

## 원양산 오징어 (*Illex argentinus*) 내장으로부터 Endoprotease의 분획

김혜숙 · 김진수 · 허민수\*  
경상대학교 해양생명과학부/해양산업연구소

### Fractionation of Endoprotease from Viscera of the 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

To evaluate the effective use of endoprotease from squid viscera as a food processing aid, various methods of fractionating endoprotease from viscera of the Argentina shortfin squid (*Illex argentinus*) were evaluated. The endoprotease-positive fractions of each fractionation were fraction II (30-40%, w/w) with cold acetone, fraction IV (50-60% saturation) with ammonium sulfate, fraction UF with anion exchange chromatography, and fraction II (15-24 kDa) with gel filtration. The specific activities (approximately 25 U/mg) of the fractions using ammonium sulfate and gel filtration were higher than the others. Total azocaseinolytic activity and recovery of the positive fraction using gel filtration were 806.95 U and 37.82%, respectively, and were the highest among the positive fractions. Based on the results, gel filtration was the most efficient method for fractionating endoprotease from the viscera of *Illex argentinus*.

Key words: Squid, Squid viscera, Endoprotease, *Illex argentinus*, Squid by-products

#### 서 론

우리나라의 오징어 생산량은 1998년 이래 현재까지 연간 1,986천톤 내외로 다른 어종에 비하여 상당히 다량에 이르고 있다. 하지만, 국내에서 오징어는 한국인의 식미 기호에 맞음으로 인하여 마른 오징어, 조미 오징어, 조미 냉동식품 및 젓갈 등과 같이 다양한 형태로 가공되거나, 조리될 뿐만 아니라 횡감으로 즐겨 식용함으로 인하여 그 수요가 증대되어 국내산의 어획량만으로는 부족하여 매년 다량 수입되고 있다. 이와 같이 식품 용도로 우리나라에 수입되고 있는 오징어는 아르헨티나 짧은 지느러미 오징어, 웰링턴 오징어(뉴질랜드), 빨강 오징어 및 아메리카 대왕 오징어 등이 대부분을 차지하고 있다(MOMAF, 2007). 한편, 오징어는 우리의 식미에 맞게 가공 및 조리하는 경우에 반드시 내장, 껍질, 자숙수 및 먹물 등과 같은 부산물이 다량 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 폐기되어 환경 오염을 야기하고 있다. 이러한 일면에서 진행된 오징어 가공 부산물의 식품소재로서 이용에 관한 연구로는 오징어 내장의 지질 추출 소재(Bihan et al., 2007; Sukamo et al., 1996), 오징어 먹물의 생리활성 소재(Okuzumi and Huzii, 2000), 오징어 내장의 쓴맛 제거 효소 추출원(Kishimura et al., 2001; Raksakulthai

and Haard, 2001), 오징어 껍질의 콜라겐 추출 소재(Kim et al., 1997; Nagai et al., 2001), 오징어 자숙액의 taurine 분리원(Cho et al., 2000), 그리고 원양산 오징어(*Illex argentinus*) 내장에 함유되어 있는 endoprotease 추출방법의 검토(Kim et al., 2007) 등에 관한 연구가 있을 뿐이다.

본 연구에서는 식품가공보조제로서 산업적 이용을 위하여 원양산 오징어 내장 조효소액으로부터 endoprotease의 적정 분획조건을 구명할 목적으로 오징어 내장 조효소액을 acetone 분획법, ammonium sulfate 분획법, anion exchange chromatography 법 및 gel filtration chromatography 법과 같은 4종류의 분획법으로 분획한 다음, 각 fraction들의 단백질 함량, 기질(azocasein)에 대한 효소 활성(total activity 및 specific activity), 정제도 및 회수율 등을 검토하여 최적 분획조건을 구명하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재 료

실험에 사용한 원양산 오징어 내장은 포클랜드 근해에서 어획된 아르헨티나 짧은 지느러미 오징어(Argentine shortfin 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℃)로 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

\*Corresponding author: minsheu@gsnu.ac.kr

**시약 및 완충액**

효소 (endoprotease) 활성 측정용 기질 (azocasein)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을, 기타 시약은 분석급 (analytical grade)으로 구입하여 사용하였다. 효소활성 측정에 사용한 완충액인 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0 및 pH 7.5)은 Dawson et al (1986)의 방법에 따라 조제하여 사용하였다.

