

감과실의 성숙과 추숙중 염가용성 및 세포벽 단백질의 변화

신승렬 · 김주남* · 김순동** · 김광수

영남대학교 식품영양학과, *영남전문대학 식품영양과, **효성여자대학교 식품가공학과

초록 : 가용성 단백질의 함량은 녹색기와 완숙기에는 각각 1.5, 2.0mg/100g-fr. wt.이었고 연시에서는 58.9mg/100g-fr. wt.으로 급격히 증가하였으며, 세포벽 단백질의 함량은 성숙중에 증가하였으나 연시에서는 감소하였다. 겔여과에 의한 염가용성 단백질의 chromatogram은 성숙중에는 유사하였으나, 연시에서는 현저한 차이가 있었다. 감과실은 2종의 단백질로 구성되어 있으며 연화시에 유리되었다(1990년 12월 14일 접수, 1991년 3월 25일 수리).

과실의 세포벽의 주요 구성성분은 cellulose, hemicellulose, pectin, protein이며, 이들은 과실의 종류와 품종에 따라 차이가 있고 과실의 특성에 많은 영향을 준다^{1,2)}.

Robinson³⁾의 보고에 따르면 과실의 세포벽구조는 세포벽 단백질이 arabinogalactan과 공유결합하여 pectin질과 연결되어 있고 pectin질과 hemicellulose는 galactan과 arabinan으로 연결되어 있으며 cellulose는 hemicellulose와 강한 수소결합하고 있다. 연화와 밀접한 관계가 있는 pectin질을 구성하는 rhamnogalacturonan은 egg-box 모양을 하고 neutral sugar side chain으로 서로 연결되어 있으며 다량의 Ca를 함유하고 있다. 또한 세포벽 단백질은 5~10% 정도 함유하고 있으며 hydroxyproline잔기를 많이 갖고 있는 glycoprotein이며^{4,5)}, hydroxyproline잔기는 arabinogalactan의 arabinose와 arabinosyl hydroxyproline 결합을 하고 serine 잔기는 pectin질의 side chain인 galactan과 arabinogalactan의 galactose잔기와 galactosyl serine 결합하여 pectin질과 연결되어 있다⁶⁾.

과실의 연화시에 세포벽 분해효소의 활성이 증가하고^{1,2)} hemicellulose와 pectin질은 저분자화되어 가용성 polymer로 유리됨과^{7,8)} 동시에 arabinose와 galactose가 유리되며, middle lamella가 용해되어 물성의 변화를 초래한다^{10,11)}. 이때 pectin질이 분해됨으로써 세포벽 단백질이 유리된다는 보고^{3,12)}가 있다. 과실의 연화에 관한 연구로서 세포벽 구성성분과 효소활성의 변화 및 이들 상호관계 등에 대해서는 많은 연구가 행해지고 있으나 세포벽 단백질에 대한 연구는 미진

한 상태이다.

한편 본 연구자들은 감과실의 연화현상을 구명한다는 차원에서 감과실의 성숙과 추숙중에 세포벽 구성성분과 세포벽 분해효소의 변화를 조사한 결과, 세포벽과 pectin의 함량이 감소하고 수용성 pectin 질의 증가¹³⁾, arabinose와 galactose의 유리¹⁴⁾ 및 세포벽 분해효소의 활성증가^{15,16)} 등을 조사하였다. 또한 세포벽 분해효소의 분리 정제중에 성숙중인 감과실과 연시의 염가용성 단백질의 함량이 차이가 있었고 gel 여과시 단백질의 pattern이 상이함을 밝혔다.

그래서 이상의 결과를 구체적으로 구명하고자 본 연구에서는 감과실의 성숙과 추숙중에 염가용성 단백질과 세포벽 단백질의 함량 변화와 유리현상을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서는 경남 창녕군에서 재배한 부유종 감시(*Diospyros kaki*, L.)로서 녹색감(개화 105~110일, GP), 변색기의 감(개화 130~135일, TP), 완숙감(개화 155~160일, MP)과 완숙감을 25°C에서 30일간 연화시킨 연시(SP)를 실험재료로 사용하였다.

염가용성 단백질의 추출 및 정량

염가용성 단백질의 추출은 시료 100g에 증류수 200ml를 가하여 균질화하고, 균질물에 NaCl을 1M이

되게 가하여 3시간 저어준 후 miracloth로 여과한 다음 10,000g로 10분간 원심분리하여 상정액을 염가용성 단백질액으로 하였다. 그리고 상정액을 황산암모늄으로 90% 포화염석하여 15,000g로 10분간 원심분리한 다음 침전물을 증류수 200ml에 용해하여 48시간 투석한 후 20,000g로 10분간 원심분리하여 상정액을 chromatography용 시료로 하였다. 염가용성 단백질의 함량은 Lowry등¹⁸⁾의 방법에 따라 구하였다.

