

어류 내장 유래 단백질 분해효소로부터 열안정성 개선을 위한 고정화 효소의 제조

전유진 · 박표잠 · 변희국 · 송병권* · 김원석** · 김세권†

부경대학교 화학과

*부산지방식품의약청

** (주) 순천당제약 기술연구소

Preparation of an Immobilized Enzyme for Enhancing Thermostability of the Crude Proteinase from Fish Intestine

You-Jin Jeon, Pyo-Jam Park, Hee-Guk Byun, Byung-Kwon Song*,
Won-Suk Kim**, and Se-Kwon Kim†

Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

**Pusan Regional Food & Drug Administration, Pusan 608-080, Korea*

***R&D Center, Suncheon Dang Pharmaceutical Co. Ltd., Pusan 604-042, Korea*

Abstract

In order to utilize tuna pyloric caeca among fish intestines wasted when treated raw fish in fish processing manufactory, a crude enzyme with high proteolytic activity was extracted and its optimum condition were investigated. An immobilized enzymes also were prepared by adsorption method to enhance thermostability of the crude proteinase. The yield of the crude proteinase was approximately 2.7% on dry basis. The proteolytic activity for casein was 0.54 U/mg protein, for BTEE 1.10 U/mg protein, and for BAEE 2.69 U/mg protein. It was almost similar to that of the commercial trypsin purified. Optimum hydrolysis activity of the crude proteinase was about 80%, as the degree of hydrolysis for casein, at pH 10.0 and 45°C for 12 hrs. Also, when the crude proteinase was immobilized on DEAE-Cellulose and chitin, the residual activities remained after 7 days of pre-incubation time were maintained about 90% or more and their thermostabilities were enhanced by about 50%, compared with the native enzyme.

Key words : fish intestine, tuna pyloric caeca, proteinase, immobilized enzyme, thermostability

서 론

수산가공공장에서 어류 가공시 부산물로서 생성되는 어

류 내장은 많은 종류의 단백질 분해효소를 함유하고 있는데, 주로 유문수나 채장에서 분비되고 있다. 이들은 trypsin, trypsin-like enzyme, chymotrypsin, collagenase, elastase,

† Corresponding author

carboxylpeptidase 및 carboxylesterase 등과 같은 소화 관련 효소가 대부분을 차지하고 있다¹⁻³⁾. 특히 어류의 내장 조직 중 참치 유문수는 참치의 맹장조직으로서 여기에는 많은 종류의 효소들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 어류의 유문수에서 추출된 효소는 다른 내장조직인 위나 식도에서 유래되는 효소보다 활성이 더 우수하며⁴⁾, trypsin이나 chymotrypsin 및 그들 유사 효소들이 많이 분포되어 있다.

森下 등⁵⁾은 양식산 방어, 갯장어, 무지개 송어 및 은어의 각 장기 중에 분포하는 단백질분해효소의 활성을 측정할 결과, 위장에서 분리한 것은 산성 영역에서, 유문수와 소화관에서 분리한 것은 알칼리 영역에서 높은 활성을 보인다고 보고하였다. 어류의 유문수 유래 효소에 관한 연구로서, Ooshiro 등⁶⁾은 고등어 유문수로부터 알칼리성 단백질 분해효소에 관하여, Murakami와 Noda⁷⁾는 정어리로부터 3 종류의 알칼리성 단백질 분해효소에 관하여, 그리고 Uchida 등⁸⁾은 연어 유문수에서 trypsin, chymotrypsin 및 carboxylpeptidase 전구체의 분포에 대하여 각각 보고한 바 있다. 그리고 Simpson 등⁹⁾은 북태평양 대구로부터 Pyeon 등¹⁰⁾은 3종류의 참치류로부터 각각 trypsin 및 trypsin-like enzyme에 대하여 보고하였다.

이와 같은 연구 결과에 의하면, 어류 내장 중 유문수 조직에는 여러 가지 종류의 단백질 분해효소들이 다량으로 함유되어 있으며 활성도 매우 높은 것으로 알려지고 있다. 특히 참치는 다른 어종에 비하여 그 어체가 상당히 크기 때문에 그 내장의 유문수 조직 또한 다른 것보다 수배~수십배에 달하기 때문에 경제적으로 매우 효용 가치가 높을 것으로 생각된다.

현재까지 어류의 유문수를 비롯한 체장, 위 및 근육으로부터 효소를 추출하여 그 특성을 검토하여 왔으나 아직까지 실용적으로 이용되지 못하고 있다. 그 이유로서 Simpson과 Haard^{11,12)}는 어류 유래 효소가 육상동물의 소 유래의 것보다 낮은 온도에서의 높은 활성, 중~알칼리 영역에서의 높은 활성, 활성화 에너지가 낮은 점 등의 잇점이 있지만, 안정성이 약하다는 단점을 지적한 바 있다. 그리고 아직 어류로부터 추출한 단백질 분해효소가 지금까지 산업적으로 널리 이용되지 못한 것은 그 동안 육상 유래의 효소에 비해 연구가 덜 이루어져 그에 대한 정보가 매우 제한적이며, 산업적으로 이용 가능한 양의 원료 회수가 어렵고 안정성이

낮기 때문인 것으로 추측된다.

