

理學博士學位論文

指導教授崔康德

한국산 배에서 추출한 단백질 분해효소의
정제 및 특성에 관한 연구

Purification and characterization of
protease isolated from Korean pear (*Pyrus serotina* L.)

2007年 2月

韓京大學校 生物環境・情報通信專門大學院

動物生命工學專攻

李 官 浩

한국산 배에서 추출한 단백질 분해효소의
정제 및 특성에 관한 연구

Purification and characterization of
protease isolated from Korean pear (*Pyrus serotina* L.)

2007年 2月

韓京大學校 生物環境・情報通信專門大學院
動物生命工學專攻

李 官 浩

한국산 배에서 추출한 단백질 분해효소의
정제 및 특성에 관한 연구

Purification and characterization of
protease isolated from Korean pear (*Pyrus serotina* L.)

指導教授 崔康德

論文을理學博士學位論文으로提出함

2006年 12月

李官浩

李官浩의博士學位論文을認准함

2006年 12月

審査委員長 (인)

審査委員 (인)

審査委員 (인)

審査委員 (인)

審査委員 (인)

ABSTRACT

**Purification and characterization of
protease isolated from Korean pear (*Pyrus serotina* L.)**

GUAN HAO – LI

Major in Animal Biotechnology

**The Graduate School of Biotechnology
and Information Technology**

Hankyong National University

Meat tenderness is one of the major palatabilities and has a major influence on the quality evaluation. It must be maintained and improved in most of the meat producing species. The tough meat is primarily due to the formation of permanent cross bridges in muscle and between the actin and myosin filaments and secondly insoluble collagen in muscle. Meat tenderness is affected greatly by the age of the animal. The proteolytic enzymes of plant origin papain, bromelin and ficin are effective in increasing tenderness of meat. However, action of these enzymes can result in extensive degradation of the skeletal muscle.

The proteolytic properties of the protease, from Korean pear (Ansung Shingo) were investigated and evaluated for its

bio-chemical and cathartic abilities as a meat tenderizer in degrading and solubility of actomyosin myofibrils and collagen of connective tissue without extensive degradation of the skeletal muscle. For the purification of protease were the analysis of salting out with ammonium sulfate, DEAE-Sepharose chromatography, Mono Q chromatography and Mini Q Membrane column were used. And purification of protease was confirmed by using SDS- PAGE and the enzymatic properties of protease were surveyed. Optimum pH and temperature of protease were 6.5 and 60°C, respectively. The hydrolysis of the actomyosin, identified by of the SDS-PAGE, indicated the activity of protease of muscle protein. The purification of protease was confirmed by the detection of single bands using SDS-PAGE. Molecular weight (M.W.) of the protease was 38,000. Specificity activity was 64,000 unit/mg and yield was 38.79%, degree of purification was 25 folds. The quantitative analysis of purified protein was carried out with MALDI-TOF MS/MS Method. The obtained precursor value was 1647.6 and with this precursor point was the peptide sequence analyzed. However identical peptide was not detected by using the Mascot MS Ion search of the Matrix sciences server. Purified protease was stable in the range of pH 3.0~7.5 and the optimum pH were 6.5 and enzyme reaction were active in 90%. The hydrolysis of purified protease could not found in alkali pH range above the pH 8.0.

These results indicated that the protease isolated from Korean pear are active in neutral pH range, and not in alkali. And the activity of purified protease showed in 25% at 4°C and the activity

of purified protease was detected at the level of 20% at 80°C. the activity is dependent on the increased temperature. The optimum temperature was 70°C, and the optimum activity was at the level of 85%. The fragmentation of actomyosin was investigated by using the Cryo-FE-SEM(cryo field emission scanning electron microscope). These results were correspondences to the fragmentation band with SDS-PAGE.

In conclusion, this study has demonstrated that the tenderization of meat was achieved through the fragmentation of myofibrils by using the protease from korean pear (Ansung shingo) without an undesirable mushy texture, and revealed that this protease from korean pear was an effective tenderizer of meat.

목 차

| | |
|---|------|
| ABSTRAC | i |
| List of Tables | viii |
| List of Figures | viii |
| Abbreviation | xii |
| | |
| I. 서 론 | 1 |
| | |
| II. 연구사 | 4 |
| | |
| III. 재료 및 방법 | 9 |
| | |
| 1. 실험 재료 | 9 |
| | |
| 2. 실험 방법 | 9 |
| 2.1. 근육단백질(actomyosin) 추출 | 9 |
| 2.2. 배 단백질분해효소의 추출 | 10 |
| 2.3. 효소의 정제 | 11 |
| 2.4. DEAE-Sepharose ion exchange chromatography | 13 |
| 2.5. Mono Q chromatography | 13 |
| 2.6. Mini Q column | 14 |
| 2.7. SDS-PAGE | 14 |
| 2.8. SDS-PAGE를 이용한 단백질분해효소의 정제 여부 및 분해도 관찰 | 16 |
| 2.9. Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)염색 | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 2.10. Silver staining | 17 |
| 2.11. 단백질분해효소의 분자량 측정 | 18 |
| 2.12. 단백질분해효소의 농도 측정 | 18 |
| 2.13. 근육단백질(actomyosin)의 농도 측정 | 19 |
| 2.14. 단백질분해효소의 활성도 | 20 |
| 2.15. Image 분석 | 20 |
| 2.16. In gel digestion | 20 |
| 2.17. MALDI-TOF(Matrix assisted laserdesorption/ionization time of flight) MS/MS(Mass spectrometry)를 이용한 펩타이드 질량 지문법 | 21 |
| 2.18. 단백질동정 및 Database 검색 | 21 |
| 2.19. pH 조건에 따른 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해 | 22 |
| 2.20. 온도 변화에 따른 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해 | 22 |
| 2.21. 반응시간에 따른 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해 | 22 |
| 2.22. 냉전계방사형 주사전자현미경을 이용한 근육단백질(actomyosin)의 구조 변화 관찰 | 23 |
| IV. 결과 및 고찰 | 24 |
| 1. 배 단백질분해효소의 추출 및 염분획 | 24 |
| 2. DEAE-Sepharose ion exchange chromatography | 24 |

| | |
|--|----|
| 2.1 DEAE-Sepharose ion exchange chromatography를 이용하여 정제된 단백질을 분해효소에 의한 actomyosin의 분해 | 29 |
| 2.2. DEAE-Sepharose chromatography를 이용하여 정제된 단백질을 분해효소의 정제 여부 | 34 |
| 3. Mono Q chromatography | 37 |
| 3.1. Mono Q chromatography를 이용하여 정제된 단백질을 분해효소에 의한 actomyosin의 분해 | 40 |
| 3.2. Mono Q chromatography를 이용하여 정제된 단백질을 분해효소의 정제 여부 | 45 |
| 4. Mini Q column | 48 |
| 4.1. Mini Q column을 이용하여 정제된 단백질을 분해효소에 의한 actomyosin의 분해 | 49 |
| 4.2. Mini Q column을 이용하여 정제된 단백질을 분해효소의 정제 여부 | 54 |
| 4.3. 정제된 단백질을 분해효소의 분자량 측정 | 57 |
| 5. 배 단백질을 분해효소의 염분획 및 정제 | 59 |
| 6. MALDI-TOF MS/MS를 거쳐 peptide map을 분석 | 62 |
| 7. pH 조건에 따른 단백질을 분해효소에 의한 actomyosin의 분해 | 65 |

| | |
|--|----|
| 8. 온도변화 및 시간경과에 따른 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해 | 71 |
| 9. 냉전계방사형 주사전자현미경을 이용한 actomyosin의 구조 변화 관찰 | 87 |
| V. 요약 | 90 |
| VI. 참고문헌 | 92 |

LIST OF TABLES

| | |
|--|----|
| Table 1. Recipe for gel preparation using SDS-discontinuous system | 15 |
| Table 2. Composition of sample buffer for SDS-discontinuous system | 16 |
| Table 3. Purification procedure of protease from Korean pear | 61 |

LIST OF FIGURES

| | |
|--|----|
| Fig. 1. Purification procedures of protease from Korean pear | 12 |
| Fig. 2. Elution profile of protease from Korean pear with DEAE-Sephadex chromatography | 27 |
| Fig. 3. Effects of protease from Korean pear purified with DEAE-Sephadex chromatography on the hydrolysis of chicken muscle actomyosin | 30 |
| Fig. 4. Activity of protease from Korean pear purified with DEAE-Sephadex column chromatograph | 32 |

| | |
|---|----|
| Fig. 5. SDS-PAGE gel electrophoresis of protease from Korean pear purified with DEAE-Sepharose chromatography | 35 |
| Fig. 6. Elution profile of protease from Korean pear with Mono Q chromatography | 38 |
| Fig. 7. Effects of protease from Korean pear purified with Mono Q chromatography on the hydrolysis of chicken muscle actomyosin | 41 |
| Fig. 8. Activity of protease from Korean pear purified with Mono Q chromatography | 43 |
| Fig. 9. SDS-PAGE gel electrophoresis of protease from Korean pear purified with Mono Q chromatography | 46 |
| Fig. 10. Activity of protease from Korean pear purified with Mini Q column on the hydrolysis of chicken muscle actomyosin | 50 |
| Fig. 11. Activity of protease from Korean pear purified with Mini Q column | 52 |
| Fig. 12. SDS-PAGE gel electrophoresis of protease from Korean pear purified with Mini Q column | 55 |

| | |
|--|----|
| Fig. 13. Determination of the molecular weight of protease from Korean pear purified by SDS-PAGE gel electrophoresis | 58 |
| Fig. 14. MALDI-Profile from tryptic digests of a candidate spot | 63 |
| Fig. 15. Effects of protease from Korean pear purified on the hydrolysis of chicken muscle actomyosin after change of pH value | 67 |
| Fig. 16. Effects of pH value on the activity of protease from Korean pear purified with Mini Q column in the hydrolysis of chicken muscle actomyosin | 69 |
| Fig. 17. Effects of temperature value on the activity of protease from Korean pear purified with Mini Q column in the hydrolysis of chicken muscle actomyosin | 73 |
| Fig. 18. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at 4°C | 75 |
| Fig. 19. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at normal temperature(25°C) | 77 |

| | |
|--|----|
| Fig. 20. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at 37°C | 79 |
| Fig. 21. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at 60°C | 81 |
| Fig. 22. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at 70°C | 83 |
| Fig. 23. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at 80°C | 85 |
| Fig. 24. Cryo-FE-SEM micrograph of the actomyosin without enzyme treatment. | 88 |
| Fig. 25. Cryo-FE-SEM micrograph of the actomyosin with 5% protease from Korean pear purified for 1 hour at 37 °C and pH 6.5. | 89 |

ABBREVIATION

| | |
|--------------|---|
| ABC | Ammonium bicarbonate |
| ACN | Acetonitrile |
| α -Ac | α -Actinin |
| CAF | Calcium activated fraction |
| DB | Database |
| DTT | α -Dithiothreito |
| EDTA | Ethylendiaminetetraacetic acid |
| FA | Formic acid |
| FE-SEM | filed emission scanning electron microscope |
| G-actin | Globular actin |
| H.C | Heavy chain |
| HMM | Heavy meromyosin |
| IAA | Iodoacetamide |
| LC | Light chain |
| MHC | Myosin heavy chain |
| M-Pr | M-Protein |
| SDS-PAGE | Sodium dodesly sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis |
| TEMED | Tetramethylethylethylenediamine |
| TFA | Trifluoroacetic acid |
| TM | Tropomyosin |

I. 서론

식육의 연도는 풍미와 함께 식육의 품질을 결정하는 중요한 요인 중 하나이다. 도축 후 근육은 일정기간 숙성 과정을 거쳐야 연해지고 풍미도 향상되어 고품질의 식육이 된다. 그러나 식육의 품질은 가축의 종류, 품종, 연령, 성별, 근육의 부위, 영양상태, 도축 전후의 취급조건 등 많은 요소에 의해 영향을 받게된다. 식육질감의 그 첫째 요인은 근원섬유의 주요 구성단백질인 actin과 myosin의 경직복합체(actomyosin)형성에 의한 이른바 actomyosin toughness로 M-Pr(M-Protein)과 connectin 등의 단백질의 질과 양이 이러한 질감현상에 영향을 미치고 있는 것으로 알려져 있다. 또 다른 요인은 근육 내의 결합조직의 주성분인 collagen 섬유가 증가하고 collagen 분자가 분자 상호간 가교결합을 형성하여 근섬유 주위에 강력한 망상구조를 이루게 되어 Background toughness 라는 질감현상을 가져오게 된다. 노폐육의 연도가 떨어져 식육제품의 가치가 저하되는 것도 바로 이러한 요인에 의한 것으로 알려져 있다(Ouali, 1990; Lehamann, 1907).

이러한 질긴 고기를 연하게 하는 방법으로 가열, 가압(Macfarlane, 1985; Janz *et al.*, 2000), 단백질분해효소처리(Dransfield and Etherrington, 1981; Elkhailifa and Marriott, 1990)등의 여러 가지 방법이 이용되고 있으나 변색, 변질, 과다연화 등의 문제점들이 나타나고 있어 보다 안전하고 효과적인 연화 방법이 요구되고 있다(Lee *et al.*, 1975).

육류가 숙성 중에 단백질분해효소에 의해 연화된다는 것은 1917년 Hoagland의 연구에 의하여 처음으로 규명되었는데 이러한 숙성과정 중 식육이 더욱 부드러워지고 비단백태질소(Non-protein nitrogen: NPN)

가 그 조직내에 증가됨이 보고되었다(Hoagland *et al.*, 1917; Lee, 1979).

단백질 펩타이드를 가수분해 시키는 단백질분해효소는 물리, 화학적인 가수분해에 비해 부가반응이 없고, 촉매활성이 적절하여 가공 후에도 제거할 필요가 없어 각종 단백질분해효소의 이용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 식품공업에 이용되는 식물 기원 단백질분해효소로는 파파야에 존재하는 papain(Monsan *et al.*, 1978; Brocklehurst *et al.*, 1979; Brooks *et al.*, 1985)을 비롯하여 무화과 유액에서 추출한 ficin(Kim and Kim, 1987; Kee *et al.*, 1998), 파인애플에서 추출한 bromelain(최 등, 1992), 키위의 actinidin (Roh *et al.*, 2002; Nam *et al.*, 2006) 그리고 능이버섯에 존재하는 고유한 단백질분해효소(Lee and Jang, 2005) 및 생강(Lee *et al.*, 1986; Kim and Lee, 1995)에서 그 효소의 화학적 특성에 관한 연구가 많이 보고되었다.

특히, 단백질분해효소는 식육의 연화(Blanchard and Mantle, 1996)는 물론 맥주의 혼탁방지(Macgregor, 1996), 치즈 숙성(Marth, 1963; Schormüller, 1968), 조미료 제조(Diniz and Martin, 1996; Tavaría *et al.*, 1997)등의 식품가공과 치아 단백질침착물의 분해제, 소화제, 소염진통제등의 제약공업(Pirotta and Giuli, 1978; Hermine, 1990), 피혁공업(Caygill, 1979), 세척산업(Lee and Hwang 1994; Kim *et al.*, 1997)등 여러 분야에 걸쳐 광범위하게 이용되고 있다(Cowan, 1983).

현재 미국이나 일본에서는 식물성 단백질분해효소 및 미생물 단백질분해효소를 분말상태로 제조하여 연육제(Meat tenderizer)라는 제품으로 상품화 되어 있다(Yang *et al.*, 1975).

Kang 등(1970)은 ficin, bromelain, papain 등과 같은 기존의 단백질분해효소는 과다 분해로 육류의 상품가치를 오히려 저하시키는 문제점

을 내포하고 있는데 Choe 등(1996)은 한국산배의 단백질분해효소를 이용하여 식육연화제의 과잉 연화라는 문제점을 해결 하고자 한국산 배의 특성을 연구 하였다.

옛부터 불고기, 육회 등의 양념에 배나 배즙을 첨가하여 고기를 연화시키는 방법이 이용되고 있는데, 이러한 고기의 연화 효과는 배 속에 포함된 단백질분해효소의 효과라고만 생각해왔을 뿐 그 분해효소에 관한 생화학적 연구는 아직도 부족하다.

본 논문은 안성산 배 속에 함유된 것으로 보고된 단백질분해효소를 추출 및 정제한 후 식육단백질에 적용하여 식육의 연화제로서의 최적의 조건과 특성을 연구하여 생화학적으로 새롭게 그 존재를 규명하고자 하였으며 궁극적으로 식육연화제로서의 가치와 산업계에서의 그 활용성을 높이하고자 하였다.

II. 연 구 사

식육의 숙성중 증가되는 연도(tenderness)는 근육내 존재하는 단백질 분해효소에 기인되고 있는 사실은 일찍부터 Locker 등(1984) 및 Sharp (1963)등 수많은 연구자들에 의해 주장되어 왔다.

식육의 질감을 가져오는 원인 중의 하나는 actomyosin의 형성으로 분자량은 정제조건에 따라 다르지만 약 $4\sim 60\times 10^3$ kDa이고, actomyosin의 구성 성분인 myosin의 분자량은 약 500 kDa이며, G-actin(globular-actin)은 약 42 kDa이다. 근원섬유 단백질의 약 절반을 차지하는 myosin의 머리부분인 HMM(heavy meromyosin)은 단백질분해효소에 의해 분해되어 ATPase활성과 actin과의 결합능력을 지닌 성분인 HMMS-1 (subfragment -1)과 HMMS-2(subfragment-2)로 나뉘진다(Pearson *et al.*, 1983).

근육 내에 존재하는 이러한 단백질 가수분해효소는 주로 산성 protease인 cathepsin류와 중성 protease인 CAF(calcium activated fraction)들로 이들 단백질분해효소들에 관해서는 일찍이 Snoke 등(1950) 및 Koszalka 등(1960)을 비롯하여 Obinata 등(1981) 및 Pearson 등(1983)등 수많은 연구자들에 의해 그 활성이 보고되었다. 이러한 단백질 가수분해효소를 이용하여 식육의 연도를 개선하려는 연구는 꾸준히 수행되어 왔으며, 특히 저렴한 식물소재 단백질분해효소를 추출 및 정제하고 그 특성을 활용하여 산업화에 이르게 되었다.

단백질분해효소는 최적의 pH에서 최대의 활성을 나타내며 pH가 지나치게 낮거나 높을 경우 활성도가 떨어지는 것으로 보고되었는데 효소의 주성분인 단백질의 입체구조가 pH에 따라 변하며 효소에 따라 차이는 있지만 대부분 중성 pH 범위에서 가장 활발한 반응을 나타내

는 것으로 알려졌다(Pearson *et al.*, 1983).

정 등(1989)은 pH 6.0에서 배 단백질분해효소 활성이 가장 강했다고 보고 하였고, Choe 등(1996)의 연구에서도 배 단백질분해효소가 pH 3.0과 7.0에서 최고의 활성을 나타냈다고 하였으며, Kim 등(2003)도 pH 5.5에서 배 단백질분해효소가 강한 활성을 나타낸 반면 pH 8.0이상에서는 활성이 전혀 없는 것으로 보고 하였다.

파인애플 및 키위, 파파야 그리고 무화과 등의 과실에 존재하는 단백질분해효소의 정제 및 특성에 관한 연구는 오래전부터 국내외에서 지속적으로 수행되어져 왔다.

최 등(1992)은 파인애플에서 추출한 단백질분해효소를 황산암모늄염석, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, gel filtration을 이용하여 약 21배로 분리 및 정제하였고, 정제된 효소의 분자량은 약 22 kDa이었으며, pH 6.0, 온도는 60℃에서 돈육의 연육효과가 최적임을 확인하였다. 파인애플에서 추출한 단백질분해효소의 특성은 Ko 등(1996)의 연구에서와 같이 효소의 최적 pH는 7.5였고, 온도는 62.5℃이었다고 보고하였으며, Ko 등(1990) 및 Lee 등(2000)도 파인애플에서 추출한 단백질분해효소의 특성에 대하여 보고하였다.

