

멸치 육과 내장으로부터 분리한 Cathepsin L, Chymotrypsin 및 Trypsin의 단백질분해 특성

변재형 · 허민수* · 조득문** · 김형락***
부산수산대학교 식품영양학과 · *경상대학교 수산대학 식품과학과
동래여자전문대학 식품영양과 · *여수수산대학교 식품영양학과

Proteolytic Properties of Cathepsin L, Chymotrypsin, and Trypsin from the Muscle and Viscera of Anchovy, *Engraulis japonica*

Jae-Hyeung PYEUN, Min-Soo HEU*, Deuk-Moon CHO** and Hyeung-Rak KIM

Department of Nutrition and Food Science, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea

*Department of Food Science, Fisheries College, Gyeongsang National University,
Tongyong 650-160, Korea

**Department of Food and Nutrition, Tongnae Women's Junior College, Pusan 607-080, Korea

***Department of Food Science and Nutrition, Yosu National Fisheries University,
Yosu 550-749, Korea

Proteolytic properties of enzymes from the muscle and viscera of anchovy have been examined. Cathepsin L, chymotrypsin, and trypsin showed similar Km values for casein. However, they had higher Km values for myofibrillar proteins than those for casein. The k_{cat} of cathepsin L and chymotrypsin for myofibrillar proteins were higher than that of trypsin, and also cathepsin L and chymotrypsin caused higher hydrolysis in myofibrillar proteins of anchovy and yellowtail. In the presence of sodium chloride (0~25%), proteolytic activity for myofibrillar proteins from yellowtail was higher than that for casein. Proteolytic activity was decreased with the increase of sodium chloride concentration. Cathepsin L had been less affected by NaCl concentration and temperature on the hydrolysis of myofibrillar proteins than chymotrypsin and trypsin. Cathepsin L and chymotrypsin were more responsible to the autolysis of muscle proteins from fish than trypsin.

Key words : anchovy, autolysis, cathepsin L, chymotrypsin, trypsin

서 론

동물체가 보유하는 단백질분해효소는 근육과 장기 중에 분포하는 효소류로 대별되며, 이들 효소는 동물의 생존 중에는 생체 조직단백질의 변환에, 그리고 동물의 사후에는 사후변화에 직접적으로 개입하여 구성단백질의 분해를 초래하는 등의 중요한 작용을 한

다 (Barrett, 1977; Kirschke et al., 1980; Ueno et al., 1988a, 1988b). 이러한 단백질분해효소의 작용 중 어류의 사후변화에 관한 연구의 일환으로서 어류 중 사후변화가 비교적 빠른 멸치를 시료로 선정하여 내장에서 단백질분해능이 강한 chymotrypsin과 trypsin을, 그리고 근육에서는 cathepsin L을 각각 분리, 정제하여 그들의 효소학적인 특성을 보고하였다 (Heu et

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 수행된 연구의 일부임.

al., 1995a, 1995b).

어류의 장기에 분포하는 활성이 높은 단백질분해효소는 북부조지의 자가소화를 촉진시켜 부패의 주요한 원인으로 작용하며, 특히 trypsin에 의한 다른 효소의 활성화(activation)는 관련효소들에 의한 사후변화에 미치는 영향면에서 중요한 의미를 갖는다 (Martinez and Goldberg, 1988). 어류의 자가소화와 관련된 연구는 주로 어류의 내장중에 분포하는 chymotrypsin과 trypsin의 생화학적인 특성에 집중되어 있으며, 정제 효소들에 의한 근육단백질의 분해기구에 관한 연구는 미진한 상태이다.

최근의 연구에 따르면 염장 멸치 육의 가용화는 육중에 분포하는 내열성의 trypsin 유사효소에 의하며 (Ishida et al., 1994), 이 효소는 pH 7.4에서 최대활성을 가진다고 보고 하였다.

한편, 미이용 어패류나 수산가공부산물을 이용한 수산발효식품의 개발에 관한 관심이 고조됨으로서 어패류의 조직 중에 분포하는 단백질분해효소에 관한 연구에 많은 관심이 집중되고 있다. 자가소화 작용을 수산가공에 응용한 연구에는 수산발효식품이나 그 가공품에 관한 보고가 있으며, 멸치 젓갈 숙성 중의 단백질분해효소의 작용에 의한 단백질소 및 아미노산의 급격한 변동 (Song et al., 1982), 저식염 멸치 젓의 숙성중 미생물균체 산생 단백질분해효소에 의한 숙성기간의 단축 등에 관한 보고가 주목을 끈다 (Cha and Lee, 1989).

전보 (Pyeun et al., 1995; Heu et al., 1995a, 1995b)에서는 어류 중 사후변화가 비교적 빠른 멸치를 시료로 선정하여 사후변화에서 중요한 영향인자로 작용하는 자가소화 관련 효소를 근육과 내장으로부터 분리, 동정하여 이들의 생화학적인 특성에 대하여 보고하였다.

본 연구에서는 이들 정제효소의 어육 구조단백질에 대한 작용 경로를 전기영동적으로 추적함으로써 어류의 자가소화에 관여하는 단백질분해효소의 본질과 그 작용기구 및 수산발효식품의 가공에서 응용될 수 있는 영향인자에 관하여 구명코자 하였다.

재료 및 방법

멸치육 및 내장 cathepsin L, chymotrypsin 및 trypsin : Heu et al. (1995a, 1995b)의 방법에 따라 정제한 효소를 시료로 하였다.

단백질 농도 측정 : 효소 및 기질의 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry et al. (1951)의 방법으로 측정하였다.

근원섬유단백질의 조제 : 근원섬유단백질은 Jiang et al. (1990)의 방법을 개량하여 조제하였다. 즉, 잘 다진 멸치육과 방어육 25g에 각각 10배량의 25 mM KCl 및 4.5 mM EDTA를 함유하는 40 mM Tris-HCl (pH 7.0) 용액을 가하여 균질기로 2분간 균질화시킨 후, 원심분리 (600×g, 15분)하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻어진 잔사에 10배량의 100 mM KCl 및 4.5 mM EDTA를 함유하는 40 mM Tris-HCl (pH 7.0) 용액을 가하여 균질기로 1분간 균질화시킨 후 원심분리 (600×g, 15분)하였다. 이 잔사에 다시 10배량의 100 mM KCl 및 4.5 mM EDTA를 함유하는 40 mM Tris-HCl (pH 7.0) 용액으로 분산시킨 다음 네겹의 cheesecloth로 여과하고, 얻어진 여액을 원심분리 (600×g, 15분)하여 그 상층액을 취해서 근원섬유단백질을 얻었다.

효소활성 측정 : Anson (1938)의 방법에 따라 효소와 기질을 반응시켜 유리되는 tyrosine을 Lowry et al. (1951)의 방법으로 측정하였으며, 효소의 활성 단위는 단위 반응 시간 (분)당 효소량 (1ml)에 대하여 1 μmole의 tyrosine을 유리시키는 양을 1 Unit (U)로 나타내었다. 그리고 고유활성은 효소 1 mg에 대한 U로써 나타내었다.

