

어류 알의 Protease Inhibitor 활성 분포

지성준¹·이지선¹·신준호¹·박권현¹·김진수¹·김경섭²·허민수^{2*}

사조산업(주), ¹경상대학교 해양식품공학과 / 해양산업연구소,

²경상대학교 식품영양학과 / 해양산업연구소

Distribution of Protease Inhibitors from Fish Eggs as Seafood Processing Byproducts

Seong Jun Ji, Ji Sun Lee¹, Joon Ho Shin¹, Kwon Hyun Park¹,
Jin-Soo Kim¹, Kyoung Sub Kim² and Min Soo Heu^{2*}

Sajo Industries Co., LTD., Goseong-gun 638-807, Korea

¹*Department of Seafood Science & Technology / Institute of Marine Industry,
Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea*

²*Department of Food & Nutrition / Institute of Marine Industry,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*

To identify and examine the distribution of proteolytic inhibitory activity in crude extracts from fish eggs, and to determine the applicability of these protease inhibitors as anti-degradation agents in surimi-based products and fish meat, we compared the inhibitory activities of various extracts from fish eggs to those of commercial proteases, such as trypsin and papain. We used the optimal conditions for the screening of trypsin activity: 30 ug/uL of 0.1% trypsin and 0.6 mM Na-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) with a pH of 8.0 at 40°C for 60 min. The activities of papain and four commercial proteases were investigated after mixing with 100 ug/uL enzymes and 0.3% casein with a pH of 8.0 at 40°C for 60 min. We performed a screening assay to detect the inhibitory activity (%) of crude extracts from eight species of fish eggs against the target proteases trypsin and papain. The assay revealed a wide distribution of trypsin and papain inhibitors in fish eggs. The specific inhibitory activities (11.6–28.6 U/mg) of crude extracts from fish eggs against trypsin and BAPNA substrate were higher than that (0.64 U/mg) of egg whites, used as a commercial inhibitor. The inhibitory activities of crude extracts from fish eggs against trypsin, and of egg whites against casein substrate (1.94–4.51 U/mg), were higher than those of papain (0.24–1.57 U/mg) and commercial protease (0.04–0.32 U/mg). The extracts from fish eggs were rich in protease inhibitors that exhibited strong inhibitory activity against trypsin, a serine protease, and papain, a cysteine protease.

Key words: Fish eggs, Protease inhibitor, Inhibitory activity, Trypsin, Papain

서 론

일반적으로, 수산 및 축산 식품에서 texture는 소비자의 기호성과 시장성의 척도가 될 정도로 중요한 품질 결정 요인 중의 하나이다. 이와 같은 수산 및 축산 식품에서 texture는 수산 및 축산 동물의 근육이나 조직 자체에 분포하는 내인성 효소 및 미생물이 분비하는 외인성 효소의 작용에 크게 좌우된다. 따라서 어류 및 육류 제품의 품질 저하 억제에 위한 방법 중의 하나가 texture에 영향을 미치는 내인성 및 외인성 효소의 작용을 억제시키는 것이라 할 수 있다 (Nonaka, 1976).

Protease inhibitor는 대체로 수산 및 축산 식품의 품질에 악영향을 주는 단백질 분해 효소의 촉매작용을 저해하는 단백질이나 peptides 등을 말한다. 이와 같은 protease inhibitor는 일반적으로 강장동물, 인간의 혈청, 동물, 식물, 박테리아에 널리 분포하고 있고, 의약품, 농업, 생물공학 분야에 있어 아주 중요한 물질이며, 생물체내에서 혈액응고, complement

activation, 세포 이동, 호르몬 운반, 종양 억제, pro-hormone 전환, fibrinolysis, 감염성 반응 등과 관련된 아주 다양한 반응을 조절 하는 등으로 인하여 생리적으로도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Potempa et al., 1994; Birk, 1994; Richardson, 1990; Weder, 1985; Rawlings, 2004).

이와 같은 생체내 다양한 반응을 조절하는 생물체내 존재하는 protease inhibitor는 작용하는 단백질 분해 효소의 특이성에 따라 serine 및 cysteine protease inhibitor로 대별된다. 이들 protease inhibitor 중 serine계 protease inhibitor는 모든 다세포 생물 내에 널리 분포하고, 대사과정 중에 단백질 분해 효소가 관여하는 많은 생물학적 대사과정 즉, metamorphosis에 있어서 중요한 역할 (Eguchi, 1993)을 하며, 주된 방어 시스템 내에는 혈액응고, pro-phenoloxidase cascade나 세포질 활성화, 다양한 병원체의 선택적 분해 등을 조절하는 결정적인 역할을 한다 (Laskowski and Kato, 1980). Cysteine계 protease inhibitors는 동물의 근육 및 체액에 널리 분포하고 있으며 (Lenney et al., 1979; Toyohara et al., 1988; Yamashita and Konagaya,

*Corresponding author: heu1837@dreamwiz.com

1990), 계란의 흰자에서 처음 분리되었고 (Sen and Whitaker, 1973), cysteine protease와 관련한 대사과정 및 병리적 대사과정의 조절에 관여하는 것으로 추정되고 있으며, 실제로 세포 내외의 cysteine계 protease에 의한 단백질분해 반응으로부터 세포의 보호뿐만 아니라 외부 침입요소에 대한 생물학적 방어 시스템에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Bjrek et al., 1989).

수산동물 유래의 protease inhibitor에 관한 연구로는 연어, white croaker, arctic charr, hake, rainbow trout 등과 같은 어류의 혈액과 근육 (Borla et al., 1998; Clereszko et al., 2000; Martone et al., 1991; Olenen et al., 2003; Sangorin et al., 2001; Yamashita and Konagaya, 1991a), herring, carp 및 chum salmon의 알 (Oda et al., 1998; Tsai et al., 1996) 그리고 atlantic salmon (Synnes, 1998; Ylonen et al., 1999; Yamashita and Konagaya, 1991b), pufferfish와 29종 어류의 껍질 (Nagashima et al., 2004)로부터 protease inhibitors를 분리 정제하여 그 특성을 검토한 바 있다.

한편, 시판 food-grade protease inhibitor에는 egg white powder, whey protein concentrate, beef plasma protein, 그리고 potato extract가 사용 (Hamann, et al., 1990; Kang and Lanier, 1999; Morrissey et al., 1993)되고 있으며, 이들 protease inhibitor의 효과는 surimi 제조를 위한 원료 어종에 따라 surimi의 품질에 차이가 있어, egg white powder와 beef plasma protein이 주로 사용 (Kang and Lanier, 1999; Morrissey et al., 1993)되고 있다. 그러나, 현재 축산식품 소재는 광우병, 조류 독감 등에 노출되어 있어 건강을 우려하는 소비자에게 외면을 받고 있어, 이러한 일면에서 조류독감 및 광우병의 위험성이 없는 수산동물의 가공부산물 소재로부터 food grade용의 protease inhibitor의 개발이 절실한 실정이다. 수산가공부산물로서 명태 알, 대구 알, 청어 알, 날치 알 및 철갑상어 알 등과 같은 몇몇 종류의 어류 알이 수산식품 및 식재료로 이용될 뿐, 대부분의 어류 알은 아무런 용도가 없어 대부분이 폐기되고 있다. 따라서 잉어 및 연어의 알 (Oda et al., 1998; Tsai et al., 1996)과 같이 어류 알로부터 유용성분을 추출하여 활용할 수 있는 방안을 개발한다면 수산가공업계에 새로운 활력을 부여할 수 있으리라 기대되어진다.

