

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/264103648>

# Purification and Characterization of Alkaline Protease from saewoo-jeot, salted and fermented shrimp (*Acetes japonicus*)

Article in *Korean Journal of Food Science and Technology* · January 1998

CITATIONS

6

READS

28

5 authors, including:



Se Wook Oh

Kookmin University

155 PUBLICATIONS 1,967 CITATIONS

SEE PROFILE

## 새우젓에서 alkaline protease의 정제 및 특성

남은정 · 오세욱\* · 조진호\* · 김영명\* · 양차범  
한양대학교 식품영양학과, \*한국식품개발연구원

### Purification and Characterization of Alkaline Protease from *saewoo-jeot*, salted and fermented shrimp (*Acetes japonicus*)

Eun-Jung Nam, Se-Wook Oh\*, Jin-Ho Jo\*, Young-Myung Kim\* and Cha-Bum Yang

Department of Food and Nutrition, Hanyang University,

\*Korea Food Research Institute

#### Abstract

This study was performed to elucidate the purification and characterization of protease from saewoo-jeot, a Korean traditional salt-fermented shrimp product. The protease in saewoo-jeot (*Acetes japonicus*) were extracted, desalted through electrodialysis and purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 gel filtration and DEAE-cellulose column chromatography. Purified enzyme had specific activity of 8.4 unit/mg, yield of 14% and purification fold of 9.8. Purified enzyme was confirmed as single band protein by polyacrylamide gel electrophoresis and the molecular weight was estimated to be about 24 kDa. The optimal pH and temperature for the enzyme activity were 8.0 and 40°C, respectively. The range of its stability to the pH and temperature were 7.0 to 10.0 and 30°C to 60°C, respectively. The activity of enzyme to synthetic substrate showed BAPNA and TAME. The enzyme was activated significantly by manganese ions, while inhibited by STI, TLCK, metals ( $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Hg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ). The  $K_m$  value of the enzyme was  $5.1 \times 10^{-7}$  M to hammersten casein. It's suggested that purified protease from saewoo-jeot seemed to be trypsin-like enzyme.

Key words: saewoo-jeot, purification, characterization, trypsin-like enzyme

## 서 론

젓갈은 어패류의 육, 내장, 생식소 등에 식염을 가하여 부패를 억제하면서 내장에 존재 하는 분해 효소, 어육에 존재하는 자가소화효소, 숙성 중 관여하고 있는 미생물이 생산 하는 효소등에 의해 원료를 적당히 분해하여 숙성시킨 우리나라 전통 발효식품이다.

우리나라 젓갈류 중 식용되는 젓갈의 종류는 149종<sup>(1)</sup>으로 그 중에서 새우젓은 담그는 시기에 따라 동백하젓, 춘젓, 오젓, 육젓으로 불리우고 오젓 및 육젓의 원료인 젓새우는 어체가 작고 연약하여 쉽게 부패하고 내장에 강력한 소화효소가 들어있다. 새우젓의 염장과정은 주로 어획선상에서 이루어지고 있으며 30~40%의 소금

을 가해 15°C 내외에서 4~5개월 숙성 발효시킨다<sup>(2)</sup>.

숙성된 새우젓은 김치조미소재, 나물, 국물, 찜류(달걀찜) 등 반찬류의 조미용으로 사용 되며 특히 삶은 돼지고기 섭취시 거의 필수적으로 먹어왔던 식품으로 이는 새우젓내의 단백질 분해 효소가 존재하여 소화 에 도움을 주기 때문이라 생각되며 이에 착안하여 본 연구에서는 전통식품의 우수성을 알리고자 우리나라 대표적 전통 발효식품인 새우젓에 존재하는 단백질 분해 효소를 정제하고 그 효소의 생화학적 특성을 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 재료

전라남도 신안군 일대의 선상에서 제조된 새우젓을 구입하여 15°C 항온조에서 보관하면서 숙성적거에 도

Corresponding author: Eun-Jung Nam, Korea Food Research Institute, San 46-1 Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Kyunggi-do 463-420, Korea

달한 새우젓을 실험에 공시하였다.

#### 염도 분석

새우젓의 염도는 Mohr법<sup>(3)</sup>으로 분석하였다.

#### 아미노태 질소 분석

새우젓의 아미노태 질소는 Formol 적정법<sup>(4)</sup>에 의하여 측정하였다.

#### 암모니아태 질소 분석

새우젓의 암모니아태 질소는 Semi-micro kjeldahl법<sup>(4)</sup>으로 정량하였다.

#### 효소의 정제

새우젓을 먼저 homogenizer에 넣고 균질화시켜 6,000 × g에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 전기투석기 (Selenium electrodialyzer, TYPE DS-0, Asahi Glass Company)를 이용해 탈염 과정을 거쳐 NaCl 농도가 2% 이하가 되도록 한 후 80% 포화농도의 ammonium sulfate 용액을 가해 단백질을 침전시켰다. 이 침전물을 투석한 후 Sephadex G-100 column (2.5 × 100 cm) 상에 loading한 후 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0)로 fraction volume 5 mL, elution 속도는 8 mL/hr로 유출

시켰다. Fraction 중 단백질 분해 활성부분을 DEAE-cellulose column (2.5 × 30 cm)상에 주입하여 상기 사용한 buffer로 용출시켜 분획하였으며 전체 정제 과정은 Fig. 1과 같다.

