

두가지 단백질분해효소복합처리에 의한 저분자펩티드의 생성조건

박영국, 리승룡

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 지적하시였다.

《과학연구기관들과 과학자, 기술자들은 우리 나라의 실정에 맞고 나라의 경제발전에 이바지할수 있는 과학기술적문제를 더 많이 풀어야 하겠습니다.》(《김정일선집》 제13권 증보판 173페이지)

현재 체육선수들의 근육증강 및 피로회복제로 리용되고있는 저분자펩티드[2]의 제조에서 미생물기원의 한가지 단백질분해효소를 리용하고있는것으로 하여 기질단백질에 대한 저분자펩티드의 생성률이 낮은것이 문제로 되고있다.

우리는 단백질분해특성과 기원이 서로 다른 두가지 단백질분해효소를 동시에 처리하여 콩단백질의 분해과정에서 저분자펩티드의 생성률을 높이기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료 단백질분해효소로는 알카리성프로테아제(*Bacillus licheniformis*기원)와 중성프로테아제(*Aspergillus oryzae*기원)를, 기질로는 식품용콩단백질가루(단백질함량 80%, 립도 50 μm)를 리용하였다.

단백질분해효소활성측정 단백질분해효소활성은 선행방법[1]에 따라 측정하였다.

저분자펩티드의 분리와 함량측정 저분자펩티드는 겔러과크로마토법으로 다음과 같이 분리하였다.

먼저 각이한 분자량을 가지는 표준물질들(비타민 B₁₂: 분자량 1 355, N-카르벤족시- α -L-글루타밀-L-티로진: 분자량 444, 글루타티온: 분자량 307, L-트립토판: 분자량 204)을 세파덱스 G-25겔러과크로마토그래프로 분리하여 분자량에 따르는 분배계수를 계산한 다음 표준곡선을 작성하였다.

분배계수는 아래의 식으로 계산하였다.

$$K_{av} = \frac{V_r - V_0}{V_t - V_0}$$

여기서 K_{av} 는 분배계수, V_t 는 탑의 총체적(mL), V_r 는 시료의 용출체적(mL), V_0 은 탑의 빈용적(mL)이다.

다음 펩티드시료(콩단백질을 효소로 물작용분해하고 려과한 상등액을 10배 농축한것)를 우와 같은 조건에서 겔러과한 후 단백질흡수봉우리가 나타난 분획들의 분배계수를 계산하여 표준곡선으로부터 아미노산의 평균분자량을 120으로 보고 분자량이 240~480인

분획을 저분자펩티드분획으로 선택하였다.

다음 선택한 분획에 대하여 트리펩티드인 글루타리온의 농도에 따르는 A_{220nm} 의 표준곡선에 근거하여 시료분획속의 펩티드함량을 구하였다.

결과 및 고찰

단백질분해와 저분자펩티드생성에 미치는 기질농도의 영향 먼저 우리는 예비실험에 근거하여 단백질분해총활성이 기질 1g당 800U되게 알카리성프로테아제(AP)와 중성프로테아제(NP)를 1 : 1로 첨가한 조건에서 저분자펩티드생성에 미치는 기질농도의 영향을 보았다.(표 1)

표 1. 콩단백질가루농도가 저분자펩티드생성률에 미치는 영향

기질 농도/%	5	6	7	8	9	10
저분자펩티드 생성률/%	24.4±1.4	29.2*±1.3	33.3±1.8	38.7±1.1	39.7±1.5	40.4±1.6

AP와 NP를 활성비로 1 : 1로 첨가, 분해시간 4h, 50°C, pH 7, * $p<0.05$ (7%인 경우와 비교)

표 1에서 보는바와 같이 효소량이 일정한 조건에서 기질농도가 증가함에 따라 저분자펩티드생성률이 점차 높아지나 8%이상에서는 변화가 없었다.

두가지 단백질분해효소첨가비의 영향 다음으로 기질농도를 8%로 고정하고 두가지 효소를 각이한 비율로 첨가할 때 저분자펩티드생성률을 검토하였다.(표 2)

표 2. 두가지 효소의 각이한 첨가비에 따르는 저분자펩티드생성률

기질 1g당 AP와 NP활성비(U : U)	200 : 600	300 : 500	400 : 400	500 : 300	600 : 200	700 : 100
저분자펩티드 생성률/%	31.6±1.3	36.2±0.9	41.5±1.4	44.4±1.5	48.9±2.4	50.3±1.7

분해시간 4h, 50°C, pH 7

표 2에서 보는바와 같이 기질농도와 총효소활성이 일정한 조건에서 저분자펩티드생성률은 NP에 대한 AP의 활성비가 증가함에 따라 현저하게 높아지다가 AP와 NP의 활성비가 3 : 1일 때 제일 높았으나 반대로 NP의 활성이 더 높아지면 저분자펩티드생성률은 감소하였다. 이것은 NP에 비하여 AP활성이 일정한 범위내에서 증가하면 기질이 더 많이 분해되어 결국은 저분자펩티드생성률이 더 높아진다는것을 보여준다.

