

Dimethylglutarylation에 의한 변형대두단백질의 물리화학적 특성

최원균* · 정철원**

서울대학교 기초과학연구원* · 한림정보산업대학 건강식품가공학과**

(1999년 10월 29일 접수)

The Physicochemical Properties of Modified Soybean Protein Isolate by Dimethylglutarylation

One-Kyun Choi* and Chul Won Jung**

Research Institute for Basic Sciences, Seoul National University*

Department of Health Food Processing, Hallym College of Information & Industry**

(Received October 29, 1999)

Abstract

We studied to improve the functional properties of soybean protein isolate by dimethylglutarylation and acetylation. Soybean protein isolate was acylated rapidly up to 80% modification and more of 80% modification was proceed slowly. Electrophoretic analysis showed that more changes in modified protein. Also, modification of soybean protein produced more ionizable tyrosines and exposed more hydrophobic groups, while modified protein exhibited a loss of reactive sulfhydryl groups. Spectrophoretic studies demonstrated that the shift was occurred at the UV 278nm and fluorescence 333nm, respectively, and the intensity decreased as the degree of modification was increased.

I. 서 론

대두단백질은 곡류를 주식으로 하는 우리 식생활에서 부족하기 쉬운 단백질이 풍부할 뿐 아니라 여러 가지 뛰어난 기능적 특성을 가지고 있다. 부족한 단백질 공급을 해결하기 위한 방안으로 새로운 단백질의 생산과 아울러, 기존 단백질의 효율적인 사용 역시 연구해야 할 과제이다. 단백질의 기능적 특성은 뚜렷한 조건 의존성을 나타내므로 경우에 따라서는 단백질의 이용이 극히 제한되고 있다. 이런 문제점을 해결하기 위하여 단백질을 변형시켜 그 기능특성을 밝힘으로써 단백질의 효율적인 이용을 극대화 할 수 있다. 지금까지의 대두 단백질 변형에 관한 연구는 주로 아세틸화¹⁻⁷⁾, 인산화⁷⁻¹²⁾, succinyl화^{3, 13, 14)} 시켜 그 변형단백질의 기능성 및 구조의 변화에 대해 많은 연구가 수행되어왔다. 본 연구에서는 아직까지 시도되지 않은 dimethylglutarylation 시킨 변형대두단백질의 물리화학적인 특

성에 대해 실험하였고, 아세틸화의 실험을 병행하여 결과를 비교하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 재료

1) 시료 및 시약 준비

본 실험에서 사용한 대두(*Glycine max* L. Merrill)는 1992년 작물시험장에서 재배한 장엽품종이었다. 사용한 시약들은 모두 특급으로 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 전기영동에 사용한 시약들은 BioRad사(Sunnyvale, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2) 분리대두단백질의 제조

분리 대두 단백질의 제조는 Thanh 등¹⁵⁾의 방법에 따라 (Fig. 1)과 같이 제조하였다. 즉, 대두의 지방을 n-hexane으로 24시간 5회 추출한 탈지대두를 건조 후 분쇄하여 100 mesh의 체를 통과시킨 탈지대두분 300g을 0.03M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 3L에 넣고 1시간 교반한 다음 4°C에서 10,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액에 1N HCl로 pH를 4.5로 조절하고 증류수로 세척한 후, pH 8.0의 증류수로 24시간 투석한 다음 냉동 건조하여 시료로 사용하였다.

3) 분리대두단백질의 변형

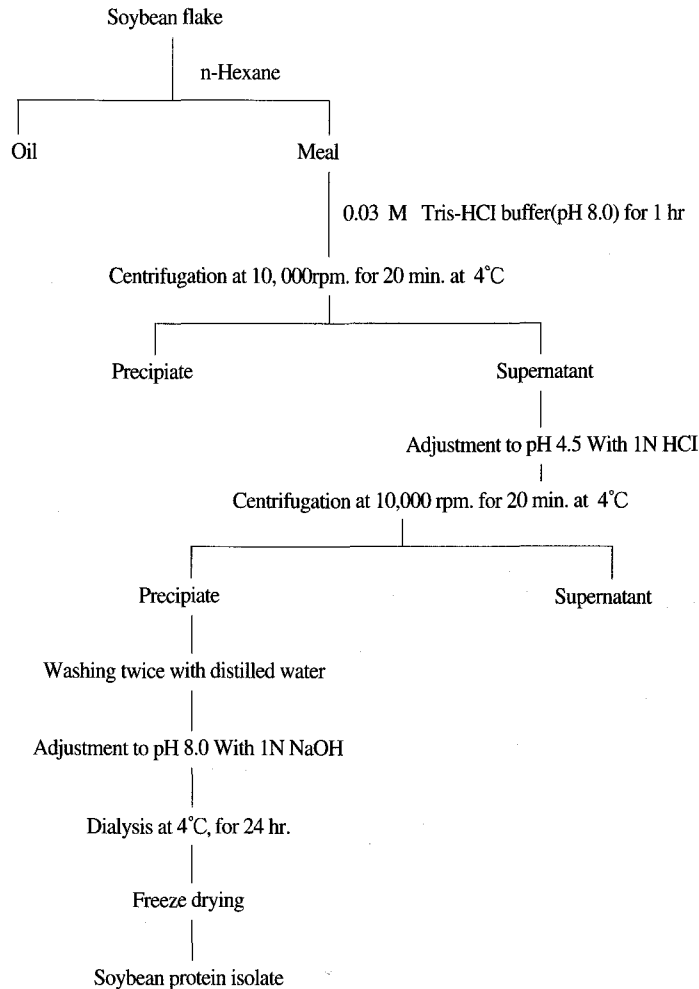
Dimethylglutaryl화와 acetyl화에 의한 변형은 Riordan 등¹⁶⁾의 acyl화 및 acetyl화 방법에 준하여 변형시켰다.

