

韓國在來山羊肉의 筋原纖維 蛋白質에 關한 研究

東南保健專門學校

洪鍾庸 · 文允熙 · 高鎮福

=Abstract=

Studies on the Myofibrillar Proteins from Korean Native Goat

Jong Yong Hong, Yoon Hee Moon and Jin Bok Koh

Dong Nam Health Junior College

Actomyosin and myofibril were extracted from Korean native Goat muscle with the Weber-Edsall solution.

ATPase activities and physiochemical properties were measured.

The results obtained were as follows;

1) Mg-activated ATPase activity of actomyosin and myofibril from Korean native Goat muscle exhibited a common biphasic response, a typical ATPase pattern, that is high at a low ionic strength and low at a high ionic strength. Actomyosin showed high activity than myofibril.

2) Mg-activated ATPase activity of actomyosin from muscle increased extraction time 24 hours.

3) EDTA-enhanced ATPase activity of actomyosin was greater than myofibril and low at the low ionic strength, high at the high ionic strength. The difference of the activity were shown great broad pattern at the after 0.3M KCl concentration.

4) Effect of EGTA on-ATPase activity of myofibril and actomyosin from muscle was measured, the Mg-ATPase activity was markedly depressed.

5) Solubility of actomyosin from muscle began to solubilize at KCl concentration of 0.28M and solubilized completely at the KCl concentration of 0.3M.

I. 緒 論

筋原纖維 蛋白質에 關한 研究는 Kühne¹⁾이 myosin을 高濃度의 鹽溶液으로 抽出하는데 성공한 후 Engelhart 등²⁾은 myosin이 ATP를 ADP로 분해하는 酵素的인 機能을 갖고 있다고 밝히며 물리화학적, 생화학적 측면에서 많이 연구되고 있다. 그러나 이러한 연구는 대부분 토끼 근육에서 행해지고 있으며^{3,4,5)} 근자에 와서 다른 動物肌肉을 이용한 연구결과들이 보고되고 있지만 한국재래산양 肌肉을 이용한 연구보고는 현재까지는 거의 없는 듯하다.

金 등⁶⁾이 한국재래산양의 산육성 및 육조성분에 대한 보고가 있을 뿐이다. 한국재래 산양육은 옛날부터 藥用으로 이용하고 있어서 이에 대한 자세한 組成이나 근수축을 담당하는 단백질들의 물리화학적 性質을 파악함은 그 물성을 밝히는데 중요한 일이라고 생각한다. 肌肉組織은 筋細胞가 주체가 되어서 집속형성된 것으로서 筋細胞는 직경이 10~100 μ , 길이 수cm~수10cm에 달하는 원주상 세포이다.

肌肉蛋白質은 鹽溶液에 대한 溶解度의 차이로 肉基質蛋白質(stromal protein)과 筋漿蛋白質(sarcoplasmic protein) 및 筋原纖維蛋白質(myofibrillar protein)로 나누는데 여기서 筋原纖維蛋白質이 鹽溶性蛋白

質로서 筋收縮에 직접 關係하는 것이다. 本 實驗은 한국재산양육의 myofibrill과 actomyosin을 抽出해서 生物活性을 조사한 것으로 蛋白質化學의 特徵을 찾는 데 그 目的이 있겠다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

한국재산양(體重 7.5kg)의 thigh muscle에서 脂肪과 結核조직을 除去하여 chopping해서 試料로 사용하였다.

2. 實驗方法

(1) Actomyosin 조제 : Szent-Gyorgyi¹⁷⁾의 方法을 약간 變형하여 試料를 조제했으며 그 조제 方法은 다음과 같다.

(1) Muscle tissue (100g)

1. Extract with 6 volumes of Weber-Edsall solution for 15 minutes with gentle stirring
2. Let stand for a given hour(0, 6, 12, 18, 24)
3. Centrifuge at 8,000rpm for 15 minutes.

