

원양산 오징어(*Illex argentinus*) 내장으로부터 Exopeptidase의 분획

김혜숙 · 김진수 · 허민수[†]

경상대학교 해양생명과학부/해양산업연구소

Fractionation of Exopeptidase from Viscera of Argentina Shortfin Squid, *Illex argentinus*

Hye-Suk Kim, Jin-Soo Kim, and Min Soo Heu[†]

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

Abstract

For the effective use of exopeptidase from squid viscera as food processing aids, the viscera of Argentina shortfin squid (*Illex argentinus*) were fractionated by various methods such as acetone treatment, ammonium sulfate treatment, anion exchange chromatography, and gel filtration. The positive exopeptidase fractions were obtained from the fraction II treated by cold acetone (30~40%, w/w), the fraction V by ammonium sulfate (60~70% saturation), the fraction II (0.2 M NaCl) by anion exchange chromatography, and the fraction I (30~50 kDa) by gel filtration. The specific activities of positive fractions from viscera of *Illex argentinus* against substrates were higher to LeuPNA than to ArgPNA. Total activity and recovery against LeuPNA of positive fraction by gel filtration were 1,867 U and 30.69%, respectively, which were the highest among those of positive fraction. The results suggested that the gel filtration chromatography method was the most efficient method for the fractionation of exopeptidase from viscera of *Illex argentinus*.

Key words: squid, squid viscera, exopeptidase, *Illex argentinus*, squid by-products

서 론

우리나라에서 오징어는 연근해에서 2003년 이래 현재까지 연간 약 123만1천 톤이 어획되고 있으며, 마른 오징어, 조미 오징어, 조미 냉동식품 및 젓갈 등과 같이 다양한 형태의 가공제품 원료로 사용되거나, 조리될 뿐만 아니라 횡감으로 즐겨 식용되고 있다. 그러나 오징어의 수요는 국내산만으로 부족하여 매년 아르헨티나 짧은 지느러미 오징어, 웰링톤 오징어, 빨강 오징어 및 아메리카 대왕 오징어 등과 같은 원양산 오징어를 매년 16만7천 톤 정도로 수입하고 있는 실정이다(1). 따라서 국내산 및 수입산 오징어를 소재로 하여 다양한 형태의 수산 가공품을 제조하고자 하는 경우 오징어 가공 소재인 머리, 다리 및 몸통과 같은 근육부의 생산은 물론이고, 근육부를 제외한 체장, 장, 간 및 직장 등으로 구성되어 있는 내장, 오징어 연골, 껍질 및 자숙수 등과 같은 부산물도 다량 발생하고 있다(2-4). 이들 오징어 가공 부산물 중 내장에는 효소, 지질 및 단백질이 다량 함유되어 있어 유용 식품 재자원(5,6)이나 일부만이 사료 등의 원료로 이용되고, 많은 양이 폐기되어 환경오염원으로 작용하고 있어, 이의 유효 이용에 관한 연구가 절실한 실정이다.

한편, 일반적으로 수산동물의 내장에는 여러 가지 효소가 다양하게 존재하고 있고, 이들의 대부분은 endoprotease가 주를 이루고 있다(7). 하지만, 이들 endoprotease는 식품산업에 응용하는 경우 분해 활성이 강하여 다량의 peptide를 생산하나, 이 중 말단이 소수성 아미노산으로 이루어져 있는 peptide가 대부분이어서 쓴맛을 나타냄으로 인하여 일부 식품가공 분야에서는 이용에 제한을 받고 있다. 이러한 일면에서 endoprotease를 응용한 쓴맛 가수분해물에 exopeptidase를 적용하여 쓴맛 peptide의 말단으로부터 소수성 아미노산을 유리하는 경우 식품가공 분야에서 이용 제한점인 쓴맛을 개선할 수 있으리라 판단된다(8-11). 하지만, exopeptidase는 고가이어서 식품산업에서 응용하는 경우 제조 단가가 상승함으로 인하여 이용에 제한을 받고 있다. 이러한 일면에서 오징어 내장과 같이 수산가공 부산물로부터 exopeptidase를 저렴하게 추출 및 분획할 수 있는 방법을 구명한다면 식품산업에서 보다 효율적으로 exopeptidase를 응용할 수 있을 것이라 생각된다.

하지만 오징어 내장으로부터 exopeptidase에 관한 연구로는 오징어 간 체장으로부터 분리한 aminopeptidase의 정제 및 특성(11) 및 carboxypeptidase의 정제 및 특성(12)에 관한

[†]Corresponding author. E-mail: heu1837@dreamwiz.com
Phone: 82-55-640-3177, Fax: 82-55-640-3170

연구와 같이 대부분이 정제에 관한 연구이고, 효율적인 분획 방법에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다.

본 연구에서는 원양산 오징어 내장 조효소를 아세톤 법, 황산암모늄 법, 음이온 교환 크로마토그래피법 및 겔 여과법과 같은 4종류의 분획법으로 분획한 다음, 각 fraction들의 단백질 함량, 합성기질(LeuPNA 및 ArgPNA)에 대한 효소 활성(총활성 및 비활성), 정제도 및 회수율 등으로 최적 분획 조건을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 원양산 오징어 내장은 포클랜드 근해에서 어획된 아르헨티나 짧은 지느러미 오징어(Argentine short-fin squid, *Illex argentinus*, length: 51.5 ± 1.5 cm, weight: 488.7 ± 55.2 g)로부터 분리한 내장(length: 28.7 ± 5.5 cm, weight: 108.2 ± 3.8 g)을 경상남도 통영시 소재의 재래식 시장(서호시장)에서 동결상태로 2004년 3월에 구입하여, 냉동상태(-70°C)로 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

시약 및 buffer

Exopeptidase 활성 측정용 기질인 LeuPNA(L-Leucine-p-nitroanilide) 및 ArgPNA(L-Arginine-p-nitroanilide)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을, 기타 시약은 분석급으로 구입하여 사용하였다. 그리고 효소활성 측정에 사용한 완충액인 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.5)는 Dawson 등(13)의 방법에 따라 조제하여 사용하였다.

