

단백질 추출에 대한 초음파 기술 적용

Application of Ultrasonic Technology for Protein Extraction

이남혁 | 기능소재연구단

Nam Hyouck Lee | Functional Materials Research Group

초음파의 원리

초음파란 인간의 가청주파수인 20 Hz~20 kHz의 범위를 벗어난 대역의 음을 말한다. 초음파는 기계적 진동파이며 매체를 통하여 전파가 가능하다. 그 속도는 공기 중에서 340 m/sec, 해수 중에서 1,500 m/sec, 철재의 경우 5,000 m/sec로 물성이 단단할 수록 속도가 빠르다. 초음파는 발진기를 통하여 전기적인 신호를 발생시킨 후 진동자로 보내지고 진동자는 전기적 신호를 기계적인 신호로 변환을 한다. 이러한 초음파의 최초 응용은 1921년 프랑스의 랑지방(P. Langevin)에 의해 제작된 측심기(測深機)로 당시 개발된 진동자는 금속원판 사이에 수정판을 샌드위치처럼 끼워 넣은 형태로서 랑지방형 진동자라 불리었다. 그 후 이 방면의 연구는 잠수함 추적을 목적으로 한 연구가 주류를 이루었으나 군사기밀로서 자세한 연구내용이 알려지지 않고 있었다. 1925년에는 미국의 피어스(Pierce)가 초음파 간섭계를 발명하였고, 1932년에는 초음파를 이용

한 빛의 회절이 발견되어 초음파를 단지 물리적 성질을 연구하는 수단으로서만 사용하였다. 1928년 미국의 우드(Wood)와 루미스(Loomis)에 의해 200 kHz의 수정 진동자와 2 kW의 발진기를 이용한 일련의 실험으로 강력한 초음파의 작용과 현상이 알려지게 되었다.

초음파는 통신적 응용, 동력적 응용 및 특수목적 응용으로 크게 나뉜다. 통신적 응용은 초음파를 신호로써 이용한 것으로 수중 소나(sonar), 어군 탐지기, 측심기, 탐상기 등의 대상체를 향해 초음파 펄스를 발사하여 그 반사파를 이용해 대상체의 위치 및 상태를 나타낼 수 있다. 동력적 응용은 초음파를 에너지로 이용한 것으로 미세한 입자까지 제거하는 세정기, 서로 다른 성질의 액체를 섞는 유화기, 가습이나 소독을 위한 액체의 무화기, 플라스틱을 서로 붙이는 용착기, 술이나 향료를 빠르게 숙성하는 숙성기, 굴뚝에서 나오는 연기에 포함된 오염물을 제거하는 집진기 등에 이용된다. 특수 응용은 물고기가 먹는 소리를 출력하여 물고기를 모으는

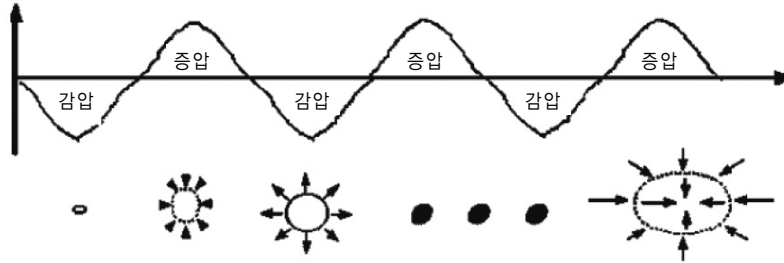


Fig. 1. The principle of cavitation occurs (Dale Ensminger, first edition, 273-358, 1988)

집어기와 금속과 광물, 콘크리트 등을 소성변형 시킬 때 물체 내에서 나오는 불규칙한 초음파 펄스를 수파하여 과도한 응력의 이력과 과다응력이 발생하고 있는 곳의 위치를 알아내어 압축용기의 사고를 예방하는 음향방출기 등에 사용된다.

