

BSA, Egg Albumin, 분리대두단백질의 용해도에 미치는 Neutralse에 의한 탈아미드 효과

김효선 · 강영주[†]

제주대학교 식품공학과

Effect of Deamidation with Neutralse on the Solubility of BSA, Egg Albumin, and Soy Protein Isolate

Hyo-Sun Kim and Yeung-Joo Kang[†]

Dept. of Food Science and Technology, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

Abstract

Effect of deamidation with Neutralse on the solubility of bovin serum albumin(BSA), egg albumin(EA), soy protein isolate(SPI) was investigated. Solubility of deamidated BSA in distilled water was decreased from 98% to 83% against native BSA at pH 4~8, minimum solubility of deamidated BSA was pH 6. Solubilities of native BSA and deamidated BSA in 0.2M NaCl solution were shown 100% as compared greatly decreasing both solubilities in 1.0M NaCl at acidic pH. According to deamidation, solubility of EA in distilled water was increased below pH 4 and above pH 6, while solubility of EA in NaCl solution was decreased by deamidation at acidic pH. Solubility of SPI in distilled water was greatly increased by deamidation at overall pH, deamidation was increased solubility in NaCl solution above pH 5. there was, however, no difference on solubility by deamidation below pH 5.

Key words : deamidation, Neutralse, solubility, BSA, egg albumin, soy protein isolate

서 론

단백질의 기능성 중 용해도는 단백질을 식품소재로 이용하는데 매우 중요한 인자이다. 단백질의 용해도는 극성아미노산의 비율, 분자 크기, 단백질 구조, pH, 온도, 염 등과 같은 인자에 영향을 받는다(1). 단백질 용해도는 단백질-용매와 단백질-단백질 상호작용의 평형에 의하여 일어나는 현상(2)으로 알려져 있는데 이런 상호작용에 영향을 미치는 중요한 힘은 정전기적 결합, 수소성 결합, 수소결합이다. 분자 사이의 정전기적 반발이 단백질 표면의 수소성 상호작용 보다 훨씬 큰 조건에서는 용해도가 증가하며, 반대로 수소성 상호작용이 정전기적 반발 보다 큰 조건에서는 분자내부의 응집이 일어나 용해도가 감소한다(3). 단백질의 용해도는 단백질을 식품에 응용할 때 이들 단백질이 얼마나 잘 적용될 것인지와 열이나 화학적 처리로 인한 변성 정도

를 결정하는 지표로 유용한 역할을 한다(4). 또한 용해도는 pH와 염 농도에 크게 영향을 받는데 pH는 단백질 내부와 단백질 간의 정전기적 균형 및 전하에 영향을 미치며, NaCl은 단백질의 전하에 변화를 일으켜 용해도를 변화시킨다.

식품 단백질들은 탈아미드화(deamidation)에 의하여 산성기로 전환될 수 있는 많은 수의 glutamine과 asparagine을 함유하고 있다. 이 두가지 아미노산의 측쇄에 결합되어 있는 아미드기(amide group)는 단백질의 구조를 안정화시키는데 매우 중요한 역할을 한다. 그러나 이 아미드기는 쉽게 가수분해되어 탈아미드화 된다. 탈아미드화는 단백질 분자 표면의 음전하(negative charge)를 증가시켜(5), 단백질의 표면특성과 용해도를 개선시키며, 단백질 원래의 고분자 형태를 그대로 유지시키면서 약 2~6% 정도의 탈아미드화만으로도 기능성의 변화를 일으키는 변형방법(6,7)이다. 단백질의 탈아미드화는 화학적, 효소적 수단에 의하여 수행되는데 이중 효소적 방법에 의한 탈아미드화는 반응 후에도 단백질

[†]To whom all correspondence should be addressed

의 거대분자 구조를 그대로 유지시킬 수 있으며, 반응 속도가 빠르고, 기질특이성을 가진다. 효소에 의한 탈아미드화 중 단백질 가수분해효소에 의한 탈아미드화는 단백질의 분자구조를 거의 파괴하지 않으면서 기능성의 변화를 일으키는 방법으로 Kato 등(8)에 의하여 제안되었으나 단백질 가수분해효소에 의한 탈아미드화 후의 기능성 변화에 대한 자세한 정보는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 Neutrase에 의하여 BSA와 egg albumin, 분리대두단백질을 탈아미드화시킨 후 이들 단백질들의 용매(물, 0.2M NaCl, 1.0M NaCl)에 따른 용해도를 pH별로 조사하여 보았다.

