

단백질 분해 효소가 세척에 미치는 영향

— 효소와 오염 기질의 특성을 중심으로 —

이 정 숙 · 심 윤 정

경상대학교 자연과학대학 의류학과

Influences of Protease on the Removal of Protein Soils from Cotton Fabrics

— Emphasis on the Characteristics
of Enzyme and Soil Substrates —

Jeong Sook Lee · Yun Jeong Shim

Department of Clothing & Textiles, College of Natural Sciences

Gyeongsang National University

(1993. 7. 20 접수)

Abstract

The influences of protease on the removal of various protein soils from cotton fabrics were studied. The human epidermal stratum corneum, hemoglobin and casein were used as protein soils. The soiled fabrics were denatured by steaming for 30 min. before washing and laundered using Terg-O-Tometer under washing conditions. The removal efficiency was evaluated by analysis of protein on the fabrics before and after washing by means of copper-Folin method.

The relations between the removal and the characteristics of protease were discussed. Also the degradation of protein were examined by microscopy. The separation of human epidermal stratum corneum after hydrolysis was examined by SDS-PAGE.

The results obtained were as follow :

1. The protein from the soiled cotton fabric was removed effectively by adding protease. The removal of protein was increased in proportion to increasing of the enzyme concentration up to a certain point, but it began to decrease above the point. The removal effect was high in the order of casein>human epidermal stratum corneum>hemoglobin.

Especially the protein was more effectively removed in AOS solution(pH 9.5) containing enzyme.

2. When protease was used with AOS, the removal of protein was efficiently showed in relatively short time(5~15min.) compared to using AOS only. It is due to the properties of this enzyme that

* 이 논문은 1990년도 교육부지원 한국 학술진흥재단의 지방대 육성 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

reacts with very short time.

3. Even at low temperature the removal efficiency of enzyme was relatively higher compared with the activity of enzyme. The removal of protein soil was increased up to a maximum near 50°C, and then decreased.

4. The removal of protein by protease was improved with the increase of alkalinity in the pH range from 9.5 to 11.0 but it began to decrease above pH 11.0.

5. According to the increase of mechanical agitation, the removal effect was increased. But the removal efficiency of protease was more effective compared with the agitation in detergency.

6. According to the SDS-PAGE separation and micrograph it was confirmed that the human epidermal corneum was effectively hydrolysed by the enzyme added. So the fragments of protein were removed more efficiently by means of the interfacial reaction of AOS.

I. 서 론

단백질 오염은 환경, 인종 및 개인차 등에 의해 많은 차이가 있으나 모든 오염 중에 20~25%를 차지하고 있는 것으로 보고되어 있다.¹⁾ 또한 皆川등²⁾은 1~3일간 착용한 의류의 단백질 및 피지를 정량한 결과, 유기 오염종의 10~40%가 단백질이라고 보고하였다.

이러한 단백질 오염은 섬유상에 부착된 초기에는 수용성이지만 시일이 경과함에 따라 물리적 혹은 화학적인 작용에 의해서 부분적인 변성 과정을 거쳐서 변성 단백질이 되므로 점차로 불용성이 되는 것이 많다.

변성된 단백질 오염은 섬유사이에 고착되어 섬유에서 쉽게 제거하기 어려우므로 세척에서 문제가 되고 있다. 따라서 단백질 가수분해 효소(protease or proteolytic enzyme)를 세척에 사용하여 섬유에 고착되어 있는 단백질을 분해하여 수용성이 되게 하거나 물에 분산되도록 쉽게 할 필요가 있다.

세척에 프로테아제를 이용할 경우에는 오염 단백질의 종류가 다양하므로 기질 특이성이 넓은 효소가 바람직하다. 또한 세제는 여러가지 계면활성제 및 조제가 첨가된 복합 성분으로 되어 있으므로 세제에 포함된 각 성분과 상호적용성이 높은 효소가 요구된다. 그외, 세척온도, 세척시간, 기계적인 힘 등 여러가지 활성도가 높고, 기질 특이성이 넓으면서, 비교적 안정 범위가 큰 효소를 선택하는 것이 효율적이다.

이상과 같은 요구사항을 충족시키기 위하여 여러가지 세제용 효소가 개발되고 있지만, 현재 널리 사용되고 있는 것은 Alcalase[®](상품명, NOVO산업)이다. Alcalase[®]

은 효소 subtilisin Carlsberg가 주성분인 endoprotease이다.³⁾ Sutilisin은 Linderstr m-Lang와 Ottensen⁴⁾이 최초로 발견한 효소로서, 오늘날 여러가지 bacillus속의 미생물에서 생산된 알칼리성 세린 protease를 일반적으로 부르는 명칭⁵⁾이다. 이 효소는 기질 특이성이 넓고 높은 pH에서도 작용할 수 있는 장점이 있어서 세제용 효소로 주로 사용하고 있다.

한편 세척 시험용 단백질 오염으로는 여러가지가 있으나 일상 생활에서 흔히 의류에 부착되는 주된 단백질 오염으로는 인체에서 탈락된 표피 각질층, 혈액 및 우유 등을 들 수 있다.

따라서 본 연구에서는 의류에 부착된 단백질 오염을 효과적으로 제거하기 위하여 세제용 효소로 주로 이용되고 있는 subtilisin Carlsberg를 선정하고 대표적인 단백질 3종류를 모델 오염으로 하여 효소의 특성과 오염 기질과의 관계가 세척에 어떤 영향을 미치는지를 중점적으로 구명하고자 했다. 즉, 인체에서 탈락된 표피 각질층 오염 또는 피부에 마찰시켜서 제작하고, 헤모글로빈 및 카페인 오염 또는 각각 소정의 양을 면포에 점적하여 제작하였다. 이때 모든 오염포는 가압 수증기하에서 열처리하여 변성시켜서 사용하였다. 일부 실험에서는 EMPA 116을 사용하여 비교가 되도록 했다. 또한 효소에 의하여 단백질 오염 기질이 붕괴 및 분산되는 작용을 주사 전자 현미경 및 광학 현미경을 이용하여 인체 표피 각질층 오염포를 중점적으로 살펴보았다. 그리고 시료 직물로부터 오염이 제거되는 세척 거동을 효소의 특성과 관련지어 조사하고 여러가지 세척 조건에서 세척성의 변화를 검토하고자 하였다. 아울러 효소가 표피 각질층

단백질을 저분자로 가수분해시키는 작용을 SDS-PAGE 법에 의해 검토하고자 하였다.

II. 실 험

1. 시약 및 시험포

1) 시약

Protease : Bacillus licheniformis로부터 생산된 subtilisin Carlsberg(NOVO산업, 상품명 : Alcalase 1.0T)를 사용하였다. 효소의 활성도는 TNBS법⁶⁾에 의하여 측정된 결과 2.30AU/g으로 나타났다.

혈액단백질 : Hemoglobin(인체), 생화학용(Sigma 화학주식회사, No. H-7379)

우유단백질 : Casein, 생화학용(Sigma 화학주식회사)

Acrylamide : 생화학용(Aldrich 화학주식회사, No. 148 57-1)

Bisacrylamide : 생화학용(Sigma 화학주식회사)

Sodium dodecyl sulfate(SDS) : 시약 특급(Aldrich 화학주식회사)

β -Mercaptoethanol : 시약일급(화광 순약주식회사)

Molecular weight standards(M.W.66,000-14,200) : 생화학용(Sigma 화학주식회사)

N, N, N', N'-tetramethyl ethylene diamine(TEMED) : 생화학용(Sigma 화학주식회사)

Coomassie brilliant Blue R 250 : 시약일급(동경화성공업주식회사, No. B-1131)

2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid sodium salt(TNBS) : 생화학용(화광 순약주식회사)

N, N-Dimethyl casein(DMC) : NOVO산업주식회사

Sodium dodecyl benzene sulfonate(LAS) : 시약일급(동경화성주식회사)

α -Olefin sulfonate(R : C₁₁₋₁₈, AOS) : 애경산업주식회사

Triton X-100 : 시약 1급(화광순약공업주식회사)

Folin-Ciocalteu's phenol reagent : 생화학용(Merck 화학주식회사)

Potassium sodium tartrate : 시약특급(임순약 주식회사)

Cupric sulfate : 시약일급(관동화학주식회사)

Sodium tripolyphosphate(STPP) : 시약일급(Shinyo Pure화학주식회사)

Sodium metasilicate : 시약특급(Chameleon 화학주식회사)

기타 시약은 시약일급을 사용하였다.

