

프로테아제 종류에 따른 이용한 연산 오계육 단백질 가수분해물의 아미노산 및 생리활성 특성

하유진¹ · 김주신² · 유선균^{1†}

¹중부대학교 식품생명과학과

²신한대학교 식품조리과학부 식품영양전공

(2019년 8월 30일 접수; 2019년 9월 24일 수정; 2019년 9월 26일 채택)

Biological Characteristics of Protein Hydrolysates Derived from Yoensan Ogae Meat by Various Commercial Proteases

Yoo Jin Ha¹ · Joo Shin Kim² · Sun Kyun Yoo^{1†}

¹Department of Food and Biotechnology, Joongbu University

²Division of Food Science and Culinary Arts, Shinhan University

(Received August 30, 2019; Revised September 24, 2019; Accepted September 26, 2019)

요 약 : 천연물 유래 저분자 펩타이드들은 항산화, 고혈압 완화, 면역조절, 진통완화 및 항균작용 등 생리활성이 있는 것으로 알려져 왔다. 본 연구는 연산오계육 단백질을 상업용 프로테아제(alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex)를 이용하여 저분자 펩타이드를 생산하고 항산화 활성(DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력), 펩타이드의 구성 아미노산 및 분자량을 분석하였다. 효소반응은 효소반응기에 다진 오계육 슬러리 50 g 와 단백질 효소 2%(w/v)를 넣고 pH 6 와 온도 60°C 조건에서 2시간 반응을 하였다. 반응 후 가수분해도(%)의 범위는 36.65±4.10%에서 70.75±5.29% 사이의 범위를 보여주었는데 protamex의 가수분해도는 46.3%로 가장 높았으며, papain hydrolysate가 70.75±5.29%로 가장 높은 값을 보여주었으며, 반면에 alcalase hydrolysate가 36.65±4.10%로 가장 낮은 값을 보여주었다. DPPH 라디칼 소거능은 bromelain 처리 저분자 펩타이드가 가장 높게 나타났고, alcalase 처리 펩타이드에서 소거능이 가장 낮게 나타났다. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 역시 bromelain 처리 저분자 펩타이드가 50% 이상의 가장 높은 라디칼 소거능을 보여주었다. 하이드록시 라디칼 소거능은 약 16.73에서 69.16% 사이의 분포를 보여 주었는데 bromelain 처리 저분자 펩타이드에서 가장 높게 나타났다. Fe²⁺ 킬레이션 능력은 약 17.85에서 47.84% 사이의 분포를 보여 주었다. hydrolysate들의 킬레이션 능력은 사용 효소들에 상관없이 큰 차이점이 없었다. 아미노산의 분석결과 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex 효소 가수분해 시켰을 때 차이점을 보여 주었고 가장 많은 아미노산은 glutamic acid이었다. 효소 hydrolysate들의 분자량의 분포는 처리 효소에 따라 분자량의 분포가 다르게 나타났지만 300-2,000 Da 범위에 있었다.

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

주제어 : 연산오계, 저분자 펩타이드, 항산화 활성, 아미노산, 분자량

Abstract : Natural-derived protein-derived low molecular weight peptides have been known to have physiological activities such as antioxidant, hypertension relief, immunomodulation, pain relief and antimicrobial activity. In this study, the low-molecular peptides were produced using commercial proteases (alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex), and the antioxidant activity (DPPH scavenging activity, superoxide radical scavenging activity, hydroxy radical scavenging activity, and metals chelation capacity), constituent amino acid and molecular weight of the peptide were analyzed. Enzyme reaction was performed by adding 50 g of chopped Ogae meat slurry and 2%(w/v) protein enzyme into the enzyme reactor for 2 h at a pH of 6 and a temperature of 60°C. The degree of hydrolysis(%) after the reaction ranged from 36.65±4.10% to 70.75±5.29%. The highest degree of hydrolysis of protamex was 46.3%, and the highest value of papain hydrolysate was 70.75±5.29%. On the other hand, alcalase hydrolysate showed the lowest value of 36.65 ± 4.10%. Bromelain-treated low molecular weight peptides showed the highest DPPH radical scavenging activity and the lowest scavenging activity of alcalase-treated peptides. Superoxide radical scavenging activity showed that bromelain treated low molecular peptide showed the highest radical scavenging activity of 50% or more. Hydroxyl radical scavenging activity ranged from about 16.73 to 69.16%, the highest among bromelain-treated low molecular peptides. Fe²⁺ chelation abilities showed a distribution between about 17.85 to 47.84%. The chelation capacity of the hydrolysates was not significantly different without any difference to the enzymes used. The results of amino acid analysis showed differences between hydrolysates of alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, and protamex enzymes. The most amino acid was glutamic acid. The molecular weight distribution of the enzyme hydrolyzates was in the range of 300–2,000 Da, although the molecular weight distribution differed according to the treated enzymes.

