

첨가물질에 따른 알파-락트알부민 겔의 총 유리 SH 그룹, Half-Cystine 및 S-S 결합 함량

박인덕 · 홍운호[†]

전남대학교 식품영양학과

Total Free SH Groups, Half Cystine and S-S Bond Contents of α -Lactalbumin Gels by Various Additives

In-Duck Park and Youn-Ho Hong[†]

Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju 550-757, Korea

Abstract

In order to investigate heat-induced gelation properties of α -lactalbumin(α -La), total free SH groups, half-cystine, and disulfide bond contents of α -La gels prepared in 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0) were measured. The samples were heated at 90°C for 40 minutes under different pH and concentrations of NaCl, CaCl₂, α -La, N-ethylmaleimide(NEM), and dithiothreitol(DTT). Total free SH groups were low at high concentrations of α -La and at pH 6.5~8.5, and were 14.72~18.58 μ mol/g and 14.17~16.11 μ mol/g, respectively. Half-cystine contents of NEM-induced gels decreased with increasing concentration of NEM, and were 1.03~39.17 μ mol/g. Disulfide bonds of DTT-induced gels increased with increasing concentration of DTT, and were 70.04~71.80 μ mol/g.

Key words: α -lactalbumin, total free SH groups, half-cystine, disulfide bonds

서 론

우유의 유청단백질은 우수한 영양적 성분과 여러 기능적인 특성 즉, 분산력, 용해성, 점성, 겔형성, 유화성, 안정성 등으로 인해 식품산업에 많이 이용되고 있는데(1-5) 그 중 겔형성 능력은 특히 중요한 성질로 식품의 물성 및 조직감 등의 향상에 매우 지대한 영향을 주므로 많은 연구가 진행되어 왔다(6-11).

겔형성은 pH, 염의 종류 및 농도, 유리 SH기의 농도, 단백질의 소수성, 열처리 조건과 시간 등 많은 요인들이 관여하고(12-15), 겔의 성질은 각각의 성분 단백질 즉, α -lactalbumin(α -La), β -lactoglobulin(β -Lg), bovine serum albumin(BSA), immunoglobulin(IG), proteose peptone(PP) 등의 물리, 화학적 성질에 많은 영향을 받는다고 알려져 있는데(16-21) 다양한 단백질 성분들 간에 이루어지는 상호반응이 매우 복잡적이기 때문에 유청단백질의 3차원 가교결합의 형성에 관한 메커니즘이 밝혀지지 못하고 있다. 따라서 유청단백질의

주성분 단백질들을 선별적 시료로 하여 겔형성 과정과 이에 영향을 주는 인자들의 상호관계를 규명하는 것이 바람직하다.

Shimada와 Cheftel은 유청단백질 분리물(22)과 대두단백질 분리물(23) 겔의 총 유리 SH 그룹과 half-cystine, disulfide 결합에 관한 실험을 통해 이들 단백질의 겔형성 과정을 추정된 보고가 있고 유청단백질 중 주요한 겔형성 단백질로서 β -Lg와 BSA의 겔형성에 관한 연구 역시 많이 이루어지고 있는데(24,25) α -La에 관해서는 현재까지 체계적인 연구가 거의 이루어지지 않고 있다.

본 연구에서는 α -La의 겔형성에 관여하는 인자들을 조절, 첨가하여 α -La겔의 총 유리 SH 그룹, half-cystine, S-S 결합 함량을 측정함으로써 이들 인자들이 α -La의 겔형성에 관여하는 효과를 조사하여 α -La 겔형성 특성을 이해하고 여타의 유청단백질 성분들과 기능적 차이를 비교하며 기능성 식품소재 및 의약품으로의 응용에 필요한 기초자료를 얻고자 하였다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

재료 및 시약

α -Lactalbumin (α -La), N-ethylmaleimide(NEM), dithiothreitol(DTT), 그리고 Tris-(hydroxy-methyl)-aminomethane은 Sigma사(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였고 기타 시약들은 분석용으로 시판되는 특급으로 사용하였다.

