

어류의 사후 변화에 관여하는 단백질분해효소의 검색

변재형 · 이동수 · 김두상 · 허민수*

부산수산대학교 식품생명과학과 · 경상대학교 수산대학 식품과학과

Activity Screening of the Proteolytic Enzymes Responsible for Post-mortem Degradation of Fish Tissues

Jae-Hyeung PYEUN, Dong-Soo LEE, Doo-Sang KIM and Min-Soo HEU*

Department of Food and Life Science, National Fisheries University of Pusan,

Pusan 608-737, Korea

*Department of Food Science, Fisheries College, Gyeongsang National University,

Tongyong 650-160, Korea

Proteolytic enzymes responsible for post-mortem degradation of the fish tissues have been studied in regard with screening the proteases distributed in the fish body by reacting with the specific synthesized substrates. Activities of cathepsin L, B, H, G, and D like enzymes were detected in the muscle crude protease from the both kind of fish, dark fleshed fish (anchovy, *Engraulis japonica*, and gizzard-shad, *Clupanodo punctatus*) and white fleshed fish (seabass, *Lateolabrax japonicus*, and sole, *Pleuronichthys cornutus*), however, those of chymotrypsin, trypsin, pepsin, and peptidase like enzymes were observed in the viscera crude protease from the fish. Proteolytic activities of the muscle crude protease at pH 6.0 were similar to those of the viscera crude protease at pH 8.0, but, those of the viscera crude protease at pH 8.0 were about 2 times higher than those at pH 6.0. The muscle and viscera crude protease from anchovy showed the strongest proteolytic activity among the four fish crude proteases and the proteolytic activity of the viscera crude protease was approximately 100 times higher than that of the muscle crude protease, which suggest that viscera proteases were more contributed on the development of post-mortem changes than muscle proteases. With the degradation patterns on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis against yellowtail myofibrillar proteins, the muscle and viscera crude protease of the four fishes were primary responsible for the degradation of myosin heavy chain, and myosin light chain and actin, respectively.

Key words : proteolytic enzymes, activity screening, dark fleshed fish, white fleshed fish, post-mortem degradation

서 론

어류의 사후에 일어나는 체단백질의 분해는 육과 장기에 분포하는 단백질분해효소들이 직접적으로 개입하여 사후 변화를 주도하는 원인으로 작용하게 된다 (Barrett, 1977, 1980; Sherekar et al., 1988; Kirschke et al., 1980; Ueno et al., 1988).

이와 같이 동물체의 사후 변화를 주도하는 단백질분해효소의 작용에 의한 체조직의 분해는 어류에 있어서는 육상 동물에 비하여 빨리 진행될 뿐만 아니라, 부패 초기의 변화를 촉진하는 원인으로 되기 때문에 지금까지 많은 연구가 수행되어 왔다 (Nonaka, 1987).

단백질분해효소에 의한 초기의 사후 변화 과정은 선도 관리의 측면에서는 그 작용 억제에 위한 연구가

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

경주되어 왔으며 (Liston, 1982), 수산 발효 식품 (젓갈, 어간장, fish soluble 등)에 있어서는 가공 수단으로 이용되기까지 하므로 이들 단백질분해효소의 작용은 양면성을 지니고 있어 더욱 중요한 의미를 지닌다 (Takahashi, 1987; Haard, 1992).

한편, 선어의 유통 과정에 있어서는 직접 소비하거나 가공용 원료로 공급되기까지 장기(臟器)를 내장한 채 유통케 되는 경우가 많으므로 장기 조직 중에 분포하는 소화 효소에 의한 작용을 피할 수 없으며, 수산 발효 식품의 경우에 있어서도 대부분 전어체를 통째 원료로 사용하게 되므로 장기 조직 중의 효소는 대단히 중요한 영향 인자이며, 따라서 어류의 사후 변화를 야기시키는 내인성효소의 분포 검색과 그 분해 특성의 규명은 이 분야 연구의 중요한 과제라고 할 수 있다 (Mackie, 1982; Takahashi, 1987).

본 연구는 어류 조직 중에 분포하는 단백질분해효소가 사후 체조직의 변화에 관여하는 과정과 그 작용 경로를 밝히기 위한 전단계 실험으로 혈합육 어류 중의 멸치와 전어, 그리고 백색육 어류 중의 농어와 도다리를 구분하여 실험 대상으로 하였다. 어류 중 단백질분해효소의 분포 검색을 위해 이들 어류의 육과 장기로부터 조제한 조효소의 각종 기질에 대한 활성도를 어종 별로 분석 비교하고, discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis (disc-PAGE)의 방법에 의하여 단백질분해효소의 분포를 확인하였으며, 이들 조효소의 근원섬유 단백질에 대한 분해 특성을 전기영동적으로 해석하여 어류 체내 분포 단백질분해효소의 이용에 관한 몇가지 유익한 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 재 료

혈합육어 중의 멸치 (*Engraulis japonica*: 체장, 8~16 cm; 체중, 10~30 g; 1995년 3월 31일 남해안에서 어획)와 전어 (*Clupanodon punctatus*: 체장, 11~20 cm; 체중, 80~135 g; 1995년 1월 13일 남해안에서 어획)를, 그리고 백색육어 중의 농어 (*Lateolabrax japonicus*: 체장, 45 cm; 체중, 1,500 g; 1995년 1월 27일 남해안에서 어획)와 도다리 (*Pleuronichthys cornutus*: 체

장, 25~33 cm; 체중, 230~390 g; 1995년 3월 10일 남해안에서 어획)를 각각 활어 상태로 구입하여 저온실로 운반한 후에 육과 내장 부분을 절취하여 조효소 추출을 위한 시료로 사용하였고, 천연기질로서 쓴 근원섬유단백질의 추출시료는 방어 (*Seriola quinqueradiata*)를 사용하였다.

2. 방 법

조효소의 추출: 육에 대하여 약 2배량의 추출 용액 (0.02% sodium azide · 1 mM 2Na-EDTA · 1% NaCl) 과 0.2배량의 사염화탄소를 가하여, 그리고 내장은 약 3배량의 추출 용액과 0.2배량의 사염화탄소를 가하여 각각 균질화 하였다. 얻어진 각 균질화액은 40°C의 항온 수조에서 3시간 동안 교반하면서 조효소액을 추출하고, 이 추출액을 원심 분리 (12,000×g, 15 min)하였다. 육과 내장의 각 추출 상층액은 30~80% 포화 황산암모늄으로 염석함으로써 각각 조효소를 얻었다.

단백질 농도의 측정: Lowry et al. (1951)의 비색법에 따라 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 구한 검량곡선으로 단백질 농도를 측정하였다.

