

새 우젓 중의 단백질 분해 효소에 대한 연구

박 길 홍 · 주 진 순

고려대학교 의과대학 생화학교실

Proteolytic Digestion of Boiled Pork by Soused Shrimp

Gil Hong, Park and Jin Soon Ju

*Department of Nutrition and Biochemistry, College of Medicine, Korea University,
Seoul, Korea*

= ABSTRACT =

This study was devised to elucidate whether soured shrimp exhibits a digestive action on boiled pork meats, and the mechanism by which sousing with a high concentration of sodium chloride preserves nutrients in foods for a prolonged period.

Protease was isolated from soured shrimp using a combination of ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose ion exchange chromatography and gel filtration. The isolated protease had specific activity of 1,560 units, 210 purification fold with an yield of 38%. Its optimum pH and temperature were 8.0 and 43 C, respectively. The molecular weight of the enzyme was 35,000. The K_m value of the enzyme for casein was 1.6×10^{-6} M. The enzyme required the presence of cupric ion to exhibit its full activity. Eighty eight percent of the enzyme activity was inhibited by 3.5M NaCl showing a reversibly linear decrease of the enzyme activity as NaCl concentration increased. The nature of the inhibition by NaCl was reversible and noncompetitive. The protease activity in soured shrimp was well preserved with the elapse of time at least in part due to NaCl induced suppression of autodigestion. The enzyme was denatured by acid easily, i.e. 1% of the original activity remained after staying at pH 2 for 10 minutes, which is within the normal range of pH of the human stomach. Soused shrimp was observed to be one of those containing the highest protease activity compared with the other soured foods such as soured oyster, squid, clam, and Pollack intestine with respect to specific activities of dialyzed 1:4 whole homogenates(w/v) in 5 mM sodium phosphate-2.4 mM β -mercaptoethanol buffer, pH 8.0. Casein and boiled meats including pork, beef, and chicken appeared to be the good substrates for the protease. Cas-

ein was the best.

Therefore, the ingestion of boiled meats including pork together with soused shrimp would help digestion of boiled pork in human not only by increasing appetite also by the direct proteolytic digestion of boiled meats by soused shrimp to some extent. And a high concentration of sodium chloride inhibited the protease activity reversibly in a remarkable degree, which ensued in a significant retardation of autodigestion of protein in foods by proteases, and hereby contributed to the preservation of foods for an extended period.

서 론

젓갈류는 새우류나 어패류의 그 자체 또는 그들의 일부인 근육, 내장 등에 포화농도의 소금을 가하여 숙성시킨 일종의 발효식품으로서 독특한 풍미를 가지고 있어서 전통적으로 한국인들이 기호식품으로 섭취하여 왔다¹⁾. 젓갈류에는 창란젓, 조개젓, 멸치젓, 새우젓, 어리굴젓 오징어젓 등 30 여종이 있으며 지방에 따라 만드는 방법에 약간의 차이가 있다²⁾.

그 중에서 새우젓은 잔새우를 포화농도 이상의 소금에 절인 후 그늘에서 약 1달 이상 숙성, 발효시켜서 만들며 과거로부터 김치를 담글 때 맛을 돋이기 위하여 첨가하거나 편육등과 함께 섭취하여 왔다.

이러한 젓갈류는 한국인의 식생활에서 중요한 위치를 차지하여 온 전통적인 저장식품으로서 그 영양소의 구성은 분석되어서 식품 분석표에 게재되어 있다³⁾. 지금까지 젓갈류에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔는데 이들은 조개젓, 멸치젓, 어리굴젓 등에서 비타민 B₁₂ 함량을 측정하였고⁴⁾, 윤등은 젓갈류의 일반영양소 성분과 미량원소 함량을 조사하였다⁵⁾. 서는 염장된 어패류의 숙성과 정에서 단백질분해효소 활성의 변화와 formonitrogen 함량의 변화를 관찰하여 보고하였다²⁾. 또 이들은 멸치젓 중의 핵산관련물질에 관해 보고하였고⁶⁾, 정과이는 새우젓 숙성 중의 핵산관련물질에 관해 보고하였고⁷⁾ 하였다. 본 연구에서는 새우젓 중에 존재하는 단백질분해효소를 추출하여 그 성질을 관찰하였다.

실험재료 및 방법

1) 실험재료

저온에 신선한 상태로 저장되어 있는 새우젓, 어리굴

젓, 오징어젓, 창란젓, 조개젓등을 시중에서 구입하여 젓갈류 실험재료로 사용하였다. 일부 새우젓은 경기도 인천시 소래에서 어획된 신선한 산새우를 구입하였으며 시중에서 구입한 식용소금으로 실험실에서 직접 새우젓을 담갔다가 효소분리용 재료로 사용하였다. 또 신선하게 냉동상태로 저장된 소고기, 돼지고기, 닭고기등도 시중에서 구입하여 효소기질 재료로 사용하였다. 우유성분의 순수한 casein 은 Wako Pure Chemical Industries, LTD 제품을 사용하였다. Monosodium phosphate 는 Merck사 제품을 사용하였다. 그 외 이 실험에 사용된 모든 시약들은 모두 특급시약을 사용하였다. Molecular weight marker kit 와 DEAE-Cellulose 는 Sigma사 제품을, Sephadex G-100는 Pharmacia Fine Chemicals 제품을 사용하였다. Ultrafiltration에 사용한 YM 10 필터는 Amicon사 제품이었다.

