프로테아제

Protease

정　　의　이 품목에는 프로테아제(곰팡이성), 프로테아제(세균성), 프로테아제(식물성)가 있다. 각각의 정의는 다음과 같다.

프로테아제(곰팡이성) : *Aspergillus niger* 및 그 변종, *Aspergillus oryzae* 및 그 변종, *Aspergillus melleus* 및 그 변종에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

프로테아제(세균성) : *Bacillus subtilis* 및 그 변종, *Bacillus licheniformis* 및 그 변종, *Bacillus stearothermophilus* 및 그 변종, *Bacillus amyloliquefaciens* 및 그 변종의 배양물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

프로테아제(식물성) : 파파인, 피신, 브로멜라인 등 식물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

이 품목은 단백질을 가수분해하여 저분자량의 펩타이드 등을 생성한다.

가. 프로테아제(곰팡이성) [Protease, Fungal]

성　　상　이 품목은 백~진한 갈색의 분말, 입상, 페이스트상 또는 무~

진한 갈색의 액상이다.

확인시험 이 품목의 활성시험법에 따라 시험할 때 활성을 나타내어야 한다.

순도시험 (1) 비소 : 이 품목을 비소시험법에 따라 시험할 때, 그 양은 4.0ppm 이하이어야 한다.

(2) 납 : 이 품목 5.0g을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 5.0ppm 이하이어야 한다.

(3) 대장균군 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 대장균군에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30 이하이어야 한다.

(4) 살모넬라 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」일반시험법의 미생물시험법 중 살모넬라에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(5) 대장균 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」일반시험법의 미생물시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

활성시험법(역가)

프로테아제(곰팡이성)의 함량을 측정하는 방법으로 제 1 법인 SAP(Spectrometric acid protease units)법 또는 제 2 법인 HUT(Hemoglobin units on the tyrosine basis)법에 따라 시험한다. 다만, *Aspergillus melleus*로부터 얻어진 프로테아제는 제 2 법에 따라 시험한다.

제 1 법 SAP(Spectrometric acid protease units)법

분석원리 : 본 시험방법은 SAP(Spectrophotometric acid protease

units) 단위로 표시된 프로테아제 역가를 측정하는 방법이다. 역가시험은 pH 3.0, 온도 37℃에서 카제인기질의 30분간 가수분해에 근거를 두고 있다. 가수분해 되지 않은 기질은 삼염화초산으로 침전시켜 여과에 의해 제거되고 여액에 있는 용해된 카제인의 양을 흡광도측정법으로 측정한다.

시험용액의 조제 : 검체 일정량을 취하여 글리신・염산완충액으로 희석한 최종희석액 2mL를 사용하여 275nm에서 효소항온여액의 보정된 흡광치(본 시험방법에서는 ΔA로 정의)가 0.200~0.500의 범위가 되도록 시험용액을 조제한다. 검체를 정밀히 달아 유리유발에 취하고 글리신・염산완충액을 가하여 분쇄한 다음 이를 일정량의 메스플라스크에 옮겨 글리신・염산완충액으로 채운다.

시험조작 : 25×150mm 시험관을 1 검체당 효소시험용 2개 이상, 효소공시험용 1개, 기질공시험용 1개로 하여 기질용액 10mL씩을 가한다. 시험관에 마개를 하고 37±0.1℃의 수욕조에서 15분간 항온 시킨다. 시험용액 2mL를 정확히 가하고 흔들어 혼합한 후 수욕조에 방치한다(※주 : 항온 시키는 동안 시험관은 마개를 한다). 기질공시험용은 시험용액 대신에 글리신・염산완충액 2mL를 가한다. 정확히 30분후 각각에 삼염화초산용액 10mL를 가하여 효소의 작용을 정지시킨다. 기질용액 10mL, 삼염화초산용액 10mL, 시험용액 2mL의 순으로 가하여 효소공시험용으로 한다. 시험관 모두를 37±0.1℃의 수욕조에서 30분간 가온하여 단백질을 완전히 응고시킨 다음 시험관을 얼음수욕조에서 5분간

냉각시키고 왓트만 No.42 또는 동종의 여지를 사용하여 여과한다. 여액은 완전히 투명하여야 한다. 기질공시험여액을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 275nm에서 여액의 흡광도를 측정한다. 효소시험용액의 흡광도에서 효소공시험용액의 흡광도 값을 빼어 효소시험용액의 흡광도 값을 보정한다.

