

Neutrase에 의한 glutamine과 asparagine 잔기의 탈아미드화

김효선 · 강영주

제주대학교 식품공학과

Deamidation on Glutamyl and Asparagyl Residues of Protein by Neutrase

Hyo Sun Kim and Yeung Joo Kang

Dept. of Food Science and Technology, Cheju National University, Cheju

Abstract

Deamidation by neutrase on glutamyl and asparagyl residues of protein was examined. The optimum pH and temperature for BSA(bovine serum albumin) deamidation by neutrase were 10 and 20°C, respectively. The incubation for 3 hrs under the optimum condition removed 24% of amide groups and hydrolyzed 2.9% of peptide bonds. Deamidation by neutrase was superior to that by pronase, bromelain, or ficin. Deamidation degrees of egg albumin, soy protein isolate and casein by neutrase under the optimum condition were about 20%, 14% and 14%, respectively. However, relatively high degree of peptide hydrolysis was accompanied with casein deamidation.

Key words: enzymatic deamidation, neutrase, BSA

서 론

식품단백질들은 탈아미드화(deamidation)에 의하여 산성기로 전환될 수 있는 많은 수의 glutamine과 asparagine을 함유하고 있다. 이 두 가지 아미노산의 측쇄 결합되어 있는 아미드기(amide group)는 단백질의 구조를 안정시키는데 매우 중요한 역할을 한다. 그러나 이 아미드기는 쉽게 가수분해되어 탈아미드화 된다. Glutamine과 asparagine의 아미드기가 가수분해되어 제거됨으로써 glutamic acid와 aspartic acid로 전환되는 탈아미드화는 단백질 분자표면의 음전하(negative charge)를 증가시킬 뿐만 아니라⁽¹⁾, 단백질 원래의 고분자 형태를 그대로 유지시키면서 약 2~6% 정도의 탈아미드화만으로도 기능성의 변화를 일으키는 변형 방법^(2,3)으로 알려져 있다. 이러한 탈아미드화 방법으로는 산⁽⁴⁻⁷⁾ 또는 알칼리⁽⁸⁾, 열⁽⁹⁾ 등에 의한 화학적 방법과 효소에 의한 효소적 방법⁽¹⁰⁻¹⁷⁾이 있다. 화학적 방법에 의한 탈아미드화 중 가장 많이 이용되는 산에 의한 탈아미드화는 0.5 N 이상의 높은 농도의 강산과 100°C 이상의 높은 온도에서 다소 격렬한 조건하에서 행하기 때문에 종종 펩티드 결합의 분해로 인하여 쓴맛을 생성되거나 풍미가 나빠지는 바람직하지 못한 결과를 초래하기도 한다⁽¹⁸⁾. 산가수분해로 인한 과도한 반응을 막기 위하여 여러 가지 촉매제들을 이용한 연구들^(18,19)을 행하였으나 화학적 방

법보다는 효소적 접근방법이 반응시간이 빠르고, 좀 더 온화한 조건에서 수행되기 때문에 단백질 잔기의 아미드결합 가수분해 이외의 펩티드 결합의 가수분해(proteolysis)와 같은 원하지 않는 부반응들을 제어하는데 더 효과적이어서 최근 효소에 의한 탈아미드화에 관한 연구가 관심을 끌고 있다. 효소에 의한 탈아미드화는 Kikuchi 등^(20,21)이 토양미생물인 *Bacillus circulans*에서 효소 peptidoglutaminase를 분리해 낸 이후 이 효소에 의한 탈아미드화가 식품학적으로 연구되기 시작하였다. 그러나 peptidoglutaminase에 의한 탈아미드화는 기질에 따라 극히 제한적인 활성을 나타낼 뿐만 아니라⁽¹¹⁾ 생단백질(intact protein)에는 거의 활성을 보이지 않고⁽¹²⁾, 열처리, 가수분해, 알칼리 처리 등에 의하여 단백질의 구조를 효소의 작용이 쉽도록 변형시킨 후 탈아미드화하여야^(3,14) 하는 문제점을 가지고 있다. 한편 Kato 등⁽¹⁵⁻¹⁷⁾은 알칼리성 pH에서의 단백질 가수분해효소에 의한 탈아미드화에 관한 보고에서 단백질 가수분해효소는 보통 중성 부근에서 peptide를 가수분해하나 알칼리성에서는 glutamyl과 asparagyl 잔기의 아미드 결합만을 선택적으로 가수분해하는 단백질 탈아미드화가 일어났다고 보고함으로써 탈아미드화가 특정효소에 의하여서가 아니라 반응조건만 조절하여 주변 가수분해효소에 의하여서도 일어난다는 것이 알려지게 되었다. 만약 효소에 의한 탈아미드화가 상업적으로 대량생산되고 있는 모든 단백질 가수분해효소들에 의하여 일어난다면 식품가공 산업계에 매우 중요한 일이 될 것임에도 불구하고 이에 관한 연구는 극히 소수의 연구자에 의하여서 몇몇의 효소(pain, pronase E, trypsin, chymotrypsin)와 기질(ovalbu-

