

## 감과 대추의 연화중 Polygalacturonase의 변화

서지형 · 신승렬\* · 정용진\*\* · 김광수†

영남대학교 식품영양학과

\*경산대학교 식품과학과

\*\*동국전문대학 전통발효식품과

## Changes in Polygalacturonase during Softening of Persimmon and Jujube Fruits

Chi-Hyeong Seo, Seung-Ryeul Shin\*, Yong-Jin Jeung\*\* and Kwang-Soo Kim†

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea

\*Dept. of Food Science, Kyungsan University, Kyungasn 712-240, Korea

\*\*Dept. of Traditional Fermented Food, Dongkuk Junior College, Chilkok 718-850, Korea

### Abstract

This work was carried out to investigate change of polygalacturonase activities and polygalacturonase patterns by gel filtration chromatography during softening of persimmon and jujube fruits. During softening of two kinds of fruit, polygalacturonase activities of water-soluble and salt-soluble proteins were increased, but that of cell wall-bound proteins was decreased. In water-soluble and salt-soluble proteins of persimmon fruits, two peaks of polygalacturonase activity were separated in mature stages, but one peak in soft stages. During softening of those fruits, the peaks of polygalacturonase activity in water-soluble and salt-soluble proteins appeared on the same fraction with the peaks of polygalacturonase activity in cell wall-bound proteins.

**Key words:** polygalacturonase, persimmon, jujube, softening

### 서 론

과실은 성숙동안의 호흡형태에 따라서 호흡상승형 과실과 호흡비상승형 과실로 나누어지며(1), 품질에 영향을 미치는 연화현상은 과실의 호흡형태에 따라 다르게 나타난다. 호흡상승형 과실은 ethylene과 carbon dioxide의 생성이 현저하게 증가하며 이때 생성된 ethylene이 세포벽 분해효소의 활성증가를 유도함으로써 연화가 초래되지만(2,3), 딸기(4)와 같은 호흡비상승형 과실의 경우에는 성숙에 따른 세포벽의 물리적인 변화에 의해 연화가 일어난다.

호흡상승형 과실의 주된 연화효소로 알려져 오랫동안 많은 연구의 대상이 된 polygalacturonase(PG)는 세포벽의 middle lamella를 구성하는 pectin질을 분해해서 저분자의 polyuronide를 유리시켜 연화를 초래하며(5), 작용형태에 따라 endo형과 exo형으로 구분되고(6), 분

자량이나 작용 최적 온도 등에 차이가 있는 2개(PG1, PG2)(7) 혹은 3개(PG1, PG2A, PG2B)(8)의 isoenzyme으로 이루어져 성숙·연화단계에 따라 다른 isoenzyme 조성을 보인다. Polygalacturonase의 활성은 미숙과에서는 매우 낮거나 거의 나타나지 않으나, 과실의 성숙으로 급격히 증가해서 연화동안에 가장 높게 나타나며, 이러한 연화 중 polygalacturonase의 활성증가를 연화현상의 하나인 세포벽 단백질의 유리화 결부시킨 연구·보고(3)도 있다.

Hobson 등(9)은 연화현상의 일부로 나타나는 가용성 단백질은 효소적 활성을 지닌 active한 단백질로 과실의 성숙말기까지 세포벽에 결합되어 있다고 했으며, Themmen 등(10)은 *in vitro*에서 세포벽 단백질(cell wall-bound protein)추출물에 의한 세포벽 성분의 분해가 polygalacturonase의 작용에 기인된다고 보고하여, 세포벽 단백질의 유리현상과 세포벽 분해효소를 관련지었다.

†To whom all correspondence should be addressed

특히 Hasegawa 등(11)은 과실의 성숙동안에 나타나는 polygalacturonase의 활성 증가는 세포벽의 분해에 의해 세포벽에 결합된 비활성형 polygalacturonase가 가용화되어 활성형으로 전환되기 때문이라고 보고하였다. 하지만 이러한 성숙 중에 나타나는 polygalacturonase의 활성 증가를 polygalacturonase의 *de novo* 합성으로 보고한 연구(12)도 있어서, 아직까지 과실의 성숙 및 연화 동안에 나타나는 가용성 단백질의 증가와 polygalacturonase의 활성 증가간의 상관관계에 대해 정확하게 밝혀지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 과실의 성숙·연화 동안에 나타나는 세포벽 단백질의 유리현상과 세포벽 분해효소의 활성 변화 상호간의 상관관계에 대해서 연구하고자 감과 대추에서 추출한 각 단백질(수용성 단백질, 엽가용성 단백질, 세포벽 단백질)의 polygalacturonase의 활성 변화 및 gel filtration chromatography에 의한 이들 단백질의 polygalacturonase pattern 변화 등을 조사·분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서는 완숙기의 삼시(청도 반시)와 대추(경산, 복조종) 및 이들을 연화시킨 연화된 감과 대추를 재료로 사용하였다.