**조효소의 추출 및 단백질 농도**

원양산 오징어 내장으로부터 조효소 추출은 Kim et al. (2007)의 방법으로 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, 6시간동안 교반 (20°C)하여 추출하였다. 이어서 조효소 추출액에 0.2배량 (v/v)의 사염화탄소 (CCl<sub>4</sub>)를 가하고 혼합한 다음, 원심분리 (12,000×g, 20 min) 하여 얻은 상층액을 탈지 조효소액으로 실험에 사용 하였다. 조효소액의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 비색법에 따라 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 구한 검량곡선으로부터 측정하였다.

**효소의 분획**

오징어 내장 조효소로부터 endoprotease의 분획은 acetone, ammonium sulfate, ion exchange chromatography 및 gel filtration chromatography 등의 방법에 의하여 실시되었다. 유기용매에 의한 오징어 내장 조효소의 분획은 조효소에 대하여 cold acetone (-20°C)을 각각 0-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60% 및 60-70% (v/v) 최종농도가 되게 단계별로 가하여 5개의 fraction으로 분획하고자 하였다. 각 농도단계별 fraction에 대하여 원심분리 (12,000×g, 20 min)를 실시한 다음, 그 잔사에 최소량의 탈 이온수로 용해 및 투석하여 fraction별 특성을 조사하기 위한 시료로 사용하였다. 염류에 의한 오징어 내장 조효소의 분획은 조효소에 대하여 ammonium sulfate를 첨가 (ammonium sulfate의 농도를 10% 씩 농도를 증가시키면서 해당 포화농도가 될 때까지 첨가)하여 염석하는 방법으로 분획하였다. 이어서 각 fraction (0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70 및 70-80% 포화농도의 fraction)을 원심분리 (12,000×g, 20 min) 한 다음 그 잔사에 대하여 최소량의 탈 이온수로 용해 및 투석하여 fraction별 특성을 조사하기 위한 시료로 사용하였다. 이온강도 차이에 의한 오징어 내장 조효소의 분획은

조효소 (50 mL)를 DEAE- Sepharose CL-6B column (i.d.; 2.6×15 cm)에 주입하고, 탈 이온수 (200 mL)로 용출하면서 단백질을 흡착시킨 다음 여기에 6종의 이온강도가 다른 100 mL의 용출액 (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 및 1.0 M의 NaCl)을 사용하여 일정한 유속 (25 mL/hr)에 의해 단계별로 분취 (25 mL)하였다. 이어서 각 이온 강도별 fraction을 농축하고 투석하여 fraction별 특성을 조사하기 위한 시료로 사용하였다. 분자량의 크기에 따른 오징어 내장 조효소의 분획은 조효소 (5 mL)를 Sephadex G-50 column (i.d.; 1.6×95 cm)에 주입하고, 일정한 유속 (40 mL/hr)으로, 용출 (3 mL/tube) 시켜 실시하였다. 이어서 각각의 용출액에 대한 단백질 분자량 분포는 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하고, 다음으로 azocasein에 대한 효소활성을 측정하여, 단백질 분포와 효소활성 간의 비교를 통해 얻어진 fraction을 특성조사를 위한 시료로 사용하였다.

**Endoprotease의 활성**

Endoprotease의 활성 측정은 기질로 azocasein을 사용하는 Starky (1977)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 조효소 10-20 μL 와 2 mL의 1% azocasein 기질이 용해되어 있는 0.1 M sodium phosphate 완충용액 (pH 6.0)을 혼합 및 반응 (50°C, 1시간) 시킨 다음, 반응혼액에 동량 (2 mL)의 5% trichloroacetic acid 용액을 가하여 실험, 정치 (30분) 및 원심분리 (146×g, 20 min) 한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하여 검토했다.

