

食用魚類 分類을 爲한 魚肉蛋白의 電氣泳動像 研究 (第 1 報)

서울保健專門學校

崔興敏·韓良一·李貞子

(1970년 9월 2일 受理)

Studies of Disc-electrophoretic Patterns of Fish Muscle Protein for Species Identification of Edible Fish (I)

by

Choi H.M., Han Y.I., and Lee J.J.

Seoul Health Junior College

(Received Sept. 2, 1970)

Abstract

This studies' objective methods of identifying fish species are based on the species-specific protein-separation patterns obtained on electrophoresis of watersoluble sarcoplasmic proteins of fish muscle. As the proteins must be in their native undenatured state, electrophoretic identification of fish species has, so far, been restricted to raw fish.

An extension of the electrophoretic method to the identification of cooked fish is described. The protein fragments extractable in 10M urea from the denatured proteins of cooked muscle can also be separated by electrophoresis into species' characteristic patterns that could be used for species identification.

The separation patterns obtained on polyacrylamide gel for the urea extracts of cooked *Mugil cephalus*, *Gadus macrocephalus*, *Scomberomorus niphonius*, *Scomber japonicus*, *Pseudosciaena manchurica*, *Seriola quinqueradiata*, *Trichiurus lepturus*, *Düderleinia berycoidea*, *Lophimus setigerus*, *Pampus argenteus* are presented. In its present form the method does not apply to canned fish.

緒 言

魚類의 分類는 大體로 形態學의 方法에 依存하는 까닭에 일단 加工된 狀態의 魚肉製品은 事實上 分類할 수 있는 方法이 없었다. 따라서 加工된 魚肉 製品의 生産 過程에서 高價의 魚肉製品을 廉價한 것으로 代置하여도

分別이 거의 不可能한데 本 實驗의 分類法에 의한면 可能하다. 즉, 加工된 魚肉을 polyacryl amide gel 을 使用한 disc-electrophoresis 에 依하여 鑑別이 可能하게 되므로 食品의 正確한 鑑別과 더불어 商道德의 確立을 爲하여 大端히 重要한 意義가 있다고 본다.

蛋白의 分離에 있어서 면밀한 分割像을 볼 수 있는 polyacryl amide gel 의 small column 에 依한 disc-電氣

泳動法은 Ornstein⁽¹⁾과 Davis⁽²⁾에 依해서 開發되었으며 그 밖에도 Samuel Raymond^(3,4)外, J. Broome⁽⁵⁾ 등에 依한 많은 研究報告가 있다.

電氣泳動法으로 魚類의 品種을 鑑別하는 일은 種別로 特性이 있는 魚肉內의 水溶性蛋白質을 電氣泳動하여 얻을 수 있는 泳動像의 特性에 基礎를 둔 것으로 Connell⁽⁶⁾의 研究報告가 있다. Thompson⁽⁷⁾은 魚類의 品種을 鑑別하는 方法으로 strach gel을 使用한 zone-electrophoresis를 利用하였으며, 이에 關한 最近의 報文으로는 polyacryl amide gel을 使用한 Payne⁽⁸⁾, Mancuso⁽⁹⁾, Torry Research Station⁽¹⁰⁾과 Thompson⁽¹¹⁾의 研究報告가 있다.

調理된 魚肉蛋白을 電氣泳動像에 依據하여 鑑別하는 方法이 Mackie⁽¹²⁾에 依하여 報告되었는데 우리나라產 食用魚類를 調理狀態에서 그 品種을 鑑別하는 方法을 提示한 報文은 全無하므로 著者 등은 國內에서 生産되는 食用魚類 全體에 對하여 polyacryl amide gel을 使用한 disc-電氣泳動法으로 魚類種別로 特性이 있는 水溶性 sarcoplasmic protein의 標準的 泳動像을 決定, 획득함과 同時에 調理된 魚肉製品을 쉽게 鑑別分類하는 基準을 完成한다는 意味에서 本 實驗을 着手하였다. 本 報文에서는 요즈음 求할 수 있는 海產 魚類 10種에 對하여 우선 報告한다.

實驗方法

Disc-electrophoresis는 poly acryl amide gel로서 構成된 세 部分의 column에서 수행했다. 즉, 蛋白試料와 混合된 large-pore anticonvection gel과 electrophoretic concentration이 일어나는 large-pore spacer gel과 electrophoretic separation이 이루어지는 small-pore gel을 連續시켜서 泳動分離하는 것이다.

(1) 供試藥劑

이번 使用한 藥劑는 다음과 같다.

