

Tilapia(*Oreochromis niloticus*) 난과 혈청 Cysteine Proteinase 저해제의 저온 및 열 안정성

최성희[†] · 권혁추 · 권준영

선문대학교 응용생물과학부

Thermal Stability of Cysteine Proteinase Inhibitor of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Egg and Serum

Seong-Hee Choi[†], Hyuk-Chu Kwon and Joon-Yeong Kwon

Division of Applied Biological Sciences, Sun Moon University, Asan 336-708, Korea

ABSTRACT : To evaluate the potentiality of industrial use of cysteine proteinase inhibitor (cystatin) of tilapia egg and serum stability of the tilapia cystatin on low temperature storage and heat treatment was studied. When the eggs were stored at 4°C for 3 days the cystatin activity was not changed much, while the supernatant of egg homogenate lost its cystatin activity significantly, remaining only about 65% of initial activity. When the eggs and serum were subjected to repeated freeze at -20°C and thaw at room temperature once a day, the egg cystatin was decreased after 5 cycles of freeze and thaw. However the serum cystatin was not changed by the 5 times repetition of freeze and thaw. More than 80% of egg cystatin activity was remained when the egg was heated at 35°C for 30 min, but less than 10% was remained when heated at 50°C. On the other hand, the serum cystatin was very resistant to heat, remaining about 74% after heating at as high as 80°C for 30 min. In summary, the egg cystatin was more stable when stored as intact form of egg rather than as supernatant of homogenate when stored at refrigeration. Egg cystatin was relatively stable against repeated freeze-thaw, and serum was found to be more stable in cysteine proteinase inhibitory activity than egg. Egg cystatin was not very resistant to heat treatment, while serum cystatin was quite resistant to high temperature heat treatment. These results suggest that tilapia egg and serum, especially the serum, would be a useful source for cysteine proteinase inhibitor in surimi production.

Key words : Tilapia egg, Cystatin, Cysteine proteinase inhibitor, Thermal stability.

요 약 : Tilapia 난과 혈청의 cysteine proteinase 저해제(cystatin)의 산업적 이용 적성을 평가하고자 이의 저온 저장성과 가열에 대한 열 안정성을 살펴보았다. Tilapia 난과 난의 균질 상등액을 4°C에서 3일간 보관하면서 cystatin 활성도의 변화를 측정된 결과 난의 경우는 저장 중 큰 변화가 없었으나, 난 균질 상등액의 경우는 활성이 차츰 감소하여 저장 3일 후에는 초기 활성의 약 65%로 줄어들었다. 냉동과 해동에 따른 cystatin의 안정성을 살펴보기 위하여 난과 혈청을 -20°C 냉동과 상온 해동을 하루에 한 차례씩 반복한 결과, 난의 경우 5회 이상 냉동과 해동이 반복된 경우에는 활성이 차츰 감소하였으나, 혈청의 경우는 냉동-해동 cycle을 5회 반복하여도 cystatin 활성에 영향을 미치지 않았다. 난 cystatin의 열 안정성을 측정하기 위하여 35°C와 50°C에서 각각 30분간 가열하여 cystatin 활성을 측정된 결과 35°C에서는 80% 이상의 활성이 유지되었으나 50°C에서는 10% 미만으로 감소되었다. 반면에 혈청의 경우는 50°C에서 30분 가열하여도 cystatin 활성이 감소하지 않고, 80°C의 고온에서 30분 동안 가열하여도 약 74%의 활성이 남아 있어 열에 매우 강한 특성을 보였다. 이상의 결과를 종합하면 난을 냉장저장할 때는 난을 파괴하지 않고 원상대로 보관하는 것이 난을 균질하여 원심분리한 상등액으로 저장하는 것보다 cysteine proteinase 저해제 활성을 더 오래 보존하는 방법이며, 난 cysteine proteinase 저해제는 냉동-해동 반복처리에도 비교적 안정하였으나 혈청은 난에 비하여 냉동-해동 반복처리에 대해 더욱 안정하였다. 열 안정성에 있어서는 난 cystatin은 열에 비교적 약한 반면 혈청 cystatin은 열에 매우 안정하였다. 따라서 tilapia 난과 혈청은 surimi 제조시 cysteine proteinase 저해제로서 활용 가치가 있으며, 특히 혈청은 더욱 유용하다고 사료된다.

서 론

* 본 연구는 해양수산부 마린바이오21사업의 해양바이오프로세스연구 단 연구비 지원(과제관리번호 B-2004-18)에 의해 수행되었음.

