

단백질 분해효소를 이용한 오계 다리육 펩타이드 생산 최적화

최소영^{†*} · 김아연^{*} · 유선균^{*}

^{†*} 중부대학교 식품생명과학과

(2016년 2월 19일 접수; 2016년 3월 24일 수정; 2016년 4월 1일 채택)

Optimization of enzymatic hydrolysis of legs proteins of black body fowl(Ogae) to produce peptides using a commercial protease

So Young Choi^{†*} · A-Yeon Kim^{*} · Sun Kyun Yoo^{*}

^{†*} Department of Food and Biotechnology, Joongbu University

(Received February 19, 2016; Revised March 24, 2016; Accepted April 1, 2016)

요약 : 연산오계는 오래전부터 건강기능 증진 및 치료 효능이 높은 것으로 알려져 왔다. 최근 건강 기능식품 소재로 기능성 펩타이드 효능이 알려짐에 따라, 연산오계 다리육으로부터 올리고 펩타이드 최적 생산 공정 및 생성물 특성에 대하여 연구를 수행하였다. 최적 효소가수 분해 공정 표면반응 분석을 이용하여 수행하였다. 최적 공정 조건을 확립하기 위해서 온도 (40, 50, 60°C), pH (pH 6.0, 7.0, 8.0), 효소 (1, 2, 3%) 범위에서 수행을 하였다. 생성물에 대한 가수분해도, 유리아미노산, 분자량 분포를 분석하였다. 효소 가수분해 최적 온도는 58°C, pH 7.5, 효소의 농도는 3% 이었다. 최적 조건에서 2 시간 효소 가수분해를 한 결과 75-80% 이었다. 유리 아미노산 총량은 168.131 mg/100 g 이었다. 분자량을 MALDI-TOF 으로 분석을 한 결과 90% 이상이 300-1,000 Da 분포를 보여주었다.

주제어 : 연산오계, 다리육, 펩타이드, 효소 가수분해, 최적 공정

Abstract : Yeosan Ogae has been known as supporting health and high efficacy of treatment. In recent days, as the efficacy of functional peptides has known, the optimization of oligo peptides production and its characteristics from Ogae legs has been performed. Response surface method was used to perform the optimization of enzyme hydrolysis. The range of processes was temperature (40, 50 and 60°C), pH(pH 6.0, 7.0 and 8.0), and enzyme(1, 2 and 3%). The degree of hydrolysis, amino acids, molecular weight of products were analyzed. The optimum process of enzyme hydrolysis were determined as temperature 58°C, pH 7.5, and enzyme concentration 3%. At optimum conditions, the degree of hydrolysis after 2 h reaction was 75-80%. The amino acid and were 168.131 mg/100 g, respectively. The molecular weight of products by using MALDI-TOF was ranged from 300 to 1,000 Da.

Keywords : Yeosan Ogae, Peptide, Enzyme hydrolysis, Optimization

[†]Corresponding author
(E-mail: skyoo@joongbu.ac.kr)

1. 서론

오골계는 중약대사전[1]에 의하면 맛이 달고 평하며, 간과 신장을 이롭게 하고 열을 제거하며 허를 보한다고 기록하고 있다. 또한 축산물을 가수분해 효소로 처리하여 얻어지는 유리아미노산, 펩타이드 및 저분자 단백질은 각각의 고유 기능을 가지므로 새로운 생물활성 소재로 이용될 가능성이 크다[2]. 아미노산이 생물기능의 출발물질이라면 펩타이드는 생명현상을 시작하는 요소로서 작용하며, 이러한 생리활성 펩타이드들은 원료 단백질의 종류, 이용효소, 분해조건, 정제방법에 따라 다양한 형태로 개발되고 있다[3]. 단백질이 가수분해되면 분자량이 감소하고 분자구조 변화에 따른 소수성 잔기가 노출되어 만들어지는 펩타이드는 본래의 단백질과는 다른 물리적 특성을 보이게 된다[4,5]. 영양적인 측면에서 펩타이드의 흡수성은 매우 중요하다. Skanderby(1994)의 연구에 의하면 디-펩타이드와 트리-펩타이드는 단백질이나 아미노산에 비해 흡수속도가 빨라서 아미노산류의 빠른 흡수가 필요한 경우 유용할 뿐만 아니라 펩타이드는 단백질에 비해 항원성이 감소하므로 알러지를 예방하는 새로운 식품 소재로 이용이 가능하다고 하였다[6]. 생리활성 펩타이드는 일반적으로 생리적 활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드로 정의되는데[7] 보통 3-20개의 아미노산으로 구성되어 있고 아미노산의 조성이나 서열에 따라 펩타이드의 활성이 다양하다[8]. 특히 단백질에 비해 크기가 작은 생리 활성 펩타이드는 생체내로 쉽게 흡수 될 수 있으며, 다양한 기능적 특성을 갖는다[9]. 생리활성 펩타이드의 효과로는 미네랄운송[10,11] 항고혈압[12], 항균활성[13] 등이 있으며, 일부 생리활성 펩타이드는 다기능적인 특성을 가지고 있다고 보고되었다[14].

