

원양산 오징어 (*Illex argentinus*) 내장의 endoprotease 및 exopeptidases의 분포 및 추출조건 검토

김혜숙 · 허민수 · 김진수*

경상대학교 해양생명과학부/해양산업연구소

Distribution and Extraction Condition of Endoprotease and Exopeptidase from Viscera of *Illex argentinus*

Hye Suk Kim, Min Soo Heu and Jin-Soo Kim*

Division of Marine Life Science/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

Received November 22, 2007; Accepted December 7, 2007

For the effective use of squid processing by-products as food resources, the distribution and the extraction condition of endoprotease and exopeptidase from viscera of *Illex argentinus* were investigated. Crude protein and lipid contents of viscera of *Illex argentinus* were 17.2% and 16.9%, respectively. Regardless of kinds of extraction solution (water, 1% NaCl, 1% KCl and 1% NaCl- KCl) and extraction times (1-20 h), endoprotease activities from viscera of *Illex argentinus* on Hb, casein and azocasein (pH 6.0) were higher than those on casein and azocasein of the other pHs, thus indicating that the distribution of protein hydrolysing protease is distinctive in the weak acid pH range. Exopeptidase activities against LeuPNA and ArgPNA at pH 7.5 were relatively higher than endoprotease activity of the same pH. The results suggested that exopeptidase among proteases from viscera of *Illex argentinus* was reasonable for application in food industry compared to endoprotease. The activity in enzymes from viscera of *Illex argentinus* was the highest in the exopeptidase extracted with deionized distilled water at room temperature for 6-8 h. The optimal reaction conditions of crude enzyme from viscera of *Illex argentinus* were 7.5 for pH and 50-55°C for temperature.

Key words: squid, squid viscera, endoprotease, exopeptidase, proteases, *Illex argentinus*

서 론

오징어는 오징어과에 속하는 동물의 총칭으로 세계 전 해역에는 약 450-500종, 북태평양에는 약 90-100종, 우리나라 전 해역에는 약 10여종이 분포하고 있으며, 이들은 수심 약 4000 m 정도의 심해에서 서식한다.¹⁾ 우리나라의 오징어 생산량은 1998년 이래 현재까지 연간 1,986천톤 내외에 이르고 있다. 하지만, 국내 오징어의 수요는 한국인의 식미기호에 맞음으로 인하여 마른 오징어, 조미 오징어, 조미 냉동식품 및 젓갈 등과 같이 다양한 형태로 가공되거나, 조리될 뿐만 아니라 횡감으로 즐겨 식용함으로써 인하여 그 수요가 증대되어 매년 다량 수입되고 있다. 이와 같이 식품 용도로 우리나라에 수입되고 있는 오징어는 아르헨티나 짧은 지느러미 오징어, 웰링턴 오징어(뉴질랜드), 빨강오징어 및 아메리카 대왕 오징어 등이 대부분을 차지하고

있다.²⁾ 한편, 오징어를 우리의 식미에 맞게 가공 및 조리하는 경우에는 반드시 내장, 껍질, 자숙수 및 먹물과 같은 부산물이 발생하고 있다. 이와 같은 오징어 가공 부산물에는 단백질, 효소, 콜라겐, 지질, taurine 및 생리활성물질 등과 같은 유용성분이 다양하게 함유되어 있으나 현재 많은 양이 식품가공소재와 같이 효율적으로 이용되지 못하고, 사료나 비료와 같이 비효율적으로 이용되거나 폐기되고 있다.

한편, 오징어 가공 부산물의 식품소재로서 이용에 관한 연구로는 오징어 내장의 지질추출소재,^{3,4)} 오징어 먹물의 생리활성소재,⁵⁾ 오징어 껍질의 콜라겐 소재,^{6,7)} 오징어 자숙액의 taurine 분리원⁸⁾ 등이 있고, 오징어 내장에 함유되어 있는 효소 및 효소 저해제를 이용하기 위한 연구로는 carboxypeptidase⁹⁾와 trypsin 저해제¹⁰⁾의 분리 및 특성에 관한 연구, aminopeptidase의 치즈 숙성에 이용을 위한 연구,¹¹⁾ 오징어 내장 조효소의 자숙 오징어 육조직 개선¹²⁾ 및 액젓의 풍미 개선^{13,14)}을 위한 연구 등이 있으나, 오징어 내장 중에 함유되어 있는 효소의 유효 이용을 위하여 exopeptidase 및 endoprotease의 분포 및 추출조건 검토 등에 관한 연구는 없다.

*Corresponding author

Phone: +82-55-640-3118; Fax: +82-55-640-3111

E-mail: jinsukim@gnu.ac.kr

본 연구에서는 오징어 내장으로부터 exopeptidase를 부분 정제하여 산업적으로 이용하기 위한 일련의 기초 연구로 원양산(*Illex argentinus*) 오징어 내장의 exopeptidase 및 endoprotease의 분포 및 이들 효소의 기본 특성에 대하여 살펴보았다.

재료 및 방법

재료. 실험에 사용한 원양산 아르헨티나 짧은 지느러미 오징어(*Illex argentinus*, length: 51.5 ± 1.5 cm, weight: 488.7 ± 55.2 g) 내장(length: 28.7 ± 5.5 cm, weight: 108.2 ± 3.8 g) (이하 오징어 내장이라 칭함)의 경우 경상남도 통영시 소재의 재래식 시장(서호시장)에서 비동결 상태로 각각 구입하여, 냉동상태(-70°C)로 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

시약. 효소활성 측정용 기질 중 endoprotease의 기질인 azocasein, casein 및 hemoglobin과 exoprotease의 기질인 LeuPNA (L-Leucine-*p*-nitroanilide) 및 ArgPNA(L-Arginine-*p*-nitroanilide)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였고, 기타 시약은 분석용 시약(analytical grade)을 구입하여 사용하였다.

완충액. 효소반응을 위해 사용한 0.1 M citrate(pH 3.0-7.0), 0.2 M acetate(pH 4.0-5.0), 0.1 M sodium phosphate(pH 6.0-8.0), 0.05 M Tris-HCl(pH 7.5-8.0), 0.1 M glycine-NaOH(pH 9.0), 0.1 M sodium carbonate(pH 9.0-10.0), 0.025 M NaHCO_3 -NaOH(pH 10.0) 및 0.025 M Na_2HPO_4 -NaOH(pH 11.0)와 같은 완충액들은 Dawson 등¹⁵⁾의 방법에 따라 각각 조제하여 사용하였다.

