

명란 단백분해효소 저해제의 특성

USTADI · 김근영¹ · 김상무^{1*}
 가자마다대학 수산학과, ¹강릉대학교 해양생명공학부

Characteristics of Protease Inhibitor Purified from the Eggs of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*)

USTADI, Keun Yeong KIM¹ and Sang Moo KIM^{1*}
 Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Gadjah Mada University,
 Yogyakarta, Skip unit 1, Indonesia
¹Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University,
 Gangneung 210-702, Korea

Protease inhibitors were purified from the eggs of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) using the following purification steps: ammonium sulfate precipitation, ion exchange, gel permeation, and high performance liquid chromatographies (HPLC). The protease inhibitor from the heated eggs of Alaska pollock was not as well purified. In addition, the heated eggs showed lower specific inhibitory activity than the unheated eggs. The purification yields after ammonium sulfate precipitation, ion exchange, and gel permeation chromatographies were 22.7%, 15.3%, and 4.4%, respectively. There were two kinds of protease inhibitors on the gel permeation chromatography pattern. Their molecular weights were estimated to be 66,700 and 16,000 Da, respectively. Both were classified as a cysteine protease inhibitor because of the existence of inhibiting papain, which is one of cysteine proteases.

Key words: Alaska pollock egg, cysteine protease, protease inhibitor, *Theragra chalcogramma*

서 론

동물성 식품의 유통기간을 결정하는데 있어서 식품의 원료로 사용되어지는 동물의 근육이나 조직자체에 함유되어 있는 내인성(endogenous)효소 및 미생물이 분비하는 외인성(exogenous)효소의 작용은 매우 중요하다. 특히 수산식품인 맛살류 및 젓갈류의 품질열화의 주 원인은 단백분해효소로 알려져 있다. 맛살류의 경우 제품의 원료인 어류의 근육 및 체내에 존재하는 내인성(endogenous)단백분해효소가 단백질을 가수분해하여 근육조직의 연화와 파괴를 가져오며(An et al., 1996), 제품의 겔(gel)화를 위한 가열공정 동안 내열성 단백분해효소에 의해 단백질이 분해 되어 독특한 조직감을 구성하는 겔 구조가 파괴(modori)된다(Saeki et al., 1995). 또한 젓갈류는 자가소화효소 및 미생물이 분비하는 단백분해효소에 의해 어느 정도 기간이 지나면 과숙성 되어 고유의 풍미가 사라지고 조직감이 저하되는 등의 품질열화가 일어난다(Cha and Lee, 1994). 그러므로 이들 제품의 유통기간 연장 및 품질향상을 위해서는 효과적으로 단백분해효소의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. 단백분해효소의 활성을 억제하기 위하여 여러 방법들이 적용되어 왔으나 천연저해제를 이용하는 것이 가장 바람직한 방법의 하나로 알려지고 있다. 대부분의 단백분해효소는 그에 부합하는 특이적인 저해제(inhibitor)에

의하여 활성이 저해되며, 활성부위의 종류에 따라 cysteine, serine, aspartic acid 및 metallo 단백분해효소로 분류된다(Kenny, 1999). 이 중 수산물의 주 내인성 분해효소는 cysteine계 단백분해효소로 cathepsin (An et al., 1994) 및 열에 안정한 알칼리성 단백분해효소(Boye and Lanier, 1988)이다. 천연 단백분해효소저해제는 달걀흰자, 소혈장, 감자전분 등에서 분리한 것이 있으나(Weerashinghe et al., 1996), 소혈장 유래 단백분해효소저해제는 광우병 문제로 사용이 금지되었으며 아직까지 수산물에서 분리한 것은 많지 않은 실정이다. 미국산 연어란(Yamashita and Konagaya, 1991) 및 잉어란(Tsai et al., 1996)에서 단백분해효소 저해제를 분리·정제한 연구가 보고되었으나 상품화하지는 못하였다. 본 연구에서는 맛살류 및 젓갈의 품질 열화를 방지할 목적으로 명란(Egg of Alaska pollock)에서 분리·정제한 단백분해효소 저해제의 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

재 료

실험에 사용된 명란은 2003년 10월 동해안산 명태(*Theragra chalcogramma*)에서 채취한 신선한 알로 -40℃에서 동결·저장하여 필요시 해동하여 사용하였다. Papain, azocasein, molecular marker (Sigma MS-70)는 Sigma사(St. Louis, U.S.A)제품을 사용하였다.