최근 육단백질 유래의 펩타이드들이 다양하게 개발되고 있는데, 특히 고기 펩타이드는 에너지 대사촉진 소재로 다이어트 식품이나 스포츠 식품에 활용되어 일본과 미국에서 많은 관심을 얻고 있다. 축산물에 각종 한약재를 첨가하여 고압 및 고열로 일정시간 추출하여 얻은 증탕액은 건강을 돕는 식품으로 소비자들에게 널리 알려져 있으나 이들 특히 오계의 효소 가수분해적 증탕액에 대한 보고는 거의 없다. 또한 연산오계의 경우 국내 천연기념물로 지정되었음에도 개인에 의해 소규모적이고 단편적인 민간 차원에서 보존되고 있

며, 기초자료가 없는 상태에서 생리적 활성 연구가 진행되고 있고, 식·의약품으로써의 기능성 소재화에 대한 제품 개발은 미비한 상태로 기능성 물질의 소재화 및 산업화를 증진할 필요가 요구되고 있는 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 천연기념물 제 265호 연산오계의 다리육을 이용하여 효소 가수분해를 통해 펩타이드를 분리하고자 하였으며, 펩타이드 제조 시 최적반응조건(pH, 온도, 분해시간)을 확립하고 여러 원료로 사용할 수 있도록 특성을 규명하고자 하였으며, 품질특성(일반성분, 기능성 및 아미노산 분석을 통한 분해율 및 수율, 분자량 확인 등) 및 품질지표를 선정하고자 분석실험을 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 Folin ciocalteu's phenol (FCP)과 tri-chloro-acetic(TCA)산 시약은 Sigma Company(Seoul, Korea)사로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 분해효소 bromelain 1200 GDU (BM1200)은 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입을 하였다. BM1200 효소는 pineapple로부터 얻어진 식물성프로테아제이다.

효소의 역가를 측정하기 위한 단백질은 카제인으로 대정화금(Daejon, Korea)에서 구입을 하였다. 실험에 사용된 오계육은 (주)지산농원(Nonsan, Chungnam, Korea)에서 제공을 하였다.

2.2. 오계 다리육 분리 및 균질화

냉동상태로 공급된 오계육은 다리육을 분리하기 위하여 냉동된 오계를 40°C 항온수조에서 20분 동안 해동을 하였다. 해동이 된 오계육은 칼과 가위를 이용하여 다리뼈와 육을 분리하였다. 분리된 다리육은 고기갈개(Kenwood, Seoul, Korea)를 이용하여 갈개 재료쟁반에 넣고 분쇄칼날로 육을 잘게 자른 다음 스크린을 통하여 등글고 가는 형태로 균질된 다리육을 제조하였다. 균질화 된 다리육은 지퍼백에 넣고 샘플이름, 제조날짜를 기입을 한 후에 실험 전까지 -20°C에 냉동보관을 하였다.

냉동 상태의 균질화 된 다리육은 실험 전 상온에서 해동하였으며 즉시 사용되었다.

2.3. 오계 다리육 단백질 가수분해 최적

공정을 위한 표면반응실험 계획(RSM)

오계 다리육의 단백질 가수분해 생산 최적 조건을 구하기 위하여 모든 실험 계획은 3개의 독립변수 즉, 효소반응온도, 반응 pH, 효소의 농도 (%)를 각각 50°C, pH 6.0, 2%로 하는 center run을 5번 반복을 포함하여 총 17개의 처리조합으로 구성을 하였다[15]. Box-Benken design은 세 가지의 중요한 절차에 따라 진행이 되는데, 첫째는 계획된 실험 (designed experiment)에 따라 통계적으로 실험을 수행하고, 둘째는 수식 모델의 계수 (coefficients of model)를 구하고, 셋째는 모델의 적합성을 판정하는 것으로 진행이 된다. 본 실험에서의 반응 변수들은 TCA 용해 펩타이드 양과 단백질 가수분해율(DH, degree of hydrolysis)로 하였다.

