



## 트랜스글루타미나제를 첨가한 우유의 전자현미경적 특성

문 정 한 · 홍 윤 호\*

전남대학교 식품영양학과, 생활과학연구소

### Electron Microscopical Property of Transglutaminase Added Milk

Jeong-Han Moon and Youn-Ho Hong\*

Department of Food and Nutrition, Human Ecology Research Institute  
Chonnam National University

#### Abstract

Raw skim milk and colloidal calcium phosphate-free skim milk were treated with microbial transglutaminase (TGase), ultracentrifuged at varying rates and were observed to contain textural properties using a scanning electron microscope (SEM). Skim milk showed irregular signs of conformation at lower centrifugal rate, and associated regular (10,000 ×g) and thin with broad holes (20,000 ×g). The associated texture became thick and irregular (40,000 ×g), and fine particles were regularly associated (100,000 ×g). When skim milk was incubated for 1 hr with TGase, casein micelles aggregated and broadened as centrifugation rate increased. When skim milk was incubated for 8 hrs with TGase, casein micelles associated to large widened aggregates, and were associated regularly which then became irregular (100,000 ×g). When colloidal calcium phosphate-free skim milk incubated for 1 hr with TGase showed no sediment, the milk incubated for 8 hrs with TGase associated together, yielding broadened and regular layers as the centrifugation rate increased. It is assumed that such phenomena could be caused by protein crosslinking reaction with TGase and conformational change of casein molecules, as well as dependencies on reaction time, temperature and ultracentrifugation rate.

**Key words** : transglutaminase, bovine milk, scanning electron microscope, ultracentrifugation

#### 서 론

Transglutaminase(TGase:EC 2.3.2.13)는 *Streptovorticillium mobaraense*의 변종으로부터 유도된 미생물에 의해 생성되는 효소이다(Motoki and Segura, 1998). TGase는 우유 단백질을 포함하는 많은 식품 단백질을 교차결합하는 효소이며, 아민 혼합, 탈아미노반응을 하여 단백질의 열안정성, 응고력, 유화력, 물성, 겔 형성, 수화작용, 용해성 등과 같은 기능적 특성을 변형시킬 수 있다고 보고하였다(Ikura et al, 1992; Motoki & Segura, 1998; Nielsen, 1995). 또한, TGase는 적은 비용으로 대량생산이 가능하고, 최적 pH는 5~8이며, 등전점은 8.9

정도이고 활성을 위한 최적온도는 50℃ 그리고 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)전기영동을 통해 평균 분자량은 40,000 Da로 확인되었다(Motoki et al, 1998). TGase는 육류, 생선, 밀가루, 우유 등을 원료로 하는 식품에 첨가되어 이화학적 및 기능적 특성들을 향상시키는데 활용되어 왔다(Babiker, 2000; Basman et al., 2002; Hozova et al., 2003; O'sullivan et al., 2002; Walsh et al., 2003). 유제품의 경우 요구르트, 크림, 아이스크림, 치즈 등에 TGase를 첨가하여 제품화를 시도한 연구들이 보고되었다. TGase를 요구르트의 제조시 첨가한 경우 응고성 및 점도가 증가되고 함수능력이 향상되어 이장현상이 감소하였으며, 아이스크림 제조시 사용하면 조직이 부드러워졌고 품질이 개선되었으며 치즈제조시 첨가한 경우 커드의 수율이 증가되었다(Han and Damodaran, 1996; Flanagan et al., 2003; Lauber et al., 2000; Lauber et al., 2001; Lee et al., 2002; Lorenzen and Schlimme., 1998; Lorenzen et al., 1998; Scho-

\* Corresponding author : Youn-Ho Hong, Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, 300, Yongbong-dong, Bukgu, Gwangju, Chonnam, Korea. Tel: 82-62-530-1333, Fax: 82-62-530-1339, E-mail: yhhong@chonnam.ac.kr

rsch et al., 2000). 현재까지 TGase를 이용한 유제품의 주사 전자 현미경(Scanning Electron Microscope, SEM) 성상에 관한 연구보고는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 TGase를 원유에 첨가하여 초고속 원심분리한 침전물 즉, 카제인 마이셀을 주사 전자 현미경으로 조직상의 특징을 관찰, 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 TGase는 Ajinomoto사(Tokyo, Japan)로부터 기증을 받았으며, 원유는 유업 회사 처리장에 냉장 중인 bulk 상태로 구입하였고, 기타 실험용 시약들은 화학실험용 특급을 사용하였다.

