

미생물유래 transglutaminase를 이용한 식품단백질의 유화안정성 향상에 관한 연구

이 득 식*
동해대학교 외식산업학과

Improvement of Emulsion Stability of Food Proteins by Microbial Transglutaminase

Deuk-Sik Lee*

Department of Food Service Industry, Donghae University

To improve functional properties of food proteins, homologous or heterologous β -casein and 11S globulin (glycinin) from animal and vegetable proteins, respectively, were bio-hybridized using transglutaminase (MTGase). Susceptibility was confirmed by SDS-PAGE, particle size analyzed, and emulsion stability tested using Reddy and Fogler method. To determine how bio-hybridized protein influences emulsion stability, protein bound on oil droplet was investigated using Scanning Electron Microscopy (SEM). Formation of bio-hybridized protein band was detected among homologous and heterologous proteins, with heterologous protein forming weak band in oligomer form. Homologous β -casein protein showed high emulsion stability, while homologous glycinin showed almost no stability. Stability of heterologous β -casein and glycinin protein was higher than that of glycinin. SEM photographs showed even distribution of bio-hybridized proteins on oil droplet improved stability.

Key words: transglutaminase, cross-linking, glycinin, β -casein, emulsion

서 론

식품단백질은 식품에 이용되는 소재의 수가 제한되어 있고, 화학적 방법에 의한 기능특성이 연구되어 사용가능성을 제안하고는 있으나 안전성에 문제가 있어서 사용이 제한되어 왔다(1,2). 근래에 와서는 이에 대한 대안으로 식품에 직접 적용할 수 있는 안전성이 확립된 미생물유래의 중합효소(microbial transglutaminase, MTGase)를 이용하여 단백질의 기능특성을 향상시키려는 시도가 행해지고 있다(3-9). TGase(protein-glutamine: amine γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13)에 의한 가교화 반응을 이용하면 단백질 및 펩타이드 중의 glutamine 잔기의 γ -carboxyamide 기와 각종 일급 아민간의 acyl 전이반응을 촉매하여 단백질내 혹은 단백질 상호간의 ϵ -(γ -glutamyl)lysyl isopeptide 결합(GL cross-linking)을 형성하여 단백질을 중합화 하는 것에 의해 다양한 기능특성을 부여하는 것이 가능하다(10,11). 미생물 유래의 TGase는 포유동물 유래의 TGase와는 다르게 칼슘 비의존성이며 열에 안정하고, 반응하는 pH 범위도 넓은 특성을 가지고 있어서 식품분야에 널리 응용되고 있다(12-16). 즉,

Kuraishi 등(17)은 MTGase를 이용하여 육류의 작은 조각에 첨가하여 덩어리로 만듦과 동시에 탄성과 조직 그리고 맛이 향상됨을 보고한 바 있으며, Kumazawa 등(18)은 어류제품을 이용하여 MTGase 사용시 원료 조직의 질이 향상되었음을 보고하였다. Motoki 등(19)은 유제품인 요거트에 이 효소를 첨가함으로써 물리적인 힘이나 온도의 변화에 따라 일어날 수 있는 내용물의 분리현상을 막을 수 있는 것으로 보고하였고, Sakamoto 등(20)은 국수와 파스타에 MTGase를 처리함으로써 조리 후 조직이 나빠짐을 예방하고 제품의 탄력이 향상됨을 보고한 바 있다. 이와 같이 MTGase에 의해 다양한 식품단백질의 물성제어가 가능하며 각각의 식품단백질이나 원료 특성에 따라 기능특성 또한 여러 형태로 나타날 수 있다. 한편, 단백질은 영양을 갖는 기능 외에 여러 기능특성(solubility, gelation, emulsion stability, forming property, surface hydrophobicity, fat binding capacity 등)을 갖지만, 종류에 따라서 여러 기능특성을 나타내는 단백질이 있는 반면, 그렇지 못한 단백질이 있다. 즉, MTGase를 첨가시키면 열에 의해 겔 형성능이 없는 단백질을 겔화(gelation)시킬 수 있으며, 고온에서 녹는 겔을 녹지 않게 할 수 있으며, 계면활성제나 변성제에 의해 더 이상 용해되지 않게 할 수 있다. 이러한 특성들은 식품가공 공정에서 다양하게 응용될 수 있다. 따라서, 식품에 이용되는 단백질을 MTGase를 이용하여 일부 혹은 전부 중합화 시키면 본래 가지고 있지 않은 기능특성이 발현되며, 이러한 성질은 식품학적인 관점에서 매우 중요한 역할이 기대되는 기능이라 할 수 있다. 지금까

*Corresponding author: Deuk-Sik Lee, Department of Food Service Industry, Donghae University, 119 Jiheung-dong, Donghae city, Gangwondo 240-713, Korea
Tel: 82-33-520-9252
Fax: 82-33-520-9252
E-mail: dslee@donghae.ac.kr

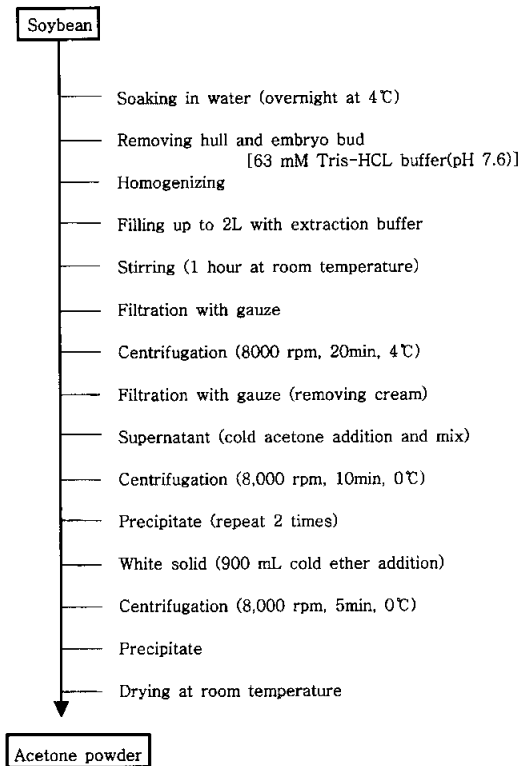


Fig. 1. Procedure of acetone powder preparation.