(2) Supernatant

1. Add 11 volumes of distilled water.
2. Centrifuge at 6,000 rpm for 7 minutes.

(3) Sediment

1. Dissolve in same volumes of 1M KCl.
2. Centrifuge at 8,000 rpm for 15 minutes.

(4) Supernatant

1. Add 2 volumes of distilled water.
2. Centrifuge at 6,000 rpm for 7 minutes.

(5) Sediment

1. Adjust to 0.6M KCl with 1M KCl.
2. Centrifuge at 8,000 rpm for 10 minutes.

(6) Supernatant

1. Adjust to 0.2M KCl with distilled water.
2. Centrifuge at 6,000 rpm for 7 minutes.

(7) Sediment

1. Dissolve in same volumes of 1M KCl.
2. Centrifuge at 8,000 rpm for 15 minutes.

(8) Supernatant

1. Adjust KCl concentration to 0.6M KCl
Refined Actomyosin

抽出시간에 따른 actomyosin의 조제는 Weber-Edsall용액 6배로 현탁시킨 muscle suspension을 6시

간 간격으로 24시간까지 상기 方法에 따라 조제했고 抽出시간 전까지는 3°C에서 방치했다.

(2) Myofibrill 조제 : 筋原纖維 조제는 梁¹⁸⁾의 方法에 의했으며 그 方法은 다음과 같다.

(1) Chopped meat (5g)

1. Add 80 volumes of 0.16M KCl-0.04 M Tris-HCl(pH 7.5)
2. Homogenize for 1 minute.
3. Centrifuge at 2,000 ×g for 10 minutes.

(2) Sediment

1. Add 80 volumes of 0.16M KCl (W/V)
2. Centrifuge at 2,000 ×g for 10 minutes.

(3) Sediment

1. Add 80 volumes of 0.16M KCl (W/V)
2. Centrifuge at 2,000 ×g for 10 minutes.

(4) Sediment

Repeat Step (3) twice.

(5) Sediment

1. Add 55 volumes of 0.16M KCl (W/V)
2. Filter by 6 mesh nylon net.

(6) Filtrate (Myofibrills)

(3) ATPase 活性測定 : 筋原纖維(0.25mg/ml) 또는 actomyosin(0.25mg/ml)과 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM ATP 및 2.5mM tris HCl(pH 8.0)로 혼합된 반응물을 30°C에서 5분동안 배양시키고 반응은 최종농도 4%인 TCA를 첨가하여 반응을 정지시키고 유리된 인을 측정하였다.

ATPase 活性은 1mg의 단백질에서 유리되어 나오는 무기인산(Pi)의 μmole로 표시했다.

(4) 蛋白質濃度 測定 : 단백질농도는 Biuret¹⁹⁾法으로 측정하였으며 檢量線은 micro-kjeldahl¹¹⁾法으로 檢定했다.

III. 結果 및 考察

1. 筋原纖維蛋白質의 Mg-activated ATPase 活性

Myosin-actin의 mechanism에 대한 Mg ion과 Ca ion의 영향은 myosin ATPase에 대한 Mg ion에 의하여 inhibition되고 Ca ion에 의해서 activation되지만 actomyosin이 형성되면 Mg ion에 의한 저해가 없어지고 오히려 Mg ion에 의해서 activation된다^{11~13)}는 사실은 myosin ATPase의 active center와 actin과의 binding center가 서로 다르다는 結果와 actin은

myosin ATPase의 allosteric effector¹⁴⁾임을 증명하고 있다.

그러므로 actomyosin의 actin-myosin interaction은 단순한 protein-protein interaction이 아니라 특이한 성질을 갖고 있다고 할 수 있다. Mg-ATP 존재 하에 myosin과 F-actin의 상호작용은 muscular-contraction을 근본적으로 하는 분자기구에 중요한 역할을 한다는 것도 잘 알려진 사실이다.