통계적인 계산을 원활히 하기 위하여 독립 변수를 다음과 같이 표준화 (code)하여 사용을 하였다. 세 개의 변수들을 각각 X_1 (온도), X_2 (pH), X_3 (효소농도)로 하였다. 표준화의 값들은 다음과 같은 공식에 의하여 구할 수 있고 그 값을 Z로 하였다.

$$Z = (X - X^0) / \Delta X \text{ ----- (1)}$$

X^0 는 표준화 값의 중심 값이고 X 는 표준화 값이다. ΔX 는 1 단위만큼의 증가 또는 감소하는 값의 크기이다. 실험결과에 대한 분석은 표면 반응 분석법으로 사용을 하였으며 최적 공정 조건을 나타내는 다중 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=j=1}^k B_{ij} X_i X_j \text{ ---(2)}$$

여기서 Y는 predicted response 이고 본 실험 처럼 3개의 변수가 있을 경우에는 k값이 3이 되고 궁극적으로 다음과 같은 식으로 표현된다.

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{12} X_2 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 \text{ -----(3)}$$

실험 후에 확정 된 결과들의 통계분석은 Design Expert (Couresy: Stat-ease Inc., Statistics Made Easy, Minneapolis, USA)를 사용하였다. 독립변수들의 값의 선택은 예비 실험에서 얻은 결과로부터 선택을 하여 X_1 (온도)는 40°C (-1), 50°C (0), 60°C (+1) 로 정하고, X_2 (pH)는 5.0 (-1), 6.0 (0) 7.0 (+1) 로하고 X_3 (효소의 양)는 1 (-1), 2 (0), 3 (+1)% 로 하였다(Table 1). 오계 다리육 펩타이드 생산은 50 ml PBS용매를 담고 있는 250 ml 삼각 플라스크를 이용하였는데, 각각 플라스크 용매에 대하여 효소 양을 넣어주었다.

2.4. 오계 다리육 단백질 가수분해

효소 반응 pH 변화에 따른 오계 다리육 단백질 가수분해를 실행하기 위하여 냉동된 상태로 보관된 균질화 된 오계 다리육 5 g 을 phosphate 완충용액 50 ml 를 담고 있는 플라스틱 비커에 넣어 homogenizer를 이용해 다리육을 균질화하였다. 균질 된 다리육을 250 ml 삼각 플라스크에 옮겨 BM1200을 첨가하고 배양기에 1 시간 반응시켰다. 1시간 반응한 후 효소 가수분해 된 것 1 ml 를 tube에 옮긴 후 9 ml 의 증류수를 더해 희석해 주었다. 희석용액 2.5 ml를 취하여 다른 tube에 옮겨, 0.3 M TCA (Trichloroacetic acid) 5 ml 넣고, 상온에 20분간 단백질 침전을 시킨 후 3000 rpm에서 10분 원심분리한 후 상등액 만을 취한 것이 오계 다리육의 단백질 가수분해물이다.

2.5. 오계 다리육 단백질 가수분해도 측정

오계 다리육의 단백질 가수분해물 1 ml에 0.3M trichloroacetic acid(TCA)용액 3ml을 넣고 혼합한 후 10분 동안 실온에서 단백질을 침전시

Table 1. Levels of independent variables in Box-Benken design

X_i	Independent variables	Level		
		-1	0	+1
X_1	Culture temperature (C°)	40	50	60
X_2	Culture pH	6	7	8
X_3	Enzyme (%)	1	2	3

켰다. 침전 후 상등액 1ml을 취하여 0.5 N NaOH 5 ml 혼합한다. 혼합용액에 0.5 N NaOH 5 ml 혼합한 후, 1 N FCP 1 ml 넣고 voltex를 이용하여 즉시 혼합시킨 후 30°C 배양기에 15분 반응시키고 여과하였다. 여과 된 용액을 578 nm 흡광도를 측정한다. 프로테아제 가수분해 양은 L-Tyrosine 표준곡선을 이용하여 측정하였고 표준곡선을 사용하여 $Y=0.0078X + 0.0182$ 절편의 값을 구하여 계산하였고, 가수분해도는 다음 식을 이용하였다.

