

Protease(Subtilisin Carlsberg)가 血液 蛋白質 汚垢의 除去에 미치는 影響 (I)

— Subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈의加水分解率 —

李 貞 淑 · 金 聲 連*

慶尙大學校 衣類學科 · *서울大學校 衣類學科

Effect of Protease (Subtilisin Carlsberg) on the Removal of Blood Protein Soil (I)

— The Hydrolysis of Hemoglobin by Subtilisin Carlsberg —

Jeong Sook Lee · Sung Reon Kim*

Dept. of Clothing and Textiles, Gyeongsang National University

*Dept. of Clothing and Textiles, Seoul National University

(1996. 4. 4 접수)

Abstract

The Effect of protease (subtilisin Carlsberg) on the removal of hemoglobin as protein soil was studied. The hydrolysis characteristics of subtilisin Carlsberg was examined by electrophoretic techniques. The fragmentation patterns of hemoglobin were analyzed by SDS-PAGE. The hydrolysis efficiency was evaluated by analysis of protein bands shown on gels before and after hydrolysis by using densitometer.

1. The hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg was increased markedly with the increase of the enzyme concentration.

2. The hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg was effectively increased in proportion to increasing of the hemoglobin concentration up to a certain point, but it began to decrease above the point.

3. The hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg followed the first order kinetics, yielding a rate constant of $4.05 \times 10^{-4} S^{-1}$.

4. The hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg was highest at 50°C and was decreased markedly at 80°C.

5. The hydrolysis of hemoglobin was comparatively low at pH 7.0~8.0, and highest at pH 11.0.

I. 序 論

Protease(Subtilisin Carlsberg)는 蛋白質 汚垢를 加水分解하여 除去하는데 매우 效率的이므로 近來에 洗劑用 酵素로 많이 利用되고 있다¹⁾.

Subtilisin은 蛋白質의 펩티드 結合을 廣範圍하게 加水分解시킨다. 加水分解는 内部 펩티드 結合에서 단이 아니라 末端 結合에서도 일어나서 遊離 아미노산酸을 生成시킨다. 또한 subtilisin은 脂肪族 아미노酸보다 芳香族 아미노酸의 에스테르(ester)에서 더 높은 活性을 나타내고²⁾, 芳香族, 疎水性, 鹽基性 아미노酸의 카르복실기 側의 펩티드 結合을 加水分解한다³⁾.

Subtilisin Carlsberg는 酸化인슐린 B 사슬의 ¹⁵Leu-

¹⁶Tyr 結合을 最大로 分解하며, 기타 ⁴Gln-⁵His과 ¹¹Leu-¹²Val을 分解한다³⁾. Johansen 등⁴⁾은 [그림 1]과 같이 加水分解하는 部位를 나타내었다.

加水分解는 切斷 部位(1次 加水分解, ↑) 이외의 構造에도 影響(2차 加水分解, ↓)을 미쳐서 매우 廣範圍하게 分解되는 것을 알 수 있다. 따라서 조개진 패턴의 特異性을 찾을 수 없다. 특히 分子量이 큰 蛋白質에 比較的 多量의 酵素를 作用시킬 境遇에는 嚴密한 特異性이 認知될 수 없다³⁾.

Subtilisin Carlsberg는 蛋白質을 트립신, 키모트립신 및 펩신보다 더욱 廣範圍하게 分解하여 작은 펩티드와 아미노산으로 分解한다. 이러한 廣範圍한 分解는 部分 酸 加水分解와 相似하나, 酸 加水分解와는 달리 아미노酸의 破壞가 일어나지 않으며 加水分解 生成物의

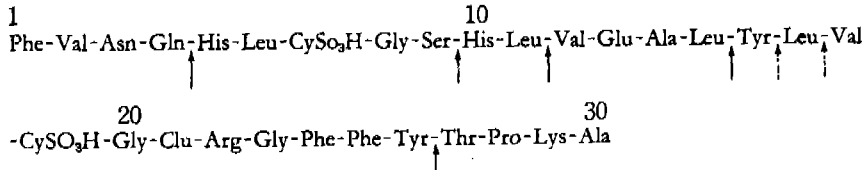


Fig. 1. Hydrolysis of the oxidized insulin B chain by subtilisin Carlsberg. Solid and broken arrows represent the primary and secondary hydrolysis, respectively.

