

## 초음파에 의한 단백질 Gel화의 연구

배 종 립

대구대학교 자연과학대학 물리학과  
(1993년 11월 2일 접수)

## Ultrasonic Velocity and Absorption Measurements in Gel of Proteins

Jong-Rim Bae

Department of Physics, Taegu University, Kyungpook 713-714, Korea

(Received November 2, 1993)

**요 약 :** Egg white의 gel화에 따른 음속과 흡수의 변화가 60°와 75°C에서 크게 나타난 것이 egg white의 어느 단백질성분에 의한 것인가를 조사하기 위해 egg white의 주요한 단백질 성분인 ovalbumin, conalbumin, ovomucoid protein에 대해 gel화에 따른 음속 및 흡수의 변화를 온도 10~95°C의 범위에서 초음파 pulse법을 사용하여 측정하였다. Ovalbumin은 70°C, conalbumin은 50°C에서 gel화가 시작되었고 ovomucoid는 측정온도범위에서는 gel화가 진행되지 않았다. Gel화하는 이상의 온도에서 음속과 흡수에 대하여 aging측정을 행하여 gel화에 의한 음속과 흡수의 변화를 관측하였다. 그 결과 conalbumin은 50°C, ovalbumin은 75°C에서 음속과 흡수의 변화가 많이 일어났다. Egg white의 60와 75°C의 gel화에 의한 음속과 흡수의 큰 변화는 각각 conalbumin과 ovalbumin에 의한 것임을 알았고 Conalbumin과 ovalbumin는 aging 온도를 parameter로 하여 이력현상이 관측되었다.

**Abstract :** Ultrasonic velocity and absorption measurement were made at 3 MHz in ovalbumin, conalbumin and ovomucoid which were protein constituent of egg white, over temperature range 10~95°C using pulse echo overlap method. The gelation process caused by heat was studied by the change in the velocity and absorption. The gelation temperatures of the ovalbumin and conalbumin proteins were 70°C and 50°C, respectively. However the gelation of the ovomucoid protein did not occur in gelation under experimental temperature condition. The change in the absorption and velocity due to gelation was observed as a function of time at aging temperatures ranging from 50~95°C for conalbumin, 70~95°C for ovalbumin. The experimental results showed that the change were prominent at 55°C in conalbumin, 75°C in ovalbumin. Hysteresis phenomenon was also observed by varying the aging temperatures as a parameter. This phenomenon is associated with the memorizing effect of the network structure of protein in gel. It was demonstrated that the ultrasonic technique was useful for monitoring the gelation process.

## 서 론

초음파는 최근 의학용의 진단 및 치료장치에 많이 응용되고 있어 단백질용액의 초음파흡수 mechanism의 해명이 대단히 중요한 문제로 되고 있다. 단백질은 가열하면 변성이 되면서 gel화로 진행되는 데 단백질의 gel화 과정에 따른 초음파특성연구도 초음파 흡수 mechanism의 해명에 기초적인 자료로 대단히 중요하다.

단백질의 gel화에 대한 연구는 점성의 측정, 압축 시험, 전기유동, 광산란, 그외 화학적인 분석 등이 있다. 그러나 이 방법들은 다소의 제한이 있다. gel화의 과정을 관측하기 위해 주어진 실험조건마다 시료를 교체하여야 하기 때문에 gel의 전과정을 관측하는데 다량의 시료가 필요하다. 또한 광을 사용한 방법은 시료가 불투명하게 되는 gel영역에서는 관측이 불가능하게 된다. 그러나 초음파를 사용하면 각 실험조건마다 시료를 교체하는 것 없이 같은 시료로 sol상태에서 gel상태까지의 전과정을 관측할 수 있어 초음파는 gel과정을 조사하는데 유효한 수단이다.

우리는 초음파 pulse법을 사용하여 온도 10~75°C의 범위에서 여러가지의 단백질 성분을 갖는 천연 단백질인 계란 흰자(egg white)의 gel화에 대한 음속과 흡수(흡수계수) 변화를 측정하여 egg white가 60°C에서 gel화가 시작되고 gel화가 진행됨에 따라 음속은 감소, 흡수는 증가하고 egg white의 gel화에 따른 음속 및 흡수의 변화는 60과 75°C에서 다른 온도에서 보다 많아 이들 온도에서 gel화가 많이 진행됨을 보고 하였다.<sup>1</sup>

본 연구는 60과 75°C에서 egg white의 gel화에 따른 음속과 흡수의 많은 변화를 egg white의 어느 단백질 성분이 gel화에 영향을 미치는 것인가를 조사하기 위해 egg white의 주요한 단백질 성분인 ovalbumin, conalbumin, ovomucoid의 gel화의 진행에 따른 음속과 흡수의 변화를 각각 측정하였다.

