

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

I. 저온저장에 의한 방어 근원섬유 단백질의 변성

최경호 · 박찬성*

효성여자대학교 식품영양학과 · *대구한의과대학 식품과학과

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

I. Denaturation of Yellowtail Myofibrillar ATPase During Cold Storage

Kyoung-Ho Choi and Chan-Sung Park*

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

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

Abstract

Myofibrillar protein(myofibril) was prepared from Yellowtail fish (*Seriola quinqueradiata*), and then, it was stored at 0°C(ice-cooling), -3.5°C(partial freezing) and -20°C(freezing). Another myofibrils were prepared from the fish stored with ice-cooling, partial freezing and freezing for a week as the maximum. Denaturation of muscle protein during the storage was investigated by the measurement of Ca^{2+} - and Mg^{2+} -ATPase activity.

Specific activity of Ca^{2+} - and Mg^{2+} -ATPase associated with Yellowtail myofibrils was 0.155 and 0.149 μ mole Pi/min/mg of protein, respectively, before storage. ATPase activity of myofibrils did not show any significant difference between 0°C and -3.5°C whereas it was decreased faster at -20°C than at 0°C or -3.5°C. ATPase activity of myofibrils extracted from the fish stored for a week was 1.2-1.8 times higher than myofibrils stored with ice-cooling or partial freezing while it was 2.5-3 times higher than that with freezing. Apparent denaturation constant of Ca^{2+} -ATPase of myofibrils was between 0.48-0.65, and it was 2-3 times higher than that of Mg^{2+} -ATPase. The constant of myofibrils extracted from the fish did not show significant difference between Ca^{2+} - and Mg^{2+} -ATPase.

서론

생선의 장기저장에는 세균의 증식 및 효소에 의한 분해를 억제할 수 있는 동결저장(freezing)법이 널리 이용되고 있다. 그러나 이 방법으로 저장된 생선에서도 저장기간중 염용성 단백질의 변성^{1,6)}, 지질산패에 의한 2-Thiobarbituric acid (TBA)치의 증가^{4,6)} 어육의 변색⁹⁾등이 일어나며

저장후 해동시 drip의 유출⁷⁾등으로 품질변화가 크게 일어나는 것으로 지적되고 있다. 이런 점에서 근간 동결점 부근의 온도 (-1~5°C)에서 식품을 저장하는 부분동결(partial freezing, 이하 PF라 약함)이라는 새로운 저장법이 개발되어 생선의 저장에도 이용되기 시작하였다.

PF저장한 생선은 빙장에 비하여 신선한 육색이 보존되며⁸⁾ 세균증식^{9,10)} 및 생화학적 변화¹¹⁾가 억제되어 shelf-life가 연장되는 것으로 보고되고 있으나 동결저장어에 비하여 해동후 복원이

나쁘고 세균의 증식이 용이하다는 보고¹²⁾도 있어 PF저장에 의한 생선의 품질변화에 관한 다각적인 검토를 필요로 하고 있다.

어류 근육단백질은 어육의 품질과 선도에 중요한 영향을 미치는 것으로서 이에 관한 연구는 근 수축의 측면에서 ATPase 활성¹³⁻¹⁷⁾, 초침점¹⁸⁻¹⁹⁾, ATP감도²⁰⁻²¹⁾ 등의 변성정도를 측정하는 방법이 널리 이용되어 왔다.

본 실험에서는 방어로부터 조제한 근원섬유 단백질질을 빙장, PF저장 및 동결법으로 각각 저장하면서 저장중 생선의 단백질 변성지표로서 근원섬유 단백질에 대한 ATPase의 변성정도를 비교 검토하였다.

재료 및 방법

근원섬유의 조제

加藤²⁴⁾의 방법에 따라 방어(*Seriola quinqueradiata*)의 등부위의 근육 10g을 채취하여 0.1N KCl-1% Triton X-100-0.04M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 80ml를 가하고 homogenize하여 원심분리하는 과정을 2회 반복한 후, 잔사에 0.1N KCl-0.04M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 140ml를 가하여 분산시켜 원심분리하는 과정을 상등액이 투명하게 될 때까지 반복하였으며 최종적으로 얻어진 잔사를 근원섬유로 하였다. 근원섬유를 0.1M KCl-0.04M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 120ml로 현탄시킨 후 3-4겹의 가제로서 여과한 여액을 효소활성 측정을 위한 근원섬유 현탁액으로 하였다.

