

# 부동단백질을 이용한 냉동식품의 품질 개선 기술

## Improvement of Freezing Food Quality by Antifreeze Protein

이창호 | 신소재연구단

Chang-Ho Lee | Neo Food Resources Research Group

### 서론

전통적인 식품의 장기저장 방법 중 하나인 냉동은 식품의 온도를 동결온도 이하로 유지하여 미생물의 생육을 억제시킴으로써 식품을 보존하는 방법이다. 그러나 동결 시 형성되는 얼음입자로 인해 식품을 구성하고 있는 동식물 세포가 손상되어 조직이 거칠어지고 식감이 저하되는 문제가 발생하여 식품의 품질을 크게 떨어뜨린다. 지금까지 이러한 동결에 의한 손상을 방지하기 위하여 수많은 동결방지제가 식품에 널리 사용되어 왔다. 현재 냉동 가공식품에 이용되고 있는 동결방지제로는 글리세롤(glycerol), 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 트레할로스(trehalose), 만니톨(mannitol) 등이 널리 이용되고 있다. 그러나 효과적인 동결 방지 기능을 위해서는 높은 농도로 사용되어야 하며 이 경우 식품의 식감, 조직감, 색깔 등에 영향을 줄 수 있으며 경우에 따라서는 독성을 나타내기도 한다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근 관심을 불러 모으

는 것이 부동단백질(antifreeze protein, AFP)이다. 이들 부동단백질은 모두 생물로부터 유래되었으며 극소량만으로도 원하는 수준의 효능을 발휘함에 따라 기존의 동결방지제가 가진 문제점을 한꺼번에 해결할 수 있는 장점이 있다. 부동단백질은 혈액이나 난자 및 수정란의 장기 보존과 같은 의학 분야를 대상으로 연구가 활발히 진행되어 왔다. 부동단백질은 북극이나 남극 대륙 근처에 서식하는 물고기의 혈액에 존재하여 순식간에 얼어 죽을 수 있을 정도의 매우 낮은 온도에서도 살아남을 수 있도록 한다. 또한 당근, 메밀, 겨울보리 등의 식물류, 일부 곤충류 및 미생물 등에도 존재하는 것으로 알려져 있다. 최근까지 부동단백질과 관련하여 진행된 연구를 살펴보면 어류에 존재하는 부동단백질은 1957년 Scholander에 의해 어류 부동단백질의 활성이 보고된 이후 기능, 구조, 분포 등에 관하여 다양한 연구가 진행되고 있다. 겨울납치의 부동단백질이 얼음입자에 결합하는 형태, 질량분석계를 이용한 다양한 종류의 어류에 대한 아미노산 조성이 분

석되었으며 NMR 및 X-선 결정 구조 분석 등을 통하여 얼음과 부동단백질과의 결합 형태가 규명되고 있다. 이외에도 곤충, 바다의 연체동물, 거미류, 진드기 등의 다양한 무척추동물에서도 부동단백질이 발견되었다. 특히 황색 딱정벌레에서는 어류의 부동단백질에 비하여 100배나 활성이 뛰어난 부동단백질이 존재하는 것으로 보고되었다. 그 외 양치류, 이끼류와 같은 원시식물체, 마늘, 겨자, 양배추, 겨울보리, 겨울호밀, 옥수수, 시금치 등 다양한 식물에 널리 존재하는 것으로 알려지고 있다. 미생물에서도 다양한 부동단백질들이 발견되는데 버섯

류, 곰팡이, 세균에 다양하게 존재하는 것으로 밝혀지고 있다. 부동단백질은 구조적인 차이에 따라 부동단단백질(antifreeze glycoprotein, AFGP), Type I, Type II, Type III 부동단백질로 구분된다 (Fig. 1). AFGP는 (Ala-Ala-Thr)<sub>n</sub>의 tripeptide repeating unit로 구성되어 있으며 분자량은 2.6 ~ 33 KDa 정도이다. Type I 부동단백질은 repeating unit로 -(Thr-(X)<sub>2</sub>-polar amino acids-(X)<sub>2</sub>)-의 구조 (X는 대개 alanine)로 구성되어 있고 분자량은 3.6 KDa이며 α-helix 구조를 이루고 있다. Type II 부동단백질은 cysteine/cysteine이 많이 함유된 단백

