

효소에 의한 참깨박 단백질의 최적 가수분해 조건

이선호¹ · 조영제¹ · 김 성¹ · 안봉진² · 최 청^{1*}

¹영남대학교 식품가공학과, ²동국전문대학 향장공업과

초록 : 참깨박 단백질의 기능개선을 위한 가수분해 조건을 검토한 결과 분리된 참깨박단백질에 대한 각 효소의 최적작용조건은 papain의 경우 pH 6.0, 60°C, 효소 대 기질의 비는 기질량에 대해 3%, 기질농도 1.5%에서 최적이었으며, pepsin은 pH 2.0, 50~60°C, 효소의 농도는 기질량에 대해 3%, 기질농도 1%에서 최적이었다. 그리고 trypsin은 pH 9.0, 60°C, 효소의 농도는 기질량에 대해 1%, 기질의 농도 1%에서 가장 높은 효소작용을 보였다(1995년 3월 10일 접수, 1995년 5월 22일 수리).

서 론

세계 인구증가에 따른 단백질의 부족현상에 대한 대비책으로 현재 연구 검토되고 있는 단백질자원으로 대두를 비롯한 땅콩, 면실, 유채, 해바라기 종자 및 참깨 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며¹⁻⁸⁾, 이들중 참깨에는 다량의 기름을 함유하고 있을 뿐만 아니라 착유한 후 부산물인 참깨박에는 약 50% 내외의 단백질을 함유하고 있으며 methionine, lysine을 보강하면 그 필수아미노산구성이 F.A.O.의 표준단백가를 능가하는 우수성이 있다고 알려져있다.²⁻⁴⁾ 대두와 옥수수분말에 참깨 단백질의 보충가가 인정되었으며, 여러가지 종실 분말의 제빵 특성이 비교 검토되었다.⁵⁻⁷⁾ De Pauda⁸⁾는 육류를 참깨로 대체할 수 있는 수용력을 연구하였는데 관능검사서서 육류의 30%까지는 참깨박으로 대체할 수 있으며, 식품의 증량제로 이용할 수 있다고 보고하였다. 그러나 다른종자박과는 달리 참깨는 유지의 풍미를 고려하여 볶은 후에 착유하기 때문에 단백질의 변성과 착색으로 인해 그 부산물인 참깨박은 현재 사료 또는 비료로 이용되고 있을 뿐이다. 이를 식용화 할 수 있다면 새로운 단백질자원으로서나 폐기자원의 이용면에서 의의가 클 것이다. 또한 종실 단백질은 종류별로 각 기능 특성이 달라 단백질을 변형시켜 기능특성을 개선하여 식품에의 이용성을 증가시키려는 연구가 많이 시도되고 있는데,⁹⁻¹⁴⁾ 그 방법은 주로 단백질을 산이나 알칼리에 의해 가수분해시키는 화학적 변형과 효소적 변형의 방법이 이용되고 있다. 전자는 염의 농도가 증가하거나 필수아미노산의 손실, 유해물질이 생성 등 문제점을 가지고 있으므로¹⁵⁾ 효소에 의한 변형방법이 많이 이용되고 있다. 일반적으로 효소반응은 효소형태, 효소농도, 온도, pH, 반응시간 등의 변수에 의해 영향을 받으며, 참깨박 단백질에 대한 이들의 연구는 별반없는 실정이다. 본 연구에서는 폐단백질 자원이용 측면에서 착유가 끝난 참깨박으로부터 분리된 단백질의 기능특성을 개선시키

고자 pepsin, papain 및 trypsin등의 효소를 작용시켰으며 이들의 가수분해 조건을 비교검토하여 기능개선을 위한 최적조건을 찾아 식품에 이용키 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료조제

본 실험에 사용한 참깨박은 1993년 10월에 경북 의성시장에서 구입한 참깨 (*Sesamum indicum* L. white)를 세척한 후 영남대학교 식품가공학과 가공 공장에서 200~220°C에서 담갈색이 될 때까지 볶은후 expeller형의 연속 압착식 착유기(풍산 기공사, 대구)로 착유한 다음 얻은 부산물인 참깨박을 40 mesh로 분쇄하여 20시간 n-hexane으로 탈지한후 4°C의 저온실에 보관하면서 사용하였으며, 단백질 분해효소로는 pepsin, trypsin과 papain (Sigma Co.)을 사용하였다.

