

Transglutaminase를 처리한 분말 유제품의 전기영동적 특성

정지은 · 홍윤호*

전남대학교 식품영양학과 · 생활과학연구소 · 바이오식품연구센터

Electrophoretical Properties of Transglutaminase Treated Milk Product Powders

Ji-Eun Jeong and Youn-Ho Hong*

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

Abstract This study was performed to understand the behavior of protein mobility and intensity of enzymatic hydrolysis according to crosslinking of sodium caseinate, whey protein isolate, skim milk and whole milk powders with or without transglutaminase (TGase, w/w = 200 : 1) at 38°C. Whey protein was limited to crosslinking and skim milk was relatively more increased in high molecular polymer than whole milk. The degree of crosslinking decreased in the order of sodium caseinate > skim milk > whole milk > whey protein isolate. The SDS-PAGE results indicated that main bands of TGase treated samples had a high mobility and formed bands of molecular weights below 15 kDa by hydrolysis with pepsin after 10 min of reaction time. However, β -lactoglobulin showed remarkable stability against pepsin hydrolysis treated with and without TGase. The high molecular polymers were easily hydrolyzed with digestive enzymes *in vitro* experiment. These results suggested that novel dairy products using TGase would have no special digestive problem in human body.

Key words: transglutaminase, SDS-PAGE, proteins mobility, pepsin hydrolysis

서 론

*Streptovorticillium mobaransae*의 변종으로부터 유래된 Transglutaminase(TGase: EC 2.3.2.1.3)는 glutaminyl 잔기의 γ -carboxamide group과 다양한 1차 아민 사이에 acyl transfer 반응을 촉매한다(1). 반응계에 아민이 존재하지 않으면 glutaminyl 잔기의 γ -carboxamide group의 가수분해를 촉매한다. Lysyl 잔기의 ϵ -amino group이 기질로 사용될 때 peptide chain은 ϵ -(γ -glutamyl)lysine 결합을 통해 이루어진다(2). 또한 이 효소는 우유 단백질을 포함하는 많은 식품 단백질의 교차결합을 촉매하며 아민결합 및 탈 아미노반응을 통하여 단백질의 열안정성, 응고력, 유화력, 물성, 겔 형성, 수화작용, 용해성 등과 같은 기능적 특성을 변화시킬 수 있다고 보고되었다(3,4). TGase는 적은 비용으로 대량생산이 가능하고, 최적 pH는 5-8이며, 등전점은 8.0 정도이고 활성을 위한 최적온도는 50°C 그리고 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통해 평균 분자량은 40,000 Da로 확인되었다(5). TGase는 육류, 생선, 밀가루, 우유 등을 원료로 하는 식품에 첨가되어 이화학적 및 기능적 특성들을 향상시키는데 활용되어 왔다(4,5). 유제품의 경우 요구르트, 크림, 아이스크림, 치즈 등에 TGase를 첨가하여 제품화를 시도한 연구들이 보고되

었다(4,6-8). TGase를 요구르트의 제조 시 첨가할 경우 응고성 및 점도가 증가되었고 함수능력이 향상되어 이장현상이 감소되었으며, 아이스크림에 사용하면 조직이 부드러워졌고 품질이 개선되었다(4).

본 저자들은 TGase가 첨가된 분말 유제품을 개발하여 식품제조에 활용 가능성을 알아보고자 선행연구에서 분말 유제품에 이 효소를 첨가하여 식품 첨가물로서의 제품화를 시도하였으며 도출된 이화학적 및 기능적 특성들에 관하여 보고하였다(9). TGase를 첨가한 분말 유제품들이 인체내에서 분비되는 소화효소에 의해 분해되는 정도 및 양상에 관해서 거의 보고되어 있지 않은 실정이다.