鯨島 등(1991)은 키위에서 추출한 단백질분해효소는 파파인 보다 강한 연육화효과가 있다고 보고 하였으며, Kim 등(1989)은 한국에서는 “양다래”로 소개된 kiwifruit(*Actindia chinensis*)에서 추출한 단백질 분해효소를 유안분획, Sephadex G-100 filtration 및 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography등의 과정을 거쳐 정제하였는데 정제효소의 specificity activity는 30.10 unit/mg으로 10.95배 증가하였고 회수율은 7.48%에 달하였으며, 최적 pH는 7.0, 최적 온도는 45℃이었다고

보고 하였다. Yoon 등(1991)도 키위에서 단백질분해효소를 추출한 결과 specificity activity 196.95 unit/mg이고 최적 pH는 3.0, 온도는 60℃ 이었다고 보고 하였으며, 이와 같은 키위에서 추출한 단백질분해효소의 활성은 Ogawa 등(1990); Cho 등(1994); Sugiyama 등(1996); Rho 등(2002)등 다수의 연구자에 의하여 그 기능이 밝혀지게 되었다.

Youn 등(1974)은 papain의 우육 연화효과를 실험한 결과 0.05% 첨가시 25℃에서 40~60분간 처리한 것이 가장 좋은 연화효과를 나타냈다고 보고 하였다. 파파야에서 추출한 단백질분해효소의 특성은 Park 등(1979)이 70℃에서 30분간 처리하였을 때 역가가 약 40% 감소하였다고 보고 하였으며, 이와 같은 파파야에서 추출한 단백질분해효소에 관한 연구는 다수의 연구자에 의하여 밝혀졌다(Brocklehurst *et al.*, 1979; Youn and Yang, 1974). 또한 Lee 등(1989)은 파파야에서 추출한 단백질분해효소를 CM-Sephadex column으로 정제한 결과 specificity activity가 0.83 unit/mg였고, 약 27 kDa에서 band가 나타났으며, 최적 활성의 pH는 7.0로 나타났다고 보고 하였다. 이와 같이 파파야에서 추출한 단백질분해효소에 관한 연구는 Kang 등(1974) 및 Noh 등(1980) 등 다수의 연구자에 의하여 수행되었다.

Kim 등(1987)은 ficin을 우육에 처리시 온도 및 시간에 따라 분해도가 증가하였다고 보고 하였는데, 대부분의 일반효소의 최적 온도는 40℃에서 불활성화 되고 75℃에서 약 5분간 가열시 파괴되는 것으로 알려졌다. 그러나 식품가공에 쓰이는 대개의 식물성 단백질분해효소의 활성 온도 범위는 60~80℃ 정도로서 근육 단백질의 가수분해 효과역시 60~80℃에서 최대로 된다고 보고 하였다(Mamoru and Masanori, 1973; Cheng and Parrish, 1978).

Kim 등(1986)은 무화과에서 단백질분해효소를 황산암모늄 염분획과,

CM-cellulose chromatography를 이용하여 정제 후 전기영동상으로 확인한 결과 main band에서 단일 band가 나타났으며, 최적 pH는 7.0이고 최적 온도는 60℃라고 보고하였다. Kim 등(1988)은 무화과에서 추출한 ficin을 우유에 처리하여 단백질 분해현상을 전자현미경을 이용하여 관찰했으며, 이와 같이 파파야에서 추출한 단백질분해효소에 관한 연구는 (Kee *et al.*, 1998)등 다수의 연구자에 의하여 밝혀졌다.

신고배(*Pyrus serotina* L.)는 장미과(*Rosaceae*) 배나무아속(*Pomoideae*) 배나무 속(*Pyrus*)에 속한다. 배는 지역마다 종류가 다양하며 품종과 성분에도 차이가 있다. 서양배의 원종인 *Pyrus communis* L.의 품종에 대해서는 비교적 많은 연구가 있었으나 우리나라와 일본에서 주로 재배되고 있는 *P. Pyrifolia*에 관한 연구는 1950년대 과피색, 육질, 과즙의 양, 향기, 숙기 등의 연구와 크기, 당도 등에 관한 기초자료가 소수 있을 뿐이다(Shin *et al.*, 1983). 신고배는 1915년 국지추옹씨가 일본에서 천의천에 금춘추를 교배 육성한 뒤 1927년에 명명한 품종이며 국내에는 1930년대에 도입되었다. 본 논문에 사용된 한국산 신고배의 개화기는 4월이고, 숙기는 10월 중순으로 과피는 담황색이며, 수확 후 2개월 정도 저장했던 배의 pH는 약 5.4이고, 시간의 경과에 따라 pH가 저하되는 경향으로 나타났으며, 수확 후 10개월 정도 저장했던 배의 pH는 약 4.5로 측정되었다.

한국산 배에서 추출한 단백질분해효소의 연구는 Choe 등(1996), Kim 등(2003), Han 등(2004)에 의해 지속적으로 연구되어 왔는데 Choe 등(1996)은 한국산 배에서 추출한 조 단백질분해효소가 pH 3.0과 pH 7.0에서 그리고 온도는 약 40℃에서 최고의 활성을 보였다고 보고하였고, Kim 등(2003) 배 단백질분해효소를 계육의 actomyosin에 처리시 pH 5.3에서 최적의 분해 활성을 가진다고 보고하였으며, Han 등(2004)은

신고배와 추황배에서 추출한 단백질을 0.1% 첨가했을 때 가장 낮은 전단력을 보였으며, 분자량은 약 30 kDa을 나타냈다고 보고 하였다. 그러나 한국산 배에서의 단백질분해효소에 관한 정제 및 특성에 관한 연구 보고는 아직 전무한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 한국산 배에서 추출 되어 활성이 확인된 단백질을 가장 효율성 있는 방법을 찾아 정제하고 그 특성을 생화학적으로 규명하기 위하여 실시 하였다.

III. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에서는 수확 후 2개월 된 경기도 안성산 신고배(*Pyrus serotina* L.)를 사용하였으며, 단백질분해효소의 분해능을 측정 하기 위한 actomyosin은 약 70주령 갈색레그혼(*Gallus gallus* var. *domesticus*)을 도살한 즉시 가슴근육의 백색근을 사용하여 조제하였다.

2. 실험 방법

2.1 근육단백질(actomyosin) 추출

2.1.1 실험재료

- Chicken muscle
- Potassium chloride (KCl) F. W.=74.56
- Sodium bicarbonate (NaHCO₃) F. W.=84.01
- Sodium carbonate anhydrous (Na₂CO₃) F. W.=105.99
- Sodium chloride (NaCl) F. W.=58.01
- Glycerin (CH₂(OH)CH(OH)CH₂(OH)) F. W.=92.09

2.1.2 실험방법

Rampton 등(1971)의 방법을 약간 수정하여 근육단백질을 추출 하였다. 백색근을 세절하여 3배의 Weber-Edsall용액(0.6 M KCl, 0.04 M NaHCO₃, 0.01 M Na₂CO₃)을 가하여 교반한 후 4℃에서 24시간동안 저장하며 1회~2회 교반 후 세절 백색근 중량의 2배(w/v)로 0.6 M KCl

용액을 가하여 충분히 교반한 다음, 4℃에서 20,000×g로 1시간 원심분리(Beckman Coulter, Inc., Avanti centrifuge J-E, USA)를 하여, 4℃ 정도의 저온에서 상등액만을 멸균거즈로 여과한 후 여과액과 동량의 증류수를 가하여 5분간 교반한 다음, 4℃에서 8,000×g로 10분간 원심분리 하여 침전물만을 수거한다. 이 침전물과 동량의 1 M KCl용액을 가하여 용해시킨 후 4℃에서 20,000×g로 1시간 원심분리 하여 상등액만을 수거한다. 상등액에 약 3배의 증류수를 가한 후 4℃에서 8,000×g로 10분간 원심분리 하였다. 침전된 것을 다시 1 M의 KCl용액에 용해시켜 0.6 M NaCl용액에서 12시간 투석한 후 4℃에서 20,000×g로 1시간 원심분리를 한 후 상등액과 동량의 글리세린을 혼합하여 -70℃에 저장하여 사용했다.

2.2 배 단백질분해효소의 추출

2.2.1 실험재료

- 신고배(*Pyrus serotina* L.)
- L-Cysteine (HSCH₂CH(NH₂)COOH) F.W.=121.15
- EDTA(Ethylendiaminetetraacetic acid) (C₁₀H₁₆N₂O₈) F.W.=292.2

2.2.2 실험방법

Choe 등(1996)의 방법을 약간 수정하여 배 단백질분해효소를 추출하였다. 배 과육과 동량의 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA(pH 7.0) 용액을 pH 6.5으로 조절하여 혼합한 후, 4℃에서 2분간 균질한 다음 멸균거즈로 여과한 액을 4℃에서 8,000×g로 20분간 원심분리한 후 상등액만을 수거하여 70% 포화황산암모늄을 가하여 단백질을 응결, 침전시키고, 침전물을 -20℃의 냉동고에 저장하여 조효소로 사용하였다.

2.3 효소의 정제

2.3.1 실험재료

- L-Cysteine (HSCH₂CH(NH₂)COOH) F.W.=121.15
- EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₈) F.W.=292.2
- DEAE-Sepharose
- Mono Q
- Mini Q column (Mini Q membrane spin column)

2.3.2 실험방법

단백질분해효소의 정제는 조효소를 추출용액(0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA(pH 5.0))으로 용해시켜 투석막에 주입한 다음 외액(0.01 M L-Cysteine, 1 mM EDTA(pH 6.0))으로 4℃에서 12시간 투석한 후 저온실(4℃)에서 DEAE-Sepharose와 Mono Q를 이용한 ion exchange chromatography(AKTA Basic 10, Amersham pharmacia biotech, Sweden)와 Mini Q column(Vivascience, C18 Micro spin column, Germany)을 이용하여 정제하였다. 전 과정은 Fig. 1과 같다.

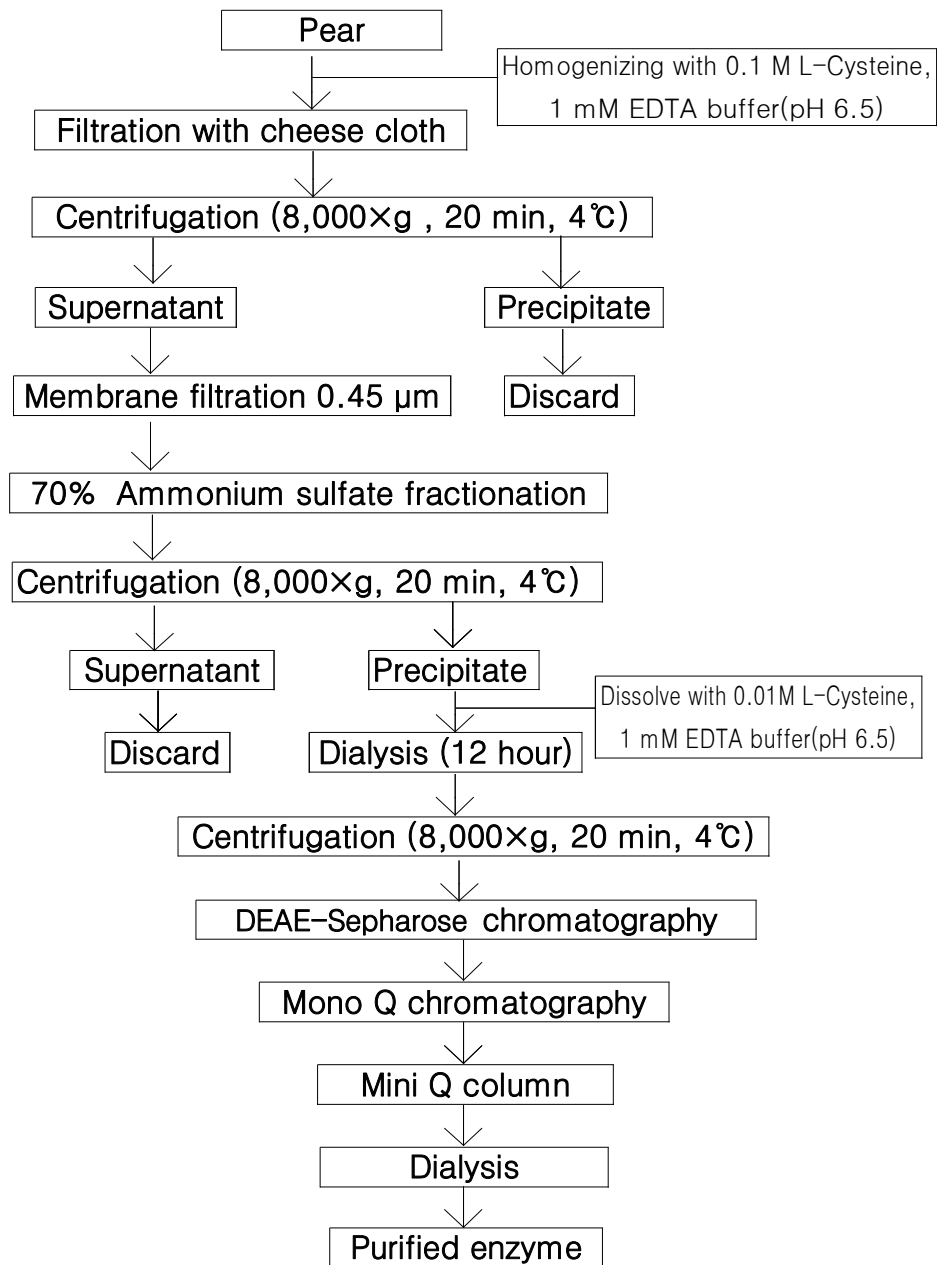


Fig. 1. Purification procedures of protease from Korean pear

2.4 DEAE-Sephacrose ion exchange chromatography

약한 이온교환수지는 그 작용기의 이온화도가 작을 뿐 아니라 매질의 pH에도 좌우되기 때문에 좁은 pH범위 내에서만 이온교환 능력을 가지게 된다(홍 등, 1997). 이온교환수지의 예비처리 및 사용방법은 아래와 같다.

DEAE-Sephacrose column을 3차 증류수에 현탁시킨 다음 0.1 N HCl, 3차 증류수, 0.1 N NaOH 및 3차 증류수의 순서로 세척하고 미립자를 제거시킨 후, column에 0.1 M L-Cysteine(Sigma, St. Louis, USA)와 1 mM EDTA(Sigma St. Louis, USA) 용액 (pH 6.5)으로 평형화 시켰다. 조 효소를 이미 평형화 시킨 DEAE-Sephacrose chromatography에 주입하여 NaCl을 0 M~1 M까지 농도 구배를 만들어 1.0 mL/min의 유속으로 1 mL씩 용액 43 mL로 조효소액을 용출시켰다. 정제 후 용출된 분획들 중 활성이 높은 분획들을 투석하였다.

2.5 Mono Q chromatography

Mono Q는 강한 이온교환수지로서 그 작용의 이온화도가 매우 크기 때문에 그 전부가 거의 하전된 상태가 된다(홍 등, 1997). 이런 이온교환수지의 예비처리 및 사용방법은 아래와 같다.

Mono Q column을 3차 증류수에 현탁시킨 다음 0.1 N HCl, 3차 증류수, 0.1 N NaOH 및 3차 증류수의 순서로 세척하고 미립자를 제거시킨 후, column에 0.1 M L-Cysteine과 1 mM EDTA용액(pH 6.5) 으로 평형화시켰다. 조효소를 이미 평형화 시킨 Mono Q chromatography에 주입하여 NaCl을 0 M~1 M까지 농도구배를 만들어 1.0 mL/min의 유속으로 1 mL씩 용액 43 mL로 조효소액을 용출시켰다. 정제 후 용출된 분획들 중 활성이 높은 분획들을 투석하였다.

2.6 Mini Q column

Mini Q Column을 0.1 N NaOH, 3차 증류수 및 L-Cysteine과 1 mM EDTA용액(pH 6.5)의 순서로 세척하고 미립자를 제거 및 평형화시킨 후, 조효소를 40 μ L씩 주입하여 4℃에서 3,000×g로 5분간 원심분리(Hanil Science Industrial Co., Mega 17R, Korea)하고 0 M~1 M까지 농도구배를 만들어 조효소를 용출시켰다. 용출된 분획들 중 활성이 높은 분획들을 투석하였다.

2.7 SDS-PAGE

2.7.1 실험재료

- Acrylamide monomer (30%T, 2.7%C) : 29.2% acrylamide and 0.093% bisacrylamide
- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
- 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
- 20% Ammonium persulfate
- 10% Sodium dodecyl sulfate
- TEMED(Tetramethylethylenediamine)
- Staining solution : 0.1 M Coomassie brilliant blue R-250 in 12.5% trichloroacetic acid, 50% methanol
- Destaining solution : 10% acetic acid, 30% methanol
- Reservoir buffer : 0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3

2.7.2 실험방법

(1) 원하는 농도의 분리 gel은 Table 2에 표시한 조성대로 혼합한 후, ammonium persulfate와 TEMED를 가하고, slab gel sandwich에 적당

한 tip을 사용하여 comb 끝에서 약 1~1.5 cm 되는 길이까지 분리 gel 용액을 넣고 3차 증류수(gel 위로 0.5 cm 높이로)로 포화시킨 n-butanol로 layering(gel 위로 0.2 cm 높이로)한 다음 뚜렷한 경계선이 나타날 때까지 중합시켰다.

Table 1. Recipe for gel preparation using SDS-discontinuous system

| Separating Gel (100 mL) | | Tacking Gel(20 mL) | | | | |
|-------------------------|------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| Reagents \ gel conc. | 5% | 7% | 10% | 12% | 15% | 4% |
| Acrylamide monomer | 16.7 | 23.3 | 33.4 | 40 | 50 | 2.7 |
| 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8) | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | – |
| 0.5 M Tris-HCl(pH 6.8) | – | – | – | – | – | 2.5 |
| 10% SDS | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.2 |
| Distilled water | 57 | 50.40 | 40.35 | 33.75 | 23.75 | 14.50 |
| Deaerate | | | | | | |
| 20% Ammonium persulfate | 0.25 | 0.25 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.06 |
| TEMED | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.02 |

Unit : mL

(2) 중합된 gel의 표면을 증류수로 잘 닦은 후, filter paper로 유리의 물기를 제거하고 Table 1의 조성대로 누적 gel을 만든 다음, comb을 삽입하고, 적당한 바늘을 사용하여 주사기로 기포가 생기지 않도록 조

심하면서 누적 gel 용액을 붓고 중합시켰다.

(3) Gel이 완전히 중합된 다음 comb을 제거하고 각 홈 들을 reservoir 완충 용액으로 잘 씻은 다음, 같은 용액으로 채운 후, sample을 2X sample 완충용액(Table 2)과 섞고 100℃에서 5분간 가열 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 조심스럽게 주입하였다.

Table 2. Composition of sample buffer for SDS-discontinuous system

| Reagents | Volume(10 mL) |
|------------------------|---------------|
| 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 | 1.0 mL |
| 10% SDS | 2.0 mL |
| 2-Mercaptoetanol | 0.5 mL |
| Glycerol | 1.5 mL |
| 0.16% Bromophenol blue | 2.5 mL |
| Distilled water | 3.5 mL |

(4) 다음 전기영동 장치를 준비하고 위와 아래 rank에 teservoir 완충 용액을 부은 후 gel 전체 표면 면적 2 cm² 당 (표면 면적은 gel 표면 길이 × gel 표면 두께) 30 mA의 일정한 전류로 sample 완충용액내 tracking dye인 bromophenol bule가 바닥에서 0.5~1 cm에 도달할 때 까지 전개시켰다.

(5) 전기영동이 끝난 gel은 염색용액으로 5시간 이상 염색시키고, 탈색용 액으로 gel 배경의 색이 완전히 없어질 때까지 탈색시켰다(Laemmli, 1970).

