

# 식품산업에서 단백질체학의 적용

## Application of Proteomics in Food Industry

조장원 | 공정기술연구단

Chang-Won Cho | Processing Technology Research Group

### 기술명

Proteomics

### 원리

단백질체학(proteomics)은 유전체(genome)에 의해 암호화되어 있는 단백질의 총체적 집합을 연구하는 학문이다. 이 학문은 세 가지 관점인 단백질의 발현, 단백질의 구조, 단백질의 기능이라는 측면을 다룬다. 특정한 시점, 그리고 특정한 환경에서 유전체에 의해 암호화되어 있는 총체적 단백질 집합을 연구하는 것은 다양한 기술을 활용하는 여러 과정을 망라한다. 전형적인 단백질체학의 연구흐름은 (i) 단백질 추출, (ii) 단백질 또는 펩타이드 분리 및 정량, (iii) 단백질 확인, (iv) 자료 분석

및 해석으로 진행 된다.

### 단백질 추출

많은 식품이 섬유성 세포벽 물질이 대부분을 차지하는 식물체로부터 유래한다는 점을 감안한다면, 단백질 추출 자체만으로 어려운 일일 수도 있다. 또한, 식물 공포(vacuole)에 수분이 함유되어 있어 세균이나 동물 조직과 비교하였을 때 단백질 수득률이 낮아진다. 식물 재료로부터 단백질을 추출하기 위한 목적으로 페놀계 성분, 탄수화물, 단백질분해 효소, 산화 효소, 색소와 같은 방해 성분에 대처할 수 있는 다양한 방법이 보고되어 왔다. 한편, 단백질의 수득률이 더 높은 동물조직과 세균 조직의 경우, chaotropic 시약, 계면활성제(detergents), 환원제(reducing agents), 완충제

(buffers), 양성물질(ampholites)을 이용하는 등 다양한 단백질 용해 완충제들이 이용된다. 단백질은 복합적인 화학적 성질과 광범위한 역학적 범위(최소크기 단백질량과 최대크기 단백질량 간의 비율)를 가지고 있어서, 각 추출기법은 일반적으로 특정 단백질 집합체에 중점을 두고 있다. 요즘은 광범위한 역학적 범위에 따른 문제를 극복하기 위해, 이차원 전기영동(2-DE: two-dimensional electrophoresis)과 액체크로마토그래피 탠덤질량 분광분석기(LC-MS/MS: Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry)를 실시하기 전에 소기관(organelle) 분획과 같은 사전분획과정이 활용되고 있다. 이와 같은 사전분획기법은 분

별밀도고속원심분리(differential density ultracentrifugation)와 같은 방법을 이용한다.

### 단백질 분리

단백질은 젤(gel)에 기초하거나 젤을 이용하지 않는 방법을 이용하여 각각 분리될 수 있다. 이와 같은 방법들은 부분적으로만 겹쳐지는 단백질의 특이적 소집합(subsets)에 초점을 두고 있기 때문에 서로 상호보완적이다. 이 방법은 단백질이나 펩티드의 구획을 나누고, 분리하고, 감지하는 방식이 다르다(Fig. 1).