검량선의 작성 : 미리 건조항량 시킨 L-티로신 181.2mg을 정밀히 달아 0.1N 염산 60mL에 완전히 녹이고 물을 가하여 1,000mL로 한다. 이 용액 1mL는 1μmol 티로신을 함유한다. 이 용액을 사용하여 1mL당 0.10, 0.20, 0.30, 0.40과 0.50μmol 함유하는 희석용액을 만든다. 물을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 275nm에서 각각의 흡광도를 측정한다. mL당 티로신의 μmol수에 대하여 흡광도검량선을 작성하여 직선이 얻어져야 한다. 다음의 계산을 위해 기울기와 절편을 구해둔다. 그 값은 1.38에 근사치이어야 한다. 기울기와 절편은 다음 계산식에 따라 최소자승법(least squares method)에 의해 구한다.

$$\text{기울기(S)} = \frac{n\Sigma(MA)-\Sigma(M)\Sigma(A)}{n\Sigma(M^2)-(\Sigma M)^2}$$

$$\text{절 편(I)} = \frac{\Sigma(A)\Sigma(M^2)-\Sigma(M)\Sigma(MA)}{n\Sigma(M^2)-(\Sigma M)^2}$$

n : 검량선상의 점의 갯수
M : 검량선상의 각 점에 대한 mL당 티로신의 μmol수
A : 표준용액 각 농도에 대한 흡광도

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(SAP/g)} = (\Delta A - I) \times \frac{22}{S \times 30 \times W}$$

ΔA : 효소 항온여액의 보정된 흡광도
I : 검량선의 절편
22 : 최종 반응액의 양(mL)
S : 검량선의 기울기
30 : 반응시간(분)
W : 시험용액 2mL에 함유된 검체의 양(g)

역가의 정의 : 1 Spectrophotometric acid protease unit(SAP)는 상기 시험조건 하에서 분당 티로신 1μmol을 유리시키는 효소의 양이다.

시 액

카제인 : 카제인(Hammarsten)을 사용한다.

글리신·염산완충액(0.05M) : 글리신 3.75g을 약 800mL의 물에 녹이고 1N 염산을 가하여 pH 3.0으로 맞춘다. 물을 가하여 1,000mL로 한다.

삼염화초산용액 : 삼염화초산 18.0g과 초산나트륨 11.45g을 800mL의 물에 녹이고 빙초산 21.0mL를 가하고 물을 가하여 1,000mL로 한다.

기질용액 : 1N 염산 8mL를 취하여 물 500mL에 가하고 카제인 7.0g (건조물로)을 계속 저어주며 분산시킨다. 때때로 저어주면서 끓는 수욕조 중에서 30분간 가열하고 꺼내어 상온으로 냉각한다. 이 용액에 글리신 3.75g을 달아 넣고 0.1N 염산으로 pH 3.0으로 조절한 다음 이에 물을 가하여 1,000mL로 한다.

제 2 법 HUT(Hemoglobin units on the tyrosine basis)법

분석원리 : 본 시험방법은 HUT (Hemoglobin units on the tyrosine

basis) 단위로 표시된 프로테아제 역가를 티로신을 기준물질로 하여 측정하는 방법이다. 역가시험은 pH 4.7, 온도 40℃에서 헤모글로빈기질의 30분간 가수분해에 근거를 두고 있다. 가수분해되지 않은 기질은 삼염화초산으로 침전시켜 여과에 의해 제거되고 여액에 있는 용해된 헤모글로빈의 양을 흡광도측정법으로 측정한다.

시험용액의 조제 : 검체를 초산염완충액에 녹여 최종희석액 1mL가 9~22HUT를 함유하도록 시험용액을 조제한다(이 농도는 다음의 시험방법에 따라 읽은 흡광도 값이 0.2~0.5범위에 든다).

시험조작 : 25×150mm 시험관을 효소시험용과 기질공시험용으로 하여 이들 각각에 기질용액 10mL씩을 넣는다. 이를 40℃의 수욕조에서 5분간 가온한다. 효소시험용 시험관에 시험용액 2mL를 가하고 기질공시험용에는 초산염완충액 2mL를 가한다. 고무마개로 막고 손바닥에 가볍게 30초간 두드려 희석하고 40℃의 수욕조에서 정확히 30분간 가열한 후 삼염화초산용액 10mL씩을 각 시험관에 가한다. 마개를 하여 10~12분 간격으로 40초 동안 격렬히 흔들어 주며 이 조작을 1시간동안 계속하여 상온으로 식힌다. 효소공시험용으로 기질용액 10mL와 시험용액 약 5mL를 별도의 시험관에 취하여 수욕조에서 30분동안 각각 가온한 다음 기질용액 10mL에 삼염화초산용액 10mL를 가해주고 40초간 흔들어 섞고 이에 미리 가온한 시험용액 2mL를 정확히 가한 후 10~12분 간격으로 40초간 흔들어 주는 조작을 1시간동안 계속하여 상온에서 식힌다. 위의 3개 시험관을 격렬히 흔들어주고 왓트

