

불용성 세리신의 효소 가수분해

김정호 · 배도규
경북대학교 천연섬유학과

Enzyme Hydrolysis of Insoluble sericin

Jeong Ho Kim and Do Gyu Bae

Natural Fiber Science, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT

To hydrolyze insoluble sericin the enzyme hydrolysis was used, and then obtained the results as given belows. When insoluble sericin was hydrolyzed by enzyme treatment, the solubility was best at pH 7, 60°C and was slightly increased both above 2 hours treatment and above 10% of enzyme concentration. As the results of electrophoresis, the distribution of molecular weight of sericin powder obtained by enzyme hydrolysis was very weak and showed in the wide range having no distinguishable band. Average degree of polymerizations (A.D.P.) of sericin hydrolyzed by enzyme were about 4.1~6.3, average molecular weight were about 470~730. The whiteness of the sericin powder obtained by enzyme hydrolysis was high and increased slightly with higher treatment concentration of enzyme. As the results of amino acid analysis, the amino acid compositions of the sericin powder from the enzyme treatment were similar to that of insoluble sericin. In DSC analysis, insoluble sericin powder was found a big endothermic peak at two positions which located at near 230°C and 320°C. The peak of near 230°C could not be found in the sericin powder obtained by enzyme hydrolysis.

Key words : insoluble silk sericin, soluble silk sericin, enzyme hydrolysis, degree of polymerization

서 론

견을 섬유소재뿐만 아니라 견이 가지고 있는 고유의 장점들을 살려 여러 형태로 재가공하기 위하여 그 소재 개발을 위해 다방면에서 연구가 진행되고 있다(배, 1994). 특히 견을 가수분해하여 분말상으로 하여 다른 물질에 첨가하거나 견의 장점을 살려 여러 가공제로 사용하고 있다. 일반적으로 견을 가수분해할 때 효소를 사용하게 되면, 효소의 기질에 대한 특이성으로 인해 분자량을 조절하기가 쉽고 적절한 효소를 사용하게 되면 작은 분자량의 펩타이드도 제조할 수 있는 것으로 알려지고 있다(Chen *et al.*, 1995). 올리고 펩타이드 이하의 작은 분자량들은 섭취하였을 때 소화율도 높아(平林 등, 1991) 음식류의 첨가물 등으로 사용 가능하며, 효소의 종류에 따라 특정 말단기를 갖는 펩타이드로 조절할 수 있는 것 등이 효소분해의 특징으로 알려지고 있다. 불용성 세리신의 가수분해 방법에 따라 얻어지는 가수분해물의 특성에 대해 진보(김·배, 1999)의 산가수분해에 이어 효소가수분해 방법으로 실험을 하였다.

재료 및 방법

불용성 세리신은 진보(김·배, 1999)와 같은 방법으로 얻었다. 효소(Protease-NP, PACIFIC Co.)는 시판품을 그대로 사용하였으며, 시약은 특급 이상의 것을 사용하였다. 효소 가수분해 시 여러 조건중 용해도가 가장 높은 최적 조건을 찾기 위해 다음과 같은 실험을 하였으며 용해도는 식 (1)과 같이 구하였다.

$$\text{용해도}(\%) = \frac{\text{가수분해 전 무게} - \text{가수분해 후 불용해물의 무게}}{\text{가수분해 전 무게}} \times 100 \dots (1)$$

1. pH 변화에 따른 용해도

2g의 불용성 세리신 분말을 용비 1:50, 효소의 양은 불용성 세리신 분말의 10%, 처리온도는 70°C에서 pH별로 2시간 가수분해한 후 여과지(Advantec, No. 5C)로 불용해물을 여과·건조하여 처리전후의 무게차를 용해도로 하였다. 효소작용에 의해서만 가수분해된 정도를 파악하기

위해서 같은 조건에서 효소를 넣지 않고 처리한 구의 용해도를 제한 값을 식(1)과 같은 방법으로 구하여 pH 변화에 따른 용해도를 구했다.

2. 처리 온도에 따른 용해도

2 g의 불용성 세리신 분말을 용비 1:50, 효소의 양은 불용성 세리신 분말의 10%, pH 7, 처리온도는 55, 60, 65, 70, 75, 80°C에서 각각 2시간 가수분해하여 온도 변화에 따른 용해도를 1)과 같은 방법으로 구하였다.