### 단백질의 추출

수용성 단백질의 추출은 Hobson 등(9)이 행한 방법에 따라 200g의 과육에 10mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 400ml를 가하여 균질화시켜 3시간 동안 추출한 다음 8000×g로 20분간 원심분리하여 그 상등액을 분리하여 시료로 하였다. 엽가용성 단백질의 추출은 수용성 단백질을 추출 후 남은 잔사에 2배의 증류수를 가해 균질화시킨 후 NaCl을 1M이 되도록 가해 3시간 동안 저어준 후 이 균질액을 8000×g로 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 엽가용성 단백질로 하였다. 세포벽 단백질을 분리하기 위한 세포벽의 추출은 수용성 단백질과 엽가용성 단백질을 추출하고 남은 잔사를 Jarvis의 방법(13)에 따라 요오드 정색반응이 없을 때까지 methanol로 세척하여 당성분을 제거하고, 다시 chloroform으로 3회 세척·여과한 다음 얻은 잔사를 동결건조하여 세포벽성분으로 하였다. 동결건조된 세포벽성분은 0.025% sodium azide와 정제한 polygalacturonase를 함유한 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.5)에 현탁시켜 30°C 항온기에서 48시간 방치한 후에 가용화된 단백질을 추

출하여 세포벽 단백질로 하였다.

### Polygalacturonase(PG)의 활성 측정

PG의 활성측정은 DNS(dinitrosalicylic acid)비색법(14)에 따라 행해졌다. 즉 각 단백질액 200μl를 취하여 30°C에 5분간 정치시킨 후에 기질인 1% polygalacturonic acid용액을 300μl 가하여 2시간 반응시킨 다음 DNS용액 500μl를 가하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액을 끓는 물에서 5분간 발색시켜 540nm에서 흡광도를 측정 한 후 검량선에 의해 생성된 환원당 농도를 산출하여 효소활성으로 나타내었다. PG활성은 30°C에서 2시간 동안에 1mmole의 환원당을 생성하는 효소작용을 1unit로 하였다.

### Gel chromatography에 의한 polygalacturonase의 pattern 변화

Ali와 Brady(8)의 방법에 따라 10mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 평형시킨 Sephacryl S-200 column(2×45cm)에 Amicon diaflo ultrafiltration system을 사용해서 N<sub>2</sub> gas하에서 가압, 농축한 각 단백질액을 주입하여 유속 0.22ml/min., 20분 간격으로 분획하였고, polygalacturonase의 pattern은 각 분획의 효소 활성을 측정하여 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### Polygalacturonase의 활성 변화

Table 1은 감과 대추의 연화동안에 추출용매에 따른 polygalacturonase의 활성 변화를 조사한 결과이다. 수용성 단백질분획에 포함된 polygalacturonase의 활성은 연화시에 증가하여 완숙감과 연시에서 각각 38.2, 46.9units였고, 대추에서는 완숙대추 72.9units, 연화대추 172.1units로 좀더 현저하게 증가하였다. 성숙·연화 동안에 엽가용성 단백질분획의 polygalacturonase 활성은 감에서 각각 28.4, 49.2units이며, 대추의 경우는 각각 56.5, 67.7units로, 수용성 단백질분획과 유사하게 약간씩 증가하였고, 세포벽 단백질분획에서는 감에서 각각 10.1, 3.2units, 대추에서는 각각 13.8, 6.1units로 연화에 따라 감소하였다.

