

한우 및 홀스타인육의 품종간 특이성분의 검색에 관한 연구

황보 식 · 이수원 · 임태진* · 정구용*

성균관대학교 생명공학연구소, *상지대학교 생명자원과학대학

Identification of Species-Specific Components between Hanwoo and Holstein Meat

S. Hwangbo, S. W. Lee, T. J. Rhim* and K. Y. Chung*

Faculty of Life Science and Technology, Sungkyungwan University

*College of Life Science and Resources, Sangji University

Abstract

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of muscles extracted with distilled water, saline solution, SDS or Triton X-100 showed similar protein patterns between Hanwoo and Holstein meat, indicating that SDS-PAGE technique may not be useful for the identification between Hanwoo and Holstein meat. Lectine blot analysis of muscle extracted with distilled water demonstrated that Hanwoo and Holstein meat had similar affinities for concanavalin A (Con A), *ricinus communis* agglutinin (RCA-120), *ulex europaeus* agglutinin (UEA-1) or peanut agglutinin (PNA) lectins. However, approximately 32.1 kDa component of Hanwoo meat showed high affinity for *dolichos biflorus* agglutinin (DBA) lectin. On the contrary, high molecular weight components of Holstein meat had the specific affinity for wheat germ agglutinin (WGA) lectin. Hanwoo meat-specific components were observed by lectin staining of heat-denatured meat at 100°C for 30 sec. Also, the component of heat-denatured meat at 100°C for 30 sec, which was slightly smaller than Hanwoo meat-specific component, was concentrated specifically in Holstein meat.

Key words : Hanwoo, meat-specific component, lectin staining, SDS-PAGE.

서 론

축종이나 품종간의 식별은 동물의 형태, 모색, 또는 체형 등 외모적 특징을 근거로 판별할 수 있으나, 도살 후 원료육 및 가열육의 가공형태로 전환될 경우 일반적인 관능적 방법으로는 그 식별은 거의 불가능하게 된다. 지금까지 보고된 바에 의하면, 외모 식별법, 형태학적 검사법^(1,2), 면역학적 방법^(3,4), 이화학적 방법⁽⁵⁾, 그리고 DNA 분석법^(6~9) 등으로 크게 나눌 수 있으며, 그 중에서 가장 일반적으로 사용되고 있는 방법은 육 단백질의 구성 성분의 차이를 전기영동으로 구분하고자 하는 것이었다^(10,11). 최근에는 예방 의학 또는 진단 의학 분야

에서 주로 사용되고 있는 면역 효소 측정법이 식품 검사에 응용됨으로써 천연 및 가열 변성된 단백질의 특이성을 인지하는 방법으로 활발히 연구되고 있다^(12,13). 또한 분자생물학 및 생명공학의 눈부신 발달에 따라 단백질 및 효소 차원에서 검출 곤란한 축종 및 품종 식별법에 유전자 분석 기법을 이용한 DNA 수준에서의 연구도 진행되고 있다^(7,14~16). 그러나, 기존에 연구되고 있는 분자생물학적인 방법은 genomic DNA의 보존상태에 크게 의존하며, 재현성에 있어서의 신뢰도에 문제가 있는 것으로 지적되고 있어 실용화되기까지는 해결하여야 할 점이 많다^(15,17).

최근 동물세포, 특히 포유동물에 있어서의 당단백질, 당지질 및 proteoglycan(muco 다당)의 당쇄에 활성이 강한 새로운 생물 활성이 계속적으로 발견되어, 당쇄가 핵산, 단백질에 이어 제3의 chain(鎖)으로써 인식되기 시작하고

Corresponding author : Ku-Young Chung, College of Life Science and Resources, Sangji University, Usan-dong, Woonju, Kangwondo, Korea.

있으며, 의학, 약학, 화학, 공학, 생물학, 그리고 농학 등의 다양한 연구 분야에 있어서도 크게 주목을 받기 시작하고 있다^(18~21). 당단백질의 당쇄는 일반적으로 단백질 중의 L-asparagine (Asn)과 L-serine (Ser), 또는 L-threonine (Thr) 등의 3종류의 아미노산에 결합되어 있다. L-Asn에 결합하는 당쇄는 L-Asn의 γ 위의 아미노기와 당쇄가 질소(N)를 매개로 결합하므로 N-결합 또는 Asn-결합 당쇄라 하며, L-Ser 또는 L-Thr과 결합하는 당쇄는 L-Ser 또는 L-Thr의 수산기와 당쇄가 산소(O)를 매개로 결합하므로 O-결합 당쇄라고 명명되고 있다^(22~24). N- 및 O-결합 당쇄는 그 단백질을 발현하는 품종에 따라 각각 다른 glycosyltransferase가 존재하거나 그 활성에 차이가 있어 매우 다양하게 생합성된다고 보고되어져 있으며^(25,26), 암 등의 종양이 발생하면 몇몇 전이효소의 활성이 바뀌고, 그에 따라 특성의 당을 많이 함유하는 당쇄가 생합성되며 이를 이용하여 질환의 유무를 검진하는 것도 가능하다는 것이 시사되어 있다^(27~30). 또한, 당쇄는 단백질이나 핵산과는 달리 여러 가지 물리적인 처리에도 안정하여(예를 들면, hydrazine으로 110°C에서 4시간 처리하여도 단백질은 거의 모두 분해되지만 당쇄는 분해되지 않음) 가열제표육의 품종식별에도 매우 유효하게 사용되리라 생각된다.