## 실 험

실험에 사용한 ovalbumin(Sigma A2512), conalbumin(Sigma C0755), ovomucoid(Sigma T2011)의 단백질은 결정화되고 동결건조한 순도 99% 이상의 것이다. 측정한 단백질 수용액의 농도는 100 mg/ml로 시료는 실험하기 1일전에 만들어 5°C의 냉장고에 보존했다. 초음파측정은 본래 음속측정법인 pulse echo overlap법을 우리실험실에서 부분적으로 수정하여 흡수 및 음속측정용의 pulse-echo overlap법으로 확립시켰다.<sup>2</sup> Fig. 1은 본 연구에서 사용된 장치의 block diagram이다. 두개의 진동자는 기본주파수가 3 MHz인 X-cut의 수정진동자이다. 이 진동자들은 똑 같은 크기를 가지고 있고 길이 62 mm의 초음파 cell의 양측면에 고정시켰다. cell의 양측면은 1/100 mm이하의 평행도를 갖도록 제작하였다. 액체층을 전파한 pulse와 echo pulse들은 주파측의 수정진동자에 의해 수신되고 감쇠기와 증폭기를 통하여 oscilloscope 화면상에서 관측된다. 제1 pulse와 제2 pulse만을 oscilloscope상에서 관측되도록 pulse를 가한다. 시간측 trig의 주파수를 CW oscillator로 조절해서 제1 pulse와 제2 pulse의 carrier파형이 중복되어 보이도록 하면 trig의 주기는 초음파 pulse가 일회왕복하는 시간과 같다. 이 주기는 counter에 의해 정밀히 측정되어지므로 정확도 높은 음속 측정이 가능하다. 흡수는 제1 pulse와 제2 pulse의 pulse진폭의 비로부터 얻어진다. 두 진폭의 비는 0.1 dB까

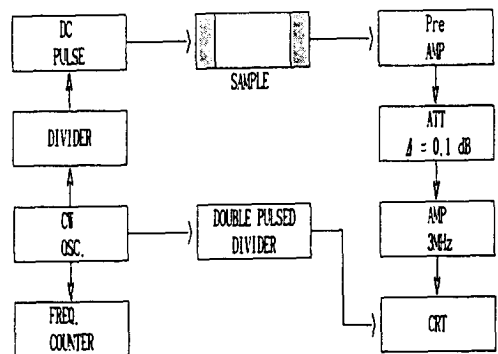


Fig. 1. Block diagram of the apparatus.

지 정확히 조정할 수 있는 가변 step attenuator에서 결정된다. Echo의 파형은 수정진동자에서 반사할 때 변형이 일어나고 이 변형은 결보기의 손실을 초래한다. 이 효과는 기준시료로 상대측정에 의해 엄격히 교정되어진다. 회절에 의한 손실계산은 음원의 반경 (5 mm)과 주파수 3 MHz를 schoch식에 대입하여 수치적으로 행하였다.<sup>2</sup> 이 측정법은 흡수의 상대정확도는 1%, 음속은 0.001%이었다. 이 장치는 아주 간단하며 음속과 흡수를 동시에 측정할 수 있어 매우 편리하고 여러 온도에서 음속 및 흡수측정을 동시에 행하는 본 실험에 적합하다. Gel화는 일반적으로 시간변화를 나타내기 때문에 일정온도에서 5분마다 음속, 흡수를 측정해서 gel화에 의한 음속, 흡수변화를 측정했다. 초음파 cell은 1/50℃이내로 온도제어되어 있는 수조에 넣어 온도를 monitor했다. 초음파 cell은 온도제어를 하나의 수조에서 행하면 측정하고자 하는 온도까지 상승하는 과정에서 cell내의 단백질이 gel화하기 때문에 2개의 수조를 사용하여 수조의 온도상승시의 gel화되는 과정을 방지하였다.