3. 처리 시간에 따른 용해도

2 g의 불용성 세리신 분말을 용비 1:50, 효소의 양은 불용성 세리신 분말의 10%, 처리온도는 60°C, pH 7에서 처리시간을 각각 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3시간으로 하여 처리 시간에 따른 용해도를 1)과 같은 방법으로 구하였다.

4. 효소 농도에 따른 용해도

2 g의 불용성 세리신 분말을 용비 1:50, 효소의 양을 불용성 세리신 분말의 1, 5, 10, 20, 30%로 하여 처리온도 60°C, pH 7에서 2시간 가수분해하여 효소 농도 변화에 따른 용해도를 1)과 같은 방법으로 구하였다.

효소 가수분해시 용해조건을 고려하여 기기 분석용 시료를 다음과 같은 조건으로 효소분해하였다.

- Sericin powder : 40 g
- pH = 7
- 온도 : 60°C
- 용비 = 1:20
- 처리시간 : 3 hr.
- 효소농도 : 5, 10, 20% o.w.s.(on the weight of sericin)

가수분해 한 수용액을 여과지로 여과한 후 원심분리기(Beckman, J2-21)로 20,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 상등액을 취하여 동결건조기(ISE, Bondiro)로 48시간 동결건조 하여 분말화 하였다. 이 분말을 이용하여, SDS 전기영동, 평균 중합도, 백도, 아미노산 분석, DSC 분석을 전보(김·배, 1999)와 같은 방법으로 행하였다.

Table 1. The sample I.D. of soluble sericin obtained by various treatment conditions

Sample I.D.	Treatment concentrations of enzyme(o.w.s.)
IN	Insoluble sericin
E1	5%
E2	10%
E3	20%

결과 및 고찰

1. 효소 가수분해

일반적으로 효소는 특정 기질의 특정 반응만을 촉진한다고 알려져 있다. 이것을 효소의 기질특이성이라 한다. 자물쇠와 열쇠의 관계에 있다고 할 수 있는 효소의 특이성은 3가지 종류로 나눌 수 있는데, 유사한 일군의 기질 중 특이적으로 한 종류의 기질에만 촉매하는 경우인 절대적 특이성, 효소가 어떤 그룹의 화합물에는 우선적으로 작용하고 다른 그룹의 화합물에는 약간만 반응할 경우를 상대적 특이성, 효소가 기질의 광학적 구조의 차이에 따라 특이성을 나타내는 광학적 특이성으로 나눌 수 있다. 효소의 작용에 영향을 미치는 인자는 크게 온도와 pH로 나눌 수 있다. 효소의 작용은 다른 화학반응과 같이 온도의 상승과 더불어 반응속도가 증대되나, 효소는 그 소재가 단백질이기 때문에 변성이 시작되는 온도를 경과하면 반응 속도는 급격히 저하하며 마침내는 응고하여 활성을 잃게 된다. 이 때 최대 반응속도를 가질 때의 온도를 최적온도라고 한다. 그리고 효소는 단백질이므로 그의 성질은 pH에 따라 영향을 받는다. 극단적인 산성 또는 알칼리성이 되면 변성하여 그 활성을 완전히 상실한다. 대부분의 효소는 일정한 pH에서만 활성을 가지며, 효소활성이 가장 좋은 때의 pH를 최적 pH라 한다(김등, 1991).

본 실험에서는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 불용성 세리신에 대한 효소의 최적 가수분해 pH는 7 부근으로 나타났다. 이 효소의 불용성 세리신에 대한 분해력은 pH가 7일 때가 최적이라고 사료되어 이 pH에서 효소처리 온도에 따른 용해도를 알아보았다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이 특이하게 두 군데에서 효소의 활성이 높게 나타났다. 그러나 60°C 부근의 기울기가 75°C 부근의 기울기보다 완만하고 용해도도 높게 나타나,

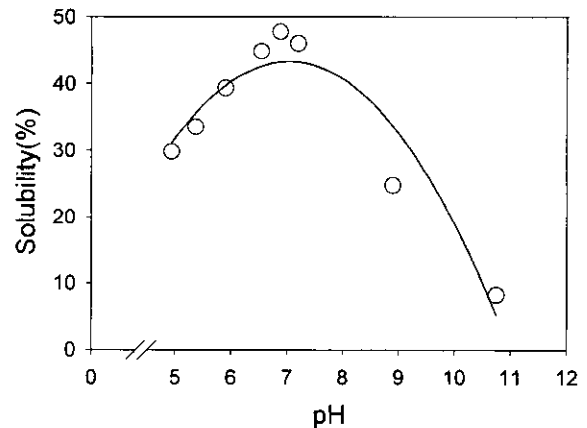


Fig. 1. The effects of pH in enzyme treatment on the solubility of insoluble sericin.