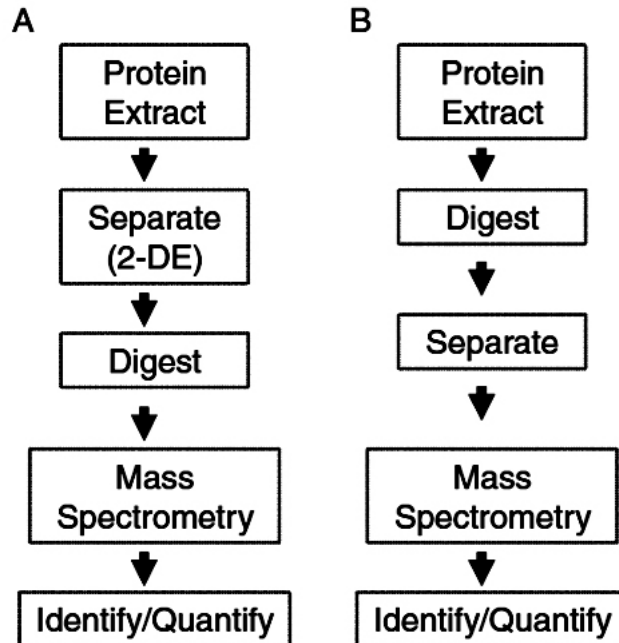
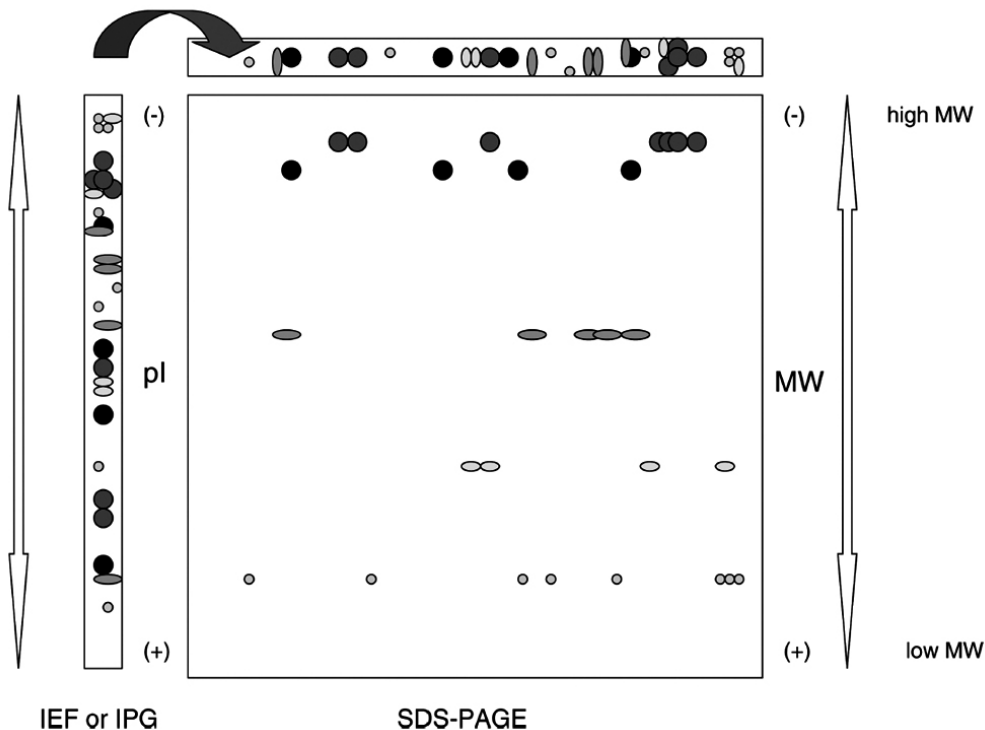


Fig. 1. Proteomics/mass spectrometric workflow (A) gel-based approach, and (B) gel-free approach (Pedreschi R *et al.*, Crit Rev Food Sci Nutr, 50(7), 2010)

## 젤기초 단백질체 분석법

젤에 기초한 단백질체 분석법은 등전점(pI, iso-electric point)과 분자량이라는 두 가지 성질에 기반한 단백질 분리를 위한 이차원 전기영동(2-DE: two-dimensional electrophoresis)을 필요로 한다(Fig. 2). 이 기법은 1970년대에 도입된 것이었다. 짧게 요약하자면, 등전 집속법(IEF, isoelectric focusing)은 단백질이 가지고 있는 양성적 특성의 이점을 활용하여 전하의 차이에 따라 단백질을 분리한다(단백질은 환경적인 pH에 따라 전하가

