

고압조건에서 가열 처리된 lysozyme의 변성

조래광 · 홍진환
경북대학교 농화학과

Denaturation of Heat Treated Lysozyme under High Pressure Conditions

Rae-Kwang Cho and Jin-Hwan Hong

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University

Abstract

In order to elucidate texturization mechanism of extruded protein, egg white lysozyme was heated under high pressure conditions, and its solubility and changes of molecular weight were investigated. Under high pressure conditions of 100, 300 and 600 kg/cm², solubility decreased gradually with increasing temperature in the samples heated at 70, 120 and 150°C and decreased notably with increasing pressure at 200°C. Polymerization was found in the samples heated at 150 and 200°C while a band which located below monomer(low-molecular) could be recognized. Molecular weight of the low-molecular was estimated to be about 6,000~9,000 and no smaller peptide was recognized. The polymerization may have occurred by disulfide crosslinking in the samples heated at 120°C but other crosslinking may have played a role in those at 150 and 200°C.

Key words: protein denaturation under high pressure, extrusion cooking of protein

서 론

전분공업과 식용유 제조산업 등에서 막대한 양의 부산물로서 얻어지는 글루텐이나 탈지대두단백질과 같은 식물성 단백질은 종래 유기질 비료나 동물의 사료로 주로 이용되어 왔으나⁽¹⁾ 최근 압출성형가공(extrusion cooking)에⁽²⁾ 의해 섬유상으로 조직화되어져 새로운 단백질 소재로서 식품 산업계에 널리 이용되고 있다.

그러나 단백질이 섬유상으로 조직화되는 메카니즘은 조직화 대두단백질에서 직선상의 섬유상 구조를 관찰하거나 강도를 조사한 연구^(3, 8), 가열시간과 처리압력에 따른 용해성의 변화⁽⁹⁾, 그리고 전기영동과 초원심 분석법으로 분자량의 변화를 조사한 연구^(10, 12) 등 많은 연구보문들이 있으나 이들은 모두 대두단백질을 원료로 사용하였으므로 7S, 11S 등이 혼존해 있는 관계로 명확한 분자량적인 변화를 조사함에 있어서 많은 제한을 받아 왔다.

본 연구에서는 단백질의 조직화 메카니즘과 관련있는 사항 중 분자량적인 변화를 보다 명확하게 조사하기 위하여 단백질의 분자량과 일차구조 및 아미노산 조성이 잘 알려져 있는 난백lysozyme⁽¹³⁾으로 고압조건에서 가열처리한 모델계 시료를 조제하여 불용화 현상과 분자량적인 변화를 조사함으로써 압출성형가공에 의한 식량

단백질의 활용방안을 보다 확장시키고자 한다.

재료 및 방법

시료조제

난백lysozyme(Seikagaku Kogyo Co., LTD., 6회 結晶) 약 5g을 수포화된 밀폐용기에 넣고 20°C에서 48시간 동안 방치하여 수분함량을 12.5%되게 조정할 후 100, 300, 600 kg/cm²의 고압조건에서 가열온도를 70, 120, 150, 200 °C로 동시에 조정할 수 있는 試製장치(Fig. 1)에 0.4g씩 넣고 3분간 유지시킨 뒤 板狀으로 성형된 시료를 분쇄한 후 60 mesh로 조정하여 실험에 사용하였다.

용해성 조사

시료 15 mg에 2% sodium dodecyl sulfate(SDS)와 1% 2-mercaptoethanol(2-ME)를 함유하는 0.1 M Na-phosphate buffer(pH 7.1)⁽¹⁰⁾ 3 ml를 가하고 35°C에서 2시간 동안 교반한 후 원심분리한 상정액을 Spectronic 21(Milton Roy社)로 280 nm에서 측정된 흡광도로서 용해도를 나타내었다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

Weber와 Osborn의 방법⁽¹⁴⁾ 준하여 시료 1 mg을 증류수 100 µl, 13% SDS, 9% 2-ME, 5.5% glycerin 및 0.8% bromophenol blue(BPB)를 함유하는 tracking dye solution 200 µl와 혼합하여 가열한 후 5 µl를 10% polyacrylamide slab gel에서 40 mA로 3시간 영동한 후 Co-

Corresponding author: Rae-Kwang Cho, Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, 1370 Sankyuk-dong, Pook-gu, Daegu 702-701, Korea

