

## 연산 오계 부산물 내장육으로부터 펩타이드 생산 최적 공정 개발과 생산물의 특성 분석

지중구<sup>1</sup> · 유선균<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>중부대학교 한방건강관리학과

<sup>2</sup>중부대학교 식품생명과학과

(2016년 8월 18일 접수; 2016년 9월 23일 수정; 2016년 9월 26일 채택)

## Optimization of Peptides Production Derived from By-product Viscera of Yoensan Ogae Meat Process

Joong Gu Ji<sup>1</sup> · Sun Kyun Yoo<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>Department of Oriental Health Care, Joongbu University

<sup>2</sup>Department of Food and Biotechnology, Joongbu University

(Received August 18, 2016; Revised September 23, 2016; Accepted September 26, 2016)

**요약** : 연산 오계육은 오래전부터 건강기능 증진 및 치료 효능이 높은 것으로 알려져 왔다. 최근 천연물 단백질 유래 기능성 펩타이드 효능이 알려짐에 따라, 본 연구는 연산오계 부산물인 내장육 단백질로부터 고압처리기술과 프로티아제를 이용하여 펩타이드 생산 최적공정과 생성물의 특성을 연구하였다. 내장육의 가수분해는 효소 bromelain 과 내장육을 고압 반응기에 투입을 하여 실시하였다. 최적 공정 조건 확립을 위하여 고압처리기의 압력(30 - 100 MPa), 효소반응 시간 (1 - 5시간), 내장육의 양(10 - 30%)의 범위에서 수행되었다. 효소 반응 후 각 조건에 따른 내장육 단백질의 가수분해도, 생산 펩타이드들의 아미노산 및 분자량 분포를 분석하였다. 연구 결과 내장육 단백질 가수분해 최적조건으로 압력 90 MPa, 효소반응시간 3-4시간, 내장육의 함량 20%에서 결정 되었다. 최적조건에서 오계 내장육 단백질의 65% 이상이 가수분해 되었다. 대부분의 가수분해물의 분자량들은 400-1,000 Da 이하의 분포를 보여줌에 대부분이 펩타이드로 판단되었다. 생산 펩타이드들은 비극성 소수성 아미노산들 42.3%, 극성 비전하 아미노산들 26.0%, 양 전하 아미노산들 13.3%, 음 전하 아미노산들 18.6% 로 분포되었다. 따라서 향산화 능력이 뛰어난 비극성 아미노산의 분포를 보아 건강 기능 식품 소재로서 활용할 가치가 높을 것으로 기대를 한다.

**주제어** : 연산오계, 내장육, 초고압, 최적공정, 펩타이드

**Abstract** : Korean Black body fowl (*Gallus gallus domesticus*; Ogae) designated as a natural monument (registration number 265) has been known as a superb traditional Korean medicine. In this study, The production of peptide from the Viscera Waste of Yeonsan Ogae was optimized

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: skyoo@joongbu.ac.kr)

using commercial protease (bromelain) by response surface methodology under high pressure process. The range of processes was pressure (30 to 100 MPa), reaction time (1 to 5 h), and substrate concentration (10 to 30%, w/v). After reaction, the degree of hydrolysis, distribution of amino acids, and molecular weight of peptides were investigated. As a results, the optimization conditions were pressure 90 MPa, reaction time 3 to 4 h, and the amount of viscera meat 20% (w/v), respectively. The molecular weight of protein hydrolysates was distributed 400 to 1,000 Da. Accordingly we presumed that most products were peptides. Of those peptides, nonpolar or hydrophobic, polar but uncharged, positively charged, and negatively charged amino acids were 42.03, 26.0, 13.3, and 18.6%, respectively. Because higher amount of hydrophobic amino acids, we expected that those products would be able to utilize as the functional food ingredients.

*Keywords* : Yeonsan-Ogae, viscera, high preassure, optimization process, peptides

## 1. 서론

가금류는 전 세계 육류 소비량의 약 30% 정도를 차지하고 있으며, 닭의 소비량은 매년 증가하고 있다[1]. 가금류 중에서 닭은 가식부가 전체 무게의 55%에 지나지 않으며 내장, 머리, 발 등 불 가식 부분이 닭 무게의 45%가 되어, 대량의 부산물이 발생되고 있다. 특히 도계장이 대형화되면서 다량의 도계 부산물이 생산되고 부산물의 체계적인 이용이 이루어지지 못하고 있어 환경오염과 질병전파의 위험마저 따르고 있다. 따라서 닭의 부산물들을 이용하여 새로운 건강 기능 식품 및 의약품 원료를 생산하는 연구가 활발하게 진행이 되고 있다[2].