조효소의 추출 및 단백질 농도

원양산 오징어 내장으로부터 조효소 추출은 Kim 등(14)의 방법에 따라 다음과 같은 공정에 의하여 실시하였다. 냉동상태의 원양산 오징어 내장을 부분해동 및 마쇄한 다음, 마쇄한 오징어 내장(100 g)에 대하여 3배(v/w)의 탈 이온수를 가하여 혼합한 후, 6시간 동안 교반(20°C)하여 추출하였다. 이어서 조효소 추출물에 0.2배량(v/v)의 사염화탄소(CCl_4)를 가하고 혼합한 다음, 원심분리($12,000 \times g$, 20 min)하여 탈지된 상층액을 조효소로서 사용하였다.

조효소의 단백질 농도는 Lowry 등(15)의 비색법에 따라 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 구한 검량곡선으로부터 측정하였다.

Exopeptidase 활성

Exopeptidase의 활성 측정은 LeuPNA 및 ArgPNA를 기질로 사용하는 Garcia-Carreno와 Haard(16)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 즉, $10 \sim 20 \mu\text{L}$ 의 조효소를 test tube에 취하고, 여기에 0.2 mM 기질이 용해되어 있는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.5)를 1 mL 가한 다음 혼합 및 반응(50°C , 1 hr)시켰다. 이어서 반응액에 0.3 mL의 33% 초산용

액을 가하여 exopeptidase를 실험 시킨 다음 정지(30 min) 및 원심분리($146 \times g$, 20 min)한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하여 exopeptidase의 활성을 검토했다. 효소 활성 단위는 1 mg의 효소(단백질)가 1시간 동안 변화시키는 흡광도 0.1 digit을 1 U/mg으로 나타내었다.

효소 분획

오징어 내장 조효소로부터 exopeptidase의 분획은 4가지 분획법(아세톤, 황산암모늄, 음이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과)에 의하여 실시하였다.

유기용매에 의한 분획은 조효소에 대하여 냉 아세톤(-20°C)을 0~30, 30~40, 40~50, 50~60 및 60~70%의 최종 농도가 되도록 순차적으로 5개의 fraction으로 분획하였다. 이어서 순차적으로 분획한 fraction을 원심분리($12,000 \times g$, 20 min)한 다음 그 잔사에 대하여 최소량의 탈 이온수로 용해 및 투석하여 fraction별 특성을 조사하기 위한 시료로 사용하였다.

염류에 의한 분획은 조효소에 대하여 황산암모늄을 0~30, 30~40, 40~50, 50~60, 60~70 및 70~80%의 포화농도가 되도록 순차적으로 6개의 fraction으로 분획하였다. 이어서 포화농도별로 분획한 fraction들을 원심분리($12,000 \times g$, 20 min)한 다음 그 잔사에 대하여 최소량의 탈 이온수로 용해 및 투석하여 fraction별 특성을 조사하기 위한 시료로 사용하였다.

이온강도 차이에 의한 분획은 조효소(50 mL)를 DEAE-Sephacel CL-6B column(i.d. 2.6×15 cm)에 주입하고, 탈 이온수(200 mL)로 용출하면서 단백질을 흡착시킨 다음, 이어서 이온강도가 다른 100 mL의 용출액(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 및 1.0 M의 NaCl)으로 일정한 유속(25 mL/hr)으로 단계별로 분취(25 mL)하여 1개의 비흡착 fraction과 6개의 흡착 fraction을 얻었고, 이를 농축 및 투석하여 fraction별 특성을 조사하기 위한 시료로 사용하였다.

분자량의 크기에 따른 분획은 조효소(5 mL)를 Sephadex G-50 column(i.d. 1.6×95 cm)에 주입하고, 0.1 M NaCl을 함유하는 sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 이용하여 일정한 유속(40 mL/hr)으로 용출(3 mL/tube)시켜 이를 10회 반복 실시하였다. Chromatogram 상의 단백질 농도곡선(파장 280 nm)과 LeuPNA기질에 대한 효소활성 분포를 측정하여 활성 fraction을 분획하였다. 이들 활성 fraction을 한외여과막(MWCO 10 kDa, Centriplus YM-10, Millipore Co., USA)을 사용하여 농축한 후 fraction별 특성을 조사하기 위한 시료로 사용하였다.

결과 및 고찰

아세톤에 의한 exopeptidase의 분획 및 특성

원양산 오징어 내장 조효소에 대하여 냉 아세톤(-20°C)으로 분획한 각 fraction의 LeuPNA 및 ArgPNA에 대한 exo-

peptidase의 분해 활성과, 회수율은 Table 1과 같다. 아세톤으로 분획한 5종 fraction의 LeuPNA에 대한 비활성 및 정제도는 fraction II가 각각 16.80 U/mg 및 3.60배로 가장 높았고, 다음으로 fraction III(각각 7.59 U/mg 및 1.63배), I(각각 5.29 U/mg 및 1.14배)의 순이었다. 각 fraction의 LeuPNA에 대한 회수율은 조효소에 대한 총 회수율의 경우 17.62%로 감소되었고, 이들 fraction 중 fraction I, II 및 III의 경우 각각 1.25%, 12.16% 및 3.42%로서 모두 16.83%가 회수되어 전체의 96%로 대부분을 차지하였다. 그리고 각 fraction의 총활성은 fraction II가 2,071.10 U로 가장 높았고, 다음으로 fraction III(583.14 U), I(213.00 U) 및 V(69.00 U)의 순이었으며, fraction IV는 64.97 U로 가장 낮았다.

한편, 아세톤으로 분획한 5종 fraction의 ArgPNA에 대한 비활성 및 정제도는 fraction II가 각각 16.40 U/mg 및 6.79배로 가장 높았고, 다음으로 fraction III(각각 6.26 U/mg 및 2.59배) 및 I(각각 3.38 U/mg 및 1.40배), V(각각 1.21 U/mg 및 0.50배) 및 IV(각각 1.15 U/mg 및 0.48배)의 순이었다. 각 fraction의 ArgPNA에 대한 회수율은 조효소에 대한 총 회수율의 경우 31.25%로 감소되었고, 이들 fraction 중 fraction II 및 III의 경우 각각 22.91% 및 5.45%로서 28.36%가 회수되어 전체의 91%로 대부분을 차지하였다. 각 fraction의 ArgPNA에 대한 총활성은 fraction II가 2,021.79 U로 가장 높았고, 다음으로 fraction III(481.00 U) 및 I(135.97 U)의 순이었으며, fraction IV 및 V가 각각 65.70 U 및 54.00 U로 대체로 낮은 편이었다.

