

닭고기의 근원섬유 단백질에 관한 연구

2. 꿀격근 부위별로 추출한 근원섬유, 액토미오신 및 미오신의 ATPase 활성 비교

박 창 식 · 공 양 숙 · 문 윤 희

부산산업대학교 식품과학과
(1984년 11월 10일 접수)

Studies on the Myofibrillar Proteins from Chicken Muscle

2. Comparison of ATPase Activity in Myofibril, Actomyosin and Myosin Extracted from Leg and Pectoral Skeletal Muscle

Chang-Sik Park, Yang-Sug Gong and Yoon-Hee Moon

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan Sanub University
(Received November 10, 1984)

Abstract

Some biological activities showed as ATPase activity of myofibril, actomyosin and myosin extracted from chicken leg and pectoral skeletal muscle were investigated. The Mg^{+2} -ATPase activity at 0.05 M KCl were 0.82, 0.38 and 0.11 μ mole Pi/mg protein/min. in actomyosin, myofibril and myosin from pectoral muscle while 0.71, 0.32 and 0.08 μ mole Pi/mg protein/min. in actomyosin, myofibril and myosin from leg muscle. EDTA-ATPase activity at 0.6 M KCl were 0.80, 0.42 and 0.40 μ mole Pi/mg protein/min. in actomyosin, myofibril and myosin from pectoral muscle. In case of leg muscle, that activity was noted as 0.69, 0.33 and 0.28 μ mole Pi/mg protein/min in proteins. ATPase activity of myosin from leg and pectoral muscle were inhibited in 10% at a higher concentration of Mg^{+2} than molar concentration of EDTA, and the ATPase activity was increased to 400% compared with control at $10^{-3}M$ of Ca^{+2} . Actomyosin from pectoral muscle was solubilized at 0.1 M KCl above and that from leg muscle was solubilized at 0.15 M KCl above. In case of myosin, pectoral muscle was solubilized at 0.25 M KCl above and leg muscle was solubilized at 0.30 M KCl above.

서 론

동물성 식품가공에 있어서 筋原纖維蛋白質의 生物活性을 밝히는 것이 식품원료의 物性을 파악 하는데

좋은 지침이 되고 있다. 특히, 사후강직과 죽성에 크게 관여하고 있는 筋收縮性 蛋白質은 여러 가지 조건에 따라서 그 특성이 달라지기 때문에 많은 연구가 이루어지고 있다.^{1~5)}

우리나라에서는 닭고기의 利用이 아직까지 加工食品 원료용으로 보다 그대로 調理 利用되는 경향이 많지만 加工食品 원료용으로도 크게 개발될 것이 기대되어지고 있다.

따라서 加工適性에 기초적인 작업으로 닭의 가슴부위 및 다리부위의 骨格筋에서 myofibril과 actomyosin 그리고 myosin을 추출하고 몇 가지 特性을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

부산시 북구 대저동 당리마을에 소재하는 H 養鷄場에서 8週齡된 닭을 구입하여 가슴부위와 다리부위의 骨格筋에서 試料를 취하여 이용하였다.

2. 실험 방법

1) 蛋白質의 抽出

Myofibril의 조제는 Yang의 방법⁶⁾, actomyosin은 前報⁷⁾에서 채택한 방법, myosin은 Mommaerts의 방법⁸⁾을 약간 수정하여 조제하였는데, 그 과정은 Fig. 1과 같다.

2) 蛋白質濃度 및 ATPase 活性測定

前報⁷⁾에서 채택한 방법에 따랐다.

3) 溶解度 測定

3 mg/ml의 蛋白質에 KCl을 농도별로 첨가하여 2,000×g에서 10분간 遠心分離시킨 후 上澄液을 278 nm에서 吸光度를 측정하여 O.D. 值로서 표시하였다.

결과 및 고찰

1. Mg²⁺ 및 EDTA-ATPase 活性比較

Actin과 myosin의 相互作用에 대한 Mg²⁺의 영향에 관하여서는 오래전부터 현재에 이르기까지 많은 연구 결과가 보고되고 있다.^{9~11)} 이러한 결과들은 일반적으로 低 ion強度에서 높은 活性值와 高 ion 強度에서 낮은 活性值를 나타낸다.

