

콜로이드 모델 식품에 있어 단백질의 구조적 안정성

송 경 빈

충남대학교 식품공학과

Conformational Stability of Proteins in Colloidal Food Model System

Kyung Bin Song

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

Abstract

To elucidate the conformational stability of proteins in colloidal food system, molecular properties of various proteins such as chemically modified β -lactoglobulin, bovine serum albumin (BSA) structural intermediates, and β -casein under chaotropic conditions, were examined using circular dichroism, S-S bond content, and hydrodynamic radius determination. As refolding time increases, BSA intermediates approach the conformation of native BSA. And succinylation made β -lactoglobulin have more aperiodic structure by increasing net negative charge. Also, under chaotropic conditions, the conformation of β -casein was affected by hydrophobic interactions. This study clearly indicates that hydrophobic interactions and electrostatic interactions are major contributing factors in conformational stability of proteins.

Key words: functional property, food colloids, protein conformation

서 론

거품과 에멀전을 기초로 하는 유제품 등, 콜로이드 식품의 안정성은 계면활성제로 쓰이는 단백질 고유의 분자적 성질에 의하여 지배되는데 구체적으로 단백질이 얼마나 빨리 계면으로 확산하여 viscous 한 film을 갖느냐가 중요하다⁽¹⁻³⁾. 이와같은 기작을 이해하려면 콜로이드 식품계에서 분자적 level에서 본 수용액상태에서의 단백질 구조가 어떠한 조건에서 구조가 변하여 결과적으로 계면에서 형성된 단백질분자들로 이루어진 film의 물리화학적 성질에 어떻게 영향을 끼치는가를 알아야 한다.

콜로이드 식품은 크게 A/W 또는 O/W system으로 나눌 수 있는데 계면에서의 단백질 변성 또는 구조변화에 따라 표면 자유에너지 감소를 통해 안정된 콜로이드계를 이룬다. 따라서 단백질 고유의 2차, 3차구조, 이황화 결합수 등이 결국 계면에서의 단백질 구조변화에 따른 콜로이드 안정성에 영향을 미치는 요소이다. 그러므로 model system을 통한 체계적인 연구결과로 가장 이상적인 조건의 구조를 갖는 단백질을 밝힌다면 콜로이드 식품계의 안정을 위한 중요한 기초연구로서의 가치가 있을 것이다.

단백질의 구조안정성에 기여하는 요인으로는 소수성 상호작용, 정전기적 상호작용, 수소결합과 같은 비공유 결합이 중요한 역할을 하는데 그 구체적인 안정정도를 나타내는 뚜렷한 척도 또는 방법이 명확하지 않다. 따라서 여러 다른 아미노산 배열을 갖는 단백질의 구조에 있어 용액상태에서의 단백질분자들 주변 local environment에 의해 결정되는 단백질 2차, 3차 구조변화에 관여하는 용질-용질, 용질-용매 상호작용들에 관해 체계적으로 연구하기 위해서는 구체적인 조건하에서 대표적인 단백질들이 어떠한 구조변화를 하는가를 규명해야 한다. 그러므로 본 연구에서는 콜로이드 식품에 있어 계면안정성을 이루는데 중요한 단백질 안정성을 이루는 여러 인자에 의한 단백질 구조변화를 밝히기 위하여 여러 요인중 소수성 상호작용과 정전기적 상호작용을 중심으로 실험하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 쓰인 bovine serum albumin(BSA), β -lactoglobulin, β -casein은 Sigma Chemical Co.에서 구입했다.

실험방법

BSA refolding intermediates 제조 : BSA refolding intermediates를 문헌방법⁽⁴⁻⁶⁾에 따라 만들었다. BSA를 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.6)/10 M urea/1 mM EDTA/

Corresponding author: Kyung Bin Song, Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

50 mM DTT에 녹여서 실온에 6시간 방치한 후 pH를 4.0으로 조정했다. Urea 등을 제거하기 위해 미리 0.01 M HCl로 평형시킨 Sephadex G-25 컬럼을 통과시킨 후 단백질 희분을 모아 regeneration buffer에서 refold시켰다(0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)/1m EDTA/1 mM reduced glutathione/0.1 mM oxidized glutathione). 이때 regeneration 용액에서의 BSA 농도는 1 μ M로 맞추고 intermediate들은 각기 0.5, 1, 2, 3, 5, 24 h에서 free-SH group을 iodoacetamide로 block함으로써 얻어진 용액을 투석한 후 동결건조시켰다.

