

해산어의 부분동결에 의한 Ca^{2+} -, Mg^{2+} - dependent Adenosine Triphosphatase 활성 및 근섬유의 미세구조 변화

II. 저온저장에 의한 방어 Actomyosin ATPase의 활성변화

박찬성 · 최경호*

대구한의과대학 식품과학과

*효성여자대학교 식품영양학과

Changes in the Ca^{2+} -, Mg^{2+} - dependent Adenosine Triphosphatase Activity and Ultrastructure of Marine Fishes by Partial Freezing

II. Changes in ATPase Activity of Yellowtail Actomyosin during Cold Storage

Chan-Sung Park and Kyoung-Ho Choi*

Dept. of Food Science, Taegu Oriental Medical College, Kyungsan, 713-715, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Hyosung Women's University, Hayang, 713-702, Korea

Abstract

Actomyosins prepared from Yellowtail fish (*Seriola quinqueradiata*) were stored at 0°C (ice-cooling), -3.5°C (partial freezing) and -20°C (freezing). Another actomyosin samples were prepared from the fish previously stored at the temperatures for a week as the maximum. Remaining activity of Ca^{2+} - and Mg^{2+} - dependent adenosine triphosphatase (ATPase) activity was measured from the actomyosin preparations. Specific activity of Mg^{2+} - ATPase of actomyosin before storage was 0.253 μ mole Pi/min/mg of protein and it was 1.5 times higher than that of Ca^{2+} - ATPase. The enzyme activities were markedly decreased during early period of storage. However, no significant differences in the enzyme activity were revealed among the samples stored at different temperatures. The enzyme of actomyosin prepared from the fish previously stored at the temperatures for a week revealed an activity of 2~3 times higher than that of freezing. Apparent denaturation constant of Mg^{2+} - ATPase of actomyosin was between 0.810~1.139 per day and it was about 1.5 times higher than that of Ca^{2+} - ATPase. But the constant of Mg^{2+} - ATPase of actomyosin extracted from the fish stored for a week at each temperature was between 0.176~0.356 per day. This constant was 4 times higher than that of Ca^{2+} - ATPase in frozen stored fish. It was presumed from these results that denaturation of ATPase is largely accorded to the structural changes of actomyosin.

서 론

근간에 식품저장의 한 방법으로 $-1\sim-5^{\circ}\text{C}$ 의 온도를 이용하는 부분동결(partial freezing, 이하 PF라 약함) 저장법이 개발되어 실용화되고 있다. PF저장법은 빙장에 비하여 세균증식^{1,2)}과 생화학적변화가 억제³⁾되고 동결저장에 비하여는 근조직의 손상이 적고^{4,5)} 해동조작이 필요없이 즉시 이용⁶⁾할 수 있어 생선의 저장법으로 특히 중요시되고 있다.

한편, 저장종료후 생선의 선도는 저장기간중에 일어나는 생선근육의 이화학적변화에 기인하는 것으로서 저장기간중 근육단백질의 구성요소인 actin^{7,8)}, myosin⁹⁻¹¹⁾ 및 복합체인 actomyosin^{12,13)}의 구조에 변화가 일어날뿐 아니라 근육중 효소계에도 상당한 변화가 야기되는 것^{14,15)}으로 보고되고 있는바, 본 연구에서는 저장온도에 따른 효소계의 변화를 이해하기 위하여 actomyosin의 adenosine triphosphatase(ATPase)활성을 측정하고 저장온도별 변성속도정수를 판정하였다.

재료 및 방법

시료어

방어(*Seriola quinqueradiata*)는 체장 23~27cm, 체중 260~330g인 것을 부산 자갈치시장에서 활어상태로 구입하여 공시하였다.

저 장

시료를 2군으로 나누어 1군은 생선으로 일정기간 저장후 actomyosin을 추출하였고 다른 1군은 신선한 생선으로부터 추출한 actomyosin을 각 온도에서 일정기간 저장하였다. 저장은 빙장, 부분동결 및 동결저장으로 구분하였으며 시료를 얼음에 채워 4°C 의 냉장고에 보관한 것을 빙장으로하였고 부분동결에는 -3.5°C 의 대류식 저장고, 냉동에는 -20°C 의 냉동고를 이용하였다.