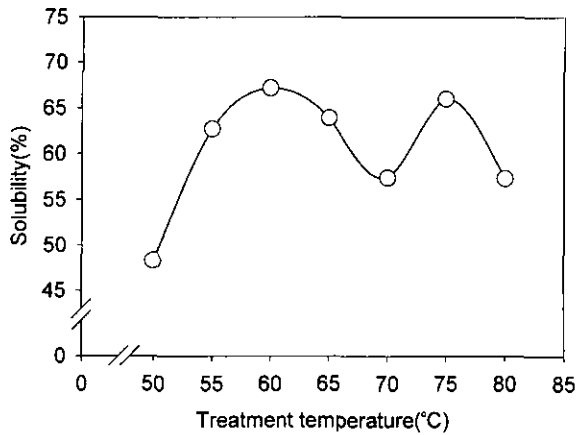


Fig. 2. The effects of temperature in enzyme treatment on the solubility of insoluble sericin.

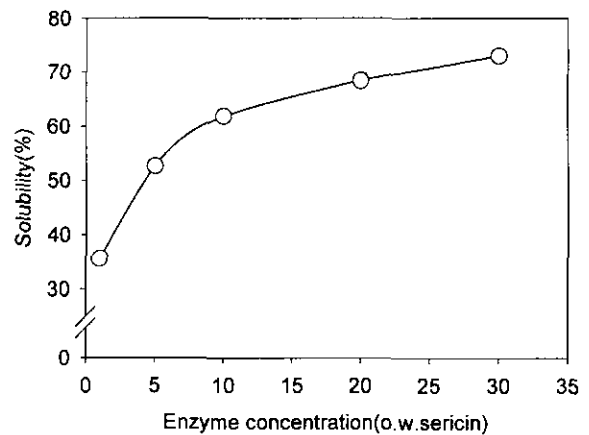


Fig. 4. The effects of enzyme treatment concentration on the solubility of insoluble sericin.

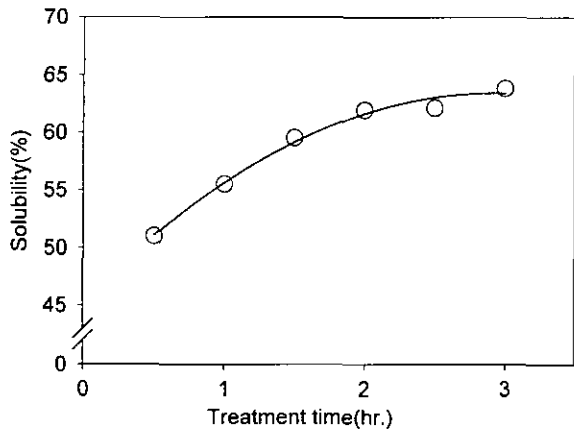


Fig. 3. The effects of time in enzyme treatment on the solubility of insoluble sericin.

이 효소의 세리신에 대한 분해력은 60°C일 때가 최적 온도라고 사료된다.

Fig. 3의 가수분해 처리시간에 따른 용해도 변화를 보면 처리 시간이 경과할수록 용해도도 증가함을 알 수 있다. 처리 시간 2시간 이후부터는 완만한 형태의 곡선으로 용해도가 증가하는 경향을 보여주고 있다. 일반적으로 효소는 단백질 기질을 분해할 때, 말단기 부분만을 절단하는 exo activity enzyme과 내부를 절단할 수 있는 endo activity enzyme로 구분할 수 있는데(정, 1996), exo형의 효소는 효소분해시 어느 정도의 분해시간을 요하는 반면에 endo형은 단시간 내에 분해가 완전히 진행되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에 사용한 효소는 endo형임에도 불구하고 분해에 많은 시간이 소요되었다. 이러한 결과는 기질이 불용성이기 때문에 일어나는 현상으로 보여진다. 기질이 불용성 덩어리 상태로 용액중에 분산되어 있는 상태에서는 효소가 기질의 표면부터 분해시킬 수밖에 없으