#### 단백질 정량

Column 용출액의 단백질은 280 nm에서 자외선 흡광도법으로 측정하였으며, 그외에는 Biuret법<sup>(5)</sup>에 의하여 Bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 단백질 함량을 측정하였다.

#### 효소 활성 측정

새우젓으로부터 분리한 protease의 활성은 Anson의 방법<sup>(6)</sup>과 萩原의 방법<sup>(7)</sup>을 변형 하여 측정하였다. 즉, 효소반응액은 0.1 M phosphate buffer 1 mL, 1.5% hamster casein 1 mL, 효소액 1 mL를 넣고 37°C에서 30분간 shaking water bath에서 반응시키고 5% TCA 2.5 mL을 넣어 효소반응을 정지시켰다. 효소활성의 측정은 12,000 × g에서 10분간 원심분리한 후 상층액 1 mL에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 mL, 증류수로 3배 희석한 Folin-ciocalteu 시약 0.5 mL을 섞어 37°C에서 30분 방치한 후 660 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 반응액 및 대조구의 흡광도 차이를 표준 곡선에서 tyrosine 함량(μg/mL.min)으로 환산하여 표시하였다. 활성단위는 효소액 1 mL이 1분간 1 μg에 상당하는 tyrosine을 생성하는 양을 1 unit로 정의하였다.

#### 분자량 측정 및 순도 검증

정제 효소의 분자량은 Laemmli 방법<sup>(8)</sup>에 따라 SDS-PAGE로 측정하였으며 전기영동 시킨 후 Rm (relative mobility) 값에 따라 표준곡선을 작성하고 정제된 효소의 Rm값을 대응시켜 산정하였다. 이때 표준품으로는 bovine serum albumin (MW: 66,000), egg albumin (MW: 45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MW: 36,000), carbonic anhydrase (MW: 29,000), trypsinogen (MW: 24,000), soybean trypsin inhibitor (MW: 20,100), α-lactalbumine (MW: 14,200) 등을 사용하였다.

#### pH의 영향 및 안정성

pH 2.5~11의 범위가 되도록 만든 pH 완충용액(pH 2.5~5.5: 0.1 M citrate buffer, pH 6.0~8.0: 0.1 M phosphate buffer, pH 8.5~9.0: 0.1 M tris-HCl buffer, pH 10.0~11.0: 0.1 M sodium carbonate buffer)에 효소액 1 mL, 기질 용액 1 mL씩 가하여 효소활성을 측정 비교하였다. pH 안정성은 각종 pH 완충용액으로 pH를 조절한

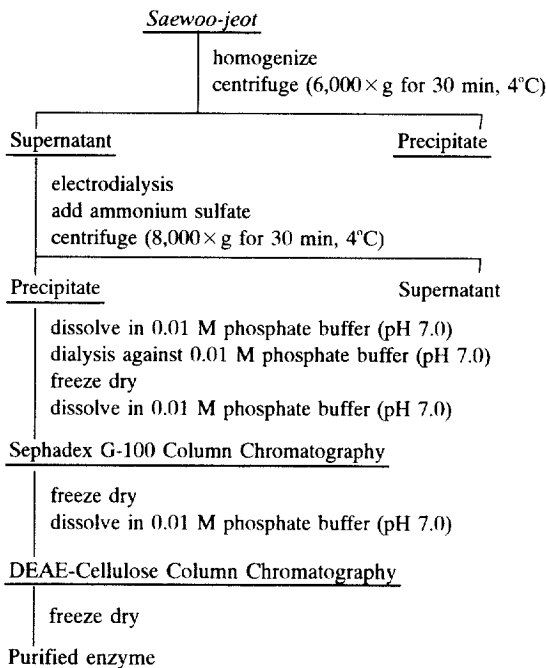


Fig. 1. Procedures of purification of protease from saewoo-jeot.

효소액을 4°C에서 24시간 방치한 후 37°C에서 효소활성을 측정하여 잔존 효소활성을 비교하였다.

#### 온도의 영향 및 안정성

작용 최적 온도는 0.1 M phosphate buffer 1 mL, 효소액 1 mL, 기질 1 mL을 10~50°C에서 30분간 반응시켜 효소활성을 측정하였고 온도 안정성은 여러 온도에서 방치된 효소액의 시간별 단백질 분해 활성을 측정하여 잔존 효소 활성을 비교하였다.