효소 활성: 천연 기질에 대한 활성은 hemoglobin (Hb, pH 3.0), azocasein, casein (pH 6.0과 8.0), 그리고 근원섬유단백질 (pH 6.0)을 사용하여 Anson (1938)의 방법에 따라 측정하였으며, 선택적 합성기질 중, cathepsin B의 기질로는 *N*-carbobenzoxy-arginyl-arginine-4-methoxy- β -naphthylamide (ZRRMNA), cathepsin H의 기질로는 *L*-arginine-4-methoxy- β -naphthylamide (ArgMNA), cathepsin L의 기질로는 *N*-carbobenzoxy-phenylalanyl-arginine-4-methoxy- β -naphthylamide (ZFRMNA), SH-proteinase의 기질로는 *N*-benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide (BANA)와 *N*-carbo benzoxy-glycyl-glycyl-arginine-4-methoxy- β -naphthylamide (ZGGRMNA)에 대한 활성을 Barrett (1972, 1976)의 방법에 따라, chymotrypsin과 cathepsin G의 기질로는 *N*-succinyl-alanylalanyl-prolinyl-phenylalanyl- ρ -nitroanilide (SAAPFNA)와 trypsin의 기질로는 *N*-benzoyl-DL-arginine- ρ -nitroanilide (BAPNA)에 대한 활성을 Erlanger et al. (1961, 1966)의 방법에 따라 그리고 carboxypeptidase A의 기질로는 hippuryl (*N*-benzoylglycine)-phenylalanine (Hi-Phe)을 또, carboxypeptidase B의 기질로는 hippuryl (*N*-benzoylglycine)-

arginine (Hi-Arg)을 각각 Folk et al. (1960)의 방법에 따라 측정하였다.

효소의 분포 검색 : 조효소를 적절히 희석한 효소 용액에 대하여 위에서 설명한 효소 활성 측정 방법에 따라 각각 고유 활성을 측정하므로써 효소의 분포를 추정하였다. 다른 한편으로는 전기 영동 시료를 조제하여 disc-PAGE (Davis, 1964)로 전기영동한 후, 전기 영동 겔을 5 mm 간격으로 절취하여 효소 활성 측정에 사용한 완충액으로 효소를 추출한 다음, 각각의 합성 기질에 대하여 활성을 측정하므로써 사후 변화에 관여하는 효소의 종류를 검색하였다.

근원섬유단백질에 대한 분해 : 방어 (*Seriola quinqueradiata*) 육을 채육하여 Jiang et al. (1990)의 방법에 따라 근원섬유단백질을 추출하였다. 그리고 각 시

료 어종의 육과 내장에서 추출한 조효소와 근원섬유 단백질의 비율은 육 조효소는 1 : 10 (100 mg : 1,000 mg), 그리고 내장 효소는 1 : 2,000 (0.5 mg : 1,000 mg)으로 하여 100 mM NaCl · 0.02% sodium azide · 10 mM sodium acetate (pH 6.0)를 완충액으로하여, 20°C에서 0~720분간 반응시킨 다음, 반응 시간별로 반응 혼액의 일정량을 취해 SDS화하여 전기 영동용 시료를 조제하였다. 효소 분해 정도는 근원섬유단백질에 대한 작용 시간별로 SDS-PAGE의 방법 (Laemmli, 1970)에 따라 효소 작용에 의한 근원섬유단백질 구성 subunit의 변화를 분석 검토하였다.

결과 및 고찰

Table 1. Comparison of enzymatic activity among the muscle crude protease* from anchovy and gizzard-shad of dark fleshed fish, and seabass and sole of white fleshed fish for natural and synthetic substrates

Substrate and pH condition	Dark fleshed fish		White fleshed fish	
	Anchovy	Gizzard-shad	Seabass	Sole
(×10 ⁻³ U/mg)				
Natural substrate				
Hemoglobin pH 3.6	0.86	0.07	0.02	0.05
Casein pH 6.0	2.58	0.09	0.07	0.08
pH 8.0	3.19	0.17	0.09	0.15
Azocasein pH 6.0	73.74	2.77	1.66	2.62
pH 8.0	43.00	1.38	2.25	3.93
Myofibrillar protein pH 6.0	0.26	0.04	0.09	0.05
Synthetic substrate				
BANA pH 6.0	4.83	—	—	—
ArgMNA pH 6.0	5.69	3.97	1.73	1.42
ZFRMNA pH 6.0	21.60	0.15	0.09	—
ZRRMNA pH 6.0	9.91	0.32	0.11	0.26
ZGGRMNA pH 6.0	10.56	0.15	—	—
SAAPFNA pH 6.0	30.12	0.32	0.03	0.51
BAPNA pH 6.0	5.85	0.02	0.01	0.02
Hi-Phe pH 6.0	—	—	—	—
Hi-Arg pH 6.0	—	—	—	—

—; not detected.

* The muscle crude proteases were obtained through salting-out fractionation in the range of 30~80% ammonium sulfate saturation after extracting with 1% NaCl · 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. Conditions for the enzyme reaction: Buffer; pH 3.6 (50 mM Gly-HCl), pH 6.0 (50 mM sodium acetate), pH 8.0 (50 mM Tris-HCl), Protein concentration; 100 µg/l~2.5 ml, Temperature; 40°C.

효소의 검색

각 2종의 혈합육어와 백색육어 육에서 추출한 조효소에 대하여 천연 기질 및 합성 기질에 대한 효소 활성의 분포를 Table 1에 나타내었다. 즉, 육에서 추출한 조효소는 합성 기질 ZFRMNA, ZRRMNA 및 ArgMNA (pH 6.0)에 대하여 강한 분해 활성을 나타냄으로서, 주로 SH-proteinase인 cathepsin L, B, 및 H 유사 효소가 분포하고 있음이 확인되었으며, 이 밖에도 SAAPFNA (pH 6.0)와 Hb (pH 3.6)에 대한 분해 활성에 비추어 cathepsin G 및 D 유사 효소도 다소 분포함을 알 수 있었다. 그리고, 이들 조효소는 casein 및 azocasein (pH 8.0)에 대하여도 강한 활성을 보여 조효소 중에는 알칼리성 단백질분해효소도 함유하고 있음이 확인되었다.

Barrett (1980)은 cathepsin B, H 및 L의 기질 특이성이 BANA에 대하여 활성을 나타낼 뿐만 아니라 ZRRMNA, ArgMNA 및 ZFRMNA에 대하여도 활성을 보이나, cathepsin B는 ZRRMNA에 대하여, cathepsin H는 ArgMNA에 대하여, 그리고 cathepsin L은 ZFRMNA에 대하여 보다 강한 활성을 나타낸다고 하였다.