이 중에서 식품산업에서 이용 가능한 초음파는 동력적 초음파인데, 동력적 초음파에는 저주파와 고주파 방식이 있으며, 저주파 방식의 초음파는 주로 캐비테이션(cavitation) 현상이 일어난다. 캐비테이션 현상은 초음파의 감압측 반주기에 음의 압력이 발생하기 때문에 액체 속에 공동(cavity)이 발생하고 다음 증압측의 반주기에 의해 폭발하여 매우 큰 압력과 고온을 수반한다. 즉, 표면장력 이상의 압력에 의해서 수축 폭발이 일어나는 현상이다.

이 힘의 강도는 수중에서 수백 기압 및 수천 도에 이르고 이러한 에너지를 이용하여 세정, 유화, 용착, 숙성, 추출, 분산 등에 이용하고 있다(Fig. 1, 2).

한편, 고주파 형식의 초음파는 캐비테이션 현상을 나타내지 않고 수분자의 큰 입자가속도 효과를 이용하여 무화(vaporization) 현상을 나타내는 것이 특징이다. 고주파 대역의 초음파에 의해 발생되는 무화현상은 수분자의 입자가 물줄기로부터 흩어져 나와 잘게 분사가 되며 가장 영향을 많이 받는 중심부분은 Fig. 3에서와 같이 기화되는 현상을 보인다. 이와 같은 고주파 형식의 초음파는 주로 반도체, 유리의 세정공정에서 주로 이용하고 있으며, 식품산업에서는 세척, 살균 및 소독 등에도 활용할 수 있다.

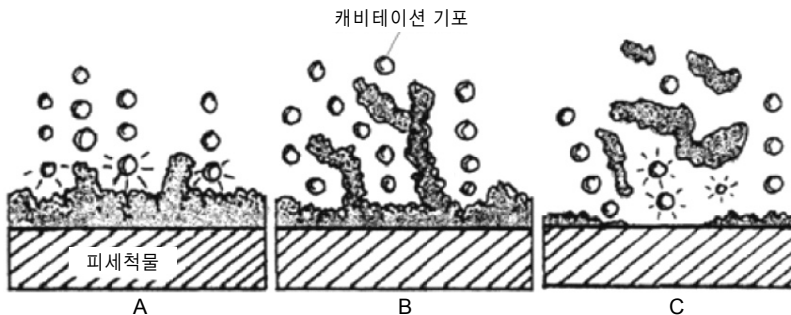


Fig. 2. Cleaning effect of cavitation



Fig. 3. Vaporization phenomena by high-frequency

이상과 같이 초음파는 형식에 따라서 응용할 수 있는 분야가 광범위하다. 따라서 다음에서는 최근에 초음파를 이용한 단백질 추출 기술에 대한 연구 성과를 소개하고자 한다. 본 연구에서는 캐비테이션에 의해 강력한 에너지를 발생시키는 저주파 영역인 20 kHz의 초음파(Table 1)를 이용하였다.

식품분야 활용방안

초음파를 이용한 노계 가슴육으로부터의 단백질 추출

노계 가슴육은 근원섬유로 이루어져 있으며 이것을 구성하는 근원섬유 단백질은 대부분 0.6 M 이상의 KCl 또는 NaCl의 고염농도 용액에서 추출되

는 염가용성 단백질로 이루어져 있다. 염가용성 단백질은 육을 원료로 하는 햄이나 소시지 제조 시 겔을 형성하는데 필수적인 가장 중요한 역할을 담당하고 있으며, 우리들은 주로 이러한 단백질을 섭취하고 있다. 그러나 최근에는 건강식품을 선호하는 시대로 변화하고 있으며 가능한 고염 농도의 가공식품에서 탈피하려는 노력을 기울이고 있다. 본 연구에서는 염가용성 단백질인 근원섬유 단백질을 물리적 기법인 초음파 처리를 하여 수용화 시킴으로써 건강 기능성 식품소재로서의 이용 가능성에 대하여 검토하였다. Fig. 4에는 근원섬유에 0~0.8 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 7.0)이 되도록 조절한 후 20 kHz에서 40분간 초음파 처리하여 측정된 용해도를 나타내었다. 초음파 처리를 하지 않은 대조구의 경우 NaCl 농도가 높아질수록 용해도는 증가하였으며 0.8 M에서 최대 53%의 용해도를 나타내