Corresponding author: Yeung Joo Kang, Department of Food Science and Technology, Cheju National University, Ara 1 Dong, Cheju 690-756, Korea

min, casein, globulin)에 대하여서만 이루어져 있는 실정이다.

단백질 가수분해효소에 의한 탈아미드화는 가능한 한 펩티드 결합의 분해는 억제하면서 일어나야만 유용하다. 따라서 본 연구는 다른 연구자에 의하여 아직 검토되지 않았으며 비교적 쉽게 구입가능한 단백질 가수분해 효소 중 Neutrase에 의한 1) BSA의 탈아미드화 최적 반응 조건을 알아보고, 2) 이 최적 조건에서의 pronase, bromelain, ficin에 의한 탈아미드화율을 neutrase와 비교하여 보며, 3) 어떤 기질들이 neutrase에 의하여 어느 정도 탈아미드화 되며 동시에 어느 정도 펩티드 결합의 분해를 일으키는지를 알아보기 위하여 BSA 이외에 egg albumin, 분리콩단백, casein의 neutrase에 의한 탈아미드화율을 조사하여 가장 우수한 탈아미드화 기질을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

기질로는 BSA(Sigma, A 4503, USA), egg albumin (Hayashi, Ltd., Japan), 분리콩단백(ADM, England), casein(Sigma, U.S.A)을 사용하였으며 효소는 neutrase (Novo, 1.5AU/g, Denmark)와 ficin(Sigma, 1.3 units/mg solid, USA), bromelain(Sigma, 1.87 units/mg solid, USA), pronase(Calbiochem, CA, USA) 등을 사용하였다.

탈아미드화

단백질 가수분해 효소에 의한 glutamine과 asparagine 잔기의 탈아미드화는 Kato 등⁽¹⁵⁾의 방법에 따라 행하였으며, 암모니아 제거는 투석 대신에 한외여과기(Pellicon Lab. Casser System, Japan Millipore)에 한외여과막(30k dalton cut-off, polysulfone)을 장치하여 사용하였다.

탈아미드화율 측정

10 ml 유리 ample에 동결건조한 탈아미드된 시료 50 mg과 3 N HCl 5 ml를 넣고 밀봉한 후 100°C 수욕상에서 3시간 동안 가열하여 완전히 탈아미드화하였다. 이때 생성된 암모니아 양은 Wilcox의 미량확산방법⁽²²⁾에 의하여 측정하였으며 단백질의 glutamine과 asparagine 잔기의 탈아미드화율은 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Deamidation}(\%) = \frac{N - D}{N} \times 100$$

N; 변형되지 않은 단백질의 1/200 N H₂SO₄ 적정치
D; 탈아미드화 된 단백질의 1/200 N H₂SO₄ 적정치

가수분해도(proteolysis) 측정

시험관에 1% 시료용액 2 ml와 20% TCA(trichloroac-

etic acid) 2 ml를 첨가하여 혼합한 후 12,000×g로 20분간 원심분리한 다음 상정액의 단백질량을 micro-biuret 방법⁽²³⁾으로 측정하여 다음과 같이 가수분해도를 측정하였다.

$$\text{Proteolysis } \% = \frac{10\% \text{ TCA-soluble N}}{\text{total N}} \times 100$$

결과 및 고찰

시판되고 있는 단백질 가수분해효소 중 neutrase를 선정하여 이 효소에 의한 glutamine과 asparagine 잔기의 탈아미드화 최적 반응 조건을 알아보고자 BSA를 기질로 하여 탈아미드화 최적 시간 및 pH, 온도 등을 검토하여 보았다.