세포벽 단백질의 추출 및 정량

Selvendran¹⁹⁾과 Jarvis²⁰⁾의 방법에 따라 시료 100g에 200mM Hepes buffer(pH 6.8) 200ml를 가하여 균질화한 후 miracloth로 여과하였으며, 이 조작을 반복해서 남은 잔사에 10mM 초산나트륨 완충용액(pH 4.0)에 현탁시킨 다음 amylase와 protease를 처리한 다음 여과하여 세포벽을 추출하였다.

단백질의 추출은 세포벽을 0.02% sodium azide와 정제한 polygalacturonase를 함유한 10mM 초산나트륨 완충용액(pH 7.0) 100ml에 현탁하여 25°C 항온기에서 수일간 방치한 후 동일한 용액 100ml를 가하여 염가용성 단백질의 추출과 같은 방법으로 행하였다. 세포벽 구성단백질의 정량은 세포벽성분 1g을 진한 황산으로 가수분해하여 Kjeldahl 방법²¹⁾으로 행하였다.

Gel 및 ion exchange chromatography에 의한 단백질의 분리

단백질의 분리는 10mM 초산나트륨 완충용액(pH 4.5)으로 평형시킨 Sephacryl S-200 column(2.65×65cm)에 단백질액 10ml를 주입하여 유속 0.25ml/min., 5ml씩 분획하였다. 분획한 단백질액은 Amicon diaflo system을 사용하여 N₂ gas로 가압, 농축하였다. 농축한 단백질액 10ml를 CM-cellulose column(2.0×35cm)에 주입하여 유속을 0.25ml/min로 하고 염농도를 0.0M에서 1.0M까지 변화를 주면서 5ml씩 분획하였다.

Gel electrophoresis에 의한 단백질의 확인

전기영동은 Laemmli와 King²⁰⁾의 방법에 따라 행하였다. 즉 separating gel과 stacking gel은 각각 7%, 2.5% polyacrylamide gel로 하였고, 시료에 SDS와 2-mercaptoethanol을 각각 2%, 5%가 되게 가하여 100°C에서 2분간 열처리하였다. 전기영동은 150volt로 5시간 실시하였고, 염색은 0.1% coomassie brilliant blue R-

250 용액으로 염색하였으며, 초산 : 메탄올 : 증류수 (200 : 70 : 730, v/v) 혼합용액으로 탈색하여 여지에 흡착, 건조시켰다.

결과 및 고찰

염가용성 단백질과 세포벽 단백질의 함량변화

연시에서 polygalacturonase의 활성이 높고 염가용성 단백질의 함량이 많은 것¹⁵⁾으로 보아 연화함에 따라 세포벽 단백질이 가용성 단백질로 전환될 것으로 생각되어 성숙과 연화시 염가용성 단백질과 세포벽 단백질의 함량변화를 조사하였다.

Table 1. Changes in the contents of salt-soluble and cell wall proteins of persimmon fruits during ripening and softening

| Protein | Stage ^{a)} | | | |
|---|---------------------|------|-------|------|
| | GP | TP | MP | SP |
| Salt-soluble protein ^{b)} (mg/100g-fr. wt.) | 1.5 | 1.4 | 2.0 | 58.9 |
| Cell wall protein ^{c)} (mg/g-cell wall) | 77.5 | 93.8 | 116.2 | 42.7 |

^{a)}GP: Mature green persimmon, TP: Turning stage persimmon, MP: Mature persimmon, SP: Soft persimmon.

^{b)}Salt-soluble proteins were extracted from persimmon fruits with 1M NaCl solution and determined by the method of Lowry *et al.*

^{c)}Cell wall proteins were analyzed by Kjeldahl's method.

Table 1에서 보는 바와 같이 염가용성 단백질의 함량은 녹숙기(GP), 변색기(TP), 완숙기(MP)에서 각각 1.5, 1.4, 2.0mg/100g-fr. wt.로 뚜렷한 변화가 없었으나 연시(SP)에서는 58.9mg/100g-fr. wt.로 약 30배 증가하였다. 세포벽 단백질은 녹숙기, 변색기 및 완숙기에서 각각 77.5, 93.8, 116.2mg/g-cell wall로 증가하였으나 연시에서는 42.7mg/g-cell wall로 급격히 감소하였다.