만 No.42 또는 동종의 여지를 사용하여 여과한다. 초류액 3mL는 버린다. 기질공시험용액을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 275nm에서 흡광도를 측정한다. 효소시험용액의 흡광도에서 효소공시험용액의 흡광도를 뺀 값을 Au라 한다(만약 흡광치가 0.2~0.5범위에 들지 않으면 검체채취량을 조절하여 다시 시험한다).

검량선의 작성 : 미리 건조항량 시킨 L-티로신 100.0mg을 정밀히 달아 0.1N 염산 60mL에 완전히 녹이고 물을 가하여 1,000mL로 한다. 이 용액은 1mL당 100μg의 티로신을 함유한다. 이 용액을 사용하여 1mL당 75.0, 50.0, 25.0μg의 티로신을 함유하도록 희석한다. 4개의 용액을 0.006N 염산을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 275nm에서 흡광도를 측정한다. 티로신 1μg당 흡광도의 표시로서 곡선의 기울기를 측정한다. 이 값에 1.10을 곱하고 이를 As라 한다. 이 값은 약 0.0084가 되어야 한다.

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(HUT/g)} = \frac{\text{Au}}{\text{As}} \times \frac{22}{30\text{W}}$$

22 : 최종반응액의 양(mL)
30 : 반응시간(분)
W : 시험용액 2mL에 함유된 검체의 양(g)

(※ 주 : As값은 표준화된 조건하에서 0.0084가 얻어지며 보통의 시험에서는 검량선에서 얻어지는 값 대신에 이 값을 사용할 수 있다. 그러나 정확을 요하거나 의심이 가는 경우는 검량선에서 정확히 계산된 값을 사용하여야 한다)

역가의 정의 : 1 HUT unit는 상기시험조건 하에서 1분간에 파장 275nm에서 0.006N 염산에 1mL당 티로신 1.10μg을 함유하는 용액과 동일한 흡광도 값을 갖는 효소분해물을 생성하는 효소의 양이다.

시 액

헤모글로빈 : 헤모글로빈 기질분말을 사용하거나, 또는 동질의 것으로 물에 완전히 녹는 것을 사용한다.

초산염완충액 : 초산나트륨($NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$) 136g을 충분한 양의 물에 녹여 500mL로 한다. 이 용액 25mL를 1M 초산 50mL와 혼합하여 물을 가하여 1,000mL로 한다. 이 용액의 pH는 4.7±0.02이어야 한다.

기질용액 : 헤모글로빈 4.0g을 250mL 비이커에 취하고 물 100mL를 가해주고 10분간 저어주면서 녹인다. pH 메타의 전극을 용액에 담그고 계속 저어주면서 0.3N 염산으로 pH를 1.7로 맞춘다. 10분후에 0.5M 초산나트륨용액으로 pH를 4.7로 조절하고 이에 물을 가하여 200mL로 한다. 이 용액은 냉장고에 보관하면 약 5일간 유효하다.

삼염화초산용액 : 삼염화초산 140g을 75mL의 물에 녹이고 이에 물을 가하여 1,000mL로 한다.

보존기준

냉암소에서 밀봉 보존하여야 한다.

나. 프로테아제(세균성) [Protease, Bacterial]

성　　상　이 품목은 백~진한 갈색의 분말, 입상, 페이스트상 또는 무~진한 갈색의 액상이다.

확인시험　이 품목의 활성시험법에 따라 시험할 때 활성을 나타내어야 한다.

순도시험　(1) 비소 : 이 품목을 비소시험법에 따라 시험할 때, 그 양은 4.0ppm 이하이어야 한다.

(2) 납 : 이 품목 5.0g을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 5.0ppm 이하이어야 한다.

(3) 대장균군 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 대장균군에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30 이하이어야 한다.

(4) 살모넬라 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 살모넬라에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(5) 대장균 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

활성시험법(역가)

분석원리 : 본 PC(Bacterial protease unit)로 표시된 프로테아제 역가를 측정하는 방법이다. 역가시험은 pH 7.0, 온도 37℃에서 카제인기질의 30분간 단백질가수분해에 근거를 두고 있다. 가수분해 되지 않은 카제인은 여과에 의해 제거되고 용해된 카제인을 흡광도측정법으로 측정한다.

