

血合肉魚의 組織中에 分布하는 蛋白質分解酵素

1. 고등어와 정어리肉組織中の 蛋白質分解酵素의 活性比較

卞在亨·金亨洛·趙鎮虔

釜山水產大學 食品營養學科

(1986년 7월 5일 수리)

Proteolytic Enzymes Distributed in the Tissutes of Dark Fleshed Fish

1. Comparison of the Proteolytic Activity of the Tissue Extracts from the Meat of Mackerel and Sardine

Jae-Hyeung PYEUN, Hyeung-Rak KIM and Jin-Guen CHO

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

Nam-gu, Pusan 608, Korea

(Received July 5, 1986)

Proteolytic activity of the tissue extracts from the muscle of mackerel, *Scomber japonicus*, and sardine, *Sardinops melanosticta*, was compared with reference to the optimum reaction condition. Thermal stability and change of proteolytic activity of the tissue extracts during storage were investigated.

The existence of acid, weak acid and alkaline proteinase was identified in the ordinary and dark muscle of the mackerel and sardine. Specific activity of acid proteinase was stronger than weak acid or alkaline proteinase in the both fish. The proteolytic activity of the tissue extracts on the optimum reaction condition was: ordinary muscle of mackerel, 0.12 nM-Tyr. eq./mg-prot./min. at pH 3.0 and 50°C; dark muscle of mackerel, 0.36 nM-Tyr. eq./mg-prot./min. at pH 3.0 and 45°C; ordinary muscle of sardine, 0.45 nM-Tyr. eq./mg-prot./min. at pH 2.4 and 45°C; dark muscle of sardine, 0.24 nM-Tyr. eq./mg-prot./min. at pH 2.4 and 45°C.

The proteinases distributed in the muscle of mackerel and sardine were stable with the heat treatment at 45°C for 5 minutes, but those in the dark muscle of mackerel was stable with the treatment at 5°C for 5 minutes.

The proteinases from the muscle were slowly inactivated with the whole storage days at 5°C and -15°C, those were more stable at -15°C than 5°C storage.

緒 論

動物의 組織中에 分布하는 蛋白質分解酵素는 動物의 種類에 따라서도 差異를 보이지만, 同一 種類의 個體에 있어서도 組織의 差異에 따라서 多様な 分布를 보인다. 이들 蛋白質分解酵素는 動物의 生存中에는 蛋白質의 代謝回轉에 關與하고, 死後에는 自己消化를 誘發시켜 腐敗를 促進시키는 등 生化學的으로나 食品學的으로 重要な 役割을 擔當하는 것으로 알려져 있다.

이같은 見地에서 魚類의 組織中에 分布하는 蛋白質分解酵素에 關하여 充分한 研究가 이루어진다면, 魚類의 增養殖을 위해서는 勿論이고 그 利用加工을 위하여서도 極히 有益한 知識으로 될 것이다.

이 研究는 魚類의 組織中에 分布하는 蛋白質分解酵素가 魚種別로, 또 器官과 組織別로 그 分布別에 따라 어떤 特徵을 갖는지를 밝히기 위하여 우선 血合肉魚의 肉組織中の 蛋白質分解酵素의 分布와 그 活性條件을 比較·檢討코자 試圖하였다.

魚類의 筋肉組織中에 分布하는 蛋白質分解酵素에

關하여는 잉어, 정어리, 고등어 및 조기 등의 筋肉을 대상으로 酸性 · 中性 및 알칼리性蛋白質分解酵素에 관한 報告가 있으며(Makinodan 과 Ikeda, 1969a, 1969b, 1976a, 1976b; 齊藤, 1958; Iwata, *et al.*, 1973, 1974a, 1974b), 筋肉中の 알칼리性蛋白質分解酵素의 耐熱性에 關한 Makinodan 과 Ikeda(1971a)의 報告, 弱酸性蛋白質分解酵素를 分離 · 同定하여 cathepsin A, B 및 C 등을 究명한 Makinodan 과 Ikeda (1971b, 1976a)와 Toyohara, *et al.*(1982)의 報告, 그리고 酸性側에서 높은 活性을 보이는 cathepsin D 에 關한 報告(Makinodan 과 Ikeda, 1969b; Makinodan, *et al.*, 1982) 등의 研究가 이루어져 있다.

