

Transglutaminase로 처리한 초고온 살균유 침전물의 전자현미경적 관찰

문정한 · 홍운호[†]

전남대학교 식품영양학과 · 생활과학연구소 · 바이오식품연구센터

Electron Microscopical Observation of Transglutaminase-treated Ultra High Temperature Milk Sediment

Jeong-Han Moon and Youn-Ho Hong[†]

Dept. of Food and Nutrition, Human Ecology Research Institute, and BioFood Research Center,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract

Ultra high temperature treated (UHT) skim milk and colloidal calcium phosphate-free skim milk were treated with microbial transglutaminase (TGase), ultracentrifuged at various rates, lyophilized, and observed for morphological properties with a scanning electron microscope (SEM). UHT skim milk showed small holes of associated micelles at lower centrifugal rates, and became thick and irregular, and fine particles were associated regularly at higher centrifugal rates. When UHT skim milk with TGase was incubated for 1 hour, casein micelles aggregated and broadened as centrifugation rate increased. When UHT skim milk with TGase was incubated for 8 hours, casein micelles were associated irregularly to large aggregates and widened. Colloidal calcium phosphate-free skim milk with TGase incubated for 1 hour and separated by two-step centrifugation showed aggregated lump, while the milk incubated for 8 hours with TGase was associated with broadened, compact, and regular layers as the centrifugation rate increased. Such phenomena were caused by heat treatment, protein crosslinking reaction catalyzed by TGase and conformational changes of casein molecules, and could be dependent on reaction time, temperature and ultracentrifugation rate.

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

서 론

트랜스글루타미나제(transglutaminase, TGase, E.C 2.3.2.1.3)는 단백질 분자들을 교차결합하는 효소로 자연계에 널리 분포되어 있다(1). TGase가 단백질 분자들에 작용할 경우, acyl 교환반응, 교차반응, 탈아미드반응 등에 의해 ϵ -(γ -glutamyl)lysine(ϵ -(γ -Glu)Lys) 교차결합이 형성된다(2). ϵ -(γ -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(3-8). 요구르트, 크림, 아이스크림, 치즈 등 유제품에 있어서 TGase의 효과에 대한 연구가 다양하게 진행되어 왔다(9-16).

우유 단백질 중 카제인이 유청 단백질보다 TGase에 더 좋은 기질이라고 알려졌고(17), 미생물인 *Streptovorticillum* sp.에서 유도된 TGase는 α -카제인보다 β -카제인에서 활성이 더 크며(18), 유청 단백질의 경우는 dithiothreitol 같

은 환원제가 존재하면 TGase에 의해 예민하게 교차결합한다고 보고되었다(11). Schorsch 등(4)은 투과 전자 현미경(transmission electron microscope, TEM)을 이용하여 카제인 겔 제조시 산 또는 응유효소(rennet)를 첨가할 경우 약한 물리적 교차결합이 야기되는데 비하여 미생물 *Streptovorticillum*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(15). 그러나 현재까지 TGase를 이용한 유제품의 전자현미경적 성상에 관한 연구보고는 별로 많지 않다.

그러므로 본 연구에서는 초고온 살균처리된 우유(ultra high temperature treated milk, UHT milk)에 TGase를 첨가하여 반응시키고 원심분리한 다음 SEM으로 형태학적 특성을 관찰, 비교하였다.

[†]Corresponding author. E-mail: yhhong@chonnam.ac.kr
Phone: 82-62-530-1333. Fax: 82-62-530-1339

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 TGase는 Ajinomoto사(Tokyo, Japan)로부터 기증을 받았으며, 초고온 살균 우유는 국내에 시판 중인 신선한 우유를 사용하였다. 기타 실험용 시약들은 화학 실험용 특급을 사용하였다.

시료의 조제 및 TGase의 처리

탈지유는 신선한 초고온 살균 우유를 3,000×g에서 20분간 4°C조건으로 원심분리한 다음 지방을 제거하고 잔여 지방을 분리하기 위해 Toyo Filter 2번(Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 2회 여과하였다. TGase가 첨가된 탈지유는 탈지유에 TGase를 10,000:1(w/w) 비율로 취한 양을 10배 희석 방법으로 탈지유에 첨가하여 30°C에서 1시간 또는 8시간 반응시키고 불활성화(70°C, 5 min)한 다음 2°C까지 냉각시켰다. 콜로이드성 인산칼슘이 유리된 탈지유(colloidal calcium phosphate-free)는 신선한 초고온 살균 우유의 탈지유를 1 N-HCl로 pH를 4.6으로 조정한 다음 시료의 20배 이상 되는 다량의 우유(bulk milk) 속에서 24시간 동안 투석하여 제조하였다.

탈지유에 TGase를 첨가하여 콜로이드성 인산칼슘을 유리시킨 시료에 TGase를 10,000:1(w/w) 비율로 취한 양을 10배 희석 방법으로 첨가하여 30°C에서 1시간 또는 8시간 반응시키고 불활성화시킨 다음 2°C까지 냉각하고 1 N-HCl로 pH를 4.6으로 조정한 후 다량의 우유(bulk milk) 속에서 24시간 동안 투석하여 제조하였다.

초고속 원심분리 및 동결건조

위의 각각의 시료들은 대부분 Fig. 1과 2의 초고속 원심분

리 과정에 따라 0, 5,000, 10,000, 20,000, 40,000, 100,000×g로 1단계 원심분리하여 얻은 침전물 즉, 카제인 입자들만을 동결건조하였다. 탈지유에 TGase를 첨가한 콜로이드성 인산칼슘이 유리된 시료는 1단계에서 분리된 supernatant를 pH 4.6으로 재 조정하여 2단계 초고속 원심분리(10,000×g, 20°C, 15 min)를 하였다(Fig. 2). 그리고 여기에서 침전된 카제인 입자들은 3~4시간 동안 동결건조시킨 후 유리봉을 이용하여 분말로 제조하였다.

