

## MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 소가족과 물소가족의 감별법

김태우 · 홍태기<sup>†</sup>

한서대학교 화학과

## Identification of Bovine Leather and Water Buffalo Leather Using MALDI-TOF MS

Tae-Woo Kim and Tae-Kee Hong<sup>†</sup>

Department of Chemistry, Hanseo University, Seosan-Si, 31962, Korea

Received February 21, 2017/Revised March 15, 2017/Accepted March 20, 2017

This study was performed to develop a reliable method for identifying distinct animal species of finished leather products, using MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry). A series of leather samples from two different species of Bovidae, bovine (*Bos taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*), were used as controls to ensure the validity of the method. The samples were treated in 2-mercaptoethanol to destroy the disulfide bridges of the protein chains and were then digested with trypsin, an endoproteolytic enzyme, to cleave the protein chain into peptides containing lysine (K) and arginine (R) residues. The modified peptides were mixed with an HCCA matrix ( $\alpha$ -cyano hydroxycinnamic acid) to form the sample/matrix composition. This mixture was then eluted onto a steel target plate and ionized by laser. The formed pool of cleaved peptides was measured by MALDI-TOF MS and arranged according to their molecular weight to charge ratio (m/z). The comparison of the mass spectra allowed the investigation of species-specific peaks between bovine and water buffalo leather. Traditional microscopic methods were used to verify consistency with the experimental values determined by MALDI-TOF MS.

**Key words:** Identification, Bovine leather, Water buffalo leather, MALDI-TOF MS

### 1. 서 론

공산품으로서 가죽(leather)의 종류를 표시하는 방법은 각 국가별로 다르다. 우리나라에서는 품질경영 및 공산품 안전관리법으로 안전·품질표시대상공산품을 지정하여 제조업자 또는 수입업자가 산업통산자원부장관이 정한 고시에 따라 적합한 표시를 해야 하는 제도가 운용되고 있다.<sup>1)</sup> 가죽제품은 품질경영 및 공산품안전관리법에 의하여 지정된 안전·품질표시대상공산품으로 안전품질표시 부속서 3에 의하여 개별제품에 표시사항을 부착하여야 하며, 천연 가죽은 재료의 종류를 표시할 때 반드시 동물명을 부기하여야 하는데 동물명은 동물종(animal species)의 통칭을 사용하도록 정해져 있다.<sup>1)</sup>

또한, 일본의 잡화공업품품질표시규정에서는 피혁의 종류를 표시할 때, 표피가 있는 가죽의 은면가죽(grain leather)에 대해서는 동물의 종을 표시하도록 정하고 있다.<sup>2)</sup> 이러한 이유로 가죽의 동물 종을 감별하는 시험방법에 대한 필요성이 요구되고 있으나 가죽의 동물 종을 감별하는 국제표준, 국가표준 또는 단체표준은 현재 존재하지 않으며 현미경을 이용하여 모공의 형태를 관찰하는데 경험에 의존하는 방법이 주로 이용되고 있다.

털을 제거하지 않은 가죽인 모피에서는 전자현미경을 이용한 동물종 감별에 대한 체계적인 연구가 1979년에서 1985년 동안 130종의 모피의 미세구조를 상세히 기록한 'Fur Skin Project'에 의하여 이루어졌다.<sup>3)</sup> 이 프로젝트에서 모피의 스킨 구조, 모공의 형태, 큐티클 스

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-41-660-1333, E-mail: tkhong1@hanseo.ac.kr

케일(cuticular scales)의 패턴 등 미세구조 특성을 코딩과 디지털화를 통하여 방대한 분량의 데이터를 컴퓨터 프로그래밍으로 대조하였다.<sup>3,4)</sup> Atlas of Microscopic Structure of Fur Skin이 1989년에 출판되어 51종의 모피에 대하여 기술하였으며,<sup>5)</sup> 1994년 모피의 미세구조 연구는 새로 83종이 추가되어 전체 134종의 시료가 디지털화 되었다.<sup>3)</sup>

가죽은 피혁제조과정 중 탈모공정에서 털이 제거되기 때문에 동물 털의 미세구조에서 얻을 수 있는 정보를 이용할 수가 없다. 다만, 털이 제거되고 남은 모공으로부터 털의 굵기를 추정하고 모공간의 간격 등을 참고하여 감별할 수 있다.

경험에 의존하는 고전적 현미경분석법의 대안으로 신뢰도를 높이기 위한 다양한 방법들이 지난 10여 년 동안 개발되었다. SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 단백질 분리 후 질량분석기로 분석하는 방법, 유전자 증폭 반응(PCR)을 이용한 DNA 분석, 면역학적 방법 등이 제안되고 있으나 가죽은 제조과정 중 필연적으로 물리적, 화학적 그리고 미생물적인 요인에 노출되기 때문에 적용이 매우 제한적이다.<sup>6-9)</sup> MALDI-TOF 질량분석기(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry)는 의료 목적으로 세균의 동정을 위하여 널리 이용되고 있으며, 이 기술은 각 세균이 가지고 있는 독특한 단백질 조성을 분석하여 데이터베이스화하고 소프트웨어로 비교하여 세균을 동정한다.