단백질 기질에 대한 Kinetics : 단백질 기질에 대한 반응 속도정수 (Km)와 최대 반응속도 (Vmax)는 casein 및 근원섬유단백질을 기질로 하여 농도별로 활성을 측정한다. 다음, Lineweaver-Burk의 식 (Dixon and Webb, 1972)에 따라 구하였다. 활성의 측정은 각 효소용액과 0.01~0.40%의 농도별 casein 및 근원섬유단백질을 함유하는 100 mM NaCl · 20 mM Na-acetate (pH 6.0)를 반응혼액으로 하여 40°C에서 3시간 동안 반응시켜, 효소활성 측정방법에 따라 활성을 측정하

였다.

근원섬유단백질에 대한 효소의 작용 : 효소와 근원섬유단백질간의 반응은 각 효소와 근원섬유단백질의 비율을 1 : 200으로 하여 100 mM NaCl과 0.02% sodium azide를 함유하는 20 mM sodium acetate (pH 6.0) 용액 중에서, 20°C에서 0~180분간 반응시키면서 시간별로 반응혼액의 일정량을 취한 다음, 전기영동용 시료를 조제하고, 효소작용에 의한 분해정도를 SDS-PAG 전기영동법 (Laemmli, 1970)으로 분석하였다.

근원섬유단백질에 대한 효소의 작용은 단일효소 (cathepsin L, chymotrypsin, trypsin), 2종의 혼합효소 (cathepsin L+chymotrypsin, cathepsin L+trypsin, chymotrypsin+trypsin), 그리고 3종의 혼합효소 (cathepsin L+chymotrypsin+trypsin) 별로 반응시켜 분석 검토하였다. 즉, 각각의 효소 및 혼합효소와 근원섬유단백질의 비율을 1 : 200으로 하여 100 mM NaCl과 0.02% sodium azide를 함유하는 20 mM sodium acetate (pH 6.0) 용액 중에서, 20°C에서 0~180분간 반응시키면서 시간별로 반응혼액의 일정량을 취해 SDS화하여 전기영동용 시료를 조제하였다. 또한, 근원섬유단백질에 대한 각 효소와 혼합효소의 분해활성은 30°C에서 60분간 반응시킨 다음, 반응혼액 중에 유리된 tyrosine의 양을 측정하여 고유활성으로 나타내었다.

염화나트륨 농도의 영향 : Casein 및 근원섬유 단백질에 대하여 NaCl의 농도별로 활성을 측정한 다음, NaCl을 첨가하지 않은 효소의 활성을 대조로 하여 상대활성으로 나타내었다. 활성의 측정은 각 효소용액과 2% casein 또는 근원섬유 단백질을 함유하는 100 mM NaCl · 20 mM Na-acetate (pH 6.0) 기질용액에 대하여 NaCl의 최종농도가 0~25%의 범위 내에서 5% 간격으로 첨가하여 30°C에서 3시간 반응시켜 효소활성 측정방법에 따라 측정하였다. 그리고, 염을 첨가하지 않았을 때의 효소활성과 대조하여 상대활성으로 나타내었다.

염화나트륨과 온도의 영향 : 식염 존재 (0~25%) 하에서 각 효소와 근원섬유 단백질 기질의 반응혼액을 10°C, 20°C, 30°C 및 40°C에서 3시간 반응시킨 후 활성을 측정하였다. 그리고, 측정된 활성 값에 대하여 Di-

xon의 식 (Dixon and Webb, 1979)에 의해 NaCl 농도에 대한 최대 반응속도를 구하였으며, Arrhenius식으로부터 온도에 대한 활성화 에너지 (kcal/mole)를 구하였다.

결과 및 고찰

천연기질에 대한 반응속도

멸치 내장으로부터 정제한 chymotrypsin과 trypsin, 그리고 멸치 근육으로부터 정제한 cathepsin L의 casein과 근원섬유 단백질의 농도에 따른 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk 식으로 나타내면 Fig. 1과 같다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 세 효소의 casein 기질에 대한 Km 값은 유사한 값을 나타내었으나, 근원섬유단백질에 대한 Km 값은 cathepsin L에 비해 chymotrypsin과 trypsin이 낮게 나타났다.

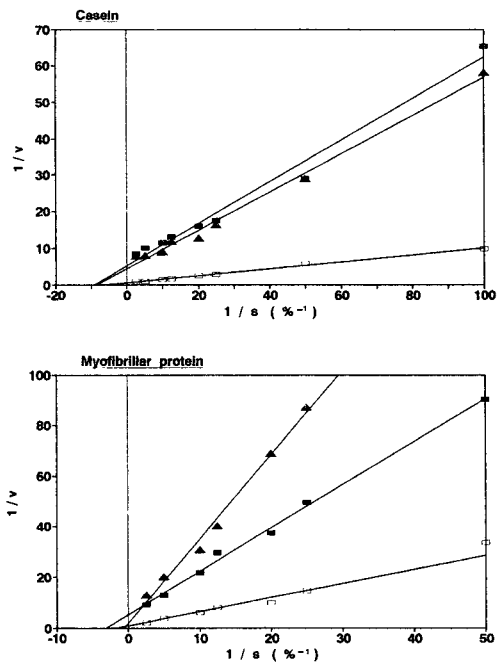


Fig. 1. Lineweaver-Burk plots for the hydrolysis of the natural substrates, casein and myofibrillar proteins by the cathepsin L(▲), chymotrypsin(□), and trypsin(■).

Table 1은 cathepsin L, chymotrypsin 및 trypsin의

Table 1. Kinetic parameters of the cathepsin L, chymotrypsin, and trypsin against natural protein substrates

Substrate	Enzyme	Km (%)	Vmax	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}/\%$)
Casein	Cathepsin L	0.12	0.23	5.93	49.45
	Chymotrypsin	0.16	1.74	45.20	282.75
	Trypsin	0.11	0.19	4.86	44.22
Myofibrillar protein	Cathepsin L	1.86	0.56	14.50	7.77
	Chymotrypsin	0.60	1.08	28.10	46.80
	Trypsin	0.32	0.19	4.86	15.20

단백질 기질에 대한 반응 속도정수를 나타낸 표이다. Cathepsin L의 Km 값은 casein과 근원섬유단백질에 대하여 각각 0.12%와 1.86%였으며, 최대 반응속도는 casein과 근원섬유단백질에 대하여 각각 0.23 U/mg과 0.56 U/mg이었다. 또한, 촉매효율은 각각 $49.45 \text{ min}^{-1}/\%$ 와 $7.77 \text{ min}^{-1}/\%$ 로서 기질에 대한 친화도는 casein에 대하여 높은 반면, 분해활성은 근원섬유단백질에 대하여 강한 것으로 나타났다. Chymotrypsin은 Km 값이 casein과 근원섬유단백질에 대하여 각각 0.16%와 0.60%였으며, 최대 반응속도는 casein과 근원섬유단백질에 대하여 각각 1.74 U/mg와 1.08 U/mg이었다. 또한 촉매효율은 각각 $282.75 \text{ min}^{-1}/\%$ 과 $46.80 \text{ min}^{-1}/\%$ 이었으며, 두 기질에 대한 친화도는 차이가 있었으나, 분해도는 차이가 없는 것으로 나타났다.