#### 기질특이성

합성기질에 대한 반응성을 보기위해 사용된 기질은 trypsin의 기질인 N-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA), p-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME), chymotrypsin의 기질인 N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE), carboxypeptidase의 기질인 hippuryl-L-phenyl alanine (HPA)을 사용하였으며 BAPNA는 Erlanger 등<sup>(9)</sup>의 방법, TAME는 Walsh<sup>(10)</sup>의 방법, ATEE와 HPA는 Bergmeyer 등<sup>(11)</sup>의 방법에 의해 기질특이성을 측정하였다.

#### Km 값

기질의 농도에 따르는 효소의 반응 속도를 측정하기 위하여 여러가지 농도(10~100 µg/mL)로 조정된 hammersten casein 용액에 정제 효소를 반응시켜 반응 속도를 측정한 후 1/S에 대한 1/V의 Lineweaver-Burk<sup>(13)</sup>법으로 plot하여 얻은 직선으로부터 Km 값을 구하였다.

#### 금속이온의 영향

금속 이온중의 LiCl, KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>을 1 mM이 되도록 첨가한 효소액 1 mL를 37°C에서 60분간 반응시킨 후에 기질로 1.5% hammersten casein 1 mL를 가하여 casein 분해력을 측정, 비교하였다.

#### 저해제의 영향

저해제의 영향은 각 저해제를 농도별로 하여 효소액과 미리 반응을 시킨 후에 기질과 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 사용된 저해제로는 metallopeptidases의 저해제인 ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), thiol-protease의 저해제인 iodo acetic acid (IAA), serine protease (trypsin-like enzyme)의 저해제인 soybean trypsin inhibitor (STI)과 histidine 잔기와 반응하는 Nα-tosyl-L-lysyl chloromethyl ketone (TLCK), chymotrypsin의 저해제인 N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK)을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

#### 효소의 정제

새우젓의 염을 제거하여 정제 실험에 공시하기위해 본 실험에서 전기투석법을 사용하였으며 전기투석 과정에서 이화학적 성분을 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 염농도가 2% 이하가 되기까지 7시간이 소요되었고 새우젓의 총질소(TN), 아미노태 질소(NH<sub>2</sub>-N), 암모니아태 질소(NH<sub>3</sub>-N) 함량 및 protease activity는 탈염시간이 증가됨에 따라 증가하였으며 NH<sub>3</sub>-N의 함량은 감소하는 경향을 나타내었다.

이와 같은 방법으로 탈염하여 얻은 조추출물을 ammonium sulfate 분획한 결과는 Table 1과 같이 수율이

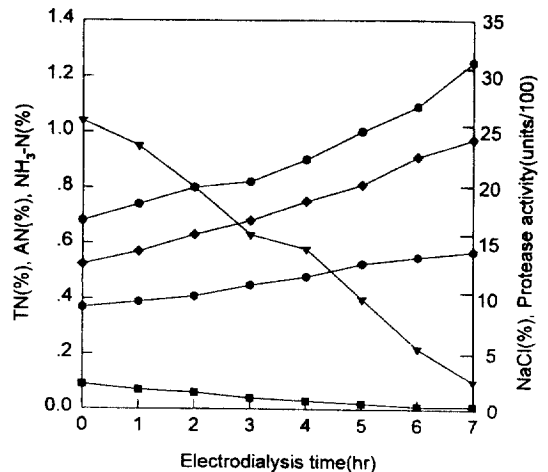


Fig. 2. Changes in chemical index during electrodesialysis. *Saewoo-jeot* was homogenized and centrifuged at 6,000× g. The supernatant was used as a desalting sample. Electrodesialysis was conducted at flow rate 150 mL/hr under 7A condition. ◆—◆: total nitrogen, ■—■: amino-nitrogen, ▲—▲: ammonia-nitrogen, ▼—▼: NaCl, ●—●: protease activity.

Table 1. Summary of purification steps of protease from *saewoo-jeot*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity <sup>1)</sup> (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	3540	3033	0.86	100	1
Ammonium sulfate	756	2177	2.88	71	3.3
Sephadex G-100	285	1478	5.19	48	6.0
DEAE-Cellulose	50	421	8.42	14	9.8

<sup>1)</sup>1.5% hammerstein casein was used substrate.

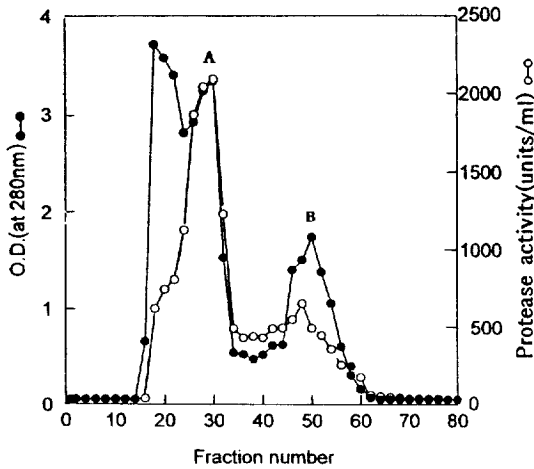


Fig. 3. Gel filtration chromatogram of protease from saewoo-jeot by Sephadex G-100. The column (2.5×100 cm) was equilibrated with 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) and eluted with the same buffer. The flow rate was 8 mL/hr and 5 mL fractions were gathered.

