

미생물을 이용한 저식염 멸치젓의 속성발효에 관한 연구 2. 젓갈에서 분리한 단백질분해효소의 열역학적 특성

車庸準 · 李應昊*

창원대학 화학과, *부산수산대학교 식품공학과

초록 : 젓갈에서 분리한 *B. subtilis* p-4와 *B. licheniformis* p-5 프로테아제의 기질(카제인)에 대한 친화도를 측정한 결과 각각 0.38mM, 0.18mM이었고 열변성에 의한 특성을 반응속도론적으로 검토한 결과, p-4 프로테아제는 50°C에서 80분 열처리할 때 20%의 잔존 활성을 보였고, p-5 프로테아제는 거의 실패되었는데 일차반응식을 따랐다. 그리고 p-4, p-5 프로테아제의 변성속도 상수는 각각 40°C에서 $12.2 \times 10^{-5}/\text{sec}$, $19.0 \times 10^{-5}/\text{sec}$, 50°C에서는 $35.7 \times 10^{-5}/\text{sec}$, $46.3 \times 10^{-5}/\text{sec}$ 였다. 또 활성화 에너지는 p-4 프로테아제가 19.6Kcal/mole, p-5 프로테아제는 15.2 Kcal/mole로 p-5 프로테아제가 열변성에 민감한 것을 알 수 있었다. 활성화 자유에너지는 p-4, p-5 프로테아제 모두 온도가 상승함에 따라 약간 증가하였는데 40°C에서 각각 23.21, 22.93Kcal/mole, 50°C에서는 23.28, 23.11Kcal/mole이었다. 아미노산 조성은 p-4 프로테아제의 경우 151개의 아미노산 잔기를 가졌으며, 이중 glycine, glutamic acid, proline이 많았고, p-5 프로테아제는 247개의 잔기에 glycine, glutamic acid, aspartic acid가 많았다(1990년 9월 13일 접수, 1990년 12월 22일 수리).

식염농도가 낮은 멸치젓을 속성 발효시킴으로써 산업적 응용 가능성을 진단하기 위하여 전보¹⁾에서는 젓갈에서 분리한 단백질분해균 및 단백질분해효소의 생화학적 특성을 조사하였다. 그러나 제조된 속성 젓갈의 저장중 품질변화를 최대한 억제하기 위해서는 젓갈중에 존재하는 미생물의 사멸이나 생성효소의 불활성화가 필요할 것으로 생각되어 본보에서는 우선 그 기초자료로서 단백질분해효소의 열변성에 의한 특성을 반응 속도론적으로 비교 검토하였다.

재료 및 방법

단백질분해효소

전보¹⁾의 시중 멸치젓에서 분리 정제한 *B. subtilis* p-4 프로테아제(M.W. : 18,000)와 *B. licheniformis* p-5 프로테아제(M.W. : 30,000)를 -60°C, 심온동결고에 저장하여 두고 필요시 사용 및 분석하였다.

기질특이성 실험 및 효소의 아미노산 조성 분석

카제인을 기질로 하여 *B. subtilis* p-4 및 *B. licheniformis* p-5 프로테아제의 반응속도를 Lineweaver-Burk 식²⁾을 이용하여 기질친화도(K_m)를 구하였다

며, 아미노산 분석은 Murakami와 Noda³⁾의 방법에 따라 110°C 진공상태에서 6N 염산으로 24, 48시간 가수분해한 후 아미노산 분석기(LKB-4150a)로 분석하였다. 이때 serine, threonine, tyrosine의 잔기수는 외삽법에 의해 가수분해 후 zero time으로 계산하였으며, valine, isoleucine의 잔기수는 48시간 가수분해 후의 값으로, 나머지 아미노산은 24, 48시간 가수분해후의 평균치로 나타내었다. 花 愁 花

효소불활성화 조건 실험

萩原의 방법⁴⁾에 따라 각 온도별로 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)로 조정된 0.6% 카제인 기질에 일정량의 효소를 넣고 40°C에서 30분간 반응시킨 후 TCA 용액으로 불활성화시킨 다음 원심분리(3,500×g, 20분)하여 상층액 1ml에 2.5ml 0.55M Na₂CO₃와 0.5ml Folin-phenol 시약(3배 희석액)을 넣고 30°C에서 20분간 발색 후 반응액의 흡광도(660nm)를 측정하여 표준곡선에서 tyrosine 함량($\mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{ml}$)으로 환산하였다. 이 활성도를 가열시간에 따라 자연대수값으로 계산하여 변성속도 상수(K_d)를 구하였으며⁵⁾, 효소활성에 대한 온도의 영향은 Arrhenius식으로 도식화²⁾하여 활성화 에너지를 구하였다. 그리고 Table 1에 나