주로 미생물의 동정에 이용되던 MALDI-TOF 질량분석기를 동물의 종 감별 방법으로 확대하여 적용한 연구는 2000년대 초부터 이루어졌다.<sup>10,11)</sup> 1991년 오스트리아와 이탈리아 국경의 알프스에서 Oetzi라고 불리는 미라가 다양한 종류의 모피로 만든 옷들과 도구와 함께 발견되었고, Klaus Hollymeyer 등(2009)이 발견된 유물을 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 분석한 연구결과를 발표하였다.<sup>12)</sup>

현대의 피혁제조공정이 수침, 탈모, 탈회, 침산, 유제, 염색 그리고 도장 등 다양한 공정을 이용하므로 화학 물질과 열에 노출된다.<sup>13)</sup> 본 연구는 피혁 제조공정을 거쳐 가공된 가죽제품에 대하여 신속하고 정확한 동물 종 분석방법의 필요성을 충족하기 위하여 MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 분석법의 적용 가능성을 확인하려 한다. 이를 위하여 상업적으로 판매되는 염색 가공된 소가죽과 물소가죽에 대하여 스테레오 현미경을 이용한 경험적 분석법과 MALDI-TOF 질량분석법을 이용하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 시료

상업적으로 판매되는 염색된 가죽 제품을 사용하였으며, 은면층을 제거한 스플릿 가죽은 연구 대상에서 배제하였다. 표면에 모공이 있는 은면가죽을 대상으로 하여 모공의 패턴을 현미경 관찰함으로써 질량분석 결과와 일치성을 확인하기 위하여 소가죽(A-1~A-10)과 물소가죽(B-1~B-10)을 각각 10개씩 준비하였다.

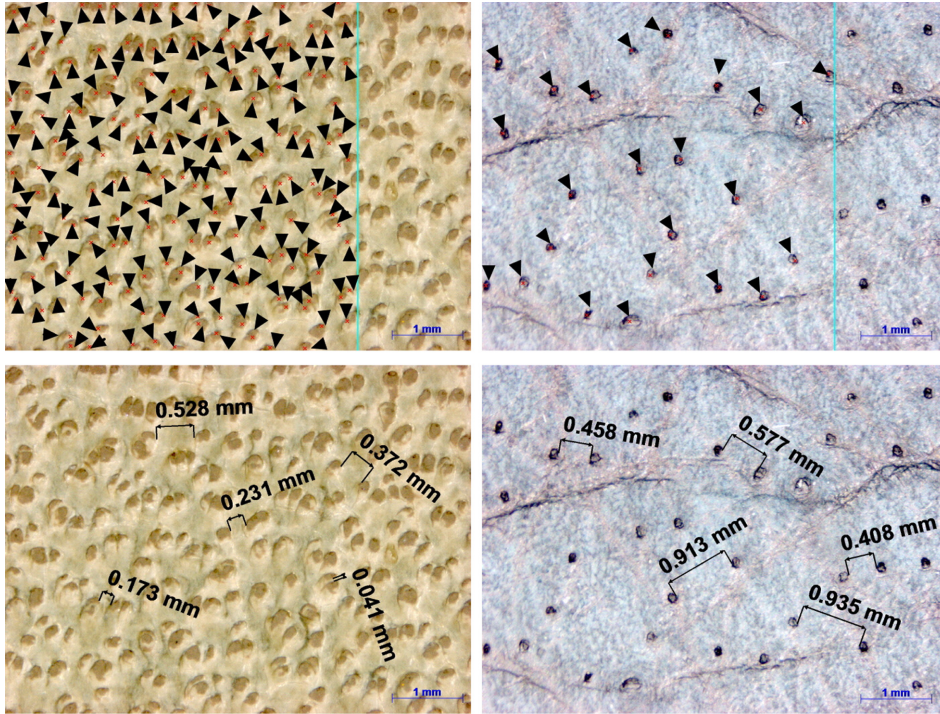
### 2.2. 스테레오 현미경 분석

시료로부터 가로 세로 약 10 cm의 시험편을 취하여 아세톤과 면봉을 사용하여 가죽의 표면을 문질러 도장을 벗겨낸 다음, 스테레오 현미경을 사용하여 가죽 표면의 모공 형태를 관찰하였다. 스테레오 현미경은 ZEISS사의 SteREO Discovery. V8을 사용하였고 배율은 30배로 하였다. 디지털 이미지를 얻기 위하여 AxioCam ICc 1을 사용하였고 측정을 위한 이미지 프로세서 소프트웨어는 AxioVision을 사용하였다.