따라서 본 연구에서는 품종간 특이적으로 발현되고 있는 특이성분을 검색하고, 이를 이용하여 품종간 원료육을 식별하기 위하여 먼저 원료육의 처리방법을 비교 검토하였으며, 각종 lectin을 이용하여 한우육 및 홀스타인육간의 특이성분을 검증하기 위하여 실시하였다. 또한 각종 lectin과의 친화성을 비교 분석하여 품종간의 구성 단백질 및 당쇄의 구조를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

재 료

한우육은 한국 종축개량협회 서산지소의 후대 검정우(암수 각각 25두)를 사용하였으며, 홀스타인육은 외모검사에 의해 선별된 50두로부터 채취하여 사용하였다. Tris (hydroxymethyl) aminomethane, sodium dodecyl sulfate (SDS), Fo-

lin-Ciocalteu phenol reagent, Acrylamide, bis-methyleneacrylamide, bovine serum albumin, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), a molecular weight marker protein kit, DBA, LCA, Con A, 그리고 PNA는 Sigma Chemical Co. (USA)로부터 구입하였다. UEA-1, RCA-120는 Honen (Japan)으로부터 구입하였다. Triton X-100은 Wako (Japan)로부터 구입하였으며, 그 밖의 시약은 생화학 분석용을 사용하였다.

육 단백질의 추출

단백질 추출을 위해 Martin 등⁽³¹⁾이 제시한 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 즉, 채취한 원료육을 지방, 인대, 결체조직 등을 제거한 후 각각 3 g을 saline solution (0.85% NaCl, 2 mM PMSF, 0.02% NaN₃을 함유) 12 ml에 첨가하여 4°C에서 1분간 균질(Ultraturrax T25, Germany, 24,000 rpm)한 후 4°C에서 7,500×g로 15분간 원심 분리하여 그 상등액을 염용성 단백질로 사용하였다.

수용성 단백질의 추출은, 2 mM PMSF, 0.02% NaN₃을 함유한 증류수 12 ml에 원료육을 3g씩 첨가하여 염용성 단백질의 추출 방법과 동일한 방법으로 처리하였다. 0.5% SDS (2 mM PMSF, 0.02% NaN₃을 함유) 및 0.5% Triton X-100 (2 mM PMSF, 0.02% NaN₃을 함유), 5 M urea를 사용하여 위와 동일한 방법으로 균질한 후, 실온에서 3시간 가용화 시켰으며, 원심분리에 의해 추출된 단백질을 상등액으로 회수하였다. 분취한 염용성, 수용성, 0.5% SDS, 그리고 Triton X-100으로 추출한 단백질은 1.5 ml tube에 넣어 -20°C에서 보관하면서 단백질의 추출량, 축종 특이적인 성분의 검색, 항원의 제조 등에 이용하였다. 본 연구에 사용한 모든 시료는 등급판정 직후의 지육에서 채취하였으며, ice box에 넣어 실험실로 옮긴 후 곧바로 각각의 용매를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 1ml씩 분주하여 -80°C이하에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법⁽³²⁾에 의해 실시하였다. Acrylamide와 bis-acrylamide의 농도 비는 37:1 (W/W)로 하였으며, 분리 겔

의 농도는 10% 또는 15%를, 또한 농축 겔은 5%를 사용하였다. SDS-PAGE에 의한 단백질의 분자량 측정은 표준 분자량 marker (myosin, 205 kDa; β -galactosidase, 116 kDa; phosphorylase, 97.4 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa)를 사용하여 15% Acrylamide 농도에서 측정하였다. 단백질의 분석량은 15 μ g을 사용하였으며, 전기 영동 후 단백질 염색은 Coomassie brilliant blue R-250 (CB)으로 염색하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Markwell 등의 방법⁽³³⁾을 사용하여 정량하였으며, 표준물질은 소 혈청 알부민을 사용하였다.

Hexose의 함량 측정

추출한 한우 및 홀스타인육 단백질 1mg을 채취하여 육 중에 함유되어 있는 구성 단당의 함량을 페놀-황산법⁽³⁴⁾으로 분석하였다. 육 중에 함유되어 있는 hexose의 양은 D-glucose를 이용하여 작성한 표준곡선을 이용하여 계산하였다($y=94.34x+0.0314$).

Western blot 및 lectin 염색

추출한 시료를 SDS-PAGE로 분석한 후, semi-dry 전사 장치(Trans-blot SD, Bio-Rad)를 사용하여 2.5mA/cm²에서 20분간 PVDF막에 전사하였다⁽³⁵⁾. Blot한 PVDF막은 Hwangbo의 방법⁽³⁶⁾을 이용하여 HRP-labeled lectin (0.1 μ g/ml)을 사용하여 lectin염색을 실시하였다.