본 연구에서는 TGase를 카제인 나트륨(Na-casinate), 유청 단백질 분리물(whey protein isolate, WPI), 탈지분유(skimmed milk powder, SMP) 그리고 전지분유(whole milk powder, WMP)에 첨가한 후 단백질의 교차결합 등의 반응 가능성을 점검하고 식품 첨가제로 사용 시 인체 내에서 소화 흡수 과정 중 문제점들은 없는지 확인하기 위하여 단백질 가수분해 효소인 pepsin을 반응시켜 전기영동적 이동 및 분해 양상을 비교하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 TGase는 Ajinomoto사(Tokyo, Japan)로부터 기증받은 Ca^{2+} 에 비의존적인 microbial transglutaminase이었으며 pepsin은 Sigma사(St. Louis, USA)에서 돼지 위의 점액으로부터 추출한 것으로 구입하였는데 효소 비활성은 2,950 units/mg protein 이었다. 유청 단백질 분리물은 Armor Proteines S.A.S사(St Brice

*Corresponding author: Youn-Ho Hong, Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, 300, Yongbong-dong, Buk-gu, Gwangju, Korea

Tel: 82-62-530-1333

Fax: 82-62-530-1339

E-mail: yhhong@chonnam.ac.kr

Received September 14, 2005; accepted February 6, 2006

en Cogles, France)로부터 구입하였으며 카제인 나트륨은 삼익유 가공(서울, 한국) 그리고 탈지분유와 전지분유는 서울우유(서울, 한국)에서 제조한 것들을 구입하여 사용하였다.

전기영동 시약들은 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였고 표준 분자량 marker는 BioRad사(Hercules, USA)에서 구입하였으며 기타 시약들은 화학실험실용 특급을 사용하였다.

실험방법

시료의 조제 및 TGase가 처리된 분말의 제조

카제인 나트륨, 유청 단백질 분리물, 탈지분유 그리고 전지분유를 증류수에 넣고(15%, w/v) 1 N HCl 또는 1 N NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 조정된 후 충분히 용해시켜 38°C 항온수조에서 10분간 정치한 다음 200:1(w/w) 비율로 TGase(1000 unit/g)를 첨가하였다. 이 시료들을 30분간 교반하였으며 2시간의 반응 후 85°C에서 5분간 가열하여 TGase를 불활성화 시켰다. 유청 단백질 분리물의 경우에는 70°C에서 5분 동안 가열한 후 투석하였다. 그 후 시료들을 동결 건조하여 분쇄하였다.

단백질 이동 분석

각각의 TGase가 처리된 분말의 단백질 분자량을 조사하고 특히 단백질 이동을 추적하기 위하여 Laemmli의 방법(10)에 따라 12% separating gel과 4% stacking gel을 사용하였다. 시료는 sample buffer에 단백질 함량이 5 µg이 되도록 넣고 5분간 끓인 후 사용하였다. 전기영동은 0.1% SDS를 함유한 Tris-glycine buffer (pH 6.8)에서 20 mA의 전류를 사용하여 1시간 동안 실온에서 전개하였다. 전기영동 후 전개된 gel은 0.2% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 distilled water:methanol:acetic acid의 혼합비가 6:3:1(v/v/v)이 되도록 섞은 혼합액으로 탈색하였다.

효소적 가수분해물의 단백질 이동 양상 추적

TGase 무첨가군과 첨가군에 증류수를 가하여(15%, w/v) 교반하면서 3 N HCl을 이용하여 pH 2.0으로 조정하였다. 시료에 단백질 가수분해 효소인 pepsin을 200:1 비율(w/w)로 첨가한 다음 38°C 항온수조에 0, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300분 동안 반응시킨 후 85°C에서 5분간 가열하여 pepsin을 불활성화시켰으며 단백질 분해 정도를 비교, 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 실시하였다. 이때 gel은 15% polyacrylamide를 사용하였다.