일반성분 분석

참깨박의 일반성분 분석은 A.O.A.C방법¹⁶⁾에 따라 실시하였다.

참깨박단백질 분리

탈지 참깨박을 10배의 증류수에 분산시켜 1N NaOH용액으로 pH를 최대 용출 pH인 9.0으로 조절한 후¹⁾ 실온에서 약 3시간 동안 교반하였다. 이 분산액을 4°C, 30분간 4,000 rpm으로 원심분리하여 상정액을 모은 다음 1N HCl 용액으로 pH를 5.0으로 조절하여 15분 교반한후 생성되는 단백질 침전을 4°C, 30분간 4000×g로 원심분리하여 회수하였다. 이와같이 얻어진 침전물은 pH 5.0으로 조절된 세척수로 3회 세척한후 pH를 7.0으로 조정한 다음 동결건조하여 참깨박 분리 단백질로 사용하였다.

찾는말 : Sesame protein, hydrolysis condition, pepsin, trypsin, papain

*연락처

단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등¹⁷⁾의 방법에 의하여 측정하였으며 단백질 값은 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

효소 활성 측정

효소 활성 측정은 Anson-秋源 등^{18,19)}의 방법에 의하여 실시하였다. 즉, 효소액 0.5 ml에 buffer 1 ml를 가하고 0.6% Hammarsten milk casein 용액 2.5 ml를 기질로 하여 35°C에서 30분간 반응시켰다. 반응후 0.44 M trichloroacetic acid 2.5 ml를 넣어 반응을 중지시키고 10분간 방치한 다음 여과하여 얻은 여액 1 ml에 0.55 M Na₂CO₃ 용액과 1 ml의 Folin-ciocalteu시약을 넣어 30°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성단위는 효소액 1 ml가 1분간에 1 µg의 tyrosine을 생성하는 것을 1 unit로 정하였다. 이때 표준품으로는 tyrosine을 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

참깨박 분리단백질의 가수분해조건

1) 가수분해도의 측정

Edward와 Shipe²⁰⁾의 방법과 Kim 등⁹⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 참깨박단백질 용액에 각 효소를 가하여 분해시킨 가수분해물 3 ml를 95°C의 물중탕에서 5분간 열처리하여 효소를 불활성화 시킨 다음 20% trichloroacetic acid(TCA)용액 3 ml를 가하여 실온에서 30분 방치시키고 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 20% TCA에 의해 침전된 물질을 제거한 후 얻어진 상정액의 단백질량을 정량하였고, 가용성단백질은 20% TCA에 의해 침전하지 않는 단백질로 하였으며, 가수분해도는 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{가용성 단백질 가수분해도} = \frac{\text{가용성 단백질}}{\text{총단백질}} \times 100$$

2) 시간별 영향

시간별 가수분해 경향을 보기위하여 분리단백질을 1% 농도로 증류수 (pepsin; pH 3.0, trypsin; pH 8.0, papain; pH 6.0)에 녹여 효소를 10 mg/ml 가하고 35°C에서 반응시간을 달리하여 가수분해도를 측정하였다.

3) pH의 영향

pH는 증류수를 용매로 하여 분리단백질을 1% 농도로 용해한 다음 pH를 2에서 12까지 조정하여 효소를 10 mg/ml 가하고 35°C에서 24시간 동안 분해시킨뒤 가수분해도를 측정하였다.

4) 온도의 영향

효소반응을 위한 최적 pH (pepsin; pH 3.0, trypsin; pH 8.0, papain; pH 6.0)에서 온도를 20~70°C까지 달리 하면서 24시간 동안 분해시킨뒤 가수분해도를 측정하였다.

5) 효소농도의 영향

효소농도의 최적 조건을 알아보기 위하여 증류수를

용매로 하여 앞에서 언급한 각 효소의 최적 작용조건에서 효소를 기질에 대해 1/20, 1/25, 1/33, 1/50, 1/100 (w/w)로 변화 시키면서 가수분해하였다.

6) 기질농도의 영향

기질농도의 최적 조건을 알아보기 위하여 앞에서 언급된 효소작용 최적조건에서 기질농도를 0.5~2.5%(w/v)까지 기질농도를 달리하여 가수분해 하였다.