가금류 중에서 연산오계는 한국 재래종으로서 1980년 천연기념물 265호로 지정이 되었으며 다양한 생리활성을 지닌 것으로 알려져 왔다. 연산오계 효능에 대한 근대적인 연구는 주로 증탕액을 제조하여 지질대사 개선, 조골세포 분화 및 파골세포 분화억제, 면역개선 등의 효능이 발표되었다[3-6]. 그러나 연산오계육 단백질로부터 유래된 펩타이드에 대한 연구들을 미비한 실정이다.

최근 호르몬처럼 생리기능을 지닌 펩타이드들은 항산화, 고혈압 완화, 면역조절, 진통완화 및 항균작용이 있는 것으로 알려져 있어 기능성 식품 소재로 활용되어 오고 있다[7-8]. 대부분의 기능성 펩타이드들은 닭 부산물, 가슴살, 날개, 난 및 피부 단백질을 상업용 프로티아제를 이용하여 생산하는 연구들이 발표되고 있다[9-13]. 펩타이드 형태의 단백질 가수 분해물을 제조하는 방법 중에서 효소를 이용하여 제조하는 것이 기

능성 및 안전성이 높다고 보고된 바가 있다 [14-15]. 최근 효소에 의한 단백질 가수분해는 고압(high hydrostatic pressure) 환경에서 활성이 향상된다고 한다. 고압처리는 우유 단백질에 펩신, 트립신 및 키모트립신과 같은 효소를 처리할 때 가수분해 속도를 증가 시켰고, 또한 고압 처리하여 생산된 육류 등 식품 소재들의 기능이 활성화 되었다[16-18].

따라서 본 연구는 초고압 처리기를 이용하여 오계육 부산물인 내장육 단백질을로부터 펩타이드 형태의 단백질 가수 분해물 최적 생산 공정 조건을 연구하고 펩타이드의 특성을 연구하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 오계 내장은 지산농원(Nonsan, Choongnam, Korea)에서 냉동상태로 공급되었고, 실험 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다. Trichloroacetic acid(TCA)시약과 Folin ciocalteu's phenol(FCP)시약은 Sigma Company 사(Seoul, Korea)에서 구입하였고, 단백질 분해효소 bromelain 1200GDU(BM 1200)은 대종상사(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 효소의 역가를 측정하기 위한 단백질은 카제인으로 대정화금(Daejeon, Korea)에서 구입하였다.

### 2.2. 내장육 전처리 및 효소반응 공정도

오계의 내장을 분리하기 위하여 냉동된 오계를 상온에서 해동하였다. 해동이 된 오계내장을 수세

하여 불순물을 제거하였다. 불순물이 제거된 오계 내장을 0.1M phosphate buffer에 넣고 homogenizer(HG-15A, DAIHAN Co., LTD., Seoul, Korea)를 사용하여 균질화 하였다. 균질화된 오계 내장은 지퍼백에 넣고 실험 전까지 -20°C에서 냉동 보관하였다. 효소 반응은 진공파우치에 균질화 된 내장육과 효소를 첨가하여 고압기(TFS, Toyoko Tasu Co., LTD, Hiroshima, Japan)에 반응시켰다. 최적 효소 반응 pH 6.0 과 온도 60°C 는 효소를 생산하는 회사에서 제공이 되었다. 반응 후 100°C의 항온수조에 30분 동안 넣고 효소활성을 정지시킨 후 냉동 보관하였다. 생산된 단백질 가수분해물로부터 0.3 M TCA(trichloroacetic acid) 를 넣고 상온에서 20분 반응 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 다음 상등액을 취하여 펩타이드의 추출하였다. 추출된 펩타이드들은 동결 건조를 하여 분석할 때까지-50°C에 보관을 하였다(Fig. 1).

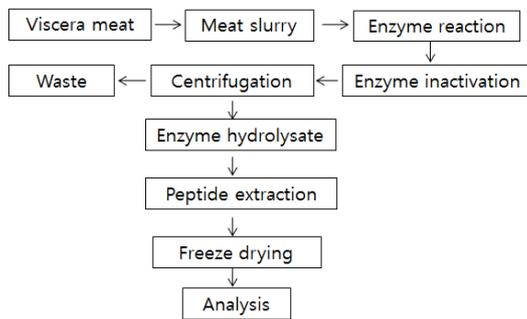


Fig. 1. Flow chart of peptide production from by-product viscera of Yoensan Ogae. Enzyme reaction was performed at high pressure reactor with various conditions such as reaction pressure, time, and substrate concentration. Optimum pH 6.0 and temperature 60°C was supplied from enzyme manufacture company.

### 2.3. 고압 처리기를 이용한 표면 반응 분석 최적화 공정 계획

표면 반응 분석 모델인 Box-Behnken Design 은 세 가지의 중요한 절차에 따라 진행이 되는 데, 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[19] 본 연구에서 펩타이드 생산 최적화 공정을 위한 실험 계획은 3개의 독립변수 효소 반응압력(MPa), 반응시간(h), 내장육의 농도(%)를 각각 65 MPa, 3시간, 20%로 하는 Center run을 5번 반복을 포함하여 총 17개의 처리 조합으로 구성 되었다. 반응 변수는 가수분해도(DH, Degree of Hydrolysis)로 하였고, 통계적인 계산을 원활하기 위하여 독립 변수를 다음과 같이 표준화(code)하여 사용하였다(Table 1).

