

鷄內金 단백질 분해 효소의 정제와 특성

김도완^{#*}, 조혜심¹, 정용진¹, 김광수²

건동대학교 한약재개발학과, 1: 계명대학교 식품가공학과, 2: 영남대학교 식품영양학과

Purification and characterization of Protease from Kyenegum

Do-Wan Kim^{#*}, Hye-Sim Jo¹, Yong-Jin Jeong¹, Kwang-Soo Kim²

Dep. of Oriental Medicine Process, Kundong University, Andong 760-833, Korea

1: Dep. of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu, 704-701, Korea

2: Dep. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

ABSTRACT

Objectives : Kyenegum has been popularly used long as the digestive. The purpose of this study was to investigate the purification and characteristics of protease obtained from Kyenegum crude enzyme.

Methods : Kyenegum protease was purified by precipitation with ammonium sulfate followed by SP-Spharose ion exchange chromatography. The molecular weight of Kyenegum protease was estimated by SDS-PAGE electrophoresis.

Results : Kyenegum protease was 3,087 units/mg protein specific activity, 14.5 purification fold and 9.8 % recovery. The molecular weight of protease was estimated to be 18 kDa. The isoelectric point was pI 8.97 and values of Km and Vmax of its were 48 mg/mL and 2 units/min, respectively.

Conclusion : The result suggests that the protease obtained from Kyenegum has excellent stability of temperature, acid and collagen substrate specificity.

Key words : Kyenegum, Galli Stomachichum Corium, Protease, Purification

서 론

최근 건강에 대한 국민적 관심이 증대됨에 따라 韓藥資源을 이용한 각종 韓方 機能性 製品의 개발이 활발히 진행되고 있으며, 그 시장 또한 급격히 성장함에 따라 각 지자체단체에서는 韓方産業을 地域 特化産業으로 집중 육성하고 있다. 한방산업 중에서 부가가치가 높은 것은 新藥을 포함한 素材 開發과 健康機能性食品 등이다¹⁾.

鷄內金(Galli Stomachichum Corium)은 꿩과(Phasianidae) 동물인 집닭(Gallus gallus domesticus Brisson)의 모래주머니인 胃膜 내벽을 채취하여 건조한 것으로 불규칙적인 긴 타원형 모양이고 두께가 약 2 mm 정도이며 표면은 황록색이거나 황갈색으로 얇고 반투명하며 뚜렷한 물결무늬의 주름이 있다. 그 질이 약하여 잘 부서지고, 단면도 각질처럼 광택이 있다^{2,3)}.

계내금의 性味는 약간 서늘하지만 대체로 평하고, 독이 없으며, 맛은 달며, 歸經은 膀胱, 脾, 胃, 大腸經이며, 食積을 삭이는 작용이 강해 여러 가지 음식의 積滯를 치료한다. 또한 健運하여 瀉痢나 反胃吐食의 증상으로 치료하며, 단맛으로 和緩하고 약간 차가운 약성으로 淸熱하여 解毒消腫하는 효능이 있어 走馬牙疳, 喉閉乳蛾, 입 속의 瘡를 치료한다. 이 외에 固澀止遺 효과가 있어 遺尿, 遺精을 치료하고, 通淋利尿하여 石淋을 치료하며, 淸熱止煩하여 煩熱을 없애고, 散結消癥하여 痰癰, 癥瘕, 經閉, 眼翳, 小兒疳積을 치료하는 효능이 있다⁴⁾. 계내금을 분석한 결과, ventriculin이 함유되어 있어서 胃液分泌를 촉진하며, keratin에는 糖蛋白質을 일부 함유하고 있다는 보고⁵⁾와 본 연구실에서 수행한 실험 결과, 계내금은 넓은 범위의 온도와 pH 영역에서 매우 안정된 반응을 보였으며, 특히 대부분의 효소가 중성 영역에서 최적 활성을 갖는데 비해 계내금 조효소액은 耐酸性 효소였으며, 내염성도 강하게 나타났다. 따라서 본 연구에서는 본초학적 규격의 기본 연구인 계내금 추출물의 효소학적 특성을 밝힌 선행 연구를 기본으로 계내금의 약재 진위와 양품 검사에 활용할 수 있는 구체적인 연구를 위해 계내금에서 유래하는 내산성 단백질 분해 효소를 정제하고, 그 정제 효소의 특성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 계내금 및 조효소액 제조