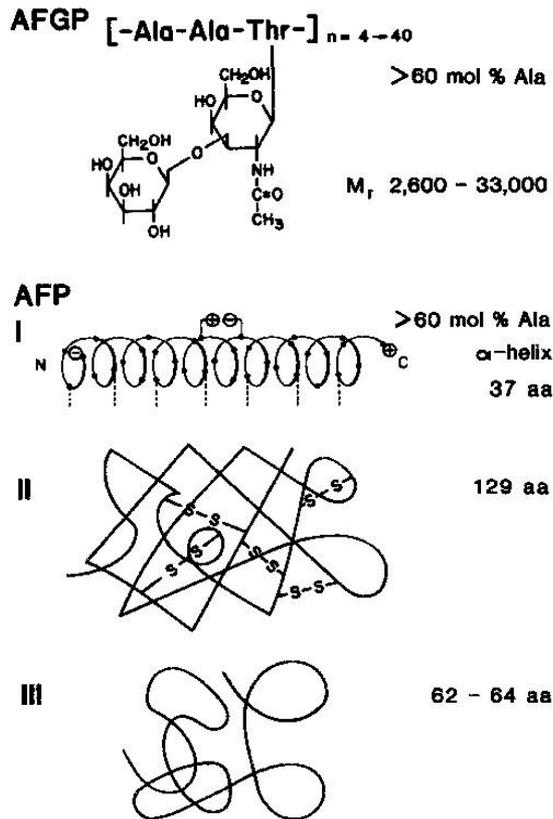


Fig. 1. Schematic representations of the four AF(G)P structures

질로 alanine 잔기를 포함하고 있으며 다양한 분자량을 가지고 있고 구조는 대부분  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn의 구조를 가지고 있다. Type III 부동단백질은 대략 62~66개의 아미노산으로 구성된 polypeptide로 다른 부동단백질과는 구조적으로 다르다. Cysteine을 가지고 있지 않으며 소수성 아미노산이 주된 구성 아미노산이 아니다.

## 작용기작

식품주위의 온도가 빙점 이하로 내려가면 얼음 결정체를 구성하기 위한 핵을 형성하기 위하여 식품의 구성성분 중 물 분자들이 정렬하여 덩어리를 형성하게 된다. 이러한 일련의 과정을 핵형성(nucleation)이라고 한다. 핵이 형성되면 핵주위로

얼음이 결정화되면서 얼음입자가 형성된다. 이러한 얼음 결정체는 열역학적으로 불안한 상태이므로 결정체의 크기, 형태가 변하고 얼음입자 수가 감소하게 된다. 이러한 과정을 얼음의 재결정화(recrystallization)라 하며 주위 환경의 온도가 불규칙적으로 변할 때 일어난다. 얼음입자의 재결정화 과정은 생물체의 조직과 세포에 물리적인 손상을 일으키는 주요 원인이 된다. 대기압 하에서 순수한 물이 얼음으로 결정화될 때 결정체의 a축과 c축 방향으로 물 분자가 흡착되어 육각형의 결정체를 이루면서 얼음 결정체를 형성하게 되고 얼음입자가 점차 커지게 된다(Fig. 2). 이 때 c축 방향의 면을 basal plane이라 하고 a축 방향을 prism face라 한다. 부동단백질은 얼음 결정체의 prism face에 수소 결합에 의한 상호 작용으로 흡착되어 얼음의 성장을 억제 한다(Fig. 3). 부동단백질이 얼음 결정체