세 개의 변수들을 각각  $X_1$ (압력),  $X_2$ (시간),  $X_3$ (기질농도)로 하였다. 표준화의 값들은 다음과 같은 공식에 의하여 구할 수 있고 그 값을 Z로 하였다.

$$Z = (X - X^0) / \Delta X$$

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

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=j=1}^k B_{ij} X_i X_j$$

여기서 Y는 Predicted response이고 본 실험처럼 3개의 변수가 있을 경우에는 k값이 3이 되고 궁극적으로 다음과 같은 식으로 표현된다.

Table 1. Levels of independent variables such as reaction pressure, time, and substrate concentration in Box-Benken design

$X_i$	Independent variables	Level		
		-1	0	+1
$X_1$	Reaction pressure (MPa)	30	65	100
$X_2$	Reaction time (h)	1	3	5
$X_3$	Substrate concentration (%)	10	20	30

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{12}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2$$

실험 후에 확정된 결과들의 통계분석은 Design Expert(Couresy: Statease Inc., Statistics Made Easy, Minneapolis, USA)를 사용하였다.

#### 2.4. 오게 내장육 단백질 가수분해도 측정

오게 내장육의 총 가수분해 값은 육 0.1 g을 110°C에서 6N HCl로 24 시간 가수분해를 실시하여 가수분해물의 tyrosine 양을 측정하여 이 값을  $D_{max}$  로 하였다. 효소 반응 t 시간 후 날개육의 가수분해물의 tyrosine 양으로 측정된 값을  $D_t$  로 하였다. 효소반응 초기 내장육의 tyrosine 양으로 측정된 값을  $D_0$ 로 하였다. 가수분해물의 tyrosine 측정은 샘플 1 ml 에 0.5 N NaOH 5 ml 혼합한 후, 1 N FCP 1 ml 넣고 즉시 혼합시킨 후 배양기에 30°C에서 15분 반응 후에 578 nm에서 흡광도를 측정하였다. 따라서 가수분해 정도 DH%(degree of hydrolysis)의 값은 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$DH = \frac{D_t - D_0}{D_{max} - D_0} \times 100$$

#### 2.5. 오게 내장 고압 처리한 펩타이드 분자량 분포(MALDI-TOF)

PBS용매 30 mL에 오게 다리육 9 g을 넣어 분쇄한 후 효소 BM 1200 1%를 사용하여 50 MPa에서 5시간 반응하고 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 취하였다. 상등액은 0.2  $\mu$ m membrane filter(Millipore Co., MA, USA)을 이용하여 여과한 샘플을 사용하였다. 펩타이드 분자량 측정을 위해 matrix는 alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid 1 mg을 0.1 mL 70% acetonitrile, 0.1% formic acid에 용해 후 만들었다. 샘플의 농도는 50 -100 ppm 정도로 준비하였으며, matrix시료와 시료를 1:1비율로 섞었다. MS plate위에 1 mL 정도 떨어뜨려 건조한 후 노란색을 띠는 샘플을 취해 질량분석기(MALDI-TOF, Voyager DE-STR, Applied biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### 2.6. 오게 내장 펩타이드 구성아미노산 분석

오게 내장 9 g과 PB 30 mL을 섞고 분쇄한 후 BM1200을 1% 사용하여 50 MPa에서 5시간 반응하고 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액 시료 0.1 mL을 18 mL test tube에 칭량하고 6 N HCl 5 mL를 가하여 감압 밀봉(질소가스 충전)한 후 110°C로 setting된 heating block에 24시간 이상 동안 가수분해시켰다. 가수분해가 끝난 시료는 50°C에서 rotary evaporater로 산을 제거한 후 sodium dilution buffer로 10 ml 정용한 다음, 이 중 1 mL를 취하여 membrane filter 0.2  $\mu$ m(Millipore Co., MA, USA)로 여과하였다. 여과된 샘플은 아미노산 자동분석기(Sykam GmbH, S433-H, Germany)로 아미노산량을 측정하였다. Column은 cation separation column(LCA K06/Na, 4.6  $\times$  150 mm; Sykam GmbH)로 정량분석하였다. Column 온도는 57~74°C, 완충용액과 o-Phthaldialdehyde(OPA) 시약의 flow rate는 각각 0.45 mL/min, 0.25 mL/min 이었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 고압 반응기에서 오게 부산물 내장육 가수분해 최적화

BM1200을 이용하여 오게 내장으로부터 효소 가수분해 최적 조건요인들인 압력, 시간, 내장육 양의 실험변수에 대하여 Box-Behnken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험결과 즉, 가수분해도를 Table 2에 나타내었다. 실험 결과 가수분해도의 값은 32.46-66.28 범위에서 측정값이 얻어졌다.