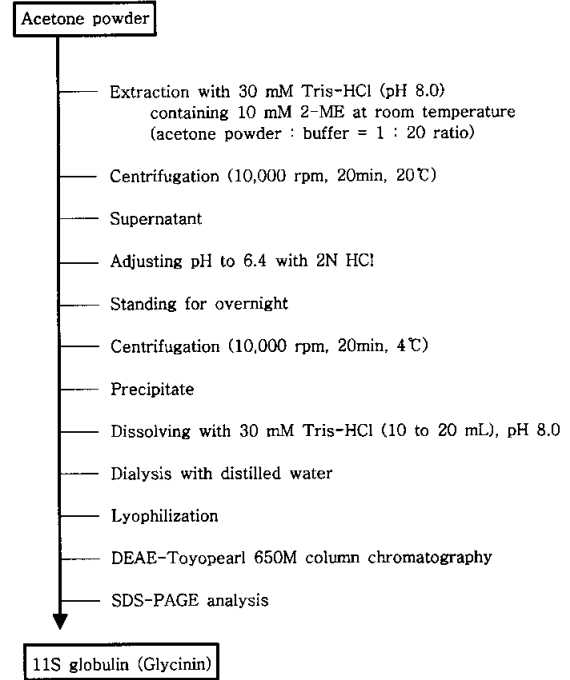


Fig. 2. Procedure of 11S globulin preparation from acetone powder.

지 연구된 결과를 분석해 보면, 동종 단백질을 가지고 겔화능력을 향상시키는 연구를 주로 많이 해 왔다. 그러나 단백질의 기능특성 중 겔화 이외의 기능에 대해서는 아직 연구가 미흡하고, 또한 동종단백질(homologous protein)에 대한 연구가 주를 이루고 있으나, 이종간의 단백질(heterologous protein)에 대해서는 연구가 거의 되어 있지 않다(21). 이에 본 연구에서는 동물과 식물 유래의 각종 식품 단백질(soy glycinin, BSA, β -casein, β -lactoglobulin 등)을 적절히 조합하여 이종간의 단백질에 MTGase를 작용시켜 생성된 중합체를 가지고 SDS-PAGE에 의한 반응성(susceptibility) 분석, oil droplet size 분포 분석, emulsion stability, SEM에 의한 emulsion 상태 분석 및 구조분석 등의 기능특성을 연구하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

재료

대두콩의 한 품종인 Shirotsurunoko(22)는 일본 교토대학으로부터 제공받았으며, 보존하면서 쓸 목적으로 Thanh 등(23)의 방법에 따라 처리하여 Fig. 1에 나타난 바와 같이 acetone powder를 제조하여 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다. Acetone powder로부터 11S globulin(glycinin)의 추출방법은 Fig. 2에 나타내었다. 또한 glycinin을 추출 후 정제도를 더욱 높이기 위해 이온 칼럼인 DEAE-Toyopearl 650 M을 이용하여 7S globulin (conglycinin, 11S globulin의 반량체)를 거의 완전히 제거시켜 실험에 사용하였다(Fig. 4의 11S globulin 전기영동 band 참조). *Streptovorticillium mobaraense*로부터 분리 정제된 중합화 효소인 MTGase는 아지노모토의 Kumazawa 박사로부터 제공받아 실험에 사용하였으며 specific activity는 2.88 units/mg이었다. 사용된 기질중 하나인 β -casein은 Sigma사(C-6905, St. Louis,

USA)의 제품을 사용하였다.

DEAE-Toyopearl 650 M Column Chromatography 조건

Acetone powder로부터 11S globulin(glycinin)의 정제도를 높이기 위해 이온 칼럼인 DEAE-Toyopearl 650 M을 이용하였다. 사용된 buffer는 0.02% NaN_3 와 10 mM 2-mercaptoethanol(2-ME)을 함유하는 35 mM KPi(potassium phosphate) buffer이며 농도구배를 위해 0.15 M(A buffer)과 0.3 M(B buffer)의 NaCl을 사용하였다.

Transglutaminase(MTGase)의 Activity

MTGase의 activity는 Folk(24)의 방법에 의하여 assay 하였으며, 0.25 mL의 최종 반응 혼합액에는 0.13 M Tris-acetate buffer (pH 7.0)에 20 mM CBZ-L-Gln- Gly, 67 mM hydroxylamine, 3.3 mM CaCl_2 , 0.7 mM EDTA를 포함한다. 효소용액은 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 반응액에 15% trichloroacetic acid, 0.1 N HCl에 용해시킨 5% FeCl_3 , 2.5 N HCl 혼합용액 0.5 mL를 첨가시킨 후 반응을 정지시키고 색깔을 발현시켰다. 반응용액은 1 cm의 측정 cell에 넣어 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 activity의 1 unit는 분당 1 μM 의 펩타이드 결합 γ -glutamyl-hydroxamate의 형성을 촉매하는 효소의 양으로서 규정하였다.

단백질 농도(기질농도)

기질단백질의 농도는 Lowry 등(25)의 방법과 protein assay kit를 사용하여 단백질을 정량하였다.

기질단백질의 조제

이종간의 반응성을 조사하기 위하여 동물성 단백질인 BSA, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, β -casein 등과 식물성 단백질인 glycinin, conglycinin, gluten 등의 단백질을 0.5-2% 농도로 3 mM DTT(dithiothreitol)의 존재하에 0.1 M Tris-HCl(pH 7.0) 완

충용액을 이용하여 37°C에서 정해진 시간만큼 MTGase로 반응시켰다. 반응 종료시는 10 mM NEM(N-ethylmaleimide)을 첨가 시킴으로써 MTGase 효소반응을 정지시켰다.