Table 1. Classification according to the oscillation frequency

분류	주파수(kHz)	원리	특징
저주파	20~90	캐비테이션	직진류, 캐비테이션에 의한 강력한 에너지
고주파	100~400	캐비테이션	캐비테이션에 의한 damage 약함
초고주파	1 MHz 이상	입자가속도	캐비테이션 없음

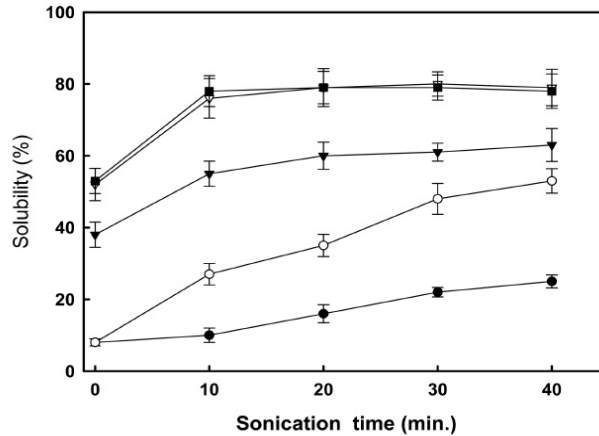


Fig. 4. Effect of salt concentrations on solubility of myofibril prepared from breast muscle of spent hen during sonication. Symbols were the 0 M (●), 0.2 M (○), 0.4 M (▼), 0.6 M (▽) and 0.8 M (■) NaCl (pH 7.0). Samples sonicated at 30% amplitude under 20 kHz.

었다. 이러한 것들을 20 kHz에서 초음파 처리를 하면 0 또는 0.2 M의 NaCl에서는 초음파 처리시간과 함께 서서히 용해도가 증가하였으며 0 M 보다는 0.2 M의 증가 속도가 빠른 것으로 나타났다. NaCl 농도 0.4 M 이상에서는 초음파 처리 초기에 급격히 증가한 후 큰 변화는 인정되지 않았다. 이상의 결

과로부터 초음파 처리는 염용성 단백질의 용해도 증가를 촉진하는 것으로 사료되었다.

다음은 초음파에 의한 근원섬유 가용화율의 pH 의존성을 알아보기 위하여 생리적인 염농도에 가까운 0.2 M NaCl의 공존하에서 검토한 후 결과를 Fig. 5에 제시하였다. 초음파 처리를 하지 않은 대

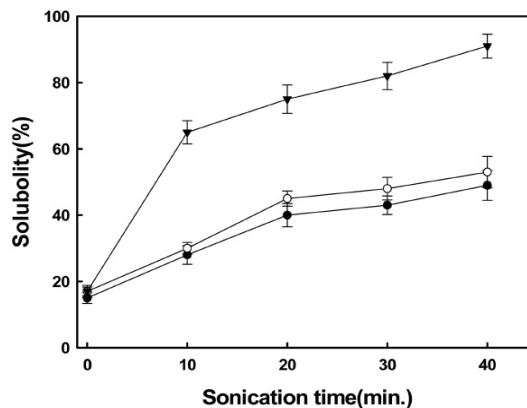


Fig. 5. Effect of pH on solubility of myofibril prepared from breast muscle of spent hen during sonication. Symbols were the pH 6.0 (●), 7.0 (○) and 8.0 (▼). Samples sonicated at 30% amplitude under 20 kHz.

조균의 경우 pH와 관계없이 약 15% 정도의 용해도를 나타내었으며 pH에 의한 용해도의 차이는 거의 인정되지 않았으나 초음파 처리를 하면 pH 의존성이 인정되었다. 즉 pH 6.0 및 7.0에서의 용해도는 초음파 처리시간에 따라서 서서히 증가하는 경향을 나타내었으나 최대 약 50%의 용해도에 불과한 두 pH 간에 큰 차이는 인정되지 않았다. 한편, pH 8.0의 조건하에서 초음파 처리를 하면 처리 10분 후에 약 60%의 용해도를 나타내는 초기에 급격한 증가 추세를 보였으며, 그 후 서서히 증가하여 최대 90% 이상의 용해도를 나타내었다. 이상의 결과로부터 초음파 처리에 의한 용해도의 pH 의존성은 약 산성 또는 중성보다도 약 알칼리 영역의 pH에서 효과가 큰 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 약 산성 및 중성 부근의 pH 영역에서는 초음파에 의해서 근원섬유의 조직이 붕괴되어 섬유를 구성하고 있는 단백질이 밖으로 해리되기 쉬운 구조적인 변화 때문인 것으로 사료되었다. 또한 다른 pH