결과 및 고찰

SDS-PAGE에 의한 한우육 및 홀스타인육의 구성 단백질의 분석

추출용매에 따른 육 단백질의 추출량 및 그 구성성분을 조사하기 위하여 증류수, 식염수, 0.5% SDS, 그리고 0.5% Triton X-100을 사용하여 한우육 및 홀스타인육의 채끝 부위로부터 단백질을 추출하였다. 증류수 및 식염수를 이용하여 추출한 경우, 홀스타인육이 한우육보다 약 25%이상의 단백질이 추출되었다(Table 1). 또한, 0.5% SDS 및 Triton X-100을 사용했을

Table 1. Soluble protein content (mg/g meat) of Hanwoo and Holstein meat (loin and chuck) extracted with various solutions (n=5)

	Hanwoo	Holstein
DDW	11.2 \pm 0.2 ¹⁾	14.2 \pm 0.2
Saline soln.	13.3 \pm 0.1	17.6 \pm 0.3
SDS	36.2 \pm 0.2	26.3 \pm 0.1
Triton X-100	25.2 \pm 0.2	22.2 \pm 0.2
Urea	27.5 \pm 0.3	25.4 \pm 0.2

¹⁾ Values are expressed as means \pm SD. Extraction solution: DDW = double distilled water, Saline soln = 0.85% NaCl, SDS = 0.5% sodium dodecyl sulfate, Triton X-100 = 0.5% Triton X-100, UREA = 5M urea.

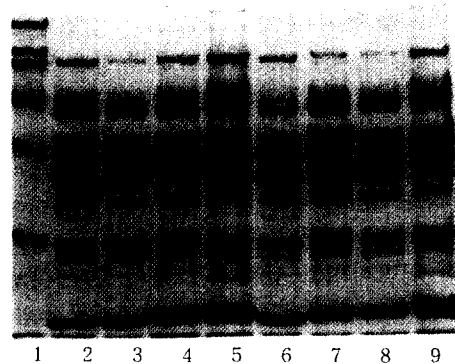


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of soluble protein of Hanwoo and Holstein meat (loin and chuck) extracted with distilled water, NaCl, SDS or Triton X-100. Lanes 1, molecular weight markers from the top to the bottom: myosin heavy chain (205kDa), β -galactosidase (116kDa), phosphorylase b (97.4kDa), bovine serum albumin (66kDa), egg albumin (45kDa), carbonic anhydrase 29kDa); 2, 4, 6, 8 Hanwoo meat; 3, 5, 7, 9 Holstein meat; 2 and 3: distilled water, 4 and 5: saline solution, 6 and 7: 0.5% SDS, 8 and 9: 0.5% Triton X-100. 15 μ g of soluble protein was loaded per well.

때, 한우육이 홀스타인육보다 각각 약 27%와 12%의 단백질이 많이 추출되는 것이 확인되었다. SDS는 증류수 및 식염수에 의해 추출된 단백질량보다 한우육에서는 약 3배, 그리고 홀스타인육에서는 약 1.5배 증가된 단백질 추출량

을 나타내었으며, 다른 추출 용액과 비교하였을 때도 가장 많은 단백질 추출량을 나타내었다 (Table 1). 이는 세포막 구성 단백질을 추출할 경우 품종에 따라 적절한 추출 조건을 설정할 필요성이 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

SDS-PAGE를 이용하여 각각의 용매를 이용하여 추출한 단백질을 분석한 결과, 한우 및 홀스타인의 구성 단백질 조성에는 큰 차이가 없었으나 (Fig. 1), 증류수로 추출하였을 때보다 식염수, SDS 및 Triton X-100으로 추출한 경우 고분자의 단백질이 많이 추출되는 경향을 나타내었으나, 큰 차이는 발견할 수 없었다. SDS 및 Triton X-100로 추출할 경우, 개체에 따라 저분자의 성분 (Fig. 1, lanes 5 and 9, ←) 이 다소 많은 양으로 추출되는 경우도 있었으나, 품종간 특이성분은 아니었다. 추출용매에 따라 추출되어 나오는 성분의 함량이 다소 차이가 있었으나, SDS-PAGE에 의한 동일 축종간의 식별은 거의 불가능한 것이 확인되었으며, 이러한 결과들은 Kato와 Deki⁽³⁷⁾의 결과와 유사하였다.

축종별 구성 단백질의 분석

추출용매에 따른 한우와 홀스타인과의 특이적인 성분이 검출되지 않았으며 (Fig. 1), 품종 식별을 위한 간편성 등을 고려하여 육단백질의 추출용매는 증류수를 사용하기로 하였다. 증류수에 의한 부위별 단백질 추출량을 비교한 결과, 한우의 경우 등심부위가 8.0 μg으로써 가장 적은 양을 나타내었으나, 그 이외의 부위의 추출량은 거의 같았다 (Table 2). 또한 홀스타인육에서는 각 부위별 단백질의 추출량은 거의 같았으며, 부위별로 거의 유사한 경향을 나타내었다.