실험결과를 이용한 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다. Quadratic 회귀 모델의 분석 결과가 Table 3에서 보여준다. 이들의 결과에 따르면 가수분해도는 압력과 시간과 기질의 양에 영향을 받는다는 것이 95% 수준 이내에서 유의성이 인정되었다.

Table 2. Experimental data of degree of hydrolysis using by-product viscera meat of Yoensan Ogae

Sample	Pressure (MPa)	Time (h)	Viscera meat (%)	Degree of hydrolysis (%)
1	30	1	20	32.46
2	100	1	20	44.32
3	30	5	20	36.74
4	100	5	20	56.17
5	30	3	10	44.90
6	100	3	10	52.09
7	30	3	30	38.48
8	100	3	30	66.28
9	50	1	10	38.48
10	50	5	10	41.79
11	50	1	30	38.48
12	50	5	30	56.17
13	50	3	20	56.70
14	50	3	20	54.20
15	50	3	20	59.80
16	50	3	20	55.40
17	50	3	20	56.70

Enzyme reaction was performed at high pressure reactor containing bromelain protease and by-product viscera.

Table 3. Analysis of variance(ANOVA) for fitted second order polynomial model and lack of fit

Source	DF	Sum of Squares
		Degree of hydrolysis <sup>a</sup>
Model	9	1532.27 <sup>b</sup>
Residual	7	27.57
Lack of Fit	3	10.12
Pure Error	4	17.45
Cor Total	16	1559.84

<sup>a</sup> Coefficient of correlation ( $R^2$ ) was 0.96

<sup>b</sup> Significant at 5% level.

모델 결정계수(determination coefficient)  $R^2$  값은 실험값(observed value), 예측값(predicted value) 그리고 상호연관(correlation) 정도를 보여 주는데 가수분해도 0.96 이므로, 이 모델은 4% 범위에서 설명되지 않는다는 것을 보여준다. 적합결여(lack of fit) 테스트 검증에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다. Table 4에서는 모델의 회귀 계수를 나타내는 것으로 가수분해도가 3가지 요인들에 대하여 크게 영향을 받는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 본 실험결과 압력, 시간, 기질의 양에 대한 영향은 1차, 2차, 교호항(cross product term)에서 유의성이 나타나 요인들의 단독 또는 교호적으로 영향을 미침을 알 수 있다. 이들에 대한 회귀식은 Table 5에 있다.

### 3.2. 내장육 가수분해에 대한 반응 압력과 시간의 영향

표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 예측 최대 고압 처리한 효소가수분해는 시간보다 압력에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도는 펩타이드 생산효율을 평가하는데 지표가 된다. 시간은 3-4 시간 사이에 가수분해도가 54.46% 까지 증가하다가 그 이후 감소하는 것으로 나타났다. 반면 압력의 경우 약 90 MPa 정도에서 62.15%까지 가수분해도가 높아지는 것으로 확인되어 펩타이드 생산에 있어 압력에 더 큰 영향을 받는 것을 알 수 있다(Fig. 2).

Table 4. Estimated coefficient for the filled second order polynomial representing the relationship between the response and process variables

Factor	Coefficient
	Degree of hydrolysis
Intercept	56.56
Linear	
Pressure	8.28
Time	4.64
Substrate	2.77
Quadratic	
Pressure	- 3.72
Time	- 10.42
Substrate	- 2.40
Interactions	
Time×Pressure	1.90
Substrate×Pressure	5.15
Time×Substrate	3.60

Table 5. Polynomial equations calculated by response surface program.

Response	Second order polynomial equations	$R^2$
Hydrolysis	$Y = 56.56 + 8.28X_1 + 4.64X_2 + 2.77X_3 - 3.72X_1^2 - 10.42X_2^2 - 2.40X_3^2 + 1.90X_1X_2 + 5.15X_1X_3 + 3.60X_2X_3$	0.96

$X_1$  : Pressure (MPa),  $X_2$  : Time (h),  $X_3$  : Substrate (g)