어류의 육 중에 분포하는 단백질분해효소에 관하여, Ting et al. (1968)은 연어 육 중에 분포하는 cathepsin의 부분 정제에 관한 연구를 통하여, pH 3.7부근에서 hemoglobin 기질에 대하여 강한 활성을 보이는 효소군과 pH 7.0과 8.5에서도 활성을 보이는 효소가 분포한다고 보고하였다. 그리고 Makinodan and Ikeda (1969)는 잉어 (*Cyprinus carpio*), 날개다랭이 (*Thunnus alalunga*), 고등어 (*Scomber japonicus*), 정어리 (*Sardinops melamosticta*), 방어 (*Seriola quinqueradiata*), 대구 (*Gadus macrocephalus*) 등의 육 중에 분포하는 단백질분해효소에 관한 연구에서 pH 3.0~3.5 부근에서 hemoglobin에 대하여, 그리고 pH 8.0 부근에서 casein기질에 대하여 활성을 보이는 산성 및 알칼리성 단백질분해효소가 분포한다고 하였고, 이어서 그들은 잉어 육에서 cathepsin A, B 및 C의 분포를 각각 합성 기질 carbobenzyloxy-glutamyl-tyrosine, benzoyl-arginine amide (BAA), glycyl-tyrosine amide에 대한 활성으로 확인하였다 (Makinodan and Ikeda, 1971). 또, Makinodan et al. (1983)은 수종 해산 어류의 육 조효소 추출액으로 부터 Hb 및 casein기질을 써서

pH별로 활성을 측정된 결과, 산성 (pH 3.0), 중성 (pH 7.0), 그리고 알칼리성 (pH 8.0)측에서 활성을 보이는 효소들이 각각 분포한다고 하였다. Bonete et al. (1984)는 송어 (*Mujil auratus*)육에는 BANA 기질에 대하여 분해능을 보이는 lysosomal protease가 분포한다고 하였으며, Ueno et al. (1988)은 고등어 보통육 중의 pepstatin insensitive protease (SH-proteinase)의 분포를, 그리고 Hara et al. (1988)은 잉어 육에서 BANA 기질을 사용하여 cathepsin B를 정제하였으며, Yamashita and Konagaya (1990)는 연어 (*Oncorhynchus keta*)육으로 부터 ZFRMCA 기질에 대하여 분해능을 보인 cathepsin L을 정제하여, 이들 효소의 분포를 확인하였다.

본 실험에서는 육에서 추출한 조효소는 천연 기질과 합성 기질에 작용시켜 단백질분해효소의 분포를 확인한 결과, 산성 (pH 3.0), 약산성 (pH 6.0) 및 알칼리성 (pH 8.0)에서 활성을 보이는 단백질분해효소가 검색되었으나, 약산성에서 활성을 보인 효소가 그 활성이 비교적 강함을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 다른 어종의 육 중에 분포하는 효소에 있어서도 유사한 경향임을 알 수 있었다 (Table 1).

한편, 내장에서 추출한 조효소의 천연 기질 및 합성 기질에 대한 활성의 분포에 관하여 실험한 결과를 Table 2에 나타내었다. BANA, BAPNA, ZRRMNA (pH 8.0) 등의 arginine 잔기를 갖는 합성 기질에 대하여 강한 분해 활성을 보이므로서 serine-proteinase인 trypsin 유사 효소가 분포하였으며, SAAPFNA (pH 8.0) 기질에 대하여도 강한 활성을 보이므로서 chymotrypsin 유사 효소가 주로 분포하고 있음을 알 수 있었다. 그러나 Hi-phe와 Hi-Arg (pH 8.0)에 대하여는 활성이 검출되지 않아 carboxypeptidase의 분포는 확인 할 수 없었다. Hb (pH 3.6)에 대한 분해 활성은 미약하였으나, pepsin 유사 효소도 다소 분포하고 있음을 알 수 있었다.

어류의 초기 사후 변화 과정 중 체조직의 pH인 6.0 부근에서 방어 육으로 조제한 근원섬유단백질을 기질로 하여 각 효소의 분해 활성을 측정된 결과 (Table 1과 2), 각 어종 별로 내장의 조효소가 육의 조효소보다 활성이 강하게 나타남으로써, 어류의 사후 변화에는 내장 중의 효소가 크게 영향을 미칠 것으로 생각되었다. 육과 내장 중의 조효소는 기질의 종류에

Table 2. Comparison of enzymatic activity among the viscera crude protease* from tyhe anchovy and gizzard-shad of dark fleshed fish, and seabass and sole of white fleshed fish for natural and synthetic substrates

($\times 10^{-1}$ U/mg)

Substrate and pH condition	Dark fleshed fish		White fleshed fish	
	Anchovy	Gizzard-shad	Seabass	Sole
Natural substrate				
Hemoglobun pH 3.6	0.48	0.06	0.07	0.09
Casein pH 6.0	2.07	0.28	0.30	0.49
pH 8.0	3.43	0.43	0.53	0.61
Azocasein pH 6.0	48.86	6.37	7.29	6.40
pH 8.0	88.92	11.35	12.94	17.05
Myofibrillar protein pH 6.0	0.09	0.01	0.01	0.03
Synthetic substrate				
BANA pH 8.0	3.72	0.74	0.05	0.31
ArgMNA pH 8.0	1.01	1.35	0.77	0.97
ZFRMNA pH 8.0	1.06	0.76	0.26	0.78
ZRRMNA pH 8.0	2.21	1.19	0.40	0.98
ZGGRMNA pH 8.0	15.68	1.45	1.13	0.99
SAAPFNA pH 8.0	18.37	0.20	0.17	5.74
BAPNA pH 8.0	3.46	0.10	0.07	0.96
Hi-Phe pH 8.0	—	—	—	—
Hi-Arg pH 8.0	—	—	—	—

—; not detected.

* The viscera crude proteases were obtained through salting-out fractionation in the range of 30~80% ammonium sulfate saturation after extracting with 1% NaCl · 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. Conditions for the enzyme reaction; refer to the legend of Table 1.

따라 활성에 다소 차이가 있었으나 멸치, 전어, 도다리, 그리고, 농어의 순으로 강하였다. 전체적으로는 내장에서 추출한 조효소가 육에서 추출한 조효소에 비하여 고유 활성이 약 100배정도 높은 것으로 확인되었다.

Morishita et al. (1964)은 방어 (*Seriola quinqueradiata*), 장어 (*Anguilla japonica*), 무지개 송어 (*Salmo quirdnerii*) 등 양식산 어류의 소화관에 분포하는 효소에 관한 연구에서, 위 추출액에서는 pH 2.5에서, 간, 유문수, 췌장 등의 추출액에서는 pH 7.0에서 casein 기질에 대하여 활성을 보이는 효소들이 존재한다고 보고하였다. Zendzian and Barnard (1967)는 연골 어류 중의 별상어 (*Squalus suckleyi*)와 수염상어 (*Dasyatis americana*), 경골어류 중의 참치 (*Thunnus secundodor-*

salis), 양서류 중의 개구리 (*Rana pipiens*), 파충류 중의 거북 (*Pseudemys elegans*), 조류 중의 닭, 포유류 중의 토끼, 말, 소, 개 등의 췌장 추출액으로 부터 합성 기질 benzoyl-tyrosine ethyl ester (BTEE)와 benzoyl-arginine ethyl ester를 써서 chymotrypsin과 trypsin의 분포를 확인하였으며, 또 천연 기질 casein 기질을 써서 그 밖의 단백질분해효소에 대하여도 분포를 확인하여 보고하였다.