本 研究는 魚類의 自己消化速度는 血合肉을 갖는 活動性魚類가 大體로 빠른 傾向임을 堪察하여 고등어와 정어리의 筋肉部分을 普通肉과 血合肉으로 區分하여 試料로 하고, 蛋白質分解粗酵素를 抽出하였으며, 酵素의 活性條件 및 熱安定성과 低溫貯藏中の 酵素活性의 變化 등을 檢討하므로써 筋肉中에 分布하는 蛋白質分解酵素가 이들 魚種의 死後變化에 미치는 影響을 밝히기 위하여 着手하였다.

材料 및 方法

1. 材 料

고등어, *Scomber japonicus*, (體長, 35~45 cm; 體重, 400~500 g)는 1985年 7月 18日 제주도 近海에서 漁獲한 것을 정어리, *Sardinops melanosticta*, (體長, 18~22 cm; 體重, 72~79 g)는 1985年 7月 25日 釜山 近海에서 漁獲한 것을 釜山共同魚市場에서 各各 購入하여 氷藏狀態로 低溫實驗室로 運搬된 것을 試料魚로 하였다. 各 試料魚는 普通肉과 血合肉을 各各 分離하여 酵素抽出을 위한 組織試料로 使用하였다.

本 實驗에서는 Hammarsten casein(Merck 製)을 비롯하여 모든 試藥을 特級品으로, 그리고 實驗에 使用한 調製用 물은 모두 蒸溜한 脫이온水를 使用하였다.

2. 方 法

1) 粗酵素液의 抽出

고등어와 정어리의 筋肉組織中에 分布하는 蛋白質分解粗酵素의 抽出方法은 Fig. 1과 같다. 즉, 試料組織을 細切한 後에 試料에 대하여 4倍量의 1 mM Na-EDTA를 含有한 1% NaCl 溶液을 加하여 Ultra-Turrax(Ianke and Kunkel Co. KG IKa-Werk

Sliced tissue sample

- add 4 vol. of 1% NaCl solution containing 1 mM Na-EDTA
- homogenized with Ultra-Turrax type tissue grinder
- autolyze at 30°C for 3 hours
- centrifuge at 14,000 × g for 30 min.

Supernatant precipitate(discard)

- filter through Toyo No. 5C filter paper
- dialyze against distilled water for 15 hr.

Crude enzyme solution(keep at 0~4°C)

Fig. 1. Procedure for the preparation of crude enzyme solution.

18/10 S7)로써 2分間 均質化하였다. 이 顯濁液을 30°C에서 3時間 放置시켜 遠心分離(14,000 × g, 30 min)시킨 後에 얻어진 上層液을 濾過(Toyo No. 5C)하였다. 그 濾液을 蒸溜한 脫이온水에 하룻밤 동안 透析시켜 얻은 粗酵素를 0~4°C에 保存하면서 實驗에 使用하였다.

2) 基質溶液 및 反應混液의 pH調整

(1) 基質溶液의 調製

5 g의 Hammarsten casein에 Clark-Lubs의 0.2 M Phosphate 緩衝液(pH 7.2) 50 ml를 加하여 3時間 攪拌하여 녹였다. 다음 100°C에서 5分間 加熱變性시켜 蒸溜한 脫이온水로써 250 ml로 定溶하여 만든 2% casein 溶液을 冷藏庫(4°C)에 保存한 것을 基質溶液으로 하였다. 調製된 基質溶液은 2日 以上 經過하지 않은 것을 使用하였다.

(2) 反應混液의 pH調整

酵素活性測定時 反應混液은 pH 1.8~3.0의 範圍는 0.2 M glycine-HCl, pH 3.0~7.0의 範圍는 0.1 M citrate-0.2 M Na₂HPO₄, pH 7.0~9.0의 範圍는 0.1 M Tris-HCl, 그리고 pH 9.0~11.0의 範圍는 0.1 M Na₂CO₃-NaHCO₃의 各緩衝液을 使用하여 주어진 pH로 調整하였다(Dawson, *et al.*, 1974).

3) 酵素活性의 測定

抽出된 粗酵素의 蛋白質分解能은 Fig. 2와 같은 方法으로 測定하였다. 즉, 마개있는 試驗管에 (2)에 나타낸 各 pH의 緩衝液 1.5 ml을 加하고 0.5 ml의 2% casein 溶液과 0.5 ml의 粗酵素液을 加하여 反應溫度로 調整된 靈湯恒溫水槽에서 30分間 反應시켰

血合肉魚의 組織中에 分布하는 蛋白質分解酵素

Take 0.5 ml of enzyme solution into the test tube
 Add 0.5 ml of 2% casein solution
 Add 1.5 ml of buffer solution
 Incubate at 40°C for 30 minutes
 Add 2.5 ml of TCA solution
 Centrifuge at 3,500×g for 20 minutes
 Take 1 ml of supernatant into the test tube
 Add 2.5 ml of 0.55 M Na₂CO₃ solution
 Add 0.5 ml of Folin-phenol reagent
 Incubate at 37°C for 30 minutes
 Check the absorbance at 660 nm

Fig. 2. Procedure for the determination of the proteolytic activity.