결과 및 고찰

단백질 이동

우유 단백질 및 우유 분말 제품에 TGase 무첨가군과 첨가군의 단백질 변화 양상과 분자량 비교 결과는 Fig. 1과 같다. 단백질 분획들의 정확한 양은 측정하지 않았지만 TGase를 처리하여 2시간 동안 반응시킨 후 모든 시료에서 거대분자 응집물이 형성되었으며, well 및 stacking gel에 정제되어 이동이 어려운 것으로 보였고 각각의 단백질 분획들이 다소 감소하였음을 관찰할 수 있었다. 카제인 나트륨의 경우 TGase를 첨가함으로써 α_1 -, α_2 -, β -, κ -casein이 감소되었고 고분자량의 중합체는 증가되었다. 이에 대하여 Sharma 등(11)은 α_1 - 및 β -casein의 유연성, random-coil 구조 그리고 S-S 결합을 하지 않음 등으로 가교결합이 용이하다고 주장하였다. 유청 단백질 분리물의 TGase 첨가군에서 α -lactalbumin (α -La)만 다소 감소된 현상에 관하여 Aboumahmoud와 Savello(12)

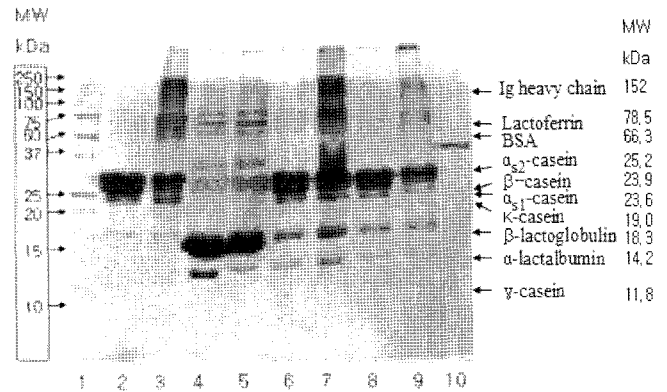


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of milk proteins and milk power products with (+) and without (-) TGase treatment. Lane 1: molecular weight standard, 2: Na-caseinate-, 3: Na-caseinate+, 4: WPI-, 5: WPI+, 6: SMP-, 7: SMP+, 8: WMP-, 9: WMP+, 10: TGase.

는 본래 유청 단백질의 구형구조 때문에 가교결합이 제한적이었다고 보고하였다. 탈지분유와 전지분유 역시 고분자 중합체를 형성하였으며 전지분유의 경우 높은 농도의 지방이 TGase작용에 영향을 끼쳐 탈지분유보다 더 낮은 가교결합 정도를 나타낸 것으로 추정된다.