Murakami and Noda (1981)는 정어리 유문수 추출액 중에는 casein 기질에 대하여 pH 9.6~10.0 부근에서 활성을 보이는 알칼리성 단백질분해효소가 분포한다고 하였으며, 이들 조효소 추출액에서 분리 정제한 3종의 알칼리성 단백질분해효소는 BAA, acetyl-tyrosine ethyl ester와 tosyl-arginine methyl ester 등의 합

성 기질에 대한 반응성을 측정하여, 한 종류의 chymotrypsin 유사 효소와 두 종류의 trypsin 유사 효소를 동정하여 보고하였다. Kalac (1978)은 청어 (*Clupea harengus* L)와 빙어 (*Malottus villosus* L)의 소화관에서 합성 기질 BTEE와 천연 기질 casein을 사용하여 chymotrypsin의 분포를 확인한 후에 정제하여 송아지 췌장 chymotrypsin의 성질의 차이를 비교하였으며, Cohen et al. (1981)은 잉어 췌장에서, Racicot and Hultin (1987)은 별상어 췌장에서, 그리고 Raae and Walther (1989)는 대구 (*Gadus morhua* L) 유문수로부터 합성 기질을 사용하여 chymotrypsin을 동정하여 보고하였다.

Hjelmeland and Raa (1982)는 빙어의 내장에서 2종의 trypsin을 분리 정제하여 Enzyme I and Enzyme II로 명명하여 보고하였으며, Simpson and Haard (1984)는 BAPNA 기질을 사용하여 그린랜드 대구 (*Gadus ogac*)의 유문수에서 trypsin을, 그리고 Pyeun et al. (1990, 1991)은 혈합육어인 menhaden (*Brevoortia tyrannus*)의 유문수에서 2종의 trypsin과 복상어 (*Cephaloscyllium umbratile*)의 유문수에서 1종의 trypsin이 분포함을 확인하고 이들 효소를 정제하여 그 특성을 보고하였다. 본 실험과 이상의 보고들을 통하여 어류의 장기 중에는 주요 알칼리성 단백질분해효소로서 chymotrypsin과 trypsin 유사 효소가 분포함을 알 수 있었다.

각 어종의 육과 내장에서 추출한 조효소를 disc-PAGE로 전기영동한 후, 전기 영동 겔을 5 mm 간격으로 절취하여 활성 측정에 쓴 완충액으로 각각 추출한 다음, 천연 기질과 합성 기질에 대해 효소 활성을 측정하여 단백질분해효소의 전기 영동 겔상의 분포를 확인한 결과를 Fig. 1~3에 나타내었다.

Fig. 1은 멸치육 조효소의 전기영동상으로서 β -naphthylamide (ArgMNA, ZFRMNA, ZRRMNA)와 *p*-nitroanilide (SAAPFNA)기질에 대하여 나타난 효소 활성의 분포를 보면, 겔 5~10 mm에 나타난 band에서는 효소 활성을 보이지 않아 효소 이외의 단백질 band로 생각되며, 겔 20~25 mm 부근에서 ArgMNA에 대한 분해 활성이 나타나 cathepsin H 유사 효소가 분포하는 것으로 검지 되었으나 단백질의 농도는 아주 낮았다. 30~45 mm 사이의 band군에서는 SAAPFNA기질에 대한 분해 활성을 보이므로서 cathepsin G 유사

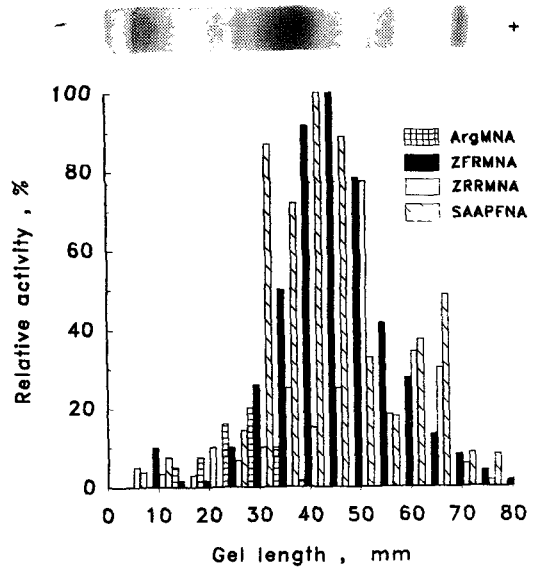


Fig. 1. Disc-polyacrylamide gel electrophoresis and enzymatic activity distribution of the gel* in the anchovy muscle crude protease. *Separated protein band was dissected into small pieces, extracted protein from the gel and determined enzymatic activity by using the synthetic substrates.

효소가 분포하는 것으로 추정되었고, 40~55 mm에서는 ZFRMNA기질에 대하여 강한 분해 활성을 나타내어 cathepsin L 유사 효소가 분포함을 알 수 있었으나, 이들 두 효소의 활성 분포가 중첩되어 하나의 단백질 band군을 형성하여 나타남으로서 이는 활성대에 분포하는 효소들이 비슷한 하전을 띠는 전기적 성질에 의하여 나타난 결과가 아닌가 생각된다. 50~60 mm에서는 단백질 band는 미미하게 나타났지만, 다른 구간과는 대조적으로 ZRRMNA의 분해 활성이 두드러짐으로서 cathepsin B 유사 효소가 분포하는 것으로 추정되었으며, 70~75 mm의 band에서도 SAAPFNA기질에 대한 분해 활성이 약 50%를 보이므로서 cathepsin G 유사 효소가 분포하는 것으로 추정되었다. 단백질 band가 거의 나타나지 않은 구간에서 효소 활성을 보인 것은 band에 나타난 농도보다 상대적으로 단백질 농도가 낮기 때문인 것으로 생각된다.

혈합육어인 멸치와 전어의 내장 조효소의 전기 영동 겔상의 효소의 분포를 Fig. 2에 나타내었다. 멸치의 경우, 절취한 겔의 이동거리 5~25 mm에서는 azoca-

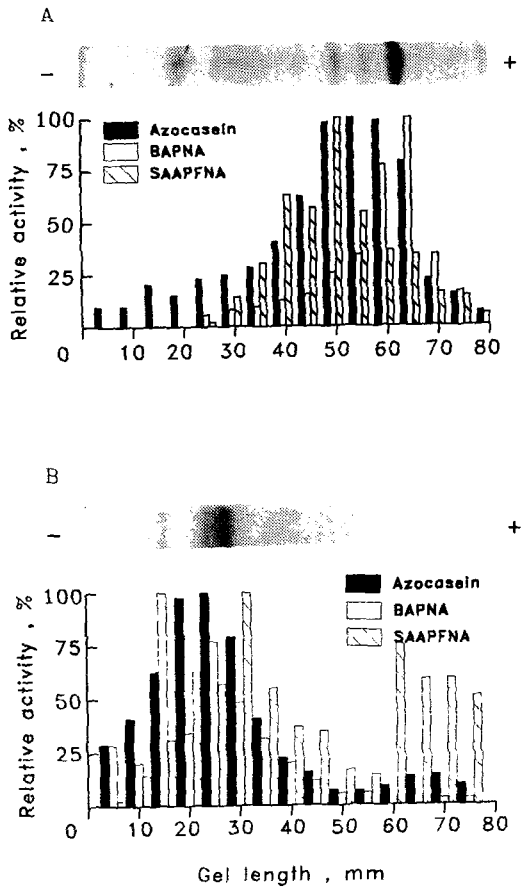


Fig. 2. Disc-polyacrylamide gel electrophoregrams and enzymatic activity distribution of the gel* in the anchovy (A) and gizzard-shad (B) viscera crude protease. Refer to the footnote of Fig. 1.

sein 기질에 대하여 10~20%의 분해 활성을 보이는 알칼리성 단백질분해효소가 분포하는 것으로 나타났으며, 주로 45~50 mm에서 azocasein 및 SAAPFNA 기질에 대하여 강한 활성을 나타내는 chymotrypsin 유사 효소가 현저한 활성으로 분포하였고, 60~65 mm의 겔에서는 BAPNA 기질에 대하여 강한 분해 활성을 보이는 trypsin 유사 효소가 분포함을 알 수 있었다. 전기 영동 겔상의 band에서 나타난바와 같이 trypsin 유사 효소가 chymotrypsin 유사 효소보다 분포량이 많은 것으로 확인되었다. 또한 50~60 mm의 겔에서는 BAPNA와 SAAPFNA에 대한 분해 활성은 낮았지만 azocasein에 대하여 강한 활성을 보이는 알칼리성 단백질분해효소가 분포함을 알 수 있었다.

