

魚類의 組織中에 分布하는 알카리性 蛋白質分解酵素의 活性條件

南 澤 正 · 卞 在 亨
東萊女子專門大學 食品營養學科 釜山水產大學 食品營養學科

Alkaline Protease Activity of the Tissue Extracts from Some Different Kinds of Fish

Taek Jeung NAM

Department of Food and Nutrition, Dongrae Women's Junior College
Pusan, 607-05 Korea

and

Jae Hyeung PYEUN

Department of Food and Nutrition Science, National Fisheries University of Pusan
Namgu, Pusan, 608 Korea

To check the differences of the digestive enzymes by the bait habits and the proteolytic activities of the tissue extracts from the fish, omnivorous filefish (*Navodon modestus*), carnivorous cat shark (*Scylliorhinus tarazame*) and bloodsucking hag fish (*Eptatretus burgeri*) were sampled for this experiment.

The activity of crude alkaline protease extracted from the muscle and the internal organs of the samples was determined with casein as substrate.

The activity of the proteolytic enzymes showed remarkable differences by the organs of the fish. The optimum condition of the proteases from the muscle revealed in range of pH 7.8-8.3, at 60-65°C, while those of the enzymes from the internal organs were at about pH 8.2, 45-55°C, but those of hag fish were at about pH 6.7, 45-55°C.

The proteolytic activity of the enzyme of alimentary canal in filefish and in hag fish was 57 and 11 times stronger than that of muscle, respectively. The crude enzyme from the alimentary canal of file fish showed the strongest proteolytic activity in samples submitted and that of cat shark was the lowest. The activity of pancreatic alkaline protease in cat shark was 50 fold higher than that of muscle alkaline protease in the fish.

序 論

魚類의 組織中에 分布하는 蛋白質分解酵素는 魚體의 死後變化에 커다란 影響을 끼칠 뿐만 아니라, 消化管 組織에 分布하는 酵素들은 餌料의 消化過程에서도 重要한 役割을 하므로 化學的으로나 生理的으로 많은 關心을 끌고 있다.

이에 관한 研究로서 魚類의 筋肉組織에 分布하는 蛋白質分解酵素의 性質에 關하여는 Fujii 등(1951), Saito 와 Sameshima(1958), Makinodan 등(1963), Maki-

nodan 과 Ikeda (1969a, 1969b), Manita 등(1969), Konagaya 와 Amano (1973), Iwata 등(1973), Lin 등 (1980), 그리고 Deng (1981) 등의 報告가 있으며, 魚類의 臟器組織에 分布하는 蛋白質分解酵素에 關하여는 무지개송어에서 抽出하여 報告한 Kitamikado 와 Tachino (1960), 그리고 잉어의 臟器組織에 分布하는 알카리性 蛋白質分解酵素의 各 臟器別 最適活性條件에 關한 Iwata 등(1974)의 研究 등 많은 報告가 있다.

그러나 魚類의 種類別에 따른 各 組織 中의 알카리性 蛋白質分解酵素를 組織別로 比較 檢討한 內容의 研究는 充分히 이루어져 있지 않다.

이같은 見地에서, 本研究은 우리나라 沿近海에서 많은 漁獲高를 보이며 雜食性魚種에 屬하는 말귀치와 夜行性으로 다른 魚類에 附着하여 그 肉을 分解하므로서 取食하는 特異한 食性を 가졌을 뿐 아니라 未進化魚種에 屬하는 먹장어, 그리고 半胎生으로 肉食性이며 底棲魚種에 屬하는 두릅상어를 試料로 擇하여 各魚種別, 組織別로 알칼리성 蛋白質分解 粗酵素를 抽出하고 카세인基質에 대한 蛋白質分解能을 分析하므로서 알칼리성 蛋白質分解酵素의 分布와 活性條件을 比較 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 材 料