실험에 사용한 계내금은 풍산제약사(한국산)에서 구입하였으며, 계내금 조효소액 제조는 계내금 분말 25 g과 시판 사과식초(S식품, 총산 6.82, pH 2.42) 500 mL을 균질기(HF-93S, SMT Co., Japan)를 사용해 250 rpm에서 10분 교반한 후 40°C water bath(HB-21, Han bak Co., Korea)에서 150 rpm으로 9시간 동안 진탕하면서 효소를 추출하였다. 계내금 추출액을 여과지(Whatman No.1)로 감압 여과(Circulating aspirator, WJ-15, Sibata Co., Japan)한 후 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.

2) 시약 및 기기

계내금으로부터 얻은 단백질 분해 효소 정제에 사용한 SP-Sepharose는 Pharmacia(Sweden) 제품을, 유리 컬럼은 Millipore(2.2 × 30cm, USA) 제품을 사용하였다. 투석막은 Spectrum 제품 중 MWCO(molecular weight cut-off, USA) 1,000 Da을 사용하였고, 전기영동용 표준 단백질은 Bio-Rad kit를, IEF용 표준 단백질과 gel filtration용 표준 단백질은 Sigma kit를 사용하였다. 효소의 생화학적 특성 분석에 이용한 시약은 모두 Sigma社 제품을 사용하였고, 유리 아미노산 분석용 시약은 특급시약을, 기타 실험용 시약 및 용매는 특급 및 일반 시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 분광 광도계(model 1601, Shimadzu Co., Japan), 동결 건조기(27SW, Samwon Co., Korea), 열풍 건조기(HB-501, Hanbak Co., Korea), 전기영동장치(Hoefer, Pharmacia Co., Sweden), 색차계(Chromameter CR-300, Minolta Co., Japan), pH 측정기(model 691, Metrohm Co., Swiss), IEF(Pharmacia Co., Sweden) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 계내금 효소의 활성 측정

계내금 효소의 활성 측정은 Folin 비색법⁶⁾을 사용하였다. 기질로는 2.0%(w/v) casein을 사용하였는데, casein 1.5 mL에 McIlvaine buffer(0.1 M citric acid + 0.2 M Na₂HPO₄) 1 mL을 첨가하여 50°C

water bath에서 3분 예열시킨 후 효소액 0.5 mL을 첨가하고, 50°C에서 60분간 반응시켰다. 그 후 3 mL의 0.4 M trichloroacetic acid(TCA)를 첨가하고 여과지(Whatman No. 1)로 여과하여 얻은 여과액 1 mL과 0.4 M Na₂CO₃ 5 mL과 2배 희석시킨 phenol 시약 1 mL을 넣고 50°C에서 30분간 발색 후 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 50°C에서 60분간 1 µg에 상당하는 tyrosine을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 하였다.

2) 계내금 효소의 분리 및 정제

계내금 조효소액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액인 효소 시료 95 mL을 취하여 5~25% ammonium sulfate로 포화시키면서 각 단계의 침전물을 증류수에 녹여 분획하고, 활성을 측정하였다. 측정 결과 15% ammonium sulfate 분획이 가장 높은 활성을 나타내었으며, 위에서 분획한 침전물을 20 mL의 증류수에 녹이고, 20 mM sodium acetate(pH 4.5) 완충 용액에서 ultra filtration membrane(MWCO 1,000Da)이 부착된 Amicon Diaflo System을 사용하여 4°C에서 24시간 투석하였다. 계내금 효소의 정제는 유리칼럼에 10 cm 높이로 SP-Sepharose를 채우고, 90% 50 mM sodium acetate(pH 4.5), 10% 50 mM sodium acetate, 1N NaCl, pH 4.5로 평형화시킨 후 농축된 효소 시료를 주입하고 50 mM sodium acetate, 1N NaCl, pH 4.5를 60분간 0~100%로 선형구배를 주어 용출시켰다. 용출시킨 분획을 모아 전기영동을 실시하였으며, 크로마토그래피를 이용한 정제 과정에서는 280 nm의 흡광도로 단백질 농도를 표시하였다. 계내금 효소의 단백질의 함량 측정은 Bio-rad社의 protein assay kit를 사용하였으며, bovine serum albumin을 표준품으로 commassie brilliant blue G-250이 단백질과 결합하여 붉은 색이 푸른색으로 변하고, 최대 흡수 파장이 옮겨지는 것을 이용하는 Bradford 등⁷⁾의 방법으로 정량하였다.