2.8 SDS-PAGE를 이용한 단백질분해효소의 정제 여부 및 분해도 관찰

단백질분해효소의 정제 여부 및 분해도는 Davis 등(1964)과 Oh 등(1997)의 사용방법을 수정하여 측정하였다. 단백질분해효소 50 μ L, 1 M L-Cysteine 과 10 mM EDTA 용액(pH3.0~9.0)을 40 μ L 및 3차 증류수 260 μ L를 혼합하고, 단백질 분해양상은 2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L, 단백질분해효소 50 μ L, 1 M L-Cysteine 과 10 mM EDTA 용액 (pH 3.0~9.0)을 40 μ L 및 3차 증류수 210 μ L를 혼합하여 70℃에서 1시간 반응 후 각각 동량의 2X Sample 완충용액 (Table 2)과 섞으며, 100℃에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 조심스럽게 주입하여 gel을 전개시켜 전기영동한 후 gel을 silver staining과 CBB염색을 통해 정제 여부 및 분해도를 확인하였다(Rattrie and Regenstein, 1977; Ryan *et al.*, 1998).

2.9 Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)염색

전기영동 후 gel염색은 CBB염색액 0.25% Coomassie Brilliant Blue R 250, 5% Methanol, 7.5% Acetic acid을 사용하여 약 20분정도 염색을 진행 하였다.

탈색액은 25% Methanol, 7.5% Acetic acid을 사용하여 약 4시간정도 탈색을 진행하였다.

2.10 Silver staining

전기영동 후 gel염색은 Silver staining Kit(Amersham Bioscience, USA)를 사용하였다.

Silver staining Kit의 Protocol에 의해 sensitizing 단계에서는 ethanol 75 mL, sodium thiosulphate 5%(w/v) 10 mL, sodium acetate(17 g)을 증

류수에 혼합하며 총량이 250 mL까지 정량한다. 이 용액으로 30분 동안 shaking한 후 증류수를 이용하여 5분씩 3반복하여 세척 한다. Developing 단계에서는 sodium carbonate(6.25 g), formaldehyde 37%(w/v) 0.05 mL 을 증류수에 혼합하며 총량이 250 mL까지 정량한 후, 이 용액으로 2~5분간 shaking 한다. Stopping 단계에서는 EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.65g) 을 증류수에 혼합하며 총량이 250 mL까지 정량한 후 이 용액으로 10분 간 shaking한 다음 증류수를 이용하여 5분간 shaking을 3반복 하여 gel을 가시화하였다.

2.11 단백질분해효소의 분자량 측정

정제 단백질분해효소의 분자량은 Weber 등(1969)의 방법에 따라 전기영동상으로 측정하였으며, 전기영동한 gel을 R_m (relative mobility) 값에 따라 표준품으로 240 kDa, 140 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 35 kDa, 25 kDa등을 사용하였다.

2.12 단백질분해효소의 농도 측정

2.12.1 실험재료

- Bovine serum albumine(BSA, Bio-Rad Protein assay standard, store at 4°C)
- 0.15 M NaCl F.W.=58.44
- CBB solution (Bio-Rad Protein assay dye reagent concentrate store at 4°C)

2.12.2 실험방법

(1) 표준곡선 작성

시험관에 1.0 mg/mL의 BSA를 각각 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ L씩 분주하고, 100 μ L되도록 0.15 M NaCl를 채운다. 5배 희석 후 여과한 CBB solution을 각각 5 mL씩 넣어 잘 섞은 후 2~20분간 실온에 방치한다. 효소면역기(Molecular Devices, Spectra max plus 384, USA)로 595 nm 파장에서 단백질 농도에 따라 흡광도를 각각 3반복씩 측정하여 표준곡선을 작성한다. 공시료는 CBB 용액만을 첨가하여 동일한 측정을 실시하였다.

(2) 단백질의 농도측정

시험관에 1.0 mg/mL의 각 효소들을 각각 0, 20, 40, 60, 80, 100 mL씩 분주하고, 100 μ L되도록 0.15 M NaCl를 채운다. 5배 희석 후 여과한 CBB 용액을 각각 5 mL씩 넣어 잘 섞은 후 2~20분간 실온에 방치한다. 효소면역기로 595 nm 파장에서 단백질 농도에 따라서 흡광도를 각각 3반복 측정한 후 흡광도의 평균을 구하여, 표준곡선에 의해 농도를 측정한 후 각각의 수치에 따라 시료의 양의 수치로 제산하였다. 이때 측정된 수치의 평균값을 구하였다. 공시료는 CBB 용액만을 첨가하여 동일한 측정을 실시하였다. Chromatography를 이용하여 분획된 단백질의 농도는 280 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

$$\text{농도(mg/mL)} = \frac{\text{효소 농도} - \text{Blank 농도}}{\text{BSA 계수}} \times \text{희석배수}$$

2.13 근육단백질(actomyosin)의 농도 측정

Actomyosin의 농도는 Biuret(Gornall *et al.*, 1948)법에 준하여 시험관에 시료를 0.1, 0.2, 0.5, 1 mL씩 분주한 후 1 mL가 되도록 증류수를

채운 후, Biuret 용액을 각각 4 mL씩 넣는다. 효소면역기를 이용하여 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{농도(mg/mL)} = \frac{\text{단백질농도} - \text{Blank 농도}}{\text{BSA 계수}} \times \text{희석배수}$$

2.14 단백질분해효소의 활성도

2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L, 단백질분해효소 50 μ L, 1 M L-Cysteine 과 10 mM EDTA 용액 (pH 6.5)을 40 μ L 및 3차 증류수 210 μ L를 혼합하여 70°C에서 1시간 반응 후 동량의 2X Sample 완충용액(Table 2)과 혼합하여 100°C에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입하여 gel을 전개시켜 전기영동한 gel을 Sigma Gel Software(Jandel Scientific Co., USA)를 이용하여 actomyosin의 분해량 차이를 확인하여 활성도를 측정한 후 단백질분해효소가 1 μ g actomyosin을 분해하는데 소요되는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

2.15 Image 분석

은염색한 gel들은 image scanner(UMAX data system, Powerlook 1120, Taiwan)를 이용하여 gel 이미지를 얻었으며, 이미지의 분석은 Sigma Gel Software를 이용하여 단백질의 분해량 차이를 확인하였다.

2.16 In gel digestion

이미지의 분석 후 확인된 차등 발현 단백질들은 수술용 칼로 gel에서 분리하였다. gel을 잘라서 PCR tube에 옮겨 담고 증류수 200 μ L를 첨가하여 세척하였다. 은염색한 gel은 30 mM potassium ferricyanide와 100 mM sodiumthiosulfate을 1:1로 혼합한 용액으로 탈색한 후 증류수

로 2회 세척하였다. Acetonitrile(ACN)을 가하여 gel squeeze하였다. ACN을 제거한 다음 Speed vac에서 건조하였으며, 건조 후 10 mM DTT(α - Dithothreito) 와 100 mM ABC(Ammonium bicarbonate)를 첨가하여 56℃ 에서 1시간 동안 반응시킨 후 55 mM IAA(Iodoacetamide) 와 100 mM ABC를 첨가하여 실온의 암실에서 40분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 ACN을 가하여 gel squeeze 하였다. ACN을 제거한 다음 Speed vac에 건조하였으며 건조 후 trypsin(Promega, USA)으로 37℃ 에서 16시간 반응하여 단백질의 분해를 유도하였다. 분해 된 단백질을 회수하기 위해 50% ACN 과 0.1% FA(formic acid)를 첨가하여 원심분리 후 상등액을 취하였다. 반응 후 얻어진 펩타이드는 50% ACN 과 0.1% FA 을 이용하여 회수하였고, Speed vac을 이용하여 건조 시켰다.

2.17 MALDI-TOF (Matrix Assited Iaserdesorption/ionization time of Flight)

MS/MS(Mass Spectrometry)를 이용한 펩타이드 질량 지문법

건조된 시료들은 0.5% TFA(trifluoroacetic acid)에 용해하였으며, MALDI-TOF전에 Zip Tip(Milipore, USA)으로 정제했다. 결정화를 시키기 위하여 동일양의 peptide와 matrix를 섞은 후 Voyager DE STR MALDI-TOF MS/MS(Per Septive Biosystem, USA)를 이용하여 펩타이드 질량 지문법을 분석하였다.

2.18 단백질동정 및 Database 검색

질량분석 후의 결과를 Matrixscienceb (<http://www.matrixscience.com>) server의 Mascot MS/MS Ion Search는 각각의 MS/MS Spectrum과 일치하는 peptide sequence를 조사한 후 이들 펩타이드의 상동성 단백

질을 검색하였다.

2.19 pH 조건에 따른 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해

2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L, 단백질분해효소 50 μ L, 1 M L-Cysteine 과 10 mM EDTA 용액(pH 3.0~9.0) 을 40 μ L 및 3차 증류수 210 μ L를 혼합하여 70°C에서 1시간 반응 후 동량의 2X Sample 완충용액(Table 2)과 혼합하여 100°C에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입하여 gel을 전개시켜 전기영동한 gel을 Sigma Gel Software를 이용하여 actomyosin의 분해량 차이를 확인하여 분해도를 측정하였다.

2.20 온도 변화에 따른 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해

2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L, 단백질분해효소 50 μ L, 1 M L-Cysteine 과 10 mM EDTA용액(pH 6.5)을 40 μ L 및 3차 증류수 210 μ L를 혼합하여 온도(4°C, 25°C, 37°C, 60°C, 70°C 및 80°C)에서 1시간 반응 후 동량의 2X Sample 완충용액(Table 2)과 혼합하여 100°C에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입하여 gel을 전개시켜 전기영동한 gel을 Sigma Gel Software를 이용하여 actomyosin의 분해량 차이를 확인하여 분해도를 측정하였다.

2.21 반응시간에 따른 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해

2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L, 단백질분해효소 50 μ L, 1 M L-Cysteine 과 10 mM EDTA 용액(pH 6.5)을 40 μ L 및 3차 증류수 210 μ L를 혼합하여 온도를 70°C에서 시간(0시간, 0.5시간, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간 및 12시간) 반응 후 동량의 2X Sample 완충용액

(Table 2)과 혼합하여 100℃에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입하여 gel을 전개시켜 전기영동한 gel을 Sigma Gel Software를 이용하여 actomyosin의 분해량 차이를 확인하여 분해도를 측정하였다.

2.22. 냉전계방사형 주사전자현미경을 이용한 근육단백질(actomyosin)의 구조 변화 관찰

실험구의 시료는 2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L, 단백질분해효소 50 μ L, 1 M L-Cysteine과 10 mM EDTA 용액(pH 6.5) 40 μ L 그리고 3차 증류수 210 μ L를 혼합한 후 반응 시키지 않고, 대조구의 시료는 2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L, 1 M L-Cysteine과 10 mM EDTA 용액 (pH 6.5) 40 μ L 그리고 3차 증류수 260 μ L를 혼합하여 70℃에서 2시간 반응시킨 다음, 실험구와 대조구의 시료를 각각 0.5 μ L씩 JFD(BAL-TEC, JFD 030, Liechtenstein)를 이용하여 급속동결 한다. High vacuum cryo transfer system(BAL-TEC, VCT 100, Liechtenstein)을 이용하여 -120℃가 유지되는 Freeze-Fracture/etching System (BAL-TEC, MED 020 GBE, Liechtenstein)에 투입 후 metal knife를 이용 fracture를 시행 후 바로 etching을 -110℃에서 1분간 시행하고, 코팅은 40 mA에서 70초간 Pt(platinum)로 코팅하였고, 구조 관찰은 High vacuum cryo transfer system을 이용 -120℃가 유지된 냉전계방사형 주사전자현미경(HITACHI, S-4700, Japan)에 투입 후 가속전압을 10.0 kV에서 관찰하였다.

IV. 결과 및 고찰

1. 배 단백질분해효소의 추출 및 염분획

Fig. 1에서와 같이 과피를 제거한 과육과 동량의 0.1 M L-Cysteine과 1 mM EDTA(pH 7.0) 용액을 혼합하여 pH 6.5로 조절한 다음, 4℃에서 2분간 균질한 후 4℃에서 8,000×g로 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 70% 포화황산암모늄을 가하여 포화상태가 되도록 응결시킨 후 원심분리를 통하여 형성된 침전물을 0.01 M L-Cysteine과 1 mM EDTA(pH 7.0)용액을 혼합 후 pH 6.5으로 조절한 용액을 외액으로 하여 24시간 투석하였다. 이때 얻어진 결과는 Table 3에서와 같이 회수율은 35.88%였고, 정제도는 1.17배, specificity activity는 1630 unit/mg 이었다.

배 단백질분해효소를 추출하여 농도를 측정한 결과, 단백질의 농도는 0.20 mg/mL이었으며, 계육에서 actomyosin을 추출하여 측정한 농도는 2.03 mg/mL이었다.

2. DEAE-Sepharose ion exchange chromatography

최 등(1992)과 Kee 등(1998)은 황산암모늄으로 농축시킨 후 단백질의 투석을 통해 얻어진 조단백질을 DEAE-cellulose column에 주입하여 분리 및 정제 하였다.

Lee 등(2001)은 조효소를 0.2 M phosphate buffer(pH 6.0)로 추출한 후 70% 포화황산암모늄을 가하여 농축한 조효소를 24시간 투석한 후

DE52 anion exchange chromatography한 결과, 효소의 활성은 NaCl의 농도가 0.2 M진후에서 용출되었으며, 회수율은 79.4%, 정제도는 4배, specificity activity는 19.6 unit/mg이었다.

본 실험에서는 조효소를 70% 포화황산암모늄을 가하여 응결시킨 후 농축한 조단백질을 추출용액에 녹인 다음 투석막에 주입하여 외액(0.01 M L-Cysteine, 1 mM EDTA Buffer, pH 6.5)으로 12시간 투석 하였다. 투석한 조단백질을 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후 여과액을 DEAE-Sephacel column에 주입하여 1 mL/tube씩 0.5 mL/min의 유속으로 용출 및 분획 하였는데 나타난 결과는 Fig. 2와 같이 2개의 peak로 나타났으며, 활성단백질은 Fig. 3과 Fig. 4에서와 같이 약 0.5 M NaCl에서 용출 되었다. 이 결과는 Table 3에서와 같이 회수율은 16%였고, 정제도는 1.38배, specificity activity는 3848.58 unit/mg이었다.

본 실험에서는 Fig. 5에서와 같이 DEAE-Sephacel column으로 정제한 결과 정제도가 1.38배로 나타났으며, Lee 등(2001)과 Hashizume 등(2003)의 실험에서 정제도는 각각 4배와 8.5배로 나타났는데 이러한 차이는 시료 및 실험방법의 차이에서 비롯된 것으로 사료된다.

최 등(1992)은 DEAE-cellulose column으로 bromelain을 정제한 결과 5개의 fraction으로 분리되었으며, 단백질은 약 0.37 M NaCl에서 활성이 용출되었다고 보고하였고, Kee 등(1998)은 무화과에서 단백질 분해 효소를 DEAE-Sephacel column으로 정제한 결과 단백질이 결합되지 않고 나온 분획과 NaCl 0.1 M 구배에서 용출된 단백질에서만 나타났다고 보고 하였는데, 본 실험 결과 최 등(1992)이 NaCl 농도 구배에서 나타났다는 것과 유사한 결과가 나타났으며, 반면 Kee 등(1998)과는 차이가 나타났다. 이것은 용출하고자하는 단백질분해효소의 특성에 따라 적합한 이온교환수지와 적절한 NaCl 농도 구배의 조건을 갖추어

야 할 것으로 판단되며 또한 홍 등(1997)의 연구에 의하면 약한 이온 교환수지는 그 작용기의 이온화도가 약할 뿐 아니라 매질의 pH에도 변화되기 때문에 좁은 pH범위 내에서만 이온교환 능력을 가지게 된다고 보고 하였으며, Boland 등(1972)은 chromatography를 이용하여 정제한 단백질은 pH 8.9 에서만 단일 band가 나타났음을 보고 하였는데 이를 통하여 볼 때 이온교환수지를 사용할 때는 매질의 pH도 단백질을 정제하는데 중요한 요소 중 하나인 것으로 사료된다.

본 실험에서의 결과 DEAE-Sepharose ion exchange chromatography를 이용한 단백질의 분리 및 정제는 각각의 매질 pH에 따라 분리 및 정제도가 다른 것으로 나타났으며 본 실험의 결과로 보아 배 단백질분해효소의 정제시 매질의 적정 pH는 6.5인 것으로 사료된다.

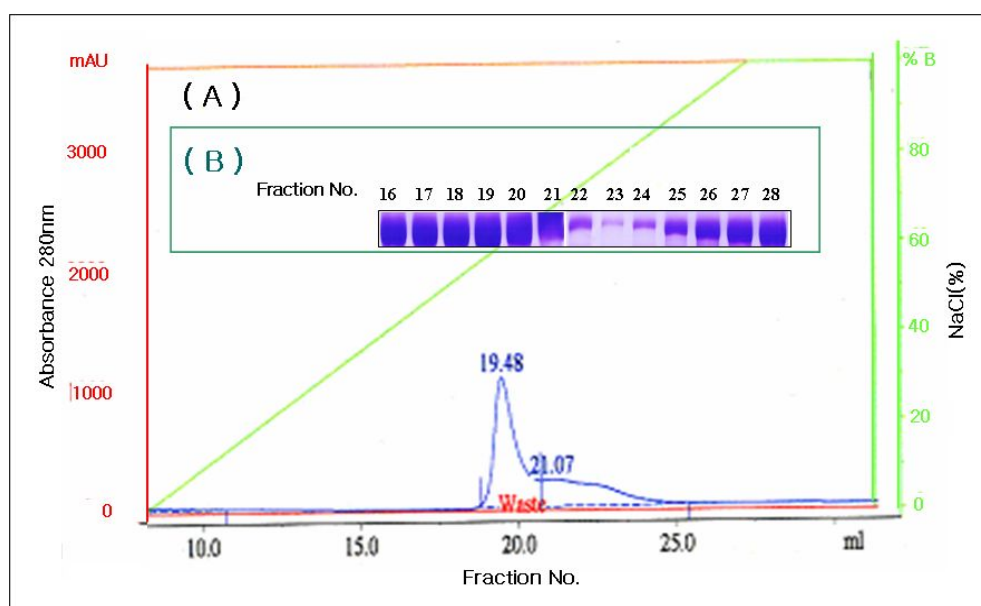


Fig. 2.

Fig. 2. Elution profile of protease from Korean pear with DEAE-Sephacrose chromatography

(A) Pooled fractions containing activity of protease from Korean pear from the first DEAE-Sephacrose chromatography equilibrated with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5). The esterase was eluted with a NaCl gradient between 0 M NaCl with 0.1M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5) and 1 M NaCl with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer (pH 6.5). The reaction sample from major protein in the reaction was measured by the absorbance at 280 nm.

(B) Activity of protease from Korean pear(50 μ L) was detected with 100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) in 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5) at 37°C for 1 hour and carried out SDS-PAGE. SDS-PAGE pattern of each fraction. SDS-PAGE conditions were identical to those described in Fig. 3.

2.1. DEAE-Sepharose ion exchange chromatography를 이용하여 정제된 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해

식물에서 추출한 단백질분해효소의 연육효과를 확인하기 위하여 많은 연구자들은 단백질분해효소를 myosin과 actin에 처리한 후 전기영동상에서 각각 분리된 소분자의 펩타이드 band를 통해 확인하였다(Koohraie *et al.*, 1984).

본 실험에서는 단백질분해효소를 DEAE-Sepharose ion exchange chromatography를 이용하여 정제 후 분해활성을 확인하기 위해 2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L와 단백질분해효소 50 μ L 그리고 1 M L-Cysteine 및 10 mM EDTA 혼합용액(pH 6.5) 40 μ L를 3차 증류수 210 mL와 혼합하여 70°C에서 1시간 반응시킨 다음 동량의 2X sample 완충용액(Table 2)과 혼합하여 100°C에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입하여 전기영동상으로 단백질분해효소의 활성을 확인하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 Fraction 22~Fraction 24가 MHC이 가장 많이 분해되었다. Fig. 3에서 나타난 gel을 Sigma Gel Software를 이용하여 단백질의 분해량 차이를 확인한 결과는 Fig. 4와 같이 Fraction 22에서 활성도는 60%, Fraction 23에서는 활성도가 75%, Fraction 24에서는 활성도가 65%로 나타났다.

