

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001331-01

보안과제(○), 일반과제(○)

# 돼지 심근으로부터 환경 친화적 단백질 분리 기술 및 기능성 식품 소재 개발에 관한 연구

Development of functional food material and  
eco-friendly extraction technique of protein from cardiac muscle of pork

한국식품연구원

농림수산식품부



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “돼지 심근으로부터 환경 친화적 단백질 분리 기술 및 기능성 식품 소재 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “돼지 심근으로부터 환경 친화적 단백질 분리 기술 및 기능성 식품 소재 개발에 관한 연구에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2012년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 이 남 혁

세부연구책임자 : 김 영 호

세부연구책임자 : 홍 상 필

연 구 원 : 김 영 봉

연 구 원 : 김 윤 지

연 구 원 : 전 기 홍

위 축 연 구 원 : 명 해 인



# 요 약 문

## I. 제 목

돼지 심근으로부터 환경 친화적 및 단백질 분리 기술 및 기능성 식품 소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

### 1. 연구개발의 목적

초음파를 이용한 심근 단백질의 수용화 및 단백질 강화 식품 소재 개발

### 2. 연구개발의 필요성

일반적으로 사람이 필요로 하는 1일 단백질의 소요량은 1.08g / kg(체중)인 것으로 알려져 있다. 예를 들어 60kg의 체중을 지닌 사람의 1일 단백질 요구량은 약 65g이 필요하게 되는 것이다. 운동에 의해서 단백질, 아미노산의 분해가 빠르게 진행되며, 또한 운동 종료 후에는 단백질의 합성도 높아진다는 것이 이미 밝혀져 있으므로 단백질의 필요량은 운동 후 당연히 높아질 것으로 사료된다. 지금까지의 연구보고에 의하면 운동을 심하게 한 경우 단백질의 섭취량을 높이는 것이 신체를 유지하는데 유리한 것으로 되어 있으며, 따라서 심하게 운동을 한 경우 1일 단백질 섭취량을 1.5~2.0g / kg(체중)을 권하고 있다. 이것은 일반사람의 1.5~2.0배의 단백질 섭취량이다.

한편, 동물성 단백질의 섭취원은 대부분 골격근으로부터 얻어지고 있다. 그 이유는 옛부터 식육이라고 불리는 것은 골격근을 이야기하는 것이며, 또한 가공적성이 내장근이나 심근보다 우수하기 때문이다. 돼지의 경우 심근은 전체 체중에 약 0.15%를 차지하고 있다. 심근의 구조는 골격근과 매우 유사한 것으로 알려져 있으며, 특히 필수 아미노산 등이 풍부한 것으로 알려져 있다. 그러나 심근의 경우 상기와 같은 이유로 일부 순대와 같은 일부 가공품 외에는 널리 이용되고 있지 못하고, 대부분 폐기되고 있는 실정이다. 현재 우리나라의 돼지의 도축수는 연간 약1,367만두에 이르고 있으며, 이를 기준으로 환산하였을 때 돼지의 부산물인 심근은 약 6,800톤에 이르고 있다. 따라서 대부분 폐기처분되고 있는 심근의 이용방안에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 심근의 활용가치를 높이기 위하여 초음파 기술을 이용한 환경친화적 단백질의 수용화 및 수거기술을 확립하고자 하며, 이들 수용화 성분을 단백질 강화식품에 이용한다면 폐기되고 있는 심근을 새로운 단백질 자원으로 활용할 수 있으며 폐기 시 문제시되는 환경오염의 문제도 일부 해

결할 수 있을 것으로 사료된다.

### Ⅲ. 연구개발 목표 및 내용

#### 1. 연구개발의 목표

- 초음파를 이용한 심근 단백질의 수용화 기술
- 수용화 단백질의 생화학적 특성
- 수용화 단백질의 가공적성 및 소재화 기술

#### 2. 세부과제별 연구목표의 내용

가. 1차년도 : 심근 근원섬유로부터 단백질의 수용화 기술

- 1) 근원섬유의 추출 기술
- 2) 초음파에 의한 근원섬유단백질의 수용화 (염에 의한 추출 능과의 비교)
- 3) 심근근원섬유로부터 단백질의 수용화 기술 확립
- 4) SDS-PAGE에 의한 수용화 단백질의 조성 분석
- 5) 펩신, 트립신에 의한 수용화 성분의 소화 능
- 6) 분리된 수용화 성분의 점도
- 7) ATPase 활성화에 의한 수용화 단백질의 특성
- 8) 수용화 단백질의 분말화 특성
- 9) 분말 단백질의 물에 대한 용해도
- 10) 분말 단백질의 에멀존 형성능
- 11) 열처리에 대한 변화 특성

나. 2차년도 : 심근으로부터의 단백질의 수용화

- 1) 심근의 혈액제거 기술
- 2) 초음파에 의한 심근 단백질의 수용화
- 3) 심근으로부터 단백질의 수용화 기술 확립
- 4) SDS-PAGE에 의한 심근 수용화 단백질의 조성 분석
- 5) 펩신, 트립신에 의한 수용화 성분의 소화 능
- 6) 심근 수용화 단백질의 점도
- 7) ATPase 활성화에 의한 수용화 단백질의 특성
- 8) 심근 수용화 단백질의 분말화 특성
- 10) 심근 수용화 분말 단백질의 물에 대한 용해도

- 11) 심근 수용화 분말 단백질의 에멀존 형성능
- 12) 심근 수용화 분말 단백질의 열처리에 대한 변화 특성

다. 3차년도 : 초음파로 분리된 단백질의 활용 방안 및 산업화를 위한 초음파기의 layout 작성

- 1) 모델과우더 제조
- 2) 모델 캡슐 제조
- 3) 모델 죽 제조
- 4) 모델 음료 제조
- 5) 모델 비스킷 제조
- 6) 모델 젤리 제조
- 7) 모델 순환식 원통수직형 초음파기 제작
- 8) 산업화를 위한 초음파기의 layout 작성

#### IV. 연구개발결과

돼지 심근은 근원섬유로 이루어져 있으며 이것을 구성하는 근원섬유 단백질은 대부분 0.5 M 이상의 KCl 또는 NaCl의 고염농도 용액에서 추출되는 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 심근의 경우는 햄이나 소시지와 같은 가공품에는 적합하지 않은 것으로 알려져 있다. 그 이유는 단백질의 분자레벨에서는 겔형성능이 우수하나 근육레벨에서는 그렇지 못하기 때문이다. 따라서, 심근의 경우는 우리나라의 전통식품인 순대 등에 일부 쓰여 지고 있을 뿐 대부분 폐기처분되고 있다. 한편 최근에는 건강 기능성식품을 선호하는 시대로 변화하고 있으며 가능한 고염 농도의 가공식품에서 탈피하려는 노력을 기울이고 있다. 본 연구에서는 염가용성 단백질인 근원섬유 단백질을 물리적 기법인 초음파 처리를 하여 수용화 시킴으로서 대부분 폐기되고 있는 심근의 건강 기능성 단백질 식품소재로서의 이용 가능성에 대하여 검토하였다.

##### 1. 초음파 처리에 의한 근원섬유 단백질의 수용화

- 1) 심근으로부터 근원섬유를 추출하는데 있어서는 계면활성제 등을 활용하면 근육에 붙어있는 혈액 등을 손쉽게 제거할 수 있었다.
- 2) 초음파를 이용하여 근원섬유 단백질의 수용화를 검토한 결과 NaCl 농도는 0.2M, pH 8.0, 초음파

는 20kHz의 60~100% amplitude, 40°C이하에서 초음파 처리하는 것이 적합하였다. 또한 이와 같이하여 분리된 근원섬유 단백질의 수율은 90% 이상으로 매우 효율적이었다.

- 3) 초음파에 의해서 분리된 성분을 SDS-PAGE로 분석한 결과 초음파 시간이 경과함에 따라서 myosin heavy chain(MHC), actin(A) 및 이외의 MHC과 A의 사이로 이동되는 성분이 관찰되었다.
- 4) 한편, 다른 염류와의 비교를 위하여 중합인산염(PPi)을 첨가하여 초음파 처리를 한 결과 5mM 정도의 매우 적은 양의 PPi만 첨가하여도 90% 이상의 용해도를 나타내었다. 또한 이온강도 의 한 것인지를 분석한 결과 0.2M NaCl의 경우  $I = 0.2$ , PPi의 경우  $I = 0.05$ 를 나타내 이온강도에 의한 것은 아닌 것으로 판단되었다.
- 5) 이들의 증가속도  $K_i$ 를 산출하여 비교 검토한 결과 5mM PPi를 첨가하여 초음파 처리한 것이 가장 빠르게 나타났다.
- 6) 초음파 추출의 온도 의존성은 40°C까지는 용해도 증가에 큰 영향을 미치지 못하였지만 그 이상의 온도에서는 온도가 높을수록 용해도가 급격히 저하하는 것으로 나타났다.
- 7) 분리된 단백질의 점도는 초음파 처리 초기에는 증가하였지만, 처리시간이 지날수록 점도는 저하하였다. 이 결과로부터 초음파 처리에 있어서 초기에는 근원섬유의 구조 붕괴에 의한 고분자의 성분이 분리되지만, 후기로 진행될수록 단백질의 저분자화가 진행되는 것으로 나타났다. 이결과는 SDS-PAGE의 결과와 같았다.
- 8) 분리된 성분의 ATPase 활성은 초음파 처리 초기에 Ca 및 Mg-ATPase 활성 모두 급격히 떨어지는 것으로 나타나 초음파 처리는 단백질의 변성을 유발시키는 것으로 나타났다.
- 9) 또한 초음파에 의해서 얻어진 가용화 성분의 가공적성을 알아보기 위하여 유화력을 검토한 결과 가용화율이 높을수록 유화력도 높게 나타났다.
- 10) 단백질의 분말화는 동결건조법이 적합하였으며, 또한 분말의 물에 대한 재용해도는 95% 이상을 나타내었다.
- 11) 초음파 처리에 의해서 분리된 단백질은 처리하지 않은 단백질 보다 pepsin 또는 trypsin에 의해 훨씬 빠르게 소화되는 것으로 나타나 우리가 섭취하였을 때 빠른 소화와 함께 체내 흡수가 촉진될 것으로 예상할 수 있었다.
- 12) 이상의 결과로부터 돼지 심장의 근원섬유는 초음파에 의해서 수용화(가용화)가 가능하였으며 단백질 식품 소재로서 충분히 이용 가능할 것으로 사료되었다.

## 2. 초음파 처리에 의한 심근 단백질의 수용화

- 1) 심근의 혈액제거는 초음파를 활용함으로써 증류수로 제거하는 것 보다 약 15% 정도의 효과를 나타내었다.

- 2) 심근단백질은 낮은 염농도에서는 용해되지 않았으나, 초음파를 활용하면 단백질의 분리가 쉽게 일어났다. 이 결과는 근원섬유 레벨에서의 결과와 같았다.
- 3) 심근단백질의 분리에 있어서도 pH 및 초음파의 amplitude의 영향을 받았으며, pH 8.0 및 80%의 amplitude에서 용해도가 높았다.
- 4) 초음파에 의한 심근단백질의 온도의존성은 40°C이하에서는 매우 높은 용해도를 나타냈으나, 그 이상의 온도에서는 온도가 높을수록 용해도가 낮아지는 경향을 나타내었다.
- 5) 이상의 결과로부터 NaCl의 낮은 농도에서도 초음파를 활용하면 심근단백질의 분리가 쉽게 분리되는 것이 확인되었으므로 NaCl 이외의 식품첨가물로 활용되고 있는 PPI 또는 Pi와 같은 다른 염류의 영향에 대해서도 검토하였다.
- 6) NaCl, Pi 및 PPI를 pH 8.0으로 조절한 후 심근현탁액에 각각 10mM씩 첨가하여 초음파 처리한 결과 PPI를 첨가한 것이 가장 높은 용해도를 나타내었다.
- 7) 심근현탁액에 PPI를 첨가하여 초음파 처리한 것이 가장 높은 용해도를 나타내었으므로, PPI의 농도 의존성을 알아보기 위하여 PPI의 농도를 5~20mM이 되도록 심근현탁액에 첨가한 후 초음파 처리를 하였다. 그 결과 5mM의 PPI만 첨가하여도 초음파 처리시간 80분만에 90% 이상의 용해도를 나타내었으며, 10mM 이상에서는 40분만에 90% 이상의 용해도를 나타내었다.
- 8) 이상의 결과로부터 PPI를 첨가함으로써 NaCl보다 훨씬 적은량(약 17.8배의 차이가 있음)으로 심근단백질의 용해도를 높일 수 있었으며, 이와 같은 방법이 보다 친환경적이며, 산업화에 있어서 비용의 문제 등을 고려할 때 보다 유리할 것으로 사료되었다.
- 9) 한편, 초음파 처리와 PPI 중 어느쪽의 영향이 큰지를 알아보기 위하여 아무 처리도 하지 않은 것(Non), 5mM PPI를 첨가한 후 4°C에서 추출한 것(5mM PPI), 초음파 처리만 한 것(sonication), 5mM PPI를 첨가한 후 초음파 처리한 것(5mM PPI-sonication)을 상호비교 하였다. 그 결과 5mM PPI-sonication > sonication > 5mM PPI > Non의 순으로 빨랐다. 따라서 5mM의 PPI보다도 sonication의 영향이 큰 것으로 나타났다.
- 10) 초음파 처리에 의해서 심근으로부터 추출된 가용화 성분의 점도, ATPase 활성, 유화력, 펩신 또는 트립신에 의한 소화력은 기본적으로 근원섬유에서 추출된 성분과 같았다.

### 3. 초음파로 분리된 단백질의 활용방안 검토

#### 1) 모델 파우더 제조

초음파에 의해서 추출한 단백질을 동결건조하면 흰색을 나타내었다. 이것을 90일간 저장하여도 큰 변화는 없었다.

#### 2) 모델 캡슐 제조

추출한 단백질을 동결건조한 후 분쇄하여 500mg의 캡슐에 충전하여 캡슐화 하였다.

### 3) 모델 죽 제조

추출단백질을 0~10% 범위에서 첨가한 후 죽을 제조한 결과 1%까지는 변화가 없었다. 그러나 5% 이상에서는 열에 의한 갈변 현상이 일어났다. 따라서 죽의 경우 1% 정도의 단백질 첨가가 적당한 것으로 사료되었다.

### 4) 모델 음료 제조

사과주스와 스포츠 음료에 추출단백질을 0.5 또는 1.0%를 첨가한 후 비열처리 또는 열처리에 의한 변화를 검토한 결과 첨가량이 많을수록 탁도가 증가하였고 비열처리보다는 열처리한 것이 탁도가 증가하였다. 그러나 단백질의 분산에는 큰 문제가 없었다.

### 5) 모델 비스킷 제조

추출단백질을 0~5% 첨가하여 비스킷을 제조한 결과 대조구와 비교하여 외관상으로 단백질의 첨가에 따른 변화는 없었다. 따라서 비스킷류의 단백질 강화 소재로서 활용도가 높을 것으로 기대되었다.

### 6) 모델 젤리 제조

한천을 활용한 모델 젤리의 경우 단백질의 첨가량이 높을수록 젤리형성능이 저하되는 것으로 나타났다. 젤리식품과 같은 경우에는 추출단백질과 한천의 적정비율을 고려할 필요성이 있었다.

## 4. 실험실 규모의 모델 원통수직형 초음파기 제작 및 산업화를 위한 초음파기의 layout 작성

### 1) 모델 순환식 원통수직형 초음파기 제작

본 기기는 초음파 발전부, Chiller, 초음파처리장치, 시료탱크, 순환펌프 등 크게 5파트로 구성되어 있으며, 그 특성은 다음과 같다. 초음파 발전부는 지금까지의 결과를 토대로 20kHz의 고정형으로 하였으며, 전원은 220V, 60Hz로 하였다. 또한 출력은 초음파의 힘을 조절할 수 있도록 0~1,000W로 하였으며, 여기에 단백질 추출 시 발생하는 열의 효과적인 차단을 위하여 -10~70℃까지 조절할 수 있는 냉각장치를 장착하였다. 본 기기의 가장 특징적인 것은 초음파 발생장치인 원통 수직형 초음파 장치인데, 원통의 길이는 직경 10cm, 길이 30cm로 하였다. 또한 초음파를 일으키는 진동자는 총 8개로 구성되어 있으며, 상호간에 초음파의 영향을 받지 않도록 적당한 간격(5~6cm)을 두었다(Fig. 22). 유속은 0.1~1L/분의 범위에서 조절할 수 있게 하였다.

### 2) 순환식 모델 초음파기에 의한 심근단백질의 용해도

순환식 원통수직형 초음파기를 이용하여 20kHz의 800W에서 5Mm PPI를 첨가한 심근 현탁액으로부터 단백질을 추출한 결과 초음파 처리 90분까지는 급격히 용해도가 증가

하였으며, 최대 약 85%의 용해도를 나타내었다. 따라서 순환식 초음파기를 활용하여 심근으로부터 단백질을 추출하더라도 큰 문제점은 없었으며 산업화를 위한 기본적인 요건은 갖추었다고 사료되었다.

### 3) 산업화를 위한 초음파기의 layout 작성

산업화를 위한 초음파기의 layout은 단백질 분리장치, 시료탱크, 초음파 발생부, 냉각부, 시료공급관, 시료배출관, 순환펌프 등으로 구성하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 1) 실용화 및 산업화는 현재 참여기업을 비롯해 관련업체와 협의 중에 있음.
- 2) 초음파를 이용한 단백질 추출에 대하여 대학원생을 대상으로 세미나를 하였으며 국제 심포지움에서 유사내용을 발표하였음
- 3) 근원섬유단백질의 가용화 방법 및 식품용 단백질의 제조 (10-2011-0009638) 및 심근 단백질의 가용화 방법 및 식품용 단백질의 제조 방법 (10-2011-0022934)등 2건의 특허를 출원하였으며, 초음파로 추출한 단백질의 이용방법에 특허출원을 준비중에 있음. 논문은 특허출원이 완료된 것을 토대로 Sci. 논문 3편 국내논문 3편을 투고할 예정임.
- 4) 초음파를 이용하면 환경친화적이며 효율적으로 단백질을 추출할 수 있는 결과가 나왔으므로 다당체 추출에 초음파를 적용하는 연구를 계획하여 2012년부터 수행하기 시작하였음.

# SUMMARY

## I. Title

Development of functional food material and eco-friendly extraction technique of protein from cardiac muscle of pork

## II. Objective and Significance of Research

### 1. Objective of research

Development of protein supplement and extraction of protein from cardiac muscle of pork by ultrasonic treatment

### 2. Significance of research

It was known that protein requirement for one day of human is 1.08g per kg (body weight). For example, the person who has the body weight of 60kg is required protein of 65g per day. The requirements of protein after exercise is increased naturally, because it was known that the loss of protein and amino acid in the body by sports such as weight training and running is greater and synthesis of protein in the body after exercise occur quickly. By the research reports, after strenuous exercise, it was known that higher intake of protein is advantageous. Therefore, the intake of protein per day is encouraging about 2.0g per body weight. This is 2.0 times of the protein intake of the typical person.

On the other hand, the intake of animal protein is obtained from skeletal muscle. It was called that meat. The so called meat from ancient ago means the skeletal muscle because the processing aptitude of skeletal muscle than cardiac muscle is better. The weight of cardiac muscle of pork occupies approximately 15% of the total weight. The structure of cardiac muscle is very similar to skeletal muscle and essential amino acids is rich. Some of the cardiac muscle is used to process food such as "sundae", the rest will be discarded. The number of pork slaughtered in the domestic for one year is 1,367 ten thousand. When it was calculated from slaughter pork, the amount of cardiac muscle is by-product is reached to 6,800 ton. Therefore, the study on the how to use of wasted cardiac muscle is necessary. This

study is investigated to extraction technique of protein from cardiac muscle by ultrasonic treatment.

### III. Objective and Scope of Research

#### 1. Objective of research

- Extraction of protein from cardiac muscle of pork
- Biochemical properties of extraction protein
- Processing aptitude and utilization of protein food

#### 2. Scope of research

- 1) first year : Extraction technique of protein from cardiac myofibril by ultrasonic treatment
  - (1) Preparation of cardiac myofibril
  - (2) Extraction of protein from cardiac myofibril by ultrasonic treatment
  - (3) Establishment of extraction techniques from cardiac myofibril
  - (4) SDS-PAGE analysis of protein extracted from cardiac myofibril
  - (5) Digestion of extracted protein by pepsin and trypsin
  - (6) Viscosity of extracted protein
  - (7) ATPase activity of protein
  - (8) Powder properties of extracted protein
  - (9) Water solubility of protein powder
  - (10) Emulsifiability of protein powder
  - (11) Thermal stability on the protein extraction
- 1) Second year : Extraction technique of protein from cardiac muscle by ultrasonic treatment
  - (1) Method of removing blood from cardiac muscle
  - (2) Extraction of protein from cardiac muscle by ultrasonic treatment
  - (3) Establishment of extraction techniques from cardiac muscle
  - (4) SDS-PAGE analysis of protein extracted from cardiac muscle
  - (5) Digestion of extracted protein by pepsin and trypsin
  - (6) Viscosity of extracted protein

- (7) ATPase activity of protein
  - (8) Powder properties of extracted protein
  - (10) Water solubility of protein powder
  - (11) Emulsifiability of protein powder
  - (12) Thermal stability on the protein extraction
- 2) Third year : Utilization of protein extracted from cardiac muscle by ultrasonic treatment and drawing of layout of ultrasonic equipment for industrialization
- (1) Manufacture of model powder
  - (2) Manufacture of model capsule
  - (3) Manufacture of model gruel
  - (4) Manufacture of model drink
  - (5) Manufacture of model biscuits
  - (6) Manufacture of model jelly
  - (7) Manufacture of ultrasonic equipment formed vertical-cylinder of circulation type
  - (8) Drawing of layout of ultrasonic equipment for industrialization

#### IV. Results

Cardiac muscle of pork is composed to myofibri and it is dissolved in high concentration of above 0.5M NaCl or KCl solution. Salt soluble proteins is main protein that composed muscle. This proteins has an important role when we are manufacturing sausage or ham is gellation food. However, cardiac muscle is not used because processing aptitude of cardiac muscle is more bad than skeletal muscle. Some of the cardiac muscle is used to process food such as "sundae" is traditional food, the rest will be discarded. In this study, it investigated to the extraction technique of protein from cardiac muscle by ultrasonic treatment.

##### 1. Extraction of protein from cardiac myofibril by ultrasonic treatment

- 1) When we extracted myofibrils from cardiac muscle utilizing surfactant, blood could be easily removed.
- 2) Optimal condition of protein extracted from cardiac myofibrils by ultrasonic treatment was

0.2M NaCl, pH 8.0, below 40°C at range to 60 from 80% amplitude of 20kHz and extraction yield was above 90%.

- 3) Extraction protein was analyzed by SDS-PAGE analysis. Myosin heavy chain(MHC), actin(A) and components is removed between MHC and A were observed with the passage of extraction time.
- 4) To compare with another salts, cardiac myofibrils with 5mM pyrophosphate were treated by ultrasound and it was shown that high solubility above 90%.
- 5) The increased rate(Ki) of solubility calculated from the each results, cardiac myofibrils treated with PPi was faster than that with NaCl.
- 6) Protein solubility of myofibrils was high to 40°C, but decreased quickly at above 40°C.
- 7) The viscosity of extraction protein by ultrasonic treatment increased at the early stage, but decreased slowly with extraction time. From the results, it was indicated that high molecular weight isolated at the early stage, but components of low molecular weight isolated with extraction time.
- 8) Ca and Mg-ATPase activity of myofibrillar protein were decreased quickly by ultrasonic treatment. Therefore, it was indicated that protein was denatured by ultrasonic treatment.
- 9) To investigate the processing aptitude of protein extracted protein from cardiac by ultrasonic treatment, the emulsifiability was investigated. The higher solubility of protein showed higher emulsifiability.
- 10) Manufacture of protein powder was suitable for freeze drying method and the solubility of protein powder for distilled water was above 95%.
- 11) Proteins isolated by ultrasonic treatment was digested rapidly by pepsin and trypsin than not ultrasonic treatment.
- 12) From the results, cardiac myofibrils of pork was extracted rapidly by ultrasonic treatment, it was considered that extracted proteins could be used as protein supplements.

## **2. Extraction of protein from cardiac muscle by ultrasonic treatment**

- 1) The removing of blood from cardiac muscle by using ultrasonic treatment was higher about 15% than removed by distilled water.
- 2) The cardiac protein in 0.2M NaCl solution was not dissolved, but protein was dissolved easily by using ultrasonic treatment. The results were same as results of myofibrils level.
- 3) Optimal condition of protein extracted from cardiac muscle by ultrasonic treatment was 0.2M

NaCl, pH 8.0, below 40°C at range to 60 from 80% amplitude of 20kHz and extraction yield was above 90%.

- 4) Solubility of protein from cardiac muscle was high to 40°C, but decreased quickly at above 40°C.
- 5) From the results, we confirmed that cardiac protein with salt of low concentration was dissolved easily by using ultrasonic treatment. Therefore, we investigated for effect of another salt such as pyrophosphate (PPi) and phosphate (Pi) has been used as food additives.
- 6) The pH of NaCl, Pi and PPI adjusted to 8.0 and then cardiac muscle suspension with 10mM NaCl, PPI and Pi were treated with ultrasound. The solubility of protein were treated cardiac muscle suspension with PPI was highest.
- 7) When cardiac muscle were treated with PPI, solubility of protein by ultrasonic treatment was highest. Therefore, it was investigated that depend on PPI concentration (to 5 from 20mM PPI) for protein solubility by ultrasonic treatment. Solubility of cardiac protein treated with 5mM PPI and ultrasound for 80 minutes was shown above 90% and its treated with above 10mM PPI is required only 40 minutes to reach 90%.
- 8) From the results, it was able to increase solubility of cardiac protein by addition of small amount of PPI than NaCl.
- 9) On the other hand, we investigated influence of solubility between ultrasonic and PPI treatment. The treatment conditions is shown below ; non treatment (non), extraction at 4°C with 5mM PPI (5mM PPI), extraction by sonication (sonication), extraction with 5mM PPI by sonication. Solubility of cardiac protein was increased rapidly in order of 5mM PPI-sonication > sonication > 5mM PPI > Non. Therefore, effect of sonication was greater than PPI.
- 10) The results of viscosity, ATPase activity, Emulsifiability and digestion of pepsin and trypsin of extracted protein from cardiac muscle were same as extracted protein from cardiac myofibrils.

### **3. Utilization of proteins extracted by ultrasonic treatment**

#### **1) Manufacture of model powder**

Protein extracted by ultrasonic treatment were freeze dried and it was shown white color. While protein stored for 90days at room temperature, color was not changed.

2) Manufacture of model capsule

Freeze dried protein was filled in the capsule of 500mg capacity.

3) Manufacture of model gruel

Gruel added to 0 from 10% protein was manufactured by heating. The color of gruel added 1% protein was not changed, however the color of gruel added above 5% protein was changed to brown. In the case of gruel, the addition of 1% protein was more suitable.

4) Manufacture of model drink

Apple juice and sports drinks added 0.5 or 1.0% protein was manufactured by heating or non heating. The turbidity of drinks increase as larger of amount of added protein and heating than non heating treatment increased.

5) Manufacture of model biscuits

Biscuits added to 0 from 5% protein was manufactured, and did not changed apparently.

6) Manufacture of model jelly

Gel forming ability using agar was decrease by added protein. Food such as jelly was necessary to investigation on mixing ratio of agar and protein.

**4. Model manufacture of ultrasonic equipment formed vertical–cylinder of circulation type and drawing of layout of ultrasonic equipment for industrialization**

1) Manufacture of ultrasonic equipment formed vertical–cylinder of circulation type

The ultrasonic equipment of circulation type is composed by five parts of ultrasonic oscillation part, chiller, ultrasonic treatment device, material tank and circulation pump etc. The ultrasonic oscillation part made to fixed type of 20kHz and electric power was 220V of 60Hz. Output of ultrasound can be adjusted to 0 from 1,000W. When protein extracted by ultrasonic treatment, for effective blocking of heat, cooling devices was equipped, it can be controlled to -10 from 70°C.

2) Solubility of cardiac protein extracted by ultrasonic equipment of circulation type

Solubility of protein extracted from the cardiac suspension added 5mM PPI by ultrasonic equipment of circulating type at 800W of 20kHz were measured.

Solubility of protein extracted from the cardiac suspension increased with treatment time and the maximum value of solubility was about 85%. Therefore, utilization of ultrasonic equipment of circulating type on the extraction from cardiac suspension was no problem, it was considered that the basic requirement for industrialization was equipped.

### 3) Drawing of layout of ultrasonic equipment for industrialization

The layout of ultrasonic equipment for industrialization is composed by seven parts of ultrasonic oscillation part, chiller, ultrasonic treatment device, material tank, circulation pump, sample supply line and outlet line, etc.

# CONTENTS

Chapter 1. Outline of the research .....	19
Chapter 2. State-of-the-art .....	21
Chapter 3. Scopes and results of the research .....	25
Section 1. Scopes of the research .....	25
1. Material .....	25
2. Removing blood and myofibrils extraction from cardiac muscle of pork .....	25
3. Removing blood by ultrasonic treatment .....	25
4. Conditions of ultrasonic .....	26
5. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) .....	26
6. Measurement of viscosity .....	27
7. Emulsifiability of protein .....	27
8. Measurement of ATPase activity .....	27
9. Digestion of protein by pepsin and trypsin .....	27
10. Solubility in the water protein powder .....	28
Section 2. Results and discussion .....	29
1. Solubility of myofibrillar protein by ultrasonic treatment .....	29
1) Depend on NaCl .....	29
2) Depend on pH .....	32
3) Depend on ultrasonic amplitude .....	35
4) Effect of pyrophosphate (PPi) .....	38
5) Increases rate constants of extracted protein by salts and ultrasonic .....	41
6) Depend on temperature .....	44
7) Viscosity of extraction protein .....	46
8) ATPase activity of extraction protein .....	47
9) Emulsifiability of extraction protein .....	49
10) Digestion of protein by pepsin and trypsin .....	50
11). Powdering of protein by freeze-dried .....	51
2. Solubility of cardiac protein by ultrasonic treatment .....	52
1). Removing blood from cardiac muscle of pork by ultrasonic treatment .....	52

2) Solubility of cardiac protein by ultrasonic treatment .....	53
(1) Depend on NaCl .....	53
(2) Depend on pH .....	55
(3) Depend on ultrasonic amplitude .....	57
(4) Depend on temperature .....	58
(5) Effects of salts and ultrasonic on the protein solubility .....	60
(가) Effect of salts .....	60
(나) Depend on pyrophosphate(PPi) concentration .....	62
3) Viscosity of extraction protein .....	66
4) ATPase activity of extraction protein .....	68
5) Emulsifiability of extraction protein .....	70
6) Digestion of protein by pepsin and trypsin .....	71
3. Utilization of proteins extracted by ultrasonic treatment .....	72
1) Manufacture of model powder .....	72
2) Manufacture of model capsule .....	73
3) Manufacture of model gruel .....	74
4) Manufacture of model drink .....	75
5) Manufacture of model biscuits .....	76
6) Manufacture of model jelly .....	77
4. Model manufacture of ultrasonic equipment formed vertical-cylinder of circulation type and drawing of layout of ultrasonic equipment for industrialization .....	78
1) Manufacture of ultrasonic equipment formed vertical-cylinder of circulation type .....	78
2) Drawing of layout of ultrasonic equipment for industrialization .....	81
Chapter 4. Achievement and contribution to related field .....	87
Chapter 5. Application plan of the results .....	88
Chapter 6. Technical oversea information collected during research .....	89
Chapter 7. Reference .....	93

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	19
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	25
제 1 절	재료 및 방법 .....	25
1.	시료 .....	25
2.	시료의 혈액제거 및 근원섬유 단백질의 추출 .....	25
3.	초음파에 의한 혈액 제거 .....	25
4.	초음파 처리조건 .....	26
5.	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) .....	26
6.	점도측정 .....	27
7.	단백질의 emulsion 형성능 .....	27
8.	초음파에 의해서 분리된 단백질의 Ca, Mg-ATPase 활성 .....	27
9.	Pepsin 및 trypsin에 의한 수용화 성분의 소화능 .....	27
10.	2차 수용화 능 .....	28
제 2 절	결과 및 고찰 .....	29
1.	초음파 처리에 의한 근원섬유단백질의 수용화 .....	29
가.	염농도 의존성 .....	29
나.	pH 의존성 .....	32
다.	초음파 amplitude의 영향 .....	35
라.	중합인산염(PPi)의 영향 .....	38
마.	염류 및 초음파에 의해서 분리된 단백질의 증가속도 .....	41
바.	온도 의존성 .....	44
사.	초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 점도 .....	46
아.	초음파 처리에 의한 근원섬유의 ATPase 활성 .....	47
자.	초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 유화력 .....	49
차.	초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 pepsin 또는 Trypsin에 의한 소화 .....	50
카.	초음파로 분리된 단백질의 동결건조에 의한 분말화 .....	51
2.	초음파 처리에 의한 심근 단백질의 수용화 .....	52

가. 심근의 혈액제거 기술 .....	52
나. 초음파 처리에 의한 심근 단백질의 수용화 .....	53
(1) 염농도 의존성 .....	53
(2) pH 의존성 .....	55
(3) 초음파의 amplitude의 영향 .....	57
(4) 온도 의존성 .....	58
(5) 초음파에 의한 심근단백질의 수용화에 미치는 염류의 영향 .....	60
(가) 염류의 영향 .....	60
(나) Pyrophosphate(PPi)의 농도 의존성 .....	62
다. 초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 점도 .....	66
라. 초음파 처리에 의한 심근단백질의 ATPase 활성 .....	68
마. 초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 유화력 .....	70
바. 초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 pepsin 또는 trypsin에 의한 소화 .....	71
사. 초음파에 의해서 추출된 심근 단백질의 2차 수용화능 .....	72
3. 초음파로 분리된 단백질의 활용방안 검토 .....	72
가. 모델 파우더 제조 .....	72
나. 모델 캡슐 제조 .....	73
다. 모델 죽 제조 .....	74
라. 모델 음료 제조 .....	75
마. 모델 비스킷 제조 .....	76
바. 모델 젤리 제조 .....	77
4. 실험실 규모의 모델 원통수직형 초음파기 제작 및 산업화를 위한	
초음파기의 layout 작성 .....	78
가. 소규모 순환식 모델 원통수직형 초음파기 제작 .....	78
나. 산업화를 위한 초음파기의 단백질 생산 시스템 layout 작성 .....	81
제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	87
제 5 장    연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	88
제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	89
제 7 장    참고문헌 .....	93

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

노약자 및 스포츠맨과 같은 운동량이 많은 사람일수록 영양섭취의 중요성은 충분히 인식되어 있지만 이를 서포트 할 만큼의 충분한 과학적 정보는 아직 부족한 상태이다. 그러나 그 정보는 최근 서서히 축적되고 있으며, 실제로 응용할 수 있는 정보도 늘고 있다. 특히 최근 밝혀지기 시작하고 있는 아미노산의 supplement의 효용에 대해서는 유용한 정보가 많으며, 운동선수에서부터 일반의 운동애호자에 이르기 까지 이용할 수 있는 단계에 이르고 있다.

