

단백질과 식용색소간의 상호작용에 관한 연구 III

이종숙·김박광·장성기·박유미·문동철*·염정록**
서울대학교 약학대학, *충북대학교 약학대학 **중앙대학교 약학대학
(Received October 16, 1989)

Studies on the Interaction of Edible Dyes with Protein III

Jong Suk Lee, Bak-Kwang Kim, Seong Ki Jang, You Mie Park, Dong-Cheul Moon*
and Jeong-Rok Youm**

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheonju Chungbuk 360-763, Korea

**College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract—Binding parameters of some edible dyes with bovine serum albumin were determined at pH 7.4 buffer solution. The edible dyes used were fast green, brilliant blue FCF, indigo carmine and allura red AC, and the final concentrations of each dyes were $3\sim 9 \times 10^{-6}M$, $6 \times 10^{-6}M$, $3 \times 10^{-5}M$ and $3 \times 10^{-5}M$, respectively. The final concentrations of bovine serum albumin were $1\sim 7 \times 10^{-5}M$. The values of binding free energy between edible dye and protein were ranged from $-6,024$ to $-6,800$ cal/mole.

Keywords □ Fast green, brilliant blue FCF, indigo carmine, allura red AC, bovine serum albumin, binding free energy, binding site, klotz method

최근에 어린이들에게 종종 나타나고 있는 격렬한 행동(hyperkinetics) 즉 불안, 충동, 과격한 행동, 흥분 등 동요되는 기분은 식용색소나 인공감미제 같은 식품첨가제의 과다 섭취에 기인하는 사실을 보고하고 있다.¹⁻⁴⁾

이에 저자들은 식품에 첨가되는 식용색소가 약물과 단백질간의 상호작용에 미치는 영향에 대한 연구의 일환으로 전보^{5,6)}에 이어 현재 통용되고 있는 Brilliant blue FCF, Indigo carmine, Fast green 및 Allura red AC 색소와 단백질간의 상호작용에 대한 결합 parameter 을 흡광광도법으로 조사하였다.

일정한 파장에 있어서 유리된 색소 또는 결합된 색소의 몰흡광계수 및 농도를 각각 ϵ_1 , c_1 또는 ϵ_2 , c_2 라 하면 혼합용액의 흡광도는 다음 식으로 표시할 수 있다.

$$\ln(I_0/I) = \epsilon_1 c_1 d - \epsilon_2 c_2 d \quad (1)$$

$$\ln(I_0/I) = \epsilon_{app}(c_1 - c_2) d \quad (2)$$

$$\alpha = c_1 / (c_1 + c_2) = (\epsilon_{app} - \epsilon_2) / (\epsilon_1 - \epsilon_2) \quad (3)$$

여기서 d 는 흡광측정용 cell의 두께(cm)이고, α 는 유리색소의 분율이다. 단백질 몰당 결합된 색소의 몰수(r), 유리된 색소의 농도(c) 그리고 결합부위의 수(n)와 결합정수(K)는 다음 식과 관련지을 수 있다.^{7,8)}

$$1/r = (1/Kn \times 1/c) + \frac{1}{n} \quad (4)$$

$\frac{1}{r}$ 을 $\frac{1}{c}$ 에 대하여 plot 하면, 기울기가 $\frac{1}{Kn}$, 절편이 $\frac{1}{n}$ 인 직선이 얻어지게 된다. Kn 은 이 식을 사용하여 구하며, 결합자유에너지(ΔF)는 다음 식으로 산출된다.

$$\Delta F = -RT \ln Kn \quad (5)$$

실험방법

시약 및 장치—소혈청단백(MW 68,000)은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였으며, 시판

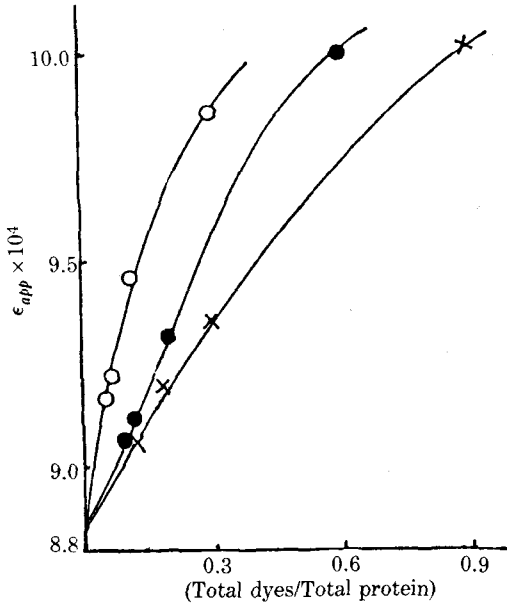


Fig. 1—Graphic determination of ϵ_2 for Fast green in the presence of BSA at pH 7.4
 ○: 3×10^{-6} M Fast green
 ●: 6×10^{-6} M Fast green
 ×: 9×10^{-6} M Fast green

Brilliant blue FCF(blue No.1), Indigo carmine(blue No.2), Fast green(green No.3)와 Allura red AC(red No.40)는 물 혹은 에탄올로 재결정하여 사용하였다. 단백질 용액은 0.2M-인 산완충액(pH 7.4)으로 조제하였으며, 혼합도는 Vortex Mixer(Korea Manhattan Co.)를 써서 항온조에서 5분간 진탕한 후 분광광도계(Pye Unicam PU 8800)로 측정하였다. 측정방법은 전보와 동일하였다.