탈아미드화 최적 시간을 알아보기 위하여 이미 Kato 등⁽¹⁵⁾이 protease(papain, trypsin, chymotrypsin, pronase)에 의한 탈아미드화의 최적 조건이라고 설정한 pH 10, 20°C에서 0.5~24시간 동안 BSA에 neutrase를 반응시켜 이 효소에 의한 탈아미드화와 가수분해도를 알아보았다 (Fig. 1). pH 10.0, 20°C에서 neutrase에 의한 탈아미드화는 반응 0.5시간 후 약 5% 일어났으며 반응시간이 길어짐에 따라 약간씩 증가하여 반응 2시간 후에는 약 22%, 3시간 반응 후에는 약 24%로 나타났으며, 3시간 이후에는 평형을 나타냈다. Kato 등⁽¹⁵⁾은 이 조건에서 papain에 의한 ovalbumin의 탈아미드화는 2시간 반응 이후 평형에 도달하여서 약 21%의 탈아미드화가 일어났다고 보고함으로써 최적 반응 시간이 본 실험에 의한 최적 반응 시간인 3시간보다 좀 짧은 것으로 보고하고 있다.

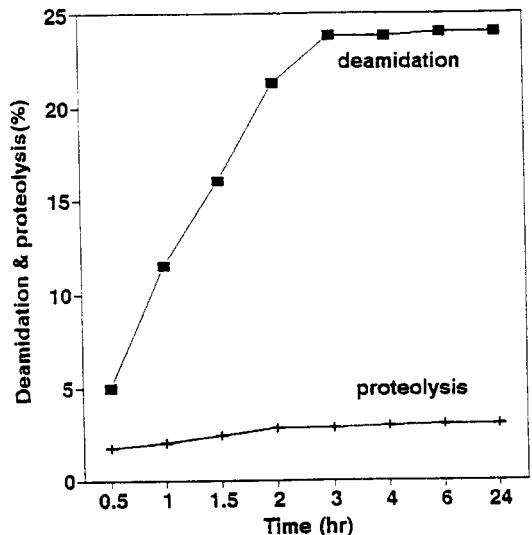


Fig. 1. Time courses of deamidation and proteolysis in BSA neutrase treatment at pH 10.0 and 20°C

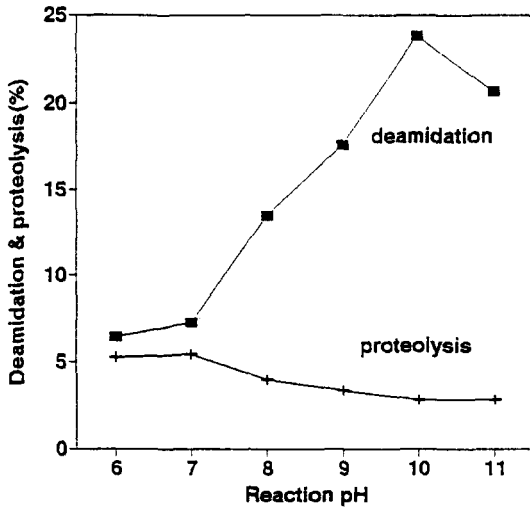


Fig. 2. Effect of pH on deamidation and proteolysis in BSA by neutrase treatment at 20°C for 3 hrs

이는 기질과 효소와의 반응 속도가 기질과 효소마다 차이가 있기 때문이라고 생각한다. 가수분해도는 시간이 경과함에 따라 약간씩 증가하기는 하였으나 3% 미만으로 매우 적게 나타나 펩티드 결합의 가수분해로 인한 쓴맛 생성을 억제하기에 충분한 것으로 생각한다. Kato 등⁽¹⁵⁾은 ovalbumin을 기질로 사용하였을 때 pH 10.0, 20°C에서의 papain에 의한 가수분해도는 약 3%, chymotrypsin인 경우는 약 8%, pronase인 경우는 약 8% 정도였다고 보고하고 있는데 탈아미드화 최적조건에서의 가수분해도는 효소에 따라 약간씩 차이가 있는 것으로 생각한다.

