

Transglutaminase를 첨가한 근원섬유 단백질과 카제인 염 혼합액의 배양시간과 온도조건에 따른 물성 변화

황지숙 · 진구복*

전남대학교 동물자원학부 식육과학연구실

서 론

최근 소비자들의 건강에 대한 관심이 고조되면서 육제품 분야에서도 식염이나 지방과 첨가물들의 함량을 줄인 웰빙 식품들이 개발 중이다. 그러나 육제품 가공 시 중요한 첨가물인 식염과 지방의 함량을 줄이면 조직적으로나 저장성 등 기타 여러 가지 문제점이 발생하기 때문에 저염, 저지방 육제품 개발을 위해서는 지방과 식염을 대체할 첨가물에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. Transglutaminase(TGase)는 밀, 난, 우유 및 대두단백질과 같은 단백질에서 내부 그리고 외부의 ϵ -(γ -glutamyl)lysine 교차결합(G-L 결합)을 촉매 시키는 작용을 한다. 이 효소와 식품 단백질의 겔화와 중합반응은 물리화학적인 특징을 변형시킴으로써 많은 식품의 품질, 특히 물성에 영향을 준다 (Tseng and Lai, 2002 ; Ramirez and Xiong, 2003). 특히 TGase와 카제인 염을 같이 사용했을 때 조직감이 더 좋아진다고 보고하였다(Killic, 2003). 한편, 단백질은 가공 시 가열감량을 줄여주고, 용해성, 유화성, 겔화 등의 다양한 기능성을 더해 주어 여러 가지 가공 식품에 많이 사용되고 있다(Keeton, 1996). 단백질 중에서도 우유단백질, 그 중에서도 카제인 염은 표면 단백질 분자가 유화되는 동안 지방-물 표면에 급속하게 흡수되어 정전기와 입체 안정성의 결합을 통해 오랫동안 유화 안정성을 유지시켜준다. 또한 다른 단백질에 비해 열에 안정적이고 오랜 열처리에도 응고되지 않은 특성을 가지고 있어 육제품 분야에서도 첨가물로써 많이 이용, 연구되고 있다.(Fox and McSweeney, 2003). 따라서 본 연구는 근육 단백질과 우유 단백질간의 상호작용에 촉매제로써 TGase와 카제인염의 식육 가공 공정의 최적화를 위한 온도와 배양시간을 결정하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시료 준비

Myofibrillar Protein(MFP)은 돈육의 등심부위를 이용하여 4배의 0.1 M NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 buffer로 3번 원심분리 시키고, 그 pellet을 다시 8배의 0.1 M NaCl로 원심분리시켜서 추출하였다(Xiong, 1993). 추출된 MFP를 Lowry 정량(Lowry *et al.*, 1951)을 이용해 단백질 함량을 구하였다. 처리구는 근원섬유 단백질, 근원섬유 단백질과 카제인 염(Sodium Caseinate,

SC)의 혼합액(1:1), 카제인 염에 TGase 를 각각 첨가하여 사용하였다. 배양온도는 4, 37°C로, 배양시간은 0, 0.5, 2, 4시간으로 설정하여 실험하였다.

2. 열량 분석기를 이용한 가열 중 단백질의 열량 변화

MFP, SC, MFP:SC(1:1) (단백질 농도 4.5%)에 TGase를 1:10(효소:기질) 비율로 첨가하고 배양시간과 온도에 따른 열안정성의 변화를 살펴보기 위하여 Differential scanning calorimetry(DSC, S-650, Scinco, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 시료를 알루미늄 캡슐에 정확히 12 mg을 첨가하여 봉합한 후 10~80°C까지 1분당 10°C씩 증가하면서 그 변화를 측정하였다.

3. 전기영동 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

Mini protein II electrophoresis assay unit(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)을 이용하여 Laemmli(1970) 방법에 준하여 separation gel과 stacking gel을 각각 12%, 3%의 polyacrylamide gel을 이용하여 단백질을 분리하였다. 추출한 단백질은 standard sample buffer와 혼합하고 불용성 단백질을 제거하기 위하여 100°C의 끓는 물에 5분 동안 가열하고 원심분리를 시켜 loading한 후 150 V에서 약 1시간 30분 동안 분리시킨 후, 겔을 떼어내어서 1% Coomassie brilliant blue R-250을 넣은 염색용액에 넣고 Roker(Model RK-1020, New power ENG. Co., Ltd)에서 가볍게 진동을 주면서 30분 동안 염색시켰다. 염색된 겔은 증류수로 1번 세척 후 30분 동안 탈색시킨 후 보관용액에 보관하였다.

