

## 어류의 수축성 근섬유단백질의 열안정성에 관한 연구

양 음 · 홍상필 · 신완철\* · 송재철\*

연세대학교 식품공학과, \*울산대학교 식품영양학과

### Study on the Thermostability of Contractile Myofibrillar Proteins from Fish Species

Ryung Yang, Sang-Pill Hong, Wan-Chul Shin\* and Jae-Chul Song\*

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul

\*Department of Food and Nutrition, University of Ulsan, Ulsan

#### Abstract

Myofibrillar proteins were prepared from cold(pollack, salmon) and warm current fish(shark), and their thermostabilities were compared. Thermodynamic data for inactivation of myofibrillar proteins, such as D-value, Kd-value, revealed that thermostability of myofibrillar proteins from warm current fish was higher than that from cold current fish.

Key words: fish myofibrillar proteins, thermostability of fish proteins.

#### 서 론

수종의 동물에 걸쳐 다양하게 연구되고 있는 수축성 근섬유단백질<sup>(1-6)</sup>은 동물의 종류와 부위에 따라 약간씩 차이는 있으나<sup>(7,8)</sup> 본질적으로는 동일한 형태를 나타내고 있는 것으로 알려지고 있다<sup>(9,10)</sup>. 그런데 동물체는 다양한 환경속에서도 최적의 생물활성을 유지하도록 짜여진 생물체계를 가지고 있는 것으로 예상되고 있으며, 이러한 다양한 환경조건에 적응하고 생물체로서의 항상성을 유지하려면 운동기관에 있어서도 환경조건에 적응시키는 어떤 변화가 어떤 형태로든지 존재할 것으로 예상되었다. 전보<sup>(11)</sup>에서 저자들은 어류의 근원섬유단백질의 생물활성이 서식하는 온도에 따라 달라짐을 발표하였다.

근섬유를 구성하는 구조단백질의 경우에도 어류의 근원섬유단백질이 육상동물의 근원섬유단백질 보다 불안정하다고 보고되고 있으며<sup>(12,13)</sup> 실제로 몇몇 연구자들은 어류의 서식온도와 근원섬유단백질의 생물학적 특성과의 상관성을 주로 열안정성의 측면에서 검토하고 있다<sup>(5,14)</sup>. 또한 LDH, MDH 그리고 GDH 와 같은 효소계에서도 생물의 환경온도 적응성이 명확히 나타나고 있으며<sup>(15,16)</sup>, 최근 Hashimoto 등<sup>(5)</sup>은 각종 어류를 대상으로 근원섬유단백질을 추출하여 Ca-ATPase를 지표로 광범위한 온도 영역에서 열안정성을 검토하고 고온적응성 어류와 저온적응성 어류의 상대적 열안정성을 보상효과<sup>(17)</sup>의 개념

을 도입하여 환경적응적 관계를 보고하고 있다.

본 연구에서는 한류성어류와 난류성어류로부터 조제된 근원섬유단백질의 열안정성을 비교하여 근원섬유단백질의 열안정성이 어류의 환경온도에 따라 명확한 차이를 나타낸다는 사실을 규명하고자 하였다.

#### 실험재료 및 방법

##### 실험재료

본 실험에서의 실험재료는 신선시장에서 구입한 鮮魚로 선도에 문제점이 없다고 판별되는 것으로 선택하였다. 한류성어류인 연어와 명태, 난류성어류인 상어의 골격근을 취하여 혈합육, 지방 및 결체조직 등을 제거한 후 사용하였으며 실험에 사용한 어류의 분류는 다음과 같다.

한류성 어류(5°C~10°C)<sup>(18)</sup>

1. 명태 (Pollack, *Theragra chalcogramma*)

2. 연어 (Salmon, *Salmonidae*)

난류성 어류(10°C~30°C)<sup>(18)</sup>

1. 상어 (Shark, *Mustelus manazo*)

##### 실험방법

근원섬유단백질의 조제: Myofibril의 조제는 Yang의 방법<sup>(1)</sup>에 따라 조제하였으며 actomyosin의 조제는 Szent-Györgyi의 방법<sup>(19)</sup>에 따라 조제하였다.

