

판크레아틴 소화효소의 활성화 조건 연구

김동청^{1*}

¹청운대학교 식품영양학과

A Study on the Activation Conditions of Pancreatic Enzymes

Dong Chung Kim^{1*}

¹Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University

요 약 돼지 췌장에서 추출한 판크레아틴 효소들의 활성화 조건에 대해 조사하였다. 십이지장의 첨가는 췌장의 단백질분해효소와 지방분해효소의 활성화를 유도하였다. 췌장액에 10% 십이지장을 첨가하여 30℃에서 90분간 반응시키거나 25℃에서 4시간 반응시켰을때 췌장의 단백질분해효소와 지방분해효소의 활성화는 정점에 도달하였고, 전분분해효소의 활성화에는 거의 영향을 주지 않았다. 25℃에서 4시간의 효소활성화, 원심분리, 아세톤침전 및 동결건조의 연속 공정으로 제조한 판크레아틴 효소들의 비활성도는 단백질분해효소 136 U/mg, 지방분해효소 170 U/mg 및 전분분해효소 400 U/mg으로 나타났다. 확립된 공정에 의해 제조된 판크레아틴은 USP 기준의 5.4배의 단백질분해효소, 58배의 지방분해효소 및 16배의 전분분해효소 활성을 보유한 고효율의 제품이었다.

Abstract This study investigated the activation conditions of pancreatic enzymes from porcine pancreas. Duodenum induced the activation of pancreatic protease and lipase in pancreas. When 10% duodenum was added to pancreatic juice and the mixture was incubated at 30℃ for 90 min or at 25℃ for 4 hrs, the activities of pancreatic protease and lipase reached the peak. When the pancreatin was prepared by sequential process of enzymatic activation at 25℃ for 4 hrs, centrifugation, acetone precipitation and freeze-drying, the specific activities of pancreatic protease, lipase and amylase were 136, 116 and 400 U/mg-protein, respectively. The protease, lipase and amylase activities of the prepared pancreatin were 5.4, 58.0 and 16.0 times higher than those of USP standard, respectively.

Key Words : Pancreatin, Pancreatic enzymes, Activation, Duodenum

1. 서론

판크레아틴(pancreatin)은 췌장의 외분비 세포에서 만들어진 후 십이지장으로 분비되어 음식물 분해에 작용하는 소화효소들의 복합체이다.

판크레아틴은 trypsin, chymotrypsin, elastase 및 carboxypeptidase A, B 등의 단백질분해효소(protease), 췌장 lipase와 phospholipase A2 등의 지방분해효소(lipase)와 전분분해효소(amylase)를 함유하고 있는 복합효소제로 소화제 등의 의약품제뿐만 아니라 식품제조용 첨가물

로 식품산업에도 사용되어져 왔다[1,2]. 췌장의 소화효소가 직접 활성형의 상태로 분비되면 자체의 췌장 조직을 공격하여 췌장염 등을 일으킬 수 있기 때문에 단백질분해효소와 지방분해효소는 활성이 없는 전구체 형태로 만들어져 십이지장으로 분비된 후 활성화되어 소화를 돕는 작용을 한다. 췌장에서 분비된 효소들의 활성화는 그림 1과 같은데, 비활성형의 trypsinogen은 십이지장 내의 enterokinase에 의해 trypsin으로 활성화되며 trypsin은 다른 비활성형의 단백질 분해효소와 지방분해효소를 활성화시키는 것은 물론 다른 trypsinogen을 활성화시킴으로써 일

본 연구는 2010년도 청운대학교 학술연구조성비의 지원을 받아 수행하였습니다.