Polygalacturonase는 성숙과실에서 유리되는 주된 가용성 단백질로서(15), 성숙·연화동안에 나타나는 세포벽 단백질의 유리와 관련하여 세포벽에 결합된 비활성형의 polygalacturonase가 과실의 연화로 유리되어 활성형의 polygalacturonase로 전환됨으로써 활성이 급

**Table 1. Changes in polygalacturonase activity during softening of persimmon and jujube fruits (units : 100g-fr.wt.)<sup>1)</sup>**

Protein	Persimmon		Jujube	
	MP	SP	MJ	SJ
WSP	38.2	46.9	72.9	172.1
SSP	28.4	49.2	56.5	67.7
CWP	10.1	3.2	13.8	6.1

<sup>1)</sup>One unit of activity is expressed as 1mmole of reducing sugar released/2hr at 30°C

MP, Mature persimmon fruits; SP, Soft persimmon fruits; MJ, Mature jujube fruits; SJ, Soft jujube fruits; WSP, Water-soluble protein; SSP, Salt-soluble protein; CWP, Cell wall-bound protein

격하게 증가한다(3). 이와 유사하게 Jansen 등(16)은 세포벽에 존재하는 pectinesterase는 세포벽에 결합된 상태에서는 비활성이지만, 세포벽에서 유리되어 가용화된 pectinesterase는 활성화되어 pectin질 분해에 관여한다고 보고했다. 즉 polygalacturonase나 pectinesterase와 같이 비활성형으로 세포벽에 결합되어 있는 효소단백질은 연화로 인해 단백질이 가용화되어 세포벽에서 유리되었을 때 활성을 나타낸다.

한편 Tucker 등(12)에 따르면 토마토의 연화시에 나타나는 polygalacturonase의 활성증가는 polygalacturonase 효소단백질이 과실의 성숙동안에 *de novo* 합성되기 때문이며, DellaPenna 등(17)은 polygalacturonase 단백질의 합성과 관련해서 미숙과에 비해 성숙과의 polygalacturonase mRNA가 현저하게 증가한다고 보고했다.

본 연구에서는 완숙감과 완숙대추의 세포벽 단백질 분획에 나타난 polygalacturonase 활성이 연시와 연화대추에서 감소하였으므로, 연화에 따른 polygalacturonase의 활성증가는 polygalacturonase 단백질의 합성과 더불어 세포벽에 결합되어 있던 비활성형의 polygalacturonase가 수용성, 염가용성 단백질과 같은 가용성 단백질로 유리되어 활성형 polygalacturonase로 전환됨에 따른 것으로 생각된다.

**수용성 단백질의 polygalacturonase pattern 변화**

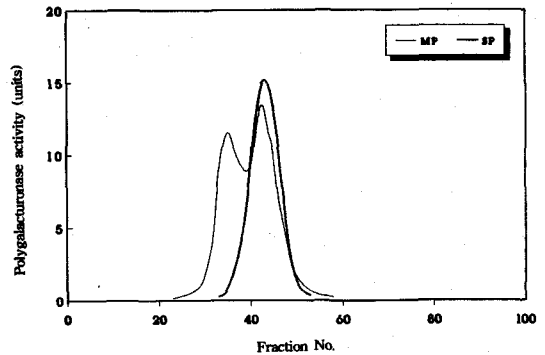
Fig. 1은 완숙감과 연시의 수용성 단백질분획을 Sephacryl S-200 column에 의해 gel filtration하여 얻은 각 fraction에 대한 polygalacturonase의 활성을 측정할 결과이다. Polygalacturonase 활성은 완숙감의 경우 fraction No. 30~40, 40~50에 분자량이 다른 2개의 peak로 존재했으나, 연시에서는 fraction No. 35~50에 1개의 peak만 존재했다.

Fig. 2는 대추에서 유리된 수용성 단백질의 polygalac-

turonase pattern 변화를 도시한 것이다. 완숙대추와 연화대추의 polygalacturonase는 연화에 따른 큰 변화없이 각각 fraction No. 40을 전후한 활성 peak로 나타났다.

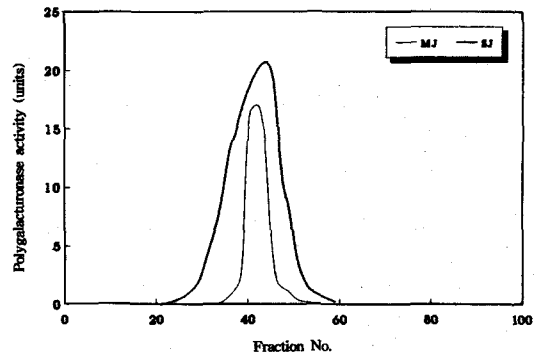
과실은 성숙·연화중에 새로운 단백질의 합성 및 기존에 존재하던 단백질의 분해로 인해 단백질 pattern이 변화하게 된다. Grierson 등(18)은 새로운 단백질의 합성으로 인해 각 성숙단계에서 추출한 토마토의 mRNA pattern에 차이가 나타나며, polygalacturonase를 비롯한 연화효소를 code하는 mRNA는 과실의 성숙 중에 합성된다고 했다.