2) 젓갈류에서의 단백질 분해효소 추출물 제조

단백질분해효소의 분리 및 정제의 모든 조작은 4℃에서 수행하였다.

① 냉동상태에 보관된 신선한 새우젓을 미리 냉각된 4배량(w/v)의 5mM sodium phosphate-2.4mM β-mercaptoethanol 완충액 pH 8.0 (완충액 A)을 첨가한후 Waring Blendor 를 사용하여 최대속도에서 15초간격으로 1분간 2번 마쇄하였다.

② 마쇄액을 완충액 A 안에서 약 12시간 투석한 후 6장의 cheesecloth 를 통하여 수거하고 Beckman L8-70 초원심분리기를 사용하여 105,000 ×g 속도에서 한시간 원심하였다.

③ 상층액에 계산된 량의 고품 ammonium sulfate 를 교반하면서 천천히 가하여 70% ammonium sulfate 용액으로 만든 후 4℃에서 30분간 더 방치한 다음 39,000 ×g속도에서 20분간 원심하여 침전을 수거하고 완충액

A 에 녹인 후 완충액 A 안에서 약 12시간 투석하였다.

④ DEAE-Cellulose column chromatography; 완충액 A로 미리 equilibration 되어있는 DEAE-cellulose column(1.8 × 22 cm)에 4ml의 70% ammonium sulfate 침전액(단백질 23 mg, 효소 960 unit)을 apply 하고 20 ml/hr의 유출속도를 유지하며 완충액 A로 유출액의 280 nm에서의 흡광도가 낮아질 때까지 씻어 주었다. 다시 0.2 M NaCl 농도의 완충액 A로 유출액이 280 nm에서의 흡광도가 낮아질 때까지 씻어주고 0.3 M NaCl의 완충액 A와 0.4 M NaCl의 완충액 A로 위의 조작을 반복하였다. 각 분획의 용량은 5 ml 이었다. 이 중 효소활성이 큰 분획들을 모아서 용량 180 ml의 ultrafiltration cell(Korea Manhattan Company 제)을 사용하여 15기압의 질소하에서 YM10(>10,000 MW cutoff) 필터로 약 15 ml까지 농축한 후 이를 70% ammonium sulfate 용액을 만들어서 침전을 수거한 후 최소량의 10 mM sodium phosphate-2.4 mM β-mercaptoethanol-10% glycerol pH 8.0 완충액(완충액 B)에 녹이고 동일한 완충액 안에서 약 12시간 투석하였다.

⑥ Sephadex G-100 column chromatography.

완충액 B로 미리 equilibration 되어있는 Sephadex G-100 column(1.0 × 105 cm)에 0.5 ml의 농축된 DEAE-cellulose column 유출액(단백질 0.48 mg, 효소 260 unit)을 apply 한 후 8 ml/hr의 유출속도로 완충액 B를 흘려주며 1 ml씩 분획을 수거하여 280 nm에서의 흡광도와 효소활성을 측정하였다. 효소활성이 큰 분획들을 모아서 효소액으로 사용하였다.

오징어젓, 창란젓, 조개젓, 어리굴젓 등으로부터의 효소의 추출은 상기 젓갈류를 4배량(w/v)의 완충액 A 안에서 Waring Blendor를 사용하여 새우젓과 동일한 조작으로 마쇄한 후 완충액 A 안에서 약 12시간 투석하고 6장의 cheesecloth를 통하여 수거하여 효소액으로 사용하였다.

3) 단백질분해효소 활성의 측정방법

효소활성의 측정법은 Kunitz의 방법을 약간 변형하여 수행하였다⁸⁾. 효소반응액의 총피부는 1 ml로서 0.1 M sodium phosphate 완충액 pH 8.0 과 기질로서 pH 8.0으로 조절된 1% casein 혹은 삶은 돼지고기, 쇠고기, 닭고기 등의 마쇄액을 사용하였다. 효소액을 제외한 기질액과 완충액을 conical tube에 넣고 5분간 37°C에서 전

가온한 후 효소액을 넣고 37°C에서 30분간 가온 반응시켰다. 그 후 1 ml의 15% TCA를 넣어서 효소반응을 중지시키고 5000 × g속도에서 원심침전한 후 그 상층액을 280 nm에서 흡광도의 변화를 읽어서 단백질의 가수분해로 생성된 아미노산과 oligopeptide의 상대적인 증가량을 측정하였다. Blank는 100°C에서 5분간 가열한 효소액을 사용하여 위와 동일한 조작을 거쳤다.

효소단위는 280 nm에서 분당 0.001 흡광도의 변화를 1단위로 정의하였다.

Sodium chloride(NaCl), Disodium ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA) 및 Copper(Cu), Magnesium(Mg), Cadmium(Cd) 등의 중금속 이온들이 단백질분해효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 계산된 량의 고형 NaCl 또는 10 mM EDTA 와 20 mM의 중금속염 용액을 효소 반응액에 첨가하였다.

최적 pH의 측정을 위하여는 pH 6.5~8.5의 범위에서 0.1 M sodium phosphate 완충액, 기질액, 효소액의 pH를 모두 조절한 후 효소활성을 측정하였다.

최적 온도의 측정은 전술한 일반적인 효소활성 측정방법으로 pH 8.0에서 30분간 15~47°C 사이에서 가온 반응시켰다.