[†] 교신저자: 충남 아산시 탕정면 갈산리 100, 선문대학교 자연과학대학 응용생물과학부. (우) 336-708, (전) 041-530-2281, (팩) 041-530-2917, E-mail: choish@sunmoon.ac.kr

Cysteine proteinase 저해제는 cathepsin B, H, L, S와 papain 등 기능기로서 thiol기를 갖는 cysteine 계열 단백질 분해효소 작용을 저해하는 단백질로서 각종 동식물의 조직과

체액에 널리 분포하며 그 종류와 특성도 다양하다(Turk & Bode, 1991). Cysteine proteinase 저해제는 세포 내부 또는 외부로부터 cysteine proteinases에 의한 비우호적인 단백질 분해활성으로부터 세포를 보호하며, 침략자에 대한 생물학적 방어체계로서 중요한 역할을 한다(Sun *et al.*, 2003). Cysteine proteinase 저해제는 bacteria의 생존에 필수적인 cysteine proteinase 작용을 억제함으로써 bacteria의 감염으로부터 세포를 보호하며, virus의 복제에 필요한 viral proteinases에 대한 방어기작으로도 작용한다(Bjorck *et al.*, 1989). Cysteine proteinase 저해제는 또한 collagen 분해를 억제함으로써 뼈의 흡수를 방지한다(Kakegawa *et al.*, 1993; Ohashi *et al.*, 2003). 어류에서는 난 발달과정에서 높은 활성이 발견되고 이는 난 발생과 관련이 있거나 발병과정, 또는 미생물에 대항하는 보호기작의 하나로 생각되어지고 있으나 그 특성과 기능에 관해 더 많은 연구가 필요하다(Yamashita & Konagaya, 1991).

Surimi는 생선을 기계로 발골하고 물로 수세하여 냉동시킨 근육단백질이 농축된 어육 반가공품으로 수분 보유력, gel 형성능력 등의 기능성이 뛰어나 게맛살과 같은 가공식품의 원료로 널리 쓰이고 있다(Okada, 1992). Surimi는 그 제조과정에서 혈액 등 이물질과 함께 일부 수용성 단백질분해효소들이 수세되어 제거되지만 이들 내인성 단백질분해효소가 완전히 제거되지는 않는다. Surimi에 잔류하는 이들 내인성 단백질분해효소들은 특히 가열온도 60°C 부근에서 탄력성이 적은 gel을 형성하도록 하는 등 gel의 강도를 낮추는 요인으로 작용한다. 이렇게 특정 온도에서 surimi gel의 강도가 약해지는 현상을 소위 “modori”라 하며, 이로 인하여 gel 구조가 재생 불가능한 상태로 파괴되어 제품의 품질이 저하되게 된다(Alvarez *et al.*, 1999; Kang & Lanier, 2000).

가열에 의한 생선 surimi의 gel 강도 저하현상의 원인이 되는 주요 단백질분해 효소시스템은 cathepsin 등 lysosomal proteinases, calpain과 같은 Ca-의존성 cytosolic proteinases 및 alkaline proteinases 등이 지목되며, 그 중에서도 cysteine proteinase인 cathepsin L은 여러 어종에서 surimi gel 품질 저하를 초래하는 주요 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다(An *et al.*, 1994; Benjakul *et al.*, 2003). 이에 따라 가열에 의한 surimi의 gel 강도 저하를 극복하기 위하여 각종 단백질분해효소 저해제를 surimi에 첨가하여 gel 강도를 높이고자 하는 시도가 있었으며, 가축 혈장, 계란 흰자, 유청, 쌀겨 등에 함유되어 있는 cysteine proteinase 저해제의 첨가로 surimi gel 강도의 개선효과를 얻은 바 있으나(Wasson *et al.*, 1992; Morrissey *et al.*, 1993; Weerasinghe *et al.*, 1996; Kang &

Lanier, 1999; Benjakul *et al.*, 2001), tilapia 난이나 혈장의 cysteine proteinase 저해제 이용에 관한 연구는 없었다.

따라서 본 연구에서는 tilapia 난과 혈청의 cysteine proteinase 저해제의 산업적 이용 적성을 평가하고자 이의 저온 저장성과 가열에 대한 열 안정성을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

N- α -benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide(BANA), di-thiothreitol(DTT), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), iodoacetic acid, papain, L-cysteine, Brij35, dimethyl sulf-oxide(DMSO), sodium azide, mersalyl acid, 2-naphthyl-amine, fast Garnet GBC sulfate salt, ammonium sulfate는 Sigma(St. Louis, USA)로부터 구입하였다.