*교신저자 : 김동청(kimdc@chungwoon.ac.kr)

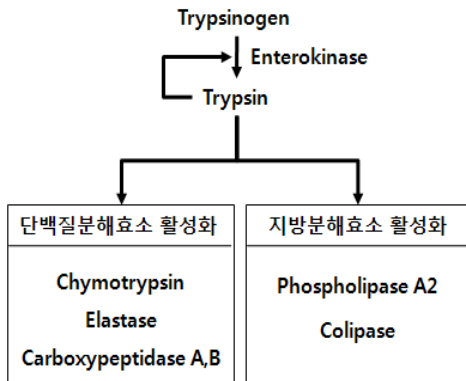
접수일 10년 10월 30일

수정일 (1차 10년 11월 16일, 2차 10년 11월 29일)

게재확정일 11년 01월 13일

련의 소화효소의 활성화를 가속시킨다[3-5].

따라서 소나 돼지의 췌장에서부터 소화효소를 바로 추출하여 판크레아틴을 제조할 경우 단백질분해효소와 지방분해효소가 활성화되어 있지 않기 때문에 소화효소제로서의 그 기능을 기대할 수 없다[6,7]. 췌장의 비활성형의 소화효소들을 활성화시키기 위해 enterokinase가 함유되어 있는 십이지장 추출물을 췌장 분쇄액에 첨가하여 판크레아틴을 제조하는 방법[8]과 적정 조건에서 췌장 추출물을 incubation함으로써 trypsinogen을 trypsin으로 활성화시켜 판크레아틴의 효소활성을 증대시키는 방법[9]이 보고된바 있다. 본 연구에서는 십이지장에 들어있는 enterokinase를 활용하여 판크레아틴의 효소 활성을 최대화하고자 하였고, 이를 위해 췌장에 십이지장을 첨가하여 온도와 시간에 따라 췌장 소화효소의 활성화 정도를 확인하였다. 이에 따라 확립된 최적의 활성화 조건으로 판크레아틴을 제조하여 미국규격표준(USP)과 비교하였다.



[그림 1] 연쇄반응에 의한 췌장의 단백질분해 효소와 지방분해효소 활성화 과정

2. 재료 및 방법

2.1 판크레아틴 효소활성 측정

돼지 췌장에서부터 추출한 판크레아틴의 단백질분해효소, 지방분해효소 및 전분분해효소의 활성은 USP 표준물질(U.S. Pharmacopeia, Rockville, MD, USA)을 기준으로 하여 미국규격표준(USP)의 방법[10]에 따라 측정하였다. 단백질 정량은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 BCA 단백질 정량법[11]에 따라 수행하였다.

2.2 십이지장 첨가에 의한 췌장 소화효소 활성화

십이지장 첨가가 췌장의 효소 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 십이지장 첨가군의 효소 활성을 대조군과 비교하였다. 대조군은 췌장 100 g에 5 mM CaCl₂ · 2H₂O 용액(추출용액, pH 8.2) 100 ml를 첨가하고 믹서를 사용하여 췌장 조직을 완전히 파쇄한 후 췌장분쇄액이 최종 250 ml이 되도록 추출용액을 첨가하였다. 십이지장 첨가군은 췌장 100 g과 십이지장 10 g에 추출용액(pH 8.2) 100 ml를 첨가하고 믹서를 사용하여 파쇄한 후 분쇄액이 250 ml이 되도록 추출용액을 첨가하였다. 각 실험군은 30℃의 항온수조에서 교반하면서 30분마다 시료를 채취한 후 원심분리(4℃, 10,000 x g, 20 min)하여 상등액을 얻었다. 각 상등액의 단백질분해효소, 지방분해효소 및 전분분해효소의 활성을 측정하여 활성화 정도를 비교하였다.

2.3 반응 온도와 십이지장 첨가량이 췌장 소화효소 활성화에 미치는 영향

십이지장 첨가량과 incubation 온도가 췌장의 효소활성화에 미치는 영향을 확인하였다. 췌장 100 g에 십이지장을 각각 2 g 및 10 g을 넣고 추출용액(pH 8.2) 100 ml를 첨가하여 각각을 파쇄한 후 각 분쇄액이 250 ml이 되도록 추출용액을 첨가하였다. 각각의 시료는 25℃의 항온수조에서 교반하면서 1시간마다 반응액을 채취하고 원심분리하여 상등액을 얻었다. 각 상등액의 단백질분해효소, 지방분해효소 및 전분분해효소의 활성을 측정하여 활성화 정도를 비교하였다.