### 2.3. MALDI-TOF 질량분석

가죽 시료를 잘게 부셔 4.0 mg을 1.5 mL 마이크로 튜브에 넣고 여기에 5% mercaptoethanol이 포함된 25 mM ABC buffer 용액 100  $\mu$ L를 넣은 다음, 볼텍스 믹서에서 약 30초간 분쇄하여 시료와 용액이 잘 혼합되도록 한 후에 시료가 용액에 충분히 잠길 수 있도록 12,000 g에서 약 1분간 원심분리를 수행하였다. 원심분리가 끝난 시료는 Thermomixer에서 95°C를 유지하고 650 rpm으로 흔들어 주며 30분간 인큐베이션(incubation)하였다. 인큐베이션이 끝나면 시료는 다시 12,000 g에서 1분간 원심분리하고, 20분간 얼음 속에 담가 두어 충분히 식혀 주었다. 여기에 25 mM ABC buffer를 사용하여 만든 2.5 mg/mL 농도의 trypsin 용액 100  $\mu$ L를 넣고, 잘 섞어준 다음에 Thermomixer에서 37°C를 유지하고, 650 rpm으로 흔들어 주며 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 다시 12,000 g에서 1분간 원심분리를 수행하였다. 원심분리가 끝난 시료의 상등액 5  $\mu$ L의 분취하여 50  $\mu$ L HCCA( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 매트릭스 용액과 잘 섞은 후에 이중 1  $\mu$ L를 MALDI-TOF 타겟 위에 떨어뜨리고 약 15분간 공기 중에서 건조시킨 후 MALDI-TOF 질량분석을 수행하였다.

MALDI-TOF 질량분석기는 Bruker Daltonics사의



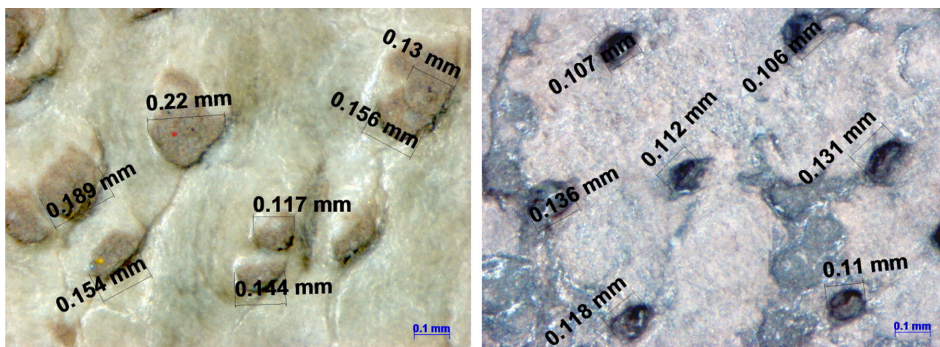
**Fig. 1.** Hair follicle counts (top) and the distance between follicles (bottom) of samples A-1 (bovine leather, left) and B-1 (water buffalo leather, right).

autoflex speed 모델을 사용하였다. 타겟 플레이트는 MTP 384 target ground steel TF를 사용하였다. 분석조건은 positive mode, ion source voltage 19 kV, reflector voltage 21 kV에서 실시하였다. 분석 후, Flash detector, 2-GHz digitizer를 이용하여 피크를 인식하였다. 피크를 인식하는 resolution은 8,000 이상이며, 질량 범위 (1,000 - 4,000) Da에서 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 스테레오 광학현미경 관찰 결과

소가죽과 물소가죽 표면 특성의 차이를 확인하기 위하여 동일면적에서 관찰되는 모공의 개수, 모공과 모공 사이의 간격 그리고 모공의 크기를 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 5 mm × 5 mm 면적 내에서 모공이 관찰되는 빈도수는 소가죽이 183개, 물소가죽이