2) 시험포

시험포는 한국의류시험검사소에서 제작한 섬유류 제품의 염색 견뢰도 시험용 청무백포(KS K 0905)를 사용하였으며 그 특성은 Table 1과 같다. 시험포는 0.1N 탄산나트륨 용액으로 액비 30 : 1, 100°C에서 60분간 수세한 다음 자연 건조하여 사용하였다.

Table 1. Characteristics of fabric

Material	Cotton 100%
Weave	Plain
Fabric count (ends×picks / 5cm)	141×140
Yarn number (Ne)	36×36
Thickness(mm)	0.268
Reflectance of surface(%) (at 520 nm)	78.3

2. 단백질의 분자량 측정

단백질의 분자량은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에 의하여 측정하였다. SDS-PAGE는 Mighty(LKB사 제작)를 사용하여 Laemmli⁷⁾법에 따라 15.0%(m/v) 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 시료와 분자량 표준 물질을 동시에 전기 이동시켰다. 겔은 Coomassie brilliant blue R 250으로 착색하고, 과량으로 착색된 염료는 증류수 : 메타놀 : 빙초산(60 : 30 : 10, V/V)의 혼합액으로 제거하였다. 시료의 분자량은 분자량 표준물질의 이동거리로부터 작성된 검량선에 의하여 산출하였다.

3. 단백질 오염포의 제조

1) 헤모글로빈 및 카제인 오염포

정련한 시험포는 5cm×10cm로 잘라서 가장자리의 물을 풀어 2.0%(W/V) 헤모글로빈 및 카제인 수용액을

각각 400 μ 씩 균일하게 점적하여 자연 건조시켰다(미변성 단백질 오염포). 열변성 단백질 오염포는 미변성 오염포를 가압 수증기(120 $^{\circ}$ C)하에서 30분간 처리하여 제조하였다. 이와같이 만든 열변성 헤모글로빈 오염포를 0~5 $^{\circ}$ C에 보관하여 세척 실험에 사용하였다.

2) 표피 각질층 오염포

표피 각질층 오염포는 10cm \times 15cm의 면포를 일주일~열흘간 신체부위에 관계없이 피부에 마찰시켜 표면 반사율이 40.0 \pm 2%사이인 오염포를 만들고, 이것을 5cm \times 10cm의 크기로 절단하여 가압 수증기하에서 30분간 열처리하였다. 이와같이 만든 오염포는 0~5 $^{\circ}$ C에 보관하여 사용하였다.

3) 기성 인공 오염포

혈액, 우유, 카본블랙을 침지법에 의해 인공 오염시킨 EMPA 116(Swiss Federal Laboratories for Materials Testing & Research제작)을 사용했다.

4. 세척

1) 세액

세척에 사용한 세액의 조성은 Table 2와 같으며 용수로는 증류수를 사용하였다.

2) 세척 방법

Terg-O-tometer를 사용하여 소정의 온도로 맞춘 500ml 세액에 5cm \times 10cm오염포를 3매 넣고 40 \pm 2cpm으로 30분간 세척한 후 같은 조건으로 증류수 500ml에서 3분간 2회 행구었다.⁸⁾

Table 2. Composition of detergent solutions

(%, W/V)

Surfactants			Na ₂ SO ₄	STPP	Na ₂ SiO ₃	pH
LAS	AOS	Triton X-100				
0	0	0	0	0	0	5.8
0.1	0	0	0	0	0	6.5
0	0.1	0	0	0	0	6.8
0.05	0.05	0	0	0	0	6.7
0	0	0.1	0	0	0	6.2
0	0.02	0	0.08	0	0	7.0
0	0.02	0	0.0784	0.0016	0	8.0
0	0.02	0	0.04	0.04	0	9.5
0	0.02	0	0.028	0.04	0.012	11.0
0	0.02	0	0.01	0.04	0.03	12.0

3) 세척률 평가

① 표피 각질층, 헤모글로빈 및 카제인 단백질 오염의 세척률은 세척 전후의 오염포상의 단백질을 다음과 같이 동-Folin법⁹⁾에 의해 정량하였다. 즉 250ml삼각 플라스크 안에 0.1N NaOH수용액 100ml를 넣은 다음 각각의 시료포를 1매씩 넣고 항온진탕기를 사용하여 90 \pm 2 $^{\circ}$ C, 80 \pm 1cpm에서 120분간 열추출하였다. 추출액을 동-Folin 시약에 의해 발색시킨 후 UV spectrophotometer(Shimadzu, Model UV-240)를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하고 다음 식에 의하여 세척률을 계산하였다.

$$\text{세척률}(\%) = \frac{A_s - A_w}{A_s - A_0} \times 100$$

여기서 A₀: 원포에서 추출한 액의 흡광도

A_s: 세척전 오염포에서 추출한 액의 흡광도

A_w: 세척후 오염포에서 추출한 액의 흡광도

② EMPA 116은 색차계(Tokyo Denshoku Co. LTD)의 Y-filter를 사용하여 원포와 세척 전후의 세척포의 표면 반사율을 측정하고 Kubelka-Munk식에 따른 K/S값으로 아래 식에 의하여 세척률(D)를 계산하였다.