재료 및 방법

재료

기질로는 BSA (Sigma, A 4503, USA), egg albumin (Hayashi Ltd., Japan), 분리대두단백질 (ADM, England)을 사용하였으며 효소는 Neutrase (Novo, 1.5AU/g, Denmark)를 사용하였다.

탈아미드화

단백질 가수분해 효소에 의한 glutamine과 asparagine 잔기의 탈아미드화는 Kato 등(8)의 방법에 준하여 행하였다. 0.5% 단백질용액의 pH를 1N NaOH로 pH 10.0으로 조정하고 난 후 Neutrase를 가하여(기질 : 효소 = 100 : 1) 20°C로 조정된 수욕상에서 3시간 동안 반응시킨다. 반응 후 1N HCl로 pH를 7로 조정하여 반응을 중지시키고 효소의 불활성화를 위하여 90°C에서 10분간 가열하고 냉각한 후 한외여과(공칭분자량 한계 30,000 dalton 막)에 의하여 생성된 암모니아를 제거한 후 동결건조시켰다.

탈아미드화율 측정

10ml 유리 ampule에 동결건조한 탈아미드화된 시료 50mg과 3N HCl 5ml를 넣고 밀봉한 후 100°C 수욕상에서 3시간 동안 가열하여 완전히 탈아미드화하였다. 이때 생성된 암모니아 양은 Wilcox의 미량확산방법(9)에 의하여 측정하였으며 단백질의 탈아미드화율은 다음 식에 의하여 계산하였다.

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

N : 변형되지 않은 단백질의 1/200 N H₂SO₄ 적정값

D : 탈아미드화된 단백질의 1/200 N H₂SO₄ 적정값

가수분해도의 측정

시험관에 1% 시료용액 2ml와 20% TCA (Trichloroacetic acid) 2ml를 첨가하여 혼합한 후 12,000×g로 15분 원심분리 한 다음 상등액의 단백질량을 micro-biuret 방법으로 측정하여 다음과 같이 가수분해도를 측정하였다.

$$\text{Proteolysis \%} = \frac{10\% \text{ TCA-Soluble N}}{\text{Total N}} \times 100$$

용해도

시료 단백질 1g을 100ml의 증류수 및 0.2M NaCl과 1.0M NaCl용액에 녹이고 이 용액을 1N NaOH용액으로 pH 12로 조정한 다음 2N HCl용액으로 용액의 pH를 10에서 2 까지 재조정하면서 각 pH에서 액을 5ml씩 취하여 원심분리관에 넣고 12,000×g에서 20분 원심분리하여 얻은 상등액을 micro-biuret 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

탈아미드화율

Table 1은 BSA와 egg albumin, 분리대두단백질의 Neutrase에 의한 탈아미드화율과 이때 부수적으로 일어난 단백질 가수분해 정도를 나타낸 것이다. BSA는 24.0%, egg albumin은 19.8%, 분리대두단백질은 13.8%의 탈아미드화율을 나타내었다. 분리대두단백질의 탈아미드화율이 BSA나 egg albumin에 비하여 낮게 나타나기는 하였으나 보통 탈아미드화는 2~6% 정도 만으로도 기능성의 변화를 일으키는 것(6,7)으로 알려져 있어서 분리대두단백질의 13.8% 탈아미드화율은 기능성을 변화시키기에 충분한 것으로 여겨진다.