4) 기질의 제조방법

신선하게 보존된 돼지고기, 소고기, 닭고기 등에 수돗물을 붓고 100°C에서 3시간 끓인 후 고형성분을 Waring Blendor를 사용하여 두배량(w/v)의 완충액 A와 함께 최대속도에서 30초간격으로 1분간 4번 마쇄한 후 마쇄액을 glasswool을 깐 깔때기를 통하여 수거하고 기질로 사용하기 전까지 0~4°C에 보관하였다.

5) 새우젓 제조 및 새우젓의 단백질분해효소 활성변화의 측정방법

신선한 산 새우에 식용 소금을 포화농도 이상이 되도록 충분히 가하고 실온에 방치하였다. 이 때 새우가 소금물에 충분히 잠기도록 하여 공기에 노출되지 않게 하였으며 또한 민물이 들어가서 염농도가 희석되지 않도록 잘 분하였다. 새우젓은 담근지 5주 이상되면 상층액이 황색으로 변하며 완전히 숙성되었다. 새우젓의 숙성과정에서 담근지 10일, 20일, 30일, 60일 경과 후 각각 일부를 채취하여 specific activity를 측정함으로써 효소활성의 변화를 관찰하였다.

6) 단백질분해효소 활성에 미치는 산의 영향

모든 조작은 4℃에서 행하였다.

분리한 효소액에 0.1 N HCl을 천천히 가하여 pH2로 만든 후 10분간 방치하였다가 다시 0.1N NaOH를 천천히 가하여 pH8로 만든 후 1시간 이상 방치하였다가 효소활성을 측정하였다.

7) 단백질농도 측정방법

단백질농도는 Lowry 등의 방법으로 소혈청알부민을 표준용액으로 하여 측정하였다⁹⁾.

8) 효소의 kinetic data의 계산방법

효소의 초기반응속도는 분당 280 nm에서의 흡광도 0.001의 변화로 정의하였다. 초기반응속도를 얻기 위하여 먼저 효소 반응속도의 역수를 기질농도의 역수의 함수로 도시하였다. 여기서 1차 함수적인 도표를 얻으면 Michaelis constant, maximum velocity 등의 kinetic data를 계산하여 이를 Wilkinson씨의 least-square method에 의거한 식1에 대입하여 초기반응속도를 얻었다¹⁰⁾.

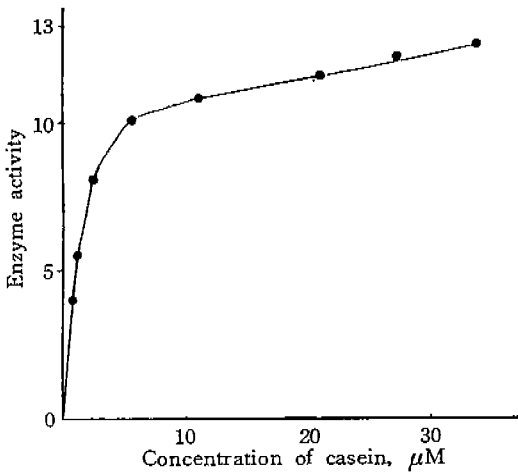


Fig. 1. The effect of casein concentration on the activity of protease from soused shrimp. A plot of v (change of 0.001 A at 280 nm per min per incubation mixture) versus substrate concentration was obtained using casein as substrate. The enzyme preparation used was 0.8 mg of protein of 70% ammonium sulfate precipitate. Incubation was conducted for 30 min at 37°C pH 8.0.

$$v = \frac{VA}{K_a + A} \dots\dots\dots(1)$$

- v : initial velocity
- V : maximum velocity
- K_a : Michaelis constant
- A : substrate concentration

실험결과 및 고찰

1) 효소활성에 대한 기질농도의 영향

단백질을 0.8mg 포함한 70% ammonium sulfate 침전액을 사용하여 0.5~26.6 μM 의 casein 농도에서 효소활성을 측정된 결과를 Fig. 1에 도시하였다.

이 효소의 K_m 값은 1.6×10^{-6} M 이었는데 실제 효소활성의 측정은 모두 26.6×10^{-6} M의 casein을 사용하였다. 이는 K_m 값의 10 배 이상의 양이므로 효소활성측정을 위한 기질은 초기반응속도가 반응시간 동안 거의 일정하게 유지되도록 충분히 공급한 것으로 생각된다.

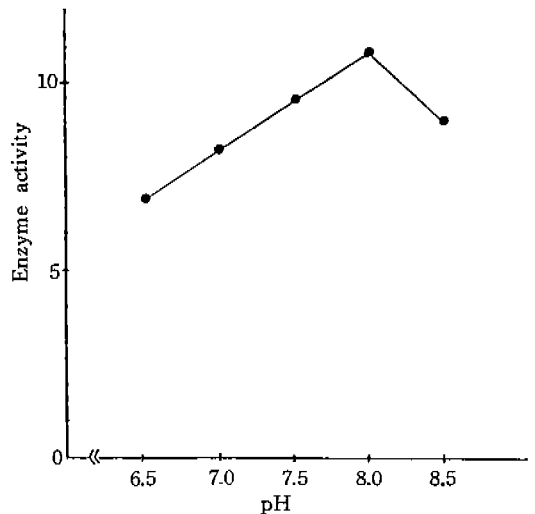


Fig. 2. pH profile of protease from soused shrimp. Protease from soused shrimp was incubated at varied pH from 6.5-8.5 at 37°C using phosphate buffer and casein as substrate.

2) 최적 pH와 최적 온도

본 효소의 최적 pH는 8.0이었으며 (Fig. 2) 최적 온도는 43°C이었다 (Fig. 3).