ATPase 활성 측정: 0.25mg/ml myofibrillar proteins, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 25mM Tris

-HCl buffer(pH 8.0)의 혼합액을 25°C에서 5분간 반응시켰다. 반응은 최종농도 4%인 TCA를 첨가하여 ice bath 상에서 정지시켰다.

ATPase 활성은 1mg의 효소단백질에 의하여 1분간 유리되어 나오는 무기인산(Pi)의  $\mu\text{mole}$ 로 표시하였다.

열안정성 실험: 단백질의 가열처리는 25mM tris-HCl buffer(pH 7.5), 25mM tris-HCl buffer(pH 8.0) 혹은 25mM tris-maleate buffer(pH 6.5), 일정 이온강도, 1mg/mI protein의 혼합액을 30°C~50°C 사이의 각 온도에서 가열하여 행하였다.

각 온도에서 일정시간 간격으로 일정액을 취하여 ice bath 상에 있는 ATPase 활성측정 용액에 넣어 가열반응을 정지시킨후 기질을 첨가하여 25°C 항온조에서 5분간 반응시켜 효소의 잔존활성을 측정하였다.

단백질 농도의 측정: 단백질 농도는 biuret 방법에 의하여 측정되었다. 검량선은 bovine serum albumin을 micro-Kjeldahl 법으로 분석하여 작성되었다.

실험결과 및 고찰

어류의 생체기능 단백질의 열안정성과 어류의 서식온도 간에는 중요한 상관성이 있는 것으로 알려지고 있으며<sup>(12,16)</sup> 또한 저온에서 서식하는 어류 myosin은 열대성 어류에 비하여 저장중에 쉽게 응집을 일으키며, 열과 urea에 의하여 쉽게 변성되어 ATPase 활성을 잃어버리는 것으로 보고되고 있다<sup>(13,20)</sup>. 저자들도 전보<sup>(11)</sup>에서 한류성어류나 난류성어류의 근원섬유단백질의 ATPase 활성은 환경온도 적응성을 나타낸다는 사실을 분명히 하였다. 변온동물인 어류의 생체단백질이 환경온도의 의존성을 나타내는 사실은 자연과학적 당위성을 갖는 것으로 추정되며, 이러한 당위성이 근원섬유단백질의 열안정성에서도 나타날 것으로 예상되었다.

본 연구에서는 실험속도가 1차반응에 따르는 Ca-ATPase를 지표로<sup>(6,21)</sup> 30°C~50°C 온도 범위에서 한류어와 난류어의 근원섬유단백질의 열안정성을 비교하였다.

Fig. 1, 2, 3은 어류 actomyosin의 변성속도가 1차반응에 따른다는 사실을 보여주고 있다. 명태와 연어의 actomyosin ATPase는 25°C의 가열에서는 ATPase 활성에 영향을 받지 않으나 30°C 이상의 온도에서부터 ATPase 활성에 영향을 받는 것으로 보아 30°C부터 변성이 시작되는 것으로 추정되며 반면 상어의 actomyosin ATPase는 35°C 이상의 온도에서부터 변성이 시작

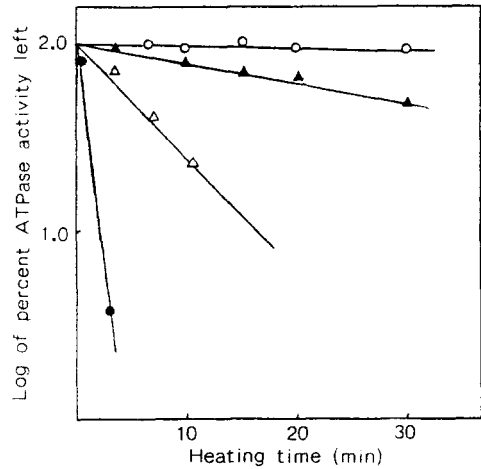


Fig. 1. Rate of inactivation of actomyosin from salmon muscle as a function of time during heating at various temperature.

