

효소를 이용한 말쥐치의 탈피

김세권 · 변희국 · 최광덕 · 노호석 · 이원희 · 이응호*
부산수산대학교 화학과 · *부산수산대학교 식품공학과

Removal of Skin from Filefish Using Enzymes

Se-Kwon KIM · Hee-Guk BYUN · Kwang-Duck CHOI ·
Ho-Seok ROH · Won-Hee LEE and Eung-Ho LEE*

Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea

*Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea

Collagenase existed in the internal organs of filefish *Novoden modestrus* was isolated with ammonium sulfate and was purified by ion exchange column chromatography with DEAE-Sephadex A-50 and gel filtration with Sephadex G-150.

The activity of the purified enzyme was increased 92.4 folds than that of the crude one and the yield of the purified one was 10.9%. The optimum conditions showing the maximum activity of the crude enzyme to digest insoluble collagen (Type I) were 55°C and pH 8.0, while those showing the maximum activity of the purified one were 55°C and pH 7.75. However, the use of the crude enzyme for skinning of filefish was more profitable because the yield was 800 folds higher than that of the purified one and the cost was also able to economy. When hydrolysis for skinning of filefish was conducted with 0.3% (w/w) crude collagenase at 50°C and pH 8.0 for 3hrs, there was some problem to cause a damage on muscle of the fish by heat. To solve such problem for the skinning, the hydrolysis at 18°C for 4hrs with 0.3% (w/w) crude enzyme after pretreated with 0.5M acetic acid for 10 min provided a good result for skinning of filefish.

서 론

우리나라 수산물의 총생산량(1990년도)은 327만 5천톤이고, 여기에 수입량을 합치면 총공급량은 393만 1천톤이었다. 이 중 가공원료로 이용된 것은 총 공급량의 86.6%, 선어(鮮魚)로 유통된 것은 13.4%로 가공율이 매년 현저하게 높아가고 있다(박, 1991).

현재 수산가공공장에서 원료어를 처리할 때 대부분의 중소기업에서는 사람의 손에 의해 탈피를 하고 있어 인건비 상승으로 인하여 경영난을 초래하고 있는 실정이며, 대기업에서는 어피탈피기를 사용하고 있으나 어피탈피기로 탈피시 잔사는 전

어체의 30~50%를 차지하여 수율이 현저하게 떨어진다. 또한 이러한 탈피잔사는 단백질과 같은 매우 유용한 성분이 함유되어 있지만 식용화하기에는 많은 문제점이 있어 보통 사료나 비료로 이용되거나 일부는 폐기되어져 환경오염을 야기시키고 있다(松本, 1980). 따라서 어피의 보다 효율적인 탈피방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

어피는 80% 이상이 콜라겐이며, 나머지 일부는 엘라스틴이다(김 등, 1986). 따라서 어피는 이들 단백질을 분해할 수 있는 효소에 의해 분해가 가능하기 때문에 효소를 이용한 어피탈피에 관한 연구가 시도되고 있다. 이에 관한 연구로는 Raa와 Nilsen(1982)의 염과 효소처리에 의한 오징어 표피

제거에 관한 특허가 있고, Stefansson(1988)은 Raa와 Nilsen(1982)의 특허를 이용하여 산업적 규모의 응용에 성공하였다는 보고가 있다. 또 Lauba 등(1987)의 오징어 표피 제거에 오징어간 추출물을 이용한 특허가 있다. Stefansson(1988)은 대구간 통조림시에 문제가 되었던 막(membrane)제거에 효소를 이용함으로써 대구간 통조림산업의 경비절감에 크게 기여한 바 있다. 그리고, Monsheimer와 Pfleiderer(1981)의 산성 protease를 이용하여 어피의 용해방법에 관한 특허와 Gildberg와 Raa(1978)의 단백질 분해효소를 이용하여 황어(*Mallotus villosus*)피의 파괴강도에 관한 보고가 있다.

본 연구에서는 말쥐치 내장에서 collagenase를 분리 정제하여 그 특성을 검토하였으며, 아울러 말쥐치 내장에서 추출한 조효소를 이용하여 말쥐치피의 탈피를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

우리나라 남해안 근해에서 어획된 말쥐치(*Novodon modestus*: 체장; 17.2~19.5cm, 체중; 50~78g)를 즉시 동결시켜 운반하여 초저온 냉동고(-60℃)에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

효소정제를 위해 사용된 Tris(hydroxymethyl), EDTA, N-p-toluenesulfonyl-L-lysine chloromethyl ketone(TLCK), aminomethans, N-p-toluenesulfonyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone(TPCK), L-cysteine, 분자량 측정용의 표준 Kit(SDS-분자량 표준단백질, 겔여과용 분자량 표준단백질), 전기영동시약, DEAE-Sephadex A-50 그리고 Sephadex G-150 등은 Sigma Co. 제품을 사용하였다. 이 외에 사용된 시약은 시약용 특급품을 사용하였다.

2. 방 법

1) Collagenase의 정제 및 활성측정

① 기질 및 완충용액의 조제

기질은 소의 아킬레스건에서 추출한 콜라겐(Type I)을 Sigma Co.로부터 구입하여 사용하였다. Dawson 등(1974)의 방법에 따라 반응액 중 pH 3.0~7.0의 완충용액은 50mM citrate로, pH 7.0~9.0의 완충용액은 50mM Tris-HCl로, pH 9.0~10.8의 완충용액은 50mM Na₂CO₃-NaHCO₃을 각각 사용하였고, 모든 완충용액에는 0.36mM CaCl₂가 함유되어 있다.

② 단백질의 농도

Bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 단백질 농도를 구하였다. 또한 정제과정 중의 단백질 희분의 검색은 280nm에서 흡광도를 측정하여 행하였다.

③ Collagen 분해활성

잠재성 collagenase의 활성은 Bauer 등(1975)의 방법에 준하여 활성화시킨 후에 Mandl 등(1953)의 방법을 다소 수정하여 천연 콜라겐에 효소를 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후, 콜라겐의 분해정도를 Moore와 Stein(1948)의 ninhydrin 방법으로 측정하였다. 즉, 5mg 기질에 1ml 완충용액을 첨가하고 55℃에서 10분 동안 방치한 후, 0.1ml 효소액을 가하여 반응(55℃, 20min)시켰다. 반응을 정지시키기 위하여 50% TCA 0.2ml를 첨가한 다음 원심분리(1,500×g, 15min)하였다. 그 상층액 0.2ml와 ninhydrin 용액 1.0ml를 혼합하고 가열(100℃, 20min)하였다. 이것을 실온까지 냉각시키고 5ml 희석액(1-propanol:H₂O=1:1)을 가하여 15분 동안 방치한 후 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 유리된 아미노산의 농도는 표준 L-leucine용액을 대조구로 하여 계산하였으며, enzyme blank(collagenase 대신에 0.1ml buffer를 첨가한 것)와 zero time blank(기질용액에 효소를 첨가한 후 즉시 원심분리한 후의 상층액)를 측정하여 보정해 주었다. Collagen 분해활성(collagenolytic activity)은 이상의 실험조건하에서 1분간에 collagen의 분해로 유리된 아미노산의 μmole 수로 나타내었다.

고유활성(U/mg-단백질) =

$$\frac{\text{유리된 아미노산}}{\text{단백질량(mg)} \times \text{반응시간(min)}}$$

④ Collagenase의 추출 및 정제

말쥐치내장 중의 collagenase는 Week 등(1976) 및 김과 김(1991)의 방법에 준하여 Fig. 1과 같은 방법으로 정제하였다.