A 液 ;

1N HCl 24 ml, Tris (trihydroxy methyl aminomethane) 18.25 g, acrylamide 19.0 g, BIS(N,N'-methylene bis acryl amide) 1 g 과 함께 증류수를 加해서 100 ml로 한다.

B 液 ;

DMAPN (β -dimethyl amino propionitril) 1.0 ml에 증류수를 加해서 100 ml로 한다.

C 液 ;

Ammonium persulfate 1.0 g에 증류수를 加해서 100 ml로 한다

D 液 ;

5N HCl 12 ml, Tris 7.5 g, TEMED(N,N,N',N'-tetramethyl ethylen diamine) 2.87 ml, 증류수를 加해서 50 ml로 한다.

E 液 ;

Acrylamide 10 g, BIS 2.5 g, 증류수를 加해서 40 ml로 한다.

F 液 ;

Riboflavin 4.0g, 증류수를 加해서 100ml로 한 後, 여과 한다.

G 液 ;

泳動用緩衝液으로서 Tris 6g, glycin 28.8g, 증류수를 加해서 1,000 ml로 단드는데, 使用할 때 마다 10배로 希釋한다.

H 液 ;

蛋白染色液으로서 amido black 10 B 1g, acetic acid (7%) 100 ml, methanol 500 ml, 증류수 400 ml를 混合한다.

I 液 ;

脫色液으로서 7%의 acetic acid solution을 使用한다.

(2) 供試材料

供試材料로서는 고등어 (*Scomber japonicus*)·대구 (*Gadus macrocephalus*)·방어 (*Seriola quinqueradiata*), 병어 (*Pampus argenteus*)·삼치 (*Scomberomorus niphonius*)·송어 (*Mugil cephalus*)·아지 (*Lophiomus setigerus*)·갈치 (*Trichius lepturus*)·참조기 (*Pseudosciaena manchurica*)·금태 (*Düderleimia berycoides*)를 steam-bath 안에서 30分間 加熱한 後, 背面筋肉을 25g씩 切斷하여 이를 各各 10 M의 urea 溶液 50 ml에 넣어 室溫에서 24時間 放置 後 이를 6,000 rpm으로 30分間 遠心分離하고 그 上澄液을 即時 試料로 使用하였다.

(3) 實驗方法

電氣泳動裝置 本體의 下端에 scotch tape를 붙여 固定한 後, 第 1層(細孔 gel)試藥을 調製하여 本體의 下側 赤線까지 流入한다. 細孔 gel의 調製는 A液과 B液을 2:1의 比로 混合하고 다음에 C液을 1의 比로 섞는다. 本體에 細孔 gel을 流入한 後 gel層의 上端을 水平으로 하기 爲하여 gel化되기 直前에 少量의 증류수를 서서히 떨어뜨려 重合한다. 3~5分間 光線을 쬐면 完全히 gel化된다.

다음 第 1層上에 重層된 증류수를 완전히 除去한 後 (本體를 꺼꾸로해서 가볍게 上下로 진탕시켜 여과지를 대어서 吸水한다) 第 2層(粗孔 gel)試藥을 調製하여 上側의 赤線까지 流入한다. 粗孔 gel은 D液, E液, F液과 증류수를 1:2:1:4의 比로 混合한다. 粗孔 gel을 流

入시킬 때 重層되기 前에 이 液의 少量을 使用하여 第 1層의 表面을 洗滌하였다(液을 넣고 가볍게 흔들어 本體를 거꾸로 하여 除去하였다). 이 경우도 第 1層과 같은 方法으로 少量의 증류수를 넣어 重層했다. 第 2層은 螢光燈(20W)으로 10cm의 거리에서 60分間 光線을 비쳤다. 처음에는 淡黃色을 나타내며(riboflavin의 色), gel 化에 따라서 白濁化된다.

다음 第 2層上의 水分을 除去 후, 第 2層에 쓰인 混合液中的 증류수 대신에 D, E, F 液의 混合液과 試料을 1 : 1의 比로 混合하여 第 2層上에 流入한다(第 2層上 5mm). 第 2層과 같은 方法으로 光重合한다. 第 3層(試料層)이 굳은 後 下端의 scotch tape를 除去하고 緩衝液을 上下의 緩衝液槽에 넣어 電流를 通한다. 上側의 緩衝液槽에는 陰極, 下側의 緩衝液槽에는 陽極으로 荷電시킨다. 定電流로서 泳動을 한 電流는 30 mA 이었고 泳動을 實施할 때의 溫度는 5°C를 유지하였으며 한번 使用한 緩衝液은 다시 사용하지 않았다. 또한 泳動中 蛋白質의 移動을 識別하기 爲하여 0.001%의 bromphenol blue 溶液을 各各의 column에 두 방울씩 떨어 뜨려 移動을 確認하였고 下端에서 1cm까지 泳動을 하고 電流를 停止시킨 다음 抽出棒을 使用하여 第 1層을

밀어내어 染色箱子에 넣었다.