며 점차적으로 분해된 부분이 수용성 상태로 되어 불용성 덩어리로부터 떨어져 나오게 되면 새롭게 노출된 표면을 효소가 다시 공격하여 분해를 시키는 과정을 반복한다고 생각된다. 따라서 불용성 덩어리가 완전히 파괴되기까지는 어느 정도 시간을 요하게 되므로 비록 endo형의 효소라도 효소분해 시간이 길게되는 것으로 추론된다.

Fig. 4는 효소처리 농도가 용해도에 미치는 영향을 나타낸 것으로 효소 농도 10% 이하에서는 용해도가 급격히 증가하였지만 그 이상의 농도에서는 용해도 증가가 완만하게 나타났다. 일반적으로 효소는 적정 조건에서는 그 활성을 소실하는데 장시간을 요한다. 따라서 적정 농도 이상이면 분해정도의 차이는 크게 나타나지 않는다. 불용성 세리신의 경우 효소 농도가 약 10% 정도일 때가 적정처리 농도로 보여지며, 이는 일반적인 경우보다 높은 농도로, 아마도 앞에서 설명한 불용성 기질의 효소분해 과정과 불용성 세리신의 구조와도 관계가 있다고 사료된다.

2. SDS 전기영동

각 조건에 따라 제작된 수용성 가수분해물로 전기영동을 실시하고 그 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 효소 가수분해된 세리신의 분자량 분포는 특정한 band가 없이 전체적으로 약하게 분포되어 있으며, 크게 차이가 나지 않으나 고농도로 처리된 것일수록 분자량이 큰 쪽의 염색정도가 열리는 것으로 보여 저분자화된 것을 알 수 있었다. 전체적으로 염색정도가 약하다고 생각되어, 각 시료별로 전기영동후 일정량의 lower buffer를 수거하여 Ninhydrin 반응을 실시한 결과, 색이 발현한 것을 관찰하였다. 모든 경우에 발색하였으며, 발색정도는 아주 진하게 나타나, 아주 작은 분자량의 펩타이드나 아미노산도 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

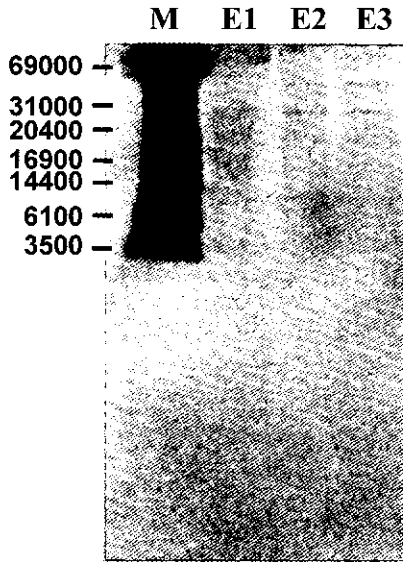


Fig. 5. 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. M : Standard protein markers(Promega, M.W.:3.5~31KDA).

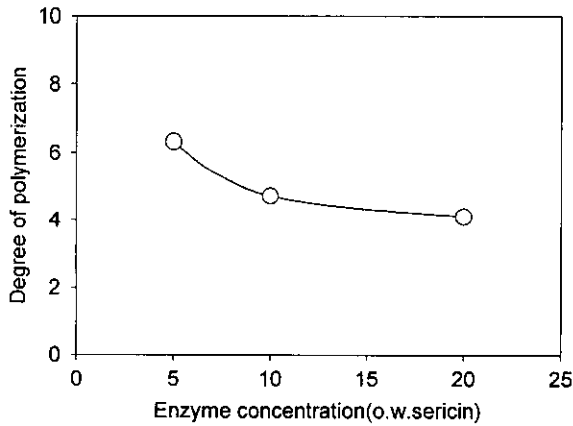


Fig. 6. The effects of the enzyme treatment concentrations on the A.D.P. of hydrolyzed sericin powders.