Succinylated β -lactoglobulin 제조 : Succinylation은 Franzen과 Kinsella 방법⁽⁷⁾을 따랐다. 여러 다른 양의 succinic anhydride(0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2g)를 천천히 75 mM phosphate buffer에 녹아 있는 1g β -lactoglobulin에 첨가하고 pH는 7.0과 8.0 사이를 NaOH를 첨가함으로써 유지했다. 반응이 끝난 후 용액을 투석한 다음 동결건조했다.

이황화물 결합 수 측정 : BSA intermediates의 이황화물 결합 수 함량측정은 2-nitro-5-thiosulfobenzoate (NTSB) 방법⁽⁸⁾에 의했다. 0.1g 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate) (DTNB)를 38 $^{\circ}$ C, pH 7.5 조건에서 10 ml의 1 M Na₂SO₃에 녹인 후 산소를 용액 전체를 통해 nitrothiobenzoate가 NTSB로 완전히 바뀔 때까지 aeration시켰다. NTSB 용액은 위 방법으로 만든 stock 용액을 0.2 M Na₂SO₃으로 100배 희석시킨 후 pH를 9.5로 맞추고 최종농도가 0.5 mM이 되게 했다. 이황화물 결합수는 0.2 ml 단백질 용액과 0.8 ml NTSB 용액을 섞은 후 암실에 25분 동안 두었다가 412 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량했다.

Succinylation 정도 측정 : β -Lactoglobulin의 succinylation 정도는 trinitrobenzenesulfonate(TNBS) 방법⁽⁹⁾에 따라 측정하였다. TNBS(0.02 ml, 1.1 M) 용액을 sodium borate buffer에 있는 1 ml 단백질 용액(0.1%, w/w)에 넣고 빨리 섞은 후 실온에 5분간 방치한 후 새로 만든 1.5 mM Na₂SO₃ 2.5 ml를 첨가함으로써 반응을 종결했다. % succinylation은 다음과 같이 구했다.

$$\% \text{ succinylation} = \frac{[A_{420}(\text{native}) - A_{420}(\text{succinylated})]}{A_{420}(\text{native})} \times 100$$

Circular Dichroism(CD) 측정 : 단백질의 이차구조를 측정하기 위해 spectropolarimeter(Cary model 60, OLIS Co.)를 이용했다. Cell pathlength는 1 mm, 단백질 농도는 0.01%로 하였고 모든 spectrum은 열번 scan의 평균치로 했다. 이렇게 얻어진 spectrum으로부터 Chang 등의 방법⁽¹⁰⁾에 의해 2차구조 함량을 추정했다.

Hydrodynamic radius 측정 : Hydrodynamic radius는 column chromatography에 의해 측정했다. 25 mM phosphate buffer(pH 7.5)로 평형된 Sephacryl S-300 column을 이용하여 여러 표준단백질로 검정한 후 분석하고자 하는 단백질의 용리부피를 측정함으로써 hydrody-

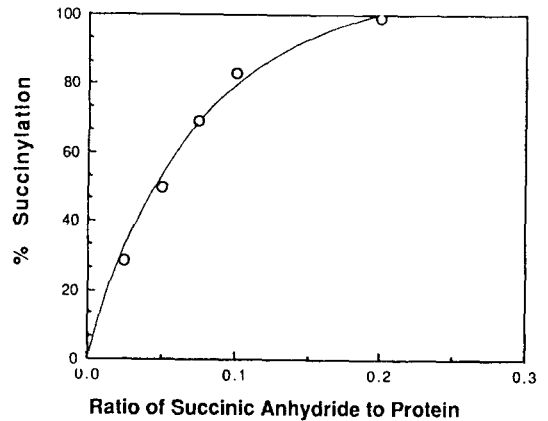


Fig. 1. Effect of the ratio of succinic anhydride to β -lactoglobulin on the extent of succinylation

amic radius를 결정했다.