본 실험에서 나타난 결과는 배 단백질분해효소가 DEAE-Sepharose ion exchange chromatography를 이용하여 용출된 분획은 NaCl 농도 구배 내에서 3개의 fraction에서 활성이 나타났으며, 그 중 Fraction 23이 활성도가 75%로 가장 높게 나타났다. 이 결과로 보아 안성산 신고배의 단백질분해효소는 DEAE-Sepharose ion exchange chromatography에 의하여 정제되는 것으로 사료된다.

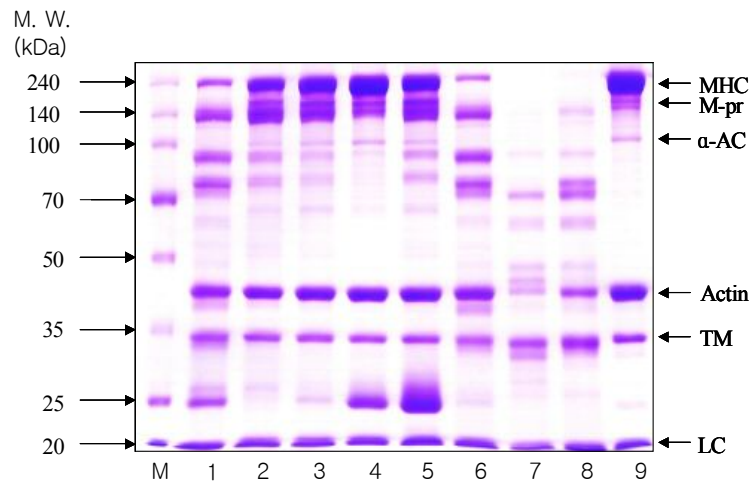


Fig. 3. Effects of protease from Korean pear purified with DEAE-Sephadex chromatography on the hydrolysis of chicken muscle actomyosin

100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) was incubated with protease(50 μ L ,pH 5.5) from Korean pear purified with DEAE-Sephadex chromatography at 37°C for 1 hour. After addition of the 2X sample buffer of same content to the incubated sample, 25 μ L of sample was loaded per Lane. M: Marker, Lane 1: a crude extract, Lane 2: Injection, Lane 3: Washing, Lane 4 : Fraction 16, Lane 5: Fraction 17, Lane 6: Fraction 18, Lane 7: Fraction 19, Lane 8: Fraction 20, Lane 9: Fraction 21, Lane 10 : Fraction 22, Lane 11: Fraction 23, Lane 12: Fraction 24, Lane 13: Fraction 25, Lane 14: Fraction 26, Lane 15: Fraction 27, Lane 16: Fraction 28, Lane 17: actomyosin.

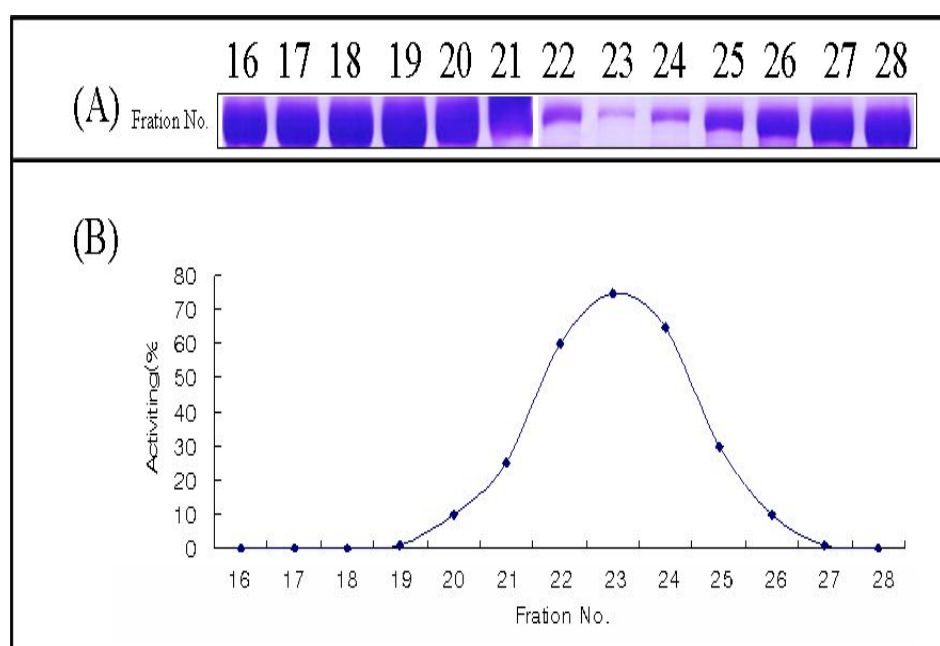


Fig. 4.

Fig. 4. Activity of protease from Korean pear purified with DEAE-Sephadex chromatograph

(A) Activity of protease from Korean pear(50 μ L) was detected with 100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) in 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5) at 37°C for 1hour. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB. SDS-PAGE pattern of each fraction. SDS-PAGE conditions were identical to those described in Fig. 3.

(B) Pooled fractions containing activity of protease from Korean pear from the first DEAE-Sephadex column chromatograph equilibrated with 0.1M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5). The esterase was eluted with a NaCl gradient between 0M NaCl with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5) and 1 M NaCl with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer (pH 6.5). The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB. Densitometry of activity protease was performed with Sigma Gel Software.

2.2. DEAE-Sepharose chromatography를 이용하여 정제된 단백질분해 효소의 정제 여부

Cho (1982)와 Suh 등(1992), 그리고 Lee 등(2001)은 chromatography를 이용하여 분획 및 정제된 단백질분해효소의 정제 여부를 SDS-PAGE로 확인하였다.

본 실험에서는 DEAE-Sepharose chromatography를 이용하여 분획 및 용출된 단백질분해효소 50 μ L와 1 M L-Cysteine, 그리고 10 mM EDTA 혼합용액(pH 6.5) 40 μ L 및 3차 증류수 260 μ L를 혼합한 다음 동량의 2X sample 완충용액(Table 2)을 함께 섞고 100°C에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입하여 전기영동 한 gel을 은염색법을 이용하여 정제 여부를 확인하였다.

Fig. 4에서와 같이 활성도가 가장 높은 Fraction 23을 은염색법을 이용하여 정제여부를 확인한 결과 Fig. 5에서와 같이 아직 타 불순단백질이 많이 혼합된 것이 확인되었고, 다음으로 활성도가 높게 나타난 Fraction 24에서는 분자량이 약 50 kDa이하에서 약 5개의 band가 확인되었다.

본 실험 결과로는 DEAE-Sepharose chromatography를 이용하여 단백질분해효소는 정제 되었으며, 활성이 나타난 fraction만 염분획 후 이온 교환 강도가 강한 Mono Q chromatography로 2차 정제해야 할 것으로 사료된다.

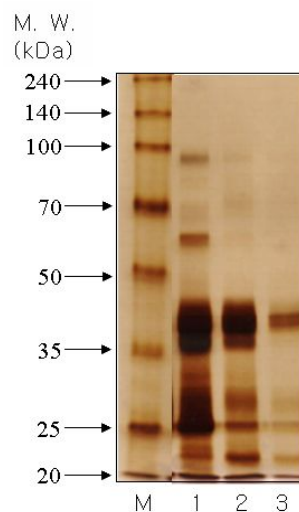


Fig. 5. SDS-PAGE gel electrophoresis of protease from Korean pear purified with DEAE-Sepharose chromatography

The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with AgNO_3 using Silver Stain Plus. We loaded a 10 μL of protease from Korean pear purified by using DEAE-Sepharose column and 10 μL of 2X sample buffer together on the per well. M : Marker, Lane 1 : Fraction 22, Lane 2 : Fraction 23, Lane 3 : Fraction 24.

3. Mono Q chromatography

본 실험에서는 DEAE-Sepharose chromatography를 이용하여 용출 및 분획된 fraction 중 Fraction 22와 Fraction 23 그리고 Fraction 24는 활성은 있으나 단일 band로 분리되지 않았으므로 membrane filter (Millipore, YM 30, USA)으로 여과하여 염분획한 후 2차 정제는 Mono Q column에 주입하여 1 mL/tube씩 0.5 mL/min의 유속으로 용출 및 분획하였다. 결과는 Fig. 6과 같이 2개의 peak가 나타났고, 활성은 Fig. 7에서와 같이 Fraction 16, Fraction 17 및 Fraction 18에서 단백질분해 효소가 용출되었다. 이 Fraction을 각각 전기영동을 이용하여 확인한 결과 Table 3에서와 같이 회수율은 6%였고, 정제도는 7.1배, specificity activity는 9921.62 unit/mg 으로 나타났다. Lee 등(2001)과 비교하면 본 실험에서도 정제도가 상당히 높은 것으로 나타났다.

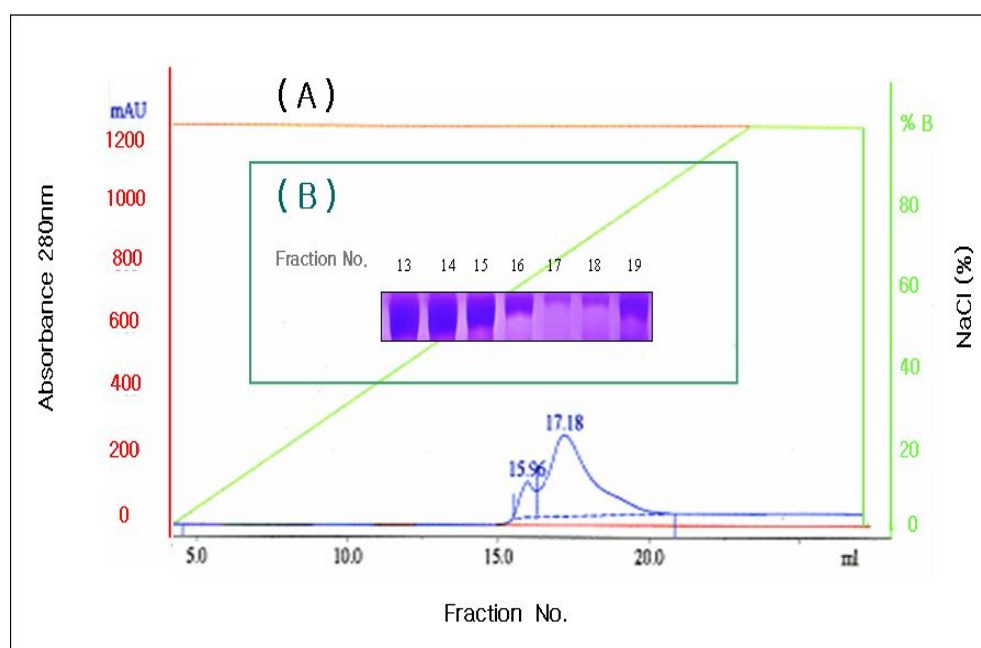


Fig. 6.

Fig. 6. Elution profile of protease from Korean pear with Mono Q chromatpgraphy

(A) Pooled fractions containing activity of protease from Korean pear from the first Mono Q column equilibrated with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5). The esterase was eluted with a NaCl gradient between 0 M NaCl with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5) and 1 M NaCl with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer (pH 6.5). The reaction sample from major protein in the reaction was measured by the absorbance at 280 nm.

(B) Activity of protease from Korean pear(50 μ L) was detected with 100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) in 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5) at 37°C for 1 hour. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB. SDS-PAGE pattern of each fraction. SDS-PAGE conditions were identical to those described in Fig. 7.

3.1. Mono Q chromatography를 이용하여 정제된 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해

Hegarty 등(1969)과 Choe 등(1996)은 단백질분해효소의 연육효과를 확인하기 위하여 단백질분해효소를 myosin과 actin에 처리한 후 전기영동상에서 각각 분리된 소분자의 펩타이드 band를 통해 확인하였다.

Mono Q chromatography를 이용하여 단백질을 분획 및 용출한 후 분해활성을 확인하기 위하여 2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L와, 용출된 단백질 50 μ L 및 1 M L-Cysteine, 그리고 10 mM EDTA 혼합용액 (pH 6.5) 40 μ L를 3차 증류수 210 μ L와 혼합하여 70°C에서 시간대 별로 1 시간 반응 후 동량의 2X sample 완충용액(Table 2)을 혼합하여 100°C에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입하여 전기영동상으로 활성을 확인하였다. 그 결과 Fig. 7에서와 같이 Fraction 16, Fraction 17 및 Fraction 18에서 M-Pr이 분해되었으며, 그 중에 Fraction 17은 MHC가 가장 많이 분해되었고, 활성도는 Fig. 8에서 나타난 것과 같이 Fraction 16에서는 활성도가 40%, Fraction 17은 75%, Fraction 18은 50%로, Fraction 17에서 활성도가 가장 높게 나타났다.

본 실험결과 Mono Q chromatography를 이용하여 분리 및 정제된 단백질은 2개의 peak로 나타났으며 단백질분해효소의 활성은 2개의 peak 중 단백질이 많이 용출된 fraction에서 활성이 큰 것으로 나타났으며 이결과는 Hegarty 등(1969)와 Choe 등(1996)의 보고에서와 같이 단백질분해효소의 연육효과를 전기영동상으로 확인한 결과 소편화된 것으로 확인 되었으며 본 실험에서도 이와 유사한 결과가 확인 되었다.

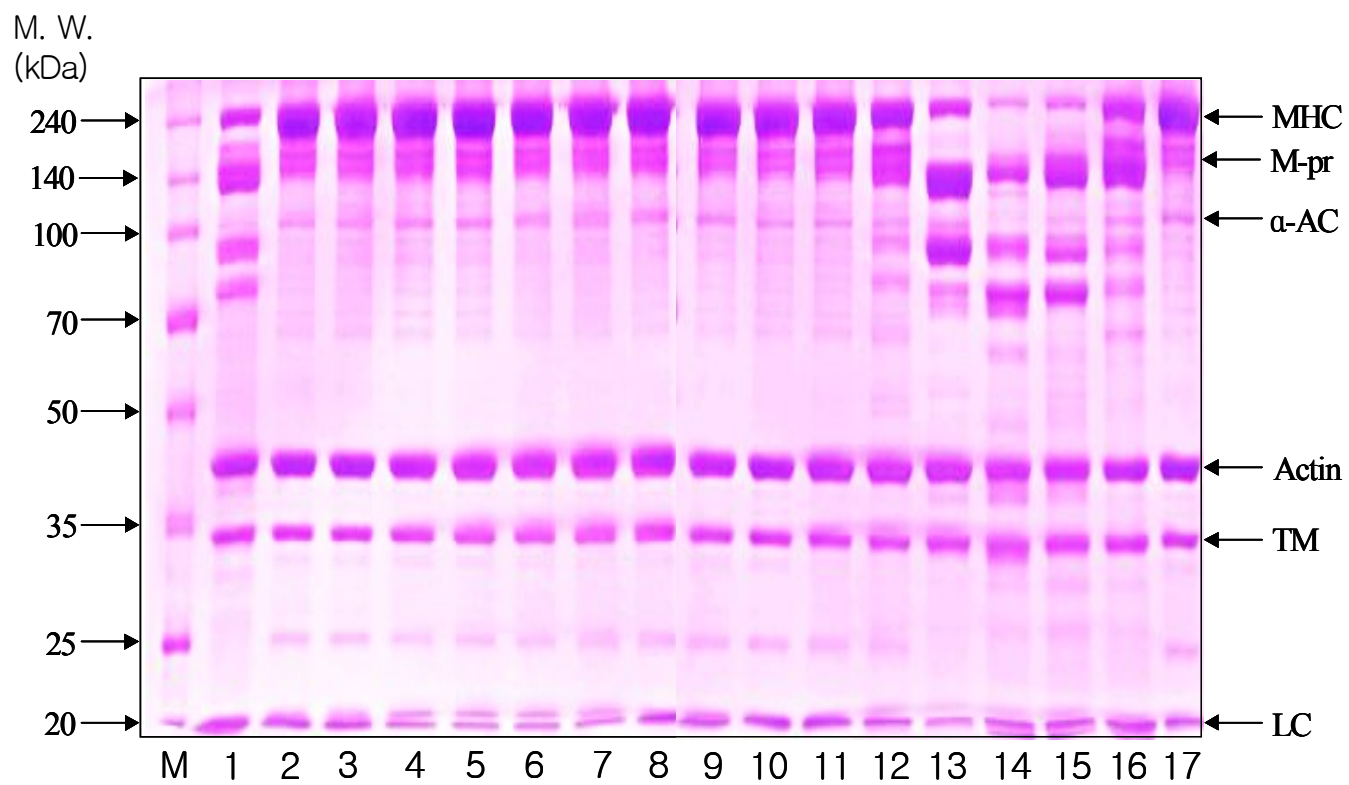


Fig. 7.

Fig. 7. Effects of protease from Korean pear purified with Mono Q chromatography on the hydrolysis of chicken muscle actomyosin

100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) was incubated with purified protease(50 μ L, pH 6.5) from Korean pear with Mono Q at 37°C for 1 hour. After addition of the 2X sample buffer of same content to the incubated sample, 25 μ L of sample was loaded per Lane. M : maker, Lane 1 : a crude extract, Lane 2 : Injection, Lane 3 : Washing, Lane 4 : Fraction 7, Lane 5 : Fraction 8, Lane 6 : Fraction 9, Lane 7 : Fraction 10, Lane 8 : Fraction 11, Lane 9 : Fraction 12, Lane 10 : Fraction 13, Lane 11 : Fraction 14, Lane 12 : Fraction 15, Lane 13 : Fraction 16, Lane 14 : Fraction 17, Lane 15 : Fraction 18, Lane 16 : Fraction 19, Lane 17 : actomyosin.

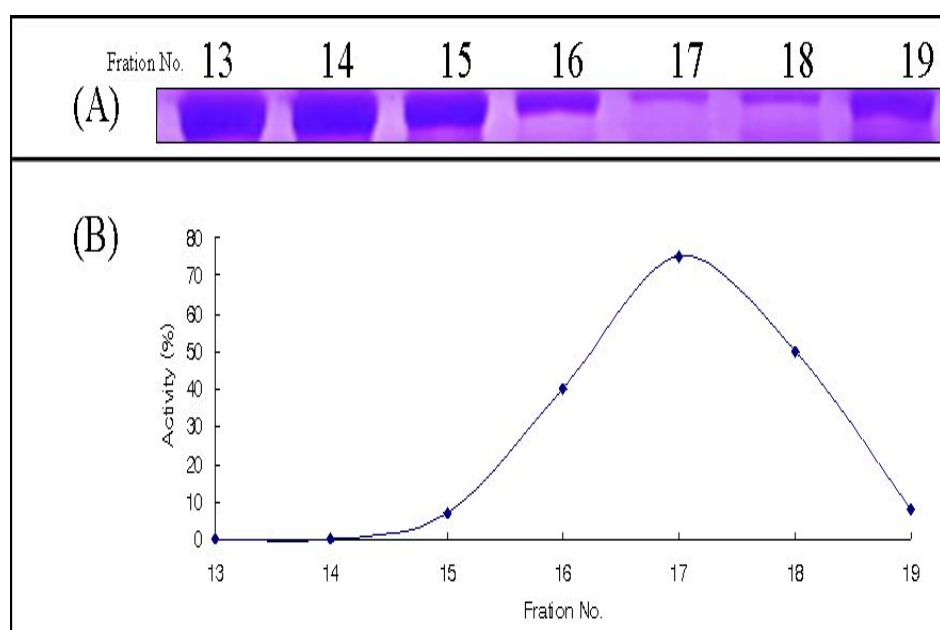


Fig. 8.

