

## 南蓝鳕鱼糜中L型组织蛋白酶的研究

胡亚芹, 姚燕佳, 陈建初\*

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310029)

**摘要:**从南蓝鳕鱼糜中提取肌动球蛋白,对肌动球蛋白进行凝胶层析,测定各收集组分中L型组织蛋白酶的活性。结果表明,组织蛋白酶L依然存留于肌动球蛋白样品中,多次漂洗以及稀释-沉淀处理亦不能有效将其除去。凝胶层析图谱分析表明,该酶可能是肌动球蛋白非结合型酶。对凝胶层析所得粗酶液进行酶学性质分析,结果得知该酶最适温度为45℃,正好落在鱼糜凝胶劣化发生范围之内。专一性底物及酶激活剂、抑制剂影响研究表明,该酶为内含巯基的半胱氨酸型组织蛋白酶。该酶最适pH为5.5,在近中性pH范围内依然有较高的残留活性,表明该酶具有潜在凝胶劣化能力。

**关键词:**南蓝鳕; L型组织蛋白酶(组织蛋白酶L); 漂洗; 酶抑制剂

**中图分类号:**TS 254.1; S 917

**文献标识码:**A

鱼糜弹性是决定鱼糜质量的重要因素。鱼糜凝胶劣化现象(modori phenomena)是鱼糜在受热形成凝胶过程中,通过40~60℃温度带时发生严重蛋白水解,形成劣质低弹性凝胶,甚至不能形成凝胶的现象。目前国内外的研究发现,导致这一现象的原因是鱼糜自身所含的蛋白水解酶的作用,主要有丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶。肌纤维结合型丝氨酸蛋白酶能够降解鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鲫(*Carassius auratus*)以及蛇鲻(*Saurida wanieso*)等的肌纤维蛋白组分<sup>[1-3]</sup>。自从人类肝组织中分离出均一组分以来,作为生物体内溶酶体型半胱氨酸蛋白酶,组织蛋白酶L受到了广泛关注<sup>[4-6]</sup>。在太平洋狭鳕(*Gadus macrocephalus*)糜加工过程中,组织蛋白酶L一直残留在鱼糜组分中,因而有学者推测它与肌原纤维结合较为紧密<sup>[7]</sup>。组织蛋白酶L对陆生动物多种蛋白成分具有很强的水解能力<sup>[8]</sup>。鲭(*Scomber japonicus*)的肌球蛋白经组织蛋白酶L降解可生成分子量为164和155 ku的片段<sup>[9]</sup>,故而残留在鳕鱼糜中的组织蛋白酶L必然导致该

种鱼糜受热形成劣质凝胶<sup>[10]</sup>。

以全球常见的南蓝鳕(*Micromesistius australis*)鱼糜为原料,研究鱼糜自身所含组织蛋白酶L与肌动球蛋白之间的关系、该酶活性受漂洗影响及该酶的初步酶学性质,为探讨该酶对鱼糜凝胶劣化现象奠定基础。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

南蓝鳕冷冻鱼糜样品购自Southern Angels Co., Ltd, Indonesia (SA grade)。鱼糜贮藏于-80℃备用。Z-Phe-Arg-MCA, Z-Arg-Arg-MCA, Arg-MCA, Boc-Gln-Ala-Arg-MCA和AMC(7-氨基-4-甲基香豆素)标准样,STI(大豆胰蛋白酶抑制剂),leupeptin(亮肽酶)购自Sigma公司,其它试剂均为分析纯。

#### 1.2 肌动球蛋白样品的提取

肌动球蛋白提取操作于4℃下进行,按传统方法提取<sup>[11]</sup>。在无泡匀浆机(Nihonseiki Kaisha Ltd)中添加大约40g鱼糜及4倍量(w/v)离子

收稿日期:2009-09-23 修回日期:2009-12-06

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2007AA091802);浙江省钱江人才计划项目(2009R10056);浙江省教育厅项目(N20090182);中央高校基本科研业务费专项资金;浙江大学2008年度优秀青年教师资助计划(紫金计划)项目;国家“十一五”科技支撑计划(2008BAD91B00)

