

## 전분가수분해물의 어육단백질 동결변성 방지효과 및 작용기구

### 2. 옥수수전분가수분해물의 어육단백질에 대한 동결변성 방지 기구

이강호 · 정병천 · 홍병일  
부경대학교 식품공학과

## Cryoprotective Effect and Mechanism of Corn Starch Enzyme Hydrolysates on Fish Protein

### 2. Cryoprotective Mechanism of Corn Starch Enzyme Hydrolysates on Fish Protein

Kang-Ho LEE, Byung-Chun JUNG and Byung-Il HONG

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

It is well known that the native conformation of many proteins can be stabilized by carbohydrates or polyalcohols. However, the mechanism of the stabilization still remains unclear. In the present studies, to characterize the cryoprotective mechanism of corn starch enzyme hydrolysates on fish protein, solubility of hydrolysates, thermal behavior of hydrolysates and actomyosin solution, and enzyme kinetics in frozen system were investigated.

The solubility of the hydrolysates increased with the increase in D.E. value. The  $T_g'$  of the hydrolysates were linearly correlated with D.E. value and the  $T_g'$  values of the hydrolysates (D.E. 5,10,15,20) were reported to be  $-7.2^\circ\text{C}$ ,  $-8.8^\circ\text{C}$ ,  $-11.9^\circ\text{C}$ , and  $-14.3^\circ\text{C}$ , respectively. The results of enzyme experiments showed that the higher the D.E. value, the higher was the rate of reaction in frozen storage ( $-12^\circ\text{C}$ ). It is found to support the cryostabilization mechanism that the hydrolysates act to enmesh the protein in a glass state where all deteriorative processes are greatly slowed down.

Key words: corn starch hydrolysates, cryostabilization, DSC

## 서 론

식품 단백질의 동결변성 방지 작용에 대한 연구들이 수행되었고, 특히 당류와 당알콜류들은 식품의 동결변성에 유용한 것으로 보고되었다(Fennema, 1973, 1982). Sucrose와 sorbitol은 surimi 가공에서 가장 일반적인 동결변성 방지제로 사용되고 있고, 단백질은 sucrose 첨가로 가열변성(Arakawa and Timasheff, 1982; Lee and Timasheff, 1981; Park and Lanier, 1990)과 동결변성(Matsumoto, 1979; Park et al, 1987a,b)이 방지되는 것으로 나타났다. 많은 단백질과 효소들의 천연 입체구조는 단수화물들 또는 당알콜에 의해 안정화될 수 있다는 것은 잘 알려져 있다(Akahane, 1982).

Noguchi (1974)와 Matsumoto (1979)는 단백질의 동결 저장에서 당류와 당알콜류가 이온결합 또는 수소결합을 통하여 즉 coating material로 작용하여 단백질의 천연구조를 유지시킨다고 하였고, Carpenter 등 (1988)은 sodium glutamate에 의한 단백질의 동결변성 방지에서

비특이적 용질 결합을 야기시키는 mechanism 즉 이온화된 glutamate는 단백질 표면과 결합하여 증가된 negative charge를 나타내어 단백질의 수화를 증가시켜 단백질의 동결변성을 방지한다고 하였다. Back 등 (1979)은 소수기들 사이의 소수적 상호작용이 순수한 물에서 보다 sucrose 또는 glycerol 용액에서 더 강하게 작용하여 단백질의 입체구조를 안정화시킨다고 하였고, Gekko와 Morikawa (1981)은 당류의 소수적 상호작용과 수소결합 형성에 기인하여 단백질의 동결변성이 억제된다고 하였다.

단백질의 동결변성 억제 mechanism으로 "cryostabilization"이라는 새로운 개념이 제안되었고, 이것은 식품의 동결저장에서 texture, 구조, 그리고 화학적 성분(효소의 활성, 지방의 산패와 같은 산화적인 반응)의 품질 저하로부터 식품을 보호하는 수단으로 인식되고 있다(Levine and Slade, 1986). 이상에서와 같이 단백질의 동결변성에 대한 방지제들의 억제 mechanism에 대한 가설들은 많지만 방지제의 종류에 따라 그 mechanism은 다른 것으로 생각된다.