일반성분 및 단백질 농도. 일반성분은 AOAC¹⁶⁾법에 따라 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 semimicro Kjeldahl법, 회분은 건식회화법으로 측정하였다. 단백질의 농도는 Lowry 등¹⁷⁾의 비색법에 따라 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 구한 검량곡선으로부터 측정하였다.

조효소 추출. 오징어 내장으로부터 조효소의 추출은 냉동상태의 시료를 부분해동 및 마쇄한 다음 마쇄한 오징어 내장(100 g)에 대하여 3배(w/v)의 추출용매(탈이온수, 1% NaCl 용액, 1% KCl 용액 및 1% NaCl-KCl 혼합용액)를 각각 가하고, 혼합한 후, 1시간 간격으로 교반(20°C , 20시간) 하였다. 이어서 시료로 사용한 탈지 오징어 내장 조효소 추출물은 각 시간별로 추출한 조효소 추출물에 0.2배(v/v)의 사염화탄소(CCl_4)를 가하고 혼합한 다음, 원심분리($12,000 \times g$, 20 min) 하여 탈지된 상층액으로 하였다.

Exopeptidase 및 endoprotease의 활성. Exopeptidase의 활성은 LeuPNA 및 ArgPNA를 기질로 사용하는 Garcia-Carreno와 Hard¹⁸⁾의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 즉, exopeptidase 활성은 10-20 μl 의 효소 용액과 1 ml의 0.2 mM 기질이 용해되어 있는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.5) 용액을 혼합 및 반응(50°C , 1시간)시킨 다음, 반응액에 0.3 ml의 33% acetic acid를 가하여 실험시키고, 흡광도(410 nm)를 측정하여 검토하였다.

Endoproteinase의 활성은 기질로 azocasein,¹⁹⁾ hemoglobin 및 casein²⁰⁾ 등을 사용하여 측정하였다. 즉, endoprotease 활성은 효소 용액 10-20 μl 에 2 ml의 여러 가지 기질(0.1 M sodium

phosphate buffer, pH 6.0 및 7.5와 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 9.0를 용매로 하여 제조한 1% azocasein, 1% hemoglobin 및 2% casein)을 각각 혼합 및 반응(50°C , 1시간)시키고, 이어서 buffer solution과 동량(2 ml)의 5% trichloroacetic acid 용액을 가하여 실험시킨 후 정치(30분), 원심분리($146 \times g$, 20 min)한 다음 흡광도(azocasein을 기질로 한 경우 410 nm, hemoglobin 및 casein을 기질로 한 경우 280 nm)를 측정하여 검토하였다. 효소활성은 1시간 동안 1 mg의 효소(단백질)가 변화시키는 흡광도 0.1을 1 unit/mg으로 나타내었다.

Exopeptidase의 최적 반응조건 구명을 위한 반응 모델. 오징어 내장으로부터 추출한 조효소의 효율적 이용을 위하여 exopeptidase의 농도, 기질의 농도, 반응 pH, 반응 시간 및 반응 온도와 같은 여러 가지 조건의 구명을 시도하였다. 즉, 10-50 μl (효소 농도의 구명을 위하여는 10, 20, 30, 40 및 50 μl 를 각각 사용-)의 효소용액에 1 ml의 0.05 M Tris-HCl(pH 7.5) buffer(반응 pH의 구명을 위하여 0.1 M citrate, pH 3.0-7.0; 0.2 M acetate, pH 4.0-5.0; 0.1 M sodium phosphate, pH 6.0-8.0; 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5-8.0; 0.1 M glycine-NaOH, pH 9.0; 0.1 M sodium carbonate, pH 9.0-10; 0.025 M NaHCO_3 -NaOH, pH 10.0; 0.025 M Na_2HPO_4 -NaOH, pH 11.0와 같은 buffer를 각각 사용)를 용매로 한 0.5 mM(기질 농도의 구명을 위하여 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5 mM을 사용) LeuPNA를 가한 다음 40°C (반응온도의 구명을 위하여는 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60 및 70°C 에서 반응)에서 30분간(반응시간의 구명을 위하여는 15, 30, 45, 60, 90 및 120분 반응)반응시켜 활성을 측정 한 다음 exopeptidase의 최적조건을 구명하였다.

결과 및 고찰

일반성분. 오징어 내장의 일반성분은 수분 함량의 경우 62.9%, 조단백질의 경우 17.2%, 조지방의 경우 16.9% 및 조회분의 경우 1.6%를 나타내어(데이터 미제시), 조효소를 추출하고자 하는 경우 전처리 공정으로 반드시 탈지공정이 동반되어야 하리라 추정되었다. 이와 같은 일반성분의 결과는 Kim 등²¹⁾에 의한 원양산 오징어 내장의 지질조성을 살펴보기 위하여 검토한 일반성분(수분함량; 65.1%, 조단백질 함량; 14.5%, 조지방 함량; 17.9%, 조회분 함량; 1.1%)의 결과에 비하여 수분함량의 경우 낮았고, 조효소가 함유되어 있으리라 추정되는 조단백질 함량의 경우 높았으며, 나머지 조지방과 조회분의 경우 거의 차이가 없었다. 이와 같이 본 실험의 결과와 Kim 등²¹⁾의 결과 간에 일반성분의 차이는 일반적으로 산란 전인 4월의 오징어 내장은 산란 후인 6월의 오징어 내장에 비하여 수분함량이 적고, 조단백질이 많은 경향을 나타내며 7월에서 12월까지의 큰 변동이 없기 때문이라 판단되었다.²²⁾

효소활성 분포. 오징어 내장의 endoprotease 분포를 살펴보기 위하여 천연기질(hemoglobin, casein 및 azocasein)을 사용하여 pH 별(pH 3.0, 6.0, 7.5 및 9.0)로 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 오징어 내장 조효소액의 hemoglobin 및 casein 과 같은 두 종류의 기질에 대한 활성은 pH 6.0에서 각각 5.30 U/mg 및 5.38 U/mg을 나타내었고, 이는 pH 3.0에서의 활성

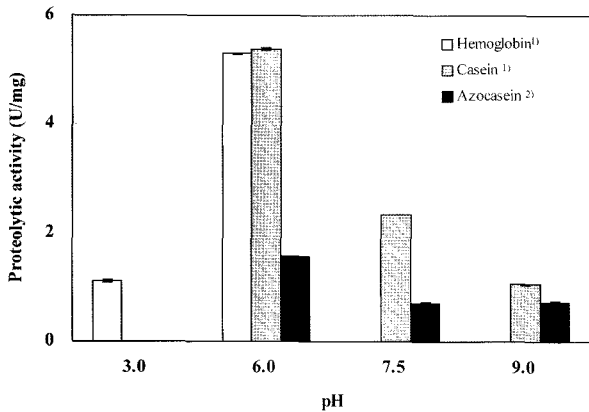


Fig. 1. Proteolytic activities of the crude enzyme from *Illex argentinus* viscera toward proteinous substrates. ¹⁾Enzyme activity was determined by the method of Anson²⁰⁾. ²⁾Enzyme activity was determined by the method of Starky *et al.*¹⁹⁾. Values are average \pm standard deviation. Reaction condition: 10-50 μ l of enzyme; 2 ml of 1% homoglobin (2% casein and 1% azocasein)/0.1 M citrate buffer, pH 3.0 and pH 6.0 for homoglobin; 0.1 M sodium phosphate, pH 6.0 and pH 7.5, 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0 for casein and azocasein; 40°C 30 min.