분해시간의 영향 다음으로 콩단백질가루분해시간에 따르는 저분자펩티드생성률을 검토한 결과는 표 3과 같다.

표 3. 분해시간에 따르는 저분자펩티드생성률

분해시간/h	2	3	4	5	6	7	8
저분자펩티드 생성률/%	31.1±1.4	40.2±2.3	48.8±1.6	53.6±1.1	54.3±2.1	55.8±1.3	55.1±1.4

AP와 NP의 활성비 3 : 1, 50°C, pH 7

표 3에서 보는바와 같이 효소처리시간에 따라 저분자펩티드생성률이 증가하다가 5h이상에서는 저분자펩티드생성률에서 변화가 없었다.

pH의 영향 최적작용pH가 서로 다른 효소를 리용하는 조건에서 저분자펩티드함량이 높은 펩티드제조를 위하여 반응액의 pH에 따르는 저분자펩티드생성률을 검토한 결과는 표 4와 같다.

표 4. 저분자펩티드생성률에 미치는 pH의 영향

반응pH	5	6	7	8	9	10
저분자펩티드 생성률/%	42.3±1.3	48.2±1.6	52.3*±1.2	56.1±1.1	57.2±1.3	53.6±1.7

AP와 NP의 활성비 3 : 1, 분해시간 5h, 50°C, * $p < 0.05$ (pH 8인 경우와 비교)

표 4에서 보는바와 같이 pH가 높아지면서 펩티드생성률이 높아지다가 pH가 8이상에서는 저분자펩티드생성률에서 변화가 없었다. 저분자펩티드생성률은 pH가 8~9구간에서 상대적으로 높았다. 약알카리성구간에서 저분자펩티드생성률이 약산성구간에서 보다 높은것은 AP의 최적작용pH가 알카리성인것과 관련된다고 볼수 있다.

반응온도 두 효소의 단백질분해작용의 최적온도가 50°C로 이미 알려졌있으므로 더 검토하지 않았다.

단독 및 두가지 효소처리에 의한 단백질분해률과 저분자펩티드생성률의 비교 효소를 각각 단독으로 또는 두가지를 혼합하여 처리하였을 때 저분자펩티드생성률을 비교한 결과는 표 5와 같다.

표 5. 단독 및 두가지 효소처리에 의한 저분자펩티드생성률비교

지표	AP	NP	AP+NP
저분자펩티드생성률/%	37.6±2.2	26.1±1.3	56.9±1.7

효소활성은 기질 1g당 800U, 기질농도 8%, 분해시간 5h, 50°C, 효소작용pH는 AP와 NP일 때 각각 10, 7

표 5에서 보는바와 같이 기질 1g당 효소활성을 고정하고 두 효소를 각각 단독으로 첨가하여 기질을 분해하였을 때 저분자펩티드생성률을 보면 AP가 NP보다 더 높았으며 두가지 효소를 함께 처리할 때에는 단독처리할 때와 동일한 활성이지만 AP로 단독처리할 때보다 1.5배 더 높았다.

위의 결과는 콩단백질분해에 의한 펩티드제조에서 기질 1g당 동일한 활성조건에서 두가지 단백질분해효소를 리용하는것이 한가지 효소를 리용할 때보다 저분자펩티드생성률을 현저하게 높일수 있다는것을 보여준다.

맺 는 말

1) 콩단백질에 알카리성프로테아제와 중성프로테아제를 동시에 처리할 때 단백질분해활성이 동일한 활성조건에서 저분자펩티드생성률은 효소를 단독으로 처리할 때보다 1.5배 더 높아진다.

2) 두가지 효소를 리용한 저분자펩티드생성을 위한 콩단백질의 분해조건은 기질농도 8%, 기질 1g당 총효소활성 800U(AP : NP=3 : 1), 분해시간 5h, 작용pH 8이다.

참 고 문 헌

- [1] 除家立; 酶生物技术手册, 科学出版社, 78~117, 1989.
[2] 編集部; 食品と開発, 2, 16, 2007.

주체103(2014)년 5월 5일 원고접수

Research on the Production Condition of Low Molecular Weight Peptids by Two Species of Protease

Pak Yong Guk, Ra Sung Ryong

When treating two species protease on soybean protein powder, production of low molecular weight peptids was 1.5 times higher than use of one species enzyme in condition of equal enzyme activity.

The condition of production of low molecular weight peptids by two species of protease is 8% concentration of substrate, 5h, pH 8, 800U of enzyme activity per 1g substrate(ratio of alkaline protease and neaturalytic protease is 3 : 1).

Key words: low molecular weight peptid, protease