

GOVP1200201037

664.7 (19대)
L2930

최 중
연구보고서

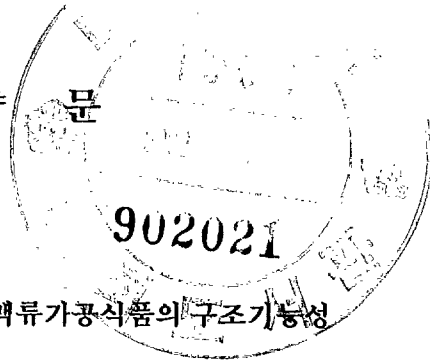
**맥류 유래 생체기능 조절물질의 이용 및 맥류가공
식품의 구조기능성(Structural Functionality)
향상에 의한 고품위 농산가공 제품의 개발**

Application of vital function-regulatory substance
obtained from barley and development of high value
agricultural processing products by improvement of
structural functionality on barley based processing
foods

이지바이오시스템

농 립 부

요 약 문



I. 제 목

맥류 유래 생체기능조절 물질의 이용 및 맥류가공식품의 구조기능성
(Structural Functionality) 향상에 의한 고품위 농산가공제품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라는 과거 농업을 기간산업으로 하여 오늘의 현대 산업사회에 진입해오고 있음에도 불구하고 우리가 주식으로 하고 있는 미곡, 맥류 및 잡곡의 대부분을 수입에 의존하고 있는 현실이다. 이러한 농업을 산업적으로 경쟁력 있는 분야로 육성하기 위해서는 우리나라 고유의 농산 자원으로부터 고기능의 생리활성물질을 탐색하고, 이의 대량생산을 위하여 첨단 생물공학, 분리공정기술, 식품가공 기술들이 접목되어야 한다.

mTGase와 같은 이차대사산물의 대량생산을 위한 발효공정 기술개발은 농업생물산업의 성공을 결정하는 중요한 기술로 인식되어져왔다. 그러나 막대한 기술 개발 투자와 장기간 지속적인 투자의 성공여부에 대한 위험 부당성 때문에 자본력이 부족한 중소기업에서는 적극적인 투자에 어려운 실정이다. 한편 균사를 형성하는 미생물의 발효는 그 독특한 형태구조와 이차대사의 까다로운 생리기능으로 인해 생물반응기의 설계 및 발효공정 최적화에 많은 어려움이 있다. 특히 이차대사산물의 낮은 생산성으로 인해 경제성의 문제점을 제기한다. 또한 독특한 3차원적인 균사구조로 인해 생산 균의 성장에 따른 발효배양액의 점도 증가 현상은 생물반응기 내의 산소전달능력을 급격히 감소시켜 생산 균의 생리기능에 변화를 초래하게 한다. 따라서 균사형성 미생물의 경우 발효 시 발생하는 용존산소 제한 현상을 해결하여야 하는 중요한 문제 중의 하나이다. 이를 위해서 교반속도, 통기량과 임펠러의 형태

에 따른 생산성에 대한 분석이 필요하다.

mTGase 효소의 식품가공시 이용성은 무한한데 비하여 발효연구와 분리정제기술 및 가공식품에 대한 적용은 상대적으로 미진한 편이며, 특히 생산된 고부가가치의 생축매(미생물, 효소)를 분리 정제하는데 통상적으로 총 downstream processing cost의 약 70%를 차지하지만 이 분야에 있어서 막분리 기술 등 효율적인 분리정제 기술이 확보되어 있지 못한 실정이다. 그러므로, 국제적으로 관심의 대상이 되고 있는 mTGase에 대하여 연속 분리 공정체계를 구축하는 것은 국제 경쟁력 차원에서 도 중요하리라 판단된다. 최근, 간편하게 조리할 수 있고 건강식대용으로 면류의 소비가 점진적으로 증가하고 있다. 특히, 유탕면, 숙면들 대신에 생면의 소비가 크게 급증하고 있으며 이들 제품을 개발하고자 하는 노력이 경주되고 있다.

이러한 고부가가치 생물산업 제품의 생산기술 확보는 국내 식품가공산업의 국제 경쟁력 강화뿐만 아니라 궁극적으로 식품가공에 필요한 원료를 공급하는 농민의 소득 증대에 기여할 수 있는 점에서 중요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 맥류가공식품의 구조기능성 향상을 위한 효소생산 미생물의 발효 최적화

가. mTGase 생산균주의 배지 최적화.

나. 세포의 형태구조가 효소 생산성에 미치는 영향을 조사.

다. 통기와 교반속도에 의한 산소전달계수 측정.

라. 임펠러의 종류에 따른 효소생산성 비교.

마. 이차대사산물을 효과적으로 생산하기 위하여 유가식 배양 방법을 확립.

바. 용존산소 조절 시스템 구축 및 효소생산.

2. 맥류가공식품의 생리활성 및 구조기능 향상을 위한 생체기능조절물질의 대량생산 및 효소의 분리

- 가. 미생물 유래 mTGase 선정
- 나. 비연속 미세/한외 여과 공정 확립
- 다. 분리 공정 및 bench top scale 비연속공정 최적화
- 라. 연속 효소분리 공정의 최적화
- 마. 연속 공정에 의한 대량생산 방안 제시

3. 천연소재 물성개량제를 이용한 농산가공식품의 기능성 개선 및 제품화

- 가. 소재단백질 구조에 따른 효소 촉매 겔화기작 규명
- 나. mTGase에 의한 밀가루반죽의 물성개량 효과
- 다. 면류의 물성증진을 위한 효소적 가공 최적모델 개발
- 라. 전통식품(너비아니, 두부전 등)의 물성개량 효과 및 제품적용성 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

“맥류 유래 생체기능조절 물질의 이용 및 맥류가공식품의 구조기능성(Structural Functionality) 향상에 의한 고품위 농산가공제품의 개발”에 대한 연구는 3개의 세부과제로 이루어 졌으며 각 세부과제 별로 연구결과를 구분하여 요약하였다.

1. 연구내용 결과

맥류가공식품의 구조기능성 향상을 위한 효소생산 미생물의 발효 최적화

- mTGase 생산균주의 생산배지 최적화 결과: 탄소원은 soluble starch 50 g/L, 질소원은 proteose peptone 20 g/L, 인원 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, MgSO_4 1 g/L, yeast extract 2 g/L, PPG 0.5 g/L이었다.
- 교반속도에 따른 미생물의 성장과 효소 생산: 330 rpm까지 교반속도가 증가하게 되면 통기량의 증가에 따른 대사활동이 더욱 원활해져서 mTGase 생산을 촉진시키지만, 330 rpm 이상의 교반속도에서는 큰 전단력에 의해 미생물의 성장과 효소생산이 유해한 영향을 받는 결과를 나타내었다. 교반속도 330 rpm 회분식 생물반응기에서 발효 결과, 효소활성은 0.69 U/mL, 건조균체질량은 20.6 g/L이었다.
- 생물반응기를 이용한 발효시 pH 비조절보다 pH를 일정하게 조절하는 것이 mTGase 생산에 2배 효과적이었다.
- $D_I/T=0.59$ 인 rushton turbine impeller를 이용한 회분식 배양에서 최대 효소활성은 48시간에 0.69 U/mL이었고 균체량은 30시간에 20.5 g/L에 도달하였다.
- 통기속도 1 vvm에서 교반속도가 증가하면 k_{La} 는 증가하는 경향을 보여주었고, 교반속도를 330 rpm으로 고정하고 통기속도를 증가한 경우 k_{La} 의 증가폭은 통기속도를 고정하고 교반속도를 증가시킨 결과보다 상대적으로 크게 나타나지 않았다. 이 결과로부터 발효시 k_{La} 를 증가시키는 방법은 미생물의 성장과 이차대사산물의 생성에 전단력이 영향을 주지 않는다면 통기속도의 증가보다는 교반속도를 증가시키는 것이 효과적임을 알 수 있었다.
- 발효조건 pH 7.0, 배양온도 30°C, 교반속도 330 rpm, 산소공급 1 vvm, $D_I/T=0.59$ 인 rushton turbine impeller, 1.5 L 배양부피에 5% 균을 접종하여 4일간 회분식 배양한 결과, 최적화배지를 이용한 효소 최대활성은 기본생산배지의 효소활성에

비해 약 1.4배 증가한 0.96 U/mL으로 나타났다.

플라스크 실험에 의한 반응표면분석 결과 mTGase 최적 생산조건은 온도 30.6°C, pH 6.5이었으며, 2차회귀모형식에 의해 효소활성은 1.28 U/mL으로 예측되었다. 그리고 반응표면분석 결과에서 제시된 최적 pH 와 온도에서 생물반응기를 이용하여 회분식 배양을 수행한 결과 효소 활성은 0.96 U/mL를 나타내었다.

bacto agar 배지조성이 mTGase 생산을 위한 가장 적합한 포자형성 배지이었다. 그리고 포자 stock과 liquid stock 모두 저장기간이 길어질수록 효소생산은 차이가 있었으며, 저장기간이 8주가 지나면 효소생산이 상당히 저하됨을 알 수 있었다.

성장배지에서의 포자 접종량이 10^6 spores/mL 이상이 되면 효소생산에는 큰 차이가 없으며, 생산배지에서의 효소생산을 비교해 보았을 때 성장배지에서의 배양은 3일, 접종량이 5% 일때 가장 좋은 효소 활성 1.05 U/mL를 나타내었다.

포자농도 10^8 spores/mL을 성장배지에 3일간 배양한 후 접종량을 5%로 하여 기본 생산배지와 최적화된 생산배지를 비교한 결과 최적화된 생산배지에서 효소생산이 기본생산배지의 효소활성 0.96 U/mL보다 1.4배 높은 결과를 나타내었다.

회분식 생물반응기에서 접종량 5%, 교반속도 330 rpm, 최적생산배지를 이용하여 효소를 생산한 결과 1.96 U/mL로 높은 값을 나타내었다. 용존산소농도는 발효가 시작되면서 서서히 감소하여 배양 31시간에 약 14%로 유지되다가 서서히 증가되어 발효말기에는 80% 정도로 일정하게 유지되었다.

플라스크를 이용하여 유가식 배양을 위한 영양원 중 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 질소원 중의 proteose peptone이 효소생산에 가장 좋은 결과를 보여주었다. 유가식 배양을 위한 공급방법으로 질소원 전량을 배양초기부터 배양일 동안 같은 양을 나누어 하루에 1회 공급하는 것이 효소활성을 1.45 U/mL까지 높일 수 있는 최적의 방법으로 판단되었다.

교반속도 330 rpm, 온도 30°C, pH 7.0, 초기 배양부피 1.3 L에서 200 mL의

proteose peptone(20 g/L)을 발효초기부터 연속적으로 1.4 mL/h로 6일 동안 공급하여 유기식 배양을 한 결과, 최대 효소활성은 2.16 U/mL이었다.

용존산소를 20%로 조절하며 회분식 생물반응기에서 mTGase를 생산한 결과, 배양 6일에 2.14 U/mL로 가장 높은 효소활성을 나타내었고, 용존산소를 조절하지 않은 경우보다(11) 1.1배 증가된 결과였다. 따라서 용존산소 자동조절 시스템은 mTGase 생산뿐만 아니라 용존산소농도가 보다 중요하게 적용되는 미생물에는 효과적으로 생산성을 높일 수 있는 시스템으로 판단되었다.

생물반응기를 이용한 회분식 또는 유기식 배양환경의 최적화 등을 통해 mTGase 생산의 변화를 실험 조건과 함께 표에 간략하게 요약하였다.

Summary of process development leading to enhanced production of
mTGase by *Streptoverticillium mabalense*

| Cell conc. (g/L) | mTGase (U/mL) | Remarks | Exp. Conditions |
|---------------------|------------------|--|---|
| 20.6 | 0.69 | Effect of agitation speed by basic production medium | liquid stock, pH 7.0, 330 rpm, 1 vvm, 30°C, 5% inoculum |
| 11.8 | 0.32 | Effect of pH control by basic production medium | liquid stock, pH 7.0, 400 rpm for the first 18 hr and turn to 330 rpm, 1 vvm, 30°C, 5% inoculum |
| 20.5 | 0.69 | Impeller effect by basic production medium | liquid stock, pH 7.0, 330 rpm, 1 vvm, 30°C, 5% inoculum, rushton turbin impeller (D ₁ /T=0.59) |
| 7 | 0.96 | Optimized production medium | liquid stock, pH 7.0, 330 rpm, 1 vvm, 30°C, 5% inoculum, rushton turbin impeller (D ₁ /T=0.59) |
| 12 | 0.96 | optimized production medium by using RSM result | liquid stock, pH 6.5, 330 rpm, 1 vvm, 30.6°C, 5% inoculum, rushton turbin impeller (D ₁ /T=0.59) |
| 14 | 1.96 | Effect of agitation speed by optimized production medium | spore stock, 330 rpm, 1 vvm, 5% inoculum, rushton turbin impeller(D ₁ /T=0.59) |
| 12.4 | 2.16 | Fed-batch culture by proteose peptone feeding | spore stock, 330 rpm, 1 vvm, 30°C, continuously feeding |
| 15 | 2.14 | DO control(20%) by using on-line computer-controlled fermentation system | spore stock, pH 7.0, 330-430 rpm, 1-4 vvm, 5% inoculum |

맥류가공식품의 생리활성 및 구조기능 향상을 위한 생체기능조절물질의 대량생산 및 효소의 분리

- mTGase 최적 반응 조건 확인 : 농도가 10 mg/mL인 mTGase를 다양한 기질 농도 (5~100 mM)에서 반응시켰을 때 40mM의 범위에서 기질 농도와 비례하여 mTGase의 V_0 가 증가했으며, Hanes-Wolf plot식에 의한 V_{max} 와 K_m 값은 $0.602 \mu\text{M}/\text{min}$, 34, 20 mM였다.
- mTGase의 최대 활성 온도는 60°C 에서 $1.00 \text{ unit}/\text{min}$ 로 최대값을 나타냈으나, 식품 적용에 적절한 온도는 40°C 이하로 나타났다.
- PM30 및 YM30막을 이용하여 0.1% mTGase 용액을 막 분리했을 때 막횡단 압력이 15psi에서 flux가 최대로 측정되었으며, polysulfone 계열의 막인 PM30이 친수성인 YM30(cellulosic type)막보다 높게 나타났다. 따라서 연속한외여과 막으로 polysulfone 계열의 막이 선정되었다.
- *Streptoverticillium mobaraense*의 2차 대사산물인 microbial transglutaminase (mTGase)의 대량 분리공정시스템 개발을 위해서 30L 발효조 와 flask에서 배양된 효소액을 각각 원심분리 후 효소 농도를 비교하였다. 발효조에서 얻어진 조효소액의 효소 농도($2.24 \text{ unit}/\text{ml}$)는 flask 배양액의 효소농도($0.75 \text{ unit}/\text{ml}$)보다 약 3배 이상 높았으며, 비활성도의 경우도 효소농도와 마찬가지로 발효조 배양액 ($0.22 \text{ U}/\text{mg}$)이 flask 배양액($0.13 \text{ U}/\text{mg}$)보다 높았다. 발효조에서 배양된 배양액이 flask 배양액에 비해 효소 농도 및 비활성도가 높으며, 이는 mTGase의 대량생산 가능성을 시사하였다.
- Lab-scale 최적 한외여과공정은 TFF(Tangential flow filtration)방식의 한계분자량(Molecular weight cut-off, MWCO) 100K 한외여과막과 30K 한외여과막을 이용하였으며, 100K 한외여과막으로 1차 분리하고 분리된 여과액은 30K 한외여과막으로 농축하는 2단계 한외여과 공정으로 수행되었다. MWCO 100K 한외여과막에 의

한 분리 수율은 55% 수준으로 나타났으며, MWCO 30K 한외여과막에서 농축된 효소 농도는 1.20(2배 농축) unit/ml에서 1.48(5배 농축) unit/ml로 증가하였다.

Scale-up 가능성을 확인하기 위해 30 L 발효조 배양액을 원심 및 예비여과(0.7 μm) 후 pore size 0.3 μm 미세여과막을 이용하여 조효소액 10 L를 flow rate 0.75 L/min으로 분리한 결과 flux는 775 L/m²/hr이었다. 최적 TMP(Pin 4, Pout 0)조건에서 pilot-scale TFF(Tangential flow filtration) 방식인 MWCO 30K 한외여과막을 이용하여 분리 및 농축한 결과, 조효소액 5 L를 5배 농축하는데 걸린 시간은 0.55 hr, 10배 농축하는데 걸린 시간은 1 hr 이었다.

평균 flux는 상온(24℃)에서 41.4 L/m²/hr, 저온(14℃)에서 72.4 L/m²/hr로 측정되어, 낮은 온도가 mTGase 분리 효율을 높이는데 적절한 것으로 나타났다. 효소 농도와 비활성도는 농축비(volumetric concentration rate, VCR)가 높아질수록 2.57(2VCR)에서 5.52(5VCR) unit/ml, 0.26(2VCR)에서 0.33(5VCR) U/mg protein로 증가했으며, 이는 lab-scale 한외여과 공정에 비해 우수한 결과였다.

이상의 결과 최적 미세여과막(1.7 μm , 0.3 μm)의 couple system과 30K 한외여과막을 사용함으로써 분리에서 농축까지 연속적인 막분리공정이 가능함을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 결과는 공정의 선형적인 생산규모확대, 분리공정의 단순화 및 높은 수율의 효소분리 가능성을 시사하였다.

천연소재 물성개량제를 이용한 농산가공식품의 기능성개선 및 제품개발

· 구상 단백질의 겔화 조건 탐색

동물성 구상 단백질을 model system으로 설정하여 가열처리에 의한 열변성 특성을 실험하였다. 각 단백질의 농도는 5%, 이온강도는 0.05이었으며, 염의 존재유무에 따른 겔화현상을 살펴보았다. 그 결과, 가열 온도에 따른 단백질 용액의 상변화가 단백질의 종류, 단백질의 혼합종류, 혼합비율, 및 온도에 따라 다양한 sol-gel 형성을 보였다. 혈청단백질 및 난백단백질 등은 가열에 의하여 불투명하지만 단단한 겔을 형성하였으나, 유청글로블린의 경우, 가열에 의한 겔은 형성되지 않고 흐름성이 감소한 현상과 아울러 시험관 벽면에 균질하고 투명하게 표면막을 형성하는 것으로 나타났다.

구상단백질의 surface hydration layer를 교란시켜 단백질의 소수성 내부(hydrophobic core)를 노출시키고 이들 소수영역의 자발적 응집에 의해 형성되는 고분자의 특성을 조사하였다. 유전항수 78인 aprotic solvent인 에탄올을 이용하여 단백질(구상단백질-혈청알부민, 유청글로블린, 난백단백질등)의 겔형성 특성을 비교한 결과, 혈청알부민과 난백알부민은 에탄올 농도 30-50%에서 투명하고 비가역적인 겔을 형성하였으며, 유청단백질의 일종인 β -lactoglobulin은 투명하고 가역적인 겔을 형성하였다. 이상의 조건에서 겔을 형성한 온도조건은 37°C로 적절한 용매조건에서는 단백질의 구조적 특성을 이용하여 응용범위가 다양한 가역적 저온 겔을 만들수 있다. 혈청알부민의 경우, 반응과정중 비가역적이고 투명한 겔이 형성되어 에탄올이 hydrophobic interaction에 의한 겔이 형성된 것으로 판단되나, 유청글로블린의 경우, 반응 종료후, cooling과정동안 형성된 겔이 온도상승에 따라 가역적으로 sol상태로 변화하는 것으로 나타났다. 이에반해 난백단백질은 저농도의 에탄올환경하에서는 흐름성있는 sol을 형성하였으며, 30%농도에서는 반투명의 단단한 겔을 형성하였다. 그러나, 고농도의 에탄올존재하에서는 빠른 응집현상을

보였으나 반투명하고 균질한 겔형성을 보여주었다. 이 구조는 식품학적 기능특성이 가장 우수한 구조단계로 많은 연구결과 밝혀짐으로써 단백질가공을 통한 고기능성 소재개발을 기대할 수 있으리라 사료된다. 아울러, 혈청단백질은 alpha-helix dominant구조를 지니고 있지만 에탄올의 첨가에 의한 구조변이는 보이지 않고 오히려 helix구조가 다소 안정화됨을 알 수 있었다. 따라서, 알콜첨가등의 단백질가공에 대한 기초자료 확보에 중요한 역할을 하리라 사료된다.

• Transglutaminase에 의한 구상 단백질군의 겔 형성 특성 비교

기질에 이용된 단백질은 주로 구상단백질인 혈청알부민, 난백알부민, 유청단백질, 및 콩단백질이 었다. 각 단백질의 구조적 특성을 감안하여 mTGase에 의한 단백질의 감수성을 높이고자 단백질 용액을 37℃, 50℃, 55℃, 60℃에서 예비 열처리를 수행하였다. 혈청단백질은 효소에 의해 투명하거나 부분적으로 반투명한 겔을 형성하였으며 효소농도 증가시 겔의 강도 및 탁도가 증가하였다. 유청단백질의 경우, 효소에 의해 반투명 겔을 형성하였고 37℃에서 예비열처리 결과 칼슘이온 존재하에서 겔이 형성되었다. 콩의 glycinin은 11S분획은 효소에 의한 불투명하고 단단한 겔이 형성되었으나 7S 분획은 흐름성이 있는 sol을 형성하였다. 혈청알부민은 효소첨가에 의해 투명하거나 반투명의 단단한 겔을 형성하였으며 칼슘존재시 불용성이며 탄력성이 있는 겔을 형성하였다. Alpha-Lactalbumin은 칼슘첨가시 침전을 형성하였으며 효소첨가에 의해 불투명하고 soft한 겔을 형성하였으며, beta-lactoglobulin의 경우 효소에 의해 투명한 겔을 형성하였다. 난백단백질인 ovalbumin은 효소에 의해 겔이 형성되지 않았다. 따라서, 구상단백질의 구조적 특성과 예비 열처리 조건에 따라 효소를 이용한 저온 겔을 형성할 수 있으며 이들 저온 겔은 식품 가공적성을 향상시킬수 있는 신소재로 이용 가능성이 높다.

- 효소첨가에 따른 전통식품의 물성개선 효과 및 신제품 개발

전통 육류제품인 너비아니를 생산할 때 다집육을 사용했을 경우에도 효소에 의한 단백질간 가교결합 형성으로 결착력이 증가되고 수분보습력이 우수한 제품을 생산할 가능성이 있다. 또한, 두부를 원재료로 하는 신제품개발시 효소첨가량을 조절함으로써 두부완자 등의 부스러짐을 방지할 수 있었으며 slicability등을 개선할 수 있었다.

2. 활용에 대한 건의

- 생물반응기 운전전략 및 배양조건 최적화 등의 축적된 know-how는 mTGase 생산 및 균사형성 미생물 발효 등에 이용 가능하리라 생각된다.
- 또한 임펠러의 종류와 교반속도 및 통기속도에 따른 산소물질전달계수에 관한 연구는 미생물 발효시 요구되는 산소요구량을 만족시킬 수 있는 최적의 임펠러 및 생물반응기 운전전략에 관한 사양을 제시할 수 있다.
- 그리고 용존산소 자동조절 시스템은 산소요구량이 중요한 미생물 발효에 효과적으로 적용할 수 있는 시스템으로 생각된다.
- 한외여과막에 의한 mTGase 분리정제 know-how는 고부가가치 protein의 분리 정제에 이용이 가능하리라 판단된다.
- 연속분리공정에 관한 연구는 대량 생산시 분리정제 비용을 최소화 할 수 있는 운용조건을 제시 할 수 있다.
- 각종 단백질의 구조적 특성을 이용하여 효소의 첨가를 통한 가공적성이 우수한 젤상식품 및 첨가물 소재를 개발할 수 있다.
- 밀가루의 품종 및 특성에 따라 효소첨가량을 조절함으로써 반죽 특성을 개선할 수 있으며 다목적 제품개발을 위한 기초자료로 활용 용가능성이 높다.
- 효소를 첨가함으로써 너비아니, 두부, 완자등 전통식품의 물성개량 및 신제품개발을 위한 물성증진 효과를 기대 할 수 있다

SUMMARY

Title of Research

Application of vital function-regulatory substance obtained from barley and development of high value agricultural processing products by improvement of structural functionality on barley based processing foods.

Optimized process development for microbial enzyme fermentation to improve the structural functionality on barley based processing foods

For optimized process development and improvement for microbial transglutaminase(mTGase) fermentation, lots of sets of experiments have been carried out in both shake and bench-scale cultures of *Streptoverticillium mobaraense*. Improvements in the fermentation processes involved determination of optimum inoculum size, seed and production media development, modification of fermentation parameters such as agitation speeds, aeration rates pH, and temperature, and introduction of fed-batch bioprocess.

The medium of mTGase production from *S. mobaraense* was optimized in shake flasks using statistical experimental design approach. Latin-square technique for the optimization of the production medium was used to identify the cell growth and the mTGase production. By combining this technique with the classical method, the essential medium components were determined and the composition quantified in shake flasks. Effect of various components in the basic medium, like carbon, nitrogen and phosphates was tested on the mTGase

production. Thus, the optimized medium composition found consisted of 50 g/L starch, 20 g/L proteose peptone, 1 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L MgSO_4 , 2 g/L yeast extract and 0.5 g/L polypropyleneglycol. The mTGase production was 1.6 U/mL, which was found to be improved almost 1.6 times in comparison with that in the basic medium.

The effect of agitation speed was also observed by using different sizes and types of impeller for the mTGase production. The agitation speed ranged from 258 to 400 rpm. Maximal mTGase production was 0.69 U/mL when agitation speed was 330 rpm. However, the severe inhibition of the cell growth was not observed at high agitation speed.

Notably, the effect of pH on the mTGase production was revealed to be significant. When pH was controlled around pH 7.0 during the whole fermentation period, the mTGase production reached around 0.32 U/mL, which was much higher quantity compared to the values obtained pH uncontrolled fermentation.

To select the optimum impeller for the fermentation, three types, namely, rushton turbine, scaba and pitched blade impeller were tested. The maximum mTGase production obtained was 0.69 U/mL in 4 days by using rushton turbine impeller, which was evaluated to be more efficient than others in order to give fairly high oxygen transfer rate.

In the previous study, it was known that the growth of *S. mobaraense* is sensitive in the factors like pH and temperature at the fixed incubation period(4 days). The effect of culture conditions like temperature and initial pH of the medium on the growth of the *S. mobaraense* was studied as a function of the biomass and mTGase production. With this design of experiments, the

optimum conditions of the two factors were found. From the experimental data, the maximum content of enzyme that could be produced was 1.28 U/mL at pH 6.5 and 30.6°C, and the maximum amount of biomass was 20.35 g/L at pH 5.1 and 33.7°C. By solving 2 order regression model the predicted values of mTGase and DCW were compared with experimental values. A well correlation was observed between the predicted and experimental values, and batch culture was also carried out to confirm the mTGase production in shake flasks under the optimum culture conditions obtained.

Culture in a fermenter by using optimized medium and physical environments was also carried out. The mTGase production was 0.96 U/mL at 78 hours, and it was improved about 1.4 times in comparison with that for the basic medium in shake flasks.

Fed-batch operation has been widely used for antibiotic and enzyme production where secondary metabolites are produced in the idophase. Fed-batch cultures are usually carried out with the control of the nutrient feeding by monitoring dissolved oxygen(D.O) to achieve a high productivity of a desired bioproduction. As a result of the previous study, it was known that mTGase produced by microorganism may crosslink peptides and amino acids in the medium, which probably cause the enzyme content to decrease. In this study, proteose peptone was supplied with a required concentration for the maximum growth in a batch culture and then the organic or inorganic nitrogen was applied continuously during a fed-batch mode to avoid the crosslinking of the nitrogen sources in medium by the mTGase produced. Thus, fed-bath studies in shake flasks were carried out to find the optimum inorganic or organic nitrogen sources. Various nutrient feeding methods were also applied to

enhance the mTGase production. As a result, the mTGase production by intermittent fed-batch feeding of proteose peptone was 1.45 U/mL, which was found to be improved almost 1.5 times in comparison with that in the optimized medium in shake flasks.

The development of a mass production process for mycelial organism is difficult because of the high branched cell morphology. In addition, DO level is known to play the important roles in regulating activities of the biosynthetic enzymes for secondary metabolite production. Therefore, we developed the on-line computer-controlled fermentation system to which both agitation speed and aeration rate were adjusted simultaneously by use of DO analyzer connected. The highest mTGase production was 2.1 U/mL when dissolved oxygen level was maintained at 20% by using the developed system, and it was improved almost 1.1 times in comparison with that without dissolved oxygen control.

Mass production of vital function-regulatory substance and enzyme separation in order to improvement of biological activity and structural functionality of barley based processing foods

In order to investigate the optimum reaction condition of the microbial transglutaminase (mTGase), 10 mg/mL of mTGase reacted on the substrate of the various concentration. V_0 of mTGase increased in proportion to the substrate concentration up to 40mM, V_{max} by Hanes-Wolf plot formulation was 0.602μ M/min and K_m value by Hanes-Wolf plot formulation was 34.2 mM. Although maximum activation temperature of mTGase was 60°C, suitable temperature for applying it to food processing was under 40°C because of its low stability at high temperature.

When 0.1% mTGase standard solution was tested using PM30 and YM30, the flux was highest at 15 psi transmembrane pressure, and the flux of PM30 (polysulfone sort) was higher than those of hydrophilic YM30 (cellulosic type). Therefore, polysulfone sort was selected for further experiment.

In order to develop mass separation process of mTGase that is a secondary metabolite produced by *Streptoverticillium mobaraense*, the culture fermented at 30L and flask scale, respectively, centrifuged, and then the enzyme concentration was compared to each other. The enzyme concentration from 30L fermenter (2.24 unit/ml) was higher about three times than those from flask culture (0.75 unit/ml). The specific activity of the culture obtained from 30 L fermenter (0.22 U/mg) was also higher than those from flask culture (0.13 U/mg).

These results suggest that 30L fermenter is better than flask for the

mTGase production, which shows the possibility of mass production of mTGase.

To determine optimum ultrafiltration (UF) process for the separation of mTGase at lab scale, two-step UF process using 100K UF membrane and 30K UF membrane of the TFF (Tangential flow filtration) system was used. The culture was permeated through a 100K UF membrane and then concentrated by a 30K UF membrane.

The initial enzyme concentration filtered through MF membrane was 425U/250mL, but it was decreased 236U/200mL with permeated through MWCO 100K membrane. The mTGase of 44.4% level was not permeated MWCO 100K UF membrane. The enzyme concentration that was concentrated using MWCO 30K UF membrane increase from 1.20(2VCR) unit/ml to 1.48(5VCR) unit/ml. These results indicate that MWCO 30K UF membrane is sufficient for the separation and concentration of mTGase.

In order to investigate the possibility of mTGase separation at large scale, the culture fermented in 30 L fermenter was centrifuged first and pre-filtered ($0.7\ \mu\text{m}$ pore size). When the permeate 10 L was separated using a MF membrane ($0.3\ \mu\text{m}$ pore size) at the flow rate of 0.75 L/min, the flux was 775 L/m²/hr.

In the condition of the optimum TMP (Pin 4, Pout 0), it took 0.55 hr (5 times concentration) and 1 hr (10 times concentration) for the concentration of the crude enzyme solution (5 L), using the pilot-scale 30K UF membrane of the TFF system,

The average flux at 24°C and 14°C were 41.4 L/m²/hr and 72.4 L/m²/hr, respectively, which shows that low temperature gives better separation efficiency.

As the VCR increases, the enzyme concentration and specific activity increased from 2.57 unit/ml (2VCR) to 5.52 unit/ml (5VCR), and from 0.26 U/mg protein (0.3 μm) to 0.33 U/mg protein (5VCR). It means that large-scale UF process gives higher efficiency than that of lab-scale UF process.

These results confirm that continuous membrane separation process using the coupled system of MF membrane(1.7 μm , 0.3 μm) and UF membrane is possible for the efficient production of mTGase. It also suggest the possibility of linear product scale-up and high-yield separation of mTGase.

Functional improvement and product development of processing food using by microbial transglutaminase as a novel ingredient

Gelation phenomena of globular proteins by microbial transglutaminase(mTGase) originated from *Streptoverticillium mobaraense* were investigated for soybean glycinin including maleylated glycinin, bovine serum albumin, β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and ovalbumin as a model protein. The glycinin of soybean was susceptible to the mTGase reaction, although the basic subunits of glycinin were not involved in polymerization without dithiothreitol(DTT), a reducing agent. Calcium gave turbidity to transglutaminase-induced gel formed from BSA and ovalbumin. Oscillatory shear measurements were employed to investigate the rheological properties of the mTGase-treated proteins. Storage and loss moduli (G' and G'') measured at a constant frequency of 1Hz and 50°C revealed. The protein solution exhibited near-zero storage moduli (G' , indicative of gel elasticity) during the onset of TGase treatment but progressively increased with incubation time and eventually leveled off to maximal G' values. In addition, the rate of development of the gel rigidity increased with increasing mTGase concentrations. Purification of TGase was conducted by precipitation by adding ammonium sulfate and dialysis, and sequentially fractionated on a column CM-sepharose CL-6B. Purification of crude enzyme at each step gave rise to increasing specific activity

Polymerization of disulfide bonds cleaved BSA(Bovine serum albumin)-stabilized emulsion by microbial transglutaminase was investigated. The structural changes of reductant-treated BSA were observed by fluorescence

spectroscopy and circular dichroism spectroscopy, which was apparently changed as the concentration of 2-ME increased. Polymerization was induced in both adsorbed and unadsorbed protein by mTGase, and reduced samples with 2-ME were polymerized more effectively. Storage modulus was the highest at both 2-ME and enzyme-treated BSA-stabilized emulsion gels. The conformational changes induced by disulfide bonds cleavage and mTGase treatment are certainly effective on making a solid-like emulsion gel.

To improve the physico-chemical properties of processing food, microbial transglutaminase has been extensively studied for years as a novel ingredient. This enzyme has been well known to have water holding capacity, fat holding capacity in the newly formed network. Korea traditional food such as meat- or tofu-based quisine is focused on developing thier texture and storage stability. In case of minced meat-based product, transglutaminase added with 0.5% greatly gave elasticity and hardness to minced-meat product. Also, transglutaminase significantly increased hardness, elasticity, homogeneity of Tofu sausage and significantly decreased fracturebility. Tofu sausage showed sliceability as good as luncheon meat sausage. As the result, transglutaminase significantly improves the textural properties of meat-based or tofu-based product.

To improve the dough properties and develop multigrain-based dough, transglutaminase was added to the wheat flour-based dough and rice flour-based dough, respectively. Any significant change in mixogram was not shown in wheat flour-based dough, and wheat flour mixed with rice flour at a low rate. However, the transglutaminase greatly stabilized the mixogram of dough made of wheat flour and rice flour mixture(5:5, w/w) with much less

water absorption. Therefore, microbial transglutaminase seem to be applicable as a novel ingredient for improving the physico-chemical properties in processing food.

CONTENTS

| | |
|--|------------|
| Presntation note | 1 |
| Summary(in Korean) | 2 |
| Summary(in English) | 14 |
| Contents(in English) | 24 |
| Contents(in Korean) | 26 |
| | |
| Chapter 1 Introduction | 29 |
| Section 1. Objective and Scope of the research | 29 |
| | |
| Chapter 2. Optimized process development for microbial enzyme fermentation to improve the structural functionality on barley based processing foods | 33 |
| Contents | 35 |
| Section 1. Introduction | 37 |
| Section 2. Material and Method | 41 |
| Section 3. Results and Discussion | 53 |
| Section 4. Reference | 117 |
| | |
| Chapter 3. Mass production of vital function-regulatory substance and enzyme separation in order to improvement of biological activity and structural functionality of barley processing food | 121 |
| Contents | 123 |
| Section 1. Introduction | 125 |
| Section 2. Material and Method | 127 |
| Section 3. Results and Discussion | 133 |
| Section 4. Reference | 174 |

| | |
|--|-----|
| Chapter 4. Product development and functional improvement of agricultural processing foods using texture improvement substances of natural source | 177 |
| Contents | 179 |
| Section 1. Introduction1 | 181 |
| Section 2. Material and Method | 183 |
| Section 3. Results and Discussion | 197 |
| Section 4. Reference | 233 |

목 차

| | |
|--|-----|
| 제 출 문 | 1 |
| 요 약 문 | 2 |
| 영문요약 | 14 |
| 영문목차 | 24 |
| 목 차 | 26 |
| | |
| 제 1 장 서 론 | 29 |
| 제 1 절 연구개발의 목적과 범위 | 29 |
| 연구 개발의 목적 | 29 |
| 연구 개발 범위 | 30 |
| | |
| 제 2 장 | |
| 맥류가공식품의 구조기능성 향상을 위한 효소생산 미생물의 발효 최적화 | 33 |
| 목 차 | 35 |
| 제 1 절 서 설 | 37 |
| 제 2 절 재료 및 방법 | 41 |
| 제 3 절 결과 및 고찰 | 53 |
| 제 4 절 참 고 문헌 | 117 |
| | |
| 제 3 장 | |
| 맥류가공식품의 생리활성 및 구조기능 향상을 위한 생체기능조절물질의 대량 생산 및 효소의 분리 | 121 |
| 목 차 | 123 |
| 제 1 절 서 설 | 125 |
| 제 2 절 재료 및 방법 | 127 |
| 제 3 절 결과 및 고찰 | 133 |

제 4 절 참 고 문 헌 174

제 4 장

천연소재 물성개량제를 이용한 농산가공 식품의 기능성 개선 및 제품화 177

목 차 179

제 1 절 서 설 181

제 2 절 재 료 및 방 법 183

제 3 절 결 과 및 고 찰 197

제 4 절 참 고 문 헌 233

여 백

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구 개발의 목적

일본에서 1993년 이후 mTGase가 상업적으로 Ajinomoto 사에 의해 생산되고 있는 실정이며, 곧 세계시장에도 관련 제품이 생산되어 출시되리라고 예상된다. 현재로서는 상당히 고가이며, 일본의 Ajinomoto Co., Inc.와 Amano Pharmaceutical Co., Ltd에 의한 특허 출원이 국제적으로 되어있는 상태이다. 상기 회사들의 공동연구에 의하면 mTGase activity가 2.5 unit/mL임을 발표하였고 효소의 분리 수율은 실험실적 규모에서 약 40% 수준인 것으로 보고되고 있으나 산업적 기술 수준에 대해서는 알려져 있지 않다 (Ando 등, 1989). Ajinomoto사는 지난 10 여년 간 상당한 규모의 연구 개발비를 투입하여 각종 단백질 식품에 물성개량제로 이용 가능한 transglutaminase를 미생물로부터 분리하여 현재 상업용 효소를 생산하는 단계에 이르러 있다. 이 효소는 극소량을 첨가하더라도 가공식품의 물성을 현저히 증강시킬 수 있는 특성을 지니고 있기 때문에 이미 고부가가치성 상품으로 인정되고 있다. 따라서 첨단 발효공학 기술을 이용하여 효율이 높은 미생물균주를 선발하여 (제1과제), 역가가 우수하고 수율이 높은 효소의 생산 및 상품화 (제2과제)를 이루게 된다면 무한한 잠재력이 있는 국제시장에서 일본제품과의 경쟁력을 확보할 수 있다고 사료된다. 또한, 이를 이용한 반가공식품의 개발 (제3과제)로 가공식품의 수출기회가 확대될 가능성을 지니고 있다. 국내에서 mTGase의 대량 생산이 가능하게 되어 상업적 수준의 효소제품이 개발되면 농산가공 뿐만 아니라, 육가공, 유가공 분야에서도 저비용으로 고부가가치성 가공제품을 개발할 수 있는 커다란 잠재성을 지니고 있으며, 궁극적으로 가공식품의 질적향상을 도모함과 동시에 수출상품의 국

제경쟁력 증진 및 농·축산가의 소득을 증대시킬 수 있다. 따라서 mTGase 생산 미생물의 발효최적화, 대량 분리·정제 시스템 확립 및 분리·정제된 mTGase를 가공식품에 적용하고자 하는데 본 연구의 목적이 있다.

2. 연구 개발 범위

가공식품의 구조기능성 향상을 위한 효소생산 미생물의 발효 최적화

가. mTGase 생산균주의 특성연구

- 1) Shake-flask에 의한 생산 균주 특성 연구, 배지 조사 및 최적화
- 2) 산업용 복합배지 개발
- 3) 배지 성분 분석 방법 개발

나. mTGase 생산성 증가 및 회분식 배양

- 1) 효율적 산소공급 방법 확립 및 장치설계
- 2) 산소전달특성 분석 및 규모확대 기초자료 조사
- 3) 회분식 배양기술 확립

다. mTGase 생산성 증가 및 유가식 배양

- 1) 제한 탄소원 또는 질소원에 의한 유가식 배양
- 2) 최적 조건 control에 의한 생산성 향상
- 3) 규모확대 방안 제시

맥류가공식품의 생리활성 및 구조기능향상을 위한 생체기능조절물질의 대량 생산 및 효소의 분리

가. mTGase의 역가 및 활성 측정

- 1) mTGase의 역가 측정법 확립
- 2) Microbial transglutaminase의 kinetic study
 - 기질의 농도 및 반응 시간에 따른 mTGase의 역가 변화 측정
 - 각 방법 별 효소의 K_m , V_{max} 값 측정
 - 효소의 최적 온도 및 각 온도에서의 효소 안정성 측정
 - 효소의 변성 온도 및 활성화 에너지 계산

나. 비연속 한외여과 시스템에 의한 효소분리공정 모델링

- 1) 모델 용액을 사용하여 PM30 막 및 YM30 막의 flux 측정
- 2) PM30 막 및 YM30 막의 permeate내 mTGase 투과율 측정
- 3) mTGase의 농축비(VCR)에 따른 permeate 및 retentate 측정

다. 비연속 예비여과 및 미세여과 조건의 최적화

- 1) 예비 여과 및 미세여과 공정별 단백질, 효소, 가용성 전분 농도 측정

라. Lab-scale용 연속 한외여과 시스템에 의한 mTGase 분리정제

- 1) 증공 사막에 의한 효소액의 농도별 flux 측정
- 2) TFF 연속 한외여과 system에 의한 분리 정제

마. Pilot-scale 연속 분리 공정에 의한 규모 확대 가능성 검증

- 1) 3단계 연속 분리 공정에 의한 mTGase 분리 정제

천연소재 물성개량제를 이용한 농산가공식품의 기능성 개선 및 제품화

가. 다양한 가공처리(열처리, 압력처리, 효소처리)에 의한 sol-gel화 기작 유도

- 1)단백질 구조에 따른 gel화 기작 유도
- 2)Gelling property 구명

나. 면류(생면, 생라면)의 물성증진을 위한 효소적 가공의 최적모델 구축

- 1)효소첨가에 따른 밀가루반죽 및 면의 물성 특성조사
- 2)밀가루 반죽의 물리적특성 조사(파리노그래프시험)
- 3)Cyclodextrin, dextrin류를 이용한 효소의 저장안정성 조사

다. 면류 및 bakery류 등의 물성증진을 위한 효소적 가공의 최적 모델 구축

- 1)편이성 면질개량제로 이용 가능한 형태의 mTGase 제품의 개발
- 2)mTGase 첨가 겔상 식품의 저장안정성 평가
- 3)전통식품 조제에 mTGase 적용 및 응용방안

맥류가공식품의 구조기능성 향상을 위한 효소생산
미생물의 발효 최적화

연구 기관 : 전북 대학교

연구책임자 : 정 용 섭

연 구 원 :

전 계 택

유 재 수

이 화 정

여 백

맥류가공식품의 구조기능성 향상을 위한 효소생산 미생물의 발효 최적화

| | |
|-----------------------------------|-----|
| 제 1 절 서 설 | 37 |
| 제 2 절 재료 및 방법 | 41 |
| 제 3 절 결과 및 고찰 | 53 |
| 1. 생산배지 최적화 | 53 |
| 2. 회분식 발효조건 확립 | 67 |
| 3. 반응표면 분석법에 의한 발효조건 확립 | 83 |
| 4. 포자 stock에 의한 mTG 생산연구 | 88 |
| 5. 플라스크에의한 유가식 배양 조건 확립 | 100 |
| 6. 생물반응기를 이용한 유가식 배양조건 확립 | 105 |
| 7. 용존산소 자동조절 시스템에 의한 mTG 생산 | 111 |
| 제 4 절 참 고 문헌 | 117 |

여 백

제 2 장 가공식품의 구조 기능성 향상을 위한

효소 생산 미생물의 발효 최적화

제 1 절 서 설

Transglutaminase(TG)는 acyl transfer 반응을 촉매하는 효소로써 단백질과 펩타이드 그리고 여러 가지 1급 아민기간의 가교 결합을 형성시킨다. 단백질의 lysine에 인접한 ϵ -amino기가 acyl acceptor로써 작용하게 되면 ϵ -(γ -Glu)-Lyn 가교 결합이 형성된다. 반응계 내에 1급 아민기가 존재하지 않는 경우에는 물이 acyl acceptor로써 작용하게 되어 glutamine 잔여기의 γ -carboxamide기가 탈아미드화되고 glutamine은 glutamic acid가 된다. 상기의 촉매반응을 Fig. 1에 나타내었다 (1, 2).

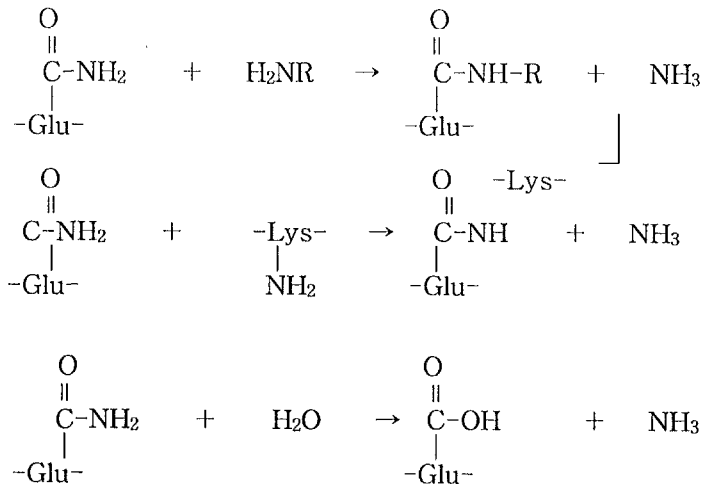


Fig. 1 Transglutaminase-catalysed reactions.

TG가 가교 결합을 촉매함으로써 단백질 식품간의 젤라틴화를 형성, 단백질과 결합하는 보조소 NAD^+ 를 고정화, 단백질 식품의 영양가와 기능성을 향상시키기 위하여 공유결합에 의해 식품단백질에 lysylpeptide와 아미노산 ester, lysine의 삽입에 대한 연구가 시도되었다.

TG는 whey protein, soya protein, gluten, myosin, actomyosin과 같은 다수의 단백질의 가교결합에 이용되었으며 이러한 식품단백질의 개량은 다양한 화학적 반응으로부터 필수아미노산인 lysine을 보호할 수 있게 하고, 지질 또는 지용성 물질을 캡슐화할 수 있고, 열 또는 물 저항성 막을 형성할 수 있으며, 젤라틴화 하는 동안 열처리를 피할 수도 있게 하고, 탄성과 수분 보유력 조직감을 향상시키고, 저장기간을 증대시키며 특정식품에 대한 알레르기를 감소시키는 것으로 나타났다⁽³⁾. 이외 의학분야에서는 혈액응고반응에 관여하는 인자 Factor VIII로써, 혈우병 치료제인 혈액응고제로써의 이용 가능성과 상처 치료, 표피 각질화, 인간 수정체의 백내장의 개발, 알츠하이머병과 관련된 전분질을 함유한 혈소판(amlyoid palques)의 침전에 관여하고 있다^(2, 4, 5)

TG를 생산하는 미생물로 *S. ladakanum*, *S. griseocarneum*, *S. cinnamoneum subsp. cinnanoneum* 등의 *Streptoverticiullium sp.*와 *Streptomyce sp.*이 알려져 있다^(1, 5, 6). 이외에도 TG는 거의 모든 동물의 조직과 체액에 분포하며 또한 식물과 어류에도 존재하는 것으로 밝혀졌다⁽²⁾.

Guinea pig의 간 등 동·식물 기원의 TG는 식품의 품질과 영양, 저장성을 증가시키는데에 지난 20여 년간 이용되었으나, 한정된 guinea pig의 공급량과 동물기원 TG의 Ca^{2+} 의존적인 특성으로 인하여 제품의 분리와 정제시 공정의 비용이 많이 소요된다. 그러므로 Ca^{2+} 비의존성이며 단시간내에 TG를 대량 생산할 수 있는 미생물 발효에 대한 연구가 요구되고 있는 추세이다.

일본의 아지노모토(Ajinomoto)사에서 생산되고 있는 Activa-TG는 *Streptoverticiullium sp.*를 배양하여 생산한 제품으로 TG를 0.2-1% 함유하고 있으며, 1% TG를 함

유하고 있는 Activa-TG는 약 150,000원/kg의 고가로 판매되고 있다⁽⁷⁾.

1980년 이후 microbial Transglutaminase의 효능이 알려진 이래 균주개발, 발효 공정, 효소 분리 및 이용 등의 보고에서는 일본 산업체의 자체 기술 보호정책 때문에 극히 제한적인 lab-scale의 정보만 제공되고 있다. 가공식품에 적용하고자 하는 부분적인 분리정제 기술에 관한 보고는 있었지만, 생산 규모의 생물공정 전반 (upstream부터 downstream 까지)에 걸친 연구결과는 거의 알려져 있지 않다^(5, 8, 9).

네덜란드의 Wageningen 농과대학에서 mTG 생산을 위한 배지 최적화와 액상, 고체 상 발효공정 개발에 관한 연구가 진행되었으며, 배지 최적화 후 mTG 활성이 0.25 U/mL에서 0.80 U/mL로 증가하였음을 발표하였다⁽¹⁰⁾.

미생물 배양시 배지조성 등 중요한 배양조건을 확립하는데 체계적인 실험에 의한 분석이 미비하여 많은 부분이 경험에 의한 축적된 know how에 의존하는 경우가 많다. 따라서 많은 시간과 경제적 손실을 가져오게 된다. 실험 계획법은 이러한 시간 손실과 경비를 막고 짧은 시간 안에 신뢰성이 있는 자료를 얻을 수 있다.

발효 중 균사형성 미생물은 2차 대사산물 생산 시 균체 형태구조가 생산성에 많은 관련이 있음이 보고되었다^(11, 12, 13). 일반적으로 균사형성 균류의 경우 액상배양을 하면 균체 형태구조는 균사 또는 펠릴 형태로 자란다. 높은 균체 농도에서 균사형태의 성장은 배지의 유변학적 특성에 따라 불리한 영향을 미치며 높은 점도를 만들어 반응기 내의 물질전달을 감소시킨다. 반면에 펠릴 형태의 성장은 배양액의 유변학적 특성이 뉴튼유체를 나타내며 물질전달능력을 향상시킨다. 따라서 균체 형태구조를 적절한 형태로 조절함으로써 생산성을 높일 수 있다.

또한 균사형성 미생물의 경우 균주의 성장에 따른 발효 배양액의 급속한 점도 증가로 인하여 반응기내의 산소전달능력을 급격히 감소시킴으로써 균주의 생리에 심각한 변화를 초래하게된다. 이러한 산소 공급의 부족은 미생물이 성장하는데 악 영향을 미치며 각 균주들은 임계 용존산소농도 유지를 필요로 한다.

본 연구에서는 라틴방격법과 반응표면 분석을 통하여 생산배지를 최적화하고, 규모확대를 위한 기술 개발로 배양 온도와 pH, 발효조의 임펠러의 종류, 임펠러의 크기를 통하여 효과적인 산소전달 방법을 위한 임펠러의 비교실험을 하였다. 또한 제한기질의 공급에 대한 영향을 알아보기 위하여 회분식 배양과 유기식 배양을 비교하였다. 그리고 균체 형태구조가 효소생산에 미치는 영향을 조사하였고, 교반속도와 통기속도를 제어하여 용존산소농도를 자동 조절할 수 있는 시스템의 개발로 본 균주의 최적 발효조건을 확립하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

균 주

본 연구에서 이용된 균주는 *Streptoverticillium mobaraense*(ATCC 29032)이다. 성장배지에 2 w/v% bacto agar를 넣어 만든 고체배지에서 3개월마다 계대배양하였고, 냉장보관하였다. 고체배지에서 배양한 포자를 액체성장배지에 접종하여 30℃에서 250 rpm으로 교반하면서 3일간 배양하였다. 성장이 좋은 배양균을 택하여 배양균 현탁액 7 mL와 glycerol 3 mL를 혼합한 glycerol liquid stock을 만들어 -20℃에서 냉동 보관하였고 종배양시마다 접종용으로 사용하였다. 그리고 spore liquid stock은 bacto agar 배지에 균을 접종하여 포자를 배양한 후 한 plate당 4 mL의 멸균수를 넣고 여과하여 현미경으로 포자수를 측정하였으며, 10^{12} spores/mL의 현탁액 0.1 mL을 취하여 glycerol 0.3 mL과 멸균수 0.7 mL을 혼합하여 포자 glycerol liquid stock을 만들었으며, 냉장보관 방법은 glycerol liquid stock과 같다. 종배양을 위한 stock은 3개월마다 만들어 사용하였다.

배양배지

배지는 살균시 고온고압에 의한 당성분의 카라멜화 또는 배지중 카르보닐 화합물과 아민, 아미노산, 단백질 등의 아미노 혼합물에 의한 amino-carbonyl 반응(Maillard reaction) 등과 같은 갈변현상이나 무기물 성분의 침전으로 인하여 미생물의 고른 배지성분 섭취가 저해를 받는다. 이를 방지하기 위하여 각 배지 성분을 따로 멸균하고 방냉한 후 무균상자에서 각 배지성분을 혼합하여 사용하였다. 배지는 성장배지와 생산배지로 구분하여 사용하였고 각각의 조성을 Table 1과 2에 나타내었다⁽⁸⁾.

건조균체질량

균체농도는 건조균체질량(Dry Cell Weight)으로 측정하였다. 일정량의 배양액을 취하여 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상정액을 버리고 증류수를 넣고 혼합, 원심분리하는 과정을 세 번 반복하여 배양액내의 수용성 성분을 세척하였다. 항량을 구한 용기에 균체를 담아 105°C에서 약 12시간 건조시킨 후 15분간 데시케이터에서 방냉하고 무게를 측정하였다.