$$D(\%) = \frac{(K/S)_s - (K/S)_w}{(K/S)_s - (K/S)_n} \times 100$$

K/S = (1-R)²/2R R = 표면 반사율/100

(K/S)_n: 원포의 K/S값

(K/S)_s: 세척전 오염포의 K/S값

(K/S)_w: 세척후 오염포의 K/S값

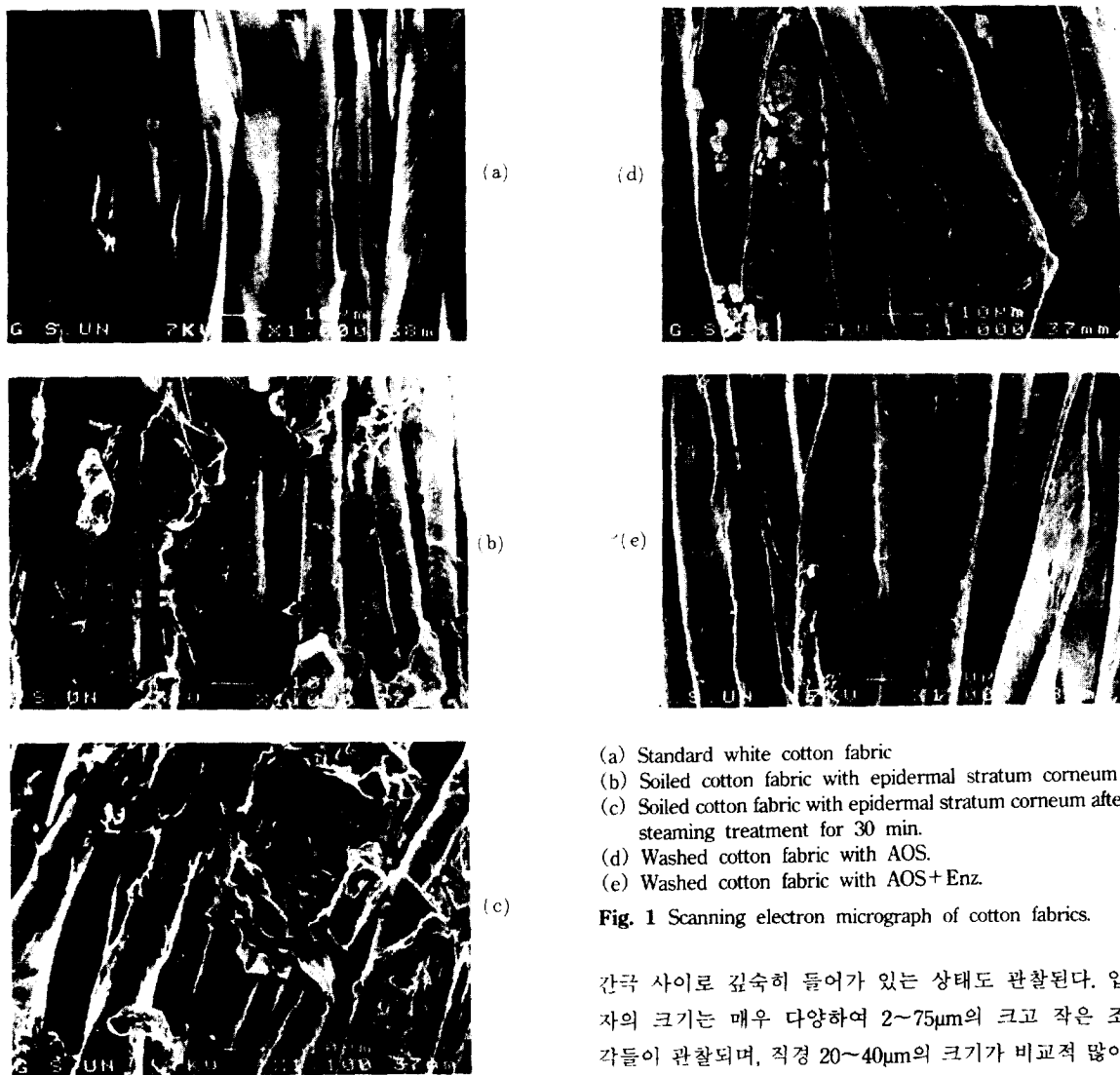
5. 주사전자현미경에 의한 관찰

주사전자현미경 JSM-6400(Jeol Co.)을 사용하여 표피 각질층 오염포(0.5cm \times 0.5cm)를 은접착제로 지지대에 고정시키고, 금(Au)을 150초 동안 증착하여 가속전압 7kV로 포의 오염상태를 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 단백질 오염의 부착 상태

본 실험에서 제작하여 사용한 천연 오염포의 표피



(a) Standard white cotton fabric
 (b) Soiled cotton fabric with epidermal stratum corneum
 (c) Soiled cotton fabric with epidermal stratum corneum after steaming treatment for 30 min.
 (d) Washed cotton fabric with AOS.
 (e) Washed cotton fabric with AOS+Enz.

Fig. 1 Scanning electron micrograph of cotton fabrics.

각질층이 오염포에 부착된 상태와 세척 전후의 상태를 주사전자현미경 사진으로 관찰한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1-a는 정련한 표준 백면포인데 면섬유의 고유한 리본 꼬임(convolution)을 볼 수 있으며 섬유 사이에 다른 불순물이 존재하지 않았다.

Fig. 1-b는 피부에 마찰시켜 만든 표피 각질층 오염포를 아무런 처리를 거치지 않고 관찰한 결과인데, 섬유 사이에 많은 표피 각질층과 피지, 땀 등이 혼재되어 덩어리를 이룬 것을 볼 수 있다. 이때 표피 각질층 오염은 섬유 표면에 매우 불균일하게 분산되어 있으며, 섬유

간극 사이로 깊숙히 들어가 있는 상태도 관찰된다. 입자의 크기는 매우 다양하여 2~75 μ m의 크고 작은 조각들이 관찰되며, 직경 20~40 μ m의 크기가 비교적 많이 보인다.

Fig. 1-c는 표피 각질층 오염포를 가압 수증기하에서 30분간 열처리한 결과인데 Fig. 1-b와 비교할 때 오염 입자가 섬유에 고착·고형화되어 더 큰 덩어리를 이룬 것을 볼 수 있다. 이것은 마치 섬유에 바인더(binder)가 붙은 것처럼 보인다. 이 경우 면포에 부착된 표피 각질층 오염은 열과 수분에 의해서 변성을 일으킨 것으로 생각된다. 峯川 등¹⁰⁾은 표피 각질층 오염포를 3주간 실온 방치하여 사용하였으나 본 실험에는 수분과 열에 의한 변성방법을 택하였다.

Fig. 1-d는 0.1% AOS세액(pH 9.5)에서 30분간 처리한 세척포(세척률 58.2%)인데, 섬유 표면에는 오염 입자가

어느 정도 제거되었으나 섬유 사이의 깊숙한 부분에는 오염 입자가 잘게 부서진 상태로 상당히 남아 있는 것을 볼 수 있다. 따라서 일반 세제와 기계적인 작용만으로는 단백질 오염의 제거는 매우 어려움을 알 수 있다. 이렇게 오염이 잔존된 상태로 계속적인 착용·세척이 반복될 경우 의복에 갈색 얼룩을 남기거나 세균·곰팡이 등의 미생물이 증식하여 섬유를 손상시킬 우려가 있으며, 이러한 미생물의 증식으로 각종 병원균이 부착될 경우 질병이 전파될 가능성도 높아진다.¹¹⁾

Fig. 1-e는 Fig. 1-d와 동일한 조건에서 프로테아제를 30 μ g/ml 첨가시켜 세척한 결과이다(세척률 86.5%). 사진을 보면 섬유 표면의 오염 입자는 거의 세척되었고 섬유 사이나 섬유 내부에 미세한 크기의 오염 입자가 조금 남아 있는 것을 볼 수 있을 뿐, Fig. 1-d에 비하면 월등하게 세척이 잘 된 것을 볼 수 있다. 그러므로 표피 각질층 오염의 세척에는 계면활성제의 계면 화학작용 외에 표피 각질층을 붕괴, 분산시키는 프로테아제의 가수분해 작용이 매우 효율적임을 알 수 있다.

2. 효소 농도와 계면활성제의 영향

세액에 첨가한 효소가 단백질 오염포의 세척성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 효소 농도를 0~50 μ g/ml로 변화시켜서 세척한 결과는 Fig. 2와 같다. 이때 계면활성제와 효소의 상호 작용도 세척에 영향을 미칠 것이라고 생각하여, 음이온계 계면활성제 2종(LAS, AOS)과 비이온계 계면활성제 1종(Triton X-100)을 선정하여 카제인 오염포를 세척 실험하여 효소와 계면활성제의 영향을 함께 고려하였다.

Fig. 2를 보면 효소의 농도가 증가함에 따라 세척 효과는 크게 증진되었으나, AOS와 LAS세액의 경우에는 20 μ g/ml 이상의 농도에서는 그 증가율이 둔화되었다. 또한 AOS세액에서 가장 높은 세척 효과가 나타났다. 또한 초기의 낮은 효소 농도에서는 AOS>LAS>Triton X-100>Water의 순서로 세척율이 나타났다. 그러나 효소의 농도가 증가할수록 비이온계에서 세척효과가 높게 나타났다. 순수한 물에서는 효소의 농도가 증가할수록 카제인의 제거율은 급격히 증가하였으며, 비이온계 세제에서도 같은 경향을 나타냈다. 이것은 효소가 비이온계 계면활성제와는 상호 적응성이 높기 때문이라고 생각된다.

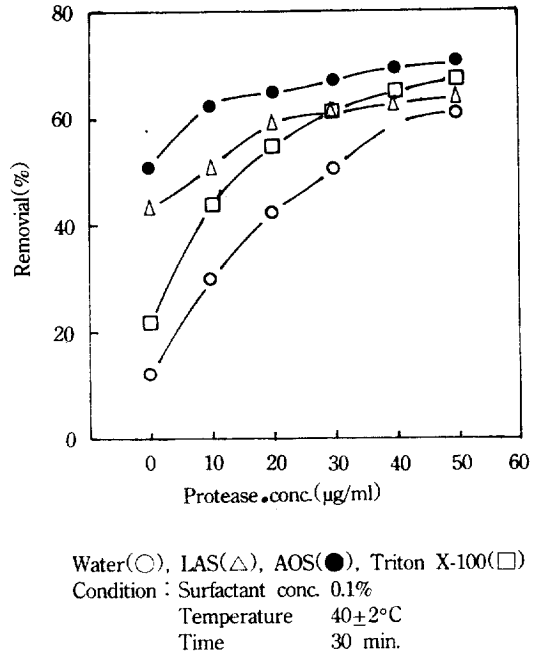
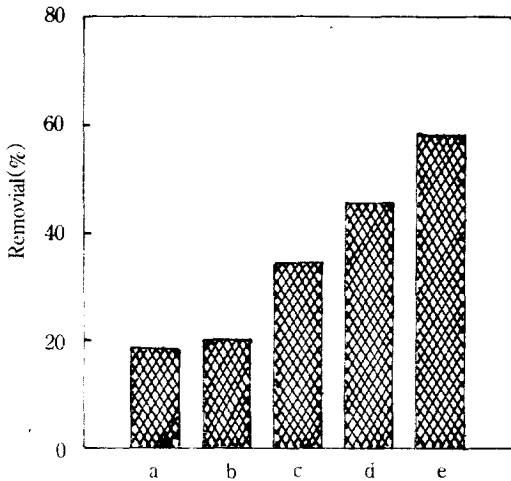


Fig. 2 Effect of protease concentration on the removal of casein in the various surfactant solutions.

