

pH 조정후 트랜스글루타미나제로 처리한 탈지 원유의 전자현미경적 특성 - 연구노트 -

문정한 · 홍윤호[†]

전남대학교 식품영양학과 · 생활과학연구소 · 바이오식품연구센터

Electron Microscopical Characteristics of Transglutaminase-treated Raw Skim Milk After pH Adjustment

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

In order to develop novel food products or additives using transglutaminase (TGase), some physicochemical and morphological understandings are needed. Raw skim milk was adjusted to pH 5.5, 7.0, and 8.5, and each was treated with microbial TGase for 0, 1, 2, 4, and 8 hours, for the protein structure observation using scanning electron microscope (SEM). The particles of untreated raw skim milk were small and evenly associated. After adjustment of pH to 5.5 and treatment of TGase for 1-hour, the protein particles aggregated widely in a bigger form than that of control. Under the same condition for 2 hours, the particles associated and clustered. The particles gathered widely and became a number of small spherical forms after 4 hours. After 8 hours, they made larger forms than the result of 1-hour treatment, and the aggregation broadened. Under the pH 7.0 and 8.5 conditions with TGase-treatment, the protein particles fractionated and associated into the bigger masses at 1 hour point, but each piece slowly became smaller and more fractionated until treated time reached 4 hours. After 8 hours, the fragmented protein particles aggregated into larger forms as those on the pH 5.5 condition. In general, the electron microscopical forms of the samples adjusted to pH 5.5 showed smaller than those of pH 7.0 or pH 8.5. It is suggested that the protein particles and textural behavior were influenced by pH, TGase, and reaction time.

Key words: transglutaminase, bovine milk, scanning electron microscope

서 론

트랜스글루타미나제(transglutaminase, TGase, E.C 2.3.1.13)는 단백질들을 교차결합하는 효소로 동물, 식물, 미생물 등 자연계에 널리 분포되어 있다(1). TGase가 단백질 분자들에 작용할 경우, acyl 교환반응, 교차반응, 탈아미노반응 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(3,4). 최근에 요구르트, 크림, 아이스크림, 치즈, 카제인, 유청, 분유 등 유제품에 TGase의 효과에 대한 연구가 다양하게 진행되어 왔다(5-10).

Schorsch 등(11)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 *Streptovorticillium*으로부터 생산된 TGase를 겔형성 시에 첨가한 경우 공유결합적으로 교차결합을 야기한다는 사실을 밝혀냈다. TGase를 원유에 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(7,8). TGase를 유제품에 이용할 경우 원료의 pH에 어느 정도 적합한가를 검토하여 예비혼합(premix)상태로 제조하는 것이 필요하다. 그러나 현재까지 pH 조정 후 TGase를 이용한 유제품의 전자현미경적 성상에 관한 연구보고는 아직 없는 실정이다. 본 연구에서는 원유(raw milk)를 산성, 중성, 알칼리성으로 pH를 조정한 후 TGase를 첨가하여 반응시키고 동결 건조한 다음 SEM으로 형태학적 특성을 관찰, 비교하였다.