*Corresponding author: smkim@kangnung.ac.kr

단백분해효소 저해제의 정제

명란 250 g에 1 L의 buffer A (25 mM sodium phosphate buffer containing 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 및 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0)를 첨가하여 균질화한 후 원심분리(10,730×g, 25 min)하여 상층액을 취하였다. 상층액을 20-40% 포화농도의 (NH₄)₂SO₄를 첨가한 다음 상기와 같은 조건에서 원심분리하여 얻은 침전물에 10 mL의 buffer B (25 mM sodium acetate buffer containing 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 5.5)를 첨가하여 녹인 다음 같은 용매에 24시간 투석하여 염을 제거하였다. CM-Sepharose column (2.6×30.0 cm)에 투석한 시료 20 mL을 loading하여 분획하였다. 단백질은 0-1.0 M NaCl의 농도 내에서 직선구배에 의하여 유속 1 mL/min로 용출하였다. Papain에 대한 저해활성(inhibitory activity)이 높은 분획물의 최대 peak의 50% 이상 fraction을 모아서 buffer C (25 mM sodium phosphate buffer, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5)로 투석한 다음 환외여과로 15 mL로 농축하여 Sephacryl HR-100 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) column (2.6×90 cm)에 loading 하여 유속 0.5 mL/min으로 용출하였다.

저해활성 (inhibitory activity) 측정

단백분해효소저해제의 저해활성은 Borla et al. (1998) 및 Weerasinghe et al. (1996)의 방법을 수정하여 측정하였다. 즉 시료 200 μL를 80°C에서 10분간 가열하고 buffer C에 녹인 0.1 U papain 용액 100 μL를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 같은 buffer에 녹인 250 μL의 azocasein 용액(0.32 mg/mL)을 첨가하여 30분간 반응하였다. 20% trichloroacetic acid (TCA) 용액 700 μL를 가하여 반응을 정지한 다음 원심분리 (10,730×g, 5 min)하여 얻은 상층액과 1 N NaOH 용액을 9:10 (v/v)의 비율로 혼합하여 440 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 단백질분해효소저해제의 저해활성 1 unit (U)은 papain 활성 1 U의 감소로 정의하였다.

HPLC purification

Sephacryl S-100 column chromatography로 분리된 peak를 25 mM MgCl₂와 0.2 M NaCl을 함유한 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) 로 24시간 투석한 다음 환외여과 (YM-5, Amicon, U.S.A)로 50 μL로 농축하여 HPLC Shodex 803 column (Showa Denco Co., Japan)에 loading 하여 같은 용매를 사용하여 유속 0.5 mL/min로 용출하였다.

온도 및 pH 안정성

단백분해효소 저해제의 온도 및 pH 안정성 측정은 온도 5-80°C, pH 4-8의 범위에서 단백질분해효소를 30분간 평형화하고 papain 및 azocasein과 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 papain에 대한 잔존 저해활성(residual inhibitory activity)을 측정하였다.

분자량 측정 및 순도 검정

정제된 단백질분해효소저해제의 분자량은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 12% polyacrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE로 측정하였으며 전기영동시킨후 R_m (relative mobility) 값에 따라 표준곡선을 작성하고 정제된 단백질분해효소의 R_m 값을 대응시켜 산정하였다. 염색은 Coomassie brilliant blue R-250 (45% methanol, 10% acetic acid, 0.1% Coomassie brilliant blue R-250)용액을 사용하였으며, 45% methanol+10% acetic acid 혼합용액으로 탈색하였다.

단백질 정량

단백질의 정량은 Bradford (1976)의 방법으로 BioRad protein assay kit (CA, U.S.A.)을 사용하여 측정하였으며 표준 단백질은 bovine serum albumin을 사용하였다. 정제과정 중의 단백질의 양은 280 nm에서의 흡광도 값으로 표시하였다.