말귀치(*Navodon modestus*, 體長; 24~26 cm, 體重; 230~240 g)는 1980年 9月 4日 巨濟島 近海에서 漁獲한 것을, 두릅상어(*Scylliorhinus tarazame*, 體長; 39~41 cm, 體重; 260~310 g)는 1980年 8月 5日 釜山近海에서 漁獲한 것을, 그리고 먹장어(*Eptatretus burgeri*, 體長; 38~40 cm, 體重; 140~166 g)는 釜山 近海에서 1980年 10月 27日에 漁獲한 것을 各各 살아 있는 狀態로 低溫實驗室(0~4°C)로 運搬하고, 肉과 各 臟器를 分離하여 酵素 抽出試料로 하였다. 그리고 本 實驗에서 使用한 試藥은 Hammarsten casein (E. Merck 製)을 비롯하여 모두 試藥用 特級을, 또 實驗에 쓴 調製用 물은 모두 蒸溜 脫이온水를 썼고, 酵素의 抽出은 0~4°C의 低溫下에서 이루어졌음을 附記한다.

2. 實驗方法

(1) 粗酵素液의 調製

細切한 各 試料組織 2倍 程度의 2% KCl 溶液을 加하고 Homogenizer로서 3分間 均質化하였다. 이것을 遠心分離(13,000×g, 45min, 0~4°C)한 다음, 殘渣를 12時間 反復 抽出하여 얻은 液을 위의 上層液과 合하고, 이것을 cellulose tubing(Visking 製, 36/32型)을 使用하여 0.1 mM EDTA 를 含有한 5 mM phosphate—2.5 mM borate buffer · pH 6.5 中에서 12時間 동안 外液을 갈면서 透析하였다.

다음에 遠心分離(13,000×g, 20 min, 0~4°C)하고 上層液을 取하여 粗酵素液으로 하였다. 酵素의 活性은 粗酵素 原液을 2% KCl 溶液으로 알맞게 稀釋하여 測定하였다.

(2) 基質溶液의 調製

5 g의 Hammarsten casein 을 1 mM EDTA 를 含

有한 0.1 M phosphate—0.5 M borate buffer · pH 8.2 에 현탁하여 0~3°C에서 4~5時間 동안 攪拌하여 溶解한 다음, 65°C에서 5分間 加溫하여 完全히 溶解시켰다. 다시 1 N NaOH 溶液으로서 pH 8.2로 調節한 다음, 앞의 緩衝液을 넣어 100 ml로 定容하였다.

이 casein 溶液은 0~4°C의 冷藏庫에 保存하면서 調製 24時間 以內에 使用하였다.

(3) 酵素活性의 測定方法

Iwata *et al.* (1973)의 方法에 따라 測定하였다. 즉, 1 ml의 粗酵素溶液에 1 mM EDTA 를 含有한 0.1 M phosphate—0.05 M borate buffer · pH 8.2, 3 ml와 5% casein 溶液 1 ml 을 合한 反應混合物을 一定溫度(35~70°C)에서 60分間 反應시킨 後에 5% trichloroacetic acid 溶液 5 ml 을 加하여 反應을 停止시켰다.

이 反應液을 37°C에서 20分間 放置한 다음, 여지(Whatman No. 542)로서 濾過하여 그 濾液을 280 mμ의 波長에서 吸光度를 測定하였다.

對照로서는 試料抽出液과 上記 緩衝液과의 混液, 그리고 casein 溶液을 별도로 一定溫度(35~70°C)에서 酵素液에서와 같은 條件으로 測定하였다. 對照의 吸光度를 酵素液으로 測定한 吸光度에서 뺀 값을 알칼리성 蛋白質分解酵素의 活性으로 나타내었으며, 比活性은 알칼리성 蛋白質分解酵素의 活性 값을 反應時間(1分當)과 抽出酵素液의 蛋白質濃度(1 mg 當)로 나누어 表示하였다.

(4) 蛋白質濃度의 測定

粗酵素液의 蛋白質濃度는 micro-biuret 法에 의하여 測定하였으며, bovine albumin (Merck 製)을 標準蛋白質로 하고 semimicro-Kjeldahl 法으로 測定한 窒素量과 micro-biuret 法으로 測定한 吸光度값으로 檢量曲線을 作成하여 試料酵素液의 蛋白質濃度를 求하였다.

