JOURNAL OF THE EAST ASIAN OF DIETARY LIFE
Vol. 9, No. 2(1999)

오징어 내장에서 분리한 Protease 특성의 모니터링

서지형 · 정용진 · 이기동 · 이명희
경북과학대학 전통발효식품과

Monitoring Characteristics of Protease Isolated from Squid Viscera

Ji-Hyung Seo, Yong-Jin Jeong, Gee-Dong Lee and Myung-Hee Lee
Department of Traditional Fermented Food, Kyongbuk College of Science

ABSTRACT

The characteristics of protease from squid viscera was investigated by response surface methodology (RSM) programmed with reaction temperature and pH. The optimal temperature and pH for the protease were 41.75℃ and pH 6.02 respectively. Also its activity was 78.65 unit at the optimal condition and R^2 of the model was 0.8461($P<0.1$). The protease activity was decreased by Na^+ and increased by Mg^{2+}. But K^+ did not affect the protease. The Km value against casein was determined to be 0.12 mM by Lineweaver-Burk plot.

Key words: squid, protease, squid viscera, RSM.

Ⅰ. 서 론

오징어는 어장에 따라 연안산과 원양산으로 나눌 수 있으며 연간 어획량이 456,000톤(1992년)에 달한다[1]. 이들 중 일부는 생체로 이용되고 나머지 대부분은 건조오징어, 조미오징어, 훈제품, 젓갈 등으로 가공되어 소비된다. 오징어는 taurine을 비롯한 다량의 아미노산을 함유하고 있으며 내장부분에는 일반 어류에 비해 지방질, 비타민 B군 및 무기질 함량이 높고 특히 내장유에는 *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid(EPA), *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (DHA)의 함량이 높은 것으로 보고되었다[2,3]. 현재 오징어의 몸통, 표피, 족육 등 가식부분을 제외한 기타 내장부분은 일부 사료로 이용되고 있으나 대부분은 폐기되고 있는 실정으로, 폐기비용 절감과 유효성분의 효율적인 이용방안이 요구되고 있다.

Protease는 조미료 제조, 식육의 연화, 맥주 및 청주의 혼탁방지, 치즈숙성, 소포제, 세제용 등 다양하게 이용되고 있으며, 주로 미생물로부터 생산되고 있다[4]. 식품산업의 경우 강력하고 안정성 있는 protease의 이용은 다양한 발효제품의 개발 및 품질향상과 직결되어 있다. Protease는 serine protease, cystine protease, metallo protease, aspartic protease 등으로 분류

본 연구는 1998년도 경북과학대학 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

되고, 또한 작용하는 pH 영역에 따라서 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 구분되며, alkaline protease는 세균과 곰팡이에서, acid protease는 주로 효모에서 분비된다고 보고되었다[5]. 현재까지 미생물이 생성하는 protease의 특성에 대해서는 많은 연구[6~8]가 행해졌으나, 어패류 자체의 protease에 대해서는 별다른 연구가 진행되지 않고 있다.

따라서 본 연구는 오징어 내장에서 분리한 protease의 특성을 모니터링함으로써 오징어 부산물의 효소적 이용방안에 대한 가능성을 검토하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

시중에서 구입한 신선한 연안산 오징어(*Todarodes pacificus*)에서 내장을 분리하여 -30℃로 급속동결 보관하면서 사용하였다.

2. 조효소액의 추출

천 등[4]의 방법에 따라 오징어 내장에 5배의 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)를 가하여 homogenizer로 마쇄시킨 후 4℃에서 12시간동안 교반하여 효소를 추출한 다음 이를 원심분리(8,000 rpm, 30min)하여 얻은 상징액을 여과하여 조효소액으로 하였다.

3. 효소활성 측정

오징어 내장에서 분리한 protease의 활성은 Anson[9]의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 효소액 1ml, 2% hammersten casein(MW 23,600)용액 1ml, 0.1M phosphate buffer 1ml를 넣고 40℃에서 30분간 반응시킨 후 5% trichloroacetic acid 용액 2.5ml를 넣어 효소반응을 정지시킨 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 후 상징액 1ml에 0.55M Na_2CO_3 2.5ml, Folin-ciacalteu's 시약 0.5ml를 넣고 30℃에서 20분간 반응시킨 다음 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 반응액 및 대조구의 흡광도 차이를 표준곡선에서 tyrosine 함량으로 환산하였으며, 활성단위는 효소액 1ml가 1분간 10 μg에 상당하는 tyrosine을 생성하는 양을 1unit로 정의하였다.