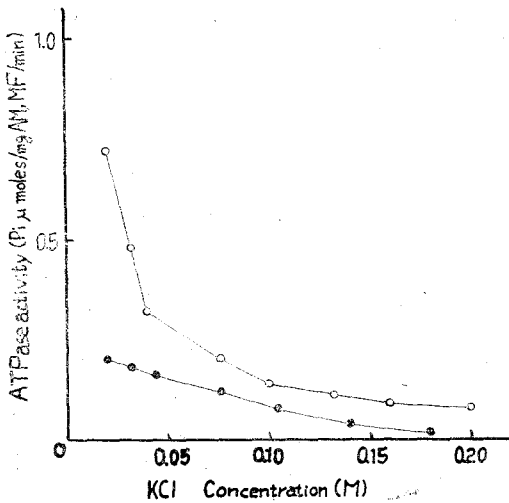


Fig. 1. Mg-activated ATPase activity of actomyosin(AF) and Myofibrill(MF) from muscle
ATPase assay: 0.25mg/ml actomyosin or myofibrill 1mM MgCl₂ 1mM ATP 25mM Tris-HCl(pH 8.0) and KCl at the concentration cited on abscissa

○—○ actomyosin ●—● myofibrill

Fig. 1은 actomyosin과 myofibrill의 Mg-ATPase 활성을 나타낸 것인데 흔히 저이온 강도에서 높고 고이온 강도에서 낮은 biphasic response를 보이고 있으며 이것은 actomyosin ATPase의 일반적인 성질로 생각된다.

그러나 梁¹⁵⁾등이 보고한 토끼와 닭에 대한 결과 보다 저이온 강도에서는 낮은 값을 나타냈고 고이온 강도로 갈수록 비슷한 값을 나타내는 현상은 동물별 운동성에起因되는 것으로 생각된다. 고이온 강도와 저이온 강도사이에서 ATPase 활성을 보면 actomyosin이 ATPase 활성폭이 큰것은 鹽溶液의 이온 강도에 민감한 것으로 생각할 수 있다. 즉 actomyosin이 ATP로 인하여 transformation의 영향을 더 받는 것이며 筋原纖維단백질을 구성하는 myosin과 actin의 결합상

태를 시사해주고 있다. 따라서 이온 강도의 존성이 낮은 것은 actin-myosin의 cross bridge가 보호받고 있다고 생각할 수 있다.

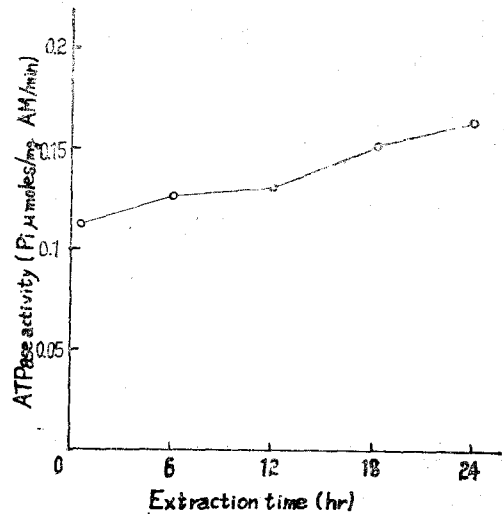


Fig. 2. Mg-activated ATPase activity of actomyosin(AM) from muscle as a function of Extraction time

ATPase assay: 0.25mg/ml actomyosin 1mM MgCl₂/mM ATP 25mM Tris-HCl(pH 8.0) 0.05M KCl

2. 추출시간별 actomyosin의 Mg-activated ATPase 활성

Fig. 2는 시간별로 actomyosin을 추출했을 때 Mg-activated ATPase 활성을 나타낸 것인데 0시간에서 24시간까지의 활성은 서서히 높아졌음을 알 수 있다.

추출물중의 actomyosin은 myofibrill의 팽창으로 붕괴된 다음 생성되고, 이러한 사실은 ATP가 해리상태인 actin과 myosin의 保存에 의해서가 아니고 actin filament의 固定이든지 Z membrane에 附着함으로써 actomyosin의 추출을 억제한다고 볼 수 있다. 이러한 이유로 Ishiyama¹⁶⁾는 ATP가 pyrophosphate에 의해 치환될 수 있다고 했으며 Mihalyi¹⁷⁾등은 inorganic phosphate에 의해서도 가능하다고 했다.

또한 actomyosin의 추출에 있어서 ATP가 myofibrill의 thin filament구조를 보호함으로써 actomyosin의 추출은 muscle mince의 intrinsic ATP가 myosin ATPase activity에 의해 가수분해 된후에 actomyosin의 complex가 추출된다고 보고했다.

