

## 넙치 근육 및 근소포체 미세구조의 변화에 미치는 전기자극의 영향

김태진 · 김영진 · 윤호동 · 조영제\* · 최영준\*\* · 이근우\*\*\* · 김건배\*\*\* · 김동수\*\*\*\*

국립수산진흥원, \*부경대학교 식품공학과, \*\*경상대학교 수산기공학과

\*\*\*군산대학교 수산기공학과, \*\*\*\*한국식품개발연구원

## Effects of Electrical Stimulation on Ultrastructure of Plaice, *Paralichthys olivaceus* Muscle and Sarcoplasmic Reticulum

Tae-Jin KIM, Young-Jin KIM, Ho-Dong YOON, Young-Je CHO\*, Young-Jun CHOI\*\*, Keun-Woo LEE\*\*\*, Geon-Bae KIM\*\*\* and Dong-Su KIM\*\*\*\*

National Fisheries R & D Institute, Pusan 619-900, Korea

\*Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*\*Dept. of Marine Food Science and Technology, Gyeongsang National University, ChungMu 650-160, Korea

\*\*\*Department of Seafood Processing, Kunsan University, Kunsan 573-360, Korea

\*\*\*\*Korea Food Research Institute, Seong Nam Si, KyungGi-Do 463-420, Korea

Electron micrographs of muscle of plaice killed instantly by spiking at the head clearly showed the A-band, I-band, Z-line and M-line in muscle strips, whereas these bands could not be distinguished from each other in electrically stimulated plaice muscle strips. As the electrical stimulation time increased, the continuity of Z-line disrupted rapidly. Electron microscopic observation showed that sarcoplasmic reticulum (SR) in unstimulated plaice had natural triad structures between Z-line. However these structures were disrupted in the electrically stimulated sample. These structures were clearly observed after storage for 10 hrs at 5°C from all the samples.

In association with the Ca<sup>2+</sup> translocation, Ca<sup>2+</sup>-pyroantimonate deposits were observed at the inner part of SR immediately after spiked the plaice. However, Ca<sup>2+</sup>-pyroantimonate deposits in electrically stimulated plaices were observed in the muscle strips and this phenomenon was clearly observed when electrical stimulation was prolonged.

Key words: electron micrographs, sarcoplasmic reticulum, Ca<sup>2+</sup> translocation, electrical stimulation

### 서 론

전기자극은 육의 연화를 촉진시켜 숙성기간을 단축하는 새로운 방법으로 알려져 있다 (Ho et al., 1996, 1997). 어육에서는 육의 조직감 증대를 목적으로 도입되었으며, 이것은 어육에 전기자극을 가함으로서 근육을 구성하고 있는 actin과 myosin 간의 결합에 의한 ATP의 소모를 가속화시켜 사후경직을 빠르게 유도함과 동시에 경직에 의한 actomyosin toughness를 증대시키는 방법이다 (Lee et al., 1995). 근육의 경직시간과 세기는 어체상태, 치사 조건 및 저장온도에 따라 다르며, 이것은 상기와 같은 요인에 의하여 근소포체의 Ca<sup>2+</sup> 수용능이 영향을 받기 때문이다. 근소포체는 근육의 수축과 이완에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있으며 근원섬유의 ATPase 활성을 조절하고 있다 (Hasselbach, 1964; Ebashi and Endo, 1968). 근육이 이완상태일때 근소포체의 Ca<sup>2+</sup>-pump (Ca<sup>2+</sup>-ATPase)는 세포내의 Ca<sup>2+</sup> 이온을 근소포체내로 받아들여 세포질의 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 0.1 μM 정도로 유지

하고 있으나, 수축시에는 근소포체막에 존재하고 있는 Ca<sup>2+</sup> 방출채널을 통하여 Ca<sup>2+</sup>을 방출함으로써 세포질의 Ca<sup>2+</sup> 농도를 1~10 μM로 상승시킨다. 근소포체의 Ca<sup>2+</sup>이 세포질로 방출되는 속도는 사후 저장온도 (Cho and Kim, 1993) 뿐만 아니라 치사방법 (Jonestone and Moon, 1980; Kim et al., 1993)에 의하여 영향을 받는다고 하였다.