우리나라는 참치 가공기술의 발달로 많은 양의 참치 내장이 부산물로서 생성되고 있다. 따라서 참치 내장 중 유문수 조직으로부터 단백질 분해효소를 추출하고 이것을 부분 정제하여 조효소로서 제조하게 되면, 이는 수산가공폐기물로부터 우수한 활성을 가진 효소를 값싸게 대량으로 얻을 수 있을 뿐만 아니라 폐기물의 재활용 및 고부가가치화, 환경오염 방지라는 측면에서 매우 큰 효과를 거둘 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 참치 유문수로부터 단백질 분해효소를 추출하여 부분 정제함으로써 얻어지는 참치 유문수 유래 조효소에 대하여 그 특성을 검토하고, 아울러 효소의 효율적 이용 방안으로서 효소의 열안정성을 높이고자 몇 종류의 담체에 물리적 흡착법으로 고정화시켜 제조한 고정화 효소에 대하여 열안정성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

조효소의 추출에 사용하기 위한 참치 유문수(tuna pyloric caeca)조직은 (주)동원산업으로부터 제공받아 -60°C 에서 저장하여 두고 사용하였으며, 참치 유문수 조효소에 대한 대조구로서 사용된 시판 효소인 α -chymotrypsin(EC 3. 4. 21. 1; from bovine pancreas, Type II), papain(EC 3. 4. 21. 2; from papaya latex, Type IV), trypsin(EC 3. 4. 21. 4; from bovine pancreas, Type II), pronase E(from *Streptomyces griseus*, Type XIV) 및 pepsin(EC 3. 4. 23. 1; from porcine stomach mucosa) 등은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다. 그리고 효소활성 측정에 사용된 천연기질인 Hammarsten casein은 Merck Co. 제품을, hemoglobin은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다. 또한 합성기질인 BTEE(benzoyl-L-tyrosine ethyl ester), ATEE(acetyl-L-tyrosine ethylester), BAPNA(benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide), BAEE(benzoyl-L-arginine ethylester)는 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다. 고정화 담체로는 키틴, 키토산, Chitopearl, CM-Cellulose 및 DEAE-Cellulose를 사용하였다. 그 외 분석에 사용된 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

2. 참치 유문수 유래의 조효소 추출

참치 유문수(2kg, 수분함량 82.66%)로부터의 조효소 추출은 Fig. 1에서 나타낸 것과 같이, 먼저 참치 유문수를 잘게 자른 후 완충용액(20mM Tris-HCl buffer containing 5mM CaCl₂, pH 7.0)을 2배 가량 첨가하여 균질기(Ace homogenizer, Nessei AM-7)로 10,000rpm에서 2분동안 2회 반복하여 균질화시켰다. 이것을 40°C 항온수조에서 3 시간동안 활성화시킨 후, 원심분리(9,500×g, 20분)하여 얻어진 상층액에 동량의 아세톤을 첨가하여 2°C 냉장실에서 6시간 동안 방치하여 두고 침전물을 얻었다. 이것을 다시 원심분리(2,370×g, 10분)하여 얻어진 침전물에 동량의 50% 아세톤을 첨가하여 원심분리(2,370×g, 10분)한 후 침전물을 다시 얻었다. 회수된 단백질에서 불용성 단백질 부분을 제거하기 위하여 동량의 증류수를 첨가하여 원심분리(9,500×g, 10분)한 후 그 상층액을 동결건조하여 -20°C에 저장하여 두고 참치 유문수 유래의 조효소(TPCCE; tuna pyloric caeca crude enzyme)로 사용하였다.

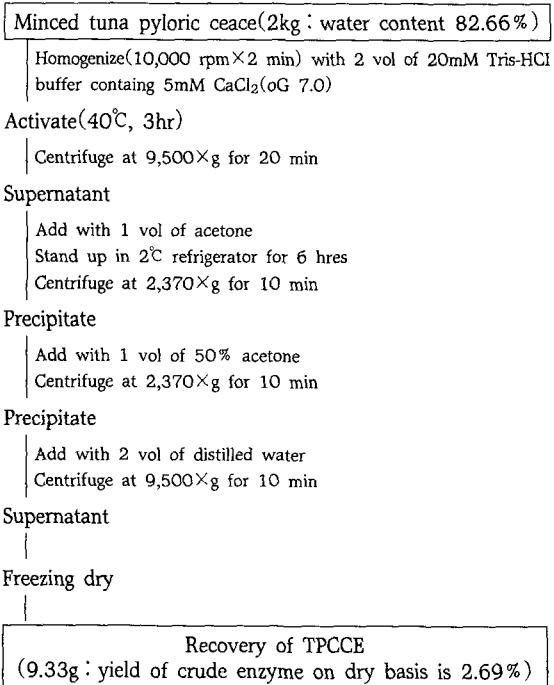


Fig. 1. Schematic procedure for the extraction of crude enzyme from tuna pyloric caeca(TPCCE).

3. 조효소의 활성 측정

3-1. 천연기질에 대한 활성 측정

천연기질인 Hammarsten casein에 대한 TPCCE의 고유활성(specific activity)은 Anson¹³⁾의 방법에 따라 효소와 기질을 반응시켰고, 유리되는 tyrosine을 Lowry 등¹⁴⁾의 방법으로 측정하였다. 즉 기질용액은 2g의 casein에 0.1M 인산화나트륨 완충액(pH 7.0)을 50ml 가하고 100°C의 항온수조에서 5분간 가열하여 동일 완충용액으로 100ml로 정용하여 제조(2% casein 용액)하였다. 반응액(완충액 1.5 ml + 기질용액 0.5ml)에 0.5ml의 효소용액을 가하여 반응(40°C, 20분)시킨 후, 2.5ml의 5% TCA용액을 가하여 반응을 정지시키고 실온에서 30분간 방치한 다음, 원심분리(1,500×g, 10분)하였다. 이 원심분리한 상층액 1ml를 취하여 2.5ml의 0.55M Na₂CO₃를 가하고 3배 희석한(w/v) Folin-phenol reagent 0.5ml를 첨가하여 실온에서 30분간 정치시킨 다음, 660nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 계산하였다. 효소의 활성도는 주어진 반응조건에서 1mg의 효소단백질이 반응시간(분)당 1μmole의 tyrosine을 유리시키는 양을 1unit(U)라 하고 고유활성(U/mg-protein)으로 나타내었다. 본 실험에서 고유활성의 계산은 다음식에 따랐다.

$$\text{고유활성(U/mg-protein)} = \frac{\text{흡광도(660nm)} \times 0.4128 \times \text{희석비}}{\text{분} - \text{반응시간/mg-protein}}$$

(단, 0.4128은 유리 tyrosine의 양과 흡광도(660nm)간의 관계식에서 구한 기울기)

또한 hemoglobin에 대한 고유활성의 측정은 0.06M 염산으로 2% hemoglobin 용액(pH 3.0)을 조제한 후, casein에서의 동일한 방법으로 실시하였다.