Heating cond.: 25mM Tris-maleate buffer(pH 6.5)  
0.1M KCl, 1mg/mI AM

○—○: 25°C      △—△: 35°C  
▲—▲: 30°C      ●—●: 40°C

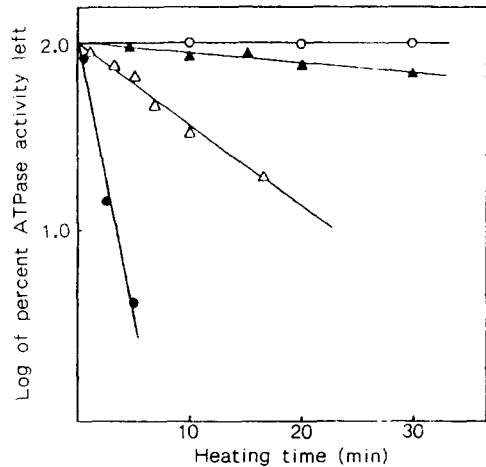


Fig. 2. Rate of inactivation of actomyosin from pollack muscle as a function of time during heating at various temperature.

Heating cond.: 25mM Tris-maleate buffer(pH 6.5)  
0.1M KCl, 1mg/mI AM

○—○: 25°C      △—△: 35°C  
▲—▲: 30°C      ●—●: 40°C

되는 것으로 추정될 수 있다. 40°C 그리고 pH 8.0에서 3어종의 actomyosin ATPase의 Kd 값을 비교하여 보

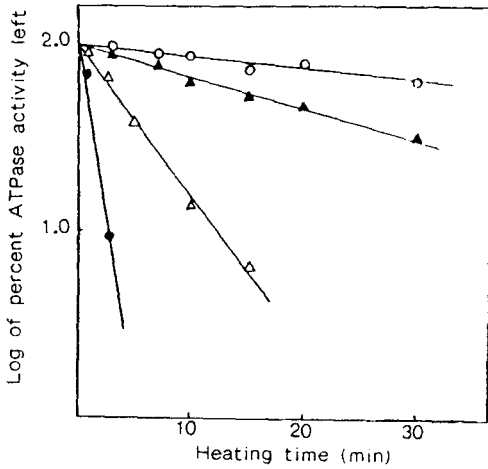


Fig. 3. Rate of inactivation of actomyosin from shark muscle as a function of time during heating at various temperature.

Heating cond.: 25mM Tris-maleate buffer(pH 6.5)

0.1M KCl, 1mg/ml AM

○—○: 35°C      △—△: 45°C  
 ▲—▲: 40°C      ●—●: 50°C

면 명태와 연어는 상어에 비하여 각각 15.77배, 4.15배 빠른 변성을 나타내고 있다(Fig. 4).

이와 같은 결과로 보아 한류성어류가 난류성어류에 비해 높은 온도에 매우 불안정하다는 것을 알 수 있다. 또한 이와 같은 결과는 myofibril의 ATPase 경우에서도 동일하게 나타나(Fig. 5 참조) 명태는 30°C, 연어는 35°C, 상어는 40°C부터 변성이 시작되었으며, 40°C pH 8.0에서 명태와 연어는 상어에 비해 각각 17배, 4.3배로 빠른 변성을 나타내어 actomyosin의 경우와 유사한 경향을 보이고 있다.

Fig. 4는 pH 별에 따른 actomyosin Ca-ATPase의 각 온도에서의 변성속도를 Arrhenius plot 한 것으로 한류성어류인 명태 및 연어와 난류성어류인 상어 사이에 뚜렷한 열안정성의 차이를 보이고 있으며, 특히 상어는 항온동물인 porcine muscle에 필적할만한 열안정성을<sup>(22)</sup> 나타내었다. 이와 같은 결과는 Fig. 5에 보인 바와 같이 보다 근육에 가까운 형태를 지닌 myofibril의 열안정성에서도 분명한 차이가 나타나고 있다.