본 연구에서는 생선회의 육질을 개선하기 위하여 도입된 치사 전의 전기자극 전처리가 근육, 근소포체의 구조 변화 및 Ca<sup>2+</sup>의 이동에 미치는 영향을 검토하여 육질개선의 기구를 구명코자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험재료

넙치 (*Plaice, Paralichthys olivaceus*)는 공수수산 (부산 기장군 소재)에서 활어상태로 실험실로 운반하여 15°C 상온의 해수에서 약 6시간 피로를 완전히 회복시킨 후에

즉살 (두부의 급소를 강타) 및 전기자극사 (해수중에 시료를 넣고 110V 전압에서 15초, 35초, 60초간 통전)하여 혈액을 제거하고 5°C로 조정된 냉장고에 저장하면서 시료로 사용하였다.

## 2. 실험방법

등육을 표피로 부터 약 10 mm의 깊이에서 3×3×10 mm의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde를 함유하는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 고정하였다. 단편의 내부를 1×1×3 mm의 크기로 세절한 다음, 4°C에서 1시간 동안 재고정하고 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)로 수세 후 1% OsO<sub>4</sub>로 4°C에서 2시간 동안 고정하였다. 이들을 인산완충액으로 씻어 methanol로 탈수시키고, polypylene oxide로 30분간 치환시킨 후, polypylene oxide와 Epon 혼합물로 2시간 침투시켰다. 이것을 다시 Epon 812로 침투시켜 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 열중합시킨 후, LKB Ultramicrotome (Nova, Sweden)으로 절편을 만들었다. Uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경 (Transmission Electron Microscope, JEM 1200EX-II JEOL, Japan)으로 관찰하였다. Ca<sup>2+</sup> translocation의 측정은 세절한 육을 2.5% glutaraldehyde를 함유하는 0.1M phosphate buffer

(pH 7.4)에 고정한 후, pyroantimonate로 30분간 처리하여 염색과정을 거치지 않고 직접 검경하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 전기자극에 의한 근육의 미세구조의 변화

근육의 파괴강도는 조직의 collagen 섬유에 의한 background toughness와 육의 수축에 의한 actomyosin toughness에 의하여 달라진다. 특히 actomyosin toughness는 수축에 의한 장력에 기인한 육의 단단함이기 때문에 근수축이 일어나는 현상을 알아보기 위하여 즉살 및 전기자극시간을 달리한 넙치육을 전자현미경으로 관찰한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 즉살의 경우 (Fig. 1a), 근섬유의 A대, I대, 및 M선은 뚜렷하게 나타났으며, 근소포체를 사이에 두고 Z-line도 질서정연하게 나타났다. 그러나 전기자극을 가하였을 때 (Fig. 1b, c, d), 근섬유의 I대가 점차 불분명하여 졌으며, 근소포체를 사이에 둔 Z-line도 연속성을 점차 잃어가고 있음을 보여주고 있다. Fig. 2는 즉살 및 전기자극시간을 달리한 근육을 5°C에 10시간 동안 저장한 후, 근섬유의 미세구조를 살펴본 것이다. 즉살하여 10시간이 경과한 근섬유에서는 A대와