Keywords : Yoensan Ogae, Low molecular weight peptides, Antioxidant activity, Amino acid, Molecular weight

1. 서론

오골계는 예로부터 질병을 예방하고 건강을 개선하는 건강기능식품으로 알려져 왔다. 대표적인 효능으로는 적혈구의 생성을 촉진, 항산화, 항고혈압, 항염증, 진통완화, 및 간 보호에 효과가 있는 것으로 보고되어 왔다[1]. 이들 중에서 한국 재래 오골계인 연산 오계는 천연기념물 265호로 지정되어 다른 오골계와 차이가 있다고 알려져 왔다[2].

최근 저분자 펩타이드들의 생리활성 기능이 발표되면서 가금류 유래 단백질들인, 닭 가공 공정 부산물 단백질, 닭 가슴살 단백질, 닭 날개 단백질, 난 단백질, 닭 피부 단백질로부터 기능성 펩타이드 생산 및 생리활성에 대한 연구들이 발표

되고 있다[3-5]. 이러한 저분자 펩타이드들은 호르몬처럼 특정 세포의 수용기에 반응을 하여 생리적인 기능을 활성화하는 물질로 새로운 생리활성 소재로 이용될 가능성이 크다[6]. 대체로 기능성 펩타이드들은 보통 3-20개의 아미노산으로 구성되어 있고 아미노산의 조성이나 서열에 따라 펩타이드의 활성이 다양하다[7]. 특히 단백질에 비해 크기가 작은 생리 활성 펩타이드는 생체내로 쉽게 흡수 될 수 있으며, 항산화 효과, 면역기능, 고혈압 예방, 진통완화 및 항균작용 등 생리활성 기능이 높은 것으로 보고되어 왔다[8-9]. 이러한 배경에서 본 연구는 연산오계육 단백질을 다양한 프로테아제 효소를 이용하여 저분자 펩타이드를 생산하고 생리활성 및 물리적 특성에 대한 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

단백질 분해효소 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain와 protamex는 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 단백질 hydrolysate 측정에 사용된 Bicinchoninic Acid(BCA) Protein Assay Kits는 Thermo Fisher Scientific(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 실험에 사용된 오계육은 깃털이 제거된 상태로 진공 포장하여 냉동된 상태로 지산농원(Nonsan, Choongnam, Korea)으로부터 제공받았다.

2.2. 오계육 단백질 가수분해

냉동된 오계육을 40°C 항온수조에서 20분간 해동하여 뼈를 제거하고 남은 오계육을 용기에 담아 고기갈개(Kenwood, Seoul, Korea)를 이용하여 곱고루 다진 후 균질화 된 오계육 50 g에 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain와 protamex 단백질 가수분해효소를 각각 2%(v/v)씩 첨가하여 60°C 반응기에서 2시간 가수분해하였다. 반응 후에 효소 반응물들은 90°C의 항온수조에 10분간 가열하여 효소활성을 정지시켰다. 저분자 펩타이드를 회수하기 위하여 효소 반응물들을 9,000 rpm x 20분의 조건으로 원심분리를 하여 상등액을 취하였다. 계속해서 0.3 M TCA(Trichloroacetic acid)로 단백질을 침전시킨 후에 3,000 rpm x 10분 조건으로 원심분리를 하여 상등액을 취하였다. 저분자 펩타이드를 회수하기 위해서 10 kDa 한외여과막을 장착한 한외여과기(Amicon 8100, bedford, USA)에서 permeate를 회수하였다. 저분자 펩타이드 용액은 동결 건조하여 다음 실험에 사용할 때까지 보존하였다.

2.3. 오계육 단백질 가수분해도 측정

가수분해도 측정은 BCA 방법에 따라 수행하였다. 오계육 hydrolysate 2.5 mL에 0.3 M TCA(Trichloroacetic acid) 5 mL를 넣고 상온에서 20분간 단백질 침전을 시켜 고형물을 제거하고 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액만을 수거한 다음 상등액 1 mL에 1N NaOH 시약으로 pH가 5-7이 되도록 중화시켰다. 중화시킨 hydrolysate의 상등액 0.1 mL에 2 mL BCA 시약을 혼합하였다. 혼합물을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 사용하여

562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 가수분해도(DH, degree of hydrolysis)는 아래와 같은 식으로 계산되었다.

$$DH(\%)=(A/B)\times 100$$

A: 가수분해 반응 전 오계육 단백질의 흡광도

B: 가수분해 반응 후 오계육 단백질의 흡광도

2.4. DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다[10]. DPPH 라디칼 소거활성 측정은 10%로 증류수에 희석한 단백질 hydrolysate 2 mL와 DPPH radical(0.2 mM) 용액 0.5 mL를 혼합하여 사용하였다. 혼합물은 30분간 실온에서 암실 보관한 후 spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 아래의 식에 의해 값을 산출하였다.