일반적으로 과실의 세포벽의 단백질은 많은 hydroxyproline 잔기를 함유한 glycoprotein으로서 세포벽에 5~10% 함유되어 있으며^{3,4)} hydroxyproline 잔기는 arabinofuranose와 결합하고, serine 잔기는 galactose와 결합되어 세포벽을 구성하고^{4,5)} 세포벽 구조를 안정시키며 세포성장시 세포벽의 신장성을 조절하는 것으로 알려져 있다²³⁾. 세포벽 단백질은 과실의 성숙 중에 함량이 증가하며²⁴⁾ 반면에 연화시에 가용성 단백질로 전환된다는 보고^{25,26)}가 있으며, 세포벽 분해

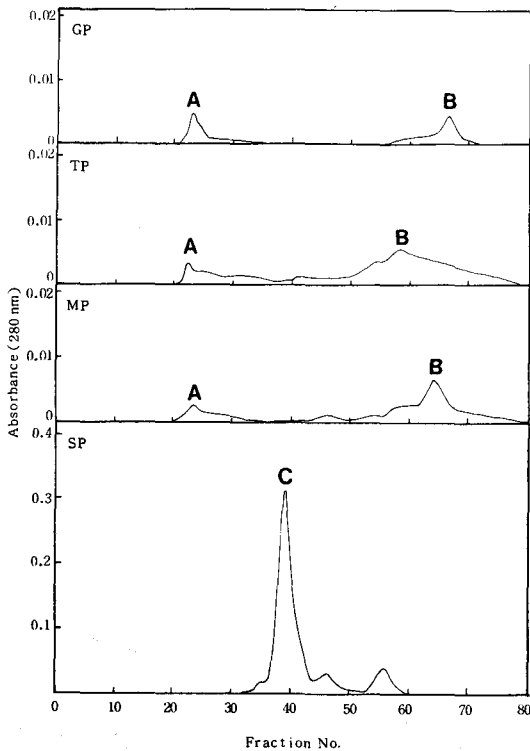


Fig. 1. Chromatograms of salt-soluble protein extracted from persimmon fruits on Sephacryl S-200 column.

Salt-soluble protein was extracted from persimmon fruits by 1M NaCl solution.

GP : Mature green persimmon, TP : Turning stage persimmon, MP : Mature persimmon, SP : Soft persimmon.

효소인 polygalacturonase는 glycoprotein 형태로 세포벽에 결합되어 있으며, 연화시 세포벽 분해효소의 작용에 의해서 세포벽의 분해와 동시에 세포벽으로부터 유리되어 활성형으로 전환됨으로 효소의 활성이 증가하고 연화를 촉진한다^{27,28)}. 이상의 연구보고와 연시의 polygalacturonase의 활성이 높은 것¹⁵⁾과 관련지어 볼 때 연시에서 염가용성 단백질의 증가와 세포벽 단백질의 감소는 연화시 세포벽 단백질이 가용성 단백질로 전환한 것으로 사료된다.

단백질의 분리 및 확인

감과실의 성숙과 연화중 단백질의 변화를 보다 구체적으로 구명하기 위하여 염가용성 단백질과 세포벽 단백질을 Sephacryl S-200과 CM-cellulose column에 의한 chromatogram의 변화를 조사하였다.

Fig. 1은 Sephacryl S-200 column에 의한 염가용성 단백질의 chromatogram의 변화를 나타낸 것이다. 성숙중의 염가용성 단백질은 peak A와 B처럼 고분자 단백질과 저분자 단백질로 분리되었고, 성숙중에 뚜렷한 변화가 없었으나, 연시에서는 fraction No. 36~44에서 한개의 큰 peak가 분리됨으로서 성숙중의 감과실과 연시에서 염가용성 단백질이 현저히 상이함을 알 수 있다.

과실의 연화시에 세포벽 단백질이 유리되어 가용성 단백질이 증가한다는 Knee²⁶⁾의 보고를 고려하면, 연시에서 염가용성 단백질의 함량이 매우 높고 Sephacryl S-200 column에 의한 chromatogram이 현저히 상이한 것은 연화중에 세포벽 단백질이 유리되어 염가용성 단백질로 전환되기 때문인 것으로 생각된다.

완숙 감과실에서 추출한 세포벽성분에 polygalacturonase를 처리하여 얻은 세포벽 단백질을 전과 동일한 방법으로 분획한 결과는 Fig. 2와 같다. Fraction No. 36~44에서 연시의 염가용성 단백질의 chromatogram과 동일한 peak가 존재함을 알 수 있었다.