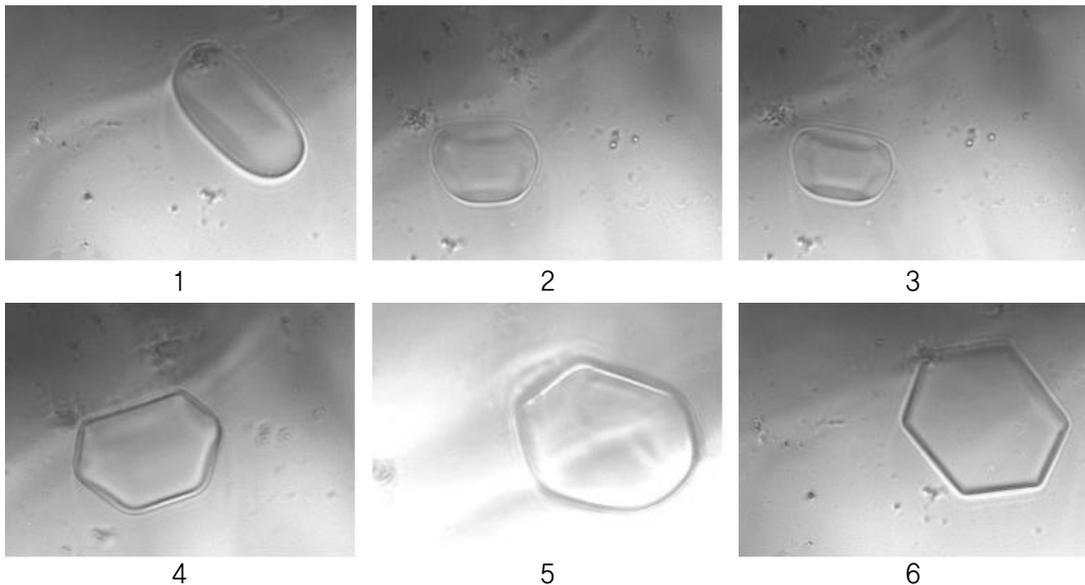


Fig. 2. Procedure of ice crystal formation

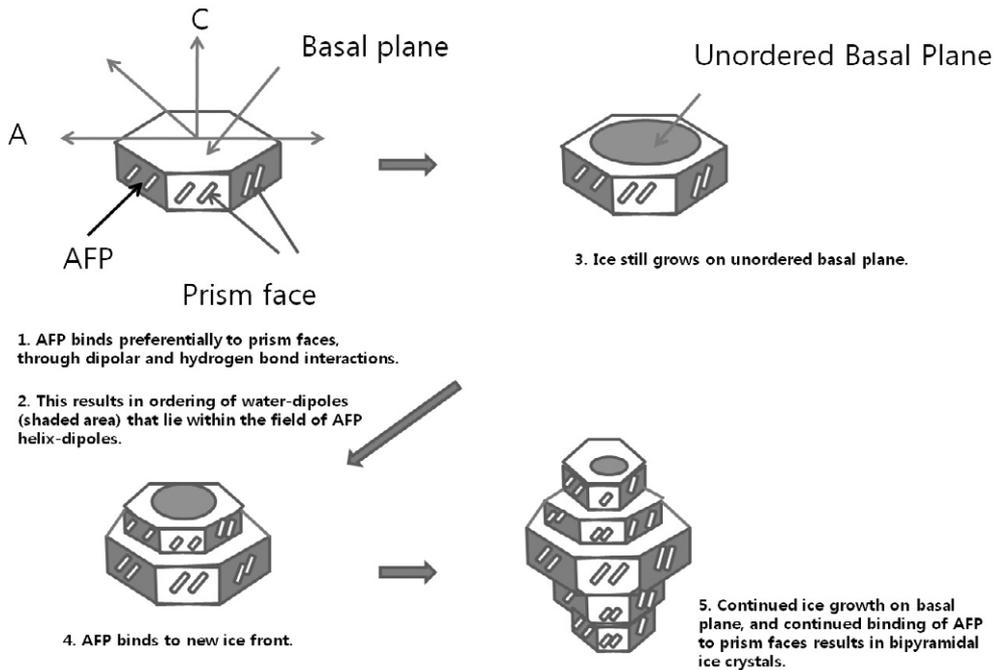


Fig. 3. Schematic representation of type I AFP interaction with ice

의 prism face에 흡착하게 되면 a축으로 진행되던 얼음의 결정화가 지연되고 c축으로만 성장하게 되어 이중 피라미드 형태(bipyramidal ice crystal)로 이와 같은 기작을 통해 얼음입자의 성장을 최소화함으로써 생물체 조직, 세포의 손상을 최소화하는 기능을 하게 된다(Fig. 4).

### 식품분야 활용방안

최근 부동단백질을 산업적으로 이용하기 위한 다양한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 특히 의학 분야의 경우, 부동단백질을 이용하여 혈소판, 난자, 수정란 등을 장기 저장하는 연구가 진행되고 있다.