효소활성측정

효소활성은 J. E. Folk 방법을 보완해서 측정하였다⁽¹⁴⁾. 효소를 함유한 배양액을 일정량 취하여 원심분리한 후 상정액 0.1 mL를 pH 7의 0.5 M Tris-acetic buffer에 용해시킨 0.1 M CBZ-L-glutaminyglycine(sigma) 0.2 mL, pH 7의 1 M Hydroxylamine-HCl stock 0.05 mL, 0.02 M EDTA 0.05 mL와 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 15% trichloroacetic acid 0.1 mL, 0.1 N HCl에 용해시킨 5% FeCl₃ 0.15 mL, 2.5 N HCl 0.25 mL를 첨가하여 반응을 정지시키고 발색시켰다. 분광광도계(Shimazu, UV-1601)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도값을 L-glutamic acid γ -mono hydroxamate(Sigma)를 표준시료로 상기방법에 의해 구한 표준곡선식에 대입하여 효소활성을 구하였다. 표준곡선은 Fig. 2에 나타났다. 효소의 1 unit은 1 μ mol L-glutamic acid γ -mono hydroxamate가 생성되는 양으로 결정하였다.

Table 1. The component of growth medium

| Components | Concentration(g/L) |
|---------------------------------|--------------------|
| glucose | 5 |
| MgSO ₄ | 1 |
| K ₂ HPO ₄ | 2 |
| proteose peptone | 2 |

Table 2. The component of production medium

| Components | Concentration(g/L) |
|---------------------------------|--------------------|
| soluble starch | 20 |
| MgSO ₄ | 1 |
| K ₂ HPO ₄ | 2 |
| proteose peptone | 20 |
| yeast extract | 2 |
| PPG(polypropyleneglycol) | 0.5 |

단백질 함량

단백질 함량측정은 Lowery 방법을 이용하였다⁽¹⁵⁾. 시료를 원심 분리하여 상정액을 취하고 적당량 희석하여 시료 1 mL에 0.1M NaOH 용액에 2% Na₂CO₃를 용해시킨 2 mL, 1%의 Na-K-tartrate 용액 0.1 mL, 0.5% CuSO₄·5H₂O 용액 0.1 mL를 혼합하여 혼합액 1 mL를 첨가하여 상온에서 15분 방치하였다. 그 후 50% folin-phenol reagent를 첨가하여 발색시키고, 상온에서 30분 방치한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도값을 표준곡선 식에 대입하여 단백질함량을 측정하였다. 표준곡선은 Fig. 3과 같다.

전분 함량 측정

전분 분석은 Dubois 방법을 보완해서 측정하였다⁽¹⁶⁾. 배양액을 원심분리하여 상정액을 취하고 적당량 희석한 시료 2 mL에 80% phenol 수용액 0.05 mL를 넣은 후 황산 5 mL를 첨가하여 발색시켜 상온에서 2시간 방치한 후 분광광도계를 이용하여 488 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도값을 표준 곡선식에 대입하여 전분을 정량 분석하였다. 표준곡선은 Fig. 4와 같다.

환원당 함량 측정

환원당 함량 측정은 Miller의 방법으로 측정하였다⁽¹⁷⁾. 시료를 원심분리하여 상정액을 취하고, 적당량 희석하여 1 mL의 시료에 DNS(Dinitrosalicylic acid)가 혼합된 시약 3 mL를 첨가한 후 끓는 물에서 5분간 반응시켰다. 실온으로 급냉시킨 후 10 mL의 증류수를 첨가하였고, 분광광도계를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도값은 표준곡선 식에 대입하여 당농도를 계산하였다. 표준곡선은 Fig. 5와 같다.

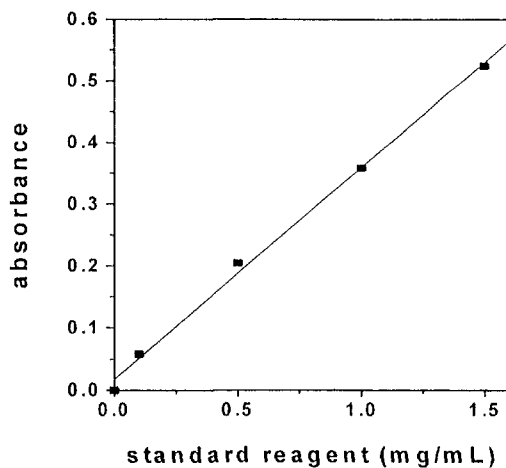


Fig. 2. Standard curve for enzyme activity by L-glutamic acid γ -mono hydroxamate (λ : 525 nm).

Linear regression for enzyme activity

$$Y = A + BX$$

| Parameter | Value | R | S.D. | N | P |
|-----------|---------|--------|---------|---|---------|
| A | 0.01745 | 0.9982 | 0.01485 | 5 | <0.0001 |
| B | 0.34151 | | | | |

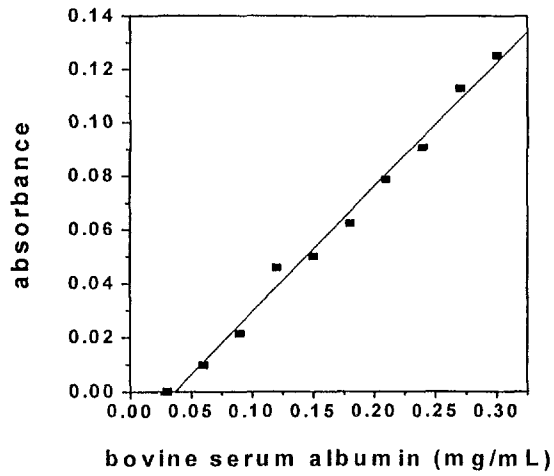


Fig. 3. Standard curve for protein content by bovine serum albumin (λ : 660 nm).

Linear regression for protein

$$Y = A + BX$$

| Parameter | Value | R | S.D. | N | P |
|-----------|----------|--------|---------|----|---------|
| A | -0.04739 | 0.9955 | 0.00426 | 10 | <0.0001 |
| B | 0.46481 | | | | |

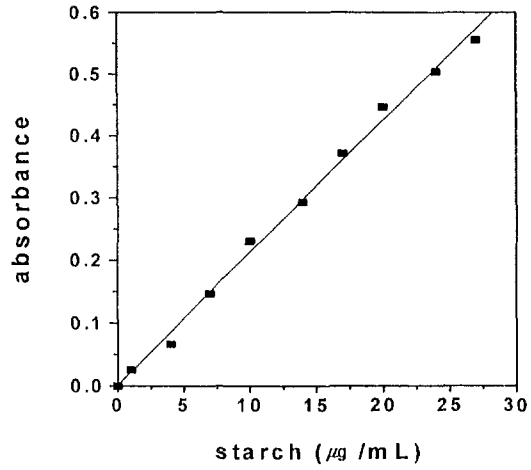


Fig. 4. Standard curve for starch content (λ : 488 nm).

Linear regression for starch

$$Y = A + BX$$

| Parameter | Value | R | S.D. | N | P |
|-----------|-----------------|--------|---------|----|---------|
| A | $-8.3434E^{-4}$ | 0.9985 | 0.01438 | 10 | <0.0001 |
| B | 0.02158 | | | | |

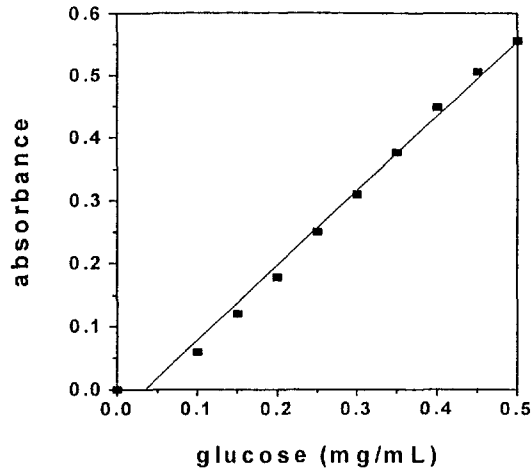


Fig. 5. Standard curve for reducing sugar by DNS method (λ : 540 nm).

Linear regression glucose

$$Y = A + BX$$

| Parameter | Value | R | S. D. | N | P |
|-----------|---------|--------|---------|----|---------|
| A | -0.0689 | 0.9994 | 0.01953 | 10 | <0.0001 |
| B | 1.26903 | | | | |

SAS program을 이용한 통계처리

실험 자료의 통계처리를 위하여 SAS program을 이용하였다. 플라스크 배양에 대하여 ANOVA 분석을 하였고, 이 경우 SNK groupin에서 A letter를 나타낸 변수의 수준을 우선으로 하였고, 동일 letter를 나타낸 경우에는 효소활성이 높은 변수의 수준을 우선으로 하였다. 또한 반응표면분석방법도 SAS program에서 행하였다.

Dynamic Method에 의한 k_La 의 측정

dynamic method는 통기성 발효조에서 세포 배양액과 미생물이 존재하는 실제 발효 진행시 k_La 를 측정할 수 있는 간편하고 정확한 방법으로 용존산소에 대한 물질수지식에 기초한 것이다⁽¹⁸⁾. 일정시간 발효조에 산소공급을 중단하고, 다시 산소를 재공급하여 배양하면 배양액내의 용존산소는 증가하게 된다. 물질수지식의 형태를 변환하여, k_La 를 기울기로 하는 직선식을 구해서 그 값을 측정하였다.

포자수 측정

agar 배지 한 plate당 4 mL의 멸균수를 넣고 여과막(20 - 25 μm)이 부착된 주사기를 이용하여 3번 여과한 여과액을 혈구계와 광학현미경(400배)을 사용해서 포자수를 측정하였다.

형태구조 측정

펠릿 크기와 형태구조는 CCD color camera가 연결된 역상현미경(TOSHIBA, MODEL NO. 1K-642K)을 사용하여 관찰하였다.

용존산소농도조절

제어 및 자료 수집은 Auto Aab LK 930(Lokas, Korea)시스템과 컴퓨터를 연결하여 자동으로 제어되도록 하였다. 시스템의 구성은 Fig. 6과 같다. 산소의 공급은 공기 압축기를 이용하여 발효기내로 공급하였으며, 통기속도는 1 - 4 vvm 범위 내에서 조절하였고, 교반속도는 330 rpm - 430 rpm으로 용존산소농도에 따라 변화시키면서 배양하였다.

CO₂와 O₂ 농도 측정

발효중 방출되는 CO₂와 O₂ 농도는 가스 분석기를 이용하여 분석하였다 (Lokas, Korea).

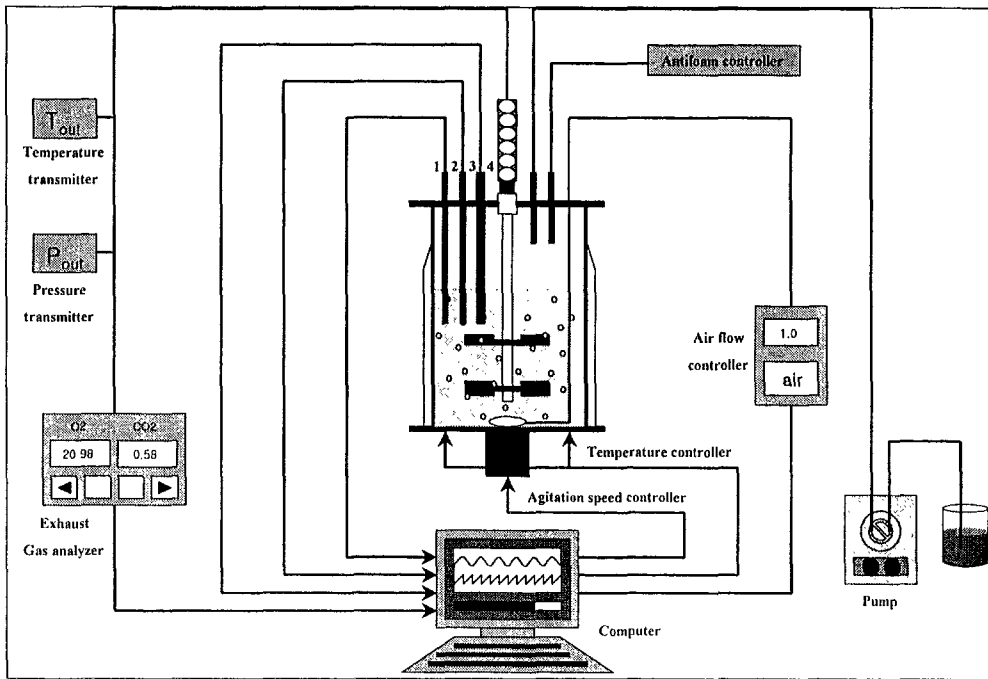


Fig. 6. Configuration of computer control system : 1. Thermocouple
2. pH electrode 3. DO electrode 4. Exhaust condenser.

플라스크 배양

배지최적화 실험과 유가식 배양을 위한 예비실험 및 종배양을 위해 플라스크 배양이 이용되었다. 종배양과 배지최적화를 위한 실험에서는 250 mL의 플라스크에 배양부피 80 mL의 배지를 넣어 항온 진탕배양기에서 30℃, 250 rpm의 조건으로 종배양을 목적으로 하는 경우 Table 3에 표기한 성장배지에서 3일, 배지최적화를 목적으로 하는 경우 Table 4에 표기한 생산배지에서 4일간 배양하였다. 실험을 위한 각각의 배지를 조제할 때 pH는 1N HCl과 NaOH를 이용하여 살균 후 pH가 7.0이 되도록 보정하였다. 24시간동안 배양온도의 배양기에서 활성화시킨 glycerol liquid stock을 성장배지에 3.5% 접종하여 종배양하였고, 배양시킨 균체를 생산배지에 5% 접종하였다. spore liquid stock은 10^8 spores/mL을 성장배지에 접종하여 3일간 배양시켰고, 배양시킨 균체를 생산배지에 5% 접종한 후 7일간 배양하였다. 플라스크 배양의 경우 매 실험마다 4반복하여 그 결과를 분석하였다.

발효조 배양

발효조에서의 배양은 플라스크 배양과 산소전달, 전단응력, pH등의 운전조건이 다르므로 배지의 최적조성비도 플라스크 배양과는 다소 상이할 수 있을 것으로 예상된다. 그러나, 플라스크 배양에서 얻은 결과를 토대로 발효조 운전조건을 확립하는 실험을 수행하였다. 이용된 발효조(KoBio Tech Co., Ltd. Korea)는 2.5 L용이었고, 조업부피는 1.5 L로 하였다. 생산배지에 종배양시킨 균체를 5% 접종하고, 30℃, 330 rpm에서 배양하였다. 배양기간동안 pH는 7.0으로 2N의 HCl과 NaOH를 이용하여 일정하게 조절하였고, 통기량은 1 vvm으로 하였다. 발효조 내의 배지와 균체, 공기의 고른 분산을 위해 rushton turbine impeller($D_1:T=0.59$)가 사용되었으며, 소포제로 PPG-2000를 이용하였다. 배양기간동안 일정량의 시료를 취하여 효소활성, 건조균체량, 환원당과 전분의 함량을 분석하고, 용존산소농도 변화를 관찰하였다. 발효조 배양 실험시 발효용기를 121℃에서 20분간 고압 살균하였고, 살균이 될 때

까지 무균상자에서 방냉하고 살균한 배지를 분주하였다. 균주 접종전에 교반속도와 통기량을 조절하여 배양액내의 용존산소량을 100%로 포화시켰다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 생산배지 최적화

가. 성장배지와 생산배지에서 미생물의 성장곡선

생산배지를 최적화함에 앞서 성장배지에서 미생물의 성장곡선을 측정하고, 생산배지에서는 mTG의 생산과 미생물의 성장곡선을 구하였다. 각각의 성장곡선은 Fig. 7과 8에 나타내었다. 미생물을 성장배지에서 4일간 배양한 결과 미생물의 생장이 활발한 시기인 3일째를 생산배지 접종을 위한 성장기간으로 정하였다. 성장배지에서 3일간 배양한 균을 생산배지에 접종하여 5일간 배양한 후 미생물의 성장과 mTG 생산성을 관찰하였다. 건조 균체량은 계속 증가하는 경향을 나타내었고, mTG 생산은 배양 1일째부터 점차 증가하여 4일, 5일에 약 2.1 U/mL로 일정하였다. 따라서, 생산배지에서 미생물의 배양일수는 mTG의 최대 생산 시기인 배양 4일째로 정하였다. 이후 실험에서는 미생물을 성장배지에서 3일간, 생산배지에서 4일간 배양하였다.

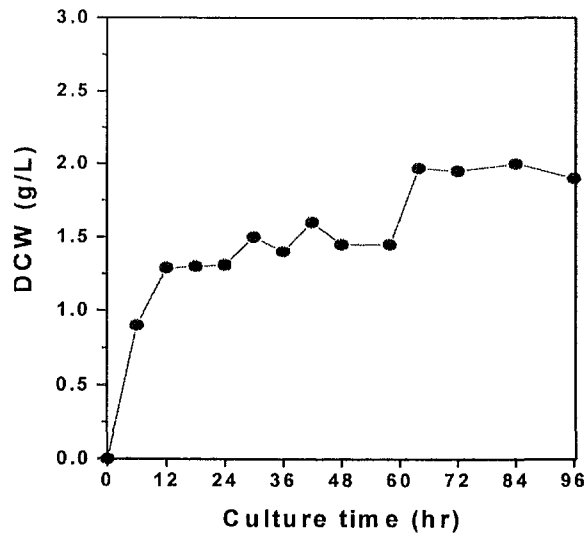


Fig. 7 The growth curve of strains on growth medium.

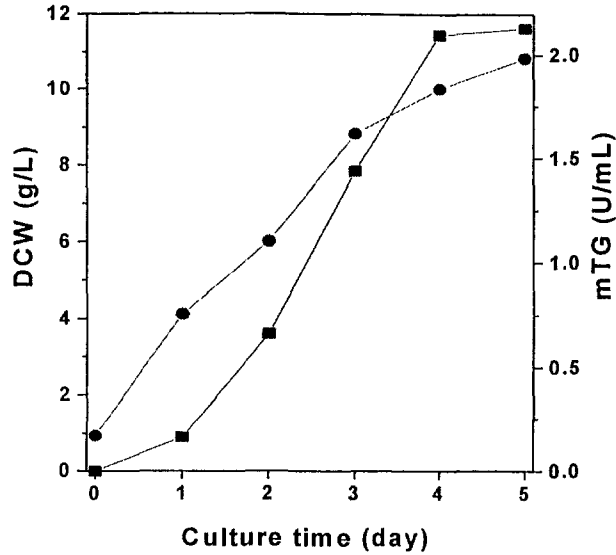


Fig. 8 The growth curve of strains on production medium

●; DCW, ■; mTG.

나. 탄소원의 종류가 mTG 생산에 미치는 영향

다양한 탄소원에 따른 mTG 생산결과를 비교하기 위하여 생산배지 조성 중 탄소원인 starch를 단당류, 이당류, 다당류 및 오일 등의 탄소원으로 대체하여 재료 및 방법에 기술한 배양조건에서 실험하였다. 플라스크를 이용한 현탁배양에서 mTG 생산에 대한 탄소원의 종류 및 영향을 Fig. 9에 나타내었다. 배양 후 최대 균체농도는 glucose, glycerol이 9.75 g/L이었으며 starch를 제외한 대부분은 4.5-7 g/L였다. mTG 생산은 glucose와 glycerol의 경우 1 U/mL 이상이었고, starch와 fructose는 0.8 U/mL이었으며 나머지는 0.3 U/mL 이하였다. 위 결과를 토대로 glucose, glycerol, starch, fructose에 대하여 본 실험을 반복하여 배지최적화실험을 위한 탄소원을 선정하고자 하였다.

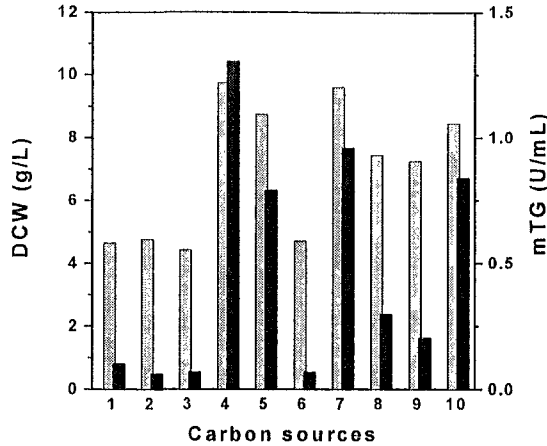


Fig. 9 Effect of various carbon sources on DCW and enzyme production.

1: maltose, 2: lactose, 3: galactose, 4: glucose, 5: fructose, 6: sucrose, 7: glycerol, 8: corn oil, 9: corn steep liquor, 10: starch. □: DCW, ■: mTG

기본생산배지에 탄소원인 starch를 glucose, glycerol, fructose로 대체하여 재실험한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. mTG 생산은 starch가 1.28 U/mL로 가장 높았으며, glucose 1.19 U/mL, glycerol 0.86 U/mL, fructose 0.78 U/mL 순이었다. 건조균체량의 경우 glucose가 12 g/L로 가장 높았고, 그외는 9.6-11.1 g/L이었다. 본 실험의 효소활성 데이터를 SAS 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였다. 그 결과 R-square가 0.9665로 매우 높았으며, F value는 308.54 이었고, Pr>F는 0.0001로써 유의수준 0.005보다 낮아 매우 유의성이 있음을 나타내었다. 각 처리에 대한 반응간의 유의 유무를 나타내는 SNK grouping에서 각 탄소원은 서로 다른 grouping을 나타내어 각 탄소원의 효소활성이 유의성 있음으로 분석되었다. 따라서 효소활성이 높은 순으로 grouping된 starch, glycerol, glucose를 라틴방격법을 이용한 배지 최적화 실험의 탄소원으로써 선정하였다.

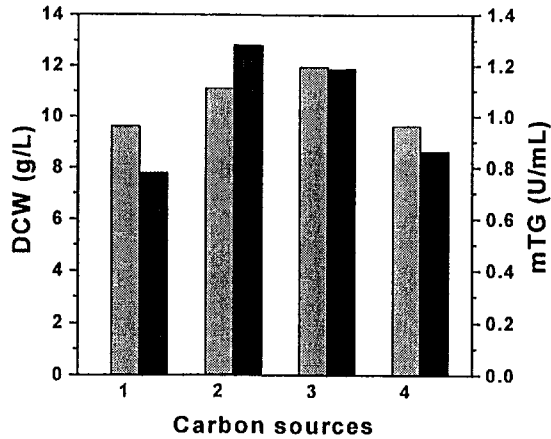


Fig. 10 Effect of various carbon sources on DCW and enzyme production.

1: fructose, 2: starch, 3: glucose, 4: glycerol, ▨: DCW, ■: mTG.

다. 질소원의 종류가 mTG 생산에 미치는 영향

여러가지 질소원에 따른 mTG 생산결과를 비교하기 위하여 생산배지 조성중 질소원 proteose peptone를 여러 무기질소원과 유기질소원으로 대체하여, mTG 생산에 대한 질소원의 종류 및 영향을 Fig. 11에 나타내었다. skim milk의 경우 1.07 U/mL의 비교적 높은 활성을 나타낸 반면, 대부분의 무기질소원에서는 효소활성이 측정되지 않았다. 상기의 실험결과에서 비교적 효소활성이 높게 측정된 peptonized milk, skim milk, casitone, tryptone, proteose peptone에 대해 재실험을 하여 그 결과를 Fig. 12에 나타내었다. mTG는 tryptone이 1.3 U/mL로 가장 높았고, proteose peptone, casitone은 1 U/mL이었다. 본 실험의 효소활성 데이터를 SAS 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 한 결과 R-square는 0.8185이었으며, F value는 45.11이었고, Pr>F는 0.0001로써 유의수준 0.005보다 낮았다. SNK grouping결과 각 질소원은 서로 다른 grouping을 나타내었기에 라탄방격법을 이용한 배치최적화 실험

혐의 질소원으로써 tryptone, proteose peptone, casitone을 선정하였다.

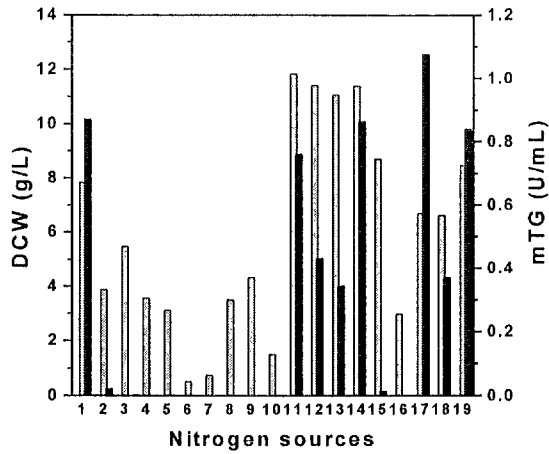


Fig. 11 Effect of various nitrogen sources on DCW and enzyme production.

1: peptonized milk, 2: NaNO_3 , 3: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 4: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5: NH_4Cl , 6: $\text{CH}_2\text{COONH}_4$, 7: NH_4CO_3 , 8: NH_4NO_3 , 9: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10: Urea, 11: casitone, 12: soy broth, 13: yeast extract, 14: tryptone, 15: corn steep liquor, 16: malt extract, 17: skim milk, 18: peptone, 19: proteose peptone, ▨; DCW, ■; mTG.

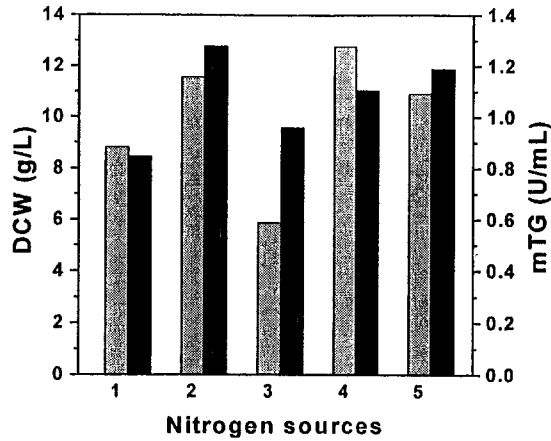


Fig. 12 Effect of various nitrogen sources on DCW and enzyme production.

1: peptonized milk, 2: tryptone, 3: skim milk, 4: casein, 5: proteose peptone □: DCW, ■: mTG.

라. 인원의 종류가 mTG 생산에 미치는 영향

대부분의 미생물에 대해 인원이 배지중에 과량으로 존재하게 되면 이차대사산물의 생산이 저해되는 것으로 알려져 있다. 다양한 인원에 따른 mTG 생산결과를 Fig.13에 나타내었다.

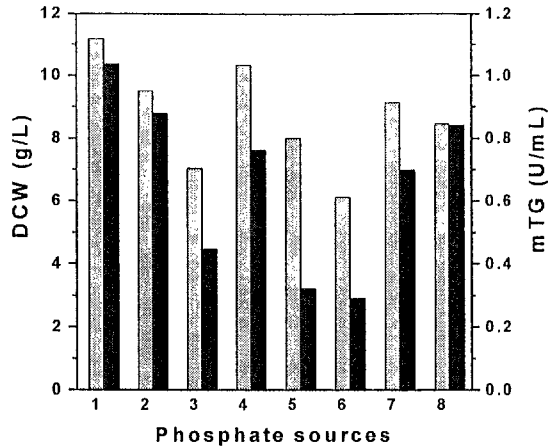


Fig. 13 Effect of phosphate sources on DCW and enzyme production.

1: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 4: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5: MgH_2PO_4 , 6: KHSO_4 , 7: KH_2PO_4 , 8: K_2HPO_4 , □: DCW, ■: mTG.

Fig. 13에 나타난 것 같이 비교적 높은 활성을 나타낸 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 에 대해 재실험을 하여 건조균체량과 효소활성을 Fig. 14에 나타내었다. mTG는 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 경우 1.46 U/mL로 가장 높았다. 본 실험의 효소 활성에 대해 SAS 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 한 결과 R-square는 0.3889로 낮았으며, F value도 6.37로 매우 낮았다. $\text{Pr}>\text{F}$ 는 0.0005이었다. SNK grouping 결과 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 는 가장 높은 grouping letter를 나타내었고, 이외 다른 인원들은 모두 동일한 grouping을 나타내었다. 상기 통계처리 결과를 토대로 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 효소활성이 높게 측정된 K_2HPO_4 와 KH_2PO_4 를 배지최적화를 위한 인원으로써 선정하였다.

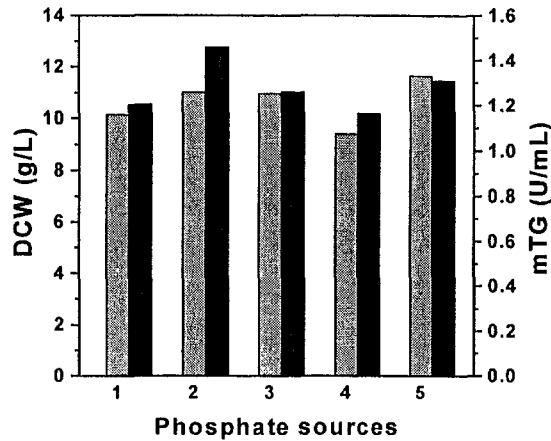


Fig. 14 Effect of phosphate sources on DCW and enzyme production.

1: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3: KH_2PO_4 , 4: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5: K_2HPO_4 □: DCW, ■: mTG.

마. 탄소원, 질소원, 인원을 조합한 생산배지의 최적화

상기에서 선정된 각각의 탄소원, 질소원, 인원의 종류와 농도에 따른 mTG의 생산성을 비교하기 위하여, 최소의 실험횟수로 최적의 배지조합을 구할 수 있는 라틴방격법을 이용하여 실험을 계획하고 수행하였다. 3가지 종류의 탄소원, 질소원, 인원을 조합한 배지원에 대한 mTG의 생산 결과를 Table 3에 나타내었다. 그 결과 starch, proteose peptone, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 로 구성된 M5 배지의 경우, 효소활성이 1.37 U/mL로 높게 나타났다. 배지조합에 대한 ANOVA 통계처리시 R-square는 0.9012로 매우 높았고, F value 34.97이었고, $\text{Pr}>\text{F}$ 는 0.0001로 유의성이 있었다. 또한 탄소원, 질소원, 인원에 대한 F value는 각각 65.7, 38.79, 0.43이었고 인원의 $\text{Pr}>\text{F}$

는 0.6566으로 유의성이 없는 것으로 판단되었으며, 탄소원과 질소원의 Pr>F는 0.0001로 유의성이 있었다.

Table 3. Optimization of carbon, nitrogen and phosphate sources *S. mobaraense* using Latin-square technique and enzyme activity obtained^(19, 20)

| Ingredient type | M 1 | M 2 | M 3 | M 4 | M 5 | M 6 | M 7 | M 8 | M 9 |
|--|------|------|------|------|-------------|------|------|------|------|
| glucose | 2% | 2% | 2% | | | | | | |
| starch | | | | 2% | 2% | 2% | | | |
| glycerol | | | | | | | 2% | 2% | 2% |
| tryptone | 2% | | | 2% | | | 2% | | |
| proteose peptone | | 2% | | | 2% | | | 2% | |
| casitone | | | 2% | | | 2% | | | 2% |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2% | | | | | 0.2% | | 0.2% | |
| K ₂ HPO ₄ | | 0.2% | | 0.2% | | | | | 0.2% |
| NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O | | | 0.2% | | 0.2% | | 0.2% | | |
| mTG (U/mL) | 1.19 | 1.27 | 0.94 | 1.07 | 1.37 | 0.97 | 0.71 | 0.89 | 0.60 |

M means medium.

각 영양원의 SNK grouping결과 탄소원에서는 starch와 glucose가 A letter로 동일하게 높은 grouping을 나타내었으며, 질소원에서는 각기 다른 grouping을 나타내었고 이때 proteose peptone이 가장 높은 A letter였다. 인원은 모두 동일한 등급을 나타내었다.

이상의 결과를 토대로 인원의 경우 유의성이 없는 것으로 분석되었고, 탄소원과 질소원에서는 배지조합 실험에서 효소활성이 가장 높은 조합과 ANOVA 분석의 결과가 일치되었기에 starch, proteose peptone, NaH₂PO₄ · 2H₂O의 배지조합을 최적배지로 선정하였으며, 기본생산배지 조성과의 차이는 인원이 K₂HPO₄에서 NaH₂PO₄ · 2H₂O

로 대체된 것이다. 선택한 각각의 탄소원, 질소원, 인원에 대해 라틴방격방법을 이용하여 농도변화에 대한 실험 결과를 Table 4에 나타냈다.

Table 4. Optimization of selected medium ingredient for *S. mobaraense* using Latin-square technique and enzyme activity obtained

| Ingredient type | M 1 | M 2 | M 3 | M 4 | M 5 | M 6 | M 7 | M 8 | M 9 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| starch 1% | 1% | 1% | 1% | | | | | | |
| starch 3% | | | | 3% | 3% | 3% | | | |
| starch 2% | | | | | | | 2% | 2% | 2% |
| proteose peptone 2% | 2% | | | 2% | | | 2% | | |
| proteose peptone 1% | | 1% | | | 1% | | | 1% | |
| proteose peptone 3% | | | 3% | | | 3% | | | 3% |
| NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 0.3% | 0.3% | | | | | 0.3% | | 0.3% | |
| NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 0.1% | | 0.1% | | 0.1% | | | | | 0.1% |
| NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 0.2% | | | 0.2% | | 0.2% | | 0.2% | | |
| mTG (U/mL) | 0.59 | 0.62 | 0.63 | 1.42 | 0.92 | 1.03 | 0.92 | 0.73 | 1.01 |

M means medium

탄소원으로 starch를 10, 20, 30 g/L, 질소원으로 proteose peptone을 10, 20, 30 g/L, 인원으로 NaH₂PO₄ · 2H₂O를 1, 2, 3 g/L 농도로 30℃에서 4일간 발효하였다. 실험 결과를 통계처리하여 분석한 결과 R-square는 0.9824로 매우 높았고, F value는 214.08로 역시 매우 높았으며 Pr>F는 0.0001이었다. 각 영양원의 F value는 100 이상으로 매우 높은 수치를 나타내었으며, Pr>F는 0.0001로 본 실험결과가 매우 타당함을 나타내었다. 탄소원의 농도에 대한 SNK grouping은 starch의 농도가 증가할

수록 효소활성이 증가하고, 질소원의 경우 20 g/L에서 A letter를 30 g/L, 10 g/L는 각각 B, C letter로 grouping되었고, 인원은 농도가 1 g/L보다 높을수록 효소활성이 저해되는 것으로 grouping되었다. 따라서 탄소원의 농도를 20, 30, 40 g/L, 질소원은 10, 20, 30 g/L, 인원은 0.5, 1, 2 g/L로 정하여 라틴방격방법에 따른 농도조합을 재실험하여 그 결과를 Table 5에 나타내었다.

Table 5. Optimization of selected medium ingredient for *S. mobaraense* using Latin-square technique and enzyme activity obtained

| Ingredient type | M 1 | M 2 | M 3 | M 4 | M 5 | M 6 | M 7 | M 8 | M 9 |
|--|------|------|-------|------|-------|------|-------|------|------|
| starch 2% | 2% | 2% | 2% | | | | | | |
| starch 4% | | | | 4% | 4% | 4% | | | |
| starch 3% | | | | | | | 3% | 3% | 3% |
| proteose peptone 1% | 1% | | | 1% | | | 1% | | |
| proteose peptone 2% | | 2% | | | 2% | | | 2% | |
| proteose peptone 3% | | | 3% | | | 3% | | | 3% |
| NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 0.2% | 0.2% | | | | | 0.2% | | 0.2% | |
| NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 0.1% | | 0.1% | | 0.1% | | | | | 0.1% |
| NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 0.05% | | | 0.05% | | 0.05% | | 0.05% | | |
| mTG (U/mL) | 1.22 | 1.53 | 0.92 | 1.19 | 1.65 | 0.82 | 1.14 | 0.85 | 1.44 |

M means medium.

ANOVA 분석에 의하면 R-square는 0.2778로 매우 낮았고 F value는 1.47, Pr>F는 0.2307로 유의성이 없는 것으로 분석되었다. SNK grouping결과 각각의 영양원 농도

가 동일하게 grouping되었다. 그래서 전 실험의 ANOVA분석 결과를 토대로 본 실험에서 동일 grouping에 대해 효소활성 순위가 상위인 농도를 선정하는 것이 타당하다고 판단되어 질소원과 인원의 농도를 각각 20 g/L, 1 g/L로 확정하였다. 탄소원은 농도가 증가할수록 효소활성이 증가하였으므로, 탄소원의 농도를 결정하기 위하여 20, 30, 40, 50, 70, 110 g/L에 대하여 재실험하여, 그 결과를 Fig. 15에 나타내었다.

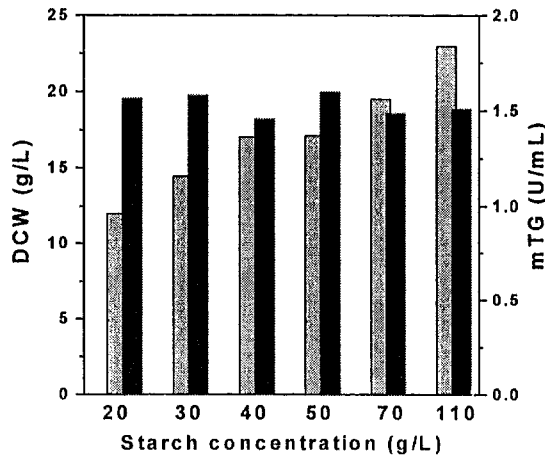


Fig. 15 Effect of carbon concentration on DCW and enzyme production

□: DCW, ■: mTG.

건조 균체량은 탄소원의 농도가 증가할수록 12 g/L에서 23 g/L로 점차 증가하였고, mTG는 탄소농도가 증가함에 따라 미미하게 증가하여 탄소원의 농도 50 g/L에서 1.6 U/mL로 가장 높게 생산되었다. ANOVA 분석결과 R-square는 0.3129로 낮았고, F value는 1.09이었으며, Pr>F는 0.4127로 유의성이 없는 것으로 분석되었다. SNK grouping에서 모든 농도에 대해 동일하게 A grouping을 나타내었다. 탄소원의 농도가 한계점 미만으로 낮으면 미생물의 성장이 저해되어 이차대사산물의 수율이 낮아

지고, 탄소원의 농도가 높으면 미생물의 성장이 우선되어서 이차대사보다는 일차대사가 촉진되므로 고수율의 mTG를 생산할 수 없게 된다. 따라서, 탄소원의 농도를 결정함에 있어서 상기의 실험을 토대로 최고 효소활성을 나타낸 50 g/L를 최적 탄소농도로 확정하였다. 배지 최적화한 결과 탄소원은 soluble starch 50 g/L, 질소원은 proteose peptone 20 g/L, 인원 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, MgSO_4 1 g/L, yeast extract 2 g/L, PPG 0.5 g/L이었다.

바. Oil이 미생물 성장과 mTG 생산에 미치는 영향

동식물에 존재하는 지방은 발효시 좋은 에너지원으로 이용되고 있다. 그리고 oil의 열량이 9 kcal/g으로써 4 kcal/g의 탄소원보다 높은 열량을 공급하기 때문에 일차대사를 활발하게하는 탄소원으로써 이용이 가능하며, 또한 지방산 ester와 대두의 lecitin과 같은 성질은 천연유화제로써 물질의 계면의 장력을 낮추어 준다⁽²¹⁻²⁴⁾. 따라서 본 실험에서는 다양한 oil이 소포제 및 탄소원으로써 미생물의 성장과 mTG 생산에 미치는 영향을 관찰하였다. 이용된 oil의 종류와 분석결과를 Table 6에 나타내었다. 최적화한 생산배지에 oil을 첨가한 경우와 oil을 첨가하지 않은 대조구의 현저한 차이는 건조균체량이었다. Oil을 첨가한 플라스크배양은 대조구에 비해 건조균체량이 20-30 g/L로 1.6-2.5배 증가한 반면, 효소활성은 대조구에 비해 0.6-0.7배 감소하여 1 U/mL 미만을 나타내었다. 이는 oil이 탄소원으로 이용되어 미생물의 생육을 촉진한 반면, 배양초기 배지중에 존재하는 과량의 탄소원 즉, starch와 oil로 인해 분해대사산물억제(catabolite repression)가 일어나 효소활성이 대조구에 비해 감소한 것으로 생각되었다. 그러나, 플라스크배양은 발효조 배양과 통기량, 교반속도 등 발효조건에 차이가 있으므로 발효조 배양에서는 플라스크 배양에서 나타난 문제점을 해결할 수 있을 것으로 생각되었다. 또한 과량의 탄소원으로 인한 분해대사산물억제는 유가식배양을 수행함으로써 플라스크배양에서 나타난 문제점을 해결하여 효소 생산을 높일 수 있을 것으로 생각되었다.

Table 6. The effect of oil sources on cell growth and enzyme activity

| Oil sources | mTG (U/mL) | DCW (g/L) | Specific activity (U/mg) | final pH |
|--------------------------|---------------|--------------|--------------------------------|-------------|
| almond | 0.976 | 23.11 | 0.073 | 4.99 |
| corn | 0.930 | 27.49 | 0.072 | 4.87 |
| coconut | 0.811 | 30.09 | 0.065 | 6.17 |
| sunflower seed | 0.929 | 28.63 | 0.069 | 4.79 |
| soy bean | 0.956 | 26.56 | 0.070 | 4.71 |
| cotton seed | 0.997 | 20.27 | 0.069 | 4.82 |
| fish | 0.877 | 25.50 | 0.065 | 4.94 |
| sesame | 0.987 | 26.18 | 0.073 | 5.11 |
| olive | 1.135 | 25.97 | 0.079 | 5.68 |
| peanut | 0.951 | 21.38 | 0.068 | 5.00 |
| lard | 0.895 | 26.15 | 0.064 | 5.01 |
| control (without oil) | 1.4 | 12.3 | 0.015 | 5.60 |

2. 회분식 발효조건 확립

가. 교반속도가 mTG 생산에 미치는 영향

교반속도에 따른 미생물의 성장과 mTG 생산성을 관찰하였다. 교반속도를 258, 330, 400 rpm으로 배양초기부터 말기까지 일정하게 조절하였고, 이외 발효조건은 '재료 및 방법'에 표기한 것과 같다. 배양시간동안 6시간마다 일정량의 시료를 취하여 효소활성, 건조균체질량, 환원당과 전분의 함량을 분석하고, 용존산소농도 변화를 관찰하였다. 258 rpm으로 배양하였을 경우의 실험결과를 Fig. 16에 나타내었다.

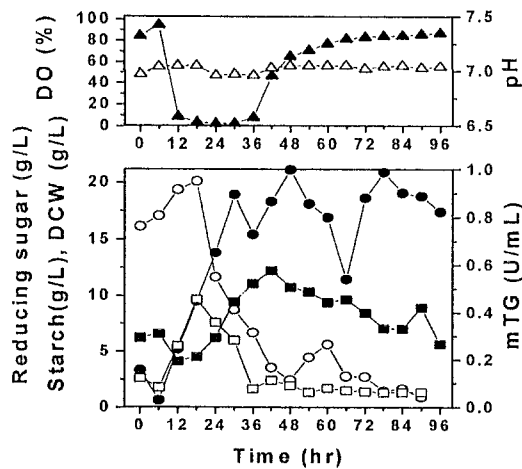


Fig. 16 Time course of cell growth, starch concentration, enzyme activity and reducing sugar in batch culture of *S. mobar-aense* at 258 rpm.

●: DCW, ■: mTG, ○: starch, △: pH, □: reducing sugar, ▲: DO.

효소활성은 계속 증가하다가 40시간에 0.58 U/mL으로 가장 높았고 이후 서서히 감소하였다. 건조균체량은 12시간 이후부터 급격히 증가하다가 48시간에 약 22 g/L로 가장 높았으며 이후 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 전분은 미생물이 이용하기 쉽게 분해되어 이용되므로 서서히 감소하여 66시간 이후에는 5 g/L 이하로 거

의 일정하였고, 환원당은 미생물의 증식이 시작되는 6시간 이후부터 급격히 증가한 후 18 시간에 최대의 농도를 나타내었다가 48시간 이후에는 미생물의 섭취로 2 g/L의 낮은 농도를 나타내었다. 용존산소농도는 발효초기에 100%로 포화시켰으며 미생물이 증식이 활발한 12시간 이후 급격히 감소하고 30시간 이후 증가하여 66시간 이후에는 80-87%를 나타내었다.

발효조의 교반속도를 330 rpm으로 증가시켜 배양한 결과를 Fig. 17에 나타내었다.

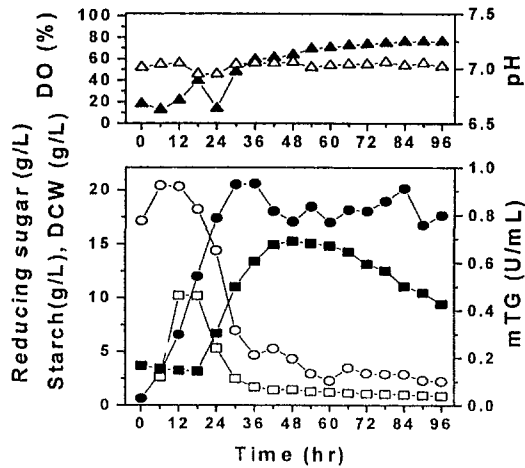


Fig. 17 Time course of cell growth, starch concentration, enzyme activity and reducing sugar in batch culture of *S. mobar-aense* at 330 rpm ●: DCW, ■: mTG, ○: starch, △: pH, □: reducing sugar, ▲: DO.

효소활성은 48시간에 0.69 U/mL로 가장 높았으며 건조 균체질량은 36시간에 20.6 g/L로 최대였다. 전분과 환원당의 함량은 258 rpm과 비슷한 경향을 보였고, 용존산소농도는 24시간까지 20% 미만이었으나 이후 증가하여 78시간에 약 75-77%로 일정하였다. 미생물의 성장이 정상기에 도달한 이후부터는 미생물의 성장속도와 사멸속도가 동일하게 되어 산소고갈이 감소하게 되므로 배지중 용존산소농도는 증가하게

된다. 또한 미생물의 형태(morphology)는 현미경 관찰시 258 rpm으로 배양하였을 때와 비슷하게 1 mm 미만의 균일한 크기와 구형의 펠릿(pellet) 형태였다.

교반속도를 400 rpm으로 증가시켜 배양한 결과를 Fig. 18에 나타내었다.

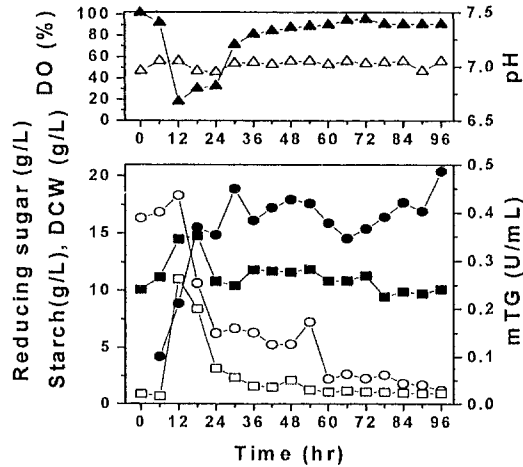


Fig. 18 Time course of cell growth, starch concentration, enzyme activity and reducing sugar in batch culture of *S. moba-raense* at 400 rpm ●; DCW, ■; mTG, ○; starch, □; reducing sugar, ▲; DO, △; pH.

효소활성은 초기에 급격히 증가하다가 18시간에 0.35 U/mL로 가장 높았고, 건조균체량은 330 rpm과 비슷한 경향을 나타내었으나, 그 수치는 전반적으로 2.5 g/L정도 감소하였다. 330 rpm과 비교시 효소활성은 50%, 건조균체량은 전반적으로 시간에 따라 14.7% 감소하였는데, 이는 교반속도의 증가에 따른 전단력에 의해 미생물이 유해한 영향을 받은 결과로 생각되었다. 용존산소농도와 전분, 환원당의 함량은 330 rpm과 유사한 경향을 나타내었으며, 단지 효소활성이 330 rpm에 비해 24시간 이후부터 급격히 감소하는 경향을 보여주었다. 이상의 교반속도에 따른 미생물의 성장과 효소활성을 비교한 실험결과에 의하면 330 rpm까지 교반속도가 증가하게 되면 통기량의 증가에 따른 대사활동이 더욱 원활해져서 mTG 생산을 촉진시키지만, 330

rpm 이상의 교반속도에서는 큰 전단력에 의해 미생물의 성장과 효소생산이 유해한 영향을 받는 결과를 나타내었고, 이때 효소활성과 건조 균체량, 전분, 환원당 등의 변화가 330 rpm에 비하여 빠른 시기에 나타난 것으로 보아, 발효공정 중 교반속도를 변화시킨다면 빠른 효소활성의 변화와 증가를 가져올 수 있을 것으로 생각되었다. 따라서, 400 rpm으로 반응을 시킨 후 최대 효소활성을 생산한 배양 18시간에 330 rpm으로 교반속도를 변화시킨다면 짧은 반응시간내에 높은 효소생산이 가능할 것으로 생각되며, 또한 258 rpm이나, 330 rpm의 경우 36시간에는 전분이 효소생산의 제한기질로 작용하므로 이 시기에 전분을 첨가하는 유가식 배양을 수행함으로써 효소 생산의 증가가 가능할 것으로 생각되었다.

나. 배양액의 pH 조절과 비조절 실험의 비교

배양기간중 pH가 미생물의 성장과 mTG 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pH를 일정하게 유지한 경우와 그렇지 않은 경우를 비교하였다. 배양조건중 교반속도는 상기의 교반속도 실험에서 제안한 교반속도로 초기 400 rpm에서 발효 18시간 이후부터 330 rpm으로 감소시켰으며, 배양시간은 상기의 결과에서처럼 미생물의 성장과 효소활성이 50시간 이전에 최대치를 나타내고 이후 감소하였으므로 72시간 배양하였다. 이외 배양조건은 '재료 및 방법'에서 표기한 것과 같다. mTG 생산과 건조균체량 등의 결과를 비교하여 Fig. 19에 나타내었다. pH 조절의 경우 산과 알칼리를 이용하여 배양초기부터 말기까지 pH를 일정하게 7.0으로 유지하였다. 이때 효소활성은 배양 30시간에 최대 0.32 U/mL를 나타내었고 이후 감소하였다. pH 비조절의 경우 pH는 pH 7.5이상의 약알칼리를 나타냈으며 효소활성은 배양초기에 0.1 U/mL, 이후 배양 36시간에 0.16 U/mL로 조금 증가하였다. 상기의 결과로 pH 비조절보다 pH를 일정하게 조절하는 것이 mTG 생산에 더욱 효과적이라고 판단되었다. 그러나 배양기간 중 교반속도를 변화시킬 경우 효소생산이 증가할 것이라는 예측과 달리 효소생산은 매우 낮았다. 따라서 이후 실험에서는 배양기간동안 pH는 7.0으로

일정하게 조절하고, 교반속도는 상기 실험에서 최대 효소활성을 나타낸 330 rpm으로 고정하였다.

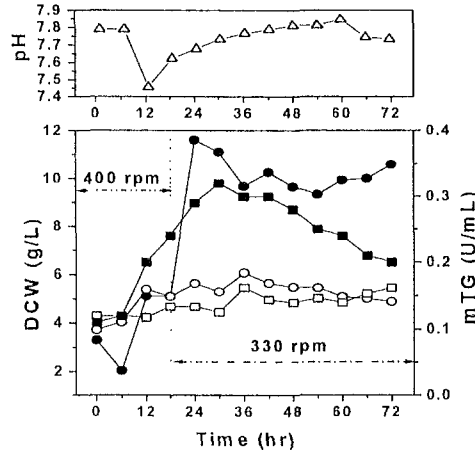


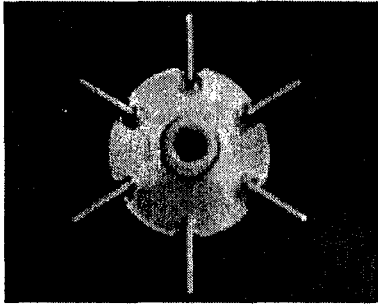
Fig. 19. The comparison of pH control and pH uncontrol in batch culture of *S. mobaraense*. ●; DCW, ■; mTG, △; pH, close symbol; pH control, open symbol; pH uncontrol.

다. 임펠러의 크기와 형태가 mTG 생산과 미생물 성장에 미치는 영향

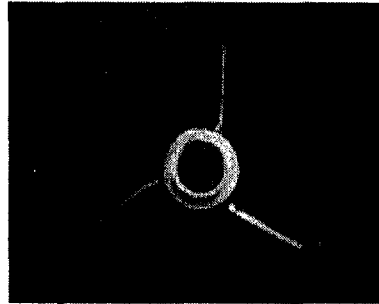
발효조 내 공기분산 및 균체를 배지중으로 고르게 분산시키는 역할을 하는 임펠러의 크기와 형태에 따른 mTG의 생산성을 알아보았다. 임펠러의 형태로는 rushton turbine impeller와 pitched blade impeller, scaba impeller가 실험에 이용되었으며, rushton turbine impeller의 경우 $D_1:D_b:D_w:D_d$ 비가 각각 1:0.24:0.2:0.64(이때 $D_1=6.6$ cm, $D_1/T=0.48$)와 1:0.25:0.22:0.61(이때 $D_1=8.1$ cm, $D_1/T=0.59$)인 두가지 임펠러를 사용하여 '재료 및 방법'에 포기한 배양조건에서 배양하였다⁽²⁵⁾. 배양시간에 따른 효소활성, 건조 균체량, 전분과 환원당 함량을 분석하였고, 용존산소농도의 변화를 관찰하였다. 임펠러의 크기와 형태에 관하여 Table 7, 각 실험 결과를 각각 Fig. 20-22에 나타내었다.