### 실험방법

#### 시료의 조제 및 TGase의 처리

##### 1) 탈지유

탈지유는 신선한 원유를 3,000 ×g에서 20분간 4℃ 조건으로 원심분리한 다음 지방을 제거하고 잔여 지방을 분리하기 위해 Toyo Filter 2번(Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)을 사

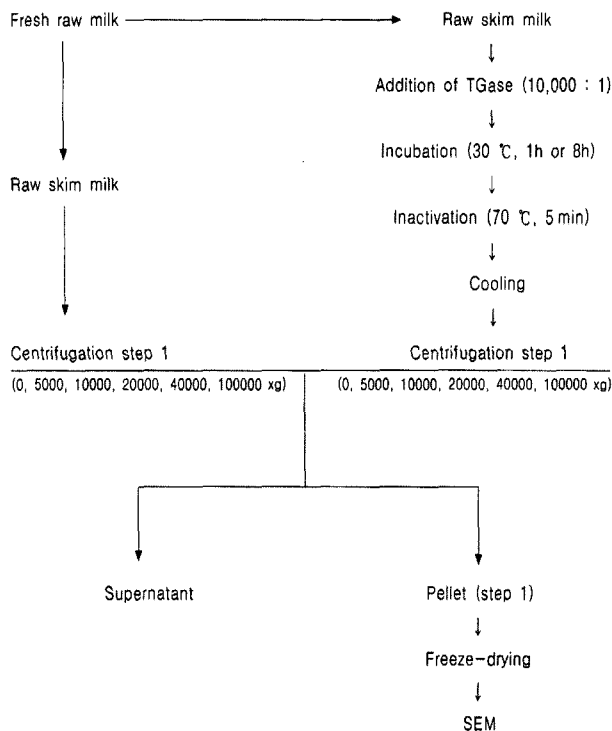


Fig. 1. Flow Chart of raw skim milk and TGase-treated milk for individual SEM.

용하여 2회 여과하였다.

##### 2) TGase가 첨가된 탈지유

탈지유에 TGase를 10,000 : 1(w : w) 비율로 첨가하여 30℃에서 1시간 또는 8시간 반응시킨 후 2℃까지 냉각시켰다(Fig. 1).

##### 3) TGase가 첨가된 콜로이드성 인산칼슘(colloidal calcium phosphate)이 유리된 탈지유 [CCP-free milk]

탈지유에서 콜로이드성 인산칼슘을 제거한 시료와 탈지유에 TGase를 첨가하여 반응시킨 다음 효소를 불활성화시킨 후 콜로이드성 인산칼슘을 제거한 시료의 초고속 원심분리 거동을 비교하기 위하여 실험하였다.

탈지유에 TGase를 10,000 : 1(w : w) 비율로 첨가하여 30℃에서 1시간 또는 8시간 반응시킨 다음 70℃에서 5분간 불활성화시키고 냉각하였다. 1N HCl을 이용하여 시료의 pH를 4.6으로 조정된 후 인산칼슘을 제거하기 위해 다량의 우유에 대하여 24시간 동안 투석(dialysis)을 실시하였다(Fig. 2).

#### 고속 원심분리 및 동결건조

TGase를 첨가하지 않은 시료와 TGase를 첨가한 시료(TGase가 첨가된 탈지유, TGase가 첨가된 CCP-free milk)들을 Fig. 1 과 2의 과정에 따라 0, 5,000, 10,000, 20,000, 40,000 및 100,000 ×g로 초고속 원심분리하여 침전된 카제인 입자들을 동결건조한 다음 분말로 제조하였다.