BSA의 용해도

Fig. 1은 수용액(a)과 0.2M 및 1.0M NaCl용액(b)을 용매로 하여 탈아미드화한 BSA(D-BSA)와 천연 BSA(N-BSA)의 pH별 용해도를 나타낸 결과이다. 수용액에서는 (Fig. 1a) N-BSA는 실험한 모든 pH에서 100%의 용해도

Table 1. Deamidation and proteolysis of BSA, egg albumin (EA) and soy protein isolate (SPI) by Neutrase at 20°C, pH 10.0 for 3hrs

	BSA	EA	SPI
Deamidation	24.0	19.8	13.8
Proteolysis	3.0	3.2	3.8

를 나타냈으며, D-BSA는 pH 4~8 범위에서는 N-BSA 보다 약간 낮은 98~83% 사이의 용해도를 나타냈는데 pH 6에서 가장 낮은 83%의 용해도를 나타내었다. 용해도는 단백질-단백질과 단백질-용매의 상호작용 사이의 평형에 의하여 나타나는 현상으로 단백질-용매의 상호작용이 좋으면 용해도가 증가하며, 단백질-단백질 상호작용이 좋으면 용해도는 떨어지게 된다(2). BSA는 다른 단백질들에 비하여 크기가 작고 중성부근의 pH에서 많은 음전하를 가지기 때문에(10) 용해도가 매우 우수하여 등전점이 없는 단백질(2)이다. 그러나 탈아미드화에 의하여 BSA의 용해도가 pH 4~8 범위에서 약간 감소하였는데 이는 탈아미드화로 음전하가 과도하게 도입되어 단백질의 표면 전하가 증가(5)하였을 뿐만 아니라 표면소수성이 증가(5,11)되므로서 BSA 표면의 소수성기에 대한 극성기의 비율이 감소되어 단백질 상호간의 결합이 증가되므로써(12) 궁극적으로 용해도가 저하된 것으로 여겨진다. 용매가 NaCl 용액(Fig. 1b)인 경우의 용해도는 물을 용매로 하였을 때와는 매우 다른 양상을 보이고 있는데 수용액에서의 D-BSA는 pH 4~8 범위에서 98~83%의 용해도를 나타냈으나 0.2M NaCl 용액을 용매로 하였을 때는 N-BSA와 D-BSA 모두 pH 2

~10에서 100%의 용해도를 나타내었다. 이렇게 D-BSA가 낮은 염농도(0.2M NaCl)에서 수용액에서 보다 용해도가 증가한 것은 탈아미드화로 과도하게 도입된 전하를 Na^+ 이 중화하였기 때문으로 생각된다. 또한 1.0M NaCl 용액을 용매로 하였을 때의 pH별 용해도의 양상은 N-BSA와 D-BSA 모두 똑같이 pH 5 이하에서 용해도가 크게 감소하였으며 pH 3에서 N-BSA는 약 30%, D-BSA는 약 32%의 낮은 용해도를 보였다. NaCl은 단백질의 전하를 변경시켜 용해도를 변화시키며, Cl^- 이 단백질 분자와 우선적으로 결합하므로써 등전점을 변경시킨다(13)고 하는데 1.0M의 NaCl은 BSA의 용해도를 변화시키는 것으로 생각된다.

Egg albumin의 용해도

Egg albumin의 탈아미드화에 의한 pH별 용해도의 변화는 Fig. 2(a, b)에 나타내었는데 수용액에서(Fig. 2a) 천연 egg albumin(N-EA)은 pH에 따른 용해도의 변화가 크지 않았으며, pH 4~6 이외의 모든 pH에서 70% 이상의 용해도를 보였다. N-EA는 pH 5에서의 용해도가 약 65%로 다른 pH에서 보다 약간 낮은 용해도를 보이고 있는데 egg albumin의 등전점은 pH 5 부근이