$$\text{DPPH-radical scavenging activity}(\%) \\ =[(B-A)/B]\times 100$$

A: 시료 첨가시의 흡광도

B: 시료 무 첨가시의 흡광도

2.5. 하이드록시 라디칼 소거활성

하이드록시 라디칼에 대한 소거활성 측정은 Fan의 방법을 변형하여 측정하였다[11]. 하이드록시 라디칼 소거활성 측정을 위해서 대조구는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 사용하였다. 10%로 증류수에 희석한 단백질 hydrolysate 300 μ L와 300 μ L 3 mM 1,10-phenanthroline, 300 μ L, 3 mM FeSO₄, 300 μ L 0.01% hydrogen peroxide를 혼합하였다. 혼합액은 37°C에서 1시간 동안 반응 후 spectrophotometer를 사용하여 536 nm에서 흡광도를 측정하였다. 하이드록시 라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity}(\%) \\ =\{[(\Delta A/\text{min})_b-(\Delta A/\text{min})_s]/(\Delta A/\text{min})_b\}\times 100.$$

b: 대조구, s: 샘플

$\Delta A/\text{min}$: 반응 후 흡광도 -반응 전 흡광도

2.6. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거활성

슈퍼옥사이드 라디칼에 대한 소거능은 Yu의 방법을 변형하여 측정하였다[12]. 슈퍼옥사이드

라디칼 소거활성 측정을 위해서 대조구는 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)용액을 사용하였다. 10%로 증류수에 희석한 단백질 hydrolysate 500 μ L 을 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)용액 500 μ L와 400 μ L 1.5 mM pyrogallol 용액에 혼합한 후 실온에서 4분 동안 반응시켰다. 반응 후 spectrophotometer를 사용하여 420 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Superoxide scavenging activity(\%)} = \left[\frac{(\Delta A/\text{min})_b - (\Delta A/\text{min})_s}{(\Delta A/\text{min})_b} \right] \times 100.$$

b: 대조구, s: 샘플
 $\Delta A/\text{min}$: 반응 후 흡광도 - 반응 전 흡광도

2.7. Fe²⁺ 킬레이션 활성

시료용액의 metal chelating effect는 Gulcin의 방법을 약간 변형하여 측정하였다[13]. Fe²⁺ 킬레이션 활성 측정을 위해서 대조구는 ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA)용액을 사용하였다. 10%로 희석한 단백질 hydrolysate 500 μ L 와 100 μ L FeCl₂(0.6 mM), 900 μ L methanol 을 넣고 혼합하였다. 혼합물은 5분 동안 상온에서 반응시킨 후 100 μ L ferrozine(5 mM)을 첨가하여 10분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후 spectrophotometer를 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fe²⁺ 킬레이션 활성은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Iron chelation activity(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료 첨가시의 흡광도
 B: 시료 무 첨가시의 흡광도

2.8. 구성 아미노산 분석

동결건조 시료 1 mg을 1 mL에 녹인 후 membrane filter 0.2 μ m(Millipore Co., MA, USA)로 여과시켜 아미노산 자동분석기(S433-H, Sykam GmbH, Germany, Munich)로 분석하였다. 아미노산 자동분석기 컬럼은 Cation separation column(LCA K06/Na)을 사용하였고, 컬럼 크기는 4.6 \times 150 mm, 컬럼 온도는 57-74 $^{\circ}$ C, 완충용액과 OPA 시약의 flow rate는 각각 0.45 mL/min, 0.25 mL/min 였으며, 이때 완충용액의 pH 범위는 3.45-10.85이었고, 파장은

440 nm과 570 nm 이었다.

2.9. MALDI-TOF에 의한 분자량 측정

동결건조 단백질 hydrolysate 0.002 g 취하여 0.1% TFA/H₂O 1mL에 녹인 후 0.2 μ m membrane filter(Millipore Co. MA, USA)으로 여과시켜 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, matrix 시료와 시료를 1:1비율로 섞었다. MS plate위에 1 mL 정도 떨어뜨려 건조한 후 노란색을 띄는 샘플을 취해 질량분석기(MALDI-TOF, Voyager DE-STR, Applied biosystems, Foster City, CA, USA)로 분자량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 오계육 단백질 hydrolysate 수율

효소별 오계육 단백질 hydrolysate의 생리활성을 가지는 펩타이드를 제조하고자 일반적으로 사용되는 상업적 단백질 가수분해효소 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex를 사용하여 가수분해하였다. 효소 반응 후 저분자 펩타이드를 함유한 가수분해도 Table 1에서 보여준다. 사용한 효소의 종류에 따라 가수분해도가 다르게 나타났다. 가수분해도는 papaian, protamex, neutrase, flavourzyme, bromelain alcalase 순으로 나타났으며, papain hydrolysate이 70.75 \pm 5.29%로 가장 높은 값을 보여주었으며, 반면에 alcalase가 36.65 \pm 4.10%로 가장 낮은 값을 보여주었다. 유사한 결과로 Sara 등[14]연구에서는 Bromelain을 이용하여 블루게 육단백질을 가수분해하였을 때 가장 높은 가수분해도를 보여주었다.