즉, 분리 대두 단백질 2g을 0.075M phosphate buffer (pH 8.0)에 3,3-dimethylglutaric anhydride 및 acetic anhydride용액을 0.2mL씩 첨가하면서(최대량 2g) 1M NaOH를 가하여 pH를 7-8사이로 유지하면서 반응시켰다. 이 용액을 Spectra/Por Molecular membrane No. 1 (pore diameter 4.8nm)을 이용하여 4°C에서 증류수(pH 8.0)으로 투석을 행하여 불순물과 잔류된 시약을 제거하였고, 동결건조하여 변형된 분리대두단백질을 제조하였다.

2. 실험방법

1) 분리대두단백질의 변형도 측정

단백질변형의 정도는 Moore 등¹⁷⁾의 방법으로 측정



<Fig. 1> Flow diagram for preparation of soybean protein isolate

하였다.

2) 분자량 및 총 전하

단백질변형에 따른 분자량의 변화는 Davis¹⁸⁾의 방법으로 측정하였다.

3) 변형단백질의 분자구조

(1) 자외선 및 형광분석

분리대두단백질과 변형단백질에 대한 흡광스펙트럼은 Kim 등⁴⁾의 방법으로 측정하였다. 즉, 단백질시료를 potassium phosphate buffer (pH 8.0)에 용해시켜 0.1% 용액을 제조한 후 UV spectrophotometer와 fluorometer로 240-350nm까지 scanning 하였다.

(2) Tyrosine의 이온화도

Tyrosine의 이온화도는 Freighfelder¹⁹⁾의 방법을 응용하였다. 즉, 단백질 시료를 0.05M borate buffer에 용해시킨 후 pH를 8.0에서 12.5까지 조정하고 각 pH에 따른 흡광도를 UV 295nm에서 측정하여 아래의 식으로 tyrosine의 이온화도를 측정하였다.

$$\% \text{ ionized tyrosine} = \frac{A_{295}(\text{pH} \times) - A_{295}(\text{pH } 8)}{A_{295}(\text{pH} \times) - A_{295}(\text{pH } 8)} \times 100$$

(3) 단백질 함량

단백질의 함량은 Lowry 등²⁰⁾의 방법으로 하였다.

(4) 아미노산 조성

단백질중 아미노산 조성의 측정은 Savoy 등²¹⁾ 방법에 준하여 단백질 시료 100mg을 6N의 HCl 20mL과 함께 분해용 시험관에서 105°C에서 24시간 산가수분해시켜 얻은 분해액을 0.2μm의 filter에서 여과한 후 ninhydrin 유도체방법을 이용한 아미노산 자동분석기에서 분석하였다. 분석기기는 amino acid analyzer Model 6300 (Beckman Inc., Fullerton, CA, USA)를 사용하였고, 검출은 460nm와 530nm에서 하였다. 사용한 column은 sodium column (4.6mm×15cm) 이었다.

(5) Sulfhydryl기 함량

단백질용액에서 sulfhydryl기의 함량은 Ellman²²⁾의 방법을 응용하여 단백질용액 3mL에 phosphate buffer (pH 8.0) 2mL과 증류수 5mL을 혼합한 용액 3mL에 5,5-dithiobis-2- nitrobenzoic acid과 100mL phosphate buffer용액을 39.6mg과 0.02mL로 혼합 첨가하고 10분 후에 412nm에서 측정하였다. Molecular extinction coefficient는 1.36×10^{-4} 을 이용하여 단백질 g당

sulfhydryl기는 μM로 계산하였다.

(6) Trypsin inhibitor의 활성도

각 단백질 시료중의 trypsin inhibitor의 활성도는 Kakade 등²³⁾의 방법으로 측정하였다.

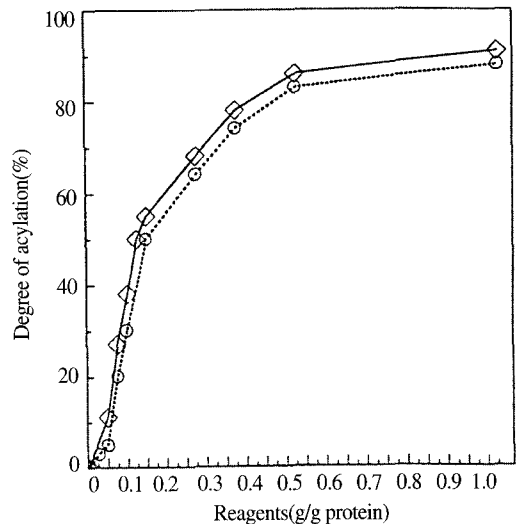
(7) 표면 소수성지수

단백질표면 소수성지수는 Hayakawa 등²⁴⁾의 방법으로 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 변형처리제 첨가량에 따른 변형도 변화

화학변형처리제의 양에 따른 분리대두단백질의 변형정도를 측정한 결과는 <Fig. 2>와 같다. 변형처리제인 3,3-dimethylglutaric anhydride와 acetic anhydride를 분리대두 단백질 1g당 변형제를 0.5g까지 첨가하였을 때 80%까지 급격히 변형이 진행되었으나, 그 이후부터는 완만하였다. Dimethylglutaryl화는 단백질 1g당 0.5g과 1.0g첨가시 83% 및 91%, acetyl화는 78% 및 88%가 각각 변형되어 dimethylglutaryl화가 acetyl화보다 10% 더 많이 변형되었다. Kim 등²⁵⁾과 Franzen 등³⁾은 succinyl 화와 acetyl화에 의해 대두단백질을 변형시켰을 때, 변형처리제의 첨가량이 증가할수록 대부분 변형도가 증



<Fig. 2> Effect of the amount of acylating reagents on degree of modification of soybean protein isolate (□ -dimethylglutarylation, ○ -acetylation).