本實驗 결과에서도 Fig. 2에서 보는 바와 같이 骨格筋의 부위에 관계없이 myofibril, myosin, actomyosin 공히 같은 결과였다. 그러나, 低ion強度에서 蛋白質間의 活性에 대한 차이가 커으며, 高 ion強度

- (1) Muscle tissue(25 g)
Add 4 vols. of Straub solution, stir for 15 min.
Centrifuge at 10,000 rpm for 15 min.
Filter by Büchner funnel or Whatman No. 31 filter paper.
- (2) Supernatant
Add 15 vols. of glass distilled water.
Let stand for overnight or 12 hrs.
Centrifuge at 6,000~10,000 rpm for 10 min.
- (3) Precipitate
Add same vol. of 1.16 M KCl($\mu=0.6$).
Centrifuge at 6,000~10,000 rpm for 10 min.
- (4) Supernatant
If necessary adjust pH 6.6 with solid NaHCO₃ and Bromothymol blue.
Add glass-distilled water($\mu=0.3$).
Centrifuge at 9,000 rpm for 15 min.
- (5) Supernatant
Add 6.5 vol. of distilled water($\mu=0.04$), stand overnight.
Centrifuge at 10,000 rpm for 10 min.
- (6) Precipitate
Add same vol. of 1.16 M KCl($\mu=0.6$).
Centrifuge at 8,000~10,000 rpm for 15 min.
- (7) Supernatant
Adjust pH 6.6 with NaHCO₃.
Add distilled water($\mu=0.3$).
Centrifuge at 8,000~10,000 rpm for 15 min.
- (8) Repeat Step (5)~(7) once more
Refined myosin solution

Fig. 1. Extraction of myosin.

에서는 적었다. 이것은 鹽溶性蛋白質들이 鹽溶液에 대한 의존성이 서로 다르다는 것을 시사하는 것으로 생각된다.

그런데, 같은 조건에서 實驗되어진 myofibril, myosin 그리고 actomyosin의 生物活性을 비교하여 보면 같은 ion 強度에서 myosin은 낮은 活性值를 나타내었고, myofibril은 중간 活性值를 나타내었으며, actomyosin은 높은 活性值를 나타내었다. 이것은 myosin이 Ca²⁺에 의해서 活性화되고 Mg²⁺에 의해서 混害되지만 myosin이 actin과 결합하여 actomyosin을 형성하면 Mg²⁺에 의한 混害는 없어지고 오히려 活性이 증대된다는 것을 의미하는 것으로서 actomyosin type ATPase 活性을 갖는다^{8,12~13)}는 사실을 잘 적혀주고 있다.

동물의 筋肉은 赤色肉과 白色肉으로 나누어 표시

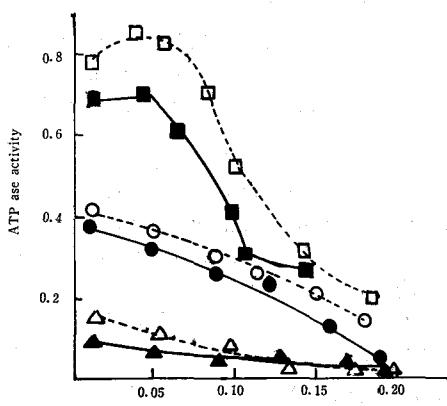


Fig. 2. Mg-activated ATPase activity.

ATPase assay; 0.25 mg/ml protein, 1 mM $MgCl_2$, 25 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM ATP.

Symbol; pectoral muscle (open line), leg muscle(filled line), myosin(Δ , \blacktriangle), myofibril(\circ , \bullet), actomyosin(\square , \blacksquare)

되고¹⁴⁾ 筋肉 운동이 빠른 부위와 느린 부위에서 추출되는 鹽溶性蛋白質의 Mg^{+2} -ATPase 活性과 Ca^{+2} -ATPase活性, 그리고 EDTA-ATPase活性의 차이는 크다고 보고되고 있다.¹⁵⁾ 本實驗에서 추출된蛋白質도 부위별로 ATPase活性을 달리하고 있다. 이러한 결과는 비둘기 다리 및 가슴부위의 骨骼筋을 試料로 하여 myosin을 추출하고 그 生物活性이 서로 다르다는 보고¹⁶⁾와 일치되고 있다.