운동에 의하여 골격근의 에너지 대사는 현저하게 증가하므로 주요 에너지원인 당질 및 지방의 대사가 빨리 진행되며 단백질 및 아미노산의 대사도 촉진된다. 또한 근조직은 운동에 의하여 손상을 입게 되며, 운동 후의 그 회복에 있어서 단백질 합성과 에너지 대사가 빠르게 진행되기 때문에 아미노산의 이용은 높아진다. 따라서, 운동은 단백질, 아미노산 대사에 큰 영향을 부여하는 생체활동이라 할 수 있다. 신체에 있어서 단백질, 아미노산을 가장 많이 포함하고 있는 곳은 근육이며, 일반적으로 체중의 약 40%를 차지하고 있는 것으로 알려지고 있다. 더욱이 근육은 3~4g / 1kg의 유리아미노산을 포함하고 있으며, 이 유리아미노산이 단백질의 합성과 분해에 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 생각되고 있다.

운동은 근조직 및 근세포에 손상을 입히지만 그 손상은 골격근 세포에 많이 포함되어 있는 creatine kinase를 혈중으로 누출하므로 혈중에서는 그 효소활성을 상승시키는 것으로 알려지고 있다. 이 운동에 의한 근세포의 손상은 weight training과 같은 eccentric한 운동에서 강하게 일어나며, 특히 보통 때 운동을 즐겨하지 않는 사람에게서 운동 시 강하게 일어난다. 근세포의 손상은 근단백질의 분해를 동반하며, 운동 후에는 단백질의 합성도 촉진되는 것으로 생각하고 있다. 따라서, 운동 후에는 충분한 영양공급이 필요하며 이러한 것이 보다 최상의 신체를 유지할 수 있는 필수 조건이라고 사료된다.

일반적으로 사람이 필요로 하는 1일 단백질의 소요량은 1.08g / kg(체중)인 것으로 알려지고 있다. 예를 들어 60kg의 체중을 지닌 사람의 1일 단백질 요구량은 약 65g이 필요하게 되는 것이다. 운동에 의해서 단백질, 아미노산의 분해가 빠르게 진행되며, 또한 운동 종료 후에는 단백질의 합성도 높아진다는 것이 이미 밝혀져 있으므로 단백질의 필요량은 운동 후 당연히 높아질 것으로 사료된다. 지금까지의 연구보고에서도 운동을 심하게 한 경우 단백질의 섭취량을 높이는 것이 신체를 유지하는데 유리한 것으로 되어있으며, 따라서 심하게 운동을 한 경우 1일 단백질 섭취량을 1.5~2.0g / kg(체중)을 권하고 있다. 이것은 일반사람의 1.5~2.0배의 단백질 섭취량이다.

한편, 동물성 단백질의 섭취원은 대부분 골격근으로부터 얻어지고 있다. 그 이유는 옛부터 식육이라고 불리는 것은 골격근을 이야기하는 것이며, 또한 가공적성이 내장근이나 심근보다 우수하기 때문이다. 돼지의 경우 심근은 전체 체중에 약 0.15%를 차지하고 있다. 심근의 구조는 골격근과 매우 유사한 것으로 알려져 있으며, 특히 필수 아미노산 등이 풍부한 것으로 알려져 있다. 그러나 심근의 경우 상기와 같은 이유로 일부 순대와 같은 일부 가공품 외에는 널리 이용되고 있지 못하고, 대부분 폐기되고 있는 실정이다. 현재 우리나라의 돼지의 도축수는 연간 약1,367만두에 이르고 있으며, 이를 기준으로 환산하였을 때 돼지의 부산물인 심근은 약 6,800톤에 이르고 있다. 따라서 대부분 폐기처분 되고 있는 심근의 이용방안에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 심근의 활용가치를 높이기 위하여 초음파 기술을 이용한 환경친화적 단백질의 수용화 및 수거기술을 확립하고자 하며, 이들 수용화 성분을 단백질 강화식품에 이용한다면 폐기되고 있는 심근을 새로운 단백질 자원으로 활용할 수 있으며 폐기 시 문제시되는 환경오염의 문제도 일부 해결할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

기능성 식품이라는 용어는 일본에서 처음으로 사용되었으며 식품이 갖는 다양한 기능을 종합적으로 연구하기 위하여 1984년부터 오차노미즈 여자대학의 후지마키 학장을 중심으로 하는 연구그룹이 문부성의 특정연구비를 지원받아 식품기능의 계통적 해석과 전개라는 테마로 연구를 추진하는 데서 비롯되었다. 식품에서의 기능은 과거에는 물리, 화학적 기능이라는 의미에서 주로 사용하였으나 현재는 생리학적인 기능이라는 의미로 쓰이고 있다. 기능성식품 또는 건강기능식품은 식품에 생체조절 기능 등의 의약적인 개념을 도입한 것이다. 기능성 식품의 구분은 생체조절분야, 질병예방분야, 질병회복분야, 노화억제분야 등으로 나눌 수 있는데 생체조절분야는 자율신경계 이상을 방지, 당분이나 지방 등의 체내 흡수를 조절하여 영양수급을 조절하는 흡수기능 조절식품이다. 질병예방분야는 알레르기를 억제하는 식품이나 면역력을 향상시키는 면역증강 식품, 고혈압, 당뇨병과 같은 주로 성인병에 효과가 있는 식품이다. 질병회복분야는 혈액의 순환에 관여하는 식품으로서 동맥경화 방지, 혈액생성을 촉진시키는 식품이다. 노화억제분야는 노화의 원인의 대표적인 것 중의 하나가 과산화지질의 증가인데 비타민C 등과 같은 산화 억제 식품과 기타 고령자 식품 등을 들 수 있다.

한편, 이들 기능성 식품은 농·축·수산물로부터 기능성 성분을 분리 정제하여 목적에 맞도록 음료, 파우더, 젤리, 환 등 각종 식품에 활용하고 있는데 이들 중 단백질을 소재로 한 기능성 식품은 전체 기능성 식품의 약 40%를 차지하고 있다. 단백질을 활용한 기능성식품은 아미노산, 펩타이드, 단백질 등 다양한 형태로 상용화가 이루어지고 있다. 아미노산은 펩타이드 및 단백질을 구성하는 단백질이 아미노산이며, 천연에서는 20종이 알려져 있다. 그 중 12종의 아미노산은 생체내에서 합성이 되지만, 8종은 필수아미노산으로서 외부로부터 섭취를 하여야 한다. 지방조직의 지방을 분해하는 인자에는 성장 호르몬, 글루카곤이 있으며, 이들 호르몬의 분비를 촉진시키는 아미노산으로서 알기닌(Arg)과 알라닌 이 있다. 시스테인은 피부의 주름을 예방하는 효과가 있어서 의료용으로서 이용되고 있다. 분지사슬 아미노산인 로이신, 이소로이신, 발린은 근육단백질의 분해에 대하여 억제작용을 하며 또한 로이신은 근육단백질 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 그 외 천연아미노산으로서 혈류개선 효과가 있는  $\gamma$ -아미노낙산(GABA)이 있으며, 녹차의 우마미 성분인 테아닌은 항스트레스 작용이 있는 것으로 알려지고 있다. 관련물질로서 베타인의 일종인 카르니틴은 지질대사에 있어서 장쇄 지방산의  $\beta$ -산화에 관여하는 중요한 역할을 하는 것으로 나타나 중성지방의 저하 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 펩타이드는 일반 기능성 식품이외에 스포츠 음료, 의료용 등 다양하게 활용되고 있다. 우

유 펩타이드는 우유 단백질보다도 흡수가 좋으며 기능성도 우수하다. 항알러지, 지질대사촉진 효과, 비피더스균 증식효과가 알려져 있다. 대두 펩타이드의 경우도 지질대사촉진 효과가 알려지고 있다. 소맥 단백질을 효소처리하여 얻어진 글루타민 펩타이드는 확실한 항스트레스 작용과 면역부활 작용이 있으며, 수술 후의 장점막 회복 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 글루타치온은 글루타민, 시스테인, 글리신을 구성성분으로 하는 트리펩타이드 인데 이것은 항산화작용이 강하고 치로시나제 활성을 저해하여 미백효과가 예상되고 있다. 단백질은 3대 영양소 중의 하나이며 생체를 구성하는 기본적인 인자이며, 더욱이 효소의 경우는 생체내의 생화학 반응을 깊어지고 있다. 섭취에 의해서 체내에 들어간 단백질은 생분해가 일어나 아미노산으로 변하며, 이중 70~80%는 사람의 단백질로 재합성되며, 일부는 에너지원 또는 지질합성에 쓰이며 나머지는 배설된다. 대두단백질은 항산화 작용이 있으며, 대두 펩타이드와 마찬가지로 항비만 작용이 있다. 또한 동물성 단백질은 식물체에서 부족한 필수아미노산이 풍부하므로 동물성 단백질의 섭취가 매우 중요하다. 한편 거의 폐기처분되고 있는 돼지의 심장도 고단백질이며 필수아미노산이 풍부하므로 단백질 보충제로서 그 활용이 기대된다.

#### ■ 국내 기술개발 현황

일본에서는 이미 히트친 바 있는 아미노산 음료가 국내(2004년)에서도 히트상품 품목대열에 이름을 올리고 있으며 롯데칠성의 “플러스마이너스”, 한국코카콜라의 “187168”, 동아오츠카의 “아미노밸류”, 해태음료의 “아미노업”, 한국야쿠르트의 “아미노센스”, 일화의 “아미노서플라이어” 등이 대표적인 제품이다. 각 업체마다 아미노산이란 성분은 같지만 컨셉을 달리하여 마케팅을 펼치고 있는데 롯데는 다이어트 음료, 코카콜라는 성장음료, 동아오츠카는 최대 함량의 아미노산, 해태는 남성에게 좋은 음료라는 점을 내세우고 있다. 이와 같이 아미노산 음료의 인기가 상승함에 따라서 후속 제품들이 출시되고 있으며 2010년에는 광동제약의 “파워샷”, 명문제약의 “파워텐”, 삼성제약의 “야”, 동아제약의 “에너지엔”, 동아오츠카의 “X-cocas”, 해태음료의 “에너르기”, 롯데 칠성의 핫식스, 복앤복의 “대쉬”, 티젠의 “닥터티젠파워업 등이 출시되었다.



펩타이드 제품으로서는 CJ가 출시한 “팻다운(Fat down)” 음료가 체지방 제거 및 생성을 억제해 주는 제품으로 약국과 피트니스클럽을 유통경로로 소비자에게 전달하고 있으며, 이상품의 주원료인 대두펩타이드와 L-카르니틴 성분이 체지방 성분의 연소를 통하여 신체에 불필요한 체지방을 에너지로 전환시켜 피트니스 활동의 효율을 증가 시킨다고 설명하고 있다. 이 제품은 출시 10년(2010년)만에 3,000억원을 돌파하였다. 또한 아모레퍼시픽에서는 저분자 마린콜라겐 펩타이드가 함유된 음료인 “슈퍼콜라겐”을 출시하였으며, 수년간 축적된 콜라겐 펩타이드 효능연구를 통하여 미용음료로서의 차별화에 성공하여 출시 2개월만에 70억 매출을 달성하기도 하였다. 또한 매일유업의 “저지방 요거트 퓨어”에 콜라겐펩타이드가 함유되어 있는 제품을 출시하였는데 역시 미용개선을 목적으로 하는 제품이다. 남양유업의 “미&콜라겐”은 피부에 탄력을 주고 주름제거 기능이 있는 콜라겐과 식이섬유가 들어 있는 미용음료이다. 이 제품은 생선의 콜라겐이 0.1% 함유된 것으로 소나 돼지 유래의 콜라겐 보다 품질과 안전성에서 우수하다고 설명하고 있다.



한편, 국산 검정콩이 비만 억제에 탁월한 효능이 있는 것으로 밝혀졌다. 국산 콩의 항비만 효과(펩타이드)와 갱년기 증상완화효과 (콩이소플라본)가 인체실험을 통해 밝혀짐에 따라 국내산 콩의 수요확대로 인한 콩 생산량이 늘어날 것으로 예측되며 이러한 연구결과를 바탕으로 농심과 정식품은 콩을 활용한 다양한 기능성식품을 개발해 국내외에 판매를 하고 있다.

#### ■ 국외 기술개발 현황

외국의 경우 단백질 보조식품에 대한 개발이 많이 이루어져 국내보다 다양한 제품들이 출시되고 있다. 일본의 경우 아지노모토사에서 개발한 스포츠 식품인 “아미노바이탈”이 출시되었으며, 기린비바렛지의 “아미노서푸리” 산토리의 “연소아미노식”, 아사히음료의 “아미노다이어트”, 카루피스의 “아미노카루피스”, 오오즈카제약의 “아미노벨류” 메이지유업의 “슈퍼밤” 젠타

이의 “BCAA시토루린플러스” 무사시의 “퀵” 등이 시판되고 있다. 이 제품들의 효과는 BCAA(Branched chain aminoacid, 분지아미노산)에 착안하여 다른 아미노산은 간장에서 대사가 이루어 지지만 바린, 로이신, 이소로이신의 분지아미노산은 근육에서 대사가 이루어지므로 운동 시 근육의 과열을 예방하고 효율적인 에너지원으로서 활용할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 이 외에도 일반적인 아미노산 음료가 출시되고 있는데 이것은 특정 아미노산에 주목한 것이 아니고 신체를 구성하고 있는 20종류의 아미노산을 골고루 섭취함으로써 건강효과를 기대할 수 있기 때문이다.



한편, 펩타이드를 소재로 한 제품 등도 다양하게 출시되었으며, 고바야시제약에서는 정어리 펩타이드와 홍국을 소재로하여 제조한 제품이 있으며, 칼피스에서는 섭취하면 상쾌해진다는 “시나야카케어”, 산토리에서는 혈압강화작용을 강조한 “고마페프차”, 단백질 강화음료인 시세이도의 “김라인드”, 다이어트효과가 우수한 검은콩 펩타이드인 "패닉 SOS" 등 많은 종류의 펩타이드 서프리멘트가 시판되고 있다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 재료 및 방법

#### 1. 시료

돼지 심근은 한일부산물물의 협조를 받아 도축일로부터 12시간이내의 것을 제공받아  $-40^{\circ}\text{C}$  이하에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 2. 시료의 혈액제거 및 근원섬유단백질의 추출

심근을 적당한 크기(약 1.0cm의 육면체)로 세절한 후, 심근 중량에 대하여 10배의 buffer①(0.1M NaCl, 20mM sodium phosphate buffer(pH 7.0))을 가한다. 이를 균질기(Ultraturrax T20, IKA, Germany)를 이용하여 13,500rpm에서 균질화 하고, 균질화는 ice bath 상태에서 1분 처리, 2분 정지를 반복하면서 실시하였다. 균질화한 시료는 원심분리기(High speed centrifuge, Avanti J-E, Beckman. USA)를 이용하여  $6,000\times\text{G}$ 에서 10분간 원심분리하여 상등액(혈액)을 제거하였다. 원심분리로 얻어진 침전물에 buffer①을 10배량 가하여 균질화하고 거르로 여과한 후  $6,000\times\text{G}$ 에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 침전물에 buffer②(0.1M NaCl, 1% triton X 100, 20mM sodium phosphate buffer(pH 7.0))를 10배 가하여 유리막대를 이용하여 현탁하였다. 이와 같은 조작을 3회 반복하여 심근에 남아있는 혈액과 지방을 제거하였다. 이렇게 얻어진 침전물에 다시 10배량의 buffer①을 가하여 현탁하고 원심분리하는 조작을 3회 반복하면서, buffer②에 함유된 Triton X 100을 제거하여 근원섬유단백질을 추출하였다. 이상의 조작은 모두  $4^{\circ}\text{C}$  이하에서 실시되었다.

#### 3. 초음파에 의한 혈액제거

심근을 적당한 크기(약 1.0cm의 육면체)로 세절한 후, 심근 중량에 대하여 10배량의 증류수를 가한 후 균질기로 13,500rpm에서 균질화 하였으며 ice bath 상태에서 1분 처리, 2분 정지를 반복하면서 실시하였다. 균질화한 시료는 원심분리기를 이용하여  $6,000\times\text{G}$ 에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전에 10배량의 증류수를 가한 후 교반하여 20 kHz에서 20% amplitude로 초음파 처리한 후  $6,000\times\text{G}$ 에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이와 같은 조작을 4회 반복하여 혈액을 제거하였다. 대조구는 시료중량에 대하여 10배량의 증류수를 가하여 균질화한 후 원심분리를 하여 상등액을 제거하는 조작을 총 5회 실시한 것으로 하였다.

### 3. 초음파 처리 조건

초음파기는 20kHz 및 60Hz의 2 종류를 사용하였으며 (VCX 750, 20kHz, Sonic and Material Inc 및 PS-Branson model 8510, 60Hz) Table 1에서와 같은 범위 내에서 기기를 조절하여 처리하였다.

Table 1. Conditions of sonication

Sonication processor	Conditions
Frequency	60Hz, 20kHz
Amplitude	0~100%
Pulse on/off	20sec/20sec
Treatment time	0~240min
Temp.	4℃

한편, 근원섬유의 초음파 처리는 단백질 농도를 5mg/ml로 조절한 후 염농도, pH, 온도 등에 변화를 주어 처리하였다. 즉, NaCl 농도를 0~1.0M, pH 5.0~8.0 로 하였으며 이때의 초음파 amplitude는 80%로 고정하였다. 또한 근원섬유를 가열한 후 초음파 처리하였을 때의 변화를 알아보기 위하여 초음파 처리 전 근원섬유를 5mg/ml로 조절한 후 20~100℃까지 30분간 열처리하였다. 그런 다음 4℃까지 냉각시킨 후 초음파 처리 하였다. 이때의 염농도는 0.2M NaCl, pH 8.0에서 수행하였으며, 초음파는 20kHz의 80% amplitude에서 처리하였다.

### 4. 단백질 용해도 측정

각각의 조건에 따라 초음파 처리한 시료를 23,000 × G에서 20분간 원심분리 하여 상등액 중의 단백질 농도를 Biuret법(Gornall, A, G.등, 1949)으로 측정하였다. 용해도는 총 단백질 함량에 대한 초음파 처리 후 상등액의 단백질 함량의 비로 계산하였다.

### 5. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Lamli법(Lamli, V.K. 등, 1970)에 의하여 10% slab gel을 이용하여 실험하였다. 초음파에 의해서 분리된 시료에 8M urea, 2% mercaptoethanol, 2% SDS와 20mM Tris-HCl(pH 8.0)을 첨가한 후, 100℃에서 2분간 가열하였다. Fixing과 staining은 Neuhoff(Neuhoff V. 등 1988)의 방법에 의해 Commassie brilliant blue R250으로 실시하였다. 탈색은 50% MeOH, 7% Acetic acid로 30분간, 9.2% Acetic acid로 겔의 배경이 투명화 될 때 까지 수행하였다.

## 6. 점도 측정

초음파 처리에 의해서 분리된 단백질 농도를 1mg/mL로 조절한 후 점도를 측정하였다. 점도는 Ostward 점도계(Cannon instrument Co., size:200 5952 ( $c=0.1049$ ))를 사용하였으며, 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$Z_n = \ln n_r, \quad n_r = n/n_0$$

$n$ : 단백질의 유출시간

$n_0$ : 용매의 유출시간

## 7. 단백질의 emulsion 형성능

Emulsion 형성능은 Pearce and Kinsella (1978)의 방법에 의해 측정하였다. 초음파 처리에 의해서 분리된 단백질을  $-75^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동결한 후, 동결건조기(FD5512, Ilshin. Lab. Co., LTD)로 건조하고, 시료의 온도가  $15\sim 18^{\circ}\text{C}$ 가 되면 동결건조를 완료한다. 이렇게 동결 건조된 시료를 1mg/mL로 조절한 후 2.1mL 취하여 corn oil 0.7mL을 첨가한다. 이렇게 만든 oil in water 형태를 ice-bath 상태에서 균질기(Ultra turrax T20, IKA, Germany)를 이용하여 13,500rpm에서 1분 동안 균질화 하였다. 시험관 밑부분에서 emulsion 0.15ml을 취하여 0.1% SDS 2.85mL을 첨가하여  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 반응하고 1분간 정치한 후, 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 초음파 처리한 단백질의 emulsion stability는 emulsion 상태의 시료를  $2^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 5분 간격으로 탁도를 측정하였으며, 이 때, 흡광도 값이 초기의 50%이하로 감소할 때까지 측정하였다.

## 8. 초음파에 의해서 분리된 단백질의 Ca, Mg-ATPase 활성

초음파 처리에 의해서 분리된 단백질의 Ca 및 Mg-ATPase 활성을 측정하였다. 분리된 단백질의 염농도를 일정하게 하기 위하여 투석(Cellu. Septi, Nominal MWCO 3500)으로 염을 제거하였다. 염이 제거된 단백질의 농도를 1mg/ml로 조절한 후 각각의 ATPase 활성을 측정하였다. 측정은 5mM  $\text{CaCl}_2$  또는  $\text{MgCl}_2$ , 0.1M KCl, 25mM Tris-maleate buffer(pH 7.0), 1mM ATP의 혼합용액에 단백질 1ml를 첨가하여  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 반응하였다. 15%  $\text{HClO}_4$ 로 반응을 정지 시킨 후 발색시약을 첨가하여 20분간 방치한 다음 640nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 초음파 처리전의 근원섬유 단백질로 하였다.

## 9. Pepsin 및 trypsin에 의한 수용화 성분의 소화능

초음파에 의해 분리된 심근단백질에 pepsin(1:10,000, Yakuri pure chem., co., Ltd., Japan)과 trypsin(min 30 usp unit/mg, Wako pure chem., co., Ltd., Japan)을 첨가하여, 초음파 분

리 단백질의 소화능을 검토하였다. 초음파 처리 전 심근 단백질과 초음파에 의해 분리된 단백질을 각각 5mg/mL로 조절하고, 단백질 농도에 대해 3%의 pepsin과 trypsin을 첨가하여 30°C에서 0~30분간 반응하였다. 반응한 시료에 8M SDS, 2-mercaptoethanol, 20mM Tris-HCl(pH8.0)을 첨가하고 100°C에서 2분간 가열하여 효소 활성을 정지시킨 후, SDS-PAGE에 의해 초음파 분리 단백질의 pattern을 분석하였다.

#### 10. 2차 수용화 능

동결 건조된 시료에 중량의 30배의 증류수를 첨가하여 용해한 다음 23,000 x G에서 20분간 원심분리 하여 상등액 중의 단백질 농도를 Biuret법(Gornall, A, G.등, 1949)으로 측정하였다. 2차 수용화능은 총 단백질 함량에 대한 원심분리 후 상등액의 단백질 함량의 비로 계산하였다.

## 제 3절 결과 및 고찰

### 1. 초음파 처리에 의한 근원섬유단백질의 수용화

돼지 심근은 근원섬유로 이루어져 있으며 이것을 구성하는 근원섬유 단백질은 대부분 0.5 M 이상의 KCl 또는 NaCl의 고염농도 용액에서 추출되는 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 심근의 경우는 햄이나 소시지와 같은 가공품에는 적합하지 않은 것으로 알려져 있다. 그 이유는 단백질의 분자레벨에서는 겔형성능이 우수하나 근육레벨에서는 그렇지 못하기 때문이다. 따라서, 심근의 경우는 우리나라의 전통식품인 순대 등에 일부 쓰여 지고 있을 뿐 대부분 폐기처분되고 있다. 한편 최근에는 건강 기능성식품을 선호하는 시대로 변화하고 있으며 가능한 고염 농도의 가공식품에서 탈피하려는 노력을 기울이고 있다. 본 연구에서는 염가용성 단백질인 근원섬유 단백질을 물리적 기법인 초음파 처리를 하여 수용화 시킴으로서 대부분 폐기되고 있는 심근의 건강 기능성 단백질 식품소재로서의 이용 가능성에 대하여 검토하였다.

#### 가. 염농도 의존성

Fig. 1에는 근원섬유에 0~1.0 M NaCl, 20 mM phosphate(pH 7.0)가 되도록 조절한 후 20 kHz에서 80% amplitude로 240분간 초음파 처리하여 측정된 용해도를 나타내었다. 초음파 처리를 하지 않은 대조구의 경우 NaCl 농도가 높아질수록 용해도는 증가하였으며 1.0 M에서 최대 55%의 용해도를 나타내었다. 이러한 것들을 20 kHz에서 초음파 처리를 하면 0~0.2 M까지는 초기에는 큰 변화가 인정되지 않았으나 초음파 처리 시간이 경과함에 따라서 용해도는 증가하기 시작하였다. 이 경향은 NaCl 농도가 높을수록 증가 속도가 빠른 것으로 나타났다. 한편, 0.4M 이상에서는 초기의 용해도의 증가속도가 빨라지기 시작하였으며, NaCl 농도가 높을수록 초기의 용해도의 증가속도가 빨라지는 것으로 나타났다. 또한, 초음파 처리시간이 길어질수록 증가하는 경향이었지만 초기에 빠르고 후기에 느린 2단계의 증가속도를 나타내었다. 이상의 결과는 초음파 처리가 근원섬유 단백질의 용해도(수용화)의 증가를 촉진시키는 것으로 나타났다. 즉, 근원섬유 단백질의 용해도는 NaCl 농도에도 의존하지만 초음파 처리에도 크게 영향을 받아 초음파 처리하지 않은 순수 염농도 의존성에서는 최대값이 1.0M NaCl에서 약 55%이었던 것이 초음파처리를 하면 약 90% 까지 상승하는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 염 농도에 영향을 받지 않는 영역(0~0.2M NaCl)에서는 용해도가 5%이었던 것이 초음파에 의해서 약 20~60%까지 증가되는 것으로 나타났다.

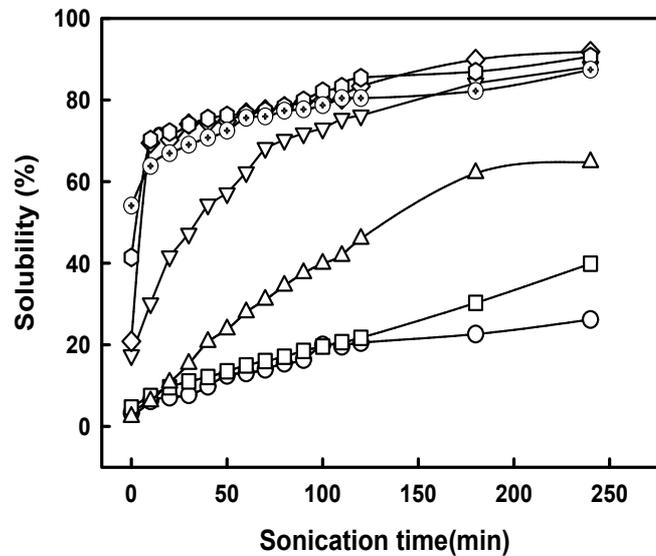


Fig. 1. Effects of salt concentrations and sonication on solubility of myofibril prepared from cardiac muscle of pork.

Symbols were the 0 M(○), 0.1 M(□), 0.2 M(△), 0.4 M(▽) 0.6 M(◇), 0.8 (⊕) and 1.0 M(⊙) NaCl(pH 7.0). Samples sonicated at 80% amplitude under 20 kHz.

다음은 Fig. 1과 같은 조건하에서 분리한 단백질의 subunit 조성을 SDS-PAGE로 분석하여 그 결과를 Fig. 2에 제시하였다. NaCl 농도 0M에서 초음파 처리를 하지 않은 것은(0 min.) 근원섬유로부터 거의 단백질은 분리되지 않았다. 그러나 초음파처리를 하면 시간의 경과와 함께 단백질이 분리되었으며 주로 분자량이 43KDa 및 23KDa에 해당하는 성분이 검출되었다. 그러나 0.1M NaCl과 같은 경우는 약간 그 경향이 달랐다. 0.1M NaCl에서는 43KDa 및 23KDa에 해당하는 성분은 초음파 처리시간에 따라서 크게 증가하지 않았으며, 전기영동 상에서 43KDa 보다 이동도가 작은 수많은 성분이 관찰되었다.

0.2M NaCl의 경우 초음파 처리 0시간에는 200KDa(myosin heavy chain인 것으로 추정)의 성분이 거의 관찰되지 않았는데, 초음파 처리를 함에 따라서 시간의 경과와 함께 200KDa에 해당하는 성분이 증가하였다. 뿐만 아니라 43KDa(actin인 것으로 추정) 및 23KDa(myosin light chain으로 추측)에 해당하는 성분도 동시에 증가한 것으로 나타났다. 또한 200KDa와 43KDa사이에 이동되는 성분들 및 200KDa 성분보다 고분자로 추정되는 성분들도 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 초음파에 의해서 구조적인 변화가 확실히 일어나고 있음을 나타내었다. 초음파 처리 초기에 있어서는 근원섬유의 구조가 붕괴되기 시작하면서 생체내에서 긴 myosin filament의 형태로 존재하던 것이 polymer 및 monomer의 형태로 변화하기 시작하며, 초음파 처리시간이 길어짐에 따라서 이러한 monomer도 peptide

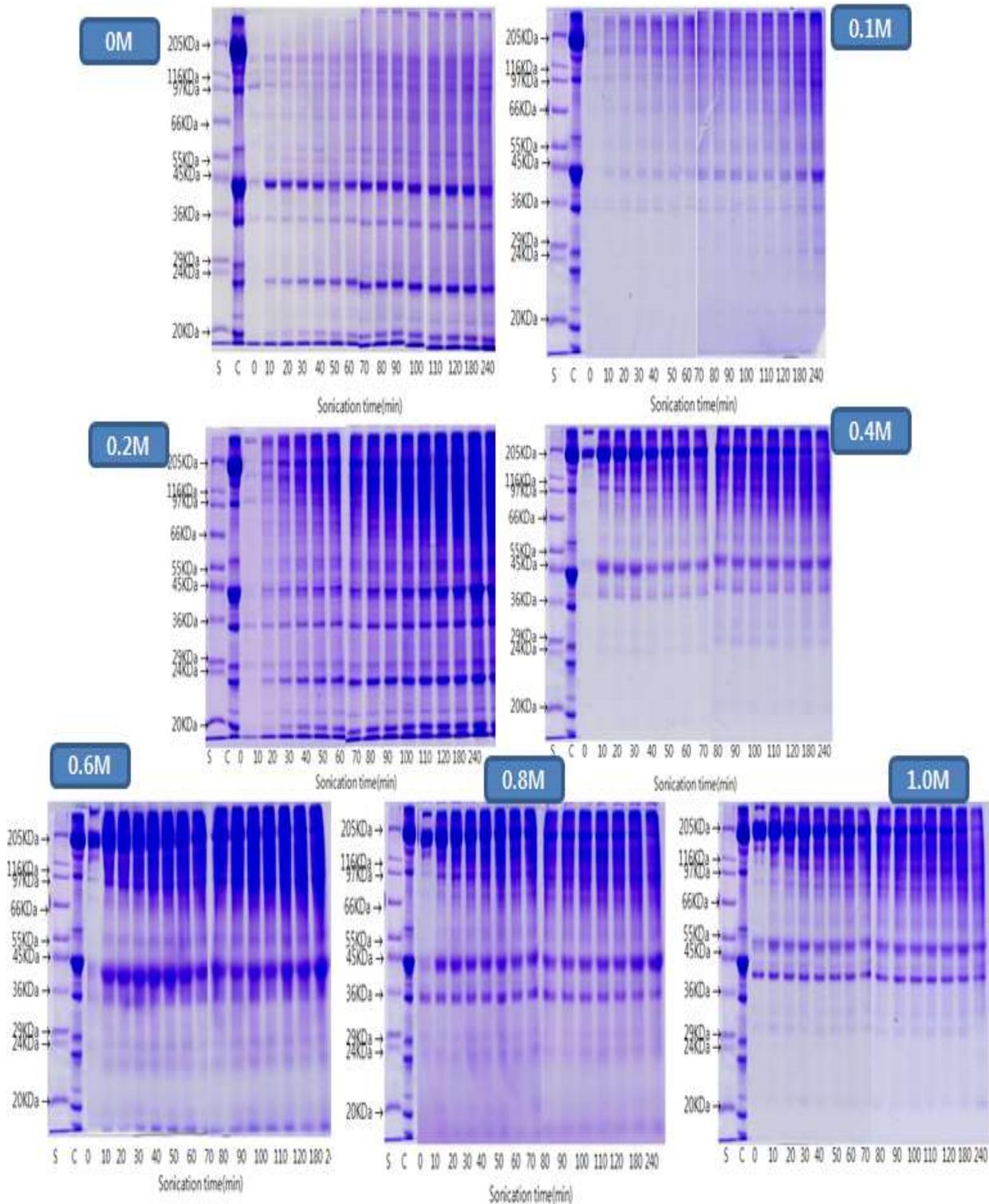


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of soluble protein isolated from cardiac myofibril of pork by sonication and salt concentration. Protein isolated under same conditions as in Fig. 1.