3.2. 효소 종류에 따른 hydrolysate의 항산화 활성

항산화 능을 평가하는데 사용되는 DPPH는 용매에서 안정한 라디칼을 비교적 장시간 유지하기 때문에 천연물의 환원반응에 널리 사용이 되고 있다[14-16]. 사용된 효소의 종류에 따라 생산된 저분자 펩타이드 형태의 단백질 hydrolysate들의 DPPH 라디칼의 소거능이 유의적으로 다르게 나

Table 1. Yields of protein hydrolysates produced from Yeonsan Ogye meat using different commercial enzymes. Enzyme reaction was performed at optimal conditions supplied from company

Name of hydrolysate	Yield of hydrolysis(%)
Alcalase hydrolysate	36.65 ± 4.10 ^a
Bromelain hydrolysate	43.92 ± 3.85 ^a
Flavourzyme hydrolysate	49.50 ± 3.93 ^{ab}
Neutrase hydrolysate	55.01 ± 4.82 ^b
Papain hydrolysate	70.75 ± 5.29 ^{bc}
Protamex hydrolysate	62.94 ± 4.67 ^d

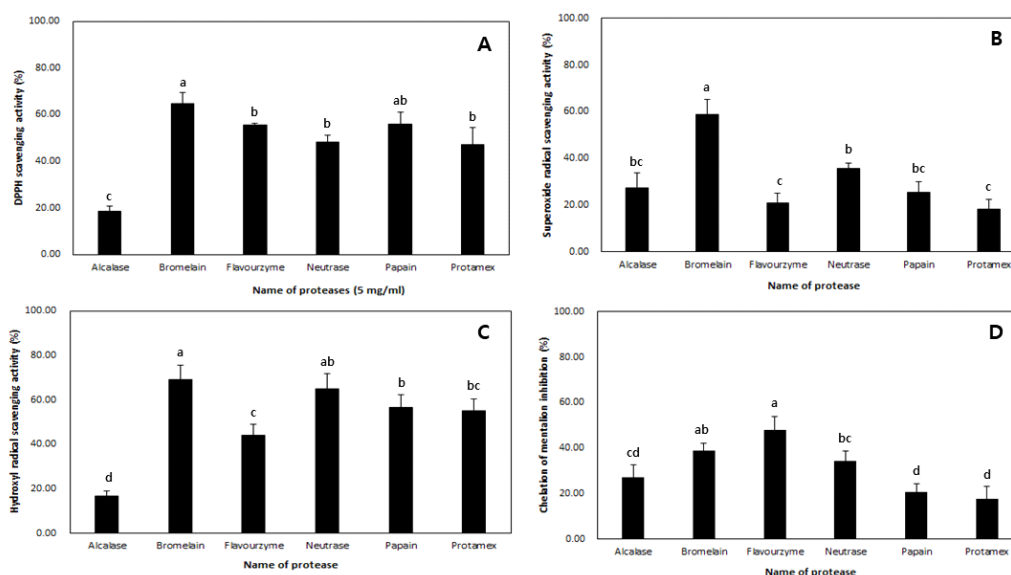


Fig. 1. The degree of antioxidant activity of Yeonsan Ogye meat protein hydrolysates. A: DPPH-radical scavenging activity(%), B: hydroxyl radical scavenging activity(%), C: superoxide scavenging activity(%), D: iron chelation activity(%).

타났다. 오계육 hydrolysate들의 DPPH 항산화 능력은 약 18.61에서 64.83% 사이의 분포를 보여 주었는데 bromelain의 소거능이 가장 높게 나타났고, alcalase의 소거능이 가장 낮게 나타났다. flavourzyme, papain의 소거능이 비슷하게 나타났고, protamex 및 neutrase의 소거능 또한 비슷하게 나타났으나 비교적 낮았다(Figure 1A). 다른 연구결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력은 1) 구성아미노산 중에서 비극성 및 방향족 아미노산, 2) 분자량이 작을수록 항산화 능력이 높은

것으로 알려 졌다.

슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical)은 굉장히 유독한 라디칼 중(specie)이며 무수한 생체적 작용에서 생성된다. 그리고 세포는 천부적으로 효소 산화방지제의 생물학적 방어 기제를 갖춰 reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/NOS)를 무해한 분자들로 전환된다[17]. 그 기체들 중 superoxide dismutase(SOD)는 체 내에서 존재하는 superoxide anion(O₂⁻)를 O₂와 H₂O₂로 전환하여 superoxide를 제거하는 효소로

써 세포막, DNA, 단백질 등에 손상에 대한 방어 작용을 한다[18]. Figure 1B 는 서로 다른 프로티아제를 사용하여 생산된 오계육 단백질 hydrolysate의 superanion 소거 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 오계육 hydrolysate의 superanion 소거 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. hydrolysate의 superanion 소거 항산화 능력은 약 18.14에서 58.87% 사이의 분포를 보여 주었는데 DPPH 소거 항산화 능력과 동일하게 bromelain 에서는 50% 이상의 항산화 능을 보여주었고 나머지는 18%에서 35%사이로 비슷한 분포를 보여 주었다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 hydrolysate의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 또한 hydrolysate에 따라서 소거하는 라디칼의 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다.

