

최 종
연구보고서

근형질 칼슘 이온 농도 조절에 의한 식육의 연화 연구

Tenderization of Meat by the Control of Calcium
Ion Concentration in the Sarcoplasm

연구기관
한국식품개발연구원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “근형질 칼슘 이온 농도 조절에 의한 식육의 연화 연구”과제의
최종보고서로 제출합니다.

2001. 11. .

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 성 기 승

연 구 원 : 김 윤 지

연 구 원 : 강 석 남

연 구 원 : 윤 칠 석

연 구 원 : 김 진 만

연 구 원 : 김 인 환

요 약 문

I. 제 목

근형질 칼슘 이온 농도 조절에 의한 식육의 연화 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 우리나라 식육계의 가장 큰 문제 중의 하나가 식육의 연도이다. 칼슘의 주사제의 활용은 가축의 사양시 들어가는 많은 비용들을 절약할 수 있으며, 고급육 개발의 획기적인 계기가 될 것이다. 현재 우리나라의 소비의 불건전성을 막고, 향 후 현장, 산업계, 학계가 유기적으로 고급식육의 생산을 위하여 연계 하여 국민 식생활 개선과 건강증진이 이 연구 과제의 수요한 수행목적이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 값싼 칼슘내포 Liposome의 제조확립

가. 칼슘내포 Liposome의 개발

- 1) Phospholipid의 조성
- 2) Solvent의 종류
- 3) 온도 범위 및 압력 범위
- 4) pH의 조절범위

나. Reverse phase evaporation 방법에 의한 Large unilamellar vesicle(LUV)의 형성시험

다. Egg phospholipid를 이용한 LUV제조법 확립

- 1) Ca 농도의 조절
- 2) LUV의 형성 비율 조사
- 3) Liposome의 harvest법

2. 칼슘의 투여 및 근육이행에 관한 동물시험

가. 실험동물에 대한 칼슘내포 Liposome의 혈관주사(주사량 조절, 쇼크방지)

- 1) 토끼 에 대한 투여 실험
- 2) 칼슘의 농도별 효과
- 3) 칼슘의 투여방법
- 4) 처리별 연화 효과 검증

나. ICE-AES에 의한 사후 근육내 칼슘농도 측정

3. 육질의 연화효과 검증

가. 칼슘투여 유무에 따른 근원섬유 소편화율에 의한 Z-선 구조의 취약화 비교검토

나. SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 비교검토

4. 칼슘투여법에 의해 생산된 가축의 실용성 검토

가. 동물 투여 시 안전성 조사

- 1) 우육의 섭취 기호성 조사
- 2) 화학적 성분의 변화유무
- 3) 경제적 타당성 검토
- 4) Ca투여한 우육의 품질 특성

나. 상품화관련 경제적 타당성 조사

- 1) 제제의 용량
- 2) 실용적 투여법 검토

IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 liposome을 이용하여 Ca^{2+} 이행방법을 연구하며, ICP분석에 의한 근육내 칼슘의 농도 변화 유무를 분석하였고, 근원섬유 소편화율에 의한 Z-선 구조의 취약화 정도, 전기영동(SDS-PAGE)에 의한 근원섬유 단백질인 nebulin, connectin의 단백질 분해정도 및 소실을 등을 분석하였다.

1. Liposome의 조제 및 특성

농도에 따른 liposome 형성 시 칼슘의 captured 정도는 1M일 때 60.28%, 2M일 때 49.29%, 3M일 때 50.02%, 4M일 때 54.37%로 나타났다. 1M 와 2M일 때 liposome의 크기가 균일하고 그 수도 많은데 3M이나 4M의 경우 Ca^{2+} 의 포집효율이 떨어진다. Ca^{2+} 포집효율과 포집량을 볼 때 2M의 calcium in PBS를 이용

하여 liposome을 만드는 것이 알맞다.

2. 투여칼슘의 근육이행 측정

토끼의 실험의 경우 근육의 칼슘농도에 변화는 대조구에 비하여 칼슘내포 Liposome을 혈관 투여하였을 때 농도변화가 큰 것으로 나타났다. 이는 도축 전 칼슘의 혈관투여에 의하여 근육이 함유하는 칼슘량의 절대량이 증가한 것을 나타내며 이에 따라 도축 후 근소포체로부터 근형질에의 칼슘유출이 빠르게 진행되고 식육의 숙성을 촉진할 수 있는 근형질의 칼슘이온 농도 $10^{-4}M$ 에 달하는 시간이 단축될 수 있다는 것을 나타낸다.

면양의 경우 근육의 칼슘농도에 변화는 대조구에 비하여 칼슘내포 Liposome을 혈관 투여하였을 때 농도변화가 큰 것으로 나타났다. 이는 도축 전 칼슘의 혈관투여에 의하여 근육이 함유하는 칼슘량의 절대량이 증가한 것을 나타내며 이에 따라 도축 후 근소포체로부터 근형질에의 칼슘유출이 빠르게 진행되고 식육의 숙성을 촉진할 수 있는 근형질의 칼슘이온 농도 4 ppm에 달하는 시간이 단축될 수 있다는 것을 나타낸다

4. 근원섬유의 소편화를

가. 토끼의 도축 전 Ca^{2+} 함유 Liposome의 혈관 투여가 食肉의 軟化에 미치는 영향

1) 토끼의 경우 도축 전 칼슘의 혈관투여에 의하여 근원섬유의 소편화가 빠르게 진행되는 것을 알 수 있었다. 대조구에 있어 2일, 6일, 10일 경과 시 각각 2.56%, 12.27%, 33.56%로 완만히 상승하는 반면 도축 하루 전에 칼슘내포 liposome을 혈관 투여한 경우에 있어서는 각각 3.10%, 16.18%, 49.60%로 대조구보다 훨씬 빠른 근원섬유의 소편화가 이루어짐을 알 수 있었다.

염소의 경우 소편화율을 측정한 결과 도축 전 칼슘의 혈관투여에 의하여 근원섬유의 소편화가 빠르게 진행되는 것을 알 수 있었다. 대조구에 있어 2일, 6일, 10일 경과 시 각각 10.93%, 20.66%, 28.77%로 완만히

상승하는 반면 처리구는 각각 15.85%, 25.29%, 40.93%로 대조구보다 훨씬 빠른 근원섬유의 소편화가 이루어짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 근소포체로부터 근형질에의 칼슘유출이 빠르게 진행되었고 상승한 근형질의 칼슘이온에 작용으로 Z-line이 약화되어 근원섬유 조제시의 물리적인 충격에 쉽게 절단된 것을 의미한다.

2) SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 비교검토

토끼 실험의 경우 Connectin의 경우 완전분해에 소요되는 기간이 대조구가 2~3일 이상 소요되는 반면 칼슘혈관 투여 시 0~1일 사이에 완전히 분해되었고, Nebulin의 경우에는 대조구가 8일 이상 소요되는 반면 칼슘혈관 투여 시에는 2~3일 사이에 완전분해가 이루어 졌다.

염소의 경우 대조구와 처리구간의 단백질인 Connectin과 nebulin의 분해 pattern에 있어 상당한 차이를 나타내었다. Connectin의 완전분해에 소요되는 기간이 대조구가 8일 이상 소요되는 반면 칼슘혈관 투여 시 3~4일 사이에 완전히 분해되었고, Nebulin의 경우에는 대조구가 3~4일 이상 소요되는 반면 칼슘혈관 투여 시에는 0~1일 사이에 완전분해가 이루어 졌다 Nebulin의 경우 2일경에 소멸이 시작하여 3-4일경에 사라짐을 알 수 있었다. α -connectin의 경우 1일차에 완전히 소멸하였다.

5. 대동물(소)의 적용 시 연구 결과

본 연구는 도축 전 한우에 Ca^{2+} liposome을 주사하였을 때의 식육의 연화에 미치는 영향에 대해 조사하려 하였으며, 더 나아가 Ca^{2+} liposome의 혈관투여가 식육의 물리화학적 특성에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 실시하였다.

- (1) 육색의 비교시 육색의 경우 CIE L*, a*, b*가 대조구와 비슷한 경향을 보였으며, 25ml 칼슘 처리구가 대조구 및 50ml 처리구보다 유의적으로 낮은 육색 L* 값을 나타내었고, 50ml 칼슘처리구가 저장 13, 17일에 가장 높은 적색도a* value값을 나타내었다.

- (2) pH의 비교시 pH의 경우 저장기간에 따라 비슷하게 변화하였으며, 저장기간 별로 25ml 처리구가 저장 3일을 제외하고는 가장 낮은 수치를 나타내었다.
- (3) TBA 및 VBN의 비교시 TBA의 경우 저장기간이 증가할수록 모든 시험구가 증가하였으며, 25ml 칼슘처리구가 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다. VBN의 경우 저장 초기에 대조구가 가장 낮은 VBN가를 나타냈으나, 저장 후반기에는 50ml 칼슘처리구가 가장 높은 VBN수치를 나타내었다. 이는 칼슘처리구가 변성을 촉진한다고 판단된다.
- (4) 전단력의 비교시 전단력의 경우 저장기간이 증가할수록 낮은 전단력가를 보였으며, 처리구가 저장 9, 13, 17일에는 유의적으로 낮은 값을 나타내었다. 칼슘 50ml 처리구의 경우 저장 3일차에 가장 높은 전단력가를 나타내었으나, 5일, 9일, 13일, 17일에 유의적으로 낮은 값을 나타내었다 ($P < 0.0001$).
- (5) 관능검사에 의한 비교시 육의 관능검사의 경우 저장 7일차의 신선육의 경우 유의적인 차이가 없었으며, 조리육의 경우 연도 면에서 50ml 칼슘을 처리군이 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 14일차 신선육의 경우 처리구가 육색이 높은 평가를 받았으며, 풍미 및 다즙성, 연도가 처리구가 대조구보다 점수를 나타내었다. 전체적으로 50ml 처리군이 가장 좋게 평가되었다.
- (6) 소편화도에 의한 비교시 소편화도를 보면 저장 처리군의 α -connectin 및 β -connectin 이 3-4일에 분해 되었으며, Nebulin의 경우 저장 3일차에 소실되었다.

V 연구 개발결과의 활용결과 및 계획

- 가. 식육에 slice 등의 물리적 손상을 가하지 않고 연화시키는 획기적인 방법 개발
- 나. 식육의 숙성실 공간 배제 및 저온유지에 필요한 에너지 절감효과 기대
- 다. 칼슘이온 상승제의 상품화(ampoule 형식의 주사제)
- 라. 국내외 특허에 따른 기술료 창출

여 백

SUMMARY

1. Title

Tenderization of Meat by the Control of Calcium Ion Concentration in the Sarcoplasm

II. Objective and Importance

1. The Objective of Research

When skeletal muscles are utilized for meat, the most important and distinct change observed is tenderization of muscle. This phenomenon can be explained by slow releasing of calcium ions from sarcoplasmic reticulum to sarcoplasm finally reaching 1,000 times as high in slaughtered muscles as in alive ones. Abnormally high concentrations of calcium ions in the sarcoplasm results in weakened myofibrils structure. This study is done to shorten meat tenderization period by artificial treatments applied just before slaughter for the purpose of saving expenditure in producing quality meat.

2. The Importance of Research

Although the quality of animal muscle are poor in flavor, water holding capacity, and tenderness just after slaughter, it is getting improved and finally suitable for meat though aging process. As mentioned earlier, tenderization of meat is caused by high concentrations of calcium ions in the sarcoplasm which, in turn, weakens Z-line, rigid connection of actin-myosin, connectin filament, and nebulin filament. It is generally accepted that aging process at 2~4°C for 5~10 days is essential for meat of high quality. However, it is common in domestic meat industry to deliver slaughtered meat without having enough aging process for the reason of saving money needed for space as well as energy for the process. Therefore, it is necessary to develop the technology which can retrench

expenditure in producing high quality meat by omitting aging process.

III. Contents and Scope of research and development

1. Preparing calcium-in liposome

- 1) A test on formation of large unilamellar visicle(LUV) by reverse phase evaporation.
- 2) A test on entrapping calcium ions in LUV

2. An animal test on calcium intaking and their transferring into muscles

- 1) Intravenous injection of calcium-in liposome to a blood vessel of rabbit considering injection amount and shock prevention.
- 2) Determination in calcium concentrations in muscles by ICP-AES after death.

3. Verification of muscle softening effect

- 1) The effect of presence of calcium on muscle softening(rate of fragmentation in myofibrils)
- 2) SDS-PAGE analysis for degree of myofibrils protein degradation

IV. Result of the research and application suggestion

1. Liposome, which was formed by dissolving phosphatidyl choline(PC) in ether followed by calcium injection, contained 60% of injected calcium and its size ranged 0.25~1.8 μ m that was suitable for passing a capillary
2. When calcium transferring rates into muscle were compared, calcium-in liposome injected group showed more than 17% increases in calcium concentrations in muscles after calcium treatments.
3. The fragmentation rate of myofibrils in control group were relatively slow showing 2.56%, 12.27%, and 33.56% after 2, 6, 10 days of slaughter, respectively. However, the fragmentation rates of myofibrils in calcium-in liposome injected group were much rapid showing 3.10%, 16.18%, and 49.60% at the same period of time.
4. There were significant differences in SDS-PAGE patterns of connectin and nebulin in muscle among two groups. For total degradation of connectin, the control group needed more than 8 days while calcium-in liposome treated groups needed 3~4 days, respectively. In the case of nebulin, control group needed 2days while calcium-in liposome treated groups needed 0~1 days for total hydrolysis.
5. Beef physicochemical, sensory characteristics and tenderization of calcium-in liposome injected beef before slaughter. 25ml calcium-in liposome injected beef were lower lightness values than the other samples during storage significantly($P<0.05$). All kinds of samples were increased during storage in pH, TBA and VBN values significantly. Control were lowest at 3 day but as the values were more quickly increased than calcium-in liposome injected groups. and 50ml treatment groups were highest VBN values at 17 day. In all groups Shear force values were decreased during storage. especially,

calcium-in liposome injected groups were more decreased than the control groups significantly ($P < 0.0001$). After 7 days, in the sensory test of fresh meat, there were no significant difference in color, aroma and acceptability. However, in the sensory test of cooked meat 50ml calcium-in liposome injected groups were showed highest score. After 14 days, all calcium-in liposome injected groups were higher scores than control group in color and acceptability for the fresh meat sensory test and color, aroma, flavor, juiciness, tenderness and acceptability for the cooked meat. The fragmentation rate of myofibrils in control group were relatively slow showing. However, the fragmentation rates of myofibrils in calcium-in liposome injected group were rapid showing at the same period of time. There were significant differences in SDS-PAGE patterns of connectin and nebulin in muscle among two groups. For total degradation of connectin, the control group needed more than 6-7 days while calcium-in liposome treated groups needed 3-4 days, respectively. In the case of nebulin, control group needed 6~7 days while calcium-in liposome treated groups needed 3~4 days for total hydrolysis.

Contents

Chapter 1. Introduction	21
Chapter 2. Present condition of Research	23
1. Background of Meat Tenderization caused by calcium ion	23
Chapter 3. Experimental Contents and Results	26
I. First year	26
1. Experimental Animals and Materials	26
2. Preparation of Calcium Captured Liposome	26
3. Measurement of Calcium entrap in phospholipid Membrane As Affected by Calcium Concentration	28
4. In vivo test on Calcium Injection and Its Translation into muscle	28
5. Measurement of Fragmentation ratio of Myofibrils	29
6. Measurement of Fragmentation Degree of Myofibrils by SDS-PAGE	29
II. Second year	30
1. Experimental animals and materials	30
2. Methods	30
1) Measurement of Meat Color	30
2) Measurement of pH	31
3) Measurement of TBA	31
4) Measurement of VBN	31

5) Measurement of Cooking Loss	32
6) Measurement of Shear Force	32
7) Sensory Evaluation	33
8) Measurement of Fragmentation ratio	33
(1) Preparation of Calcium Captured Liposome	33
(2) Measurement of Fragmentation ratio of myofibrils	34
9) Measurement of Fragmentation Degree of Myofibrils by SDS-PAGE ...	34
10) Statistical Treatment	34
Chapter 3. Result and Discussion	36
I. First year	36
1. Effect of Calcium Captured Liposome Injection on Rabbit Meat Tenderization Before Slaughter	36
1) Preparation of Liposome and Its Characteristics	36
2) Measurement of Translation of Calcium injected into Muscle	39
3) Measurement of Fragmentation ration of myofibrils	41
4) Measurement of Fragmentation degree of Myofibrils by SDS-PAGE ...	45
2. Effect of Calcium Captured Liposome Injection on Goat Meat Tenderization Before Slaughter	48
1) Measurement of Calcium concentration	48
2) Measurement of meat tenderization	49
(1) Measurement of Fragmentation ration of myofibrils	49
(2) Measurement of Fragmentation degree of Myofibrils by SDS-PAGE	49
II. Second year	52
1. Effect of Calcium Captured Liposome Injection on Beef Tenderization Before Slaughter	52
1) Comparison of Meat Color	53
(1) Comparison of CIE L* value	53
(2) Comparison of CIE a* value	55
(3) Comparison of CIE b* value	57
2) Comparison of pH value	60
3) Comparison of TBA	62

4) Comparison of VBN	64
5) Comparison of Cooking loss	66
6) Comparison of Shear Force value	68
7) Sensory Evaluation	70
8) Comparison of Correlation Among Meat Characteristics	76
9) Analysis of Fragmentation ratio	78
10) Measurement of Fragmentation degree of Myofibrils by SDS-PAGE	79
11) Photography of Tissue and Fragmentation	83
III. Result	92
IV. Reference	93

여 백

목 차

제 1 장 서 론	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제1절. 칼슘이온에 의한 식육연화의 이론적 배경	23
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	26
제 1절 . 1차년도	26
1. 실험동물 및 재료	26
2. 칼슘내포 Liposome의 조제	26
3. Calcium 농도에 따른 인지질막 소포내의 칼슘 Entrap측정	28
4. 칼슘의 투여 및 근육이행에 관한 동물시험	28
5. 근원섭유 소편화율 측정	29
6. SDS-PAGE에 의한 근원섭유 단백질의 분해정도 측정	29
제 2절. 2차년도	30
1. 실험동물 및 재료	30
2. 실험 방법	30
1) 육색(Meat Color) 측정	30
2) pH 측정	31
3) 지방 산패도(TBA, Thiobarbituric Acid Reactive Substance) 측정	31
4) 단백질 변패도(VBN, Volatile Basic Nitrogen) 측정	31
5) 가열감량(Cooking Loss) 측정	32
6) 전단력(Shear Force) 측정	32

7) 관능검사	33
8) 소편화율 측정	33
(1) 칼슘내포 liposome의 제조	33
(2) 근원섬유 소편화율 측정	34
9) SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 측정	34
10) 통계처리	34
제 3 장. 결과 및 고찰	36
제 1 절 1 차년도	36
1. 토끼의 도축 전 Ca ²⁺ 함유 Liposome의 혈관 투여가 食肉의 軟化에 미치는 영향	36
1) Liposome의 조제 및 특성	36
2) 투여칼슘의 근육이행 측정	39
3) 근원섬유의 소편화율	41
4) SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 비교검토	45
2. 염소의 도축 전 Ca ²⁺ 함유 Liposome의 혈관 투여가 食肉의 軟化에 미치는 영향	48
1) 칼슘농도변화	48
2) 육질의 연화효과	49
(1) 근원섬유의 소편화율 비교	49
(2) SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 비교검토	49
제 2 절 2차년도	52
1. 한우의 도축 전 Ca ²⁺ 함유 Liposome의 혈관 투여가 食肉의 軟化에 미치는 영향	52
1) 육색의 비교.	53
(1) 백색도 L* value의 비교	53
(2) 적색도 a* value의 비교	55
(3) 황색도 b* value의 비교	57
2) 육의 pH의 비교.	60
3) 육의 지방산패도(TBARS)의 비교.	62
4) 육의 단백질 변패도(VBN)의 비교.	64
5) 육의 가열감량(Cooking loss)의 비교.	66
6) 육의 전단력가(Shear Force)의 비교.	68

7) 한우육의 관능검사	69
(1) 저장 7일차의 신선육 관능검사	69
(2) 저장 7일차의 조리육 관능검사	70
(3) 저장 14일차의 신선육 관능검사	71
(4) 저장 14일차의 조리육 관능검사	72
(5) QDA(정량적 묘사분석)에 의한 관능적 품질특성 분석	74
8) 육의 특성간 상관관계(Correlation: R^2) 비교.	76
9) 소편화율 측정	78
10) SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 비교검토	79
11) 육의 조직 촬영 및 소편화도	83
제 3 절 결론	92
제 4 장 참고 문헌	93

여 백

제 1 장 서 론

도축후의 식육은 사후경직에 의하여 질기고, 보수성 및 풍미가 저하되지만 일정기간의 숙성을 통하여 육질이 연화되며 보수성 및 풍미도 개선된 고품질의 식육으로 변환한다. 식육의 연화는 칼슘이온에 의해 근원섬유 구조가 약화되는 현상으로 숙성기간 중 고농도로 상승한 칼슘이온이 Z-line, actin-myosin간 경직 결합, connectin filament 및 nebulin filament를 약화시키기 때문이다. 고품질의 돈육과 우육생산을 위하여 숙성이 2~4℃에서 이루어질 때 각각 5일과 10일 이상의 기간이 필요한 것으로 알려져 있는데, 현재 우리나라의 경우 도축 후 충분한 숙성기간을 두지 않고 유통되는 경우가 많다. 도축 후의 근형질 칼슘이온 농도를 조속히 상승시켜 숙성기간을 두지 않고도 품질이 좋은 식육을 생산하는 기술은 식육숙성을 위한 공간배제 및 숙성실의 저온유지에 따른 에너지의 절감 효과도 동반되기 때문에 고품질의 식육을 값싸게 소비자에게 공급할 수 있고, 식육의 소비확대 차원에서도 본 연구가 필요하리라 판단된다.

1. 식육소비의 전망

지금의 우리나라 축산업은 생산과 유통을 포함한 모든 면에서 전환기적 시련에 봉착되어 있다. 93년 말 타결된 다자간 무역협상(UR), 주요 교역대상국과의 쌍무협상 등 다방면에 걸친 수입개방압력은 궁극적으로는 전체 농산물에 대한 완전개방화의 압력으로 나타나고 있다. 한편 상품의 수입개방화가 가속화되고 있다. 또한 고단백 동물성 식품인 식육은 필수아미노산이 다른 여타 식품보다 풍부하여 곡물을 주식으로 하는 우리에게 부족하기 쉬운 lysin과 threonine 등의 공급원이 될 수 있다. 또한 식육에 풍부한 비타민 B₁은 당질 지방화의 억제작용으로 비만억제는 물론 에너지화에 기여한다.

따라서 해마다 늘고 있는 수입육에 경쟁력을 갖춘 우리의 기술개발이 절실하며 식육의 소비증진을 위하여 이들 식육의 품질향상이 이루어져야 할 것이다.