본 연구에서는 우리나라에서 기호도가 높고, 소비량이 많거나 대량양식이 이루어지는 어종으로, 횡감 및 통조림 가공 부산물로 대량 발생하는 8종류의 어류 (가다랑어, 황다랑어, 명태, 넙치, 전어, 송어, 참돔 및 방어)알을 대상으로 하여 효율적 이용을 위한 기초연구로 target protease 및 시판 상용효소에 대한 반응조건을 확립하여 어류 알의 protease inhibitor의 분포를 살펴보고, food grade protease inhibitor로서 egg white powder와 저해활성을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 8 종류의 어류 알 중 가다랑어 (Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*) 및 황다랑어 (Yellowfin tuna,

Thunnus albacares) 알은 경상남도 창원시 소재 (주) 동원산업에서, 명태 (Alaska pollock, *Theragra chalcogramma*) 알은 부산광역시 사하구 소재 블루오션 (주)에서 동결상태로 분양받았다. 넙치 (Bastard hailbut, *Paralichthys olivaceus*), 전어 (Gizzard shad, *Konosirus punctatus*), 송어 (Mullet, *Mugil cephalus*), 참돔 (Res seabream, *Pagrus major*) 및 방어 (Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*)알은 통영시 소재 어시장에서 활어상태로 구입하여 실험실에서 알을 분리하였다. 8 종류의 어류 알은 초저온냉동고 (-70°C)에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

Target protease 및 기질

어류 알로부터 추출한 protease inhibitor의 저해활성 분포를 살펴보기 위한 target protease는 serine protease 1종, cysteine protease 1종, 그리고 미생물 기원의 시판 상용효소 4종으로 하였다. 실험에 사용한 serine protease인 trypsin과 cysteine protease인 papain은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을, 그리고 시판 상용효소인 Alcalase 2.4 LFG (이하 Alcalase라 칭함), Flavourzyme 500 MG (이하 Flavourzyme이라 칭함), Neutrase 0.8 L (Neutrase라 칭함) 및 Protamex 1.5 MG (이하 Protamex라 칭함)는 Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) 제품을 구입하여 사용하였다.

이상에서 언급한 시판 상용효소의 최적 온도, 최적 pH 및 효소기원은 Table 1과 같다. 이들 단백질분해효소의 활성을 측정하기 위해 사용한 기질은 천연기질로서 casein을, 합성기질로서 L-benzoyl-arginine-p-nitroanilide (BAPNA)를 Sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였고, 기타 시약은 분석급으로 구입하여 사용하였다.

Table 1. Characteristics of target and commercial enzymes used in this experiment

Enzyme	Optimal conditions		Manufacture Origin
	Temp. (°C)	pH	
Trypsin	40	8.0	Bovine pancreas
Papain	40	6.5	Papaya fruit
Alcalase 2.4 LFG	55-70	6.5-8.5	<i>Bacillus licheniformis</i>
Flavourzyme 500 MG	50	7.0	<i>Aspergillus oryzae</i>
Neutrase 0.8 L	45-55	6.0	<i>Bacillus amyloliiensquefaciens</i>
Protamex 1.5 MG	40	6.0-7.0	<i>Bacillus sp.</i>

단백질 농도

어류 알 조추출물의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 비색법에 따라 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 구한 검량곡선으로부터 측정하였다.

어류 알로부터 crude extract의 조제

8종의 어류 알로부터 crude extract의 추출은 냉동상태의 시료를 부분해동 및 마쇄한 다음, 어류 알 (100 g)에 대하여 3배량 (v/w)의 탈 이온수를 각각 가하고, 혼합한 후, 1시간 간격으로 교반 (20°C, 6시간)하여 추출하였다. crude extract의 지방제거를 위하여 시료량의 0.2배 (v/w)에 해당하는 사염화탄소 (CCl₄)를 가하고 혼합한 다음, 원심분리 (12,000 × g,

20 min) 하여 얻어진 상층액을 탈지 crude extract로 하였다.

Target protease 및 시판 상용효소의 반응조건 구명

어류 알로부터 추출한 crude extract의 단백질분해 저해활성 및 분포를 알아보기 위한 target protease 및 시판 상용효소의 반응조건의 구명은 효소농도 (trypsin, papain 및 4 종의 시판 상용효소), 반응시간 및 기질농도에 대하여 실시하였다.

효소농도 : Target protease로서 serine계 protease인 trypsin의 BAPNA에 대한 최적농도 구명은 Erlanger et al. (1961, 1966)의 방법을 다소 수정한 Heu and Ahn (1999)의 방법에 따라 측정하였다. 먼저, 10~50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 0.1% trypsin, 2.8 mL의 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer 및 180 μL 의 10 mM BAPNA기질을 반응혼액으로 하여 40°C에서 1시간 반응 시킨 후, 300 μL 의 33% acetic acid 용액을 가하여 반응을 정지 시킨 다음 원심분리 (146 x g, 20 min)하고, 상층액을 파장 410 nm에서 흡광도 (U-2900, UV-VIS spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan)를 측정하여 BAPNA 기질에 대한 trypsin의 최적 농도를 구하였다.

그리고, casein 기질에 대하여는 Anson (1938)의 방법을 다소 수정한 Heu and Ahn (1999)의 방법에 따라, 10~50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 0.1% trypsin, 1.7 mL의 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer 및 300 μL 의 2% casein 기질을 반응혼액으로 하여 40°C에서 1시간 반응 시킨 후, 2 mL의 5% trichloroacetic acid (TCA) 용액을 가하여 반응을 정지시킨 다음 원심분리 (146 x g, 20 min)하고, 상층액을 파장 280 nm에서 흡광도 (U-2900, UV-VIS spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan)를 측정하여 casein에 대한 trypsin의 최적 농도를 산출하였다.

한편, Target protease로서 cysteine protease인 papain 및 미생물기원의 시판 상용효소의 casein에 대한 최적 효소농도는 20~250 μL 의 0.1% papain 및 2% 시판 상용효소, 1.7 mL의 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) buffer 및 300 μL 의 2% casein을 반응혼액으로 하여 40°C에서 1시간 반응 시킨 후, 2 mL의 5% TCA 용액을 가하여 반응을 정지시킨 다음 원심분리 (146 x g, 20 min)하고, 상층액을 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하여 papain 및 시판 상용효소의 최적농도를 산출하였다.

반응시간 : Target protease 및 시판 상용효소의 BAPNA 기질 및 casein 기질에 대한 최적 반응시간의 구명은 BAPNA 기질의 경우, 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 0.1% trypsin에 2.8 mL의 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer 및 180 μL 의 10 mM BAPNA 기질을 반응혼액으로, 그리고 casein 기질의 경우 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 0.1% trypsin에 1.7 mL의 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) buffer 및 300 μL 의 2% casein을 반응혼액으로 하여 40°C에서 일정 반응시간 (0~120 min)으로 반응시킨 후, 전술한 방법에 따라 BAPNA 기질 및 casein 기질에 대한 trypsin 최적 반응시간을 각각 산출하였다.

기질 농도 : Trypsin의 BAPNA 및 casein 기질의 최적농도 구명을 위한 효소 반응혼액은 BAPNA 기질의 경우 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 0.1% trypsin에 2.8 mL의 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer 및 180 μL 의 여러 가지 농도의 BAPNA 기질 (최종농도 0.2~1.0 mM)을 혼합하여, 그리고, casein 기질의 경우 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 0.1% trypsin에 1.7 mL의 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer

및 300 μL 의 여러 가지 농도의 casein 기질 (최종농도 0.1~0.5%)을 각각 가하여 40°C에서 60분으로 반응시킨 후, 전술한 방법에 따라 trypsin의 최적기질 농도를 각각 산출하였다.