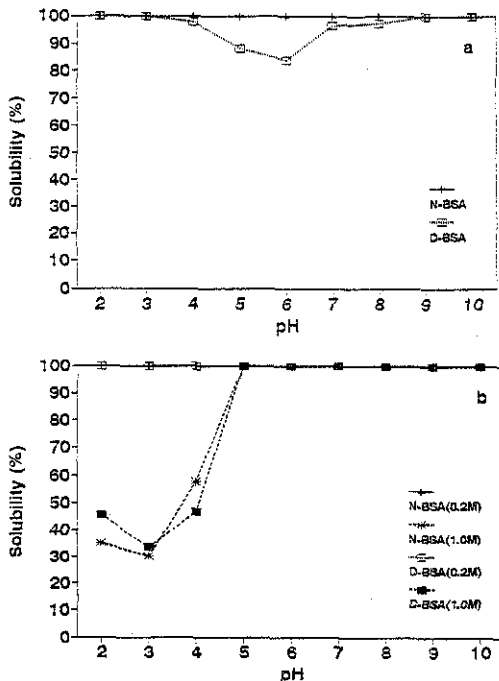


Fig. 1. Solubility curves of native BSA (N-BSA) and deamidated BSA (D-BSA) in distilled water (a) and NaCl Soln.(b).

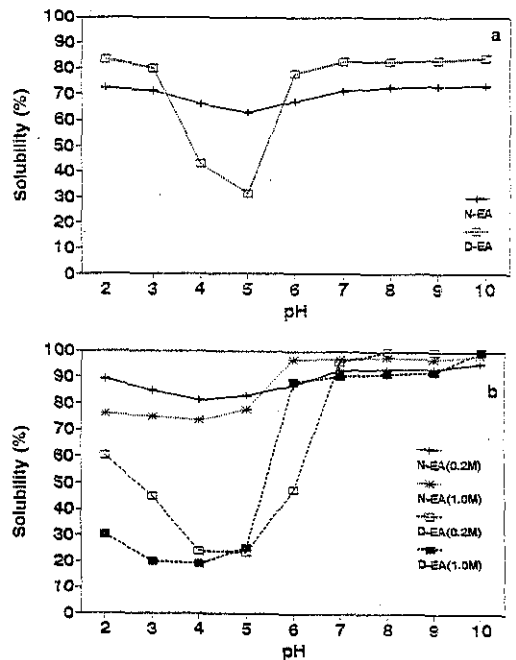


Fig. 2. Solubility curves of native egg albumin (N-EA) and deamidated egg albumin (D-EA) in distilled water (a) and NaCl Soln.(b).

라고 알려져 있다. 탈아미드화된 egg albumin(D-EA)의 경우 pH 5 부근에서의 용해도가 매우 낮아져 약 32% 정도의 용해도를 나타내었다. 단백질은 특정한 pH에서 단백질의 전하가 0이 되어 단백질과 물과의 접촉이 감소되므로서 단백질의 침전이 일어나 등전점을 형성하는 것으로 알려져 있다. pH 5에서 D-EA의 용해도가 감소하여 등전점을 형성하고 있는데 이 현상은 탈아미드화에 의하여 단백질의 입체적 구조에 변화가 일어나서 pH에 따른 EA의 대응능력이 변화가 생겨 pH 5 근처에서는 용해도의 감소가 pH 3 이하와 pH 6 이상의 pH에서는 용해도의 증가가 일어났다고 생각된다. pH 3 이하와 6 이상에서 용해도가 증가하는 것은 탈아미드화로 단백질 분자의 표면에 음전하가 도입되었기 때문으로 탈아미드화로 인한 음전하의 도입으로 용해도가 증가하는 것에 대하여서는 많은 연구자들이 보고(11,14,15)하고 있는 바와 일치하고 있다. 탈아미드화로 인한 BSA와 EA의 용해도 변화 양상은 비슷하여 정도의 차이는 있지만 이 두단백질 모두 탈아미드화로 인하여 종모양의 용해도 곡선을 보이고 있는데 이는 탈아미드화로 인하여 입체적 구조에 변화가 일어나서 pH에 대한 대응능력이 생단백질과는 달라지는 것으로 생각된다. 단백질의 탈아미드화로 인한 입체적 구조의 변화에 대하여서는 추후 연구해 볼 필요가 있다. 또한 NaCl용액을 용매로 하였을 경우(Fig. 2b) 탈아미드화는 egg albumin의 용해도를 pH 5 이하에서 감소시켰다. 또한 N-EA와 D-EA 모두 pH 5 이하에서는 0.2M NaCl용액에서의 용해도가 1.0M NaCl에서 보다 높았으나 pH 6 이상에서는 반대로 염 농도가 높은 쪽이 낮은 쪽 보다 용해도를 증가시켰는데 D-EA의 용해도가 pH 8 이상에서는 100%를 나타내었으며 N-EA는 모든 pH 범위에서, D-EA는 pH 6 이상의 pH에서 수용액에서 보다 NaCl용액에서가 더 잘 녹는 것으로 나타났다.

