

Competitive Indirect ELISA를 이용한 Bovine Myosin의 동결 변성도 측정

김성배 · 이주운 · 박종흠 · 도형기 · 현창기 · 신현길
한동대학교 기능성 식품 및 안전성 연구소

Monitoring the Rate of Frozen Denaturation of Bovine Myosin by Competitive Indirect ELISA Method

Seong-Bae Kim, Ju-Woon Lee, Jong-Heum Park, Hyung-Ki Do,
Chang-Kee Hyun and Heuyn-Kil Shin
Institute of Functional Foods and Safety, Handong University

Abstract

This study shows the application of Ci-ELISA method for monitoring the denaturation of myosin by the frozen treatment in order to differentiate thawed beef from chilled. Hanwoo *M.Semiteminosus* (n=25) was treated under the two different frozen process as follows; simple frozen treatment (Exp-1) at 4 different temperatures, -10, -20, -50 and -80°C, respectively, and repeated thawing-refreezing treatment (Exp-2) stored at 4 different temperatures, -10, -20, -50 and -80°C, respectively. Antibodies (Abs) were produced from rabbits immunized with myosin whole molecule (MWM) isolated from beef round, heavy meromyosin S-1 (S-1) and light meromyosin (LMM) prepared by digestion of MWM. Each immunoglobulin G (IgG) was separated from antiserum. At 6 month storage, IA of anti-MWM IgG for myosin was decreased to 32.67, 32.23, 51.52 and 34.27% in Exp-1 and to 14.82, 15.61, 25.3 and 23.7% in Exp-2 at -10, -20, -50 and -80°C, respectively (p<0.05). In Exp-1, the reactivities of anti-LMM IgG were decreased to 25.12, 21.42, 49.05 and 28.96%, and those of Exp-2 were to 11.88, 9.56, 20.63 and 12.64% at -10, -20, -50 and -80°C, respectively, at 6 times thawing (p<0.05). Conclusively, myosin was denaturated by freezing treatment and LMM or myosin rod part might have suffered from more extreme damage than HMM S-1, and samples at -50°C were slightly injured less than others by freezing treatment.

Key words: bovine myosin, subfragments, frozen denaturation, Ci-ELISA

서 론

Grujic 등⁽¹⁾은 *M.longgissimus dorsi*의 냉동에 따른 근육 구성분의 변화를 전자현미경을 사용한 초구조적 조사를 통하여 동결온도대에 따른 빙결정의 위치, 모양 그리고 크기가 근육 구성분에 미치는 영향을 조사하였다. 그들은 근세포 내에 있는 근섬유가 빙결정의 압력에 의하여 영향을 받아 근육의 횡축 줄 형태가 붕괴된다고 보고하였다. 이들의 파괴는 S-S bridge, hydrophobic residue, aldehyde류의 생성과 같은 여러 가지 화학반응의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 또

한 많은 연구들을 통해서 동결 처리와 동결 기간 중에 발생하는 변화가 축육과 어육의 질에 영향을 미친다는 것이 보고되었으며^(2,3), 근육단백질의 변성, 특히 근섬유 단백질의 변성은 육질을 저하시키는 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다⁽⁴⁾.

근래에 들어 항원의 표면에 존재하는 항원 결정기(epitope)에 대한 항체의 인식에 의한 결합 반응에 착안하여 외부 요인에 의한 항원의 변성이 epitope의 구조적 변화를 야기시키고, 이런 구조적 변화에 대한 항체의 인식정도를 항원-항체의 결합반응으로서 나타낼 수 있는 면역분석법이 널리 연구되고 있다. 분석하고자 하는 물질에 대한 매우 선택적인 특이성과 뛰어난 감도 때문에 다른 분석방법에 비해 많은 선호를 받고 있으며, 단백질의 변성 측정에도 이용되고 있다^(5,6). 한

Corresponding author: Heuyn-kil Shin, Institute of Functional Foods and Safety, Handong University, Heunghae, Pohang, Kyungbuk 791-940, Korea

편 이⁹⁾는 동결에 의해 myosin 분자의 변성이 일어난다고 이에 따라 변성된 myosin과 그 항체는 결합반응 정도가 변성전 단백질보다 더 낮게 나타난다는 것을 이용하여 동결육의 변성도를 측정하였다.

Myosin은 그 구조적 특징이 α -helical의 이중 나선 구조를 이루고 있으며 분자량이 약 500 kDa정도되는 거대 분자로서 α -chymotrypsin 등과 같은 단백분해 효소에 의해 머리부분(myosin head, heavy meromyosin S-1)과 꼬리부분(myosin tail)으로 분리된다⁽¹⁰⁾.

따라서, myosin분자를 효소처리하여 생산된 myosin subfragments를 항원으로 사용하여 생산된 항체를 이용하여 동결 처리에 의해 발생하는 myosin 분자의 변성 정도를 분자구조의 특성에 따라 이해하고, myosin 분자 중 어떤 부분에서 변성이 주요하게 발생되는지를 판단하기 위하여 본 실험을 실시하였다. 또한, 근섬유 단백질의 용해성의 변화가 myosin과 항체의 면역 친화성의 변화와 어떠한 상관관계가 있는지를 조사하고, 수입냉동육과 국내산 냉장한우육을 차별화하기 위한 분석법으로서 competitive indirect ELISA (Ci-ELISA)를 이용할 수 있는지를 알기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

Myosin, S-1 그리고 LMM의 분리

Weeds와 Pope⁽¹¹⁾의 방법을 사용하여 도축 후 24시간이 경과된 한우육의 *M.Semiteminosus*로 부터 myosin과 myosin subfragment인 S-1과 LMM을 생산하였다. Lee⁽⁹⁾의 방법에 의해, 높은 이온강도와 중성 pH에서 myosin이 용해되는 성질을 이용하여 근섬유 단백질을 분리하였고, 다시 ammonium sulfate를 사용하여 염석시켰다. 분리된 myosin을 0.6 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 (high salt buffer, HSB)에 녹인 후 최종 농도가 10 mg/mL이 되게 보정한 후 20배의 0.12 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0에서 투석시켜 synthetic myosin을 준비한 후 α -chymotrypsin (Sigma, U.S.A.)을 기질과 효소의 비가 50:1이 되도록 첨가하고 20°C에서 9분간 반응시켰다. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 첨가하여 반응을 종결시킨 후, 12배의 냉각수를 넣어 염용성 부분(myosin rod)과 분해되지 않은 myosin을 침전시켰다. 원심분리 후 상등액을 DEAE-Cellulose ion exchanger, Whatman DE-52 (Whatman, U.S.A.)을 이용하여 S-1 부분을 분리하여 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.15 M NaCl (PBS)에서 투석시켰다. Myosin rod 부분을 HSB에 녹여 농도를 10 mg/mL로 보정한 후 같은 방법으로 효소