Table 7. The impeller size and type in fermenter on enzyme activity

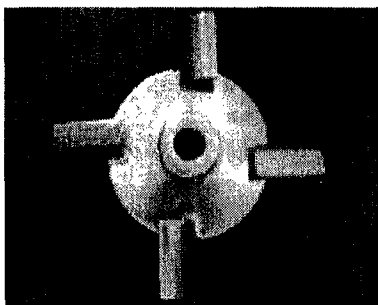
| Impeller | Flow | Impeller diameter/ tank diameter(D_1/T) | Angle of blade (α [$^\circ$]) | No. blades |
|--------------------|--------|--|--|------------|
| Rushton turbine(a) | Radial | 0.48 | 90 | 6 |
| | | 0.59 | 90 | 6 |
| Pitched blade(b) | Axial | 0.58 | 45 | 3 |
| Scaba(c, d) | Radial | 0.61 | 90 | 4 |



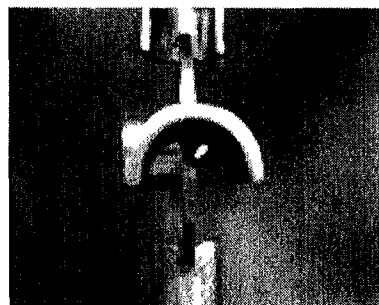
(a)



(b)



(c)



(d)

$D_1/T=0.48$ 인 rushton turbine impeller의 경우 발효초기 효소활성은 사용된 배지 자체의 탁도에 의해 높게 측정되었으며, 72시간에 최대 0.48 U/mL를 나타낸 후 서서히 감소하였다.

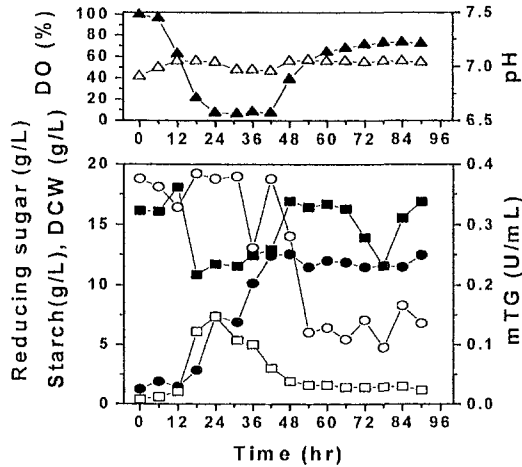


Fig. 20 Time course of cell growth, starch concentration, enzyme activity and reducing sugar in batch culture of *S. mobar-aense* using rushton turbine impeller($D_1/T=0.48$) ●: DCW, ■: mTG, ○: starch, △: pH □: reducing sugar, ▲: DO.

건조 균체량은 발효초기부터 증가하다가 66시간에 11.44 g/L로 최대를 나타냈으며 이후 감소하다가 다시 증가하였다. 전분은 서서히 감소하였고, 환원당은 서서히 증가하다가 24 시간에 7.24 g/L로 최대를 나타냈으며 이후 감소하여 72 시간부터 2 g/L 이하였다. 초기 용존산소농도는 100%으로 포화시켰으며 발효시작부터 감소하여 미생물의 증식이 활발한 24시간부터 60시간까지 5% 미만이었으며 이후 증가하여 72 시간부터는 50% 이상을 유지하였다.

$D_i/T=0.59$ 인 rushton turbine impeller를 이용한 배양에서는 발효 초기 효소활성은 배지자체의 탁도로 인해 높게 측정되었다.

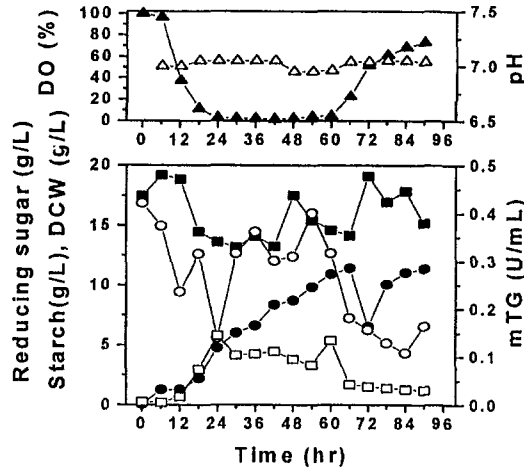


Fig. 21 Time course of cell growth, starch concentration, enzyme activity and reducing sugar in batch culture of *S. mobar-aense* using pitched blade impeller ●: DCW, ■: mTG, ○: starch, □: reducing sugar, ▲: DO, △: pH.

최대 효소활성은 48시간에 0.69 U/mL이었고 균체량은 증가하여 30시간에 20.5 g/L 이었다가 이후 16 - 19 g/L로 거의 일정하였다. 환원당 및 전분은 감소하여 36시간 이후 각각 2 g/L, 7 g/L 미만이었다. 그리고, 용존산소농도는 24시간까지 20% 미만이었으나 이후 증가하여 66시간이후 70% 이상을 유지하였다. 상기의 rushton turbine impeller에서 임펠러의 크기가 큰 경우가 기체상에서 액상인 배지로의 공기의 공급 및 교반이 더욱 효과적임을 알 수 있었다. Pitched blade impeller를 사용한 경우에는 효소활성은 서서히 증가하여 48시간에 0.34 U/mL이었다. 건조균체량은 점차 증가하여 48시간에 12.58 g/L로 최대를 나타냈으며 이후 대략 12 g/L로 일정하였다. 전분 및 환원당은 감소하여 각각 7 g/L, 1.2 g/L이었다.

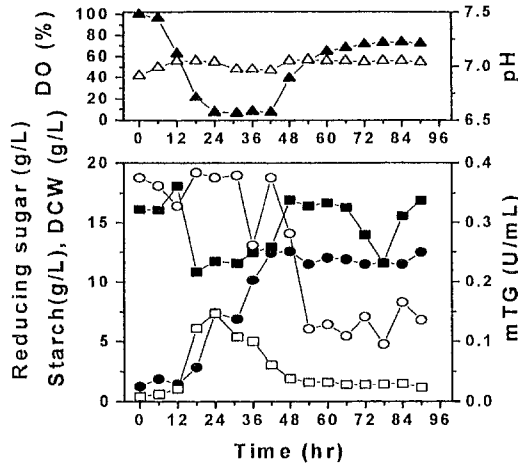


Fig. 22 Time course of cell growth, starch concentration, enzyme activity and reducing sugar in batch culture of *S. moba-raense* using scaba impeller. ●: DCW, ■: mTG, ○: starch, □: reducing sugar, ▲: DO, △: specific activity.

Scaba impeller의 경우 효소활성은 48시간에 0.69 U/mL으로 최대를 나타내었다. 건조 균체량은 36시간에 16.72 g/L로 최대였으며 이후 서서히 감소하였다. 환원당의 함량은 발효가 진행됨에 따라 감소하여 1 g/L를 나타냈고, 전분의 함량도 감소하여 6.1 g/L를 나타내었다. 용존산소농도는 미생물이 성장함에 따라 감소하여 36시간에 40.7%로 미생물에 의한 산소이용도가 컸음을 보여주며, 이후 증가하여 90%를 나타냈다. Scaba impeller와 $D_i/T=0.59$ 인 rushton turbine impeller의 경우 발효 48시간에 0.69 U/mL의 동일한 활성을 나타내었으며, $D_i/T=0.48$ 인 rushton turbine impeller와 pitched blade impeller의 경우 각각 0.48, 0.35 U/mL의 효소활성을 나타내었다. 임펠러의 크기와 형태에 따른 mTG 생산성을 비교 분석한 결과 교반날개의 숫자가 많고 임펠러의 크기가 클수록 공기, 배지, 균체간의 혼합이 더욱 좋게되어 효소생산이 증가하는 것을 알 수 있었다. 본 실험에서 사용된 균주는

교반속도 330 rpm에서 임펠러의 크기에 따라 발생하는 전단력에 대해 영향을 적게 받는 것으로 생각되어지며, 사용된 임펠러 중에서는 가장 산소 제한이 없는 것으로 판단되어 이후 실험에서 rushton turbine impeller($D_i/T=0.59$)를 이용하였다.

라. 규모확대에 필요한 부피산소전달계수 측정

발효조배양시 통기와 교반속도에 대한 발효조내 산소가 미생물로 전달되는 속도를 측정하여 미생물의 생장에 미치는 영향을 살펴보았다. 배양온도 30℃, pH 7.0, rushton turbine impeller를 이용하여 발효 시간 15.5, 40.8와 65.4 hr에서 시료를 일정량 채취하여 건조균체질량을 측정하였고 각 시간마다 통기속도와 교반속도에 따른 k_{La} 와 OUR을 측정하였다. 건조균체량은 시간에 따라 12.44, 15.65와 13.66 g/L였다. Table 8-11은 각 건조균체량에 통기속도와 교반속도에 따른 k_{La} 와 OUR을 나타낸 것이다. Table 8에 의하면 통기속도 1 vvm에서 교반속도가 증가하면 k_{La} 는 증가하는 경향을 보여주었다. 건조균체질량이 12.44 g.L인 경우 교반속도가 낮은 경우 상당히 높은 k_{La} 가 측정되었으나 실험오차로 생각된다.

Table 8. Real Value of k_{La} in term of rpm at aeration 1 vvm

| rpm | O. U. R (mM O ₂ /L · hr) | | |
|-----|-------------------------------------|----------------------|----------------------|
| | D. C. W. (12.44 g/L) | D. C. W. (15.65 g/L) | D. C. W. (13.66 g/L) |
| 185 | 1.32 | 5.83 | 1.69 |
| 223 | 2.43 | 5.14 | 0.71 |
| 258 | 1.26 | 3.66 | 0.24 |
| 293 | 7.22 | 1.47 | 0.09 |
| 330 | 10.67 | 0.87 | 0.11 |
| 366 | 14.77 | 0.68 | 0.10 |
| 400 | 14.79 | 0.38 | 0.18 |

Table 9에 의하면 교반속도를 330 rpm으로 고정하고 통기속도를 증가한 경우 $k_{l,a}$ 의 증가 폭은 통기속도를 고정하고 교반속도를 증가시킨 결과보다 크게 나타나지 않았다.

Table 9. Real Value of $k_{l,a}$ in term of vvm at 330 rpm

| rpm | O, U, R (mM O ₂ /L · hr) | | |
|-----|-------------------------------------|----------------------|----------------------|
| | D. C. W. (12.44 g/L) | D. C. W. (15.65 g/L) | D. C. W. (13.66 g/L) |
| 185 | 1.32 | 5.83 | 1.69 |
| 223 | 2.43 | 5.14 | 0.71 |
| 258 | 1.26 | 3.66 | 0.24 |
| 293 | 7.22 | 1.47 | 0.09 |
| 330 | 10.67 | 0.87 | 0.11 |
| 366 | 14.77 | 0.68 | 0.10 |
| 400 | 14.79 | 0.38 | 0.18 |

이 결과로부터 발효시 $k_{l,a}$ 를 증가시키는 방법은 미생물의 성장과 이차대사산물의 생성에 전단력이 영향을 주지 않는다면 통기속도의 증가보다는 교반속도를 증가시키는 것이 효과적임을 알 수 있었다. 본 실험의 배양조건과 동일한 실험조건에서 수행한 발효조 배양에서 최대 건조균체량은 발효 30-36 hr으로 발효초기부터 이시간까지 급격히 미생물이 증식하였고, 이후 건조균체질량은 서서히 감소하는 경향을 보였다. 따라서 본 실험의 건조균체질량 12.44 g/L는 미생물이 급격히 증식하는 기간의 것으로, 이때의 OUR은 매우 높을 것으로 예상되며, 반면 $k_{l,a}$ 는 발효 초기에 비해 낮을 것으로 예상되었다. 건조균체질량 15.65 g/L의 경우는 발효 40 hr을 조금 넘은 기간으로 미생물의 증식이 서서히 감소되는 기간이므로, OUR은 감소하는 경향을 나타냈다. 통기속도 1 vvm과 교반속도 330 rpm에서의 $k_{l,a}$ 는 건조균체질량에 따라 약간의 차이는 있지만 약 160 hr⁻¹의 정도를 보여 주었다. 이는 다른 균사형성 미생물에서 보여주는 결과와 유사하다. 균사를 형성하는 미생물은 독특한 3차

원적인 형태구조로 인하여 균체의 성장에 따른 발효배양액의 점도 증가 현상은 생물반응기내의 산소전달 능력을 급격히 감소시켜 이차대사산물의 생산성 저해요인이 된다. 이문제를 해결하기 위해서 k_{La} 의 측정을 통한 정밀한 산소전달 메카니즘의 해석이 필요하다. 교반속도 300 rpm에서 균체농도에 따른 k_{La} 측정은 생물반응기 운전에 중요한 정보를 제공할 것이며, k_{La} 측정자료는 용존산소농도를 자동조절하는 시스템의 구축 및 시스템을 이용한 발효에 응용할 것이다.

Table 10. Real Value of O.U.R in term of rpm at aeration 1 vvm

| vvm | k_{La} (hr^{-1}) | | |
|-----|------------------------|--------------------|--------------------|
| | D.C.W. (12.44 g/L) | D.C.W. (15.65 g/L) | D.C.W. (13.66 g/L) |
| 0.5 | 77.83 | 138.20 | 105.30 |
| 1 | 70.16 | 157.75 | 124.67 |
| 1.5 | 101.48 | 149.15 | 82.58 |
| 2 | 108.14 | 169.31 | 110.92 |
| 2.5 | 112.28 | 155.38 | 139.79 |

Table 11. Real Value of O.U.R. in term of vvm at 330 rpm

| vvm | O.U.R ($mM O_2 / L \cdot hr$) | | |
|-----|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| | D.C.W. (12.44 g/L) | D.C.W. (15.65 g/L) | D.C.W. (13.66 g/L) |
| 0.5 | 13.29 | 1.23 | 0.23 |
| 1 | 12.96 | 1.12 | 0.14 |
| 1.5 | 14.03 | 1.43 | 0.18 |
| 2 | 13.92 | 1.41 | 0.24 |
| 2.5 | 15.19 | 1.26 | 0.22 |

마. 선정된 임펠러의 형태와 크기, 교반속도에서의 mTG 생산

최적생산배지를 이용하여 mTG 생산 및 발효환경 요인 변화를 관찰하였다. 발효조건으로는 상기의 실험을 토대로 pH 7.0, 배양온도 30℃, 교반속도는 330 rpm으로 하고 산소공급을 1 vvm, $D_1/T=0.59$ 인 rushton turbine impeller, 1.5 L 배양부피에 5% 균을 접종하여 4일간 배양하여 시간에 따른 효소활성, 건조균체량, 전분과 환원당 함량과 용존산소 농도 변화를 Fig. 23에 나타냈다.

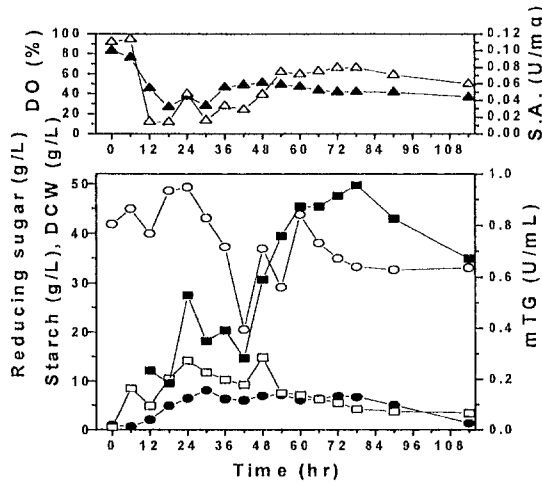


Fig. 23 Time course of enzyme fermentation in optimized medium and condition. ●: DCW, ■: mTG, ○: starch, □: reducing sugar, ▲: DO, △: specific activity.

초기 18시간까지 고농도의 탄소원으로 인해 배지는 불투명하였으며, 이 결과 효소활성은 배지 자체의 탁도로 높게 측정되었다. 기본생산배지(대조구, Fig. 17 참조)를 이용한 발효조 배양시 효소활성은 0.7 U/mL 미만으로 적합한 배양일수는 72 시간이었으나, 최적화배지를 이용한 본 실험에서의 최대활성은 78 hr에 0.96 U/mL 으로 나타났다. 기본생산배지의 효소활성에 비해 약 1.4배 증가하였으며, Zhu의 최적생산배지와 유사한 결과를 나타내었다⁽¹⁰⁾. Zhu의 최적생산배지는 각종 아미노산

을 미량 첨가한 배지이며, 본 실험에서 사용한 배지 peptone에도 미량의 아미노산이 첨가되어 있다. Zhu의 생산배지 조성과 본 실험에서 사용된 proteose peptone 및 peptone의 조성을 각각 Table 12, 13에 나타내었다.

Table 12. The component of production medium by Zhu⁽¹⁰⁾

| Optimized medium | |
|---------------------------------|------------------------|
| Component | Concentration (g/L) |
| starch | 20 |
| peptone | 20 |
| yeast extract | 2 |
| MgSO ₄ | 2 |
| KH ₂ PO ₄ | 2 |
| K ₂ HPO ₄ | 2 |
| Arg | 0.30 |
| Asp | 0.649 |
| Asn | 0.155 |
| Cys | 0.023 |
| Gly | 0.145 |
| His | 0.083 |
| Ile | 0.063 |
| Met | 0.092 |

Table 13에 표기한 시약조성은 Difco사의 자료를 참조하였다. Zhu의 배지에 존재하는 아미노산과 본 실험의 proteose peptone을 함유하는 배지중에 존재하는 아미노산 함량은 각 아미노산마다 거의 비슷하거나 2배 미만의 차이가 있다. 예를 들어 aspartic acid 경우 proteose peptone에는 7.28%, peptone에는 5.6%가 존재하며 본 실험에 이용된 proteose peptone 20 g/L를 함유한 배지에는 1.456 g/L가 존재하게 되며, Zhu의 최적배지에서는 20 g/L의 peptone에 존재하는 1.12 g/L와 아미노산으로 첨가되는 0.649 g/L으로 총 1.789 g/L가 배지중에 존재하게 된다.

Table 13. The component of proteose peptone and peptone

| Component(%) | proteose peptone | peptone |
|---------------------|------------------|---------|
| Carbohydrate | 0.1< | 6.9 |
| Nitrogen | | |
| total nitrogen | 14 | 15.5 |
| amino nitrogen | 2.9 | 3.1 |
| amino acids | | |
| Ala | 6.5 | 8.67 |
| Arg | 5.12 | 8.75 |
| Asp | 7.28 | 5.6 |
| Cys | 0.87 | 0.2 |
| Glu | 11.95 | 10.21 |
| Gly | 9.68 | 15.59 |
| His | 2.01 | 0.58 |
| Ile | 3.04 | 1.45 |
| Leu | 5.66 | 3.01 |
| Lys | 5.33 | 3.42 |
| Met | 1.97 | 1.19 |
| Phe | 2.86 | 1.81 |
| Pro | 5.93 | 8.8 |
| Ser | 3.49 | 2.87 |
| Thr | 3.14 | 1.81 |
| Try | 0.6 | 0.38 |
| Tyr | 2.35 | 0.64 |
| Val | 3.76 | 2.35 |
| Inorganics | | |
| Ca | 0.021 | 0.008 |
| Cl | 4.51 | 1.086 |
| Fe | 0.002 | 0.004 |
| Mn | 0.027 | 0.007 |
| P | 0.872 | 0.445 |
| K | 0.685 | 0.203 |
| Na | 3.677 | 1.795 |
| sulfate | 0.162 | 0.244 |
| S | 0.812 | 0.410 |
| Zn | 0.002 | 0.001 |
| Co, Cu, Pb, Mg, Sn | <0.0001 | <0.0001 |

Zhu의 최적화배지와 본 실험의 최적생산배지의 조성에는 큰 차이가 없으나, 아미노산의 단가가 최소 판매규격인 25 g을 기준으로 12,000-40,000원 또는 최대

210,000원(proline)인 반면 proteose peptone은 최소 판매규격 500 g에 대해 129,500원으로 6475 원/25 g에 해당된다. 따라서 proteose peptone을 함유한 본 실험의 최적생산배지는 Zhu의 최적화배지보다 가격면에서 경제적이며 배지조제가 간편하다는 장점이 있다. 최적생산배지와 최적조건에서 미생물을 배양하였을 때 건조균체량은 서서히 증가하여 30시간에 8.1 g/L로 최대를 나타내었으며 이후 약간 감소하였다. 이 수치는 동일 조건의 기본배지 실험값에 비해 1.9배 감소한 것이었다. 용존산소농도 변화는 배양기간동안 30-50%를 유지하였고, 기본배지를 이용한 실험에서 용존산소가 균체성장이 활발할 때 바닥상태를 유지한 것과 비교시 상당히 높은 값을 나타내었다. 이는 배지내 고농도 탄소원으로 인해 균체로의 산소전달이 원활하지 못하여 호기성 균주의 성장이 저해되어 균체량이 적었으며, 균체량이 적음으로 상대적으로 용존산소가 높은 것으로 판단되었다. 따라서 실험균주가 호기성 미생물인만큼 산소공급을 향상시키기 위해서는 고농도 배지인 탄소원의 농도를 낮게 조절하면 균체의 증가 및 mTG 생산이 증가될 것으로 판단되어 탄소원의 농도를 30 g/L로 감소하여 실험하였다. 탄소원의 농도를 30 g/L로 선택한 이유는 플라스크 배양에서 탄소원의 다양한 농도(Fig. 15 참조)에 대해 실험하였을 때 각 농도간의 유의성이 없는 것으로 통계 분석되어 최적 농도로 선정된 50 g/L 보다 작은 농도에서 실험하여 탄소원에 의한 분해대사산물 억제여부를 판단하기 위해서이다. 발효초기 효소활성은 배지자체의 혼탁에 의해 높게 측정되었고, 24시간에서 0.38 U/mL이었고 이후 거의 변화가 없이 0.3 U/mL를 유지하다가 이후 감소하는 경향을 보여주었다. 건조균체량은 42시간에 15.7 g/L로 가장 높았으며 점차 감소하였다. 단백질 함량은 12시간이후 약 12 g/L로 감소하여 발효말기까지 유지되었고 전분함량은 36시간이후 급격히 감소하여 발효말기 약 4 g/L이었다. 용존산소농도는 발효초기 100%로 포화시켰으며 미생물 증식이 활발한 30시간에 최소 55%를 나타내었고, 이후 서서히 증가하였으며 발효말기에는 90% 이상을 유지하였다. 최적화배지에서 탄소원의 농도를 감소시켰을 경우, 발효 시간에 따른 용존산소농도 변화는 탄소원의 농도

가 50 g/L인 경우와 비슷한 경향을 나타내었다. 다만, 최소 수치는 55%였으며 예상된 효소활성의 증가는 없었다. 이 결과 고농도의 탄소원에 의한 분해대사산물억제는 없는 것이 확인되었다.

3. 반응표면 분석법에 의한 발효조건 확립

가. 온도와 pH 조건 확립을 위한 플라스크배양

미생물의 성장과 이차산물의 생산에 있어 중요한 요소로는 배지, 온도, pH, 산소 전달, 전단응력 등이 있다. 본 실험에서는 배양온도와 pH가 미생물의 성장과 mTG 생산에 미치는 영향을 조사하였으며, 최적 조건을 구하기 위해 반응표면분석법(RSM)을 사용하였다. 반응표면분석을 하기 위하여 중심합성계획법을 이용하였으며, 그 설계와 분석결과를 Table 14-16와 Fig. 24 에 나타내었다.

Table 14. The Level of independent variables

| | $- \alpha$ | -1 | 0 | 1 | α |
|--------------|------------|----|----|----|----------|
| X_1 (temp) | 24.3 | 26 | 30 | 34 | 35.7 |
| X_2 (pH) | 4.6 | 5 | 6 | 7 | 7.4 |

Table 15. The Central composite design for the two independent variables (variables are combined by 2^k factorial point, central point and axial point)

| Trial No. | X_1 | X_2 | |
|-----------|------------|------------|--------------|
| 1 | -1 | -1 | 26°C, pH 5 |
| 2 | -1 | 1 | 26°C, pH 7 |
| 3 | 1 | -1 | 34°C, pH 5 |
| 4 | 1 | 1 | 34°C, pH 7 |
| 5 | 0 | 0 | 30°C, pH 6 |
| 6 | - α | 0 | 24.3°C, pH 6 |
| 7 | α | 0 | 35.7°C, pH 6 |
| 8 | 0 | - α | 30°C, pH 4.6 |
| 9 | 0 | α | 30°C, pH 7.4 |

Table 16. Comparison between experimental value and predicted value of enzyme activity and cell growth.

| X_1 | X_2 | mTG(U/mL) | | DCW (g/L) | | final pH |
|--------|--------|--------------|-----------|--------------|-----------|----------|
| | | experimental | predicted | experimental | predicted | |
| 24.3°C | pH 6 | 1.092 | 0.942 | 17.54 | 18.74 | 5.81 |
| 26°C | pH 5 | 0.793 | 0.853 | 19.48 | 19.41 | 4.41 |
| | pH 7 | 1.120 | 0.993 | 17.11 | 16.19 | 5.33 |
| 30°C | pH 4.6 | 0.687 | 0.655 | 21.53 | 19.67 | 5.09 |
| | pH 6 | 1.232 | 1.232 | 19.42 | 19.43 | 5.55 |
| | pH 7.4 | 1.241 | 1.145 | 14.96 | 14.31 | 6.01 |
| 34°C | pH 5 | 0.625 | 0.620 | 16.96 | 20.34 | 5.13 |
| | pH 7 | 1.135 | 1.180 | 13.38 | 15.90 | 5.55 |
| 35.7°C | pH 6 | 0.914 | 0.909 | 22.83 | 19.20 | 4.98 |

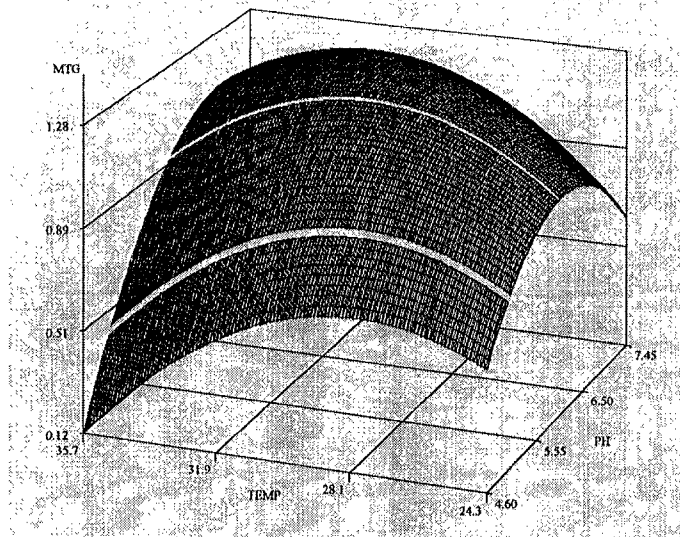
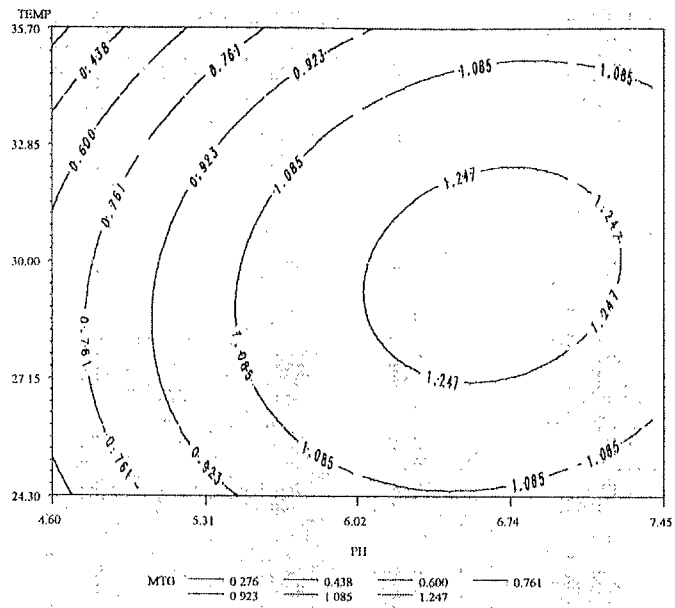


Fig. 24 Contour plot(a) and Response surface(b) for the mTG

RSM 분석결과 Fig. 24(b)에서 나타난 것과같이 정상점은 최대점으로 mTG 최적 생산조건은 온도 30.6°C, pH 6.5이었으며, 2차회귀모형식에 의해 효소활성은 1.28 U/mL으로 예측되었다. 온도와 pH에 대한 반응면으로 mTG와 건조균체량에 대하여 2차회귀모형식을 추정하였을 때, mTG의 경우 $Y = 0.406745X_1 + 1.422575X_2 - 0.009451X_1^2 + 0.026238X_1X_2 - 0.169560X_2^2 - 9.618141$ 이었고, 건조균체질량은 $Y = 1.340314X_1 + 15.307471X_2 - 0.014110X_1^2 - 0.075625X_1X_2 - 1.245946X_2^2 - 41.455438$ 이었다. 건조균체량과 mTG의 실험치와 2차회귀모형식에 의한 예측치를 비교하였을 때 mTG 생산은 유사하였으며, 건조균체량은 미미한 차이가 있었다(Table 16 참조). 본 실험에서 최대점으로 나타난 온도와 pH의 확인실험을 위하여 플라스크 배양과 발효조 배양을 하였다. 플라스크 배양을 위해 살균전 배지의 pH를 6.5로 조절하였으며, 30.6°C에서 4일간 배양하였다. 배양 후 측정된 효소활성은 0.78 U/mL으로 RSM 분석결과 제시된 1.28 U/mL에 비하여 38% 적게 나타났다. 그러나 건조균체량과 발효후 pH는 각각 16 g/L와 5.5로써 Table 16에 표기된 RSM 분석결과에서 크게 벗어나지 않았다. 효소가 낮게 측정된 것은 실험오차로 생각된다.

나. 최적 pH와 온도에서 회분식 배양.

최적 조건에 대하여 발효조 실험을 수행하여 그 결과를 Fig. 25에 나타내었다. 효소활성은 발효초기 배지자체의 탁도에 의하여 배양 18시간까지 0.3-1 U/mL으로 매우 높게 측정되었으나, 이후 미생물의 성장으로 인한 배지의 고갈과 효소생산으로 인해 발효말기에 0.96 U/mL를 나타내었다. 단백질 함량은 효소활성이 증가함에 따라 증가하며 12시간에 10 mg/mL이었다가 발효말기에는 39 mg/mL까지 증가하였고, 결국 비활성은 0.03 U/mg으로 매우 낮았다. 건조균체량은 발효시간에 따라 증가하여 배양 30시간 이후 약 12 g/L로 유지되었다. 전분함량은 발효가 진행됨에 따라 감소하여 배양말기에는 5 g/L이었으며, 환원당은 4 g/L를 나타내었다. 용존산소농도는 배양기간동안 79% 이상을 유지하였으며 발효기간동안 용존산소농도는 발효초

부터 서서히 감소하여 48시간에 79%로 감소하는 경향을 보였으나, 서서히 회복되어 발효말기에는 88%를 나타내었다. 본 실험에서 나타난 실험결과는 최적배지를 이용한 기본 발효 조건의 실험결과(Fig. 23 참조)와 유사한 경향을 보여주고 있다. 특히 효소활성의 수치는 최적배지, 기본발효조건에서 나타낸 효소활성 0.96 U/mL와 동일하였으며, 단지 전자의 경우 배양 78시간에 최대 활성값을 나타내었고, 용존산소농도가 미생물의 증식이 활발한 18시간에 30%로 감소한 이후 용존산소농도는 60% 미만이었다. 반면 본 실험에서는 배양말기에 최대 효소활성값을 나타내었으며 이후에도 다소 증가하는 경향을 보여주었으며, 용존산소농도는 배양기간동안 79% 이상을 유지하였다. 따라서, RSM 분석결과 제시된 온도 30.6°C, pH 6.5에 대하여 플라스크배양과 발효조 배양에서 배양일수 연장에 따른 효소활성의 증가여부를 관찰할 필요가 있고, 또한 산소가 이차대사에 있어 분해대사산물의 억제를 초래하는 과농도 기질로의 작용여부를 관찰할 필요가 있다고 판단되었다.

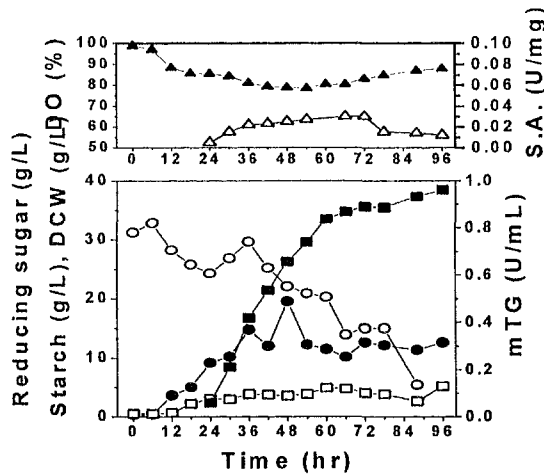


Fig. 25 Time course of enzyme fermentation in optimized medium at 30.6°C and pH 6.5. ●: DCW, ■: mTG, ○: starch, □: reducing sugar, ▲: DO, △: specific activity.

4. 포자 stock에 의한 mTG 생산연구

가. 균주특성

본 균주는 방선균으로 색깔은 우유 빛으로 불투명하였으며, 표면은 매끄러운상태였다. conidia의 모양은 막대모양으로 크기는 $0.45 \times 1.43 \mu\text{m}$ 이었고, Fig. 26에 나타난것과 같이 monoverticillate의 특징을 가지고 있다.

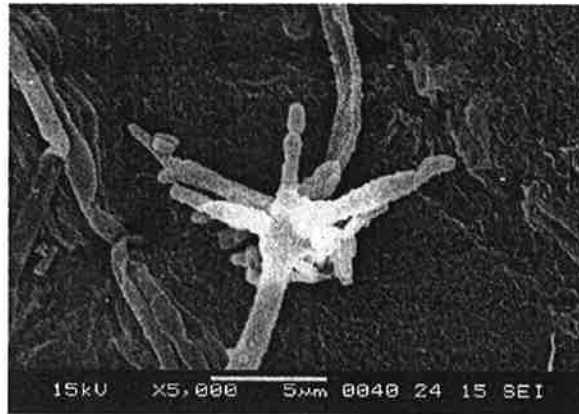


Fig. 26. Scanning electron microscopic photograph of *Streptoverticillium morbaraense*.

나. 포자형성배지 선정

*Streptoverticillium morbaraense*의 포자형성능력을 조사하기 위하여 oat meal agar와 malt extract agar 그리고 bacto agar 배지를 사용하여 효소생산을 비교하였다. 포자수는 mL당 10^8 개로 성장배지에서 5일간 배양한 후 종균 5%를 접종하여 생산배지에서 4일간 배양하였다. 그 결과 Table 17에서 보여주는 것처럼 bacto agar 배지에서 효소생산이 가장 높은 값을 보였다. Lincoln은 발효중 미생물의 생산용 배지 적응시간을 최소로 하기 위해 종균생육배지는 실제 생산용 배지와 거의 유사해야함을 강조하였고⁽²⁶⁾, Hoockenhull은 연속적인 발효 단계에서 매우 다른배지를 사용했을 때의 위험성을 지적하였다⁽²⁷⁾. 따라서 상기 결과는 bacto agar 의

배지조성이 생장을 위한 성장배지의 조성 과 동일하여 적응이 빠르기 때문에 판단 되었다. 따라서 mTG 생산을 위한 가장 적합한 포자형성 배지로서 bacto agar 배지를 선정하였다.

Table 17. Effect of inoculum quantity on DCW and enzyme activity

| agar media | spore concentration after culture (spores /mL) | inoculum spore concentration (spores /mL) | DCW (g /L) | Enzyme activity (U/ mL) |
|-------------------|--|---|------------|-------------------------|
| oat meal agar | 5.7×10^{10} | 1.0×10^8 | 7.4 | 0.91 |
| malt extract agar | 4.7×10^{10} | 1.0×10^8 | 6.6 | 0.66 |
| bacto agar | 2.5×10^{11} | 1.0×10^8 | 10.8 | 1.5 |

다. 포자 stock과 liquid stock의 저장성 및 효소생산 비교

포자 stock(10^8 spores/mL)과 liquid stock을 조제한 후 냉동고에 12주동안 보관하면서 stock의 저장성 및 효소생산을 비교하여 결과를 Table 18과 19에 나타내었다. 제조된 stock은 2주마다 실험 하루 전 온도 30℃인 배양기에서 활성화를 시킨 후 사용하였다. 실험에서 얻어진 자료는 SAS program을 이용하여 각 군별 평균치와 표준편차를 구하였다. 저장기간이 효소생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 저장일과 건조균체량, 효소활성, 단백질함량 등에 대해 $p < 0.05$ 수준으로 분산분석을 행하였고, 각 저장일 간의 유의차 검정은 Duncan의 다중범위검정을 이용하였다. 포자 stock과 liquid stock 모두 저장기간이 길어질수록 효소생산은 유의차가 있는 것으로 나타났으며, 저장기간이 8주가 지나면 효소생산이 저하됨을 알 수 있었다. 따라서 stock은 적어도 2개월 전에 계대하는 것이 바람직하다고 판단되었다. 한편 포자 stock은 liquid stock 보다 건조 균체량, 효소생산, 단백질 함량간의 표

준편차가 낮음으로써 liquid stock보다 재현성이 높음을 확인 할 수가 있었다. 이러한 이유는 포자 stock이 liquid stock과는 달리 적정량의 포자수(10^8 spores/mL)를 일정하게 접종하기 때문으로 판단되어진다. 그러나 포자 stock이 liquid stock에 비해 재현성이 높게 나타난 반면 단백질 함량은 모두 높게 측정되어 specific activity가 낮음을 알 수 있었다.

Table 18. Effect of storage period on DCW, Enzyme activity and protein content in spore stock

| storage period (weeks) | DCW(g/L) | activity (U/mL) | protein (mg/mL) | specific activity |
|------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| 2 | $12.28 \pm 0.38^{1)bz)}$ | 1.34 ± 0.0238^a | 43.96 ± 1.38^a | 0.03 |
| 4 | 12.62 ± 0.23^b | 1.35 ± 0.04^a | 43.78 ± 2.51^a | 0.03 |
| 6 | 12.50 ± 0.30^b | 1.25 ± 0.09^b | 40.9 ± 0.68^c | 0.031 |
| 8 | 12.52 ± 0.28^b | 1.26 ± 0.08^b | 40.54 ± 1.6^c | 0.031 |
| 10 | 13.54 ± 0.51^c | 1.19 ± 0.07^{bc} | 41.2 ± 2.17^{dc} | 0.28 |
| 12 | 11.72 ± 0.25^c | 1.12 ± 0.04^c | 39.36 ± 2.7^c | 0.029 |

1) Each value represents mean \pm standard deviation of five replicate.

2) Means with different letters (a, b, c) within a column are significantly different from each other at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test (a>b>c)

Table 19. Effect of storage period on DCW, Enzyme activity and protein content in liquid stock

| storage period (weeks) | DCW (g/L) | activity (U/mL) | protein content (mg/mL) | specific activity |
|------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------|
| 2 | 16.96 ± 1.8 ^{1)az)} | 1.024 ± 0.44 ^{ba)} | 34.4 ± 1.5 ^{a)} | 0.035 |
| 4 | 16.80 ± 14.79 ^{a)} | 1.30 ± 0.05 ^{a)} | 36.5 ± 2.7 ^{a)} | 0.036 |
| 6 | 14.79 ± 1.87 ^{a)} | 1.29 ± 0.17 ^{a)} | 36.4 ± 0.9 ^{a)} | 0.036 |
| 8 | 12.56 ± 0.73 ^{c)} | 1.09 ± 0.17 ^{a)} | 29.6 ± 1.9 ^{b)} | 0.037 |
| 10 | 12.56 ± 0.71 ^{c)} | 0.97 ± 0.08 ^{b)} | 30.7 ± 2.8 ^{b)} | 0.032 |
| 12 | 12.94 ± 0.76 ^{c)} | 0.97 ± 0.08 ^{b)} | 30.7 ± 2.8 ^{b)} | 0.032 |

- 1) Each value represents mean ± standard deviation of five replicate.
- 2) Means with different letters (a, b, c) within a column are significantly different from each other at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test (a>b>c)

라. 다양한 포자농도에 따른 형태구조 및 효소생산

미생물 배양 중 생산되는 균체의 형태구조가 배양액의 유변학적 특성에 매우 중요한 영향을 미치며, 생물반응기의 운전에도 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서 다양한 포자 농도에 의한 형태구조를 관찰하고 그 형태구조가 효소생산에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 포자농도를 각각 10^4 spores/mL에서 10^9 spores/mL로 변화하여 성장배지에서 5일간 배양한 후 포자농도에 따른 건조균체량과 배양 후 pH를 Fig. 27에 나타내었다. Fig. 27에 나타낸 바와 같이 포자수의 접종량이 증가하면 최종 균체량은 증가하는 경향을 보였으며 접종포자수가 10^7 spores/mL 이상인 경우는 1 mm 이하의 작고 균일한 펠릿 형태를 보여주었다. 즉, 접종한 포자농도가 높아질수록 펠릿 크기는 작아지고 균일한 분포를 보였다.

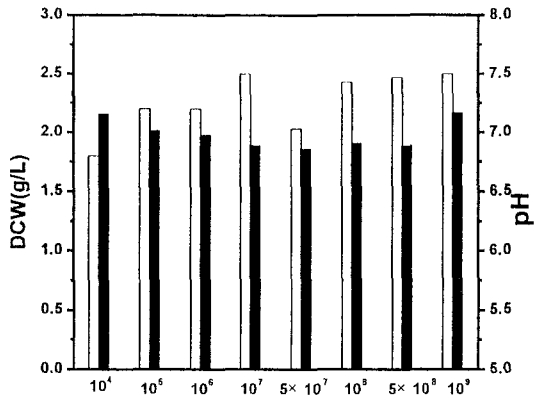


Fig. 27. Effect of various spore concentrations on DCW and final pH in growth. -□-: DCW, -■-: pH.

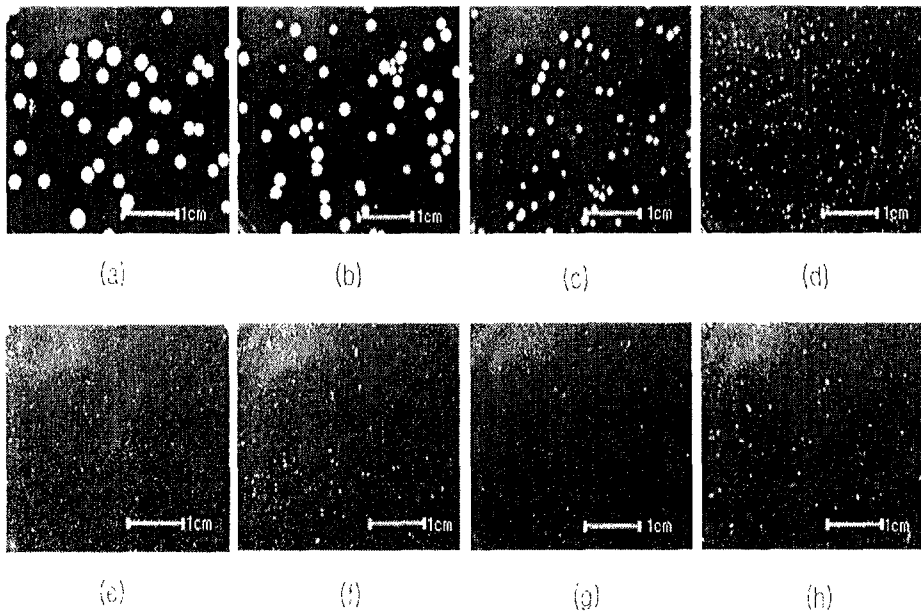


Fig. 28. Photographs of pellet according to various spore concentrations in growth medium.

(a) : 10^4 spores/mL, (b) : 10^5 spores/mL, (c) : 10^6 spores/mL,
 (d) : 10^7 spores/mL, (e) : 5×10^7 spores/mL, (f) : 10^8 spores/mL,
 (g) : 5×10^8 spores/mL, (h) : 10^9 spores/mL.

Smith와 Calam 등은 펠릿의 형태를 다음과 같이 4가지로 구분하였다⁽²⁸⁾. 즉, Dense pellet(DP)은 무정형으로 밀집되어 있는 중앙주위에 군사가 짧게 돌출 되어 있고, semi-open pellet(SOP)은 중앙에 군사의 덩어리를 가지고 있으며, open pellet(OP)은 펄프 또는 군사의 형태와 비슷하다고 정의하였다. 접종 포자수 10^7 spores/mL에서 10^9 spores/mL을 CCD-color camera(150배)로 확대하여 Fig. 29에 나타내었다.

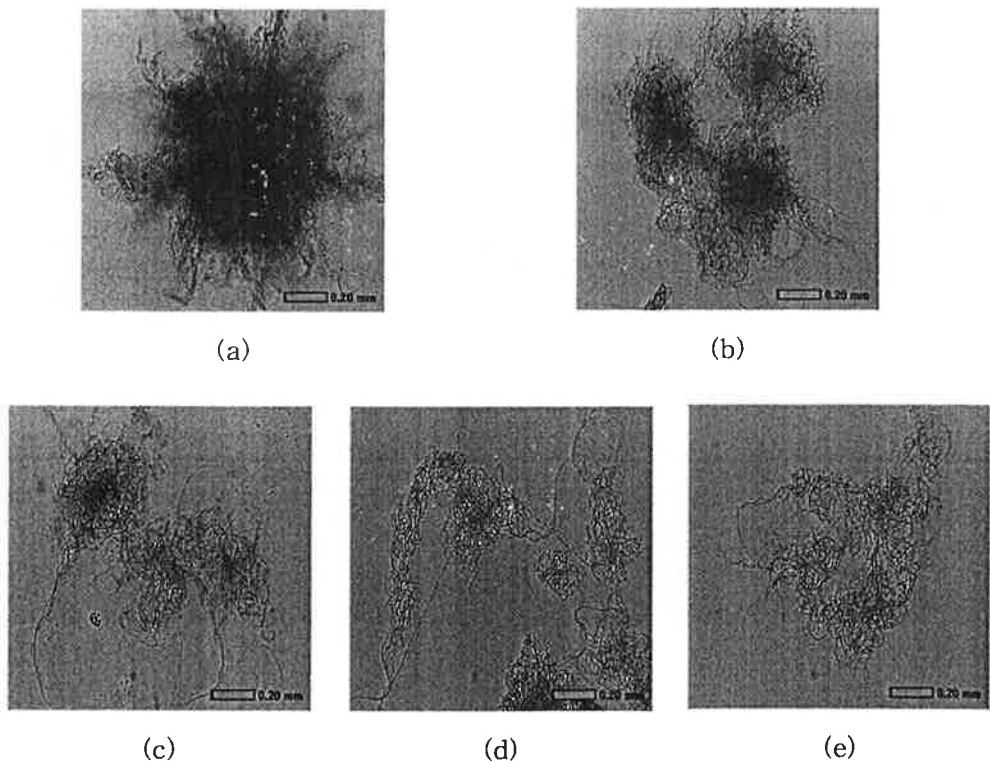


Fig. 29. Morphology according to various spore concentrations in growth medium by CCD color camera($\times 150$).

(a): 10^7 spores/mL, (b): 5×10^7 spores/mL, (c): 10^8 spores/mL (d): 5×10^8 spores/mL (e) 10^9 spores/mL

접종 포자수 10^7 spores/mL을 접종한 경우의 펠릿은 중앙부분의 뭉쳐진 정도가 단단하고 균사의 길이는 짧았으며(DP), 접종 포자수 5×10^7 spores/mL과 10^8 spores/mL은 뭉쳐진 정도가 조금 약하고 긴 균사를 가지고 있었다(SDP). 또한 접종 포자수 5×10^8 spores/mL은 중앙에 약간의 작은 덩어리(cluster)를 가지고 있고(SOP), 접종 포자수 10^9 spores/mL은 균사가 많이 풀어진 펄프형태로 보였다(OP). 따라서 접종한 포자농도가 높아질수록 펠릿의 중앙부분의 뭉쳐진 정도가 약하고 밀도가 낮은 것으로 판단되었다. 다음은 다양한 포자농도를 성장배지에 배양한 후, 접종량 5%로 생산배지에 배양했을 때의 형태구조변화를 Fig. 30에 나타내었다.

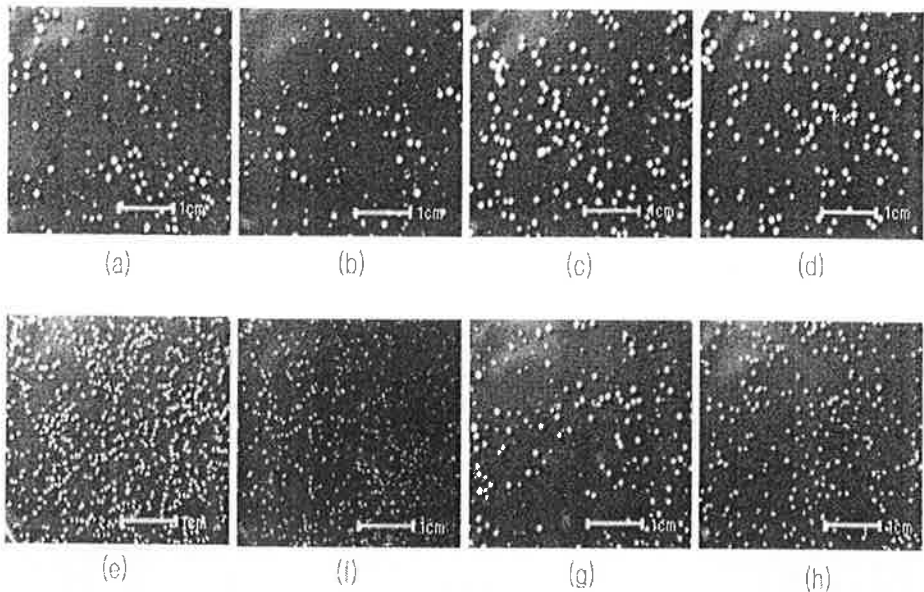


Fig. 30. Photographs of pellet according to various spore concentrations in production medium.

- (a) : 10^4 spores/mL, (b) : 10^5 spores/mL, (c) : 10^6 spores /mL,
 (d) : 10^7 spores/mL, (e) : 5×10^7 spores/mL, (f) : 10^8 spores/mL,
 (g) : 5×10^8 spores/mL, (h) : 10^9 spores/mL.

접종 포자수와 관계없이 모두 펠릴 형태이었으며, 접종 포자수 10^4 spores/mL에서 5×10^7 spores/mL은 펠릴 크기가 1-1.5 mm 이하 범위이었고, 접종 포자수 10^8 spores/mL에서 10^9 spores/mL은 1 mm 이하로 모두 균일한 분포를 보였다. 이로부터 성장배지의 포자수 접종량이 작은 경우 큰 펠릴이 형성되고 생산배지에서의 펠릴 크기가 상대적으로 큰 것을 알 수 있었다. 생산배지에서 다양한 포자접종농도에 따른 건조균체량, 효소생산과 발효 후 pH를 Fig. 31에 나타내었다.

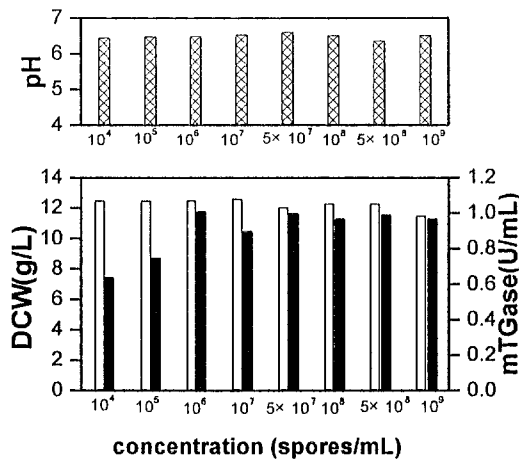


Fig. 31. Effect of various spore concentrations on DCW and final pH in production medium. -□- : DCW, -■- : activity, -▣- : pH.

각각의 포자 접종 농도에 대한 건조 균체량은 약 12 g/L로 비슷한 값을 나타내었고, 접종 포자수 10^6 spores/mL에서 10^9 spores/mL의 효소생산은 약 0.97 U/mL로 비슷한 값을 나타내었다. 따라서 성장배지에서의 포자 접종량이 10^6 spores/mL 이

상이 되면 효소생산에는 큰 차이가 없으나 초기 포자 접종량이 적은 경우(10^4 spores/mL- 10^5 spores/mL)는 효소생산이 낮은 것을 알 수 있었다.

마. 접종시기와 접종량이 효소생산에 미치는 영향

미생물 배양 시 성장배지에서의 초기 포자 접종량과 생산배지에 접종하는 시기 및 접종량(1 - 10%) 등은 균체의 형태구조 및 최종 2차 대사산물의 생산량과 밀접한 관계가 있다. 따라서 상기 실험결과를 토대로 초기 접종량을 포자수 10^8 spores/mL로 정한 후 이에 따른 성장곡선을 구하고, 접종시기를 조사하였으며 접종량에 따른 생산배지에서의 최적조건을 알아보았다. 접종 포자수 10^8 spores/mL를 성장배지에 접종한 후 10일간 배양하면서 건조균체량을 측정하여 Fig. 32에 나타내었다.

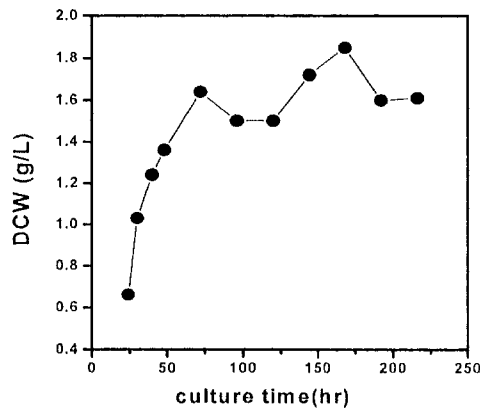


Fig. 32. The growth curve of *S. mobaraense* in growth medium by 10^8 spores/mL.