**Fig. 2.** Hair follicle size of samples A-1 (bovine leather, left) and B-1 (water buffalo leather, right).

**Table 1.** Hair follicle size of samples A-1 (bovine leather) and B-1 (water buffalo leather)

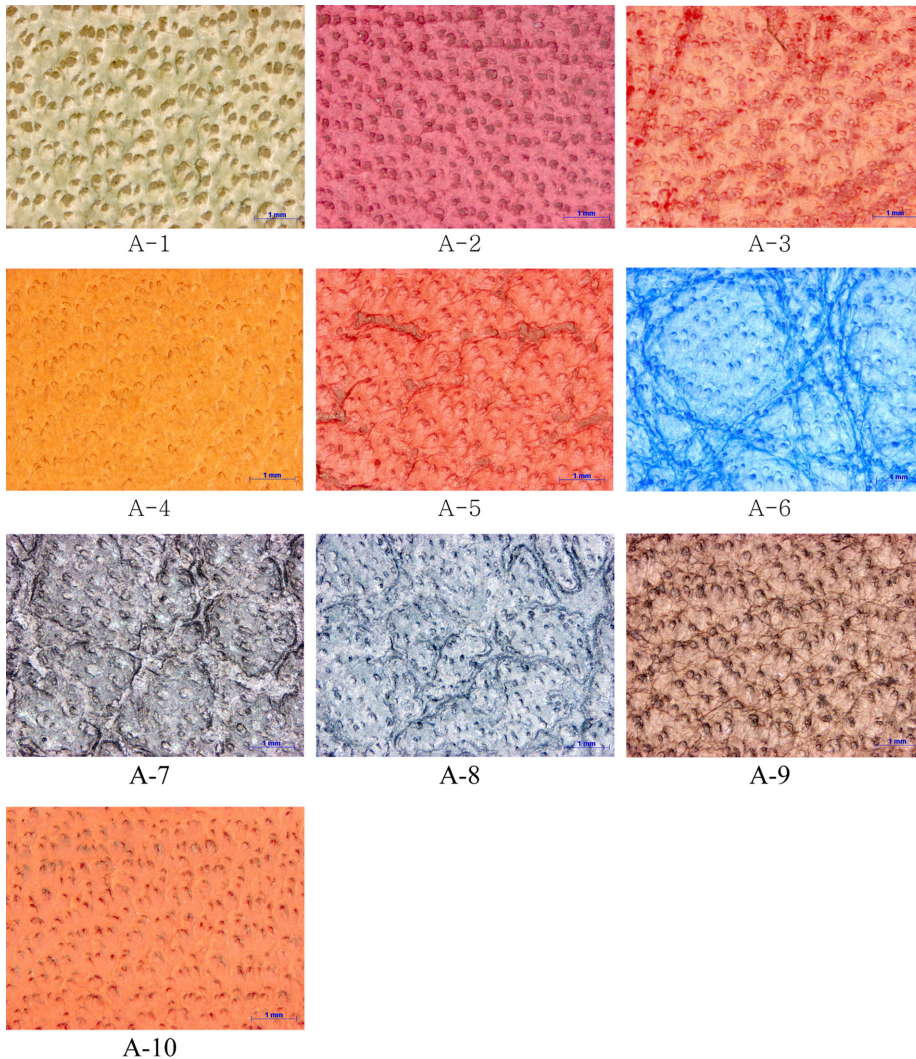
	Hair follicle size (mm)							Mean	SD	CV(%)
	1	2	3	4	5	6	7			
A-1	0.130	0.156	0.220	0.189	0.117	0.154	0.144	0.159	0.033	20.6
B-1	0.107	0.136	0.112	0.106	0.131	0.118	0.110	0.117	0.011	9.4

SD: Standard Deviation, CV: Coefficient of Variance

24개로 측정되었다. 소가죽의 표면은 동일 면적에서 모공이 관찰되는 빈도수가 물소가죽에 비하여 상대적으로 높다. 소가죽의 모공과 모공 사이 간격은 물소가죽에 비하여 상대적으로 가깝고 때로는 서로 인접하여 있는 것이 관찰되는 반면에 물소가죽의 모공과 모공 사

이 간격은 상대적으로 떨어져 있다.

소가죽과 물소가죽의 모공 크기는 Fig. 2와 Table 1에 나타내었다. Anton Blažej 등의 모피 구조 연구에 따르면 소의 모피는 굵기가 가는 솜털(fine fibers)과 중간 굵기의 헤어(intermediate hair), 그리고 가드 헤

**Fig. 3.** Light microscopy images of bovine leather samples.

어(guard hairs)로 구성되어 있다.<sup>5)</sup> 즉, 소의 모피는 섬유(fibers)와 헤어(hairs)로 구성된 2중 구조인 것으로 알려져 있다.

털을 제거한 소가죽의 표면에서도 이러한 2중 구조가 관찰되었다. Fig. 2의 소가죽 표면 확대 사진에서 직경이 큰 모공과 작은 모공이 함께 분포함을 볼 수 있다. 측정된 모공의 평균 직경은 0.159 mm였고 CV가 20.6%로 높게 나타났다.

물소는 모피로 사용되지 않기 때문에 물소 모피의 표면 구조에 대한 자료는 확인할 수 없었다. 물소는 주로 열대지방에서 서식하기 때문에 털의 구조가 가드 헤어로만 존재하는 단일 구조(single coat)일 것으로 추정된

다. Fig. 3의 현미경 사진에서 물소가죽의 모공 크기는 소가죽에 비하여 일정함을 볼 수 있다. 측정된 모공의 평균 직경은 0.117 mm였고 CV는 9.4%로 직경의 분포가 상대적으로 균일한 것으로 나타났다.

A-1과 B-1을 대표로 하여 측정된 모공과 모공 사이의 간격, 일정면적에 관찰되는 모공의 빈도 그리고 모공의 크기분포에서 상대적인 차이를 정성적으로 확인하기 위하여 소가죽과 물소가죽 전체 시료에 대한 현미경 사진을 Figs. 3과 4에 나타내었다. 스테레오 현미경을 이용한 가죽 표면의 모공 분석으로부터 소가죽의 스킨 구조는 헤어와 화이버로 구성된 2중 구조임이 확인되며, 물소가죽의 스킨 구조는 헤어로 구성된 단일

