

계면에서의 단백질 흡착에 미치는 영향인자

송 경 빈

충남대학교 식품공학과

Factors Affecting Protein Adsorption at the Air-Water Interface

Kyung Bin Song

Department of Food and Technology, Chungnam National University

Abstract

To elucidate adsorption of proteins and examine the molecular behavior of protein molecules at interfaces, various proteins at the air-water interface were studied. The adsorption data of bovine serum albumin intermediates indicated that the conformational state of a protein played an important role in adsorption of proteins at interfaces. The adsorption behavior of succinylated beta-lactoglobulin indicated that the increase in the net negative charge of the protein significantly influenced both the kinetics and thermodynamics of adsorption. The adsorption kinetics of beta-casein showed that the salt that induced break-down of water structure decreased the rate of adsorption.

Key words: surface activity, protein conformation, chaotropic salt

서 론

계면에서의 단백질 흡착과 흡착된 상태에서의 단백질 분자들의 상호작용은 많은 생물학적 및 공업적 공정에서 중요한 역할을 한다. 막 전달계 등 생체계에서의 단백질 흡착의 근본적인 중요성은 차지하고라도 단백질은 거품이나 에멀전에서의 안정제로 쓰이는 식품공업적 측면에서 매우 중요하다 할 수 있다^{1, 2)}. 특히 거품과 에멀전을 기초로하는 유제품 같은 콜로이드 식품의 안정성은 계면활성제로 쓰이는 단백질 고유의 분자적 성질에 의하여 지배되는데 구체적으로 단백질이 얼마나 빨리 계면으로 확산하여 viscous한 film을 갖느냐가 중요하다^{3, 4)}.

계면에서의 단백질 film은 사용된 단백질의 크기, 전하, 구조, 용해도, 소수성 정도 등에 의해 좌우되며⁵⁾ 단백질을 포함한 계면의 형성 및 안정화는 계면에서의 단백질 흡착 및 dispersion, spreading에 따라 달라진다. 따라서 단백질 흡착 기작을 이해하기 위해서는 계면에서의 단백질 분자들의 분자적 성질들이 연구되어야 한다. 그러므로 본 연구의 목적은 단백질 흡착 기작을 보다 체계적으로 연구하고 또한 계면에서의 단백질 분자들의 molecular behavior를 규명하는 데 있다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 쓰인 bovine serum albumin(BSA), β -lactoglobulin, β -casein은 Sigma Chemical Co.에서 구입했다.

실험방법

BSA refolding intermediates 제조 : BSA refolding intermediates를 문헌방법^{6,7)}에 따라 만들었다. BSA를 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.6)/10 M urea/1 mM EDTA/50 mM DTT에 녹여서 실온에 6시간 방치한 후 pH를 4.0으로 조정했다. Urea 등을 제거하기 위해 미리 0.01 M HCl로 평형시킨 Sephadex G-25 컬럼을 통과시킨 후 단백질 회분을 모아 regeneration buffer에서 refold시켰다(0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)/1 mM EDTA/1 mM reduced glutathione/0.1 mM oxidized glutathione). 이때 regeneration용액에서의 BSA농도는 1 μ M로 맞추고 intermediate들은 각기 0.5, 3, 6, 24 h에서 free-SH group을 iodoacetamide로 block 함으로써 얻어진 용액을 투석한 후 동결건조시켰다.

succinylated β -lactoglobulin 제조 : Succinylation은 Franzen과 Kinsella 방법⁸⁾을 따랐다. 여러 다른 양의 succinic anhydride(0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2 g)를 천천히 75 mM phosphate buffer에 녹아 있는 1 g β -lactoglobulin에 첨가하고 pH는 7.0과 8.0사이를 NaOH를 첨가함으로써 유지했다. 반응이 끝난 후 용액을 투석한 다음

Corresponding author: Kyung Bin Song, Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

동결건조했다.