처리한 후 반응시켰다. 2차 효소 처리 후 생성된 subfragment인 LMM을 HSB에 녹인 후 같은 buffer에서 투석시켰다. 분리된 myosin, S-1 그리고 LMM을 항원으로 사용하기 위해 Bicinchoninic acid (BCA, Sigma, U.S.A.) 발색법으로 농도를 측정하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준 단백질로 하여 PBS에 일정 농도로 희석하여 BCA와 반응하여 얻은 값을 이용하여 정량하였다. 각각의 항원의 농도를 2 mg/mL의 농도로 보정한 후 동량의 glycerol과 섞어 -20°C에 보관하며 사용하였다.

토끼의 면역화 및 IgG의 분리

분리된 myosin, S-1과 LMM을 항원으로 하여 이에 대한 복합클론 항체를 생산하기 위하여 각각의 항원에 대하여 2마리의 New Zealand White종 토끼가 준비되었다. 항원용액을 주사하기 전에 각 토끼의 귀에서 1 mL의 혈액을 취하여 혈청을 분리하여 normal serum으로 사용하였다. 토끼의 등에 피내주사법으로 1 mL의 항원용액을 200 g/mL의 농도로 보정한 후 동량의 Freund's complete adjuvant를 사용하여 유회시킨 후 주사하였다. 2차 면역부터는 Freund's incomplete adjuvant를 사용하여 같은 방법으로 주사를 실시하였다. 주사 후 1주일이 경과된 토끼의 귀에서 1 mL의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 Kim⁽¹¹⁾의 방법을 모방한 indirect ELISA법을 사용하여 각 항원에 대한 역가를 측정하였다. 4회 주사 후 항체의 역가가 최고 수준을 유지하였으므로 adjuvant를 사용하지 않고 항원 용액만을 주사하였으며, 1주일이 지난 다음 토끼의 귀로부터 10 mL의 혈액을 채집하여 항혈청을 분리하였다.

얻어진 항혈청을 Protein A high trap (5 mL, Sigma)을 사용하여 친화성 크로마토그래피법으로 immunoglobulin G (IgG)를 분리하였다. PBS buffer를 이동상으로 사용하였으며, IgG를 Protein A에 흡착시켰다. 0.1 M acetic acid (pH 3.0)를 용출용액으로 사용하여 column 내부의 pH의 변화를 야기시켜 흡착되어 있던 IgG를 분리하였다. 이때 각 분획당 1 mL씩 취하였다. 분리된 각 분획을 280 nm로 파장이 고정된 spectrophotometer (UV 1601, Shimatzu, Japan)에서 정량하였으며, 분획된 IgG 용액을 투석법으로 PBS buffer로 교환하였다. Polyethylene glycerol # 20,000을 사용하여 IgG 용액을 농축하여 농도를 2 mg/mL로 보정한 후 동량의 Glycerol과 섞어 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

Ci-ELISA법의 확립

Indirect ELISA법은 microplate에 항원을 coating하

는 방법을 사용하여 myosin을 10 µg/mL의 농도로 coating하였다. Coating 용액은 basic coating buffer (0.1 M sodium carbonate, pH 9.6)를 사용하였다. 항체의 희석배수 그리고 이차항체의 희석배수를 구하여 분석 최적조건을 확립하기 위해 Lee⁽⁶⁾의 방법에 따라 항원 고정화 농도를 1.56 µg/mL에서부터 50 µg/mL까지, 이차 항체의 희석배수를 1:100부터 1:102,400까지, 이차항체의 희석배수는 1:5,000부터 1:160,000까지의 범위로 정하여 실험하였을 때 490 nm에서 흡광도가 1.5를 나타내는 각 용액의 희석 농도를 조사하여 분석실험에 사용하는 최적농도로 결정하였다.

시료의 처리

도축후 24시간이 경과한 한우의 *M.Semitendinosus* (n=25)를 지역 축협 육가공장에서 구입하였다. 동결 기간에 따른 myosin의 변화를 측정(Exp-1) 하기 위한 시료의 처리는 두께가 1 cm정도가 되게 자른 후 polyethylene 봉지에 넣어 진공 포장 한 다음 -10, -20, -50 또는 -80°C로 온도가 보정된 freezer에 넣어 동결시켰다. 동결 후 1달 간격으로 시료를 4°C 저온 항온기에서 중심온도가 2°C가 될 때까지 해동한 다음 중심부에서 2g의 시료를 취하여 분석에 이용하였다.

해동과 재동결을 반복 처리(Exp-2)한 경우에 있어서 myosin의 변화를 측정하기 위해 시료를 1 Kg의 무게로 준비하여 진공포장한 후 Exp-1 처리구와 마찬가지로 -10, -20, -50°C 또는 -80°C의 freezer에서 동결시켰다. 시료는 1개월마다 4°C 저온 항온기에서 중심온도가 2°C까지 해동한 후 2g의 시료를 취한 다음 다시 진공포장 후 재동결시켰다.

채취한 2g의 육에 20 mL의 PBS (pH 7.0)을 첨가한 후 균질기(Ultraturex, Heidolph DIAX 600, Germany)에서 10,000 rpm으로 3분간 균질한 후 원심분리기(high-speed centrifuge, Beckman J2-MC, U.S.A.)에서 9000

rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리하였다. 침전된 분획을 같은 방법으로 2회 반복하였다. 침전물에 20 mL의 HSB (pH 7.0)을 첨가하고 다시 균질화 한 다음 원심분리기에서 9,000 rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리하였다. 상등액을 Whatmann No. 3에서 여과하여 여액을 얻었다. 얻은 여액을 염용성 단백질(salt soluble proteins, SSP) 분획으로 사용하였다. SSP을 사용하여 단백질 용해성의 변화와 myosin에 대한 IgG의 면역 친화성의 변화를 측정하였다. 동결처리 전 냉장육에서 같은 방법으로 SSP 분획을 얻었고, 용해성과 myosin과 각 항체들의 면역 친화성을 측정하여 비교구의 기준값으로 사용하였다.