3) 계내금 효소의 분자량 측정

전기영동은 15% acrylamide gel을 사용하였으며, 120 V의 constant voltage 조건으로 1시간 30분 동안 행하였으며, commassie blue로 염색하여 단백질의 밴드를 확인하였다⁸⁾. 이때 사용한 표준 단백질은 Bio-rad社의 precision standard maker(broad range)를 사용하였다. 효소의 분자량은 동일한 조건에서

전기 영동한 표준 단백질의 이동거리와 효소 단백질의 이동거리를 비교하여 산출하였다. 이때 사용한 표준 단백질은 trisphosphate isomerase(M.W. 26,600), myoglobin(M.W. 18,400), lysozyme(M.W. 14,300), aprotinin(M.W. 6,200) 등을 사용하였다.

4) 계내금 효소의 등전점 및 반응 속도

계내금 효소의 등전점(pI ; isoelectric point)은 isoelectric focusing(IEF)에 의해 측정하였으며, pH 3~10용 13% acrylamide gel 상에 정제된 효소와 pI 표준 단백질을 주입하여 전기 영동한 후 silver staining하여 등전점을 확인하였다. 이때 IEF 표준곡선 작성을 위한 표준 단백질은 IEF Mix 4.91~9.59로 β-lactoglobulin A(pI 4.93), carbonic anhydrase II(pI 6.41), carbonic anhydrase I(pI 6.59), myoglobin(pI 8.12), trypsin precursor(pI 8.23), cytochrome C(pI 9.59) 등을 사용하였다. 계내금 효소의 반응속도는 casein을 0.1 M McIlvaine buffer(pH 2.5)에 녹여 casein의 농도를 mL 당 1~10 mg로 조절하고, 5.5 unit의 효소량을 가하여 50°C에서 10분간 반응시켜 초기 분해 속도를 측정하고, 기질 농도와의 관계를 Lineweaver-Burk식에 적용하여 기질에 대한 효소 친화성을 나타내는 Km 값과 최대 반응 속도를 나타내는 Vmax 값을 구하였다.

5) 계내금 효소의 온도 및 pH 안정성

계내금 효소의 온도 안정성을 알아보기 위해 40, 50, 60, 70°C에서 계내금 효소액을 10분 동안 예열시킨 후 4°C에서 방치한 후 반응이 종료된 효소의 활성도를 측정하였다. pH에 대한 계내금 효소의 안정성을 조사하기 위해 McIlvaine buffer의 0.1 M citric acid와 0.2 M Na₂HPO₄를 이용하여 pH를 1.0~8.0으로 조절한 후 각각의 pH buffer 1 mL과 계내금 효소액 1 mL을 혼합하여 40°C에서 3시간 처리한 후 pH(1 N HCl로 조절)를 약 2~3가지 낮춘 후 효소 활성도를 측정하여 활성의 변화를 조사하였다.

6) 계내금 효소의 기질 농도 및 기질 특이성

계내금 효소 활성에 미치는 기질 농도의 영향을 알아보기 위해 Jeong⁹⁾의 방법을 변형하여 casein 용액 농도를 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%(w/v)로 조제한 후 casein 농도 변화에 따른 계내금 효소 활성도를 측정하였다. 계내금 효소의 기질에 대한 특이성을 조사하기 위해 egg albumin, azocasein, elastin,

collagen, casein 등의 단백질을 사용하여 0.6%의 기질 농도에서 각각의 효소 활성을 비교하였다.