3. 말단기 정량에 의한 평균 중합도

효소 가수분해로 얻은 수용성 세리신의 평균 중합도를 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 효소처리 농도가 높을수록 평균 중합도는 낮게 나타났다. 효소의 양이 증가할수록 분해력도 크며 분해된 펩타이드도 더 많은 효소에 의해 계속 분해되기 때문에 중합도가 작아지는 것으로 생각된다. 평균 중합도는 6.32, 4.70, 4.09 순으로 나타났다. 평균 분자량은 전보(김·배, 1999)와 같은 방법으로 산출하여, 733, 542, 470 순으로 나타났다. 효소의 종류마다 다른 기질 특이성이 있지만, Chen등(1995)이 피브로인을 효소 가수분해하여 분자량을 측정된 결과를 보면, 처리시간이 경과할수록 분자량이 큰 펩타이드가 감소하고 분자량이 작은 펩타이드나 아미노산

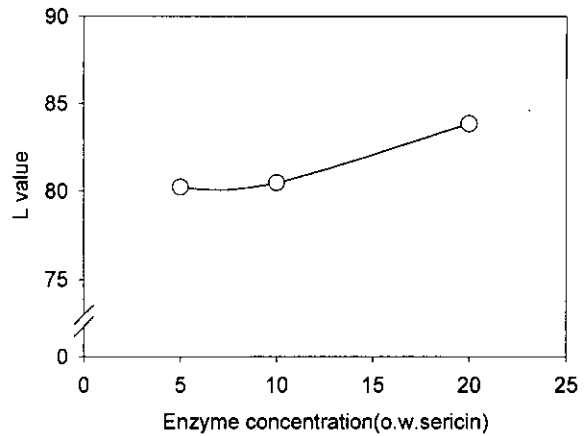


Fig. 7. The effects of enzyme treatment concentration on the whiteness of hydrolyzed sericin powders.

이 증가하는 것을 볼 수 있다고 한다. 즉 피브로인이나 세리신의 효소 가수분해시 일정한 평균 분자량의 수용액을 얻으려면 효소의 농도나 시간을 조절함으로써 어느 정도 가능할 것으로 보인다. 더 나아가 효소는 기질 특이성이 있으므로 평균 분자량뿐만 아니라 어느 특정의 말단기를 갖는 펩타이드를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

4. 백도

일반적으로 효소 가수분해는 산화를 일으키지 않으면서 가수분해할 수 있는 방법으로 알려져 있다(정, 1996). 효소 가수분해 시 백도는 Fig. 7에 나타나듯이 효소처리 농도가 증가할수록 약간 증가하지만, 그 차이는 크지 않았다. 이것은 효소의 백도가 세리신 분말의 백도보다 높아 분말 제조 시 효소에 의한 백도의 증가분으로 보인다. 효소의 백도수치는 84.42였다.

5. 아미노산 분석

Table 2의 효소 가수분해된 세리신의 아미노산 분석 결과를 보면, 전체적으로 불용성 세리신과 거의 아미노산 조성이 비슷하였다. 이는 앞서서도 고찰한 바와 같이 효소는 세리신을 분해하면서 아미노산을 파괴하지는 않고 특정 펩타이드 결합 부분만 가수분해하기 때문에 아미노산 조성에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

6. DSC 분석

수용성 세리신 분말의 열적 거동을 알아보기 위하여 DSC 분석을 행하였다. Fig. 8은 대조구인 불용성 세리신 분말과 효소 가수분해된 세리신 분말의 DSC 곡선인데 320°C 부근의 흡열 peak는 열분해에 기인하는 것으로 주로 아미노산 조성에 따라 peak가 shift 될 수 있는데 앞에

Table 2. The composition of amino acids of sericins (unit: mol%)

Amino Acid	E1	E2	E3	IN
Asp.	14.78	15.02	15.69	15.14
Thr.	9.45	9.56	10.09	9.91
Ser.	31.22	31.05	32.94	33.78
Glu.	3.48	3.46	3.50	3.37
Pro.	1.84	2.69	0.56	0.57
Gly.	16.22	16.13	16.26	16.34
Ala.	4.81	4.58	4.20	5.06
Cys.	0.36	0.36	0.30	0.24
Val.	4.20	4.08	4.02	3.76
Met.	0.65	0.72	0.53	0.40
Ile.	1.17	1.13	1.05	0.98
Leu.	1.93	1.84	1.85	1.73
Tyr.	3.36	3.27	3.30	3.97
Phe.	1.16	1.14	1.03	1.01
His.	2.25	2.07	2.00	1.59
Lys.	3.13	2.90	2.68	2.14
Arg.	0.99	0.71	0.64	0.64
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

