

건조 및 저장조건에 따른 쌀 저장단백질의 변화양상

신평균 · 장안철¹⁾ · 홍성창¹⁾ · 이기상¹⁾ · 이금희²⁾ · 이용복^{1)*}

농촌진흥청 국립원예특작과학원 벼서과, ¹⁾국립농업과학원 토양비료관리과, ²⁾식물검역원 중부격리재배연구소
(2008년 12월 1일 접수, 2008년 12월 22일 수리)

Changes of Rice Storage Proteins Affected by Dry and Storage Temperature

Pyung Gyun Shin, Ancheol Chang¹⁾, Seong Chang Hong¹⁾, Ki Sang Lee¹⁾, Keum Hee Lee²⁾, and Yong Bok Lee^{1)*}
(Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herval Science, ¹⁾Soil and Fertilize Management Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, ²⁾National Plant Quarantine Service, MAF, Suwon 443-400, Korea)

ABSTRACT: Quality of rice grain changes during dry storage with internal physiological changes and external injury by organism. Storage rice changes by condition with respiration via variable temperature, hydrolysis enzyme reaction, lipid peroxidation occurs with change of palatability. During dry storage, physiological change with protein variation pattern was examined by image analysis on proteomic technology. Analysis revealed that protein activity had no change store at room temperature and store at 4 0°C, but decreased store at 60°C. Analysis of variable hydrophobic protein pattern revealed that protein activity of beta-tubulin, protein disulfide isomerase, vacuolar ATPase b subunit, globulin was not significantly decreased all dry and store condition. However, heat shock protein 70, and glutathione transferase was significantly decreased when rice dried at 60°C compared with room temperature and 40°C dry condition.

Key Words: Rice storage protein, dry storage condition, proteomic, hydrophobic biomarker

서 론

쌀 품질 및 밥맛은 주로 품종, 기상, 토양, 재배 방법 및 수확시기 등에 크게 영향을 받기 때문에 이에 관한 다수의 연구가 수행된 바 있다. 그러나 벼는 수확 후 오랜 시간 저장되므로 저장기간 발생 할 수 있는 질적 손실을 최소화 할 필요가 있다. 산물벼를 즉시 건조하지 않고 장시간 방치하거나, 고온 건조시 단백질 응고 및 변성에 의해서 밥맛이 저하 된다. 특히, 소수성 단백질은 온도변화에 민감하게 반응한다. 따라서 생산된 고품질 쌀이 최종적으로 소비자의 식탁에서 좋은 쌀로 평가받을 수 있도록 건조, 저장, 도정 등의 수확 후 적절한 관리기술이 절실히 요구되고 있다^{1,2)}. 수확물이 일시에 대량 반입되는 RPC (Rice Processing Complex)의 처리능력이 떨어져 야적상태로 두거나, 규모에 비해 많은 양을 처리하기 위해 고온에서 단시간 건조하는 것은 곡물 내의

당이나 단백질의 변성을 유발한다. 최근에 단백질 함량이 쌀 품질평가의 기준으로 널리 이용되고 있지만, 건조 및 저장 조건에 따른 단백질 변성에 의한 품질 저하는 단백질 함량으로 평가가 어렵다. 따라서 건조 및 저장조건에 따른 단백질 함량 변화 뿐만아니라 특정 단백질의 변성 평가가 가능하다면 건조 및 저장기술 개발에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단 된다^{3,4)}. 최근 여러 분야에서 많이 이용되고 있는 Proteomics 기법은 다변량 단백질군의 정량적 해석과 개개 단백질의 변화 양상 분석이 가능한 기술이다⁵⁻⁸⁾.

본 연구는 Proteomics 기법을 이용해서 건조 및 저장조건에 따른 총 단백질과 온도변화에 민감한 소수성 단백질 함량변화를 구명하고자 한다.

재료 및 방법

시료준비

건조 및 저장조건별 저장단백질의 변화양상을 분석하기 위해서는 수확한 벼로부터 실온(Room temp. : RT), 40°C, 60°C에서 곡물수분계 (PM-830, Kett Co. Japan)를 이용하

*연락처:
Tel: +82-31-290-0321 Fax: +82-31-290-0208
E-mail: soiltest@kg21.net

여 14%가 되도록 건조하여 약 10일간 실온과 저온 (15°C)에 보관하였다. 그리고 실험실용현미기 (TR200, Kett Co. Japan)로 벼의 껍질을 벗긴 후 실험실용백미기 (PEARLEST, Kett Co. Japan)로 백미를 추출하여 해부용 칼을 이용하여 배아와 배유로 절단하여 시료분쇄기(실험실용 밀 (TQ-100), Kett Co. Japan)로 분쇄한 다음 표준용 체 (5 μm)로 친 쌀가루를 시료로 사용하였다.