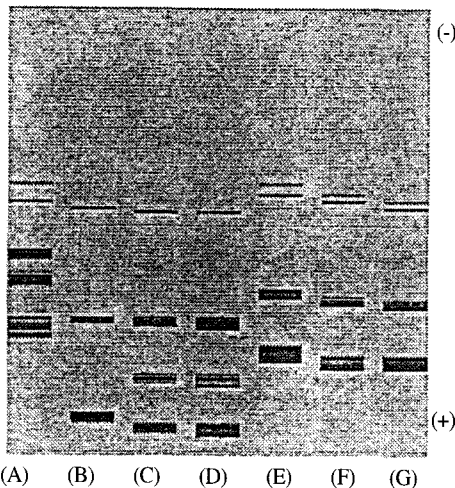
가하였으며, succinyl화에 의한 변형이 acetyl화에 의한 변형보다 약간 많이 변형됨을 보고한 바 있으나 본 실험의 결과는 dimethylglutaryl화가 acetyl화보다 더 많이 변형됨을 알 수 있었다. 이러한 화학적 변형의 정도는 단백질 중 lysine잔기 때문으로 추정되며 Kim 등⁵⁾의 acetylation과 Rao 등²⁶⁾의 succinylation시켰을 때도 80%까지는 변형도가 급격히 증가하다가 이후 증가율이 저하되었다고 보고하였는데 본 실험의 결과도 같은 경향을 나타내었다.

2. 화학적 변형에 따른 구조 및 성분변화

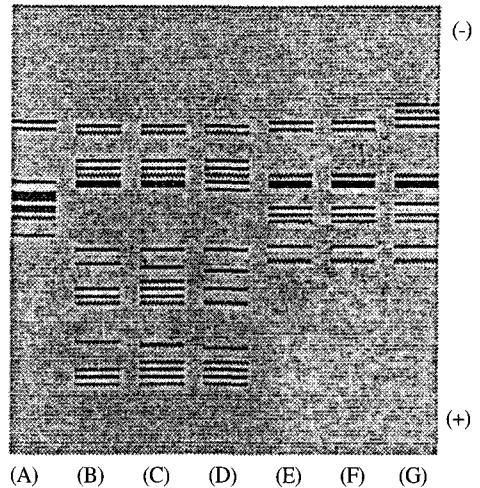
1) 총전하량과 분자량의 변화

Dimethylglutaryl화 및 acetyl화에 의한 대두단백질을 전기영동한 결과는 <Fig. 3>과 같이 분리대두단백질, acetyl화 단백질 그리고 dimethylglutaryl화 단백질을 (+)극으로의 이동이 많았다. Kim 등⁷⁾과 Sung등⁸⁾은 인산화에 의한 변형대두단백질이 (+)극으로의 이동량이 증가하여 변형대두단백질의 내부에 총음전하량이 증가함을 보고하였으며, Brinegar 등²⁷⁾, Beuchat²⁸⁾, Choi 등²⁹⁾, Grant³⁰⁾, Sato 등³¹⁾ 그리고 Ma 등³²⁾은 각각 땅콩단백질, 면실단백질 또는 난단백질을 succinyl화에 의한 변형시 (+)극으로의 이동이 더 많았음을 보고하

였다. 이상의 연구결과에 의하면 분리대두단백질을 acetyl화하는 경우, 원래 분리단백질에 함유된 양성의 전하가 acetyl group과의 반응에 의하여, 중성의 전하로 변환되면서 단백질 내부의 음성전하가 증가되어 변형되지 않은 분리 대두단백질보다 (+)극으로의 이동이 증가됨을 알 수 있다. 본 실험에서 dimethylglutaryl화 단백질이 (+)극으로 이동량이 많은 것은 단백질분자 내의 양성전하를 음성전하로 더 많이 변환시켜주기 때문인 것으로 판단된다. 한편 화학적변형에 의한 분자량변화에 대한 결과는 <Fig. 4>와 같이 acetyl화 및 dimethylglutaryl화 단백질이 acetyl화 단백질보다도 더 많은 해리 및 회합이 발생함을 알 수 있었다. Berman 등³³⁾ 다른 연구자들^{27-30, 34, 35)}에 의하면 acetyl화, succinyl화에 의한 단백질 변형시 각각 단백질 분자내에 총음전하량의 증가로 변형단백질의 해리 및 회합을 보고하였다. 따라서 변형에 의해 해리 및 회합현상이 일어나는 것은 분리 대두단백질을 acetyl화 시켰을 때 양성의 전하를 갖는 단백질분자가 중성의 단백질 분자로 1단위의 음성전하가 증가하지만 dimethylglutaryl화 시켰을 때는 양성의 단백질 분자를 음성의 단백질 분자로 2단위의 음성전하가 증가하여 (+)극으로 더 많이 이동되어지며 분자내의 총전하량이 증가하기 때문인 것으로 생각된다.