이황화물 결합 수 측정 : BSA intermediates의 이황화물 결합 수 함량 측정은 2-nitro-5-thiosulfobenzoate (NTSB)방법⁽⁹⁾에 의했다. 0.1 g 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate) (DTNB)를 38°C, pH 7.5 조건에서 10 ml의 1 M Na₂SO₃에 녹인 후 산소를 용액 전체를 통해 nitrothiobenzoate가 NTSB로 완전히 바뀔 때까지 aeration시켰다. NTSB 용액은 위 방법으로 만든 stock 용액을 0.2 M Na₂SO₃으로 100배 희석시킨 후 pH를 9.5로 낮추고 최종농도가 0.5 mM이 되게 했다. 이황화물 결합 수는 0.2 ml 단백질 용액과 0.8 ml NTSB 용액을 섞은 후 암실에 25분 동안 두었다가 412 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량했다.

Succinylation 정도 측정 : β -Lactoglobulin의 succinylation 정도는 trinitrobenzenesulfonate(TNBS) 방법⁽¹⁰⁾에 따라 측정하였다. TNBS(0.02 ml, 1.1 M) 용액을 sodium borate buffer에 있는 1 ml 단백질 용액(0.1%, W/W)에 넣고 빨리 섞은 후 실온에 5분간 방치한후 새로 만든 1.5 mM Na₂SO₃ 2.5 ml를 첨가함으로써 반응을 종결했다. % succinylation은 다음과 같이 구했다.

$$\% \text{ succinylation} = \frac{[A_{420}(\text{native}) - A_{420}(\text{succinylated})]}{A_{420}(\text{native})} \times 100$$

Circular Dichroism(CD) 측정 : 단백질의 이차구조를 측정하기 위해 spectropolarimeter (Cary model 60, OLIS Co.)를 이용했다. Cell pathlength는 1 mm, 단백질 농도는 0.01%로 하였고 모든 spectrum은 열번 scan의 평균치로 했다. 이렇게 얻어진 spectrum으로부터 Chang 등의 방법⁽¹¹⁾에 의해 2차구조 함량을 추정했다.

Hydrodynamic radius 측정 : Hydrodynamic radius는 column chromatography에 의해 측정했다. 25 mM phosphate buffer(pH 7.5)로 equilibrated된 Sephacryl S-300 column을 이용하여 여러 표준단백질로 검정한 후 분석하고자 하는 단백질의 용리부피를 측정함으로써 hydrodynamic radius를 결정했다.

Surface pressure 측정 : Surface pressure는 Wilhelmy Plate 방법⁽¹²⁻¹⁵⁾을 이용하여 측정했다. 실험방법은 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 있는 단백질 용액을 teflon coated-Langmuir trough에 쏟은 후 시간에 따라 단백질 흡착으로 인한 표면장력의 감소를 측정함으로써 이루어지며 이 결과인 surface pressure 값은 계속적으로 recorder에 기록했다.

결과 및 고찰

BSA structural intermediates

단백질 구조만의 차이가 계면에서의 단백질 흡착기작에 어떻게 영향 끼치는가를 규명하기 위하여 4개의 bovine serum albumin(BSA) intermediates를 만들었다.

Table 1. Molecular properties of BSA intermediates

Intermediates	Refolding Time(h)	% $[\theta]_{221}$	Number of S-S Bonds Regained
1	0.5	+10,496	7
2	3.0	+19,160	13
3	6.0	+20,090	14
4	24.0	+20,410	15
Native		+21,220	17

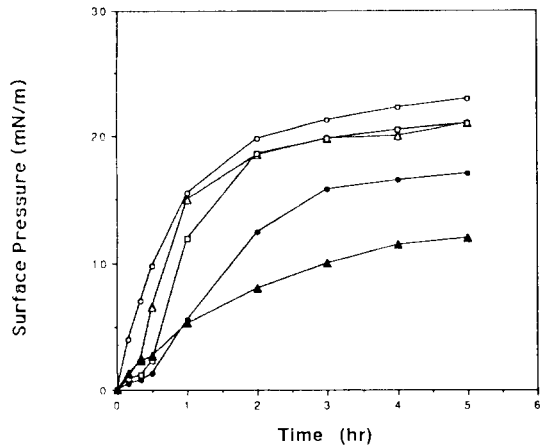


Fig. 1. Variation of surface pressure with time during adsorption of bovine serum albumin intermediates at the air-water interface. The protein concentration was $2 \times 10^{-4}\%$.

Key: ○; intermediate 1, △; intermediate 2, □; intermediate 3, ●; intermediate 4, ▲; native.