한편 pH의 효과에 있어 myosin ATPase의 변성은 pH 의존성이 큰 것으로 발표되고 있다. Yasui 등<sup>(23)</sup>은 rabbit myosin의 열변성과 pH의 상관성을 조사하고 pH 7.5~8.5에서 온도에만 의존하는 변성을 나타내나

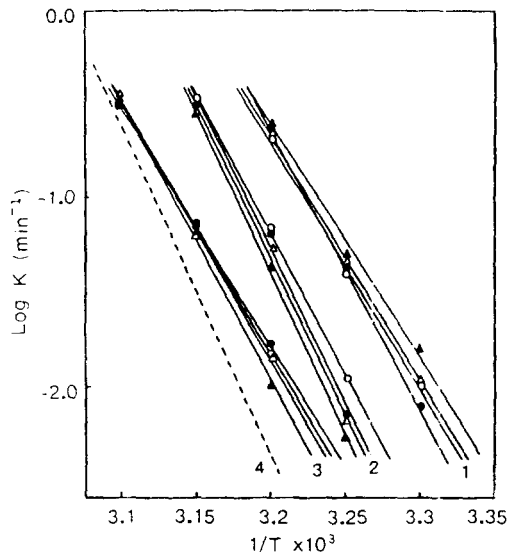


Fig. 4. Arrhenius plot of the effect of temperature on the rate of inactivation of actomyosin from various fish species.

pH 6.5(○), pH 7.5(●), pH 8.0(△), pH 8.5(▲)

1. Pollack 2. Salmon 3. Shark 4. Porcine

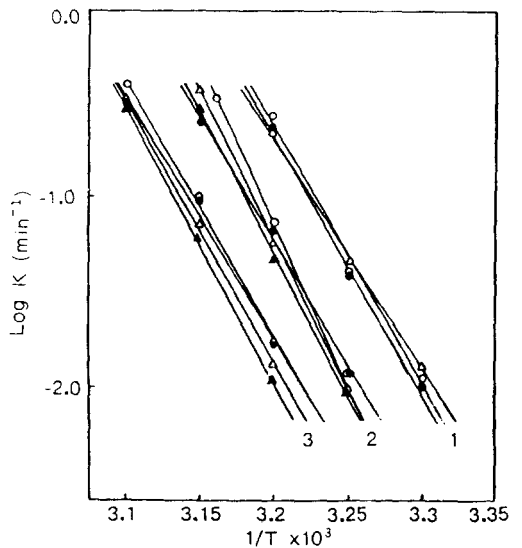


Fig. 5. Arrhenius plot of the effect of temperature on the rate of inactivation of myofibril from various fish species.

pH 6.5(○), pH 7.5(●), pH 8.0(△), pH 8.5(▲)

1. Pollack 2. Salmon 3. Shark

pH 5.2~6.0에서는  $[H^+]$ <sup>1,3</sup>에 비례하는 변성을 나타내며 pH 10.0~10.5에서는 온도에 의존하지 않고 pH에 의한 변성만이 일어난다고 하였다. 그러나 Fig. 4, 5와 같이 어류 근원섬유단백질의 ATPase는 pH 6.5~8.5 범위에서 모두 온도에 의존하는 변성을 나타내었다.

Table 1과 Table 2는 Fig. 4와 Fig. 5의 결과를 종합하여 D, Z value 및 열역학 parameter로 나타낸 것으로 한류성어류와 난류성어류의 근원섬유단백질의 열안정성은 D value와 Z value에서 현저한 차이를 보여주고 있다. D value가 전부 나타나고 있는 40°C에서의 명태, 연어 그리고 상어의 D value는 actomyosin과 myofibril 둘다 각 pH에 따라 약간씩 차이는 있으나, 각 pH에서는 일률적으로 상어 > 연어 > 명태 순으로 나타나고 있으며 현저한 차이를 보이고 있다.