형태로 분해가 일어나는 것으로 추측하였다. 또한 분자량 43KDa에 해당하는 성분도 초음파 처리시간의 경과와 함께 늘어났는데 43KDa의 성분은 근원섬유를 구성하는 주요 단백질 중

actin에 상당하는 성분이며, 구형 단백질로서 생체내에서는 filament 형태로 존재하고 있으며 myosin과의 상호작용을 담당하고 있는 매우 중요한 단백질이다. 이와 같은 단백질이 초음파 처리에 의해서 늘어난 것은 myosin과 actin이 결합된 상태에서 약간의 NaCl 첨가로 해리가 일어나기 좋은 조건이 되어 여기에 초음파 처리를 함으로서 확실하게 해리를 일으키는 현상이 일어났기 때문인 것으로 사료되었다. 또한 43KDa의 경우 초음파를 오랫동안 처리하여도 분해되는 양상은 일어나지 않았는데 actin의 경우 myosin 보다 매우 강한 단백질인 것으로 알려져 있으며, 이러한 것이 물리적인 힘에 의해서도 분해가 일어나지 않는 것으로 사료되었다.

한편 0.4M 이상의 NaCl 농도에서의 결과를 살펴보면 NaCl 농도와는 관계 없이 거의 같은 경향의 결과를 나타내었다. 즉, 초음파 처리를 하지 않더라도 많은 양의 200KDa에 상당하는 성분이 관찰되었으며 초음파 처리 초기에는 이 성분이 다소 증가하는 경향을 보이다가 다시 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 이와 함께 43KDa와 200KDa의 사이로 이동되는 성분들이 증가하는 것으로 관찰되었다.

이상의 결과로부터 초음파 처리는 근원섬유 단백질의 용해도를 촉진시키는 것으로 나타났다. NaCl의 첨가와와는 관계없이 용해도는 증가하였으며 고염농도에서보다 오히려 생리적인 염농도 부근에서 그 효과가 크게 나타났다. 즉 1.0M NaCl에서는 초음파처리에 의해서 약 1.6배, 0.8M 약 2.2배, 0.6M 및 0.4M 약 4.5배, 0.2M 약 12배, 0.1M 약 7.4배, 0M 약 4배의 효과가 인정되었다. 이 결과는 NaCl을 그다지 사용하지 않더라도 생리적인 염농도 부근에서 초음파를 적절히 활용함으로써 충분히 근원섬유 단백질을 수용화 할 수 있는 것으로 나타났으며 또한 추출 후의 단백질은 붉은색에서 백색으로 완전히 혈액이 제거되어 있었다. 따라서 초음파를 사용하여 폐기처분되고 있는 돼지 심근으로부터 단백질을 분리하여 기능성 단백질 식품소재로 활용함으로써 환경친화적이며, 새로운 단백질 자원의 확보라는 차원에서 본 기술이 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

## 나. pH 의존성

일반적으로 용해도는 pH의 영향을 크게 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서도 은 초음파에 의한 근원섬유의 가용화율의 pH 의존성을 알아보기 위하여 pH를 5~8의 범위 및 생리적인 염농도인 0.1M NaCl의 공존하에서 검토한 후 결과를 Fig. 3에 제시하였다. 여기에서는 pH간의 차이를 확실히 검토하기 위하여 0.1M NaCl로 하였다. 초음파 처리를 하지 않은 대조구의 경우 pH와 관계없이 수% 정도의 용해도를 나타내었으며 pH에 의한 용해도의 차이는 거의 인정되지 않았다. 그러나 초음파 처리를 하면 pH 의존성이 확실히 인정되었다. 즉, pH가 높을수록 또한 초음파 처리시간이 길어질수록 용해도는 증가되었다. 실지로 측정된 pH 변화에 따른 용해도는 pH 5에서는 초음파 처리 240분 후에도 약 10% 밖에 증가하지 않은데 반하여

pH 6에서는 약 20%, pH 7에서는 약 38%, pH 8에서는 약 55% 정도의 용해도를 나타내었다. 이상의 결과로부터 초음파 처리에 의한 용해도의 pH 의존성은 산성 또는 중성보다도 약 알칼리 영역의 pH에서 효과가 큰 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 다른 pH 영역보다 pH 8.0의 약 알칼리 영역에서 알칼리에 의해서 느슨해진 조직이 초음파에 의해서 구조적인 변화(붕괴)가 보다 쉽게 일어났기 때문인 것으로 사료되었다. 지금까지의 결과는 20 kHz, Amplitude 80%에서 검토한 결과이며, 이보다 작은 60 Hz에서도 검토한 결과(data 생략) 거의 용해도의 증가에는 영향을 미치지 못하였다. 이상의 결과로부터 초음파 처리는 생리적인 염 농도인 0.1 M NaCl에서도 pH를 조절함에 따라서 보다 효율적으로 염용성인 근원섬유 단백질의 가용화를 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다.

다음은 Fig. 3과 같은 조건하에서 분리한 단백질 조성을 SDS-PAGE로 검토하여 결과를 Fig. 4에 제시하였다. 초음파 처리를 하지 않은 근원섬유의 경우 어떠한 pH의 조건하에서도 거의 구성단백질은 분리되지 않았다. 그러나 20kHz의 80%의 amplitude에서 24시간 동안 초음파 처리를 하면 단백질은 분리되기 시작하였으며, pH가 높을수록 분리되는 단백질의 양이

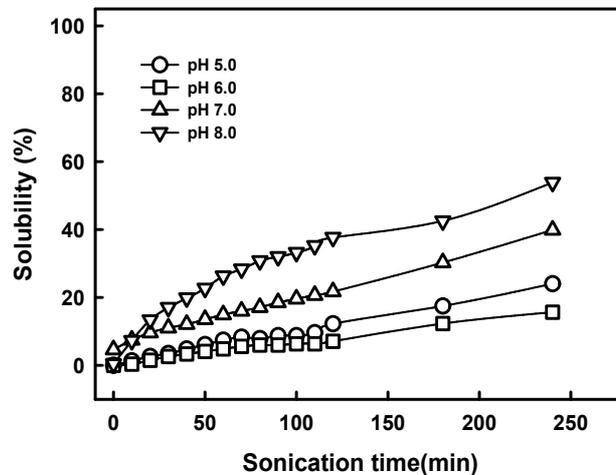


Fig. 3. Effects of pH and sonication on solubility of myofibril prepared from cardiac muscle of pork. Samples in 0.1M NaCl solution sonicated 80% amplitude under 20 kHz.

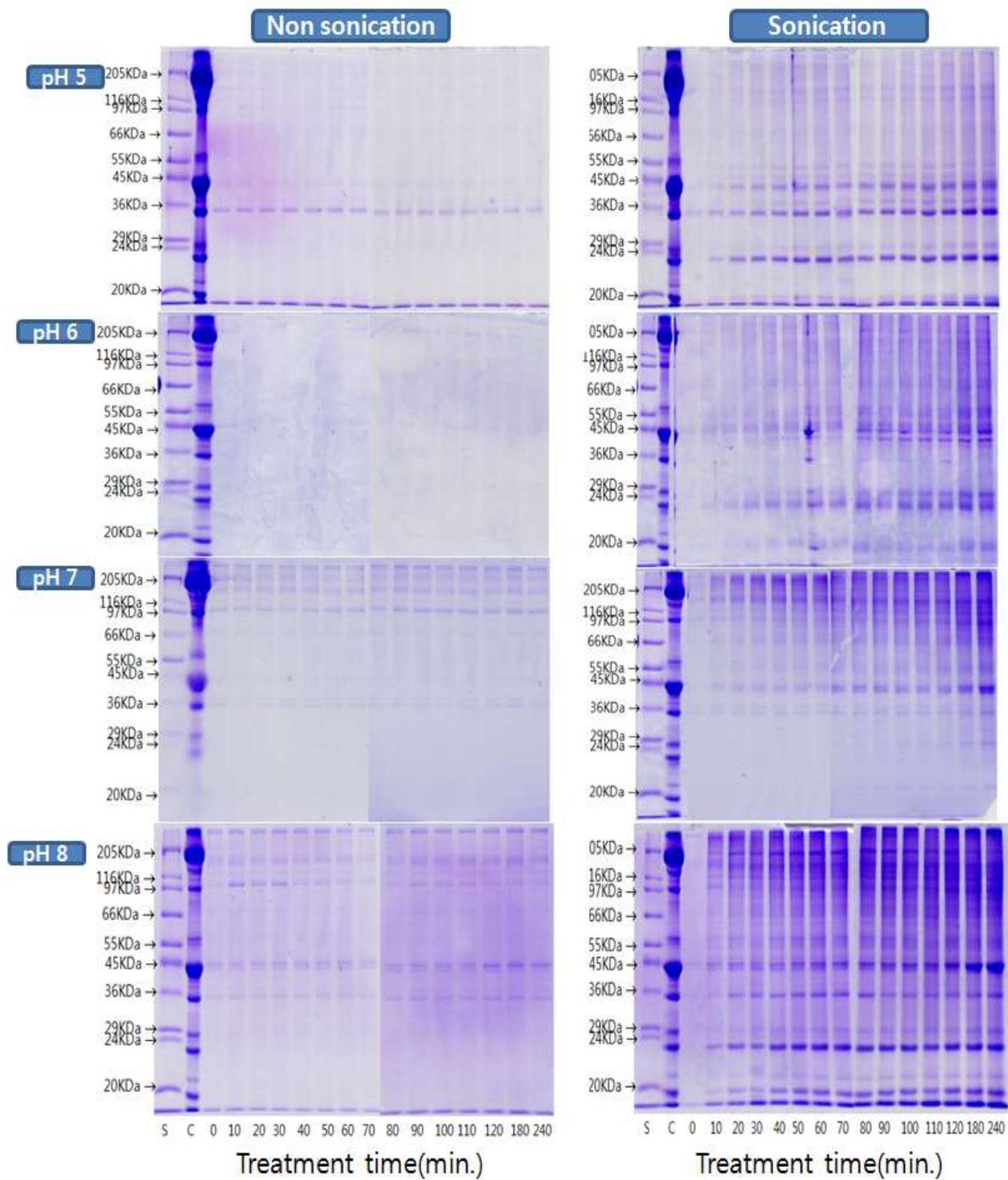


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of soluble protein isolated from cardiac myofibril of pork by sonication under pH conditions. Protein isolated under same conditions as in Fig. 3.

많게 관찰되었다. 즉, pH 5.0에서는 분자량으로부터 actin, tropomyosin, myosin light chain 등이 초음파 처리 시간의 경과와 함께 증가하는 것으로 관찰되었다. pH 6.0에서도 pH 5.0과 매우 유사한 결과를 나타냈는데 양적으로 조금 많이 검출되는 것으로 관찰되었다. 한편 pH 7.0 및 8.0의 경우에 있어서도 초음파 처리에 의해서 200kDa에 상당하는 고분자 성분이 관찰되는 점과 양적으로 pH가 높을수록 많이 관찰된다는 점을 제외하면 매우 유사한 결과 였다.

이상의 결과는 초음파에 의한 근원섬유단백질의 수용화에 있어서 염농도 뿐만이 아니라 pH도 매우 중요한 factor인 것으로 나타났다. 즉, pH 5는 단백질의 등전점 부근이며 이 pH 영역에서 근원섬유 단백질은 조금밖에 가용화되지 않았다. 그 이유에 대해서는 좀더 상세한 연구를 필요로 하지만 2가지의 경우를 추측할 수 있을 것으로 사료되었다. 첫째로 초음파에 의해서 근원섬유의 구조는 붕괴되었지만 상당부분의 단백질 등전점이 pH 5.0부근이어서 유리된 단백질이 침전으로 이전되었거나, 또는 pH 5.0 부근에서는 근원섬유 구조가 오히려 타이트해져 붕괴되기 어려운 상태로 되어 단백질의 분리가 일어나기 어려워 졌기 때문이 아닌가 추측할 수가 있었다. 반면에 알카리 쪽에서 초음파처리에 의해서 가용화율이 높게 일어나는 것은 알카리 영역에서는 근원섬유의 구조가 느슨해져 여기에 초음파의 물리적인 힘을 가하면 구성단백질의 용출 및 분해가 일어나기 때문인 것으로 사료되었다.

#### 다. 초음파 amplitude의 영향

Amplitude는 초음파의 힘을 나타낸 것이며, 이것에 따라서 근원섬유의 가용화율 또는 가용화된 성분의 조성이 달라질 것으로 예상된다. 따라서 여기에서는 앞서 제시한 염농도 및 pH 의존성에서 가장 우수하였던 조건인 0.2M NaCl, pH 8.0에서 amplitude 0~100%로 초음파 처리하였을 때의 용해도의 변화를 살펴보았다(Fig. 5). 우선 초음파 처리를 하지 않은 amplitude 0%에서는 거의 용해도에 거의 변화가 없었다. 그러나 amplitude가 강해짐에 따라서 급격히 용해도가 증가하기 시작하였으며, amplitude가 높을수록 용해도의 증가속도는 빠르게 나타났다. 이와 같이 amplitude에 따라서 용해도가 급격히 증가할 때 분리된 단백질은 어떠한 성분인지를 확인하고자 SDS-PAGE로 검토하여 결과를 Fig. 6에 제시하였다.

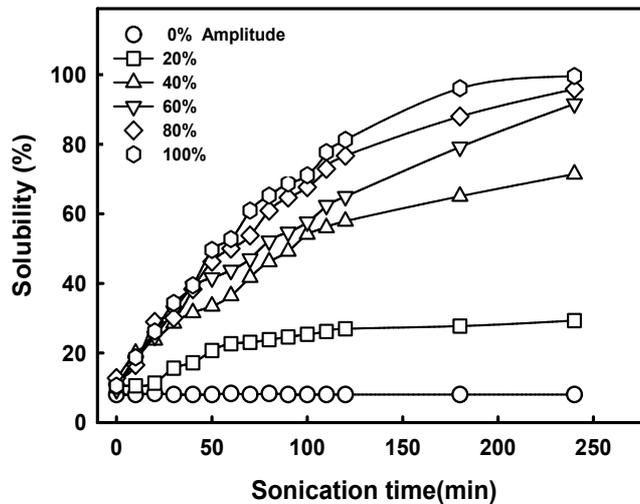


Fig. 5. Effects of ultrasonic amplitudes on solubility of myofibril prepared from cardiac muscle of pork. Samples in 0.2M NaCl solution(pH 8.0) sonicated at 20 kHz.

이결과에 의하면 amplitude 0%에서는 이렇다 할 분리된 단백질은 관찰되지 않았으나 amplitude가 높아질수록 단백질의 분리가 많아짐을 알 수 있었다. 또한 그 성분을 살펴보면, myosin heavy chain, actin 및 그 외의 많은 성분들이 관찰되었으며 초음파처리 조건에 따라서 성분의 조성도 달라지는 것으로 나타났다. 즉 amplitude 20%에서는 초음파 처리시간의 경과와 함께 겔의 최상단에서 관찰되는 거대분자(myosin의 다량체일 가능성도 있음) 및 myosin heavy chain, 150kDa, 100kDa, actin, tropomyosin 및 myosin light chain에 해당하는 성분들이 증가하는 것으로 관찰되었다. 그러나 40% 이상의 amplitude에서는 이들 성분뿐만이 아니라 초음파에 의해서 근원섬유 단백질의 분해산물로 추측되는 성분이 증가되었으며, 초음파 처리시간이 길어짐에 따라서 더욱 저분자화된 성분이 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 성분은 어디에서 유래한 것인지에 대해서는 표식 등의 방법으로 조사할 필요성이 있었다.

이상의 결과로부터 초음파 처리시간과 amplitude를 적당히 조절하면 원하는 분자량의 단백질을 제조할 수 있을 것으로 사료되었다. 예를 들어 분자량 10만 이상의 단백질을 많이 제조하고자할 때는 amplitude를 작게 하면서 처리시간을 적당히 조절하여 몇 번에 걸쳐 처리하면 고분자의 성분을 많이 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 또한 10만 이하의 저분자를 제조할 시에는 amplitude를 높게 하여 초음파를 장시간 처리하면 초음파로 저분자를 제조할 수 있을 것으로 생각되었다.

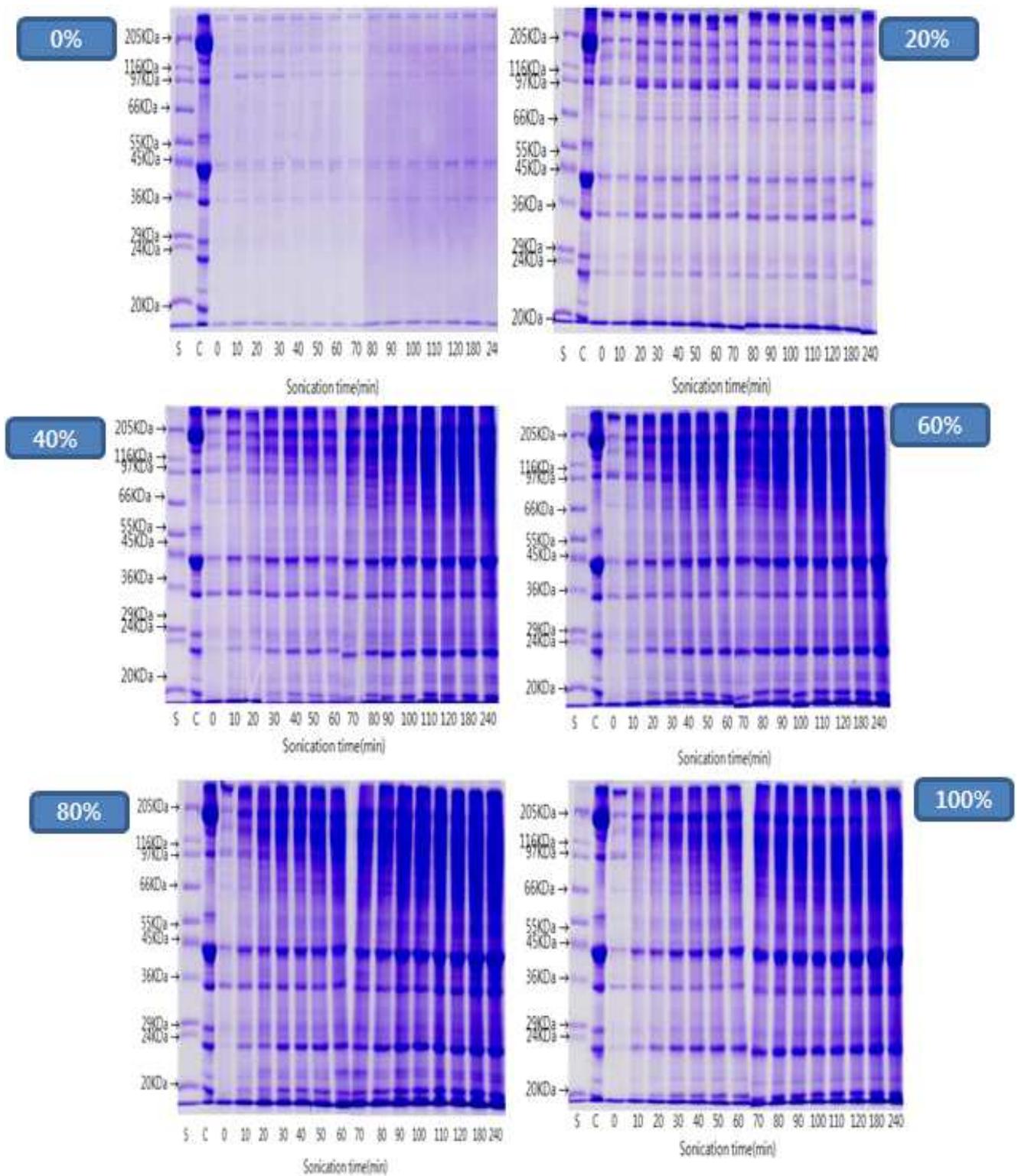


Fig. 6. SDS-PAGE patterns of soluble protein isolated from cardiac myofibril of pork by ultrasonic amplitude. Proteins were isolated under same conditions as in Fig. 5.

**라. 중합인산염(PPi)의 영향**

0.2M NaCl (pH 8.0)과 함께 초음파처리를 하면 높은 amplitude에서 심근 근원섬유로부터 구성 단백질이 해리되어 많은 량의 단백질이 용출되었다. 이와 같은 현상이 다른 염류에서도 같은 현상이 일어나는 지를 확인하기 위하여 심근 근원섬유에 PPi(중합인산염)를 첨가한 후 초음파처리를 하였을 때의 현상을 검토하였다. PPi는 첨가량에 따라서 단백질을 해리시키는 작용이 있으며, 식품에 첨가할 때는 약 0.3% 이하를 첨가한다. 본 연구에서는 0~5mM의 범위에서 검토하였는데 가장 높은 5mM의 경우 약 0.22%에 상당하므로 일반적인 첨가량보다도 적은 범위내에서의 PPi를 첨가하여 검토하였다. 우선 초음파처리를 하지 않고 0 및 5mM PPi만을 첨가한 후 4°C에서 210분 동안 교반하여 분리된 단백질의 용해도(%)를 측정하여 Fig. 7에 결과를 제시하였다. PPi 무첨가구(0mM)는 210분 동안 교반을 하여도 단백질은 용출되지 않았다. 그러나 5mM PPi를 첨가한 경우 초기 30분까지는 급격히 증가하다가 그 후 서서히 증가하는 경향을 보였는데 그 최대값이 약 30% 수준으로 매우 적었다.

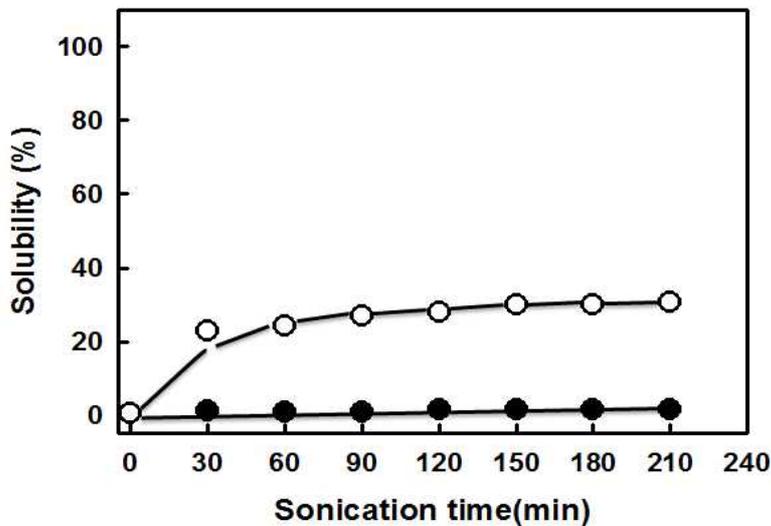


Fig. 7. Effects of pyrophosphate on solubility of myofibrillar protein prepared from cardiac muscle of pork.

\* Symbols were the 0mM (●) and 5mM pyrophospahte(○).

다음은 PPi를 0~5mM의 범위에서 첨가한 후 20kHz에서 60%의 amplitude로 초음파 처리를 하였을 때의 결과를 Fig. 8에 제시하였다. PPi를 첨가하지 않고 초음파 처리만을 한 경우 초음파 처리시간과 함께 증가하였으며 210분 후에 약 40%의 용해도를 나타내었다. 그러나 PPi를 1~5mM의 범위에서 첨가한 후 초음파 처리를 하면 PPi 첨가 농도의 증가와 함께 용해도가 증가하는 것으로 나타났으며, 3mM 이상에서는 처리 210분 후에 약 90% 이상의 용해도를 나타내었다. 또한 뿐만아니라 PPi 첨가량이 높을수록 용해도의 증가속도가 빨라지는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 염의 종류에 따라서 증가속도가 다른 것

으로 나타났으며, NaCl(Fig. 1)의 경우 최소한 0.2M(pH8.0)을 필요로하였으나, NaCl 대신에 PPi로 대체 하면 5mM 정도만 첨가 하여 초음파 처리를 하면 충분히 근원섬유로부터 단백질이 용출되는 것으로 나타났다. 이와 같은 현상이 이온강도의 영향에 의한 것이 아닌지를 검토한 결과 0.2M NaCl의 경우  $I = 0.2$ , 5mM PPi는  $I = 0.05$ 에 해당되므로 이온강도의 영향은 크지 않은 것으로 사료되었다. 따라서 NaCl 보다는 PPi를 첨가하여 단백질을 분리하는 것이 보다 효율적인 것으로 나타났다.

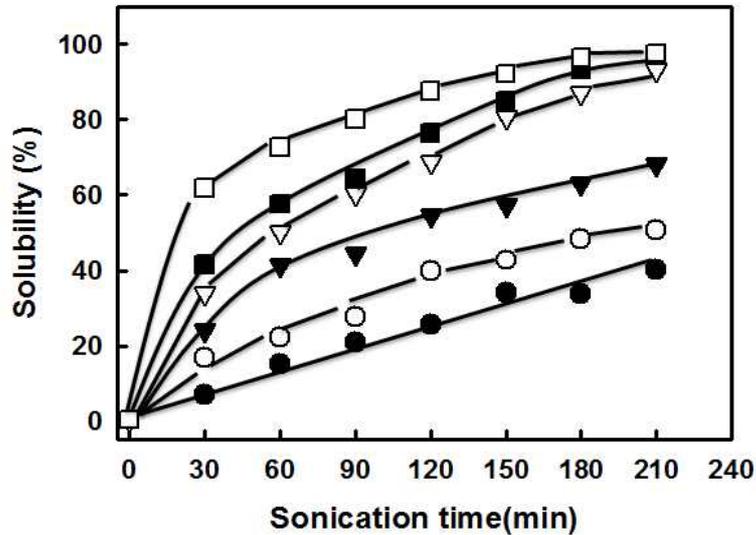


Fig. 8. Effects of pyrophosphate and sonication on solubility of myofibrillar protein prepared from cardiac muscle of pork. Symbols were the 0mM (●), 1mM(○), 2mM(▼), 3mM(▽), 4mM (■) and 5mM (□) pyrophosphate, respectively.

Fig. 7 및 Fig. 8에서의 PPi 첨가와 초음파 처리에 의해서 분리된 단백질의 subunit 조성을 알아보기 위하여 SDS-PAGE로 분석하여 결과를 Fig. 9 및 10에 제시하였다. Fig. 9에 제시한 초음파 처리를 하지 않고 PPi만을 첨가하였을 때의 조성은 PPi를 첨가하지 않은 것과 비교하여 많은 양의 단백질 조성이 관찰되었다. 즉 PPi를 첨가하지 않고 4°C에서 그대로 교반하였을 경우 분리된 단백질은 150kDa 및 36kDa에 해당하는 성분이 약간 관찰되었을 뿐 그 외의 다른 성분은 관찰되지 않았다. 그러나 5mM PPi를 첨가하여 4°C에서 210분 동안 교반한 후 원심분리에 의해서 얻어진 단백질은 매우 복잡한 패턴을 나타내었으며, 근원섬유의 주요단백질인 MHC (Myosin heavy chain) 및 A(actin)에 해당하는 성분뿐만 아니라 그 외 많은 마이너 성분들도 관찰되었다. 근원섬유를 구성하고 있는 단백질은 그 종류가 다양하여 크게 기능적으로 서로 다른 수축성 단백질, 조절단백질(주요, 미량), 골격단백질 등으로 나뉘고 있으며 SDS-PAGE(SDS-전기영동)로 관찰하면 각각의 subunit로 나뉘어 약 20여종의 단백질을 관찰할 수 있다. 따라서, PPi를 첨가하면 단백질의 해리가 일어나 해리된 일부의 단백질이 용출되어 전기영동상에서 관찰된 것으로 사료되었다. 이와 같은 현상은 PPi와의 반응시간이 길어질수록 많은 양의 subunit이

관찰되었다.

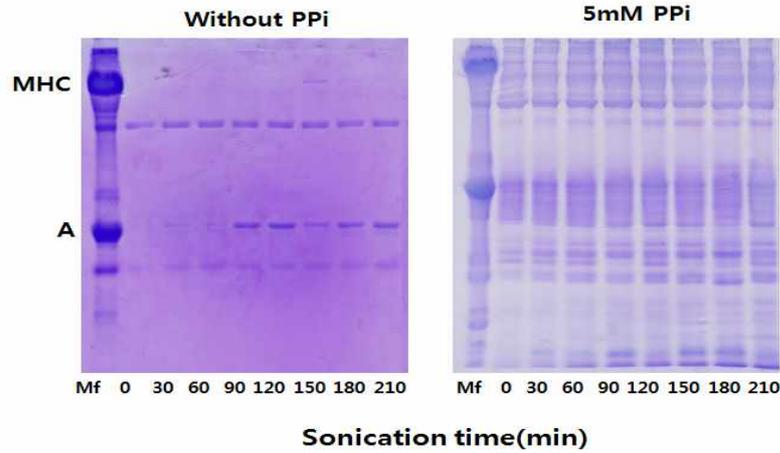


Fig. 9. SDS-PAGE patterns of protein isolated from cardiac myofibril of pork with or without PPI.

Proteins were isolated under same conditions as in Fig. 7.

Fig. 10에는 심근 근원섬유에 0~5mM PPI를 첨가한 후 주파수 20kHz에서 60% amplitude로 초음파 처리하였을 때에 분리된 단백질의 subunit 조성을 나타내었다. 우선 PPI를 첨가하지 않고 초음파 처리한 경우에도 단백질이 분리되는 것으로 나타났다. 앞서 결과에서의 아무 처리를 하지 않은 경우 단백질은 거의 분리되지 않았는데 초음파만 처리하여도 210분 후에 약 40%의 단백질이 분리되었다. 분리된 단백질 조성을 살펴보면 초음파 처리 초기에는 거의 단백질은 관찰되지 않았지만 처리 60분이 지나면서 분리되는 단백질양이 증가하는 것으로 나타났다. 이들의 분자량으로 보아 MHC에 해당하는 성분은 약간 검출되는 정도였으나 A에 해당하는 성분이 처리시간과 함께 증가하는 것으로 관찰되었다. 또한 그 외의 성분들도 관찰되었는데 역시 초음파 처리시간의 경과와 함께 늘어나는 것으로 관찰되었다.

한편 PPI를 첨가한 후 초음파 처리를 하면 이와 같은 경향은 더욱 확실히 일어났으며 첨가된 PPI 농도가 높을수록 이 현상은 더욱 확실하였다. 즉, PPI의 첨가량이 늘어날수록 주요 단백질인 MHC 및 A에 해당하는 성분이 늘어났으며, 특히 A에 해당하는 성분이 PPI의 첨가량과 비례하여 크게 늘어났는데 초음파 처리 초기에는 myosin과 actin의 중합체인 actomyosin의 해리가 일어나 myosin과 actin이 분리되고 계속해서 filament 형태의 myosin 중합체가 PPI 및 초음파에 의해서 해리가 일어나 myosin의 monomer의 형태로 분리가 일어난 것으로 사료되었다. 또한 A에 해당하는 성분이 PPI 첨가량의 증가와 초음파 처리 시간의 증가와 함께 급격히 증가하였는데 해리된 actin 중합체가 초음파에 의해서 해리(F-G로 전환)되어 monomer의 형태로 유리되었기 때문으로 사료되었다. 그럼에도 불구하고 A의 경우 비율적으로 상당히 많은 양이 검출되었는데 이 현상은 초음파에 의해서 A 보다 고분자 성분이 분해되어 A의 분자량과 유사한 위치에서 검출되었을 가능성이 있었다.

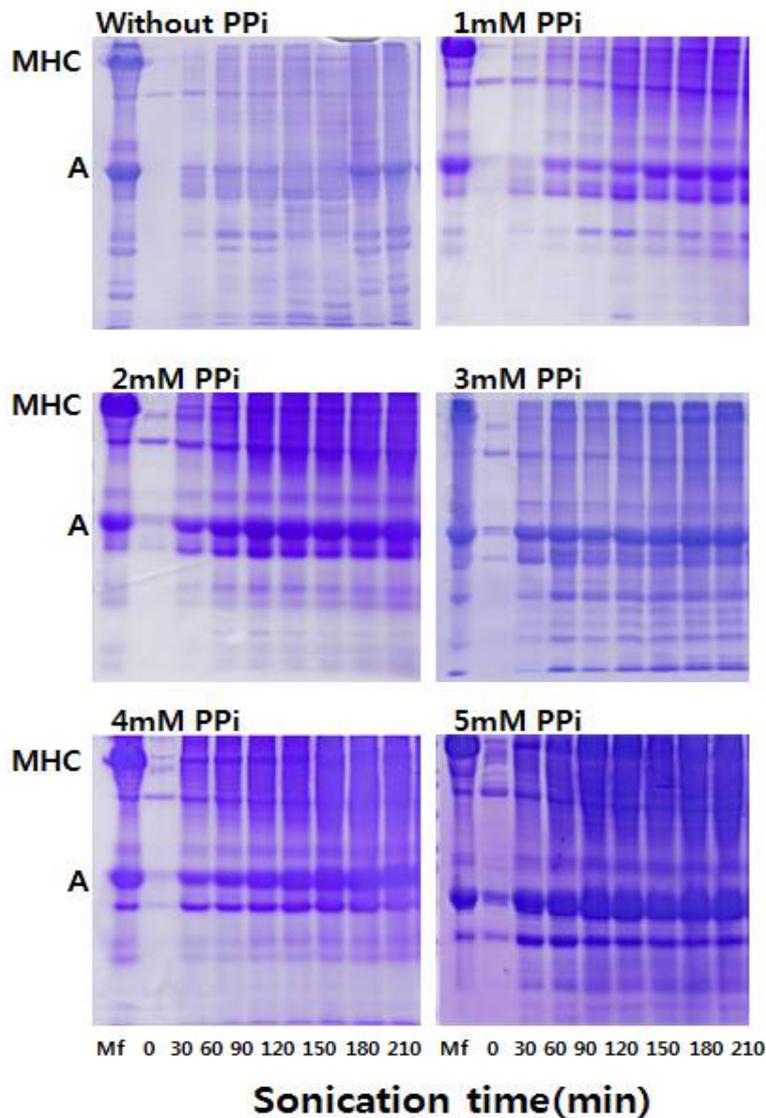


Fig. 10. SDS-PAGE patterns of protein isolated by sonication from cardiac myofibril with PPi. Proteins were isolated under same conditions as in Fig. 8.