같은 음이온계인 AOS용액과 LAS용액의 경우를 비교하면, AOS용액에서 세척효과가 더 높게 나타났다. 이것은 효소의 활성도가 음이온계 계면활성제의 존재로 인하여 저하되지만 LAS용액에서 보다는 AOS용액에서 저하율이 낮기 때문이다.¹²⁾ 또한 효소의 분해 작용과 AOS의 계면활성 작용이 병행하여 상승효과를 나타냈다고 볼 수 있다. 그러나 비이온계 용액에서는 효소의 활성도가 다소 증진하는 데도¹²⁾ 불구하고, AOS용액의 경우보다 세척성이 떨어진 것은 극성이 높은 면직물 기질의 표면 에너지가 크기 때문에 음이온계에 비하여 비이온계 계면활성제의 세척 작용이 낮게 나타나기 때문이다.¹³⁾ 그러므로 Triton X-100용액에서는 효소의 활성도가 AOS용액의 경우에 비하여 더 높을지라도 섬유 기질에 부착된 오염을 제거하는 작용이 떨어졌다고 볼 수 있다.

Kravetz등¹⁴⁾은 sulfonate를 함유하는 음이온 계면활성제의 존재는 프로테아제의 안정성을 크게 저해하며, 비이온계의 EO(Ethylene Oxide)의 부가 mole수에 따른 친수성 혹은 친유성 정도가 프로테아제의 안정성에 영향을 준다고 보고한 바 있다. 따라서 계면활성제의 분자

구조는 효소의 안정성 및 활성도에 영향을 미침을 알 수 있다.



(a) Water (b) LAS (c) LAS+AOS (d) AOS (e) AOS(pH 9.5)

Condition : Detergent conc. 0.1%
 Enzyme conc. 30 μ g/ml
 Temperature 40 \pm 2 $^{\circ}$ C
 Time 30 min.

Fig. 3 Effect of surfactant on the removal of hemoglobin.

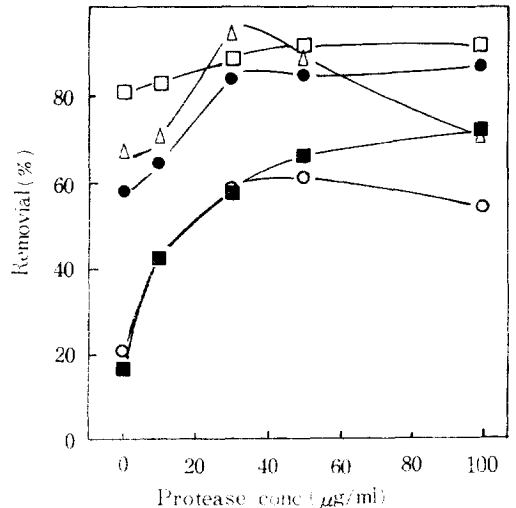
Fig. 3에서는 헤모글로빈 오염포를 대상으로 하여 LAS와 AOS 두가지의 경우를 비교하여 볼 것이다. 카제인의 경우와 비교할 때 세척률이 전반적으로 낮게 나타났다. 특히 LAS의 경우 증류수의 경우와 거의 비슷한 세척효과가 나타났다. AOS세액에서는 현저히 높은 세척효과를 나타내었으며, pH를 9.5로 조절하였을 때 더욱 높게 나타났다. 이것은 프로테아제가 pH9.5에서 활성이 더욱 높아지기 때문이다. LAS와 AOS를 1:1로 혼합한 c의 경우에는 각각의 중간 정도의 효과가 나타났다. 이로써 계면활성제가 효소에 미치는 영향이 세척효과로 그대로 연결되어 나타남을 알 수 있다.

이상과 같은 결과로부터 오염 단백질을 비교 검토하는 다음의 실험은 프로테아제와 상호 적응성이 좋고 효소의 활성 및 일반적인 세척 조건을 고려하여 pH9.5인 AOS세액에서 실험하였다.

Fig. 4는 단백질 오염을 달리하여 효소 농도의 변화를 본 것이다.

먼저 카제인 오염포>표피 각질층 오염포>헤모글로빈

오염포 순으로 세척효율이 높게 나타났다. 어느 경우나 효소를 첨가하였을 때 세척 효율이 크게 증대하였다. 효소의 세척 작용은 비교적 낮은 효소의 농도에서 현저하게 높아졌으나 30 μ g/ml이상이 되면 세척률의 증가가 둔화되거나 오히려 저하되었다.



Hemoglobin(\odot), Casein(\triangle), Human epidermal cornium(\bullet), EMPA-a(\square), EMPA-b(\blacksquare)

Condition : Detergent conc. 0.1%
 pH 9.5
 Temperature 40 \pm 2 $^{\circ}$ C
 Time 30 min.

Fig. 4 Effect of protease concentration on the removal of protein soils in the AOS solution.

이것은 subtilisin Carlsberg는 자가 가수분해 (autolysis)가 잘 일어나는 효소이기 때문에¹⁵⁾ 고농도의 효소 용액에서는 오히려 세척률이 저하되었다고 생각된다. Subtilisin Carlsberg는 자가 가수분해하여 M.W.13,000 및 15,000으로 분해되어 효소의 활성을 잃는다.¹⁶⁾

전반적으로 세척제에서 효소가 오염포에 작용할 때는 효소의 존재는 낮은 농도에서 상대적으로 뚜렷한 세척 작용을 나타내었으며, 효소의 농도가 증가함에 따른 세척률의 증가는 비교적 적게 나타났다. 이것은 효소가 섬유와 결합된 단백질 오염에 접촉할 때, 섬유 표면에 노출된 단백질 오염은 비교적 쉽게 가수분해시킬 수 있으나, 섬유 내부에 침투된 단백질 오염에 대해서는 가수분해 작용이 둔화되기 때문이 아닌가 추정된다. 즉, 면직물 시험포에 부착된 단백질은 고정된 상태이므로

효소는 입체 장애(steric hindrance)를 받게 되므로 효소의 작용이 둔화된다. 또한 면섬유의 내부에 침투된 단백질은 효소에 의하여 분해된 경우에도 쉽사리 섬유 밖으로 나오기가 어려운 점도 생각할 수 있다. AOS계 면활성제를 첨가하였을 때 월등하게 세척률이 향상된 것은 효소의 작용과 계면활성제 작용과의 상승효과가 나타났기 때문이라고 생각된다.

또한 단백질이 배합된 표준 오염포로 널리 사용되고 있는 EMPA 116 오염포의 경우를 보면 오염포의 제작 및 보관 상태에 따라 세척률이 크게 차이가 있음을 알 수 있다. EMPA-a는 세척률이 지나치게 높게 나타나 변인의 효과를 보기 어려웠다. EMPA-b는 시일이 상당히 경과된 것인데 세척 효율은 현저히 저하되었다. 이것은 변성에 의한 결과라고 생각된다. 따라서 세제의 성능 비교로는 적합하지만, 세척 효율의 차이가 크게 나타나서 본 실험에서는 바람직하지 못하므로 배제하였다.

3. 세척 시간의 영향

세척 시간이 단백질 오염포의 세척성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 0~60분으로 세척 시간을 변화시켜서 실험한 결과는 Fig. 5에 나타내었다.

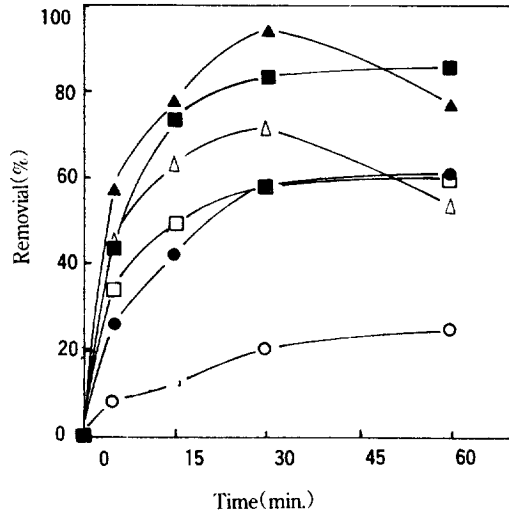
Fig. 5를 보면 5분, 15분의 비교적 짧은 세척 시간의 경우에는 세척률의 향상이 컸으나 30분 이상의 시간에서는 세척률이 거의 일정하여졌다. 이러한 경향은 所¹⁷⁾의 연구 결과에서도 유사하게 나타났다.