2. Tilapia 난

수조에서 기른 tilapia의 난소를 채취하여 무게를 측정 한 후, 난을 수거하여 시료로 사용하였다. 난 10 g을 1.33 mM EDTA와 2.7 mM cysteine을 함유하는 100 mM phosphate buffer(pH 6.0)로 homogenize(Bio homogenizer M133/1281-0, speed 2, 20 sec)하여 100 mL로 조정 한 후 4°C에서 10,000 rpm으로 20 min 원심분리하여 상등액을 NO. 1 filter paper로 여과하여 난 균질 상등액으로 사용하였다.

3. 저온 안정성

Tilapia 난 cysteine proteinase 저해제의 저온 안정성을 살펴보기 위하여 tilapia 난을 4°C에 저장하면서 난 균질 상등액의 cysteine proteinase 저해제 활성을 3일간 측정하였다. 또한 난 균질 상등액 cysteine proteinase 저해제의 저온 안정성을 살펴보기 위하여 난 상등액을 4°C에 저장하면서 3일간 cysteine proteinase 저해제 활성을 측정하였다.

4. 냉동해동 안정성

반복되는 냉동과 해동에 따른 tilapia 난 cysteine proteinase 저해제 활성의 안정성을 살펴보기 위하여 tilapia 난을 -20°C 냉동과 상온 해동을 하루 한 번씩 반복하며 cysteine proteinase 저해제 활성을 측정하였으며, 결과는 냉동-해동 처리하지 않은 control 난의 활성에 대한 상대 활성(%)으로 나타냈다.

5. 열 안정성

Cysteine proteinase 저해제 활성의 열 안정성을 측정하기 위하여 시료를 35°C, 50°C 및 80°C에서 30분간 가열한 다음 즉시 얼음에서 냉각시킨 후 열처리하지 않은 control 시료와 함께 원심분리(10,000 rpm, 5 min) 하여 얻은 상층액의 cysteine proteinase 저해제 활성을 측정하였으며, 결과는 열처리하지 않은 시료에 대한 상대 활성(%)으로 나타냈다.

6. Cysteine Proteinase 저해제 활성 측정

Cysteine proteinase 저해제인 cystatin 활성은 Li *et al.* (2000)과 Barrett(1972)의 방법을 수정하여 측정하였다. 억제활성측정에 사용된 완충액은 1.33 mM disodium EDTA를 함유하는 100 mM phosphate buffer(88 mM KH_2PO_4 , 12 mM Na_2HPO_4)(pH 6.0)였고, 사용하기 직전에 2.7 mM의 cysteine을 첨가하였다. 발색을 위한 시약은 Mersalyl-Brij solution은 Mersalyl acid 2.43 g을 0.5 M NaOH 60 mL에 녹인 후 증류수를 사용하여 약 450 mL 정도로 맞추고 0.3 g의 disodium EDTA를 첨가하여 6 M HCl로 pH를 4.0으로 조정 한 후 volume을 500 mL로 만들었으며, 여기에 4%(w/v) Brij 35 500 mL를 첨가하여 최종 1,000 mL로 만들어 4°C에서 보관하며 사용하였다. Fast Garnet base stock solution은 225 mg의 Fast Garnet GBC(4-amino-2,3-dimethylazobenzene)를 ethanol 50 mL에 녹여 1 M HCl 30 mL를 첨가한 후 증류수를 사용하여 100 mL로 만들어 4°C에 보관하며 사용하였으며, color reagent는 Fast Garnet base stock solution 1 mL에 0.2 M NaNO_2 0.1 mL를 넣고 5분간 얼음에서 혼합한 후 Mersalyl-Brij 시약으로 최종 100 mL로 만들었으며 4°C에서 하루 이내에 사용하였다.

Cystatin 활성도는 BANA(α -N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide)를 기질로 하여 papain 활성 억제제를 측정하였다. Papain은 증류수를 사용하여 stock solution(4.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)을 만든 다음 4% Brij 35 용액에 100배 희석하여 papain working solution(45 $\text{ng}/\mu\text{L}$)을 만들어 사용하였다. 기질 BANA는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 40 mg/mL 농도로 녹여 사용하였다.