通讯作者:陈建初, E-mail: jc@zju.edu.cn

强度为 0.05 的磷酸缓冲液(缓冲液 A, pH 7.5), 1 500 r/min 匀浆 15 min, 匀浆液于 3 000 × g 冷冻离心(Hitachi CR21E) 10 min, 重复以上操作两次, 所得沉淀以缓冲液 B(0.6 mol/L NaCl-缓冲液 A, pH 7.5) 分散并保存在冰水中提取粗肌球蛋白, 20 h 后将分散样于 10 000 × g 条件下冷冻离心 30 min, 所得上清液轻轻搅拌同时添加 10 倍量(v/v) 4 °C 蒸馏水, 以 1 mol/L HCl 调节 pH 至 6.8, 于 3 000 × g 条件下冷冻离心 10 min。所得沉淀以 0.6 mol/L NaCl-50 mmol/L 磷酸缓冲液溶解(缓冲液 C, pH 7.0), 即为肌球蛋白样品(AM)。此样品用于下一步的凝胶层析。

另取 5 g 左右鱼糜样品添加 6 倍量(w/v) 缓冲液 B 匀浆(1 500 r/min, 15 min), 于冰水中提取 20 h, 冷冻离心(10 000 × g, 30 min), 所得上清液即为空白对照(AM0)。

### 1.3 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度测定采用 Biuret 方法, 以牛血清蛋白作为标准<sup>[12]</sup>。

### 1.4 肌球蛋白样品的凝胶柱层析处理

凝胶柱层析处理于 4 °C 条件下进行。充填着 Sepharose-6B (Pharmacia Fine Chemicals) 的凝胶柱(Excell SD450 column, 2.6 × 40 cm) 预先用缓冲液 C 平衡好。取 70 mg 肌球蛋白样品上样, 以缓冲液 C 进行洗脱(0.5 mL/min)。洗脱组分以自动收集仪(Gilson 202, France) 每 10 mL 收集 1 个试管。测定每管中组织蛋白酶 L 的活性。

### 1.5 组织蛋白酶 L 的活性测定

活性测定按 Barrett 等<sup>[13-14]</sup> 方法稍作改动。专一性组织蛋白酶 L 的合成底物 Z-Phe-Arg-MCA 临用前配制成 0.1 mmol/L 溶液, 置于冰水中备用。在 0.45 mL 待测样品中添加 0.25 mL 的 4 mmol/L EDTA-0.4 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 5.5), 内含 20 mmol/L 新鲜配制的半胱氨酸。于 25 °C 预热 2 min, 添加 0.25 mL 的 0.1 mmol/L 合成底物, 开始反应。经 25 °C 保温 30 min 后, 在反应体系中添加 1.5 mL 的 0.1 mol/L 氯乙酸钠-0.1 mol/L 乙酸缓冲液(pH 4.5) 终止反应。在发射波长 370 nm, 消光波长 460 nm 处测定反应体系中 AMC 的荧光值(Hitachi 650-10S 荧光仪)。以标准 AMC 样品作标准曲线, 将 25 °C、30 min 条件下每释放 1 nmol AMC 定义为 1 个单位(unit)。

### 1.6 肌球蛋白样品提取过程的多次漂洗处理

方法同 1.2 中肌球蛋白提取。约 40 g 鱼糜中添加 4 倍量(w/v) 缓冲液 A, pH 7.5, 1 500 r/min 匀浆 15 min, 匀浆液于 3 000 × g 条件下冷冻离心(Hitachi CR21E) 10 min。此操作以下称为一次“漂洗”。离心所得上清液称为 SP1, 沉淀称为 AM1。AM1 经重复漂洗两次, 上清液依次为 SP2、SP3, 沉淀依次为 AM2、AM3。为进一步纯化粗样, 将 AM3 以缓冲液 B 分散并于冰水中提取 20 h 后, 冷冻离心(10 000 × g, 30 min), 所得上清液添加 10 倍量(v/v) 4 °C 蒸馏水, 以 1 mol/L HCl 调节 pH 至 6.8, 冷冻离心(3 000 × g, 10 min)。这一操作称为一次“稀释-沉淀”处理, 离心后所得上清液称为 DP1, 沉淀为 AM31。继续稀释-沉淀处理两次, 所得上清液依次为 DP2、DP3, 沉淀依次为 AM32、AM33。各沉淀组分均以缓冲液 C 溶解备用。在漂洗液 SP1、SP2、SP3 和稀释液 DP1、DP2、DP3 样品中添加固体 NaCl, 调节其含量达 0.6 mol/L, 以保持 NaCl 浓度与 AM 各个样品的浓度一致。测定以上各样中组织蛋白酶 L 的酶活。