타낸 식에 따라 열역학적 함수들을 계산하였으며, 그 결과는 최소자승법으로 처리하였다. 여기서 활성화 엔트로피는 절대속도이론(absolute rate theory)에서 유도된 $K = \left(\frac{k \cdot T}{h}\right) \cdot e^{a/h} \cdot e^{-(E_a - RT)/RT}$ 식⁶⁾에서 계산하였다. K는 반응속도 상수로 본 실험의 변성속도 상수(K_D)이며, k는 볼트만 상수($3.30 \times 10^{-24} \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1}$), h는 플랑크 상수($1.584 \times 10^{-34} \text{ cal} \cdot \text{sec}$), E_a 는 실험으로 얻어진 활성화 에너지값(Kcal/mole), R은 기체 상수($1.987 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$), T는 절대온도(°K)이다. 양변에 자연대수와 R을 곱하면 $\Delta S^* = R \cdot \ln K_D - R(1 + \ln k/h) - R \cdot \ln T + E_a/T$ 이며, R값 단위를 Kcal로, 자연대수를 상용·log값으로 환산한 4.576으로 양변을 나누고, 볼트만 상수 및 플랑크 상수값을 대입하면 Table 1의 활성화 엔트로피 식과 같다.

Table 1. Calculating equations of denaturation constant and thermodynamic parameters

| Formulae | |
|--------------|--|
| K_D | $(\ln C_0 - \ln C_T)/t$ |
| E_a | $-R \cdot d(\ln K)/d(1/T) = -2.303 R \cdot a$ |
| ΔH^* | $E_a - RT$ |
| ΔS^* | $4.576(\log K_D - 10.75 - \log T + E_a/4.576 T)$ |
| ΔG^* | $H - T \cdot S$ |

K_D : Denaturation constant., C_0 : Protease activity before denaturation, C_T : Protease activity after denaturation, E_a : Activation energy. R: Gas constant, T: Absolute temp. a: Slope of Arrhenius plot, ΔH^* : Activation enthalpy, ΔS^* : Activation entropy and ΔG^* : Free energy of activation.

결과 및 고찰

단백질 분해효소의 기질친화도(K_m)

카제인을 기질로 하여 친화도를 측정한 결과 Fig. 1에서의 같이 *B. subtilis* p-4 및 *B. licheniformis* p-5 프로테아제는 각각 0.38mM, 0.18mM로 p-4 프로테아제의 경우가 p-5보다 친화도가 더 컸다. Hara 등⁷⁾이 보고한 알카리성 프로테아제와 비교하여 보면 친화도가 낮았으며, 어육에서 분리한 단백질분해효소를 합성기질을 이용하여 온도별로 측정된 Ooshiro⁸⁾의 보고와 비교하여 볼 때 기질친화도는 효소 및 기질의 종류와 반응속도에 의해 상당한 차이가 있음을 알 수 있었으며, 본 실험의 경우 어육이 기질로 사용될 것을 감안한다면 어느 균의 효소가 좋다고 단정지을 수는 없었다.

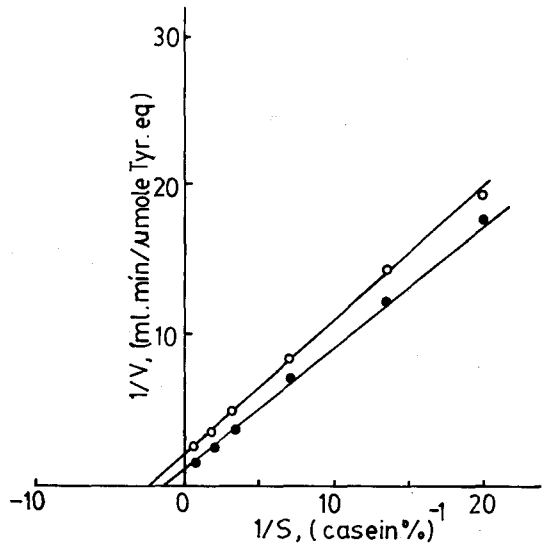


Fig. 1. Lineweaver-Burk plots for hydrolysis of casein by two proteases produced by *B. subtilis* p-4 (●—●) and *B. licheniformis* p-5 (○—○).