결과 및 고찰

단백분해효소 저해제의 정제

Ammonium sulfate 농도 20-40%에서 비활성(specific inhibitory activity)은 1.1 U/mg, yield는 22.7%로 나타났으며 다른 농도의 염석구간에 비하여 가장 높은 단백질분해효소 저해활성을 나타내었다 (Table 1). CM-Sepharose chromatography에서 두 개의 peak를 얻었으며 이는 Tsai et al. (1996)이 잉어 (Carp, *Cyprinus carpio*) 난소에서 CM-TSK chromatography로 분리한 단백질분해효소저해제의 peak와 유사한 pattern을 나타내었다 (Fig. 1). Borla et al. (1998)은 몇 종의 어류에서 단백질분해효소저해제를 ion exchange chromatography로 정제할 때 비활성은 1-7 U/mg의 범위라고 보고하였으나 본 실험에서는 Peak II (elution volume 310-370 mL)에서 8.4 U/mg으로 더 높은 비활성이 측정되었다. Synnes (1998)가 연어 껍질에서 정제한 cysteine 단백질분해효소 저해제 또한 ion exchange chromatography에서 두개의 peak를 나타내었으며 두 번째 peak에서 높은 저해활성을 나타내어 본 실험의 결과와 유사하였다. 두 번째 peak중 최대저해활성(maximal inhibitory activity)의 50% 이상 활성을 가진 fraction을 pooling 한 뒤 buffer C에 투석하여 Sephacryl HR-100 gel filtration chromatography한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Sephacryl gel filtration chromatography로 정제하였을 때 Peak I 및 Peak II의 비활성은 각각 10.2 및 15.6 U/mg, purity는 34.10 및 52.21 folds로 Peak II가 Peak I 보다 높았으나 수율은 낮았다(Table 1). Peak I 및 II 모두 연어란의 단백질분해효소저해제 (3.8 U/mg 및 66 folds) (Yamashita and Konagaya, 1991)에 비하여 비활성은 높았으나 purity는 낮았으며 수율은 각각 3.2 및 1.2%로 수율에 상당한 문제점이 있었다. 어류의 단백질분해효소저해제는 열안정성이 우수하며(Synnes, 1998), 일반적으로 어란에서 분리·정제한 단백질분해효소저해제는 열에 안정하여 정제 과정 중 가열 처리를 통한 어란 내의 내인성 단백질분해효소(endo-protease)의 제거가 용이하다고 하였으나(Barrett, 1981), 본 실험에서 시료에 잔존하는

Table 1. Purification of protease inhibitor from the eggs of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*)

Sample	Total protein concentration (mg)	Total inhibitory activity (U)	Specific inhibitory activity (U/mg)	Yield (%)	Purity (fold)
Extract	1,191.7	354.0	0.3	100.0	1.00
Ammonium Sulfate (20-40%)	70.2	80.4	1.1	22.7	3.90
CM Sepharose	6.5	54.0	8.4	15.3	28.20
Sephacryl HR-100					
Peak I	1.1	11.3	10.2	3.2	34.10
Peak II	0.3	4.3	15.6	1.2	52.51

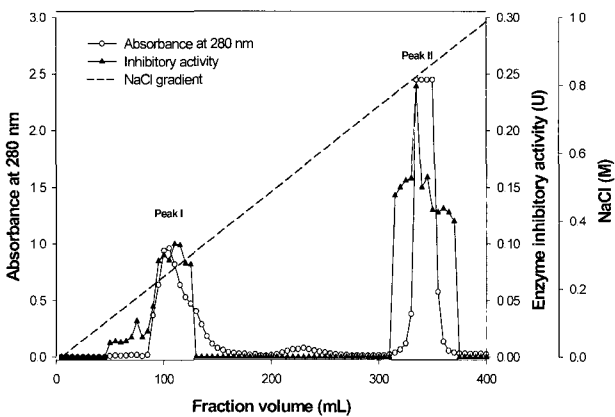


Fig. 1. CM-sepharose chromatographic pattern of ammonium sulfate fraction (20-40%) from the crude extract of the eggs of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*).