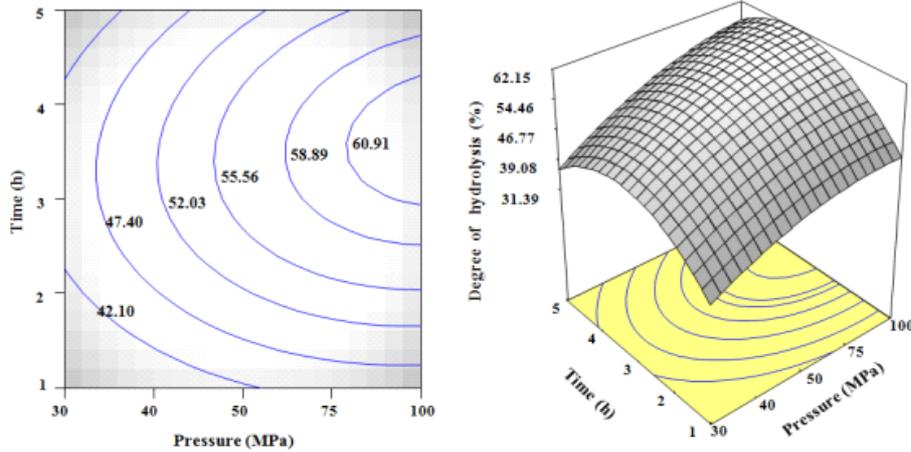


Fig. 2. Contour plot (left) and 3D surface on the response. Effect of enzyme reaction time and pressure of high pressure reactor on the hydrolysis of by-product viscera of Yeonsan Ogae. Enzyme reaction was performed at pH 6.0 and enzyme concentration 2%.

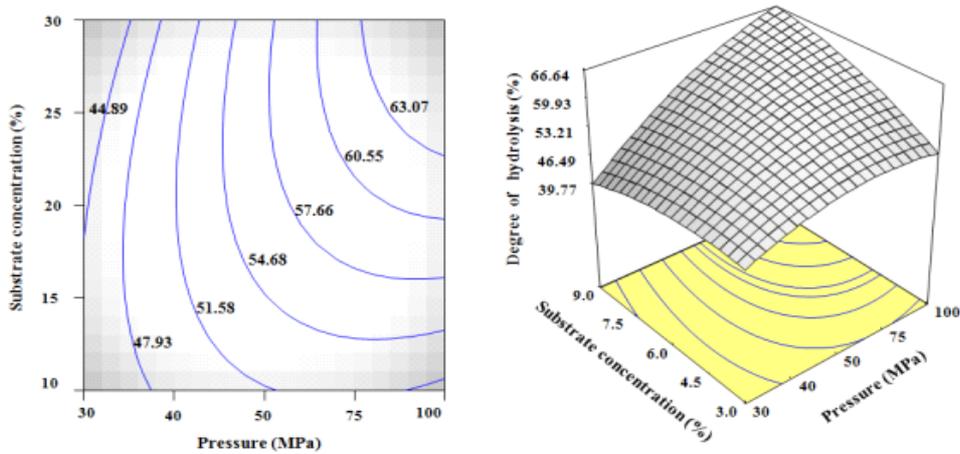


Fig. 3. Contour plot (left) and 3D surface on the response. Effect of enzyme reaction time and viscera meat amount on the hydrolysis of by-product viscera of Yeonsan Ogae. Enzyme reaction was performed at pH 6.0 and enzyme concentration 2%.

**3.3. 내장육 가수분해에 대한 반응 압력과 내장육의 양의 영향**

압력과 기질에 따른 가수분해도의 변화는 Fig. 3에 나타내었다. 기질의 양의 변화에 따른 가수분해도 변화 보다는 압력의 변화에 상당히 민감하였으며, 기질의 양 20%, 압력 약 90 MPa 근처에서 정상점이 나타났는데, 이것이 가수분해도의 최대점이 되어 그 값은 약 61.59%로 압력이

높을 때 펩타이드의 생산량이 증가함을 알 수 있다.

**3.4. 내장육 가수분해에 대한 반응 압력과 시간의 영향**

가수분해도에 대한 시간과 기질의 영향에 대한 표면반응이다. 오계 내장 고압처리 효소가수분해하여 시간과 기질에 따른 최적 표면 반응의 분석

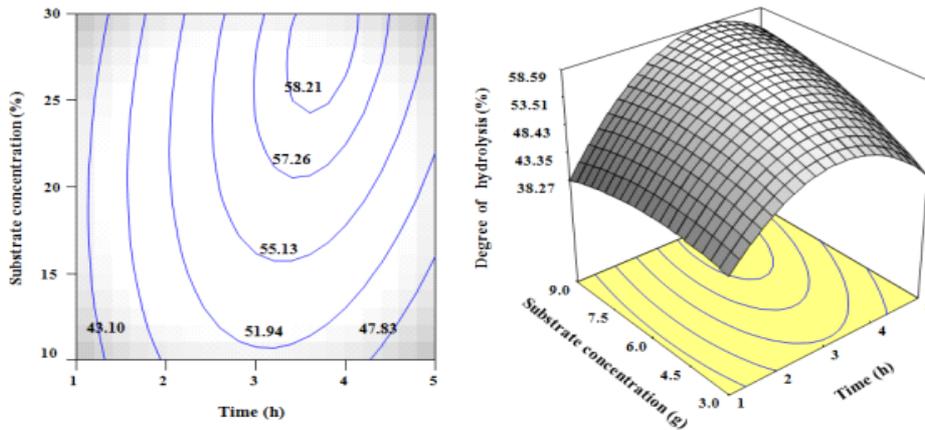


Fig. 4. Contour plot (left) and 3D surface on the response. Effect of enzyme reaction time and pressure of high pressure reactor on the hydrolysis of by-product viscera of Yeonsan Ogae. Enzyme reaction was performed at pH 6.0 and enzyme concentration 2%.