결과의 평가 및 통계처리

얻어진 결과들은 SAS[®] software⁽¹²⁾에서 프로그램된 general linear procedures, least square 평균값을 Duncan의 multiple range test법을 사용하여 평가하였다.

결과 및 고찰

Competitive indirect ELISA의 확립

항체의 희석 농도는 myosin을 coating (10 µg/mL)하고 coating된 myosin과 같은 농도로 준비된 표준용액 (10 µg/mL) 사이에서 일정하게 희석된 항체를 경험적으로 반응시켰을 경우 반응값이 490 nm에서 1.5를 나타냈을 때의 희석농도를 항체의 최적 희석농도로 결정하였다(Table 1). 이를 만족시키는 값으로 anti-MWM IgG은 1/2000 (0.5 µg/mL), anti S-1 IgG과 anti-myosin IgG은 1/1000 (1 µg/mL)로 나타났다. 2차 항체의 희석농도는 1/10,000으로 사용하는 것이 분석의 최적조건인 것으로 판단되었다(p<0.05). 이 값은 Gonzalez 등⁽¹³⁾이 사용한 복합클론 항체의 희석 농도 1/500보다 두배 높은 값이다. Martin 등⁽⁷⁾은 이중단백

Table 1. The analytical condition of Ci-ELISA formatted by us for monitoring the rate of frozen denaturation of bovine myosin

	Antibody			Commercially purchased from Sigma (U.S.A.)
	Anti-MWM IgG	Anti S-1 IgG	Anti-LMM IgG	
Immunogen	Myosin whole molecules	Heavy meromyosin S-1	Light meromyosin	
Coating concentration of myosin	10 ug/mL	10 ug/mL	10 ug/mL	
Rate of dilution of primary Ab	1/2,000 (0.5 ug/mL)	1/1,000 (1 ug/mL)	1/1,000 (1 ug/mL)	
Rate of dilution of secondary Ab	1/10,000	1/10,000	1/10,000	
Blocking solution	1% gelatin solution in PBS			
Chromogenic enzyme	horseradish peroxidase (HRP)			
Substrate	o-phenylenediamine (OPD)			
Incubation	1.5 hour at 37°C, 20 min for developing colour			

질의 혼입여부를 조사하기 위해 개발한 sandwich ELISA (immunocapture 법)에서 단클론 항체를 1/1000 (1 µg/mL)으로 희석하여 사용하였고, capture antibody를 사용한 Sargeart 등⁽⁶⁾은 1/500 (2 µg/mL)의 항체 희석 농도를 사용하였다. 위와 같이 다른 연구자들의 보고와 비교하였을 때 본 연구에서 사용한 항체의 역가는 상당히 좋은 것으로 판단되었다.

Microplate에 일정한 농도로 고정화된 항원과 반응하는 일정한 양의 IgG는 첨가되는 표준 항원의 양에 따라 달라진다. 표준 항원의 농도가 증가하면 항체와 고정화된 항원의 반응 기회는 줄어들고 이에 따라 최종적으로 항원-항체의 반응을 나타내는 기질의 발색 정도도 낮아진다. 이것이 competitive indirect ELISA의 기본 원리이다. 이때 얻은 반응 값을 semi-log로 표현한 곡선을 표준 곡선이라고 한다. 이러한 표준 곡선을 기초로 하여 항원을 정량할 수 있다.

위에서 얻은 결과를 기초로 하여 myosin과 항체의 농도를 고정하였을 때 표준항원의 농도를 1,000 µg/mL에서 0.12 µg/mL까지 일정하게 희석하여 항체용액이 coating된 항원과 경쟁적으로 반응하는 값을 구하였다. 이때 normal serum을 blank로 사용하였고, 표준항원을 넣지 않았을 때의 값을 반응의 100%로 보아 이에 대해 각 농도에 대한 반응 값(B_T/B_{MAX})을 백분율(%)로 나타내었을 경우 각각 일정한 형태의 곡선을 나타내었다. 이 곡선을 표준곡선으로 하여 각 항체를 이

용한 myosin을 정량하는데 사용하였다. 각각의 항체에 대한 표준곡선은 Fig. 1에 나타났다. 각각의 항원에 대한 표준곡선에서 최적 반응범위는 4~125 µg/mL이었고, 검출한계는 0.1 µg/mL이었다($p < 0.05$). Myosin에 대한 각 항체를 이용한 표준곡선에서 0.1 µg/mL의 검출 한계는 Dincer 등⁽⁴⁾이 보고한 0.1 µg/mL의 감도와 같게 나타났다. 또한 이 값은 Sargeart 등⁽⁶⁾이 발표한 beef meat에서 papain의 검출 한계인 0.16~0.91 µg/mL의 감도를 포함하는 것이다.

본 연구에서 생산한 항체가 다른 항원과의 반응 정도를 측정하였다(Table 2). Bovine myosin에 대한 anti-MWM IgG의 반응 값을 100으로 하였을 때, bovine actin과 troponin compounds에 대한 이 항체의 교차 결합도는 8.36과 4.28%를 나타냈다. S-1을 항원으로 하

Table 2. Cross reactivity tests of anti-MWM IgG for bovine myosin, actin, and troponin compound and of anti S-1 IgG for LMM and anti-LMM IgG for S-1 by Ci-ELISA (%)

	Myosin	Actin	Troponin compound
Anti-MWM IgG	100	8.36	4.28
Ag	Anti S-1 IgG	Anti-LMM IgG	
S-1	100	10.3 (± 0.36)	
LMM	8.6 (± 0.15)	100	

($p < 0.01$)