Trypsin의 Km 값은 casein과 근원섬유단백질에 대하여 각각 0.11%와 0.32%였으며, 최대 반응속도는 두 기질에 대하여 모두 0.19 U/mg이었다. 또한, 촉매효율은 각각 $44.22 \text{ min}^{-1}/\%$ 와 $15.20 \text{ min}^{-1}/\%$ 로 나타났으며, trypsin은 casein과 근원섬유단백질에 대하여 유사한 친화도와 분해활성을 지니고 있었다.

이상의 결과로, 세 효소의 기질에 대한 친화도는 근원섬유단백질보다는 casein에 대하여 높게 나타났으며, 이러한 결과는 casein기질 조제시에 열처리에 의하여 casein의 분자구조의 풀림에 의한 것으로 추정된다. Casein과 근원섬유단백질에 대한 최대 반응속도는 chymotrypsin이 가장 강하였으며, cathepsin L과 trypsin 순이었다. 근원섬유단백질에 대한 반응 속도 상수를 비교하면, Km 값은 cathepsin L과 chymotrypsin에 비해 trypsin이 낮은 반면에 최대 반응속도는 역으로 나타났다. 합성기질과 달리 단백질 기질의 분해는 효소와 기질간의 반응으로 생긴 1차 반응생성

물에 다시 효소가 작용하여 2차 생성물을 생성하게 되고, 이러한 생성물의 평균값이 효소의 활성 측정값에 반영됨으로써(Doke et al., 1980; Boneto et al., 1984) 반응속도 상수 Km과 Vmax는 효소의 실제 반응 속도상수와는 차이가 있다. 일반적으로 어육 조직 중에는 효소에 비해 기질인 근원섬유단백질이 과량으로 존재하기 때문에 어육의 자가소화시 Km 값은 크게 영향을 미치지 않고, 오히려 근원섬유단백질에 대한 최대반응속도에 의해 영향을 받을 것으로 판단된다. 따라서 멸치의 사후분해 또는 젓갈 제조시의 자가소화는 trypsin 보다는 chymotrypsin과 cathepsin L의 활성에 의해 지배될 것으로 추정된다.

효소에 의한 근원섬유단백질의 분해

멸치 육에서 추출한 근원섬유단백질에 각 효소를 작용시켜 시간별로 근원섬유단백질 구성 subunit의 분해과정을 전기영동적으로 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 멸치의 근원섬유단백질은 200 kDa의 myosin heavy chain (MHC), 120 kDa의 α -actinin (Atn), 45 kDa의 actin, 37 kDa의 troponin-T (Tn-T), 33 kDa의 tropomyosin (Tm), 15 kDa의 myosin light chain (MLC) 등이 SDS-PAG 전기영동상에서 판별되었다. Cathepsin L에 의해 멸치 근원섬유단백질은 반응 10분을 경과한 후, 200 kDa의 MHC가 현저히 분해되어 150 kDa, 130 kDa 및 100 kDa의 fragment가 생성되었으며, 45 kDa의 actin의 분해로 말미암아 37 kDa, 29 kDa 및 15 kDa의 fragment가 생성되었고, 37 kDa의 Tn-T도 다소 분해되었다. 반응 60분 후에는 대부분의 actin이 분해되었고, MHC와 actin의 분해에 의한 fragment의 생성율도 차츰 감소하였다. 반응 시간의 경과와 더불어 분해가 더욱 진행되어 180분 경

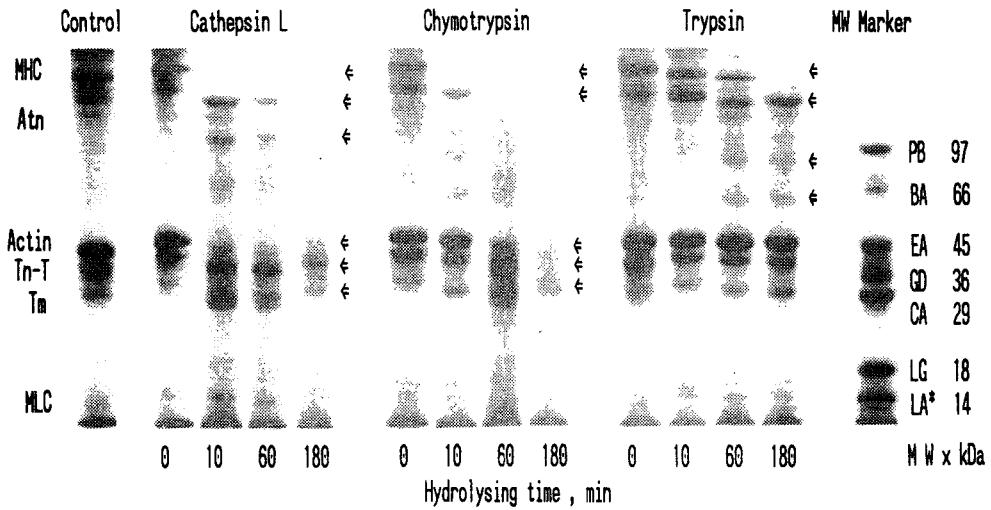


Fig. 2. Changes in SDS-PAGE of the anchovy myofibrillar protein during hydrolysis with the cathepsin L, chymotrypsin, and trypsin.

Hydrolysing condition:

Concentration of enzyme; 50 μ g/ml.

Concentration of myofibrillar protein; 10 mg/ml.

Used buffer; 20 mM sodium acetate, pH 6.0 containing 0.1 M NaCl and 1 mM sodium azide.

Incubation temperature; 20 $^{\circ}$ C

* Molecular weight standard markers: PB, phosphorylase B; BA, bovine albumin; EA, egg albumin; GD, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; CA, carbonic anhydrase; LG, β -lactoglobulin; LA, α -lactalbumin.