분리대두단백질의 용해도

수용액(Fig. 3a)에서와 NaCl용액(Fig. 3b)에서의 탈아미드화에 의한 분리대두단백질(SPI)의 용해도 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 수용액에서의(Fig. 3a) 대두분리단백질의 pH별 용해도는 전형적인 단백질 용해 곡선의 양상을 보이고 있는데, 천연 SPI(N-SPI)의 용해도가 모든 pH에서 10~45% 정도로 매우 낮게 나타났다. 이는 연구에 사용된 SPI가 trypsin inhibitor(TI) 변성을 위하여 열처리된 단백질임을 의미한다. 반면 탈아미드화된 SPI(D-SPI)는 용해도가 38%에서 70%로 N-SPI 보다 실험한 모든 pH에서 크게 증가하였다. 특히 산성 pH에

서의 용해도가 탈아미드화로 인하여 현저하게 증가되었으며, SPI 등전점인 pH 4에서 5 사이의 용해도는 N-SPI 보다도 약 300%의 증가를 보였다. 산성 pH에서 대두단백질의 용해도 증가를 위하여서는 효소에 의한 가수분해방법(16)이 있으나 이 경우는 용해도의 증가 정도가 크지 않으며 dipeptide 생성에 따른 쓴맛 생성이 해결 과제이나 탈아미드화된 경우 이런 문제는 발생되지 않을 것으로 생각되어 열변성된 SPI의 용해도 증가에 효과적인 방법으로 생각된다. NaCl용액에서의 SPI의 pH별 용해도 변화에서는(Fig. 3b) D-SPI가 N-SPI 보다 pH 6 이상에서 모두 증가하였는데 특히 NaCl 농도가 0.2M일 경우 용해도가 크게 향상되어 pH 7 이상에서는 80% 이상의 용해도를 나타내었다. 또한 NaCl 농도가 증가할수록 용해도는 감소하는 경향을 보였는데 열변성된 SPI는 NaCl 농도가 증가할수록 용해도는 감소한다(17)고 한다. 또한 NaCl용액을 용매로 하였을 경우 산성 pH에서의 용해도가 N-SPI와 D-SPI 모두 크게 감소하였으며 pH 5 이하에서는 N-SPI와 D-SPI의 용해도 차이가 거의 없는 것으로 나타났다.

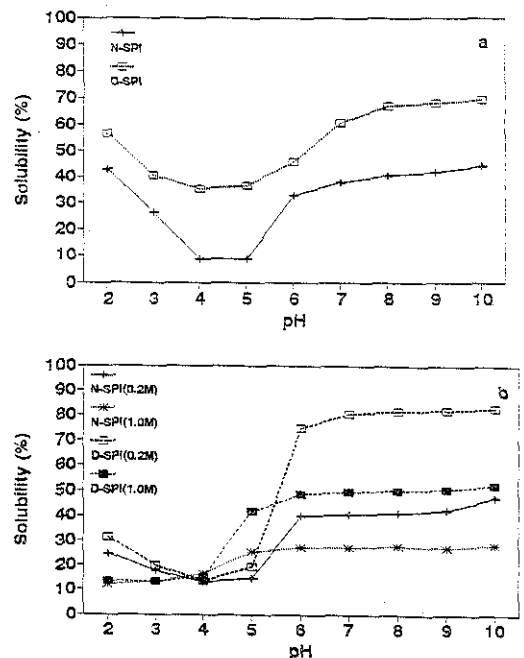


Fig. 3. Solubility curves of native soy protein isolate (N-SPI) and deamidated soy protein isolate (D-SPI) in distilled water (a) and NaCl Soln. (b).