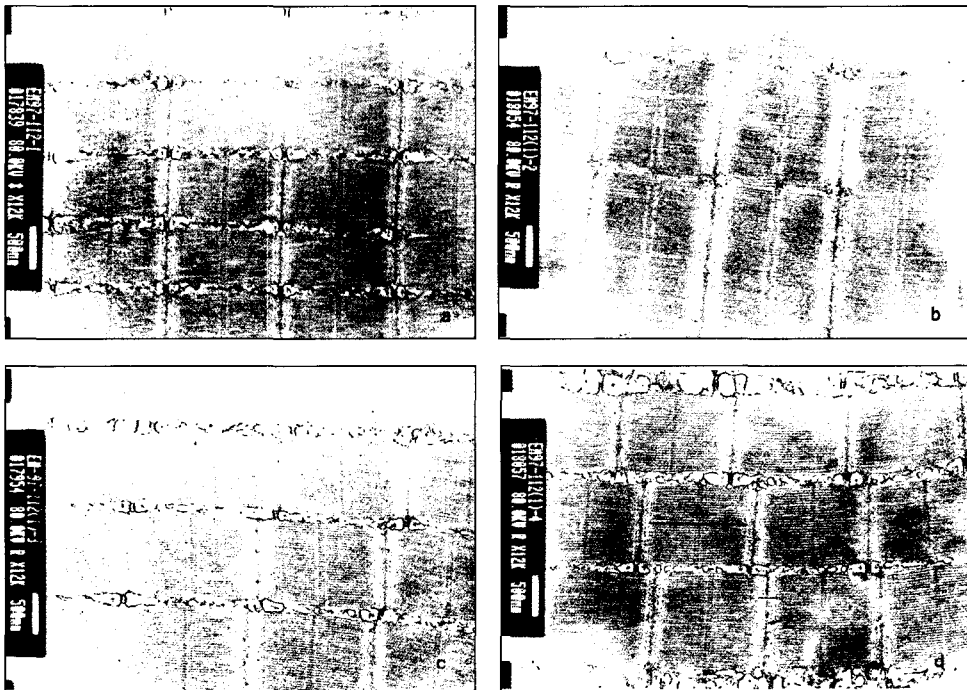


Fig. 1. Electron micrographs of longitudinal views of plaice muscle treated by electrical stimulation (110V/60Hz). a, control (spiking at the head instantly); b, electrical stimulation for 15 sec.; c, electrical stimulation for 35 sec.; d, electrical stimulation for 60 sec.; A, A band; I, I band; Z, Z-line. Bar represented 500 nm.

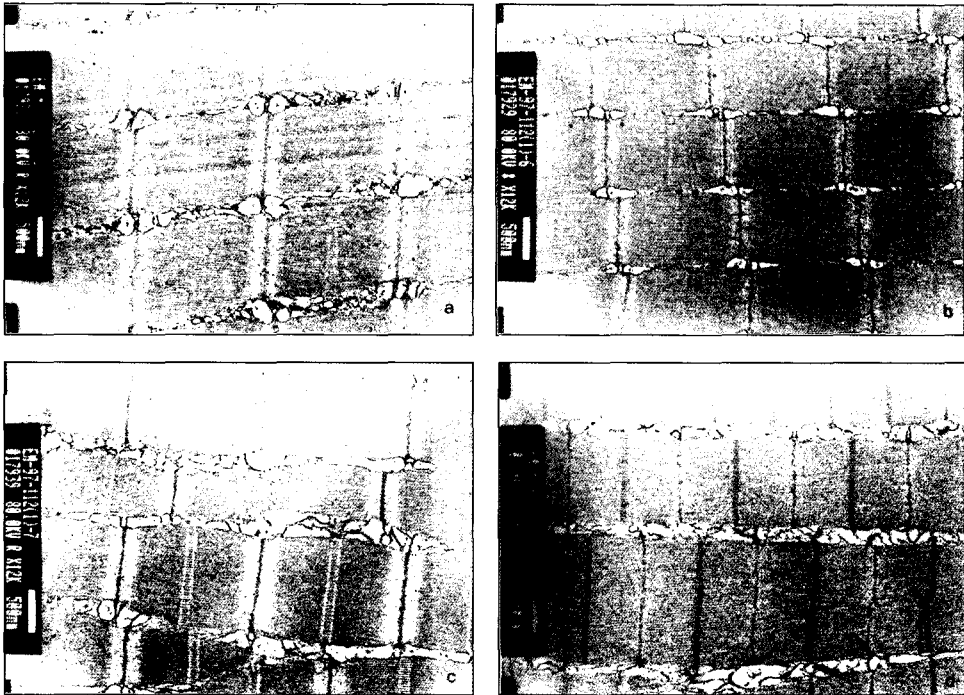


Fig. 2. Electron micrographs of longitudinal views of plaiice muscle treated by electrical stimulation (110V/60Hz) after storage for 10 hrs at 5°C. a, control (spiking at the head instantly); b, electrical stimulation for 15 sec.; c, electrical stimulation for 35 sec.; d, electrical stimulation for 60 sec; A, A band; I, I band; Z, Z-line. Bar represented 500 nm.

Z-line은 즉살직후에 비하여 차이를 보이지 않았으나, I 대는 다소 불분명하였으며, M선은 소실되어 가고 있음을 보여주었다. 그리고 전기자극을 가하여 저장한 것은 자극시간이 길어질수록 근원섬유간 Z-line의 연속성을 현저하게 잃어가고 있었으며, 특히 60초간 전기자극을 가한 근육에서는 I대가 거의 나타나지 않았다. 이와 같은 근육의 미세구조의 불연속성 및 I대의 소실은 전기자극에 의하여 강한 수축이 발생되었음을 밝히고 있으며, 또한 비정상적인 장력발생으로 인하여 근육의 섬유구조가 Z-line을 중심으로 하여 연속성이 상실되고 있음을 보여주고 있다.

2. 근소포체의 미세구조의 변화

근소포체는 근육의 수축과 이완의 조절 및 근원섬유의 ATPase 활성을 제어하는데 있어 중요한 역할을 담당하며, 근소포체의 기능소실은 근육에서의 사후변화와 밀접한 연관이 있다(Hasselbach, 1964; Ebashi and Endo, 1968; Greaser et al., 1967, 1969). 특히, 전기자극에 의한 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 활성의 변화(Kim et al., 1998)는 근소포체의 막구조가 영향을 입을 가능성을 내포하고 있다.