### 1.7 组织蛋白酶 L 的酶学性质分析

合并凝胶柱层析各个收集组分中显示有组织蛋白酶 L 活性的组分, 称为 L 型组织蛋白酶粗酶液( $L_{mix}$ , 图 1), 研究在不同 pH、不同温度、不同反应底物以及不同酶激活剂、抑制剂的条件下, 组织蛋白酶 L 粗酶液的酶学性质。酶活测定方法同 1.5 中活性测定, 依据不同测定项目, 作相应变动。

**底物对酶活的影响** 分别使用 Z-Phe-Arg-MCA, Z-Arg-Arg-MCA, Arg-MCA 和 Boc-Gln-Ala-Arg-MCA 作为测定底物。

**不同 pH 对酶活的影响** 分别使用 pH 为 4.0, 5.0, 5.5 的 4 mmol/L EDTA-0.4 mol/L 乙酸钠缓冲液; 以及 pH 为 6.0, 6.5, 7.0 的 4 mmol/L EDTA-0.4 mol/L 磷酸缓冲液作为酶活测定缓冲液。

**温度对酶活的影响** 分别在 0, 25, 35, 45, 50, 55, 60, 70, 80 °C 反应条件下测定酶活。

**激活剂、抑制剂的影响** 肌球蛋白样品(AM)、 $L_{mix}$  与等量 0.2 mmol/L E-64, 2 mmol/L 碘乙酸(IDA), 0.2 g/L STI(soybean trypsin inhibitor), 0.2 mmol/L 亮氨酸(leupeptin), 4

mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT) 及 4 mmol/L 乙二胺四乙酸钠 (EDTA) 混匀后于 25 °C 条件下反应 15 min, 以蒸馏水作为空白对照, 测定反应完成后各体系的组织蛋白酶 L 的酶活。

## 2 结果和讨论

### 2.1 组织蛋白酶 L 残留性及其多次漂洗的影响

按照常规方法从南蓝鲳鱼糜中提取肌动球蛋白, 将之进行凝胶过滤, 收集得的各个组分中检测到组织蛋白酶 L 的存在, 其活性主峰显著偏离肌动球蛋白主峰 (图 1)。将显示活性主峰的收集组分合并起来, 称为组织蛋白酶 L 的粗酶液 ( $L_{mix}$ , 图 1)。进一步测定表明  $L_{mix}$  活性占组织蛋白酶 L 总活性的 97.6%。以上结果表明组织蛋白酶 L 可能是肌动球蛋白非结合型酶, 这与我们前面报道的结果一致<sup>[15]</sup>。

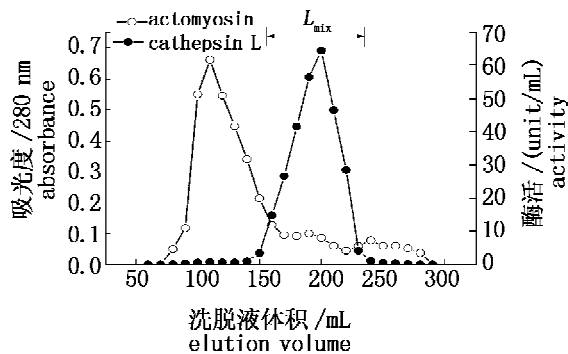


图 1 南蓝鲳鱼糜肌动球蛋白凝胶柱层析图谱

Fig. 1 Sepharose 6B gel filtration of actomyosin from southern blue whiting surimi