본 실험에서는 이 효소가 체내에서 갖는 소화작용에 대하여 관찰하였으므로 모든 효소활성은 37°C에서 측정

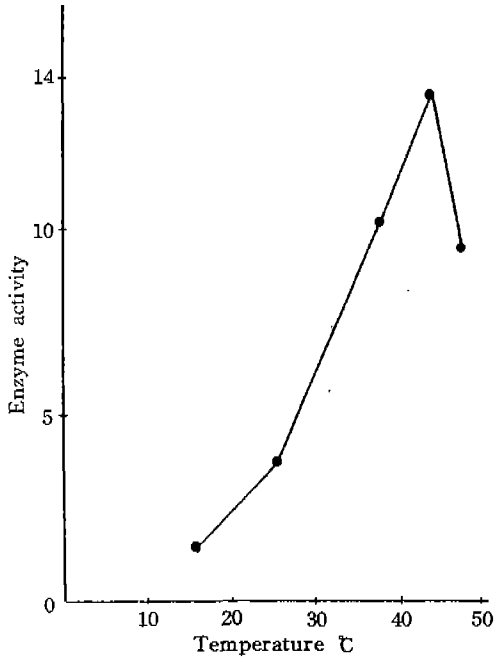


Fig. 3. Temperature curve of protease from soused shrimp. Protease from soused shrimp was incubated at varied temperatures 15-47°C at pH 8.0 using casein as substrate.

하였는데 이 때에는 43°C의 경우에 비하여 72%의 효소 활성을 나타내었다.

3) 효소정제

단백질분해효소가 새우젓으로부터 38%의 수율로 210배 정제되었으며 최종 활성은 단백질 mg 당 1560 unit였다 (Table 1).

DEAE-Cellulose column chromatography로 효소를 정제하였을 때 0.2M과 0.3M사이의 소금농도에서 단백질 분해효소가 가장 많이 유출되었으며 이를 취하여 더욱 정제하였는데 이 때 수율이 크게 떨어진 바 이는 0.3M과 0.4M사이의 소금농도에서도 상당량의 단백질 분해효소가 유출되기 때문으로 생각되며 (Fig. 4) 이 효소는 0.2M과 0.3M사이의 소금농도에서 유출되는 단백질분해효소와는 다른 종류의 효소로 생각된다. 이 효소에 대하여는 더 이상 정제하여 그 성질을 관찰하지 못하였는데 앞으로 더 추구하고자 한다.

Sephadex G-100 column chromatography로 효소를 더욱 정제한 후 (Fig. 5) 동일한 column을 Cytochrome C (M.W. 12,400), Carbonic anhydrase (M.W. 29,000), Bovine serum albumin (M.W. 66,000), Alcoholdehydrogenase (M.W. 150,000), Blue dextran (M.W. 2,000,000) 등을 사용하여 calibration 하여 이 효소의 분자량을 측정한 결과 35,000으로 추정되었다 (Fig. 6).

4) 수중의 것갈류들의 단백질분해효소 활성

것갈류 다쇄액들의 단백질분해효소 활성을 비교한 결과는 Table 2에서 보는바와 같이 새우젓, 조개젓, 참

Table 1. Protease purification from soused shrimp

Purification steps	Purification (fold)	Specific activity (unit/mg of protein)	Total enzyme Activity (unit)	Yield (%)
Whole homogenate	1.0	7	3,730	100
Supernatant at 105,000 ×g	1.7	12	3,130	84
70% Ammonium sulfate precipitate	5.5	41	2,600	70
Eluate from DEAE-cellulose	42.4	314	1,570	42
Eluate from sephadex G-100	210.8	1,560	1,410	38

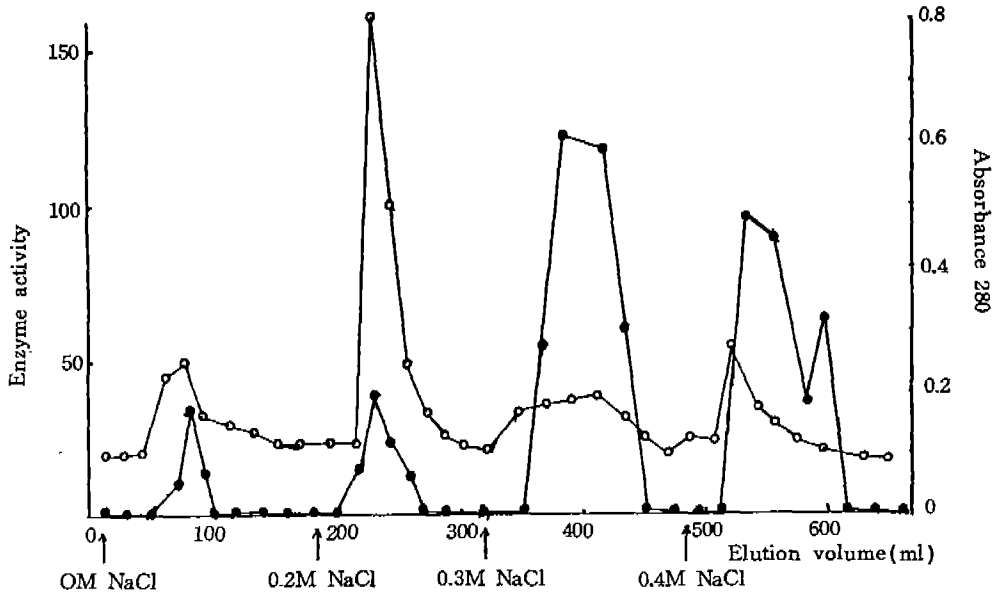


Fig. 4. Elution profile of the protease on DEAE-Cellulose column. Step gradient was applied. The arrows indicate application of new buffer A with different concentrations of NaCl: 0, 0.2, 0.3, 0.4 M, respectively. The enzyme assay was conducted using 1% casein as substrate. The enzyme activity (●) and absorbance at 280 nm (○) are illustrated as above.

