

博士學位論文

Neutrase의 탈아미드 반응에 의한
단백질의 기능성 변화

濟州大學校 大學院

食品工學科



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

金 孝 宣

1996年 6月

Neutrase의 탈아미드 반응에 의한 단백질의 기능성 변화

指導教授 姜 永 周
金 孝 宣

이 論文을 工學 博士學位 論文으로 提出함

1996年 8月

金孝宣의 工學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長	宋 道 大 鎮	
委 員	柳 洪 秀	
委 員	高 正 三	
委 員	金 洙 賢	
委 員	姜 永 周	

濟州大學校 大學院

1996年 8月

사 사

먼저 부족한 저를 엄한 다스림과 따뜻한 격려로 이끌어 주신 강영주 지도교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 논문심사를 맡아주시고 많은 귀중한 조언을 주셨던 송대진 교수님, 세심하게 논문을 다듬어 주신 고정삼 교수님, 바쁘신 가운데서도 논문의 기틀을 정리하여 주신 류홍수 교수님과 김수현 교수님께 감사드립니다. 또한 논문이 모양을 잡을 수 있게 세심한 충고를 하여 주신 임상빈 교수님과 학위과정 동안 따뜻한 격려와 사랑으로 이 어려운 과정을 끝까지 마칠 수 있도록 하여 주신 하진환 교수님께 깊은 감사를 드리며, 배움의 길에 도움을 주신 김재하 교수님과 고영환 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

그동안 함께 연구하며 힘들고 어려운 일들을 함께해 준 식품공학과 석/박사과정 선배, 동료 및 후배들과 식품가공II실험실 여러분께도 감사의 마음을 전합니다.

공부를 끝마칠 수 있도록 묵묵히 지켜봐주신 어머님께 깊은 감사를 드리며, 끝내 이 논문이 나오는 것을 보지 못하고 돌아가신 아버님의 영전에 이 논문을 바칩니다.

이 력 서

성 명 : 김 효 선 (金 孝 宣)
생년월일 : 1961년 1월 3일
출 생 지 : 제주도
본 적 : 제주도 서귀포시 하예동 203

학 력

1979년 3월 ~ 1983년 2월 : 서울여자대학 식품과학과 졸업 학사
1987년 3월 ~ 1989년 2월 : 제주대학교 공과대학 식품공학과 졸업 석사
1991년 3월 ~ 1996년 8월 : 제주대학교 공과대학 식품공학과 졸업 박사

연구 실적 목록

1. 이장순, 김효선, 김충희, 정용현, 강영주, 1991. 유채박 단백질의 정제조건에 따른 이화학적 성질과 기능성에 관한 연구. 한국영양식량학회지, 20(6). 551-558
2. 김효선, 양영택, 정용현, 고정삼, 강영주, 1992. 좁쌀약주의 청징화. 한국식품과학회, 24(1). 101-106
3. 김충희, 김효선, 정용현, 강영주, 1992. 유채단백질의 단백질효소에 의한 가수분해 조건. 한국영양식량학회지, 25(5). 513-518
4. 김충희, 김효선, 이장순, 강영주, 1992. 유채단백질의 proteolysis에 의한 기능성 변화. 한국영양식량학회지, 25(5). 519-524
5. 김효선, 강영주, 1994. 제주 전통엿 제조를 위한 최적당화조건. 한국식품과학회, 26(6). 659-664
6. 김효선, 강영주, 1995. Neutralse에 의한 glutamine과 asparagine 잔기의 탈아미드화. 한국식품과학회, 27(5). 794-798

7. 김효선, 강영주, 1995. BSA, egg albumin, 분리대두단백질의 용해도에 미치는 neutrase에 의한 탈아미드효과. 한국영양식량학회, 24(5). 811-815
8. 김병주, 김효선, 강영주, 1995. 감귤 품종별 이화학적 성분비교. 농산물저장유통학회지, 2(2). 259-268
9. 강영주, 류근태, 김효선, 1996. 기능성 음료의 개발을 위한 갈조류 생세포액의 제조. 한국영양식량학회지, 25(1). 94-103

Functional Properties of Deamidated Proteins with Neutrase

Hyo-Sun Kim

(Supervised by Professor Yeung-Joo Kang)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

August 1996

총 목 차

List of figures	III
List of tables	V
Abbreviation	VI
Summary	1
서론	3
재료 및 방법	11
재료	11
탈아미드	11
탈아미드율 측정	12
가수분해도 측정	13
용해도 측정	13
상대형광 스펙트럼 측정	13
SDS-PAGE 분석	13
표면소수성 측정	14
유연성(Flexibility) 측정	14
유리 SH 및 S-S결합 함량 측정	15
열용집성(Heat induced aggregation)	16
열용고성(Coagulation)	16
겔화성	17
수 및 유흡수성	17
칼슘용고성	17

거품성	18
유화능	18
Lysinoalanine 함량	19
결과 및 고찰	20
최적 탈아미드 효소의 선정	20
Neutralse에 의한 최적 탈아미드 조건	25
용해도	32
상대형광 스펙트럼	38
SDS-PAGE	41
표면소수성	43
유연성(Flexibility)	44
유리 SH 및 S-S결합 함량	45
열응집성(Heat induced aggregation)	46
열응고성(Coagulation)	48
겔화성	49
수 및 유흡수성	53
칼슘응고성	55
거품성	56
유화특성	65
Lysinoalanine 생성여부	75
요약	77
참고문헌	79



List of Tables

Table 1. Changes in surface hydrophobicity of deamidated proteins	43
Table 2. Changes in flexibility of deamidated proteins	45
Table. 3. Changes in SH and S-S contents of deamidated proteins	46
Table 4. Least gelation concentration of BSA, EA and SPI	50
Table 5. Time and temperature required for gel formation of BSA at the least gelation concentration	51
Table 6. Time and temperature required for gel formation of EA at the least gelation concentration	52
Table 7. Time and temperature required for gel formation of SPI at the least gelation concentration	53
Table 8. Water and oil absorption of deamidated proteins	54
Table. 9. Lysinoalanine contents of deamidated proteins	76



Abbreviation

ANS	1-anilino-8-naphthalenesulfonate
BSA	bovine serum albumin
D-BSA	deamidated bovine serum albumin
D-EA	deamidated egg albumin
D-SPI	deamidated soy protein isolate
EA	egg albumin
EAI	emulsion activity index
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EA	emulsion stability
N-BSA	native bovine serum albumin
N-EA	native egg albumin
N-SPI	native soy protein isolate
NSI	nitrogen solubility index
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
S ₀	surface hydrophobicity
SPI	soy protein isolate
TCA	trichloroacetic acid
tris	tris(hydroxymethylamino)methane

Summary

Deamidation of food proteins with protease was investigated to prepare enzymically modified proteins with specific functional properties. To determine the optimum deamidation condition and enzyme, bovine serum albumin(BSA), egg albumin(EA) and soy protein isolate(SPI) were deamidated with different enzymes and conditions. Physicochemical and functional properties of deamidated proteins with neutrase as the optimum enzyme were investigated.

For all enzyme tested, the optimum condition for deamidation of proteins was pH 10, 20°C and 3hr. Neutrase was superior to papain, pronase, bromelain and ficin for deamidation of food proteins. BSA, EA, SPI and casein were deamidated by 24, 20, 14, 14%, respectively. However, high proteolysis was observed accompanying deamidation of casein.

Solubility of deamidated BSA(D-BSA) in distilled water decreased slightly at pH 4~8 compared to native BSA(N-BSA). While it decreased greatly at acidic pH in 1.0M NaCl solution. Solubility of deamidated EA (D-EA) in distilled water increased at lower than pH 4 and higher than pH 6, while it decreased greatly in NaCl solution at acidic pH. Solubility of deamidated SPI(D-SPI) increased remarkably only at higher than pH 6 in NaCl solution.

Deamidation had no effect on the maximum fluorescence band of EA and SPI, but caused blue shift in D-BSA.

SDS-PAGE showed that D-BSA was divided into 3 bands, while no changes were observed with D-EA and D-SPI.

Deamidation improved surface hydrophobicity without changes on contents of free SH and S-S bond.

Deamidated proteins were increased heat resistance thereby decreasing the formation of heat induced aggregation or gel.

Water and oil absorptions of D-BSA, D-EA and D-SPI were increased remarkably.

Deamidation increased 3.3 and 15 times on calcium induced coagulation of BSA and EA respectively, had no effect its of SPI.

D-BSA, D-EA and D-SPI showed excellent foaming capacity.

Deamidation improved slightly foam stability of BSA, but decreased those of EA and SPI.

Emulsion activities of BSA, EA and SPI were increased by deamidation, specially D-EA in 0.2M NaCl and D-SPI in NaCl solution at above pH 6.

Emulsion stability(ES) of BSA did not change greatly by deamidation, ES of D-EA was increased in distilled water and in 0.2M NaCl except neutral pH while it was increased at above pH 4 in 1.0M NaCl. Deamidation also improved ES of SPI in both distilled water and NaCl solution.

Lysinoalanine was not detected in D-EA and SPI but it was determined 0.0339mg per 100g in D-BSA.

서 론

식품산업이 발전하고 다양해지면서 단백질의 기능성 개선을 위한 연구도 지난 20여년간 많은 발전을 이루워왔다. 단백질의 기능적 특성인 유화능, 거품성, 겔형성능, 용해도, 보수성, 습윤성 및 점도 등은 단백질을 식품소재로 이용하기 위한 기준이 된다. 이와 같은 단백질의 식품학적 기능성은 영양가와 다른 특성으로서 그 이용에 큰 영향을 미친다(Kinsella, 1976; Hermansson, 1973). 또한 단백질은 활성기의 분포, 분자구조(Means와 Feeney, 1971) 및 크기, 전자상태(Haque과 Kito, 1984; Kinsella, 1984) 등이 다르기 때문에 서로 다른 기능성을 가지게 된다. 따라서 식품을 제조하거나 가공하는데 적당한 구조를 가진 단백질을 개발하기 위하여 또는 단백질의 여러 가지 물리화학적 특성을 개선시키기 위하여, 물리적 처리에 의한 물리적 변형(physical modification)과 화학제 처리에 의한 화학적 변형(chemical modification), 효소처리에 의한 효소적 변형(enzymic modification)과 같은 단백질 변형방법들이 단백질 공학의 한 분야로 꾸준히 연구되어 오고 있다.

식품단백질의 물리적 변형으로는 가열(Kato와 Nakai, 1980; Kato 등, 1983; Townsend와 Nakai, 1983; Shimizu 등, 1986) 또는 가압 방법 등이 있으나 고도의 기능성 개선은 기대하기 어렵다.

화학적 변형은 정전기적 상호반응의 변화(Feeney와 Whitaker, 1977)나 분자의 구조적 변화(Kella 등, 1988)를 일으켜 단백질의 기능성을 향상시키는 것으로 알려지고 있는데 그 방법으로는 숙시닐화(Franzen과 Kinsella, 1976a, b; Alford 등, 1984; Siu와 Thompson, 1992), 아세틸화(Barman 등, 1977; Narayan과 Rao,

1984), 인산화(Sung 등, 1983; Matheis 등, 1983; Hirotsuka 등, 1984) glycosylation(Waniska와 Kinsella, 1984), disulfide 결합 환원반응 (Rothenbuhler와 Kinsella, 1986; Kim과 Kinsella, 1987; Kella 등, 1986, 1989) 등이 있다. 그러나 이러한 화학적 변형은 단백질의 구조를 변화시켜 원하는 방향으로 기능성의 변화를 유도할 수 있으나 필수아미노산의 손실 등으로 영양가의 저하를 일으키거나 합성화합물과 같은 바람직하지 못한 반응물이 생기는 문제점이 있다.

이러한 문제를 해결하기 위하여 효소에 의한 변형방법이 많이 시도되고 있다. 효소적 변형방법(Puski, 1975; Monti와 Jost, 1978; Kim과 Kinsella, 1987)은 빠른 반응속도, 온화한 반응조건, 고정화의 가능성 등의 장점이 있는 반면 비용이 많이 드는 단점이 있다. 그러나 효소적 반응에 의한 단백질의 기능성 변화는 물리적, 화학적 방법 보다 많은 이점을 가지고 있어 최근에 이를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 효소적 변형방법 중 가장 많이 이용되는 효소에 의한 단백질 가수분해(proteolysis)는 분자크기 및 구조, 단백질 분자내 또는 분자간 결합의 강도변화 등을 일으켜(Adler-Nissen, 1978) 단백질의 용해도, 유화능, flavor 등 여러 가지 기능성을 개선시킨다. 그러나 이 방법은 가수분해 조건을 조절하기 어려우며, 특히 쓴맛과 이취를 내는 물질이 생성되는 결함이 있다. 이런 쓴맛 생성의 문제점을 해결하기 위한 방법으로 plastein 반응(Fusimaki 등, 1970; Arai 등, 1970) 또는 탈아미드 방법(Ma와 Khanzada, 1987; Kato 등, 1987a, b; Hamada, 1991a, b; 1992)이 우수한 것으로 보고되고 있다.

식품단백질들은 탈아미드에 의하여 산성기로 전환될 수 있는 glutamine과 asparagine을 많이 함유하고 있다. 이 두 아미노산에 축쇄결합되어 있는 아미드기(amide group)는 단백질의 구조를 안정시키는데 매우 중요한 역할을 하나 쉽

게 가수분해되어 탈아미드 된다. 그런데 glutamine과 asparagine의 아미드기가 가수분해되어 glutamic acid와 aspartic acid로 전환되는 탈아미드 반응은 단백질 고유의 고분자 형태는 그대로 유지시키면서 분자표면의 음전하(negative charge)를 증가시켜(Matsudomi 등, 1982), 2~6% 정도의 탈아미드만으로도 기능성에 변화를 일으키게 하는 방법(Shih, 1991; Hamada와 Marshall, 1989)으로 알려져 있다. 탈아미드 방법으로는 화학적(Finley와 Kohler, 1979; Matsudomi 등, 1985; Ma 등, 1986; Ma와 Khanzada, 1987; Zhang 등, 1993) 또는 효소적 방법(Kato 등, 1987a, b, 1987, 1989; Hamada 등, 1988, 1991a, b, 1992)이 있다.

1) 화학적인 방법에 의한 탈아미드

화학적 방법에 의한 탈아미드는 산이나 알칼리, 열처리 등에 의해서 일어나는데 주로 단백질에 약산을 처리하여 일으킨다. 단백질에 약산을 가하면 단백질의 glutamine과 asparagine 잔기의 탈아미드와 부수적으로 펩티드결합의 개열이 일어나게 된다. 잘 조절된 산성조건하에서는 asparagine 잔기의 탈아미드가 다른 펩티드결합의 개열보다 약 100배정도 빨리 일어난다(Matsudomi 등 1985). 이러한 산 가수분해는 glutamine과 asparagine의 탈아미드를 일으켜 단백질 전하의 변화를 가져와 단백질의 용해도가 변화하게 되며, 펩티드결합의 개열 혹은 다른 변성으로 인하여 소수성 아미노산들이 노출됨으로써 좀 더 양성적인(amphiphilic) 성질을 띄게 되어 단백질의 기능적 성질에 변화를 일으킨다. Ma와 Khanzada(1987)는 귀리 농축단백질을 산 처리하여 탈아미드시킨 결과 용해도, 유화능, 유흡수성 및 수흡수성이 크게 개선되었다고 보고하였다. 또한 산에 의한 탈아미드로 gluten의 표면장력이 감소되었으며 표면소수성은 증가하여 유

화능(Matsudomi 등, 1982) 및 용해도(Wu 등, 1976)가 증가하였다고 하였다. 그런데 산에 의한 탈아미드는 100℃에서 30분간 0.05N HCl로 처리하였을 때 일반적으로 10%의 탈아미드가 일어나는데(Matsudomi 등, 1985), 실제적인 효과를 얻기 위해서는 0.5N 이상의 HCl과 같은 강산과 100℃보다 높은 온도의 다소 격렬한 조건하에서 반응시켜야 하였다고 보고하였다(Shih와 Kalmer, 1987). 그러나 이러한 조건에서는 종종 단백질분자의 과다한 가수분해가 일어나 쓴맛이 생 성되거나 풍미가 나빠지기도 한다. 따라서 보다 온화한 조건에서 효과적인 탈아미드를 일으키기 위해서는 촉매에 의한 방법이 이상적이라고 보고되고 있다(Shih와 Kalmer, 1987; Shih, 1987). Shih와 Kalmer(1987)는 이러한 촉매에 의한 탈아미드 방법 중 sodium dodecyl sulfate(SDS)에 의한 탈아미드 촉매반응이 우수하였다고 보고하였는데 이에 의하면 대두단백질, 땅콩단백질, 면실단백질을 70℃에서 0.2N HCl과 0.04M SDS로 2시간 처리하였을 때 탈아미드가 각각 33.7, 27.8, 42.0% 일어났으며, 이 때 펩티드결합의 가수분해는 2.0% 이하였다고 하였다. 또한 이들 단백질은 탈아미드로 용해도, 수흡수성, 유화능, 거품성 등이 개선 되었다고 하였다. 그러나 SDS의 촉매에 의한 단백질의 탈아미드는 용해도와 유화능 등 단백질의 기능성은 개선시키지만 반응물 안에 남아있는 SDS를 분리 제거하여야 하는 결점이 있다. 따라서 이를 해결하기 위한 방법으로 SDS보다는 제거가 쉬운 Dowex 50 수지 (불용성 sulfonate anions 형태)에 의한 촉매반응이 제안되었다(Shih, 1987). 대두추출물 단백질에 0.3N HCl을 가하여 58~85℃ 범위의 온도에서 반응시켰을 때 아미드기의 9.0~37.5%가 탈아미드되었으나 Dowex 50 수지를 이용하였을 때는 반응온도가 증가함에 따라 탈아미드가 3.0배 까지 증가하였다고 보고하였다. 또한 Dowex 50 수지의 촉매에 의하여 탈아미드

된 대두단백질의 기능성은 거품안정성을 제외한 모든 기능성들이 향상되었다고 보고하였다.

또한 Shih(1991)는 대두단백질의 탈아미드에 대한 음이온의 효과 연구에서 중탄산염 및 인산염과 같은 음이온은 유리 glutamine의 탈아미드를 가속화시키며 음이온 촉매에 의하여 탈아미드된 대두단백질은 용해도, 거품성, 유화능이 증가되었다고 보고하였다. 그러나 이런 화학적 방법에 의한 탈아미드는 단백질의 기능성을 매우 효과적으로 개선시킬 수는 있으나 단백질의 변성 및 펩티드결합의 분해를 일으키게 된다는 문제점이 있다.

2) 효소적인 방법에 의한 탈아미드

Glutamine의 잔기인 아미드기의 치환을 촉매하는 효소인 transglutaminase가 glutamine의 가수분해, 즉 탈아미드를 촉매한다고 발표(Mycek와 Waelsch, 1960)한 이후, Kikuchi 등(1971)이 토양미생물 *Bacillus circulans*에서 peptidoglutaminase(PGase)를 분리하였으며, 이 효소가 glutamine의 carboxyamide의 탈아미드를 촉매한다고 보고함으로써 효소적 탈아미드에 대한 연구가 본격적으로 시행되어졌다.

Gill 등(1985)은 casein과 유청단백질의 전하특성의 변형을 위하여 PGase를 이용한 결과 단백질의 가수분해에는 PGase II만이 관여하며 PGase I은 관여하지 않았고, PGase에 의한 casein과 유청단백질 가수분해물의 탈아미드 활성은 극히 제한적이었다고 보고하였다.

그 후 Hamada 등(1988)은 대두펩티드와 대두단백질의 탈아미드를 위하여 PGase를 이용한 결과 대두펩티드를 쉽게 탈아미드하였으나 대두단백질에 대한

활성은 매우 낮았다고 보고하였다. 이는 대두단백질이 가지는 독특한 분자구조와 거대분자 때문이며, 습열처리(100°C, 10분)에 의하여 단백질의 구조를 변형시키거나 alcalase 등과 같은 가수분해효소를 처리하여 단백질 분자크기를 줄임으로써 PGase에 의한 탈아미드 활성을 27배 증가시킬 수 있었다고 보고하였다(Hamada와 Marshall, 1988). 그러나 그 결과 단백질 가수분해에 의하여 쓴맛을 내는 물질이 생성되었다. 이것을 해결하기 위하여 단백질 가수분해도(Degree of Hydrolysis, DH)를 5% 이하로 억제시키면서 100°C에서 15분간과 30분 동안 열처리 한 후 PGase 처리하였다. 그 결과 2.0 DH 대두단백질 가수분해물에서는 6.0과 8.2%, 4.0 DH에서는 12.8과 16.0%의 탈아미드가 이루어졌으며, 단백질의 용해도와 유화능, 거품성이 개선되었다고 보고하였다(Hamada와 Marshall, 1989).

Hamada(1992)는 대두단백질 외에 casein과 glutelin을 알칼리에 용해하고 가수분해시킨 후 PGase를 작용시킨 결과 각각 48, 37, 39%가 탈아미드되었다고 보고하였다. 그러나 PGase에 의한 단백질의 탈아미드는 천연상태의 단백질에는 적용이 어려우며, PGase의 정제 분리에 어려움이 많아 실제 산업적으로 적용하기에는 어려운 문제가 있다.

Papain은 알칼리성에서 펩티드결합 가수분해와는 다른 transamidation과 transesterfication을 촉매하는 것으로 알려져 있다. 이것은 단백질 내의 glutaminyl과 asparaginyal 잔기의 탈아미드가 papain에 의해 일어날지도 모른다는 가능성을 의미한다. Kato 등(1987a)은 단백질을 pH 10에서 papain, chymotrypsin, pronase로 처리하였을 때 ovalbumin과 lysozyme이 탈아미드되었다고 보고하였다. 또한 chymotrypsin에 의한 탈아미드는 단백질의 표면소수성과 유연

성(flexibility)을 증가시켜 유화능과 거품성의 개선을 일으켰다고 하였다(Kato 등, 1987b). 또한 Matsudomi 등(1986)은 알칼리성 pH에서 gluten을 chymotrypsin 처리하였을 때 25%의 탈아미드가 일어났으며, 천연 gluten은 불용성단백질이지만 탈아미드된 gluten은 용해도가 크게 증가하였고 또한 유화능도 증가하였다고 보고하였다. 그러나 단백질 가수분해효소에 의한 탈아미드는 반응액(기질) 내에 효소가 그대로 남아 있게 되는 문제점이 있었다. Kato 등(1989)은 고정화 효소를 이용하여 이 문제의 해결을 시도하였다. 그러나 chymotrypsin의 고정화에 의한 알칼리성 pH에서의 탈아미드는 고정화된 효소-기질계의 입체장애에 의하여 유리 chymotrypsin에 의한 탈아미드율보다 약 반 정도 감소하였다. 그러나 고정된 chymotrypsin에 의한 탈아미드는 더 좋은 proteolysis의 제어와 반응계로부터 단백질 가수분해효소를 쉽게 제거할 수 있는 장점이 있었다고 하였다.

이와 같이 단백질 가수분해효소는 알칼리성에서 glutaminyl과 asparaginyl 잔기의 아미드결합만을 선택적으로 가수분해하는 탈아미드 반응을 일으켰다고 보고함으로써 탈아미드가 특정효소에 의해서가 아니라 반응조건의 조절에 따라 단백질 가수분해효소에 의해서도 일어난다는 것이 알려지게 되었다. 단백질 가수분해효소에 의한 탈아미드는 가능한 한 펩티드결합의 분해를 억제하면서 일어나야만 유용하다. 또한 효소에 의한 탈아미드가 상업적으로 대량 생산되고 있는 단백질 가수분해효소들에 의하여 일어난다면 식품가공 산업계에 유용한 일이 될 것임에도 불구하고 이에 관한 연구는 극히 소수의 연구자에 의하여서 몇몇의 효소(papain, pronase E, trypsin, chymotrypsin)와 기질(ovalbumin, casein, globulin)에 대하여서만 이루어져 있는 실정이다.

본 연구에서는 탈아미드 효소로 다른 연구자에 의하여 아직 검토되지 않았으며 비교적 쉽게 구입이 가능한 단백질 가수분해효소 중 neutrase를 사용하였는데, neutrase는 *Bacillus subtilis*에서 분리해 낸 protease로서 pH 5.5~6.5, 온도 45~55°C 범위에서 최적 가수분해 작용을 나타내는 단백질 가수분해효소이다. Neutrase는 보리를 이용하여 술을 양조할 때 보리에 들어있는 단백질 가수분해 효소 저해제에 의하여 저해를 받지 않으므로 맥아의 단백질 가수분해효소를 강화시키기 위하여 첨가하거나, 제빵시 gluten의 강도를 완화시키기 위하여 주로 이용되는 효소이다. Neutrase를 이용한 연구로는 저지방 치즈의 품질에 미치는 liposome에 의하여 캡슐화된 neutrase와 열처리된 *lactobacilli*의 영향(Skeie 등, 1995)과 단백질 가수분해물의 제조를 위한 neutrase의 적용(Surowka와 Fik, 1992)에 관한 연구가 있을 뿐 neutrase를 이용한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 neutrase에 의한 단백질의 탈아미드 및 탈아미드 후의 기능성 변화에 대한 연구는 새로운 소재의 단백질 식품을 개발해내는데 중요한 자료가 될 것으로 여겨진다.

따라서 본 연구는 최적 탈아미드 효소로 선정된 neutrase에 의한 우혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)의 탈아미드 최적 반응조건을 알아보고, 이 최적 조건에서 BSA, 난알부민(egg albumin, EA)과 대두분리단백질(soy protein isolate, SPI)을 탈아미드시킨 후 탈아미드에 의한 이들 단백질들의 기능성 즉, 용해도, 상대형광 스펙트라, 표면소수성, 유연성, 유리 SH기 및 S-S 함량, 열응고성, 열응집성, 겔화성, 거품성, 유화능 등이 어떻게 변하는지를 알아봄으로써 새로운 기능성을 가지는 단백질 식품소재 개발하는데 그 목적이 있다.