본 연구에서는 일반적인 동결변성 방지제인 단당류, 이당류와 당알콜 보다는 분자량이 큰 옥수수전분 가수분해물의 어육단백질에 대한 동결변성 방지 기구에 관하여 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 전분가수분해물의 용해도 측정

전분가수분해물의 용해도는 Schoch 등의 방법 (1964)으로 측정하였다. 시료 0.2g과 증류수 20 ml를 가하여 균질화한 후 3000×g에서 15분간 원심분리하고 상정액 5 ml를 취하여 110°C 건조기에서 건조 중량을 측정하여 다음 식으로부터 구하였다.

$$\text{용해도} = \frac{\text{건조중량}}{\text{시료채취량}} \times 400$$

2. 전분가수분해물 및 actomyosin 용액의 DSC 분석  
전분가수분해물 용액의 변이 온도는 Perkin Elmer DSC 700을 사용하여 측정하였고, 시료용액은 탈이온수로 약 20%~60% (w/w)로 조제하였고, actomyosin 용액 및 옥수수 전분 가수분해물을 첨가한 actomyosin 용액을 조제하였다. 이들 용액을 넣은 pan을 잘 밀봉하고 액체 질소로 -150°C까지 냉각시키고 분당 10°C로 가열하면서 scanning에 의해 thermograms을 얻었다.

### 3. 동결모델계에서 Alkaline phosphatase 실험

Bessey 등의 방법 (1964)에 따라 alkaline phosphatase와 기질인 disodium-p3-nitrophenylphosphate가 포함된 용액을 시료용액에 첨가하여 급속동결시켜 동결저장 (-5, -12, -20°C)하고, 일정 시간이 경과한 후 시료 tube에 반응정지 용액 (28% TCA) 1 ml를 가하고 끓는 물에서 40초간 급속 해동을 시킨 후 얼음물에서 냉각시키고 발색시약 (2N NaOH + 5% sodium hexametaphosphate, 1:1 혼합액) 1 ml를 가하여 400 nm에서 흡광도를 구하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 옥수수전분가수분해물의 찬물에 대한 용해도

식품은 수분이 많이 함유되어 있고 따라서 식품 첨가물은 무엇보다도 물에 대한 용해도가 높아야 첨가물의 기능을 나타낼 수 있고, 특히 본 실험에서 전분 가수분해물을 어육 단백질 동결 변성 방지제로서의 가능성을

검토하였으므로 찬물에 대한 용해도가 중요할 것으로 생각되어 D.E. 값에 따른 용해도를 알아보았다.

Fig. 1은 옥수수전분 가수분해물들의 찬물에 대한 용해도를 나타낸 것이다. D.E. 값이 5, 10, 15, 20 일 때 용해도는 옥수수전분 가수분해물의 경우 각각 64.51, 88.53, 93.41, 95.2%로 나타났고, D.E. 값이 증가함에 따라 용해도는 증가하였는데 이것은 효소의 작용을 용이하게 하기 위하여 95°C에서 5분간 가열하여 호화시켰을 때 부분적인 가수분해 뿐만 아니라 D.E. 값이 증가함에 따라 나선구조의 붕괴로 -OH기의 증가에 기인한 증가된 수화 때문일 것이다.

### 2. 전분가수분해물 및 actomyosin 용액의 DSC (differential scanning calorimetry) thermograms

유리상태와 액체상태 사이의 전이는 물리적 성질의 변화를 수반하고 이런 변화는 액체상태의 자유도와 운동성 증가에 기인한다. 따라서 이런 전이에는 열용량의 변화가 있으므로 이런 전이를 알아보기 위해 열량계를 사용하게 된다 (Reid et al., 1993).