Fig. 8. Activity of protease from Korean pear purified with Mono Q chromatography

(A) Activity of protease from Korean pear purified(50 μ L) was detected with 100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) in 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5) at 37°C for 1 hour. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB. SDS-PAGE pattern of each fraction. SDS-PAGE conditions were identical to those described in Fig. 7.

(B) Pooled fractions containing activity of protease from Korean pear purified by using Mono Q column equilibrated with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5). The esterase was eluted with a NaCl gradient between 0 M NaCl with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5) and 1 M NaCl with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer (pH 6.5). The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB. Densitometry of activity protease was performed with Sigma Gel Software.

3.2. Mono Q chromatography를 이용하여 정제된 단백질분해효소의 정제 여부

Suh 등(1992)과 Lee 등(2001)은 Mono Q chromatography를 이용하여 분획 및 정제한 후 단백질분해효소의 정제여부를 SDS-PAGE로써 확인하였다.

본 실험에서는 Mono Q chromatography를 이용하여 분획 및 용출된 단백질을 50 μ L와 1 M L-Cysteine 그리고 10 mM EDTA 혼합용액 (pH 6.5) 40 μ L 및 3차 증류수 260 μ L를 혼합 후 동량의 2X sample 완충용액(Table 2)을 혼합하고 100℃에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입하여 전기영동을 한 gel 을 은염색법을 이용하여 정제 여부를 확인하였다. Fig. 9에서는 은염색법을 통해 정제 여부가 확인된 결과를 보여주고 있다.

본 실험결과는 Mono Q chromatography를 이용하여 분리 및 정제된 단백질을 전기영동상으로 확인한 결과 정제도는 7배로 많이 제거되었으나 Fraction 17과 Fraction 18에 아직 미량의 불순단백질이 혼합되어 있으므로 Mini Q column으로 3차 정제해야 할 것으로 사료된다.

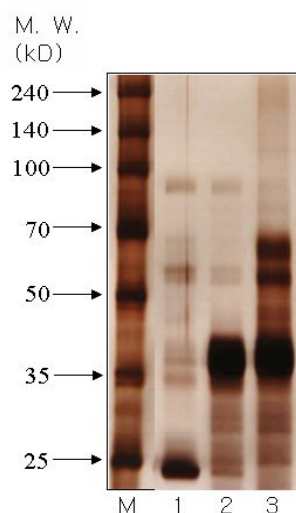


Fig. 9. SDS-PAGE gel electrophoresis of protease from Korean pear purified with Mono Q chromatography

The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with AgNO₃ using Silver Stain Plus. We loaded a 10 μ L of protease purified by using Mono Q column and 10 μ L of 2X sample buffer together on the per well. M : maker, Lane 1: Fraction 16, Lane 2: Fraction 17, Lane 3: Fraction 18.

4. Mini Q column

본 실험은 Mono Q chromatography를 이용하여 분획 후 활성이 있는 Fraction 16, Fraction 17 및 Fraction 18을 membrane filter YM 30으로 여과하여 NaCl을 제거한 후 Mini Q column에 10 mL/tube 씩 주입하여 분획한 결과 Fig. 10과 같이 Gradient 0.3 M과 0.4 M에서 MHC가 분해되어 활성이 나타났는데, 이는 Mini Q column에서 흡착되지 않은 다른 불순단백질이 많이 제거되었음을 보여주고 있다. CBB 염색한 gel은 image scanner를 이용하여 gel 이미지를 얻었으며, 이미지의 분석은 Sigma Gel Software를 이용하여 단백질분해량 차이를 확인한 결과 Fig. 11에서와 같이 Gradient 0.3 M은 활성도가 50%이고 Gradient 0.4 M의 활성도는 40%로 나타났다. 이때 정제된 결과는 Table 3에서와 같이 회수율은 2%였고, 정제도는 25배, specificity activity는 3490.14 unit/mg 이었다.

본 단백질분해효소는 Mini Q column을 통해 분리 및 정제되어 Gradient 0.4 M에서 활성이 나타났고, 정제도는 25배이며, 전기영동한 결과 Fig. 12와 같이 Gradient 0.4 M에서 단일 band로 나타났으며, 분자량은 Fig. 13에서와 같이 약 38 kDa으로 측정되었다.

4.1. Mini Q column을 이용하여 정제된 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해

Naveena 등(2004)은 단백질분해효소의 연육효과를 전기영동상 으로 gel의 분리된 소분자 펩타이드 band를 통해 확인하였다.

본 실험은 단백질분해효소를 Mini Q column에 의해 정제한 후, 2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L와 단백질분해효소 50 μ L그리고 1 M L-Cysteine 과 10 mM EDTA 혼합용액 (pH 6.5) 40 μ L를 3차 증류수 210 μ L와 혼합하여 70℃에서 시간별로(0 시간, 0.5 시간, 1 시간, 2 시

간, 4 시간, 8 시간 및 12 시간) 반응 후 동량의 2X sample 완충용액 (Table 2)과 혼합하여 100℃에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입한 뒤 전기영동상으로 활성을 확인하였다. 그 결과 Fig. 10과 같이 Gradient 0.3 M과 Gradient 0.4 M에서 MHC를 분해하였으며, Fig. 11에서 나타난 것과 같이 Gradient 0.3 M에서는 활성도가 50%, Gradient 0.4 M에서는 활성도가 40%로, Gradient 0.3 M이 활성도가 높게 나타났다.

본 실험결과 Mini Q column을 이용하여 분리 및 정제된 단백질은 Gradient 0.3 M과 Gradient 0.4 M에서 활성 단백질이 용출 되었으므로 이결과는 Naveena 등(2004)의 보고에서와 같이 단백질분해효소의 연육 효과를 전기영동상으로 확인한 결과 소편화된 것으로 확인되었으며 본 실험에서도 이와 유사한 결과가 확인 되었다.

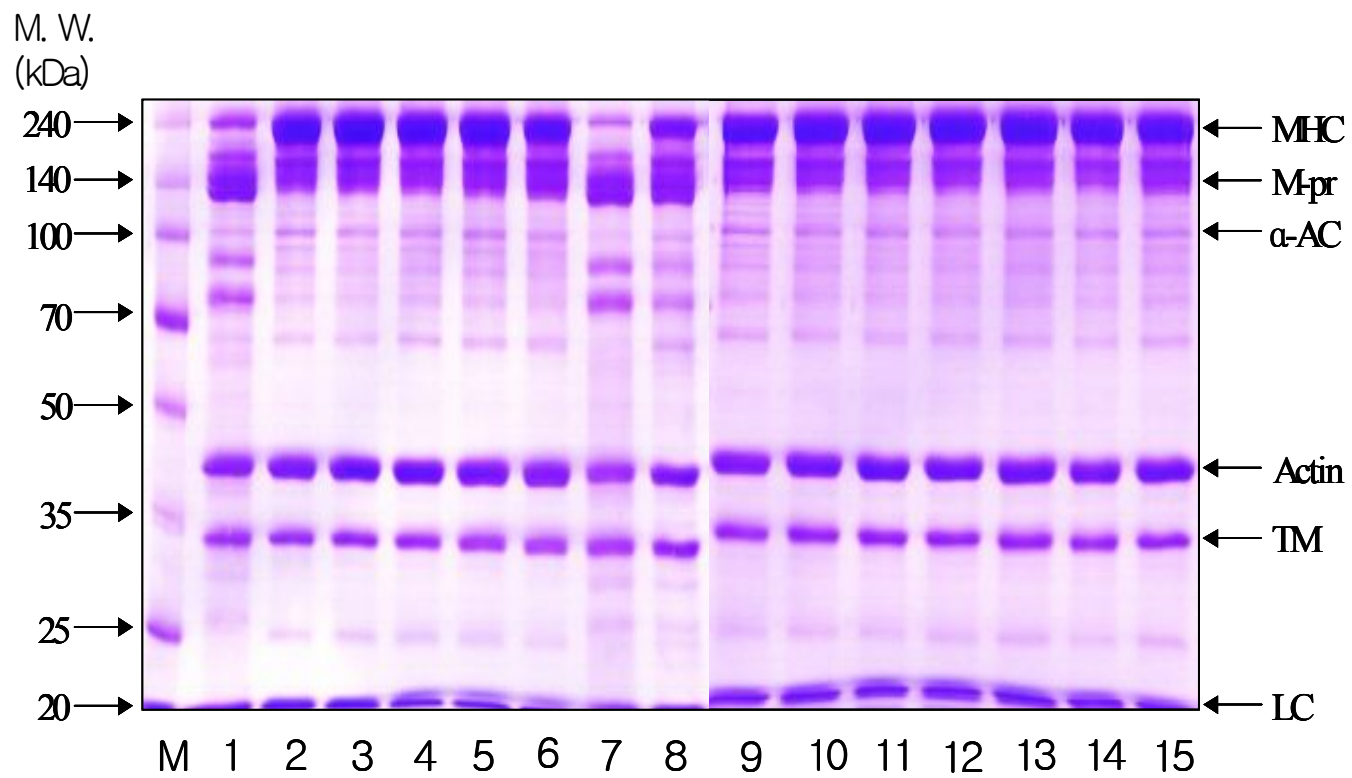


Fig. 10.

Fig. 10. Activity of protease from Korean pear purified with Mini Q column on the hydrolysis of chicken muscle actomyosin

100 μ L actomyosin (2.03 mg/mL) was incubated with protease(50 μ L, pH 6.5) from Korean pear purified with Mini Q column at 37°C for 1 hour. After addition of the 2X sample buffer of same content to the incubated sample, 25 μ L of sample was loaded per Lane. M : maker, Lane 1 : Mono Q Column Fraction 17, Lane 2 : Injection, Lane 3 : Washing, Lane 4 : Gradient 0 M, Lane 5 : Gradient 0.1 M, Lane 6 : Gradient 0.2 M, Lane 7 : Gradient 0.3 M, Lane 8 : Gradient 0.4 M, Lane 9 : Gradient 0.5 M, Lane 10 : Gradient 0.6 M, Lane 11 : Gradient 0.7 M, Lane 12 : Gradient 0.8 M, Lane 13 : Gradient 0.9 M, Lane 14 : Gradient 1.0 M, Lane 15 : actomyosin.

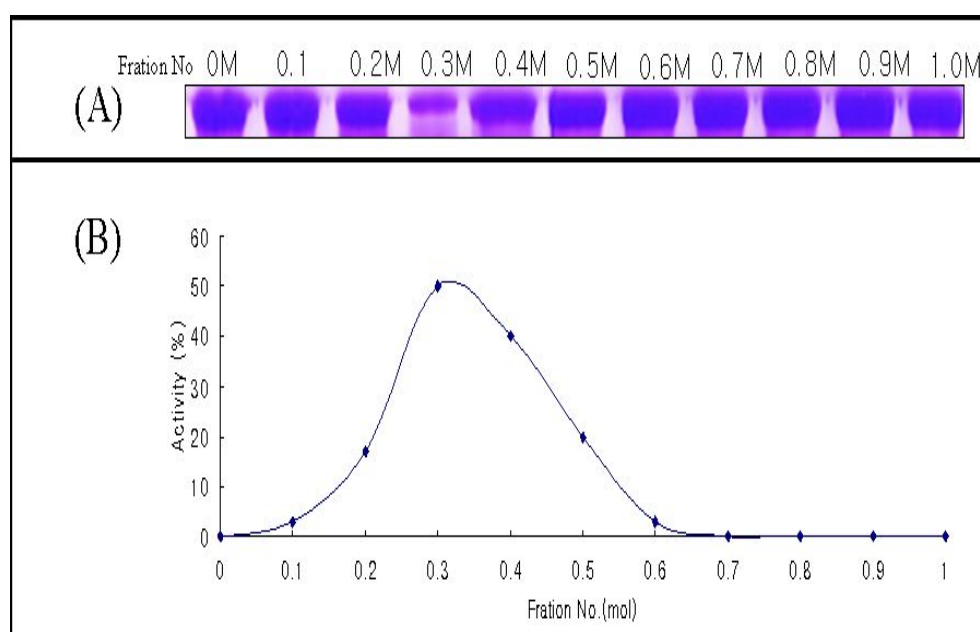


Fig. 11.

Fig. 11. Activity of protease from Korean pear purified with Mini Q column

(A) Activity of protease from Korean pear(50 μ L) was detected with 100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) in 0.1M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5) at 37°C for 1 hour. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB. SDS-PAGE pattern of each fraction. SDS-PAGE conditions were identical to those described in Fig. 10.

(B) Pooled fractions containing activity of protease from Korean pear from the first Mini Q column equilibrated with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5). The esterase was eluted with a NaCl gradient between 0 M NaCl with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5) and 1 M NaCl with 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 6.5). The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB. Densitometry of activity protease was performed with Sigma Gel Software.

4.2. Mini Q column을 이용하여 정제된 단백질분해효소의 정제 여부

Suh 등(1992)과 Lee 등(2001)은 column으로 단백질분해효소의 정제 후 단백질분해효소의 정제여부를 전기영동상으로 확인할 수 있다고 보고하였다.

본 실험에서는 Mini Q column에 의해 정제된 단백질분해효소 50 μ L 와 1M L-cysteine, 그리고 10 mM EDTA 혼합용액(pH 6.5) 40 μ L 및 3차 증류수 260 μ L를 혼합 후 동량의 2X sample 완충용액(Table 2)과 혼합하여 100℃에서 5분간 가열한 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입한 뒤 gel을 전개시켜 전기영동한 후 분자량을 측정하였다. Fig. 12에 나타난 것과 같이 은염색법을 이용하여 효소의 정제 여부를 확인한 결과 활성도가 가장 높은 Gradient 0.4 M에서 단일 band가 나타났다.

본 실험에서 Mini Q column을 통해 분리 및 정제한 배의 단백질분해효소는 활성도가 40%인 Gradient 0.4 M에서 단일 band가 나타났다.

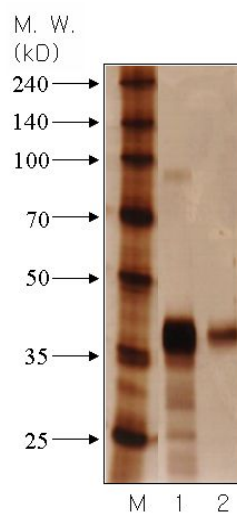


Fig. 12. SDS-PAGE gel electrophoresis of protease from Korean pear purified with Mini Q column

The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with AgNO_3 using Silver Stain Plus. We loaded a 10 μL of protease purified by using Mini Q column and 10 μL of 2X sample buffer together on the per well. M : maker, Lane 1 : Gradient 0.3 M, Lane 2 : Gradient 0.4 M.

4.3. 정제된 단백질분해효소의 분자량 측정

정제된 효소는 Weber 등(1969)의 방법에 따라 전기영동을 실시한 결과 Fig. 13에서와 같이 분자량은 약 38 kDa 정도로 측정되었고, Choe 등(1996)은 배 단백질분해효소로 분자량 약 26 kDa 으로 추정되는 band 외에 2개 정도의 band가 확인되었다고 보고 하였다. 이러한 결과는 본 실험에서 DEAE-Sepharose와 Mono Q chromatography 및 Mini Q column을 이용한 정제과정에서 Choe 등(1996)의 연구에서는 발견되지 않았던 단백질분해효소가 나타난 것으로 사료된다.

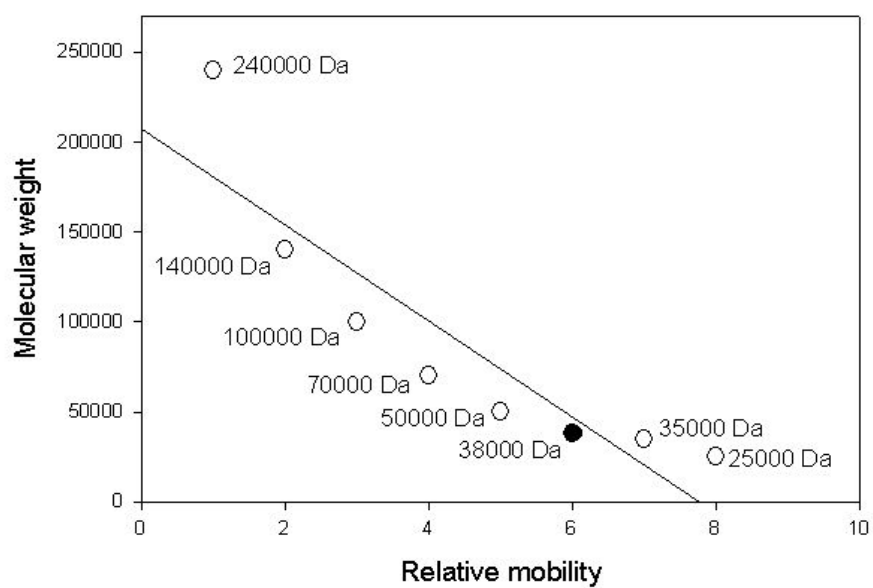


Fig. 13. Determination of the molecular weight of protease from Korean pear purified by SDS-PAGE gel electrophoresis(○), protein maker(●), protease from Korean pear purified.

5. 배 단백질분해효소의 염분획 및 정제

Kim 등(1989)은 키위에서 추출한 단백질분해효소를 추출하여 유안분획과 sephadex G-100 filtration 및 DEAE-sephadex A-50 column chromatography를 이용하여 정제되었으며 정제효소의 specificity activity는 30.10 unit/mg으로 10.95배 증가하였고 활성수율은 7.48%에 달하였다. 또한 최 등(1992)은 파인애플에서 추출한 단백질분해효소를 황산암모늄염석, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, gel filtration을 이용하여 약 21배 정제하였다고 보고 하였다.

본 실험에서는 배 단백질분해효소의 분리단계에 따른 분석치는 Table 3과 같다. 즉 specificity activity는 조단백질분해효소 추출물에서 1396 unit/mg이고 황산암모늄으로 농축 후 1630 unit/mg, 회수율은 35.88%, 정제도는 1.17배로 나타났다. 염분획 후 DEAE-Sephrose chromatography한 결과 Fig. 2에서 와 같이 2개의 peak로 분리되었다. 그 결과 Fraction 23과 Fraction 24에서 활성이 나타났으며 specificity activity는 3848.58 unit/mg, 회수율은 16%, 정제도는 1.38배로 나타났으며, 이때 활성을 가진 Fraction 23과 Fraction 24를 염분획한 후 Mono Q chromatography를 이용하여 2차 정제한 결과 Fig. 6과 같이 2개의 peak로 분리되었으며 Fraction 16, Fraction 17 및 Fraction 18에서 활성이 나타났으며, specificity activity는 9921.62 unit/mg, 회수율은 6.00%, 7.1배로 나타났다. 최종 정제에서 Mini Q column을 사용하여 정제한 결과 Fig. 11과 같이 Gradient 0.3 M과 Gradient 0.4 M에서 활성이 나타났으며 specificity activity는 64,000 unit/mg, 회수율은 38.79%, 정제도는 25배로 나타났다.

본 실험 결과 단백질분해효소의 최종 정제에서는 정제도가 25배로 나타났다. 반면 Kim 등(1989)이 키위에서 추출된 단백질분해효소는 최종 정제의 정제도는 10.95배, 최 등(1992)이 파인애플에서 추출한 단백질분해효소의 정제도는 21배로 보고되었다. 이는 정제물질, 추출방법 및 정제방법의 차이로 인하여 정제도가 다르게 나타난 것으로 사료된다.