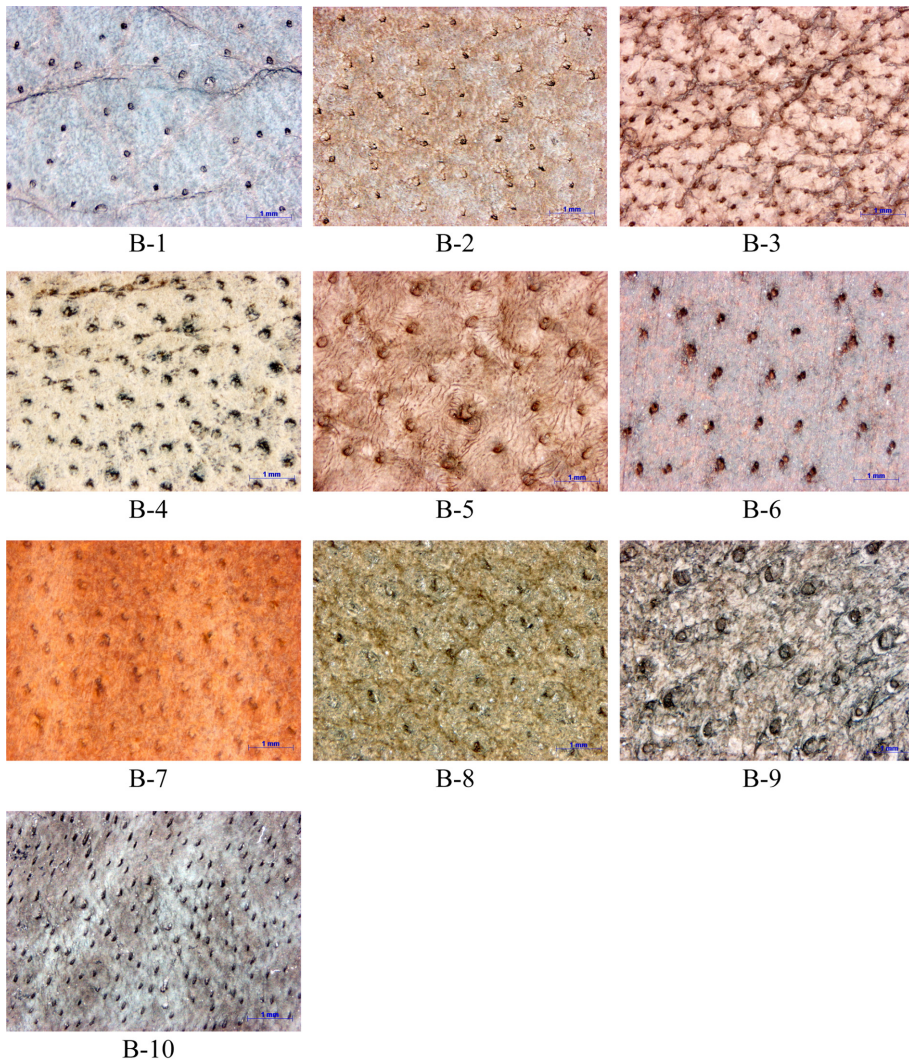


Fig. 4. Light microscopy images of water buffalo leather samples.

구조임이 확인된다. 두 시리즈의 시료에서 이러한 스킨 구조의 차이는 일관되게 나타나며 서로 구분이 가능하였다. 다만, 가죽은 천연의 재료이기 때문에 기본적으로 불균제하며 가죽으로 사용된 부위, 동물의 나이 그리고 가공 방법에 따라 스킨 구조는 달라질 가능성이 있다.

### 3.2. MALDI-TOF 질량분석 결과

소가죽과 물소가죽 중 A-1과 B-1을 대표로 선정하여 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 전하-대-질량비( $m/z$ )를 1050에서 2200 범위까지 분석하여 Fig. 5에 도시하였다. 가죽으로 사용되는 동물 중 돼지, 뱀, 악어 등에서는 관찰되지 않으면서 소와 물소에서 주로 관찰되는 질량값을 표시하였다. 이중에서 1192.7  $m/z$ , 1208.7  $m/z$ , 2131.1  $m/z$ 는 소과의 동물에서 나타나는 특이피크로 사용할 수 있는데 이는 Buckley, M.의 연구결과에서도 확인할 수 있다.<sup>14)</sup>

두 시료 모두 소과에서 나타나는 공통의 질량이 1105.6  $m/z$ , 1192.7  $m/z$ , 1208.7  $m/z$ , 1435.7  $m/z$ , 1648.9  $m/z$ , 2131.1  $m/z$ 에서 나타났으며, 피혁제조공정에서 가해지는 열과 화학물질에 영향을 받지 않고 MALDI-TOF 질량분석이 가능함을 확인하였다.

Fig. 6은 MALDI-TOF 질량분석 결과 중 A-1과 B-1을 대표로 선정하여  $m/z$  1400에서 1500 범위의 질량

스펙트럼을 도시하였다. 이중에서 1427.8  $m/z$ 와 1455.8  $m/z$ 는 각각 소와 물소를 구분할 수 있는 특이피크로 볼 수 있는데, 이는 Buckley, M.의 연구결과에서도 확인할 수 있다.<sup>14)</sup> Fig. 7은 MALDI-TOF 질량분석 결과 중 A-1과 B-1을 대표로 선정하여  $m/z$  2050에서 2150 범위의 질량 스펙트럼을 도시하였다.  $m/z$  2098은 A-1에만 나타나는 질량이 발견되었다.