$$DH = \frac{D_{at\ time\ t} - D_0}{D_{max} - D_0} \times 100$$

2.6. 오계 다리육 펩타이드 유리아미노산 분석

전 처리로 다리육에서 추출한 펩타이드 액체시료 10ml에 sulfosalicylic acid 0.2 g을 첨가 하여 4°C에서 1시간 방치하였다. 방치가 끝난 시료는 0.2 μ m membrane filter로 여과하고 이중 1 ml을 lithium citrate buffer(0.12 N, pH 2.2)와 혼합하여 적절한 농도로 희석한 후 그중 1 ml을 취하여 Table 2과 같이 아미노산 자동분석기 automated amino acid analyzer(Sykam GmbH, Germany)를 이용하여 정량분석 하였다.

2.7. 오계 다리육 펩타이드 분자량 측정

오계 다리육 펩타이드 분자량 측정을 위해 alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid 사용하였고, 70% ACN 과 0.1% formic acid 로 하여 10 m / ml의 matrix 시료를 만들었다. Sample을 50-100 ppm 정도 준비하였다. Matrix 시료와 샘플을 1:1비율로 섞었다. 깨끗한 plate위에 1 ml 정도 떨어뜨려 열풍건조 시켰다. 건조 후에 노란색을 띠는 샘플을 취해 질량분석기로

(MALDI-TOF, Voyager DE-STR, Applide biosystems, USA) 레이저를 사용하여 분석하였다 (Laser : Nitrogen, 337 nm, 3ns pulse).

3. 결과 및 고찰

3.1. 오계 다리육을 이용한 효소가수분해 생산 최적화

BM1200 효소를 이용하여 오계 다리육으로부터 효소 가수분해하여 최적 조건요인들인 온도, pH, 효소의 양의 3개의 실험변수에 대하여 Box-Benken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험결과 즉 가수분해도를 Table 3에 나타내었다.

가수분해 효율성을 나타내는 중요한 요인들인 가수분해도를 보여준다. 실험 결과 가수분해도의 값은 15.07-94.38 범위에서 측정값이 얻어졌으며, 수율은 16.439-102.915 %, 생산속도는 0.822-4.311 g/h-L의 범위에서 측정되었다. 실험결과를 이용한 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다. Quadratic 회기 모델의 분석 결과가 Table 4 에서 보여준다. 이들의 결과에 따르면 가수분해도, 총 수율, 생산속도들은 온도, pH, 효소의 양에 영향을 받는다는 것이 95% 수준 이내에서 유의성이 인정되었다.

모델 결정계수(determination coefficient) R^2 값은 실험값 (observed value)와 예측값(predicted value)과 상호연관(correlation) 정도를 보여주는 데 가수분해도 0.96 이므로 이 모델은 10% 범위에서 설명되지 않는다는 것을 보여준다. 적합결여 (lack of fit) 테스트 검정에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다. Table 5 에서는 모델의 회귀계수를

Table 2. Operating conditions of free amino acid auto-analyzer

Instrument	S430 (SYKAM)
Column	Cation separation column (LCA K07/Li)
Column size	4.6 × 150 mm
Column temperature	37 ~ 74°C
Flow rate	Buffer 0.45 ml/min, reagent 0.25 ml/min
Buffer pH range	2.90 ~ 7.95
Wavelength	440 nm and 570 nm

나타내는 것으로 가수분해도, 가수분해 수율, 생산속도들이 3가지의 요인들에 대하여 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. ($P < 0.05$). 본 실험결과 반응온도, pH, 효소의 농도에 대한 영향은 1차,

2차, 교호항(cross product term)에서 유의성이 나타나 요인들의 단독 또는 교호적으로 영향을 미침을 알 수 있다. 이들에 대한 회귀식은 Table 6 에 있다.