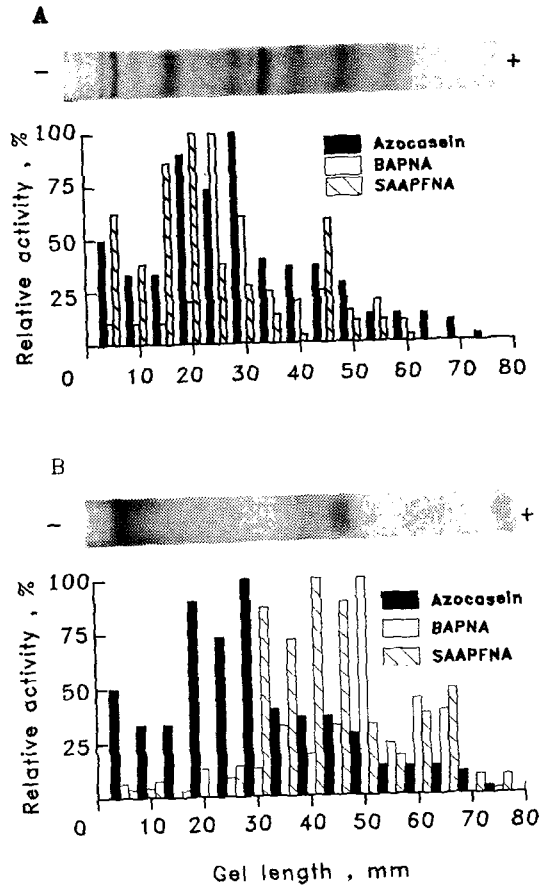


Fig. 3. Disc-polyacrylamide gel electrophoregrams and enzymatic activity distribution of the gel* in the seabass (A) and sole (B) viscera crude protease. Refer to the footnote of Fig. 1.

전어 내장 조효소의 전기영동상에서는 절취한 겔 15~20 mm 사이의 저 농도 band에서 azocasein 및 BAPNA에 대하여 분해 활성을 보이는 trypsin 유사 효소의 분포가 확인되었으며, 20~30 mm의 겔에서는 azocasein에 대하여 강한 활성을 보일 뿐만 아니라 BAPNA (80%) 및 SAAPFNA (60%)에 대하여도 활성을 나타냄으로서 2종 이상의 효소가 혼재되어 있는 것으로 추정되었다. 30~35 mm에서는 SAAPFNA 기질에 대하여 강한 활성을 보여 chymotrypsin 유사 효소가 분포하는 것을 확인 할 수 있었다. 단백질 band는 나타나지 않았지만, 65~85 mm에서 절취한 겔에서는 azocasein에 대한 활성(10~15%)에 비해 SAAPFNA 기질에 대하여는 50~75%의 활성을 보이므로서

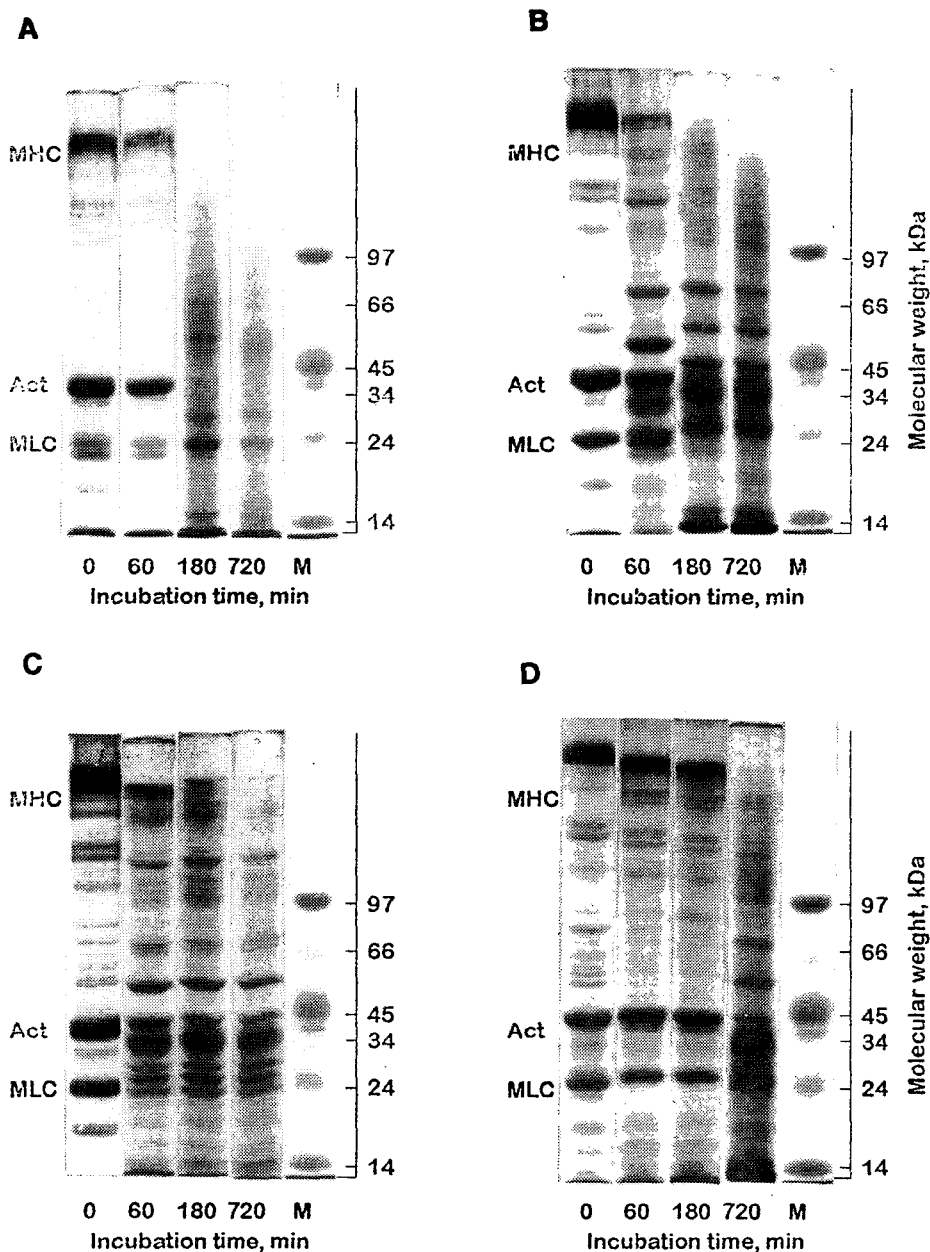


Fig. 4. Changes in SDS-PAGE electrophoregrams of the enzymatic hydrolysates of yellowtail myofibrillar protein by the anchovy (A), gizzard-sha (B), seabass (C), and sole (D) muscle crude protease in accordance with incubation time. MHC, myosin heavy chain; Act, actin; MLC, myosin light chain; M, molecular weight marker protein.