재 료 및 방 법

재 료

기질로는 bovine serum albumin(Sigma, A 4503, USA), egg albumin (Hayashi, Ltd, Japan), soy protein isolate(ADM, England, NSI: 28.6), casein (Sigma, U.S.A)을 사용하였으며 효소는 neutrase (Novo, 1.5AU/g, Denmark), ficin(Sigma, 1.3units/mg solid, USA), bromelain (Sigma, 1.87 units/mg solid, USA), pronase(Calbiochem, CA, USA)를 사용하였다.

탈아미드

단백질 가수분해효소에 의한 glutamine과 asparagine 잔기의 탈아미드는 Kato 등(1987a)의 방법에 준하여 행하였으며(Fig. 1), 생성된 암모니아는 한외여과기(Pellicon Lab., Casser System, Japan Millipore)에 30K dalton cut-off 한외여과막(polysulfone)을 장치하여 제거하였다.

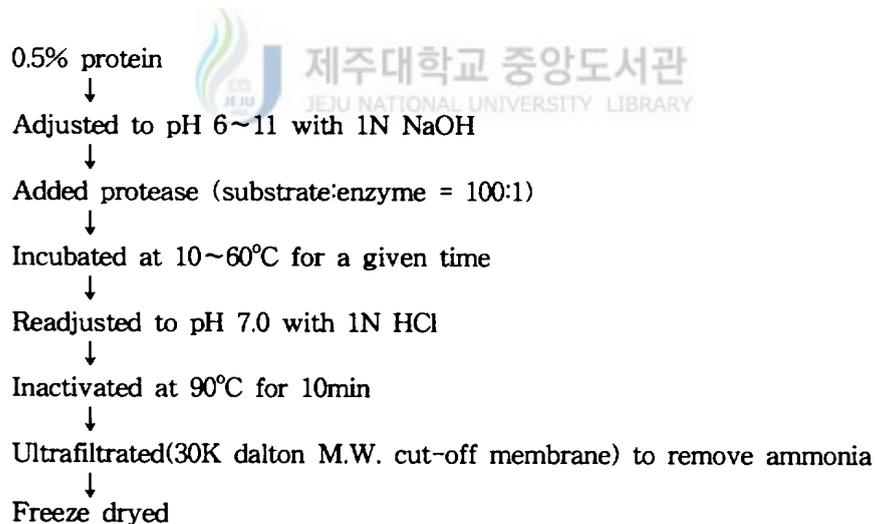


Fig. 1. Deamidation of glutaminyl and asparaginyl residues from protein.

탈아미드올 측정

10ml 유리 앰플에 동결건조한 탈아미드된 시료 50mg과 3N HCl 5ml를 넣고 밀봉한 후 100°C 수욕상에서 3시간 동안 가열하여 완전히 탈아미드시켰다. 이때 생성된 암모니아량은 Wilcox의 미량확산방법(1967)에 의하여 측정하였다(Fig. 2).

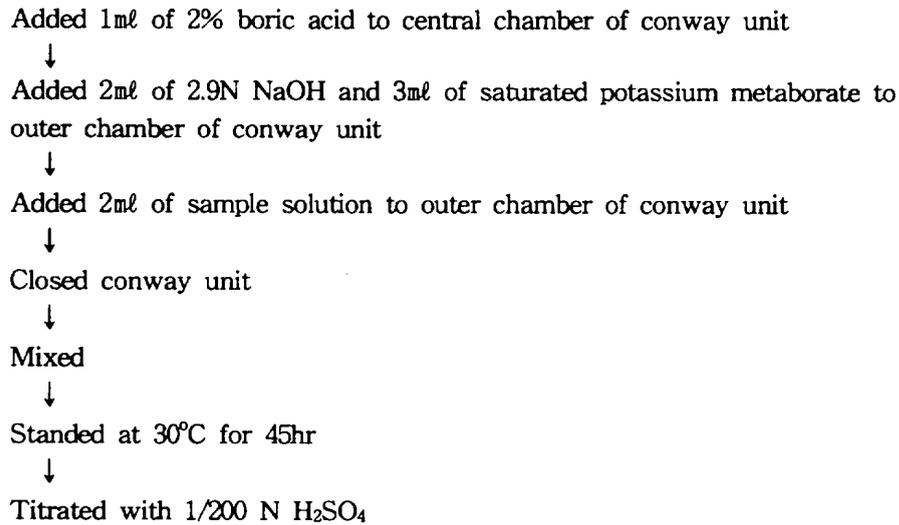


Fig. 2. Measurement of degree of deamidation.

단백질의 glutamine과 asparagine 잔기의 탈아미드올은 다음 식에 의하여 계산하였다.

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

N : 변형되지 않은 단백질의 1/200N H₂SO₄ 적정값

D : 탈아미드 된 단백질의 1/200N H₂SO₄ 적정값

가수분해도(proteolysis) 측정

시험관에 1% 시료용액 2ml와 20% trichloroacetic acid(TCA) 2ml를 첨가하여 혼합한 후 12,000g에서 20분간 원심분리한 다음 상정액을 취하여 micro-biuret 방법(Itzhaki와 Gill, 1964)에 의하여 단백질 함량을 측정하고 다음 식에 의하여 가수분해도를 계산하였다.

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

용해도 측정

시료 단백질 0.5g을 50ml의 증류수에 녹이고 이 용액을 1N NaOH로 pH 12로 조정하고 다음 2N HCl로 pH를 10에서 3까지 재조정하면서 각 pH에서 2ml씩 취하여 10,000g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상정액을 micro-biuret 방법(Itzhaki와 Gill, 1964)으로 측정하였다.

상대형광 spectra 측정

시료단백질 0.2g에 0.1M sodium phosphate citrate 완충액(pH 8.0)을 2ml 가하여 녹인 용액을 다시 10배로 희석한 후 여과지(Toyo No.2)로 여과한 여과액을 spectrophotometer(Perkin-Elmer Ltd. LS-5)를 사용하여 280nm에서 들뜨게 하여 300nm에서 400nm까지의 상대형광값을 측정하였다.

SDS-PAGE 분석

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Kang(1984)의 방법을 변형하여 실시하였다. 겔은 130×1×120mm(W×D×H) 규

격한 slab 겔로, 겔의 최종농도는 7.5%, 전개길이는 10cm였으며, 전개 완충액은 pH 7.0으로 조정하여 사용하였다. 시료량은 native BSA는 20 μ l, deamidated BSA는 35 μ l, native EA, deamidated EA, native SPI, deamidated SPI는 40 μ l씩 주입하였으며, 시료당 6mA의 전류를 사용하여 2시간 30분 동안 실온에서 전개시켰다. 전개된 겔은 0.25% coomassie brilliant blue R-250을 사용하여 8시간 동안 염색시켰으며, 탈색은 메탄올과 증류수, 초산을 각각 2 : 2 : 1의 비율로 혼합하여 실시하였다.

표면소수성(surface hydrophobicity, S_o) 측정

Toro-vazquez와 Rengenstein(1989)의 방법에 따라 시료단백질 0.2g에 0.02% NaN_2 을 함유하고 있는 0.01M sodium phosphate-citrate 완충액(pH 8.0)을 20ml 가하고, 이 용액을 다시 10배로 희석하였다. 이 0.1% 단백질 용액을 여과지(Toyo No.2)로 여과한 다음 여액을 micro-biuret 방법(BSA, std.)으로 단백질 농도를 0.25mg/ml 되게 조정하였다. 여기에 8mM의 1-anilino-8-naphthalenesulfonate(ANS) 40 μ l를 가하여 375nm에서 들뜨게 하고 470nm에서 단백질량(0.02-0.25 mg)을 변화시키며 상대형광값을 측정하여 직선회귀방정식의 기울기로부터 S_o 값을 구하였다.

유연성(Flexibility) 측정

Kato 등(1985)과 Lee 등(1992)의 방법에 따라 단백질 유연성을 trypsin에 의한 가수분해의 민감성으로 결정하였으며 그 방법은 다음과 같다.

0.05M tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 0.1% 단백질 용액을 제조한 후 이 용액 4ml를 0.05M tris-HCl에 녹이고 농도를 0.1%로 조정된 trypsin 250 μ l를 가하여 38°C의 항온수조에서 20분과 60분 동안 반응시켰다. 반응을 종결시키기 위하여 4% TCA용액을 4ml 가하고 여과지(Toyo, No. 5)로 여과한 후 여액의 단백질 함량을 micro-biuret 방법으로 측정한 다음 단백질의 유연성을 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Protein flexibility(\%)} = \frac{\text{protein hydrolyzed in 20 min}}{\text{protein hydrolyzed in 60 min}} \times 100$$

유리 SH기 및 S-S결합 함량 측정

Beveridge 등(1974)의 방법을 변형한 Toro-vazquez와 Regenstein(1989)의 방법에 따라 시료단백질 75mg을 1ml의 tris-glycin 완충액(40.8g tris, 27.6g glycin, 1.2g EDTA를 증류수 1 l 에 녹이고 NaOH용액으로 pH 8로 조정)에 녹이고 이 용액에 5M의 guanidine-HCl 5ml를 가하여 tris-glycine 완충액으로 전체부피가 10ml가 되게 하여 원액을 만들었다. 유리 SH기 측정은 원액 1ml에 urea-guanidine-HCl 4ml를 혼합하고 Ellman시약(5,5'-dithiobis [2-nitro-benzoic acid] 40mg을 1ml의 tris buffer에 녹임) 0.05ml를 넣은 후 정확히 30분 후 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 SH기는 원액 1ml에 2-mercaptoethanol 0.05ml와 urea-guanidine-HCl 4ml를 섞고 시험관에 넣어서 25°C에서 1시간 동안 항온처리한 후 12% TCA용액 10ml를 가하여 다시 1시간 동안 상온에 방치 후 5,000g에서 10분간 원심분리하여 얻은 침전물에 12% TCA 용액 5ml를 가하여 잘 현탁하

였다. 이것을 다시 5,000g에서 10분간 원심분리하여 2-mercaptoethanol을 수세하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻은 침전물에 8M urea용액 10ml와 Ellmam시약 0.04ml를 가하여 정확히 30분간 방치한 후 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 중의 유리 SH기와 S-S결합 함량은 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{SH } \mu\text{M/g} = \frac{69.98 (A_{412})(D)}{C P}$$

A : 흡광도

P : 건물중량 당 단백질 비율

C : 시료농도(mg solid/ml)

D : 회석농도

$$\text{S-S content} = [\text{total SH} - \text{free SH}]$$

열용집성(Heat induced aggregation)

단백질의 열용집성은 Matsudomi 등(1990)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 0.2%의 단백질 용액을 3ml씩 뚜껑이 있는 시험관에 넣고 수욕조에서 30~90°C로 가온하면서 원하는 온도가 되면 시험관을 꺼내어 급냉하고 가온하지 않은 0.2% 단백질 용액을 대조구로 하여 540nm에서의 흡광도를 측정하였다.

열용고성(Coagulation)

Kramer와 Kwee 등(1977)의 방법에 따라 1% 단백질 용액 10ml를 시험관에 넣고 수욕상에서 100°C, 10분간 가열한 후 실온에서 식히고 나서 3,000g에서 20

분간 원심분리하여 얻은 상징액 중의 단백질 함량을 micro-biuret 방법으로 측정하였다.

겔화성

단백질의 겔을 형성할 수 있는 최소농도는 King 등(1988)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 단백질을 4~14%까지 2% 간격으로 증류수에 용해시킨 후 시험관에 2ml씩 넣고 60~90°C로 조절된 항온수조안에서 10~60분 동안 가열한 후 흐르는 물로 냉각시키고 4°C에서 2시간 정치시킨 다음 겔 형성여부를 관찰하였다. 겔 형성은 시험관을 뒤집었을 때 흘러내리지 않으면 겔이 형성된 것으로 하였다.

수 및 유흡수성

수 및 유흡수성은 Okezie와 Bello의 방법(1988)에 따라 시료 0.5g을 50ml 원심분리관에 넣은 후 증류수 혹은 옥수수 기름 10ml와 잘 혼합하여 간헐적으로 교반하면서 30분 동안 방치하였다. 그 후 5,000g에서 30분 동안 원심분리하여 상징액을 제거한 후 수분 또는 기름을 흡수한 시료의 무게를 측정하여 흡수 전의 무게에 대한 비율로 수 및 유흡수성을 표시하였다.

칼슘용고성

칼슘용고성은 Kang 등(1988)의 방법에 따라 시료 단백질 0.2g을 증류수 20ml에 녹인 후 8ml를 취하여 60%(W/V) CaCl₂ 0.133ml를 가하여 vortex mixer로 잘 섞은 후 4,000g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상징액 중의 단백질 함량을 micro-biuret 법으로 측정하였다.

거품성

거품형성능과 안정성은 Bryant 등(1988)의 방법에 따라 측정하였는데 1% 단백질 용액 50ml를 pH 2에서 10까지 조정하고 균질기(Karlkolb, Germany)로 16,500rpm에서 30분 동안 현탁시킨 후 즉시 250ml 메스실린더에 부어 부피를 측정하고 실온에서 방치하면서 20분마다 100분이 경과할 때까지 거품의 부피를 측정하여 다음 식으로 나타내었다.

거품형성능(%) =

$$\frac{\text{거품형성 후의 부피(ml)} - \text{거품형성 전의 부피(ml)}}{\text{거품형성 전의 부피(ml)}} \times 100$$

$$\text{거품안정성(}\%) = \frac{\text{일정시간 경과 후의 거품의 부피(ml)}}{\text{초기의 거품 부피(ml)}} \times 100$$

유화능

유화활성지수는 Pearce와 Kinsella(1978)의 방법에 따라, 유화안정성은 Haque와 Kinsella(1988)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 단백질 0.2g을 0.01M sodium phosphate-citrate 완충액(pH 7.5) 20ml에 녹이고 이 용액 15ml를 비이커에 취하여 5ml의 옥수수 기름을 가하고 균질기(Karlkolb, West Germany)로 20,100rpm에서 30초 동안 현탁시켰다. 이 현탁액 50 μ l를 시험관에 취하여 0.1% SDS 용액 4.95ml를 가하여 희석시킨 후 500nm에서 흡광도를 측정하여 유화활성지수를 표면적으로 나타내었다. 유화안정성은 위와 같은 방법으로 현탁시킨 후 10ml를 취하여 원심분리하고 그 하층액 30 μ l를 취하여 시험관에 넣고 0.1% SDS 2.97ml를 가하여 희석한 후 500nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같

이 표면적으로 나타내었다.

$$\text{표면적(m}^2/\text{g protein)} = \frac{2(2.303)A}{\phi C} \times 100 \times 10^4$$

A : 500nm에서의 흡광도

ϕ : 체적분율(옥수수 기름 : 총액량, v/v)

C : 단백질 농도

Lysinoalanine 함량

알칼리 처리로 인하여 lysinoalanine이 생성되었는지를 알아보기 위하여 아미노산 자동분석기(Biochrom 20, Pharmacia Model, USA)로 다음과 같이 분석하였다.

시료 5mg을 유리 앰플에 넣고 6N HCl 10ml를 가하여 질소 가스로 충전시킨 후 밀봉하여 110°C의 건조기에서 24시간 분해시켰다. 그 후 실온에서 냉각하고 여과(0.2 μ m)한 후 50°C에서 진공농축하여 염산을 제거하였다. 염산이 완전히 제거되면 5ml의 초순수를 가하고 다시 50°C에서 부피가 반이 될 때까지 진공농축한 후 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

결 과 및 고 찰

최적 탈아미드 효소의 선정

단백질 가수분해효소에 의한 탈아미드는 단백질 말단 잔기의 아미드기를 산성기로 치환시키는 반응으로 가능한 한 펩티드결합의 가수분해를 억제하면서 일어나야만 원하는 방향의 변형을 얻을 수 있다. Kato 등(1987a)은 펩티드결합의 가수분해가 억제되는 조건인 알칼리성 pH에서 papain에 의하여 ovalbumin의 탈아미드가 21% 일어났으며, 이 때의 펩티드결합의 가수분해율은 2% 정도로 매우 낮았다고 보고하였다. 따라서 단백질 가수분해효소에 의한 탈아미드는 반응조건만 적절히 조절하면 모든 기질들에 적용이 되며, 기질이나 효소에 따라 반응조건이 달라지지는 않는지의 여부를 검토할 필요가 있었다.

탈아미드의 최적조건을 확인하기 위하여 Kato 등(1987a)이 탈아미드 최적조건이라고 보고한 결과를 근거로 pH 10, 20°C에서 0.5~24시간 동안 우혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)에 papain을 반응시켜 일정시간 경과 후의 탈아미드율과 펩티드결합의 가수분해도를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. Papain에 의한 탈아미드율은 반응 0.5시간 후에 약 3%였으나 반응시간이 길어짐에 따라 조금씩 증가하다가 반응 3시간 이후에는 평형에 이르러 22.8%의 탈아미드율을 보였다. 펩티드결합의 가수분해는 반응시간이 길어짐에 따라 계속 증가였는데, 탈아미드율이 평형에 도달한 3시간 후에는 18%의 펩티드결합 가수분해율을 나타내었다. Kato 등(1987a)은 papain에 의한 ovalbumin의 최적 탈아미드 시간은 2시간이며 약 21%의 탈아미드가 일어났고, 동반하여 일어난 펩티드결합 가수분해도는 약 2%라고 하였다. 본 실험에서는 papain에 의한 BSA의 탈아미드 결과 탈아미드율

은 22.8%로 Kato 등(1987a)의 보고와 비슷하였으나 펩티드결합 가수분해도는 18%로 Kato 등(1987a)이 보고한 2% 보다 매우 높았다.

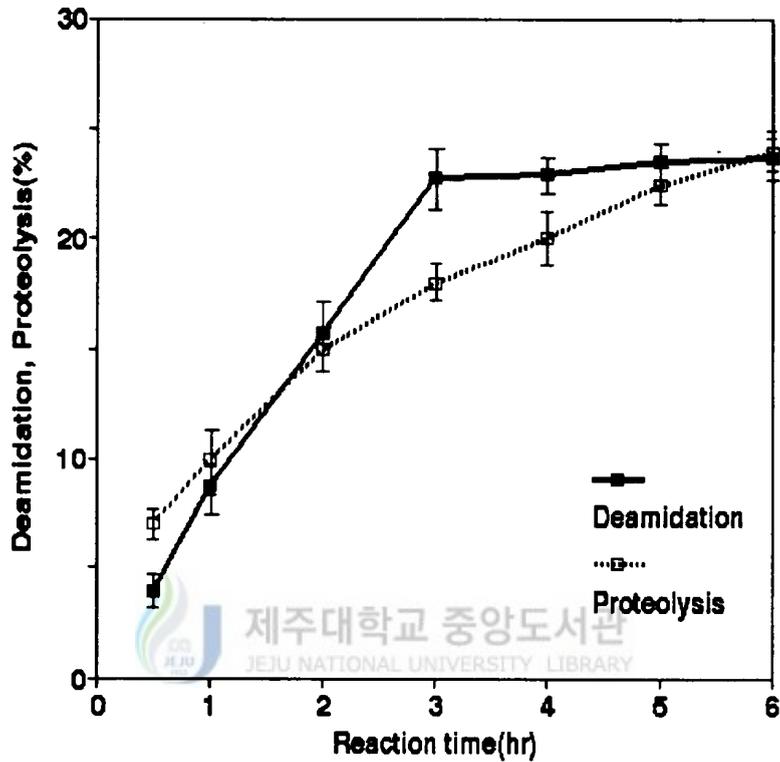


Fig. 3. Effect of reaction time on deamidation and proteolysis of BSA with papain at pH 10 and 20°C.

Papain에 의한 BSA 탈아미드의 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 7~11, 반응 온도 20°C, 반응 3시간 후의 탈아미드율 및 펩티드결합 가수분해도를 측정하였다 (Fig. 4).

pH가 증가함에 따라 탈아미드율은 점차 증가하여 반응 pH가 10일 때 22.8%로 가장 높게 나타났으나 그 이후에는 약간 감소하여 반응 pH는 pH 10이 적당하였다. 이는 papain, chymotrypsin, pronase에 의한 ovalbumin의 탈아미드 최적 pH가 10.0이었다고 보고한 Kato 등(1987a)의 보고와도 일치하였다. 그러나 Shih (1990)는 인산염 완충액에서 pronase E, prozyme 6, protease 2A에 의한 대두단백질의 탈아미드 결과 pH 7에서가 pH 10에서보다 더 높게 일어났다고 보고하였다.

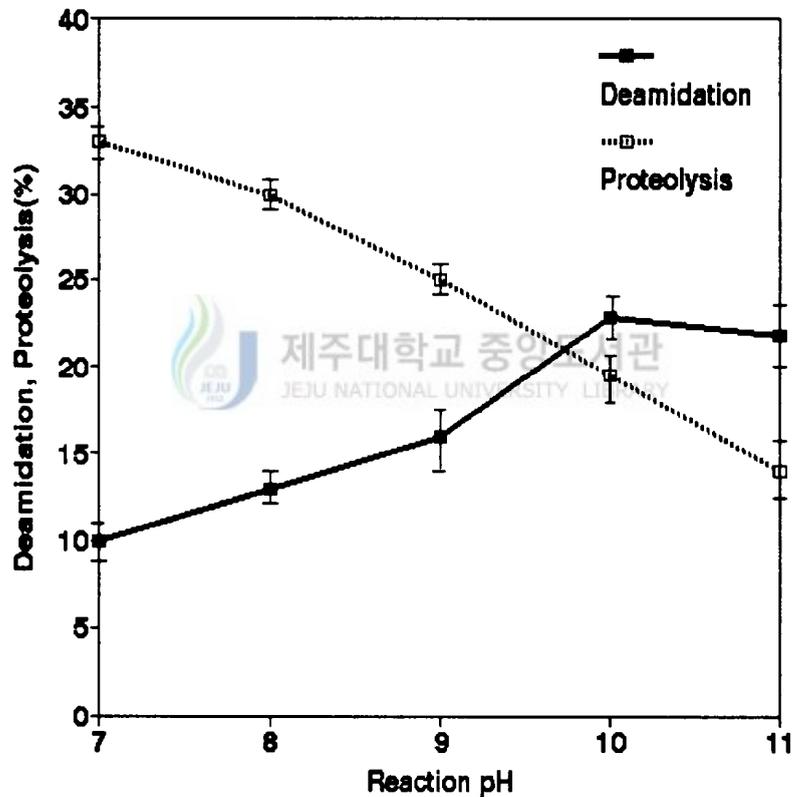


Fig. 4. Effect of pH on deamidation and proteolysis of BSA with papain at 20°C for 3hr.

그러나 이것은 효소에 의한 탈아미드보다는 완충액 중의 음이온 작용에 의하여 화학적 탈아미드가 일어났기 때문이라고 하였으며(Hamada, 1992), Shih(1991)는 중탄산염과 인산염과 같은 몇몇 종류의 음이온은 탈아미드를 촉진시킨다고 보고하였다.

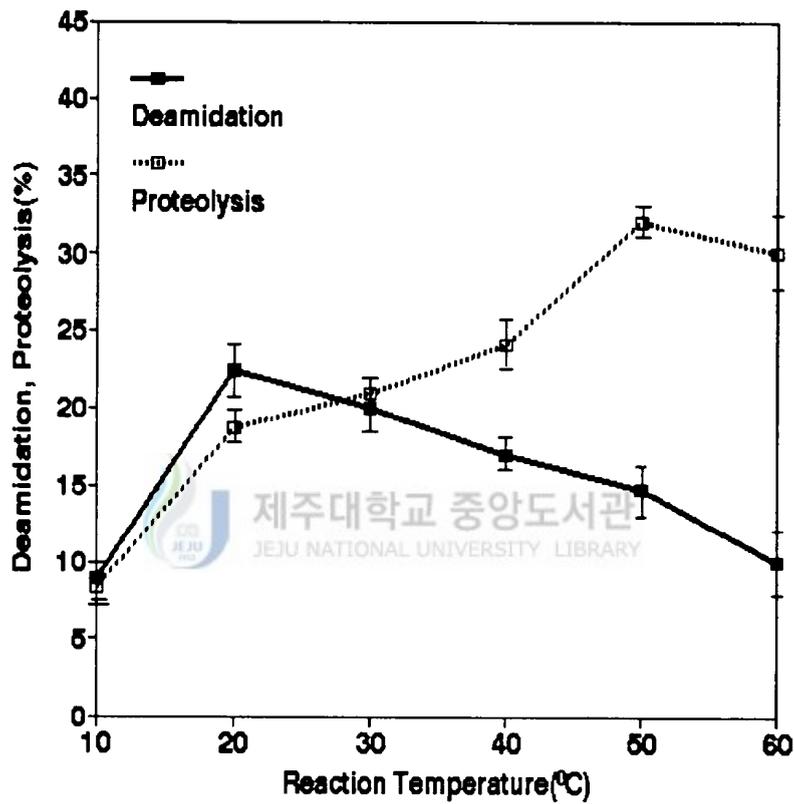


Fig. 5. Effect of reaction temperature on deamidation and proteolysis of BSA with papain at pH 10 for 3hr.

Fig. 5는 papain에 의한 BSA의 최적 탈아미드 온도를 알아보기 위하여 pH

10에서 3시간 반응시킨 후 각 온도에서의 탈아미드율과 가수분해도를 측정한 결과이다.

BSA의 탈아미드율은 10°C에서는 약 7%로 매우 적었으나 20°C인 경우 약 23%로 높아졌으며 그 이후는 반응온도가 상승함에 따라 탈아미드율은 점점 감소하였다. 따라서 탈아미드 최적온도는 20°C였다. 또한 펩티드결합 가수분해도는 온도가 증가함에 따라 계속 증가하여 20°C에서는 18%였으나 50°C에서는 32%까지 증가하였으며 그 이후 약간 감소하였다. 이상의 결과로부터 papain에 의한 BSA 탈아미드의 최적조건은 pH 10, 20°C, 3시간이었으나, 이 최적조건에서의 펩티드결합 가수분해 역시 높게 일어남으로써 papain은 BSA의 탈아미드 효소로서는 부적당하였다.