소가죽과 물소가죽 중 A-1과 B-1을 대표로 선정하여 MALDI-TOF 질량분석을 하였을 때 나타난 특이 질량이 재현상을 나타내는지 확인하기 위하여 소가죽과 물소가죽 각각 10개의 시료에 MALDI-TOF 질량분석을 수행하였다. Fig. 8은 MALDI-TOF 질량분석 결과 중  $m/z$  1400에서 1500 범위의 질량 스펙트럼을 도시한 것이다. A-1에서 A-10까지 10개의 소가죽 시료에서 1427.8  $m/z$ 이 항상 나타남을 관찰할 수 있다. 그러나 B-1에서 B-10까지 10개의 물소가죽 시료에서는 1427.8  $m/z$ 이 나타나지 않았다. 따라서 1427.8  $m/z$ 는 소가죽에서만 나타나는 특이 질량임을 확인할 수 있다. 마찬가지로 B-1에서 B-10까지 10개의 물소가죽 시료에서는 1455.8  $m/z$ 가 항상 관찰된다. 그러나 A-1에서 A-10까지 10개의 소가죽 시료에서는 1455.8  $m/z$ 이 나타나지 않았다. 따라서 1455.8  $m/z$ 는 물소가죽에서만 나타나는 특이 질량임을 확인할 수 있다.

Fig. 9는 말디토프 질량분석 결과 중  $m/z$  2050에서

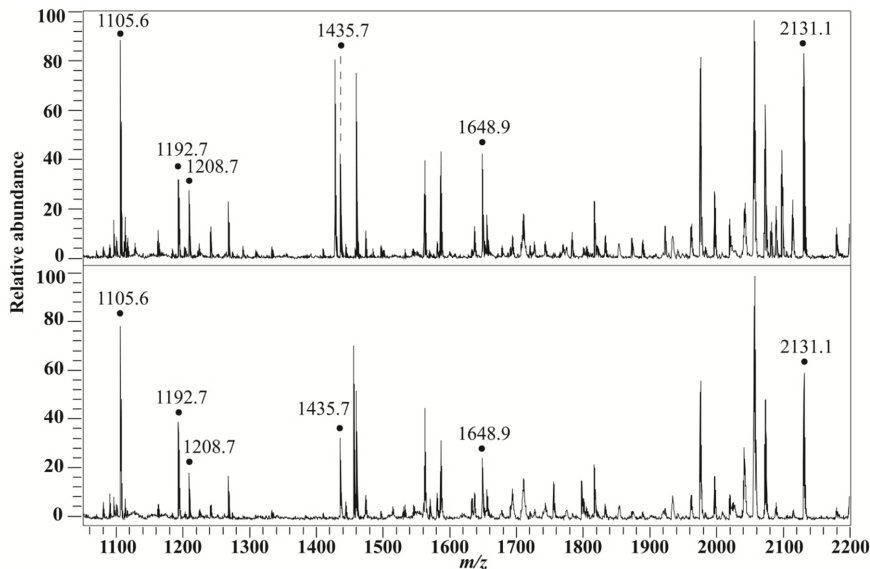


Fig. 5. MALDI-TOF mass spectra of samples A-1 (bovine leather, top) and B-1 (water buffalo leather, bottom) with a range of  $m/z$  1050-2200( $m/z$ ).

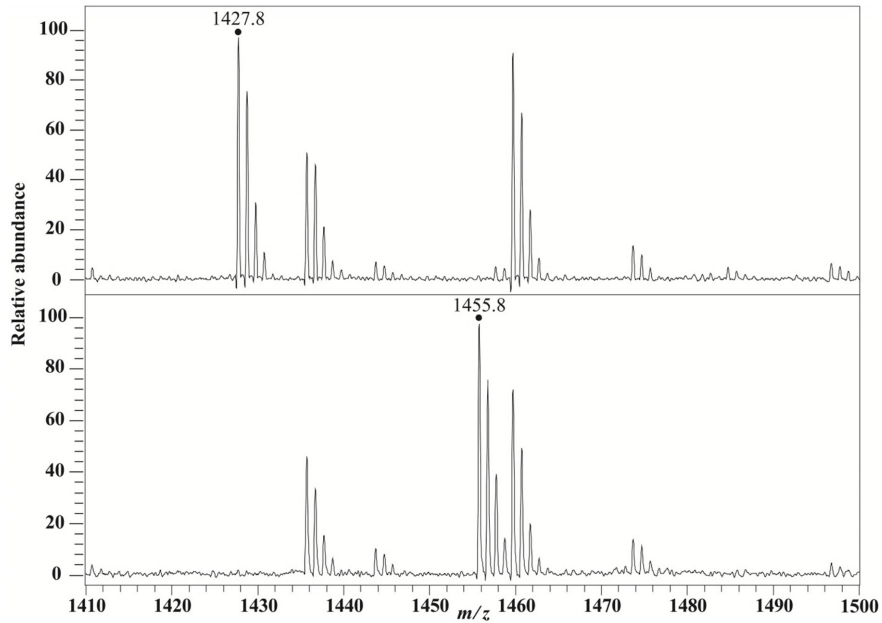


Fig. 6. MALDI-TOF mass spectra of A-1 (bovine leather, top) and B-1 (water buffalo leather, bottom) with a range of 1400-1500 ( $m/z$ ).