結果 및 考察

1. 筋肉組織의 알칼리성 蛋白質 分解酵素의 活性

(1) 反應溫度의 影響

肉組織中의 알칼리성 蛋白質分解酵素의 活性은 pH 8.2에서 60分間 反應시켜 最大活性을 보이는 溫度條件을 測定하였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 말귀치와 먹장어 肉에서 抽出한 酵素는 65°C에서 最大活性을 보였는데, 이것은 Makinodan과 Ikeda(1969a, 1969b)의

魚類의 組織中에 分布하는 알카리性 蛋白質分解酵素의 活性條件

(2) pH의 影響

肉에서 抽出한 알카리性 蛋白質分解酵素의 活性에 대한 pH의 影響은 앞에서 測定 提示한 最適溫度條件에서 60分間 反應시켜 그 比活性을 測定 比較하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 말쑤치는 pH 7.8, 두릅상어는 8.3, 그리고 먹장어는 8.1 附近에서 活性 最適 pH를 보였다.

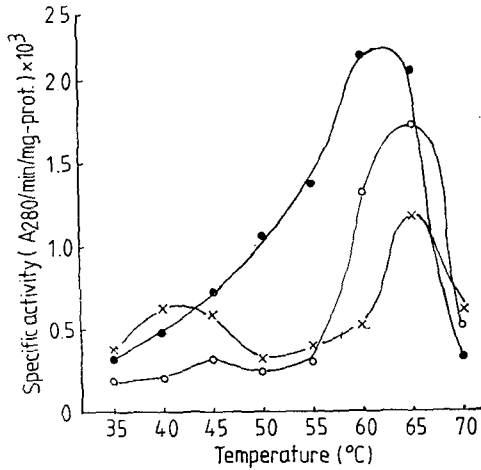


Fig. 1. Temperature dependence of alkaline protease activity in muscle of filefish, cat shark and hag fish. The reaction mixture was incubated at pH 8.2 for 60 min. —○—○—; filefish, —●—●—; cat shark, —×—×—; hag fish.

잉어, 다랑어, 방어 등의 筋肉組織에서 抽出한 粗酵素로서 測定報告한 60~65°C와 Iwata 등(1974)이 잉어, 황어, 무지개송어, 전어 및 날치에서 抽出 測定한 活性最適溫度가 65°C라는 報告와 큰 差異가 없었으며, 두릅상어는 60°C 附近으로 다른 魚種에 比하여 多少 낮았다. 이들 肉組織에 分布하는 알카리性 蛋白質分解酵素의 比活性은 Table 1에 나타낸 바와 같이 두릅상어가 가장 높았으며, 말쑤치는 두릅상어에 比하여 約 79%, 그리고 먹장어는 約 56%의 活性을 보였다. 이 같은 結果는 Iwata 등(1974)이 報告한 잉어, 갈치 등의 比活性에 比하면 그 값이 낮은 것을 알 수 있었다.

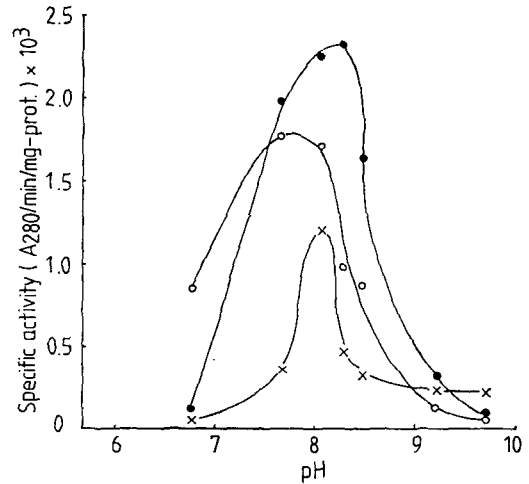


Fig. 2. pH dependence of alkaline protease activity in muscle of filefish, cat shark and hag fish. The temperature conditions of incubation were represented in Table 1. The symbols are the same as in Fig. 1.

이 結果는 Makinodan과 Ikeda(1969a), Iwata 등(1974)이 잉어, 다랑어, 방어 등을 材料로 한 報告와 Deng (1981)이 송어를 材料로 하여 얻은 結果들과 비슷한 傾向임을 알 수 있었다.