오염 기질의 종류별로 살펴볼 때 효소를 첨가하지 않은 경우와 효소를 첨가한 경우에서 모두 카제인>인체 표피 각질층>헤모글로빈의 순으로 세척률이 높았다. 그리고 효소 첨가에 의한 세척률 향상은 헤모글로빈의 오염포에서 가장 크게 나타났다. 이것은 헤모글로빈의 특성으로 인해 헤모글로빈 오염포의 세척성이 매우 낮기 때문에 상대적으로 프로테아제 작용의 효과가 커진 것 같다.

대체로 세척 초기 시간에서 세척 효과가 높게 나타난 결과도 효소가 단백질에 접촉하는 조건과 관련이 깊은 것으로 생각된다. 즉, 초기 시간에는 직물의 표면에 부착된 단백질에 쉽게 효소가 작용하여 가수분해함으로써 제거율이 높아졌다고 볼 수 있다. 皆^{18), 19)}의 연구에서도 비교적 초기시간에 세척 효과가 높게 나타났다.

이러한 결과는 subtilisin Carlsberg는 매우 짧은 단시

간내(1-2분)에 반응을 시작하는 특성을 갖고 있는 점에도 관련이 있으나 직물에 부착된 단백질에 작용할 때는 주로 표면에 노출된 단백질을 가수분해하고, 섬유내부에 깊숙히 침투하여 결합된 단백질의 제거는 입체 장애로 인하여 상대적으로 어려운 것에 기인하는 것이 아닌가 생각된다.



Hemoglobin(AOS ○, AOS+Enz. ●), Casein(AOS△, AOS+Enz. ▲), Human epidermal corneum(AOS □, AOS+Enz. ■)
 Condition : Detergent conc. 0.1%
 Enzyme conc. 30μg/ml
 pH 9.5
 Temperature 40±2°C

Fig. 5 Effect of washing time on the removal of protein soils.

4. 세척 온도의 영향

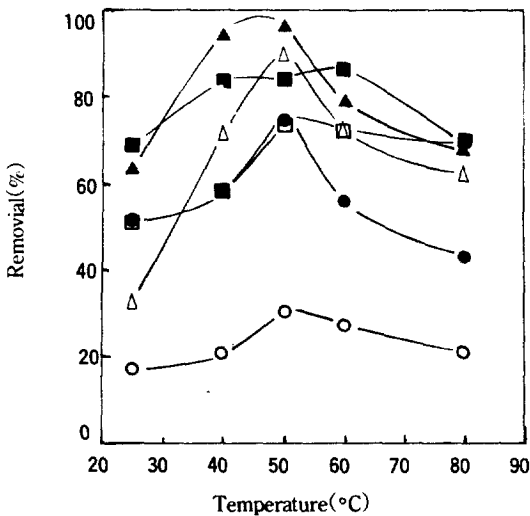
세척 온도가 단백질 오염포의 세척성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 세액의 온도를 25~80℃의 범위로 변화시켜서 실험한 결과는 Fig. 6과 같다.

Fig. 6을 보면 AOS세액에 각각 효소를 첨가하였을 경우 오염 기질에 관계없이 월등히 높은 세척 효과가 나타났다. 또한 50℃부근에서 세척 효율이 최대치를 나타냈는데 이것은 프로테아제의 온도 특성과 일치하는 결과이다. 이렇게 효소의 최적 온도에서 세척 효과가 높게 나타난 현상은 많은 보고^{10), 18)~23)}에서도 인정하였

다.

그러나 효소의 활성이 비교적 낮은 저온(25°C)에서도 효소의 첨가에 의하여 세척률이 크게 높아진 것은 효소에 의한 기질의 가수분해 결과와 세척현상이 꼭 일치하는 것은 아님을 나타낸다. 즉, 앞에서 언급한 바 있듯이 세척계에서는 약간의 가수분해에 의해서도 단백질의 협동 결합(cooperative binding)이 현저하게 저하되기 때문에 세척 효과가 좋아지는 것으로 생각된다.

60°C에서는 헤모글로빈 및 카제인 오염포의 세척성이 현저하게 저하되었는데 이것은 면직물에 부착된 단백질이 용액의 온도가 60°C 이상이 되면 변성 정도가 더욱 심해져서 용해도가 감소하고, 효소의 작용이 둔화되기 때문이 아닌가 추정되며 AOS 계면활성제의 특성과의 관련이 있지 않나 생각된다.



Hemoglobin(AOS ○, AOS+Enz. ●), Casein(AOS△, AOS+Enz. ▲), Human epidermal corneum(AOS □, AOS+Enz. ■)
 Condition : Detergent conc. 0.1%
 Enzyme conc. 30μg/ml
 pH 9.5
 Time 30 min.

Fig. 6 Effect of washing temperature on the removal of protein soils.

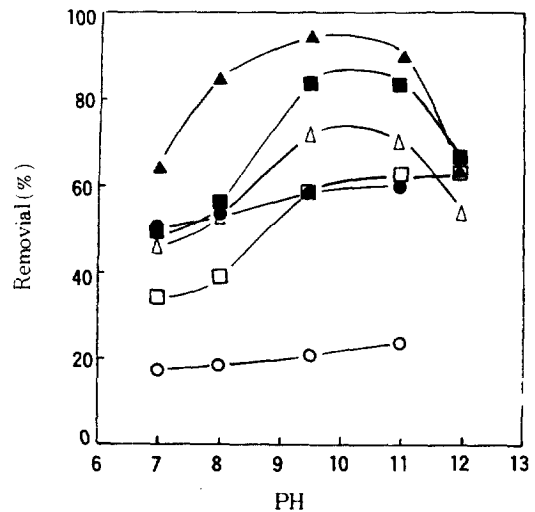
인체 표피 각질층 오염포의 경우는 60°C에서 50°C와 비슷한 세척 효과를 나타냈으며, 80°C고온에서는 세척률이 크게 저하되었다. 헤모글로빈 및 카제인 오염포와 비교할 때 다소 다른 거동을 보인 것은 천연오염포 제

작용에 표피 단백질 오염뿐만 아니라 다른 지용성 오염도 함께 공존하기 때문이 아닌가 생각된다. 비교적 세척 효과가 크게 나타난 현상은 단백질 오염보다는 지용성 오염의 제거가 비교적 용이하기 때문에 지용성 성분과 함께 결합된 단백질 성분의 제거가 용이했다고 볼 수 있다.

세척 온도에 있어서는 효소의 온도 특성 및 열에 대한 안정성 이외에도 단백질의 물에 대한 용해도, 분산성 등이 세척에 영향을 미치므로 고온의 세척에서는 오히려 전반적으로 세척 효과가 낮아졌다고 생각된다.

5. 세액의 pH 영향

세액의 pH가 오염포의 세척성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 pH를 7.0~12.0으로 변화시켜서 실험한 결과는 Fig. 7과 같다.



Hemoglobin(AOS ○, AOS+Enz. ●), Casein(AOS△, AOS+Enz. ▲), Human epidermal corneum(AOS □, AOS+Enz. ■)
 Condition : Detergent conc. 0.1%
 Enzyme conc. 30μg/ml
 Temperature 40±2°C
 Time 30 min.