4. 점도/겔 강도 측정

MFP, SC, MFP:SC(1:1) (단백질 농도 4.5%)에 1:10(효소:기질)의 비율로 TGase를 첨가하고 점도계(Viscometers, RC01-R, Rheotec, Germany)를 이용하여 측정하였다. 겔 강도는 점도측정 샘플과 동일한 방법으로 샘플링하고 80°C에서 30분 가열한 후 Instron Universal Testing Mashine(Model 3344, Instron, USA)을 이용하여 측정하였다. 탐침은 Flat Faced Prove를 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 열량 변화

열량 변화는 주로 Myosine의 변성온도인 59°C, Collagen의 변성온도인 66°C 그리고 Actin의 변성온도인 82°C 부근에서 3개의 주요 피크를 보이며 각 단백질 별로 열량 변화 패턴이 상이하게 나타났다(Fig. 1). 이러한 피크는 Burnton 등(2005)과 Ramirez-Suarez 등(2005)의 결과와 유사하며, 특히 근원섬유 단백질과 카제인 염 단백질의 혼합액은 근원섬유와 카제인 염 단백질 각각의 피크와 유사하게 나타났다. 배양시간에 따른 TGase의 반응에 있어서 Xiong 등(2003)은 배양시간이 증가함에 따라 피크가 약간 더 높은 온도로 이동한다고 보고된 것과는 다르게 2시간과 4시간이 유사한 경향을 나타내었다. 또한 배양온도에 따라서도 차이를 보여 4°C에 비하여 37°C에서 열량 변화가 크게 나타났다.

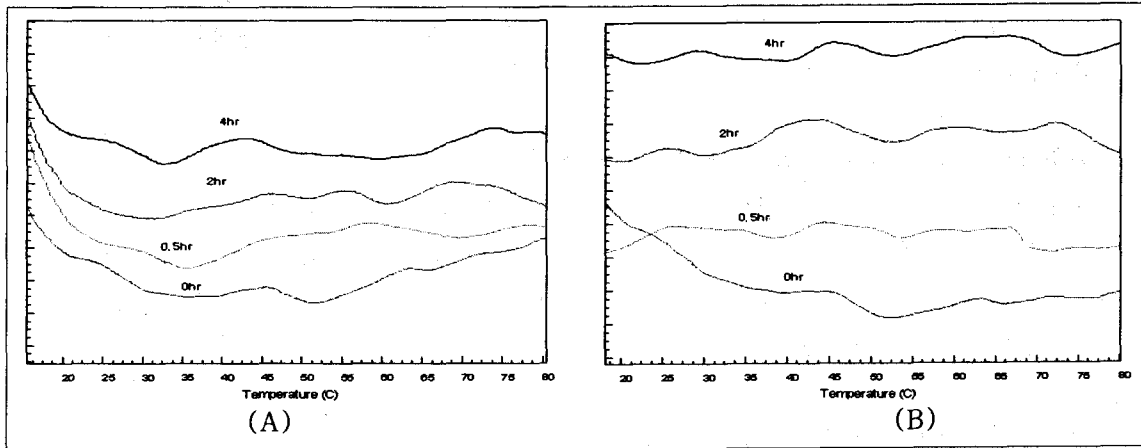


Fig. 1. Differential scanning calorimetry of myofibrillar/ sodium caseinate mixture as affected by incubation time and temperature. (A) = 37°C, (B) = 4°C

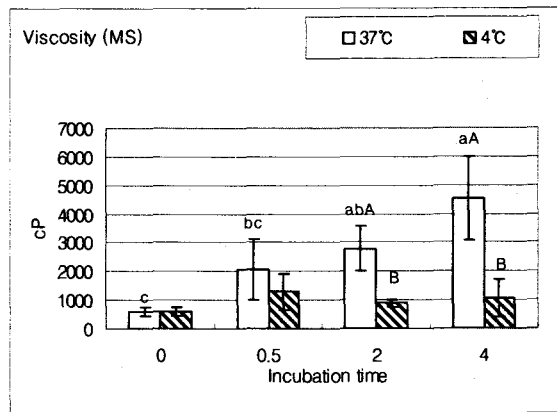


Fig. 2. Viscosity of myofibrillar protein/sodium caseinate mixture as affected by incubation time and temperature.