따라서 단백질의 탈아미드는 반응조건만 적절하게 조절하면 모든 기질이나 모든 단백질 가수분해효소들에 의하여 일어나는 것은 아니고 일부의 기질과 효소에 의하여서만 일어나는 것으로 생각되었다. 이것을 확인해 보기 위하여 papain 이외의 ficin, pronase, neutrase 및 bromelain에 의한 BSA의 탈아미드 정도를 측정하였다(Fig. 6).

이 결과에 의하면 bromelain, ficin, pronase는 각각 2.2, 5.8, 4.3%로 매우 낮은 탈아미드율과 각각 7.4, 6.1, 3.8%의 단백질 가수분해도를 나타냈으나 neutrase에 의한 BSA의 탈아미드는 24.1%로 비교적 높았다. 이 때의 단백질 가수분해도는 3.2%로 매우 적게 일어남으로써 본 실험에 사용한 효소 중 BSA의 최적 탈아미드 효소는 neutrase로 판단되었다.

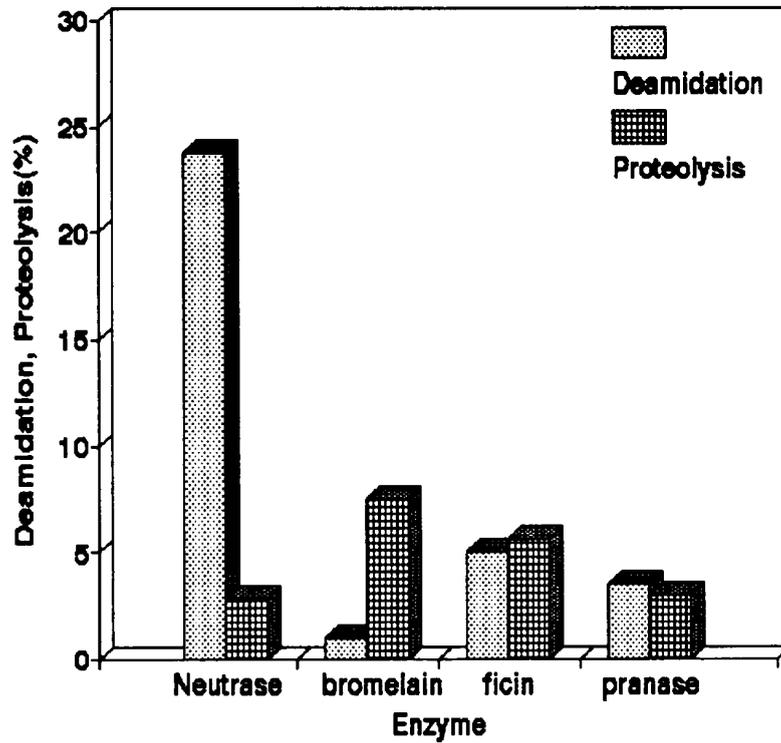


Fig. 6. Deamidation and proteolysis of BSA with different proteases at pH 10 and 20°C for 3hr.

Neutrase의 최적 탈아미드 조건

앞에서 사용하였던 papain이나 Kato 등(1987a, b)이 탈아미드 효소로 보고하였던 pronase, trypsin, chymotrypsin의 단백질 가수분해 최적 pH는 모두 7.5~8 근처(정, 1987; 김 등, 1992)인 효소들이다. 그러나 neutrase의 단백질 가수분해

최적 pH는 5.5~6.5이다. 효소의 단백질 가수분해 최적조건이 탈아미드 최적반응 조건에 미치는 영향을 알아보기 위하여 neutrase에 의한 탈아미드 최적반응조건을 검토하였다.

Neutrase에 의한 BSA의 탈아미드 최적반응시간을 결정하기 위하여 pH 10, 20°C에서 0.5~24시간 동안 BSA에 neutrase를 반응시켜 이 효소에 의한 탈아미드와 가수분해도를 측정 한 결과는 Fig. 7과 같다.

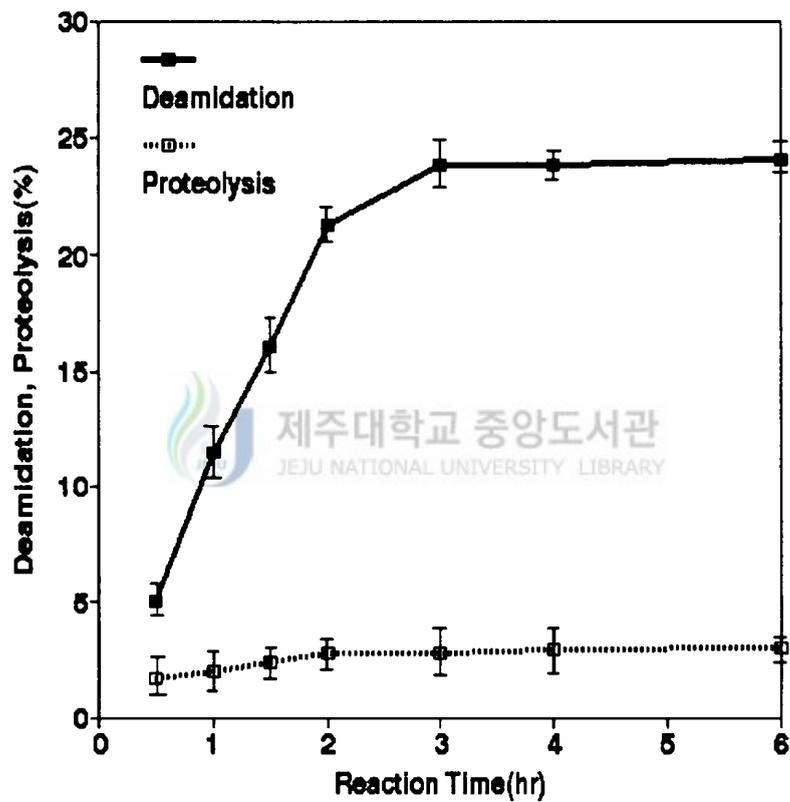


Fig. 7. Effect of reaction time on deamidation and proteolysis of BSA with neutrase at pH 10 and 20°C.

탈아미드는 pH 10, 20°C에서 반응 0.5시간 후 4.9% 일어났으며 반응시간이 길어짐에 따라 계속 증가하여 반응 2시간 후 약 21.8%, 3시간 반응 후에는 24.1%였으며, 그 이후에는 평형을 나타내었다. 이 결과는 위의 papain에 의한 BSA의 최적 탈아미드 반응시간이 3시간이었던 것과도 일치하였다. Kato 등(1987a)은 여러가지 단백질 가수분해효소에 의한 ovalbumin의 최적 탈아미드시간이 2시간이었다고 보고하였으며, Matsudomi 등(1986)은 gluten을 chymotrypsin으로 탈아미드하였을 때 반응 3시간 후 평형에 도달하였다고 하였다. 이와 같이 연구자들에 따라 평형에 도달하는 시간이 약간 다르게 보고되고 있는 것은 기질과 효소의 반응속도가 기질과 효소마다 차이가 있기 때문이라고 생각한다. 가수분해도는 시간이 경과함에 따라 약간씩 증가하기는 하였으나 3% 미만으로 매우 적게 나타나 펩티드결합의 가수분해로 인한 쓴맛 생성을 억제하기에 충분한 것으로 여겨진다. Kato 등(1987a)은 ovalbumin을 기질로 사용하였을 때 pH 10.0, 20°C에서의 papain에 의한 가수분해도는 약 3%, chymotrypsin인 경우는 약 8%, pronase인 경우는 약 8% 정도였다고 보고하였는데 탈아미드 최적조건에서의 가수분해도는 효소에 따라 약간씩 차이가 있는 것으로 생각된다.

20°C에서 3시간 반응 후 BSA의 pH별 탈아미드율과 가수분해도를 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. pH 7~11에서 20°C, 3시간 반응 후의 neutrase에 의한 BSA 탈아미드는 pH가 증가함에 따라 점차 증가하여 pH가 10일 때의 탈아미드율이 24.1%로 가장 높게 나타났으며, 이보다 높은 pH에서는 20.2%로 좀 낮아졌다. 이는 papain 및 chymotrypsin, pronase에 의한 ovalbumin의 탈아미드 최적 pH가 10.0이었다고 보고한 결과(Kato 등, 1987a) 및 앞의 papain에 의한 BSA의 탈아미드 최적 pH와 일치함으로써 단백질의 가수분해효소의 최적 가수분해 pH는 탈아미드 최적 pH에 영향을 미치지 않으며, 효소의 종류에 관계없이 알칼리성 pH

에서 단백질 가수분해 효소들이 탈아미드를 일으키는 것으로 나타났다. 가수분해도 또한 실험한 모든 pH에서 5% 이하로 낮았으며 탈아미드가 가장 높게 나타난 pH 10에서는 2.9%로 매우 낮아 neutrase에 의한 탈아미드는 pH 10이 적당하였다.

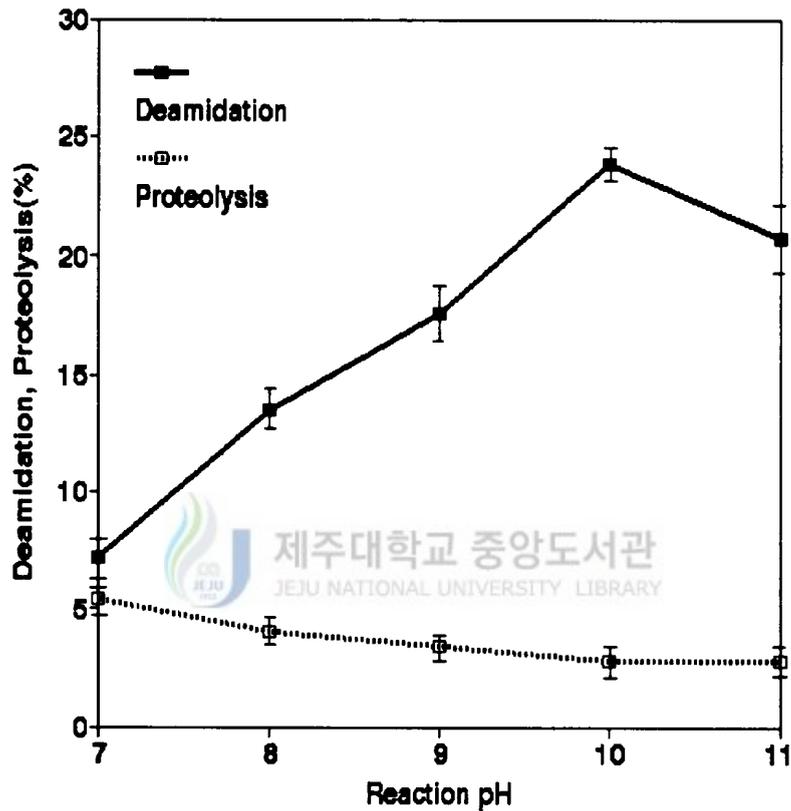


Fig. 8. Effect of pH on deamidation and proteolysis of BSA with neutrase at 20°C for 3hr.

pH 10에서 3시간 반응시킨 후의 BSA 탈아미드에 대한 반응온도의 영향을

측정한 결과는 Fig. 9와 같다. BSA의 탈아미드는 10°C에서 약 19%, 20°C에서 약 24%였으나, 30°C 이상에서는 반응온도가 올라감에 따라 탈아미드율은 점차 감소하였다. 가수분해도는 온도의 상승에 따라 증가하여 50°C에서 12.5%로 가장 높게 나타났으며, 탈아미드율이 가장 높게 나타난 20°C에서는 2.9%로 낮아 papain 과 마찬가지로 neutrase에 의한 BSA의 탈아미드 최적온도는 20°C였다.

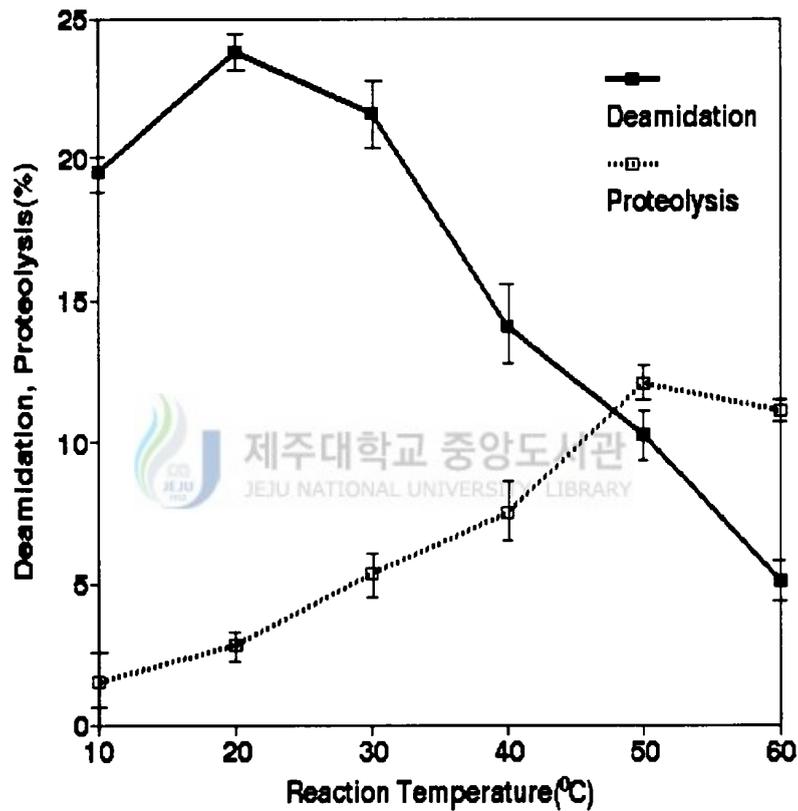


Fig. 9. Effect of reaction temperature on deamidation and proteolysis of BSA with neutrase at pH 10 for 3hr.

이상의 결과로부터 neutrase에 의한 BSA 탈아미드의 최적반응조건은 pH 10, 반응온도 20°C, 반응시간 3시간으로 papain의 최적조건과 같았으며, 효소의 단백질 가수분해 최적 pH가 탈아미드 최적조건에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Kato 등(1987a)은 알칼리성 pH에서 papain에 의한 여러 가지 단백질(ovalbumin, lysozyme, 7S globulin, 11S globulin)의 탈아미드율이 19~24%였으며, 이때의 가수분해도는 0~8%였다고 보고하였다. 기질로 ovalbumin을 사용하여 chymotrypsin과 pronase E 처리하였을 경우 약 23%의 탈아미드와 8% 이하의 가수분해가 일어났으나 trypsin 처리를 한 결과 탈아미드가 거의 일어나지 않았다고 보고하였다. 따라서 모든 단백질 가수분해효소가 모든 기질에 대하여 탈아미드를 일으키는 것은 아닌 것으로 여겨졌다. 따라서 neutrase가 어떤 기질에서 대하여 보다 높은 탈아미드 반응활성을 가지는지를 알아보기 위하여 BSA 이외에 난알부민(egg albumin, EA)과 대두분리단백질(soy protein isolate, SPI) 및 casein을 기질로 하여 최적 탈아미드 조건에서 탈아미드 하였다(Fig. 10).

BSA는 24.1%의 탈아미드와 2.9%의 가수분해를, EA인 경우는 19.8%의 탈아미드와 3.1%의 가수분해를 일으킴으로써 neutrase에 의한 BSA와 EA의 탈아미드율은 매우 우수한 것으로 나타났다. 그러나 기질로 casein을 사용하였을 때 탈아미드율은 14.0%인데 비하여 가수분해도는 24.0%로 매우 높았다. 이와 같은 결과는 Kato 등(1987a)이 기질로 casein을 사용하여 papain에 의한 탈아미드율을 측정한 보고와 일치하고 있는데 그에 의하면 papain에 의한 casein의 탈아미드는 35.0%로 매우 높게 나타났으나, 단백질 가수분해 또한 47.0%로 매우 높게 나타났다고 보고함으로써 casein은 탈아미드 반응 기질로는 부적당하였다. 이상의 결과 기질 및 효소에 따라 탈아미드율 및 가수분해도의 차이가 큰 것으로 나타나

탈아미드 반응은 기질특이성이 큰 반응으로 보여진다. 한편 SPI는 13.8%의 탈아미드가 일어나서 BSA나 EA에 비하여 조금 낮게 나타났으나 이 정도의 탈아미드만으로도 대두단백질의 단점인 낮은 용해도 문제를 해결할 수 있을 것으로 여겨진다.

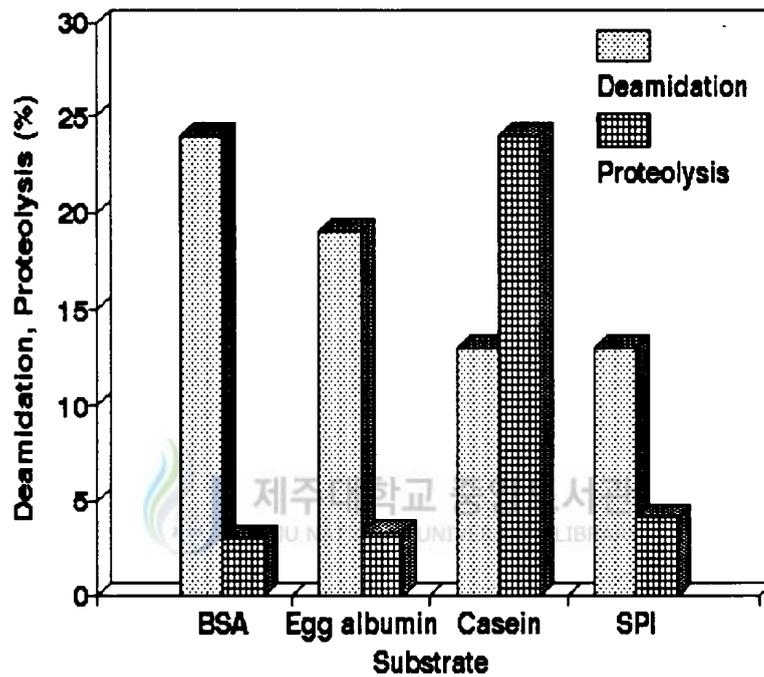


Fig. 10. Deamidation and proteolysis of different substrates with neutrase at pH 10 and 20°C for 3hr.

이상의 결과를 종합해 볼 때 탈아미드 반응은 조건의존성이 뚜렷하였으며, 기질과 효소특이성을 나타내었다. 또한, 단백질 가수분해효소 중에서 neutrase가 비교적 다양한 기질에 대하여 보다 높은 탈아미드 반응 활성을 나타내었다.

용해도

Fig. 11은 수용액(a)과 NaCl 용액(b)을 용매로 탈아미드된 BSA(D-BSA)와 탈아미드되지 않은 BSA(N-BSA)의 pH별 용해도를 나타낸 결과이다. 용매가 수용액인 경우(Fig. 11a) N-BSA는 pH 2~10에서 100%의 용해도를 나타냈으나, D-BSA는 pH 4~8 범위에서는 N-BSA보다 약간 낮은 98~83%를 나타냈는데 pH 6에서 가장 낮은 용해도를 보였다. 용해도는 단백질-단백질과 단백질-용매의 상호작용 사이의 평형에 의하여 나타나는 현상으로 단백질-용매의 상호작용이 단백질-단백질 상호작용보다 크면 용해도가 증가하게 된다(Kella 등, 1988). BSA는 다른 단백질들에 비하여 크기가 작고 중성부근의 pH에서 많은 음전하(negative charge)를 가지기 때문에(Peters, 1985) 용해도가 매우 우수한 단백질이다(Kella 등, 1988). 그러나 탈아미드에 의하여 BSA의 용해도가 pH 4~8에서 약간 감소하였다. 이는 탈아미드로 음전하가 과도하게 도입되어 단백질의 표면 전하가 증가(Kato 등, 1987b)하였을 뿐만 아니라 표면소수성이 증가(Kato 등, 1987b; Ma와 Khanzada, 1987)됨으로써 BSA 표면의 소수성기에 대한 극성기의 비율이 감소되고 이에 따라 단백질 상호간의 결합이 증가됨으로써(Kella 등, 1989) 용해도가 저하된 것으로 여겨진다. 용매가 NaCl 용액(Fig. 11b)인 경우의 용해도는 증류수를 용매로 하였을 때와는 다른 양상을 보이고 있는데 수용액에서의 D-BSA는 pH 4~8 범위에서 98~83%였으나 0.2M NaCl 용액을 용매로 하였을 때는 N-BSA와 D-BSA 모두 pH 2~10에서 100%의 용해도를 나타내었다. 이와 같이 수용액에서보다 낮은 염농도(0.2M NaCl)에서 D-BSA의 용해도가 증가한 것은 탈아미드로 과도하게 도입된 전하가 Na⁺에 의하여 중화되었기 때문으로 추정된다.

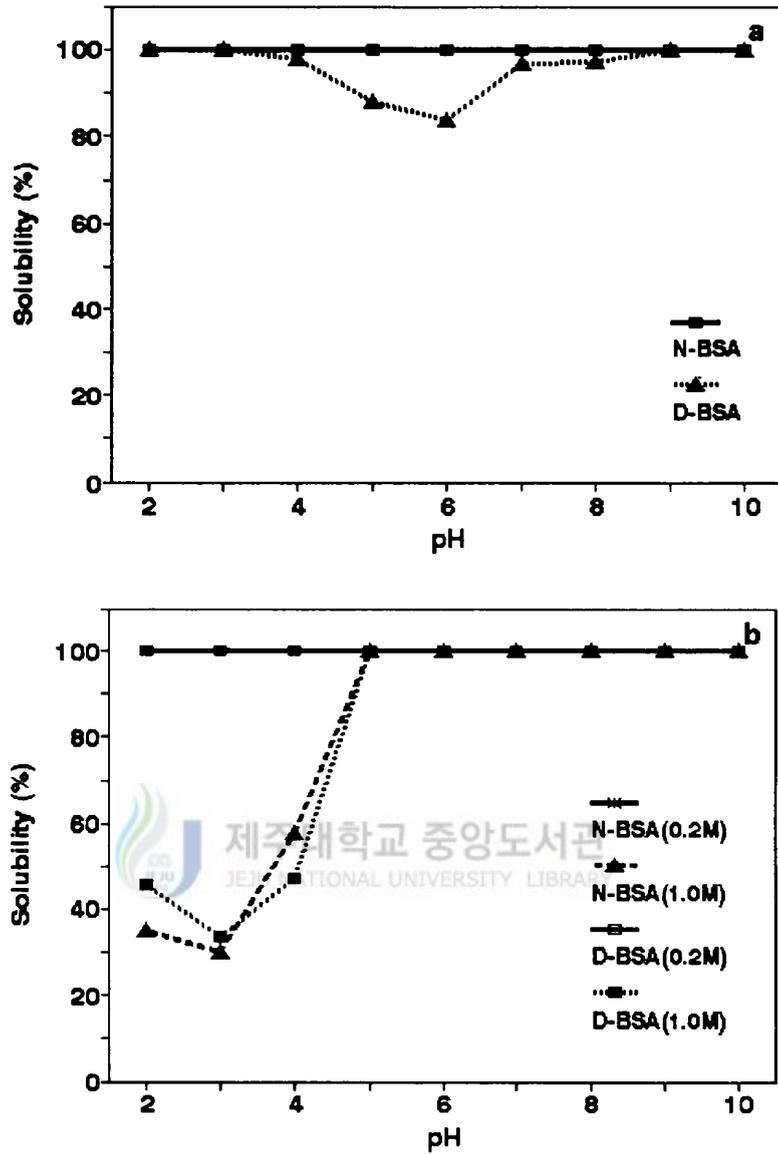


Fig. 11. Solubility of native BSA(N-BSA) and deamidated BSA(D-BSA) in distilled water(a) and NaCl solution(b).

또한, 1.0M NaCl 용액을 용매로 하였을 때의 pH별 용해도의 양상은 N-BSA와 D-BSA 모두 pH 5 이하에서 크게 감소하여 pH 3에서 N-BSA는 30%, D-BSA는 32%로 가장 낮은 용해도를 보였다. 이는 NaCl이 단백질의 전하를 변경시켜 용해도를 변화시키며, Cl⁻이 단백질 분자와 우선적으로 결합하므로써 등전점이 달라지기 때문(Venktesh and Prakash, 1993)으로 추정된다.

EA의 pH별 용해도의 변화는 Fig. 12(a, b)와 같은데 용매가 수용액일 경우 (Fig. 12a) pH에 따른 N-EA의 용해도는 변화가 크지 않아서 거의 모든 pH에서 70% 이상을 나타내었으나 pH 5에서의 용해도가 약 65%로 다른 pH에서 보다 약간 낮았다. EA를 탈아미드(D-EA)하였을 경우 pH 5 부근에서의 용해도는 매우 낮아져 32%였다. 단백질은 특정한 pH에서 단백질의 전하가 0이 되어 단백질과 물과의 흡착이 감소됨으로써 단백질의 침전이 일어나 등전점을 형성한다. 그러나 pH 5에서 D-EA의 용해도가 감소하는 현상은 탈아미드에 의하여 단백질에 음전하가 도입되는데 pH 5 부근에서는 오히려 과도한 음전하의 도입으로 단백질과 용매사이의 반발이 일어나 용해도가 감소되는 것으로 판단된다. pH 3 이하와 pH 6 이상의 pH에서는 D-EA가 N-EA보다 용해도가 높았는데 이는 탈아미드로 단백질 분자의 표면에 음전하가 도입되었기 때문으로 탈아미드에 의한 용해도 증가에 대하여서는 많은 연구자들이 보고하고 있다(Ma와 Khanzada, 1987; Hamada와 Marshall, 1989; Kato 등, 1989). NaCl 용액을 용매로 하였을 경우 (Fig. 12b), pH 5 이상에서는 탈아미드로 EA의 용해도가 약간 증가하였으며, 또한 EA는 수용액에서보다 NaCl 용액에서가 더 잘 녹는 것으로 나타났다. 한편 pH 5 이하에서의 D-EA 용해도가 크게 감소하였는데 이것은 산성 pH에서는 Cl⁻이온이 단백질과 결합하여 단백질의 양전하 수를 감소(Kakalis와 Rengenstein, 1986)시키기 때문으로 추정된다.