**결과 및 고찰**

**Acetone에 의한 endoprotease의 분획 및 특성**

원양산 오징어 내장 조효소에 대하여 cold acetone (-20°C)으로 분획한 각 fraction의 azocasein에 대한 endoprotease의 활성과 회수율은 Table 1과 같다. Acetone으로 분획한 fraction의 azocasein에 대한 specific activity와 정제도는 fraction II가 각각 17.5 U/mg 및 10.8배로 가장 높았고, 다음으로 fraction III (각각 17.2 U/mg 및 10.6배), IV (각각 11.4 U/mg 및 7.0배) 및 I (각각 10.9 U/mg 및 6.7배)의 순이었으며, fraction V가 각각 4.0 U/mg 및 2.5배로 가장 낮았다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 조효소를 acetone으로 분획 처리하는 경우 endoprotease의 분획 효과가 인정되었다. 조효소에 대한 endoprotease의 회수율은 총 fraction의 경우 79.8%로 감소하였고, 이들 fraction 중에서

Table 1. Endoprotease activities of fractions from crude extracts of squid viscera by the acetone fractionation toward azocasein as a substrate. <sup>1</sup>CE, Crude extracts; I, 0-30%; II, 30-40%; III, 40-50%; IV, 50-60%; V, 60-70%

Fraction <sup>1)</sup>	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
CE	140.00	26.10	5,956.02	1.63	100.00	1.00
I	10.65	3.78	438.78	10.90	7.37	6.69
II	33.50	3.68	2,162.33	17.54	36.30	10.76
III	13.00	5.91	1,321.23	17.20	22.18	10.55
IV	7.30	7.84	652.13	11.39	10.95	6.99
V	5.00	8.95	180.00	4.02	3.02	2.47

fraction II, III 및 IV의 경우 각각 36.3%, 22.2% 및 11.0%로서 69.4%가 회수되어 대부분을 차지하였다. 각 fraction들의 total activity는 fraction II가 2,162 U으로 가장 높았고, 다음으로 fraction III (1,321 U)의 순이었으며, 이들 2종의 fraction은 다른 3종의 fraction (180-652 U)에 비해 월등히 높았다. 이상의 acetone 분획 fraction 중 azocasein에 대한 endoprotease의 total activity, specific activity, 회수율 및 정제도는 fraction II가 가장 우수하여 다른 fraction에 비하여 endoprotease가 다량 함유되어 있으리라 추정되었다. 한편, Heu and Ahn (1999)은 멸치, 넙치, 고등어 및 참돔의 조효소의 azocasein의 활성에 대한 유기용매 (cold acetone)의 분획효과를 살펴 본 결과, 조효소에 대한 0-40% fraction에서의 정제도는 고등어가 21배로 가장 높게 나타났고, 다음으로 넙치 (18배), 참돔 (15배) 그리고 멸치 (11배)의 순이었다. 그러나, 수율을 고려한 최적 fraction으로는 0-40%와 40-55% fraction 이었고, 어류 종에 따라 활성 강도는 다르나 주요 활성 fraction 구간은 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서, acetone 처리에 의해 오징어 내장으로부터 endoprotease를 분획하고자 하는 경우, 탈 이온수로 오징어 내장으로부터 조효소를 추출한 다음 acetone을 최종농도가 30-40%가 되도록 가하여 분획한 후, 투석하여 조제하는 것이 적절하리라 판단되었다. 한편, acetone 분획의 장점으로는 조효소액으로부터 1회 처리 할 수 있는 양이 비교적 많은 점, 유기용매를 사용함으로써 쉽게 목적하는 분획 최종 농도를 맞출 수 있는 점, 탈수 및 탈지가 동시에 이루어지기 때문에 각 fraction의 분말화가 용이한 점, 투석과정이 필요 없다는 점 등이며, 단점으로는 용해도차이에 의한 분획방법이므로 주변온도에 따라 분획효과가 달라지는 점, 고농도 처리 시 시료량 보다 사용되는 acetone의 양이 많아 질수 있는 점, 분획 후, 폐 acetone이 발생한다는 점, acetone에 의한 단백질의 변성을 야기 시킬 수 있다는 점 등이다. 따라서, acetone 분획방법은 폐 acetone의 발생을 최소화하는 유기용매 회수 장치를 이용하고, 저온의 일정한 조건에서 단백질의 변성을 최소화하여 실행한다면, 효과적으로 목적효소의 분획하는데 이용 가능하리라 생각된다.