#### 주사전자현미경을 이용한 카제인의 조직특성 관찰

주사 전자 현미경(JEOL JSM-5400, Japan)을 이용하여 카제인 마이셀의 조직상의 특징을 관찰하기 위해 각각의 시료에 아세톤을 가하여 입자를 분산시키고 금으로 도금시켜 전도성을 갖게 하였다. 이 시료를 주사 전자 현미경을 사용하여 가속전압 15 KV 또는 20 KV, phototimes 85초, 2,000배의 배율로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

#### 탈지유 중 침전된 카제인 입자들의 주사 전자 현미경에 의한 형태 관찰

탈지유를 초고속 원심분리 분리한 카제인 입자들의 주사 전자현미경에 의해 관찰된 형태는 Fig. 3과 같이 나타났다. 초고속 원심분리 속도 증가에 따라 카제인 입자들의 성상은 불규칙적으로 회합되어 있었으나(a) 10,000 ×g로 원심분리한 시료는 규칙적으로 회합을 하였으며, 약간의 홈을 형성하였다(b). 20,000 ×g로 원심분리한 시료에서는 카제인 입자 조직이 얇고, 넓어지면서 부분적으로 큰 홈을 이루었다(c).

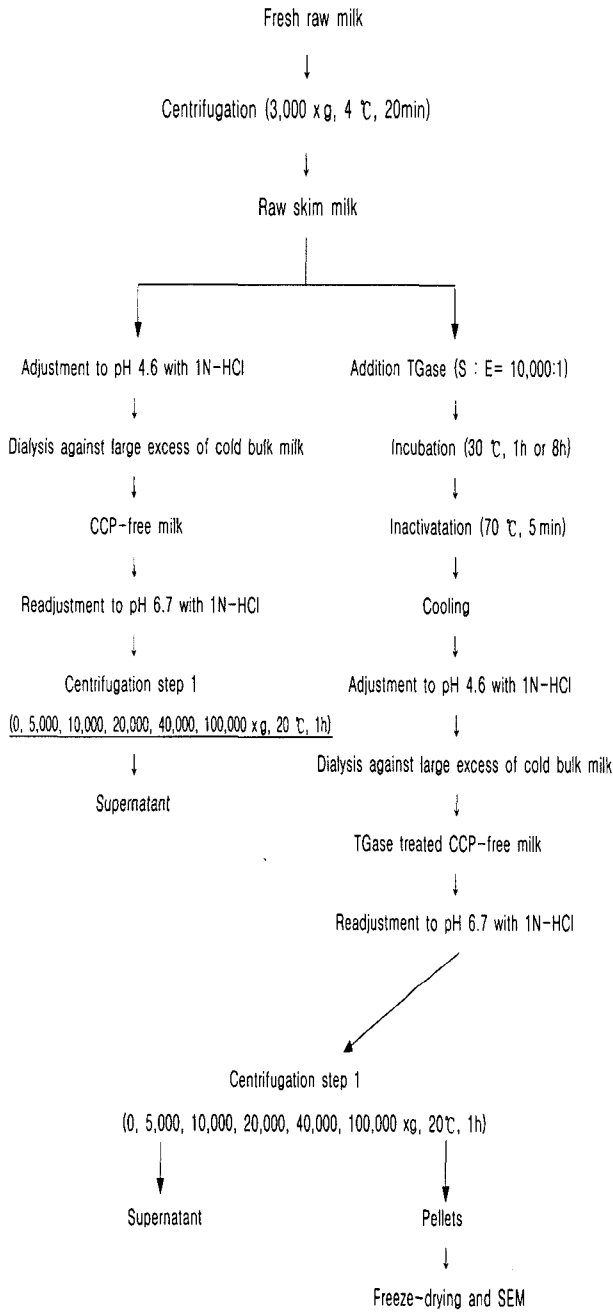


Fig. 2. Flow Chart of CCP-free raw milk and TGase-treated CCP-free raw milk for individual SEM.

한편 40,000×g로 원심분리한 시료에서는 조직이 두껍고 회합이 불규칙해졌으며(d) 100,000×g로 원심분리한 시료의 경우 미세한 카제인 입자 조직들이 규칙적으로 회합하고 있음을 관찰할 수 있었다(e). 탈지유의 형태학적 특성은 원심분리속도에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다.

