

FOOD & CHEMISTRY

# Application of crude enzymes obtained from *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo on milk proteins

Min-Gil Park<sup>1,2</sup>, Hyoung-Sub Kim<sup>2</sup>, In-Sik Nam<sup>2</sup>, Woan-Sub Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Future Convergence Technology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

<sup>2</sup>Department of Animal Life and Environmental Science, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

\*Corresponding author: kimws@hknu.ac.kr

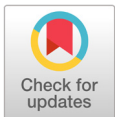
## Abstract

This study investigated the activity of crude enzymes obtained from *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo on milk proteins. In the milk processing industry, there is an increasing interest in the addition of functional materials to dairy products or functional peptides isolated from milk proteins. First, *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo was separated into core, flesh, and peel regions, and crude enzymes were obtained from the individual regions. The activity of the obtained crude enzymes was measured using casein and gelatin agar. The crude enzyme obtained from the flesh of *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo decomposed gelatin, but the activity of the crude enzymes obtained from the peel and core regions was insignificant. On the other hand, the crude enzymes obtained from the flesh and core regions of *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo had a remarkable enzymatic activity in casein agar. However, the activity of the crude enzyme obtained from the peel region was insignificant. In addition, the crude enzymes obtained from the individual regions were mixed with casein to induce reactions, and the degradation patterns were investigated through electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC). According to the results, the crude enzymes from *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo degraded milk proteins. Thus, the results of this study can be used in studies on functionality. Additionally, it is expected that the use of pear peels and cores in the milk processing industry would greatly contribute to the reduction of food waste.

**Keywords:** casein, enzyme, milk, *Pyrus pyrifolia*

## Introduction

배는 장미과 *Pyrus* 속에 속하며, 중국서부, 아프리카니스탄, 인도북서부 및 남동유럽이 원산지이다 (Eun et al., 2012). 배는 유럽계의 서양배(*Pyrus communis* L.)와 동양계인 일본배(*Pyrus pyrifolia* N.), 그리고 중국배(*Pyrus ussuriensis* M.)로 구분된다(Feron et al., 1996). 우리나라 배는 1906년 일본에서 개량된 품종들이 도입되어 전국적으로 재배되고 있다(Hwang et al., 2006). 국내에 '신고'는 1963년에 도입된 품종으로, 현재 96% 이상이 '신고'배로 있다(Lee et al., 2010; Lee et al., 2017). 배의 주요 성분으로는 7 - 10%의 탄수화물, 0.3%의 단백질, 0.2%의 지방, 0.5%의 섬유소, 그리고 85 - 88%의 수분



## OPEN ACCESS

**Citation:** Park MG, Kim HS, Nam IS, Kim WS. 2018. Application of crude enzymes obtained from *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo on milk proteins. Korean Journal of Agricultural Science. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180076>

**DOI:** <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180076>

**Received:** July 24.2018

**Revised:** September 19.2018

**Accepted:** September 27.2018

**Copyright:** © 2018 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

을 함유하고 있다(Lee et al., 2003). 배는 강한 알칼리식품으로 Na, K, Mg, P 등을 많이 함유하여 건강에 매우 좋은 것으로 알려져 있다(Zhang et al., 2003). 배의 주요 기능성 성분으로는 페놀성 성분과 불용성 식이 섬유로 알려져 있다(Leontowicz et al., 2003; Zhang et al., 2003; Zheng and Wang, 2003). 배에서 조사된 페놀성 화합물은 arbutin, caffeic acid, catechin, chlorogenic acid, coumaric acid, 4-hydroxymethyl benzoic acid, epicatechin, rutin 등으로 있다(Zhang et al., 2007). 탄닌으로 분류되는 폴리페놀은 항산화 기능으로 식물계에 다량 존재하며 친수성이고 500 - 4,000 Da의 분자량을 가지고 있다(Haslam, 1989). 그리고 Seo et al. (2001)은 배에서 가장 중요한 폴리페놀 물질은 chlorogenic acid, epicatechin, 그리고 4-hydroxymethyl benzoic acid라고 하였다. 왜냐하면 chlorogenic acid는 신고배에서 흑변이 발생하였을 때 급격히 감소하여 배의 산화와 관련이 있기 때문이다. 한편 식이섬유는 난소화성 고분자물질로 배에서도 많은 식이섬유가 존재하여 생리 및 기능적 역할을 하는 것으로 보고되어졌다(Zhang et al., 2005). 펙틴은 수용성 하이드로콜로이드 물질로서 점결제, 겔화제 및 안정제로 식품에 이용된다. 펙틴은 포도당 흡수를 저해시켜 당뇨병환자의 혈중 glucose tolerance를 증진시키는 것으로 알려져 있다. 이는 수용성 식이섬유가 음식물의 점성을 높여 위에 머무르는 시간과 포만감을 제공하여 영양소의 소화와 흡수를 지연시킨 결과라고 하였다(Torsdottir et al., 1991). 이외에 인슐린과 배추출물의 복합작용에 의한 고혈당 억제와 고혈압 억제효과가 알려져 있다(Trejo-González et al., 1996; Fernandez et al., 1994).