한편 호흡상승형 과실의 polygalacturonase는 효소적 특성이 다른 PG I 과 PG II, 2개의 isoenzyme으로



**Fig. 1. Elution profile of water-soluble protein extracted from persimmon fruits on Sephacryl S-200 column chromatography.**

Column size, 2×45cm  
Flow rate, 0.22ml/min  
MP, Mature persimmon fruits  
SP, Soft persimmon fruits



**Fig. 2. Elution profile of water-soluble protein extracted from jujube fruits on Sephacryl S-200 column chromatography.**

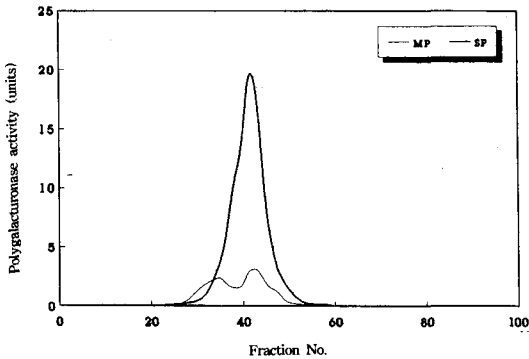
Column size, 2×45cm  
Flow rate, 0.22ml/min  
MJ, Mature jujube fruits  
SJ, Soft jujube fruits

이루어져 있으며, PG II의 dimer인 PG I은 성숙·연화 초기에 작용이 우수하고, PG II는 연화 후기에 작용해서 과실의 생리적 변화에 영향을 미친다(19). 또한 PG II는 과실내에 존재하는 특정인자(convertor)와 함께 작용해서 PG I으로 전환된다(20). 최근에는 PG II가 다시 PG2A와 PG2B로 분리되므로 polygalacturonase에는 3개의 isoenzyme이 존재한다는 보고도 있으나(8), 아직까지 확실하게 밝혀지지 않고 있다.

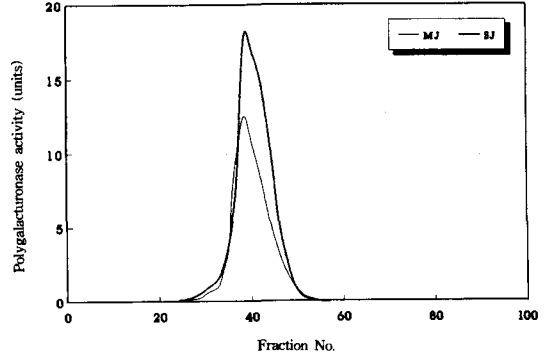
Gel filtration에 의한 두 과실의 polygalacturonase 활성 변화로 보아서, 하나의 활성 peak를 나타낸 대추의 polygalacturonase에 비해 감의 polygalacturonase에는 완숙감에 나타난 2개의 활성 peak에 해당하는 PG I과 PG II, 2개의 isoenzyme이 존재하며, 완숙기에는 PG I과 PG II가 모두 작용하고 그중 PG II의 영향력이 좀더 크지만, 연화가 진행됨에 따라 PG II만의 우세한 작용으로 여러가지 생리적인 변화가 초래되는 것으로 생각된다.

**염가용성 단백질의 polygalacturonase pattern 변화**

Fig. 3과 4는 감과 대추에서 추출한 염가용성 단백질 분획을 Sephacryl S-200 column으로 분리하여 polygalacturonase pattern을 조사한 결과이다. 염가용성 단백질의 polygalacturonase는 완숙감의 경우 fraction No. 30~40과 40~50에서 두개의 활성 peak가 존재하고 연지는 fraction No. 35~50에서 1개의 큰 활성 peak가 존재하였다. 대추의 경우에는 polygalacturonase 활성은 완숙대추와 연화대추 모두 fraction No. 40 전후에 하나의 peak로 각각 나타났다.