蛋白質의 染色은 第 1層을 H 液에 30分間 담가서 染色한 후, I 液을 使用하여 脫色하였다. 脫色은 background가 無色透明할 때까지 반복하였다. 染色 및 脫色時의 溫度는 40°C를 유지하였다. 完全히 脫色된 gel의 保存은 7%의 acetic acid solution에 넣어 保存하였다.

結 果

加熱된 鰻어 · 대구 · 삼치 · 고등어 · 참조기 · 방어 · 갈치 · 금태 · 아지 · 병어의 背面筋肉을 10M의 urea 溶液에 處理한 後, polyacryl amide gel을 使用하여 disc-electrophoresis로 泳動한 結果 그림 1·2와 같은 蛋白 電氣泳動分劃像을 얻었다.

各 魚類의 種別 泳動帶數와 位置는 그림 2와 같거니와 泳動帶는 鰻어에서 7개, 대구 10개, 삼치 8개, 고등어 9개, 참조기 7개, 방어 8개, 갈치 8개, 금태 10개, 아지 8개, 병어 8개로 나타났다. 그림 1·2에서의 最下層에 보이는 泳動帶는 bromphenolblue가 泳動된 것으로 魚肉蛋白과는 아무 관계가 없다.

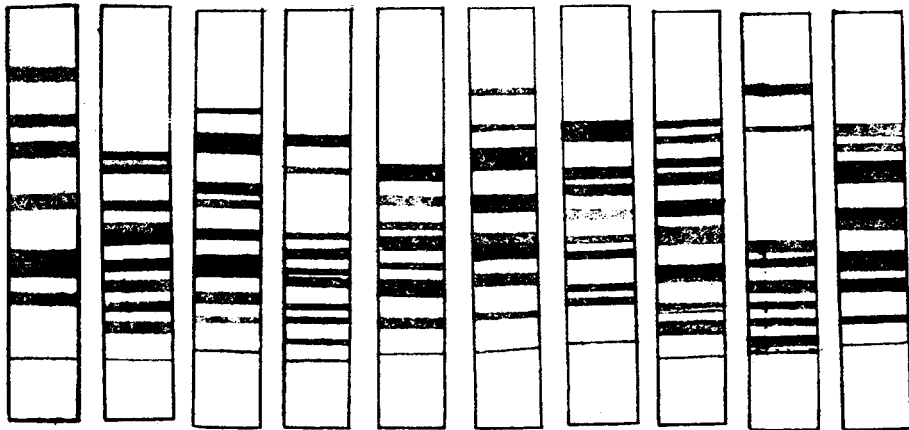


Fig. 1 Electrophoretic patterns of urea extracts of cooked fish

- (1) *Mugil cephalus* (2) *Gadus macrocephalus* (3) *Scomberomorus nipponius* (4) *Scomber japonicus*
- (5) *Pseudosciaena manchurica* (6) *Seriola quinqueradiata* (7) *Trichius lepturus* (8) *Düderleinia berycoides*
- (9) *Lophiomus setigerus* (10) *Pampus argenteus* in 10 M urea

考 察

結果에서 보는 바와 같이 10種의 加熱한 魚肉의 電氣 泳動分劃像은 各 魚類種別로 그 差異가 明白하여 쉽게 鑑別할 수 있다. 이러한 結果는 Mackie⁽¹²⁾의 報文과도 一致하는 結論인 것이다. 그러나 豫備實驗結果에서 본

다면 통조림된 魚肉의 경우는 泳動帶가 鮮明히 分離되지 않기 때문에 實際로 利用하려면 좀 더 研究할 餘地가 있다고 본다. 即, 통조림할 때 含有되는 여러가지 調味料과 植物性蛋白 등의 混合으로 因하여 純粹한 魚肉蛋白 以外的 여러가지 物質의 泳動이 함께 일어나게 되기 때문이다.