3-2. 합성기질에 대한 활성

측정 합성기질에 대한 활성은 trypsin과 α-chymotrypsin에 대한 합성기질을 사용하여 측정하였다. Trypsin에 대한 합성기질인 nitroanilide에 대한 반응성은 BAPNA에 대한 반응활성으로 나타내었고, Erlanger 등¹⁵⁾의 방법으로 측정하였다. 즉, 100mM Tris-HCl(pH 8.0)용액으로 만든 0.5mM BAPNA 950μl와 효소용액 50μl를 반응혼합액으로 하고 30°C에서 5분간 반응시켰을 때, 유리되어 나오는 p-

nitroanilide의 양을 분광광도계 파장 410nm에서 측정하였다. 이때의 효소활성 단위는 30°C에서 반응시간(분)당 유리되어 나오는 p-nitroanilide 1μmole을 효소단위 1unit로 표기하고, 다음 식으로 고유활성을 계산하였다.

$$\text{고유활성(U/mg-protein)} = \frac{\text{흡광도(파장, 410nm)} / \text{분} \times 1000 \times \text{회석비}}{8800 \times \text{단백질 농도(mg/ml)}}$$

(단, 8800은 p-nitroanilide의 흡광 계수임)

Ester 기질에 대한 분해활성은 BAEE에 대하여 다음과 같이 측정하였다. 100mM Tris-HCl(pH 8.0)용액으로 만든 0.5mM BAEE 950μl와 효소용액 50μl를 혼합하여 30°C에서 5분간 반응시켰을 때, 유리되어 나오는 benzoyl-L-arginine의 양을 파장 253nm에서 측정하여 다음과 같은 식으로 그 고유활성을 계산하였다.

$$\text{고유활성(U/mg-protein)} = \frac{\text{흡광도(파장, 253nm)} / \text{분} \times 1000 \times \text{회석비}}{1048 \times \text{단백질 농도(mg/ml)}}$$

(단, 1048은 benzoyl-L-arginine의 흡광계수임)

α-Chymotrypsin에 대한 합성기질로서 사용된 ester 기질에 대한 반응성은 BTEE와 ATEE에 대한 분해활성으로 측정하였으며, BTEE는 Hummel(1959)의 방법으로 측정하였다. 즉 25.6%의 methanol을 함유한 100mM Tris-HCl 염산(pH 8.0)용액으로 만든 0.5mM BTEE 950μl와 효소용액 50μl를 반응혼합액으로 하여 30°C에서 5분간 반응시켰을 때, 유리되어 나오는 benzoyl-L-tyrosine의 양을 256nm에서 측정하여 다음 식으로 그 고유활성을 계산하였다.

$$\text{고유활성(U/mg-protein)} = \frac{\text{흡광도(파장, 256nm)} / \text{분} \times 1000 \times \text{회석비}}{964 \times \text{단백질 농도(mg/ml)}}$$

(단, 964는 benzoyl-L-tyrosine의 흡광계수임)

ATEE에 대해서는 BTEE 측정에서와 같은 반응조건으로 측정하였으며, ATEE에 대한 분해활성은 반응 중에 유리되어 나오는 acetyl-L-tyrosine을 238nm에서 측정하여 다음 식으로부터 계산하였다.

$$\text{고유활성(U/mg-protein)} = \frac{\text{흡광도(파장, 238nm)} / \text{분} \times 1000 \times \text{회석비}}{2250 \times \text{단백질 농도(mg/ml)}}$$

(단, 2250는 acetyl-L-tyrosine의 흡광계수임)

3. 가수분해도 측정

가수분해도(degree of hydrolysis; DH)는 천연기질인 casein 1g을 완충액 100ml에 분산시켜 1% 기질용액으로 하여 40°C에서 1시간 반응시켰으며, 첨가된 효소량은 기질 대 효소비가 100:1이 되도록 하였다. 반응이 종료한 반응혼합물에서 2ml를 취하고 여기에 20% TCA를 동량 첨가하여 원심분리(2,370×g, 5분)한 다음, 상층액의 일정량을 취하여 Lowry 법¹⁴⁾으로 10% TCA 가용성 질소량을 측정할 후 다음 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

$$\text{가수분해도(DH), \%} = \frac{10\% \text{ TCA 가용성 질소량}}{\text{총질소량}} \times 100$$

4. Casein의 가수분해를 위한 TPCCE의 최적활성 조건

천연기질인 casein에 대한 TPCCE의 pH효과는 1% 기질 농도에 효소를 기질 대 효소비가 100:1(w/v) 되도록 첨가한 후 40°C에서 반응을 진행하였으며, 이때 용액으로써 pH의 변화를 위해 0.1M glycine-HCl(pH 3.0~4.0), 0.1M sodium acetate-acetic acid(pH 5.0~6.0), 0.1M disodium hydrogenphosphate-sodium dihydrogen phosphate(pH 7.0), 0.1M Tris-HCl(pH 8.0~9.0), 0.1M sodium carbonate-sodium bicarbonate(pH 10.0~12.0)를 각각 완충용액으로 하여 최적 pH를 검토하였다. 최적온도의 검토는 30°C에서 70°C까지 온도를 변화시켜서 가수분해도를 측정하여 수행하였다. 최적반응시간은 검토된 최적 pH 및 온도조건 하에서 1, 4, 8, 12, 24 및 48시간동안 반응시킨 후 가수분해도를 검토하여 결정하였다. 또한 시판 단백질 분해효소인 papain(12 units/mg solid), α-chymotrypsin(38 units/mg solid), pronase E(5.5 unit/mg solid)를 각각의 최적조건에서의 casein을 가수분해시켜 TPCCE와 가수분해도를 비교하였다.

5. TPCCE의 고정화

참치유문수로부터 추출한 TPCCE의 고정화는 Kise 등¹⁶⁾

의 방법을 이용하였다. 즉 각 담체 100mg과 효소 10mg에 증류수 0.4ml를 첨가하여 4°C에서 12시간 방치시킨 후 여과하여 여러차례 반복 세척하여 고정화된 TPCCE를 얻었으며, 여과액은 100ml되게 정용하여 Lowry법¹⁴⁾으로 단백질량을 측정하고 이로부터 담체에 흡착된 조효소의 고정화율을 계산하였다.