**Fig. 3.** Elution profile of salt-soluble protein extracted from persimmon fruits on Sephacryl S-200 column chromatography. Column size, 2×45cm Flow rate, 0.22ml/min MP, Mature persimmon fruits SP, Soft persimmon fruits

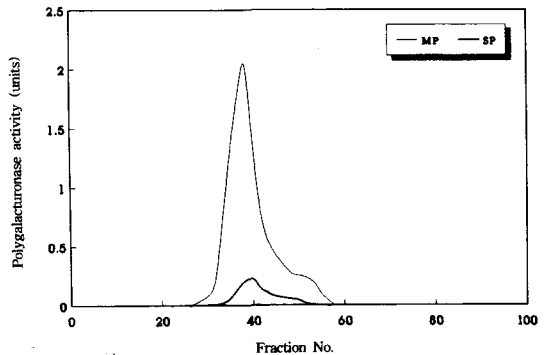


**Fig. 4.** Elution profile of salt-soluble protein extracted from jujube fruits on Sephacryl S-200 column chromatography. Column size, 2×45cm Flow rate, 0.22ml/min MJ, Mature jujube fruits SJ, Soft jujube fruits

염처리로 유리되는 효소단백질은 세포벽에 이온결합하고 있으며, 이들을 유리시키기 위해서는 강한 이온력이 요구된다(8). 세포벽 분해효소의 유리와 관련해서 Chan 등(21)은 파파야로부터 이온력에 차이가 있는 2가지 buffer를 이용해서 polygalacturonase를 추출할 때 이온력이 큰 buffer의 경우에 좀더 용이하게 유리된다고 하였다. 따라서 염가용성 단백질분획에서 유리된 polygalacturonase는 과실내에 이온력으로 결합되어 있으며, 특히 감의 염가용성 단백질은 효소단백질과 밀접하게 관련된 것으로 추측된다.

**세포벽 단백질의 polygalacturonase pattern 변화**

Fig. 5와 6은 감과 대추에서 추출한 세포벽성분을 in



**Fig. 5.** Elution profile of cell wall-bound protein extracted from persimmon fruits on Sephacryl S-200 column chromatography. Column size, 2×45cm Flow rate, 0.22ml/min MP, Mature persimmon fruits SP, Soft persimmon fruits

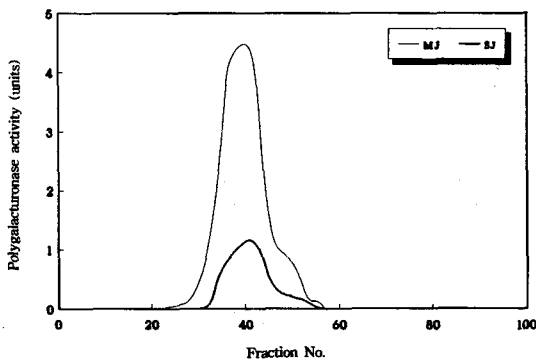


Fig. 6. Elution profile of cell wall-bound protein extracted from jujube fruits on Sephacryl S-200 column chromatography.

Column size, 2×45cm

Flow rate, 0.22ml/min

MJ, Mature jujube fruits

SJ, Soft jujube fruits

*in vitro*에서 polygalacturonase 처리한 후 유리되는 단백질을 Sephacryl S-200 column으로 gel filtration한 chromatogram의 각 fraction에 대한 polygalacturonase 활성 변화를 도사한 것이다. 완숙감과 연시의 polygalacturonase는 연화동안에 fraction No. 40을 전후한 1개의 peak로 나타나며, 연화에 따라 활성이 감소했다. 대추의 세포벽 단백질을 gel filtration 하여 얻은 각 fraction에 대한 polygalacturonase 활성은 완숙, 연화된 대추에 다같이 fraction No. 30~50에서 1개의 활성 peak로 존재하였다.

## 요 약

과실의 연화중에 단백질과 polygalacturonase의 변화에 대해 연구하고자 감과 대추에서 용해성에 따라 추출한 수용성 단백질, 열가용성 단백질 및 세포벽 단백질 중의 polygalacturonase 활성 변화와 polygalacturonase pattern 변화를 조사하였다. 감과 대추의 연화 동안에 polygalacturonase 활성은 수용성 단백질과 열가용성 단백질분획에서는 증가하였고, 세포벽 단백질분획에서는 다소 감소하는 경향을 보였다. 완숙감의 수용성 단백질과 열가용성 단백질을 gel filtration한 경우 polygalacturonase는 두 단백질 모두 fraction No. 30~40, 40~50 사이 2개의 활성 peak를 나타내었고, 연시의 경우에도 fraction No. 35~50 사이 1개의 peak로 큰 변화가 없었다. 또한 대추의 수용성 단백질과 열가용성 단백질을 gel filtration한 경우 완숙대추, 연화대추 모두 유사한 1개의 활성 peak를 나타내었다. 한편 감과 대추의 세포벽 단백질을 gel filtration한 경우 연화에 따른 활성 peak