NaCl 첨가에 따른 겔의 제조

0.1M Tris 완충용액을 이용해 400mM NaCl을 만든 후 동일한 완충용액으로 20, 40, 80, 160, 200, 400mM되게 희석한 다음 20% α -La용액과 1 : 1로 혼합하고 0.1N HCl을 사용해 pH를 8.0으로 고정시켜 밀봉한 후 이 액을 수조(90°C)에서 40분간 가열하여 10, 20, 40, 80, 100, 200mM NaCl을 각각 함유한 10% α -La 겔을 제조하였다.

CaCl₂ 첨가에 따른 겔의 제조

0.1M Tris 완충용액을 이용해 40mM CaCl₂를 만든 후 동일한 완충용액으로 4, 10, 20, 40mM 되게 희석한 다음 20% α -La용액과 1 : 1로 혼합하고 0.1N HCl을 사용해 pH를 8.0으로 고정시켜 밀봉한 후 이 액을 수조(90°C)에서 40분간 가열하여 2, 5, 10, 20mM CaCl₂를 각각 함유한 10% α -La 겔을 제조하였다.

pH 변화에 따른 겔의 제조

0.1M Tris 완충용액을 이용해 80mM NaCl 또는 10mM CaCl₂를 함유한 10% α -La용액을 만든 다음 0.1N HCl을 사용해 pH를 각각 2.5, 3.5, 6.5, 7.5, 8.5로 조정하여 밀봉한 후 이 액을 수조(90°C)에서 40분간 가열하여 pH가 각각 다른 10% α -La 겔을 제조하였다.

알파-라트알부민 농도변화에 따른 겔의 제조

0.1M Tris 완충용액을 이용해 40% 알파-라트알부민(α -La)용액을 만든 후 동일한 완충용액으로 4, 10, 20, 30, 40% 되게 희석한 다음 160mM NaCl용액 또는 20mM CaCl₂용액과 1 : 1로 혼합하고 0.1N HCl을 사용해 pH를 8.0으로 고정시켜 밀봉한 후 이 액을 수조(90°C)에서 40분간 가열하여 80mM NaCl 또는 10mM CaCl₂를 함유한 2, 5, 10, 15, 20% α -La 겔을 제조하였다.

N-Ethylmaleimide 첨가에 따른 겔의 제조

0.1M Tris 완충용액을 이용해 200mM N-ethylma-

leimide(NEM)용액을 만든 후 동일한 완충용액으로 8, 20, 40, 80, 200mM 되게 희석한 다음 320mM NaCl용액 또는 40mM CaCl₂용액과 20% α -La용액을 1 : 1 : 2로 혼합하고 0.1N HCl을 사용해 pH를 8.0으로 고정시켜 밀봉한 후 이 액을 수조(90°C)에서 40분간 가열하여 2, 5, 10, 20, 50mM NEM을 각각 함유한 10% α -La 겔을 제조하였다.

Dithiothreitol 첨가에 따른 겔의 제조

0.1M Tris 완충용액을 이용해 200mM dithiothreitol (DTT)용액을 만든 후 동일한 완충용액으로 8, 20, 40, 80, 200mM 되게 희석한 다음 320mM NaCl용액 또는 40mM CaCl₂용액과 20% α -La용액을 1 : 1 : 2로 혼합하고 0.1N HCl을 사용해 pH를 8.0으로 고정시켜 밀봉한 후 이 액을 수조(90°C)에서 40분간 가열하여 2, 5, 10, 20, 50mM DTT를 각각 함유한 10% α -La 겔을 제조하였다.