Ammonium sulfate에 의한 endoprotease의 분획 및 특성  
원양산 오징어 내장 조효소에 대하여 ammonium sulfate로

분획한 각 fraction의 azocasein에 대한 endoprotease의 활성과 회수율은 Table 2와 같다. Ammonium sulfate로 분획한 각 fraction들의 azocasein에 대한 specific activity와 정제도는 fraction I이 각각 47.9 U/mg 및 29.4배로 가장 높았고, 다음으로 fraction IV (각각 24.9 U/mg 및 15.3배), V (각각 23.4 U/mg 및 14.3배), VI (각각 21.8 U/mg 및 13.4배) 및 III (각각 14.3 U/mg 및 8.8배)의 순이었으며, fraction II가 13.7 U/mg 및 8.4배로 가장 낮았다. 조효소에 대한 endoprotease의 회수율은 총 fraction의 경우 84.0%로 감소하였고, 이들 fraction 중에서 fraction IV, V 및 VI의 경우 각각 35.4%, 17.3% 및 11.4%로서 전체의 64.1%로 대부분을 차지하였다. 각 fraction들의 total activity는 fraction IV가 3,011 U으로 가장 높았고, 다음으로 fraction V (1,473 U), fraction VI (969 U) 등의 순이었으며, 나머지 fraction (I-III)은 269-763 U 범위의 낮은 활성을 나타내었다. 이상의 결과로 원양산 오징어 내장 유래 조효소로부터 ammonium sulfate로 분획한 6개의 fraction들 중 azocasein에 대한 endoprotease의 total activity 및 회수율은 fraction IV가 가장 우수하여 다른 fraction에 비하여 endoprotease가 다량 함유되어 있으리라 추정되었다. 따라서, ammonium sulfate 처리에 의하여 오징어 내장으로부터 endoprotease를 분획하여 이용하고자 하는 경우 탈 이온수로 원양산 오징어 내장으로부터 조효소를 추출한 다음 여기에 ammonium sulfate를 최종농도가 50-60%가 되도록 염석하여 분획하는 것이 적절하리라 판단되었다. Heu and Ahn (1999)은 멸치, 넙치, 고등어 및 참돔의 4종의 수산 동물 내장 조효소의 염석 (ammonium sulfate)에 의한 분획에 따른 azocasein의 활성을 살펴 본 결과 조효소에 대한 정제도는 50-60% fraction에서 멸치 및 넙치가 각각 6배 및 9배로 증가하였고, 40-50% fraction에서 고등어와 참돔이 각각 12배 및 5배가량 증가하였다고 보고하여 어류의 종에 따라 활성강도는 달랐으나 주요 활성 fraction은 본 연구결과와 유사하였다. 한편, ammonium sulfate 분획방법에 따른 장점은 조효소액으로부터 1회에 대량처리가 가능한 점, 상온에서 처리가 가능한 점, 단백질의 변성 가능성이 적은 점, 비교적 분획효과가 뚜렷한 점 등이 있고, 단점으로는 용해도차이에 의한 분획방법이므로 주변 온도의 영향을 받아 분획효과에 차이를 보이는 점, 고형상의 ammonium sulfate를 사용함으로써 목적하는 포화농도로의 평형화에 시간이 다소 걸리는

Table 2. Endoprotease activities of fractions from crude extracts of squid viscera by the ammonium sulfate fractionation toward azocasein as a substrate. <sup>1</sup>CE, Crude extracts; I, 0-30%; II, 30-40%; III, 40-50%; IV, 50-60%; V, 60-70%; VI, 70-80%

Fraction <sup>1)</sup>	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
CE	200.00	26.10	8,508.60	1.63	100.00	1.00
I	5.40	1.04	268.92	47.88	3.16	29.38
II	10.40	4.65	663.87	13.73	7.80	8.42
III	11.10	4.79	762.57	14.34	8.96	8.80
IV	35.70	3.39	3,011.30	24.88	35.39	15.27
V	15.70	4.02	1,473.45	23.35	17.32	14.32
VI	6.40	6.95	968.75	21.78	11.39	13.36

점, ammonium sulfate 입자주위에 과포화가 일어날 수 있는 점, 용해 과정 중에 과도한 교반으로 단백질 변성이 야기될 수 있는 점, 염을 사용함으로써 각 fraction에 염이 함께 존재함으로써 탈염조작이 필요한 점, 분획 후 ammonium sulfate 용액이 부산물로 발생하는 점 등을 들 수 있다. 따라서, ammonium sulfate에 의한 분획방법은 대량처리를 위한 분획에 이용 가능하나, 이로 인한 폐 염류용액 처리 및 회수방법 그리고, 탈염을 위한 방안을 마련해야 할 것으로 생각된다.