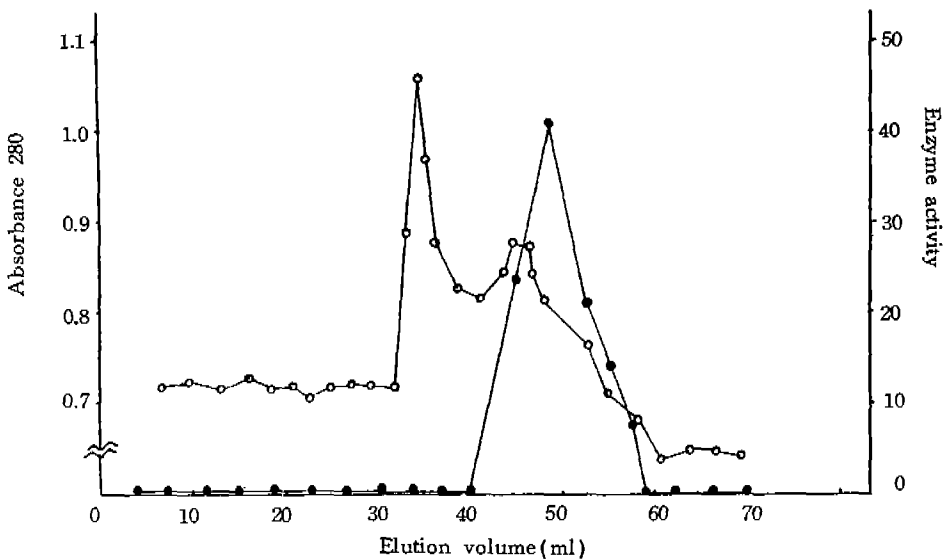


Fig. 5. Sephadex G-100 column chromatographic pattern of the protease from soured shrimp. The enzyme assay was conducted using 1% casein as substrate. The enzyme activity (●) and absorbance at 280 nm (○) are shown as above.

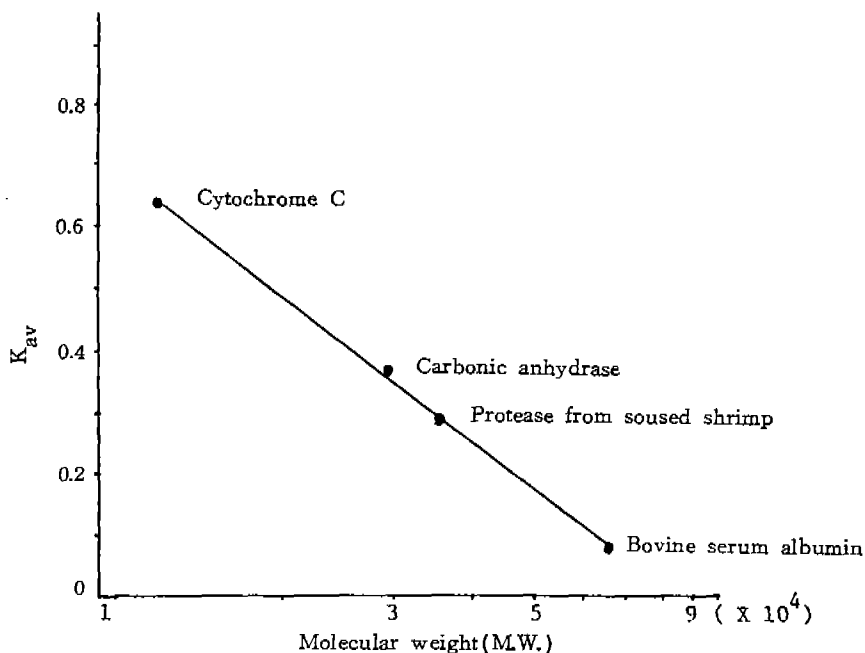


Fig. 6. Calibration curve of Sephadex G-100 gel filtration chromatography using Cytochrome C (M.W. 1.24×10^4), Carbonic anhydrase (M.W. 2.9×10^4), Bovine serum albumin (M.W. 6.6×10^4) as standard proteins.

Table 2. Protease activities of various soused foods

Soused Foods	Specific Activity (unit/mg of protein)
Soused Shrimp	7.4
Soused Clam	6.5
Soused Pollack Intestine	7.0
Soused Oyster	1.5
Soused Squid	0.5

26.7 μ M of casein was used as substrate in the assay procedure described previously in the methods.

란젓등이 많은 단백질분해 효소를 포함하고 있었다.

이 들은 모두 젓갈에 소화효소를 풍부히 포함하고 있는데 이로 미루어 원래 단백질분해효소를 많이 포함하고 있는 식품은 염장함으로써 이 소화효소의 활성이 잘 보존되고 있는 것으로 보여진다.