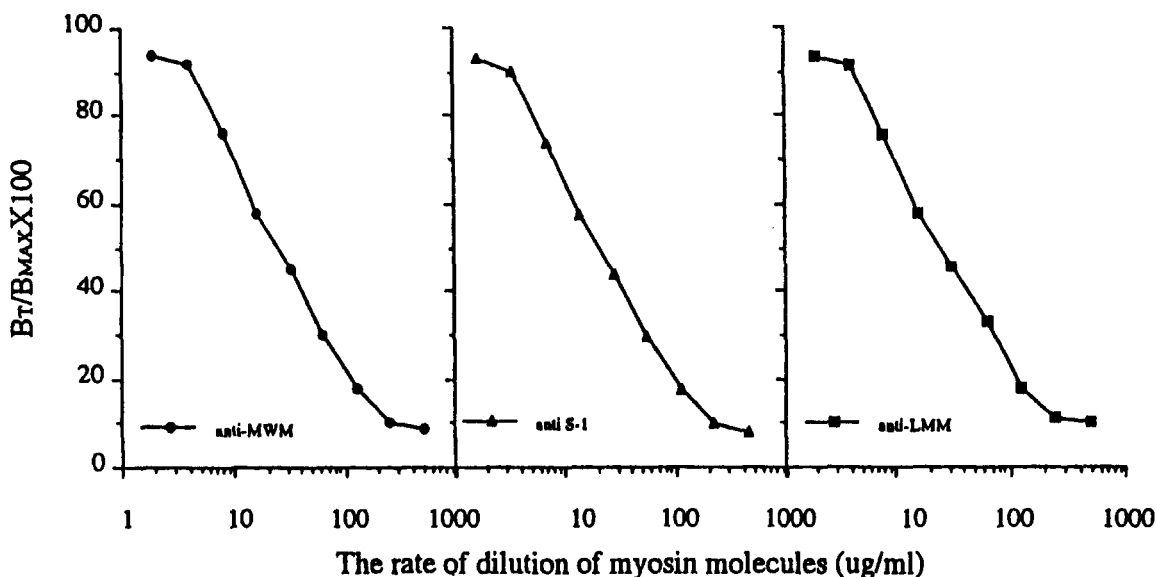


Fig. 1. Standard curves for quantifying bovine myosin molecules. B_T indicates O.D. values from reaction of Ab between variously added myosin and coated myosin and B_{MAX} is O.D. values from reaction of Ab for only coated myosin (10 µg/mL).

고 anti-LMM IgG를 항체로 하였을 경우 10.3%의 교차 결합도를 보였고, LMM을 항원으로 하고 anti S-1 IgG를 항체로 하였을 경우 8.5%의 교차 결합도를 보였다($p < 0.01$). Myosin subfragments에 대해 각각 생산하여 분리한 anti S-1과 anti-LMM IgG의 교차 결합도는 상당히 우수하게 나타났다. 비록 다른 단백질들과 subfragment들 사이의 반응성이 약간씩 존재하는 것을 감안하더라도 위의 값은 매우 특이성이 있다고 볼 수 있다.

동결 기간에 따른 단백질 용해성의 변화

일반적으로 알려진 이론에 의하면, 동결처리에 의해 발생하는 근섬유의 변성은 낮고 균일한 온도의 유지에 의해 효과적으로 최소화될 수 있다고 보고되고 있다⁽¹⁵⁾. Differential Scanning Calorimetry (DSC)를 이용한 근섬유 단백질의 변성 연구에서 낮은 동결속도에서 저장된 경우 높은 동결속도보다 변성이 심하다는 것이 보고되었으며, 특히 용해성의 감소에 대한 결과가 보고되었다⁽¹⁶⁾. 동결 저장에 따른 용해성의 변화는 저장 온도에 따라 다르게 나타나고 있다. -10°C 에서 저장된 우육의 용해성 변화는 비교구와 비교하였을 때 2개월까지는 비교구보다 높게 나타났으나, 그 후 감소하기 시작하여 저장 6개월째에는 88.81%의 용해성을 나타냈다(Table 3). -20°C 에서 저장된 처리구의 용해성은 저장기간 2개월을 기준으로 증가하다 감소하는 경향을 보이고 있으며, 저장 2개월째에 비교구보다 14.83%까지 더 높은 용해성을 보였고, 6개월째에는 비교구보다 낮게 나타났다. -50°C 의 처리구는 저장기간 6개월까지 비교구보다 더 높은 용해성을 보여주고 있으며, 최고 19.42% 더 높은 값을 나타냈다. -80°C 의 처리구는 저장기간 2개월째 최고 18.15%의 더 높은 용해성을 나타냈으나 6개월째에는 89.49%의

용해성을 보였다. 모든 온도에서 용해성의 증가와 감소의 경향을 보이고 있으며, 저장온도에 따른 차이를 보이고 있다. 그러나, -20°C 와 -80°C 에서 저장된 처리구에서는 거의 유사한 결과를 나타냈다. 용해성을 비교하여 보면 -50°C 에 저장된 우육의 근섬유 단백질의 용해성이 더 높은 것으로 판단되며, -10°C 에서 저장된 처리구가 가장 낮은 것으로 판단되었다. 그러나, 본 실험에서 -20°C , -50°C , 그리고 -80°C 에서 저장된 처리구의 근섬유 단백질의 용해성은 저장 5개월까지 크게 차이가 있는 것으로 나타나지 않았다($p < 0.05$).

동결 기간에 따른 항체의 면역 친화성의 변화

Anti-MWM IgG: Myosin의 동결 처리에 의한 동결 기간에 따른 변화는 저장기간이 경과함에 따라 점차 감소하는 경향을 보여주고 있다. Myosin과 항체의 면역 친화성은 온도별 처리구에 따라 조금씩 차이를 보였다. 면역 친화성은 저장 1개월까지는 팔목할 만한 변화를 보이지 않았다. 그러나 저장 2개월부터 친화성이 감소되기 시작하였으며, 처리구간 차이를 나타내었다(Fig. 2-A). 동결 2개월째에 -20°C 에 저장된 처리구가 32.46%의 가장 심한 차이를 나타내었고, -50°C 의 처리구는 15.64%의 감소를 나타내었다($P < 0.05$). SSP의 농도 변화와 비교하였을 경우 저장 6개월째 -10°C 의 처리구에서 11.19%의 단백질 용해성의 감소를 나타냈으나, 이 용액에 존재하는 myosin 분자에 대한 항체의 인식은 단지 32.67%만을 인식할 수 있었고(Fig. 3), -80°C 는 34%, -50°C 에서는 49%로 나타났다. -20°C 처리구에서 변성정도가 가장 컸으며, -50°C 의 처리구에서 가장 적게 변성되는 것으로 나타났다. myosin의 항체와의 반응력의 감소는 항원결정기들의 구조적 변화를 설명할 수 있으며 이 변화는 myosin 분자의 변성으로 설명할 수 있다⁽⁹⁾.