카제인 입자들의 전자현미경적 특성

침전된 카제인 입자들을 동결건조하여 분말로 만든 각각의 시료들을 주사 전자 현미경(scanning electron microscope, SEM, JSM-5400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 카제인 입자들의 표면관찰을 위해 각각의 시료에 아세톤을 가하여 입자를 분산시키고 금으로 도금시켜 전도성을 갖게 한 다음, 가속전압 15 KV, phototimes 85 초, 2,000배의 배율로 조직의 특성을 관찰하였다.

결과 및 고찰

탈지유를 초고속 원심분리한 침전물의 주사 전자 현미경에 의한 형태

탈지유를 초고속 원심분리하여 얻은 카제인 입자들을 SEM으로 관찰한 형태는 Fig. 3과 같이 나타났다. 5,000×g에서 침전한 카제인 입자들의 성상은 비교적 규칙적으로 회합하고 있었으며(a) 10,000×g에서는 회합되어 있던 카제인 입자들이 넓게 개방되면서 큰 홈을 형성하였다(b). 그리고, 20,000×g에서는 홈은 작아지고 카제인 입자들은 회합되어 있었으며(c), 40,000×g의 경우에는 회합되어 있던 입자들이 약간 개방되면서 표면이 불규칙한 형태를 나타내다가(d),

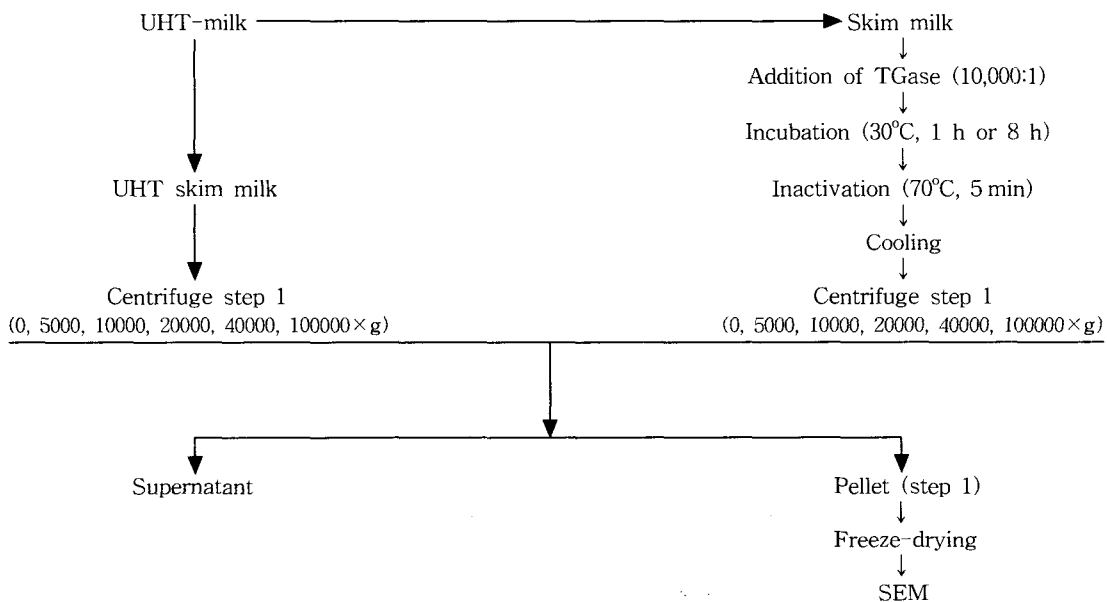


Fig. 1. Flow Chart of UHT skim milk and TGase-treated UHT-skim milk for individual SEM.