**마. 염류 및 초음파에 의해서 분리된 단백질의 증가속도**

지금까지의 결과에 의하면 NaCl을 첨가한 후 20kHz에서 초음파 처리를 하면 0.2M NaCl(pH 8.0), 60% amplitude에서 충분히 단백질이 용출되는 것으로 나타났다. 또한 NaCl 이외의 다른 염류인 PPi를 첨가하여 초음파 처리를 하면 5mM에서 단백질의 대부분이 용출되는 것으로 나타났다. 따라서 각각의 결과 (Fig. 5, 7 및 8)로부터 Ln 값을 산출하여 Fig. 11에 나타내었다. 대조구로서는 PPi 및 초음파 처리를 하지 않은 것(without PPi and sonication)으로 하였으며, 이와 대비하여 초음파 처리만 한 것(with sonication), PPi 처리만 한 것(with PPi), 0.2M NaCl과 함께 초음파 처리한 것(with 0.2M NaCl and sonication), 5mM PPi와 함께 초음파 처리한 것(with 5mM PPi and sonication)을 검토하였다. 이 결과

에 의하면 초기에 빠르며 후기에 느린 2단계의 직선관계의 식이 성립되었으며, 초기의 1차식으로부터 각각 증가속도 계수 ( $K_i$ )를 산출하여 Fig. 12에 나타내었다. 이 결과에 의하면 with 5mM PPI and sonication > with 0.2M NaCl and sonication > with PPI > with sonication > without PPI and sonication의 순으로 빠르게 나타났다. 이상의 결과는 PPI를 첨가한 후 초음파 처리를 하는 것이 가장 빠르게 나타났는데 염류의 종류에 따라서 단백질의 해리가 다르게 나타나는 것으로 사료되었다. 즉, 근원섬유 내부로의 침투력이 NaCl 보다 PPI가 빠르기 때문인 것은 아닌지 추측을 해보았지만 이것으로만으로는 설명이 부족하다. 따라서, 이온강도를 측정한 결과 NaCl은  $I = 0.2$ , PPI는  $I = 0.05$ 로서 PPI가 4배 정도 낮게 나타나고 있으며 그런데도 오히려 이온강도가 낮은 PPI에 의한 용출속도가 빠르게 나타났다. 이들의 특성에 대해서는 추후 좀더 자세한 연구를 필요로 하였다.

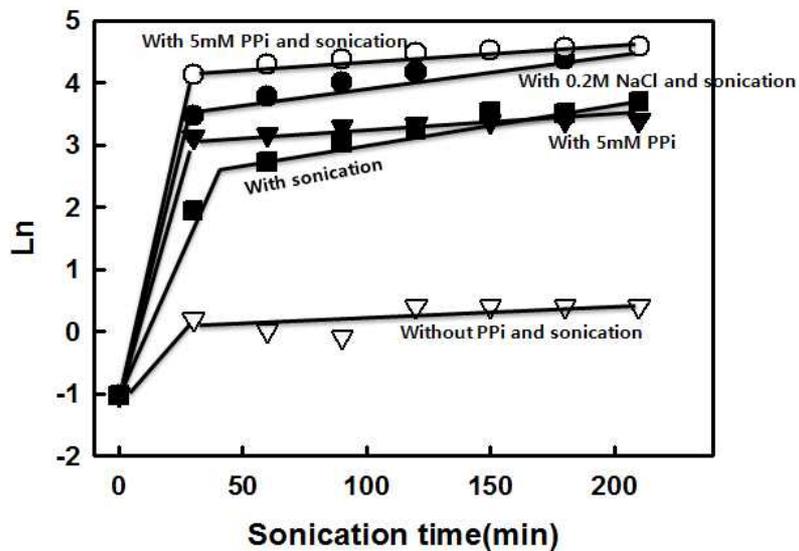


Fig. 11. Increase in the solubility of cardiac myofibril of pork during sonication in the presence NaCl or PPI.

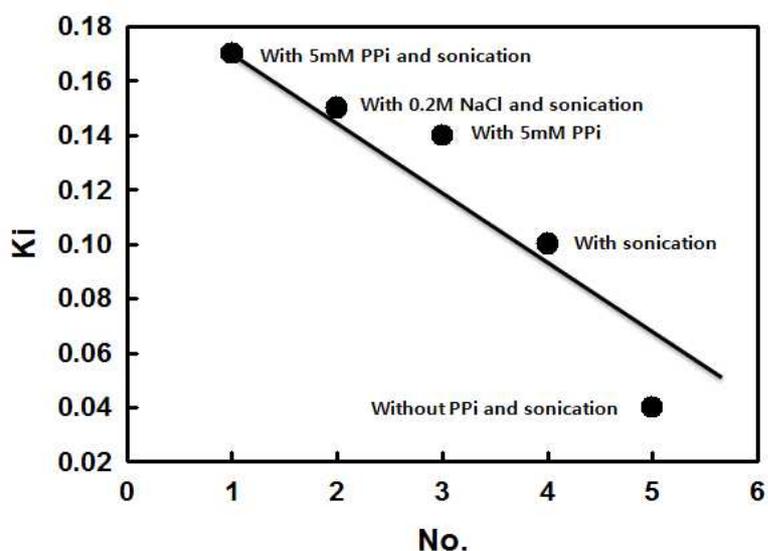


Fig. 12. The effect of sonication on the increases rate constants of protein extraction from cardiac myofibril of pork. The increased rate constant for each result ( $K_i$ ) was calculated as :  $K_i = \ln(n_t - n_0) / t$ , where  $n_t$  denotes solubility after sonication with salts for  $t$  times, and  $n_0$  denotes solubility before the sonication with salts.

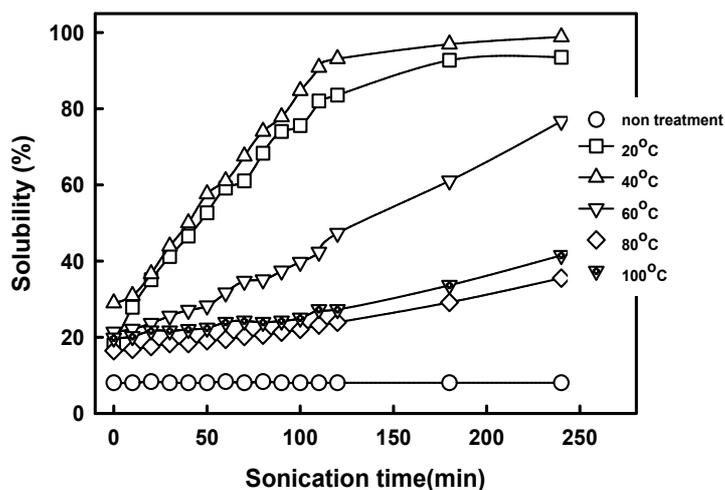


Fig. 13. Effects of sonication on solubility of cardiac myofibril heated at various temperatures. Samples in 0.2M NaCl solution(pH 8.0) sonicated at 80% amplitude under 20 kHz.

## 바. 온도 의존성

근원섬유를 열처리하면 변성이 일어나 염용성인 단백질의 불용화가 일어난다. 그러나 이와 같이 열처리 후 초음파 처리를 하였을 때 어떠한 변화가 일어나는지에 대해서는 아직까지 검토한 바가 없다. 따라서 여기에서는 근원섬유를 20°C~100°C의 범위에서 열처리한 후 20kHz의 80% amplitude로 초음파 처리하였을 때의 변화를 검토하였다. Fig. 13에는 우선 이들의 용해도를 나타내었다. 이결과에 의하면 40°C까지는 초음파 처리시간의 경과와 함께 급격히 용해도가 증가하는 것으로 나타났으나, 60°C이상에서는 온도가 높을수록 용해도의 증가속도가 둔화되는 것으로 나타났다. 즉, 40°C까지는 최대 용해도가 약 90% 이상인 것으로 나타났으나 60°C에서는 약 75%, 80~100°C에서는 약 35%인 것으로 나타났다. 이 결과에서 40°C까지는 높은 용해도가 유지되었는데 심근 근원섬유의 주요 단백질인 myosin의 변성온도가 약 45°C인 것으로 알려져 있으므로 저온에서 처리한 것과 크게 달라지지 않은 것으로 사료되었다. 또한 60°C 이상의 온도에서는 온도가 높을수록 초음파처리를 하여도 용해도의 증가속도가 늦어지는 것으로 나타났는데 이것은 열에 의하여 변성된 단백질은 침전으로 이전하고 미변성 단백질이 초음파에 의해서 용출된 것으로 사료되었다. 이와 같은 현상을 좀더 자세히 살펴보기 위하여 용출된 성분을 SDS-PAGE로 분석하여 Fig. 14에 결과를 제시하였다.

이결과에 의하면 4~40°C(편의상 저온으로 칭함)까지의 SDS-PAGE의 pattern이 매우 유사하였으며, 60~100°C(편의상 고온으로 칭함)의 pattern이 매우 유사하였다. 즉 저온에서는 단백질의 변성이 일어나지 않아 초음파에 의해서 단백질의 분리가 잘 일어났으며, 그 성분들도 근원섬유의 주요 성분인 myosin heavy chain, actin 등이 검출되었으며 초음파 처리시간이 길어짐에 따라서 저분자화된 성분들도 늘어나는 것으로 관찰되었다. 그러나 고온에서 단백질의 변성이 일어난 상태에서 초음파 처리를 하면 분리되는 양이 적을 뿐만 아니라 그 분리되는 성분에 있어서도 저온과는 달랐다. 즉, 고온에서 열처리 후 초음파 처리를 하면 actin에 상당하는 성분과 tropomyosin, myosin light chain 등과 같은 성분이 증가되는 것으로 관찰되었다. 이러한 성분들은 열에 매우 강한성분이어서 열에 의한 변성이 잘 일어나지 않는 특성이 있으므로 이러한 성분들이 용출된 것으로 사료되었다.

이상으로 초음파 처리에 의한 근원섬유 단백질의 수용화에 대한 결과를 정리하면 다음과 같다. NaCl 보다는 PPI(5mM 이상)가 우수하였으며, pH는 8.0 부근, 온도는 40°C 이하, 초음파는 20kHz의 60% 이상의 amplitude에서 처리되었을 때 가장 효율적으로 가용화 시킬 수 있었다.

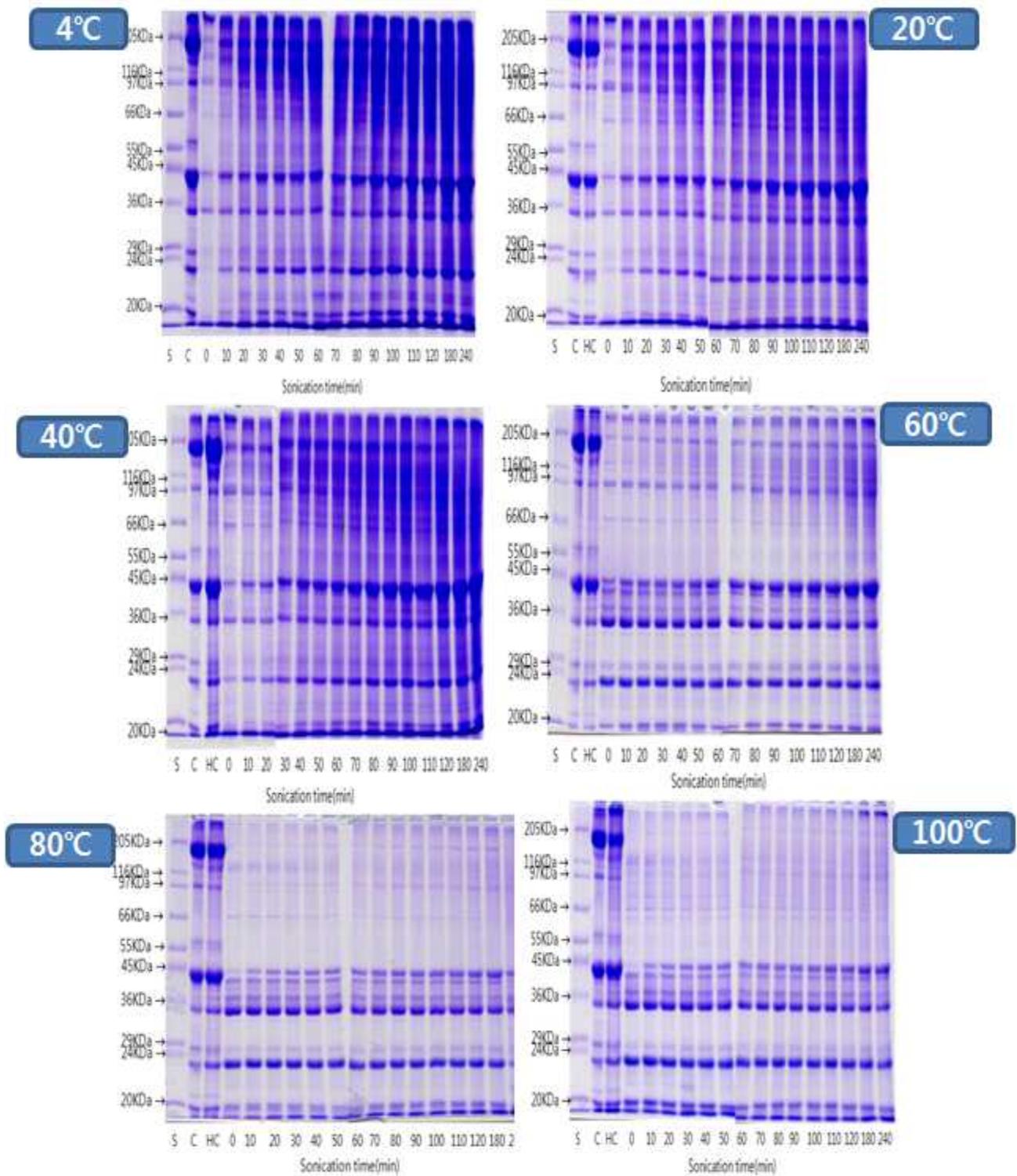


Fig. 14. SDS-PAGE patterns of proteins isolated by sonication after heated myofibril at various temperatures. Samples in 0.2M NaCl solution(pH 8.0) sonicated at 80% amplitude under 20 kHz.

### 사. 초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 점도

초음파에 의해서 분리된 성분의 특성을 알아보기 위해서 Fig. 1과 같은 조건하에서 분리된 성분의 점도를 측정하여 Fig. 15에 제시하였다. 근원섬유 단백질에 0~1.0 M NaCl, 20 mM phosphate(pH 8.0)이 되도록 조절한 후 20 kHz의 80% amplitude에서 처리하여 얻어진 가용화 성분의 점도는 어떠한 염농도에 있어서도 가용화가 일어나기 시작하여 약 30분까지는 처리 시간이 길어질수록 가용화 성분의 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 점도의 저하는 분리된 주요 단백질 특히 MHC의 초음파에 의하여 분해가 일어났기 때문인 것으로 사료되었다. 이상은 Fig. 2에서의 결과를 지지하는 결과였다.

한편, amplitude의 변화에 의한 가용화 성분의 점도 변화를 Fig. 16에 나타내었는데 기본적으로는 Fig. 15와 같은 결과였다. 즉 초음파 처리 초기에 분리된 성분의 점도는 증가하였으나 초음파 처리 시간이 경과함에 따라서 감소하였다. 이는 앞서 기술한바와 같이 초음파 처리 조건에 따라서 분리되는 성분도 변화한다는 결과와 일치하였다.

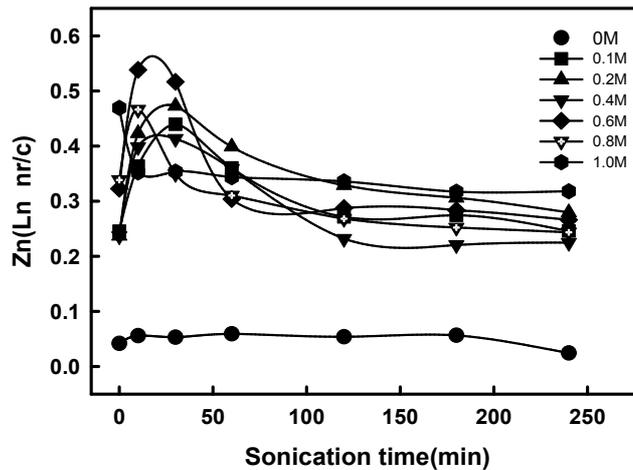


Fig. 15. Changes in viscosity of protein isolated from cardiac myofibril by sonication at various salt concentrations. Conditions were the same as in Fig. 1 and viscosity measured at room temperature.

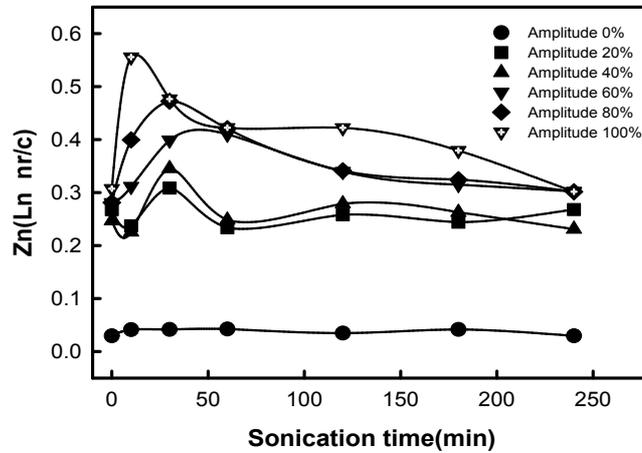


Fig. 16. Changes in viscosity of protein isolated from cardiac myofibril at various amplitudes and sonication of 20kHz. Conditions were the same as in Fig. 5 and viscosity measured at room temperature.

#### 아. 초음파 처리에 의한 근원섬유의 ATPase 활성

지금까지 검토한 결과에 의하면 근원섬유를 초음파 처리하면 근원섬유의 구조가 붕괴되어 구성 단백질의 해리가 일어나 유출되는 것으로 나타났다. 이와 같이 초음파에 의해서 근원섬유의 구조가 붕괴될 때 구성 단백질의 기능적 변화는 어떻게 일어나는지를 살펴보기 위하여 초음파 처리 후 근원섬유 단백질의 Ca-, 및 Mg-ATPase 활성에 대하여 검토하였다.

여기에서는 대표적으로 0.2M NaCl(pH 8.0), 20kHz의 80% amplitude 조건하에서 초음파 처리한 근원섬유 단백질의 Ca-ATPase 활성 및 Mg-ATPase 활성을 측정하여 Fig. 17 및 18에 나타내었다. 이결과에 의하면 초음파 처리 시간과 함께 급격히 Ca 및 Mg-ATPase 활성이 저하되는 경향을 나타내었다. 이상의 결과는 다음과 같이 정리할 수 있다. 초음파 처리에 의해서 근원섬유는 구조의 붕괴뿐만이 아니라 동시에 주요 구성 단백질이 지니고 있는 기능적(ATPase 활성)특성에도 변화(변성)를 일으키는데, 이것이 Ca 뿐만이 아니라 주요구성 단백질인 M과 A의 상호작용과 관련 있는 Mg-ATPase 활성도 저하시키는 것으로 사료되었다. 즉 이것은 M의 두부에 존재하는 ATPase의 초음파에 의한 완전한 실활을 의미하며 단백질의 변성이 초음파에 의해서 빠른 속도로 일어나고 있음을 시사하였다.

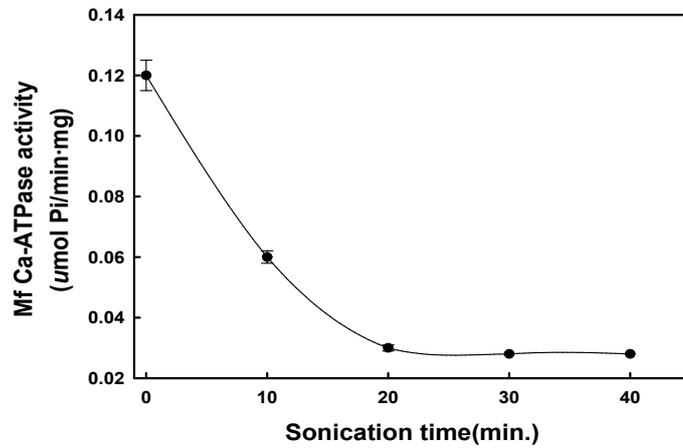


Fig. 17. Changes in Ca-ATPase activity of myofibril prepared from cardiac muscle of pork during sonication.

이상의 결과를 종합하면 근원섬유를 적당량의 주파수(20 kHz)로 초음파 처리하면 근육의 생리적인 염농도(0.2 M NaCl)에 가까운 조건하에서도 단백질이 분리되는데 초음파에 의한 근원섬유 구조의 붕괴가 주요 원인인 것으로 생각되었다. 그러나 이때에 단백질의 변성도 동시에 일어났으며, 단백질의 변성과 용해도와는 지금까지 밀접한 비례관계에 있는 것으로 알려져 있는 것과 비교해 볼 때 본 연구에서의 결과는 약간 다른 경로의 메카니즘에 의한 것도 생각할 수 있다. 이에 대한 메카니즘적인 연구는 초음파 처리에 의한 근원섬유의 구조붕괴 속도와 Ca- 및 Mg-ATPase 활성을 통한 근원섬유 단백질의 변성속도 등의 비교를 통하여 밝혀질 수 있을 것으로 사료된다.

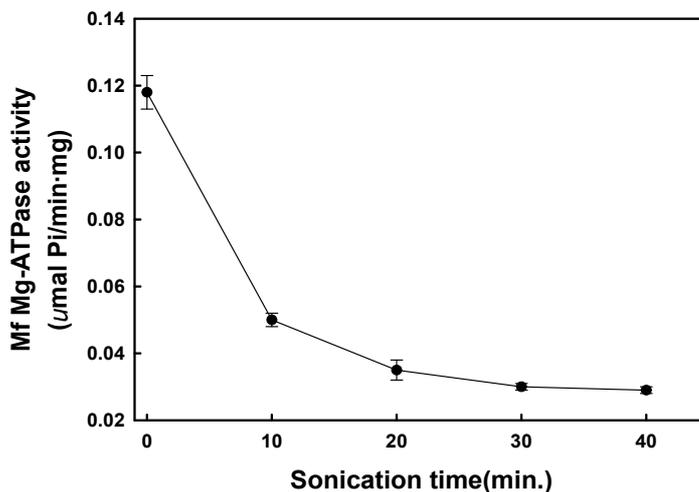


Fig. 18 Changes in Mg-ATPase activity of myofibril prepared from cardiac muscle of pork during sonication.

### 자. 초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 유화력

초음파에 의해서 분리된 단백질의 가공적성을 알아보기 위하여 유화력을 측정하여 Fig. 19 및 20에 나타내었다. 우선 Fig. 19에 제시한 염농도 의존성에서 분리된 성분의 유화력은 높은 염농도에서 오랫동안 초음파 처리하여 분리된 성분일수록 우수하였으며, 낮은 염농도에서 분리된 성분의 유화력은 거의 변화가 인정되지 않았다. 이와 같은 결과는 높은 염농도에서 초음파 처리를 하면 여러 종류의 분자량을 갖는 성분들이 검출되었으며, 이러한 것들이 유화력을 높였을 것으로 추측하였다.

한편, Fig. 20에 제시한 amplitude 변화에 따른 가용화 성분의 유화력에 있어서도 amplitude가 높을수록 유화력이 우수한 것으로 나타났으며, 이때의 가용화율도 높았다는 점에 있어서는 Fig. 19의 결과와 같은 경향이였다.

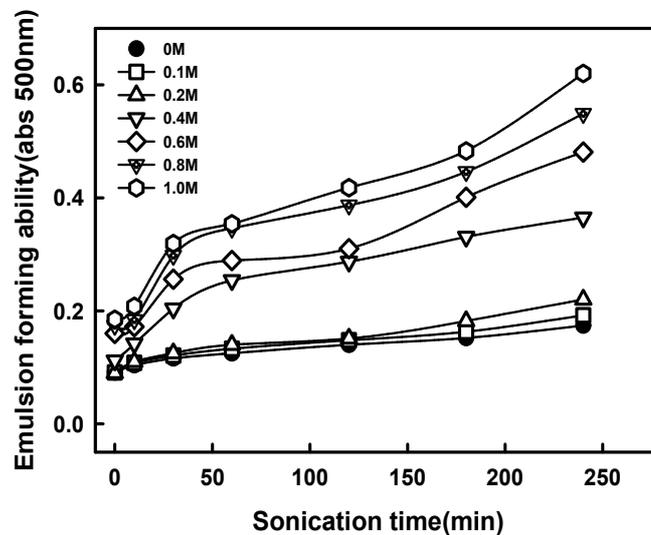


Fig. 19. Changes in emulsion forming ability of protein isolated from cardiac myofibril by sonication at various salt concentrations. Conditions were the same as in Fig. 1.

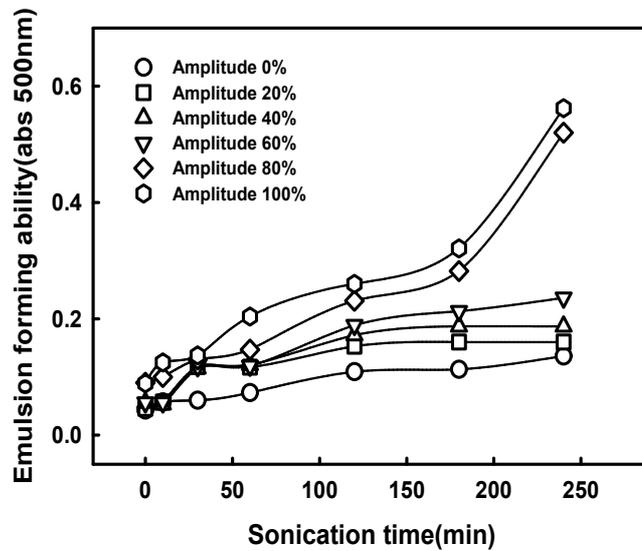


Fig. 20. Changes in emulsion forming ability protein isolated from cardiac myofibril at various amplitudes and sonication of 20kHz. Samples in 0.2M NaCl solution(pH 8.0) sonicated at 20 kHz.

#### 차. 초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 pepsin 또는 trypsin에 의한 소화

20kHz 및 60% amplitude 및 0.2M NaCl(pH 8.0)의 조건하에서 초음파 처리하여 분리된 단백질의 pepsin 또는 trypsin 처리하였을 때의 소화력을 검토하여 Fig. 15에 결과를 제시하였다. 여기에서는 각각 초음파 처리하지 않은 근원섬유와 비교하였다. 펩신 처리의 경우 반응시간의 경과와 함께 단백질의 소화가 일어났으며 근원섬유의 주요 단백질인 myosin은 완전히 소화가 일어나 SDS-PAGE에서 관찰되지 않았다. 그러나 actin의 경우는 변화가 없었다. 또한 이와 같은 경향은 근원섬유보다 초음파 처리 단백질이 더 빠르게 진행되었다. trypsin 처리한 경우는 myosin 뿐만이 아니라 actin도 소화가 일어났다. 또한 여기에서도 근원섬유보다는 초음파 처리 단백질이 훨씬 빠르게 일어났다.

이상으로 초음파 처리에 의하여 분리된 단백질의 pepsin 또는 trypsin에 의한 소화력을 검토하였는데 크게 2가지로 나누어 정리할 수 있다. 첫째로 초음파 처리에 의해서 분리된 단백질은 처리하지 않은 단백질 보다 훨씬 빠르게 소화되는 것으로 나타나 우리가 섭취하였을 때 빠른 소화와 함께 체내 흡수가 촉진될 것으로 예상할 수 있었다. 둘째로 초음파에 대해서도 비교적 안정할 것으로 예상되었던 actin에 있어서도 trypsin 처리로 근원섬유보다 분해가 빨리 일어나는 것으로 보아 초음파에 의해서 actin의 구조도 변화가 일어난 것으로 사료되었다.

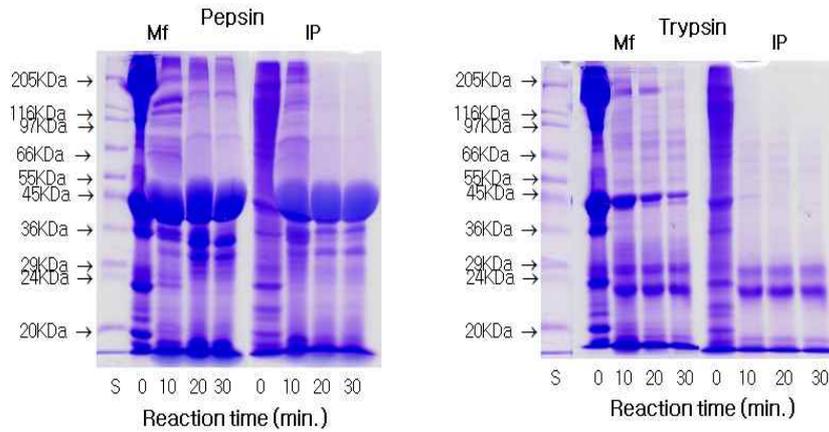


Fig. 21. SDS-PAGE patterns of protein digested by pepsin or trypsin at 30°C

Mf : myofibril, IP : Isolated protein by sonication  
S : standard marker

Proteins isolated from myofibril by sonication of 20kHz and 60% amplitude.

#### 카. 초음파로 분리된 단백질의 동결건조에 의한 분말화

초음파 처리 후 얻어진 단백질을 동결건조하여 그 결과를 Fig. 22에 제시하였다. 심근은 혈액 및 색소가 많이 포함되어 있으므로 붉은색에 가까운 색채를 띄고 있다. 그러나 심근으로부터 근원섬유를 추출한 후 초음파를 활용하여 단백질을 분리하면 백색의 순수한 근육단백질만을 분리할 수 있었다. 이것은 근원섬유를 추출하는 과정에서 혈액 및 색소를 대부분 제거할 수 있었으며, 일부분은 전처리 과정에서 초음파 처리에 의해서 제거할 수 있었다. 따라서 추출한 단백질 powder는 전반적인 식품에 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료되며, 자세한 내용은 제 2장에서 설명하고자 한다.



Fig. 22. Powder of protein extracted from cardiac myofibril of pork by sonication

## 2. 초음파 처리에 의한 심근 단백질의 수용화

### 가. 심근의 혈액 제거 기술

도살시 방혈 함에도 불구하고 돼지의 심근내에는 다량의 혈액이 남아있다. 심근을 식품소재로서 효율적으로 활용하기 위해서는 적절한 혈액제거 기술이 필요하다. 혈액제거는 1차적으로 검토한 결과에 의하면 심근으로부터 근원섬유 추출 시 계면활성제를 사용하면 혈액이 제거되는 것으로 나타났다. 그러나 이와 같은 방법은 케미컬을 사용하기 때문에 폐수처리 비용, 환경오염과 같은 추가적으로 따라오는 비용증가 및 문제점이 있어 실질적으로 실용화하기에는 곤란한 점이 있다. 따라서 본 연구에서는 환경친화적인 방법인 초음파를 활용하여 혈액을 제거하는 기술에 대하여 검토하였다. Fig. 23에는 초음파 처리에 의한 혈액제거와 증류수에 의한 혈액제거에 대하여 비교 검토하였다. 초음파 처리는 시료에 10배량의 증류수를 첨가하여 교반한 후 20kHz에서 20% amplitude로 총 4회에 걸쳐 10분씩 40분간 하였다. 또한 대조구는 증류수에 의한 혈액제거를 총 4회에 걸쳐 40분간 수행하였다. 이결과에 의하면 초음파 처리한 것이 대조구 보다 약 15% 정도 효과가 있는 것으로 나타났다. 초음파 처리가 혈액제거에 있어서 상당히 효율적일 것으로 예상하였는데 혈액의 대부분은 수용성 성분으로 이루어져 있기 때문에 물리적인 힘을 가하지 않더라도 어느 정도 제거되는 것으로 사료되었다. 그러나 큰 차이는 아니었지만 초음파 처리를 하는 것이 효과적이었다.

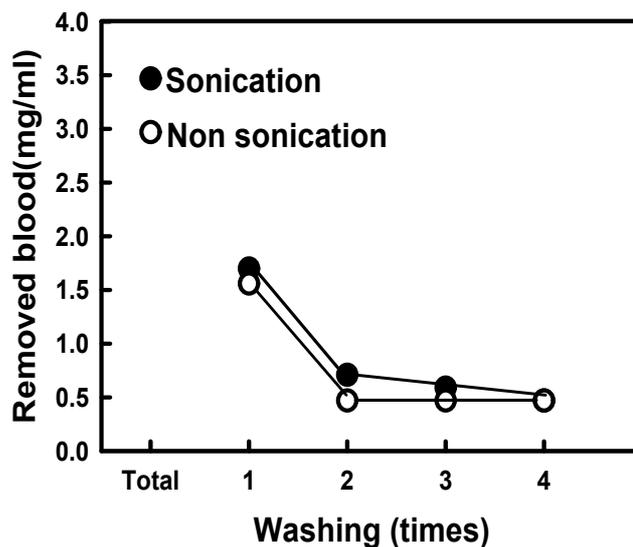


Fig. 23. Removing of blood in cardiac muscle of pork by sonication.

## 나. 초음파 처리에 의한 심근 단백질의 수용화

돼지 심근은 대부분 0.5 M 이상의 KCl 또는 NaCl의 고염농도 용액에서 추출되는 염가용성 단백질로 이루어져 있는데 제 1항에 제시한 근원섬유 레벨에서는 초음파를 활용하면 0.2M NaCl에서도 충분히 구성단백질을 분리할 수 있었다. 그러나 근원섬유는 심근으로부터 분리하여야 하는 번잡함과, 시간, 비용의 문제로 산업화를 위해서는 그다지 현실적이지 못하다. 따라서, 혈액을 제거한 심근 현탁액을 초음파 처리를 하였을 때 근원섬유에서의 경우와 같은 효과가 일어나는지에 대하여 검토하였다.