^{a-c} Means with same letter with increased incubation time are not different ($p > 0.05$).

^{A,B} Means with same letter at different incubation time are not different ($p > 0.05$).

2. 점도

37°C의 경우 MS에 TGase를 반응시킨 후 2시간 배양했을 때부터 점도의 차이가 나타났다. 0, 0.5시간보다는 2, 4시간 배양했을 때 유의적으로 점성이 높게 측정되었으나 2시간과 4시간 간의 차이는 크게 나타나지 않았다(Fig. 2). 반면에 4°C에서는 배양시간에 따른 변화는 나타나지 않았고 37°C와 비교하여 2시간 배양하였을 때 유의적인 차이를 더 낮게 나타났다. 이 결과는 온도가 증가함에 따라 점도가 감소한다는 이전연구 결과와 다른 경향을 나타냈으며 TGase가 4°C의 낮은 온도보다는 37°C에서 활성을 더 크기 때문이라고 사료된다. 따라서 이 결과는 곧 TGase가 효소로서 낮은 온도에서는 활력이 저조한 효소 자체 특성에 기인한 것이라고 사료된다

Table 1. Gel strength of myofibrillar protein(MFP) as affected by incubation time and temperature

	Incubation time				Incubation temperature	
	0	0.5	2	4	37	4
MFP	8.30±2.78 ^a	7.41±2.36 ^a	8.57±4.86 ^a	6.16±1.19 ^a	7.18±1.76 ^A	8.04±4.03 ^A

^{a,b} Means with same superscript in a same row are not different ($p>0.05$).

다(Xiong, 2003).

3. 겔 강도

겔 강도는 일정한 경향을 나타내지 않았으며 4℃에서 높은 값을 나타냈지만 유의적인 차이를 나타내지는 않았다(Table 1)($P>0.05$). 단백질의 겔화는 식육 가공에 있어서 조직감에 관여하여 육제품의 품질적인 특성을 부여한다. 카제인 염 단백질의 겔화에 있어서 배양시간에 따른 변화는 배양시간이 증가함에 따라 겔 강도가 증가함을 보였지만, 100분 이후부터는 유의차를 나타내지 않았다(Sakamoto, 1994). 반면에 TGase를 첨가할 경우 겔화는 진행되지만, 이전 결과와는 다르게 배양시간에 따라 유의차를 보이지 않아 TGase의 겔화는 배양시간과 무관함을 알 수 있었다.

4. 전기영동

TGase를 첨가한 후 배양시간이 지남에 따라 저분자 밴드가 사라지면서 고분자의 biopolymer가 형성된다는 연구 결과가 이미 보고되었다(Fig. 3)(Xiong, 2003). 근원섬유 단백

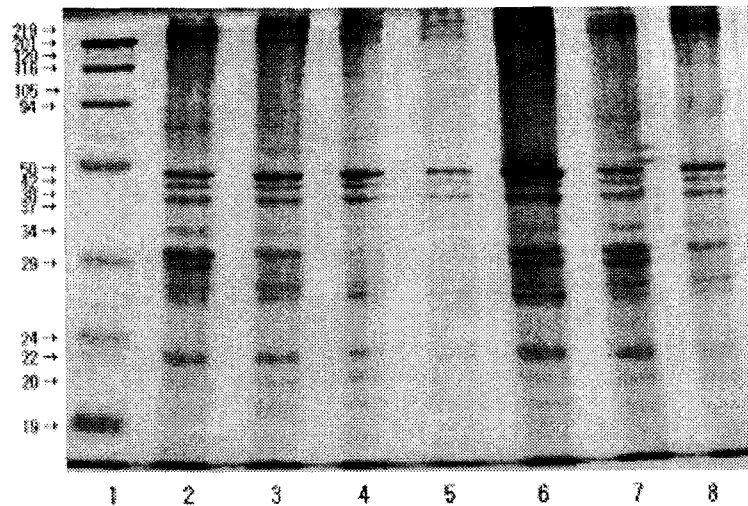


Fig. 3. SDS-PAGE profile of myofibrillar protein/sodium caseinate mixture as affected by incubation time and temperature.