카제인 및 유청 단백질에 TGase 무첨가군과 첨가군의 가수분해 후 단백질 이동 양상

카제인 및 유청 단백질에 TGase를 첨가하지 않은 군과 첨가한 군에 단백질 가수분해효소인 pepsin을 처리하여 가수분해한 후 변화 양상을 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다. TGase를 첨가하지 않은 각각의 시료(15%, w/v)에 pepsin을 처리하고 즉시 불활성화시킨 경우(lane 3) 불활성화 온도까지 도달하는 수초 동안에 이미 효소가 작용하여 세분화된 펩타이드를 형성하였다. 카제인 나트륨의 경우 빠른 가수분해로 α_1 -, α_2 -, β -, κ -casein 등이 반응 10분 후 20 kDa 이하의 분자량을 가진 펩타이드로 분해되었으며(A) 이러한 결과는 Chobert 등(13)이 보고한 카제인 나트륨에 trypsin을 첨가하여 가수분해 정도를 실험한 결과와 유사하였다. 또한 반응 시간이 점차 길어짐에 따라 15 kDa 이상의 펩타이드들은 소실되었고 그 이하의 분자량을 가진 펩타이드는 증가되는 것으로 나타났다(5,13). 첨가군 역시 반응 10분 내외에서 25 kDa 이하의 펩타이드로 분해되었고 그 후 반응시간이 증가함에 따라 대부분 소실되었다(B). 이런 양상은 동일한 시료의 단백질 분해 정도를 분광광도계로 측정된 결과에서도 확인되었다(9). 유청 단백질의 대부분을 차지하는 β -lactoglobulin(β -Lg)은 pepsin을 처리한 후 반응시간이 4시간까지 경과하여도 거의 분해되지 않았다. 이러한 현상은 자연 상태에서 β -Lg이 구조적으로 소수성 및 방향성 아미노산들이 β -barrel의 내부에 잘 묻혀 있어서 강한 소수성 중심을 형성함으로써 펩신에 의해서 잘 분해되지 않는 저항성을 보인다고 보고되었는데(14-16), 본 실험 결과도 이와 유사한 것으로 사료되었다. 우유의 β -Lg은 낮은 pH 2.0에서도 잘 변성되지 않으며 pepsin에 의해서는 최적 pH 2.5에서 가수분해된다고 알려져 있다(17). 또한 유청 단백질의 분리물 제조 과정에서 β -Lg은 pepsin에 대한 저항성이 감소되지 않은 것으로 사료된다. El-Zahar 등(18)은 양유에 펩신을 처리하여 반응시킨 후 2-4시간 경과한 경우에 소수성 가수분해물이 친수성 가수분해물 보다 더 많이 생성되었는데, 이는 구형 단백질의 중심 가까이 존재하던 숨겨진 소수성 부위가 먼저 노출되기 때문이라고 추정하였다. α -La의 경

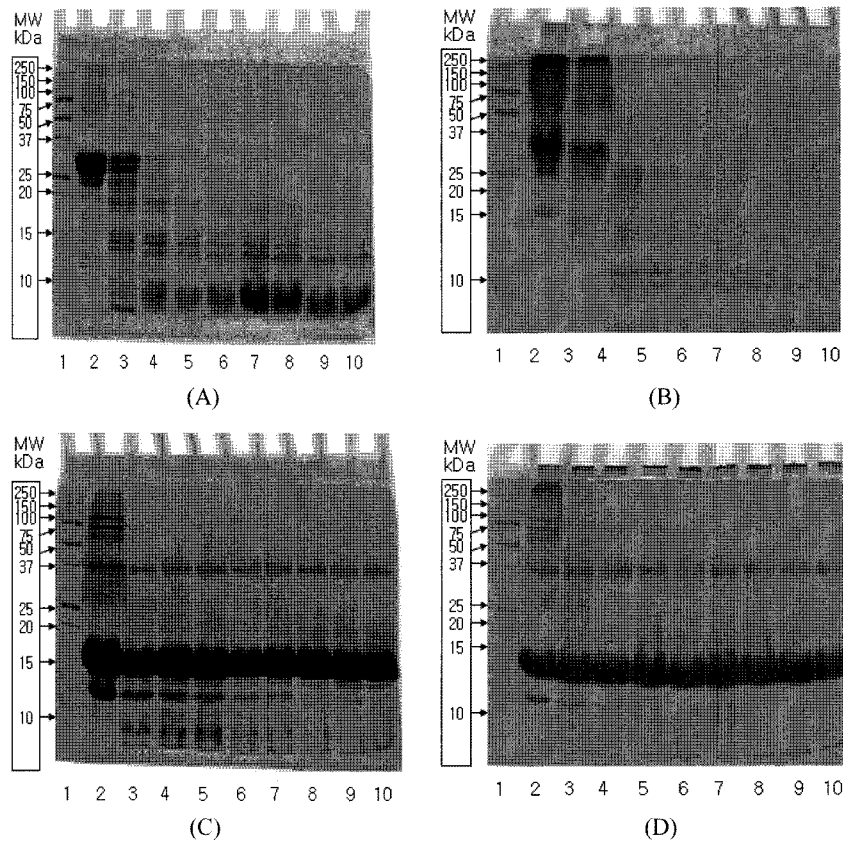


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of pepsin hydrolyzates of Na-caseinate without TGase (a) Na-caseinate with TGase (b), WPI without TGase (c), and WPI with TGase (d). Lane 1: molecular weight standard, 2: native sample, 3-10: 0, 10, 20, 40, 60, 120, 180, and 240 min reaction products, respectively.