이상의 비활성 및 정제도로 검토한 결과에서 조효소로부터 아세톤으로 0~30%, 30~40% 및 40~50% 최종농도로 분획 처리한 fraction의 경우, exopeptidase의 분획 효과가 인정되었으며, 총활성 및 회수율을 고려한 최적 활성 fraction은 두 종의 기질(LeuPNA 및 ArgPNA) 모두에서 frac-

tion II이었다. 또한, fraction II는 기질 종류 간 총활성 및 비활성과 같은 분해활성은 차이가 인정되지 않았으나, 정제도 및 회수율은 ArgPNA 경우가 LeuPNA 경우보다 우수하였다. 따라서 fraction II를 실제 가공 중에 적용하는 경우 Leu를 말단으로 하는 peptide에보다는 Arg를 말단으로 하는 peptide에 보다 잘 작용하리라 판단되었다.

한편, 아세톤 분획법의 단점으로는 용해도 차이에 의한 분획방법이므로 주변온도에 따라 분획효과가 차이가 있고, 고농도 처리 시 시료량보다 사용되는 아세톤의 양이 많을 수 있으며, 분획 후 폐 아세톤이 발생할 수 있다는 점 등을 들 수 있다. 따라서 아세톤 분획방법은 탈수 및 탈지가 동시에 이루어지기 때문에 각 fraction의 분말화가 용이한 점, 투석과정이 필요 없다는 점 등의 장점이 있어, 폐 아세톤의 회수 장치를 이용하고, 저온의 일정한 조건에서 단백질의 변성을 최소화 한다면, 효과적으로 목적효소를 분획하는데 이용 가능하리라 생각된다(7).

황산암모늄에 의한 exopeptidase의 분획 및 특성

원양산 오징어 내장 조효소로부터 황산암모늄으로 분획한 각 fraction의 LeuPNA 및 ArgPNA에 대한 분해활성, 회수율 및 정제도를 살펴 본 결과는 Table 2와 같다. 황산암모늄으로 분획한 6종 fraction의 LeuPNA에 대한 비활성 및 정제도는 fraction V가 각각 57.00 U/mg 및 12.23배로 가장 높았고, 다음으로 fraction VI(각각 43.42 U/mg 및 9.32배), IV(각각 34.04 U/mg 및 7.30배), I(각각 32.02 U/mg 및 6.87배), III(각각 14.75 U/mg 및 3.16배) 및 II(각각 13.55 U/mg 및 2.91배)의 순으로 6종의 fraction 모두 분획효과가 인정되었다. 각 fraction의 LeuPNA에 대한 회수율은 조효소에 대한 총 회수율이 46.30%로 감소되었고, 이들 fraction 중 fraction IV, V 및 VI의 경우 각각 16.93%, 14.78% 및 7.94%

Table 1. Exopeptidase activities of fractions obtained from the crude extracts of squid viscera by the acetone fractionation toward LeuPNA and ArgPNA as substrates

Substrate	Fraction ¹⁾	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
LeuPNA	CE	140.00	26.10	17,033.22	4.66	100.00	1.00
	I	10.65	3.78	213.00	5.29	1.25	1.14
	II	33.50	3.68	2,071.10	16.80	12.16	3.60
	III	13.00	5.91	583.14	7.59	3.42	1.63
	IV	7.30	7.84	64.97	1.14	0.38	0.24
	V	5.00	8.95	69.00	1.54	0.41	0.33
ArgPNA	CE	140.00	26.10	8,825.60	2.42	100.00	1.00
	I	10.65	3.78	135.97	3.38	1.54	1.40
	II	33.50	3.68	2,021.79	16.40	22.91	6.79
	III	13.00	5.91	481.00	6.26	5.45	2.59
	IV	7.30	7.84	65.70	1.15	0.74	0.48
	V	5.00	8.95	54.00	1.21	0.61	0.50

¹⁾CE, crude extracts; I, 0~30% fraction; II, 30~40% fraction; III, 40~50% fraction; IV, 50~60% fraction; V, 60~70% fraction. Total activity (U)=total volume (mL)×protein (mg/mL)×specific activity (U/mg). Specific activity=total activity (U)/ total protein (mg). % Recovery=(total activity/ total activity of CE)×100. Purification fold=specific activity/ specific activity of CE.

Table 2. Exopeptidase activities of fractions obtained from the crude extracts of squid viscera by the ammonium sulfate fractionation toward LeuPNA and ArgPNA as substrates

Substrate	Fraction ¹⁾	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
LeuPNA	CE	200.00	26.10	24,333.17	4.66	100.00	1.00
	I	5.40	1.04	179.82	32.02	0.74	6.87
	II	10.40	4.65	655.20	13.55	2.69	2.91
	III	11.10	4.79	784.40	14.75	3.22	3.16
	IV	35.70	3.39	4,119.78	34.04	16.93	7.30
	V	15.70	4.02	3,597.39	57.00	14.78	12.23
ArgPNA	VI	6.40	6.95	1,931.52	43.42	7.94	9.32
	CE	200.00	26.10	12,608.00	2.42	100.00	1.00
	I	5.40	1.04	180.36	32.12	1.43	13.30
	II	10.40	4.65	414.96	8.58	3.29	3.55
	III	11.10	4.79	446.22	8.39	3.54	3.47
	IV	35.70	3.39	1,720.74	14.22	13.65	5.89
	V	15.70	4.02	1,370.61	21.72	10.87	8.99
	VI	6.40	6.95	656.00	14.75	5.20	6.11

¹⁾CE, crude extracts; I, 0~30% saturated fraction; II, 30~40% saturated fraction; III, 40~50% saturated fraction; IV, 50~60% saturated fraction; V, 60~70% saturated fraction; VI, 70~80% saturated fraction.