다. 反應後에 5% 三鹽化酢酸 2.5 ml 를 加하고 室溫에서 45分 동안 放置한 다음 遠心分離(2,500×g, 20 min)하였다. 다음에 上層液 1 ml 를 取하여 0.55 M 炭酸나트륨 2.5 ml 를 加하고 다시 3倍로 稀釋된 Folin-Ciocalteus phenol 試藥 0.5 ml 를 加하여 37°C 의 恒溫水槽에서 30分間 發色시켰다. 發色된 反應液의 吸光度(波長 660 nm)를 測定하여 酵素活性을 計算하였다.

酵素의 活性度는 Anson 의 方法(1938)에 따라 주어진 反應條件에서 單位時間(分)當 粗酵素溶液中 1 mg 의 蛋白質이 遊離할 수 있는 1 n mole 相當量의 tyrosine 을 Activity(nM Tyr. eq/mg-prot./min.)로 表記하였다.

4) 蛋白質의 濃度

粗酵素液中的 蛋白質의 濃度는 Lowry, et al. (1951) 의 方法에 따라 測定하였다.

結果 및 考察

1. 活性에 미치는 pH 의 影響

고등어와 정어리의 肉組織에서 抽出한 蛋白質分解粗酵素液을 2% casein 을 反應基質로 하여 40°C 에서 30分間 反應시켰을때 두 魚種의 普通肉에 分布하는 蛋白質分解粗酵素의 活性에 미치는 pH 의 影響을 Fig. 3에 나타내었다. 고등어는 pH 3.0, 5.8 및 9.0 에서, 정어리는 pH 2.4, 6.0, 10.0에서 높은 活性을 보였으며, 두 魚種 共히 酸性, 弱酸性 및 알칼리性의 세 領域에서 casein 加水分解能을 發現하는 것을 알 수 있었다. 또한 弱酸性과 알칼리性에서 나타난 活性에 비해 酸性側의 活性이 고등어는 5배, 정어리는 3.5배 정도 높았으며, 고등어에 비해 정어리의 活性이 全體적으로 6배 정도 높게 나타났다. 이는 牧之段 등(1983)이 8種의 魚類筋肉組織中에 分布하는 蛋白質分解酵素는 酸性, 弱酸性 및 알칼리性의 세 領域에서 높은 活性을 나타낸다고 한 報告와 類似하였다. 筋肉으로부터 抽出한 粗酵素液이 酸性域에서 높은 活性을 갖는 것은 주로 cathepsin D(Makinodan 과 Ikeda, 1969b; Geist 와 Crawford, 1974; Deng 과 Lillard, 1973; Martin 과 Whiteker, 1968), 弱酸性域에서 높은 活性은 cathepsin A, B 및 C(Makinodan 과 Ikeda, 1971b, 1976a; Toyohara, et al., 1982) 그리고 알칼리性에서 높은 活性은 筋肉組織中에 分布하는 알칼리性 蛋白質分解酵素(Iwata, et al.,

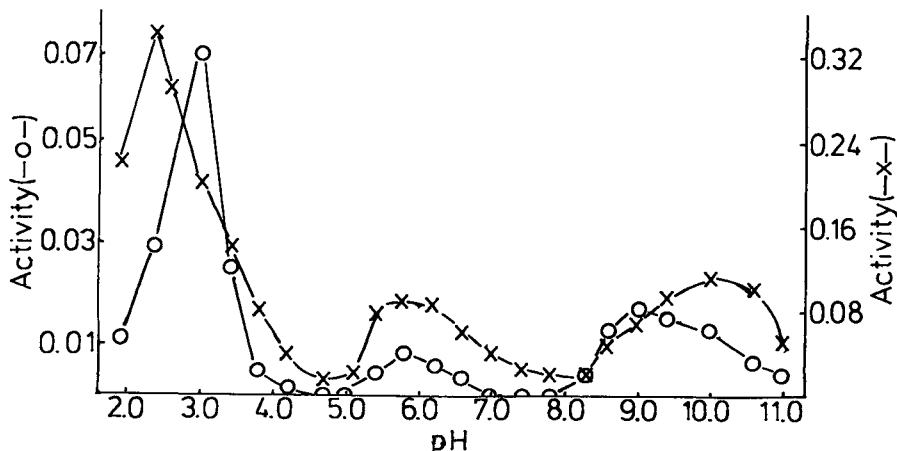


Fig. 3. Effect of pH on the hydrolysis of casein by the tissue extracts from the ordinary muscle of mackerel(—○—) and sardine(—×—). The reaction mixture was incubated at 40°C for 30 min.