Table 2. Water soluble protein content (mg/g meat) from various parts of Hanwoo and Holstein meat (n=5)

	Hanwoo	Holstein
Loin	8.0 ± 0.2 ¹⁾	14.5 ± 0.1
Loin and chuck	11.2 ± 0.2	14.2 ± 0.2
Tenderloin	11.5 ± 0.1	14.7 ± 0.2
Hind leg	11.2 ± 0.2	14.2 ± 0.2

¹⁾ Values are expressed as means ± SD

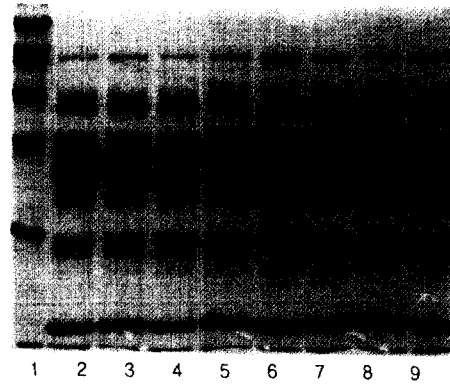


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of soluble protein from various parts of Hanwoo and Holstein meat extracted with distilled water. Lanes 1, molecular weight markers from the top to the bottom: myosin heavy chain (205kDa), β-galactosidase (116kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66kDa), egg albumin (45kDa), carbonic anhydrase 29kDa); 2, 4, 6, 8 Hanwoo meat; 3, 5, 7, 9 Holstein meat; 2 and 3 : loin, 4 and 5 : loin and chuck, 6 and 7 : tenderloin, 8 and 9 : hind leg. 15 μg of soluble protein was loaded per well.

SDS-PAGE에 의하여 증류수로 추출한 한우육의 각 부위를 분석한 결과, 각 부위별 구성 단백질에는 차이가 없는 것이 확인되었다 (Fig. 2). 또한 Fig. 1의 결과와 같이 SDS-PAGE에 의한 각 부위별 구성 단백질을 분석할 경우, 특이적으로 추출되어 나오는 성분이 없는 것으로 나타났다. 또한 한우 및 홀스타인의 식별을 위하여 사용되는 육단백질은 부위별 구분 없이 사용하여도 가능하다는 것이 확인되었다. 그러나, 비가열 한우육 및 홀스타인육은 SDS-PAGE에 의한 분석으로는 거의 그 식별이 불가능한 것으로 나타났다. 현재, 핵산을 이용한 품종 식별에 관한 연구가 많이 진행되고 있으나 원료육의 상태에 따라 genomic DNA의 보존상태가 상이하므로, 이에 따른 개선책이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

각종 lectin을 이용한 품종 특이적인 성분의 검색

한우육 및 홀스타인육의 각 부위별 핵소오스의 양을 측정 한 결과, 매우 상이한 것으로 나타

Table 3. Hexose content (mg/g meat) from various parts of Hanwoo meat in comparison with Holstein meat (n=5)

	Hanwoo	Holstein
Loin	79.3 ± 2.7 ¹⁾	26.9 ± 2.7
Loin and chuck	85.2 ± 3.5	32.2 ± 1.6
Tenderloin	62.5 ± 3.8	21.5 ± 0.7
Hind leg	91.2 ± 3.9	34.9 ± 2.3

¹⁾ Values are expressed as means ± SD

났다(Table 3). 이러한 동일 축종간의 헥소오스의 차이는 단백질의 생합성이 완료된 후, 골지체에서의 당의 생합성이 품종에 따라 특이적으로 일어나며, 축종 특이적 또는 품종 특이적인 Sugar chain(당쇄)이 생합성되고 있을 가능성이 시사되었다.⁽²⁵⁾

품종에 따라 특이적으로 생합성된 당쇄를 이용하여 한우와 홀스타인간의 품종식별을 실시하기 위하여 단백질에 결합되어 있는 각종 당쇄와 특이적으로 결합하는 lectin을 이용하여 lectin염색을 실시하였다. 증류수로 추출한 비가열 한우육 및 홀스타인육을 이용하여 lectin염색을 실시한 결과, 한우육 및 홀스타인육간의 lectin에 대한 친화력은 거의 동일한 것으로 나타났다(Fig. 3). RCA-120, UEA-1, 그리고 PNA에서는 거의 동일한 염색 강도를 나타내었으며, Con A, LCA, 그리고 DBA에서는 한우

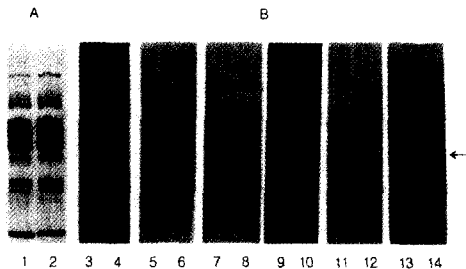


Fig. 3. Lectin staining of Hanwoo and Holstein meat with Con A, RCA, UEA-1, PNA, LCA or DBA. Pannels A, CB staining; B, lectins staining. Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, Holstein meat; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, Hanwoo meat. Lanes 3, 4, Con A; 5, 6, RCA-120; 7, 8, UEA-1; 9, 10, PNA; 11, 12, LCA; 13, 14, DBA. 15 µg of soluble protein was loaded per well.