총 유리 SH 그룹

총 유리 SH 그룹은 Ellman의 방법(26)을 일부 변형한 Shimada와 Cheftel의 방법(22,23)을 이용하여 측정하였다. 형성된 10% α -La 겔 1g을 8M urea와 0.5% SDS를 함유한 표준 완충용액 10ml를 넣어 25°C에서 3분간 균질화시킨 후 20,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 얻어진 상층액 3ml에 즉시 0.03ml Ellman 시약(40mg 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), DTNB/10ml 표준 완충용액)을 첨가해 완전히 섞은 후 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 계산은 8M urea와 0.5% SDS를 함유한 표준 완충용액에 용해된 단백질 g당 μ mol로 나타내었다.

$$\mu\text{mol/g} = \frac{73.53(\text{Abs}_{412} - 1.6934 \times \text{Abs}_{540} + 0.009923)}{g \alpha\text{-La}}$$

Half-cystine 함량

Half-cystine 함량(SH + (2 × (S-S)))은 Shimada와 Cheftel의 방법(22,23)에 의거하여 측정하였는데 형성된 10% α -La 겔 1g에 8M urea, 0.5% SDS, 10mM DTT를 함유한 표준 완충용액 10ml를 첨가해 3분간 균질화시켜 20,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 얻어진 상층액을 실온에 6~8시간 정치시킨 다음 그 액을 변성제(8M urea와 0.5% SDS)가 함유된 표준 완충용액으로 Sephadex G-25 컬럼을 통과시켜 DTT를 제거한 후 다시 한번 변성제를 함유한 표준 완충용액으로 흡

러보내 완전히 DTT를 제거한 다음 얻어진 액을 DTNB와 반응시켜 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 계산은 8M urea, 0.5% SDS, 10mM DTT를 함유한 표준 완충 용액에 용해된 단백질 g당 μmol 로 하였다.

S-S 결합

S-S 결합은 위에서 측정된 half-cystine 함량과 총 유리 SH 그룹 간의 차이를 구하여 계산하였다.

결과 및 고찰

NaCl의 효과

Na는 전하를 중성화시켜 정전기적 반발력을 억제함으로써 단백질 분자간에 상호반응을 증가시키고 단백질의 열안정성을 낮추며 형태를 변화시키는데(27) 본 실험 결과 총 유리 SH 그룹과 half-cystine 함량은 첨가된 NaCl의 양에 큰 의존성은 나타내지 않았고 거의 일정하였다. S-S 결합 역시 NaCl의 첨가량에 따라 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 1). 이는 NaCl의 첨가로 인한 α -La 겔의 안정성과 형성에 정전기적 상호작용이 중요함을 의미하는 것이다. 10~200mM NaCl 첨가로 인한 α -La 겔의 총 유리 SH 그룹, half-cystine, 그리고 S-S 결합은 각각 15.04~17.48 $\mu\text{mol/g}$, 146.66~150.38 $\mu\text{mol/g}$, 66.06~66.98 $\mu\text{mol/g}$ 이었다.

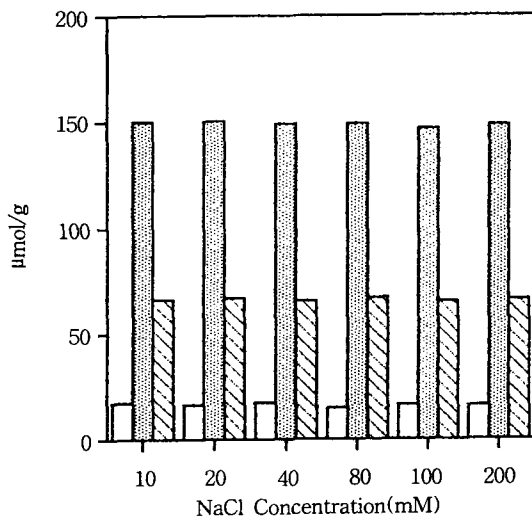


Fig. 1. Free SH groups, half-cystine and S-S bonds of α -La gels as a function of NaCl concentration upon heating at 90°C for 40min(pH 8.0). □: Free SH groups, ▨: Half-cystine contents, ▩: Disulfide contents