(hemoglobin에 대하여 1.11 U/mg)에 비하여 약 4.8배, pH 7.5에서의 활성(casein에 대하여 2.32 U/mg)에 비하여 약 2.3배, 그리고, pH 9.0에서의 활성(casein에 대하여 1.05 U/mg)에 비하여 5.1배가 높았다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 오징어 내장으로부터 추출된 endoprotease는 알칼리성 또는 강산성보다는 주로 미산성에서 강한 활성을 나타내는 protease로 판단되었다. 한편, Seo 등²³⁾은 연안산 오징어(*Todarodes pacificus*) 내장에서 protease를 분리한 다음 casein을 기질로 하여 여러 가지 pH에서 활성을 조사한 결과 최적 pH는 6.02라고 보고한 바 있다.

Endoprotease의 활성을 측정하고자 할 때 기질로 casein을 사용하는 경우 단백질 추출액의 아미노산과 단백질 등에 의해 자외선 영역(파장 280 nm)에서 방해받기도 하여, 보다 정확한 활성을 측정하고자 하는 경우 일반적으로 azocasein을 많이 사용한다.²⁴⁾ 오징어 내장 유래 조효소의 활성을 보다 명확히 검토하기 위하여 azocasein을 기질로 하여 살펴 본 결과 오징어 내장 조효소의 활성은 pH 6.0에서 1.55 U/mg으로 pH 7.5(0.70 U/mg)에 비하여 2.2배, pH 9.0(0.73 U/mg)에 비하여 2.1배가 높았다. 이와 같은 azocasein을 기질로 하여 살펴 본 오징어 내장 조효소의 활성은 경향의 경우 casein을 기질로 하였을 때와 차이가 없었으나, 효소활성단위로 나타낸 활성강도에 있어서는 상당히 차이가 있었다.

한편, Heu와 Ahn²⁵⁾은 멸치, 넙치, 감성돔, 은연어, 말쥐치, 고등어, 참돔, 조피볼락, 참다랑어 및 방어와 같은 여러 가지 수산동물 내장 조효소의 활성을 casein에 대하여 pH 3.0, 6.0 및 9.0으로 나누어 살펴 본 결과 어종에 관계없이 모두 pH 8.0에서 가장 높았고, 다음으로 pH 6.0 및 pH 3.0의 순이었다고 보고하여 본 오징어 내장 조효소와 차이가 있었다.

일반적으로, 산성측 pH에서 강한 단백질 분해활성을 나타내는 효소로는 pepsin, gastricsin 및 cathepsin D 등의 aspartic proteinase이며,²⁶⁾ 약산성 및 중성 pH에서 활성을 나타내는 효

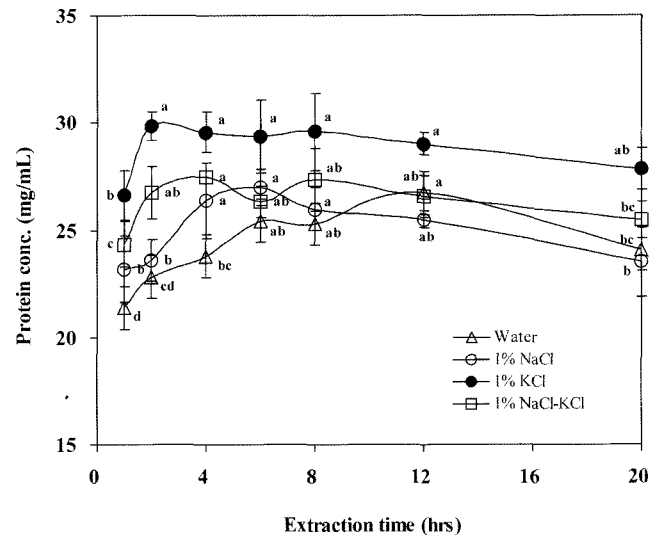


Fig. 2. Protein concentration of the crude enzyme from *Illex argentinus* viscera with various solvents for different times. Different letters beside the same symbol indicate a significant difference at $p < 0.05$.

소는 동물세포의 lysosome에 존재하는 cathepsin B, H 및 L 등의 cysteine proteinase로서 이들 효소의 최적 pH는 5.5-6.8로 알려져 있고, 주로 근육, 간 및 비장 등의 내장 기관에 분포하고 있는 것으로 알려져 있으며,^{27,28)} 알칼리성 pH에서 활성을 보이는 효소들은 주로 chymotrypsin, trypsin, elastase, carboxypeptidase 등과 같은 serine proteinase가 내장 기관에 분포하고 있는 것으로 알려져 있다.²⁹⁻³³⁾

이상의 결과와 보고로 미루어 원양산 오징어 내장에서 추출한 단백질 분해 조효소 중에는 활성 강도의 차이는 있겠지만 cathepsin B, H 및 L 등의 cysteine proteinase군에 속하는 유사효소들이 분포하는 것으로 추정되었다.