배양 24h 이후부터 균체량이 서서히 증가하다가 배양 72 h부터 건조 균체량이 거의 일정하여 정지기에 도달함을 알 수 있었다. 따라서 성장배지에서의 접종시간을 3일로 정하였다. 다음은 mTG 생산을 위한 접종시기와 접종량을 조사하기 위해 실험

을 진행하였다. 접종 포자수를 10^8 spores/mL로 하여 성장배지에서 1일, 2일, 3일, 4일, 5일로 배양한 후 배양기간별로 생산배지에 접종량을 1%, 3%, 5%, 7%, 10%로 각각 달리하여 4일간 배양하여 Fig. 33에 나타내었다.

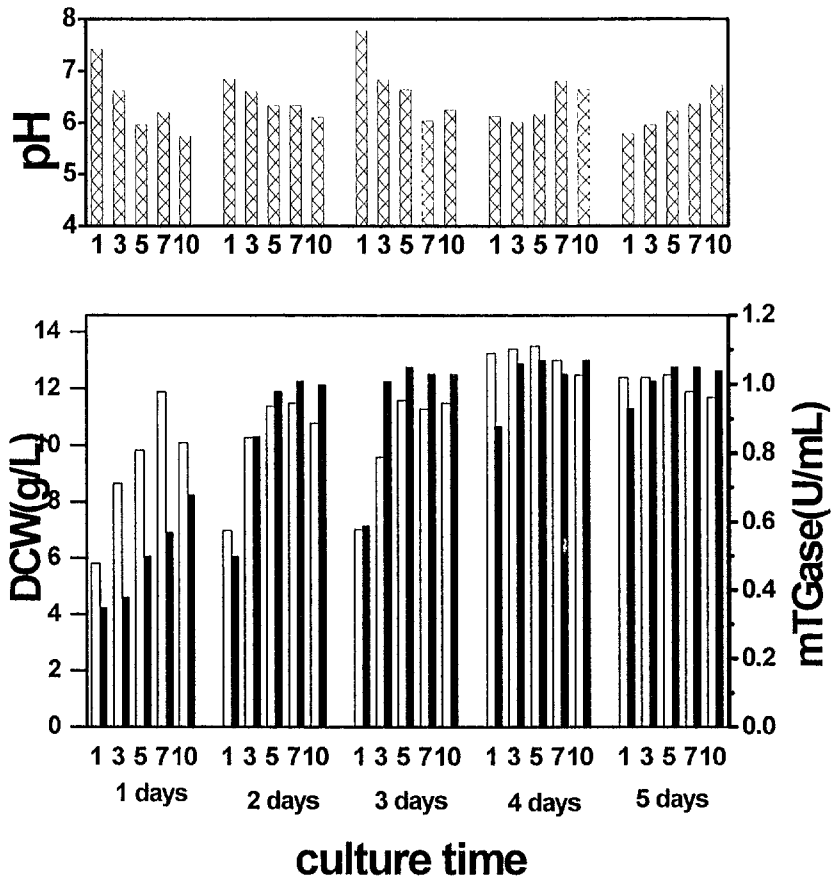


Fig. 33. Effect of various culture time and inoculum size on DCW, mTG and final pH by *S. mobaraense*. -□- : DCW, -■- : activity, -▣- : pH.

건조균체량은 성장배지에서 배양시간이 짧은 3일까지는 접종량이 1%에서 3%로 증가하면 증가하는 경향을 보이다가, 접종량이 5% 이상이면 큰 변화를 보이지 않았다. 또한 접종시기 즉, 성장배지에서 배양일이 길어질수록(4일과 5일) 최종 균체량은 초기 접종량과는 무관하게 일정하였으며, 초기 접종량이 7-10%인 경우 오히려 약간 감소하는 경향을 보였는데, 이는 많은 접종량으로 인한 영양원 고갈 때문으로 판단되었다. 효소생산을 비교해 보았을 때 접종시기 3일째이고 접종량이 5% 일때 1.05 U/mL로 최대값을 나타내었으며 성장배지에서 배양시간 4일, 5일에서 건조균체량은 3일의 경우 보다 높아졌으나 생산량은 크게 높아지지 않았다. 이결과로 배양시간 3일째이며, 접종농도 5%가 발효의 최적 접종조건으로 판단되었다. 균체 형태구조는 접종시기 1일, 2일인 경우 접종량 1%와 3%에서 펠릿의 크기는 1-2 mm 정도이었으며, 접종시기 3일-5일인 경우 접종량이 높아질수록(5-10%) 펠릿 형태로 크기가 1 mm 이하로 균일한 분포를 보였다. 발효 후pH 변화는 높게는 7.78 낮게는 5.7로 나타났으며, 접종시기 4일과 5일인 경우 접종량이 증가할수록 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 실험결과를 토대로 접종시기는 3일째 생산배지에 종균의 접종량을 5%로 하여 이후의 실험을 진행하였다.

바. 생물반응기에서 기본생산배지와 최적생산배지에서의 mTG 생산 비교

포자농도 10^8 spores/mL을 성장배지에 3일간 배양한 후 접종량을 5%로 하여 기본생산배지와 최적화된 생산배지를 이용하여 8일간 배양하여 건조균체량, mTG생산, 발효 후 pH를 Fig. 34에 나타내었다. 기본생산배지에서의 건조균체량은 접종 후 8시간부터 서서히 증가하기 시작하였으며, 배양 5일에 13.4 g/L로 최대값을 나타내었다. 그 이후 균체량은 약간 감소하는 경향을 보여주었다. 균체량은 8시간부터 서서히 증가하였으며 40시간까지 mTG 생산은 없었다. 48시간 이후부터 mTG는 생산되기 시작하여 배양 5일에 0.96 U/mL로 최대값을 나타내었다. 효소 생산이 낮은 48시간까지의 pH는 7.16에서 7.76 범위이었고, 건조 균체량과 효소생산이 높아지기 시

작하는 배양 3일-4일까지는 pH가 감소하였다. 그후 5일부터 pH가 증가하는 경향을 보였다. 균의 형태구조는 1 mm 이하의 펠릴 형태이였으며 균일한 분포를 보였다.

최적화된 생산배지에서의 균체량은 접종후 8시간부터 서서히 증가하기 시작하여 배양 2일까지 기본배지와 비슷한 경향을 보였다. 그리고 배양 6일에 최대값인 10.0 g/L를 나타내었고 그후 균체량의 변화는 일정하였다. 효소생산은 접종 후 1일부터 서서히 증가하기 시작하여 배양 7일에 1.37 U/mL로 최대값을 나타내었다. 발효 후 pH는 접종 후 8시간까지는 초기 pH 7.0과 비슷한 값인 7.5를 나타내었고 그 이후 부터 2일까지는 8.4로 증가하였으며, 효소가 생산되는 배양 3일부터 7.9에서 6.3으로 서서히 감소하는 경향을 보였다. 결국 기본생산배지와 최적화된 생산배지를 비교한 결과 최적화된 생산배지에서 효소생산이 1.4배 높은 결과를 나타내었다.

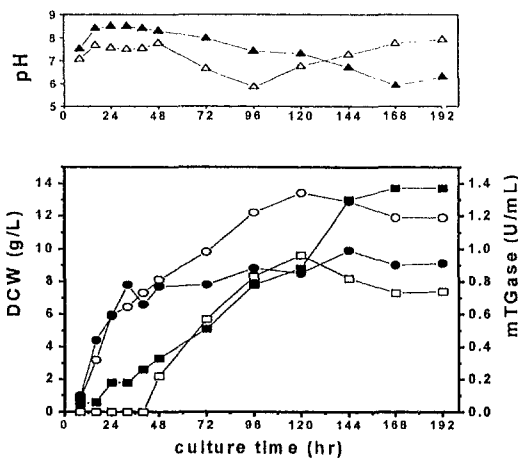


Fig. 34. Time course of mTG, DCW and pH by their basic and optimized production medium. (10^8 spores/mL for the growth medium and 5% inoculum size for the production medium) -○-, -●-, DCW: -□-, -■-, enzyme activity: -△-, -▲-, final pH, opened symbol: production medium, closed symbol: optimized production medium

5. 플라스크에 의한 유가식 배양 조건 확립

가. 유가식 배양을 위한 유기 및 무기질소원 확립

미생물배양을 위한 배지 중 유기질소원인 peptone과 아미노산 등은 이차대사산물인 mTG에 의해 가교결합을 형성하게 된다. mTG가 계속적으로 acyl transfer 반응을 촉매하는 데에 관여하게 되면, 발효액에서 회수할 수 있는 mTG의 양이 감소할 가능성이 있다. 따라서, mTG의 생산성을 증가시키기 위하여 배지중 유기질소원의 농도를 조절할 필요가 있다고 판단되었다. 유기질소원의 농도를 조절하기 위하여 발효 초기 peptone의 농도를 최적화하고, 발효 중기부터 무기질소원을 배지에 공급하여 mTG의 생산성을 높이고자 하였으며, 예비실험으로 최적 무기질소원을 선정하기 위한 실험을 수행하였다^(29, 39). 최적 생산배지를 이용하여 총 배양부피 80 mL를 기준으로 배양초기 70 mL 부피의 배지에 proteose peptone 10 g/L를 첨가하여 30시간 배양한 후 10 g/L의 무기질소원 10 mL을 첨가 배양하여 효소활성, 건조균체량, 단백질 함량, 발효 후 pH를 측정하여 결과를 Table 20에 나타내었다. 예상과는 달리 무기질소원을 공급한 경우보다 유기질소원인 proteose peptone을 공급한 경우 효소활성이 1.44 U/mL로 높게 측정되었고, 무기질소원의 경우 ammonium diphosphate를 제외하고 대부분은 약 0.7 U/mL보다 낮은 효소활성을 나타내었다. 본 실험을 통해 Zhu가 제시한 미반응 질소원 물질에 대한 mTG의 촉매반응이 본 연구에서 이용된 최적생산배지와 균주 배양 조건에서는 크게 작용하지 않는 것으로 생각되었다. 그리고 회분식 배양과 유가식 배양을 비교한 결과, 본 연구에서 최적화한 생산배지의 경우 proteose peptone을 이용한 유가식배양이 무기질소원을 이용하는 것보다 mTG 생산에 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

Table 20. The effect of various nitrogen sources on the mTG production and DCW in fed-batch culture

| Feeding sources | mTG(U/mL) | DCW(g/L) | S. A. (U/mg) | Final pH |
|---|-----------|----------|--------------|----------|
| Proteose peptone | 1.44 | 18.49 | 0.081 | 6.08 |
| CH ₃ COONH ₄ | 0.52 | 9.95 | 0.083 | 7.54 |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 0.96 | 15.69 | 0.077 | 6.65 |
| NH ₄ CO ₃ | 0.26 | 10.43 | 0.061 | 9.56 |
| NH ₄ NO ₃ | 0.72 | 13.91 | 0.082 | 5.40 |
| NaNO ₃ | 0.73 | 17.20 | 0.095 | 5.28 |
| NH ₂ OH · HCl | 0.68 | 8.82 | 0.019 | 3.57 |
| NH ₄ CONH ₂ | 0.78 | 12.93 | 0.110 | 8.67 |
| NH ₄ Cl | 0.36 | 16.29 | 0.052 | 5.46 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.38 | 14.84 | 0.043 | 5.77 |
| NaN ₃ | 0.56 | 7.23 | 0.107 | 7.07 |
| KNO ₃ | 0.40 | 14.69 | 0.049 | 5.42 |
| control | 0.76 | 16.71 | 0.048 | 6.27 |

다음 실험에서는 proteose peptone 및 상기의 실험들을 토대로 제안된 기질을 공급하여 각각의 실험결과를 비교하고, 기질 공급 시기를 구명하고자 하였으며 실험 결과를 Table 21에 나타내었다.

Table 21. The effect of organic and inorganic nitrogen sources on mTG production and DCW in fed-batch culture

| Feeding source | mTG(U/mL) | DCW(g/L) | S. A. (U/mg) | Final pH |
|--|-----------|----------|--------------|----------|
| (a) | | | | |
| Proteose peptone | 1.11 | 17.77 | 0.070 | 5.87 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0.33 | 17.59 | 0.042 | 5.67 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.57 | 14.99 | 0.050 | 6.84 |
| (b) | | | | |
| Proteose peptone | 1.45 | 22.24 | 0.073 | 6.90 |
| Control | 0.98 | 15.22 | 0.067 | 5.41 |

기질의 공급방법은 최종배양부피가 80 mL이 되도록 공급하였으며, 최종배양부피를 기준으로 기질 공급량을 결정하였다. 기질 공급방법으로 다음의 두가지가 사용되었다. (a)의 경우는 최적 생산배지 조성에 proteose peptone 0.8 g을 배지 70 mL에 용해하여 배양한 후, proteose peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 각각 10 mL에 0.8 g을 용해하여 발효시작 후 30시간에 1회 공급하였다. (b)는 배양초기 70 mL의 배지에 proteose peptone 1.6 g을 10 mL에 용해하여 배양 시간 0, 12, 24, 48, 72 시간에 2 mL씩 총 5회 공급하였다. 대조구의 효소활성 0.98 U/mL와 비교한 결과, (a)방법으로 proteose peptone을 공급하였을 때 1.1 U/mL의 효소활성, (b)방법으로 proteose peptone을 공급한 경우는 1.45 U/mL로 상대적으로 높은 효소 활성을 나타내었다. 건조균체량도 (b)방법이 22 g/L로 매우 높은 미생물의 성장을 보였다. 따라서 proteose peptone 공급방법은 질소원 전량을 배양초기부터 배양일 동안 같은 양을 나누어 하루에 1회 공급하는 것이 mTG 생산을 높일 수 있는 최적의 방법으로 판단되었다.

나. 유기식 배양을 위한 배지공급원 확립

상기 실험 결과 얻어진 배지공급시기를 토대로 공급배지를 확립하고자 최적생산 배지 및 유기질소원, 유기질소원 조합배지가 mTG 생산에 미치는 영향을 조사하여 결과를 Table 22에 나타냈다

Table 22. The effect of optimum medium and organic nitrogen sources on mTG production and DCW in fed-batch culture

| Feeding source | mTG(U/mL) | DCW(g/L) | Final pH |
|--------------------------------|-----------|----------|----------|
| Optimum medium | 1.9 | 14.1 | 5.76 |
| Proteose peptone+Yeast extract | 1.9 | 13.3 | 7.44 |
| Proteose peptone | 1.85 | 13.1 | 7.6 |
| Yeast extract | 1.56 | 9.8 | 5.5 |
| Control | 1.4 | 9.7 | 6.36 |

포자수는 10^8 spores/mL이 되도록 포자용액을 적정량 성장배지에 접종하였으며, 성장배지에서 3일간 배양한 후 mTG 생산을 위한 종균으로 사용하였다. 플라스크배양에서의 초기 배양부피는 80 mL이었고, 유가식 배양을 위해 7일 동안 공급한 배지량은 10 mL이었다. 배지는 하루에 1회 공급하였으며, 6회 동안은 1.5 mL, 마지막날에는 1 mL을 공급하였다. 공급을 위한 배지는 proteose peptone, yeast extract, proteose peptone과 yeast extract의 조합, 최적 생산배지였다. 실험결과 대조구의 효소생산은 1.4 U/mL이었고, 실험한 배지 모두 대조구 보다 높은 효소생산을 나타내었다. 최적 생산배지와 proteose peptone과 yeast extract를 조합하여 공급한 경우 효소생산은 1.9 U/mL로 가장 높았고, 건조균체량은 각각 14.1 g/L, 13.3 g/L이었다. Proteose peptone과 yeast extract를 단독으로 공급한 경우 효소생산은 각각 1.85 U/mL, 1.56 U/mL 이었고, 건조균체량은 각각 13 g/L, 9 g/L이었다. 최적 생산배지와 유기질소원 조합배지를 공급한 경우 효소생산이 제일 좋았으나, 최적 생산배지를 유가식으로 공급하는 경우에는 배지의 한 성분인 soluble starch의 젤화 현상으로 배지공급이 쉽지 않았다. Proteose peptone과 yeast extract를 조합하여 공급한 경우와 proteose peptone만을 공급한 경우를 비교해 보았을 때 측정된 효소활성 값이 오차범위로 판단되었다. 그러므로 유가식 배양으로 proteose peptone을 공급하는 방법이 최적으로 생각되었으며, 향후실험에서는 선정된 proteose peptone의 농도에 따른 영향을 조사하였다.

다. 유기질소원인 proteose peptone 농도 확립

유가식배양에서의 proteose peptone 농도를 결정하기 위하여 공급 농도를 각각 10, 15, 20, 25, 30 g/L로 변화하였고, 그 결과를 Table 23에 나타내었다.

Table 23. The effect of various proteose peptone concentrations on mTG production and DCW in fed-batch culture time

| Concentration (g/L) | DCW (g/L) | mTG (U/mL) | Protein content (mg) | Specific activity (U/mg) | Final pH |
|------------------------|--------------|---------------|----------------------------|--------------------------------|-------------|
| 10 | 8.1 | 0.8 | 21 | 0.057 | 6.9 |
| 15 | 8.6 | 1.2 | 26.2 | 0.064 | 7.3 |
| 20 | 11.6 | 1.67 | 26.5 | 0.067 | 7.6 |
| 25 | 10.5 | 1.78 | 26.5 | 0.058 | 7.6 |
| 30 | 12.5 | 1.86 | 30.4 | 0.052 | 7.8 |
| Control | 8.7 | 1.38 | 28.5 | 0.048 | 8.74 |

대조구의 효소생산과 specific activity는 각각 1.38 U/mL, 0.048(U/mg)이었고, 공급농도를 높일수록 건조균체량과 효소 생산은 높아지는 경향을 나타내었다. 즉, 공급농도가 10 g/L인 경우 건조균체량은 8.1 g/L, 효소생산은 0.8 U/mL, 15 g/L로 공급한 경우 각각 8.6 g/L, 1.2 U/mL이었다. 20 g/L로 공급한 경우에는 11.6 g/L, 1.6 U/mL이었고, 25 g/L로 공급한 경우 10.5 g/L, 1.78 U/mL이었으며, 30 g/L로 공급한 경우 각각 12.5 g/L, 1.86 U/mL으로 증가하였다. 또한 단백질 함량은 공급농도가 높아짐에 따라 높아지는 경향을 보여 주었다. 발효 후 pH는 proteose peptone의 공급농도가 높아질수록 약간 높아지는 경향을 관찰할 수 있었다. 따라서 상기 결과를 토대로 proteose peptone의 공급농도는 specific activity가 대조구보다 39.6% 높아진 20 g/L로 결정하였다.

6. 생물반응기를 이용한 유가식 배양조건 확립

가. 회분식 생물반응기에서 교반속도가 mTG생산에 미치는 영향

생물반응기에서 교반은 기체의 분산, 혼합 및 물질과 열전달을 위해 필요한 전단력을 제공한다. 즉, 균류와 같이 균사를 형성하는 미생물들은 세포가 성장하면서 배양액내의 점도가 높아지게 되는데 교반속도를 증가시켜 산소전달을 향상시킬 수 있다. 그러나 과도한 교반 속도는 강한 전단력으로 인해 세포의 성장에 악 영향을 미칠 수 있다. Paul 등은 *Aspergillus niger*에 의한 발효에서 800 rpm의 높은 교반 속도에서 citric acid 생산이 감소되고⁽¹³⁾, Lee 등은 *Agrobacterium sp.*에 의한 Curdlan 생산이 700 rpm에서 감소됨을 보고하였다⁽³¹⁾. 따라서 발효시 적절한 교반 속도 확립은 중요하다고 생각되어진다. 본 실험에서는 다양한 교반속도가 균체의 형태구조와 효소생산에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 회분식 배양에서의 교반 속도는 258, 330, 400 rpm이었고, 온도 30℃, pH는 7.0으로 조정하면서 운전하였다. 교반속도를 258 rpm에서의 시간에 따른 건조균체량, 효소활성, 전분 및 잔류당 분석결과를 Fig. 35에 나타내었다.

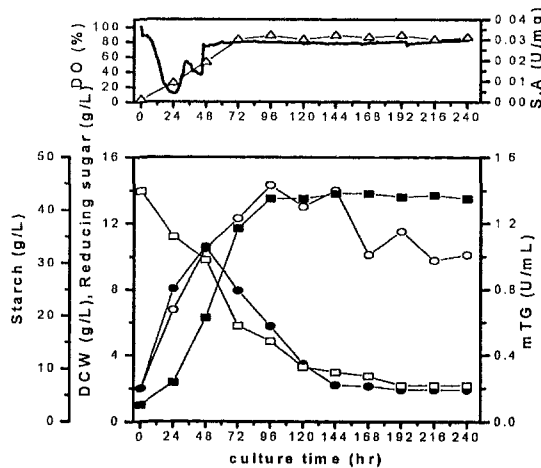


Fig. 35. Time course of mTG production at 258 rpm, 1 vvm, pH 7.0, 30℃ and 5% inoculum during batch culture. -○-: DCW, -■-: mTG, -●-: reducing sugar, -□-: starch, △: specific activity, —: DO.

발효가 시작되면서 세포는 서서히 성장하여 배양 4일에 건조 균체량이 13.34 g/L로 최대값을 나타내었고 이후에는 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. mTG 생산은 배양 24시간부터 증가하여 배양 6일에 1.38 U/mL로 최대값을 나타내었으며 이후에는 일정하였다. 전분은 발효가 진행되면서 감소하였고, 배지중의 잔류 당농도는 발효 말기에 약 2 g/L이었다. 용존산소농도는 발효가 시작되면서 미생물 성장으로 인해 감소하였고 배양 19시간부터 배양 28시간까지 20% 이하를 유지하였다. 그 후 서서히 증가되어 발효말기에는 약 80%를 유지하였다. 발효중 균체의 형태구조는 1 mm 이하의 펄린이었고, 발효중 배지색상은 배양이 시작되면서 배양 5일까지 밝은 베이지색을 유지하다가 배양 6일부터 갈변이 되어 발효말기에는 갈색을 나타내었다. 교반속도를 330 rpm으로 증가시켜 운전한 실험결과를 Fig. 36에 나타내었다.

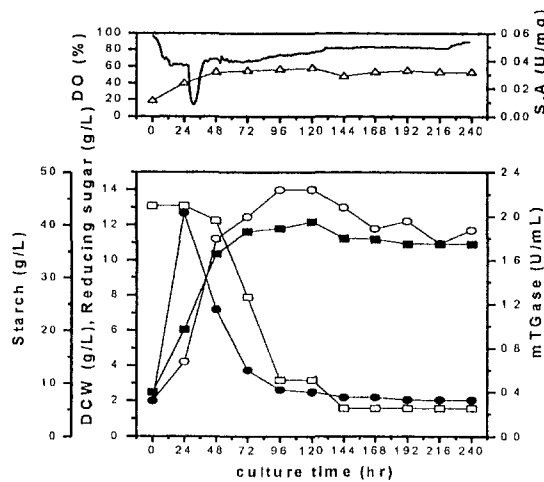


Fig. 36. Time course of mTG production at 330 rpm, 1 vvm, pH 7.0, 30°C and 5% inoculum during batch culture. -○-: DCW, -■-: mTG, -●-: reducing sugar, -□-: starch, △: specific activity, —: DO.

건조균체량은 발효가 진행되면서 서서히 증가하여 배양 5일에 14 g/L로 최대값을 나타내었고, 효소생산은 1.96 U/mL로 가장 높은 값을 나타내었다. 이 결과를 교반

속도 258 rpm과 비교시 효소생산은 24시간 빠른 시점에서 최대의 활성을 나타내었고, 1.4배 향상됨을 알 수 있었다. 용존산소농도는 발효가 시작되면서 서서히 감소하여 배양 31시간에 약 14%로 유지되다가 서서히 증가되어 발효말기에는 80% 정도로 일정하게 유지되었다. 발효 중 전분은 낮은 교반속도로 운전한 258 rpm 보다 빠르게 소모됨을 관찰할 수 있었고, 배지중에 잔류해 있는 glucose 농도는 2 g/L로 탄소원의 고갈은 없는 것으로 판단되었다. 발효중 균체의 형태구조는 1 mm 이하의 펄틸이었고, 발효중 배지의 색깔은 교반속도 258 rpm과 같은 경향을 나타내었다.

교반속도를 400 rpm으로 운전한 실험결과를 Fig. 37에 나타내었다.

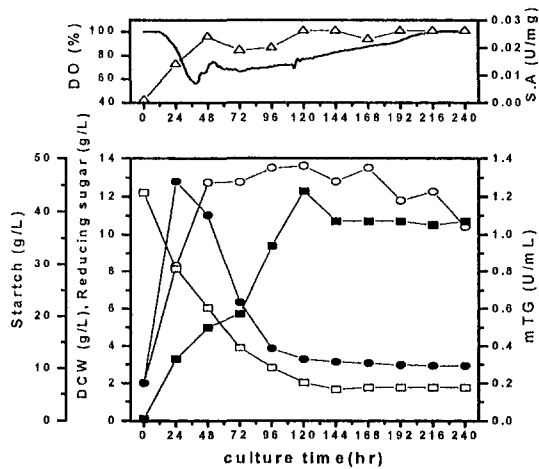


Fig. 37. Time course of mTG production at 400 rpm, 1 vvm, pH 7.0, 30°C and 5% inoculum during batch culture. -○-; DCW, -■-; mTG, -●-; reducing sugar, -□-; starch, △; specific activity, —; DO.

건조균체량은 교반속도 330 rpm과 비슷한 경향을 나타내었고, 효소생산은 배양 5일에 최대 0.3 U/mL로 나타내었는데 이러한 mTG 생산 감소는 높은 교반속도에 의한 전단력 영향으로 판단되었다. 용존산소농도는 높은 교반속도로 인하여 30% 이상을 유지하였고, 균체의 형태구조와 발효중 배지의 색깔은 다른 교반속도에서 운전한

결과와 동일하였다. 결과적으로 회분식 배양에서 미생물생장과 효소생산을 고려할 때 최적 교반속도는 330 rpm으로 판단되었다.

나. 배지 공급방법에 따른 mTG 생산

미생물 배양시 탄소원, 질소원, 인원 등은 미생물의 성장에 필수적인 영양원이지만 기질의 농도가 과도하게 높을 경우 이차대사 산물의 생산에는 매우 부정적인 영향을 미치게 된다. 유가식 배양은 이러한 고농도 기질에 의한 세포성장의 억제, 부산물의 생성에 의한 생육억제와 같은 고농도의 세포배양에서 일어나는 문제점들을 최소화시킨다⁽³²⁾. 예를들어 Zhu 등은 mTG 생산에서 고농도의 peptone이 질소원으로 사용되었을 때 발효중 생산된 mTG와 가교를 형성하기 때문에 transglutaminase 생산이 향상되지 않음을 관찰하여 무기 질소원인 암모늄 설페이트를 공급함으로써 mTG 생산이 향상됨을 보고하였고⁽³⁰⁾, Xie와 Wang은 동물세포배양에서 배지내 고농도의 glucose와 glutamine은 부산물로서 독성의 lactate와 ammonia가 생성됨을 관찰하고, 이러한 독성효과를 제거하기 위해 glucose와 glutamine의 공급을 조절함으로써 생산성을 향상할수 있음을 보고하였다⁽³³⁾. 본 실험에서는 이전 실험 결과로부터 최적의 질소원으로 확립된 proteose peptone으로 mTG 생산을 높이고자 공급방법을 연속적 또는 간헐적으로 조절하여 발효를 수행하였다. 상기 실험 결과에서 확립된 교반속도 330 rpm으로 온도 30℃, pH 7.0으로 조정하면서 발효를 진행하였다. 반응기 부피는 2.5 L(KBT CO., LTD, Korea)로 초기 배양 부피는 1.3 L이었고, 200 mL의 proteose peptone(20 g/L)을 연동펌프(Cole-parmer instrument company, USA)를 이용하여 6일 동안 공급하였다. 발효초기부터 연속적으로 1.4 mL/h로 기질을 공급하였으며, 그 실험결과를 Fig. 38에 나타내었다.

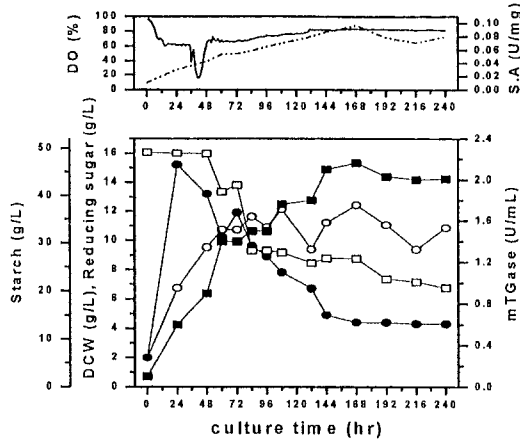


Fig. 38. Time course of mTG production at pH 7.0, 30°C and 330 rpm. 20 g/L of proteose peptone was continuously supplied for 6 days during fed-batch culture. -○-: DCW, -■-: mTG, -●-: reducing sugar, -□-: starch, --: specific activity, —: DO.

발효가 진행됨에 따라 세포농도와 효소생산은 증가하였고, 배양 7일에 건조균체량 12.4 g/L, 효소생산 2.16 U/mL로 최대값을 나타내었다. 단백질 함량은 배양초기부터 20.1 mg/mL로 발효 말기(25.5 mg/mL)까지 많은 차이를 나타내지 않았고, 회분식 배양과 비교시 약 60% 감소하였다. 단백질 함량의 감소는 효소의 순도를 결정하는 specific activity가 높아지는 요인이된다. 회분식 배양(Fig. 36)과 비교시 효소생산은 1.1배, specific activity는 2.8배 증가하였다. 용존산소농도는 배양시간이 지날수록 서서히 감소하는 경향을 나타내었으며, 배양 40시간에 15%까지 감소한 후 서서히 증가 하다가 약 80% 정도로 일정하게 유지되었다. Proteose peptone(20 g/L)을 발효초기부터 하루에 한번 33.6 mL씩 6일 동안 간헐적으로 공급하여 배양한 실험결과를 Fig. 39에 나타내었다.

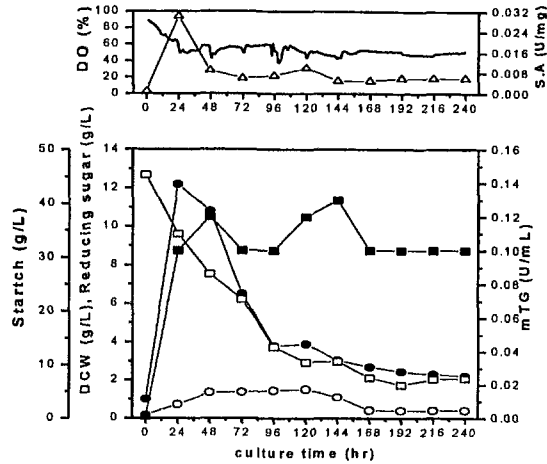


Fig. 39. Time course of mTG production at pH 7.0, 30°C and 330 rpm. 20 g/L of prote-ose peptone was supplied a time per a day from zero time for 6 days during fed-batch culture. -○-; DCW, -■-; mTG, -●-; reducing sugar, -□-; starch, -△-; specific activity, -; DO.

배양시간이 증가함에 따라 세포농도와 효소생산은 큰 차이를 보이지 않았고, 배양 6일에 각각 1.51 g/L, 0.13 U/mL로 매우 낮은 값을 나타내었다. 이 결과로부터 적절한 질소원의 공급은 세포성장과 생산물을 생산하는데 필수적이나 proteose peptone의 간헐적 공급은 연속적 공급에 비하여 배지의 이용 및 대사에 나쁜 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 전분은 발효가 시작되면서 소비되기 시작하여 발효 말기에는 약 7 g/L로 상당히 높았으며, 단백질함량은 상대적으로 낮았다. 용존산소 농도는 배양시간이 지날수록 감소하는 경향을 보이다가 배양말기까지 40-50% 수준을 유지하였다. 따라서 생물반응기에서 배지의 공급방법은 하루에 한번 간헐적으로 공급한 경우보다 연속적으로 공급한 경우가 mTG 생산에 더 효과적임을 알 수 있었다.

7. 용존산소 자동조절 시스템에 의한 mTG 생산

가. 용존산소 농도에 따른 mTG 생산 비교

용존산소는 미생물 대사에 중요한 인자로 알려져 있다. 발효중 미생물의 산소 요구도는 발효조의 교반에 의한 산소공급과 균형을 이루어야한다. 만일 이 요구를 충족시키지 못하면 배양액의 용존산소농도는 임계농도 이하가 되어 미생물 대사에 치명적인 저해를 가져올 수 있다. Zhou 등은 *Sephalosporium acremonium*에 의한 Cephalosporin C 합성에서 최적의 Cephalosporin C 합성을 위한 임계산소농도는 20%이었음을 보고했다⁽³⁴⁾. 또한 Hwang 등은 *Acetobacter xylinum BRC5*에 의한 셀룰로오스 생산에서 용존산소농도를 10%로 유지했을 때 셀룰로오스 생산이 최적임을 보고하였다⁽³⁵⁾. 따라서 미생물마다 용존산소 임계점이 다르기 때문에 생산물을 극대화하기 위한 용존산소농도조절에 관한 연구는 중요한 일이라 판단된다. 본 연구에서는 발효동안 교반과 통기속도를 조절하여 미생물 유래 mTG 생산을 위한 최적의 용존산소농도를 확립하고자 하였다. 회분식 배양에서 용존산소농도가 배양 31시간에 14%로 감소된 이전 실험결과를 토대로 용존산소농도를 지정된 농도로 증가시켜 줌으로써 mTG 생산을 향상시킬 수 있으리라 판단되어 발효를 수행하였다. 지정된 농도의 용존산소농도를 유지하기 위하여 통기속도와 교반속도를 조절하였고, 미생물의 전단력에 의한 영향력을 고려하여 우선적으로 통기속도가 증가되도록 설정하였으며, 만약 통기속도의 증가만으로 지정된 용존산소를 유지할 수 없을 경우 교반속도가 동시에 자동적으로 작동되도록 하였다. 교반기 속도의 최소값은 330 rpm, 최대값은 430 rpm으로 정하였고, 통기속도는 1 L/min-4 L/min으로 설정하였다. 용존산소농도를 30%로 유지했을 때의 실험결과를 Fig. 40-42에 나타냈다. Fig. 40은 통기속도와 교반속도 변화이다. 발효가 시작되면서 용존산소농도는 감소되기 시작하여 발효 13시간부터 약 36시간까지 용존산소농도 30%를 유지하기 위해 통기속도와 교반속도가 작동되기 시작하였고, 통기속도는 최대 3.7 L/min, 교반속도는 360 rpm까지 증가하였다. 발효 36시간 이후부터 용존산소농도는 서서히 증가되기 시작하여 발효말기에는 통기속도와 교반속도 변화가 최소 설정값으로 일정하게 유지되었다.

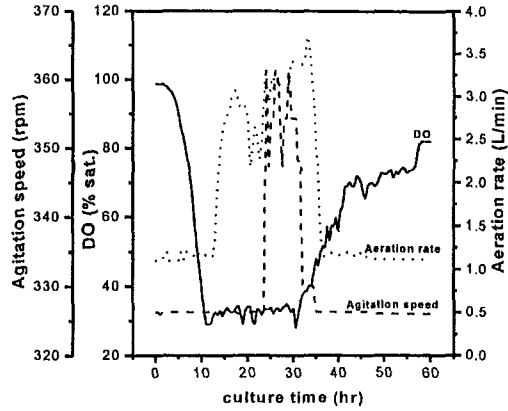


Fig. 40. Time course profiles of DO, agitation speed, aeration rate in a 2.5 L batch fermenter culture at 30°C and 330 rpm for 60 hrs. DO was maintained at about 30%, controlled by on-line computer-controlled fermentation system. - : DO, ...: aeration rate, - - : agitation speed.

발효가 진행되는 기간동안 방출되는 CO₂와 O₂ 변화를 Fig. 41에 나타내었다.

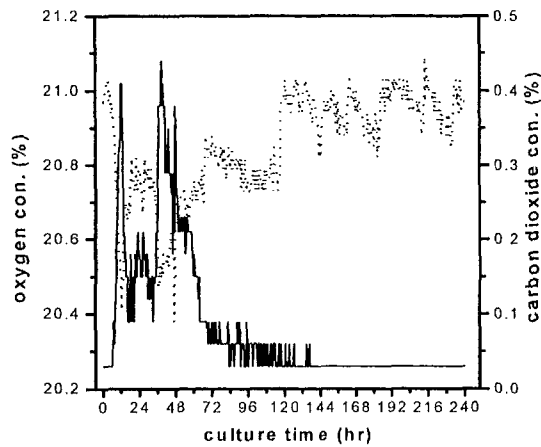


Fig. 41. Time course profiles of oxygen and carbon dioxide concentration by on-line computer-controlled fermentation system at 30% DO saturation level. - : carbon dioxide, ...: oxygen concentration.

CO₂ 농도는 용존산소농도가 감소되는 시기에 증가되지는 않았지만 발효초기에 증가하는 경향을 나타내었고, O₂ 농도 또한 미생물이 성장함에 따라 감소하는 것을 알 수 있었다. mTG 생산에 대한 실험결과를 Fig. 42에 나타내었다.

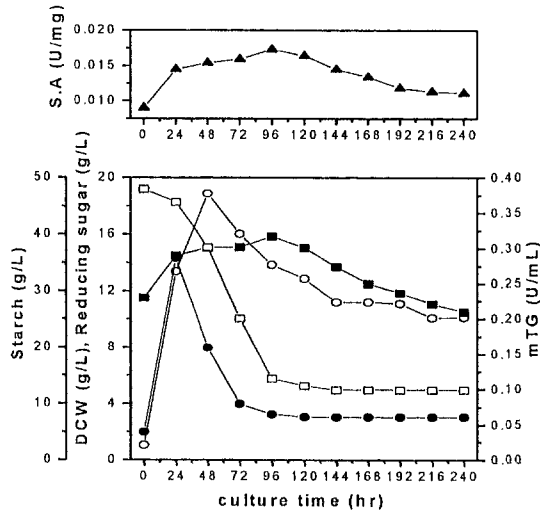


Fig. 42. Time course profile of mTG production by on-line computer-controlled fermentation system at 30% saturation level during the batch culture. -○-: DCW, -■-: mTG, -●-: reducing sugar, -□-: starch, -▲-: specific activity.

mTG 생산은 배양 4일에 최대가 0.32 U/mL로 낮은 값을 나타내었다. 용존산소농도를 조절하지 않은 회분식 배양과 비교했을 때 건조균체량은 약 26% 증가된 반면, mTG 생산은 약 6배 감소하였다. 이 결과는 각 미생물마다 용존 산소 임계점이 다르기 때문에 본 균주의 경우 30%의 용존산소농도는 효소생산보다 세포 성장만을 향상시켜주는 것으로 판단되었다. 따라서 용존산소농도를 20%로 고정하여 발효를 수행하였다.

용존산소농도를 20% 유지했을 때의 실험결과를 Fig. 43-45에 각각 나타내었다. Fig. 43은 통기속도와 교반속도의 변화이다. 용존산소농도는 발효가 시작되면서 서서히 감소되었고 배양 13시간부터 배양 19시간까지 20%로 자동조절 되었다. 용존산소농도가 20%로 유지되기 위해서 통기속도는 1.85 L/min 까지 증가하였고, 교반속도는 약간 변화하는 것을 관찰할 수 있었다. 통기속도 조절로써 용존산소농도를 20%로 유지하것이 가능함을 확인 할 수가 있었다.

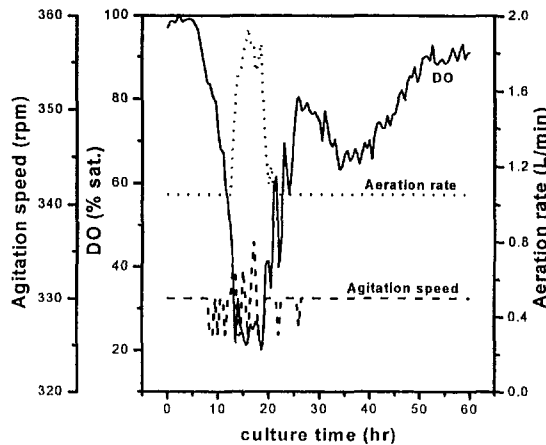


Fig. 43. Time course profiles of DO, agitation speed, aeration rate in a 2.5 L batch fermenter culture at 30°C and 330 rpm for 60 hrs. DO was maintained at about 20%, controlled by on-line computer-controlled fermentation system. - : DO, ---; aeration rate, - - : agitation speed.

발효 중 방출되는 CO₂와 O₂ 변화를 Fig. 44에 나타내었다. CO₂ 농도는 용존산소농도가 20%로 조절되는 시기에 높게 유지되다가 그 후 감소하는 경향을 보였고, O₂ 농도는 CO₂ 변화와 반대로 서서히 증가하는 추세를 보여주었다. 결과로부터 CO₂는 세포성장이 활발한 시기에 세포의 대사에 의해 대사산물로 방출되어 높게 유지됨을 알 수 있었다.

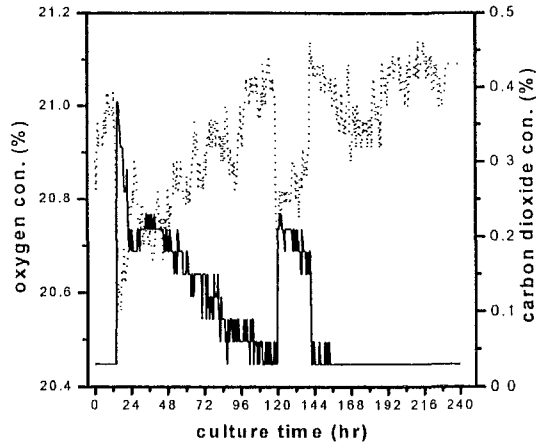


Fig. 44. Time course profiles of oxygen and carbon dioxide concentration by on-line computer-controlled fermentation system at 20% DO saturation level. - : carbon dioxide, · · : oxygen concentration.

mTG 생산에 대한 실험결과를 Fig. 45에 나타내었다. 건조균체량은 배양 2일에 약 15 g/L로 최대를 나타내었고, 그 이후 감소 추세를 나타내었다. mTG 생산은 배양 6일에 2.14 U/mL로 가장 높은 효소활성을 나타내었고, 용존산소를 조절하지 않은 경우(Fig. 36 참조)보다 1.1배, 30%로 자동 조절했을때보다 6.8배 증가된 결과였다. 따라서 본 균주의 경우 용존산소농도 조절로 효소생산은 회분식배양에 비해 약 10% 정도 증가하였으며, 용존산소농도가 보다 중요하게 적용되는 미생물에는 효과적으로 생산성을 높일 수 있는 시스템으로 판단되었다.

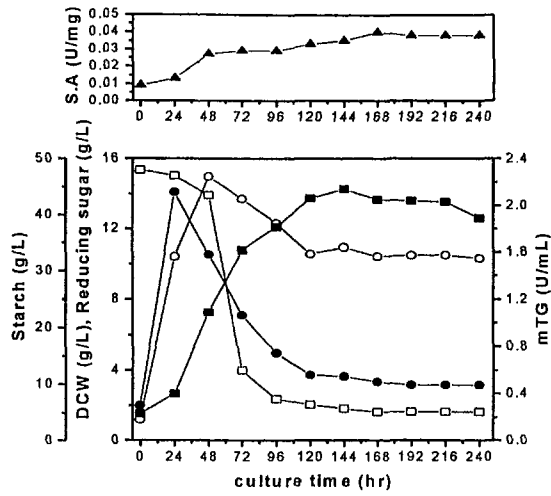


Fig. 45 Time course profile of mTG production by on-line computer-controlled fermentation system at 20% saturation level during the batchculture. -○-; DCW, -■-; mTG, -●-; reducing sugar, -□-; starch, -▲-; specific activity.

제 4 절 참 고 문헌

1. Zhu, Y., A. Rinzema, J. Tramper, and J. Bol (1995), Microbial Transglutaminase—a Review of its Production and Application in Food Processing, *Appl Microbial Biotechnol.* 44, 277-282.
2. Motoki, M. and K. Seguro (1998), Transglutaminase and its Use for Food Processing, *Trends in Food Science & Technology* 9, 204-210.
3. <http://www.ct.utwente.nl/~ospt/minipost95/luw/Zhu.html> 1998.3.27.
4. Day, N. and J. W. Keillor (1999), A continuous Spectrophotometric Linked Enzyme Assay for Transglutaminase Activity, *Analytical Biochemistry* 274, 141-144.
5. Gerber, U., U. Jucknkschke, S. Putzien and H. L. Fuchsbauer (1994), A Rapid and Simple Method for The Purification of Transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*, *Biochem. J.* 299, 825-829.
6. Tsai, G. J., S. M. Lin and S. T. Jiang (1996), Transglutaminase from *Streptoverticillium ladakanum* and Application to Minced Fish Product, *Journal of Food Science* 61 (6), 1234-1238.
7. <http://www.taekyoung.com> 2000.11.14.
8. Ando, H., M. Acachi, K. Umeda, M. Motoki, A. Matura, M. Nonaka, P. Uchio and H. Tanaka (1989), Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms, *Agric Biol. Chem.* 53, 2613-2617.
9. Tsai, G. J., S. M. Lin, and S. T. Jiang(1996), Transglutaminase from *Streptoverticillium ladakanum* and application to minced fish product,

- Journal of Food Science, 61(6), 1234 -1238.
10. Zhu, Y., A. Rinzema, J. Tramper, and J. Bol (1996), Medium Design Based on Stoichiometric Analysis of Microbial Transglutaminase Production by *Streptoverticillium mobaraense*, *Biotechnology and Bioengineering* 50, 291-298.
 11. Claus, L. J., L. C, and J, H. H. 1998. Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations. *Bio-technol. Prog.* 14: 233-240.
 12. Kim, S. H., Y. J. Yoo., E. Y. Kim, and M. H. Kim. 1995. Effect of *Aspergillus niger* pellets on citric acid production in a bubble column bioreactor. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 5(3): 172-176
 13. Paul, G. C., M. A. Priede, C. R. Thomas(1999), Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations, *Biochemical Engineering Journal*, 3, 121-129.
 14. Folk, J. E. (1970), Transglutaminase, In *Methods in Enzymology* , H. Tabor and C W. Tabor, Eds., p 889-894, Academic press, New York.
 15. Suelter, C. H. (1985), A Practical Guide to Enzymology, p 31, John Wiley & Sons, Inc., Michigan.
 16. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956), Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analitical Chemistry* 28(3), 350-356.
 17. Miller, G. L. (1960), Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination for Reducing Sugar, *Analitical Chemistry* 31, 426-428.
 18. Pauline, M. Doran (1995), In *Bioprocess Engineering Principles*, 190-213, Academic Press Inc, San Diego.

19. Gomes, J., L. Gomes, H. Esterbauer, W. Kreiner and W. Steiner (1989), Production of Cellulases by A Wild Strain of *Gliocladium virens*: Optimization of The Fermentation Medium and Partial Characterization of The Enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 31, 601-608.
20. Gyorgy, S., M. Gyorgy and P. T. Robert (1998), Production of Lovastatin by A Wild Strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters.* 20, 411-415.
21. 김의용, 서명교, 송치현, 윤종원, 이근복, 전홍기 (1999), 미생물공학, p 5, 문운당, 서울.
22. Stowell, J. D. (1987), The Application of Oils and Fats in Antibiotics Processes, In *Carbon Substrate in Biotechnology*, J. D. Stowell, A. J. Beardsmore, C. W. Keevil, and J. R. Woodward, Eds., p 139, IRL Press.
23. Snell, F. C. and L. S. Ettore (1979), In *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*, p 494, John Wiley & Sons, Inc., New York.
24. 김동연, 권용주, 양희천, 윤형식 (1995), 식품화학, p 420, 영지문화사, 서울.
25. 김승욱, 이진석, 정용섭, 조영일, 홍석인 (1997), 생물화학공학, p 229, 희중당, 서울.
26. Lincoln, R.E.1960. Control of stock culture preservation and inoculum build-up in bacterial fermentations. *J. Biochem. Microbiol. tech. Eng.* 2: 481-5001.
27. Hockenhull, D. J. 1980. Inoculum development with particular reference to *Aspergillus and Penicillium*. In *Fungal Biotechnology*, pp. 1-24(Editors Smith, J. E., D. R. Berry, and Christiansen, B). Academic Press, London.
28. Smith, G. M., and C. T. Calam. 1980. Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnology*

Letters. 2(6):261-266

29. Zhu, Y., A. Rinzema, J. Tramper, and J. Bol (1995), Microbial Transgluta-minase- a Rivew of its Production and Application in Food Processing, *Appl Microbial Biotechonol.* **44**, 277-282.
30. Zhu, Y., Rinzema, A. Tramper, E. de Bruin and J. Bol (1998), Fed-batch Fermentation Dealing with Nitrogen Limitation in Microbial Transglutamin-ase Production by *Streptoverticillium mobaraense*, *Appl Microbial Biotechnol.* **49**, 251-257.
31. Lee, I.Y., M. K. Kim, J. H. Lee, W. T. Seo, J. K. Jung, H.W. Lee, Y. H. Park(1999), Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species, *Bioprocess Engineering*, **20**, 283-287.
32. Yee, L., H.W. Blanch(1992), Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *E. coli*, *Biotechnology*, **10**,1550-1556.
33. Xie, L., and D.I.C.Wang(1993), Fed-Batch Cultivation of Animal Cells using different medium design concepts and feeding strategies, *Biotechnology and Bioengineering*, **43**, 1175-1189.
34. Zhou, W., K. Holzhauser-Rieger, M. Dor, and K. Schugerl(1992), Influence of dissolved oxygen concentration on the biosynthesis of cephalosporin C, *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 848-854.
35. Hwang, J. L., Y. K. Yang, J. K. Hwang, Y. R. Pyun, and Y. S. Kim(1999), Effect of pH and Dissolved Oxygen on Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in Agitated Culture, *Journal of Bioscience and Bioengineering.* **88(2)**, 183-188.

맥류가공식품의 생리활성 및 구조기능 향상을
위한 생체기능조절물질의 대량생산 및 효소의 분리

연구 기관 : 이지바이오시스템

연구책임자 : 1, 2 차년도 우 건 조
3 차년도 강 대 경

연 구 원 :

목 철 균

성 찬 용

민 대 규

이 수 영

여 백

맥류가공식품의 생리활성 및 구조기능 향상을 위한 생체기능조절물질의 대량생산 및 효소의 분리

| | |
|--|-----|
| 제 1 절 서 설 | 125 |
| 제 2 절 재료 및 방법 | 127 |
| 제 3 절 결과 및 고찰 | 133 |
| 1. Microbial transglutaminase(mTGase)의 kinetic study | 133 |
| 2. 비연속 한외여과 시스템에서 모델 용액을 이용한 최적 분리조건 설정 | 142 |
| 3. 예비여과 및 미세여과 조건의 최적화 | 148 |
| 4. 한외여과를 이용한 mTGase의 분리 | 154 |
| 5. Scale-up시의 연속적인 미세여과 및 한외여과 시스템에서 최적 막분리 조건 확립 | 162 |
| 제 4 절 참 고 문 헌 | 174 |

여 백

제 3 장 맥류가공식품의 생리활성 및 구조기능 향상을 위한 생체기능조절물질의 대량생산 및 효소의 분리

제 1 절 서 설

자연에 많이 존재하는 trans-glutaminase(TG:EC 2.3.2.13)는 단백질을 함유한 식품의 물성을 현저히 개량시키는 혁신적인 효소로서, 단백질 분자의 글루타민 잔기와 라이신 잔기 간의 가교 결합과 중합화를 형성함으로써 각종 식품의 물성 개량을 가능하게 한다. 수산 연제품과 소세지와 같은 다양한 단백질 식품에 있어서 탄력성 증강과 식감 개량, 결합력 증강 등의 물성면에서의 품질 개량에 사용이 가능하며, 또한 식육 등의 조각을 결합시켜 하나의 커다란 덩어리로 만드는 것도 가능하다. 효소로서의 미생물 유래 microbial transglutaminase(mTGase)의 세계시장 규모는 일본을 중심으로 축산가공 및 수산가공분야 (총 18건)에서 그 수요가 급증해왔고 그 결과 일본 축산업과 수산업 분야의 생산량 증대에 기여한 바가 크다. 그러나, 일본에서도 농업분야 소득 작물에의 이용 및 가공에 mTGase를 이용한 결과는 단 1건 (Zhu 등, 1995)에 불과하다. mTGase와 같은 효소를 분리·정제할 때는 최종 물질의 순도, 활성 및 정제 비용 등이 가격 결정에 매우 중요한 요소이다. 복잡하고 다양한 화합물로부터 원하는 물질만 순수분리하기 위해서 사용되는 분리 공정 중 막 분리공정은 생물공학 분야에 빠르게 도입되고 있으며, downstream processing비용을 낮출 수 있는 새로운 기술로서 막에 관한 연구가 활발히 연구되고 있다. 한외여과 중 용질의 이동을 방해하는 농도분극현상, 흡착, 겔화, 물질의 침착에 의한

flux 저하 현상 때문에 식품산업에서 한외여과(UF, ultrafiltration) 공정의 적용이 부분적으로 제한 받고 있으므로, 이러한 농도분극현상을 감소시키기 위한 최적 분리조건을 찾아내는 것이 가장 중요한 과제이다. 같은 한계분자량을 가진 막을 사용하더라도 막 재질 또는 막 형태에 따라 분리되는 효소나 단백질의 종류와 양이 달라 질 수 있으며, 막 주위의 미세환경이 달라짐에 따라 단백질의 분리도가 상당히 영향을 받을 수 있다. 또한 막 분리 공정을 scale-up 하였을 때, 분리 공정상의 운용 변수들이 달라지기 때문에 최적 조건을 다시 구해야 한다. 따라서 미세여과 및 한외여과막 system을 운용하여 mTGase를 선택적으로 분리·농축 하고자 한 본 실험에서는 lab-scale 조건에서 최적 분리·농축 조건을 구하고, 일단 설정된 막분리 최적 조건에 근거하여 분리 단계별, 단백질 농도, 비활성도를 측정함으로써 최적 운용 시스템을 결정하고자 하였다. lab-scale 조건에서 최적 운용 시스템으로 결정된 분리·농축 공정은 pilot-scale의 실험을 통하여 우수한 물성 개량제인 mTGase를 대량으로 분리·농축 할 수 있는 최적 운용 조건 결정 및 대량 생산 가능성을 제시하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

균체 분리

본 연구에서 사용한 microbial transglutaminase(mTGase)는 제1세부과제와의 협조하에 확보하였다. *Streptoverticillium mobaraense*(ATCC 29032) 균주의 배양 후 얻어진 배양액을 증류수와 섞고 2000 rpm에서 원심분리 한 후 상정액을 따라내어 균체를 일차적으로 제거하였다.