7) 계내금 효소의 금속 이온 영향

금속 이온이 계내금 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 Kim10)의 방법에 준하여 CaCO₃, CuSO₄ · 5H₂O, ZnSO₄ · 7H₂O, MnSO₄ · 4H₂O, MgSO₄ · 7H₂O, FeSO₄의 금속 염류를 대상으로 10⁻³ M에서 효소 활성도를 조사하였다. 각 금속 염류 용액의 조제는 상기 농도의 용액을 pH 3(HCl로 조절)의 증류수에 용해하였다. 각각의 금속 염류 용액과 계내금 효소액을 예열시킨 후 기질을 가하여 효소 반응을 시켰으며, 비색도를 측정하여 활성 값을 나타내었다. 이 때 대조구는 효소만이 기질에 반응했을 경우와 금속 이온만이 기질에 반응했을 경우를 비교 조사하였다.

결 과

1. 계내금 효소의 정제

계내금 조효소액을 15% ammonium sulfate 침전시킨 후 SP-Spharose로 분리한 결과, Fraction No. 34~38 사이에서 한 개의 활성 peak가 분리되었다 (Fig. 1). 활성 peak가 큰 효소 분획을 모아 Amicon system으로 농축한 후 SDS-PAGE 전기영동을 실시하여 단일밴드를 찾았으며, 이로써 계내금으로부터 추출한 조효소액에서 순수한 단백질 분해 효소가 완전히 정제되었음을 확인하였다(Fig. 2, 3). 계내금으로부터 얻은 조효소액을 각 단계별 정제 과정 중 효소 활성 및 단백질 함량을 조사한 결과, 초기 단계의 조효소액 총활성도, 단백질 함량 및 비활성도는 각각 15.356 units, 70.58 mg, 217.56 units/mg protein이었다. 효소 정제의 최종단계인 SP-Spharose 후의 효소의 총활성도, 단백질 함량 및 비활성도는 각각 2.223 units, 0.72 mg, 3,087.5 units/mg protein이었으며, 조효소액에 비해 14.5배의 정제도를 나타내었으며, 정제 수율은 9.8%였다 (Table 1).

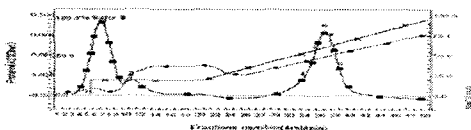


Fig. 1. Ion-chromatogram of Kyenegum protease with

SP-Sephrose.(• : OD 280nm, × : 1M NaCl linear gradient, ◦ : Enzyme relative activity)

Table 1. Summary of Purification of Protease from Kyenegum

Purification steps	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity	Recovery (%)	Purification fold
			(units /mg protein)		
Initial	15,356	70.58	217.56	100.00	1.0
Ammonium sulfate	2,909	7.36	407.47	10.43	1.9
precipitation Ion exchange chromatography	2,223	0.72	3087.5	9.80	14.5

2. 계내금 효소의 분자량

계내금 효소의 분자량 측정을 위해 표준 단백질과 계내금 정제 효소를 SDS-PAGE 전기영동에 의한 분자량 측정 결과, 모두 단일 밴드를 확인하였으며, 분자량이 약 18 kDa 정도의 단일 단백질이었다. 따라서 계내금에서 분리한 단백질 분해 효소는 한 개의 단백질로 구성된 monomer임을 알 수 있었다 (Fig. 2, 3).

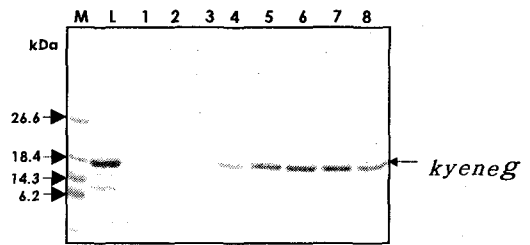


Fig. 2. SDS-PAGE electrophoresis of Kyenegum protease. Lane M : MW standard, Lane L : loading sample, Lane 1~8 : IEX fractions above chromatogram. (Trisphosphate isomerase (M.W. 26,600), Myoglobin(M.W. 18,400), Lysozyme(M.W. 14,300), Aprotinin(M.W. 6,200).