Actomyosin의 조제

高士¹⁶⁾의 방법에 따라 공시어의 등부위의 근육

10g을 채취하여 phosphate buffer(pH 7.5)로 1회 세척하여 homogenize한 후 원심분리하는 과정을 3회 반복하고 그 잔사를 3배의 KCl phosphate buffer(pH7.5) 40ml를 가하여 하루밤 방치한 후 원심분리하였으며 상정액을 3~4점의 가제로 여과하였다. 여액에 냉정한 증류수를 서서히 가하여 희석시킨 후 원심분리하여 얻은 침전을 0.6M KCl에 용해시켜 0.6M KCl-20mM tris-maleate buffer(pH 6.8)에 하루밤 투석(Sigma, 250-9U)한 후 원심분리하여 얻은 상정액을 효소실험용 actomyosin으로 하였다.

ATPase 활성측정

ATPase는 Goodno¹⁷⁾의 방법에 따라 Mg^{2+} -dependent(Mg^{2+} -)와 Ca^{2+} -dependent(Ca^{2+} -ATPase)로 구분하였으며 ATPase활성측정법은 전보¹⁸⁾와 동일하였다. ATPase의 변성속도정수(K_D)는 内山¹⁹⁾의 방법에 따라 다음 식으로 산출하였다.

$$K_D = \left(\ln \frac{C_{t_1}}{C_0} - \ln \frac{C_{t_2}}{C_0} \right) / (t_2 - t_1)$$

C_0 : 저장직전의 ATPase비활성

C_{t_1} : 저장시간 t_1 에서의 ATPase비활성

C_{t_2} : 저장시간 t_2 에서의 ATPase비활성

결과 및 고찰

ATPase 활성변화

Table 1은 조제한 actomyosin을 저장하였을때의 저장온도별 ATPase활성변화이다.

저장직전에는 Ca-ATPase가 0.171, Mg-ATPase가 $0.253\mu\text{mole Pi/min/mg protein}$ 으로 모두 높은 활성이었으며 Mg-ATPase의 활성이 Ca-ATPase의 150%에 상당하였다. 저장 1일째에는 Ca-ATPase가 0.078(-3.5°C), Mg-ATPase가 $0.086\mu\text{mole Pi/min/mg protein}$ 으로 급격히 감소하였는데 이는 Ca-ATPase는 저장하루사이에 약 50%, Mg-ATPase는 저장하루사이에 약 70%의 활성이 저하되

있음을 나타내고 있다. 저장 1일 이후에는 활성이 비교적 완만히 저하되었으며 $0^{\circ}C$ 와 $-3.5^{\circ}C$ 간에는 유의적인 차이가 인정되지 않았으나 $-20^{\circ}C$ 에서는 다른 저장온도에 비해 다소 낮은 활성을 나타내었다.

위의 결과는 actomyosin ATPase가 동결저장에 의해 빠르게 변성됨을 나타내는 것으로 Okada등²⁰⁾과 Ohnishi등²¹⁾도 비슷한 결과를 보고하였다. 그 원인에 관하여 Okada등²¹⁾은 동결저장에 의하여 actomyosin의 구조가 곧은 화살모양으로부터 점차 변형되어 20시간후에는 granule형태로 변형되어 효소활성이 저하된다고 보고하였으며 Ohnishi등²¹⁾도 전자현미경을 통하여 동결에 의한 actomyosin의 변형을 확인하고 이로 인한 actin과 myosin의 친화력의 감소가 ATPase 활성저하의 원인으로 분석하였다.

Table 2는 각 온도에서 3일 혹은 7일간 저장한 생선으로부터 조제한 actomyosin의 ATPase 활성 변화로서 Table 1의 경우보다 저장온도와 효소의 종류에 따른 차이가 현저하였다. Ca-ATPase는 빙장에서는 저장 3일만에 효소활성이 저장직전의 약 50%로 급격히 감소되었으며 이후 4일간은 완만히 저하되었으나 PF저장과 동결저장에서는 전 저장기간동안 활성의 저하가 완만하였다. 특히 동결저장에서는 저장 7일째에도 저장직전의 85% 이상의 활성이 유지되었다.