Fig. 3은 EDTA-ATPase活性을 비교한 것이다.

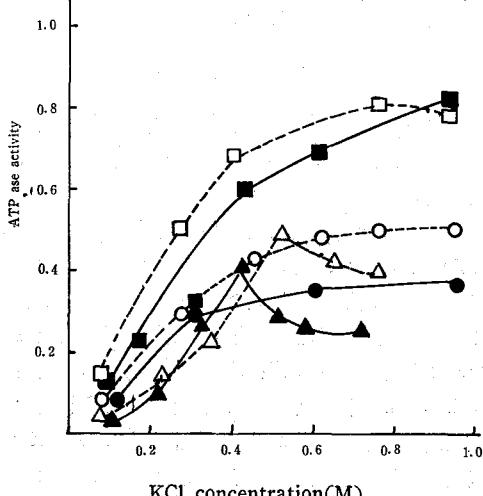


Fig. 3. EDTA-enhanced ATPase activity.

ATPase assay; 0.25 mg/ml protein, 1 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM ATP.

Symbol; same as Fig. 2

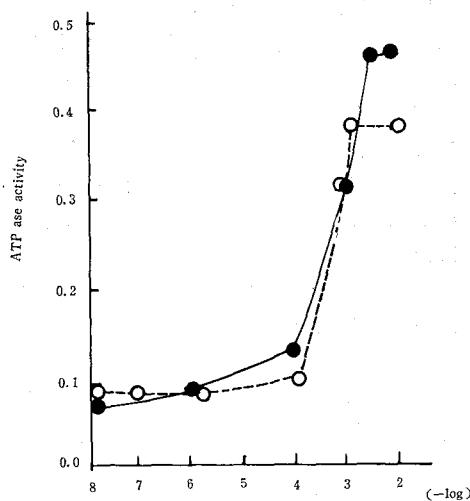
Actomyosin 및 myofibril의 EDTA-ATPase活性은 가슴부위와 다리부위에 관계 없이 low ion 強度에서 낮은活性值를 나타내었고, high ion 強度에서 높은活性值를 나타내었는데, myosin은 특정한 ion 強度에서 최대의活性值를 나타내었다가 그以上のion 強度에서는 감소하는 현상을 보여주고 있다.

이러한 결과는 myosin의 경우 EDTA에 의하여 myosin A의 ATPase가 myosin B ATPase보다 활성 증가되고 0.6 M KCl 또는 1.0 M KCl에서 pH 8의條件은 EDTA의 존재하에 myosin의 ATPase活性를 대단히 높인다는 사실¹⁷⁾과는 일치되지만, Ca^{+2} 이 존재하지 않을 때 0.6 M KCl에서 $10^{-4}M$ 정도의 EDTA는 myosin의 脫磷酸 속도를 加速化하여 $10^{-2}M$ 정도에서 約 400%까지 加速化 된다는 보고¹⁸⁾와는 다른 현상을 나타내고 있으며 문¹⁹⁾이 지적한 특정 농도以上의 ion 強度에서는 myosin의 分子形이 크게 변형되고 있을 것으로 추측한 결과와는 비슷한 현상을 나타내고 있기 때문에 이에 대한 연구가 앞으로 더욱 필요하다고 생각된다.

한편 Wu²⁰⁾는 赤色筋의 myosin과 白色筋의 myosin 보다 ATPase活性이 낮다고 하였는데, 本實驗 결과에서도 부위별로 달리 추출된 筋原纖維蛋白質의 ATPase活性의 차이를 인정할 수 있었다.