### (1) 염농도 의존성

Fig. 24에는 심근현탁액에 0~0.2 M NaCl, 20 mM phosphate(pH 7.0)가 되도록 조절한 후 20 kHz에서 80% amplitude로 120분간 초음파 처리하여 측정된 용해도를 나타내었다. 초음파 처리를 하지 않은 대조구의 경우 용해도는 증가하지 않았으며, 초음파 처리한 것은 초음파 처리 시간이 경과함에 따라서 용해도는 증가하기 시작하였다. 이 경향은 NaCl 농도가 높을수록 증가 속도가 빠른 것으로 나타났다. 이상의 결과는 초음파 처리가 심근 단백질의 용해도(수용화)의 증가를 촉진시키는 것으로 나타났다. 즉, 심근 단백질의 용해도는 NaCl 농도에도 의존하지만 낮은 염농도에서는 거의 단백질이 분리되지 않았다. 그러나 낮은 염농도에서 초음파 처리를 하면 단백질이 분리되었으며 초음파 처리시간이 경과함에 따라서 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이 결과는 제 1항의 초음파에 의한 근원섬유로부터 단백질의 분리와 기본적으로 같았다.

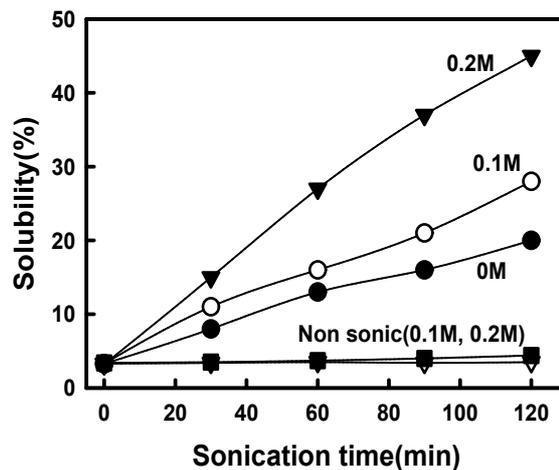


Fig. 24. Effects of salt(NaCl) and sonication on solubility of cardiac muscle protein of pork. Cardiac muscle suspension were the sonication at 80% amplitude of 20kHz.

다음은 Fig. 24와 같은 조건하에서 분리한 단백질의 subunit 조성을 SDS-PAGE로 분석하여 그 결과를 Fig. 25에 제시하였다. NaCl 농도 0M에서 초음파 처리를 하지 않은 것은(0 min.) 심근으로부터 거의 단백질은 분리되지 않았다. 그러나 초음파처리를 하면 시간의 경과와 함께 단백질이 분리되었으며 주로 분자량이 43KDa 이상의 단백질에 상당하는 성분들이 검출되었는데 그 양은 적었다. 그러나 0.1M NaCl과 같은 경우는 43KDa 및 23KDa에 상당하는 성분이 많이 관찰되기 시작하였으며, 그 외 200KDa과 43KDa사이로 이동하는 성분들도 관찰되었다. 이와 같은 성분들은 초음파 처리 시간이 길어질수록 많은 양이 관찰되었다.

0.2M NaCl의 경우 초음파 처리 0시간에는 200KDa(myosin heavy chain인 것으로 추정)의 성분이 거의 관찰되지 않았는데, 초음파 처리를 함에 따라서 시간의 경과와 함께 200KDa에 상당하는 성분이 증가하였다. 뿐만 아니라 43KDa(actin인 것으로 추정) 및 23KDa(myosin light chain으로 추측)에 상당하는 성분도 동시에 증가한 것으로 나타났다. 또한 200KDa와 43KDa사이에 이동되는 성분들 및 200KDa 성분보다 고분자로 추정되는 성분들도 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 초음파에 의해서 구조적인 변화가 일어나고 있음을 나타내었다. 초음파 처리 초기에 있어서는 근육내 단백질의 구조가 붕괴되기 시작하면서 생체내에서는 긴 myosin filament의 형태로 존재하던 것이 polymer 및 monomer의 형태로 변화하기 시작하며, 초음파 처리시간이 길어짐에 따라서 이러한 monomer도 peptide 형태로 분해가 일어나는 것으로 추측하였다. 또한 분자량 43KDa에 상당하는 성분도 초음파 처리시간의 경과와 함께 늘어났는데 43KDa의 성분은 근육을 구성하는 주요 단백질 중 actin에 상당하는 성분이며, 구형단백질로서 생체내에서는 filament 형태로 존재하고 있으며 myosin과의 상호작용을 담당하고 있는 매우 중요한 단백질이다. 이와 같은 단백질이 초음파 처리에 의해서 늘어난 것은 myosin과 actin이 결합된 상태에서 약간의 NaCl 첨가로 해리가 일어나기 좋은 조건이 되어 여기에 초음파 처리를 함으로서 확실하게 해리를 일으키는 현상이 일어났기 때문인 것으로 사료되었다. 또한 43KDa의 경우 초음파를 오랫동안 처리하여도 분해되는 양상은 일어나지 않았는데 actin의 경우 myosin 보다 매우 강한 단백질인 것으로 알려져 있으며, 이러한 것이 물리적인 힘에 의해서도 분해가 일어나지 않았던 것으로 사료되었다.

이상의 결과로부터 초음파 처리는 근육 단백질의 용해도를 촉진시키는 것으로 나타났다. 즉, 일반적으로 단백질의 용해가 일어나지 않는 것으로 알려진 생리적인 염농도 부근에서도 초음파를 적절히 활용함으로써 충분히 심근 단백질을 수용화 할 수 있었으며, 또한 추출 후의 단백질은 백색을 띄고 있었다. 따라서 폐기처분되고 있는 돼지 심근 단백질은 초음파에 의해서 분리 가능하였으며 새로운 식품소재로서 활용할 수 있을 것으로 기대되었다.

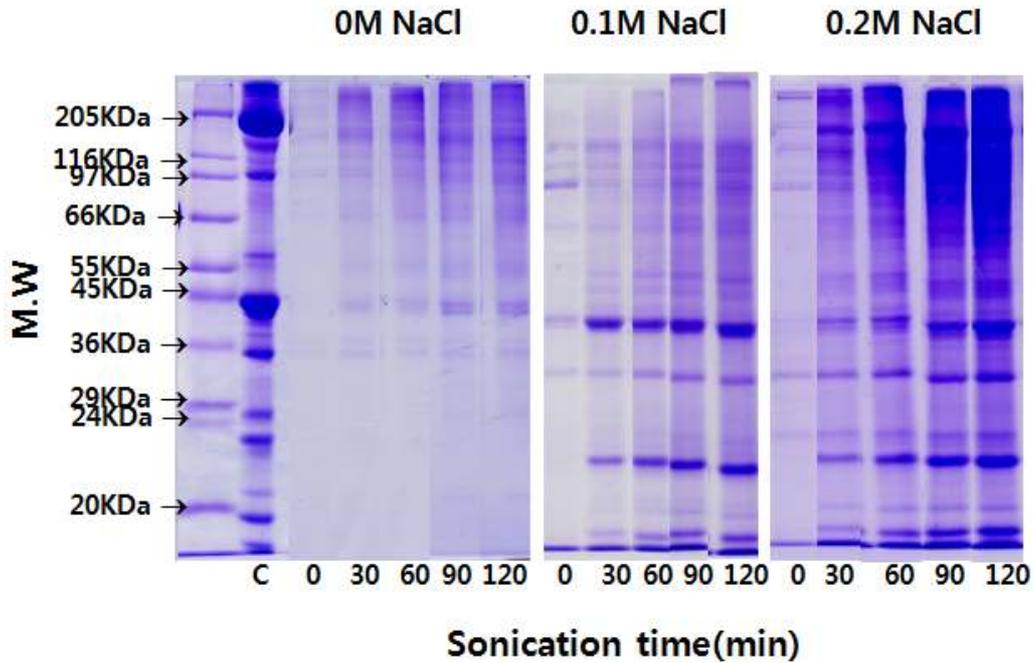


Fig. 25. SDS-PAGE patterns of protein isolated from cardiac muscle of pork by sonication at low salt concentration. Protein isolated under same conditions as in Fig. 1.

## (2) pH 의존성

본 연구에서는 초음파에 의한 심근 단백질의 용해도의 pH 의존성을 알아보기 위하여 pH를 5~8의 범위 및 생리적인 염농도인 0.1M NaCl의 공존하에서 검토한 후 결과를 Fig. 26에 제시하였다. 초음파 처리를 하지 않은 경우 pH와 관계없이 수% 정도의 용해도를 나타내었으며 pH에 의한 용해도의 차이는 거의 인정되지 않았다. 그러나 초음파 처리를 하면 pH 의존성이 확실히 인정되었다. 즉, pH가 높을수록 또한 초음파 처리시간이 길어질수록 용해도는 증가되었다. 실제로 측정된 pH 변화에 따른 용해도는 pH 5에서는 초음파 처리 240분 후에도 약 7% 밖에 증가하지 않은데 반하여 pH 6에서는 약 14%, pH 7에서는 약 22%, pH 8에서는 약 38% 정도의 용해도를 나타내었다.

이상의 결과로부터 초음파 처리에 의한 용해도의 pH 의존성은 산성 또는 중성보다도 약 알칼리 영역의 pH에서 효과가 큰 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 다른 pH 영역보다 pH 8.0의 약 알칼리 영역에서 알칼리에 의해서 느슨해진 조직이 초음파에 의해서 구조적인 변화(붕괴)가 보다 쉽게 일어났기 때문인 것으로 사료되었다.

다음은 Fig. 26과 같은 조건하에서 분리한 단백질 조성을 SDS-PAGE로 검토하여 결과를 Fig. 27에 제시하였다. 초음파 처리를 하지 않은 심근의 경우 어떠한 pH의 조건하에서도 거의 단백질은 관찰되지 않았다. 그러나 20kHz의 80%의 amplitude에서 24시간 동안 초음파 처리를 하면 단백질은 분리되기 시작하였으며, pH가 높을수록 분리되는 단백질의 양이 많게

관찰되었다. 즉, pH 5.0에서는 분자량으로부터 actin, tropomyosin, myosin light chain 등이 초음파 처리 시간의 경과와 함께 증가하는 것으로 관찰되었다. pH 6.0에서도 pH 5.0과 매우 유사한 결과를 나타냈는데 양적으로 조금 많이 검출되는 것으로 관찰되었다. 한편 pH 7.0 및 8.0의 경우는 초음파 처리에 의해서 200KDa 및 43KDa에 상당하는 고분자 성분이 관찰되는 점과 양적으로 pH가 높을수록 많이 관찰된다는 점을 제외하면 매우 유사한 결과 였다. 이외에도 여러 형태의 펩타이드로 추정되는 성분들이 관찰되었다.

이상의 결과는 초음파에 의한 심근단백질의 수용화에 있어서 염농도 뿐만이 아니라 pH도 매우 중요한 factor인 것으로 나타났다. 즉, pH 5는 단백질의 등전점 부근이며 이 pH 영역에서 심근 단백질은 조금밖에 가용화되지 않았다. 그 이유에 대해서는 좀더 상세한 연구를 필요로 하지만 2가지의 경우를 추측할 수 있을 것으로 사료되었다. 첫째로 초음파에 의해서 근육의 구조는 붕괴되었지만 상당부분의 단백질 등전점이 pH 5.0부근이어서 유리된 단백질이 침전으로 이전되었거나, 또는 pH 5.0 부근에서는 근육을 구성하는 근원섬유 구조가 오히려 타이트해져 붕괴되기 어려운 상태로 되어 단백질의 분리가 일어나기 어려워 졌기 때문인 것으로 추측할 수 가 있었다. 반면에 알카리 쪽에서 초음파처리에 의해서 가용화율이 높게 나타나는 것은 알카리 영역에서는 근육의 구조가 느슨해져 여기에 초음파의 물리적인 힘을 가하면 구성 단백질의 용출 및 분해가 쉽게 일어났기 때문인 것으로 사료되었다.

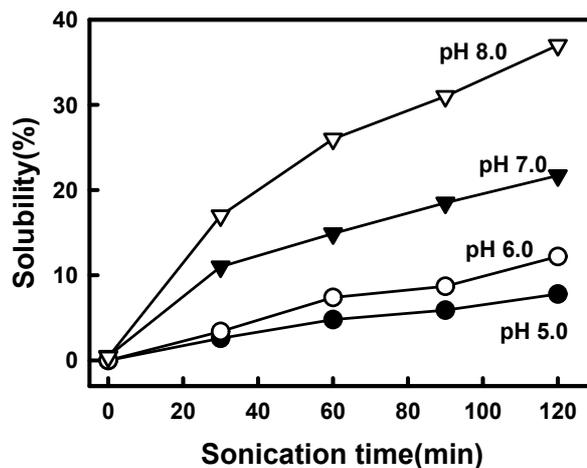


Fig. 26. Effects of pH and sonication on solubility of cardiac muscle protein of pork.

Samples in 0.1M NaCl solution sonicated at 80% amplitude of 20 kHz.

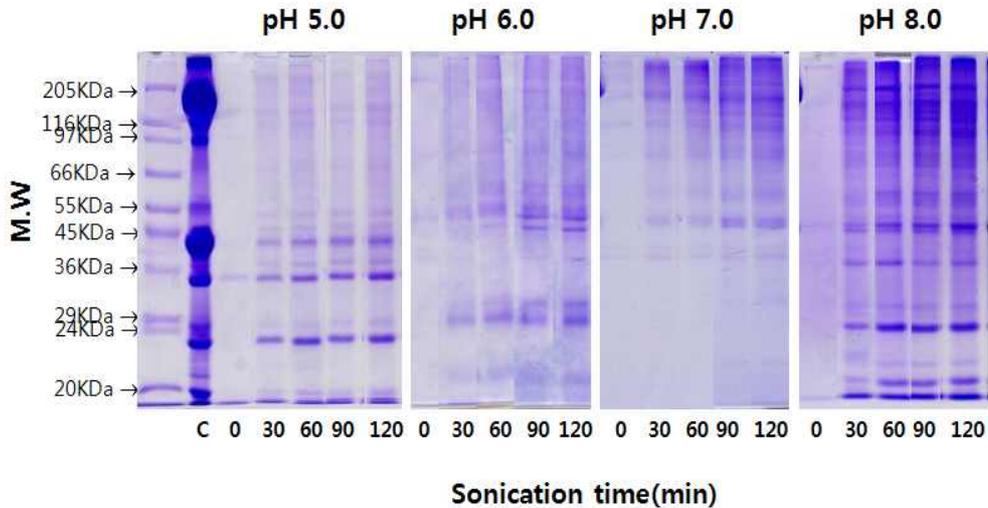


Fig. 27. SDS-PAGE patterns of proteins isolated from cardiac muscle of pork by sonication under various pH conditions.

Proteins isolated under same conditions as in Fig. 3.

### (3) 초음파 amplitude의 영향

본 연구에서는 앞서 제시한 염농도 및 pH 의존성에서 가장 우수하였던 조건인 0.2M NaCl, pH 8.0에서 amplitude 0~80%로 초음파 처리하였을 때의 용해도의 변화를 살펴보았다(Fig. 28). 우선 초음파 처리를 하지 않은 amplitude 0%에서는 거의 용해도에 거의 변화가 없었다. 그러나 amplitude가 높아짐에 따라서 급격히 용해도가 증가하기 시작하였으며, amplitude가 높을수록 용해도의 증가속도는 빠르게 나타났다. 이와 같이 amplitude에 따라서 용해도가 급격히 증가할 때 분리된 단백질은 어떠한 성분인지를 확인하고자 SDS-PAGE로 검토하여 결과를 Fig. 29에 제시하였다.

이결과에 의하면 amplitude 0%에서는 이렇다 할 분리된 단백질은 관찰되지 않았으나 amplitude가 높아질수록 단백질의 분리가 많아짐을 알 수 있었다. 또한 그 성분을 살펴보면, myosin heavy chain, actin 및 그 외의 많은 성분들이 관찰되었으며 초음파처리 조건에 따라서 성분의 조성도 달라지는 것으로 나타났다. 즉 amplitude 20%에서는 초음파 처리시간의 경과와 함께 겔의 최상단에서 관찰되는 거대 분자(myosin의 다량체일 가능성도 있음) 및 myosin heavy chain, 150kDa, 100kDa, actin, tropomyosin 및 myosin light chain에 상당하는 성분들이 증가하는 것으로 관찰되었다. 그러나 40% 이상의 amplitude에서는 이들 성분뿐만이 아니라 초음파에 의해서 심근 단백질의 분해산물로 추측되는 성분이 증가되었으며, 초음파 처리시간이 길어짐에 따라서 더욱 저분자화된 성분이 증가하는 것으로 관찰되었다.

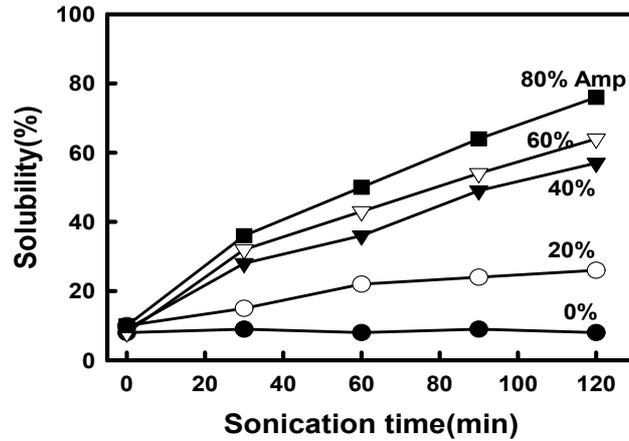


Fig. 28. Effects of ultrasonic amplitude on solubility of cardiac muscle protein of pork.

Samples in 0.2M NaCl solution(pH 8.0) sonicated at 20 kHz.

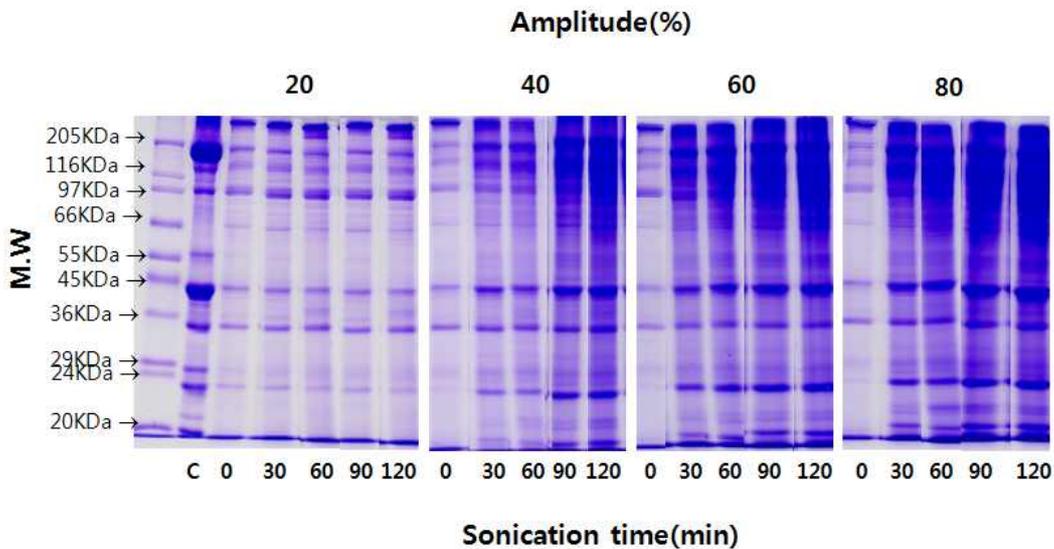


Fig. 29. SDS-PAGE patterns of protein isolated from cardiac muscle of pork by ultrasonic amplitude.

Proteins were isolated under same conditions as in Fig. 6.

#### (4) 온도 의존성

본 연구에서는 초음파에 의해서 분리되는 단백질이 고온에서 열처리한 후 초음파 처리를 하면 어떻게 되는지를 알아보기 위하여 그 온도의존성에 대하여 검토하였다. 심근 현탁액을 20℃~80℃의 범위에서 열처리한 후 20kHz의 80% amplitude로 초음파 처리하였을 때의 변화를 검토하였다. Fig. 8에는 우선 이들의 용해도를 나타내었다. 이결과에 의하면 40℃까지는 초음파 처리시간의 경과와 함께 급격히 용

해도가 증가하는 것으로 나타났으나, 60°C 이상에서는 온도가 높을수록 용해도의 증가속도가 둔화되는 것으로 나타났다. 즉, 40°C까지는 최대 용해도가 약 80% 이상인 것으로 나타났으나 60°C에서는 약 40%, 80°C에서는 약 22%인 것으로 나타났다. 이 결과에서 40°C까지는 높은 용해도가 유지되었는데 심근의 주요 단백질인 myosin의 변성온도가 약 45°C인 것으로 알려져 있으므로 저온에서 처리한 것과 크게 달라지지 않은 것으로 사료되었다. 또한 60°C 이상의 온도에서는 온도가 높을수록 초음파처리를 하여도 용해도의 증가속도가 늦어지는 것으로 나타났는데 이것은 열에 의하여 변성된 단백질은 침전으로 이전하고 미변성 단백질이 초음파에 의해서 용출된 것으로 사료되었다. 이와 같은 현상을 좀더 자세히 살펴보기 위하여 용출된 성분을 SDS-PAGE로 분석하여 Fig. 31에 결과를 제시하였다.

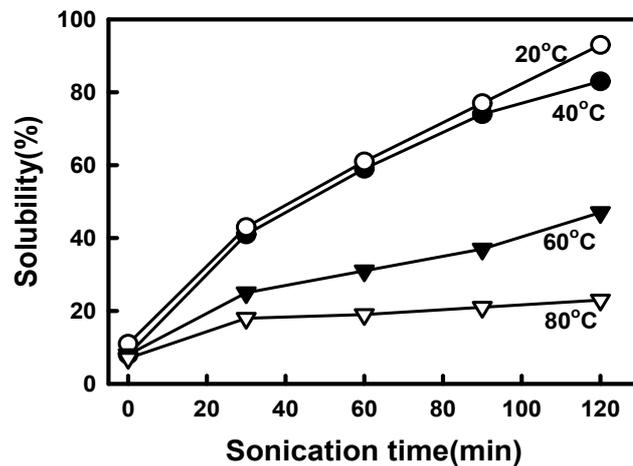


Fig. 30. Effects of sonication on solubility of cardiac muscle protein heated at various temperatures. Samples in 0.2M NaCl solution(pH 8.0) sonicated at 80% amplitude of 20 kHz.

이결과에 의하면 20~40°C까지는 SDS-PAGE의 pattern이 매우 유사하였고, 60~80°C에서 이들의 pattern이 매우 유사하였다. 즉 20~40°C에서는 단백질의 변성이 일어나지 않아 초음파에 의해서 단백질의 분리가 잘 일어났으며, 그 성분들도 심근 단백질의 주요 성분인 myosin heavy chain, actin 등이 검출되었으며, 초음파 처리시간이 길어짐에 따라서 저분자화된 성분들도 늘어나는 것으로 관찰되었다. 그러나 60~80°C에서는 단백질의 변성이 일어난 상태에서 초음파 처리를 하면 분리되는 양이 적을 뿐만 아니라 그 분리되는 성분에 있어서도 20~40°C의 양상과는 달랐다. 즉, 60~80°C에서 열처리 후 초음파 처리를 하면 actin에 상당하는 성분과 tropomyosin, myosin light chain 등과 같은 성분이 증가되는 것으로 관찰되었다. 이러한 성분들은 열에 매우 강한성분이어서 열에 의한 변성이 잘 일어나지 않는 특성이 있으므로 이러한 성분들이 유출된 것으로 사료되었다.

이상으로 초음파 처리에 의한 심근 단백질의 수용화에 대한 결과를 정리하면 다음과 같다. NaCl

농도에 있어서는 0.1 내지 0.2M, pH는 8.0 부근, 온도는 40℃ 이하, 초음파는 20kHz의 60% 이상의 amplitude에서 처리되었을 때 가장 효율적으로 가용화 시킬 수 있었다.

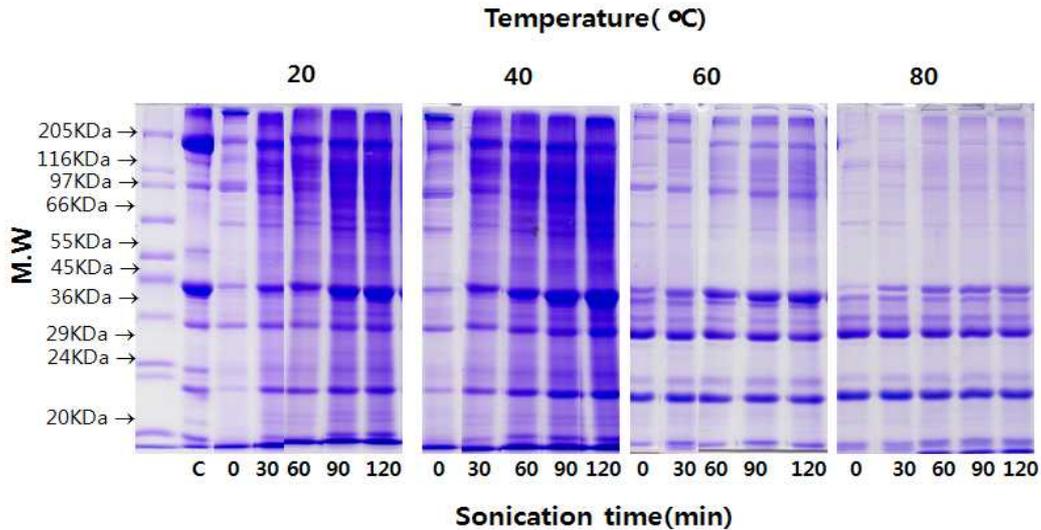


Fig. 31. SDS-PAGE patterns of proteins isolated by sonication after heated cardiac muscle at various temperatures.

Samples in 0.2M NaCl solution(pH 8.0) sonicated at 80% amplitude under 20 kHz.

### (5) 초음파에 의한 심근단백질의 수용화에 미치는 염류의 영향

#### (가) 염류의 영향

지금까지의 결과는 제 1항에서 실시하였던 심근 근원섬유의 결과를 토대로 하여 근원섬유가 아닌 심근을 초음파 처리하였을 때의 결과를 제시하였다. 그 결과 기본적으로는 심근의 결과도 근원섬유와 마찬가지로의 현상이 일어났으며, 즉 염농도(NaCl), pH 및 초음파 및 초음파의 amplitude의 영향을 받았다. 그러나 여기서 주목할 사항은 초음파에 의한 심근단백질의 수용화는 생리적인 염농도에 가까운 0.1~0.2M의 NaCl을 최소한의 양을 필요로 하였으며, 따라서 식품첨가물로 활용되고 있는 다른 이종의 염류에 대해서도 검토할 필요성이 있었다. Fig. 32에는 심근 현탁액에 최종농도가 10mM이 되도록 Pyrophosphate(pH 8.0) 및 Phosphate(pH 8.0)를 첨가하여 20 kHz의 60% Amplitude에서 초음파처리를 하였을 때의 용해도를 측정하여 그 결과를 제시하였다. 대조구로서 10mM NaCl(pH 8.0)을 첨가하여 초음파 처리를 하였다. 이 결과에 의하면 대조구(NaCl)의 경우 초음파처리 120분 후에 약 15% 정도가 분리된 반면에 Phosphate 처리구는 약 38%, Pyrophosphate는 약 60%의 용해도를 나타내었다. 한편, 본 data에서는 제시하지 않았지만 Pyrophosphate 처리구 만큼의 단백질을 분리시키기 위해서는 NaCl의 경우 0.2M 정도를 필요로 하였다. 이와 같은 첨가량을 중량비로 나타내었을 경우 10mM pyrophosphate는

0.13%, 0.2M NaCl은 1.16%에 상당하는 것으로 나타나 그 차이는 약 8.9배인 것으로 확인되었다. 그러나 나중에 기술하겠지만 pyrophosphate의 경우 5mM(0.065%)만 첨가하여도 충분히 단백질을 분리할 수 있는 것으로 확인되었다. 그러면 그 차이는 17.8배에 이른다.

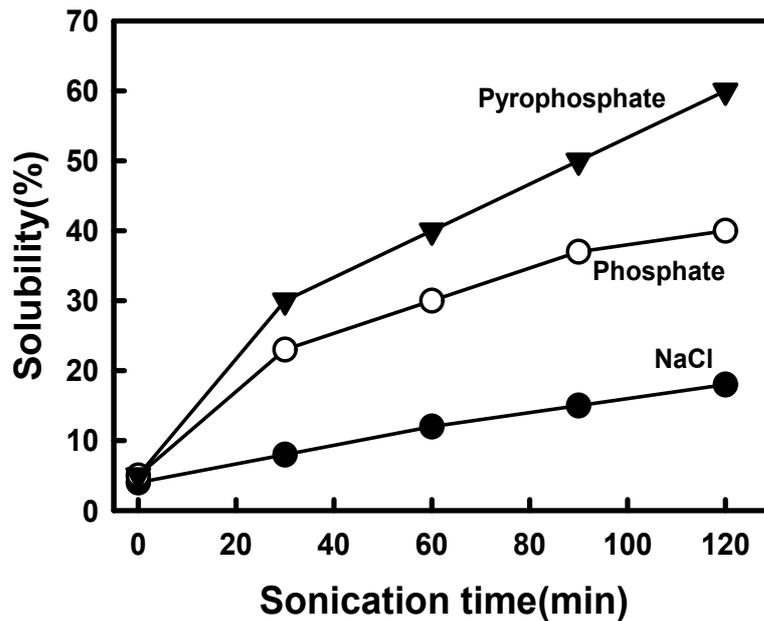


Fig. 32. Effects of salts on the solubility of cardiac muscle protein by sonication.

The addition of salts(pH 8.0) were 10mM.

Samples sonicated at 60% amplitude of 20 kHz.

다음은 이들 3종의 염류에 의해서 분리된 단백질의 성분을 조사하기 위하여 SDS-PAGE로 분석하였다(Fig. 33). NaCl 첨가구의 경우는 초음파 처리 시간이 길어짐에 따라서 각각의 성분들이 늘어나는 것으로 관찰되었지만 그 양은 매우 적었다. 그러나 Phosphate 첨가구의 경우는 초음파 처리 30분만에 150KDa, 43KDa, 34KDa에 상당하는 성분들이 관찰되기 시작하였으며, 이들 성분은 초음파 처리시간이 늘어남에 따라서 증가하는 것으로 나타났다. 한편, Pyrophosphate의 경우는 초음파 처리 초기에 이미 200KDa(Myosin heavy chain으로 추정됨)에 상당하는 성분이 다량 검출되었으며, 그 외에 150KDa, 43KDa 및 34KDa에 상당하는 성분이 관찰되기 시작하였다. 또한 초음파 처리 시간이 길어짐에 따라서 200KDa에 상당하는 성분이 분해되는 양상을 보였으며, 이들의 분해된 성분들은 규칙적인 작용에 의해서 분해가 일어나는 것이 아니라 분자량 200KDa과 43KDa의 사이로 이동되는 불규칙적인 형태로 분해된 성분들이 관찰되었다. 또한 전체적으로 분리된 양을 관찰하였을 때 Fig. 32에서의 결과와 마찬가지로 Pyrophosphate > Phosphate > NaCl의 순으로 많이 관찰되었다.

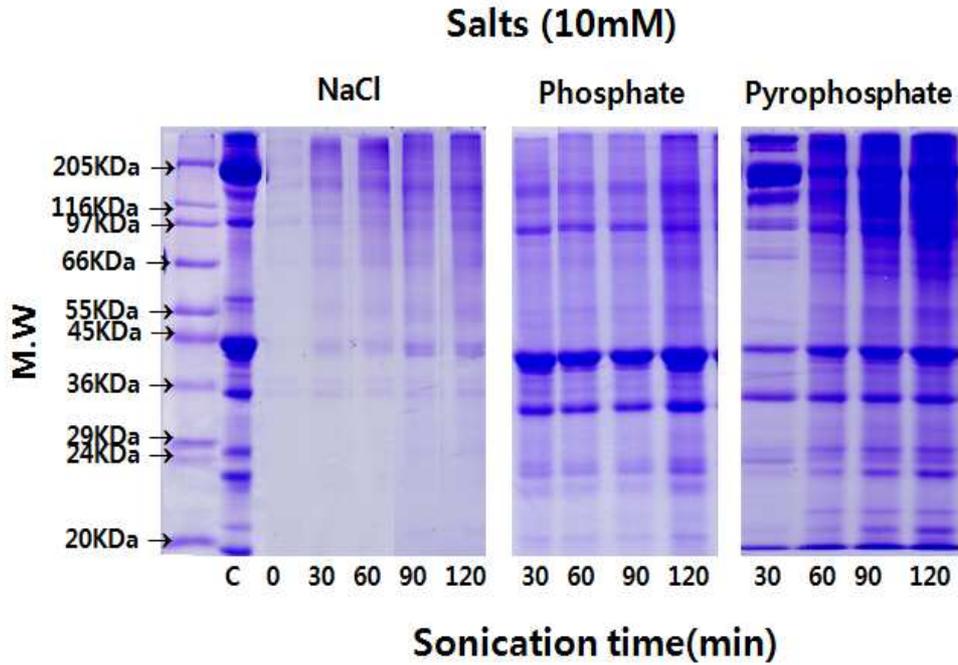


Fig. 33. SDS-PAGE patterns of proteins isolated by salts and sonication

Samples sonicated at 60% amplitude of 20 kHz.