Table 3. The changes of solubility of salt soluble proteins in thawed beef slices and beef cuts treated in the conditions of Exp-1 and Exp-2 (mg/mL)

Treatment	Storage temperature (°C)	Storage periods (month)						
		0	1	2	3	4	5	6
Exp-1	-10	2.86 (±0.13)	3.28 (±0.21)	3.13 (±0.18)	2.81 (±0.14)	2.65 (±0.20)	2.55 (±0.19)	2.54 (±0.16)
	-20	3.17 (±0.17)	3.46 (±0.16)	3.64 (±0.22)	3.58 (±0.16)	3.50 (±0.19)	3.26 (±0.12)	2.89 (±0.13)
	-50	3.09 (±0.14)	3.47 (±0.15)	3.69 (±0.13)	3.65 (±0.21)	3.54 (±0.17)	3.29 (±0.22)	3.14 (±0.16)
	-80	3.14 (±0.15)	3.39 (±0.23)	3.71 (±0.14)	3.47 (±0.22)	3.50 (±0.13)	3.43 (±0.12)	2.81 (±0.14)
Exp-2	-10	2.93 (±0.15)	2.68 (±0.14)	2.66 (±0.14)	2.60 (±0.21)	2.36 (±0.14)	1.93 (±0.22)	1.99 (±0.23)
	-20	3.07 (±0.14)	2.94 (±0.12)	2.97 (±0.17)	2.92 (±0.21)	2.99 (±0.20)	2.59 (±0.14)	2.53 (±0.21)
	-50	2.42 (±0.17)	2.59 (±0.17)	2.65 (±0.20)	2.61 (±0.15)	2.51 (±0.13)	2.49 (±0.13)	2.32 (±0.15)
	-80	2.99 (±0.16)	3.19 (±0.15)	3.05 (±0.12)	3.01 (±0.14)	2.95 (±0.16)	2.76 (±0.13)	2.65 (±0.15)

($p < 0.05$)

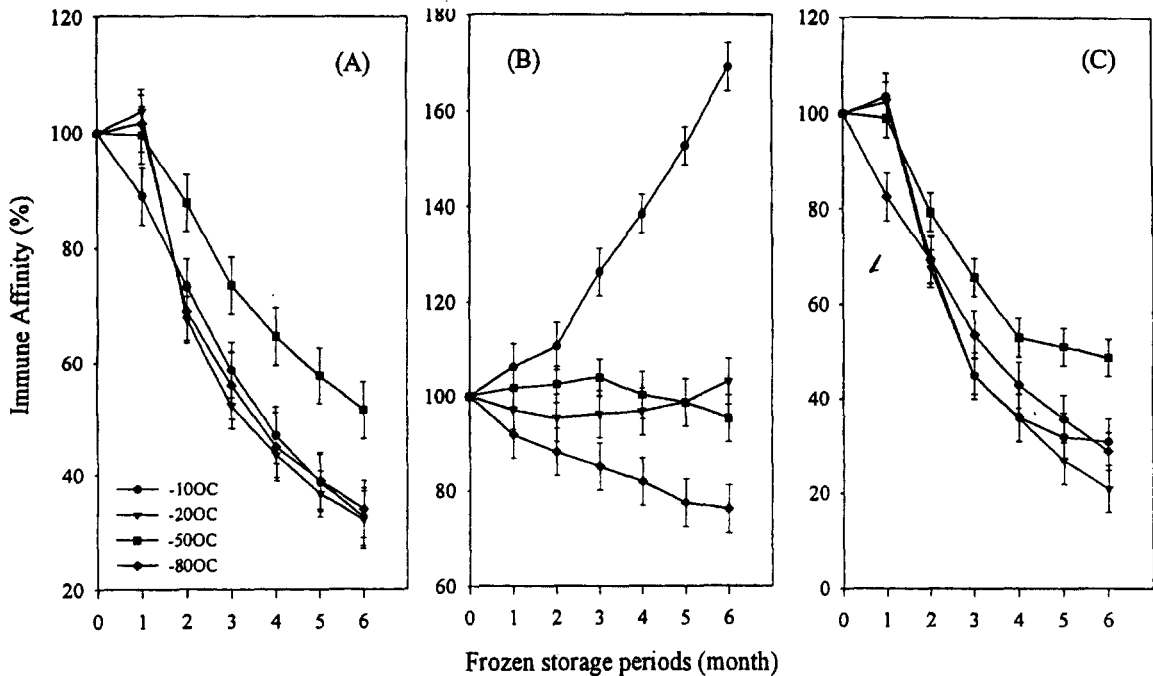


Fig. 2. The changes of immune affinities of anti-MWM IgG (A), anti S-1 IgG (B) and anti-LMM IgG (C) for myosin molecules from thawed beef slices frozen and stored at the different temperatures (Exp-1).

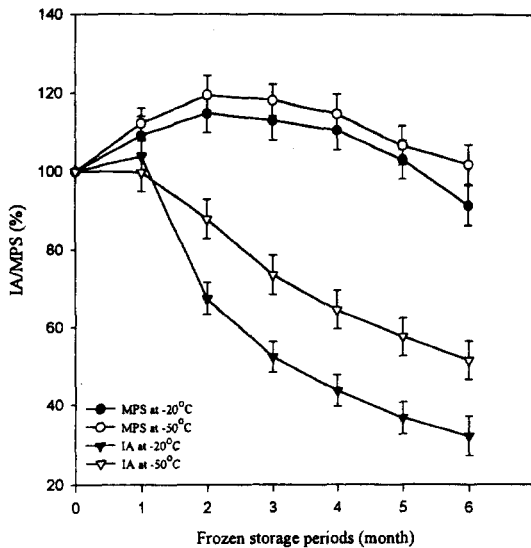


Fig. 3. The comparison of myofibrillar protein solubility (MPS) with immune affinity (IA) of anti-MWM IgG in salt soluble protein solution obtained from thawed beef slices during frozen periods (Exp-1).