2. Myosin의 ATPase活性에 대한 Ca^{+2} 및 Mg^{+2} 의 影響

筋原纖維蛋白質중 myosin의 ATPase酶素의 작용은 Mg^{+2} , Ca^{+2} , ATP의 농도 및 pH 조건등에 의하여 이루어진다.^{21~22)} 그런데, 生筋의 특징은弛緩 상태에서 筋小胞體속의 Ca^{+2} 이 $10^{-7}M$ 정도이지만 자극이 筋小胞體에 전달되어 筋小胞體에서 Ca^{+2} 이 방출되면 筋細胞내의 Ca^{+2} 농도는 $10^{-5}M$ 로 상승하게 되면서 收縮되고 자극이 없어지게 되면 Ca^{+2} 은 다시 筋小胞體로 들어가 Ca^{+2} 농도를 $10^{-7}M$ 로 저하시켜弛緩되는 것인데, 도살후의 筋肉에서도 사후강직에 이르는 과정에서 生筋과 같은 收縮이 일어나는데 이때의 收縮은 더욱 불가역적으로 시사되고 있다.^{23~24)} 生筋이 收縮하기 위하여서는 筋小胞體에서 Ca^{+2} 이 방출되는 것이 당연하지만 도살후의 筋肉에서는 아무런 자극 없이 強直時의 收縮이 일어나는 것은 非生理的인 조건하에서 筋小胞體가 내부에 Ca^{+2} 을 축적하는 기능을 상실하기 때문에 Ca^{+2} 농도가 $10^{-6}M$ 이상이 되면 troponin과 결합되어 thin filament와 thick filament 사이의 마찰이 일어난다.²⁵⁾ 그러므로 筋의 가슴부위

 CaCl_2 concentration(M)Fig. 4. Effect of CaCl_2 on the ATPase activity of myosin.

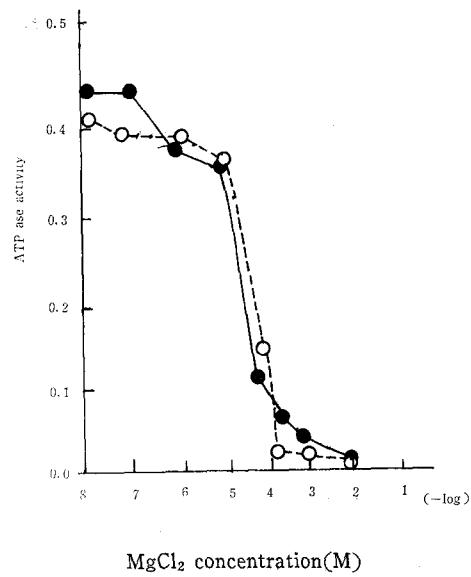
ATPase assay; 0.25 mg/ml pectoral myosin (filled line), leg myosin(open line), 1 mM ATP, 25 mM Tris-HCl(pH8.0) and 0.6M KCl.

와 다리부위의 骨格筋에서 추출된 myosin의 ATPase活性에 대한 Ca^{+2} 과 Mg^{+2} 의 영향을 비교하여 그 특징을 비교하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 가슴부위와 다리부위 모두 Ca^{+2} 농도가 낮은 때 낮은活性值를 나타내었고, Ca^{+2} 농도가 높아짐에 따라 ATPase活性은 높은活性值를 나타내었다. 이것은 Friess의 보고¹⁸⁾와 일치된 결과이었으며, 특히 10^{-4}M 에서 급격히活性值가 증가하기 시작하는 현상과 10^{-3}M 以上에서 최대活性值를 나타내는 현상 및 그以上の농도에서는 거의 변화가 없는 현상은 骨格筋의 부위에 큰 차이가 없었다.

한편, 부위별로 추출된 myosin의 EDTA-ATPase活性에 대한 Mg^{+2} 의 영향은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 가슴부위와 다리부위 모두 낮은 Mg^{+2} 에서 높은活性值를 나타내었고, 높은 Mg^{+2} 에서 낮은活性值를 나타내었는데, 특히 10^{-5}M Mg^{+2} 에서 급격히 감소하기 시작하는 것을 알 수 있었다.

그리고 Mg^{+2} 은 EDTA와 농도비율이 같아짐에 따라서 myosin의 ATPase活性은 混合되기 시작하여

 MgCl_2 concentration(M)Fig. 5. Effect of MgCl_2 on the EDTA-enhanced ATPase activity of myosin.

ATPase assay; Same as Fig. 4.

Mg^{+2} EDTA 농도보다 커짐에 따라서 酶素活性이 완전히 混合되었다.