시험용액의 조제 : 트리스완충액을 사용하여 최종희석액 2mL가 10~

44 PC단위를 함유하도록 시험용액을 조제한다.

시험조작 : 25×150mm 시험관을 효소시험용, 효소공시험용 및 기질공시험용으로 하여 각각에 기질용액 10mL씩을 넣는다. 이들은 37±0.1℃의 수욕조에서 15분간 항온시킨다. 효소시험용에는 시험용액 2mL를 정확히 취하여 재빨리 가하고 흔들어 수욕조에 다시 방치한다. 기질공시험용에는 시험용액 대신 트리스완충액 2mL를 가한다. 정확히 30분 후에 각각의 시험관에 삼염화초산용액 10mL씩을 가하여 효소의 작용을 정지시킨다. 공시험용에는 기질용액 10mL에 삼염화초산용액 10mL를 가하고 40초간 흔든 다음 시험용액 2mL를 가한다(주 : 삼염화초산용액은 입으로 빨지 않는다). 다시 수욕조에서 30분간 가온하여 단백질을 완전히 응고 시킨다. 2차 가온의 종말점에서 시험관을 심하게 흔들어 왓트만 No. 42를 사용하여 여과한다. 초류액 3mL는 버리고 완전히 투명한 여액을 사용하여 기질공시험용액을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 275nm에서 흡광도를 측정하여 효소시험용액의 흡광도에서 효소공시험용액의 흡광도를 뺀 값을 Au라 한다.

검량선의 작성 : 미리 건조항량시킨 L-티로신 100.0mg을 정밀히 달아 0.1N 염산 60mL에 완전히 녹이고 물을 가하여 1,000mL로 한다. 이 용액은 1mL당 100μg의 티로신을 함유한다. 이 용액을 사용하여 1mL당 75.0, 50.0, 25.0μg을 함유하도록 0.006N 염산으로 희석한다. 4개의 용액을 0.006N 염산을 대조액으로 액층 1cm, 파장 275nm에서 흡광도를 측정한다. 티로신농도에 대한 흡광도로 검량선을 작성한다. 검량선으

로부터 1mL당 60μg의 티로신농도를 가지는 용액의 흡광도를 구한다. 이 값을 40으로 나누어 1mL당 1.5μg의 티로신농도를 함유하는 용액에 상당하는 흡광도를 구한 값을 As라 한다(이 때 이 값은 0.0115에 가까운 수치가 얻어진다).

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(PC/g)} = \frac{Au}{As} \times \frac{22}{30W}$$

22 : 최종반응액의 양(mL)
30 : 반응시간(분)
W : 시험용액 2mL에 함유된 검체의 양(g)

역가의 정의 : 1 Bacterial protease unit(PC)는 상기시험조건 하에서 분당 1.5μg/mL의 L-티로신을 생성하는 효소의 양이다.

시 액

카제인 : 카제인(Hammarsten)을 사용한다.

트리스완충액(pH 7.0) : 효소시험용 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 [Tris(Hydroxymethyl) amino-methane] 12.1g을 800mL의 물에 녹이고 1N 염산을 사용하여 pH 7.0으로 하고 물을 가하여 전량을 1,000mL로 한다.

삼염화초산용액 : 삼염화초산 18g과 초산나트륨(3수화물) 19g을 800mL의 물에 녹이고, 빙초산 20mL 및 물을 가하여 1,000mL로 한다.

기질용액 : 효소시험용 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 6.05g을 500mL의 물에 녹이고 1N 염산 8mL를 가하고 혼합한다. 이 용액에

서 카제인 7g을 가하여 녹이고 때때로 흔들어 주며 끓는 수욕에서 30분간 가열한다. 실온으로 냉각하고 격렬히 흔들며 침전이 생기지 않게 0.2N 염산을 천천히 가하여 pH 7.0으로 한다. 이에 물을 가하여 1,000mL로 한다.

보존기준

냉암소에서 밀봉 보존하여야 한다.

다. 프로테아제(식물성) [Plant Protease]

성　　상 이 품목은 백~진한 갈색의 분말, 입상, 페이스트상 또는 무~진한 갈색의 액상이다.

확인시험 이 품목의 활성시험법에 따라 시험할 때 활성을 나타내어야 한다.

순도시험 (1) 비소 : 이 품목을 비소시험법에 따라 시험할 때, 그 양은 4.0ppm 이하이어야 한다.

(2) 납 : 이 품목 5.0g을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 5.0ppm 이하이어야 한다.