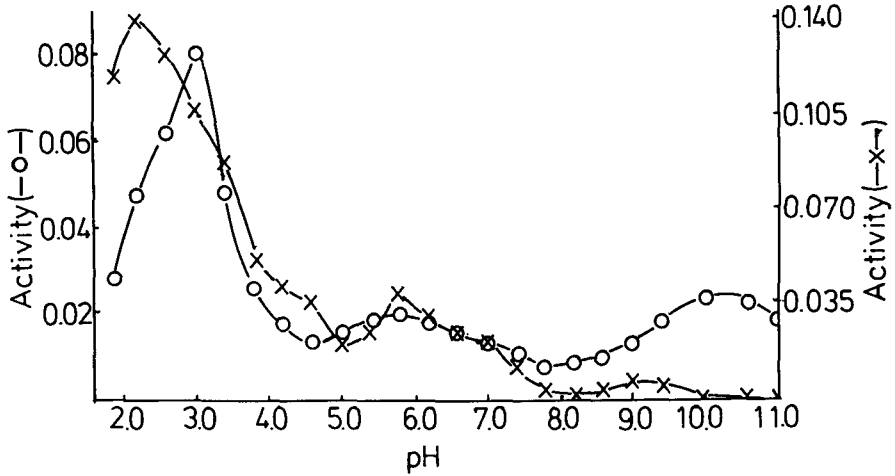


Fig. 4. Effect of pH on the hydrolysis of casein by the tissue extracts from the dark muscle of mackerel (—○—) and sardine(—×—). The reaction condition was the same as in Fig. 3.

1973; Ting, *et al.*, 1968; 牧之段 등, 1963)인 것으로 報告되고 있다.

한편, Fig. 4에 나타낸 바와 같이 두 魚種의 血合肉에 分布하는 酵素도 이와 類似한 傾向을 보였으며, 정어리에서 抽出한 것은 알칼리성에서 微微하게 나타났으며 酸性에서의 活性도 普通肉과 同一한 pH에서 다소 낮은 活性을 보였다. 또한, 고등어에 비해 정어리에서 抽出한 粗酵素液의 casein 分解能은 약 1.7배로 強하게 나타났으며, 고등어의 경우 普通肉과는 活性에 큰 差異가 없었으나, 정어리의 경우 普通肉에 비해 1/4 정도 낮았다. 이상의 實驗結果, 魚肉의 自己消化는 死後 魚體의 最終 pH와 비슷한 pH 範圍에서 最大活性을 갖는 弱酸性蛋白質分解酵素에 의해 많은 影響을 받을 것으로 생각되었다.

2. 活性에 미치는 溫度的 影響

고등어 普通肉에서 抽出한 粗酵素는 pH 3.0에서 정어리 普通肉에서 抽出한 粗酵素는 pH 2.2에서 最大活性을 나타내었으므로 各各의 最適 pH에서 30°C ~ 70°C 까지의 溫度에 대한 影響을 Fig. 5에 나타내었다. 고등어는 50°C, 정어리는 45°C에서 最大活性을 나타내었으며, 그 때의 고등어 普通肉에서 抽出한 粗酵素의 固有活性은 0.12이었으며 정어리는 0.45로 나타났다. 活性最適條件에서 고등어의 固有活性에 비해 정어리의 固有活性이 4배 정도 높게 나타났으며 60°C 以上에서 酵素活性은 急激히 低下하여 65°C에서는 完全히 失活되었다. 또, 30°C 附近에서 고등어는 最大活性의 15%, 정어리는 最大活性의 25%를

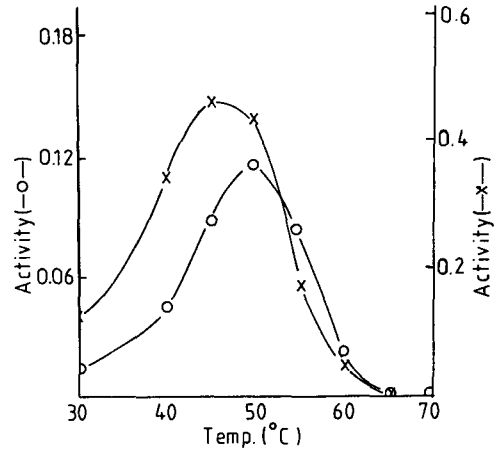


Fig. 5. Effect of temperature on the hydrolysis of casein by the tissue extracts from the ordinary muscle of mackerel (—○—) and sardine (—×—). The used buffers were 0.1 M HCl/Gly at pH 3.0 (mackerel) and pH 2.4 (sardine).