조효소의 추출조건 검토. 추출용매(탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용액과 같은 추출용매)와 추출시간(1-20시간)에 따른 오징어 내장 조효소의 단백질 농도는 Fig. 2와 같다. 탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용액과 같은 추출용매에 따른 오징어 내장 조효소의 단백질 함량은 추출 1시간제에 각각 21.4, 23.2, 26.6 및 24.3%를 나타내었다. 이후 추출용매에 따른 오징어 내장 조효소의 단백질 함량은 탈이온수로 추출한 조효소의 경우 12시간제까지 증가하여 26.7%로, 1% NaCl로 추출한 조효소의 경우 6시간제까지 증가하여 27.0%로, 1% KCl로 추출한 조효소의 경우 2시간제까지 증가하여 29.9%로, 그리고, 1% NaCl-KCl 혼합용액으로 추출한 조효소의 경우 4시간제까지 증가하여 27.5%로 최대를 나타내었으며, 추출용매의 종류에 관계없이 최대치 이후에는 거의 변화가 없거나 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 하지만, 오징어 내장 조효소의 최대 단백질 함량은 5% 유의수준에서 탈이온수로 추출한 조효소의 경우 6-12시간 추출물 간(25.4-26.7%)에, 1% NaCl로 추출한 조효소의 경우 4-12시간 추출물 간(25.5-27.0%)에, 1% KCl로 추출한 조효소의 경우 2-20시간 추출물 간(27.9-29.9%)에, 1% NaCl-KCl 혼합용액으로 추출한

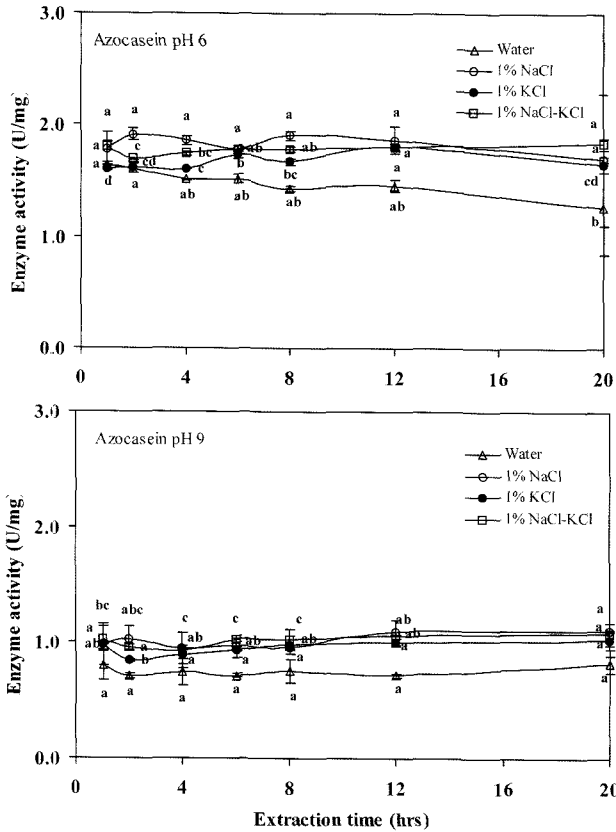


Fig. 3. Proteolytic activity of the crude enzyme from *Illex argentinus* viscera with various solvents for different times. Reaction condition: 50 μ l of enzyme; 2 ml of 1% azocasein/0.1 M sodium phosphate, pH 6.0 and 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0; 40°C, 60 min. Different letters beside the same symbol indicate a significant difference at $p < 0.05$.

조효소의 경우 2-12시간 추출물 간(26.3-27.5%)에 차이가 인정되지 않았다.

이상의 결과로 미루어 보아 추출용매(탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용액) 및 추출시간(1-20시간)에 관계없이 오징어 내장 조효소를 추출하기 위하여는 단백질 함량만으로 미루어 보아 오징어 내장에 1% KCl을 가하고 2-20 시간 범위에서 추출 하는 것이 가장 적절하다고 판단되었다.

천연기질(azocasein)에 대한 endoprotease activity. 추출용매(탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용액과 같은 추출용매)와 추출시간(1-20시간)에 따른 오징어 내장 조효소의 pH별(pH 6 및 9) azocasein에 대한 활성은 Fig. 3과 같다. 추출용매와 추출시간에 따른 오징어 내장 조효소의 pH 6에서 azocasein에 대한 활성은 1% KCl로 추출한 조효소를 제외하고는 나머지 3종류의 추출용매(탈이온수, 1% NaCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용액)로 추출한 조효소의 경우 추출 1시간째에 각각 1.65 U/mg, 1.79 U/mg 및 1.81 U/mg로 최대치를 나타내었고, 이후 미미한 정도에서 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 이들 3종류의 추출용매로 1시간동안 추출한 조효소의 경우 다른 시간(2-20시간) 동안 추출한 조효소의 최대 활성치와 5% 유의수준에서 차이가 없었다. 한편, 1% KCl로 1-20시간 동안 추출한 조효소의 활성은 1.60-1.80 U/mg 범위를 나타내었고, 12시간까지는

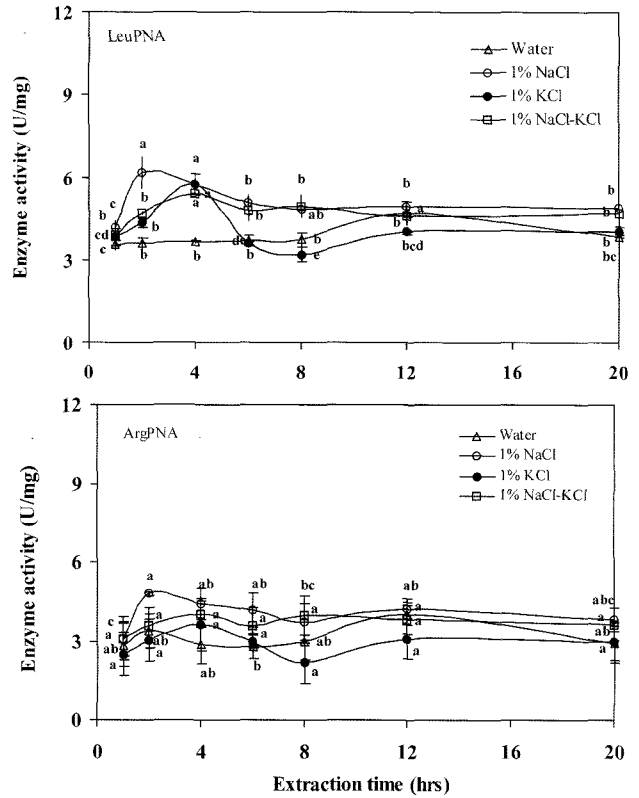


Fig. 4. Amidolytic activity of the crude enzyme from *Illex argentinus* viscera with various solvents for different times. Reaction condition: 10 μ l of enzyme; 1 ml of 0.5 mM LeuPNA (0.5 mM ArgPNA)/50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 40°C, 30 min. Different letters beside the same symbol indicate a significant difference at $p < 0.05$.

추출시간이 경과할수록 5% 유의수준에서 증대하는 경향을 나타낸 다음, 이후 감소하는 경향을 나타내었으며, 최대 활성은 12 시간 추출한 조효소가 나타낸 1.80 U/mg이었다. 한편 추출용매에 따른 오징어 내장 조효소의 pH 6.0에서 azocasein에 대한 활성은 탈이온수를 제외한 나머지 3종의 추출용매(1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용액)로 추출한 것이 높았다.

탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용액과 같은 여러 가지 용매로 1시간동안 추출한 오징어 내장 조효소의 pH 9에서 azocasein에 대한 활성은 각각 0.81 U/mg, 0.98 U/mg, 0.98 U/mg 및 1.03 U/mg를 나타내었고, 이들의 활성은 이후 1% NaCl로 20시간 추출한 조효소를 제외하고는 모두 5% 유의수준에서 차이가 없었다. 오징어 내장 조효소의 활성은 추출용매의 종류에 관계없이 모두 pH 9.0에서 azocasein에 대한 활성이 pH 6.0에서 azocasein에 대한 활성보다 낮았다.

이상의 결과로 미루어 보아 오징어 내장으로부터 endoprotease를 추출하고자 하는 경우 탈이온수를 제외한 나머지 3종의 추출용매로 6-8시간 동안 추출하는 것이 적절하리라 판단되었다. 이와 같이 3종의 추출용매(1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용액)로 추출한 오징어 내장 조효소는 모두 미산성에서 강한 활성을 나타내는 효소가 주로 분포되어 있다고 판단되었다.

합성기질(Leu- 및 ArgPNA)에 대한 exopeptidase activity. 추출 용매(탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl)와

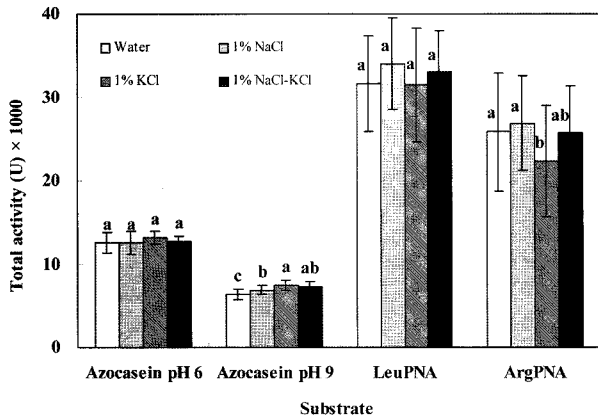


Fig 5. Total activity of the crude enzyme from *Illex argentinus* viscera with various solvents for different times. Different letters on the bars indicate a significant difference at $p < 0.05$. Values are the means \pm standard deviation of three determination.

추출 시간(1-20시간)에 따른 오징어 내장 조효소의 합성기질에 대한 효소 활성은 Fig. 4와 같다. 오징어 내장으로부터 탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl를 이용하여 1시간동안 추출한 조효소의 LeuPNA에 대한 분해활성은 각각 3.55 U/mg, 4.17 U/mg, 3.83 U/mg 및 3.91 U/mg을 나타내었다. 여러 가지 용매와 추출시간을 달리하여 오징어 내장으로부터 추출한 조효소의 LeuPNA에 대한 분해활성은 탈이온수를 제외한 3종의 추출용매(1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl)로 추출한 조효소 모두가 추출시간 4시간까지는 증가하였고, 그 이후 감소하여 거의 일정한 경향(1% NaCl로 추출한 조효소의 경우 4.84-5.09 U/mg, 1% KCl로 추출한 조효소의 경우 3.20-4.04 U/mg, 1% NaCl-KCl 혼합용액으로 추출한 조효소의 경우 4.59-4.94 U/mg)을 나타내었다. 그러나, 탈이온수로 추출한 조효소의 LeuPNA에 대한 분해활성은 12시간 추출한 조효소를 제외하고는 전 추출시간 범위에서 3.54-3.86 U/mg을 나타내었다. 오징어 내장으로부터 4종의 추출용매로 추출한 조효소의 안정화된 범위 내에서 LeuPNA에 대한 분해 활성은 1% NaCl로 8시간 이상 추출한 조효소가 가장 높았고, 다음으로 1% NaCl-KCl 혼합용액으로 8시간 이상 추출한 조효소 등의 순이었다.

오징어 내장으로부터 탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl를 이용하여 1시간동안 추출한 조효소의 ArgPNA에 대한 분해활성은 각각 2.83 U/mg, 3.08 U/mg, 2.50 U/mg 및 3.09 U/mg을 나타내었다. 여러 가지 추출 용매와 추출시간을 달리하여 오징어 내장으로부터 추출한 조효소의 ArgPNA에 대한 분해활성은 1% NaCl을 제외한 3종의 추출용매(탈이온수, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용매)로 추출한 조효소 모두가 5% 유의수준에서 차이가 인정되지 않았고, 단지 1% NaCl로 추출한 조효소만이 2시간 추출한 것이 약간 증가하였으며, 그 이상의 시간을 소요하여 추출한 것에서는 차이가 인정되지 않았다. 4종의 추출용매를 이용하여 오징어 내장으로부터 추출한 조효소의 안정화된 범위 내에서 ArgPNA에 대한 분해활성의 안정화는 1% NaCl로 8시간 이상 추출한 조효소가 3.71-4.41 U/mg 범위에서 가장 높았고, 다음으로 1% NaCl-KCl 혼합용액(3.09-

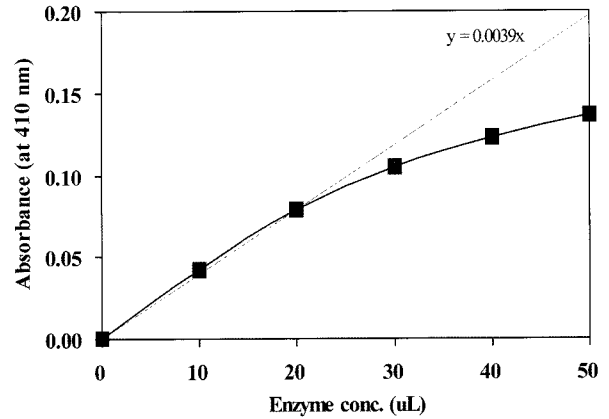


Fig. 6. Effect of enzyme concentration on amidolytic activity of the crude enzyme from *Illex argentinus* viscera. Enzyme activity was measured by the method of Erlanger *et al.*³³⁾ with slight modification. Protein concentration: 24.1 mg/ml. Reaction condition: 10-50 μ L of enzyme; 1 ml of 0.5 mM LeuPNA/50mM Tris-HCl (pH 7.5); 40°C 30 min. Values are the means \pm standard deviation of three determination.