**Anion exchange chromatography에 의한 endoprotease의 분획 및 특성**

원양산 오징어 내장 조효소를 DEAE-Sephacel CL-6B anion exchange matrix를 충전한 column에 주입하여 흡착시킨 다음, 비흡착 fraction (UF, unadsorbed fraction)과 흡착 단백질을 NaCl 용액에 의한 이온강도별로 분획한 fraction의 chromatogram은 Fig. 1과 같다. 원양산 오징어 내장 조효소로부터 anion exchange chromatography를 통하여 흡착되지 않은 1개의 fraction (UF)과 NaCl 용액의 이온강도 차이에 의한 6개의 fraction을 분획하였다. 비흡착 fraction인 UF 및 이온강도별 fraction I (0.1 M), fraction II (0.2 M), fraction III (0.3 M), fraction IV (0.4 M), fraction V (0.6 M) 및 fraction VI (1.0 M)의 azocasein에 대한 endoprotease의 활성과 회수율은 Table 3과 같다. 각 fraction들의 azocasein에 대한 endoprotease의 specific activity 및 정제도는 UF가 각각 20.8 U/mg 및 12.7배로 가장 높았고, 다음으로 fraction I (각각 20.3 U/mg 및 12.4배), III (각각 17.9 U/mg 및 11.0배), II (각각 13.9 U/mg 및 8.5배), IV (각각 11.4 U/mg 및 7.0배) 및 VI (각각 7.0 U/mg 및 4.3배)의 순이었으며, fraction V가 각각 6.3 U/mg 및 3.8배로 가장 낮았다. 이와 같이 각 fraction의 azocasein에 대한 endoprotease의 specific activity 및 정제도 결과로 미루어 보아 탈 이온수로 추출한 조효소를 anion exchange chromatography로 분획 처리하는 경우 endoprotease의 분획효과를 얻을 수 있다고 판단되었다. 조효소에 대한 endoprotease의 회수율은 anion exchange chromatography로 분획한 총 fraction의 경우 45.0%이었고, UF fraction을 제외하면 25.8%이었다. 각 fraction들의 total activity는 비흡착 fraction인 UF가 410 U으로 가장 높았고, 다음으로 fraction II (259 U), I (192 U), III (55 U), IV (22 U) 및 V (15

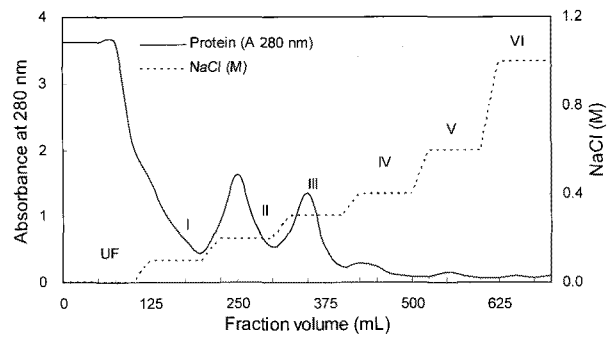


Fig. 1. DEAE-Sepharose CL-6B anion exchange chromatogram of crude extracts from squid viscera. Crude extracts were eluted with 100 mL of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing different NaCl concentration by stepwise elution. UF, unadsorbed fraction; I, 0.1 M NaCl; II, 0.2 M NaCl; III, 0.3 M NaCl; IV, 0.4 M NaCl; V, 0.6 M NaCl; VI, 1.0 M NaCl.