로서 39.65%가 회수되어 전체의 86%로 대부분을 차지하였다. 각 fraction의 LeuPNA에 대한 총활성은 fraction IV가 4,119.78 U로 가장 높았고, 다음으로, fraction V(3,597.39 U), VI(1,931.52 U), III(784.40 U) 및 II(655.20 U)의 순이었으며, fraction I이 179.82 U로 가장 낮았다. 이상의 결과로 미루어 보아 원양산 오징어 내장 조효소 유래 황산암모늄으로 분획한 fraction의 LeuPNA에 대한 총활성 및 회수율은 fraction IV가 우수한 반면, fraction V는 비활성 및 정제도가 우수하였다.

한편, 황산암모늄으로 분획한 6종 fraction의 ArgPNA에 대한 비활성 및 정제도는 fraction I이 각각 32.12 U/mg 및 13.30배로 가장 높았고, 다음으로 fraction V(각각 21.72 U/mg 및 8.99배), VI(각각 14.75 U/mg 및 6.11배), IV(각각 14.22 U/mg 및 5.89배), II(각각 8.58 U/mg 및 3.55배)의 순이었으며, fraction III의 경우 각각 8.39 U/mg 및 3.47배로 다른 fraction들에 비하여 낮았다. 이와 같이 황산암모늄 분획 fraction의 ArgPNA에 대한 비활성 및 정제도로 미루어 보아 조효소를 황산암모늄으로 분획 처리하는 경우 전 fraction에서 exopeptidase의 정제 효과가 확연히 인정되었고, 그 중에서도 특히 0~30% 포화농도 범위에서 황산암모늄으로 분획 처리하는 경우 그 효과가 가장 우수하였다. 각 fraction의 ArgPNA에 대한 회수율은 조효소에 대한 총 회수율의 경우 37.98%로 감소되었고, 이들 fraction 중 fraction IV, V 및 VI의 경우 각각 13.65%, 10.87% 및 5.20%로서 29.72%가 회수되어 전체의 78%로 대부분을 차지하였다. 각 fraction들의 ArgPNA에 대한 총활성은 fraction IV가 1,720.74 U로 가장 높았고, 다음으로 fraction V(1,370.61 U), VI(656.00 U), III(446.22 U), II(414.96 U) 및 I(180.36 U)의 순이었다.

이상의 결과로 미루어 보아 조효소로부터 황산암모늄으로

로 60~70% 포화농도가 되도록 분획한 fraction V는 나머지 5종 fraction에 비하여 두 종의 기질(LeuPNA 및 ArgPNA) 모두에서 비활성 및 정제도 면에서 우수하였고, 두 종의 기질 간에는 LeuPNA의 분해활성이 ArgPNA 분해활성에 비하여 높은 것으로 나타났다.

Heu와 Ahn(7)은 멸치, 넙치, 고등어 및 참돔의 내장 조효소로부터 30~70% 황산암모늄 fraction의 ArgMNA에 대한 exopeptidase 분해활성의 경우 혈합육 어류인 멸치와 고등어가 백색육 어류인 넙치 및 참돔에 비하여 매우 강하다고 보고하여, 어류 종에 따라 분포하는 효소에 차이가 있음을 암시하였으며, 분획방법(아세톤 및 황산암모늄 분획법) 간에도 exopeptidase의 활성분포에 차이가 있다고 보고한 바 있다. 또한, Raksakulthai와 Haard(11)은 오징어(*Illex illecebrosus*) 간체장(Hepatopancreas) 조효소의 20~80% 황산암모늄 fraction의 LeuPNA 기질에 대한 정제도 및 회수율의 경우 각각 2.84배 및 34.97%로 보고한 바 있고, Chiou 등(17)은 송어알의 30~60% 황산암모늄 fraction의 LeuPNA 기질에 대한 정제도 및 회수율의 경우 각각 1.1배 및 75%라고 보고한 바 있다. 그리고 Nishimura 등(18)은 소 골격근의 45~65% 황산암모늄 fraction의 LeuNA 기질에 대한 정제도 및 회수율의 경우 2.0배 및 67.6%라고 보고한 바 있고, Nishiwaki와 Hayashi(19)는 흰 잎새버섯(*Grifola frondosa*)의 0~70% 황산암모늄 fraction의 LeuPNA 기질에 대한 정제도 및 회수율의 경우 각각 2.0배 및 48.8%이었다고 보고한 바 있다. 이상의 보고로 미루어 보아, 황산암모늄 분획의 경우, 효소 기원의 차이, 포화농도 범위에 따라 exopeptidase의 정제도 및 회수율에 차이를 보였으며, exopeptidase의 정제도가 높을수록 회수율은 낮은 경향이였다.

따라서, 오징어 내장 조효소로부터 황산암모늄을 이용하여 peptide의 말단 중 Leu 및 Arg의 절단 특성이 강한 exo-

peptidase를 주로 하는 fraction을 분획하고자 하는 경우 총 활성, 회수율, 비활성 및 정제도를 같이 고려하여, 오징어 내장 조효소에 황산암모늄의 60~70%(fraction V) 포화농도가 되도록 가하고 염석 및 투석하여 조제하는 것이 적절하리라 판단되었다.

한편, 황산암모늄 분획법은 용해도 차이에 의한 분획법이므로 주변 온도의 영향을 받아 분획 효과에 차이를 보이고, 고품상의 황산암모늄을 사용함으로써 목적하는 포화농도로의 평형화에 시간이 다소 걸리며, 황산암모늄 입자주위에 과포화가 일어날 수 있고, 용해 과정 중에 과도한 교반으로 단백질 변성이 야기될 수 있으며, 염을 사용함으로써 각 fraction에 염이 함께 존재함으로써 탈염조작이 필요하고, 분획 후 황산암모늄 용액이 부산물로 발생하는 점 등의 단점이 있다(7). 따라서 황산암모늄에 의한 분획방법은 대량처리를 위한 분획에 이용 가능하나, 이로 인한 폐 염류용액 처리 및 회수 방법 그리고, 탈염을 위한 방안을 마련해야 할 것으로 생각된다.