오랫동안 식육의 연화에 배를 이용하게 된 것은 배에 함유되어 있는 단백질 분해효소의 작용 때문이라고 하였다(Choe et al., 1996). 고기의 품질 평가 시 가장 중요한 요소 중의 하나인 연도는 actomyosin toughness와 background toughness에 의해 결정된다(Locker, 1960; Marsh and Leet, 1966). 고기를 연하게 하는 방법은 저온에서 오랫동안 숙성을 하거나, 열을 가하는 방법, 그리고 단백질을 분해하는 효소를 이용하는 방법 등이 알려져 있다(Dransfield and Etherrington, 1981; Macfarlane, 1985; Elkhalfifa and Marriot, 1990). 그러나 이러한 방법은 고기를 변색시키거나, 변질 또는 연화의 과다 등이 문제될 수 있다. 이처럼 식육산업에 있어서 질긴 고기의 연화방법으로는 다양한 방법이 이용되고 있다. 반면 유제품 산업에 있어서는 유산균, 효모 및 곰팡이에 의한 단백질 분해에 의존하고 있다. 유제품에 있어서 단백질분해는 다양한 생리기능을 가지는 peptide 들을 기대할 수 있다. 그러나 과일의 효소를 이용한 우유 단백질 분해에 대한 연구와 그 분해물로부터 얻어진 peptide 들의 기능에 관한 연구 논문은 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo (신고배)로부터 얻어진 조효소의 우유단백질에 대한 분해를 조사하였다. 우유단백질이 과일의 효소에 의해서 다양한 peptide로 분해 된다면, 얻어진 peptide 들의 생리적 기능 또한 기대할 수 있다.

## Materials and Methods

### 시약

Amresco (USA)사로부터 tris, TEMED (tetramethylethylenediamine), SDS (sodium dodecyl sulfate), NaCl (sodium chloride), 그리고 glycine을 사용하였다. TNT research (Korea)사로부터 urea, acrylamide, 그리고 CBB-R250을 사용하였다. Acetic acid, ethanol, methanol과 glycerol은 Daejung Chemicals & Metals (Korea)사의 것을 사용하였다. 그 외 casein은 Calbiochem, EMD Biosciences (USA), gelatin은 Difco (USA)사의 것을 사용하였다.

### 신고배로부터 조효소의 분리

경기도 안성시 한경대학교 부속농장에서 생산된 신고배를 실험에 이용하였다. 배는 멸균 증류수로 깨끗이 세척한 후, 껍질, 속살, 그리고 심부분으로 분리하였다. 각각의 분리된 부위는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8)와 함께 무균 백에 넣고 시료 분쇄기(IKA, China)로 파쇄하였다. 파쇄된 각 부위는 원심분리기(Hanil, Korea)에서 4,000 rpm/20 min/4°C 조건으로 원심

분리 하였다. 얻어진 상층액은 0.45와 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter (Toyo Roshi Kaisha, Japan)을 이용하여 여과하였다. 여과된 상층액은  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하면서 실험에 이용하였다.

### Gelatin과 casein에 대한 조효소 활성 측정

각각의 삼각플라스크에 gelatin과 casein 1 g 넣고, agar (1.5%)를 첨가하여 용해하였다. Casein은 0.1 N NaOH를 첨가하면서 용해하였다. 그리고 autoclave에 멸균 한 후, 각각의 petri dish에 20 mL씩 부어 굳혔다. 굳어진 gelatin과 casein agar 위에 준비된 배의 껍질, 속살, 심으로부터 얻어진 조효소를 20  $\mu\text{L}$ 씩 스며들게 분주하였다. 각각의 샘플은  $37^{\circ}\text{C}$  항온기에 넣어 12시간 반응을 측정하였다.