U)의 순이었으며, fraction VI이 6 U으로 가장 낮았다. 이상의 결과로부터 원양산 오징어 내장 유래 조효소로부터 anion exchange chromatography로 분획한 총 7개의 fraction 중 azocasein에 대한 endoprotease의 total activity 및 회수율은 비흡착 fraction인 UF가 가장 우수하였고, 흡착 fraction들 간에는 fraction II가 가장 우수하여 다른 fraction에 비하여 endoprotease가 다량 함유되어 있으며, 서로 다른 하전을 띠는 endoprotease들이 분포하고 있으리라 추정되었다. 따라서, anion exchange chromatography법에 의해 오징어 내장 조효소로부터 고효성 endoprotease를 분획하고자 하는 경우 탈 이온수로 원양산 오징어 내장으로부터 조효소를 추출한 다음 비흡착 fraction인 UF 및 0.2 M NaCl로 fraction II를 분획 및 투석하여 조제하는 것이 가장 좋으리라 판단되었다. 한편 ion exchange chromatography 분획방법에 따른 장점은 acetone, ammonium sulfate 분획방법과 같이 조효소액으로부터 사용되는 ion exchange matrix의 양에 비례하여 1회에 대량처리가 가능한 점, 단백질의 하전 차이에 따른 분획이므로 분획효과가 뛰어나다는 점, 비교적 단시간에 처리가 가능하다는 점, 사용한 ion exchange matrix는 regeneration과정을 거쳐 반복사용이 가능한 점, 비교적 단백질의 변성 가능성이 적은 점 등이 있고, 단점으로는 ion exchange matrix가 고가인 점, 하전에

Table 3. Endoprotease activities of fractions from crude extracts of squid viscera by the anion exchange chromatography toward azocasein as a substrate. <sup>1)</sup>Fractions are the same as explained in Fig. 1

Fraction <sup>1)</sup>	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
CE	50.00	26.10	2,133.50	1.63	100.00	1.00
UF	7.00	2.81	409.85	20.84	19.21	12.74
I	6.50	1.46	192.40	20.27	9.02	12.40
II	8.00	2.34	259.20	13.85	12.15	8.47
III	1.70	1.80	54.83	17.92	2.57	10.96
IV	0.70	2.80	22.26	11.36	1.04	6.95
V	0.50	4.90	15.35	6.27	0.72	3.83
VI	0.20	4.30	6.02	7.00	0.28	4.28

의한 분획방법이므로 분획을 위하여 각기 이온강도가 다른 용액을 사용하여야 하는 점, 상온에서의 단백질변성을 최소화하기 위해 저온에서 실행하여야 하는 점, 1회 처리 후 재사용을 위해 ion exchange matrix의 regeneration과정을 거쳐야 하는 점, 분획 후 이온강도의 차이를 위해 사용한 염이 각 fraction에 함께 존재함으로써 탈염조작이 필요한 점, 경우에 따라 fraction의 농축과정이 필요한 점 등을 들 수 있다. 따라서, ion exchange matrix를 이용한 분획방법은 대량처리를 위한 회분식(batch 식) 분획의 경우, 상온에서 비교적 단시간에 이용 가능하며, 용해도 차이에 의한 분획방법 보다 분획효과가 좋은 점 등이 있지만, 탈염 및 농축을 위한 방안을 마련해야 할 것으로 생각된다.

**Gel filtration chromatography에 의한 endoprotease의 분획 및 특성**

원양산 오징어 내장 조효소를 Sephadex G-50 gel matrix를 충전한 column에 주입하여 분획한 fraction의 chromatogram은 Fig. 2와 같다. Gel filtration chromatography를 이용하여 원양산 오징어 내장 조효소로부터 endoprotease 활성이 있는 2종의 fraction을 각각 분획하였다. 원양산 오징어 내장 조효소로부터 분획한 2종의 fraction 중 fraction I은 fraction No. 22-34의 것으로, 분자량 30-50 kDa 범위의 것이었으며, fraction II는 fraction No. 44-54의 것으로 15-24 kDa 범위의 것이었다. 원양산 오징어 내장 조효소로부터 Sephadex G-50 gel filtration을 통해 분획한 각 fraction의 azocasein에 대한 endoprotease의 활성과 회수율은 Table 4와 같다. 각 fraction의 specific activity 및 정제도는 fraction II가 각각 25.2 U/mg 및 15.4배로, fraction I의 11.6 U/mg 및 7.1배에 비하여 2배 이상 높은 것으로 나타났다. 그러나, fraction I의 경우도 조효소(각각 1.6 U/mg 및 1.0 배)에 비하여 높아 탈 이온수로 추출한 조효소를 Sephadex G-50 gel filtration을 통하여 분획하더라도 endoprotease의 fraction을 동시에 얻을 수 있다고 판단되었다. Gel filtration을 통한 각 fraction의 총 회수율은 66.7%이었고, 이 중 fraction II가 37.8%로 fraction I의 28.9%에 비하여 높았다. 그리고 이들 fraction의 total activity는 각각 fraction II가 807 U로, fraction I의 616 U에 비하여 높은 것으로 나타났다. 따라서, total activity 및 회수율은 fraction II가 fraction I에 비하여 높아, azocasein을 분해할 수 있는 endoprotease가 가장 다량 함유되어 있을 뿐만 아니라 분자량 분포가 서로 다른 두 fraction의 분획이 gel filtration을 통해 가능한 것으로 확인 되었다. 이와