들은 蛋白質食品의 物性を 밝히는 意味를 갖고 食品加工 原料를 利用한 製品製造時의 營養學的 變化를 추구 하는데 기초자료가 되리라 생각된다.

IV. 結 論

한국계태산양육에서 myofibrill과 actomyosin을 추출해서 생물활성을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. Mg-activated ATPase활성은 低이온 強度에서 높고 高이온 強度에서 낮은 biphasic response를 나타내고, actomyosin활성이 myofibrill활성보다 높았다.

2. 추출시간별 actomyosin의 Mg-activated ATPase활성은 점점 높아졌다.

3. EDTA-enhanced ATPase활성은 高이온 強度에서 높고 低이온 強度에서 낮았으며 myofibrillo이 actomyosin보다 낮았다. 그리고 추출시간별로는 서서히 낮아지는 현상을 보였다.

4. Myofibrill과 actomyosin의 Mg-ATPase활성은 EGTA에 대해서 저해를 받았고 高濃度에서보다 低濃度에서 많이 받았다.

5. Actomyosin의 KCl 鹽溶液에 대한 용해성은 약 0.28M에서 용해되기 시작해서 0.3M에서 완전히 용해되었다.

參 考 文 獻

- 1) W. Kuhne: *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med. Leipzig*, 564, 1859.
- 2) W.A. Engelhardt & M.N. Ljubimova: *Nature*, 144 : 668, 1939.
- 3) S. Ebashi & F. Ebashi: *J. Biochem.*, 55 : 604, 1964.
- 4) R. Yang, C.J. Kim, Y.H. Moon & J.H. Yu: *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol. 2. No. 79, 1974.
- 5) M. Fujimaki, A. Okitani & N. Arakawa O. Takage: *Agr. Biol. Chem.*, 29 : 700, 1965.
- 6) J.W. Kim, K.Y. Ra & I.H. Lee: *Thesis Collection, Chungnam Univ. Vol. 11* 109, 1972.

- 7) A. Szent-Gyorgi: *The chemistry of Muscular contraction, 2nd rev. ed., Academic press, New York, 1951.*
- 8) R. Yang, A. OKitani & M. Fujimaki: *Agr. Biol. Chem.*, 36 : 2087, 1972.
- 9) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M.: *J. Biol. Chem.*, 177 : 751, 1949.
- 10) Oser, B.L.: *Chemistry. 14th ed. McGraw-hill Book Co. New York, 506, 1965.*
- 11) R. Yang: *Central Med.*, 24 : 237, 1973.
- 12) S. Nagashima & K. Maruyama: *Scientific papers of the College of General Education Univ. of Tokyo*, 18 : 55, 1968.
- 13) I. Ozawa & K. Maruyama: *Scientific paper of the College of General Education Univ. of Tokyo*, 18 : 261, 1968.
- 14) H. Tokuyamura, Y. Tonomura: *J. Biochem.*, 62 : 456, 1967.
- 15) R. Yang & C.J. Kim: *Thesis collection, Yonsei Univ. Vol. 12* : 305, 1975.
- 16) I. Ishiyama: *Dtseh. Z. ges. gerichtl. Med.* 50 : 583, 1960.
- 17) E. Mihalyi & A.J. Rowe: *Biochemische Zeitschrift* 345 : 267, 1966.
- 18) H. Noda, K. Maruyama: *Biochem. Biophys. Acta.*, 32 : 263, 1959.
- 19) T. Hage, K. Maruyama & H. Noda: *Biochem. Biophys. Acta.*, 94 : 226, 1965.
- 20) E.T. Friess: *Arch. Biochem. Biophys.*, 51 : 17, 1954.
- 21) W.J. Bowen & T.D. KeRwin: *J. Biol. Chem.*, 211 : 237, 1954.
- 22) S. Ebashi, F. Ebashi & A.K. Dama: *J. Biochem.*, 62 : 137, 1967.
- 23) S. Watanabe: *Arch. Biochem. Biophys.*, 54 : 559, 1955.
- 24) S. Ebashi, A. Kodama & F. Ebashi: *J. Biochem.*, 64 : 465, 1968.
- 25) M.S. Lewis, H.A. Saroff: *J. Am. Chem. Soc.*, 79 : 2112, 1957.