Table 3. Purification procedure of protease from Korean pear

| Purification step | Total Protein (mg) | Protein activity (unit) | Specificity activity (unit/mg) | Yield (%) | Purification Fold |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------|-------------------|
| 1. Crude extract | 30.59 | 182,350 | 1,396.0 | 100 | 1.00 |
| 2. Ammonium sulfate precipitate | 40.12 | 65,430 | 1,630.0 | 36 | 1.17 |
| 3. DEAE-Sephrose chromatography | 7.80 | 30,019 | 3,848.58 | 16 | 1.38 |
| 4. Mono Q chromatography | 1.11 | 11,013 | 9,921.62 | 6 | 7.10 |
| 5. Mini Q column | 0.14 | 4,887 | 3,4907.14 | 2 | 25.00 |

6. MALDI-TOF MS/MS를 거쳐 peptide map을 분석

Mini Q column을 이용하여 정제된 단백질을 MALDI-TOF MS/MS 방법으로 Matrixscience(<http://www.matrixscience>) server의 Mascot MS Ion Search를 사용하여 하여 각각의 MS Spectrum과 일치하는 peptide sequence를 조사한 결과 이 단백질은 미지의 단백질로 밝혀졌다(Fig. 14).

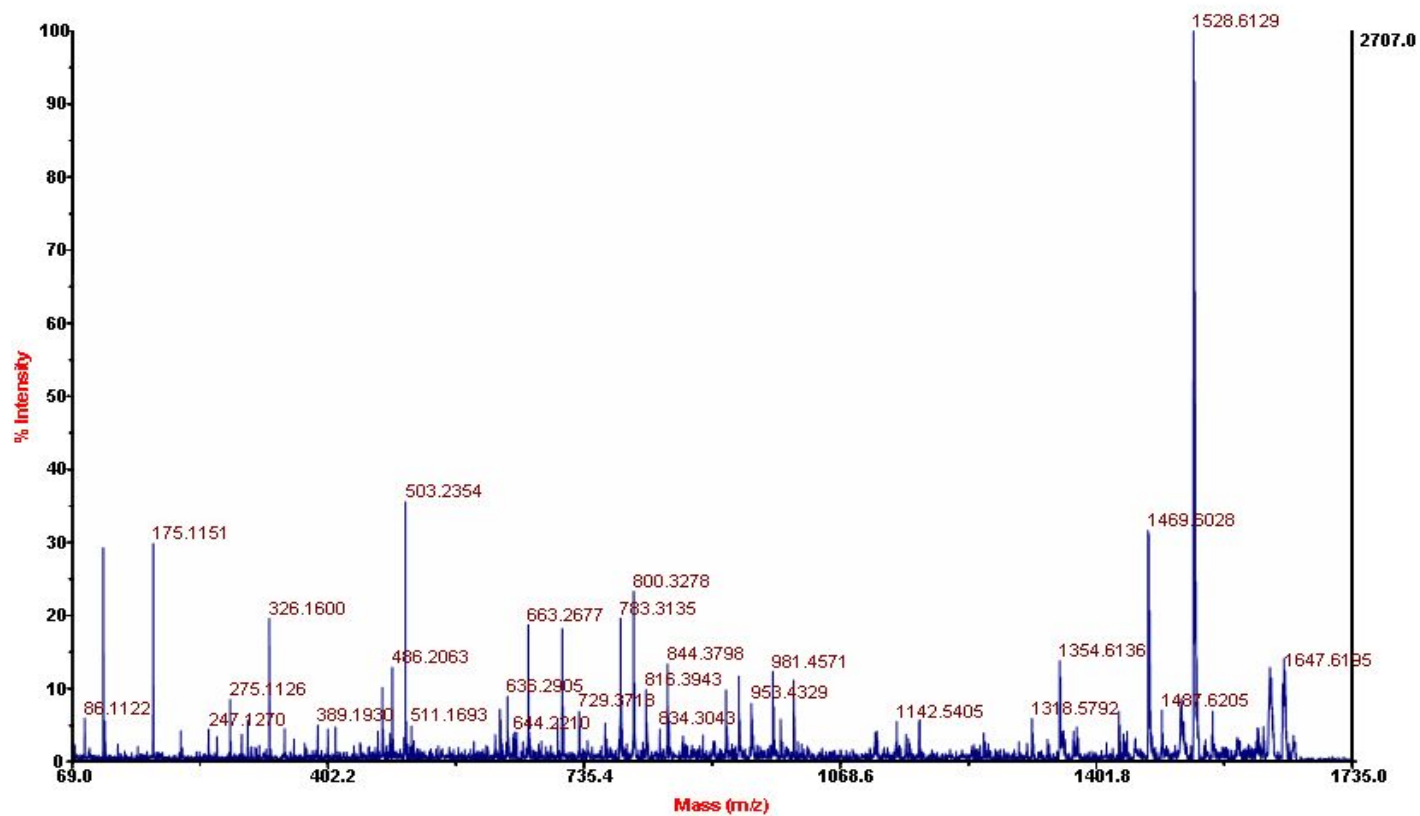


Fig. 14.

Fig. 14. MALDI-Profile from tryptic digests of a candidate spot

Candidate spot was excised and destained as described in the Experimental Procedure. The 12 mg/ μ L modified porcine trypsin (sequencing grade, Promega) / 0.05 M NH_4HCO_3 1:7(v/v) were added to destaining gels in ice box, after 1~2 hour, remove the trypsin solution, and add to 0.05 M NH_4HCO_3 . Overnight incubation in 37°C. After desalting of the protein fragment, MALDI Mass(m/z) spectra were recorded with Reflex IV (BRUKER)

7. pH 조건에 따른 배 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해

단백질분해효소는 최적의 pH에서 최대의 활성을 나타내며 pH가 지나치게 낮거나 높을 경우 반응속도가 떨어지며 효소에 따라 차이는 있지만 대부분 중성 pH 범위에서 가장 활발한 반응을 나타낸다고 보고하였다(Pearson *et al.*, 1983). Choe 등(1996)에 의해 보고된 것과 같이 배의 단백질분해효소는 pH 3.0과 7.0에서 최고 활성이 나타났으며, 정 등(1989)은 pH 6.0에서 배 단백질분해효소의 활성이 가장 강했다고 보고하였다. 또한 Kim 등(2003)은 pH 5.5에서 배 단백질분해효소가 강한 활성을 보였다고 보고함과 동시에 배의 단백질분해효소는 알칼리성이 아닐 것이라고 보고 하였다.

본 실험에서는 단백질분해효소를 Mini Q column을 이용하여 정제한 후 단백질분해효소의 분해능을 확인하기 위하여 2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L, 정제된 단백질분해효소 50 μ L와 1 M L-Cysteine 그리고 10 mM EDTA 혼합용액(pH 3.0~9.0) 40 μ L 및 3차 증류수 210 μ L를 혼합하였다. 그리고 70°C에서 1 시간 반응 후 동량의 2X sample 완충용액(Table 2)과 혼합 후 100°C에서 5분간 가열 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입한 후 gel을 전개시켜 전기영동상으로 분해활성을 확인한 결과 Fig. 15에서와 같이 MHC은 pH 3.0~7.5에서 분해가 되고, M-Pr은 pH 6.0~7.0에서 분해가 되며, α -actinin은 pH 6.5에서 분해되었다. 각각의 활성도를 측정하기 위하여 Fig. 15를 Sigma Gel Software를 이용하여 단백질의 분해량 차이를 확인한 결과는 Fig. 16에서와 같이 pH 3.5에서는 활성도가 40%였고, pH 5.5에서는 활성도가 60%로 나타났다. 또한 pH 6.5에서는 활성도가 90%였고, pH 8.0에서는 활성도가 10%로, pH 9.0에서는 활성도가 0%로 나타났다.

본 실험에서 정제된 단백질분해효소의 최적 pH는 6.5로서 Choe 등 (1996)에 보고된 바와 같이 pH는 3.0과 7.0에서 활성이 강하며, 알칼리성에서는 활성이 없다는 보고와 유사한 결과로 나타났다. 이는 또한 Yang 등(1975)이 식품의 pH는 중성내지는 산성이라고 보고했는데, 본 실험의 단백질분해효소는 식품 연화제로 사용하기에 적합한 중성 pH의 범주에 속한 것으로 식육 연화제로서의 조건을 갖춘 것으로 사료된다.

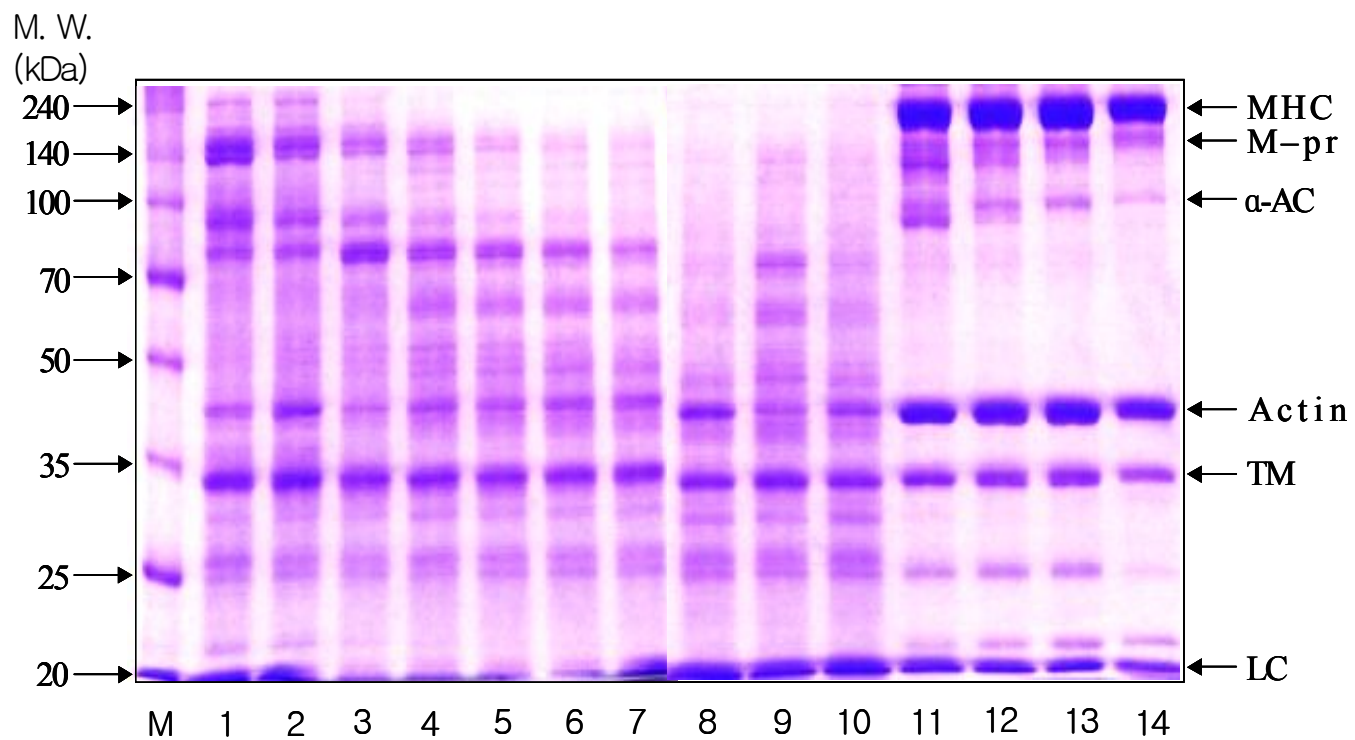


Fig. 15.

Fig. 15. Effects of protease from Korean pear purified on the hydrolysis of chicken muscle actomyosin after change of pH value

100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) was incubated with protease(50 μ L, pH 6.5) from Korean pear purified with Mini Q column at 37℃ for 1 hour. After addition of the 2X sample buffer of same content to the incubated sample, 25 μ L of sample was loaded per Lane. M : Marker, Lane 1 : pH 3.0, Lane 2 : pH 3.5, Lane 3 : pH 4.0, Lane 4 : pH 4.5, Lane 5 : pH 5.0, Lane 6 : pH 5.5, Lane 7 : pH 6.0, Lane 8 : pH 6.5, Lane 9 : pH 7.0, Lane 10 : pH 7.5, Lane 11 : pH 8.0, Lane 12 : pH 8.5, Lane 13 : pH 9.0, Lane 14 : actomyosin.

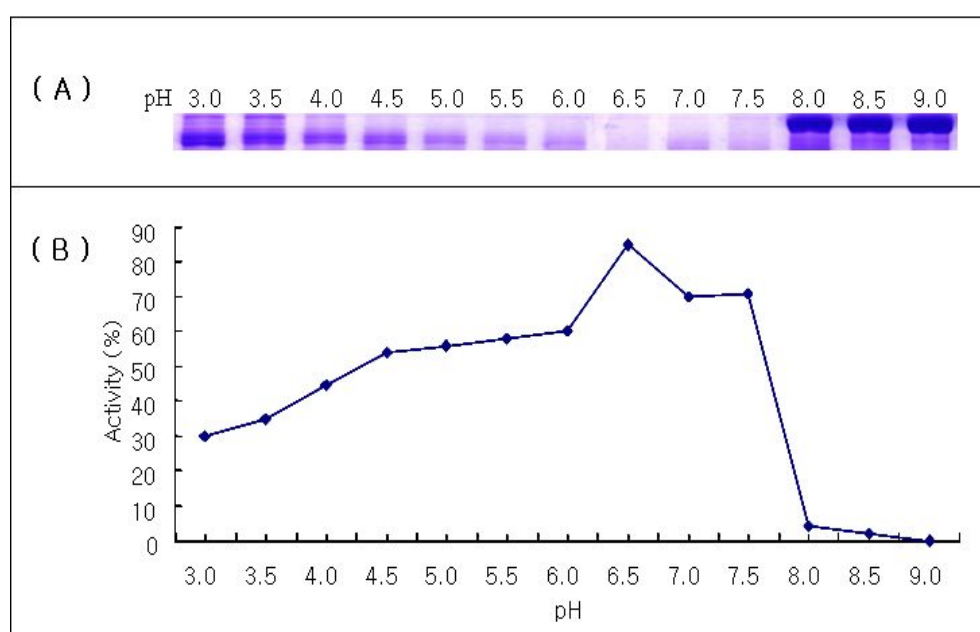


Fig. 16.

Fig. 16. Effects of pH value on the activity of protease from Korean pear purified with Mini Q column in the hydrolysis of chicken muscle actomyosin

(A) SDS-PAGE pattern of each fraction. SDS-PAGE conditions were identical to those described in Fig. 15.

(B) Activity of protease(50 μ L) from Korean pear purified was detected from the solution of 100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) and 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH 3.0~9.0) at 37°C for 1 hour. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB. Densitometry of activity protease was performed with Sigma Gel Software.

8. 온도변화 및 시간경과에 따른 단백질분해효소에 의한 actomyosin의 분해

Pearson 등(1983)은 식육의 질감을 가져오는 원인 중의 하나는 actomyosin의 형성으로 분자량은 정제조건에 따라 다르지만 약 $4 \sim 60 \times 10^3$ kDa, actomyosin의 구성성분인 myosin의 분자량은 약 500 kDa 이고, G-actin은 약 42 kDa 이며, 근원섬유 단백질의 약 절반을 차지하는 myosin의 머리부분인 HMM은 단백질분해효소에 의해 분해되어 ATPase활성과 actin과의 결합능력을 지닌 성분인 HMMS-1과 HMMS-2로 나뉜다고 보고하였고, Choe 등(1996)은 배의 단백질분해효소를 myosin에 처리시 최적의 pH와 온도에서 시간이 경과함에 따라 분해된다고 보고하였다. 또한 Kim 등(1987)은 ficin을 우육에 처리시 온도 및 시간에 따라 분해도가 증가하였다고 보고하였다. 대부분의 효소는 40℃ 이상에서 불활성화되며, 75℃ 이상에서 약 5분간 가열시 파괴되지만 식품가공에 쓰이는 대개의 식물성 단백질분해효소의 활성 온도 범위는 60~80℃ 정도로서 근육단백질의 가수분해 효과도 이 온도범위에서 최대로 된다고 보고되었다(Cambell *et al.*, 1979; Cheng and Parrish, 1978).

본 실험에서는 단백질분해효소를 Mini Q column을 이용하여 정제한 후 분해 활성을 확인하기 위하여 2.03 mg/mL의 actomyosin 100 μ L, 정제된 단백질분해효소 50 μ L과 1 M L-Cysteine, 그리고 10 mM EDTA 혼합용액 (pH 6.5) 40 μ L 및 3차 증류수 210 μ L를 혼합하여 온도 별로 4℃, 25℃, 37℃, 60℃, 70℃ 및 80℃와 시간대 별로 0 시간, 0.5 시간, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간 및 12 시간에서 반응 후 동량의 2X sample 완충용액(Table 2)과 혼합하여 100℃에서 5분간 가열 후 25 μ L씩 gel loading tip으로 각각의 홈에 조심스럽게 주입한 후 gel을 전개시켜 전기영동상으로 분해활성을 확인한 결과는 Fig. 18~Fig. 23에서

와 같이 MHC은 0.5 시간일 때 60℃와 70℃에서 분해가 되었고, M-Pr은 1 시간일 때 37℃, 60℃ 및 70℃에서 분해가 되었으며, α -actinin은 2 시간일 때 60℃와 70℃에서 분해가 되었다. Tropomyosin은 4 시간일 때 70℃에서 대부분이 분해되어 70℃에서 효소활성이 가장 강한 것으로 나타났으며, 이것을 Sigma Gel Software를 이용 하여 단백질의 분해량 차이를 확인한 결과는 Fig. 17에서와 같이 4℃에서는 활성도가 25%, 25℃에서는 26%, 37℃에서는 60%, 60℃에서는 75%, 70℃에서는 85%, 80℃에서는 20%로 나타났으며, 70℃에서 4시간 만에 tropomyosin을 거의 분해한 것으로 나타났다.

본 실험결과에서 나타난 바와 같이 배에서 정제한 단백질분해효소의 최적 온도와 시간은 70℃에서 4시간으로 사료되며, 온도는 37℃~70℃ 사이에서 안정하며, 시간이 경과함에 따라 분해되며 4시간 이후에는 안정한 상태로 나타났으며, Choe 등(1996)은 배 단백질분해효소로 계육의 조 myosin은 최적의 pH와 온도에서 시간이 경과함에 따라 분해된다는 보고와 유사한 경향을 나타냈다. 본 실험에서 정제된 효소는 상대적으로 높은 온도인 70℃에서 최적의 활성을 가지므로 식육연화효소로서의 기능적 조건을 충족하고 있으므로 우수한 연화제로서의 사용이 가능할 것으로 사료된다.

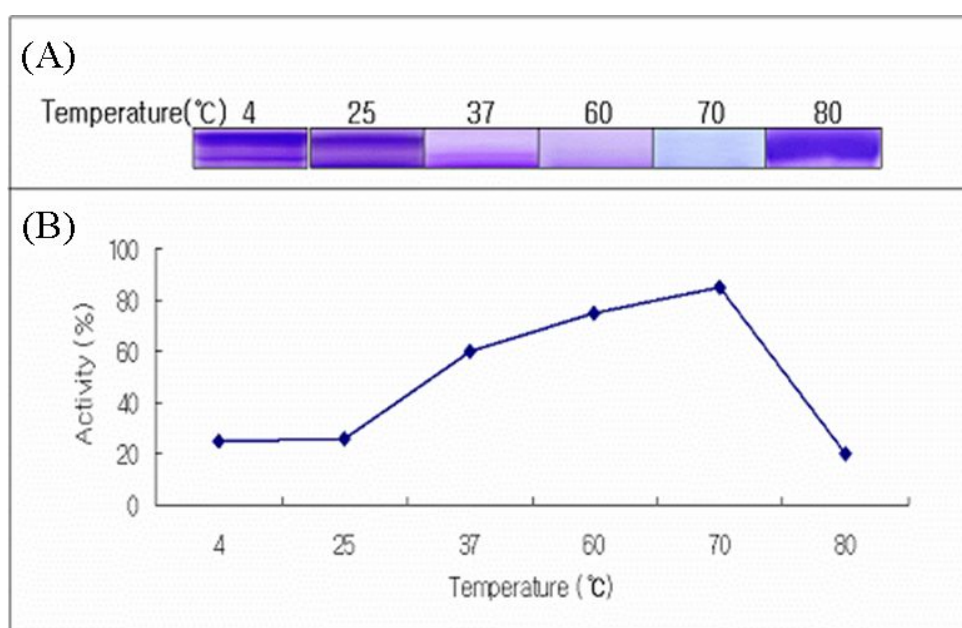


Fig. 17.