Mg-ATPase는 Ca-ATPase와는 달리 전 저장온도에서 저장초기의 3일간 활성이 현저히 저하되

었으나 이후로는 완만히 저하되는 경향이였다. 그러나 빙장의 경우는 타 저장법에 비하여 최초 3일간의 활성저하도 현저하였을 뿐만아니라 4일 이후로도 다른 저장구와는 달리 계속적인 활성저하를 나타내었다.

Table 1과 2의 결과를 저장온도에 따라 비교해보면 actomyosin을 미리 조제한 경우에서는 Ca-과 Mg-ATPase 모두 $-20^{\circ}C$ 에서 최저활성을 나타낸 반면에 생선으로 각 온도에 저장한 후 조제한 actomyosin은 역으로 $0^{\circ}C$ 에서 활성이 최저였으며 $-20^{\circ}C$ 에서는 최대활성을 나타내었다. 이 결과는 actomyosin의 조제시기에 따라 저장온도에 대한 감수성이 달라짐을 나타내는 것으로서 동결저장시 미리 조제한 시료의 ATPase 활성이 최저인 반면에 저장후 조제한 시료의 ATPase 활성이 최대인 점으로 미루어 저온에서 ATPase 활성이 유지되기 위하여는 actomyosin의 구조변화가 ATPase 활성저하의 주요원인으로 분석한 Okada등²⁰⁾의 보고와도 일치하고 있다.

한편, 빙장한 시료의 ATPase 활성이 전체적으로 낮은 것은 공시어인 방어등의 붉은살생선은 glycogen 함량이 높아서^{14, 19)} glycogen의 분해에 따라 lactate가 생성됨으로 인하여 pH가 저하된 것이 빠른 ATPase의 실패를 초래한 것으로 추측된다. 福田등²²⁾과 西村등²³⁾도 pH변화를 생선 근육단백질 변성의 주요 원인으로 보고하고 있으며 松本등²⁴⁾은 역으로 냉동시에는 당류가 근육단백질 변성의 억제효과가 있음을 보고하고 있다.

Table 1. Changes in ATPase activity of actomyosins during storage at different temperatures (μ mole Pi/min/mg protein)

Storage(days)	Ca-ATPase			Mg-ATPase		
	$0^{\circ}C$	$-3.5^{\circ}C$	$-20^{\circ}C$	$0^{\circ}C$	$-3.5^{\circ}C$	$-20^{\circ}C$
0	0.171 ^a	—	—	0.253 ^b	—	—
1	0.087 ^a	0.078 ^a	0.092 ^{ab}	0.081 ^a	0.086 ^{ab}	0.098 ^b
2	0.079 ^a	0.069 ^b	0.057 ^c	0.082 ^a	0.084 ^{ad}	0.050 ^c
3	0.070 ^a	0.081 ^b	0.061 ^{ac}	0.072 ^a	0.072 ^{ab}	0.044 ^c
5	0.070 ^a	0.069 ^a	0.053 ^b	0.071 ^a	0.061 ^a	0.043 ^c
7	0.052 ^a	0.059 ^a	0.048 ^a	0.055 ^a	0.048 ^a	0.037 ^b

a~d: Values with the different letter in each row are significantly different at the 5% level($p < .05$). Actomyosin preparations were stored at 0, -3.5 or $-20^{\circ}C$ as described in the materials and methods.

Table 2. Changes in ATPase activity of actomyosins prepared from the fish previously stored at different temperatures (μ mole Pi/min/mg protein)

Storage(days)	Ca-ATPase			Mg-ATPase		
	0°C	-3.5°C	-20°C	0°C	-3.5°C	-20°C
0	0.171 ^a	—	—	0.253 ^d	—	—
3	0.077 ^a	0.131 ^b	0.150 ^c	0.087 ^d	0.128 ^b	0.149 ^c
7	0.068 ^a	0.124 ^b	0.146 ^c	0.040 ^d	0.105 ^c	0.132 ^b

a~e : Values with the different letter in each row are significantly different at the 5% level($p < .05$).