#### (나) Pyrophosphate(PPi)의 농도 의존성

앞서 제시한 바와 같이 초음파에 의한 심근단백질의 분리능에 있어서 다른 염류보다 PPi가 가장 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 PPi 첨가 시 pH를 8.0으로 고정하여 첨가하였으므로 pH를 고정하지 않고 그대로 농도별로 첨가하였을 때는 어떠한 현상이 일어나는지 확인하기 위하여 농도별 첨가 시 pH 변화 및 이에 따른 심근단백질의 용해도를 검토하였다. 우선 심근현탁액에 PPi를 농도별로 첨가하였을 때의 pH를 Fig. 34에 나타내었다. 이 결과에 의하면 5mM의 PPi를 첨가하였을 때는 pH 8.2 정도를 나타내었으나 10mM의 PPi를 첨가하였을 때는 pH 9.1 정도인 것으로 나타났다. 그러나 20mM 이상의 PPi를 첨가하였을 때는 pH 9.2 정도로 큰 변화는 인정되지 않았다.

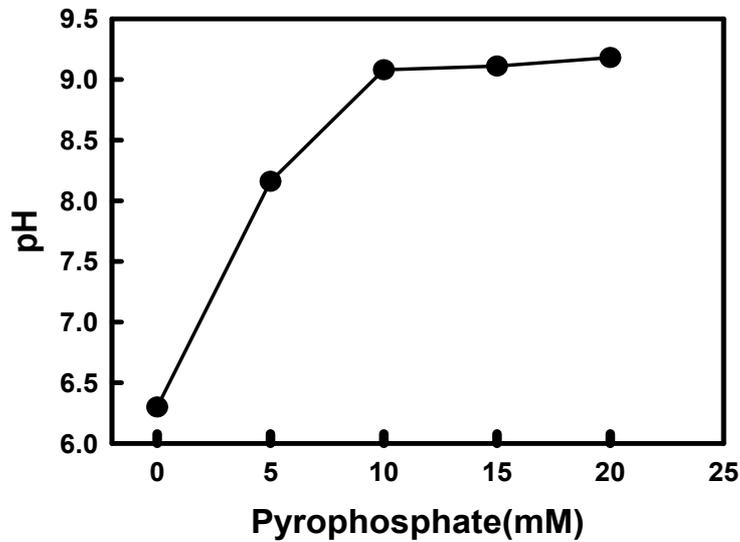


Fig. 34. The pH of cardiac muscle homogenized with pyrophosphate at various concentration.

다음은 이와 같이 PPi의 첨가량 및 이에 따라 pH가 변화하였을 때의 심근의 초음파에 의한 용해도를 측정하여 Fig. 35에 제시하였다. 이 결과에 의하면 5mM의 경우 초음파 처리시간 20분까지는 급격히 증가하였다가 그 후 서서히 증가였으며, 초음파 처리 80분만에 90% 이상의 용해도를 나타내었다. 한편 10mM 이상의 PPi 첨가구에서는 전체적인 경향은 같았으나 용해속도가 매우 빨라졌으며, 불과 초음파 처리 40분만에 90% 이상의 용해도를 나타내었다.

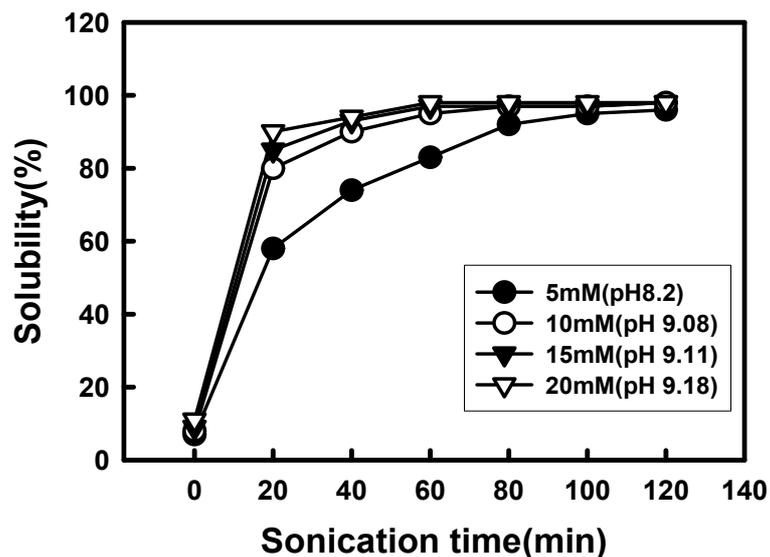


Fig. 35. Changes in solubility of cardiac muscle protein in pyrophosphate of various concentration by sonication.

Samples sonicated at 80% amplitude of 20 kHz.

이상의 결과로부터 5mM의 PPI 첨가만으로도 초음파처리에 의해서 심근으로부터 단백질이 90% 이상 분리되는 것을 알았으므로 초음파 처리와 PPI 중 어느쪽의 영향을 더 받는지를 검토하기 위하여 아무처리도 하지 않은 것(Non), 5mM PPI 첨가 후 4°C에서 추출한 것(5mM PPI), 초음파 처리만한 것(Sonication), 5mM PPI를 첨가한 후 초음파 처리한 것(5mM PPI-sonication)간의 상호비교를 하였다. 그 결과를 Fig. 36에 나타내었다. 우선 Non의 경우 240분 동안 저온에서 교반하면 심근으로부터 단백질은 거의 분리되지 않았다. 그러나 5mM PPI의 경우는 저온에서 24시간 동안 추출하면 초기 30분까지 증가하다가 그 후는 서서히 증가하는 경향을 나타내었는데 그 최대값은 약 18%의 용해도에 불과하였다. Sonication의 경우는 처리 시간이 증가함에 따라서 계속적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 24시간 후에 약 36%의 용해도를 나타내었다. 그러나, 5mM PPI를 첨가한 후 24시간 동안 초음파 처리를 하면 초기 60분까지 이미 약 72%의 용해도를 나타내었으며 그 후로도 서서히 증가하여 24시간 후에는 약 91%의 단백질이 용출되었다. 이상의 결과는 PPI의 첨가는 초음파 처리 시 단백질의 용출을 촉진시키는 것으로 사료되었다. 즉, PPI를 첨가함으로써 심근의 구조에 침투하여 구조적으로 느슨해지며 이 상태에서 초음파 처리를 하면 느슨해진 구조가 붕괴되어 많은 양의 단백질을 유리시키는 결과로 생각되어 진다. 한편, 근원섬유와(Fig. 8) 비교를 하면 전체적으로 추출속도가 늦어지는 경향을 보였는데 근원섬유는 결합조직과 같은 협잡물을 제거한 것이므로 환경적으로 보다 외부로부터의 영향을 쉽게 받을 수 있는 조건이기 때문으로 사료되었다.

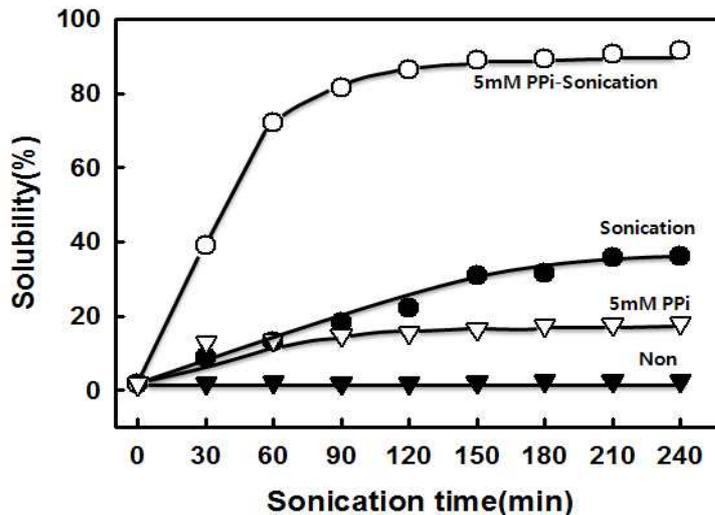


Fig. 36. Effects of pyrophosphate and sonication on solubility of protein prepared from cardiac muscle of pork.

5mM PPi를 첨가한 후 20kHz에서 초음파 처리를 하면 60% amplitude에서 충분히 단백질이 용출되는 것으로 나타났다. 따라서, 이들의 속도는 상호간에 어떻게 다른지를 알아보기 위하여 우선 Fig. 36의 결과로부터 Ln 값을 산출하여 Fig. 37에 나타내었다. 이 결과에 의하면 초기에 빠르며 후기에 느린 2단계의 직선관계의 식이 성립되었다. 여기에서 주목할 만한 사항은 초기 30분까지는 PPi만을 첨가한 것이 초음파 처리만 한 것보다 빠르게 증가하였으나 처리시간 30분 이후의 2단계의 직선관계에 있어서는 서로 역전하는 현상이 일어났다. 즉, PPi만으로 단백질을 분리하면 초기 30분 동안 급격히 증가한 후 그 후로는 거의 변화가 일어나지 않았으나, 초음파로만 처리한 것은 초기에 급격히 증가한 후 그 이후에도 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 이 결과는 PPi와 초음파간의 추출특성이 약간 다른 것으로 사료되었으며 PPi의 경우는 어느정도 반응이 진행되면 그 이상은 진행되지 않는 특징이 나타났으며, 초음파는 계속해서 물리적인 힘에 의해서 구조적 변화가 일어나고 있음을 시사하였다.

초기의 1차식으로부터 각각 증가속도 계수 ( $K_i$ )를 산출하여 Fig. 38에 나타내었다. 이 결과에 의하면 5mM PPi - sonication > 5mM PPi > Sonication > Non의 순으로 빠르게 나타났다. 즉, 속도가 가장 빨랐던 5mM PPi - sonication은 Non보다 약 800배, PPi 보다는 150배, sonication 보다는 180배 정도 빨랐다. 그러나, Fig. 37에서도 언급한 바와 같이 초기 30분까지는 PPi만을 첨가한 것이 초음파 처리만 한 것보다 빠르게 증가하였으나 처리시간 30분 이후의 2단계의 직선관계에 있어서는 서로 역전하는 현상이 일어났는데 2단계의 속도에 있어서는 sonication 처리한 것이 PPi 처리한 것보다 약 10배 정도 빠른 것으로 나타났다. 따라서, 이결과로부터 Fig. 37에서의 PPi와 초음파간의 추출 특성이 다르다는 것을 지지하는 결과였다.

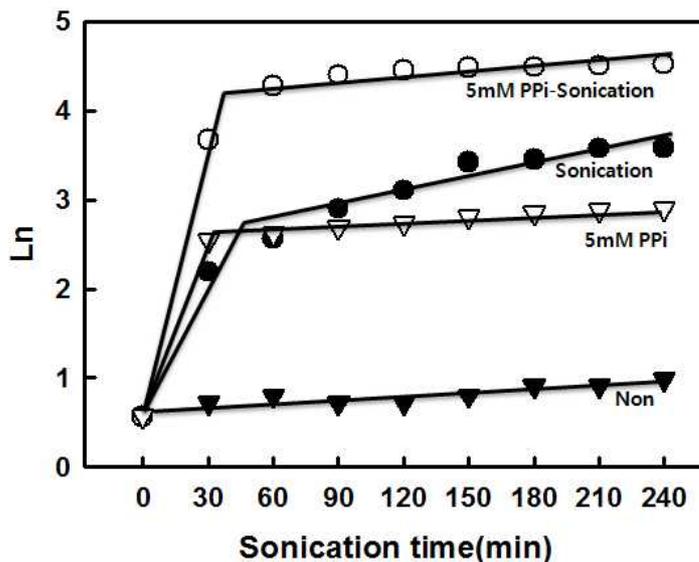


Fig. 37. Increase in the solubility of cardiac muscle of pork during sonication in the presence PPi.

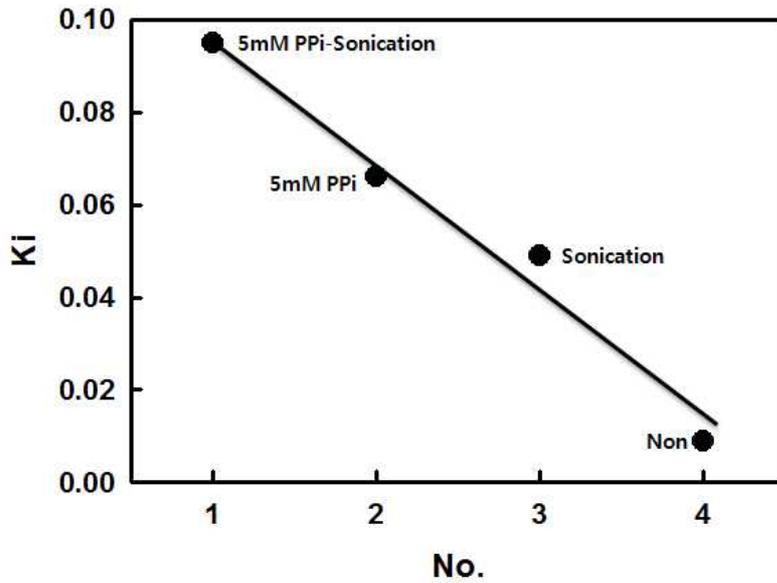


Fig. 38. The effect of sonication on the increases rate constants of protein extraction from cardiac muscle of pork. The increased rate constant for each result ( $K_i$ ) was calculated as :  $K_i = \ln(n_t - n_0) / t$ , where  $n_t$  denotes solubility after sonication with salts for  $t$  times, and  $n_0$  denotes solubility before the sonication with salts.

#### 다. 초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 점도

초음파에 의해서 분리된 성분의 특성을 알아보기 위해서 Fig. 2와 같은 조건하에서 분리된 성분의 점도를 측정하여 Fig. 39에 제시하였다. 심근 단백질에 0~0.2M NaCl, 20 mM phosphate(pH 8.0)가 되도록 조절한 후 20 kHz의 80% amplitude에서 처리하여 얻어진 가용화 성분의 점도는 가용화가 일어나기 시작하는 시점부터 점도의 상승이 일어났으며, 어느정도까지는 처리시간이 길어질수록 가용화 성분의 점도가 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 0.1M NaCl 처리구에서는 초음파 처리 90분 후에는 점도가 떨어지기 시작하였으며, 0.2M의 경우는 더욱 빨라져 초음파 처리 60분 후에 떨어지는 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 어느 정도의 초음파 처리 시간까지는 심근의 주요 성분인 Myosin 및 Actin이 점차적으로 초음파에 의해서 분리가 촉진되었기 때문인 것으로 사료되었으며, 초음파 처리 시간이 길어지면 분리된 주요 성분들이 초음파에 의하여 분해가 일어났기 때문인 것으로 사료되었다.

한편, amplitude의 변화에 의한 가용화 성분의 점도 변화를 Fig. 40에 나타내었으며, 염류에 따른 점도의 변화를 Fig. 41에 나타내었다. 기본적으로는 Fig. 39와 같은 결과였다. 즉 초음파 처리 초기에 분리된 성분의 점도는 증가하였으나 초음파 처리 시간이 경과함에 따라서 감소하였다. 이는 앞서 기술한바와 같이 초음파 처리 조건에 따라서 분리되는 성분도 변화한다

는 결과와 일치하였다.

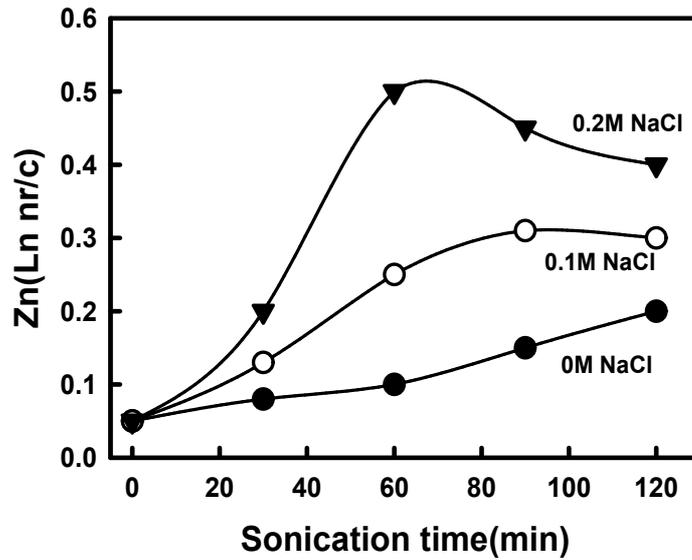


Fig. 39. Viscosity of protein isolated from cardiac muscle by sonication and various NaCl concentrations. Conditions were the same as in Fig. 2 and viscosity measured at room temperature.

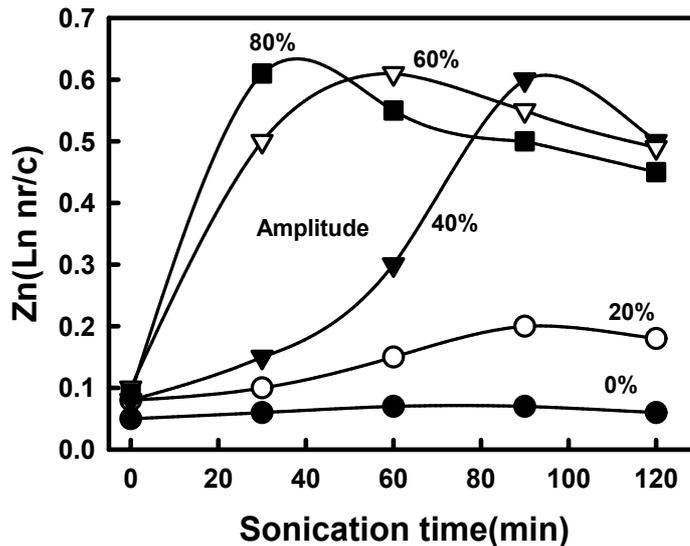


Fig. 40. Viscosity of protein isolated from cardiac muscle by various amplitudes and sonication of 20kHz. Conditions were the same as in Fig. 6 and viscosity measured at room temperature.

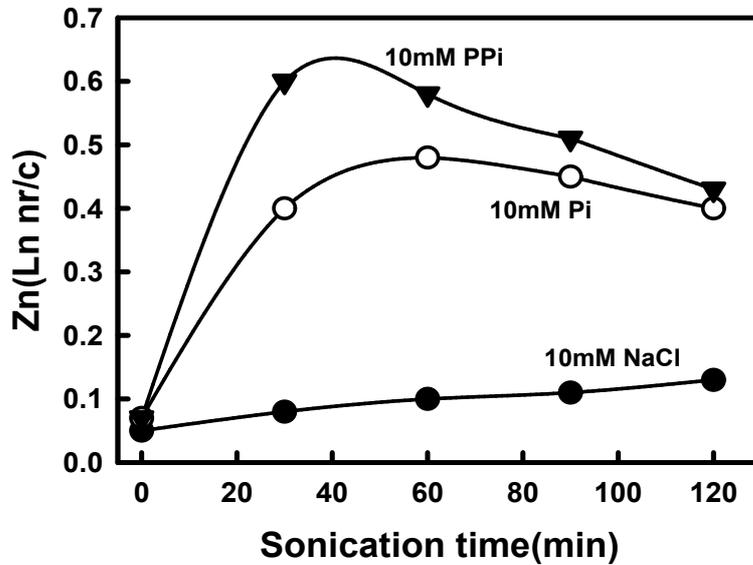


Fig. 41. Viscosity of protein isolated from cardiac muscle by various salts and sonication of 20kHz.

#### 라. 초음파 처리에 의한 심근단백질의 ATPase 활성

지금까지 검토한 결과에 의하면 심근을 초음파 처리하면 근육의 구조가 붕괴되어 구성 단백질의 해리가 일어나 유출되는 것으로 나타났다. 이와 같이 초음파에 의해서 근육의 구조가 붕괴될 때 심근 단백질의 기능적 변화는 어떻게 일어나는지를 살펴보기 위하여 초음파 처리 후 심근 단백질의 Ca-, 및 Mg-ATPase 활성에 대하여 검토하였다.

여기에서는 대표적으로 염류에 의한 영향을 알아보기 위하여 심근현탁액에 10mM NaCl(pH 8.0), 10mM Pi 및 10mM PPI를 첨가한 후 20kHz의 80% amplitude 조건하에서 초음파 처리한 심근 단백질의 Ca-ATPase 활성 및 Mg-ATPase 활성을 측정하여 Fig. 42 및 43에 나타내었다. 이 결과에서는 초음파 처리 시간과 함께 급격히 Ca 및 Mg-ATPase 활성이 저하되는 경향을 나타내었으며, 첨가된 염류에 따른 차이점은 찾아볼 수 없었다. 이상의 결과는 다음과 같이 정리할 수 있다. 초음파 처리에 의해서 심근은 구조의 붕괴뿐만이 아니라 동시에 주요 구성 단백질이 지니고 있는 기능적(ATPase 활성)특성에도 변화(변성)를 일으키는데, 이것이 Ca 뿐만이 아니라 주요구성 단백질인 Myosin과 Actin의 상호작용과 관련 있는 Mg-ATPase 활성도 저하시키는 것으로 사료되었다. 즉 이것은 Myosin의 두부에 존재하는 ATPase의 초음파에 의한 완전한 실활을 의미하며 단백질의 변성이 초음파에 의해서 빠른 속도로 일어나고 있음을 시사하였다. 이 결과는 제 1항의 근원섬유에서의 결과와 같았다.

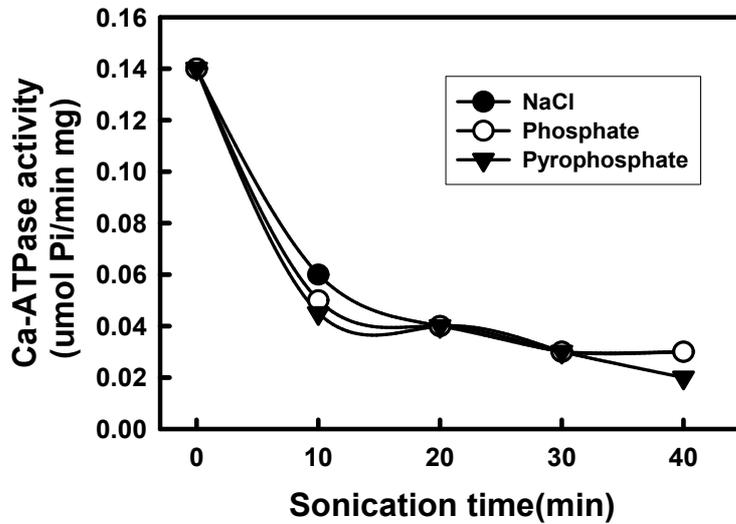


Fig. 42. Changes in Ca-ATPase activity of protein prepared from cardiac muscle of pork by sonication and salts.

이상의 결과를 종합하면 심근 현탁액을 적당량의 주파수(20 kHz)로 초음파 처리하면 근육의 생리적인 염농도(0.2 M NaCl)에 가까운 조건하에서도 단백질이 분리되는데, 이 보다 더 효과적인 것은 식품첨가물로서 많이 활용되고 있는 매우 적은양의 PPI의 효과가 더욱 컸다. 그러나 이때에 단백질의 변성도 동시에 일어났으며, 단백질의 변성과 용해도와는 지금까지 밀접한 비례관계에 있는 것으로 알려져 있는 것과 비교해 볼 때 본 연구에서의 결과는 약간 다른 경로의 메카니즘에 의한 것도 생각할 수 있다. 이에 대한 메카니즘적인 연구는 초음파 처리에 의한 심근의 구조붕괴 속도와 Ca- 및 Mg-ATPase 활성을 통한 심근 단백질의 변성속도 등의 비교를 통하여 밝혀질 수 있을 것으로 사료된다.

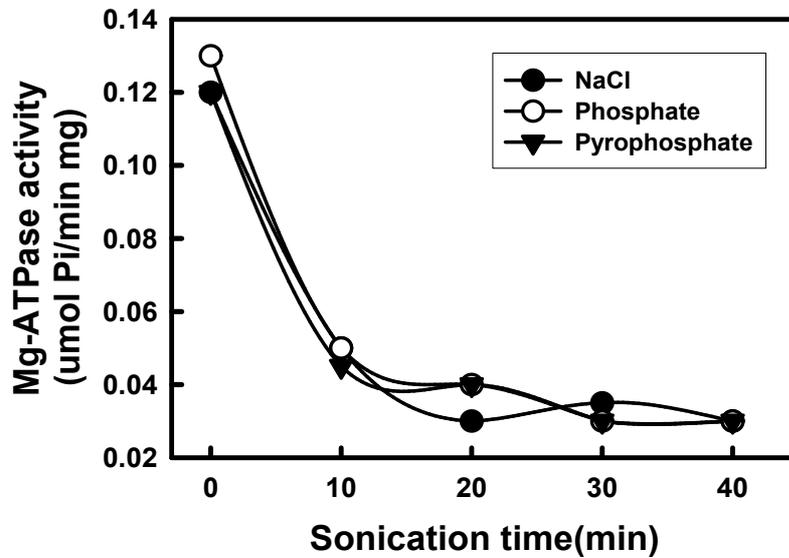


Fig. 43. Changes in Mg-ATPase activity of myofibrils prepared from cardiac muscle of pork during sonication.

마. 초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 유화력

초음파에 의해서 분리된 단백질의 가공적성을 알아보기 위하여 유화력을 측정하여 Fig. 44 에 나타내었다. 여기에서도 대표적으로 염류에 의해서 분리된 단백질의 유화력에 대해서 검토하였다. 염류에 의해서 분리된 성분의 유화력은 용해된 단백질의 양과 비례하는 것으로 나타났다. 즉, P<sub>Pi</sub>에 의해서 분리된 단백질의 유화력이 가장 높게 나타났으며, 다음으로 P<sub>i</sub>, NaCl 의 순으로 높게 나타났다. 즉, 이와 같은 결과는 심근 현탁액에 P<sub>Pi</sub>를 첨가한 후 초음파 처리를 하면 주요 단백질인 myosin 및 Actin에 상당하는 성분이 많이 분리되었으며, 이러한 성분이 유화력을 높이는데 일조하였을 것으로 사료되었다. 또한 미량을 첨가하기는 하였지만 P<sub>Pi</sub>는 각종 식품의 유화제로서 사용되기도 하므로 이러한 것이 유화력에 약간의 영향을 주었을 것으로 사료된다.

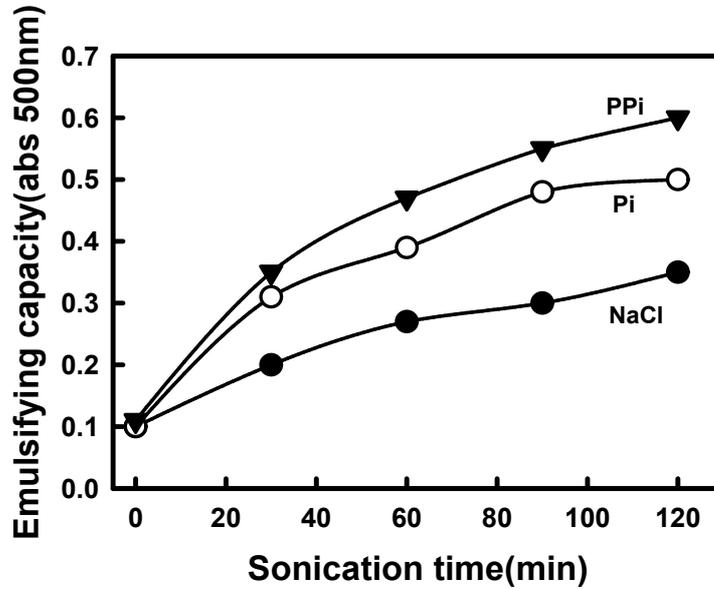


Fig. 44. Changes in emulsifying capacity of protein isolated from cardiac myofibrils by sonication at various salt concentrations.

바. 초음파에 의해서 분리된 가용화 성분의 pepsin 또는 trypsin에 의한 소화

심근중량의 20배량의 증류수(4°C)와 5mM pyrophosphate (PPI)를 첨가하여 현탁시킨 후 20kHz의 60% amplitude의 조건하에서 초음파 처리하여 분리된 단백질과 PPI로만 추출한 단백질을 pepsin 또는 trypsin 처리하였을 때의 소화력을 검토하였다. PPI(PPI 단백질)로 분리한 단백질을 펩신 처리한 것은 반응시간의 경과와 함께 단백질의 소화가 일어났으나, 주요 단백질인 myosin heavy chain(HC)의 감소는 적었으며 actin(A)으로 추정되는 단백질의 감소는 뚜렷하였다. 그 외의 성분은 큰 변화가 없었다. 그러나 PPI 첨가 후 초음파 처리(PPI-초음파 단백질)한 것은 심근의 주요 단백질인 HC가 급격히 감소하였으며, A도 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 이 결과에서 초음파에 의해서 추출된 단백질의 소화성이 우수한 것으로 나타났는데, 이것은 추출과정에서 초음파에 의해서 단백질의 구조에 데미지를 주어 구조적으로 느슨한 상태로 변하여 여기에 소화효소를 첨가하면 보다 쉽게 분해가 일어났기 때문으로 사료되었다. 이 결과는 실질적으로 사람이 섭취하였을 때 초음파로 추출한 단백질이 PPI만으로 추출한 것보다 소화성이 우수하므로 영양학적 손실이 적을 것으로 예상된다. 한편, trypsin 처리를 하였을 때의 결과를 살펴보면 전체적으로는 PPI로 추출한 것보다 PPI-초음파에 의해서 추출한 것이 소화속도가 빠른 것으로 관찰되었다. 이결과는 pepsin 처리한 것과 기본적으로 같았다. 이상의 결과로부터 PPI-초음파 처리에 의해서 추출된 단백질은 추출력이 우수할 뿐만이 아니라 추출과정에서 단백질 구조의 약화로 소화효소에 보다 쉽게 분해가 일어났으며, 섭취 시 영양학적 손실이 적을 것으로 기대되며, 앞으로 저활용 단백질 자원인 돼지심장이 단백질 식품 소재로서 활용성이 클 것으로 사료되었다.

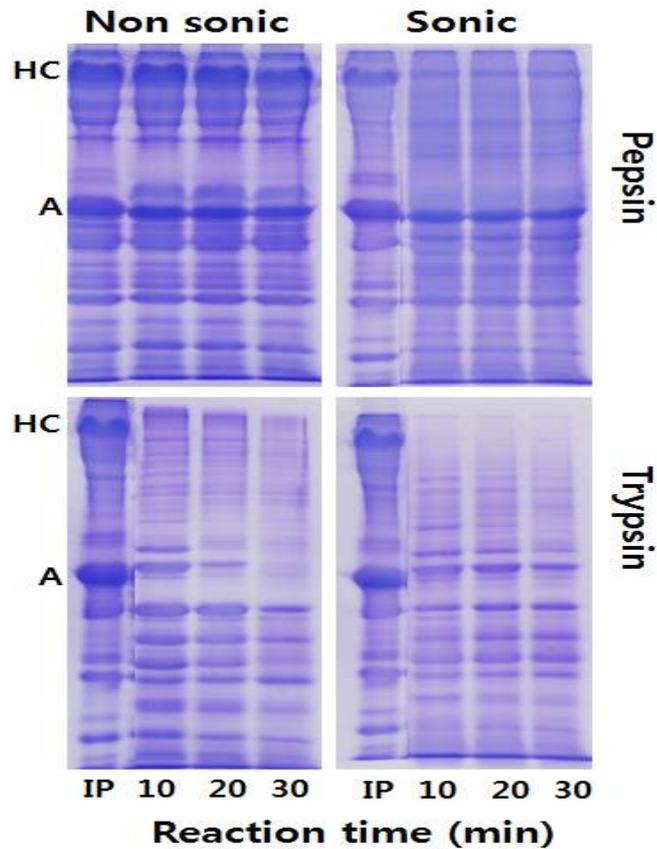


Fig. 45. Fig. 21. SDS-PAGE patterns of protein digested by pepsin or trypsin at 30°C.

The protein was extracted from cardiac muscle of pork with PPI by sonication or not.

IP : extracted protein.

### 사. 초음파에 의해서 추출된 심근 단백질의 2차 수용화능

추출된 단백질 분말에 10~30배의 증류수를 첨가하여 용해시킨 후 원심분리하여 단백질의 2차 용해도를 측정하였다. 30배의 증류수를 첨가하면 약 95%의 용해도를 나타내었지만, 그 이하에서는 급속한 점도의 증가로 측정 불가능하였다. 따라서 단백질 분말과 증류수의 비율이 1 : 30이상에서 수용화능이 우수한 것으로 나타났다(data 생략).

## 3. 초음파로 분리된 단백질의 활용 방안 검토

### 가. 모델 파우더 제조

분리한 단백질을 동결건조하여 분말화 한 것이다. 외관상으로 심근으로부터 흰색의 심근단백질을 분리할 수 있었으며, 백색이므로 식품소재로서 충분히 이용가치가 높을 것으로 기대하고 있다. 이들의 단백질을 90일 동안 실온에서 저장하면서 어떠한 변화가 일어나는지 색차계로 측정하여 결과를 Table 2에 제시하였다. 90일 동안 저장하여도 밝기를 나타내는 L값, 붉은색을 나타내는 a값, 황색을 나타내는 b

값에 있어서 큰 변화는 인정되지 않았다. 따라서 어느 정도 장기 저장을 하여도 단백질의 갈변현상은 일어나지 않았으며 유통 시 큰 문제점은 없을 것으로 사료되었다.