Starch 분석

전분 분석은 Dubois 방법을 보완해서 측정하였다. 시료를 원심 분리하여 상정액을 취하고 적당량 희석하여 시료 2 mL에 80% phenol 수용액 0.05 mL를 넣은 후 황산 5 mL를 첨가하여 발색시켜 상온에서 2시간 방치한 후 분광광도계(SHIMADZU, UV-1601)를 이용하여 488 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도값을 표준 곡선식에 대입하여 전분을 정량 분석하였다.

단백질 분석

각 공정 단계별 여과액의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 방법을 이용하여 측정하였다. 단백질 표준 곡선은 Sigma protein assay kit (No. P5656, USA)를 이용하여 구하였다. 시료의 단백질 함량은 Spectrophotometer 301 (Milton Roy Co., USA)로 750 nm에서 단백질의 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

mTGase 활성 측정 및 kinetic study

mTGase는 아지노모토(Japan Co.)에서 구입하였으며, mTGase의 활성은 Folk(1996)법을 변형하여 측정하였다. mTGase 1 units은 37°C에서 1분간 형성된 1 μ M hydroxamate양으로 정의하였다. 효소 농도, incubation time, 기질 농도, 온도가 mTGase의 initial velocity(V_0)에 미치는 영향을 측정하였다. V_{max} 와 K_m 값은 Lineweaver-Burk plot, Woolf-Augustinsson-Hofstee plot, Hanes-Woolf plot으로 각각 측정하였다. Activation energy는 Arrhenius plot을 이용하여 직선의 기울기로부터 구하였다.

비연속 예비 여과 및 미세 여과조건의 최적화

mTGase를 함유하는 부분 정제 분리액 (partial purified enzyme solution)을 다시 8000 rpm, 15분으로 원심분리하여 잔여 균체를 제거한 후 미세여과(MF, microfiltration) 및 한외여과(UF, ultrafiltration)를 위한 전처리과정으로 예비 여과를 실시하였다. 예비 여과시스템에서 사용된 막은 GF/A, GF/D, GF/F (Whatman Co., USA)막으로서 세공의 크기가 각각 1.6, 2.7, 0.7 μ m이며, 고온에서도 안정한 borosilicate glass 재질로 제조되었다. 본 실험에 사용된 미세여과 막은 모두 고압살균이 가능하며 막의 면적은 158.3 cm^2 이었다. 세 가지 glass 재질 외에 membrane 타입의 막을 사용하여 예비여과를 실시하였다. 사용된 membrane 타입의 막은 cellulose acetate 재질의 막(Sartorius Co., Germany)으로서 세공의 크기가 각각 0.8, 0.45 μ m 인 것을 사용하였다.

Pilot-scale용 최적 미세여과막

Scale-up된 미세여과조건의 최적화에 사용된 membrane은 광범위한 온도범위와 다양한 용매 및 수용액상에서 사용가능하며 pressure drop이 낮고 dirt-holding이 작아 UF 공정 전 예비여과(prefiltration)에 적합한 polypropylene 재질의 막

(Millipore Co., USA) 으로서 세공의 크기가 0.3 μm 인 것을 사용하였다.

한외여과 시스템 : PM30, YM30 membrane

막 재질별 최적 한외여과막을 선정하기 위해서 mTGase 분리에 사용한 PM30 막은 한계분자량 30,000, 막 직경 62 mm, 막 표면적 28.7 cm^2 , 물의 permeation flow rate 2.0~6.0 $\text{mL}/\text{cm}^2/\text{min}$, 최대 허용 압력 55 psi인 polysulfone 재질의 막이었다. YM30 막은 한계분자량 30,000인 cellulosic 형태이었다. 한번 사용한 막은 0.1 N NaOH와 0.1% protease로 30분간 세척하였으며, 막 세척 후 증류수를 사용하여 원래의 flux 회복 여부를 판단하였다. PM30과 YM30 막을 장착한 Amicon cell에서 막 횡단 압력을 0->25 psi로 5 psi 간격으로 상승시켰을 때와 25->0 psi로 감소시켰을때의 flux 변화를 측정하였다. 막 재질이 mTGase 분리도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 YM30 막과 PM30 막을 통과한 여액의 단백질 농도와 flux를 측정하였다.

한외여과 시스템 : Hollow fiber membrane

시료 농도에 따른 최적 한외여과 막을 선정하기 위하여 예비여과를 거친 용액을 한계분자량(Molecular weight cut-off, MWCO)이 100,000인 증공사 막을 이용하여 한외여과 하였다. 실험에 사용된 polysulfone 막(hollow fiber membrane(H1P 100-43, Amicon, USA)은 막 표면적 0.03 m^2 , 길이 20.3cm, 물의 permeation rate 0.05~0.15 L/min, 내부 지름 1.1 mm, 최대 허용 압력 25 psi인 polysulfone 재질의 막이었다. mTGase 분리에 사용된 한외여과 시스템은 속도를 조절할 수 있는 pump, 압력계, 온도 조절 기능을 함유한 magnetic stirrer로 구성되었다. Inlet 압력과 outlet 압력의 차이가 거의 없기 때문에 inlet 압력만을 구동력으로 간주하여 flux를 측정하였다. 모든 실험 후, 증류수로 20분, 0.1 N NaOH로 30 분, 다시 증류수로 20분간 막을 세척하였으며, 증류수의 flux를 측정하여 원래의 flux를 측정하여 원래의 flux가 회복되었는지 알아보았다.

한외여과시스템 : Lab-scale용 TFF(Tangential flow filtration)System

Scale-up을 위한 최적 한외여과 조건을 선정하기 위하여 예비여과를 거친 용액을 가지고 한계분자량(Molecular weight cut-off, MWCO) 100,000과 30,000의 membrane(BIOMAX 100K, BIOMAX 30K, Millipore, USA)과 한외여과시스템(Pellicon XL, millipore, USA)을 이용하여 최적 TMP, Pressure, VCR을 알아보았다.

Pilot-scale 한외여과시스템을 이용한 연속식 농축공정 최적화

최적 한외여과 막으로 선정된 MWCO 30,000인 한외여과막을 이용하여 한외여과 하였다. 실험에 사용된 막(cassette membrane Biomax 30, Millipore, USA)은 막 표면적 0.1m², 길이 21 cm, 너비 5.6 cm, 두께 1.5 cm로 물의 permeation rate 240~540 L/hr/m², 최대TMP 7 bar at 30°C, 운용온도 4~40°C인 polyethersulfone 재질의 막으로서 한외여과 시스템(ProScale 67/20, Millipore, USA)을 이용하여 mTGase 한외여과분리를 실시하였다. Inlet 압력과 outlet 압력의 차이가 거의 없기 때문에 inlet 압력만을 구동력으로 간주하여 flux 및 최적 TMP, VCR을 측정하였다. 모든 실험 후, 증류수로 20분, 0.1 N NaOH로 30 분, 다시 증류수로 20분간 막을 세척하였으며, 증류수의 flux를 측정하여 원래의 flux를 측정하여 원래의 flux가 회복되었는지 알아보았다.

Pilot-scale 배양

본 연구에서는 제1세부과제와의 협조하에 확보된 *Streptoverticillium mobaraense* (ATCC 29032)를 30 L Fermenter(KFC, Korea)에서 mTGase를 대량생산하였다. 먼저 동결건조된 균에 2 mL 증류수를 섞어 포자 형성을 위해 bacto agar 배지에 도말하여 27°C에서 5-7일 키운 후 포자를 성장배지에 접종하여 30°C에서 교반하면서 3일간 배양한 후 Glycerol과 배양균 현탁액(3:7, v/v) 10 mL liquid stock culture를 만들어 -20°C에서 저장하였으며, 종배양시마다 새로운 liquid stock을

사용하였다. 이때, 250 mL baffle 삼각 플라스크를 사용하여 80 mL 배지에 liquid stock을 4 mL 접종하였다. 성장배지 성분은 glucose 5 g/L, MgSO₄ 1 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, proteose peptone 2 g/L이었으며 살균 후 pH 7.0으로 30℃, 250 rpm에서 3일간 진탕배양하였다. mTGase 생성을 위하여 성장배지에서 배양한 균을 생산배지에 5% 접종하였으며, 생산배지 성분은 soluble starch 20 g/L, MgSO₄ 1 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, proteose peptone 20 g/L, yeast extract 2 g/L, PPG(polypropylene glycol) 0.5 g/L이었다. 이때 배양 조건은 성장배지의 것과 동일하며 4일간 배양하였다. 생산배지에서 얻어진 균체를 30 L fermenter에 제1세부과제에서 얻어진 최적화배지의 조성인 soluble starch 50 g/L, proteose peptone 20 g/L, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1 g/L, MgSO₄ 1 g/L, yeast extract 2 g/L, Soy Bean Oil 23 g/L으로 구성된 생산배지에 5% 접종하여 3일간 배양하였다. 배양 조건은 초기 pH 7.0, 배양온도 30℃, 교반속도 200 rpm으로 하고 산소공급을 1 vvm으로 유지하여 working volume 20 L로 배양하였다.

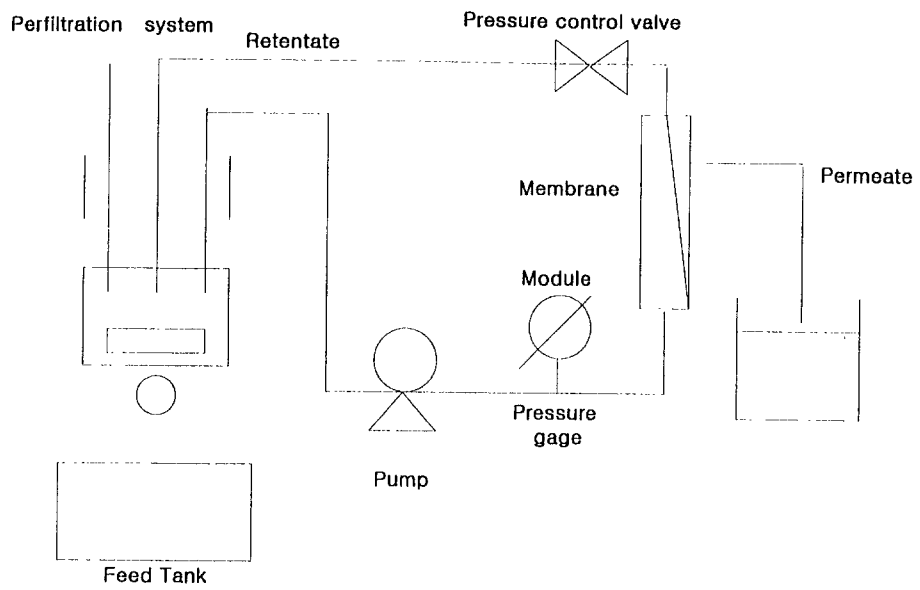


Fig.1. Schematic flow diagram of the UF module

제 3 절 결과 및 고찰

1. Microbial transglutaminase(mTGase)의 kinetic study

가. mTGase의 농도와 초기 속도 (V_0)

일정 온도에서 mTGase의 농도를 달리하여 기질과 반응시켰을 때, mTGase의 초기 활성은 효소 농도에 비례하여 증가하였다(Fig. 2). 추세선의 식은 원점을 X절편으로 하는 1차 방정식으로 농도에 대한 V_0 가 first order reaction을 따랐다. Michaelis-Menten식에 따르면 단일 효소-기질 반응(uni-uni reaction)에서 기질의 농도가 매우 높은 상황에서의 반응 속도는 효소-기질의 복합체 형성 농도에 비례하여 증가한다. 따라서, mTGase의 농도가 증가할수록 기질과 복합체를 많이 형성하므로 초기 속도가 효소 농도 증가에 비례적으로 증가하는 것으로 판단된다.

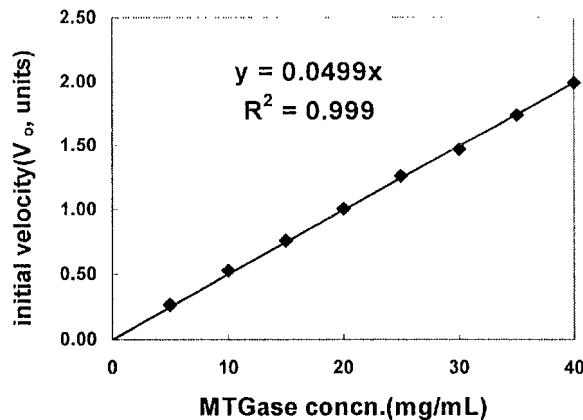


Fig. 2. Effect of enzyme concentration on initial velocity. mTGase concentration was varied from 5 to 40 mg/mL. One unit of mTGase was defined as 1 μ M hydroxamate formation at 37°C per minute. Absorbance was detected at 525 nm.

나. 효소 반응 시간과 초기 속도

Folk(1966)의 Guinea pig liver로부터 추출한 TGase의 활성 측정법에 따르면 기질과 37°C에서 10분간 반응시킨 후 분당 생성된 hydroxamate의 μM 농도를 TGase의 1 units으로 정의하고 있다. 본 실험에서는 10분간 반응시킨 후, 다시 1분간의 반응 속도로 환산해 줄 필요가 있는지 여부를 알아보기 위하여 반응 시간에 따른 초기 속도를 실험하였다(Fig. 3). 1분부터 10분까지 효소와 기질을 각각 반응시킨 결과, 초기 반응 속도는 반응 시간에 비례적으로 증가하였다($R^2=0.999$). 따라서, 반응시간을 실험자에 따라 일정하게 정하여 실험하여도 결과에 큰 영향을 주기 않을 것으로 사료되었다.

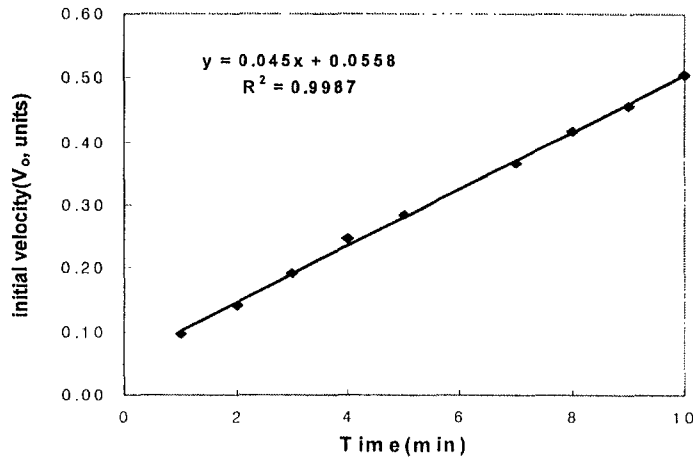


Fig. 3. Effect of incubation time on initial velocity. mTGase was incubated at various time from 1 to 10 min. Enzyme and substrated concentration was 10 mg/mL, 1×10^{-2} M, respectively.

다. 기질의 농도와 초기 속도

농도가 10 mg/mL인 mTGase를 다양한 기질 농도(5~100 mM)에서 반응시켰을 때, 기질 농도가 40 mM까지는 V_o 가 급격히 증가하여 first-order kinetics를 따랐지만, 60 mM 이상의 기질 농도에서는 기질의 농도가 증가하여도 V_o 가 거의 증가하지 않아 정상상태를 나

타내는 zero-order kinetics를 따랐다(Fig. 4). 기질 농도 40 mM의 범위에서 기질 농도에 비례하여 mTGase의 V_o 가 증가하는 것은 mTGase의 농도에 비해 상대적으로 기질의 농도가 낮아 용액 내에서 효소-기질의 복합체를 형성하는데 시간이 많이 소요되기 때문이다. Fig. 4와 같이 기질의 농도를 증가시키면 그만큼 결합에 소요되는 시간이 줄어들므로 효소와 빨리 반응함으로써 반응속도가 기질 농도에 비례하여 증가한다. 기질 농도가 60 mM 이상에서는 효소의 분해속도가 V_{max} 에 근접하였으므로 거의 모든 mTGase가 기질과 효소-기질 복합체를 형성하고 있다는 것을 추정할 수 있었다.

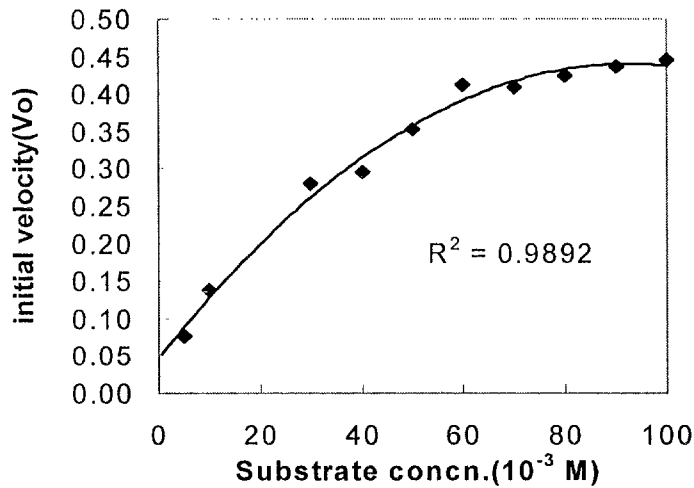


Fig. 4. Effect of substrate concentration on initial velocity. Substrate concentration was varied from 5 to 100 Mm. mTGase concentration was 10 mg/mL.

라. V_{max} 와 K_m

Fig. 3의 결과를 다양한 직선형의 plot 방법을 사용하여 정확한 V_{max} 와 K_m 값을 구하고자 하였다. Lineweaver-Burk plot을 이용하여 $1/[S_o]$ 와 $1/[V_o]$ 와의 관계를 직선으로 나타내었을 때(Fig. 5), 직선의 Y 절편은 $1/V_{max}$, X 절편은 $-1/K_m$ 를 의미하므로 직선 방정식 $Y = 56.945x + 1.662$ 로부터 구한 V_{max} , K_m 값은 각각 $0.602 \mu M/min$, $34.48 mM$ 로 계산되었다(Table 1). 또 다른 plot 방법인 Woolf-ugustinsson-Hofstee 식을 사용하였을

때(Fig. 6), 직선의 Y 절편은 V_{max} , X 절편은 V_{max}/K_m 을 의미하므로 직선 방정식 $Y = -0.0342x + 0.6016$ 으로부터 구한 V_{max} , K_m 값은 각각 $0.620 \mu\text{M}/\text{min}$, 36.31 mM 로 계산되었다(Table 1). Hanes-Woolf plot에 의하면 직선의 Y 절편은 K_m/V_{max} , X 절편은 $-K_m$ 을 의미하므로 V_{max} , K_m 값은 각각 $0.602 \mu\text{M}/\text{min}$, 34.20 mM 으로 계산되었다(Fig. 7, Table 1). 따라서, 적절한 plot 방법을 결정하는 것이 정확한 V_{max} , K_m 값을 계산하는데 매우 중요하다고 사료된다.

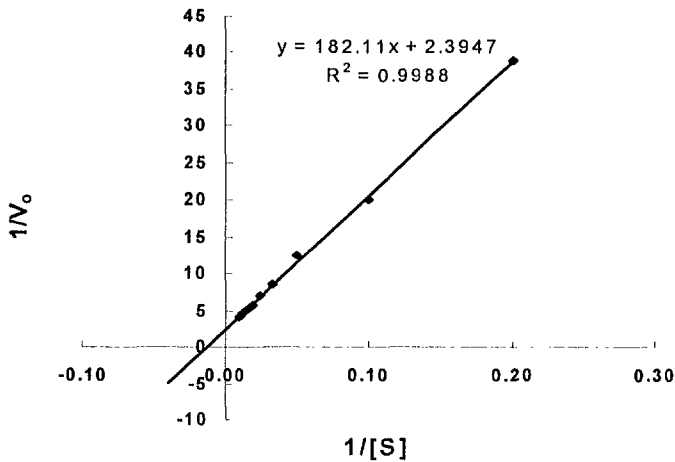


Fig. 5. The Lineweaver-Burk plot($1/v$ versus $1/[S]$) at 10 mg/mL mTGase concentration. The intercept on the $1/[S]$ axis and the $1/v$ axis is $-1/K_m$ and $1/V_{max}$, respectively

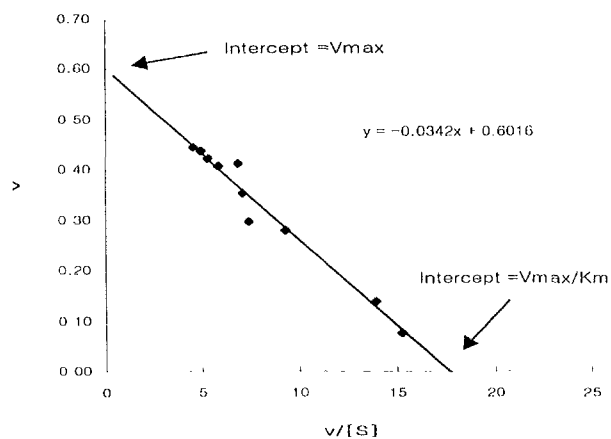


Fig. 6. Woolf-Augustinsson-Hofstee plot(v versus $v/[S]$) at 10 mg/mL mTGase concentration. The intercept on the $v/[S]$ axis and the v axis is V_{max}/K_m and V_{max} , respectively

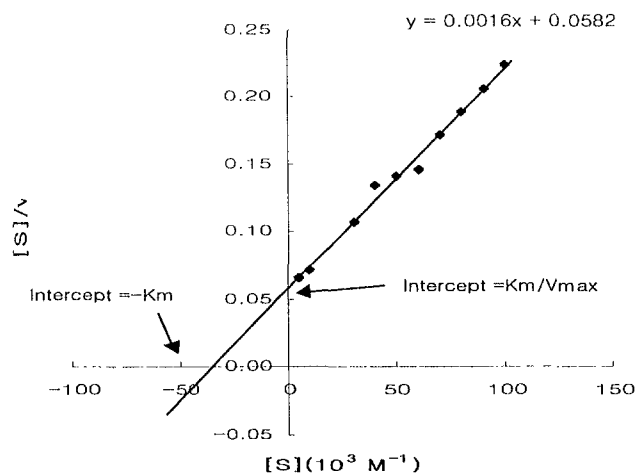


Fig. 7. Hanes-Woolf plot($[S]/v$ versus $[S]$) at 10 mg/mL mTGase concentration. The intercept on the $[S]$ axis and the $[S]/v$ axis is $-K_m$ and K_m/V_{max} , respectively

Table. 1. Determination of the Vmax and Km value by various plotting methods.

| | by L-B plot | by W-A-H plot | by H-W plot |
|---------------------------------|-------------|---------------|-------------|
| K_m(mM) | 34.48 | 36.31 | 34.20 |
| V_{max}(μM/min) | 0.602 | 0.620 | 0.602 |

마. mTGase의 최대 활성 온도

일정한 기질 농도와 효소 농도 하에서 반응 온도에 따른 mTGase의 반응 속도를 실험한 결과, 상온인 20℃에서 0.20 units/min의 활성을 나타내던 것이 온도가 상승함에 따라 initial velocity도 증가하여 60℃에는 1.00 units/min으로 최대의 활성을 나타내었다 (Fig. 8). 그러나 60℃ 이상의 온도에서 V₀가 급격히 감소하여 65℃ 이상에서는 0℃에서와 비슷한 활성을 나타내었다. 온도가 증가할수록 반응 속도도 함께 증가하는데 온도의 상승은 반응물의 운동 에너지(kinetic energy)를 증가시켜 반응물의 단위 시간당 생산적 운동(productive collision)을 유도한다. 효소 촉매 작용도 이와 비슷한데 효소는 복합 단백질 분자이므로 이들의 촉매 활성은 R-그룹의 특정 아미노산으로 구성되어 있으며 기질에 대한 결합부위와 촉매 부위를 형성하는 3차 구조에 의해 효소 활성이 좌우된다. 효소의 3차 구조는 결합력이 약한 많은 비 공유결합으로 되어있어 쉽게 변형되므로 너무 많은 에너지를 외부로부터 흡수하게되면 3차 구조가 파괴되어 효소가 변성되므로 촉매 활성을 잃게된다. Fig. 8에서 나타난 것과 같이 0~60℃ 범위에서 온도가 상승함에 따라 mTGase의 반응 속도가 함께 증가하는 현상은 효소와 기질간의 결합이 증가하여 촉매 반응이 활발히 일어났기 때문이며, 60℃이후 급격한 반응 속도 감소는 고온에 의하여 mTGase가 변성되었기 때문이다. 따라서, mTGase의 최대 활성 온도는 60℃로 판단되었다.

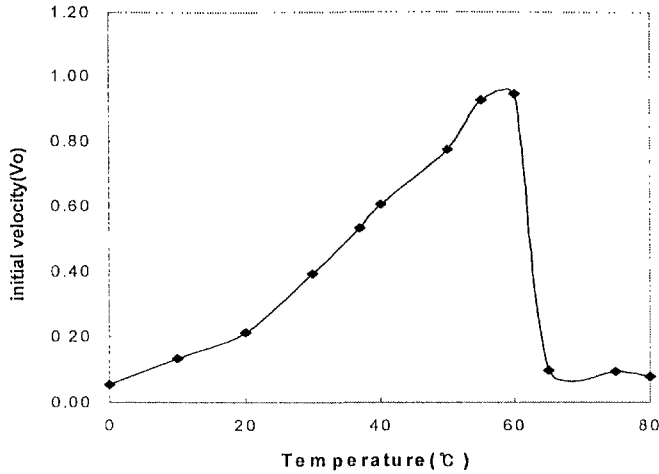


Fig. 8. Effect of temperature on initial velocity. Enzyme and substrate are incubated at each temperatures for 10 min. mTGase concentration was 10 mg/mL.

바. 활성화 에너지

비효소 반응보다 효소반응의 활성화 에너지가 상당히 낮으며 효소반응에 있어서는 활성화 에너지가 낮은 쪽의 반응 속도가 더 빠르다. 온도에 따라 K_m 값이 변하기 때문에 모든 온도에서 일정 기질의 농도가 효소와 반응한다고 할 수 없으며 대부분의 효소 촉매 반응에서는 온도가 변함에 따라 각각 다르게 영향받는 여러 가지 반응 상수에 의해 V_{max} 값이 달라지므로 Arrhenius plot을 통해 활성화 에너지를 계산하였다(Fig. 9, Table 2). 서로 다른 온도에서 $1/T$ 값에 대한 $\log V$ 값을 나타낸 Arrhenius plot 자체는 각각 다른 온도에서 속도 제한 단계가 있으면 직선적 관계를 보이지 않는다. 특정 온도에서 직선의 기울기가 변하면 이 지점이 한 단계에서 다른 단계로 바뀔 때 V_{max} 도 바뀌는 전이 온도(transition temperature)이므로 Fig. 9에서 전이 온도는 직선의 기울기가 바뀌는 37°C 로 판명되었다. Table 2에 의하면 0°C 에서 37°C 사이의 E_{a1} 값과 37°C 에서 60°C 사이의 E_{a2} 값의 각각 9.974 cal/mole , 4.577 cal/mole 로 나타나 37°C 이하에서보다 37°C 이상의

온도에서 반응이 두 배 더 빠르게 일어난다는 것을 알 수 있었다. 60°C 이후에 mTGase가 변성되기 시작하여 반응 속도가 급격히 감소하였으므로 mTGase의 최대 활성 온도는 60°C인 것으로 판단되었다.

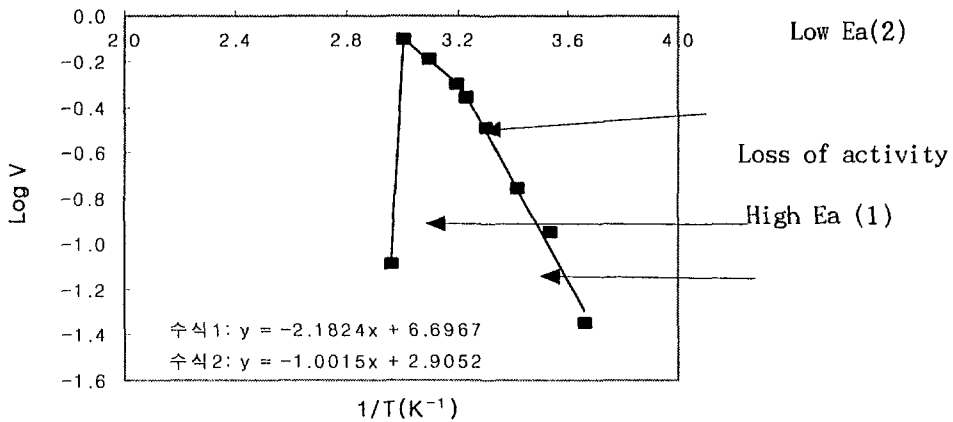


Fig. 9. An arrhenius plot. The activation energy, E_a , for a reaction was determined by measuring the reaction rate constant at different temperatures and plotting $\log k$ versus $1/T$.

Table. 2. The activation energy

| Temperature (°C) | 0~37 | 37~60 |
|------------------|-------|-------|
| E_a (cal/mole) | 9.974 | 4.577 |

사. 온도와 mTGase의 안정성

Fig. 8과 Fig. 9의 결과로부터 mTGase의 최대 활성 온도가 60°C로 결정되었으나, 효소에 있어서 활성뿐 아니라 안정성도 매우 중요하므로 다양한 온도에서 효소의 안정성을 살펴 보았다. Fig. 10에 의하면, mTGase는 40°C 이하에서는 열에 의한 영향 없이 초기 활성

을 그대로 유지하였으나 40℃ 이상에서는 활성이 점차 감소하였으며 60℃에서는 초기 활성의 40%만을 유지하였다. Incubation 시간에 따른 mTGase의 잔존 활성을 측정한 Fig. 11에서, 일정 온도에서 mTGase의 incubation 시간이 증가함에 따라 효소의 안정성은 점차 감소하는 것으로 나타났다. Incubation 5분까지는 70℃를 제외한 모든 온도에서 mTGase가 안정하였으나, 20분 경과시에는 10℃와 37℃에서만 mTGase가 90% 이상의 활성을 유지하였으며, 60℃와 70℃에서는 잔존 활성이 40% 미만으로 나타나 이 온도에서의 효소 안정성이 매우 낮은 것으로 판단되었다. 따라서, mTGase를 식품에 적용할 때 40℃ 이하의 온도에서 반응시키는 것이 적합하다고 판단되며, mTGase와 상반되는 작용을 하는 protease의 최적 온도를 피하는 동시에 mTGase의 활성 및 안정성이 비교적 높은 온도를 선택하는 것이 바람직하다고 사료된다.

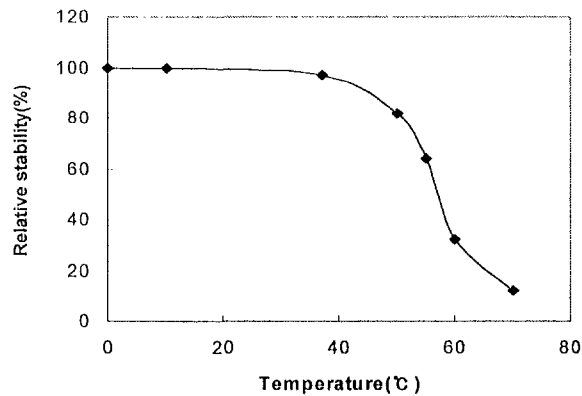


Fig. 10. Thermal stability of mTGase at various temperatures. Enzyme was preincubated at each temperature for 10 min followed by reacting with substrate.

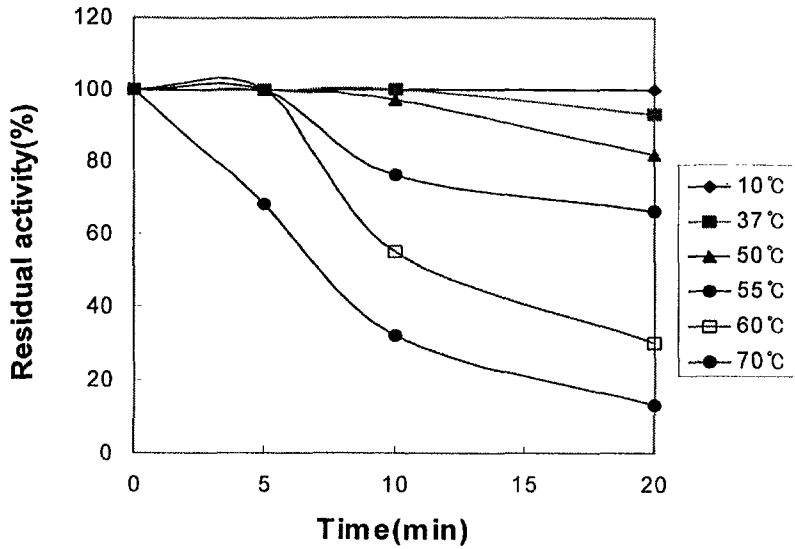


Fig. 11. Residual activity of mTGase for 20 min. Enzyme was preincubated at each temperature for 5,10 and 20 min, respectively, followed by reacting with substrate.

2. 비연속 한외여과 시스템에서 모델 용액을 이용한 최적 분리조건 설정

가. 막 횡단 압력에 따른 flux 변화

PM30 막을 사용하여 0.1% mTGase 용액을 막 분리하였을 때, 막 횡단 압력에 따른 flux 변화가 Fig. 12에 나타나있다. 모든 막 횡단 압력하에서 0.1% mTGase 용액의 flux는 물보다 낮았으며 막 횡단 압력을 0에서부터 점차 증가시켰을 때와 25 psi에서부터 점차 감소시켰을 때의 flux 변화 양상이 다르게 나타났다. 낮은 압력부터 막 횡단 압력을 점차 증가시킨 경우, 약 15 psi에서 flux가 최대로 측정되었으며 더 높은 압력에서는 오히려 flux가 감소하였다. 이와 같은 현상은 막 표면에 침착된 겔 층의 밀도 변화로 설명될 수 있다. 낮은 막 횡단 압력에서는 막 분리 공정이 진행되는 동안 막 표면에서의 용질 침착율이 낮으며 생성된 겔층의 밀도도 그다지 높지 않다. 따라서, 한외여과 공정의 주요 구동력인 막 횡단 압력이 증가함에 따라 막을 통과하는 물질의 속도가 빨라져 flux가 증가하

게 된다. 반면, 15 psi 이상의 높은 막 횡단 압력에서는 단단한 겔 층이 형성되어 flux가 오히려 감소한 것으로 판단되었다. 막 횡단 압력을 25 psi부터 점차 감소시킨 경우, 막 분리가 진행됨에 따라 겔층은 점차 두꺼워지는 반면 mTGase를 막에 통과시키는 힘인 막 횡단 압력은 점차 감소하므로 결과적으로 flux가 감소한 것으로 추측할 수 있었다. YM30 막의 flux도 PM30 막과 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 13). YM30 막을 사용하여 mTGase를 막 분리하였을 때, 막 횡단 압력 15 psi에서 최대 flux를 측정할 수 있었으며 15 psi 이상에서는 급격히 flux가 감소하였다.

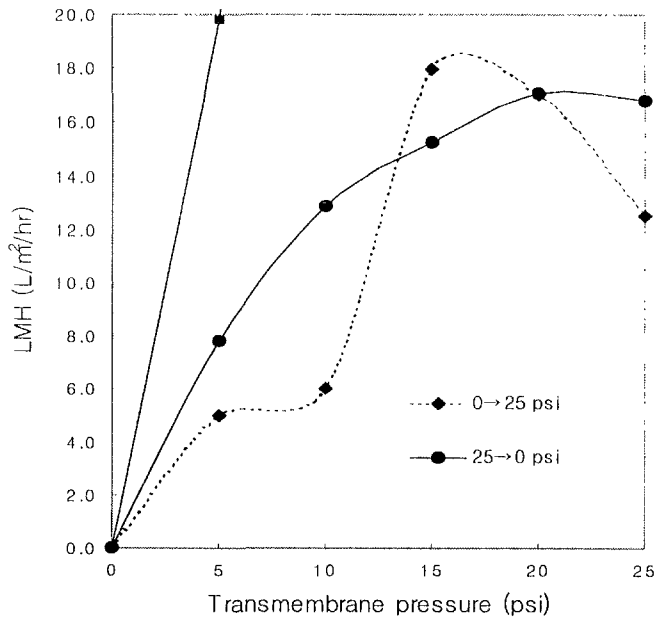


Fig. 12. Effects of transmembrane pressure on mTGase flux using PM30 membrane. The concentration of mTGase solution was 0.1 %(w/v). Transmembrane pressure was increased gradually from 0 to 25 psi as well as decreased from 25 psi to 0 psi.

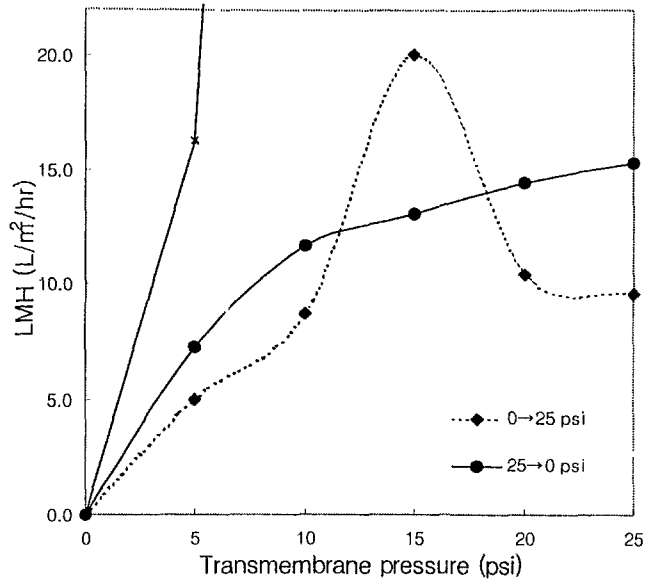


Fig. 13. Effects of transmembrane pressure on mTGase flux using YM30 membrane. The concentration of mTGase solution was 0.1 %(w/v). Transmembrane pressure was increased gradually from 0 to 25 psi as well as decreased from 25 psi to 0 psi.

나. 막 재질에 따른 flux 변화

Fig. 14는 막 횡단 압력을 25 psi까지 서서히 상승시켰을 때, YM30 막과 PM30 막의 flux 변화를 관찰한 그림이다. 두 막 모두 15 psi에서 최대의 flux를 나타내었으며, 15 psi 이상의 압력에서는 flux가 점차 감소하였다. 15 psi 이하의 막 횡단 압력에서는 YM30 막의 flux가 PM30 막의 flux에 비해 더 높았으나, 15 psi 이상의 압력에서는 오히려 PM30 막의 flux가 더 높았다.

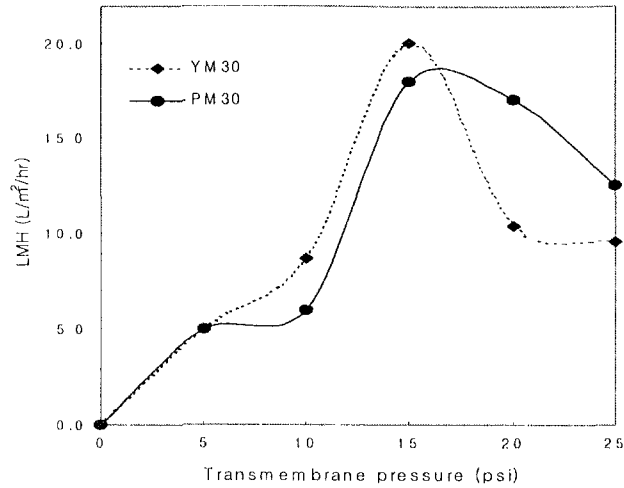


Fig. 14. The changes of flux as transmembrane pressure increased from 0 to 25 psi. The concentration of mTGase solution was 0.1 %(w/v). YM30 and PM30 membrane were used.

친수성인 YM(cellulosic type) 막은 단백질과의 흡착력이 매우 낮아 용질의 회수율이 높은 반면, PM 막은 비이온성 중합체(non-ionic polymer)로서 소수성 고분자 물질들이 막에 잘 흡착되는 특성을 가지고 있다. 따라서, 낮은 막 횡단 압력에서는 YM30 막의 높은 용질 회수율과 낮은 단백질 흡착성으로 인하여 PM30 막보다 flux가 더 높게 나타났으나, 막 분리가 진행됨에 따라 막 표면에 얇은 단백질 층이 형성된 후에는 막의 단백질 흡착력보다는 막 투과율에 의해 flux가 더 많은 영향을 받으므로 PM30 막의 flux가 더 높게 측정되었다고 추측할 수 있었다.

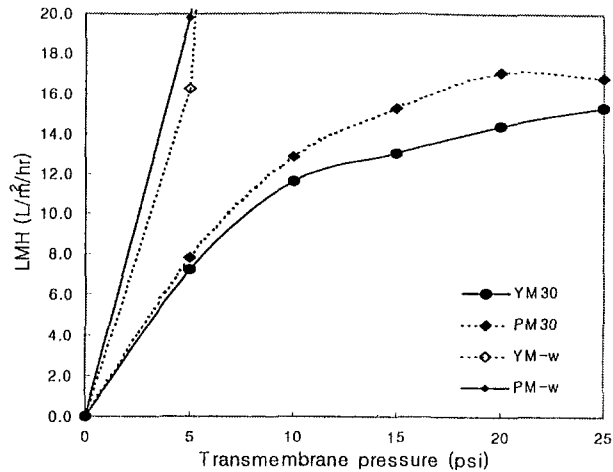


Fig. 15. The changes of flux as transmembrane pressure decreased from 25 to 0 psi. The concentration of mTGase solution was 0.1 %(w/v). YM30 and PM30 membrane were used.

Fig. 15는 막 횡단 압력을 25 psi부터 점차 감소시켰을 때, YM30 막과 PM30 막의 flux 변화를 관찰한 그림이다. 막 횡단 압력이 감소함에 따라 두 막의 flux도 감소하였는데, 이는 막 분리시 구동력으로 작용하는 압력이 감소하였기 때문이다. 모든 압력하에서 PM30 막의 flux가 동일한 한계분자량을 가진 YM30 막에 비해 약간 더 높게 나타났는데, 이러한 flux 차이는 막 제조시 생성되는 pore의 크기가 막 재질에 따라 달라지기 때문이다. 일반적으로 YM 막보다 PM 막이 더 빠른 flux를 나타내는데, 명목적인 한계 분자량(nominal molecular weight cut-off)은 같지만 실질적인 pore 크기는 PM30이 더 클 수 있으므로, Fig. 14, Fig. 15에서 보는 것과 같이 PM30 막의 flux가 더 높게 나타난 것으로 판단되었다.

다. 농축비(VCR)에 따른 permeate 및 retentate 내의 mTGase 농도

mTGase가 PM30 및 YM30 막을 통과하는지 알아보기 위하여 permeate와 retentate내의 단백질 농도를 분석하였다(Fig. 16). 농축비가 1에서 6 VCR(Volume Concentration Rate)로 증가함에 따라 YM30 막과 PM30 막의 retentate내 단백질 함량은 점차 감소하는 반면, 두 막을 통과한 permeate내의 단백질 함량은 32 μg 에서 161 μg 으로 약 5배 증가하였다. 따라서, 막분리가 진행됨에 따라 mTGase가 한계분자량 30,000인 막을 서서히 통과하는 것으로 판단되었다. mTGase의 분자량은 37,000 수준으로 이론상으론 한계분자량 30,000막을 투과 할 수 없지만 pore의 크기가 막 재질에 따라 달라지기 때문에, 다른 한 외여과막을 사용해서 실험을 진행하였다.

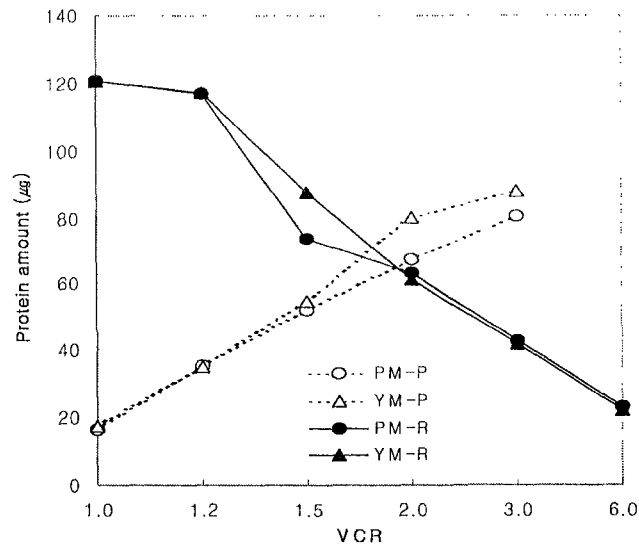


Fig. 16. Protein amount in each permeate and retentate of PM30 and YM30 membrane. UF process is continued as volume concentration ratio(VCR) increased up to 6. The protein concentration in each permeate and retentate was measured by Lowry method.

3. 예비여과 및 미세여과 조건의 최적화

가. 예비여과액 및 미세여과 액의 단백질 농도 측정

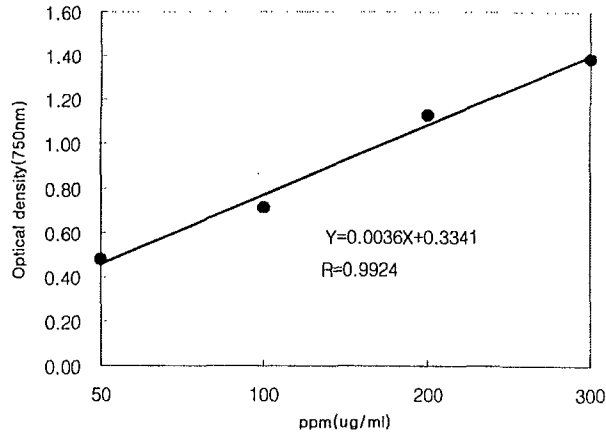


Fig. 17. Standard curve of protein at 750nm.

배양액의 단백질 농도를 측정하기 위해서 흡광도 750nm에서 표준곡선을 작성 한 결과(Fig. 17), $Y=0.0036X+0.3341$ 관계식을 얻었으며 $R=0.9924$ 였다. Baffle Flask 를 이용하여 배양했을 경우 원심분리된 여과액의 단백질 함량은 5.68 g/L이었으나 예비 여과막을 순차적으로 통과하면서 5.61($2.70 \mu\text{m}$) g/L, 5.15($1.60 \mu\text{m}$) g/L, 4.57($0.70 \mu\text{m}$) g/L으로 1.30%, 9.29%, 19.55%가 각각 감소했으며, 미세여과막을 통과한 시료는 4.14($0.45 \mu\text{m}$) g/L와 4.04($0.20 \mu\text{m}$) g/L로 각각 27.2%, 29%가 감소했다.(Table 3.)

Table 3. Protein concentration of sample that permeate different pore size

| | Culture condition | Sup. ¹⁾ | Membrane pore size(μm) | | | | | Pr>F |
|------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------|
| | | | 2.70 | 1.60 | 0.70 | 0.45 | 0.20 | |
| Protein conc. (g/L) | Flask | 5.68 ²⁾ | 5.61 ^a | 5.15 ^{ab} | 4.57 ^{bc} | 4.14 ^c | 4.03 ^c | 0.0001 |
| | Fermenter | 10.07 ^a | 9.84 ^a | 9.52 ^b | 9.33 ^{bc} | 9.24 ^d | 9.05 ^d | 0.0001 |
| Decrease rate (%) | Flask | 0.00 | 1.30 | 9.29 | 19.55 | 27.21 | 29.0 | |
| | Fermenter | 0.00 | 2.30 | 5.52 | 7.35 | 8.27 | 10.11 | |

¹⁾ Supernatant of culture broth

²⁾ Means of 3 replication

abc Means in rows with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple comparison at $p < 0.05$

원심 분리한 시료와 2.7 μm , 1.6 μm 막을 통과한 시료의 단백질 함량간에 유의차는 없었으나, 0.70 μm , 0.45 μm , 0.20 μm 막을 통과한 시료와는 고도의 유의차 ($P < 0.01$)를 보였다. 원심 분리한 시료에 비해 미세여과막을 통과한 시료의 단백질 함량이 30% 가량 감소한 이유는 분자량이 큰 단백질들이 예비여과막 및 미세여과막을 통과하지 못했기 때문으로 판단된다.

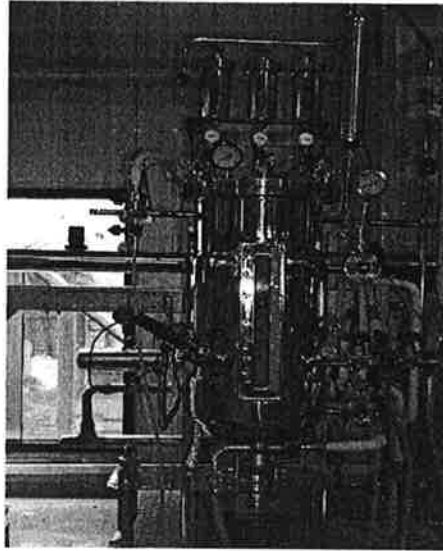


Fig. 18. mTGase fermentation in a 30 L fermenter.

30L 발효조(Fig. 18)를 이용한 배양액의 경우 원심분리 후 얻어진 여과액의 단백질 함량은 10.07 g/L로 flask 배양으로 얻어진 여과액보다 단백질 함량이 높았으며 예비 여과막을 순차적으로 통과하면서 9.84(2.70 μm)g/L, 9.52(1.60 μm)g/L, 9.33(0.70 μm) g/L으로 2.30%, 5.52%, 7.35%가 각각 감소했으며, 미세여과막을 통과한 시료는 9.24(0.45 μm)g/L와 9.05(0.20 μm) g/L로 각각 8.27%와 10.11%가 감소했다. 발효조를 이용한 배양액은 flask 배양액과 마찬가지로 원심 분리한 시료와 2.7 μm , 1.6 μm 막을 통과한 시료의 단백질 함량간에 유의차는 없었으나, 0.70 μm , 0.45 μm , 0.20 μm 막을 통과한 시료와는 고도의 유의차($P < 0.01$)를 보였다. 발효조 배양액이 flask 배양액보다 단백질 함량이 많은 이유는 충분한 산소공급과 균일한 교반이 균체 증식에 영향을 미친 것으로 판단된다. 따라서 2.70 μm 와 1.60 μm , 0.45 μm 와 0.20 μm 막을 통과한 시료간에는 유의차가 없었던 바, 1.60 μm , 0.70 μm , 0.45 μm 막을 한외여과를 하기 위한 예비 전처리 단계로 선정하였다.

나. 예비 여과액 및 미세 여과액의 효소 농도 측정

배양액의 효소농도를 측정하기 위해서 흡광도 525nm에서 표준곡선을 작성 한 결과 (Fig. 19), $Y=25.05X+0.02$ 관계식을 얻었으며 $R=0.9996$ 이었다.

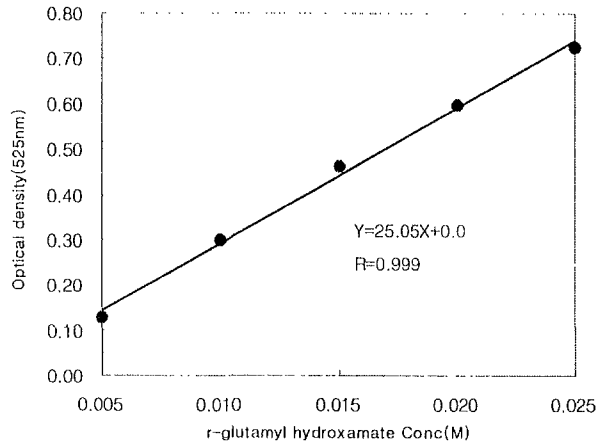


Fig. 19. Standard curve of mTGase at 525nm.

Flask 배양액의 경우 원심 여과액의 효소 농도는 0.75 unit/ml 이었으나 예비 여과막과 미세여과막을 순차적으로 통과하면서 0.67($2.70 \mu\text{m}$)unit/ml, 0.62($1.60 \mu\text{m}$)unit/ml, 0.54($0.70 \mu\text{m}$)unit/ml, 0.51($0.45 \mu\text{m}$)unit/ml, 0.47($0.20 \mu\text{m}$)unit/ml로 활성이 감소했으나, 각 시료의 비활성도는 0.12 U/mg protein으로 시료간에 차이가 없었다(Table 4). 예비여과막 및 미세여과막을 통과한 시료의 효소농도가 감소했음에도 불구하고 효소의 순도를 의미하는 비활성도(specific activity)가 감소하지 않은 이유는 단백질과 효소 농도의 감소 비율이 유사했기 때문이다. 원심분리한 시료와 $2.7 \mu\text{m}$ 막을 통과한 시료의 효소 농도는 유의차는 없었으나, $1.60 \mu\text{m}$, $0.70 \mu\text{m}$, $0.45 \mu\text{m}$, $0.20 \mu\text{m}$ 막을 통과한 시료와는 고도의 유의차($P<0.01$)를 보였다.

Table 4. Enzyme concentration and specific activity of sample that permeate different pore size

| | Culture condition | Sup ¹⁾ | Membrane pore size(μm) | | | | | |
|---|-------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------|
| | | | 2.70 | 1.60 | 0.70 | 0.45 | 0.20 | Pr>F |
| Enzyme conc. (units/ml). | Flask | 0.75 ^{az)} | 0.67 ^{ab} | 0.62 ^{bc} | 0.54 ^{cd} | 0.51 ^d | 0.47 ^d | 0.0001 |
| | Fermenter | 2.24 ^a | 2.01 ^b | 1.88 ^c | 1.81 ^{cd} | 1.79 ^d | 1.70 ^e | 0.0001 |
| Specific activity (units/mg protein) | Flask | 0.13 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | |
| | Fermenter | 0.22 | 0.20 | 0.20 | 0.19 | 0.19 | 0.19 | |

¹⁾⁻²⁾: See footnote of Table 3.

