

수산동물의 비가식 부산물을 이용한 단백질분해효소의 분획 및 효소제제의 개발 단백질분해효소의 분포 및 분획

허민수 · 안삼환
경상대학교 식품과학과, 해양산업연구소

Development and Fractionation of Proteolytic Enzymes from an Inedible Seafood Product Distribution and fractionation of proteolytic enzymes

Min-Soo HEU and Sam-Hwan AHN

Department of Food Science · Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

Distribution of the proteolytic activities of crude protease extracted from the viscera of ten kinds of fish was examined. Their proteolytic activities on proteinous substrates (azocasein, hemoglobin, and casein) from the viscera of anchovy, bastard flatfish, mackerel and red sea bream were higher than those of other fishes, and the crude proteases were further fractionated with acetone or ammonium sulfate. Optimum concentrations for proteases fractionation were 0~55% for acetone and 30~70% for ammonium sulfate. The fractionated viscera protease of mackerel showed the highest proteolytic activity among four kinds of fishes. Activities of cathepsin D- and pepsin-like enzymes at pH 3.0, cathepsin L-, B-, H- and G-like enzyme at pH 6.0, and trypsin- and chymotrypsin-like enzymes (pH 8.0) were detected in the fractionated viscera protease, whereas activities of cathepsin L- and chymotrypsin-like enzyme were observed in commercial proteases. Proteolytic activities of Alcalase, Protamex, and Aroase AP-10 for azocasein were slightly higher than the fractionated viscera proteases, but their amidolytic activities at pH 6.0 and 8.0 toward synthetic substrates were lower than counterpart. The fractionated proteases from fish viscera would be utilized as commercial proteases.

Key words: protease distribution, protease fractionation, fish proteases, commercial protease

서 론

수산동물의 가식 부의 비율이 약 40~60% 내외로, 폐기되는 비가식 부분이 상당 부분을 차지한다. 머리, 껍질, 뼈, 내장, 꼬리 등의 폐기되는 부분에는 수분을 제외한 단백질, 지방, 색소 등을 다량 함유하고 있어, 이를 이용하기 위한 노력으로 어류 양식 사료로서의 이용과 가공 공장에서 가공 원료의 수세 액으로부터 유용성분을 분리하고자 하는 연구가 이루어지고 있다 (Shahidi, 1994). 그러나 이들 수산 동물 유래 폐기물의 이용 실태는 극히 미미하며, 가공 공장에서는 이들 폐기물의 처리 미비로 인해 하천 및 연안 해수면의 환경오염을 유발하는 원인이 되기도 한다.

수산 동물의 조리 또는 가공시 파생되는 내장에는 소화 효소를 다량 함유하고 있으며, 이들 효소는 동물의 생존 중에는 소화기능에 관여하며, 동물의 사후에는 사후 변화에 직접적으로 개입하여 생체조직의 분해를 초래하는 등의 중요한 작용을 한다 (Barrett, 1977, 1980 ; Kirschke et al., 1980 ; Simpson and Haard, 1987 ; Ueno, 1988 ; Haard, 1992).

산업적으로 광범위하게 이용되고 있는 효소의 약 60%는 가수분해 효소인, 당질분해효소 및 단백질 분해 효소가 주를 이룬다. 이들 효소는 식품을 비롯하여 섬유, 피혁, 사진, 제지, 화장품, 폐기물 처리, 제약, 의료 등 여러 분야에서 이용되고 있다 (Haard et al., 1982, 1983 ; Hameed and Haard, 1985, Haard, 1994). 따라서, 내장으로부터 소화 효소를 분리하여 산업적 이용을 위한 효소제제의 개발은 수산동물의 비가식 부산물의 효율적 이용의 측면에서 고부가가치를 창출할 수 있을 것이다.

본 연구는 어류의 주된 비가식부인 내장으로부터 단백질 분해 효소를 추출하여, 효소의 기질 특이성에 따른 효소의 분포를 검토하고, 유기 용매와 염류를 이용한 효소의 분획 방법을 확립하여, 분획 효소와 상용효소의 천연기질과 합성기질에 대한 활성을 비교함으로써 효소제제의 개발 가능성을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

재료

수산동물의 비가식 부산물로서 효소자원으로 이용 가능한 내장을 시료로 하였으며, 시료어류는 비교적 손쉽게 구입이 가능하고, 자주식탁에 오르거나, 생식하는 10종을 선택하였다 (Table 1). 한편, 효소활성의 비교용으로 시판 상용효소 Alcalase, Neutrase, Protamex, Flavourzyme (Novo-Nordisk, Denmark), Aroase AP-10, Pantidase NP-2 (Yakult, Japan) 그리고 Protease-NP (태평양, Korea)를 구입하여 사용하였다.

방법

조효소의 추출 : 각 어류 내장시료에 약 3배량 증류수를 가하여 균질화 시킨 후, 20°C에서 24시간 추출, 여기에 0.2배량의 사염화탄소를 가하여 약 2시간 탈지한 후, 원심분리 (12,000×g, 10분)하여 상층액을 조효소로 사용하였다.

단백질농도의 측정 : Lowry et al.의 비색법 (1951)에 따라 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 구한 검량곡선으로

Table 1. Body length and body weight of fish species for crude enzyme extraction

Korean name	Common name	Latin name	Body length (cm)	Body weight (g)	Number of fish	Collection date
Myeol-chi	Anchovy (AN)	<i>Engraulis japonica</i>	11.1	14	1000	Mar. '96
Neob-chi	Bastard Flatfish (BF)	<i>Pararlichthys olivaceus</i>	29.3	365	5	Apr. '96
Gam-seong-dom	Black sea bream (BB)	<i>Acanthopagus schlegelii</i>	23.4	300	5	May. '96
Eun-yen-eo	Coho salmon (CS)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	47.5	1840	2	Jun. '96
Mal-jwi-chi	File fish, Scraper (FF)	<i>Navodon modestus</i>	17.5	110	10	May. '96
Ko-deung-eo	Mackerel (MA)	<i>Scomber japonicus</i>	27.5	365	10	May. '96
Cham-dom	Red sea bream (RB)	<i>Chysophrys major</i>	20.2	210	5	May. '96
Jo-pi-bol-nag	Schlegels black rockfish (SR)	<i>Schastes schlegeli</i>	24.2	410	7	May. '96
Cham-da-rang-eo	Tuna (TU)	<i>Thunnus thynnus</i>	90.5	8000	2	Dec. '95
Bang-co	Yellow tail (YT)	<i>Seriola quinqueradiata</i>	37.5	850	5	Apr. '96

단백질 농도를 측정하였다.