요 약

BSA, egg albumin (EA), 그리고 분리대두단백질 (SPI)의 Neutrase에 의한 탈아미드화가 용해도에 미치는 영향을 조사하여 보았다. BSA는 탈아미드화로 pH 4~8 사이의 물에 대한 용해도가 천연 BSA에 비하여 98~83%로 감소하였으며, pH 6 부근에서 가장 낮은 용해도를 보였다. 천연 BSA와 탈아미드화된 BSA 모두 0.2M NaCl 용액에서는 100%의 용해도를 보였으나, 산성 1.0M NaCl용액에서는 용해도가 모두 크게 떨어졌다. EA의 용해도는 탈아미드화로 pH 3 이하와 6 이상의 수용액에서는 증가하였으나, 산성 NaCl용액에서는 크게 감소하였다. SPI는 탈아미드화로 수용액에서의 용해도가 모든 pH 범위에서 크게 증가하였으나, NaCl용액에 대한 용해도는 pH 6 이상에서는 증가하였고, pH 5 이하에서는 변화가 없었다.

문 헌

- Kinsella, J. E. : Relationships between structure and functional properties of food proteins. In "Food Proteins" Fox, P. F. and Cordon, J. J. (eds.), Applied Science Publishers, London and New York, p.51 (1982)
- Kella, N. K. D., Kang, Y. J. and Kinsella, J. E. : Effect of oxidative sulfitolysis of disulfide bonds of bovine serum albumin on its structural properties : A physicochemical study. *J. Protein Chem.*, **7**, 535 (1988)
- Kinsella, J. E., Damodaram, S. and German, B. : Physicochemical and functional properties of oil seed proteins with emphasis on soy protein. In "New Protein Foods" Altshul, A. M. and Wilcke, H. L. (eds.), Academic Press, New York, p.5 (1985)
- Okezie, B. O. and Bello, A. B. : Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. *J. Food Sci.*, **53**, 450 (1988)
- Kato, A., Tanaka, A., Lee, Y., Matsudomi, N. and Kobayashi, K. : Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 285 (1987)
- Matsudomi, N., Kato, A. and Kobayashi, K. : Comformation and surface properties of deamidation gluten. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1583 (1982)
- Shih, F. F. : Effect of anions on the deamidation of soy protein. *J. Food Sci.*, **56**, 452 (1991)
- Kato, A., Tanaka, A., Matsudomi, N. and Kobayashi, K. : Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 285 (1987)
- Wilcox, R. E. : Determination of amide residue by chemical methods. *Meth. Enzymol.*, **11**, 63 (1967)
- Peter, T. Jr. : Serum albumin. In "Adverces in protein chemistry" Anfinsen, C. B., Edsall, J. T. and Richards, F. M. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 37, p.161 (1985)
- Ma, C. and Khanzada, G. : Functional properties of deamidated oat protein isolates. *J. Food Sci.*, **52**, 1583 (1987)
- Kella, N. K. D., Yang, S. T. and Kinsella, J. E. : Effect of disulfide bonds cleavage on structural and interfacial properties of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1203 (1989)
- Venktesh, A. and Prakash, V. : Functional properties of the total proteins of sunflower (*Helianthus annuus L.*) seed—Effect of physical and chemical treatment. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 18 (1993)
- Hamada, J. S. and Marshall, W. E. : Preparation and functional properties of enzymatically deamidated soy protein. *J. Food Sci.*, **54**, 598 (1989)
- 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)
- Kang, Y. J. : Enzymatic modification of soy proteins : effect of functional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis. *Kor. J. Food Sci. Tech.*, **19**, 211 (1984)
- Shen, J. L. : Solubility and viscosity. In "Protein Functionality in Foods" Cherry, J. P. (ed.), ACS Symposium series 147, American chemical Society, Washington, D.C., p.89 (1981)

(1995년 8월 12일 접수)