2.4 판크레아틴 제조

췌장 100 g에 십이지장을 10 g을 넣고 추출용액(pH 8.2) 100 ml를 첨가하여 파쇄한 후 분쇄액이 250 ml이 되도록 추출용액을 첨가하였다. 25℃의 항온수조에서 4시간 incubation 시킨 후 원심분리(4℃, 10,000 x g, 20 min)하여 상등액을 얻었다. 상등액을 4℃에서 1시간 동안 incubation하고 4℃의 아세톤을 최종 농도 70%(w/w)가 되도록 5분에 걸쳐 처리한 후 4℃에서 30분간 교반하여 saturation 시켰다. 원심분리로 상등액을 제거하여 단백질 침전을 얻고 4℃에서 15시간 방치하여 아세톤을 휘발시킨 후 동결건조기에서 건조하여 분말로 제조하였다. 판크레아틴 분말은 50 mM phosphate 완충용액(pH 7.2)에 녹여 단백질분해효소, 지방분해효소 및 전분분해효소의 활성을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 십이지장 첨가가 췌장 효소의 활성화에 미치는 영향

그림 2A에서 보듯이 십이지장을 첨가한 실험군에서 단백질을 분해효소의 활성이 3배 정도 더 높게 나타나 10%(w/w)의 십이지장 첨가가 췌장의 단백질을 분해효소 활성화에 큰 효과가 있음을 알 수 있었다. 십이지장 첨가군은 30°C에서 90분간 반응시켰을 때 단백질을 분해효소의 활성도가 최대점에 도달했다. 십이지장의 단백질을 분해효소의 활성을 측정할 결과 매우 미미한 것(data not shown)으로 나타났기 때문에 췌장의 단백질을 분해효소의 활성 증가는 단순히 십이지장에 있는 단백질을 분해효소의 첨가 효과가 아니라 enterokinase의 연쇄 활성화 반응에 따른 췌장 단백질을 분해효소의 활성화[12]에 의한 것임을 알 수 있다. 또한 단백질을 분해효소의 활성이 반응시간에 따라 증가하는 것도 십이지장 첨가로 인해 단백질을 분해효소의 활성도가 순차적으로 유도된다는 것을 보여준다. 췌장의 파쇄 시 pH를 8.2로 조절한 추출용액을 사용하면 췌장 분쇄액의 pH는 6.0 정도가 되는데 이는 enterokinase의 반응의 최적 pH인 5.6에 근접하므로 효소 활성도의 연쇄반응을 잘 촉매할 수 있다[12].

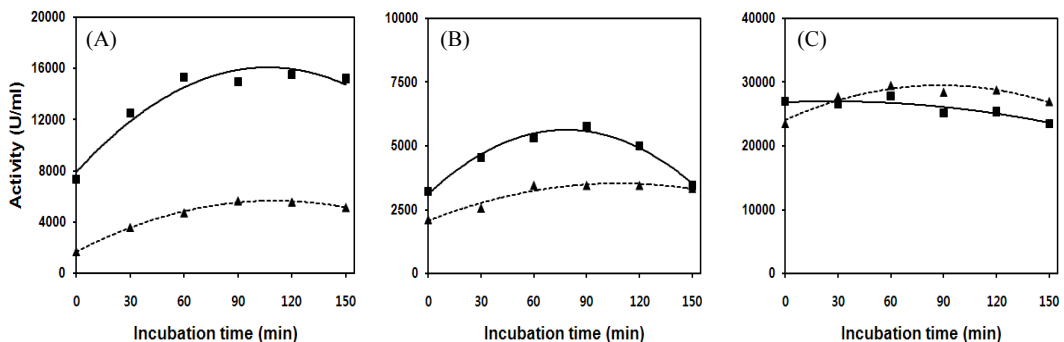
그림 2B에서 보듯이 대조군의 지방분해효소는 시간이 지남에 따라 활성이 서서히 증가하는 현상을 보였으나 그 증가 정도는 매우 미미했다. 그러나 십이지장 첨가군에서는 시간이 지남에 따라 지방분해효소가 2배 정도 활성화되었다가 90분 이후부터는 활성이 오히려 감소하는 현상을 보였다. 이는 trypsin에 의해 지방분해효소들이 활성화됨에 따라 활성이 증가[그림 1]하다가 반응 시간이 길어지면 높은 온도에 의해 지방분해효소의 3차 구조가 불안정해지고 이들이 단백질을 분해효소에 의해 공격을 받음