육과 홀스타인육의 구성 단단백질과 다소 차이가 나는 성분이 있었으나, 뚜렷하게 구분할 수는 없었다.

WGA의 경우, 고분자 추출 성분가운데 홀스타인육에서 특이적으로 생합성되는 성분이 존재하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 4, lane 5, ←). WGA는 GlcNAc과 친화력을 나타내는 lectin으로써, bisecting구조를 가진 N-결합 당쇄와 강한 친화력을 나타내지만^(19,24), 환원말단의 N-GlcNAc에 Fuc α1-6으로 결합되어 있을 경우, 결합을 방해하는 것으로 확인되어 있어, 이러한 구조를 가진 고분자 수용성 단단백질이 홀스타인육에 다량으로 존재하고 있을 것으로 사료된다.

Greenwalt 등⁽²⁵⁾에 의하면, 동일 품종간의 동일 단백질이라 하더라도 조직에 따라 생합성되는 당쇄의 구조가 상이하며, 또한 당쇄의 고

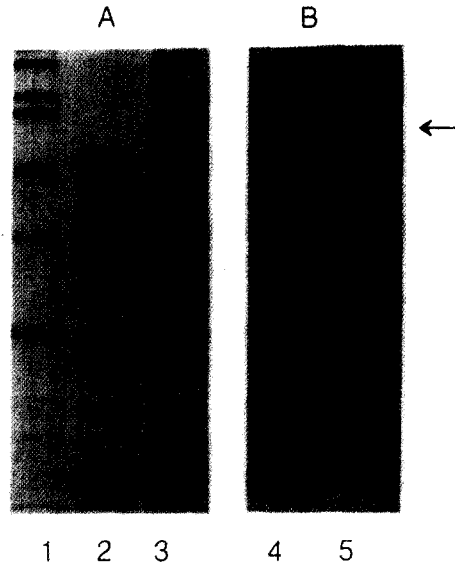


Fig. 4. Lectin staining of Hanwoo and Holstein meat with WGA. Pannels A, CB staining; B, lectins staining. Lanes 1, molecular weight markers from the top to the bottom: myosin heavy chain (205kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4kDa), bovine serum albumin (66kDa), egg albumin (45kDa), carbonic anhydrase 29kDa); 2, 4, Hanwoo meat; 3, 5, Holstein meat. 15 µg of soluble protein was loaded per well.

유 기능을 발휘하기 위해서는 각각 상이한 당쇄가 생합성되는 것^(27,29)으로 이미 알려져 있다. 따라서 본 연구 결과는 이와 유사한 경향으로 해석할 수 있으며, 당쇄를 이용하여 품종간의 식별도 가능하리라는 것을 암시한다고 할 수 있다.

이상의 결과, 한우 특이적으로 발현되는 당쇄는 없으나, 홀스타인육을 한우육과 구분하고자 할 경우, WGA lectin을 사용하면 가능할 것으로 사료되며(Fig. 4, lane 5, ←), 홀스타인육이 값비싼 한우육으로 둔갑될 경우, 이를 식별하는 간단한 수단으로 사용할 수 있으리라 생각한다.

내열성 성분을 이용한 특이성분의 검색

한우육 및 홀스타인육을 75, 80, 90, 그리고 100°C에서 각각 15초 및 1분간 가열한 후, 그 내열성 단백질량을 검사하였다. 75°C에서 15초 가열할 경우, 한우육 및 홀스타인육은 약 85% 이상이 내열성 단백질이었으나(Table 4), 온도가 상승함에 따라 그 변성도가 심하여 졌으며, 이러한 경향은 한우육보다 홀스타인육이 심한 것으로 확인되었으나, 유의적인 차이는 없었다(Table 4). 또한 1분간 가열할 경우, 그 변성도는 더욱 심하였으며, 한우육의 경우 100°C/1분 가열할 경우 약 85%가 열 변성하였으나, 홀스타인육의 경우 약 90%가 열 변성하였다. 이러한 경향은 온도에 관계없이 홀스타인육이 열에 약한 것으로 나타났으며, 이는 동일 축종이라

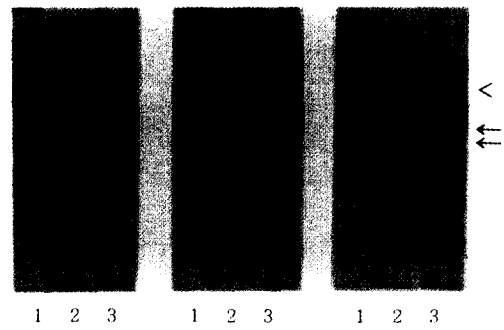


Fig. 5. SDS-PAGE patterns of denatured Hanwoo and Holstein meat at 70, 80 and 100°C for 30 sec. Panels A, 70°C; B, 80°C; C, 100°C. Lanes 1, molecular weight markers from the top to the bottom: myosin heavy chain (205 kDa), β-galactosidase (116kDa), phosphorylase b (97.4kDa), bovine serum albumin (66kDa), egg albumin (45kDa), carbonic anhydrase 29 kDa); 2, Holstein meat; 3, Hanwoo meat.