CaCl₂의 효과

측정된 총 유리 SH 그룹은 16.11~17.99 $\mu\text{mol/g}$ 로 NaCl의 첨가시와 마찬가지로 염의 농도 증가로 약간 감소하기는 했으나 현저한 경향은 아니었다. Half-cystine 함량은 비교적 일정한 값으로 150.04~151.74 $\mu\text{mol/g}$ 을 나타내었고 형성된 S-S 결합은 66.54~67.62 $\mu\text{mol/g}$ 이었는데 CaCl₂의 첨가로 큰 변화는 없었다(Fig. 2).

pH의 효과

pH 2.5~3.5에서의 총 유리 SH 그룹은 18.00~18.77 $\mu\text{mol/g}$ 이었고, half-cystine 함량은 149.35~151.14 $\mu\text{mol/g}$ 이었다. S-S 결합은 65.31~65.85 $\mu\text{mol/g}$ 을 나타내었다. pH 6.5~8.5에서의 총 유리 SH 그룹과 half-cystine, S-S 결합은 각각 14.17~16.11 $\mu\text{mol/g}$, 149.84~153.73 $\mu\text{mol/g}$, 67.13~68.45 $\mu\text{mol/g}$ 을 나타내었다(Fig. 3). 위의 결과 pH 2.5~3.5에서는 SH 그룹의 반응성이 낮아 pH 6.5~8.5에서의 총 유리 SH 그룹 함량이 더 높고 총 half-cystine 함량은 비교적 일정하였으나 형성된 S-S 결합은 더 낮음을 알 수 있었다.

Xiong 등(28)은 β -Lg의 경우 pH가 증가할수록 SH 산화속도와 겔망상구조의 형성이 가속화된다고 하였는데 이것은 pH 증가시 deprotonation을 통한 mercaptide ion species(S⁻) 형성이 더 활발하기 때문이라고 주장

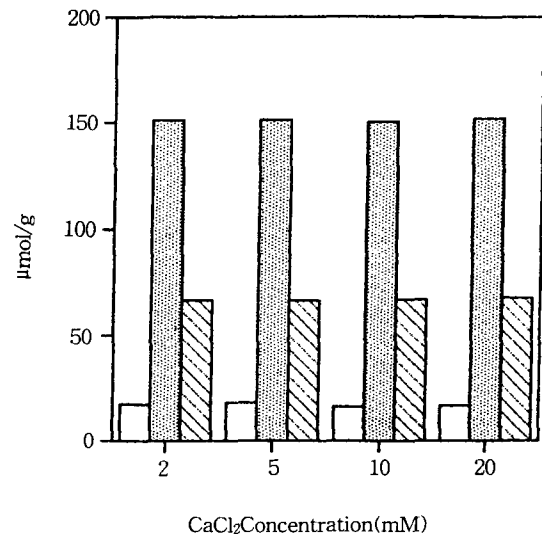


Fig. 2. Free SH groups, half-cystine and S-S bonds of α -La gels as a function of CaCl₂ concentration upon heating at 90°C for 40min(pH 8.0). □: Free SH groups, ▨: Half-cystine contents, ▩: Disulfide contents

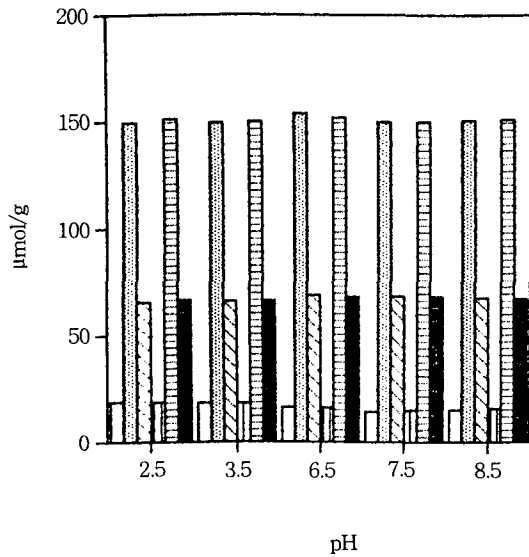


Fig. 3. Free SH groups, half-cystine and S-S bonds of α -La gels as a function of pH upon heating at 90°C for 40min.