Fig. 17. Effects of temperature value on the activity of protease from Korean pear purified with Mini Q column in the hydrolysis of chicken muscle actomyosin

(A) SDS-PAGE pattern of each fraction. SDS-PAGE conditions were identical to those described in Fig. 18~Fig. 23.

(B) Activity of protease(50 μ L) from Korean pear purified with Mini Q column was detected from the solution of 100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) and 0.1 M L-Cysteine, 1 mM EDTA buffer(pH6.5) in the change of temperature. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB. Densitometry of activity protease was performed with Sigma Gel Software.

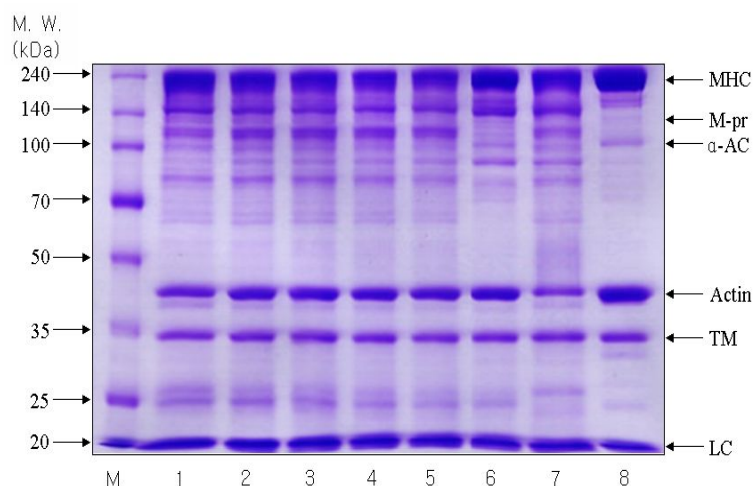


Fig. 18. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at 4℃

100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) was incubated with protease(50 μ L) from Korean pear purified with Mini Q column for the different time at 4℃. After addition of the 2X sample buffer of same content to the incubated sample, 25 μ L of sample was loaded per Lane. M : Marker, Lane 1 : 0 hour, Lane 2 : 0.5 hour, Lane 3 : 1 hour, Lane 4 : 2 hour, Lane 5 : 4 hour, Lane 6 : 8 hour, Lane 7 : 12 hour, Lane 8 : actomyosin. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB.

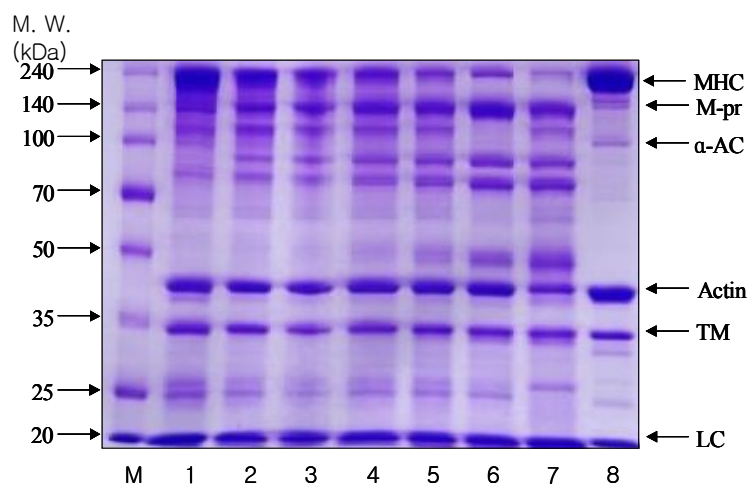


Fig. 19. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at normal temperature (25℃)

100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) was incubated with protease from Korean pear(50 μ L, pH 6.5) purified with Mini Q column for the different time at 25℃. After addition of the 2X sample buffer of same content to the incubated sample, 25 μ L of sample was loaded per Lane. M : Marker, Lane 1 : 0 hour, Lane 2 : 0.5 hour, Lane 3 : 1 hour, Lane 4 : 2 hour, Lane 5 : 4 hour, Lane 6 : 8 hour, Lane 7 : 12 hour, Lane 8 : actomyosin.

The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB.

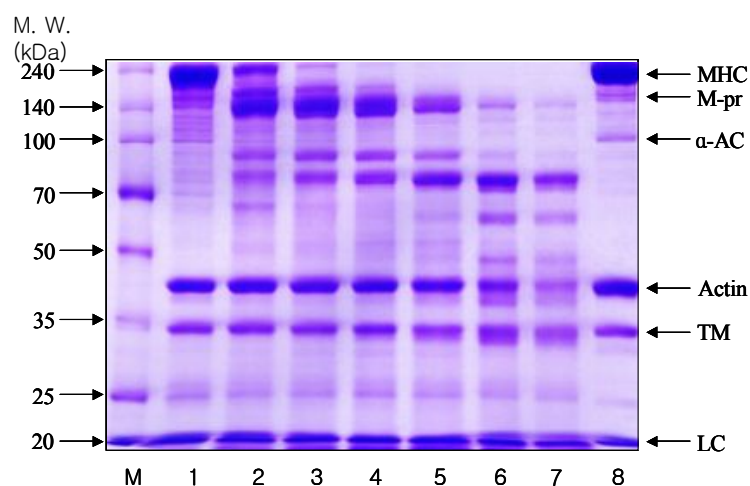


Fig. 20. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at 37℃

100 μ L actomyosin(2.03 mg/mL) was incubated with protease(50 μ L) from Korean pear purified with Mini Q column for the different time at 37℃. After addition of the 2X sample buffer of same content to the incubated sample, 25 μ L of sample was loaded per Lane. M : Marker, Lane 1 : 0 hour, Lane 2 : 0.5 hour, Lane 3 : 1 hour, Lane 4 : 2 hour, Lane 5 : 4 hour, Lane 6 : 8 hour, Lane 7 : 12 hour, Lane 8 : actomyosin. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB.

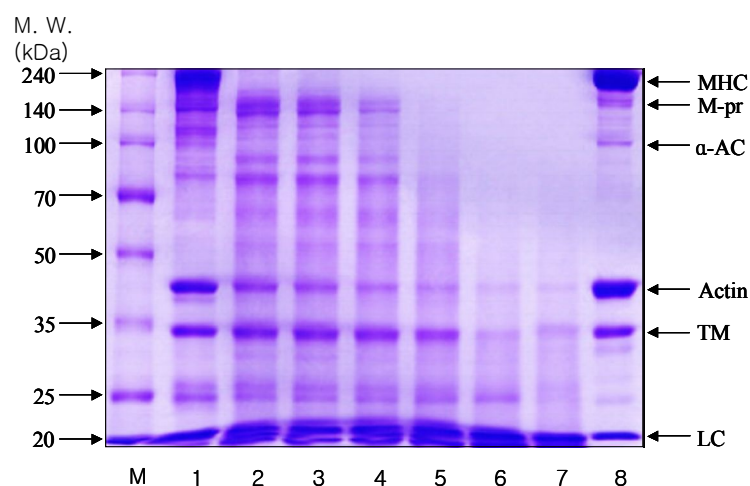


Fig. 21. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at 60℃

100 μ L actomyosin (2.03 mg/mL) was incubated with protease(50 μ L) from Korean pear purified with Mini Q column for the different time at 60℃. After addition of the 2X sample buffer of same content to the incubated sample, 25 μ L of sample was loaded per Lane. M : Marker, Lane 1 : 0 hour, Lane 2 : 0.5 hour, Lane 3 : 1 hour, Lane 4 : 2 hour, Lane 5 : 4 hour, Lane 6 : 8 hour, Lane 7 : 12 hour, Lane 8 : actomyosin. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB.

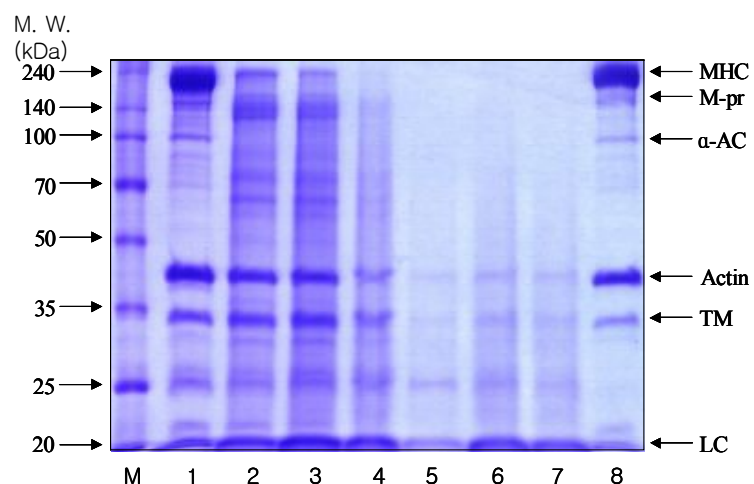


Fig. 22. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at 70℃

100 μ L actomyosin (2.03 mg/mL) was incubated with protease(50 μ L) from Korean pear purified with Mini Q column for the different time at 70℃. After addition of the 2X sample buffer of same content to the incubated sample, 25 μ L of sample was loaded per Lane. M : Marker, Lane 1 : 0 hour, Lane 2 : 0.5 hour, Lane 3 : 1 hour, Lane 4 : 2 hour, Lane 5 : 4 hour, Lane 6 : 8 hour, Lane 7 : 12 hour, Lane 8 : actomyosin. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB.

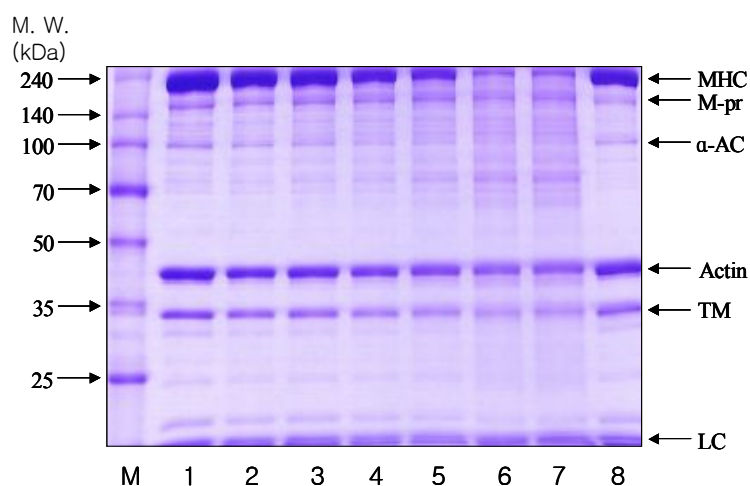


Fig. 23. Analysis of the hydrolysis of actomyosin from chicken muscle by protease from Korean pear purified with Mini Q column with the flow of time at 80℃

100 μ L actomyosin (2.03 mg/mL) was incubated with protease(50 μ L) from Korean pear purified with Mini Q column for the different time at 80℃. After addition of the 2X sample buffer of same content to the incubated sample, 25 μ L of sample was loaded per Lane. M : Marker, Lane 1 : 0 hour, Lane 2 : 0.5 hour, Lane 3 : 1 hour, Lane 4 : 2 hour, Lane 5 : 4 hour, Lane 6 : 8 hour, Lane 7 : 12 hour, Lane 8 : actomyosin. The samples were run on 12%(w/v) polyacrylamide gels. The SDS electrophoresis buffer 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8). The gel was stained with quick CBB.

9. 냉전계방사형 주사전자현미경을 이용한 actomyosin의 구조 변화 관찰

근육의 조직 단백질은 결합조직 단백질과 근원섬유 단백질로 구성되며, 근원섬유 단백질은 actin, myosin, tropomyosin, troponin, α -actinin, β -actinin 등이 있으며, 근육의 수축 또는 식육의 사후강직시 actin과 myosin이 결합하여 actomyosin이 형성된다(박 등, 2003). 한편 근육이 저온 단축시 actin filament와 myosin filament사이에 actomyosin bridge가 형성된다(Marsh and Carse, 1974). 한편 Kim (1989)등은 단백질분해효소를 생육에 처리시 생육의 조직적인 변화를 투과형전자현미경으로 관찰한 결과 결합조직 단백질은 소편화되고 용해현상도 일어났다고 보고하였다.

본 실험에서는 actomyosin에 정제된 단백질분해효소를 처리하였을 때의 분해현상을 조사하기 위하여 대조구는 actomyosin에 효소 처리를 하지 않았으며, 대조구의 현상을 확인한 결과 Fig. 24에서 나타난 것과 같이 actomyosin의 구조와 모양이 다소 보존된 상태로 나타났다. 반면 실험구는 actomyosin에 정제된 배 단백질분해효소를 70℃에서 2시간 반응 결과 Fig. 25에서 나타난 것과 같이 actomyosin의 구조와 모양이 변형된 상태로 나타났다. 이러한 현상은 전기영동상에서 소편화된 band가 나타나는 것과 일치하는 현상으로 사료된다. 또한 Kim (1985)과 Ouali (1990)는 식육에 ficin 처리 후 조직학적인 변화를 광학현미경, 주사전자현미경 및 투과전자현미경으로 관찰한 결과 결합조직 단백질은 시간의 경과에 따라 정형에서 무형정형의 상태로 나타났다는 보고와 유사한 결과가 본 실험에도 나타났다.

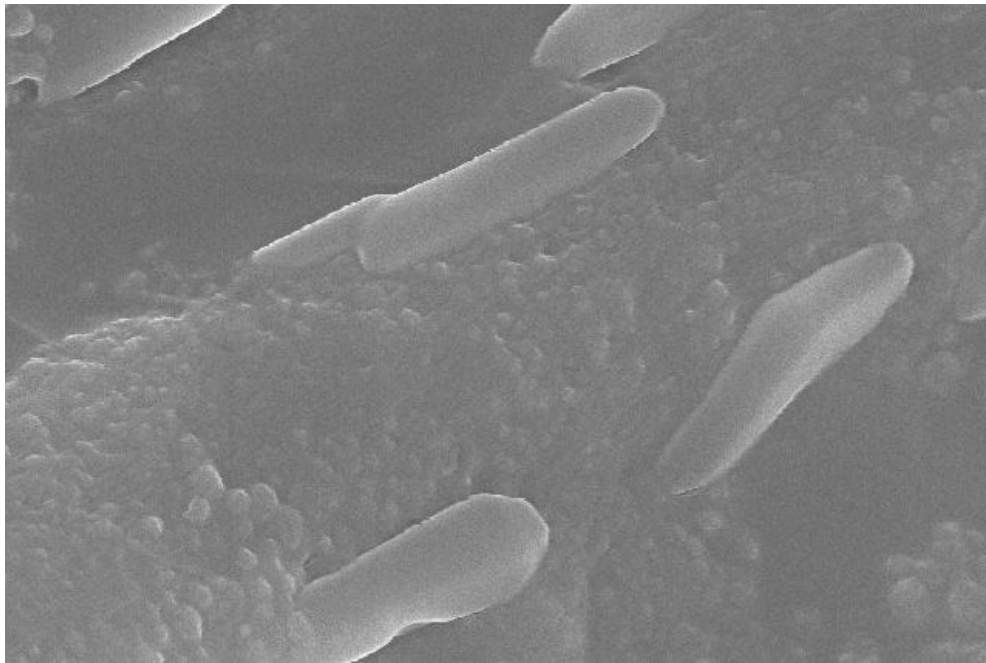


Fig. 24. Cryo-FE-SEM micrograph of the actomyosin without enzyme treatment.

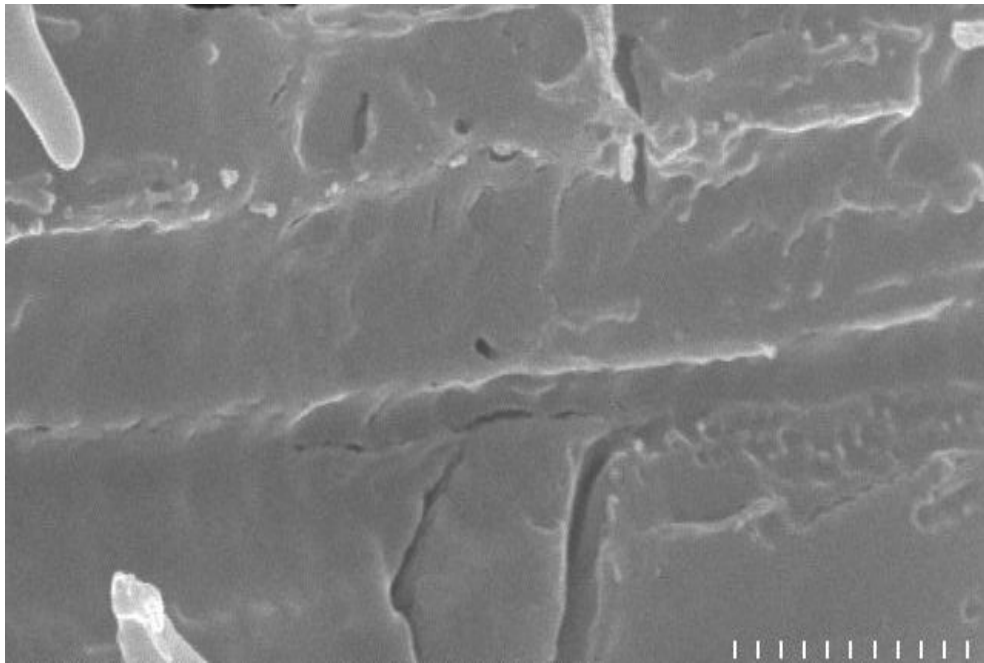


Fig. 25. Cryo-FE-SEM micrograph of the actomyosin with 5% protease from Korean pear purified for 1 hour at 37 ℃ and pH 6.5.

V. 요 약

식육의 연도(Tenderness)는 풍미와 함께 식육의 품질을 결정하는 중요한 요소이다. 우리민족은 옛부터 식육의 연도증진을 위해 불고기, 육회 등의 양념에 배나 배즙을 첨가하여 고기를 연화시키는 방법이 이용되고 있는데, 이러한 고기의 연화는 배 속에 존재하는 고유한 단백질분해효소의 효과라고만 생각해왔을 뿐 그 분해효소에 관하여 생화학적 연구는 아직도 미약하다. 본 논문에서는 안성산 신고배 속에 함유된 것으로 알려진 단백질분해효소의 식육 연화제로서 최적의 조건과 특성을 생화학적으로 규명하고자 하였다.

한국산 신고배로부터 단백질분해효소를 추출하여 황산암모늄염석, DEAE-Sephrose ion exchange chromatography과 Mono Q Chromatography 및 Mini Q column 을 이용하여 순차적으로 정제된 단백질분해효소를 전기영동상으로 확인 결과 분자량이 약 38 kDa 에서 단일 band가 나타났으며, specificity activity는 64,000 unit/mg, 회수율은 38.79%, 정제도는 25배로 나타났다. 정제된 단백질을 MALDI-TOF MS/MS 방법으로 Matrixscienceb (<http://www.matrixscience>) server의 Mascot MS Ion Search를 통하여 각각의 MS Spectrum과 일치하는 Peptide Sequence를 조사한 결과, 이 단백질이 미지의 단백질임을 밝혔다. 그리고 정제된 단백질분해효소는 pH 3.0~7.5에서 활성을 보였으며 최적 pH는 6.5로 활성도가 90%로 나타났고, pH 8.0이상에서는 분해가 되지 않았으므로 활성이 없는 것으로 미루어 본 단백질분해효소는 알칼리성에서는 불활성되는 것으로 추정된다. 정제된 단백질분해효소는 4℃에서는 활성도가 25%로 나타났고 온도가 증가함에 따라 점차 분해활성이 증가하였으나 80℃에서 활성도가 20%로 낮아지는 경향을 확인하였으며 최적 온도는 70℃로 활성도가 85%로 측정되었다.