단백질의 분해능은 떨어지지만, peptide 분해능이 있는 peptidase가 존재하는 것으로 추정되었다.

Fig. 3에는 백색육어인 농어와 도다리 내장 조효소

의 전기영동상을 나타내었다. 먼저, 농어의 경우, 5~15 mm 겔에서 azocasein (50%) 및 SAAPFNA (60%) 기질에 대하여 활성을 보였으며, 15~25 mm의 겔에서

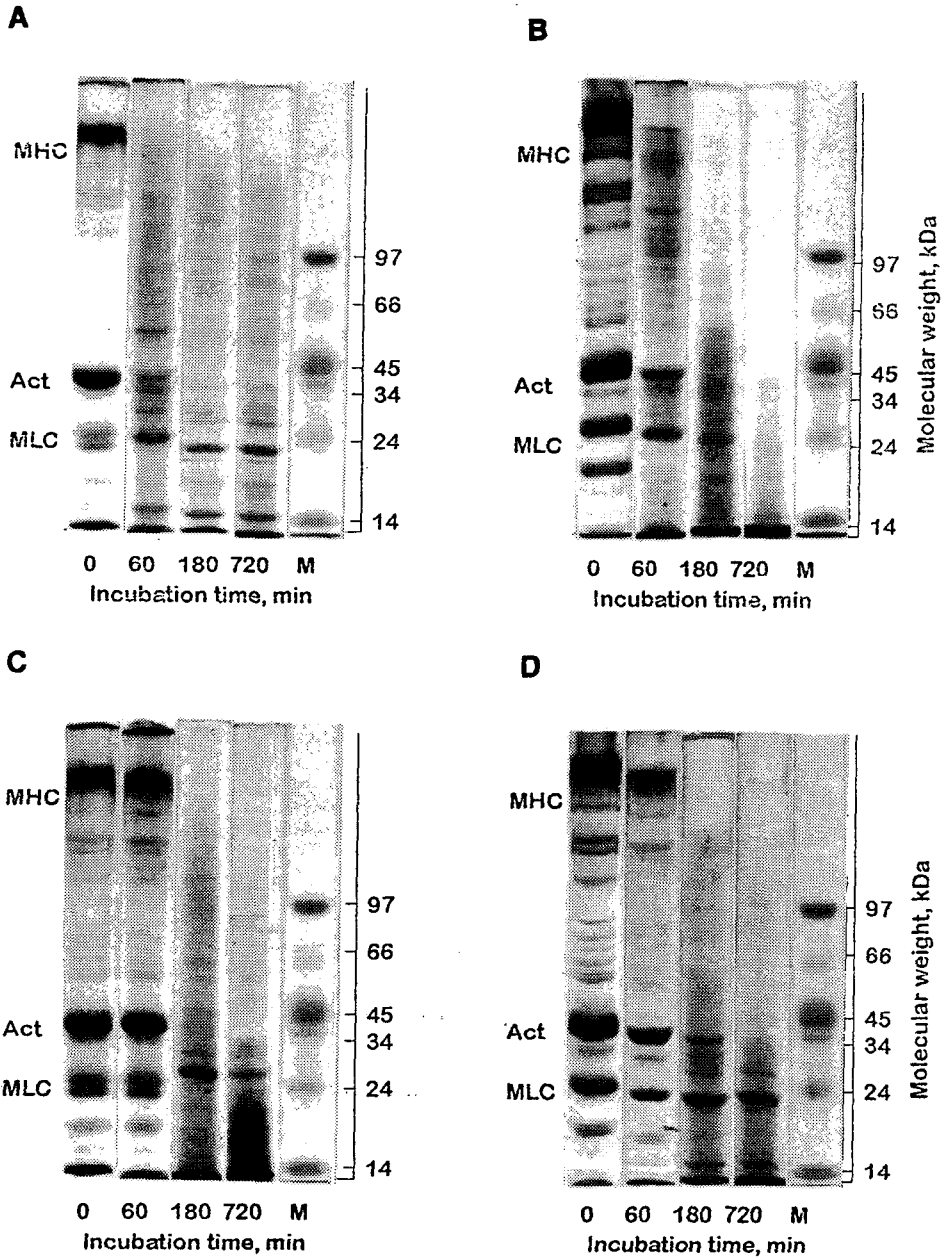


Fig. 5. Changes in SDS-PAGE electrophoregrams of the enzymatic hydrolysates of yellowtail myofibrillar protein by the anchovy (A), gizzard-shad (B), seabass (C), and sole (D) viscera crude protease in accordance with incubation time. Refer to the abbreviations represented in Fig. 4.

는 SAAPFNA 기질에 대하여 강한 활성을 보여 chymotrypsin 유사 효소가 분포하는 것을 알 수 있었고, 25~30 mm의 껍에서는 BAPNA 기질에 대하여 강한 활성을 나타내어 trypsin 유사 효소가 분포하는 것

로 확인되었다. 한편, 30~35 mm의 껍에서는 BAPNA (60%) 및 SAAPFNA (25%) 기질에 대한 활성에 비해 azocasein (100%)에 대한 분해 활성이 강하여 단백질 분해능이 강한 알칼리성 단백질분해효소가 분포하는

것으로 생각되었으며, 단백질에 대한 정색도가 가장 높은 35~40 mm 사이의 겔은 단백질분해능이 40% 정도에 불과하여 효소 이외의 단백질이 혼재하고 있음을 알 수 있었다. 45~50 mm의 겔에서는 SAAPFNA 기질에 대하여 약 60%의 활성을 보여 chymotrypsin 유사 효소가 분포하는 것으로 추정되었다.

도다리의 내장 조효소의 전기영동상에서, 절취한 5~10 mm 사이의 겔에서는 단백질의 농도가 가장 진한데도 불구하고 효소의 활성이 25~50%로 약하였으며, 20~35 mm에서는 azocasein (70~100%)에 대한 활성이 강하여 알칼리성 단백질분해효소가 분포하였고, 35~50 mm 사이의 겔에서는 SAAPFNA (70~100%)에 대한 분해 활성으로 chymotrypsin 유사 효소가 분포하는 것이 확인되었다. 50~55 mm 사이의 겔에서는 BAPNA (100%)에 대한 분해 활성으로 trypsin 유사 효소가 분포하였다.