우 효소반응 10분 후 상당히 감소되었다가 1시간 이후 펩타이드 소실이 관찰되었다. α -La이 pepsin에 의해 용이하게 분해된다는 실험 결과는 Pelligrini 등(19)에 의해서 보고되었다. 다른 연구자들은 β -Lg이 pepsin에 의해 거의 가수분해되지 않는 반면, α -La는 pepsin 처리 후 30분 이내에 작은 펩타이드들로 완전히 분해되었다고 주장하였다(20,21). Immunoglobulin(Ig), bovine serum albumin(BSA), lactoferrin 등은 초기반응 시 분해되었다(C). 이와 같은 현상에 대하여 Aboumahmoud와 Savello(12)는 유청 단백질의 독특한 구형의 구조에 기인할 수 있으며, 독특한 3차 구조를 가지면서 소수성 부위의 대부분은 구조내부에 존재하기 때문에 유청 단백질은 상호작용하지 않는다고 보고했다. 유청 단백질의 경우 TGase 무첨가군과 유사한 양상으로 β -Lg의 pepsin에 의한 효소적 가수분해는 반응시간 동안 거의 관찰되지 않았는데, 이것은 β -Lg의 구조적인 특성으로 인한 저항성이 TGase 첨가에 의해 변화되지 않은 것으로 생각된다. 한편, α -La의 경우 효소반응 10분 후 상당히 감소되었다가 1시간 이후 펩타이드 소실이 관찰되었다(D). 일반적으로 동일한 시료에서는 TGase를 첨가하여 반응시키고 pepsin으로 처리한 경우가 TGase를 첨가하지 않은 경우보다 가수분해가 더 잘 일어난 것으로 나타났다(A-D).

탈지분유 및 전지분유에 TGase 무첨가군과 첨가군의 가수분해 후 단백질 이동 양상

탈지분유와 전지분유의 TGase 무첨가군, 첨가군이 단백질 가수분해효소인 pepsin을 처리하여 가수분해한 후 변화 양상을 나타낸 결과는 Fig. 3과 같다. TGase를 첨가하지 않고 pepsin처리한 경우, 탈지분유의 초기반응 10분 동안 α ₁-, α ₂-, β -, κ -casein의

대부분이 현저하게 감소하였고, 40분 후 탈지분유의 상당량이 12 kDa 이하의 분자량으로 분해되었으며 반응시간이 더 증가함에 따라 10 kDa 이하의 펩타이드만 소량 잔존하였다(A). 또한 TGase를 첨가하고 pepsin을 처리한 20 kDa 범위의 펩타이드가 급격히 소실되었으며 10-15 kDa 범위의 펩타이드는 초기 반응 시 크게 감소되었고 반응시간이 길어짐에 따라 점차 감소하였다(B). 전지분유의 경우 단백질 분해효소 작용 후 소량의 α ₁- 및 α ₂-casein이 남아있었으며 1시간 후 분해되었다(C). 각각의 반응시간에 따른 10 kDa 이상의 펩타이드가 탈지분유보다 더 많이 존재함이 관찰됨에 따라 상대적으로 지방 함량이 높은 전지분유가 단백질 분해 효소인 pepsin의 작용에 덜 민감한 것으로 사료된다. 또한 전지분유의 경우 탈지분유와 유사한 양상이 확인되었으며 15 kDa 범위의 펩타이드는 반응시간이 길어짐에 따라 가수분해 정도가 서서히 증가하였다(D). 유사한 경향이 동일한 시료의 단백질 분해 정도를 분광광도계로 측정한 결과에서도 확인되었다(9).