Table 1. Comparison of pH and temperature in optimum condition with specific activity of the tissue extracts by muscle and internal organs of filefish, cat shark and hag fish

Organ	Filefish			Cat shark			Hag fish		
	pH	Temperature(°C)	Specific activity*	pH	Temperature(°C)	Specific activity*	pH	Temperature(°C)	Specific activity*
Muscle	7.8	60	1.76×10 ⁻³	8.3	60	2.33×10 ⁻³	8.1	65	1.20×10 ⁻³
Alimentary canal	8.3	50	11.16×10 ⁻²	8.3	45	10.00×10 ⁻³	6.7	55	2.28×10 ⁻²
Liver	—	—	—	8.1	45	5.69×10 ⁻³	6.8	45	8.99×10 ⁻³
Spleen	8.3	50	9.24×10 ⁻³	8.3	45	8.80×10 ⁻³	—	—	—
Hepatopancreas	8.1	45	1.52×10 ⁻²	—	—	—	—	—	—
Pancreas	—	—	—	8.1	45	10.84×10 ⁻²	—	—	—
Kidney	8.5	55	4.60×10 ⁻²	—	—	—	—	—	—

* A₂₈₀/min/mg-prot. is expressed as specific activity.

2. 各 臟器組織의 알카리性 蛋白質分解 酵素의 活性

(1) 反應溫度의 影響

말쥐치의 臟器에 分布하는 알카리性 蛋白質分解 酵素의 最適活性 溫度는 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 消化管이 50°C 附近, 肝脾臟과 腎臟은 各各 45°C와 55°C 附近. 그리고 脾臟은 50°C 附近이었으며, 두툽상어는 Fig. 4와 같이 消化管, 肝臟, 脾臟 및 膵臟이 모두 45°C 附近이었다. 그리고 먹장어는 消化管이 50~55°C, 그리고 肝臟은 45°C 附近에서 높은 活性을 보였다(Fig. 5).

이와 같은 最適活性 溫度는 Iwata 등(1974)이 報告한 잉어의 臟器에서 抽出한 酵素의 活性과 比較하면 器管에 따라 活性 溫度에 多少 差異를 보였고, 또 魚種間의 比較에서도 差異를 보였는데, 이것은 魚種에 따라 棲息環境과 生理的 條件의 差異가 그 原因인 것으로 생각된다. 또 魚種에 따라 臟器의 比活性을 比較하면 Table 1에 나타낸 바와 같이 말쥐치는 消化管이 가장 높았으며, 腎臟은 消化管에 比하여 約 41%, 肝脾臟은 約 16% 脾臟은 約 9%의 活性을 보였다. 그리고 두툽상어는 膵臟이 가장 높았고, 消化管은 脾臟에 比하여 約 9%의 比活性을 보였으며, 腎臟과 肝臟은 約 8%와 4%에 不過하였다. 그리고 먹장어 肝臟에서 얻은 酵素

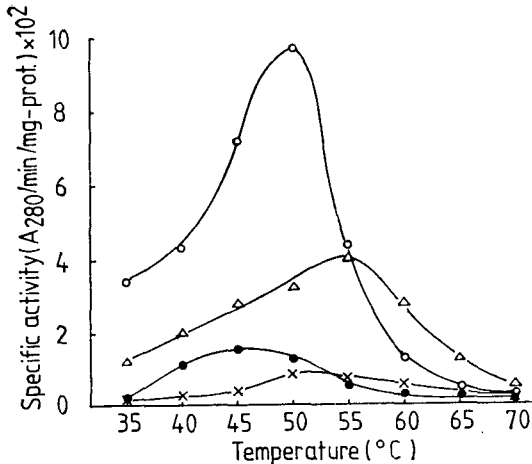


Fig. 3. Temperature dependence of alkaline protease activity in internal organs of filefish. The enzymatic activity was determined under the conditions described in Fig. 1. —○—○—; alimentary canal, —●—●—; hepatopancreas, —×—×—; spleen, —△—△—; kidney.