건조 및 저장조건별 단백질체의 분석

쌀가루로부터 단백질 추출은 다음과 같이 진행되었다. 쌀가루는 10배 부피의 7M urea, 2 M Thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) dithiothreitol (DTT), 2% (v/v) pharmalyte, 1 mM benzamidine로 구성된 용액과 혼합하여 homogenizer에 의해 분해되었다. 그리고, 단백질 추출을 위해서 1시간 동안 vortexing 하였으며, 15,000 rpm으로 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 이차원전기영동의 시료로 사용하였다. 단백질의 농도 측정은 Bradford법⁹⁾으로 수행하였다. 농도가 측정된 단백질을 일차 Isoelectric focusing (IEF)를 한 후 이차적으로 SDS-PAGE를 수행하였다. 이차원전기영동이 완료된 이차원 젤의 단백질은 Anderson 등¹⁰⁾의 방법에 따라 Coomassie G250으로 시각화하였다. 염색된 이차원 젤은 AGFA 사의 Duoscan T1200 스캐너로 스캐닝되어 확장자가 TIFF 파일의 형태로 컴퓨터에 저장되었다. 스캐닝된 이미지로부터 단백질 spots의 발현변화 확인을 위한

정량적인 분석은 PDQuest software (version 7.0, BioRad)를 이용하여 수행하였다. 선정된 단백질 spots는 Shevchenko 등¹¹⁾의 방법에 따라 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해하여 질량분석 (MALDI-TOF)을 하였고, 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다¹²⁾. 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 서열 분석 후 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 PepFrag 검색엔진¹³⁾을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

건조 및 저장조건별 단백질체의 변화양상

Proteomics 기법은 시간과 환경에 따라 변화하는 유전자 발현의 최종산물인 단백질 총체를 연구하는 기술로서 단백질의 발현 후 변형, 기능 및 조절작용, 다른 단백질과의 상호작용 등의 세포 내 분자수준에서 기능 작용을 해석하는 연구방법론을 뜻한다. 본 실험에서는 proteomics 기법을 도입하여 쌀의 건조 및 저장조건별 저장단백질의 함량 및 변화양상을 분석하였다 (Fig. 1). 일반적으로 RPC에서 현물벼를 수분이 14%까지 건조시 필요한 시간은 40°C 에서는 10시간, 60°C 에서는 4시간이 필요하므로 RPC 효율을 높이기 위해서 고온 건조를 많이 하는 경향이 있다. 본 연구에서 상온에서 건조시 단백질 함량은 저장온도에 크게 영향을 받지 않았다 (Fig. 2). 그러나 40°C에서 건조시 저온 저장 보다 상온 저장

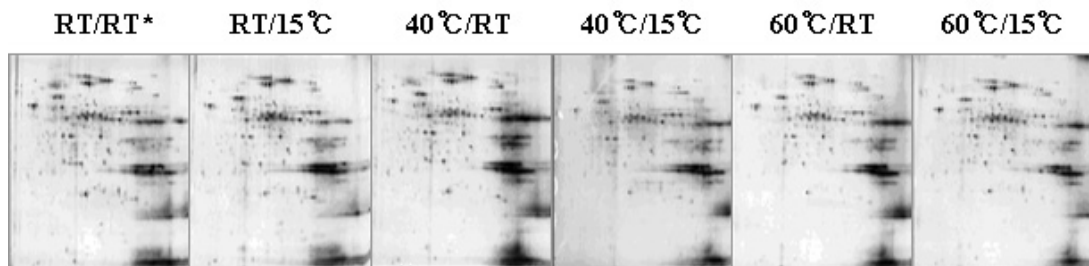


Fig. 1. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis patterns of storage proteins in rice embryo affected by dry and storage temperature. *Dry/ storage temperature.