변화한다). 단백질을 분리하기 위해서는, IPG 스트립(pH 구배를 가지고 중합되어 있는 acrylamide 젤망)에 전류를 적용시킨다. 단백질이 해당 단백질의 pI보다 낮은 pH 영역에 있는 경우, 단백질은 양 전하를 띠게 되며 음극을 향해 이동하게 된다. 단백질이 등전점(단백질이 전체적으로 전하를 띠지 않게 되는 pH)에 도달하게 되면, 단백질은 이동을 멈추게 되고, 이 상태를 “고정된(focused) 상태”로 일컫는다. IEF가 완료된 후, 단백질이 분리되어 있는 IPG 스트립은 SDS-PAGE를 이용한 이차원적 분석의 시작점으로 이용된다.



**Fig. 2.** Schematic representation of a two-dimensional (2-DE) map. Proteins were separated on the horizontal axis based on isoelectric point and on the vertical axis based on molecular weight (Pedreschi R *et al.*, Crit Rev Food Sci Nutr, **50**(7), 2010)

SDS polyacrylamide 젤 전기영동(SDS-PAGE)에서는 단백질을 분자량에 따라 분리한다. 이 이차원 분리를 실시하기 전에, IPG 스트립 상의 단백질은 자체적으로 가지고 있는 내인성 전하를 제거하기 위하여 과량의 sodium dodecyl sulphate(SDS) 용액 중에서 평형화되어야 한다. 이 과정에서 단백질의 이차구조 및 삼차구조가 제거되고, 시스테인(cysteines) 잔기들 간의 이황화결합(disulfide bridges)을 환원하고 나면 전기영동 상에서 단백질 움직임은 전적으로 분자량에만 의존하게 된다. Acrylamide 분리 젤은 복잡한 구조로 되어 있어 크기가 작은 분자는 크기가 큰 분자에 비해 더 빨리 이동할 수 있다. 단백질이 분리되고 나면, 콜로이드성 coomassie blue를 이용한 염색법, 은(Silver)염색법, 방사성동위원소 표지, 형광분석법 등과 같은 방법들을 이용하여 가시화함으로써 정량적 분석이 이루어진다. 위에 열거된 염색법들에는 검출한계(예, 콜로이드성 coomassie blue), 역학적 범위, 재현성(예, 은염색)의 측면에서 보았을 때 각기 다른 한계가 존재한다. 젤에 기초한 단백질체학은 비모델성 개체(예, 대부분의 식물원료로 구성된 식품들)에서 isoforms와 post-translational modification에 대한 연구를 수행하는 데 있어서 가장 막강한 분석법이다. 2-DE의 해상도가 균등하지 않다는 점(예, 빈도가 높은 단백질에 대한 왜곡, 소수성이거나 매우 산성도가 높은 단백질의 경우 잘 보이지 않음, 단백질들이 함께 이동함으로써 인하여 여러 종류의 단백질이 같은 위치에 존재하는 등)과 분석 가능한 역학적 범위가 제한적이라는 점, 그리고 자동화가 어렵다는 점 등이 2-DE 방법이 가진 일부 한계들이다.

## 젤을 이용하지 않는 단백질체학적 접근법

젤을 이용하지 않는 방법은 대부분의 경우 세 부적인 것에서부터 출발하는 방법(bottom-up strategy)을 이용하는 것으로, 먼저 단백질을 분해한 결과로 얻어진 펩티드 혼합물을 역상 크로마토그래피를 이용하여 소수성(hydrophobicity)에 따라 분리하고, 용출된 펩티드를 질량 분광분석기에서 분석하게 된다. 수집된 모든 탠덤 질량 분광분석 결과들은 데이터베이스에서 검색한 후 원형의 단백질들로 재구성하게 된다. 이 방법은 서열결정이 완료된 종으로부터 유래한 상대적으로 간단한 단백질 혼합체인 경우 성공할 확률이 높다. 복합 시료로부터 얻어진 단백질을 구분하는 데 있어서의 문제점은 MudPit(다차원 단백질 확인 기술, Multidimensional Protein identification technology)이라는 기술을 통해 극복되었다. 2006년도에 발표된 한 연구에서는 Mud-Pit을 적용함으로써 저빈도 단백질을 검출하는 능력이 증가하였음은 물론 세포막 단백질의 분리에도 도움이 되는 것으로 나타났다.