SDS-PAGE 분석

SDS-polyacrylamide gel은 Laemmli(26)의 방법을 이용하였으며, SDS와 환원제인 2-ME(2-mercaptoethanol)로 반응액을 denaturation 시킨 후, stacking gel이 4.5%, separating gel이 10%인 homogeneous polyacrylamide slab gel을 이용하여 전개하였다. 전개된 gel은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 증류수, 메탄올, 초산의 혼합비가 각각 50:40:10인 탈색액을 이용하여 탈색하였다.

Emulsion 조제

수중유적형(oil-in-water) emulsion은 17%(v/v)의 corn oil을 0.02% sodium azide(NaN₃)와 MTGase로 반응시킨 0.5% 혹은 1%의 기질단백질을 함유한 0.1 M Tris-HCl(pH 7.0)에 첨가시켜 조제하였다. 즉 효소 반응시킨 단백질 용액과 corn oil을 혼합하여 균질기(Phycostron NS-50, Japan)를 사용하여 25°C, 22,000 rpm에서 3분간 균질화 시킨 후, Ultrasonic Generator US150 (Nihonseiki, Japan)를 사용하여 10 μA에서 2분간 초음파 처리를 하여 emulsion을 조제하였다.

Emulsion 안정성

균질화 시킨 emulsion의 안정성(stability)을 시험하기 위해 25°C로 유지하면서 실험이 종료될 때까지 실험에 필요한 양을 경시적으로 취해 실험에 이용하였다. 경시적으로 채취된 양은 곧 바로 0.1% SDS 용액을 이용하여 350 nm에서 OD 값이 0.7 이하가 되도록 희석하였다. 탁도 스펙트라(turbidity spectra)는 분광광도계를 이용하여 400 nm에서 700 nm까지 기록하였고, emulsion 안정성은 Reddy and Fogler(27)의 방법에 따라 계산하였다.

$$\frac{N_t}{N_0} = \frac{1}{r_0^3} \left[\frac{\lambda^{m_t - m_0} r_0^{-1}}{T_0/T_t} \right]^{3/m_t - 1}$$

여기서 N₀와 N_t는 0시간과 t시간에서의 oil droplet(유적)의 초기 수이고, T₀와 T_t는 t=0와 t=에서의 탁도이다. m₀와 m_t는 0 시간과 t시간에서 에멸전의 lnT 대 lnλ(λ는 파장)의 plot에서의 기울기이며, r₀는 초기의 평균 oil droplet 반경을 나타낸다.

유적의 Particle Size 분석

유적의 평균 입자 크기 분석은 Particle Size Analyzer(Horiba LA-500, Japan)를 이용하여 분석하였다. 측정에 앞서 emulsion은 기기의 필요한 입자 수 밀도를 맞추기 위하여 0.1% SDS로 희석하였다. Emulsion 입자의 크기는 median diameter로 나타내었다.

주사형 전자현미경(Scanning Electron Microscope) 샘플조제

주사형 전자현미경(SEM, Hitachi S-4100, Japan)의 emulsion 샘플조제는 Fig. 3과 같다. 각 emulsion 시료 200 μL와 glutaraldehyde 200 μL를 혼합하여 조제하였으며, 시료건조는 Critical Ion Dryer(Hitachi HCP-2, Japan)를, 코팅은 Ion Sputter(Hitachi E-1030, Japan)를 이용하였다. Emulsion의 초기 시료의 모습과 7일 후의 emulsion 시료의 모습을 상호 비교하여 시일이 경과

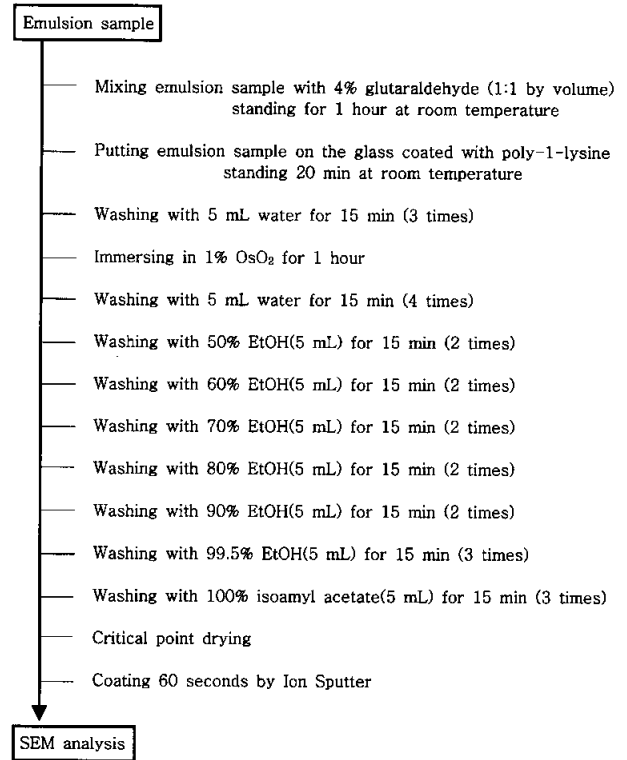


Fig. 3. Procedure of scanning electron microscopy sample preparation.

함에 따라 안정성에 어떠한 영향을 미치는지 주사형 전자현미경으로 분석하였다.