Table 3. Experimental data of degree of hydrolysis by black body fowl(Ogae) legs

Sample	Temp.(°C)	pH	Enzyme(%)	Degree of hydrolysis(%)
1	-1	-1	0	14.80
2	1	-1	0	15.60
3	-1	1	0	22.63
4	1	1	0	18.50
5	-1	0	-1	16.80
6	1	0	-1	14.50
7	-1	0	1	25.60
8	1	0	1	26.80
9	0	-1	-1	15.40
10	0	1	-1	20.76
11	0	-1	1	28.90
12	0	1	1	31.54
13	0	0	0	31.38
14	0	0	0	29.80
15	0	0	0	28.90
16	0	0	0	32.50
17	0	0	0	30.50

Table 4. Analysis of variance(ANOVA) for fitted second order polynomial model and lack of fit for black body fowl(Ogae) legs

Source	DF	Sum of Squares
		DH ^a
Model	9	720.66
Residual	7	10.58
Lack of Fit	3	2.82
Pure Error	4	7.76
Cor Total	16	731.24

^a Coefficient of correlation (R^2) for black body fowl(Ogae) legs was 0.96

^b Significant at 5% level.

Table 5. Estimated coefficient for the fitted second order polynomial representing the relationship between the response and process variables.

Factor	Coefficient DH
Intercept	30.62
Linear	
Temperature	-0.55
pH	2.34
Enzyme	5.67
Quadratic	
Temperature	-7.98
pH	-4.76
Enzyme	-1.71
Interactions	
pH×Temperature	-1.23
pH×Enzyme	0.88
Enzyme×Temperature	-0.68

Table 6. Polynomial equations calculated by response surface program.

Response	Second order polynomial equations	R^2
Ogae legs production	$Y=65.91+21.09X_1+1.11X_2+14.05X_3-13.99X_1^2-6.33X_2^2+1.29X_3^2-2.82X_1X_2+6.65X_1X_3-6.84X_2X_3$	0.962

X_1 : Temperature(°C), X_2 : pH, X_3 : Enzyme(%)

3.2 온도와 pH에 따른 최적 생산조건

표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대적으로 판명되어 오게 부산물 중 오게 다리육을 이용한 효소가수분해도 즉 펩타이드 생산량은 pH보다 온도에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도는 펩타이드 생산효율을 평가하는데 지표가 된다. pH 6-8 사이에서 크게 변화가 없었던 반면 온도의 경우 40°C에서 서서히 증가하다가 약 58°C 근처에서 최고생산량 72.52%까지 펩타이드 생산량이 높아지는 것으로 확인되었다. 즉 펩타이드 생산에 있어 pH보다 온도에 더 큰 영향을 주는 것으로 나타났다(Fig. 1).

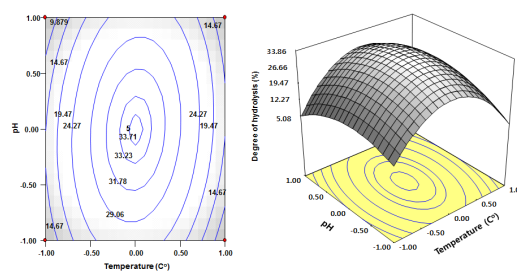


Fig. 1. Contour 3D plots of response surface. Effect of pH and temperature on the peptide production of black body fowl(Ogae) legs using commercial protease.

3.3. 효소와 pH에 따른 최적 생산조건

Fig. 2에서 보듯이 효소의 양에 따른 펩타이드 생산량 변화가 pH의 변화보다 민감한 것을 알 수 있다. 효소의 양 1.7% 부터 서서히 증가하여 3%로 올렸을 때 78.82%로 효소의 양을 점차 늘렸을 때 최고 생산량을 보여주었으나 이에 반해 pH의 경우 pH 7-7.5에서 약간의 증가함을 보였으나 pH의 변화에 따른 값이 크게 변화되지 않았음을 확인하였다. 그러므로 pH의 변화 보다는 효소의 양이 3%로 높아졌을 때 펩타이드의 생산량이 증가함을 알 수 있다.

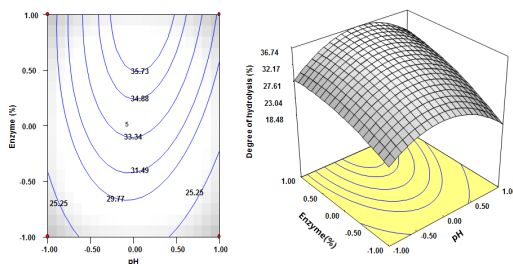


Fig. 2. Contour 3D plots of response surface. Enzyme concentration of pH on the peptide production of black body fowl(Ogae) legs using commercial protease.