Cystatin 활성 측정을 위하여 125 μL 의 시료를 50 μL 의 papain working solution(45 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 1.5 mL의 100 mM phosphate buffer(88 mM KH_2PO_4 , 12 mM Na_2HPO_4 , 1.33 mM disodium EDTA, 2.7 mM cysteine, pH 6.0)와 함께(총 볼륨을 1.675 mL) 40°C에서 5분간 preincubation하여 papain을 활성화 시켜서 억제활성 단백질과 상호작용을 유도하였으며, 5분간의 가열 후 기질(BANA) 50 μL 를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시키고 발색시약 2 mL를 첨가함으로써 반응을

종결시켰다. 반응 중 papain의 작용으로 방출된 β -naphthylamide와 발색시약에 함유된 Fast Garnet의 짝지음 반응으로 생성된 적색의 아조 화합물은 spectrophotometer(Pharmacia Model 80-2092-26)를 사용하여 520 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

Tilapia 난 cystatin 활성의 저온 안정성을 살펴보기 위하여 tilapia 난과 난의 균질 상등액을 4°C에서 3일간 보관하면서 cystatin 활성도의 변화를 측정하였다. Fig. 1은 tilapia 난의 저장 중 cystatin 활성의 변화를 초기 활성에 대한 상대활성 비율로 나타낸 것이며, 4°C에서 3일간 난의 저장 중 cystatin 활성에 있어 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 난 균질 상등액의 경우는 저장 2일까지는 cystatin 활성의 변화가 없었으나, 저장 3일 후에는 활성이 현저히 감소하여 초기 활성의 65.15%에 지나지 않았다(Fig. 2).

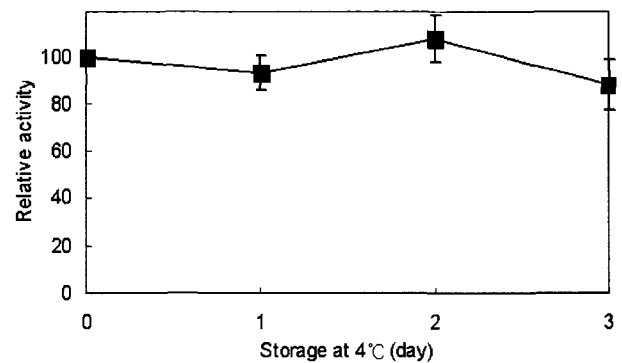


Fig. 1. Changes in cysteine proteinase inhibitory activity of tilapia egg during storage at 4°C.

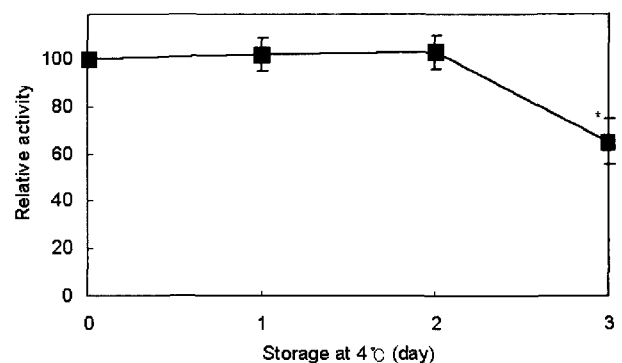


Fig. 2. Changes in cysteine proteinase inhibitory activity of tilapia egg supernatant during storage at 4°C. *Significantly different from day 0 ($p < 0.05$).

반복되는 냉동과 해동에 따른 tilapia 난과 혈청 cystatin 활성의 안정성을 살펴보기 위하여 tilapia 난과 혈청을 -20℃ 냉동과 상온 해동을 하루에 한 차례씩 반복하며 cystatin 활성을 측정하였으며, 그 결과를 냉동-해동 처리하지 않은 초기활성에 대한 상대활성 비율(%)로 나타내었다(Fig. 3, 4). 난의 경우, 냉동과 해동의 반복을 4회까지는 cystatin 활성에 거의 변화가 없었으나, 5회 이상 냉동 해동이 반복된 경우에는 활성이 차츰 감소하였다(Fig. 3). 한편 혈청의 경우에는 냉동-해동 cycle을 5회 반복하여도 cystatin 활성에 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 4).

Fig. 5는 tilapia 난 cystatin 활성의 열 안정성을 측정하기 위하여 35℃와 50℃에서 각각 30분간 가열하여 cystatin 활성을 측정한 결과로서 35℃에서는 80% 이상의 활성이 유지되었으나 50℃에서는 10% 미만으로 감소되었다. 반면에 혈청의 경우는 50℃에서 30분 가열하여도 cystatin 활성이 전혀 감소하지 않아 난과는 대조적인 결과를 보였으며, 80℃의 고온에서 30분 동안 가열하니 활성이 감소하기는 하였으나

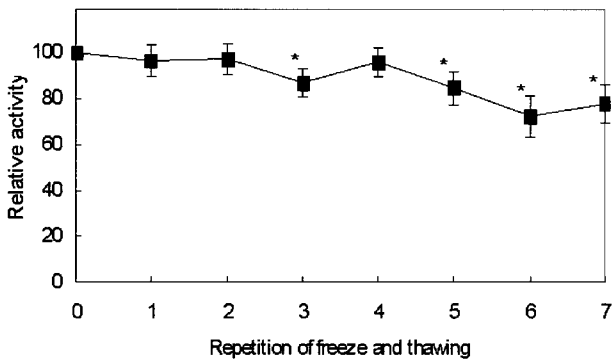


Fig. 3. Effects of repetitive freeze and thawing on cysteine proteinase inhibitory activity of tilapia egg. *Significantly different from day 0 ($p < 0.05$).