알칼리성 pH에서의 효소적 탈아미드화에 대한 연구 보고⁽¹⁵⁾에 의하면 papain과 pronase, trypsin, chymotrypsin의 탈아미드화 최적 pH는 pH 10이었을 때라고 보고하였는데, 이 실험 효소들은 모두 최적 단백질 가수분해 pH가 7.5~8 근처^(24,25)인 효소여서 혹시 효소가 가지는 최적 단백질 가수분해 조건이 탈아미드화 최적 반응 조건에 영향을 미치지도 못할 가능성을 배제할 수 없어서 본 연구에서는 최적 단백질 가수분해 pH가 이 효소들과는 다른, 단백질 가수분해 최적 pH가 5.5~6 근처인 neutrase를 선정하여 20°C에서 3시간 반응 후 BSA의 pH별 탈아미드화율과 가수분해도를 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다. pH 6~11에서 20°C, 3시간 반응 후의 Neutrase에 의한 BSA 탈아미드화는 pH가 증가함에 따라 점차 증가하여 반응 pH가 10.0일 때의 탈아미드화율이 약 24%로 가장 높게 나타났으며 이보다 높은 pH에서는 약 20% 정도로 좀 낮아졌다. 이는 papain 및 chymotrypsin, pronase에 의한 ovalbumin의 탈아미드화 최적 pH가 10.0이었다고 보고한 결과⁽¹⁵⁾와 일치함으로써 단백질 가수분해효소의 최적 가수분해 pH가 탈아미드화 최적 pH에는 영향을 미치지 않으며, 효소에 관계없이 알칼

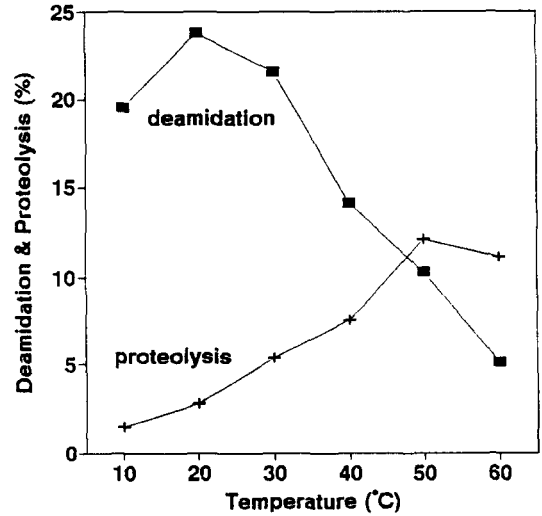


Fig. 3. Effect of temperature on deamidation and proteolysis in BSA by neutrase treatment at pH 10.0 for 3 hrs

리성 pH에서 단백질 가수분해 효소들이 탈아미드화를 일으키는 것으로 나타났다. 그러나 Shih⁽²⁾은 인산염 완충액에서 pronase E, Prozyme 6, Protease 2A에 의한 대두단백질의 탈아미드화 결과 pH 7에서가 pH 10에서 보다 더 높게 일어났다고 보고하고 있으나, Hamada⁽¹⁴⁾에 의하면 이는 효소에 의한 탈아미드화보다는 완충액 중의 음이온의 작용에 의한 화학적 탈아미드화가 일어났기 때문이라고 보고하고 있는데, bicarbonate, phosphate와 같은 몇몇 종류의 음이온은 탈아미드화를 촉진한다⁽²⁾고 알려져 있다. 가수분해도 또한 실험한 모든 pH에서 5% 이하로 모두 낮았으며 탈아미드화가 가장 높게 나타난 pH 10과 11에서는 3% 이하로 매우 낮게 관찰됨으로써 neutrase에 의한 탈아미드화 최적 pH는 pH 10이 적당한 것으로 나타났다.