또한 urea가 蛋白의 hydrogen과 hydrophobic bond

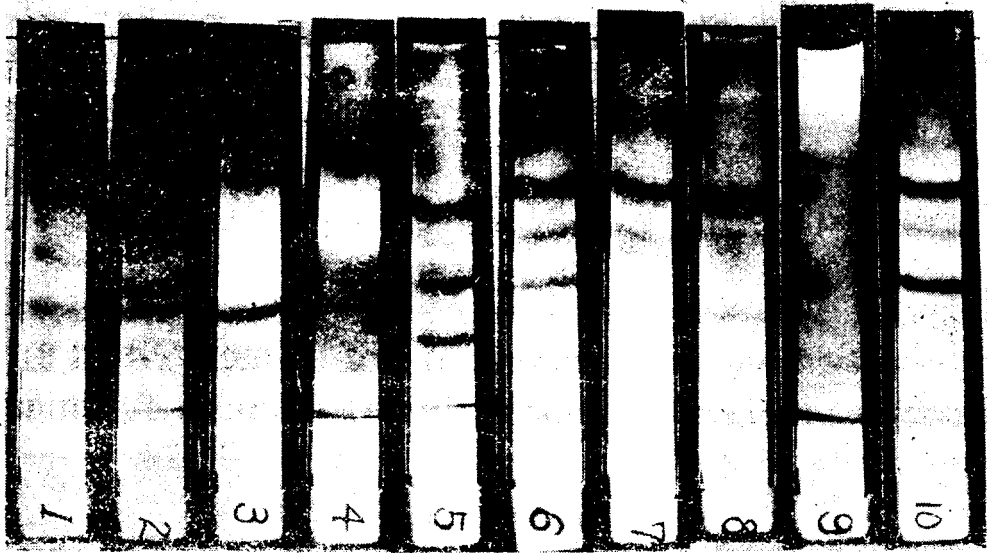


Fig. 2 Electrophoretic patterns of urea extracts of cooked fish

- (1) *Mugil cephalus* (2) *Gadus macrocephalus* (3) *Scomberomorus niphonius* (4) *Scomber japonicus*
 (5) *Pseudosciaena manchurica* (6) *Seriola quinqueradiata* (7) *Trichiurus lepturus* (8) *Düderleinia berycoides*
 (9) *Lophiomus setigerus* (10) *Pampus argenteus* in 10 M urea

를 分離하는 要素라는 것은 잘 알려진 사실⁽¹³⁾인바, 蛋白質을 加熱하면 前記한 바의 bond가 생긴다고 알려져 있으며 이것이 強力한 urea 溶液에 의하여 分離된다는 理論이 成立된다. 實際로 本 實驗에 있어서는 加熱된 魚肉의 分割像과 加熱하지 않은 魚肉의 分割像이 Mackie⁽¹²⁾의 報文의 境遇와 같이 同一하게 나타났으나 단순한 加熱處理뿐 아니고 여러가지로 加工處理된 경우는 계속 研究하여야 할 것이다.

要 約

各種 魚類의 加熱된 魚肉蛋白을 acrylamide gel을 使用하여 電氣泳動한 結果로 나타나는 分割像의 特異性으로서 魚類品種을 分類할 수 있었다. 즉 송어·대구·삼치·고등어·참조기·방어·갈치·금대·아지·병어의 특징있는 電氣泳動分割像 10 個를 만들었다. 이로써 acrylamide gel을 利用한 disc-電氣泳動을 통하여 調理된 魚肉製品 小片으로 그 魚類品種을 鑑別해 낼 수 있는 標準이 確實하게 되었다. 그러나 아직 本 實驗結果를 通조된 魚肉에는 適用할 수가 없다.

參 考 文 獻

1) Leonard Ornstein; *Annals New York Academy of*

- Science*, 121, 321~349 (1964)
 2) Daruch J. Davis; *Annals New York Academy of Science*, 121, 404~427 (1964)
 3) Samuel Raymond, Lewis Weinstraub; *Science*, 130, 711 (1959)
 4) Samuel Raymond, Masumi Nakamichi, Barbro Aurell; *Nature*, pp.697~698, August 18 (1962)
 5) J. Broome; *Nature*, pp.179~180, July 13 (1963)
 6) Connell, J.J.; *Biochem. J.*, 55, 378 (1953)
 7) Thompson, R.R.; *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, 43, 763 (1960)
 8) Paync, W.R.; *J. Ass. Off., Agric. Chem.*, 46, 1003 (1963)
 9) Mancuso, V.M.; *ibid.*, 47, 841 (1964)
 10) Torry Research Station Annual Report, H.M. Stationery Office, Edinburgh, p.53 (1966)
 11) Tompson, R.R.; *J. Ass. Off. Analyst. Chem.*, 50, 282 (1967)
 12) I.M. Mackie; *Analyst.*, 93, pp.458~460 (1968)
 13) Mac Kenzie, H.A., Smith, M.B., Wake, R.G.; *Biochem. Biophys. Acta.*, 69, 222 (1963)