

단백질 분해효소의 생산과 그 특이성

효소를 산업에 효과적으로 이용하려는 시도는 일찍부터 있었다. 식품공업에서는 식품의 素材를 얻고 식품제조공정을 개량하기 위해서, 또는 식품의 맛과 영양가를 높이기 위해서, 그밖에도 여러가지 목적으로 사용되어 왔다.

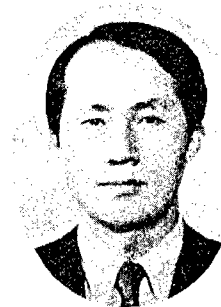
그중에서도 단백질분해효소(*protease*)는 치즈 熟成, 된장·간장의 釀造, 맥주混濁방지, 청주의 混濁제거, 食肉의 軟化, fishsoluble 제조, 香味液제조, 製빵, 穀粉가공, 분리단백질의 脫息·脫色·*plastein* 합성, 쓴맛 제거등에 사용되고 있다.

本橋에서는 이미 공업적으로 다종다양으로 생산 이용되고 있는 *protease* 가 미생물을 매개로 해서 그 효소작용이 이용되던 시대로부터, 효소標品을 식품제조의 각 단계에 응용하는 시대가 올것을 기대하면서, *protease* 의 생산과 그 특이성에 대한 연구현황을 소개하고자 한다. 그럼으로써 장차 *protease* 의 응용개발을 꾀하려는 분들의 도움이 되면 한다.

1. 효소의 생산

(1) 효소給源

효소의 給源은 이때까지 동물의 臟器나 식물의 종자에서 주로 구해 왔으나 효소생산이란 면에서 볼때 효소源으로서의 양적으로나 질적으로 그 한계가 있다. 한편 미생물이 생산하는 효소는 대량생산이 가능하고, 미생물은 환경適應力이 강하기때문에 소위 適應的인 효소를 생성할 수 있으므로(誘導효소) 산업에 이용할 효소給源으로서의 最適이라 하겠다. 그래서 여기에서는 지면도 제한되어 있기때문



이학박사 윤 주 익
동국대학교 공과대학 부교수

에 주로 미생물효소의 생산에 대해서 언급할까 한다.

(2) 미생물배양과 효소생산

미생물효소는 그 존재양식에 의해서 細胞外 효소(분비성)와 細胞內효소및 細胞壁또는 膜효소로 크게 나눌 수 있다. 그중 세포내효소는 미생물 菌체가 효소의 분리원료로 되므로, 거의가 액체배양 즉 액체표면배양, 액체진탕 또는 通氣深部배양, 또 嫌氣性菌은 혐기적 조건하에서 액체배양을 해서 集菌한다. 枯草菌을 深部通氣배양했을 경우를 보면, 중성*protease* 는 菌의 증식과 병행해서 활성이 증가하고, 알카리*protease* 는 자가소화기에 들어간뒤에야 배양액중에 나타나고, 菌체內*protease* 는 菌증식 靜止期에 들어가기 직전에 활성이 최대로 된다.

菌체외효소의 경우는 반드시 액체배양 이라야만 하는것이 아니고, 옛부터 술이나 간장 담글때 사용해 온 麴式배양도 이용될 수 있다. 이 국식배양은

온도파리의 잘, 잘못이 효소생산의 관건이 되는 수가 많고, 또 효소를 극히 고농도로 모을 수 있을뿐만 아니라, 균의 종류 또는 효소의 종류에 따라서는 국식배양 아니고서는 효소생산이 안되는 것도 있다. 예를 들면 *Rhizopus* 屬의 *glucoamylase* 는 菌系가 어느 정도의 길이로 된 뒤에 aging 해야 생산되므로 深部배양으로서는 거의 생산되지 않는다. 더욱이 麴배양시에 열을 放散시키기 위해 通氣를 하면, 때로는 산소과잉으로 균의 호흡이나 菌체증식율은 좋지만 효소생산은 잘 안되는 수가 많다. 그래서 물을 뿌려 放熱시킨다거나 濕트를 물에 띄워 배양하기도 한다. 경우에 따라서는 산소를 제거한 공기를 냉각시켜, 이를 麴層에 통하기도 한다. 이와같이 미생물에 의한 효소생산은 배양조건, 특히 배지조성이나 배양방식에 따라서 현저하게 달라진다.