pH 10.0에서 3시간 반응 후의 BSA 탈아미드화에 대한 온도의 영향을 알아본 결과를 Fig. 3에 나타내었다. BSA의 탈아미드화는 10°C에서 약 19%, 20°C에서 약 24%로 관찰되었으며, 30°C 이상에서는 반응온도가 올라감에 따라 탈아미드화율은 점차 감소하였다. 단백질 가수분해도는 온도의 증가와 함께 증가하여 50°C에서 약 12.5%로 가장 높게 나타났으며 탈아미드화율이 가장 높게 나타난 20°C에서는 약 3%로 매우 낮게 관찰되어 neutrase에 의한 BSA의 탈아미드화 최적온도는 20°C인 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 보면 neutrase에 의한 BSA 탈아미드화 최적 반응 조건은 pH 10.0, 20°C, 3시간이며, 효소의 단백질 가수분해 최적 pH가 탈아미드화 최적조건에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Kato 등⁽¹⁵⁾은 알칼리성 pH에서 papain에 의한 여러

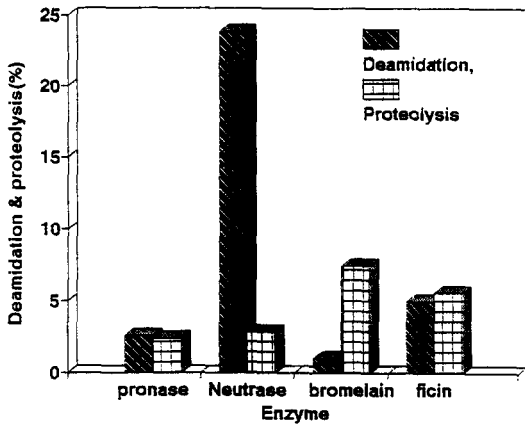


Fig. 4. Deamidation and proteolysis in BSA by various protease treatment at 10.0 and 20°C for 3 hrs

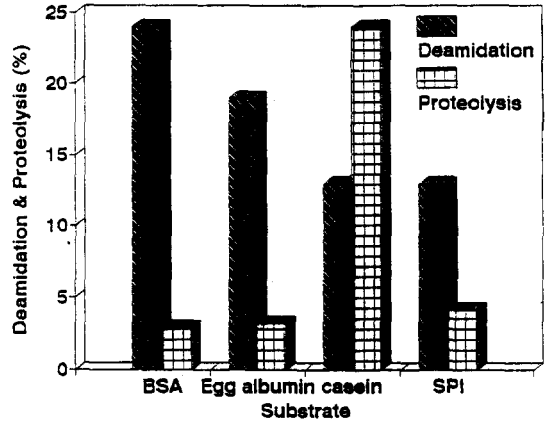


Fig. 5. Deamidation and proteolysis of various substrate by neutrase treatment at pH 10.0 and 20°C for 3 hrs

가지 단백질(ovalbumin, lysozyme, 7S globulin, 11S globulin)들의 탈아미드화율이 약 19~24%였으며 이때의 가수분해도는 0~8% 정도였다고 보고하였으며, 기질로 ovalbumin을 사용하여 chymotrypsin과 pronase E 처리하였을 경우 약 23%의 탈아미드화와 8% 이하의 가수분해가 일어났으나 trypsin 처리를 한 결과 탈아미드화가 거의 일어나지 않았다고 보고하여, 모든 단백질효소가 모든 기질에 대하여 탈아미드화를 일으키는 것은 아닌 것으로 여겨졌다. 따라서 어떤 효소와 기질이 가장 우수한 탈아미드화를 일으키는지를 알아보기 위하여 위의 결과에서 얻어진 최적 탈아미드화 조건(pH 10.0, 20°C, 3시간)에서 기질로 BSA를 사용하여 여러 가지 protease(pronase, neutrase, bromelain, ficin)에 의한 탈아미드화율 및 가수분해도를 알아보았다.

BSA에 대한 여러 단백질 분해효소들(pronase, neutrase, bromelain, ficin)의 탈아미드화율 및 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 이 결과에 의하면 pronase, bromelain, ficin은 각각 3.5%, 2.2%, 6.1%로 매우 낮은 탈아미드반응 활성을 보였으나 neutrase에 의한 BSA의 탈아미드화는 약 24%로 매우 높게 나타났으며 이때의 가수분해도도 약 3% 정도로 매우 적게 일어나 BSA에 대한 탈아미드화는 neutrase가 가장 우수한 것으로 관찰되었다.