음이온 교환 크로마토그래피에 의한 exopeptidase의 분획 및 특성

원양산 오징어 내장 조효소를 음이온 교환 크로마토그래피에 흡착시킨 다음, 비흡착 fraction(UF)과 흡착 단백질을 NaCl 용액으로 이온강도별로 분획한 fraction들의 chromatogram은 Fig. 1과 같다. 원양산 오징어 내장 조효소로부터 음이온 교환 크로마토그래피를 통하여 흡착되지 않은 1개의 fraction(UF)과 NaCl 용액의 이온강도 차이에 의한 6종의 fraction을 분획하였다.

비흡착 fraction인 UF 및 이온강도별 6종 fraction(I - VI)들의 LeuPNA 및 ArgPNA에 대한 분해활성, 회수율 및 정제도의 결과는 Table 3에 나타내었다. 비흡착 fraction인

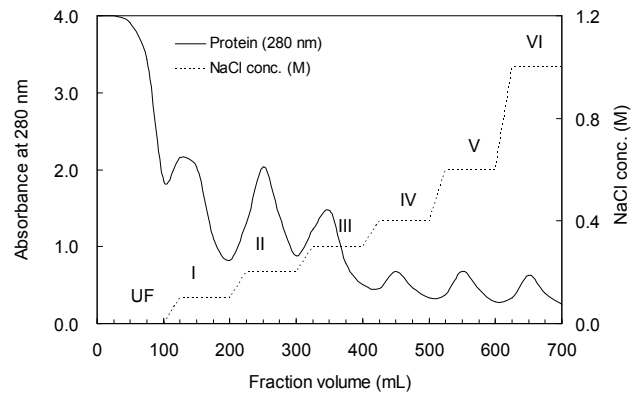


Fig. 1. DEAE-Sepharose CL-6B anion exchange chromatogram of the crude extracts of squid viscera.

Crude extracts were eluted with 100 mL of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing different NaCl concentration by stepwise elution. Fraction volume and flow rate were 25 mL and 25 mL/hr, respectively. Each fractions were pooled and concentrated by salting-in with 0~80% saturated ammonium sulfate. CE, crude extracts; UF, unadsorbed fraction; I, 0.1 M NaCl fraction; II, 0.2 M NaCl fraction; III, 0.3 M NaCl fraction; IV, 0.4 M NaCl fraction; V, 0.6 M NaCl fraction; VI, 1.0 M NaCl fraction.

UF를 포함한 7종 fraction들의 LeuPNA에 대한 비활성 및 정제도는 fraction II가 각각 34.49 U/mg 및 7.41배로 가장 높았고, 다음으로 fraction I(각각 25.48 U/mg 및 5.47배), III(각각 21.08 U/mg 및 4.53배), UF(각각 16.16 U/mg 및 3.47배) 및 IV(각각 11.50 U/mg 및 2.47)의 순이었으며, fraction V(각각 6.09 U/mg 및 1.31배) 및 VI(각각 4.97 U/mg 및 1.07배)의 경우 조효소와 큰 차이가 없어 LeuPNA를 분해할 수 있는 exopeptidase에 대한 분획 효과를 기대할 수 없었다. 7종 fraction의 총 회수율은 21.59%이었고, 여기서 UF, fraction I 및 II의 총 회수율은 19.84%로 전체의 약 92%를 차지하여 대부분을 차지하였다. 각 fraction들의 LeuPNA에

Table 3. Exopeptidase activities of fractions obtained from the crude extracts of squid viscera by the anion exchange chromatography toward LeuPNA and ArgPNA as substrates

Substrate	Fraction ¹⁾	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
LeuPNA	CE	50.00	26.10	6,076.19	4.66	100.00	1.00
	UF	7.00	2.81	317.80	16.16	5.23	3.47
	I	6.50	1.46	241.80	25.48	3.98	5.47
	II	8.00	2.34	645.60	34.49	10.63	7.41
	III	1.70	1.80	64.52	21.08	1.06	4.53
	IV	0.70	2.80	22.54	11.50	0.37	2.47
	V	0.50	4.90	14.93	6.09	0.25	1.31
VI	0.20	4.30	4.27	4.97	0.07	1.07	
ArgPNA	CE	50.00	26.10	3,156.50	2.42	100.00	1.00
	UF	7.00	2.81	195.30	9.93	6.19	4.10
	I	6.50	1.46	178.75	18.84	5.66	7.79
	II	8.00	2.34	393.20	21.00	12.46	8.68
	III	1.70	1.80	40.72	13.31	1.29	5.50
	IV	0.70	2.80	16.66	8.50	0.53	3.51
	V	0.50	4.90	11.55	4.71	0.37	1.95
VI	0.20	4.30	4.83	5.62	0.15	2.32	

¹⁾Fractions are the same as explained in footnote of Fig. 1.

대한 총활성은 fraction II가 645.60 U로 가장 높았고, 다음으로 UF(317.80 U) 및 fraction I (241.80 U) 등의 순이었으며, 나머지 fraction들의 경우 4.27~64.52 U 범위에 있었다. 이상에서 검토한 총활성, 비활성 및 회수율은 음이온 교환 크로마토그래피로 분획한 fraction 중 fraction II가 가장 높아, fraction II가 LeuPNA를 분해할 수 있는 exopeptidase가 가장 다량 함유되어 있다고 판단되었다.

한편, 6종 fraction과 비흡착 fraction인 UF의 ArgPNA에 대한 비활성 및 정제도는 fraction II가 각각 21.00 U/mg 및 8.68배로 가장 높았고, 다음으로 fraction I (각각 18.84 U/mg 및 7.79배), III(각각 13.31 U/mg 및 5.50배), UF(각각 9.93 U/mg 및 4.10배), IV(각각 8.50 U/mg 및 3.51배) 및 VI (각각 5.62 U/mg 및 2.32배)의 순이었으며, fraction V의 경우 각각 4.71 U/mg 및 1.95배로 가장 낮았다. 이들 fraction의 총 회수율은 26.65%이었고, fraction UF, I 및 II의 총 회수율은 24.31%로 전체의 91%로 대부분을 차지하였다. 음이온 교환 크로마토그래피로 분획한 fraction들의 ArgPNA에 대한 총활성은 fraction II가 393.20 U로 가장 높았고, 다음으로 UF(195.30 U), fraction I (178.75 U) 등의 순이었으며, 나머지 fraction들의 경우도 4.83~40.72 U 범위에 있었다. 이상에서 검토한 ArgPNA 기질에 대한 총활성, 비활성 및 회수율은 fraction II 가장 높아, ArgPNA를 분해할 수 있는 exopeptidase가 다량 함유되어 있으리라 판단되었다.