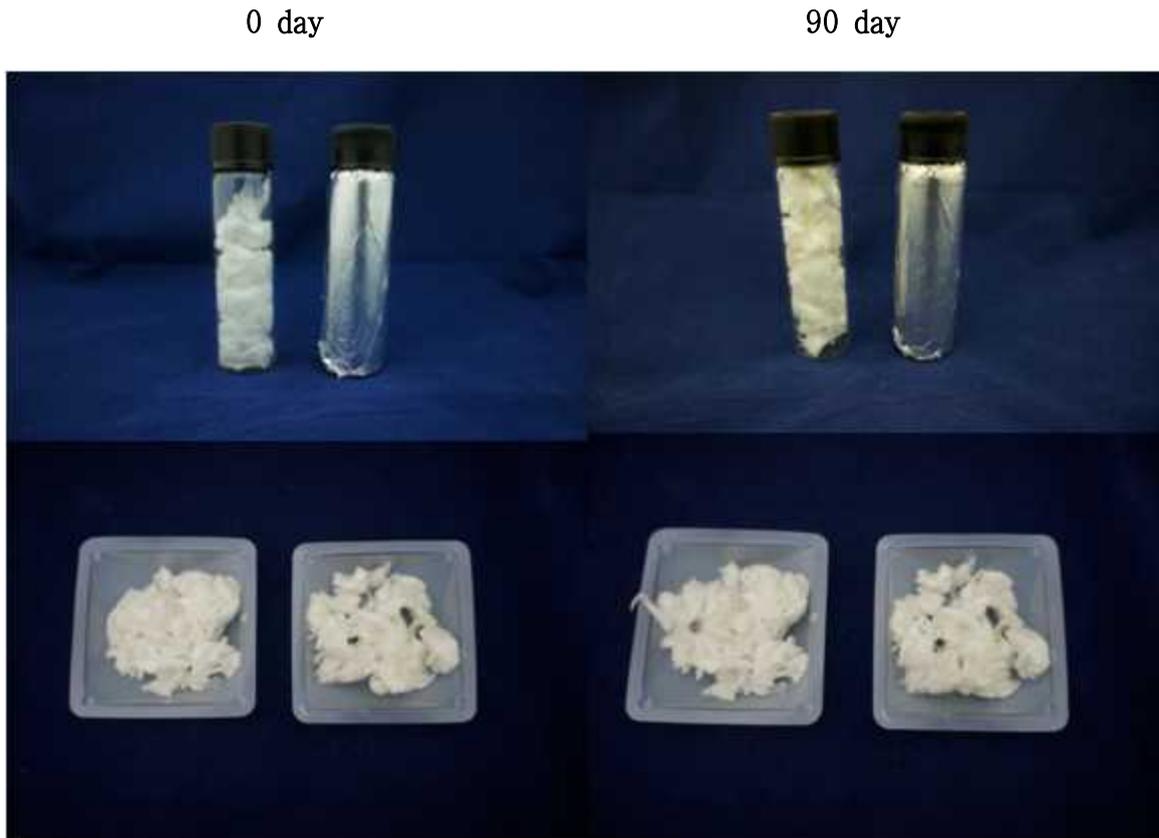


Fig. 46. Powder product of protein extracted from cardiac muscle of pork by sonication.

Table 2. Color properties of protein extracted from cardiac muscle of pork by sonication.

Value	Storage time (days)	
	0 day	90 day
L	123.3	121.8
a	-4.98	-5.11
b	20.13	20.31

#### 나. 모델 캡슐 제조

500mg의 캡슐(젤라틴)에 충전기로 충전한 단백질 캡슐을 Fig. 47에 나타내었다. 보통 사람의 1일 단백질 섭취 권장량은 1.08g / 1kg(체중)이므로 60kg의 체중을 지닌 사람의 경우 약 64g을 필요로 한다. 그러나 다른 식품에서도 단백질을 섭취하므로 과다하게 섭취할 필요는 없으며, 식사 메뉴에 따라서 다르겠지만 1일 수 g 정도 보충제를 섭취하면 충분할 것으로 생각된다. 따라서 캡슐의 경우 5~6개의 캡

술을 섭취하면 단백질의 부족 현상을 개선할 것으로 사료된다. 또한 분리한 단백질 안에는 지방이 없어 순수한 단백질만을 섭취하게 되므로 근육을 키워야 할 운동선수나 운동을 취미생활로 하는 일반인들, 지방섭취를 줄여야 하는 사람 등에게 특히 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.



Fig. 47. Capsule products of protein extracted from cardiac muscle of pork by sonication.

#### 다. 모델 죽 제조

쌀과 분말 단백질을 비율에 따라서 혼합한 후 혼합물에 5배의 물을 첨가하여 30분간 수침하였다. 그런 다음 레토르트 파우치에 충전하여 121°C에서 15분간 레토르트 처리를 하였다. 이렇게 하여 제조한 죽의 외관을 Fig. 48에 제시하였다. 외관상으로는 단백질 첨가량 1%까지는 거의 변화가 인정되지 않았지만 5% 이상에서는 현저하게 갈색으로 변화하였으므로, 죽 제조 시 단백질의 첨가량을 조절할 필요가 있었다. 하지만 한 끼 식사량을 200~300g 이라고 가정했을 때 1% 첨가된 죽을 섭취하면 2~3g의 단백질을 보충할 수 있으며 1% 첨가하여 제조한 죽은 갈변 등의 변화는 거의 인정되지 않았다.

모델 죽의 목적은 일반 건강인 보다는 밥을 정상적으로 섭취 불가능하며 절대적으로 단백질 공급이 필요한 사람들에게 제공하기 위한 것이다. 예를 들어 병상에서 제대로 식사를 못하는 병자, 유아(이유식)나, 노인식 등이 있다. 또한 앞서 제시한 체내 소화효소인 pepsin tripsin에 본 연구에서 개발한 초음파에 의해서 추출한 단백질이 소화력이 우수한 것으로 나타나 소화력이 떨어지는 사람에게도 좋은 단백질 공급 식품이 될 것으로 기대된다.

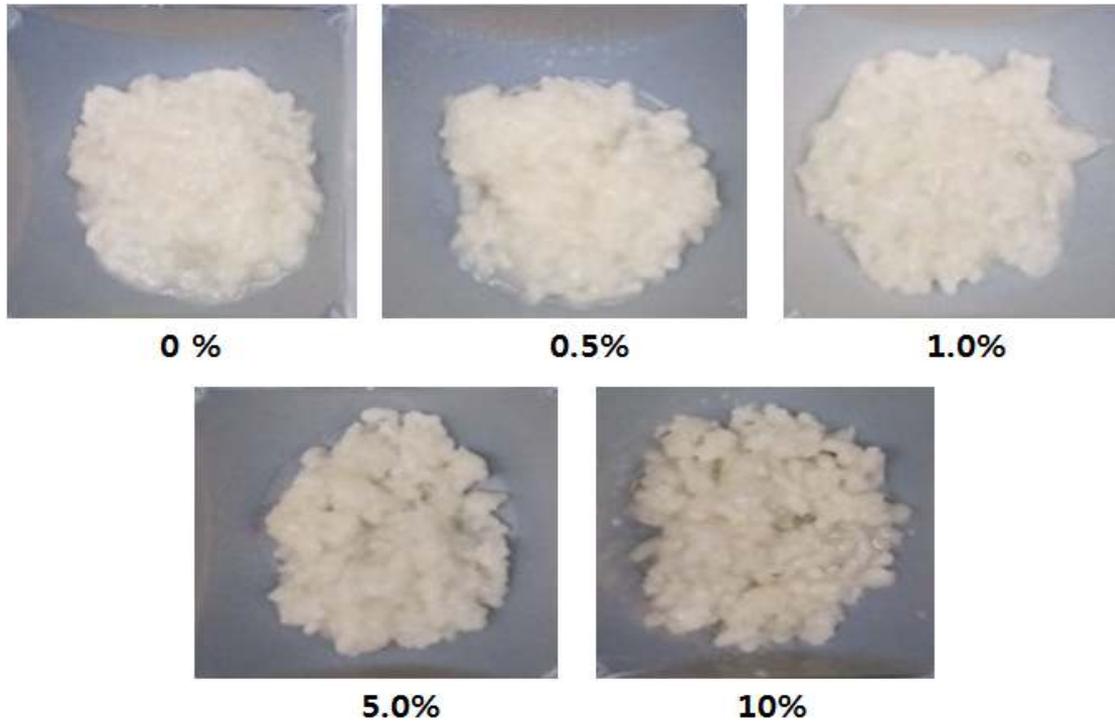


Fig. 48. Rice gruel added extraction protein.

#### 라. 모델 음료 제조

시중에서 유통되고 있는 사과주스와 스포츠 음료와 같은 recipe에 추출 단백질을 0.5 또는 1.0% 첨가하여 제조한 후 비가열 처리 또는 열처리(100℃)를 하여 추출단백질을 첨가하여 음료수 제조가 가능한지를 검토하였다. 열처리를 하는 이유는 음료 제조 시 살균처리가 필수이므로 단백질 첨가 시 첨가된 단백질에 어떠한 변화가 일어나는지를 검토하기 위해서다. Fig. 49에는 상기와 같이 제조한 주스 및 스포츠 음료의 사진을 제시하였다. 우선 사과주스의 변화를 살펴보면 단백질을 첨가함으로써 탁도가 증가하는 것으로 나타났으며 열처리한 것이 탁도가 좀더 증가한 것으로 관찰 되었다. 단백질을 첨가함에 따라서 탁도가 증가하는 것은 극히 당연한 결과로 본 연구에서 개발한 단백질은 고분자의 형태로 추출한 것이므로 일반적으로 시중에 나와 있는 펩타이드 또는 아미노산 음료와는 다른 특성을 지니고 있는 것이 당연하다. 하지만 앞서 제시한 소화효소에 대한 추출단백질의 소화력이 우수하다는 결과가 있으므로 영양손실 면에서는 그다지 크지 않을 것으로 사료되며, 오히려 저분자 펩타이드나 아미노산 보다 경제적인 측면에서 유리할 것으로 사료되었다. 스포츠음료의 경우도 결과는 기본적으로는 같았다. 또한 단백질 첨가에 따른 침전물 생성이 일어나는지를 관찰하였지만 전체적으로 분산되어 있는 형태로 크게 침전은 일어나지 않았다. 침전이 일어나지 않는 이유는 본 연구에서 초음파로 추출한 단백질은 앞서 제시한 바와 같이 수용액에 용해가 잘되며(염용성-수용성으로 변환) 음료용액에도 용해가 잘되었기 때문으로 사료되었다.

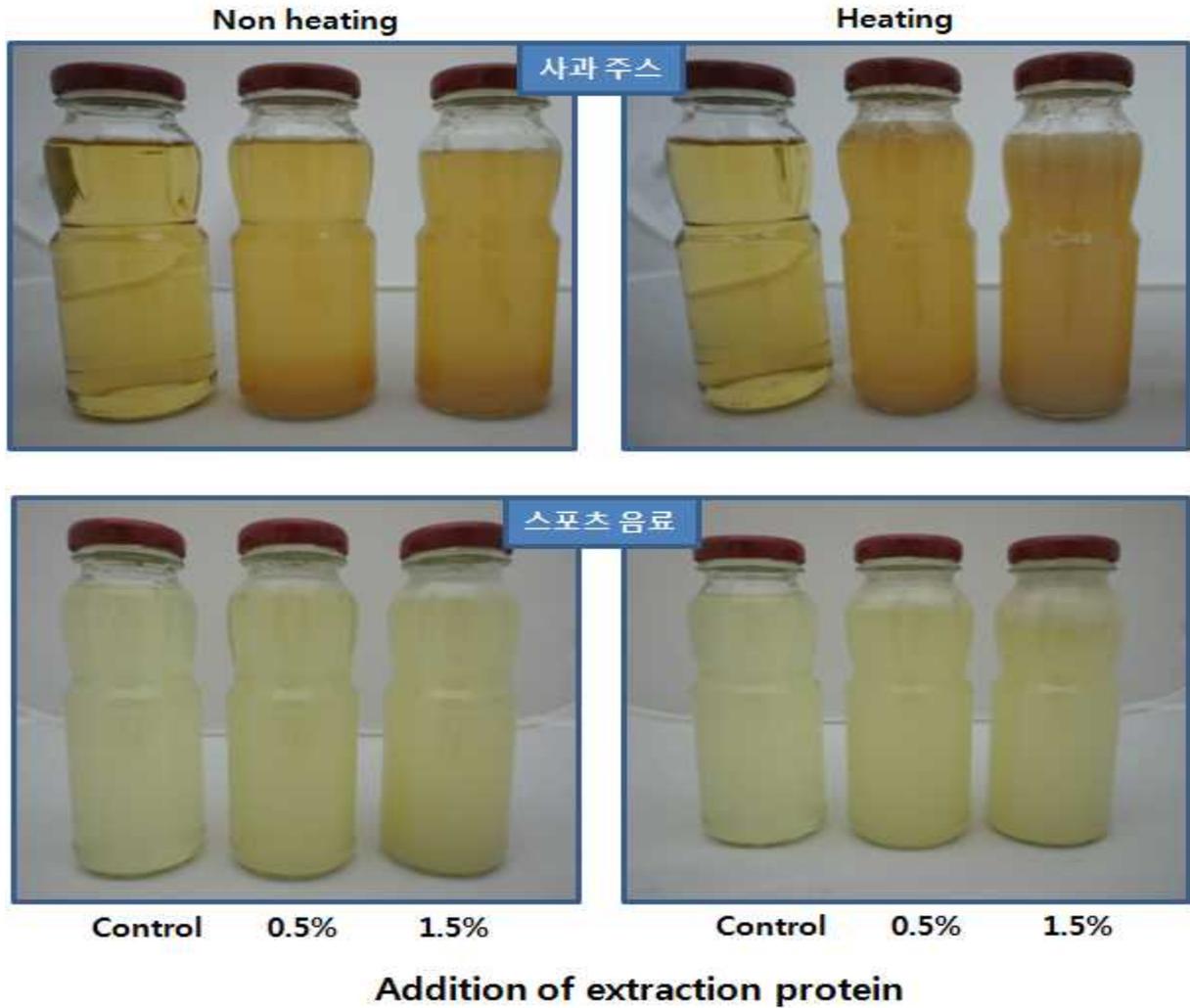


Fig. 49. Juice and sports drink added extraction protein.

#### 마. 모델 비스킷 제품

일반 가정에서 손쉽게 만들 수 있는 비스킷을 모델로하여 제조하였다. 즉, 박력분에 0~5%의 단백질을 첨가하여 잘 섞은 후 15% 설탕과 15%의 포도씨유를 첨가하여 반죽하였다. 30분간 발효시킨 후 성형하여 약불로 20분간 프라이팬에 구워서 제조하였다. 이렇게 제조한 비스킷의 모습을 Fig. 50에 제시하였다. 이 결과에 의하면 외관상으로는 단백질 첨가에 따른 변화는 일어나지 않았다. 또한 파삭거림도 대조구와 거의 동일하였다. 따라서 비스킷의 경우는 다량의 단백질을 첨가하여도 대조구와 거의 같은 품질을 유지하였으며, 비스킷류의 단백질 강화 소재로서의 본 연구에서 개발한 추출단백질은 활용도가 높을 것으로 기대되었다.

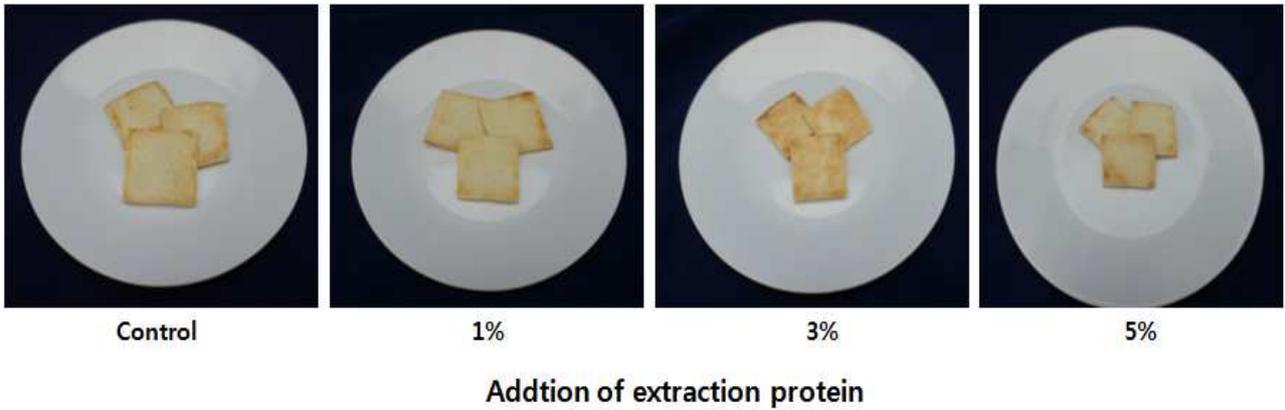


Fig. 50. Biscuits added extraction protein.

#### 바. 모델 젤리 제품

파우더 형태의 수용화 단백질을 첨가하여 모델젤리를 제조하였다. 젤리제조에 사용하는 agar의 함량을 0.25%로 고정하고 여기에 추출단백질을 0~2.0% 첨가하여 모델젤리를 제조하였다. 본 결과에 의하면 추출단백질의 첨가량이 높을수록 젤리형성능이 저하되는 것으로 나타났다. 즉 0.5%를 첨가하면 젤리의 형태는 유지하고 있었으나 대조구와 비교하여 이미 젤리의 모습이 무너지는 경향을 나타내었으며, 0.5% 이상의 추출단백질을 첨가하면 젤리가 형성되지 않았다. 추출단백질 첨가가 젤리형성능을 저해하는 요인으로서 초음파에 의해서 추출된 단백질은 초음파 추출과정에서 단백질의 변성이 일어났기 때문으로 사료되며, 이로 인하여 protein-protein 또는 protein-agar의 상호작용이 일어날 수 없기 때문으로 사료되었다. 뿐만 아니라 추출단백질의 첨가로 인하여 오히려 agar-agar 상호작용을 방해 역할을 하고 있는 것으로 추정되며, 실질적으로 앞서 제시한 추출단백질의 Ca, Mg-ATPase 활성이 초음파처리 초기에 거의 실활되어 있는 것으로 나타났다. 즉, 단백질 고유의 기능을 초음파를 통하여 잃어버린 것으로 판단하고 있다. 따라서 젤리식품과 같은 경우에는 추출단백질과 agar의 적절한 첨가 비율에 대하여 좀 더 자세한 검토가 필요할 것으로 사료된다.

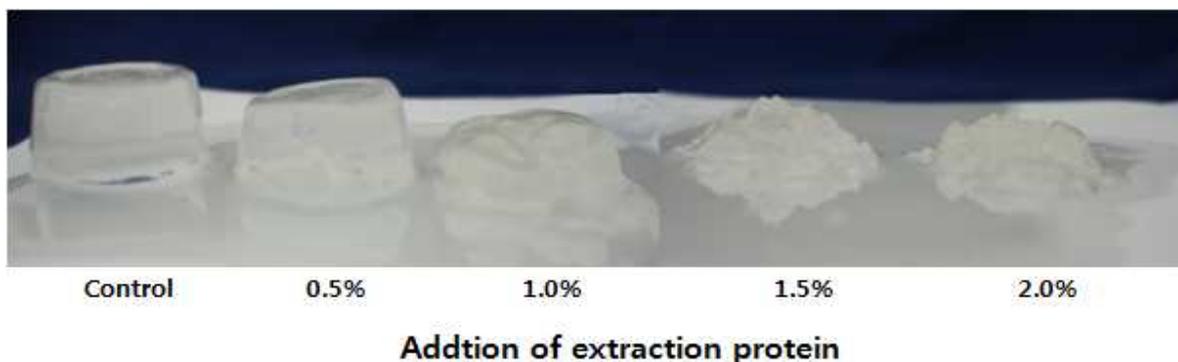


Fig. 51. Jelly added extraction protein.

#### 4. 실험실 규모의 모델 원통수직형 초음파기 제작 및 산업화를 위한 초음파기의 layout 작성

##### 가. 소규모의 순환식 모델 원통수직형 초음파기 제작 (추가)

초음파를 활용함으로써 심근단백질을 효율적으로 분리할 수 있었으며 수율의 증대뿐만이 아니라 추출시간의 단축, NaCl을 사용하지 않더라도 5mM Pyrophosphate만의 첨가로도 충분히 90% 이상의 단백질을 분리할 수 있었다. 따라서 기초적으로는 충분히 심근단백질을 분리할 수 있다는 것이 확인되었으므로, 이들의 산업화를 위해서는 규모 및 연속식의 생산시스템을 개발할 필요성이 있다. 이를 위하여 우선적으로 순환식 원통 수직형 초음파기기의 설계 및 제작을 하였으며 제작된 본기기를 이용하여 산업화에 근접한 환경에서 연구를 수행하였다.

Table 3 및 Fig. 52, 53에는 원통수직형 초음파기기의 사양 및 설계도를 각각 나타내었다. 그리고 본 설계도에 의해서 제작한 초음파기를 Fig. 55에 나타내었다. 본 기기는 초음파 발전부, Chiller, 초음파처리장치, 시료탱크의 5파트로 구성되어 있으며, 그 특성은 다음과 같다. 초음파 발전부는 지금까지의 결과를 토대로 20kHz의 고정형으로 하였으며, 전원은 220V, 60Hz로 하였다. 또한 출력은 초음파의 힘을 조절할 수 있도록 0~1,000W로 하였으며, 여기에 단백질 추출 시 발생하는 열의 효과적인 차단을 위하여 -10~70℃까지 조절할 수 있는 냉각장치를 장착하였다. 본 기기의 가장 특징적인 것은 초음파 발생장치인 원통 수직형 초음파 장치인데, 원통의 길이는 직경 10cm, 길이 30cm로 하였다. 또한 초음파를 일으키는 진동자는 총 8개로 구성되어 있으며, 상호간에 초음파의 영향을 받지 않도록 적당한 간격(5~6cm)을 두었다 (Fig. 22). 유속은 0.1~1L/분의 범위에서 조절할 수 있게 하였다. 시료탱크(10L)도 열에 의한 시료의 손상을 입지 않게 냉각수가 흐를 수 있도록 2중 자켓의 형태로 제조하였다.

Table 3. Specifications of vertical cylinder type ultrasonic equipment

<b>MODEL</b>	<b>MD-1000</b>
<b>주파수</b>	<b>20KHz</b>
<b>전원</b>	<b>220V 60Hz</b>
<b>출력</b>	<b>0~ 1000Watt 설정가능</b>
<b>Display</b>	<b>주파수, 출력 digital 표시</b>
<b>Chiller</b>	<b>영상 0~70 CEL degree</b>
<b>시료 처리량</b>	<b>10 Liter</b>

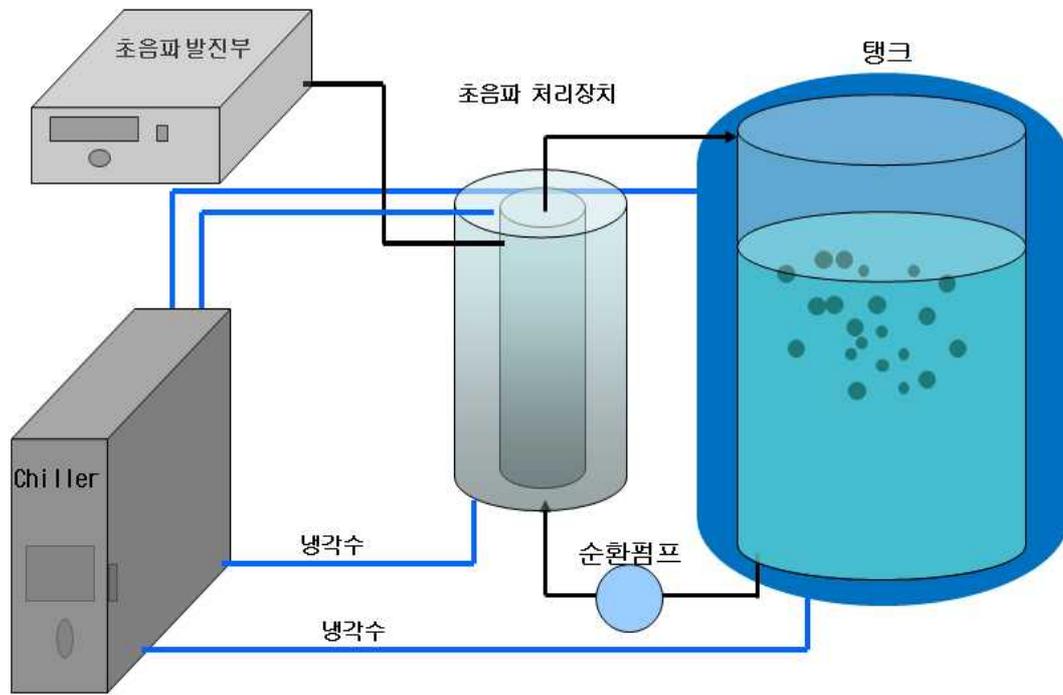


Fig. 52. Blueprint of ultrasonic wave equipment

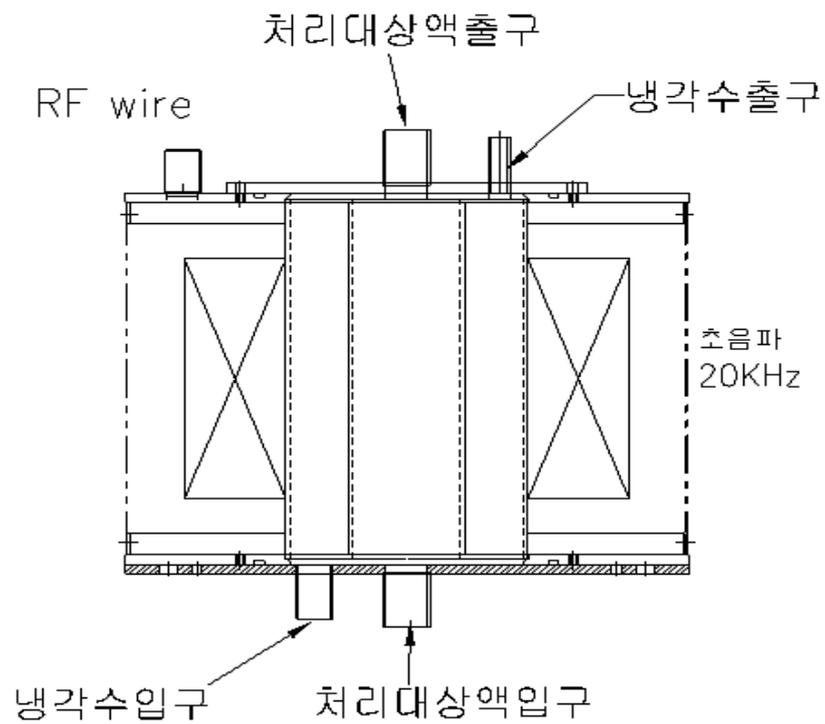


Fig. 53. Blueprint of ultrasonic wave generator



Fig. 54. Inner structure of ultrasonic wave generator



Fig. 55. Picture of ultrasonic wave equipment

Fig. 56에는 제작한 소규모 순환식 원통수직형 초음파기(순환식 초음파기로 명명)를 이용하여 20kHz의 800W에서 심근 현탁액으로부터 단백질을 추출한 결과를 나타내었다. 이결과에 의하면 초음파 처리 90분까지는 급격히 용해도가 증가하였으며 그 후로는 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 한편 분리된 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과 근육을 구성하고 있는 주요 단백질인 MHC 및 A에 상당하는 성분이 초음파 처리시간의 증가와 함께 증가하였으며 기

본적으로는 실험용 배치식 초음파기와 같은 경향을 나타내었다. 그러나 실험용 배치식 보다는 순환식 초음파기가 다소 용해도가 떨어지는 것을 나타내고 있는데 그 차이는 4~5% 정도로 큰 차이는 아니었다. 따라서 순환식 초음파기를 활용하여 심근으로부터 단백질을 추출하더라도 큰 문제점은 없었으며 산업화를 위한 기본적인 요건은 갖추었다고 사료되었다. 이상의 결과로부터 초음파를 활용한 심근 단백질의 추출은 염의 사용량을 최소화할 수 있었으며 기존의 고농도의 염으로 추출한 것보다 보다 효율적이며 친환경적으로 추출 가능한 것으로 사료되었다.

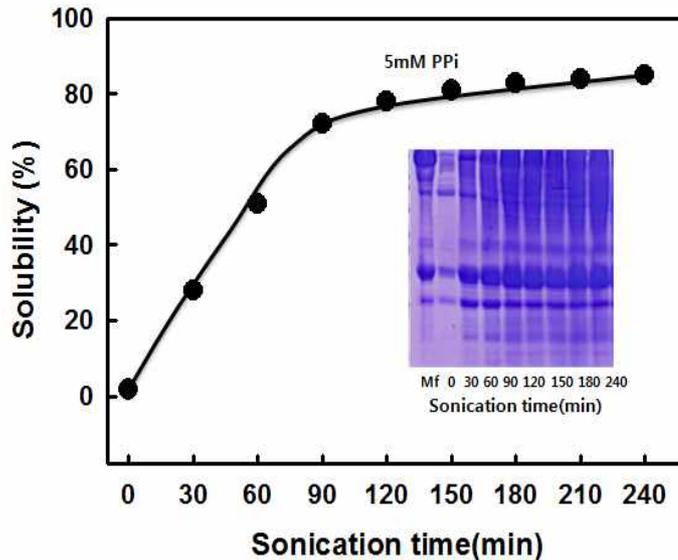


Fig. 56. Solubility of protein prepared from cardiac muscle of pork by pyrophosphate and sonication.

#### 나. 산업화를 위한 초음파의 단백질 생산 시스템 layout 작성

Fig. 57 및 Fig. 58에는 돼지 심근단백질 생산의 산업화를 위한 초음파기기의 layout을 작성하여 제시하였다. Fig. 57은 초음파를 이용한 단백질 분리장치의 모식도이며, Fig. 58은 단백질 분리장치의 분리유닛의 모식도이다. 즉, 이들 도면을 살펴보면 초음파를 이용한 단백질 분리장치(100), (이하 '단백질 분리장치(100)'이라 함)는 심근 현탁액이 수용되는 시료탱크(110), 시료탱크(110)로부터 심장 현탁액을 공급받아 단백질로 분리하며 분리된 단백질을 시료탱크(110)로 다시 공급하는 분리유닛(130), 심장 단백질로 분리하기 위한 초음파를 발생시키도록 분리유닛(130)에 연결되는 초음파 발생 유닛(150), 단백질 분리 시 발생하는 열을 차단할 수 있도록 마련되는 냉각부(170), 시료탱크(110)로부터 분리유닛(130) 측으로 심장현탁액을 공급하는 시료 공급관(180a), 분리유닛(130)에 의해 분리된 단백질을 시료탱크(110) 측으로 다시 공급하는 시료 배출관(180b), 심장 현탁액 및 단백질이 시료 공급관(180a) 및 시료 배출관(180b)을 따라 강제로 순환될 수 있도록 시료 공급관(180a)의 연장 경로 상에 마련

되는 순환펌프(191), 순환펌프(191)의 구동 정도를 조절하는 순환량 조절 컨트롤러(192)로 구성되어 있다.

시료탱크(110)는 분리유닛(130) 측으로 공급되어 단백질로 분리되는 심장 현탁액(시료)이 수용되는 구성으로, 심장 현탁액이 저장되는 저장부(111)와, 저장부(111)의 외부를 완전히 밀폐함으로써 냉각부(170)로부터 공급되는 냉각수가 유입 및 유출될 수 있는 공간을 제공하는 제2 냉각수 유출입부(113)로 되어있다. 저장부(111)는 시료로 사용되는 심장 현탁액이 저장되기 위한 공간을 제공하는 중공 원통 형상으로 구성되어있다. 저장부(111)에는 심장 현탁액 뿐만 아니라 심장 현탁액을 단백질로 분리하는데 필요한 중합인산염(PPi)이 함께 저장된다. 저장부(111)의 하측은 후술하는 시료 공급관(180a)에 의해 분리유닛(130)의 하측(보다 정확하계는 처리부(131)의 하측)으로 연결되어 심근 현탁액이 분리유닛(130) 측으로 공급될 수 있게 되며, 그 상측은 시료 배출관(180b)에 의해 분리유닛(130)의 상측(처리부(131)의 상측)으로 연결되어 분리된 단백질이 다시 저장부(111) 측으로 배출될 수 있게 하였다. 제2 냉각수 유출입부(113)는 제2 냉각수 유입관(175a)을 따라 냉각수가 냉각 본체(171)로부터 유입되거나, 제2 냉각수 유출관(175b)을 따라 냉각수가 냉각 본체(171) 측으로 유출되기 위한 공간을 제공하고 있다. 이를 위해 제2 냉각수 유출입부(113)는 저장부(111)의 외주면으로부터 일정간격 이격되어 저장부(111)의 외부를 완전히 밀폐할 수 있도록 마련하였으며, 바로 이러한 저장부(111) 및 제2 냉각수 유출입부(113) 사이에 마련되는 공간을 통해 냉각수가 유출입할 수 있게 하였다.

한편, 분리유닛(130)은 시료탱크(110)로부터 심근 현탁액을 공급받아 이를 단백질로 분리하며 분리된 단백질을 시료탱크(110) 측으로 다시 공급하는 방식으로 하였다. 분리유닛(130)은 심근 현탁액이 단백질로 분리되는 처리부(131)와, 처리부(131)의 외부를 완전히 밀폐함으로써 냉각부(170)로부터 공급되는 냉각수가 유입 및 유출될 수 있는 공간을 제공하는 제1 냉각수 유출입부(133)를 포함하고 있다. 처리부(131)는 후술하는 초음파 발생 유닛(150)에 연결되어 시료탱크(110)로부터 심근 현탁액을 공급받아 이를 단백질로 분리하거나 분리된 단백질을 다시 시료탱크(110) 측으로 공급하는 중공 원통 형상의 구성으로 되어있다. 처리부(131)의 하측 및 저장부(111)의 하측과, 처리부(131)의 상측 및 저장부(111)의 상측이 각각 시료 공급관(180a) 및 시료 배출관(180b)에 의하여 연결되는 것은 전술한 바와 같다.

