

(생물분리정제)

## *Streptovorticillum morbarensense*로부터 생산되는 Transglutaminase 분리 및 식품에의 적용

유재수, 신원선<sup>1</sup>, 엄태봉<sup>2</sup>, 김영수, 정용섭

전북대학교 응용생물공학부, 한국식품개발연구원<sup>1</sup>, 전북대학교 생물과학부<sup>2</sup>

전화 (063) 270-2571, FAX (063) 270-2572

### Abstract

In order to improve the physical properties of food such as texture and food self-life. Transglutaminase(mTG) from *Streptovorticillum morbarensense* was prepared. In the preliminary experiments, presence of proteases in the crude enzyme did not improve the texture of dough, which mean the inteferece of mTG reaction by the proteases. Among the cation exchange resins tested for the removal of proteases, MonoPlus S 100(Bayer, Germany) was the most efficient resin with 20 fold increase in the mTG/protease activity ratio. By further purification steps with a quaternary ammonia salt resin and a gel permeation chromatography, proteases were effectively removed from the preparation. Therefore, the improvement of flour texture was shown by adding the protease-free mTG.

### 서론

Transglutaminase(mTG)는 단백질 뿐만아니라 펩타이드와 다양한 1차 아민사이에 전자쌍을 공유하는 교차결합을 받아들여 acyl transfer 반응을 촉매하는 효소이다. 이러한 transglutaminase의 촉매 반응은 유청 단백질, soya 단백질, gluten, myosin과 actomyosin 같은 많은 단백질의 가교 형성에 이용되어 식품의 물리적 성질을 향상시킨다. Sakamoto와 Soeda는 다진 고기에 다른 식품성분과 TG를 첨가함으로써 탄성, 조직, 맛, 향미가 향상됨을 보고하였고(1), Ichihara 와 Wakameda 등은 TG를 넣은 생선묵 제조에 대한 방법을 보고하였다(2). Tanni 등은 동남아시아에서 건강식품으로 알려진 상어지느러미의 모조식품 제조에 이용되고 있음을 보고하였고(3), Takagaki 등은 TG를 야채와 과일에 코팅함으로써 신선함이 유지됨을 보고하였다(4). 본 연구에서는 식품적용을 위한 예비실험 결과 배양액중의 protease가 밀가루 반죽 시 조직개선을 방해하는 것으로 나타났다. 따라서 mTG 활성은 유지하면서 mTG에 대한 protease의 상대적인 활성을 낮추기 위해 여러 종류의 수지를 사용, 선별하였고, column chromatography를 통해 분리하여 식품에 적용하고자 하였다.

### 재료 및 방법

## 균주

본 연구에 사용한 균주는 *Streptovercillium mobaraense*(ATCC 29032)이다. 포자형성을 위한 고체배지로써 bacto agar를 사용하였으며, 30℃로 유지된 배양기에서 7~10일간 배양하였다. 포자수는 혈구계와 광학현미경을 사용해서 계수하였다.

## 배지 및 배양조건

성장배지의 조성은 glucose 0.5%, proteose peptone 0.2%, MgSO<sub>4</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%이며, 성장배지에 접종된 포자(10<sup>8</sup> spores/mL)는 pH 7.0, 온도 30℃, 교반속도 250 rpm에서 진탕 배양되었다. 발효를 위한 접종량은 5%(v/v)로 하였다. mTG 생산을 위한 최적 생산배지 조성은 soluble starch 5%, proteose peptone 2%, yeast extract 0.2%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.1%, PPG 0.05%이었고, pH는 2 N HCl 또는 2 N NaOH를 사용하여 7.0으로 조정하였다.

## 분석방법

발효된 배양액은 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상정액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액은 70% 암모늄설페이트로 포화시켜 원심 분리한 후 침전물을 모아 염을 제거하였다. 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 충분히 세척된 MonoPlus S 100(Bayer, Germany)의 수지에 탈염 효소액을 넣고 4 시간 동안 4℃에서 안정화하였다. MonoPlus S 100(Bayer, Germany)으로 처리한 상정액은 원심분리 후 IEX-Q Resin(Sigma, USA)에 적용하였다. 활성기가 quaternary ammonium salt로 이루어진 column(7.5 m × 7.5 cm)의 유속은 1 mL/min이었다. 10분간 25 mM sodium phosphate pH 7.0(buffer A) buffer로 흘려준 다음 10분에서 25분 동안 1 M NaCl이 첨가된 상기 완충용액(buffer B)으로 농도 경사를 하고 다시 10분간 buffer B로 흘려보냈다. 활성이 있는 부분은 모은 뒤 0.5 mL/min의 유속으로 gel filtration(Sigma, column size 7.5 m × 30 cm)하여 다시 활성부위를 모았다.