<Fig. 3> Polyacrylamide gel-electrophoresis pattern of soybean protein isolate, dimethylglutarylated and acetylated soybean protein (A; Soybean protein isolate, B, C, D; 33%, 64%, 91% dimethylglutarylated soybean protein, E, F, G; 30%, 60%, 88% acetyl-at-ed soybean protein)



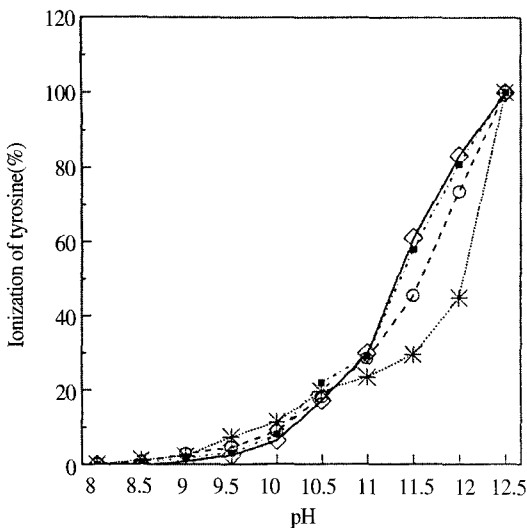
<Fig. 4> SDS gel electrophoresis pattern of soybean protein isolate, dimethylglutarylated and acetylated soybean protein (A; Soybean protein isolate, B,C,D; 33%, 64%, 91% dimethylglutarylated soybean protein, E,F,G; 30%, 60%, 88% acetylated soybean protein)

2) 단백질 중 tyrosine의 이온화

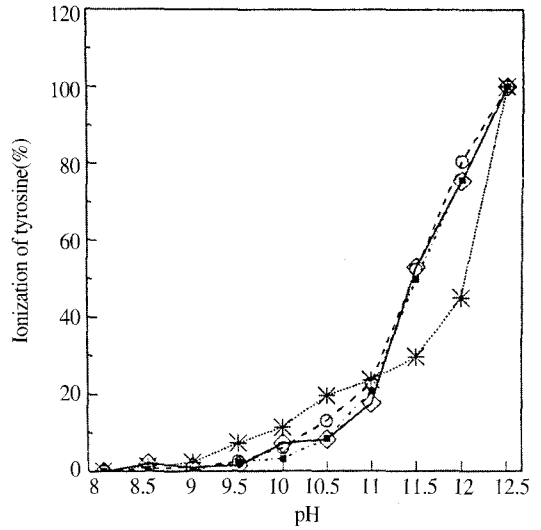
분리대두단백질을 변형시켰을 때 pH에 따른 tyrosine의 이온화경향을 살펴본 결과는 분리대두단백질에 비하여 dimethylglutaryl화 단백질은 pH 10.5이상에서 흡광도가 급격히 증가하였으며 33%, 64%, 91%로 변형도가 증가할수록 흡광도도 증가하였다(Fig. 5). Acetyl화 단백질도 분리대두단백질보다는 pH 11.0이상에서 흡광도가 증가하였으나, 30%, 60%, 88%로 변형이 증가하여도 변형도에 따른 흡광도의 차이는 없었다(Fig. 6). Freifelder¹⁹⁾의 보고에 따르면 같은 pKa 값을 갖는 ionizable group에서 pH에 따른 흡광도의 변화는 용액에서 단백질의 표면에 아미노산의 노출 때문이라고 하였다. 즉, 변성에 의한 tyrosine의 spectrum이 변화하는데 pH가 증가함에 따라 tyrosine의 노출로 인해 흡광도가 증가한다고 보고하였다. 또한 Gourmaris 등³⁶⁾의 보고에 의하면 pepsinogen을 succinyl화시켰을 때 16개의 tyrosine잔기가 succinyl화 되었다고 하였고, Kim 등¹⁴⁾은 분리대두단백질의 succinyl화에 의하여 tyrosine이 이온화됨을 보고하였다. 본 실험의 결과 pH 11.0이상에서 흡광도의 급격한 변화를 나타내 tyrosine이 이온화되는 것은 단백질표면에 tyrosine이 노출되는 것을 뜻하며 dimethylglutaryl화 단백질이 acetyl화의 경우보다 노출 정도가 큰 것으로 판단된다.

3) 흡광스펙트럼의 변화

화학적변형에 의한 분리대두단백질의 자외선 흡광

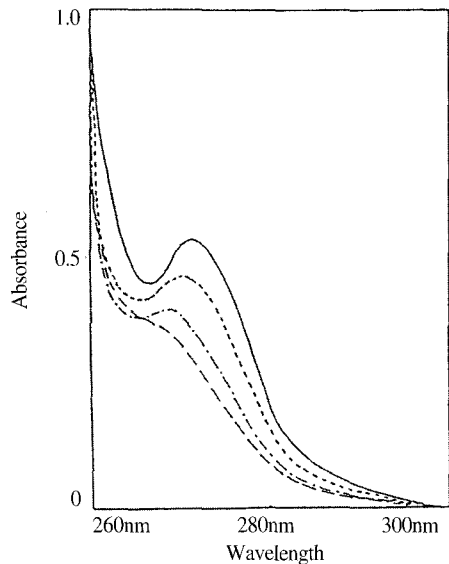


<Fig. 5> Changes in ionization of tyrosine modified by dimethylglutarylation(○-33%, ■-64%, ▴-91%) of soybean protein isolates(*).

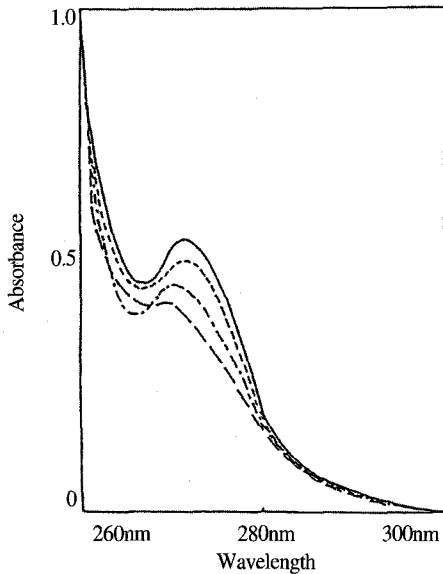


<Fig. 6> Changes in ionization of tyrosine modified by acetylation (○-30%, ■-60%, ▴-88%) of soy-bean protein isolates (*).