## 단백질 확인

### 질량 분광분석기 (Mass Spectrometry)

단백질은 질량 분광분석기에 적용하기 전에 분해되어야 한다. 미지의 관심 단백질은 대부분의 경우 트립신(trypsin) 효소를 이용하여 절단하게 된다. 이 효소는 특이적으로 단백질 상의 아르기닌(arginine) 및 라이신(lysine) 잔기의 카르복시-말단 위치를 절단한다. 질량 분광분석기는 시료로

부터 이온을 생성하는 이온 생성기(예, ESI 또는 MALDI), 전하대비 질량 비(m/z)에 따라 이온들을 분리하는 하나 이상의 질량 분석기(예, quadrupole, TOF, ion trap), 그리고 자료를 가공하고 질량 분광선(spectra)을 생성하는 컴퓨터로 구성된다. 또한, 시료를 이온생성기에 투여하기 위한 투입기구도 필요하다.

### 질량 분석기 (Mass Analyzers)

질량분석기에는 여러 가지 종류가 있으며, 각 종류별로 장단점을 가지고 있다. 비행시간형(TOF: Time Of Flight)은 동일한 전위(potential)에서 이온을 가속화하기 위한 전기장을 이용하며, 검출기에 도달하는 데에 소요되는 시간을 측정한다. 동일한 전하를 띠는 입자들의 경우, 운동에너지(kinetic energy)는 동일하기 때문에 속도는 전적으로 질량에 따라 달라진다. 즉 m/z 값이 더 작은 이온들이 검출기에 먼저 도달하게 되는 것이다.

Quadrupole(Q)의 경우 고주파 4중극 가속영역(radio frequency quadrupole field)을 지나가는 이온들을 선택적으로 안정화 혹은 불안정화시키는 진동전기장(oscillating electrical fields)을 이용한다. 이온 트랩, 또는 더욱 특이적으로 말하자면 4중극자 이온 트랩(quadrupole ion traps)은 역동적인 전기장 내에서 이온들을 포획하고, 포획된 이온들을 해당 이온의 m/z 값에 따라 순차적으로 튀어나가게 한다. Fourier transform과 Orbitrap 장비에서 확인되는 고도정밀 검출 시스템과 결합되지 않을 경우 이온 트랩의 정확도가 낮다는 점이 주된 단점이지만, 견고하고, 민감도가 높으며 비용이 비싸지 않은 방법이다. “선형 이온트랩(linear ion trap)”은 민감도와 해상도, 질량의 정확도를

향상시켰다. 이는 삼차원적 4중극 가속영역대신 이차원적 4중극 가속영역을 이용한다는 점에서 4중극 이온트랩과 차이가 있다.

### MS vs Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)

펩티드 질량 지문분석(PMF: Peptide Mass Fingerprinting)은 펩티드 별로 단일한 피크로 표현되는 간결한 양상으로 결과를 얻을 수 있어 일반적으로 (MALDI-TOF) MS를 이용하여 펩티드 질량 지문분석이 실시된다. PMF의 경우, 개별 단백질을 먼저 크기가 작은 펩티드들로 분해하고 이 펩티드들의 질량을 질량 분광분석기를 이용하여 측정하게 된다. 데이터베이스 검색에 있어서는 독립적으로 각 단백질 서열이 가상환경(in silico)에서 분해된다. 이후, 각 데이터베이스별로 가상으로 생성된 펩티드들의 질량들을 측정된 질량 스펙트럼 분포와 비교하게 된다. 유의하게 일치하는 결과를 얻기 위해서는, 해당 단백질로부터 생성되는 모든 단백질의 세부군만 서로 일치하면 된다. PMF를 실시하는 데에 있어서, 유전체가 잘 규명되지 않은 비모델성 개체로부터 얻어진 단백질은 검출력이 떨어진다는 단점이 있다.