(3) 대장균군 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 대장균군에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30 이하이어야 한다.

(4) 살모넬라 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 살모넬라에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(5) 대장균 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

활성시험법(역가)

분석원리 : 본 역가시험은 pH 6.0, 온도 40℃에서 60분간 카제인 기질의 단백질가수분해에 근거를 두고 있다. 가수분해 되지 않은 기질은 삼염화초산으로 침전하여 여과에 의해 제거되고 용해된 카제인을 흡광도 측정법으로 측정한다.

시험용액의 조제 : 최종희석액 2mL의 흡광도가 0.2~0.5의 범위가 되도록 검체를 정밀히 달아 유발에 취하고 인산염-시스테인-이.디.티.에이.완충액을 가하여 분쇄시킨 다음 이를 메스플라스크에 옮겨 인산염-시스테인-이.디.티.에이.완충액으로 채운다.

시험조작 : 25×150mm 시험관 3개는 효소시험용으로, 6개는 파파인검량선용으로 하여 이들 각각에 카제인기질용액 5mL씩을 넣는다. 이를 40±0.1℃의 수욕조에서 15분간 항온 시킨 후 시험용액 2mL, 표준용액 2mL를 각각 가하여 흔들어 섞고 마개를 하여 다시 수욕조에서 60분간 항온시킨 후 각각의 시험관에 삼염화초산용액 3mL씩을 가하여 흔들어 섞는다. 별도로 효소공시험용 시험관 9개에는 기질용액 5mL, 삼염화초산용액 3mL를 가하여 흔들어 섞고, 이에 시험용액, 해당 표준용액 2mL를 정확히 취하여 각각 가한다. 시험관 모두를 다시 수욕조에서 30분간 항온하여 침전된 단백질을 완전히 응고시킨 다음 왓트만 No. 42 또는 동종의 여지를 사용하여 여과한다. 초류액 3mL는 버리고 완전히 투명한 여액을 사용하여 각각의 공시험용액을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 280nm에서 흡광도를 측정한다. 표준용액농도

(mg/mL)에 대하여 여액의 흡광도로 검량선을 작성한다. 검량선으로부터 시험용액에서 얻은 여액의 농도를 구한다.

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(PU/mg)} = A \times C \times \frac{10}{W}$$

A : USP 파파인표준품의 역가(PU/mg)
C : 검량선에서 구한 효소시험용액에 대응하는 표준품의 농도(mg/mL)
W : 시험용액 2mL에 함유된 검체의 양(mg)

역가의 정의 : 1 Papain unit(PU)는 상기시험조건 하에서 1시간 동안에 Tyrosine 1μg 상당량을 유리시키는 효소의 양이다.

시 액

인산나트륨용액(0.05M) : 인산이나트륨(무수) 7.1g을 500mL의 물에 녹이고 물을 가하여 1,000mL로 한다. 이에 보존료로서 톨루엔 한방울을 가한다.

구연산용액(0.05M) : 구연산(1수화물) 10.5g을 500mL의 물에 녹이고 물을 가하여 1,000mL로 한다. 이에 보존료로서 톨루엔 한방울을 가한다.

인산염-시스테인-이.디.티.에이.완충액 : 인산이나트륨 7.1g을 약 800mL의 물에 녹이고 이에 이.디.티.에이.이나트륨(2수화물) 14.0g과 시스테인염산염(1수화물) 6.1g을 녹인다. 1N 염산 또는 1N 수산화나트륨용액으로 pH 6.0±0.1로 맞추고 물을 가하여 1,000mL로 한다.

삼염화초산용액 : 삼염화초산 30g을 물에 녹여 100mL로 한다.

기질용액 : 카제인(Hammarsten) 1g(건조물로서)을 인산나트륨용액

50mL에 녹이고 끓는 수욕조에서 30분간 때때로 흔들어 주면서 가열시킨다. 이를 냉각시켜 계속 흔들어 주며 구연산용액으로 pH 6.0±0.1로 맞춘다(※주 : 계속 빨리 흔들어주면 침전이 생기지 않는다). 이에 물을 가하여 정확히 100mL로 한다.

표준원액 : USP파파인표준품 100.0mg을 인산염-시스테인-이.디.티.에이.완충액에 녹여 100mL로 한다.

표준용액 : 표준원액 2, 3, 4, 5, 6 및 7mL를 100mL 메스플라스크에 각각 취하고 이에 인산염-시스테인-이.디.티.에이.완충액으로 용량을 맞춘다.

보존기준

냉암소에서 밀봉 보존하여야 한다.