아울러, Lineweaver-Burk 식 (Dixon and Webb, 1979)에 적용하여 각 기질에 대한 최대반응속도 V_{max} 및 K_m 정수도 구하였다.

이들 trypsin, papain 및 시판 상용효소의 활성은 1시간 동안 1 mg의 효소 (단백질)가 변화시키는 흡광도 0.1 digit을 1 U/mg으로 나타내었다.

어류 알 crude extracts의 target protease 저해활성 분포

8종의 어류 알로부터 추출한 crude extract와 식품용 시판 protease inhibitor로서 1% egg white powder의 저해활성 분포는 전술한 반응 최적조건서 target protease인 trypsin 및 papain에 대하여 BAPNA 및 casein 기질을 사용하여 측정하였고, 저해제를 첨가하지 않은 control에 대한 효소활성 감소정도를 저해활성(%)으로 나타내었다.

Target protease 및 시판 상용효소에 대한 저해 활성

Target protease (0.1% trypsin 및 papain을 각각 30 μL 및 100 μL)와 4종의 시판 상용효소 (100 μL 의 2% Alcalase, Flavourzyme, Neutrase 및 Protamex)에 어류 알 (명태 알, 넙치 알, 가다랑어 알, 황다랑어 알)로부터 추출한 100 μL 의 crude extract를 혼합하여 전단계 반응 (40°C, 30 min)을 실시한 후, 반응혼액에 대한 기질 최종농도가 BAPNA 기질의 경우 0.6 mM 및 casein 기질의 경우 0.3%이 되도록 가하여, 40°C에서 1시간동안 반응시켜, 전술한 방법에 따라 잔존 효소활성을 측정하였다. 이를 저해제를 첨가하지 않은 control에 대한 효소활성 감소정도를 저해활성 (Inhibitory activity, U/mg)으로 나타내었다.

이때 저해활성 (inhibitory activity, U/mg)은 crude extract의 1 mg 단백질이 1시간 동안 1 U/mg의 효소활성 (enzymatic activity, U/mg)을 감소시키는 것으로 나타내었다.

결과 및 고찰

Target protease 및 시판 상용효소의 최적 반응조건

Target protease로서 serine protease인 trypsin의 첨가량 (10~50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)에 따른 BAPNA 기질 및 casein 기질에 대한 분해 활성은 Fig. 1과 같다. 기질의 종류에 관계없이 0.1% (w/v) trypsin의 첨가량 (BAPNA 기질의 경우 10~50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 범위, casein 기질의 경우 10~30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 범위)과 trypsin 활성간의 상관관계는 일차 함수적으로 증가하였으며, 이때의 trypsin의 첨가량과 기질 분해 활성과의 일차 반응식은 BAPNA 기질의 경우 $y = 0.0268x + 0.056$ ($r^2=0.9885$)이었고, casein 기질의 경우 $y = 0.0232x$ ($r^2=0.9665$)이었다.

따라서, trypsin에 대한 어류 알의 protease 분해 활성 저해정도를 측정하기 위한 0.1% trypsin의 반응혼액 중 첨가량은 기질의 종류에 관계없이 모두 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 판단되었고, 이후의 실험에서는 BAPNA 기질 및 casein 기질에 대한 0.1%

trypsin 첨가량을 30 µg/µL로 정하였다.

Target protease로서 cysteine계 protease인 papain 및 4종의 시판 상용효소의 casein 기질에 대한 각 효소농도별 분해활성은 Fig. 2와 같다. Papain의 분해활성은 40~120 µg/µL 범위에서 효소 농도가 증가할수록 일차 함수적으로 증가하였고, 이때의 일차반응 관계식은 $y = 0.0062x$ ($r^2=0.9459$)이었으며, 이후의 효소농도에서는 서서히 증가하는 경향을 보였다.

또한 4종의 시판 상용효소 중 Alcalase, Neutrase 및 Protamex의 분해활성은 10~50 µg/µL 범위에서, Flavourzyme의 분해활성은 10~100 µg/µL의 범위에서 일차반응 관계식을 나타내었다. Casein 기질에 대한 효소 분해활성은 Protamex가 가장 강하였고, 다음으로 Alcalase, Neutrase 및 Flavourzyme의 순이었다.

이상의 결과로 미루어 보아 papain 및 시판 상용효소의 분해활성에 대한 저해 정도를 측정하기 위한 반응 혼합액 중의 최적 효소 첨가농도는 100 µg/µL로 정하였다.

반응시간 (0~120 min)에 따른 trypsin의 BAPNA 및 casein 기질에 대한 분해 활성 (data 미제시)은 BAPNA 기질에 대한 분해 활성이 반응시간 60분까지 일차 함수적으로 증가하였고,

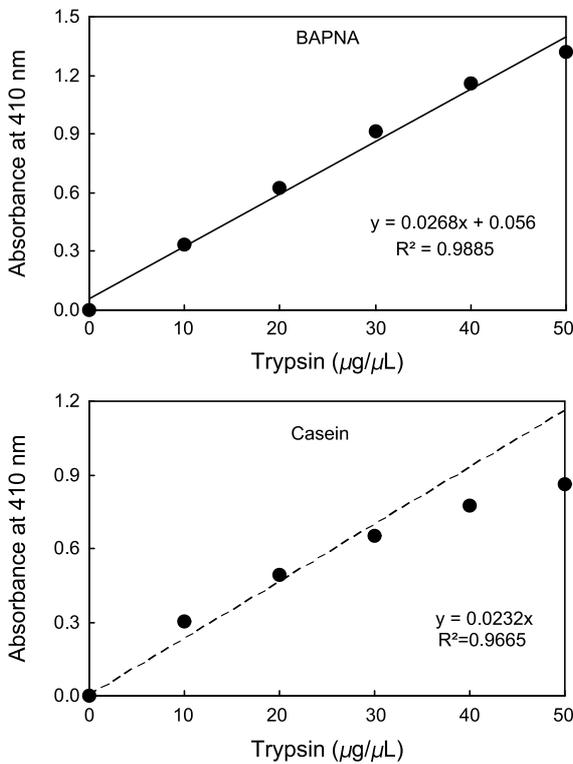


Fig. 1. Effect of the enzyme concentration on trypsin activity toward BAPNA and casein as substrates.

Enzyme activity was measured by the method of Erlanger et al. (1961, 1966) with slight modification. Protein concentration: 1 mg/mL. Reaction condition : 10~50 µL of enzyme; 3 mL of 0.5 mM BAPNA/50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 40°C, 1 hr.

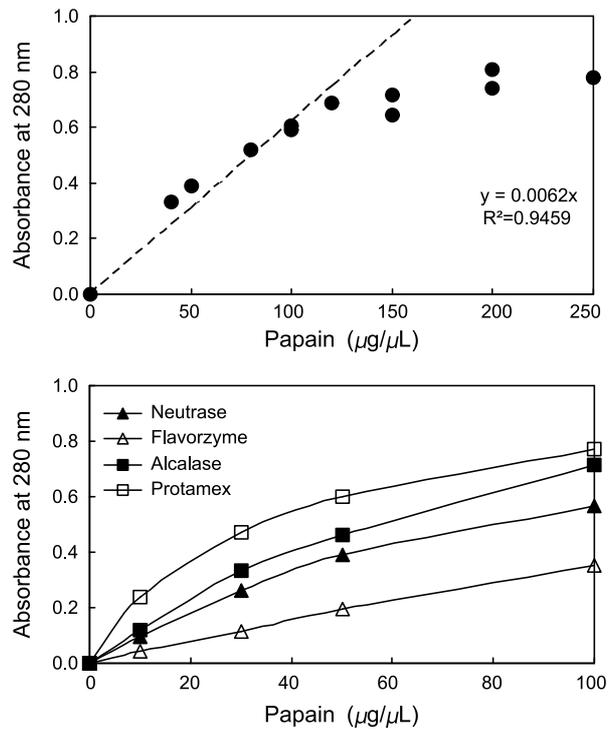


Fig. 2. Effect of the enzyme concentration on caseinolytic activity of the papain and commercial proteases toward casein. Enzyme activity was measured by the method of Anson (1938) with slight modification. Protein concentration: 1 mg/mL. Reaction condition : 10~250 µL of enzyme; 2 mL of 0.3% casein/50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 40°C, 1 hr.