이들 intermediates들의 아미노산 배열은 바뀌지 않은 상태에서 단지 구조만이 변경되었고 이들 intermediates들의 구조적 특성은 Table 1에 잘 나타나 있다. Refolding time이 증가함에 따라 단백질의 2차구조 중 α -helix 함량을 나타내는 221 nm에서의 ellipticity($[\theta]_{221}$) 값이 점차 native BSA에 접근하는 것을 보여주고 있고 이황화물 수 또한 증가하는 것을 보여주고 있다. 이들 2차 및 3차구조가 다른 BSA intermediates들의 계면에서의 surface activity 들을 조사하기 위하여 A/W 계면에서의 BSA intermediates 용액의 surface pressure(Π) 값들을 시간에 따라 측정했다(Fig. 1). 모든 BSA intermediates들에 대하여 시간에 따라 Π 값이 증가하는 것을 보여주고 있고 5시간 후에는 steady state surface pressure(Π_{ss}) 값에 도달하는 것을 보여주고 있다. Intermediates들 중에서는 일시적으로 초기 값들을 제외하고는 refolding time이 감소함에 따라 Π 값이 보다 빠르게 증가하여 보다 unfolded된 단백질이 보다 빨리 흡착하는 것을 보여준다. 이러한 경향은 다른 bulk phase 단백질 농도에서도 관찰되었다. Intermediate 3과 4는 native

Table 2. Conformational characteristics of succinylated β -lactoglobulin

Succinylation (%)	Radius (nm)	Net Charge	aperiodic structure ^{a)} (%)
0	1.63	+8	24
29	1.71	+16	35
50	1.81	+22	45
69	3.27	+28	55
83	3.90	+32	60
99	3.90	+38	69

a) estimated values based on CD spectra

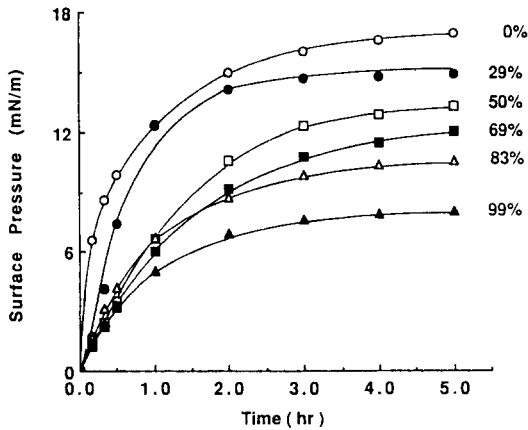


Fig. 2. Variation of surface pressure with time during adsorption of succinylated β -lactoglobulin at the air-water interface. The protein concentration was $2 \times 10^{-4}\%$.

Key: \circ ; native, \bullet ; 29% succinylated β -lactoglobulin, \square ; 50% succinylated β -lactoglobulin, \blacksquare ; 69% succinylated β -lactoglobulin, \triangle ; 83% succinylated β -lactoglobulin, \blacktriangle ; 99% succinylated β -lactoglobulin.

BSA와 거의 같은 $[\theta]_{221}$ 값을 갖지만 이들 intermediates에 대한 Π_{ss} 값은 큰 차이를 보이는데 이는 단백질의 2차구조 보다도 3차구조의 차이가 결국 흡착속도, peptide segments의 orientation, equilibrium spreading, 계면에서의 단백질 분자들이 차지하는 면적에 커다란 영향을 끼치는 것을 시사한다. 즉, 단백질의 surface activity는 얼마나 빨리 흡착하는가, 그리고 계면에서 unfold되어 얼마나 큰 면적을 차지하는가가 중요하다⁽¹⁶⁾. 이러한 성질들은 용액 상태에서의 단백질 구조와 밀접한 관련이 있는데 이와 같은 2차, 3차구조의 차이가 BSA intermediates의 surface property에 영향을 준 것으로 사료된다.