는 수용성 단백질과 열가용성 단백질의 활성 peak와 거의 동일한 fraction에서 존재하였다. 이상의 연구결과로 보아서 감과 대추의 연화동안에 나타나는 polygalacturonase의 활성 증가는 과실의 성숙·연화에 따른 새로운 효소 단백질의 합성 및 두 과실의 세포벽에 결합된 비활성형의 polygalacturonase가 세포벽 단백질의 유리에 따라 활성형으로 전환됨에 따른 것으로 생각된다.

## 문 헌

1. Biale, J. B. : Growth, maturation and senescence in fruits. *Science*, **113**, 880(1964)
2. Poovaliah, B. W. and Nukaya, A. : Polygalacturonase and cellulase enzymes in the normal ruters and mutant rin tomato fruit and their to the respiratory climacteric. *Plant Physiol.*, **64**, 534(1979)
3. McGlason, W. B. : Ethylene and ripening. *Hort. Science*, **20**, 51(1985)
4. Neal, G. E. : Changes occurring in the cell walls of strawberries during ripening. *J. Sci. Food Agr.*, **16**, 604(1965)
5. Redgwell, R. J., Melton, L. D. and Brasch, D. J. : Cell wall dissolution in ripening kiwifruit. *Plant Physiol.*, **98**, 71(1992)
6. Pressey, R. and Avants, J. K. : Seperation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peachs. *Plant Physiol.*, **52**, 252(1973)
7. Crookes, P. R. and Grierson, D. : Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiol.*, **72**, 1088(1983)
8. Ali, Z. M. and Brady, C. J. : Purification and characterization of the polygalacturonase of tomato fruits. *Aust. J. Plant Physiol.*, **9**, 155(1982)
9. Hobson, G. E., Richardson, C. and Gillham, D. J. : Release of protein from normal and mutant tomato cell walls. *Plant Physiol.*, **71**, 635(1983)
10. Themmen, A. P. N., Tucker, G. A. and Grierson, D. : Degradation of isolated tomato cell walls by purified polygalacturonase *in vitro*. *Plant Physiol.*, **69**, 122(1982)
11. Hasegawa, S., Maier, V. P., Kaszycki, H. P. and Crawford, J. K. : Polygalacturonase content of dates and its relation to maturity and softness. *J. Food Sci.*, **34**, 527(1969)
12. Tucker, G. A., Robertson, N. G. and Grierson, D. : Changes in polygalacturonase isoenzymes during the ripening of normal and mutant tomato fruit. *Eur. J. Biochem.*, **112**, 119(1980)
13. Talmadge, K. W., Keegstra, K., Bauer, W. D. and Albersheim, P. : The structure of plant cell walls. *Plant Physiol.*, **51**, 158(1973)
14. Jarvis, M. C. : The preparation of calcium-bond pectin in plant cell walls. *Planta*, **154**, 344(1982)
15. Brady, C. J., MacAlpine, G., McGlason, W. B. and Ueda, Y. : Polygalacturonase in tomato fruits and the

- induction of ripening. *Aust. J. Plant Physiol.*, **9**, 171 (1982)
16. Jansen, E. F., Jang, R. and Bonner, J. : Orange pectin-esterase binding and activity. *Food Res.*, **25**, 64(1960)
17. DellaPenna, D., Alexander, D. C. and Bennett, A. B. : Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase. Analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6420(1986)
18. Grierson, D., Slater, A., Speirs, J. and Tucker, G. A. : The appearance of polygalacturonase mRNA in tomatoes. One of a series of changes in gene expression during development and ripening. *Planta*, **163**, 263(1985)
19. Brady, C. J., Meldrum, S. K. and McGlasson, W. B. : Differential accumulation of the molecular forms of polygalacturonase in tomato mutants. *J. Food Biochemistry*, **7**, 7(1983)
20. Knegt, E., Vermeer, E., Pak, C. and Bruinsma, J. : Function of the polygalacturonase convertor in ripening tomato fruit. *Physiologia Plantarum*, **82**, 237(1991)
21. Chan, Jr. H. T., Tam, S. Y. T. and Seo, S. T. : Papaya polygalacturonase and its role in thermally injured ripening fruits. *J. Food Sci.*, **46**, 190(1981)

(1996년 10월 27일 접수)