- : Added 80mM NaCl, Free SH groups
- ▨: Added 80mM NaCl, Half-cystine contents
- ▩: Added 80mM NaCl, Disulfide contents
- ▧: Added 10mM CaCl₂, Free SH groups
- ▦: Added 10mM CaCl₂, Half-cystine contents
- : Added 10mM CaCl₂, Disulfide contents

하였다. pH의 증가로 정전기적 상호작용 또한 겔형성에 관여하나 (-) 이온의 증가로 이온결합은 공유 이황화 결합과 비교해 볼 때 극히 작은 영향을 미친다고 할 수 있다. 또한 β -mercaptoethanol을 처리한 실험에서는 모든 pH에서 동일한 형태로 중합체가 형성되지는 않았는데 β -mercaptoethanol을 처리하지 않은 결과 pH 증가시 α -La와 β -Lg가 줄고 많은 중합체가 형성되었다고 하여(28) pH 증가로 잠재적으로 형성될 수 있는 다른 비이황화 공유결합은 겔구조에 관여하지 않음을 시사했다.

단백질 농도의 효과

α -La의 농도가 증가될수록 총 유리 SH 그룹은 약간 감소하였는데 NaCl을 첨가한 경우 총 유리 SH 그룹의 함량은 14.72~18.58 μ mol/g이었고 CaCl₂를 첨가한 것은 15.41~18.36 μ mol/g이었다. Half-cystine 함량은 각각 149.47~151.99 μ mol/g과 147.51~151.88 μ mol/g로 농도 증가에 따른 큰 변화는 없었고 S-S 결합은 농도 증가로 약간 증가하였는데 이것은 α -La의 농도 증가에 따라 겔 지지체에서 S-S결합의 관여가 큼을 시사하는 것으로 추정된다(Fig. 4).

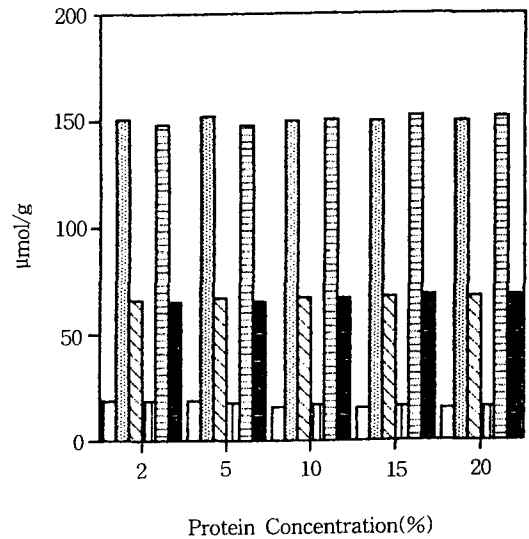


Fig. 4. Free SH groups, half-cystine and S-S bonds of α -La gels as a function of α -La concentration upon heating at 90°C for 40min(pH 8.0).

- : Added 80mM NaCl, Free SH groups
- ▨: Added 80mM NaCl, Half-cystine contents
- ▩: Added 80mM NaCl, Disulfide contents
- ▧: Added 10mM CaCl₂, Free SH groups
- ▦: Added 10mM CaCl₂, Half-cystine contents
- : Added 10mM CaCl₂, Disulfide contents