TGase를 첨가하지 않은 시료와 첨가한 시료들은 pepsin과 반응시켰을 경우 10분이 경과하면 우유 단백질 성분들과 고분자 중합체들이 대부분 분해되어 저분자 펩타이드가 생성되었다. 이 결과로부터 유제품에 TGase를 첨가하여 교차결합이 형성되더라도 단백질 분해효소에 의해 정상적으로 분해되는 것이 확인되었으므로 새로운 유제품의 개발 및 이용에 참고가 될 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 시판되고 있는 카제인 나트륨, 유청 단백질 분리물, 탈지분유 및 전지분유에 TGase를 첨가하여 단백질 이동특

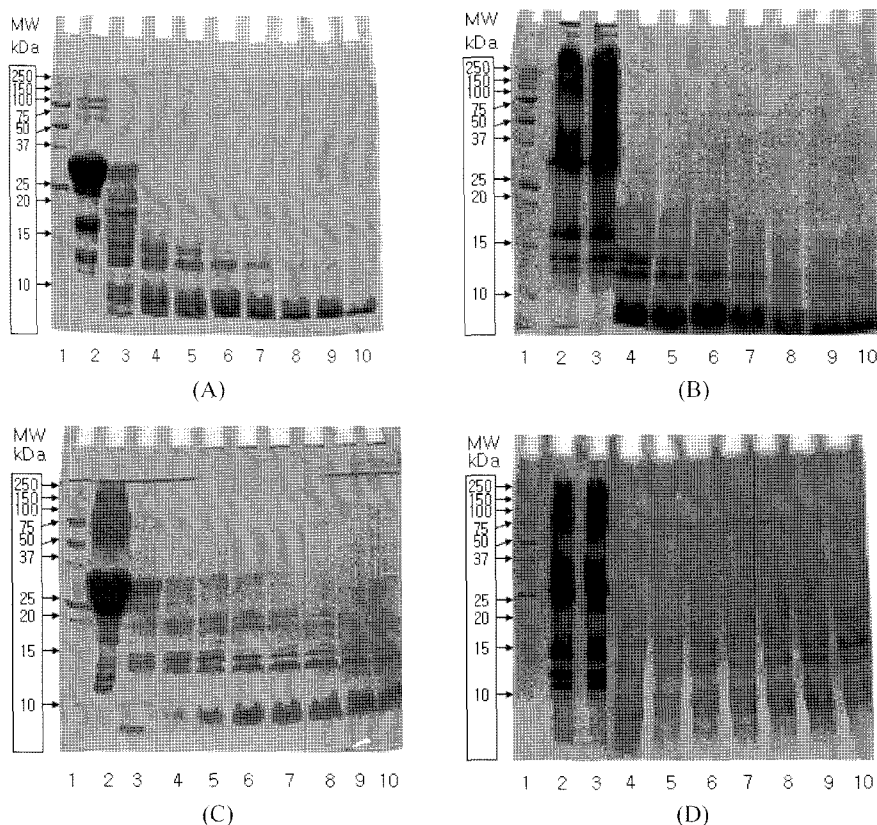


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of pepsin hydrolyzates of SMP without TGase (a), SMP with TGase (b), WMP without TGase (c) and WMP with TGase (d). Lane 1: molecular weight standard, 2: native sample, 3-10: 0, 10, 20, 40, 60, 120, 180, and 240 min reaction products, respectively.