하더라도 품종에 따라 열에 대한 민감도가 상이할 수 있다는 것을 나타낸다고 생각한다. 이는 사육환경 또는 그 사육의 목적에 따라 사양 조건이 다르며, 또한 유전적 형질도 다르므로, 조직을 구성하는 각종 단백질의 분포가 상이하다는 것을 나타내며, Table 1의 증류수 또는 저염도의 용액에서 추출되는 단백질의 양이 한우육보다 홀스타인육이 많은 결과와도 일치한다

Table 4. Extraction amounts of Hanwoo and Holstein meat heated at 75°C to 100°C for 30 sec and 1 min (n=5)

	Heating tem.(°C)	Before heating (mg)	After heating (mg)		Recovery (%)	
			30 sec	1 min	30 sec	1 min
Hanwoo	75	10	8.79±0.51 ¹⁾	3.47±0.19	87.9	34.7
	80		8.06±0.22	2.87±0.21	80.6	28.7
	90		7.43±0.31	2.36±0.11	74.3	23.6
	100		6.75±0.24	1.69±0.14	67.5	16.9
Holstein	75	10	8.75±0.41	3.55±0.23	87.5	35.5
	80		7.96±0.11	2.99±0.15	79.6	29.9
	90		7.14±0.18	1.98±0.11	71.4	29.8
	100		6.23±0.17	1.04±0.12	62.3	10.4

¹⁾ Values are expressed as means ± SD

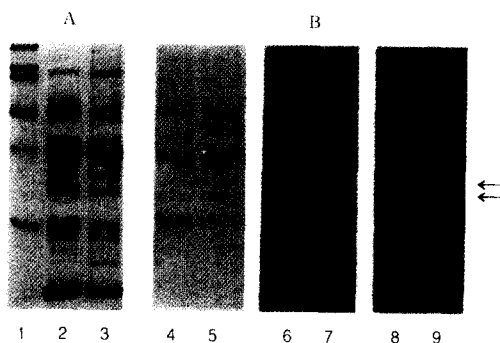


Fig. 6. Lectin staining of denatured Hanwoo and Holstein meat at 70, 80 and 100°C for 30 sec with LCA. Panels A, CB staining, B, lectin staining. Lanes 1, molecular weight markers from the top to the bottom: myosin heavy chain (205kDa), β -galactosidase (116kDa), phosphorylase b (97.4kDa), bovine serum albumin (66kDa), egg albumin (45kDa), carbonic anhydrase 29kDa); 2, 4, 6, 8, Holstein meat; 3, 5, 7, 9, Hanwoo meat. Lanes 4 to 9 were heated meat at 70°C (4, 5), 80°C (6, 7) and 100°C (8, 9) for 30 sec.

고 할 수 있다.

가열조건에 따른 내열성 성분을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 가열에 의하여 특정성분이 농축되거나 또는 열 변성되어 소실되는 현상이 확인되었다(Fig. 5). 100°C에서 15초간 가열할 경우, 한우육에서는 고분자 성분이 대부분 열 변성에 의해 소실되는 것으로 나타났다. 한우육의 경우, 35.5kDa와 32.1kDa성분이 홀스타인육보다 열에 강한 것으로 나타났으며(Fig. 5, lane 3, ←), 이 두 성분은 가열온도가 상승함에 따라 농축되는 경향을 나타내었다. 한우육 및 홀스타인육을 가열할 경우, 각각의 온도에서 그 내열성 단백질의 함량이 다르게 나타났으며(Table 4, Fig. 5), 또한 100°C에서 35초 가열할 경우 특정성분이 농축되는 것이 확인되어, 이러한 내열성 성분의 각종 lectin에 대한 친화성을 검사하였다. 그 결과, Con A, DBA, UEA-1, 그리고 PNA에서는 그 유의성이 발견되지 않았다(Data not shown). 특히, 홀스타인육에서 WGA와 특이적으로 반응하던 고분자성분들(Fig. 4, lane 5)은 모두 열 변성되어 침전한 것으로 확인되어, 열에 매우 민감한 성분인 것이

시사되었다(Fig. 5, lane 2).

각종 lectin을 이용하여 내열성 당단백질을 염색한 결과, 한우 특이적으로 농축된 성분(Fig. 6, lane 9)이 LCA와 강하게 반응하였으나, 홀스타인육에서는 반응하지 않는 것이 확인되었다. 이 성분의 분자량을 계산한 결과, 약 32.1kDa이었으며, 이러한 성질은 Fig. 3의 결과(lane 11, 12)와 유사한 것으로 나타났다. 홀스타인육을 100°C에서 30초간 가열할 경우, 대부분의 성분은 열변성되어 침전하였으며, LCA로 염색할 경우, 분자량 약 30kDa성분이 특이적으로 반응하였다(Table 4, Fig. 6, lane 8). 이 성분은 가열하기 전에는 없는 성분으로, 가열에 의한 열변성으로 고분자 성분이 분해되어 농축되었거나, 극히 미량이었으나, 다른 성분에 비해 상대적으로 열에 매우 강한 성분이 농축되었을 가능성이 시사되었다⁽²⁹⁾.