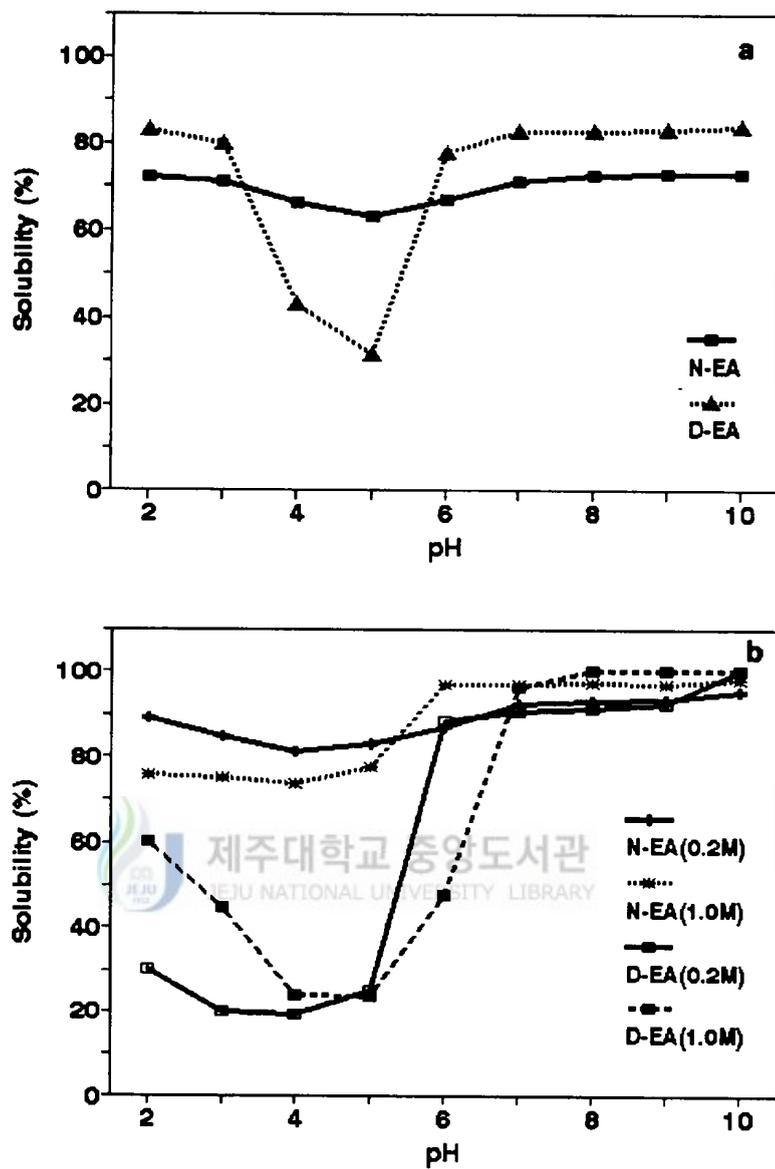


Fig. 12. Solubility of native egg albumin(N-EA) and deamidated egg albumin(D-EA) in distilled water(a) and NaCl solution(b).

수용액과 NaCl 용액에서의 N-SPI와 D-SPI의 pH별 용해도 변화를 Fig. 13에 나타내었다. 수용액에서의(Fig. 13a) pH별 SPI의 용해도는 종모양으로 전형적인 단백질 용해도 곡선의 양상을 보였으며, N-SPI의 용해도가 모든 pH에서 10~45% 정도로 매우 낮았다. 이는 본 실험에 사용된 SPI가 trypsin inhibitor(TI) 변성을 위하여 열처리된 단백질이기 때문(NSI; 28.6)이다. 반면 D-SPI는 용해도가 38에서 70% 사이로 N-SPI보다 실험한 모든 pH에서 크게 증가하였다. 특히 SPI의 탈아미드로 인한 용해도의 변화는 등전점 부근에서의 증가가 커서 pH 4~5 사이의 용해도가 N-SPI보다 300% 이상 증가하였다. 산성 pH에서 대두단백질의 용해도를 증가시키기 위한 방법으로는 효소에 의한 가수분해(Kang, 1984)가 있으나 이 경우는 용해도의 증가 정도가 크지 않으며 dipeptide 생성으로 쓴맛을 내는 물질이 생기는 결점이 있지만 탈아미드인 경우 이런 문제가 발생되지 않을 것으로 생각되어 열변성된 SPI의 용해도 증가에 효과적인 방법으로 생각된다. NaCl 용액에서도 수용액에서처럼 탈아미드로 SPI의 용해도가 증가하였는데 특히 pH 6 이상에서 크게 증가하였다. NaCl 농도가 0.2M일 경우 1.0M NaCl 용액에서보다 탈아미드로 인한 용해도의 증가가 커서 pH 7 이상에서는 80% 정도의 용해도를 나타내었다. NaCl 농도가 증가할수록 용해도는 감소하는 경향을 보였는데 열변성된 SPI는 NaCl 농도가 증가할수록 용해도는 감소한다고 보고되어 있다(Shen, 1981). NaCl 용액을 용매로 하였을 경우 수용액에 비하여 산성 pH에서의 용해도가 N-SPI와 D-SPI 모두 감소하였으며 pH 5 이하에서는 탈아미드로 인한 용해도 차이가 거의 없었다.

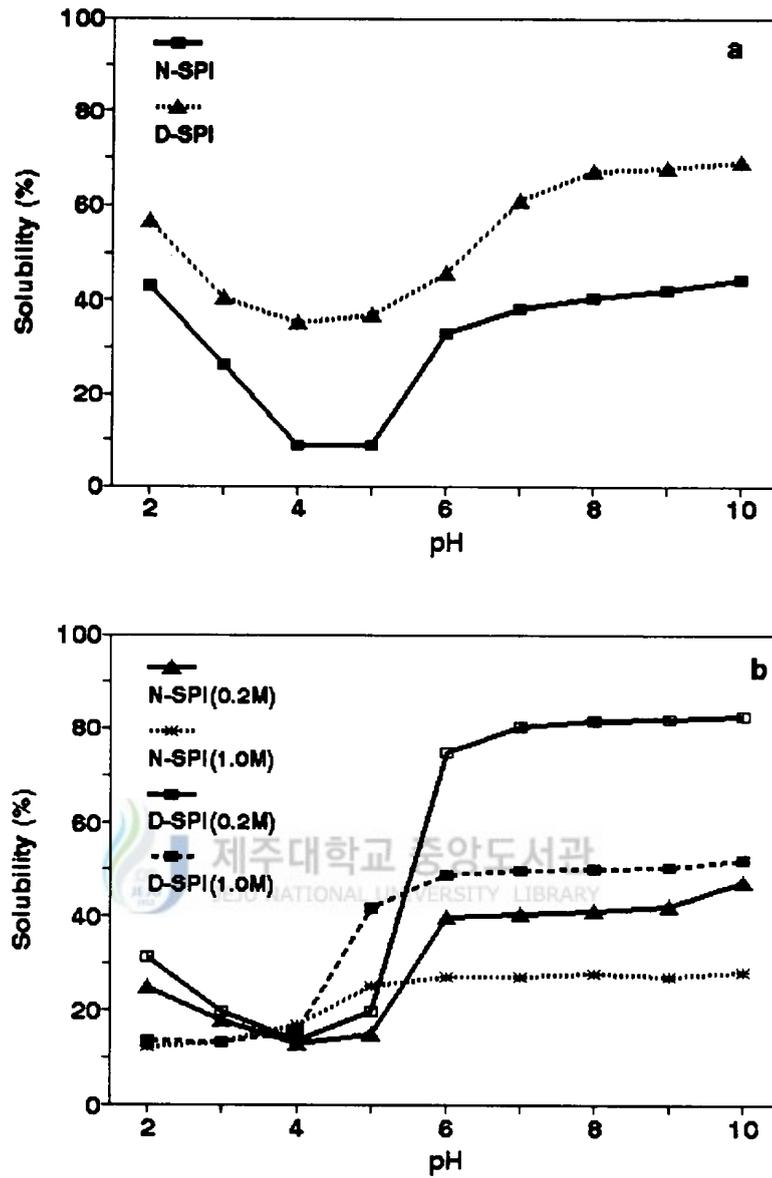


Fig. 13. Solubility of native soy protein isolate(N-SPI) and deamidated soy protein isolate (D-SPI) in distilled water(a) and NaCl solution(b).

상대형광 스펙트럼

상대형광 스펙트럼은 용액에서의 단백질의 구조, 동적상태, 상호작용 등을 연구하는데 중요한 정보를 제공한다. 탈아미드는 단백질의 거대구조를 변형시키지 않으면서 기능성의 변화를 일으키는 방법으로 알려져 있어서 본 실험에서 행한 탈아미드가 단백질의 구조를 변경시키는 것은 아닌지의 여부를 알아보기 위한 방법으로 천연단백질과 탈아미드된 단백질의 상대형광 스펙트럼을 측정하였다. Fig. 14는 BSA의 상대형광 스펙트럼을 나타낸 것이다. 천연 BSA는 340nm에서 최대흡수가 일어났으나 탈아미드된 BSA는 330nm에서 최대흡수를 나타내어 blue shift가 일어났다. 이와 같은 blue shift는 보통 상대형광 스펙트럼값의 증가와 함께 일어나는데 이는 단백질의 재접합(refolding)이나 응집(agggregation)으로 인하여 형광 스펙트럼의 흡수를 일으키는 tryptophan 잔기가 극성 매체에서 비극성 매체로 이동하였기 때문이라고 보고되고 있다(Shamesunder와 Prakash, 1994). 그러나 본 실험에서는 BSA가 탈아미드에 의하여 blue shift를 일으키기는 하였으나 상대형광 스펙트럼값이 감소되었다. 이와 같은 결과는 Kella 등(1986, 1988, 1989)의 disulfide결합 개월에 관한 보고와 일치하는데 이들은 이 현상을 음으로 하전된 sulfonate기가 도입됨으로써 blue shift가 일어났다고 하였다. 또한, Lehrer(1975)는 lysozyme에 음으로 하전된 요오드 이온을 도입시켰을 때 tryptophan의 형광스펙트럼이 blue shift되는 동시에 형광의 방출(emmission)이 억제되었다고 보고하고 있어서, 본 실험에서 BSA의 blue shift와 함께 상대형광 스펙트럼값의 감소는 탈아미드로 인하여 음으로 하전된 carboxyl기가 BSA에 도입되었기 때문인 것으로 추정된다.

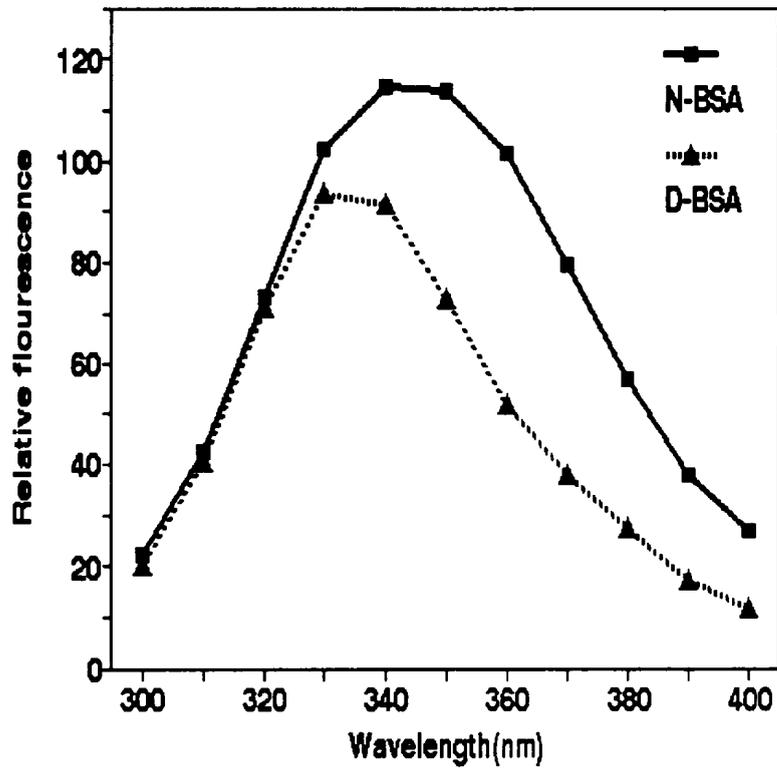


Fig. 14. Relative fluorescence of native BSA(N-BSA) and deamidated BSA(D-BSA).

EA과 SPI의 상대형광 스펙트럼은 각각 Fig. 15, 16과 같은데 모두 340nm에서 최대흡수를 나타내었다. 단백질의 형광스펙트럼 최대흡수값은 일반적으로 tryptophan 잔기로 인하여 335nm에서 일어난다. 비록 이 파장에서 tyrosine 잔기 역시 최대흡수를 나타내지만 tryptophan 잔기가 tyrosine 잔기의 흡수값보다 훨씬 우수하여 tryptophan의 최대흡수값이 측정된다(Shamesunder와 Prakash, 1994).

또한, 천연단백질과 탈아미드된 단백질의 최대흡수대가 모두 같았으나 D-SPI의 최대흡수값이 N-SPI에 비하여 크게 높았는데 이는 탈아미드로 SPI의 용해도가 증가(Fig. 13)하였기 때문으로 추정된다.

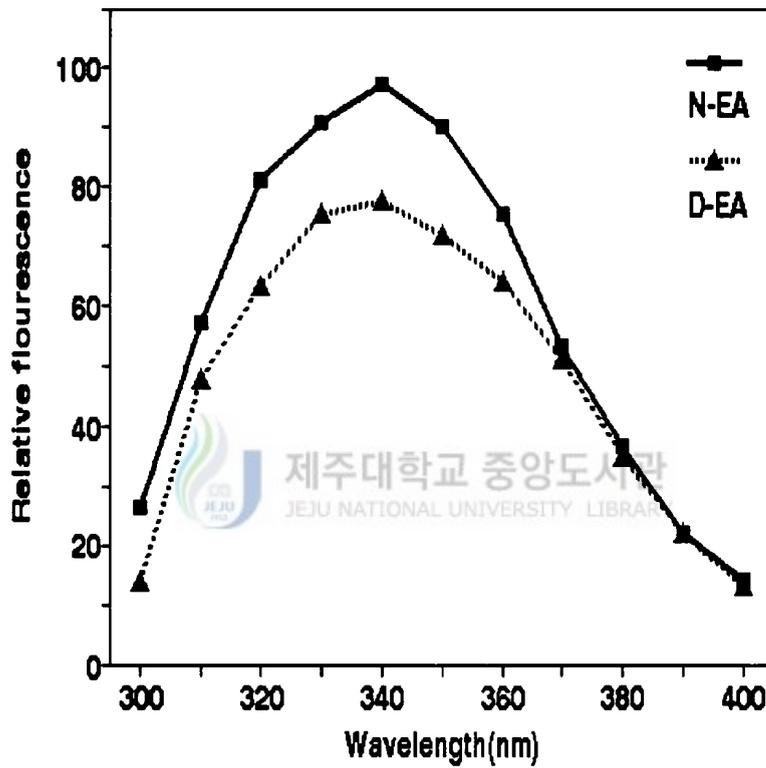


Fig. 15. Relative fluorescence of native egg albumin (N-EA) and deamidated egg albumin(D-EA).

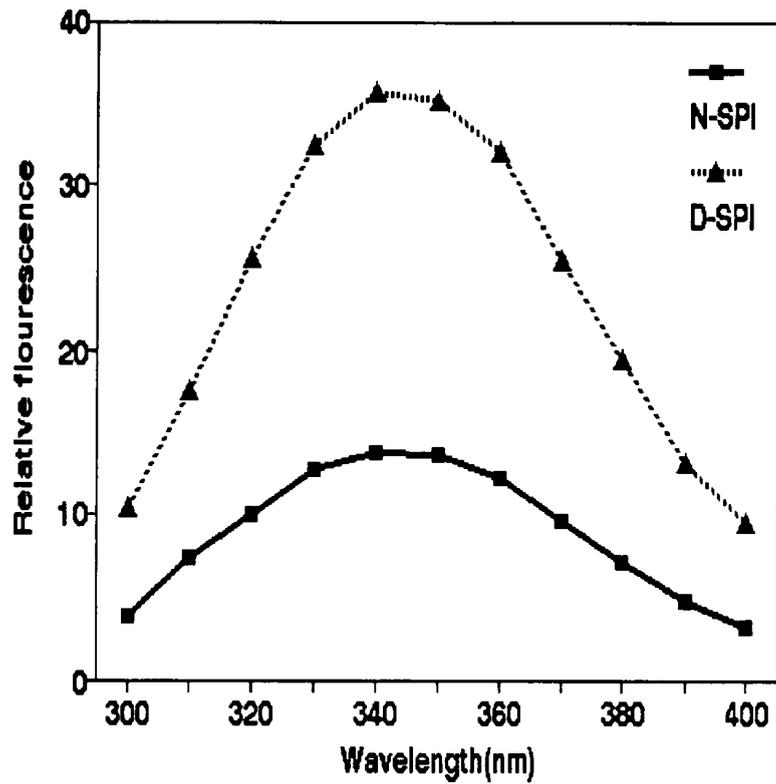


Fig. 16. Relative fluorescence of native soy protein isolate(N-SPI) and deamidated soy protein isolate(D-SPI).

SDS-PAGE

단백질의 탈아미드는 단백질의 거대구조는 변화시키지 않는 것으로 보고되고 있다(Hamada와 Marshall, 1989; Shih, 1991). 따라서 본 실험에서 행한 neurase에 의한 탈아미드가 단백질 구조에 어떤 변화를 일으키는지 알아보기 위하여 BSA, EA, SPI를 전기영동하여 보았다(Fig. 17).

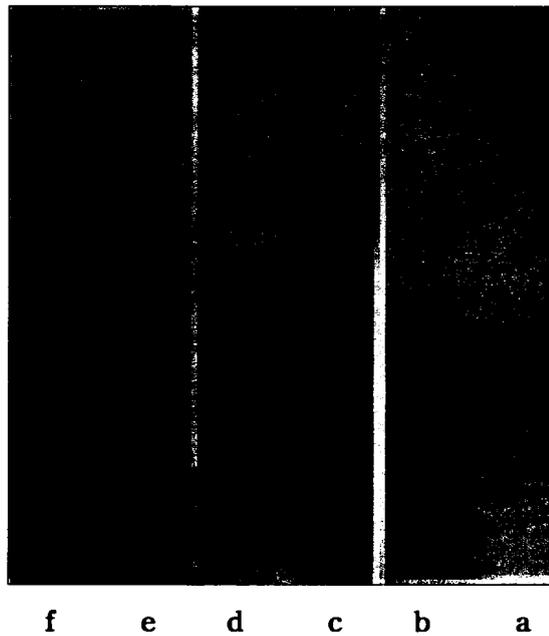
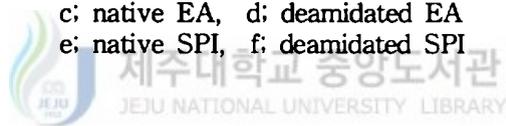


Fig. 17. SDS-PAGE of native (a,c,e) and deamidated (b,d,f) proteins.

a: native BSA, b: deamidated BSA
 c: native EA, d: deamidated EA
 e: native SPI, f: deamidated SPI



EA과 SPI는 탈아미드 전과 후의 band가 동일하여 구조적 변화는 일어나지 않은 것으로 보였다. 그러나 BSA의 경우는 탈아미드 전에는 1개의 band를 나타냈으나 탈아미드 후 band가 3개로 분리되었다. 이는 탈아미드로 인하여 펩티드 결합이 끊어져 구조적인 변화가 일어났다고 보다는 탈아미드로 음전하가 도입됨으로써 분자 상호간의 반발력이 커져 BSA의 구조를 개열시키고, BSA의 구조를 이루고 있는 여러 가지 결합들이 느슨해져 있다가 전기영동을 위하여 첨가된

SDS나 mercaptoethanol 등이 이들 결합을 파괴시킴으로써 일어난 변화로 보여진다.

표면소수성

단백질의 표면소수성은 용액 중에서 단백질이 소수성 물질들과 얼마나 결합하느냐 하는 결합능력을 나타내는 것으로(Kinsella, 1982), 단백질의 표면소수성은 방향족과 지방족 아미노산 잔기에 의하여 영향받는 방향족 소수성기와 지방족 소수성기로 분류된다(Hayakawa와 Nakai, 1985). 소수성 결합은 단백질의 기능성에 매우 중요한 역할을 하는데 특히 표면소수성은 단백질의 계면장력 및 유화성과 높은 상관관계가 있는 것으로 알려져 있어(Kato와 Nakai, 1980; Nakai 등, 1980) 표면소수성의 측정은 단백질 기능성의 정확한 예측을 위하여 필요하다(Nakai, 1983).

Table 1은 탈아미드 후의 BSA, EA, SPI의 표면소수성 변화를 측정한 결과이다.



Table 1. Changes in surface hydrophobicity of deamidated proteins

Proteins	Surface hydrophobicity(S_o)		
	BSA	EA	SPI
Native	60.6	4.4	5.1
Deamidated	83.0	25.2	12.6

BSA, EA, SPI 모두 탈아미드로 표면소수성이 각각 1.4, 5.7, 2.5배 증가하였다. 특히 EA은 탈아미드로 인한 표면소수성의 증가폭이 다른 단백질보다 큰데 비하여 BSA는 적었다. 표면소수성의 증가는 탈아미드로 인하여 내부에 묻혀있던 소수성기들이 표면으로 노출되기 때문으로(Ma와 Holme, 1982, 1986; Kato 등, 1987b; Matsudomi 등, 1986), Masudomi 등(1982)은 탈아미드율이 증가할수록 표면소수성은 직선적으로 증가하였다고 보고하였다. 그러나 본 실험 결과에서 EA가 SPI보다 탈아미드로 인한 표면소수성의 증가폭이 큰 것은 EA의 탈아미드율이 약 2배 정도 높았기 때문으로 추정되나, BSA는 EA보다 탈아미드율이 높았음에도 탈아미드로 인한 표면소수성의 증가가 작았다.

유연성(Flexibility)

단백질은 기름과 물, 물과 기름 계면에서의 변성에 민감하다. 단백질의 표면 변성이 일어난다면 표면소수성이 증가하며 그 결과 거품성과 에멀전 특성이 증가하게 된다. 따라서 물과 기름, 기름과 물 계면에서의 표면 변성에 대한 감수성은 단백질의 기능성에 영향을 미치게 된다. 단백질분자가 유연하다면 견고한 분자를 가지고 있는 단백질보다 표면변성을 일으키기가 쉽다. 따라서 단백질의 유연성 측정은 단백질의 표면소수성과 더불어 거품성과 에멀전 특성에 관여하는 중요한 구조적 요인이 된다(Kato 등, 1985).

단백질의 유연성은 아주 작은 단백질의 구조변화를 일으키는 요인들 혹은 물리화학적 조건하에서의 변성평형이라고 정의할 수 있다(Kato 등, 1985). Table 2는 BSA, EA, SPI의 탈아미드 후의 유연성 변화를 측정한 결과이다.

탈아미드는 BSA, EA 및 SPI의 유연성을 모두 개선시켜 탈아미드된 단백질

들의 유연성은 모두 100%였다. 특히 SPI는 탈아미드에 의한 유연성의 개선이 다른 단백질보다 높았다. 탈아미드에 의한 단백질의 유연성 개선은 음전하의 증가 때문이라고 Kato 등(1987b)은 보고하고 있다. 또한 이 결과로부터 탈아미드가 거품성과 에멀전 특성을 개선시킬 것이라는 가능성을 예측할 수 있다.

Table 2. Changes in flexibility of deamidated proteins

Proteins	Flexibility(%)		
	BSA	EA	SPI
Native	95.7%	81.4%	71.4%
Deamidated	100.0%	100.0%	100.0%

유리 SH 및 S-S결합 함량

Table 3은 탈아미드로 인한 단백질의 유리 SH기와 S-S결합의 변화를 측정된 결과이다. 탈아미드는 유리 SH기와 S-S결합 수에 거의 영향을 미치지 않았다. Matsudomi 등(1982)에 의하면 탈아미드는 SH기와 S-S결합 함량을 변화시키지는 않았으나 helix 함량이 크게 감소하여 S-S 상호교환반응에 의한 구조적 변화의 가능성을 배제할 수는 없다고 하였으며, helix의 함량이 감소하는 것은 탈아미드로 정전기적 반발력은 증가한 반면 수소결합은 감소하였기 때문이라고 보고하였다.

Table. 3. Changes in SH and S-S contents of deamidated proteins

		($\mu\text{M/g protein}$)	
		Free SH	S-S
BSA	native	3.9	69.4
	deamidated	3.3	68.7
EA	native	33.8	11.2
	deamidated	33.8	11.2
SPI	native	3.4	15.5
	deamidated	3.4	16.0

열응집성(Heat induced aggregation)

열에 의한 응집은 단백질 분자 사이의 정전기적 인력과 sulfhydryl-disulfide 상호교환에 의하여 일어나는 것으로 단백질 분자의 응집은 겔형성의 필수적인 전제조건이다(Hermansson, 1986).

Fig. 18은 0.2% 단백질 용액을 30°C에서 90°C까지 가온하면서 온도의 변화에 따른 응집 정도를 540nm에서의 흡광도로 나타내었다.