### Zymography와 SDS-PAGE

배의 각 부위로부터 얻어진 조효소에 의한 casein과 gelatin의 Zymography 활성은 Caballero et al. (2001)의 방법에 따라 수행하였다. 그리고 SDS-PAGE는 Laemmli (1970)의 방법에 따라 10% 또는 12% gel을 이용하여 수행하였다. 탈색은 탈색액(67.5% milli Q water, 7.5% acetic acid, 25% methanol)으로 수행하였다.

### 우유단백질에 대한 조효소 반응시험

Casein과 신고배의 각 부위로부터 분리된 조효소를 각각 1 : 1로 혼합하였다. 혼합된 각 시료는  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 6, 12, 그리고 24 시간 반응시켰다. 반응 종료 후, 각 시료는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 HPLC분석과 전기영동 분석을 수행하였다.

### HPLC분석

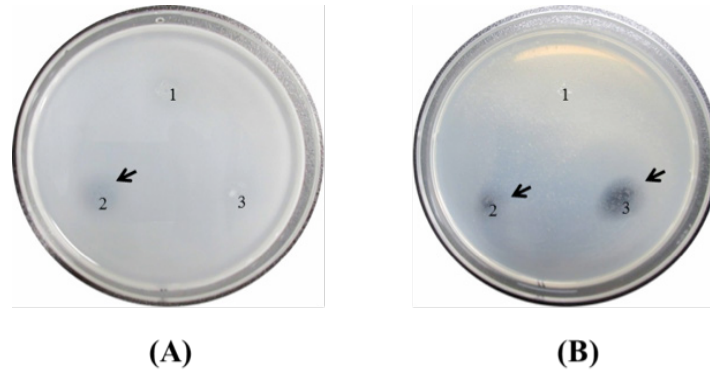
Casein과 반응시킨 각 시료의 분석은 prominence liquid chromatograph system (Shimadzu, Japan)을 이용하였다. Column 은 shim-pack GIS-ODS column (4.6 mm  $\times$  150 mm)을 사용하였다. 검출기는 SPD-M20A를 이용하여 파장 190 - 330 nm의 범위에서 검출하였다. 용액 A는 증류수에 0.1% (V/V) trifluoroacetic acid (TFA)와 용액 B는 acetonitrile에 0.1% (V/V) TFA를 첨가한 두 용액을 용매로써 이용하였다. 각 시료의 주입량은 100  $\mu\text{L}$ 로 하였으며, 유속은 A용액과 B용액 모두 1 mL/min으로 하였다.

## Results and Discussion

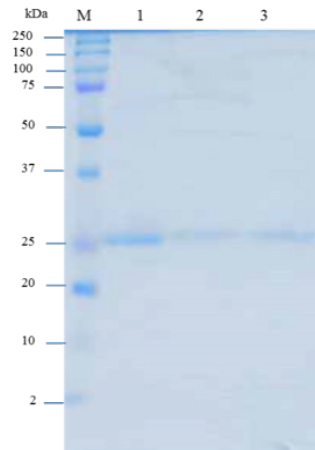
Gelatin과 casein agar에 배의 껍질, 속살, 심으로부터 얻어진 조효소를 각각 20  $\mu\text{L}$ 씩 스며들게 분주 한 후,  $37^{\circ}\text{C}$  항온기에 넣어 12시간 반응을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. Gelatin에서는 배의 속살로부터 얻어진 조효소가 가장 현저한 활성을 나타내었다(Fig. 1A-2). 그리고 나머지 배 껍질(Fig. 1A-1)과 배심(Fig. 1A-3)에서는 뚜렷한 반응을 나타내지 않았다. 한편 casein에 있어서 껍질, 속살, 심으로부터 얻어진 조효소의 반응의 결과는 Fig. 1B에 나타내었다. Casein에 있어서 조효소의 현저한 반응을 나타낸 곳은 배의 속살과 심 부분이었으며, 배심에서 보다 더 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1B, 2, and 3). 그러나 배 껍질 부위에서는 반응이 명확하게 나타나지 않았다(Fig. 1B-1).

