Fig. 7A). 이를 항복응력과 임계 변형률 값으로 환산한 결과(Fig. 7B), 단백질 농도 및 가열시간의 증가는 항복응력이 높게 측정되었다. 단백질 겔의 항복응력은 단백질-단백질 상호작용의 증가, 겔 네트워크 구조의 안정성, 겔 미세구조의 특성 등과 같은 다양한 매개변수에 영향을 받을 수 있다. 본 연구결과에서 관찰된 항복응력의 증가는 단백질 응집체의 우세한 상호작용에 의한 단단한 겔 형성으로 설명될 수 있으며, 반면 임계 변형률의 감소는 형성된 겔이 부서지기 쉬운 조직감을 가지고 있음을 예측할 수 있다. 이러한 임계 변형률 감소로 인한 부서지기 쉬운 조직감은 위의 TPA의 결과에서 응집력 측정 결과와 일치한다.

## 요 약

본 연구에서는 분리완두단백질로부터 열 유도화된 응집체 및 겔을 제조하기 위한 단백질 함량 및 가열시간을 체계적으로 확립하고자 하였다. 열 유도 응집체는 5 nm 크기 내외의 불균일한 구형의 형태로 관찰되었으며, 증가된 단백질 함량 및 가열시간에 의해 미세하고 고도화된 겔 네트워크 구조를 형성하였다. 열 유도 겔화는 가열뿐 아니라 냉각과정에서 또한 겔의 고체적 특성을 강화시키고, 단백질 입자(응집체)의 이동성 감소를 시켜 겔의 안정성을 보장하는 것으로 나타났다. 이러한 특성은 식물성 단백질을 기반으로한 대체계란 및 대체육의 조직감 구현을 위한 결착제로 사용 가능할 것으로 판단되며, 추후 새로운 겔 제형의 식품 개발 및 공정 최적화를 확장하는데 도움이 되는 기초연구로 사료된다. 다만, 분리완두단백을 이용한 응집체 및 겔 형성 과정동안 단백질 입자간 상호작용에 따른 결합 메커니즘을 이해하기 위한 후속연구가 필요하다.

## 감사의 글

이 논문은 2022년도 강릉원주대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 수행되었음. 또한, 이 논문은 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2021R1C1C2012916).

## References

- Alavi F, Emam-Djomeh Z, Chen L. 2020. Acid-induced gelation of thermal co-aggregates from egg white and hempseed protein: Impact of microbial transglutaminase on mechanical and microstructural properties of gels. *Food Hydrocoll.* 107: 105960.
- Cha SH, Shin KO, Han KS. 2020. A study on the physicochemical properties of sausage analogue made with mixed bean protein concentrate. *Korean J. Food Sci. Technol.* 52(6): 641-648.
- Cho SY, Ryu GH. 2022. Quality characteristics of plant-based proteins used in meat analogs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*

- 51(4): 375-380.
- Jeong JY, Jo CU. 2018. The application of meat alternatives and ingredients for meat and processed meat industry. *Food Sci. Nutr.* 7: 2-11
- Jo YJ, Huang W, Chen L. 2020. Fabrication and characterization of lentil protein gels from fibrilla aggregates and the gelling mechanism study. *Food & Funct.* 11: 10114-10125.
- Jo YJ, Chen, L. 2023. Gelation behavior of lentil protein aggregates induced by sequential combination of glucono- $\delta$ -lactone and transglutaminase. *Food Struct.* 36: 100312.
- Lam ACY, Can Karaca A, Tyler RT, Nickerson MT. 2018. Pea protein isolates: structure, extraction, and functionality. *Food Rev. Int.* 34(2): 126-147.
- Lee EJ, Lee JY, Hong GP. 2021. Current status and development strategies of domestic plant-based meat alternative food market. *Food Sci. Anim. Resour. Ind.* 10(1): 61-70.
- Lee MY, Jo YJ. 2023. Microstructural and rheological properties of heat-induced gels from mung bean protein aggregates. *J. Food Meas. Charact.* 17: 3464-3472.
- Li J, Wu M, Wang Y, Li K, Du J, Bai, Y. 2020. Effect of pH-shifting treatment on structural and heat induced gel properties of peanut protein isolate. *Food Chem.* 325: 126921.
- Mezger T. 2020. The rheology handbook, For users of rotational and oscillatory rheometers. European Coatings.
- Nicolai T, Chassenieux C. 2019. Heat-induced gelation of plant globulins. *Curr. Opin. Food Sci.* 27: 18-22.
- O'Kane FE, Happe RP, Vereijken JM, Gruppen H, van Boekel MA. 2004. Heat-induced gelation of pea legumin: comparison with soybean glycinin. *J. Agric. Food Chem.* 52(16): 5071-5078.
- Rajpurohit B, Li Y. 2023. Overview on pulse proteins for future foods: ingredient development and novel applications. *J. Future Foods.* 3(4): 340-356
- RDA [Rural Development Administration]. 2016. Food composition table I. 7 revision. National Rural Re-sources Development Institute, RDA. Korea. 78-83.
- Shand PJ, Ya H, Pietrasik Z, Wanasundara PKJPD. 2007. Physico-chemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chem.* 102(4): 1119-1130.
- Wang Z, Zeng L, Fu L, Chen Q, He Z, Zeng M, Qin F, Chen J. 2022. Effect of ionic strength on heat-Induced gelation behavior of soy protein isolates with ultrasound treatment. *Molecules* 27(23): 8221.
- Zhan Z, Zhou Y, Cai X, Liu H, Chen L, Yu L. 2022. Fabrication of soybean protein-based meat with two-phases. *Int. J. Food Sci. Technol.* 57: 6646-6653.

## Author Information

- 하주연:** 강릉원주대학교 웰니스바이오산업학과  
**이근곤:** 강릉원주대학교 해양바이오식품학과  
**박성훈:** 강릉원주대학교 식품영양학과  
 강릉원주대학교 해람제빵연구소  
**박혜령:** 수원여자대학교 호텔외식조리과  
**조연지:** 강릉원주대학교 웰니스바이오산업학과  
 강릉원주대학교 해양바이오식품학과  
 강릉원주대학교 해람제빵연구소