6. 고정화 효소의 활성 측정

고정화 효소를 이용하여 trypsin과 α -chymotrypsin의 합성기질에 대한 활성측정은 앞에서 서술한 것과 같은 방법(3-2항)으로 측정하였고, 이때 유리 상태의 TPCCE와 비교하였다.

7. 고정화 효소의 열안정성

고정화 효소의 열안정성은 효소를 미리 60°C에서 1~7일간 저장하여 두고 일정시간 경과 후 casein에 대한 가수분해도를 측정하여 잔존활성으로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. TPCCE의 활성

천연기질인 casein(pH 7.0)에 대한 참치 유문수 유래 조효소(TPCCE)의 고유활성을 시판 단백질 분해효소(α -chymotrypsin, papain, protease, trypsin 및 pronase E)와 비교한 결과(Fig. 2), TPCCE의 고유활성은 약 0.54 U/mg으로서 α -chymotrypsin 및 pronase E보다는 낮았지만, papain보다는 높았으며 trypsin과는 유사한 활성을 보였다. TPCCE가 대체로 시판 효소보다 활성이 낮은 이유는 TPCCE가 참치 유문수로부터 단지 부분정제만 행한 조효소의 상태이므로 효소반응을 저해할 수 있는 지방이 일부 함유되어 있다는 사실과 또한 TPCCE의 효소반응 측정시 최적 조건이 아닌 일반적인 조건에서 실시하였기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 trypsin의 활성과 유사한 것으로 보아 중성~알칼리성 영역에서 활성을 가지는 효소가 다량으로 존재함을 알 수 있었다. 한편 hemoglobin을 기질로 하여 산성영역에 대한 TPCCE의 활성 측정에서 시판 효소인 pepsin보다 활성이 약간 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 사실은 참치 유문수에서 추출한 조효소에는 산성영역에서도 활성을 가진 효소가 다소 존재하고 있음을 알 수 있었다.

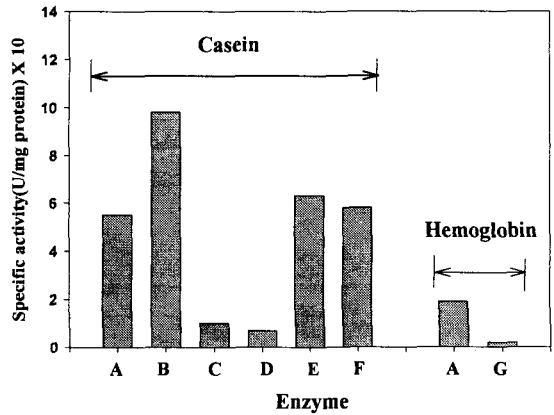


Fig. 2. Comparison of specific activities of TPCCE and commercial proteinases for natural substrates, casein and hemoglobin. The mixture of 0.5ml substrate solution (concentration 2%), 1.5ml phosphate buffer solution (pH 7.0) and 0.5ml enzyme solution (200 μ g/ml) was incubated at pH 7.0 and 40°C for 20 min. A: TPCCE, B: pronase E, C: papain, D: protease, E: trypsin, F: α -chymotrypsin, G: pepsin.

森下 등⁵⁾은 양식산 방어, 갯장어, 무지개 송어 및 은어의 각 장기 중에 분포하는 단백질 분해효소의 활성을 측정한 결과, 위장에서 분리한 것은 산성 측에서, 유문수와 소화관에서 분리한 것은 알칼리 측에서 높은 활성을 보인다고 보고하였으며, Ooshiro⁶⁾는 고등어 유문수 조직 중에 분포하는 알칼리성 단백질 분해효소를 정제하여 그 효소적 특성을 보고하였고, Murakami와 Noda⁷⁾는 정어리 유문수에서 3종의 알칼리성 단백질 분해효소를 분리 정제하여 효소적 특성을 보고하였다. 그리고 Simpson 과 Haard¹⁷⁾은 대구의 유문수로부터 추출한 trypsin을 이용하여 산업적 응용을 시도한 바 있다.

어류 유래의 trypsin이 육상 유래 trypsin보다 가장 특징적인 것은 낮은 온도에서 서식하는 어종에 대해서는 낮은 온도조건의 반응용액에서 높은 활성을 보이지만, 낮은 pH 영역에서의 pH 안정성과 높은 온도에서의 열안정성이 낮다는 것이다^{11,12,18,19)}. 어류 유래의 chymotrypsin은 어류 유래의 trypsin과 같이 육상 유래 chymotrypsin보다 산성영역에서 낮은 pH 안정성을 보이지만²⁰⁾, 연어로부터 추출한 chymotrypsin은 소 유래의 것보다 formaldehyde에 의

한 불활성화에 좀더 안정하며, 곰팡이 chymotrypsin은 소 유래의 것보다 단백질의 가수분해에서 좀 더 광범위한 특성을 가지고 있으며, plastein반응에서 methionine을 효율적으로 결합시키는 특성을 가지고 있다²¹⁾.

이와 같이 어류 유래 단백질 분해효소는 몇가지 점에서 유리하지만 안정성이 낮다는 것이 큰 결점으로 지적되고 있어, 이를 활용하기 위해서는 안정성의 개선이 요구되고 있다.

한편, TPCCE의 합성기질에 대한 활성을 측정한 결과 (Fig. 3), α -chymotrypsin의 합성기질에 대한 활성보다 trypsin의 ester 합성기질인 BAEE에 대한 활성(2.694U/mg)이 가장 높게 나타났다. 따라서 참치 유문수 유래 조효소에는 trypsin의 ester 합성기질에 특이적인 활성을 나타내는 trypsin-like enzyme이 많이 함유되어 있음을 알 수 있다.