3.4. 효소와 온도에 따른 최적 생산조건

표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 오계 다리육을 이용한 효소가수분해도는 Fig. 3 에서와 같이 효소의 양에 의해 생산되는 가수분해도의 변화보다는 온도의 변화에 상당히 민감하였다. 효소의 값이 높아질수록 펩타이드의 생산량은 미미하게 높아졌다. 그러나 이에 반해 온도가 40℃일 때 약 37.49%였으나 약 58℃로 높아질수록 펩타이드 생산량의 정상점이 나타났다. 이 결과 효소는 약 3%가 되었을 때 그리고 온도는 약 58℃로 반응을 주었을 때 정상점이 나타났으며, 이곳이 최대 펩타이드 양이 생산되는 것으로 보이며, 그 값은 약 78.82%로 나타났다.

한 등[16]은 정어리를 통째로 마쇄한 육에 bromelain을 첨가한 것은 55℃ 부근에서 최대 활성을 나타냈다고 보고되었다. 이는 본 실험의 결과와 유사함을 알 수 있었다.

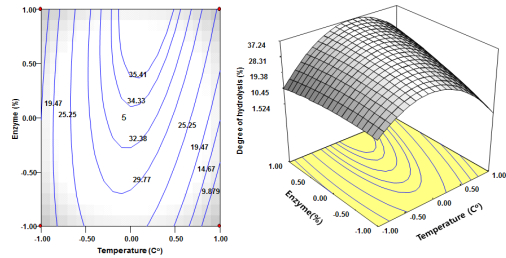


Fig. 3. Contour 3D plots of response surface. Enzyme concentration of temperature on the peptideproduction of black body fowl(Ogae) legs using commercial protease.

반응표면 분석 실험의 결과를 종합해 보면 오계 다리육의 효소가수분해에 따른 펩타이드 생산 양에 가장 영향을 미치는 것은 온도이고, 효소의 양과 pH 순으로 나타났으며, pH의 영향은 아주 미미한 것으로 판단되었다(Fig. 4).

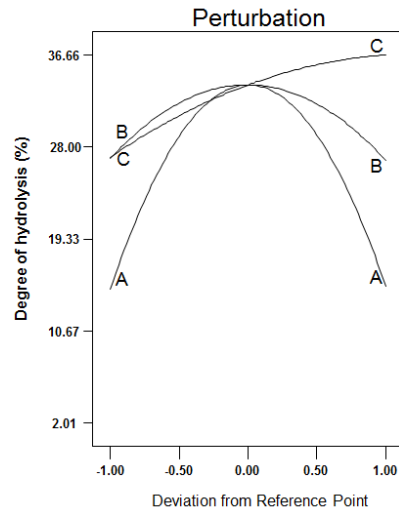


Fig. 4. Effect of temperature, pH and protease on hydrolysis of protein of ogae legs. A: temperature, B: pH, C: enzyme

3.5. 유리아미노산의 분석

유리아미노산은 생체 활성물질의 구성성분이며, 맛을 내는 중요한 성분이다. 특히 당과 함께 반응하여 비효소적 갈변반응을 일으키며, 여러 가지 풍미 전구물질을 생성한다[17].

오계 다리육을 분리하여 효소가수분해 처리한 가수분해물의 유리 아미노산 함량은 다음과 같다 (Table 7). 오계 다리육 효소가수분해물에서 26 종류의 유리아미노산이 검출되었으며, 총 양은 168.131 mg/100 g 으로 확인되었다. 쓴맛에 관여하는 Leucine 이 12.5% (21.014 mg/100 g) 로 가장 많았다. 그 다음으로 Lysine (11.9%), Arginine (10.5%), Glutamic acid (8.5%) 등의 순으로 존재하였다. Ornithine (0.04%), β -alanine (0.07%), 1-methylhistidine (0.17%), γ -amino-n-butyric acid(0.27%)은 함량이 적은 순이었다.