Fig. 3a는 즉살직후 근소포체의 미세구조를 전자현미경을 통하여 살펴본 것이다. Z-line을 사이에 두고 근소포체는 뚜렷하게 관찰되었으나, 전기자극을 가한 것은 근소포체가 뭉쳐져 나타나고 있으며, 이러한 현상은 전기자극시간이 길어질수록 현저하였다(Fig. 3b, c, d). 그리고 전기자극한 근육을 5°C에서 10시간 저장한 다음 근소포체의 형태를 살펴본 결과, 전기자극 직후에 비하여 근소포체는 본래의 상태를 벗어나 파괴된 형태를 보이고 있다(Fig. 4b, c, d). 이와 같이 근소포체는 전기자극에 의한 영향으로 막구조의 파괴현상을 나타내고 있으며, 이러한 연유로 Kim et al.(1998)이 보고한 바와 같이 전기자극에 의하여 근소포체의 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 활성이 저하되었을 것이라고 생각된다. 또한 근소포체의 미세구조는 coagulation이나 fragmentation의 2가지 양상을 보이고 있는데, 그 원인은 전기자극에 의하여 근소포체내의 염용성단백질의 내부에 들어 있는 소수성 잔기들이 노출되어 Ca<sup>2+</sup> binding protein과 결합되었을 가능성을 보이고 있으며, 또 하나는 전기자극에 의하여 peptide결합이 약한 부위에서 절단이 일어났다고 여겨진다.

Ushio et al.(1991)은 사후 경직의 진행동안 근소포체

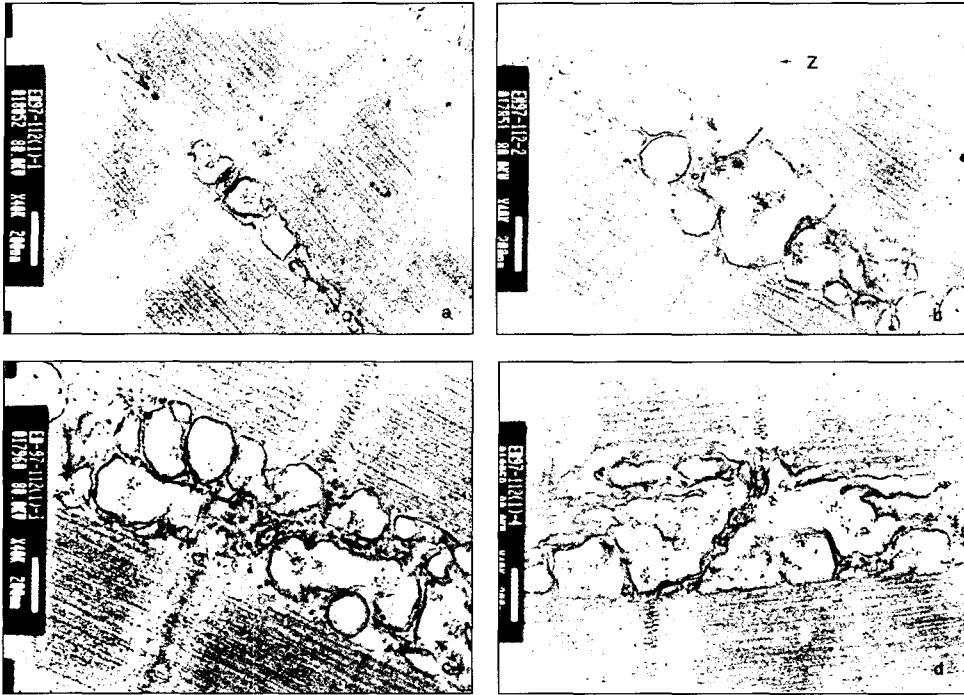


Fig. 3. Ultrastructure of plaice sarcoplasmic reticulum treated by electrical stimulation (110V/60Hz). a, control (spiking at the head instantly); b, electrical stimulation for 15 sec.; c, electrical stimulation for 35 sec.; d, electrical stimulation for 60 sec.; Z, Z-line. Bar represented 200 nm.