영역에서 보다 pH 8.0의 약 알칼리 영역에서 용해도의 급격한 증가는 알칼리에 의해서 느슨해진 조직이 초음파에 의해서 구조적인 변화(붕괴)가 보다 쉽게 일어났기 때문인 것으로 사료되었다. 이상의 결과로부터 초음파 처리는 생리적인 염 농도에 가까운 0.2 M NaCl에서도 염용성인 근원섬유 단백질의 가용화가 잘 일어남을 알 수 있었다.

초음파가 근원섬유 단백질의 용해도에 미치는 영향력을 좀 더 상세히 검토하기 위하여 0.1 M NaCl, pH 8.0 및 0.2 M NaCl, pH 7.0의 공존 하에서 20 kHz에서의 Amplitude를 75%로 변형하여 검토한 결과를 Fig. 6에 제시하였다. 또한 여기에서의 초음파 운전 조건은 pulse on/off를 3초, 10초 또는 15초, 3초로 하여 각각 비교하였다. 우선 0.1 M NaCl, pH 8.0의 결과에 있어서는 pulse on/off의 조건에 따라서 용해도에 큰 차이를 보여 주었다. 즉 pulse on/off가 15초, 3초로 설정하여 처리한 것이 3초, 10초의 조건에서 처리한 것보다 월등히 높은

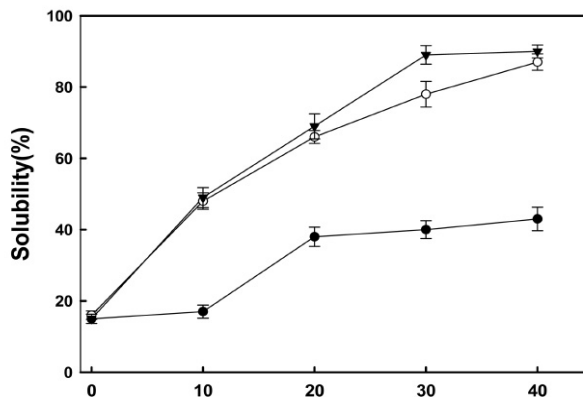


Fig. 6. Effect of sonication conditions on solubility of myofibril prepared from breast muscle of spent hen. Myofibril suspended in 0.1 M or 0.2 M NaCl containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.0 or 8.0) and then sonicated at 30% or 75% amplitude under 20 kHz. (●): 0.1 M NaCl(pH 8.0), 30% amplitude; (▼): 0.1 M NaCl(pH 8.0), 75%amplitude; (○): 0.2 M NaCl(pH 7.0), 75%amplitude.

용해도를 나타내었으며, 같은 크기의 초음파라 하더라도 운행 방법에 따라서 용해도에 크게 영향을 미치는 것으로 사료되었다. 또한 0.2 M NaCl, pH 7.0(pulse on/off 15초, 3초)과 0.1 M NaCl, pH 8.0(pulse on/off 15초, 3초)을 비교한 결과 양자 간에 큰 차이가 나타나지 않았으며, 초음파에 의한 용해도의 변화는 pH 및 초음파 처리조건에 더욱 민감한 것으로 사료되었다.