N-Ethylmaleimide의 효과

총 유리 SH 그룹의 함량은 NEM 첨가로 급격히 감소되어 모든 농도에서 5 μ mol/g 이하를 나타내었고 half-cystine 역시 감소되어 그 값은 1.03~39.17 μ mol/g이었으며 형성된 S-S 결합은 2mM NEM 첨가시 약간 높고 나머지 농도에서는 전부 낮았는데 그 값은 0~17.09 μ mol/g이었다(Fig. 5). NEM 첨가로는 모든 농도에서 겔형성이 지장을 받았는데 특히 50mM NEM 첨가시 겔형성이 이루어지지 않았다. 겔형성에는 SH/S-S 상호교환반응이 매우 중요한 의미를 갖고 NEM 첨가로 인해 SH 그룹이 반응성을 잃어 결국 겔형성에 지장을 줄 수 있었다(29,30).

Dithiothreitol의 효과

총 유리 SH 그룹은 NaCl를 첨가한 것은 8.04~10.42 μ mol/g이었고, CaCl₂를 첨가한 것은 8.35~9.25 μ mol/g으로 다른 조건에 비해 크게 낮았는데 이것은 DTT 첨가로 총 유리 SH 그룹이 S-S 결합으로 상호교환반응을 일으켰기 때문이다(31,32). 그러나 half-cystine은 NaCl과 CaCl₂를 첨가한 것이 각각 149.64~150.62 μ mol/g과 150.39~151.66 μ mol/g으로 다른 처리와 크

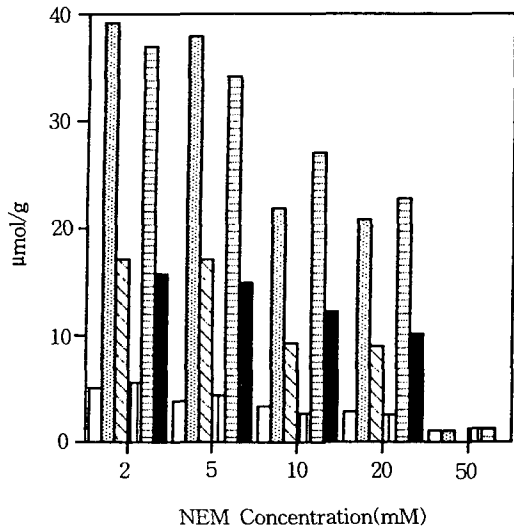


Fig. 5. Free SH groups, half-cystine and S-S bonds of α -La gels as a function of NEM concentration upon heating at 90°C for 40min(pH 8.0).
 □: Added 80mM NaCl, Free SH groups
 ▨: Added 80mM NaCl, Half-cystine contents
 ▩: Added 80mM NaCl, Disulfide contents
 ▧: Added 10mM CaCl₂, Free SH groups
 ▦: Added 10mM CaCl₂, Half-cystine contents
 ■: Added 10mM CaCl₂, Disulfide contents

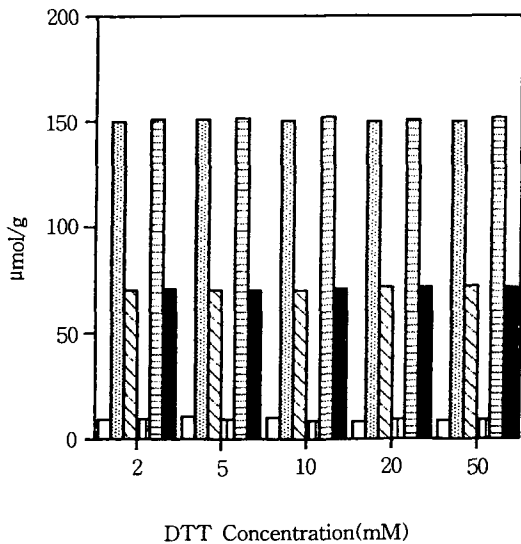


Fig. 6. Free SH groups, half-cystine and S-S bonds of α -La gels as a function of DTT concentration upon heating at 90°C for 40min(pH 8.0).
 □: Added 80mM NaCl, Free SH groups
 ▨: Added 80mM NaCl, Half-cystine contents
 ▩: Added 80mM NaCl, Disulfide contents
 ▧: Added 10mM CaCl₂, Free SH groups
 ▦: Added 10mM CaCl₂, Half-cystine contents
 ■: Added 10mM CaCl₂, Disulfide contents