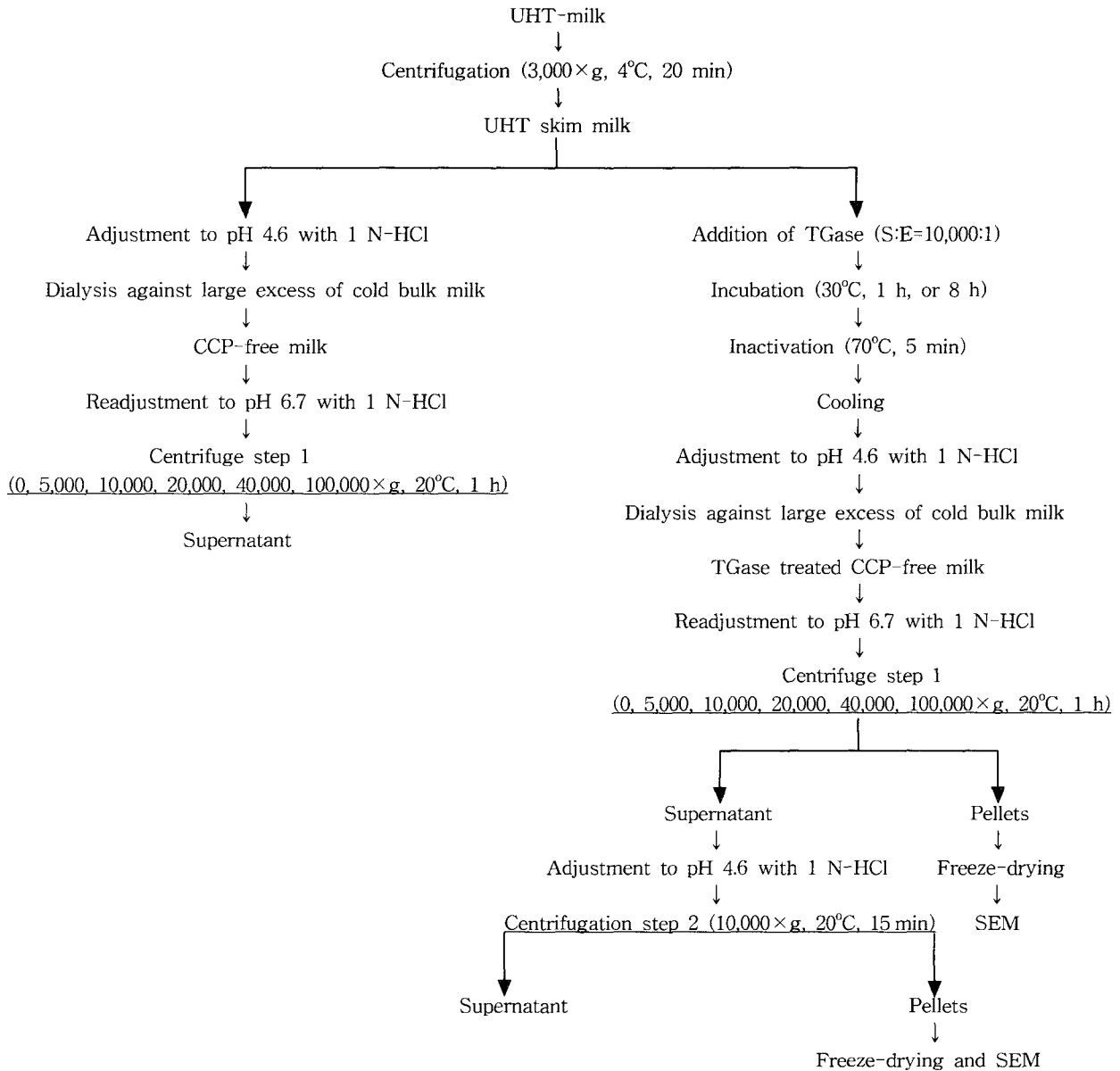


Fig. 2. Flow Chart of CCP-free UHT-milk and TGase-treated CCP-free UHT-milk for individual SEM.

100,000×g에서 다시 카제인 입자 수가 증가하면서 규칙적인 회합층을 형성하였다(e). 원유(raw milk)를 시료로 하여 실험한 결과를 Moon과 Hong(15)이 보고한 탈지유의 형태와 비교하면 UHT 처리한 시료의 경우 더 많은 수의 입자들이 촘촘히 회합되어 있었다. 이런 현상은 우유 단백질 중 카제인 단백질과 유청 단백질이 열처리에 의해 회합되고 원심분리 후의 양상에도 영향을 주는 것으로 추정된다.

탈지유를 TGase로 처리하고 초고속 원심분리한 침전물의 주사전자 현미경에 의한 형태

탈지유를 TGase로 1시간 처리한 경우 : 탈지유를 TGase로 처리하여 1시간 반응시킨 후 초고속 원심분리하여 얻은 침전물의 주사전자 현미경적 성상은 Fig. 4와 같이 나타났

다. 5,000×g에서는 카제인 입자들이 덩어리져서 규칙적으로 회합해 있었다(a). 10,000×g에서는 회합되어 있던 카제인 입자들이 넓어졌으며(b) 원심분리 속도(20,000~40,000×g)의 증가에 따라 카제인 입자들의 크기는 확대되어 회합하였다(c,d). 그리고 100,000×g 속도에서는 다시 미세한 홈이 발생하면서 카제인 입자들의 조직은 다소의 입자가 존재하는 겔의 형태를 나타냈다(e). 원유의 경우 카제인 입자들의 조직은 초고속 원심분리 초기(5,000×g)에 개방되어 있다 가 최고 속도(100,000×g)에서 다시 카제인 입자들이 작게 세분화되어 회합층을 이루고 있음이 보고되었다(15).

탈지유를 TGase로 8시간 처리한 경우 : 탈지유를 TGase로 처리하여 8시간 반응시킨 경우 주사전자 현미경에 의한 성상은 Fig. 5와 같이 나타났. 카제인 입자들이 미세하게