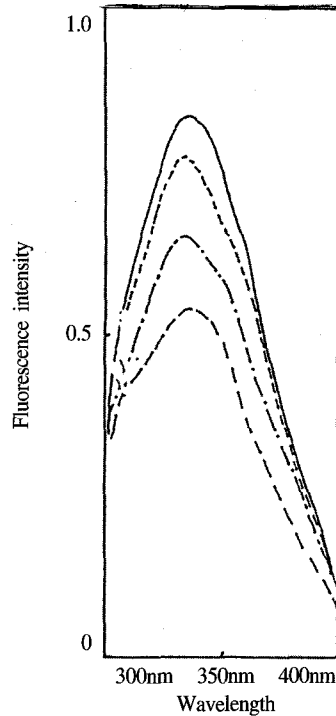
스펙트럼 변화는 분리대두단백질의 dimethylglutaryl화에 의하여 자외선 흡광도는 λ_{max} 278nm에서 276nm로 blue shift가 일어나고, 변형의 정도가 증가할수록 흡광도가 점진적으로 감소되었으며, (Fig. 7, 8)에서와 같이 acetyl화 단백질에서도 dimethylglutaryl화와 같은 경



<Fig. 7> UV spectra of soybean protein isolate (-) and dimethylglutarylated soybean protein (···; 33%, - · - ; 64%, - - ; 91%)



<Fig. 8> UV spectra of soybean protein isolate (-) and acetylated soybean protein (···; 30%, - - -; 60%, - · -; 88%)



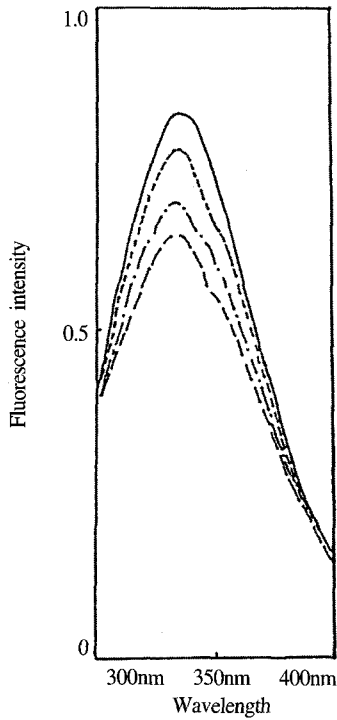
<Fig. 9> Fluorescence spectra of soybean protein isolate (-) and dimethylglutaryl soybean protein (···; 33%, - - -; 64%, - · -; 91%)

향을 나타내었으나 흡광도의 감소가 더 적었다. Simpson 등³⁷⁾은 60%이상의 화학적 변형에 의하여 대부분의 tyrosine 잔기가 화학적으로 변형되어 흡광도가 감소한다고 보고하였으며, Freifelder¹⁹⁾는 polar effect 즉, $n \rightarrow \pi^*$ 전이에서 λ_{max} 의 값은 비극성용매보다는 극성용매에서 blue shift가 일어나고 Shetty 등³⁸⁾은 점진적인 화학적 변형에 의하여 수용액에 방향족 무극성기의 노출에 의하여 수용액에 방향족 무극성기의 노출에 의하여 blue shift가 발생한다고 보고하였다. 본 실험에서 단백질 변형에 의하여 blue shift가 발생한 것은 단백질내부 환경이 극성으로 이동된 것으로 생각할 수 있다. 분리대두단백질을 변형시켰을 때 형광스펙트럼의 변화는 <Fig. 9, 10>과 같이 최대 emission 파장은 분리대두단백질이 333nm에서 변형이 정도가 증가할수록 더 많은 red shift가 발생하여 91% dimethylglutaryl화 단백질은 337nm로 red shift가 일어났으며, 변형도가 증가함에 따라 intensity가 감소하였으나 dimethylglutaryl화의 경우보다는 적었다. 화학적 변형에 의한 형광스펙트럼의 변화는 용매내에서 약산성, 열변성, 음성으로 하전된 방향족 acyl group 등에 의하여 나타나며, 단백질에서 방향족 아미노산인 phenylalanine (278nm), tyrosine (303nm), tryptophan (348nm)의 특징적인 최대 emission 파장을 나타낸다고 보고되어 있다³⁹⁾. Freifelder¹⁹⁾는 단백질 용액에서 용매의 극성이 증가함으로

써 λ_{max} 의 강도가 감소하고 긴파장으로 이동한다고 하였으며, 단백질이 극성용매에 존재할 때 λ_{max} 가 긴 파장으로 이동하면 tryptophan과 tyrosine의 quantum yield가 감소하여 λ_{max} 가 감소한다고 하였다. Damodaran³⁹⁾ 등에 의하면 soy globulin의 succinyl화에 의하여 형광에서 emission의 λ_{max} 가 red shift되었음을 보고하였으며, Rao 등⁴⁰⁾도 같은 결과를 보고하였다. Kim 등⁵⁾은 분리대두단백질의 acetyl화에 의하여, Brinegar 등²⁷⁾은 대두단백질의 citraconyl화에 의하여 λ_{max} 와 emission intensity가 감소한다고 보고하였다. 이상의 연구를 종합하여 볼 때, 본 실험에서 변형에 의하여 형광스펙트럼이 red shift가 일어남으로 보아 tryptophan이 극성용매에 위치하고, emission intensity가 감소하는 것은 tryptophan이 노출되는 등 단백질의 구조 변화를 추정할 수 있으며 dimethylglutaryl화 단백질이 acetyl화의 경우보다 더 많은 단백질의 구조 변화가 있었음을 알 수 있었다.