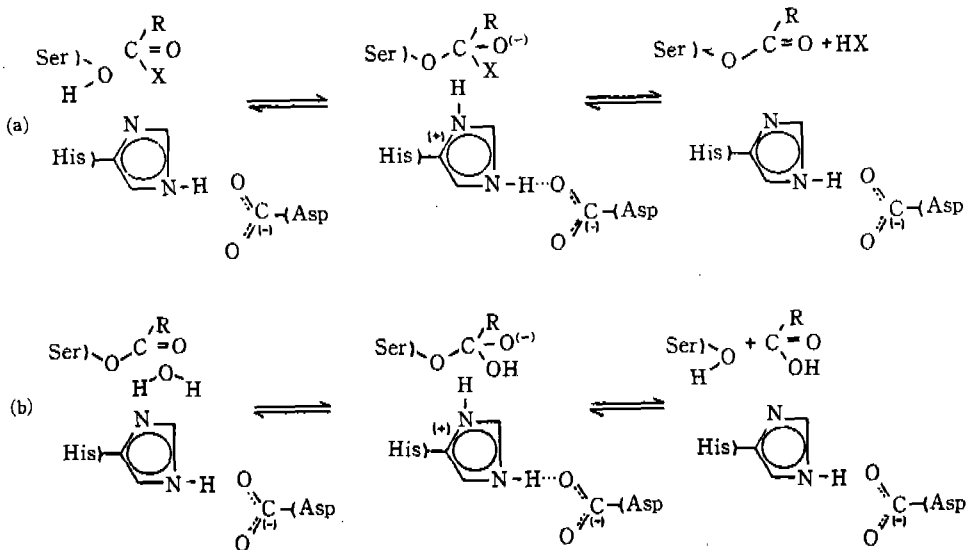


Fig. 2. Possible mechanism of the formation (a), and the hydrolysis (b) of the acyl enzyme in the catalysis by serine proteases; X represents the leaving group. From Polgär and Bender.

收率⁵⁾이 높다.

또한 Polgár와 Bender⁶⁾는 acyl enzyme의 形成과 加水分解 反應 機構를 [그림 2]와 같이 나타내었다.

이 見解에 따르면 觸媒 反應을 開始하는데 必要한 것은 카르보닐 炭素 原子와 세린 殘基의 酵素 原子 사이의 衝突이다. 두 個의 一般의인 觸媒 反應 사이에서 imidazolium은 aspartate-imidazole hydrogen bond system에 의해 安定化된다.

酵素를 利用한 蛋白質 汚垢의 洗滌에 대한 研究로는 血液⁷⁻¹³⁾, 牛乳^{14, 15)}, 卵白¹⁶⁾, 젤라틴¹⁷⁻¹⁹⁾ 등을 人工 汚垢로 使用하여 각각의 洗滌性을 檢討한 報告와 皮膚에 附着시켜 만든 天然 汚垢布를 만들어 表皮 角質層 汚染의 洗滌性을 檢討한 報告²⁰⁻²⁴⁾ 등이 있다. 이들 報告에 의하면 酵素가 蛋白質 汚垢의 除去에 影響을 미치는 것으로 나타났지만, 酵素에 의한 洗滌 機構의 究明은 아직 充分하지 못하다.

헤모글로빈은 人體에서 由來되는 重要한 蛋白質 汚垢 源인 血液의 主成分이다. 헤모글로빈은 4개의 小單位體(subunit)가 結合한 4量體(tetramer)로서 約 50×55×64 Å 크기를 가지고 있으며 分子量은 64,400이다. 헤모글로빈의 種類에는 몇 가지가 알려져 있으나, 보통 成人의 90% 이상을 차지하고 있는 헤모글로빈 A는 2 α 2 β 로 構成되어 있고, α 사슬은 141개, β 사슬은 146개의 아미노산 殘基를 갖고 있다. 헤모글로빈 4量體는 直徑이 約 55 Å 인 球型의 3次 構造를 나타내고 있으며, 폴리펩티드 사슬이 접혀져 있는 各 小單位體 안에 4個의 heme group이 각각 끼워져 있다. Deoxy와 oxyhemoglobin 形態에 따라서 quaternary conformation에 뚜렷한 差異가 있다. 즉, deoxy 形態를 安定化시키는 鹽結合(salt bonds)은 分子가 oxyhemoglobin이 될 때 절단된다²⁵⁾. 헤모글로빈이 熱에 의해 變性되는 機構는 1次 反應인 것으로 알려져 있으며, 특히 水分의 影響을 크게 받는 것으로 報告되었다²⁶⁾.

本 研究에서는 위에서 살펴본 바와 같이 subtilisin Carlsberg의 加水分解 作用에 重點을 두고 酸素 濃度, 헤모글로빈의 濃度, 時間, 溫度 및 pH 등의 反應 條件을 一般 洗滌 條件과 恰似하게 變化시켜서 헤모글로빈이 低分子物로 加水分解 되는 狀態를 電氣泳動法에 의해 定量 分析하여 酵素에 의한 洗滌 機構를 밝혀보는 基礎資料를 얻고자 하였다.

II. 實 驗

1. 試藥

Protease : Bacillus licheniformis로부터 生産된 subtilisin Carlsberg(NOVO 産業, 상품명 : Alcalase 2.0T)를 사용하였다. 효소의 活性度는 TNBS法²⁷⁾에 의하여 측정하였으며 2.30 AU/g으로 나타났다.

血液蛋白質 : Hemoglobin(人體), 生化學用(Sigma 化學株式會社, No. H-7379)

Acrylamide : 生化學用 (Aldrich 化學株式會社, No. 14857-1)

Bisacrylamide : 生化學用 (Sigma化學株式會社)

Sodium dodecylsulfate(SDS) : 試藥 特級 (Aldrich 化學株式會社)

β -Mercaptoethanol : 試藥一級(和光純藥株式會社)

Molecular weight standards(M.W. 66,000-14,200) : 生化學用 (Sigma 化學株式會社)

N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine(TEMED) : 生化學用 (Sigma 化學株式會社)

Coomassie brilliant Blue R 250; 試藥一級 (東京化成工業株式會社, No. B-1131)

2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid sodium salt (TNBS) : 生化學用 (和光 純藥株式會社)

N, N,-Dimethyl casein (DMC) : NOVO 産業株式會社

其他 試藥은 試藥一級을 使用하였다.

實驗에 使用한 물은 2次 및 3次 蒸溜水를 使用하였다.