Low 등<sup>(15)</sup>은 저온적응성 냉혈동물의 효소가 저온에서

온혈동물의 효소에 비하여 높은 활성을 나타내는 것은 활성화된 enzyme-substrate complex의 weak bond 형성이 증가하기 때문이라 하였으며, Johnston 등<sup>(14)</sup>은 저온에 적응된 어류의 효소는 수많은 weak bond가 이들의 고도의 질서를 안정화시켜 주기 때문에 열에 의하여 쉽게 파괴되며 열대성어류의 효소는 열에 강하도록 보다 치밀하고 판단한 구조를 유지하도록 적응되었다고 추론하고 있다.

한편 Hashimoto 등<sup>(5)</sup>은 열대지역 어류의 myofibril은  $\Delta H^*$  및  $\Delta S^*$ 가 높고 한대지역 어류의 myofibril은 낮은 값을 나타낸다는 점에서  $\Delta H^*$  및  $\Delta S^*$ 가 어느정도 보상적인 관계가 성립되기 때문에  $\Delta G^*$ 에는 별차이가 없다고 하였다. 그러나 Table. 1과 Table. 2의 결과는 Hashimoto 등의 그것과는 다르게 나타나고 있으나  $\Delta G^*$ 에서는 별차이를 보이지 않고 있다.

Table 1. D,Z-value and thermodynamic data for inactivation of actomyosin from various fish species

| pH  | Fish species | D (min.) |       |       |      |      | Z (°C) | Ea (cal/mol) | $\Delta H^*$ (cal/mol) | $\Delta S^*$ (e.u. <sup>a</sup> ) | $\Delta G^*$ (cal/mol) |
|-----|--------------|----------|-------|-------|------|------|--------|--------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|
|     |              | 30°C     | 35°C  | 40°C  | 45°C | 50°C |        |              |                        |                                   |                        |
| 6.5 | Pollack      | 261.7    | 59.0  | 11.5  |      |      | 7.36   | 62,097       | 61,475                 | 134.5                             | 19,376                 |
|     | Salmon       |          | 217.2 | 33.4  | 6.5  |      | 6.58   | 55,873       | 55,251                 | 112.5                             | 20,038                 |
|     | Shark        |          |       | 154.5 | 33.2 | 6.6  | 7.30   | 62,508       | 61,886                 | 130.7                             | 20,976                 |
| 7.5 | Pollack      | 303.0    | 54.1  | 9.7   |      |      | 6.69   | 68,366       | 67,744                 | 154.9                             | 19,260                 |
|     | Salmon       |          | 329.0 | 35.7  | 7.5  |      | 6.09   | 51,144       | 50,492                 | 97.2                              | 20,068                 |
|     | Shark        |          |       | 142.1 | 34.5 | 7.4  | 7.79   | 58,527       | 57,905                 | 118.1                             | 20,939                 |
| 8.0 | Pollack      | 211.0    | 51.2  | 10.2  |      |      | 7.62   | 60,083       | 59,461                 | 128.3                             | 19,303                 |
|     | Salmon       |          | 343.0 | 39.0  | 7.5  |      | 6.02   | 64,247       | 63,625                 | 139.0                             | 20,118                 |
|     | Shark        |          |       | 162.1 | 36.9 | 6.8  | 7.26   | 62,966       | 62,344                 | 132.0                             | 21,028                 |
| 8.5 | Pollack      | 147.6    | 47.9  | 9.5   |      |      | 8.39   | 54,455       | 53,883                 | 110.5                             | 19,296                 |
|     | Salmon       |          | 434.0 | 56.1  | 7.3  |      | 5.65   | 70,288       | 69,606                 | 157.5                             | 20,308                 |
|     | Shark        |          |       | 258.7 | 35.5 | 6.3  | 6.19   | 73,674       | 73,052                 | 165.3                             | 21,313                 |