으로서 효소활성이 오히려 감소하는 것으로 볼 수 있다 [13]. 전분분해효소는 비활성형의 zymogen 형태로 발현되지 않고 활성형의 형태로 바로 만들어지기 때문에 활성화 과정이 필요없다[2,3]. 따라서 대조군과 십이지장 첨가군에서 전분분해효소의 활성은 큰 차이가 없었다[그림 2C].

따라서 췌장에 10%(w/w)의 십이지장을 첨가하여 30°C에서 90분간 반응시키면 단백질을 분해효소의 활성도가 최대에 달했고 지방분해효소의 활성화도 정점에 도달했다. 그러나 판크레아틴의 효소활성화를 대량생산 공정에 적용할 경우 30°C에서 90분이 넘어가면 급격히 지방분해효소가 불활성화 되어 수율이 오히려 감소하는 문제가 발생하기 때문에 반응 온도를 낮추는 것이 바람직하다. 그러나 온도를 저온으로 많이 낮출 경우 냉장온도를 유지하는데 에너지가 필요한 물은 활성화에 많은 시간이 소모되므로 바람직하지 않고 따라서 활성화 온도가 실온에 가까울수록 효율적인 공정으로 볼 수 있다. 따라서 25°C의 온도에서 췌장 효소의 활성화 공정을 수행하여 효소활성화 정도를 비교하였다.

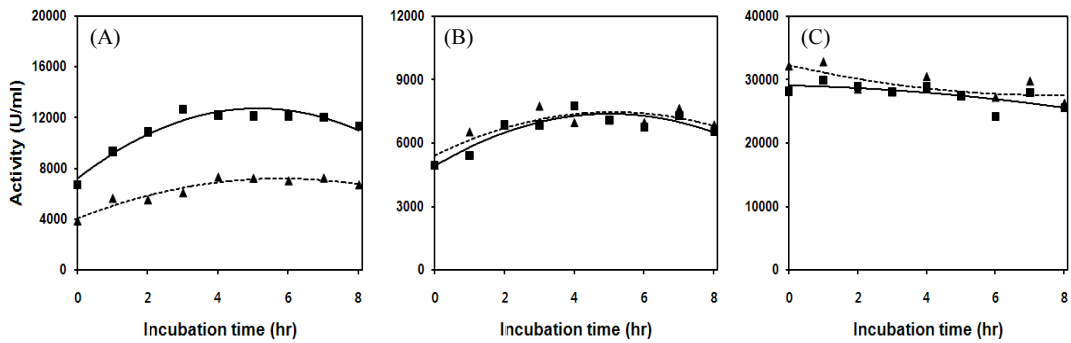
3.2 반응온도와 십이지장 첨가량이 췌장 효소의 활성화에 미치는 영향

그림 3A에서 보듯이 25°C에서 십이지장을 첨가하여 췌장의 효소를 활성화시켰을 때 십이지장 첨가량을 1/5로 줄인 실험군에서는 단백질을 분해효소의 활성도가 50% 정도만 일어나, 십이지장 첨가량은 10%(w/w)가 효소활성화에 적합함을 알 수 있었다. 10%의 십이지장 첨가 시 25°C에서 단백질을 분해효소의 활성화는 4시간에 최대값에 도달하였다. 지방분해효소의 활성화는 십이지장의 첨가량에 따라 큰 차이를 보이지 않았다[그림 3B]. 30°C에서의 결과와 비교하여 보면, 25°C에서 지방분해효소의 활



[그림 2] 30°C에서 십이지장 첨가가 췌장의 단백질을 분해효소(A), 지방분해효소(B) 및 전분분해효소(C) 활성에 미치는 영향 (-■-, 십이지장 첨가군; ··▲··, 대조군).