K_m value: *B. subtilis* p-4; 0.38mM, *B. licheniformis* p-5; 0.18mM.

가열온도에 따른 효소의 불활성화

단백질분해효소의 불활성화 정도를 측정하기 위하여 효소를 30°C, 40°C, 45°C, 50°C에서 경시적으로 가열하면서 효소활성을 측정한 후에 가열시간별로 효소활성의 실행 정도를 상용대수값으로 표시하였다 (Fig. 2, 3). 두 단백질분해효소는 각각의 온도에서 가열시간별에 따라 직선의 상관을 가진 일차반응식에 의해 활성이 소실됨을 알 수 있었다. 그리고 50°C에서 80분 열처리할 때 p-4 프로테아제는 20%의 잔

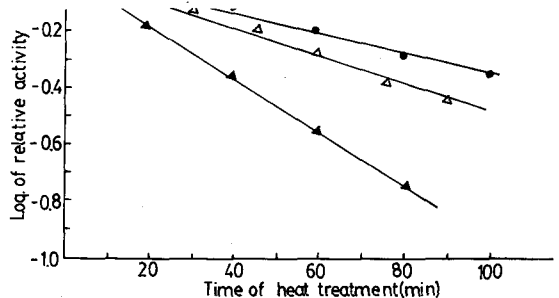


Fig. 2. Inactivation of protease produced by *B. subtilis* p-4 during heat treatment at 30°C (○—○), 40°C (●—●), 45°C (△—△) and 50°C (▲—▲)

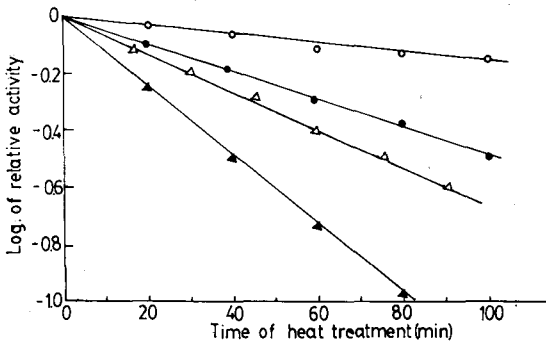


Fig. 3. Inactivation of protease produced by *B. licheniformis* p-5 during heat treatment at 30°C(○—○), 40°C(●—●), 45°C(△—△) and 50°C(▲—▲)

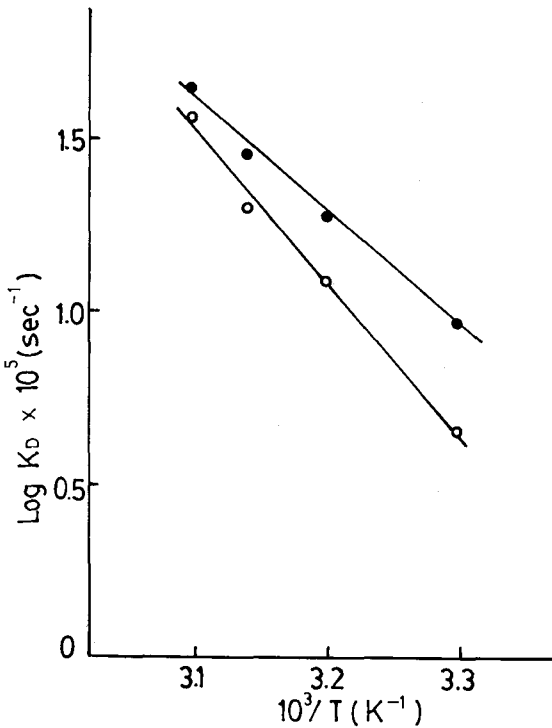


Fig. 4. Arrhenius plots of apparent rate constants for inactivation of proteases produced by *B. subtilis* p-4(○—○) and *B. licheniformis* p-5(●—●) during heat treatment

존활성을 보였으며, p-5 프로테아제는 거의 실활되었다.