한편 ovalbumin을 기질로 하여 pronase E에 의한 탈아미드화율과 가수분해도를 조사한 연구결과¹⁵⁾ 보고에 의하면 탈아미드화는 약 20%, 가수분해도는 약 8% 정도로 탈아미드화율은 높았으나 이 때 동반하여 일어난 가수분해도가 비교적 높았다고 하고 있으나 본 연구 결과는 pronase에 의한 BSA의 탈아미드화율과 가수분해도가 매우 적게 나타남으로써 탈아미드 반응은 기질특이성이 높은 것으로 여겨진다. 따라서 neutrase가 어떤 기질에서 가장 우수한 탈아미드 반응 활성을 가지는지를

알아보기 위하여 BSA 이외에 egg albumin과 분리콩단백 및 casein을 기질로 하여 앞에서 조사한 최적 탈아미드화 조건에서 탈아미드 반응을 일으켜 보았다(Fig. 5). BSA는 24%의 탈아미드화와 3.8%의 가수분해를 egg albumin인 경우는 19.8%의 탈아미드화와 약 3%의 가수분해를 일으킴으로써 Neutrase에 의한 egg albumin과 BSA의 탈아미드화율은 매우 우수한 것으로 나타났다. 기질로 casein을 사용하였을 때 neutrase에 의한 탈아미드화율은 13.95%인데 비하여 이 때 수반하여 일어난 가수분해도는 약 24%로 매우 높게 관찰되었다. 이와 같은 결과는 Kato 등¹⁵⁾이 기질로 casein을 사용하여 papain에 의한 탈아미드화율을 관찰하였을 때와 그 결과가 일치하고 있는데 그에 의하면 papain에 의한 casein의 탈아미드화는 35.0%로 매우 높게 나타났으나 이 때 동반하여 일어난 단백질 가수분해 또한 47.0%로 매우 높게 나타났다고 보고함으로써 casein은 탈아미드 반응 기질로는 부적당한 것으로 여겨졌다. 이상의 결과 작용 기질 및 효소에 따라 탈아미드화 및 가수분해도 차이가 큰 것으로 나타나 탈아미드 반응은 큰 기질 특이성을 가지는 반응으로 보여진다. 또한 분리콩단백은 13.82%의 탈아미드화가 일어나서 BSA나 egg albumin에 비하여 좀 낮게 나타나기는 하였으나 이 정도의 탈아미드화만으로도 대두단백질의 단점인 낮은 용해도 문제를 해결할 수 있을 것으로 여겨짐으로써 탈아미드화 효소로 neutrase가 비교적 기질특이성이 적은 것으로 나타났다.

이렇게 탈아미드 반응은 뚜렷한 조건 의존성을 나타내며, 또한 제한된 기질과 효소에서만 반응이 일어나는 것으로 나타났다. 또한 단백질 가수분해효소 중에는 neutrase가 비교적 다양한 기질에서 모두 좋은 탈아미드 반응 활성을 보였으므로 좀 더 많은 기질들에 대한 활성과 변형 후의 기능성 변화 등에 관한 실험이 계속되

어저야 할 것으로 생각한다.

요 약

식품단백질의 효율적인 이용을 위하여 neutrase에 의한 glutamine과 asparagine 잔기의 탈아미드화에 관한 연구를 행하였다. Neutrase에 의한 BSA의 최적반응 조건은 20°C, pH 10에서 3시간 반응시켰을 때로, 이때 BSA는 24%가 탈아미드화되었고, 동시에 2.9%가 가수분해되었다. 또한 pronase, bromelain, ficin 보다는 neutrase에 의한 BSA의 탈아미드화율이 높은 것으로 나타났다. 최적 탈아미드화 조건에서 neutrase에 의한 egg albumin, 분리콩단백 및 casein의 탈아미드화율은 각각 20%, 14%, 그리고 14%였으나, casein의 경우 탈아미드화에 수반하여 펩티드결합의 분해가 비교적 높게 관찰되었다.