나타내었다. Deng 과 Lillard(1973)는 돼지肉에 分布하는 cathepsins 은 50°C에서 最大活性을 나타냈으며 Geist 와 Crawford(1974)는 3種의 가자미肉에 分布하는 cathepsin 類는 共히 45°C에서 最大活性을 나타내었다고 報告하였다. 또, Makinodan 등(1982)은 잉어肉에서 精製한 cathepsin D 는 50°C에서 最大活性을 나타냈으며, 基質의 種類에 따라 作用最適 pH가 變化한다고 報告하였다.

한편, 두 魚種의 血合肉에서 抽出한 蛋白質分解粗酵素도 同一한 pH에서 最大活性을 나타냈으므로 各 各 活性最適 pH에서 30°C~70°C까지의 溫度에 대한 影響을 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 고등어와 정어리의 血合肉에 分布하는 蛋白質分解粗酵素는 45°C에서 最大活性을 나타내었으며, 最適條件下에서 고등어의 固有活性은 0.36, 정어리는 0.24로 나타났다. 活性最適條件에서 정어리에 비해 고등어의 固有活性이 1.5배 가량 높게 나타났으며, 55°C 이상에서 酵素活性은 急激히 低下하여 정어리는 65°C, 고등어는 70°C에서 完全히 失活되었으며, 30°C 附近에서 고등어는 最大活性의 10%, 정어리는 25% 정도 나타났다. 眞仁田 등(1969)은 고등어肉의 自己消化에 關與하는 蛋白質分解酵素는 45°C에서 最大活性을 나타낸다고 報告하였으며, Makinodan과 Ikeda(1969b)는 잉어肉에서 抽出한 蛋白質分解酵素는 45~50°C에서 最大活性을 나타낸다고 報告하였다. 이는 本 實驗의 結果와 類似하였다. 또한, 齊藤과 鮫島(1958)은 상어와 정어리의 血合肉에서 抽出한 蛋白質分解粗酵素는 共히 35°C에서 最大活性을 나타냈다고 報告하였으며, 이는 本 實驗의 結果와는 差異가 있었다.

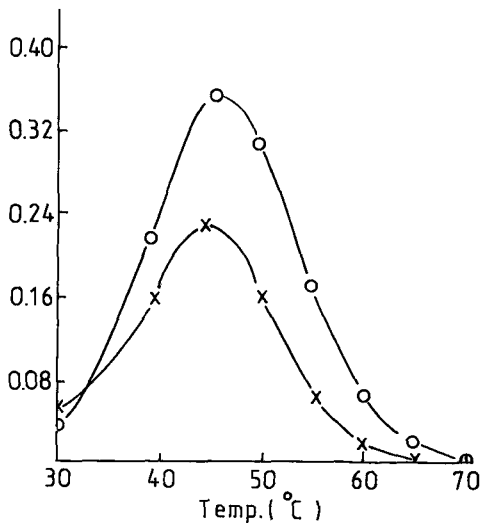


Fig. 6. Effect of temperature on the hydrolysis of casein by the tissue extracts from the dark muscle of mackerel (—○—) and sardine (—×—). The used buffers were 0.1 M HCl/Gly at pH 3.0 (mackerel) and pH 2.4 (sardine).

3. 加熱에 의한 安定性

고등어와 정어리의 普通肉 및 血合肉에서 抽出한 蛋白質分解粗酵素液을 30°C에서 70°C까지의 溫度에서 5分間 熱處理한 後, 各 粗酵素의 反應最適條件(最適 pH, 最適溫度)에서 殘留活性을 測定하였다.