Anti S-1 IgG: Myosin의 subfragments에 대한 변성도 조사에서 S-1은 myosin에서와는 다른 형태의 매우 특이한 결과를 나타내었다(Fig. 2-B). 동결 기간 중의

S-1의 변화는 -10°C 와 -50°C 에서는 비교구와 비교하였을 때 차이가 발견되지 않았지만, -80°C 의 처리구에서는 면역 친화성이 약하게 감소하여 6개월째 23.29%의 감소를 나타내었다($P < 0.05$). 그러나 -20°C 의 처리구에서는 저장 6개월째 anti S-1 IgG의 반응성을 비교구와 비교하였을 때 약 70%까지 증가하는 경향을 나타내었다($P < 0.05$). Wagner & Anon⁽⁴⁾의 연구에 의하면 ATPase의 활성은 낮은 동결속도에서 더 많이 상실되지만 빠른 동결에서는 유의성이 없었다고 보고하였다. 본 실험에서 사용한 항체와 S-1에 존재하는 항원 결정기들과의 반응이 동결에 의해 크게 영향을 받지 않은 부분이거나 또는 동결에 의해 내부 구조의 돌출로 인하여 내부에 존재하는 항원 결정기들이 표면으로의 출현으로 인하여 항체와 더 많이 반응할 수 있다고 사료된다. 그러나, S-1 부분을 가지고 우리가 생산한 항체를 이용한 변성도 측정은 불가능하다고 판단된다.

Anti-LMM IgG: LMM의 동결 저장에 따른 변화는 모든 처리구에서 비슷한 경향을 보이고 있으며, 저장 기간이 길어질수록 anti-MWM IgG를 사용하여 얻은 결과와 유사한 경향을 보였다(Fig. 2-C). LMM의 변화는 동결이 시작되면서 진행되는 것으로 보였고 -20°C 처리구에서 가장 심하게 나타났다. -10°C 와 -80°C 의

처리구는 거의 유사한 감소 추세를 보였고 6개월 후의 면역 친화력은 25.12%와 28.96%를 나타냈다($P<0.05$). 동결 저장 동안의 변성이 주요하게 myosin의 rod 부분에서 발생되고 있다는 것을 보여준다. DSC를 이용한 연구보고에서도 같은 연구결과를 얻었는데, peak II의 감소는 LMM의 변성으로 추정된다고 보고하였다^(16,17).

해동·재동결에 따른 단백질 용해성의 변화

Exp-2의 조건에서 처리된 beef cuts에서는 동결 기간에 의한 처리구와는 확연히 다른 결과를 보여주었다(Table 3). 용해성의 감소가 크게 보이고 있으며 각 저장 온도별 차이도 심하게 나타났다. -10°C 에 저장하면서 검사한 처리구에서 2회 해동에서 약 10%의 감소를 보이고 있으며, 6개월째는 이미 32.08%까지 용해성이 감소되었다($p<0.05$). -20°C 처리구는 4회의 해동까지 약 96%의 용해성을 보였으나, 5회, 6회의 해동처리에서 이미 15% 이상의 용해성 감소를 나타냈다($p<0.05$). 그러나, -50°C 의 처리구는 저장기간에 따른 용해도의 변화 형태와는 약간의 차이가 있지만 5회 해동까지 비교구보다 높은 용해성을 보여주었다. -80°C 의 처리구에서 4회 해동에서 비교구보다 낮은 값을 보여주었으며, 6회 해동에서 11.37%의 용해성 감소를 나타냈다($p<0.05$). 해동·재동결에 따른 용해성의 감

소는 고온에서 저장된 시료에서 더욱 심하게 나타났다. 시료의 평균 무게가 약 1 kg 정도이기 때문에 동결은 완만한 동결 속도로 이루어졌을 것이다. Wagner와 Anon⁽¹⁸⁾의 보고에서 -10°C 와 -20°C 에서 완만한 동결속도로 동결된 처리구의 용해성은 저장 13주까지 약하게 감소하다 급격히 감소되는 것으로 나타났다. 우리의 연구결과는 -10°C 와 -20°C 의 처리구가 저장 1개월째부터 감소하기 시작하였으며($p<0.05$), 반복되는 해동 처리에 의해서 더 많은 용해성의 손실을 나타냈고, -10°C 의 처리구는 5회 해동에서 단지 65.87%의 용해성만을 나타냈다($p<0.05$). 이 결과는 Wagner와 Anon⁽¹⁸⁾이 보고한 결과와 매우 유사한 경향을 나타내지만, 그들은 반복적인 해동처리를 실시하지 않고 단지 장기 저장기간만을 연구하였다. 반복되는 해동·재동결 처리에 의해 근섬유 단백질은 저장 기간에 따른 처리구와 비교하였을 때 더 크게 용해성을 상실하는 것으로 나타났다. 이것은 반복되는 해동이 근섬유에 더 심한 손상을 입히기 때문일 것이다. 육은 동결 저장 중에 formaldehyde 등의 물질이 생성되고 이것이 단백질과 작용하여 불용성 화합물을 생성한다^(19,20). 이러한 불용성 화합물은 저장 기간이 길어지면서 점차 증가하여 오랜 기간(6개월 이상) 동결되어진 육에서의 용해성을 감소시키는 결과를 야기할 것이다.