각각의 온도에 동결저장된 전분가수분해물 수용액을 가온할 때 전이를 알아보고 동결 저장 중 반응속도에 관련된 연구를 위하여 용액들의 유리전이를 결정하기 위하여 DSC를 사용하였다. 옥수수 전분가수분해물 용액의 전형적 저온 thermograms을 Fig. 2에 나타내었다. 열용량의 증가로 나타난 유리전이를 볼수 있으며 D.E. 값이 증가할수록 유리전이 온도대는 더 낮은 온도를 나타

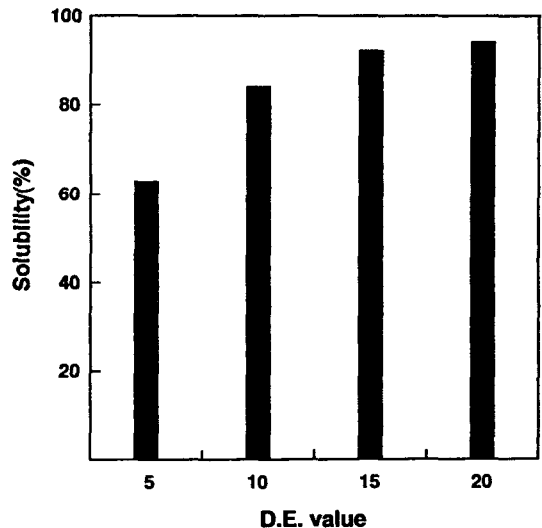


Fig. 1. The solubility of corn hydrolysates in cold water.

내었다. 이것은 D.E. 값이 높을수록 저분자의 가수분해 물들이 많이 포함되어 유리전이 온도가 낮아졌을 것이다.

Table 1은 옥수수 전분가수분해물들의  $T_g'$  값을 나타낸 것이다.  $T_g'$  값은 4~6번 실험치의 평균 값이고 표에서 보는바와 같이 옥수수 전분가수분해물의  $T_g'$  값은 D.E. 5의 경우  $-7.2^{\circ}\text{C}$ , D.E. 10의 경우  $-8.8^{\circ}\text{C}$ , D.E. 15의

경우  $-11.9^{\circ}\text{C}$ , D.E. 20의 경우  $-14.3^{\circ}\text{C}$ 로 나타났고, 이런 결과들은 Levine and Slade (1991) 등이 보고한 상업적 전분 가수분해물의 값과 약간의 차이를 나타내고 있는데 이것은 DSC의 종류에 따른 다른 감도에 따른 결과가 원인일 것이다. 이상과 같은 옥수수전분가수분해물의 DE값이 증가할 수록  $T_g'$  값은 감소하는 것을 알수 있었다. Fig. 3은 sucrose 및 옥수수전분가수분해물 (DE 10,20)이 8% 함유된 명태 actomyosin 용액의 DSC thermograms을 나타낸 것이고,  $T_g'$  값은 앞의 전분가수분해물 단독의 경우와 거의 비슷한 값을 나타내었다. Rosen (1981)은 삼상계 (물, 단백질, 용질)에서 유리전이온도는  $1/T_g' = (W1/Tg1') + (w2/Tg2')$ 의 식에 따른다고하였고, 본 실험에서도 동결계에서 주요한 용질에 의하여 유리전이 온도