결과 및 고찰

시료 제조

Refolding time에 따른 7개의 BSA structural intermediates를 만들었고 succinylation 과정에 있어 succinic anhydride/ β -Lactoglobulin 비를 변화시킴으로써 succinylation의 정도가 다른 5개의 succinylated β -Lactoglobulin 시료를 만들었다. Succinylation 정도는 succinic anhydride/ β -Lactoglobulin 비를 증가함에 따라 증가했는데 0.2 g/g succinic anhydride/ β -Lactoglobulin에서 거의 99%의 lysyl residue를 변경시킬 수 있었다(Fig. 1).

구조적 성질 규명

BSA structural intermediates : 7개의 BSA structural intermediates의 분자적 성질들을 규명하기 위하여 CD를 이용하여 2차구조를 밝혔다. 대부분의 CD spectra가 207과 221 nm에서 negative ellipticity minima를 가졌고 특히 refolding time에 따라 alpha-helix 함량을 나타내는 221 nm에서의 ellipticity 값이 점차 증가하는 것을 보였다(Fig. 2). 221 nm에서의 ellipticity value에 따르면 약 90%의 2차구조가 refolding time 3시간만에 이루어지는 것을 볼 수 있고 또한 NTSB 방법에 따라 측정된 disulfide 함량이 refolding time에 따라 증가되는 것을 볼 수 있었다(Table 1). 이것은 완전히 환원되고 변성된 BSA가 regeneration buffer에서의 refolding을 통해 여러 refolding intermediates를 갖는 것을 보여준다. 즉 아미노산 조성 및 배열, net charge 등이 모두 같으나 단지 2차, 3차 구조가 다른 단백질의 intermediates들을 만들어 그러한 구조적 차이가 어떻게 콜로이드 식품에 있어 단백질 안정성에 영향끼치는 가를 보고자 한 것이다. Refolding time이 길어질수록 점점 native structure를 갖

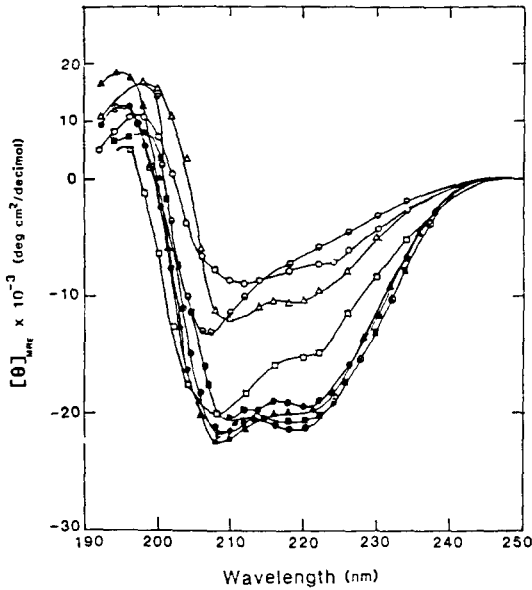


Fig. 2. Circular dichroic spectra of BSA intermediates. Spectra were obtained in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). The path-length was 1 mm and the protein concentration was 0.001 to 0.01%
Intermediates: ○; 1, △; 2, ●; 3, □; 4, ●; 5, ▲; 6, ■; 7, ⊕; native BSA

계되는 뚜렷한 경향을 CD data는 보여주고 있고 이황화물 결합 수 또한 비례하여 증가함을 나타내고 있다. 그리하여 refolding time 24h 후에는 거의 native BSA의 이황화물 결합 수에 접근하고 있는 것을 보여주고 있다.

β-Lactoglobulin : 순 전하 변화 효과 : 단백질구조의 안정성을 이루는 한 요인으로서 정전기적 상호작용이 어떻게 그리고 얼마나 영향 미치는가를 살펴보기 위하여 대표적으로 잘 알려진 β-lactoglobulin을 이용하여 단지 순 전하만을 변경시킴으로써 달라진 정전기적 환경의 차이에 의하여 변화된 단백질 구조를 CD 등으로 2차구조 함량분석, hydrodynamic radius 측정 등을 통해 조사했다.