세포 호흡에 관여하는 철(Fe^{2+})의 과잉현상은 생체 내에 존재하는 H_2O_2 와 펜톤산화 반응에 의하여 단백질 및 DNA 산화, 세포노화와 세포손상에 원인을 일으키는 강력한 하이드록시 라디칼을 생성한다[19]. 그러므로 하이드록시 라디칼 제거는 이러한 라디칼에 의해 유발되는 산화스트레스로 인해 생기는 여러 가지 질병들을 예방할 수 있다. Figure 1C 는 오계육 단백질 hydrolysate의 하이드록시 라디칼 소거능을 보여준다. 라디칼 소거 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. hydrolysate의 항산화 능력은 최저 DPPH 16.73 에서 최고 69.16% 사이의 분포를 보여 주었는데 높은 능력을 보여준 bromelain 과 neutrase와는 유사하였고, 이어서 낮은 능력을 보여준 alcalase, flavourzyme, protamex는 유의적으로 같았다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 hydrolysate의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다.

금속 이온을 킬레이트화 하는 hydrolysate의 능력을 Figure 1D 에서 보여준다. hydrolysate의 항산화 능력은 약 17.85 에서 47.84% 사이의 분포를 보여 주었는데 hydrolysate의 킬레이션 능력은 사용 효소들에 상과 없이 크게 차이점이 없었다. hydrolysate의 킬레이션 능력은 비교적 낮은 값이 나타났다. 이러한 결과는 효소에 따른 hydrolysate의 DPPH, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능이 다르게 나

타난 것과는 대조적이었다. Alcalase 가수분해 산물은 pepsin-pancreation 가수분해 산물보다 금속 킬레이션 능력이 현저히 더 높았고, 이것은 각 효소에서 생성된 펩티드 종류가 다른 것 때문일 가능성도 있다. 가수분해 산물의 금속 킬레이션 능력 또한 86.43%에서 93.09% 증가한 효소 농도에 따라 상승했고, 이것은 효소 단계가 증가함에 따라 더 많은 수의 펩티드가 작용(liberation)된 것임을 알 수 있다. 또한 금속 킬레이션 능력은 펩티드 크기가 증가할 때 감소했으며, 이 의미는 낮은 분자량의 펩티드가 금속 킬레이트화에 더 큰 효과를 보인다고 제시한다.

다른 연구 결과를 보면 Aluko 등[20]은 분자량이 작을수록 DPPH 라디칼 소거활성이 높은 것으로 보고하였다. 효소반응 생성물 중에 하이드록시 라디칼과 슈퍼옥사이드 라디칼 등의 생성을 촉진하는 Fe^{2+} , Cu^{2+} 등에 대한 결합능이 우수할수록 높은 항산화 활성을 나타낸다[21]. 금속 킬레이션 능력은 단백질의 종류, 효소 종류 그리고 효소 농도에 큰 영향을 받는 것으로 보고되었다 [22].

3.3. 효소 종류에 따른 hydrolysate의 아미노산 특성

Alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex 효소로 가수분해 시킨 오계육 hydrolysate의 구성 아미노산을 극성 아미노산, 비극성 아미노산, 양이온 아미노산, 음이온 아미노산으로 분류하여 Table 2 에 나타내었다. 극성 아미노산의 함량은 alcalase 효소로 가수분해 시켰을 때 serine이 가장 높은 함량을 보여주고, papain 효소로 가수분해 시켰을 때에는 glycine이 가장 높은 함량을 보여주며, bromelain, neutrase, protamex 효소로 가수분해 시켰을 때에는 tyrosine이 가장 높은 함량을 보여주었고, flavourzyme 효소로 가수분해 시켰을 때에는 threonine이 가장 높은 함량으로 보여진다. 비극성 아미노산의 함량은 모든 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex 효소에서 가수분해 시켰을 때 leucine이 가장 높은 함량으로 보여진다. 양이온 아미노산의 함량은 bromelain, flavourzyme 효소로 가수분해 시켰을 때 lysine이 가장 높은 함량으로 보여지고, alcalase, neutrase, papain, protamex 효소로 가수분해 시켰을 때에는 histidine이 가장 높은 함량으로 보여졌으며, 음이온 아미노산의 함량은 모

Table 2. Characteristics of amino acids of protein hydrolysates produced from Yeonsan Ogye meat using various proteases