7) 아미노산 분석

참깨박 분리단백질을 산가수분해법으로 분해하고 아미노산 자동분석기 (LKB-4150)로 아미노산분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

참깨박의 일반성분

참깨박의 일반성분은 Table 1에서 보는 바와 같이 참깨박의 조단백 및 조지방 함량은 31.87%, 2.97%이었다. 최 등²¹⁾이 분석한 참깨박의 단백질 함량과는 거의 비슷하였으나 김 등²²⁾이 분석한 참깨박중의 44.7%보다는 낮았다. 탈지 참깨박의 단백질 분별 정량은 Table 2에서 보는 바와 같이 glutelin이 57.02%로 그 함량이 가장 많았으며 albumin, globulin, prolamin순이었다. 최 등²¹⁾이 탈지 참깨박으로 부터 분리한 단백질의 globulin과 prolamin에 비해 적은 양이었지만 albumin과 glutelin의 조성은 많았다. Nilo 등⁴⁾이 pH 10의 알칼리 용액으로 추출한 참깨박 단백질의 함량과 비교했을 때는 albumin과 glutelin의 함량에 다소 차이를 보였으며 globulin, prolamin은 비슷한 결과를 보였다.

효소활성

본 실험에 사용한 단백질 가수분해효소 papain, pepsin

Table 1. Chemical composition of defatted sesame meal

Moisture	Crude protein	Crude fat	Ash	Crude fiber	Nitrogen free extract
6.61%	31.87%	2.97%	12.95%	25.44%	20.18%

Table 2. Fraction of the soluble protein in defatted sesame meal

Albumin	Globulin	Prolamin	Glutelin
20.42%	12.74%	9.82%	57.02%

Table 3. Activity of enzyme against the casein and isolated sesame meal protein with papain, pepsin and trypsin

Substrate	Enzyme activity (Unit/g)		
	Papain	Pepsin	Trypsin
Casein	44.32	43.83	38.09
ISMP	27.30	36.00	36.00

ISMP; Isolated of sesame meal protein

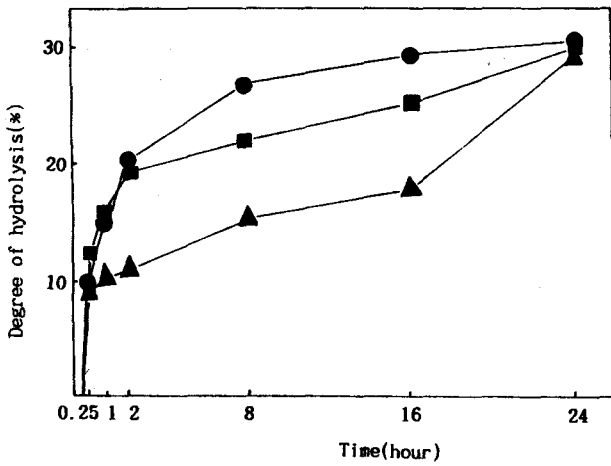


Fig. 1. Effect of time on the degree of hydrolysis of isolated sesame meal protein treated with pepsin, papain and trypsin. ●-●, pepsin; ■-■, trypsin; ▲-▲, papain

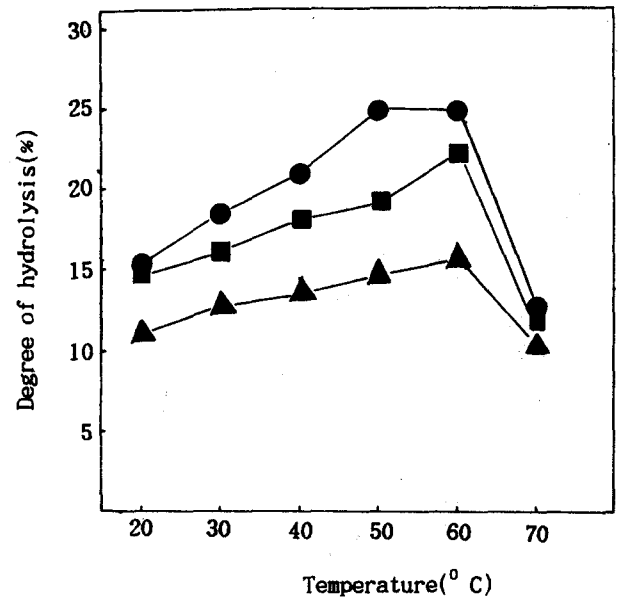


Fig. 3. Effect of temperature on the degree of hydrolysis of isolated sesame meal protein treated with pepsin, papain and trypsin. ●-● pepsin, ■-■ trypsin, ▲-▲ papain