배의 각부위로부터 얻어진 상층액의 전기영동 패턴은 Fig. 2와 같다. 전기영동상에서 26 kDa 부근에 명확한 밴드가 각각 확인되었다. 한편, 조효소의 분자량을 측정하기 위하여 Zymography를 실시하였다. 그러나, Zymogram에서 조효소의 활성은 나타나지 않았다(data not shown).

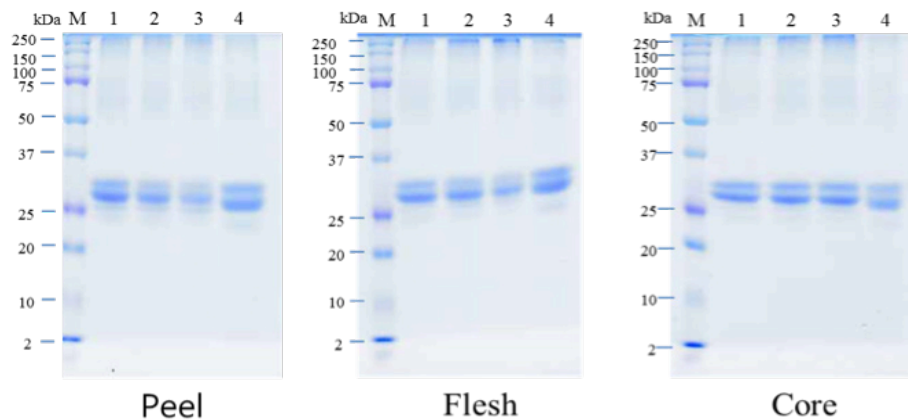
Casein과 배의 심, 속살, 그리고 껍질 부위의 조효소가 함유된 상층액을 각각 1:1로 혼합하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 반응시킨 후 전기영동으로 분석한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 전기영동상으로 조효소에 의한 casein의 분해 정도는 명확하게



**Fig. 1.** Enzyme activity of gelatin (A) and casein (B) of supernatant obtained from the three parts of *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo. 1, Peel; 2, Flesh; 3, Core.

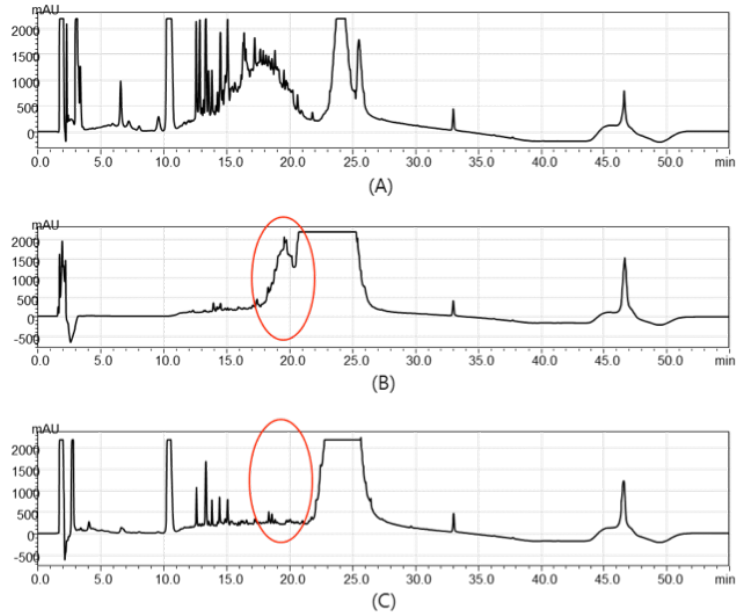


**Fig. 2.** Electrophoresis pattern of supernatant obtained from the three parts of *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo. SDS-polyacrylamide electrophoresis was performed on a 12% gel. M, standards molecular weight; 1, Peel; 2, Flesh; 3, Core.