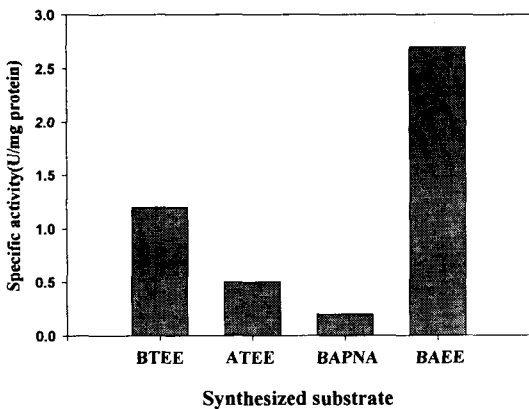


Fig. 3. Specific activities of TPCCE for synthesized substrates. BTEE : benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, ATEE : acetyl-L-tyrosine ethylester, BAPNA : benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide, BAEE : benzoyl-L-arginine ethylester.

어류 유문수 유래의 효소에 관한 연구를 살펴보면, Uchida 등⁹⁾에 의한 연어로부터, Simpson 등⁹⁾에 의한 북태평양 대구로부터, 그리고 Pyeun 등¹⁰⁾에 의한 3종의 참치로부터 각각 효소를 추출한 것이 있는데, 이들은 대부분 trypsin 혹은 trypsin-like enzyme의 특성에 대하여 보고하였다.

2. Casein의 가수분해도에 미치는 TPCCE의 최적활성 조건

천연기질인 casein의 가수분해에 대한 최적 pH조건(Fig. 4)에서는 중성부근인 pH 6에서부터 활성이 증가하기 시작하여 약알칼리 영역인 pH 10에서 가장 높은 활성을 보였다. 그러나 pH 6이하의 산성영역 및 pH 10 이상의 알칼리 영역에서는 급격한 활성감소를 보였다.

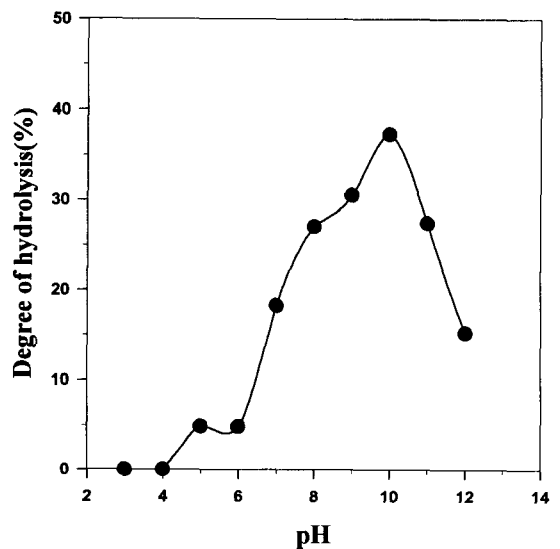


Fig. 4. Effect of pH on the hydrolysis of casein by TPCCE. The enzymatic hydrolysis conditions were substrate concentration 1%, enzyme to substrate ratio 1 : 100(v/w), temperature 40°C and incubation time 1hr.

Kim 등(1986)은 정어리와 고등어의 횡장에서 추출한 단백질 분해효소의 최적 pH는 각각 9.8과 9.0인데 비하여 유문수에서는 10.0과 9.4으로서, 유문수 조직에서의 것들이 약간 높은 pH영역에서 최적활성을 보였다고 보고하였다. Simpson 등⁹⁾은 북태평양 대구의 유문수로부터 추출한 trypsin은 pH 7.5에서 최적활성을 보였으며, 알칼리 영역의 pH(7.0~10.0)에서 비교적 안정하였다고 보고한 바 있다.

어류의 근육에서 유래한 단백질 분해효소를 보면, Bracho와 Haard²²⁾는 일반적으로 pH 8.0에서 최적활성을 보인다고 보고하였고, Doke와 Ninjoor²³⁾도 잉어와 새우로부터

터 pH 8.0에서 최적활성을 보이는 단백질 분해효소를 추출하여 보고한 바 있다. 이상과 같은 결과들은 단백질 분해효소가 분포한 어류의 조직에 따라 최적 pH는 다르며, 유문수로부터 추출하였을 때 최적 pH는 가장 높다는 것을 알 수 있다.

최적 온도에 대한 검토(Fig. 5)에서는 45°C에서 최대활성을 나타내었으며 온도가 50°C까지 최대활성의 60% 이상을 유지하다가 그 이후부터 급격하게 감소하기 시작하여 60°C에서의 TPCCE의 활성은 거의 저해되었다.

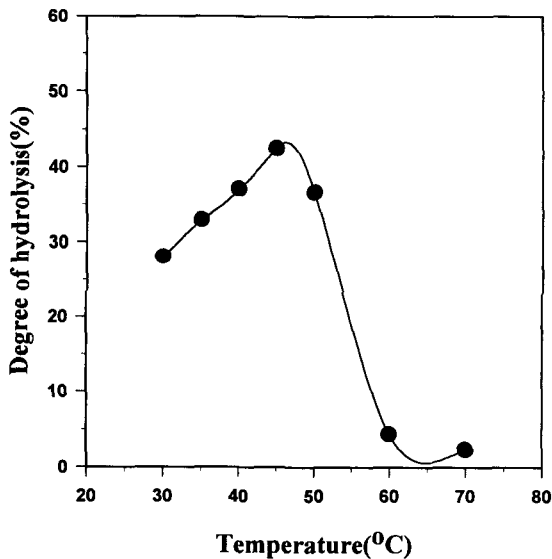


Fig. 5. Effect of temperature on the hydrolysis of casein by TPCCE. The enzymatic hydrolysis conditions were substrate concentration 1%, enzyme to substrate ratio 1 : 100(v/w), pH 10.0 and incubation time 1hr.