(3) 미생물효소의 분리·정제

세포외효소는 菌체를 여과 또는 원심분리하고, 여액을 정제해 가면 되지만, 세포내효소는 菌체세포를 凍結融解法, 超音波法, 加壓法 등으로 破碎해서 얻은 上清에서 정제한다. 세포내 효소의 추출은 生菌체에서보다도 미리 건조한 것에서 하면 추출이 잘 되는 수도 있다. *Rhizopus nigricans* 의 生菌체의 磨碎한 *Succinate dehydrogenase* 활성을 나타내지 않으나, 건조균체의 것은 대단히 강한 활성을 나타낸다. 菌체의 건조는 효모에서 *thymine* 을 조제할 때와 같이 유기용매로서 할 수 있다.

배양여액이나 菌체추출액에서 효소를 분리정제하는데는 일반적으로 무기염에 의한 鹽析 또는 유기용매에 의한 침전으로 위선 粗品을 얻는다. 염석에 의하면 다당류 핵산등의 고분자물질을 남기고, 효소단백질을 침전시킬 수 있는 장점이 있으나, 정제해서 얻은 粗효소標品에 鹽이 남는다. 염석에는 용해도가 온도의 영향을 적게 받는 황산암모늄을 가장 많이 사용하고 있으나, 염석할때의 온도가 높으면 (25°C 이상) 효소가 활성을 잃기 쉽고, 또 염석 標品은 착색되기 쉽다. 이에 대해 황산나트륨은 30°C 이상의 온도가 아니면 사용하기 어려우나, 염석효

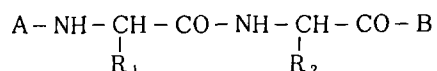
과가 황산암모늄 보다 뛰어나고, 또 이같은 온도에서도 효소는 염석에 의한 失活을 잘 안 일으키며, 염석표품의 착색도 적다.

염석으로 얻은 효소는 透析이나 gel 여과로 탈염하고, 또 유기용매로 얻은 것은 직접 이온交換体나 gel 여과에 의해 정제한 다음 다시 電氣泳動的 정제를 한다. 또 한편 효소의 정제에 있어서 어떤 효소만을 특이적으로 吸着분리하면 대단히 효과적으로 정제할 수 있다. 고초균에서의 *protease* 분리에는 전분에 의한 흡착으로 한꺼번에 高濃度の 효소표품을 얻을 수가 있다. 예를 들면 배양여액에 효소가 염석 또는 침전될까 말까한 정도로 황산암모늄이나 이소프로필알콜을 가하고 옥수수등의 生전분 또는 미리 그 조건에서 흡착이 일어나기 쉽게 처리한 전분을 가하면 *protease* 는 특이적으로 흡착된다. 흡착전분에서 *protease* 는 약 알칼리성에서 incubation 하면 溶離된다. 단 *protease* 의 종류에 따라 용리조건은 달라야 한다. 麴배양으로 생성된 효소의 경우는 麴을 직접 또는 건조후에 물로 추출한다. 연속적으로 추출하는 방법을 쓰면 국과 같은 양의 물로서 효소를 완전히 추출할 수 있다. 다만 국배양물의 효소활성의 체크에 주의가 필요한데, 가령 *Pen cyclopium* 의 국추출액은 그냥 방치하면 *protease* 활성은 없어지나, 염석해서 침전시킨 효소표품의 *protease* 는 그런일이 없다. 이는 이균이 *poly-L-malic acid* 를 생성하고 이것이 incubation 하고 있는 동안에 *protease* 를 失活시키기 때문이다. 그러므로 효소 활성은 한조건만으로 체크하면 위험한 경우도 있다.

2. Protease 의 특이성

(1) protease 의 특이성이란.

protease 는 다음과 같은 펩티드결합을 분해하는 효소를 말한다.