각 온도 조건에서 활성의 반감기는 p-4 프로테아제의 경우 40°C에서 145분, 50°C에서는 53분이었으며, p-5 프로테아제는 40°C에서 103분, 50°C에서 42분이었다. 그리고 p-4, p-5 프로테아제의 변성속도

Table 2. Thermodynamic activation parameters of the proteases produced by *B. subtilis* p-4 and *B. licheniformis* p-5 at different temperatures*

| Temp (°C) | Enzyme | K_D ($\times 10^{-5}/\text{sec}$) | H (Kcal/mole) | S (eu) | G (Kcal/mole) |
|-----------|--------|---------------------------------------|---------------|--------|---------------|
| 30 | p-4 | 4.6 | 19.00 | -13.29 | 23.03 |
| | p-5 | 9.4 | 14.60 | -26.40 | 22.60 |
| 40 | p-4 | 12.2 | 18.98 | -13.50 | 23.21 |
| | p-5 | 19.0 | 14.58 | -26.68 | 22.93 |
| 50 | p-4 | 35.7 | 18.96 | -13.38 | 23.28 |
| | p-5 | 46.3 | 14.56 | -26.48 | 23.11 |

* Activation energy : p-4 protease ; 19.6Kcal/mole, p-5 protease ; 15.2Kcal/mole.

Table 3. Amino acid composition of the proteases produced by *B. subtilis* p-4 and *B. licheniformis* p-5*

| Amino acid | <i>B. subtilis</i> p-4 | <i>B. licheniformis</i> p-5 |
|---------------|------------------------|-----------------------------|
| Alanine | 11.9(12) | 21.1(21) |
| Valine | 4.6(5) | 11.0(11) |
| Leucine | 10.5(11) | 20.8(21) |
| Isoleucine | 5.6(6) | 6.9(7) |
| Proline | 15.7(16) | 10.7(11) |
| Methionine | ND** | 5.5(6) |
| Phenylalanine | 2.8(3) | 5.5(6) |
| Glycine | 26.4(26) | 45.3(45) |
| Serine | 12.0(12) | 17.5(18) |
| Threonine | 3.3(3) | 6.3(6) |
| Cysteine | 2.3(2) | 4.4(4) |
| Tyrosine | 2.0(2) | 7.9(8) |
| Aspartic acid | 13.5(14) | 25.3(25) |
| Glutamic acid | 16.2(16) | 32.4(32) |
| Lysine | 11.0(11) | 12.2(12) |
| Arginine | 6.6(7) | 6.4(6) |
| Histidine | 5.4(5) | 4.8(5) |

* The compositions were expressed as amino acid residues/mole based on a molecular weight of protease p-4(18,000), and p-5(30,000). The values in parentheses are the nearest integer.

** ND : Not detected.

상수(K_D)를 구한 결과 30°C에서 각각 $4.6 \times 10^{-5}/\text{sec}$, $9.4 \times 10^{-5}/\text{sec}$, 40°C에서 $12.2 \times 10^{-5}/\text{sec}$, $19.0 \times 10^{-5}/\text{sec}$, 50°C에서 각각 $35.7 \times 10^{-5}/\text{sec}$, $46.3 \times 10^{-5}/\text{sec}$ 로 온도가 높아짐에 따라 K_D 값이 컸다(Table 2). 이는 각종 어류의 근원섬유에 존재하는 ATPase의 온도 안정성에 대해 보고한 内山 등⁵⁾의 결과와 비교하여 볼 때 잉어나 열대성 어족인 *Tilapia*의 K_D 값과 비슷하

였다.

Fig. 4는 K_D 를 절대온도에 대하여 Arrhenius식으로 도식화한 것으로 p-4 프로테아제가 p-5 프로테아제에 비해 온도 의존성은 높은 기울기를 나타내었으며, 활성화 에너지(E_a)를 구한 결과 p-4 프로테아제가 반응속도가 빠르며 열변성에 민감하다는 것을 알 수 있었다. Lehrer와 Barker⁹⁾는 토끼근육에 존재하는 aldolase의 E_a 는 14.0~18.8Kcal/mole이라고 하였으며, Johnston등¹⁰⁾이 보고한 각종 어류의 근원섬유에 존재하는 ATPase의 E_a 와 비교하여 보면 상당히 높았다. Table 2는 K_D 와 E_a 값으로 부터 각 온도에서의 열역학적 변수를 나타낸 것으로 온도가 상승함에 따라 활성화 엔탈피는 거의 변화가 없는데 반해 활성화 자유에너지는 약간씩 증가하였는데 이러한 증가는 활성화 엔트로피의 역할에 의한 것으로 생각된다. Lehrer와 Barker⁹⁾가 보고한 aldolase의 열역학적 변수와 비교하여 보면, 활성화 엔트로피는 p-4, p-5 프로테아제 모두 음의 값으로 안정하였다.