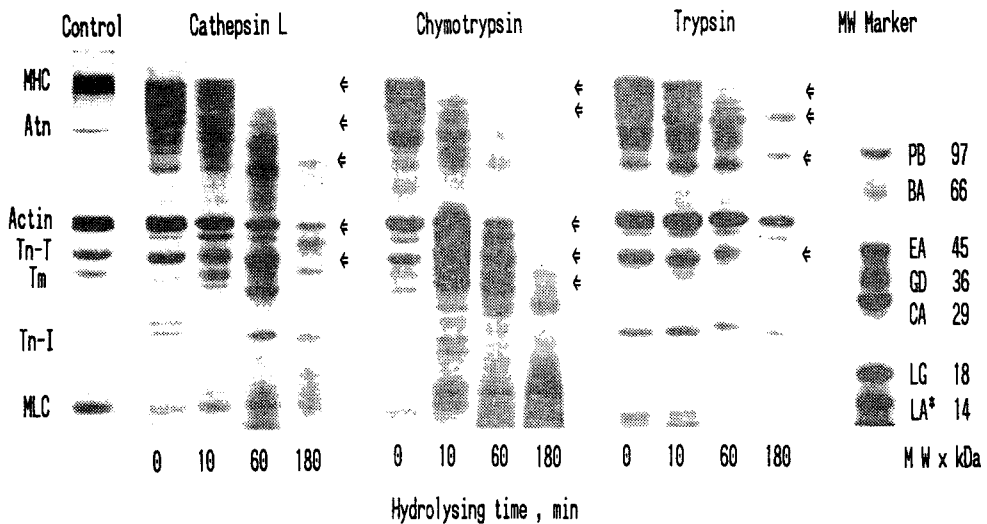


Fig. 3. Changes in SDS-PAGE of the yellowtail myofibrillar proteins during hydrolysis with the cathepsin L, chymotrypsin, and trypsin.

Hydrolysing condition: Refer to the footnote of Fig. 2.

* Molecular weight standard markers: The same as in the legend of Fig. 2.

과후에는 actin과 Tm은 완전히 분해되었으며, Tn-T는 분해로 생긴 150 kDa의 fragment와 Tn-T는 반응 180 미미한 분해를 보일 뿐이었다. 반응 초기에 MHC의 분 후에는 대부분이 분해된 결과 적은 양만이 잔류할

따름이었다.

Chymotrypsin의 작용에 의하여 반응 10분이 경과했을 때는 다른 단백질에 비해 MHC의 분해가 빨리 일어나서 150 kDa의 fragment가 현저하게 생성되었으며, 반응 60분 후에는 Atn과 150 kDa의 fragment 및 45 kDa의 actin이 분해되어 35 kDa과 29 kDa의 fragment가 증가하였고, Tn-T와 Tm도 점차적으로 분해되었다. 이후 반응 시간의 경과와 더불어 분해가 진행되어 반응 180분에는 근원섬유를 구성하는 거의 모든 subunit가 분해되었으며 근원섬유단백질의 분해양상은 cathepsin L에 의한 것과 유사하였다.

Trypsin의 작용에 의한 영향을 검토한 결과, 반응 후 10분이 경과했을 때는 MHC는 다른 효소에 비해 느리게 분해되어 150 kDa의 fragment가 형성되었으나, Atn, actin 및 Tn-T는 거의 분해되지 않았다. 반응 60분이 경과했을 때는 MHC의 분해가 진행될 뿐이었으며, 이후 반응 시간의 경과와 더불어 다른 subunit는 큰 변동이 없었으나, MHC만은 점차적으로 분해되었고, 동시에 80kDa와 60kDa의 fragment는 조금씩 증가하였다. MHC에서 유래한 150 kDa의 fragment는 반응 180분 후에도 완전히 분해되지 않았다.

한편, 멸치와 같은 혈합육어인 방어의 근원섬유단백질을 분리하여 이들 효소를 작용시킨 다음, 시간별로 근원섬유단백질 구성 subunit의 분해과정을 전기영동법으로 분석하고 (Fig. 3), 그 분해정도를 멸치 근원섬유단백질의 그것과 대비하여 검토하여 보았다. 전기영동 양상을 보면, 방어의 근원섬유단백질 (Fig. 3. control)은 200 kDa의 HMC, 112 kDa의 Atn, 48 kDa의 actin, 38 kDa의 Tn-T, 35 kDa의 Tm, 24 kDa의 Tn-I와 15 kDa의 MLC 등의 subunit로 이루어진 것이 판별되었다.

Cathepsin L을 10분간 작용시켰을 때는 200 kDa의 MHC가 현저히 분해되어 100~190 kDa에 해당하는 11개 정도의 fragment가 생성되었으며, 48 kDa의 actin도 다소 분해되어 46 kDa의 fragment가 증가하였고, Tn-T와 Tm도 다소 분해되기 시작하여 25~29 kDa의 fragment가 증가하였다 (Fig. 3. cathepsin L, 10분). 이후 반응 시간의 경과와 더불어 분해가 진행되어 180분 경과 후, actin과 Tn-T는 다소 분해가 일어났으며, 반응초기에 분해되어 생성된 MHC의 fragment (100 kDa)는 180분에서도 완전히 분해되지 않

았다 (Fig. 3. Cathepsin L, 60분 및 180분).

Chymotrypsin을 10분간 작용시킨 결과, 200 kDa의 MHC가 가장 빨리 분해되어 100~150 kDa의 fragment가 생성되었으며, actin, Tn-T 및 Tm의 분해도 다소 일어나기 시작하여 25~30 kDa의 fragment가 증가하였다. 반응 60분이 경과되었을 때는 MHC와 actin은 대부분 분해되었으며, Tn-T와 Tm도 상당히 분해가 일어나 18~25 kDa의 fragment가 증가하였다. 그리고 반응 180분 경과시의 Tm은 대부분 분해되었으며, 15 kDa이하의 fragment가 증가되었다 (Fig. 3. Chymotrypsin).

Trypsin을 10분간 작용시킴으로써 MHC의 분해로 말미암아 100~190 kDa에 해당하는 6개 정도의 fragment가 생겼으나, actin, Tn-T, Tn-I 및 MLC의 분해는 일어나지 않았다. 반응 60분에서는 Tn-T와 Tn-I의 분해가 다소 일어나기 시작하였으며, MLC는 대부분이 분해되었다. 반응 180분 후에는 MHC의 분해로 생긴 150 kDa의 fragment와 100 kDa의 fragment는 더 이상 분해되지 않았고, actin의 분해도 거의 일어나지 않았으나 Tn-T와 MLC는 완전히 분해되었다 (Fig. 3. Trypsin).

이상의 결과를 분석하면 멸치육과 방어육에서 추출한 근원섬유 단백질에 대한 각 효소들의 작용은 주로 MHC에 우선하였으며, 그 분해정도는 chymotrypsin이 다른 두 효소보다 강하게 나타났다. 반응시간 경과와 더불어 actin과 Tm은 chymotrypsin에 의해 서서히 분해되었으며 cathepsin L에 의해서도 다소 분해되었으나, chymotrypsin보다 분해정도는 약하였다. 그러나 trypsin에 의해 actin과 Tm은 거의 분해되지 않았다. 이러한 전기영동적인 단백질의 분해정도는 Table 1에 제시된 세 효소의 Vmax와 일치함을 알 수 있다. 어류의 자가소화 또는 수산발효식품의 제조시에 근육단백질의 가수분해는 조직중에 분포하는 거의 모든 단백질분해효소들의 복합적인 작용에 의하여 일어난다. 이러한 복합효소계에 의한 근원섬유단백질의 분해양상을 검토하기 위한 모델실험으로서 각 효소를 두 종류씩, 그리고 세 효소를 모두 혼합하여 방어의 근원섬유 단백질의 분해양상을 살펴보았다 (Fig. 4). Cathepsin L과 trypsin의 혼합효소를 작용시켰을 때, 반응 30분에서 MHC가 다소 분해되어 100~190 kDa의 fragment와 25 kDa의 fragment가 나타났으며, actin과