Polygalacturonase를 처리한 세포벽 단백질(Fig. 2)이 연시의 단백질(Fig. 1)과 동일한 단백질인지를 확인하기 위해 CM-cellulose column으로 분리한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 연시의 염가용성 단백질과 효소를 처리한 세포벽 단백질의 fraction No. 10~30에서 각각 동일하게 두개의 peak로 분리, 확인되었다. 그리고 Sephacryl S-200 column으로 분획한 각 단백

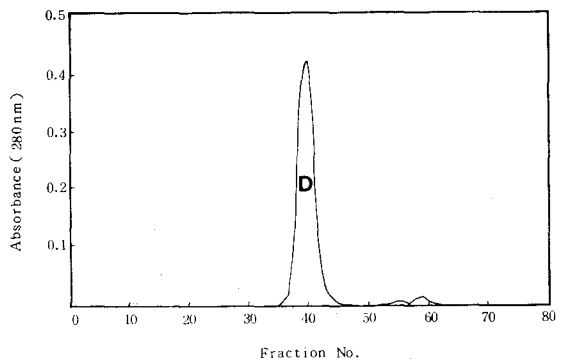


Fig. 2. Chromatogram of protein extracted from cell wall of mature persimmon fruits on Sephacryl S-200 column.

Protein was extracted from cell wall of mature persimmon fruits after polygalacturonase treatment.

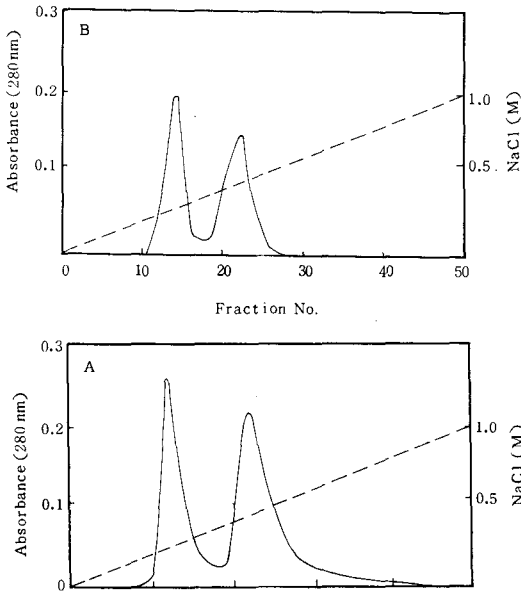


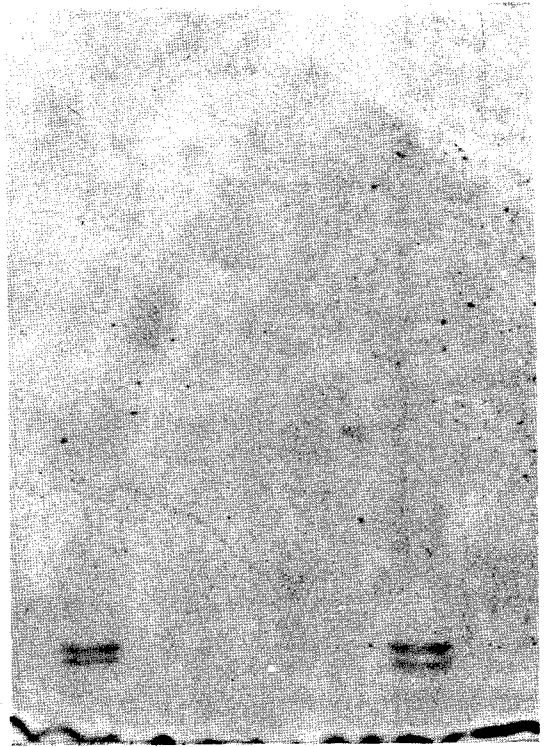
Fig. 3. Chromatograms of protein on CM-cellulose column.

A : Fraction C of salt-soluble proteins(Fig. 1), B : Fraction D of cell wall proteins(Fig. 2).

질을 전기영동한 결과, Fig. 4에서와 같이 염가용성 단백질과 효소를 처리한 세포벽 단백질이 동일한 단백질임을 확인할 수 있었다.

Knee^{12,26)}는 사과 성숙중에 가용성 단백질의 함량이 증가하고 hydroxyproline 잔기가 많은 세포벽 단백질이 유리된다고 하였고, 또한 polygalacturonase를 사과 조직에 처리하였을 때 hydroxyproline을 많이 함유한 세포벽 단백질이 유리된다고 하였다. 그리고 Stand 등²⁹⁾과 Ishii³⁰⁾는 과실의 연화중에 polygalacturonase가 middle lamella의 구성 성분인 pectin질을 분해함으로써 세포벽 단백질이 유리된다고 보고하였다.