즉, 내장을 잘게 다진 후 0.25% triton X-100과 10mM CaCl₂가 함유된 10mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액을 5배량(w/v) 가하여 균질기로 균질화(15,000×g, 2min)한 후, 원심분리(7,000×g, 20min)하였다. 상층액을 모은 다음, 잔사는 다시 0.1M CaCl₂가 함유된 20mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액을 첨가하여 동일한 방법으로 상층액을 얻었다. 위의 두 상층액을 혼합한 후 지방을 제거하기 위하여 사염화탄소를 20% (v/v) 정도 넣고 균질화(10,000×g, 30min)시켜 1시간 동안 방치하였다. 이것을 원심분리(10,000×g, 30min)시킨 다음 그 상층액을

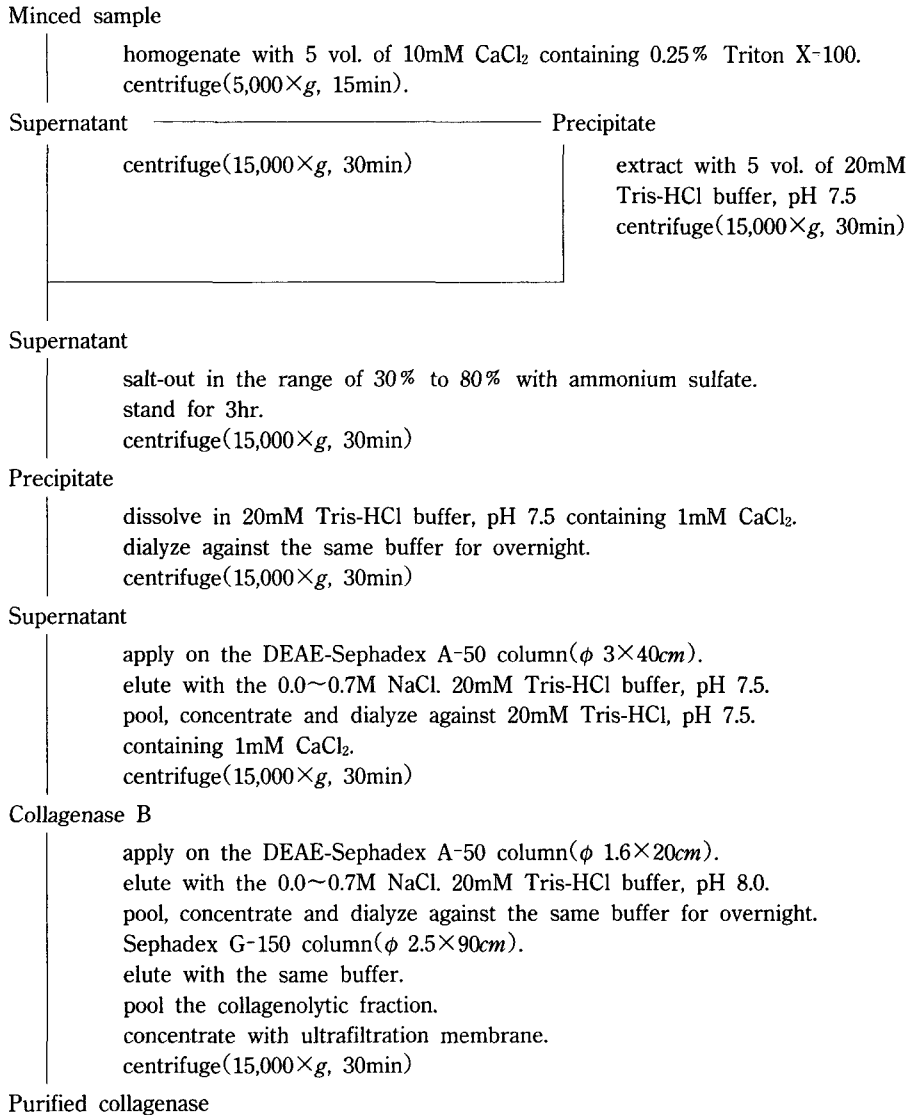


Fig. 1. Purification of crude collagenase extracted from the internal organs of filefish.

조효소로 하였다. 이 조효소액의 30~80% 포화 황산암모늄 염석 획분을 모아 20mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 녹인 다음, 동일 완충용액으로 48시간 투석하였다. 용해되지 않는 물질은 원심분리(10,000×g, 30min)하여 침전물을 제거하였다.

이 염석 획분의 조효소를 미리 0.36mM CaCl₂가 함유된 20mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(φ 3×40cm)에 주입하고, 동일 완충용액 1로 비흡착 부분을 용출한 후, 완충용액 700ml와 0.7M NaCl이 녹아있는 완충용액 700ml을 사용하여 선형상농도 구

배법으로 분별용출(유속: 30ml/hr, 분배량: 10ml)하여 얻어진 획분을 질소압력농축기(SATORIUS Co. ultra-membrane filterator, MW 10kDa)로 농축하여 0.36mM CaCl₂가 함유된 20mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액으로 20시간 투석한 후에 원심분리(10,000×g, 30min)하였다. 다음 단계로 위와 동일방법으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(φ 1.6×25cm)에 재차 주입하여 완충용액의 NaCl농도가 0~0.7M되게 선형상농도 구배법으로 분별용출(유속: 30ml/hr, 분배량: 10ml)하여 얻어진 획분을 농축한 후, 48시간 투석, 원심분리(10,000×g, 30

min)하였다. 그 상층액을 평형화시킨 Sephadex G-150 column(ϕ 2.5×90cm)에 다시 주입하여 분자량별로 회분을 받아 농축시켜 원심분리(10,000×g, 30 min)하였다.

이상의 과정으로 정제한 효소를 -40℃이하에 보관하여 정제 collagenase 특성실험에 사용하였다.

2) 조효소의 최적 활성조건

반응용액의 최적 활성조건은 김과 김(1991)의 방법에 따라, pH는 collagen(Type I) 5mg에 대하여 각각 0.36mM CaCl₂가 함유된 50mM citrate-Na₂HPO₄(pH 2.0~6.5), 50mM Tris-HCl(pH 7.0~8.5) 및 50mM Na₂CO₃-NaHCO₃(pH 9.0 이상)의 완충용액 1ml를 pH별로 취하고, 조효소(단백질량: 0.24 mg/ml) 0.1ml씩을 넣은 후, 60℃에서 1시간 동안 반응시키면서 구하였다.

최적 온도는 기질 5mg에 0.36mM CaCl₂를 함유하는 50mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액 1ml와 조효소 0.1ml를 각각 가하여 온도 조건을 달리하여 분해하면서 분해된 정도로서 최적조건을 구하였다. 한편, 반응시간은 반응온도와 동일한 방법으로 하여 37℃와 최적 온도인 55℃에서 시간을 달리하면서 최적조건을 구하였다.

3) 정제 collagenase의 최적 활성조건

조효소의 최적 활성조건 측정시와 같은 완충용액 1ml를 pH별로 취하고 정제 collagenase(단백질량, 4.1μg/ml) 0.1ml 가한 후 55℃에서 20분간 반응시켜 최적 pH를 얻었다.

온도는 기질 5mg에 0.36mM의 CaCl₂를 포함하는 50mM Tris-HCl(pH 7.75) 완충용액 1ml씩 넣고, 정제 collagenase 0.1ml 가한 후, 온도조건을 달리하여 최적조건을 얻었으며, 반응시간은 반응온도와 동일한 방법으로 하여 37℃와 최적조건인 55℃에서 시간을 달리하면서 최적조건을 구하였다.

4) 활성의 비교

55℃와 37℃에서 각 기질 collagen(Type I) 5mg과 0.36mM CaCl₂를 함유하는 50mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.75) 1ml에 정제 collagenase(단백질량, 4.1μg/ml), Sigma제 단백질분해효소 collagenase(No. C-9891), papain(No. P-4762), α-chymotrypsin(No. C-4129), trypsin(No. T-8003), pronase E(No. P-2143) 및 pepsin(No. P-7012)용액(1mg/ml)을 각각 만들어 0.1ml씩 가한 다음 20분간 반응시켜 얻은 활성값을 서로 비교하였다.