2. 蛋白質의 分子를 測定

蛋白質의 分子量은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의하여 測定하였다. SDS-PAGE는 Mighty(LKB社 制作)를 使用하여 Laemmli²⁸⁾法에 따라 16.0%(W/V) 폴리아크릴아미드 겔을 使用하여 試料와 分子量 標準 物質을 同時에 電氣 移動시켰다. 겔은 Coomassie brilliant blue R 250으로 着色하고, 過量으로 착색된 염료는 蒸溜水 : 메타놀 : 水醋酸(60 : 30 : 10, V/V)의 混合液으로 除去하였다. 試料의 分子量은 分子量 標準物質의 移動거리로부터 作成된 檢量線에 의하여 算出하였다.

3. Subtilisin Carlsberg 에 의한 蛋白質의 加水分解率

헤모글로빈 濃度, pH(pH는 0.2 M 수산화나트륨과 0.04 M 氷醋酸, 0.04 M 磷酸, 0.04 M 硼酸의 混合酸으로 調節²⁹⁾함.), subtilisin Carlsberg 濃度, 溫度 등을 所定의 實驗 條件에 맞도록 調製한 헤모글로빈 溶液을 667 μl를 취하여 1.5 ml microtube 안에 넣은 다음 密封하여, cpm 40±1의 恒溫 震蕩機에 넣고 任意의 時間 동안 加水分解하였다. 加水分解가 完了된 헤모글로빈 溶液은 試料 緩衝溶液을 333 μl 넣고 100°C에서 3 分間 熱處理한 다음, 常溫으로 식히고 10-20 μl씩 취하여 電氣 泳動 實驗에 使用하였다.

SDS-PAGE는 II-2와 같은 방법으로 實驗하였으며 分離 結果에 나타난 protein band의 量은 densitometer (Helena Lab 製作, Quick Scan)를 使用하여 525 nm에서 定量하고, 다음의 式에 의하여 加水分解率을 算出하였다.

$$\text{加水分解率(\%)} = \left(1 - \frac{Ph}{Po}\right) \times 100$$

여기서 Po : 加水分解 前에 나타난 주된 protein band의 量

Ph : 加水分解 後에 나타난 주된 protein band의 量

III. 結果 및 考察

1. 蛋白質의 分子量

血液 蛋白質로 使用한 헤모글로빈과 protease로 使用한 subtilisin Carlsberg의 分子量을 測定한 結果는 Fig. 3, 4 및 Table 1과 같다. Fig. 3-(b)는 헤모글로빈을 分離한 것인데 Fig. 3-(a)의 分子量 標準物質과 比較할 때 protein band는 M.W. 16,300에서 주로 나타나고, M.W. 28,000에서 少量 나타났다. Densitogram은 Fig. 4에 나타난 것과 같은데 이것을 分析한 結果 M.W. 16,300이 約 91%를 차지하였다. M.W. 28,000에 나타난 少量의 protein band는 不純物인 것으로 推定된다. 헤모글로빈은 앞에서 敘述하였듯이 4개의 小單位體 (2αβ)로 構成되어 있는데, SDS 및 β-메르캅토에탄올에 의하여 쉽게 小單位體로 쪼개지므로³⁰⁾ 本 實驗에 使用한 헤모글로빈은 分子量이 約

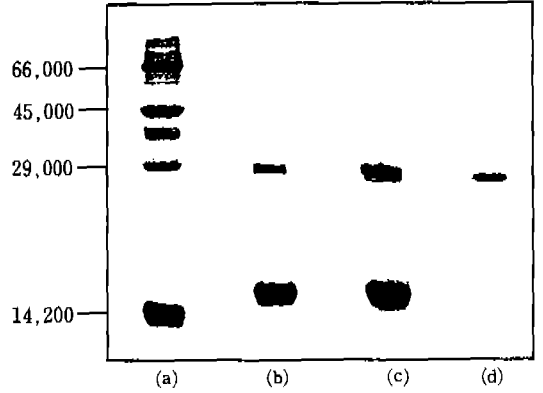


Fig. 3. Separation of (a) M.W. standards (b) hemoglobin, (c) denatured hemoglobin, (d) subtilisin Carlsberg by SDS-PAGE.

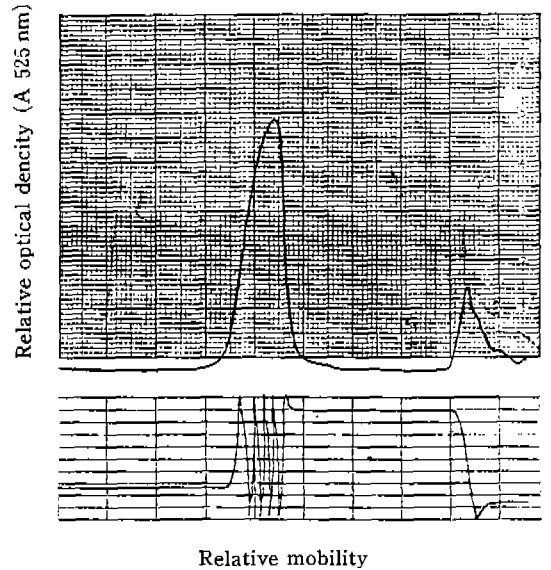


Fig. 4. Densitometric analysis of Coomassie blue stained protein bands shown in Fig. 3-(b).

Table 1. Molecular weight of proteins.

