

## pH 조정후 Transglutaminase로 처리한 원유의 전자현미경적 관찰

문정한\* · 홍윤호

전남대학교 식품영양학과 · 생활과학연구소 · 바이오식품연구센터

### 서 론

트랜스글루타미나제(transglutaminase, TGase, E.C 2.3.2.1.3)는 단백질 분자들을 교차결합하는 효소로 자연계에 널리 분포되어 있다<sup>(1)</sup>. TGase가 단백질 분자들에 작용할 경우, acyl 교환반응, 교차반응, 탈아미드반응 등에 의해  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine( $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys) 교차결합이 형성된다<sup>(2)</sup>.  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys 교차결합은 단백질의 겔형성, 열안정성, 수화능력 등에 특이한 영향을 미친다. TGase는 생선, 육류, 국수, 반죽, 제과, 제빵, 유제품 등에 탄력성, 점성, 견고성, 수화성, 유화능력 등을 향상시키므로 다양하게 이용되고 있다<sup>(3-5)</sup>. 요구르트, 크림, 아이스크림, 치즈 등 유제품에 TGase의 효과에 대한 연구가 다양하게 진행되어 왔다<sup>(6-9)</sup>. 우유 단백질 중 카제인이 유청 단백질보다 TGase에 더 좋은 기질이라고 알려졌고<sup>(10)</sup>, 미생물인 *Streptovorticillium* sp.에서 유도된 TGase는  $\alpha$ -카제인보다  $\beta$ -카제인에서 활성이 더 크며<sup>(11)</sup>, 유청 단백질의 경우 dithiothreitol 같은 환원제가 존재하면 TGase에 의해 예민하게 교차결합한다고 보고되었다<sup>(12)</sup>. Schorsch 등<sup>(3)</sup>은 투과 전자 현미경(transmission electron microscope, TEM)을 이용하여 카제인 겔 제조시 산 또는 응유 효소(rennet)를 첨가할 경우 약한 물리적 교차결합이 야기되는데 비하여 미생물 *Streptovorticillium*으로부터 생산된 TGase를 겔형성시에 사용한 경우 공유결합적으로 교차결합을 야기한다는 사실을 밝혀냈다. 최근에 원유에 TGase를 첨가하여 반응시키고 원심분리한 다음 주사 전자 현미경(scanning electron microscope, SEM)으로 관찰한 결과, 효소에 의한 교차결합으로 인하여 카제인 입자의 분자구조가 변형되어 표면의 성상이 다르게 형성되었음이 보고되었다<sup>(8)</sup>. 그러나 현재까지 pH 조정 후 TGase를 이용한 유제품의 전자현미경적 성상에 관한 연구보고는 별로 많지 않다. 본 연구에서는 원유(Raw milk)를 산성, 중성, 알칼리성으로 pH를 조정한 후 TGase를 첨가하여 반응시키고 동결건조한 다음 SEM으로 형태학적 특성을 관찰, 비교하였다.

### 재료 및 방법

본 실험에 사용된 TGase는 Ajinomoto사 (Tokyo, Japan)로부터 기증을 받았으며, 원유는 유가공사에서 지원을 받아 사용하였다. 기타 실험용 시약들은 화학실험용 특급을 사용하

였다. 탈지유는 신선한 원유를 5,000 xg에서 20분간 4℃조건으로 원심분리한 다음 지방을 제거하고 잔여 지방을 분리하기 위해 Toyo Filter 2번 (Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 여과하였다. 여과된 탈지유는 1N-HCl 또는 NaOH를 이용하여 pH 5.5, 7.0, 8.5 즉, 산성, 중성, 알칼리성으로 조정하였으며, TGase는 탈지유에 10,000 : 1 (w/w)비율로 취한 양을 10배 희석 방법으로 첨가하여 30℃에서 각각 0, 1, 2, 4, 8시간 반응시키고 불활성화 (70℃, 5min)한 다음 2℃까지 냉각시켰다. 동결건조는 시료를 -70℃에서 동결한 다음 동결건조기 (freeze dryer, FD, FD-5505, IL SIN ENGINEERING CO, Korea)를 이용하여 5시간 이상을 동결건조시킨 후 유리봉을 사용하여 분말로 제조하였다. 원유의 카제인 입자들과 유청 단백질 입자의 전자현미경적 관찰은 분말로 만든 각각의 시료들을 주사 전자 현미경 (scanning electron microscope, SEM, JSM-5400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 원유 단백질 입자들의 표면관찰을 위해 각각의 시료에 아세톤을 가하여 입자를 분산시키고 금으로 도금시켜 전도성을 갖게 한 다음, 가속전압 15KV, phototimes 85초, 2,000배의 배율로 조직의 특성을 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 탈지유와 pH 조정후 TGase를 처리한 시료의 주사 전자 현미경에 의한 형태