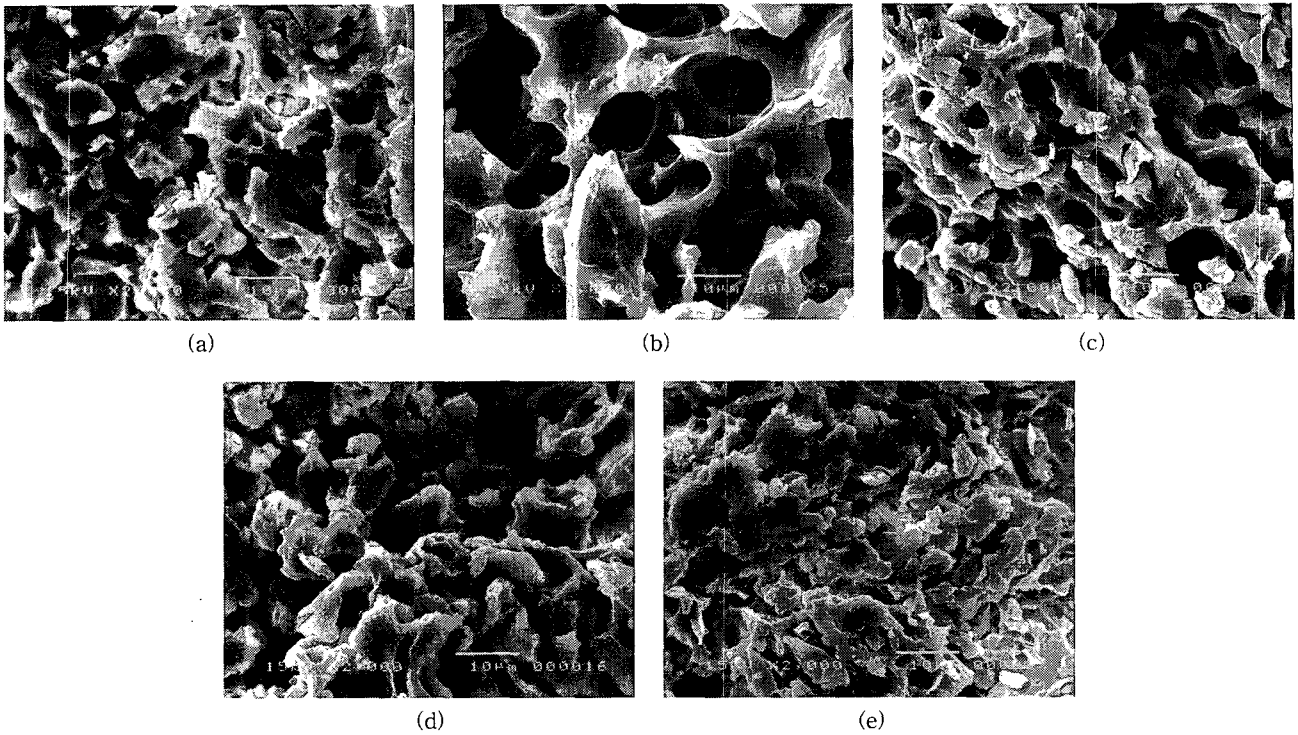


Fig. 3. SEM images of freeze-dried UHT skim milk pellet after step 1 centrifugation to which TGase was not added and incubated. (a): 5,000×g skim milk pellet, (b): 10,000×g skim milk pellet, (c): 20,000×g skim milk pellet, (d): 40,000×g skim milk pellet, (e): 100,000×g skim milk pellet.

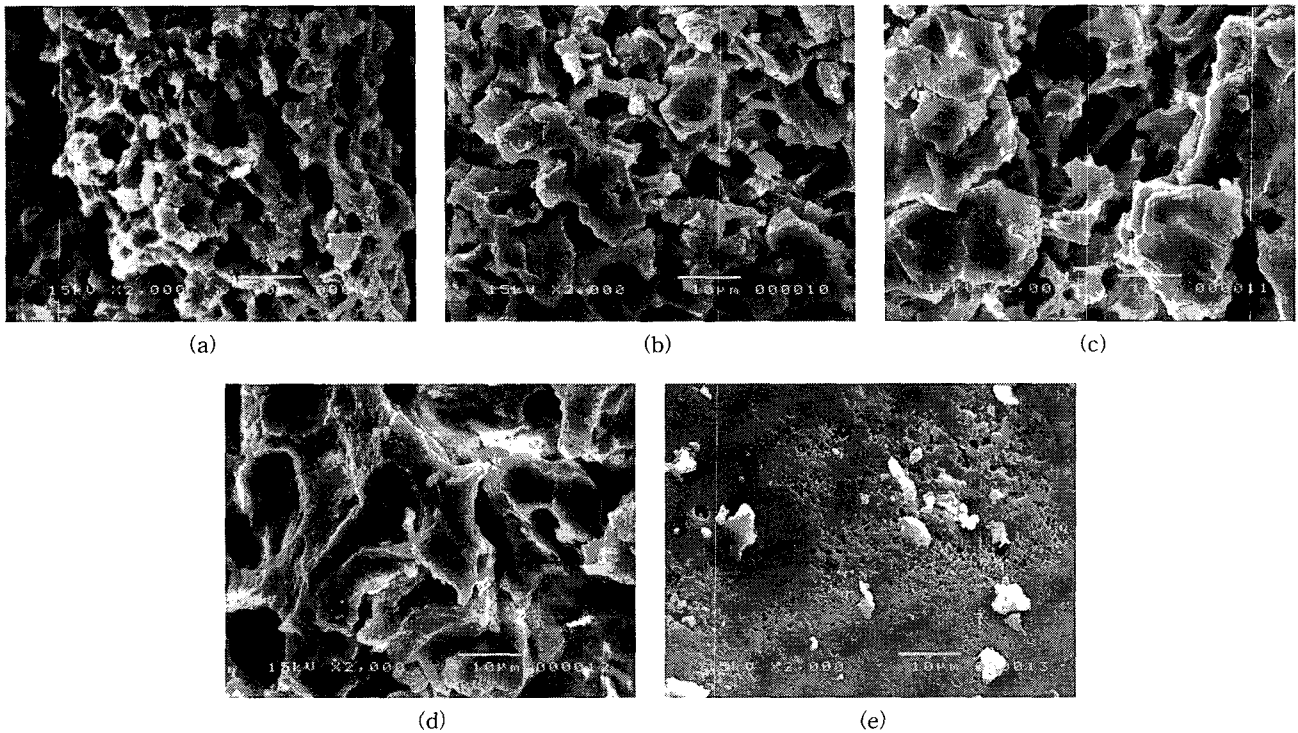


Fig. 4. SEM images of freeze-dried UHT skim milk pellet after step 1 centrifugation to which TGase was added and incubated at 30°C for 1 h. (a): 5,000×g skim milk pellet, (b): 10,000×g skim milk pellet, (c): 20,000×g skim milk pellet, (d): 40,000×g skim milk pellet, (e): 100,000×g skim milk pellet.

회합하여 규칙적인 층을 이루고 있었으며(5,000~10,000×g), 원심분리 속도 증가에 따라 미세했던 카제인 입자들의 조직이 확대되면서 홈을 형성하였다(20,000×g). 40,000×g에서는 다시 입자들이 작게 회합하여 불규칙하게 분산되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(d). 100,000×g 속도에서는 작게 회합해 있던 입자들의 조직이 확대되면서 약간의 홈을 형성하였다(e). 이 결과는 TGase를 첨가하여 1시간 반응시킨 경우보다 더 많은 미세한 입자들이 회합되어 있음을 보여준다. 초고온 살균 우유에서는 비교적 원심분리 속도 증가에 따라 카제인 입자들의 조직이 미세하게 회합되어 규칙적인 층을 형성하고 있는 반면에 Moon과 Hong(15)이 보고한 원유의

경우에서는 카제인 입자들이 회합하여 불규칙적으로 분산되어 있었다.