결과 및 고찰

기질단백질의 반응성에 대한 SDS-PAGE 분석결과

Fig. 4는 MTGase에 의한 대두 11S globulin(glycinin) 단독과 β-casein 단독, 그리고 두 단백질의 이종간 SDS-PAGE 결과이다. 그림에서 M은 분자량 marker, N은 native, 5와 15는 MTGase 반응시간 5분과 15분을 각각 나타낸다. Glycinin의 경우는 2-mercaptoethanol(2-ME)의 존재하에서 분자량 약 38,000인 acidic subunit와 약 22,000인 basic subunit로 분리되었으며, MTGase에 의한 반응 초기인 5분후 이미 acidic subunit는 oligomer와 분자량이 매우 큰 polymer의 형태를 나타내었다. Basic subunit의 경우는 acidic subunit와는 다르게 반응성을 나타내지 않았다. Acidic subunit의 경우는 표면에 glutamine 잔기가 많이 노출되어 반응성이 좋게 나타난 반면, basic subunit의 경우는 반응에 참여하는 glutamine 잔기가 대부분 분자 내부에 위치하고 있고 구조적으로 compact한 상태를 나타내기 때문에 반응성이 거의 없는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서도 그림에서 나타난 바와 같이 acidic subunit와는 달리 basic subunit는 반응성이 거의 없는 것으로 나타났다(28). 치즈단백질인 β-casein의 경우는 monomer(단량체)일 경우 분자질량이 약 24 kDa 정도이나 SDS-PAGE상에 나타난 것은 약 30 kDa을 나타내었다. 이는 β-casein의 구조적인 특징에 의한 것으로 추정되고 있으며, 타 단백질이 단단하거나 구상을 나타내는 것에 비해 β-casein은 무정형의 flexible한 특징을 지니고 있어서 반응성이 매우 뛰어난 것으로 판단되었으며, Liu and Damodaran(29)의 경우에서도 β-cascin의 MTGase에 의한 반응성은 우수한 것으로

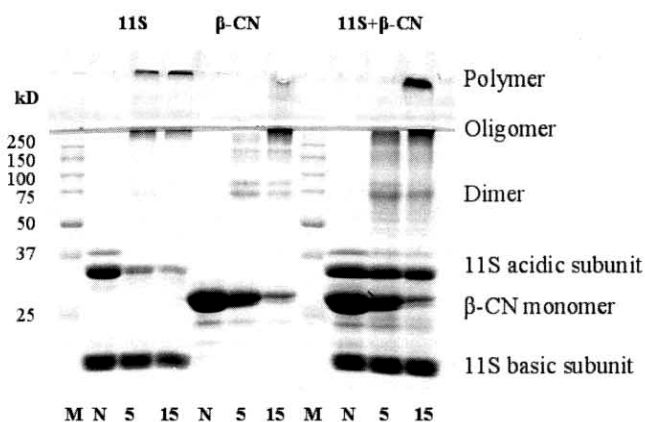


Fig. 4. The SDS-PAGE result of 11S globulin, β -casein, and 11S globulin+ β -casein.

M: marker, N: native, 5: 5 min, 15: 15 min.

나타났다. 반응시간 5분 후, monomer는 dimer와 약한 band의 oligomer를 나타내었으며, 15분 후는 5분과 비교시 많은 양의 oligomer와 약한 polymer를 나타내었다. Glycinin이나 β -casein의 경우 반응시간을 짧게 한 이유는 반응시간이 길어지면 monomer 형태의 단백질이 대부분 oligomer나 polymer를 나타내어 단백질의 기능특성을 나타내는 것이 어려울 것으로 판단되어 반응시간을 짧게 하였다. 즉, 분자량이 커지면 커질수록 용해도나 emulsion의 안정성 등의 기능특성이 떨어지는 것으로 나타났기 때문이다. 11S globulin과 β -casein의 이종간 반응성은 Fig. 4에 나타낸 바와 같다. 이량체(dimer)의 부분을 보게 되면 11S globulin의 경우 아주 약한 band를 나타낸 반면, β -casein의 경우는 선명한 band를 볼 수 있으나 적은 양의 단백질 band를 나타내었다. 그러나 두 단백질간의 반응성은 11S globulin과 β -casein 각각의 반응량보다 많은 양의 dimer 및 oligomer를 형성하고 있는 것으로 확인이 되었다. 이 dimer나 oligomer의 경우, 이종간의 conjugation 뿐만이 아니고, 동종간에도 conjugation이 일어난 것으로 판단되었다. 이들 식물성 단백질인 11S globulin과 동물성 단백질인 β -casein의 이종간 conjugation 이외에 다른 단백질을 가지고 susceptibility에 대한 연구를 진행하였지만, 구상단백질인 α -lactalbumin, β -lactoglobulin, ovalbumin, BSA 등의 동물성 단백질과 11S globulin의 반량체인 7S globulin(conglycinin, Mw 180,000)이나 gluten의 경우, 동종간의 conjugation은 환원제(dithiothreitol, 2-mercaptoethanol, glutathione 등) 처리나 가열에 의한 denaturation 등의 방법을 통해서 반응성을 높

일 수는 있었으나, 이종간의 반응성은 중요하게 나타나지 않았다. 따라서 기질단백질은 11S globulin과 β -casein의 반응조건을 가지고 동종 혹은 이종간의 conjugation에 의한 단백질의 기능특성을 위한 조건으로 이용하였다.