5) 말쥐치피의 가수분해 조건

① 반응온도

반응용기에 1%(건조물량, w/v)의 기질용액 100ml를 넣고 0.1N NaOH와 HCl용액으로 pH 8.0으로 조절한 다음 진탕항온수조에서 온도를 각각 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55 및 60℃로 조절한 후 효소를 0.1%(S/E=1,000, w/w)되게 가하여 2시간 동안 반응시켰다. 반응완료 후 분해액 3ml를 20% 삼염화초산(TCA)용액 3ml에 가한 다음 원심분리(1,500×g, 10min)하여 상층액의 가용성 질소량을 Kjeldahl 법으로 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

② pH

반응용기에 1%(w/v)기질용액 100ml를 넣고 0.1N NaOH와 HCl로 pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 및 11로 조절한 다음 진탕항온수조에서 온도 50℃로 조절한 후, 효소를 각각 0.1%(w/w) 가하여 2시간 동안 반응시켰다. 가용성 질소량은 ①과 같은 방법으로 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

③ 반응시간

반응용기에 1%(w/v)기질용액 100ml를 넣고 pH 8.0, 온도 50℃로 조절한 다음 효소를 0.1%(w/w) 가하여 12시간 반응시키면서 1시간 간격으로 반응액 3ml를 취하여 20%(w/v) TCA용액 3ml로 불활성화시킨 후 원심분리(1,500×g, 10min)하여 상층액 중의 가용성 질소량을 ①과 같은 방법으로 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

④ 효소농도

반응용기에 1%(w/v)기질용액 100ml를 넣고 pH 8.0, 온도 50℃로 조절한 다음 효소농도를 기질에 대해 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 및 1.0%(w/w) 되게 가한 후, 3시간 동안 반응시켜 ①과 같은 방법으로 질소량을 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

6) 말쥐치피 탈피

① 말쥐치의 전처리

어체를 0.5M 초산용액 1l에 담구어 10분간 처리한 후, 효소 활성에 영향이 없도록 중성이 될 때까지 증류수로 충분히 세척하였다.

② 효소에 의한 말쥐치피 탈피

말쥐치 내장으로부터 추출한 조효소를 이용하여 전처리한 말쥐치를 탈피하였다. 즉, 2l의 비이커에 증류수 950ml와 전처리한 어체를 넣은 다음 0.1N HCl 또는 NaOH로 pH를 8.0으로 조절한 후, 조효소가 활성을 나타내며 열에 의해 육이 손상을 받지 않는 온도인 18℃에서 효소용액 50ml를 가한 후, 교반하였다.

효소에 의한 말쥐치피의 탈피과정은 시간에 따른 변화를 사진으로서 대조구와 비교하여 나타나

었다.

결과 및 고찰

1. Collagenase의 추출 및 정제

말쥐치 내장에서 Fig. 1에 나타낸 공정에 따라 collagenase를 정제하였다. 추출한 조효소액의 30~80% 황산암모늄 포화 염석 획분을 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 0~0.7M NaCl과 1mM CaCl₂가 포함된 20mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로써 농도구배법으로 용리시킨 결과(Fig. 2), 2개의 획분을 얻었으며, 이 중 먼저 용리되어 나온 것을 획분 A, 나중에 용리되어 나온 것을 획분 B라 구분하였다. 획분 A와 B는 collagenolytic 활성측정을 통하여 다른 획분에 비해 활성이 뚜렷하였고, 그 중에서 획분 B가 콜라겐 분해활성이 매우 높았으며, collagenase의 고유활성은 조효소에 비해 8.6배 증가하였다. 획분 B를 같은 완충액으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 크로마토그래피를 사용하여 다시 분획한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 이때, 기질 콜라겐에 대하여 활성을 보이는 뚜렷한 획분을 얻었으며, 이 획분을 다시 농축, 투석하여 Sephadex G-150(ϕ 2.5 \times 90cm) 칼럼 크로마토그래피에 의하여 1mM CaCl₂와 0.01M NaCl이 함유된 50mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액으로 한 획분당 10ml씩 용리시켜 Fig. 4에서와 같이 단일 획분으로 분리하였다.

Collagenase의 정제과정을 disc- 및 SDS-PAG 전

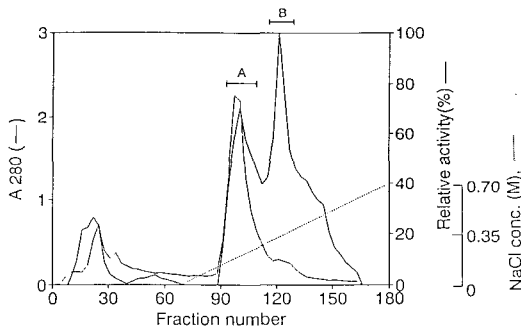


Fig. 2. Chromatogram of DEAE-Sephadex A-50 column (ϕ 3 \times 40cm) chromatography of the ammonium sulfate saturation in the range of 30% to 80%. The column was eluted with 700ml 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) buffer and then a linear gradient of 0~0.7M NaCl in the same buffer. Flow rate was 30ml/hr.

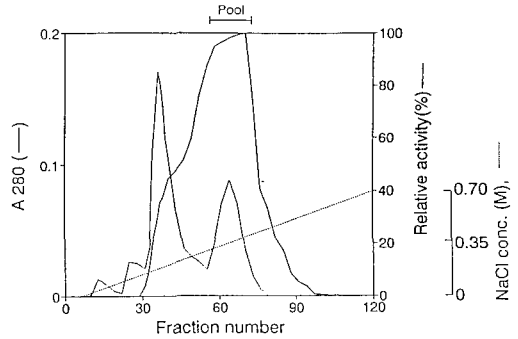


Fig. 3. Rechromatogram of the collagenolytic fraction B pooled from the DEAE-Sephadex A-50 column chromatography. The column(ϕ 3 \times 20 cm) was eluted with 5ml Tris-HCl(pH 8.0) buffer and a linear gradient of 0~0.7M NaCl in the same buffer. Flow rate was 30ml/hr.

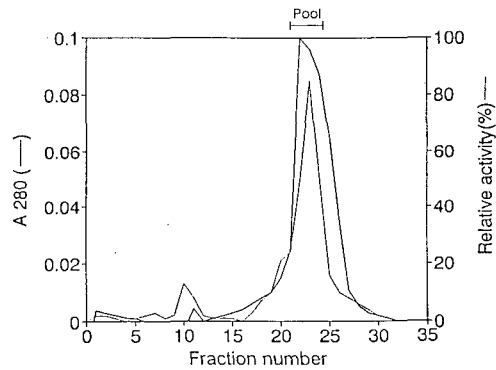


Fig. 4. Gel filtration with Sephadex G-150 of rechromatographic fraction. The column(ϕ 2.5 \times 90cm) was eluted 300ml 20mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer. The flow rate was 30ml/hr.

기영동법으로 확인한 결과는 Fig. 5와 같다. Lane 1은 첫단계인 조효소로서 band들이 복잡하게 나타났고, lane 2는 황산암모늄 포화 획분을 거친 단계로 lane 1과 거의 비슷한 양상을 보이고 있어 정제가 거의 되지 않았으며, lane 3은 이온교환 크로마토그래피를 거쳐 얻은 획분 A를 나타내었다. Lane 3에서는 주요 band가 lane의 상단에 있고, 획분 B band가 lane 중간에 소량 존재함을 확인하였다. Lane 4는 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 크로마토그래피를 거쳐 얻은 획분 B로서 주요 band가 뚜렷하게 나타났으며, lane 상단에 획분 A단백질이 약간 남아 있고, lane 하단에는 불순 단백질이 소량 존재하였다. Lane 5는 DEAE-Sephadex A-50 이온

교환 크로마토그래피를 다시 거쳐 얻은 획분으로 주요 band가 약간 하단에 미량의 불순 단백질 한 개가 존재함을 확인하였고, 겔 여과를 거쳐 얻은 획분은 lane 6에 나타내었다. Lane 6에서 하나의 단일 band로서 순도가 확인되었으며, 정제된 collagenase는 모두 -40°C 이하에서 보관하였다. 그리고, collagenase의 정제 단계별 고유활성 및 수율, 단백질량 등은 Table 1에 나타내었다. 이때 정제 collagenase의 고유활성은 조효소에 비해 92.2배 높았고, 수율은 10.9%이었다.