Shimizu 等<sup>[16]</sup>报道从白姑鱼、鲭等体内分离得到的鱼糜凝胶劣化 (modori phenomena) 诱导因子经 Sepharose-6B 凝胶过滤后主峰偏离肌球蛋白, 且此诱导因子受热后失去活性, 具有酶类特征。该报道中的诱导因子与本研究中组织蛋白酶 L 活性主峰位置相当, 很可能是组织蛋白酶 L 或它的类似物。和组织蛋白酶 B、H 一样, 组织蛋白酶 L 是极为重要的溶酶体蛋白水解酶, 能够作为内切酶催化诸多蛋白如肌动蛋白、肌球蛋白、伴肌动球蛋白、胶原蛋白以及弹性蛋白等的水解<sup>[5]</sup>。

在本研究中, 虽然经过 3 次漂洗来提取肌球蛋白, 组织蛋白酶 L 依然残留在肌球蛋白样品中。为了进一步探讨组织蛋白酶 L 与肌动球蛋白的关系, 将鱼糜样品进行多次漂洗及多次稀

一沉淀处理, 测定所得各个漂洗液、稀释液以及沉淀组分中组织蛋白酶 L 的活性 (图 2)。水溶性组分 SP1、SP2 和 SP3 中组织蛋白酶 L 的活性明显低于 AM1、AM2 和 AM3, 表明组织蛋白酶 L 很难通过漂洗方式加以去除。理论上, AM1 组分的比活力应高于 AM2, 而 AM2 应高于 AM3, 但实际情况则相反, 原因可能是漂洗过程中蛋白含量降低使比活力上升。第一次稀释-沉淀处理后, DP1 中酶活较高, 对应的 AM31 酶活要比 AM3 低, 表明该处理能够除去部分组织蛋白酶 L, 但后继第二次、第三次稀释-沉淀处理并没有带来明显的去除效果, 因为 AM32 和 AM33 值降低不大。以上结果表明组织蛋白酶 L 不能通过漂洗或稀释-沉淀有效去除。

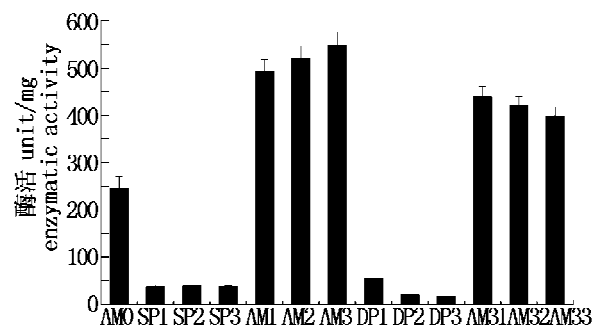


图 2 肌动球蛋白提取过程中多次漂洗所得各组分中组织蛋白酶 L 的酶活

Fig. 2 Activity of cathepsin L in the fractions obtained during the bleaching process of actomyosin extraction

漂洗是鱼糜加工必不可少的工艺, 可以通过水或低盐溶液的漂洗去除很多肌浆蛋白成分如类胡萝卜素等色素物质、部分脂肪以及一些异味物质<sup>[17]</sup>。漂洗在一定程度上能够改善鱼糜凝胶强度, 但是鱼糜凝胶劣化现象并不能通过漂洗得到抑制, 肌球蛋白重链的降解即使用碱液、焦磷酸盐溶液等漂洗也无法有效避免<sup>[18]</sup>。本研究中的组织蛋白酶 L 属于这类难以通过漂洗方式去除的物质。推测有两种可能, 一是组织蛋白酶 L 与肌动球蛋白一同溶解于 0.6 mol/L NaCl 的缓冲液中, 在稀释-沉淀处理过程中与肌动球蛋白一同沉淀; 另一种解释是尽管组织蛋白酶 L 与肌动球蛋白在 0.6 mol/L NaCl 溶液中没有相互作用, 但是在稀释-沉淀处理过程中, 低盐环境导致两者的静电结合。