한국산 배에서 정제한 단백질을 효소를 actomyosin에 처리하여 시간이 경과함에 따라 냉전계방사형 주사전자현미경으로 관찰한 결과 actomyosin의 구조가 변형된 것으로 확인 되었으며 이는 전기영동상으로 확인한 결과 band가 소편화 되는 것과 일치한 경향이 나타났다. 본 효소는 고온에서도 상당 시간 비교적 안정한 특성을 보여 식품제조, 식육연화 등 식품산업 분야에서의 활용가능성이 높을 것으로 보이며, 나아가 단백질이 갖는 식품학적 기능성을 높이는 데에도 널리 활용 할 수 있을 것으로 판단된다.

V. 참 고 문 헌

- Blanchard, P.J. and Mantle, D., 1996. Comparison of proetolytic enzyme levels in chicken, pig, lamb and rabbit muscle at point of slaughter : role in meat tenderisation post mortem. J. Sci. Food Agric., 71, 83~91.
- Boland, M. J., and Hardman, M. J., 1972. Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia Chinensis*. North-Holland Publishing Company-Amsterdam. 27(2)282~284.
- Brocklehurst, K., Malthouse, J. Paul G. and Shipton Michael., 1979. Evidence that binding to the S2-Subsite of papain may coupled with catalytically relevent structural change involving the Cysteine-25-Histidine-159 Daid. Biochem. J. 183, 223~231.
- Brooks, Barbara A., Kalsing, Kirk C., and Regenstein Joe M., 1985. Effects of antemortem injected crude papain chicken muscle. Journal of Food Science. Vol. 50, 1370~1375.
- Cambell, A.M., Penfield, M.P., and Griswold, R.M., 1979. The Experimental study of Food, Mifflin Co., Boston
- Caygill, J. C., 1979. Sulphydryl plant proteases. Enzyme and Microbial Technology, Volume 1, Issue 4, October, Pages 233~242.

- Cheng, C. S. and Parrish, F. C. 1978. Effects of postmortem storage conditions on myofibrillar ATPase activity of porcine red and white Semitendinosus. Muscle. J. Food Sci. 43, 17.
- Cho Moo Je. 1982. Degradation of muscle proteins by lysosomal hydrolases. Korean Biochem. J. Vol. 15, No. 1, pp. 13~25.
- Cho Sung-Ja, Chung Soo-Hyun, Suh Hyung-Joo, Lee Ho, 1994. Purification and characterization of a pretense actinidin isolated from Cheju kiwifruit. Korean J. Food & Nutrition Vol. 7, No. 2, 87~94.
- Choe, I.S., and Yon-Jin Park. 1996. A Study on the utilization as meat tenderizer from Korean pear protease. KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR. Vol.16, No.1, pp.89~93.
- Choe Il-sin, Park Yon-Jin, Ishioroshi Makoto and Samejima Kunihiko, 1996. A New protease in Korean pears as meat tenderizer. Anim. Sci. Technol. (Jpn.) 67 (1). 43~46.
- Cowan, D., 1983 Industrial applications : Proteins, In Godfrey, T. and S. West (eds.), Industrial enzymology The application of enzymes in industry, The Nature Press, New. pp.352~374

- Davis, J., 1964. Disc electrophoresis II, Method and applications to human serum proteins, Annual N.Y. Academy Sci., 121, 404.
- Diniz, F. M. and Martin, A.M., 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish(*Squalus acanthias*) muscle. J. Food Engin., 31, 419~426.
- Dransfield, E. and Etherrington, D., 1981. Enzymes and food processing. Elsevier Applied Science Pub., London and New York, p.177
- Elkhalifa, E.A., and Marriott, N.G., 1990. Comparison of the effects of achromobacter iophagus and splenic pulp on collagen of restructured beef. J. Muscle Foods, 1, 115~128.
- Gornall, A. G., Bardawill, J. and Davide, M. M., 1948. Determination of seurm proteins by means burit reaction. J. Biol. Chem., 177~751.
- Han Seung K and Chin Koo B., 2004. Study on meat tenderness of a protease extracted from domestic pear. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. Vol. 24. No. 4, pp. 326~328.
- Hashizume Hirosh, Tanase Koji, Shiratake Katsuhiro, Mori Hitoshi,

- Yamaki Shohei, 2003. Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese pear fruit. *Phytochemistry*. 62. 125~129.
- Hegarty, G. R., Bratzler, L. J., and Pearson, A.M., 1996. The relationship of some intracellular protein characteristics to beef muscle tenderness. *J. Food Sci.*, 28, 535.
- Hermine, L.W., 1990. On the pharmacology of bromelain. An update with special regard to animal studies on dose dependent effect. *Planta Med.*, 56, 249~253.
- Hoagland, R., McBryde, C. N. and Powick, W. C., 1917. Changes in fresh beef during cold storage above freezing. U.S. Dept. Agr. Bull. P.43
- Janz J.A.M., Aalhus J.L., Price M.A., Schaefer A.L., 2000. The influence of elevated temperature conditioning on bison (*Bison bison bison*) meat quality. *Journal of Meat Science* 56, pp. 279~284.
- Kang, C.K., and Rice, E.E.(1970) Degradation of various meat fraction by tenderizing enzymes. *J. Food Sci.* 35, 563~567.

Kang, C.K., and Warner, W.D., 1974. Tenderization of meat with latex proteases. J. Food Sci. 39. 812.

Kee Hae-Jin, Hwang Yong-Sun, Kim Kang-Hwa, and Hong Yong-Ho, 1998. A pplication of fig protease to foods. KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR. Vol. 18. No. 1, pp. 19~26.

Kim Bok-Ja, 1989. Purification and characterization of kiwi fruit protease. Korean J. Food Sci. Technol Vol. 21, No. 4, pp.569~574.

Kim Chan Jo, Lee Jae Sook , Choi Seong Hyun and Oh Man Jin, 1997. Enzyme detergent using alkaline protease produced by halomonas sp . ES - 10. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol Vol. 25, No. 1, 51~55.

Kim Eun-Mi, Choe Il-Shin and Hwang Seong-Gu, 2003. Effects of singular manner or mixed type trement of proteases isolated from pear, pineapple and kiwifruit on actomysoin degradation. KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR. Vol. 23. No. 3, pp.193~199.

Kim Jun-Pyoung, Suh Jai-Sin, and Kim Jung-Sook, 1986. Isolation and purification of ficin from figure latex. Korean J. Food Sic. Technal Vol. 18, No. 4.

Kim Jung sook, and Kim Jun pyong, 1987. Studies on the digestion of beef by ficin treatment. J. Korean Agricultural Chemical Society. Vol. 30, 210~218.

Kim, Jung-Sook, Chu Soon-Jae, 1988. Studies on the digestion of beef by ficin treatment : IV. An Optical Microscopic Observation. Korean J. Food & Nutr 1(2)9~17.

Kim, Jung-Sook .1989. Studies on the digestion of beef by ficin treatment: V.A Transmission Electron Microscopic Observation. KOREAN J. FOOD & NUTR. 2(2)21~26.

Kim, K. J., and Lee, Y. B., 1995. Effect of ginger rhizome extract on tenderness and shelf life of precooked lean beef. Korean J. Soc. Food Sci. Vol. 11, No. 2,

Ko Bo-Sung, Hwang Yong-Il, and Lee Seung-Cheol, 1996. Sample purification of bromelain from pineapple. J. Food Sci. Nutr. Vol. 1, No. 1, pp.106~110.

Ko Young-hwan, Kang Young-joo., 1990. Isolation and partial characterization of proteolytic enzymes from stems of pineapples cultivated in Cheju island. Cheju National university Journal Vol. 31.

Koohraie, M., Kennick, W. H., Anglemier, F. A. and Elkgasim, E.

- A., and Johns, T. K., 1984. Effect of prstmortem storage on cold-shortened bovine muscle analysis by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. J. Food Sci. Vol. 49, 290~290.
- Koszalka, T. R., and Miller, L. L., 1960. Proteolytic activity of rat skeketal muscle. J. Bio. Chem., Vol. 235, No. 3, pp. 669~672.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature, 227, 680.
- Lee Dong-Hoon, Jin Bong-Hwa, 2000. Encapsulation of bromelain in liposome. J. Food Sci. Nutr. Vol .5, No. 2, p.81~85.
- Lee Hyung-Hoan and Kim Sang-Chul, 1989. Purification of chymopapain A and B from carica papaya latex. KK. J. Gen. Eng. Vol. 3, pp.8~13.
- Lee Jong-Ho, and Jang Hyuk-Rae, 2005. Preoteolytic(Proteolytic) properties of sarcodon aspratus on beef loin. The Korean Journal of Chulinal Research Vol. 11, No. 2.
- Lee Jong-Ho, Yang Jeong-Lye, Jung Chung-Sung, Kim Hee-Sook and Cho Jae-Sun, 2001. Isolation and purification enzyme of edible mushroom, *Sarcodon aspratur*s (Berk.) S. Ito. Korean Journal of Life Science. Vol. 11, No. 6, 516~567.

Lee Jung-Hee, Kim Kun-wha, Yu Ju-hyun and Yang Ryung, 1975.
Study on meat tenderizer Part II. ; tenderizing ability of
enzyme from *Asp. oryzae*. Korean J. Food sci. Technol Vol. 7,
No. 4, pp. 229~237.

Lee Seung-Cheol, Hwang Yong-Il, 1994. A study on the
biodegradable detergent, alkaline protease. environmental
problems research institute. Kyungnam Univ, VOL. 16,
pp. 121~128.

Lee, Y. B., Sehnert, D. J., and Ashmore, C. H., 1986.
Tenderization of meat with ginger rhizome protease. Journal of
Food Science. Vol. 51, No. 6

Lee Yu-Bang, 1979. The effect of postmortem metabolism on meat
quality. Korean J. Food Sci. Technol Vol. 11, No. 2.

Lehamann, K. B., 1907. Studies of the causes for the toughness of
meats. Arch. Hyg, 63, 134.

Locker, R. H. and Wild, D. J. C. 1984. The fate of the large
proteins of the myofibril during tenderising treatments. Meat Sci.
11, 89.

Macfarlane, J. J., 1985. High pressure technology and meat quality.

- In developments in Meat Science-3 (R. Lawrie, ed.) pp. 155~184, Elsevier Applied Science Publishers, London & New York.
- Macgregor, A. W., 1996. Malting and brewing science : challenges and opportunities. J. Institute Brewing., 102, 97~102.
- Mamoru Sugiura and Masanori Sasaki. 1973. Studies on proteinases from ficus carica var. Horaishi. II. Physicochemical Properties of Ficin A, B, C and D. YAKUGAKU ZASSHI. 93(1). 63~67
- Marsh, B. B., and Carse, W. A. 1974. Meat tenderness and the sliding-filament hypothesis. J. Food Technol. 9, 129~139.
- Marth, E. H., 1963. Microbiological and chemical aspects of Cheddar cheese ripening. A review. J. Dairy Sci., 46, 869.
- Monsan, P., Duteurtre, B., Moll, M., and Durand, G., 1978. Use of papain immobilized on spherosil for beer chillproofing. Journal of Food Science. Vol. 43, 424~427.
- Nam Seung-Hee, Walsh, Marie K., Yang Kwang-Yeol, 2006. Research Note : The Enzymatic Properties of Actinidine from Kiwifruit. Food Sci. Biotechnol. Vol. 15, No. 3, pp.453~457.
- Naveena, B. M., Mendiratta, S. K., Anjaneyulu, S. R., 2004.

Tenderization of buffalo meat using plant proteases from cucumis trigonus roxb(kachri) and zingeriber offocinale roscoe(Ginger rhizome). Journal of Meat Science 68, 363~369.

Noh Bong Soo, Park Kwan Hwa, 1980. Heat inactivation of proteolytic enzymes in papaya latex. Korean J. Food Sic. Technal Vol. 12, No. 3.

Obinata. T., Maruyama, K., Sugita, H., Kohama, k., and Ebashi, S. 1981. Dynamic aspects of structural proteins in vertebrate skeletal muscle. Muscle Nerve 4, 456.

Ogawa Hiroshi, Fukumoto Haruji, Yano Toshihiro, Yamamoto Kenji and Tochikura Tatsurokuro, 1990. Purication and characterization of β -Galactosidase from kiwifruit. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi Vol. 37, No. 4, 298~305.

Oh Se-Wook, Kim Young-Myoung, Nam Eun-Jung and Jo Jin-Ho, 1997. Proteolytic properties of Saewoojeot(Salted and Fermented Shrimp) on meat proteins. Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 29, No. 6, pp.1991~1995.

Ouali, A., 1990. Meat Tenderization: Possible causes and mechanisms. Areview. Journal Of Muscle Foods, 1, 129~165.

- Park Kwan Hwa , Kim Ze Uook , Shin Jae Doo, and Noh Bong Soo, 1979 Thermal inactivation of crude papain and papaya peroxidase. Korean J. Food Sic. Technal Vol. 11, No. 3
- Pearson, A.M., Wolzak, A.M., and Gray, J. I. 1983. Possible role of muscle proteins in flavor and tenderness of meat. J. Food Biochem. 7, 189.
- Pirotta, F. and Giuli-Morghen, C., 1978. Bromelain-A deeper phamacological study. Note 1. Antiinflammatory and serum fibrindytic activity after oral administration. Drugs Exptl. Clin. Res., 4, 1~5.
- Rampton, J. H., Pearson, A. M., Walker, J. E., and Kapsalis, J. G., 1971. Disc electrophoresis of Weber-Edsall extract and actomyosin from sketal muscle. J. AG R. FOOD CHEM., VOL. 19, NO. 2, 238~240.
- Rattrie, N. W. and Regenstein, J. M., 1977. Action of crude papain on actin and myosin heavy chains isolated from chicken breast muscle. J. Food. Sci. Vol. 42, No. 5, pp.1159~1163.
- Roh Jeong-Hea, Kim Young-Boong, and Kil Bok-Im, 2002. The Effect of bulking agent on quality of kiwifruit powder in the process of domestic kiwifruit tenderizer. Korean J. Food Sci.

Technol. Vol. 34, No. 5, pp. 805~810.

Ryan Stuart N., Laing William A., and Mcmanus Michael T., 1998.
A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit.
phytochemistry, Vol. 49, No. 4, pp. 957~963.

Schormüller J., 1968. The chemistry and biochemistry of cheese ripening. Adv. Food. Res., 16, 213.

Sharp, J. G., 1963. Aseptic autolysis in rabbit and bovine muscle during storage at 37°C. J.Sci. Food Agric. 14; 468

Shin, Y. U., Yim, Y. J., Cho, H. M., Yae, B. W., Kim, M. S., and Kim, Y. K., 1983. Studies on the inheritance of fruit characters of oriental pear, *Pyrus serotina* Rehder var. culta. Res. Rept. ORD.25(H):108~117.

Snoke, John. E., and Neurath, Hans., 1950. The proteolytic of striated rabbit muscle. J. Biol. Chem. 127~135.

Sugiyama. S., Ohtsuki. K., Sato. K., and Kawabata. M., 1996. Purification and characterization of six kiwifruit proteases isolated with two ion-exchange resins, Toyoperarl-SuperQ and Bakerbond WP-PEI, Biosci. Biotech. BioChem. 60 (12), 1994~2000.

Suh Hyung-Joo, Lee Ho, 1992. Purication and characterization of

- bromelain isolated from pineapple. Hanguk Nonghwahak Hoechi(J. Korean Agric. Chem. Soc.)35(4). 300~307.
- Tavaria, F.K., Sousa, M.J., Domingos, A., Malcata, F.X., Brodelius, P., Clemente, A. and Pais, M.S., 1997. Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. J. Agric. Food Chem., 45, 3760~3765.
- Weber, K. and M. Osborn., 1969. The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem., 244, 4406.
- Yang Ryung, Kim Kun-Wha, Lee Jung-Hee, Youn Jung-Eae, and Yu Ju-Hyun, 1975. Study on meat tenderizer Part 1. Tenderizing ability of commercial meat tenderizer. Korean J. Food sci. Technol Vol. 7, No. 4, pp. 221~228.
- Yoon Sun, Choi Hyejung and Lee Jinsil, 1991. Modification of functional properties of casein by kiwifruit protease. Korean J. Soc. Food Sci Vol. 7, No. 4, 93~101.
- Youn, J. E., Yang, R., 1974. Studies on the aging of beef at adding the proteolytic enzyme ; studies on the tenderness effect of beef by Papain treatment. Korean. J. Food Sci. Technol. Vol. 6, No. 3,
- 박형기, 오홍록, 하정옥, 강종옥, 이근택, 진구복, 2003. 식육·육제품의

과학과 기술. 신진 문화사. p103~104.

정혜정, 1989. 동양배 Protease의 精製 및 性質에 關하여. 충남대학교
학위 논문

최 청, 손 규 목 1992. 한국산 파인애플에서 분리한 bromelain의 정제
와 특성. J. Korean Agric. Chem. Soc. 35(1), 23~29.

홍성렬,이희봉, 김태봉등 ,1997. 실험생화학. 한국생화학회. 개정 3
판, 84~85

鮫島邦彦, 崔一信, 石下眞人, 早川忠昭, 1991. 食肉軟化劑としてのアクチ
ニジン(キウイフルーシ蛋白質分解酵素)の効果 New Food Industry
Vol. 33, No. 1, pp. 56~60.

감사의 글

한국에서 3년간의 박사학위가 본 논문으로 하여금 유종의 결실을 맺었습니다. 이 유종의 결실은 저의 인생에서 새로운 출발점이 되어 앞으로 더욱더 연구에 정진할 것입니다.

한국 유학생들의 발판을 마련해 주시고, 타향에서의 생활에 물심양면으로 많은 관심과 도움을 주신 최일신 총장님과 김애현 사모님, 새로운 출발점이 된 본 논문이 완성되기까지 많은 가르침과 따뜻한 관심, 세심한 배려를 아끼지 않으셨던 최강덕 지도교수님의 은혜에 감사드립니다. 그리고 많은 조언을 주신 허강철 교수님과 남기택 교수님, 황성구 교수님, 조진국 박사님 학문에 정진할 수 있도록 많은 가르침과 관심을 주신 이학교 교수님, 전광주 교수님, 장경만 교수님, 민관식 교수님, 황수연 교수님께 감사드립니다. 또한 많은 격려와 도움을 주신 건국대학교 이치호 교수님, 경희대학교 함대현 교수님께 감사드립니다.

본 논문의 실험에 있어서 아낌없는 지원과 따뜻한 관심을 준 (주)한경협업의 곽영순 부장님, 신자영, 이윤희, 안성민, 박종혁, 김은주, 반장 김경자 여사님을 비롯한 여러 여사님들께도 고마움을 전합니다. 그리고 본 논문이 나오기까지 여러 가지 배려를 해주신 김형정 조교님, 이돈우 사장님, 이관우 사장님, 이상열 사장님, 한경대학교 박기배 선생님, 임창혁 선생님, 윤희정 선생님, 소현경 등 여러 선생님들과 교직원, 유전자원실험실의 이정수 선생님, 오윤길, 임희경, 원화, 육가공 연구실의 바쁘신 가운데도 많은 것을 가르쳐주시고 도와주신 최도영 박사님, 서상원, 차재웅, 홍종혁, 김상현, 전세아 등 그 외 많은 분들에게 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

한국에서 유학 생활동안의 짧지만, 이 소중한 만남에 감사하며, 이 만남이 인연이 되어 제 인생에서 가장 값진 보배로 간직될 것입니다. 또한 저의 박사학위 과정에 노력의 성과인 이 논문이 완성되어 감개무량하며, 이 작은 기쁨과 영광을 제가 만난 모든 분들과 함께 나누고 싶습니다.

끝으로 고향에서 사랑과 믿음으로 후원해 준 가족과 친인척들에게 고마움을 전합니다.

2007년 2월 이관호