5) 새우젓 숙성 중의 단백질분해효소 활성의 변화

새우를 염장한 후 10일, 20일, 30일, 60일이 경과하였을 때 새우젓의 단백질 분해효소 활성의 변화를 관찰한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

이에 의하면 새우젓의 단백질분해효소 활성은 염장 후 2달 경과시까지 잘 보존되어 있었는데 이는 고농도의 소금에 의하여 단백질분해효소 활성이 가역적으로 억제되는데 이로 인하여 단백질 분해효소 자체도 자가분해되지 않고 활성을 유지하고 있기 때문으로 사료된다.

고농도 소금의 이러한 작용은 또한 식품내의 다른 영양소들도 변질되지 않고 비교적 오래 보존되도록 할 것으로 추측된다.

6) 단백질분해효소의 기질특이성

삶은 돼지고기, 소고기, 닭고기 등과 casein을 기질로 하여 기질 농도에 따른 효소의 초기반응속도의 변화를 측정하여 그 결과를 Fig. 7에 도시하였다.

여기서 최대초기반응속도를 얻어서 육류를 포함한 여러가지 단백질들에 대한 상대적인 기질특이성을 비교하

Table 3. Change of protease activity in shrimp with the elapse of time after sousing

Soused shrimp	Specific activity of protease (unit /mg of protein)
10 days elapsed	7.8
20 days elapsed	7.3
30 days elapsed	7.4
60 days elapsed	7.2

26.7 μ M of casein was used as substrate in the assay procedure described previously in the methods.

였는데 casein을 기질로 하여 얻은 최대초기반응속도에 대한 다른 기질들의 최대초기반응속도의 백분율을 단백질분해효소에 대한 상대적인 기질효율로서 Table 4에 표시하였다.

이 효소는 casein뿐만 아니라 여러가지 육류에 대하여도 단백질 소화작용을 나타냄을 볼 수 있었는데 그 기질특이성은 casein, 닭고기, 돼지고기와 소고기의 순서였다.

7) NaCl에 의한 단백질분해효소의 억제와 단백질분해효소의 Kinetic상수

단백질분해효소의 활성은 NaCl의 농도의 증가에

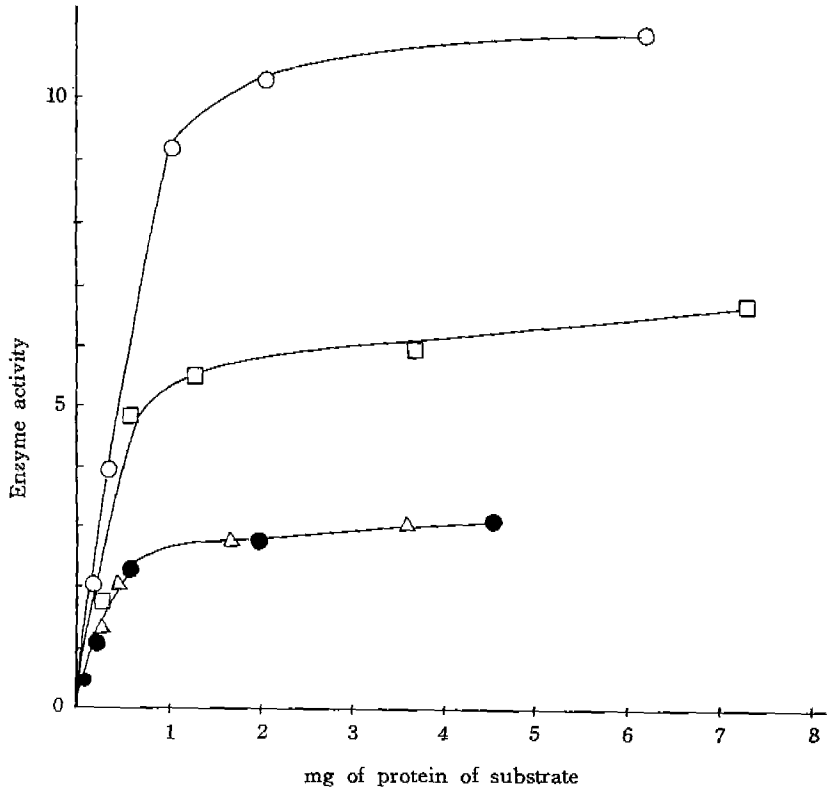


Fig. 7. Effect of substrate concentration on the rate of shrimp protease - catalyzed reaction. Substrate - concentration curves were drawn on a plot of substrate concentration (mg of protein of substrate per incubation mixture of 1 ml) versus initial rate (change of 0.001 absorbance at 280 nm per min). The substrates used for comparison were casein (○), homogenates of boiled pork (●), boiled beef (△), and boiled chicken (□) to assess relative substrate efficiency.

비례하여 1차 함수적인 감소를 하여 3.5 M NaCl 존재하에서는 효소활성이 원래 활성의 12%로 감소하였다 (Fig. 8). 억제된 효소활성은 NaCl이 제거되면 다시 원상태로 복귀하였다. NaCl에 의한 억제효과의 유형을 분석하기 위하여 2.7~26.6 μ M 농도의 casein 을 기질로 하여 1.5M NaCl 존재 하에서의 단백질분해효소의 초기반응속도의 역수를 casein 농도의 역수에 대한 함수로 도시하고 여기에 NaCl이 없을 때 위와 동일한 농도의 casein 을 기질로 하여 얻은 이 효소의 초기반응속도의 역수를 역시 casein 농도의 역수에 대한 함수로 Fig. 9에 도시하였다. 그 결과 Km값은 1.6×10^{-6} M로서 양자가 일치하였으며 최대초기반응속도는 Sephadex G-100 정제효소 (단백질 3 μ g)를 사용하였을 때 1.5M NaCl 하에서 3.1 unit NaCl이 없을 때 5.3 unit 이었다. 이로써 NaCl은 비경쟁적으로 단백질분해효소 활성을 억제한다고 생각된다. 또한 이러한 NaCl의 단백질분해효소 억제작용은 식품이 자가분해되는 것을 막아 줌으로써 식품의 보존에 도움을 줄 것으로 사료된다.