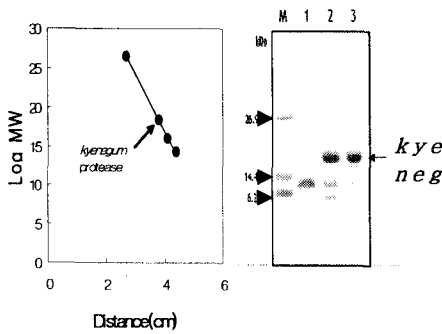


Fig. 3. Determination of molecular weight of Kyenegum protease by SDS-PAGE electrophoresis. (Trisphosphate isomerase(M.W. 26,000), Myoglobin(M.W. 18,400), Lysozyme(M.W. 14,300), Aprotinin(M.W. 6,200).

3. 계내금 효소의 등전점 및 반응속도

계내금 효소의 등전점(pI)은 trypsin precursor와 cytochrome C의 등전점 사이인 pI 8.97(pH 2.3)로 나타났다(Fig. 4). 계내금 효소의 반응속도는 계내금 단백질 분해 효소의 활성에 미치는 기질 농도의 영향을 조사하여 각 기질의 농도에 따른 활성을 측정 한 후 그 값을 Lineweaver-Burk plotting하여 나타 내었으며, Km치는 48 mg/mL, Vmax 값은 2 mg/min이었다(Fig. 5).

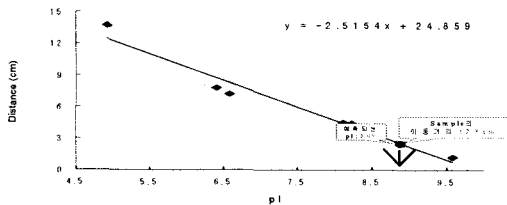


Fig. 4. Determination of pI of Kyenegum protease by isoelectronic focusing. (β -Lactoglobulin A(pI 4.93), Carbonic anhydrase II (pI 6.41), Carbonic anhydrase I (pI 6.59), Myoglobin(pI 8.12), Trypsin precursor(pI 8.23), Cytochrome C(pI 9.59).

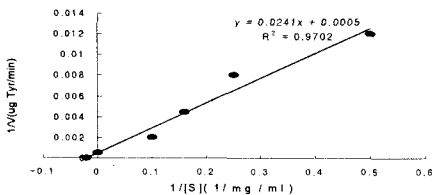


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of Kyenegum protease.

4. 계내금 효소의 온도 및 pH에 대한 안정성

온도가 계내금 효소에 미치는 영향을 조사한 결과, 40°C에서 3시간 경과한 후 서서히 효소의 활성이 줄어들었으며, 60°C는 3시간 경과 후에도 약 30% 정도 활성이 감소되었지만, 70°C에서는 약 1시간 후부터 70%정도 활성이 감소하였다(Fig. 6). 계내금 효소의 pH에 대한 안정성을 실험한 결과, pH 4.0 이하에서 활성이 매우 높았으나, pH 4.0 이상으로 증가함에 따라 계내금 효소의 활성이 서서히 감소하였으나 여전히 80%의 높은 활성을 보였다(Fig. 7).

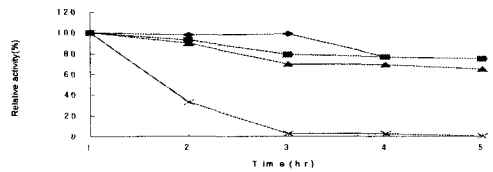


Fig. 6. Effects of temperature on the thermal stability of Kyenegum protease.

(◆ : 40°C, ■ : 50°C, ▲ : 60°C, × : 70°C)

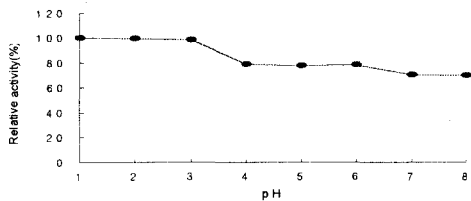


Fig. 7. Effect of pH on the stability of Kyenegum protease.