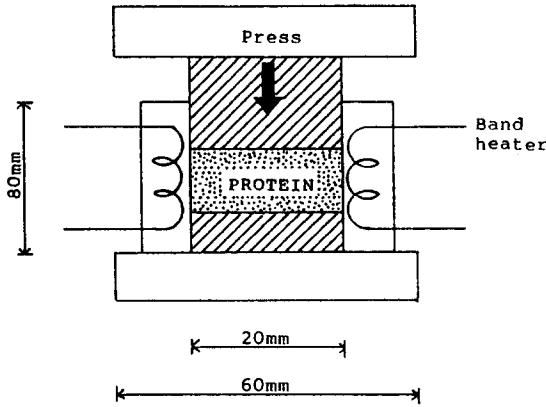


Fig. 1. Scheme of experimental apparatus designed specially for preparation of heat treated lysozyme under high pressure conditions

massie brilliant blue R-250(CBB)으로 염색시킨 뒤 메탄올과 초산의 혼합액으로 탈색하였다. 분자량 marker 단백질로서는 ovalbumin(43,000), carbonic anhydrase (29,000), β -lactoglobulin(18,400), bovine trypsin inhibitor(6,200)을 사용하였다. 또한, 15% polyacrylamide slab gel에서 2시간 영동한 gel을 Ketan 등의 방법⁽¹⁵⁾ 따라 銀염색법에 의한 분자량 변화도 조사하였다.

결과 및 고찰

용해성 변화 조사

고압조건에서 가열처리한 시료의 SDS와 2-ME를 함유하는 Na-phosphate buffer에 대한 용해성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 각각의 압력조건에서 가열온도가 높은 시료일수록 용해성은 감소하는 경향이였다. 가열온도가 70, 120, 150°C의 조건에서는 처리압력의 차이에 따른 불용화 정도는 크게 차이를 나타내지 않았다. 그러나 200°C의 조건에서 100 kg/cm²으로 처리한 시료의 용해도가 83.93%, 300 kg/cm²으로 처리한 시료는 80.46%, 600 kg/cm² 처리 시료에서는 69.96%로서 처리압력이 증가할수록 용해도가 현저히 감소하여 압력에 의한 영향이 뚜렷하게 인정됨을 알 수 있었다.

분자량적인 변화 조사

고압조건에서 가열처리한 lysozyme 시료의 분자량적인 변화를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 모든 고압조건에서 70°C와 120°C로 가열처리한 시료에서 dimer가 인정되었고 150°C로 가열처리한 시료에서는 dimer보다 분자량이 큰 polymer가 현저하게 생성되었으며 monomer보다 분자량이 작은 band도 출현하였다. 즉, 70, 120°C로 처리한 시료에서 고분자가 생성되었고 150, 200°C로 처리한 시료에서는 저분자를 동반한 고분자가 일어남을 알 수 있었다. 200°C로 가열처리한 시료는 mono-

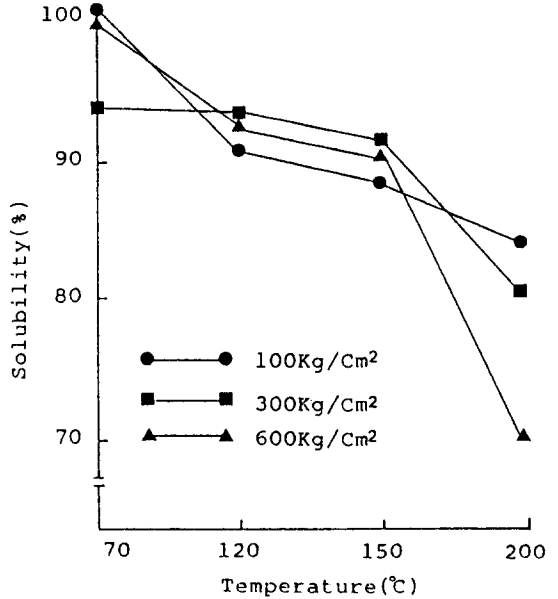


Fig. 2. Solubility of heat treated lysozyme under high pressure conditions in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.1) containing 2% SDS and 1% 2-ME

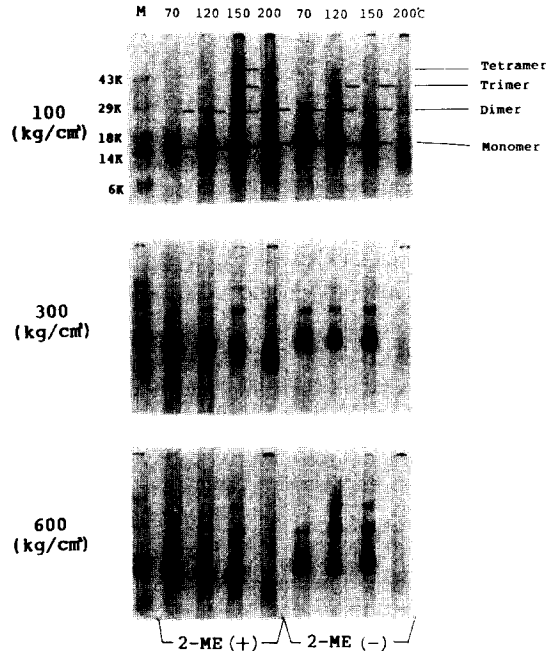


Fig. 3. The results of SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of heat treated lysozyme under high pressure conditions