발효조 배양액의 경우 원심 여과액의 효소 농도는 2.24 unit/ml로 Flask 배양액의 효소농도 보다 약 3배 정도 높았으며, 예비 여과막과 MF막을 순차적으로 통과하면서 2.01(2.70 μm) unit/ml, 1.88(1.60 μm) unit/ml, 1.81(0.70 μm) unit/ml, 1.79(0.45 μm) unit/ml, 1.70(0.20 μm) unit/ml로 소량 감소했다. 또한 각 시료의 비순도는 원심 분리액의 경우 0.22 U/mg로 Flask 배양액보다 순도가 높았으며, 이는 발효조 배양이 Flask 배양보다 더 많은 효소를 생산하기 때문으로 판단된다. 예비여과막 및 MF막을 통과한 시료의 비순도는 0.20(2.7 μm , 1.6 μm)과 0.19(0.70 μm , 0.45 μm , 0.20 μm)로 flask배양액보다 높은 순도를 보였다.

다. 예비 여과액 및 미세 여과액의 가용성 전분 농도

배지의 구성 성분 중 67%를 차지하는 가용성 전분은 효소의 분리 정제 과정 중 Flux의 감소를 초래 할 수 있으므로 예비여과 및 미세여과 단계에서 제거되어야 한다. 배지내 전분의 초기 함량은 50g/L이었으며, 배양 후 시료의 전분 농도를 측정하기 위해서 흡광도 588nm에서 표준곡선을 작성 한 결과(Fig. 20),

$Y=0.003736X+0.0054509$ 관계식을 얻었으며 $R=0.9957$ 이었다.

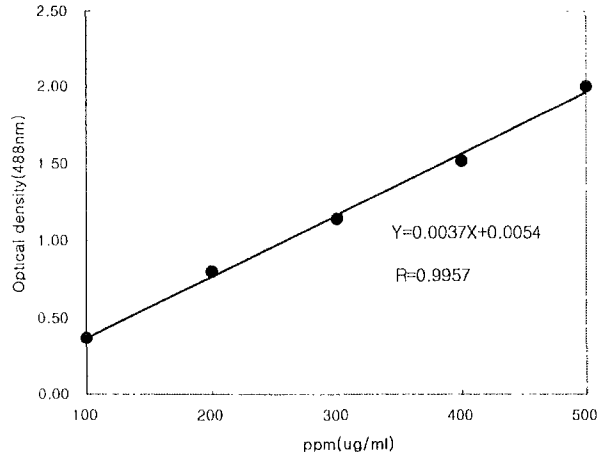


Fig. 20. Standard curve of soluble starch at 488nm.

원심 여과액의 전분 함량은 25.68 g/L이었으나, 예비 여과막을 순차적으로 통과 하면서 23.8(2.70 μm) g/L, 22.0(1.60 μm) g/L, 20.8(0.70 μm) g/L으로 7%, 14%, 18%가 각각 감소했으며, 미세여과막을 통과한 시료는 19.6(0.45 μm)g/L와 18(0.20 μm)g/L로 각각 23%, 27%가 감소했다(Table 5).

Table 5. Starch concentration of sample that permeate different pore size

| | Sup ¹⁾ | Membrane pore size(μm) | | | | | Pr>F |
|--------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------|
| | | 2.70 | 1.60 | 0.70 | 0.45 | 0.20 | |
| Starch conc. (g/L) | 25.6 ^{a2)} | 23.8 ^a | 22.0 ^{ab} | 20.8 ^{bc} | 19.6 ^c | 18.5 ^c | 0.0001 |
| Decrease rate(%) | 0.00 | 7.19 | 14.31 | 18.86 | 23.45 | 27.7 | |

¹⁾⁻²⁾: See footnote of Table 3.

이상의 결과로 볼 때 가용성 전분의 50%는 미생물의 대사과정 중에 소비되었거나 또는 배양 후 원심분리 과정에서 제거되었으며, 또한 예비 여과막과 미세여과막에 의해서 13%가 제거되었다. 따라서 배지 성분 중 대부분을 차지하는 가용성 전분은 한외여과(Ultra filtration)에 의한 효소의 분리정제 과정에서 막 표면에 부분적인 농축으로 Flux를 감소시킬 수 있으므로, 최적화 배지의 전분 함량을 조정하거나, 또는 예비여과 단계에서 전분을 다량 제거 할 수 있는 분리 조건을 확립할 필요가 있다.

4. 한외여과를 이용한 mTGase의 분리

가. 증공사막(Hallow fiber membrane) 한외여과 시스템

1) 압력 변화에 따른 시료 농도별 막 분리도

비연속 한외여과 실험에서(Fig. 14.) polysulfone 재질인 PM30이 15 psi 이상의 압력에서 친수성인 YM30(cellulosic type)보다 flux가 높게 측정되었으며, 따라서 연속 한외여과 시스템에 적용가능성을 확인하기 위해 같은 polysulfone 재질의 증공사막(H1P 100-43)을 이용해서 시료의 농도별 flux 및 단백질 함량을 측정하였다. 압력변화에 따른 각 시료(5%, 10%, 20%, 50%)의 flux를 측정한 결과 농도가 낮을 수록, 막 횡단 압력이 높을수록 flux가 증가하였으며, 막 횡단 압력이 증가하여도 flux가 더 이상 증가하지 않는 지점이 시료 농도에 따라 달랐다. (Fig. 21.) 최소 적용 압력인 5 psi에서 50% 시료를 제외한 시료간 flux 차이가 0.5 LMH미만이었으나, 최대 적용 압력인 25 psi에서는 5%시료를 기준으로 농도가 2배, 4배, 10배로 증가함에 따라 flux가 19%, 40%, 47% 감소하였다. 또한, 5%시료에서는 25 psi까지 flux가 거의 직선에 가깝게 증가하는 반면, 그 외의 농도에서는 15 psi에서 mass transfer controlled region과 pressure controlled region으로 구분되어 농도에 따라 최적 막 횡단 압력이 달랐다. 전반적으로 여러 시료농도와 막 횡단 압력에 대해 농도가 낮을수록, 막 횡단 압력이 높을수록 flux가 증가하였는데, 이러한 현상은 낮은 농도일 때 막 표면에서 용질 침착율이 낮으며 한외여과 공정의 주

요 구동력이 막 횡단 압력이기 때문이다. 5% 시료 이외에서 일정 압력(15 psi) 이상에서 압력상승에 관계없이 더 이상 flux가 증가하지 않는 mass transfer controlled region 이 관찰되었는데, 이 구역에서 flux가 막 횡단압력에 비례하지 않는 것은 막 표면에 부분적인 물질 농축으로 인한 농도 분극 현상이 발생하여 구동력인 막 횡단 압력을 상쇄시켰기 때문이다. 따라서 mTGase의 회수효과를 고려하였을 때 scale-up 시 상대적 비용손실의 가능성이 큰 5%의 시료농도보다 10%, 또는 20%의 시료가 더 적절하리라고 판단된다.

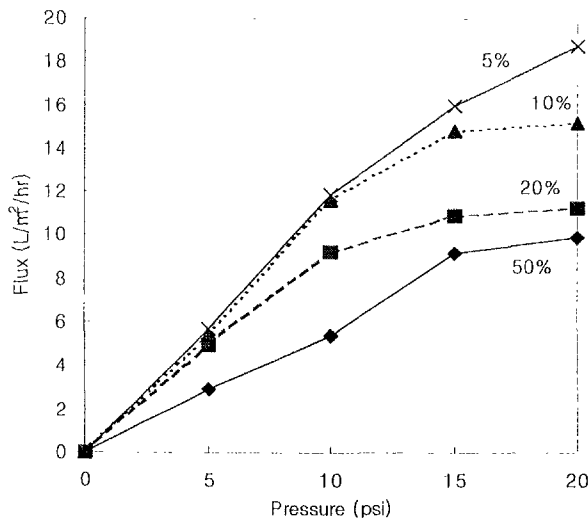


Fig. 21. Effect of sample concentration and transmembrane pressure on flux. ×: 5% sample solution, ▲: 10% sample solution, ■: 20% sample solution, ◆: 50% sample solution.

2) 농도 변화에 따른 압력별 단백질 함량

Fig. 22에서 보면 중공사막에 의해 분리된 시료 농도별(5%, 10%, 20%, 50%)분리액의 단백질 농도는 50% 시료 분리액을 제외하고는 비례적으로 증가하였으며, 20% 시료 분리액의 경우 최적 막 횡단 압력은 15 psi로 나타났다. 그러나 시료의 농도가 50%인 경우는 오히려 단백질 함량이 감소하는 결과를 나타냈으며, 이는 고 농도

의 시료일수록 많은 단백질이 막 표면에서 침착을 일으키며 침착된 물질의 막 통과가 저해되어 flux가 감소되었기 때문이다. 이상의 결과로 볼 때 증공사막은 막횡단 압력 15 psi에서 저농도의 시료를 분리 할 경우 적절한 것으로 나타났으나, 고농도의 시료를 연속적으로 분리하는데는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 따라서 scale-up시 적용 가능한 연속한외여과 시스템을 선정하여 실험을 수행하였다.

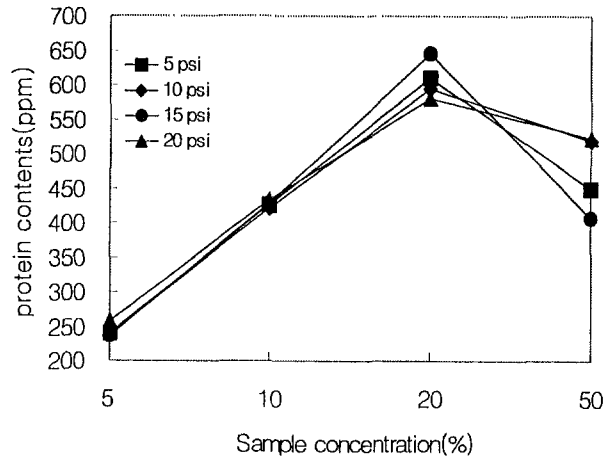


Fig. 22. Protein contents at various sample concentration

나. Lab-scale TFF(Tangential flow filtration) system을 이용한 최적 한외여과 공정 개발

1) 농축비(VCR)에 따른 농축시간 및 flux의 변화

미세여과막에 의해 분리된 효소액을 한외여과막에 의해 분리·정제 하기 위해 TFF방식의 MWCO 100K와 30K 두 종류의 한외여과막을 이용하였다. 먼저 100K 한외여과막으로 target 물질인 mTGase를 통과시켜 분자량이 mTGase보다 큰 단백질들을 먼저 제거하는 1차 한외여과를 거치고 MWCO 30K 한외여과막을 사용하여 1차 분리된 분리액을 농축시키는 공정을 적용하였다.

100K 한외여과막의 최적 TMP를 선정하기 위해서 조건 1(Pin 1.5bar, Pout 0bar)과

조건 2(Pin 1bar, Pout 0.5bar)를 비교한 결과 같은 TMP조건에서 높은 flux를 나타내는 조건 1을 최적 조건으로 선정하였다. Fig. 23에서 보는 것처럼 초기 미세여과액 250ml를 100K 한외여과막으로 5배 농축하는데 걸린 시간은 0.8 hr이었으며, 시간에 따른 Flux의 변화를 살펴보면(Fig. 24.) 시간이 흐를수록, 농축이 진행될수록 flux가 저하되는 현상을 나타내었다. 평균 flux는 5 L/m²/hr 로 측정되었다.

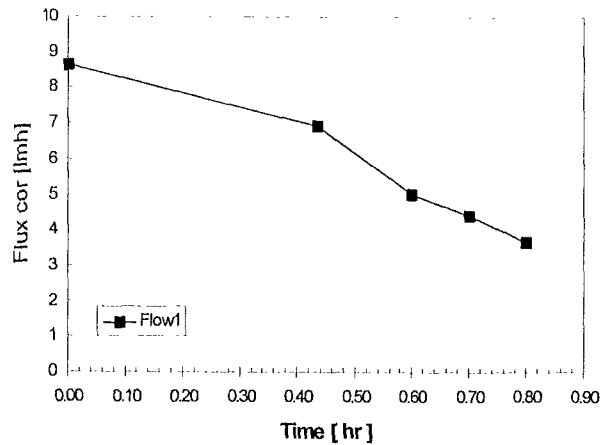


Fig. 23. Change of flux with concentration time.(MWC0 100K membrane)

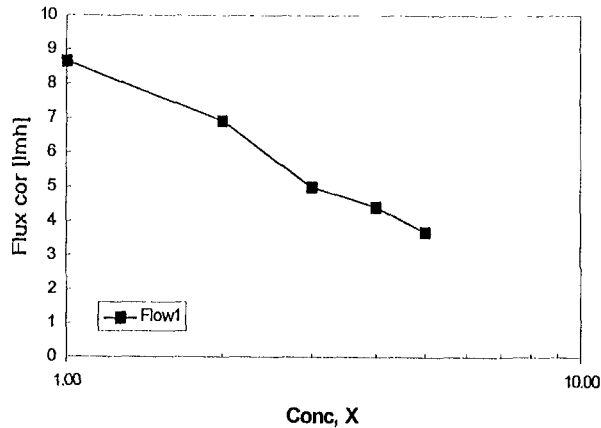


Fig. 24. Correlated flux at various concentration rate.(MWC0 100K membrane)

MWCO 100K 한외여과막에 의해 1차 분리된 permeate를 MWCO 30K 한외여과막으로 농축실험을 수행한 결과 100K 한외여과막보다 더 높은 flux를 나타내었고 5배 농축 까지 걸리는 시간 역시 상당히 단축되었으며 평균 flux가 23.3 L/m²/hr로 2배 이상 측정되었다.(Fig. 25, Fig. 26) 따라서 30K 한외여과막으로 분리된 retentate내로 protein이 농축된다는 사실을 간접적으로 나타낸다고 할 수 있다.

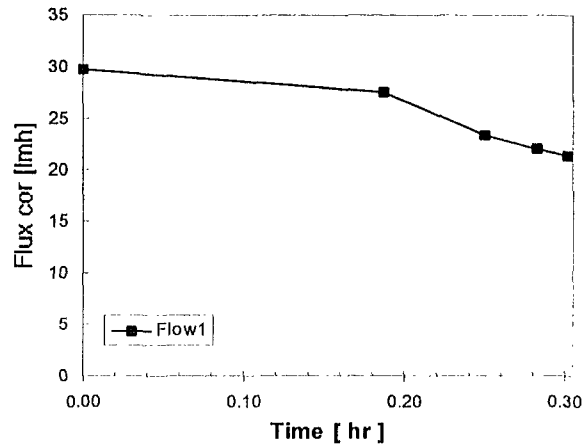


Fig. 25. Change of flux with concentration time.(MWCO 30K membrane)

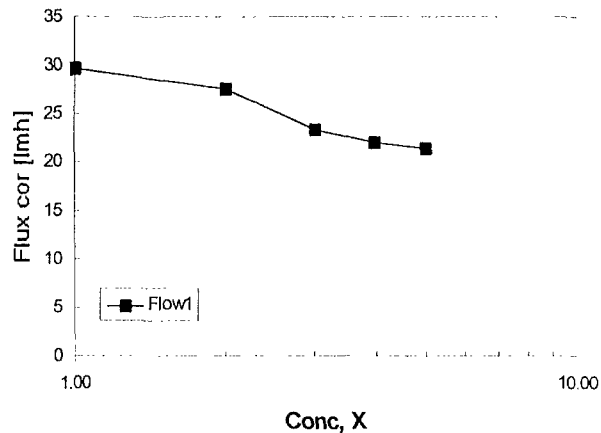


Fig. 26. Correlated flux at various concentration rate.(MWCO 30K membrane)

위의 결과로 각각 다른 MWCO 한외여과막을 사용함으로써 분리에서 농축까지 연속적인 막분리공정의 가능성을 알 수 있었다.

Fig. 27은 MWCO 100K와 30K 한외여과막에서 inlet pressure에 따른 flux의 변화를 살펴본 결과이다. 두 한외여과막 모두 압력이 증가함에 따라 flux가 선형으로 증가하는 것을 알 수 있었고 이는 공정의 scale-up시에 선형적인 생산규모확대 가능성을 제시한다고 볼 수 있다.

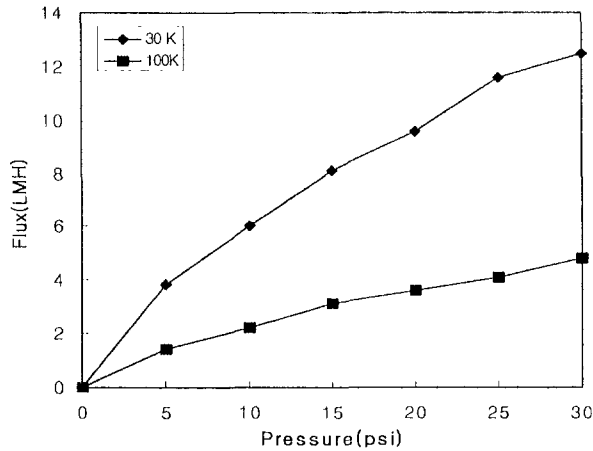


Fig. 27. Effect of membrane pore size and inlet pressure on flux.

2) 농축비(VCR)에 따른 permeate액의 mTGase 농도

미세여과막에 의해 분리된 mTGase 조효소액을 TFF방식의 MWCO 100K 한외여과막을 이용하여 농축비에 따른 투과액의 단백질 함량, 효소농도 및 비활성도를 측정된 결과는 Table 6과 같다.

Table 6. Protein concentration, enzyme concentration and specific activity on permeated solution during ultrafiltration with MW 100K membrane

| | Feed(ml) ¹⁾ | | Permeate(ml) ²⁾ | | | Total ³⁾ (mL) |
|---|------------------------|------|----------------------------|------|------|--------------------------|
| | 250 | 125 | 42 | 20.5 | 12.5 | |
| Protein contents(g/L) | 9.05 | 4.53 | 5.89 | 6.16 | 6.64 | 5.80 |
| Enzyme conc. (units/ml) | 1.70 | 1.07 | 1.15 | 1.23 | 1.29 | 1.18 |
| Specific activity (units/mg protein) | 0.19 | 0.24 | 0.20 | 0.20 | 0.19 | 0.20 |

¹⁾: Permeated solution from 0.2 μm membrane

²⁾: As each volumetric concentration rate(VCR), permeated volume from 100K membrane

³⁾: Total permeated volume from 100K membrane

시료의 초기 volume은 250 ml 이었으며, MWCO 100K 한외여과막을 통과한 총 량은 200 mL, 그리고 5배 농축된 잔량은 50mL 이었다. 미세여과막에 의해 분리된 시료의 단백질 함량은 9.05 g/L이었으나, MWCO 100K 한외 여과막을 통과한 시료의 단백질 함량은 5.80 g/L로 감소하였다. 효소 농도는 미세여과막에 의해 분리된 시료의 경우 1.70 unit/ml에서 1.18unit/ml로 감소하였으나, 비활성도는 분리전과 큰 차이가 없었다. 결과적으로 미세여과막에 의해 분리된 효소농도는 425U/250ml이었으나 MWCO 100K 한외여과막을 통과하면서 236U/200ml 감소하였으며, 결국 44.4% 수준의 mTGase가 MWCO 100K 한외 여과막을 통과하지 못하고 5배 농축액에 잔류하는 것으로 나타났다.

MWCO 100K 한외 여과막을 통해 분리된 시료는 MWCO 30K 한외여과막을 이용하여 농축하였으며 그 결과는 Table 7과 같다.

Table 7. Protein concentration, enzyme concentration and specific activity on retentated solution during ultrafiltration from 30K membrane

| | Feed ¹⁾ | VCR ²⁾ | | | |
|--------------------------------------|--------------------|-------------------|------|------|------|
| | 200mL | 2× | 3× | 4× | 5× |
| Protein contents(g/L) | 5.80 | 5.50 | 5.55 | 6.00 | 6.64 |
| Enzyme conc. (units/ml) | 1.17 | 1.20 | 1.24 | 1.30 | 1.48 |
| Specific activity (units/mg protein) | 0.20 | 0.21 | 0.22 | 0.22 | 0.22 |

¹⁾: Permeated solution from 100K membrane

²⁾: Initial feed volume/Retentate volume

단백질 함량과 효소의 농도는 농축비가 높아질수록 5.50(2VCR) g/L, 5.55(3VCR) g/L, 6.00(4VCR) g/L, 6.64(5VCR) g/L와 1.20(2VCR) unit/ml, 1.24(3VCR) unit/ml, 1.30(4VCR) unit/ml, 1.48(5VCR) unit/ml로 증가했으며, 효소의 비활성도 또한 0.20(feed) U/mg protein에서 0.22(5VCR)U/mg protein로 증가하였다. MWCO 30K 한외여과막을 이용하여 농축된 mTGase는 1.48 unite/ml로 높은 활성을 가지고 있으나, 0.20 μm 미세여과막을 통과한 시료의 효소농도(Table 6, 1.70)보다 다소 떨어졌다. 결과적으로 MWCO 30K 한외여과막에 의해 농축된 효소액은 농축비가 증가함에 따라 효소 농도가 증가하는 추세를 보였으나, 효소의 순도를 나타내는 비활성도는 농축비의 증가에도 불구하고 차이가 거의 없었다.

이상의 결과에서 보면 MWCO 100K 한외여과막에 의한 분리에 있어서 100K 한외여

과막에 의한 효소액의 분리 수율은 55% 수준으로 나타났기 때문에, 이러한 문제를 해결하기 위해 분리 공정의 단순화 방안을 모색하였으며, 연속분리공정의 scale-up 가능성을 확인하기 위해 pilot-scale의 미세 여과막과 한외여과막을 사용하여 실험을 진행하였다.

5. Scale-up시의 연속적인 미세여과 및 한외여과 시스템에서 최적 막분리 조건 확립

가. Lab-scale 3단계 공정별 단백질 함량

30L fermenter에서 배양한 배양액을 예비 여과막, 미세여과 및 30K 한외여과막을 이용하여 단백질을 분리한 결과는 다음과 같다. 초기 예비 여과단계에서($0.7\ \mu\text{m}$) 단백질 함량은 $7.69\ \text{g/L}$ 이었으나 $0.3\ \mu\text{m}$ 미세여과막을 통과하면서 $7.14\ \text{g/L}$ 로 감소했다(Table 8).

Table 8. Protein concentration of sample that permeate prefiltration and pilot MF system

| | 0.70 ¹⁾ | 0.30 ¹⁾ | 30K ²⁾ | Pr>F |
|---------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------|
| Protein conc. (g/L) | 7.69 ^{a)3)} | 7.14 ^{a)} | 3.96 ^{b)} | 0.0001 |
| Decrease rate(%) | | 7.13 | 48.45 | 0.0001 |

¹⁾ Permeated solution from $0.7\ \mu\text{m}$, $0.3\ \mu\text{m}$ pore-size membrane

²⁾ Permeated solution from molecular weight 30,000 membrane

³⁾ Measurement of 3 times replication

abc Means in rows with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple comparison at $p < 0.05$

예비여과 단계에서 7.13% 단백질 손실이 있었으며, 분자량 30K 한외여과막을 거치면서 단백질 함량은 3.96g/L로 50% 가까이 감소하였다. 0.7 μm 와 0.3 μm pore size를 통과한 시료의 단백질 함량간에 유의차는 없었으나, 분자량 30K 한외여과막을 통과한 시료와는 고도의 유의차($P<0.01$)를 보였다. 예비 여과막을 통과한 시료에 비해 미세여과막을 통과한 시료의 단백질 함량이 50% 가량 감소한 이유는 분자량이 큰 단백질들이 미세여과막을 통과하지 못했기 때문이다. 2차년도 실험에서 2.70 μm , 1.60 μm , 0.45 μm 와 0.20 μm 막을 통과한 시료간에는 유의차($P<0.01$)가 없었던 바, 분리공정의 단순화를 위해서 0.70 μm , 0.30 μm 막을 한외여과를 하기 위한 예비 전처리 단계로 선정하였다.

나. Lab-scale 3단계 분리 공정별 효소 농도

30L fermenter에서 배양한 배양액을 예비여과, 미세여과 및 30K한외여과막을 이용하여 분리한 결과 효소농도는 다음과 같다(Table 9).

Table 9. Enzyme concentration and specific activity of sample that permeate prefiltration and pilot MF system

| | 0.70 ¹⁾ | 0.30 ¹⁾ | 30K ²⁾ | Pr>F |
|---|----------------------|--------------------|--------------------|--------|
| Enzyme conc. (units/ml) | 1.48 ^{a)3)} | 1.34 ^{a)} | 0.62 ^{b)} | 0.0001 |
| Decrease rate(%) | | 9.3 | 57.5 | 0.0001 |
| Specific activity (units/mg protein) | 0.19 | 0.18 | 0.15 | 0.0001 |

¹⁾⁻³⁾ : See footnote of Table 8.

abc Means in rows with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple comparison at $p<0.05$

초기 예비여과단계에서($0.7\ \mu\text{m}$) 효소 함량은 $1.48\ \text{unit/ml}$ 이었으나 $0.3\ \mu\text{m}$ 미세 여과막을 통과하면서 $1.34\ \text{unit/ml}$ 로 감소했다. 예비여과 단계에서 9.3% 효소 손실이 있었으며, 분자량 30K 한외여과막을 거치면서 효소 함량은 $0.62\ \text{unit/ml}$ 로 58% 가까이 감소하였다. mTGase의 분자량은 37K로 이론적으로 분자량 30K 한외여과막을 통과 할 수 없으나 막 재질 특성, 압력, 온도, 교반, 시료농도, 막면적 등 기타 여러 요인에 의해서 투과가 가능하며, 이러한 손실을 방지하기 위해서 최적의 분리조건을 선정하고, 또한 분자량 30K 한외여과막을 투과한 용액을 분자량 10K 한외여과막으로 농축하는 과정이 필요하다. $0.7\ \mu\text{m}$ 와 $0.3\ \mu\text{m}$ pore size를 통과한 시료의 효소 함량간에 유의차($P < 0.01$)는 없었으나, 분자량 30K 한외여과막을 통과한 시료와는 고도의 유의차($P < 0.01$)를 보였다. 단백질 함량과 마찬가지로 예전의 실험에서 $2.70\ \mu\text{m}$ 와 $1.60\ \mu\text{m}$, $0.45\ \mu\text{m}$ 와 $0.20\ \mu\text{m}$ 막을 통과한 시료간에는 유의차($P < 0.01$)가 없었던 바, 분리공정의 단순화를 위해서 $0.70\ \mu\text{m}$, $0.30\ \mu\text{m}$ 막을 한외여과를 하기 위한 예비 전처리 단계로 선정하였다.

$0.7\ \mu\text{m}$, $0.3\ \mu\text{m}$ 막을 통과한 시료의 경우 효소 함량이 $1.48\ \text{unit/ml}$ 와 $1.34\ \text{unit/ml}$ 로 5단계의 분리공정을 거쳤던 예전의 실험 결과인 $1.81\ \text{unit/ml}$ ($0.70\ \mu\text{m}$)와 $1.70\ \text{unit/ml}$ ($0.20\ \mu\text{m}$)보다 효소 함량이 적었으나, 효소의 순도를 나타내는 비활성도의 경우 $0.19\ \text{unit}(0.7\ \mu\text{m})/\text{mg protein}$ 와 $0.18\ \text{unit}(0.3\ \mu\text{m})/\text{mg protein}$ 로 5단계 분리공정을 거쳤던 실험결과인 $0.19\ \text{unit}(0.7\ \mu\text{m}, 0.20\ \mu\text{m})/\text{mg protein}$ 와 거의 동일한 수준을 보였다. 이상의 결과로 볼 때 한외여과를 하기 위한 전처리 공정으로 예비여과 및 미세여과공정 단계를 5단계 공정에서 2단계공정으로 축소했을 때 효소의 비활성도는 차이가 없었기 때문에 2단계 분리 공정이 시간 및 비용면에서 적절한 것으로 나타났다. 또한 분자량 30K 한외여과막을 사용하여 단백질과 효소를 분리했을 때 손실량이 50% 수준으로 나타났으며, 이러한 손실을 줄이기 위해서는 온도에 따른 막 분리도를 측정하여, 최적 분리 온도에서 분리를 수행하면 효소의 손실을 크게 줄일 수 있을 것으로 판단되어, pilot-scale 한외여과 과정에

서 온도에 따른 분리도를 측정하였다.

라. pilot-scale 연속분리를 위한 최적 한외여과 시스템 개발

효소 분리를 위해 사용된 한외여과막은 2차년도 과제실험결과 MWC0 100K 한외여과막을 투과한 것과 최종 미세여과막(pore size $0.45 \mu\text{m}$)을 투과한 것이 효소역가와 효소량에 있어 커다란 유의차가 없는 것으로 나타나 MWC0 30K의 한외여과막만을 이용하였다. pilot-scale 연속 분리 공정에 사용된 미세여과막은 UF 공정전 prefiltration에 적합한 polypropylene 재질의 막(Millipore Co., USA)으로서 세공의 크기가 $0.3 \mu\text{m}$ 으로 Fig. 28과 같으며, 한외여과시스템은 (cassette membrane Biomax 30, Millipore, USA)은 막 표면적 0.1m^2 , 길이 21 cm, 너비 5.6 cm, 두께 1.5 cm로 물의 permeation rate $240\sim 540 \text{ L/hr/m}^2$, 최대 TMP 7 bar at 30°C , 운용 온도 $4\sim 40^\circ\text{C}$ 인 polyethersulfone 재질의 막과 서 20L 용량을 수용 할 수 있는 장치로서 Fig. 29와 같다

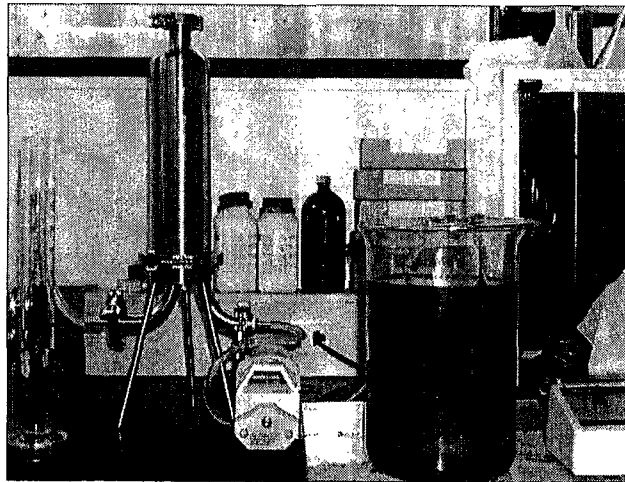


Fig. 28. mTGase separation in continuous MF separation unit.

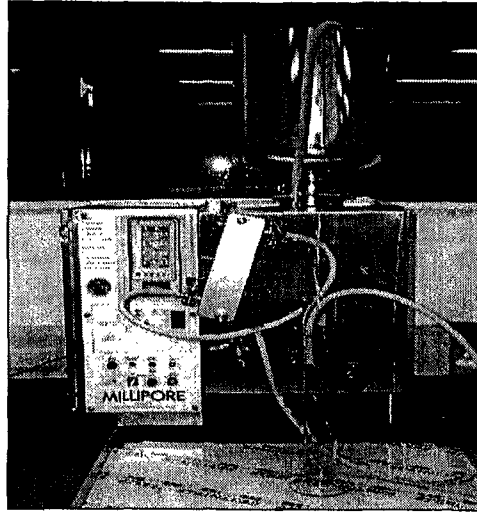


Fig. 29. mTGase separation in the continuous UF separation unit.

먼저 0.3 μm 미세여과막으로 target 물질인 mTGase를 통과시켜 분자량이 mTGase보다 큰 단백질들을 1차적으로 제거시키고 MWC0 30K 한외여과막을 사용하여 1차분리된 분리액을 농축시키는 공정을 적용하여 보았다.

1) 온도별 TMP

30K 한외여과막을 갖고 최적의 TMP를 선정하기 위해서 여러 조건을 비교하여 TMP를 측정한 결과가 table 10과 같이 나타났다.

Table 10. Membrane Flux at the variable TMP using MWC0 30K UF membrane

| Condition Factor | 1 | 2 | 3 | 3-1 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| P_{in} (bar) | 2 | 3 | 4 | 2 | 6 | 2 | 3 | 4 | 6 |
| P_{out} (bar) | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Temp. ($^{\circ}\text{C}$) | 23.7 | 24.0 | 24.2 | 24.8 | 24.3 | 13.6 | 13.9 | 14.3 | 14.5 |
| TMP (bar) | 1 | 1.5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1.5 | 2 | 3 |
| Flux (LMH) | 41.32 | 52.91 | 62.11 | 50.02 | 90.09 | 73.48 | 83.75 | 105.9 | 128.7 |

높은 온도그룹과 낮은 온도그룹에서 각각 최적의 flux를 나타낸 조건은 조건 4와 조건 8이었지만 사용된 한외여과시스템의 압력조건(operation pressure 1~5 bar) 및 운전조건(pump 구동력 등)을 고려한 결과 시스템의 안전성과 균일한 조건 조절이 가능한 TMP 2 bar로 1차적인 TMP 범위를 선정하였고 같은 TMP 2 bar를 갖는 조건3과 조건3-1(Pin 2, Pout 2)에서 flux를 측정하고 결과 조건 3(Pin 4, Pout 0)에서 같은 TMP조건에서 높은 flux를 나타내어 최적 조건으로 선정하였다.

2) 농축비(volumetric concentrate rate, VCR)에 따른 온도별 막 분리도

Fig. 30과 Fig. 31에서 보는 것처럼 초기 미세여과액 5 L를 5배 농축하는데 걸린 시간은 0.55 hr, 10배 농축하는데 걸린 시간은 1 hr이었다. 시간에 따른 Flux의 변화를 살펴보면 시간이 흐를수록, 농축이 진행될수록 flux가 저하되는 현상을 나타내었고 온도에 따른 flux는 온도가 낮을수록 높은 flux를 나타내었다. 평균 flux는 상온(24℃)에서 41.4 L/m²/hr, 저온(14℃)에서 72.4 L/m²/hr로 측정되었다. 같은 sample에서 MWCO 30K 한외여과막으로 농축실험을 수행한 결과 14℃의 저온에서 더 높은 flux를 나타내었고 5배 농축까지 걸리는 시간 역시 45% 단축되었으며 평균 flux가 72.4 L/m²/hr로 1.5배 이상 측정되었다. 따라서 MWCO 30K 한외여과막으로 분리 시 낮은 온도에서의 분리가 mTGase 분리효율을 높이는 데 유리한 것으로 나타났다.

위의 결과로 최적 미세여과막 1.7 μm, 0.3 μm의 couple system과 최적한외여과막 MWCO 30K 한외여과막을 사용함으로써 농축에서 분리까지 연속적인 3단계 막분리 공정이 가능함을 확인할 수 있었다.

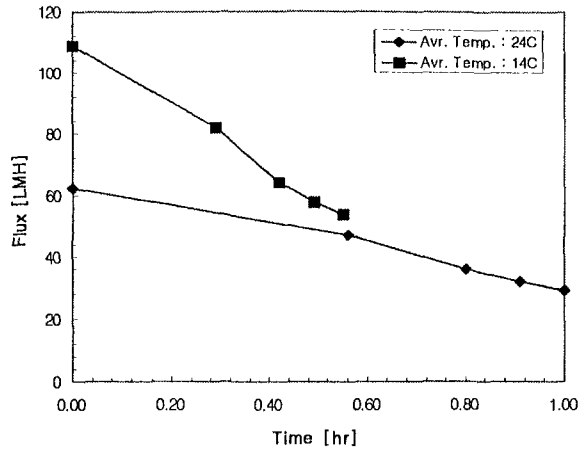


Fig. 30. Change of flux with concentration time at different temperature. (MWC0 30K membrane)

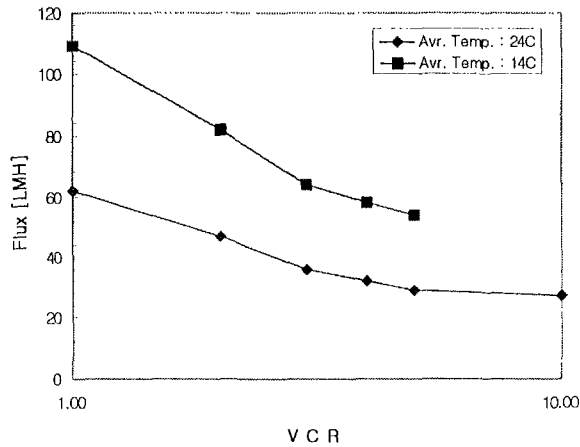


Fig. 31. Change of flux with various concentration rate at different temperature. (MWC0 30K membrane)

3) 막횡단 압력에 따른 온도별 flux 변화

Fig. 32는 MWC0 30K 한외여과막에서 inlet pressure에 따른 flux의 변화를 살펴본 결과이다. 실험 결과 압력이 증가함에 따라 flux가 선형으로 증가하는 것을 알 수 있었고 이는 공정의 scale-up시에 선형적인 생산규모확대 가능성을 제시한다고

볼 수 있다.

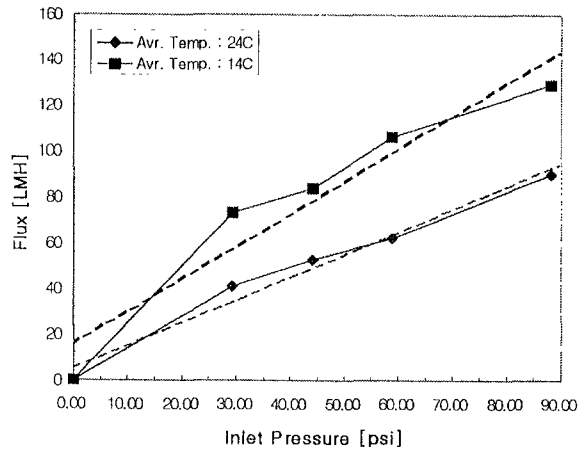


Fig. 32. Effect of temperature and inlet pressure on flux.

마. 연속공정에서 한외여과막의 경제성 검토

막분리공정시 가장 높은 cost를 차지하는 부분이 분리 system의 감가상각 부분과 membrane 소모비용으로 분리 후 membrane의 재사용여부에 따라 생산비용에 많은 영향을 미친다. 본 실험에서는 막분리 공정 후 membrane의 재사용여부를 확인하기 위해 분리공정 전 membrane의 NWP(normal water pressure)를 측정하고 분리공정 후 cleaning 과정이 끝난 다음 membrane의 NWP를 측정하여 그 차이를 갖고 membrane의 재사용여부를 확인하였다. (Fig. 33)

실험 결과 공정후 NWP의 감소가 39.3%가 발생하였으나 실제 sample에 대한 flux의 변화에는 차이가 없는 것으로 나타나 실제 공정적용에는 큰 무리가 없는 것으로 판단되었다.

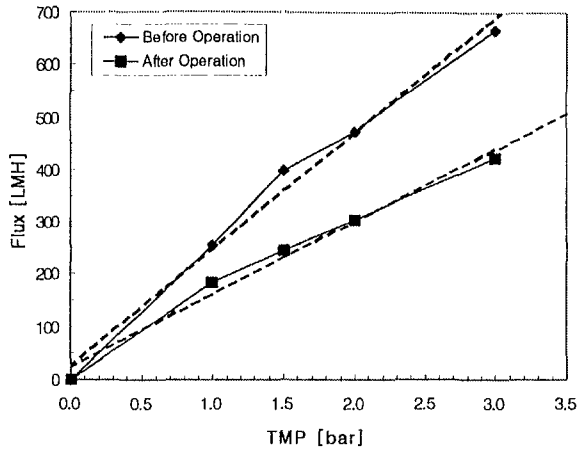


Fig. 33. Changes of NWP according to the temperature and the TMP.

바. Pilot-scale 한외여과 시스템에 의한 효소의 분리정제

미세여과($0.3\mu\text{m}$)막에 의해 분리된 mTGase 조효소액을 Cross-flow filtering 방식의 pilot-scale 한외여과막을 이용하여 분리 및 농축한 결과는 Table 11과 같다.

시료의 초기 volume은 5L 이었으며, 연속적으로 2VCR(2,500 ml), 3VCR(1,670 ml), 4VCR(1,250 ml), 5VCR(1,000ml), 10VCR(500 ml)로 농축하면서 단백질 함량과 효소 농도를 측정하였다. 미세여과막 의해 분리된 시료의 단백질 함량은 7.14 g/L 이었으나, 농축비가 높아질수록 한외 여과막을 통과한 시료의 단백질 함량이 9.89(2VCR) g/L, 12.57(3VCR) g/L, 14.26(4VCR) g/L, 16.48(5VCR) g/L, 20.36(10VCR) g/L로 증가하였다. 효소 농도는 미세여과막에 의해 분리된 시료의 경우 1.34 unit/ml이었으나, 단백질 함량과 마찬가지로 농축비가 높아질수록 분리된 여과액의 효소 농도는 2.57(2VCR) unit/ml, 3.88(3VCR) unit/ml, 4.54(4VCR) unit/ml, 5.52(5VCR) unit/ml, 10.19(10VCR) uite/ml로 증가하는 추세를 보였다. 비활성도의 경우 0.18(feed) U/mg protein에서 0.26(2VCR)U/mg protein, 0.30(3VCR)U/mg protein, 0.31(4VCR)U/mg protein, 0.33(5VCR)U/mg protein,

0.50(10VCR)U/mg protein로 증가하였다. 이상의 결과는 여전히 순수한 mTGase 외에 다른 단백질들이 농축되고 있음을 알 수 있으나, lab-scale용 한외여과 분리시스템에 의해 분리된 효소의 효소 농도와 비활성도에 비해 크게 증가했으며, 대량생산시 분리공정의 단순화와 높은 수율의 효소분리 가능성을 시사하였다.

Table 11. Protein concentration, enzyme concentration and specific activity on retentated solution during pilot ultrafiltration from 30K membrane

| | VCR ¹⁾ | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|
| | Feed ²⁾ | ×2 | ×3 | ×4 | ×5 | ×10 | Pr>F |
| Protein contents(g/L) | 7.14 ^{a)3)} | 9.89 ^{b)} | 12.57 ^{c)} | 14.26 ^{d)} | 16.48 ^{e)} | 20.36 ^{f)} | 0.001 |
| Concentration rate(%) | | 38.3 | 75.9 | 99.6 | 130.6 | 184.9 | |
| Enzyme conc. (units/ml) | 1.34 ^{a)} | 2.57 ^{b)} | 3.88 ^{c)} | 4.54 ^{d)} | 5.52 ^{e)} | 10.19 ^{f)} | 0.001 |
| Concentration rate(%) | | 91.8 | 189.0 | 238.2 | 311.2 | 659.1 | |
| Specific activity (units/mg protein) | 0.18 | 0.26 | 0.30 | 0.31 | 0.33 | 0.50 | |

¹⁾ : Initial feed volume/Retentate volume

²⁾ : Permeate solution from 0.3 μm MF membrane

³⁾ : Measurement of 3 times replication

abc Means in rows with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple comparison at p<0.05

사. Pilot-scale 한외여과막 분리시스템의 단백질 및 효소의 농축 특성

Pilot-scale 한외여과막 분리시스템의 단백질의 농축 특성을 나타낸 결과는 Fig. 34~36과 같다. 단백질 함량과 농축비간에 $Y=1.4047X+7.5971$ 관계식을 얻었으며 $R=0.951431$ 였다. 이러한 결과는 적어도 10VCR 까지는 단백질 농도가 선형식에 따라 증가함을 알 수 있으며, 시간에 따른 Flux 저하 현상이 심하게 변하지 않는 범위에 있어서 최적 농축 배수나 단백질 함량을 결정 할 수 있다.

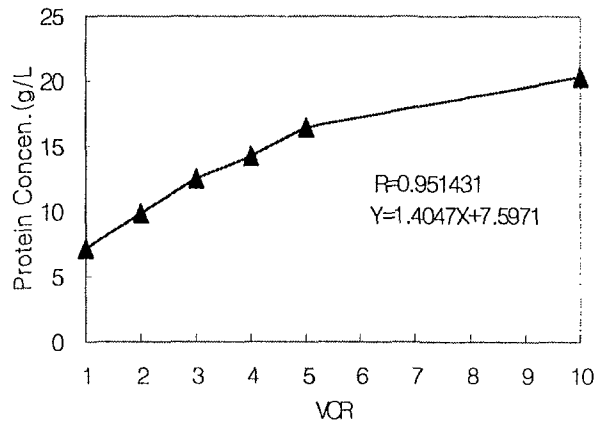


Fig. 34. Correlated protein concentration at various VCR

효소의 경우 $Y=0.96270X+0.6638$ 관계식을 얻었으며, $R=0.997874$ 로 거의 직선에 가까운 경향을 나타냈다. pilote 규모의 한외여과 시스템을 이용하여 효소를 분리할 경우 농축 배수가 높아질수록 효소함량도 동일한 비율로 농축됨을 알 수 있다.

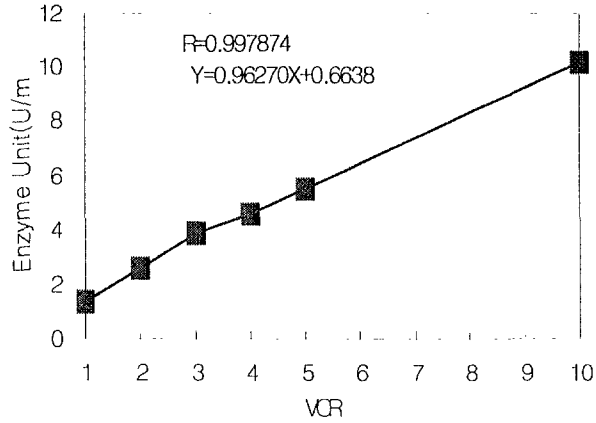


Fig. 35. Correlated enzyme concentration at various VCR

비활성도의 경우 $Y=0.032X+0.1851$ 관계식을 얻었으며, $R=0.982284$ 로 나타났다. 이는 순수한 mTGase를 분리 할 경우 농축 배수가 높아질수록 비활성도가 동일한 비율로 높아짐을 알 수 있으며, 향후 고 순도의 효소를 정제하기 위해 10VCR 이상의 농축비에 따른 효소 순도 실험 및 예비 분리과정에서 효소 손실의 최소화 등 분리 조건을 개선한다면 고 순도, 고 수율의 mTGase의 대량 분리가 가능함을 시사하였다.

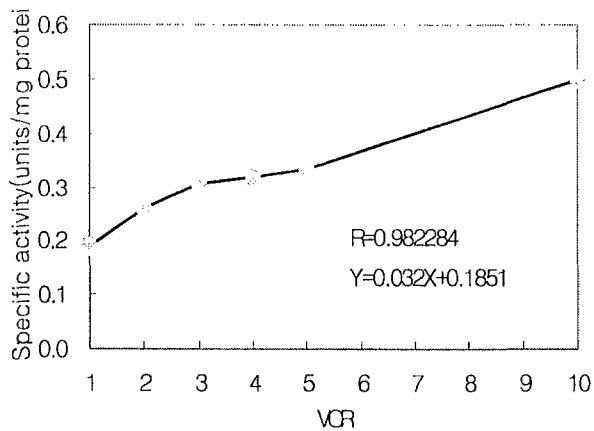


Fig. 36. Correlated specific activity at various VCR

제 4 절 참 고 문 헌

- Hiroyasu ANDO, Masae ADACHI, Koichi UMEDA, Akira MATSUURA, Masahiko NONAKA and Masao MOTOKI : Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms, *Agric. Biol. Chem.*, 53(10), 2613~2617(1989)
- Masahiko NONAKA, Haruo TANAKA, Atsusi OKIYAMA, Masao MOTOKI, Hiroyasu ANDO, Koichi UMEDA and Akira MATSUURA : Polymerization of Several Proteins by Ca^{2+} -Independent Transglutaminase Derived from Microoganesms, *Agric. Biol. Chem.*, 53(10), 2619~2623(1989)
- Y. Zhu, A. Rinzema, J. Tramper, J. Bol : Microbial transglutaminase-a review of its production and application in food processing, *Appl Microbial Biotechnol* 44:277 282(1995)
- James D. E., Ronald M. T., Peter J. W. and Jean E. I. : Purification and properties of a 1,3-1,4- β -D-glucanase(lichenase, 1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.73) from *Bacteroides succinogenes* cloned in *Escherichia coli*, *Biochem. J.* 255, 833-841(1988)
- Zoltan B., Noemi K., laszlo N., Peter J.A., Davies and Laszlo F. : Lak of Induction of Tissue Transglutaminase But Activation of the Preexisting Enzyme in c-Myc-Induced Apoptosis of CHO Cells, *Biochemical and biophysical research communications* 236, 280-284(1997)
- Yoshiro K., Erika I. and Masao M. : Enzyme Immobilization on Ion Exchangers by Forming an Enzyme Coating with Transglutaminase as a Crosslinker, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(8), 1323-1324(1992)
- Masahiko N., Akiko S., Yukihiro M., Masao M. and Noriki N. : Deamidation of

- Several Food Proteins Using Free and Immobilized Ca^{2+} -Independent Microbial Transglutaminase, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(3), 532-533(1996)
- Zhu Yang : Process development for microbial transglutaminase production in submerged and solid-state fermentation, *Process develop. for Microbial trans...submerged and solid-state fermentation*
- Guo-J.T., Shang-M.L. and Shann-T.J. : Transglutaminase from *Streptoverticillium Iadakanum* and application to minced fish product, 1234-*Journal of food science*-volume 61, No. 6, (1996)
- EL Fadil E.B., Nao F., Naotoshi M. and Akio K. : Improvement in the Functional Properties of Gluten by Protease Digestion or Acid hydrolysis followed by Microbial Transglutaminase Treatment, *J. Agric. Food Chem.* 44, 3746-3750(1996)
- Yoshiyuki K., Koh-ichiro S., Katsuya S., Hisashi Y., Noriki N. and Masao M. : Purification and Characterization of Transglutaminase from Japanese Oyster(*Crassostrea gigas*), *J. Agric. Food Chem.* 45, 604-604(1997)
- Thomas A.S., Margo Y.P., Michael T.M. and Heajung An : Surimi Gel Enhancement by Bovine Plasma Proteins, *J. Agric. Food. Chem.* 45, 2919-2923(1997)
- Janet D.K., Ernest G. and Glenn D.K. : Purification and Partial Charaterization of Transglutaminase from *Physarum polycephalum*, *Journal of Bacteriology*, Apr. 2599-2605(1992)
- John T., Stanley A.R., Carolyn L.B., Daron I.F. and J.E. Folk : Phospho- β -Glucosidase from *Fusobacterium mortiferum*:Purification, Cloning, and Inactivation by 6-Phosphoglucono- δ -Lactone, *Journal of bacteriology*, Mar. 1636-1645(1997)

- ChangRak Ha and Ichiro Iuchi : Purification and Partial Characterization of 76 kDa Transglutaminase in the Egg Envelope (Chorion) of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, J. Biochem, 122, 947-954(1997)
- H.G. Lee, T.C. Lanier, D.D. Hamann and J.A. Knopp : Transglutaminase Effects on Low Temperature Gelation of Fish Protein Sols, Journal of food science-Volume 62, No. 1(1997)
- H.G. Lee, T.C.Lanier and D.D. Hamann : Covalent Cross-linking Effects on Thermo-Rheological Profiles of Fish Protein Gels, Journal of food science-volume 62, No. 1(1997)
- Chiya K., Jiro S., Katsutoshi Y., Yasuyuki S., Chiho K. and Takahiko S. : Production of Restructured Meat using Microbial transglutaminase without Salt or cooking, Journal of food science-Volume 62, No. 3(1997)
- Oddur Vilhelmsson : The state of enzyme biotechnology in the fish processing industry, Trends in Food Science & Technology August(1997)
- Eric Dickinson : Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization, Trends in Food Science & Technology October(1997)

천연소재 물성개량제를 이용한 농산가공 식품의
기능성 개선 및 제품화

연구 기관 : 한국식품개발 연구원

연구 책임자 : 신 원 선

연 구 원 :

문 테 화

박 춘 옥

서 희 선

여 백

천연소재 물성개량제를 이용한 농산가공식품의 기능성 개선 및 제품화

| | |
|---|-----|
| 제 1 절 서 설 | 181 |
| 제 2 절 재료 및 방법 | 183 |
| 제 3 절 결과 및 고찰 | 197 |
| 1. Transglutaminase를 이용한 구상단백질의 고분자형성능 탐색 | 197 |
| 2. Transglutaminase를 이용한 모델단백질의 겔화 특성 | 215 |
| 3. Transglutaminase에 의한 emulsion gel화 특성 | 218 |
| 4. Transglutaminase를 이용한 전통식품의 물성개량 효과 | 223 |
| 제 4 절 참 고 문 헌 | 233 |

여 백

제 4 장 천연소재 물성개량제를 이용한 농산가공 식품의 기능성개선 및 제품개발

제 1 절 서 설

식품 단백질의 기능성을 증가시키는 수단으로 많이 이용되고 있는 효소로는 주로 단백질을 선택적으로 절단하는 가수분해형 효소와 중합하는 여러 가교 중합형 효소가 있다(Kang, 1984; Kim, 1992). 가교 중합형 효소 중 대표적인 transglutaminase(TGase, EC.2.3.2.13)는 단백질 및 펩타이드 중의 glutamine 잔기의 γ -carboxamide 기와 각종 일급 아민 간의 아실(acyl) 전이반응을 촉매 하여 단백질 내 혹은 단백질 상호간에 ϵ -(γ -glutamyl)lysine 가교 결합(GL 교차결합)을 형성하여 단백질을 중합함으로써 겔을 형성시키는 효소이다(Soeta, 1997). Transglutaminase를 이용한 단백질 gel들로는 casein, soy protein등과 같은 식품단백질을 이용하는데, 이때 형성되는 gel의 형성능과 hardness의 증가가 연구되어왔다(Nio, 1985). 특히 TGase 처리로 겔이 형성되지 않는 단백질의 겔화 뿐만 아니라 미가열 상태 및 천연 유화상태의 단백질의 겔화, 내열성, 내산성, 내수성을 가진 안정성이 높은 겔 형성에 도움을 준다고 보고되고 있다. 식품 가공에 있어 동물 유래의 guinea pig transglutaminase (GTGase)의 상업적인 이용은 효소 생산의 높은 비용이 문제가 되었으나 *Streptoverticillium mobaraense*의 변종에서 생산된 미생물 체외 효소인 transglutaminase(TGase)의 발견 이후로 경제적인 문제가 해결되어 식품분야에서의 응용 연구가 활발해 지고 있다(Ando, 1989). 미생물 유래의 이 효

소는 동물에서 추출한 TGase와는 다르게 칼슘 농도에 영향을 받지 않는 칼슘 비의존성 효소라는 점, 또한 동물 유래의 TGase에 비해 열에 비교적 안정하고, 작용 pH 범위도 넓은 특성을 지니고 있다(Tsai, 1996).