저장

방어로 부터 조제한 근원섬유를 0℃, -3.5℃, -20℃에 저장하면서 저장기간에 따른 ATPase 활성변화를 조사하였으며 같은 저장기간에 대하여 Ca²⁺-dependent ATPase(Ca-ATPase)와 Mg²⁺-dependent ATPase(Mg-ATPase)의 활성에 대한 저장온도간의 유의성을 T-test 로서 검정하였다. 일부의 시료는 생선으로 0℃, -3.5℃, -20℃에 일정기간 저장한 후 근원섬유를 조제하여 ATPase 활성을 측정하였으며 근원섬유를 저장하였을 때의 ATPase 활성변화와 비교하였다.

ATPase 활성측정 및 변성속도정수의 산출

근원섬유 현탁액을 조효소로하여 ATPase활성을 측정하였으며 반응액의 조성은 Goodno등²⁵⁾의 방법에 준하여 Ca-ATPase는 50mM CaCl₂ 대신 5mM CaCl₂, 25mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) 및 1mM ATP를 사용하였으며 Mg-ATPase는 동일한 반응액에서 5mM CaCl₂ 대신 5mM MgCl₂ 와 0.25mM CaCl₂를 사용하였다.

반응에서 생성된 무기인의 양은 Fiske and Subbarow²⁶⁾의 방법, 단백질양은 Biuret법²⁷⁾으로 비색정량한 후 비활성(μ mole Pi/min/mg protein)을 구하였으며 ATPase의 변성속도정수(K_D)는 丙山²⁸⁾의 방법에 따라 다음 식으로 산출하였다.

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

여기서 C₀ : 저장직전의 ATPase 비활성

C_{t₁} : 저장시간 t₁에서의 ATPase 비활성

C_{t₂} : 저장시간 t₂에서의 ATPase 비활성

결과 및 고찰

ATPase 활성변화

Table 1은 방어로 부터 조제한 근원섬유를 저장하였을 때의 ATPase 활성변화를 나타낸 것이다. 저장직전의 활성은 Ca-ATPase가 0.155, Mg-ATPase가 0.149 μ mole Pi/min/mg protein으로 거의 비슷한 값을 나타내었다. 저장 1일째에 Ca-ATPase는 0℃와 -3.5℃에서 20-30% 정도 활성이 증가하였으나 -20℃에서는 거의 변화가 없었다. 저장 1일과 3일 사이에 Ca-ATPase는 활성이 급격히 저하하였는데 저장 3일째의 활성은 저장 1일에 비해 약 1/3로 감소하였고 저장 3일과 7일 사이에는 완만하게 저하하였다. Mg-ATPase활성은 저장 1일째에 저장직전에 비해 0℃에서는 약 10% 증가하였으나 -20℃에서는 30%정도 저하하였다. 저장 1일과 2일 사이에는 Mg-ATPase 활성변화가 거의 없었으며 0℃와 -3.5℃의 경우는 저장 3일과 5일 사이, -20℃에서는 저장 5일과 7일 사이에 효소활성이 크게 저하되었다.

저장온도에 따른 효소활성은 Ca-ATPase와 Mg-ATPase 모두 -20℃의 경우가 0℃와 -3.5℃

에 비해 유의적으로 낮았다. 이와 같이 -20°C 에서 ATPase 활성이 저하하는 원인으로 小國 등²⁰⁾과 岡田 등¹⁴⁾은 동결시에 현탁액의 KCl 농축에 의한 단백변성을 제시하고 있으며 Oguni 등³⁰⁾, Ohnishi 등²³⁾과 Okada 등¹⁵⁾은 동결저장에 의해 actomyosin의 형태가 변화되어 근육단백질이 변성되는 것으로 보고하였다.