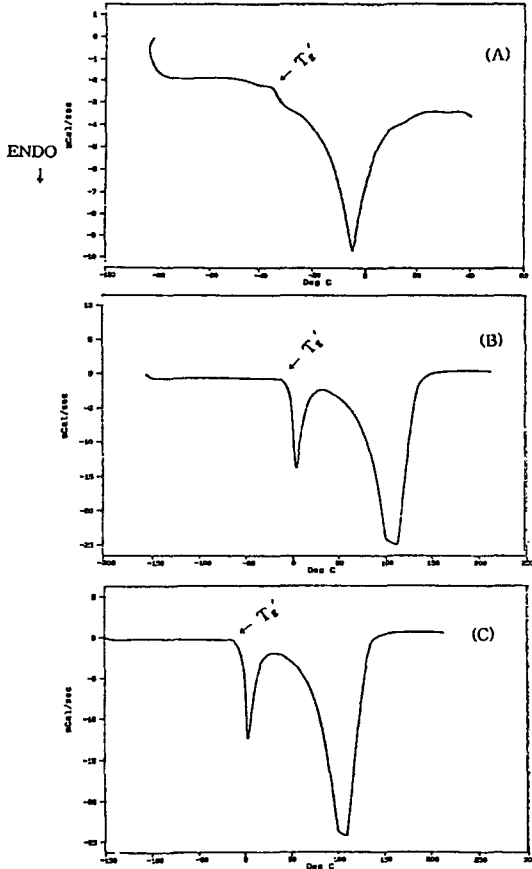


Fig. 2. DSC thermograms of solutions of sucrose and corn starch hydrolysates.  
 (A) ; sucrose 20%, w/w  
 (B) ; corn starch hydrolysate (D.E 10) 28%, w/w  
 (C) ; corn starch hydrolysate (D.E 20) 28% w/w

Table 1.  $T_g'$  values for starch hydrolysates

D. E. 5	D. E. 10	D. E. 15	D. E. 20
-7.2	-8.8	-11.9	-14.3

$T_g'$  ; subzero glass transition temperature of the amorphous solute/unfrozen water matrix surrounding the ice crystals in a maximally freeze-concentrated aqueous solution

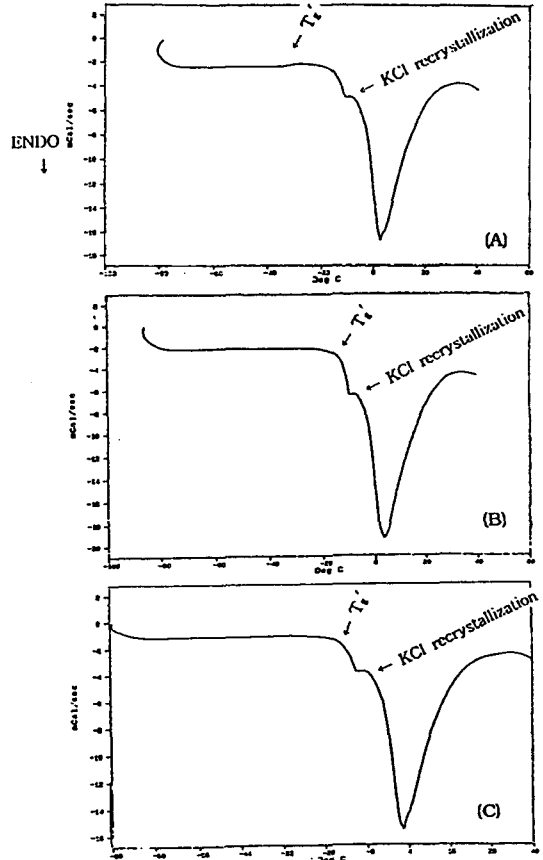


Fig. 3. DSC thermograms of solutions containing additives.  
 (A) ; sucrose 8%, w/w  
 (B) ; corn starch hydrolysate (D.E 10) 8%, w/w  
 (C) ; corn starch hydrolysate (D.E 20) 8% w/w

가 결정된다는 것을 나타낸다.

3. 동결계에서 효소반응 속도

동결계에서 효소 반응속도에 대한 많은 연구가 있었지만 이들의 대부분은 동결 해동에 대한 효소 활성을 연구한 (Carpenter et al., 1987; Carpenter and Crowe, 1988) 것으로 단지 저장 온도와 점도만이 변하는 효소 반응 모델에는 아니었다. 본 실험에서는 계를 단순화시켜 단지 저장온도와 미동결상의 점도만이 변수로 작용할 때의 효소반응 모델계가 필요하므로 동결 해동 과정에서 불활성화가 일어나지 않고 안정한 Lim and Reid (1991)가 사용한 alkaline phosphatase 실험을 행하였다.