또한, 제1 냉각수 유출입부(133)는 제1 냉각수 유입관(173a)을 따라 냉각수가 냉각 본체(171)로부터 유입되거나, 제1 냉각수 유출관(173b)을 따라 냉각수가 냉각 본체(171) 측으로 유출되기 위한 공간을 제공하는 구성으로 되어있다. 이를 위해 제1 냉각수 유출입부(133)는 처리부(131)의 외주면으로부터 일정간격 이격되어 처리부(131)의 외부를 완전히 밀폐할 수 있도록 마련되며, 바로 이러한 처리부(131) 및 제1 냉각수 유출입부(133) 사이에 마련되는

공간을 통해 냉각수가 유출입할 수 있도록 하였다. 초음파 발생 유닛(150)은 심근 현탁액을 단백질로 분리하기 위한 초음파를 발생시키도록 분리유닛(130)에 연결되도록 하였다. 초음파 발생 유닛(150)은 처리부(131)의 외주면에 결합되는 다수의 진동자(151)와, 진동자(151)의 출력 정도를 조절하는 진동조절 컨트롤러(153)로 구성되어 있다. 진동자(151)는 진동조절 컨트롤러(153)의 제어에 따라 일정한 진동을 발생시킴으로서 처리부(131)의 내부로 초음파를 발생시키도록 되어있다. 다수의 진동자(151)는 상호 간에 초음파의 영향(간섭)을 받지 않도록 5 ~ 6cm의 범위에서 서로 이격되어 처리부(131)의 외주면을 따라 부착하였다. 진동자(151)에 의해 발생하는 초음파의 주파수는 20kHz 정도이며, 이는 본 주파수에서 가장 높은 효율로 심근 현탁액으로부터 단백질을 분리시킬 수 있었기 때문이었다.

진동조절 컨트롤러(153)는 진동자(151)의 출력 정도, 즉 진동자(151)에 의해 발생하는 초음파의 주파수를 제어할 수 있도록 하였다. 진동조절 컨트롤러(153) 및 진동자(151)는 RF Wire(Radio Frequency Wire)로 연결되어 진동조절 컨트롤러(153)에 의해 제어되는 신호가 진동자(151)로 제공된다. 진동조절 컨트롤러(153)의 출력은 0.1 ~ 1,000W의 범위에서 조절할 수 있도록 하였다.

냉각부(170)는 단백질 분리 시 발생하는 열을 차단할 수 있도록 제1 냉각수 유출입부(133) 측으로 냉각수를 공급하도록 하였다. 또한, 냉각부(170)는 제2 냉각수 유출입부(113) 측으로도 냉각수를 공급함으로써 단백질 분리 시 발생하는 열을 효율적으로 차단하는 역할을 함께 한다. 냉각부(170)는 냉각수가 유입되거나 유출되는 냉각 본체(171)와, 냉각 본체(171) 및 제1 냉각수 유출입부(133)를 상호 연결하는 제1 냉각수 유입관(173a) 및 제1 냉각수 유출관(173b)과, 냉각 본체(171) 및 제2 냉각수 유출입부(113)를 상호 연결하는 제2 냉각수 유입관(175a) 및 제2 냉각수 유출관(175b)으로 구성하였다. 또한 냉각 본체(171)는 제1 냉각수 유출입부(133) 또는 제2 냉각수 유출입부(113)에 공급되는 냉각수가 저장되도록 하였다. 냉각 본체(171)의 일측에는 제1 냉각수 유출입부(133) 또는 제2 냉각수 유출입부(113)에 공급되는 냉각수의 순환량을 조절하기 위한 컨트롤러(171a)가 마련되며, 단백질 분리 시 발생하는 열을 고려하여 컨트롤러(171a)를 조절함으로써 냉각수의 순환량을 결정할 수 있게 하였다. 제1 냉각수 유입관(173a)은 냉각 본체(171)의 하측 및 제1 냉각수 유출입부(133)의 하측을 상호 연결함으로써 냉각 본체(171)로부터 제1 냉각수 유출입부(133) 측으로 냉각수가 공급될 수 있도록 하였으며, 제1 냉각수 유출관(173b)은 냉각 본체(171)의 상측 및 제1 냉각수 유출입부(133)의 상측을 상호 연결함으로써 제1 냉각수 유출입부(133)로부터 냉각 본체(171) 측으로 냉각수가 유출될 수 있도록 하였다. 즉, 제1 냉각수 유입관(173a) 및 제1 냉각수 유출관(173b)에 의해 냉각수는 냉각 본체(171)와 제1 냉각수 유출입부(133) 사이를 계속 순환할 수 있게 하였으며, 냉각수의 순환에 따라 심근 현탁액으로부터 단백질을 분리하는 경우 처리부

(131)에서 발생하는 열이 효율적으로 차단될 수 있게 하였다. 제2 냉각수 유입관(175a)은 냉각 본체(171)의 하측 및 제2 냉각수 유출입부(113)의 하측을 상호 연결함으로써 냉각 본체(171)로부터 제2 냉각수 유출입부(113) 측으로 냉각수가 공급될 수 있도록 하였으며, 제2 냉각수 유출관(175b)은 냉각 본체(171)의 상측 및 제2 냉각수 유출입부(113)의 상측을 상호 연결함으로써 제2 냉각수 유출입부(113)로부터 냉각 본체(171) 측으로 냉각수가 유출될 수 있도록 하였다. 제2 냉각수 유입관(175a) 및 제2 냉각수 유출관(175b)에 의해 냉각수는 냉각 본체(171)와 제2 냉각수 유출입부(113) 사이를 계속 순환할 수 있게 되며, 냉각수의 순환에 따라 심근 현탁액으로부터 단백질을 분리하는 경우 처리부(131)에서 발생하는 열이 효율적으로 차단될 수 있게 하였다. 또한, 처리부(131)의 외부가 아닌 시료탱크(110) 외부에도 별도의 냉각수를 공급하는 이유는 처리부(131)에서 분리된 단백질이 다시 시료탱크(110)의 저장부(111) 측으로 공급되기 때문이다. 즉, 처리부(131)에 수용된 심근 현탁액이 초음파에 의해 한번에 모두 단백질로 분리되는 것은 아니므로 후술하는 바와 같이 어느 정도의 시간에 걸쳐 심근 현탁액에 초음파를 가하여만 일정한 정도의 단백질을 얻을 수 있기 때문이다. 이러한 시간 동안 심근 현탁액으로부터 지속적으로 단백질이 분리되면서 처리부(131) 및 저장부(111) 사이를 순환하게 되므로, 처리부(131)로부터 저장부(111) 측으로 유입되는 심근 현탁액 및 단백질의 혼합 상태 물질은 어느 정도의 열을 지닌 상태가 되므로 바로 이러한 열을 차단할 필요성이 생기는 것이다. 따라서, 처리부(131)의 외부 및 저장부(111)의 외부에 각각 제1 냉각수 유출입부(133) 및 제2 냉각수 유출입부(113)를 마련함으로써 심근 현탁액으로부터 단백질 분리 시 발생하는 열을 효율적으로 차단할 수 있도록 하였다. 또한, 제1 냉각수 유입관(173a)을 냉각 본체(171)의 하측과 제1 냉각수 유출입부(133)의 하측을 연결하도록 배치하고, 제2 냉각수 유입관(175a)을 냉각 본체(171)의 하측과 제2 냉각수 유출입부(113)의 하측을 연결하도록 배치하는 것도 심근 현탁액으로부터 단백질 분리 시 발생하는 열을 효율적으로 차단하기 위해서이다. 즉, 저장부(111)에 저장된 심근 현탁액(물론 본 단백질 분리장치(100)의 사용에 따라 단백질도 섞여 있게 된다)과 처리부(131)에 공급된 심근 현탁액은 각각 저장부(111) 및 처리부(131)에 완전히 채워지는 것이 아니기 때문에, 냉각 본체(171)에 저장된 차가운 냉각수가 이러한 저장부(111) 및 처리부(131)의 하측으로부터 공급되어 저장부(111) 및 처리부(131)의 열을 식히고 상측으로 유출되도록 함으로써 냉각수에 의한 냉각효율을 향상시킬 수 있도록 하였다.

시료 공급관(180a)은 저장부(111)로부터 처리부(131) 측으로 심근 현탁액이 공급될 수 있도록 마련되는 구성이며, 시료 배출관(180b)은 처리부(131)에 의해 분리된 단백질이 저장부(111) 측으로 배출될 수 있도록 마련하였다. 시료 공급관(180a)의 연장 경로 상에는 순환펌프(191)가 마련되며, 이러한 순환펌프(191)는 순환량 조절 컨트롤러(192)에 의해 그 구동 정도

가 제어되도록 하였다. 순환량 조절 컨트롤러(192)를 조절함으로써 순환펌프(191)의 구동 정도를 조절하게 되며, 순환펌프(191)의 구동 정도에 따라 저장부(111)로부터 일정한 양의 심근 현탁액이 처리부(131) 측으로 공급됨과 동시에 처리부(131)에 저장된 단백질도 저장부(111) 측으로 배출되어 심근 현탁액 및 단백질이 지속적으로 순환될 수 있게 하였다. 순환펌프(191)를 시료 배출관(180b) 측이 아닌 시료 공급관(180a) 측에 마련하는 것은 처리부(131)에 공급된 심근 현탁액은 각각 저장부(111) 및 처리부(131)에 완전히 채워지는 것이 아님을 고려한 것이다. 단백질 분리장치(100)는 기존과 같이 염 용액으로만 단백질을 얻는 것이 아니라 초음파를 함께 사용하여 단백질을 얻게 되므로, 단백질을 분리하는데 사용되는 염(鹽)의 사용량을 줄임으로써 친환경적인 방법으로 단백질을 분리할 수 있도록 하면서도 단백질의 수율을 함께 향상시킬 수 있는 장점이 있다.

Fig. 58은 Fig. 56의 초음파를 이용한 단백질 분리장치를 사용하여 단백질을 분리하는 방법을 나타낸 순서도이다. 이들 도면으로부터 단백질 분리장치(100)를 사용하여 심근 현탁액으로부터 단백질을 분리하기 위해서는 먼저 심근 현탁액 및 낮은 농도의 PPI를 시료탱크에 저장하고(S1 단계), 시료탱크로부터 심근 현탁액 및 PPI를 공급받는 분리유닛과 분리유닛에 연결되어 일정 시간 동안 초음파를 발생시키는 초음파 발생 유닛을 사용하여 심근 현탁액으로부터 단백질을 분리하며(S2 단계), 분리된 단백질과 분리되지 않은 심근 현탁액을 분리유닛으로부터 시료탱크 측으로 다시 전달하고(S3 단계), 일정한 수율에 도달할 때까지 S2 단계 및 S3 단계를 반복하는 과정을 거치게(S4 단계) 하였다.

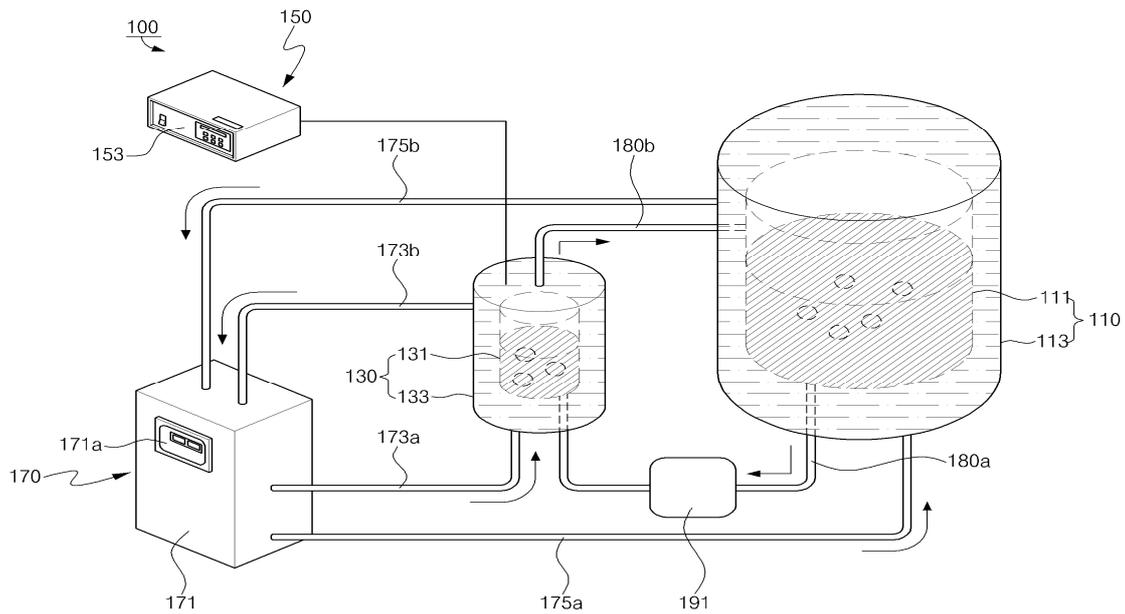


Fig. 56. Drawing of cardiac protein separation device.

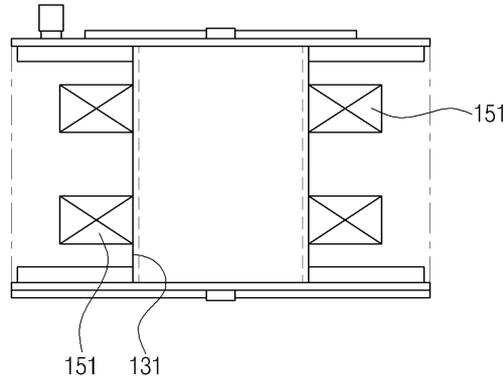


Fig. 57. Drawings of cardiac protein separation unit.

- 100 : Separation device of cardiac protein
- 110 : Material tank
- 111 : Storage unit
- 113 : The second coolant inlet and outlet
- 130 : Separation unit
- 131 : Processing unit
- 133 : The first coolant inlet and outlet
- 150 : Ultrasonic generator
- 151 : Vibrator
- 153 : Vibration controller
- 170 : Cooling section
- 171 : Cooling the body
- 180a : Sample supply line
- 180b : Sample outlet tube
- 191 : Circulation pump
- 192 : Circulation controller

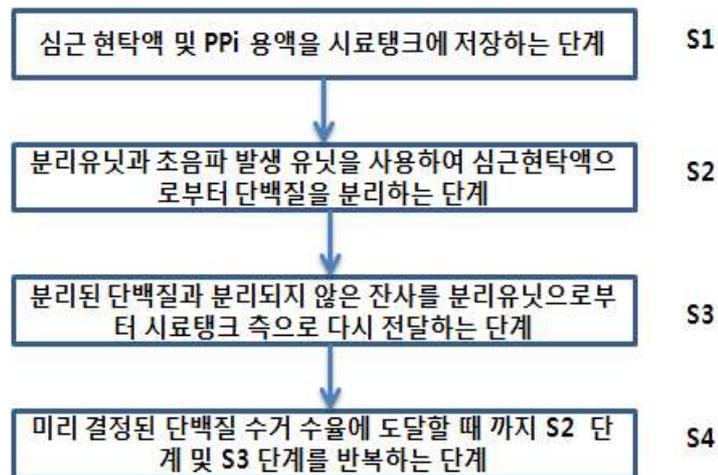


Fig. 58. Flowchart of how to separation of cardiac protein.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	연구목표 및 평가의 착안점	목표달성도	기여도
1차년도 (2009년)	o 초음파에 의한 심근 근원섬유 단백질의 수용화 기술 확립	100	50
	o 심근 근원섬유로부터 수용화 단백질의 생화학적 특성	100	20
	o 심근 근원섬유로부터 수용화 단백질의 가공적성	100	30
2차년도 (2010년)	o 초음파를 이용한 심근으로부터의 단백질의 수용화 기술 확립	100	50
	o 심근으로부터 수용화 단백질의 생화학적 특성	100	20
	o 심근 수용화 단백질의 가공 적성	100	30
3차년도 (2011년)	o 초음파로 분리된 단백질의 활용방안 검토	100	15
	o 모델 순환식 원통수직형 초음파기 제작	100	30
	o 원통수직형 초음파기를 이용한 심근 단백질의 수용화	100	25
	o 산업화를 위한 초음파기의 단백질 생산시스템 layout 작성	100	30
최종평가	o 심근 근원섬유 단백질의 수용화	100	30
	o 심근 단백질의 수용화	100	30
	o 순환식 원통수직형 초음파기의 제작과 심근 단백질의 수용화	100	25
	o 산업화를 위한 생산 시스템의 layout 작성	100	15

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### \* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

실용화 및 산업화는 현재 참여기업을 비롯해 관련 업체와 협의 중에 있으며, 협의 진행상황에 따라서 실용화가 이루어질 것으로 사료된다. 그러나 장치산업의 일종이므로 초기비용이 많이 들며 비용을 줄이기 위한 국내 초음파 제조업체의 협조를 얻어 추진할 예정이다.

### \* 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

본 연구에서 얻어진 결과를 토대로 초음파를 이용한 단백질 추출에 대한 박사학위 논문을 지도하고 있으며 금년 9월에 졸업할 예정이다. 또한 초음파에 대하여 대학원생을 대상으로 세미나를 하였으며(순천대), 국제 심포지움에서 초음파 관련 유사 내용을 발표한 실적이 있다. 앞으로도 이와 관련된 교육·지도·홍보 등에 대해서는 계속적으로 적극 참여할 예정이다.

### \* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

근원섬유단백질의 가용화 방법 및 식품용 단백질의 제조 (10-2011-0009638) 및 심근 단백질의 가용화 방법 및 식품용 단백질의 제조 방법(10-2011-0022934) 등 2건의 특허를 출원하였으며, 앞으로 초음파로 추출한 단백질의 이용방법에 대하여 2건의 특허를 출원할 예정이다. 논문은 특허출원이 완료된 것을 토대로 Sci 논문에 3편을 투고할 예정이며 단백질의 이용방법에 대한 특허 출원이 완료되면 국내 논문에 3편 투고할 예정이다.

### \* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

초음파를 이용하면 환경친화적이며 효율적으로 단백질을 추출할 수 있는 결과가 나왔으므로 다당체 추출에 초음파를 적용하는 연구를 계획하여 2012년부터 수행하기 시작하였으며, 이 뿐만이 아니라 식품 전반에 걸쳐서 활용할 수 있는 방안을 모색 중에 있다.

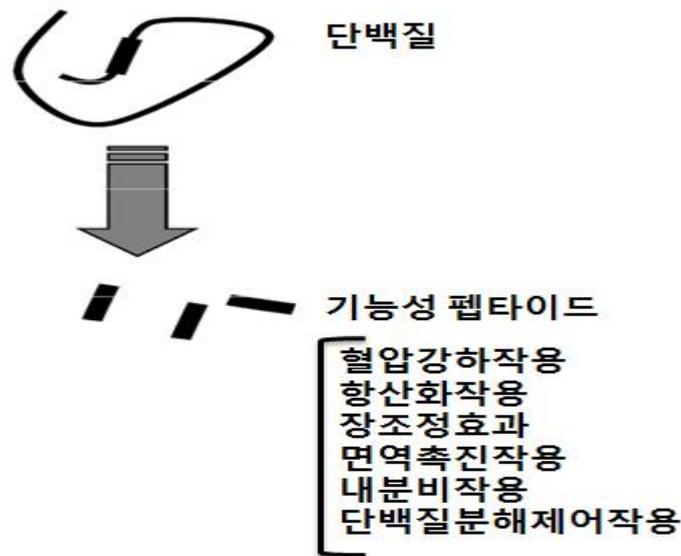
## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

중고년층의 대사증후군은 사회적으로 심각한 문제로 대두되고 있다. 지방이 많은 서양의 식문화가 도입되면서 이 문제는 더욱 심각한 사회적 문제로 사회적 지출 비용도 매년 증가하고 있는 추세이다. 내장 지방형 비만은 3대 생활습관병인 “고지혈증”, “고혈압”, “당뇨병”을 유발하는데 이중 2가지 병을 갖고 있으면 대사증후군이라고 한다. 중고년이 되면 기초대사량이 저하되어 젊었을 때와 비교하여 지방이 쌓이기 쉬우며, 이로 인한 대사증후군이 나타나기 시작하는데 나타나기 전까지는 전혀 고통 등의 자각증세가 없으며, 자각증세가 나타났을 때는 이미 신체에 많은 데미지를 주어 중증의 병으로 발전한 단계가 대부분이다. 대개 대사증후군은 도미노 현상이 일어나는데 처음에는 복부가 조금 나온 정도로 큰 자각증세가 없는 것이 특징이다. 그러나 일단 비만이 오면 급격히 진행되어 당뇨병, 고지혈증, 고혈압 등의 위험인자 도미노 현상이 일어나게 된다. 최초의 도미노는 과식, 과음 등의 생활습관에서 오는 현상을 시작으로 활동이 왕성한 중년층 이상이 되면 스트레스, 수면부족, 운동부족 등이 여기에 추가된다. 체중이 늘어나면 운동을 게을리 하는 악순환이 오게 되는데 운동을 하지 않으면 근육량이 저하되고 칼로리 소비량도 줄어들게 되고 체중은 계속 늘어나게 된다. 비만이 심해지면 혈당을 떨어뜨리는 인슐린의 활동이 저하되어 고혈당 도미노가 오게 되며, 계속해서 고혈압, 고지혈증의 도미노가 오게 되는 것이다. 이것이 심해지면 다음으로 허혈성심질환, 뇌혈관장애, 동맥경화, 신부전, 망막증, 인지증 등이 오게 된다. 이와 같은 것을 예방 또는 치료의 목적으로



단백질 소재를 이용하는 방법이 오래전부터 연구가 진행되어 왔는데 단백질을 가수분해한 펩타이드 및 아미노산이 바로 여기에 해당된다. 펩타이드는 단백질의 일부분(아미노산 2개 이상)이 특이한 아미노산 배열을 갖고 있으면서 특별한 생리기능을 발휘하는 경우가 있다. 이들

펩타이드는 단백질 중에서는 활성을 나타내지 않지만 소화관에서 소화가 되거나 가공(저분자화)을 통하여 처음으로 기능을 발휘한다. 이미 고혈압, 식욕감퇴 등 특성의 질환에 효과가 있는 펩타이드가 발견되었으며 신규의 기능성식품으로서 주목을 받고 있다. 지금까지 주요 기능



[펩타이드의 기능성]

성 펩타이드를 살펴보면 대부분의 펩타이드는 아미노산이 2~10개 정도의 아미노산으로 형성되어 있는 올리고펩타이드였다. 이미 상용화된 펩타이드도 있지만 아직 효과에 대한 증거가 되어 있지 않은 펩타이드도 많다. 표 1에 제시한바와 같이 기능성 펩타이드가 발견할 수 있는 이유 중의 하나는 올리고펩타이드의 여러 입체구조를 얻을 수 있기 때문인 것으로 생각되어진다. 예를들어 테트라펩타이드(4개의 아미노산으로부터 형성된 펩타이드)를 생각하면 기본적으로 20종류의 아미노산이 존재하므로  $20^4$ 의 서로 다른 구조의 펩타이드를 만들 수 있다. 그 결과 길항저해제 및 활성화제로서 효소와 수용체 등에 특이적으로 결합가능한 구조를 갖는 펩타이드를 만들 수 있는 것이 된다. 더욱이 자연계에는 아직 1차 구조가 결정되지 않은 수많은 단백질이 존재하고 있으며, 앞으로 새로운 기능성 펩타이드가 발견될 가능성은 매우 높다. 또한 기능성 펩타이드의 입체구조를 결정할 수 있으면 그 기본 구조를 약제(저분자화합물)의 개발에도 이용가능하다. 현재 가장 많이 연구되고 있는 것은 혈압강하 작용이 있는 기능성 펩타이드이며 혈압상승과 관련있는 angiotensin 변환효소(ACE)를 저해함으로써 혈압을 조절한다. 유제품 및 정어리 단백질 유래의 펩타이드가 고혈압에 적합한 특정보건용식품으로서 상용화되었다. 그 외에도 내분비, 면역 및 신경계의 작용과 항산화작용을 갖고 있는 펩타이드의 존재가 밝혀졌다. 뿐만 아니라 최근에는 근육강화 기능성 식품 및 미용식품에도 응용되기 시작하면서 콜라겐펩타이드의 경우 피부를 보호하는 효능이 있는 것으로 증명되어 미용식품으로도 활용되

고 있다. 또한 급속한 고령화 시대를 맞이하여 누워만 있거나 운동부족에 의한 근위축(Sarcopenia)이 사회적으로 큰 문제가 되고 있는데 이들의 폐용성 위축이 ubiquitinligase(근단백질의 ubiquitin화를 촉매하는 효소)의 활성화에 의한 근단백질 분해의 촉진이 원인인 것으로 밝혀졌다. ubiquitinligase를 결손시킨 마우스는 폐용성근위축이 일어나지 않았으므로 폐용성근위축의 치료는 ubiquitinligase의 활성을 저해시키는 것이 유용할 것으로 사료된다. 그러나 ubiquitinligase의 활성 저해제는 아직까지 보고된 바가 없다. ubiquitinligase는 기질단백질(펩타이드)의 일부분을 인식하여 결합하므로 어떤 특수한 배열을 갖고 있는 펩타이드는 ubiquitinligase와 기질단백질의 결합을 저해할 수 있을 것으로 사료된다. 그 결과 지금까지 대두단백질 유래의 펩타이드 등에 수종의 ubiquitinligase 저해 펩타이드를 발견하였다. ubiquitinligase 저해 펩타이드는 그 저해활성에 특이성이 높으며 부작용이 적은 것으로 추측하고 있다. 또한 지금까지 대두단백질(펩타이드)은 근단백질 대사에 좋은 영향을 주는 식재로서 대두단백질 중의 기능성(항ubiquitinligase)펩타이드가 근단백질 분해 경로를 제어하고 있을 가능성이 있다. 이와같은 기능성 펩타이드의 발견은 제 2세대의 유전자변환 작물의 작성에도 계속 발전하고 있다. 병원체로부터의 저항력을 높이기 위하여 유전자를 조작하는 제 1세대 [대표적인 기능성 펩타이드]

	효과·작용	기능성 펩타이드
정어리 펩타이드	혈압강하 작용 (angiotensin I 변환효소 저해)	정어리 단백질을 부분 소화한 펩타이드 혼합물 Val-Tyr 디펩타이드가 좌기의 작용을 나타냄
글로빈 펩타이드	중성지방 저하 작용	글로빈을 효소분해 Val-Val-Tyr-Pro의 테트라펩타이드
대두유청 및 껍질 단백질로부터의 생리기능성 펩타이드	혈압강하 작용 (angiotensin I 변환효소 저해) 항산화 스트레스 작용	혈압강하 작용 : 대두유청 단백질의 프로테아제S 분해물 Val-Ala-Pro, Val-Lys-Pro, Val-Thr-Pro 항산화스트레스 작용 : 대두유청 단백질의 트립신, 프로테아제N 및 서모라이신 분해물
감자 펩타이드	혈압강화 작용 (angiotensin I 변환효소 저해)	감자 액기스를 alcarase2.4L로 효소분해
유산균발효유 유래의 펩타이드	혈압강화 작용 (angiotensin I 변환효소 저해)	유산균 L. helveticus의 활동으로 우유 중의 카제인으로부터 ACE 저해활성을 갖는 Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro이 생성
대두유래 펩타이드	항ubiquitin화 작용	대두단백질의 $\beta$ -conglycinin을 가수분해한 것

의 변환작물과는 다른 제 2세대에서는 영양성분과 건강기능성성분, 의약품적인 성분을 부여한 유전자변환체를 작성하는 것이다. 즉 기능성펩타이드를 포함한 단백질과 기능성펩타이드 만을 발견하도록 유전자존환 작물의 연구가 활발히 행하여 지고 있다. 인간에게 있어서 관심이 높은 생활습관병에 대하여 효과가 있는 작물을 개발할 수 있다면 유전자전환 작물에서도 소비자에게 받아들여질 가능성이 높다고 사료된다. 그러나, 이와같은 기능성펩타이드를 상품으로서 보급하기 위해서는 실제로 인간이 경구적으로 섭취하였을 때의 효과 작용기작과 안전성을 확인할 필요가 있다. 작용기작에서 우선 극복하지 않으면 안될 것은 펩타이드의 생체내에 있어서 용이한 대사성이다. 펩타이드는 생체내에 풍부하게 존재하는 펩타이드 분해효소에 의해서 의해서 쉽게 아미노산으로 분해시킨다. 따라서 표적장기에 도달할때까지 분해되지 않도록 안전성을 높일 필요가 있다. 또한, 테트라펩타이드 이상의 올리고펩타이드의 수송체(트랜스포터)는 없는 것으로 생각되어지므로 세포내에서 작용하는 펩타이드에 관해서는 세포막의 통과에 관한 메카니즘을 해결할 필요가 있다. 생체내에서의 펩타이드의 안전성과 투과성, 안전성을 높이기 위해서는 항ubiquitin화 펩타이드에 당류 및 지방산 등의 수식에 대하여 연구가 이루어지고 있다. 또한, 목표로 하는 펩타이드의 대량생산 기술의 개발도 중요하며, 발효기술을 이용한 신규기술의 개발이 요구된다.

## 제 7 장   참고문헌

- 1) Acton, J. C., Ziegler, G. R., Carpenter, Z. I., and Dill, C. W. (1983) Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products. *Food Sci. Nutr.* **18**, 99–121.
- 2) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts K., and Watson, J. D. (1983) Cytoskeleton. In : *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing, Inc, New York & London, pp 549.
- 3) 조영준, 이남혁, 양승용, 김영봉, 김영호, 임상동, 전기홍, 김기성 (2007) 초음파처리가 노계가슴육 근원섬유 단백질의 수용화에 미치는 영향. *한국축산학회지*, 27, 457–462.
- 4) Cho, D. H. and Yu, Y. H. (2000) Effect of ultrasonic treatment on the isolation of the Chlamydospore of *Cylindrocarpum destructans* causing root rot of *Panax ginseng*. *J. Ginseng. Res.* **24**, 53–57.
- 5) Chung, K., Kim, W. I., Hong, I. K., and Park, K. A. (2000) Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. *Appl. Chem.* **4**, 149–152.
- 6) Gornall, A.G., Bardawill, C.J., and David., M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751–766.
- 7) Hamm, R. (1986) Functional properties of the myofibrillar system and their measurements. In *Muscle as Food*. Bechtel, P. J. (ed.), Academic Press, New York, pp. 135–199.
- 8) Huxely, H. E. (1963) Electron Microscope Studies on the Structure of Natural and Synthetic Protein Filaments from Striated Muscle. *J Mol. Biol.* **7**, 281–308.
- 9) Kandos, N. and Luche, J. L. (2001) Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydrate Res.* **332**, 115–131.
- 10) Kim, H. S., Kim, C. H., Kwon, M. C., and Song, Y. K. (2006) Anticancer activity of ultrasonicified extracts from seawater-based culture of the microalgae *Spirulina platensis*. *J. Korean. Fish. Soc.* **39**, 318–325.

- 11) Kim, J. H., Kim, D. H., You, J. H., Kim, C. H., Kwon, M. C., and Seong, N. S. (2005) Immuno-regulatory activities of various fractions from *Ehpedrae Sinica* STAPE, *Rubus Coreanus* Miq. and *Angelica gigas* Nakai extracts with ultasonication. *J. Medicinal Crop Sci.* **13**, 161–170.
- 12) Kim, S. M., Park, S. M., Choi, H. M., and Lee, K. T. (1999) Optimal Processing parameters of low molecular weight carrageenan by ultrasound. *J. Korean Fish. Soc.* **32**, 495–500.
- 13) Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 14) Lawrie, R. A. (1985) *Developments Meat Science-3*. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, pp. 25.
- 15) Lee, B. S., Ko, M. S., Kim, H. J., Kwak, I. S., Kim, D. H., and Chung, B. W. (2006) Separation of 6-gingerol from ginger and antioxidative activity. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 484–488.
- 16) McClements, D. (1995) Advantages in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Sci, Technol.* **6**, 293–299.
- 17) Moson, T. and Cordmas, E. (1996) Ultrasound intensification of chemical processing and related operations – a review. *Trans Instit, Chem, Engineers* **74(A)**, 511–516.
- 18) Nowsad, A. A. K. N., Kanoh, S., and Niwa, E. (2000) Thermal gelation characteristics of breast and thigh muscles of spent and broiler and their surimi. *Meat Sci.* **54**, 169–175.
- 19) Richardson, R. I. and Jones, J. M. (1987) The effects of salt concentration and pH upon water-binding, Water-holding and protein extractability of turkey meat. *Int. J. Food Dci. Tech.* **22**, 683–692.
- 20) Shin, H. J. and Lee, D. C. (2003) Study on the process to decrease the molecular

- weight of  $\beta$ -1.6-branched  $\beta$ -1.3-D-glucans. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 352–355.
- 21) Smyth, A. B. and O’Niel, E. (1997) Heat-induced gelation properties of surimi from mechanically separated chicken. *J. Food Sci.* **62**, 326–330.
- 22) Srinivasan, S., Xiong, Y. L., and Decker, E. A. (1996) Inhibition of protein and oxidation in beef heat surimi-like material by antioxidants and combinations of pH, NaCl, and buffer type in the washing media. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 119–125.
- 23) Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams GR, Baldwin KM, Yasui N, Kishi K, Takeda S (2004) Skeletal muscle gene expression in spaceflown rats. *FASEB J* **18** 522–524.
- 24) Bodine SE, Latres E, Baumhueter S, Lal VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Identification of ubiquitin ligase required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704–1708.
- 25) Kawasaki T, Seki E, Osajima K, Yoshida M, Asada K, Matsui T, Osajima Y (2000) Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* **14**, 519–23.
- 26) Kagawa K, Matsutaka H, Fukuhama C, Watanabe Y, Fujino H (1996) Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hypertriglyceridemia and Val-Val-Tyr-Pro, one of its constituents, possesses most superior effect. *Life Sci* **58**, 1745–1755.
- 27) 米倉政実, 市村妙子, 西川実希 (2005) 大豆ホエイおよびオカラたん白質からの生理機能性ペプチドの単離と応用 (第三報) 大豆たん白質研究**8**, 97–102
- 28) 大庭潔, 永草淳, 葛西大介, 高橋是太郎 (2002) 植物性及び動物性ペプチドからのプラステイン作成技術の開発 (第1 報) 十勝圏地域食品加工技術センター平成14 年度事業報告

1-3.

29) 中村康則 (2004) *Lactobacillus helveticus* 発酵乳の血圧降下ペプチドに関する研究  
*Bioscience Microflora* **23**, 131-138.

30) 二川健. 特願2006-185089