두 魚種의 普通肉 및 血合肉에서 抽出한 蛋白質分解粗酵素의 熱安定性은 Fig. 7에 나타난 바와 같이 정어리의 普通肉 및 血合肉과 고등어의 普通肉에서 抽出한 粗酵素는 45°C의 熱處理에 의해 活性에 變化가 없었으며, 50°C의 熱處理에 의해 원래活性의 30~40%가 失活되었다. 또, 55°C의 熱處理에 의해 두 魚種의 普通肉은 원래活性의 88%가 失活되었으며, 정어리의 血合肉은 65% 정도 失活되었다. 고등어의 血合肉은 50°C의 熱處理에 의해 安定하였으나 55°C의 熱處理에 의해 급격히 活性이 低下하여 75% 정도 失活되었으며, 60°C의 熱處理에 의해 90% 정도 失活되었다. 以上の 結果에 나타난 바와 같이, 두 魚種의 경우 普通肉보다는 血合肉의 耐熱性이 보다 強하게 나타났으며 65°C의 熱處理에 의해 完全히 失活되었다. Makinodan과 Ikeda(1969b)는 잉어肉에서 抽出한 cathepsin D는 37°C의 熱處理에 의해 活性이

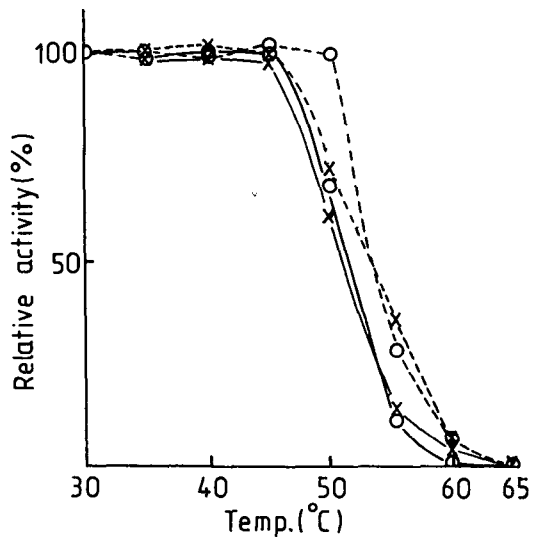


Fig. 7. Thermal stability of the tissue extracts from the ordinary muscle (—) and dark muscle (---) of mackerel (○) and sardine (×). Preheating was performed for 5 min at various given temp. and proteolytic activities were determined at optimum condition.

變하지 않으나, 45°C, 50°C, 및 55°C의 熱處理時間에 따른 殘留活性를 測定한 結果, 45°C에서 10分間 熱處理에 의해 15%가 失活되었다고 報告하였다. Iwata 등(1974a)은 잉어肉에서 抽出한 알칼리性蛋白質分解酵素는 60°C의 熱處理에 의해 安定하였으며, 岩田 등(1974c)은 보구치, 꼬치 및 잉어의 肉中에 分布하는 알칼리性蛋白質分解酵素의 熱安定性을 測定한 結果, 잉어는 60°C, 꼬치는 50°C까지의 熱處理에 의해 活性에 變化가 없었으나 보구치는 50°C의 熱處理에 의해 10% 정도 失活하였다고 報告하였다. 따라서 肉에 分布하는 蛋白質分解酵素中 알칼리性蛋白質分解酵素는 대체로 耐熱성이 強하며 酸性蛋白質分解酵素는 耐熱성이 弱한 酵素로 추정된다.

4. 貯藏期間에 따른 活性度の 變化

고등어와 정어리의 普通肉 및 血合肉組織抽出液을 5°C와 -15°C에 貯藏하여 蛋白質分解酵素의 貯藏性을 最適條件에서 검토하였으며, 生體組織에서 粗酵素를 抽出한 직후의 粗酵素液이 보인 活性를 대조로 하여 相對的인 活性도를 나타내었다.

두 魚種의 普通肉 및 血合肉에 分布하는 蛋白質分解酵素의 貯藏期間에 따른 活性度の 變化를 Fig. 8 및 9에 나타내었다. Fig. 8에 나타난 바와 같이,

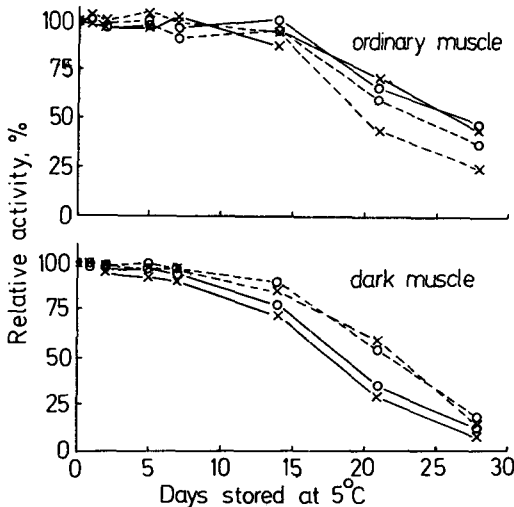


Fig. 8. Changes of proteolytic activity of the tissue extracts from the muscle of mackerel (—○—) and sardine(—×—) during storage at 5°C.