Amino acids	Composition of percent of amino acids (%)					
	Alcalase	Bromeline	Flavourzyme	Neutrase	Papain	Protamex
Proline	0.25±0.09 ^c	1.75±0.41 ^a	1.36±0.54 ^a	1.91±0.34 ^a	0.39±0.19 ^c	1.31±0.25 ^b
Alanine	4.76±0.73 ^c	9.43±0.50 ^a	5.83±0.34 ^b	4.22±0.78 ^c	4.15±0.82 ^c	5.76±0.41 ^b
Valine	6.60±0.68 ^a	3.66±0.85 ^b	6.72±0.67 ^a	7.27±0.85 ^a	3.13±0.71 ^b	6.73±1.22 ^a
Methionine	7.01±0.48 ^a	6.32±0.79	3.84±0.36 ^c	7.37±0.80	5.64±0.54 ^b	3.84±0.93 ^d
Isoleucine	1.56±0.42 ^c	2.93±0.79 ^b	6.29±0.73 ^a	5.92±0.89 ^a	0.96±0.11 ^d	6.23±0.81 ^a
Leucine	10.81±1.05 ^c	14.30±1.11 ^b	11.61±1.00 ^c	17.56±0.74 ^a	10.55±1.26 ^c	11.71±1.54 ^c
Phenylalanine	5.57±0.70 ^{ab}	6.24±0.81 ^a	5.38±0.30 ^b	6.60±0.52 ^a	2.92±0.74 ^c	5.32±1.01 ^b
Threonine	2.98±1.29 ^b	3.70±1.34 ^b	6.87±1.26 ^a	2.76±1.14 ^b	3.58±1.19 ^b	6.49±1.02 ^a
Serine	4.90±1.24 ^{ab}	4.73±1.23 ^{ab}	6.16±1.06 ^a	2.45±0.99 ^c	4.26±1.03 ^b	6.16±0.90 ^a
Glycine	1.04±0.52 ^c	2.30±0.79 ^b	2.21±0.71 ^b	0.84±0.29 ^c	4.20±1.26 ^a	2.22±0.43 ^b
Cystine	2.12±0.77 ^a	N. D.	0.63±0.28 ^c	1.19±0.34 ^{ab}	0.75±0.20 ^{bc}	0.61±0.33 ^c
Tyrosine	4.73±1.02 ^b	6.73±1.05 ^a	3.14±0.92 ^c	3.11±0.95 ^c	2.75±0.61 ^c	3.16±0.67 ^c
Histidine	12.45±1.17 ^b	1.72±0.36 ^d	6.65±0.56 ^c	27.46±1.52 ^a	27.34±1.40 ^a	6.60±0.95 ^c
Lysine	6.71±0.52 ^c	15.61±0.98 ^a	10.00±1.11 ^b	3.16±0.35 ^d	10.17±0.87 ^b	9.90±0.63 ^b
Arginine	7.60±0.67 ^c	12.40±0.74 ^a	7.79±0.62 ^c	3.71±0.54 ^d	10.91±0.66 ^b	7.86±0.29 ^c
Aspartic acid	4.96±0.49 ^a	3.25±0.56 ^b	5.50±0.41 ^a	1.15±0.31 ^d	2.04±0.90 ^c	5.13±0.37 ^a
Glutamic acid	16.07±0.71 ^a	4.78±0.46 ^d	10.28±0.39 ^b	3.31±0.71 ^e	6.46±0.41 ^c	10.41±0.79 ^b

은 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex 효소로 가수분해 시켰을 때에는 glutamic acid가 가장 높은 함량으로 보여 졌다. 전 연구결과에 의하면 소수성 펩타이드의 특성은 세포막의 인지질 층의 통과하여 표적 지점에 도달하기 용이 하기 때문에 기능성이 높은 것으로 알려졌다[23]. 항산화 기능을 나타내는 라이신과 타이로신은 전자를 제공하는 반면에 히스티딘은 이미다졸 구조로 강한 라디칼 소거능력을 지닌 것으로 발표하였다[24, 25].

3.4. 효소 종류에 따른 hydrolysate의 분자량 분포 특성

다음 Figure 2는 6가지의 효소를 이용하여 오계육을 가수분해 한 샘플의 분포도를 각각 나타낸 그림이다. Bromelain을 이용하여 오계육을 가수분해 한 경우 2,000 Da 미만의 분자량으로 분포되어 있었으며, chromatogram 의 피크를 분석

한 결과 11개의 피크를 확인하였다. 가장 많은 피크를 보여준 alcalase 효소의 펩타이드는 3,000 Da 미만의 분자량들로 골고루 분포 되어있으며, chromatogram의 피크를 분석한 결과 20개의 피크를 확인 할 수 있었다. Flavourzyme protamex, papain은 각각 14, 16, 16개의 피크로 비슷하게 분석되었으며, 분자량의 경우 3,398 Da, 3,057 Da, 1,958 Da 이하로 골고루 분포되어 있음을 확인하였다. 수산물 유래 단백질에 대한 효소 bromelain를 이용한 전갱이 단백질 hydrolysate은 항바이러스를 보이는 5 kDa 펩타이드 생산을 보고하였다[26], 새우 가공 부산물로부터 생산된 펩타이드는 699 Da, 고등어 근육 1,400 Da, 참치육 hydrolysate에서는 분자량이 각각 1305 Da, 938 Da, 584 Da로 보고되었다 [27-29]. Jamdar 등[30]은 낮은 분자량을 가진 펩타이드가 더 높은 분자량을 가진 펩타이드보다 강한 하이드록시 라디칼 소거제로서 더 효과가