2.2 组织蛋白酶 L 粗酶液的酶学性质分析

底物对酶活的影响 粗酶液对于组织蛋白酶 L 的专一性底物 Z-Phe-Arg-MCA 具有很强的分解能力(图 3)。组织蛋白酶 L 属于内切酶,能够选择性裂解 P2、P3 位上具有疏水性氨基酸残基的肽键<sup>[19]</sup>。从剑齿比目鱼中分离纯化出的组织蛋白酶 L 只能水解 Z-Phe-Arg-MCA,表明疏水氨基酸是作为组织蛋白酶 L 底物的必要条件<sup>[20]</sup>。本研究中组织蛋白酶 L 的粗酶液  $L_{mix}$  对于组织蛋白酶 B 的专一性底物 Z-Arg-Arg-MCA、组织蛋白酶 H 的专一性底物 Arg-MCA 以及胰蛋白酶专一性底物 Boc-Gln-Ala-Arg-MCA 同样具有一定程度的水解能力,特别是在底物浓度非常高的情况下效果更佳明显,原因是本研究中所得组织蛋白酶  $L_{mix}$  为 Sepharose-6B 凝胶柱一次层析过滤获得的粗酶液,虽然组织蛋白酶活达到总酶活的 97.6%,样品中很可能混杂有少量的组织蛋白酶 B、H 以及胰蛋白酶。

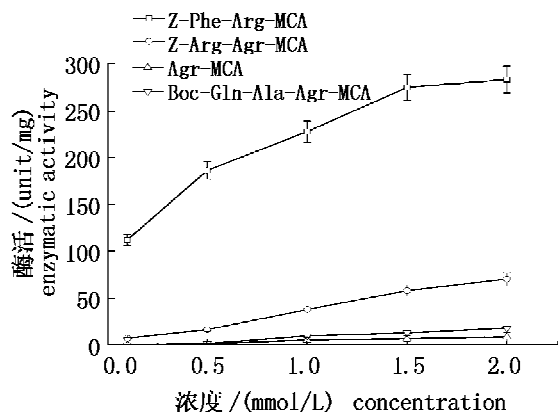


图 3 组织蛋白酶 L 粗酶液对不同合成底物的酶活  
Fig.3 Activity of cathepsin L in  $L_{mix}$  on various synthetic substrates

温度及 pH 对酶活的影响 通常认为溶酶体中的组织蛋白酶 L 属于酸性酶<sup>[21]</sup>。在本研究中,组织蛋白酶 L 粗酶液最适 pH 为 5.5,在 pH 接近中性的 6.5~7.0 范围内依然具有较高的酶活量,约为最适酶活的 35%(图 4)。温度影响试验表明该酶最适温度为 45 °C(图 5)。这与剑齿比目鱼体内的组织蛋白酶 L 一致<sup>[20]</sup>。而鱼糜凝胶劣化通常发生在为以 50 °C 为中心的 40~60 °C 范围内,因而在接近鱼糜制作的中性 pH 时依然保持较高活性的组织蛋白酶 L 很可能属于参与凝胶劣化的潜在蛋白酶。

激活剂、抑制剂的影响 在巯基阻断剂 E-

64, IDA 及 leupeptin (亮肽酶) 的作用下,无论是肌球蛋白样品还是  $L_{mix}$  中都检测不到组织蛋白酶 L 的活性或具极低的活性(表 1)。而具有巯基激活剂效应的 DTT 和 EDTA 都能够有效提高  $L_{mix}$  的组织蛋白酶 L 活性。作为丝氨酸蛋白酶抑制剂的 STI 则对样品中组织蛋白酶 L 的活性没有明显影响作用。以上结果均显示出典型含巯基的半胱氨酸型蛋白酶特征,表明  $L_{mix}$  为半胱氨酸型组织蛋白酶。

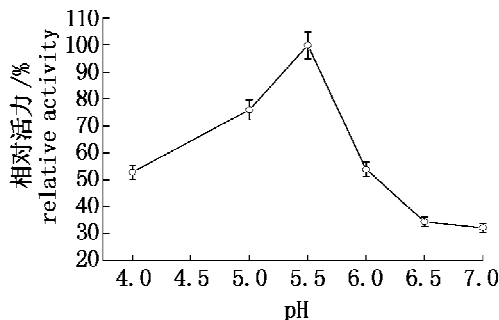


图 4 组织蛋白酶 L 粗酶液在不同 pH 下的相对活性  
Fig.4 The pH dependence of cathepsin L relative activity in  $L_{mix}$