효소 활성: 천연 기질 1% hemoglobin (pH 3.0) 및 2% casein (pH 6.0과 8.0)에 대한 활성은 Anson (1938)의 방법을 개량한 Pyeun and Kim (1986)의 방법에 따라 파장 660 nm에서 측정하였으며, 1% azocasein에 대한 활성은 Starky (1977)의 방법에 따라 파장 410 nm에서 측정하였다. 분포검색용 합성기질로서는 *N*-benzoyl-D,L-arginine- β -naphthylamide (BANA), L-arginine-4-methoxy- β -naphthylamide (ArgMNA), *N*-carbobenzoxy-phenylalanyl-arginine-4-methoxy- β -naphthylamide (ZFRMNA), *N*-carbobenzoxy-arginyl-arginine-4-methoxy- β -naphthylamide (ZRRMNA)와 *N*-carbobenzoxy-glycyl-glycyl-arginine-4-methoxy- β -naphthylamide (ZGGRMNA)에 대한 활성은 Barrett (1972, 1976)의 방법에 따라 파장 520 nm에서, *N*-succinyl-alanyl-alanyl-prolinyl-phenylalanine- ρ -nitroanilide (SAAPFNA)와 *N*-benzoyl-D,L-arginine- ρ -nitroanilide (BAPNA)에 대한 활성은 Erlanger et al. (1961, 1966)의 방법에 따라 파장 410 nm에서 측정하였다. 효소활성 단위 (U/mg)는 효소 1 mg이 1분간 변화시킨 흡광도 0.1을 1 U로 하였다.

단백질 분해 효소의 분획: 유기용매에 의한 분획은 조효소액에 냉 acetone을 가하여 각각 0~40%, 40~55%, 55~70%, 70~85%의 포화 acetone 희분을 조제하였으며, 염류에 의한 분획은 황산암모늄을 10%씩 포화 농도를 증가하여 (20~90%) 황산암모늄 염석희분을 조제하였다.

조효소 및 분획효소 및 상용효소의 활성분포 비교: 천연기질 (1% hemoglobin, 1% azocasein 및 2% casein) 그리고 합성기질로서 0.1 mM β -naphthylamine기질과 0.1 mM ρ -nitroanilide기질을 사용하여 각각 pH 6.0과 8.0에서 활성을 측정, 효소의 분포를 비교하여 효소제 개발 가능성을 검토하였다.

결과 및 고찰

추출 조효소의 천연기질에 대한 pH별 효소활성 분포

10종의 어류 내장으로부터 추출한 조효소의 azocasein에 대한 분해활성의 분포를 pH별 (pH 3~9)로 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 은연어, 멸치, 조피볼락 및 방어의 조효소는 다른 어종에

비하여 산성측 (pH 3.0)에서 높은 활성 (0.045~0.064 U/mg)을 보였으며, 약산성측 (pH 6.0)과 알칼리성측 (pH 8.0~9.0)에서는 멸치, 넙치, 은연어 고등어 및 참돔의 조효소 활성이 각각 0.236~0.309 U/mg과 0.42~0.77 U/mg으로 다른 어종에 비해 높게 나타났다.

이들 어종 중에서 산성, 약산성, 알칼리성의 세 영역에서 비교적 강한 활성 분포를 보인 어종은 멸치와 은연어였으며, 약산성 및 알칼리성의 두 영역에서 강한 활성을 보인 어종은 넙치, 고등어 및 참돔으로 나타났다.

한편, 단백질 기질인 hemoglobin, casein 및 azocasein에 대한 분해활성을 각각 pH 3, 6 및 8에서 측정하여 Table 2에 나타내었다. Hemoglobin은 주로 산성측에서 활성을 나타내는 단백질분해효소의 활성 측정에 사용되는 기질로서 (Anson, 1938) pH 3.0에서 멸치, 은연어 및 방어의 조효소의 경우, 비교적 강한 활성 (0.15~0.23 U/mg)을 나타내었으나, pH 6.0과 8.0 (0.09~0.21 U/mg)에서의 활성은 낮았으며, 다른 어종의 경우에도 측정된 pH (pH3.0, 6.0 및 8.0 ; 0.02~0.11 U/mg)에서 낮은 활성을 보였다.

Casein과 azocasein은 주로 약산성 및 알칼리성 단백질분해효소의 활성 측정에 사용되는 기질로서, casein에 대한 멸치, 넙치, 은연어, 고등어 및 참돔의 조효소 활성이 0.40~0.52 U/mg (pH 6.0)과 0.71~0.94 U/mg (pH 8.0)으로 강한 활성을 보였으며, azocasein에 대한 활성도 0.24~0.31 U/mg (pH 6.0)과 0.42~0.57 U/mg (pH 8.0)으로 다른 어종에 비하여 강한 활성을 나타내었다. 이들 두 기질의 pH 3.0에서의 활성은 hemoglobin (pH 3.0)에 비하여 낮은 것으로 나타났는데, 이는 산성 pH에서 이들 기질의 용해도가 낮아 변성을 일으켜 효소가 작용하기 어렵기 때문이며, 산성 pH에서의 효소활성 측정에는 hemoglobin이 적절한 기질임을 뒷받침 해준다 (Anson, 1938).