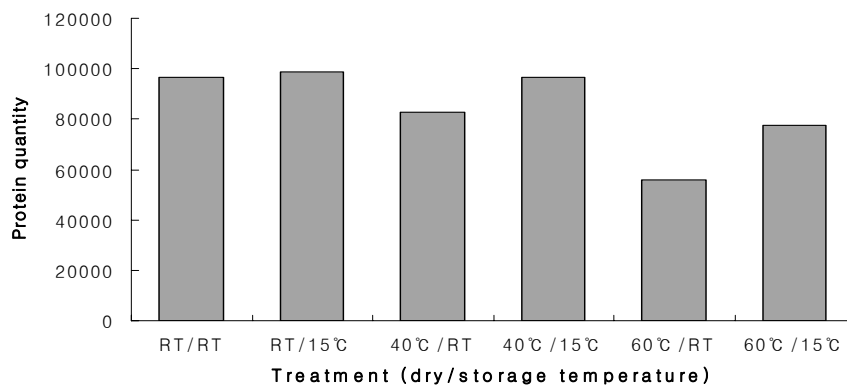


Fig. 2. Comparison of storage protein content in rice embryo affected by dry and storage temperature.

에서 단백질 함량이 감소되었다. 그리고 60°C에서 건조시 상온 및 저온 저장 모두에서 현저한 단백질 함량 감소가 되었지만, 저온 저장은 40°C 건조 후 상온 저장과 비슷한 단백질 함량 감소를 보였다. 이는 Yamada 등¹⁴⁾이 보고한 건조 및 저장 조건에 따른 단백질 변성에 의한 단백질 함량 감소와 같은 결과이다. 따라서 현물벼를 RPC에서 건조시 단백질 변성에 의한 밥맛 저하를 방지하기 위해서 건조 온도를 40°C 이하로 유지하고 싸일로 내부에 냉각팬을 가동해야 할 것으로 판단된다.

저장단백질 중 소수성단백질의 동정

저장 단백질 중 소수성 단백질은 온도변화에 민감하게 반

응한다. 실험에서는 소수성 단백질의 변화를 분석하기 위해 2차원 전기영동을 실시한 결과 102개의 단백질 spots 중에서 단백질발현 변화양상을 보이는 26개를 선별하여 단백질 서열을 Table 1과 같이 동정하였다.

단백질 서열이 동정된 26개의 단백질 중에서 건조와 저장 온도에 따라 반응이 나타난 beta-tubulin, protein disulfide isomerase (PDI), heat shock protein 70 (HSP70), vacuolar ATPase b subunit (ATPase), glutathione transferase, globulin 6개의 소수성 단백질의 함량의 변화는 Table 2와 같다. 소수성 단백질 중 tubulin, PDI, ATPase, globulin 함량은 건조 및 저장 온도에 크게 영향을 받지 않았다. 그러

Table 1. Proteins identified in rice embryo by MALDI-TOF MS

Spot ID	Accession no.(gi)	Protein name	pI		Seq. cov.(%)	Z score
			Meas/calcul	Mr		
107	52076116	Unknown protein	8.5/4.3	48.2/26.8	17	0.81
208	17297985	Non-ATPase subunit 12	5.0/4.5	31.1/31.5	26	1.87
212	29124145	Chalcone isomerase	5.2/4.8	24.0/27.8	33	1.78
213	34393530	Tryptophan synthase alpha chain	6.2/4.9	34.0/28.7	24	1.77
311	53982669	Unknown protein	9.3/4.4	42.6/44.0	12	0.73
404	15217294	40S ribosome protein	4.8/4.7	33.3/53.3	23	2.35
502	12957711	beta-tubulin	4.8/4.5	50.4/65.8	40	2.38
608	7209794	Protein disulfide isomerase	4.8/4.4	33.5/76.5	43	2.34
711	2654208	Heat shock 70 protein	5.2/4.5	76.3/89.9	10	1.47
1304	47847769	Succinyl-CoA ligase	6.0/5.1	45.4/51.0	21	2.42
1502	13366196	Vacuolar ATPase B subunit	5.0/4.9	54.4/67.0	24	2.42
2108	14587212	Glutathione transferase	5.4/5.3	24.4/24.2	25	0.92
2207	51090384	PrMC3	5.4/5.3	34.1/42.3	44	2.40
3203	47497892	Ulp1 protease-like	5.6/5.4	32.9/33.7	20	1.18
5111	14192878	Hypothetical protein	7.1/6.3	27.5/26.1	15	0.99
5203	46391111	NAD-/NADP-dependent oxidoreductase	9.3/5.8	39.3/38.7	23	
5307	52353520	Legumin	5.8/5.9	38.5/43.3	22	2.37
5514	13959	Unnamed protein product	5.8/6.0	55.6/64.8	28	2.39
5615	22002151	Hypothetical protein	6.3/6.0	52.6/72.0	15	1.78
5623	22002151	Hypothetical protein	6.3/6.2	52.6/71.4	12	1.27
5702	38347165	OSJNBa0039C07.01	5.8/5.8	75.4/79.8	11	1.50
6102	169805	DNA fragment with a miscella	6.6/6.4	20.3/21.2	38	2.39
6608	32488924	OSJNBb0059K02.15	6.8/6.7	64.2/73.4	15	2.37
7102	27261084	RAB24 protein	6.0/7.0	24.2/22.3	52	2.30
7110	1783206	26 kDa globulin	6.0/7.8	21.5/20.1	21	1.05
7506	8101497	Granule-bound starch synthase	8.7/7.5	67.0/67.0	21	2.30