M: Molecular weight marker, (+): with 2-ME, (-): without 2-ME

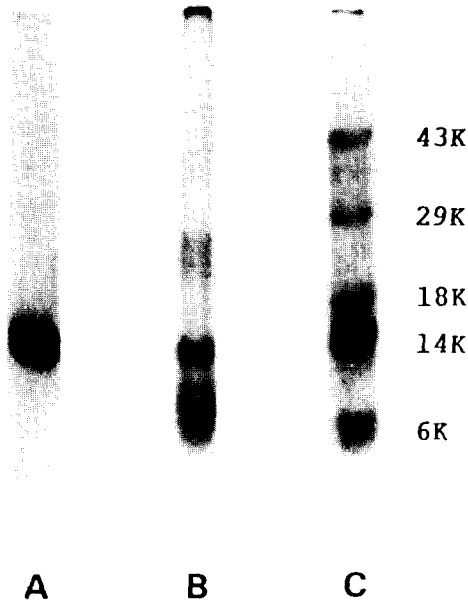


Fig. 4. Comparison of intact lysozyme and heat treated lysozyme at 200°C under 100 kg/cm² condition

A: Intact lysozyme, B: Treated lysozyme, C: Molecular weight marker

mer보다 저분자인 band가 더욱 많이 생성되었고 dimer와 dimer보다 약간 저분자인 band도 인정되었으며 또한, 처리압력이 증가할수록 polymer간의 band 구분이 점점 명확하지 않게 되어 분자량 변화에서도 Fig. 2의 용해성 결과와 같이 200°C에서 압력의 영향이 크게 작용함을 알 수 있었다.

한편, 2-ME를 함유하지 않은 전기영동 결과를 2-ME를 함유한 결과와 비교해 볼 때 각각의 압력조건에서 120°C로 가열한 시료에서는 dimer보다 분자량이 큰 polymer가 생성된 것으로 보아 dimer 이상의 고분자 형성에는 주로 분자간 disulfide 결합이 관여된 것으로 생각된다. 그러나 150°C와 200°C로 가열처리한 시료에서는 disulfide 결합 이외의 분자간 결합도 상당수 관여한 것으로 사료된다.

100 kg/cm²의 고압조건에서 200°C로 가열처리한 시료의 분자량 변화를 별도로 조사하여 Fig. 4에 나타내었는데 dimer 아래에 위치하는 저분자 band가 존재함을 확실히 알 수 있었으며 monomer 아래에도 분자량이 약 6,000~9,000 정도로 추정되는 저분자 band가 존재함을 알 수 있었다. monomer의 절단에 의해 생성된 것으로 추정되는 이들 저분자의 peptide보다 더욱 저분자인 peptide가 존재하는지를 확인하기 위해 전기영동 후 銀염 색법으로 확인한 결과 Fig. 5에서와 같이 분자량 6,000~9,000의 분포를 보이는 peptide보다 더욱 저분자의 peptide는 생성되지 않은 것으로 판단된다.

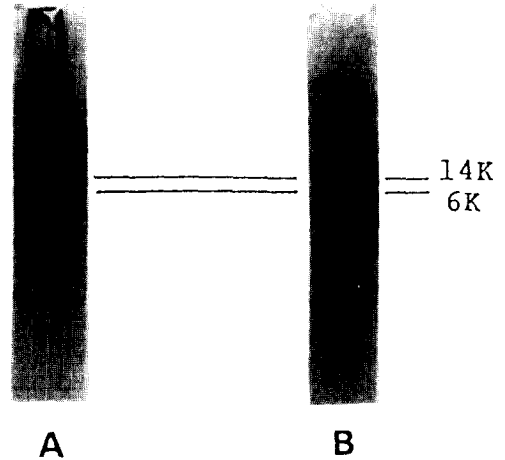


Fig. 5. The results of silver staining in SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of heat treated lysozyme at 200°C under 100 kg/cm² condition