같은 저장기간에 대하여는 -3.5°C 에서, Ca-ATPase와 Mg-ATPase간에 유의적인 차이가 있었는데 저장 1일에는 Ca-ATPase가 높았으나 2일째 부터는 Mg-ATPase의 활성이 Ca-ATPase에 비해 유의적으로 높았다.

Table 2는 각 저장온도에서 3일 혹은 7일간 저장한 생선으로부터 추출한 근원섬유의 ATPase 활성변화이다. 동일한 저장기간에 대하여 저장 온도에 따른 ATPase활성은 Ca-과 Mg-ATPase

모두 유의적인 차이를 인정할 수 없었다. 그러나 전 저장기간을 통하여 볼 때 Ca-ATPase는 저장초기의 3일간에 활성저하가 컸으며 Mg-ATPase는 저장말기의 4일간에 활성이 크게 저하되었다.

Table 1과 2의 결과를 비교하여 보면 생선으로 저장한 후 추출한 근원섬유의 ATPase 활성은 추출한 근원섬유를 저장한 경우에 비해 월등히 높았는데 저장 3일째에 Mg-ATPase는 0°C 와 -3.5°C 의 경우 효소활성이 비슷한 수준을 유지하였다. 저장말기의 근원섬유의 ATPase 활성을 비교하면 방어를 7일간 0°C , -3.5°C , -20°C 에 저장하였던 경우가 근원섬유를 추출하여 같은 기간 각 온도에 저장한 경우에 비해 Ca-ATPase와 Mg-ATPase 모두 0°C 와 -3.5°C 에서는 1.2-1.8배였으며 -20°C 에서는 2.5-3배의 높

Table 1. Changes in ATPase activity of myofibrils stored at 0, -3.5 and -20°C

(μ mole Pi / min / mg protein)

Storage (days)	Ca-ATPase			Mg-ATPase		
	0°C	-3.5°C	-20°C	0°C	-3.5°C	-20°C
0	0.155 ^a	-	-	0.149 ^a	-	-
1	0.205 ^a	0.192 ^a	0.153 ^b	0.163 ^b	0.142 ^{bc}	0.110 ^d
2	0.126 ^a	0.109 ^b	0.067 ^c	0.158 ^d	0.146 ^d	0.102 ^b
3	0.078 ^a	0.071 ^a	0.042 ^b	0.126 ^c	0.142 ^c	0.078 ^a
5	0.059 ^a	0.052 ^{ab}	0.034 ^c	0.071 ^{ad}	0.084	0.060 ^a
7	0.052 ^a	0.051 ^{ab}	0.022 ^c	0.062 ^c	0.067 ^a	0.028 ^c

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

Table 2. Changes in ATPase activity of myofibrils extracted from the fish stored at 0, -3.5 and -20°C

(μ mole Pi / min / mg protein)

Storage (days)	Ca-ATPase			Mg-ATPase		
	0°C	-3.5°C	-20°C	0°C	-3.5°C	-20°C
0	0.155 ^a	-	-	0.149 ^a	-	-
3	0.133 ^a	0.102 ^{ab}	0.090 ^b	0.123 ^{ac}	0.131 ^c	0.120 ^{ac}
7	0.089 ^a	0.070 ^b	0.066 ^b	0.085 ^{ab}	0.077 ^{ab}	0.073 ^b

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

은 값을 나타내었다.

이와같이 생선으로 저장한 경우와 추출한 근육단백질을 저장한 경우의 ATPase활성이 큰 차이를 보이는 것은 단백질 변성에 영향을 미치는 요인으로 pH변화¹⁶⁻¹⁷⁾, 당류²⁰⁾, 염류의 농도^{14, 23)}등이 보고되고 있는데 본 실험결과에서 생선으로 저장한 경우의 효소활성이 월등히 높았던 점은 동결저장으로 인한 KCl농축의 영향이 거의 없었으며 생선 근육중에 포함된 당류로 인하여 단백질변성에 억제된 결과로 사료된다.