a :  $\Delta S^*$  in cal/mol/degree

Table 2. D,Z-value and thermodynamic data for inactivation of myofibril from various fish species

| pH  | Fish species | D (min.) |       |       |      |      | Z (°C) | Ea (cal/mol) | $\Delta H^*$ (cal/mol) | $\Delta S^*$ (e.u. <sup>a</sup> ) | $\Delta G^*$ (cal/mol) |
|-----|--------------|----------|-------|-------|------|------|--------|--------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|
|     |              | 30°C     | 35°C  | 40°C  | 45°C | 50°C |        |              |                        |                                   |                        |
| 6.5 | Pollack      | 205.6    | 55.7  | 8.5   |      |      | 7.23   | 63,103       | 62,481                 | 138.3                             | 19,193                 |
|     | Salmon       |          | 155.6 | 31.1  | 4.0  |      | 6.28   | 72,622       | 72,000                 | 166.2                             | 19,379                 |
|     | Shark        |          |       | 136.2 | 28.7 | 6.2  | 7.32   | 62,325       | 61,703                 | 130.3                             | 20,919                 |
| 7.5 | Pollack      | 235.0    | 60.4  | 10.0  |      |      | 7.29   | 62,234       | 61,612                 | 135.2                             | 19,294                 |
|     | Salmon       |          | 158.8 | 35.0  | 9.3  |      | 8.12   | 56,331       | 55,709                 | 113.9                             | 20,058                 |
|     | Shark        |          |       | 137.9 | 28.2 | 7.4  | 7.87   | 57,932       | 57,310                 | 116.3                             | 20,908                 |
| 8.0 | Pollack      | 177.1    | 51.1  | 10.3  |      |      | 8.09   | 56,514       | 55,892                 | 116.9                             | 19,302                 |
|     | Salmon       |          | 230.0 | 40.1  | 7.6  |      | 6.75   | 67,771       | 67,149                 | 150.2                             | 20,136                 |
|     | Shark        |          |       | 173.1 | 32.2 | 6.8  | 7.11   | 64,064       | 63,442                 | 135.4                             | 21,061                 |
| 8.5 | Pollack      | 185.7    | 100.1 | 11.5  |      |      | 8.27   | 55,141       | 54,519                 | 112.3                             | 19,369                 |
|     | Salmon       |          | 264.7 | 49.5  | 7.9  |      | 6.55   | 69,693       | 69,071                 | 155.9                             | 20,274                 |
|     | Shark        |          |       | 221.4 | 38.8 | 7.3  | 6.75   | 67,679       | 67,057                 | 146.5                             | 21,652                 |

a :  $\Delta S^*$  in cal/mol/degree

이상의 결과로부터 한류성어류와 난류성어류의 근원섬유단백질의 ATPase 활성이 어류의 환경온도에 대한 적응성을 나타내고 근원섬유단백질의 열안정성은 어류의 환경온도에 따라 명확한 차이를 나타낸다는 사실을 확인하였다.

## 요 약

한류성어류(연어, 명태)와 난류성어류(상어)의 열변성과 pH의 상관성에 있어서는 서식하는 환경온도에 관계없이 어류의 근원섬유단백질의 ATPase는 pH 6.5~8.5 범위에서 모두 온도에 의존하는 변성을 나타내었다.

한편 열안정성에 대한 열역학량중 D value와 변성속도 Kd value에 있어서는 상어 > 연어 > 명태 순으로 확실한 차이를 나타내어 어류 근원섬유단백질의 열안정성은 서식하는 어류의 환경온도와 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났으며, 동물의 종류에 따라서도 차이를 나타내었다.

## 감사의 말

본 연구는 수축성 근원섬유단백질의 환경온도 적응성에 관한 연구의 제2보로 1987년도 전반기 한국과학재단 연구비로 수행된 것이다. 저자들은 연구비를 지원하여준 한국과학재단에 심심한 사의를 표하는 바이다.