β-Lactoglobulin의 succinylation이 5개의 다른 succinic anhydride/β-lactoglobulin 비에 의해 이루어졌고 그 비율이 증가함에 따라 succinylation 정도가 커졌다. β-Lactoglobulin의 1차구조로부터 그리고 succinylation에 의해 lysyl residues만이 변경된다고 가정할 때 여러 정도의 succinylated β-lactoglobulin의 순 음전하는 Table 2에서 나타낸 바와 같이 succinylation 정도가 증가함에 따라 증가하였다.

Native와 succinylated β-lactoglobulin의 far-UV CD spectra를 Fig. 3에 나타냈다. Native 단백질의 CD spectrum은 208~215 nm에서 넓은 negative peak를 보여주고 또한 194 nm에서의 intense positive peak를 갖는 것으로 주로 β-sheet 구조로 이루어져 있다고 볼 수 있다. Succinylation은 negative maximum이 작은 파장으로 이동되

Table 1. Structural properties of BSA intermediates

| Refolding time (h) | %[θ] ₂₂₁ recovery | Number of S-S bonds regained |
|--------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0 | 36 | 0 |
| 0.5 | 49 | 7 |
| 1.0 | 29 | 9 |
| 2.0 | 72 | 13 |
| 3.0 | 90 | 13 |
| 6.0 | 95 | 14 |
| 24.0 | 96 | 15 |
| Native | 100 | 17 |

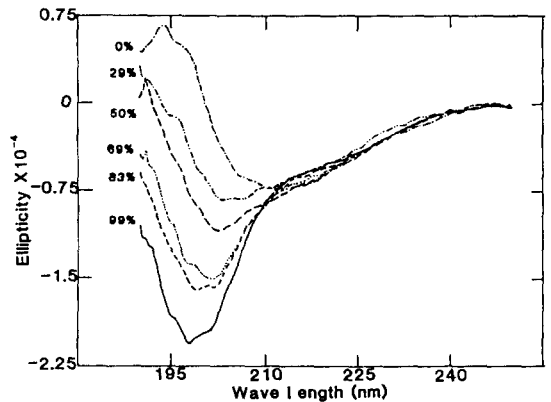


Fig. 3. Circular dichroic spectra of succinylated β-lactoglobulin

Key: ---; native, - - -; 29% succinylated, ····; 50% succinylated, - · - ·; 69% succinylated, - - - -; 83% succinylated, — · — ·; 99% succinylated

ge 했고, 99% succinylated β-lactoglobulin은 198 nm에서 negative maximum을 가졌다. Native β-lactoglobulin에 대한 2차구조 추정은 14% α-helix, 57% β-pleated sheet, 5% β-turns, 24% aperiodic structure를 나타냈다. 이러한 추정치는 아미노산 배열로부터 유추된 수치와 그리고 최근 X선 결정 결과⁽¹¹⁾와 일치한다. Table 2는 succinylation이 α-helix와 β-pleated sheet 함량을 감소시킴과 동시에 aperiodic structure 함량을 증가시키는 것을 보여준다.

여러 succinylation 정도에 따른 β-lactoglobulin의 hydrodynamic radius의 변화를 Table 2에 보였고 aperiodic structure 함량과의 상관관계는 Fig. 4에 나타냈다. β-Lactoglobulin에서의 aperiodic structure가 succinylation 정도의 증가에 정비례하여 증가함에 반하여 hydrodynamic radius 경우에는 50%에서 69%로 증가할 때 거의 2배가 증가하는 것을 보여주고 있다. 이것은 compact native structure에서 expanded structure로의 전이가 약 60%의 succinylation에서 일어나는 것을 시사한다.

이와 같은 결과는 명백히 succinylation이 단백질의 순

Table 2. Conformational characteristics of succinylated β -lactoglobulin

| Succinylation (%) | Radius (nm) | Net charge | α -helix | β -sheet (%) | β -turns | aperiodic |
|-------------------|-------------|------------|-----------------|--------------------|----------------|-----------|
| 0 | 1.63 | -8 | 14 | 57 | 5 | 24 |
| 29 | 1.71 | -16 | 5 | 59 | 1 | 35 |
| 50 | 1.81 | -22 | 5 | 46 | 4 | 45 |
| 69 | 3.27 | -28 | 3 | 30 | 12 | 55 |
| 83 | 3.90 | -32 | 3 | 20 | 17 | 60 |
| 99 | 3.90 | -38 | 0 | 11 | 20 | 69 |