결론 및 고찰

Fast green 색소의 ϵ_2 값은 약 88,500이었다 (Fig.1). 이 값을 사용하여 단백질-색소의 비로부터 산출된 값들을 Table I에 표시하였다.

Kn 값은 Fig.2에 표시한 바와 같이 작도법으로 산출한 결과 상관계수 0.951인 직선성을 나타내었으며, n 및 ΔF 값들은 각각 0.8과 -6.796 cal/mole 이었다.

Brilliant blue FCF, Indigo carmine과 Allurared AC 색소들의 경우에 있어서는 n 및 ΔF 값들은 각각 0.6, 0.2, 3.5와 $-6,705$, $-6,024$, $-6,750$ cal/mole 을 나타내었다(Table II - IV).

Table I—Calculation of BSA-bound fast green at pH 7.4

$\epsilon_1=112,056$, $\epsilon_2=88,500$

Total conc. of dye $\times 10$ M/l	Conc. of BSA $\times 10$ M/l	Abs.	ϵ_{app} at 623 nm	α	Conc. of free dye $\times 10$ M/l	Conc. of bound dye $\times 10$ M/l	Moles dye bound per mole protein r	$1/r$	$1/c$
3.0	1.0	0.296	98667	0.432	1.295	1.705	0.171	5.865	772328
3.0	3.0	0.284	94667	0.262	0.785	2.215	0.074	13.550	1273297
3.0	5.0	0.277	92333	0.163	0.488	2.512	0.050	19.920	2048348
3.0	7.0	0.275	91667	0.134	0.403	2.597	0.037	26.954	2479579
6.0	1.0	0.601	100167	0.495	2.972	3.028	0.303	3.303	336514
6.0	3.0	0.559	93167	0.198	1.189	4.811	0.160	6.234	841286
6.0	5.0	0.547	91167	0.113	0.679	5.321	0.106	9.399	1472250
6.0	7.0	0.544	90667	0.092	0.552	5.448	0.078	12.854	1812000
9.0	1.0	0.904	100444	0.507	4.564	4.436	0.444	2.254	219126
9.0	3.0	0.843	93667	0.219	1.974	7.026	0.234	4.270	506581
9.0	5.0	0.829	92111	0.153	1.380	7.620	0.152	6.562	724800
9.0	7.0	0.817	90778	0.097	0.870	8.130	0.116	8.613	1149073

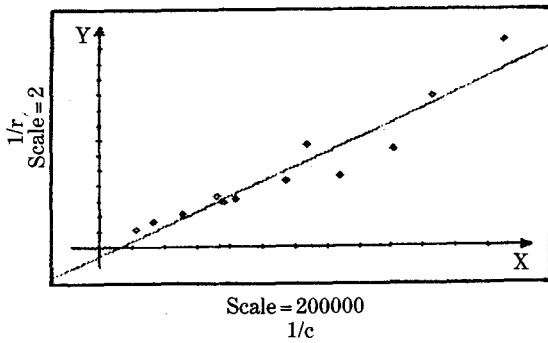


Fig. 2—Plot of $1/r$ against $1/c$ in the binding of fast green to bovine serum albumin at pH 7.4

위의 결과들을 요약하면 본 실험에서 사용된 농도 범위 내에서는 단백질에 대한 식용색소들의 결합강도는 Indigo carmine, Brilliant blue FCF, Allura red AC, Fast green 의 순으로 감소하였으며 (Table V), 결합자유에너지는 $-6,020 \sim -8,100$ cal/mole 범위를 나타내었다. 동일한 색깔을 갖고 있는 식용색소의 경우에 있어서는 최대 흡광과 장과 ΔF 간의 상호관계는 몰흡광계수의 크기에 의존하였으며, 또한 일정농도의 식용색소에 대한 첨가되는 단백질의 농도가 증가됨에 따라 일정한 농도의 존성을 나타내고 있다. 그리고 8종의 식용색소로부