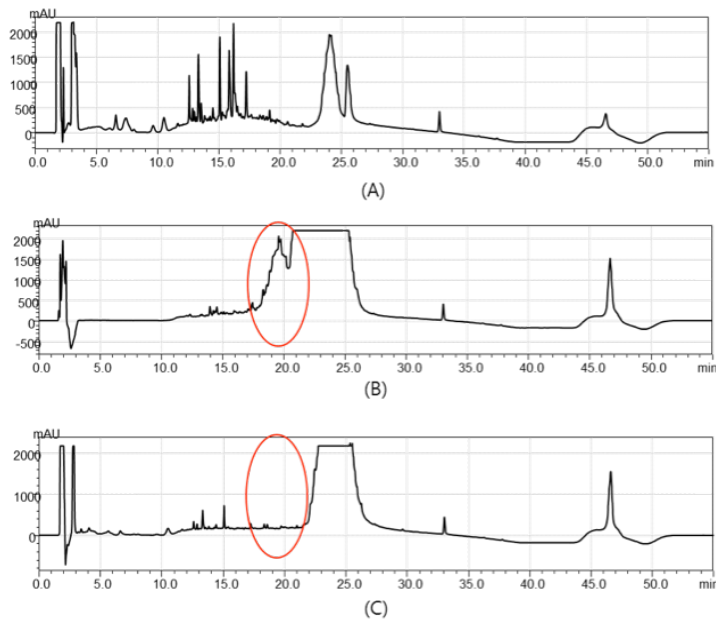


**Fig. 3.** Electrophoresis pattern obtained after reaction between casein and supernatant of *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo for 24 hours at 37°C. SDS-polyacrylamide electrophoresis was performed on a 12% gel. M, standards molecular weight; 1, casein + core extract solution/6 hr; 2, casein + core extract solution/12 hr; 3, casein + core extract solution/24 hr; 4, casein.

나타나지 않았다(Fig. 3). 따라서 배의 조효소가 함유된 상층액과 casein을 혼합하여 24시간동안 반응시킨 후, HPLC를 이용하여 casein의 분해를 측정하였다(Fig. 4 - 6). Fig. 4는 배 껍질로부터 얻어진 조효소 함유 용출액, casein, 그리고 껍질로부터

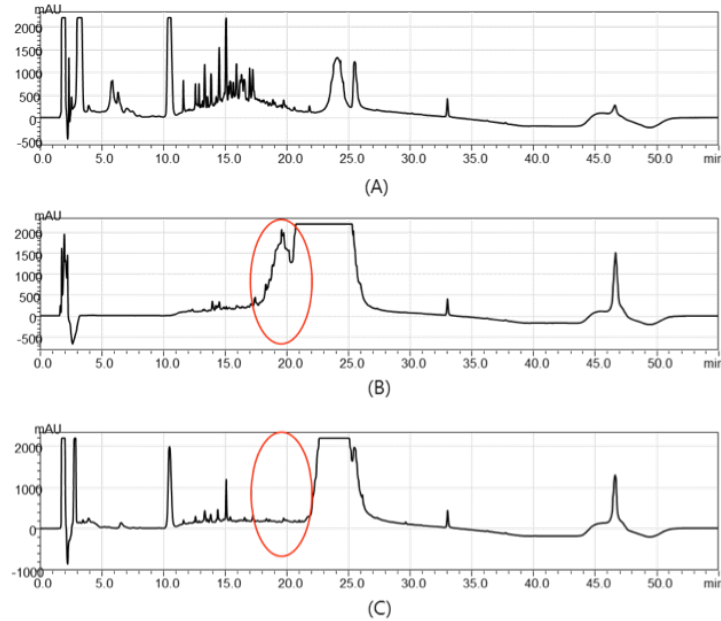


**Fig. 4.** HPLC obtained after reaction between casein and supernatant of peel of *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo for 24 hours at 37°C. A, Peel extract solution; B, casein solution; C, mixture solution of casein and peel, Injection volume, 100  $\mu$ L.



**Fig. 5.** HPLC obtained after reaction between casein and supernatant of flesh of *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo for 24 hours at 37°C. A, flesh extract solution; B, casein solution; C, mixture solution of casein and flesh, Injection volume, 100  $\mu$ L.