2. 기술적 측면

식육의 식미성에 관련한 요소로는 연도, 맛, 다즙성 외관 및 향기 등이 있으나 이중 소비자가 가장 중시하는 것은 연도이다. 식육의 연도는 가축의 품종, 연령, 성별 등 생체시에 갖춰지는 부분과 도축 후 숙성에 의해 획득되는 부분으로 나뉘어진다. 또한 식육의 연도는 근원섬유 구조와 근육 내 결합조직의 성장에

따라 달라지는데, 연하고 맛이 있는 양질의 식육을 얻기 위하여 도축후 일정기간의 숙성을 필요로 하는데 우육의 경우는 10일 이상, 돈육은 5~6일, 계육은 반나절에서 1일 정도 걸리게 된다. 이 숙성기간을 통하여 식육에 있어 유산이 축적되어 pH가 5.5 부근까지 저하되며 ATP의 소실과 함께 근소포체는 생리기능을 상실하여 내부에 축적되어 있던 칼슘이온이 누출되어 근세포내 칼슘이온 농도가 최종적으로 0.2mM에 달하게 되는데 이는 생체의 골격근 이완시의 약 2,000배에 해당된다. 이와 같이 상승한 칼슘이온은 근원섬유의 구조 즉 Z-line, actin-myosin 간의 경직결합, connectin(titin) filament 및 nebulin filament을 취약화하여 근섬유내의 근원섬유의 위치를 고정하고 있는 desmin 분자를 단편화 한다. 이들 변화는 숙성중 상승된 칼슘이온에 의한 것으로 근원섬유구조 변화는 0.1mM의 칼슘이온에 의해 최대로 야기되며 desmin 분자의 단편화는 10mM의 칼슘이온하에서 최대로 야기되는데, 0.1mM의 칼슘이온 처리에서도 43~46 kDa, 42 kDa 및 34~36 kDa의 분자단편이 생성된다.

도축직후 근세포내의 칼슘이온 농도는 0.1 μ M 이하로 근원섬유구조 및 desmin의 단편화에 필요한 농도에 1/1,000에도 못 미치고, 도축 후 근소포체로부터 유리되어 서서히 그 농도가 증가하며 최종적으로 0.2mM 정도까지 상승하게 된다. 따라서 본 연구는 칼슘이온이 도축 후 근세포질에 조속히 유리될 수 있도록 생체 근육 내 칼슘이온 농도를 높이는 방법으로 도축 후 근소포체로부터 칼슘이온이 빠르게 방출시켜 식육의 연화기간을 대폭 단축함을 목표로 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절. 칼슘이온에 의한 식육연화의 이론적 배경

식육의 식미성에 관련한 요소로는 연도, 맛, 다즙성 외관 및 향기 등이 있으나 이중 소비자가 가장 중시하는 것은 연도이다. 식육의 연도는 가축의 품종, 연령, 성별 등 생체시에 갖춰지는 부분과 도축 후 숙성에 의해 획득되는 부분으로 나뉘어진다. 또한 식육의 연도는 근원섬유 구조와 근육 내 결합조직의 성상에 따라 달라지는데, 연하고 맛이 있는 양질의 식육을 얻기 위해서는 도축 후 일정기간의 숙성을 필요로 하는데 우육의 경우는 10일 이상, 돈육은 5~6일, 계육은 반나절에서 1일 정도 걸리게 된다. 이 숙성기간을 통하여 식육에 있어 유산이 축적되어 pH가 5.5 부근까지 저하되며 ATP의 소실과 함께 근소포체는 생리기능을 상실하여 내부에 축적되어 있던 칼슘이온이 누출되어 근세포내 칼슘이온 농도가 최종적으로 0.2mM에 달하게 되는데 이는 생체의 골격근 이완시의 약 2,000배에 해당된다. 칼슘이온 농도의 상승은 근원섬유의 구조 즉 Z-line, actin-myosin 간의 경직결합, connectin(titin) filament 및 nebulin filament을 취약화하며 근섬유 내의 근원섬유의 위치를 고정하고 있는 desmin 분자를 단편화한다.

(1) Z선의 취약화

근원섬유의 구조단위인 sarcomere를 연결하는 Z선의 미세구조는 Z-filament와 무정형 물질로 이루어진다. 종래 무정형 물질로 추측되었던 α -Actinin은, 실제로는 Z-filament를 형성하는 단백질로 판명되었고 Z-filament 간의 공극을 메우고 있는 무정형 물질이 칼슘이온과 작용하여 가용화되는 것으로 판명되었다. 따라서 Z선의 무정형 물질과 칼슘이온과의 결합에 의해 Z선으로부터 무정형 물질의 유리가 Z선 구조의 약화를 초래하는 것으로 생각된다.

(2) 경직결합의 취약화

사후경직시의 근원섬유는 수축하여 있고 ATP가 소실되어 있기 때문에 actin과 myosin간의 경직결합이 형성된다. 그러나 생체의 근원섬유에서 A-band와 I-band의 접속부에 국재하고 있던 paratropomyosin은 식육의 숙성과 함께 국재이동을 하여 경직결합을 취약화하며 sarcomere의 길이를 복원시킨다. Paratropomyosin의 국재이동은 0.1mM의 칼슘이온에 의해 비효소적으로 이루어지며 이는 식육의 연화에 기여하는 것으로 설명된다.

(3) connectin filament의 개열

connectin은 Maruyama에 의해 발견된 탄성 단백질로 근원섬유의 thick filament와 Z선을 연결하는 분자량 2,800 kDa의 거대 단백질이다. 이는 칼슘이온에 의해 분자량 2,100 kDa과 분자량 1,200 kDa의 subfragment로 나뉘어진다. 이는 0.1mM의 칼슘이온에 의해 최대로 야기되며, 이와 같은 탄성 단백질의 개열이 식육의 탄성 저하를 초래하며 결국 식육의 연화에 직결되는 것으로 판단된다.

(4) nebulin filament의 단편화

nebulin은 1977년 Wang과 Williamson에 의해 발견된 근원섬유의 구성 단백질로 분자량 약 700kDa의 거대한 단백질이다. nebulin도 극히 가는 filament상으로 존재하며 근원섬유의 thin filament와 평행하게 결합되어 있는 것으로 보고되어 있다.

단리한 근원섬유를 0.1mM의 염화칼슘에 의해 처리하면 분자량 200, 80, 40, 33 및 23 kDa으로 단편화되어 180 kDa 성분 이외에는 모두 근원섬유로부터 유리된다. 이러한 현상 역시 식육의 숙성 중에 근원섬유의 칼슘이온 농도가 0.2mM로 상승하면 nebuline에 칼슘이온이 다량 결합하여 단편화하는 것으로 생각된다.

(5) 세포골격 단백질 desmin의 단편화

desmin은 1976년 Lazarides와 Hubbard에 의해 발견된 분자량 약 53 kDa의 단백질이다. 이는 중합에 의해 직경 10nm의 중간경 filament 를 형성하며 이웃하는 근원섬유를 서로 연결하여 위치를 고정하는 역할을 한다. desmin은 우육에 있어서 숙성 14일째, 돈육에서는 8일째, 계육에서는 2일째에 도축직후의 70~80%가 감소한다. 이는 desmin 분자가 43~46 kDa, 40 kDa 및 34~36 kDa의 단편을 형성하기 때문이라고 알려졌으며, 실제 0.1mM 칼슘이온 처리시 동일한 결과를 확인할 수 있었다.

2. 식육의 연화를 위한 국내외 관련기술 및 문제점

칼슘이온을 이용한 식육연화의 실용화연구는 국내의 경우 전무하며, 미국에서 일부 연구가 이루어지고 있는 실정이다. Wheeler 등은 도축 후의 우육에 대해 염화칼슘을 주입하여 우육의 품질개선 효과를 최대로 하기 위한 실험을 실시하였다. 우육 중량의 10%(w/w)에 염화칼슘 용액(175 mM)을 도축 30분 후에 injection하면 전단력가가 감소하였으며, 칼슘 미처리구와 비교하였을 때 보다 좋은 육색을 나타내었으며, 세균수에 있어서도 감소하였다. 또한 Benito-Delgado 등은 우육에 염화칼슘의 주입은 연도를 개선하고 숙성기간을 단축하지만 약간의 쓴맛과 염미를 느꼈다고 보고하였다. 이들의 연구는 도축 후의 식육을 대상으로 강제적인 injection에 의하여 칼슘이온을 주입하는 방법으로

과다한 수분과 칼슘이온을 사용하는 점과 고기에 물리적 손상을 초래하는 결점이 있는 것으로 판단된다.

3. 연구의 목표

본 연구는 도축 전에 생체 근육 내의 칼슘이온 농도를 높이는 방법을 추구하기 때문에 육괴를 대상으로 하는 기존의 방법과는 근본적인 차이가 있는 것으로 판단되며 이러한 시도는 세계에서 전무한 실정이다.

지질성분으로 만들어지는 liposome은 vortex mixing 또는 초음파 조사에 의해 비교적 쉽게 만들 수 있다. 그러나 MLV(multilamellar vesicles)은 거대분자 구조를 가지게 되므로 모세혈관(직경 7.5~8.5 μ m의 적혈구가 통과할 정도의 내경을 지님)으로의 출입이 용이하지 않다. 또한 MLV로부터 초음파조사, 계면활성제(cholate, octyl glucoside 등) 및 유기용매 처리로 만들어지는 SUV(small unilamellar vesicles)과 LUV(large unilamellar vesicle)중 SUV는 보통 지름이 25~40nm로 내부용적이 작아 칼슘이온을 내포하기에는 부적당하다. 따라서 지름이 50~500nm인 LUV를 선별적으로 만들어 칼슘을 내포시키는 기술이 필요하다. 카슘내포 LUV는 혈관을 통하여 투여하는데 vesicle내의 칼슘이온은 혈액 내 칼슘농도에 크게 관여하지 않으므로 쇼크 등의 우려는 적을 것이며 근육으로 이행하여 근형질의 칼슘농도 증가에 기여할 것으로 기대된다.

이 연구에서는 여러 농도의 calcium으로 값싼 인지질을 이용하여 liposome을 조제하고 liposome 형성정도와 실험동물의 혈관 내 투여에 대한 안전성을 조사하였다. 이번 실험에서 제조된 liposome은 실제 축산업계에서 바로 이용할 수 있도록 가격경쟁력에 중점을 두었다. 이 실험을 통해 안전성이 확보된다면 가축의 근형질 칼슘이온 농도를 인위적으로 상승시켜 식육의 연화에 필요한 숙성기간을 대폭 단축함과 동시에 숙성육과 동일한 고급식육의 조속한 생산체계 구축이 가능해지므로 식육연화 연구의 획기적 전기를 마련하게 될 것이다.

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

제 1절 . 1차년도

1. 실험동물 및 재료

실험동물은 4kg 정도의 토끼(New Zealand White)를 사용하였으며 대조구, 칼슘구 급여 및 칼슘내포 Liposome의 혈관투여 처리 후, 도축하여 각각의 배최장근(M. longissimus thoracis)을 0.1% Sodium Azide에 적신 gauze로 감싸고 Polyethylene으로 Lapping하여 5℃에 저장하였다. 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 일 간격으로 적당량의 근육을 취하여 근원섬유 조제에 공시하였다. Egg phosphatidylcholine(PC)는 Fluka에서 Ether, CaCl₂, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄는 Sigma에서 구입을 하였다.

2. 칼슘내포 Liposome의 조제

본 실험에서는 Reverse phase evaporation의 방법으로 Liposome을 제조하였다 (Szoka and Papahadjopoulos, 1978). 300mg의 phosphatidyl choline(PC)을 50ml의 Ether에 녹인 다음 여기에 1M, 2M, 3M, 4M의 CaCl₂함유한 PBS용액 5ml을 빠르게 사출하였다(Deamer and Bangham, 1976). 30℃에서 2분간 sonication(Branson 5210)을 실시하고 곧바로 rotary evaporator(Büchi RE121)로 유기용매를 증발시켜 Liposome을 조제하였다. 투석용 필름(Cellu·Sep T2, Part# 8030-32)에 제조된 liposome를 넣고 이를 PBS용액에 넣어 24시간 투석하여 용액에 남아있는 Calcium을 제거한다(Fig. 1.). liposome은 현미경(Olympus Model PM10AK phase-contrast microscope)을 이용하여 관찰하였으며, Olympus Model C-35AD-4를 이용하여 사진을 촬영하였다.

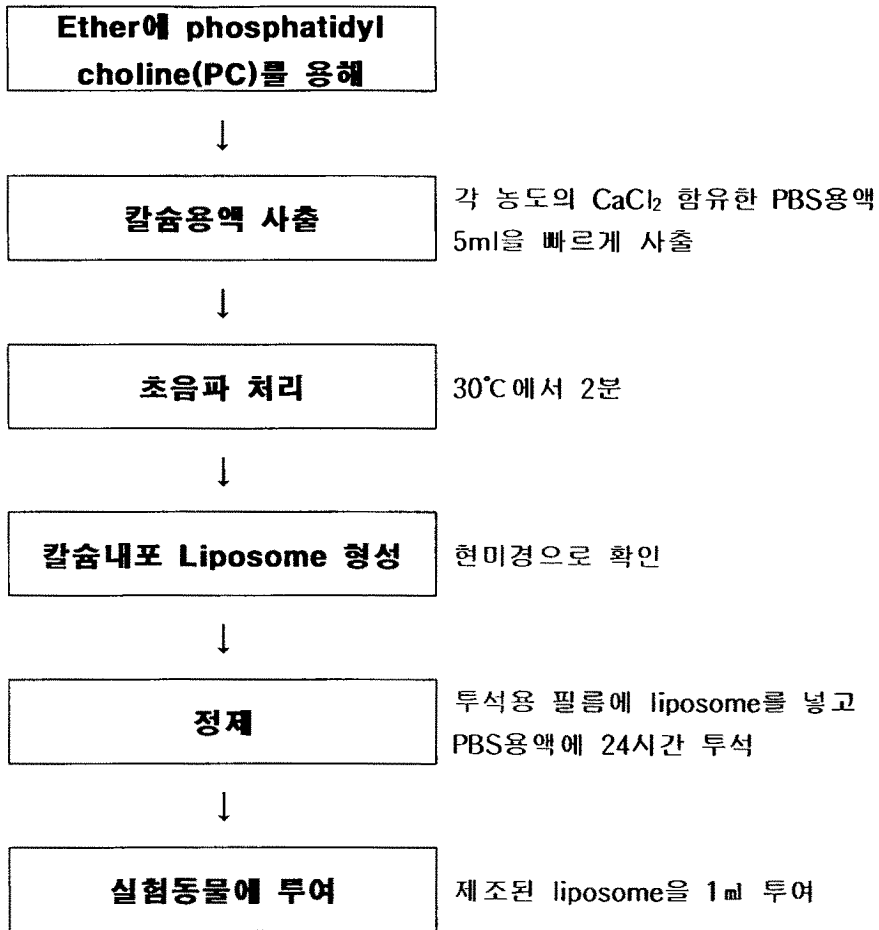


Figure. 1 Preparation of liposome by reverse-phase evaporation and injection to animal

3. Calcium 농도에 따른 인지질막 소포내의 칼슘 Entrap 측정

제조된 liposome 10ml을 투석막에 넣고 1ℓ의 PBS용액에 담가 24시간 투석한다. 이때 liposome에 내포되지 않은 calcium은 PBS용액으로 나오게 된다. 이때 PBS용액의 내포되지 않은 calcium양을 한국식품개발연구원 분석실에 의뢰하여 ICP-AES(JOBIN YVON ICP spectroanalyzer)로 측정한 후 처음 넣은 calcium의 양에서 측정된 calcium의 양을 빼어 내포된 calcium의 양을 계산하였다.

$$\text{liposome 내 칼슘량(\%)} = \frac{\text{칼슘용액의 칼슘량(g)} - \text{투석후 남은 칼슘량(g)}}{\text{칼슘용액의 칼슘량(g)}}$$

4. 칼슘의 투여 및 근육이행에 관한 동물시험

5℃에 저장한 토끼의 배최장근을 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10일 간격으로 적당량을 취하고 근육의 4배량(w/v)의 3차 증류수를 가하고 Blade type homogenizer(Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.)로 5,000rpm, 3분간 균질하였다. 다음에 15,000g, 100분간 원심분리 후(Beckman Avanti J-251) 상정액을 취하여 한국식품개발연구원 분석실에 의뢰하여 ICP-AES로 calcium 농도를 측정하였다.

5. 근원섬유 소편화율 측정

Etlinger 등(1976)의 방법에 따라 근육의 5배량에 PRB(pyrophosphate relaxing buffer)를 가하여 blade type homogenizer(Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.)로 5,000rpm, 1분간 균질하고 1,000g, 10분간 원심 분리(Beckman Avanti J-25I)하는 과정을 4회 반복하여 근원섬유를 조제하였다. 근원섬유의 소편화율은 Takahashi 등(1967)의 방법에 따라 위상차 현미경(Olympus Model PM10AK phase-contrast microscope)과 사진기(Olympus Model C-35AD-4)을 이용하여 관찰하고 근원섬유 500개 이상을 세어 그 중 1~4 근절로 이루어진 소편들이 차지하는 수를 백분율로 구하여 근원섬유의 소편화율로 하였고 근원섬유의 약화정도를 나타내는 지표로 나타내었다.

$$\text{근원섬유 소편화율(\%)} = \frac{\text{근절의 수가 4개 이하인 근원섬유}}{\text{총근원섬유 수}}$$

6. SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 측정

조제한 근원섬유를 5mM EDTA, 5mM Tris/HCl(pH 8.0)용액으로 치환 후 현탁액을 SDS처리(최종농도: 1% SDS, 1% β -Mercaptoethanol, 10% Glycerol)하여 -70℃에서 전기영동에 공시할 때까지 보관하였다. 전기영동용 Gel은 Nishimura 등(1996)의 방법에 따라 2% Polyacrylamide - 0.5% Agarose 복합 Gel을 사용하였고 전기영동용 완충액은 Fairbanks 완충액을 사용하였다.

제 2절. 2차년도

1. 실험동물 및 재료

한우 도체의 구입은 경기도 인근 한우 사육 농가를 찾아 출하 예정인 한우 중 같은 사료와 조건으로 자란 한우 축종으로 샘플처리군을 결정하였다. 한우들은 3그룹으로 대조군은 한 군으로 처리군은 두 개의 군으로 나누었다.

처리군에는 준비해간 버퍼 용액을 주사하였다. 처리군의 버퍼용액은 최종 농도가 25ml, 50ml의 liposomed 칼슘이 포함되어 있으며, 대조군은 칼슘이 포함되지 않는 버퍼만을 동량 혈관 주사하였다. 혈관주사 이후 24시간이 지난 다음날 도축을 실시하였으며, 도축 이후 우육의 등심은 아이스박스에 담아 실험실까지 수송하였다. 식육의 이화학적 시험을 위해 4℃에 적당량의 샘플을 지퍼백에 담아 호기상태에서 저장실험을 하였으며, 관능검사는 저장 7일과 저장 14일째에 실시하였다.

소편화 실험용 샘플은 0.1% sodium Azide에 적신 gauze로 감싸고 Polyethylene film으로 포장하여 4℃에 저장하였다. 저장기간동안 근육을 취하여 실험하였다.

2. 실험 방법

1) 육색(Meat Color) 측정

각 시료를 절단 후 1시간 동안 충분히 발색 반응을 시킨 후 Chroma 미터 (Minolta CR-210, Japan)를 이용하여 CIE system의 L^* , a^* , b^* 값을 측정하였다. 또한 주관적인 육색 평가를 위해서 신선육 상태와 조리육 상태에서의 육색에 대한 관능검사를 수행하였다.

2) pH 측정

분쇄 시료 10g에 증류수 90ml가해 균질화하여 pH 미터(Model 5985-80n Digi-Sense® pH meter, Cole-Parmer Instrument Company, USA)를 이용하여 측정하였다.

3) 지방 산패도(TBA, Thiobarbituric Acid Reactive Substance) 측정

육조직 내 지방 산패정도는 Witte 등(1970)의 방법을 이용하여 TBA extraction method로 측정하였다. 시료 10g을 취하고 extracting solution으로 균질화 한 후 25ml로 whatman No 1 여과지를 이용하여 여과하였다 이를 thiobarbituric acid를 첨가하여 암실에서 15시간 발색시킨다. 발색된 용액을 spectrometer로 530nm에서 흡광도를 측정하여 측정치에 5.2를 곱하여 ppm 단위로 환산하였다.

$$TBA(ppm) = Absorbance \times 5.2$$

4) 단백질 변패도(VBN, Volatile Basic Nitrogen) 측정

단백질 변패정도를 조사하기 위해 VBN은 高判(1975, 1991)의 conway법을 이용하여 측정하였다. 시료 10g을 Veltex beaker에 넣고 증류수 90ml를 가하여 14,000rpm에서 5분간 Homogenizing한 후 Whatman No 1 여과지로 여과시킨 후 여과액 1ml를 취하여 conway unit의 외실 한쪽에 넣고, 한쪽 외실에는 50%K₂CO₃를 1ml 넣고 내실에는 0.01N 붕산 1ml와 지시약을 넣고 재빨리 밀폐시킨 후 용기를 수평으로 회전하여 외실의 시료와 K₂CO₃를 반응하게 한 후 37°C Incubator에서 120분간 활성화시킨 후 붕산용액에 0.02N-H₂SO₄로 신속히 적정한다.

고기시료를 Sg, 공시험 증기정치를 b ml, 본 실험 적정치를 a ml, 0.02N H₂SO₄의

표준화지수를 f라고 할 때, 다음 식에 의해 VBN값을 산출하였다.

$$VBN \text{ mg\%}(mg/100g \text{ sample}) = \frac{(a-b) \times f \times 28}{\text{sample}} \times 100 \times 100$$

a = 본 실험 적정치 ml

b = 공실험구 적정치 ml

$$f = 0.02N-H_2SO_4 \text{ 표준화지수} = \frac{\text{이론치}}{\text{실제치}}$$

28 = 0.02N-H₂SO₄ 1ml소모하는데 필요한 N의 양

즉, $0.02 \times 1.4 \times 1,000$

5) 가열감량(Cooking Loss) 측정

가열 감량(cooking loss)은 시료를 3cm두께로 일정하게 절단하여 무게를 측정하고(A), 지퍼백에 넣은 후 85도의 water bath에서 1시간 가열한 이후에 심부온도가 65도℃에 도달하면 실온에서 30분간 방치한 이후에 표면의 수분을 제거한 이후에 무게를 측정하여(B) 산출하였다.

$$\text{Cooking Loss}(\%) = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

6) 전단력(Shear Force) 측정

전단력(Shear Force)은 생육을 3cm 두께로 잘라 지퍼백에 넣어 85℃ water bath 에서 1시간 가열이후 내부 온도가 65도 이상이 될 때 꺼내어 30분간 방치한 이후 가로×세로가 1㎢가 되는 직육면체로 자른 후 Texture meter(TAX2 Texture Analyser)를 사용하여 option은 rupture를 사용하였으며, pre speed 5.0mm/s, test speed 1.00mm/s, post speed 10.0mm/s, rupture test distance 0.2의 조건으로 측정하였다.