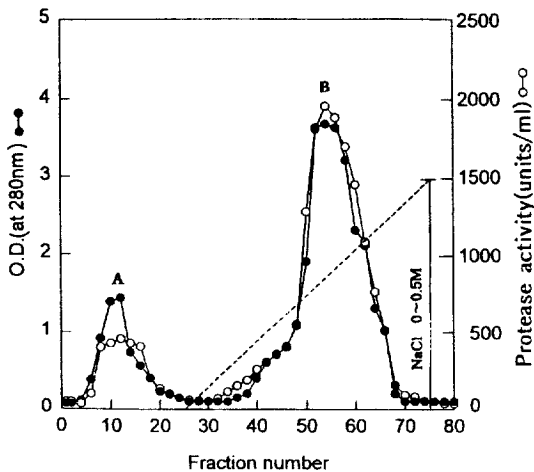


Fig. 4. Chromatogram of protease from saewoo-jeot by DEAE-cellulose. The column (2.5×30 cm) was equilibrated with the same buffer. The flow rate was 20 mL/hr and 7 mL fractions were gathered.

71%, 비활성역가는 3 unit/mg으로 약 3.3배 정제되었다. 여기서 얻은 활성획분을 투석, 동결건조하여 Sephadex-G 100 column chromatography한 결과는 Fig. 3에서와 같이 peak가 2개 나타났으며 이 peak중 효소 활성이 현저히 강한 A peak를 취하여 동결건조 하였다. 이 활성획분을 수율이 48%, 비활성역가가 5.19 unit/mg으로 조효소액 보다 약 6배 증가하였다(Table 1). 이 활성획분을 보다 더 정제하기위해 DEAE-cellulose column chromatography에 공시한 결과는 Fig.

4와 같이 peak가 2개 나타났으며 이 peak중 효소 활성이 강한 B peak를 취하여 동결건조하여 정제 효소로 하였다. 여기서 얻어진 정제 효소는 수율이 14%, 비활성역가는 8.42 unit/mg으로 증가하였으며 조추출물에 비하여 정제 배수는 9.8배 증가하였다(Table 1).

Hjelmeland 등<sup>(13)</sup>은 capelin으로 부터 trypsin 정제 과정에서 ammonium sulfate fractionation, Sepharose 4B, Sephadex G-100 column, DEAE-Sephadex A 25 column chromatography로 분리, 정제하였을때 비활성역가는 87.1배로, 수율은 6.9% 라고 보고하였으며 멸치 젓<sup>(14)</sup>으로부터 protease 정제시 ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose column, Sephadex G-100 column chromatography하여 분리, 정제하였을때 비활성역가는 10.55배, 수율은 1.1%로 보고하였다.

#### 정제효소의 전기영동

새우젓에서 추출한 protease의 순도 및 분자량을 알기위해 정제된 효소를 SDS-PAGE한 결과 Fig. 5-A와 같이 단일 band로 나타나 이 정제효소는 단일단백질로 구성되어있음을 확인하였으며 여기서 얻은 Rm값에 따라 분자량을 측정한 결과는 Fig. 6과 같이 trypsinogen과 거의 같은 위치에 있어 24 kDa에 해당되는 분자량을 가지는 효소로 추정되었다. 또한 이 정제효소를 polyacrylamide gel electrophoresis한 후 전기영동 band 상의 효소활성 위치를 알기위해 실시한 active staining 결과는 Fig. 5-B와 같으며 여기서 단일 단백질과 같은 부위에 활성이 나타났으므로 정제효소는 단백질 분해 효소임을 확인하였다.

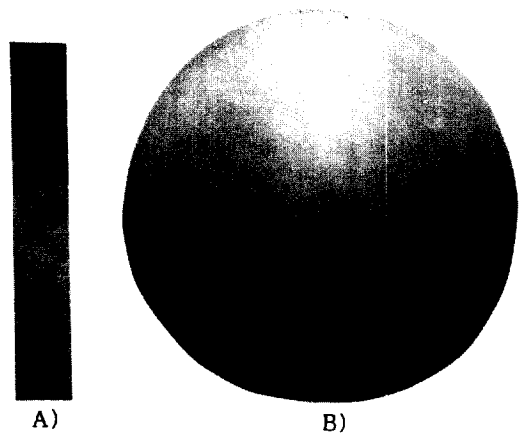


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of protease from saewoo-jeot. A) 10% SDS-PAGE pattern of purified protease stained with coomassie brilliant blue R-250. B) activity staining pattern in skim milk plate.