Fig. 4. Effects of repetitive freeze and thawing on cysteine proteinase inhibitory activity of tilapia serum.

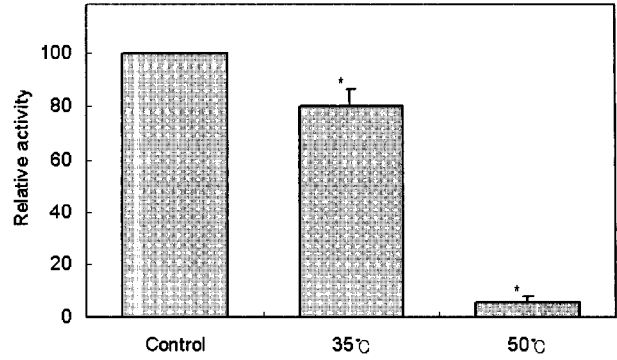


Fig. 5. Changes in cysteine proteinase inhibitory activity of tilapia egg after heating at different temperatures for 30 minutes. *Significantly different from control group ($p < 0.05$).

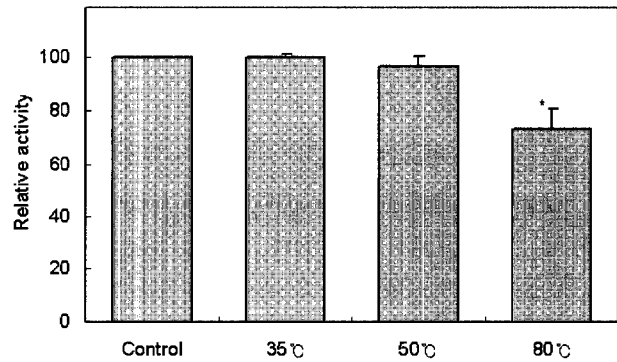


Fig. 6. Changes in cysteine proteinase inhibitory activity of tilapia serum after heating at different temperatures for 30 minutes. *Significantly different from control group ($p < 0.05$).

감소의 폭은 그리 크지 않아 30분 후에도 약 74%의 활성이 남아 있었다.

고 찰

Surimi는 생선살을 잘게 분쇄하여 물로 수세한 후 동해방지제를 첨가하여 냉동시킨 어육 반가공품이다. Surimi는 근육단백질이 농축된 형태로서 양질의 단백질을 함유하여 영양적으로 매우 우수한 식품소재로서 수분 보유력, gel 형성 능력 등의 기능성이 뛰어나 계맛살과 같은 가공식품의 원료로 널리 쓰인다. Surimi는 그 제조과정에서 혈액과 같은 이물질과 함께 일부 수용성 단백질분해효소들이 수세되어 제거되지만 내인성 단백질분해효소들이 완전히 제거되지는 않는다. 이들 내인성 단백질분해효소들은 surimi의 근단백질을 분해하여 surimi의 품질을 저하시키며, 특히 50~70℃ 근처

에서 탄력성이 적고 쉽게 부스러지는 gel을 형성하여 gel의 강도를 낮추는 요인으로 작용한다(An *et al.*, 1996). 이렇게 특정 온도에서 surimi gel의 강도를 약화시키는 현상을 "modori"라 하며, 이로 인해 gel 구조가 재생 불가능하게 파괴되어 제품의 품질이 저하된다(Alvarez *et al.*, 1999; Kang & Lanier, 2000).

Modori의 원인이 되는 단백질분해효소(MIP; modori-inducing proteases)에는 cathepsin 등 lysosomal proteinases, calpain과 같은 Ca-의존성 cytosolic proteinases 및 내열성 alkaline proteinases 등이 알려져 있으며(Haard, 1990; Izquierdo-Pulido *et al.*, 1994), 그 중에서도 cysteine protease인 cathepsin L은 여러 어종에서 surimi gel의 품질 저하를 초래하는 주요 요인으로 작용한다. Benjakul *et al.* (1997)과 Visessanguan *et al.* (2003)에 의하면 Pacific whiting과 arrowtooth flounder의 사후강직 중 근단백질의 자가분해에 있어 cathepsin L이 중요한 역할을 하며, 또한 이들 어류로부터 제조된 surimi의 주요 MIP로 cathepsin L이 작용한다(An *et al.*, 1994; Visessanguan & An, 2000).