ATPase 잔존활성 변화

방어로부터 추출한 근원섬유를 각 온도에 저장하였을 때의 ATPase 잔존활성 변화는 Fig. 1과 같다. 잔존활성은 초기활성의 상대치를 자연대수로 나타내었다. 그림에서 Ca-ATPase 잔존활성은 저장초기의 1일동안 증가한 후 1일과 3일 사이에 크게 감소되었으며 특히 -20℃에서

잔존활성의 감소가 현저하였다. 저장 3일과 7일 사이에는 Ca-ATPase의 잔존활성은 0℃, -3.5℃, -20℃ 모두 거의 비슷한 율로 저하되었다.

Mg-ATPase는 0℃와 -3.5℃에서 저장 2,3일간의 유도기를 거친 후부터 일정 비율로 감소하였으나 -20℃에서는 처음부터 잔존활성이 감소하였는데 감소비율은 각 온도에서 거의 비슷하였다.

Fig. 2는 방어를 각 온도에서 3일 혹은 7일간 저장한 후 추출한 근원섬유의 ATPase잔존활성 변화이다. 전 저장기간을 통하여 Ca-과 Mg-ATPase 모두 잔존활성의 변화는 적었으며 저장 온도간에도 큰 차이를 나타내지 않았다. Ca-ATPase의 잔존활성은 저장초기에, Mg-ATPase는 저장말기에 다소 큰 변화를 나타내었다.

ATPase 변성속도정수

Table 3은 근원섬유를 추출하여 저장한 경우

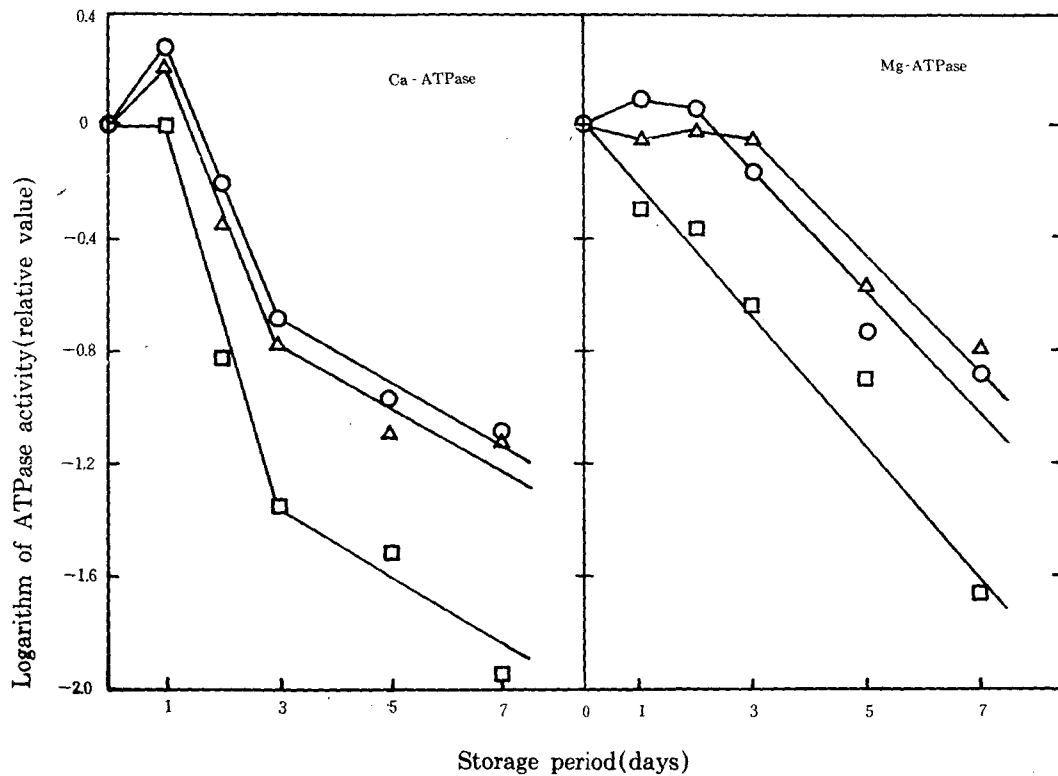


Fig. 1. Retention of ATPase activity of Yellowtail myofibrils stored at 0℃(○-○), -3.5℃(△-△) and -20℃(□-□).