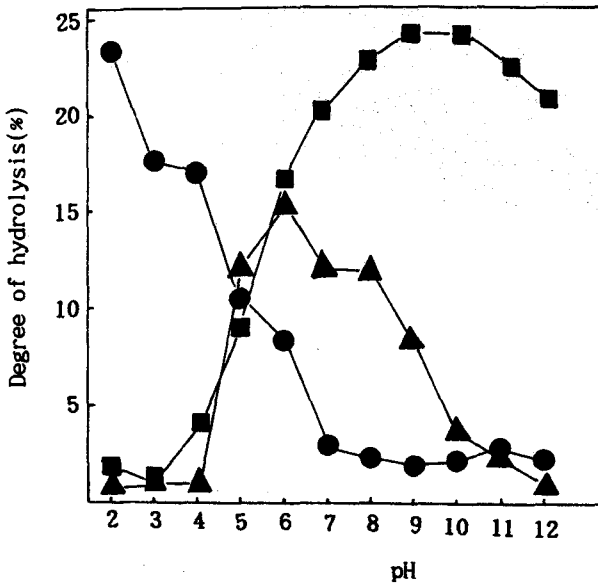


Fig. 2. Effect of pH on the degree of hydrolysis of isolated sesame meal protein treated with pepsin, papain and trypsin. ●-●, pepsin; ■-■, trypsin; ▲-▲, papain

및 trypsin의 casein과 참깨박 분리 단백질에 대한 효소 활성은 Table 3과 같다. 참깨박 분리 단백질에 대한 효소활성은 모든 효소에 있어서 casein보다는 낮았다. 이는 효소의 기질에 대한 특이성 때문으로 보이며, 유채박 단백질에 단백질 가수분해효소를 작용시켰을 때 유채 단백질 기질에 대한 효소 활성은 조사된 모든 효소에 대하여 casein보다는 낮았다는 보고²²⁾와 비슷하였다. Papain의 경우 참깨박 분리 단백질을 기질로 사용하였을 경우 casein을 기질로 사용하였을 경우보다 약 1.6배 가량 활성이 낮았으나 trypsin의 경우 거의 비슷한 활성을 보여 높은 기질 친화성을 보여주었다.

참깨박 분리 단백질의 가수분해 최적조건

1) 시간별 가수분해도 측정

참깨박 분리 단백질을 시간을 달리하여 가수분해한 결과는 Fig. 1과 같다. 각 효소 처리군에 따른 가수분해의 양상을 보면 papain, pepsin 및 trypsin을 처리 하였을 때 반응시간이 길어짐에 따라 가수분해도가 증가하였고 각 처리구에서 공히 반응 초기에 급격한 반응을 보였으며 그 이후로는 아주 완만한 분해증가를 나타내었다. 이러한 변화는 효소의 첨가시 반응성이 좋은 펩타이드 결합들로부터 우선적으로 쉽게 분해되어지고, 반응성이 약한 펩타이드 결합은 천천히 분해되는 것에 기인하는 것으로 판단된다. 이런 양상은 Kim 등⁹⁾과, 김 등²²⁾, Kang 등²³⁾, Montecalvo 등²⁴⁾이 보고한 결과와 비슷하였다.

2) pH의 영향

pH가 효소 처리에 의한 참깨박 단백질의 가수분해에 미치는 영향을 살펴 본 결과는 Fig. 2와 같다. Papain 처리구에 있어서 산성에서 중성쪽으로 가까와 질수록 가수분해도가 증가하여 pH 5~8의 넓은 범위에서 높은 가수분해도를 보였으며 pepsin을 첨가한 참깨박 단백질 현탁액에서는 pH가 증가할수록 가수분해율이 급격히 감소하는 경향을 보여 주었다. Trypsin 처리구에 있어서는 중성에서 약알칼리 부근에서 높은 가수분해도를 나타내고 있는데 이같은 경향은 이 등²⁵⁾, 최 등²⁶⁾, 유와 이²⁷⁾의 결과에서 보여 준 바와 같이 약알칼리인 효소의 작용 최적 pH와 관련 된 것으로 보인다.