펩티드의 내부 (A, B = 펩티드) 에 작용하는 효소를

endopeptidase, 외부(A=H - 또는 B=-OH)에 작용하는 것을 exopeptidase라 한다. 전자는 큰 분자인 단백질에, 후자는 소분자의 펩티드에 작용하므로, 전자를 proteinase 후자를 peptidase 라고도 한다. protease 는 이들의 총칭이다. endo- 및 exopeptidase 의 차이는 기질분자의 대소 이외에 切斷 點 양쪽의 아미노산 殘基의 α -아미노기 및 α -카르복실기가 마스크 되어야 하는가, 그렇지 않은가에 따라 찾아 볼 수 있다. 즉 A를 아실기나, 아릴기, B를 아미드나 에스테르형으로 바꾼것에도 endopeptidase는 작용한다.

한편 exopeptidase 는 절단점 주변에 荷電 그룹의 존재를 요구한다. α -아미노기가 유리상태(A=H-)인것을 요구하는 효소를 aminopeptidase, α -카르복실기가 유리상태(B=-OH)인것을 요구하는 효소를 carboxypeptidase 라한다.

그러면 이들 효소는 절단점의 어느쪽 아미노산側鏈(R₁ 또는 R₂)에 특이성을 나타낼까? 예를 들면, 돼지의 腎臟leucine aminopeptidase 는 절단점의 카르복실기쪽의 아미노산최쇄(R₁)에, 肝臟carboxypeptidase 는 아미노기쪽의 최쇄(R₂)에 특이성을 나타내고 있다. 그리고 많은 endopeptidase 는 절단점의 카르복실기쪽의 아미노산최쇄(R₁)에 특이성을 나타낸다. (trypsin, chymotrypsin 등).

최근 세균이 생산하는 中性proteinase 중에 아미노기쪽의 최쇄(R₂)에 특이성을 나타내는것이 발견되었다. 그래서 전자를 carboxyendopeptidase, 후자를 amino- endopeptidase 라 부르고 있다.

요컨대 protease 의 특이성은

- 1) 절단점 이웃에 荷電그룹을 요구하는가.
- 2) 절단점의 어느쪽에 어떤아미노산최쇄를 요구하는가. 하는 것이다. 이들 특이성의 역할은 基質의 어떤 특이적인 아미노산최쇄 및 荷電그룹의 存否에 의해서, 기질이 효소의 특정部位와 결합(이온結合, 수소結合, 疎水結合, van der waals 力등)하여 그 절단점을 효소의 触媒部位와 작용하기 알맞는 位置에 오겠끔 하는 것이라 생각할 수 있다.

(2) protease 의 종류와 특이성

Hartley 는 효소를 그 활성부위의 구조에 따라 다음과 같이 분류하고 있다.

- i) serine proteinase
- ii) thiol proteinase
- iii) 금속protease
- iv) 산성proteinase

여기에서도 이 분류에 따라 기술하기로 한다.

i) serine proteinase

Diisopropylfluorophosphate 를 첨가하면 활성부위의 serine 에 유기磷酸이 결합되어 활성을 잃는 일군의 효소로서 chymotrypsin, trypsin 이 이에 속한다. chymotrypsin 에 대해서는 Blow 들이 활성부위의 입체구조로부터 Aop(102)-His(57)-Ser(195)의 電荷리레이프를 제안하여 효소반응의 메카니즘을 설명하고 있다.

미생물의 경우는 S. griseus (상품명: 푸로나아제) S. fradiae 등의 放射菌에 의해 생산되는 trypsin 樣 효소가 있다. 또 B. subtilis가 생산하는 subtilisin은 chymotrypsin 과 비슷하게 그 촉매작용이 전하 리레이제에서 이루어진다고 밝혀졌으며, 생산균주에 따라 Carlsberg, Novo, Bpn' 등의 타입이 알려져 있으나 Novo 와 Bpn' 는 같은 효소라고 推論되고 있다.

ii) Thiol proteinase

이 효소들은 분자속에 한개이상의 cysteine 殘基를 갖고 있으며 촉매작용을 하기전에 遊離SH의 형태로 되는 proteinase 로서 papain 이 가장 잘 연구되어 있다. 미생물생산효소로서는 group A Streptococci 가 생산하는 Streptococcus proteinase 를 들 수 있는데 insulin 에 대한 특이성은 papain 과 닮은점이 많으나, esterase 활성은 amidase 활성에 비해 수백배 높아서 이점에서는 SH-효소라기보다 serine- 효소에 가깝다는 주장도 있다.

iii) 금속 protease

이들 효소는 금속이 촉매작용에 관여하고 금속chelate 시약에 의해 가역적으로 활성을 잃는 효소군으로서 Carboxypeptidase 가 대표적인 것이다.