이상의 연구를 고려할 때 감과실의 세포벽은 2중



A B

Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins.

A : Fraction C of salt-soluble proteins, B : Fraction D of cell wall proteins.

의 단백질을 함유하고 있으며, 연화함에 따라 세포벽 단백질은 가용성 단백질로 전환됨을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 1988년도 학술연구조성비 지원(891-1508-062-2)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비를 지원하여 준 한국과학재단에 깊은 사의를 표하는 바이다.

참 고 문 헌

1. Huber, D. J. : Horticultural Reviews, 5 : 169 (1983)
2. Hobson, G. E. : In 'Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables', Friend, J. and Rhodes, M. J. C.(eds), p. 123, Academic Press, London(1981)
3. Robinson, D. G. : Adv. Bot. Res., 5 : 89(1977)
4. Lamport, D. T. A. : Nature, 216 : 1322(1967)
5. Lamport, D. T. A. : Adv. Bot. Res., 2 : 1151 (1965)
6. Lamport, D. T. D. : Ann. Rev. Plant Physiol., 22 : 235(1971)
7. Pressey, R. : In 'Enzymes in food and beverage

- processing'. R. L. Ory and Angelo, A. St.(eds), p. 172, ACS Symposium Series 47(1977)
8. Knee, M. : Phytochemistry, 12 : 1543(1973)
 9. Gross, K. C. and Sams, C. E. : Phytochemistry, 23(11) : 2457(1984)
 10. Ahmed, A. E. R. and Labavich, J. M. : Plant Physiol., 65 : 1009(1980)
 11. Plat-Aloia, K. A. and Thomson, W. W. : Ann. Bot., 48 : 451(1981)
 12. Knee, M. : Phytochemistry, 14 : 2181(1975)
 13. 신승렬, 김주남, 김순동, 김광수 : 한국식품과학회지, 22(7) : 738(1990)
 14. 신승렬, 송준희, 김순동, 김광수 : 한국식품과학회지, 22(7) : 743(1990)
 15. 신승렬, 김진구, 김순동, 김광수 : 한국영양식량학회지, 19(6) : 596(1990)
 16. 신승렬, 하유덕, 김진구, 김순동, 김광수 : 한국영양식량학회지, 19(6) : 605(1990)
 17. 신승렬, 송준희, 김순동, 김광수 : 한국농화학회지, 34(1) : 32(1991)
 18. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall R. J. : J. Biol. Chem., 193 : 265 (1951)
 19. Selvendran, R. R. : Phytochemistry, 14 : 1011 (1975)
 20. Jarvis, M. C. : Planta, 154 : 344(1982)
 21. A. O. A. C. : Official Methods of Analysis, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, p. 858, Washington D. C.(1980)
 22. Laemmli, U. K. and King, J. : J. Mol. Biol., 62 : 465(1971)
 23. Forrest, I. S. : Biochem. Soc. Transation, 5 : 1154(1977)
 24. Woodward, J. R. : J. Sci. Food Agric., 23 : 465 (1972)
 25. Nagahashi, G. : Plant Physiol., 69 : 105(Abstract, 641)(1987)
 26. Knee, M. : Phytochemistry, 12 : 637(1973)
 27. Nakagawa, H., Sekiguchi, K., Ogura, T. and Takehena, H. : Agric. Biol. Chem., 35 : 301 (1971)
 28. Lang, W. C. : Plant Physiol., 69 : 678(1981)
 29. Strand, L. L., Rechteris, C. and Mussell, H. : Plant Physiol., 58 : 722(1976)
 30. Ishii, S. : Plant Physiol., 62 : 586(1978)

Changes in the salt-soluble and cell wall proteins during maturation and post-harvest of persimmon fruits

Seung-Ryeul Shin, Ju-Nam Kim*, Soon-Dong Kim** and Kwang-Soo Kim (Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea, *Department of Food and Nutrition, Yeungnam Junior College, Daegu 705-030, Korea, **Department of Food Science and Technology, Hyosung Women's University, Kyungsan 713-702, Korea)

Abstract : Salt-soluble protein contents of green and mature persimmon were 1.5 and 2.0mg/100g-fr. wt., respectively, but that of soft persimmon was 58.9mg/100g-fr. wt.. Protein contents of cell wall increased during maturation but decreased in soft persimmon. The chromatograms of salt-soluble proteins by gel filtration were similar during maturation but those of protein extracted from soft persimmon were different from those of persimmon during maturation. The cell wall protein of persimmon was of two kinds and released during softening.