얻어진 용출액과 casein을 반응 시킨 후 얻어진 HPLC 결과로 있다. Fig. 4A는 배 껍질로부터 얻어진 용출액을 HPLC로 분석한 결과이다. 그리고 Fig. 4B는 casein을 HPLC로 분석된 결과를 나타내었다. Casein과 배 껍질로부터 얻어진 조효소 함유 상층액을 1 : 1로 혼합 후, 24시간 반응시킨 결과는 Fig. 4C에 나타내었다. Casein (Fig. 4B)에서 용출 18 - 20분 사이의 단백질



**Fig. 6.** HPLC obtained after reaction between casein and supernatant of core of *Pyrus pyrifolia* cv. Shingo for 24 hours at 37°C. A, core extract solution; B, casein solution; C, mixture solution of casein and core, Injection volume, 100  $\mu$ L.

질부분(red circle)이 배 껍질 조효소와 반응시킨 후, Fig. 4C에서 보는 것과 같이 Fig. 4B의 18 - 20분 사이 단백질(red circle)이 분해된 것이 확인되었다. Fig. 5는 casein과 배 속살로부터 얻어진 조효소 함유 상층액을 1 : 1 혼합 후, 24시간 반응시키고 분석한 결과이다. 배의 속살에서도 껍질과 동일하게 용출 18 - 20분 사이의 단백질(red circle)이 분해된 것이 확인되었다(Fig. 5B and 5C). 또한 이러한 결과는 배의 심에서 얻어진 상층액에서도 같은 결과를 나타내었다(Fig. 6). HPLC 분석결과 배의 3부위(껍질, 속살, 심)로부터 얻어진 조효소는 casein을 충분히 분해하는 것으로 분석되었다.

본 연구는 배의 효소를 이용한 우유단백질의 생리활성 펩타이드의 획득을 목적으로 분해 가능성을 검토하였다. Korea Dairy Committee (2017)에 따르면 2010년부터 현재까지 분유의 재고량은 꾸준히 증가하고 있다. 따라서 우유의 다양한 이용 및 기능성 펩타이드의 활용은 매우 필요한 실정이다. Kitts and Weiler (2003)는 생리활성 펩타이드를 신체기능과 상태에 긍정적인 작용을 하여 궁극적으로는 인간의 건강에 도움을 주는 특정한 단백질의 단편으로 정의하였다. 우유 유래 생리활성 펩타이드는 면역증강 작용, 항산화작용, 진정작용, 항균작용, 혈압강화작용, 금속이온결합작용 등이 알려져 있다(Kim, 2010). 치즈제조 시 응유효소인 렌넷은  $\kappa$ -casein에 작용하여 105번째의 Phenylalanine과 106번째의 Methionine 사이를 절단한다. Met<sup>106</sup> 이후의 펩타이드를  $\kappa$ -caseinglycomacropeptide (GMP), 또는 caseinmacro peptide (CMP)라고 불리 운다(Kim, 2010). Otani et al. (1992)은 마우스의 비장세포를 이용한 미토젠 존재하에 있어서 GMP는 세포증식을 억제한다고 보고하였다. 또한 Yun et al. (1996)에 의하면 GMP는 LPS로 자극시킨 마우스 비장세포의 세포수를 약 30%정도 감소시켰다고 보고하였다. 그 외 GMP는 위산분비의 억제기능이 알려져 있다(Yvon et al., 1994). 락토페린은 젖 등의 외분비액 및 호중구에 포함되어 있는 염기성 단백질로 있으며, 단일 물질로서는 폭넓은 기능을 가지고 있다(Garcia-Montoya et al., 2012). 락토페린을 펩신으로 분해하면 락토페리신(lactoferricin)이라는 강한 항균 펩타이드가 얻어진다. Opioid peptide는 진통, 마취, 동맥이완, 수면조절, 장관 연동 등이 알려져 있다. 이러한 opioid peptide는 우유 또는 모유의  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\alpha$ -lactalbumin, 그리고  $\beta$ -lactoglobulin으로부터 유리된 것이다. 대표적인 펩타이드로는  $\beta$ -casomorphin ( $\beta$ -casein), exorphine ( $\alpha$ -casein), 그리고 casoxin ( $\kappa$ -casein) 등이 있다(Loukas et al., 1983; Teschemacher et al., 1997). 우유의 casein 단백질로부터 유래된 casokinin과 유청단백질로부터 유래된 lactokinin은 혈압강하 펩타이드로 알려져 있다(Tauzin et al., 2002; Walsh et al.,