2. 조효소의 최대 활성

Type I 콜라겐에 대한 조효소의 활성은 pH, 온도 및 반응시간에 따라 달랐으며, 그 결과는 Fig. 6, Fig. 7 및 Fig. 8에 나타내었다. pH에 따른 영향은 Fig. 6에서와 같이 조효소의 최대활성 pH는 8.0이었으며, pH 4 이하 및 pH 11 이상에서는 활성을 나타내지 않았다. 온도별로는 Fig. 7에서와 같이 55°C 에서 최대활성을 보였다. 반응시간에 따른 조효소의 Type I 콜라겐에 대한 활성을 측정된 결과는 Fig. 8과 같다. 콜라겐에 대한 조효소의 활성은 반

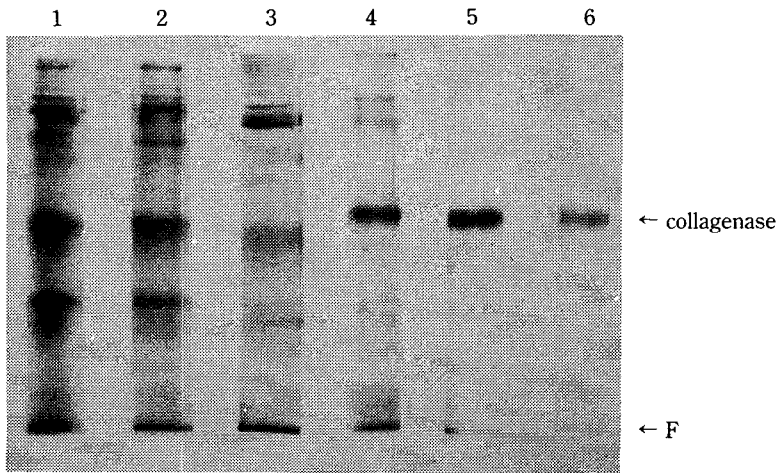


Fig. 5. Disc-polyacrylamide gel (PAG) electrophoretic patterns of collagenase from the internal organs of filefish. Abbreviations used: Lane 1, crude enzyme; lane 2, ammonium sulfate; lane 3, fraction A from chromatogram; lane 4, fraction B from chromatogram; lane 5, fraction from rechromatogram; lane 6, fraction from gel filtration.

Table 1. Collagenase activity and recoveries in stages of purification

Fraction	Total protein (mg)	Specific collagenolytic activity*	Yield of activity (%)	Fold
Crude extract	792.23	114.15	100	1.00
Ammonium sulfate, fraction(30~80%)	400.15	145.34	64.30	1.27
Chromatography, DEAE-Sephadex A-50 column(ϕ 3×40cm)	35.35	976.31	38.16	8.60
Rechromatography, DEAE-Sephadex A-50, column(ϕ 3×20cm)	2.55	10,204.61	28.77	89.39
Gel filtration, Sephadex G-150, column(ϕ 2.5×90cm)	0.93	10,553.28	10.90	92.40

*U/mg/min.

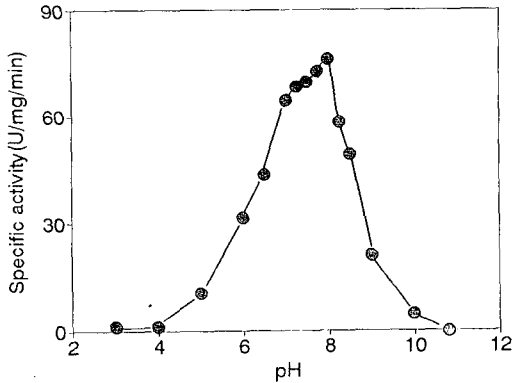


Fig. 6. Effect of pH on the hydrolysis of Type I collagen by the crude enzymes from the internal organs of filefish. The used buffers were 50mM citrate- Na_2HPO_4 (pH 3.0~7.0), 50mM Tris-HCl(pH 7.0~9.0) and 50mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.0~10.8). All buffers contained 0.36mM CaCl_2 . The reaction mixture was reacted at 60°C for 20min.

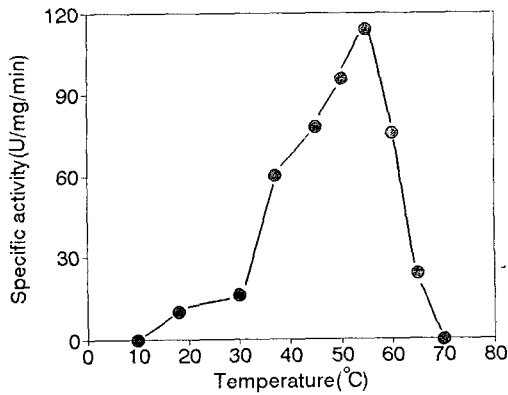


Fig. 7. Effect of temperature on the hydrolysis of Type I collagen by the crude enzymes from the internal organs of filefish. The used buffer was 50mM Tris-HCl(pH 7.75) containing 0.36mM CaCl_2 . The reaction mixture was reacted at various temperature for 20min.

응시간 30분까지 급격하게 증가하였으나, 그 이후에는 완만하게 증가하였다.

3. 정제 collagenase의 최대 활성조건

1) pH

정제 collagenase의 기질용 콜라겐(Type I)에 대한 반응 pH의 영향을 Fig. 9에 나타내었다. pH

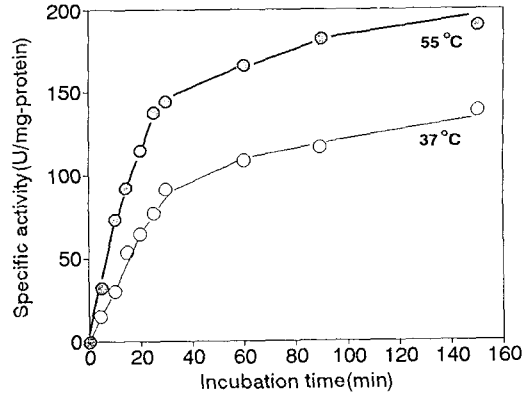


Fig. 8. Effect of reaction time on the hydrolysis of Type I collagen by the crude enzymes from the internal organs of filefish. The used buffer was 50mM Tris-HCl(pH 7.75) containing 0.36mM CaCl_2 .

5 이하 및 pH 9 이상에서는 활성을 나타내지 않았고, pH 7.75에서 최대활성을 보였으며, 고유 활성이 10,460 U/mg-protein이었다. 이것은 조효소의 활성 pH 범위보다 좁게 나타났다.