Emulsion 입자 분석에 의한 MTGase 반응 기질단백질의 emulsion 안정성

11S globulin의 emulsion 입자분포는 Table 1과 같다. 11S globulin의 경우는 분자량이 약 360,000, 분자크기는 약 9 nm로 보통 단백질 중에서 매우 큰 분자이다. 11S globulin을 emulsion으로 만들면 곧 aggregation이 일어나 emulsion 입자들이 큰 덩어리를 형성하기 시작하여 초기치의 입자크기를 측정하고 나서는 불과 한 시간도 지나지 않아 측정이 불가능한 상태가 되었다. Native의 경우 emulsion을 만든 즉시 초기의 median diameter는 9.66 μ m로 매우 컸으며, MTGase를 5분간 반응시킨 11S의 경우는 22.87 μ m, 15분 반응시킨 것은 43.88 μ m로 aggregation이 매우 심하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이는 Fig. 4의 SDS-PAGE 결과에서 알 수 있듯이 11S의 경우는 MTGase의 반응시간이 짧은 경우에도 아주 거대한 polymer를 형성하기 때문에 이를 emulsion으로 만들었을때 oil droplet(유적)의 표면에 cross-linking된 단백질 분자들이 고르게 분산되지 않아 유화안정성을 나타내지 않고, 거대분자들의 회합에 의해 유화안정성이 거의 없는 것으로 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과의 추정은 SEM의 분석에 의해 확실히 알 수 있었다. 치즈단백질인 β -casein의 경우는 native와 MTGase에 의해 5분, 15분 반응시킨 결과, 초기의 유적 사이즈에 비해 7일 후 그다지 크게 형성되지 않은 결과를 나타내어 유화안정성은 Liu and Damodaran (29)의 결과와 비슷하게 본 연구에서도 매우 우수한 것을 알 수 있었다. 즉, native의 경우는 초기와 7일 후의 값이 각각 1.46 μ m, 1.50 μ m를 나타내었고, 효소반응 5분의 경우는 초기와 7일 후의 값이 1.43 μ m과 1.48 μ m, 그리고 15분 반응시킨 경우는 각각 1.41 μ m과 1.43 μ m의 유적 사이즈 값을 나타내어 안정성이 매우 우수하였다. 11S globulin과 β -casein을 동일농도로 혼합하여 최종농도 1%로 MTGase 반응시킨 경우는 native의 경우보다는 7일 후 약간 큰 입자크기를 나타내었지만 유화안정성은 우수한 것으로 나타내었다. 즉, native의 경우는 1.57 μ m에서 7일 후 1.59 μ m로 거의 변화가 없었으며, 효소반응 5분 후는 1.51 μ m에서 1.62 μ m로, 15분간의 반응시간에서는 1.46 μ m에서 1.57 μ m로 native보다는 약간 큰 입자크기를 나타내었지만, 총 분리나 안정성에는 변화가 거의 없었다. 따라서 이 결과로부터 11S globulin의 유화 불안정성은 β -casein

Table 1. Emulsion stability of MTGase-reacted proteins by particle size analysis

(median diameter: μ m)

Days	11S globulin			β -CN			11S+ β -CN ¹⁾		
	Nat ²⁾	5m ³⁾	15m ⁴⁾	Nat	5m	15m	Nat	5m	15m
0	9.66	22.87	43.88	1.46	1.43	1.41	1.57	1.51	1.46
1							1.60	1.54	1.56
2							1.61	1.52	1.57
3							1.60	1.54	1.56
4							1.60	1.58	1.57
7				1.50	1.48	1.43	1.59	1.62	1.57

¹⁾11S+ β -CN: 11S globulin+ β -casein.

²⁾Nat: Native.

³⁾5m: 5 min.

⁴⁾15m: 15 min.

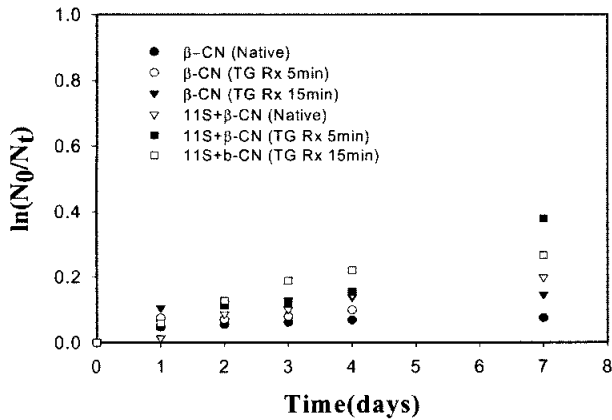


Fig. 5. Emulsion stability of β -casein and 11S globulin+ β -casein by Reddy and Fogler method.

과 MTGase에 의해 일부가 이중간의 cross-linking 됨으로 인해 안정성이 부가된 것으로 판단되었다. 이러한 결과에서 유추가 가능한 것은 11S globulin은 emulsion을 만들면 곧 aggregation이 일어나는 것을 알 수 있었는데, β -casein과의 일부가 cross-linking됨으로써 aggregation을 방지해 주고 유효안정성을 높여주는 것을 알 수 있었다. SDS-PAGE 결과에서 보여주는 바와 같이 β -casein은 분자량이 약 30,000 정도(실제는 24,000)로 분자량이 아주 큰 11S와 상호 결합함으로써 11S의 aggregation의 원인이 되는 소수성 결합(hydrophobic bond)을 방해함으로써 안정성을 높여주는 것으로 추정되었다.

Reddy and Fogler 방법에 의한 유효안정성

유효안정성을 측정하는 방법의 하나로 Reddy and Fogler의 방법(27)을 종종 이용하기도 한다. 본 연구에서도 이들의 방법을 이용하여 유적사이즈 뿐만 아니라 공학적인 방법에 의해서 계산된 유적의 수를 경시적으로 분석하여 유효안정성을 판정하였다. 즉, 초기의 유적의 수(N_0)를 시간 후의 유적의 수(N_t)로 나눈 값에 ln 값을 취한 값으로 데이터를 나타내었으며, 시간 후의 값이 초기값에 가까우면 가까울수록 유효안정성은 뛰어나며, 초기 값에서 멀어지면 멀어질수록 유효안정성은 좋지 않은 것으로 판정할 수 있다. 즉, 값이 1 이내에 있을 경우는 유효안정성이 우수한 것으로 인정되며, 그 이상일 경우는 유효안정성이 점점 나빠지는 경향을 띤다. 유효안정성이 좋을 경우 유적이 상호 접근하면 유적의 표면에 결합되어 있는 단백질이 유적 상호간에 결합(coalescence) 되지 못하도록 서로 밀어내는(steric repulsion) 역할을 한다. 이때 단백질은 유적의 표면에 붙어 있는 경우 소수성 아미노산이 주로 작용하고 있으며, 유적간 서로 밀어낼 경우는 동일 charge를 띠고 있기 때문이다. 또한 유효안정성이 나쁜 경우는 유적이 상호 접근할 경우, 유적 표면에 결합되어 있는 단백질이 고르게 분산되어 있지 않거나, 유적의 단분자층(mono-molecular layer)에 결합된 단백질이 약하게 결합하여 breaking 되거나, 혹은 유적으로부터 떨어져 나와 유적이 서로 결합함으로써 점점 큰 사이즈를 형성하여 시간이 경과함에 따라 oil과 물이 분리되는 층분리 현상이 일어나므로 유효안정성에 나쁜 영향을 주는 것이다(30). Fig. 5에 나타난 것은 Reddy and Fogler 방법(27)에 의한 β -casein과 11S globulin + β -casein의 유효안정성을 나타낸 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 β -casein의 경우는 매우 우수한 안정성을 나타내었고, 11S globulin + β -casein의 경우도 우수한 안정성을 나타