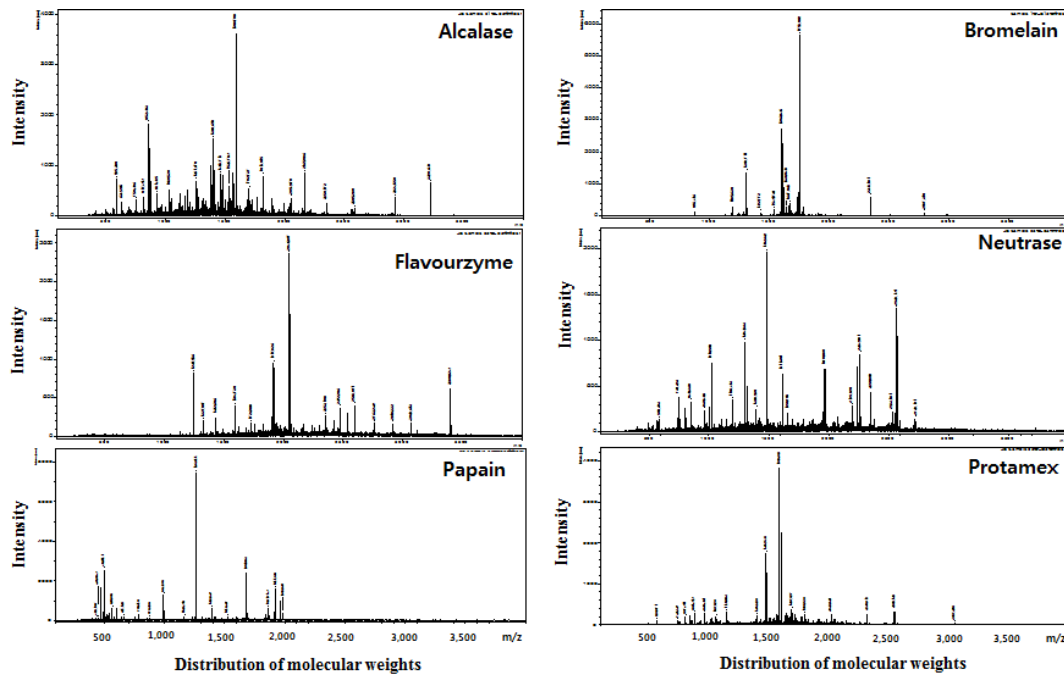


Fig. 2. The chromatogram of MALDI-TOF represents the molecular weight distribution of protein hydrolysates of Yoensan Ogae meat using alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, and protamex, respectively.

좋다고 보고하였다.

4. 결론

본 연구는 연산오계육 단백질을 6가지 프로티아제(alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex) 효소에 따른 hydrolysate의 항산화 활성(DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력), 아미노산 분포 및 분자량 특성을 비교 분석하였다.

1. 연산 오계육 단백질 hydrolysate의 가수분해도(%)의 범위는 $36.65 \pm 4.10\%$ 에서 $70.75 \pm 5.29\%$ 사이의 범위를 보여주었는데 protamex의 가수분해도는 46.3%로 가장 높았으며, papain hydrolysate가 $70.75 \pm 5.29\%$ 로 가장 높은 값을 보여주었으며, 반면에 alcalase hydrolysate가 $36.65 \pm 4.10\%$ 로 가장 낮은 값을 보여주었다.

2. DPPH 라디칼 소거능은 bromelain으로 생산된 hydrolysate의 소거능이 가장 높게 나타났고, alcalase의 소거능이 가장 낮게 나타났다. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능은 bromelain으로 생산된 hydrolysate의 소거능은 50% 이상의 라디칼 소거능을 보여주었고 나머지는 18%에서 35%사이로 비슷한 분포를 보여 주었다. 하이드록시 라디칼 소거능은 alcalase에서 제일 낮았고 bromelain에서는 가장 높게 나타났다. hydrolysate들의 Fe^{2+} 킬레이션 능력은 약 17.85에서 47.84% 사이로 비슷한 분포를 보여주었다.

3. 극성 아미노산 중 alcalase hydrolysate에서는 serine이 가장 높은 함량을 보였고, papain hydrolysate는 glycine, flavourzyme는 threonine이 가장 높은 함량으로 보였으며, 나머지는 tyrosine이 가장 높은 함량을 보여주었다. 비극성 아미노산 중 모든 효소 hydrolysate에서는 leucine이 가장 높은 함량으로 나타났으며, 양이온 아미노산 중

bromelain hydrolysate, flavourzyme hydrolysate는 lysine이 가장 높은 함량으로 보였고, 나머지 hydrolysate는 histidine이 가장 높은 함량으로 보여 졌다. 음이온 아미노산 중에는 모든 hydrolysate에서 glutamic acid가 가장 높은 함량으로 볼 수 있었다.

4. 오계육 단백질 hydrolysate들은 사용한 효소에 따라 다르게 나타났으며 소수성 아미노산의 분포가 높아 항산화 활성에 영향을 주는 것으로 보이며 분자량의 분포는 저분자 펩타이드에 해당하는 3,000 kDa 이하가 대부분으로 분석 되었다. 따라서 본 연구결과 오계육 단백질 hydrolysate들은 저분자 펩타이드들로 다양한 건강 지향 식품 및 사료 첨가제 등 고부가가치 상품화에 기여할 것으로 기대한다.