탈지 CCP-free milk를 TGase로 처리하고 초고속 원심분리한 침전물의 주사전자 현미경에 의한 형태

탈지 CCP-free milk를 TGase로 1시간 처리한 경우: 탈지 CCP-free milk에 TGase를 첨가하여 1시간 반응시킨 경우의 주사 전자 현미경에 의한 성상은 Fig. 6과 같이 나타났다. CCP-free milk에 TGase를 첨가하지 않은 시료에서는 침전물이 발생하지 않았으나 TGase를 첨가한 시료에서는 20,000×g부터 침전물이 발생하였고, 카제인 입자들은 규칙

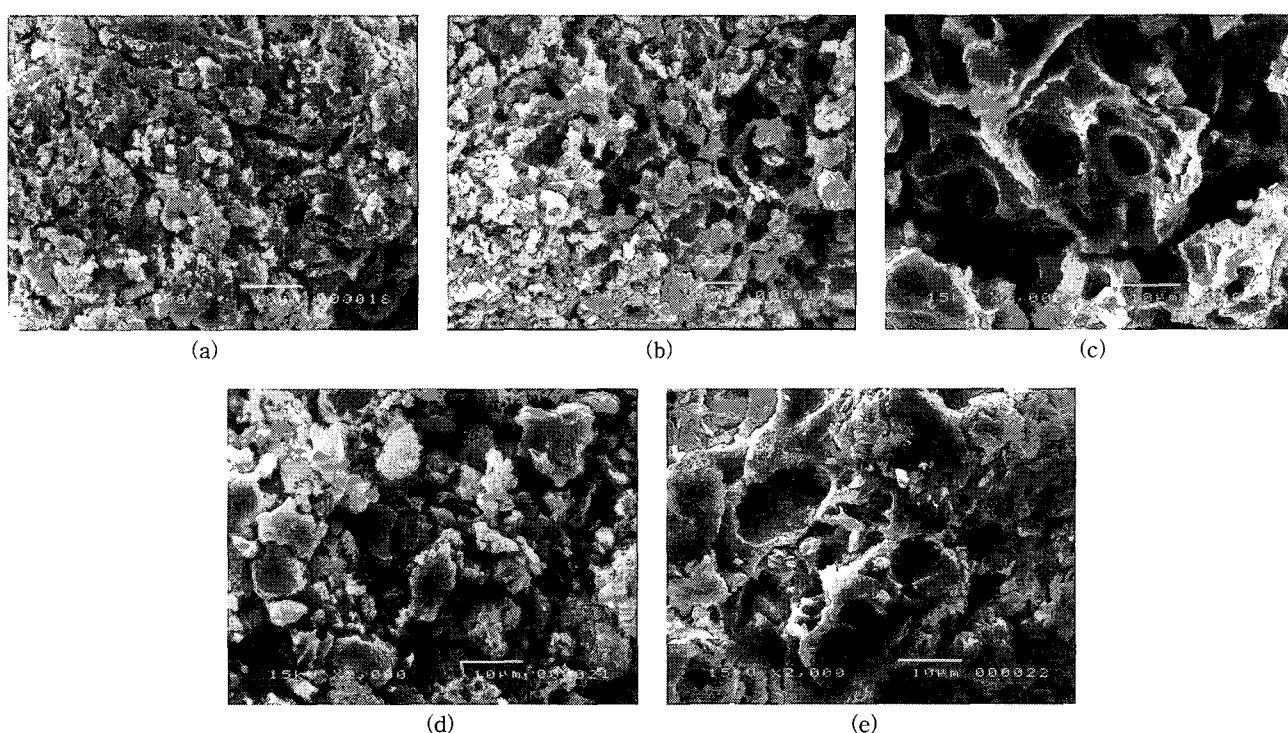


Fig. 5. SEM images of freeze-dried UHT skim milk pellet after step 1 centrifugation to which TGase was added and incubated at 30°C for 8 h.

(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.

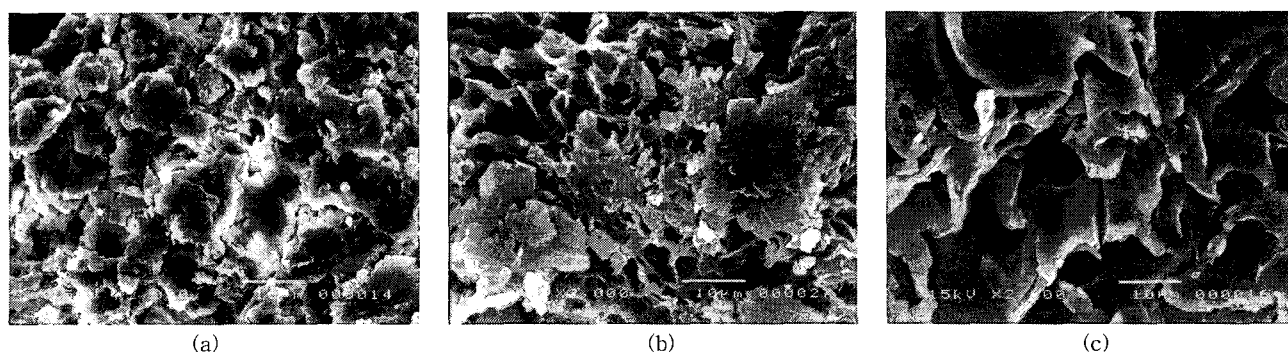


Fig. 6. SEM images of freeze-dried CCP-free UHT skim milk pellet after step 1 centrifugation to which TGase was added and incubated at 30°C for 1 h.

(a): 20,000×g CCP-free milk pellet, (b): 40,000×g CCP-free milk pellet, (c): 100,000×g CCP-free milk pellet.

적으로 회합하여 쌓여 있었으며(a), 40,000×g 원심분리 속도에서 카제인 입자들이 부분적인 회합층은 유지되었다(b). 그러나, 100,000×g에서 카제인 입자들의 조직은 넓어지고 비교적 불규칙한 성상을 보였다(c). 원유의 경우에는 카제인 마이셀이 침전하지 않았다고 보고되었다(15).

탈지 CCP-free milk를 TGase로 8시간 처리한 경우: 탈지 CCP-free milk에 TGase를 첨가하여 반응시킨 후 초고속 원심분리한 침전물의 주사 전자 현미경의 성상은 Fig. 7과 같이 나타났다. 카제인 입자들의 조직은 회합되어 불규칙하게 존재하였으며 초고속 원심분리 속도 증가에 따라 큰 변화 없이 유지되었다(a~e). 이 경우 회합된 입자들은 1시간 반응시켰을 때보다 더 크게 관찰되었다. 이러한 현상은 Moon과 Hong(15)이 보고한 원유의 경우에서도 유사하였다.