산성측 pH에서 강한 단백질 분해활성을 나타내는 효소로는 pepsin, gastricsin 그리고 cathepsin D 등의 aspartic proteinase이며 (Shamsuzzaman and Haard, 1984), 어류 pepsin의 경우, 포유동물의 pepsin (pH 1.8~2.4)보다 상대적으로 높은 최적 pH (pH3.5)와 낮은 열안정성, 저온에서도 높은 활성을 나타내고, polypeptide 사슬 중에 염기성 아미노산 함량이 많은 등, 독특한 성질을 갖는다고 하였다 (Haard et al., 1982 ; Gildberg, 1988). Pepsin과는 달리, gastricsin은 저농도의 NaCl에 의해 활성화 되어지며, 이러한

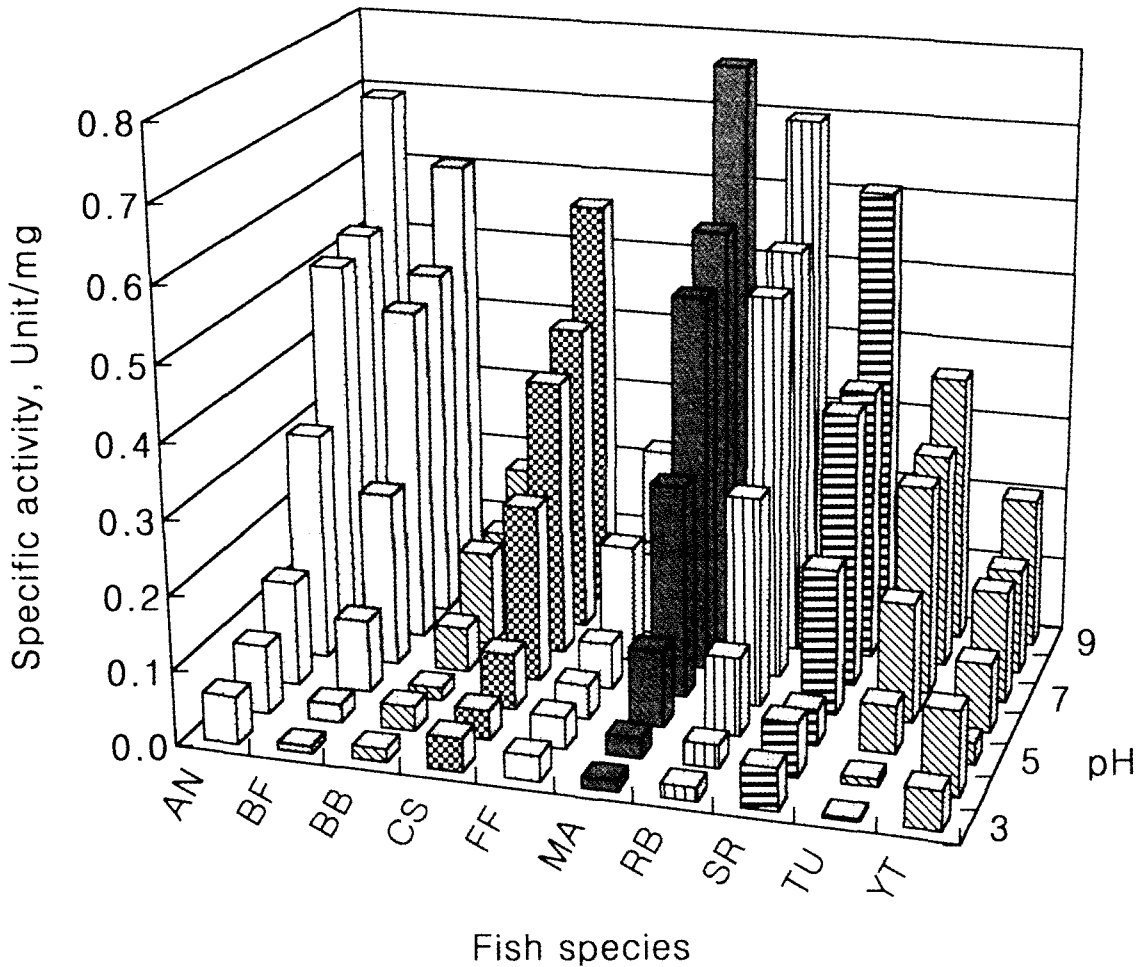


Fig. 1. Effect of pH on the azocaseinolytic activity of the crude proteases extracted from fish viscera. AN, anchovy ; BF, bastard flatfish ; BB, black sea bream ; CS, coho salmon ; FF, file fish, scraper ; MA, mackerel ; RB, red sea bream ; SR, schlegels black rockfish ; TU, tuna ; YT, yellow tail

Table 2. Proteolytic activities of the crude enzyme extracted from fish viscera toward proteinous substrates (U/mg)

Fish species	Hemoglobin			Casein			Azocasein		
	pH 3.0	pH 6.0	pH 8.0	pH 3.0	pH 6.0	pH 8.0	pH 3.0	pH 6.0	pH 8.0
Anchovy	0.19	0.15	0.15	0.10	0.48	0.81	0.06	0.31	0.53
Bastard, Flatfish	0.02	0.05	0.04	0.01	0.41	0.75	0.01	0.24	0.48
Black sea bream	0.06	0.07	0.11	0.05	0.14	0.26	0.02	0.06	0.12
Coho salmon	0.15	0.10	0.09	0.05	0.40	0.71	0.04	0.24	0.42
File fish, Scraper	0.05	0.07	0.06	0.01	0.23	0.41	0.03	0.06	0.11
Mackerel	0.04	0.07	0.05	0.01	0.52	0.94	0.01	0.29	0.57
Red sea bream	0.05	0.08	0.06	0.01	0.49	0.83	0.02	0.28	0.55
Schlegels black rockfish	0.06	0.12	0.11	0.03	0.25	0.55	0.06	0.20	0.37
Tuna	0.02	0.01	0.02	0.01	0.19	0.36	0.00	0.16	0.29
Yellow tail	0.23	0.12	0.21	0.11	0.13	0.21	0.05	0.09	0.14

성질은 가열 수산식품의 가공에 중요한 영향을 미친다고 하였으며 (Sanchez-Chang and Ponce, 1981), Squires et al. (1986, 1986 a)은 어류의 pepsin은 4종류 또는 그 이상의 isozymes이 분포한다고 보고하였다. 또한, Gildberg (1988)는 위액의 분비가 미미하거나, 분비되지 않는 무척추 동물과 위장이 없는 어류는 cathepsin D와 유사한 효소가 분포할 수 있지만, pepsin은 존재하지 않는다고 보고하였다.