탈지유에 TGase를 첨가하여 초고속 원심분리한 침전물의 전자현미경에 의한 형태 관찰

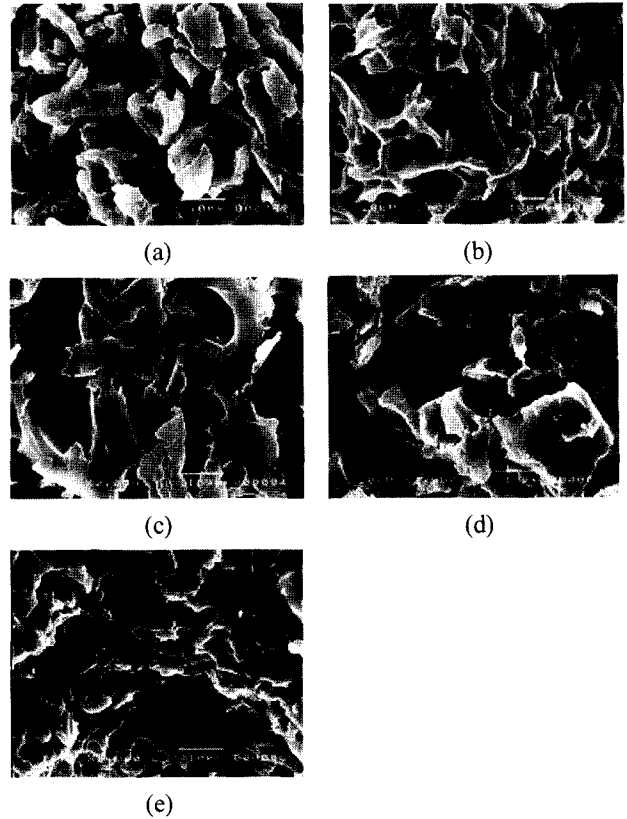


Fig. 3. SEM images of freeze-dried raw skim milk pellet after step 1 centrifugation.

- (a): 5,000 × g skim milk pellet,
- (b): 10,000 × g skim milk pellet,
- (c): 20,000 × g skim milk pellet,
- (d): 40,000 × g skim milk pellet,
- (e): 100,000 × g skim milk pellet

1) 탈지유에 TGase를 첨가하여 1시간 반응시킨 시료의 주사 전자 현미경적 형태

탈지유에 TGase를 첨가하여 1시간 반응시킨 후 초고속 원심분리한 침전물을 주사 전자 현미경으로 관찰한 성상은 Fig. 4와 같이 나타났다.

TGase를 첨가하고 반응시킨 경우 5,000×g로 원심분리한 시료는 카제인 입자들이 개방되어 불규칙적이었으나(a) 10,000×g로 원심분리한 시료는 규칙적으로 작은 카제인 입자들이 회합을 이루었으며(b), 20,000×g로 원심분리한 시료는 카제인 입자들이 넓어지면서 큰 홈을 형성하였다(c). 그리고 40,000×g로 원심분리한 경우 카제인 입자들이 넓은 상태로 덩어리져서 비교적 불규칙적으로 회합해 있었고(d) 100,000×g로 원심분리한 시료는 작은 카제인 입자들이 나뭇잎이 쌓여있는 것처럼 규칙적으로 분포되어 있었으며 입자의 크기는 작고 입자수도 증가하였음이 관찰되었다(e). 이러한 현상은 탈지유에서 나타난 주사 전자 현미경적 특성과 비교해 보면 보다 부드럽게 회합된 것으로 생각된다.

## 2) 탈지유에 TGase를 첨가하여 8시간 반응시킨 시료의 주사 전자 현미경적 형태

탈지유에 TGase를 첨가하여 8시간 반응시킨 경우 주사 전자 현미경으로 관찰한 성상은 Fig. 5와 같다. 5,000 ×g로 원심분리한 시료는 카제인 입자들이 모여 회합을 이루고 있었으며(a), 10,000 ×g로 원심분리한 시료에서는 5,000 ×g보다 좀 더 규칙적으로 카제인 입자들이 모여 회합층을 이루고 있었다(b). 그리고 20,000 ×g로 원심분리한 시료는 회합되어 있었던 카제인 입자들이 넓게 펼쳐져서 층을 이루고 있었으며(c), 이러한 현상은 40,000 ×g로 원심분리한 시료에서도 유사하였다(d). 한편, 100,000 ×g로 원심분리한 시료에서 카제인 입자들이 회합하여 불규칙적으로 존재하고 있는 것을 관찰할 수 있었다(e). 이러한 결과로 보아 탈지유에 TGase를 첨가하고 반응시간과 초고속 원심분리 속도가 길어짐에 따라서 교차결합이 형성되어 카제인 입자들의 형태학적 구조

를 변형시킨 것으로 추정된다.