탈지 CCP-free milk를 TGase로 처리한 후 pH를 조정하여 2단계 초고속 원심분리하여 얻은 침전물의 주사 전자 현미경에 의한 형태

탈지 CCP-free milk를 TGase로 1시간 처리한 경우: 탈지 CCP-free milk에 TGase를 첨가하여 1시간 반응시킨 후 2단계 초고속 원심분리한 침전물의 주사 전자 현미경에 의한 성상은 Fig. 8과 같다. 1단계 초고속 원심분리한 침전물의 성상과는 달리 밀가루 반죽처럼 카제인 입자들이 회합되

어 있었으며(a) 원심분리 속도 증가에 따라 입자들이 불규칙하게 분산되었다(b) 20,000×g(c)와 40,000×g(d)에서 다시 반죽처럼 회합되었으며 100,000×g에서는 카제인 입자들이 부분적으로 덩어리진 상태로 불규칙하게 분산되어 있었다(e).

탈지 CCP-free milk를 TGase로 8시간 처리한 경우: 탈지 CCP-free milk에 TGase를 첨가하여 8시간 반응시킨 후 산성화(pH 4.6)하여 2단계 초고속 원심분리한 침전물의 주사 전자 현미경적 성상은 Fig. 9와 같이 나타났다. 5,000×g로 원심분리한 시료의 성상은 TGase를 처리해서 30°C에서 1시간 반응시킨 후 5,000×g 속도에서 원심분리하여 침전된 카제인 입자들의 성상(Fig. 6)과 거의 유사한 양상을 나타냈다(a). 10,000×g에서는 카제인 입자들이 작은 알맹이처럼 회합하여 밀집되어 있었다(b). 20,000×g 및 40,000×g에서는 작은 덩어리와 납작한 회합물들이 혼합되어 있었다(c,d). 100,000×g에서는 회합되어 있던 작은 입자들이 불규칙하게 분포하고 큰 덩어리들이 증가하였다(e). 시료를 8시간 반응시키고 원심분리한 경우의 전자현미경적 성상이 1시간 반응시킨 경우보다 입자가 더 미세하여 촘촘하게 존재하는 것으로 나타났다. 이는 우유가 TGase에 의해 반응하는 시간이 길어짐에 따라 현미경적 성상이 달라짐을 시사하는 것이다.

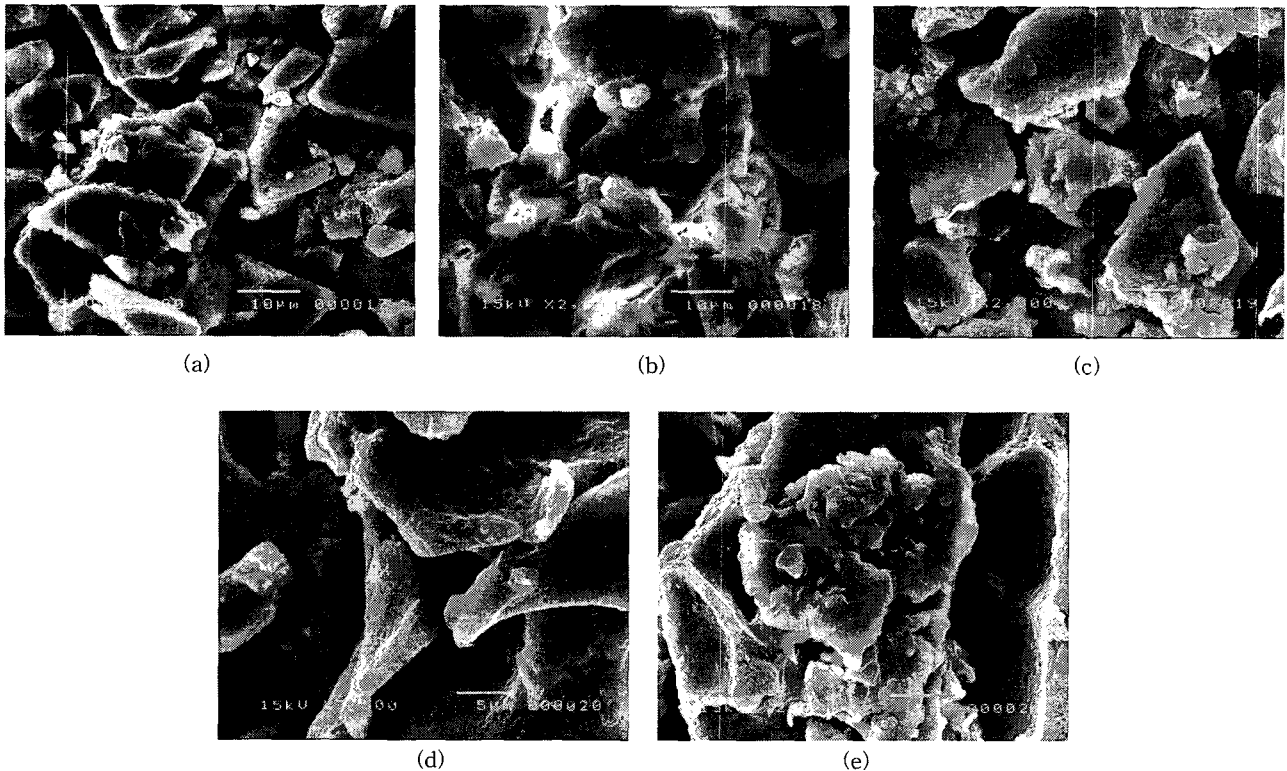


Fig. 7. SEM images of freeze-dried CCP-free UHT skim milk pellet after step 1 centrifugation to which TGase was added and incubated at 30°C for 8 h.

(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.