어류의 유문수로부터 추출한 단백질 분해효소의 최적 온도는 대부분 40~50°C에서 최적활성을 나타내는 것으로 알려져 있다^{6,9,23}. 근육으로부터 추출한 단백질 분해효소의 경우에는, Doke와 Ninjoor²⁴는 새우 유래의 효소는 60°C라고 보고하였고, Makinodan과 Ikeda²⁵는 잉어 유래의 효소는 65°C라고 보고한 바 있다. 그리고 Iwata²⁶는 담수어 4종, 해산어 21종 및 포유동물 2종으로부터 추출한 단백질 분해효소의 최적 온도의 경우, 근육 유래는 60~65°C이고,

내장 조직 유래는 45~55°C였다고 보고하였다. 이와 같은 결과를 종합하여 보면, 어류의 유문수 유래 단백질 분해효소는 근육 유래의 것보다 최적 활성온도가 10~15°C 낮은 것을 알 수 있다. 한편, Ramakrishna 등²¹은 casein과 bovine serum albumin(BSA)을 기질로 하여 곱상어와 소 유래의 chymotrypsin으로 각각 37°C와 35°C에서 단백질을 분해할 경우, 곱상어 유래 chymotrypsin이 좀더 높은 활성을 보였으며, 또 soy protein isolate를 기질로 하여 가수분해할 때는 검토된 3가지 온도조건(5, 20 및 35°C) 모두에서 어류 유래의 효소가 훨씬 높은 가수분해도를 나타내었다고 보고하였다. Simpson과 Haard^{11,12}는 어류 유래 효소가 소 유래 효소보다 낮은 온도조건에서 높은 활성을 보인다고 하여 어류 유래의 효소의 잇점을 밝힌 바 있다.

Casein 기질에 대하여 시간변화에 따른 가수분해도(Fig. 6)는 TPCCE를 사용하였을 경우 반응시간 4시간까지 가수분해도가 71%로 급격하게 증가하였으나 그 이후는 완만한 증가를 보여 48시간 반응에서 약 88%의 가수분해를 보였다. 이러한 결과는 시판 효소인 pronase E, α-chymotrypsin 및 papain보다도 각각 3%, 8% 및 27% 높은 것이었다.

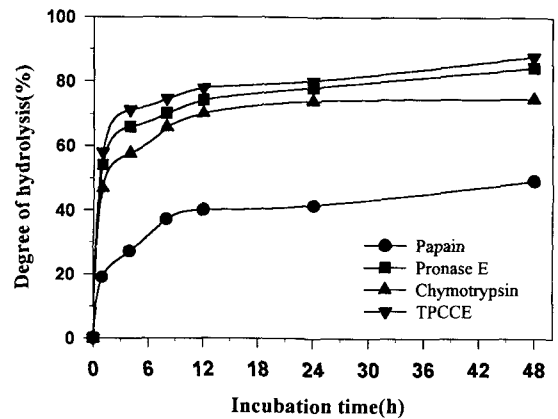


Fig. 6. Comparing to TPCCE and commercial proteinase with the degree of hydrolysis for casein on incubation time course. The enzymatic hydrolysis conditions were substrate concentration 1%, enzyme to substrate ratio 1 : 100(v/w), temperature 40°C and pH 10.0.

이상의 결과를 보면, 비록 TPCCE가 부분 정제된 조효소

의 상태이지만, 많은 종류의 단백질 분해효소를 가지고 있기 때문에 시판 정제효소 이상으로 높은 활성을 보였으며, 참치 유문수의 원료 확보 및 추출 수율을 고려해 볼 때 충분히 이용 가능할 것으로 판단된다.

3. TPCCE의 고정화 및 고정화 효소의 활성

효율적인 고정화 효소를 제조할 목적으로 TPCCE에 대한 고정화율을 담체의 종류에 따라 효소의 고정화 정도를 알아보기 위하여 키틴, 키토산, Chitopearl, CM-Cellulose 및 DEAE-Cellulose를 사용하였으며, 이중 Chitopearl과 DEAE-Cellulose가 각각 76.5%와 78.2%로서 비교적 높은 고정화율을 나타내었고, 키틴, 키토산 및 CM-Cellulose의 순으로 60~70%의 고정화율을 나타내었다(Fig. 7).

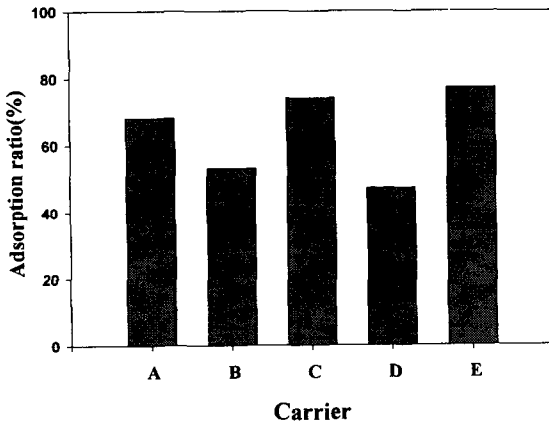


Fig. 7. Adsorption ratio of the immobilized enzymes prepared with TPCCE and various carriers using physical adsorption method. The amounts of carriers and enzymes were 100mg and 10mg, respectively. The adsorption ratio of the immobilized enzyme was calculated as the ration of the amount of protein in solution before and after the immobilization. A : chitin, B : chitosan, C : Chitopearl, D : CM-Cellulose, E : DEAE-Cellulose.

고정화 효소의 합성기질에 대한 활성을 고정화시키지 않은 유리 상태의 TPCCE와 비교한 결과(Fig. 8), trypsin의 ester 합성기질인 BAEE에 대한 활성은 TPCCE가 2.69 U/mg인데 비하여 키틴은 2.46U/mg, DEAE-Cellulose는 2.35U/mg, 키토산은 2.29 U/mg, Chitopearl은 2.12 U/mg 그리고

CM-Cellulose는 1.78 U/mg이었다. 따라서 CM-Cellulose를 제외한 나머지 담체에 고정화시킨 TPCCE는 모두 유리 TPCCE와 비교하여 약 80%의 활성을 유지하였다.