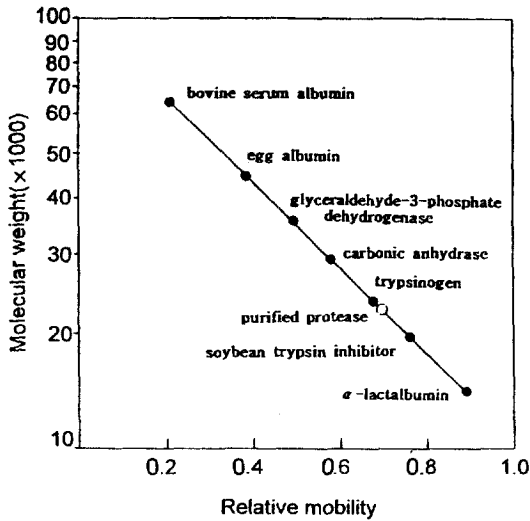


Fig. 6. The calibration curve for the determination of molecular weight of protease from *saewoo-jeot* by SDS-PAGE.

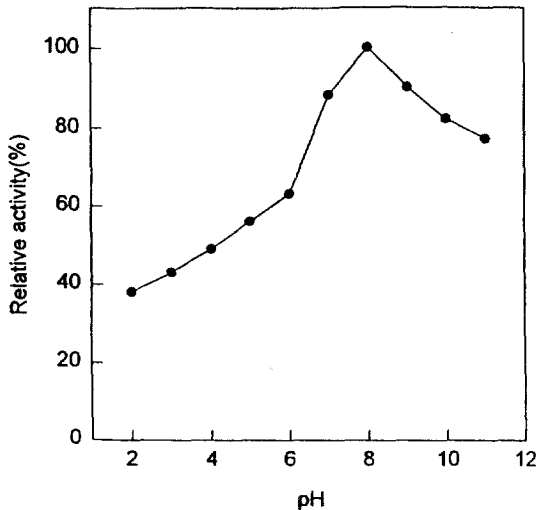


Fig. 7. Effect of pH on the activity of protease from *saewoo-jeot*. The enzyme activity was measured at various pH adjusted buffers.

#### 최적 pH 및 pH 안정성

정제효소의 최적 pH와 pH에 대한 안정성을 측정한 결과를 Fig. 7 및 8에 나타내었다. pH 8.0에서 활성이 가장 높게 나타났으며 pH 7.0~10.0에서 안정하였다. 이는 정제효소가 알칼리 범위에서 안정하며 최적 활성을 나타내어 alkaline protease임을 알 수 있었다.

보고에 의하면 shrimp muscle protease<sup>(15)</sup>, milkfish protease<sup>(16,17)</sup>, oyster protease<sup>(18)</sup>, poikilotherm로부터 분

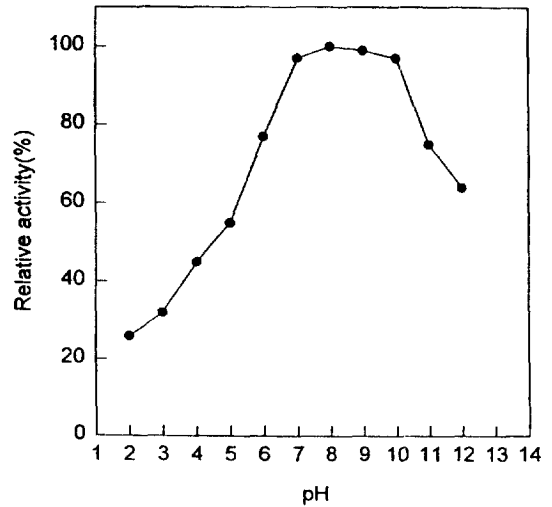


Fig. 8. Effect of pH on the stability of protease from *saewoo-jeot*. The enzyme was incubated at 4°C for 24 hr on each pH and the remaining activity was measured at pH 8.0.

리한 3종의 trypsin<sup>(19)</sup>은 최적 pH가 8.0이었으며 grass shrimp의 digestive tract로부터 분리한 3종의 protease<sup>(20)</sup>의 경우 2종은 pH 8.0에서, 나머지 1종은 pH 7.0에서 최적 활성을 나타내었고 capelin에서 분리한 2종의 trypsin type의 효소<sup>(13)</sup>는 pH 8~9, shrimp hepatopancreas에서 분리한 2종의 trypsin-like enzyme<sup>(21)</sup>은 pH 6.5~11로 광범위한 범위를 나타내었고 cod의 pyloric caeca protease<sup>(22)</sup>는 pH 9.0~9.6의 범위, mackerel의 pyloric caeca protease<sup>(24)</sup>는 pH 9.4에서 최적 활성을 나타내어 어체로부터 유래된 trypsin-like enzyme은 최적 pH가 알칼리성이었음을 알 수 있었고 본 실험 결과도 이와 유사하였다.

또한 pH에 대한 효소의 안정성에 관한 보고도 shrimp hepatopancreas의 2종의 protease<sup>(21)</sup>는 pH 안정성이 pH 6~12, cod의 pyloric caeca protease<sup>(23)</sup>는 pH 8.8~9.6에서 안정하다고 하였으며 poikilotherm<sup>(19)</sup>과 capelin<sup>(13)</sup>에서 분리한 효소의 경우 낮은 pH에서 불안정하다고 하며 본 실험 결과와 유사한 경향이였다.