이때의 효소 활성과 반응 시간과의 일차 반응식의 관계식은 $y = 0.0168x$ ($r^2=0.9820$)이었다. 한편, casein 기질에 대한 분해활성은 BAPNA기질에 대한 분해활성과 같은 경향으로 반응 60분까지 일차반응 관계식을 나타내었으며, 이때의 반응관계식은 $y = 0.0114x$ ($r^2=0.9237$)이었다.

이상의 결과로 합성기질 (0.5 mM BAPNA) 및 천연기질 (0.3% casein)에 대한 0.1% trypsin의 적정 반응시간은 60분으로 판단되었고, 이후의 trypsin에 대한 저해활성을 측정하기 위한 반응시간은 60분으로 적용하였다.

BAPNA (0.2~1.0 mM) 및 casein (0.1~0.5%) 기질농도에 따른 trypsin의 분해 활성 (data 미제시)은 BAPNA 기질의 경우 0.2~0.6 mM 범위까지 기질 농도의 증가와 더불어 일차 함수적으로 증가하였으며, 이때 기질농도와 분해활성과의 일차 반응식은 $y = 28.176x$ ($r^2=0.9610$)이었다. 또한 기질농도 (1/mM)와 효소활성 (1/U/mg)을 각각 역수로 취하여 Lineweaver-Burk 식에 적용한 결과, 일차 반응식은 $y = 0.0206x + 0.0304$ ($r^2=0.9984$)로 이때의 최대반응속도 (V_{max})는 32.89 U/mg이었고, K_m 정수는 0.68 mM이었다.

한편, trypsin의 casein 기질에 대한 분해활성은 0.1~0.3% 범위까지 기질 농도의 증가와 더불어 일차 함수적으로 증가하였으며, 이때 기질농도와 분해활성과의 일차 반응식은 $y = 26.961x$ ($r^2=0.9661$)이었다. 또한 기질농도 (1%)와 효소활성

(1/ U/mg)을 각각 역수로 취하여 Lineweaver-Burk 식에 적용한 결과, 반응식은 $y = 0.0241x + 0.0603$ ($r^2=0.9810$)로 이때의 최대 반응속도 (V_{max})는 16.58 U/mg이었고, K_m 정수는 0.40%이었다.

이상의 결과로 target protease로서 serine계 protease인 trypsin의 저해활성 측정을 위한 반응혼액 중 기질의 농도는 BAPNA 및 casein기질에 대하여 각각 0.6 mM 및 0.3%가 적절하리라 판단되었으며, papain 및 4종의 시판 상용효소에 대하여도 반응시간 및 기질농도조건을 동일하게 적용하였다.

Target proteases 및 시판 상용효소의 최적 효소활성

어류 알에서 추출한 crude extract의 단백질분해 저해활성을 측정하기 위하여, 최적 효소반응 조건하에서 target proteases 및 시판 상용효소의 BAPNA 및 casein에 대한 비효소활성 (Enzymatic activity, U/mg)를 측정하여 Table 2에 나타내었다. 먼저 BAPNA 기질에 대하여는 trypsin (17.50 U/mg)이 papain (0.05 U/mg)에 비하여 350배 강한 분해활성을 보여 BAPNA 기질이 trypsin에 대하여 특이적인 기질이라 확인되었다. 한편, casein 기질에 대하여는 trypsin (7.12 U/mg)의 비효소활성이 가장 강하였으며, Alcalase, Neutrase, 및 Protamex (2.25~2.56 U/mg), Flavourzyme (1.25 U/mg) 그리고 papain (0.83 U/mg) 순이었으며, trypsin이 papain에 비하여 비효소활성이 약 8.6배 가량 강하였다. 이들 비효소활성을 토대로 8종의 어류 알에서 추출한 crude extract의 단백질분해 저해활성을 측정하였다.

Nagashima et al. (2004)은 29종의 어류 껍질의 crude extracts로부터 protease inhibitors의 분포 검색에 trypsin과 BAPNA 기질을 사용하였으며, 특히, 복어 (*Takifugu pardalis*) 껍질에서 정제한 protease inhibitor에 대하여는 casein 기질을 사용하여 serine proteases로서 trypsin과 chymotrypsin을 cysteine protease로서 papain을, 그리고 metalloprotease로서 thermolysin 등의 효소를 사용하여 저해활성을 측정하였다. Choi et al. (2002)은 가다랑어 알의 trypsin inhibitor에 관한 연구에서 trypsin 및 BAPNA에 기질을 사용하여 그 저해활성을 검토하였으며, Ee et al. (2008)은 Australian wattle 종자의 serine protease inhibitor에 대한 연구에서 trypsin 및 chymotrypsin 효소와 합성기질을 사용하여 그리고 Angelova et al. (2006)은 *Streptomyces chromofuscus*로부터 trypsin 및 BAPNA 기질 사용하여 serine protease inhibitor에 대한 활성을 측정하여 보고하였다.

Table 2. Enzymatic activity (U/mg) of target and commercial enzymes under the optimum condition in this experiment

Enzyme	BAPNA	Casein
Trypsin	17.50	7.15
Papain	0.05	0.83
Alcalase	-	2.40
Flavourzyme	-	1.25
Neutrase	-	2.25
Protamex	-	2.56

Values were mean of triple determination.
-, Not detected.

Japanese eel (Saitoh et al., 2005) 껍질로부터 cysteine protease inhibitor의 저해활성을 papain 및 BANA 기질에 대하여 측정하였으며, Atlantic salmon (Synnes, 1998)의 껍질, 명태 (Ustadi et al., 2005a), glassfish (Ustadi et al., 2005b) 및 연어 (Yamashita and Konagaya, 1991a ; Kim et al., 2006)알로부터 protease inhibitor의 특성에 관한 연구에서 papain 효소와 azocasein 기질을 사용하여 저해활성을 측정하였다. 이상의 결과와 보고에서 어류 알 crude extracts로부터 protease inhibitor의 분포검색을 위해, 본 연구에서 사용한 target protease로서 serine protease인 trypsin과 cysteine protease인 papain 그리고 합성기질로서 BAPNA와 천연기질로서 casein 기질의 선택은 적절하리라 판단되었다.