4.02 U/mg 범위)으로 8시간 이상 추출한 조효소의 순이었다.

조효소의 total activity. 여러 가지 추출용매(탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl)에 따른 오징어 내장 조효소의 추출량과 비활성을 모두 고려한 total activity는 Fig. 5와 같다. 여기서 total activity는 추출용매로 1, 2, 4, 6, 8, 12 및 20시간 추출한 각 조효소의 total activity에 대한 평균치로 나타내었다. 여러 가지 추출 용매에 따른 오징어 내장 조효소의 천연기질(azocasein)에 대한 total activity는 추출용매의 종류에 관계없이 pH 6의 기질(12,590-13,120 U)이 pH 9의 기질(6,360-7,500 U)에 비하여 상당히 높았다. 오징어 내장 조효소의 pH 6으로 조정된 천연기질(azocasein)에 대한 total activity는 5% 유의수준에서 추출용매에 따른 활성 차이가 인정되지 않았다. 여러 가지 추출 용매에 따른 오징어 내장 조효소의 pH 9로 조정된 천연기질(azocasein)에 대한 total activity는 1% KCl로 추출한 조효소가 가장 높았으나, 5% 유의수준에서 1% NaCl-KCl 혼합용매로 추출한 조효소와 차이가 없었다.

여러 가지 추출 용매에 따른 오징어 내장 조효소의 합성기질(LeuPNA 및 ArgPNA)에 대한 total activity는 추출용매의 종류에 관계없이 LeuPNA 기질에 대한 분해 활성(31,480-34,010 U)이 ArgPNA 기질에 대한 분해 활성(22,310-26,860 U)에 비하여 상당히 높았다. 오징어 내장 조효소의 LeuPNA 기질에 대한 total activity는 5% 유의수준에서 추출용매에 따른 활성의 차이가 인정되지 않았고, ArgPNA 기질에 대한 total activity는 탈이온수, 1% NaCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용매로 추출한 것이 대체로 높았고, 3종의 조효소 간에는 5% 유의수준에서 차이가 없었다.

이상의 오징어 내장 조효소의 활성을 천연기질(azocasein)과 합성기질(LeuPNA 및 ArgPNA)로 나누어 살펴 본 결과, 추출용매(탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용액) 및 추출 시간(1-20시간)에 관계없이 전 조효소가 동일 pH에서 천연기질의 분해활성에 비하여 상대적으로 합성기질의 분해활성(pH 7.5)이 높아, 오징어 내장으로부터 효소를 분리하여

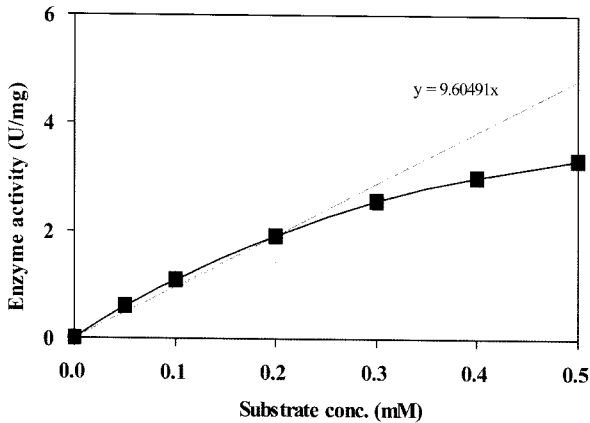


Fig. 7. Effect of substrate concentration on activity of the crude enzyme from *Illex argentinus* viscera. Enzyme activity was measured by the method of Erlanger *et al.*³³⁾ with slight modification. Protein concentration: 23.5 mg/ml. Reaction condition: 20 μ l of enzyme; 1 ml of 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mM LeuPNA/50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 40°C 30 min. Values are the means \pm standard deviation of three determination.

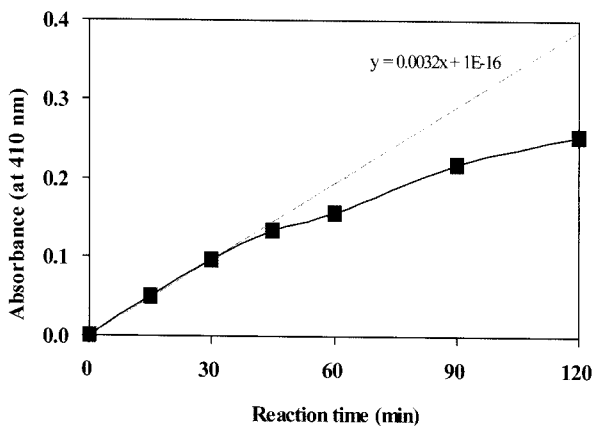


Fig. 8. Effect of reaction time on activity of the crude enzyme from *Illex argentinus* viscera. Enzyme activity was measured by partial modified methods of Erlanger *et al.*³³⁾. Protein concentration: 23.5 mg/ml. Reaction condition: 20 μ l of enzyme; 1 ml of 0.2 mM LeuPNA/50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 40°C 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min. Values are the means \pm standard deviation of three determination.

이용하고자 하는 경우 exopeptidase에 초점을 맞추어야 하리라 판단되었다. 또한 exopeptidase를 오징어 내장에서 추출하고자 하는 경우 추출 용매로는 염용액 보다는 탈이온수가 적절 하리라 판단되었다.

이상의 결과로부터 원양산 오징어 가공 중 부산물로 발생하여 사료와 같이 비효율적으로 이용되거나 이미지 이용되지 못하고 폐기되고 있는 오징어 내장에서 탈이온수를 이용하여 exopeptidase를 단가가 저렴한 방법에 의해 적절히 추출 및 정제방법을 개발하여 속성 액 및 어류 가수분해물 등의 쓴맛을 개선할 수 있다면 오징어 가공 부산물을 식품가공 소재와 같이 효율적으로 이용 가능하리라 생각된다.

효소반응 조건의 검토. 오징어 내장에서 탈이온수를 이용하여 추출(20°C, 6시간)한 조효소의 합성기질(LeuPNA) 분해 활성에 미치는 효소 농도(10-50 μ l)(Fig. 6), 기질농도(Fig. 7),