Data are averages of duplicate measurements with spread less than 10%.



[그림 3] 25℃에서 십이지장 첨가량이 췌장의 단백질분해효소(A), 지방분해효소(B) 및 전분분해효소(C) 활성화에 미치는 영향 (-■-, 10% 십이지장 첨가; ···▲···, 2% 십이지장 첨가). Data are averages of duplicate measurements.

성은 최대 2,000 U/ml 정도 증가하였고, 시간이 지남에 따라 활성이 급격히 감소하는 현상도 나타나지 않았다. 이는 25℃에서 지방분해효소의 3차 구조가 안정적으로 유지되어 단백질분해효소의 공격에 의해 실활되지 않는다는 것을 의미[14]하므로 판크레아틴 효소 활성화에는 25℃의 온도가 적합함을 확인하였다. 십이지장 첨가량과 반응 온도는 전분분해효소의 활성화에는 거의 영향을 주지 않았다[그림 3C]. 따라서 췌장에 10%(w/w)의 십이지장을 넣고 파쇄한 후 25℃에서 4시간 incubation 시키면 단백질분해효소는 최대로 활성화되고, 지방분해효소와 전분분해효소의 활성도 높은 판크레아틴을 제조할 수 있다.

3.3 판크레아틴 제조

췌장 100 g에 십이지장 10 g을 넣고 파쇄하여 25℃에서 4시간 incubation 시키고, 원심분리, 아세톤침전 및 동결건조를 거쳐 최종 14.6 g의 판크레아틴을 제조할 수 있었다. 판크레아틴 회수단계에 따른 효소활성과 수율을 표 1에 나타내었다. 단백질분해효소는 4시간 incubation에 의해 약 2.6배 활성화되었고, 활성화된 상태를 100%로 보았을 때 회수공정을 거치는 동안 56.0%의 단백질분해효소를 회수할 수 있었다. 동결건조 분말은 10 mg을 완충용액 1 ml에 녹여 활성을 측정했기 때문에 단백질분해효소의 비활성도는 136 U/mg이고, 이는 USP 기준의 5.4배의 활성을 나타내었다[10]. 지방분해효소도 활성

화되어 최종 회수공정까지 33.2%의 활성이 유지되었고 비활성도는 116 U/mg으로 이는 USP 기준의 58배로 매우 높았다[10]. 전분분해효소는 최종 42.1%의 활성이 유지되었고, 비활성도는 400 U/mg으로 USP 기준의 16배의 활성을 보유하고 있었다[10]. 기존에 보고된 dichloro methane과 trichlorofluoro methane의 용매를 사용하여 회수한 판크레아틴의 단백질분해효소 200 U/mg, 지방분해효소 58 U/mg 및 전분분해효소 140 U/mg의 비활성도 [15]와 비교하였을 때, 십이지장을 첨가하여 최적화된 조건으로 제조한 판크레아틴의 단백질분해효소의 비활성도는 다소 낮지만 지방분해효소와 전분분해효소의 비활성도는 월등히 높게 나타났다.

4. 결론

십이지장의 첨가와 반응조건이 돼지 췌장에서 추출한 판크레아틴 효소들의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과, 십이지장의 첨가는 췌장의 단백질분해효소와 지방분해효소의 활성화를 유도함을 확인하였다. 10%(w/w)의 십이지장을 첨가하여 30℃에서 90분간 반응시킨 실험군은 무첨가군에 비해 단백질분해효소의 활성이 약 3배 높게, 지방분해효소의 활성은 약 2배 높게 나타났다. 그러나 30℃에서는 지방분해효소가 불안정한 것으로 나타나