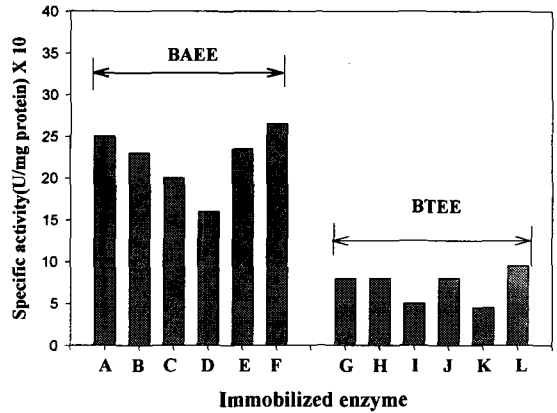


Fig. 8. Specific activities of TPCCE immobilized on various carriers. A,G : chitin, B,H : chitosan, C,I : Chitopearl, D,J : CM-Cellulose, E,K : DEAE-Cellulose, F,L : TPCCE.

α -Chymotrypsin의 ester 합성기질인 BTEE에 대한 활성은 유리 상태의 TPCCE가 1.10U/mg이었고, 키토산은 0.89 U/mg, 키틴은 0.88 U/mg, CM-Cellulose는 0.86 U/mg, Chitopearl은 0.60 U/mg 그리고 DEAE-Cellulose는 0.55 U/mg이었으며, 키토산, 키틴 및 CM-Cellulose의 고정화 효소는 유리 TPCCE보다 약 80% 이상을, 그리고 Chitopearl과 DEAE-Cellulose에서는 50% 이상의 활성을 보였다. 이와 같은 결과에서 보면, TPCCE는 물리적 흡착법에 의하여 고정화시켰을 때 비교적 높은 흡착율과 낮은 활성 감소율을 보였으며, 특히 키틴을 담체로 사용하였을 때 가장 효과적으로 나타나 이를 이용한 TPCCE의 고정화 효소 제조는 보다 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

4. 고정화 효소의 열안정성

TPCCE 및 고정화 효소를 60°C에서 7일동안 저장하여 두고 효소의 열안정성을 casein 기질에 대한 가수분해도로 측정하여 잔존활성으로 나타낸 결과(Fig. 9), 60°C에서 TPCCE는 저장 하루만에 활성이 약 15%가 감소하기 시작하였으며 7일간 저장한 후의 잔존활성은 약 60% 이하였다.

그러나 고정화 효소에서는 담체로서 Chitopearl을 사용한 것을 제외한 나머지 키틴, 키토산, CM- 및 DEAE-Cellulose에서는 저장온도 60°C에서 7일간 저장한 후에도 그 활성은 약 90% 정도 유지하였다. 특히 DEAE-Cellulose를 사용한 고정화 효소는 가장 높게 나타났으며, 7일이 경과한 후에도 그 활성은 거의 95%를 유지하여 열에 대단히 안정한 것으로 나타났다. 따라서 유리의 TPCCE는 고정화 효소보다 단백질의 가수분해 활성은 높았으며, 이를 DEAE-Cellulose나 키틴 등으로 고정화시켰을 때 60°C의 비교적 높은 온도에서 7일간 저장한 후에도 그 활성이 90% 이상 유지하였다. 이와 같은 결과로 볼 때, 고정화 효소는 장시간 효소반응을 진행할 경우에 더욱 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

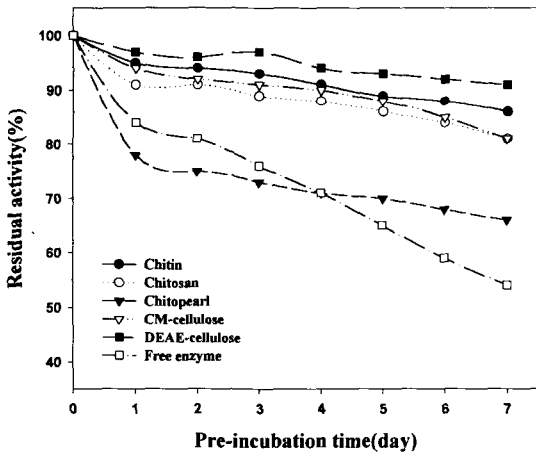


Fig. 9. Comparison of the thermostabilities of TPCCE and commercial enzymes immobilized on various carriers according to pre-incubation time at 60°C. The hydrolysis reactions for casein were carried out under respective optimal conditions with enzymes which were taken out from incubator(60°C) after proper pre-incubation time.

어류 유래의 단백질 분해효소가 육상동물 유래의 것보다 여러 가지 유리한 측면을 지니고 있으나, 가장 큰 결점으로 열안정성이 매우 낮다는 것이 지적된 바 있다^{11,12)}. 이러한 사실은 이들 효소가 산업적으로 응용되기 위해서는 반드시 열안정성을 개선해야 할 필요성이 요구된다는 것이다. 이를

위해 사용될 수 있는 것이 바로 고정화 효소의 제조인데, 여기에서 시도된 물리적 흡착법의 이용은 단순한 제조공정 및 낮은 활성감소로 인해 유리할 뿐만 아니라 열안정성도 크게 개선되었다는 점에서 그 효과가 크게 기대된다.

요 약

수산가공공장에서 원료여 처리시 생성되는 부산물인 참치 내장중 유분수 조직으로부터 높은 활성을 가진 단백질 분해효소를 추출하고, 이것을 부분 정제하여 참치 유분수 유래 조효소(TPCCE)를 대량으로 제조하였다. 제조된 TPCCE에 대한 최적활성조건을 규명하였으며, 아울러 시판 정제 단백질 분해효소들과 비교하였다. 또한 TPCCE의 열안정성을 높이고자 몇가지 종류의 담체에 물리적으로 흡착시켜 제조한 고정화 효소의 열안정성을 검토하였다.

1. 참치 유분수 조직으로부터 높은 활성을 가진 단백질 가수분해효소를 부분정제하여 조효소 상태를 추출하였으며 이때의 수율은 약 2.7% 정도로 매우 높았다. 활성은 천연 기질인 카제인에 대하여 0.54 U/mg이었고, 합성기질인 BTEE와 BAEE에서는 각각 1.10과 2.69 U/mg로서 시판 정제효소인 trypsin과 유사한 활성을 나타내었다.

2. 참치유분수 유래 조효소의 천연기질인 casein에 대한 가수분해의 최적조건은 pH 10.0, 반응온도 45°C, 반응시간 12시간이었으며, 이 때의 가수분해도는 약 80%였다.