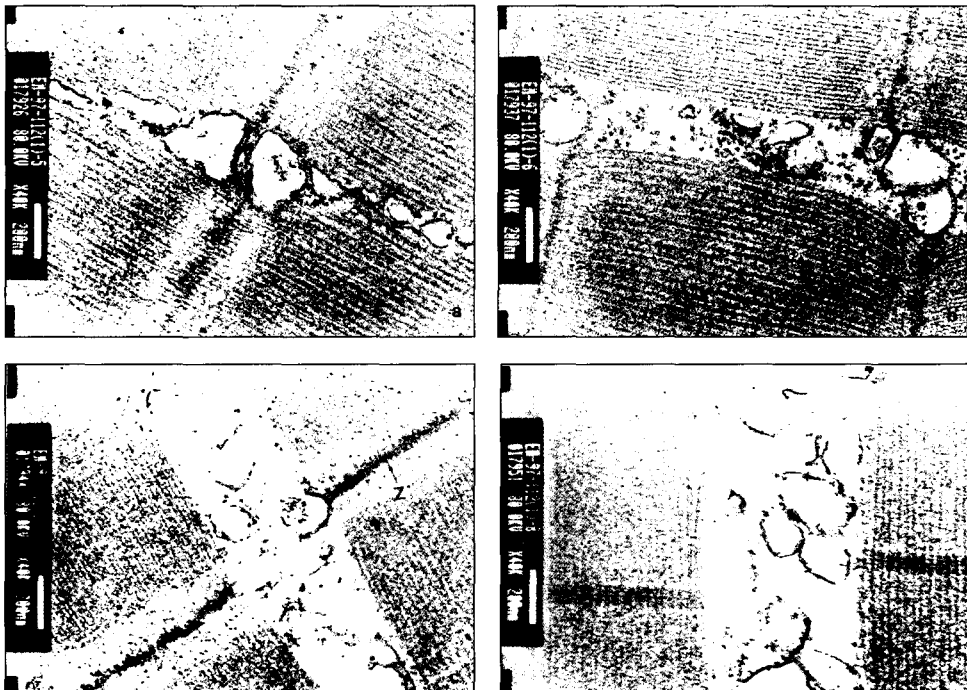


Fig. 4. Ultrastructure of plaice sarcoplasmic reticulum treated by electrical stimulation (110V/60Hz) after storage for 10 hrs at 5°C. a, control (spiking at the head instantly); b, electrical stimulation for 15 sec.; c, electrical stimulation for 35 sec.; d, electrical stimulation for 60 sec.; Z, Z-line. Bar represented 200 nm.

의 미세구조가 변화되며, 0°C에 저장한 것이 10°C에 저장한 것에 비하여 현저하다고 하였는데, 이것은 0°C에서 근소포체의 기능소실이 Ca<sup>2+</sup>의 누출을 촉진한다고 하였다.

3. Ca<sup>2+</sup> translocation의 변화

신경으로 부터 전달된 자극은 신경세포 말단에 존재하는 운동종판을 거쳐 T-system이라 불리우는 체계를 따라 근소포체의 횡행소관(Transversable tubule)을 통하여 종말조를 자극하게 되고 종말조는 탈분극현상(depolarization)을 일으키면서 Ca<sup>2+</sup>을 방출한다.

Fig. 5a는 즉살직후 pyroantimonate로 고정된 근육의 조직을 전자현미경으로 관찰하였는데 pyroantimonate로 침전된 Ca<sup>2+</sup>은 주로 근소포체에서 발견되었다. 이것은 즉살 직후의 근육의 근소포체는 천연 상태의 것으로 변성을 받지 않았음을 보여주고 있다. 그러나, 전기자극을 가한 것은 근소포체보다는 주로 근섬유에 분산되어 나타났으며, 이러한 현상은 전기자극시간이 길어질수록 현저한 경향을 나타내었다(Fig. 5b, c, d). 또한, 즉살구

및 전기자극한 것을 5°C에서 10시간 저장 후 관찰하였을 때, 즉살구에 있어서도 Ca<sup>2+</sup>가 그 정도는 약하지만 근섬유에 분산되는 결과를 보여주었으며(Fig. 6a), 전기자극 후 저장한 것은 치사직후에 비하여 근섬유 전체에 분포되는 정도가 현저하였다. 특히 35초간 전기자극한 것은 Ca<sup>2+</sup>의 침착이 I대 주위에 많이 관찰되었으며, 60초간 처리한 것은 근섬유 전체에 광범위하게 퍼져 있었다. Ushio et al.(1991)은 사후 경직의 진행시 근소포체로부터 방출된 Ca<sup>2+</sup>이 근원섬유의 I대 부위에서 주로 관찰되었다고 하였으며, Suzuki et al.(1993)은 가압하였을 때는 근원섬유 전체에 분산되는 경향을 보였다고 하였다. 이와 같이 Ca<sup>2+</sup>의 분산은 근소포체의 기능소실이나 구조적인 파괴에 의하여 분산되는 정도가 다르기 때문에 결과적으로 전기자극처리에 의하여 근소포체가 영향을 받아 Ca<sup>2+</sup>의 분포상태가 차이를 나타낸 것이라고 생각된다. 또한 Kim et al.(1998)이 보고한 바와 같이 전기자극에 의한 근소포체의 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 활성의 저하로 인하여, 근섬유에 분산된 Ca<sup>2+</sup>을 효과적으로 pumping 할