7) 관능검사

척도묘사분석법(Descriptive Analysis with scaling)을 이용하여 실시하였으며, 저장 7일차와 저장 14일차에 15명의 훈련된 관능요원에 의하여 수행하였다. 신선육(fresh meat)은 육색(color), 냄새(aroma), 기호도(acceptability)를 조사하였고, 조리육(cooked meat)은 육색(color), 냄새(aroma), 풍미(flavor), 다즙성(juiciness), 연도(tenderness), 기호성(acceptability)을 각각 조사하였다. 관능검사 점수 배점은 color은 1-3은 좋지 않음, 4-6은 보통, 7-9는 좋음, aroma는 1-3 약함, 4-6은 보통, 7-9는 강함, flavor은 좋지 않음, 4-6은 보통, 7-9는 좋음, tenderness는 1-3 질감, 4-6은 보통, 7-9는 매우 연함, acceptability는 1-3은 좋지 않음, 4-6은 보통, 7-9는 좋음 등으로 표시하게 했다.

8) 소편화율 측정

(1) 칼슘내포 liposome의 제조

한우의 경우 Reverse Phase evaporation 방법으로 liposome을 제조하였으며 (Szoka and Papahadjopoulos, 1979) 300mg의 phosphatidyl choline(PC)을 50ml의 ether에 녹인 다음 2M의 CaCl_2 를 함유한 PBS용액 5mL를 빠르게 사출하였다 (Deamer and Bangham, 1976). 30°C에서 evaporator로 유기용매를 증발시켜 liposome을 제조하였다. 제조된 칼슘함유 liposome은 투석용 필름(Cellu·Sep T2, Part# 8030-32)에 제조된 liposome을 넣고 PBS 용액에 넣어 24시간 투석하여 사용하였다. 투석 후 칼슘 liposome 총량이 25ml와 50ml가 되게 준비하였다.

(2) 근원섬유 소편화율 측정

Etlinger 등(1976)의 방법에 따라 근육의 5배량에 PRB(pyrophosphate relaxing buffer)를 가하여 blade type homogenizer(Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.)로 5,000rpm, 1분간 균질하고 1,000g, 10분간 원심 분리(Beckman Avanti J-25I)하는 과정을 4회 반복하여 근원섬유를 조제하였다. 근원섬유의 소편화율은 Takahashi 등(1967)의 방법에 따라 위상차 현미경(Olympus Model PM10AK phase-contrast microscope)과 사진기(Olympus Model C-35AD-4)을 이용하여 관찰하고 근원섬유 500개 이상을 세어 그 중 1~4 근절로 이루어진 소편이 차지하는 수를 백분율로 구하여 근원섬유의 소편화율로 하였고 근원섬유의 약화 정도를 나타내는 지표로 나타내었다.

$$\text{근원섬유 소편화율(\%)} = \frac{\text{근절의 수가 4개 이하인 근원섬유}}{\text{총근원섬유 수}}$$

9) SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 측정

조제한 근원섬유를 5mM EDTA, 5mM Tris/HCl(pH 8.0)용액으로 치환 후 현탁액을 SDS처리(최종농도: 1% SDS, 1% β -Mercaptoethanol, 10% Glycerol)하여 -70℃에서 전기영동에 공시할 때까지 보관하였다. 전기영동용 Gel은 Nishimura 등(1996)의 방법에 따라 2% Polyacrylamide - 0.5% Agarose 복합 Gel을 사용하였고 전기영동용 완충액은 Fairbanks 완충액을 사용하였다.

10) 통계처리

통계분석은 SAS(2001) program을 통해 분산분석과 Duncan의 Multiple range test로 처리간의 결과의 차이를 분석하였다.

Sensory Test Paper

Name :

belonging :

Date :2001. .

Descriptive analysis with scaling for **Fresh** beef loin

Sample	Color	Aroma	Acceptability
NO. 1			
NO. 2			
NO. 3			

점수 배점은 다음과 같다.

color는 1-3은 좋지 않음, 4-6은 보통, 7-9는 좋음,

aroma는 1-3 약함, 4-6은 보통, 7-9는 강함

acceptability는 1-3은 좋지 않음, 4-6은 보통, 7-9는 좋음.

Descriptive analysis with scaling for **Cooked** beef loin

Sample Name	Color	Aroma	Flavor	Juiciness	Tenderness	Acceptability
No α						
No β						
No γ						

점수 배점은 다음과 같다.

color는 1-3은 좋지 않음, 4-6은 보통, 7-9는 좋음,

aroma는 1-3 약함, 4-6은 보통, 7-9는 강함

flavor는 좋지 않음, 4-6은 보통, 7-9는 좋음,

tenderness는 1-3 질김, 4-6은 보통, 7-9는 연하다.

acceptability는 1-3은 좋지 않음, 4-6은 보통, 7-9는 좋음.

Figure 2. Sensory test paper

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 1 차년도

1. 토끼의 도축 전 Ca^{2+} 함유 Liposome의 혈관 투여가 食肉의 軟化에 미치는 영향

1) Liposome의 조제 및 특성

300mg의 phosphatidyl choline(PC)을 ether에 용해한 후 각 농도별로 칼슘을 넣은 PBS(phosphate-buffered saline)용액을 빠르게 사출하여 Liposome을 조제 하였다. 농도에 따른 liposome 형성 시 칼슘의 captured 정도는 Table. 1에 나타났다.

Table 1. Captured Calcium of liposome preparation by reverse-phase evaporation

	1M	2M	3M	4M
Encapsulated Ca^{2+} (%)	63.81 ± 1.30	61.71 ± 2.06	54.51 ± 0.58	54.33 ± 1.39
Encapsulated Ca^{2+} (mg) / 1ml	25.53 ± 0.52	49.37 ± 1.65	65.42 ± 0.70	86.94 ± 2.22

동물의 혈관을 통하여 liposome을 주사해야 하므로 지름이 50~500nm인 LUV를 선별적으로 만들어 칼슘을 내포시키는 기술이 필요하다(Szoka and Papahadjopoulos, 1978; Kim and Marin, 1981; Kim 등, 1983; Regine 등, 1999; Maureen and Stefan, 1999; Tenzel 등, 1991).

Reverse-phase evaporation의 방법으로 제조된 liposome은 칼슘농도의 차이에

따라 liposome의 형성에 다소 차이를 나타내었는데 그 중 현미경상에서 관찰하였을 때 liposome형성이 양호하였던 사출용액의 칼슘농도는 1M 와 2M로 각각의 칼슘포집 효율은 1M일 때 63.81, 2M일 때 61.71%이었다. 반면에 3M은 54.51%, 4M은 54.33%은 낮은 칼슘 포집 효율을 나타냈다.

Figure 3 은 각 농도에 따른 liposome을 위상차 현미경으로 촬영한 것이다. 이 때 1M 와 2M은 liposome의 크기가 균일하고 그 수도 많은데 크기 면에서 0.25~1.8 μ m로 동물의 모세혈관을 따라 용이하게 이동할 수 있는 크기를 나타내었다. 1M일 때는 가장 높은 비율의 칼슘이 포집되나 그 절대량이 2M에 비하여 너무 적다. 근육주사 시 Calcium의 주입효과를 위해서는 0.1mM이 되어야 한다 (Takahashi 등, 1995). 그러나 liposome안의 칼슘이온이 근육으로 이행되는 데 걸리는 시간을 고려하여 칼슘농도를 0.2mM이 되도록 조절하여 주사하였다. 토끼의 체중을 4kg이라고 볼 때 33mg의 Calcium이 주사되어야 한다. 1ml의 liposome을 주사기로 투여한다고 볼 때 1M의 경우 25.53g의 calcium만 근육 속으로 들어가게 된다. 그러므로 1M의 calcium liposome으로는 연화효과를 보기가 어렵다. 3M이나 4M의 경우 PBS용액의 calcium 농도가 높아 PBS중에 calcium의 침전이 발생하거나 liposome 제조 시 간혹 결정화가 생기기도 하여 liposome제조에 있어서 칼슘이온의 포집효율을 감소시킨다. Fig. 2에서 보이듯이 3M와 4M로 제조한 liposome의 크기는 균일하지 않으며 그 수도 적다. 그 이유는 칼슘이온이 음전하의 인지질과 상호작용하여 liposome 이중막 구조를 “trans complex”로 전환시켜주는데, 이 trans complex로 인하여 liposome들이 서로 융합하면서 이 융합에 의해 liposome 막이 파괴되는 것으로 보고 있다(Vail and Stollery, 1979). 이는 칼슘이온이 liposome 제조 시 방해물질로 작용하는 것으로 볼 수 있다 (Chanturiya 등, 2000; Rao 등, 1984; Papahadjopoulos 등, 1975; Juliano 등, 1983). liposome의 크기가 고르고 칼슘이온을 포집하는 양과 효율이 높은 2M의 calcium in PBS를 이용하여 liposome을 만드는 것이 알맞다.

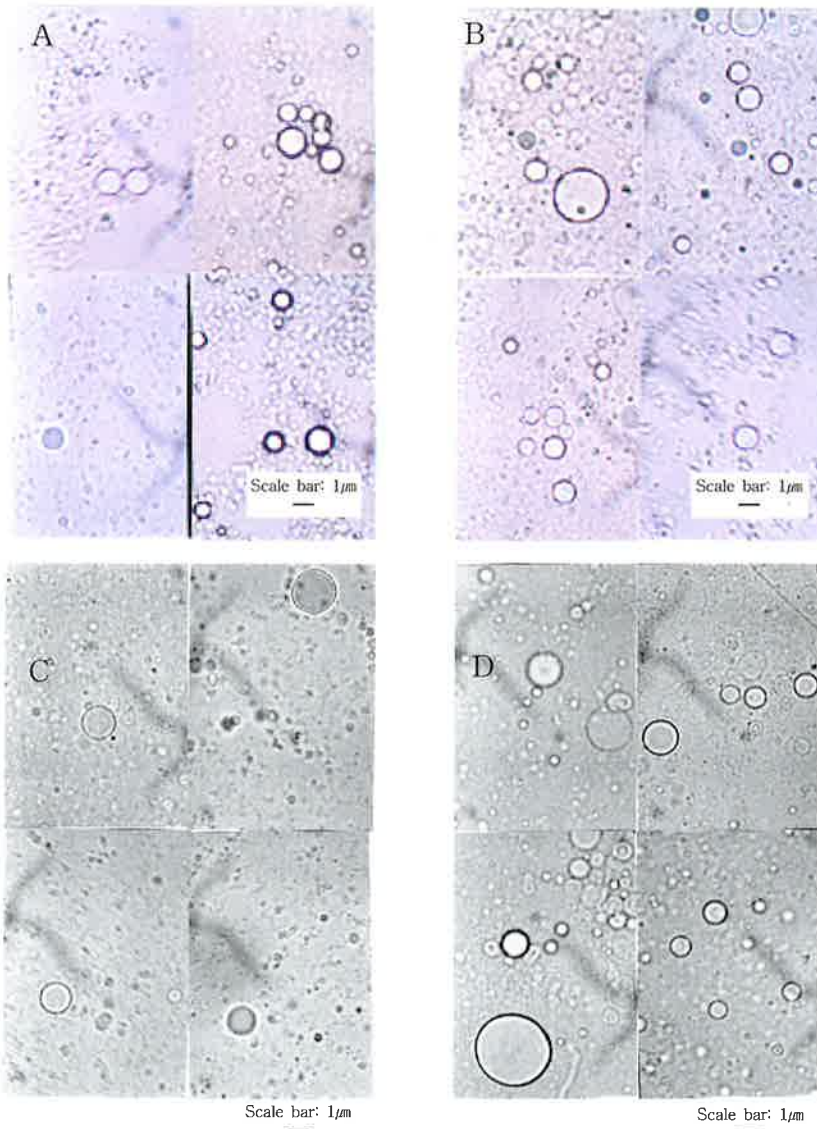


Figure 3. Micrographs of phosphatidyl choline liposomes injected by each mole of Ca^{2+} (A: 1M, B: 2M, C: 3M, D: 4M).

2) 투여칼슘의 근육이행 측정

칼슘이온의 근육이행에 관한 비교는 대조구와 칼슘내포 Liposome을 도축 하루 전에 정맥을 통하여 투여한 처리구간에 비교하였다(Figure 3). 도축 직후에는 근육 중에 ATP가 존재하기 때문에 근소포체의 calcium pump protein이 ATP를 Energy로 이용하여 칼슘이온을 근소포체 내부로 흡수하기 때문에 칼슘농도의 측정이 용이하지 않아 추정치인 0ppm($10^{-7}M$ 이하)으로 나타내었고 이후의 농도는 ICP-AES으로 측정한 수치이다. 그 결과 평균 칼슘농도가 대조구는 4.38ppm, liposome 혈관 투여구는 5.67ppm으로 근육의 칼슘농도에 변화는 대조구에 비하여 칼슘내포 Liposome을 혈관 투여하였을 때 농도변화가 큰 것으로 나타났다. 이는 도축 전 칼슘의 혈관투여에 의하여 근육이 함유하는 칼슘량의 절대량이 증가한 것을 나타내며 대조구보다 약 29%증가했다. 이에 따라 도축 후 근소포체로부터 근형질로 칼슘유출이 빠르게 진행되고 식육의 숙성을 촉진할 수 있는 근형질의 칼슘이온 농도 0.1mM에 달하는 시간이 단축될 수 있다는 것을 나타낸다. Cottin 등(1991)은 도축 후 $CaCl_2$ 로 처리를 하면 숙성기간을 줄일 수 있다고 하였다. Koohmaraie 등(1988)은 전기자극만 가한 lamb meat의 칼슘이온농도가 1g 당 $57\mu g$ 이었으나 전기자극 후에 생시체중의 10%에 해당하는 0.3M의 $CaCl_2$ 를 주입하였을 때는 1g 당 $1577\mu g$ 으로 약 28배 상승한다고 하였다.

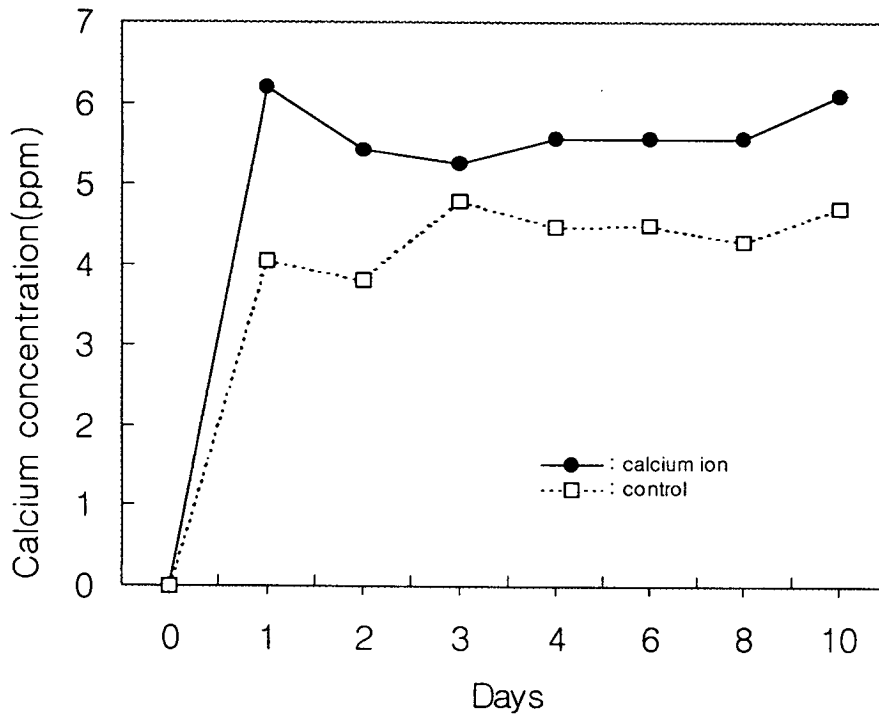


Figure 4. Calcium concentration of muscle during post-mortem aging by ICP-AES(n=3).

3) 근원섬유의 소편화율

근원섬유의 소편화율은 근원섬유 구조인 Z-line의 약화정도를 나타내는 것으로 Figure 5는 숙성기간동안 근원섬유의 소편화를 위상차 현미경으로 관찰한 사진이다. 도축직후의 실험동물에서 적출한 배최장근을 0.1% NaN_3 에 적신 거즈로 두르고 5°C에 보관하면서 시간경과에 따른 근원섬유를 조제하여 소편화율을 측정 한 결과 도축 전 칼슘의 혈관투여에 의하여 근원섬유의 소편화가 빠르게 진행되는 것을 알 수 있었다. Figure 4는 같은 기간동안 숙성한 육이지만 근원섬유지만 칼슘혈관 투여구의 근원섬유의 소편화율이 대조구에 비해 높은 것을 확인할 수 있다.

이러한 결과는 근소포체로부터 근형질의 칼슘유출이 빠르게 진행되었고 상승한 근형질의 칼슘이온에 작용으로 Z-line이 약화되어 근원섬유 조제시의 물리적인 충격에 쉽게 절단된 것을 의미한다.

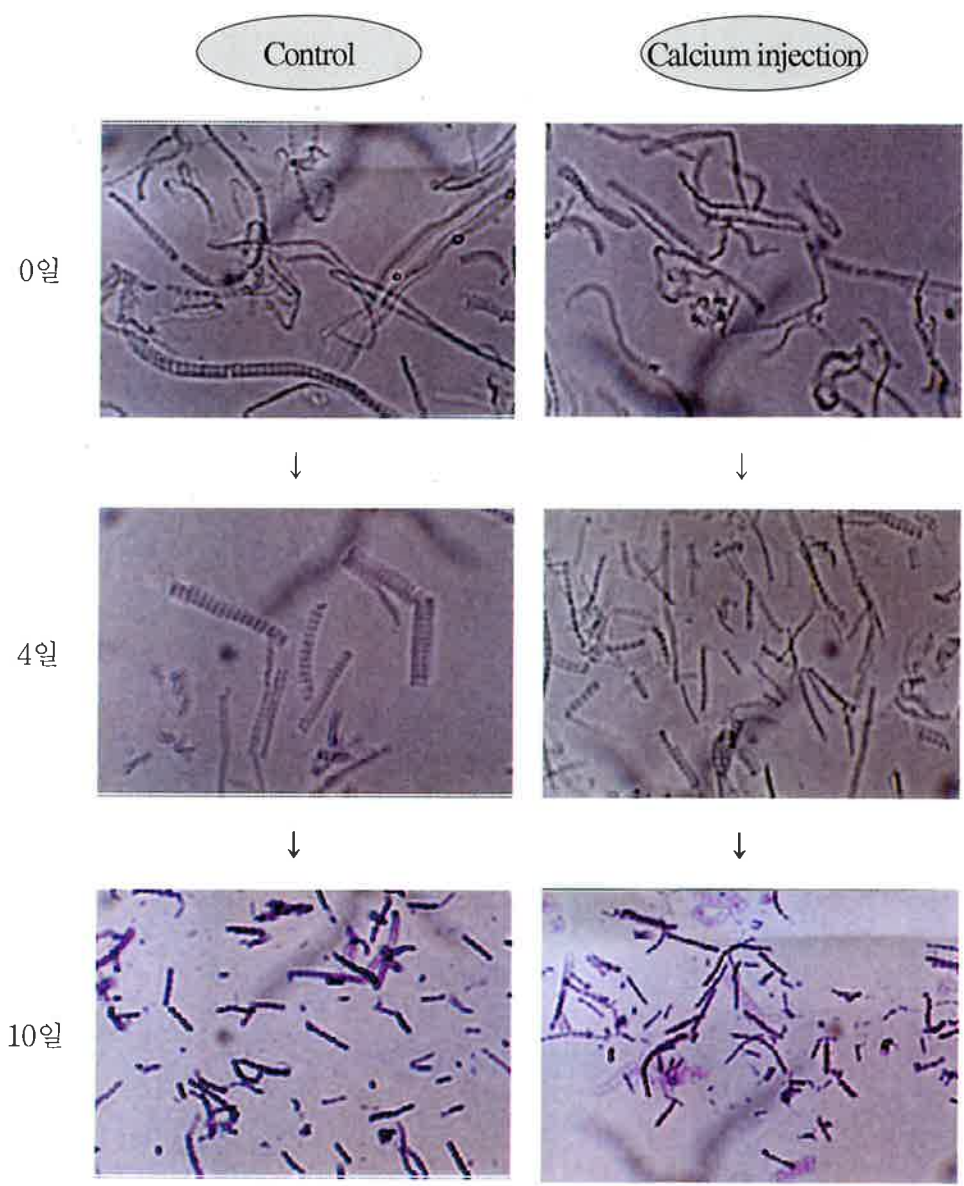


Figure 5. Micrographs displaying the fragmentation of myofibrils during post-mortem aging

Figure 6는 근원섭유의 소편화율을 그래프로 나타낸 것이다. 대조구에 있어 2일, 6일, 10일 경과 시 각각 2.56%, 12.27%, 33.56%로 완만히 상승하는 반면 도축 하루 전에 칼슘내포 liposome을 혈관 투여한 경우에 있어서는 각각 3.10%, 16.18%, 49.60%로 대조구보다 21%~48%의 훨씬 빠른 근원섭유의 소편화가 이루어짐을 알 수 있었다.

Koohmaraie 등(1988)은 lamb meat의 실험에서 대조구에 비해 약 28배 칼슘이온 농도가 상승하였을 때 숙성 1일에서 shear force가 $6.32 \pm 0.27\text{kg}$ 에서 $3.56 \pm 0.16\text{kg}$ 으로, 숙성 6일에서는 $3.60 \pm 0.31\text{kg}$ 에서 $2.77 \pm 0.29\text{kg}$ 으로 줄어들었다. Pérez 등(1998)도 CaCl_2 를 처리하였을 때 관능검사에서 beef의 경우 연도가 7.304에서 4.176으로 떨어졌고, rabbit meat의 경우 6.376에서 5.108로 줄어들었다고 하였다.

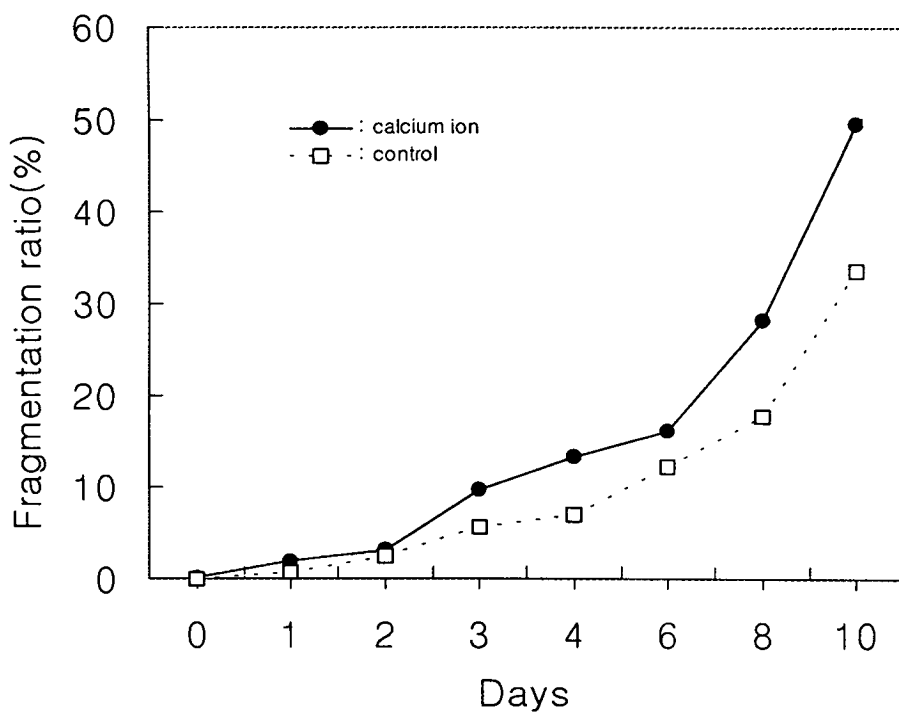


Figure 6. Fragmentation ratio(<4 myofibrils/total myofibrils) of myofibrils during post-mortem aging(n=3).

4) SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 비교검토

대조구, 칼슘혈관투여 처리한 실험동물의 배최장근으로부터 시간경과에 따라 각각 조제한 근원섬유를 SDS-PAGE에 공시한 결과, 고기의 연도에 밀접하게 관련 하는 구조단백질인 connectin(titin)과 nebulin의 분해 pattern에 있어 상당한 차이를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Disappearance time of myofibril cytoskeletal protein during post-mortem ageing

	Disappearance time(days)	
	Connectin(Titin)	Nebulin
Control	2 ~ 3	8 ~ 10
Calcium liposome injection	0 ~ 1	2 ~ 3

Myosin filament와 Z선을 연결하는 역할을 하고, 높은 탄성을 가지는 connectin(2,800kDa)은 완전분해에 소요되는 기간이 대조구가 2일 이상 소요되는 반면 칼슘혈관 투여 시 0~1일 사이에 완전히 분해되었다. Z선에 존재하며 전 근원섬유 단백질의 5%가량 차지하는 nebulin(600~900kDa)은 대조구가 8일 이상 소요되는 반면 칼슘혈관 투여 시에는 2~3일 사이에 완전분해가 이루어 졌다(Fig. 6).

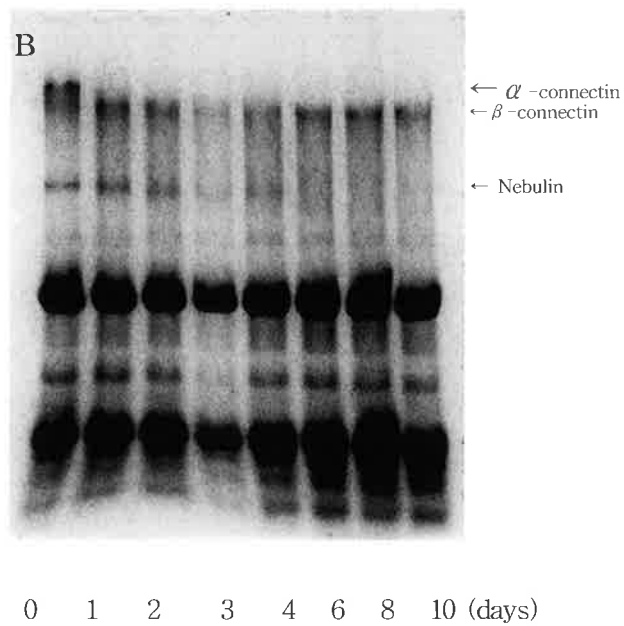
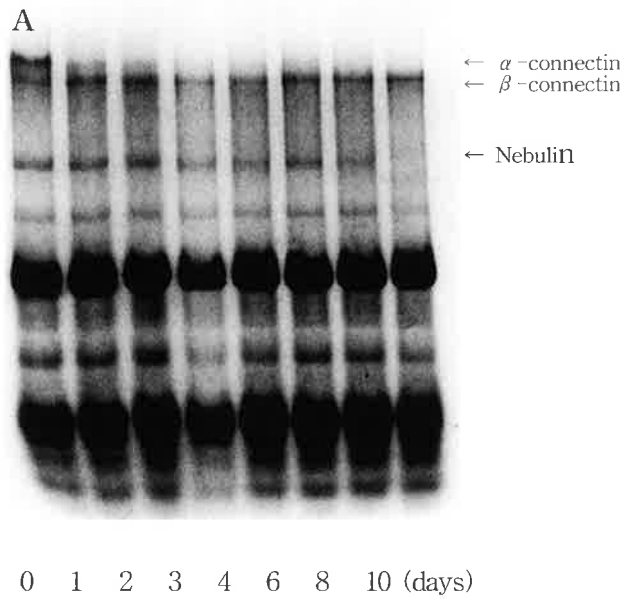


Figure 7. Post-mortem changes in SDS-polyacrylamide gel electrophoretic of cytoskeletal protein in rabbit loin. Samples were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (A: Control, B: Ca^{2+} injection, 2% polyacrylamide - 0.5% agarose gel)

Taylor 등(1995)은 전자현미경으로 관찰한 결과 도축 후 4℃에서 3~4일 저장했을 때 connectin(titin)와 nebulin이 있는 N₂-line이 붕괴되는 것이 관찰되었다고 하였다. Takahashi 등(1992)은 rabbit skeletal muscle myofibrils은 염화칼슘처리에 의해 α -connectin이 β -connectin와 1,200kDa의 분자단편으로 분해되었다고 했다. 또한 Tatsumi 와 Takahashi (1992)은 chicken breast muscle myofibrils을 0.1mM의 염화칼슘에 의해 처리하면 분자량 200, 180, 40, 33, and 23 kDa으로 단편화되어 180kDa 성분이외에는 모두 근원섬유로부터 유리된다. 이러한 현상 역시 식육의 숙성 중에 근형질의 칼슘이온 농도가 0.2mM로 상승하면 nebuline에 칼슘이온이 다량 결합하여 단편화하는 것으로 생각된다. Fei 등(1999)은 도축 후 칼슘이온이 증가함에 따라 β -connectin에서 paratropomyosin이 방출되며 이는 식육의 연도에 영향을 미친다고 하였다. 칼슘이온의 증가는 구조단백질인 connectin과 nebulin의 분해를 촉진하는데 이는 사후 고기의 연도에 중요한 역할을 하게된다.

이 연구는 식육으로 이용되는 모든 가축에 적용이 가능하며 식육연화를 위한 칼슘 상승제 보급으로 현장, 산업계, 학계가 유기적으로 고급식육의 생산을 위하여 연계될 수 있다. 식육소비의 확대는 곧 국민 식생활 개선과 건강증진에 직결된다. 또한 liposome을 이용한 무기질의 전달체계 확립으로 동물 나아가서 인체에 필요한 유효성분의 공급에 유효한 연구 결과를 제공한다.

2. 염소의 도축 전 Ca²⁺ 함유 Liposome의 혈관 투여가 食肉의 軟化에 미치는 영향

1) 칼슘농도변화

칼슘이온의 근육이행에 관한 비교는 대조구와 칼슘내포 Liposome을 도축 하루 전에 이정맥을 통하여 투여한 처리구간에 비교하였다(Table 3.).

Table 3. Calcium concentration of muscle during post-mortem aging by
ICP-AES(n=3). 단위 : ppm

실험처리	경과시간(일)							
	0	1	2	3	4	6	8	10
대조구	0	3.988	6.177	5.384	4.041	5.756	5.634	4.207
칼슘혈관투여	0	4.278	7.363	5.174	4.142	5.973	5.494	5.980

표3은 도축 후 시간경과에 따른 근육 중 칼슘농도의 변화(염소)에 대한 표이다.

염소의 도축 직후에는 근육 중에 ATP가 존재하기 때문에 근소포체의 calcium pump protein이 ATP를 Energy로 이용하여 칼슘이온을 근소포체 내부로 흡수하기 때문에 칼슘농도의 측정이 용이하지 않아 추정치인 0ppm($10^{-7}M$ 이하)으로 나타내었고 이후의 농도는 ICP-AES으로 측정한 수치이다. 그 결과 염소의 근육의 칼슘농도에 변화는 대조구에 비하여 칼슘내포 Liposome을 혈관 투여하였을 때 농도변화가 큰 것으로 나타났다. 이는 도축 전 칼슘의 혈관투여에 의하여 근육이 함유하는 칼슘량의 절대량이 증가한 것을 나타내며 이에 따라 도축 후 근소포체로부터 근형질에의 칼슘유출이 빠르게 진행되고 식육의 숙성을 촉진할 수 있는 근형질의 칼슘이온 농도 4 ppm에 달하는 시간이 단축될 수 있다는 것을 나타낸다.

2) 육질의 연화효과

(1) 근원섬유의 소편화율 비교

근원섬유의 소편화율은 근원섬유 구조인 Z-line의 약화정도를 나타내는 것이다. 도축직후의 실험동물에서 적출한 배최장근을 0.1% NaN_3 에 적신거즈로 두르고 5°C에 보관하면서 시간경관에 따른 근원섬유를 조제하여 소편화율을 측정한다. 결과 Table 5에서와 같이 도축 전 칼슘의 혈관투여에 의하여 근원섬유의 소편화가 빠르게 진행되는 것을 알 수 있었다.

Table 5. Fragmentation ratio(<4 myofibrils/total myofibrils) of myofibrils during post-mortem ageing (단위 : %)

실험처리	경과시간(일)							
	0	1	2	3	4	6	8	10
대조구	0	10.54	10.93	15.13	17.2	20.66	29.80	28.77
칼슘혈관투여	0	11.28	15.85	18.57	21.4	25.29	43.18	40.93

대조구에 있어 2일, 6일, 10일 경과 시 각각 10.93%, 20.66%, 28.77%로 완만히 상승하는 반면 도축 하루전에 칼슘내포 Liposome을 혈관투여한 경우에 있어서는 각각 15.85%, 25.29%, 40.93%로 대조구보다 훨씬 빠른 근원섬유의 소편화가 이루어짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 근소포체로부터 근형질에의 칼슘유출이 빠르게 진행되었고 상승한 근형질의 칼슘이온에 작용으로 Z-line이 약화되어 근원섬유 조제시의 물리적인 충격에 쉽게 절단된 것을 의미한다.

(2) SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 비교검토

대조구, 칼슘혈관투여 처리한 실험동물의 배최장근으로부터 시간경과에 따라 각각 조제한 근원섬유를 SDS-PAGE에 공시한 결과, 고기의 연도에 밀접하게 관련하는 단백질인 Connectin과 nebulin의 분해 pattern에 있어 상당한 차이를 나타내었다.

염소 실험의 경우 Connectin의 완전분해에 소요되는 기간이 대조구가 8일 이상 소요되는 반면 칼슘혈관 투여 시 3~4일 사이에 완전히 분해되었고, Nebulin의 경우에는 대조구가 3~4일 이상 소요되는 반면 칼슘혈관 투여 시에는 0~1일 사이에 완전분해가 이루어 졌다(Figure 8).

Nebulin의 경우 2일경에 소멸이 시작하여 3-4일경에 사라짐을 알 수 있었다. α -connectin의 경우 1일차에 완전히 소멸하였다.

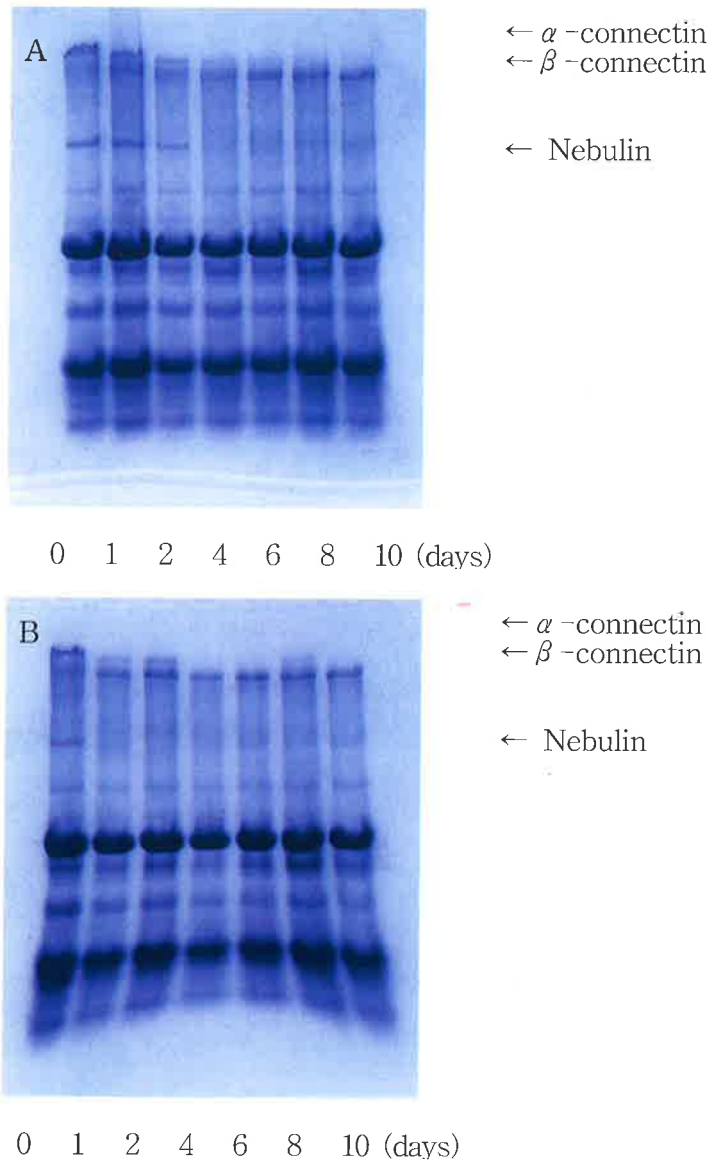


Figure 8. Post-mortem changes in SDS-polyacrylamide gel electrophoretic of cytoskeletal protein in rabbit loin. Samples were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (A: Control, B: Ca²⁺ injection, 2% polyacrylamide - 0.5% agarose gel)

제 2 절 2차년도

1. 한우의 도축 전 Ca^{2+} 함유 Liposome의 혈관 투여가 食肉의 軟化에 미치는 영향

식육의 식미성에 관련한 요소로는 연도, 맛, 다즙성, 외관 및 향기 등이 있으나 이중 소비자가 가장 중요시하는 것은 연도이다(朴亨基 등, 1996). 도축후의 식육은 사후경직에 의하여 질기고, 보수성 및 풍미가 저하되지만 그 후 경직은 숙성과정을 거치면서 서서히 풀려 부드러워진다. 숙성은 Z선의 약화, Actin-myosin 간의 경직결합의 약화, connectin의 약화 등에 의해 이루어지는데 (Takahashi, 1996) 소의 경우 2~4℃에서 7~10일을 숙성기간을 필요로 한다 (Nishimura, 등 1998). 이런 숙성기간을 통하여 육질이 연화되며 보수성 및 풍미도 개선된 고품질의 식육으로 변환한다(Foster J. B., 1986).

칼슘이온을 이용한 식육연화의 실용화연구는 국내의 경우 전무하며, 미국에서 일부 연구가 이루어지고 있는 실정이다. Pollock 등(2000)은 도축 후의 lamb meat에 대해 주사기를 이용하여 경동맥으로 $CaCl_2$ 을 주입하여 식육의 품질개선 효과를 최대로 하기 위한 실험을 실시하였는데 0.3M의 $CaCl_2$ 를 처리하면 전단력가가 감소하였다. Pérez 등(1998)은 chicken, horse, cattle, rabbit meat에 75mM 와 150mM $CaCl_2$ 처리를 하였을 때 풍미와 연도를 증가시켰다고 한다. Morgan 등(1991)도 우육에 $CaCl_2$ 를 injection하였을 경우 연도에서뿐만 아니라 관능적으로 좋은 결과를 보였다고 하였다. 그러나 300mM이상의 $CaCl_2$ 를 injection 하였을 경우에는 풍미에 영향을 미친다고 하였다. 또한 Lansdell 등(1995)은 우육에 $CaCl_2$ 의 처리에 의해 육색과 풍미에 변화를 있었다고 하였고, Benito-Delgado 등 (1994)은 우육에 $CaCl_2$ 의 주입은 연도를 개선하고 숙성기간을 단축하지만 약간의 쓴맛과 짠맛을 느꼈다고 보고하였다.

이들의 연구는 도축 후의 식육을 대상으로 강제적인 injection에 의하여 칼슘

이온을 주입하는 방법으로 과다한 수분과 칼슘이온을 사용하는 점과 고기에 물리적 손상을 초래하는 결점이 있는 것으로 판단하였다. 이러한 결점을 보완하기 위해 본 연구에서는 칼슘이온을 포집한 liposome을 이용하였다.

1) 육색의 비교.

(1) 백색도 L* value의 비교

Table 6. CIE L* values of beef loin Ca²⁺-liposome injected Han-woo before slaughter.

CIE	Storage days					
	3*	5**	9**	13*	17***	
L*	con-loin***	41.80	37.85	37.71	39.44	41.00
		±1.25 ^{aA}	±1.35 ^{aC}	±1.39 ^{aC}	±1.47 ^{abB}	±0.55 ^{aA}
	25ml-loin***	38.64	35.85	35.56	37.90	38.35
		±2.47 ^{bA}	±0.87 ^{bB}	±0.88 ^{bB}	±1.69 ^{bA}	±0.48 ^{bA}
	50ml-loin***	40.17	36.99	37.70	40.44	41.52
		±1.78 ^{aB}	±0.61 ^{abC}	±1.42 ^{aC}	±0.56 ^{aAB}	±1.37 ^{aA}

*p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001.

^{a,b,c}Mean±SD with different superscripts in the same column differ significantly.

^{A,B,C}Mean±SD with different superscripts in the same row differ significantly.

Table 6은 칼슘혈액주사구들(25ml 칼슘 처리구, 50ml 칼슘 처리구)과 대조구 간의 육색 L* 값의 변화를 나타낸 표이다.

저장기간이 증가할수록 대조구 및 칼슘 처리구의 백색도가 유의적으로 증가하였다($P < 0.001$). 저장기간이 증가할수록 육색 L값은 유의적으로 증가하였다($P < 0.001$). 또한 저장 3일차에는 50ml 혈액주사처리구가 대조구와 25ml 혈액주사처리구보다 비교적 낮은 L* 값을 나타내었고, 전체적으로 5일차에는 5일차에는 대조군이 높은 L* 값을 나타내었다. 또한 모든 기간에서 25ml 처리구가 낮은 값을 나타내었다.

저장기간에 따른 육색의 비교 중 백색도 L*(Lightness)의 비교하였을 때 대조군, 25ml 칼슘처리군 그리고 50ml 칼슘처리구에 있어 저장 초기에는 다소 높았으나 저장 3일과 5일째에 감소하다가 다시 저장 13, 17일에 유의적으로 증가하였다. 먼저 대조군 등심의 경우는 저장기간이 5, 9, 13, 17일로 증가할수록 백색도 L*값이 증가하였으며 3일차와 17일 차에서 높은 백색도 L*값을 나타내었으며, 이들의 수치는 41.80, 41.00을 나타냈다. 칼슘의 25ml 처리군 에서도 저장기간별로 3일차와 13, 17일차에서 백색도 L*값이 각각 38.64, 37.90, 38.35로 유의적으로 높게 나타났으며, 5일차와 9일차에서 상대적으로 낮은 값을 나타내었다. 칼슘 50ml 처리군에서는 저장기간별로 백색도 L*값이 유의적으로 증가하였다.

전체 저장기간동안 25ml 처리군이 대조구 및 50ml 처리군보다 백색도 L*값이 다소 낮은 경향을 나타내었다. 먼저 저장기간별로 비교하였을 때,

저장 3일차의 경우 25ml 칼슘처리구가 다른 두 시험구 보다 다소 낮은 백색도 L*값인 38.64를 나타내었으며($P < 0.005$), 저장 5일차에는 대조구가 37.85로 25ml 칼슘처리와 50ml 칼슘처리구 보다 백색도 L*값이 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.01$). 저장 9일차에는 대조구와 50ml 칼슘처리구가 25ml 칼슘처리구보다 유의적으로 백색도 L*값이 높게 나타났다($P < 0.01$). 또한 13일의 경우 25ml 칼슘처리구가 백색도 L*값이 가장 높게 나왔으며, 다음으로 대조구, 다음으로 50ml 처리구 순으로 백색도 L*값이 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 저장 17일에는 50ml 칼슘 처리한 한우 등심의 경우 대조구와 25ml 처리군보다 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.001$).

전체적으로 저장 초기와 저장 말기에 육색 L* 값이 가장 높았으며, 25ml 칼슘 처리구가 대조구 및 50ml 처리구보다 유의적으로 낮은 육색 L* 값을 나타내었다.

본 연구는 칼슘이온이 도축 후 근세포질에 조속히 유리될 수 있도록 생체근육 내 칼슘이온 농도를 높이는 방법과 도축 전 칼슘 liposome 투여에 의하여 근세포체로 부터 칼슘이온을 빠르게 방출시킬 필요성을 인지하여 식육의 연화기간을 대폭 단축함을 목표로 한다.

(2) 적색도 a* value의 비교

Table 7. CIE a* values of beef loin Ca²⁺-liposome injected Han-woo before slaughter.

CIE	Storage days					
	3	5**	9**	13*	17***	
a*	con-loin***	17.03 ±0.86 ^A	15.00 ±1.91 ^{ab}	14.51 ±1.79 ^{bb}	13.48 ±0.76 ^{abBC}	12.89 ±1.30 ^{bc}
	25ml-loin***	18.17 ±1.54 ^A	13.18 ±0.27 ^{bb}	17.22 ±0.39 ^{aA}	12.46 ±1.44 ^{bbC}	11.46 ±0.61 ^{cc}
	50ml-loin***	17.59 ±1.67 ^A	14.25 ±0.86 ^{abB}	18.25 ±0.41 ^{aA}	14.74 ±2.24 ^{ab}	13.93 ±0.40 ^{ab}

*p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001

^{a,b,c}Mean±SD with different superscripts in the same column differ significantly.

^{A,B,C}Mean±SD with different superscripts in the same row differ significantly.

Table 7은 우육의 칼슘처리구들(25ml 처리구, 50ml 처리구)과 대조구의 육색 중 적색도 a* value(redness)를 나타낸 표이다. 저장기간에 따라 모든 처리구 및 대조구에서 유의적으로 적색도a*가 감소하는 추세를 나타내었다($P < 0.001$).

저장기간에 따라 대조군의 경우 저장 3일차에 가장 높은 17.03의 적색도a*가 나타났으며, 저장기간이 증가할수록 적색도a* value가 감소함을 나타내었다.

25ml 칼슘 혈액투여군의 경우 저장 7일까지 적색도a* value가 다소 높은 값인 17.17, 17.22를 나타내었으나, 저장 13, 17일에 적색도a* value가 각각 12.46, 11.46으로 유의적으로 감소하는 결과를 가져왔다($P < 0.001$).

또한 50ml 칼슘 혈관 처리구에서도 저장 초기 7일까지는 다소 높은 17.59, 18.25의 적색도a* value수치를 보였으나 저장기간 13, 17일에 14.74, 13.93의 적색도a* value로 유의적으로 감소하였다.

저장기간별로 비교할 경우 저장 3일차의 경우 대조구와 25ml 처리군, 50ml 처리구의 적색도a* value값이 17.03~18.17로 시험구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 저장5일차의 경우 적색도a* value가 대조군이 15.00으로 유의적으로 높은 적색도a* value 값을 나타내었으며, 25ml 처리군이 13.18 다음으로 50ml 처리군이 14.25의 적색도a* value로 나타났다. 그러나 저장 9차에는 처리군이 대조구보다 적색도a* value가 높게 나타났으며, 저장 13, 17일에는 25ml, 50ml 칼슘처리군의 적색도a* value가 각각 11.46, 13.94로 대조구보다 낮게 나타났다 ($P < 0.01$, $P < 0.001$).