Table 2. Quantities of degenerated and hydrophobic proteins identified by MALDI-TOF and platinumium software

Spot ID	Accession no.(gi)	Protein name	Protein Quantity					
			RT* /RT	RT /15°C	40°C /RT	40°C /15°C	60°C /RT	60°C /15°C
502	12957711	Beta-tubulin	399	306	458	506	173	373
608	7209794	Protein disulfide isomerase	2205	3004	946	3035	937	3259
711	2654208	Heat shock 70 protein	1048	1003	1558	1342	363	528
1502	13366196	Vacuolar ATPase B subunit	428	638	508	342	264	290
2108	14587212	Glutathione transferase	1343	2104	1974	1330	71	7
7110	1783206	26 kDa globulin	1254	341	3214	1139	2670	1412

* dry/storage temperature.

나 HSP70과 glutathione transferase는 60°C 건조 조건에서 상온과 40°C 건조 조건과 큰 단백질 함량 차이를 보였다. 그리고 위 6개의 소수성 단백질은 저장 조건 온도 보다는 건조 온도에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 따라서 HSP70과 glutathione transferase는 건조온도를 예측할 수 있는 biomarker로의 이용가능성이 있는 것으로 판단된다.

참고문헌

- Chae, J.C. (2002) Present status prospect of crop production technology to improve the crop quality and functionality, *Korean J. Crop Sci.* 47(S), 1-14.
- Choi, H.C. (2002) Current status and perspectives in varietal improvement of rice cultivars for high-quality and value-added products, *Korean J. Crop Sci.* 47(S), 15-32.
- Ju, Z.Y., Hettiarachchy, N.S., and Rath, N. (2001) Extraction, Denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins, *J. Food Science* 66(2), 229-232.
- Juliano, B.O. (1994) *Polysaccharides, proteins, and lipids of rice*, In: Rice: Chemistry and Technology, St. Paul, Minn., Amer Assoc of Cereal Chemists, p. 98-141.
- Komatsu, S., Kajiwarra, H., and Hirano, H. (1993) A rice protein library: a data-file of rice proteins separated by two-dementional electrophoresis, *Theor. Appl. Genet.* 86, 935-942.
- Komatsu, S., Konish, H., Shen, S., and Yang, G. (2003) Rice proteomics. A step toward functional analysis of the rice genome, *Mole Cell Proteomics* 2.1, 2-10.
- Komatsu, S., Kojima, K., Suzuki, K., Ozaki, K., and Higo, K. (2004) Rice proteome database based on two-dementional poltacrlyamide gel electrophoresis: its ststus in 2003, *Nucleic Acids Research* 32, D389-D392.
- Tanaka, N., Mitsui, S., Hiroya, H., Yanagi, K., and Komatsu, S. (2005) Expression and function of proteins during development of the basal region in rice seedling, *Mole Cell Proteomics* 4.6, 796-808.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Anderson, N.L., Esquer-Blasco, R., Hofmann, J.P., and Anderson, N.G., (1991) A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies, *Electrophoresis* 12(11), 907-30.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann. M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 68, 850-858
- Wang, D.X., Kalb S.R., and Cotter, R.J. (2004) Improved procedures for N-terminal sulfonation of peptides for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay peptide sequencing, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 96-102.
- <http://prowl.rockefeller.edu/prowl/-pepfrag.html>
- Yamada, C., Izumi, H., Hirano, J., Mizukuchi, A., Kise, M., Matsuda T., and Kato. Y. (2005) Degradation of soluble proteins including some allergens in brown rice grains by endogenous proteolytic activity during germination and heat-processing, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1877-1883.