감사의 글

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

References

1. 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.* Vol.43, pp.322-329, (2015).
2. C. M. Cho, C. K. Park, M. Y. Lee, I. D. Lew, "Physicochemical characteristics of silky fowl (*Gallus domesticus* var. *silkies*)", *Korean J. Food Sci. Ani.* Vol.26, pp. 306-314, (2006).
3. Y. Y. Sun, D. D. Pan, Y. X. Guo, J. J. Li, "Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity", *Food and Chemical Toxicology*, Vol.50, pp. 3397-3404, (2012).
4. K. Elavarasan, B. A. Shamasundar, B. Faraha, H. Howell, "Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and structural properties of oven- and freeze-dried protein hydrolysate from fresh water fish (*Cirrhinus mrigala*)", *Food Chemistry*, Vol.206, pp. 210-216, (2016).
5. 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*, Vol.49, pp. 326-333, (2012).
6. 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.*, Vol.45, pp. 232-237, (2012).
7. 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).
8. A. L. Carthy, Y. C. Callaghan, N. M. Brien, "Protein Hydrolysates from Agricultural Crops Bioactivity and Potential for Functional Food Development", *Agriculture*, Vol.3, pp. 112-130, (2013).
9. L. Qing, L. Yi, M. Peter, I. Brent, "Commercial proteases: Present and future", *FEBS Letters*, Vol.587, pp.1155-1163, (2013).
10. M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radica", *Nature*, Vol.18, pp. 1000, (2004).
11. X. B. Fan, C. J. Li, D. N. sha, "The establishment of o-phenanthroline chemiluminescence system for measuring OH radical", *Basic Medical Sciences and Clinics*. Vol.18, No.6 pp. 468-471. (1998).
12. W. Yu, Y. Zhao, Z. Xue, H. Jin, D. Wang, "The antioxidant properties of lycopene concentrate extracted from tomato paste", *J. American oil Chem. Soc.*,

- Vol.78, No.7 pp. 697-701. (2001).
13. I. Gulcin, "Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)", *Toxicol.*, Vol.217 No.2 pp. 213-220, (2006).
 14. A. A. V. Sara, R. S. F. Sandra, H. Haiko, "Enzymatic Hydrolysis of Blue Crab (*Callinectes Sapidus*) Waste Processing to Obtain Chitin, Protein, and Astaxanthin-Enriched Extract", *International J. Environmental & Agriculture Res.*, Vol.3, pp. 81-92, (2017).
 15. I. Gulcin, D. Berashvili, A. Gepdiremen, "Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne", *J. Ethnopharmacol.*, Vol.101, No1 pp. 287-293, (2005).
 16. H. Ham, K. S. Woo, B. Lee, J. Y. Park, E. Y. Sim, B. J. Kim, "Antioxidant compounds and activities of methanolic extracts from oat cultivars". *J Korean Soc Food Sci Nutr.* Vol.44, pp.1660-1665, (2015).
 17. T. Y. Kim, T. W. Jeon, S. H. Yeo, S. B. Kim, J. S. Kim, J. S. Kwak, "Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of Jubak extracts", *Korean J Food Nutr.* Vol.23, pp. 299-305, (2010).
 18. H. W. Kang, "Antioxidative activity of extracts from *Cichorium endivia* L.", *J Korean Soc Food Sci Nutr.* Vol.41, pp. 1487-1492, (2012).
 19. S. Sakanaka, Y. Tachibana, Y. Okada, "Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha)", *Food Chemistry*, Vol.89, pp.569-575. (2005).
 20. R. E. Aluko, E. Monu, "Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates", *J Food Sci.* Vol. 68, pp. 1254-1258, (2003).
 21. M. Y. Yoo, S. K. Kim, J. Y. Yang, "Characterization of an antioxidant from sporophyll of *Undaria pinnatifida*", *Korean J Microbiol Biotechnol.* Vol. 32, pp. 307-311, (2004).
 22. A. T. Girgih, C. C. Udenigwe, R. E. Aluko, "In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions", *J American Oil Chem Soc.* Vol.88, pp. 381-389, (2010).
 23. R. He, A. T. Girgih, S. A. Malomo, X. Ju, R. E. Aluko, "Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions", *J Functional Foods*, Vol.5, pp. 19-227, (2013).
 24. A. G. P. Samaranyaka, E. C. Y. L. Chan, "Food-derived peptidic antioxidant: A review of their production, assessment, and potential applications", *J Functional Foods*, Vol.3, pp. 229-254, (2011).
 25. C. C. Udenigwe, R. E. Aluko, "Chemometric Analysis of the Amino Acid Requirements of Antioxidant Food Protein Hydrolysates", *Int. J. Mol. Sci.*, Vol.12, No.5 pp. 3148-3161, (2011).
 26. J. Adler-Nissen, "Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility", *J Afric Food Chem.*, Vol.24, pp. 1090-1093, (1976).
 27. Z. Liu, K. L. Schey, "Optimization of a MALDI TOF-TOF Mass Spectrometer for Intact Protein Analysis", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* Vol.16, pp. 482-490, (2005).
 28. K. Hsu, G. Lu, C. Jao, "Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with *Orientase* (*Bacillus subtilis*)", *Food Research International.* Vol.42, pp. 647-665, (2009).
 29. D. M. Yeum, Y. S. Kim, "Antioxidative action of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein", *Korean J. Food & Nutrition*, Vol.7, No.2 pp. 128-136, (1994).
 30. S. N. Jamdar, V. Rajalakshmi, A. Sharma, "Antioxidant and ACE inhibitory properties of poultry viscera protein hydrolysate and its peptide fractions", *Journal of Food Biochemistry*, Vol.36, pp. 494-501, (2012).