약산성 및 중성 pH에서 활성을 나타내는 효소는 동물세포의 lysosome에 존재하는 cathepsin B, H 및 L 등의 cysteine proteinase로서 이들 효소의 최적 pH는 5.5~6.8로 알려져 있으며, 주로 근육 및 간, 비장등의 내장기관에 분포하고 있으며 (Barrett and Kirschke, 1981; Heu et al., 1997), 알칼리성 pH에서 활성을 보이는 효소들은 주로 chymotrypsin, trypsin, elastase, carboxypeptidase 등의 serine proteinase가 내장기관에 분포하고 있다

(Yoshinaka et al., 1981 ; Smith, 1989 ; Chen et al., 1989 ; Heu et al., 1995). 따라서, 10종의 어류 내장에서 추출한 단백질분해 효소액 중에는 활성강도의 차이는 있지만 aspartic, cysteine 및 serine protease군에 속하는 유사효소들이 분포하는 것으로 추정된다.

이상의 결과에서, 멸치, 넙치, 고등어 그리고 참돔의 조효소가 다른 어종에 비하여 넓은 pH영역과 세 종류의 단백질 기질에 대해 강한 분해능을 나타냄으로서, 이들 어종의 조효소를 효소제제의 조제를 위한 분획시료로 선정하였다.

유기용매 및 염석에 의한 효소의 분획

멸치, 넙치, 고등어 및 참돔의 조효소액의 유기용매에 의한 분획은 조효소액에 냉 acetone을 가해, 0~40%, 40~55%, 55~70% 그리고 70~85% (v/v)의 포화 농도로 분획한 후, 각 획분별 단백질농도와 azocasein 분해활성을 측정하여 Table 3에 나타내었다. 0~40% 획분 (1.20~3.98 mg/mL, 5.53~12.63 U/mg, pH 8.0)이 40~55% 획분 (2.49~6.04 mg/mL, 4.39~9.93 U/mg, pH 8.0)보다 단백질농도는 낮은 반면, 효소활성은 높은 것으로 나타났다.

55~70% 획분의 단백질농도 (1.09~3.54 mg/mL)는 0~40% 획분 (1.20~3.98 mg/mL)보다 다소 낮거나 (멸치, 넙치 및 참돔), 오히려 높지만 (고등어, 2.07 mg/mL), 효소활성 (1.32~2.87 U/mg)은 현저히 낮은 것으로 나타나, 이 획분에는 단백질분해효소 이외의 단백질이 상대적으로 많이 분포하고 있음을 알 수 있다. 네 어종 모두 분획 전 (0%)의 조효소 활성 (0.48~0.57 U/mg, pH 8.0)에 비하여 분획 후 (0~40%)의 효소활성이 멸치는 약 11배 (5.53 U/mg, pH 8.0), 고등어는 21배 (12.63 U/mg, pH 8.0), 참돔은 15배

(8.23 U/mg, pH 8.0), 그리고 넙치는 18배 (8.51 U/mg, pH 8.0)가량 높아졌고, 어종별 효소활성의 강도는 고등어, 넙치, 참돔 그리고 멸치 순이었다. 이상의 결과에서, 수율을 고려한 최적분획 조건은 0~40%과 40~55% 획분으로, 다음 단계의 실험에서는 이들 두 획분 (0~55%)을 합하여 사용하였다.

염석에 의한 분획은 조효소액에 ammonium sulfate를 가하여, 10%씩 농도단계별로 0~20%에서 80~90%까지의 포화 농도로 분획하여 각 획분별 단백질농도와 azocasein에 대한 분해활성을 측정하여 Table 4에 나타내었다. 네 어종 모두 20에서 80%에 이르는 포화농도까지 분획 전의 (0%) 효소활성 보다 높게 나타났으며, 효소활성 (pH 8.0)이 가장 강한 포화농도의 획분은 멸치가 50~60% 획분 (6.92 mg/mL; 3.03 U/mg), 넙치는 50~60% 획분 (5.35 mg/mL; 3.82 U/mg), 고등어는 40~50% 획분 (4.97 mg/mL; 7.10 U/mg) 그리고 참돔은 40~50% 획분 (4.48 mg/mL ; 2.60 U/mg)이었다. 한편, 분획전 (0%)의 효소활성에 비하여 분획 후, 멸치와 넙치 (50~60% 획분)의 활성은 각각 6배와 9배 가량 증가하였고, 고등어와 참돔 (40~50% 획분)은 각각 12배와 5배 가량 증가하였다. 어종별 효소활성의 강도는 고등어, 넙치, 멸치, 참돔 순이었으며, 이상의 결과에서 효소활성과 단백질의 수율을 고려한 ammonium sulfate에 의한 최적 분획 조건은 30~70% 포화 획분으로, 다음 단계의 실험에서는 이들 획분을 모아 사용하였다.

Acetone 및 ammonium sulfate 획분과 상용효소와 효소활성 비교

Table 5는 acetone 획분 (0~55%)과 ammonium sulfate 획분 (30~70%)의 천연기질별 효소활성을 측정하여 상용효소와 활성

Table 3. Azocaseinolytic activities of fractionated enzymes by the acetone fractionations (U/mg)

Fractionation	Anchovy			Bastard, Flatfish			Mackerel			Red sea bream		
	Protein mg/mL	Activity		Protein mg/mL	Activity		Protein mg/mL	Activity		Protein mg/mL	Activity	
		pH 6.0	pH8.0		pH 6.0	pH8.0		pH 6.0	pH8.0		pH 6.0	pH8.0
0%	14.30	0.31	0.53	19.70	0.24	0.48	17.20	0.29	0.57	14.56	0.28	0.55
0~40%	3.98	2.77	5.53	2.82	4.78	8.51	1.71	7.89	12.63	1.20	4.80	8.23
40~55%	6.04	2.70	4.52	4.70	2.90	5.16	2.49	5.50	9.93	3.55	2.66	4.39
55~70%	3.54	0.94	1.54	1.80	0.76	1.34	2.07	1.02	2.87	1.09	0.74	1.32
70~85%	2.16	0.25	0.57	1.44	0	0.95	1.33	1.13	0.25	1.77	0.43	0.64
85% Sup.	0.23	0	0	0.21	0	0	0.20	0	0	0.21	0	0

Table 4. Azocaseinolytic activities of fractionated enzymes by the ammonium sulfate fractionations (U/mg)