3) 온도의 영향

온도를 20°C에서 70°C까지 변화 시키면서 가수분해한 결과 Fig. 3과 같이 온도가 높아짐에 따라 가수분해도가 점차 증가하였다. Papain, trypsin으로 처리했을 때 60°C에서 가장 높은 가수분해도를 나타내었고 pepsin 처리에 있어서는 50°C와 60°C에 있어 비슷한 가수분해도를 보

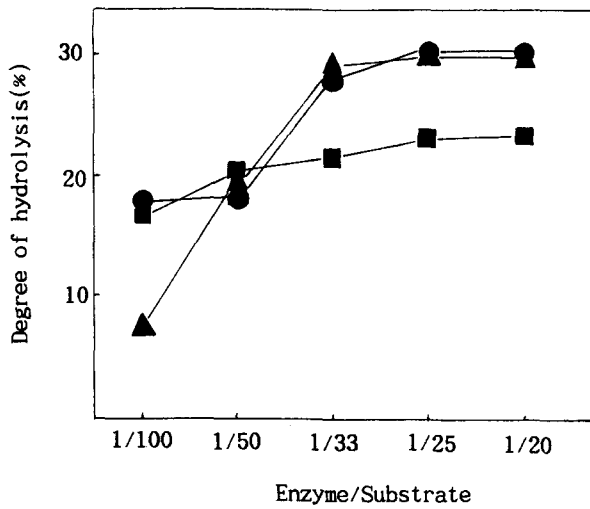


Fig. 4. Effect of enzyme concentration on the degree of hydrolysis of isolated sesame meal protein treated with pepsin, papain and trypsin. ●-●, pepsin; ■-■, trypsin; ▲-▲, papain

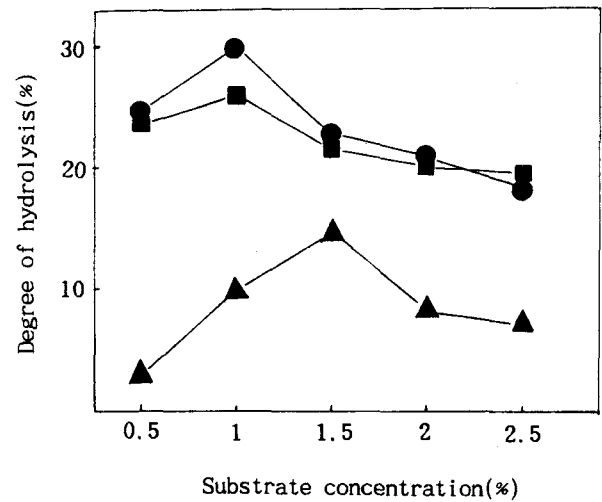


Fig. 5. Effect of substrate concentration on the degree of hydrolysis of isolated sesame meal protein treated with pepsin, papain and trypsin. ●-●, pepsin; ■-■, trypsin; ▲-▲, papain

였으며, 각 반응구에서 공히 50°C와 60°C사이에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 70°C에서는 현저히 낮은 값을 보였다. 70°C에서 가수분해도가 낮게 나타난 것은 고온에서 단백질 분해효소의 불활성화에 기인하는 것으로 판단되며, 이러한 결과는 유와 이²⁷⁾, 김 등²⁸⁾이 보고한 반응온도에 따른 가수분해경향과 유사하였다.

4) 효소농도의 영향

참깨박 분리 단백질로부터 papain, pepsin, trypsin과 같은 효소를 처리하여 단백질 가수분해물을 제조함에 있어서 최적 조건하에서 효소의 농도를 달리하여 가수분해를 하였을 때 효소의 첨가량의 변화에 따른 가수분해도의 변화는 Fig. 4와 같다. 기질에 대한 각 효소의 농도가 증가함에 따라 전체적으로 가수분해가 증가되는 경향을 보였는데 이는 결국 높은 효소첨가량이 효소반응을 촉진하기 때문인 것으로 판단된다. 각 반응구에 있어 기질량에 대해 papain 3%, pepsin 3%, trypsin 1%에 해당하는 양을 가할 때까지는 가수분해도가 현저히 증가되었으며 그 이후로는 증가하는 효소량에 비하여 가수분해도가 그다지 증가하지 않았다. 따라서 경제성 면에서도 각 효소에 있어서의 효소와 기질의 비는 상기의 결과가 적정비라 판단되며 김 등²⁸⁾, 유와 이²⁷⁾, 이 등²⁹⁾은 기질에 대해 어느 정도 이상의 효소를 첨가했을 때 증가하는 효소농도에 비하여 가수분해율이 크지 않았다고 보고 하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