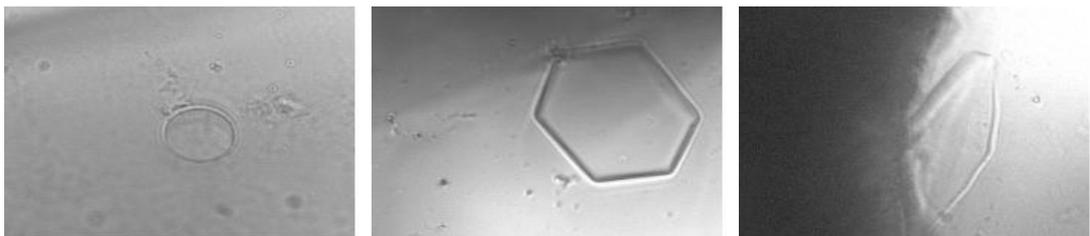


Fig. 4. Morphology of ice crystal in the presence of AFP

식품분야에서의 연구는 아직 미미한 실정이지만 최근 미국의 한 생명공학업체는 부동단백질 유전자를 대구에서 추출해 연어에 주입하는데 성공하였다. 부동단백질을 주입받은 연어는 덜 먹으면서도 잘 자라고 겨울에도 성장을 멈추지 않았다. 부동 단백질의 경우 성장 호르몬을 자극할 뿐더러 겨울에도 성장이 멈추지 않게 하는 효과가 있기 때문이었다. 현재까지 부동단백질은 과채류의 냉동, 냉장 저장, 아이스크림, 제빵 및 육류의 품질 개선 분야 등에 적용되고 있다.

## 과채류

일반적으로 세포내외(extracellular and intracellular) 조직에 존재하는 얼음입자는 얼음의 형성 및 재결정화 과정을 통하여 세포의 원형질막이 손상되며 이에 따른 조직의 물리적인 손상 혹은 바람직하지 않은 품질변화 등을 야기할 수 있다. 냉동 조건 하에서 얼음입자의 급격한 성장이나 재결정화 같은 현상이 일어나면 과채류의 영양 성분의 손실이 커지고 조직감 등도 크게 변화한다. 특히 과채류에 있어서 얼음입자의 형성 및 재결정화를 야기하는 원인은 동결 속도 및 급격한 온도의 변동이다. 토마토의 경우 저장고에서 천천히 냉동될 때 얼음입자가 커지게 되고 이는 조직 내 세포의 공간(extracellular space)을 채우게 된다. 이 경우 만약 주위 온도가 빙점 이하로 급격하게 떨어지게 되면 재결정(recrystallization) 현상이 일어나게 되어 생물체의 조직 및 세포를 손상시키는 원인이 된다. 또한 해동 시에는 조직 내 수분의 급격한 이탈(dehydration) 및 영양성분의 손실을 초래하게 된다. 급속 동결 시에는 조직 내 세포내외(extracellular and intracellular) 공간에서도 매우 작

은 얼음입자가 형성됨으로써 세포의 물리적 손상을 최소화할 수 있다. 토마토의 냉동 저장 시 이러한 물리적 손상을 최소화 할 수 있는 방법으로 비용이 많이 소요되는 급속 동결법 대신 AFP를 이용함으로써 토마토 내의 얼음입자의 성장 및 재결정화를 방지하여 조직 내 영양성분의 손실과 물리적 손상을 최소화 할 수 있다. 조직 내 세포외(extracellular) 공간에 존재하는 AFP는 생물체 조직에 내동성(freeze tolerance)을 부여함으로써 냉·해동 시 얼음입자의 재결정화 등에 의한 물리적 손상을 최소화할 수 있다. 과채류와 같은 식품에 AFP를 도입하는 방법으로 일반적으로 혼합(mixing), 주입(injection), 침지(soaking), 진공침습(vacuum infiltration), 유전자 전달(gene transfer) 등이 이용되고 있다. 특히 토마토 같은 채소류의 냉동 저장 시 품질 변화를 방지하기 위한 방법으로 AFP gene이 클로닝된 형질전환 토마토의 경우 냉동 시 얼음입자 형성 방지 및 재결정화를 억제하는 능력이 매우 우수한 것으로 알려지고 있다.