문 헌

- Matsudomi, N., Kato, A. and Kobayashi, K.: Conformation and surface properties of deamidated gluten. *Agric. Bio. Chem.*, **46**, 1583 (1982)
- Shih, F.F.: Effect of anions on the deamidation of soy protein. *J. Food Sci.*, **56**, 452 (1991)
- Hamada, J.S. and Marshall, W.E.: Preparation and functional properties of enzymatically deamidated soy protein. *J. Food Sci.*, **54**, 598 (1989)
- Matsudomi, N., Sasaki, T., Kato, A. and Kobayashi, K.: Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein. *Agric Biol. Chem.*, **49**, 1251 (1985)
- Ma, C., Oomab, B.D. and Holme, J.: Effect of deamidation and succinylation on some physicochemical and baking properties of gluten. *J. Food Sci.*, **51**, 99 (1986)
- Ma, C. and Khazada, G.: Functional properties of deamidated oat protein isolates. *J. Food Sci.*, **52**, 1583 (1987)
- Finley, J.W.: Deamidated gluten: A potential fortifier for fruit juices. *J. Food Sci.*, **40**, 1283 (1975)
- Masters, P.M. and Fridman, M.: Amino acid racemization in alkali-treated food proteins-chemistry, toxicology and nutritional consequences. In *Chemical Deterioration of Proteins*. ACS symposium series 123. Washington, D.C. p.165 (1980)
- Ahern, T.J. and Klivanov, A.M.: The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. *Science*, **228**, 1280 (1985)
- Gill, B.P., O'Shaughnessey, A.J., Henderson, P. and Headon, D.R.: An assesment of potential of peptidoglutaminase I and II in modifying the charge characteristics of casein and whey proteins. *Irish J. Food Sci. Technol.*, **9**, 33 (1985)
- Hamada, J.S., Shih, F.F. Frank, W. and Marshall, W.E.: Damidation of soy peptides and proteins by *Bacillus circulans* peptidoglutaminase. *J. Food Sci.*, **53**, 671 (1988)
- Hamada, J.S.: Ultrafiltration for recovery and reuse of peptidoglutaminase in protein deamidation. *J. Food Sci.*, **56**, 1731 (1991)
- Hamada, J.S.: Membrane reactor for enzymic deamidation of food protein. *J. Food Sci.*, **56**, 1725 (1991)
- Hamada, J.S.: Effect of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using peptidoglutaminases. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 719 (1992)
- Kato, A., Tanaka, A., Matsudomi, N. and Kobayashi, K.: Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 224 (1987)
- Kato, A., Tanaka, A., Lee, Y., Matsudomi, N. and Kobayashi, N.: Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 285 (1987)
- Kato, A., Lee, Y. and Kobayashi, K.: Deamidation and functional properties of food proteins by the treatment with immobilized chymotrypsin at alkaline pH. *J. Food Sci.*, **54**, 1345 (1989)
- Shih, F.F. and Kalmar, A.: SDS-catalyzed deamidation of oilseed proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 672 (1987)
- Shih, F.F.: Deamidation of protein in a soy extract by ion exchange resin catalysis. *J. Food Sci.*, **52**, 1529.
- Kikuchi, M., Hayashida, H., Nakano, E. and Sakaguchi, K.: Peptidoglutaminase. Enzymes for selective deamidation of γ -amide of peptidebond glutamine. *Biochem.*, **10**, 1222 (1971)
- Kikuchi, M. and Sakaguchi, K.: Peptidoglutaminase (*Bicillus circulans*). *Methods in Enzymol.*, **45**, 485 (1976)
- Wilcox, R.E.: Determination of amide residue by chemical methods. *Meth. Enzymol.*, **11**, 63 (1967)
- Itzhaki, R.E. and Gill, D.M.: A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal Biochem.*, **9**, 401 (1964)
- 정동효 : 효소학. 선진문화사, p.157 (1987)
- 김충희, 김효선, 정용현, 강영주 : 유채단백질의 단백질소에 의한 가수분해 조건. 한국영양식량학회지, **21**, 513 (1992)

(1995년 7월 7일 접수)