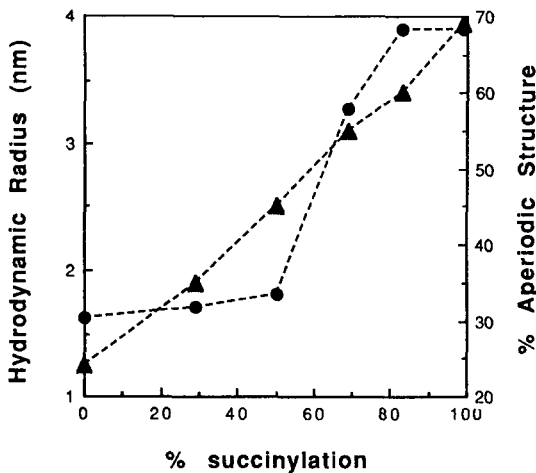


Fig. 4. Effect of succinylation on hydrodynamic radius and % aperiodic structure of β -lactoglobulin

Key: ●; hydrodynamic radius, ▲; % aperiodic structure

음전하를 증가시킬 뿐만 아니라 단백질의 구조적 안정성에 기여하는 정전기적 상호작용에 영향을 미쳐 그 결과로서 많은 구조적 변화를 야기한다고 볼 수 있다.

β -Casein : chaotropic salt 효과 : chaotropic salt 조건에서 대부분 aperiodic 구조를 갖는 β -casein이 어떠한 구조적 변화를 갖는가를 살펴보기 위하여 여러 sodium perchlorate 농도에서 β -casein의 CD spectra를 측정했다. 인산완충용액에서의 β -casein의 spectrum은 shoulder없이 198 nm에서 trough를 나타냈는데 이는 이 단백질의 대부분이 aperiodic structure를 갖는 것을 시사한다(Fig. 5). Sodium perchlorate의 첨가는 198 nm에서의 ellipticity value를 감소시키고 동시에 215~230 nm에서의 증가를 나타냈는데 이는 aperiodic structure가 보다 ordered structure로 변경된 것을 보여주며 특히 4 M perchlorate에서는 221 nm에서의 명백한 shoulder를 보여준다. 이와 같은 perchlorate 첨가에 의한 구조적 변화는 Table 3에서의 2차구조 추정에서 나타났듯이 1 M까지는 β -sheet 함량이 15%에서 35%로 증가했으며 그 이상에서는 β -sheet- α -helix 전이가 일어나는 것을 보여준다.

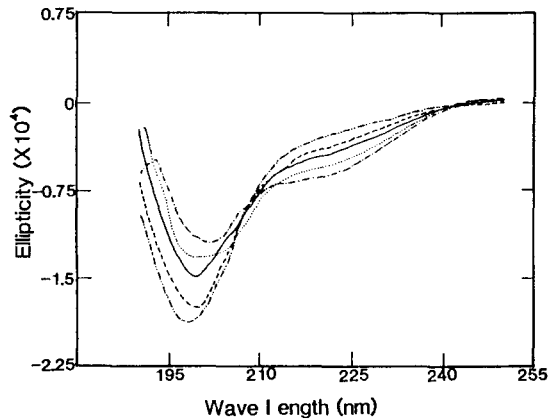


Fig. 5. Circular dichroic spectra of β -casein in the presence of various sodium perchlorate solutions

Key: ----; 0 M, ---; 0.5 M, —; 1 M,; 2 M, -.-; 4 M

Table 3. Analysis of secondary structure content for β -casein in various sodium perchlorate concentration

| NaClO ₄ (M) | α -helix | β -sheet (%) | β -turns | aperiodic |
|------------------------|-----------------|--------------------|----------------|-----------|
| 0 | 0 | 15 | 20 | 65 |
| 0.5 | 0 | 25 | 15 | 60 |
| 1.0 | 0 | 35 | 10 | 55 |
| 2.0 | 5 | 25 | 15 | 55 |
| 4.0 | 10 | 15 | 20 | 55 |