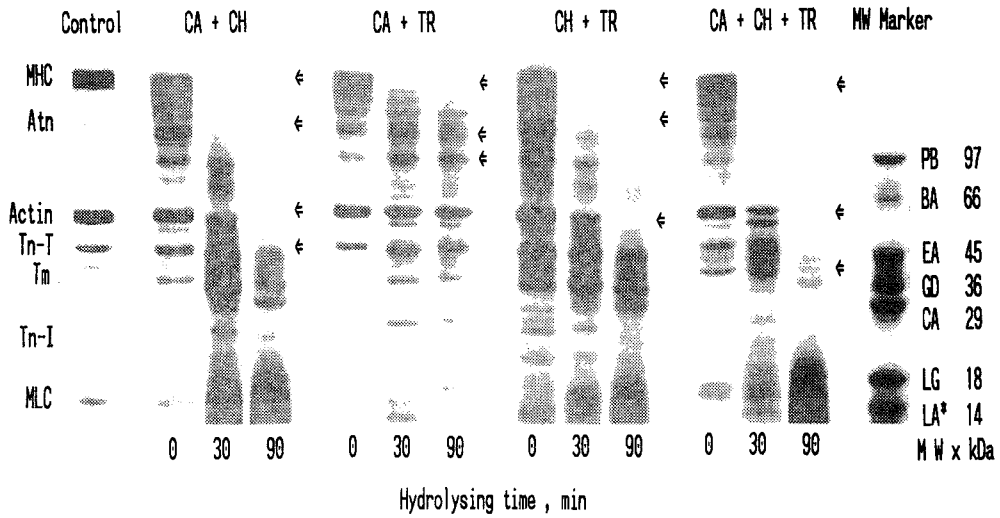


Fig. 4. Changes in SDS-PAGE of the yellowtail myofibrillar proteins during hydrolysis with mixed enzyme.

Hydrolysing condition: Refer to the footnote in Fig. 2.

Abbreviation used: CA, cathepsin L; CH, chymotrypsin; TR, trypsin.

* Molecular weight standard markers: The same as in the legend of Fig. 2.

Tm은 반응 90분까지도 거의 분해되지 않았다. 반응 90분에서 MHC는 대부분이 분해되었으나, 반응 초기에 나타난 150 kDa, 100 kDa 및 24 kDa의 fragment는 거의 분해되지 않았으며, 15 kDa의 fragment는 점차적으로 분해되었다.

Cathepsin L과 chymotrypsin의 혼합효소 또는 chymotrypsin과 trypsin의 혼합효소를 작용시켰을 때, 반응 30분에서 MHC의 분해가 두드러졌으며, 100 kDa의 fragment만이 미량 존재하였고, actin, Tn-T, Tm도 다소 분해되어 36~39 kDa의 fragment가 증가하였다.

반응 90분 후에는 actin은 거의 분해되었으며, Tm과 29 kDa의 fragment는 더 이상 분해되지 않았다.

세 효소 모두를 혼합한 효소를 작용시켰을 때, 반응 30분에서 MHC가 현저히 분해되었고, actin의 분해도 다소 나타나기 시작하여 43 kDa의 fragment를 생성하였다. Tn-T와 Tm의 분해도 인지되어 29~36 kDa의 fragment가 증가하였다. 반응 90분에서 MHC는 완전히 분해되었고, 15 kDa 가량의 fragment들이 상당히 증가하였으며, actin과 Tm도 거의 분해되었다. 그러나 29 kDa의 fragment만이 다소 분해되지 않은채 잔류하고 있었다.

Cathepsin L과 trypsin의 혼합효소는 chymotrypsin이 혼합된 효소계보다 단백질의 분해가 느리기 때문

에 어육의 근원섬유단백질의 분해는 chymotrypsin에 의해 주도적으로 일어남을 알 수 있다. 그리고 멸치의 자가소화 과정은 cathepsin L과 chymotrypsin이 각각 근육과 내장에서 주도적으로 영향을 미치는 것으로 판단할 수 있었다. 이들 각 효소와 혼합효소가 어육의 근원섬유단백질을 효과적으로 분해함으로써 이들 효소들이 멸치의 자가소화에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었으며, 효소를 혼합하여 작용시켰을 때는 각각 작용시켰을 때 보다 빨리 분해시키는 것으로 나타났다. 이는 단백질분해효소가 각기 분해한 polypeptide에 각각의 기질특이성에 따라 상호작용함으로써 나타난 결과인 것으로 추정된다. 따라서, 어육의 자가소화는 특정효소에 의해서라기 보다는 어체내에 존재하는 효소계의 상호작용을 받아 자가소화가 촉진되는 것으로 판단된다.

근원섬유단백질에 대한 효소의 기질 특이성과 pH 의존성이 효소간에 서로 다르기 때문에 근원섬유단백질을 포함한 세포내 단백질은 이들 단백질분해효소의 상호보완적인 작용에 의하여 분해가 촉진되며, 그 분해속도는 효소의 분포량과 조직 중에 존재하는 저해제에 의해서 조절된다 (Okitani et al., 1980). 그리고 육상 동물체 근육 중의 lysosome 분포 thiol계 효소는 MHC, Atn, actin, Tn-T, Tn-I 등을, 장기 중의 serine

계 효소는 MHC, Tm, Tn, actin 등을 주도적으로 분해한다는 보고 (Okitani et al., 1980; Matsukura et al., 1981)와는 달리, cathepsin L과 chymotrypsin이 근원섬유단백질 구성 subunit의 모두에 작용한 본 실험의 결과와 다소 차이를 보였으나, trypsin이 MHC와 Tm에 분해작용을 보인 결과와는 일치하였다.

구조단백질에 대한 효소의 활성

근원섬유단백질에 대한 각 효소와 혼합효소의 활성을 측정하여 그 공유활성을 비교 검토함으로써 구조단백질의 분해에 대한 효소 상호간의 작용을 알아보고자 하였다. 반응혼액 중에 단일 효소는 12 µg을 첨가하였으며, 2종의 혼합효소는 각각 6 µg씩을, 그리고 3종의 혼합효소는 각각 4 µg씩을 첨가하여 전체 반응혼액의 효소량을 12 µg로 조정하였다. 그리고 반응혼액 중의 효소와 근원섬유 단백질의 비를 1 : 200 (12 µg : 2400 µg)으로 하여 측정된 각 효소와 혼합효소의 활성을 고유활성으로 계산하여 Fig. 5에 나타내었다.