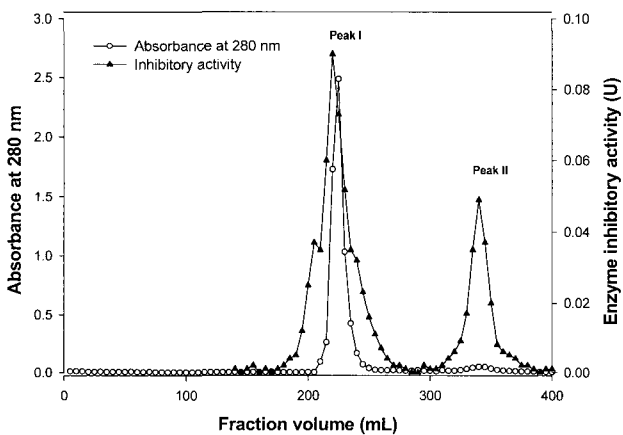


Fig. 2. Sephacryl HR-100 gel filtration chromatographic pattern of Peak II fraction from CM-sepharose chromatography.

내인성 단백질분해효소의 실활을 위해 가열한 다음(80°C, 15 min) 상기와 동일한 실험조건 상에서 정제하였을 때 염석에서는 동일한 농도(20-40%)의 분획물의 저해활성이 가장 높았으나 비활성 및 purification yield는 0.13 U/mg 및 12.6%로 가열하지 않은 시료에 비하여 낮았다(자료미제시). 그러므로

본 실험에서는 가열처리를 하지 않은 시료를 실험에 사용하였다. CM-Sepharose column chromatography에서는 가열한 시료와 가열하지 않은 시료 모두 두 개의 peak를 나타내었으나 (Fig. 3), Sephacryl gel filtration chromatography로 분리하였을 때 가열한 시료는 하나의 peak만을 나타내었고(Fig. 4), HPLC에서는 두 개의 peak로 잘 분리되지 않았다(Fig. 5). 시료를 가열하였을 때 (80°C, 15 min) 시료속의 단백질분해효소저해제는 구형 구조가 선형 구조로 변성된 것으로 생각되며 단백질의 선형 구조는 분자 크기에 의한 분리력을 기초로 하는 gel filtration chromatography 및 HPLC 상에서 peak의 분리가 용이하지 않은 것으로 알려져 있다(Welling, 1989).

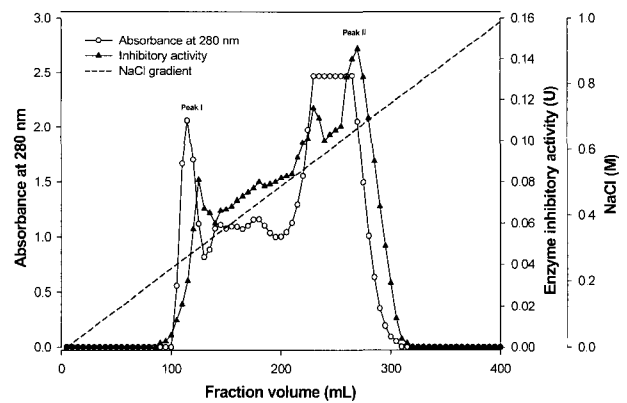


Fig. 3. CM-sepharose chromatographic pattern of ammonium sulfate fraction (20-40%) from the crude extract of the heated eggs of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*).

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Sephacryl gel filtration chromatography에서 얻은 두개의 활성 Peak (I 및 II)를 전기영동 한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Peak I은 두개의 protein band를 나타내었고(자료미제시), Peak II는 한 개의 band를 나타내었다(Fig. 6). Peak I의 전기영동 결과로 얻어진 2개의 band의 분자량은 각각 66.7 및 16 kDa 이었다. 66.7 kDa band는 Barret (1986)의 cystatin group의 분류 (stefin, cystatins 및 kininogen) 중 kininogen과 분자량이 비슷한 것으로 예상된다(68-120 kDa). 16 kDa band는 연어란에서 분

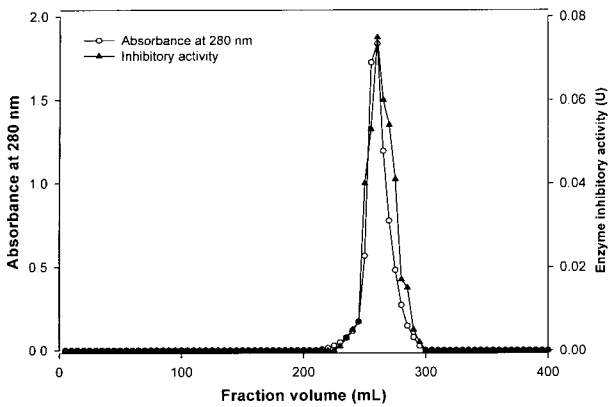


Fig. 4. Sephacryl HR-100 gel filtration chromatographic pattern of Peak II fraction from CM-sepharose chromatography.