## 문 헌

1. Yang, R., Okitani, A. and Fuzimaki, M.: Postmortem changes in regulatory proteins of rabbit muscle. *Agri. Biol. Chem.*, **42**, 555(1978)
2. 신완철 : 근원섬유단백질의 특성과 열안정성에 관한 연구, 연세대학교 박사학위 논문(1985)
3. Yang, R., Shin, W.C., Oh, D.W., Jin, H.S. and Kim, K. T. : Comparison of biochemical characteristics of myofibrillar proteins from red and white muscle. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **18**, 173(1986)
4. Johnston, I.A. and Goldspink, G. : Thermodynamic activation parameters of fish myofibrillar ATPase enzyme and evolutionary adaptation to temperature. *Nature*, **257**, 620(1975)
5. Hashimoto, A., Kobayashi, A. and Arai, K. : Thermostability of fish myofibrillar Ca-ATPase and adaptation to environmental temperature. *Bull. Jap. Soc. Fish.*, **48**(50), 671(1982)
6. Halmes, W.N. and Donaldson, E.M. : In *Fish Physiology*, ed. Academic Press, New York. **1**, 80(1973)
7. Forrest, J.C., Aberle, E.D., Hendrick, H.B., Judge, M. D. and Merkel, R. A. : In *Principles of meat science*, Freeman, Sanfrancisco, California, 27(1975)
8. Ashgar, A. and Pearson, A.M. : In *Advances in Food Research*, **26**, 54(1975)
9. Yang, R., Oh, D.W., Shin, W.C. and Lee, Y.K. : Studies on the functional properties of meat for meat product. *Yonsei, Engineering Report*, **14**, 99(1982)
10. Yang, R. : A study on the comparison of conversion rate of chemical energy in muscle. *J. Engineering research institute, Yonsei university*, **17**, 147(1985)
11. Shin, W.C., Song, J.C., Hong, S.P. and Yang, R. : Study on the temperature adaptation of contractile proteins from fish species, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**, 371(1988)
12. Connel, J.J. : The relative stabilities of the skeletal muscle myosins of some animals. *Biochem. J.*, **80**, 503(1969)
13. Connel, J.J. : In *Proteins as a Human Food*(Sawrie, R. A., ed.), Butter-worths, London, 207(1969)
14. Johnston, I.A., Walesby, N.J., Davison, W., Goldspink, G. : Temperature adaptation in myosin of antactic fish. *Nature*, **254**, 74(1974)
15. Low, P.S., Bada, J.L., Somero, G.N. : Temperature adaptation of enzymes. *Proc. Natu. Acad. Sci. U.S. A.*, 70(1973)
16. Green, F.C. and Feeny, R.E. : Properties of muscle glyceraldehyde-5-phosphatedehydrogenase from the cold antactic fish, *Dissostichus Mawsoni.*, *Biochem. Biophys. Acta.*, **220**, 430(1970)
17. Laidler, K.J. : In *Reaction kinetics*, Pergamon Press, New York, **2**, 46(1966)
18. 우전도웅 : 해양어장학, 향성사 후생각, 동경 (1960)
19. Szent-Gyorgyi, A. : In *The chemistry of muscular contraction* 1st rev. Academic Press, New York, 1(1947)
20. Connel, J.J. : Studies on the properties of fish skeletal muscle. *Biochem. J.*, **75**, 530(1966)
21. Hashimoto, A., Arai, K. : Thermostability of Ca-activated myofibrillar ATPase of Epipelagic and

- Mesopelagic fish species. *Bull. Japan Soc. Fish.*, **44**, 1389(1978)
22. 박현주 : procine myofibrillar protein 에 대한 비교 생화학적 연구, 연세대 석사학위 논문(1985)
23. Yasui, T., Ishioroshi, M. : *Kagaku to seibutsu*, **19**(5), 337(1981)  

---

(1988년 9월 8일 접수)