Protein	Molecular Weight
Hemoglobin	65.200
Subtilisin Carlsberg	27.500

65,200으로 算出되었다.

Fig. 3-(c)는 헤모글로빈을 水蒸氣로 30分間 熱處理하여 變成시킨 것인데 protein band는 (b)와 같은 위치에 나타났다. 따라서 變成 헤모글로빈의 分子量은 未變成 헤모글로빈의 分子量과 같다고 볼 수 있다. 實驗結果 얻은 헤모글로빈의 分子量은 다른 文獻²⁵⁾의 값과 비슷한 것이다.

Fig. 3-(d)는 subtilisin Calsberg를 分離한 것인데 M.W. 27,500으로 算出되었으며, sedimentation法으로 測定한 값(27,400)과 비슷하다.

2. Subtilisin Carlsberg 濃度の 影響

酵素 subtilisin Carlsberg의 濃도가 헤모글로빈의 加水分解率에 미치는 影響을 알아보기 위하여, 酵素의 濃도를 0-200 $\mu\text{g/ml}$ 로 變化시켜서 實驗한 結果는 Fig. 5와 같다. 후속되는 헤모글로빈 汚垢布의 洗滌 實驗과 同一한 조건으로 하기 위하여, 分解液의 pH는 9.5로 하고 溫度는 40°C에서 30分間 加水分解하였다. 이때 헤모글로빈의 濃도는 一定하게 하였다.

Fig. 5를 보면 酵素의 濃도가 增加할수록 헤모글로빈의 加水分解率은 크게 높아졌다. 酵素의 濃도가

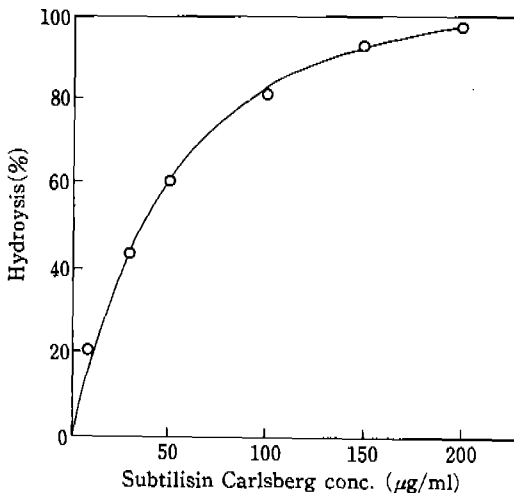


Fig. 5. Effect of subtilisin Carlsberg concentration on the hydrolysis of hemoglobin.

Conditions: Hemoglobin conc. 40 $\mu\text{mol/l}$
 Temperature 40 \pm 0.1°C
 pH 9.5
 Time 30 min.

10 $\mu\text{g/ml}$ 로서 헤모글로빈 濃도에 비해 매우 낮은 境遇 (약 300 : 1)에서도 基質의 약 21%가 加水分解 되었다. 헤모글로빈과 酵素의 濃度比(W/W)가 약 100 : 1인 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 酵素 濃度에서는 헤모글로빈은 44%가 加水分解 되었으며, 약 20 : 1인 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 酵素 濃度에서는 94%가 加水分解 되었다. 그리고 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 濃度에서는 低分子物로 거의 다 分解되었기 때문에 헤모글로빈 量에 대하여 酵素濃도가 充分하면 加水分解가 완전히 됨을 알 수 있다.

Nomato 등⁵⁾은 subtilisin을 基質 濃度の 0.5%(W/V) 濃도로 72時間 加水分解하였을 때 casein bonds의 약 75%, ovalbumin bonds의 약 87%, wheat gluten bonds의 약 80%가 分解되었음을 報告했다. 이때, 附加로 많은 遊離 아미노酸이 加水分解物에 存在하였다. 예를 들면 카제인의 총 아스파르트酸의 45%, 메티오닌의 94%, 발린과 루신의 61%, 리신의 74%가 72時間 加水分解 後에 遊離 아미노酸으로 發見되었다.

따라서 subtilisin Carlsberg는 헤모글로빈을 작은 低分子物로 切斷하는데 매우 效率的이며 酵素의 濃도가 높아질수록 加水分解率이 크게 높아짐을 알 수 있다.

3. 헤모글로빈 濃度の 影響

헤모글로빈 濃도가 加水分解率에 어떤 影響을 미치는 지 알아보기 위하여, 酵素의 濃도를 一定하게 하고 헤모글로빈 濃도를 變化시키면서 實驗한 結果는 Fig. 6 및 7과 같다.

Fig. 6은 헤모글로빈의 濃도를 0-60 $\mu\text{mol/l}$ 로 變化시켰을 때 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 酵素에 의하여 各各 加水分解된 헤모글로빈의 量을 나타낸 것이다.

初期의 낮은 헤모글로빈의 濃度에서는 加水分解는 계속 증대하였으나 40 $\mu\text{mol/l}$ 濃度 以上에서는 大수 減少하였다. 이것은 一定한 酵素의 量으로 헤모글로빈을 加水分解 시키는 作用에는 限界가 있음을 나타내서, 어느 濃度 이상이 되면 酵素 한 分子가 分解할 수 있는 基質의 分子가 飽和值에 到達함을 알 수 있다.

따라서 이후의 本 實驗에서는 Fig. 5~7의 結果로부터 헤모글로빈의 量에 대하여 酵素의 濃도를 약 1% (W/W)로 하여 實驗하였다.