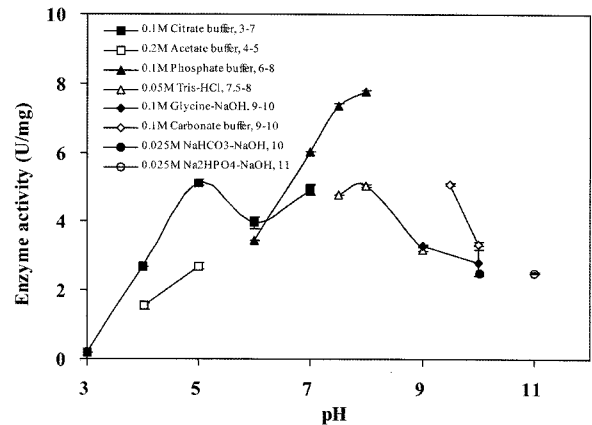


Fig. 9. Effect of pH on activity of the crude enzyme from *Illex argentinus* viscera. Enzyme activity was measured by partial modified methods of Erlanger *et al.*³³⁾. Protein concentration: 27.9 mg/ml. Reaction condition: 20 μ l of enzyme; 1 ml of 0.2 mM LeuPNA/various pH buffer; 40°C 30 min. The buffers used in the reaction mixture were 0.1 M citrate (pH 3.0-7.0), 0.2 M acetate (pH 4.0-5.0), 0.1 M sodium phosphate (pH 6.0-8.0), 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5-8.0), 0.1 M glycine-NaOH (pH 9.0), 0.1 M sodium carbonate (pH 9.0-10.0), 0.025 M NaHCO₃-NaOH (pH 10.0) and 0.025 M Na₂HPO₄-NaOH (pH 11.0) buffers containing 0.2 mM LeuPNA. Values are the means \pm standard deviation of three determination.

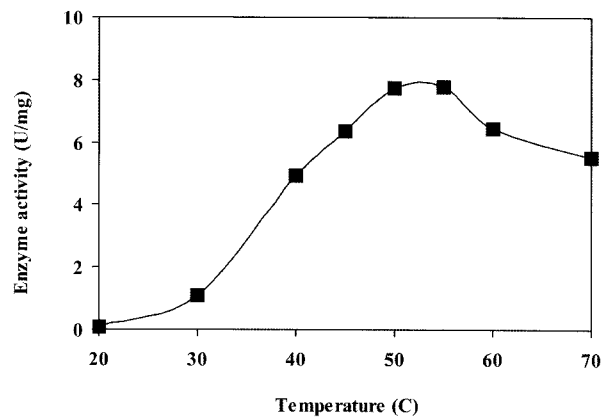


Fig. 10. Effect of temperature on activity of the crude enzyme from *Illex argentinus* viscera. Enzyme activity was measured by partial modified methods of Erlanger *et al.*³³⁾. Protein concentration: 25.5 mg/ml. Reaction condition: 20 μ l of enzyme; 1 ml of 0.2 mM LeuPNA/0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5); 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60 and 70°C 30 min. Values are the means \pm standard deviation of three determination.

반응시간(0-120분)(Fig. 8), pH(pH 3-11)(Fig. 9) 및 반응온도 (Fig. 10)에 대하여 살펴본 결과는 다음과 같다.

효소 활성은 합성기질인 LeuPNA에 대하여 오징어 내장 조효소 첨가농도 10-50 μ l 범위에서 효소 농도와 비례적으로 증가하였으며, 이때의 조효소 농도와 기질 분해 활성과의 관계식은 $y = 0.0039x$ 이었다. 그러나 그 이상의 효소 첨가농도(20 μ l)에서는 효소의 기질 분해 활성은 서서히 감소하였다. 이상의 결과로 미루어 보아 추출 조효소의 활성 측정을 위한 반응 혼합 중 조효소의 적정 첨가량은 20 μ l로 판단되었다.

20 μ l의 오징어 내장 조효소와 1 ml의 기질(LeuPNA) 농도별 반응 혼합을 반응(40°C, 30분) 시켰을 때, 오징어 내장 조효소

의 합성기질에 대한 분해 활성은 기질농도 0.05-0.20 mM 범위까지의 경우 기질 농도 증가와 더불어 직선적으로 증가하였으며, 이때 기질농도와 활성과의 관계식은 $y = 9.6049x$ 이었다. 이상의 결과로 미루어 오징어 내장 조효소의 활성 측정을 위한 반응 혼합액 중 적정 기질의 첨가농도는 0.2 mM이 적절하리라 판단되었다.

20 μ l의 오징어 내장 조효소, 1 ml의 0.2 mM LeuPNA를 반응 혼합액으로 하여 40°C에서 일정시간 반응시켜 시간별로 측정된 오징어 내장 조효소의 합성기질에 대한 분해활성은 반응시간 30분까지의 경우 반응시간과 분해활성 간의 상관관계가 비례적으로 증가하였다. 이때의 효소의 활성과 반응 시간과의 관계식은 $y = 0.0032x + 1E - 16$ 이었다. 그러나 30분 이상의 반응 시간에서는 분해활성이 다소 완만하게 증가하는 경향이였다. 이상의 결과로 미루어 보아 합성기질(0.2 mM LeuPNA)에 대한 오징어 내장 조효소의 활성 측정을 위한 적정 반응시간은 30 분으로 판단되었다.

20 μ l의 오징어 내장 조효소, 1 ml의 0.2 mM LeuPNA를 반응 혼합액으로 하여 40°C에서 30분간 반응시켜 pH별(pH 3-11)로 측정된 효소활성은 pH 7.5-8.0에서 최대 활성을 나타내었다. 오징어 내장 조효소의 활성은 최대활성에 대하여 산성영역(pH 3-6)에서는 3-66%의 활성을, 알칼리성 영역(pH 9-11)에서는 34-66%의 활성을 나타내었다. 또한 동일한 pH에서도 완충액의 조성이 다를 경우, 효소활성에 있어서 차이를 보였는데, 이는 완충액의 조성도 효소활성에 영향을 미치기 때문이라 판단되었다. 이상의 결과로 미루어 오징어 내장 조효소의 최적 반응 pH는 7.5로 판단되었다.

20 μ l의 오징어 내장 조효소, 1 ml의 0.2 mM LeuPNA를 함유하는 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.5를 반응 혼합액으로 하여 다양한 온도(20-70°C)에서 30분간 반응시켜 측정된 효소활성은 50-55°C에서 최대치를 나타내었다. 온도별 오징어 내장 조효소의 활성은 최대활성에 대하여 30°C의 경우 10-30%이었으며, 40-70°C 범위에서는 약 70% 이상인 반면 20°C 이하에서는 10% 미만을 나타내었다. 이상의 결과로 미루어 보아 합성기질인 LeuPNA를 분해하는 exoprotease의 반응 최적 온도 조건은 50°C로 판단되었다.