N-BSA는 50°C까지 응집이 생기지 않았으나 60°C에서 흡광도가 크게 증가하였으며 그 이상의 온도에서는 거의 변화가 없었다. D-BSA는 90°C까지 가열하는 동안 응집을 형성하지 않았다. N-EA는 50°C 이후 흡광도가 서서히 증가하여 온도가 올라감에 따라 계속하여 서서히 증가하는 경향을 보였다.

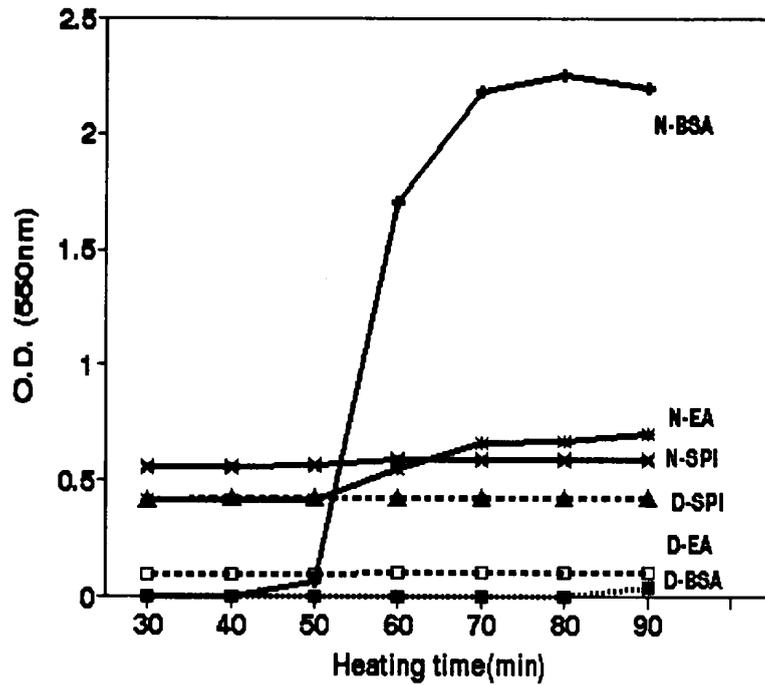


Fig. 18. Changes in heat induced aggregation of deamidated proteins.



Masudomi 등(1990)은 ovalbumin을 65°C로 가열했을 때 540nm에서의 흡광도가 크게 증가하였다고 보고하였다. D-EA는 N-EA보다 540nm에서의 흡광도가 매우 낮은 0.2였으나 온도에 따른 변화는 거의 없었다. 열에 의한 응집은 단백질 분자의 sulfide결합과 disulfide결합의 상호교환과 정전기적 흡착에 의하여 일어나는데 탈아미드된 BSA와 EA의 열에 의한 응집은 90°C까지도 전혀 일어나지 않아 탈아미드가 단백질의 정전기적 상태를 변화시키는 것으로 추정된다. SPI의 경우 D-SPI가 N-SPI보다 540nm에서의 흡광도는 낮아졌지만 모두 90°C까지 열에

의한 응집이 형성되지 않았다. SPI를 60°C 이상으로 가열하면 열에 의한 응집이 일어나며 계속하여 sol에서 progel로의 비가역적 전환이 일어나 polypeptide subunit의 개열이 일어난다고 한다(Catsimpoolas 등, 1970; Kim 등, 1990). 그러나 본 실험에서 N-SPI가 90°C에서조차도 응집이 발생하지 않은 것은 본 실험에서 사용된 SPI가 가공과정 중 열처리된 시료(용해도 참조)이기 때문이라고 추정된다.

열응고성(Coagulation)

열처리를 하면 disulfide결합의 개열 혹은 단백질의 개열이 일어나 단백질 내부에 묻혀있던 sulfhydryl기의 활성화를 유도할 수도 있다(Schmidit, 1981). 또한, 열응집성은 disulfide결합 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(Choi 등, 1982).

Fig. 19는 단백질을 100°C에서 10분 동안 가열한 후 각 단백질들의 열에 의한 응고율을 나타낸 결과이다. 탈아미드되지 않은 단백질들에 비하여 탈아미드된 단백질들은 열에 의한 응고율이 매우 낮은 것으로 나타났는데, 특히 BSA의 경우 N-BSA는 98.9%의 열응고성을 나타낸 반면 D-BSA는 6.1%에 지나지 않았다. SPI는 N-SPI가 18%, D-SPI가 9.9%의 열응고성을 나타내 열에 의한 안정성이 매우 높은 단백질임을 알 수 있었다. Kang(1984)은 대두단백질의 열에 의한 응고성이 약 10%이며 이렇게 대두단백질의 열응고성이 낮은 것은 완충액의 영향 때문일 것이라고 보고하였다. Idouraine 등(1991)은 용해도가 높은 단백질은 열에 매우 민감하다고 하였으나 본 실험에서 탈아미드된 단백질들은 모두 용해도가 증가하였음에도 불구하고 열에 대한 저항력이 큰 것으로 나타나 용해도와 응고성과의 상관관계를 해석하기는 어려웠다.

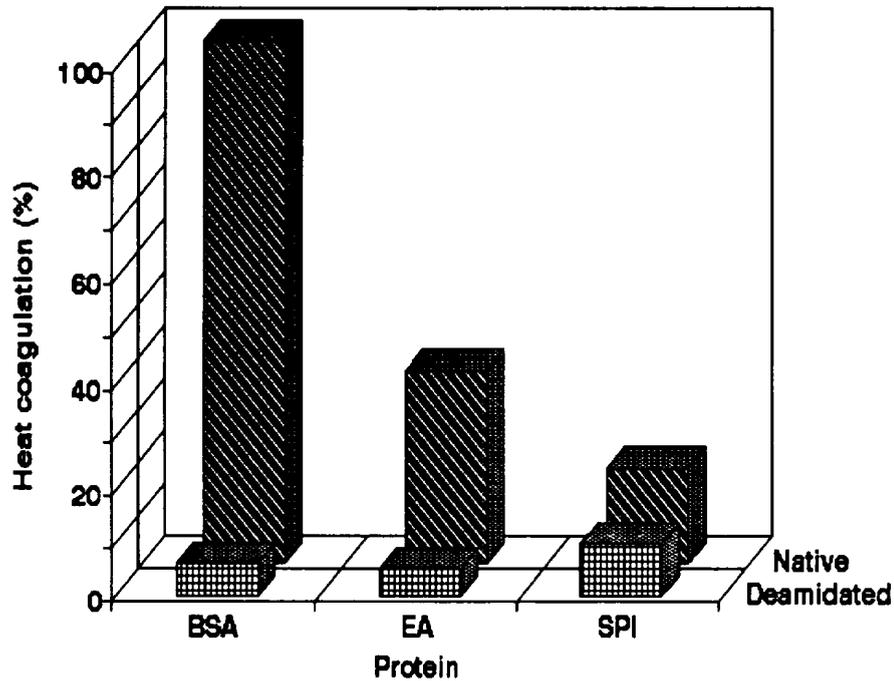


Fig. 19. Heat coagulation of deamidated proteins at 100°C for 10min.



겔화성(Gelation)

겔은 이론적으로 분자들간의 인력과 반발력이 균형을 이루어 잘 정돈된 3차 구조를 이루게 되는 단백질의 응집 현상이다(Schmit, 1981). 반발력은 표면전하들에 의하여 일어나며, 인력은 열에 의한 단백질 분자들의 개열로 노출된 여러 가지 기능기들에 의해 형성된다(Wang과 Damodaran, 1991). 열에 의하여 노출된 기능기들은 단백질 분자의 교차결합 형성에 매우 중요한 역할을 한다. 겔에는 변성된 단백질의 응집체인 coagulant와 분자내부의 disulfide 결합과 정전기적, 소수

성 상호작용에 의해 좀더 정렬된 구조를 가지는 transparent gel 두가지 형태가 있다(Hashizum과 Sato, 1988; Aretfield 등, 1991; Mangino, 1992; Shimada와 Cheftel, 1988).

Table 4는 BSA, EA, SPI의 최소 겔농도를 결정하기 위하여 단백질 농도를 4~14%까지 2% 단위로 증가시키면서 100°C에서 1시간 가열한 후 어느 농도에서 겔이 형성되는지를 측정한 결과이다.

Table 4. Least gelation* concentration of BSA, EA and SPI

concentration (%)	BSA		EA		SPI	
	native	deamidated	native	deamidated	native	deamidated
4	-	-	-	-	-	-
6	gel	-	gel	-	-	-
8	gel	gel	gel	gel	-	-
10	gel	gel	gel	gel	-	-
12	gel	gel	gel	gel	gel	gel
14	gel	gel	gel	gel	gel	gel

-, gel was not formed

*, after heating at 100°C for 1hr followed by cooling for overnight at 4°C

겔을 형성하기 위한 단백질의 최소 농도는 탈아미드 전 단백질의 경우 BSA와 EA은 6%였으며 SPI는 12%였으나 탈아미드된 단백질들은 SPI를 제외하고는 모두 탈아미드 전보다 높은 농도에서 겔이 형성되었다. BSA는 4.5%의 농도에서 90°C로 10분 가열하였을 때 pH 4와 pH 6.4~7.8에서 transparent gel을 형성하였

다고 Yasuda 등(1986)은 보고하였으며, Matudomi 등(1993)은 80°C에서 30분 가열하였을 때 4%의 농도에서 겔을 형성하였다고 하였다. 본 실험 결과 N-BSA는 4% 농도에서도 겔을 형성하기는 하였으나 겔과 수층이 분리되는 현상을 보였다. SPI는 BSA나 EA에 비하여 겔을 형성하기 위한 최소 농도가 높았는데, Okezie와 Bello(1988)는 SPI(promine D)의 최소 겔농도는 14%였다고 하였으며 구상단백질은 높은 단백질 농도에서 겔을 형성하는 것으로 보고되고 있다(Schmit, 1981).

Table 5~7은 Table 4의 결과를 바탕으로 결정된 각 단백질들의 최소 겔농도에서 가열 시간별 가열온도에 따른 BSA, EA, SPI의 겔형성 여부를 측정된 결과이다.

Table 5. Time and temperature required for gel formation of BSA at the least gelation concentration

Time	BSA							
	native (6%)				deamidated (8%)			
	60°C	70°C	80°C	90°C	60°C	70°C	80°C	90°C
10min	-	gel	gel	gel	-	-	-	-
20min	-	gel	gel	gel	-	-	-	-
20min	gel	gel	gel	gel	-	-	-	gel
40min	gel	gel	gel	gel	-	-	-	gel
50min	gel	gel	gel	gel	-	-	-	gel
60min	gel	gel	gel	gel	-	-	-	gel

BSA의 경우(Table 5) N-BSA는 6%의 단백질 농도에서 60°C, 30분 가열 이후 모두 겔을 형성하였으나 D-BSA는 8%의 농도에서 90°C, 30분 이상 가열하였을 때만 겔을 형성하여 겔을 형성하는데 더 높은 온도가 필요하였다. 따라서 D-BSA는 N-BSA보다 열에 안정하여 단백질의 변성이나 겔을 형성하기 위한 기능기들을 노출시키기 위하여서는 처리조건이 달라야 함을 알 수 있었다.

EA(Table 6)도 마찬가지로 N-EA의 경우는 60°C, 30분 가열 또는 70°C 이상에서 10분 가열하는 것만으로도 겔을 형성하였으나 D-EA는 60°C에서 60분을 가열하여도 겔을 형성하지 않았으며 70°C에서 30분, 80°C에서는 20분, 90°C에서는 10분 이상 가열하여야 겔을 형성하였다.

Table 6. Time and temperature required for gel formation of EA at the least gelation concentration

Time	EA							
	native (6%)				deamidated (8%)			
	60°C	70°C	80°C	90°C	60°C	70°C	80°C	90°C
10min	-	gel	gel	gel	-	-	-	gel
20min	-	gel	gel	gel	-	-	gel	gel
30min	gel	gel	gel	gel	-	gel	gel	gel
40min	gel	gel	gel	gel	-	gel	gel	gel
50min	gel	gel	gel	gel	-	gel	gel	gel
60min	gel	gel	gel	gel	-	gel	gel	gel

D-SPI(Table 7) 또한 겔을 형성시키기 위한 온도 및 시간이 N-SPI보다 높아

서 N-SPI인 경우는 60°C에서 30분 가열 후 또는 70°C 이상에서 10분 가열 후 겔이 형성되었으나 D-SPI는 80°C에서 40분 이상 또는 90°C에서 30분 이상 가열 하여야만 겔을 형성하였다.

Table 7. Time and temperature required for gel formation of SPI at the least gelation concentration

Time	SPI							
	native (12%)				deamidated (12%)			
	60°C	70°C	80°C	90°C	60°C	70°C	80°C	90°C
10min	gel	gel	gel	gel	-	-	-	-
20min	gel	gel	gel	gel	-	-	-	-
30min	gel	gel	gel	gel	-	-	-	gel
40min	gel	gel	gel	gel	-	-	gel	gel
50min	gel	gel	gel	gel	-	-	gel	gel
60min	gel	gel	gel	gel	-	-	gel	gel

이상의 결과 단백질의 탈아미드는 열에 대한 저항력을 증진시킨 것으로 나타났다. Nakamura 등(1978)과 Shimada와 Matsushita(1980)는 단백질 분자내에 음전하나 양전하가 증가하였을 경우 이온반발에 의하여 응집체가 잘 형성되지 않는다고 하였는데 탈아미드는 단백질 분자에 음이온을 도입시키게 되므로 천연단백질에 비하여 겔을 형성하기가 어려운 것으로 생각된다.

수 및 유흡수성

수 및 유흡수성은 단백질의 종류, 가공정도, 단백질의 조성(Kinsella, 1979) 또

는 단백질 구조나 친수성 carbohydrate(Idouraine 등, 1991)의 영향을 받는다. 탈아미드된 단백질들의 수 및 유흡수성은 Table 8과 같다. BSA는 용해도가 매우 높은 단백질이어서 완전히 용해되어 수흡수성을 측정할 수 없었으나 EA과 SPI는 탈아미드로 인하여 수흡수성이 크게 증가되었다.

Table 8. Water and oil absorption of deamidated proteins

Proteins		Water absorption (g water/g sample)	oil absorption (g oil/g sample)
BSA	Native	soluble	4.5
	Deamidated	soluble	27.8
EA	Native	0.6	1.3
	Deamidated	10.7	23.0
SPI	Native	5.4	5.7
	Deamidated	11.2	40.7

N-EA의 경우 g당 0.6g의 수분을 흡수하였으나 D-EA은 g당 10.7g으로 약 18배 수흡수성이 증가하였으며, SPI는 EA보다 작지만 약 2배의 수흡수성이 증가하였다. 수흡수성의 증가는 분자의 개열로 분자내부에 묻혀있던 친수성 아미노기들이 분자 외부로 노출되었기 때문에(Voutsinas 등, 1983) 일어난다. 그러나 탈아미드된 단백질의 수흡수성이 증가된 것은 분자내부에 묻혀있던 친수성기들이 노출되었기 때문이라기 보다는 탈아미드로 인하여 아미드기가 산성기로 전환되었기 때문이라 여겨진다. 단백질의 아미드기는 물을 흡수하지 않을 뿐만 아니라 다른 극성기들이 물과 결합하는 것을 방해한다(Bull과 Breese, 1968). 따라서 탈아미드된 단백질들의 수흡수성이 증가된 것은 탈아미드로 아미드기가 산성기로

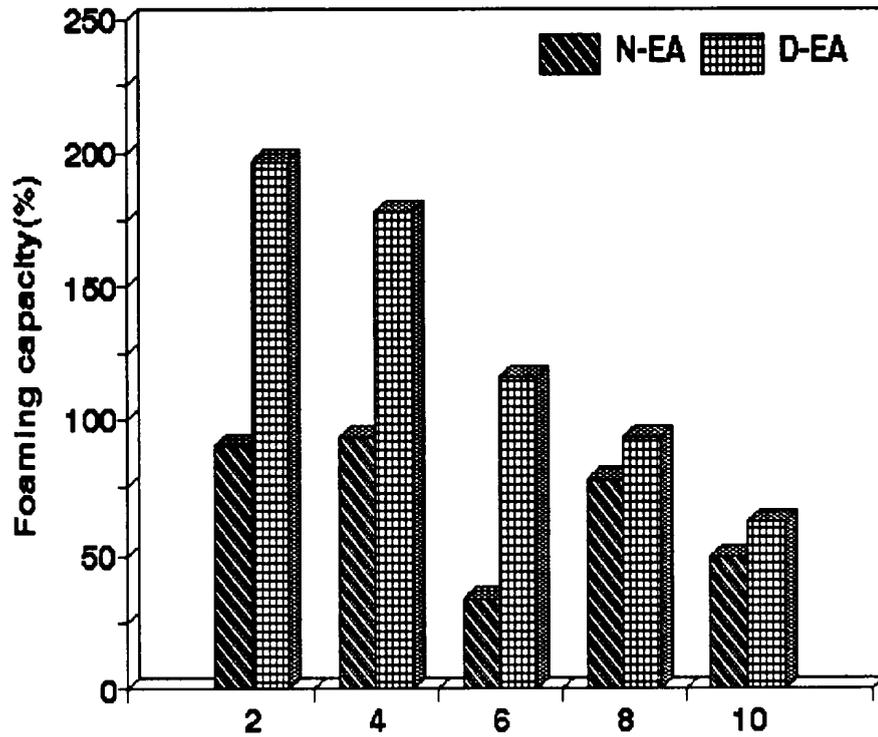


Fig. 22. Foaming capacities of native egg albumin(N-EA) and deamidated egg albumin(D-EA) at different pH.

SPI의 pH에 따른 거품형성능은 Fig. 23과 같다. SPI의 pH에 따른 거품형성능은 “U” 형으로 용해도 곡선과 같은 양상을 보여 등전점 부근인 pH 4 부근에서 N-SPI와 D-SPI 모두 가장 낮은 거품형성능을 나타내었는데 이는 단백질의 용해도가 거품성과 밀접한 관계가 있기 때문이다(Kinsella, 1979). 또한 탈아미드로 인하여 SPI의 거품형성능은 증가되었는데 pH 2에서는 270%로 N-SPI에 비하여 약 130%, pH 4에서는 약 100%가 증가되었으나 pH 6 이상에서는 증가가 크지 않았다. 탈아미드로 인한 대두단백질의 거품형성능 개선에 대하여서는 많은 연구자들도 보고하고 있는데(Mashudomi 등, 1985; Hamada와 Marshell, 1989; Kato

와 Kobayashi, 1989), 단백질 분자의 유연성은 거품성을 조정하는 중요한 인자 중의 하나로(Graham과 Phillips, 1980a, b; Townsend와 Nakai, 1983) 유연성의 개선은 거품성을 증가시킨다고 보고되었다(Measter 등, 1990). 따라서 탈아미드로 인한 유연성의 증가(Table 2)는 거품성을 증가시키는 한 가지 요인으로 작용한 것으로 판단되며, 용해도의 증가(Fig. 13) 또한 거품성의 증가 요인으로 생각된다.

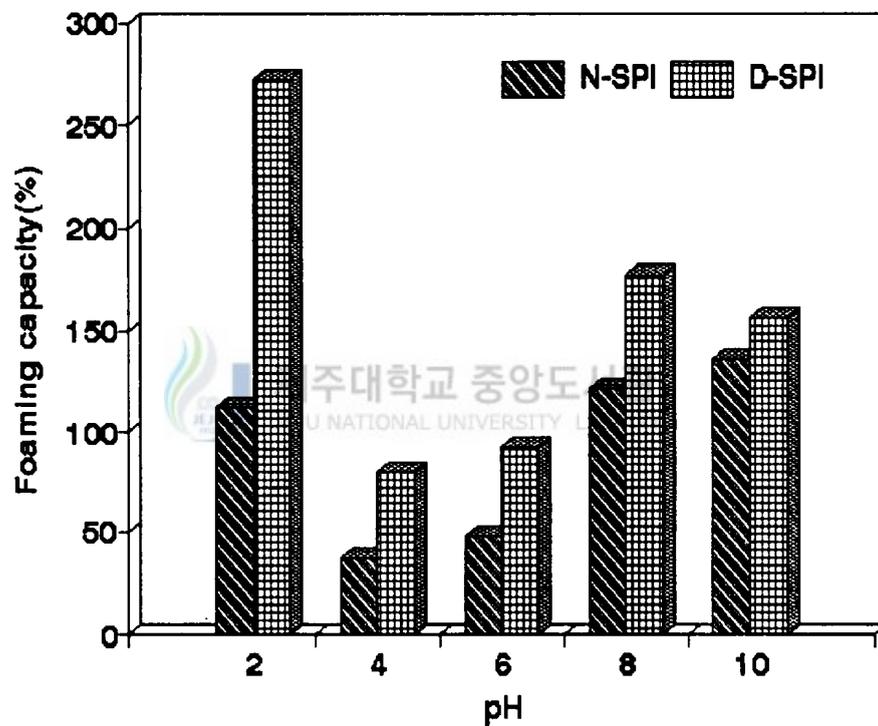


Fig. 23. Foaming capacities of native soy protein isolate (N-SPI) and deamidated soy protein isolate(D-SPI) at different pH.

Fig. 24는 탈아미드된 BSA(Fig. 24b)와 탈아미드되지 않은 BSA(Fig. 24a)의 거품안정성을 조사한 결과이다. BSA는 거품안정성이 매우 낮아 거품형성 20분 후 모든 pH에서 70% 이상의 거품이 없어졌으며 특히 pH 2에서는 거품안정성이 가장 낮아 거품형성 20분 후 거품이 거의 소멸되었다. German 등(1985)은 BSA는 낮은 밀도를 가진 거품을 형성하기 때문에 불안정하여 거품안정성이 낮다고 보고하였다. 탈아미드는 pH 6 이상에서의 BSA의 거품안정성을 약간 개선시켰으나 1시간 후에는 pH 6에서 제외하고는 거품이 거의 소멸되었다. D-BSA의 경우 pH 6에서의 거품안정성이 다른 pH에서 보다 높게 나타난 것은, pH 6이 D-BSA의 등전점이기 때문인데(Fig. 11), 가용성 단백질의 경우 등전점에서는 정전기적 반발이 최소가 되어 표면장력이 감소되기 때문에 단백질은 공기-물 계면에 빠르게 흡착되어 거품안정성이 증가된다(Graham과 Phillips, 1980a, b). 따라서 등전점 부근에서의 거품안정성은 최대가 된다.

EA의 거품안정성(Fig. 25)은 탈아미드로 약간 감소되었다. 순전하의 증가는 거품막에서의 단백질-단백질 상호작용을 방해하여 거품의 파괴 및 안정성의 저하를 가져온다고 보고되고 있다(Townsend와 Nakai, 1983; Thompson과 Cho, 1984). 따라서 단백질의 탈아미드는 음전하를 도입시키기 때문에 결국 전하의 증가로 거품안정성이 낮아지게 되는 것이다.

SPI의 거품안정성(Fig. 26) 또한 탈아미드로 감소하는 경향이였다. N-SPI는 pH에 관계없이 거품안정성이 비교적 높은 것으로 나타났으나 D-SPI은 pH에 따른 거품안정성의 변화가 커서 D-SPI의 등전점 부근에서는 높았으나 그 이상이나 이하의 pH에서는 낮았다. 탈아미드는 거품안정성을 감소시키거나 거의 변화시키지 않았다는 보고(Ma와 Khanzda, 1987; Hamada와 Marshall, 1989)와 증가시켰다는 보고(Kato 등, 1987b)가 있는데 본 실험에서 의하면 neutrase에 의한 탈아미드는 단백질의 거품안정성을 감소시키는 것으로 나타났다.

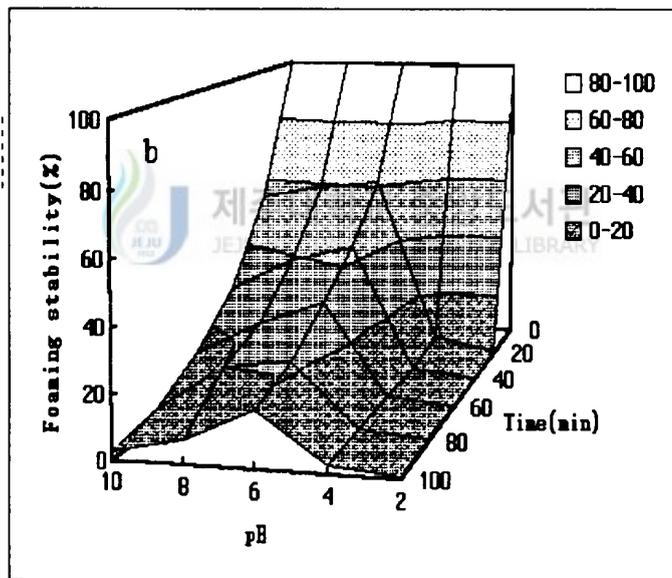
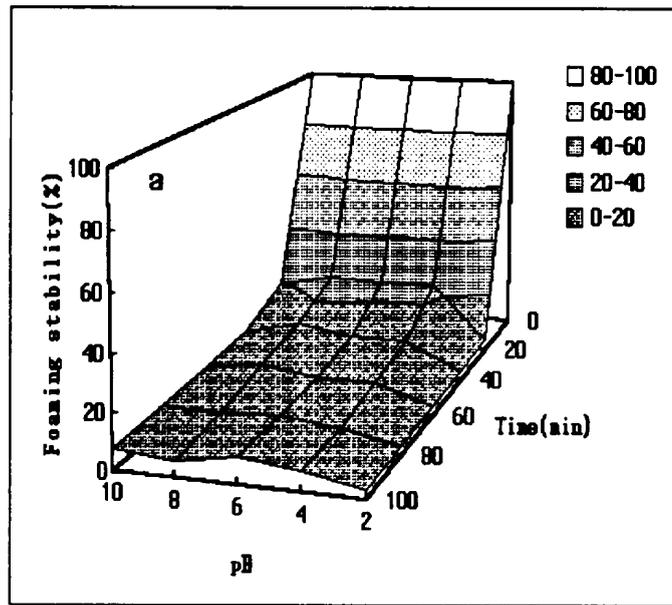


Fig. 24. Foaming stabilities of native(a) and deamidated(b) BSA.