一般的으로 protease를 觸媒로 하는 加水分解 反應은 다음의 식 (1-5)에 의하여 나타낼 수 있다³²⁾.

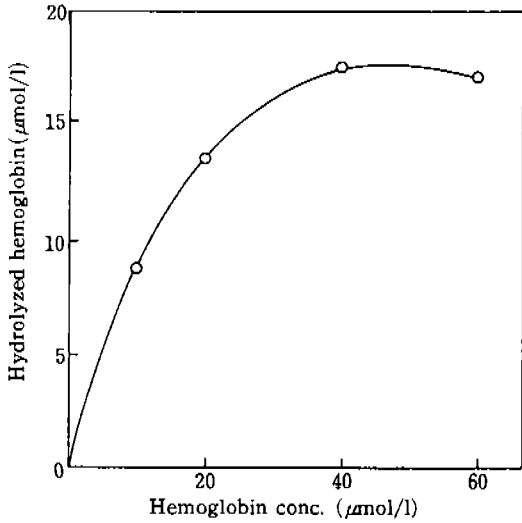


Fig. 6. Effect of hemoglobin concentration of the hydrolysis of hemoglobin.

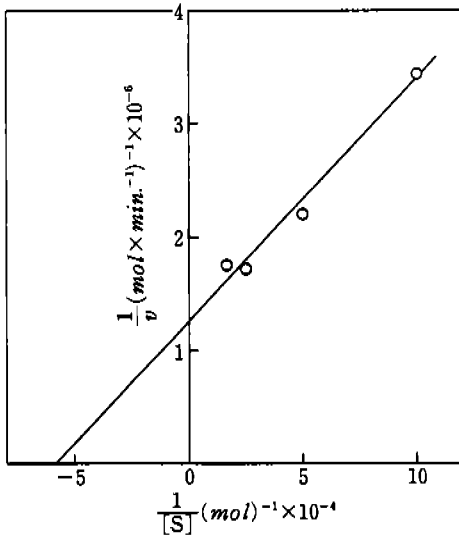
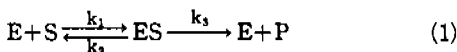


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of the hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg.

Conditions: Enzyme conc. 30 μg/l
 Temperature 40 ± 0.1°C
 pH 9.5
 Time 30 min.



$$V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad \text{Michaelis-Menten eq. (2)}$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (3)$$

$$V_{max} = k_3([E_t]), \quad k_3 = k_{cat} \quad (4)$$

여기서

E : enzyme

S : substrate

ES : enzyme-substrate complex

k₁ : k₂, k₃ ; catalytic rate constants

P : product

K_m : Michaelis constant

V_{max} : maximal initial velocity

[E_t] : total enzyme concentration

k_{cat} : turnover number

K_{cat} 및 V_{max}는 Lineweaver-Burk reciprocal plot (5式)에 의하여 얻은 Fig. 7로부터 算出하였다.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

각각 산출된 값은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Kinetic parameters for the hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg.

K _m (mol)	V _{max} (mol · s ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ · mol ⁻¹)
1.70 × 10 ⁻⁸	1.32 × 10 ⁻⁸	1.32 × 10 ⁻¹	7.76 × 10 ⁸

이 때 [E_t]는 Alcalase의 단백질 함량(13.8%)으로부터 구하였다. (反應時濃度 1.00 × 10⁻⁷ mol/l 使用)

일반적인 protease의 基質인 N-benzoylarginine ethyl ester(BAEE)를 使用하였을 境遇에 subtilisin Carlsberg의 K_m은 7.51 ± 1 mM로 算出된 것³³⁾과 比較하면 K_m은 約 1/440이므로 subtilisin Carlsberg의 헤모글로빈에 대한 親和力은 매우 큰 것으로 나타났다. 또한 여러가지 oligopeptide에 대해서 K_m은 약 10~50 mM의 범위로 산출되었으므로³⁴⁾ 이것에 대해서도 헤모글로빈에 대한 subtilisin Carlsberg의 親和力이 훨씬 더 높은 것을 알 수 있다. Subtilisin Carlsberg의 反應 機構에 있어서 acylation 反應은 매우 急速度로 이루어지기 때문에 (1)式에서 deacylation rate

constant 인 k_3 가 주로 反應速度를 左右한다.

4. 時間의 影響

酵素가 헤모글로빈을 加水分解시키는데 미치는 反應時間의 影響을 알아보기 위하여 0~90分間으로 時間을 變化시켜서 實驗한 結果는 Fig. 8에 나타내었다.

Fig. 8을 보면 反應 時間 5分에서는 12%, 15分에서는 23%, 30分에서는 44%가 各各 加水分解되어 짧은 時間內에도 比較的 높은 加水分解率을 나타내었다. 이것은 subtilisin Carlsberg가 매우 짧은 時間 (1-2分)에 反應을 시작하는 特性과 관련이 있는 것으로 보인다. 또한 反應 時間 60分에서는 69%, 90分에서는 80%로 各各 加水分解되어, 時間이 充分히 주어질 境遇에는 加水分解가 거의 다 이루어짐을 알 수 있다.