Fig. 4는 -5°C에서 시료들을 저장하였을 때, 기질의 가수분해에 대한 sucrose, glucose, maltose, 그리고 옥수수전분가수분해물 D.E. 5,10,15,20의 영향을 나타낸 것이다. 전체적으로 다소간의 차이는 있지만 저장과 함께 기질의 분해율은 급속히 증가하는 것을 알 수 있다. 특히 sucrose, glucos, 그리고 maltose보다는 옥수수전분 가수분해물들이 약간 분해율이 억제되었다. 저장온도가 -5°C일 때는 옥수수전분 가수분해물들의 T<sub>g</sub>' 이상이고 따라서 동결계의 matrix는 유리상태에 미치지 못하므로 효소와 기질의 반응은 쉽게 일어나는 것으로 생각된다.

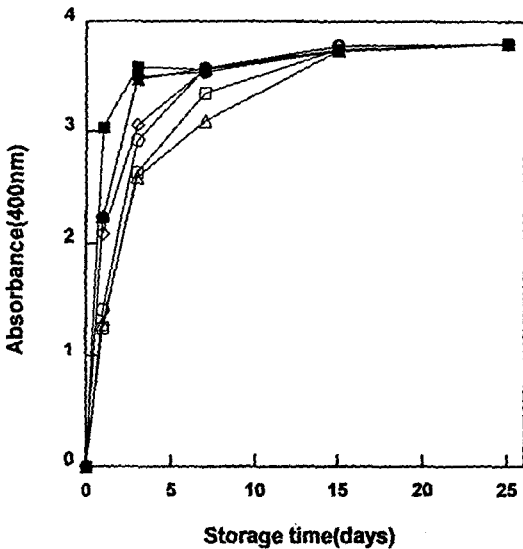


Fig. 4. Effect of corn starch hydrolysate different in D.E. values on the release of *p*-nitrophenol from disodium-*p*-nitrophenyl phosphate during storage at -5°C.  
 ▲—Sucrose    △—D.E.5    ◇—D.E.20  
 ■—Glucose    □—D.E.10  
 ●—Maltose    ○—D.E.15

첨가물들을 함유한 시료들을 -12°C에서 저장하였을 때, 기질의 가수분해율의 변화 (Fig. 5)를 살펴보면 sucrose, glucose와 maltose가 함유된 시료는 대체로 저장과 함께 급속한 *p*-nitrophenol의 생성을 나타낸 반면 D.E. 5,10,15, 20이 포함된 시료들은 생성율이 완만하고 D.E. 값이 낮을수록 더 낮은 생성율을 나타내었다. D.E. 값이 낮을수록 저장온도인 -12°C에서 확산이 억제된다는 것을 나타낸다. Fig. 6에는 -20°C에서 저장할 때 기질의 가수분해에 대한 각 용질들의 영향을 나타내었다. 옥수수 전분가수분해물들이 포함된 시료들은 D.E. 값에 상관없이 전 저장 기간 동안 기질이 거의 분해되지 않았고, 따라서 동결계에서 확산이 거의 일어나지 않았다는 것을 나타낸다. 그러나 sucrose, glucose와 maltose를 포함하는 시료들은 저장온도 -5와 -12°C보다는 흡광도치가 낮지만 대체로 저장에 따라 점점 증가하는 경향을 나타내고 있다.