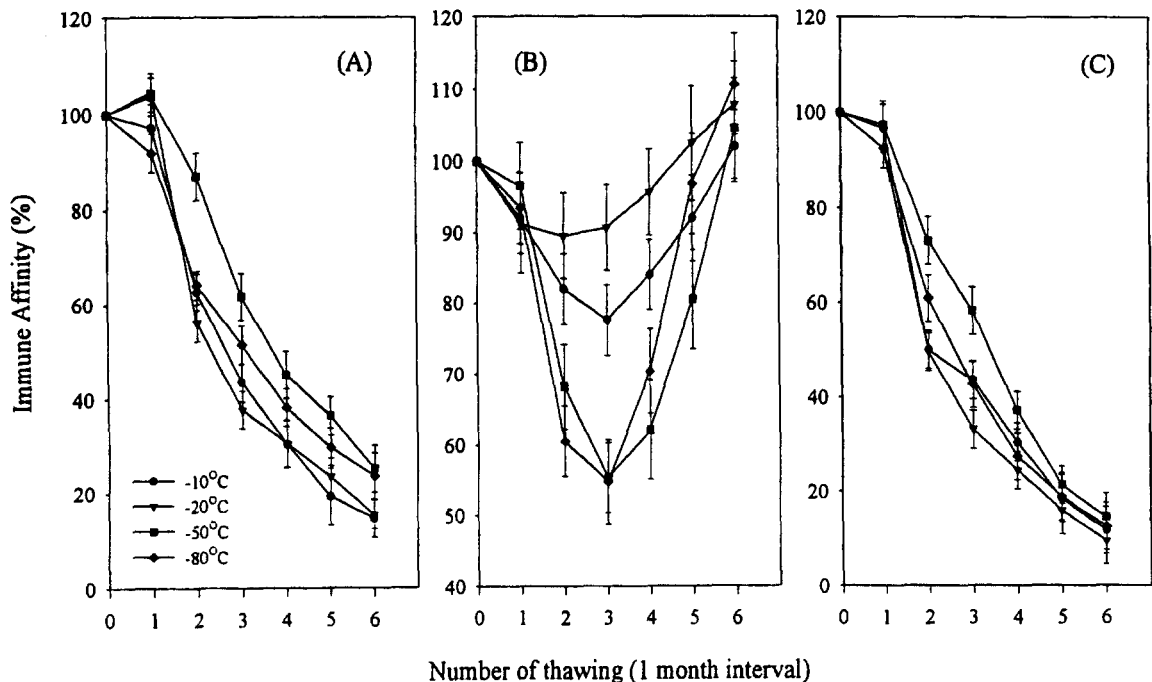


Fig. 4. The changes of immune affinities of anti-MWM IgG (A), anti-S-1 IgG (B) and anti-LMM IgG (C) for myosin molecules from thawed beef cuts treated under the repeated thawing and refreezing process (Exp-2).

해동·재동결에 따른 항체의 면역 친화성의 변화

Anti-MWM IgG: 동결과 해동을 반복한 처리구에 있어서 anti-MWM IgG와 myosin 사이의 반응성은 심하게 감소되었다(Fig. 4-A). 2회의 해동 처리에서 이미 -20°C 의 처리구는 약 50%까지 반응력이 감소된 것으로 나타났다. 그러나, 추출용액내의 단백질 농도는 약 91% 정도를 나타내었다(Table 3). 3회 해동에서는 -10°C 와 -20°C 의 처리구의 처리구들의 면역 친화력이 단지 37.80% (-20°C)와 43.6% (-10°C)를 나타내었다. 6회 해동하였을 경우 모든 처리구들은 약 85% 정도의 변성을 겪은 것으로 나타났다($P < 0.05$). -10°C 와 -80°C 의 처리구 변성정도는 매우 유사한 경향을 보였으며, -20°C 의 처리구가 가장 심한 손상을 받는 것으로 나타났다. 이 결과는 myosin이 단순한 동결 저장 보다는 반복되는 해동처리에 의해 더 심한 손상을 입는다는 것을 보여주고 있으며⁽¹⁾, 얼음의 재결정화에 의해 근섬유의 파괴가 더 많이 일어난다는 것을 설명하여 준다(Fig. 5)⁽²⁾.

Anti S-1 IgG: 해동 과정 중에 발생하는 S-1의 변화는 동결 기간에 따른 변화와 다른 양상을 보여주었다(Fig. 4-B). 모든 처리구들이 다소 차이는 있지만 3회 해동까지 감소하는 경향을 보여주었다. 3회 해동까지 대부분의 처리구에서 반응력의 감소를 나타냈다. 그러나 해동 횟수가 증가할수록 다시 반응이 증가하는 것은 재동결 처리에 의해 S-1 분자의 구조적 변화가

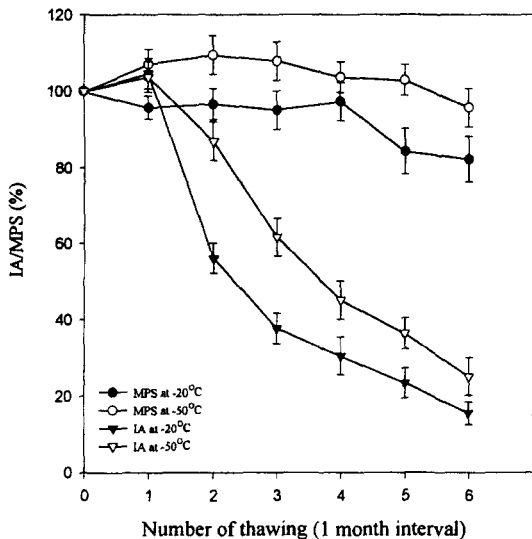


Fig. 5. The comparison of myofibrillar protein solubility (MPS) with immune affinity (IA) of anti-MWM IgG in salt soluble protein solution obtained from thawed beef cuts treated under the repeated thawing and refreezing process (Exp-2).

계속 진행되면서 epitope의 노출이 더 잘 이루어져 항체에 의한 인식정도가 높아졌을 것으로 추정된다. 그러나, 동결 기간에 따른 경우와 같이 동결육을 판별하는데는 실패하였다.

Anti-LMM IgG: 반복되는 해동 과정 중에 일어나는 변화는 동결 기간에 따른 변화와 유사하지만 좀더 심하게 변성되는 것으로 나타났다(Fig. 4-C). 2회 해동에서 이미 -50°C 를 제외한 모든 처리구들의 면역 친화성이 약 35% 이상 감소하였고, -10°C 와 -20°C 의 처리구는 약 50%의 감소를 나타냈다($P < 0.05$). LMM의 반복되는 해동처리에 의한 변성은 높은 온도에 저장하였을 때 더 많이 발생하는 것으로 나타났다. 즉 -10°C 와 -20°C 의 처리구가 저온 저장된 처리구들보다 약 10~15%의 더 많은 변성을 겪은 것을 보였다.