이상의 결과, 가열하지 않은 한우육과 홀스타인육을 식별할 경우 WGA를 이용하여 홀스타인육을 판별하여 한우육과 구별하는 것이 매우 바람직할 것이며, 한우육 특이성분을 검색하고자할 경우에는 100°C에서 30초 가열한 후, 내열성 단백질을 LCA를 이용하여 검증하는 것이 매우 효과적일 것으로 사료된다. 한우 고유의 자원을 확보하고, 2001년 1월 1일부터 완전 수입 자유화에 대비한 국내 육류산업의 안정적 발전을 위하여 정확하고 신뢰도 높은 원료육의 검증법이 조속히 확립되어야 할 것이다. 본 연구에서 밝혀진 바와 같이 lectin을 이용함으로써 품종 특이적으로 생합성되는 당쇄를 동정하고 이를 이용한 품종 식별을 할 수 있음이 확인되었다. 따라서 지금까지 peptide 또는 핵산차원에서의 품종식별이 아닌 당쇄를 이용한 식별이 가능하게 되어, 각종 이종단백질의 둔갑이나 축육제품의 제조시 첨가되는 저급 육류 단백질의 첨가를 손쉽게 식별할 수 있으리라 생각한다.

요 약

증류수, 식염수, SDS, Triton X-100을 이용하여 한우육과 홀스타인육으로부터 추출한 단백질을 SDS-PAGE에 의하여 분석한 결과, 한우육 및 홀스타인육의 구성 단백질에는 큰 차이가 없음이 확인되어 SDS-PAGE 분석에 의

한 한우육과 홀스타인육의 식별은 불가능하였다. 또한 각 부위별 추출단백질을 분석한 결과, 부위별 특이적으로 추출되는 성분은 발견되지 않았으므로, 증류수를 이용하여 추출한 육 단백질에 이용하여 분석에 사용하기로 하였으며, 시료의 채취가 가장 용이한 채끝 부위를 사용하였다. 증류수로 추출한 육 단백질을 이용하여 lectin염색을 실시한 결과, Con A, RCA-120, UEA-1, 그리고 PNA에서는 그 차이를 발견할 수 없었으나, DBA의 경우 약 32.1kDa의 성분이 한우육에서 많이 생합성되는 것으로 나타났다. 또한 WGA와의 친화성을 검사한 결과, 고분자성분이 홀스타인육 특이적인 당단백질인 것이 확인되었다. 내열성 단백질의 함량을 측정된 결과, 온도가 상승함에 따라 단백질 변성이 일어났으며, 이러한 경향은 한우육보다 홀스타인육에서 심하게 관찰되었다. 100°C에서 30초 동안 가열한 후, 내열성 단백질을 이용하여 LCA lectin 염색을 실시한 결과, 한우육 특이적인 성분을 검색할 수 있었다. 또한, 홀스타인육에서는 한우육 특이성분보다 분자량이 다소 적은 성분이 특이적으로 농축되었으며, 이 성분은 한우육에는 없는 것으로 나타났다. 따라서 한우육과 홀스타인육을 100°C에서 30초간 가열한 후, LCA lectin으로 염색할 경우, 홀스타인육과 한우육의 식별이 가능하리라 생각된다.

감사의 글

이 논문의 일부분은 1997년도 농림수산기술과제의 연구비에 의해 진행되었으므로, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 中江利孝 : 乳肉卵의 科學特性和 組織-食品의 組織. 弘學出版株式會社. 213 (1988).
2. Kang, K. S., Jung, K. S., Cho, R. I. and Yoo S. H. : 한우육과 수입우육의 판별 검사에 관한 연구. *Korean J. Anim. Sci.* 32, 121 (1992).
3. Hayden, A. R. : Immunochemical detection of ovine, porcine and equine flesh in beef products with antisera to species myoglobin. *J. Food Sci.*, 44, 494 (1979).
4. Berger, R. G., Mageau, R. P., Schwab, B. and Johnston, R. W. : Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme linked immunosorbent assays. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 71, 406 (1988).
5. Wintero, A. K. and Thomsen, P. D. : A comparison of DNA-hybridization, immunodiffusion, countercurrent immuno electrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork to beef. *Meat Sci.*, 27, 75 (1990).
6. Bailey, E. and Lear, T. L. : Comparison of thoroughbred and arabian horses using RAPD markers. *Anim. Genet.*, 25, 105 (1994).
7. Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M. and Monama, M. : Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Sci.*, 37, 337 (1994).
8. Ebbehøj, K. F. and Thomsen, P. D. : Differentiation of closely related species by DNA hybridization. *Meat Sci.*, 30, 359 (1991).
9. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531 (1990).
10. King, N. L. and Kurth, L. : Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzymestaining of isoelectric focusing gels. *J. Food Sci.*, 47, 1608 (1982).
11. Armstrong, S. G. and Leach, D. N. : The use of HPLC protein profiles in fish species identification. *Food Chem.*, 44, 147 (1992).
12. Chung, K. Y. : Immunologische Untersuchungen zum Nachweis Nativer und Hitzedenaturierter Schweinefleischanteile in Fleischerzeugnissen Mitteleuropas, ELISA und Monoklonaler Antikörper. Ph.D Dissertation (1992).