β -Lactoglobulin

Surface active property에 정전기적 상호작용이 어떻게 그리고 얼마나 영향을 미치는가를 살펴보기 위하여 여러 succinic anhydride/ β -lactoglobulin비에 따라 succi-

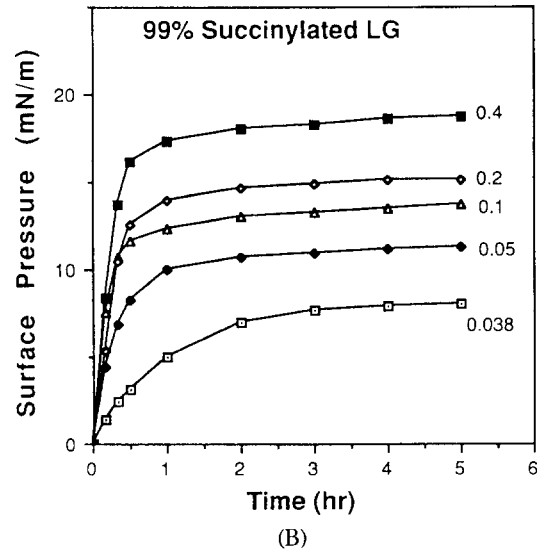
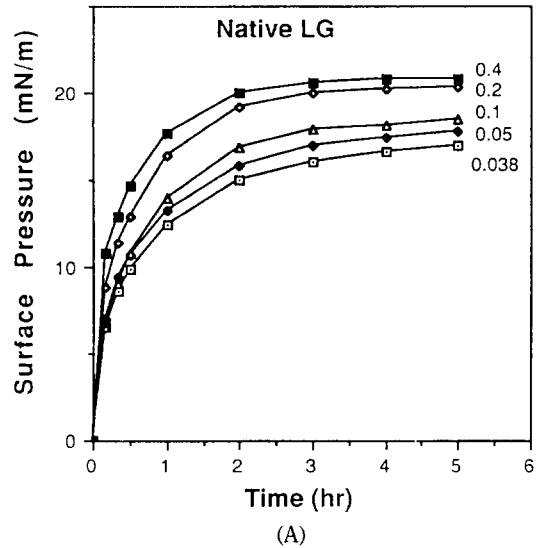


Fig. 3. Effect of ionic strength on the variation of surface pressure with time during adsorption of native and 99% succinylated β -lactoglobulin at the air-water interface. The protein concentration was $2 \times 10^{-4}\%$.

A) native β -lactoglobulin B) 99% succinylated β -lactoglobulin.

nylated β -lactoglobulin이 만들어졌고 그들의 A/W 계면에서의 surface pressure 값들이 시간에 따라 측정되었다. Succinylation 정도가 증가함에 따라 Lysyl residue의 ϵ -amino group의 +전하가 carboxyl group의 -전하로 바뀜에 따라, 이것은 보다 많은 정전기적 반발을 야기시켜 hydrodynamic radius와 aperiodic structure 함량이 증가하는 것을 나타냈다(Table 2). Succinylated β -lactoglobulin 용액의 Π 값들의 시간에 따른 변화가 Fig. 2에서

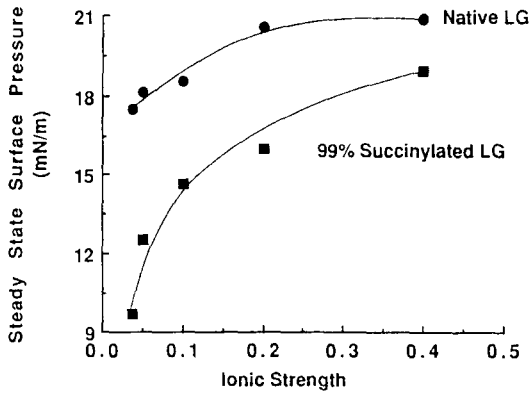


Fig. 4. Effect of ionic strength on the steady state surface pressure of native β -lactoglobulin and 99% succinylated β -lactoglobulin.