## 결과 및 고찰

Egg white는 88%의 물과 10%의 단백질로 구성되어 있고 주요한 단백질 성분은 ovalbumin, conalbumin, ovomucoid이다. Fig. 2는 ovalbumin의 sol과 gel상태에 대한 초음파흡수치의 온도변화를 나타낸 것으로 ●표시는 sol, 그외 표시는 gel상태에서의 흡수치를 나타낸다. 그림에서  $\alpha$ 는 흡수계수,  $f$ 는 주파수를 나타낸다. 실험은 우선 sol상태의 10℃에서 온도를 상승시키면서 음속, 흡수를 측정하면 70℃에서 gel화가 시작된다. 기호로 표시하면 Fig. 2에서  $a \rightarrow b^*$ 가 된다. \*표시는 시간변화의 측정(aging)을 나타낸다. 70℃에 온도를 고정해서 음속, 흡수의 시간변화를 거의 변화가 없을 때까지 측정하면  $b$ 의 ▲ 표시까지 상승한다.  $b^*$ 는 흡수와 음속 모두 거의 시간적으로 포화치에 달할때까지 3~4시간 측정한 값이다. 시간변화의 측정은 75℃에서도 똑같이 측정한다. 기호로 표시하면  $b \rightarrow c^*$ 가 된다. 2일째 식혀진

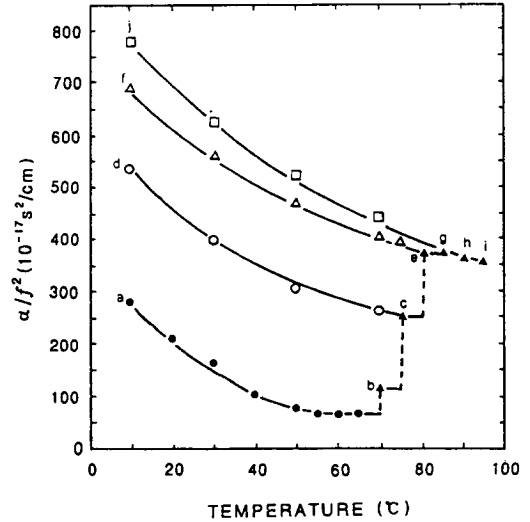


Fig. 2. Hysteresis of ultrasonic absorption in ovalbumin. The closed circles indicate the experiment values in the sol state. The closed triangles denote the final values in the aging experiment. The symbols ○, △ and □ represent the values obtained after aging at 75, 80, and 95℃, respectively.

gel상의 단백질을 10℃에서 온도를 올리면서 75℃까지 측정을 하면 75℃에서는 전일에 측정한 흡수치와 일치한다. 즉  $d \leftrightarrow c$ 에서 가역적으로 변화한다. 계속해서 80℃에서 aging측정하면  $c \rightarrow e^*$ 가 되고  $e$ 에서 온도를 내려 다시 올리면  $f \leftrightarrow e$ 와 같이 이전과 다른 별도의 경로를 따라 흡수치가 변화한다. 이와같이 흡수는 gel의 aging온도 이상을 올리지 않는 한 예를 들면  $d \leftrightarrow c$ 곡선을 따라 온도와 함께 가역적으로 변화하고 최고온도를 어디까지 올리는가에 의해 흡수치가 다른 Fig. 2와 같은 이력(hysteresis)현상이 관측된다. 일단 gel화 상태로 된 단백질은 식혀도 원래의 단백질상태로 돌아오지 않는다. 즉 열적으로 비가역적이다. 이것은 제리 등과 크게 다른 점이다. 식혀진 단백질은 과거의 자신의 이력을 구조중에 기억하고 있다. 이것은 Fig. 2와 같은 실험결과에서 알 수 있다. Fig. 2에서 ovalbumin는 75℃에서 gel화에 의한 흡수의 큰 변화가 일어남을 알 수 있다. 음속의 경우는 gel화에 의해 음속이 감소되지만 똑같은 이력현상이 Fig. 3과 같이 일어났고 gel화에 의한 음속의