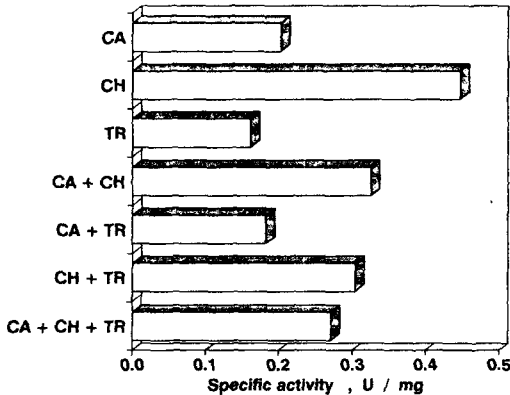


Fig. 5. Comparison of proteolytic activity of anchovy cathepsin L, chymotrypsin, trypsin, and the mixed enzymes of the three enzymes for yellowtail myofibrillar protein.

각각의 효소로는 chymotrypsin의 고유활성이 0.45 U/mg로서 cathepsin L (0.20 U/mg)과 trypsin (0.16 U/mg)보다 약 2~3배 강한 활성을 보였다. 효소 상호간의 작용을 알아보기 위하여, 각 효소의 고유활성 값을 2로 나누어 더한 값 (CA+CH, 0.33 U/mg; CA+TR, 0.18 U/mg; CH+TR, 0.30 U/mg)을 실제 측정된 2

중 혼합효소의 고유활성과 비교하면, cathepsin L과 chymotrypsin의 혼합효소는 그 고유활성이 0.35 U/mg으로 계산값 (0.33 U/mg)보다 약간 (6%)의 활성 증가를 보일 뿐이었으며, cathepsin L과 trypsin의 혼합효소는 0.27 U/mg으로 계산값 (0.18 U/mg)에 비하여 약 50%의 활성이 증가되는 상승효과가 있었다. 그러나 chymotrypsin과 trypsin의 혼합효소는 0.30 U/mg였으며, 계산값 (0.30 U/mg)과는 차이를 보이지 않았다. 그리고 cathepsin L, chymotrypsin 및 trypsin의 3중 혼합효소의 고유활성은 0.30 U/mg였으며, 각 효소의 고유활성 값을 3으로 나누어 더한 값 (0.27 U/mg)보다는 약 11% 정도의 활성증가를 보였다.

이상의 결과에서, cathepsin L과 chymotrypsin의 활성이 trypsin보다 강한 것은 단백질 기질에 대하여 방향족아미노산이나 소수성이 큰 아미노산의 carboxyl기 측 결합을 절단하는 성질을 갖는 cathepsin L과 chymotrypsin이 염기성 아미노산의 carboxyl기 측 결합을 절단하는 성질을 갖는 trypsin보다 상대적으로 많은 양의 tyrosine을 유리시키기 때문인데, 이는 Anson (1938)의 방법에 따라 측정된 천연기질에 대한 효소 활성이 유리되는 tyrosine 양으로 효소의 활성단위 (Unit)를 나타내는데 기인하는 것으로 추정된다. Cathepsin L과 trypsin의 혼합효소는 50% 정도의 활성 상승효과를 보였는데, 이는 이들 효소의 천연기질에 대한 기질특이성이 서로 다른 것과 cathepsin L의 기질 특이성이 광범위하여 효소간의 상호보완 작용에 의한 결과로 생각된다.

염화나트륨 농도의 영향

수산발효식품의 가공에 있어서 식염은 가공중의 정균작용 뿐만 아니라 제품의 질에 중요한 영향을 미치므로 NaCl에 의한 각 효소활성의 영향을 측정함으로써 이들 자가소화 관여 단백질분해효소의 작용에 대하여 검토하였다. 각 효소가 근원섬유단백질의 분해에 미치는 NaCl의 영향을 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. 또한, casein에 대하여도 같은 조건에서 활성을 측정하여 효소활성의 비교자료로 제시하였다. 효소를 casein 기질에 작용시켰을 때는 NaCl 5% 첨가로 활성은 현저히 감소하여 cathepsin L과 trypsin은 약 67%의 활성을 나타내었으며, chymotrypsin은 48%의 활

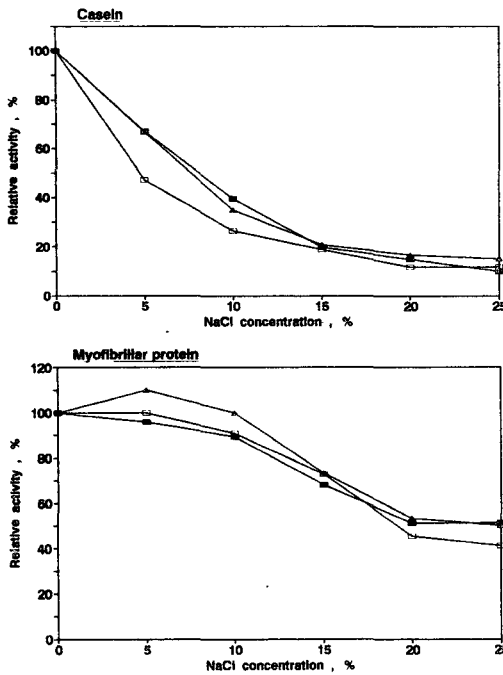


Fig. 6 Effect of NaCl concentration of the hydrolysis of natural substrates by the cathepsin L(▲), chymotrypsin(□), and trypsin(■).

성을 나타내었다. 그리고, 세 효소 모두는 15~25%의 NaCl 첨가로 불과 20% 내외의 활성을 보일 뿐이었다. 근원섬유단백질에 대하여는 NaCl 5% 첨가로서 cathepsin L은 약 10%의 활성 증가를 보였으나, chymotrypsin과 trypsin은 활성의 변화를 보이지 않았으며, 세 효소 모두가 10%의 첨가까지 90% 이상의 활성을 유지하였다. 그러나 그 이상의 염 농도의 증가에 따라 활성은 감소하였으며, 25%의 첨가로 세 효소는 약 50%의 활성을 보였다.

NaCl 첨가에 의한 각 효소의 단백질 기질에 대한 분해능의 차이는 기질 단백질의 구조와 기질에 대한 친화성에 그 원인이 있겠지만, casein기질이 열변성의 과정을 거쳐 조제됨으로써 느슨해진 단백질 구조내의 SH기 및 OH기 등의 음하전을 띠는 이온과 Na⁺ 이온이 결합하여 효소의 작용을 방해하기 때문인 것으로 추정되며 (Brown and Smith, 1990), 변성이 되지 않은 상태로서 기질로 이용된 근원섬유단백질은 안정된 구조를 유지함으로써 염농도에 의한 영향을 덜 받는 것이라 추정된다. 또한, 염농도의 증가에 따른 효소의 활성감소는 반응혼액 중의 이온강도의 증가로 효소와

기질의 구조적 변화에 의해 불활성화를 초래하기 때문이며 (Dixon and Webb, 1979), 고염 농도하에서의 잔류활성으로 인해 이들 단백질분해효소가 어체의 구조 단백질의 분해에 결정적인 영향인자임을 추정할 수 있다.