3. 溶解度比較

Myosin의 ion強度에 대한 친화력이 매우 강하고²⁶⁾, 筋原纖維蛋白質의 용해도는 소, 토끼의 경우 0.5 M KCl, 0.1 M phosphate, pH 7.4 용액 안에서 도살후 저장온도를 25°C까지 높여줌으로써 크게 증대되며, 0.1 M potassium phosphate, 1.1 M KCl 용액내에서는 비슷한 용해도의 변화를 보였지만 37°C에 筋肉을 저장하였을 경우 일반적으로 감소되었다는 보고²⁷⁾와 筋原纖維蛋白質의 鹽濃度에 따른 용해도의 차이는 myosin과 actin과 결합하여 actin-myosin complex를 형성하면 1價의陽ion은 actin과 결합할 수 없게 된다는 보고²⁸⁾들은 筋原纖維蛋白質이 여러 ion強度의 鹽溶液에 대한 용해도가 그蛋白質의 성질을 나타낼 수 있다고 예상되게 한다.

따라서 가슴부위와 다리부위에서 추출된 myosin과 actomyosin의 용해도를 비교하였는데, Fig. 6에서 보는 바와 같이 actomyosin과 myosin의 용해도에 차이가 있었고 부위별로도多少의 차이를 나타내고 있으나 0.4 M 까지는 모두 완전히 용해되었다.

문 헌

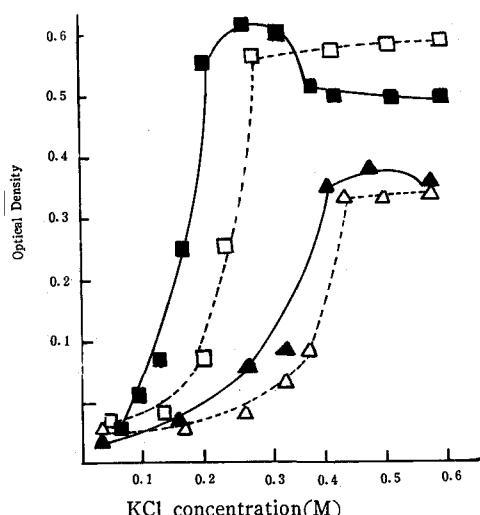


Fig. 6. Comparison of solubility of myosin and actomyosin.

Symbol; Same as Fig. 2

요 약

닭의 가슴부위 및 다리부위의 骨骼筋에서 myofibril, actomyosin 및 myosin을 추출하고 ATPase活性($\mu\text{mole Pi/mg protein/min}$)로서 나타낸 몇 가지生物學的活性을 비교하였다.

가슴부위에서 추출한 actomyosin, myofibril 그리고 myosin의 Mg^{2+} -ATPase活性은 0.05 M KCl에서 0.82, 0.38, 0.11 이었다. 이를 모두 다리부위에서 추출한蛋白質의活性인 0.71, 0.32, 0.08 보다 높았다.

가슴부위에서 추출한 actomyosin, myofibril 그리고 myosin의 EDTA-ATPase活性은 0.6 M KCl에서 0.80, 0.42, 0.40으로서 다리부위에서 추출한蛋白質의活性인 0.69, 0.33, 0.28 보다 높았다.

가슴부위와 다리부위의 myosin의 ATPase活性은 EDTA 농도보다 Mg^{2+} 농도가 높아지면서 ATPase活性을 1/10정도沮害시켰고, Ca^{2+} 농도는 10⁻³M에서 400%까지活性를 증가시켰다.

가슴부위와 다리부위에서 추출한 actomyosin의 용해되는始點은 각각 0.1 M KCl 및 0.15 M KCl이었고 myosin인 경우는 각각 0.25 M KCl 및 0.30 M KCl이었다.