2004). Glutathione은 cysteine, glutamate, 그리고 glycine이 결합된 tripeptide를 말한다. 이물질은 인간의 건강유지에 있어서 체내의 면역체계가 지속적으로 작용하여, 세포내로 유입된 독성 물질을 해독시키며, 세포의 손상을 방지하는 역할을 한다. 유청단백질은 glutathione의 구성성분인 cysteine, glutamate, 그리고 glycine이 풍부하게 함유되어 있으며, 체내에 항산화 효과를 나타낸다고 하였다(Aimutis, 2004). 그 외 우유 casein단백질을 트립신 처리에 의해 얻어진 CPP (casein phosphopeptides)는 소화효소에 저항성이 높아 소장 아래까지 도달하여 칼슘과 인의 흡수를 증가시킨다고 하였다(Sun et al., 2016).

본 연구를 통해서 배로부터 유래된 조효소는 우유단백질을 분해하는 것으로 밝혀졌다. 그리고 배 효소를 우유단백질에 적용시켜 얻어진 결과로부터 우유단백질의 기능들이 더욱더 밝혀질 것으로 사료된다.

## Conclusion

본 연구는 신고배로부터 얻어진 조효소의 우유단백질에 대한 활성을 조사하였다. 배는 심, 속살, 그리고 껍질 부위로 분리하였고, 각 부위로부터 조효소를 획득하였다. 얻어진 조효소의 활성은 casein과 gelatin agar를 이용하여 측정하였다. 결과적으로 gelatin에서는 속살에서 얻어진 조효소가 활성을 나타내었고, 반면 casein에서는 속살과 심에서 얻어진 조효소가 높은 활성을 나타내었다. 또한 각 부위로부터 얻어진 조효소를 casein과 혼합하여 반응 시킨 후, 전기영동과 HPLC를 통하여 분해 패턴을 조사하였다. 신고배의 조효소는 casein을 분해하였으며, 얻어진 결과는 우유의 기능성 연구에 대한 기회를 제공할 것으로 사료된다.

## References

- Aimutis WR. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *The Journal of Nutrition* 134:989S-995S.
- Caballero AR, Moreau JM, Engel LS, Marquart ME, Hill JM, O'Callaghan RJ. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Analytical Biochemistry* 290:330-337.
- Choe IS, Park YJ, Ishioroshi M, Samejima K. 1996. A new protease in Korean pears as meat tenderizer. *Animal Science and Technology* 67:43-46. [in Japanese]
- Dransfield E, Etherrington D. 1981. *Enzymes and food processing*. p. 177. Elsevier Applied Science Pub., London and New York, UK and USA.
- Elkhalifa EA, Marriott NG. 1990. Comparison of the effects of *Achromobacter iophagus* and splenic pulp on collagen of restructured beef. *Journal of Muscle Foods* 1:115-128.
- Eun JB, Eo JH, Lee BD. 2012. Functional compounds and biological activity of Asian Pear. *Food Science and Industry* 45:60-69. [in Korean]
- Fernandez ML, Lin EC, Trejo A, McNamara DJ. 1994. Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin alters hepatic cholesterol metabolism without affecting cholesterol absorption in guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *The Journal of Nutrition* 124:817-824.
- Feron G, Bonnarne P, Durand A. 1996. Prospects for the microbial production of food flavours. *Trends in Food Science and Technology* 7:285-293.