Fractionation	Anchovy			Bastard, Flatfish			Mackerel			Red sea bream		
	Protein mg/mL	Activity		Protein mg/mL	Activity		Protein mg/mL	Activity		Protein mg/mL	Activity	
		pH 6.0	pH8.0		pH 6.0	pH8.0		pH 6.0	pH8.0		pH 6.0	pH8.0
0%	14.30	0.31	0.53	19.70	0.24	0.48	17.20	0.29	0.57	14.56	0.28	0.55
0~20%	0.09	0.22	0.54	5.90	0.37	0.67	1.18	1.28	2.31	3.48	0.18	0.29
20~30%	0.82	1.22	1.71	0.57	0.86	1.49	0.91	1.77	3.10	1.79	0.45	0.73
30~40%	2.34	0.85	1.67	0.66	1.41	2.28	1.37	3.33	5.51	4.42	1.02	1.67
40~50%	3.91	1.71	2.59	7.19	1.71	3.14	6.91	4.97	7.10	4.84	1.45	2.60
50~60%	6.92	1.82	3.03	5.35	2.02	3.82	5.45	4.85	6.62	6.06	1.19	2.31
60~70%	4.63	1.12	1.88	3.64	1.57	2.66	5.53	3.34	5.40	14.72	0.60	1.11
70~80%	5.67	0.56	0.94	4.08	0.32	0.60	7.49	1.73	2.92	11.04	0.40	0.62
80~90%	3.70	0	0	4.59	0	0	7.94	0	0	9.75	0	0

Table 5. Comparison of proteolytic activities of acetone fraction, ammonium sulfate fraction, and commercial proteases toward proteinous substrates (U/mg)

Protease	Substrates	Hemoglobin		Casein		Azocasein	
		pH 3.0	pH 6.0	pH 8.0	pH 6.0	pH 8.0	
Acetone fraction							
Anchovy		1.97	3.80	5.98	2.77	5.53	
Bastard, Flatfish		0.04	8.69	13.88	4.78	8.51	
Mackerel		0.02	7.61	15.14	7.89	12.63	
Red sea bream		0.28	6.26	9.76	4.80	8.23	
Ammonium sulfate fraction							
Anchovy		0.47	3.13	5.07	2.70	4.52	
Bastard, Flatfish		0.07	4.34	7.50	2.90	5.16	
Mackerel		0.03	7.04	12.50	5.50	9.93	
Red sea bream		0.31	4.13	7.02	2.66	4.39	
Commercial protease							
Alcalase		-	-	-	8.37	10.43	
Flavourzyme		-	-	-	5.76	6.56	
Neutrase		-	-	-	4.72	6.26	
Protamax		-	-	-	10.84	14.28	
Aroase AP-10		-	-	-	8.85	11.36	
Pantidase NP-2		-	-	-	4.78	4.97	
Protease-NP		-	-	-	4.56	6.05	

- ; Not determined

을 비교하여 나타내었다. Hemoglobin (pH 3.0)에 대한 분해활성은 멸치와 참돔의 분획효소가 높게 나타났으며, acetone 획분(멸치, 1.97 U/mg ; 참돔, 0.28 U/mg)이 ammonium sulfate 획분(멸치, 0.47 U/mg ; 참돔, 0.31 U/mg)보다 다소 강하였으나, 넙치와 고등어의 hemoglobin에 대한 활성(0.02~0.07 U/mg)은 미미하였다.

Acetone 획분의 casein 및 azocasein에 대한 분해활성은 고등어가 각각 15.14와 12.63 U/mg (pH 8.0)으로 가장 강한 것으로 나타났으며, 넙치와 참돔은 ammonium sulfate 획분에 비하여 1.4~2배 가량 활성이 높은 결과를 나타내었으나, 멸치는 분획 방법간의 활성차이는 보이지 않았다. 단백질 기질 및 pH별 분해활성은 네 어종 모두 acetone 획분이 ammonium sulfate 획분 비해 강한 것으로 나타났다.

한편, 상용효소의 azocasein에 대한 분해활성은 pH 6.0에서 Protamex는 10.84, Alcalase는 8.37 그리고 Aroase AP-10은 8.85 U/mg 였으며, pH 8.0에서는 각각 14.28, 10.43 그리고 11.36 U/mg으로 이들 세 효소가 다른 상용효소에 비하여 강한 단백질 분해능을 나타내었다. 이들 3종의 상용효소들은 고등어의 acetone 획분 보다는 pH 6.0에서 1.1~1.3배 가량 활성이 높았으며, pH 8.0에서 Protamex가 고등어(12.63 U/mg)에 비하여 1.2배 정도 높을 뿐, Alcalase와 Aroase AP-10은 오히려 낮았다. 고등어의 ammonium sulfate 획분은 활성이 강한 3종의 상용효소보다 pH 6.0에서는 35~48%, 그리고 pH 8.0에서는 5~30% 정도 활성이 낮았으나, Flavourzyme, Neutrase, Pantidase NP-2 및 Protease-NP보다는 pH 6.0에서 10~20%, 그리고 pH 8.0에서 35~50% 정도 활성이 강하였다. Acetone 획분의 넙치와 참돔의 경우, pH 6.0에서의

활성은 각각 4.78과 4.80 U/mg으로 Flavourzyme, Neutrase, Pantidase NP-2 및 Protease-NP와 비슷하였으나, pH 8.0에서의 활성(넙치, 8.51 U/mg ; 참돔, 8.23 U/mg)은 25~70%가량 높은 것으로 나타났다. 따라서, 상용효소와의 단백질 분해활성으로 비교한 결과, 어류 내장으로부터 추출한 단백질분해효소를 이용한 효소제제 개발 가능성이 있음이 확인되었다.