어류 알 crude extracts의 단백질 함량 및 target protease에 대한 저해 활성

8종류의 어류 알로부터 추출한 crude extracts의 단백질 함량 (mg/ 100 g sample) 과 BAPNA 기질에 대한 target protease인 trypsin과 papain의 분해활성을 저해하는 정도를 시판 protease inhibitor인 egg white powder와 상대활성 (%)으로 비교하여 살펴본 결과는 Table 3과 같다. 100 g의 어류 알에서 추출한 crude extracts의 Lowry et al. (1951)법으로 측정된 단백질 함량은 방어 (6,273 mg/100 g)가 가장 높은 함량을 나타내었으며, 다음으로 전어 및 참돔 (5,739~5,823 mg/100 g), 명태와 넙치 (3,088~3,700 mg/100 g), 그리고 송어, 가다랑어 및 황다랑어 (2,377~2,536 mg/100 g) 순이었다. 동일한 추출 조건에서 100 g당 추출단백질의 함량에 있어 방어, 전어 및 참돔의 알 crude extract가 다른 어종의 알에 비하여 약 2배정도의 함량 차이를 보였다. 어류 알 추출물의 단백질함량에 대한 보고에 따르면 glassfish 알 crude extract의 단백질함량이 20,031 mg/250 g (환산 8,012 mg/100 g, Ustadi et al., 2005b), 연어 알 crude extract가 1,046 mg/25 g (환산 4,184 mg/100 g, Kim et al., 2006) 그리고 명태 알에서 추출한 crude extract의 단백질 함량은 1,192 mg/25 g (환산 4,768 mg/100 g, Ustadi et al., 2005a)이라고 하여 본 연구 결과와는 차이가 있었으며, 이는 어종 및 추출조건 등에 차이에 기인하는 것으로 판단되었다.

Table 3. Distribution of amidolytic inhibition activity of crude extracts from fish eggs toward target proteases

Fish	Total protein (mg/100 g sample)	Trypsin inhibition (%)	Papain inhibition (%)
Alaska pollock	3,700±158	24.4±1.3	27.5±13.5
Bastard halibut	3,088±250	28.8±1.2	8.5±12.2
Gizzard shad	5,823±369	23.2±1.1	-
Mullet	2,464±250	11.6±1.3	22.2±11.5
Red seabream	5,739±390	16.3±0.8	-
Skipjack tuna	2,377±158	39.4±2.3	45.2±13.8
Yellowfin tuna	2,536±231	33.0±1.8	40.3±12.6
Yellowtail	6,273±254	27.1±1.3	0.4±0.1
1% Egg white powder	1,000	8.0±0.1	-

Values were mean ±SD of triple determination.
-, Not detected.

어류 알로부터 추출한 crude extracts의 trypsin (BAPNA 기질) 저해활성은 가다랑어와 황다랑어 알 crude extracts가 각각 39.4 및 33.0%의 상대적으로 강한 저해활성을 보였으며, 명태, 넙치, 전어 및 방어는 23.2~27.1% 범위의 저해활성을, 송어 (11.6%) 및 참돔 (16.3%)의 저해활성 분포를 나타내었다. Positive control로서 시판 egg white inhibitor의 경우 BAPNA에 대한 trypsin 저해활성은 8%에 불과하여 8종의 어류 알의 crude extracts 보다 낮은 저해활성으로 보였다. 한편, papain (BAPNA 기질)에 대한 저해활성은 전어, 참돔, 방어 (0.4%), 넙치 (8.5%) 및 egg white inhibitor의 경우 저해활성이 없거나 거의 나타나지 않은 반면, 가다랑어 (45.2%), 황다랑어 (40.3%), 명태 (27.5%) 및 송어 (22.2%)는 비교적 높은 저해활성을 나타내었다. 그러나, papain의 BAPNA의 비효소활성 (0.05 U/mg, Table 2)이 너무 낮고, 상대 저해활성의 편차가 커 papain의 저해활성 분포 유무를 판단하기에는 다소 무리가 있을 것으로 판단되었다. 한편 29종의 어류 껍질 (Nagashima et al., 2004) 및 가다랑어 알 (Choi et al., 2002), 그리고 white croaker (Hara et al., 1985; Cao et al., 2000) 및 carp (Hara and Ishihara, 1987)의 근육에는 trypsin (BAPNA 기질)에 대해 저해활성을 나타내는 serine protease inhibitor가 분포한다고 보고 하였으며, Saitoh et al. (2005)은 Japanese eel 껍질의 crude extract에는 papain 및 ficin 효소에 대하여 저해활성을 나타낸다고 하여 cysteine protease inhibitor가 분포한다고 하였다.

Table 4. Distribution of caseinolytic inhibition activity of crude extracts from fish eggs toward target proteases

Fish	Total protein (mg/100 g sample)	Trypsin inhibition (%)	Papain inhibition (%)
Alaska pollock	3,700±158	10.9±2.2	11.1±3.5
Bastard hailand	3,088±250	5.6±1.4	37.9±14.6
Gizzard shad	5,823±369	1.7±0.1	-
Mullet	2,464±250	5.2±1.3	25.5±11.5
Red seabream	5,739±390	10.6±2.6	30.6±13.2
Skipjack tuna	2,377±158	18.8±3.2	39.9±13.8
Yellowfin tuna	2,536±231	26.6±2.4	53.0±12.6
Yellowtail	6,273±254	35.9±1.8	38.5±10.1
1% Egg white powder	1,000	14.5±2.0	4.4±1.6

Values were mean ±SD of triple determination.
-, Not detected.

Table 4는 어류 알로부터 추출한 crude extracts의 casein 기질에 대한 target protease의 저해 활성분포를 나타낸 결과이다. 먼저, trypsin에 대한 저해활성은 방어 (35.9%)가 가장 높은 저해 활성을 나타내었으며, 다음으로 황다랑어 (26.6%), 가다랑어, egg white, 명태 및 참돔이 10%대의 저해활성을 나타내었다. 반면에 송어와 전어의 경우 5% 미만의 저해활성을 나타낼 뿐이었다. 한편 papain에 대한 어류 알 crude extracts의 저해활성 분포는 황다랑어가 53%의 높은 저해 활성을 보였고, 넙치, 참돔, 가다랑어 및 방어의 경우 30.6~39.9% 범위의 저해활성을, 전어와 egg white의 경우 저해활성이 없거나 거의

나타나지 않았다. 또한 trypsin 저해활성이 papain 저해활성보다 낮은 경향을 나타내었다. 이처럼 papain에 대한 저해활성이 trypsin에 대한 저해활성보다 상대적으로 높고, 저해활성의 편차가 크게 나타난 이유는 비효소활성 (Table 2)이 trypsin에 비하여 낮아, control (어류 알 crude extract를 첨가하지 않은 대조군)에 대한 효소활성의 감소폭이 절대적으로 낮음에도 불구하고, control에 대한 상대 백분율로 저해활성을 나타낸 것에 기인한다.

Nagashima et al. (2004)은 복어 (*Takifugu pardalis*) 껍질의 정제된 protease에 대하여는 casein 기질에 대하여도 papain, trypsin chymotrypsin, thermolysin 등의 효소에 대하여도 저해활성을 나타내어 serine, cysteine 및 metallo-protease가 분포한다고 하였으며, glassfish 알 (Ustadi et al., 2005b), 연어 알 (Yamashita and Konagaya, 1991b ; Kim et al., 2006), 및 명태 알 (Ustadi et al., 2005a)에 분포하는 protease inhibitor는 cysteine protease인 papain 및 cathepsin L에만 저해활성을 보일 뿐, serine protease인 trypsin에는 저해활성을 보이지 않는다고 하였다.