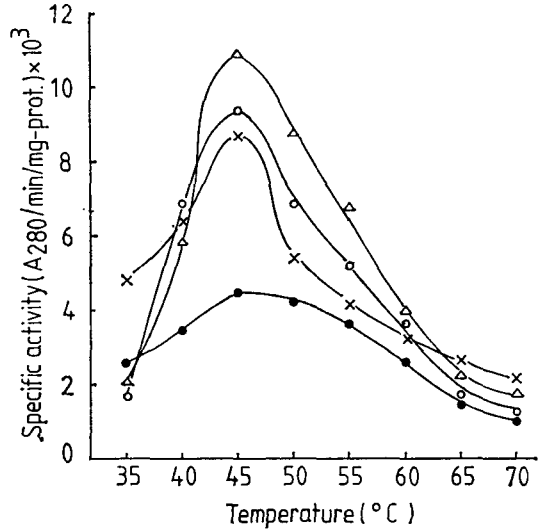


Fig. 4. Temperature dependence of alkaline protease activity in internal organs of cat shark. The enzymatic activity was determined under the conditions described in Fig. 1. —○—○—; alimentary canal, —●—●—; liver, —×—×—; spleen, —△—△—; pancreas.

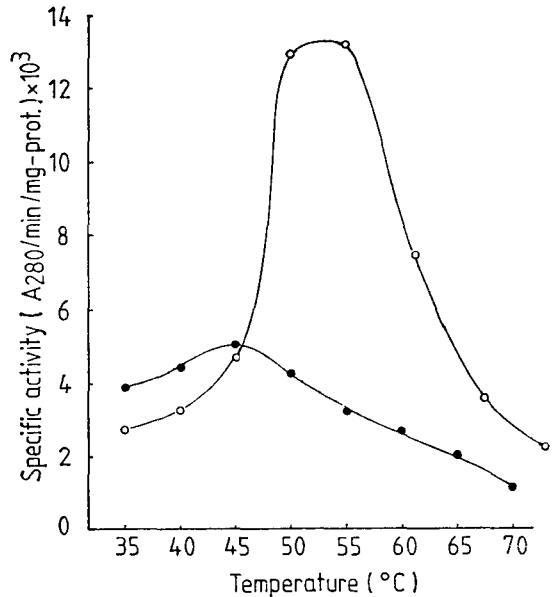


Fig. 5. Temperature dependence of alkaline protease activity in internal organs of hag fish. The enzymatic activity was determined under the conditions described in Fig. 1. —○—○—; alimentary canal, —●—●—; liver.

魚類의 組織中에 分布하는 알카리性 蛋白質分解酵素의 活性條件

의 活性은 消化管에 대하여 約 39%의 活性이 나타났다. 한편, 魚種別로 가장 높은 活性을 보인 臟器는 먹장어와 말쥐치는 消化管이, 두릅상어는 脾臟을 알 수 있었다. 또 肉과 臟器에 대하여 가장 높은 活性을 보인 魚種의 比活性의 強度를 比較하면 말쥐치는 消化管이 肉에 比하여 約 57倍 程度 活性이 높았는가 하면, 두릅상어는 腎臟이 肉에 比하여 約 50倍, 그리고 먹장어는 消化管이 肉에 比하여 約 11倍 程度 活性이 各各 높았다. 한편, 이 實驗에 쓴 各 組織 試料中 肉과 消化管의 一部를 各各 -20°C 의 冷凍庫中에서 1週 日間 貯藏한 後에 酵素液을 抽出하여 그 比活性의 變化를 分析하고 그 結果를 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Changes of the enzymatic activity after 1 week of storage at -20°C . (Unit: $A_{280}/\text{min}/\text{mg}\text{-prot.}$)

Sample	Specific activity	
	Immediately after 1 week after death of storage	after storage
Filefish		
Muscle	1.70×10^{-3}	1.75×10^{-3}
Alimentary canal	9.70×10^{-2}	10.03×10^{-2}
Cat shark		
Muscle	2.16×10^{-3}	2.21×10^{-3}
Alimentary canal	9.40×10^{-3}	9.75×10^{-3} (9.21×10^{-3})
Hag fish		
Muscle	1.20×10^{-3}	1.19×10^{-3}
Alimentary canal	1.31×10^{-3}	1.32×10^{-3}

Numerical in parenthesis represents the value of specific activity from sample stored for 2 weeks at -20°C .