—, without sodium azide
 ---, with sodium azide

5°C 貯藏인 경우 貯藏 14日까지는 活性에 變化가 없었으나, 貯藏 21日 경과시 고등어는 sodium azide를 加하지 않은 粗酵素液은 25%, sodium azide를 加한 粗酵素液은 50% 정도 失活되었다. 또, 貯藏 28日이 경과한 경우 고등어는 50%, 정어리는 60% 정도 失活되었다. 그리고 貯藏 15日까지는 방부제에 의한 影響이 나타나지 않았으나, 15日 경과후에는 오히려 방부제가 添加된 粗酵素液의 活性이 보다 낮게 나타났다. Fig. 8에 나타난 바와 같이, 血合肉의 경우 普通肉과 類似한 傾向을 나타내고 있으나, 同一貯藏期間 普通肉보다 失活도가 크게 나타났으며 普通肉의 경우와는 달리 貯藏 7日以後에는 방부제가 添加된 粗酵素液의 活性이 높게 나타나는 傾向을 보여주고 있었다. Fig. 9에 나타난 바와 같이, 두 魚種의 普通肉 및 血合肉에서 抽出한 蛋白質分解粗酵素液을 -15°C에 貯藏한 경우 貯藏 14日까지는 酵素活性의 變化가 없었으나, 貯藏 21日頃 20%정도 失活되었으며, 貯藏 28日까지 35% 가량 失活되었다.

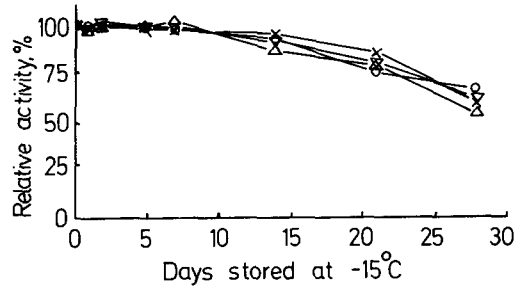


Fig. 9. Changes of proteolytic activity of the tissue extracts from the ordinary and dark muscle of mackerel and sardine during storage at -15°C.

○, ordinary muscle of mackerel; △, ordinary muscle of sardine; ▽, dark muscle of mackerel; ×, dark muscle of sardine.

Su, et al. (1981)은 보구치육에서 抽出한 알칼리性蛋白質分解酵素를 4°C에 貯藏한 경우 방부제에 의한 活性度變化는 나타나지 않았으나 貯藏 12日까지 20% 정도 失活되었다고 報告하였으며, 이러한 報告는 本實驗의 結果와 類似하였다.

要 約

고등어와 정어리의 普通肉과 血合肉의 各組織에 分布하는 蛋白質分解酵素의 最適活性條件을 究明하고 熱安定性과 低溫貯藏中の 活性變化 등을 比較·檢討한 結果를 要約하면 다음과 같다.

血合肉魚의 組織中에 分布하는 蛋白質分解酵素

1. 고등어와 정어리의 普通肉 및 血合肉에서 蛋白質分解酵素를 抽出하여 pH에 따른 蛋白質分解能을 分析한 結果, 酸性, 弱酸性 및 알칼리성에서 活性을 보이는 세 種類의 蛋白質分解酵素가 分布하고 있음을 알았다. 그리고 이들 各 分布酵素中에서 酸性蛋白質分解酵素가 가장 活性이 強하였으며, 고등어에 있어서는 普通肉에서 抽出한 것이 pH 3.0, 50°C의 活性最適條件에서 固有活性은 0.12였으며, 血合肉에서 抽出한 것은 pH 3.0, 45°C의 活性最適條件에서 固有活性은 0.36이었다. 정어리의 普通肉과 血合肉에서 抽出한 蛋白質分解酵素의 活性最適條件은 모두 pH 2.4, 45°C 였으며, 그때의 固有活性은 各各 0.45 및 0.24였다.

2. 고등어와 정어리의 普通肉과 血合肉에 分布하는 蛋白質分解酵素液을 30°C부터 70°C까지의 溫度에서 5分間 加熱處理한 結果, 고등어의 血合肉에서 抽出한 酵粗素는 55°C에서 失活하기 始作하였으나, 그 밖의 組織에서 抽出한 粗酵素는 50°C에서 失活이 일어났다.

3. 抽出된 粗酵素液을 5°C와 -15°C에서 貯藏하는 中에 活性의 變化를 檢討한 結果, 肉에서 抽出한 粗酵素液은 時日의 경과와 더불어 失活이 일어나 貯藏 28일까지 대부분의 酵素活性이 消失되었으며 防腐劑의 添加效果는 나타나지 않았다.