1=marker, 2~5= 37℃, 6~8=4℃, 2=0hr, 3,6= 0.5hrs, 4,7= 2hrs, 5,8=4hrs.

질의 경우 37℃에서 배양했을 때 30분까지는 큰 차이를 나타내지 않았으나, 2시간부터 24, 30 kDa의 밴드가 점차적으로 사라졌다. 반면에 4℃에서는 37℃ 배양한 것보다 더 선명한 밴드를 형성하였지만 동일하게 2시간 배양할 때부터 24, 30 kDa의 밴드가 희미해져감을 알 수 있었다. 카제인 염의 경우 37℃에서는 점차적으로 36 kDa의 밴드가 소멸되면서 고분자 biopolymer가 형성되었지만 4℃에서는 더 선명한 밴드를 보이며 큰 변화를 나타내지 않았다. 근원섬유 단백질/카제인염 단백질의 혼합액의 경우 37℃에서 시간이 경과함에 따라 24 ~ 29 kDa의 밴드가 희미해져 감을 알 수 있었고 2시간 경과했을 때는 38 kDa 이하의 밴드가 대부분 소멸됨을 알 수 있었다. 37℃에 비하여 4℃일 때 MFP와 SC가 뚜렷한 밴드를 나타냈으며 2시간까지는 큰 변화가 나타나지 않았지만 4시간 배양할 때부터 밴드가 사라지기 시작하였다.

요 약

근육 단백질과 우유 단백질간의 상호작용의 촉매제로써 TGase의 최적화를 위한 온도와 배양 시간을 결정하고자 본 실험을 실시하였다. 돼지 등심에서 근원섬유 단백질을 추출하였고 배양 온도는 4, 37℃로, 배양시간은 0, 0.5, 2, 4시간으로 설정하였다. 단백질의 열량분석, 점도, 겔 강도, 단백질 밴드의 변화를 측정하였으며, 그 결과 단백질 열량 변화는 각 단백질 별로 열량 변화 패턴이 상이하게 나타났으며 근원섬유와 카제인 염의 혼합액은 각각의 단백질의 피크와 유사하게 나타났고 배양시간과 온도에 따라 차이를 보여 4℃에 비하여 37℃에서 열량 변화가 크게 나타났다. 점도의 경우 배양하지 않은 것과 비교했을 때 37℃에서 2시간 배양했을 때부터 유의적인 차이를 보이며 증가했으나 4시간 배양한 것과는 차이를 나타내지 않았다. 전기영동의 경우에도 37℃에서 30분 배양한 처리구는 큰 변화를 나타내지 않았으나 2시간부터 저분자의 밴드가 소멸되고 고분자의 biopolymer를 형성되었다.

참고문헌

1. Kilic, B. *Meat Sci.*, 63:417-421(2003).
2. Tseng, C. S., and Lai, H. M. J. *Food Sci.*, 67(2):750-755(2002).
3. Fox, P. F. and McSweeney, P. L. H. *Advanced Dairy Chemistry*, Volume 1, Protein, 3rd ed(2003).
4. Ramirez-Suarez, J. C., and Xiong, Y. L. *Meat Sci.*, 65:899-907(2003).
5. Ramirez-Suarez, J. C., Addo, K., and Xiong, Y. L. *Food Research International* 38: 1143-1149(2005).
5. Keeton, J. T. Proceedings of the Recipr. *Meat Conf.*, 49:23-31(1996).
6. Laemmli, U. K. *Nature*, 227:680-685(1970).
7. Lowry, O. et al., *J. Biol. Chem.* 193:265-275(1951).
8. Brunton, N. P., Lyng, J. G., Zhang, L., and Jacquier, J. C. *Meat Sci.*, 72:236-244 (2005).
9. Xiong, Y. L., *J. Food Biochem.*, 16: 217-22 (1993).