이상의 결과로 미루어 보아 fraction II가 나머지 6종 fraction에 비하여 두 종의 기질(LeuPNA 및 ArgPNA)에 대한 분해활성, 회수율 및 정제도 면에서 우수하였고, 두 종의 기질 간에는 LeuPNA를 기질로 한 경우가 ArgPNA를 기질로 한 경우보다 분해활성, 회수율 및 정제도가 높았다.

한편, Vo 등(20)은 정어리 내장 조효소로부터 ion exchange chromatography로 분획한 fraction의 LeuBNA에 대한 정제도 및 회수율의 경우 각각 36배 및 79%라고 보고한 바 있고, Umetsu 등(21)은 가리비(*scallop, Patinopecten yessoensis*)의 중장선(midgut gland) 조효소로부터 이온 교환 크로마토그래피로 분획한 fraction의 LeuPNA에 대한 정제도 및 회수율의 경우 각각 16배 및 46.7%라고 보고한 바 있다. 이들 보고로 미루어 보아 aminopeptidase는 0.1~0.2 M의 저염 농도에서 LeuPNA에 대한 분해활성이 높은 fraction이 검출되었으며, 본 연구 결과의 fraction II(0.2 M NaCl)와도 유사한 경향을 나타내었다.

따라서 음이온 교환 크로마토그래피에 의하여 peptide의 말단 중 Leu 및 Arg의 분해 특성이 강한 exopeptidase를 주로 하는 fraction을 분획하고자 하는 경우 음이온 교환 수지에 오징어 내장 조효소를 흡착시킨 다음 여기에 0.2 M NaCl 용액으로 분획하고 염석 및 투석하여 조제하는 것이 적절하리라 판단되었다.

한편 이온교환크로마토그래피 분획방법의 장점은 대량 처리를 위한 회분식 분획의 경우, 상온에서 비교적 단시간

에 이용 가능하며, 용해도 차이에 의한 분획방법보다 분획 효과가 있는 반면, ion exchange matrix가 고가인 점, 하전에 의한 분획방법이므로 분획을 위하여 각기 이온강도가 다른 용액을 사용하여야 하고, 상온에서의 단백질변성을 최소화하기 위해 저온에서 실행하여야 하며, 1회 처리 후 재사용을 위해 ion exchange matrix의 regeneration 과정을 거쳐야 하고, 분획 후 이온강도의 차이를 위해 사용한 염이 각 fraction에 함께 존재함으로써 탈염작업이 필요하며, 경우에 따라 fraction의 농축과정이 필요한 점 등과 같은 단점이 있어, 탈염 및 농축을 위한 방안을 마련하여야 할 것으로 생각된다.

겔 여과에 의한 exopeptidase의 분획 및 특성

원양산 오징어 내장 조효소로부터 Sephadex G-50 겔 여과로 분획한 각 fraction의 LeuPNA 및 ArgPNA에 대한 총활성과 단백질 농도에 대한 chromatogram은 Fig. 2와 같다. 겔 여과를 통해 단백질 농도곡선(A 280)과 LeuPNA 및 ArgPNA에 대한 분해활성 분포로부터 분자량 크기별로 fraction I (fraction No. 22~36, 30~50 kDa 범위) 및 II (fraction No. 40~54, 분자량 15~24 kDa 범위)와 같이 2종의 fraction을 분획하였다.

오징어 내장 조효소로부터 Sephadex G-50 겔 여과로 분획한 fraction I 및 II의 LeuPNA 및 ArgPNA에 대한 분해활성, 회수율 및 정제도의 결과는 Table 4와 같다. 각 fraction의 LeuPNA에 대한 비활성 및 정제도는 fraction I 이 각각 35.26 U/mg 및 7.56배로, fraction II의 각각 5.74 U/mg 및 1.23배에 비하여 높았다. 이들 두 fraction의 조효소에 대한 총 회수율은 33.71%이었고, 이 중 fraction I 이 30.69%로 대부분을 차지하였으며, LeuPNA에 대한 총활성은 fraction

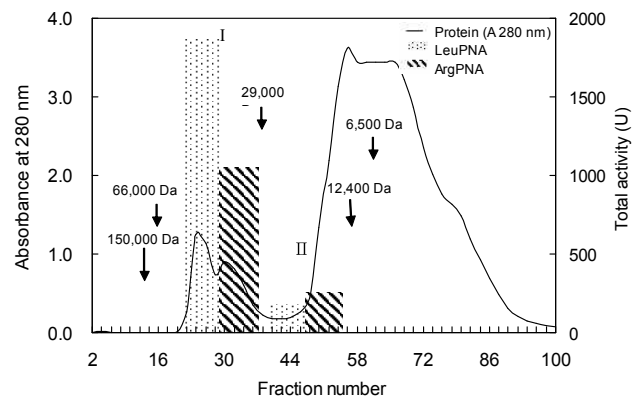


Fig. 2. Sephadex G-50 gel chromatogram of the crude extracts of squid viscera.

Crude extracts were eluted with 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing 0.1 M NaCl. Fraction volume and flow rate were 3 mL and 40 mL/hr, respectively. Each fractions were pooled and concentrated by salting-in with 0~80% saturated ammonium sulfate. I, 30~50 kDa fraction; II, 15~24 kDa fraction. Standards for gel filtration: alcohol dehydrogenase (150,000 Da), albumin bovine serum (66,000 Da), carbonic anhydrase (29,000 Da), cytochrome C (12,400 Da), aprotinin (6,500 Da).