Yoshinaka 등(1976)의 보고에 의하면, yellowtail의 유문수에서 분리한 collagenase는 산으로 추출한 collagen에 대하여 pH 8.5에서 최대활성을 보였으며, 이 때의 고유활성은 3,363 U/mg-protein/hr이었다. Macartney 등(1983)은 human polymorphonuc-

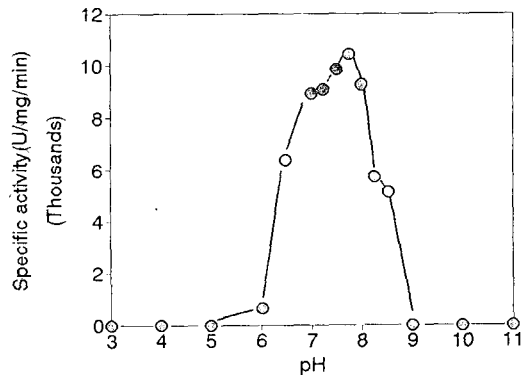


Fig. 9. Effect of pH on the hydrolysis of Type I collagen by the purified collagenase from the internal organs of filefish. The used buffers were 50mM citrate- Na_2HPO_4 (pH 3.0~7.0), 50mM Tris-HCl(pH 7.0~9.0) and 50mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.0~10.8). All buffers contained 0.36mM CaCl_2 . The reaction mixture was reacted at 55°C for 20min.

lear leukocyte에서 분리한 collagenase의 최적 pH는 7.4라고 보고하였고, *Vibrio* B-30에서 추출한 collagenase는 최적 pH가 7.6인 것으로 보고한 바 있다 (Dipaolo, 1988). 그리고 김과 김(1991)의 말쥐치 육조직으로부터 분리 정제한 collagenase의 최적 pH는 8.0이었다.

이상과 같이 말쥐치 어류 내장 collagenase의 최적 pH는 7.75로 일반동물 및 미생물 collagenase의 최적 pH(pH 7.0~9.0)와 유사하였다.

2) 온 도

Collagenase의 콜라겐(Type I)에 대한 반응온도의 영향을 Fig. 10에 나타내었다. 정제 collagenase는 55℃에서 최대활성을 보였고, 일반 동물 collagenase의 최적온도인 37℃(Salo 등, 1983)에서는 최대활성의 15% 정도의 활성만 나타내었다. 조효소에서와 유사하게 20℃까지 콜라겐에 대해 활성을 보였으며, 10℃ 이하에서는 활성을 나타내지 않았다. 일반적으로 동물 collagenase와 미생물 collagenase는 30~37℃에서 최적활성이 나타나는 것으로 보고되었으나(Salo 등, 1983; Weeks 등, 1976; Peterkofsky, 1982), Foegeding 등(1986)에 의하면 40~46℃에서 미생물 collagenase의 활성이 최대가 된다고 보고한 바 있다. 그리고 Iwata 등(1974)은 대부분 육 중에 분포하는 단백질분해효소는 60~65℃에서 최대활성을 보인다고 하였고, 김과 김(1991)의 말쥐치 육조직으로부터 정제한 collagenase도 최대활성이 60℃이었다.

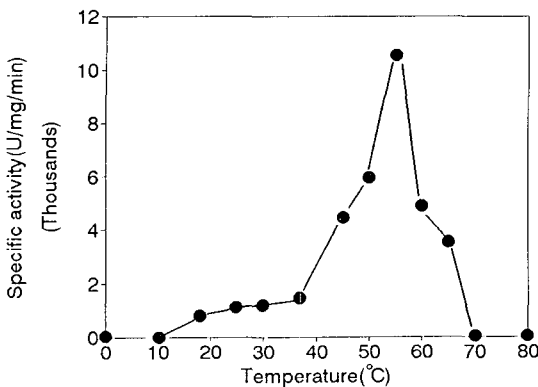


Fig. 10. Effect of temperature on the hydrolysis of Type I collagen by the purified collagenase from the internal organs of filefish. The used buffer was 50mM Tris-HCl(pH 7.75) containing 0.36mM CaCl₂. The reaction mixture was reacted at various temperature for 20min.

본 실험에서 추출한 말쥐치 내장 collagenase는 육 중에 분포하는 collagenase와 비슷한 양상을 보였다.

3) 반응시간

정제 collagenase의 반응시간별 collagen(Type I)의 가수분해도를 측정하여 Fig. 11에 나타내었다. Collagen 가수분해도는 반응시간 30분까지 급격히 증가하였으나, 그 이후부터는 완만하게 증가하므로 최적 반응시간은 30분으로 하였다. 55℃ 및 37℃의 온도 차이에 따른 활성차이는 조효소에 비해 정제된 collagenase가 컸는데, 이것은 collagenase의 정제도가 높을수록 콜라겐에 대한 특이성이 높아지기 때문이라고 생각된다. Beltran 등(1991)은 *Clostridium histolyticum* collagenase와 송아지 콜라겐이 반응할 때, 콜라겐의 변성온도가 55~57℃로 보고하였다. 따라서, 말쥐치 내장 collagenase의 최대 활성조건인 55℃는 collagen의 변성온도 범위이므로, 일반동물 collagenase의 최적온도이며 bovine 콜라겐의 변성온도 이하인 37℃(Salo 등, 1983)에서 시간별로 활성을 측정, 비교하였다. 그 결과 55℃에서의 정제 collagenase에 비하여 6.3배 낮은 활성을 보였으나, 55℃ 조효소에 비해서는 13배나 높은 활성을 보였다. 그러나 정제과정에서의 활성측정은 55℃에서 행하였는데 그 이유는 활성을 나타내는 분획이 쉽게 구분되었기 때문이다.

4. 단백질 가수분해 효소들과의 활성비교

불용성 콜라겐(Type I)에 대하여 정제된 collagenase의 활성을 단백질 가수분해 효소들과 55℃

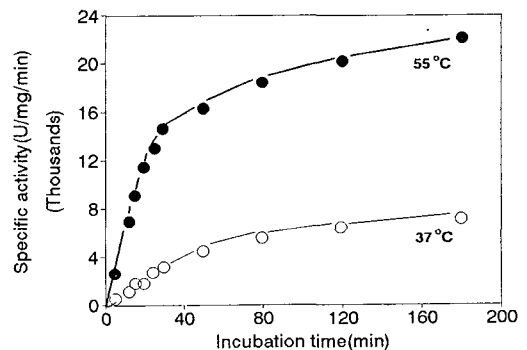


Fig. 11. Effect of reaction time on the hydrolysis of Type I collagen by the purified collagenase from the internal organs of filefish. The used buffer was 50mM Tris-HCl(pH 7.75) containing 0.36mM CaCl₂.

및 37°C에서 비교한 결과를 Fig. 12 및 Fig. 13에 나타내었다.

55°C에서는 정제 collagenase의 활성이 10,500 U로서 높은 활성을 나타내었으며, pronase E의 활성

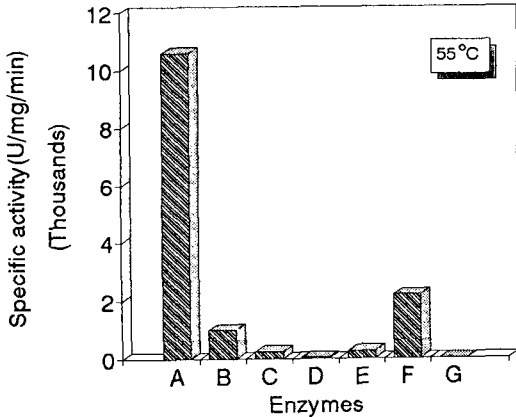


Fig. 12. Comparison of the activity of the purified collagenase with those of other enzymes at 55°C and pH 7.75 for 20min. Abbreviations used; A, purified collagenase from the internal organs of filefish; B, collagenase Type I from *Clostridium histolyticum*; C, papain; D, α -chymotrypsin; E, trypsin; F, pronase E; G, pepsin.