5. 계내금 효소의 기질 및 기질 특이성

계내금 효소에 미치는 기질 영향을 알아보기 위해 0.5~2.0%의 casein 용액을 사용하여 효소활성을 측정 한 결과, casein의 농도가 1.5%까지는 효소 활성이 증가하여 1.5%에서 가장 높게 나타났다(Fig. 8). 본 연구에 사용된 계내금 단백질 분해 효소의 기질 특이성에 대한 실험 결과를 살펴보면, 계내금 효소는 일반적인 효소가 잘 분해하지 못하는 섬유상 단백질인 collagen 단백질에 대해 기질 특이성이 매우 높은 것으로 밝혀졌으며, hemoglobin이나 azocasein 단백질에 대한 분해력은 나타나지 않았다(Table 2).

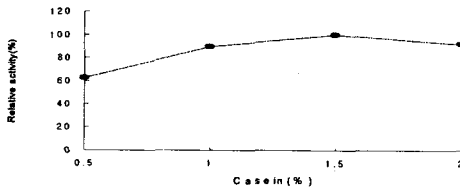


Fig. 8. Effect of substrate concentration on the activity of Kyenegum protease.

Table 2. Specificity of Substrate on the Activity of Kyenegum Protease

Substrate	Relative activity(%)
Hemoglobin	0
Casein	26.6
Azocasein	0
Collagen	100.0
Gelatin	0.7
Ovalbumin	20.2

6. 계내금 효소액의 금속 이온 영향

각종 금속 이온이 계내금 효소에 미치는 영향을 조사한 결과, 대부분의 금속 이온들이 계내금 효소의 활성에 큰 영향을 미치지 않았지만, Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺은 계내금 효소의 활성을 오히려 조금 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Effects of Metal Ion on the Activity of Kyenegum Protease

Ion	Relative activity(%)
Control	100.0
Ca ²⁺	103.7
Cu ²⁺	114.9
Fe ²⁺	98.1
Mg ²⁺	98.0
Mn ²⁺	102.5
Zn ²⁺	103.7

고찰

현재 새로운 고부가가치 산업으로 주목 받고 있는 한방산업은 전통 한약자원을 활용한 각종 신약 개발과 산업용 소재 개발, 기능성 제품 등 그 분야가 매우 다양함으로 많은 지역자치단체에서 특화사업으로 선택, 육성하고 있다. 계내금은 소화제로 많이 이용하고 있으며, 예비실험 결과 단백질 함량이 높아 산업적 효용 가치가 높은 효소제로 개발 가능성이 있으므로 본 논문에서는 계내금에서 단백질 분해 효소를 정제하고, 그 정제 효소의 특징을 조사하

였다.

계내금 단백질 분해 효소는 15% ammonium sulfate 침전시킨 후 SP-Spharose로 분리하고, Amicon system으로 농축한 후 SDS-PAGE 전기영동을 실시하여 단일밴드를 찾았으며, 효소 정제후 총활성도, 단백질 함량 및 비활성도는 각각 2.223 units, 0.72 mg, 3,087.5 units/mg protein이었으며, 조효소액에 비해 14.5배의 정제도와 9.8% 정제 수율을 보였다.

계내금 단백질 분해 효소의 등전점인 pI 값은 8.97로 나타났는데, 이 결과는 곤충 병원성 곰팡이에서 분리한 protease 정제 효소의 pI 값이 9.5라는 연구¹¹⁾ 결과와 일치하였으며, 분자량은 약 18 kDa으로 단일 단백질이었다.

계내금 단백질 효소의 Km치는 48 mg/mL이었으며, Vmax 값은 2 mg/min이었으며, 온도 안정성을 조사한 결과, 60°C까지는 매우 높은 활성을 유지하는 것으로 나타났는데, 이 결과는 *Penicillium sp.*에서 생성하는 acid protease는 40°C에서 1시간 처리 후 서서히 활성이 감소되어 3시간 경과 후 30%정도 감소되었으며, Opapin 등¹²⁾의 사상균 protease에 관한 보고에 의하면 *Aspergillus. awamori* U-3이 생성하는 protease의 열 안정성은 60°C에서 55% 활성이 감소 되었다는 결과와 비교해 볼 때 본 계내금 효소는 미생물이 생성하는 acid protease에 비해 열에 대한 안정성이 크다는 것을 알 수 있었다.