Table 2에서 알 수 있는 바와 같이 말쥐치와 두릅상어, 그리고 먹장어가 모두 活性의 變化를 認定할 수 없었을 뿐만 아니라, 두릅상어의 消化管은 2주일이 經過한 後에도 그 抽出酵素의 比活性은 거의 變化하지 않았다. 이 結果로 미루어 本實驗에서 다룬 魚類의 肉과 臟器中에 分布하는 알카리性 蛋白質分解酵素는 低溫에서는 比較的 安定함을 알 수 있었다.

(2) pH의 影響

各 臟器別로 抽出한 酵素의 活性에 대한 pH의 影響은 肉에서와 같은 實驗條件으로 分析 檢討하였다. 말쥐치의 消化管과 脾臟은 pH 8.3에서 높은 比活性을 나타내었고, 肝脾臟과 腎臟은 pH 8.1과 pH 8.5에서 各 各 높은 比活性을 보였다(Fig. 6). 두릅상어의 消化管과 脾臟은 말쥐치에서 처럼 pH 8.3에서 높았고, 肝臟과 脾臟은 pH 8.1에서 比活性이 높았다(Fig. 7). 그러나 먹장어의 消化管과 肝臟은 말쥐치와 두릅상어와는

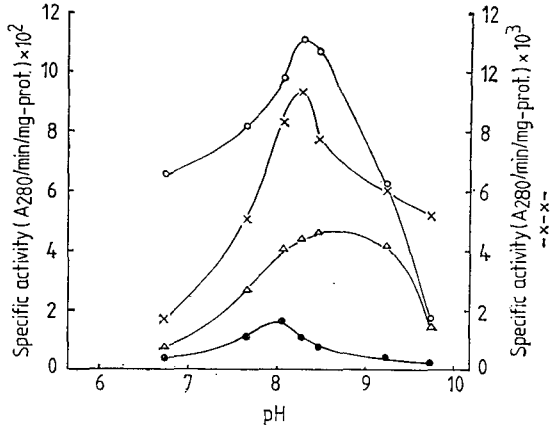


Fig. 6. pH dependence of alkaline protease activity in internal organs of filefish. The temperature conditions of incubation were represented in Table 1. The symbols are the same as in Fig. 3.

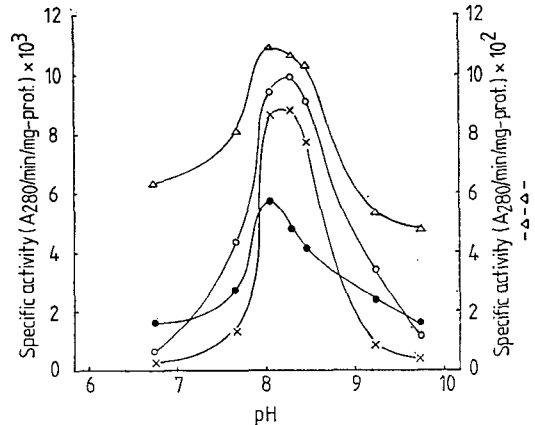


Fig. 7. pH dependence of alkaline protease activity in internal organs of cat shark. The temperature conditions of incubation were represented in Table 1. The symbols are the same as in Fig. 4.

달리 弱酸性側인 pH 6.7~6.8에서 比活性이 높았다 (Fig. 8).

이들 세 魚類의 臟器組織中 알카리性 蛋白質分解酵素의 活性最適 pH는 Fujii 등(1951)이 報告한 정어리 幽門垂中の 알카리性 蛋白質分解酵素의 活性最適 pH와, 그리고 Iwata 등(1974)이 報告한 잉어의 臟器組織中の 알카리性 蛋白質分解酵素가 보인 活性最適 pH와는 큰 差異가 없었다.