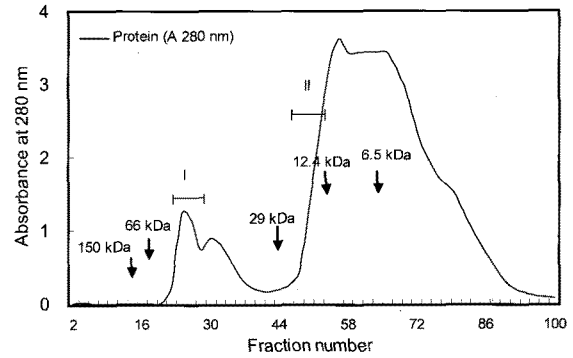


Fig. 2. Sephadex G-50 gel chromatography of crude extracts from squid viscera. Crude extracts were eluted with 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing 0.1 M NaCl. Standards for gel filtration: Alcohol dehydrogenase (150,000 Da), Albumin bovine serum (66,000 Da), Carbonic anhydrase (29,000 Da), Cytochrome C (12,400 Da), Aprotinin (6,500 Da).

같은 결과로부터 Sephadex G-50 gel filtration chromatography로 오징어 내장 조효소로부터 고 활성의 endoprotease를 분획하고자 하는 경우, 탈 이온수로 원양산 오징어 내장으로부터 조효소를 추출한 다음, fraction No. 40-54의 분자량 15-24 kDa 범위에 해당하는 것을 분획하여 조제하는 것이 가장 좋으리라 판단되었다. 한편 gel filtration chromatography 분획방법에 따른 장점은 단백질의 분자량 크기에 따른 분획이므로 분획효과가 뛰어나다는 점, 반복처리에 따른 재현성이 뛰어난 점, 연속 처리가 가능한 점, 비교적 단백질의 변성 가능성이 적은 점, 분획에 사용되는 염의 농도(0.6% 미만)가 생리식염수의 농도(0.9% 내외) 보다 낮아 별도의 투석과정을 거칠 필요가 없다는 점 등이 있고, 단점으로는 gel filtration matrix가 고가인 점, 분자량 크기에 의한 분획방법이므로 분획효과를 높이기 위해 가늘고 긴 column을 사용하여야 한다는 점, 1회 처리량이 본 실험에 사용한 분획 방법 중에 가장 적다는 점, 상온에서의 단백질변성을 최소화하기 위해 저온에서 실행하여야 하는 점, 경우에 따라 fraction의 농축과정이 필요한 점 등을 들 수 있다. 따라서, gel filtration matrix를 이용한 분획방법은 재현성과 연속처리가 가능한 점, 분획 후 별도의 처리(탈염 및 농축)가 최소화되는 점으로 단백질 유용자원의 분획에 효과적이라고 할 수 있으며, 단점인 대량처리를 위한 산업화 공정의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

Table 4. Endoprotease activities of fractions of fractionated from crude extracts of squid viscera by the gel filtration fractionation toward azocasein as a substrate. <sup>1)</sup>CE, crude extracts; I, 30-50 kDa fraction; II, 15-24 kDa fraction

Fraction <sup>1)</sup>	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
CE	50.00	26.10	2,133.50	1.63	100.00	1.00
I	16.60	3.19	616.28	11.64	28.89	7.12
II	14.28	2.24	806.95	25.23	37.82	15.44

Table 5. Comparison of endoprotease activity of positive fractions from crude extracts of Argentine shortfin squid viscera by different fractionation methods