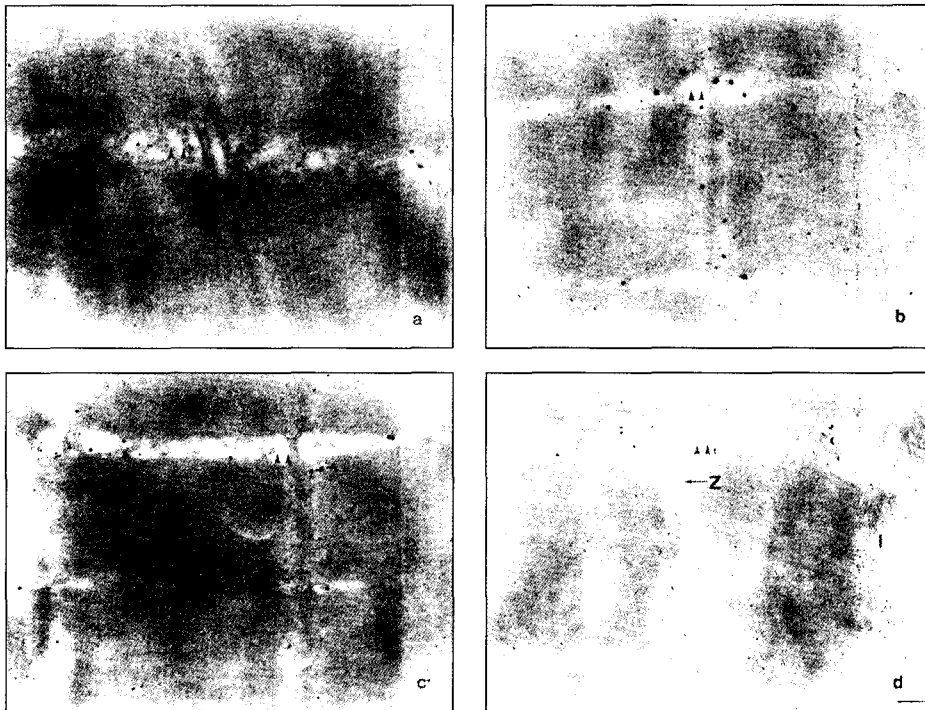


Fig. 5. Electron micrographs of longitudinal views of plaiice muscle showing location Ca<sup>2+</sup>. Excised muscle were fixed with OsO<sub>4</sub> and pyroantimonate. a, control (spikig at the head instantly); b, electrical stimulation for 15 sec.; c, electrical stimulation for 35 sec.; d, electrical stimulation for 60 sec.; Arrowheads and double arrowheads indicate terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum and calcium deposits. Bar represented 200 nm