전체적으로 볼 때 저장기간이 증가할수록 적색도a* value가 낮아졌으며, 저장기간별로 비교할 경우 저장 3일차에선 대조구와 처리구간의 유의적인 차이를 발견할 수 없었다. 또한 저장 13, 17일에 50ml 칼슘처리구가 가장 높은 적색도a* value값을 나타내었다.

(3) 황색도 b* value의 비교

Table 8. CIE b* values of beef loin Ca²⁺-liposome injected Han-woo before slaughter.

CIE	Storage days					
	3	5*	9**	13*	17***	
b*	con-loin***	8.99	6.06	5.68	5.16	3.44
		±0.78 ^A	±1.74 ^{ab}	±1.08 ^{bb}	±0.51 ^{ab}	±0.73 ^{bc}
	25ml-loin***	9.34	4.23	7.20	3.56	3.01
		±1.23 ^A	±0.55 ^{bc}	±0.82 ^{ab}	±0.57 ^{bcd}	±0.54 ^{bd}
	50ml-loin***	9.60	5.22	7.85	5.39	4.93
		±1.16 ^A	±0.65 ^{abc}	±0.64 ^{ab}	±1.55 ^{ac}	±0.41 ^{ac}

*p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001

^{a,b,c} Mean±SD with different superscripts in the same column differ significantly.

^{A,B,C} Mean±SD with different superscripts in the same row differ significantly.

Table 8은 황색도 b*value값(Yellowness)에 대한 칼슘처리구의 실험결과이다. 저장기간이 증가함에 따라 모든 시험구에서 황색도 b*value가 유의적으로 감소하는 추세를 나타내었다(P<0.001)

저장기간에 따른 비교의 경우 대조구는 저장기간이 지남에 따라 황색도 b*value 값이 감소하였으며(P<0.001), 저장 3일에 가장 높은 8.99황색도 b*value를 보였으며, 저장 17일차에 황색도 b*value가 가장 낮은 3.44를 나타내었다(P<0.001). 또한25ml 칼슘처리구의 경우에도 3일차에 9.34로 가장 높은 황색도 b*값을 나타내었으며, 저장 17일에 가장 낮은 3.01의 황색도 b*값을 나타내었다(P<0.01). 50ml 칼슘처리구에서도 저장 3일차에 9.60으로 가장 높은 황색도 b*값을 나타내었으며, 다음으로 저장 9일차에 7.85를 나타내었다. 3일,13일, 17일에는 각각 5.22, 5.39, 4.93으로 유의적으로 초기의 값보다 낮은 황색도 b*

값을 나타내었다($P < 0.001$).

저장기간별로 비교할 경우 대조구와 칼슘혈액투여구간의 비교에 있어 저장 3일차에 모든 대조구와 처리구간의 수치가 8.99~9.60 정도의 황색도 b*value를 나타내었으며, 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

저장 5일차일 때 비교의 경우 50ml 칼슘투여구가 비교적 낮은 수치인 5.22를 나타내었고, 대조구와 25ml 칼슘처리구에서는 4.23~5.22로 유의적으로 낮은 황색도 b*값을 나타내었다($P < 0.05$).

저장 9일차의 경우 대조구가 처리구보다 유의적으로 낮은 5.68의 황색도 b*값을 나타내었으며, 25ml, 50ml 처리구 각각에서 7.20, 7.85의 비교적 높은 황색도 b*값을 나타내었다($P < 0.01$). 또한 저장 13일 차에는 대조구와 50ml 처리구가 각각 5.16, 5.39로 높은 황색도 b*value를 보였으며, 25ml 처리구가 다소 낮은 값인 3.56의 값을 나타내었다($P < 0.05$). 저장 17일의 경우 50ml 처리구에서 가장 낮은 황색도 b*value값인 4.93을 나타내었다. 전체적으로 저장기간에 따라 대조구와 처리구모두에서 저장초기와 저장 말기에 비교적 높은 황색도 b*를 나타내었다. 또한 저장기간별로 비교할 경우 3일차에 대조구 및 처리구에서 상대적으로 높은 황색도 b*값을 나타내었다. 다음의 그림 9, 10, 11은 육색 L*, a*, b*의 변화도를 그림으로 나타낸 것이다.

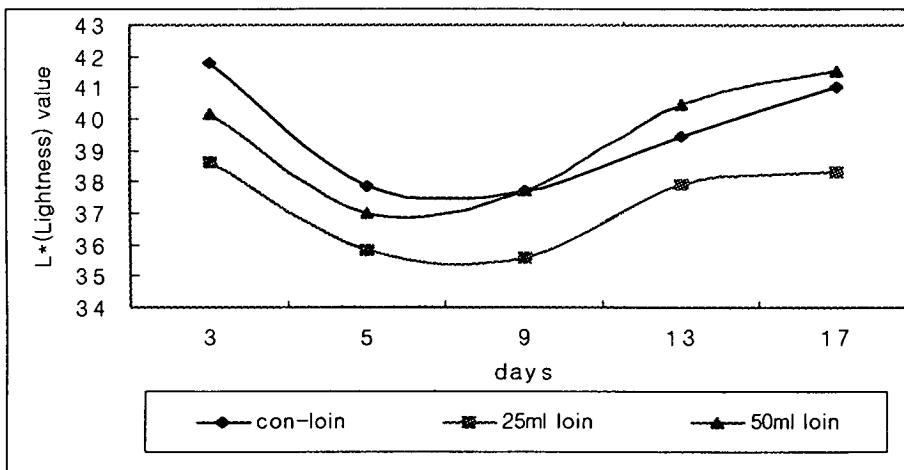


Figure 9. The change of CIE L* values of beef loin Ca^{2+} -liposome injected Han-woo before slaughter.

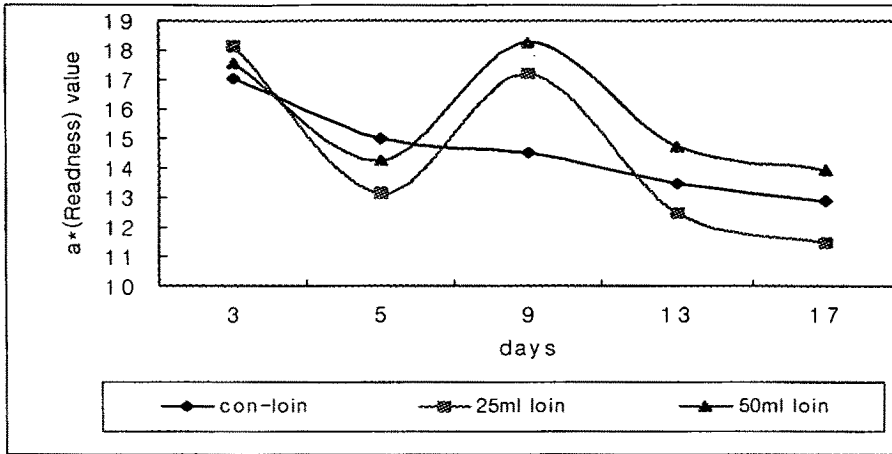


Figure 10. The change of CIE a* values of beef loin Ca^{2+} -liposome injected Han-woo before slaughter.

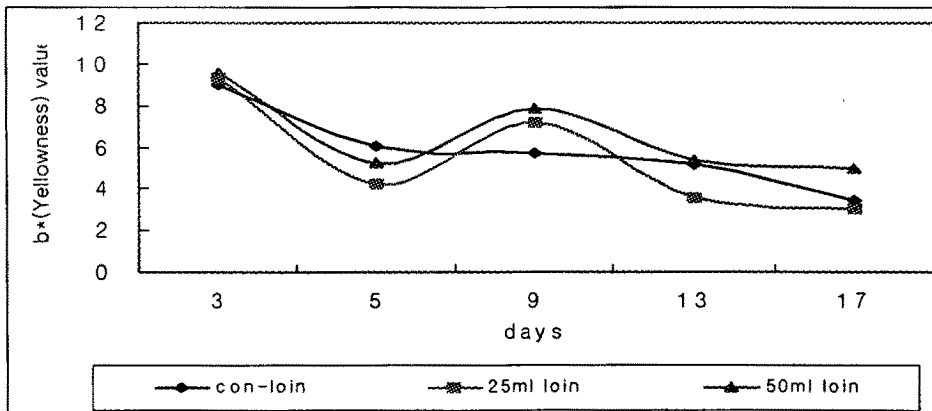


Figure 11. The change of CIE b* values of beef loin Ca^{2+} -liposome injected Han-woo before slaughter.

2) 육의 pH의 비교.

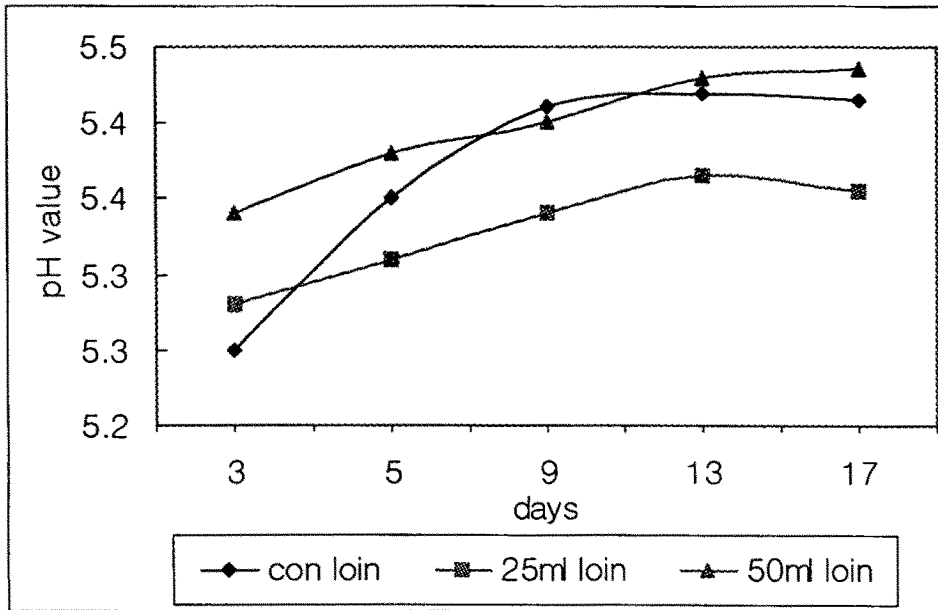


Figure 12. The changes of pH value of beef loin Ca^{2+} -liposome injected Han-woo before slaughter during storage.

저장 중 pH의 변화는 식육의 신선도와 보수력 등 품질과 관련된 변화와 관련되어 있으며, pH가 높아지면 육즙이 유의적으로 증가하고, 담백하고 유연한 조직을 나타낸다고 보고되었다(Kauffman 등, 1961). Deymer와 Vandekerckhove(1979)는 저장 기간에 따라서 pH는 상승하는데, 이는 단백질과 이온물질의 반응, 전해질 분해의 감소 및 암모니아 생성 때문이라고 보고하였다. Hamm(1974)도 우육의 숙성기간에 따라서 pH가 다소 상승한다고 보고하였다.

Figure 12은 대조구 및 칼슘처리구의 pH변화를 나타낸 것이다.

저장기간에 따라 모든 시험구에서 저장기간이 증가할수록 pH 값이 $P<0.001$ 로 유의적으로 증가하였다. 저장기간에 따라 대조구의 pH가 증가하였으며, 저장 3일차에 가장 낮은 pH 5.25를 나타내었으며 5일차에 5.35로 다소 낮았으며 저장 9일에서 17일까지는 가장 낮은 pH 5.41~5.42를 나타내었다($P<0.001$).

또한 저장기간에 따라 25ml 칼슘처리구도 pH 값이 증가하였으며, 저장기간이 3, 5, 9, 13, 17일의 pH가 각각 5.28, 5.31, 5.34, 5.37, 5.36으로 저장기간이 증가할수록 pH값이 증가하였으며($P < 0.001$), 저장 13일과 17일에 상대적으로 높은 pH를 나타내었다. 또한 저장기간이 증가함에 따라 50ml 칼슘처리구의 pH도 증가하였으며, 저장 3일차에서 가장 낮은 pH 5.34를 보였으며, 저장 13~17일에 5.43~5.44로 비교적 높은 pH값을 나타내었다($P < 0.001$).

저장기간별로 비교할 경우 저장 3일에 대조구가 가장 낮은 pH를 보였으며, 다음으로 25ml 칼슘 처리구 다음으로 50ml 처리구 순으로 pH 값이 높았다. 이들의 pH 수치는 각각 5.25, 5.28, 5.34로 칼슘투여가 증가할수록 pH가 증가하였다($P < 0.001$). 또한 저장 5일차의 경우에도 50ml 칼슘처리구가 가장 높은 pH 값인 5.38로 나타났으며, 다음으로 대조구가 5.35를 나타냈고, 25ml 칼슘처리구가 가장 낮은 pH값을 나타내었다.

저장 9일차에는 대조구가 가장 높은 pH값인 5.41로 나타났으며, 다음으로 50ml의 pH 값이 5.40 이었으며, 25ml 칼슘 처리구에서 가장 낮은 pH 5.34를 나타내었다($P < 0.0001$). 그리고 저장 13일 차에서는 대조구와 50ml 칼슘 처리구가 25ml 칼슘 처리구보다 pH 값이 유의적으로 높게 나타났으며, 이를 대조군 및 25ml 칼슘 처리군 및 50ml 칼슘투여군의 수치는 각각 5.42, 5.37, 5.43으로 나타냈다.

또한 저장 17의 경우 25ml 칼슘 처리군이 가장 낮은 pH값 5.36을 나타냈으며, 대조구와 50ml 칼슘투여구가 각각 5.42, 5.44로 유의적으로 높은 pH값을 나타내었다.

전체적으로 볼 때 저장기간이 증가할수록 pH값이 모든 대조구 및 처리구에서 증가하였다. 25ml 투여구가 상대적으로 낮은 pH 값을 나타내었으며, 저장기간별로 볼 저장 3일을 제외하고는 가장 낮은 수치를 보였다.

3) 육의 지방산패도(TBARS)의 비교.

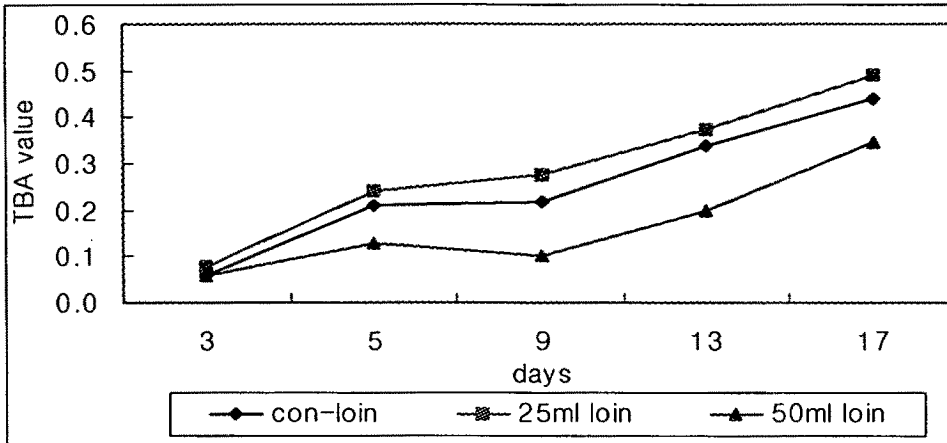


Figure 13. The change of TBA values of beef loin Ca^{2+} -liposome injected Han-woo before slaughter(mgMA/kg).

Sinnhuber와 Yu(1958)은 지방이 포함되어 있는 식품의 지방 산패를 측정하기 위해서 TBA 값을 측정할 것을 제안하였고, Dahle 등(1962)은 지방 산화과정 중에서 malon- aldehyde가 형성되기 위해서는 산소가 필요하다고 보고하였다. Witte 등(1970)은 저장기간에 따라서 TBA 값은 지속적으로 증가한다고 하였다. Chen과 Wailmaleongora-ek 등(1981)은 TBA 값은 시간의 경과, 저장온도, 지방산의 조성, 산소의 활성, 항산화제 등의 여러 요인에 의해 영향을 받는다고 보고하였고, TBA는 지방 산패 정도를 측정하는 방법으로 지방 산화에 의해서 생기는 malon- aldehyde와 thiobarbituric acid와 반응하여 생성되는 복합체를 UV-Spec 을 이용하여 측정하는 방법이다.

Figure 13은 칼슘의 혈관 처리구의 지방 산패도(TBA)를 측정한 결과 값이다. 저장기간이 증가할수록 모든 시험구의 지방산패도 TBA 변화량은 유의적으로 증가하는 추세를 나타내었다($P < 0.01$).

저장기간별로 살펴보면 저장 3일차의 대조구에선 0.06 mgMA/kg 지방산패도가를 나타내었으며, 25ml 처리구에선 0.078mgMA/kg의 지방산패도가를, 50ml 처리구에선 0.058mgMA/kg의 지방산패도가를 나타내었다.

3일차에서 25ml 처리구가 가장 높은 수치를 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다.

저장 5일, 9일 13일 17일 모두에서 대조구와 25ml 처리구에선 유의적인 차이가 없었으나, 처리50ml 처리구가 가장 낮게 나왔으며 유의적인 차이를 나타내었다($P < 0.05$). 이들 각각의 수치는 0.128, 0.101, 0.199, 0.364mg MA/kg이었다.

전체적으로 비교할 때 대조구와 25ml 처리구는 서로 유의성이 없었으며, 변화하는 추위가 같았으나 25ml 칼슘처리구의 경우 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다. Table 9는 TBA가를 표로 나타낸 것이다.

Table 9. The changes of TBA value of beef loin Ca^{2+} -liposome injected Han-woo before slaughter during storage(mg MA/kg).

	3**	5**	9**	13*	17**
con-loin**	0.060 ± 0.003 ^{ac}	0.212 ± 0.003 ^{ac}	0.218 ± 0.046 ^{ac}	0.339 ± 0.003 ^{ab}	0.441 ± 0.022 ^{aa}
25ml loin**	0.078 ± 0.004 ^{ac}	0.243 ± 0.007 ^{abc}	0.278 ± 0.079 ^{abc}	0.372 ± 0.029 ^{ab}	0.490 ± 0.043 ^{aa}
50ml loin**	0.058 ± 0.010 ^{bc}	0.128 ± 0.003 ^{bbc}	0.101 ± 0.019 ^{bbc}	0.199 ± 0.03 ^{bb}	0.346 ± 0.009 ^{ba}

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

^{a, b, c} Mean ± SD with different superscripts in the same column differ significantly.

^{A, B, C} Mean ± SD with different superscripts in the same row differ significantly.

4) 육의 단백질 변패도(VBN)의 비교.

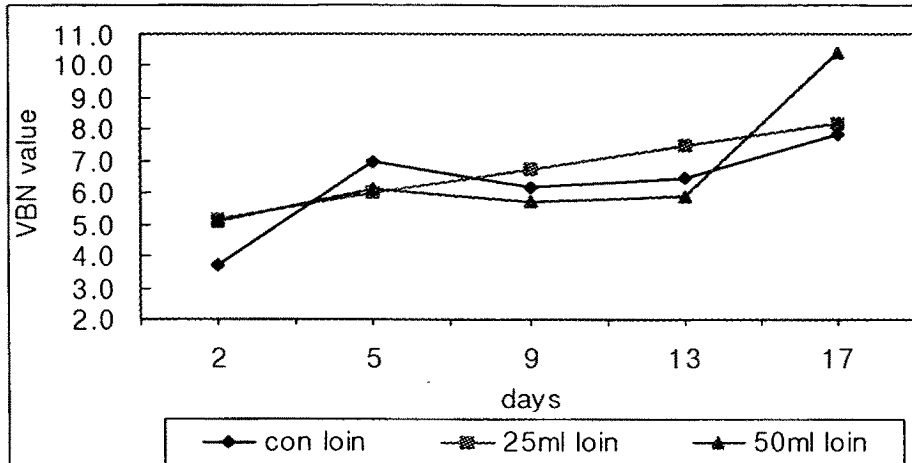


Figure 14. The changes of VBN value of beef loin Ca^{2+} -liposome injected Han-woo before slaughter during storage.

저장 중에 근육단백질이 아미노산과 그 외에 여러 가지 무기태 질소로 분해가 되는데 이는 단백질의 가수분해에 따른 아미노산과 펩타이드의 증가에 의해서 휘발성 염기태 질소가 증가한다. 이 뿐만 아니라, adenosyl monophosphate(AMP)의 분해에 따른 암모니아의 생성과 nucleotide의 증가에 의해서도 영향을 받는다.

高坂(1975)은 저장 중에 일어나는 단백질의 분해 산물인 암모니아 질소의 양을 측정하는 휘발성 염기태 질소(Volatile Basic Nitrogen: VBN) 측정법이 신선육의 선도 측정에 유효하며, VBN값이 5~10mg% 수준이면 신선한 상태, 30mg% 이상의 수준이면 부패한 상태라고 보고하였고, 이와 성(1989)은 20mg% 이상을 신선육의 부패 수준으로 보고하였다. 변 등(1985)은 18mg% 이상을 외관과 냄새로 보아 변패한 것으로 판정하였고, 김 등(1972)은 15mg%를 부패의 기준을 판단하였다.

Figure 14은 칼슘혈관처리구의 저장기간별 VBN 결과를 그림으로 나타낸 것이다. 저장기간에 따라 모든 시험구에서의 VBN가 대조구 $P < 0.001$ 수준에서 증가하는 추세를 보였으며, 25ml 칼슘처리구의 경우는 $P < 0.05$ 수준에서 증가하는 추세를 보였으며, 50ml 칼슘처리구의 경우는 고도의 유의차를 보이며 증가하는 추세를 나타내었다($P < 0.0001$)는 증가하였다($P < 0.05$).

저장기간에 따라 대조구의 경우 저장 3일차가 3.74로 가장 낮은 VBN가를 나타냈으며, 저장 17일차에 가장 높은 3.93의 VBN가를 나타내었다.

또한 25ml 칼슘처리구에서도 3일차와 5일차에 VBN가 5.14~6.03으로 상대적으로 낮은 값을 나타냈으며, 저장 17일에 가장 높은 8.28의 VBN가를 나타내었다.

50ml 칼슘 처리구의 경우 저장기간에 따라 3일차에 가장 낮은 5.10의 VBN가를 보이다가 5일~15일에는 5.75~6.11 정도로 약간 증가하다가 저장 17일 차에 갑작스럽게 10.40으로 유오적으로 증가하였다.

저장기간별로 비교했을 경우 저장 3일차에 대조구가 두 처리구보다 낮은 VBN가를 보였으며($P < 0.05$), 저장 5일차에는 오히려 대조구가 높은 VBN가를 나타내었다($P < 0.05$). 저장 9일차에는 50ml 칼슘처리구가 대조구와 25ml 칼슘처리구보다 높은 낮은 VBN가를 나타냈다($P < 0.05$). 또한 저장 13일 차에는 25ml 칼슘처리구가 7.53으로 가장 높고 50ml 칼슘처리구가 5.88로 가장 낮은 수치를 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다.