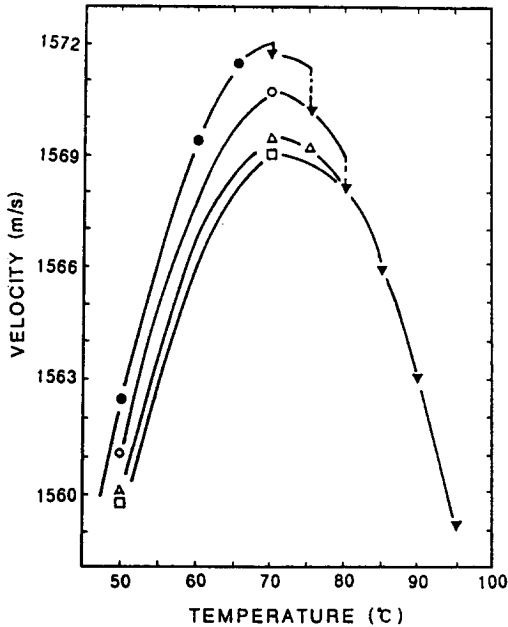


Fig. 3. Hysteresis of ultrasonic velocity in ovalbumin. All symbols have the same meaning as those in Fig. 2.

변화도 75°C에서 크다는 것을 알 수 있다.

Fig. 4와 Fig. 5는 conalbumin의 초음파 흡수와 음속의 온도변화를 나타내는 것으로 ●표시는 sol, 그 외의 표시는 gel상태의 흡수치를 나타낸다. conalbumin은 50°C에서 gel화가 시작되고 ovalbumin과 같이 이력현상이 관측된다. Fig. 4, 5에서 conalbumin의 gel화에 의한 음속과 흡수의 큰 변화는 55°C 임을 알 수 있다. Fig. 5에서 gel화는 50°C에서 시작되지만 음속의 peak는 70°C이다. 즉 음속의 극대는 물의 성질을 반영하고 gel화와는 관계없다. 이력현상은 gel상태에서 분자의 집합체로서 설명할 수 있다. gel화의 온도이상에서 단백질의 분자는 열변성된 분자간에 network가 형성되고 집합체가 만들어진다.<sup>3</sup> 이 network의 형성때문에 음속과 흡수의 변화가 일어난다. 단백질의 gel화가 어떤 온도  $T_m$ 에서 일어나면 network의 형성은  $T_m$ 에서 평형상태로 되기까지 계속된다. 이 과정은 Fig. 2~5에서 나타난 바와 같이 초음파를 이용해서 검출할 수 있다. Network의 구조가 일단 만들어지면  $T_m$ 이하로 온도를

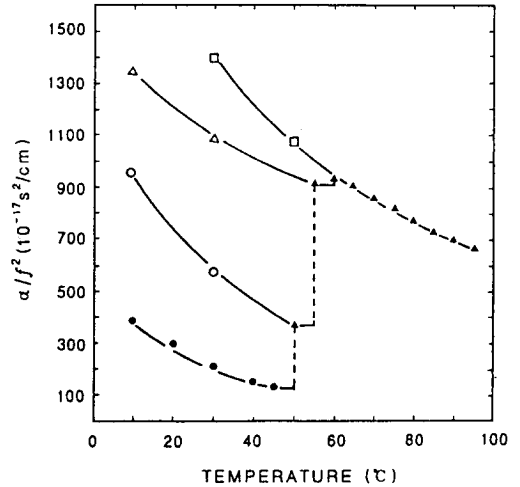


Fig. 4. Hysteresis of ultrasonic absorption in conalbumin. The closed circles indicate the experiment values in the sol state. The closed triangles denote the final values in the aging experiment. The symbols ○, △ and □ represent the values obtained after aging at 50, 55, and 95°C, respectively.

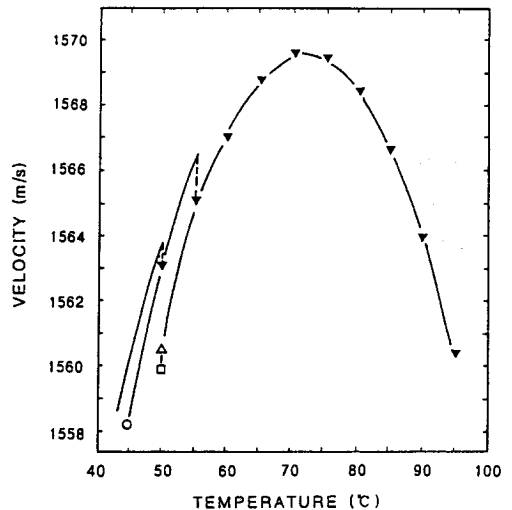


Fig. 5. Hysteresis of ultrasonic velocity in conalbumin. All symbols have the same meaning as those in Fig. 4.