Fractionation methods	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extracts	2,133.50	1.63	100.00	1.00
Acetone (II, 30-40%)	774.46	17.54	36.30	10.76
Ammonium sulfate (IV, 50-60%)	755.07	24.88	35.39	15.27
Anion exchange chromatography (UF)	409.85	20.84	19.21	12.74
Gel chromatography (II, 15-24 kDa)	806.95	25.23	37.82	15.44

**분획방법의 상호비교**

오징어 내장 조효소로부터 4종류의 분획방법 (acetone, ammonium sulfate, anion exchange chromatography 및 gel filtration chromatography)을 이용하여 얻은 positive fraction들을 대상으로 endoprotease의 효율적 분획방법을 검토하였다. 이를 위하여 각 분획방법별 조효소의 1회 기준처리량을 50 mL로 해서, total activity, specific activity, 회수율 및 정제도에 대해 상호 비교하여 Table 5에 나타내었다. 분획방법에 따른 원양산 오징어 내장 조효소 유래 endoprotease의 total activity 및 회수율은 gel filtration 분획법이 각각 806.95 U 및 37.82%로 가장 높았고, 다음으로 acetone (각각 774.46 U 및 36.30%) 및 ammonium sulfate (각각 755.07 U 및 35.39%) 분획법의 순이었으며, anion exchange chromatography 분획법이 각각 409.85 U 및 19.21%로 분획효율이 가장 낮았다. 이와 같은 결과와 앞서의 분획방법별 고찰에 의하면, 오징어 내장 조효소로부터 고 활성 endoprotease를 분획하고자 하는 경우 탈이온수로 원양산 오징어 내장으로부터 조효소를 추출한 다음, gel filtration 분획법으로 분자량 15-24 kDa 범위의 fraction을 분획하여 제조하는 것이 가장 적절하리라 판단되었다. 다만, 원양산 오징어 내장으로부터 endoprotease의 식품가공소재로서 산업적 이용을 위하여는 추출 조효소의 연속 및 대량처리를 위한 공정개발이 필요할 것으로 사료된다.

**사 사**

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

**참 고 문 헌**

Bihan, G.L., A. Perrin and N. Koueta. 2007. Effect of different treatments on the quality of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) viscera. *Food Chem.*, 104, 345-352.  
 Cho, S.Y., D.S. Joo, S.H. Park, H.J. Kang and J.K. Jeon. 2000. Change of taurine content in squid meat during squid processing and taurine content in the squid processing waste water. *J. Kor. Fish. Soc.*, 33, 51-54.  
 Dawson, R.M.C., D.C. Elliot, W.H. Elliot and K.M. Jones. 1986. *Data for Biochemical Research*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 417-441.

Heu, M.S. and S.H. Ahn. 1999. Development and fractionation of proteolytic enzymes from an inedible seafood product. *J. Kor. Fish. Soc.*, 32, 458-465.  
 Kim, H.S., M.S. Heu and J.S. Kim. 2007. Distribution and extraction condition of endoprotease and exoprotease from viscera of *Illex argentinus*. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.*, 50, 308-315.  
 Kim, J.S., J.G. Kim and S.Y. Cho. 1997. Screening for the raw material of gelatin from the skins of some pelagic fishes and squid. *J. Kor. Fish. Soc.*, 30, 55-61.  
 Kishimura, H., H. Saeki and K. Hayashi. 2001. Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from the hepatopancreas of a squid (*Todarodes pacificus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 130B, 117-123.  
 Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.  
 MOMAF. 2007. Annual catch of squid species. Retrieved from <http://badasori.momaf.go.kr> on Nov., 25, 2007.  
 Nagai, T., E. Yamashita, K. Taniguchi, N. Kanamori and N. Suzuki. 2001. Isolation and characterization of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chem.*, 72, 425-429.  
 Okzumi, M. and T. Huzii. 2000. *Nutrition, Function, Components of Squid*. Seizando, Tokyo, Japan, 135-139.  
 Raksakulthai, R. and N.F. Haard. 2001. Purification and characterization of a carboxypeptidase from squid hepatopancreas (*Illex illecebrosus*). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5019-5030.  
 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, Netheland, 57-89.  
 Sukarno, T.K., M. Hatano and Y. Sakurai. 1996. Lipase from neon flying squid hepatopancreas: purification and properties. *Food Chem.*, 57, 515-521.

2008년 4월 23일 접수  
 2008년 6월 27일 수리