Acetone과 ammonium sulfate 획분의 합성기질에 대한 분해활성을 측정하여 Table 6 (pH 6.0)과 Table 7 (pH 8.0)에 나타내었으며, 기질특이성에 따른 효소의 분포를 상용효소와 비교하였다. Acetone 획분은 넙치가 ArgMNA와 ZRRMNA에 대하여, 그리고 참돔은 ZRRMNA에 대한 분해활성을 보이지 않았으며, SAAP-FNA를 제외한 다른 기질에 대하여 멸치와 고등어의 분해활성이 넙치와 참돔보다 강한 것으로 나타났다. 멸치는 ArgMNA (0.29 U/mg)에 대한 분해활성이, 넙치는 SAAPFNA (44.23 U/mg)에 대한 분해활성이 다른 어종으로 부터 분획된 효소에 비하여 강하였으며, 고등어는 ArgMNA와 SAAPFNA를 제외한 다른 기질에 대한 분해활성이 가장 높았다. 한편, ammonium sulfate 획분은 측정에서 사용된 모든 기질에 대하여, acetone 획분과는 달리 네 어종 모두 분해활성을 보였으며, 고등어가 가장 강한 분해활성을 나타내었다. 고등어와 참돔의 SAAPFNA에 대한 분해활성에 있어 ammonium sulfate 획분(고등어, 51.81 U/mg ; 참돔, 29.97 U/mg)이 acetone 획분(고등어, 13.16 U/mg; 참돔, 10.67 U/mg)보다 3~5배 정도 강한 것으로 나타났다.

상용효소의 경우, BANA에 대한 활성은 보이지 않았으며, ArgMNA에 대하여는 Flavourzyme (2.65 U/mg)과 Pantidase NP-2 (0.5 U/mg)만이 분해활성을 보였고, ZFRMNA (0.01~0.18 U/mg), ZGGRMNA (0.06~1.67 U/mg) 및 SAAPFNA (9.06~31.54 U/mg)에 대하여 7종의 상용효소가 분해활성을 나타내었으나, acetone 및 ammonium sulfate 획분의 활성에 비하여 현저히 낮았다.

Table 7은 pH 8.0에서의 합성기질에 대한 분해활성을 측정된 결과로서, pH 6.0 (Table 6)에서 보다 acetone 획분의 멸치는 1~4.7배, 넙치는 2.2~6.5배, 고등어는 1~14배, 그리고 참돔은 2.9~11배의 활성증가를 보였으며, ammonium sulfate 획분의 경우, 멸치가 1.7~3.8배, 넙치는 1.2~4.7배, 고등어는 2.2~4.5배, 그리고 참돔은 1.4~4.4배의 활성증가를 나타내었고, 상용효소는 분해활성을 나타낸 기질에 대하여 대체로 1.2~4.9배의 활성이 증가하였다. 그러나 ZGGRMNA에 대하여 멸치와 고등어의 acetone 및 ammonium sulfate 획분은 pH 6과 8에서의 분해활성의 변화는 거의 없었다. 한편, 각 기질별 분해활성정도는 BANA, ZFRMNA 및 BAPNA에 대하여 고등어의 acetone 획분은 7.13, 34.01 그리고 11.68 U/mg였으며, ArgMNA, ZRRMNA 및 SAAPFNA에 대하여 고등어의 ammonium sulfate 획분이 각각 13.56, 5.61 그리고 114.69 U/mg으로 가장 강한 활성을 보였고, ZGGRMNA에 대하여는 acetone 획분의 참돔(28.62 U/mg)이 가장 강한 분해활성을 나타내었다.

분획 방법에 따른 활성분포는 acetone 획분이 BANA, ZFRMNA, ZGGRMNA, 및 BAPNA에 대한 분해활성이 높은 반면에

Table 6. Comparison of amidolytic activities of acetone fraction, ammonium fraction, and commercial proteases toward synthetic substrates at pH 6.0 (U/mg)

Protease	Substrates	BANA	ArgMNA	ZFRMNA	ZRRMNA	ZGGRMNA	BAPNA	SAAPFNA
Acetone fraction								
	Anchovy	0.55	0.29	1.93	1.31	9.12	0.91	31.57
	Bastard, Flatfish	0.07	0	0.78	0	3.17	0.12	44.23
	Mackerel	1.40	0.06	6.73	2.14	21.05	3.66	13.16
	Red sea bream	0.20	0.11	0.22	0	9.82	0.45	10.67
Ammonium sulfate fraction								
	Anchovy	0.43	2.17	1.89	1.66	5.92	0.88	30.20
	Bastard, Flatfish	0.12	0.10	1.36	0.20	5.91	0.28	35.37
	Mackerel	0.85	4.76	4.48	2.01	14.65	2.39	51.81
	Red sea bream	0.21	0.15	0.54	0.15	7.07	0.40	29.97
Commercial protease								
	Alcalase	0	0	0.01	—	0.20	0.06	20.75
	Flavourzyme	0	2.65	0.06	—	0.19	0.14	16.90
	Neutrase	0	0	0.11	—	0.21	0	22.16
	Protamax	0	0	0.09	—	0.23	0	31.54
	Aroase AP-10	0	0	0.13	—	1.67	0.01	18.24
	Pantidase NP-2	0	0.50	0.09	—	0.06	0.01	12.96
	Protease-NP	0	0	0.18	—	0.17	0	9.06

— ; Not determined

Table 7. Comparison of amidolytic activities of acetone fraction, ammonium fraction, and commercial proteases toward synthetic substrates at pH 8.0 (U/mg)

Protease	Substrates	BANA	ArgMNA	ZFRMNA	ZRRMNA	ZGGRMNA	BAPNA	SAAPFNA
Acetone fraction								
	Anchovy	1.77	1.38	5.94	2.13	8.84	3.51	72.58
	Bastard, Flatfish	0.26	0.05	1.68	0.28	12.03	0.79	97.51
	Mackerel	7.13	0.86	34.01	3.78	20.43	11.68	58.19
	Red sea bream	0.92	1.06	2.43	0.67	28.62	2.18	43.10
Ammonium sulfate fraction								
	Anchovy	1.65	5.76	5.30	4.01	5.73	2.89	53.05
	Bastard, Flatfish	0.56	0.41	3.50	0.57	7.42	1.33	67.77
	Mackerel	3.82	13.56	18.50	5.61	14.08	7.30	114.69
	Red sea bream	0.82	0.61	2.18	0.60	9.87	1.76	70.10
Commercial protease								
	Alcalase	0	0	0.21	—	0.35	0.06	42.49
	Flavourzyme	0	3.96	0.20	—	0.23	0.18	39.60
	Neutrase	0.13	0	0.24	—	0.44	0.12	45.60
	Protamax	0.07	0	0.25	—	0.62	0.10	65.85
	Aroase AP-10	0	0.08	0.28	—	3.67	0	62.10
	Pantidase NP-2	0	1.84	0.15	—	0.10	0.01	25.96
	Protease-NP	0.01	0	0.29	—	0.16	0	44.70

— ; Not determined

ammonium sulfate 획분은 ArgMNA, ZRRMNA, SAAPFNA에 대한 분해활성이 강한 것으로 나타나 분획 방법에 따른 효소의 분포에 차이가 있음을 알 수 있었다 (Table 6과 7). 특히, 고등어와 참돔의 SAAPFNA에 대한 분해활성에 있어 ammonium sulfate 획분이 acetone 획분에 비하여 3~5배정도 강하였다.