ATPase잔존활성변화

조제한 actomyosin을 각 온도에 저장하였을때의 ATPase 잔존활성변화는 Fig. 1과 같다. 잔존활성은 초기활성의 상대치를 자연대수로 나타낸 것으로서 Ca-과 Mg-ATPase의 잔존활성은 비슷한 경향으로 감소되었으나 Mg-의 경우가 Ca-ATPase에 비하여 활성저하속도가 큰편이었다. 병장과 PF저장에서는 저장초기의 1일간, 동결저장에서는 저장초기의 2일간 ATPase잔존활성의 감소가 현저하였으나 그후부터 활성의 감소는 완만하였다. Okada 등²⁰⁾도 잉어의 actomyosin현탁액을 -5°C 에 저장했을때 저장하루사이에 ATPase활성은 저장직전의 30~50%로 저하되는 비

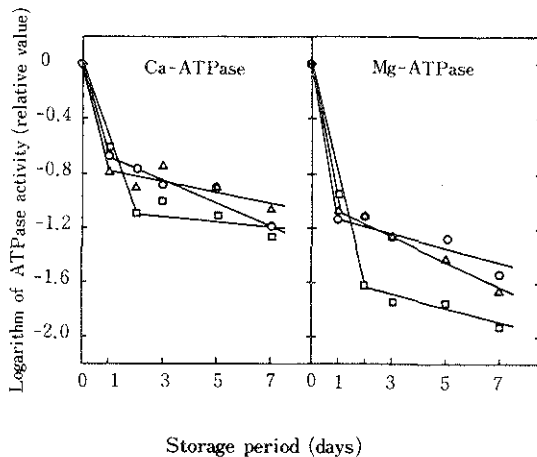


Fig. 1. Retention of ATPase activity of actomyosins by storage at different temperatures. Symbols are : 0°C (—○—), -3.5°C (—△—) and -20°C (—□—).

슷한 현상을 보고하고 있다. 이와같은 저장초기의 효소활성 저하현상은 염류의 농도에 크게 영향을 받으며 염류농도가 높을수록 비동결액량이 증가되어 단백질변성이 촉진되는 것으로 추측되고 있다.

Fig. 2는 방어를 각 온도에 3일 혹은 7일간 저장한 후 추출한 actomyosin의 잔존활성변화이다. PF저장 또는 동결저장한 생선의 actomyosin은 ATPase 잔존활성변화가 작았는데 특히 Ca-ATPase는 전 저장기간을 통해 큰변화를 나타내지 않았다. 병장한 생선의 actomyosin은 저장초기의 3일간 잔존활성의 변화가 컸으며 특히 Mg-AT-

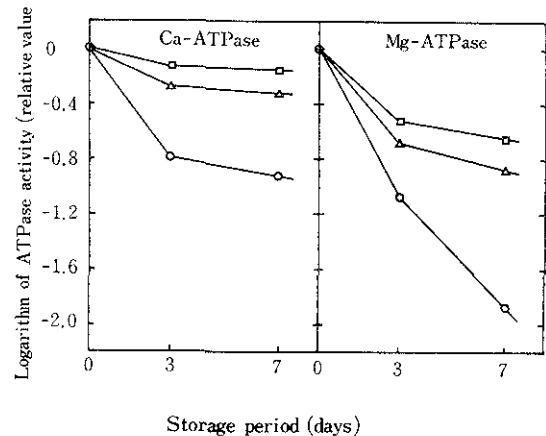


Fig. 2. Retention of ATPase activity of actomyosins extracted from the fish previously stored at different temperatures. Symbols are : 0°C (—○—), -3.5°C (—△—) and -20°C (—□—).

Pase는 Ca에 비해 잔존활성의 변화가 클뿐만 아니라 저장말기에도 잔존활성변화가 지속되었다.

Table 3은 조제한 actomyosin을 각 온도에 저장하였을때 ATPase의 변성속도정수를 Fig. 1로부터 계산한 결과로서 Ca-ATPase의 변성은 동결저장에서 0.550으로 가장 느렸으며 PF저장에서 0.785로 가장 빨랐다. Mg-ATPase의 경우에는 동결저장에서 0.810으로 가장 느렸으며 빙장에서는 1.139로 가장 빨라서 Ca-ATPase에 비해 현저히 높은 값을 나타내었다. Okada등²⁰⁾은 동일한 온도에 저장한 actomyosin의 Mg-ATPase변성이 Ca에 비해 빠른 것으로 보고하였으며 Watabe등²⁶⁾은 고등어의 흰살과 붉은살로부터 각각 조제한 ac-

tin과 myosin으로 actomyosin을 합성하였을때 Mg-ATPase활성은 흰살의 경우가 붉은살에 비해 6배나 높은값을 나타내었다고 보고한 점으로 미루어 시료의 채취부위에 따라 다소의 차이가 있을것으로 사료된다.