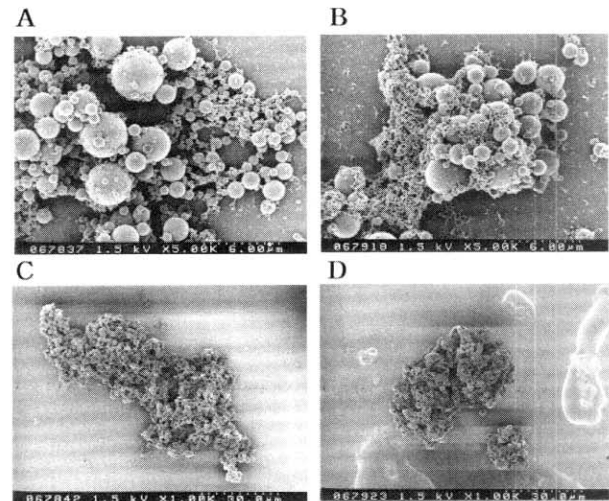


Fig. 6. SEM micrograph of native and MTGase-reacted 11S globulin emulsion.

A: native (0 day), B: native (7 days), C: MTGase reaction time for 5 min (0 day), D: MTGase reaction time for 5 min (7 days).

내었다. β -casein의 경우, native는 7일 후 약 0.08, MTGase는 반응시간 5분 및 15분은 0.15 정도의 값을 나타내었다. 이들 값으로 추정해 볼 때 안정성은 매우 좋은 것으로 인정되었다. 11S globulin + β -casein의 경우는 native가 0.2, MTGase 반응시간 5분이 0.28, 15분이 0.4로 β -casein 보다는 약간 높은 값을 나타내었지만 안정성은 비교적 좋은 것으로 판단되었다. Table 1의 유적사이즈 분석에 의한 결과와 Reddy and Fogler의 방법(27)에 의한 결과(Fig. 5)를 상호 비교해 볼 때, 결과가 거의 비슷한 것으로 미루어 두 실험은 결과가 잘 일치하는 것으로 나타났다.

SEM에 의한 emulsion 유적의 유효안정성 분석

Fig. 6은 0.5% native 11S globulin의 emulsion을 만든 후 glutaraldehyde로 고정시켜 처리한 후, 주사형 전자현미경(SEM)을 이용하여 분석한 결과이다. 5,000배의 배율로 분석한 결과, 11S의 경우는 분자량이 매우 커서(360,000) emulsion을 만든 후 곧 aggregation이 일어나는 경향을 나타내었다. Fig. 6의 A와 B는 초기 emulsion의 SEM 분석결과이다. A의 경우는 11S 단백질이 고르게 분포되어 있는 것처럼 보이지만 실제로는 이미 단백질간의 회합(aggregation)이 일어나고 있는 것을 알 수 있었으며, 더욱 자세하게는 B(emulsion을 만든 후 7일 경과 후)의 사진에서 알 수 있었다. 즉, 단백질이 거의 덩어리로 뭉쳐있는 모습을 볼 수가 있었으며, 이러한 이유로 emulsion의 안정성이 낮은 것을 확인할 수 있었다. MTGase를 11S에 5분간 반응시킨 경우, 1,000배의 배율로 분석한 결과, 초기(C) 및 7일(D) 후의 emulsion은 모두 큰 덩어리를 형성하고 있어서 안정성이 거의 없는 것으로 나타났다. 이 결과는 유적사이즈 분포에서 나타난 결과와 매우 잘 일치하는 결과이다. 결과적으로 oil과 물 층으로 분리되는 것은 MTGase에 의해 cross-linking된 단백질 혹은 monomer 상태의 단백질이 서로 회합하는 것에 의해 큰 응집체를 형성하고 있기 때문이다. Fig. 7은 native 및 MTGase 반응시킨 β -casein의 SEM microscope이다. A와 B는 native β -casein의 에멀전 초기 및 7일 경과 후의 모습(5,000 \times)으로서 모양에 있어서 변화가 거의 없었으며, β -casein 단백질이 유적표

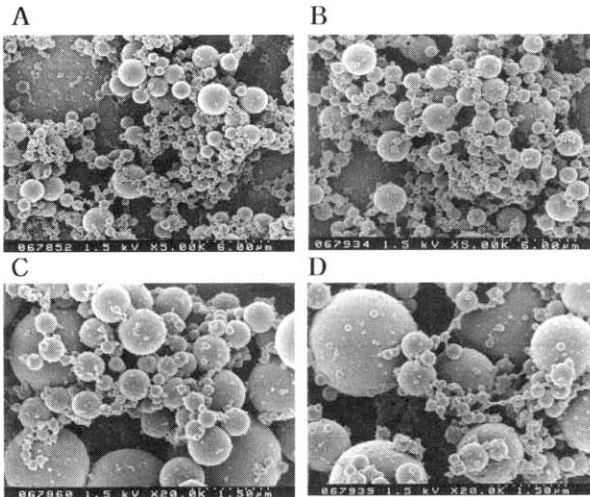


Fig. 7. SEM micrograph of native and MTGase-reacted β -casein emulsion.

A: native (0 day), B: native (7 days), C: MTGase reaction time for 5 min (0 day), D: MTGase reaction time for 5 min (7 days).