초음파에 의해서 분리한 가용화 성분의 SDS-PAGE

대부분이 염용성 단백질인 근원섬유 단백질을 생리적 염농도(0.1 M NaCl, pH 8.0)하에서도 초음파 처리에 의해서 단백질이 분리되는 것을 확인하였다 (Fig. 6). 따라서 Fig. 7에는 초음파 처리 시 분리되

는 성분을 조사하기 위하여 10% polyacrylamide gel 을 이용한 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다. 여기에서는 대표적으로 초음파 처리 효과가 우수하였던 0.1 M NaCl, pH 8.0의 결과를 제시하였다. b lane은 가슴육 근원섬유 그대로를 나타낸 것으로서 분자량 205 KDa에 해당하는 myosin heavy chain (MHC)과 분자량 45 KDa에 해당하는 actin(A)의 주요 성분이 관찰되는 전형적인 근원섬유 단백질의 조성을 나타내고 있다. c에 제시한 초음파를 처리하지 않은 근원섬유 단백질로부터 분리된 성분의 조성을 살펴보면 약간의 마이너 성분이 관찰되었을 뿐 주요 단백질은 관찰되지 않았다. 그러나 초음파처리를 10~40분간 처리하면 약 30분까지는 처리시간의 경과와 함께 MHC 및 A에 해당하는 성분이 증가하는 것으로 관찰되었다. 또한 처리 40분

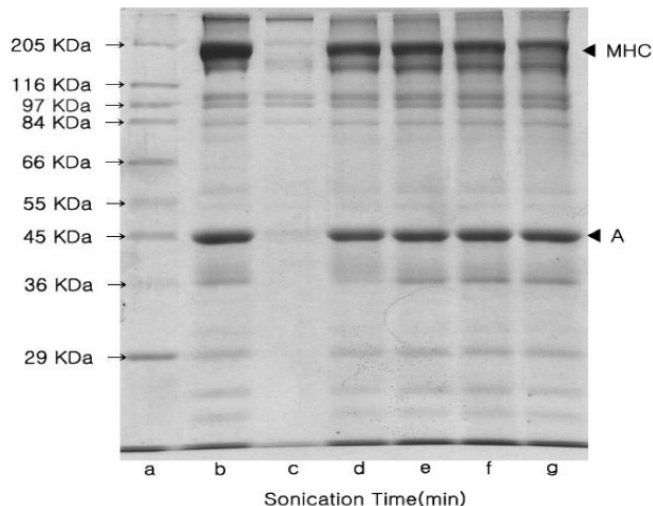


Fig. 7. SDS-PAGE patterns of soluble proteins isolated from myofibril of breast muscle of spent hen during sonication. Myofibril suspended in 0.1 M NaCl containing 20mM Tris-HCl(pH 8.0) and then sonicated at 75% amplitude under 20 kHz. MHC: myosin heavy chain, A: Actin, a: Molecular marker, b: Myofibril, c: Sonicated for 0 min, d: Sonicated for 10 min, e: Sonicated for 20 min, f: Sonicated for 30 min, g: Sonicated for 40 min.

후에는 MHC의 성분이 약간 감소하였으며, MHC보다 저분자 성분이 약간 증가하는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과로부터 초음파 처리를 함에 따라서 분리되는 단백질은 적어도 처리 초기에는 단백질 분해에 의하여 새로이 형성된 수용화 성분이 아닌 것으로 판단되었으며, 이 성분은 초음파에 의한 근원섬유의 구조 붕괴에 의한 것으로 판단되었다. 즉, 이상의 결과를 정리하면 아래와 같은 추론을 내릴 수 있다.



초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 점도

초음파에 의해서 분리된 성분의 특성을 알아보기 위해서 Fig. 7과 같은 조건에서 분리된 성분의 점도를 측정하여 Fig. 8에 제시하였다. 근원섬유 단

백질에 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)이 되도록 조절한 후 20 kHz에서 처리하여 얻어진 가용화 성분의 점도는 가용화가 일어나기 시작하여 30분까지는 처리시간이 길어질수록 점도가 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 30분 이후에는 오히려 점도가 저하하는 현상이 일어났다. 이와 같은 현상은 초음파 처리 30분까지는 근원섬유의 주요 구성 단백질인 MHC 및 A가 점차적으로 초음파에 의해서 분리가 촉진되었기 때문인 것으로 사료되었으며, 초음파 처리 30분 이후의 점도 저하는 분리된 주요 단백질 특히 MHC가 초음파에 의하여 분해가 일어났기 때문인 것으로 사료되었다. 이상은 앞서 제시한 추론을 지지하는 결과였다.