Table 4는 각온도에 3일 혹은 7일간 저장한 방어육으로부터 actomyosin을 조제하여 측정된 ATPase의 변성속도정수를 Fig. 2로부터 계산한 결과이다. Ca-ATPase의 변성속도정수는 빙장에서 0.266, PF저장에서 0.089, 동결저장에서 0.044로서 빙장에서의 변성은 PF저장에 비해 3배, 동결저장에 비해 6배나 빨랐다. 그러나 Mg-ATPase의 변성속도정수는 빙장에서 0.356, PF저장에서 0.227, 동결저장에서 0.176으로 빙장시의 변성은 동결저장시보다 2배정도 빠르게 진행되었다.

Table 3과 4의 결과를 비교해보면 생선으로 일정기간 저장후 조제한 actomyosin의 변성속도는 미리 actomyosin을 조제하여 저장한 경우에 비해 월등히 느렸으며 전보¹⁸⁾에서 조사한 myofibril의 경우에도 같은 경향을 나타내었던 점으로 미루어 생선의 상태로 저장하는 경우에는 생선육으로부터 추출한 단백질을 저장할때보다 변성이 억제되는것으로 사료된다.

Table 3. The apparent denaturation constants of ATPase of actomyosins by storage at different temperatures

Storage temp.	Ca-ATPase	Mg-ATPase
	K _D (day ⁻¹)	
0°C	0.675 (0~1 day)	1.139 (0~1 day)
-3.5°C	0.785 (0~1 day)	1.079 (0~1 day)
-20°C	0.550 (0~2 day)	0.810 (0~1 day)

*The values were calculated according to Uchiyama's method as described in the methods.

Table 4. The apparent denaturation constants of ATPase of actomyosins prepared from the fish previously stored at different temperatures

Storage temp.	Ca-ATPase	Mg-ATPase
	K _D (day ⁻¹)	
0°C	0.266 (0~3 day)	0.356 (0~3 day)
-3.5°C	0.089 (0~3 day)	0.227 (0~3 day)
-20°C	0.044 (0~3 day)	0.176 (0~3 day)

*The values were calculated by the same formula in Table 3.

요 약

방어로부터 조제한 actomyosin 현탁액을 0°C(빙장), -3.5°C(PF저장), -20°C(동결저장)에 저장하면서 Ca-과 Mg-ATPase활성을 조사하였으며 일부는 생선의 상태로 각온도에 일정기간 저장한 후 actomyosin을 조제하여 ATPase활성을 조사하였다.

저장직전의 Mg-ATPase 비활성은 0.253 μmole Pi/min/mg of protein Ca-ATPase에 비해 1.5배정도 높았다. Actomyosin의 저장중 ATPase 활성저하는 초기의 1일간 급격하였으며 이후는 완만하였다. ATPase활성은 빙장과 PF저장간에 큰 차이가 없었으나 동결저장에서는 타 저장온도에 비해 다소 낮았다. 생선을 각온도에 일정기간 저장한 후

조제한 actomyosin 역시 저장초기에 ATPase활성 저하의 폭이 컸으며 1주일간 PF저장 혹은 동결 저장했던 생선의 actomyosin은 Ca-과 Mg-AT-Pase가 병장에 비해 2~3배의 활성이 유지되고 있었다. Actomyosin의 Mg-ATPase 변성속도정수는 0.810~1.139로서 Ca-에 비해 1.5배정도 빨랐는데 생선을 각온도에 저장한 후 조제한 actomyosin은 0.176~0.356으로 동결저장에서 가장 큰 차이로서 Ca-에 비해 4배정도 빠르게 변성되었다.