게 차이가 없고 DTT 농도 증가에 따라 큰 변화가 없었다. 형성된 S-S 결합은 NaCl를 첨가한 경우에는 70.04 ~ 71.80 $\mu\text{mol/g}$ 과 CaCl₂를 첨가한 경우에는 70.07 ~ 71.66 $\mu\text{mol/g}$ 으로 DTT를 첨가하지 않은 시료 보다 훨씬 더 많은 양이 형성되었다(Fig. 6).

요 약

본 연구에서는 열처리에 의한 알파-락탈알부민(α -La) 겔의 특성을 규명하기 위하여 겔형성에 관여하는 인자들 즉, 염의 종류와 농도, pH, α -La 농도, 티올시약(NEM, DTT)의 농도를 각각 변화시켜 90°C에서 40 분간 가열하여 만든 알파-락탈알부민 겔의 총유리 SH 그룹, half-cystine 함량, S-S 결합 함량을 측정하였다. 총 유리 SH 그룹, half-cystine 함량, S-S 결합은 첨가된 염의 종류와 농도 변화에는 큰 의존성을 나타내지 않았다. pH 2.5~3.5에서는 SH 그룹의 반응성이 낮아 pH 6.5~8.5에서의 총 유리 SH 그룹 보다 함량이 더 높고 half-cystine 함량은 일정하였으나 형성된 S-S 결합은 더 낮아 pH가 증가할수록 SH 산화속도와 겔망상 구조의 형성이 가속화됨을 확인할 수 있었다. α -La의 농도 증가로 half-cystine 함량은 큰 변화가 없었으나 총 유리 SH 그룹은 약간 감소하고 S-S 결합은 약간 증가하여 α -La의 농도 증가에 따라 겔지체에서 S-S 결합의 관여가 큼을 나타내었다. NEM 첨가의 경우는 총 유리 SH 그룹과 half-cystine 함량이 급격히 감소하였으나 S-S 결합은 증가하여 NEM 첨가로 SH 그룹이 반응성을 잃어 결국 α -La의 겔형성에 지장을 줌을 확인하였다. DTT 첨가로는 새로운 분자인 티올-이황화물 상호교환반응이 용이하게 되어 총 유리 SH 그룹은 낮고 S-S 결합은 높은 함량을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구비(941-0600-035-1) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사를 드립니다.

문 헌

- Hong, Y. H. : Nutritional properties and utilization of bovine whey. *Korean J. Nutr. Society*, **16**, 137(1983)
- Morr, C. V. : Fractionation and modification of whey protein in U.S. *IDF Bulletin*, **212**, 145(1987)
- De Wit, J. N. : In developments in dairy chemistry-4. The use of whey protein products. Elsevier Applied Sci., London & New York, p.323(1989)
- Foegeding, E. A. : Molecular properties and func-