4) 아미노산조성변화

분리대두단백질과 demethylglutaryl화 또는 acetyl화



<Fig. 10> Fluorescence spectra of soybean protein isolate (-) and acetylated soybean protein (---; 30%, - · - ; 60%, - - ; 88%)

단백질이 아미노산조성은 <Table 1>과 같다. 즉, dimethylglutaryl화 또는 acetyl화 단백질이 아미노산중 isoleucine, leucine, phenylalanine, tyrosine, valine 등 중성의 소수성 아미노산이 증가하고, 염기성과 산성 아미노산은 감소하였다. 또한 변형의 정도가 증가할수록 이들에 대한 증감율이 커졌으며 acetyl화의 경우보다 demethylglutaryl화 단백질이 더 증가하였다. 그러나 개개의 아미노산조성으로 보았을 때에 lysine만을 제외하고는 큰 차이가 없었으며, lysine의 감소는 산 가수분해 중 불완전한 deacyl화에 의한 것으로 판단된다. Sung 등⁸⁾은 phosphoryl화 단백질과 변형시키지 않은 단백질의 아미노산 elution pattern이 거의 같은 것을 나타나 변형에 의한 영양가의 감소는 없었다고 하였고, Thompson 등⁴¹⁾은 채종단백질을 succinyl화 또는 acetyl화시켰을 때 lysine과 isoleucine을 제외한 아미노산함량에 차이가 없었음을 보고하였으며, Goulet 등⁴²⁾은 귀리 단백질을 succinyl화 시켰을 때 소수성 아미노산이 약간 증가하였음을 보고하였으나, Ma⁴³⁾는 귀리단백질을 acetyl화 및 succinyl화 시켰을 때 valine, isoleucine, phenylalanine과 필수 아미노산들이 감소하였다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 valine은 크게 감소되지 않았고 isoleucine과 phenylalanine은 약간 감소되었다.

<Table 1> Amino acid composition of isolated, dimethylglutarylated and acetylated soybean protein.

(Unit : g/100g protein)

A.A.	Sample	Dimethylglutarylated protein			Acetylated soybean protein		
	Soybean protein	33%*	64%	91%	30%	54%	88%
Asp.	9.8	9.4	9.4	9.1	9.8	9.7	9.3
Thr.	3.1	3.0	3.0	2.8	3.1	3.1	3.0
Ser.	3.7	3.6	3.7	3.5	3.8	3.9	3.8
Glu.	17.7	16.9	16.9	16.4	17.8	17.6	16.5
Pro.	4.3	4.0	4.2	4.0	4.4	4.4	4.0
Gly.	3.4	3.3	3.3	3.1	3.4	3.4	3.3
Ala.	3.3	3.2	3.2	3.2	3.4	3.4	3.2
Cys.	1.2	2.2	2.3	2.6	1.8	1.8	1.5
Val.	4.1	4.0	4.0	3.9	4.1	4.1	3.9
Met.	0.6	0.7	0.7	0.7	0.8	0.8	0.7
Ile.	4.3	4.5	4.7	5.0	4.4	4.4	4.5
Leu.	6.5	6.3	6.3	6.5	6.4	6.5	6.5
Tyr.	2.4	2.6	2.6	2.7	2.7	2.7	2.7
Phe.	4.4	4.2	4.0	3.9	3.9	4.0	4.0
His.	2.0	1.9	2.1	2.1	2.0	2.1	1.9
Lys.	5.1	3.9	3.9	3.7	4.5	4.5	4.3
Arg.	13.1	15.0	14.8	16.3	13.6	13.8	16.6

* Degree of modification

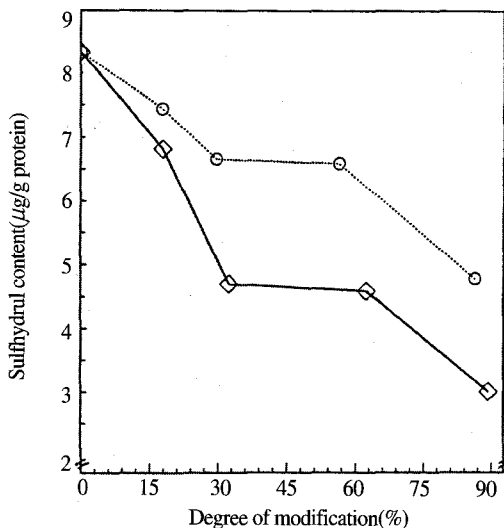
5) Sulfhydryl 기의 함량변화

분리대두 단백질의 화학적 변형에 의한 유리 sulfhydryl기의 함량변화를 측정한 결과는 <Fig. 11>과 같다. 즉, dimethylglutaryl화에 의한 변형 초기에는 급격히 감소하였지만, 30%이상의 변형에 의해서는 감소율이 완만하게 저하되었으며, 91%변형시 유리 sulfhydryl기가 75%로 감소하였다. 그러나 acetyl화에 의한 변형에서도 30% 이상의 변형시 까지 급격히 감소하였으나, 이후 완만하였고, 88% 변형시 유리 sulfhydryl기가 45% 감소하였다.

Choi 등⁴⁴⁾은 면실단백질을 succinyl화 시켰을 때 변형의 정도가 증가할수록 sulfhydryl기가 12.4 μ g/g protein에서 6.7 μ g/g protein으로 감소하였다고 보고하였으며, 이때 disulfide기의 농도에는 변화가 없어 단백질 peptide chain사이에 혹은 단백질의 4차 구조에서 subunit간에 disulfide bond는 붕괴되지 않았음을 보고하였다. Ma 등³²⁾은 egg albumin을 succinyl화 시켰을 때 43.9 μ g/g protein에서 40.8 μ g/g protein으로 감소한다고 하였으며, Gandi 등⁴⁵⁾은 egg albumin을 dimethylglutaryl화시켰을 때 약 40%이상 감소한다고 보고하였으며, 이것은 변형제와 sulfhydryl기 사이의 반응에 의한다고 하였다. 또한 Groninger 등⁴⁶⁾ fish myofibrillar protein을 화학적으로 변형시켰을 때 sulfhydryl기가 약 25% 감소한다고 하였다.