## 탈지 CCP-free milk에 TGase를 첨가하여 1단계 초고속 원심분리한 침전물의 주사 전자현미경에 의한 형태 관찰

탈지 CCP-free milk에 TGase를 첨가하여 반응시킨 후 초고속 원심분리한 침전물의 주사 전자 현미경에 의해 관찰된 성상은 Fig. 6과 같이 나타났다. 5,000 ×g로 원심분리한 시료의 경우 카제인 입자들이 모여서 회합을 이루고 있었고 조직은 비교적 불규칙적이었다(a). 원심분리 속도가 10,000~20,000 ×g로 증가함에 따라 카제인 입자들의 조직은 회합되어 넓게 펼쳐져서 입체적인 층을 형성하였다(b, c). 시료가 40,000 ×g로 원심분리된 경우에서는 카제인 입자들이 큰 홈과 함께 불규칙한 조직을 형성하였다(d). 한편, 100,000×g로 원심분리한 시료에서는 카제인 입자들이 비교적 넓게 퍼져

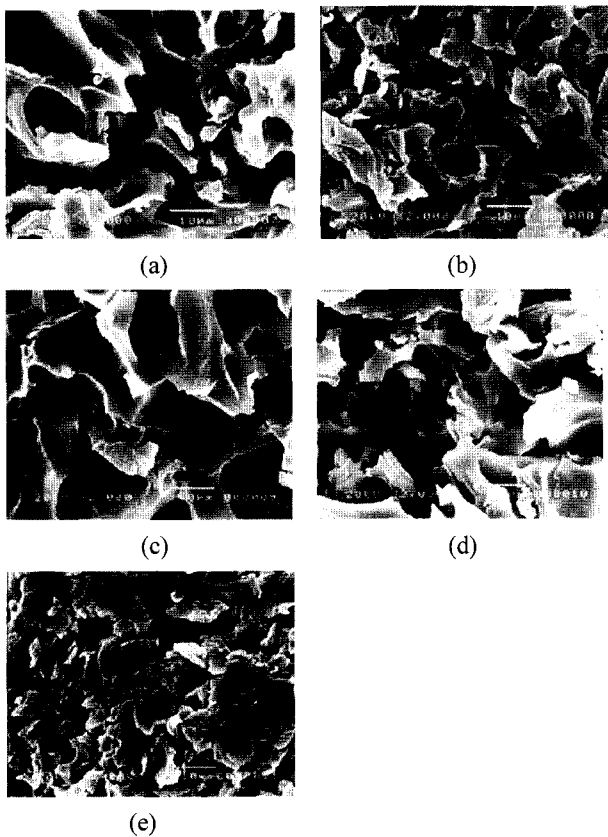


Fig. 4. SEM images of freeze-dried raw skim milk pellet after step 1 centrifugation to which TGase was added and incubated at 30°C for 1 hr.

- (a): 5,000 × g skim milk pellet,
- (b): 10,000 × g skim milk pellet,
- (c): 20,000 × g skim milk pellet,
- (d) : 40,000 × g skim milk pellet,
- (e): 100,000 × g skim milk pellet

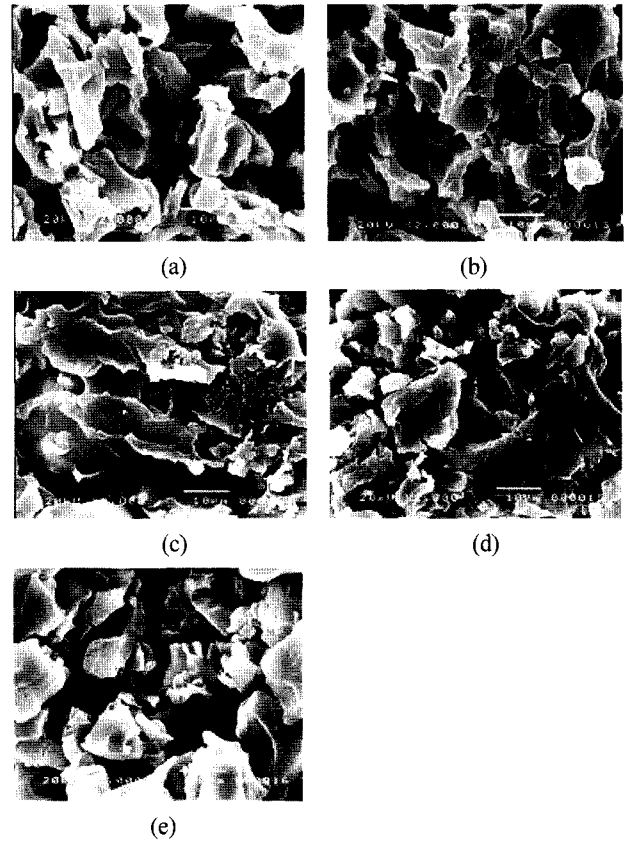


Fig. 5. SEM images of freeze-dried raw skim milk pellet after step 1 centrifugation to which TGase was added and incubated at 30°C for 8 hr.