가열 중 surimi gel 강도의 저하는 제품의 품질을 손상시켜 커다란 경제적 손실을 가져오게 된다. 따라서 이를 방지하기 위하여 각종 단백질분해효소 저해제를 surimi에 첨가하여 gel 강도를 높이고자 하는 많은 시도가 있었으며, 가축 혈장, 계란 흰자, 유청, 쌀겨 등에 함유되어 있는 cysteine protease 저해제의 이용으로 surimi gel 강도의 개선효과를 얻은 바 있으나(Wasson *et al.*, 1992; Morrissey *et al.*, 1993; Weerasinghe *et al.*, 1996; Kang & Lanier, 1999; Benjakul *et al.*, 2001), tilapia 난과 혈장에 존재하는 cysteine protease 저해제의 이용에 관한 연구는 없었다.

Cystatin은 기능기로서 thiol기를 갖는 cysteine 계열 단백질 분해효소인 cathepsin B, H, L, S와 papain을 저해하는 단백질로서 포유동물에서 많이 연구되어 왔다(Abrahamson, 1986; Turk & Bode, 1991). Cystatin은 주로 척추동물을 위주로 분류되었으며, 식물체로부터 분리된 cystatin들은 cystatin family 중의 하나로 분류될 수 없었다. 그리하여 plant cystatin family로 따로 구분하게 되었고 이들을 phytocystatin으로 분류한다(Rassam & Laing, 2004). 어류에서는 최근에 무지개송어와 연어, zebrafish 및 carp에서 부분적으로 clone 되어졌을 뿐 포유동물에 비하여 극히 제한적인 연구만이 되어 있는 상태이다(Li *et al.*, 1998). 최근에 Choi(2006)는 tilapia 난으로부터 cystatin을 분리 정제하여 그 특성을 규명하고자 여러 가지 분리 방법을 살펴본 결과 ammonium sulfate 침전과 papain이 결합된 CNBr-Sepharose 4B affinity

chromatography에 의해 효율적으로 분리 정제할 수 있는 것으로 보고하였으며, tilapia 난의 cystatin 활성은 분자량 45 kD~66 kD 사이로 추정하였다.

Cystatin은 cysteine protease의 작용을 저해하여 세포내부 또는 외부로부터 cysteine proteinases에 의한 비우호적인 단백질 분해활성으로부터 세포를 보호하는 역할을 하며(Bjorck *et al.*, 1989), virus의 복제에 필요한 viral proteinases에 대한 방어기작으로도 작용한다(Argos *et al.*, 1984). 인체에서는 cystatin의 유전적 이상이 신경계 질환의 발병원인으로 작용하며(Ghiso *et al.*, 1986), 신경조직세포 분화발달의 조절에 필요한 것으로 알려져 있다(Solem *et al.*, 1990). 또한 어류에서는 난 발달과정에서 높은 cystatin 활성이 발견되고 이는 embryogenesis와 관련이 있거나 pathological process와 미생물에 대항하는 보호기작의 하나로 생각된다(Yamashita & Konagaya, 1991).

Tilapia는 조건만 적당하면 연중 10회까지 산란하는 열대성 어종으로 난소막내에 미성숙란과 성숙란 과숙란, 퇴행란이 공존하여 20~40일 만에 연속적으로 산란을 한다. 산란조건이 적당하지 않은 경우 성숙란 퇴행에 단백질분해 효소가 관련하고, 난황의 전구물질인 vitellogenin이 난소로 유입된 후에 lipoprotein과 L-phosvitin, B-component로 분해되어 난황을 생성하게 되는데 이때에도 단백질 분해효소가 관련하는 것 같다(Carnevali *et al.*, 1999).

본 연구에서는 tilapia 난과 혈청에 존재하는 cystatin의 산업적 이용 적성을 평가하고자 이의 저온 저장성과 가열에 대한 열 안정성을 평가하였다. Tilapia 난 cystatin 활성의 저온 안정성을 살펴본 결과 4℃에서 3일간 난을 저장하는 동안 cystatin 활성이 크게 변화하지 않는 것으로 나타났다. 그러나 tilapia 난을 균질하여 그 상등액을 저장한 경우에는 저장 2일까지는 활성의 변화가 없었으나, 저장 3일 후에는 현저히 감소하였다. 이러한 결과로 볼 때 tilapia 난의 난막을 파괴하지 않고 난 그대로 냉장 보관하는 것이 난을 균질하여 원심 분리한 상등액으로 저장하는 것보다 cystatin 활성을 더 오래 보존하는 방법이 될 것이다.