수산발효식품 중 젓갈은 일반적으로 20% 이상의 식염을 첨가하여 제조하는데, 이 정도의 식염농도에서는 미생물의 생육이 거의 억제되는 것으로 알려져 있다 (Pelczar and Chan, 1981). 따라서, 젓갈의 숙성은 미생물에 의한 작용보다는 어체 중에 분포하는 단백질분해효소의 작용에 의하여 구조단백질의 분해가 일어남으로서 진행됨을 뒷받침하고 있다. 그 이유로서 젓갈 제조시 첨가되는 20% 정도의 식염일지라도 실제로 어육 단백질내에 침투되는 식염의 양은 이보다 훨씬 낮은 것으로 예상되며, 보다 낮은 염농도하에서의 단백질분해효소 활성은 20% 정도에서의 활성보다 월등히 높다. 미생물에 의한 생육을 최대한 억제시키는 저염농도 조건에서 수산발효식품을 숙성함으로써 효소활성을 최대로 활용한 저식염의 수산발효식품을 숙성으로 제조할 수 있을 것으로 생각된다.

염화나트륨과 온도의 영향

수산발효식품의 숙성온도와 자가소화 관여 단백질분해효소의 활성에 관련한 자료를 얻고자 식염 존재하에서 근원섬유단백질의 분해에 미치는 온도의 영향을 검토하였다. 식염의 농도 (0~25%)에 따라 효소의 활성을 10°C, 20°C, 30°C 및 40°C에서 측정하여 Dixon 식으로 나타내면 Fig. 7과 같다. Dixon 식에서 구한 각 온도에서의 최대 반응속도는 cathepsin L이 10°C에서 0.19 U/mg, 20°C에서 0.43 U/mg, 30°C에서 0.62 U/mg, 그리고 40°C에서 1.06 U/mg였으며, chymotrypsin은 각각 0.52 U/mg, 0.70 U/mg, 1.41 U/mg, 그리고 2.43 U/mg이었고, trypsin은 0.22 U/mg, 0.12 U/mg, 0.14 U/mg, 그리고 0.26 U/mg이었다. 따라서, 세 효소는 온도의 상승과 더불어 활성도 증가하는 경향을 보였으며, 모든 온도대에서 NaCl 농도의 증가에 의하여 활성은 감소하였다. Dixon 식에서 나타난 각 온도별 활성의 변화는 cathepsin L과 chymotrypsin은 비교적 규칙적으로 변화하여 온도의 변화에 대하여 안정하였으나, trypsin은 10°C와 20°C에서 활성이 현저하게 감소하므로써 온도에 대하여 민감하게 반응함을 보였다.

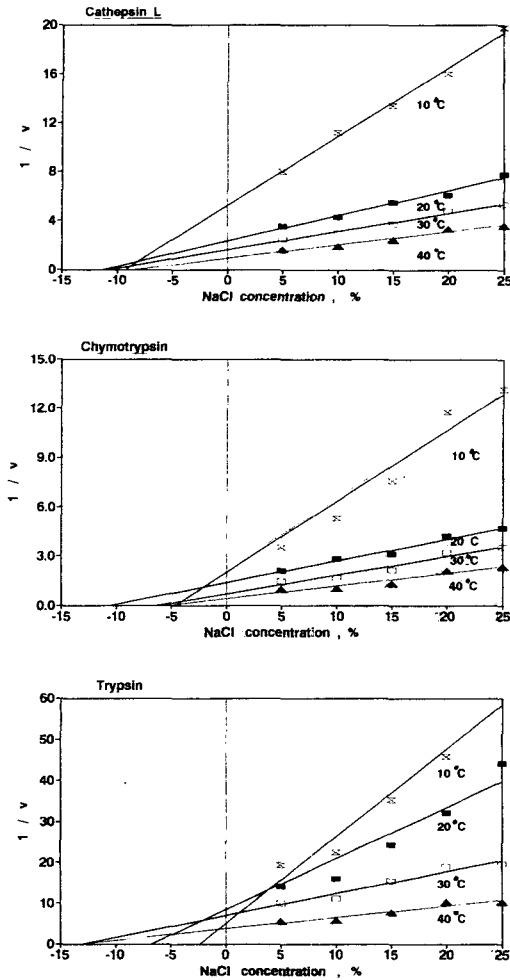


Fig. 7. Dixon plots for NaCl concentration and temperature on the hydrolysis of the myofibrillar proteins by the cathepsin L, chymotrypsin, and trypsin.

V_{max} value(U/mg):

Cathepsin L; 0.19 at 10°C, 0.43 at 20°C, 0.62 at 30°C, and 1.96 at 40°C.
 Chymotrypsin; 0.52 at 10°C, 0.70 at 20°C, 1.14 at 30°C, and 2.43 at 40°C.
 Trypsin; 0.22 at 10°C, 0.12 at 20°C, 0.14 at 30°C, and 0.26 at 40°C

한편, NaCl의 첨가에 의한 각 온도 (10~40°C)에서의 활성을 측정하여 Arrhenius 식으로 구한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. Arrhenius 식으로 구한 활성화 에너지는 NaCl을 첨가하지 않았을 때 Cathepsin L이 8.88 kcal/mole, chymotrypsin은 6.85 kcal/mole, 그리고 trypsin은 7.17 kcal/mole이었으며, 20%의 식염을 첨가

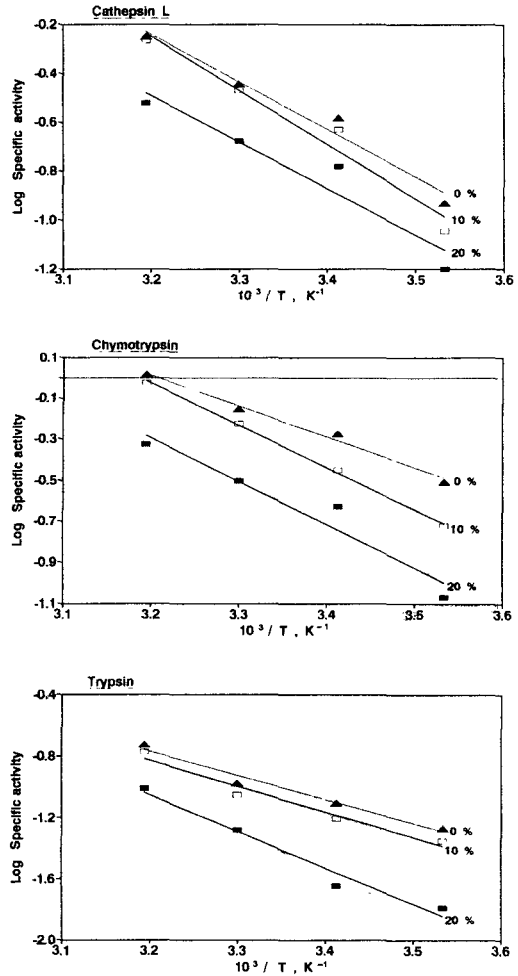


Fig. 8. Arrhenius plots for effect of NaCl concentration of the hydrolysis of the myofibrillar protein by the cathepsin L, chymotrypsin, and trypsin.