저장 17일째의 비교를 보면 50ml 칼슘처리구가 10.40으로 가장 높은 VBN가를 나타냈으며, 대조구 및 25ml 칼슘처리구가 비교적 낮은 7.85~8.21의 VBN수치를 보였다($P < 0.0001$). 전체적으로 볼 때 저장기간이 증가할수록 모든 시험구에서 VBN수치는 증가하였으며, 저장 초기에 대조구가 가장 낮은 VBN가를 나타냈으나, 저장 후반기에는 50ml 칼슘처리구가 가장 높은 VBN수치를 나타내었다. 이는 단백질의 변성정도가 50ml가 가장 높다는 것을 보여주는 것이어서 칼슘처리구가 변성도가 높다는 것을 나타내주고 있다.

5) 육의 가열감량(Cooking loss)의 비교.

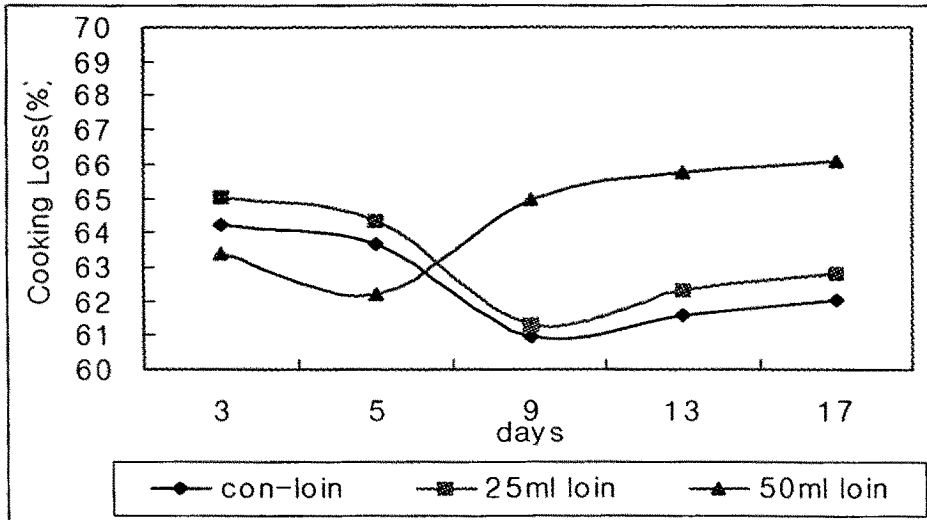


Figure 15. The change of cooking loss values of beef loin Ca^{2+} -liposome injected Han-woo before slaughter.

Figure 15는 도축 전 칼슘 처리구의 가열감량(cooking loss)을 그림으로 나타낸 것이다. 저장기간이 증가할수록 대조군 및 25ml의 가열감량은 $P < 0.05$ 수준으로 유의적으로 감소하였으나, 50ml 칼슘 혈관투여 처리구의 저장 3일을 제외하고는 저장 5일부터 저장 17일까지 $P < 0.001$ 수준에서 유의적으로 가열감량이 증가하는 추세를 나타내었다.

저장기간별로 비교할 경우 저장 3일의 경우 대조구가 64.26이었으며, 25ml 처리구가 65.03 50ml 처리구가 63.36으로 나타났으나, 이들은 유의적인 차이는 발견되지 않았다. 5일의 경우에도 50ml 처리구가 62.21로 나타났으며, 대조군 및 25ml 처리구가 각각 63.70, 64.34로 비교적 낮았으나 이들간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 저장 9일의 경우 대조구가 가장 낮은 60.94이었으며, 25ml 처리구와 50ml는 각각 61.30, 64.96으로 처리구간의 유의성은 발견되지 않았으나

대조구와 처리구간은 유의적인 차이를 나타내었다($P < 0.05$). 또한 저장 13일차의 경우 대조구가 61.60으로 유의적으로 낮은 수치를 보였으며($P < 0.001$), 처리구간에는 25ml 처리구가 62.33, 50ml 처리구가 65.78로 처리구간별로는 유의적인 차이가 없었다.

저장 17일차의 경우 대조구와 25ml 칼슘혈관주사 처리구가 각각 62.02, 62.80으로 유의적인 차이가 없었으나 가열감량 66.08%를 보인 50ml 처리구와는 유의적인 차이를 나타내었다($P < 0.001$).

전체적으로 볼 때 저장기간에 따라 대조구 및 25ml 칼슘주사 처리구의 경우 감소하는 추세를 보였으나, 50ml 칼슘주사 처리구는 증가하는 추세를 나타내었다($P < 0.001$). 또한 저장 9일부터 17일까지는 50ml 칼슘 주사구가 다른 시험구보다 높은 가열감량을 나타내었다.

6) 육의 전단력가(Shear Force)의 비교.

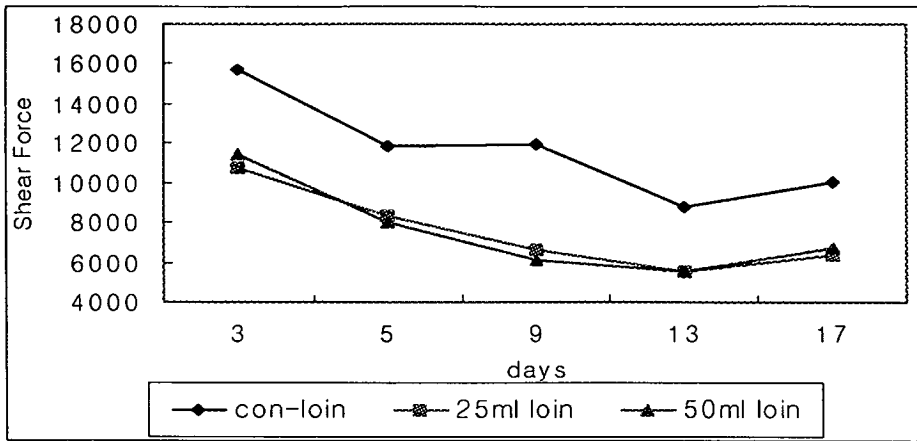


Figure 16. The changes of shear force of beef loin Ca^{2+} -liposome injected Han-woo before slaughter during storage.

Figure 16은 도축 전 칼슘 처리구의 저장기간에 따른 전단력 변화를 그린 그림이다. 저장기간이 증가할수록 대조구의 경우 $P<0.001$ 로 유의적으로 감소하는 추세를 보였다. 저장 3일차에 가장 높은 15666을 나타냈으며, 저장 13일차에 가장 낮은 8821의 수치를 나타내었다. 또한 25ml 처리구에서도 저장기간에 따라 $P<0.001$ 로 유의적으로 감소하였으며, 저장 3일차와 5일차에 가장 높은 수치인 10729 및 8324를 나타냈으며, 이들간의 유의적인 차이는 없었다. 하지만 저장 9, 13, 17일에는 유의적으로 낮은 6622, 5560, 6357의 값을 나타내었다. 칼슘 50ml 처리구에서는 $P<0.0001$ 의 유의적인 감소를 나타내었으며, 저장 3일차에 11437로 가장 높은 전단력가를 나타내었으며, 5일, 9일, 13일, 17일에 각각 8042, 6140, 5520, 6767로 유의적으로 낮은 값을 나타내었다($P<0.0001$).

저장기간별로 비교해 보면 저장 3일차의 경우 대조구가 가장 높은 값을 나타내었으며, 25ml 처리구와 50ml 처리구는 상대적으로 낮은 값인 10729, 11437의 값을 나타내었다($P<0.001$).

저장 5일차 때에도 처리구 각각이 8324, 8042로 대조구보다 유의적으로 낮은

값을 나타내었다. 또한 저장 9일차에서도 처리구가 각각 6622, 6140으로 대조구보다 상대적으로 낮은 전단력가를 나타내었다($P < 0.01$). 저장 13일차에도 대조구가 8821인데 반해 25ml 처리구와 50ml 처리구가 각각 5560, 5520으로 대조구에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었다($P < 0.05$). 저장 17일차의 경우에도 대조구가 10100의 전단력가를 나타내는 반면 25ml 처리구에서는 6357, 50ml 처리구에서는 6767의 전단력가를 나타내 처리구가 유의적으로 대조구보다 낮은 전단력가를 보여줄 수 있었다.

전체적으로 저장기간이 증가할수록 대조구 및 처리구의 전단력가는 감소하였으며, 저장기간별로 25ml 처리구와 50ml 처리구가 모두 대조구보다 낮은 전단력가를 나타내었으나, 처리구간별로는 유의적인 차이가 없었다.

7) 한우육의 관능검사

(1) 저장 7일차의 신선육 관능검사

Table 10. Sensory characteristics¹ stored 7 day of fresh beef loins stored injected Ca^{2+} -liposome before slaughter.

	color	aroma	acceptability
con-loin	4.77 ± 1.88 ¹⁾	4.23 ± 2.13	5.08 ± 1.75
25ml	4.92 ± 1.75	4.15 ± 2.54	5.69 ± 1.55
50ml	4.92 ± 1.61	3.92 ± 2.18	5.00 ± 1.58

¹ Sensory scores were assessed on 9 point hedonic scale where 1 = extremely bad or slight, 10 = extremely good or much

관능검사에 대한 결과는 표 10, 11, 12, 13와 그림 17, 18, 19, 20에 나타나 있다. Table 10에서 보듯 저장 7일차의 신선육의 경우 육색, 향미, 기호성면에

서 시험구간별로 유의적인 차이가 없었다.

육색은 칼슘 25ml, 50ml을 혈액에 주사한 처리군 들 다 4.92점으로 가장 높게 나타났으며, 대조구는 4.77점으로 가장 낮게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. 향기면 에서는 칼슘50ml처리한 군이 3.92점으로 가장 낮게 나타났으며, 25ml 처리군이 4.15로 다음으로 높고, 대조군이 가장 높은 4.23으로 나타났으나 유의적인 차이는 발견되지 않았다. 종합적 기호도는 칼슘25ml 처리한 군이 5.69로 가장 높게 나타났으며 대조구가 5.08, 50ml 칼슘처리구가 5.00으로 가장 낮게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다.

(2) 저장 7일차의 조리육 관능검사

Table 11. Sensory characteristics¹ stored 7 day of cooked beef loins stored injected Ca²⁺-liposome before slaughter.

	color	aroma	flavor	juiciness	tenderness*	acceptability
con	4.69±	5.00±	5.38±	5.00±	5.42±	5.38±
	1.84 ¹⁾	1.41	1.26	1.53	0.67 ^b	1.26
25ml	5.00±	5.00±	5.08±	5.00±	5.23±	5.31±
	1.22	1.00	1.12	1.29	0.93 ^b	0.95
50ml	4.85±	5.15±	5.31±1.	5.85±	6.77±	6.23±
	0.80	0.90	44	1.46	1.01 ^a	0.83

¹⁾Mean±Standard deviation ,Values with different letters in the same column are significantly different by multiple range test. *P<0.001. Sensory scores were assessed on 9 point hedonic scale where 1 = extremely bad or slight, 10 = extremely good or much

Table 11은 저장 7일차의 관능검사 중 조리육의 경우에는 연화도면에서 유의적인 차이가 나타났으며(P<0.001), 50ml칼슘을 처리한 군이 6.77점으로 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 대조구와 25ml 칼슘처리구에서 각각 5.42, 5.23으

로 유의적으로 낮은 값을 나타내었다. 하지만 대조구와 25ml처리한 군과는 유의적인 차이가 없었다. 저장 7일차 때의 조리육 육색의 선호도를 볼 경우 25ml 처리군이 5.00점으로 가장 좋게 평가됐으며, 대조구 및 50ml칼슘 처리군이 각각 4.69 4.85를 나타내어 다소 낮은 값을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 조리육의 향기는 50ml처리한 군이 5.15로 다른 두 시험구보다 높게 나타났으나 유의적인 차이는 발견되지 않았다. 조리육의 풍미 측면에서는 대조구가 5.38점으로 가장 좋게 평가되었다. 다즙성의 경우 50ml처리한 군이 5.85점으로 가장 높게 평가되었으나 유의적인 차이는 발견되지 않았다.

저장 7일차 때의 조리육의 연도의 경우 50ml 칼슘처리군이 가장 높은 6.77로 나타났으며, 대조군과 25ml 처리군이 상대적으로 낮은 5.42, 5.23점으로 다소 낮은 점수를 나타내었다. 조리육의 종합적 기호도는 50ml처리한 군이 6.23점으로 가장 높게 나타났으며, 대조군이 5.38, 25ml칼슘처리군이 5.23으로 다소 낮았으나 유의적인 차이는 발견되지 않았다.

(3) 저장 14일차의 신선육 관능검사

Table 12. Sensory characteristics¹ stored 14 day of fresh beef loins stored injected Ca²⁺-liposome before slaughter.

	color**	aroma	acceptability* ²⁾
con-loin	5.08±0.86 ^{c1)}	3.23±1.42	5.77±1.01 ^b
25ml	7.69±0.63 ^a	3.08±1.32	7.69±1.84 ^a
50ml	6.33±1.40 ^b	3.27±1.28	6.07±2.02 ^b

¹⁾Mean±Standard deviation, Values with different letters in the same column are significantly different by multiple range test.

* P<0.01 ; ** P<0.001

Sensory scores were assessed on 9 point hedonic scale where 1 = extremely bad or slight, 10 = extremely good or much

Table 12는 저장기간 14일차의 신선육의 관능검사결과의 결과는 표 3과 Figure 3에 나타나있다. 신선육의 육색의 선호도 면에서는 각 처리군간 별로 유의적인 차이를 나타내었다($P<0.001$). 25ml 처리한 군이 7.69점으로 가장 좋게 평가되었으며, 다음으로 대조구와 50ml 칼슘처리군으로 각각 5.08, 6.33으로 25ml 처리군보다 유의적으로 낮은 값을 나타내었다($P<0.001$).

신선육의 향기 측면에서는 대조구가 3.23점, 25ml 처리구가 3.08, 50ml 처리구가 3.27로 나타났으며, 이들 각 처리군간에는 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 종합적 기호도면에서는 25ml 처리군이 7.69점으로 유의적으로 가장 높은 수치를 나타내었으며, 대조구가 5.77, 50ml 칼슘처리구가 6.07로 낮은 수치를 나타냈다($P<0.05$). 하지만 대조구와 50ml 처리구 사이에서는 유의적인 차이가 발견되지 않았다

(4) 저장 14일차의 조리육 관능검사

Table 13 Sensory characteristics¹ stored 14 day of fresh beef loins stored injected Ca^{2+} -liposome before slaughter.

	color**	aroma*)	flavor**	juiciness**	tenderness**	acceptability**
con	3.80±	4.53±	4.60±	4.13±	5.53±	4.40±
	0.86 ^{b1)}	1.42 ^b	1.01 ^b	0.86 ^c	1.55 ^b	1.40 ^b
25ml	6.57±	6.00±1.	5.93±	5.20±	5.80±	6.17±
	0.82 ^a	56 ^a	1.39 ^a	1.37 ^b	1.26 ^b	1.38 ^a
50ml	5.97±	6.60±1.	6.90±	7.03±	7.87±	7.07±
	1.40 ^a	28 ^a	2.02 ^a	1.32 ^a	1.06 ^a	1.17 ^a

¹⁾Mean±Standard deviation ,Values with different letters in the same column are significantly different by multiple range test

* $P<0.001$; ** $P<0.01$.

Sensory scores were assessed on 9 point hedonic scale where 1 = extremely bad or slight, 10 = extremely good or much

Table 13는 저장 14일차의 조리육의 비교는 표4와 그림 4에 나타나 있다. 14일차 조리육의 경우에는 육색에 대한 기호성, 풍미의 기호성, 다즙성, 연화정도, 종합적기호도에서 처리구간별로 고도의 유의적인 차이를 나타내었으며 ($P<0.001$), 향기성분도 처리구간 내에서 $P<0.01$ 의 수준으로 유의적인 차이를 나타내었다.

먼저 육색의 기호도의 경우 25ml 칼슘처리구와 50ml 칼슘처리구에서 각각 6.57, 5.97로 유의적으로 높은 점수를 나타내었다($P<0.001$). 하지만 처리구간 내의 유의적인 차이는 발견되지 않았다. 조리육의 향기성분의 관능검사 결과의 경우 두 칼슘 처리구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타냈으며, 처리구간내의 유의적인 차이는 발견되지 않았다. 풍미성분의 기호성에 있어서는 두 처리구 즉 25ml 칼슘처리구와 50ml 칼슘처리구가 각각 6.00점, 6.60점으로 대조구에 비해 유의적으로 높은 수치를 나타내었으며, 대조구가 유의적으로 낮은 값이 4.53점을 나타내었다($P<0.001$). 다즙성 면에서는 처리구 50ml 칼슘처리구가 7.03점으로 가장 높게 평가되었고, 다음으로 25ml 칼슘처리구가 5.80점이었으며, 마지막으로 대조구가 4.13점으로 가장 나쁜 점수를 받았다. 이는 조리 중에 육조직 내에서 유리수의 결합능은 감소시키나 결합수나 고정수의 결합능에는 처리구가 영향을 적게 미치는 것으로 생각된다. 연화정도에 따른 관능검사의 경우 50ml처리한 군이 7.87점으로 유의적으로 가장 높은 점수를 받았고 대조구와 25ml 칼슘처리구가 각각 5.53점, 5.80점으로 점수를 나타내어 고도의 유의성인 $P<0.001$ 의 유의차이를 보였다. 하지만 대조구와 25ml 처리구간에는 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 실험의 결과 50ml 칼슘 처리구가가 쇠고기의 연화에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

저장 14일차의 조리육의 종합적 기호도 면에서는 50ml처리한 군이 7.07로 가장 높게 평가되었으며, 25ml 칼슘처리구에서도 높은 수치인 6.17점을 받다 상대적으로 낮은 대조구 4.40 월등히 높은 기호성이 있음을 알 수 있었다($P<0.001$). 하지만 처리구간내의 유의성은 발견되지 않았다. 다음 Figure 16, 17, 18, 19는 관능검사에 대한 분석을 정량적 묘사분석에 의해 표시한 그림이다.

(5) QDA(정량적 묘사분석)에 의한 관능적 품질특성 분석

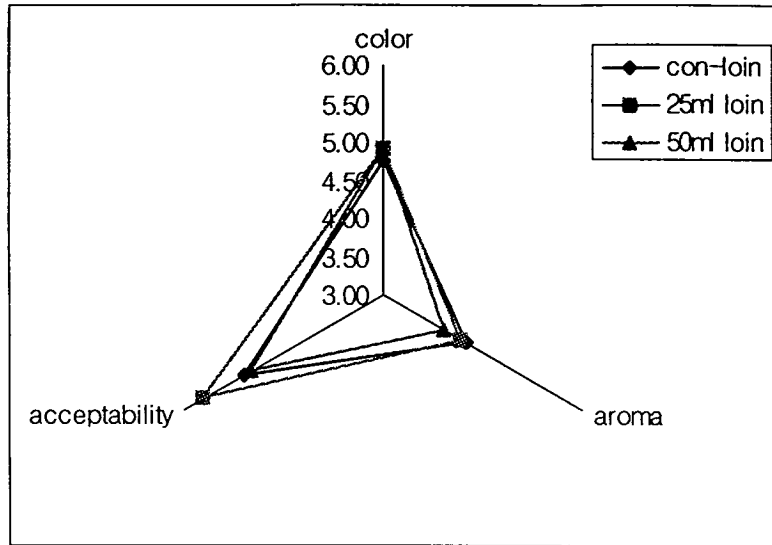


Figure 17. Change in QDA profiles of fresh beef loin at different Ca conditions(control, 25ml, 50ml) for 7 days

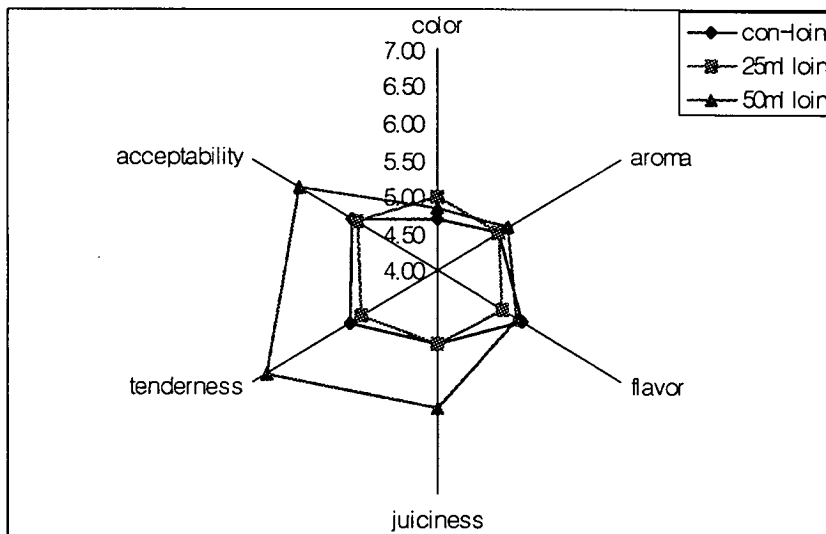


Figure 18. Change in QDA profiles of cooking beef loin at different Ca conditions(control, 25ml, 50ml) in 7 days

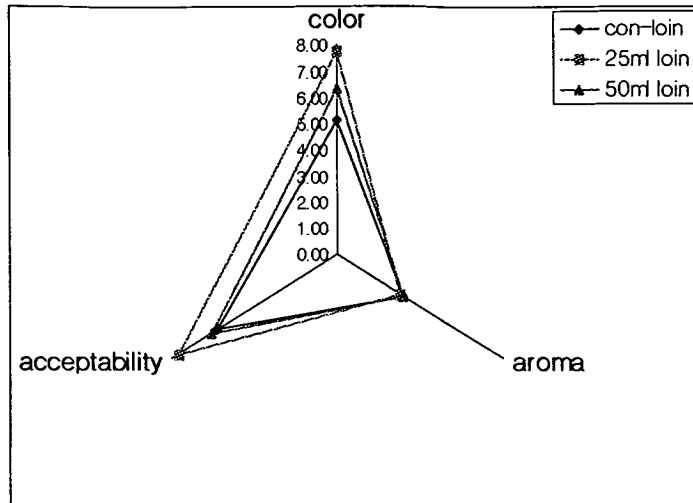


Figure 19. Change in QDA profiles of fresh beef loin at different Ca conditions(control, 25ml, 50ml) in 14 days

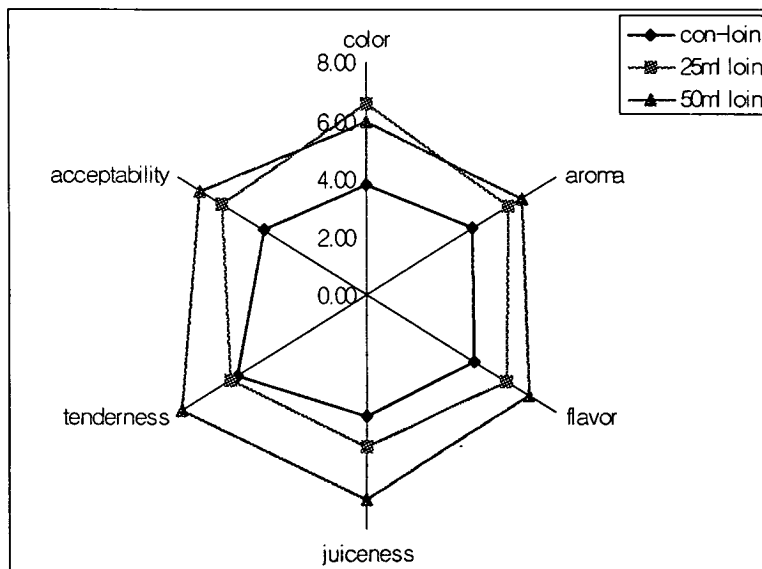


Figure 20. Change in QDA profiles of cooking beef loin at different Ca conditions(control, 25ml, 50ml) for 14 days

8) 육의 특성간 상관계수(Correlation: R^2) 비교.