- (a): 5,000 × g skim milk pellet,
- (b): 10,000 × g skim milk pellet,
- (c): 20,000 × g skim milk pellet,
- (d) : 40,000 × g skim milk pellet,
- (e): 100,000 × g skim milk pellet

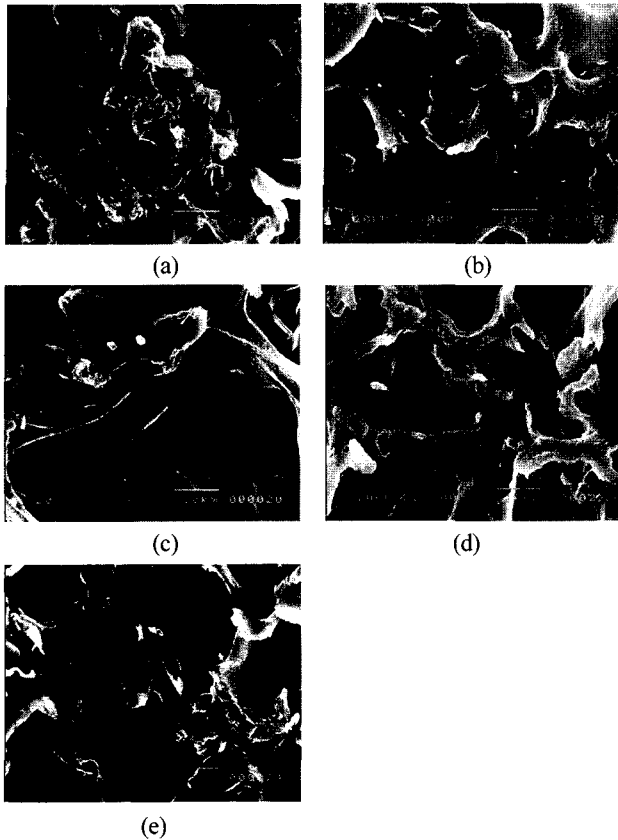


Fig. 6. SEM images of freeze-dried CCP-free raw skim milk pellet after step 1 centrifugation to which TGase was added and incubated at 30°C for 8 hr.

- (a): 5,000 × g CCP-free milk pellet,  
 (b): 10,000 × g CCP-free milk pellet,  
 (c): 20,000 × g CCP-free milk pellet,  
 (d): 40,000 × g CCP-free milk pellet,  
 (e): 100,000 × g CCP-free milk pellet

층을 형성하였다(e). 이와 같은 현상은 TGase가 콜로이드성 인산칼슘이 제거된 탈지유에 첨가된 후 반응시간이 길어짐에 따라 교차결합으로 인해 카제인 입자들을 회합시키는데 충분한 촉매작용을 하여 부드러운 형태를 나타낸 것으로 판단된다.

## 요 약

원유를 이용하여 탈지유와 콜로이드성 인산칼슘이 제거된 우유에 TGase를 첨가하여 반응시킨 다음 초고속 원심분리를 실시하여 침전된 카제인 입자들을 동결건조하여 조직의 성상을 주사 전자 현미경을 이용해 관찰, 비교하였다. 탈지유와 탈지유에 TGase를 처리하고 1시간 반응시킨 경우에서 카제인 입자들의 성상은 초고속 원심분리 속도 증가에 따라 불규칙적으로 혹은 규칙적으로 변형되면서 입자들이 넓어지다가 다시 규칙적으로 카제인 입자들이 회합층을 이루었다. 탈