초 록

오징어 가공 부산물인 오징어 내장을 효소제제와 같이 식품 가공소재로 이용하기 위하여 오징어 내장의 endoprotease와 exopeptidase의 분포 특성에 대하여 살펴보았다. 오징어 내장은 조효소가 함유되어 있으리라 추정되는 단백질이 17.2%를 차지하였고, 또한, 이물질로 제거하여야 되는 조지방의 경우도 16.9%로 다량 차지하였다. 오징어 내장 조효소의 활성을 천연 기질(azocasein)과 합성기질(LeuPNA 및 ArgPNA)로 나누어 살펴 본 결과 추출 용매(탈이온수, 1% NaCl, 1% KCl 및 1% NaCl-KCl 혼합용액) 및 추출 시간(1-20시간)에 관계없이 전 조효소가 동일 pH에서 천연기질의 분해활성에 비하여 상대적으로 합성기질의 분해활성(pH7.5)이 높아, 오징어 내장으로부터 효소를 분리하여 이용하고자 하는 경우 exopeptidase를 분리하

여 이용하는 것이 적절하리라 판단되었다. 오징어 내장으로부터 exopeptidase를 분리하여 이용하고자 하는 경우 탈이온수를 이용하여 6-8시간 동안 추출하는 것이 가장 적절하리라 판단되었다. 오징어 내장 조효소의 최적 pH와 온도는 pH 7.5 및 50-55°C 범위로 판단되었다.

Key words: squid, squid viscera, endoprotease, exopeptidase, proteases, *Illex argentimus*.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지방대학육성지원(KRF-2004-002-F00053)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Okutani, T. (2005) Cuttlefishes and Squid of the World. Seizando. Tokyo. pp. 198.
- Ministry of Maritime Affairs and Fisheries (2007) <http://badasori.momaaf.go.kr/matrix/momaf/trans/trans.jsp>.
- Bihan, G. L., Perrin, A. and Koueta, N. (2007) Effect of different treatments on the quality of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) viscera. *Food Chemistry*. **104**, 345-352.
- Sukarno, K., Takahashi, M. Hatano and Sakurai, Y. (1996) Lipase from neon flying squid hepatopancreas: purification and properties. *Food Chem.* **57**, 515-521.
- Okzumi, M. and Huzii, T. (2000) Nutrition·Function Components of Squid. Seizando. Tokyo. pp. 135-139.
- Kim, J. S., Kim, J. G. and Cho, S. Y. (1997) Screening for the raw material of gelatin from the skins of some pelagic fishes and squid. *J. Korean Fish. Soc.* **30**, 55-61.
- Nagai, T., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N. and Suzuki, N. (2001) Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chemistry*. **72**, 425-429.
- Cho, S. Y., Joo, D. S., Park, S. H., Kang, H. J. and Jeon, J. K. (2000) Change of taurine content in squid meat during squid processing and taurine content in the squid processing waste water. *J. Korean. Fish. Soc.* **33**, 51-54.
- Kishimura, H., Saeki, H. and Hayashi, K. (2001) Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from the hepatopancreas of a squid (*Todarodes pacificus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. **130**, 117-123.
- Raksakulthai, R. and Haard, N. F. (2001) Purification and characterization of a carboxypeptidase from squid hepatopancreas (*Illex illecebrosus*). *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5019-5030.
- Raksakulthai, R., Rosenberg, M. and Haard, N. F. (2002) Accelerated cheddar cheese ripening with an aminopeptidase fraction from squid hepatopancreas. *J. Food Sci.* **67**, 923-929.
- Kolodziejaska, I., Pacana, J., Sikorski, Z. E. (1992) Effect of squid liver extract on proteins and on the texture of cooked squid mantle. *J. Food Biochem.* **16**, 141-150.
- Kim, S. M. (1999) Accelerating effect of squid viscera on the

- fermentation of Alaska pollack scrap sauce. *J. Food Sci. Nutr.* **4**, 103-106.
14. Raksakulthai, N., Lee Y. Z. and Harrd, N. F. (1986) Effect of enzyme supplements on the production of fish sauce from male capelin (*Mallotus villosus*). *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **19**, 28-33.
15. Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H. and Jones, K. M. (1986) Data for biochemical research, 3rd ed., Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 417-441.
16. AOAC. (1990) Official methods of analysis (15th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
18. Garcia-Carreno, F. L. and Haard, N. F. (1993) Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* **17**, 97-113.
19. Starky, P. M. (1977) Elastase and cathepsin G: the serine proteinases of human neutrophil leucocytes and spleen. In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, Barrett, A. J. ed. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 57-89.
20. Anson, M. I. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Physiol.* **22**, 79-89.
21. Kim, E. M., Cho, J. H., Oh, S. W. and Kim, Y. M. (1997) Characteristics of squid viscera oil. *J. Korean Fish. Soc.* **30**, 595-600.
22. Suyama, M., Konosu, S., Hamada, M. and Okuda, Y. (1983) Use of squid. *Kouseiya-kouseikaku*, pp. 52-100.
23. Seo, J. H., Jeong, Y. J., Lee, G. D. and Lee, M. H. (1999) Monitoring characteristics of protease isolated from squid viscera. *J. the east asian of dietary life.* **9**, 195-199.
24. Charney, J. and Tomarelli, R. M. (1947) A colorimetric method for determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Bio. Chem.* **171**, 501-505.
25. Heu, M. S. and Ahn, S. H. (1999) Development and fractionation of proteolytic enzymes from an inedible seafood product. *J. Korean Fish. Soc.* **32**, 458-465.
26. Shamsuzzaman, K. and Haard, N. F. (1984) Purification and characterization of chymotrypsin-like protease from the gastric mucosa of harp seal, *Pagophilus groenlandicus*. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **62**, 699-708.
27. Barrett A. J. and Kirschke, H. (1981) Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. In *Methods in Enzymology*, Vol. 80. L. Lorand ed Academic Press, Inc., New York, pp. 535-561.
28. Heu, M. S., Kim, H. R., Cho, D. M., Godber, J. S. and Pyeun, J. H. (1997) Purification and characterization of cathepsin L-like enzyme from the muscle of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.* **118B**, 523-529.
29. Yoshinaka, R., Sato, M. and Ikeda, S. (1981) Distribution of trypsin and chymotrypsi, and their zymogens in digestive system of catfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **47**, 1615-1618.
30. Smith, L. S. (1989) Digestive functions in teleost fishes. In *Fish Nutrition*, J. E. Halver ed. Academic Press, Inc., New York, pp. 387-389.
31. Chen, C. S., Tsao, C. Y. and Jiang, S. T. (1989) Purification and characterization of proteases from the viscera of mikfish, *Chanos chanos*. *J. Food Biochem.* **12**, 269-288.
32. Heu M. S., Kim, H. R. and Pyeun, J. H. (1995) Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**, 557-567.
33. Erlanger, B. F., Cooper, A. G. and Bendich, A. J. (1964) On the heterogeneity of three-times-crystallized a-chymotrypsin. *Biochemistry.* **3**, 1880-1883.