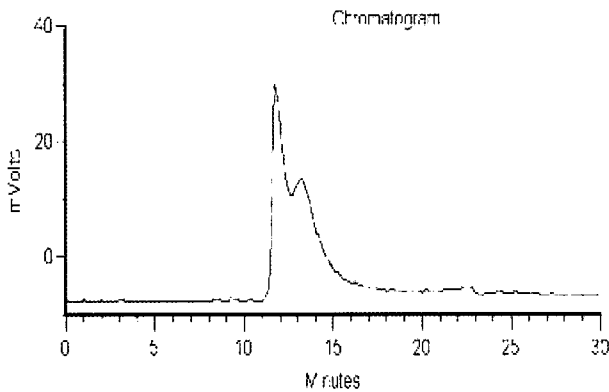


Fig. 5. HPLC pattern of peak fraction from Sephacryl HR-100 gel filtration chromatography.

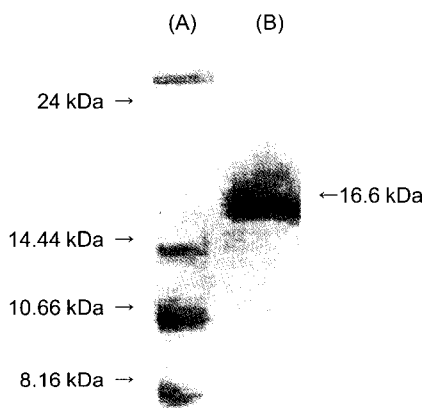


Fig. 6. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) protease inhibitor. (A) standard marker; trypsinogen (24 kDa), myoglobin I+II (14.44 kDa), myoglobin I+III, (10.66 kDa), and myoglobin I (8.16 kDa). (B) peak II.

리한 단백질분해효소 저해제(Yamashita and Konagaya, 1991)의 분자량과 일치하였으며 연어의 뇌, 심장 및 신장에서 분리한

단백분해효소저해제의 분자량은 13 kDa이었다(Yamashita and Konagaya, 1996). 또한 잉어란 단백질분해효소저해제의 분자량(12 kDa) (Tsai et al., 1996) 및 난백 cystatin (12 kDa) (Barrett, 1981) 보다는 약간 높았으나 일반적인 cystatin의 분자량 (10-20 kDa) (Abe et al., 1987)의 범위 안에 있었다. Peak II의 분자량은 16.6 kDa으로 Peak II 또한 cystatin으로 판단된다.

온도 및 pH 안정성

명란 단백질분해효소저해제의 저해활성은 35°C 이상에서 급격히 감소하기 시작하여 80°C에서 최초 저해활성의 약 70%가 감소하였다(Fig. 7). 연어 껍질의 단백질분해효소저해제는 80°C에서 최초 저해활성의 60%가 감소하여(Synnes, 1998) 본 실험의 결과와 유사하였으며 내열성이 약한 것으로 생각된다. 또한 명란 단백질분해효소저해제는 60°C에서 30분간 반응하였을 때 잔존 저해활성(residual inhibitory activity)이 약 35%까지 감소하였다. 수산 연제품의 되풀림 현상(modori)의 주 원인으로 알려져 있는 cathepsin B, H, and L 등과 같은 내인성 단백질분해효소는 50-60°C에서 안정한 것으로 알려져 있기 때문에(An et al., 1994), 명란 단백질분해효소저해제가 cathepsin류의 단백질분해효소를 저해하는 데는 한계가 있을 것으로 생각된다. pH