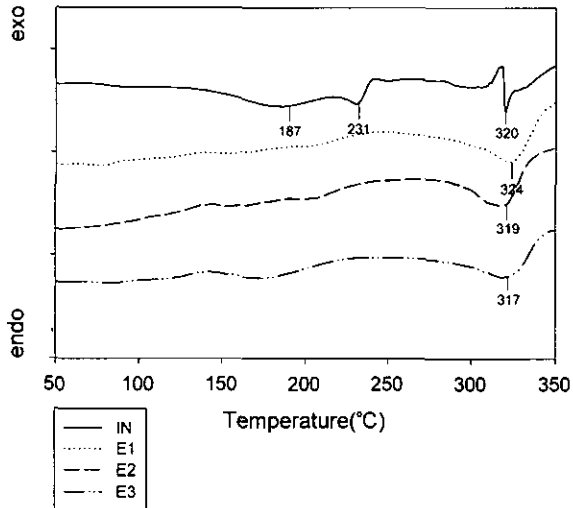


Fig. 8. DSC thermogram of sericin powders hydrolyzed by enzyme treatment depending on various concentrations.

서도 고찰된 바와 같이 효소분해는 그 특성상 분해물의 아미노산 조성을 달리하지 않기 때문에 열분해에 의한

peak 위치가 비슷한 것으로 고려된다. 한편, 대조구인 불용성 세리신에서 보이는 187°C와 231°C 부근의 흡열 peak는 열변성을 나타내는데(Kaplan *et al.*, 1994) 효소 가수분해된 시료에서는 이 열변성 peak는 나타나지 않았다. 이는 가수분해 결과로 세리신이 균일하게 저분자화 되어(평균 중합도 : 4.1~6.3) 고분자로서 갖는 성질, 특히 수소결합을 형성하지 않기 때문이라고 추론된다.

적 요

불용성 세리신의 가수분해를 위해 효소를 이용하여 가수분해시의 최적조건 및 가수분해물의 분석 결과를 다음과 같이 얻었다. 실험에 사용한 효소는 pH 7, 온도는 60°C, 처리시간은 2시간 정도가 적당하였다. 적정 조건에서 처리 효소 농도에 따른 변화를 분석한 결과 처리 농도가 높을수록 용해도가 높았으며, 전기 영동상에서는 전체적으로 염색정도가 아주 열은 분포로 나타나 저분자들이 많은 것으로 추정된다. 평균 중합도는 처리 농도가 증가할수록 낮게 나타났으며, 측정결과 6.3, 4.7, 4.1순으로 나타났다. 이를 분자량으로 환산하면 470~730 정도가 된다. 백도는 처리 농도가 증가할수록 높았으며, 아미노산 분석 결과 아미노산 함량이 불용성 세리신과 거의 흡사하게 나타났다. DSC 분석 시 열변성 피크는 나타나지 않고 열분해 피크만 불용성 세리신과 비슷한 온도에서 나타났다.

참고문헌

배도규 (1994) 실크의 非衣類用 이용, 韓蠶學誌., 36(2) : 182-185
 Chen Kaili, Umeda Yumeda and Hirabayashi Kiyoshi (1995) Enzymatic hydrolysis of silk fibroin, *J. Seric. Sci. Jpn.*, 65(2) : 131-133
 정동호 (1996) 효소학 개론, 대광서림, 159-161
 Kaplan David, Adams W. Wade, Farmer Barry & Viney Christopher (1994) *Polymers*, Maple Press, 211-221
 平林 潔, 陳 開利, 勢旗毅 (1991) 絹の食品化, 絲科學と技術., 30(1) : 42-45.
 김동주, 권통주, 양희천, 윤형식 (1991) 食品化學, 영지문화사, 168-169.
 김정호, 배도규 (1999) 불용성 세리신의 산 가수분해, 韓蠶學誌, 41(1) : 48-53.
 塩澤和男 (1991) 染色任上加工技術, 地人書館, 149-153.