5) 기질 농도의 영향

기질의 첨가량을 달리 하여 가수분해시킨 결과는 Fig. 5와 같다. 각 처리구에 대해서 최대의 가수분해도를 나타낸 기질농도는 papain, pepsin 및 trypsin 처리구에서 각각 1.5%, 1.0%, 1.0%였으며 기질 농도가 증가함에 따라 가수분해도가 점차로 감소하였다. 이러한 가수분해도의 감소는 기질 자체가 저해제 역할을 하는 것으로 판단되는데, 이러한 기질 저해는 단백질 가수분해에서 일반

Table 4. Amino acid composition of isolated sesame meal protein

Amino acid	Content (g/100 g)
Lysine	1.29
Histidine	4.06
Arginine	4.38
Aspartic acid	8.83
Threonine	4.14
Serine	6.52
Glutamic acid	17.51
Proline	5.41
Glycine	9.40
Alanine	8.48
Cysteine	0.23
Valine	5.57
Methionine	0.60
Isoleucine	4.20
Leucine	8.30
Tyrosine	2.49
Phenylalanine	4.36

적으로 일어나는 현상으로 이 등²⁹⁾은 두유박 단백질을 이용하여 pepsin으로 가수분해시 pH 1.5, 45°C에서 기질의 첨가량을 달리하고 기질의 2% pepsin을 가하여 24시간 가수분해한 결과 가수분해율은 3%의 기질농도에서 가장 높았으며 그 이상의 범위에서는 기질의 농도가 증가함에 따라 수율이 점차로 감소하였다고 보고하였고, 김 등²⁸⁾은 기질 농도가 높아짐에 따라 가수분해도가 감소하는 경향을 보여 이와 비슷한 기질 저해 현상을 보여주었다.

6) 아미노산 조성

참깨박에서 분리한 단백질의 아미노산 조성은 Table 4에서 보는 바와 같이 17종류의 아미노산이 검출되었

으며 glutamic acid가 17.51 g/100 g로 가장 많고 필수아미노산이 고루 함유되어 있었다. 신²⁾, El Tinay 등³⁾, Nilo 등⁴⁾은 참깨박 단백질의 필수아미노산 구성이 우수하다고 보고하였으나 본 실험 결과에서는 cysteine, methionine 등의 함황 아미노산이 적게 함유되어 있어 이들 부족한 아미노산이 많이 함유된 단백질 원료와 혼용해서 사용하거나 이들 아미노산을 보충한다면 더욱 훌륭한 영양원이 될 것이라 판단된다.