#### 최적 온도 및 온도 안정성

정제효소의 최적 온도 및 안정성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과를 Fig. 9 및 10에 나타내었다. 본 실험에서 정제한 효소의 최적 온도는 40°C이었으며 온도 안정성은 30~50°C의 범위에서 1시간 경과시에도 90% 이상의 잔존 활성을 나타내어 상당히 안정한 것으로 사료되었다.

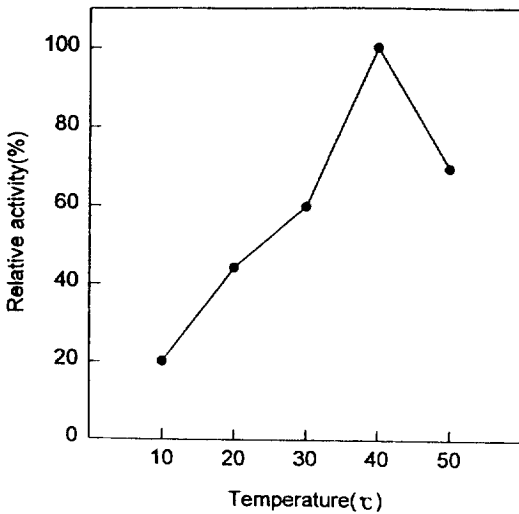


Fig. 9. Effect of temperature on the activity of protease from *saewoo-jeot*. The enzyme activity was measured at various temperatures.

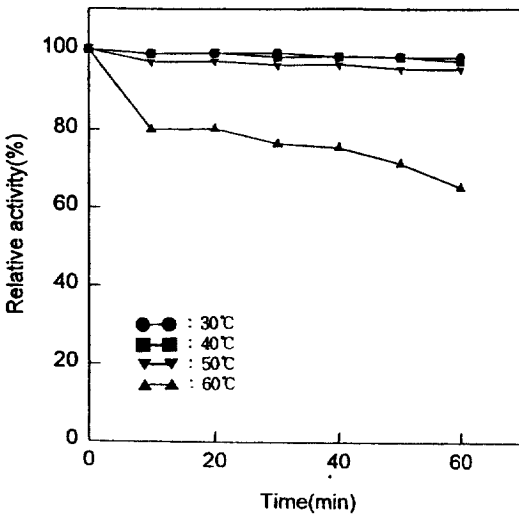


Fig. 10. Effect of temperature on the stability of protease from *saewoo-jeot*. The enzyme was incubated at various temperature and the remaining activity was measured at 40°C.

효소활성 최적 온도와 온도에 대한 안정성에 대한 보고에 의하면 capelin의 trypsin-like enzyme<sup>(13)</sup>은 42°C, shrimp hepatopancreas trypsin-like enzyme<sup>(21)</sup>은 45°C, mackerel pyloric caeca protease<sup>(23)</sup>는 45~50°C, cod pyloric caeca protease<sup>(22)</sup>는 46~48°C, shrimp muscle에서 분리한 protease<sup>(15)</sup>는 60°C, grass shrimp의 digestive tract로부터 분리한 4종의 protease<sup>(20)</sup>중 3종은 65°C, 나머지 1종은 55°C가 최적 온도이었다고 하였다. 이들의

결과에서 볼 때 어체로부터 유래된 protease는 대체로 중온성임을 알 수 있었고 본 실험에서 정제된 효소도 중온성의 protease로서 비슷한 결과를 나타내었다.

#### 기질특이성

여러가지 합성기질에 대한 본 정제효소의 활성을 측정한 결과는 Table 2와 같이 Trypsin의 합성기질인 BAPNA와 TAME에 대한 specific activity는 각각 7.28 units/mg, 8.52 units/mg으로 나타나 강한 활성을 나타내었지만 chymotrypsin의 합성기질인 ATEE, carboxypeptidase의 합성기질인 HPA에는 활성이 전혀 나타나지 않았다. 합성기질에 대한 반응성에 대한 보고로는 grass shrimp의 digestive tract에서 분리된 4종의 protease<sup>(20)</sup>중 3종과 milk fish muscle protease<sup>(17)</sup>중 1종은 각각 TAME에 활성을 나타내어 trypsin-like enzyme으로 보고했고 혈합육어 중 멸치, 고등어, 황다랭이, 날개다랭이의 trypsin<sup>(25)</sup>도 BAPNA, TAME에 현저한 활성을 보였다.

Table 2. Substrate specificity of protease from *saewoo-jeot*

Substrate <sup>1)</sup>	Specific activity (units/mg)
BAPNA	7.28
TAME	8.52
ATEE	0
HPA	0

<sup>1)</sup>BAPNA: N $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide, TAME: p-tosyl-L-arginine methyl ester, ATEE: N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester, HPA: hippuryl-L-phenylalanine.