전환되었기 때문에 판단된다. Ma와 Khanzada(1987)는 탈아미드로 음전하가 증가하였기 때문에 단백질과 물과의 상호작용이 강화되어 수흡수성이 증가되었다고 하였다. 유흡수성 또한 탈아미드로 모두 개선되어서 BSA는 6배, EA은 18배, SPI는 7배 증가되었다. 유흡수성의 증가는 표면소수성의 증가와 관련이 있는데(Ma와 Khanzada, 1987) 본 실험에서도 탈아미드는 단백질의 표면소수성을 증가시키는 것으로 나와(Table 1) 유흡수성의 증가는 이에 의한 영향으로 여겨진다. 또한 유흡수성의 증가는 유화능에도 영향을 미쳐 탈아미드화는 유화활성을 높였다(Fig. 21~23).

칼슘용고성

칼슘은 단백질의 carboxyl기 및 imidazol기와 결합하여 단백질 표면소수성을 증가시켜 단백질간의 응집을 유도하는 것으로 추정하고 있다(Saio 등, 1975). 칼슘에 대한 반응성이 민감한 단백질은 겔 형태의 식품을 만들 때 유용하며 칼슘에 대한 반응성에 둔감한 단백질은 칼슘강화음료 등 칼슘을 첨가하여도 단백질의 응집이 일어나서는 안되는 음료류의 제조에 유용하다.

Fig. 20은 탈아미드가 각 단백질들의 칼슘용고성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

탈아미드는 칼슘용고성을 크게 개선하여 N-BSA의 경우는 5.2%였으나 탈아미드 후에는 17.3%로 3.3배 증가되었고, 특히 EA은 4.8%에서 72%로 15배의 증가를 보여 탈아미드는 칼슘과의 반응성을 크게 증가시키는 것으로 나타났다. 그러나 SPI는 탈아미드로 인한 칼슘용고성이 증가하기는 하였으나 SPI 자체가 칼슘과의 반응성이 높아 그 변화가 크지 않았다.

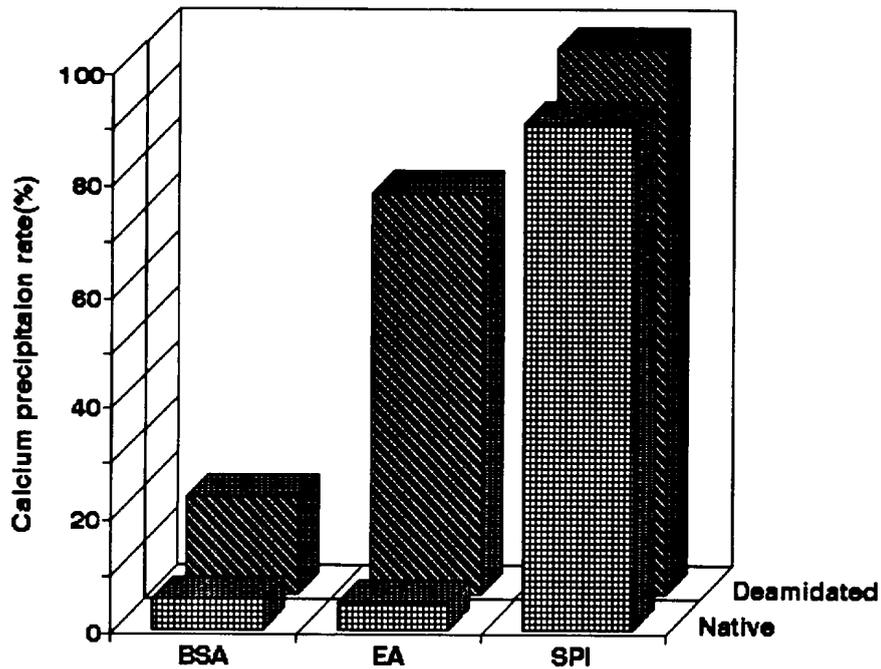


Fig. 20. Changes in calcium precipitation of deamidated proteins.



거품성

단백질의 거품성은 식품가공의 중요한 범주 중의 하나로, pH, 온도, 염이나 설탕의 첨가, 단백질원 등과 같은 여러 요인들에 의하여 영향을 받는다(Cherry와 MacWatter, 1981). 거품은 가스의 거품상이 연속적인 수층막에 의하여 둘러싸여 있는 이상계(two-phase system)로서, 표면활성과 단백질을 구성하고 있는 인자들의 막 거품 형성 특성은 식품의 거품에 주요한 작용을 한다(Halling, 1981). 거품의 형성은 공기를 붙잡아 가두어두거나 보유할 수 있는 점착성이 있는 계면막

을 얼마나 빨리 형성할 수 있는나 하는 단백질의 능력에 따라 달라진다. 공기에 의하여 둘러싸여 있는 단백질막은 거품을 형성시키는 동안의 기계적 충격을 충분히 견딜 수 있을 만큼 강하여야 하며, 충분한 수분을 보유할 수 있어야 한다 (Kinsella, 1984; Halling, 1981; Phillips 등, 1987). 따라서 탈아미드된 단백질이 변형 전에 비하여 거품을 형성하거나 유지하는 능력이 어떻게 변하는지를 알아보았다.

BSA의 거품형성능은 Fig. 21과 같다. BSA는 거품능이 매우 우수한 단백질로 모든 pH에서 높게 나타나 거품형성능이 가장 적은 pH 2에서도 N-BSA는 182%, D-BSA에서는 318%로 나타났다. 또한, 탈아미드는 BSA의 거품성을 향상시켰는데, 강산성과 강알칼리성 pH에서의 증가가 중성 pH에서보다 커서 pH 2에서는 탈아미드로 약 74%, pH 10에서는 102%의 증가를 보였다. N-BSA의 경우 pH 4에서 거품형성능이 가장 높았지만, 이보다 높거나 낮은 pH에서는 감소하는 경향을 보였다. 그러나 D-BSA는 pH가 증가함에 따라 거품형성능도 증가하였다. 단백질의 거품형성능은 단백질 분자들이 공기-물 계면에 확산되어 흡착되는 정도 및 표면변성에 의하여 달라지며 단백질의 분자량, 표면소수성 및 분자내부의 결합상태 등에 따라 영향을 받게 된다(Poole 등, 1987). 탈아미드로 인한 거품형성능의 향상은 이들 여러 가지 인자 중 표면소수성의 증가(Table 1)에 의한 것으로 추정된다(Kato, 1987b).

EA의 거품형성능(Fig. 22)도 탈아미드로 인하여 증가하였는데 특히, pH 2~6에서의 증가율이 컸으며 pH 6에서는 300% 증가하였다. Kato 등(1989)은 거품능이 향상되는 것은 용해도와 표면소수성이 증가하였기 때문이라고 보고하였으며, Halling (1981)은 용해도의 증가와 인접한 거품들 사이의 정전기적 반발력의 증가는 거품성을 개선시킨다고 보고하였다. 따라서 탈아미드로 표면소수성이 증가

하였으며(Table 1), 또한 단백질 분자에 음이온이 도입됨으로써 정전기적 반발력이 커져 거품형성능이 증가하는 것으로 추정된다.

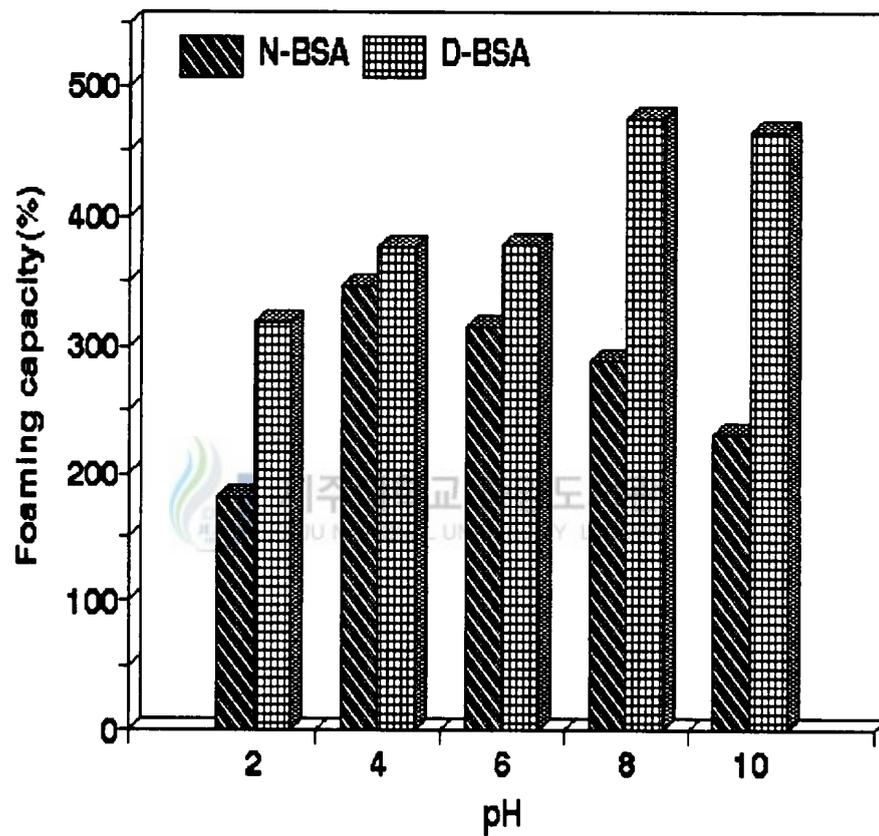


Fig. 21. Foaming capacities of native BSA(N-BSA) and deamidated BSA(D-BSA) at different pH.

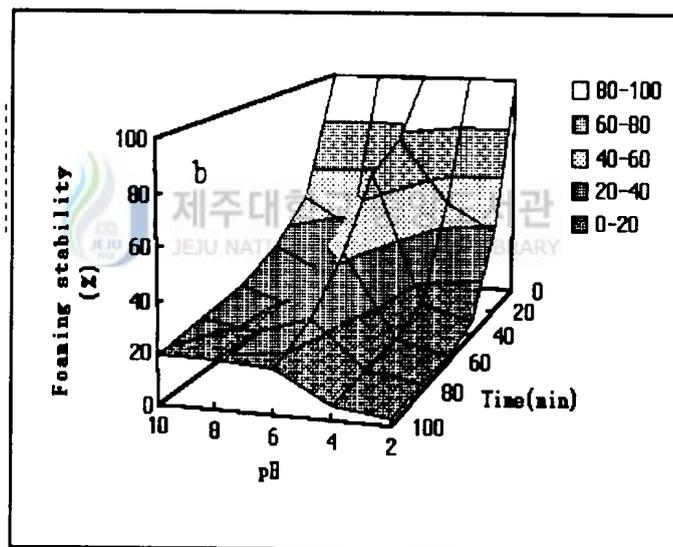
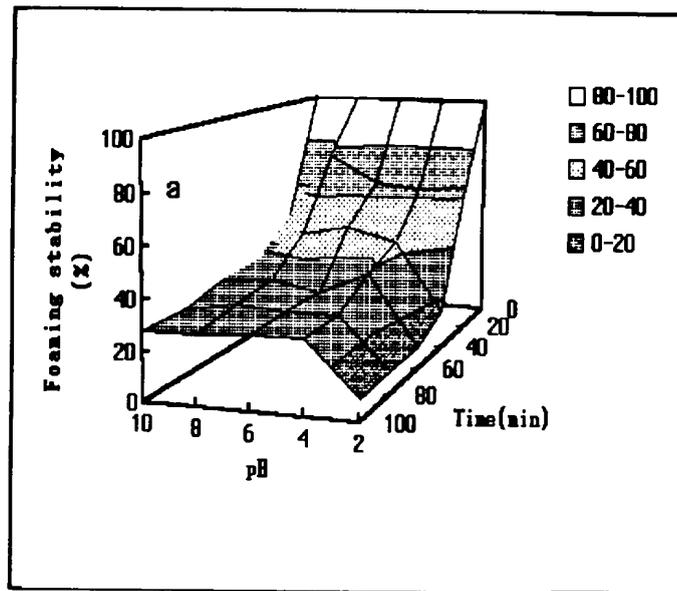


Fig. 25. Foaming stabilities of native(a) and deamidated(b) EA.

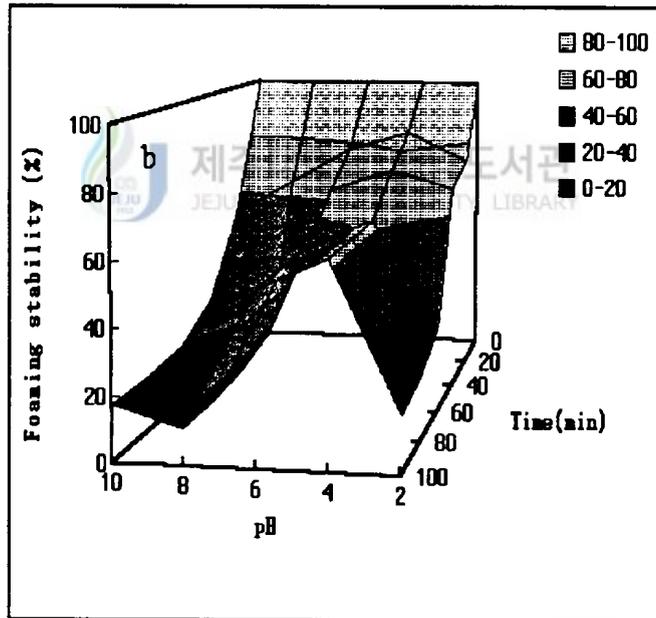
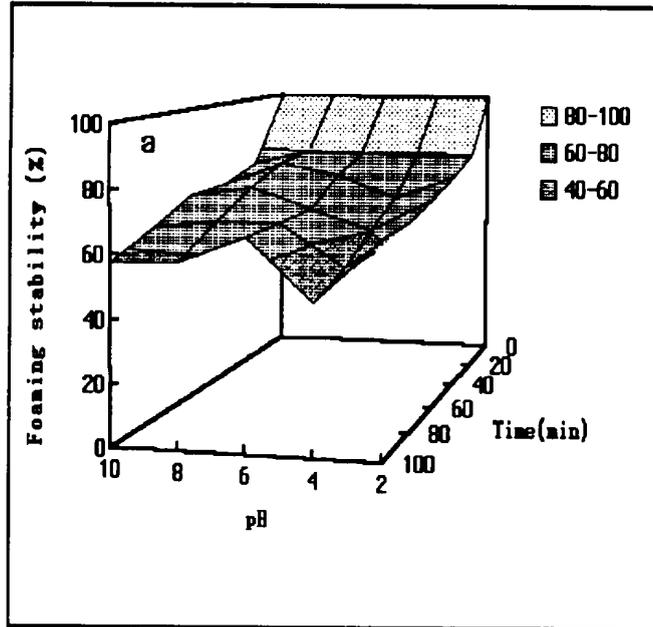


Fig. 26. Foaming stabilities of native(a) and deamidated(b) SPI.

유화특성

단백질은 양성적인 성질을 가지며 유연하기 때문에 식품의 유화를 안정시키며 양성을 띄고 있는 비단백성 물질, 예를 들면 단당류에 비하여 안정적인 막을 형성한다(Haque과 Kinsella, 1988). 이런 단백질의 유화능은 계면에서의 흡착 등과 같은 여러 가지 인자에 의하여 영향을 받는다(Mine 등, 1991; Matsudomi 등, 1985).

BSA는 친수성이 큰 단백질이다(Kato와 Nakai, 1981). BSA는 구조가 견고하지 않아 기름과 물의 계면을 변화시키며(Graham과 Philips, 1980a, b) 이에 따라 BSA의 표면활성 특성을 증진시킨다(MacRitchie, 1978). 이는 BSA의 유화활성지수의 값이 다른 단백질에 비하여 높은 것으로도 알 수 있다(Fig. 28, 29 참조). Fig. 27은 탈아미드로 인한 수용액(a), 0.2M NaCl(b) 및 1.0M NaCl(c) 용액에서의 천연 BSA(N-BSA)와 탈아미드된 BSA(D-BSA)의 유화활성지수(emulsion activity index, EAI)를 나타낸 결과이다. 탈아미드는 수용액이나 염용액 모두에서 BSA의 EAI를 증가시켰으며, pH가 낮아질수록 탈아미드로 인한 BSA의 EAI 증가폭이 컸다. N-BSA나 D-BSA 모두 수용액이나 염용액에서의 pH에 따른 EAI의 변화는 같은 경향을 나타내어 pH 2에서 가장 낮았으며 pH 2 이상에서 pH 6까지 서서히 증가하여 pH 6에서 최대의 EAI를 나타내었고 그 이후 다시 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 경향은 Waniska 등(1981)의 보고와도 일치하고 있는데 이들은 pH 4 이하에서 BSA의 유화능이 감소하는 것은 산성에서는 단백질 구조의 작은 변화에도 유화능이 영향을 받기 때문에 산에 의하여 BSA의 3차구조의 수소결합이 파괴되므로써 정전기적 반발이 일어나 3차구조가 변하기 때문에 유화활성이 감소한다고 보고하였다. 또한 pH 9 이상에서 BSA는 소수성 인력의 파괴와 약간의 disulfide 결합의 개열이 일어나는 alkaline expansion이 일

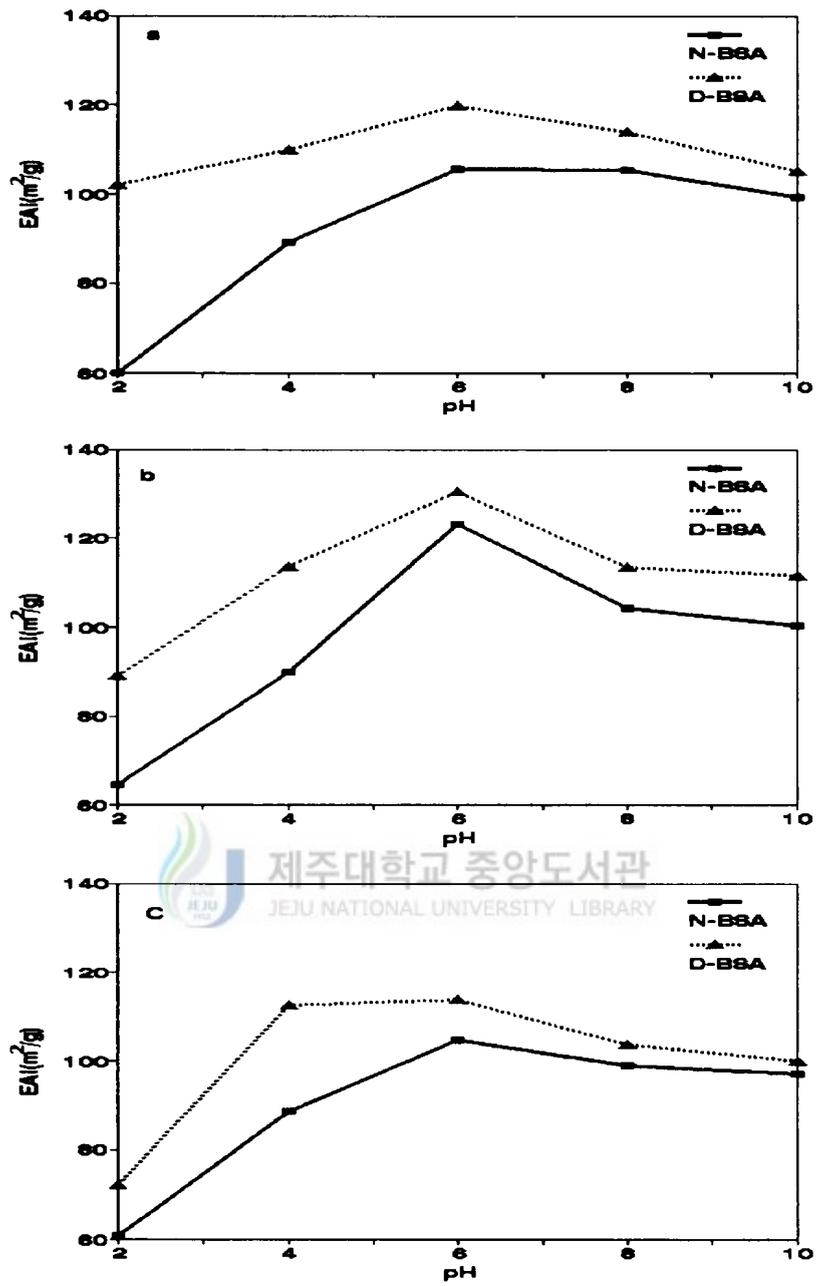


Fig. 27. Emulsion activity index(EAI) of BSA in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(C) solution.

어난다(Leonard와 Foster, 1961)고 알려지고 있는데 pH 8 이후에 BSA의 EAI가 다시 감소하는 것은 pH 조정을 위하여 첨가한 알칼리에 의하여 disulfide 결합의 파괴 등이 일어나 3차구조가 변하기 때문이다.

또한 N-BSA와 D-BSA 모두 pH 4~8에서 수용액보다는 0.2M NaCl 용액에서의 EAI가 증가하였는데, 0.1~0.6M의 이온강도에서는 BSA는 단백질간의 상호작용이 커져 정전기적 반발력이 감소됨에 따라 기름과 물계면 사이에서의 BSA의 표면 전하가 중화되어(MacRitchie, 1978; Kinsella, 1976) 막의 유동학적 성질 및 계면 농도가 최대가 되기 때문에 EAI가 증가한다고 한다. 또한 1.0M NaCl 용액에서는 0.2M NaCl 용액이나 수용액에서보다 N-BSA와 D-BSA의 EAI가 감소하였는데 0.8M 이상의 염농도에서는 기름과 물 계면으로 전이되는 단백질양이 감소하기 때문에(Waniska, 1981) BSA의 EAI가 감소하는 것으로 추정된다.

천연 egg albumin(N-EA)과 탈아미드된 egg albumin(D-EA)의 pH에 따른 수용액에서와 염용액에서의 EAI 변화를 나타낸 결과는 Fig. 28과 같다. N-EA는 용매에 관계없이 pH 6까지 EAI가 증가하다가 pH 8에서 감소하고 그 이후 다시 증가하는 양상을 보였다. Kinsella 등(1982)은 EA의 EAI는 pH 5에서 가장 높았으며 pH 5 이상에서는 감소하다가 pH 8 이후 다시 증가하였다고 보고하고 있어 본 결과와 비슷한 경향을 보이고 있으나 Mine(1991)은 EA의 EAI는 pH 3에서 가장 높았으나 그 이상의 pH에서는 감소하였는데 pH 7 이상에서는 감소정도가 매우 작았다고 보고하고 있어 본 결과와는 다른 양상을 나타내었다. 유화능은 단백질 농도, 첨가된 기름의 양, 염 존재 등에 영향을 받으며 특히 pH가 유화능의 변화에 가장 중요하다(Mine, 1991). 따라서 연구자들에 따라 결과가 달리 나타난 것은 유화능에 영향을 미치는 요인 중 단백질 농도나 첨가된 기름의 종류나 양 등이 다르기 때문이라고 생각된다. 본 실험에서는 0.5% 단백질 용액에

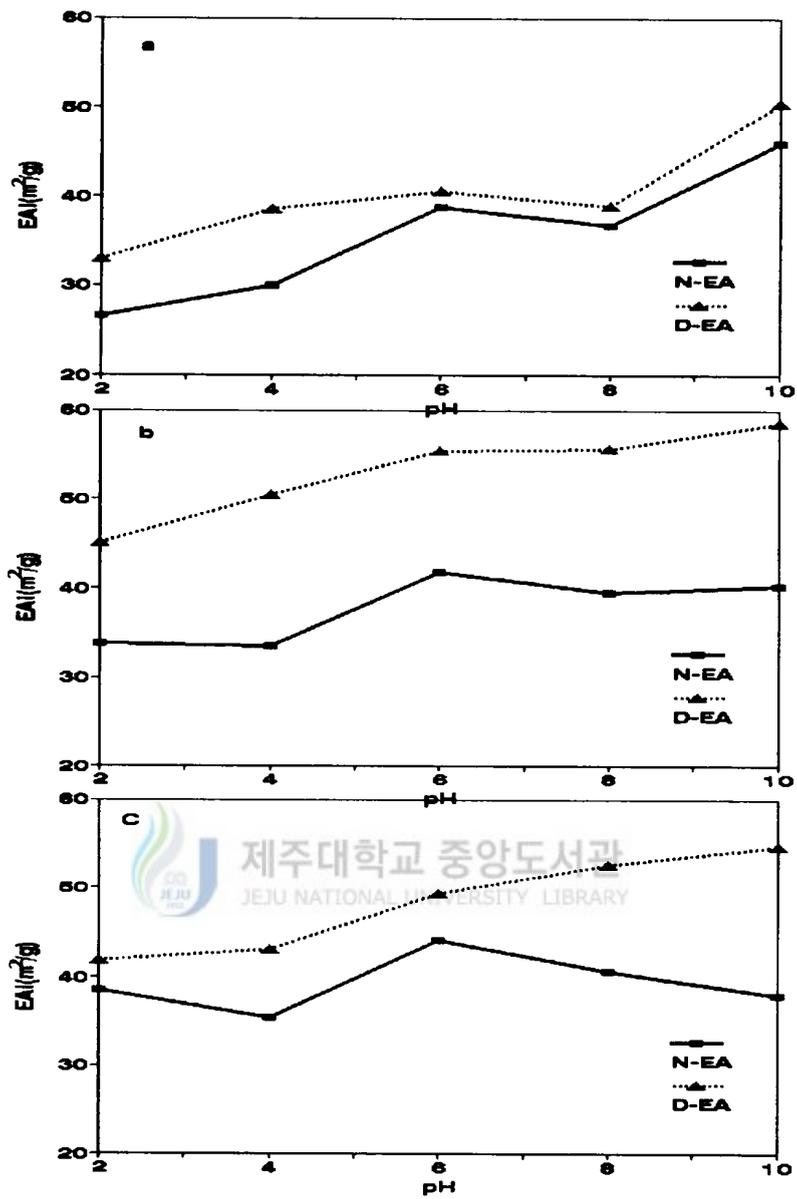


Fig. 28. Emulsion activity index of egg albumin in distilled water(a), and 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution.