Table 7. Free amino acid composition of black body fowl(O-gae) legs

Amino acid	Peptide of Ogae legs (mg/100 g)
Phosphoserine	0.634
Taurine	7.956
Aspartic acid	4.651
Threonine	5.908
serine	7.064
Asparagine	3.636
Glutamic acid	14.272
Sarcocine	1.617
Proline	1.576
Glycine	5.175
Alanine	13.778
Valine	4.734
Methionine	10.319
Cysthathionine	1.156
Isoleucine	5.612
Leucine	21.014
Tyrosine	7.726
phenylalanine	8.489
β -alanine	0.121
γ -amino-n-butyric acid	0.448
Histidine	1.951
1-methylhistidine	0.286
Hydroxylysine	2.227
Ornithine	0.075
Lysine	20.088
Arginine	17.619
Total	168.131

3.7. 효소가수분해 한 오계 다리육의 펩타이드 분자량 결과 (MALDI-TOF)

오계 다리육을 단백질 가수분해 효소를 이용하여 분해한 생성물들의 분자량 분포 특성을 분석하고자 MALDI-TOF를 사용하였다. MALDI-TOF는, PMF(Peptide Mass Fingerprint) 분석법으로 특정 enzyme을 처리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 이를 사용하여 database search를 하여 동정한다. 그러므로 PMF방법은 genomic sequence가 완료된 생물종이나 NCBI에 등재가 된 단백질을 동정하는데 주로 사용한다. 단백질의 모든 아미노산 평균 분자량은 138이지만, 가중 평균은 128이고 축합 중합에 의해 단백질은 각 단위체당 110의 평균 분자량을 갖게 된다. 이를 나타내는 단위는 dalton(달톤)으로 1 kD는 1000 g/mol이다. 예를 들면 약 500개의 아미노산을 갖는 단백질의 평균적인 분자량은 55000 D, 즉 55 kD의 분자량을 갖는다.

본 연구에서 오계 다리육 단백질 가수분해물의 여러 종류의 펩타이드 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOF의 그래프에서 x축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화 된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드 들은 m/z 500에서 1,400 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 오계 다리육 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5, 6, 8, 10개로 이루어져 있었다(Fig. 5).

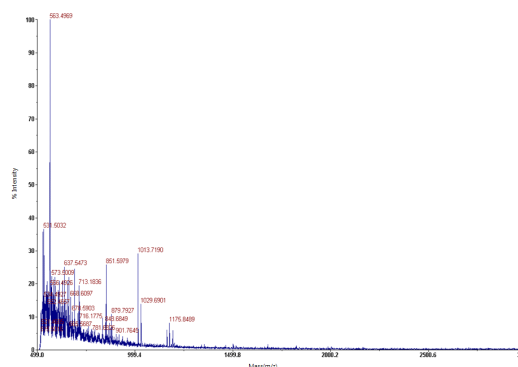


Fig. 5. MALDI-TOF mass spectra of peptides produced by hydrolyzing leg protein of Ogae using bromelain protease.

Salampessy et al.[18] 들은 bromelain 효소를 이용하여 어류인 전갱이 단백질을 가수분해를 하여 항바이러스를 보이는 5 kDa 펩타이드 생산을 보고하였으며, Huang 등[18]의 새우 가공 부산물로부터 펩타이드를 동정한 결과 699 Da의 분자량을 가진 펩타이드가 보고되었고, Vatterm과 Mahoney[19]의 연구에서도 닭 근육 단백질로부터 철분 결합력을 가지는 주요 분획이 2-3.5 kDa에 존재하였다고 보고한 바 있다.

4. 결론

연산오계는 오래전부터 건강기능 증진 및 치료 효능이 높은 것으로 알려져 왔다. 최근 건강 기능식품 소재로 기능성 펩타이드 효능이 알려짐에 따라, 오계 다리육을 사용하여 올리고 펩타이드 최적 생산 공정 및 생성물 특성에 대하여 연구를 수행하였다.

1. 오계 다리육의 펩타이드를 분리하기 위하여 효소가수분해 최적 공정을 개발하기 위하여 온도 (40, 50, 60°C), pH (pH 6.0, 7.0, 8.0), 효소 (1, 2, 3%) 별로 가수분해율을 분석하였다.
2. 가수분해도는 온도, pH 그리고 효소의 양에 영향을 받는 다는 것이 95% 수준 이내에서 인정되었으며, 오계 다리육의 효소가수분해에 따른 펩타이드 함량은 효소의 값이 3%로 높아질수록 온도의 경우 58°C로 높아질수록 가수분해도는 높아졌다. 하지만 pH 변화에 따른 펩타이드의 생산량은 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.
3. 유리아미노산은 총 28종류의 유리아미노산이 분석되었으며, Leucine 이 12.5% (21.014 mg/100 g)로 가장 높게 나타났다. Lysine (11.9%), Arginine (10.5%), Glutamic acid (8.5%) 등의 순으로 존재하였다.
4. 오계 다리육 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5, 6, 8, 10개로 이루어져 있음을 확인하였다.