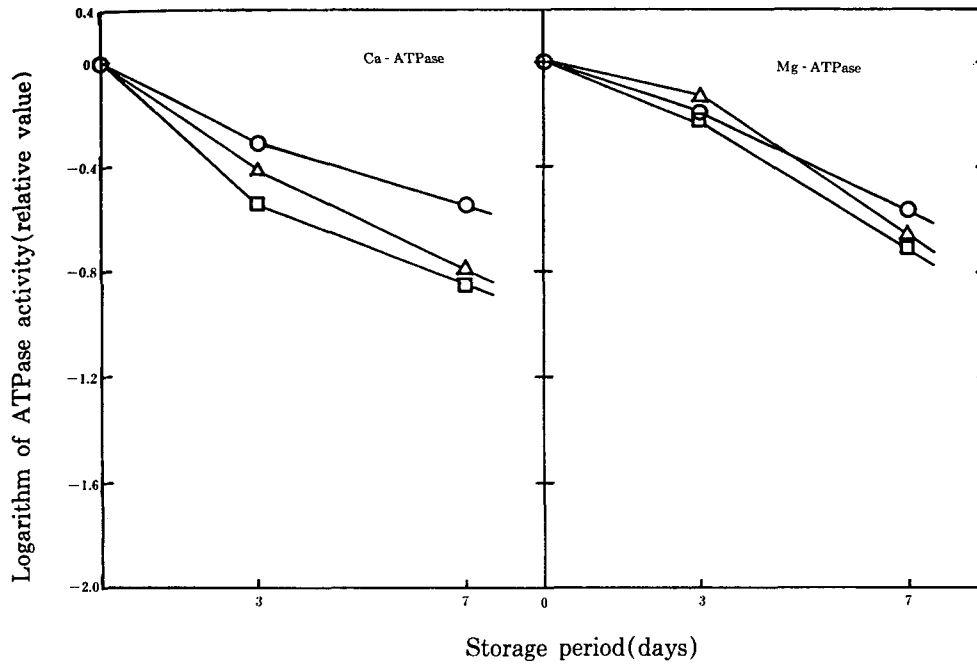


Fig. 2. Retention of ATPase activity of Yellowtail myofibrils extracted from the fish stored at 0°C (○-○), -3.5°C(△-△) and -20°C(□-□).

각 저장온도에서의 변성속도정수를 Fig. 1로부터 계산한 결과이다. Ca-ATPase는 저장 1일과 3일 사이에 변성속도정수가 0°C에서 0.484로 가장 낮았으며 -20°C에서 0.647로 저장 가장 높은 값을 보였다. 그러나 저장 3일과 7일 사이의 변성속도정수는 각 저장온도에서 모두 0.1정도의 낮은 수준이었다.

Mg-ATPase의 변성속도정수는 각 저장온도 모두 0.22정도로써 유의적인 차이는 없었다. Ca-ATPase는 Mg-ATPase에 비해 2.2-2.9배의 빠른 속도로 변성되었다. Ca-ATPase는 초기에 변성이 빠른 반면에 Mg-ATPase는 저장말기에 변성이 빠르게 진행되었다.

Table 4는 0°C, -3.5°C, -20°C에 저장한 방

Table 3. The apparent denaturation constants of ATPase of myofibrils stored at 0, -3.5 and -20°C

Storage temp.	Ca-ATPase	Mg-ATPase
	K _D (day ⁻¹)	
0°C	0.484 (1-3 day)	0.220 (2-7 day)
-3.5°C	0.498 (1-3 day)	0.213 (3-7 day)
-20°C	0.647 (1-3 day)	0.220 (0-7 day)

* The values were calculated by the formula : as described in the materials and methods.