## 아이스크림

아이스크림 제조에 있어서 AFP의 사용은 아이스크림 속 얼음입자의 성장을 억제하여 제품의 조직감 및 맛의 품질을 월등히 향상시킨다. 또한 아이스크림에 있어서 가장 큰 문제점이 바로 저장 유통 중 온도의 급격한 변화로 인한 얼음입자의 재결정화와 제품의 재냉동으로 인한 거대 얼음입자의 형성이다. 아이스크림 중의 거대 얼음입자는 아이스크림 특유의 부드러운 조직감과 풍미를 파괴한다. 아이스크림에 AFP를 첨가함으로써 얼음입자의 재결정화를 방지하고 제품의 조직감을 개선시키는 효능을 알아보

기 위하여 cold-acclimation을 통해 AFP가 유도된 겨울보리 추출액을 첨가한 모델 아이스크림 용액을 -50℃로 동결한 후 다시 -10℃로 가온하고 최종적으로 -5℃로 고정한 후 얼음입자의 변화를 관찰하였다. AWWE(cold-acclimated winter wheat extract)가 첨가된 것과 첨가되지 않은 아이스크림 간의 얼음입자 형태에 있어서 커다란 차이를 나타낸다(Fig. 5). AFP가 첨가되지 않은 아이스크림의 경우 얼음입자의 크기가 저장 기간이 길어짐에 따라서 성장하지만 AFP가 첨가된 시험군의 경우 얼음입자가 더 이상 커지지 않은 것을 알 수 있다.

### 빵 효모

최근 빵 소비가 급격하게 증가함에 따라서 냉동 생지의 수요가 급증하고 있다. 그러나 생지의 냉동 저장 중 효모 세포막의 파괴와 세포 내 수분이탈로

인한 세포의 수축 및 변형으로 인하여 빵 제품의 품질에 악영향을 주게 된다. 지금까지 이러한 문제점을 보완하기 위한 방법으로는 효모의 함량을 4~10%로 증가시키는 방법을 사용하였으나 비용의 상승, 빵 제품의 풍미와 조직감을 떨어뜨리는 단점이 있다. 이러한 문제를 해결하는 방법의 하나로 효모의 유전자에 AFP gene을 이식하여 효모의 냉동 내성을 향상시키는 방법이 이용되고 있다.

### 육제품

일반적으로 육제품은 -80℃에서 급속 동결된 후 -6℃~-8℃에서 저장된다. 이 때 육제품에 얼음입자가 형성되고 시간이 지남에 따라 점차 커지게 되며 이로 인하여 육제품에 물리적인 손상을 주어 탈수, 조직의 변형 등을 초래하여 육제품의 품질을 크게 저하시킨다. 이 경우 부동단백질을 주입하게

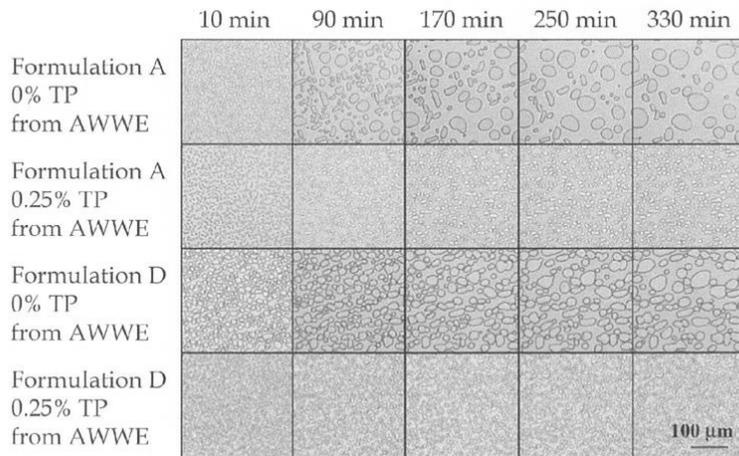


Fig. 5. Bright field pictures taken of formulation A(only sucrose), and formulation D(ice cream mixture), with and without 0.25% AWWE(cold-acclimated winter wheat extracts) at -5℃, for every 80 minute(starting after 10 minutes), TP: total protein.