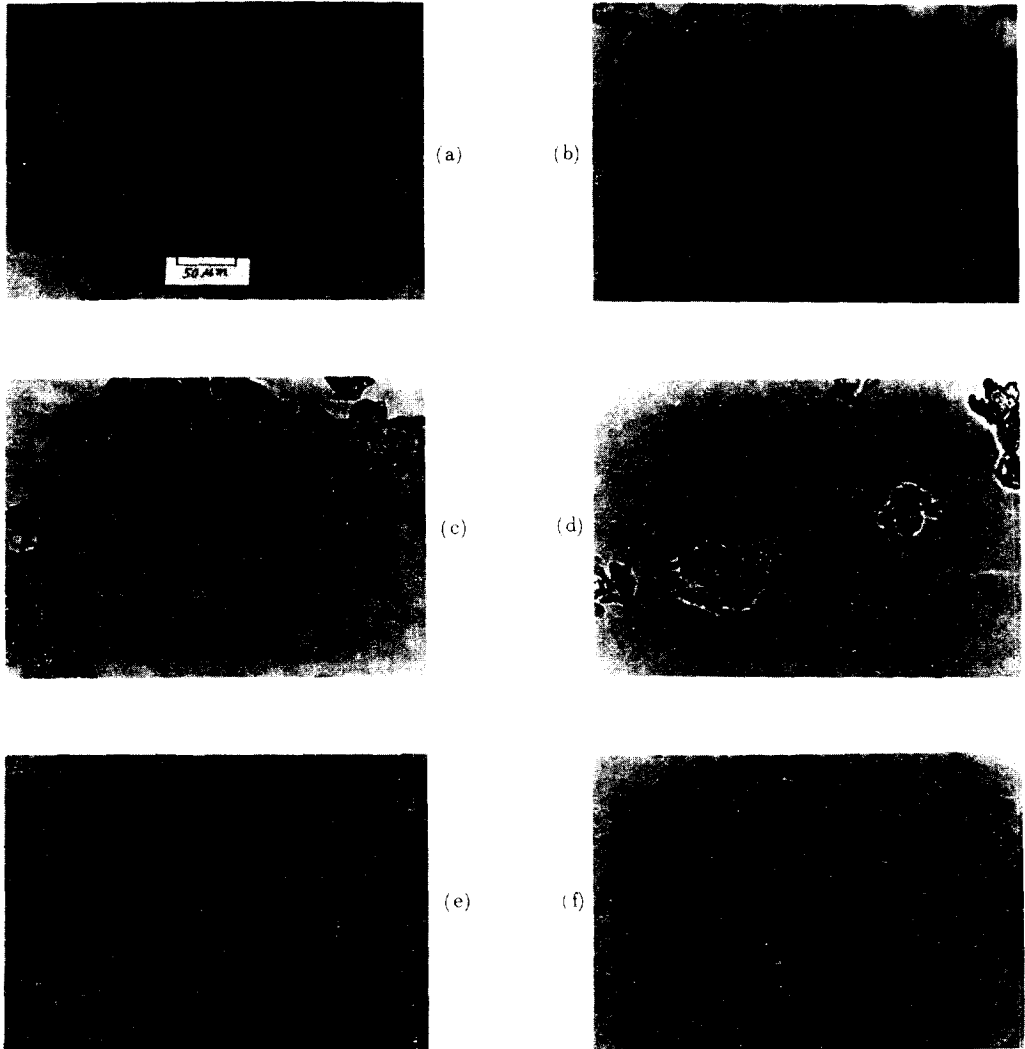
Fig. 7 Effect of pH on the removal of protein soils.

Fig. 7을 보면 세액의 pH가 알칼리가 될수록 카제인 및 인체 표피 단백질 오염의 세척률이 크게 증가하였으며 pH9.5~11.0에서 높은 세척률을 보이다가 pH12.0

에서 급격히 감소하였다. 일반적으로 세액의 pH가 알칼리성이 될수록 단백질의 용해도가 증가함에 따라 단백질 오염포에서 단백질의 제거율이 높아진다.^{10), 18), 19), 20), 22), 21)}

헤모글로빈 오염포의 경우에는 pH의 영향이 크게 나타나지 않았다. pH7~8의 중성 부근의 AOS 세액에

서는 전반적으로 오염포의 세척률이 낮게 나타났으나 이 경우에서도 효소를 첨가했을 때는 세척 효과가 현저하게 높게 나타났다. 그러므로 세척계에서는 효소의 가수분해 작용으로 오염 단백질이 조금만 분해되어도 세척 효과는 증진된 것이 다시 한번 확인되었으며, 단백질 오염포에서 단백질을 제거하는데 미치는 효소의



(a) 0 min.(untreated) (b) 5min. (c) 15min.
(d) 30min. (e) 60min. (f) 90min.

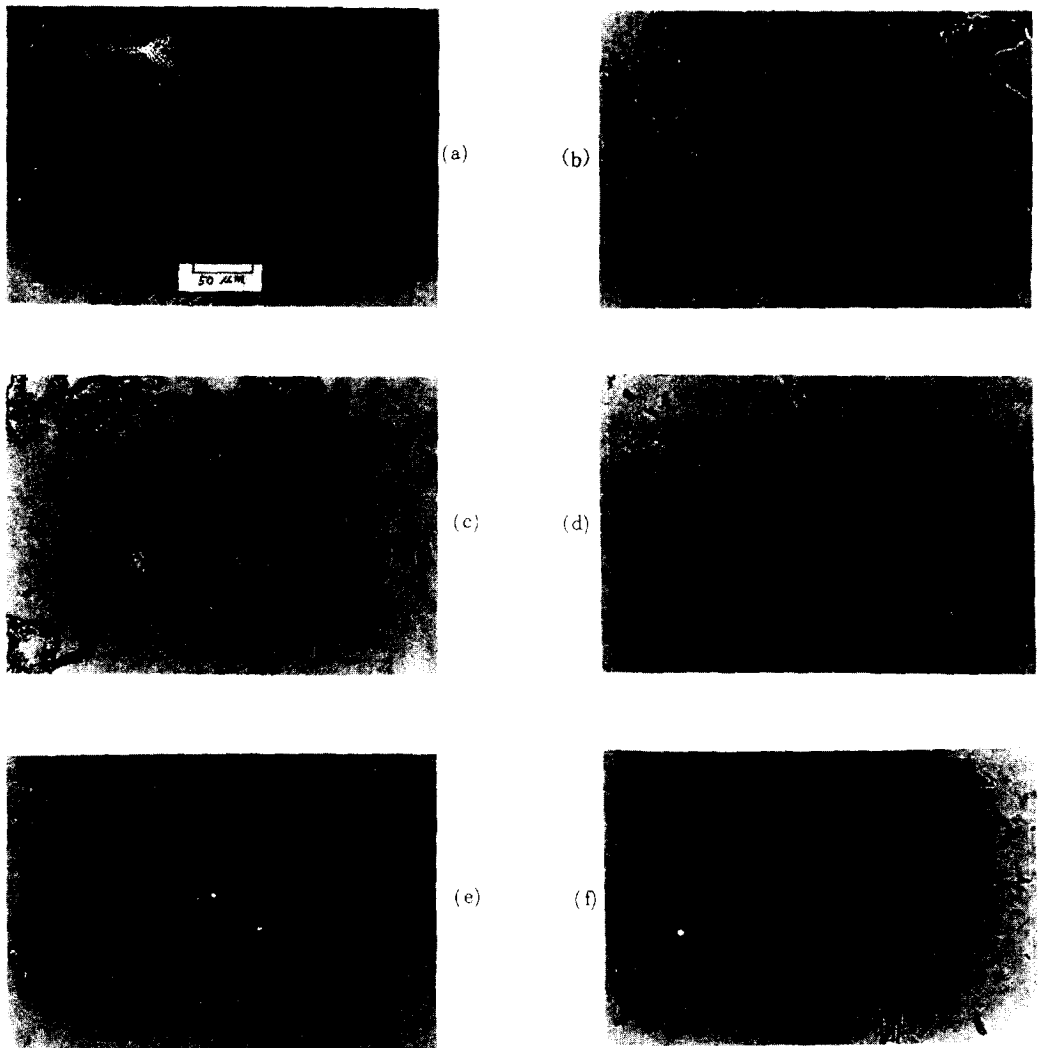
Fig. 8 Photomicrograph showing epidermal stratum corneum debris with reaction time.(Inverted Transmitted-Light Microscope)

반응기구는 직물에 부착된 헤모글로빈의 협동 결합을 약화시키는데 주된 작용이 있다고 생각되고, 효소와의 상호 적응성이 좋으면서 섬유기질과 오염의 특성에 부합되는 계면활성제를 병용하면 효소의 분해 작용과 더불어 계면활성제의 작용이 서로 상승 작용을 하기 때문에 세척 효과를 높일 수 있다.

6. 효소가 표피 각질층 오염의 붕괴 및 분산에 미치는 영향

1) 반응시간의 영향

세척 실험에 사용한 프로테아제가 표피 각질층을 가수분해시키는 거동을 알아보기 위하여 인체에서 채집



(a) untreated (b) pH 7.0 (c) pH 8.0
(d) pH 9.5 (e) pH 11.0 (f) pH 12.0

Fig. 9 Photomicrograph showing epidermal stratum corneum debris with pH of enzyme solution.