Table II—Calculation of BSA-bound brilliant blue FCF at pH 7.4

$$\epsilon_1 = 111,333, \epsilon_2 = 95,850$$

Total conc. of dye $\times 10^{-6}$ M/l	Conc. of BSA $\times 10^{-5}$ M/l	Abs.	ϵ_{app} at 631 nm	α	Conc. of free dye $\times 10^{-6}$ M/l	Conc. of bound dye $\times 10^{-6}$ M/l	Moles dye bound per mole protein r	$1/r$	$1/c$
6.0	1.0	0.632	105333	0.613	3.675	2.325	0.233	4.301	272109
6.0	3.0	0.601	100167	0.279	1.673	4.327	0.144	6.935	597799
6.0	5.0	0.592	98667	0.182	1.092	4.909	0.098	10.183	916154
6.0	7.0	0.587	97833	0.128	0.769	5.231	0.075	13.387	1301092

Table III—Calculation of BSA-bound indigo carmine at pH 7.4

$$\epsilon_1 = 19,117, \epsilon_2 = 14,000$$

Total conc. of dye $\times 10^{-5}$ M/l	Conc. of BSA $\times 10^{-5}$ M/l	Abs.	ϵ_{app} at 621 nm	α	Conc. of free dye $\times 10^{-5}$ M/l	Conc. of bound dye $\times 10^{-5}$ M/l	Moles dye bound per mole protein r	$1/r$	$1/c$
3.0	1.0	0.564	18800	0.938	2.814	0.186	0.186	5.379	35535
3.0	3.0	0.546	18200	0.821	2.462	0.538	0.179	5.580	40611
3.0	5.0	0.529	17633	0.710	2.130	0.870	0.174	5.747	46945
3.0	7.0	0.513	17100	0.606	1.818	1.183	0.169	5.921	55022

Table IV—Calculation of BSA-bound allura red AC at pH 7.4

$$\epsilon_1 = 21,200, \epsilon_2 = 17,700$$

Total conc. of dye $\times 10^{-5}$ M/l	Conc. of BSA $\times 10^{-5}$ M/l	Abs.	ϵ_{app} at 503 nm	α	Conc. of free dye $\times 10^{-5}$ M/l	Conc. of bound dye $\times 10^{-5}$ M/l	Moles dye bound per mole protein r	$1/r$	$1/c$
3.0	1.0	0.588	19600	0.543	1.629	1.371	1.371	0.729	61404
3.0	3.0	0.556	18533	0.238	0.714	2.286	0.762	1.313	140000
3.0	5.0	0.546	18200	0.143	0.429	2.571	0.514	1.944	233333
3.0	7.0	0.542	18067	0.105	0.314	2.686	0.384	2.606	318182

Table V—Binding free energy and binding site between edible dye and protein

Edible dye	λ max (nm)	ϵ_1	ϵ_2	Absolute Temp. ($^{\circ}$ K)	Binding site (n)	ΔF (cal/mole)
Erythrosine	525	80,590	42,000	295	6.1	-8,139
Fast green	623	112,056	88,500	297	0.8	-6,796
Amaranth	520	22,810	15,000	295	1.2	-6,757
Allura red	503	21,200	17,700	295	3.5	-6,750
Brilliant blue	631	111,333	95,850	293	0.6	-6,705
Tartrazine	428	21,870	14,500	295	1.6	-6,333
Sunset yellow	480	20,300	13,000	295	3.2	-6,276
Indigo carmine	621	19,117	14,000	291	0.2	-6,024

터 얻은 결합자유에너지를 비교하여 보면 quinoid 형 구조를 가진 식용색소들의 값들이 azo 형 구조를 가진 것보다 큰 값을 나타내었다.

문 헌

- 1) Plamer, S., Papoport, J.L. and Quinn, P.O.: *Clinical Pediatrics* **14**, 956 (1975).
- 2) Feingold, B.: *Hosp. Prac.* **8**, 11 (1973).
- 3) Gale, A.E.: *Med. J. Aust. Oct.*, 546 (1976).
- 4) Feingold, B.: "Why your child is hyperactive", Rand House, New York, N.Y. (1975).
- 5) Jang Seong Ki, Kim Bak-Kwang and Lee Wang-Kyu: Studies on the Interaction of Edible with Protein(I), *Arch. Pharm. Res.* **8**, 169 (1985).
- 6) Kim Bak-Kwang, Lah Woon Lyong, Jang Seong Ki, Lim Bang Ho, Jang Jae Yeon and Lee Wang Kyu: Studies on the Interaction of Edible Dyes with Protein (II), *Arch. Pharm. Res.* **10**, 29 (1987).
- 7) Klotz, I.M. and Curme, H.G.: The Thermodynamics of Metallo-Protein Combinations. Copper with Bovine Serum Albumin: *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 939 (1948).
- 8) Klotz, I.M., Walker, F.M. and Pivan R.B.: The Binding of Organic Ions by Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 1486 (1946).
- 9) Feingold, B.F.: Behavioral disturbances, learning disabilities, and food additives, *Chem. Technol.*, **5**, 264 (1975).