보여주고 있다. Succinylation은 흡착속도를 낮추었고 또한 succinylation 정도가 커짐에 따라 Π_{ss} 값들이 현저히 떨어지는 것을 나타내고 있다. 예를들면 99% succinylated β -lactoglobulin의 Π_{ss} 는 8 mN/m인 native β -lactoglobulin은 17 mN/m이었다. 이러한 커다란 차이는 succinylation에 의해 야기된, 계면에 접근하는 단백질 분자들 사이의 증가된 정전기적 반발현상에 기인한다. 또한 succinylated β -lactoglobulin의 증가된 친수성 정도가 흡착에 있어서 driving force를 감소한다고 볼 수도 있다. Succinylated β -lactoglobulin의 흡착 속도의 감소가 정전기적 energy barrier의 증가에 의한 것인지를 확인하기 위하여 ionic strength 효과를 조사했다. Fig. 3과 4는 native β -lactoglobulin과 99% succinylated β -lactoglobulin의 Π 및 Π_{ss} 와 ionic strength과의 관계를 나타낸 것으로 ionic strength가 증가함에 따라 counter ion의 screening 효과에 의해 Π 및 Π_{ss} 값들이 증가하는 것을 보여준다. 또한 99% succinylated β -lactoglobulin의 0.4 ionic strength에서의 Π_{ss} 값이 native β -lactoglobulin의 Π_{ss} 값에 접근하는 것은 계면에서의 succinylated β -lactoglobulin의 흡착에 정전기적 작용이 중요한 역할을 하는 것을 강하게 시사한다.

β -Casein

분자 level에서의 물 구조상태가 계면에서의 단백질 용액의 흡착기작에 어떻게 영향끼치는가를 살펴보기 위하여 chaotropic 염 존재하 β -casein의 흡착 상태를 조사했다. 물 구조 변형을 위해 chaotropic 염으로 SCN 이 사용되었다. Chaotropic 염이 물 구조를 변경하여 소수성 상호작용을 약화시킨다는 문헌보고는 많다^(17,18). 그러나 chaotropic 염의 첨가는 물 구조 변경 뿐만 아니라 단백질 구조의 불안정화에도 영향끼치기에 가장 flexible하고 random coil 구조를 갖는 단백질 중의 하나인 β -casein을 연구 대상 단백질로 선정하였다. 1 M NaCl와 NaSCN

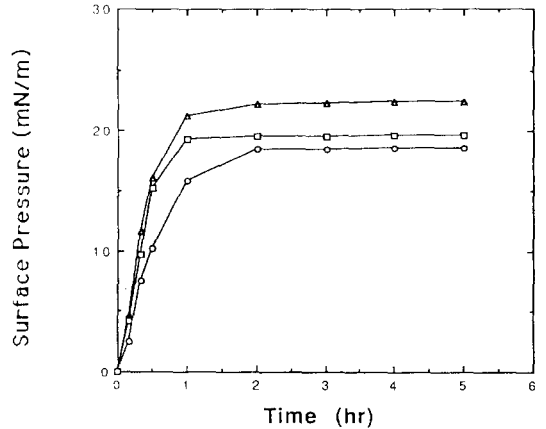


Fig. 5. Variation of surface pressure with time during adsorption of β -casein at the air-water interface. The protein concentration was $2 \times 10^{-4}\%$.

Key: \circ ; 20 mM phosphate, \triangle ; 1 M NaCl, \square ; 1 M NaSCN.

존재하에서의 β -casein의 surface pressure 변화속도가 Fig. 5에서 보여준다. 20 mM buffer에서 보다 ionic strength가 훨씬 큰 1 M NaCl 및 NaSCN 존재하 β -casein의 흡착속도가 빠른 것을 보여주며 β -casein의 흡착속도가 1 M NaSCN 보다 1 M NaCl 일때 빠른것을 보여준다. 계면에서 amphiphiles의 흡착이 주로 소수성 상호작용 효과에 많이 영향받으므로 chaotropic 염에 의한 물구조의 파괴는 A/W 계면에서의 단백질 흡착에 있어 driving force를 약화시킴으로써 결과적으로 NaSCN 존재하 β -casein의 흡착속도가 낮은 것으로 사료된다. 이것은 NaCl 같은 structure enhancing 염에 비해 NaSCN이 liquid water의 수소결합 구조를 파괴하는 차이에서 비롯된다. Joos와 Serrien은 fructose (structure maker)와 urea (structure breaker)가 A/W 계면에서의 alcohol의 흡착기작에 어떻게 영향끼치는가를 조사했는데 urea 존재하에서 흡착속도가 낮아진다고 보고했다⁽¹⁹⁾. 이것은 물구조 파괴와 그 결과인 hydrophobic driving force의 감소에 기인한 탓이다.