하고 정제한 표피 각질층에 효소액을 첨가하여 반응 시간에 따른 표피 각질층의 붕괴 및 분산 효과를 광학 현미경으로 관찰하여 Fig. 8에 나타내었다.

이때 실험조건은 시간을 0~90분간으로 변화시키고 pH9.5, 온도 40±2°C, 0.1% AOS, 1mg/ml의 프로테아제로 실험하여 hollow slide glass에 담아 관찰하였다.

사진 (a)에서 표피 각질층이 큰 덩어리로 뭉쳐 있는 것을 볼 수 있다. 사진 (b)는 반응시간이 5분인 것으로 표피 각질층에 균열이 생겨 덩어리로 조금 떨어져 있으며 투명도가 증가한 것을 알 수 있다. 사진 (c)는 반응시간이 15분인 것으로 덩어리가 보다 작아지고 많이 붕괴되어 작은 크기로 분산된 것을 볼 수 있다. 사진 (d)는 반응시간이 30분인 것으로 표피 각질층이 잘게 붕괴되어 넓게 분산되어 있는 것을 볼 수 있다. 그리고 사진 (e)는 반응시간이 60분인 것으로 작은 크기가 다양하게 섞여 있으며 가늘게 붕괴된 상태로 분산되어 있는 것을 볼 수 있다. 사진 (f)는 반응시간이 90분인 것으로 표피 각질층이 붕괴되어 크기가 작고 가는 입자로 넓게 분산된 것을 볼 수 있다.

이와같이 표피 각질층편에 대한 프로테아제의 반응 시간을 증가시키면 표피 단백질에 대한 붕괴 및 분산이 급격히 증대하는 것을 확인할 수 있었으며, 다른 방법으로 각질층 단백질의 분해율을 측정한 *李동¹¹⁾*의 연구 결과와 일치하였다.

2) pH의 영향

Fig. 9는 각 pH에 따라 효소의 작용이 표피각질층의 붕괴·분산효과에 미치는 영향을 광학 현미경으로 관찰한 것이다.

이때 실험조건은 pH를 7~12로 변화시키고, 온도 40±2°C, 1mg/ml의 프로테아제, 0.1% AOS용액에서 60분간 실험한 것으로 용액의 pH 조정은 세척실험에 사용한 세액의 pH 조성을 그대로 사용하였다.

사진 (a)는 처리하지 않은 표피각질층으로 크게 뭉쳐 있는 것을 볼 수 있다. 사진 (b)는 pH 7에서 처리한 표피각질층으로 큰 덩어리로 떨어져 있는 것을 볼 수 있으며, 사진 (c)는 pH 8에서 처리한 표피각질층으로 작은 덩어리로 떨어져 나가며 투명도도 증가한 것을 알 수 있다.

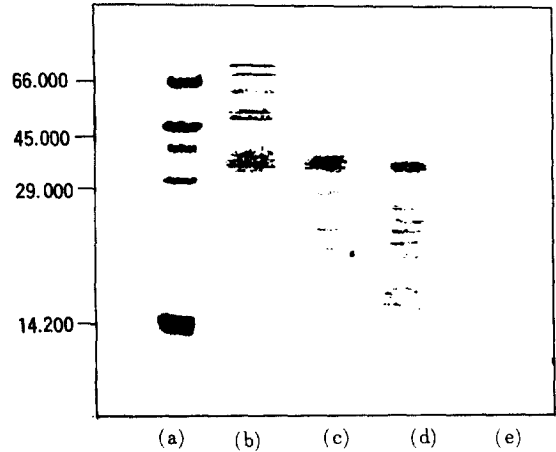
그리고 사진 (d)는 pH 9.5에서 처리한 표피각질층으로 잘게 붕괴되어 여러 크기가 섞여 분산된 것을 볼 수 있다. 사진 (e)는 pH 11에서 처리한 표피각질층으로

더욱 잘게 붕괴되어 널리 분산된 것을 볼 수 있다. 사진 (f)는 pH 12에서 처리한 표피각질층으로 pH 11의 결과에 비해 입자들이 뭉쳐 있는 것을 볼 수 있으며, 효소의 작용이 둔화되어 분산·붕괴의 정도가 감소한 것을 알 수 있다. 이상의 결과에 의해서 분해액의 pH가 단백질의 붕괴 및 분산에 많은 영향을 미침을 확인하였다.

3) SDS-PAGE에 의한 단백질의 분리

인체 표피 단백질을 프로테아제에 의하여 시간별로 가수분해 시킨 뒤 SDS-PAGE에 의하여 분리한 결과는 Fig. 10에 나타내었다.

Fig. 10-(a)의 분자량 표준 물질과 비교할 때 시료의 protein band는 30K~80K에 걸쳐서 다양하게 나타났으나 주된 band는 40K~65K이다. *Hosokawa²⁴⁾*과 *Matoltsy²⁵⁾*은 표피 각질층의 keratin filament는 그 subunit의 분자량이 크게 차이가 있으며 대략 40K~70K이며 같은 신체 부위에서도 분자량이 다른 2개 이상의 keratin이 분리되고 있다고 보고하였다. 이것은 본 실험의 결과와도 비슷한 것이다. 또한 효소에 의한 반응 시간에 따라 분자량이 큰 쪽이 점차 농도가 적어지고 그대신 낮은 저분자 물질의 농도가 증가된 것이 확인되었으며, 30분에 이르면 거의 분해가 된 것을 알 수 있었다.



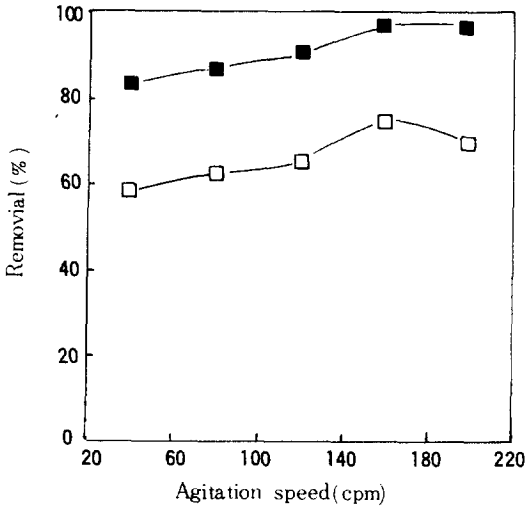
(a) M.W.Standards, (b) 0 min. (c) 5 min. (d) 15 min. (e) 30 min.
Condition : Enzyme conc. 50µg/ml
Temperature 40±0.1°C
pH 9.5

Fig. 10 The Separation of human epidermal stratum corneum by SDS-PAGE after hydrolysis.(Time dependence)

SDS-PAGE에 의하여 분리는 가능하였으나 분리된 band의 농도가 적어서 가수분해율을 정량하기는 어려웠다.

7. 기계 작용의 영향

Fig. 11은 Terg-O-Tometer를 사용하여 기계 작용이 표피 각질층 오염의 세척성에 미치는 영향을 알아보기 위해 교반 횟수를 40~200cpm으로 변화시켜 실험한 결과이다.



AOS(□), AOS+Enz(■)
 Condition : Detergent conc. 0.1%
 Enzyme conc. 30µg/ml
 pH 9.5
 Temperature 40±2°C
 Time 30 min.

Fig. 11 Effect of, echanical agitation on the removal of human epidermal corneum.

세척에서 기계적인 힘의 작용은 고휘 오염 입자들보다 작은 입자로 분할하여 세액내에 안정한 분산을 이루게 한다. 기계적인 힘은 분리된 오염을 직물표면으로부터 멀리 운반하며, 신선한 세액을 직물에 공급하여 세척작용을 촉진하고 재오염을 방지하는데 도움을 준다.²⁶⁾

Tuzson과 Short는 Terg-O-Tometer를 이용하여 세척한 결과 교반속도가 커짐에 따라 기계적인 힘의 작용이 커져서 세척성이 향상된다고 하였다.²⁷⁾

AOS세액에 의한 세척에서는 기계작용의 증가에 따른 세척율의 증가가 완만한데 120cpm까지는 서서히 증가하며, 160cpm에서 최대치를 나타내고 그 이후에는 감소하는 것을 볼 수 있다. 그리고 AOS세액에 프로테아제를 첨가한 경우에는 AOS세액에 의한 세척에 비해 전체적으로 세척성이 높아졌으나 교반 속도에 의한 영향은 크게 두드러지지 않은 것으로 나타났다. 이것은 세척에 미치는 기계작용의 영향보다는 효소작용의 영향이 더 크다는 것을 보여준다.