탠덤 질량 분광분석은 두 단계에 걸친 MS와 획득된 단백질에 관한 서열 정보가 필요하다. MS/MS에서는 특정 펩티드를 분리하고, 에너지를 불활성 기체(예, 질소 분자, 또는 아르곤 또는 헬륨 원자)와의 충돌을 통해 에너지가 전달되어, 이 에너지로 펩티드 상의 펩티드 결합 아래쪽이 절단되도록 한다. 그에 따른 절단체(fragments)의 질량 스펙트럼 분포가 생성된다. MALDI-Q-TOF, MALDI-TOF/TOF, 또는 MALDI-quadrupole

ion trap/TOF 기구는 물론 LC-ESI-MS/MS도 이용되는 것을 흔히 볼 수 있다.

MS/MS 결과로부터 펩티드 서열결정을 통하여 미지의 펩티드를 재구성하는 것도 가능하지만 (de novo peptide sequencing으로 일컬어짐), 여전히 한계가 존재한다. 대부분의 경우, 이 과정은 MASCOT, SEQUEST, !XTandem, PHENYX와 같은 다양한 알고리즘을 이용하여 아직 미해석 상태에 있는 절단체 자료를 검색함으로써 이루어진다. 비모델성 개체(예, 대부분의 식물원료로 구성된 식품에서는, 이와 같은 접근법이 가장 큰 가능성을 제시하고 있다.

## 식품분야 활용방안

식품과학에서는 단백질체학과 관련된 접근법을 통하여 내재하고 있는 생리학적 정보를 더 많이 얻고자 하는 노력이 증가되고 있다. 과실의 수확 후 장애들과 관련된 생리학적 진행과정을 이해하고, 수확 과실의 성숙도와 관련된 지표들을 선택하고자 하는 노력들을 그 예로 들 수 있겠다. 포도주 산업에서는 각기 다른 환경적 상태에서 얻어진 포도 과실을 통해 포도주 가공과정을 향상시키려고 하거나, 포도주의 부패를 확인하기 위한 단백질 지표를 활용하고, 효모균의 선택 및 유전학적 개량을 통해 포도주 제조 공정을 더욱 향상시키고자 하는 시도가 이루어져 오고 있다. 곡물과학 분야 내에서는 반죽(dough), 파스타, 밀가루, 맥주의 성질과 품질과 같은 특정 산업적 가공과 관련된 특이적인 생화학적 문제들을 해결하기 위해 일련의 단백질체를 이용한 접근법이 적용되어오고 있다.

## 기능성 식품

기능성 식품이란 기본적인 영양 외에도 건강학적 유용성을 가져올 수 있는 식품 또는 식품 성분을 의미한다. 기능적 성분 또는 생물학적 활성 성분들을 뒷받침하고 검증할 수 있는 강력한 과학적 근거가 부족한 상태이다. 곡류 및 식물을 주원료로 하는 식품들에서 이와 같은 생물활성을 증진시킬 경우 의도하지 않은 부작용이 발생하지는 않을 것으로 기대되고 있다. 단백질체학적 방법들을 이용할 경우, 어떤 생화학적 경로에 있어서 특정 단계에 변이를 가하였을 경우 원하지 않는 부작용이 새로 유입될 가능성이 있는지를 평가할 수 있을 것이다(예, 카로테노이드 생합성이 증가하도록 가공하였을 경우 플라보노이드 경로에 관련된 단백질도 영향을 받을 가능성이 있음). 그러나 생물활성 성분의 함량을 증진시키기 위하여 의도적으로 생물학 및 비생물학적 스트레스를 가하게 되는 경우와 관련되는 생화학적 기전에 대해서는 완전히 규명되어 있지 않은 상태이다. 유기농으로 재배한 제품이 비유기농 공법으로 재배된 제품에 비하여 영양학적으로 더 나은 지에 대한 부분은 과학적 근거의 한계에도 불구하고 여전히 논란이 지속되고 있다. 최근 재배생산시스템이 감자 종괴근의 단백질 양상에 미치는 영향과 관련하여 단백질체학적 접근방법을 이용한 결과 비옥화 활동(유기농 물질 vs 광물성 비료)만이 단백질 조성에 유의한 효과를 주는 것으로 확인되었다. 또한, 유기농으로 재배한 농작물에서 살충제 사용을 하지 않음으로 인하여 발생한 스트레스가 페놀성 성분의 함량을 증가시키기도 하였지만, 또한 방어적 알레르기 단백질의 합성 등을 비롯한 이와 상반되는 효과도 단백질체학을 이용한 연구를 통하여 밝혀졌다.