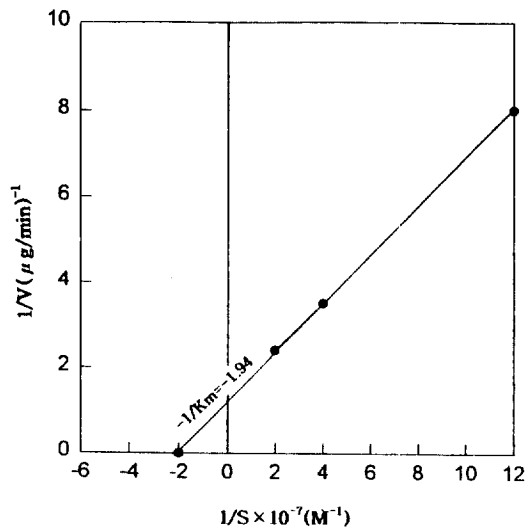


Fig. 11. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of hammersten casein by purified protease from *saewoo-jeot*.

### Km 값

본 효소의 기질에 대한 친화력을 살펴보기 위해 Lineweaver-Burk plot<sup>(12)</sup>로 Km값을 측정한 결과는 Fig. 13과 같이 정제효소의 Km값은  $5.1 \times 10^{-7}$  M로 새우젓 protease<sup>(24)</sup>의 Km값  $1.6 \times 10^{-6}$  M, 멸치젓갈 protease<sup>(14)</sup>의 Km값  $2.67 \times 10^{-4}$  M보다 더 낮게 나타나 본 실험의 정제효소는 정제도가 높거나 또는 기질과의 친화력이 높은 효소로 사료되었다.

### 금속 이온의 영향

금속 이온의 첨가가 단백질 분해 효소활성에 미치는 영향은 Table 3과 같이 Mn<sup>2+</sup>는 60% 정도 효소 활성을 증가시켰으나 Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 등은 효소 활성을 저해하였다.

본 실험에서는 Mn<sup>2+</sup>에 의해 효소 활성이 현저히 증가하는 특성을 보였는데 이는 Mn<sup>2+</sup>에 강한 저해를 나타낸다고 보고한 Doke 등<sup>(15)</sup>의 shrimp muscle protease, Jiang 등<sup>(17)</sup>의 milk fish muscle trypsin-like protease, Honjo 등<sup>(1)</sup>의 shrimp hepatopancreas에서 분리된 2종의 trypsin-like enzyme과는 상반된 결과를 나타내었으며 조 등<sup>(25)</sup>의 Mn<sup>2+</sup>에 의해 활성이 증가한 고등어와 황다랭이 trypsin과는 일치된 결과를 보였다.

### 저해제의 영향

정제효소에 대한 저해제의 영향을 측정한 결과는 Table 4와 같이 정제된 효소는 IAA (inhibitor of thiol-protease), TPCK (inhibitor of chymotrypsin)에 의해서는 영향을 받지 않았고 STI와 TLCK (inhibitor of serine protease, trypsin-like enzyme)에 의해 각각 88%, 75%로 저해되어 현저하게 불활성화 되었으며 EDTA

**Table 3. Effect of metal ions on the activity of purified protease from saewoo-jeot**

Metal ion (1 mM)	Relative activity (%)
Control	100
Li <sup>+</sup>	52
K <sup>+</sup>	47
Na <sup>+</sup>	64
Ca <sup>2+</sup>	51
Co <sup>2+</sup>	51
Cu <sup>2+</sup>	65
Mn <sup>2+</sup>	160
Mg <sup>2+</sup>	48
Ba <sup>2+</sup>	49
Hg <sup>2+</sup>	45
Zn <sup>2+</sup>	48
Fe <sup>3+</sup>	78

Metal ions was preincubated at 37°C for 60 min and the enzyme activity was determined.

**Table 4. Effect of some inhibitors on the activity of purified protease from saewoo-jeot**

Some inhibitor <sup>1)</sup> (1 mM)	Relative activity (%)
Control	100
TPCK	100
TLCK	25
IAA	81
STI	12
EDTA	39

Inhibitor was preincubated at 37°C for 60 min and the enzyme activity was determined.

<sup>1)</sup>TPCK: N<sub>α</sub>-tosyl-L-phenylalanyl-chloromethyl ketone, TLCK: N<sub>α</sub>-tosyl-L-lysyl chloromethyl ketone, IAA: Iodoacetic acid, STI: soybean trypsin inhibitor, EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid.

(inhibitor of metalloproteinase)에 의해 61%로 저해되었다. 따라서 본 정제 효소는 trypsin과 비슷한 binding site를 갖는 serine계의 trypsin-like enzyme으로 사료되었다.