- tionality of proteins in food gels. *J. Food Sci.*, **54**, 69 (1989)
5. Rost, J. : Functional characteristics of dairy proteins. *Trends in Food Sci. & Tech.*, **1**, 283(1993)
 6. De Wit, J. N. : Functional properties of whey proteins in food systems. *Neth. Milk Dairy J.*, **38**, 71(1984)
 7. Katsuta, K., Rector, D. and Kinsella, J. E. : Viscoelastic properties of whey protein gels. *J. Food Sci.*, **55**, 512 (1990)
 8. Morr, C. V. and Foegeding, E. A. : Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates : A status report. *Food Technol.*, **44**, 100(1990)
 9. Brandenberg, A. H., Morr, C. V. and Weller, C. L. : Gelation of commercial whey protein concentrates : Effect of removal of low molecular weight components. *J. Food Sci.*, **57**, 427(1992)
 10. Beuschel, B. C., Culbertson, J. D., Patridge, J. A. and Smith, D. M. : Gelation and emulsification properties of partially insolubilized whey protein concentrates. *J. Food Sci.*, **57**, 605(1992)
 11. Paulsson, M. : Thermal denaturation and gelation of whey proteins and their adsorption at the air/water interface. *J. Dairy Sci.*, **65**, 211(1982)
 12. Mulvihill, D. M. and Kinsella, J. E. : Gelation characteristics of whey proteins and β -lactoglobulin. *Food Technol.*, **41**, 102(1987)
 13. Xiong, Y. L. : Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 380(1992)
 14. Gupta, V. K. and Reuter, H. : Protein solubility and gelation behavior of whey protein concentrates prepared by ultra-filtration of sweet cheese whey. *Neth. Milk Dairy J.*, **46**, 89(1992)
 15. Kato, A. and Nakai, S. : Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **624**, 13(1980)
 16. Matsudomi, N., Rector, D. and Kinsella, J. E. : Gelation of bovine serum albumin and β -lactoglobulin : Effects of pH, salts, and thiol reagents. *Food Chem.*, **40**, 55 (1991)
 17. Hienes, M. E. and Foegeding, E. A. : Interactions of α -La and BSA with β -Lg in thermally induced gelation. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 341(1993)
 18. Legowu, A. M., Imada, T. and Hayakawa, S. : Heat-induced gelation of the mixtures of α -La and β -Lg in the presence of glutathione. *Food Res. Int.*, **26**, 103 (1993)
 19. Legowu, A. M., Imada, T. and Hayakawa, S. : Heat-induced gelation of the mixtures of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in the presence of glutathione. *Food Research Int.*, **26**, 103(1993)
 20. Lyster, R. : The denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in heated milk. *J. Dairy Res.*, **37**, 233(1970)
 21. Li-chan, E. and Nakai, S. : Raman spectroscopic study of thermally and/or dithiothreitol induced gelation of lysozyme. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1238(1991)
 22. Shimada, K. and Cheftel, J. C. : Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1018 (1988)
 23. Shimada, K. and Cheftel, J. C. : Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 147 (1988)
 24. Lee, S. P., Cho, Y. and Batt, C. A. : Enhancing the gelation of β -Lg. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1343(1993)
 25. McSwiney, M., Singh, H., Campanella, O. and Creamer, L. K. : Thermal gelation and denaturation of bovine β -lactoglobulins A and B. *J. Dairy Res.*, **61**, 221(1994)
 26. Ellman, G. C. : Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70(1959)
 27. Boye, J. I., Alli, I., Ismail, A. A., Gibbs, B. F. and Konishi, Y. : Factors affecting molecular characteristics of whey protein isolates. *Int. Dairy J.*, **5**, 337(1995)
 28. Xiong, Y. L., Dawson, K. A. and Wan, L. : Thermal aggregation of β -lactoglobulin : Effect of pH, ionic environment, and thiol reagent. *J. Dairy Sci.*, **76**, 70 (1993)
 29. Fox, P. F. : In advanced dairy chemistry. Vol. 1. Heat stability of milk. Elsevier Applied Sci., London & New York, p.621(1992)
 30. Yamagishi, T., Takaya, M., Ebina, F. and Yamaguchi, F. : Effect of heating temperature on sulfhydryl and disulfide contents and state of aromatic amino acid residues in soybean protein. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 537(1984)
 31. Kella, N. K. D., Yang, S. T. and Kinsella, J. E. : Effect of disulfide bond cleavage on structural and interfacial properties of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1203(1989)
 32. Toro-Vazquez, J. F. and Regenstein, J. M. : Physicochemical parameters of proteins by additives and their emulsifying properties. *J. Food Sci.*, **54**, 1177 (1988)

(1996년 7월 15일 접수)