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

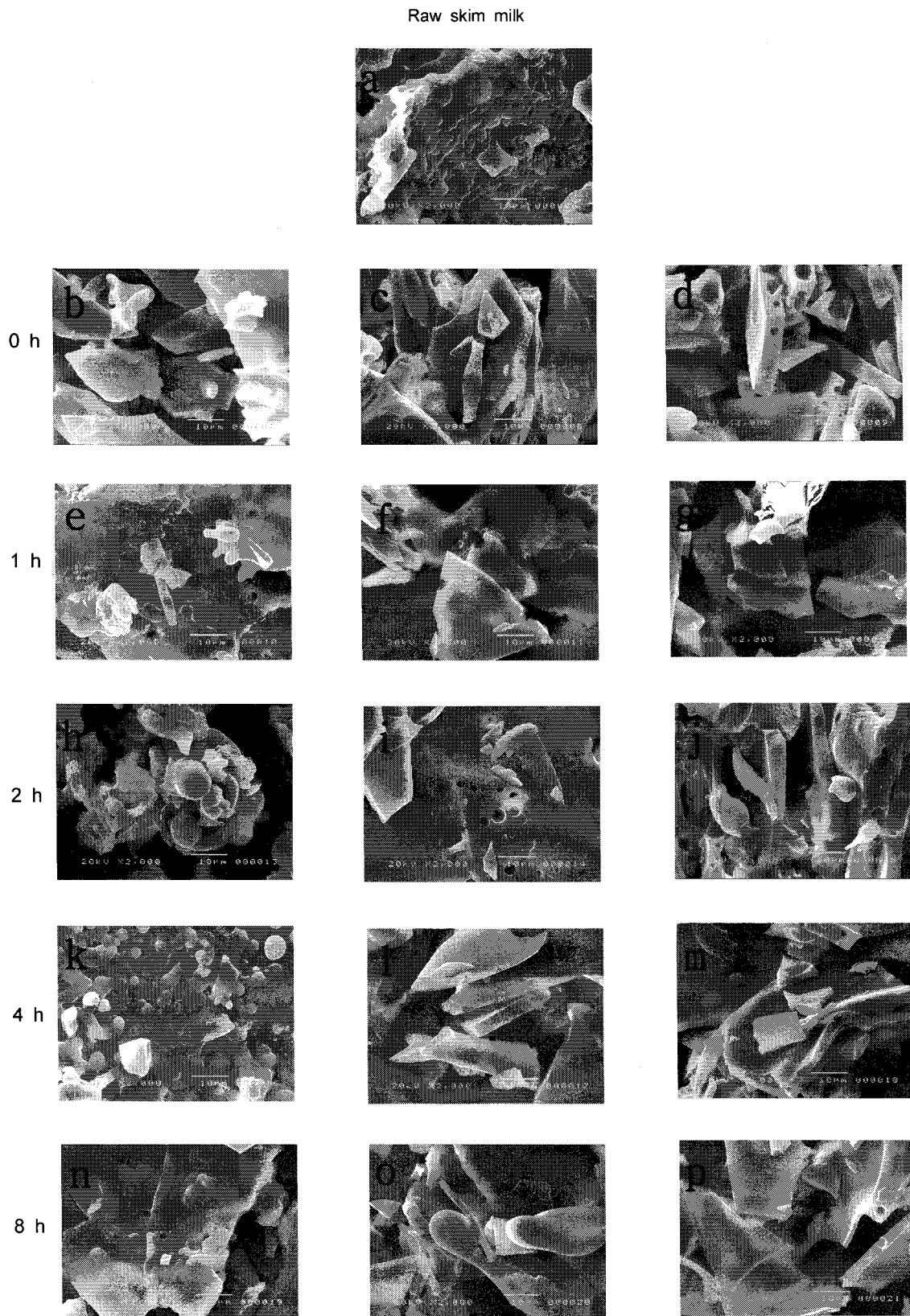


Fig. 1. Scanning electron microscope (SEM) images of freeze-dried raw skim milk pellet to which TGase was added and incubated at 30°C for 0, 1, 2, 4, and 8 hour after adjustment to pH 5.5, 7.0, and 8.5 with 1 N HCl or 1 N NaOH. (a): raw skim milk, (b): pH 5.5, (c): pH 7.0, (d): pH 8.5, (e): pH 5.5, (f): 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.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 TGase는 Ajinomoto사(Tokyo, Japan)로부터 기증을 받았으며, 원유는 매일유업(주) 광주공장에서 지원을 받아 사용하였다. 기타 실험용 시약들은 Sigma사(St. Louis, USA) 및 동양제철화학(서울, 한국)에서 화학실험용 특급을 구입하여 사용하였다.

시료제조

탈지유는 신선한 원유를 4°C에서 5,000×g로 20분간 원심분리한 다음 지방을 제거하고 잔여 지방을 분리하기 위해 Toyo Filter 2번(Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 여과하였다. 여과된 탈지유는 1 N HCl 또는 1 N 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°C에서 각각 0, 1, 2, 4, 8시간 반응시키고 불활성화(70°C, 5 min)한 다음 2°C까지 냉각시켰다. 동결건조는 시료를 -70°C에서 동결한 다음 동결건조기(freeze dryer, FD, FD-5505, Il Sin Engineering Co., Seoul, Korea)를 이용하여 5시간 이상을 동결 건조시킨 후 유리병을 사용하여 분말로 제조하였다.

전자현미경 관찰

원유의 카제인 입자들과 유청 단백질 입자의 전자현미경적 관찰은 분말로 만든 각각의 시료들을 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 15 kV, phototimes 85초, 2,000배의 배율로 조직의 특성을 관찰하였다.

결과 및 고찰

탈지유와 pH 조정후 TGase를 처리한 시료의 주사 전자현미경에 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 있음이 관찰되었다. pH를 조정한 다음 TGase를 첨가한 후 동결건조한 시료의 경우 pH 5.5에서는 단백질 입자들이 크게 조각 형태를 유지하였으며(Fig. 1b) pH 7.0에서는 pH 5.5에서 보다 더 큰 단백질 입자들이 형성되었다(Fig. 1c). pH 8.5로 조정한 시료에서는 단백질 입자가 pH 7.0과 큰 차이가 없었다(Fig. 1d). TGase를 처리하고 1시간 반응시킨 후 동결건조한 경우 pH 5.5 시료(Fig. 1e)는 단백질 입자들이 비교적 작은 회합체 성상을 하고 있는 반면에, pH 7.0과 8.5 시료는 단백질 입자들이 넓은 판의 형태를 하고 있음을 관찰