β -Casein은 높이 하전된 N-말단과 소수성 C-말단으로 이루어져 있는데⁽¹²⁾ Val, Leu 등 bulky side chain이 있는 아미노산을 많이 함유하고 있어 적절한 열역학적 조건 하에서 β -sheet structure를 이룰 수가 있다. Perchlorate 존재하에서 β -casein이 35%까지의 β -sheet structure를 갖는다는 사실은 chaotropic salt인 perchlorate에 의해 단백질 분자 주위의 물 분자간의 또는 물분자와 단백질 분자간의 수소결합 정도를 변화시켜 β -sheet 구조를 촉진시키는 조건을 만들어 준다고 생각할 수 있다. 이와 같은 2차구조 변화는 여러 용매나 detergent에 의한 구조변화의 예에서도 찾아볼 수 있다. 예를 들면 κ -casein의 구조에 미치는 alcohol의 영향이나 SDS에 의한 α -helix

구조의 형성이 그것이다^(13,14). 그러나 그러한 조건하에서 일어나는 구조변화에 관한 기작은 충분히 이해되지 않고 있다. 하지만 본 연구에서, perchlorate에 의해 유도된 ordered 2차구조는 intramolecular non-bonded side chain interaction에 의해 형성된 것으로 여겨지며 이것은 단백질의 구조적 안정성에 소수성 상호작용이 매우 큰 비중을 차지하는 것을 시사한다.

요 약

콜로이드 식품에서의 단백질의 구조적 안정성을 연구하기 위하여 7개의 BSA structural intermediates, succinylated β -lactoglobulin을 만든 후 CD, 이황화물 결합량, hydrodynamic radius 등을 측정하여 그 구조적 특성을 규명했다. Refolding time이 길수록 BSA intermediates들은 native BSA 구조에 근접하는 것을 나타냈고 succinylation은 β -lactoglobulin의 순 음전하를 변화시켜 보다 aperiodic structure를 갖게하였다. Perchlorate 존재하 β -casein의 구조는 소수성 상호작용에 크게 영향받는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1992년도 한국학술진흥재단의 자유공모과제 연구비에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Cante, C.J., Franzen, R.W. and Saleev, F.Z.: Proteins as emulsifiers. *J. AOCS*, **56**, 71(1979)
2. Kato, A. and Nakai, S.: Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **624**, 13(1980)
3. Barbeau, W.E. and Kinsella, J.E.: Physical behavior

- and functional property. *Colloids and Surfaces*, **17**, 167 (1986)
4. Damodaran, S.: Kinetics of formation of hydrophobic regions during refolding of BSA. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **27**, 598(1986)
5. Johanson, K.O., Wetlaufer, D.B., Reed, R.G. and Peters, T.: Refolding of BSA and its proteolytic fragments. *J. Biol. Chem.*, **256**, 445(1981)
6. Creighton, T.E.: Kinetics of refolding of reduced ribonuclease. *J. Mol. Biol.*, **113**, 329(1977)
7. Franzen, K.L., Kinsella, J.E.: Functional properties of succinylated and acetylated soy proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 788(1979)
8. Thannhauser, T.W., Konishi, Y. and Scheraga, H.A.: Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Anal. Biochem.*, **138**, 181 (1978)
9. Fields, R.: Rapid determination of amino groups with TNBS. In *Methods in Enzymology*, Hirs, C.H.W. and Timascheff, W.(ed), Academic Press, New York, Vol. **25**, p.464(1972)
10. Chang, C.T., Wu, C.C. and Yang, J.T.: Circular dichroic analysis of protein conformation. *Anal. Biochem.*, **91**, 13(1978)
11. Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Silvaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E., Kraulis, P.J.: The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, **324**, 383(1986)
12. Swaisgood, H.E.: Chemistry of milk proteins. In *Developments in Dairy Chemistry*, Fox, P.F.(ed), Applied Science, New York, p.1(1982)
13. Griffin, M.C.A., Price, J.C. and Martin, S.R.: Effect of alcohols on the structure of caseins. *Int. J. Biol. Macromol.*, **8**, 367(1986)
14. Jirgensons, B.: Circular dichroism study on reconstructive denaturation of proteins by sodium dodecyl sulfate in neutral and acid solutions. *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **2**, 213(1981)

(1993년 4월 1일 접수)