면에 고르게 분산되어 있었다. 유적의 표면에 결합된 단백질은 이웃 유적의 표면에 결합된 단백질과 회합하고 있어 안정된 상태의 emulsion을 나타낸 것으로 판단되었다. C와 D는 MTGase로 5분간 반응시킨 결과로서 20,000배율로 분석한 결과이다. 초기와 7일 경과 후의 모습이 거의 비슷하였으며, 단백질이 유적 표면에 결합되어 이웃하는 유적의 단백질과 회합 혹은 결합하여 안정한 상태를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 β -casein이 11S globulin보다 더욱 안정한 기질인 것을 나타내 주는 것이며, Liu and Damodaran(29)의 결과와도 일치하는 것으로 나타났다. Fig. 8은 11S와 β -casein을 혼합, 동시에 유화시켜서 안정성을 분석한 결과이며, A와 B는 각각 초기와 7일 경과 후 1,000배로 분석한 결과이다. 사진에서 11S globulin과 β -casein은 유적의 입자에 고르게 분산, 결합되어 일정한 형태의 emulsion을 나타내고 있는 것을 알 수 있었다. C와 D는 MTGase를 5분간 반응시킨 결과로서 30,000배의 고배율로 분석한 것이다. 사진에서 보는 바와 같이 유적의 표면에 단백질이 고르게 분산되어 있었으며, 11S globulin 혹은 β -casein이 동종 혹은 이종간 cross-linking되어 유적간 교량역할을 함으로써 유화안정성을 나타내는 것으로 판단되었다. E와 F는 MTGase를 15분간 반응시킨 emulsion의 초기와 7일 후 유적입자 표면을 20,000배의 고배율로 분석한 결과이다. 유적의 표면에 단백질이 고르게 분산되어 있었으며, 이들 단백질이 유화안정성에 영향을 주는 중요한 구실을 하는 것으로 생각되었다. Fig. 6의 11S globulin은 native 혹은 MTGase에 의해 단독으로는 유화안정성에 중요한 역할을 할 수 없었다. 그러나 11S globulin을 β -casein과 혼합하여 유화시킬 경우, 안정성을 크게 향상시킬 수 있다는 결과를 가져왔다. 즉, 11S globulin 단독으로는 유화안정성이 없었으나 이종의 단백질을 부가하여 native 혹은 MTGase를 반응시킴으로써 유화안정성을 크게 향상시킬 수 있었다는 것은 매우 중요한 결과인 것으로 평가되었다.

현재까지 단백질에 대한 연구는 대개 단일 단백질에 대한 모델케이스로 연구가 많이 진행되어 왔으나 이와 같은 이종의 단백질을 가지고 연구한 모델케이스는 거의 없었다. 따라서 식품 화학 및 식품가공학적인 관점에서 동, 식물성 단백질에 대한 연구가 이제부터 이종의 단백질에 대해서 계속해서 진행될 필

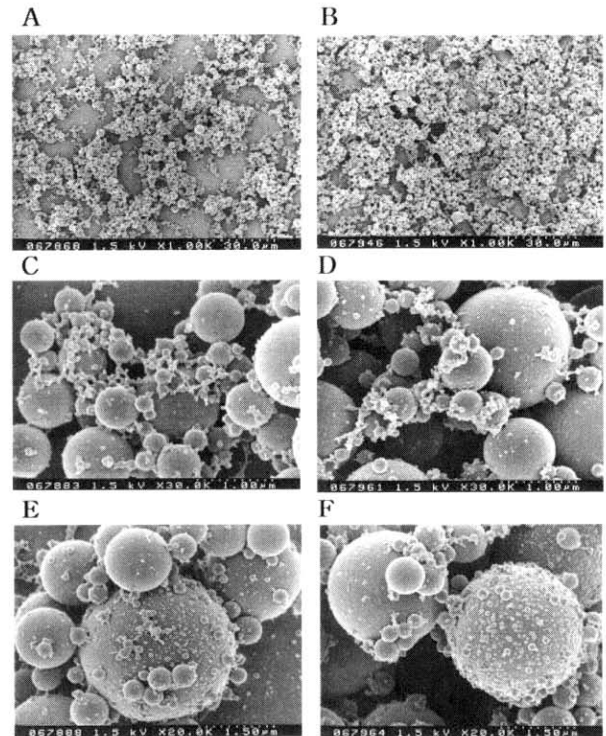


Fig. 8. SEM micrograph of native and MTGase-reacted 11S globulin+ β -casein emulsion.

A: native (0 day), B: native (7 days), C: MTGase reaction time for 5 min (0 day), D: MTGase reaction time for 5 min (7 days), E: MTGase reaction time for 15 min (0 day), F: MTGase reaction time for 15 min (7 days) Soybean.

요가 있다고 하겠다. 이러한 이유는 단일의 단백질이 나타내는 기능특성은 한계가 있기 때문이다. 지금까지 hydrolase에 의한 단백질의 기능특성이 많이 연구되어 왔지만, 향후 이종간 단백질의 중합화에 의한 기능특성 연구가 계속해서 진행될 필요가 있다. 이것은 산업적으로 이용 가능한 기능특성이 우수한 단백질을 개발함으로써 고부가가치를 창출할 수 있기 때문이며 꾸준한 연구가 기대된다.