대부분의 효소들은 동결과 해동하는 과정에서도 활성적인 것이 많고, 동결하는 동안에 미동결상의 용질 농도는 항상 증가하고, 그 결과로 pH, 이온강도, 점성 등과 같은 성질들은 현저한 변화를 받게 된다 (Fennema, 1973). 만약 pH, 이온강도, 그리고 계의 성분과 같은 가능한 모든 조건을 일정하게 유지한다면, 효소의 반응

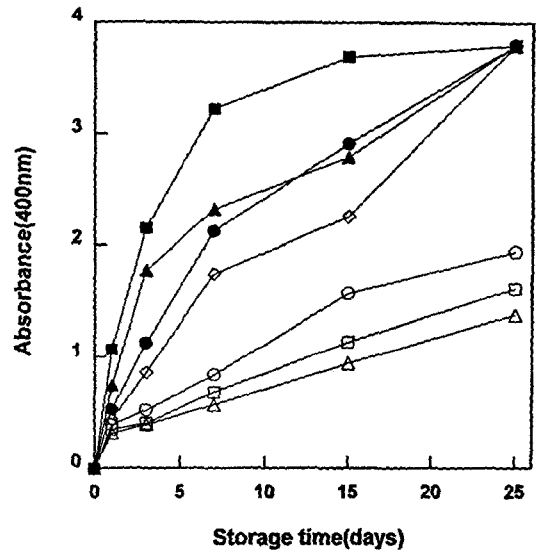


Fig. 5. Effect of corn starch hydrolysate different in D.E. values on the release of *p*-nitrophenol from disodium-*p*-nitrophenyl phosphate during storage at -12°C.  
 ▲—Sucrose    △—D.E.5    ◇—D.E.20  
 ■—Glucose    □—D.E.10  
 ●—Maltose    ○—D.E.15

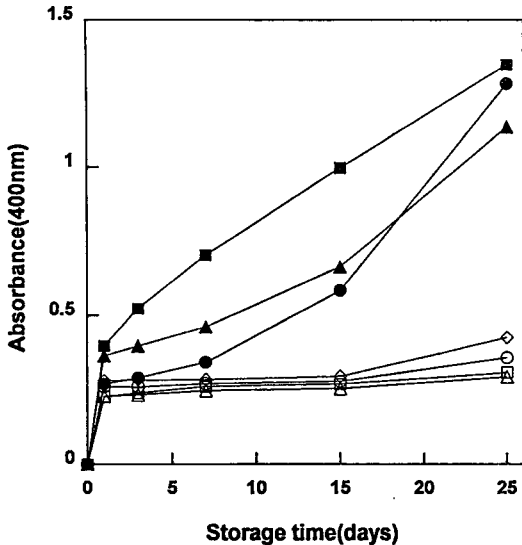


Fig. 6. Effect of corn starch hydrolysate different in D.E. values on the release of  $p$ -nitrophenol from disodium- $p$ -nitrophenyl phosphate during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

▲ Sucrose    △ D.E.5    ◇ D.E.20  
 ■ Glucose    □ D.E.10  
 ● Maltose    ○ D.E.15

속도는 미동결상의 점성과 동결온도에 영향을 받을 것이다. 동결계에서 효소촉매 반응의 속도는 효소의 성질, medium의 조성(효소 순도와 농도, pH, 전해질의 종류와 양, 보호물질의 존재 여부, 동결동안 미동결상에서 일어나는 성분조성의 변화), 그리고 동결조건(동결과 해동 속도, 동결하는 동안에 일어나는 최저온도, 저장시간과 온도) 등에 의해 영향을 받게 될 것이다. Lim and Reid (1991)은 동결계는 동결상(얼음)과 미동결상(용질, 미동결수, 효소, 기질, 염류 등)으로 구성되어있고, 효소반응은 미동결상에서 일어날 것이므로 미동결상의 성질에 의해 영향을 받을 것이고, 따라서 pH, 이온강도, 계의 성분 등의 조건을 가능한 동일하게 유지한다면 효소반응은 미동결상의 점성과 동결저장온도에 의해 조절된다고 하였다. 본 실험에서 sucrose, glucose, maltose 등이 함유된 효소용액들은 저장온도에 따라 다소의 영향은 있지만 효소반응속도는 저장기간에 따라 급속히 진행되었고, 옥수수전분가수분해물들의 경우  $-5^{\circ}\text{C}$  저장에서는 반응이 급속히 진행된 반면에  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서는 반응이 거의 일어나지 않은 것으로 나타났고,  $-12^{\circ}\text{C}$ 에서는 전분가수분해물의 DE값에 따라 반응속도는 차이가 나타났다. sucrose, glucose, maltose는  $T_g'$  값이  $-34$ ,  $-43$ ,  $-29^{\circ}\text{C}$  등으로 본실험에서 사용한 저장온도 보다 낮음으로서