이 가운데 胰臟carboxypeptidase 는 Zn - 금속효소이나, 미생물효소에서는 아직 實證이 되어 있지 않다. 곰팡이 효소(phymatotrichum omnivorum)에 있어서는 10^{-3} M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)나 o-phenanthroline에 의해 失活된 것에서 chelate 劑를 제거하고 Co, Zn, 또는 Ni 을 첨가하면 활성이 회복된다.

Amino-peptidase 樣효소들중에서 돼지腎臟leucine-amino-peptidase 는 부분제거되면 그의 안정화 및 활성화에 Mg 또는 Mn 을 필요로 하나, 미생물효소에서는 그와같은 처리가 필요치 않다. B. subtilis 는 관체내효소로서 생산되나 放線菌, 곰팡이는 배지중에도 분비된다. 바다세균 Aeromonas proteolytica 효소는 Zn, 금속효소로서 EDTA 처리로 失活되나, Zn Co, Mn 을 첨가하면 회복된다.

iv) 산성 proteinase

이들은 산성에서 효소작용을 하는 proteinase 의 일군으로서 pepsin 을 예로 들 수 있다. 앞서 말한 효소들은 어떤 특정의 공동아미노산 殘基들이 活性中心을 이루고 있는데 반해서, 여기에 속하는 효소들은 그 촉매작용 發現에 산성 아미노산 잔기의 카르복실기가 둘 또는 셋 필요한 것으로 밝혀지고 있다. 저자는 pepsinogen 이 활성화 될때의 조건에 따라서 pepsin 과는 다른 효소, gastricsin 이 생성됨을 밝히고, 이 효소를 소에서 분리·정제하고, 아미노산 조성, 분자량, 합성기질에 대한 작용 특이성이 pepsin 과는 다르며, 그러나 이 두 산성proteinase 는 그의 触媒部位에서 카르복실기가 중요한 역할을 하는점과 반응 중간체로서 아미노-효소가 형성되는 점은 동일함을 알아 냈다. 한편 pepsin, gastricsin, trypsin, chymotrypsin 들을 사용해서, 일반적으로 球狀단백질은 천연상태로는 이들 proteinase 에 의해서 분해가 잘 안되나 casein은 그렇지 않은 이유를 조사하였다. 그 결과 casein 단백질은 다른 전형적인 구상 단백질과는 그 구조가 달라서, casein 의 천연상태에서의 구조가 바로 이들 prot-

ease 에 의한 분해작용에 가장 적합한 구조임을 발견 하였다.

미생물이 생산하는 산성 proteinase 는 많은 종류가 정제·單離되고 있으나 특이성에 대한 계통적인 연구는 흔치 않다. 대표적인 미생물생산 효소의 insulin B 체인에 대한 특이성은 pepsin 에 유사하다.

끝으로 지금까지 동식물 및 미생물로부터의 효소 생산과, 이들 효소의 종류, 그리고 특이성을 알아 왔는데, 의외로 그 종류가 적다는 사실과 동식물계와 비슷한 특이성을 갖는 것이 미생물계에도 존재함을 발견하였다. 다만 미생물계에 특징적인 효소라 할 수 있는 금속chelate 劑感受性 proteinase 는 지면관계로 여기에서는 생략하였다.

오늘날 효소는 의약, 분석용시약, 식품공업 기타 여러 산업분야에서 사용되고 있다. 이와같은 산업분야에의 응용은 기대되는 바가 크면서, 아직도 그 기대에는 미치지 못하고 있다.

이는 酸素標品の 제조가 質과 量에 있어서 부족한 탓도 있겠고, 또 이들의 응용연구가 부족한 탓도 있을 것이다. 효소자체의 연구는 酸素化學에 마진다 하더라도 동식물 특히 미생물을 給源으로 하는 효소의 식품공업에의 應用開發研究는 사용 미생물의 선택과 효소의 생성 조건의 解析, 효소의 분리정제라는 기초적인 것들이 해결된다면, 한번 손대볼 만한 일일 것이다.