되면 얼음입자의 성장을 크게 감소시켜 얼음입자에 의한 조직의 손상을 방지할 수 있다. 그 외 부동단백질의 효능을 알아보기 위하여 양고기를 대상으로 부동단백질을 주입한 후 진공 포장하여 -20℃에서 2~16주간 저장한 후 관찰한 결과 탈수 현상이나 얼음입자의 크기 증가 등이 관찰되지 않았다. 이처럼 부동단백질은 육제품의 장기저장에도 매우 유용하게 이용될 수 있다.

## 기대효과

부동단백질을 식품분야에 이용하는데 있어서 걸림돌이 되는 것은 비용 때문으로 현재는 대부분 의학 등 고부가가치 산업에 국한되고 있으며 식품분야에서는 극히 일부 분야에 한정되어 있다. 부동단백질의 가격은 순도에 의하여 결정되며 현재 미국 내 가격은 \$ 500/g 정도이다. 현재 많은 과학자들이 부동단백질을 생합성하거나 대량생산하는 방법을 연구하고 있으며 조만간 가격이 크게 떨어질 것으로 예측된다. 이에 따라 식품에 적용되는 범위도 크게 확대될 것으로 판단된다. 또한 식품분야의 경우 의학 분야와는 달리 고순도의 부동단백질을 필요로 하지 않아 비교적 저렴한 부동단백질을 이용할 수 있다는 장점이 있다. 현재 아이스크림의 품질을 향상시키기 위해 필요한 적정 수준의 부동단백질은 1  $\mu$ g/ml 정도이며 이 농도로도 충분히 아이스크림의 저장, 유통 중 얼음입자의 재결정화를 방지할 수 있다. 따라서 아이스크림 1리터 제조에 소요되는 부동단백질 비용이 50 cent 이하로 떨어뜨릴 수 있다. 또한 이 가격도 향후 훨씬 저렴해질 것으로 판단되며 모든 냉동식품의 품질 향

상을 위하여 부동단백질이 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

## ● 참고문헌 ●

1. Edwards AR, A molecular modeling study of the winter flounder antifreeze peptide as a potential kinetic hydrate inhibitor, *Ann N Y Acad Sci*, **715**(1), 543-544, 1994
2. Duncker BP, Gauthier SY, Davies PL, Cysteine-rich fish antifreeze is produced as an active proprotein precursor in fall armyworm cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **203**(3), 1851-1857, 1994
3. Li B, Sun DW, Novel methods for rapid freezing and thawing of foods-a review, *J Food Engineering*, **54**, 175-182, 2002
4. Rubinsky B, Arav A, Hong JS, Lee CY, Freezing of mammalian livers with glycerol and antifreeze proteins, *Biochem Biophys Res Commun*, **200**(2), 732-741, 1994
5. Brooke-Taylor CA, Grant GH, Elcock AH, Graham Richards W, Mechanism of action of antifreeze polypeptide HPLC6 in solution: Mechanism of solvent behaviour by molecular dynamics, *Chemical Physics*, **204**, 251-261, 1996
6. Hwang CH, Park HW, Min SR, Liu JR, Freeze tolerance enhanced by antifreeze protein in plant, *Korean J Plant Tissue Culture*, **27**(4), 339-343, 2000