하였다(Fig. 1f, g). pH 조정 후 TGase와 2시간 반응시킨 시료는 pH 5.5에서 단백질 입자들은 비교적 규칙적으로 둥글게 회합하고 있었으며(Fig. 1h), pH 7.0에서는 단백질 입자들이 넓게 회합되어 있었고 중앙에는 작은 홈을 형성하였다(Fig. 1i). pH 8.5에서는 단백질 입자들이 크게 회합되었다(Fig. 1j). pH 조정 후 TGase를 4시간 반응시킨 시료의 경우 pH 5.5에서는 단백질 입자들의 성상이 콩과 같은 비교적 균일한 성상을 이루었으며(Fig. 1k), pH 7.0에서는 단백질들이 넓은 조각으로 분리되면서 회합하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1l). pH 8.5에서는 pH 7.0에서보다 더 큰 단백질 판형 조각 모양의 회합체를 형성하고 있었다(Fig. 1m). pH 조정 후 TGase를 처리하여 8시간 반응시킨 후 동결 건조한 시료의 경우 pH 5.5에서는 단백질 입자들이 아주 넓은 판에 응집되어 회합체를 이루고 있었다(Fig. 1n). 이 성상은 원유의 탈지유 성상과는 크게 대조적임을 알 수 있었다(Fig. 1a). pH 7.0에서는 단백질 입자들이 나뭇잎 성상으로 회합되고 있었다(Fig. 1o). pH 6.7인 탈지 원유에 TGase를 첨가하고 8시간 반응시킨 후 전자현미경으로 관찰한 시료에서도 이와 유사한 성상이 관찰되었다(7). pH 8.5에서는 다시 단백질 입자들이 넓게 퍼지면서 넓적한 조각 회합체의 성상을 하고 있었다(Fig. 1p). 원유를 산성, 중성, 알칼리성으로 pH를 조정한 다음 TGase를 첨가하여 SEM을 측정할 결과 중성과 알칼리성보다 산성 조건이 우유 단백질들의 등전점에 근접하게 되어 TGase에 의한 교차결합을 촉매함으로써 카제인과 유청 단백질의 상호 결합을 더 증가시킨 것으로 추정된다. 따라서 pH 5.5에서의 현미경적 입자 형태가 pH 7.0 또는 pH 8.5의 경우보다 작게 나타났다. 우유 단백질의 전자현미경적 형태는 pH의 차이가 클수록 현저하며 동결건조 또는 초고온 살균 등 열처리 방법에 의해서도 입자의 크기와 응집 특성에도 영향을 받을 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

원유에서 지방을 제거한 탈지유의 pH를 5.5, 7.0, 8.5로 조정한 다음 TGase를 첨가하여 0, 1, 2, 4, 8시간 반응시킨 후 동결 건조하여 조직의 성상을 주사 전자 현미경을 이용해 관찰, 비교하였다. pH와 TGase를 처리하지 않은 탈지유는 단백질 입자들이 규칙적으로 회합해 있었다. pH 조정 후 TGase를 처리한 다음 반응시간을 달리한 시료에서는 pH를 5.5로 조정한 경우 현저한 변화가 있었는데, 그 변화 양상은 단백질 입자들이 0시간에서 조각을 이루어 회합되어 있다가 1시간 반응시킨 경우 단백질 입자들이 서로 결합하여 넓게 회합하였다. 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. 전반적으로 현미경적 입자의 형태는 pH 5.5로 조정된 시료가 pH 7.0 또는 pH 8.5로 처리된 시료들보다 더 작게 관찰되었다. 이와 같은 단백질들의 현미경적 변화 양상은 pH, TGase처리 그리고 반응시간에 따라 영향을 받고 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

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

문헌

1. Ickson 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 29-38.
3. O'sullivan M M, Kelly AL, Fox PF. 2002. Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *J Dairy Res* 69: 433-442.
4. 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.
5. Lauber S, Noack I, Klostermeyer H, Henle T. 2001. Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. *Eur Food Res Technol* 213: 273-276.
6. 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.
7. Moon JH, Hong YH. 2003. Electron microscopical property of transglutaminase added milk. *Korean J Food Sci Ani Resour* 23: 350-355.
8. Moon JH, Hong YH. 2004. Electron microscopical observation of transglutaminase-treated ultra high temperature milk sediment. *Korean J Food Sci Ani Resour* 33: 1359-1366.
9. 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.
10. Jeong JE, Hong YH. 2005. Electrophoretic properties of transglutaminase treated milk product powders. *Korean J Food Sci Technol* 37: 345-351.
11. 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.

(2005년 8월 6일 접수; 2005년 11월 21일 채택)