이상의 결과와 보고에서 수산동물의 조직 (근육, 껍질, 알 등)에 따라 protease inhibitor의 분포가 다양함을 보였으며, 특히 어류 알에는 serine protease inhibitor (Choi et al., 2004)와 cysteine protease inhibitors (Ustadi et al., 2005a; 2005b; Kim et al., 2006)가 분포한다고 하여 어종에 따라 protease inhibitors의 분포에 차이가 있었다. 따라서, target protease 및 기질의 종류에 따라 저해활성의 강도 및 분포에 차이를 보였으며, 대체로 8종의 어류 crude extracts에는 casein 및 BAPNA 기질에 대하여 trypsin에 대한 저해작용이 papain에 비하여 강하게 나타남으로서 serine protease를 저해하는 protease inhibitor가 주로 분포하리라 판단되었으며, 전어를 제외한 7종의 어류 알 crude extracts에는 cysteine protease로서 papain의 casein 기질의 분해에 대한 저해활성으로 cysteine protease를 저해하는 protease inhibitor도 분포하는 것으로 추정되었다.

Target proteases 및 시판 상용효소에 대한 저해활성

어류 알로부터 protease inhibitor의 산업적 이용가능성을 살펴보기 위하여, 8종의 crude extracts 중, 단백질 함량 및 target protease에 대한 저해활성 (%) 그리고 원료확보의 용이성을 고려하여, 우리나라 대표적인 양식어종으로서 대량생산되어 주로 횡감용으로 이용하는 넙치, 통조림용으로 대량 가공되는 가다랑어 및 황다랑어, 그리고 수산발효식품으로서 것갈로서 이용되고 있는 명태 알을 선정하였다. 이들 4종의 어류 알을 대상으로 BAPNA 기질에 대하여 crude extract 중의 1 mg 단백질이 1시간 동안 target protease의 비효소활성 1 U/mg를 감소시키는 저해활성 (Inhibitory activity, U/mg)으로 살펴본 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

4종의 어류 알로부터 추출한 crude extracts의 trypsin (BAPNA 기질) 저해활성은 가다랑어가 28.6 U/mg으로 황다랑어 (17.0 U/mg)에 비하여 높았으며, 명태 (13.3 U/mg) 그리고 넙치 (11.6 U/mg) 순이었으며, 대조구로서 사용한 시판 protease inhibitor인 egg white powder (0.64 U/mg)보다 저해활

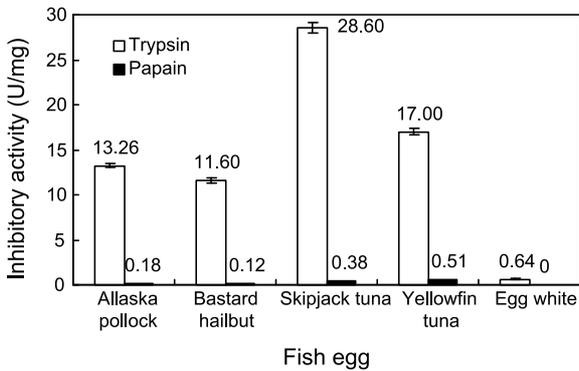


Fig. 3. Distribution of inhibitory activity of target proteases (trypsin and papain) by the crude extracts of fish eggs and egg white toward BAPNA as a substrate.

성이 약 20.1~44.7배 높은 수준이었다. 또한, 넙치, 명태, 가다랑어 및 황다랑어 알과 같은 4종류의 어류 알로부터 추출한 crude extracts의 papain (BAPNA 기질)에 대한 저해활성은 황다랑어가 0.51 U/mg으로 가다랑어 (0.38 U/mg), 명태 (0.18 U/mg), 넙치 (0.12 U/mg) 및 대조구로 사용한 시판 protease inhibitor인 egg white powder (활성 미검출)에 비하여 높았다. Trypsin과 papain의 (BAPNA 기질)에 대한 상대 저해활성(%) 결과 (Table 3)와 Fig. 3의 inhibitory activity (U/mg) 결과와 비교해보면 BAPNA에 대한 기질특이성으로 인해 4종의 어류

알 crude extracts의 papain에 대한 저해활성 분포는 trypsin에 대한 저해활성이 월등히 강한 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 보아 명태, 넙치, 가다랑어 및 황다랑어 알 crude extracts에는 BAPNA 기질에 대하여 trypsin 및 papain 저해활성을 보이는 저해제가 분포함을 알 수 있었으며, 또한 papain보다는 trypsin을 강하게 저해하는 저해제가 다량 분포하고 있음이 확인되었다.

Nagashima et al. (2004)은 복어 (*Takifugu pardalis*) 껍질 crude extracts의 trypsin (BAPNA 기질)에 대한 저해활성 (0.92 U/mg)이 가장 강하다고 하였으며, Choi et al. (2002)은 가다랑어 알로부터 추출한 crude extract의 0.0095 U/mg의 저해활성을 나타낸다고 하여, 본 연구결과와 저해활성 강도에 상당한 차이를 보였으며, 이는 저해활성 단위를 정의하는 흡광도의 기본 단위 및 반응시간의 차이에 기인하는 것으로 판단되었다. 그러나 이러한 점을 고려하더라도 본 연구의 어류 알 crude extract의 저해활성이 강한 것으로 판단되었다.

한편, 어류 알 protease inhibitor의 산업적 이용가능성을 확보할 뿐만 아니라 protease의 기질특이성을 배제하고자 천연 단백질기질인 casein 기질을 사용하여 target protease인 trypsin과 papain, 그리고 4종의 시판 상용효소의 분해활성 저해 정도 (Inhibitory activity, U/mg)를 3종의 어류 알로부터 추출한 crude extracts와 시판 protease inhibitor인 egg white powder와 비교하여 살펴본 결과는 Fig. 4와 같다.

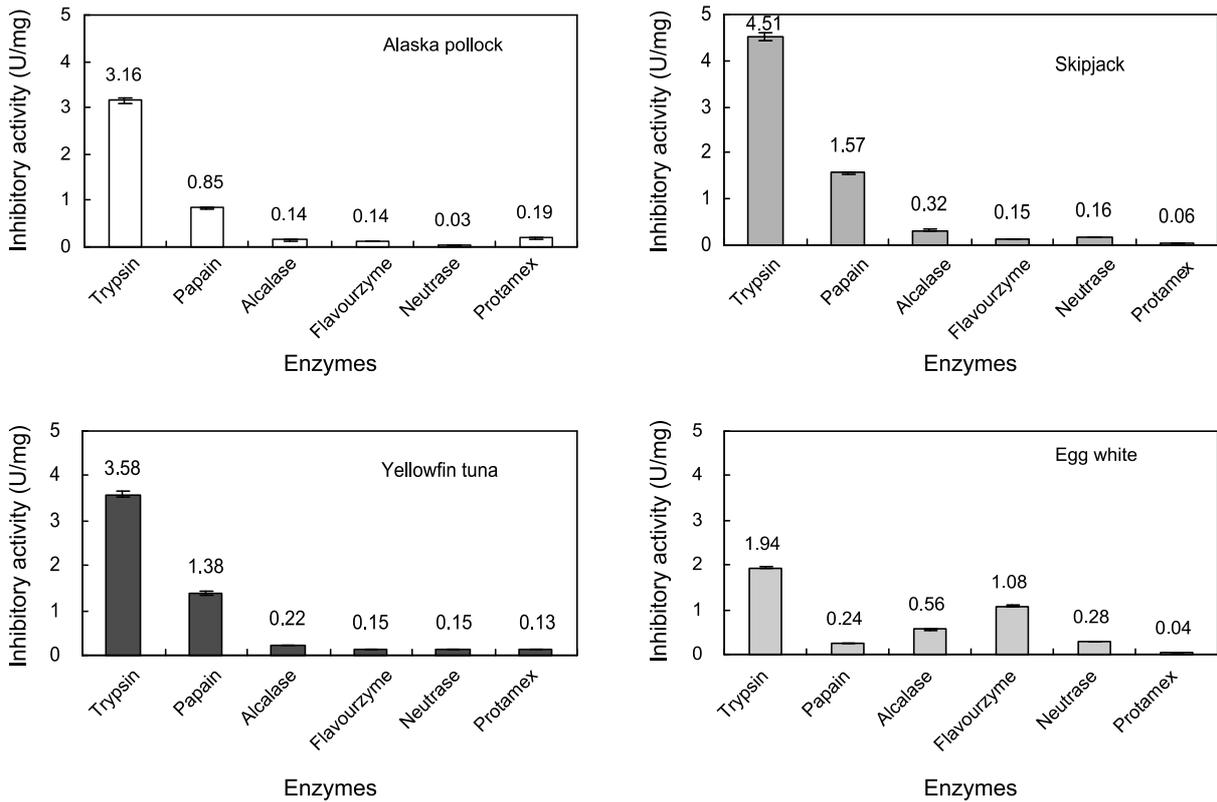


Fig. 4. Distribution of inhibitory activity of target and commercial proteases by the crude extracts of fish eggs and egg white toward casein as a substrate.