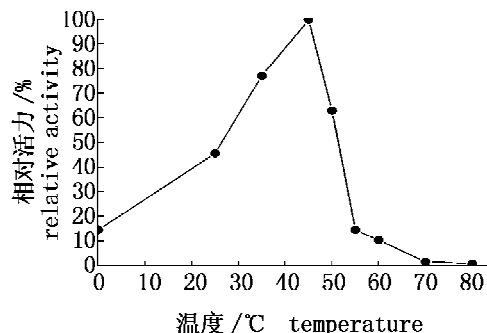


图 5 组织蛋白酶 L 粗酶液在不同温度下的酶活  
Fig.5 Temperature profiles of cathepsin L in  $L_{mix}$

表 1 不同酶激活剂、酶抑制剂对肌球蛋白及组织蛋白酶 L 粗酶液的影响作用

Tab.1 Effect of inhibitors and activators on the activity of cathepsin L in AM and  $L_{mix}$

抑制剂/激活剂 inhibitor/ activator	浓度 concentration	肌球蛋白 (%) AM	组织蛋白酶 粗液(%) $L_{mix}$
control	-	100	100
E-64	0.1 mmol/L	0	0
Leupeptin	0.1 mmol/L	0	0
IDA	1 mmol/L	1.75	1.86
STI	0.1 g/L	108.76	101.39
EDTA	2 mmol/L	114.84	111.84
DTT	2 mmol/L	263.48	258.69
EDTA + DTT	2 mmol/L + 2 mmol/L	249.42	213.47

更加细致、确切的酶学性质分析研究需要对粗酶进行分离纯化得到均一的组分。目前该酶对于鱼糜凝胶劣化现象影响与作用机理的研究正在进一步进行。

### 3 结论

尽管凝胶层析图谱表明组织蛋白酶 L 活性主峰显著偏离肌动球蛋白组分,且活性主峰酶活占总酶活的 97.6%,表明组织蛋白酶 L 可能是肌动球蛋白非结合型酶类。但是组织蛋白酶 L 不能通过肌动球蛋白提取过程中的常规漂洗有效去除。对凝胶层析后所得粗酶液进行各种酶学性质分析进一步证实了这种肌动球蛋白非结合型酶是半胱氨酸型组织蛋白酶,该酶具有较强潜在凝胶劣化能力。

#### 参考文献:

- [1] Cao M, Osatomi K, Hara K, *et al.* Identification of a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish *Saurida wanieso* which specifically cleaves the arginine site [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000, 125(2): 255 - 264.
- [2] Cao M, Shao W, Li Y, *et al.* Identification of a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of silver carp [J]. *J Food Biochem*, 2004, 28(5): 373 - 386.
- [3] Cao M, Jiang X, Zhang H, *et al.* Degradation of myofibrillar proteins by a myofibril-bound serine proteinase in skeletal muscle of crucian carp [J]. *Food Chem*, 2006, 94(1): 7 - 13.
- [4] Mason R W, Green G D J, Barrett A J. Human liver cathepsin L [J]. *Biochem J*, 1985, 226: 233 - 241.
- [5] Aranishi F, Ogata H, Hara K. Purification and characterization of cathepsin L from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 118(3): 532 - 537.
- [6] Yamashita M, Konagaya S. Purification and characterization of cathepsin L from the white muscle of chum salmon *Oncorhynchus keta* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1990, 96B(2): 247 - 252.
- [7] An H, Weerasinghe V T, Seymour A, *et al.* Cathepsin degradation of pacific whiting surimi proteins [J]. *J Food Sci*, 1994, 59: 1013 - 1017.
- [8] Etherington D J, Taylor M A J, Wakefield D K, *et al.* Protenase (cathepsin B, D, L and calpains) levels and conditioning rates in normal, electrically stimulated and high-ultimate-pH chicken muscle [J]. *Meat Sci*, 1990, 28(2): 99 - 109.
- [9] Jiang S T, Lee J J, Chen H C. Protolysis of actomyosin by cathepsin B, L, L-like, and X from Mackerel [J]. *J Agr Food Chem*, 1996, 44(3): 769 - 773.
- [10] Jiang S T, Lee B L, Tsao C Y, *et al.* Mackerel cathepsins B and L effects on thermal degradation of surimi [J]. *J Food Sci*, 1997, 62(2): 310 - 315.
- [11] Takashi R, Arai K. Studies on muscular proteins of fish-II. Preparation of actomyosin from carp muscle [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1970, 36: 129 - 172.
- [12] Robinson H W, Hodgen C G. The biuret reaction in the determination of serum protein. I. A study of the condition necessary for the production of the stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1940, 135: 707 - 725.
- [13] Barrett A J. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates [J]. *Biochem J*, 1980, 187: 909 - 912.
- [14] Barrett A J, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L [J]. *Meth Enzymol*, 1981, 80: 535 - 561.
- [15] Hu Y, Morioka K, Itoh Y. Non-binding property of cathepsin L to myosin [J]. *Food Chem*, 2008, 106(2): 741 - 744.
- [16] Shimizu Y, Nomura A, Nishioka F. Modori-inducing property of croaker myosin preparation [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1986, 52: 2027 - 2032.
- [17] Chawla S P, Venugopal V, Nair P M. Gelation of proteins from washed muscle of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) under mild acidic conditions [J]. *J Food Sci*, 1996, 61(2): 362 - 366.
- [18] Sano Y, Itoh Y, Suwansakornkul P, *et al.* Effects of manufacturing process on myosin heavy chain degradation of shortfin lizardfish meat paste at around 40 °C [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2003, 69: 393 - 398.
- [19] Kargel H J, Dettmer R, Etzold G, *et al.* Action of rat liver cathepsin L on glucagons [J]. *Acta Biol Med Ger*, 1981, 40(9): 1139 - 1143.
- [20] Visessanguan W, Benjakul S, An H. Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) muscle [J]. *Comp*