Table 4. The apparent denaturation constants of ATPase of myofibrils extracted from the fish stored at 0, -3.5 and -20°C

Storage temp.	Ca - ATPase	Mg - ATPase
	K _D (day ⁻¹)	
0°C	0.105 (1-3 day)	0.093 (3-7 day)
-3.5°C	0.140 (1-3 day)	0.133 (3-7 day)
-20°C	0.181 (1-3 day)	0.124 (3-7 day)

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

어육에서 추출한 근원섬유의 ATPase에 대하여 변성속도정수를 Fig. 2로부터 계산한 결과이다. Ca - ATPase의 변성속도정수는 0°C에서 0.105로 가장 낮았으며 -20°C에서 0.181로 가장 높았다. 한편 Mg - ATPase의 변성속도정수는 Ca - ATPase에 비하여 낮은 편이었는데 0°C에서 0.093으로 가장 낮았으며 -3.5°C와 -20°C는 각각 0.133, 0.124로 큰 차이는 없었다.

요 약

방어로부터 추출한 근원섬유 현탁액을 0°C(빙장), -3.5°C(PF저장), -20°C(동결저장)에 저장하면서 Ca-과 Mg-ATPase활성을 측정하여 근육단백질의 변성을 조사하였으며 일부는 생선을 각 온도에 일정기간 저장한 후 근원섬유를 추출하여 단백질 변성정도를 비교한 결과 추출한 근원섬유를 저장하였을 때 빙장 및 PF저장한 시료의 ATPase활성은 비슷한 수준이었으나 동결저장한 시료에서는 현저히 낮았다. 생선을 각 온도에 1주일간 저장한 후 추출한 근원섬유의 효소활성은 근원섬유를 미리 추출하여 같은 기간동안 저장한 경우에 비하여 빙장과 PF저장에서는 1.2-1.8배, 동결저장에서는 2.5-3배 정도 높은 수준을 유지하고 있었다. 근원섬유를 각 온도에 저장하였을 때의 변성속도는 Ca-의 경우가 Mg-ATPase에 비해 2-3배 빨랐으나 생선으로 저장한 경우에는 Ca-과 Mg-ATPase간에 큰 차이를 나타내지 않았다.

(본 연구는 1988년 문교부 학술연구조성비 지원에 의해 자유공모과제로 선정된 "해산어의 부분동결에 의한 Ca²⁺, Mg²⁺-dependent adenosine triphosphatase 활성 및 근섬유의 미세구조 변화" 연구의 일부임)

문 헌

1. Dyer, W. J. : Protein denaturation in frozen and stored fish. *Food Res.*, 16, 522(1951).
2. Lauder, J. Y. and Macallum, W.A. : Keeping time of frozen red fish fillets in relation to handling the raw material, *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 27, 1599 (1971).
3. Peter, J. A., Macallum, W. A., Dyer, W. J., Idler, K. R., Slavin, J.W., Lame, J. P., Fraser, K. I. and Laishley, E. J. : Effect of stage of rigor and of freezing-thawing processes on storage quality of refrozen cod. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 25, 299 (1968).
4. Anderson, K. and Danielson, C. E. : Storage changes in frozen fish. *Food Technol.*, 15, 55 (1961).
5. Botta, J. R. and Richard, J. F. : TBA value, total long chain free fatty acids and flavor of Pacific halibut and Chinook salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 30, 63 (1973).
6. 尾藤方通 : 冷凍マクロ肉の肉色保持に関する研究-I. 冷凍貯藏中の變色と水抽出液の吸