7. Hwang CH, Molecular analysis of freeze-tolerance enhanced by treatment of trinexapac-ethyl in kentucky bluegrass, *Korean J Crop Sci*, **44**(2), 176-179, 1999
8. Wen D, Laursen RA, A model for binding of an antifreeze polypeptide to ice, *Biophys J*, **63**, 1659-1662, 1992
9. Wen D, Laursen RA, Structure - function relationships in an antifreeze polypeptide, *J Biol Chem*, **268**(22), 16401-16405, 1993
10. Wen D, Laursen RA, Structure-function relationships in an antifreeze polypeptide, *J Biol Chem*, **267**(20), 14102-14108, 1992
11. Wen D, Laursen RA, A D-antifreeze polypeptide displays the same activity as its natural L-enantiomer, *FEBS Lett*, **317**(1, 2), 31-34, 1993
12. Hinch DK, DeVries AL, Schmitt JM, Cryotoxicity of antifreeze proteins and glycoproteins to spinach thylakoid membranes-comparison with cryotoxic sugar acids, *Biochim Biophys Acta*, **1146**, 258-264, 1993
13. Bae EK, Park GY, 부동단백질의 특성과 식품 산업에의 이용, *식품과학과 산업*, **33**, 150-57, 2000
14. Sonnichsen FD, DeLuca CI, Davies PL, Sykes BD, Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetics of the protein-ice interaction, *Structure*, **4**(11), 1325-1337, 1996
15. Sichel F, Yang DS, Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter founder, *Nature*, **375**(1), 427-431, 1995
16. Sichel F, Yang DS, Structure determination of a lone  $\alpha$ -helical antifreeze protein from winter founder, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **D52**, 486-498, 1996
17. Warren GJ, Hague CM, Corotto LV, Mueller GM, Properties of engineered antifreeze peptides, *FEBS Lett*, **321**(2, 3), 116-120, 1993
18. Suk HJ, Molecular dynamics simulation study on winter flounder antifreeze protein and binding mechanism, 석사학위논문, KAIST, 1996
19. Sung HC, Kim DI, Hwang CH, Immunological assays of freezing tolerance in barley using antifreeze proteins antisera, *Korean J Crop Sci*, **48**(5), 407-412, 2003
20. Chao H, Sonnichsen FD, DeLuca CI, Sykes BD, Davies PL, Structure-function relationship in the globular type III antifreeze protein: Identification of a cluster of surface residues required for binding to ice, *Protein Science*, **3**, 1760-1769, 1994
21. Peters ID, Rancourt DE, Davies PL, Walker VK, Isolation and characterization of an antifreeze protein precursor from transgenic *Drosophila*: evidence for partial processing, *Biochim Biophys Acta*, **1171**, 247-254, 1993
22. Chun JU, Griffith M, Variation of antifreeze proteins during cold acclimation among winter cereals and their relationship with freezing resistance, *Korean J Crop Sci*, **43**(3), 172-178, 1998
23. Meyer K, Keil M, Naldrett MJ, A leucine-rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze

- activity, FEBS Lett, **447**, 171-178, 1999
24. Vanya Ewart K, Yang DSC, Ananthanarayanan VS, Flether GL, Hew CL, Ca<sup>2+</sup>- dependent antifreeze protens, J Biol Chem., **271**(28), 16627-16632, 1996
  25. Daley ME, Spyrapoulos L, Jia Z, Davies PL, Sykes BD, Structure and dynamics of a  $\beta$ -helical antifreeze protein, Biochemistry, **41**, 5515-5525, 2002
  26. Loewen MC, Chao H, Houston Jr. ME, Baardsnes J, Hodges RS, Kay CM, Sykes BD, Sonnichsen FD, Davies PL, Alternative roles for putative ice-binding residues in type I antifreeze protein, Biochemistry, **38**, 4743-4749, 1999
  27. Ng NFL, Hew CL, Structure of an antifreeze polypeptide from the sea raven, J Biol Chem, **267**(23), 16069-16075, 1992
  28. Wilson PW, Beaglehole D, DeVries AL, Antifreeze glycopeptide adsorption on single crystal ice surfaces using ellipsometry, Biophys J, **64**, 1878-1884, 1993
  29. Li Q, Luo L, A study of the growth rates and growth habits of ice crystals in a solution of antifreeze (glyco)proteins, Chem Phys Lett, **263**, 651-654, 1996
  30. Feeney RE, Yeh Y, Antifreeze protein: Current status and possible food uses, Trends Food Sci Technol, **9**, 102-106, 1998
  31. Feeney RE, Yeh Y, Antifreeze protein: Properties, mechanism of action, and possible applications, Food Technol, **47**, 82-90, 1993
  32. Tanaka S, Kobashigawa Y, Miura K, Nishimura Y, Miura A, Tsuda S, Antifreeze Protein, 生物物理, **43**(3), 130-135, 2003
  33. Graether SP, Deluca CI, Baardsnes J, Hill GA, Davies PL, Jia Z, Quantitative and Qualitative analysis of type III Antifreeze protein structure and function, J Biol Chem, **274**(17), 11842-11847, 1999
  34. Tsuda T, Nishimura SI, Synthesis of an antifreeze glycoprotein analogue: efficient preparation of sequential glycopeptide polymers, Chem Commun, 2779-2780, 1996

**이 창 호** 농학박사

소 속 : 한국식품연구원 신소재연구단

전문분야 : 식품공학 및 건강기능식품분야

E-mail : chang@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9226