3. 反應時間과 酵素濃度の 影響

말쥐치와 두릅상어 그리고 먹장어의 消化管에서 抽出한 粗酵素에 대하여 活性最適 溫度와 pH 條件下에

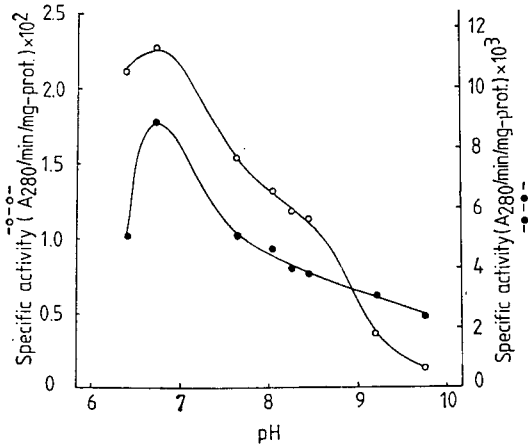


Fig. 8. pH dependence of alkaline protease activity in internal organs of hag fish. The temperature conditions of incubation were represented in Table 1. The symbols are the same as in Fig. 5.

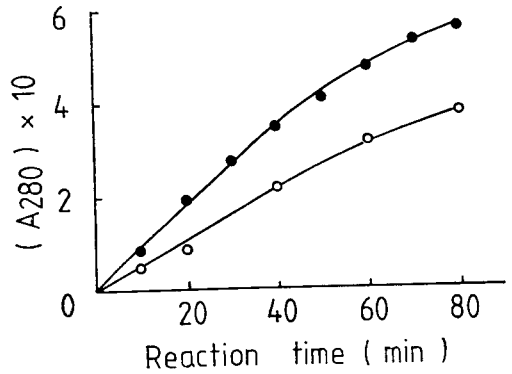


Fig. 9. Proteolytic activity by reaction time in alimentary canal of filefish. The reaction mixture was incubated at 50°C, pH 8.2. Enzyme concentration; —●—●—; 1.320 mg/ml, —○—○—; 0.660 mg/ml.

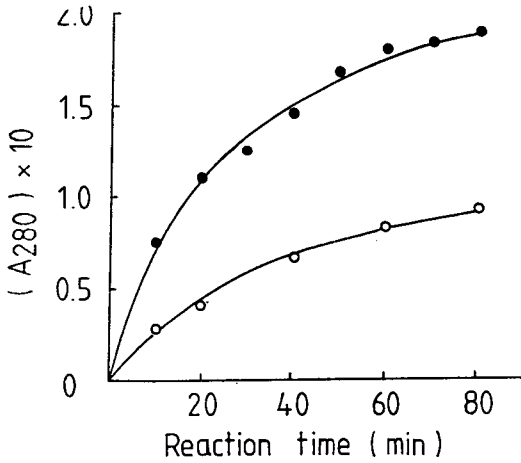


Fig. 10. Proteolytic activity by reaction time in alimentary canal of cat shark. The reaction mixture was incubated at 46°C, pH 8.2. Enzyme concentration; —●—●—; 1.219 mg/ml, —○—○—; 0.609 mg/ml.

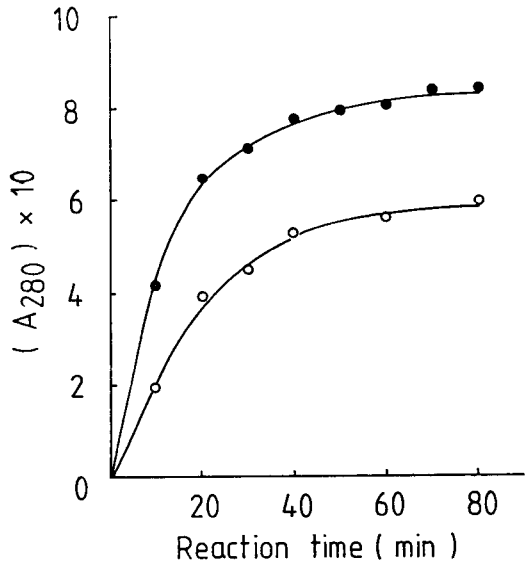


Fig. 11. Proteolytic activity by reaction time in alimentary canal of hag fish. The reaction mixture was incubated at 55°C, pH 8.2. Enzyme concentration; —●—●—; 2.025 mg/ml, —○—○—; 1.013 mg/ml.

서 反應時間과 濃度條件이 酵素活性에 미치는 影響을 Fig. 9~11에 나타내었다.