Table 4. Exopeptidase activities of fractions obtained from the crude extracts of squid viscera by the gel filtration chromatography toward LeuPNA and ArgPNA as substrates

Fraction ¹⁾	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
LeuPNA	CE	50.00	26.10	6,083.29	4.66	100.00
	I	16.60	3.19	1,867.09	35.26	30.69
	II	14.28	2.24	183.45	5.74	3.02
ArgPNA	CE	50.00	26.10	3,152.00	2.42	100.00
	I	16.60	3.19	1,054.10	19.91	33.44
	II	14.28	2.24	256.25	8.01	8.13

¹⁾CE, crude extracts; I, 30~50 kDa fraction; II, 15~24 kDa fraction.

I 이 1,867.09 U로, fraction II의 183.45 U에 비해 10.2배 높았다.

Fraction I 및 II의 ArgPNA에 대한 비활성 및 정제도는 fraction I 이 각각 19.91 U/mg 및 8.24배로, fraction II의 각각 8.01 U/mg 및 3.32배에 비하여 높았으며, 각 fraction의 ArgPNA에 대한 총 회수율은 41.57%이었고, fraction I 이 33.44%로 대부분을 차지하였다. 이들 fraction의 ArgPNA에 대한 총활성은 fraction I 이 1,054.10 U로, fraction II의 256.25 U에 비하여 4.1배 높았다.

이상의 결과에서 원양산 오징어 내장 조효소로부터 겔 여과로 분획한 fraction I 은 fraction II에 비하여 두 종의 기질(LeuPNA 및 ArgPNA) 모두에 대하여 분해활성과 회수율이 높았고, 두 종의 기질 간에는 LeuPNA보다는 ArgPNA의 분해활성, 회수율 및 정제도가 높았다.

Kurokawa와 Suzuki(22)은 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 유어의 소장 brush border의 조효소로부터 겔 여과로 분획한 fraction(170 kDa)의 LeuBNA 기질에 대한 비활성의 경우 조효소에 대해 19.3배로 증가하였다고 보고한 바 있고, Perez-Guzman 등(23)은 *Latococcus lactis* sub sp. *cremoris* NRRL 634로부터 gel filtration으로 분획한 fraction(80 kDa)의 Arg-ProPNA 기질에 대한 정제도 및 회수율의 경우 각각 5.1배 및 50.2%이었다고 보고한 바 있다.

이상의 결과와 보고로 미루어, 겔 여과에 의한 분획이 정제도 및 회수율 측면에서 효과적인 것으로 판단되었다. 따라

서 Sephadex G-50을 이용한 겔 여과에 의해 오징어 내장 조효소로부터 고 활성 aminopeptidase를 분획하고자 하는 경우 30~50 kDa 범위의 분자량 분포를 보이는 fraction I 을 분획 및 투석하여 조제하는 것이 가장 좋으리라 판단되었다.

한편, 겔 여과 분획방법에 따른 단점은 분자량 크기에 의한 분획방법이므로 분획효과를 높이기 위해 가늘고 긴 column을 사용하여야 하고, 1회 처리량이 본 실험에 사용한 분획 방법 중에 가장 적으며, 상온에서의 단백질 변성을 최소화하기 위해 저온에서 실행하여야 하고, 경우에 따라 fraction의 농축과정이 필요한 점 등을 들 수 있다. 따라서 gel filtration matrix를 이용한 분획방법은 재현성과 연속처리가 가능하고, 분획 후 별도의 처리(탈염 및 농축)가 최소화 되는 점으로 미루어 보아 단백질 유전자원의 분획에 효과적이라고 할 수 있으며, 단점인 대량처리를 위한 산업화 공정의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

분획방법의 상호비교

오징어 내장 조효소로부터 4종류의 분획방법(아세톤, 황산암모늄, 음이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과)을 이용하여 얻은 최적 fraction들을 대상으로 exopeptidase의 효율적 분획방법을 검토하였다. 이를 위하여 각 분획방법별 조효소의 1회 기준 처리량을 50 mL로 해서, 총활성, 비활성, 회수율 및 정제도에 대해 상호 비교하여 Table 5에 나타내었다. 분획방법에 따른 오징어 내장 조효소 유래 exopeptidase의

Table 5. Comparison of exopeptidase activities of fractions obtained from the crude extracts of squid viscera by different fractionation methods toward LeuPNA and AgrPNA as substrates

Fractionation Methods	Substrate	Total activity (U) ¹⁾	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extracts	LeuPNA	6,083.29	4.66	100.00	1.00
	ArgPNA	3,152.00	2.42	100.00	1.00
Acetone (II, 30~40%)	LeuPNA	739.73	16.80	12.16	3.60
	ArgPNA	722.12	16.40	22.91	6.79
Ammonium sulfate (V, 60~70%)	LeuPNA	899.11	57.00	14.78	12.23
	ArgPNA	342.62	21.72	10.87	8.99
Anion exchange chromatography (II, 0.2 M)	LeuPNA	646.65	34.49	10.63	7.41
	ArgPNA	392.74	21.00	12.46	8.68
Gel chromatography (I, 30~50 kDa)	LeuPNA	1,866.96	35.26	30.69	7.56
	ArgPNA	1,054.03	19.91	33.44	8.24

¹⁾Total activities (U) were calculated based on the 50 mL of CE.

LeuPNA에 대한 총활성 및 회수율은 겔 여과 분획법이 각각 1,866.96 U 및 30.69%로 가장 효율적이었고, 다음으로는 황산암모늄(899.11 U 및 14.78%), 아세톤(739.73 U 및 12.16%)의 순이었으며, 음이온교환 크로마토그래피가 각각 646.65 U 및 10.63%로 분획효율이 가장 낮았다. 또한 분획방법에 따른 오징어 내장 조효소 유래 exopeptidase의 ArgPNA에 대한 총활성 및 회수율의 결과도 같은 경향을 나타내었다.