요 약

미생물유래의 중합효소(microbial transglutaminase, MTGase)를 이용하면 식품 단백질의 기능특성을 향상시키는 것이 가능하다. 본 연구에서는 MTGase를 이용, 동물성 단백질인 β -casein 및 식물성 단백질인 11S globulin의 동종 혹은 이종간을 bio-hybrid시킴으로써 단백질의 기능특성을 향상시키고자 하였다. 즉, SDS-PAGE에 의한 susceptibility 확인, particle size 분석 및 Reddy and Fogler 방법에 의한 유화안정성(emulsion stability) 실험, 그리고 유화안정성에 영향을 주는 bio-hybrid된 단백질이 어떤 형태로서 안정성에 영향을 미치는지 주사형 전자현미경(SEM)을 이용하여 유적(oil droplet)에 결합된 단백질을 고배율로 분석하였다. SDS-PAGE에 의해 동종 혹은 이종의 단백질간의 가교결합이 형성되었으며, 특히 이종간의 결합은 그 밴드가 약하게 형성되었으며 oligomer의 형태를 나타내었다. 또한 유화안정성은 동종간에서는 β -casein이 우수하였으며, glycinin은 안정성이 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나, 두 단백질 이종간의 안정성은 glycinin보다 더 우수하였다. 전자현미경 사진에

서는 유적에 bio-hybrid된 단백질이 고르게 분포될수록 안정성이 더 우수한 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2002-003-C00158)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

1. Kato A, Nakamura S, Takasaki H, Maki, S. New functional properties of glycosylated lysozymes constructed by chemical and genetic modifications. pp. 243-256. In: Macromolecular Interactions in Food Technology. Parris N, Kato A, Creamer L, Pearce J (eds). ACS Symposium Series 650, American Chemical Society, USA (1996)
2. Ibrahim HR, Kato A. Design of amphipathic lysozyme using chemical and genetic modifications to achieve optimal food functionality and diverse antimicrobial action. pp. 16-28. In: Food Proteins-Structure and Functionality. Schwenke KD, Mothes R (eds). VCH, New York, NY, USA (1993)
3. Alexandre MC, Larre C, Viroben G, Popineau Y, Guegen J. Modification of a wheat gliadin by bovine plasma factor XIII. pp. 172-179. In: Food Proteins. Structure and Functionality. Shwenke KD, Mothes R (eds). VCH, Weinheim, Germany (1993)
4. Damodaran S. Protein-stabilized foam and emulsions. pp 57-110. In: Food Proteins and Their Applications. Damodaran S, Paraf A (eds). Dekker, New York, NY, USA (1997)
5. Ikura K, Kometani T, Sasaki R, Chiba H. Crosslinking of soybean 7S and 11S proteins by transglutaminase. Agric. Biol. Chem. 44: 2979-2984 (1980)
6. Ikura K, Yoshikawa M, Sasaki R, Chiba H. Incorporation of amino acids into food proteins by transglutaminase. Agric. Biol. Chem. 45: 2587-2592 (1981)
7. Motoki M, Nio N. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. J. Food Sci. 48: 2587-2592 (1981)
8. Nio N, Motoki M, Takinami K. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. Agric. Biol. Chem. 50: 851-855 (1986)
9. Traore F, Meunier JC. Cross-linking activity of placental F XIIIa on whey proteins and caseins. J. Agric. Food Chem. 40: 399-402 (1992)
10. Folk JE, Chung SI. Molecular and catalytic properties of transglutaminase. Adv. Enzymol. 38: 109-191 (1973)
11. Lee DS, Matsumoto S, Matsumura Y, Mori T. 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 (2002)
12. Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from Microorganisms. Agric. Biol. Chem. 53: 2613-2617 (1989)
13. Faergemand M, Otte J, Qvist KB. Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. Food Hydrocoll. 11: 19-25 (1997)
14. Matsumura Y, Lee DS, Mori T. Molecular weight distributions of α -lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. Food Hydrocoll. 14: 49-59 (2000)
15. Nonaka M, Tanaka H, Okiyama A, Motoki M, Ando H, Umeda K, Matsuura A. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganisms. Agric. Biol. Chem. 53: 2619-2623 (1989)
16. Sakamoto H, Kumazawa Y, Motoki M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase related to reaction conditions. J. Food Sci. 59, 866-871 (1994)
17. Kuraishi C, Sakamoto J, Soeda T. The usefulness of transglutaminase for food processing. pp 29-38. In: Biotechnology for Improved and Flavors. Kuraishi C, Soeda T (eds). American Chemical Society, Washington, DC, USA (1996)
18. Kumazawa Y, Sakamoto H, Kawairi H, Motoki M. Determination of ϵ -(γ -glutamyl)lysine in several fish eggs and muscle proteins. Fish. Sci. 62: 331-332 (1995)
19. Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing. Food Sci. Technol. 9: 204-210 (1998)
20. Sakamoto H, Yamazaki K, Kaga C, Yamamoto Y, Ito R, Kurosawa Y. Strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during chinese noodle processing. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 43: 598-602 (1996)
21. Han XQ, Damodaran S. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. J. Agric. Food Chem. 44: 1211-1217 (1996)
22. Lee DS, Matsumoto S, Hayashi Y, Matsumura Y, Mori T. Differences in physical and structural properties of heat-induced gels from glycinins among soybean cultivars. Food Sci. Technol. Res. 8: 360-366 (2002)
23. Thanh VH, Okubo K, Shibasaki K. Isolation and characterization of the multiple 7S globulins of soybean proteins. Plant Physiol. 56: 19-22 (1975)
24. Folk JE. Methods in Enzymology. Vol. 17A, pp. 889-894. Tabor H, Tabor CW (eds). Academic Press, New York, NY, USA (1970)
25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
26. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)
27. Reddy SR, Fogler HS. Emulsion stability: Determination from turbidity. J. Colloid Interface Sci. 79: 101-104 (1981)
28. Lee DS. Studies on mechanism of polymerization of food proteins by transglutaminases from mammalian and microbial origins. PhD thesis, Kyoto University, Kyoto, Japan (1997)
29. Liu M, Damodaran S. Effect of transglutaminase-catalyzed polymerization of β -casein on its emulsifying properties. J. Agric. Food Chem. 47: 1514-1519 (1999)
30. Liu M, Lee DS, Damodaran S. Emulsifying properties of acidic subunits of soy 11S globulin. J. Agric. Food Chem. 47: 4970-4975 (1999)

(2005년 1월 24일 접수; 2005년 4월 11일 채택)