내려도 집합체의 구조는 기억되고 음속과 흡수는 가역적으로 변화한다. 다시  $T_m$ 을 증가시키면 집합체는 촉진되고 network는 더욱 조밀하게 형성되어 그 수가 증가한다. 그것에 따라 gel의 음향특성도 변한다.

이와같이  $T_m$ 을 parameter로 해서 음속과 흡수의 이력현상이 관측된다.

Fig. 6은 ovalbumin, conalbumin, ovomucoid의 흡수치의 온도의존성을 나타낸 것으로 그림에서 검게 표시된 것은 gel상태의 흡수치를 나타낸다. 그림에서 conalbumin은 50°C에서, ovalbumin은 70°C에서 각각 gel화가 시작되고 ovomucoid는 측정된 온도의 범위(10~95°C)에서는 gel화가 진행되지 않았다. conalbumin은 55°C, ovalbumin은 75°C에서 gel화에 의한 흡수의 큰 변화가 나타났다. Gel화에 의한 흡수치의 증가는 분자량(conalbumin : 76,000, ovalbumin : 45,000)이 클수록 컸다. 특징적인 것은 ovalbumin은 85°C, conalbumin은 60°C까지 gel화가 진행되고 그 온도이상에서는 더 이상의 gel화의 진행은 일어나지 않고 용액의 온도의존성을 반영해서 sol상태에서와 같이 흡수치는 감소함을 알 수 있다. Fig. 7은 3종류의 단백질, egg white와 증류수와 음속이 온도의존성을 나타낸 것으로 본 연구에서 측정된 3종류의 단백질의 음속은 붉은 실선으로 나타낸 바와 같이 거의 일치하고 증류수보다 전체온도에 대

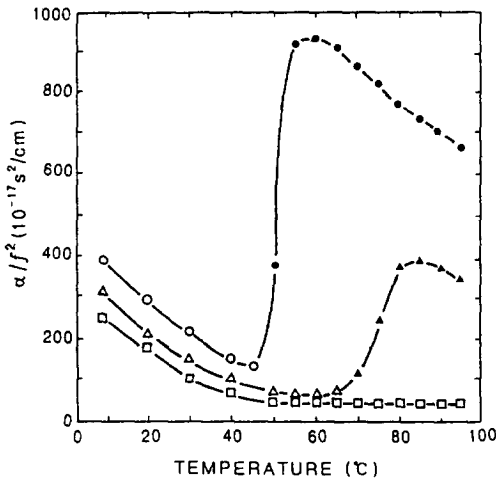


Fig. 6. The ultrasonic absorption of conalbumin, ovalbumin, and ovomucoid. The open symbols indicate the experiment values in the sol state. The closed symbols denote the final values in the aging experiment in the gel state. The symbols ○, △ and □ represent conalbumin, ovalbumin, and ovomucoid, respectively.

하여 각 온도에서 20 m/s정도 빠름을 알 수 있다. 음속의 피크는 70°C부근으로 egg white의 66°C보다 고온도, 증류수의 75°C보다 저온도로 벗어나 있지만 증류수의 온도의존성을 전체적으로 반영하고 있다.

Fig. 8은 75°C에서 ovalbumin의 음속과 흡수의 시간적인 변화를 나타낸 것으로 5분마다 측정을 행하여 음속과 흡수의 변화가 거의 없을 때까지(3~4시간) 측정하였다. 온도는 75°C로 온도제어되어 있는 수조

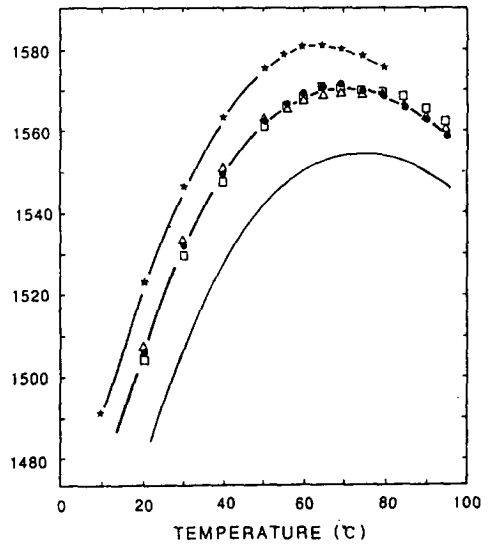


Fig. 7. The velocity in ovalbumin(□), conalbumin(△), ovalbumin(●), egg white(★), and water(—) as a function of temperatures.