아미노산 조성

B. subtilis p-4 및 *B. licheniformis* p-5 프로테아제의 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 3과 같다. p-4 프로테아제는 151개의 잔기수를 나타내었는데 이중 glycine, glutamic acid, proline, aspartic acid, serine, alanine, lysine, leucine등이 수가 많았으며, p-5 프로테아제는 247개의 잔기수로 glycine, glutamic acid, aspartic acid, alanine, leucine 등이 많았다. p-4 프로테아제는 p-5 프로테아제에 비해 분자량은 적으나 isoleucine, proline과 같은 소수성기를 가진 아미노산의 비율이 큰 것으로 보아 열 안정성에 어느 정도 기여할 것으로 생각되었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 학술연구비의 지원에 의하여 수행된 연구의 일부입니다.

참 고 문 헌

1. 車庸準, 李應昊 : 한국수산학회지, 22(5) : 363 (1989)
2. Segel, I. H. : Biochemical calculations, John Wiley & Sons, New York, 278(1975)
3. Murakami, K. and Noda, M. : Biochemical et Biophysical Acta, 658 : 17(1981)
4. 赤堀四郎 : 酵素研究法, Vol , 朝倉書店, 237~246(1956)
5. 内山均, 加藤登, 工藤雄司, 新井健一 : 日本水産學會誌, 44(5) : 491~497(1978)
6. Laidler, Keith, J. : Physieal chemistry with biological applications, Benjamin/Cummings Pub., Co., USA, 394~398(1983)
7. Hara, K., Arano, H. and Ishihara, T. : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50(9) : 1611(1984)
8. Ooshiro, Z. : Bull. Japan. Soc. Fish., 37(11) : 1110~1114(1971)
9. Lehrer, G. M. and Barker, R. : Biochemistry, 9 (7) : 1533(1970)
10. Johnston, I. A., Frearson, N. and Goldspink : Biochem. J., 133 : 735(1973)

Studies on the processing of rapid fermented anchovy prepared with low salt contents by adapted microorganism. 2. Thermodynamic characteristics of microbial extracellular protease isolated from fermented fish paste

Yong-Jun Cha and Eung-Ho Lee*(Department of Chemistry, Changwon National University, Changwon 641-240, Korea, *Department of Food Science & Technology, National University of Pusan, Pusan 608-023, Korea)

Abstract : This study was undertaken to determine thermodynamic characteristics of *B. subtilis* p-4 and *B. licheniformis* p-5 proteases isolated from fermented anchovy paste. K_m values of two proteases for casein as a substrate were 0.38mM in p-4 protease and 0.18mM in p-5 protease, respectively. Denaturation constants(K_D) of p-4 and p-5 proteases were $12.2 \times 10^{-5}/\text{sec}$ and $19.0 \times 10^{-5}/$

sec at 40°C, and $35.7 \times 10^{-5}/\text{sec}$ and $46.3 \times 10^{-5}/\text{sec}$ at 50°C, respectively. Activation energies(E_a) of p-4 and p-5 proteases were 19.6 Kcal/mole and 15.2Kcal/mole, respectively. Free energy of activation(ΔG^\ddagger), activation enthalpy(ΔH^\ddagger) and activation entropy(ΔS^\ddagger) at 40°C were 23.21Kcal/mole, 18.98Kcal/mole and -13.50 eu, respectively for p-4 protease and 22.93Kcal/mole, 14.58Kcal/mole and -26.68 eu, respectively for p-5 protease. The major amino acids in p-4 protease(151 residues of amino acid) were Gly, Glu, Pro, Asp, Ser, Ala, Lys and Leu, while those in p-5 protease (247 residues of amino acid) were Gly, Glu, Asp, Ala and Leu. It may be concluded that heat denaturation of two proteases showed liner regression curve and p-5 protease was more sensitive to heat than p-4 protease.