결과 정상점이 최대점으로 판명되어 예측 최대 펩타이드 생산은 3-4시간 반응 하였을 때, 그리고 기질의 양이 약 27%에서 반응할 때 정상점이 나타났다. 이곳이 최대 펩타이드 양이 생산되는 것으로 확인되었으며 그 값은 약 57.43%로 나타났다. 고압처리 효소가수분해를 이용한 최적조건은 기질의 양보다 시간 영향을 받는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

**3.5. 반응 조건들이 가수분해에 미치는 영향**

결과를 종합해 보면 표면 반응의 분석결과 정상점이 최대점으로 판명되어 고압처리 효소가수분해에 가장 영향을 미치는 것은 압력, 시간, 기질의 순으로 나타났다(Fig. 5). 즉, 압력은 낮을수록, 반응시간을 연장할수록, 기질이 적을수록 가수분해도가 높았다.

**3.6. 내장육 단백질 가수분해물의 분자량 분포**

본 연구에서 Fig. 6은 오계내장 단백질 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOF의 그래프에서 X 축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화 된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드는 m/z 400에서 1,000 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 오계 내장 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 8개 정도의 분포를 보여 주었다. 평균

분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5, 6, 8, 10 개로 이루어져 있다고 평가되었다.

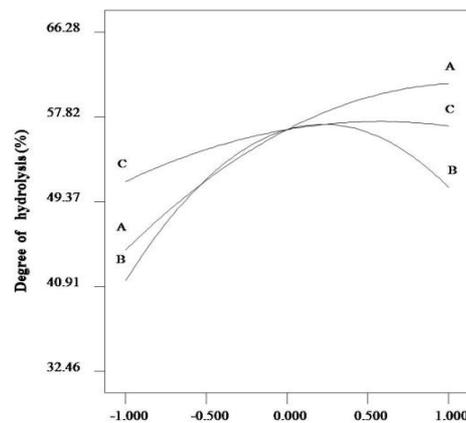


Fig. 5. Effect of enzyme reaction time, pressure of high pressure reactor, and amount of viscera on degree of hydrolysis of by-product viscera of Yeonsan Ogae meat process. Enzyme reaction was performed at pH 6.0 and enzyme concentration 2%. A, B, and C represent the pressure of reactor, reation time, and amount of viscera, respectively.

효소 bromelain를 이용하여 어류인 전갱이 단백질을 가수분해를 하여 항바이러스를 보이는 5 kDa 펩타이드 생산을 보고하였으며, 새우 가공 부산물로부터 펩타이드를 동정한 결과 699 Da의 분자량을 가진 펩타이드가 보고된 바 있다 [20,21]. 항산화 기능을 가진 펩타이드 3가지가 참치육 가수 분해물로부터 생산이 되었는데 분자량은 각각 1305 Da, 938 Da, 584 Da이었다 [22]. 항바이러스 효능을 보이는 전갱이 단백질 가수 분해물은 5 KDa 이었다[23].

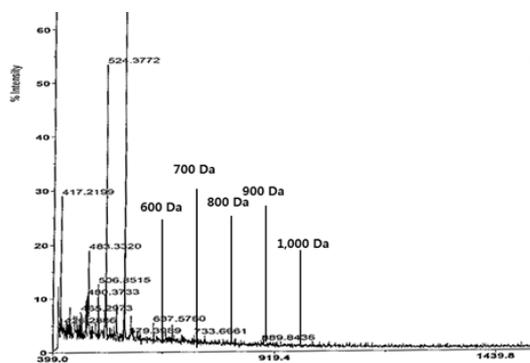


Fig. 6. MALDI-TOF mass spectra of viscera protein hydrolysates. Protein hydrolysates was produced at high pressure reactor with optimized conditions such as pressure 800 MPa, 3 h, and 20% viscera concentration. Enzyme reaction was performed at pH 6.0 and enzyme concentration 2%.

### 3.7. 내장육 펩타이드 아미노산 조성

오계 부산물 내장의 고압처리 효소가수분해 펩타이드의 구성 아미노산의 조성은 Fig.7에서 보여 준다. 구성 아미노산 중에서 비극성 소수성 아미노산인 isoleucine이 전체 10.6%를 차지하였고 관련 아미노산들인 alanine, valine, leucine, proline, phenylalanine, tyrosine들이 42.3%를 차지하였다. 이어서 극성 비전하 아미노산들 26.0%, 양 전하 아미노산들 13.3%, 음 전하 아미노산들 18.6% 로 분포되었다. 소수성 및 방향족 아미노산들은 수소이온 공여를 통하여 라디칼 소거능 과 키이레이팅능력이 높은 것으로 알려졌다[24]. 또한 소수성 아미노산들은 세포막의 소수성부위를 통과하기 용이하기 때문에 생체이용률이 높은 것으로 보고되었다[25]. 따라서 소수성

아미노산을 다량으로 함유한 펩타이드들은 항산화 기능이 뛰어난 것으로 보고되고 있다[26].