A: Treated lysozyme, B: Molecular weight marker

이상의 결과를 종합하여 볼 때 시료 lysozyme은 고압 조건에서 150°C 이상의 가열처리를 받는 과정 중 그 일부분이 분자량 6,000~9,000을 가지는 peptide로 절단되어지고 이들 단편화된 peptide간의 결합, monomer간의 결합, 그리고 monomer와 단편화된 peptide간의 새로운 분자간 결합으로 dimer, trimer 등의 고분자와 이들 고분자보다 약간 분자량이 작은 band를 형성함으로써 polymer간의 경계가 불확실하게 된다고 생각되어진다. 이러한 고분자에 따른 복잡한 peptide band의 출현은 탈수대두를 재료로한 extrudate의 전기영동 실험 결과에서도 확인할 수 있었다¹⁶⁾. 그리고 이 때 고분자를 형성하는 분자간 결합양식은 disulfide 결합 이외에도 단백질 중의 carboxyl기와 amino기간의 탈수가 일어나 일부 isopeptide 결합을 형성하기 때문인 것으로 추정되는데 현재 isopeptide의 형성과정 및 그 확인 실험을 추진하고 있다.

요 약

압출성형가공(extrusion cooking)에 의한 단백질의 조직화 메카니즘을 해석하기 위해 난백 lysozyme을 고압조건에서 가열처리한 모델계 시료의 불용화 현상과 분자량적인 변화를 조사하였다. 100, 300, 600 kg/cm²의 고압조건에서 70, 120, 150°C로 가열온도가 높은 시료일수록 용해성은 감소하였으며 200°C로 가열한 시료에서는 처리압력이 증가할수록 용해도가 현저히 감소하였다. 150°C와 200°C로 가열처리한 시료에서는 dimer 이상의 polymer가 생성되었고 monomer보다 분자량이 작은 band의 생성도 인정되었는데 그 추정 분자량은 약 6,000~9,000의 분포이었으며 이 보다 저분자의 pep-

tion은 존재하지 않았다. 120°C에서 가열한 시료의 고분자 형성은 주로 분자간 disulfide 결합에 의한 것이었고 150°C 이상으로 가열한 시료의 고분자 형성에는 disulfide 결합 이외의 분자간 결합도 상당수 관여한 것으로 판단된다.

문 헌

- Haper, J.M.: Extrusion of foods. CRC. Inc., p.89(1981)
- Atkinson, W.T.: Meat-like protein food product. *U.S. patent* 3, 488, 770(1970)
- Aguilera, J.M., Kosikowski, F.V. and Hood, L.F.: Ultrastructural changes occurring during thermoplastic extrusion of soybean grits. *J. Food Sci.*, 41, 1209(1976)
- Saio, K.: Expansion and texturization mechanisms of soybean protein relating to the microstructures. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 34, 407(1987)
- Faubion, J.M. and Hoseney, R.C.: High-temperature short-time extrusion cooking of wheat starch and flour. I. Effect of moisture and flour type on extrudate properties. *Cereal Chem.*, 59, 529(1982)
- Faubion, J.M. and Hoseney, R.C.: High-temperature short-time extrusion cooking of wheat starch and flour. II. Effect of protein and lipid on extrudate properties. *Cereal Chem.*, 59, 533(1982)
- Isobe, S. and Noguchi, A.: 二軸エクストルuderによる食品素材の製造. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 34, 456(1987)
- Kitabatake, N., Megard, D. and Chefel, J.C.: Continuous gel formation by HTST extrusion-cooking: soybean proteins. *J. Food Sci.*, 50, 1260(1985)
- 野口直徳, 趙來光, 五十部誠一郎, 植村邦彦: 高温における大豆蛋白の變化. 日本食品工業學會 講演要旨集, p. 28(1988)
- Noguchi, A., Kugimiya, W., Haque, Z. and Saio, K.: Physical and chemical characteristics of extruded rice flour and rice flour fortified with soybean protein isolate. *J. Food Sci.*, 47, 240(1981)
- Saio, K., Terashima, M. and Watanabe, T.: Food use of soybean 7S and 11S proteins: Heat denaturation of soybean proteins at high temperature. *J. Food Sci.*, 40, 537(1975)
- 趙來光: 쌀가루를 混合하여 壓出 成形한 分離大豆蛋白質의 組織化 機構. 韓國食品開發研究院 用役 研究報告書 (1989)
- 林 勝哉, 井本泰治: リゾチム. 南江堂, 東京, p.2(1974)
- Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969)
- Ketan, P., David, J.E. and Michael, J.D.: Methods in molecular biology. Vol.3, *New Protein Techniques*. The Humana Press Inc., New Jersey, p.159(1988)
- 이현우, 한 역, 이상효, 김성수, 오상용, 민병용, 조래광: 쌀을 이용한 壓出型 營養食品 開發에 關한 研究(2次). 韓國食品開發研究院 研究報告書, p.93(1989)

(1991년 4월 19일 접수)