명태 알 crude extracts의 protease 저해활성은 trypsin (3.16 U/mg)이 papain (0.85 U/mg)에 비하여 약 3.7배 강하였으며, 4종의 시판 상용효소는 0.03~0.19 U/mg 범위의 저해활성을 나타내었다. 2종의 다랑어류 알 crude extracts의 target protease에 대한 저해활성은 다랑어류 알의 종류에 관계없이 trypsin에 대하여 가다랑어 및 황다랑어가 각각 4.51 U/mg 및 3.58 U/mg으로 가장 높았고, 다음으로 papain (각각 1.57 U/mg 및 1.38 U/mg)의 순이었으며, 4종의 시판 상용효소에 대하여는 각각 0.06~0.32 U/mg 범위 및 0.13~0.22 U/mg으로 저해활성 미미하였다. 또한, 가다랑어와 황다랑어 알 crude extracts 간 target protease 및 시판 상용효소에 대한 저해활성은 이 실험에서 검토한 모든 단백분해효소에 대하여 가다랑어가 황다랑어 알 crude extracts에 비하여 높은 저해활성 분포를 보였다.

이와 같은 다랑어류 알 및 명태 알 crude extracts의 target protease (casein)에 대한 저해활성의 결과로 미루어 보아, target protease에 대한 저해활성은 명태 알 crude extract에 비하여 다랑어류 알 crude extracts가 target protease의 종류에 관계없이 모두 높았으며, 4종의 시판 상용효소에 대하여는 3종의 어류 알 crude extracts 모두 유산 한 저해활성을 보였다. 시판 protease inhibitor인 egg white powder는 trypsin (casein 기질) 저해활성이 1.94 U/mg으로, 4종의 시판 상용효소 (Flavourzyme, 1.08 U/mg ; Alcalase, 0.56 U/mg ; Neutrase, 0.28 U/mg ; Protamex, 0.04 U/mg) 뿐만이 아니라 papain (0.24 U/mg)에 비하여도 높았다. 따라서, 다랑어류 알 crude extracts는 물론이고 명태 알 crude extract가 시판 protease inhibitor인 egg white powder의 target protease (casein 기질)에 대한 저해활성보다 높은 것으로 나타나, 어류 알 crude extracts의 protease inhibitor로서 식품산업에의 이용가능성을 확인한 결과로서 그 의미가 있었다. 4종의 시판 상용효소 (casein 기질)에 대한 저해활성은 egg white powder에 비하여 어류 알의 종류에 관계없이 모든 어류 알 crude extracts가 Alcalase, Flavourzyme 및 Neutrase 저해 활성은 낮았으나, Protamex 저해활성은 유사하거나 미미한 정도에서 높았다. 이상의 결과로 casein을 기질로 하는 target proteases에 대한 모든 어류 알 crude extracts와 egg white powder의 분해활성 저해 정도는 trypsin에 대한 경우가 1.03~4.51 U/mg 범위로 가장 강하였고, 다음으로 papain에 대한 경우 (0.24-1.57 U/mg 범위) 및 Flavourzyme에 대한 경우 (0.14~1.08 U/mg 범위)의 순이었다.

Nagashima et al. (2004)은 복어 껍질로부터 정제한 protease inhibitor의 경우, casein 기질에 대하여는 serine protease인 trypsin 및 chymotrypsin은 완벽한 저해활성(100%)을 보인 반면, cysteine protease인 papain과 metallo protease인 thermolysin의 저해활성은 10% 미만이라고 보고하였다. 3종의 어류 glassfish, 연어 및 명태 알의 crude extract의 papain 및 azocasein에 대한 저해활성이 각각 0.09 U/mg, 0.08 U/mg 및 0.3 U/mg이라고 하여 저해활성 단위의 차이를 감안하더라도 본 연구의 target protease와 시판 상용효소에 대한 저해활성보다 낮은 수준이었다 (Ustadi et al., 2005b ; Kim et al., 2006 ; Ustadi et al., 2005a). 또한, papain에 대한 어류 알 정제 protease

inhibitor 및 시판 egg white inhibitor의 저해활성이 cathepsin L에 비하여 높은 저해활성을 보인다고 보고하여 target protease의 종류에 따라 저해활성에 차이가 있음을 시사하였다. 한편, 본 실험에서 사용한 4종의 시판 상용효소의 천연기질 및 합성 기질에 대한 기질특이성에 대한 연구보고 (Heu and Ahn, 1999)에서 이들 시판 상용효소들은 cysteine protease로서 cathepsin B, H 및 L과 serine protease로서 trypsin 및 chymotrypsin 등과 유사한 기질특이성을 나타낸다고 하여, 어류 알 crude extracts에 의해 저해활성을 나타냄으로서 이들 어류 알의 protease inhibitor로서의 활용 폭이 넓다고 판단되었다.

따라서, 어류 알의 crude extracts에는 BAPNA 및 casein 기질로 하는 trypsin에 대한 저해활성이 강하여 serine protease를 주로 저해하는 저해제가 다량 분포할 뿐만 아니라 papain에 대한 분해 활성 저해 정도도 다른 4종의 상용효소에 비하여 강한 것으로 나타나 cysteine protease 저해제도 분포하고 있음이 확인되었고, 그 저해활성의 강도는 가다랑어 알, 황다랑어 알 및 명태 알의 순이었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 어류 알의 crude extracts를 대상으로 산업적 이용을 위하여는 어류 알에 분포하는 protease inhibitor를 정제하여 그 특성을 밝히고, 효과적인 분획방법을 개발하여, protease inhibitor로서 식품가공분야를 포함하여 다양하게 분야에 산업적으로 이용이 가능하리라 사료된다.

사 사

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2008-521-F00041).