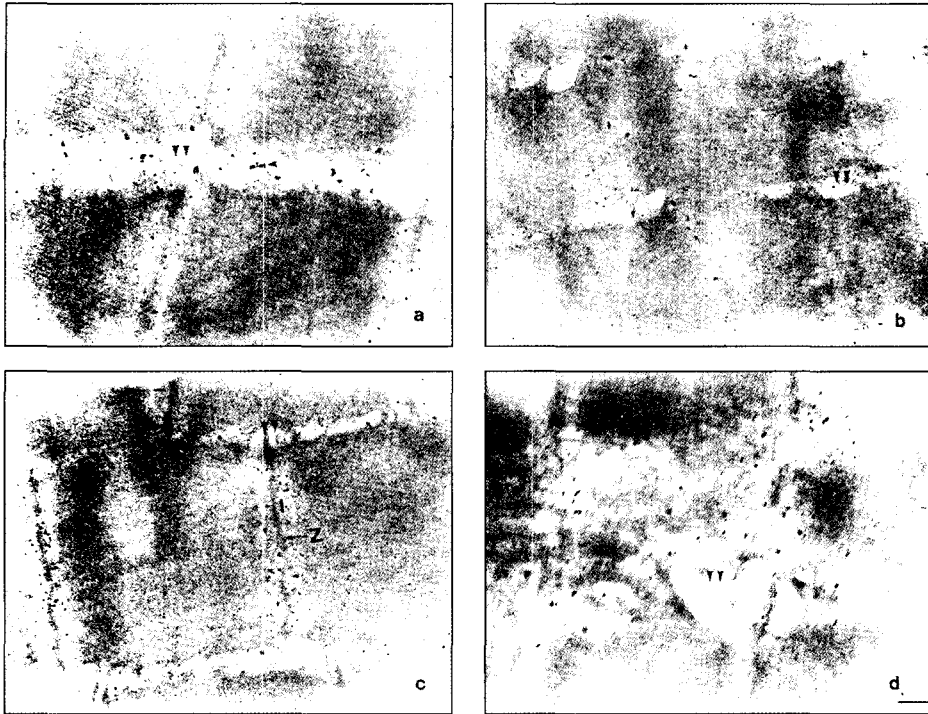


Fig. 6. Electron micrographs of longitudinal views of plaice muscle showing location  $\text{Ca}^{2+}$  after storage for 10 hrs at  $5^{\circ}\text{C}$ . Excised muscle were fixed with  $\text{OsO}_4$  and pyroantimonate. a, control (spiking at the head instantly); b, electrical stimulation for 15 sec.; c, electrical stimulation for 35 sec.; d, electrical stimulation for 60 sec.; Arrowheads and double arrowheads indicate terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum and calcium deposits. Bar represented 200 nm.

수 없기 때문에  $\text{Ca}^{2+}$ 의 이동이 저장시간이 길어질수록 더욱 현저하게 나타났다고 여겨진다.

$\text{Ca}^{2+}$ 의 이동도를 측정하기 위하여  $\text{Ca}^{2+}$ 을 pyroantimonate에 붙여 측정하는 방법은 여러 연구자들에 의하여 시도된 바 있으며,  $\text{Ca}^{2+}$ 의 분산을 측정하기 위한 pyroantimonate 방법은 닭 (Kawashiwa and Thiersch, 1984), 쥐 골격근 (Mentre and Halpern, 1988), 개구리 근육 (Somlyo et al., 1981) 등에서  $\text{Ca}^{2+}$ 을 효과적으로 측정할 수 있었다고 보고하였다. 또한 Ushio et al. (1991)은 어류의 사후 경직의 진행 중 근섬유에서  $\text{Ca}^{2+}$ -pyroantimonate 침전물을 관찰할 수 있었다고 하였다. 근육이 이완상태일때  $\text{Ca}^{2+}$ 농도가  $10^{-6}\text{M}$  정도로 낮는데 (Ebashi and Endo, 1968), 이것은  $\text{Ca}^{2+}$ 이 근소포체의 calsequestrin과 같은  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein과 복합체로서 존재하기 때문이며, 근소포체의 파괴 및 기능소실로  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein으로 부터  $\text{Ca}^{2+}$ 이 유출되어 pyroantimonate와 침전되었을 것이라 판단된다. 또한 상기의 결과에서 나타난 바와 같이 침전물이 I대 주위에서 관찰되는 것은 I대

위에 존재하고 있는 troponin과의 반응성 때문인 것으로 보고된 바 있다 (Legato and Langer, 1969).

이상의 결과에서 나타난 바와 같이 전기자극한 것이 측살에 비하여 근수축이 강하게 일어났으며, 이것은 전기자극에 의한 근소포체의 기능소실로 자극에 의하여 세포질로 방출된  $\text{Ca}^{2+}$ 을 효과적으로 재수용할 수 없어 증가된 상태로 유지되는  $\text{Ca}^{2+}$ 으로 인하여 근수축이 강하게 유발되었음을 보여주고 있다. 이러한 결과는 전기자극에 의한 근육에 있어서  $\text{Ca}^{2+}$  이동의 변화로부터 확인할 수 있었다. 따라서 상기와 같은 결과에 의하여 육질의 조직감이 개선되었던 것이라고 고찰된다.