말쥐치의 경우는 酵素의 濃도가 진할수록 活性도 높았으며, 反應 60분까지는 反應時間에 比例하여 活性도 規則적으로 增加하였다. 두릅상어와 먹장어의 酵素는 反應 20분까지는 비슷한 關係를 보였으나 그 以後부터는 서서히 增加하여 定常水準에 이르러감을 알 수 있었다.

結論 및 要約

말쥐치, 두릅상어 및 먹장어의 肉과 臟器組織으로부터 蛋白質分解 粗酵素를 抽出하고 casein을 基質로 하여 活性를 測定하였으며, 알칼리性 蛋白質 分解酵素의

分布와 活性條件을 比較檢討한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 試料魚의 肉과 臟器組織에서 抽出한 粗酵素는 알카리性側에서 모두 casein 分解 活性을 나타내었다.
2. 肉에서 抽出한 粗酵素의 最適活性條件은 말쥐치와 덕장어는 pH 7.8~8.1, 65°C 였고, 두릅상어는 pH 8.3, 60°C 이었다.
3. 말쥐치, 두릅상어 및 덕장어의 各 臟器에서 抽出한 粗酵素의 알카리性側에서의 蛋白質分解 活性의 最適條件은 덕장어의 pH 6.7, 45~55°C 을 除外하면, 모두 pH 8.2, 45~55°C 範圍였다.
4. 세 魚種의 肉에서 抽出한 알카리性 蛋白質分解 粗酵素中 活性이 가장 強한 것은 두릅상어였다.
5. 各 魚種別로 肉과 臟器 抽出 粗酵素에 대하여 比 活性의 差異를 比較하면, 말쥐치는 消化管이 肉보다 57倍, 두릅상어는 臍臟이 肉보다 50倍, 그리고 덕장어는 消化管이 肉보다 11倍 程度, 各各 強하였다.
6. 各 魚種別로 肉과 消化管을 -20°C에서 7일간 凍結 保存하여도 抽出한 粗酵素의 活性에는 影響이 없었다.

參 考 文 獻

- Deng, J. C. (1981) : Effect of temperatures on fish alkaline protease. protein interaction and texture quality. *J. of Food Sci.* 46, 62-65.
- Fujii, M., H. Hirose and S. Era(1951) : Studies on the proteases of fishes(1). Part 2, The distribution of proteases in the body of sardine and the influence of hydrogen ion concentration and temperature on the proteolytic enzymes of sardin pyrolic caeca. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 16, 37-39 (in Japanese).
- Iwata, K., K. Kobayashi and J. Hase (1973) : Studies on muscle alkaline prorease-I. Isolation, purification and some physico-chemical properties of an alkaline protease from carp muscle. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39, 1325-1337.
- Iwata, K., K. Kobashi and J. Hase (1974) : Studies on muscle alkaline protease-III. Distribution of alkaline protease in muscle of freshwater fish, marine fish and in internal organs of carp. *ibid.* 40, 201-209 (in Japanese).
- Kitamikado, M. and S. Tachino (1960) : Studies on the digestive enzymes of rainbow trout -II. Proteases. *ibid.* 26, 685-690 (in Japanese).
- Konagaya, S. and K. Amano(1973) : Studies on jellied meat of tuna-III. Proteolytic activity of the jellied meat of yellowfin tuna. *ibid.* 39, 1169-1178.
- Lin, T. S., H. K. Su and T. C. Lanier(1980) : Characterization of fish muscle proteases using radiolabeled protein substrates. *J. of Food Sci.* 45, 1036-1039.
- Makinodan, Y., M. Yamamoto and W. Shimidu (1963) : Studies on muscle of aquatic animals-XXXIX. Protease in fish muscle. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 29, 776-780 (in Japanese).
- Makinodan, Y., and S. Ikeda (1969a) : Studies on fish muscle protease-I. On the existence of two kinds of proteinases active in acid and in slightly alkaline pH range. *ibid.* 35, 672-676.
- Makinodan, Y. and S. Ikeda (1969b) : Studies on fish muscle protease-II. Purification and properties of a proteinase active in slightly alkaline pH range. *ibid.* 35, 749-757.
- Manita, H., C. Koizumi and J. Nonaka (1969) : Aseptic autolysis of mackerel muscle. *ibid.* 35, 1027-1033 (in Japanese).