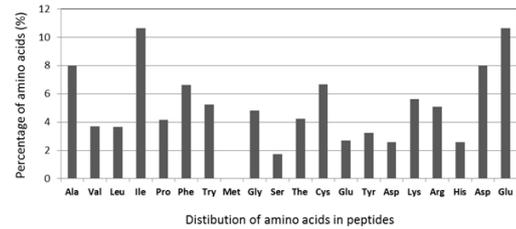


Fig. 7. Amino acids distribution of peptides produced at high pressure reactor with optimized conditions such as pressure 800 MPa, 3 h, and 20% viscera concentration. Enzyme reaction was performed at pH 6.0 and enzyme concentration 2%.

## 4. 결론

본 연구는 단백질 가수분해 효소 bromelain를 이용하여 오계육 가공 부산물인 내장육으로부터 펩타이드 최적 생산 조건을 확립 하기 위하여 수행되었다. 효소가수분해 공정은 고압 반응기에서 수행이 되었고 효소 반응 pH 6.0 과 온도 60°C 는 효소 제조 업체에서 제공이 되었다. 따라서 본 연구는 고압반응기의 압력(30-100 MPa), 반응시간(1-5시간), 내장육의 양 (10- 30%)의 범위에서 수행이 되었다.

1. 가수분해도 최적 조건은 압력은 높을수록 증가를 하였고, 반응 시간은 3시간, 기질의 농도는 20%에서 결정이 되었다. 이때 최대 가수분해도가 34.10%이었다.
2. 단백질 가수분해물의 분자량은 MALDI-TOF로 분석을 하였는데 평균 분자량 300 이상 1,000 이하의 분자량 분포를 보여 대부분이 펩타이드로 평가되었다. .
3. 소수성 및 방향족 아미노산들은 수소이온 공여를 통하여 라디칼 소거능과 키이레이팅 능력이 높고 세포막 통과가 용이하기 때문에 생체이용률이 높은 것으로 보고되어 왔다. 따라서 본 연구 결과 생산된 펩타이드

의 구성 아미노산 중에서 비극성 소수성 아미노산들이 42.3%를 차지하여 향산화 기능이 뛰어날 것으로 기대한다.

4. 그러므로 본 연구 결과를 바탕으로 생산된 펩타이드들에 대한 생리활성 특성 연구가 후속으로 진행하여 건강 기능 식품소재로 활용할 가치가 매우 높은 것으로 기대한다.

### 감사의 글

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

### References

1. J.H. Oh, S. Yoon, Y. Choi. 2014. The effect of superheated steam cooking condition on physico-chemical and sensory characteristics of chicken breast fillets. *Korean J. Food Cook. Sci.*, 30: 317-324, 2014.
2. I. V. Nikolaev, S. Sforza, F. Lambertini, D. Y. Ismailova, V. P. Khotchenkov, V. G. Volik, A. Dossena, V. O. Popov, O. V. Koroleva, "Biocatalytic conversion of poultry processing leftovers: Optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization", *Food Chemistry*, 197: 611-621, 2016.
3. H. S. Chae, Y. M. Yoo, C. N. Ahn, S. H. Cho, B. D. Sang, Y. G. Kim, J. M. Lee, S. K. Yun, Y. I. Choi, "Feeding Effects of the High Pressure Boiled Extract(HPBE) of the Ogol Chicken on Weight Gain and Serum Lipid Composition of Rat", *Korean J Poultry Sci*, 30: 135-143, 2003.
4. H. S. Chae, Y. M. Yoo, C. N. Ahn, S. H. Cho, B. Y. Park, J. M. Lee, Y. K. Kim, S. G. Yun and Y. I. Choi, "Chemical and Sensory Characteristics of Boiled Soup Extracted from Crossbred Ogol Chicken as Affected by the Level of Flavourzyme", *Korean J Poultry Sci*, 30: 11-16, 2003.
5. H. S. Yoo, K. H. Chung, K. J. Lee, D. H. Kim, J. H. An. Effect of Gallus gallus var. domesticus (Yeonsan ogolgye) Extracts on Osteoblast Differentiation and Osteoclast Formation. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 43: 322-329, 2015.
6. H. S. Chae, C. N. Ahn, Y. M. Yoo, J. S. Ham, J. M. Lee, S. K. Yoon, Y. I. Choi. The Effects of the High Pressure Boiled Extracts (HPBE) of the Ogol Chicken with Herbs on the Hormones, Cytokine, Specific Antibody of Serum in the Rat, 24: 283-292, 2004.
7. E. Haque, R. Chand, S. Kapila. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Reviews International* 25: 28-43, 2009.
8. J.H. Baek, E.J. Jeong, S.Y. Jeon, Y.J. Cha. Taste components of the hydrolysate of snow crab chionoecetes japonicus cooker effluent as precursors of crab flavorings. *Kor J Fish Aquat Sci.*, 45: 232-237, 2012.
9. F. Nahed, K. Naourez, H. Anissa, H. M. Ibtissem, D. Ines, N. Moncef, "Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, Bacillus pumilus A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity", *Process Biochemistry*, 46: 1731-1737, 2012.
10. O. John O., G. Abraham T., M. Sunday A., A. Rotimi E., A. Michel, "Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats", *Journal of Functional Foods*, 14: 133-143, 2015.
11. R. Z. Gu, W. Y. Liu, F. Lin, Z. T. Jin, L. Chen, W. X. Yi, J. Lu, M. Y. Cai, "Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of oligopeptides derived from black-bone silky fowl (Gallus gallus domesticus