20%의 옥수수기름을 첨가하여 유화시켰으며, Mine (1991)은 1.0% 단백질 용액에 25%의 대두유를 첨가하였다. D-EA의 경우는 pH 증가와 함께 더불어 EAI가 증가하는 양상을 보였다. EA의 탈아미드는 수용액과 염용액 모두에서 EAI를 증가시켰으며 특히, 0.2M NaCl 용액에서의 탈아미드로 인한 EAI의 증가가 수용액이나 1.0M NaCl 용액에 비하여 컸으며, 1.0M NaCl 용액에서는 중성 이상의 pH에서 증가폭이 컸다. D-EA의 EAI의 증가는 탈아미드로 인하여 EA의 표면소수성이 크게 증가하였기 때문으로(Table 1) 단백질의 표면소수성은 유화능에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Kato와 Nakai, 1980). 유화에 의하여 기름 표면에 단백질이 흡착되는 것은 소수성 상호작용에 의하여 일어나는 현상으로(Nir 등, 1994) 결국 표면소수성의 증가는 EAI를 증가시키게 된다. 또한 유화능은 용해도와 양의 상관관계가 있다는 보고(Yasumatsu 등, 1972; Volkert와 Klein, 1979)와 전혀 관련이 없다는 보고(Aoki 등, 1980; Flint와 Johnson, 1981; McWatters와 Holmes, 1979, Wang과 Kinsella, 1976)가 있는데 본 실험 결과에 의하면 EA의 경우 용해도와 유화능 사이의 상관관계는 없는 것으로 나타났다.

Fig. 29 은 중류수(a)와 0.2M NaCl(b), 1.0M NaCl(C) 용액에서의 SPI의 pH 별 EAI를 나타낸 결과이다. SPI의 pH에 따른 EAI 곡선은 N-SPI와 D-SPI 모두 용해도와 비슷한 양상을 보이고 있다. 이런 결과는 Franzen과 Kinsella(1976), MacWatter와 Holmes(1979) 등의 보고와도 유사한데 SPI는 등전점 부근에서 EAI가 매우 작은 것으로 알려져 있다. SPI는 탈아미드로 EAI가 증가되었는데 특히 NaCl 용액 pH 6 이상에서의 증가폭이 컸으며, N-SPI와 D-SPI 모두 수용액에서보다 염용액에서의 EAI가 컸다. Tornberg(1979)는 0.2M NaCl용액에서는 점성이 매우 강한 유화액이 형성되었는데 이것은 용매의 이온강도는 단백질의 용해도와 대두단백질 subunit의 연합 및 해리에 영향을 미쳐 0.1M 이상의 NaCl

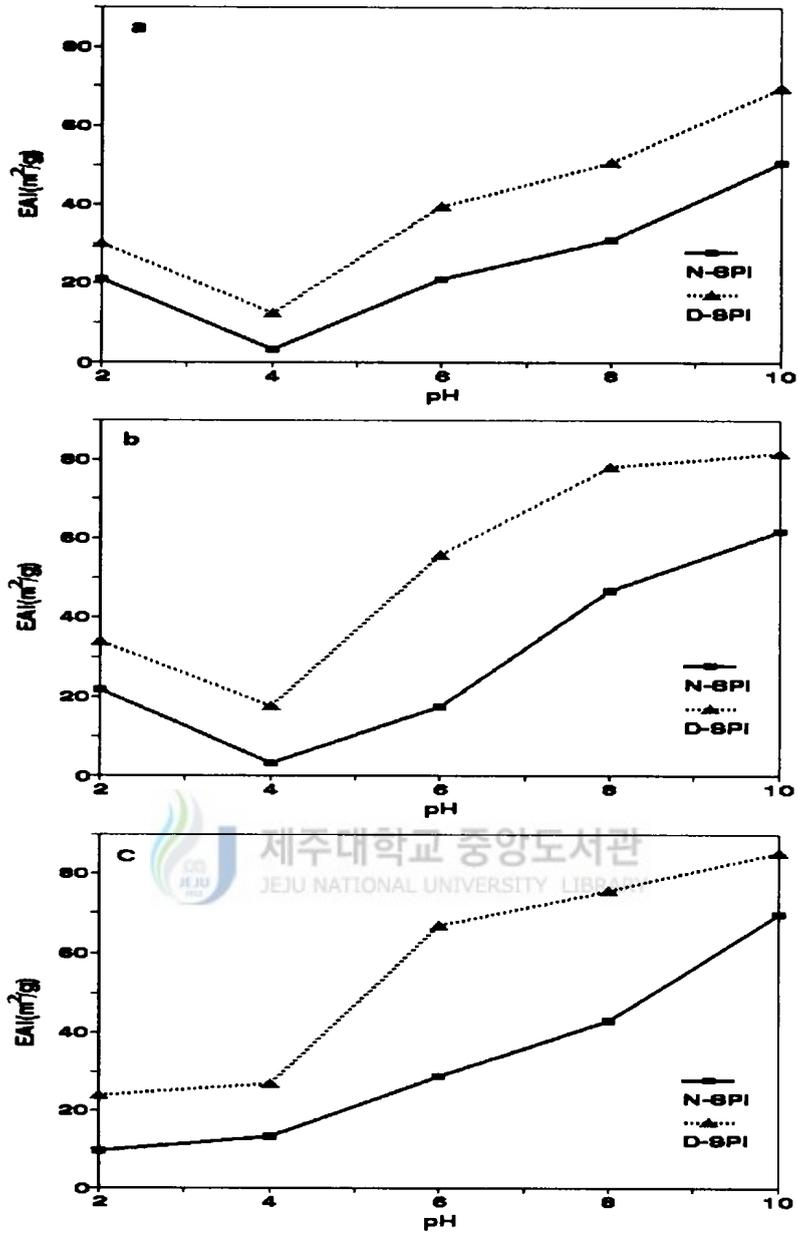


Fig. 29. Emulsion activity index of soy protein isolate in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution.

농도에서는 좀 더 정착성있는 막이 형성되기 때문에 유화능이 강화된다고 보고 하였다. 그러나 Kamat 등(1978)은 2.0M 이상의 NaCl 용액에서는 대두단백질의 유화가 파괴되었다고 하여 이온강도와 유화능과는 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

Fig. 30은 수용액(a)에서와 염용액(b, c)에서의 탈아미드로 인한 BSA 유화안정성(emulsion stability, ES)의 변화를 pH별로 나타낸 것이다. N-BSA의 경우 수용액에서와 0.2M NaCl 용액에서 BSA 분자의 표면 양전하가 높은 pH 4에서 EAI가 다른 pH에서보다 증가하였는데 이 pH에서는 BSA가 분자내에 양성자화된 염기성 측면쇄와 이온쌍을 형성함으로써 정전기적으로 중성이 되어 부분적으로 분자가 개열되기 때문에(Peters, 1985) BSA분자는 팽창되며, 전하의 반발로 분자구조가 풀려 ES가 증가하였다고 Haque과 Kinsella(1988)는 보고하고 있다. 또한 염용액에서의 ES는 수용액에서보다 감소하였으며 0.2M NaCl 용액에서보다 1.0M NaCl 용액에서의 ES가 좀 더 감소하였다. BSA의 ES는 수용액과 염용액 모두에서 pH 4 이하의 산성에서는 약간 개선되었으나 탈아미드로 크게 변화되지 않았다.



Fig. 31은 EA의 ES를 나타내고 있다. EA의 탈아미드는 산성과 알칼리성 pH의 수용액 중에서 ES를 개선시켰으나 중성 부근에서는 약화시켰다. 낮은 염농도(0.2M NaCl)에서의 ES도 수용액에서와 같은 양상을 보여 중성 이외의 pH에서는 탈아미드로 인하여 증가되었으나 높은 염농도(1.0M NaCl)에서는 pH 4 이상에서 증가하였다. 그러나 1.0M NaCl 용액에서의 ES는 수용액이나 0.2M NaCl 용액에서보다 모든 pH에서 낮았다.

SPI의 각 용액에서의 pH별 ES는 Fig. 32와 같다. SPI의 ES는 EAI 및 용해도와 동일한 양상을 보여 등전점 부근에서 가장 낮았다. 등전점에서는 분자들간

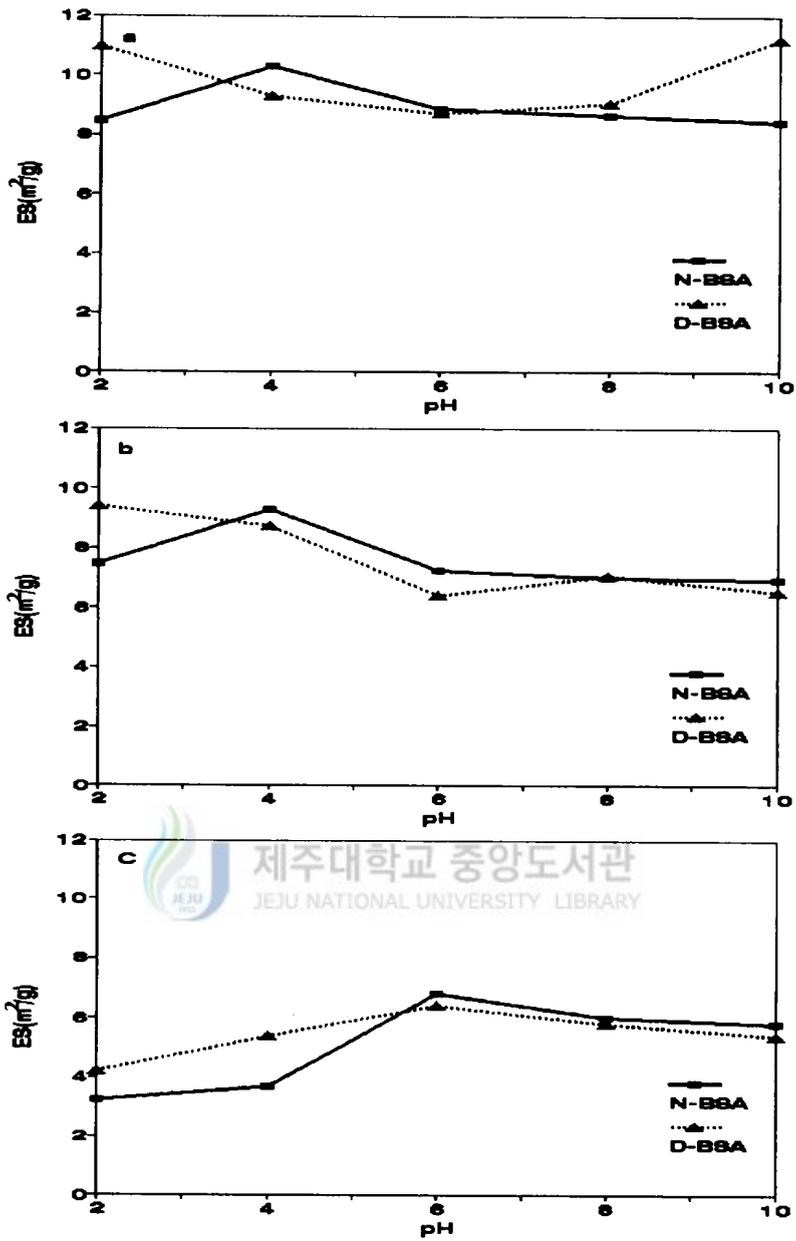


Fig. 30. Emulsion stability of BSA in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution.

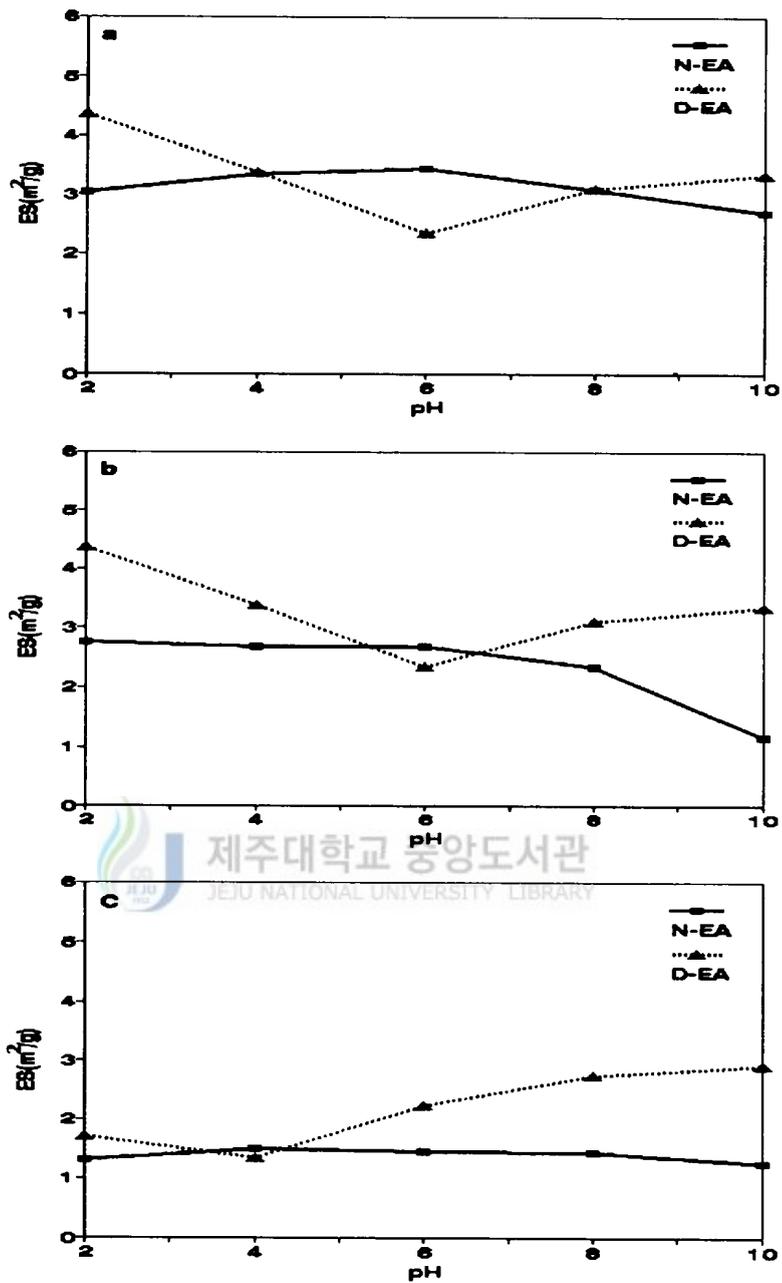


Fig. 31 Emulsion stability of egg albumin in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution.

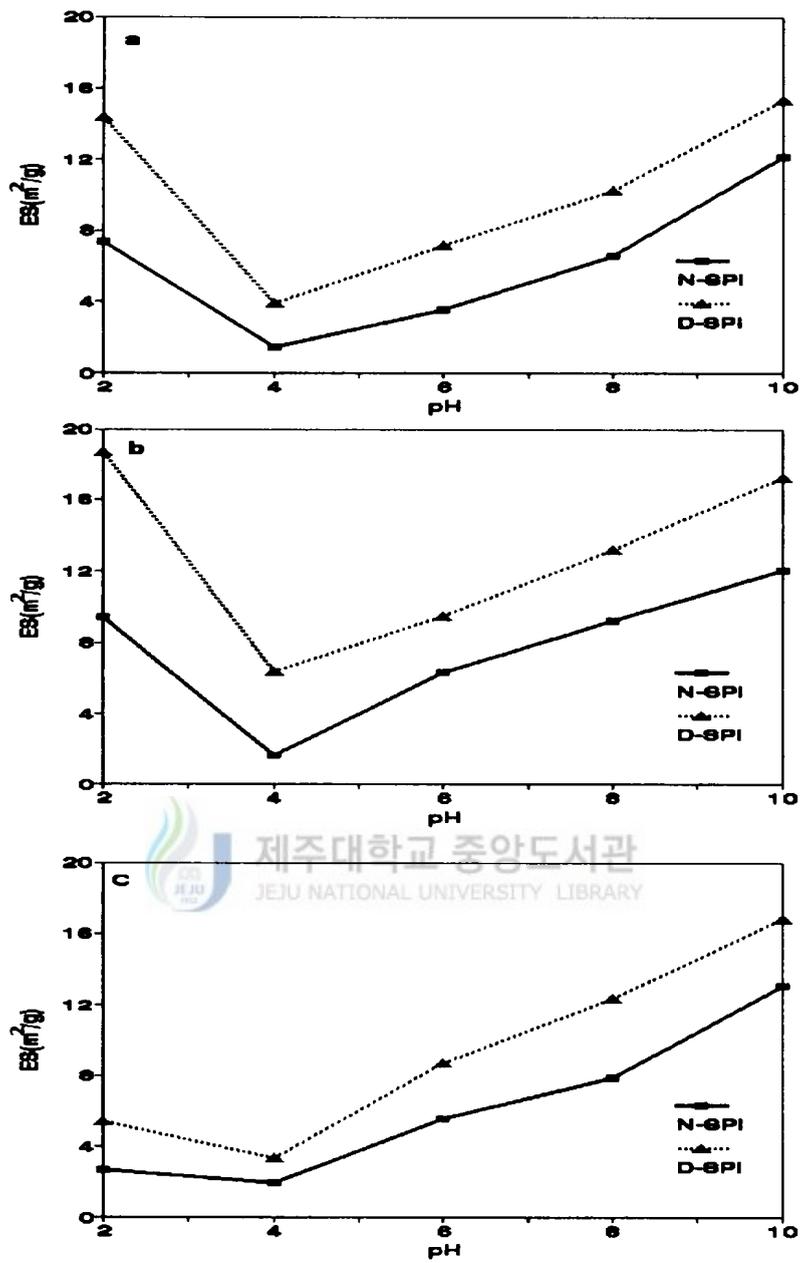


Fig. 32. Emulsion stability of SPI in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution.

의 정전기적 반발이 최소가 되어 단백질이 가장 작은 상태로 되고 단단한 단백질 막이 형성된다. 이 단단한 막의 형성은 단백질의 유화를 안정화시키나 이 유화액이 묽을 경우 인접한 방울들간의 반발이 적어져 유화액은 침전되어 ES가 감소되며, 등전점에서 멀어질수록 반발력이 커지기 때문에 침전이 최소화되어 유화액은 안정된다(Kinsella 등, 1985). 염은 이웃 방울들 사이의 콜롱 상호작용을 감소시켜 대두단백질의 유화액을 안정화시킨다고 보고되고 있는데(MacWatters와 Holmes, 1979) 본 실험 결과에 의하면 염용액에서 SPI의 ES는 수용액에서의 ES와 거의 변화가 없었다.

Lysinoalanine(LAL) 생성여부

LAL은 cystine이나 serine잔기의 β -elimination에 의하여 형성된 이중결합을 가진 dehydroalanine 잔기와 lysine의 ϵ -amino기가 반응하여 생기는 독성물질로 식품단백질을 알칼리 처리하였을 경우 처리조건에 따라 생성되는 양이 다양한 것으로 알려져있다(Maga, 1984). 단백질 가수분해효소에 의한 알칼리성 pH에서의 탈아미드는 단백질의 여러 가지 기능성을 개선시켰으나 알칼리 처리로 인하여 LAL이 생성될 가능성이 있다고 Kato 등(1987b)은 보고하고 있다. 따라서 탈아미드 후의 LAL의 생성여부는 매우 중요한 변수로 작용한다. LAL은 아미노산 분석기에 의하여 정량이 가능한데 Table 9는 단백질을 pH 10, 20°C에서 3시간 동안 neutrase에 의하여 탈아미드시켰을 때 탈아미드된 단백질들에 LAL이 생성되었는지의 여부를 측정한 결과이다. D-EA과 D-SPI에서는 LAL이 검출되지 않았으나 D-BSA에서는 0.0339g/100g의 LAL이 검출되었다. LAL은 단백질 1g당 0.3g이 함유되어 있을 경우 쥐의 간에 손상을 입히는 것으로 알려지고 있다

(Finley and Kohler, 1979). 따라서 탈아미드로 인하여 BSA에 LAL이 생성되기는 하였으나 그 양이 매우 적어(0.00339g/g) 위해를 일으킬 만큼은 아닌 것으로 측정되었으며, 알칼리성 pH에서의 탈아미드는 단백질의 종류에 따라 미량의 LAL을 생성하기도 하는 것으로 나타났다.

Table. 9. Lysinoalanine contents of deamidated proteins

	(g/16g N)					
	N-BSA	D-BSA	N-EA	D-EA	N-SPI	D-SPI
ASP	15.84	156.40	12.88	9.70	12.44	10.94
THR	7.60	6.69	4.50	3.73	4.82	3.55
SER	4.55	4.63	5.80	4.89	6.21	4.02
GLU	24.71	24.80	15.68	11.92	15.97	18.03
GLY	1.47	1.45	2.33	1.65	3.26	1.97
ALA	5.51	4.58	4.61	3.48	3.21	2.22
VAL	6.93	6.86	6.12	4.78	4.82	5.19
ISO	2.91	3.59	4.91	3.73	5.49	4.09
LEU	13.10	15.58	6.18	4.58	7.84	7.05
PHE	17.81	18.23	6.61	5.15	6.75	7.39
LAL	n. d.	0.0185	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
HIS	2.07	2.03	1.01	0.81	1.22	0.78
LYS	1.20	1.21	5.74	4.68	5.89	4.12
AMM	0.25	0.25	0.50	0.23	0.35	0.25
ARG	3.20	3.10	2.51	1.94	3.75	2.62

요 약

특수한 기능성을 가지는 효소적 변형 단백질을 개발하기 위하여 알칼리성 pH에서 단백질 가수분해효소를 이용한 탈아미드를 행하였다. 최적 탈아미드 조건과 효소를 찾기 위하여 우혈청단백질(bovine serum albumin, BSA)와 난알부민(egg albumin, EA), 대두분리단백질(soy protien isolate, SPI), casein을 효소 및 조건을 달리하여 탈아미드하였다. 또한 최적효소로 선정된 neutrase에 의하여 탈아미드된 단백질들의 이화학 및 기능적 특성을 조사하였다.

효소에 관계없이 최적 탈아미드 조건은 pH 10, 20°C, 3시간이었으며, 탈아미드 효소로는 neutrase가 papain, pronase, bromelain, ficin보다 우수하였다. 최적 탈아미드 조건에서 neutrase에 의한 BSA, EA, SPI 및 casein의 탈아미드율은 각각 24, 20, 14, 그리고 14%였으나, casein의 경우 탈아미드에 동반하여 일어난 펩티드결합의 분해가 비교적 높았다.

D-BSA는 pH 4~8 사이에서 중류수에서의 용해도가 N-BSA에 비하여 약간 감소하였다. 그러나 1.0M NaCl 용액에서는 산성의 pH에서 D-BSA의 용해도가 크게 떨어졌다. EA의 용해도는 탈아미드로 pH 3 이하와 6 이상의 수용액에서는 증가하였으나, NaCl 용액에서는 산성의 pH에서 크게 감소하였다. SPI는 탈아미드로 중류수에서의 용해도는 증가하였으나, NaCl 용액에서는 pH 6 이상에서만 증가하였다.

탈아미드로 인하여 EA과 SPI의 최대 형광흡수대는 변하지 않았으나 D-BSA는 blue shift가 일어났다.

전기영동 결과에 따르면 D-BSA는 3개의 band로 나누어졌으며, EA이나 SPI

는 탈아미드에 의한 band의 변화가 없었다.

탈아미드로 표면소수성은 증가되었으나, 유리 SH기와 S-S결합은 영향을 받지 않았다.

탈아미드된 단백질들은 일반적으로 열에 대한 민감성이 저하되어 열에 의한 응집이나 겔을 잘 형성하지 않았다.

또한 탈아미드는 수흡수성 및 유흡수성을 크게 증가시켰다.

칼슘용고성은 탈아미드로 BSA는 3.3배, EA는 15배 증가되었으나 SPI의 경우는 변화가 크지 않았다.

D-BSA, D-EA 및 D-SPI 모두 높은 거품형성능을 보였다. 거품안정성은 BSA의 경우는 탈아미드로 약간 증가하였으나 EA과 SPI는 약간 감소하였다.

탈아미드는 BSA와 EA, SPI의 에멀전활성을 증가시켰는데 EA은 0.2M NaCl 용액에서, SPI는 pH 6이상의 NaCl 용액에서의 증가가 두드러졌다. 에멀전 안정성의 경우 BSA는 탈아미드로 거의 달라지지는 않았으며, D-EA에서는 중성의 pH를 제외한 증류수와 0.2M NaCl 용액에서, 1.0M NaCl 용액에서는 pH 4 이상에서 증가하였다. 또한 SPI는 탈아미드로 에멀전 안정성이 증류수와 NaCl 용액에서 모두 증가하였다.

EA과 SPI는 탈아미드로 lysinoalanine을 생성시키지 않았으나 D-BSA에서는 0.0339g/100g의 lysinoalanine이 검출되었다.

참 고 문 헌

Adler-Nissen, J., 1978. Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food. *Ann. Nutr. Alim*, 32. 205-216.