결합효소로 사용되는 효소중 transglutaminase는 ϵ -(γ -glutamic) lysine 잔기를 결합하는 효소로 casein 및 bovine serum albumin과 같은 동물성 구상 단백질 또한 낮은 온도에서 gel을 형성시키는 것으로 알려져있다(Nio, Motoki and Takinami, 1985, Nonaka, Tanaka, Okiyama, Motoki, Ando, Umeda and Mori, 1989). Glycinin의 경우 TGase를 이용하여 gel을 형성하면 glycinin의 최저 농도의 gel을 얻을 수 있으며 이런 과정은 효소에 의한 glycinin의 분자간의 공유결합이 형성되었음을 의미한다(Chanyangvorakul, Matsumura, Sakamoto, Motoki and Mori, 1994). 또한 transglutaminase를 이용한 gel은 물성특성에도 변화를 주는데 열에 의한 gel과 비교하였을 때 물리적 특성이 향상된 것을 볼 수 있었다(Kang, Matsumura, Ikura, Motoki, Sakamoto and Mori, 1994). Dickinson 등과 Faergemand등은 단백질을 유화안정제로 이용한 emulsion gel 형성시, transglutaminase를 이용하여 계면에 형성되는 단백질의 막 안정성을 증진시켜 에멀션의 안정화에 기여한다고 보고하였다. Soeda(1995)등은 미생물로부터 생산한 transglutaminase를 두부의 응고제대체제로 첨가하여 질감개선 효과에 관련된 연구를 수행하였으며, 생면의 면질개량제로 이용할 수 있는 방안을 연구하였다

본 연구에서는 *Streptoverticillium mobaraense* 에서 생산한 배양액으로부터 부분 정제한 효소를 이용하여 다양한 구상단백질들의 겔화 특성을 조사하고 이들을 가공식품 적성 개선에 응용할 수 있는 방안을 제시하고자 한다. 또한, 전통식품들을 현대적 감각에 맞도록 개선하고 새로운 기호에 맞도록 신제품 개발에 관심이 집중되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 천연소재효소를 이용하여 전통식품의 물성개량 및 소재개발등을 도모하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

원료단백질 및 효소

황금콩은 충북농업연구회로부터 구입하여 사용하여 침전법을 이용해서 단백질(11S 분획)을 분리하여 시료로 이용하였다. 효소에 의한 단백질의 가교결합 형성 시험에 이용한 단백질로 소의 혈청 알부민, β -lactoglobulin, α -lactalbumin, ovalbumin 등은 sigma에서 구입하여 정제 단계없이 사용하였다. 단백질 겔화 실험에 사용한 유청단백질(whey protein concentrate)은 매일유업에서 공급받아 과량의 유당(lactose)을 제거한 후 시료로 이용하였다. 콩 단백질의 말레일화(maleylation)에 사용한 maleic acid 는 sigma에서 구입하여 사용하였으며, 효소정제에 사용한 ammonium sulfate는 Junsei사 제품을 이용하였다. 그밖의 실험에 사용한 시약 및 증류수는 특급을 이용하였으며 구입 후 정제 단계없이 이용하였다.

Streptoverticillium mobaraense 유래의 transglutaminase는 전북대 식품공학과에서 flask 배양을 통해 생산한 배양액을 제공받아 부분 분리 정제하여 이용하였으며, 그 밖의 시약은 sigma에서 구입한 특급으로 사용하였다.

Glycinin분획 및 말레일화

Glycinin의 분획은 Shibasaki and Thanh (1975)의 방법을 변형하여 분리하였다(Fig.1). 황금콩을 ball mill을 이용하여 마쇄한후 실온에서 6시간동안 hexane에 담가두어 탈지된 가루를 0.03 M Tris buffer(pH 8, 0.01 M β -mercaptoethanol, 0.02% sodium azide)에 녹여 실온에서 2시간동안 교반한후 원심분리하였다(10,000g, 30min, 4°C). 상등액만을 취하여 1 M HCl를 사용하여 pH 6.4로 맞춘 후 4°C에서 24시간 방치하였다. 이 용액을 다시 원심분리하여 가라앉은 침전물을 증류수에 녹인 후 다시 NaOH를 사용하여 pH 7.5 - 8.0으로

맞춘 다음에 이런 과정을 3번 이상 반복한 후 동결건조하여 사용하였다.

효소활성 측정

Transglutaminase 활성은 Folk 방법을 보완해서 측정하였다. 0.5 M Tris-acetic acid(pH 7.0) 완충용액에 용해시킨 효소액 0.1 mL를 0.1 M CBZ-L-glutaminyglycine 0.2 mL, 4 M hydroxylamine(pH 7) 0.05 mL, 0.02 M EDTA 0.05 mL를 넣어 총부피를 0.5 mL로 맞추었다. 이 반응혼합물을 37°C에서 10분간 반응시킨 후 15% trichloroacetic acid 0.1 mL과 0.1 N H₂SO₄ 0.25 mL을 첨가하여 반응을 정지시키고 발색시켰다. 그리고 침전물이 있을 경우 원심분리로 제거한 후 분광광도계를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 1 unit는 1분간 1 μmol의 L-glutamic acid γ-mono hydroxamate 가 생성되는 양으로 결정하였다.

효소정제

Streptoverticillium mobaranse 유래의 transglutaminase의 정제과정은 0.005 M 의 sodium phosphate buffer(pH 7.5) 200 mL 에 효소를 천천히 녹여 거품이 발생되지 않도록 하고 원심분리(5000 rpm, 10 min, 4°C)하여 배지로 사용된 유당을 침지시켰다. 상등액만을 취하여 ammonium sulfate을 넣어 40% 농도에서 1차 침전물을 회수하고, 70% 농도에서 2차 침전물을 얻어 transglutaminase 분획하였다. 고형물을 다시 buffer에 녹여 투석(0.005 M sodium phosphate, pH 7.5)후 동결건조하여 조효소로 사용하였다.

Ion Exchange Chromatography(IEC)를 이용한 정제

Table 1에서 보여주듯이 IEC에 이용된 충전물질은 양이온 교환수지인 CM Sepharose CL-6B를 이용하였다. 용출 buffer로는 0.01 M sodium phosphate

buffer에서 0.5 M sodium phosphate buffer까지 기울기 용리 (gradient elution)를 행하였으며 용출되어 나온 각각의 분획을 분광광도계를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

Table 1. Ion-Exchange chromatography condition of transglutaminase fraction

| | |
|--------------|---|
| Column | 1.5 ϕ x30cm |
| Temperature | 4°C |
| Resin | CM Sepharose CL-6B |
| Pump | ECONO Pump (Bio-Rad) |
| Flow rate | 1 mL/min |
| Detector | 280 nm (Jasco UV-570, Japan) |
| Eluent phase | 0.01 M sodium phosphate buffer 0.5 M sodium phosphate buffer |

IEF를 이용한 transglutaminase의 등전점 확인

등전점 전기영동 (Isoelectric focusing)을 사용하여 미생물 유래의 transglutaminase의 등전점을 알아보았다.

Isoelectric focusing은 PhastGel system에 pH 3-9(Pharmacia)의 범위를 분석할 수 있는 gel(PhastGel IEF 3-9)을 이용하였다. 시료의 양은 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 되도록 준비하여 applicator를 이용하여 시료를 loading한후 약 30분간 전개시킨 후 fixing solution(20% trichroacetic acid)에서 5분간 고정시킨다. Wash/destain 용액(methanol : acetic acid : 증류수= 3 : 1 : 6)을 이용하여 2분간 gel을 씻어주고 stain 용액(30% methanol, 10% acetic acid in distilled water and 0.02% PhastGel Blue R, 0.1% CuSO_4)을 이용하여 10분간 염색한 후 wash/destain 용액으로 10분간 탈색하였다.

SDS-PAGE를 이용한 정제도 확인

정제 각 단계별 transglutaminase를 Leammli의 방법에 따라 4%의 stacking gel과 12%의 separating gel 을 이용한 전기영동을 실시하였다. 15 mA에서 약 1시간 30분간 전개시킨 후 comassie brilliant blue R 250용액을 이용하여 염색후 acetic acid : methanol : H₂O = 1 : 4.5 : 4.5 (V/V)를 섞은 용액으로 탈색하였다.

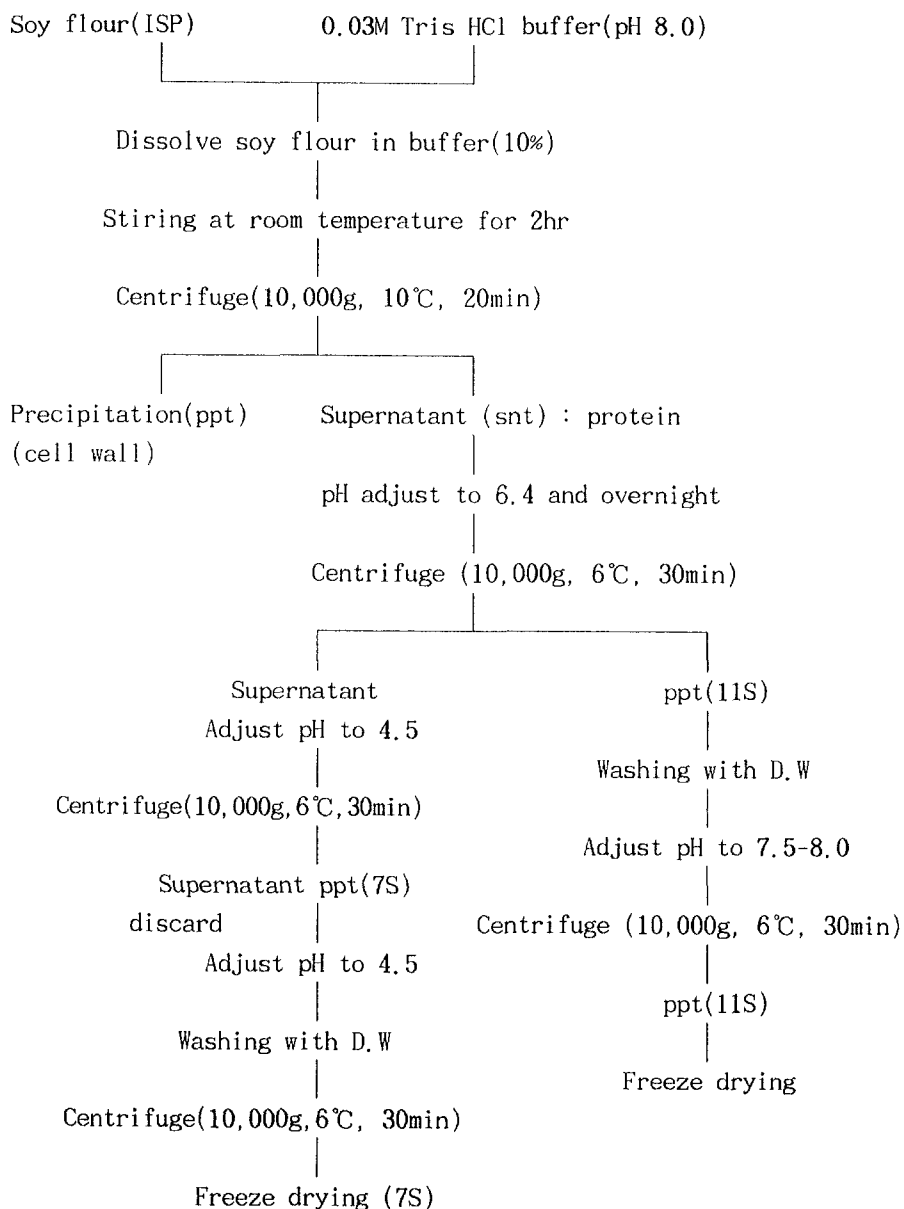


Fig. 1. Glycinin purification

단백질 정량

Bradford 의 방법을 이용한 protein assay 시약(Bio-Rad사)을 사용하여 측정하였다. 이 방법은 미량의 protein을 정량할수 있는 방법으로 단백질양의 증가에 따라 갈색에서 청색으로 변화하는 색의 변화를 분광광도계를 이용하여 595 nm에서 측정하였다. 검출용 표준단백질로 소 혈청 알부민(BSA)을 사용하여 단백질 량을 정량 하였다.

Glycinin의 말레일화

Glycinin의 말레일화는 콩가루(soy flour)에 대한 Tris buffer(pH 8, 0.01 M β -mercaptoethanol, 0.02% sodium azide)의 비율을 1대 15로 하여 3시간동안 실온에서 교반한후, 원심분리(8,000rpm, 10°C, 20 min)를 하여 상등액을 모은 다음에 1 M의 HCl을 사용하여 pH 6.4로 조정하고, 원심분리(10,000g, 6°C, 30 min)를 하여 침전물을 회수하였다. 앞에 사용한 buffer를 사용하여 3번 반복하여 씻어준 후 maleic anhydride를 사용하여 glycinin의 lysine기와 maleic acid를 반응시켰다. 단백질의 lysine과 반응한 말레일 양은 TNBS법을 이용하여 분광광도법으로 정량 하였다. 반응이 종료된 시료는 투석후 동결건조하여 보관하였다.

말레일잔기 정량

0.1% TNBS 시약을 준비하여 빛을 차단한 상태에서 사용하였다. 정량용 표준단백질로 BSA를 사용하여 1, 2.5, 5, 10 및 15 μ g/mL의 용액을 만든 후 각각의 표준단백질에 0.1% TNBS 시약 1 mL와 sodium phosphate buffer 1 mL를 넣고 혼합한 후 40°C에서 2시간동안 반응시켰다. 1 mL의 1 N HCl을 첨가하여 반응을 종료시킨 후, 340 nm에서 흡광도를 측정하여 glycinin의 lysine 잔기와 반응한 말레일 정도를 정량 하였다.

용해도 측정

pH 1에서부터 pH 13로 조절하여 glycinin과 말레일화된 glycinin의 pH 별 용해도를 알아보았다. pH 1.0과 pH 2.0은 Clark - Lubs 완충용액(0.2 M KCl + 0.2 M HCl)을 사용하였으며 pH 3.0에서 pH 8.0까지는 MacIlvaine 완충용액(0.1 M citric acid + 0.2 M Na₂HPO₄)을 사용하였다. pH 9.0와 pH 10.0는 glycine-NaCl 완충용액을 pH 11에서 pH 13은 sodium phosphate 완충용액을 사용하여 순수한 glycinin과 50%, 100% 말레일화를 시킨 단백질을 각각 0.1% (w/v)가 되도록 녹여 280 nm에서 용해도를 측정하였다.

단백질의 lysine기 정량

각각의 단백질 약 0.1g을 취하여 5 mL의 6 N HCl에 녹여 질소 가스로 치환한 후 마개를 밀봉하여 155°C에서 1시간동안 가수분해한 후 실온에서 방냉하였다. 이를 25 mL로 정용한후 filtering하여 AccQ-Tag 방법을 이용하여 HPLC로 분석하였다.

HPLC 분리조건은 Table 2에와 같이 고정상은 Nova-Pak C18 (3.9 x 150mm)로 분리하였으며, 사용한 이동상은 0.14 M sodium acetate와 60% acetonitrile을 기울기 용리방법으로 하였다. 분석시 column의 온도는 37°C였으며 flow rate는 분당 1 mL로 하였다. 기울기 용리의 조건은 0.14 N sodium acetate 용매와 60% acetonitrile을 이용하였으며, 분석 시간은 50분을 두었다.

Table 2. HPLC conditions for amino acid analysis

| | | | |
|--------------------|---|------|------|
| Column | Nova-Pak C18 (3.9×150 mm) | | |
| Oven temperature | 37°C | | |
| Flow rate | 1.0 mL/min | | |
| Detector | fluorescence(Ex. 250nm, Em. 395nm) | | |
| Mobile phase | A : 0.14 M sodium acetate B : 60% acetonitrile | | |
| Gradient condition | Time | A(%) | B(%) |
| | 0 | 98 | 2 |
| | 15 | 93 | 7 |
| | 19 | 90 | 10 |
| | 32 | 67 | 33 |
| | 33 | 67 | 33 |
| | 34 | 0 | 100 |
| | 37 | 0 | 100 |
| | 38 | 100 | 0 |
| | 49 | 100 | 0 |

SDS-PAGE 분석

Transglutaminase를 이용하여 반응시킨 고분자시료(0.2 g)를 9 M urea 용액에 녹여 37°C에서 15분간 녹인 후 희석하여 사용하였다. 전기영동(SDS-polyacrylamide gel)은 Lammlie(1970)의 방법을 이용하였다.(4% stacking gel, 12% running gel). 각각의 well에 시료 주입량은 15 µg이며, 10 mA의 전류를 사용하여 3시간동안 실온에서 전개하였다. 전기영동 후 전개된 겔은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고, 증류수 : 메탄올 : 초산 혼합비가 45 : 45 : 10의 용액으로 탈색하였다.

물리적 특성 (rheological property) 측정

Dynamic oscillatory rheometer(CSL2-100, TA, USA)를 이용하여 50℃에서 1 Hz의 진동으로 반응시간에 따른 각각의 단백질의 gel 형성과정과 상전이점 (phase transition point)을 알아보았다.

단백질의 Sulfhydryl기 측정

혈청알부민(BSA)을 2-mercaptoethanol를 time-course로 처리하여 환원된 disulfide bond로 부터 얻어진 thiol기의 정량을 변형된 Ellman법(23)을 이용하여 측정하였다. BSA용액 20 μ l와 2-mercaptoethanol을 적량 취하여 0.48%의 SDS, 8M urea, 1mM EDTA가 들어있는 0.1M sodium phosphate buffer(pH 8.0)와 혼합하여 2ml가 되도록한다. 여기에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 10mM의 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 10 μ l을 첨가하여 녹이고, 2ml의 증류수를 가한 후, 혼합하여 412nm에서 흡광도를 측정한다. sulfhydryl기 함량은 분자흡광계수 13,600 M⁻¹cm⁻¹을 적용하여 계산한다.

단백질의 형광측정

단백질을 2-mercaptoethanol로 처리하여 disulfide bond를 환원시키거나 열처리한 단백질의 구조적 변화를 Hitachi spectrofluorometer F-4500을 이용하여 측정하였다. 혈청알부민을 0.01M Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 0.01% 되도록 용해하여 0, 10, 20, 50mM의 2-mercaptoethanol을 처리하여 37℃에서 1시간동안 전처리 한 후, 295nm(excitation), 310nm 및 410nm(emission)에서 형광의 변화를 측정하였다.

단백질의 2차 및 3차구조 측정

단백질을 열처리하거나 2-mercaptoethanol을 처리하여 disulfide bond를 환원시킨 후, 단백질의 2차 및 3차구조의 변화를 circular dichroism으로 측정하였다. 혈청알부민의 2차구조 변화를 추적하기 위하여 Far-UV 영역인 190-260nm에서 0.1mg/ml의 단백질용액을 pathlength 0.1cm의 cell을 이용하여 측정하였고, 3차구조 변화는 near-UV영역인 250-300nm에서 0.5mg/ml의 단백질용액을 1cm의 cell을 이용하여 측정하였다. 상대적인 α -helix의 함량은 222nm에서의 molar ellipticity(deg · cm² · dmol⁻¹)로 나타냈다.

구상 단백질의 Transglutaminase-의존성 겔화

각종 구상단백질(혈청알부민, 유청단백질(WPI), beta-lactoglobulin, ovalbumin, alpha-lactalbumin, 대두의 glycinin)에 대한 효소적 겔화 특성을 조사하기 위하여 다양한 겔형성 조건을 탐색하였다. 각 단백질의 stock solution을 준비하여 겔형성에 필요한 단백질 최종농도를 1-10% 범위에서 조절하였다. 단백질의 구조적 특성에 따라 효소를 첨가하기전에 예열처리, disulfide bond의 한정적 환원처리, 염처리등을 수행한 후, 효소를 첨가하여 50-55℃에서 반응시켜 겔형성을 유도하였다

Table 3. Gelling condition of globular proteins with mTGase

| Protein conc. (%) | DIT conc. (mM) | Calcium conc. (mM) | Pre-heat treatment(℃) | Enzyme conc. (U) | Reaction temp. (℃) |
|-------------------|----------------|--------------------|-----------------------|------------------|--------------------|
| 5 | 1/2/3/4/5 | 1/2/3/4/5 | 70-85 | 0.225-0.1 | 50-55 |

Table 4. Gelling condition of globular proteins with heat treatment

| Protein | Treatment condition | | | |
|-----------------------------|---------------------|-------|---------------|---------|
| | pH | Temp. | Reaction time | Salt 존재 |
| BSA | 8.1 | 70°C | 60min | - |
| | | 75°C | 60min | - |
| | | 85°C | 60min | - |
| OVA | 8.1 | 70°C | 60min | - |
| | | 75°C | 60min | - |
| | | 80°C | 60min | - |
| β -Lactoglobulin | 7.52 | 70°C | 60min | - |
| | | 75°C | 60min | - |
| | | 80°C | 60min | - |
| BSA+OVA | 8.1 | 75°C | 60min | - |
| BSA+ β -Lactoglobulin | 8.1 | 75°C | 60min | - |
| OVA+ α -lactalbumin | 8.1 | 75°C | 60min | - |

Emulsion 제조

단백질의 disulfide bond의 환원정도에 따른 유화액 형성 및 안전성을 측정하기 위해 oil-in-water 유화액을 조제하였다. 유화액은 5% 농도의 혈청알부민에 0-50mM의 2-mercaptoethanol을 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응시킨후, Ultra turrax T-25 homogenizer(IKA Labortechnik, Germany)를 이용하여 22,000rpm에서 1분간 실온에서 형성하였다. 신선하게 형성한 유화액에 미생물유래의 transglutaminase를 20:1(단백질:효소, w:w)로 첨가하여 계면에서의 단백질 거동을 조사하였다.

유화액 형성능 측정

유화형성능은 Pearce와 Kinsella의 방법을 약간 변형한 turbidimetric technique으로 측정하였다. 형성된 유화액을 10 μ l을 취하여 0.1% SDS를 포함한 0.1M NaCl용액으로 희석하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3반복으로 수행하여 평균값을 취하여 유화형성지표(EAI)로 나타내었다.

$$\text{Emulsion Activity Index(EAI)} = 2T/\Phi C$$

ϕ 는 첨가한 oil fraction이고, C는 수용액상의 ml당 포함된 단백질의 함량을 mg으로 나타낸 것이다. 유화액의 turbidity(T)는 2.303A/L 로 표시하며, A는 흡광도, L은 cubette의 pathlength이다. 유화액의 안정성은 30분 후의 유화액의 흡광도변화로 표시하였다.

지방구에 흡착된 단백질의 SDS-PAGE 분석

형성된 유화액의 계면에 흡착된 단백질의 함량을 측정하기 위하여 Chanyonporakul 등의 방법을 이용하였다. 각 유화액의 비흡착 단백질을 제거하기 위하여 25°C에서 104×g로 30분간 원심분리하여 지방구층을 10mM N-ethylmaleimide(NEM)를 함유하는 20mM sodium phosphate buffer에 분산시켰다. 잔여분의 비흡착 단백질을 제거하기 위하여 이상의 과정을 반복하여 얻어진 지방구층을 buffer에 분산시켜 모은 용액을 지방구표면에 흡착하지 않은 단백질시료로 하였다. 4%의 SDS, 20%의 glycerol, 125mM Tris-HCl buffer를 포함하는 washing 용액에 2-ME가 2% 되도록 첨가하여 씻어낸 지방구액에 동량 첨가한다. 이 혼합액을 실온에서 20시간 천천히 흔들어 지방구에 흡착된 단백질을 추출한다. 이 용액을 25°C에서 104×g 로 30분간 원심분리하여 추출된 단백질을 수거하여 SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 지방구에 흡착된 단백질의 함량은 Bradford법으로 측정하여 초기에 첨가한 단백질의 함량으로부터 환산하여 결정하였다. SDS-PAGE는 Laemmli법에 의거하여 수행하였으며 5% Stacking gel, 8% separating gel에서 분석하였다. 전가 영동이 끝난 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 acetic acid: methanol: distilled water가 1:1:8(v/v) 혼합액으로 탈색하였다.

Emulsion gel의 oscillatory rheological property 측정

효소에 의해 형성된 emulsion gel의 물리적인 특성을 측정하기 위해 diameter 6cm(angle 2°, gap 200 μ m) plate를 장착한 oscillatory rheometer를 이용하였다

(carri-Med CSL 100, TA Instruments, Germany). 유화액에 다양한 농도의 효소액을 첨가하여 parallel plate에 점적한 후, silicon oil을 한방울 떨어뜨리고 플라스틱 뚜껑을 덮어 가열과정중 액체가 증발하는 것을 방지하였다. 시료는 50℃에서 1시간 가열하면서 frequency 1Hz, strain amplitude 0.03의 조건에서 물성의 변화를 측정하였다.

밀가루 및 쌀가루 제조

본 실험에 이용한 수입산 밀가루는 ASW(Australian Standard White)와 AH(Australian hard)의 혼합분을 사용하였다. 국내산 밀가루는 전라북도 고창에서 2001년 5-6월 사이에 수확된 그루밀(Gerumil)품종으로, 우리밀 살리기 운동본부 산하 전문회사에서 백밀가루를 인수받아 반죽의 특성 및 이화학적 특성을 구명하였다.

본 실험에 사용된 쌀은 2001년 강원도 철원에서 수확되어 가공된 오대(Oh-Dae)품종을 이용하였다. 쌀가루는 roller mill과 ball mill을 병용하여 건식으로 제조하였으며, roller mill로 1차 분쇄한 뒤 ball mill로 분쇄하였다. 쌀가루의 입도분리는 100mesh의 표준망체를 이용하여 잔류된 쌀가루를 이용하였다.

반죽의 물리적 성질

효소에 의한 반죽의 물리적 성질을 측정하기 위하여 mixograph 및 farinograph를 이용하여 반죽을 형성하였다.

Farinograph는 AACC(54-2149) 표준방법을 이용하여 시료 300g을 30℃로 유지시킨 mixing bowl에서 반죽의 굳기가 500 ± 20 BU(Brabender unit)에 도달하도록 수분 함량을 조절하여 water absorption, peak time, stability, weakness, valorimeter value를 조사하였다.

Mixograph(National Mfg. Co., USA)는 AACC 54-4049의 방법에 따라 10g

mixogram을 측정하였다. 이에 연결된 computer software에서 계산된 midline peaktime, midline peakheight, width at peak 수치를 이용하여 반죽의 물성을 측정하였다. Dough stability는 midline이 peak에 도달한 후 3분 후의 tail width로 정의하였다. Farinograph와 mixograph 측정시 transglutaminase의 첨가는 용액상태로 완전히 용해하여 반죽에 첨가하였다.

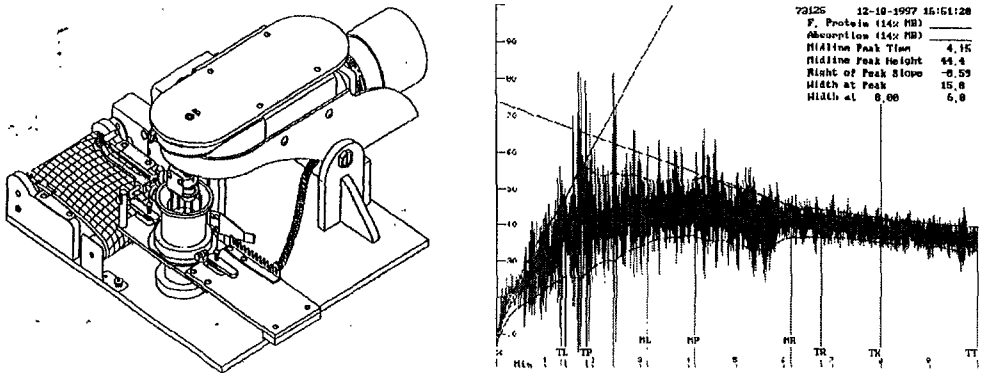


Fig. 2. 10g mixograph and mixogram

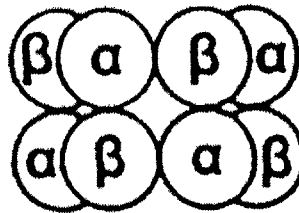
제 3 절 결과 및 고찰

1. Transglutaminase를 이용한 구상단백질의 고분자형성능 탐색

가. Glycinin 및 말레일화 단백질의 특성비교

Fig. 4에서 보여지는 것과 같이 native glycinin과 말레일화 시킨 glycinin의 용해도는 크게 차이를 보였다. Hamm(1963)의 연구 결과에서와 같이 native glycinin의 등전점은 pH 4.5 - 4.6 사이로, pH 4.0 - 5.0 부근에서 용해도가 가장 낮았으나, 말레일화된 glycinin의 경우 maleic acid의 영향으로 glycinin의 구조가 unfolding 되며 charge의 변화로 인해 정전기적 반발력의 증가된다. 따라서 말레일화된 glycinin은 최저용해도를 나타내는 등전점이 pH 3.0을 나타내어 산성 쪽으로 이동된 것으로 보인다.

Fig. 5에서 보면 native glycinin의 acid subunit와 basic subunit이 A에서는 뚜렷이 보여지지만 말레일화 시킨 두 단백질에서는 subunit이 말레일화 정도에 따라 해리되어지는 모습이 나타나고 있으며, 이는 Fig. 4에 나타난 용해도와 같이 glycinin의 말레일화에 따른 glycinin의 구조적 변화에 따른 것으로 보여진다. 이런 결과는 Owen, (1985)의 저서에서 보인 단백질 화학적 변성과 같은 모습을 보였다.



α : acidic subunit, β : basic subunit

Fig. 3. Glycinin subunits

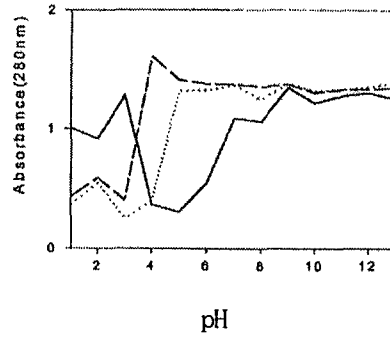


Fig. 4. Effect of pH on solubility of native and maleylated glycinin. — glycinin, ···50% maleylated, -- 100% maleylated

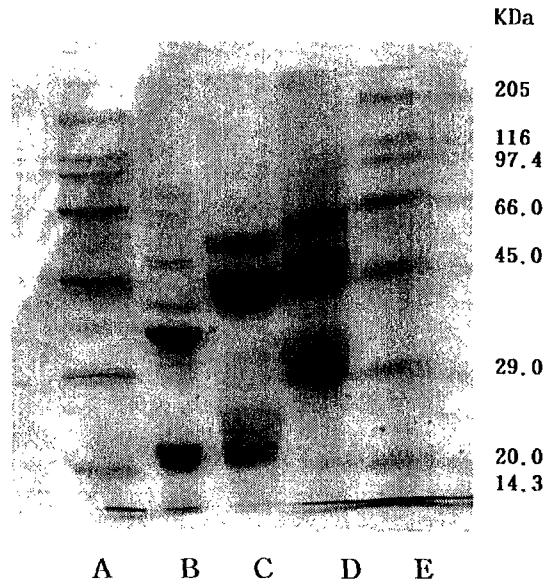


Fig. 5. Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) pattern of native glycinin and maleylated glycinin : (A) molecular weight marker, (B) native glycinin, (C) 50% maleylation glycinin, (D) 100% maleylation glycinin, (E) molecular weight marker.

Glycinin의 말레일화는 lysine 잔기에 maleic acid가 결합하는 반응이므로 AccQ-tag방법을 이용하여 HPLC로 native glycinin과 말레일 화한 glycinin의 lysine량을 비교 분석하였다. 결과 native glycinin에 말레일화 시킨 glycinin의 lysine의 함량이 점점 낮아진 것을 볼 수 있었다. 또한 이는 말레일화 정도를 알아보기 위하여 free NH₂기를 측정하는 TNBS법과 같은 결과를 나타내고 있다. 각 단백질의 아미노산 분석 결과는 lysine기 함량이 native glycinin에서 말레일화 67%, 93% 순으로 7.4%, 6.0%, 5.0%로 감소한 것을 Table 4에 나타냈다. 이런 경향은 Choi (1982)의 연구결과와 비교하여 보았을 때 Choi의 경우 control의 free NH₂기의 값이 26.0 meq/ 100g protein을 나타내었으며 약 80% 말레일 화된 glycinin의 경우 free NH₂기는 2.8meq/ 100g protein을 나타내었다. 이런 실험 결과의 차이는 실험 방법에 있어 HPLC를 이용할 경우 강산 첨가 후 가수분해를 하므로 아미노기와 결합하던 maleic acid의 분리에 따른 결과의 차이로 보인다. 그러나 감소의 양의 차이와는 다르게 감소의 경향은 같은 모습을 보인다.

Table 4. Lysine contents of native glycinin and maleylated glycinin

| Protein fraction | Sample weight(g) | Total amino acid(%) | lysine(%) | lysine(%) |
|------------------|------------------|---------------------|-----------|-----------|
| Native IIS | 0.0743 | 81.763 | 6.084 | 7.4 |
| Maleylated (67%) | 0.0984 | 49.325 | 2.978 | 6.0 |
| Maleylated (93%) | 0.0978 | 64.712 | 3.244 | 5.0 |

효소 정제

본 연구에서 사용된 효소는 전북대 식품공학과에서 생산한 효소로 *Streptovercillium mobaraense*를 균주로 하여 생산된 배양액을 원심분리하여 포자를 제거한 후 사용하였다. Ammonium sulfate를 효소 액의 약 70%로 염석 방법을 이용하여 1차 정제를 하였으며 이때의 specific activity는 9.2를 나타내었다. 1차 정제 후 동결건조를 마친 microbial transglutaminase를 0.01 M sodium phosphate buffer에 녹여 CM sepharose를 이용하여 양이온 교환수지 column으로 분획하였다.

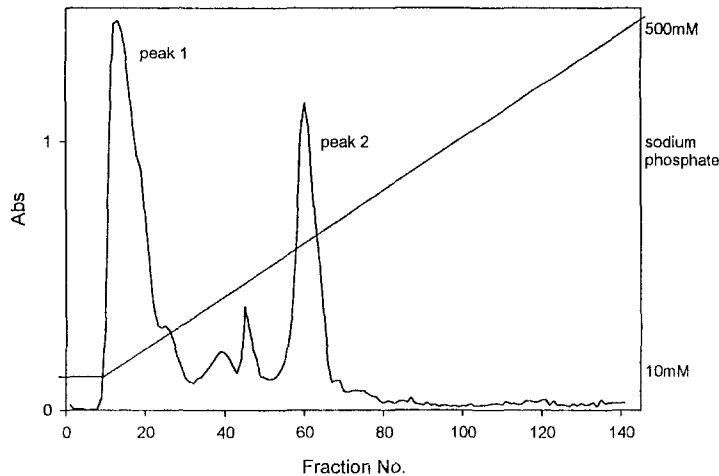


Fig. 6. Cation-exchange chromatography of crude mTGase

그 결과는 Fig. 6에서 보여지듯이 0.01 M의 sodium phosphate buffer만이 흐를 때 용출되어진 peak 1과 sodium phosphate buffer가 약 0.225 M로 흐를 때 용출된 peak 2인 두종류의 peak가 나타났다. Peak 1의 경우 pI가 4에서 5사이 에 있으므로 6.5에서는 음이온을 띄게 됨으로 sodium phosphate buffer의 이온 강도와는 무관하게 용출 용매에 씻겨 나온 것으로 생각된다.

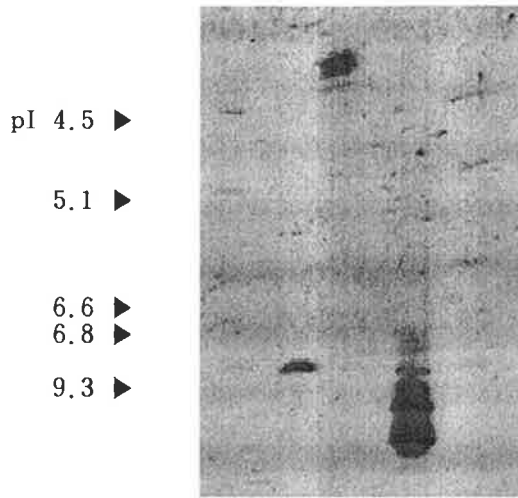


Fig. 7. Isoelectric focusing pattern of transglutaminase : (A) marker , (B) commercial enzyme, (C) purified microbial TGase by IEC peak 1, (D) : purified microbial TGase by IEC peak 2, (E) marker

Microbial transglutaminase의 등전점 실험 결과는 Fig. 7에서 보여지는 바와 같이 A의 경우 상업적으로 생산되어지고 있는 transglutaminase로 pI가 기존에 알려진 대로 약 pH 8.0을 나타내었으나 C의 경우인 미생물 유래의 transglutaminase의 경우 pI가 pH 8.5-pH 9.0정도를 나타내고 있다. B와 C는 이온교환수지 column으로 분리 정제한 시료로 B는 Fig. 6에서 볼 때 peak 1이며 C는 peak 2이다. 이러한 등전점의 차이로 보아 B의 경우 pI값이 4에서 5사이를 나타내는데 비해 C는 pI 8.5이상이 나타났다. 효소 정제 단계별 정제도는 SDS-PAGE 통하여 알아 본 결과를 Fig. 8에서 나타내었다. A의 경우는 상업적으로 생산되고 있는 transglutaminase이며 B의 경우 *Streptoverticillium mobaraense*의 배양액을 70% ammonium sulfate 분획을 회수하여, 투석 후 동결 건조한 효소이다. C는 CM sepharose CL 6B column으로 분리한 효소분획을 동결

건조한 시료이다. 이온 교환수지 분리한 microbial transglutaminase는 아래의 SDS-PAGE상에서 나타난바와 같이 저분자량의 분획이 제거된 단일 band를 얻을 수 있었으며 이는 효소의 정제도가 증가된 것으로 보인다.

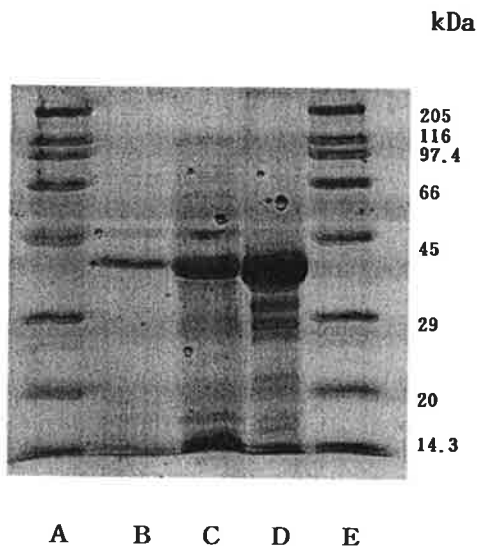


Fig. 8. Electrophoretic pattern of purified transglutaminase : (A) molecular marker, (B) purified microbial TGase by IEC, (C) ammonium sulfate-precipitated enzyme of microbial TGase, (D) commercial enzyme, (E) molecular marker.

각 정제 단계별 transglutaminase의 농도와 활성도 측정은 Table 6에 제시하였다. 정제를 할수록 총 단백질량은 줄어들지만 반면에 specific activity가 증가하는 것을 보아 이는 정제 과정을 통해 transglutaminase가 아닌 다른 저분자의 단백질이 제거되어 효소의 순도가 높아진 것으로 보여진다. 이는 앞의 SDS-PAGE의 정제도 확인 실험과 같은 결과를 나타내었다. 염석의 단계는 ammonium sulfate 농도가 40%까지는 transglutaminase는 염석되지 않는다는 기존의 문헌을 참고하여 분리하고 ammonium sulfate 농도 40 - 70%에서 염석되어

지는 물질만을 회수하여 투석후 280 nm에서 측정된 결과 기존에 crude한 용액에서 보다 단백질의 양은 약 60%로 줄었으나 효소의 specific activity는 거의 1.6배 증가하였다. 이를 이온교환 수지 column을 이용해 정제한 결과 transglutaminase는 단백질의 양이 약 13%로 줄었지만 반면에 specific activity는 2.2배 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이 같은 결과는 Tanimoto와 Kinsella(1988)의 결과와 비교하여 보았을 때 Tanimoto와 Kinsella의 경우 단백질의 양 처음 시료의 5.6%의 회수율을 보였으나 specific activity는 약 17배 증가한 것으로 나타내었다. 이렇게 Tanimoto와 Kinsella의 실험 결과와 차이를 보이는 것은 mTGase의 생산 배지의 색이 activity 측정 영역에서 흡광을 나타내는 붉은 색을 나타내므로 실험에 영향을 준 것으로 사료되고 정제과정에 따른 저분자 색소가 제거되므로 정제과정에 따른 activity 증가율은 다소 적은 것으로 보이나 실제로는 activity는 크게 증가된 것으로 보인다.

Table 6. Enzyme purification scheme

| | Total A _{280nm} (mg) | Total Activity | Specific activity | Recovery of Activity |
|---|----------------------------------|----------------|----------------------|-------------------------|
| Crude enzyme solution | 110.8 | 1016.6 | 9.2 | 100.0 |
| Ammonium sulfate precipitates (40-70%) | 66.9 | 968.1 | 14.5 | 95.2 |
| CM shepharose (Peak I) | 15.8 | 92.8 | 7.0 | |
| | | | | 37.8 |
| CM shepharose (Peak II) | 14.4 | 291.9 | 20.3 | |

단백질의 mTGase-의존성 겔 형성

Native glycinin의 gel 형성은 단백질 농도 5%일에 transglutaminase 0.113 unit, 0.225 unit, 0.45 unit, 0.90 unit을 첨가하여 50℃에서 한시간 동안 반응시킨 후 95℃에서 30초간 효소 반응을 정지한 실험결과는 Fig. 9와 같이 나타났다. 말레일화를 시킨 단백질농도 5%일 때 transglutaminase 0.225 unit을 첨가하여 50℃에서 한시간 동안 가열하여도 gel을 형성하지 못하였다. 이는 lysine잔기와 glutamine 잔기를 결합시키는 transglutaminase가 말레일화에 의해 lysine잔기의 양이 줄어 gel 형성시 작용한 것으로 사료된다(Data 생략). 그러나 SDS-PAGE를 이용한 native glycinin 및 말레일화 된 glycinin의 gel 형성능을 비교하여 보면 native glycinin의 경우 단백질농도 1%일 때 mTGase 농도 0.225 unit을 첨가하고 50℃에서 가열하면 10분부터 고분자를 형성하기 시작하였으나 황금콩 단백질 glycinin의 subunit 중 acidic subunit만이 중합체형성에 참여할 뿐 basic subunit은 gelation에 참여하지 않고 있는 것을 볼 수 있다(Fig. 9). 이런 결과는 Lee (1997)의 논문에서도 나타나고 있으나 Lee의 실험에는 diethylaminoethyl (DTT)를 첨가하여 1차 가열 후 mTGase를 처리하여 gel을 형성하였다. 그러나 본 실험에서는 환원제 첨가 없이도 10분 가열 후부터 겔이 형성된다는 것을 알 수 있었다. Native glycinin과 달리 glycinin을 말레일화 시킨 단백질의 경우 고분자 형성시 다른 경향을 보였는데, 50% 말레일화시킨 glycinin은 농도 1%에서 DTT를 첨가하지 않았을 때는 고분자를 생성하지 않았으나 환원제 0.001 M을 첨가하였을 때부터 고분자가 형성되는 것을 볼 수 있었다. 이때 겔 형성에 참여한 subunit은 glycinin의 basic subunit으로부터 해리된 subunit으로 보여진다. 100% 말레일 화시킨 glycinin의 경우 DTT 0.001, 0.002 M에서는 고분자가 형성되지 못하였으나 DTT 0.003 M부터 고분자를 생성하였고 50% 말레일화보다 glycinin 보다 basic subunit으로부터 해리된 subunit들이 고분자생성에 더 많이 참여하였다(Fig. 10, Fig. 11). Native glycinin의 경우 고분

자형성에 참여하지 않았던 basic subunit이 말레일화에 의해 해리 되고 효소에 의해 고분자화 되고 있음을 볼 수 있다.

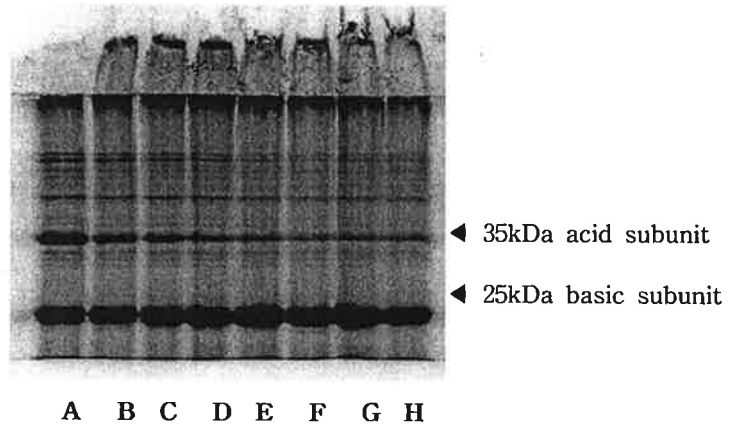


Fig. 9. SDS-PAGE pattern of native glycinin incubated with mTGase without reducing agent at 50°C for 0 to 240 min : (A) 0 min, (B) 10min, (C) 20min, (D) 30 min, (E) 60 min, (F) 90min, (G) 120min, (H) 240min.

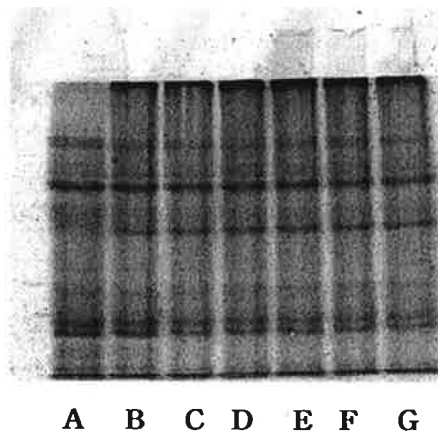
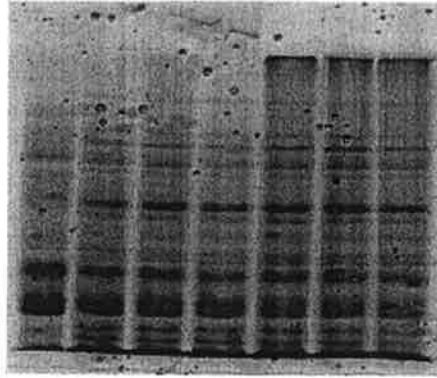
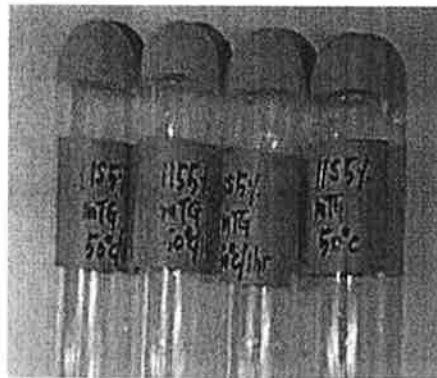


Fig. 10. SDS-PAGE pattern of 50% maleylated glycinin incubated with reducing agent at 50°C. : (A) control, (B) DTT 0 mM, (C) DTT 1 mM, (D) DTT 2 mM, (E) DTT 3 mM, (F) DTT 4 mM, (G) DTT 5 mM.



A B C D E F G

Fig. 11. SDS-PAGE pattern of 100% maleylated glycinin incubated reducing agent at 50°C : (A) control, (B) DTT 0 mM, (C) DTT 1 mM, (D) DTT 2 mM, (E) DTT 3 mM, (F) DTT 4mM, (G) DTT 5 mM.



1 2 3 4

Fig.12. Transglutaminase-mediated gelation of 5% glycinin at 50°C: tube 1: mTGase 0.225U, tube 2: mTGase 0.550U, tube 3: mTGase 0.775U, lane 4: mTGase 1.000U

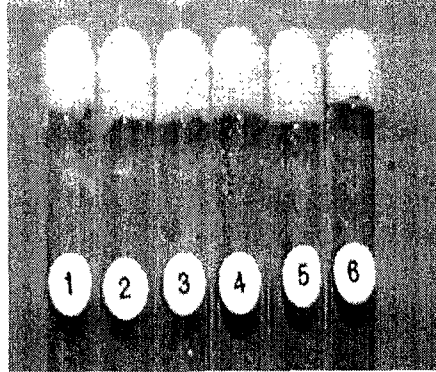


Fig. 13. Microbial transglutaminase -mediated gelation of 5% glycinin at 50°C: lane 1: 85°C preheating/mTGase 0.5unit, 2: 85°C preheating/mTGase 1.0unit, 3: 85°C preheating/mTGase 1.5unit, 4: 37°C preheating/mTGase 0.5unit, 5: 37°C preheating/mTGase 1.0unit, 6: 37°C preheating/mTGase 1.5unit

가열에 의한 겔 형성

동물성 구상 단백질을 model system으로 설정하여 가열처리에 의한 열변성 특성을 실험하였다. 각 단백질의 농도는 5%, 이온강도는 0.05이었으며, 염의 존재유무에 따른 겔화현상을 살펴보았다. 그 결과, 가열 온도에 따른 단백질 용액의 상변화가 단백질의 종류, 단백질의 혼합종류, 혼합비율, 및 온도에 따라 다양한 sol-gel형성을 보였다(Table 7). 혈청단백질 및 난백단백질등은 가열에 의한 독특한 겔화 현상을 보였으나, 유청글로블린의 경우, 가열에 의한 겔은 형성되지 않고 흐름성이 감소한 현상과 아울러 시험관 벽면에 균질하고 투명하게 표면막을 형성하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 가공과정중이나, 일정온도에서의 반응과정중에 일어나는 단백질의 상변화를 추적함으로써 가공과정중의 단백질의 거동(예: fouling현상등)을 예측하거나 해결할 수 있으리라 사료된다.

Table 7. Gelling properties of globular protein under various condition

| Protein | Treatment condition | | | | Phase |
|-----------------------------|---------------------|-------|---------------|------|-------------------------|
| | pH | Temp. | Reaction time | Salt | |
| BSA | 8.1 | 70°C | 60min | - | Transparent/weak sol |
| | | 75°C | 60min | - | Transparent/weak gel |
| | | 85°C | 60min | - | Translucent/strong gel |
| OVA | 8.1 | 70°C | 60min | - | Transparent/weak gel |
| | | 75°C | 60min | - | Translucent/strong gel |
| | | 80°C | 60min | - | Opaque/hard gel |
| β -Lactoglobulin | 7.52 | 70°C | 60min | - | Transparent/weak sol |
| | | 75°C | 60min | - | Transparent/weak sol |
| | | 80°C | 60min | - | Translucent/thick sol |
| BSA+OVA | 8.1 | 75°C | 60min | - | Translucent/hard gel |
| BSA+ β -lactoglobulin | 8.1 | 75°C | 60min | - | Transparent/viscous gel |
| OVA+ α -lactalbumin | 8.1 | 75°C | 60min | - | Translucent/hard gel |

구상단백질의 용매의존성 겔화 특성

용매 내에서의 단백질(구상단백질-혈청알부민, 유청글로블린, 난백단백질등)의 거동을 조사하기 위하여 에탄올(유전항수: 78)을 이용하였다. 각 단백질(농도:5%)을 에탄올 농도를 증가시켜가면서 37°C에서 60분간 반응시킨 결과는 다음의 Table 8에 제시하였다. 혈청알부민의 경우 에탄올과 단백질의 소수성 상호작용에 의한 반응과정중 비가역적이고 투명한 겔이 형성었으나, 유청글로블린의 경우, 반응 종료후, cooling과정동안 형성된 겔이 온도상승에 따라 가역적으로 sol상태로 변화함으로써 에탄올과 단백질의 수소결합력이 증가된 것에 기인하는 것으로 판단된다. 이에반해 난백단백질은 저농도의 에탄올환경하에서는 흐름성있는 sol을 형성하였으며, 30%농도에서는 반투명의 단단한 겔을 형성하였다(Figure 14). 그러나, 고농도의 에탄올존재하에서는 빠른 응집현상을 보였으나 반투명하고 균질한 겔형성을 보여주었다. 에탄올(유전항수: 78)은 aprotic solvent로

용매의 환경을 소수성으로 변화시켜주어 단백질의 구조에 영향을 미친다. 즉, 단백질을 둘러싸고 있는 친수성환경을 perturbation시켜줌으로써 단백질과 물과의 안정화를 파괴시키고 단백질내부 존재하는 소수성patch를 표면으로 노출시켜 줌으로써 반응성을 증가시켜 줄 수 있다. 특별히, 유청글로블린의 경우, 에탄올환경하에서 beta-sheet 가 우세한 구조에서 alpha-helix 가 우세한 구조로 전이되는 과정에서 중간단계의 변성구조인 molten globule현상을 보여준다. 이 구조는 식품학적 기능특성이 가장 우수한 구조단계로 많은 연구결과에서 밝혀짐으로써 단백질가공을 통한 고기능성 소재개발을 기대할 수 있으리라 사료된다. 아울러, 혈청단백질은 alpha-helix 가 우세한 구조를 지니고 있지만 에탄올의 첨가(20% 까지)에 의한 구조변이는 보이지 않고 오히려 helix구조가 다소 안정화됨을 알 수 있었다. 난백단백질은 에탄올을 50% 까지 첨가해도 이차구조에는 유의적인 변화를 보이지 않았으나 에탄올 60% 이상에서는 이차구조가 상당히 붕괴되고 random coil 형태의 구조를 지니는 것으로 나타났다(Figure 15).