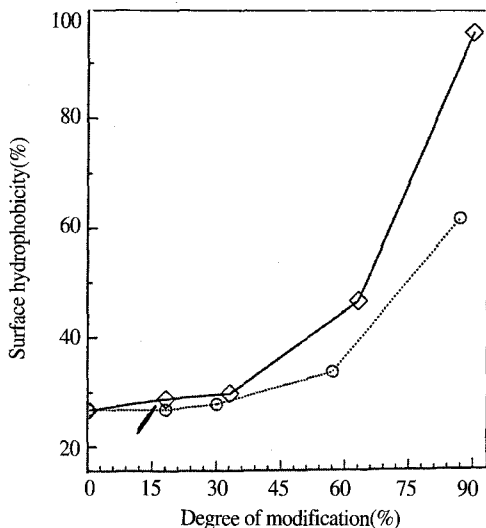
6) 표면 소수성지수 변화

변형에 따른 대두단백질의 표면 소수성지수의 변화



<Fig. 11> Changes in sulfhydryl content of soybean protein isolate modified by dimethylglutarylation (□) and acetylation (○)

를 측정한 결과는 <Fig. 12>와 같다. 즉, dimethylglutaryl화 혹은 acetyl화에 의해 60% 변형시까지의 표면 소수성지수가 완만히 증가하였으나, 60% 이상의 변형에서는 급격히 증가하였다. 또한 30%변형까지는 dimethyl-glutaryl화와 acetyl화에 따른 차이가 없었으나 60%이상에서는 dimethylglutaryl화에 의하여 표면 소수성지수가 급격히 증가하여 acetyl화와 큰 차이를 나타내어 91% dimethylglutaryl화가 88% acetyl화 대두 단백질보다 약 2배의 표면 소수성지수를 나타내었다. 김 등⁴⁶⁾이 보고한 soybean glycinine의 acetyl화에 의하여 표면소수성지수가 증가한다고 하였고, Ma 등³²⁾은 egg albumin의 succinyl화에 의하여 표면 소수성지수가 역시 증가한다고 하였다. 화학적 변형에 의하여 표면소수성지수가 증가하는 것은 분자내 총 음전하의 증가에 비례하며⁴⁷⁾, 자외선 및 형광 스펙트럼분석결과에서 나타난 바와 같이 내부소수성기의 노출과 총 전하가 감소하기 때문이다. 또한 subunit의 해리에 의해서도 표면소수성 지수가 증가하며, tyrosine잔기의 화학적 변형에 의하여 표면 소수성 지수는 약간 증가된다⁴⁸⁾고 보고하였다. 이것은 일반적으로 tyrosine잔기가 친수성보다는 표면 소수성이기 때문이다. 이상의 연구들을 종합하여 볼 때 본 실험의 결과 단백질의 변형에 의하여 내부의 소수성기의 노출과 총전하의 감소, tyrosine 잔기의 화학적인 변형에 의하여 표면 소수성이 증가함을 알 수 있었다.



<Fig. 12> Changes in surface hydrophobicity of soybean protein isolate modified by dimethylglutarylation (□) and acetylation (○)

7) Trypsin inhibitor의 활성도 변화

이화학적변형에 의한 분리대두단백질에 잔류된 trypsin inhibitor의 활성도를 살펴본 결과는 <Fig. 13>과 같다. 즉, 초기 15% dimethylglutarylation에 의한 변형으로 trypsin inhibitor의 활성도가 급격히 감소하였으며, 그 이상의 변형시에는 완만히 감소하여 dimethylglutarylation에 의하여 91% 변형시킨 단백질의 경우에는 7%밖에 잔존하지 않았다. acetylation의 경우도 15% acetylation까지는 급격히 감소하였으나, 이후에는 완만하였고, 88% acetylation에 의하여 trypsin inhibitor의 활성이 20%만 잔존하였다. 이러한 trypsin inhibitor활성의 감소는 acetylation시킨 분리 대두단백질에 있어서 Barman 등³³⁾, Brekke 등⁴⁰⁾ 그리고 Shetty 등³⁸⁾의 결과와도 일치한다.

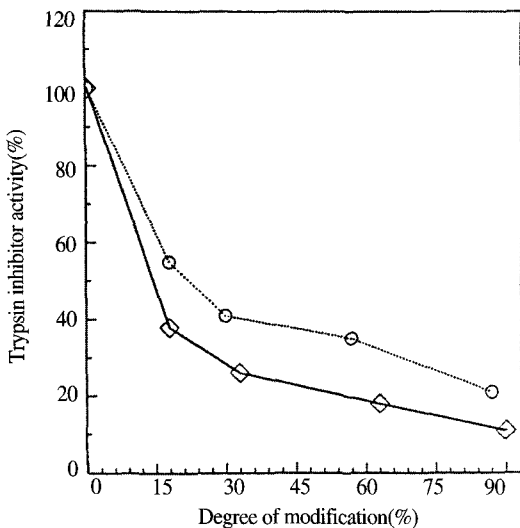
IV. 결론

분리대두단백질의 기능적 특성을 개선할 목적으로 dimethylglutarylation시킨 변형단백질의 구조적 특성과 물리적 특성의 변화를 보았다. 변형처리제인 3,3-dimethylglutaric anhydride와 acetic anhydride를 첨가하여 변형할 경우 변형도가 80%에 이를 때까지는 반응이 급격히 진행되고 그 이후에는 완만하였다. 전기영동한 결과 분리대두단백질에 비하여 변형단백질은 (+)극으로 이동량이 많아지고 단백질분자가 해리되었다. 또한 tyrosine 잔기가 많이 이온화되고 sulfhydryl기

는 감소하였으며, 소수성기가 노출되었다. 분광분석결과 변형에 의한 대두단백질은 자외선에서는 273nm에서 276nm로 형광에서는 333nm에서 337nm로 각각 shift되었으며, 변형도가 증가할수록 intensity가 감소하였다. 이러한 변형에 의한 구조적 변화는 acetylation보다 dimethylglutarylation의 경우가 더욱 컸다. 아미노산의 변화는 lysine이 변형에 의하여 감소되었을 뿐 다른 아미노산의 조성은 큰 변화가 없었으며, trypsin inhibitor의 활성은 대두 단백질에 비하여 91% dimethylglutarylation 단백질은 7%, 88% acetylation 단백질은 20%가 잔존하였다.