즉, AOS세액에 효소를 첨가한 경우 40cpm에서 160cpm으로 교반수를 높였을 때 세척률 증가는 약 13%였지만, 효소를 첨가하지 않은 경우에 비해서는 약 22% 세척률이 증가하여 효소에 의한 세척 효과가 월등하게 높게 나타났다.

皆川 基 등²⁸⁾의 보고에 의하면 반전수 105rpm이상에서 섬유표면에 부분적으로 0.2~0.8µm의 피브릴(fibril)이 발생하며, 반전수가 많을수록 많아져서 5~10회 반복 세척할 경우 섬유의 부분적인 붕괴가 관찰된다고 하였다.

그러므로 Terg-O-Tometer에 의한 세척의 경우 기계 작용의 증가가 세척률의 증가를 가져오기는 하나 섬유의 손상을 피할 수 없으므로 세척성은 높으면서 기계작용은 줄여주는 것이 필요하다. 따라서 효소에 의한 세척의 경우, 일반적으로 높은 세척성을 나타내어 기계작용을 크게 줄여주는 역할을 기대할 수 있다.

IV. 결 론

단백질 분해효소가 세척에 미치는 영향을 구명하기 위하여 의류의 주된 단백질 오염인 인체 표피 각질층, 헤모글로빈 및 카제인 오염포를 제작하여 각각의 세척 거동을 효소의 특성과 관련지어 검토하였다. 또한 인체 표피 각질층 오염의 부착 상태와 효소에 의한 붕괴 및 분산 상태를 주사전자현미경과 광학현미경으로 관찰하였으며 효소가 인체 표피 각질층을 가수분해시키는 작용을 SDS-PAGE법으로 검토하였다.

실험한 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 단백질 오염 기질의 종류와 관계없이 비교적 낮은 효소 농도에서 세척성이 크게 향상되었으며 pH9.5의 AOS세액에서 효소에 의한 세척 효과가 높게 나타났다. 세척 효과는 카제인>인체 표피 각질층>헤모글로빈의

순으로 높게 나타났다.

2. 효소에 의한 세척에서 단백질 오염은 5~15분간의 단시간 세척에도 높은 세척률을 나타내었으며 30분 이상이 되면 거의 평형에 도달하였다.

3. 효소의 활성 온도보다 낮은 온도인 25°C에서도 효소 첨가에 의해 세척효율이 높아졌으며, 40~50°C의 세척 온도에서 높은 효과를 보이다가 그 이상의 고온에서는 세척률이 저하되었다.

4. 세액의 pH가 9.5~11.0에서 높은 세척 효과를 나타내었다.

5. 기계적 작용이 증가함에 따라 세척 효과는 커졌으나 효소 첨가에 의한 세척 효과가 더 크게 나타났다.

6. 현미경 관찰에 의하여 효소가 단백질을 붕괴 및 분산시키는 효과를 볼 수 있었으며, 아울러 일반적인 세척작용으로는 제거하기 어려운 미세한 표피 각질층 조각들이 효소 세척에 의해 효율적으로 제거되었음을 확인하였다. 또한 표피 각질층 단백질이 효소의 가수분해 작용에 의하여 분해되어 생성된 여러개의 protein band를 SDS-PAGE에 의해 분리, 확인하였다.

참 고 문 헌

- 1) 皆川 基, 所 康子, 奥山 春彦, 藤井 富美子, たん白質汚れの洗淨に関する研究(第一報), 卵白アルブミン汚染布の作製について 織消誌, **10**(2), 60-65(1969).
- 2) 皆川 基, 岡本 幾子, たん白質汚れの洗淨に関する研究(第七報), 衣類に付着する表皮角質層汚れについて, 織消誌, **19**(3), 106-115(1978).
- 3) Novo Information, B259b-GB 2000(1984).
- 4) Linderstrøm-Lang, K. and Ottesen M., Nature, **159**, 807 (1947).
- 5) Boyer, P. D., The Enzyme, vol. 3, Hydrolysis: Peptide Bonds. Academic Press, 547(1971).
- 6) Novo Analytical Method: Manual Procedure for Determination of Proteolytic Activity in Enzyme Preparations and Detergents(1984).
- 7) Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4., Nature, **227**, 680-685(1970).
- 8) 日本規格協會: JIS K3371-1976, 衣料用 合成洗劑.
- 9) 皆川 基, たん白質汚れの洗淨に関する研究, 銅-Folin 試薬によるたん白質の定量について, 大阪市立大學家政學部紀要, **20**, 55-65(1972).
- 10) 皆川 基, 岡本 幾子, 重田 美智子, たん白質汚れの洗淨に関する研究(第八報), 頸部綿汚染布に付着する表皮角質層汚れの洗淨について, 織消誌, **19**, 420-430 (1978).
- 11) 李貞淑, 金聲連, 蛋白質汚染에 관한 研究(1), 洗滌 시험용 모델 汚染으로서의 人體表皮 角質層의 特性, 韓國衣類學會誌, vol. 10(3), 1-8(1986).
- 12) 小ノ澤 治子, 小見山 二郎, 洗劑用酵素の活性に及ぼす 15種の洗劑成分の影響, 日本家政學會誌, **39**(12), 1273-1280(1988).
- 13) 鄭惠嫻, 金聲連, Polyethylene terephthalate 필름의 表面에너지 變化에 따른 洗滌性(第2報) MMA-그라프트 PET 필름에서의 Triolein의 洗滌일과 洗滌性, 韓國衣類學會誌, **12**(2), 225-235(1988).
- 14) Kravetz, L. and Guin, K. F., Effect of Surfactant Structure on Stability of Enzymes Formulated into Laundry Liquids. J. Am. Oil Chem. Soc., **62**, 943-949(1985).
- 15) Boyer, P. D., op. cit., 639-644.
- 16) Kim D. U., Yang C. H. and Choi M. U., Identification of Major Autolytic Cleavage Site of Subtilisin Carlsberg, Korean Biochem. J., **23**(1), 58-61(1990).
- 17) 所 康子, 皆川 基, 血液たん白質汚れの 洗淨に関する 研究(第三報), 프로テ아제의 基質特異性나びに 活性가 洗淨性に及ぼす影響, 織消誌, **26**(3), 123-129(1985).
- 18) 皆川 基, 重田 美智子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗淨に関する研究(第三報), 血液汚染布の洗淨について, 織消誌, **11**(5), 263-273(1970).
- 19) 皆川 基, 重田 美智子, 所 康子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗淨に関する研究(第五報), 牛乳カゼイン汚染布の洗淨について, 織消誌, **13**(12), 519-529(1972).
- 20) 皆川 基, 重田 美智子, 所 康子, 奥山 春彦, 藤井 富美子, たん白質汚れの洗淨に関する研究(第二報), 卵白アルブミン汚染布の洗淨について, 織消誌, **10**(2), 66-74 (1969).
- 21) 所 康子, 皆川 基, 血液たん白質汚れの 洗淨に関する 研究(第四報), 프로テ아제의 pH 特性나びに 溫度特性가 洗淨性に及ぼす影響, 織消誌, **26**(11), 479-484 (1985).

- 22) 皆川 基, 所 康子, 重田 美智子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗淨に関する研究(第六報), セラチン汚染布の洗淨について, 繊維誌, **15**(1), 15-21(1974).
- 23) 皆川 基, 重田 美智子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗淨に関する研究(第四報), 酵素洗淨におはる金属イオンの影響について, 繊維誌, **11**(5), 274-279(1970).
- 24) Hosakawa, M. and Masu, S., Immunofluorescence Characteristics and Some Biochemical Properties of Large Molecular Weight Keratin from Human Plantar Stratum Corneum, *J. of Dermatol.*, **10**, 295-303(1983).
- 25) Matoltsy, A. G., Matoltsy, M. N., and Cliffler P. J., Characterization of Keratin Polypeptides of Normal and Psoriatic Horny Cells, *J. of Invest. Dermatol.*, **80**, 185-188(1983).
- 26) 金聲連, 洗劑와 洗濯의 科學, 教文社: 109-117(1987).
- 27) J. Tuzson and Brant A. Short, A study on the Agglomeration Deposition and Removal Process of clay Particles During Washing, *Textile Res. J.*, **32**, 111-116(1962).