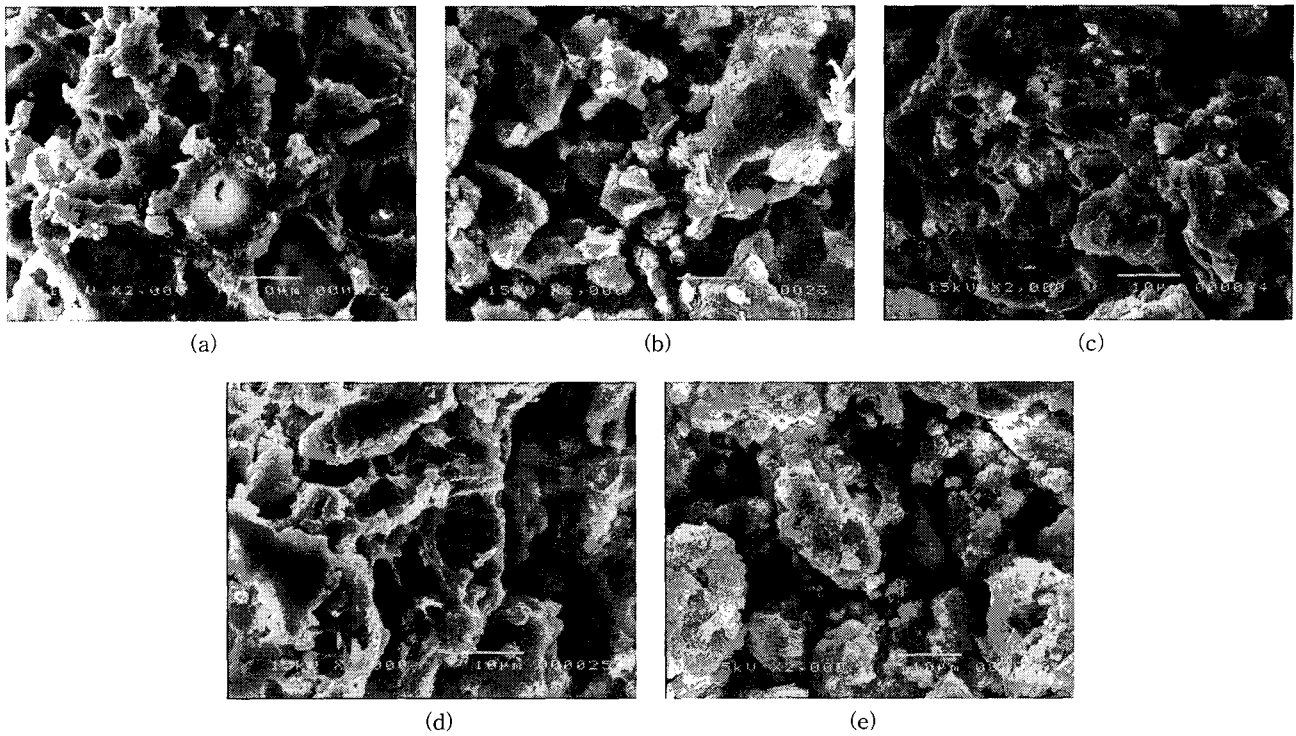


Fig. 8. SEM images of freeze-dried CCP-free UHT skim milk pellet after step 2 centrifugation to which TGase was added and incubated at 30°C for 1 h.

(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.

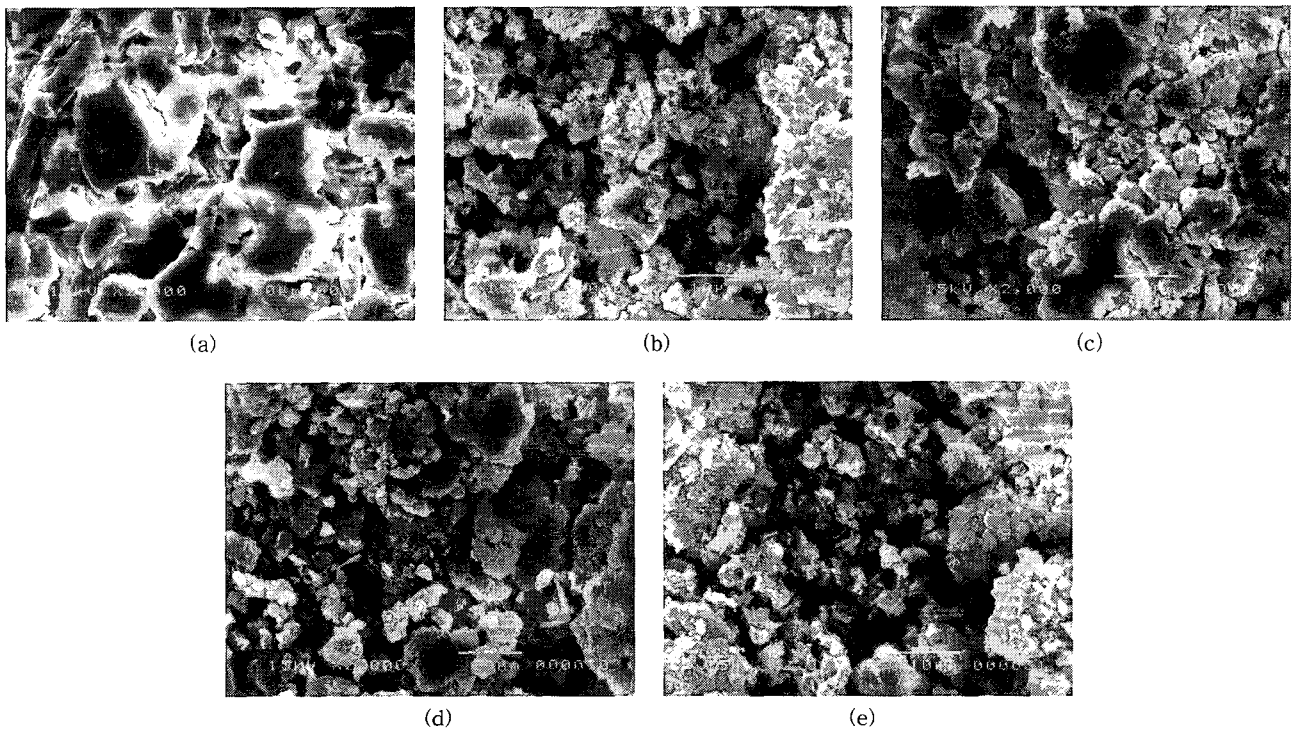


Fig. 9. SEM images of freeze-dried CCP-free UHT skim milk pellet after step 2 centrifugation to which TGase was added and incubated at 30°C for 8 h.