Table 8. Effet of aprotic solvent on gelation of globular protein

| Ethanol (%) | Proteins | | |
|-------------|-----------------|-------------------------------------|------------------------|
| | BSA | β -LG | OVA |
| 0 | Liquid | Liquid | Liquid |
| 10 | Liquid | Weak sol | Weak sol |
| 20 | Liquid | Weak sol | Weak sol |
| 30 | Transparent gel | Transpatrent sol (after cooling) | Translucent gel |
| 40 | Transparent gel | Transparent gel (after cooling) | Reversible coagulum |
| 50 | Transparent gel | Transparent gel (after cooling) | Reversible coagulum |
| 60 | Coagulum | Transparent gel (after cooling) | Coagulum |
| 70 | Coagulum | Coagulum | Precipitation |

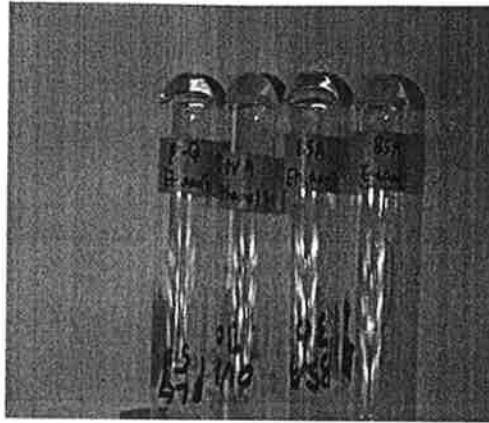


Fig. 14. Ethanol-induced gelation of globular proteins

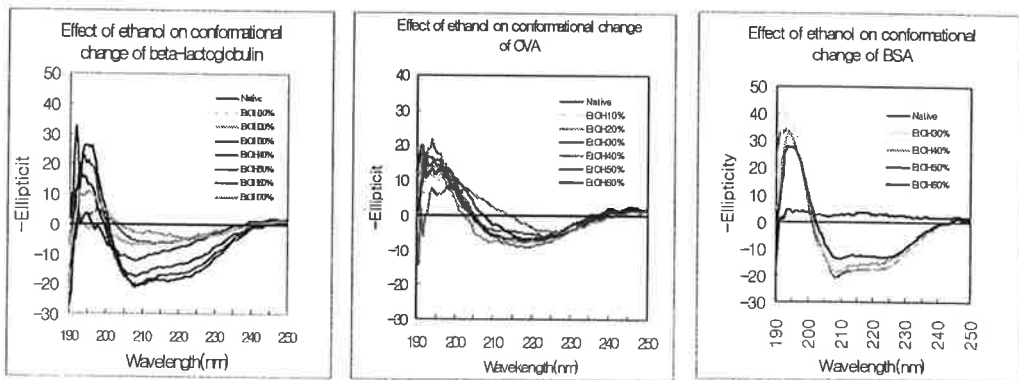


Fig 15. Far-UV CD spectra of ethanol-induced secondary structure in globular proteins

칼슘에 의한 비가열 겔 형성

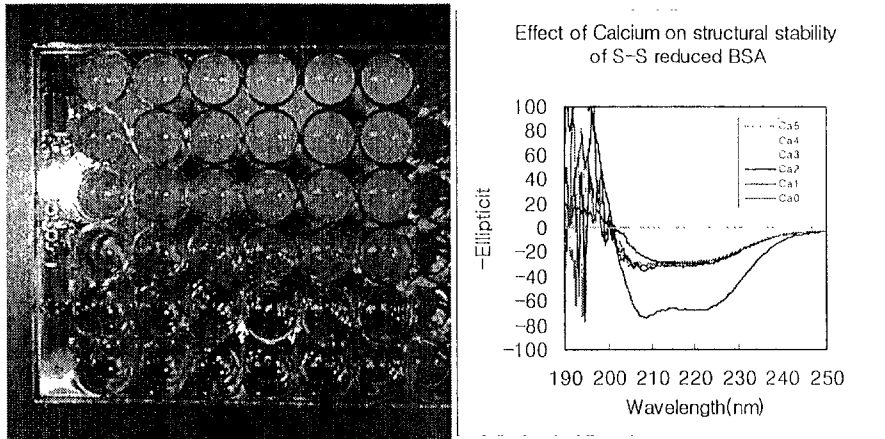


Fig 16. Thiol-dependent gelation of BSA with/without Calcium

혈청알부민은 17개의 disulfide결합과 1개의 sulfhydryl기를 지니고 있는 단백질이다. 따라서, 이 단백질은 disulfide기의 산화·환원반응을 통하여 겔형성을 유도할 수 있으며, disulfide의 환원정도(단백질에 대한 S-S기의 몰비를 기준으로)에 따른 겔형성을 유도해낼 수 있다. 본 연구에서는 2-mercaptoethanol 및 DTT를 이용하여 disulfide기를 환원시키고 여기에 Calcium의 이온강도를 증가시키면서 생성되는 겔의 양상을 살펴보았다. 그 결과 칼슘이 존재하지 않은 경우, 투명한 겔이 형성되었으나, 2-ME와 칼슘농도가 증가할수록 불투명하고, 단단한 겔이 형성됨을 알 수 있었다. 따라서, 칼슘첨가에 따른 단백질의 구조적 특성을 조사하기 위하여 CD를 이용한 혈청알부민의 구조변화를 추적한 결과, BSA에 5mM의 DTT를 첨가한 경우, alpha-helix의 함량이 50%이상 감소하였으나 칼슘첨가에 의한 단백질구조는 유의적인 변화를 보이지 않았다(Figure 16).

Table 9. Effect of calcium on thiol-dependent gelation

| Protein | DTT conc. (mM) | Calcium conc. (mM) | Temp. (°C) | Phase transition |
|---------|-------------------|-----------------------|---------------|--|
| BSA(5%) | 1/2/3/4/5 | 0/1/2/3/4/5 | 37 | Thick sol, transparent gel, opaque gel |

| Protein | 2ME conc. (mM) | Calcium conc. (mM) | Temp. (°C) | Phase transition |
|---------|---------------------------|-------------------------|---------------|---|
| BSA(5%) | 0/10/30/50/70 /100/200 | 0/1/2/3/4/5/10 15/20 | 37 | Weak sol, translucent sol, transparent/translucent/opaque gel |

Transglutaminase 첨가에 따른 단백질의 상변화 측정

Native glycinin과 glycinin을 말레일화 시킨 5% 단백질 시료에 transglutaminase 0.225unit을 첨가하고 50°C에서 가열하여 겔 물성을 측정하여 보았다. 그 결과 50%, 100% 말레일화 glycinin은 거의 storage modulus(G')값이 증가하지 않았으나 그에 비해 native glycinin의 경우 260초 이후 급격한 storage modulus(G')값이 증가되고 있는 것을 볼 수 있다. Chanyongvorakul, Matsumusa와 Motoki(1994)의 연구 결과에서는 glycinin 농도 및 반응 시간에 따른 G'값을 알아 보았는데 glycinin의 농도 5%의 경우 총 120분의 반응시간 동안 약 0.5×10^4 dyne/cm² 값을 나타내고 있으며 이 실험의 30분 지점의 값과 비교하여 보았을 때 이는 본 실험의 30분 지점의 값과 같은 모습을 보였다(Figure 17).

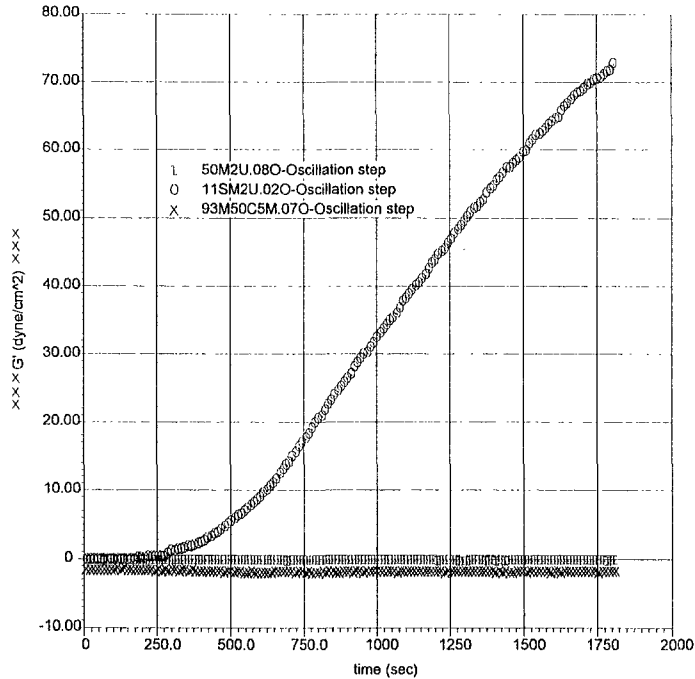


Fig 17. Change in storage modulus(G') of native and maleylated glycinin mediated by transglutaminase at 50°C

Transglutaminase첨가에 따른 glycinin의 gel 형성능 비교

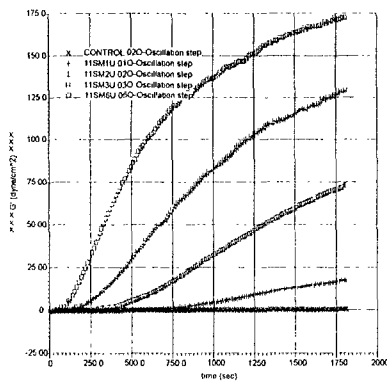
효소 농도가 증가할수록 native glycinin의 gel 형성과정을 oscillatory로 측정하여 storage modulus(G') 값을 구하였다. 단백질 농도는 5%, 가열 온도는 50°C로 유지하면서 측정한 결과 효소를 넣지 않은 control의 경우는 G' 값이 거의 변화가 없었으며, transglutaminase를 0.1 unit 첨가하였을 경우는 G' 값이 매우 낮은 25를 나타냈으며 0.2 unit의 경우 250초 이후 G' 값이 상승하기 시작하여 65까지 상승하게 되었다. 0.3 unit의 경우 150초에서부터 고분자화 되기 시작하여 최종 G' 값은 125가 되었고 0.5 unit을 첨가하였을 경우 50초부터 상승하기 시작하여 175값을 나타내었다. Lim, Mine 그리고 Marvin(1998)의 연구 결과와 비교하여 보면 본 실험과

는 다른 egg white protein을 사용하여 실험한 결과 0,02%의 mTGase 첨가 때보다 TGase의 농도가 0.03, 0.04%로 증가할수록 G'값이 증가하며 증가량이 증가할수록 G'값의 그래프 곡선이 완만하게 증가하고 있다. 이는 본 실험과 같은 결과를 보이는 것이다.

Glycinin의 상변이점

Fig 18-2에서와 같이 mTGase의 unit을 증가할수록 gel 형성이 빠르게 일어나는 것을 볼 수 있었다. glycinin 농도 5%일 때 효소농도 0.1 unit을 첨가하였을 경우 500초부터 시료의 상이 바뀌는 것을 볼 수 있었으나 효소의 농도가 0.2 unit을 첨가하였을 때는 180초에서 상변이점이 나타났다. 또한 0.3, 0.4, 0.6 unit으로 효소 양을 증가시킬수록 상의 변화가 빨리 나타나는 것을 볼 수 있었다. 본 실험은 앞의 실험의 G'값을 측정한 실험과 같이 효소의 농도 증가에 따라 겔 상의 변화가 빠르게 일어나는 것을 나타내는 것이다.

18-1



18-2

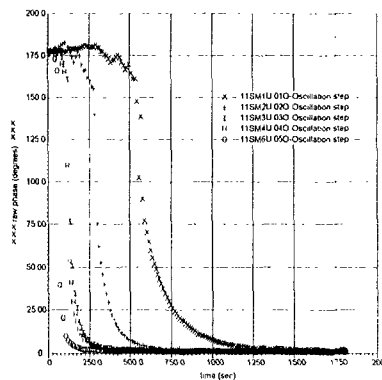
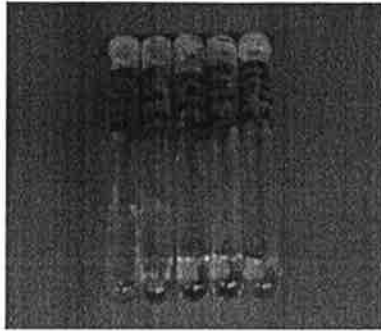


Fig. 18. Enzyme concentration-dependent of polymerization native glycinin and phase transition point of native glycinin under various concentration of transglutaminase

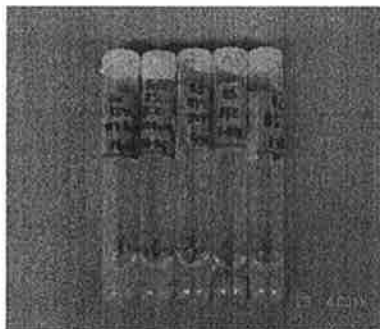
2. Transglutaminase를 이용한 모델단백질의 겔화 특성

(1) β -Lactoglobulin의 칼슘첨가의 효과



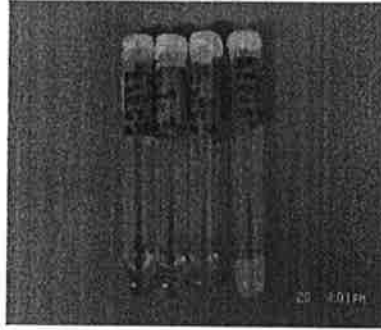
단백질농도 5%의 β -lactoglobulin 용액에 칼슘(1, 2, 3, 4, 5 mM)을 첨가하여 85°C에서 10분간 예비가열 처리 후, transglutaminase처리를 하였다. 그 결과, 1 mM의 칼슘첨가군은 상변이가 일어나지 않았으며, 2 mM의 칼슘첨가군은 유동성있고 투명한 sol을 형성하였다. 칼슘농도 3 mM이상에서는 효소첨가에 의해 투명하고 탄성있는 겔을 형성하였다.

(2) 열침의 효소-비의존성 겔 형성



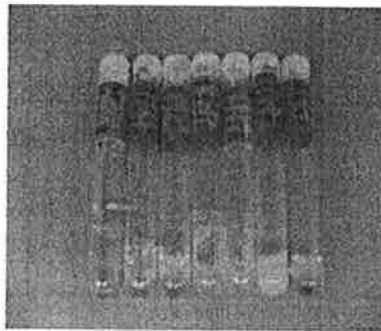
열침을 85°C의 water-bath에서 예비 가열처리를 한 결과, transglutaminase를 첨가하지 않아도 점도가 높고 불투명한 겔을 형성하였다.

(3) 혈청의 thiol기 교환에 의한 겔 형성



혈청을 70℃에서 10분간 예비가열 후, disulfide bond의 환원제인 dithiothreitol(DTT)를 1, 2, 3, 4 mM을 첨가할 경우, 저농도의 DTT 첨가시에는 점도가 높은 sol을 형성하였으며, 4mM의 DTT 첨가시에는 불투명한 겔을 형성하였다.

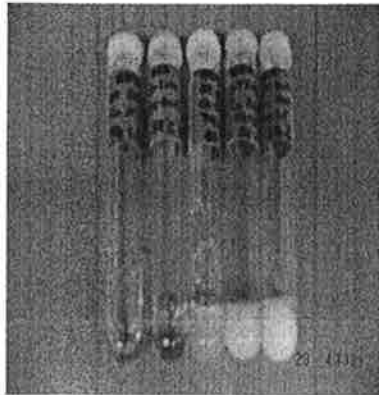
(4) 난백 단백질(OVA)의 겔 형성



단백질농도 5% 인 OVA 용액에 칼슘(1, 2, 3, 4, 5 mM)과 DTT(1, 2, 3, 4, 5 mM)을 각각 첨가하여 70℃에서 30분간 가열 처리하였다.

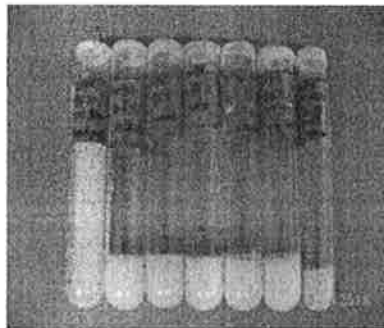
그 결과, 저농도의 칼슘첨가시 불투명하고 유동성있는 sol을 형성하였으며, 칼슘농도가 5mM 이상, DTT 4 mM부터 불투명한 겔을 형성하기 시작하였다.

(5) Bovine serum albumin(BSA)의 칼슘의존성 겔 형성



5%의 혈청알부민 용액에 칼슘(1, 2, 3, 4, 5 M)과 효소를 첨가하고 70°C에서 가열 처리한 경우, 칼슘농도가 2 mM 이상 첨가한 시료는 70°C에서 가열처리 하였을 때, 불투명하고 탄성있는 겔을 형성하였다.

(6) 유청 농축단백질의 저온 겔 형성



유청 농축단백질 용액을 85°C에서 30분간 예비가열 후, 냉장온도에서 2시간 방냉한 결과, 효소첨가없이 불투명한 겔을 형성하였다.

3. Transglutaminase에 의한 emulsion gel화 특성

BSA의 sulfhydryl 기 함량 측정 결과

Native BSA는 17개의 분자간 disulfide 결합과 1개의 sulfhydryl기를 지니고 있는 단백질이다. Disulfide 결합을 환원시키는 20-mercaptoethanol의 농도가 10mM일 경우 환원된 sulfhydryl기는 약 7개, 20mM인 경우 약 13개의 sulfhydryl기가 환원되었다. 첨가한 2ME 농도가 50mM 이었을때 약 14개의 -SH기가 환원된 것으로 나타났다. Disulfide 결합은 단백질의 구조적 안정성에 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 BSA의 경우, 17개의 intrachain s-s 결합이 안정한 도메인 구조를 형성하고 단백질의 기능특성에 영향을 주는 양친매적 특성을 부여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이와같은 disulfide 결합이 환원되면 구조적으로 느슨(loose)해져서 반응성이 증가하게 된다. Disulfide 결합 수가 환원될 수록 기름과 물의 계면에서의 흡착력이 증가하게 되고 유화형성능(EAI)과 유화안정성(ES)이 향상된다고 보고하고 있다. 본 실험의 결과, BSA의 disulfide 결합이 환원될수록 oil droplet의 단백질 흡착량이 비례적으로 증가하여 Shin(1995) 등과 일치하는 결과를 보였다.

Table 10. Number of cleaved disulfide bonds and amount of adsorbed proteins at the oil droplet according to the concentration of 2-ME

| Conc. of 2-ME (mM) | No. of cleaved disulfide bonds | Amount of adsorbed protein at the oil droplet (%) |
|--------------------|--------------------------------|---|
| 0 | 0 | 53.9964 |
| 10 | 3.8444 | 61.3134 |
| 20 | 6.5498 | 64.7140 |
| 50 | 7.1909 | 71.8344 |

Disulfide 결합 환원에 따른 내재적 형광성 변화

단백질을 열처리하거나 2ME를 첨가하여 구조를 변형시키는 경우 단백질 내부에 묻혀있던 소수성 core가 노출되게 되고 이에 따라 tryptophane의 환경이 변화하게 되어 형광성이 변화하거나 λ_{max} 가 shift하는 것으로 알려져 있다. BSA에 다양한 농도의 2-mercaptoethanol을 처리하여 37°C에서 반응시킨 후, 내재적 형광광도를 측정하였다. BSA는 열처리나 환원제 처리에 의해 형광성이 모두 감소하였으며, 2ME의 농도가 증가할 수록 형광성은 비례적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이는 native BSA의 최대 형광도가 341.8 nm이고, 37°C에서 예열처리한 경우 339.4 nm, 50mM의 2ME를 첨가하여 37°C에서 반응시킨 시료의 경우에는 335.0nm 로 shift하였으며 2ME의 농도가 증가하면서 blue-shift하는 것으로 나타났다.

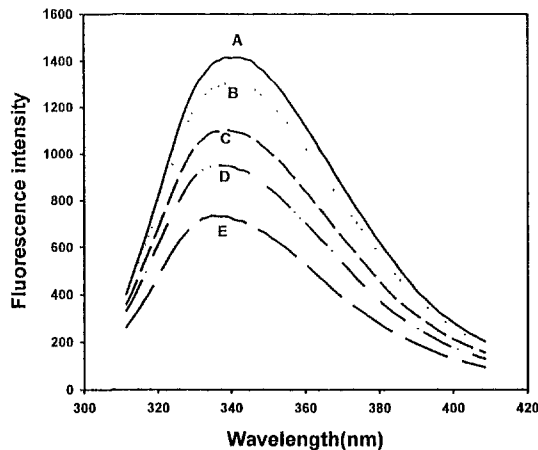


Fig. 18. Intrinsic fluorescence intensity spectra of BSA treated with various concentrations of 2-ME at 37°C A : Native BSA, B : Heated BSA(no 2-ME), C~E : BSA treated with 10mM, 20mM, and 50mM 2-ME, respectively, and heated at 37°C for 1 hour

Disulfide 결합 환원에 따른 far-UV 및 near-UV CD 측정

BSA의 disulfide 결합을 부분적으로 환원시킨 후 amide 잔기 주변의 변화를 측정하여 단백질의 이차구조의 변화를 측정하였다. 그 결과, 2ME의 농도가 50mM까지 증가해도 helix구조를 명확히 나타내는 222nm, 208nm에서의 선광도(ellipticity)에 변화를 보이지 않고 있어 s-s 결합이 7개(mole 비율) 환원된 부분적 변성에서는 이차구조의 붕괴는 없는 것으로 나타났다. 그러나, 2ME의 첨가를 통한 s-s결합의 부분적 환원으로 얻어진 BSA의 삼차구조는 native BSA 보다 구조적으로 unfolding된 flexible 한 구조를 형성하고 있는 것으로 나타났다.

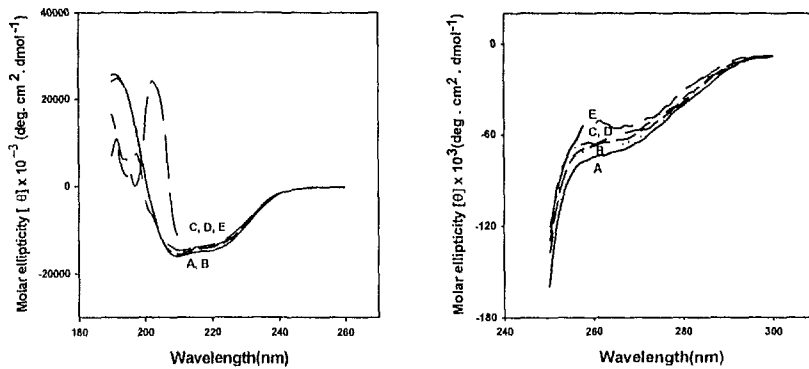


Fig. 19. Far-UV and Near-UV CD spectra of BSA reduced with various concentrations of 2-ME at 37°C A : Native BSA, B : Heated BSA(no 2-ME), C~E : BSA treated with 10mM, 20mM, and 50mM 2-ME, respectively, and heated at 37°C for 1 hour

계면에 흡착된 단백질의 SDS-PAGE

단백질은 수용액과 oil droplet 사이의 계면에 흡착하여 계면장력을 낮추어 안정된 유화액을 형성시킨다. 지방구주변에 흡착되지 않은 단백질과 흡착된 단백질을 분리하여 전기영동을 실시한 결과, 2ME로 disulfide 결합을 환원시킨 단백질이 지방구 표면에서 고분자형성에 참여한 것으로 판명되었다. 이는 2ME의 농도가 증가할수록 지방구표면에 흡착한 단백질의 고분자화가 더 많이 진행된 것으로 보아 s-s 결합이 환원되면서 부분적으로 변성한 단백질의 소수성 상호작용 등에 의한 단백질 간의 고분자형성능이 향상된 것으로 판단된다.

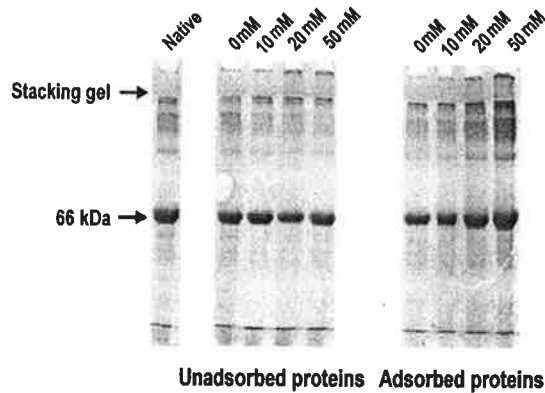


Fig. 20. SDS-PAGE analysis of adsorbed and unadsorbed proteins

Emulsion gel화 과정의 Dynamic oscillatory rheology 측정

Dynamic shear rheology는 겔화 과정에서 초기단계의 kinetics를 연구하는데 중요한 수단이 된다. Emulsion gel의 storage modulus(G')를 반응온도(50°C)에서 시간의 함수로 측정된다. Transglutaminase에 의해 형성된 emulsion gel은 효소를 처리하지 않은 emulsion gel보다 G' 가 더 높았다. 또한, G' 값은 2ME의 농도가 증가할수록 더 높은 것을 알 수 있다. 앞선 결과에서와 같이 50M의 2ME를 첨가하고

transglutaminase를 처리한 시험구가 G' 값이 가장 높았다. 이상의 결과를 종합해 보면 단백질의 s-s 결합을 부분적으로 환원시켜 단백질 소수성내부의 core를 노출시켜 protein-protein interaction이 증가된 상태로 계면에서의 흡착과 고분자화가 용이하게 된다. 부분적으로 변성된 단백질상태(즉, molten globule state)에 transglutaminase를 첨가하는 경우 계면에서의 안정한 단백질막을 형성하고 TGase에 의하여 형성된 emulsion gel은 안정되고 탄성이 있는 gel network를 형성하게 되는 것으로 판단된다.

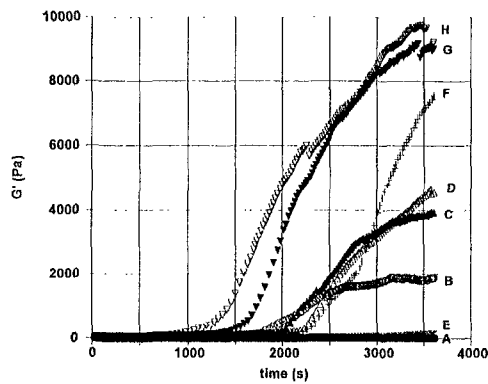


Fig. 21. Changes in storage modulus(G') during formation of emulsion gel A~D : 0, 10, 20, 50mM 2-ME, respectively (no mTGase) E~F : 0, 10, 20, 50mM 2-ME, respectively (mTGase)

4. Transglutaminase를 이용한 전통식품의 물성개량 효과

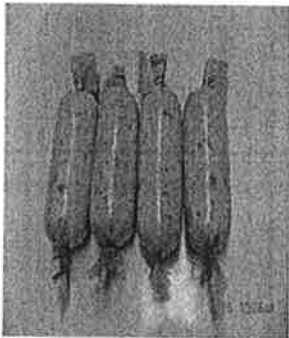
두부소세지 제조

두부소세지의 제조를 위하여 두부(총중량 83%), 당근(7%), 완두콩(5%), 옥수수(5%)와 Transglutaminase를 농도별(0, 3000, 5000, 7000 ppm)로 첨가한 후, Hobart mixer를 이용하여 배합하고 cellulose film 에 시료중량 50g을 채워 총길이가 7cm가 되도록 하였다. 시료를 냉장상태에서 overnight 한 후, 물성측정을 위하여 Texture profile analysis를 실시하였다.

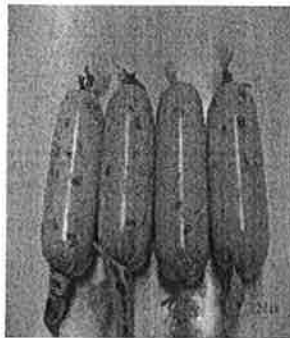
너비아니식 고기완자 및 두부완자 제조

다짐육 400g 혹은 두부 400g 에 소금, 설탕, 참기름, 깨소금을 각각 1 tspoon을 넣고 transglutaminase를 0, 0.5, 1.0, 1.5 % 혹은 0, 3000, 5000, 7000, 10000 ppm 씩 첨가하여 균질하게 혼합한 다음 성형하여 20분간 방치 후 실험군으로 하였다.

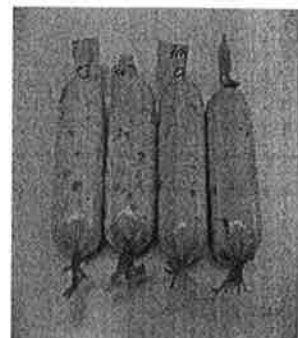
두부소세지의 casing



효소농도 3000ppm



효소농도 5000ppm



효소농도 7000ppm

Table 11 TPA condition of Tofu sausage added with mTGase

| | |
|----------------|--------------------|
| Graph type | Force vs Time |
| Force unit | Grams |
| Contact area | 10mm × 10mm × 3.14 |
| Contact force | 20 |
| Distance force | Strain |
| Pre-test speed | 5.0 |
| Test speed | 1.0 |
| Strain | 50 |

Table 12. TPA condition of Tofu sausage

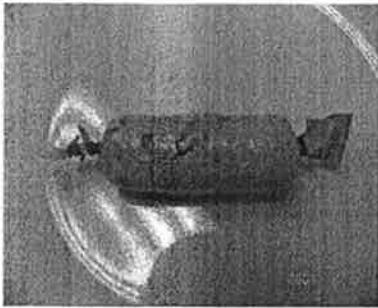
| | Tofu A | Tofu B | mTGase 0 ppm | mTGase 3000 ppm | mTGase 5000 ppm | mTGase 7000 ppm |
|--------------|-----------------|----------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Springness | 0.715 | 0.747 | 0.686 | 0.652 | 0.728 | 0.714 |
| Cohesiveness | 0.620 | 0.543 | 0.522 | 0.348 | 0.484 | 0.538 |
| Chewiness | 235.549 | 374.620 | 351.34 | 617.707 | 769.471 | 1603.373 |
| Hardness | 531.2g (50%) | 923.5 (50%) | 771.8g (50%) | 2725.1g (50%) | 2185.3g (50%) | 4175.7g (50%) |

두부를 이용한 소세지는 콩이 원재료가 되는 건강지향적 신식품으로 개발가치를 기대해볼 수 있다. 두부는 열처리를 통하여 결합력이 증가하고 씹힘성이 향상되지만 조직이 연하여 부서지는 성질을 피할 수 없다. 따라서, 육류를 원재료로 하는 소세지와 유사한 조직감을 내기 위해서 단백질 내/간 가교결합 형성을 통해서 water holding capacity가 증가하고 결합력이 향상된 제품개발을 할 수 있다. 본 실험의 결과, transglutaminase 의 첨가량이 증가할 수록 씹힘성(chewiness)은 2배에서 5배까지 증가하였으며, 단단함(hardness)은 3배에서 5배까지 증가하였다. 이

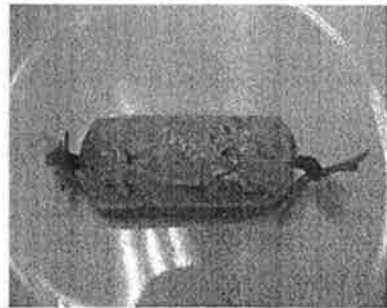
결과는 두부를 원재료로 이용하여 다양한 가공식품을 개발하는데 있어 transglutaminase를 효과적인 물성개량제 및 물성증진제로써의 광범위한 이용가능성을 기대할 수 있다.

두부소세지의 가열처리

<Casing 성형>



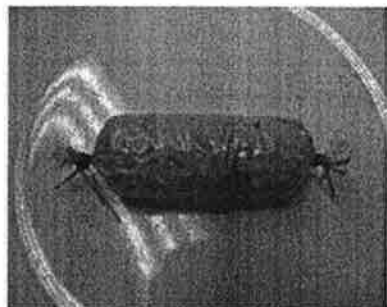
효소농도 0 ppm



효소농도 3,000 ppm



효소농도 5,000 ppm



효소농도 7,000 ppm

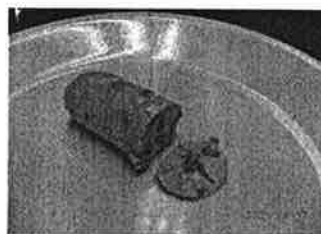
두부소세지의 sliceability



효소농도 0 ppm



효소농도 3,000 ppm



효소농도 5,000 ppm

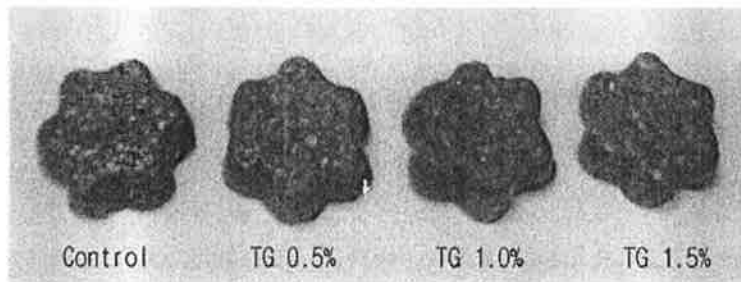


효소농도 7,000 ppm

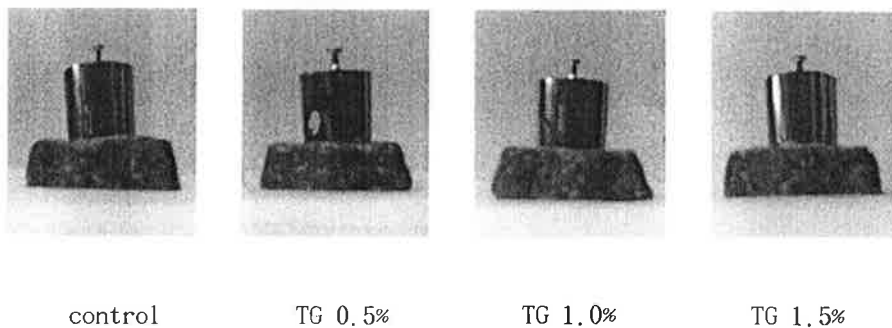
효소를 첨가하여 제조한 두부 소세지를 가열처리하여 칼로 썰었을 때의 sliceability 를 비교한 결과, 효소를 첨가하지 않은 시료의 경우 썰는 순간 두부 소세지가 부서지고 썰어놓은 단면이 재구성할 수 없는 형태이었으나, 효소를 3000 ppm이상 첨가한 시료군에서는 썰는 단면이 균질하게 남아있었고 썰어놓은 단면은 부서짐없이 균질한 상태였다. 따라서, 두부를 이용한 전통식품 개발 등에 transglutaminase를 이용할 경우 물성개량 효과를 도모할 수 있을뿐 아니라 기능성 첨가물 소재원으로 이용가치가 기대된다.

효소를 이용한 전통 육제품(너비아니)의 물성증진 효과

(1) 성형후



(2) 100g 추를 올려놓았을때



(3) 200g 추를 올려놓았을 때



control



TG 0.5%



TG 1.0%



TG 1.5%

(4) 500g 추를 올려놓았을 때



control



TG 0.5%



TG 1.0%



TG 1.5%



control



TG 0.5%

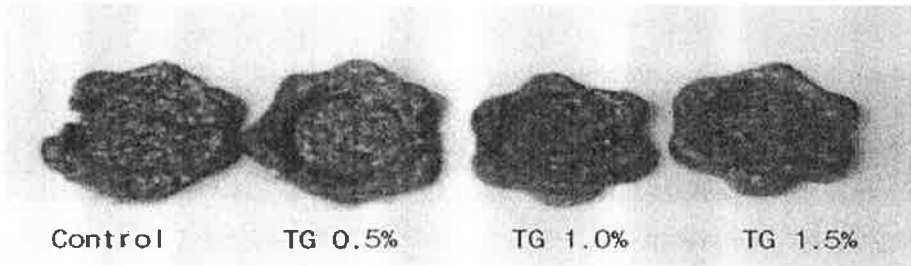


TG 1.0%



TG 1.5%

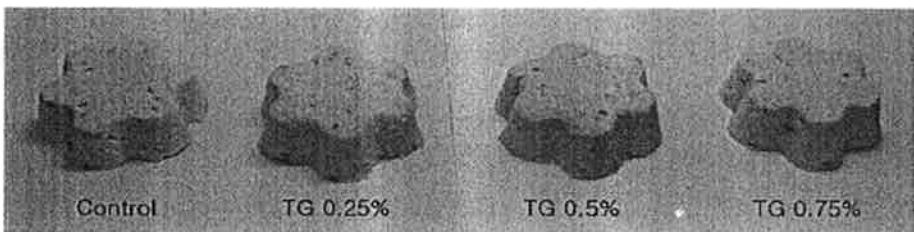
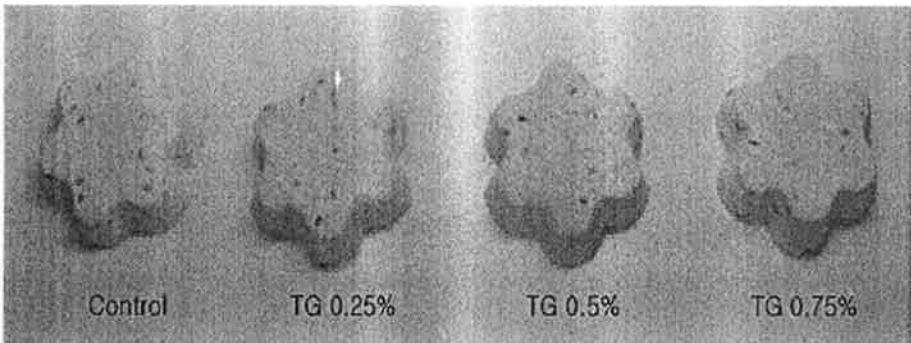
(5) 압착 실험 후

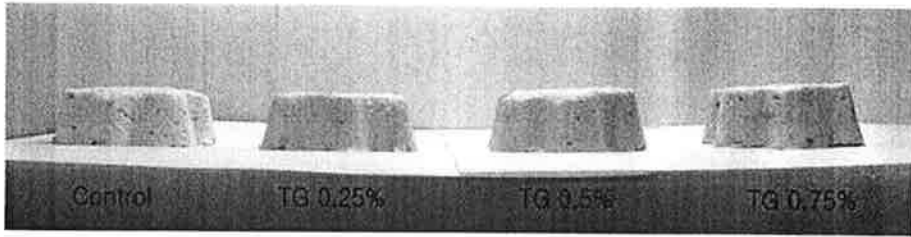


탄 성 증가/접착성 감소/보수력 증가

효소를 이용한 두부완자의 물성증진 효과

(1) 성형 후





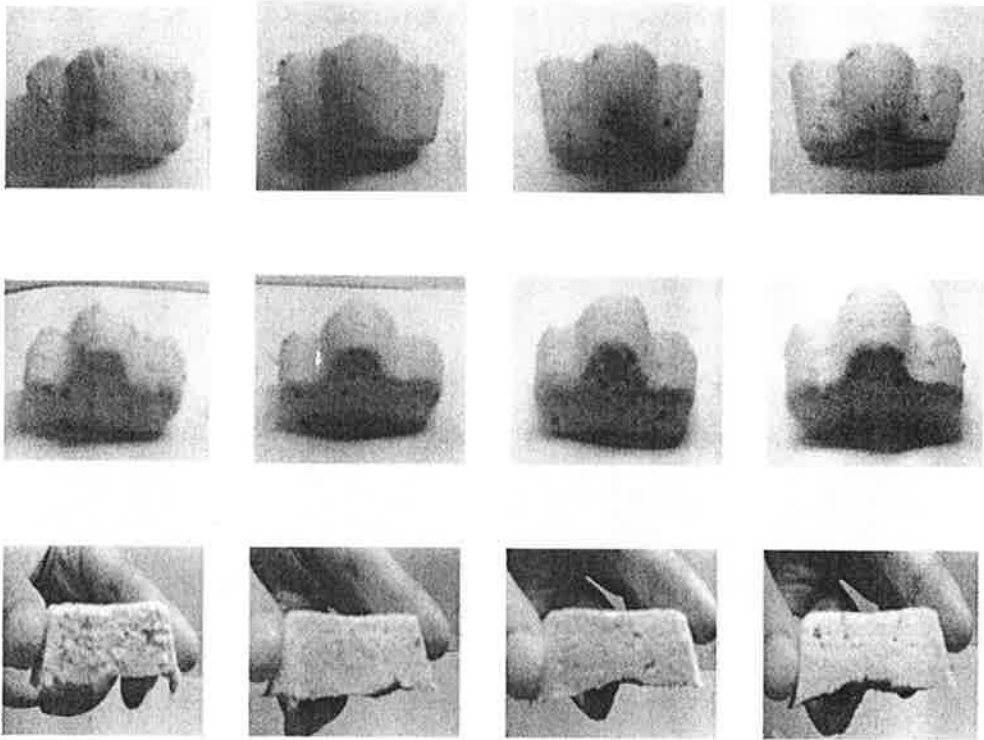
(2) 형태

시료 1

시료 2

시료 3

시료 4



효소농도 0 %

효소농도 0.25%

효소농도 0.5%

효소농도 0.75%

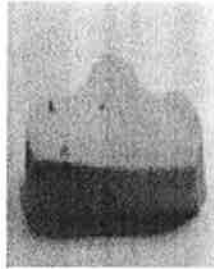


균질성 증가
조밀도 증가
탄 성 증가

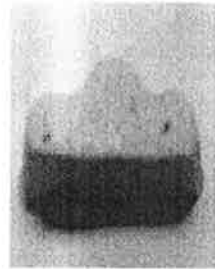
(3) 부스러짐 실험



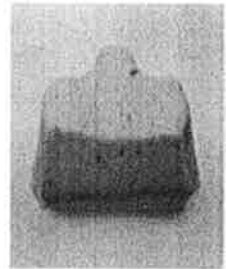
효소농도 0 %



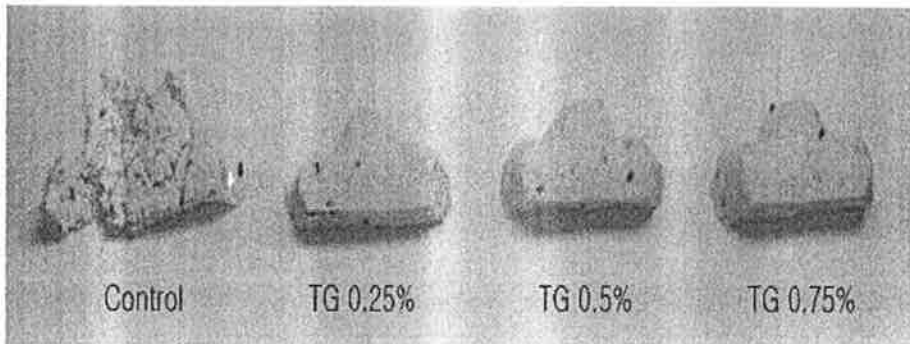
효소농도 0.25%



효소농도 0.5%



효소농도 0.75%



Control

TG 0.25%

TG 0.5%

TG 0.75%



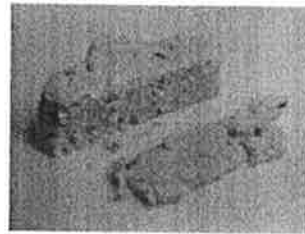
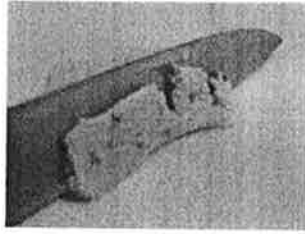
부스러짐 감소

탄 성 증가

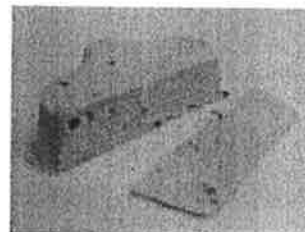
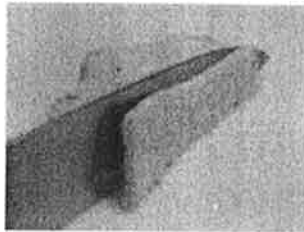
성 형 성 유지

(4) sliceability

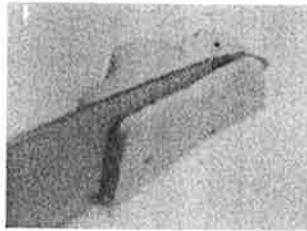
① 효소농도 0%



② 효소농도 0.25%



③ 효소농도 0.5%



④ 효소농도 0.75%



제 4 절 참 고 문 헌

- 김강성 : Acetylation이 포도당과 함께 저장 중에 있는 콩단백질의 기능에 미치는 영향, 한국과학기술원, (1986)
- 김세란 : 황금콩 종으로부터 분리한 Glycinin의 이화학적 특성과 말레일화가 Glycinin 기능적 특성에 미치는 영향에 관한 연구, 서울 여자 대학교 박사학위, (2000)
- 현은희, 강영주 : 미생물 Transglutaminase에 의한 유채단백질의 겔화, 한국식품과학회지, 31(5), 1262-1267 (1999)
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura A., Nonaka M., Uchio R., Tanaka H. and Motoki M. : Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganism, *Agric. Biol. Chem.*, 53(10), 2613-2617 (1989)
- Boatright W.L. and Hetiarachchy N.S. : Spray-Dried Soy Protein Isolate Solubility, Gelling Characteristics, and Extractable Protein as Affected by Antioxidants, *J. Food Sci.*, 60(4), 806-809 (1995)
- Chanyongvorakul Y., Matsumura Y., Nonaka M., Motoki M., and Mori T. : Physical Properties of Soy Bean and Broad Bean 11S Globulin Gels Formed by Transglutaminase Reaction, *J. Food Sci.*, 60(3), 483-488 (1995)
- Chanyongvorakul Y., Matsumura Y., Sakamoto H. and Motoki M. : Gelation of Bean 11S Globulins by Ca²⁺-Independent Transglutaminase, *Biosci. Biotech. Biochem.* 58(5), 864-869 (1994)
- Choi Y.R., Lusas E.W. and Rhee K.C. : Effects of Acylation of Defatted Cottonseed Flour with Various Acid Anhydrides on Protein Extractability and Functional Properties of Resulting Protein Isolates. *J. Food Sci.*, 47.

1713-1716 (1982)

- Clark A.H. and Lee-Tuffnell C.D. : Gelation of globular proteins, *Functional properties of Food Macromolecules*, p203 (1986)
- Damodaran S. : Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process : effect on gelation, *J. Agric. Food Chem.* 36(2), 262-269 (1988)
- Derbyshire E., Wright D.J. and Boulter D. : Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds, *Phytochemistry*, 15(1), 3-24 (1976)
- Dickinson E. and Yamamoto : Rheology of Milk Protein Gel and protein-Stabilized Emulsion Gels Cross-Linked with Transglutaminase, *J. Agric. Food Chem.*, 44(6), 1371-1377 (1996)
- Dufour E., Rovert P., Renard D. and Llamas G. : Investigation of β -Lactoglobulin Gelation in Water/Ethanol Solutions, *Int. Dairy J.*, 8(2) 87-93 (1998)
- El F.E., Babiker, Hiroyuki A., Matsudomi N., Iwata H., Ogawa T., Bando N, and Kato A. : Effect of Polysaccharide Conjugation or Transglutaminase Treatment on the Allergenicity and Functional Properties of Soy Protein, *J. Agric. Food Chem.* 46(3), 866-871 (1998)
- Gerrard J.A., Fayle S.E., Wilson A.J., Newberry M.p., Ross M. and Kavale S. : Dough Properties and Crumb Strength of White Pan Bread as Affected by Microbial Transglutaminase. *J. Food Chem.*, 60(3), 472-475 (1998)
- German B., Damodaran S., and Kinsella J. E. : Thermal dissociation and association of soy proteins, *J. Agric. Food Chem.* 30(5), 807-811 (1982)
- Giese J., Associate Editor: Proteins as Ingredients : Types, Functions, Applications, *Food Techno.*, 10(1), 50-56 (1994)

- Guo S.T., Tomotada O., and Masayuki M. : Incorporation of Soy Milk Lipid into Protein Coagulum by Addition of Calcium Chloride, *J. Agric. Food Chem.* 47(3), 901-905 (1999)
- Hamm : In Recent Advances in Food Science, vol III, Butterworths, p218 (1963)
- Han X.Q. and Damodaran S. : Thermodynamic Compatibility of Substrate Proteins Affects Their Cross-linking by Transglutaminase, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1211-1217 (1996)
- Hasler, C.M., : Functional Foods :Their role in disease prevention and health promotion, *Food Technol.* 52(1), 63-70 (1998)
- Imm J.Y., Lian P. and Lee C.M.: Gelation and Water Binding Properties of Transglutaminase-treated Skim Milk Powder, *Food Chemi, and Toxicol.*, 65(2), 200-205 (2000)
- Kang I.J., Matsumura Y., Ikura K., Motoki M., Sakamoto H. and Mori T. : Gelation and gel properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalyzed system, *J. Agric. Food Chem.* 42(1), 159-165 (1994)
- Kang, Y.J. : Enzymatic modification of soy proteins : Effect of functional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis, *Kor. J. Food Sci. Tech.*, 19(2), 211-217 (1984)
- Kim, C.H., Kim, H.S., Jung, Y.H, and Kang, Y.J. : The hydrolysis conditions of rapiered protein by protenase, *J. Kore. Soc. Food Nutr.*, 21(5), 513-518 (1992)
- Kinsella J.E : Functional properties of soy proteins, *J. Am. Oil. Soc.* 56(3), 242-258 (1979)

- Kohyama K., Sano Y. and Doi E. : Rheological Characteristics and Gelation Mechanism of Tofu (Soy Crud). *J. Agric. Food Chem.* 43, 1808-1812 (1995)
- Kumazawa Y., Numazawa T. Seguro K. and Motoki M. : Suppression of Surimi Gel Setting by Transglutaminase Inhibitors. *J. Food Sci.* 60(4), 715-717 (1995)
- Larre C., Kedzior Z.M., Chenu M.G., Viroben G. and Gueguen J. : Action of Transglutaminase on an 11S Seed Protein (Pea Legumin) : Influence of the Substrate Conformation, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1121-1126 (1992)
- Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 (1970)
- Lee D.S. : Studies on Mechanism of Polymerization of Food Proteins by Transglutaminase from Mammalian and Microbial Origins, (1997)
- Lee H.G., Lanier T.C. and Hamn D.D. : Covalent Cross-linking Effects on Thermo-Rheological Profiles of Fish Protein Gels. *J. Food Sci.* 60(1), 25-32 (1997)
- Lim T.L., Mine Y, and Tung M.A: Transglutaminase Cross-Linked Egg White Protein Films : Tensile Properties and Oxygen Permeability. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4022-4029 (1998)
- Mofihara, K. : Using proteases in perptide synthisis. *Trend. Biotech.*, 5(1), 164-170 (1987)
- Mori T., Utsmi S., Inaba H., Kitamura K. and Kyuya Harada: Differences in Subunit Composition of Glycinin among Soybean Cultivates, *J. Agric. Food Chem.*, 29(1), 20-23 (1981)
- Mori T., Nakamura T. and Utsumi S. : Gelation mechanism of soybean 11S globulin : formation of soluble aggregation as transient intermediate, *J. Food Sci.* 47(1), 26-30 (1982)

- Nio N., Motoki M. and Takinami K.: Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase, *Agric. Biol. Chem.*, 49(8), 2283-2286 (1985)
- Nonaka M., Tabaja H., Okiyama A., Motoki M., Ando H., Umeda K. and Matsuura A.: Polymerization of several proteins by Ca²⁺-independent transglutaminase derived from microorganisms, *Agric. Biol. Chem.*, 53(10), 2619-2623 (1989)
- Oe H., Hirose M. and Doi E.: Conformation Changes and Subsequent Gelation of Conalbumin by a Thial Reagent, *Agric. Biol. Chem.*, 50(10), 2469-2475 (1986)
- Owen R.F. : Food chemistry, Deller, P358-363 (1985)
- Petrucelli S. and Anon M.C. : Partial Reduction of Soy Protein Isolate Bonds, *J. Agric. Food Chem.* 43(8), 2001-2006 (1995)
- Petrucelli S. and Anon M. C. : Thermal Aggregation of Soy Protein Isolates, *J. Agric. Food Chem.* 43(12), 3035-3041 (1995)
- Sakamoto H., Yamazaki K., Kaga C., Yamamoto Y., Ito Y., and Kurosawa Y. (1996) Strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during Chinese noodle processing *Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi* 43(5) 598-605
- Sathe S.K., Mason A.C. and Weaver C.M. : Thermal Aggregation of Soybean (Glycine max L.) Sulfur-rich Protein, *J. Food Scien.*, 54(2), 319-323 (1989)
- Seguro K., Kumazawa Y., Ohtsuka T., Toiguchi S. and Motoki M. : Microbial transglutaminase and ϵ -(γ -glutamyl)lysine Crosslink Effects on Elastic Properties of Kamaboko Gels, *J. Food Scien.*, 60(2), 305-311 (1995)
- Soeda, K.A. : Study of new protein ingredient by transglut aminase, *Shouhing Kougok*, 12, 18-25 (1997)
- Soeda T., Ishi T., Yamazaki K. and Kurasawa K.: The effect of transglutaminase on texture of tofu *Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi* 42(4)

254-261 (1995)

Staswick P.E., Hermodson M.A., and Nielsen N.C. : Identification of the cysteines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits, *J. Biol. Chem.* 259, 13431 (1984)

Tanimoto, S. Y. and Kinsella, J. E. : Enzymatic Modification of Proteins : Effects of Transglutaminase Cross-Linking on Some Physical Properties of β -Lactoglobulin, *J. Agric. Food Chem.* 36, 281-285 (1988)

Thanh, V. H., and Shibasaki, K. : The heterogeneity of 7S soybean protein by sepharose gel chromatography and disc gel electrophoresis. *Agric. Biol. Chem.* 39, 1501-1506 (1975)

Tsai G.J., Lin S.M. and Jiang S.T. : Transglutaminase from *Streptovercillium ladakanum* and application to minced fish product, *J. Food Scien.* 61(6), 1234-1238 (1996)

Utsumi S. , Nakamura T., Harada K. and Mori T. : Occurrence of Dissociable and Undissociable Soybean Glycinin, *Agric. Biol. Chem.*, 51(8), 2139-2144 (1987)

Yildirim M. and Hettiarachchy N.S. : Biopolymers Produced by Cross-linkng Soybean 11S Globulin with Whey Proteins using Transglutaminase, *J. Food Scien.*, 62(2), 270-275 (1997)

Yildirim M., Hettiarachchy N.S., Kalapathy U. : Properties of Biopolymers of from Cross-linking Whey Protein Isoate and Soybean 11S Globulin, *J. Food Sci.* 61(6), 1129-1131 (1996)