근원섬유단백질 기질에 대한 반응성

어육의 근원섬유단백질은 대체로 근육 단백질의 60~70%를 차지하며 구조 단백질로서 근육조직의 형성뿐만 아니라 육의 식품학적 물성에도 영향 인자로서 작용하므로 단백질분해효소의 근원섬유단백질에 대한 반응성은 어류의 선도와 품질에 관련이 깊은 것으로 해석된다 (Seki, 1977). 어류 육과 내장 중에 분포하는 단백질분해효소가 어육 근원섬유단백질의 사후 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료어의 육과 내장에서 단백질분해 조효소를 추출하여 방어의 근원섬유단백질에 대한 반응성을 검토한 결과를 Fig. 4와 5에 나타내었다.

먼저, 각 2종의 혈합육어과 백색육어의 육 조효소를 방어의 근원섬유단백질에 작용시켜 (효소:근원섬유단백질=1:10) SDS-PAGE로 분석한 결과를 보면 Fig. 4와 같다. 멸치의 육에서 추출한 조효소는 반응 60분만에 myosin heavy chain (MHC)과 myosin light chain (MLC)이 대부분 분해되었으며, actin (Act)은 반응 180분에 이르러 거의 분해되었고, 반응 720분에는 거의 모든 subunit가 분해되어 약 24kDa의 subunit가 다소 잔류할 따름이었다. 전어 육에서 추출한 조효소는 반응 60분에 MHC가 거의 분해되어 120kDa, 70kDa 및 50kDa의 subunit가 나타났으며, Act의 분해도 다소 일어남을 보였다. 반응 180분에는 120kDa의

subunit가 완전히 분해되었고, 720분에 이르기까지에는 Act과 MLC도 상당 부분이 분해되었다.

백색육어 농어의 육에서 추출한 조효소는 반응 60분에 MHC가 거의 분해되어 120kDa과 50kDa의 subunit가 출현하였으며, 이들 subunit는 반응 720분까지도 거의 분해되지 않고 잔류하였다. Act도 상당 부분 분해되었으나 32kDa의 subunit가 반응 720분에 이르기까지도 잔류하였으며, MLC는 거의 분해되지 않았다. 도다리 육의 조효소에 의하여서는 반응 180분에 이르기까지 MHC가 다소 분해되었을 뿐, Act 및 MLC 등의 구성 subunit는 거의 분해가 일어나지 않았으나, 반응 720분에 이르러서 MHC는 70kDa와 50kDa의 subunit로 분해되었으며, Act의 분해로 32kDa의 새로운 subunit가 출현한 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 미루어 볼 때, 육에서 추출한 조효소의 경우, 근원섬유단백질의 분해 정도는 멸치, 전어, 농어 그리고 도다리의 순으로 크게 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

Fig. 5는 4종 시료의 내장 조효소와 방어의 근원섬유단백질의 비율을 1:2,000으로 작용시켜 SDS-PAGE로 분석한 결과이다. 혈합육어 멸치와 전어의 반응 60분에 구성 subunit 거의가 분해되었으며, 전어의 경우 Act와 MLC만이 다소 잔류하고 있었지만, 반응 720분에 이르러서는 거의 모든 subunit가 분해되고 멸치의 경우만 약 20kDa의 subunit만이 조금 남아 있을 뿐이었다. 백색육어 농어와 도다리는 그 분해 양상이 비슷하여 반응 60분에서는 구성 subunit의 분해가 거의 일어나지 않았으며, 반응 180~720분에 이르러 MHC와 Act은 거의 분해되었고, MLC만이 다소 잔류하고 있을 따름이었다.

자가 소화와 관련한 보고에서, 육 중의 lysosome 분포 SH-proteinase은 MHC, α -actinin, Act, troponin-T와 troponin-I 등을 분해한다고 하였으며, 장기 중의 serine-proteinase는 MHC, tropomyosin, troponin, Act 등을 분해한다고 하였다 (Okitani et al., 1980; Matsuura et al., 1981).

Suwansakornkul et al. (1993)은 매통이의 근원섬유단백질의 분해 인자로서 단백질분해 효소 활성의 분포에 관한 연구에서, MHC의 분해에는 주로 serine-proteinase가 작용을 하고 활성은 약하지만 이차적으로 SH-proteinase가 관여한다고 하였으며, Pyeun et al.

(1995)은 멸치의 사후 변화에는 육 중의 효소로서 SH-proteinase인 cathepsin L이, 그리고 내장 중의 효소로는 serine-proteinase로서 chymotrypsin이 주도적인 역할을 한다고 하였다. 본 실험에서는 어중에 따라 다소의 차이를 보이지만 육에서 추출한 조효소의 경우, 주로 MHC의 분해가, 그리고 내장에서 추출한 조효소는 MHC와 Act에 대하여 두드러진 분해를 보였다. 본 실험에서는 효소 활성 정도를 동일한 수준에서 비교하기 위하여 내장 조효소를 육 조효소에 비하여 200배로 희석하여 같은 용량으로 첨가하였기 때문에, 근원섬유단백질의 분해에 있어서는 내장 조효소의 활성이 200배정도 강하다고 할 수 있다.

이상의 결과를 종합하면, 육과 내장에 분포하는 단백질분해효소 모두 백색육어에 비하여 혈합육어 쪽이 훨씬 활성이 강하였다. 그리고, 사후 변화 과정 중 육 조직은 육 중에 분포하는 단백질분해효소에 의하여 구조 단백질 중의 MHC 등의 골격이 와해되면서 연화를 일으키는 동시에 내장 중에 분포하는 단백질분해효소의 왕성한 작용으로 내장 조직의 분해와 내장에 인접한 육질부를 분해시켜 사후 변화를 촉진시키는 것으로 결론지을 수 있다.

요 약

혈합육어(멸치와 전어)와 백색육어(농어와 도다리)의 육과 내장에서 추출한 조효소에 대하여 천연 기질 및 합성 기질에 대한 효소 활성과 disc-PAG 전기영동에서 분리된 효소 단백질의 분포를 선택적 합성 기질을 써서 비교 검토하였다. 육에는 SH-proteinase인 cathepsin L, B, 및 H 유사 효소가 분포하는 것을 확인 할 수 있었으며, 이 밖에도 cathepsin G 및 D도 다소 분포하는 것으로 추정되었다. 그리고 내장에는 강한 활성의 chymotrypsin 및 trypsin 유사 효소가 주로 분포하고 있음이 확인되었다.

육과 내장에서 추출한 조효소들은 공통적으로 멸치, 전어, 도다리 그리고 농어의 순으로 활성이 높은 것을 알 수 있었으며, 전체적으로 혈합육어에 분포되어 있는 효소가 백색육어류에 분포되어 있는 효소에 비하여 약 100배정도 높았다.

육과 내장의 조효소를 방어의 근원섬유단백질에 작

용시킨 결과, 육 중의 조효소는 myosin heavy chain의 분해가 두드러졌으며, 특히 멸치의 효소가 근원섬유단백질의 구성 subunit 모두에 대하여 강한 분해능을 보였다. 내장 조효소의 경우는 반응 초기에 myosin heavy chain과 actin을 현저하게 분해시켰으며, 혈합육어인 멸치와 전어 조효소의 분해능이 백색육어인 농어와 도다리의 조효소보다 강한 것을 확인 할 수 있었다. 육의 조효소는 어중에 따라 서로 다른 분해 양상을 보였으며, 내장 조효소는 혈합육어와 백색육어의 효소 활성뿐만 아니라 효소의 분포상으로도 많은 차이가 있었다.