미동결상은 점성이 낮은 상태로 되어 반응속도는 빠른 것으로 생각되었고, 전분가수분해물의 경우  $T_g'$  값이 DE 값에 따라  $-7.2$ ,  $-8.8$ ,  $-12$ ,  $-14.4^{\circ}\text{C}$ 로서 저장온도  $-20^{\circ}\text{C}$  보다 모두 높은 온도이므로 아마 유리상태로 되어 점도가 아주 높아 효소반응은 지연되거나 억제된 것으로 생각된다. 따라서 동결계에서 효소반응속도는 미동결상의 물리적 성질 특히  $T_g'$  온도와 밀접한 관계가 있을 것이다.

전보의 명태 actomyosin 동결변성 방지효과 실험에서 sucrose의 경우는 다소의 차이는 있지만 저장온도에 상관없이 단백질의 동결변성을 방지하고, 이것은 앞서 서론에 언급한 바와 같이 sucrose가 coating material로 작용하는 mechanism이나 소수작용과 수소결합 등에 의하여 단백질을 보호하는 mechanism으로 설명되어야 할 것이고, 옥수수전분가수분해물은 저장온도에 따라 방지효과는 아주 많은 차이를 나타내었다. 즉 가수분해물의 유리전이온도 이하의 저장온도에서는 방지효과가 뛰어났고, 반면에 유리전이온도 이상의 온도에서는 동결변성 방지효과를 거의 나타내지 않거나 떨어지는 결과를 나타내어 alkaline phosphatase 실험에서의 결과와 일치하였고, 따라서 단백질의 동결변성 보호효과는 동결계의 물리적인 변화, 즉 동결계가 유리상태로 되어 단백질간의 응집의 기회가 줄어들어 보호효과를 나타내는 것으로 생각된다. 단백질 동결변성에서 sucrose와 같은 저분자 방지제는 화학적인 작용에 의하여 단백질을 보호하고, 본 실험에 사용한 전분가수분해물과 같은 고분자 물질은 화학적인 보호작용 보다는 물리적인 작용 즉, cryostabilization mechanism (Levine and Slade, 1986)으로 설명이 가능할 것이다.

## 요 약

옥수수 전분가수분해물의 용해도는 D.E. 값이 높을수록 증가하였고, 10 이상에서는 거의 차이가 없었다.  $T_g'$  값은 D.E. 값이 증가함에 따라 감소하는 직선적인 관계를 나타내었다. Alkaline phosphatase의 동결계에서 거동은 glass dynamic mechanism, 즉 효소의 가수분해 속도는 첨가된 물질의  $T_g'$  이하의 온도에서 지연되거나 억제되었다. 옥수수전분 가수분해물은 동결계에서 유리전이온도를 높임으로서 동결계가 유리상태로 되고 따라서 점도는 높아지고 단백질은 분자간 접촉의 기회가 줄어들어 단백질이 보호된다는 cryostabilization mechanism으로 설명 가능하였다.