지유에 TGase를 처리하고 8시간 반응시킨 경우 카제인 입자들의 성상은 불규칙적으로 모여서 덩어리 형태를 나타내다가 다시 규칙적으로 회합하였으며, 원심분리 속도의 (20,000~40,000 × g) 증가에 따라 조직이 넓어지면서 층을 이루다가 다시 불규칙으로 회합하여 분산되는 현상이 관찰되었다. 콜로이드성 인산칼슘이 제거된 우유와 콜로이드성 인산칼슘이 제거된 우유에 TGase를 첨가하여 1시간 반응시킨 경우에는 카제인 입자들이 거의 침전하지 않았다. 반면에 8시간 반응시킨 경우에는 카제인 입자들이 초고속 원심분리 속도 증가에 따라 모여서 회합층을 이루다가 점차적으로 조직이 넓어지는 현상을 관찰할 수 있었다. 결론적으로 주사 전자 현미경에 의한 카제인 입자들의 조직 성상은 TGase를 처리하고 반응시간과 초고속 원심분리 속도를 증가했을 때 입자들이 모여 불규칙하게 분산되거나 혹은 넓게 회합층을 형성하였다. 이러한 현상은 TGase가 우유 단백질에 작용하여 교차결합을 촉매함으로써 단백질의 분자구조가 변형되어 카제인 입자들의 조직이 다양하게 나타난 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2002-041-F00037)에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Babiker, E. E. (2000) Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. *Food Chem.* **70**, 139-145.
- Flanagan, J. and FitzGerald, R. J. (2003a) Functional properties of *Bacillus* proteinase hydrolysates of sodium caseinate incubated with transglutaminase pre- and post-hydrolysis. *Int. Dairy J.* **13**, 135-143.
- Flanagan, J. and FitzGerald, R. J. (2003b) Characterisation and quantification of the reactions catalysed by transglutaminase using the o-phthalaldehyde reagent. *Nahrung* **47**, 207-212.
- Flanagan, J., Gunning, Y., and FitzGerald, R. J. (2003) Effect of cross-linking with transglutaminase on the heat stability and some functional characteristics of sodium caseinate. *Food Res. Int.* **36**, 267-274.
- Han, X. Q. and Damodaran, S. (1996) Thermodynamic compatibility substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1211-1217.
- Ikura, K., Sasaki, R., and Motoki, M. (1992) Use of

- transglutaminase in quality improvement and processing of food proteins. *Com. Agric. & Food Chem.* **2**, 389-487.
7. Lauber, S., Henle, T., and Klostermeyer, H. (2000) Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *Eur. Food Res. Technol.* **210**, 305-309.
  8. Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H., and Henle, T. (2001) Oligomerization of  $\beta$ -lactoglobulin by microbial transglutaminase during high pressure treatment. *Eur. Food Res. Technol.* **213**, 246-247.
  9. Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H., and Henle, T. (2001) Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. *Eur. Food Res. Technol.* **213**, 273-276.
  10. Lee, D. S., Matsumoto, S., Matsumura, Y., and Mori, T. (2002) Identification of the  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl) lysine cross-linking sites in  $\alpha$ -lactalbumin polymerized by mammalian and microbial transglutaminases. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7412-7419.
  11. Lorenzen, P. C., Schlimme, E., and Roos, N. (1998) Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. *Nahrung* **42**, 151-154.
  12. Lorenzen, P. C. and Schlimme, E. (1998) Properties and potential fields of application of transglutaminase preparations in dairying. *Bulletin of the IDF* **332**, 47-53.
  13. Motoki, M. and Segura, K. (1998) Transglutaminase and its uses for food processing. *Trends in Food Sci. & Technol.* **9**, 204-210.
  14. Nielsen, P. M. (1995) Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. *Food Biotechnol.* **9**, 119-156.
  15. O'sullivan, M. M., Kelly, A. L., and Fox, P. F. (2002) Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *J. Dairy Res.* **69**, 433-442.
  16. Sharma, R., Zakora, M., and Qvist, K. B. (2002) Susceptibility of an industrial  $\alpha$ -lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. *Int. Dairy J.* **12**, 1005-1012.
  17. Schorsch, C., Carrie, H., Clark, A. H., and Norton, I. T. (2000) Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase - induced gels. *Int. Dairy J.* **10**, 519-528.
  18. Walsh, D. J., Cleary, D., Mccarthy, E., Murphy, S., and FitzGerald, R. J. (2003) Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. *Food Res. Int.* **36**, 677-683.
- 
- (2003. 11. 7. 접수 ; 2003. 12. 18. 채택)