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. 1972. A new assay for cathepsin B 1 and other thiol proteinases. *Anal. Biochem.*, 47, 280~293.
- Barrett, A. J. 1976. An improved color reagent for use in Barrett's assay of cathepsin B. *Anal. Biochem.*, 76, 374~376.
- Barrett, A. J. 1977. Proteinases of mammalian cell and tissues, North Holland Publ., pp. 181~208.
- Barrett, A. J. 1980. Enzyme regulation and mechanism of action, Pergaman, Oxford, pp. 307~315.
- Bonete, M. J., A. Manjon, F. Llorca and J. L. Iborra. 1984. Acid proteinase activity in fish-I. Comparative study of extraction of cathepsins B and D from *Mujil auratus* muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B, 203~206.
- Cohen, T., A. Gertler and Y. Birk. 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)-I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B, 639~646.
- Davis, B. J. 1964. Disc-electrophoresis II. Method

- and application to human serume protein. Ann. New York Acad. Sci., 121, 404~427.
- Erlanger, B. F., N. Kokowsky and W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys., 95, 271~278
- Erlanger, B. F., F. Edel and A. G. Cooper. 1966. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. Arch. Biochem. Biophys., 155, 206~210.
- Folk, J. E., K. A. Piez, W. R. Carroll and J. A. Gladner. 1960. Carboxypeptidase B. IV. Purification and characterization of the porcine enzyme. J. Biol. Chem., 235, 2272~2277.
- Haard, N. F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. J. Aqua. Food Produc. Tech., 1, 17~31.
- Hara, K., A. Suzumatsu and T. Ishihara. 1988. Purification and characterization of cathepsin B from carp ordinary muscle. Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 1243~1252.
- Hjelmeland, K. and J. Raa. 1982. Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the Arctic fish capeline (*Mallotus villosus*). Comp. Biochem. Physiol., 71B, 557~562.
- Jiang, S. T., Y. T. Wang, B. S. Gau and C. S. Chen. 1990. Role of peptatin-sensitive proteases on the postmortem changes of Tilapia (*Tilapia nilotica* X *Tilapia aurea*) muscle myofibrils. J. Agric. Food. Chem., 38, 1484~1488.
- Kalac, J. 1978. Studies on herring (*Clupea harengus* L.) and capelin (*Malottus villosus* L.) pyloric caeca proteases III: Characterization of the anionic fractions of chymotrypsins. Biologia, 33, 939~949.
- Kirschke, H., J. Langner, S. Riemann, B. Wiederanders, S. Ansorge and P. Bohley. 1980. Protein degradation in health and disease, Excerpta Medica., Amsterdam, 15~35.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, 227, 680~686.
- Liston, J. 1982. Recent advances in the chemistry of iced fish spoilage. In "Chemistry & Biochemistry of marine food products." AVI publishing Co. U.S.A. 27~37.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265~275.
- Mackie, I. M. 1982. General review of fish protein hydrolysates. Animal Feed Sci. Tech., 7, 113~124.
- Makinodan, Y., and S. Ikeda. 1969. Studies on fish muscle protease-I. On the existence of two kinds of proteinases active in acid and in slightly alkaline pH range. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 35, 672~676.
- Makinodan, Y. and S. Ikeda. 1971. Studies on fish muscle protease-V. On the existence of cathepsins A, B and C. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 37, 1002~1006.
- Makinodan, Y., H. Toyohara and S. Ikeda. 1983. On the existence of acid, neutral, and alkaline proteinases in fish muscle. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 49, 109~112.
- 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.
- Morishita, T., H. Noda, M. Kitamikado, T. Takahashi and S. Tachino. 1964. On the activity of the digestive enzymes in cultured fish. J. Fac. Fish. Prefect. Univ. Mie, 6, 239~246 (in Japanese).
- Murakami, K. and M. Noda. 1981. Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I. Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca. Biochim. Biophys. Acta, 658, 17~26.
- Nonaka, J. 1987. Objective of fishery processing and characteristics of fishery raw materials. In "Seafood materials for utilization". Koseisha

- Koseigaku, Tokyo, Japan, 9~15 (in Japanese).
- 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.
- Pyeun, J. H., D. M. Cho, M. S. Heu. 1991. Comparative studies on the enzymatic properties of trypsins from cat-shark and mackerel. 1. Purifications and reaction conditions of the trypsins. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 24, 273~288 (in Korean).
- Pyeun, J. H., H. R. Kim and J. S. Godber. 1990. Comparative studies on the enzymatic properties of two trypsin-like enzymes from menhaden, *Brevoortia tyrannus*. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 23, 12~20 (in Korean).
- Pyeun, J. H., M. S. Heu, D. M. Cho and H. R. Kim. 1995. Proteolytic properties of cathepsin L, chymotrypsin, and trypsin from the muscle and viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *J. Korean Fish. Soc.*, 28, 557~568 (in Korean).
- Raae, A. J. and B. T. Walther. 1989. Purification and characterization of chymotrypsin, trypsin and elastase like proteinases from cod (*Gadus morhua* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 93B, 317~324.
- Racicot, W. F. and H. O. Hultin. 1987. A comparison of dogfish and bovine chymotrypsins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 256, 131~143.
- Seki, N. 1977. Myofibrillar protein of fish. In "Fish Protein." Koseisha-Koseigaku, Tokyo, p. 7~20 (in Japanese).
- Sherekar S. V., M. S. Gore and V. Ninjoor. 1988. Purification and characterization of cathepsin B from the skeletal muscle of fresh water fish, *Tilapia mossambica*. *J. Food Sci.*, 53 (4), 1018~1023.
- Simpson, B. K. and N. F. Haard. 1984. Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79B, 613~622.
- Suwansakomkul, P., Y. Itoh, S. Hara and A. Obatake. 1993. Identification of proteolytic activities of gel-degrading factors in three lizardfish species. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 1039~1045.
- Takahashi, T. 1987. Autolysis. In "Sea food materials for utilization". Koseisha-koseigaku, Tokyo, p. 213~227 (in Japanese).
- Ting, C. Y., M. W. Montgomery and A. F. Anglemier. 1968. Partial purification of salmon muscle cathepsins. *J. Food Sci.*, 33, 617~620.
- Ueno, R., K. Sakanaka, S. Ikeda and Y. Horoguchi. 1988. Purification of pepstatin insensitive protease from mackerel white muscle. *Nippon Suisan gakkaishi*, 54, 691~697.
- Yamashita, M. and S. Konagaya. 1990. Purification and characterization of cathepsin L from the white muscle of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 96B, 247~252.
- Zendzian, E. N. and E. A. Bamard. 1967. Distribution of pancreatic ribonuclease, chymotrypsin, and trypsin in vertebrates. *Arch. Biochem. Biophys.*, 122, 699~713.

1996년 4월 3일 접수

1996년 5월 4일 수리