Table 1. Levels of reaction condition in experimental design

X_i	Reaction conditions	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X_1	pH	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
X_2	Temperature (℃)	30	35	40	45	50

4. 반응표면분석 및 실험계획

반응표면분석법은 2개 이상의 회귀변수가 복합적으로 반응변수에 영향을 미칠 때 이 반응변수가 이루는 표면에 대한 통계적 분석을 하고 이에 관련된 설계를 하는 방법이다[10]. Protease 활성의 최적 반응온도 및 최적 반응 pH에 대한 실험계획은 중심합성계획에 따라 다섯단계로 부호화하여 측정하였다 (Table 1).

5. 금속이온의 영향

KCl, $MgCl_2$, NaCl을 각각 1, 10, 50mM이 되도록 첨가한 효소액 1ml를 40℃에서 30분간 방치시킨 후에 기질로 2% hammersten casein용액 1ml를 가하여 casein 분해력을 측정하여 비교하였다.

6. Km값의 측정

기질의 농도에 따르는 효소의 반응속도를 측정하기 위하여 여러가지 농도로 조정된 hammersten casein 용액에 조효소액을 반응시켜 반응속도를 측정한 후 1/S에 대한 1/V의 Lineweaver-Buck법으로 plot하여 얻은 직선으로부터 Km값을 구하였다[6].

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 반응표면분석에 의한 최적 반응 pH와 최적 반응 온도의 설정

Table 2와 Fig. 1은 제한조건을 동일하게 하고 pH와 온도를 변수로 하여 각각의 설정된 조건에서 6시간동안 반응후 protease활성 변화를 분석한 결과이다. Protease활성은 pH가 6.0 이상으로 증가할수록 감소하였으며, 온도가 30℃ 이상으로 높아질수록 증가하였으나, 42℃ 이상에서는 활성이 감소하는 경향을 나타내었다. 즉 protease활성은 41.75℃, pH 6.02

Table 2. The central composite design and experimetal data for optimization of squid viscera protease activity

No.	pH	Temp.(℃)	Protease activity (unit)
1	7.5	35	69.76
2	7.5	45	67.96
3	6.5	35	72.55
4	6.5	45	76.68
5	7.0	40	77.82
6	7.0	40	78.27
7	8.0	40	69.29
8	6.0	40	78.77
9	7.0	50	63.26
10	7.0	30	71.88

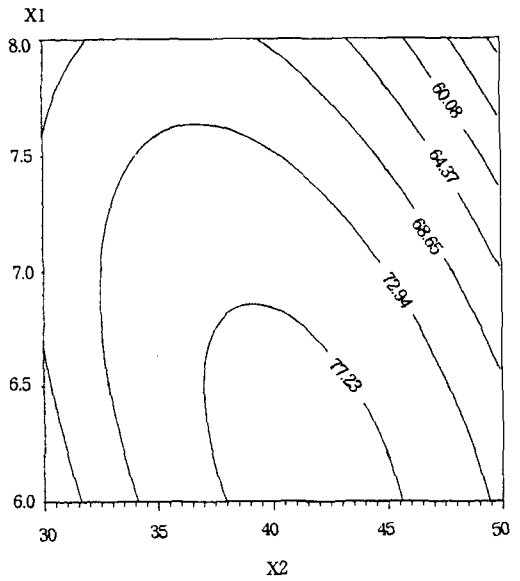

Fig. 1. Surperimposed contour map for the effect of pH and temperature on protease activity isolated from squid viscera. X_1 : pH, X_2 : Temperature(℃)

에서 78.65unit로 최고치를 나타내었으며, 이때 모델식(Table 3)의 R^2는 0.8461로서 10% 이내에서 유의성이 인정되었다. Protease활성에 대한 조건변수들의 영향은 pH의 영향보다 온도의 영향을 더 많이 받고 있었다(Table 5).