따라서 연구 결과 연산오계 다리육을 이용하여 기능성 소재의 생산체계 확보를 위한 제조 공정을 표준화, 추출물 및 분말 등 대량 생산 공정을 매뉴얼, 소비자 맞춤형 가공식품 생산 체계 및 실용화에 필요한 기초자료를 확보할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가 식품기술개발사업 (314040-30-1-HD030)에 의해 이루어진 것임

References

1. Kim JJ Herb medicine of present 1. Kwang Bok Press 150-166. 1987
2. Nam HS. Market tendency and development of physiological active peptide. Kor J Food Ind Nutr 4:17-19. 1999
3. Lee CH. Application and development of protein sources. Kor J Food Sci Ind 25:93-100. 1992
4. Rupnow JH. Proteins. Biochemistry and Application in Encyclopedia of Food Science and Technology, Hui, Y.H.(ed.), John Willy and Son Inc, NY 3: 2182. 1992
5. Mahmoud MI. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. Food Technology 48:89-95. 1994
6. Skanderby M. 蛋白質分解物の機能性とその利用. 食品と開發 29:23-26. 1994
7. Kitts DD, Weiler K, "Bioactive proteins and peptides from food sources. Application of bioprocesses used in isolation and recovery. Curr Pharm Des", Vol. 9, No. 16, pp.1309-1323, 2003.
8. Anne Pihlanto-Leppälä, "Bioactive peptides derived from bovine whey protein: opioid and ACE-inhibitory peptides. Trends Food Sci Technol". Vol. 11, No. 9-10, pp.347-356. 2001.
9. Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, et. al., "Peptide inhibitors for angiotensin

- I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci*", Vol. 57, No. 3, pp.319-324, 2001.
10. Lee SH, Song KB. "Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochem*", Vol. 44, No. 3, pp.378-381, 2009.
 11. Huang G, Ren Z, Jiang J. "Separation of iron-binding peptides from shrimp processing by-products hydrolysates. *Food Bioprocess Technol*", Vol. 4, No. 8, pp.1527-1532, 2011.
 12. Lee SH, Song KB. "Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from irradiated bovine blood plasma protein hydrolysates. *J Food Sci*", Vol. 68, No. 8, pp.2469-2472, 2003.
 13. Mine Y, Ma F, Lauriau S. "Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric Food Chem*", Vol. 52, pp.1088-1094, 2004.
 14. FitzGerald RJ, Meisel H. "Milk protein-derived peptide inhibitor of angiotensin-I-converting enzyme. *Br J Nutr*", Vol. 84, pp.33-37, 2000.
 15. Seung Kyun Hwang, Jun Taek Hong, Kyung Hwan Jung, Byung Chul Chang, Kyung Suk Hwang, Jung Hee Shin, Sung Paal Yim, Sun Kyun Yoo, "Process Optimization of Dextran Production by *Leuconostoc* sp. strain YSK. Isolated from Fermented Kimchi. *J. Life Sci*". Vol. 18, No. 10, pp.1377-1383, 2008.
 16. Han, B.H., J.H. Pyeun, K.T. Lee, S.I. Choi and S.Y. Cho. "A study on rapid fermentation of whole sardine for sauce production. *Bull. Fish. Res. Dev. Agency*". Vol. 29, pp.59-70, 1982.
 17. Shahidi F, Rubin LJ, D'Souza LA. "Meat flavor volatiles - a review of composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *Crit Rev Food Sci Nutr*." Vol. 24, pp.141-243, 1986.
 18. Junus Salampeyy, Narsimha Reddy, Kasipathy Kailasapathy, Michael Phillips, "Functional and potential therapeutic ACE-inhibitory peptides derived from bromelain hydrolysis of trevally proteins. *journal of functional foods*". Vol. 14, pp.716-725, 2015.
 19. Huang G, Ren Z, Jiang J. "Separation of iron-binding peptides from shrimp processing by-products hydrolysates. *Food Bioprocess Technol*," Vol. 4, pp.1527-1532, 2011.
 20. Vatter DA, Mahoney RR. "Production of dialyzable iron by in vitro digestion of chicken muscle protein fractions: the size of the dialyzable iron. *J Sci Food Agric*," Vol. 85, pp.1537-1542, 2005.