계내금 효소의 pH에 대한 안정성을 실험한 결과, pH 4.0 이하에서 활성이 매우 높았으며, 넓은 pH 영역에서 안정하였는데 이 결과는 Kim¹¹⁾의 보고에 의하면 *Penicillium sp.*에서 생성하는 acid protease에서는 pH 2.0~6.0까지 넓은 범위에서 그 활성이 안정하였으며, pH 2.0 이하로 떨어지거나 6.0 이상으로 올라감에 따라 효소 활성이 감소한다고 하였으며, Choi 등¹³⁾의 보고에서도 *Penicillium citrinum* C-39에 의한 acid protease는 pH 3.0~5.0 에서 효소 활성이 비교적 안정하다고 보고 하였다. 본 실험에 사용한 계내금 단백질 분해 효소는 일반적으로 미생물이 생성하는 acid protease와는 달리 넓은 pH 영역에서 그 활성이 안정됨으로 산업적인 효용 가치가 충분한 내산성 단백질 분해 효소로 확인되었다.

본 연구의 계내금 효소는 casein의 농도 1.5%까지는 효소 활성이 농도에 비례하여 증가하여 1.5%에서 가장 높게 나타났다. 이는 *Aspergillus oryzae*가 생산하는 protease가 casein의 농도 0.5%까지는 효소 활성이 농도에 비례하여 증가하였으나, 그 이

상의 농도에서는 완만한 증가를 보였다는 보고¹⁴⁾와 Todanobau¹⁵⁾의 보고에서 *Aspergillus oryzae*가 생산하는 KC-15에 의한 protease가 casein 2.0% 이상에서는 활성이 감소하였다는 결과와 본 연구에서의 계내금 protease는 유사한 경향을 보였다. 각종 금속 이온이 계내금 효소에 미치는 영향을 조사한 결과, 대부분의 금속 이온들이 계내금 효소의 활성에 큰 영향을 미치지 않았지만 Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺은 계내금 효소의 활성을 오히려 조금 증가시키는 것으로 나타났는데 이는 *Aspergillus oryzae*가 생산하는 protease는 Mn²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺에 의해 활성이 증가되었으나, Hg²⁺, Sn²⁺는 활성을 완전히 저해시켰다는 보고¹⁶⁾와 *Aspergillus oryzae*가 생산하는 KC-15에 의한 protease는 10-2 M의 Fe³⁺, Hg²⁺, Sn²⁺에 의해 효소의 활성을 크게 저해시켰다는 결과¹⁷⁾와 비교해 볼 때 계내금 단백질 분해 효소는 금속 이온에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 또한 Jeng 등¹⁸⁾은 멀치에서 분리한 protease는 K⁺이온을 첨가한 경우 1 mM의 농도에서는 protease 활성이 약간 저해되었으나, 10 mM 첨가에서는 활성이 다소 증가하였으며, Mg²⁺ 이온과 Cu²⁺ 이온은 첨가량이 높을수록 활성이 증가하였다는 연구와 유사한 경향을 보여 본 계내금 효소는 금속 이온에 매우 안정하여 다양한 산업 현장에서 활용 가능성이 높은 유용한 효소 자원으로 밝혀졌다. 본 연구에 사용된 계내금 단백질 효소의 기질 특이성에 대한 실험 결과, 일반적인 효소제는 콜라겐에 제한적인 작용은 하지만, 변성되지 않은 콜라겐 분자의 독특한 triple helical region의 peptide bond를 거의 분해하지 못하는 것으로 보고¹⁹⁾되어 있는데 본 실험에 사용된 계내금 단백질 분해 효소는 콜라겐 기질 특이성이 매우 높은 것으로 보아 단백질 분해 효소 중 collagenase라 유추되며, 부가적인 연구가 요구된다.

결론

계내금에서 추출한 단백질 분해 효소를 정제하고, 그 특성을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 계내금 단백질 분해 효소를 정제하여 최종 효소 총활성도, 단백질 함량 및 비활성도가 각각 2.23 units, 0.72 mg, 3,087.5 units/mg protein이었으며, 조효소액에 비해 14.5배의 정제도, 9.8%의 정제 수율을 보였으며, 분자량이 약 18 kDa 정도의 단일 단백질로 구성된 monomer임을 확인하였다.