8) 산에 대한 저항력

이 효소는 pH 2에 10분간 방치한 후 pH 8.0으로 되 돌아 왔을 때 99%의 효소활성을 상실하였는데 이는 이 효소가 정상위액의 산도 환경에 노출되면 단백질소화작용이 약해질 것을 암시한다고 하겠다.

9) EDTA와 Cu, Mg, Cd 등의 중금속들의 영향

1 mM disodium ethylene diamine tetraacetic acid

Table 4. Relative efficiency of various proteins as substrate for protease from soused shrimp

Protein used as substrate	% Efficiency
Casein	100
Boiled pork homogenate	28
Boiled beef homogenate	28
Boiled chicken homogenate	57

One hundred percent enzyme activity represents maximum rates of proteolysis when casein is used as substrate for the protease. Relative efficiency as substrate was calculated by comparing maximum rates of proteolysis of various food proteins used as substrates with that of casein

(EDTA) 존재하에서 효소활성을 측정하였을 때 EDTA가 없을 때에 비하여 37%의 효소활성을 나타내었으며 1mM EDTA와 함께 그 2mM CuCl₂를 첨가하였을 때 원래 효소활성의 127%의 활성을 나타내었다. 이 때

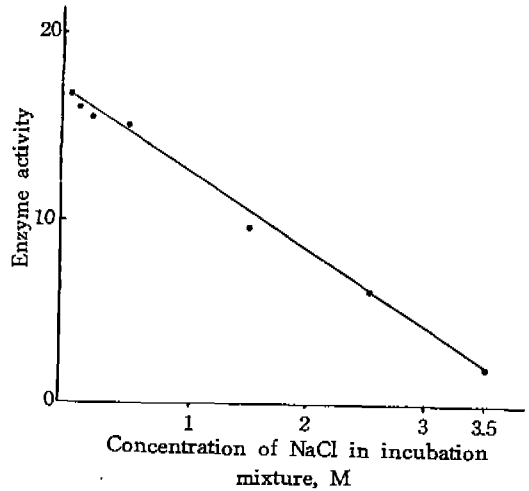


Fig. 8. Inhibition of protease from soused shrimp by NaCl. Protease from soused shrimp were tested for inhibition by NaCl. NaCl concentration of reaction mixtures varied 0-3.5M. Incubation was carried out at 37 °C pH 8.0 using casein as substrate.

Table 5. Effect of *EDTA and various cations on the protease activity

Concentration of *EDTA and various cations in reaction mixture	Percent of the enzyme activity
Free of *EDTA and cations	100
1mM *EDTA and	37
1mM *EDTA and 2 mM MgCl ₂	37
1mM *EDTA and 2 mM CuCl ₂	127
1mM *EDTA and 2 mM CdCl ₂	37

*EDTA represents Disodium ethylene diamine tetraacetic acid. The enzyme activity obtained by the reaction without *EDTA or cations addition is presented as one hundred percent enzyme activity. Sephadex G-100 column eluent(3ug of protein) was used as enzyme preparation in the assay procedure and casein was used as substrate.

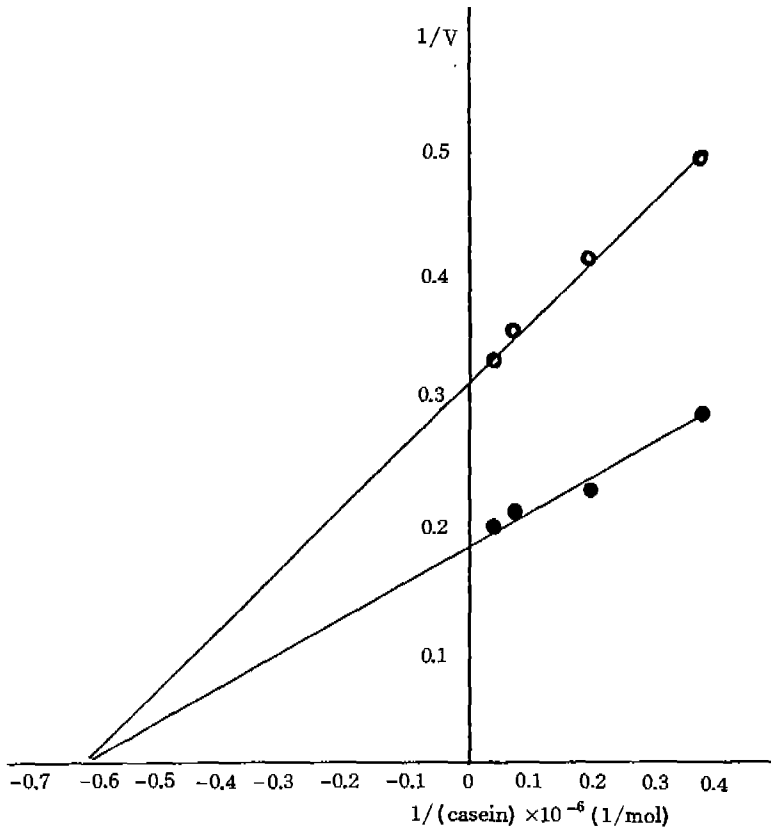


Fig. 9. Effect of NaCl on the protease activity. Casein concentration was varied from 2.7 to 26.7 μ M. The concentration of NaCl used: 0M(●), 1.5M(○). Sephadex G-100 eluate(3 μ g of protein) was used as the enzyme preparation in the assay procedure described in the methods.