## 알레르기 항원 (Allergens)

가장 중요한 알레르기항원은 동물이나 식물로부터 유래한 것들이다. 여섯 가지 주요한 식품 알레르기항원들 중 세 가지는 식물(밀, 땅콩, 콩)로부터 유래한 것으로 식품 과민반응의 약 90%의 원인이 되고 있다. 알레르기 항원성 단백질 연구에 단백질체학을 적용하는 것을 일컬어 “알레르제노믹스(allergenomics)”라 한다. 이 분야는 2-DE에 알레르기 환자의 혈청을 이용한 IgE-반응성 단백질의 immunolotting을 결합하였다. 이와 같은 방법으로, 밀로부터 기존에 잘 알려져 있던 serpin,  $\alpha$ -amylase 저해제,  $\gamma$ -gliadin, 저분자 글루테닌들과 같은 알레르기 항원 외에 9가지 저분자 글루테닌(glutenin) 소단위(subunits)들이 추가로 확인되었다. 최근연구에서는 2-DE 상에 있는 IgE를 질량 분광분석기와 함께 이용하여 19가지 잠재적 밀 알레르기 항원들을 찾아내기도 하였다.

알레르기 항원은 과일(예, 사과, 배, 딸기, 올리브, 복숭아)과 같은 다른 종류의 식물에도 존재하는 것으로 알려져 있다. 이런 종류의 알레르기 항원은 “자작나무 꽃가루 알레르기(birch pollen allergy)”로 불린다. 백색 딸기에는 안토시아닌 성분이 결핍되어 있어 주된 알레르기 항원인 Bet v-1의 발현을 낮추었다. 알레르기 항원 발현의 저하는 플라보노이드 생합성에 관여하는 여러 단백질들의 발현 저하와도 관련되어 있었다. 과일과 채소들의 유통기간을 연장하기 위한 방법들(예, 공기 조건 조절)도 알레르기 항원 단백질들의 존재를 변화시킬 수 있다는 것이 증명되기도 하였다.

잠재적인 알레르기 항원은 가공 전, 가공 과정 중 및 가공 후에 검출, 관리해야 한다. 단백질체학적 방법들은 땅콩 알레르기 항원인 Ara h 3의 단백질 분해 공정 연구에도 활용되기도 하였다. 단백질

은 식품의 주요 구성성분일 뿐만 아니라 상당수는 식품 첨가물로도 이용되고 있다는 측면에서도 식품 알레르기 항원 연구는 중요성을 가지고 있다.

## 가공 제품: 열가공 vs 비열가공

가공과정 중 열에 노출됨으로써 효소와 구조단백질에 있어서 접힘이 풀어지기도 하고 잘못 접히는 경우도 발생할 수 있으며, 그에 따라 이 단백질이 응집하거나 침전하기도 한다. 단백질들은 영양학적으로 뿐만 아니라 기능적으로도 필수적이며 기본적인 식품의 구성성분이다. 따라서 가공이 어떻게 단백질 수준에서 변화를 유도하는지를 이해하는 것은 식품의 핵심적인 단백질 성분들에 여러 가지 다른 가공 과정(예, 튀김vs굽기, 냉동vs건조)을 적용한 결과를 이해하는 데에도 기본적인 중요성을 가진다.