한편 tilapia 난과 혈청을 -20℃ 냉동과 상온 해동을 하루에 한 차례씩 반복하며 cystatin 활성을 측정할 결과 난의 경우, 냉동과 해동의 반복을 4회까지는 cystatin 활성에 거의 변화가 없었으나, 5회 이상 냉동 해동이 반복된 경우에는 활성이 차츰 감소하였으나 감소폭은 크지 않았으며, 혈청의 경우에는 냉동-해동 cycle을 5회 반복하여도 cystatin 활성이 감소되지 않아 난과 혈청 모두 냉동-해동이 반복되는 가혹한 온도처리 조건에 잘 견디며, 난에 비하여 혈청 cystatin이 좀

더 내성이 강한 것으로 나타났다.

반대로 tilapia 난과 혈청 cystatin의 고온 안정성을 살펴본 결과 난의 경우 35℃에서는 80% 이상의 활성이 유지되었으나 50℃에서는 10% 미만으로 감소되었다. 반면에 혈청의 경우는 50℃에서 30분 가열하여도 cystatin 활성이 전혀 감소하지 않아 난과는 대조적인 결과를 보였으며, 80℃의 고온에서 30분 동안 가열해도 약 74%의 활성이 남아 있어 열에 매우 강한 특성을 보였다. Cystatin의 고온에 대한 내열성은 여러 다른 유래의 cystatin에서도 보고된 바 있는데, Abe *et al.* (1987)과 Izquierdo-Pulido *et al.*(1994)에 의하면 쌀겨에서 분리된 cystatin을 100℃에서 30분 이상 가열하였음에도 그 활성을 잃지 않았고, Sano *et al.*(2005)에 의하면 우유에 함유된 cystatin이 70℃에서 20분간 그 활성을 잃지 않았다. 이렇게 cystatin이 종종 고온에서 그 활성을 잃지 않고 안정한 것은 그들의 화학구조에서 많은 disulfide 결합에 의해 매우 단단한 코일구조를 이루고 있기 때문이다(Richardson, 1981).

이상의 결과를 요약하면, tilapia 난을 단기간 냉장저장할 때 난을 균질하여 원심분리한 상등액으로 저장하는 것보다 난을 파괴하지 않고 원상대로 보관하는 것이 cystatin 활성을 더 오래 보존할 수 있는 방법이며, 난 cystatin 활성은 냉동-해동 반복처리에도 비교적 안정하였으며, 혈청은 난에 비하여 냉동-해동 반복처리에 대해 더욱 안정하였다. 고온 안정성에 있어서도 난 cystatin은 열에 비교적 약한 반면 혈청 cystatin은 열에 매우 안정한 것으로 밝혀졌다. 따라서 tilapia 난과 혈청은 surimi 제조시 cysteine proteinase 저해제로서 활용가치가 있으며, 특히 혈청은 더욱 유용하다고 사료된다.

인용문헌

- Abe K, Kondo H, Arai S (1987) Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. *Agric Biol Chem* 51:2763-2768.
- Abrahamson M, Barrett AJ, Salvesen G, Grubb A (1986) Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem* 261:11282-11289.
- Alvarez C, Couso I, Tejada M (1999) Thermal gel degradation(modori) in sardine surimi gel. *J Food Sci* 64: 633-637.
- Argos P, Kamer G, Nicklin MJH, Wimmer E (1984) Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picorviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. *Nucleic Acid Res* 12:7251-7267.
- An H, Weerasinghe V, Seymour TA, Morrissey MT (1994) Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi protein. *J Food Sci* 59:1013-1017.
- An H, Margo YP, Seymour TA (1996) Role of endogenous enzymes in surimi gelation, *Trends Food Sci Technol* 7:321-326.
- Barrett AJ (1972) A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. *Anal Biochem* 47:280-293.
- Benjakul S, Seymour TA, Morrissey MT, An H (1997) Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. *J Food Sci* 62:729-733.
- Benjakul S, Visessanguan W, Srivilai C (2001) Porcine plasma protein as gel enhancer in bigeye snapper(*Priacanthus tayenus*) surimi. *J Food Biochem* 25:285-305.
- Benjakul S, Visessanguan W, Leelapongwattana K (2003) Purification and characterization of heat-stable alkaline proteinase from bigeye snapper(*Priacanthus macracanthus*) muscle. *Comp Biochem Physiol B* 134:579-591.
- Bjorck L, Akesson P, Bohus M, Trojnar J, Abrahamson M, Olafsson I, Grubb A (1989) Bacterial growth blocked by a synthetic peptide based on the structure of a human proteinase inhibitor. *Nature* 337:385-386.
- Carnevali O, Carletta R, Cambi A, Vita A, Bromage N (1999) Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases. *Bio Reprod* 60:140-146.
- Choi SH (2006) Isolation of cystatin from tilapia ovum using CNBr-activated Sepharose 4B, Sepharose 6B, Sephadex G-75 and Superose 6 column chromatography. *Sun Moon J Nat Sci* 7:55-67.
- Ghiso J, Jansson O, Frangione B (1986) Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Icelandic type is a variant of gamma-trace basic protein (cystatin C). *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2974-2978.
- Haard NF (1990) Enzymes from food myosystems. *J Muscle Foods* 1:292-338.
- Izquierdo-Pulido ML, Haard TA, Hung J, Haard NF (1994) Orizacystatin and other proteinase inhibitors in rice