마그네슘이나 카드뮴 이온의 첨가는 EDTA에 의하여 억제된 효소활성의 회복에 도움을 주지 못하였다 (Table 5).

이로 미루어 이 단백질분해효소가 정상적인 활성을 나타내기 위하여는 2가 구리이온의 존재가 필요하여서 2가 구리이온은 이 효소의 Co-factor로 작용할 가능성이 있는 것으로 보인다. 하지만 구리이온의 구체적인 역할을 규명하기 위한 실험은 더 이상 진행하지 못했다.

결 론

본 연구에서는 새우젓을 포함한 수종의 젓갈류들의 단백질분해효소 활성을 측정하였고 새우젓으로부터 단백질

분해효소의 하나를 정제하여 그 성질을 조사하였으며 casein 및 돼지고기 등의 육류에 미치는 단백질 소화작용을 관찰하였다. 또한 염장이 식품보존에 미치는 효과를 생화학적인 관점으로 고찰하였다. 효소를 분리한 젓갈류로는 새우젓, 어리굴젓, 오징어젓, 창란젓, 조개젓등을 사용하였으며 효소의 기질로는 casein, 돼지고기, 소고기, 닭고기등을 사용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 젓갈류 중에서 새우젓, 조개젓, 창란젓등이 단백질분해효소를 풍부하게 포함하고 있었다.
- 2) 새우젓의 단백질분해효소 활성은 염장 후 2달 경과시까지 잘 보존되어서 새우젓이 숙성된 후에도 그 활성을 유지하였다.
- 3) 새우젓으로부터의 단백질분해효소는 38%의 수율

로 210 배 정제할 수 있었으며 최종 활성은 단백질 mg 당 1,560 unit 이었다.

4) 새우젓으로부터 정제된 단백질분해효소의 분자량은 35,000으로 추정되었으며 그 최적 pH는 8.0 이었고 최적 온도는 43°C 이었다.

5) 새우젓의 단백질분해효소는 casein 뿐만 아니라 돼지고기, 소고기, 닭고기 등의 육류에 대하여도 단백질소화작용을 나타내었다.

6) 새우젓의 단백질분해효소의 활성은 NaCl의 농도의 증가에 비례하여 1차 함수적인 감소를 하여 3.5 M NaCl 존재하에서는 효소활성이 원래 활성의 12%로 감소하였는데 NaCl은 이 효소의 활성을 가역적으로 비경쟁적 억제를 하였다.

7) 이 효소의 casein에 대한 K_m 값은 1.6×10^{-6} M 이었다.

8) 이 효소는 pH 2.0에서 그 활성을 거의 상실하였다.

9) 이 효소는 자신의 활성을 충분히 나타내기 위하여 2가 구리이온의 존재를 필요로 하였다.

그래서 새우젓을 돼지고기 등의 육류와 함께 섭취하면 이는 식욕을 증진시켜서 체내의 소화효소의 분비를 촉진할 뿐만 아니라 새우젓 중의 소화효소가 어느정도 육류를 소화하여 이들의 인체내에서의 소화흡수에 도움을 줄 것으로 생각된다. 또한 고농도의 소금은 새우젓중의 단백질분해효소를 가역적으로 억제함으로써 식품중의 영양소가 자가분해되는 것을 막아주어서 음식물을 장기간 신선하게 보존하는데 기여할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1) Haeing Ja Kim: *Changes in Nucleotides and*

Their Related Compounds in Clam, Tapes Japonica Korean J. Nutr. 17(3) : 169-177, 1984.

2) Myung Jah Suh: *Changes in Protease and Formonitrogen of Salted Fish and Shellfish. Korean J. Nutr.* 6(2) : 45-56, 1973

3) Office of Rural Development and Rural Nutrition Institute: *Food Composition Table, 2nd Edition: 54, 1981.*

4) 李仁宰·許鈴·金星翊: 韓國 醱酵食品에 對한 生物化學的 研究*(第8報) 醱酵食品中の Vitamin B₁₂의 含量 調查報告, 藥學會誌, 4(1) : 50-52, 1958.

5) 尹惠禎: 韓國生活科學研究院 論叢, 第2輯, 103~109, 1969.

6) 李春寧·李啓湖·金榮洙·韓仁子·金尙淳: 멸치젓의 呈味性 5-mononucleotides에 關한 研究. 韓國食品科學會誌, 1(1) : 66-73, 1969.

7) 鄭承鏞·李應昊: 새우젓의 呈味成分에 關한 研究. 釜山水山大學大學院 博士學位請求論文, 1~22, 1976.

8) Kunitz, M.J.: *Gen. Physiol.* 30:291, 1947.

9) Lowry, O.H., Rosebrough, B.H., Lewis Farr, A., and Randall, R.J.: *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.

10) Wilkinson, G.N.: *Statistical Estimations in Enzyme Kinetics. Biochem. J.* 80: 324-332, 1961.