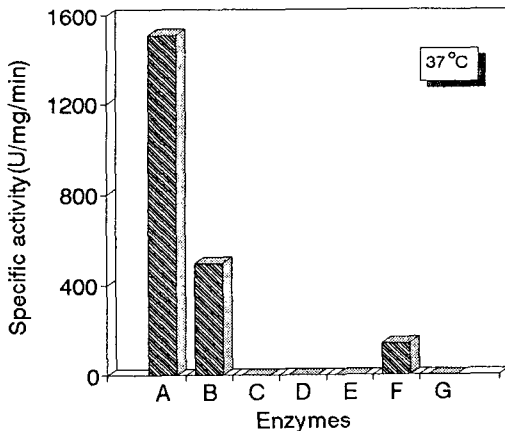


Fig. 13. Comparison of the effect of collagenolytic activity with other enzymes at 37°C and pH 7.75 for 20min, pH 7.75. Abbreviations used; A, purified collagenase from the internal organs of filefish; B, collagenase Type I from *Clostridium histolyticum*; C, papain; D, α -chymotrypsin; E, trypsin; F, pronase E; G, pepsin.

은 2,000 U로서 정제 collagenase에 비해 10배 정도 낮은 활성을 나타내었고, papain, α -chymotrypsin, trypsin, pepsin 등은 55°C에서 거의 활성을 나타내지 않았다.

37°C에서는 정제 collagenase의 활성이 1,500 U로서 55°C에 비해 7배 정도 낮은 활성을 나타내었으나, 다른 단백질 가수분해효소들에 비해서는 가장 높았다. 시판용 collagenase의 활성은 약 500 U이었고, pronase E의 활성은 160~180 U이었으며, 다른 효소들은 활성을 전혀 나타내지 못하였다.

이상의 결과에서 볼 때, 정제 collagenase는 기질용 콜라겐(Type I)에 대하여 다른 단백질 가수분해 효소들에 비해 특이적인 분해활성을 나타내기 때문에 collagenase라 판단된다(Kim과 Choi, 1993).

5. 말쥐치피의 가수분해 조건

1) 반응온도

콜라겐에 대한 조효소와 정제 collagenase의 pH, 온도 및 반응시간에 따른 최대활성조건은 서로 유사한 경향을 보였으며, 정제 collagenase는 조효소의 활성에 비해 92배 정도 높았지만, 수율이 현저하게 떨어져 정제 collagenase에 비해 800배 정도 많은 양을 얻을 수 있고 경제성이 높은 조효소를 말쥐치피 탈피에 사용하였다.

기질농도를 1% (건조물량, w/v)로 하여 pH 8.0으로 조절한 다음 조효소액 0.1% (w/w)를 가하여 각 온도별로 가수분해시킨 결과는 Fig. 14에서와 같이 50°C에서 61.2%로 가장 높은 가수분해도를 나타내었으며, 온도가 낮아짐에 따라 가수분해도는 감소하였다.

김 등(1991)은 대구피를 pronase로 가수분해시

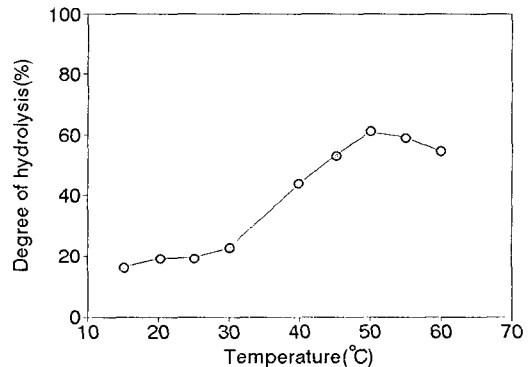


Fig. 14. Effect of incubation temperature on the hydrolysis of filefish skin with 0.1% crude collagenase for 2hrs at pH 8.0.

킬 때 온도 50℃에서 가장 높은 가수분해도를 나타내었으며, 55℃ 이상에서는 가수분해도가 현저히 감소하였다고 보고하였다. Gildberg와 Raa(1978)는 황어피부터 유리되는 단백질량은 pH 6.6~9.2, 온도 16~25℃에서 뚜렷하게 증가하였다고 보고한 바 있다.

2) pH

1% (w/v) 기질용액에 조효소액 0.1% (w/w)를 가하여 앞의 결과에 따라 온도 50℃에서 pH변화에 따른 가수분해도는 Fig. 15와 같다. pH 8.0에서 가수분해도가 72.1%로 가장 높았으며, pH 7.0 이하와 9.0 이상에서는 가수분해도가 감소하였다.

김 등(1991)은 대구피를 pronase로 가수분해시킬 때 pH 6.0에서 가장 높았으나 pH 9.0 이상에서는 가수분해도가 현저히 감소하였다고 보고하였으며, Gildberg와 Raa(1978)는 황어피를 황어의 내장에서 추출한 조효소로 가용화시킬 때 pH 4.0에서 가수분해도가 가장 높았다고 보고한 바 있다. Fuji 등(1973)은 20℃에서 48시간 동안 10% pronase로 collagen을 가수분해하였을 때 pH 6.0에서 85%로, pH 7.6의 18%에 비해 매우 높았다고 보고하였다. 본 실험에서는 중성 pH 범위에서 말쥐치피에 대한 조효소의 가수분해도가 높게 나타났다.

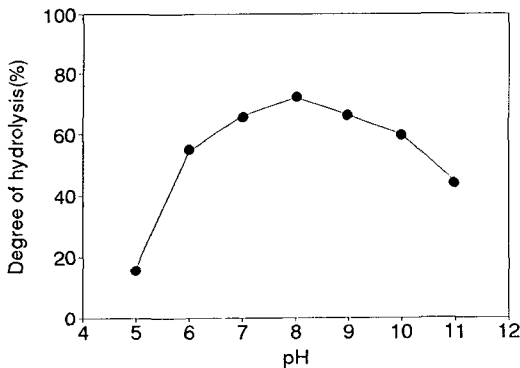


Fig. 15. Effect of pH on the hydrolysis of filefish skin with 0.1% crude collagenase for 2hrs at 50℃.

3) 반응시간

기질용액 1% (w/v)에 조효소액 0.1% (w/w)를 가하여 앞의 결과에 따라 온도 50℃, pH 8.0으로 조절한 다음, 반응시간에 따른 가수분해도는 Fig. 16과 같다. 즉, 반응시간 3시간까지의 가수분해도는 70.8%로 비교적 급격히 증가하다가 3시간 이후에는 거의 일정하였다. 김 등(1991)은 대구피 용액에

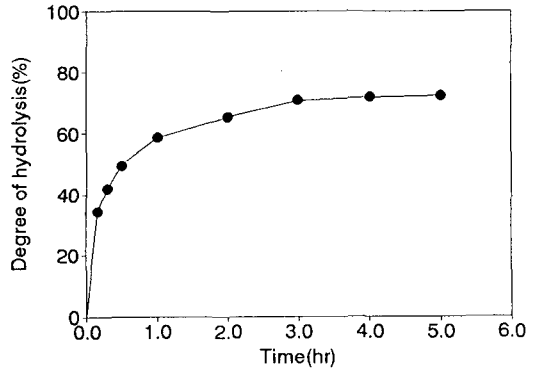


Fig. 16. Effect of incubation time on the hydrolysis of filefish skin with 0.1% crude collagenase at 50℃ and pH 8.0.

pronase를 가하여 50℃에서 시간변화에 따른 가수분해도를 측정한 결과 1시간까지 비교적 급격하게 증가하다가 3시간까지 완전한 증가를 보였다고 보고한 바 있다. 이에 반해, 말쥐치 내장으로부터 추출한 조효소에 의한 말쥐치피 분해반응은 3시간 때에 거의 일정 수준에 도달되었다.

4) 효소농도

1% (w/v)의 기질용액에 온도, 시간 및 pH는 앞의 결과에 따라 최적조건으로 하여 효소농도 변화에 따른 가수분해도는 Fig. 17과 같다. 효소농도가 0.3%에서의 가수분해도는 76.2%로 급격히 증가하다가 그 이상의 농도에서는 완만하게 증가하였다. 여기서 최적 효소농도는 0.3%로 선정하였다.