文 獻

Makinodan, Y. and S. Ikeda. 1969a. Studies on fish muscle protease-II. Purification and properties of a proteinase active in slightly alkaline pH range. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 35(8), 749-757.

Makinodan, Y. and S. Ikeda. 1969b. Studies on fish muscle protease-III. Purification and properties of a proteinase active in acid pH range. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 35(8), 758-766.

Makinodan, Y. and S. Ikeda. 1976a. Studies on fish muscle protease-VI. Separation of carp muscle cathepsin A and D, and some properties of carp muscle cathepsin A. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 42(2), 239-247.

Makinodan, Y. and S. Ikeda. 1976b. Studies on fish muscle protease-VIII. On the existence of protease active in neutral pH range. Bull.

Japan. Soc. Sci. Fish. 42(6), 665-670.

齋藤 要・鮫島宗雄. 1958. 魚類의 肉質變化に關する 生化學的研究-VIII. 魚肉抽出液의 proteolytic activity について. 日水誌. 24(3), 201-204.

Iwata, K., K. Kobashi and J. Hase. 1973. Studies on fish muscle alkaline protease-I. Isolation, purification and some physicochemical properties of an alkaline protease from carp muscle. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 39(12), 1325-1337.

Iwata, K., K. Kobashi and J. Hase. 1974a. Studies on fish muscle alkaline protease-II. Some enzymatic properties of carp muscular alkaline protease. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 40(2), 189-200.

岩田和士・小橋恭一・長谷純一. 1974b. 筋肉アルカリ性プロテアーゼの研究-III. 魚類의 筋肉および코의 臟器中의 알칼리성 프로테アーゼ의 分布. 日水誌. 40(2), 201-209.

Makinodan, Y. and S. Ikeda. 1971a. Studies on fish muscle protease-IV. Relation between HIMODORI of KAMABOKO and muscle proteinase. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 37(6), 518-523.

Makinodan, Y. and S. Ikeda. 1971b. Studies on fish muscle protease-V. On the existence of cathepsin A, B and C. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 37(10), 1002-1006.

Toyohara, H., Y. Makinodan and S. Ikeda. 1982. Purification and properties of carp muscle cathepsin A. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 48(8), 1145-1150.

Makinodan, Y., T. Akasaka, H. Toyohara and S. Ikeda. 1982. Purification and properties of carp muscle cathepsin D. J. Food Sci. 47(1), 647-652.

Dawson, R. M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott and K. M. Jones. 1971. Data for biochemical research. 2, nd ed. pp. 475-508.

Anson, M. N. 1938. The estimation of pepsin papain and cathepsin with hemoglobin. J. Physiol. 22, 79-89.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.

- 193, 265—275.
- 牧之段保夫・豊原治彦・池田静徳. 1983. 魚類の筋肉における酸性, 中性, アルカリ性プロテイナーゼの存在について. 日水誌. 49(1), 109—112.
- Geist, G. M. and D. L. Crawford. 1974. Muscle cathepsins in three species of pacific sole. *J. Food Sci.* 39, 548—551.
- Deng, J. C. and D. A. Lillard. 1973. The effect of curing agents, pH and temperature on the activity of porcine muscle cathepsin. *J. Food Sci.* 38(1), 299—02.
- Martin, C. B. and J. R. Whitaker. 1968. Catheptic enzymes and meat tenderization. Purification of cathepsin D and its action on actomyosin. *J. Food Sci.* 33, 59—63.
- Ting, C. Y., M. W. Montgomery and A. F. Anglemier. 1968. Partial purification of salmon muscle cathepsins. *J. Food Sci.* 33(2), 617—620.
- 牧之段保夫・山本正男・清水亘. 1963. 水産動物肉に関する研究-XXXIX. 魚筋肉プロテアーゼについて. 日水誌. 29(8), 776—780.
- 眞仁田英男・小泉千秋・野中順三九. 1969. サバ筋肉の無菌的自己消化. 日水誌. 35(10), 1027—1033.
- 岩田和士・小橋恭一・長谷純一. 1974c. 筋肉アルカリ性プロテアーゼの研究-IV. シログチおよびアカカマスとコイの筋肉内アルカリ性プロテアーゼの諸性質の比較. 日水誌. 40(10), 1043—1050.
- Su, H., T. S. Lin and T. C. Lanier. 1981. Investigation into potential source of heat-stable alkaline protease in mechanically separated atlantic croaker. *J. Food Sci.* 46, 1654—1664.