## 결과 및 고찰

mTG의 식품적용을 위한 예비실험 결과, *S. mobaraense* 발효액중 protease의 존재가 밀가루 반죽의 물성 향상에 역효과를 보여주었다. 그러므로 mTG 정제 시 protease 제거를 위한 방법을 연구하였으며, 정제된 mTG를 식품에 적용하여 물성증가를 구명하였다. 먼저 조효소액으로 여러 종류의 이온교환수지에 효소를 넣은 후 protease와 mTG의 상대적인 활성차이를 비교하였다. 그 결과 양이온교환수지인 MonoPlus S100이 mTG와 protease 분리에 가장 효과적이었다. 상기 실험결과를 토대로 이온교환수지에는 MonoPlus S100을 적용하여 실험을 진행하였다. 각 단계에 대한 정제의 결과를 Table 1에 나타내었다. 조효소액의 mTG에 대한 protease ratio는 1.88이었고, 조효소액과 비교하여 protease의 ratio가 암모늄설페이트 침전은 8배, MonoPlus S100에서는 20배 각각 증가되었다. 또한 IEX-Q column chromatography

에서는 65배 증가하였고, gel filtration 분획 분에서는 protease가 검출되지 않음을 알 수 있었다. 이 결과로부터 정제 단계가 진행될수록 protease 활성은 현저하게 감소되었고, 수율이 감소됨을 알 수 있었다. 따라서 식품적용을 위한 정제 단계로는 protease 제거와 수율 그리고 경제적인 면을 고려할 때 암모늄설페이트 침전과 MonoPlus S100 resin이 효율적이라 판단되었다.

### 참고문헌

1. Sakamoto, H., and T. Soeda (1991), Minced meat products containing transglutaminase. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 03175929.
2. Ichihara, Y., A. Wakameda and M. Motoki (1990), Fish meat paste products containing transglutaminase and their manufacture. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 02186961.
3. Tani, T., K. Iwamoto., M. Motoki., and S, Toiguchi (1990), Manufacture of shark fin imitation food. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 02171160.
4. Takagaki, Y., K. Narukawa., R. Uchio (1991), Coating of vegetables and fruits with transglutaminase and proteins for preservation. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 03272639.

Table 1. Comparison of mTG and protease activities during the purification steps

purification step	mTG (U)	protease (U)	ratio	yield (%)
crude enzyme	790	420.2	1.88	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 70%	474	30.08	15.76	60
MonoPlus S100	308.1	8.34	36.9	39
IEX-Q	87.6	0.72	122.2	11.1
Gel filtration	79.7	-	∞	10.1

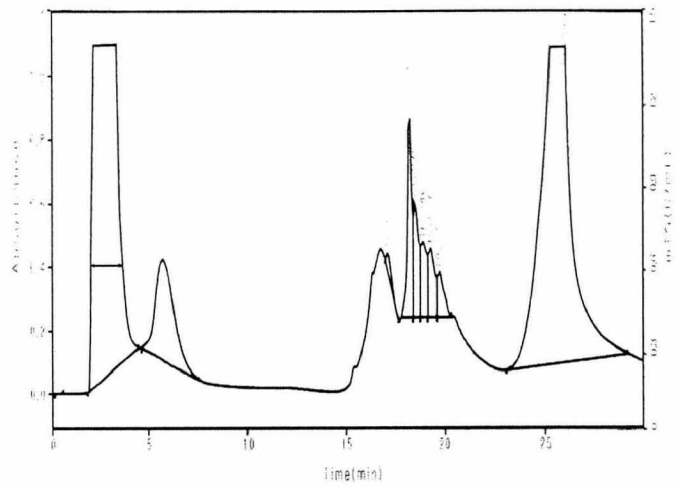


Fig. 1. Chromatogram of IEX-Q chromatography.  
 → indicates the fractions with mTG activity.

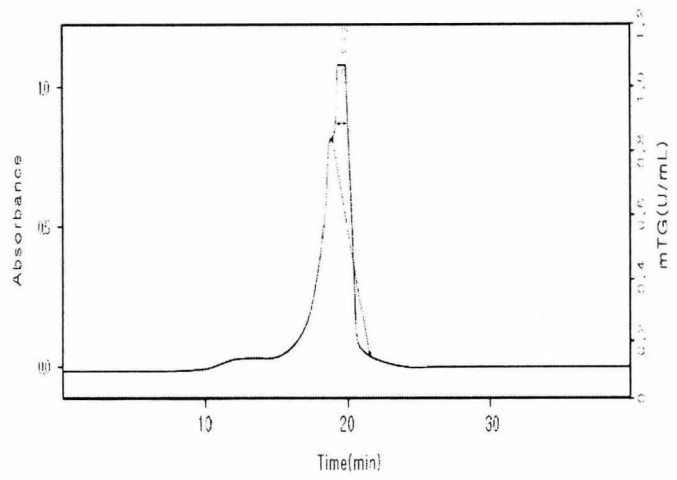


Fig. 2. Chromatogram of gel filtration chromatography.  
 → indicates the fractions with mTG activity.