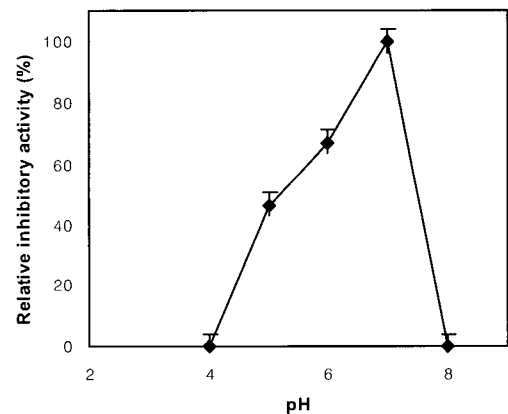
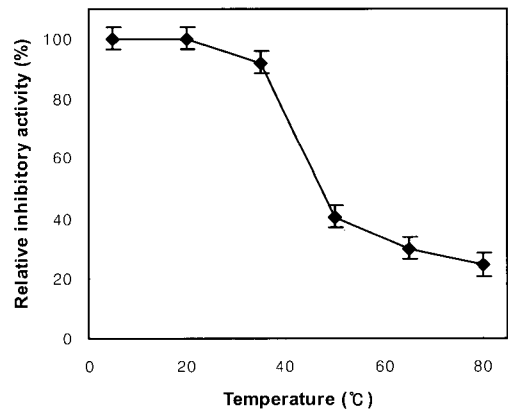


Fig. 7. Effects of temperature and pH on the stability of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) protease inhibitor.

안정성은 중성부근의 pH에서 안정한 것으로 나타났으며 pH 4 및 8 에서는 저해활성이 나타나지 않았다(Fig. 7). 어육 내 잔존하는 내인성 단백질분해효소인 cathepsin B, H 및 L은 중성 또는 알칼리 pH에서 안정하므로(Visessanguan et al., 2003) 명란 단백질분해효소저해제는 수산연제품의 내인성 단백질분해효소저해제의 활성억제를 위해 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 연어 이리(soft milt)에서 정제한 단백질분해효소저해제의 경우 pH 5-7에서 안정하였으며(Kawabata and Ichishima, 1997), 연어란에서 분리된 단백질분해효소저해제는 pH 4 이상에서 저해활성이 감소하기 시작하여 pH 7 이상의 알칼리 pH 에서는 저해활성의 약 80% 이상이 감소되는 차이를 보였다(Yamashita and Konagaya, 1991). 따라서 명란 단백질분해효소저해제를 수산연제품의 품질열화를 억제하기 위한 내인성 단백질분해효소저해제의 저해에 사용할 경우 내열성이 약한 문제점이 있을 수 있으나 pH 안정성의 경우 내인성 단백질분해효소의 최적 활성 pH인 중성 pH에서 안정하므로 저해효과를 얻을 수 있을 것으로 생각되어지며 추후 온도 및 pH의 복합적인 안정성 실험이 필요할 것으로 생각된다.

단백분해효소저해제의 특성

명란 단백질분해효소저해제는 cysteine 단백질분해효소인 papain 및 cathepsin L을 저해하는 것으로 나타났으며(Table 2). serine 계 단백질분해효소인 trypsin에 대한 저해활성은 없는 것으로 나타났다(자료미제시). 시판되고 있는 난백저해제 (egg white inhibitor)의 papain 및 cathepsin L에 대한 저해 비활성은 37.71 및 16.05 U/mg로 명란 단백질분해효소저해제 (15.60 및 29.04 U/mg)와 비교하였을 때 papain에 대한 저해활성은 높았으나 cathepsin L에 대한 저해활성은 낮았다. Cathepsin 계 단백질분해효소는 어육내에 존재하여 Surimi의 gel 연화현상(modori)에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며(An et al., 1994) 명란 단백질분해효소저해제는 온도 안정성이 약한 약점이 있으나 37°C에서의 저해활성 실험에서 난백 저해제보다 cathepsin L에 대한 저해활성이 높았으므로 surimi의 modori를 방지에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 2. Inhibitory activity of Alaska pollock egg and egg white protease inhibitor against papain and cathepsin proteases

Inhibitor	Specific inhibitory activity (U/mg) ^c	
	Papain	Cathepsin L
Alaska pollock egg	15.60 ^b	29.04 ^a
Egg white	37.71 ^b	16.05 ^b

^{a,b}Means in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

^cMean values obtained from four replications.