(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.

요 약

문 헌

초고온 살균 우유를 이용하여 탈지유와 콜로이드성 인산칼슘이 제거된 우유에 TGase를 첨가하여 반응시킨 다음 초고속 원심분리를 실시하고 침전된 카제인 입자들을 동결건조하여 조직의 성장에 대해 주사 전자 현미경을 이용해 관찰, 비교하였다. 탈지유는 카제인 입자들이 원심분리 초기(5,000×g)에는 규칙적으로 회합하였으며 원심분리 속도가 증가하면서 홈을 형성하였고(10,000~20,000×g), 40,000×g에서 다시 회합하였다. 그리고, 100,000×g에서는 카제인 입자 수의 증가와 함께 규칙적인 회합층을 이루었다. 탈지유에 TGase를 처리하고 1시간 반응시킨 경우에 카제인 입자들의 성상은 입자들끼리 엉켜져서 회합을 하였으며 초고속 원심분리 속도 증가에 따라 규칙적으로 혹은 불규칙적으로 변형되면서 입자들이 넓어지다가 다시 규칙적으로 카제인 입자들이 회합층을 이루었다. 탈지유에 TGase를 처리하고 8시간 반응시킨 경우 카제인 입자들의 성상은 1시간 반응시킨 경우보다 카제인 입자들이 미세해지면서 규칙적인 층을 형성하였으며, 초고속 원심분리 속도가 증가함에 따라 카제인 입자들의 조직이 홈을 형성하면서 불규칙적으로 회합하여 분산된 형태를 나타내다가 다시 비교적 규칙적으로 회합하였다. 콜로이드성 인산칼슘이 유리된 우유에서는 카제인 입자들이 침전되지 않았다. TGase가 첨가되어 1시간 반응시킨 후 콜로이드성 인산칼슘이 유리된 우유에서는 20,000×g 속도에서부터 카제인 입자들이 침전하였고 그 양상은 작은 낙엽처럼 미세하게 회합층을 형성하였으며, 속도 증가에 따라 카제인 입자들의 조직은 개방되었다. TGase가 첨가된 후 8시간 반응시킨 다음 콜로이드성 인산칼슘이 유리된 시료의 경우 카제인 입자들은 대부분 넓게 회합층을 이루고 불규칙적이었으며 원심분리 속도 증가에 따라 큰 변화가 없었다. TGase가 첨가된 후 1시간 혹은 8시간 반응시킨 다음 콜로이드성 인산칼슘을 제거하고 원심분리한 현탁액(유청 단백질)을 pH 4.6으로 조정 후 2단계 원심분리한 침전물의 경우 카제인 입자들은 1시간 반응시킨 시료에서는 대부분의 카제인 입자들끼리 엉켜져 불규칙적인 회합층을 이루고 있는 반면에 8시간 반응시킨 시료에서는 입자들이 미세한 형태로 분산되어 규칙적인 층을 형성하였다.

감사의 글

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

1. Icekson I, Apelbaum A. 1987. Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol* 84: 972-974.
2. Kuraishi C, Sakamoto J, Soeda T. 1996. The usefulness of transglutaminase for food processing. In *Biotechnology for improved foods and flavors*. ACS Symposium Series 637. American Chemical Society, Washington, DC. p 29-33.
3. Motoki M, Segura K. 1998. Transglutaminase and its uses for food processing. *Trends in Food Sci Technol* 9: 204-210.
4. Schorsch C, Carrie H, Norton IT. 2000. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gels. *Int Dairy J* 10: 529-539.
5. Babiker EE. 2000. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. *Food Chem* 70: 139-145.
6. Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y. 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Rev Int* 17: 221-246.
7. O'sullivan MM, Kelly AL, Fox PF. 2002. Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *J Dairy Res* 69: 433-442.
8. Walsh DJ, Cleary D, McCarthy E, Murphy S, FitzGerald RJ. 2003. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. *Food Res Int* 36: 677-683.
9. Dickinson E, Yamamoto Y. 1996. Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. *J Agric Food Chem* 44: 1371-1377.
10. Faegermand M, Otte J, Qvist KB. 1998. Emulsifying properties of milk proteins crosslinked with microbial transglutaminase. *Int Dairy J* 8: 715-723.
11. Lorenzen PC, Schlimme E, Roos N. 1998. Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. *Nahrung/Food* 42: 151-154.
12. Lorenzen PC, Schlimme E. 1998. Properties and potential fields of application of transglutaminase preparations in dairying. *Bulletin of the IDF* 332. p 47-53.
13. Lauber S, Noack I, Klostermeyer H, Henle T. 2001. Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. *Eur Food Res Technol* 213: 273-276.
14. Lee DS, Matsumoto S, Matsumura Y, Mori T. 2002. Identification of the ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-linking sites in α -lactalbumin polymerized by mammalian and microbial transglutaminases. *J Agric Food Chem* 50: 7412-7419.
15. Moon JH, Hong YH. 2003. Electron microscopical property of transglutaminase added milk. *Korean J Food Sci Ani Resour* 23: 350-355.
16. Flanagan J, FitzGerald RJ. 2003. Functional properties of *Bacillus* proteinase hydrolysates of sodium caseinate incubated with transglutaminase pre- and post-hydrolysis. *Int Dairy J* 13: 135-143.
17. Nonaka M, Tanaka H, Okiyama A, Motoki M, Ando H, Umeda K, Matsuura A. 1989. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem* 53: 2619-2623.
18. Kuraishi C, Sakamoto J, Soeda T. 1999. Process for producing cheese using transglutaminase. *Eur Patent* 0-711-504.

(2004년 4월 20일 접수; 2004년 9월 8일 채택)