기대효과

식품산업에서 초음파 활용 기술은 아직 초보 단

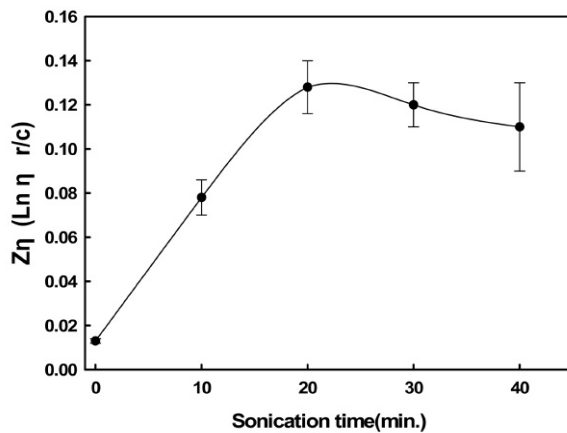


Fig. 8. Changes in viscosity of soluble proteins prepared from myofibril of breast muscle of spent hen during sonication. Myofibril suspended in 0.1 M NaCl containing 20mM Tris-HCl(pH 8.0) and then sonicated at 75% amplitude under 20 kHz.

게이지만 다양한 식품분야에 있어서 활용 가능할 것으로 사료되었다. 이번에 소개한 연구결과에서와 같이 근육 단백질을 추출하는데 있어서 chemical을 그다지 사용하지 않더라도 초음파 처리를 함으로써 cavitation에 의한 구조 변화가 확인되었으며 쉽게 추출되는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 초음파 처리에 의해서 단백질의 분해 현상이 일어나 효소를 거의 사용하지 않더라도 펩타이드를 제조할 수 있는 가능성도 보여주었다. 또한 초음파에 의해서 분리된 단백질은 chemical에 의해서 분리된 단백질 보다 펩신 또는 트립신과 같은 소화효소에 빨리 소화가 일어나는 것으로 확인되었으며 생체 내 단백질의 흡수를 촉진할 수 있을 것으로 예상되었다. 이와 같은 현상은 단백질뿐만 아니라 다당류 등의 각종 유용성분의 추출 및 저분자화에도 활용 가능할 것으로 생각되며, chemical의 사용량을 대폭 줄일 수 있어 친환경적으로 각종 기능성 성분을 분리하는데 유용할 것으로 기대된다.

● 참고문헌 ●

1. Acton JC, Ziegler GR, Carpenter ZI, Dill CW, Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products, *Food Sci Nutr*, **18**, 99-121, 1983.
2. Antonomanolaki RE, Varelzis KP, Georgakis SA, Kaldrymidou E, Thermal gelatin properties of surimi-like material made from sheep meat, *Meat Sci*, **52**, 429-435, 1999
3. Dale Ensminger, *Ultrasonics* Marcel Dekker, first edition, 273-358, 1988.
4. Gladweel GML, The calculation of mechanical impedance relating to an indenter vibrating on the surface of a semi-infinite elastic body, *Sound and vibration*, **8**, 215-220, 1968
5. Nakatani H, Tamura S, Tanaka K, Kitabatake A, Inoue M, A binocular stereoscopic display system for echocardiography, *IEEE Trans Biomed Eng*, **26**(2), 65-67, 1979
6. Kandos N, Luche JL, Sonochemistry of carbohydrate compounds, *Carbohydrate Res*, **332**, 115-131, 2001
7. McClements D, Advantages in the application of ultrasound in food analysis and processing, *Trends in Food Sci Technol*, **6**, 293-299, 1995
8. Olamura S, Hayashi K, Sasaki T, Shioda T, *Japanese Pat*, **16**, 155, 1965
9. Shiota T, Goto Y, Tazuke S, Hayashi K, Okamura S, *Kobunshi kagaku*, **22**(239), 186-192, 1965
10. Xiong YL, Cantor AH, Pescatore AJ, Blanchard SP, Straw ML, Variations in muscle chemical composition, pH and protein extractability among eight different broiler crosses, *Poultry Sci*, **72**, 583-588, 1993

이 남 혁 수산학박사

소 속 : 한국식품연구원 기능소재연구단

전문분야 : 수산학, 근육학

E-mail : lnh@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9095