최 등은 재래간장[8]에서 *Bacillus subtilis globigii*

Table 4. Predicted levels of the minimum and maximum activity of squid viscera protease by the ridge analysis

Activity conditions of protease	Protease activity	
	Min.	Max.
pH	7.52	6.02
Temperature(℃)	48.53	41.75
Estimated response (unit)	61.16	78.65

Table 5. Regression analysis for regression model of activity of squid viscera protease

Activity conditions of protease	F-Ratio
pH	3.469
Temperature(℃)	4.465*

* Significance at 10% level

Table 6. Effect of metal ions on the protease activity

Treatment	Conc.(mM)	Relative activity(%)
None	-	100.00
K^+	1	81.90
	10	106.95
	50	98.02
Na^+	1	106.39
	10	85.50
	50	68.24
Mg_2^+	1	93.92
	10	115.69
	50	200.05

Table 3. Polynomial equations calculated by RSM program for squid viscera protease

Response	Polynomial equation	R^2	Significance
Protease activity	$Y = -358.181667\,\beta_0 + 64.060000\,\beta_1X_1 + 11.661381\,\beta_2X_2 - 3.247143\,\beta_1^2X_1^2 - 0.592000\,\beta_{12}X_1X_2 - 0.097071\,\beta_2^2X_2^2$	0.8461	0.0882

X_1 : pH, X_2 : temperature(℃)

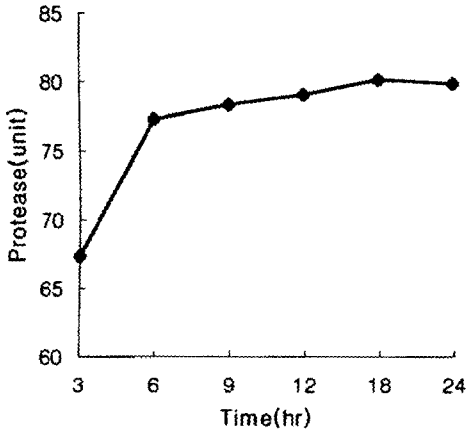

Fig. 2. Time course on the activity of protease isolated from squid viscera.

CCKS-118을, 재래메주[11]에서 *Scopulariopsis brevicaulis*를 각각 분리하고 이들이 생성한 protease의 최적 pH는 9.0, 최적 반응온도는 50℃로 보고하였다. 유 등[5]도 *Yarrowia lipolytica* TH65를 이용해서 생성한 alkaline protease에 대해서 보고하였으며, 허 등[7]은 오징어 젓갈에서 분리한 *Pseudomonas* D2가 생성하는 protease의 경우 pH 7.0, 50℃에서 최고의 활성을 나타내며 70℃에서도 최대 활성의 90%가 잔존한다고 보고하였다. 또한 남 등[12]이 새우젓에서 분리한 protease도 중온성이라는 점에서는 본 연구결과와 유사하였으나, 이 역시 alkaline protease로서 최적 pH에서 차이를 보였다. 따라서 오징어 내장으로부터 분리한 protease는 미생물에 의해 생성된 protease에 비해 최적 작용 pH가 낮은 acid protease이며 열안정성은 다소 낮은 것으로 나타났다.

2. 반응시간에 따른 활성 변화

Fig. 2는 최적온도, 최적 pH에서 반응시간에 따른 활성변화를 조사한 결과이다. 오징어 내장에서 분리한 protease활성은 반응시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였으며 특히 6시간까지 활성변화가 급격하였고 9시간 이후에는 큰 변화가 없었다.

3. 금속이온의 영향

오징어 내장에서 분리한 protease의 금속이온에 대한 영향을 조사한 결과는 Table 6과 같다. Na^+는

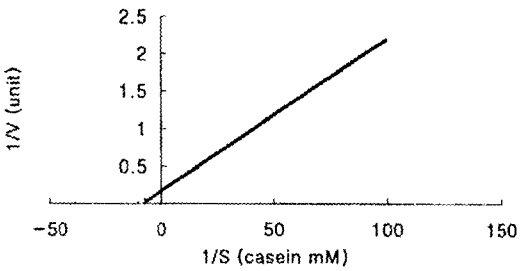

Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of the protease isolated from squid viscera.