사 사

본 연구는 2002년도 해양수산부 수산특정과제 (과제번호 20020129) 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부임.

참 고 문 헌

Abe, K., H. Kondo, Y. Emori, K. Suzuki and S. Arai. 1987. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (Oryzacystatin), homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seed. *J. Biol. Chem.*, 262, 16793-16797.

An, H., M.Y. Peters and T.A. Seymour. 1996. Roles of endogenous enzymes in surimi gelation. *J. Food Sci.*, 7, 321-326.

An, H., V. Weerasinghe, T.A. Seymour and M.T. Morrissey. 1994. Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi proteins. *J. Food Sci.*, 59, 1013-1017, 1033.

Barrett, A.J. 1981. Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Meth. Enzymol.*, 80, 771-777.

Barrett, A.J. 1986. Cysteine protease inhibitors of the cystatin superfamily In: *Proteinase Inhibitors*. Rawlings, N.D., M.E. Davies, W. Macleidt, G. Salvesen and V. Turk, Elsevier, Amsterdam, pp. 515-569.

Borla, O.O., C.B. Martone and J.J. Sanchez. 1998. Protease I inhibitor system in fish muscle: A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119B, 101-105.

Boye, S.W. and T.C. Lanier. 1988. Effect of heat-stable alkaline protease activity of Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) on surimi gels. *J. Food Sci.*, 53, 1340-1342, 1398.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 71, 248-254.

Cha, Y.J. and E.H. Lee. 1990. Studied on the processing of rapid fermented anchovy prepared with low salt contents by adapted microorganism. 2. Thermo-dynamic characterizations of microbial extracellular protease isolated from fermented fish paste. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 33, 325-329.

Kawabata, C. and E. Ichishima. 1997. Miltpain, new cysteine proteinase from the milt of Chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117B, 445-452.

Kenney, A.J. 1999. Nomenclature and classes of peptidase. In: *Proteolytic Enzymes*. Sterchi, E.E. and W. Stocker eds. Springer Lab Manual, New York, pp. 1-8.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during

- the assembly of the head bacteriophage. *Nature*, 227, 265-275.
- Pandhare, J., K. Zog and V.V. Deshpande. 2002. Differential stabilities of alkaline protease inhibitor from actinomycetes: effect of various additives on thermostability. *Biores. Technol.*, 84, 165-169.
- Saeki, H., Z. Iseya, S. Sugiura and N. Seki. 1995. Gel forming characteristics of frozen surimi from Chum salmon in the presence inhibitors. *J. Food Sci.*, 60, 917-922.
- Synnes, M. 1998. Purification and characterization of two cysteine proteinase inhibitors from skin of Atlantic salmon (*Salmo Salar L.*). *Comp. Biochem. Physiol.*, Part B, 121, 257-264.
- Tsai, Y.J., G.D. Chang, C.J. Huang, Y.S. Chang and F.L. Huand. 1996. Purification and molecular cloning of carp ovarian cystatin. *Comp. Biochem.*, 113B, 573-580.
- Visessanguan, W., S. Benjakul and H. An. 2003. Purification and characterization of cathepsin L in arrow-tooth flounder (*Atheresthes stomias*) muscle. *Comp. Bioch. Phy- siol.*, 134, 477-487.
- Weerasinghe, V.C., M.T. Morrissey and H. An. 1996. Characterization of active components in food grade proteinase inhibitor for surimi manufacture. *J. Food Chem.*, 44, 2584-2590.
- Welling, G.W. 1989. Size exclusion HPLC of protein: a practical approach. 2nd ed. In: *HPLC of macromolecules*, Oliver R.W.A. and S.W. Wester. University Press, Oxford, England, pp. 77-89.
- Yamashita, M. and S. Konagaya. 1991. Cysteine protease inhibitor in egg of Chum salmon. *J. Biochem.*, 110, 762-766.
- Yamashita, M. and S. Konagaya. 1996. Molecular cloning and gene expression of Chum salmon cystatin. *J. Biochem.*, 120, 483-487.

2004년 10월 1일 접수
2005년 4월 9일 수리