13. Hitchcock, C. H. S. : In "Control of food quality and food analysis" (Ed. Birch G. G. and Parker K. J.). Elsevier applied science publishers. *London and New York*, 117, 133 (1984).
14. 민병록, 한재용, 이무하 : RAPD 기법을 이용한 쇠고기 품종 [한우육, 유우육 (Holstein육), 수입우육] 구분. *한국축산학회지*, 37, 651 (1995).
15. 이창수, 유영복, 나기준, 조병대, 최병규 : 핵산분석법에 의한 한우의 판별. *한국축산학회지*, 36, 369 (1994).
16. 정의룡, 김우태, 한상기 : RAPD-PCR 기법을 이용한 젓소의 DNA 다형분석과 유전적 특성에 관한 연구. *한국축산학회지*, 37, 455 (1995).
17. 村松正實, 岡山博人 : 遺傳子工學 Handbook-genomic DNA의 調製. 羊土社, 41 (1991).
18. Drickamer, K. and Carver, J. : Carbohydrates and Glycoconjugates: Upwardly Mobile Sugars Gain Status as Information-Bearing Molecules. *In Current Opinion in Structural Biology*, 2, 653 (1992).
19. Irimura, T., Nakamori, S., Matsushita, Y., Taniuchi, Y., Todoroki, N., Tsuji, T., Izumi, Y., Kawamura, Y., Hoff, S. D., Cleary, K. R. and Ota, D. M. : Colorectal Cancer Metastasis Determined by Carbohydrate-Mediated Cell Adhesion: Roll of Sialyl-Lex Antigens. *In Seminars in Cancer Biology*, 4, 319 (1993).
20. Rademacher, T. W., Arekh, R. B. P. and Week, R. A. D. : Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 785 (1988).
21. Sharon, N. and Lis, H. : Lectins as Cell Recognition Molecules. *Science*, 246, 227 (1989).
22. 橋禮子 : 糖蛋白質糖鎖研究法. 학회출판센타, 23, 1 (1989).
23. 古川 清 : 蛋白質·核酸·酵素, 複合糖質, 公立出版社, 32, 2076 (1992).
24. 永井克孝 : 糖鎖-I. 糖鎖와 生命. 동경화학동인 (1994).
25. Greenwalt, D. E., Watt, K. W. K., Hasler, T., Howard, R. J. and Patel, S. : Structural, functional, and antigenic differences between heart endothelial CD36 and human platelet CD36. *J. Biol. Chem.*, 265, 16296 (1990).
26. Ito, K., Okada, Y., Ishida, K. and Minamura, N. : Human Salivary Endo-N-Acetyl glucosaminidase as Specific for Complex Type Sugar Chains of Glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 268, 16074 (1993).
27. Hakomori, S. : Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 733 (1981).
28. Hannun, Y. A. and Bell, R. M. : Functions of Sphingolipids and Sphingolipid Breakdown Products in Cellular Regulation. *Science*, 243, 500 (1989).
29. Yamashita, K., Koide, N., Endo, T., Iwaki, Y. and Kobata, A. : Fractionation of L-Fucose-Containing Oligosaccharides on Immobilized Aleuria Aurantia Lectin. *J. Biol. Chem.*, 264, 2415 (1989).
30. 永井克孝 : 糖鎖-II. 糖鎖와 病態. 동경화학동인 (1994).
31. Martin, R., John W., Sheila, J. J., Pablo, E., Hernandez, R. and Patterson, L.S. : Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. *Meat Sci.*, 30, 23 (1991).
32. Laemmli U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 (1970).
33. Markwell, M. A. K., Suzanne M. H., Bieber L. L. and Tolbert, N. E. : A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochem.*, 87, 206 (1978).
34. Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. : Methods in carbohydrate chemistry. Vol. 1 (Whistler, R. L. and Wolfrom, M. L. eds), *Academic Press*, 338 (1962).

35. 平野 久 : 電氣永動한 Gel로부터 Blotting 한 蛋白質의 Amino acid 配列分析. 蛋白質·核酸·酵素. 33, 2388 (1988).
36. Hwangbo, S. : Biochemical and molecular biological studies on PAS-4 glycoprotein of milk fat globule membrane. Tokyo Agr. Tech. Univ. Doctoral thesis (1996).
37. Kato, T. and Deki, M. : Identification of meat species by polyacrylamide gel electrophoresis. *Kansai Chuo Bunsekihoho*. 17, 17 (1977).
-

(2001년 2월 8일 접수)