비열가공 기법(예, 초고압[HPP], 펄스 전기장[pulse electric fields], 광펄스[pulsed light], 자외선 조사, 초음파 등)를 이용함으로써 좀 더 영양가가 있고, 더 신선하며, 가공을 덜 거치면서도, 더 안전한 식품을 제조할 수도 있다. HPP를 이용하면 미생물체는 실온에서, 심지어 그보다 더 낮은 온도에서도 파괴될 수 있으며, 상업적으로 가치를 높일 수 있게 된다. 효소들과 포자형성균(spore-forming bacteria)은 압력과 열을 함께 처리함으로써 불활성화 될 수 있다. HPP는 새로운 구조와 질감을 가진 제품을 생산하고, 특정 성분의 기능성을 확장하는 데에도 이용될 수 있다. 고압은 비공유결합에만 영향을 미치므로, 단백질의 접힘이 풀리게 되며 색상, 풍미, 영양학적 성분과 같은 식품의 품질에는 거의 영향을 미치지 않는다. HPP가 효소 활성과 구조적 측면에서 알레르기항원과 단

백질의 변화에 미치는 영향에 대한 정보는 거의 없는 실정이다. 따라서 이 분야에 단백질체학적 접근법을 적용할 수 있는 여지가 충분하다. 마찬가지로, 식품 방사선조사는 포자형성균을 제거함으로써 식품 안전성을 보증하기 위해 적용된다. 미국과 라틴 아메리카에서는 식품 방사선조사가 상업적으로 도입되어 있다. 유럽에서는 정치권과 소비자 지지 단체들이 식품 멸균 협회와 함께 식품 방사선조사의 이용을 늦추고 있는 것으로 보인다. 현재까지 식품 방사선조사가 단백질체 수준에서 미치는 영향에 관한 연구는 이루어진 바가 없다. 한 예로 HP를 감마선 조사와 결합시킬 경우 특정 표적 미생물체를 감소시키는데 필요한 감마선 조사량을 감소시키는 데에 효과가 있는 것으로 입증된 바 있다. GMO와 관련하여, 제품의 안전성을 평가하는 데에 있어서 처치하지 않은 식품과의 차이를 밝혀내는 비가공기술에 대하여 “실질적 동등(substantial equivalent)”의 원칙이 적용될 수 있다.

## 기대효과

소비자들의 선호도는 식품 기술을 좌지우지한다. 요즘의 소비자들은 높은 감각적 품질은 물론, 더 향상된 기능적 및 영양적 성질, 안전성 보장, 더 적은 첨가물, 그리고 더 적은 가공이 이용되기를 기대한다. 과학적 근거가 없다는 위험성이 존재함에도 불구하고 더 건강하고 더 안전한 것으로 인식

되는 식품(예, 유기농 재배)에 대한 요구는 증가되었다. 단백질체학은 전통적 기술, 논란이 되는 기술, 그리고 신가공기술의 산물로 얻어진 제품의 완결성과 안전성을 과학적으로 입증하기 위한 기회를 제공할 수 있을 것이다.

결론적으로, 단백질체학을 이용한 연구는 식품 산업에 있어서 (1) 가공공정 최적화 및 관리, (2) 품질 및 이력추적, (3) 안전성, (4) 영양학적 평가 분야에 큰 기회를 제공하고 있다. 단백질체학을 대사체학(metabolomics)과 같은 다른 오믹스(OM-ICS) 플랫폼으로 보완할 경우 의심의 여지없이 더욱 확고한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

### ● 자료출처 ●

Pedreschi R, Hertog M, Lilley KS, Nicolaï B, Proteomics for the food industry: opportunities and challenges, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **50**(7), 680–692, 2010

#### 조 장 원 이학박사

소 속 : 한국식품연구원 공정기술연구단

전문분야 : 유산균 발효, 면역활성, 성분분석

E - mail : cwcho@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9312

본 내용은 자료 출처의 원문을 번역 기술한 것입니다.