요 약

Myosin과 그 subfragment인 S-1과 LMM를 항원으로 하는 간접경합 효소면역분석법(Ci-ELISA)을 이용하여 동결육의 변화를 연구함으로써 수입 냉동육과 국내산 냉장 한우육과의 차별화를 위한 기초 자료를 마련하기 위하여 본 연구를 실시하였다. 각 항체의 표준곡선을 작성하였으며 최적반응범위는 $4\sim 125\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 검출한계는 $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 확립된 Ci-ELISA를 이용하여 각각 -10°C , -20°C , -50°C , 그리고 -80°C 에서 동결 기간 동안의 변화와 해동과 재동결에 따른 변화를 측정하였을 때 동결 기간 중 anti-MWM IgG와 반응한 myosin은 비교구와 비교하였을 때 -20°C 에서 변성도가 가장 컸으며 -50°C 에서 가장 적게 변성되었다. 단백질 용해성의 변화와 myosin과 항체와의 면역 친화성을 비교하였을 때 용해성이 감소하는 속도보다 더 빠르게 myosin이 변성되는 것으로 판단되었다. Anti S-1 IgG의 면역 친화성의 변화는 anti-MWM IgG에서 얻은 결과와 비교하였을 때 전혀 다른 경향을 보였다. anti-MWM IgG는 면역 친화성이 1개월 이후 급격히 감소된데 비하여 anti S-1 IgG는 그와 같은 큰 변화를 나타내지 않았다. 반복되는 해동과 재동결 처리에서 anti-MWM IgG는 myosin과의 반응에서 2회 해동시부터 급격한 반응성의 감소를 보였으며 6회 해동시에는 85%까지 반응력을 상실했다($P < 0.05$). 두 실험 조건에서 -20°C 의 처리구의 myosin이 가장 심한 영향을 받은 것으로 나타났다. Anti-LMM IgG는 anti-MWM IgG에서 얻은 결과와 매우 유사한 경향을 보였다. -10°C 와 -20°C 에서 처리된 우육의 myosin은 저온에서 처리된 시료의 그것보다 보다 약 10~15% 정

도 더 많은 변성을 보인 것으로 사료된다.

문 헌

1. Grujic, R., Petrovic, L., Pikula, B. and Amidzic, L.: Definition of optimum freezing rate. *Meat Sci.*, **33**, 301-318 (1993)
2. Petrovic, L., Grujic, R. and Petrovic, M.: Definition of optimum freezing rate-2. *Meat Sci.*, **33**, 319-331 (1993)
3. Ziauddin, K.S.: Effect of freezing, thawing and frozen storage on physico-chemical and sensory characteristics of buffalo meat. *Meat Sci.*, **35**, 331-340 (1993)
4. Wagner, J.R. and Anon, M.C.: Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. Myofibrillar ATPase activity and differential scanning calorimetric studies. *J. Food Technol.*, **21**, 9-17 (1986a)
5. Franek, M., Kolar, V., Granatova, M. and Nevorunkova, Z.: Monoclonal ELISA for 2, 4- Dichlorophenoxyacetic acid; characterization of antibodies and assay optimization. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1369-1374 (1994)
6. Sargeant, J.G., Bowre, H.M. and Billington, M.J.: Determination of papain in raw meat by immunoassay. *Meat Sci.*, **34**, 39-47 (1993)
7. Martin, R., Wardule, R.J., Jone, S.J., Hernandez, P.E. and Patterson, R.L.S.: Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixture of raw beef and pork. *Meat Sci.*, **29**, 23-31 (1991)
8. Rodriguez, E., Martin, R., Garcia, T., Azcona, J.I., Sanz, B. and Hernandez, P.E.: Indirect ELISA for detection of goat's milk in ewe's milk and cheese. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **26**, 457-465 (1991)
9. Lee, J.W.: Monitoring the rate of frozen denaturation of bovine myosin (in Korean). *M.S. Thesis*, Konkuk Univ., Seoul, Korea (1995)
10. Weeds, A.G. and Pope, B.: Studies on the chymotryptic digestion of myosin. Effects of divalent cations on proteolytic susceptibility. *J. Mol. Biol.*, **111**, 129-157 (1977)
11. Kim, J.B.: Development of chemiluminescence immunoassay for the measurement of plasma steroid and urinary steroid and urinary steroid glucuronides. *Ph.D. Thesis*, University of London, U.K. (1983)
12. SAS Institute.: *SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 Edition*. SAS Institute Inc., Cary, NC. (1988)
13. Gonzalez, I., Martin, R., Garcia, T., Morales, D., Sanz, B. & Hernandez, P.E.: Polyclonal antibodies against protein F from the cell envelope of *Pseudomonas fluorescens* for the detection of psychrotropic bacteria in refrigerated meat using an indirect ELISA. *Meat Sci.*, **42**(3), 305-313 (1996)
14. Dincer, B., Spearow, J.L., Cassens, R.G. and Greaser, M.L.: The effect of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques. *Meat Sci.*, **20**, 253-265 (1987)
15. Martino, M.N. and Zaritzky, N.E.: Ice crystal size modifications during frozen beef storage. *J. Food Sci.*, **53**, 1631-1637, 1649 (1988)
16. Wright, D.J. and Wilding, P.: Differential scanning Calorimetric study of muscle and its proteins; Myosin and its subfragments. *J. Sci. Food Agric.*, **35**, 357-372 (1984)
17. Wagner, J.R. and Anon, M.C.: Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. *J. Food Technol.*, **20**, 735-744 (1985)
18. Wagner, J.R. and Anon, M.C.: Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. II influence on solubility, viscosity and electrophoretic behaviour of Myofibrillar proteins. *J. Food Technol.*, **21**, 547-558 (1986b)
19. Bevilacqua, A. and Zaritzky, N.E.: Ice morphology in frozen beef. *J. Food Technol.*, **15**, 589-597 (1980)
20. Bevilacqua, A. and Zaritzky, N.E.: Ice recrystallization in frozen beef. *J. Food Sci.*, **47**, 1410-1414 (1982)

(1998년 3월 27일 접수)