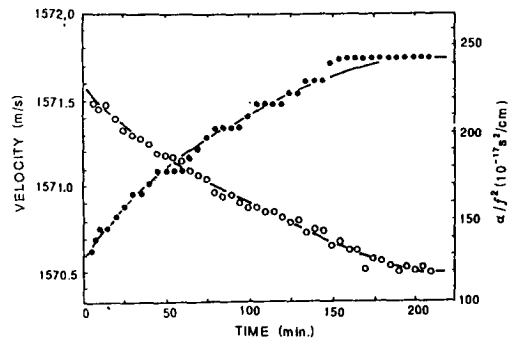


Fig. 8. Ultrasonic absorption(●) and velocity(○) in ovalbumin gel observed in the aging experiment at 75 °C. The lines represent the exponential curves fitted to the experimental values.

에 70°C의 초음파 cell를 순간적으로 넣었을 때이고 초음파 cell내의 온도와 수조의 온도는 4분 이내에 같아진다. 시간의 경과와 더불어 gel화가 진행됨에 따라 흡수는 천천히 증가하는 것에 비하여 음속은 같은 시간에서 조금만 감소하고 있다. 흡수의 변화량은 47%이지만 음속은 0.1%이다. Fig. 8의 실선은 음속과 흡수치의 시간변화를 지수함수적으로 근사한 것이다. 이 fitting에서 gel화에 의한 음속과 흡수치의 변화량과 완화시간(time constant)이 구하여진다. 측정된 75°C의 ovalbumin의 음속과 흡수의 network가 형성되는 완화시간은 100분이고 이 실험에서 행한 단백질의 각 aging온도의 완화시간은 거의  $100 \pm 10$  분으로 일치하였다.

Fig. 9는 Fig. 8과 같이 aging측정에서 구한 ovalbumin의 gel화에 의한 음속과 흡수치의 변화량을 적분한 것으로 90°C부터 gel화는 진행되지 않음을 알 수 있다. ○와 ●표시를 따라 그른 실선은 각 온도에 있어서의 gel화의 정도를 나타내고 있다. 그림에서 ovalbumin의 gel화하기 쉬운 온도는 75°C임을 알 수 있다. Kato et al.<sup>4</sup>은 0.1%의 ovalbumin 수용액의 광산란실험에서 열변성이 일어나기 쉬운 76°C 부근에서 급속히 분자집합체가 일어나는 것을 보고하고 있

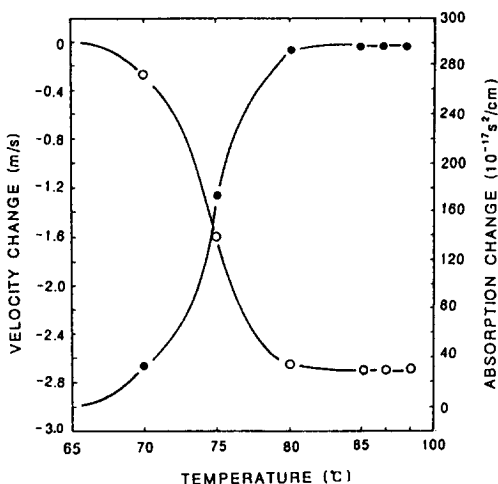


Fig. 9. Accumulated values of the total increase in absorption(●) and decrease in velocity(○) in aging experiment, which give the degree of gelation of ovalbumin.