## 참 고 문 헌

- Akahane, T. 1982. Freeze Denaturation of Fish Muscle Proteins, PhD Thesis. Sophia University, Tokyo, Japan.
- Arakawa, T. and S.N. Timasheff. 1982. Stabilization of protein structure by sugar. *Biochem.* 21, 6536~6544.
- Back, J.F., K. Oakenfull, and M.B. Smith. 1979. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochem.* 18, 5191~5196.
- Bessey, A., O.H. Lowry, and M.J. Brock. 1964. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321~329.
- Carpenter, J.F., B. Martin, L.M. Crowe, and J.H. Crowe. 1987. Stabilization of phosphofructokinase during air-drying with sugars and sugar/transition metal mixtures. *Cryobiology.* 24, 455~464.
- Carpenter, J.F., S.H. Loomis, and J.H. Crowe. 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology.* 25, 244~255.
- Fennema, O.R. 1973. Freezing injury and cryoprotectants. In *Low-Temperature Preservation of Foods and Living Matter*. Fennema, O. R., Powrie, W. D., and Marth, E. H. (Eds). Marcel Dekker, New York, NY.
- Fennema, O.R. 1982. Behavior of proteins at low temperatures. In *Protein Deterioration Mechanism and Functionality*. Cherry, J.P (Ed.). ACS Symp. Ser. 206 : 109. American Chemical Society, Washington, DC.
- Gekko, K. and T. Morikawa. 1981. Preferential hydration of bovine serum albumin in polyhydric alcohol-water mixture. *J. Biochem.* 90, 39~50.
- Lee, J.C. and S.N. Timasheff. 1981. The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* 256, 7193.
- Levine, H. and L. Slade. 1986. A polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products (SHPs). *Carbohydr. Polym.* 6, 213~244.
- Levine, H., and L. Slade. 1991. A polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products. *Carbohydr. Polym.* 6, 213~244.
- Lim, M.H. and D.S. Reid. 1991. Studies of reaction kinetics in relation to the  $T_g'$  of polymers in frozen model systems. In "Water Relationships in Foods," ed. H. Levine and I. Slade, 103~122. Plenum Press, New York.
- Matsumoto, J.J. 1979. Denaturation of muscle proteins during frozen storage. In *Proteins at Low Temperature*, O. Fennema (Ed.), 205~224. ACS Symp. Series 180, American Chemical Society, Washington, DC.
- Noguchi, S. 1974. The Control of Denaturation of Fish Muscle Proteins during Frozen Storage. PhD Thesis. Sophia University. Tokyo, Japan.
- Park, J.W., T.C. Lanier, J. T. Keeton, and D. D. Hamann. 1987. Use of cryoprotectants to stabilize functional properties of prerigor salted beef during frozen storage. *J. Food Sci.* 52, 537.
- Park, J.W., T.C. Lanier, H. E. Swaisgood, D. D Hamann, and J.T. Keeton. 1987. Effects of cryoprotectants in minimizing physicochemical changes of bovine natural actomyosin during frozen storage, *J. Food Biochem.* 11, 143.
- Park, J.W. and T.C. Lanier. 1990. Effects of salt and sucrose addition on thermal denaturation and aggregation of water-leached fish muscle. *J. Food Biochem.* 14, 395.
- Park, J.W. and T.C. Lanier. 1990. Effects of salt and sucrose addition on the thermal denaturation and aggregation of water leached fish muscle. *J. Food Biochem.* 14, 395.
- Reid, D.S., Hsu, J. and Kerr, W. 1993. Calorimetry. In "The Glassy State in Foods." ed. J. M. V. Blanshard and P. J. Lillford, 123~132. Nottingham Univ. Press, Loughborough, England.
- Roos, Y.H. 1995. Phase transitions in foods. 26-29. Academic Press.
- Rosen, S.L. 1982. Fundamental principles of polymeric materials. Wiley interscience, N.Y.
- Schoch, T.J. 1964. Swelling power and solubility of granular starch. In *Methods in Carbohydrate chemistry*, Whistler, R.L.(eds) Academic Press, New York, Vol. 4, 106.

---

1998년 3월 9일 접수

1998년 10월 27일 수리