- 光曲線との關係. 日水誌 30, 847 (1964).
7. Botta, J. R. and Richard, J. F. : Flesh pH, color, thaw drip and mineral concentration of Pacific halibut and Chinook salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 30, 71 (1973).
 8. Tomilson, M., Geiger, S. E., Kay, W. W., Uthe, J. and Roach, S. W. : Partial freezing as a means of preserving Pacific salmon intended for canning. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 22, 955 (1955).
 9. 角田聖齊, 江平重男, 内山 均 : Partial freezingによる魚類の鮮度保持—サバ, イシガレイ, アジ筋肉内諸物質の鮮度中の消長—. 東漁水研報, 113, 43 (1984).
 10. Ehira, S. and Fujii, T. : Changes in bacterial count for sardine during Partially frozen storage (short paper). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1419 (1984).
 11. Lee, C. M. and Toledo, R. T. : Comparison of shelf life and quality of mullet stored at zero and subzero temperature. *J. Food Sci.*, 49, 317 (1984)
 12. 藤井建夫 : 食品冷凍における微生物の挙動. 食の科学, 79, 26 (1984).
 13. 松浦 基, 新井健一 : 魚類ミオミンのフィラメント形成能と生化学的活性に及ぼすpHの影響. 日水誌, 52, 1657 (1986).
 14. 岡田 猛, 太田冬雄, 猪上徳雄, 秋場 稔 : コイミオシンBの冷凍變性におよぼす KCl 濃度および冷結貯藏温度の影響. 日水誌, 51, 1887 (1985).
 15. Okada, T., Inoue, N. and Akiba, M. : Electron microscopic observation and biochemical properties of carp myosin B during frozen storage. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52, 345 (1986).
 16. 福田 裕, 柘木田善治, 新井健一 : マサバの鮮度ガ筋原纖維タンパク質の冷凍變性に及ぼす影響. 日水誌, 50, 845 (1984).
 17. 西村公雄, 河村幸雄, 米澤大造 : スジエビ (*Palaemon paucidens*)筋肉の冷凍貯藏中の變化について. 日本營養・食糧學會誌, 40, 123 (1987).
 18. Ebashi, S. and Ebashi, F. : A new protein, component participating in the superprecipitation of myosin B. *J. Biochem.*, 55, 604 (1964).
 19. Ebashi, S. : α -Actinin, a new structural protein from straited muscle. *J. Biochem.*, 58, 7(1965).
 20. Weber, H. H. and Portzehl, H. : Muscle contraction and fibrous muscle protein. *Advances in protein chemistry*. Academic Press Inc., New York, 7, 161(1952).
 21. 高士冷二, 新井健一, 齊藤恒行 : 魚類筋肉構成たんぱく質に關する研究—I, コイ筋肉からミオシンの調製について. 日水誌, 36, 165(1970).
 22. Iwata, K., Kobashi, K. and Hase, J. : Studies on muscle alkaline protease-I. Isolation, purification and some properties of alkaline protease from carp muscle. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 39, 1325(1973).
 23. Ohnishi, M., Tsuchiya, T. and Matsumoto, J. J. : Kinetic study on the denaturation mechanism of carp actomyosin during frozen storage. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 44, 27 (1987).
 24. 加藤 登, 内山 均, 塚本志朗, 新井健一 : 魚類筋原線維 ATPase の生化学的研究. 日水誌, 43, 857 (1977).
 25. Goodno, C. C., Wall, C. M. and Perry, S. V. : Kinetics and regulation of the myofibrillar adenosine triphosphate. *Biochem. J.*, 175, 813(1978).
 26. Fiske, C. H. and Subbarow, Y. : The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66, 375(1925).
 27. Gornall, A. G., Bardawill, C. S. and David, M. M. : Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751(1949).
 28. 内山 均 : 白身の魚と赤身の魚. 水産學シリーズNo.13(日本水産學會編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 78-92(1974).
 29. 小國盛稔, 猪上徳雄, 大井嘉代子, 信濃清雄

- : コイミオシンBの-8℃凍結および-8℃過冷却貯藏中の變性. 日水誌, 53, 789(1987).
30. Oguni, M., Kubo, T. and Matsumoto, J. J. : Studies on the denaturation of fish muscle proteins - I. Physico-chemical and electron microscopical studies of freeze-denatured carp actomyosin. *Bull. Japan. Soc. Sci. fish.*, 44, 27(1978).
31. 松本行司, 新井健一: 魚類筋原機維タンぱく質の熱變性と冷凍變性に對する糖類の保護効果の比較. 日水誌, 52, 2033(1986).

(Received January 28, 1989)