- grain: potential use as a fish processing aid. *J Agric Food Chem* 42:616-622.
- Takegawa H, Nikawa T, Tagami K, Kamioka H, Sumitani K, Kawata T, Drobnic-Kosorok M, Lenarcic B, Turk V, Katunuma N (1993) Participation of cathepsin L on bone resorption. *FEBS Lett* 321(2-3):247-250.
- Kang IS, Lanier TC (1999) Bovine plasma protein functions in surimi gelation compared with cysteine protease inhibitors. *J Food Sci* 64:842-846.
- Kang IS, Lanier TC (2000) Heat induced softening of surimi gel by proteinases. In: Park JW (ed.), *Surimi and surimi seafood*. Marcel Dekker, New York, pp 445-474.
- Li F, An H, Seymour TA, Barnes DW (2000) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cystatin C: expression in *Escherichia coli* and properties of the recombinant protease inhibitor. *Comp Biochem Physiol Part B* 125:493-502.
- Li F, An H, Seymour TA, Bradford CS, Morrissey MT, Bailey GS, Helmrich A, Barnes DW (1998) Molecular cloning, sequence analysis and expression distribution of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cystatin C. *Comp Biochem Physiol Part B* 121:135-143.
- Morrissey MT, Wu JW, Lin DD, An H (1993) Effect of food grade protease inhibitor on autolysis and gel strength of surimi. *J Food Sci* 58:1050-1054.
- Ohashi A, Murata E, Yamamoto K, Majima E, Sano E, Le QT, Katunuma N (2003) New functions of lactoferrin and β -casein in mammalian milk as cysteine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 306:98-103.
- Okada M (1992) History of surimi technology in Japan. In: Tyre CL, Chong ML(eds.), *Surimi technology*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 3-21.
- Rassam M, Laing WA (2004) Purification and characterization of phytocystatins from kiwifruit cortex and seeds. *Phytochemistry* 64:19-30.
- Richardson M (1981) Protein inhibitors of enzymes. *Food Chem* 6:235-253.
- Sano E, Miyauchi R, Takakura N, Yamauchi K, Murata E, Le QT, Katunuma N (2005) Cysteine protease inhibitors in various milk preparations and its importance as a food. *Food Res Int* 38:427-433.
- Solem ML, Rawson C, Lindburg K, Barnes DW (1990) Transforming growth factor β regulates cystatin C in serum-free mouse embryo(SFME) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 172:945-951.
- Sun H, Li N, Wang X, Liu S, Chen T, Zhang L, Wan T, Cao X. (2003) Molecular cloning and characterization of a novel cystatin-like molecule, CLM, from human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 301:176-182.
- Turk V, Bode, W (1991) The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 285:213-219.
- Visessanguan W, An H (2000) Effects of proteolysis and mechanism of gel weakening in heat-induced gelation of fish myosin. *J Agric Food Chem* 48:1024-1032.
- Visessanguan W, Benjakul S, An, H (2003) Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) muscle. *Comp Biochem Physiol* 134B:477-487.
- Wasson DH, Reppond KD, Babbitt JK, French JS (1992) Effects of additives on proteolytic and functional properties of arrowtooth flounder surimi. *J Aqua Food Prod Technol* 1:147-165.
- Weerasinghe VC, Morrissey MT, Chung Y, An H (1996) Whey protein concentrate as a proteinase inhibitor in Pacific whiting surimi. *J Food Sci* 61:367-371.
- Yamashita M & Konagaya S (1991) Cysteine protease inhibitor in egg of chum salmon. *J Biochem(Tokyo)* 110: 762-766.