상용효소의 경우, ZFRMNA, ZGGRMNA 그리고 SAAPFNA에 대하여 분해활성을 나타내었으며, 특히 Flavourzyme과 Pantidase

NP-2는 ArgMNA에 대한 분해 활성으로 aminopeptidase의 활성을 보이는 cathepsin H와 유사한 기질 특이성을 가지는 효소가 분포하는 것으로 추정된다 (Barrett and Kirschke, 1981). 단백질 기질 (Table 5)에 대한 분해활성과는 달리 합성기질 (Table 6과 7)에 대한 분해활성은 분획 효소가 상용효소에 비해 강하였으며, 효소의 분포도 다양한 것으로 나타났다. 분획 효소와 상용효소간의 공통점이라면 SAAPFNA에 대한 분해활성이 높아 chymotrypsin과

유사한 성질을 띠는 효소가 다량 분포하고 있다는 것을 나타내며, 이는 Pyeun et al. (1995)과 Heu et al. (1995)의 연구 결과에서 멀치의 chymotrypsin은 trypsin에 비하여 천연기질 및 합성기질에 대하여 최대 반응속도 (V_{max})와 촉매효율 (K_{cat}/K_m)이 7~10배 가량 높아 어류 내장 중에 분포하는 주된 단백질분해효소라고 보고하였다.

BANA, ArgMNA, ZFRMNA 및 ZRRMNA에 대하여 약산성 (pH 6.0부근)에서 분해활성을 보이는 단백질분해효소는 주로 trypsin과 유사한 기질 특이성을 가진 cysteine proteinase로서 cathepsin B, H 및 L 그리고 chymotrypsin과 유사한 기질 특이성을 나타내는 cathepsin G이며, 이들 효소는 주로 근육과 간, 비장 등에 분포하고 있는 것으로 알려져 있다 (Barrett and Kirschke, 1981; Heu et al., 1997). 한편, BANA, ZGGRMNA 및 BAPNA에 대하여 알칼리성 (pH 8.0)에서 활성을 나타내는 단백질분해효소는 serine protease로서 trypsin 유사효소이며, SAAPFNA (pH 8.0)에 대하여 분해활성을 보이는 효소는 chymotrypsin 유사효소로서 주로 내장에 분포하는 것으로 알려져 있다 (Heu et al., 1995; Pyeun et al., 1996; Lee et al., 1996; Oh et al., 1998).

효소의 활성분포 및 강도를 비교하기 위하여 사용한 상용효소 대부분이 미생물 기원의 효소들이며, Alcalase는 *Bacillus licheniformis* 균주가 생산하는 단백질분해효소로서 주로 subtilisin A를 함유하고 있으며, 최적 온도는 55~70°C, 그리고 최적 pH는 6.5~8.5인 serine protease계로 chymotrypsin과 유사한 기질 특이성을 가진 효소 (Novo Nordisk, 1996a)로서, 본 실험 결과 (Table 6과 7)와 일치하였다. 또한 Neutrase는 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주가 생산하는 단백질분해효소 중에서 중성 pH에서 높은 활성을 나타내는 효소이며, Zn에 의하여 활성화되는 metallo-proteinase로서 Ca²⁺이온에 안정화되고, EDTA에 의하여 저해를 받으며, 반응 최적조건의 pH 5.5~7.5와 45~55°C이라고 하였다 (Novo Nordisk, 1996b). 한편 Aroase AP-10은 *B. subtilis*가 생산하는 알칼리성 단백질 분해효소이며, Pantidase NP-2는 *Aspergillus oryzae*가 생산하는 중성 단백질 분해효소이며 (Yakurt, 1996), Flavourzyme은 곰팡이가 생산하는 단백질 분해효소로서 광범위한 단백질 분해 활성을 나타내는 exopeptidase와 endoproteinase의 복합 효소제제이다.

본 실험에서 효소의 분획을 위하여 사용한 acetone과 ammonium sulfate에 의한 방법은 대량처리에 적합하고, 재현성이 비교적 높은 분획 방법으로, acetone에 의한 분획은 탈염조작이 필요 없고, 지질과 같은 유기용매에 가용성인 비 단백질질의 불순물을 제거할 수 있는 잇점이 있는 반면에, 실험조작이 염석보다 다소 번거로우며, 단백질의 변성이나 효소의 실활을 초래할 수 있다. 한편, ammonium sulfate에 의한 분획은 조작이 단순하며, 단시간에 처리가 가능한 반면에 분별이 예민하지 못하며, 다음 단계에 사용하기 위하여 탈염 조작이 필요하다. 또한 두 방법 모두 단백질의 농도가 높은 경우에 사용하여야 한다는 제약이 있다 (西望, 1982). 따라서 효소제제의 조제를 위하여는 효소 단백질의 변성이나 실활을 초래하지 않고, 단시간에 처리 가능하며, 조작이 비교적 단순한 방법인 ammonium sulfate에 의한 분획이 적절하다고 판단된다.