결론적으로 BSA intermediates, succinylated β -lactoglobulin, chaotropic 염 존재하 β -casein의 A/W 계에서의 흡착 연구 결과로서, 단백질 흡착기작에 끼치는 영향 인자로서는 수용액 상태에서의 단백질 구조, 단백질 분자들 사이의 정전기적 상호작용, 물구조 상태와 관련된 있는 소수성 상호작용 등으로 볼 수 있다.

요 약

계면에서의 단백질 흡착 기작을 연구하기 위하여 여러 단백질의 A/W 계면에서의 흡착이 조사되었다. BSA intermediates들의 흡착결과는 단백질 2차, 3차 구조가

계면에서의 흡착기작에 영향끼친 것을 나타냈으며, succinylated β -lactoglobulin의 흡착에서는 순 음전하의 증가가 정전기적 상호작용에 영향끼침을 보여 주었다. 또한 β -casein의 흡착은 물 구조를 파괴하는 chaotropic 염 존재하에서 흡착속도가 떨어지는 것을 시사했다.

감사의 글

본 연구의 일부는 1992년 한국과학재단 연구비 지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

문헌

1. Cante, C.J., Franzem, R.W. and Saleev, F.Z.: Proteins as emulsifiers. *J. AOCS.*, **56**, 71(1979)
2. Kinsella, J.E.: Functional properties of proteins. *Food Chem.*, **7**, 273(1981)
3. Kato, A. and Nakai, S.: Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **624**, 13(1980)
4. Barbeau, W.E. and Kinsella, J.E.: Physical behavior and functional property. *Colloids and Surfaces*, **17**, 167 (1986)
5. Horbett, T.A. and Brash, J.L.: Proteins at interfaces. In *Proteins at Interfaces*, Dickinson, E. (ed), The Royal Society of Chemistry, England, p.188(1987)
6. Johanson, K.O., Wetlaufer, D.B., Reed, R.G. and Peters, T.: Refolding of BSA and its proteolytic fragments. *J. Biol. Chem.*, **256**, 445(1981)
7. Creighton, T.E.: Kinetics of refolding of reduced ribonuclease. *J. Mol. Biol.*, **113**, 329(1977)
8. Franzen, K.L., Kinsella, J.E.: Functional properties of succinylated and acetylated soy proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 788(1979)
9. Thannhauser, T.W., Konishi, Y. and Scheraga, H.A.: Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Anal. Biochem.*, **138**, 181 (1978)
10. Fields, R.: Rapid determination of amino groups with TNBS. In *Methods in Enzymology*, Hirs, C.H.W. and Timascheff, W. (ed), Academic Press, New York, p.464 (1972)
11. Chang, C.T., Wu, C.C. and Yang, J.T.: Circular dichroic analysis of protein conformation. *Anal. Biochem.*, **91**, 13(1978)
12. Benjamins, J., de Feijter, J.A., Evans, M.T.A., Graham, D.E. and Phillips, M.C.: Dynamic and static properties of proteins adsorbed at the air-water interface. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **59**, 218(1975)
13. de Feijter, J.A. and Benjamins, J.: Adsorption kinetics of proteins at the air-water interface. In *Food Emulsions and Foams*, Dickinson, E. (es), The Royal Society of Chemistry, England, p.72(1987)
14. Gaines, G.L.: *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. Wiley, New York, p.45(1966)
15. Evans, M.T.A., Mitchell, J., Mussellwhite, P.R. and Irons, L.: The effect of the modification of protein structure on the properties of proteins spread and adsorbed at the air-water interface. In *Surface Chemistry of Biological Systems*, Blank, M. (ed), Plenum Press, New York, p.1(1970)
16. Graham, D.E. and Phillips, M.C.: Proteins at liquid interfaces. *J. Colloid Interface Sci.*, **70**, 403(1979)
17. von Hippel, P.H.: Ion effects on the solution structure of biological macromolecules. *Accts. Chem. Research.*, **2**, 257(1969)
18. Dandliker, W.B. and de Sasure, V.A.: Stabilization of macromolecules by hydrophobic bonding. In *The chemistry of biosurfaces*, Hair, M.L. (ed), Marcel Dekker Inc., New York, p.1(1971)
19. Joos, P. and Serrien, G.: Adsorption kinetics of lower alkanols at the airwater interface. *J. Colloid Interface Sci.*, **127**, 97(1989)

(1993년 8월 3일 접수)