문헌

- Ehira, S. and Fujii, T.: Changes in bacterial count for sardine during partially frozen storage. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 1419 (1980)
- 江平重男, 内山 均, 角田聖齊: Partial freezingによるマイワシの鮮度保持-貯藏中の生化学的鮮度と細菌學的鮮度-. *東海水研報*, **114**, 103(1984)
- Aleman, P. M., Kakuda, K. and Uchiyama, H.: Partial freezing as a means of keeping freshness of fish. *Bull. Tokai. Res. Lab.*, **106**, 11(1982)
- Lee, C. M. and Toledo, R. T.: Comparison of shelf life and quality of mullet stored at zero and subzero temperature. *J. Food. Sci.*, **49**, 317(1984)
- 小國盛稔, 猪上德雄, 大井嘉代子, 信濃清雄: コイミオシンB의 -8°C凍結および-8°C過冷却貯藏中の變性. *日本誌*, **53**, 789(1987)
- 伊達郁子, 角田聖齊, 内山 均: Partial freezingによる魚の鮮度保持. *家政學雜誌*, **35**, 839(1984)
- Connell, J. J.: Changes in actin of cod flesh during storage at -14°C. *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 515(1960)
- 北尾 藤, 關伸 夫, 新井健一: 魚類筋肉カラG-アクチンの抽出と重合能力について. *日本誌*, **39**, 1263(1973)
- Buttkus, H.: Accelerated denaturation of myosin in frozen solution. *J. Food Sci.*, **35**, 558 (1970)
- Connell, J. J.: Sedimentation and aggregation of cod myosin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **74**, 374(1963)
- Buttkus, H.: The sulfhydryl content of rabbit and trout myosins in relation to protein stability. *Can. J. Biochem.*, **49**, 97(1971)
- 松浦 基, 新井健一: 魚類ミオシンF ラメント形成能と生化学的活性に及ぼすpHの影響. *日本誌*, **52**, 1657(1986)
- Kanoh, S., Watabe, S. and Hashimoto, K.: ATPase activity of Requiem shark myosin. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 973(1985)
- 福田 裕, 柞木田善治, 新井健一: マサバの鮮度が筋原纖維タンパク質の冷凍變性に及ぼす影響. *日本誌*, **50**, 845(1984)
- 内山 均, 加藤 登, 工藤雄司, 新井健一: 魚類筋原纖維の生化学的研究. 各種魚類筋原纖維Ca²⁺-ATPaseの温度安定性の比較. *日本誌*, **44**, 491(1978)
- 高士令二, 新井健一, 齊藤恒行: 魚類筋肉構成たんぱく質に關する研究-II コイ筋肉からアクトミオシンの調製について. *日本誌*, **36**, 169(1970)
- Goodno, C. C., Wall, C. M. and Perry, S. V.: Kinetics and regulation of the myofibrillar adenosine triphosphate. *Biochem. J.*, **175**, 813 (1978)
- 최경호, 박찬성: 해산어의 부분동결에 의한 Ca²⁺-, Mg²⁺- dependent Adenosine Triphosphatase 활성 및 근섬유의 미세구조 변화 I. 저온저장에 의한 방어 근원섬유 단백질의 변성. *한국영양식량학회지*, **18**, 123(1989)
- 内山 均: 白身の魚と赤身の魚. *水産學シリーズ No. 13*(日本水産學會編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 78(1974)
- Okada, T., Inoue, N. and Akiba, M.: Electron microscopic observation and biochemical properties of carp myosin B during frozen storage. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 345(1986)
- Ohnishi, M., Tsuchiya, T. and Matsumoto, J.: Kinetic study on the denaturation mechanism of carp actomyosin during frozen storage. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **44**, 27(1987)
- 福田 裕, 掛端甲一, 新井健一: サバおよびスケトウタラおとし身中アクトミオシンの温度安定性の比較. *日本誌*, **43**, 717(1977)
- 西村公雄, 河村幸雄, 米澤大造: スジエビ(*palemon paucidens*)筋肉の冷凍貯藏中の變化について. *日本營養・食糧學會誌*, **40**, 123 (1987)
- 松本行司, 新井健一: 魚類筋原纖維タンパク質の熱變性と冷凍性に對する糖類の保護効果の比較. *日本誌*, **52**, 2033(1986)
- 岡田 猛, 太田冬雄, 猪上德雄, 秋場 稔: コイミオシンBの冷凍變性におよぼす KCl濃度および凍結貯藏温度の影響. *日本誌*, **51**, 18

- 87(1985) *chem.*, 87, 1491(1980)
26. Watabe, S. and Hashimoto, K. : Myosins from white and dark muscle of mackerel. *J. Bio-* (1990년 5월 16일 접수)