1. 단백질 변패도와 전단력과의 비교

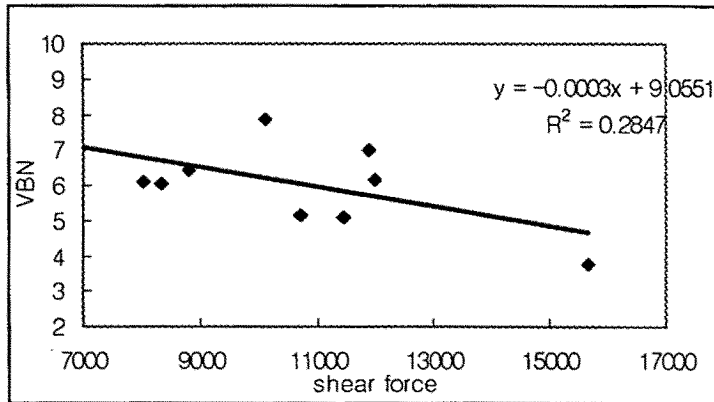


Figure 21. The correlation between VBN value and shear force value of beef during storage.

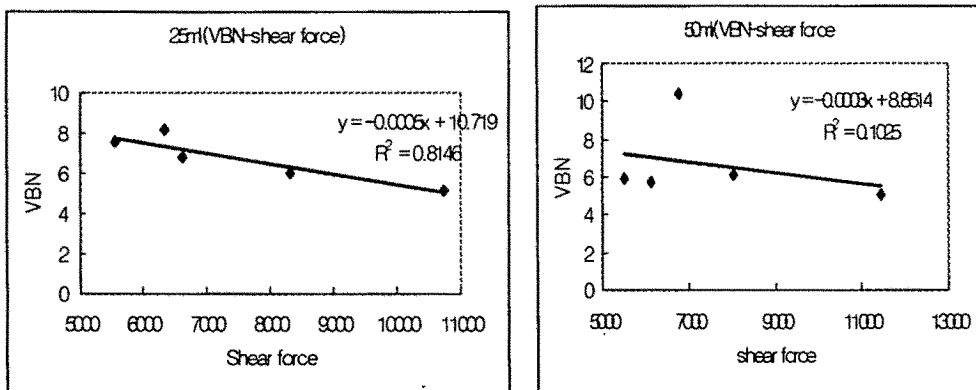


Figure 22. The correlation between VBN value and shear force value of beef Ca^{2+} -liposome injected Han-woo during storage. (left = 25ml, right = 50ml)

Figure 21. 은 저장기간별 VBN 수치와 전단력과의 상관관계(R^2)를 그림으로 나타낸 것이다. 그림에서 보듯이 VBN수치와 전단력과의 상관도(R^2)값은 0.28이었다. 이때의 회귀식은 $Y = -0.003X + 9.2551$ 이었다. 대조구간의 비교에 있어 VBN 수치와 전단력과의 상관관계(R^2)는 0.6647이었으며 상관 회귀식은 $Y = -0.0005X + 11.9151$ 이었다. Figure 22의 왼쪽은 25ml 처리군의 VBN 수치와 전단력과의 상관도(R^2)를 나타낸 것인데, 0.8146로 높은 상관도를 나타내었으며, 회귀식은 $Y = -0.005X + 10.719$ 였다. Figure 22의 오른쪽 그림은 50ml 혈관주사군에서의 VBN과 전단력과의 상관관계는 0.1025였으며, 회귀식은 $Y = -0.0003X + 5.8874$ 였다.

9) 소편화율 측정

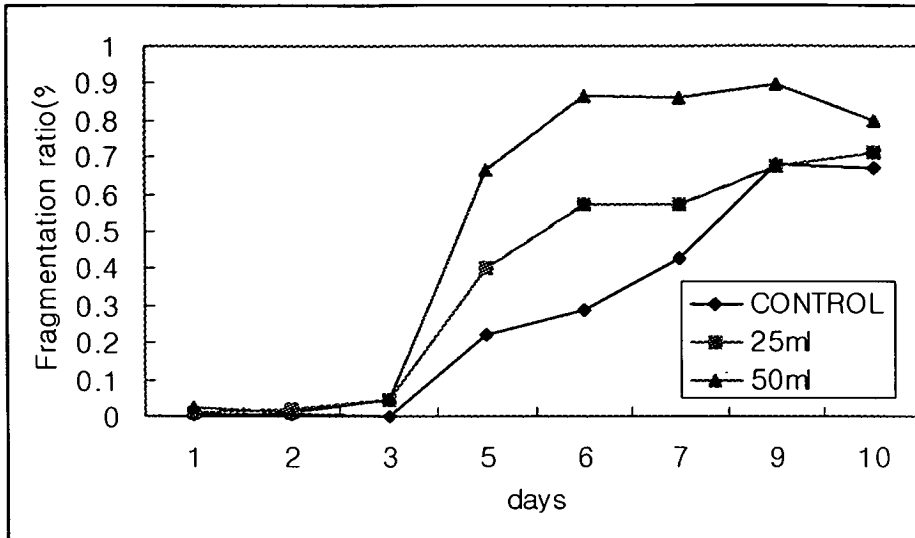


Figure 23. Fragmentation ratio(<4 myofibrils/ total myofibrils) of myofibrils during post-mortem ageing (n=8)

Figure 23는 근원섬유의 소편화율 그래프로 나타낸 것이다. 대조구에 있어 1, 2, 3 일의 경우 각각 0.01% 정도로 낮게 나타났으며, 처리구의 경우에도 0.1~0.3으로 아주 낮은 소편화율을 보였다. 하지만 대조구에 비해 저장 3일차에 유의적으로 처리구가 높은 수치를 나타내었다 ($P < 0.01$). 5일차에서 10일차 사이에는 전체적으로 처리구와 대조구가 많은 소편화율 격차를 나타냈다. 대조구의 경우 5, 6, 7, 9, 10이 각각 0.22%, 0.29%, 0.43%, 0.68%, 0.77%로 저장기간이 증가함에 따라 소편화율이 증가하였으며, 6일부터 급격히 소편화가 증가함을 알 수 있었다. 25ml 처리구의 경우 5일부서의 각각의 저장기간에 0.40%, 0.57%, 0.57%, 0.68%, 0.71%로 변화하는 추세를 보였으며, 50ml의 경우 0.67, 0.87, 0.86, 0.90, 0.80으로 변화하는 추세를 보였다. 각 저장기간마다 대조구와 처리구간은 유의적인 차이를 보였다($P < 0.001$)

10) SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질의 분해정도 비교검토

Honikel(1987)는 고기의 pH가 높으면 드립 발생이 적으며 높은 pH에서는 완만 해동이라도 드립이 거의 생기지 않는다. 그러나 pH가 낮으면 고기 단백질의 등전점에 가까워 단백질의 변성이 쉽게 일어나고 보수력이 감소하기 때문에 드립의 발생이 높다고 보고하였다. 드립 발생은 근질의 수축에 의한 근육 미세구조의 변화에 의한 것으로 근육, 근절(sarcomere)의 수축과 드립 발생은 관련성이 높아 근원섬유가 수축되면 될수록 근섬유 내부 공간이 좁아지면서 내부에 존재하는 수분이 외부로 이동되어 이러한 수분들은 쉽게 드립의 형태로 손실되며 사후 육의 pH가 감소되어 보수력이 감소하게 된다(Hamm, 1982).

Table 14는 숙성기간중의 myofibril cytoskeletal의 감소시간을 표시한 표인데, 대조구, 칼슘혈관투여 처리한 한우의 등심은 시간경과에 따라 각각 조제한 근원섬유를 SDS-PAGE에 공시한 결과, 고기의 연도에 밀접하게 관련하는 구조단백질인 connectin(titin)과 nebulin의 분해 pattern에 있어 상당한 차이를 나타내었다. Myosin filament와 Z선을 연결하는 역할을 하고, 높은 탄성을 가지는 connectin(2,800kDa)은 완전분해에 소요되는 기간이 대조구가 5일 이상 소요되는 반면 칼슘혈관 투여 시 3-4일 사이에 완전히 분해되었다. Z선에 존재하며 전 근원섬유 단백질의 5%가량 차지하는 nebulin(600~900kDa)은 대조구가 7일 이상 소요되는 반면 칼슘혈관 투여 시에는 5에 완전분해가 이루어 졌다.

Table 14. Disappearance time of myofibril cytoskeletal protein during post-mortem ageing

	Disappearance time(days)	
	Connectin(Titin)	Nebulin
Control	6-7	6-7
25ml Ca injection	3-4	3
50ml Ca injection	3-4	3

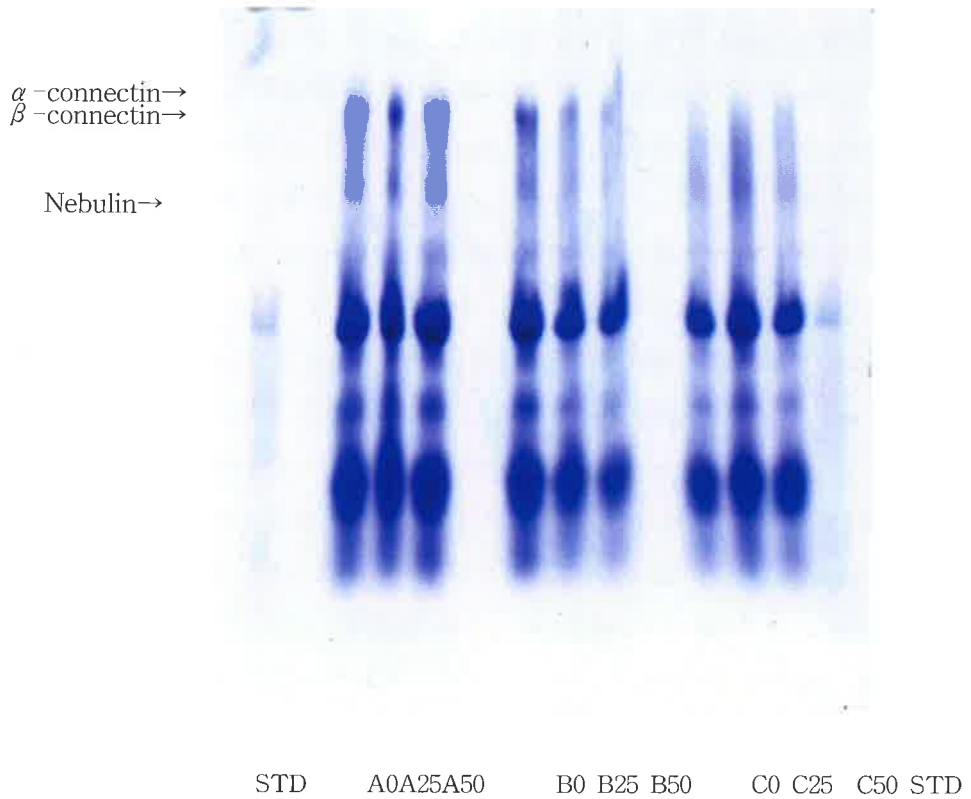


Figure 24. Post-mortem changes in SDS-polyacrylamide gel electrophoretic of cytoskeletal protein in beef loin. Samples were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (A: Control, B: Ca^{2+} injection, 2% polyacrylamide - 0.5% agarose gel) STD=standard, A= storage 1st day, B = storage 3th day, C storage 7th day.; 0 = control, 25 = 25ml treatment, 50 =50ml treatment,

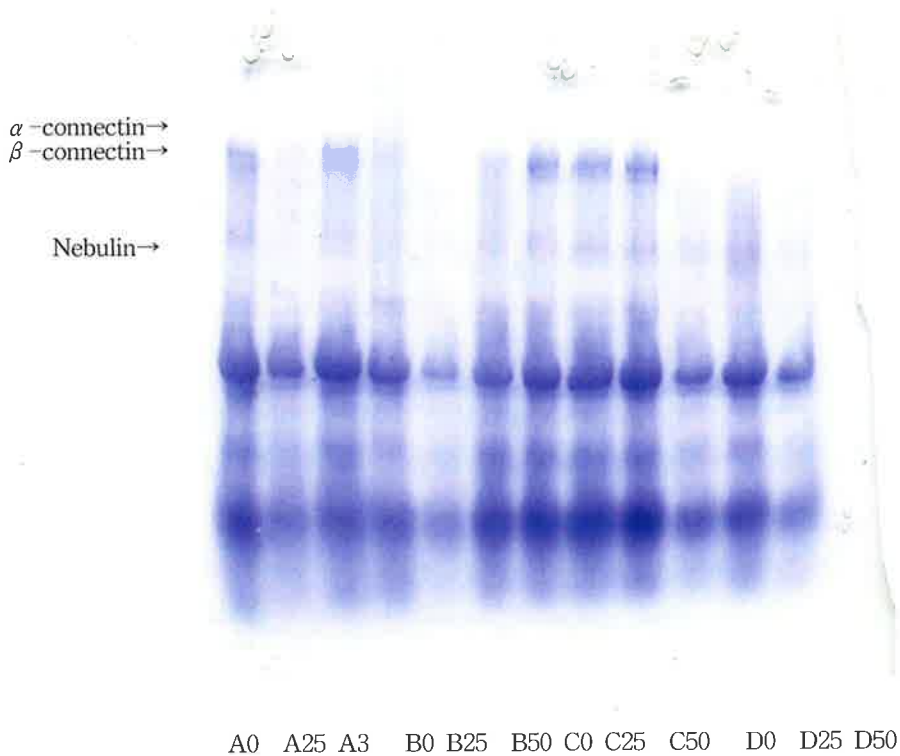


Figure 25. Post-mortem changes in SDS-polyacrylamide gel electrophoretic of cytoskeletal protein in beef loin. Samples were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (A: Control, B: Ca^{2+} injection, 2% polyacrylamide - 0.5% agarose gel). A= storage 1st day, B = storage 3th day, C = storage 5th day, D =storage 8th day ; 0 = control, 25 = 25ml treatment, 50 =50ml treatment,

Figure 24와 25는 저장기간별 단백질의 전기영동 사진이다. 저장 1일차에는 모든 시험구에서 α -connectin 및 β -connectin 이 보인다. 하지만 저장 3일차와 7일차의 대조구는 α -connectin 및 β -connectin 이 아직 남아 있으나, 처리구에서는 α -connectin 및 β -connectin 은 3-4일경에 분해되었다. 또한 Nebulin의 경우 1일차의 경우 모든 시험구에서 보이거나 저장 3일차에 대조구에만 남아 있고 처리구 25ml와 50ml에선 사라졌음을 볼 수 있다.

Taylor 등(1995)은 전자현미경으로 관찰한 결과 도축 후 4°C에서 3~4일 저장했을 때 connectin(titin)와 nebulin이 있는 N₂-line이 붕괴되는 것이 관찰되었다고 하였다. Takahashi 등(1992)은 rabbit skeletal muscle myofibrils은 염화칼슘처리에 의해 α -connectin이 β -connectin와 1,200kDa의 분자단편으로 분해되었다고 했다. 또한 Tatsumi 와 Takahashi (1992)은 chicken breast muscle myofibrils을 0.1mM의 염화칼슘에 의해 처리하면 분자량 200, 180, 40, 33, and 23 kDa으로 단편화되어 180kDa 성분이외에는 모두 근원섬유로부터 유리된다. 이러한 현상 역시 식육의 숙성 중에 근형질의 칼슘이온 농도가 0.2mM로 상승하면 nebuline에 칼슘이온이 다량 결합하여 단편화하는 것으로 생각된다. Fei 등(1999)은 도축 후 칼슘이온이 증가함에 따라 β -connectin에서 paratropomyosin 이 방출되며 이는 식육의 연도에 영향을 미친다고 하였다. 칼슘이온의 증가는 구조단백질인 connectin과 nebulin의 분해를 촉진하는데 이는 사후 고기의 연도에 중요한 역할을 하게된다.

11) 육의 조직 촬영 및 소편화도

근원섬유의 소편화율은 근원섬유 구조인 Z-line의 약화정도를 나타내는 것이다. 아래의 그림들을 보면 대조구는 5일 이후에 소편화 현상이 일어나고 있으나, 처리구는 3일 이후부터 완전 분해됨을 알 수 있었으며, 9일 이후에는 완전 조직이 와해됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 근소포체로부터 근형질의 칼슘 유출이 빠르게 진행되었고 상승한 근형질의 칼슘이온에 작용으로 Z-line이 약화되어 근원섬유 조제시의 물리적인 충격에 쉽게 절단된 것을 의미한다.

이 연구는 식육으로 적용이 가능하며 식육연화를 위한 칼슘 상승제 보급으로 현장, 산업계, 학계가 유기적으로 고급식육의 생산을 위하여 연계될 수 있다. 식육소비의 확대는 곧 국민 식생활 개선과 건강증진에 직결된다. 또한 liposome을 이용한 무기질의 전달체계 확립으로 동물 나아가서 인체에 필요한 유효성분의 공급에 유효한 연구 결과를 제공한다. 아래의 Figure 26~36은 저장기간 동안의 조직 변화도를 사진으로 나타낸 것이며, Figure 37~49는 소편화도의 변화를 그림으로 나타낸 것이다. 저장 3일부터 처리구의 결합조직이 변화하기 시작했으며, 5일 이후에는 완전히 분해됨을 볼 수 있었다.

(photograph of sacoplasm tissue)

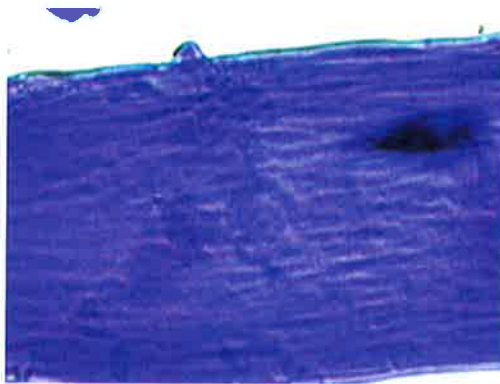


Figure 26. Micrographs displaying the fragmentation of control myofibrils stored at 3 day

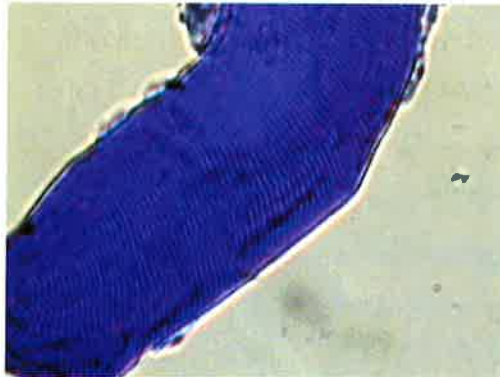


Figure 27. Micrographs displaying the fragmentation of 25ml treatment myofibrils stored at 3 day



Figure 28. Micrographs displaying the fragmentation of 50ml treatment myofibrils stored at 3 day

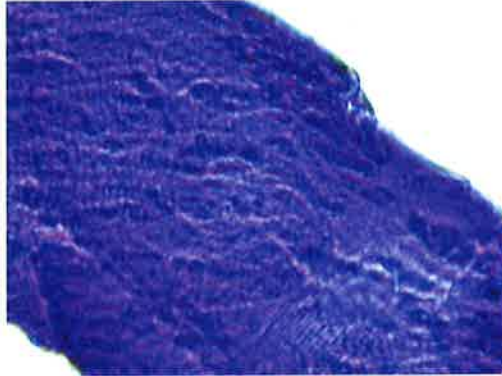


Figure 29. Micrographs displaying the fragmentation of control myofibrils stored at 5 day

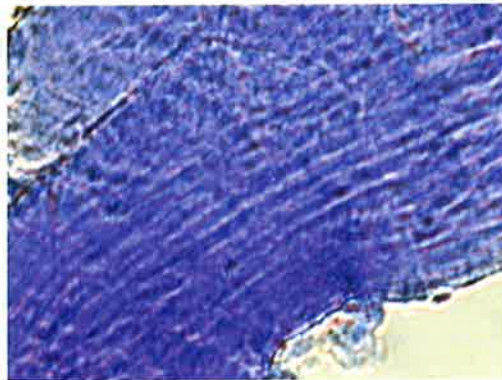


Figure 30. Micrographs displaying the fragmentation of 25ml myofibrils stored at 5 day



Figure 31. Micrographs displaying the fragmentation of 50ml control myofibrils stored at 5 day

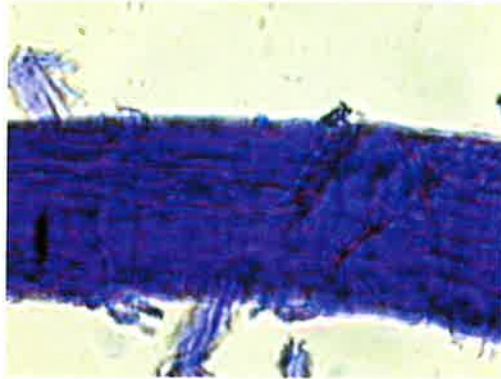


Figure 32. Micrographs displaying the fragmentation of control myofibrils stored at 7 day

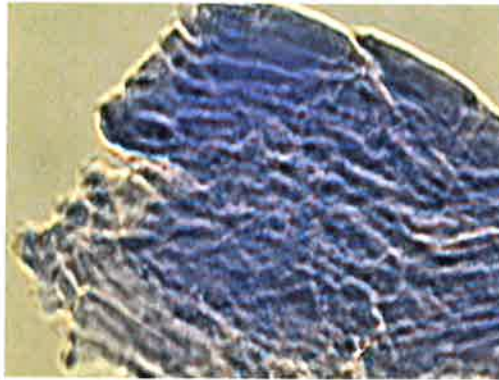


Figure 33. Micrographs displaying the fragmentation of 25ml myofibrils stored at 5 day

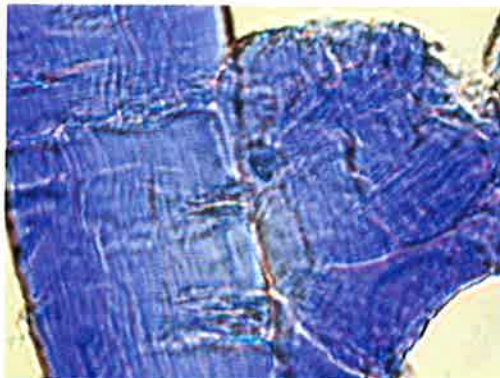


Figure 34. Micrographs displaying the fragmentation of 25ml myofibrils stored at 7 day