이와 같은 결과로 미루어 보아 산업성을 고려하여 오징어 내장 조효소로부터 경제성을 가진 exopeptidase를 분획하고자 하는 경우 탈 이온수로 원양산 오징어 내장으로부터 조효소를 추출한 다음 겔 여과를 이용하여 분자량 30~50 kDa 범위의 fraction을 분획하여 제조하는 것이 적절하리라 판단되며, 이와 같은 방법으로 분획한 fraction은 그 기질 특이성으로 보아 peptide 말단으로부터 Arg보다는 Leu에 대한 분해능이 강하리라 추정되었다.

따라서 오징어 가공부산물인 내장으로부터 산업적 이용을 가능하게 하기 위해서는 겔 여과의 장점인 높은 재현성과 회수율을 실현하고, 1회 처리량이 적은 단점을 획기적으로 개선한 연속 및 대량처리가 가능한 scale-up 공정개발이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

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

요 약

원양산 오징어 내장 조효소로부터 아세톤법, 황산암모늄법, 음이온교환 크로마토그래피법 및 겔 여과법을 이용하여 exopeptidase를 분획한 다음, 각 분획방법별 fraction들의 효소 활성(총활성 및 비활성), 정제도 및 회수율 등을 검토하여 최적 분획조건을 구명하고자 하였다. 아세톤 분획법의 경우 아세톤의 최종농도가 30~40%가 되도록 분획하는 것이, 황산암모늄 분획법의 경우 황산암모늄을 60~70%의 포화농도가 되도록 분획하는 것이, 음이온교환 크로마토그래피의 경우 0.2 M NaCl을 이용하여 분획하는 것이, 그리고, 겔 여과의 경우 분자량 30~50 kDa 범위의 것을 분획하는 것이 효율적이었다. 분획방법별 최적 활성 fraction간의 상호비교에서 LeuPNA 및 ArgPNA에 대한 총활성 및 회수율은 겔 여과가, 비활성 및 정제도는 황산암모늄에 의한 분획법이 가장 우수한 것으로 나타났다. 원양산 오징어 내장으로부터 탈 이온수로 조효소를 추출한 다음, 겔 여과로 분획한 exopeptidase의 식품가공소재로서 산업적 이용을 위해서는 겔 여과법의 특성을 기초로 하여 추출 조효소로부터 연속 및 대량처리를 위한 공정개발이 필요할 것으로 사료된다.

문 헌

1. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries. 2007. <http://badasori.momaf.go.kr/matrix/momaf/trans/tratns.jsp>.
2. Aspino SI, Horn SJ, Eijsink VGH. 2005a. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. *Process Biochemistry* 40: 3714-3722.
3. Aspino SI, Horn SJ, Eijsink VGH. 2005b. Use of hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 248: 65-68.
4. Horn SJ, Aspino SI, Eijsink VGH. 2005. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. *J Appl Microbiol* 99: 1082-1089.
5. Hameed KS, Haard NF. 1985. Isolation and characterization of cathepsin C from atlantic short finned squid *Illex illecebrosus*. *Comp Biochem Physiol* 82B: 241-246.
6. Gildberg A. 1987. Purification and characterization of cathepsin D from the digestive gland of the pelagic squid *Todarodes sagittatus*. *J Sci Food Agric* 39: 85-94.
7. Heu MS, Ahn SH. 1999. Development and fractionation of proteolytic enzymes from an inedible seafood product. *J Korean Fish Soc* 32: 458-465.
8. Nishiwaki T, Yoshimizu S, Furuta M, Hayashi K. 2002. Debitting of enzymatic hydrolysates using an aminopeptidase from edible Basidiomycete *Griфоla frondosa*. *J Biosci Bioeng* 93: 60-63.
9. Izawa N, Tokuyasu K, Hayashi K. 1997. Debitting of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase. *J Agric Food Chem* 45: 543-545.
10. Barry CM, O'Cuinn G, Harrington D, O'Callaghan DM, Fitzgerald RJ. 2000. Debitting of a tryptic digest of bovine β -casein using porcine kidney general aminopeptidase and X-prolydipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *J Food Sci* 65: 1145-1150.
11. Raksakulthai R, Haard NF. 1999. Purification and characterization of aminopeptidase fractions from squid (*Illex illecebrosus*) hepatopancreas. *J Food Biochem* 23: 123-144.
12. Raksakulthai R, Haard NF. 2001. Purification and characterization of a carboxypeptidase from squid hepatopancreas (*Illex illecebrosus*). *J Agric Food Chem* 49: 5019-5030.
13. Dawson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM. 1986. *Data for biochemical research*. 3rd ed. Oxford Univ Press, Oxford. p 417-441.
14. Kim HS, Heu MS, Kim JS. 2007. Distribution and Extraction condition of endoprotease and exoprotease from Viscera of *Illex argentinus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 308-315.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
16. Garcia-Carreno FL, Haard NF. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J Food Biochem* 17: 97-113.
17. Chiou TK, Matsui T, Konosu S. 1988. Purification and properties of an aminopeptidase from mullet, *Mugil cephalus*, roe. *Agric Biol Chem* 52: 235-242.
18. Nishimura T, Rhyu MR, Kato H, Arai S. 1994. Purification and properties of aminopeptidase H from bovine skeletal muscle. *J Agric Food Chem* 42: 2709-2712.
19. Nishiwaki T, Hayashi K. 2001. Purification and characterization of an aminopeptidase from edible basidiomycete

- Grifola frondosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 424-427.
20. Vo VT, Kusakabe I, Murakami K. 1983. Purification and some properties of two aminopeptidases from sardines. *Agric Biol Chem* 47: 2453-2459.
 21. Umetsu H, Arai M, Ota T, Kudo R, Sugiura H, Ishiyama H, Sasaki K. 2003. Purification and properties of an aminopeptidase from the mid-gut gland of scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Comp Biochem Physiol* 136B: 935-942.
 22. Kurokawa T, Suzuki T. 1998. Development of intestinal brush border aminopeptidase in the larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 162: 113-124.
 23. Perez-Guzman AE, Victoria TC, Cruz-Camarillo R, Hernandez-Sanchez H. 2006. Purification and characterization of x-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NRRL 634. *World J Microbiol Biotechnol* 22: 953-958.

(2008년 7월 7일 접수; 2008년 7월 17일 채택)