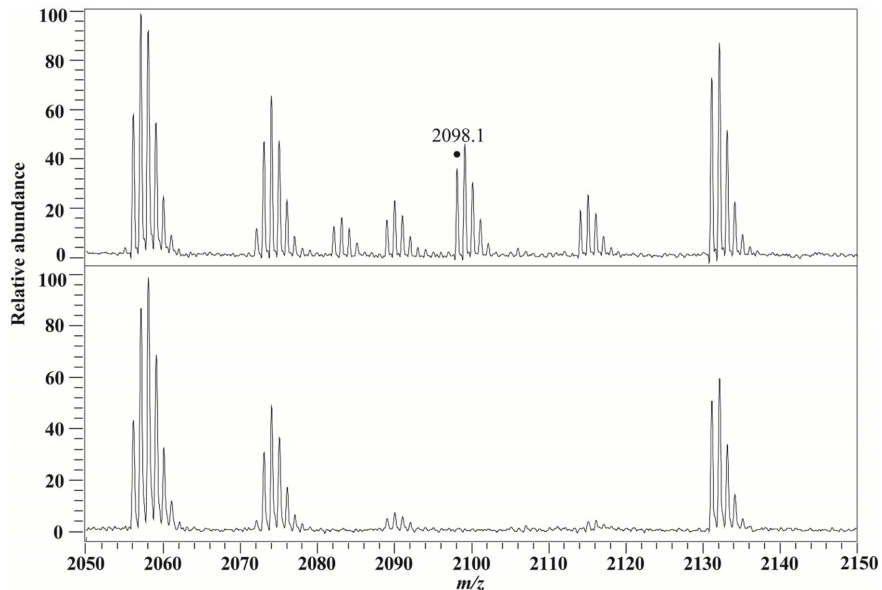


Fig. 7. MALDI-TOF mass spectra of A-1 (bovine leather, top) and B-1 (water buffalo leather, bottom) with a range of 2050-2150 ( $m/z$ ).

2150 범위의 질량 스펙트럼을 도기한 것이다. A-1에서 A-10까지 10개의 소가죽 시료에서  $m/z$  2098가 항상 나

타남을 관찰할 수 있다. 그러나 B-1에서 B-10까지 10개의 물소가죽 시료에서는  $m/z$  2098가 나타나지 않았다.

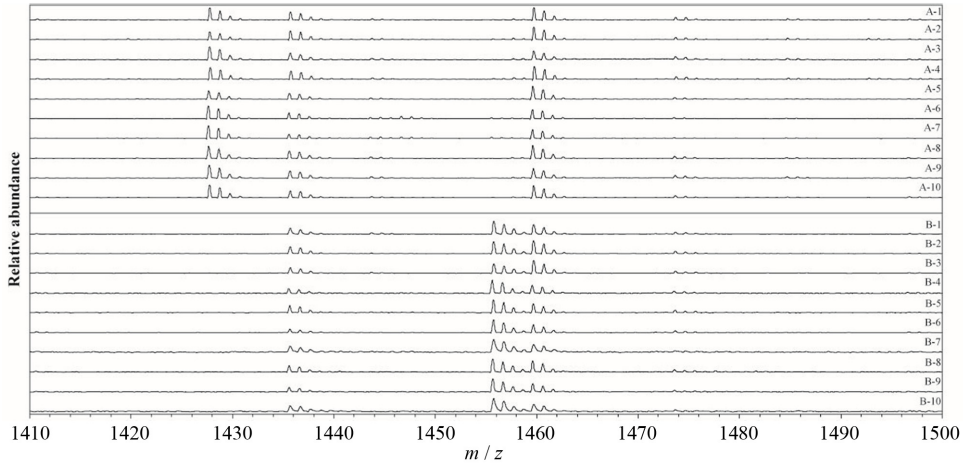


Fig. 8. MALDI-TOF mass spectra of bovine leather samples (top) and water buffalo leather samples (bottom) with a range of 1400-1500 (m/z).

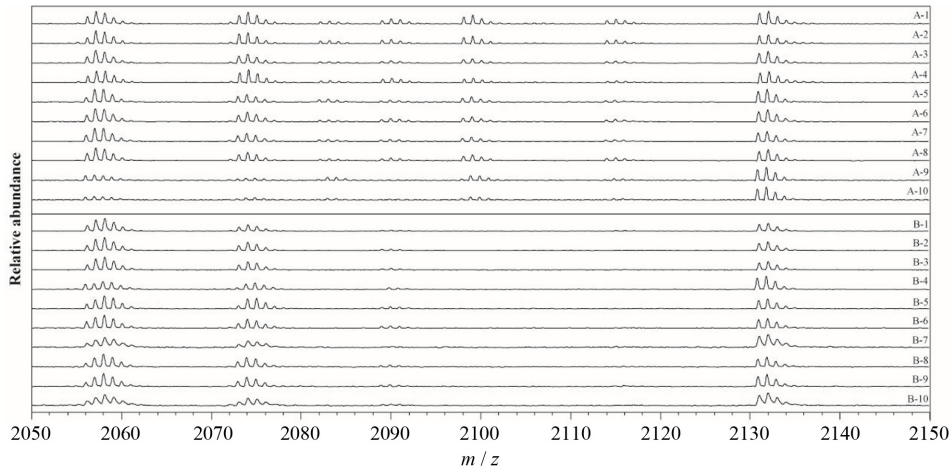


Fig. 9. MALDI-TOF mass spectra of bovine leather samples (top) and water buffalo leather samples (bottom) with a range of 2050-2150 (m/z).