■참고문헌

- 1) Akoi H, Orimo N, Shimazu R, Wakabayashi K. Nippon Shokuhin Kyogyo Kagashi 25:668, 1978
- 2) Fulger CV, Dewey JE. US patent 4138500, 1977
- 3) Franzen KL, Kinsella JE. J Agric Food Chem 24:788, 1976
- 4) Kim KS, Rhee JS. Korean J Food Sci Technol 21:714, 1989
- 5) Kim KS, Rhee JS. J Food Biochem 13:187, 1989
- 6) Kim KS, Rhee JS. J Agric Food Chem 38:669, 1990
- 7) Kim NS, Kwon DY, Nam YJ. Korean J Food Sci Technol 20:625, 1988
- 8) Sung HT, Chen HJ, Liu TY, Su JC. J Food Sci 48:716, 1983
- 9) Hirotsuka M, Kito M. US patent 4501194, 1983
- 10) Ross LF, Bhatnager D. J Agric Food Chem 37:841, 1989
- 11) Hirotsuka M, Taniguchi H, Narita H and Kito M. Nippon Shokuhin Kyogyo Kagashi 32:626, 1985
- 12) Hirotsuka M, Taniguchi H, Narita H, Kito M. Nippon Shokuhin Kyogyo Kagashi 32:175, 1985
- 13) Appu AG, Narasinga MS. Int J Peptide Res 14:307, 1979
- 14) Kim SH, Kinsella JE. Cereal Chem 63:342, 1986
- 15) Thanh VH, Shibasaki K. J Agric Food Chem 24:1117, 1976
- 16) Riordan JF, Vallee BL. Biochem 3:1768, 1962
- 17) Moore S, Stein, WH. J Biol Chem 176:367, 1948
- 18) Davis BJ. N Y Acad Annuals 121:404, 1964
- 19) Freifelder D. Physical Biochemistry, p.110, Freeman, Sanfransisco. 1982
- 20) Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ. Science 193:265, 1951



<Fig. 13> Changes in residual trypsin inhibitor activity of soybean protein isolate modified by dimethylglutarylation (□) and acetylation (○)

- 21) Savoy CF, Heinis JL, Seals RG. *Cereal Chem* 56:562, 1975
- 22) Ellman GL. *Arch Biochem, Biophys* 82:70, 1959
- 23) Kakade ML, Simpson M, Liener IE. *Cereal Chem* 46:518, 1969
- 24) Hayakawa S, Nakai S. *Protein Res* 14:307, 1979
- 25) Kim YS, Hwang JK, Cho EK, Lee SY, Pyun YR. *Korean J Food Sci Technol* 17:383, 1985
- 26) Rao AFA, Rao MSN. *Int J Pept Protein Res* 14:307, 1979
- 27) Brinegar AC, Kinsella JE. *J Agric Food Chem* 28:818, 1980
- 28) Beuchat LR. *J Agric Food Chem* 25:258, 1977
- 29) Choi YR, Lusas EW, Rhee KC. *J Food Sci* 47:1713, 1982
- 30) Grant DR. *Cereal Chem* 50:417, 1973
- 31) Sato Y, Nakamura R. *Agric Biol Chem* 41:2163, 1977
- 32) Ma CY, Holme J. *J Food Sci* 47:1454, 1982
- 33) Barman BG, Hanson JR, Mossey AR. *J Agric Food Chem* 25:638, 1977
- 34) Ma CY, Wood DF. *J Am Oil Chem Soc* 64:1726, 1987
- 35) Messinger JK, Rupnow JH, Zeece MG, Anderson RL. *J Food Sci* 52:1620, 1987
- 36) Gounaris AD and Perlman GE. *J Biol Chem* 242:11, 1967
- 37) Simpson RT, Riordan JF, Valley BL. *Biochem* 2:616, 1963
- 38) Sheety IK, Rao N. *J Pept Protein Res* 11:305, 1978
- 39) Darnodaran S, Kinsella JE. *J Agric Food Chem* 29:1253, 1981
- 40) Carpenter JA, Saffle RL. *Food Technol* 19:1567, 1965
- 41) Thompson LU, Cho YS. *J Food Sci* 49:1584, 1984
- 42) Goulet G, Ponnampalam R, Amiot J, Roy A, Brisson GJ. *J Agric Food Chem* 35:589, 1987
- 43) Ma CY. *J Food Sci* 49:1128, 1984
- 44) Choi YR, Lusas EW, Rhee KC. *J Food Sci* 48:1275, 1983
- 45) Gandhi SK, Schultz JR, Boughey FW, Forsythe RH. *J Food Sci* 33:163, 1968
- 46) Groninger JS, Miller R. *J Food Sci* 40:327, 1975
- 47) Borton RJ, Webb NB, Bratzler L. *J Food Technol* 22:506, 1968
- 48) Nakai S. *J Agric Food Chem* 31:679, 1983
- 49) Brekke JH, Johnson EA. *J Food Sci* 48:722, 1983