## 요 약

근육의 미세구조는 측살의 경우, 근섬유의 A대, I대 및 M-line이 뚜렷하게 관찰되었으나, 전기자극한 것은 근섬유의 가는섬유가 굵은섬유 사이로 미끌어져 들어가 I대

가 불분명하였으며, 자극 시간이 길어질수록 Z-line의 연속성은 현저하게 소실되었다. 근소포체의 미세구조는 즉살의 경우, Z-line을 사이에 두고 원래의 상태를 유지하고 있었으나, 전기자극한 것은 자극 시간이 길어질수록 근소포체가 뭉쳐지거나 파괴된 형태를 보이고 있었으며, 저장 10시간째 더욱 현저하게 나타났다. 근소포체의  $Ca^{2+}$ -translocation을 살펴본 결과, 즉살 직후에는 근소포체 내부에  $Ca^{2+}$ 이 관찰되었으나, 전기자극을 가한 것은 근섬유에 분포되는 경향을 보였으며 이러한 현상은 전기자극 시간이 길어질수록 현저한 경향을 나타내었다. 저장 10시간 후에는 즉살에서도 근섬유에  $Ca^{2+}$ 이 관찰되었다.

### 참 고 문 헌

- Cho, Y. J. and Y. Y. Kim. 1993. Early changes after death of plaice muscle: 2. Temperature dependency on physicochemical and rheological properties. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 26 (1), 1~7 (in Korean).
- Ebashi, S. and M. Endo. 1968. Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 18, 123~128.
- Greaser, M.L., R.G. Cassens and W.G. Hoekstra. 1967. Changes in oxalate stimulated calcium accumulation in particulate fractions from post mortem muscle. *J. Agric. Food Chem.*, 15, 1112~1119.
- Greaser, M.L., R.G. Cassens, W.G. Hoekstra and E.J. Briskey. 1969. The effects of pH-temperature treatments on the calcium accumulating ability of purified sarcoplasmic reticulum. *J. Food Sci.*, 34, 633~636.
- Hasselbach, W. 1964. Relaxing factor and the relaxation of muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 14, 167~222.
- Ho, C. Y., M. H. Stromer and R. M. Robson. 1996. Effects of electrical stimulation on postmortem titin, nebulin, desmin and troponin-T degradation and ultrastructural changes in bovine longissimus. *J. Anim. Sci.*, 74, 1563~1575.
- Ho, C. Y., M. H. Stromer, G. Rouse and R. M. Robson. 1997. Effects of electrical stimulation and postmortem storage on changes in titin, nebulin, desmin, troponin-T and muscle ultrastructure in bos indicus crossbred cattle. *J. Anim. Sci.*, 75, 366~376.
- Johnston, I.A. and T.W. Moon. 1980. Exercise training in skeletal muscle of brook trout. *J. Exp. Biol.*, 87, 177~194.
- Kawashiwa, H. K. and N. J. Thiersch. 1984. Evaluation of potassium pyroantimonate/sucrose/ glutaraldehyde concentration and incubation time as essential variables for localizing calcium bound to organic compounds in epiphyseal chondrocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, 32, 1055~1065.
- Kim, J. H., N. G. Lee, Y. Y. Kim, K. W. Lee and Y. J. Cho. 1993. Early changes after death of plaice muscle. 3. Effect of killing methods on changes in content of ATP and its related compounds and lactate. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 26 403~408 (in Korean).
- Kim, T. J., Y. J. Choi, D. S. Kim and Y. J. Cho. 1998. Effects of electrical stimulation on biochemical properties of plaice sarcoplasmic reticulum and myofibrils. *Bull. Korean Fish. Soc.*, submitted.
- Lee, N. G., M. H. Yang and Y. J. Cho. 1995. Effects of electrical stimulation on physicochemical and rheological properties of plaice, *Paralichthys olivaceus* muscle at early period after death. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 28 (1), 23~30 (in Korean).
- Legato, M. J. and G. A. Langer. The subcellular localization of calcium ion in mammalian myocardium. *J. Cell Biol.*, 41, 401~423.
- Mentre, P. and S. Halpern. 1988. Localization of cations by pyroantimonate. II. Electron probe microanalysis of calcium and sodium in skeletal muscle of mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 36, 55~64.
- Somlyo, A., H. Gonzale, H. Shuman, H. McClellan G and A. P. Somlyo. 1981. Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of retanized muscle.: An electron-probe study. *J. Cell. Biol.*, 90, 577~594.
- Suzuki, A., A. Okamoto, Y. Ikeguchi and M. Saito. 1993. Pressure induced  $Ca^{2+}$  release from rabbit sarcoplasmic reticulum. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (5), 862~863.
- Ushio, H., S. Watabe, M. Iwamoto and K. Hashimoto. 1991. Ultrastructural evidence for temperature-dependent Ca release from fish sarcoplasmic reticulum during rigor mortis. *Food Struct.*, 10, 267~275.

1998년 2월 7일 접수

1998년 7월 8일 수리