- Garcia-Montoya IA, Cendon TS, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q. 2012. Lactoferrin, a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820:226-236.
- Haslam E. 1989. Plant polyphenols, vegetable tannin revisited. pp. 48-59. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hwang IG, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Yang MH, Jeong HS. 2006. Change of physicochemical characteristics of Korean pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) juice with heat treatment conditions. *Korean Journal of Food Science and Technology* 38:342-347. [in Korean]
- Kim GB. 2010. Bioactive components in milk. *Korean Journal of Dairy Science Technology* 28:43-52. [in Korean]
- Kitts DD, Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources: Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9:1309-1323.
- Korea Dairy Committee. 2017. 2016 Dairy statistics yearbook. Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs, Korea Dairy Committee, Sejong, Korea.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-686.
- Lee JW, Kim SH, Hong SI, Jeong MC, Park HW, Kim DM. 2003. Quality distribution of Korean Shingo pears. *Korean Journal of Food Preservation* 10:162-168. [in Korean]
- Lee UY, Ahn YJ, Chun JP. 2017. Effect of different pollen sources on fruit characteristics and quality in 'Niitaka' pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Korean Journal of Agricultural Science* 44:23-29. [in Korean]
- Lee UY, Oh KY, Shim HK, Lee HJ, Hwang YS, Chun JP. 2010. Comparison of fruit quality among fruits set on various position within cluster in 'Niitaka' pears. *Korean Journal of Agricultural Science* 37:13-18. [in Korean]
- Leontowicz M, Gorinstein S, Leontowicz H, Krzeminski R, Lojek A, Katrich E, Ciz M, Martin-Belloso O, Soliva-Fortuny R, Haruenkit R, Trakhtenberg S. 2003. Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:5780-5785.
- Locker RH. 1960. Degree of muscular contraction as a factor in tenderness of beef. *Journal of Food Science* 25:304-307.
- Loukas S, Varoucha D, Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA. 1983. Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry* 22:4567-4573.
- Macfarlane JJ. 1985. High pressure technology and meat quality. p. 155. In *Developments in meat science* (3), Elsevier Applied Science Pub., London and New York, UK and USA.
- Marsh BB, Leet NG. 1966. Studies in meat tenderness. III. The effects of cold shortening on tenderness. *Journal of Food Science* 31:450-459.
- Otani H, Monnnai M, Hosono A. 1992. Bovine  $\kappa$ -casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft* 47:512-515.



- Seo JH, Hwang YS, Chun JP, Lee JC. 2001. Changes of phenolic compounds and occurrence of skin browning and characterization of partially purified polyphenol oxidases in oriental pear fruits. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 42:184-188. [in Korean]
- Sun N, Wu H, Du M, Tang Y, Liu H, Fu Y, Zhu B. 2016. Food protein-derived calcium chelating peptides: A review. *Trends in Food Science and Technology* 58:140-148.
- Tauzin J, Miclo L, Gaillard JL. 2002. Angiotensin- I -converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein. *Federation of European Biochemical Societies letters* 531:369-374.
- Teschemacher H, Koch G, Brantl V. 1997. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 43:99-117.
- Torsdottir I, Alpsten M, Holm G, Sandberg AS, Tölli J. 1991. A small dose of soluble alginate-fiber affects postprandial glycemia and gastric emptying in humans with diabetes. *The Journal of Nutrition* 121:795-799.
- Trejo-González A, Gabriel-Ortiz G, Puebla-Pérez AM, Huizar-Contreras MD, Munquia-Mazariegos MR, Mejia-Arrequin S, Calva E. 1996. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 55:27-33.
- Walsh DJ, Bernard H, Murray BA, MacDonald J, Pentzien AK, Wright GA, Wal JM, Struthers AD, Meisei H, FitzGerald RJ. 2004. *In vitro* generation and stability of the lactokinin  $\beta$ -lactoglobulin fragment (142-148). *Journal of Dairy Science* 87:3845-3857.
- Yun SS, Sugita-Konishi Y, Kumagai S, Yamauchi K. 1996. Glycomacropeptide from cheese whey protein concentrate enhances IgA production by lipopolysaccharide stimulated murine spleen cells. *Animal Science and Technology* 67:458-462.
- Yvon M, Beucher S, Guilloteau P, Le Huerou-Luron I, Corring T. 1994. Effects of caseinomacropeptide (CMP) on digestion regulation. *Reproduction Nutrition Development* 34:527-537.
- Zhang X, Lee FZ, Eun JB. 2007. Changes of phenolic compounds and pectin in asian pear fruit during growth. *Korean Journal of Food Science and Technology* 39:7-13. [in Korean]
- Zhang X, Lee FZ, Eun JB. 2005. Physical properties of dietary fiber sources from peel of Asian pear fruit at different growth stages. *Korean Journal of Food Science and Technology* 37:905-911. [in Korean]
- Zhang YB, Choi HJ, Han HS, Park JH, Son JH, Bae JH, Seung TS, An BJ, Kim HG, Choi C. 2003. Chemical structure of polyphenol isolated from Korean pear (*Pyrus pyrifolia Nakai*). *Korean Journal of Food Science and Technology* 35:959-967. [in Korean]
- Zheng W, Wang SY. 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:502-509.