성 및 pepsin에 의한 가수분해 정도를 조사하였다. 우유 단백질과 분말 제품들을 TGase로 2시간 동안 반응시킨 후 전기영동을 실시한 결과 모든 시료에서 고분자량의 중합체를 형성하였으며 가교결합 정도는 카제인 나트륨 > 탈지분유 > 전지분유 > 유청 단백질 분리물 순으로 감소하는 양상을 보였다. 인체 내 소화효소인 pepsin에 의하여 가수분해된 카제인 나트륨은 10 kDa 이하의 펩타이드로 분해됐고, 유청 단백질은 분해 전, 후 양상이 유사하였다. 유청 단백질 중 β -Lg는 pepsin에 의해 거의 분해되지 않고 저항성을 보였다. 탈지분유, 전지분유 역시 더 낮은 분자량의 펩타이드가 관찰되었는 바, *in vitro* 상에서의 TGase작용으로 인한 교차결합은 소화효소에 의한 가수분해가 용이함을 확인하였다. 이 결과는 TGase를 첨가하여 새로운 유제품을 개발, 이용하는데 인체내에서의 소화에 거의 문제가 없을 것임을 시사하는 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

문헌

- Motoki M, Nio N. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. *J. Food Sci.* 48: 561-566 (1983)
- Nonaka M, Matsumura Y, Motoki M. Incorporation of lysine and lysine dipeptides into α_1 -casein by Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 131-133 (1996)
- Ikura K, Sasaki R, Motoki M. Use of transglutaminase in quality improvement and processing of food proteins. *Com. Agric. Food Chem.* 2: 389-487 (1992)
- Motoki M, Segura K. Transglutaminase and its uses for food processing. *Trends Food Sci. Technol.* 9: 204-210 (1998)
- Babiker EE. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. *Food Chem.* 70: 139-145 (2000)
- Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y. Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Rev. Int.* 17: 221-246 (2001)
- Lorenzen PC, Neve H, Mautner A, Schlimme E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.* 55: 152-157 (2002)
- O'Sullivan MM, Kelly A, Fox PF. Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *J. Dairy Res.* 69: 433-442 (2002)
- Jeong JE, Hong YH. Characterization of transglutaminase treated milk product powders. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 345-351 (2005)
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
- Sharma R, Zakora M, Qvists KB. Susceptibility of industrial α -lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. *Int. Dairy J.* 12: 1005-1012 (2002)
- Aboumahmoud R, Savello P. Crosslinking of whey protein by transglutaminase. *J. Dairy Sci.* 73: 256-263 (1990)
- Chobert JM, Harb CB, Nicolas MG. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.* 36: 883-892 (1988)
- Kinekawa YI, Kitabatake N. Purification of β -lactoglobulin from whey protein concentrate by pepsin treatment. *J. Dairy Sci.* 79: 350-356 (1996)
- Reddy M, Kella KN, Kinsella JE. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymot-

- ryptic digestion. *J. Agric. Food Chem.* 36: 737-741 (1988)
16. Dalgalarondo M, Dufour E, Chobert JM, Bertrand-Harb C, Haertle T. Proteolysis of β -lactoglobulin and β -casein by pepsin in ethanolic media. *Int. Dairy J.* 5: 1-14 (1995)
 17. Stapelfeldt, H., Petersen, PH, Kristiansen, KR, Qvist, KB, Skibates, LH. Effect of high hydrostatic pressure on the enzymic hydrolysis β -lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. *J. Dairy Res.* 63: 111-118 (1996)
 18. El-Zahar, K, Sitohy, M, Choiset, Y, Metro, F, Haertle, T, Chobert, J-M. Peptic hydrolysis of ovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin exceptional susceptibility of native ovine β -lactoglobulin to pepsinolysis. *Int. Dairy J.* 15: 17-27 (2005)
 19. Pelligrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, von Fellenberg R. Isolation and identification of three bacteriocidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta* 1426: 439-448 (1999)
 20. Miranda G, Pelissier, JP. Kinetic studies of in vivo digestion of bovine unheated skim-milk proteins in rat stomach. *J. Dairy Res.* 50: 27-36 (1983)
 21. Schmidt DG, Poll KJ. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.* 45: 225-240 (1991)