2. 계내금 단백질 분해 효소의 등전점은 pI 8.97(pH 2.3)이었고, Km치는 48 mg/mL, Vmax 값은 2 mg/min이었으며, 각종 금속 이온이 계내금 효소에 미치는 영향을 조사한 결과, 대부분의 금속 이온들이 계내금 효소의 활성에 큰 영향을 미치지 않았지만 Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺은 계내금 효소의 활성을 오히려 조금 증가시키는 것으로 나타났다.

3. 계내금 단백질 분해 효소의 온도 및 pH에 대한 안정성은 60℃ 이하와 pH 6.0까지는 80% 이상의 활성을 유지하여 넓은 온도 범위와 pH 영역에서 매우 안정한 것으로 나타나 산업적으로 활용 가치가 매우 높은 효소였다.

4. 계내금 단백질 분해 효소의 기질 영향은 casein의 농도가 1.5%까지는 효소 활성이 농도에 비례하여 증가하여 1.5%에서 가장 높게 나타났다. 기질 특이성에 대한 실험 결과, 계내금 효소는 일반적인 효소가 잘 분해하지 못하는 섬유상 단백질인 콜라겐 단백질에 대해 특이적으로 기질 특이성이 높은 것으로 밝혀졌다.

감사의 글

본 연구는 2004년 지역산업(공동)기술개발사업의 일부로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 대구가톨릭대학교 한방바이오산업육성지원센터. 한방산업의 육성과 미래(유통/판매). 2004:219-220.
2. 배병철. 전통의학연구소. 본초약재도감. 1978.
3. 강병수 외. 본초학. 영림사. 1999:374.
4. 서부일. 알기쉬운 본초학. 대구:대구한의대학교출판부. 2004:245.
5. 김창민 외. 중약대사전. 서울:도서출판 정담. 1997:233.
6. 日本醸造協會. 國稅廳所定分析法. 日本. 1993:223-226.
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:24 8-254.

8. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins as the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;277:680-685.
9. Jeong YJ, Yeo SH and Lee OS. Study on the simultaneous production of the bacteria cellulose and vinegar by *Gluconacetobacter persimmonis* KJ145T. *Korean J. Food & Nutr.* 2003;32(7):981-986.
10. Ko HJ, Kim HK, Kim BG, Kang SC and Kwon ST. Purification and characterization of protease from entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, Agricultural chemistry and biotechnology. 1997;40(5):388-394.
11. Kim SY. Studies on the acid stable protease from *Penicillium* sp. (part I) Isolation of *Penicillium* sp. and the properties of the acid protease. 1973;1(2):93-99.
12. Opapin B. Effect of some surfactants on the production of acid protease by *Aspergillus phenicis* and *Aspergillus awamori*. *J. Ferment. Technol.* 1982;60:167-171.
13. Choi C, Cho YJ and Son GM. Production of acid protease by *Penicillium citrinum* C-39 and characteristics of the enzyme. *자원개발 연구*. 1988;7:13-18.
14. User's guide version 6, 4th ed., SAS Institute Inc. Cary. NC. USA. 1992;37(2):1457.
15. Todanobau N, Seichi N and Nobuyoshi L. Purification and properties of alkaline protease from *Aspergillus oryzae* *Agr. Bio l. Chem.* 1973;37:2685-2694.
16. Battista OA. Microcrystalline collagens. *Microcrystal Polymer Science*. 1975:58.
17. 정재현. *Aspergillus oryzae*가 생산하는 Protease에 관한 연구. 청주:충북대학교대학원 석사학위논문. 1981.
18. Jeong YJ, Seo KI and Kim KS. Physicochemical properties of market and intensive persimmon vinegar. *J. of East Asian of Dietary Life*. 1996;6:355-363.
19. Lee MJ and Chung MJ. Studies on the production of by *Aspergillus oryzae* KC-15 and characteristics of the enzymes. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 1980;8(2):77-85.