- ### 문헌
- Briskey, E.J., Cassens, R.G. and Marsh, B.B.; In "The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food," Vol. II, Univ. of Wisconsin, Madison, Ill., 349(1970)
 - Forrest, J.C., Aberle, E.D., Hedrick, H.B., Judge, M.D. and Merkel, R.A.; In "Principles of Meat Science", Freeman and Company, San Francisco, CA, 127(1975)
 - Lawrie, R.A.; In "Meat Science", Pergamon Press, Oxford, London, 70(1974)
 - 양룡, 김철재, 문윤희, 유주현: 한국식품과학회지, 6(2), 79(1974)
 - 문윤희, 황칠성, 양룡: 한국축산학회지, 26(1), 72(1984)
 - Yang, R., Okitani, A. and Fujimaki, M.; *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1765(1970)
 - 공양숙, 박창식, 문윤희: 한국영양식량학회지, 14(1), 77(1985)
 - Mommaerts, W.F. H.M.; In "Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food", Univ. of Wisconsin, Madison, Ill., 277(1966)
 - 문윤희: 전국대학원 논문집, 13, 11(1981)
 - Olson, D.E., Parrish, F.C. Jr., Dayton, W.R. and Goll, D.E.; *J. Food Sci.*, 42, 117(1977)
 - Ouari, A. and Valin, C.; *Meat Sci.*, 5, 233 (1981)
 - Chaplain, R.A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 514(1966b)
 - Gergely, J.; In "Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food", Vol. II, Univ. of Wisconsin, Madison, Ill., 349(1970)
 - Ashmore, C.R., Tompkins, G. and Doerr, L.; *J. Anim. Sci.*, 34, 37(1972a)
 - Barany, M., Barany, K., Reckard, T. and Volpe, A.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 109, 185 (1965a)
 - Maddox, C.E.R. and Perry, S.V.; *Biochem. J.*, 99, 8(1966)
 - Bowen, W.J. and Kerwin, T.D.; *J. Biol. Chem.*, 211, 237(1954)
 - Friess, E.T.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 51, 17 (1954)
 - 문윤희: 한국식육연구회지, 4(1), 19(1983)

20. Wu, C. C.; *Biochem.*, **8**, 39(1969)
21. Bailey, K.; *Biochem. J.*, **36**, 121(1942)
22. Mueller, H. and Perry, S. V.; *Biochem. J.*, **85**, 431(1962)
23. Ebashi, S. and Kodama, A.; *J. Biochem.*, **58**, 107(1965)
24. Ebashi, S., Kodama, A. and Ebashi, F.; *J. Biochem.*, **64**, 465(1968)
25. Nauss, K. M. and Davies, R. E.; *J. Biol. Chem.*, **241**, 2918(1966)
26. Maruyama, K. and Gergely, J.; *J. Biol. Chem.*, **237**, 1095(1962b)
27. Chaudhry, H. M., Parrish, F. C. Jr. and Goll, D. E.; *J. Food Sci.*, **34**, 183(1969)
28. Lewis, H. S. and Saroff, H. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2112(1957)

科學技術者倫理要綱

現代的國家發展에 미치는 科學技術者의 役割의 重要性에 비추어 우리들 科學技術者는 우리들의 行動指針인 倫理要綱을 아래와 같이 制定하고 힘써 이를 지침으로써 祖國의 近代化에 이바지 할 것을 깊이 銘心한다.

1. 우리들 科學技術者는 모든 일을 最大限으로 誠實하고 公正하게 處理하여야 한다.
2. 우리들 科學技術者는 恒常 專門家로서의 權威를 維持하도록 努力하며 自己가 所屬하는 職場 또는 團體의 名譽를 昂揚하여야 한다.
3. 우리들 科學技術者는 法律과 公共福利에 反하는 어떠한 職分에도 從事하여서는 안되며, 의아스러운 企業體에 自己의 名稱을 릴려주는 것을 拒絕하여야 한다.
4. 우리들 科學技術者는 依賴人이나 雇傭主로부터 取得 또는 그로 因해 얻어진 科學資料나 情報에 對하여서는 秘密을 지켜야 한다. 또한, 他人의 資料 情報를 引用할 때는 그 出處를 點하야 한다.
5. 우리들 科學技術者는 誇張 및 無根한 發言과 非權威的 또는 眩惑的 宣傳을 삼가야 하며, 또 이를 制止하여야 한다. 特히, 他人의 利害에 關係되는 評價, 報告 및 發言에는 慎重을 期하여야 한다.
6. 우리들 科學技術者는 어떠한 研究가 그 依賴者에게 利益이 되지 않음을 아는 경우에는 이를 미리 알리지 아니하고는 어떠한 報酬를 위한 研究도 擔當하지 않는다.
7. 우리들 科學技術者는 祖國의 科學技術의 發展을 위하여 最大限으로 奉仕精神을 發揮하여야 하며, 또한 이를 위한 應分의 物質的 協助를 아껴서는 안된다.