- Biochem Physiol, 2003, 134B(3): 477-487.
- [21] Ogata H, Aranishi F, Hara K, *et al.* Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L [J]. J Sci Food Agri, 1998, 76(4): 499-504.

## Studies on cathepsin L in the surimi of southern blue whiting

HU Ya-qin, YAO Yan-jia, CHEN Jian-chu \*

(School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** According to the conventional method, actomyosin was extracted from the surimi of southern blue whiting (*Micromesistius australias*). After Sepharose-6B gel filtration of the actomyosin obtained, cathepsin L activity was monitored in each of the fractions collected. The results showed that the activity values in the actomyosin samples were much higher than that in the washing water, suggesting that cathepsin L could not be removed completely during conventional leaching and still remained in actomyosin sample. Further purification of actomyosin by dilution-precipitation could not remove cathepsin L effectively, indicating that cathepsin L might be dissolved together with actomyosin in the presence of high ion-strength solutions. The profile of the gel filtration showed that the main peak of cathepsin L was obviously separated from that of actomyosin, suggesting that cathepsin L was non-binding with actomyosin. Fractions that showing the main peak of cathepsin L were pooled to be called  $L_{\text{mix}}$ , partially purified cathepsin L.  $L_{\text{mix}}$  could strongly hydrolyze Z-Phe-Arg-MCA, a specific substrate for cathepsin L, rather than Z-Arg-Arg-MCA, specific substrate for cathepsin B, nor Arg-MCA, substrate for cathepsin H, as well as Boc-Gln-Ala-Arg-MCA, substrate for trypsin and trypsin-like proteases. The above results indicate that  $L_{\text{mix}}$  was a crude cathepsin L. Cathepsin L specific inhibitors, such as E-64, specific inhibitor for cathepsins, and leupeptin, inhibitor for both cathepsins and trypsin-like proteases, could suppress the activity of  $L_{\text{mix}}$  completely. Activators for cathepsin L, such as DTT, EDTA + DTT, could effectively improve the activity of  $L_{\text{mix}}$ . As a result, the effect of activators and inhibitors confirmed the partially purified crude enzyme,  $L_{\text{mix}}$ , to be a thiol-type cysteine protease. The temperature dependence and pH dependence of the activity of  $L_{\text{mix}}$  were also investigated.  $L_{\text{mix}}$  had optimum temperature of 45 °C which was right in the temperature range of modori phenomena.  $L_{\text{mix}}$  had optimum pH of 5.5, but kept high residue activity near neutral pH, and the pH range of surimi processing, suggesting its high potential ability in modori phenomena.

**Key words:** southern blue whiting (*Micromesistius australias*); cathepsin L; leaching; inhibitor

**Corresponding author:** CHEN Jian-chu. E-mail: jc@zju.edu.cn