또한 (6)式에 의하여 Fig. 9에 나타낸 것과 같이 酵素에 의한 헤모글로빈의 加水分解 反應은 1次 反應으로 나타났으며, 速度 常數는 $4.05 \times 10^{-4} S^{-1}$ 로 算出되었다. 이것은 일반적인 protease의 基質인 BAEE를 사용하였을 境遇의 subtilisin Carlsberg의 速度 常數

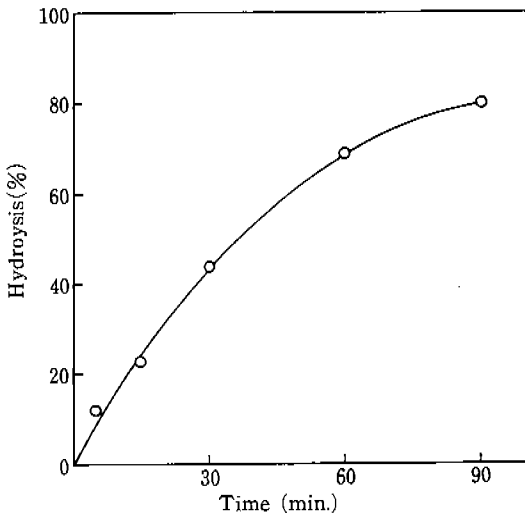


Fig. 8. Effect of reaction time on the hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg.

Conditions: Hemoglobin conc. 40 $\mu\text{mol/l}$
 Enzyme conc. 30 $\mu\text{g/ml}$
 pH 9.5
 Temperature $40 \pm 0.1^\circ\text{C}$

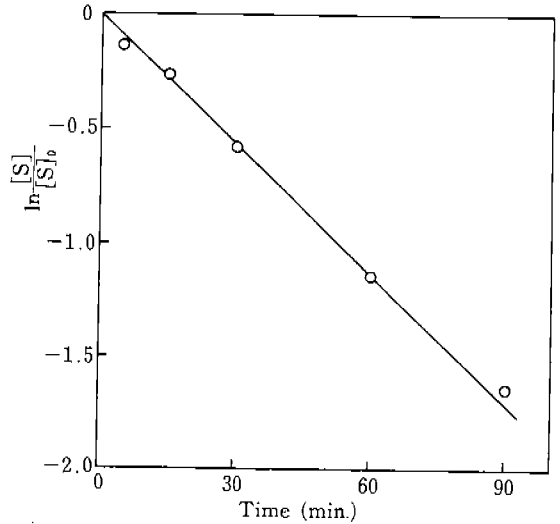


Fig. 9. Reaction kinetics of the hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg.

Conditions: Hemoglobin conc. 40 $\mu\text{mol/l}$
 Enzyme conc. 30 $\mu\text{g/ml}$
 pH 9.5
 Temperature $40 \pm 0.1^\circ\text{C}$

가 $3.5 \times 10^{-5} S^{-1}$ 인 것³⁰⁾과 比較하면 分解速度가 約 10배 정도 크게 나타났다. 따라서 subtilisin Carlsberg는 헤모글로빈 基質에 대한 親和力이 매우 높음을 알 수 있다.

$$\ln \frac{[S]}{[S]_0} = -kt \tag{6}$$

여기서

$[S]_0$: substrate concentration at $t=0$

$[S]$: substrate concentration at $t=t$

k : rate constant

t : time

5. 溫度的 影響

酵素가 헤모글로빈을 加水分解시키는데 미치는 溫度的 影響을 알아보기 위하여 20~80°C로 變化시켜 實驗한 結果는 Fig. 10과 같다. 溫度的 影響은 매우 敏感하여서 溫度가 增加함에 따라 加水分解率은 급격히 增加하여 50°C에서 最高 값을 나타내었다.

Fig. 10을 보면 20°C의 低溫에서는 23%의 加水分解率을 나타내고 있으며 40°C에서는 20°C의 境遇보다 約

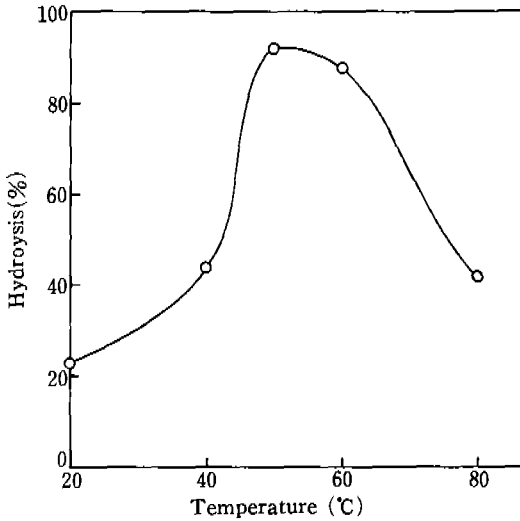


Fig. 10. Effect of temperature on the hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg.

Conditions: Hemoglobin conc. 40 $\mu\text{mol/l}$
 Enzyme conc. 30 $\mu\text{g/ml}$
 pH 9.5
 Time 30 min.

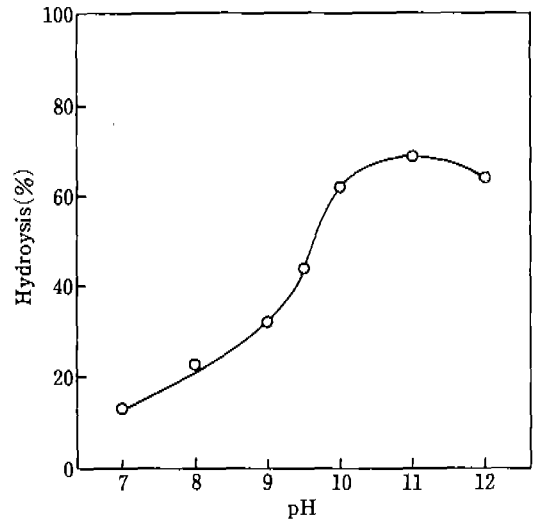


Fig. 11. Effect of pH on the hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg.