원유의 탈지유를 동결건조한 후 카제인과 유청 단백질 입자들의 복합체를 SEM으로 관찰한 형태는 Fig. 1의 (a)와 같이 나타났다. 단백질 입자들은 규칙적인 회합체를 형성하고 있음을 관찰하였다. pH를 조정한 후 TGase를 첨가한 후 동결건조한 시료에서 pH 5.5는 단백질 입자들이 크게 조각 형태를 유지하였으며(b) pH 7.0에서는 pH 5.5에서 보다 더 큰 단백질 입자들이 형성되었다(c). pH 8.5 시료에서는 pH 7.0과 큰 차이가 없었다(d). TGase를 처리하고 1시간 반응시킨 후 동결건조한 경우 pH 5.5 시료(e)는 단백질 입자들이 비교적 작은 회합체 성상을 하고 있는 반면에 pH 7.0과 8.5 시료는 단백질 입자들이 넓은 판의 형태를 하고 있음을 관찰하였다(f, g). pH 조정 후 TGase와 2시간 반응시킨 시료는 pH 5.5에서 단백질 입자들은 비교적 규칙적으로 둥글게 회합하고 있었으며(h) pH 7.0에서는 단백질 입자들이 넓게 회합되어 있었고 중앙에는 작은 홈을 형성하였다(i). pH 8.5에서는 단백질 입자들이 크게 회합되었다(j). pH 조정 후 TGase를 4시간 반응시킨 시료의 경우 pH 5.5에서는 단백질 입자들의 성상이 둥근 콩과 같은 성상을 이루었으며(k), pH 7.0에서는 단백질 입자들이 조각으로 분리되면서 회합하고 있음을 관찰하였다(l). pH 8.5에서는 pH 7.0보다 더 큰 단백질 판형 조각을 형성하면서 회합체를 하고 있었다(m). pH 조정 후 TGase를 처리하여 8시간 반응시킨 후 동결건조한 시료에서 pH 5.5는 단백질 입자들이 아주 넓은 판에 응집되어 회합체를 이루고 있었다(n) 이 성상은 원유의 탈지유 성상과는 크게 대조적임을 알 수 있었다(Fig. 1의 a). pH 7.0에서는 단백질 입자들이 나뭇잎 성상을 하면서 회합되고 있었다(o). pH 8.5에서는 다시 단백질 입자들이 넓게 퍼지면서 넓적한 조각 회합체의 성상을 하고 있었다(p). 원유를 산성, 중성, 알칼리성으로 pH를 조정한 다음 TGase를 첨가하여 SEM을 측정한 결과 중성과 알칼리성보다 산성 조건이 TGase에 의한 교차결합을 촉매함으로써 카제인과 유청 단백질의 상호 결합을 더 증가시킬 것으로 추정된다.



**Fig. 1.** SEM images of freeze-dried Raw skim milk pellet to which TGase was added and incubated at 30 °C for 0, 1, 2, 4, 8h after adjustment to pH 5.5, 7.0, 8.5 with 1N-HCl or NaOH. (a): raw skim milk, (b): pH 5.5, (c): pH 7.0, (d): pH 8.5, (e): pH 5.5, (f): pH 7.0, (g): pH 8.5, (h): pH 5.5 (i): pH 7.0, (j): pH 8.5, (k): pH 5.5, (l): pH 7.0, (m): pH 8.5, (n): pH 5.5, (o): pH 7.0, (p): pH 8.5.

## 요 약

본 연구는 원유에서 지방을 제거한 탈지유의 pH를 5.5, 7.0, 8.5로 조정한 다음 TGase를 첨가하여 0, 1, 2, 4, 8시간 반응시킨 다음 단백질 입자들을 동결건조하여 조직의 성상에 대해 주사 전자 현미경을 이용해 관찰, 비교하였다. pH와 TGase를 처리하지 않은 원유의 탈지유는 단백질 입자들이 규칙적으로 회합해 있었다. 그러나 pH 조정 후 TGase를 처리한 다음 반응시간을 달리한 시료에서는 pH를 5.5로 조정한 시료에서 현저한 변화가 있었는데 그 변화 양상은 단백질 입자들이 0시간에서 조각을 이루워 회합되어 있다가 1시간 반응시킨 경우 단백질 입자들이 서로 결합하여 넓게 회합을 하였다. 2시간 반응시킨 경우 단백질 입자들이 다시 뭉쳐서 회합하였으며 4시간 반응시킨 경우 뭉쳐져 있던 단백질 입자들이 조그만 한 구형 성상으로 넓게 회합하였다. 8시간 반응시킨 시료는 구형 성상으로 회합되어 있던 단백질 입자들이 사라지면서 다시 넓게 회합하는 것을 관찰할 수 있었다. pH 7.0과 8.5 조건하에서는 단백질 입자들이 조각 형태를 이루고 있었으며 반응시간이 증가할수록 입자들이 넓게 확대되는 현상을 나타냈다. 이와 같은 단백질들의 변화 양상은 pH와 TGase처리 그리고 반응시간에 영향을 받고 있는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Ickson I, Apelbaum A. (1987) *Plant Physiol.*, 84, 972-974.
2. Kuraishi C, Sakamoto J, Soeda T. (1996) *ACS Symposium Series* 637. American Chemical Society: Washington, DC. 29-38.
3. Schorsch C, Carrie H, Norton IT. (2000) *Int. Dairy J.* 10, 529-539.
4. O'sullivan MM, Kelly AL, Fox PF. (2002) *J. Dairy Res.* 69, 433-442.
5. Walsh DJ, Cleary D, McCarthy E. et al. (2003) *Food Res. Int.* 36, 677-683.
6. Lauber S, Noack I. et al. (2001) *Eur. Food Res. Technol.* 213, 273-276.
7. Lee DS, Matsumoto S, Matsumura Y. et al. (2002) *J. Agric. Food Chem.* 50, 7412-7419.
8. Moon JH, Hong YH. (2003) *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 23(4), 350-355.
9. Flanagan J, FitzGerald RJ. (2003) *Int. Dairy J.* 13, 135-143.
10. Nonaka M. et al. (1989) *Agric. Biol. Chem.* 53, 2619-2623.
11. Kuraishi C, Sakamoto J, Soeda T. (1999) *Europe Patent* 0-711-504.
12. Lorenzen PC. et al. (1998) *Nahrung/Food*