Activation energy(kcal/mol):

Cathepsin L; 8.88 at 0%, 10.31 at 10%, and 8.70 at 20%.
 Chymotrypsin; 6.85 at 0%, 9.40 at 10%, and 9.59 at 20%.
 Trypsin; 7.17 at 0%, 7.63 at 10%, and 10.87 at 20%.

했을 때는 cathepsin L이 8.70 kcal/mole, chymotrypsin은 9.59 kcal/mole, 그리고 trypsin은 10.87 kcal/mole이었다. Cathepsin L은 NaCl의 첨가로 인한 활성화 에너지의 변화는 보이지 않아 염에 의한 효소분자의 구조는 변하지 않은 것으로 추정되지만, 근원섬유단백질을 분해하는 효소의 활성은 감소하였다. Chymo-

trypsin과 trypsin은 염의 첨가에 의하여 활성화 에너지가 증가함으로써 효소와 기질의 반응에 보다 많은 에너지가 필요함을 알 수 있었다.

효소의 작용에 의한 구조단백질의 분해에 미치는 NaCl의 첨가와 온도의 영향은 cathepsin L이 영향을 적게 받은 반면, chymotrypsin과 trypsin은 영향을 많이 받는 것으로 나타났다. 이상의 결과에 의하면 근육단백질을 분해시키는 효소의 작용은 chymotrypsin이 가장 컸으며, 그 다음으로 cathepsin L, 그리고 trypsin의 순이었다. 식염의 첨가와 온도에 의하여 각 효소가 받는 영향에는 차이를 보였으나, 자가소화 및 수산발효식품의 가공 중의 근육단백질의 분해에 이들 효소들이 주된 작용을 하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 수산발효식품의 가공에 응용한다면, 미생물의 생육을 최대한 억제하는 염농도 조건에서 숙성 온도와 숙성기간의 조절로 다양한 제품의 생산도가 가능할 것으로 생각된다.

요 약

어류의 사후 초기의 변화를 육 및 장기조직중에 분포하는 단백질분해효소의 작용과 관련하여 검토할 목적으로 멸치의 육 및 장기에서 분리한 cathepsin L과 chymotrypsin 및 trypsin의 단백질 기질에 대한 특성과 근원섬유단백질에 대한 분해능을 전기영동적으로 분석하여 다음의 결론을 얻었다.

이들 세 효소의 casein에 대한 친화도는 유사하였고, 근원섬유단백질에 대한 친화도는 casein에 대한 친화도보다 높았다. 멸치와 방어의 근원섬유단백질에 대한 cathepsin L과 chymotrypsin의 활성은 trypsin보다 훨씬 높게 나타났다. 0~25%까지의 식염농도에서 세 효소의 단백질분해활성은 식염의 농도에 반비례하였으며, 식염의 공존상태에서 세 효소는 casein 보다 근원섬유단백질에 대하여 높은 활성을 나타내었다. 근원섬유단백질의 효소 분해시에 cathepsin L은 chymotrypsin과 trypsin에 비하여 염농도와 온도에 의한 영향이 적었다. 따라서, 멸치의 사후변화와 젓갈 숙성 중의 자가소화는 trypsin보다는 cathepsin L과 chymotrypsin의 단백질분해활성이 더욱 깊이 관여할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Physiol.*, 22, 79~89.
- Barrett, A. J. 1977. Proteinases of mammalian cell and tissues. North Holland Publ., pp. 181~208.
- Boneto, M. J., A. Manjon, F. Llorca and J. L. Iborra. 1984. Acid proteinase activity in fish-II. Purification and characterization of cathepsin B and D from *Mujil auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B, 207~213.
- Brown, D. H. and W. E. Smith. 1990. The impact of metal ion chemistry on our understanding of enzymes. In *Enzyme Chemistry*, 2nd ed., Chapman and Hall, London, pp. 227~243.
- Cha, Y. J. and E. H. Lee. 1989. Studies on the processing of rapid fermented anchovy prepared with low salt contents by adapted microorganism. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 22, 363~369 (in Korean).
- Dixon, M. and E. C. Webb. 1979. *Enzymes*, 3rd ed., Longman, London, pp. 47~62, 138~140, 164~169.
- Doke, S. N., V. Ninjoor and G. B. Nadkarni. 1980. Characterization of cathepsin D from the skeletal muscle of fresh water fish, *Tilapia mossambica*. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1521~1528.
- Heu, M. S., H. R. Kim and J. H. Pyeun. 1995a. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, In press.
- Heu, M. S., H. R. Kim and J. H. Pyeun. 1995b. Purification and characterization of cathepsin L from the muscle of anchovy. *Comp. Biochem. Physiol.*, Submitted.
- Ishida, M., S. Niizeki and F. Nagayama. 1994. Thermostable proteinase in salted anchovy muscle. *J. Food Sci.*, 59, 781~785.
- Jiang, S. T., C. Y. Tsao, Y. T. Wang and C. S. Chen. 1990. Purification and characterization of pro-

- tease from milkfish muscle (*Chanos chanos*). J. Agric. Food Chem., 38, 1458~1463.
- Kirschke, H., J. Langner, S. Riemann, B. Wiederanders, S. Ansorge, and P. Bohley. 1980. Protein degradation in health and disease. Excerpta Medica., Amsterdam, pp. 15~35.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T₄. Nature, 227, 680~686.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265~275.
- Martinez, A. and A. Gildberg. 1988. Autolytic degradation of belly tissue in anchovy (*Engraulis encrasicolus*). Inter. J. Food Sci. Tech., 23, 185~194.
- Matsukura, U., A. Okitani, T. Nishimuro and H. Kato. 1981. Mode of degradation of myofibrillar proteins by an endogenous protease, cathepsin L. Biochim. Biophys. Acta, 662, 41~47.
- Okitani, A., U. Matsukura, H. Kato and M. Fujimaki. 1980. Purification and some properties of a myofibrillar protein-degrading protease, cathepsin L, from rabbit skeletal muscle. J. Biochem., 87, 1133~1143.
- Pelczar, M. J. and E. C. S. Chan. 1981. Elements of microbiology. McGraw-Hill Book Co., New York, pp. 323~324.
- Pyeun, J. H., M. S. Heu, D. S. Lee and D. S. Kim. 1995. Proteolytic enzymes participating in post-mortem autolysis of fish. Abstracts in 1995 spring joint meeting of Korean Societies on Fisheries Science, 271~275 (in Korean).
- Song, Y. O., D. S. Byeun and J. H. Pyeun. 1982. Lipid oxidation and proteolysis of anchovy pickle during ripening. Korean J. Nutr. Food, 11, 1~6 (in Korean).
- Ueno, R., K. Sakanaka, S. Ikeda and Y. Horoguchi. 1988a. Purification of pepstatin insensitive protease from mackerel white muscle. Nippon Suisan gakkaiishi, 54, 691~697 (in Japanese).
- Ueno, R., S. Ikeda, K. Sakanaka and Y. Horoguchi. 1988b. Characterization of pepstatin insensitive protease in mackerel white muscle. Nippon Suisan gakkaiishi, 54, 699~707 (in Japanese).

1995년 6월 29일 접수

1995년 9월 7일 수리