다. 이것은 우리들이 75°C에서 gel화하기 쉬운 결과와 잘 일치하고 있다. Conalbumin은 Fig. 11에서 보인 바와 같이 gel화에 의한 음속과 흡수변화량을 적분하면 gel화 하기 쉬운 온도는 55°C이다. 이것들에서 egg white의 60과 75°C에서의 gel화에 의한 음속 및 흡수의 큰 변화는 각각 conalbumin과 ovalbumin의 열변성에 의한 것임을 알 수 있다. Ovomucoid는 본 실험의 범위에서는 gel화가 진행되지 않았다. Ovomucoid는 통상의 가열의 조건하에서는 변성되지 않는다고 보고되고 있어 본 실험과 잘 일치하고 있다.<sup>3</sup> 단백질이 열변성하면 열변성된 분자는 서로 집합체로 되면서 network가 형성되는데 gel화에 의한 초음파흡수의 증가는 gel화가 진행하면 network의 수는 증가하고 그것과 동시에 물과 network와의 상호작용이 많아지기 때문에 증가한다.<sup>5</sup> Gel화에 의한 음속의 감소는 gel의 탄성율의 변화로 설명할 수 있다. 음속은  $C = (M/\rho)^{1/2}$ 와 같이 쓸 수 있다. 여기서 M은 종파탄성율,  $\rho$ 는 밀도이다. Network상에서  $\rho$ 는 gel화의 진행에 따라 변화가 거의 없다고 생각되지만 M은 변화한다고 예상된다.  $M = M_0 + 4/3G$ 와 같이 표시되어 진다. 여기서 K, G는 각각 체적탄성율, 강성율을 나타낸다. Gel의 network형성은 G를 증가시키지만 gel구조의 전체의 단단함은 오

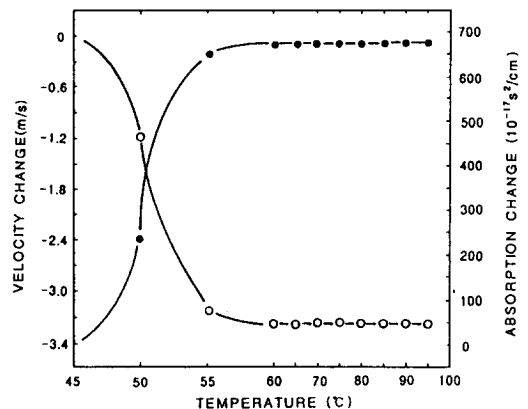


Fig. 10. Accumulated values of the total increase in absorption(●) and decrease in velocity(○) in aging experiment, which give the degree of gelation of conalbumin.

히려 부드러워진다. 즉 gel화가 진행되는 것에 의해 G는 증가하지만 K는 G의 증가보다 더 감소한다. 그 때문에 전체의 M은 작아지게 되고 음속은 감소한다.

## 결 론

단백질의 gel화를 연구하는 데는 광산란, 점탄성 등의 방법이 있지만 초음파를 이용하면 단일의 시료로 전과정을 관측할 수 있는 이점이 있다.

Egg white의 주요한 단백질 성분인 ovalbumin, conalbumin, ovomucoid의 gel화에 의한 음속과 흡수의 변화를 조사한 결과는 다음과 같다.

1. Conalbumin은 50°C, ovalbumin은 70°C에서 gel화가 시작되고 ovomucoid는 측정 한 온도의 범위(10~95°C)에서는 gel화가 진행되지 않았다.

2. 3종류의 단백질의 음속은 거의 같고 70°C부근에 peak가 나타나 증류수의 75°C보다 저온도, egg white의 66°C보다는 고온도로 벗어나 있으나 전체적으로 증류수의 온도의존성을 반영하고 있다.

3. Conalbumin은 55°C, ovalbumin은 75°C에서

gel화에 의한 음속과 흡수의 큰 변화가 일어났다.

4. 위의 결과에서 egg white의 60°C, 75°C의 gel화에 의한 음속과 흡수의 큰 변화는 각각 conalbumin과 ovalbumin에 의한 것임을 알았다.

감사의 글 : 본 연구는 1992년도 교육부지원 한국 학술진흥재단의 자유공모(지방대육성)과제 학술연구조성비에 의하여 이루어진 것입니다. 연구비를 지원하여 주신 교육부 학술진흥재단에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. P. K. Choi, J. R. Bae, and K. Takagi, *Jpn. Appl. Phys.*, 26 Suppl. 26-1, 32 (1986).
2. J. R. Bae, *Kor. Appl. Phys.(Kor. Phys. Soc.)*, 5, 136 (1992).
3. 佐泰, “食卵の科學と利用”, 地球社, 205-207 (1980).
4. A. Kato, Y. Nagase, N. Matsudori, and K. Kobayashi, *Agric. Bioi. Chem.*, 47, 1829 (1983) 5.
5. J. Gormally, M. C. Pereira, E. Wyn-Jones, and E. R. Morris, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 2, 78, 1661 (1982).