3. 참치 유분수로부터 추출된 조효소를 여러 가지 담체에 고정화시켰으며 이용된 담체중에서 고정화율은 Chitopearl, DEAE-Cellulose 및 키틴 순으로 가장 높았으며(70~80%), 합성기질인 BAEE에 대한 활성은 키틴, DEAE-Cellulose 및 키토산 고정화 효소의 순서로 각각 2.46 U/mg, 2.35U/mg, 및 2.29 U/mg이었고, BTEE에 대한 활성은 키토산, 키틴, CM-Cellulose의 순서로 각각 0.89 U/mg, 0.88 U/mg 및 0.86 U/mg이었다. 이 중 키틴 고정화 효소가 모든 조건에서 충분한 효과를 보여 가장 효율적으로 나타났다.

4. 고정화 효소의 열안정성에서 대부분의 고정화 효소는 유리 TPCCE보다 높은 열안정을 보였으며, 특히 DEAE-Cellulose를 이용한 고정화 효소는 60°C의 높은 온도에서 7일이 경과한 후에도 약 95%의 활성을 유지하여 장시간의 효소 반응공정이나 고정화 효소를 이용한 컬럼 반응에서의

연속적 단백질 가수분해물 생성과 같은 공정에서 매우 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Yoshinaka, R., Sato, M. and Ikeda, S. : Distribution of trypsin and chymotrypsin and their zymogens in digestive system of catfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 1615-1618(1981).
2. Smith, L. S. : Digestive functions in teleost fishes, In *Fish Nutrition*, (ed. J. E. Halver). pp. 387-389, Academic Press, Inc., New York (1989).
3. Chen, C. S., Tsao, C. Y. and Jiang, S. T. : Purification and characterization of proteases from the viscera of milkfish (*Chanos chanos*). *J. Food Biochem.*, **12**, 269-288(1989).
4. Kidamikado, M. and Tachino, S. : Studies on the digestive enzymes of rainbow trout - I. Carbohydrates. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **26**, 679(1960).
5. 森下達雄, 野田宏行, 北御門學, 立野新光 : 養殖魚の消化酵素について. *三重大學水産學部紀要*. **6**, 239-246 (1964).
6. Ooshiro, Z. : Studies on proteinase in the pyloric caeca of fishes - II. Some properties of proteinase purified from the pyloric caeca of mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **37**, 145-148(1971).
7. Murakami, K. and Noda, M. : Studies on proteinases from the digestive organs of sardin. Purification and characterization of three alkaline proteinase from the pyloric caeca. *Biochem. Biophys. Acta*, **689**, 17-29(1981).
8. Uchida, N., Tsukayama, K. and Nishida, E. : Purification and some properties of trypsins from the pyloric caeca of chum salmon. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 129-138(1984).
9. Simpson, B. K., Simpson, M. V. and Haard, N. F. : Properties of trypsin from the pyloric ceca of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Food Sci.*, **55**, 959-961 (1990).
10. Pyeun, J. H., Cho, D. M. and Heu, M. S. : Trypsins from the dark fleshed fish (anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore). 1. Purification and optimal reaction conditions. *J. Korean Soc. Food Nut.*, **22**, 448-457(1993).
11. Simpson, B. K. and Haard, N. F. : Purification and characterization of trypsin from the Greenland cod (*Gadus orac*). 1. Kinetic and thermodynamic properties. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **62**, 894-900(1984).
12. Simpson, B. K. and Haard, N. F. : Trypsin from Greenland cod *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, **79B**, 613-622(1984).
13. Anson, M. L. : The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Physiol.*, **22**, 79-89 (1938).
14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951).
15. Erlanger, B. F., Edel, F. and Cooper, A. G. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 206-210(1966).
16. Kise, H. and Hayakawa, A. : Immobilization of proteases to porous chitosan beads and their catalysis for ester and peptide synthesis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 584-593(1991).
17. Simpson, B. K. and Haard, N. F. : Trypsin from Greenland cod (*Gadus ogac*) as a food processing aid. *J. Applied Biochem.*, **6**, 135-143(1984).
18. Asgeirsson, B. and Bjarnason, J. B. : Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *Eur. J. Biochem.*, **180**, 85-90(1989).
19. Kolodzeiskaia, M. V. and Berezka, S. V. : Comparative study of the properties of serine proteases of lower and higher vertebrates. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, **62**, 31-37(1990).
20. Kolodzeiskaia, M. V. and Pivnenko, T. N. : Trypsin, chymotrypsin-like proteinases in fishes. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, **60**, 103-117 (1988).
21. Ramakrishna, M., Hultin, H. O. and Atallah, M. T. : A comparison of dogfish and bovine chymotrypsin in relation to protein hydrolysis. *J. Food Sci.*, **52**, 1198-1202(1987).
22. Bracho, G. E. and Haard, N. F. : Characterization of alkaline metalloproteinases with collagenase activity from the muscle of Pacific rockfish (*Sebastes* sp.). In *Proceedings of Joint Meeting of Atlantic Fisheries Technologists and Tropical/Subtropical Fisheries Technologists*, (ed. S. Otwell), pp. 105-125, Gainesville, Florida Sea Grant (1990).
23. Kim, H. R., Pyeun, J. H. and Cho, J. G. : Proteolytic enzymes distributed in the tissues of dark fleshed fish. 2. Comparison of the proteolytic activity of the tissue extracts from the intestinal organs of mack-

- rel and sardine. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **19**, 521-528(1986).
24. Doke, S. N. and Ninjoor, V. : Characteristics of an alkaline proteinase and exopeptidase from shrimp (*Penaeus indicus*) muscle. *J. Food Sci.*, **52**, 1203-1208(1987).
25. Makinodan, Y. and Ikeda, S. : Studies on fish muscle protease-II. Purification and properties of a proteinase active in slightly alkaline pH range. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **35**, 749-755(1969).
26. Iwata, K, Kobashi, K. and Hase, J. : Studies on fish muscular alkaline protease. 1. Some enzymatic properties of carp muscular alkaline protease. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **40**, 189-200(1974)