[표 1] 판크레아틴의 단백질분해효소, 지방분해효소 및 전분분해효소의 수율 및 활성도

단계	단백질분해효소		지방분해효소		전분분해효소	
	활성(U/ml)	수율(%)	활성(U/ml)	수율(%)	활성(U/ml)	수율(%)
파쇄 후	5,275	-	15,558	-	53,556	100.0
4시간 후	13,607	100.0	19,616	100.0	48,013	89.7
동결건조	1,355	56.0	1,158	33.2	4,006	42.1

반응온도를 25℃로 낮춰 효소활성화를 시도하였다. 췌장액에 10%(w/w) 십이지장을 첨가하여 25℃에서 4시간 반응시켰을때 단백질분해효소의 활성화는 정점에 도달하였고, 지방분해효소와 전분분해효소의 활성도 높게 유지됨을 확인하였다. 25℃에서 4시간 동안의 효소활성화, 원심분리, 아세톤침전 및 동결건조의 연속공정으로 회수한 판크레아틴 효소들의 비활성도를 측정된 결과, 단백질분해효소 136 U/mg, 지방분해효소 116 U/mg 및 전분분해효소 400 U/mg으로 나타났다.

참고문헌

- [1] 김동현, 윤혜경, 신지은, “판크레아틴 규격 표준화 연구”, 약제학회지, 제33권, 제4호, pp. 273-279, 1월, 2003.
- [2] J. E. Clain, et al., "In vitro enzyme activity of commercially available pancreatic enzyme extracts", South African Medical Journal, 53(15), pp. 582-583, 1978.
- [3] I. Jung, 이득식, 김동청, “돼지 췌장으로부터 판크레아틴 회수 공정 연구”, 산학기술연구, 제4권, 제2호, pp. 98-102, 12월, 2009.
- [4] T. Wieloch, "Trypsin activation of porcine procolipase", FEBS, 185(1), pp. 63-66, 1985.
- [5] A. Larsson and C. Erlanson-Albertsson, "The effect of pancreatic procolipase and colipase on pancreatic lipase activation", Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism, 1083(3), pp. 283-288, 1991.
- [6] M. H. Kang and J. Lee, "An improved procedure for the recovery of pancreatic enzymes with enhanced activity", Biotechnology Techniques, 10(6), pp. 419-424, 1996.
- [7] H. Kimura, et al., "Activation of human pancreatic lipase activity by calcium and bile salts", The Journal of Biochemistry, 92(1), pp. 243-251, 1982.
- [8] S. H. Lewis, "Preparing pancreatin", U.S. Patent 3956483, 1976.
- [9] M. Abboudi, et al., "Method for producing pancreatin which contains low amounts of residual organic solvent and product thereof", U.S. Patent 5861291, 1999.
- [10] USFDA, "Pancreatin", The United State Pharmacopeia, 1995.
- [11] C. M. Stoscheck, "Quantitation of protein", Methods in Enzymology, 182, pp. 50-68, 1990.
- [12] D. A. Grant and J. Hermon-Taylor, "Purification of porcine enterokinase by affinity chromatography", Biochemical Journal, 147(2), pp. 363-366, 1975.
- [13] D. H. De Souza, "The stability of pancreatic lipase", Biochemical Journal, 10(1), pp. 108-114, 1916.
- [14] B. Borgstrom, "The temperature-dependent interfacial inactivation of porcine pancreatic lipase effect of colipase and bile salts", Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism, 712(3), pp. 490-497, 1982.
- [15] H. Hans, et al., "Continuous process of producing pancreatin and product thereof", U.S. Patent 4019958, 1977.

김 동 청(Dong Chung Kim)

[정회원]



- 1990년 2월 : 연세대학교 생화학 과 (이학사)
- 1992년 8월: 연세대학교 생화학 과 (이학석사)
- 2003년 8월: 서울대학교 농화학 과 (농학박사)
- 2009년 9월 ~ 현재 : 청운대학교 식품영양학과 조교수

<관심분야>
식품 및 의약 소재