- Brisson) muscle”, *Food Research International*, 49: 326–333, 2012.
12. J. H. Liu, Y. G. Tian, Y. Wang, S. P. Nie, M. Y. Xie, S. Zhu, C. Y. Wang, P. Zhang, “Characterization and in vitro antioxidation of papain hydrolysate from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle and its fractions”, *Food Research International*, 44: 133–138, 2011.
  13. H. S. Chae, Y. M. Yoo, C. N. Ahn, S. H. Cho, B. D. Sang, Y. G. Kim, J. M. Lee, S. K. Yun, Y. I. Choi, “Feeding Effects of the High Pressure Boiled Extract(HPBE) of the Ogol Chicken on Weight Gain and Serum Lipid Composition of Rat”, *Korean J Poult Sci*, 30: 135–143, 2003.
  14. H. S. Chae, Y. M. Yoo, C. N. Ahn, S. H. Cho, B. Y. Park, J. M. Lee, Y. K. Kim, S. G. Yun and Y. I. Choi, “Chemical and Sensory Characteristics of Boiled Soup Extracted from Crossbred Ogol Chicken as Affected by the Level of Flavourzyme”, *Korean J Poult Sci*, 30: 11–16, 2003.
  15. H. S. Yoo, K. H. Chung, K. J. Lee, D. H. Kim, J. H. An. Effect of *Gallus gallus* var. *domesticus* (Yeonsan ogolge) Extracts on Osteoblast Differentiation and Osteoclast Formation. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 43: 322–329, 2015.
  16. E. Peñas, G. Préstamo, F. Polo, R. Gomez. Enzymatic proteolysis, under high pressure of soybean whey: Analysis of peptides and the allergen Gly m 1 in the hydrolysates. *Food Chemistry*, 99: 569–573, 2006.
  17. D. Knorr, V. Heinz, R. Buckow. High pressure application for food biopolymers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1764: pp. 619–631, 2006.
  18. B. B. Bobonyaratanakornkit, C. B. Park, D. S. Clark. Pressure effects on intra and intermolecular interactions within proteins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1595: 235–249, 2002.
  19. S.K.Hwang, J.T.Hong, JK. H.ung, B.C. Chang, K.S. Hwang, J.H. Shin, S.P. Yim, S.K. Yoo. Process Optimization of Dextran Production by *Leuconostoc* sp. strain YSK. Isolated from Fermented Kimchi. *J. Life Sci.* 1377–1383, 2008.
  20. J. Salampessy, N. Reddy, K. Kailasapathy, M. Phillips. 2015. Functional and potential therapeutic ACE-inhibitory peptides derived from bromelain hydrolysis of trevally proteins. *Journal of functional foods*. 14: 716–725. 2015.
  21. G. Huang, Z. Ren, J. Jiang. 2011. Separation of iron-binding peptides from shrimp processing by-products hydrolysates. *Food Bioprocess Technol*, 4: 1527–1532, 2011
  22. K. Hsu, G. Lu, C. Jao. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with Orientase (*Bacillus subtilis*), *Food Research International*, 42: 647–665, 2009.
  23. J. Adler-Nissen. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem*, 24: 1090–1093, 1976.
  24. T.L. Pownall, C.C. Udenigwe, R.E. Aluko. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed enzymatic protein hydrolysate fractions. *J. Agri. Food Chem*, 58: 4712–4718, 2010.
  25. S.W. Himaya, B. Ryu, D.H. Ngo, S.K. Kim. Peptide isolated from Japanese flounder skin gelatin protects against cellular oxidative damage. *J. Agri. Food Chem*. 60: 9112–9119, 2012.
  26. O. Power, P. Jakeman, R.J. FitzGerald. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential application of milk-derived antioxidative peptides. *Amino acids*, 44: 797–820, 2013.