Alford, E. S., V. Piriyaan, C. W. Pill, C. R. Young, R. L. Richter and A. Landmann, 1984. Effect of succinylation on the proteolysis of food proteins. *J. Food Sci.*, 49(2). 614-616.

Aoki, H., O. Taneyama and M. Imani, 1980. Emulsifying properties of soy protein: Characteristics of 7S and 11S proteins. *J. Food Sci.*, 45(2). 535-538.

Arai, S., M. Yamashita, H. Kato and M. Fujimaki, 1970. Applying proteolytic enzymes on soybean. 5. A nondialyzable bitter peptide in peptic hydrolysate of soybean protein and its bitterness in reaction to chemical structure. *Agric. Biol. Chem.*, 34. 729-733.

Arntfield, S. D., E. D. Murray, M. A. H. Ismond, 1991. Role of disulfide bonds in determining the rheological and microstructural properties of heat-induced protein networks from ovalbumin and vicilin. *J. Agric. Food Chem.*, 39. 1378-1385.

Barman, B. G., J. R. Hansen and A. R. Mossey, 1977. Modification of the physical properties of soy protein isolate by acetylation. *J. Agric. Food Chem.*, 25. 638-640.

Beveridge, T., S. J. Toma and S. Nakai, 1974. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent. *J. Food Sci.*, 39(1). 49-51.

Bryant, L. A., J. Montecalvo, Jr., K. S. Morey and B. Loy, 1988. Processing, functional and nutritional properties of okra seed products. *J. Food Sci.*, 53(3). 810-816.

Bull, H. B. and K. Breese. 1968. Protein hydration. 1. Binding sites. *Arch. Biochem. Biophysics.*, 128. 488-491.

-
- Catsimpoolas, N., S. K. Funk and E. W. Meyer, 1970. Thermal aggregation of glycinin subunits. *Cereal Chem.*, 47(5). 331-337.
- Choi, Y. R., E. W. Lusas and K. C. Rhee, 1982. Effects of acylation of defatted cottonseed flour with various acid anhydrides on protein extractability and functional properties of resulting protein isolates. *J. Food Sci.*, 47(6). 1713-1719.
- Feeny, R. E. and Whitaker, J. R, 1977. Improvement through chemical and enzymatic modification. pp.312-345. In "Food Proteins". (eds. Fox, P. F. and J. J. Condon). Food Proteins Advances in Chemistry Series 160. Am. Chem. Soc., Washington DC.
- Finley, J. W. and G. O. Kohler, 1979. Processing conditions to inhibit lysinoalanine formation in alkaline treated proteins. *Cereal Chem.*, 56(3). 130-132.
- Flint, F. O. and R. F. P. Johnson, 1981. A study of film formation by soy protein isolate. *J. Food Sci.*, 46(5). 1351-1353.
- Franzen, E. L. and J. E. Kinsella, 1976a. Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *J. Agric. Food Chem.*, 24. 788-798.
- Franzen, K. L. and J. E. Kinsella, 1976b. Functional properties of succinylated and acetylated leaf protein. *J. Agric Food Chem.*, 24. 914-919.
- Fujimali, M., M. Yamashita, S. Arai and H. Kato, 1970. Enzymatic modification of protein in foodstuffs, Part. I. Enzymatic proteolysis and plastein synthesis application for preparing bland protein-like substance. *Agric. Food Chem.*, 34. 1325-1332.
- German, J. B., T. E. O'Neil and J. E. Kinsella. 1985. Film foaming and foaming behavior food proteins. *J. Agric. Food Sci.*, 62. 1358-1366.
- Gill, B. P., A. J. O'Shaughnessey, P. Henderson, and D. R. Headon, 1985. An assessment characteristics of casein and whey proteins. *Irish J. Food Sci. Technol.*, 9(1). 33-41.

- Graham, D. E. and M. C. Philips, 1980a. Proteins at liquid interface. IV. Dilatational properties. *J. Colloid Interface Sci.*, 76(2). 227-231.
- Graham, D. E. and M. C. Philips, 1980b. Proteins at liquid interface. V. Shear properties. *J. Colloid Interface Sci.*, 76(2). 240-243.
- Halling, P. J, 1981. Protein stabilized foams and emulsions. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 10. 155-159.
- Hamada, J. S. and W. E. Marshall, 1988. Enhancement of peptidoglutaminase deamidation of soy protein by heat treatment and/or proteolysis. *J. Food Sci.*, 53(5). 1132-1134.
- Hamada, J. S., F. F. Shih, A. W. Frank and W. E. Marshall, 1988. Deamidation of soy peptides and proteins by *Bicillus circulans* peptidoglutaminase. *J. Food Sci.*, 53(3) 671-672.
- Hamada, J. S. and W. E. Marshall, 1989. Preparation and functional properties of enzymatically deamidated soy protein. *J. Food Sci.*, 54(3). 598-601
- Hamada, J. S, 1991a. Peptidoglutaminase deamidation of proteins and protein hydrolysates for improved food use. *Am. Oil Chem. Soc.*, 68(7). 459-462.
- Hamada, J. S, 1991b. Ultrafiltration for recovery and reuse of peptidoglutaminase in protein deamidation *J. Food Sci.*, 56(6). 1731-1734.
- Hamada, J. S, 1992. Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using peptidoglutaminase. *J. Agric. Food Chem.*, 40. 719-723.
- Haque, Z. and M. Kito, 1984. Lipophilization of α_{s1} -casein: 3. purification and physicochemical properties of novel amphipathic fatty acyl peptides. *J. Agric. Food Chem.*, 32. 1392-1342.
- Haque, Z, and J. E. Kinsella, 1988. Emulsifying properties of food proteins: Bovine serum albumin. *J. Food Sci.*, 53(2). 416-420.
- Hashizume, K. and T. Sato, 1988. Gel-forming characteristics of milk proteins, 2. Roles of sulfhydryl groups and disulfide bonds. *J. Dairy Sci.*, 71(6).

1447-1450.

Hayakawa, S. and S. Nakai, 1985. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.*, 50(2). 486-490.

Hermansson, A. M, 1973. Determination of functional properties of protein foods. In "Proteins in Human Nutrition". Academic Press. New York.

Hermansson, A. M, 1986. Soy protein gelation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63(3). 658-661.

Hirotsuka, M., H. Taniguchi, H. Narita, and M. Koto, 1984. Functionality and digestibility of a highly phospholyated soybean protein. *Agric. Biol. Chem.*, 48(2). 93-97.

Idouraine, A., S. B. Yensen and C. W. Weber, 1991. Tepary bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compared with soy protein isolate. *J. Food Sci.*, 56(6). 1316-1318.

Itzhaki, R. F. and D. M. Gill, 1964. Micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.*, 9. 401-404.

정동효, 1987. 효소학. 선진문화사. 서울. p. 157

Kakalis L. T. and J. M. Regenstein, 1986. Effect of pH and salts on the solubility of egg white protein. *J. Food Sci.*, 51(6). 1445-1449.

Kamat, V., G. Graham and M. Davis. 1978. *Cereal Chem.*, 55. 295-230. (Kinsella, J. E., S. Damodaram and B. German, 1985. Physicochemical and functional properties of oil seed proteins with emphasis on soy protein. pp. 5-42. In "New Protein Foods" (eds. Altschul, A. M. and H. L. Wilcke) Academic Press, New York.)

Kang, Y. J, 1984. Enzymatic modification of soy proteins: effect of functional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 16(2). 211-217

Kang, Y. J., K. C. Rhee and Y. H. Park, 1988. Effect of proteolysis on functionalities of 7S and 11S soy proteins. *Kor. J. Food Tech.* 20(3) 344-349

Kato, A. and S. Nakai, 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochem. Biophys. Acta.*, 624(1). 13-20.

Kato, A., Y. Nagase, N. Matsumoto and K. Kobayashi, 1983. Determination of molecular weight of soluble ovalbumin aggregates during heat denaturation using low angle laser light scattering technique. *Agric. Biol. Chem.*, 48(6). 1829-1832.

Kato, A., K. Komatsu, K. Fujimoto and K. Kobayashi, 1985. Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility. *J. Agric. Food Chem.*, 33. 931-934.

Kato, A., A. Tanaka, N. Matsudomi and K. Kobayashi, 1987a. Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH. *J. Agric. Food Chem.*, 35. 224-227.

Kato, A., A. Tanaka, Y. Lee, N. Matsudomi and K. Kobayashi, 1987b. Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 35. 285-288.

Kato, A., Y. Lee and K. Kobayashi, 1989. Deamidation and functional properties of food proteins by the treatment with immobilized chymotrypsin at alkaline pH. *J. Food Sci.*, 54(6). 1345-1347.

Kella, N. K. D., W. B. Barbeau and J. E. Kinsella, 1986. Effect of disulfide bond cleavage on the structure and conformation of glycinin. *Int. J. Peptide Protein Res.* 27. 421-432

Kella, N. K. D., Y. J. Kang and E. Kinsella, 1988. Effect of oxidative sulfitolysis of disulfide bonds of bovine serum albumin on its structural properties: A physicochemical study. *J. Protein Chem.*, 7(5). 535-548.

Kella, N. K. D., S. T. Yang and J. E. Kinsella, 1989. Effect of disulfide bonds cleavage on structural and interfacial properties of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 37. 1203-1210.

Kikuchi, M., H. Hayashida, E. Nakano and K. Sakaguchi, 1971. Peptidoglutaminase. Enzymes for selective deamidation of γ -amide of peptide bound

glutamine. *Biochem.*, 10. 1222-1224.

Kim, S. H. and J. E. Kinsella, 1987. Surface active properties of food proteins: Effects of reduction of disulfide bonds on film properties and foam stability of glycinin. *J. Food Sci.*, 52(1). 128-131.

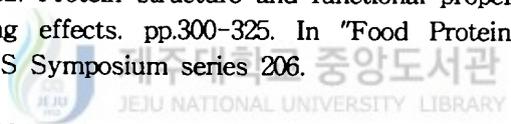
Kim, S. Y., S. W. Peter and K. C. Rhee, 1990. Functional properties of proteolytic modified soy protein. *J. Agric Food Chem.* 38. 651-656.

김충희, 김효선, 정용현, 강영주, 1992. 유채단백질의 단백효소에 의한 가수분해조건. *한국영양식량학회지*, 25(5). 513-518.

King, T., S. D. Pablo and F. M. D. Oca, 1988. Evaluation of gelation and solubility of bovin plasma protein isoates. *J. Food Sci.*, 53(5). 1381-1382.

Kinsella, J. E. 1976. Functional properties of proteins in Food: A survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7(3). 219-280.

Kinsella, J. E, 1979. Functional properties of soy proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56(3). 242-258.

Kinsella, J. E, 1982. Protein structure and functional properties: Emulsification and flavor binding effects. pp.300-325. In "Food Protein Deterioration".(ed. Cherry, J. P.). ACS Symposium series 206. 

Kinsella, J. E, 1984. Milk protein: Physicochemical and functionalities. *Crit. Rev. Food Sci. & Nutr.*, 21. 197-262.

Kinsella, J. E., S. Damodaram and B. German, 1985. Physicochemical and functional properties of oil seed proteins with emphasis on soy protein. pp. 5-42. In "New Protein Foods" (eds. Altschul, A. M. and H. L. Wilcke) Academic Press, New York.

Kramer, A. and W. H. Kwee, 1977. Functional and nutritional properties of tomato protein concentration. *J. Food Sci.*, 42(2). 207-211.

Lee, S. Y., C. V. Morr and E. Y. W. Ha, 1992. Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature

land pH. *J. Food Sci.*, 57(5). 1210-1214.

Lehrer, S. S., 1975. Perturbation of intrinsic fluorescence. pp.487-498. In "Biochemical Fluorescence: Concepts. (eds. Chen, R. F. and H. Edelhoch) Marcel Dekker. Newyork.

Leonard, W. J. and J. F. Foster, 1961. *J. Biol. Chem.*, 236. 2262-2267.
(Waniska, R. D., J. K. Shetty and J. E. Kinsella, 1981. Protein-stabilized emulsion: Effects of modification on the emulsifying activity of bovine serum albumin in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 29. 826-831.)

Ma, C. Y. and J. Holme. 1982. Effect of chemical modifications on some physicochemical properties and heat coagulation of egg albumin. *J. Food Sci.*, 47. 1454-1459.

Ma, C. Y., D. B. Oomah and J. Holme, 1986. Effect of deamidation and succinylation on some physicochemical and baking properties of gluten. *J. Food Sci.*, 51(1). 99-103.

Ma, C. Y. and G. Khanzada, 1987. Functional properties of deamidated oat protein isolates. *J. Food Sci.*, 52(6). 1583-1587.

MacRitchie, F., 1978. Proteins at interfaces. *Adv. Prot. Chem.*, 32. 283-286.

MacWatter, K. H. and M. R. Holmes, 1979. Influence of pH and salt concentration on nitrogen solubility and emulsification properties of soy flour. *J. Food Sci.*, 44(3). 770-773.

Maga, J. A, 1984. Lysinoalanine in foods. *J. Agric. Food Chem.*, 32. 964-970

Mangino, M. E, 1992. Gelation of whey protein concentrates. *Food Technol.*, 46(1). 114-117.

Mathesis, G., M. H. Penner, R. Fenney, and J. R. Whitaker, 1983. Phosphorylation of casein and lysozyme by phosphorus oxychloride. *J. Agric. Food Chem.*, 31. 379-342.

- Matsudomi, N., A. Kato and K. Kobayashi, 1982. Conformation and surface properties of deamidation gluten. *Agric. Biol. Chem.*, 46(6). 1583-1586.
- Matsudomi, N. T. Sasaki. A. Tanaka, K. Kobayashi and A. Kato. 1985. Polymerization of deamidated peptide fragments obtained with the mild acid hydrolysis of ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, 33. 738-742.
- Matudomi, N., A. Tanaka, A. Kato, and K. Kobayashi, 1986. Functional properties of deamidated gluten obtained by treating with chymotrypsin at alkali pH. *Agric. Biol. Chem.*, 50(8). 1989-1994.
- Matsudomi, N., M. Takasaki and K. Kobayashi, 1990. Heat-induced aggregation of lysozyme with pepsin-treated ovalbumin. *Agric. Biol. Chem.*, 54(9). 2451-2453.
- Matsudomi, N., T. Oshita, K. Kobayashi and J. E. Kinsella, 1993. α -lactalbumin enhances the gelation properties of bovine serum albumin. *J. Agric. Food Sci.*, 41. 1053-1057.
- Mean, G. E. and R. E. Feeney, 1971. "Chemical Modification of Proteins" (eds. Mean, G. E. and R. E. Feeney) Holden-Day, Inc. San Francisco, CA
- Meste, M. L., B. Colas, D. Simatos, B. Closs, J. L. Courthaudon and D. Lorient, 1990. Contribution of protein flexibility to the foaming properties of casein. *J. Food Sci.*, 55(6). 1445-1449.
- Mine, Y., T. Noutomi and N. Haga, 1991. Emulsifying and structural properties of ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, 39. 443-446.
- Monti, J. C. and R. Jost, 1978. Enzymatic solubilization of heat denaturated cheese whey protein. *J. Dairy Sci.*, 61(9). 1233-1237.
- Mycek, H. J. and H. Waelsch. 1960. *Biol. Chem.*, 235. 3513-3515.
- Nakai, S., H. N. Helbig, A. Kato and M. A. Tung, 1980. Relationship between hydrophobicity and emulsifying properties of some plant proteins. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 13(1). 23-27.
- Nakai, S., 1983. Structure-function relationships of food proteins with an

- emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *J. Agric. Food Chem.*, 31. 676-683.
- Nakamura, R., H. Sugiyama and Y. Sato, 1978. Factors contributing to the heat induced aggregation of ovalbumin. *Agric. Biol. Chem.*, 42(4). 819-823.
- Narayan, K. and M. S. N. Rao, 1984. Effect of acetylation and succinilation on the functional properties of winged bean flour. *J. Food Sci.*, 49(2). 547-551.
- Nir, I., Y. Feldman, and N. Garti, 1994. Surface properties and emulsification behavior of denatured soy proteins. *J. Food Sci.*, 59(3). 606-610.
- Okezie, B. O. and A. B. Bello, 1988. Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. *J. Food Sci.*, 53(2). 450-454.
- Peace, K. N. and J. E. Kinsella, 1978. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, 26. 716-723.
- Peters, T. Jr., 1985. Surum albumin. pp.161-183. In "Adverces in Protein Chemistry" Vol. 37. (eds. Anfinsen, C. B., J. T. Edsall, and F. W. Richards) Academic Press, New York.
- Phillips, L. G., Z. Haque and J. E. Kinsella, 1987. A method for the measurement of foam formation and stability. *J. Food Sci.*, 52(4). 1074-1077.
- Poole, S., S. West and J. Fry, 1987. High performance protein foaming and gelation systems. pp.257-298. In "Developments in Food Proteins - 5". (ed. Hudson, B. J. F.). Elsevier Applied Science, London and New York.
- Puski, G., 1975. Modification of functional properties of soy proteins by proteolysis enzyme treatment. *Cereal Chem.*, 52(5). 655-664.
- Rothenbuhler, E. and J. E. Kinsella, 1986. Disulfide reduction and molecular dissociation improves the proteolysis of soy glycinin by pancreatin *in vitro*. *J. Food Sci.*, 51(6). 1479-1482
- Saio, K. M. Terashima and T. Watanabe, 1975. Food use of soybean 7S and

11S protein changes in basic groups of soybean proteins by high temperature heating. *J. Food Sci.*, 40(3). 541-545

Schmidt, R. H., 1981. Gelation and coagulation. pp.131-148. In "Protein Functionality in Foods". ed. Cherry, J.). American Chemical Society, Washington, DC.

Shamasunder, B. A. and V. Prakash., 1994. Physicochemical and functional properties of proteins from prawns(*Metapenaeus dobsoni*). *J. Agric. Food Chem.*, 42. 169-174

Shen, J. L., 1981. Solubility and viscosity. pp.89-104. In "Protein Functionality in Foods". (ed. Cherry, J. P.) ACS Symposium series 147. American chemical Society, Washigton, DIC.

Shih, F. F., 1987. Deamidation of protein in a soy extract by ion exchange resin catalysis. *J. Food Sci.*, 52(6). 1529-1531.

Shih, F. F. and A. D. Kalmar, 1987. SDS-catalyzed deamidation of oilseed protiens. *J. Agric. Food Chem.*, 35. 672-675.

Shih, F. F., 1990. Deamidation during treatment of soy protein with protease. *J. Food Sci.*, 55(1). 127-130.

Shih, F. F., 1991. Effect of anions on the deamidation of soy protein. *J. Food Sci.*, 56(2). 452-455.

Shimada, K. and S. Matsushita, 1980. Thermal coagulation of egg albumin. *J. Agric. Food Chem.*, 28. 409-512.

Shimada, K. and J. C. Cheftel, 1988. Texture chatacteristics, protein solubility and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat induced gels of whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 36. 1018-1021.

Shimizu, M., M. Saitio and K. Yamauchi, 1986. Hydrophobicity and emulsifying activity of milk proteins. *Agric. Biol. Chem.*, 50(3). 791-792.

Siu, M. and L. U. Thompson, 1982. In vitro and in vivo digestibilities of succinylated cheese whey protein concentrates. *J. Agric. Food Chem.*, 30.

749-752.

Skeie, S., J. Narvhus, Y. Ardo and R. K. Abrahamsen, 1995. Influence of liposome-encapsulated neutrase and heat-treated lactobacilli on the quality of low-fat gouda-type cheese. *J. Dairy Res.*, 62. 131-139.

Sung, H. Y., H. J. Chen, T. Y. Liu and J. C. Su, 1983. Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. *J. Food Sci.*, 48(3). 716-719.

Surowka K. and M. Fik, 1992. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. *International J. Food Sci. Tech.*, 27. 9-20.

Thompson, L. U. and Y. S. Cho, 1984. Chemical composition and functional properties of acylated low phytate rapeseed protein isolate. *J. Food Sci.* 49(6). 1584-1588.

Thompson, L. U. and S. Nakai, 1984. Chemical composition and functional properties of acylated loq phytate rapeseed protein isolate. *J. Food Sci.*, 49(6). 1594-1697.

Townsend, A. and S. Nakai, 1983. Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *J. Food Sci.*, 48(2). 588-594.

Tornberg, E. and A. M. Hermansson, 1977. Functional characterization of protein stabilized emulsion: effect of processing. *J. Food Sci.*, 42(2). 468-471.

Toro-Vazquez, J. F. and J. M. Regenstein, 1988. Physicochemical parameters of protein additives and their emulsifying properties. *J. Food Sci.*, 54(5). 1177-1201.

Venktesh, A., and V. Prakash, 1993. Functional properties of the total proteins of sunflower(*Helianthus annuus L.*) seed - Effect of physical and chemical treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 41. 18-21.

Volkert, M. A. and B. P. Klein, 1979. Protein dispersibility and emulsion characteristics of four soy products. *J. Food Sci.*, 44(1). 93-96.

-
- Voutsinas, L. P., E. Cheung and S. Nakai, 1983. Relationship of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *J. Food Sci.*, 48(1). 26-30.
- Wang J. C. and J. E. Kinsella, 1976. Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf proteins. *J. Food Sci.*, 41(2). 286-292.
- Wang, C. H. and S. Damodaran, 1991. Thermal gelation of globular proteins: Influence of protein conformation on gel strength. *J. Agric. Food Chem.*, 39. 433-438.
- Waniska, R. D., J. K. Shetty and E. Kinsella, 1981. Protein-stabilized emulsion: Effects of modification on the emulsifying activity of bovin serum albumin in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 29. 826-831.
- Waniska, R. D. and J. E. Kinsella, 1984. Physicochemical properties of maltosyl and α -lucosaminyl derivatives of beta-lactoglobulin. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 23(5). 467-476.
- Wilcox, R. E, 1967. Determination of amide residue by chemical methods. *Meth Enzymol.*, 11(7). 63-65.
- Wu, C. H., S. Nakai and W. D. Powrie, 1976. Preparation and properties of acid solubilized gluten. *J. Agric. Food Chem.*, 24. 504-507.
- Yasumatsu, K., K. Sawada, S. Moritaka, M. Misaki, J. Toda, T. Wada and K. Ishii, 1972. Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agric. Biol. Chem.*, 36(3). 719-724.
- Yasuda, K., R. Nakamura and S. Hayakawa, 1986. Factors affecting heat induced gel formation of bovine serum albumin. *J. Food Sci.*, 51(5). 1289-1292
- Zhang, J., T. C. Lee and C. T. HO, 1993. Thermal deamidation of proteins in a restricted water environment. *J. Agric. Food Chem.*, 41. 1840-1844.

List of Figures

Fig. 1 Deamidation of glutaminy and asparaginy residues from protein	11
Fig. 2. Measurement of degree of deamidation.	12
Fig. 3. Effect of reaction time on deamidation and proteolysis of BSA with papain at pH 10 and 20°C	21
Fig. 4. Effect of pH on deamidation and proteolysis of BSA with papain at 20°C for 3hr	22
Fig. 5. Effect of reaction temperature on deamidation and proteolysis of BSA with papain at pH 10 for 3hr	23
Fig. 6. Deamidation and proteolysis of BSA with different proteases at pH 10 and 20°C for 3hr	25
Fig. 7. Effect of reaction time on deamidation and proteolysis of BSA with neutrase at pH 10 and 20°C	26
Fig. 8. Effect of pH on deamidation and proteolysis of BSA with neutrase at 20°C for 3hr	28
Fig. 9. Effect of reaction temperature on deamidation and proteolysis of BSA with neutrase at pH 10 for 3hr	29
Fig. 10. Deamidation and proteolysis of different substrates with neutrase at pH 10 and 20°C for 3hr	31
Fig. 11. Solubility of native BSA(N-BSA) and deamidated BSA(D-BSA) in distilled water(a) and NaCl solution(b)	33
Fig. 12. Solubility of native egg albumin(N-EA) and deamidated egg albumin(D-EA) in distilled water(a) and NaCl solution(b)	35
Fig. 13. Solubility of native soy protein isolate(N-SPI) and deamidated soy protein isolate(D-SPI) in distilled water(a) and NaCl solution(b)	37
Fig. 14 Relative fluorescence of native BSA(N-BSA) and deamidated BSA(D-BSA)	39
Fig. 15. Relative fluorescence of native egg albumin(N-EA) and deamidated egg albumin(D-EA)	40

Fig. 16	Relative fluorescence of native soy protein isolate(N-SPI) and deamidated soy protein isolate(D-SPI)	41
Fig. 17.	SDS-PAGE of native and deamidated proteins	42
Fig. 18.	Changes in heat induced aggregation of deamidated proteins	47
Fig. 19.	Heat coagulation of deamidated proteins at 100°C for 10min	49
Fig. 20.	Changes in calcium precipitation of deamidated proteins	56
Fig. 21.	Foaming capacities of native BSA(N-BSA) and deamidated BSA(D-BSA) at different pH	58
Fig. 22.	Foaming capacities of native egg albumin(N-EA) and deamidated egg albumin(D-EA) at different pH	59
Fig. 23.	Foaming capacities of native soy protein isolate(N-SPI) and deamidated soy protein isolate(D-SPI) at different pH	60
Fig. 24.	Foaming stabilities of native BSA(a) and deamidated BSA(b)	62
Fig. 25.	Foaming stabilities of native egg albumin(a) and deamidated egg albumin(b)	63
Fig. 26.	Foaming stabilities of native SPI(a) and deamidated SPI(b)	64
Fig. 27.	Emulsion activity index of BSA in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution	66
Fig. 28.	Emulsion activity index of egg albumin in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution	68
Fig. 29.	Emulsion activity index of soy protein isolate in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution	70
Fig. 30.	Emulsion stability of BSA in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution	72
Fig. 31	Emulsion stability of egg albumin in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution	73
Fig. 32.	Emulsion stability of SPI in distilled water(a), 0.2M NaCl(b) and 1.0M NaCl(c) solution	74