김 등(1991)은 대구피를 pronase로 가수분해시킬 때 기질에 대해 효소농도가 0.03%에서 가수분

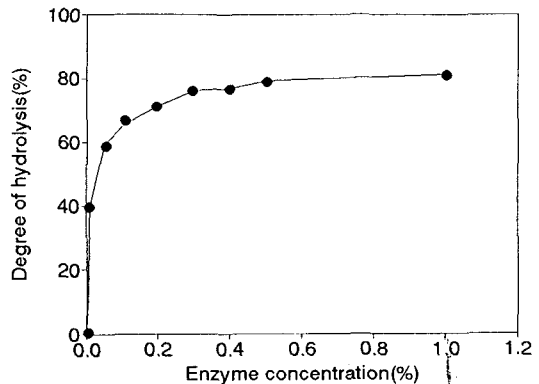


Fig. 17. Effect of enzyme concentration on the hydrolysis of filefish skin with crude collagenase for 3hrs at 50℃ and pH 8.0.

해도가 76.8%였으나 대구피를 collagenase로 1시간 가수분해시킨 후 pronase로 처리한 경우 가수분해도는 83.13%였다고 보고하였다.

6. 말쥐치피 탈피

말쥐치 내장에서 추출한 조효소에 의한 말쥐치 탈피는 Fig. 18과 같다. 손으로 탈피시킨 A와 조효소의 어피가수분해 최적조건인 온도 50℃, pH 8.0으로 조절된 효소용액으로 탈피시킨 B를 비교하였을 때, 50℃에서 탈피시 육의 손상으로 인해 어피탈피에 문제가 되었다. Stevenotwell와 Hamann(1979)은 온도변화에 따른 오징어육의 변화를 현미경으로 관찰한 결과 50℃ 이상에서 근원섬유가 열에 의해 영향을 받는다고 보고한 바 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 말쥐치를 0.5M 초산에 10분 동안 전처리한 후 조효소가 활성을 나타내는 최적 온도 부근이며, 김 등(1993)이 보고한 collagen의 변성한계온도(25℃) 이하인 18℃, pH 8.0에서 말쥐치 내장으로 부터 추출한 조효소용액을 0.015% (w/v)되게 가하여 가수분해하였으며, 그 결과는 Fig.

19과 같다. 즉, A는 대조구이며, B는 0.5M 초산용액에 10분간 처리한 후의 말쥐치로서 대조구 A와 비교하였을 때 외관상으로 크게 차이가 없었다. C는 pH 8.0, 온도 18℃에서 2시간 동안 반응시켰을 때의 말쥐치로, 거의 50% 이상이 탈피되었다. D는 C와 동일한 조건하에서 효소반응 4시간이 경과한 후를 나타낸 것으로서 완전한 탈피가 가능하였다.

결론 및 요약

말쥐치(*Novodon modestrus*)의 내장으로부터 collagenase를 황산암모늄 염석, 두차례에 걸친 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 크로마토그래피 및 겔 여과를 거쳐 분리 정제한 후 몇가지 효소학적 성질을 구명하였으며, 또한 조효소 collagenase를 이용하여 말쥐치피의 탈피를 시도하였다. 그 결과는 다음과 같다.

정제 collagenase의 고유활성은 조효소에 비해 92.4배로 증가하였고, 이때의 수율은 10.9%였다. 기질인 불용해성 Type I 콜라겐(bovine)에 대한 조

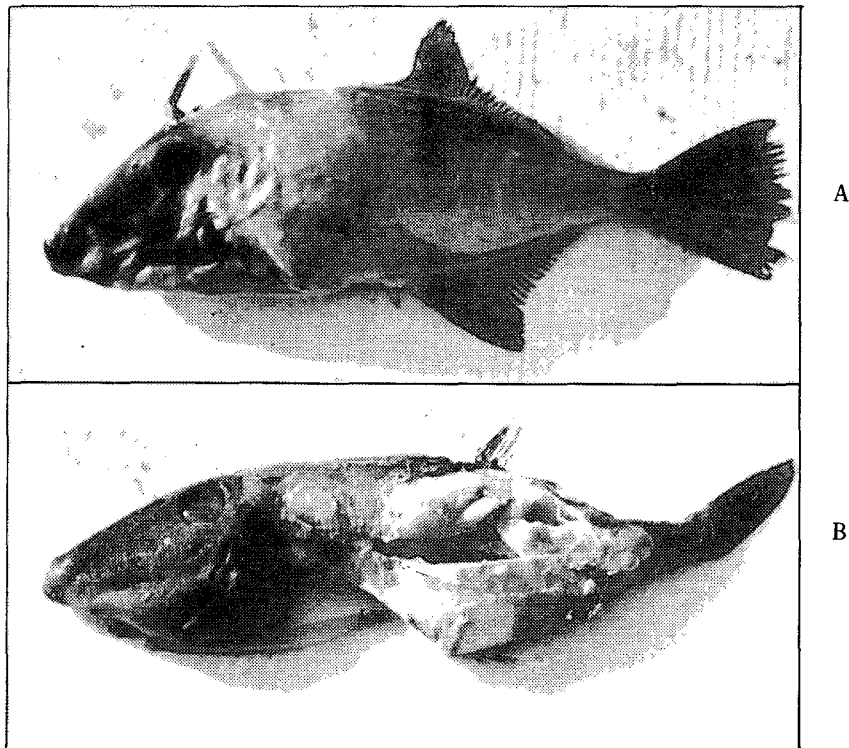


Fig. 18. Filefish skinned with knife(A) and with crude collagenase for 30min at 50℃ and pH 8.0(B).