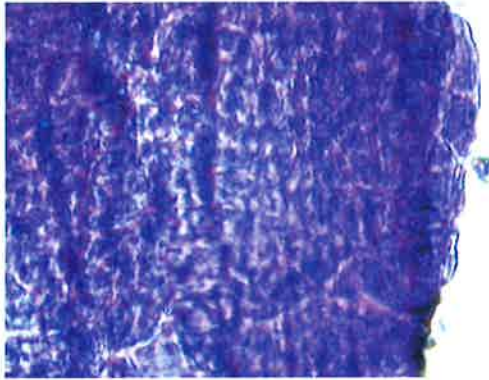


Figure 35. Micrographs displaying the fragmentation of control myofibrils stored at 10 day

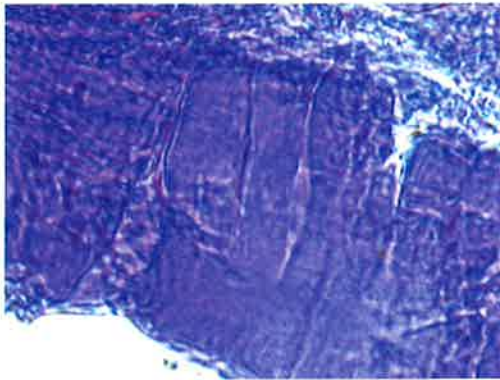


Figure 36. Micrographs displaying the fragmentation of 25ml myofibrils stored at 10 day

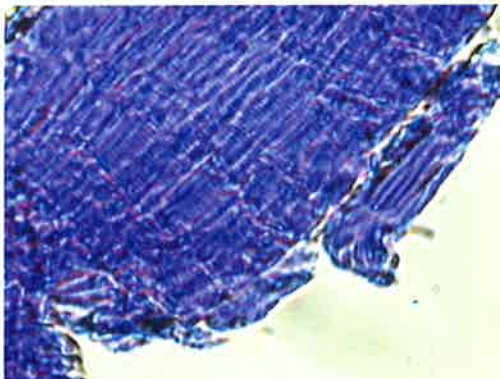


Figure 37. Micrographs displaying the fragmentation of 50ml myofibrils stored at 10 day

(photograph of fragmentaion)

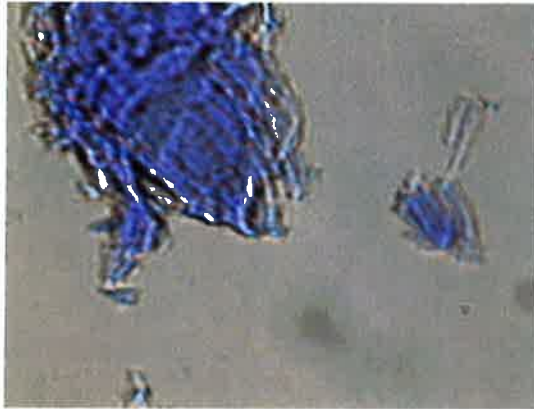


Figure 38. Micrographs displaying the fragmentation of control myofibrils stored at 3 day



Figure 39. Micrographs displaying the fragmentation of 25ml myofibrils stored at 3 day

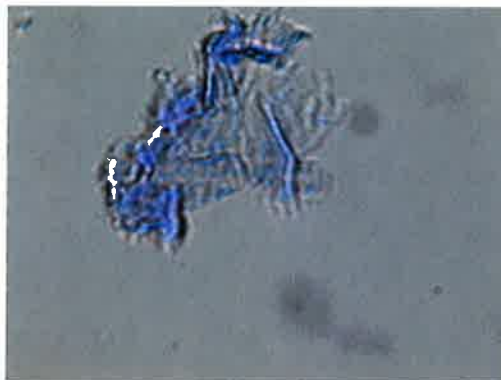


Figure 40. Micrographs displaying the fragmentation of 50ml myofibrils stored at 3 day

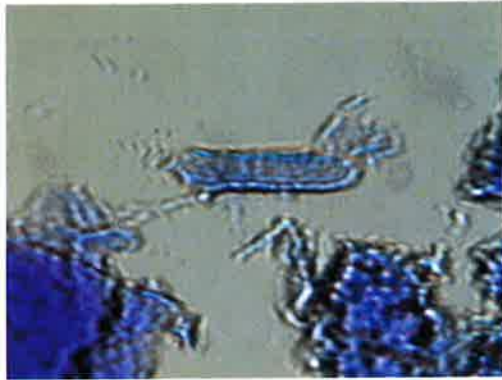


Figure 41. Micrographs displaying the fragmentation of control myofibrils stored at 5 day

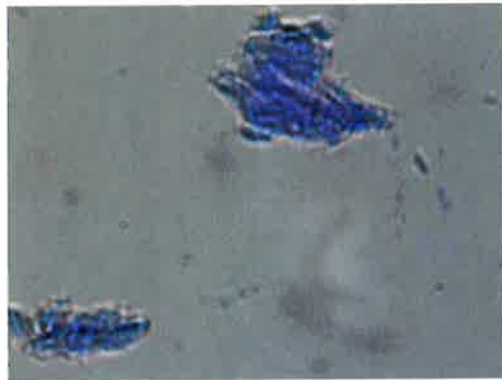


Figure 42. Micrographs displaying the fragmentation of 25ml myofibrils stored at 5 day

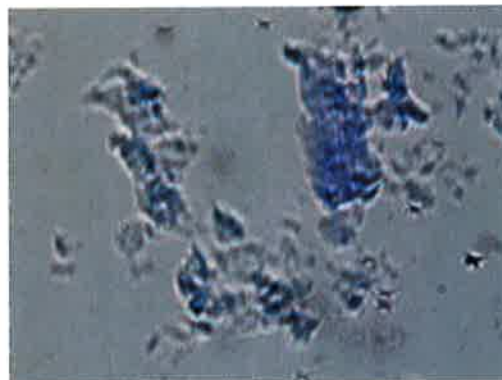


Figure 43. Micrographs displaying the fragmentation of 50ml myofibrils stored at 5 day

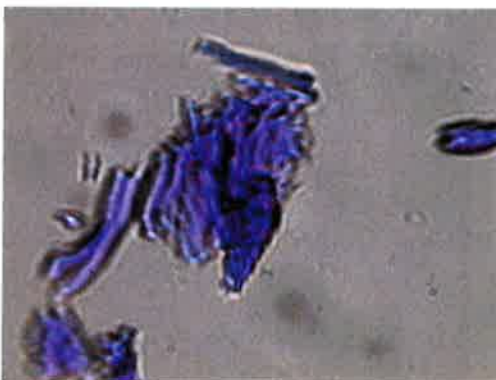


Figure 44. Micrographs displaying the fragmentation of control myofibrils stored at 7 day

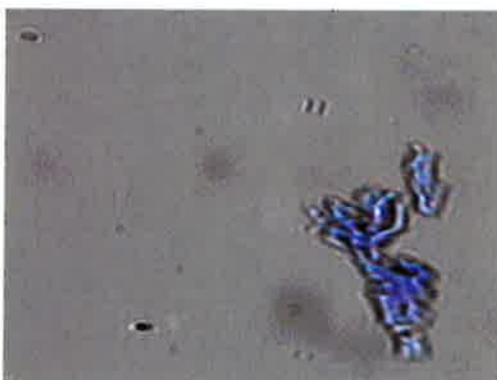


Figure 45. Micrographs displaying the fragmentation of 25ml myofibrils stored at 7 day



Figure 56. Micrographs displaying the fragmentation of 50ml myofibrils stored at 7 day



Figure 57. Micrographs displaying the fragmentation of control myofibrils stored at 10 day

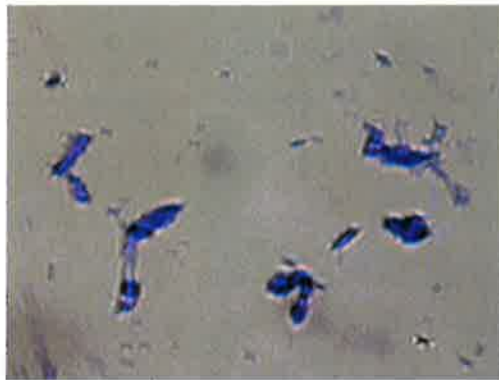


Figure 48. Micrographs displaying the fragmentation of 25ml myofibrils stored at 10 day



Figure 49. Micrographs displaying the fragmentation of 50ml myofibrils stored at 10 day

제 3 절 결 론

phosphatidyl choline(PC)을 이용한 식육의 연화실험은 도축후의 식육이 사후 경직에 의하여 질기고, 보수성 및 풍미가 저하되지만 일정기간의 숙성을 통하여 육질이 연화되며 보수성 및 풍미도 개선된 고품질의 식육으로 변환한다. 식육의 연화는 칼슘이온에 의해 근원섬유 구조가 약화되는 현상으로 숙성기간 중 고농도로 상승한 칼슘이온이 Z-line, actin-myosin간 경직결합, connectin filament 및 nebulin filament를 약화시키기 때문이다. 고품질의 식육생산을 위하여 숙성기간이 (2~4℃로 숙성시킬 때) 10일 이상의 기간이 필요한 것으로 알려져 있는데, 현재 우리나라의 경우 도축 후 충분한 숙성기간을 두지 않고 유통되는 경우가 많다. 도축 후의 근형질 칼슘이온 농도를 조속히 상승시켜 숙성기간을 두지 않고도 품질이 좋은 식육을 생산하는 기술은 식육숙성을 위한 공간배제 및 숙성실의 저온유지에 따른 에너지의 절감효과도 동반되기 때문에 고품질의 식육을 값싸게 소비자에게 공급할 수 있고, 식육의 소비확대 등의 여러 가지 차원을 고려하여 본 실험을 실시하였다.

20mg의 phosphatidyl choline(PC)을 ether에 용해한 후 PBS(phosphate-buffered saline)용액을 빠르게 사출하여 Liposome을 조제하며, 2M의 calcium in PBS를 이용하여 liposome을 만드는 것이 알맞았다.

칼슘혈관 투여시 소동물의 경우 3~4일 사이에 완전히 분해되었고, Nebulin의 경우에는 대조구가 3~4일 이상 소요되는 반면 처리구는 0~1일 사이에 완전분해가 이루어졌다. 대동물의 경우 소편화도에 의한 비교시 처리군의 α -connectin 및 β -connectin 이 3-4일에 분해되어 대조군보다 월등히 연화에 높은 효과를 보였다. 또한 대동물의 물리화학특성에 악영향은 없으며 오히려 관능 검사나 전단력같은 연도 실험에서 연도가 급격히 증가하였으며, 연도의 증가로 인한 소비자의 선호도가 상승함을 알 수 있었다. 향후 본 실험은 근육 내 칼슘농도의 증가가 저장기간이 증가할수록 증가하는 것을 토대로 도축 7일전에 실시할 경우 더 좋은 효과가 있을 것으로 기대되며, 본 실험의 Knowhow를 통한 보다 편리한 연화 키트의 개발에 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

제 4 장 참고 문헌

- Akira, W. and Carrick, D. 1996. Effect of meat ultimate pH on rate of titin and nebulin degradation. *Meat Sci.* 42: 407-413
- Benito-Delgado, Marriott, N. G., Claus, J. R., Wang, H., and Graham, P. P. 1994. Chuck longissimus and infraspinatus muscle characteristics as affected by rigor state, blade tenderization and calcium chloride injection. *J. Food Sci.* 59: 295.
- Berry, B. W., Joseph, R. L., and Stanfield, M. S. 1996. Use of electrical stimulation, hot processing and carrageenan for processing low-fat ground beef patties. *Meat sci.* 42: 111-123.
- Chanturiya, A., Scaria, P. Woodle M. C. 2000. The role of membrane lateral tension in calcium-induced membrane fusion. *J. Mem. Bio.* 176: 67-75.
- Chen, T. C. and Wailmaleongora-ek, C. 1981. Effect of pH on TBA values of ground raw poultry meat. *J. Food Sci.* 46:1946
- Choi, Y. I., Kastner, C. L. and Kropf, D. H., 1987. Effects of hot boning and various levels of salt and phosphate on microbial, TBA, and pH values of preblended pork during cooler storage. *J. Food Prot.* 50(12):1037-1043
- Cottin, P., Poussard, J. P., Desmazes, D., Georgescauld, H., and Ducastaing, A. 1991. Free calcium and calpain I activity. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1079: 139-140.
- Cécile B. B., and Marion L. G. 1998. Effect of postmortem storage on the Z-line Region of titin in bovine muscle. *J. Anim. Sci.* 76: 1034-1044.
- Dahle, L. K., Hill, E. G. and Holman, R. T. 1962. The thiobarbituric acid

- reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch. Biochem. Biophys.* 98:253
- Deamer, D. W. and Bangham, A. D. 1976. Large volume liposomes by an ether vaporization method, *Biochim. Biophys. Acta.* 443: 629.
- Deymer, D. I. and Veandekerckhove, P. 1979. Compounds determining pH in dry sausage. *Meat Sci.* 3:161
- Dransfield, E. 1995. Alteration of post-mortem ageing in beef by the addition of enzyme inhibitors and activators. *Meat Sci.* 41: 163-178.
- Dransfield, E., Ledwith, M. J. and Taylor, A. A. 1991. Effect of electrical stimulation, hip suspension and ageing on quality of chilled pigmeat. *Meat Sci.* 29:129.
- Etlinger, J. D., Zak, R., and Fischman, D. A. 1976. Compositional studies of myofibrils from rabbit striated muscle. *J. of Cell Biology.* 68: 123
- Fei, S., Yamanoue, M., and Okayama, T. 1999. Interaction of paratropomyosin with beta-connectin and its 400-kilodalton fragment from chicken skeletal muscle as influenced by the calcium ion concentration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 1425-1432
- Hamm, R. 1974. Water holding capacity of meat. In *Meat*. The Worth Press, London
- Hamm, R. 1982. Post-mortem changes in muscle with regard to processing of hot-boned beef. *Food Technol.* 37:86
- Hattori, A. and Takahashi, K. 1982. Calcium-induced weakening of skeletal muscle Z-disks. *J. Biochem.* 92: 381-90.
- Hattori, A. and Takahashi, K. 1988. Localization of paratropomyosin in skeletal muscle myofibrils and its translocation during postmortem storage of muscles. *J. Biochem.* 103: 809-814.

- Honikel, K. O. 1987. How to measure the water holding capacity of meat
Recommendation of standardized methods. In Evaluation and Control of
Meat Quality in Pigs. Tarrant, P. V., Eikelenboom, G. and Monin, G.,
Marttinus Nijhoff, Dordrecht, p. 129
- Hwan, S. F., and Bandman, E. 1989. Studies of desmin and α -actin
degradation in bovine semitendinosus muscle. *J. Food Sci.* 54,
1426-1430.
- Jain, M. K., and Wagner, R. C. 1980. Introduction to biological membranes.
Wiley. NY.
- Jeremiah, L. E., Greer, G. G., and Dilts, B. D. 1997b. Influence of
hot-processing and electrical stimulation on the bacteriology and retail
case-life of vacuum packaged lamb. *Food. Res. Internl.* 30: 281-286.
- Jeremiah, L. E., Tong, A. K. W., and Gibson, L. L. 1997a. Hot-processing
and elevated temperature conditioning influence on lamb cooking
properties, palatability, attributes, and consumer acceptance. *Food.
Res. Internl.* 30: 45-53.
- Juliano, R. L. 1983. Interactions of proteins and drugs with liposomes. In
Liposomes. Ostro, M. J. (Ed.), Marcel Dekker, Inc. 53-86.
- Kauffman, R. G., Carpenter, Z. I., Bray, R. W. and Hockstra, W. G. 1961.
pH of chilled aged and cooked pork as related to quality. *J. Anim. Sci.*
20:918
- Kim, S., and Marin, G. M. 1981. Preparation of cell-size unilamellar
liposomes with high captured volume and defined size distribution.
Biochimica et biophysica Acta. 646: 1-9.
- Kim, S., Mttchell, S. T., Emil, Y. C. Shifea, S., and George, M. M. 1983.
Preparation of multivesicular liposomes, *Biochimica et Biophycica Acta.*

728: 339-348

- Koohmaraie, M., Babiker, A. S., Schroeder, R. A., Merkel, R. A. and Duston, T. R. 1988. Acceleration of post-mortem tenderization in ovine carcasses through activation of Ca^{2+} -dependent protease. *J. Food Sci.* 53:1638-1641.
- Lansdell, J. L., Miller, M. F. Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., and Ramsey, C. B. 1995. Post-mortem injection of calcium chloride effects on beef quality traits. *J. of Anim. Sci.* 73: 1735-1740.
- Lawrie, R. A. 1985. Meat science(fourth edition). Pergamon press. 86-91.
- Locker, R. H. and Hagyard, C. J. 1963. A cold shortening effect in beef muscle, *J. Sci. Food. Agric.* 14: 787-793.
- MacFarlane, J. J. 1985. High-pressure technology and meat quality, In Development in Meat Sci.(ed. Lawrie, R. A.), Elsevier, London, 155
- Maruyama, K. 1994. Connectin, an elastic protein of striated muscle. *Biophysical chemistry.* 50: 73-85.
- Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S., Ohashi, K., Murakami, F., Handa, S., and Eguchi, G. 1977. Connectin, an elastic protein of muscle: characterization and function. *J. Biochem.* 82: 317-337.
- Maruyama, K., Natori, R. and Nonomura, Y. 1976. New elastic protein from muscle. *Nature.* 262: 58-60.
- Maureen, M. T. and Stefan, M. 1999. Spectroscopic detection of endovesiculation by large unilamellar phosphatidylcholine vesicles: effects of chlorpromazine, dibucaine, and safinol. *Bioorganic & medicinal chemistry.* 7: 1373-1379.
- Morgan, J. B., Miller, R. K., Mendez, F. M., Hale, D. S. and Savell, J. W.

1991. Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. *J. of Anim. Sci.* 69: 4469-4476.
- Morton, J. D., Bickerstaffe, R., Kent, M. P., Dransfield, E., and Keeley, G. M. 1999. Calpain-calpastatin and toughness in M. longissimus from electrically stimulated lamb and beef carcasses. *Meat Sci.* 52: 71-79
- Nishimura, T., Hattori, A., and Takahashi, K. 1996. Relationship between degradation of proteoglycans and weakening of the intramuscular connective tissue during post-mortem ageing of beef. *Meat Sci.* 42: 251-260
- Nishimura, T., Liu, A., Hattori, A., and Takahashi, K. 1998. Changes in mechanical strength of intramuscular connective tissue during postmortem aging of beef. *J. Anim. Sci.* 76: 528-532.
- Nisimura, T., Hattori, A., and Takahashi, K. 1995. Weakening of intramuscular connective tissue during conditioning of beef. *Meat Sci.* 39: 127-133.
- Papahadjopoulos, D., Vail, W. J., Jacobson, K., and Poste, G. 1975. Cochleate lipid cylinder formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 394: 483-491.
- Peter, J. B. 1986. Muscle as Food. Academic press, INC.
- Pisula, A., and Tyburey, A. 1996. Hot processing of meat. *Meat Sci.* 43: s125-s134.
- Polidori, P., Trabalza Marinucci, M., Fantuz, F., Renieri, C., and Polidori, F. 2000. Tenderization of wether lambs meat through pre-rigor infusion of calcium ions. *Meat Sci.* 55: 197-200.
- Pérez, M. L., Escalona, H., and Guerrero, I. 1998. Effect of calcium chloride marination on calpain and quality characteristics of meat from

- chicken, horse, cattle and rabbit. *Meat Sci.* 48: 125-134
- Rao, L. S. 1984. Preparation of liposomes on the industrial scale. *Liposome Technology*. G. Gregory(Ed.), CRC press, 1: 247-257
- Rao, M. V. and Gault, N. F. S. 1991. Acetic acid marinating-The rheological characteristics of some raw and cooked beef muscles which contribute to changes in meat tenderness. *J. Texture Studies*. 21: 455
- Regine, P., Cathi D., and Francis C. Szokr Jr. 1999. A simple in vitro model to study the release kinetics of liposome encapsulated material. *Journal of controlled release*. 56: 41-51.
- SAS. 2001. SAS/STAT Software for PC. Release 6.11, SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.
- Sinnhuber, R. O. and Yu, T. C. 1958. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. 2. The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technol.* 12:9
- Soeno, Y., Yajima, H., Kawamura, Y., Kimura, S., Maruyama, K., and Obinata, T. 1999. Organization of connectin/titin filaments in sarcomeres of differentiating chicken skeletal muscle cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 190: 125-131.
- Sorimachi, H., Kinbara, K., Kimura, S., Takahashi, M., Ishiura, S., SaSagawa, N., Sorimachi, N., Shimada, H., Tagawa, K., Maruyama, K., and Suzuki, K. 1995. Muscle-specific calpain, P94, responsible for lime girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin, through IS2, a P94-specific sequence. *J. Bio. Chem.* 270: 31158-31162.
- Szoka, F. Jr., and Papahadjopoulos, D. 1978. Procedure for preparation of liposome with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75: 4194-4198.

- Takahashi, K. 1996. Structural weakening of skeletal muscle tissue during post-mortem ageing of meat : the non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.* S67-S80.
- Takahashi, K. and Hattori, A. 1989. Alpha-actinin is a component of the Z-filament, a structural backbone of skeletal muscle Z-disks. *J. Biochem.* 105: 529-536
- Takahashi, K., Fukazawa, T., and Yasui, T. 1967. Formation of myofibrillar fragments and reversible contraction of sarcomeres in chicken muscle. *J. Food Sci.* 32: 409-423
- Takahashi, K., Hattori, A., and Kuroyanagi, H. 1995. Relationship between the translocation of paratropomyosin and the restoration of rigor-shortened sarcomeres during post-mortem ageing of meat - a molecular mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.* 40: 413-423.
- Takahashi, K., Hattori, A., Tatsumi, R., and Takai, K. 1992. Calcium-induced splitting of connectin filaments into beta-connectin and a 1,200-kDa subfragment. *J. Biochem.* 111: 778-782
- Tatsumi, R. and Takahashi, K. 1992. Calcium-induced fragmentation of skeletal muscle nebulin filaments. *J. Biochem.* 112: 775-779
- Tenzel, Rene, Aitcheson, and David, F. 1991. Preparation of uniform-size liposomes. US patent 5,000,887.
- Vail, W. J. and Stollery, J. G. 1979. Phase change of cardiolipin vesicle mediated by divalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta.* 551: 74.
- Wang, K., and Williamson, C. L. 1980. Identification of an N2-line protein of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3256.
- Witte, V. C., Krause, G. F. and Bailey, M. E. 1970. A new extraction for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during

storage. J. Food Sci. 35:582

Yeagle, P. L. 1993. The membranes of cells. 2nd ed., *Academic Press*, CA,

18

高坂和久. 1975. 肉製品の鮮度保持と測定. 食品工業. 18:257.

高坂和久. 1991. 畜産物の鮮度保持. 范波書房. p. 52

김병철, 박구부, 성삼경, 이무하, 이성기, 정명섭, 주선태, 최양일. 1998. 근육
식품의 과학, 선진문화사. 85-90.

박형기, 오홍록, 문윤희, 강종옥, 김언현, 김천제, 오동환, 신현길, 박태규, 하
정옥, 이근택, 이영진, 박창일, 이보영, 김안규, 문영덕. 1996. 식육의 과
학과 이용, 선진문화사. 142-167.