Conditions: Hemoglobin conc. 40 $\mu\text{mol/l}$
 Enzyme conc. 30 $\mu\text{g/ml}$
 Temperature 40 $\pm 0.1^\circ\text{C}$
 Time 30 min.

2 배 정도(44%)加水分解되었다. 50°C에서는 92%, 60°C에서는 88%가 각각加水分解되었고, 80°C에서는顯著하게加水分解률이 낮아져서(42%) 온도의影響이 매우 크게 나타났다. 이러한現象은 subtilisin Carlsberg의溫度特性和 거의一致하였다. 그러나 80°C의高温에서 酵素의活性도가 극히 낮은데³⁵⁾ 비하면 헤모글로빈의加水分解률은比較的 높게 나타났다.

6. pH의影響

酵素가 헤모글로빈을加水分解시키는 데 미치는 pH의影響을 알아보기 위하여, 分解液의 pH를 7.0~12.0으로變化시켜實驗한 결과는 Fig. 11과 같다.

Fig. 11을 보면 pH가 7.0에서는 13%, pH가 8.0에서는 23% 각각加水分解되어中性附近에서는比較的分解률이 낮게 나타났다. 그러나 pH가 9.0 이상이 되면顯著하게分解률이 높아져서 pH 9.5에서는 44%, pH 10.0에서는 62%, pH 11.0에서는 69%가 각각加水分解되었다. pH 12.0에서는 64%가加水分解되어 다소分解률이低下되었다.

이러한結果는 酵素의活性도와는 다소 다르게 나타

난舉動이다. 즉, subtilisin Carlsberg의最適 pH인 7.0~10.5의範圍에서는活性도의差異가比較的 적으며, pH 11.0 이상에서는活性도가顯著하게低下된³⁵⁾ 것과는 달리,中性附近에서는 헤모글로빈의分解률이相對적으로 매우 낮게 나타났으며 알칼리쪽에서는比較的 헤모글로빈의分解률이 높게 나타났다. 이것은 헤모글로빈基質의特性和 關聯이 깊은 것으로 생각된다.

IV. 結 論

Protease (subtilisin Carlsberg)가 血液蛋白質汚垢의除去에 미치는影響을究明하기 위하여 subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈의加水分解률을本報에서1次的으로 먼저檢討하였다. Subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈의加水分解률은 SDS-PAGE法에 의해分析하였으며, densitometer를使用하여加水分解前後의 젤(gel) 위에 나타난 protein band를定量함으로써評價하였다.

實驗한結果로부터 다음과 같은結論을 얻었다.

1. Subtilisin Carlsberg의濃도가增加할수록水溶

液 状態의 헤모글로빈의加水分解率은 顯著하게 높아져서 酵素의 濃度가 充分한 境遇에는 大部分의 헤모글로빈이 加水分解 되었다.

2. Subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈의加水分解量은 水溶液 中の 헤모글로빈 濃度가 增加할수록 높아지다가 어느 濃度 以上이 되면 加水分解되는 헤모글로빈의 量은 다소 減少하였다.

3. Subtilisin Carlsberg가 헤모글로빈을 加水分解하는 反應은 1次 反應으로 나타났으며 速度 常數는 $4.05 \times 10^{-4} S^{-1}$ 로 算出되었다.

4. Subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈의加水分解率은 分解液의 溫度가 높아질수록 顯著하게 增加하여 50°C에서 가장 높게 나타났으며 80°C의 高温에서는 크게 低下되었다.

5. Subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈의加水分解率은 分解液의 pH가 7.0~8.0 附近에서는 비교적 낮았으며 11.0 附近에서 가장 높았다.

參 考 文 獻

- 1) 李貞淑, 沈潤貞, 蛋白質 分解 酵素가 洗滌에 미치는 影響. 酵素와 汚染 基質의 特性을 中心으로, 韓國衣類學會誌, 17(3), 491-505 (1993).
- 2) Boyer P.D., The Enzymes, vol. 3. Hydrolysis: Peptide Bonds, Academic Press, 584-596 (1971).
- 3) 赤堀四郎, 奥貫一男, 酵素 Handbook, 朝倉書店, 551-552 (1982).
- 4) Johansen, J.T., Ottesen M., Svendsen, I. and Wybrandt, G., *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 36, 365 (1968).
- 5) Anfinsen, C.B., Anson, M.L., Edsall, J.T., and Richards, F.M., *Advances in Protein Chemistry*, vol. 20, Academic Press, 80-82 (1965).
- 6) Polgär L. and Bender, M.L., The Nature of General Base-General Acid Catalysis in Serine proteases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 64, 1335-1342 (1969).
- 7) 皆川 基, 重田 美智子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗滌に関する研究(第三報), 血液汚染布の洗滌について, 繊維誌 11(5), 263-273 (1970).
- 8) 皆川 基, 重田 美智子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗滌に関する研究(第四報), 酵素洗滌における金屬イオンの影響について, 繊維誌, 11(5), 274-279 (1970).
- 9) 所 康子, 皆川 基, 血液たん白質汚れの洗滌に関する研究(第三報), プロテアーゼの 基質特異性なびに活性方洗滌性に及ぼす影響, 繊維誌, 26(3), 123-129 (1985).
- 10) 所 康子, 皆川 基, 血液たん白質汚れの洗滌に関する研究(第四報), プロテアーゼの pH 特性なびに溫度特性が洗滌性に及ぼす影響, 繊維誌, 26(11), 479-484 (1985).
- 11) 所 康子, 皆川 基, 血液たん白質汚れの洗滌に関する研究(第五報), 變性たん白質汚れの洗滌について, 繊維誌, 27(10), 449-455 (1986).
- 12) 所 康子, 皆川 基, 血液たん白質汚れの洗滌に関する研究(第六報), 界面活性劑存在下における, プロテアーゼの 活性の安定性が血液蛋白質汚れの洗滌舉動に及ぼす影響, 繊維誌, 28(3), 116-122 (1987).
- 13) 所 康子, 皆川 基, 血液たん白質汚れの洗滌に関する研究(第七報), 陰イオン界面活性劑・非イオン界面活性劑・プロテアーゼ系 洗滌における, 血液たん白質汚れの除去, 繊維誌, 28(7), 284-291 (1987).
- 14) Kame, M., Koda H., Kato A. and Koma, T., Detergency and Mechanism of Soil Removal in detergent-Enzyme System, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 50 (11), 464-469 (1973).
- 15) 皆川 基, 重田 美智子, 所 康子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗滌に関する研究(第五報), 牛乳カゼイン汚染布の洗滌について, 繊維誌, 13(12), 519-529 (1972).
- 16) 皆川 基, 重田 美智子, 所 康子, 奥山 春彦, 藤井 富美子, たん白質汚れの洗滌に関する研究(第二報), 卵白アルブミン汚染布の洗滌について, 繊維誌, 10(2), 66-74 (1969).
- 17) 皆川 基, 所 康子, 重田 美智子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗滌に関する研究(第六報), セラチン汚染布の洗滌について, 繊維誌, 15(1), 15-21 (1974).
- 18) 佐藤 昌子, 吉川 研一, 北村 直子, 皆川 基, 無リン洗滌劑による洗滌に関する研究(第八報), プロテアーゼ・リパーゼ配合系におけるたん白質汚れの洗滌性, 繊維誌, 29(4), 155-161 (1988).
- 19) 佐藤 昌子, 朴銀憬, 皆川 基, 泡沫洗滌用酵素洗滌に関する研究(第二報), 泡沫系におけるフロテアーむ活性の安定性かむラチン綿汚染布の洗滌性にほす影響, 繊維誌, 30(7), 317-323 (1989).
- 20) 皆川 基, 岡本 幾子, たん白質汚れの洗滌に関する研究(第七報), 衣類に付着する表皮角質層汚れについて, 繊維誌, 19(3), 106-115 (1978).
- 21) 皆川 基, 岡本 幾子, 重田 美智子, たん白質汚れの洗滌に関する研究(第八報), 頸部綿汚染布に付着する表皮角質層汚れの洗滌について, 繊維誌, 19, 420-430 (1978).
- 22) 岡本 幾子, 皆川 基, たん白質汚れの洗滌に関する研

- 究, 各種繊維布に附着する表皮角質層汚れの非水系洗浄について, 繊維消誌, 26(2), 511-521 (1985).
- 23) 岡本 幾子, 皆川 基, たん白質汚れの洗浄に関する研究, 低温洗浄における酵素作用の影響について, 繊維消誌, 28(4), 167-172 (1987).
- 24) 岡本 幾子, 皆川 基, たん白質分解酵素による豫浸を行った場合, 洗浄時の機械作用が表皮角質層汚染綿布の洗浄ならびに損傷におよぼす影響について, 繊維消誌, 28(12), 522-530 (1987).
- 25) Bunn, H. Franklin, Forget, Bernard G., Ranney Helen M., Hemoglobinopathies, Major Problems in Internal Medicine, W.B. Saunders Company, vol. 12., 1-10 (1977).
- 26) 水島三一郎, 赤堀四郎, 蛋白質化学, 2, 共立出版株式会社, 571 (1954).
- 27) Novo Analytical Method: Manual Procedure for Determination of Proteolytic Activity in Enzyme Preparations and Detergents (1984).
- 28) Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- 29) Dean, J.A., Langer's Handbook of Chemistry, McGraw-Hill Book Company, 5-104 (1985).
- 30) Hames B.D., Rickwood D., Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach, IRL Press, 1-60 (1981).
- 31) Boyer, P.D., op. cit., 567-584.
- 32) Stryer, L., Biochemistry, 3rd ed., W.H. Freeman and Company, 187-191 (1988).
- 33) Kim D.U. and Choi M.U., Irreversible Thermoinactivation Mechanisms of Subtilisin Carlsberg, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 10(6), 600-604 (1989).
- 34) Karasaki, Y. and Ohno M., Interactions of BPN' and Carlsberg Subtilisin with Peptides containing Aromatic Amino Acids at the C-Terminus, Specific Rate Enhancement due to the Secondary Enzyme-Substrate Interaction, *J. Biochem.* 86, 563-567 (1979).
- 35) Novo Information, B259b-GB 2000 (1984).