참고문헌

- Angelova L, Dalgalarondo M, Kinkov I, Danova A, Kirilov N, Serkedjieva J, Chobert J, Haertle T and Ivanova I. 2006. Purification and characterization of a protease inhibitor from *Streptomyces chromofuscus* 34-1 with antiviral activity. *Biochem Biophys Acta* 1760, 1210-1216.
- Anson ML. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Physiol* 22, 79-89.
- Birk Y. 1994. Protein proteinase inhibitors in legume seeds. *Arch Am Nutr* 44, 26-30
- Bjrek L, Akesson P, Bohus M, Trojnar J, O'Laflon M and Grubb A. 1989. Bacterial growth blocked by synthetic peptide based on the structure of a human proteinase inhibitor. *Nature* 337, 385-386.
- Borla OO, Martone CB and Sanchez JJ. 1998. Protease I inhibitor system in fish muscle: A comparative study. *Comp Biochem Physiol B* 119, 101-105.
- Cao M, Osatomi K, Matsuda R, Ohkubo M, Hara K and

- Ishihara T. Purification and a novel serine proteinase inhibitor from the skeletal muscle of white croaker (*Argyrosomus argentatus*). *Biochem Biophys Res Comm* 272, 485-489.
- Choi JH, Park PJ and Kim SK. 2002. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from the egg of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*. *Fish Sci* 68, 1367-1373.
- Clereszko A, Kwasnik M, Dabrowski K, Poros B and Glogowski J. 2000. Chromatographic separation of trypsin-inhibitory activity of rainbow trout blood and deminal plasma. *Fish Shellfish Immunol* 10, 91-94.
- Dixon M and Webb EC. 1979. *Enzymes; enzyme inhibition and activation*. 3rd ed. Longman Group Ltd., London, U.K., 332-381.
- Ee KY, Zhao J, Rehman A and Agboola S. 2008. Characterization of trypsin and a-chymotrypsin inhibitors in Australian wattle seed (*Acacia victoriae* Bentham). *Food Chem* 107, 337-343.
- Erlanger BF, Kokowsky N and Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95, 271-278.
- Erlanger BF, Edel F and Cooper AG. 1966. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. *Arch Biochem Biophys* 155, 206-210.
- Eguchi M. 1993. Protein protease inhibitors in insects and comparison with mammalian inhibitors. *Comp Biochem Physiol B* 105, 449-456.
- Hamann DD, Amato PM, Wu MC and Foegeding EA. 1990. Inhibition of modiri (gel weakening) in surimi by plasma hydrolysate and egg white. *J Food Sci* 55, 665-669.
- Hara K and Ishimura T. 1987. Purification and characterization of serine proteinase inhibitor from carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle. *Agric Biol Chem* 51 153-159.
- Hara K, Nakaoka H, Nosaki Y, Tabata Y and Ishihara T. 1985. Purification and characterization of serine proteinase inhibitor from white croaker *Argyrosomus argentatus* ordinary muscle. *Bull Jap Soc Sci Fish* 51, 1029-1036.
- Heu MS and Ahn SH. 1999. Development and fractionation of proteolytic enzymes from inedible seafood product. *J Kor Fish Soc* 32, 458-465.
- Kang IS and Lanier TC. 1999. Bovine plasma protein functions in surimi gelation compared with cysteine protease inhibitors. *J Food Sci* 64, 842-846.
- Kim KY, Ustadi K and Kim SM. 2006. Characteristics of the protease inhibitor purified from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) eggs. *Food Sci Biotechnol* 15, 28-32.
- Laskowski M and Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Ann Rev Biochem* 49, 593-626.
- Nagashima Y, Takeda M, Ohta I, Shimakura K and Shiomi K. 2004. Purification and properties of proteinaceous trypsin inhibitors in the skin mucus of pufferfish *Takifugu pardalis*. *Comp Biochem Physiol B* 138, 103-110.
- Lenney CJ. 1979. Thermostable endogenous inhibitors of cathepsins B and H. *Eur J Biochem* 101, 153-161.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 256-275.
- Martone CB, Busconi L, Folco E and Sanchez JJ. 1991. Detection of a trypsin-like serine protease and its endogenous inhibitor in hake skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 289, 1-5.
- Morrissey MT, Wu JW and An H. 1993. Protease inhibitor effects on torsion measurement and autolysis of Pacific whiting surimi. *J Food Sci* 58, 1050-1054.
- Nonaka J. 1976. *Suisanchokuhinkaku. SeaFood Goseisago-goseigaku*, Tokyo, Japan, 56-60.
- Oda S, Igarashi Y, Manaka KI, Koibuchi N, Sakai-Sawada M, Sakai M, Morisawa M, Otake H and Shimizu N. 1998. Sperm-activating proteins obtained from the herring eggs are homologous to trypsin inhibitors and synthesized in follicle cells. *Dev Biol* 204, 55-63.
- Olenen A, Kalkkinen N and Paulin L. 2003. A new type of cysteine proteinase inhibitor the salrin gene from Atlantic salmon (*Salmo salar L*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Biochemie* 1, 1-5.
- Potempa J, Korzus E and Travis J. 1994. The seprin superfamily of proteinase inhibitors; structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 269, 15957.
- Rawlings ND. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors *Biochem J* 378, 705-716.
- Richardson M. 1990. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In *Methods in plant Biochemistry, Amino Acid, Proteins and Nucleic Acids*, Vol. 5. Rogers L J. (eds). Academic Press, New York, U.S.A., 259-305.
- Ritonja A, Machleidt W and Barret AJ. 1985. Amino acid sequence of the intracellular cysteine protease inhibitor cystatin B from human liver. *Biochem Biophys Res Commum* 131, 1187-1192.
- Saitoh E, Isemura S, Chiba A, Oka S and Odani S. 2005. A novel cysteine protease inhibitor with lectin

- activity from the epidermis of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comp Biochem Physiol part B* 141, 103-109.
- Sangorin MP, Folco EJ, Martone CM and Sanchez JJ. 2001. Purification and characterization of a protease inhibitor from white croaker skeletal muscle (*Micropogon opercularis*). *Intl J Biochem Cell Biol* 33, 691-699.
- Sen LJ and Whitaker JR. 1973. Some properties of a ficin-papain inhibitor from avian egg white. *Arch Biochem Biophys* 158, 623-632.
- Synnes M. 1998. Purification and characterization of two cysteine proteinase inhibitors from the skin of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp Biochem Physiol B* 121, 257-264.
- Toyohara H, Makinodan Y and Ikeda S. 1988. Detection of a cysteine protease inhibitor in carp muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 157-163.
- Tsai YJ, Chang GD, Haung CJ, Chang YS and Haung FL. 1996. Purification and molecular cloning of carp ovarian cystatin. *Comp Biochem Physiol B* 113, 573-580.
- Ustadi K, Kim KY and Kim SM. 2005a. Characteristics of protease inhibitor purified from the eggs of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *J Kor Fish Soc* 38, 83-88.
- Ustadi K, Kim Y and Kim SM. 2005b. Purification and identification of a protease inhibitor from glassfish (*Liparis tankai*) eggs. *J Agric Food Chem* 53, 7667-7672.
- Ustadi K, You SG and Kim SM. 2006. Purification, characterization and inhibitory activity of glassfish (*Liparis tankai*) egg high molecular weight inhibitor against papain and cathepsin. *J Micorbiol Biotechnol* 16, 524-530.
- Weder JKP. 1985. Chemistry of legume protease inhibitors and their use in taxonomy. *Qual Plant Foods Hum Nutr* 35, 183-195.
- Yamashita M and Konagaya S. 1990. High activities of cathepsin B, D, H and L in the white muscle of chum salmon in spawning migration. *Comp Biochem Physiol B* 95, 149-152.
- Yamashita M and Konagaya S. 1991a. A comparison of cystatin activity in various tissues of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) between feeding and spawning migrations. *Comp Biochem Physiol A* 100, 749-751.
- Yamashita M and Konagaya S. 1991b. Cysteine protease inhibitor in egg of chum salmon. *J Biochem* 110, 762-766.
- Ylonen A, Rinne A, Herttuainen J, Bogwald J, Jarvinen M and Kalkkinen N. 1999. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin contains a novel kininogen and another cystein proteinase inhibitor. *Eur J Biochem* 266, 1066-1072.

2011년 1월 10일 접수
 2011년 2월 7일 수정
 2011년 2월 11일 수리