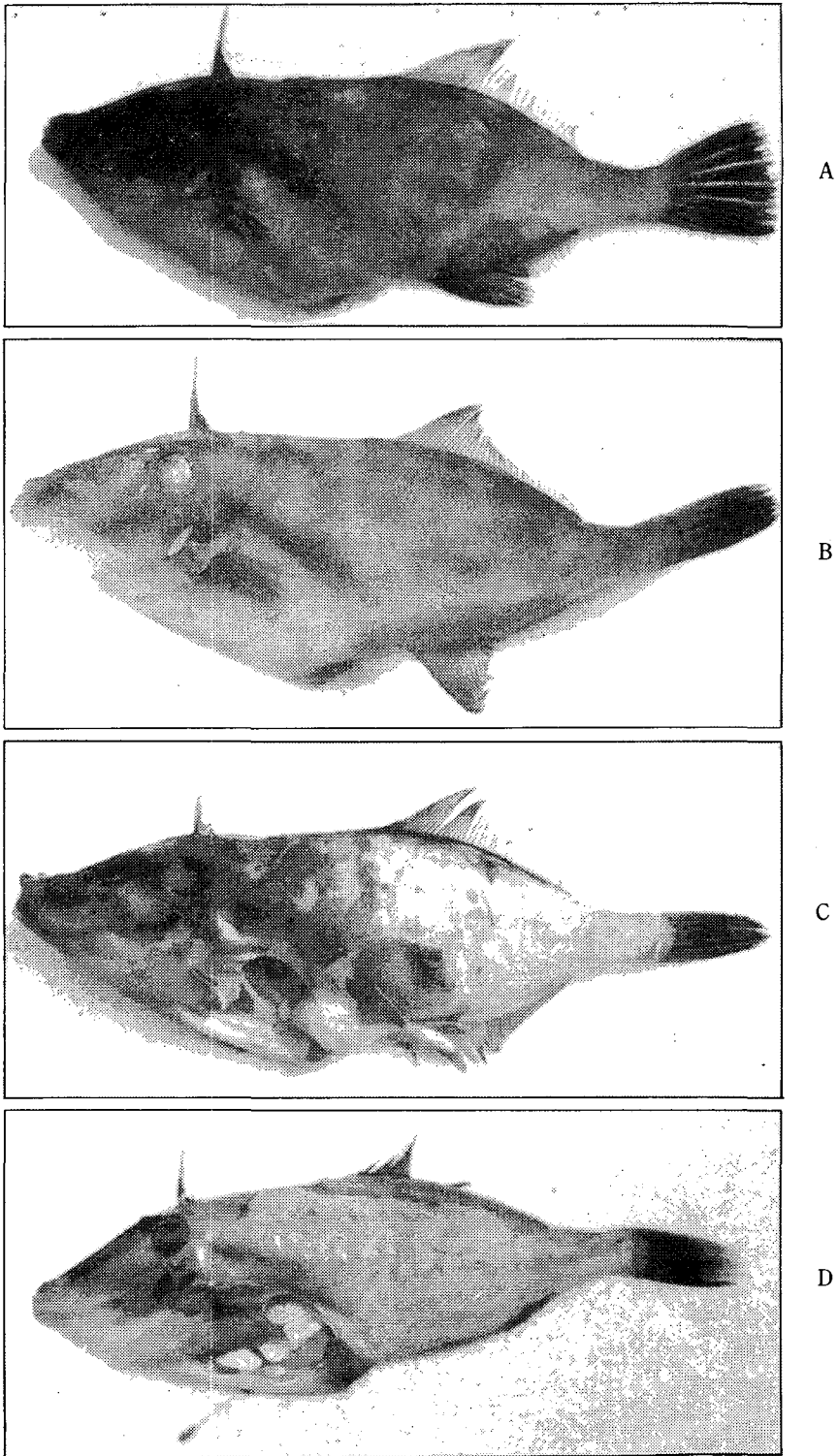


Fig. 19. Filefish skinning process. Abbreviations used: A, control; B, treated with 0.5M acetic acid for 10min at 18°C; C, skinning with crude collagenase for 2hrs at 18°C after filefish is pretreated with 0.5M acetic acid for 10min at 18°C; D, skinning with crude collagenase for 4hrs at 18°C after filefish is pretreated with 0.5M acetic acid for 10min at 18°C.

효소의 최적 분해활성 조건은 pH 8.0, 55℃이었고, 정제 collagenase의 pH 및 온도는 각각 pH 7.75, 55℃이였으며, 반응 시간별 활성은 30분까지는 급격하게 증가하였으나 그 후로는 매우 완만하게 증가하였다. 한편, 정제 collagenase는 시판용 collagenase, papain, α-chymotrypsin, trypsin, pronase E 및 pepsin에 비해서 그 활성은 대단히 높았으며, 37℃에서 높은 활성을 보인 시판용 collagenase에 비해 3.33배, 55℃에서 높은 활성을 나타낸 pronase E보다도 각각 11.11배 높았다.

말쥐치피에 대한 조 collagenase의 가수분해를 pH 8.0, 효소농도 0.3% (w/w), 50℃에서 말쥐치의 탈피를 실시해 본 결과, 탈피 효과는 좋았으나, 열에 의해 육이 손상받았다. 그래서 저온하에서 탈피를 시도하였으며, 말쥐치를 0.5M 초산으로 10분간 처리한 후, 18℃의 조효소 0.015% (w/v) 용액에 4시간 처리가 근육의 손상없이 탈피가 완전히 되는 최적조건으로 생각되었다.

사 사

본 연구는 1991년도 산학협동재단의 학술 연구비 지원으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Bauer, E. A., G. P. Stricklin, J. J. Jeffrey and A. Z. Eisen. 1975. Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64(1), 232~240.
- Beltran, J. A., M. Bonnet and A. Ouali. 1991. Collagenase effect on thermal denaturation of intramuscular collagen. *J. Food. Sci.*, 56(6), 1497~1499.
- Dawson, R. M. C., D. C. Eliot, W. H. Eliot and K. M. Jones. 1974. *Data for biochemical research*, 2nd. Ed., p. 475.
- Dipaolo, B. R. 1988. Studies on multiple collagenase production by *Vibrio B-30* and collagen metabolism in fetal wound healing, a doctoral dissertation of Lehigh University. 1~100.
- Foegeding, E. A. and D. K. Larick. 1986. Tenderization of beef with bacterial collagenase. *Meat Science*, 18, 201~214.
- Fujii, T. and K. Kobayashi. 1973. The effects of pH and borohydride reduction on the solubilization of steer hide collagen by pronase. *J. Biochem.*, 74, 307~311.
- Gildberg, A. and J. Raa. 1978. Solubility and enzymatic solubilization of muscle and skin (*Mallo-tus villosus*) at different pH and temperature. *Biochem. Physiol. Vol. 63B*, 309~314.
- Iwata, K., K. Kobashi and J. Hase. 1974. Studies on muscle alkaline protease-III; Distribution of alkaline protease in muscle of freshwater fish, marine fish and in internal organs of carp. *Bull. Japan Soc. Sci. Fisher*, 40(2), 201~209.
- Kim, S. K. and K. D. Choi. 1993. Purification and characterization of collagenase from the internal organs of filefish, *Novoden modestrus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 투고중.
- Leuba, J. L., I. Meyer and E. M. Andersen. 1987. Method for dissolving squid membranes. *United State Patent No. 4,701,339*.
- Lowry, O. H., J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- Macartney, H. W. and H. Tschesche. 1983. Latent and active human polymorphonuclear leukocyte collagenase isolation, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.*, 130, 71~78.
- Mandl, I., J. D. Maclennan and E. L. Howes. 1953. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Clostridium histolyticum*. *J. Clin. Invest.*, 32, 1323~1329.
- Monsheimer, R. and E. Pfeleiderer. 1981. Method of dissolving collagen-containing tissues. *United States Patent No. 4,293,647*.
- Moore, S. and W. H. Stein. 1948. Photometric ninhydrin method. *J. Biol. Chem.*, 176, 367~372.
- Peterkofsky, B. 1982. Bacterial collagenase. *Methods in Enzymology*, 82, Part A, 453~471.
- Raa, J. and K. Nilson. 1982. A method for the removal of connective skin from squid. *Norway Patent No. 150304*.
- Salo, T., L. A. Liotta and K. Tryggvasan. 1983. Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J. Biological Chemistry*, 258(5), 3058~3063.

- Stefansson, G. 1988. Enzymes in the fishing industry. Food Technology, March, 64~65.
- Stevenotwell, W. and D. D. Hamann. 1979. Textural characterization of squid (*Loligo pealei* LEUER), Scanning electron microscopy of cooked mantle. J. Food Sci., 44, 1629~1635.
- Weeks, J. G., J. Halme and J. F. Woessner. 1976. Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. Biochem. Biophys. Acta., 445, 205~214.
- Yoshinaka, R., M. Sato and S. Ikeda. 1976. Studies on collagenase in fish-II, Some properties of a collagenase from the pyloric caeca of *Seriola quinqueradiata*. Bull. Japan Soc. Sci. Fisher., 42(4), 445~463.
- 松本 重一郎. 1980. 多獲性赤身漁の高度利用技術開發研究成果の概要. 393, 水産廳研究部研究果.
- 김세권·양현필·이용호. 1991. 어피의 효소적 가수분해물을 이용한 천연조미료의 개발. 한국생물공학회지, 6(4), 327~336.
- 김세권·이용호·강옥주·권철성. 1986. 어패류의 조리, 가공과 collagen. 냉동 공조공학, 5(1), 5~30.
- 김세권·강옥주·곽동채. 1993. 어피콜라겐의 추출 정제 및 그 물리화학적 특성. 한국농화학회지, 36(2), 투고중.
- 김용태·김세권. 1991. 말쥐치 육조직 Collagenase의 정제 및 특성. 한국생화학회지, 24, 401~409.
- 박영호. 1991. 세계의 수산업 현황과 전망에 관한 국제학술 심포지움: 한국수산업의 현황과 전망, p. 26.

1993년 2월 8일 접수

1993년 3월 6일 수리