분획 과정을 거친 분획효소가 비교적 시판효소의 활성에 가깝게 나타나, 효소제제 조제를 위하여는 추출상태의 조효소보다는 유기용매나 염류를 이용한 분획과정을 거치는 것이 적절하다고 생각되며. 또한 활성의 강도에 차이는 있지만, 어떠한 어종의 내장으로도 분획과정을 거쳐, 안정제, 활성제의 조성을 적절히 조절한다면, 효소제제 개발이 가능하리라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Physiol.*, 22, 79~89.
- Barrett, A.J. 1972. A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. *Anal. Biochem.*, 47, 280~293.
- Barrett, A.J. 1976. An improved color reagent for use in Barrett's assay of cathepsin B. *Anal. Biochem.*, 76, 374~376.
- Barrett, A.J. and H. Kirschke. 1981. Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. In *Methods in Enzymology*, Vol. 80, L. Lorand ed. Academic Press, Inc., New York, pp. 535~561.
- Chen, C.S., C.Y. Tsao and S.T. Jiang. 1989. Purification and characterization of proteases from the viscera of milkfish, *Chanos chanos*. *J. Food Biochem.*, 12, 269~288.
- Erlanger, B.F., N. Kokowsky and W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 271~278.
- Erlanger, B.F., F. Edel and A.G. Cooper. 1966. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. *Arch. Biochem. Biophys.*, 155, 206~210.
- Gildberg, A. 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B, 425~435.
- Haard, N.F. 1992. Enzymes from marine organisms as food processing aids. *J. Aquatic Food Product Technol.*, 1, 17~35.
- Haard, N.F. 1994. Protein hydrolysis in seafoods. In *Seafoods Chemistry, Processing Technology and Quality*, F. Shahidi ed. Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp. 10~33.
- Haard, N.F., L.A.W. Feltham, N. Helbig and J. Squires. 1982. Modification of proteins with enzymes from the marine environment. In *Modification of Protein in Food, Pharmaceutical, and Nutritional Sciences*, R. Feeney and J. Whitaker ed. Advances in Chemistry Series, No 198, American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 223~244.
- Haard, N.F., K. Shamsuzzaman, P. Brewer and K. Arunchalam. 1983. Enzymes from marine organism as rennet substitutes. In *Processing Int. Symp. on the Use of Enzymes in Food Technology*, P. Dupuy ed. Centre National de la Recherche Scientifique, Editions Lavoisier, Paris, pp. 237~242.
- Hameed, K.S. and N.F. Haard. 1985. Isolation and characterization of cathepsin C from Atlantic short finned squid, *Illex illecebrosus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82B, 241~246.

- Heu, M.S., H.R. Kim, D.M. Cho, J.S. Godber and J.H. Pyeun. 1997. Purification and characterization of cathepsin L-like enzyme from the muscle of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118B, 523~529.
- Heu, M.S., H.R. Kim and J.H. Pyeun. 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B, 557~567.
- Kirschke, H., J. Langner, S. Riemann, B. Wiederanders, S. Ansoerge, and P. Bohley. 1980. Protein degradation in health and disease, *Excerpta Medica*, Amsterdam, pp. 15~35.
- Lee, D.S., M.S. Heu, D.S. Kim and J.H. Pyeun. 1996. Some properties of the crude proteases from fish for application in seafood fermentation industry. *J. Korean Fish. Soc.*, 29, 309~319 (in Korean).
- 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, 265~275.
- Novo Nordisk. 1996a. Alcalase Food Grade. *in Product sheet*. B318d-GB500, Denmark, pp1~4.
- Novo Nordisk. 1996b. Neutrase for Protein Upgrading. *in Product sheet*. B855b-GB500, Denmark, pp1~4.
- Pyeun, J.H. and H.R. Kim, 1986. The proteinase distributed in the intestinal organs of fish. 1. Purification of the three alkaline proteinases from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber japonicus*. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 19, 537~546.
- Pyeun, J.H., M.S. Heu, D.M. Cho and H.R. Kim. 1995. Proteolytic properties of cathepsin L, chymotrypsin and trypsin from the muscle and viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *J. Korean Fish. Soc.*, 28, 557~568 (in Korean).
- Pyeun, J.H., D.S. Lee, D.S. Kim and M.S. Heu. 1996. Activity screening of the proteolytic enzymes responsible for post-mortem degradation of fish tissues. *J. Korean Fish. Soc.*, 29, 296-308 (in Korean).
- Sanchez-Chang, L. and O. Ponce. 1981. Gastricsinogen and gastricsin from *Merluccius gay*-purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B, 251~257.
- Simpson, B.K. and N.F. Haard. 1987. Cold-adapted enzymes from fish. In *Food Biotechnology*, D. Knorr ed. Marcel Dekker, inc., New York, pp. 495~527
- Shahidi, F. 1994. Proteins from seafood processing discards. In *Seafood Proteins*, Z.E. Sikorski, B.S. Pan, and F. Shahidi, ed. Chapman & Hall, New York, pp. 171~186.
- Shamsuzzaman, K. and N.F. Haard. 1984. Purification and characterization of chymotrypsin-like protease from the gastric mucosa of harp seal, *Pagophilus groenlandicus*. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 62, 699~708.
- Smith, L.S. 1989. Digestive functions in teleost fishes. In *Fish Nutrition*, J.E. Halver ed. Academic Press, Inc., New York, pp.387~389.
- Squires, J., N.F. Haard and L.A.W. Feltman. 1986. Pepsin isozymes from Greenland cod, *Gadus ogac*. 1. Purification and physical properties. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 65B, 205~209.
- Squires, J., N.F. Haard and L.A.W. Feltman. 1986a. Pepsin isozymes from Greenland cod, *Gadus ogac*. 2. Substrate specificity and kinetic properties. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 65B, 210~214.
- Starky, P.M. 1977. Elastase and cathepsin G: the serine proteinases of human neutrophil leucocytes and spleen. In *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*, Barrett, A. J. ed. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 57~89.
- Ueno, R., K. Sakanaka, S. Ikeda and Y. Horoguchi. 1988. Purification of pepstatin insensitive protease from mackerel white muscle. *Nippon Suisan gakkaiishi*, 54, 691~697.
- Yakurt. 1996. Aroase AP-10 and Pantidase NP-2. *in Product Catalog*. Japan, pp 1-2 (in Japanese).
- Yoshinaka, R., M. Sato and S. Ikeda. 1981. Distribution of trypsin and chymotrypsin, and their zymogens in digestive system of catfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47, 1615~1618 (in Japanese).
- 西望. 1983. 蛋白質の溶解度の差による分割. In *蛋白質・酵素の基礎実験法*, 屈尾武一, 山下仁平 ed. 南江堂, 東京, pp 47~60.

1999년 3월 31일 접수

1999년 7월 3일 수리