10mM 이상 첨가할 경우 protease 활성이 저해되었으며 50mM 첨가시 68.24%의 활성을 나타내었다. 이에 비해서 Mg^{2+}는 첨가량을 증가시킴에 따라 활성이 증가하여 50mM 첨가시에는 2배 이상의 활성 증가를 나타내었다. 한편 K^+은 protease활성에 영향을 거의 미치지 않는 것으로 나타났다. 안 등[6]에 따르면 Mg^{2+}은 호염성 미생물에서 분리한 protease의 활성을 증가시키고 K^+은 거의 영향을 미치지 않는 것으로 본 연구결과와 유사하게 보고되었다.

4. Km값

Fig. 3에서 casein을 기질로 측정한 오징어 내장에서 분리한 protease의 Km값은 0.12mM로서, 멸치젓갈[13]에서 분리한 protease의 0.18, 0.38mM 및 *Halobacterium* sp.가 생성한 protease의 0.42mM[6]과 비교할 경우 기질 친화도가 큰 것으로 나타났다.

Ⅳ. 요 약

오징어 내장에서 분리한 protease를 중심합성 계획법을 이용해서 제한조건을 동일하게 하고 pH와 온도를 변수로 protease활성을 모니터링하였다. 그 결과 protease활성은 41.75℃, pH 6.02에서 78.65unit로 최고치를 나타내었으며, 이때 R^2는 0.8461로서 10% 이내에서 유의성이 인정되었다. 또한 오징어 내장 protease는 50mM의 Na^+첨가에서 활성이 저해되었으나 Mg_2^+에 의해서는 상승효과를 보였으며 Km값은 0.12mM이었다.

V. 참고문헌

1. 김은미, 조진호, 오세욱, 김영명: 오징어 내장의 지방질조성. 한국수산학회지, 30(4): 595, 1997.
2. 김진수: 오징어 내장유를 이용한 어육버거의 품질개선. 한국농화학회지, 40(4): 318, 1997.
3. 김진수, 하진환, 이응호: 오징어 내장유의 정제. 한국농화학회지, 40(4): 294, 1997.
4. 천성숙, 조영제, 손규목, 최희진, 최정: Protease 처리에 의한 폐단백자원의 단백질 용출 및 기능성 변화. 한국농화학회지, 41(1): 13, 1998.
5. 유춘발, 김창화, 진영호, 진익렬: *Yarrowia lipolytica* TH65가 생산하는 alkaline proteinase의 정제 및 특성. 24(3): 316, 1996.
6. 안영석, 김찬조, 최성현: 고도 호염성 *Halobacterium* sp.가 생산하는 protease의 특성. 한국농화학회지, 33(4): 337, 1990.
7. 허성호, 이호재, 김형선, 최성희, 김영만: 오징어 젓갈에서 분리한 *Pseudomonas* D2가 생성하는 protease의 효소학적 특성. 한국영양식량학회지, 24(4): 636, 1995.
8. 최청, 최광수, 조영제, 임성일, 이선호, 손준호, 최희진, 이희덕: 한국재래간장으로부터 분리한 *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118이 생성하는 protease의 특성 및 작용 양상. 한국농화학회지, 39(6): 460, 1996.
9. Anson, M. L.: The extimation of pepsin, papain, cathepsin with hemoglobin. J. Physiol., 22: 79, 1939.
10. 박성현: 현대실험 계획법. 민영사, 서울, 547, 1989.
11. 최청, 최광수, 김성, 이선호, 손준호, 최희진, 이상선, 안봉전: 한국재래메주에서 분리한 *Scopulariopsis brevicaulis*가 생성하는 protease의 특성 및 작용양상. 한국산업미생물학 회지, 25(1): 56, 1997.
12. 남은정, 오세욱, 조진호, 김영명, 양차범: 새우젓에서 alkaline protease의 정제 및 특성. 한국식품과학회지, 30(1): 82, 1998.
13. 차용준, 이응호: 젓갈에서 분리한 단백질분해효소의 열역학적 특성. 한국농화학회지, 33(4): 325, 1990.