Table 2. Common and diagnostic MALDI-TOF MS peaks in bovine leather and water buffalo leather (●: common, ◆: diagnostic)

	Mass (m/z)								
	1106	1193	1209	1428	1436	1455	1649	2098	2131
Bovine Leather	●	●	●	◆	●		●	◆	●
Water Buffalo Leather	●	●	●		●	◆	●		●

따라서 m/z 2098는 소가죽에서만 나타나는 특이 질량임을 확인할 수 있다.

m/z 2082와 m/z 2115도 소가죽에서만 관찰되지만, 신

호대 잡음비(S/N ratio)가 10 이하로 나타나 주된 특이 질량으로는 고려하지 않았다.

m/z 1000에서 2200 범위의 말디토프 질량분석으로

확인된 소가죽과 물소가죽의 공통 질량과 특이 질량을 Table 2에 나타내었다.

#### 4. 결 론

현대의 피혁 제조공정을 거쳐 가공된 가죽제품에 대하여 신뢰할 수 있는 동물종 분석방법을 개발하기 위하여 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 상업적으로 판매되는 염색 가공된 소가죽과 물소가죽을 대상으로 분석을 실행하였고 그 결과를 고전적인 현미경 분석의 결과와 부합하는지 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

스테레오 현미경을 이용한 가죽 표면의 모공 분석으로부터 소가죽의 스킨 구조는 헤어와 화이버로 구성된 2중 구조임을 확인할 수 있었고 물소가죽의 스킨 구조는 헤어로 구성된 단일 구조임을 확인할 수 있었다. 두 시리즈의 시료에서 이러한 스킨 구조의 차이는 일관되게 나타났으며 서로 구분이 가능하였다.

MALDI-TOF 질량분석에서 두 시리즈의 시료에서 소과(bovidae family)의 동물에서 나타나는 공통의 질량이 확인되었고, 각 종에서 나타나는 특이 질량이 확인되어 피혁제조공정에서 가해지는 열과 화학물질에 영향을 받지 않고 분석 가능성이 확인되었다. 두 종의 차이를 확인할 수 있는 소가죽의 특성 질량은 1427 m/z, 2098 m/z에서 물소가죽의 특성 질량은 1455 m/z에서 나타났다.

이 연구의 결과로부터 MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 천연가죽의 동물 종 감별방법은 숙련된 전문가가 현미경을 사용하여 경험에 의존하여 분석하는 고전적 방법을 대체할 수 있는 객관적인 시험방법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### 참고문헌

1. 국가기술표준원, <http://www.kats.go.kr>, January 2017.
2. Consumer Affairs Agency of Japan, <http://www.caa.go.jp>, January 2017.
3. Furskin Identification, <http://www.furskin.cz>, January 2017.
4. Anton Blažej, Antonin Galatik, Jan Galatik and Zdislav Krul, "Atlas of microscopic structures of fur skins 1", **1989**, 15-27, Elsevier Science, Netherlands.
5. Anton Blažej, Antonin Galatik, Jan Galatik and Zdislav Krul, "Atlas of microscopic structures of fur skins 1", **1989**, 106-374, Elsevier Science, Netherlands.
6. S. Ohashi, Y. Demura and Motoaki Sano, "Identification of cashmere fiber by using SDS-PAGE and MALDI-ToF mass spectrometry", *SENI GAKKAI-SHI*, **2012**, 68, 276.
7. E. J. Plowman, "The proteomics of keratin proteins", *Journal of Chromatography*, **2007**, 849, 181.
8. C. Tonetti, C. Vineis, A. Aluigi and C. Tonin, "Immunological method for the identification of animal hair fibres", *Textile Research Journal*, **2012**, 82, 766.
9. K. Kerkhoff, G. Cesutti, L. Kruse and J. Mussig, "Development of a DNA-analytical method for the identification of animal hair fibers in textiles", *Textile Research Journal*, **2009**, 79, 69.
10. K. Hollyemeyer, W. Altmeyer and E. Heinzle, "Identification and quantification of feathers, down, and hair of avian and mammalian origin using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry", *Analytical Chemistry*, **2002**, 74, 5960-5968.
11. K. Hollyemeyer, W. Altmeyer and E. Heinzle, "Identification of furs of domestic dog, raccoon dog, rabbit and domestic cat by hair analysis using MALDI-ToF mass spectrometry", *Spectroscopy Europe*, **2007**, 19, 8-15.
12. K. Hollyemeyer, W. Altmeyer and E. Heinzle, "Species origin identification of Oetzi's clothing by MALDI-ToF mass spectrometry using tryptic hair digests", *Spectroscopy Europe*, **2009**, 21, 7.
13. 김원주, "피혁과 환경", **2006**, 61-196, 어드북스, 대한민국.
14. M. Buckley, M. Collins, J. Thomas-Oates and J. C. Wilson, "Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2009**, 23, 3843-3854.