참 고 문 헌

1. 金俊平, 沈愚萬, 金鍾益 (1980) 참깨粕 蛋白質의 分離와 組成. 한국농화학회지 **23**, 14-22.
2. 辛孝善 (1973) 참깨에 대한 식품영양학적인 연구. 한국식품과학회지 **5**, 113-118.
3. El Tinay, A. H., A. H. Khattab and M. O. Khidir (1976) Protein and oil compositions of sesame seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **53**, 648-655.
4. Nilo R., J. E. Dench and J. C. Caygill (1981) Nitrogen Extractability of Sesame(*Sesamum indicum* L.) Seed and the Preparation of Two Protein Isolates. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 565-570.
5. Boloorforooshan, M. and P. Markakis (1979) Protein Supplementation of Navy bean with Sesame. *J. Food Sci.* **44**, 390-397.
6. Brito, O. J. and N. Nunez (1982) Evaluation of sesame flour as a complementary protein source for combinations with soy and corn flours. *J. Food Sci.* **47**, 457-465.
7. Rooney, L. W., C. B. Gustafson, S. P. Clark and C. M. Cater (1972) Comparison of the baking properties of several oilseed flour. *J. Food Sci.* **37**, 14-22.
8. De Pauda, M. R. (1983) Some functional and utilization characteristics of sesame flour and proteins. *J. Food Sci.* **48**, 1145-1153.
9. Kim, S. Y., P. S. W. Park and K. C. Rhee (1990) Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 651-664.
10. Kang, Y. J. (1984) Enzymatic Modification of Soy Proteins: Effects of Functional Properties of Soy Isolate upon Proteolytic Hydrolysis. *Korean J. Food Sci. Tech.* **16**, 211-217.
11. Sekul, A. A., C. H. Vinnett and R. L. Ory (1978) Some functional properties of peanut protein partially hydrolyzed with papain. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 855-863.
12. Lacroix, M., J. Amiot and G. J. Brisson (1983) Hydrolysis and ultrafiltration treatment to improve the nutritive value of rapeseed proteins. *J. Food Sci.* **48**, 1644-1650.
13. Ponnampalan, R., M. A. Vijayalakshmi, L. Lemieux and J. Amiot (1987) Effect of acetylation on composition of phenolic acids and proteolysis of rapeseed flour. *J. Food Sci.* **52**, 1552-1559.
14. Yang, C. I. (1980) Studies on the nutritional quality of rapeseed protein isolates. *Korean J. Food Sci. Technol.* **12**, 109-115.
15. Rahama, E. H. and M. S. Narasinga Rao (1983) Effect of acetylation and succinylation of cottonseed flour on its functional properties. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 352-357.
16. William, H. (1980) A.O.A.C., Geory Banta Co. Inc., Menasha, Wisconsin.
17. 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**, 265-271.
18. Anson, M. L. (1938) The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **22**, 79-85.
19. 萩原四郎(1956) 酵素研究法, Vol. II (朝昌書店, 東京), 1-7, 237-246(1956).
20. Edwards, J. H. and W. F. Shipe (1978) Characterization of plastein reaction products formed by pepsin, α -chymotrypsin, and papain treatment of egg albumin hydrolysates. *J. Food Sci.* **43**, 1215-1222.
21. 최 청, 조영제, 손규목, 임성일, 이우제 (1989) 참깨박 단백질과 Phytate의 용해도에 의한 pH와 염류의 영향. 영남대학교 자원문제연구소 논문집 **8**, 85-90.
22. 김충희, 김효선, 정용현, 강영주 (1992) 유채단백질의 단백질효소에 의한 가수 분해 조건. 한국영양식품화학회지 **21**, 513-518.
23. Kang, Y. J., K. C. Rhee and Y. H. Park (1988) Hydrolysis of 7S and 11S Soy Proteins By commercial Proteases. *Korean J. Food Sci. Tech.* **20**, 338-343.
24. Montecalvo, J. JR., S. M. Coonstantinides and C. S. T. Yang (1984) Enzymatic modification of fish frame protein isolates. *J. Food Sci.* **49**, 1305-1311.
25. 이상준, 박우포, 문태화, 김재욱 (1992) 두유박 단백질을 이용한 plastein의 합성. 한국농화학회지 **35**, 501-506.
26. 최 청, 천성숙, 조영제 (1993) *Bacillus* sp. CW-1121이 생성하는 단백질분해 효소를 이용한 참깨박 단백질의 용출. 한국농화학회지 **36**, 121-126.
27. 유정선, 이서래 (1988) 두유의 품질향상을 위한 효소제 처리의 효과. 한국식품과학회지 **20**, 426-432.

Optimal Conditions for the Enzymatic Hydrolysis of Isolated Sesame Meal Protein

S. H. Lee¹, Y. J. Cho¹, S. Kim¹, B. J. Ahn² and C. Choi^{1*} (¹*Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyongsan, Korea;* ²*Department of Cosmetic Engineering, Tongkuk Junior College*)

Abstract : Optimum conditions for the enzymatic hydrolysis of isolated sesame meal protein were investigated. Optimum conditions by papain were 60°C, pH 6.0, 3% enzyme concentration to substrate and 1.5% substrate concentration, respectively. The optimum operating conditions using pepsin were 55°C, pH 9.0, 3% enzyme concentration to substrate and 1% substrate concentration. The optimum operating conditions using trypsin were 60°C, pH 9.0, 1% enzyme concentration to substrate and 1% substrate concentration.

*Corresponding author