## 요 약

새우젓에서 protease를 추출, 정제하여 이의 효소학적 특성을 조사하였다. 새우젓 protease를 추출, 전기투석으로 탈염, ammonium sulfate로 단백질을 분획시킨 후 Sephadex G-100 column chromatography와 DEAE-cellulose column chromatography를 행하여 정제하였으며 정제 효소는 전기영동상 단일 band로 나타났으며 분자량은 24 kDa, 수율은 14%, 비활성역가는 8.4 unit/mg, 정제배수는 9.8이었다. 정제효소의 최적 pH는 8.0 이었고 pH 7.0~10.0의 범위에서 안정하였다. 단백질 분해 효소 활성의 최적 온도는 40°C이었고 30~60°C의 온도 범위에서 안정성을 나타내었다. 기질에 대한 특이성으로 합성기질인 BAPNA, TAME에는 활성을 보였으며 hammersten casein을 기질로 사용하였을때의 Km값은  $5.1 \times 10^{-7}$  M이었다. 금속 이온의 영향으로는 Mn<sup>2+</sup>만이 활성이 증가되었고 다른 금속 이온들에 의해서는 저해되었다. 저해제의 효과에서는 STI와 TLCK에 의해 현저하게 저해되었다. 이상의 성질에서 새우젓에서 분리된 protease는 serine계의 trypsin-like enzyme으로 추정되었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산 특정연구 사업(젓갈의 저염화 및 위생포장 기술 개발) 지원으로 수행된 연구결과일부로서 이에 감사드립니다.



## 문헌

1. Korean Society of Food Science and Technology: Cumulative Review of the Literatures on Korean Foods(5). Hanrimwon Press, Seoul, p.188 (1992)
2. Kim, Y.M. and Kim D.S.: Fermented seafoods of Korea (in Korean). Changjo press, Seoul, p9 (1990)
3. 日本藥學會編: 衛生試驗法註解, 金原出版株式會社, 東京, 62 (1980)
4. 日本藥學會編: 衛生試驗法註解, 金原出版株式會社, 東京, 164 (1980)
5. Gornall, A.G., Bradawill, C.J. and David, M.M.: Determination of serum proteins by means of the buret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949)
6. Anson, M.L.: The estimation of pepsin, papain, cathepsin with hemoglobin. *J. Physio.*, **22**, 79 (1939)
7. 萩原四郎: 酵素研究法. Vol. II. 朝倉書店. 日本. p237 (1956)
8. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970)
9. Erlanger, F.B., Kokowsky, N. and Cohen, W.: The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archs Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961)
10. Walsh, K.A.: Trypsinogens and trypsins of various species. *Methods Enzymol.*, **19**, 41 (1970)
11. Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. and Grassl, M.: Enzymes as biochemical reagents. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed. Bergmeyer, H.U., Ed., Academic Press, New York, p436 (1974)
12. Lineweaver, H. and D. Burk.: Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934)
13. Hjelmeland, K. and Raa, J.: Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **71B**(4), 557 (1982)
14. Kim, Y.M.: Influence of fermentation conditions on the quality properties and protease activity of anchovy sauce. *Ph. D. Thesis*. Korea Univ., Seoul, Korea (1993)
15. Doke, S.N. and Ninjoor, V.: Characteristics of an alkaline proteinase and exopeptidase from shrimp (*Penaeus indicus*) muscle. *J. Food Sci.*, **52**(5), 1203 (1987)
16. Chen, C.S., Tsao, C.Y. and Jiang, S.T.: Purification and characterization of proteases from the viscera of milkfish (*Chanos chanos*). *J. Food Biochem.*, **12**, 269 (1989)
17. Jiang, S.T., Tsao, C.Y., Wang, Y.T. and Chen, C.S.: Purification and characterization of proteases from milkfish muscle (*Chanos chanos*). *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1458 (1990)
18. Tsao, C. Y., and Nagayama, F.: Purification and characterization of proteases from oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Food Biochem.*, **15**, 81 (1991)
19. Asgeirsson, B., Fox, J.W. and Bjarnason, J.B.: Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *Eur. J. Biochem.*, **180**, 85 (1989)
20. Jiang, S.T., Moody, M.W. and Chen, H.C.: Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Sci.*, **56**(2), 322 (1991)
21. Honjo, I., Kimura, S. and Nonaka, M.: Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**(10), 1627 (1990)
22. Shin, D.H. and Zall, R.R.: Purification and identification of a trypsin-like enzyme from the pyloric caeca of cod. *Process Biochemistry*, Feb. 11 (1986)
23. Pyeun, J.H. and Kim, H.R.: The Proteinase distributed in the intestinal organs of fish. 1. Purification of the three alkaline proteinases from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber japonicus* (in Korean). *Bull. Korean Fish. Soc.*, **19**(6), 537 (1986)
24. Park, G.H. and Ju, J.S.: Proteolytic digestion of boiled pork by soured shrimp (in Korean). *Korean J. Nutr.*, **19**(6), 363 (1986)
25. Cho, D.M., Heu, M.S. and Pyeun, J.H.: Trypsins from the dark fleshed fish (anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore). 2. Enzymatic properties and thermal stabilities (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**(4), 458 (1993)

(1997년 8월 26일 접수)