

대구가공 부산물로부터 생리기능성 펩타이드의 스크리닝

김세권* · 최영일¹ · 박표잠 · 최정호 · 문성훈

부경대학교 화학과, ¹연변의과대학 면역학연구소

(2000년 5월 10일 접수, 2000년 8월 16일 수리)

서 론

최근, 수산물에 대한 건강식으로서의 인식이 높아짐에 따라 수산가공 공장에서의 가공율도 해마다 높아져, 전체 어체의 약 40~70%를 차지하고 있는 어뼈, 어피, 어두, 내장, 비늘 등과 같은 부산물인 비가식부의 증가도 동시에 수반되고 있다.

현재까지 이들 비가식부를 활용하여 환경오염예방, 자원재활용 및 고부가가치 창출 등과 같은 효과를 기대한 연구로는 생선껍질로부터 젤라틴의 제조 및 이용,¹⁾ 어뼈로부터 hydroxyapatite 제조 및 이용,²⁾ 어류내장 유래 효소 이용³⁾ 및 굴껍질로부터 칼슘제의 개발⁴⁾ 등이 있다. 또한, 최근에는 동식물 단백질을 각종 효소를 이용하여 가수분해시킨 가수분해물의 올리고 펩타이드를 분리·정제하여 생리활성을 검토한 연구가 많이 진행되고 있다.^{5,6)}

이러한 연구의 일환으로 식물성 항산화성 물질의 탐색연구가 많이 수행되었으며,^{7,9)} 해양 생물자원에서는 가자미 피에 항산화성 물질이 존재한다고 Kim 등¹⁰⁾이 보고하였다. 또한, 고혈압의 직접적인 억제와 관련된 안지오텐신 전환효소(ACE: angiotensin I converting enzyme)의 활성을 억제하는 물질이 정어리와 참치 등의 단백질 가수분해물에 존재한다고 보고되어 있다.^{11,12)}

본 연구에서는 수산가공율의 증가에 따라 원료여 처리시 대량으로 발생하는 비가식부를 고도로 이용하기 위한 연구의 일환으로 수산가공부산물 중에서 대구의 내장(고니), 간 및 머리부위를 각종 효소로 가수분해하여 얻은 펩타이드의 ACE 저해활성과 항산화활성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 대구의 간, 고니 및 머리부위는 부산광역시 남천동 소재 활어센터에서 동결된 상태로 구입하여 미쇄한 다음, -30±2°C의 동결고에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

가수분해시 사용한 효소인 papain, α-chymotrypsin, trypsin 및 pronase E는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA), Alcalase와 Neutrase는 NOVO Co.(Denmark)으로부터 구입하였

찾는말 : ACE 저해활성, 항산화 활성, 대구가공 부산물
*연락처 : Tel : 82-51-620-6375; Fax : 82-51-628-8147
E-mail : sknkim@mail.pknu.ac.kr

고, ACE 저해활성 측정에 사용된 angiotensin I converting enzyme과 Hippuryl-Histidyl-Leucine(HHL)은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 또한, 항산화성 측정에 사용된 linoleic acid, thiobarbituric acid(TBA)는 Sigma Chemical Co.으로부터 구입하였고, α-tocopherol은 純情化學(株)에서 구입하였다. 그 외의 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

ACE 저해활성 측정

ACE 저해활성은 Cushman과 Cheung¹³⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 2 mg의 가수분해물을 정평하여 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3, 300 mM NaCl 함유) 1 ml에 녹인 다음, 그 가수분해액 100 μl에 25 mU/ml ACE용액 100 μl를 가한 후 37°C에서 30분간 항온처리하였다. 여기에 25 mM HHL(107.4 mg/10 ml sodium borate buffer) 50 μl를 넣고 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 1 N HCl 용액 0.5 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate 1.5 ml를 가하여 교반한 다음, 원심분리(2,500×g, 5 min)시켜 상층액 1 ml를 분취하였다. 이 상층액을 완전히 건조시킨 다음 증류수 1 ml를 가하여 용해시키고, 228 nm에서 흡광도를 측정하여 가수분해물의 첨가 전, 후의 백분율로써 ACE 저해율을 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{ACE inhibitory activity(\%)} = (B-A) \times 100 / (B-C)$$

여기서 A는 저해제를 첨가하여 반응시킨 후 측정된 흡광도 값, B는 저해제를 첨가하지 않고 반응시킨 후 측정된 흡광도 값, C는 1 N HCl 용액을 첨가하여 ACE를 실활시킨 후 반응시킨 다음 흡광도를 측정된 값이다.

항산화성 측정

단백질 가수분해물의 항산화성은 linoleic acid emulsion을 Osawa 등¹⁴⁾의 방법에 따라 linoleic acid 0.13 ml, ethanol 10 ml, 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 10 ml를 혼합하고, 이 혼합물에 가수분해물을 linoleic acid에 대해 각각 1%(w/v)의 농도로 첨가하여 40±1°C로 조절된 항온기내에서 저장하면서 자동산화도를 촉진시켰다. TBA에 의한 항산화 측정은 Ohkawa 등¹⁵⁾의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 40°C에서 6일 동안 방치시킨 linoleic acid emulsion 50 μl에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2 ml, 20% acetic acid 1.5 ml 및 0.8% TBA 수용액 1.5 ml를 넣고 혼합한 다음, 5°C에서 60분간 방치하고

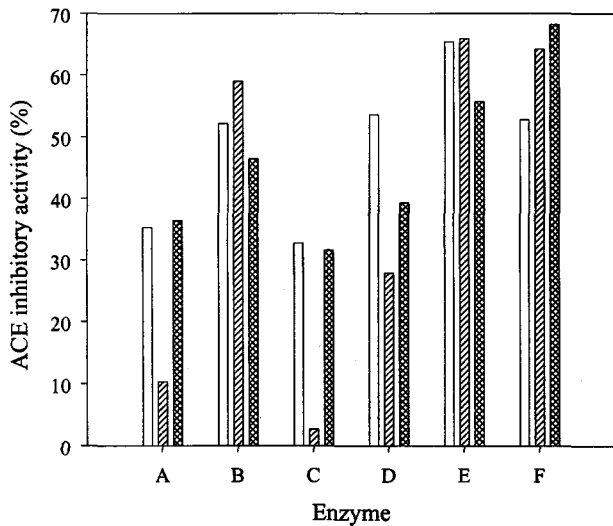


Fig. 1. ACE inhibitory activity of cod teiset, liver and head hydrolysates prepared with various proteases. A, Alcalase; B, α -Chymotrypsin; C, Neutrase; D, Papain; E, Pronase E; F, Trypsin, □, Cod teiset hydrolysate; ▨, Cod liver hydrolysate; ▩, Cod head hydrolysate. Values are the mean for the results of three experiments.

다시 95°C에서 60분간 발색시켜 분광광도계(Hitachi, Japan)를 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

대구의 부위 및 효소에 따른 가수분해물의 ACE 저해활성

대구의 고니, 간 및 머리부위를 기질로 하여 각 효소별로 4 시간 가수분해하여 동결건조한 가수분해물의 ACE 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

대구의 고니에서 제조한 가수분해물에서 ACE 저해활성을 측정한 결과, pronase E처리 가수분해물에서 ACE 저해활성이 65.4%로 가장 높았으며, papain, α -chymotrypsin 및 trypsin처리에서도 50% 이상의 ACE 저해활성을 나타내었다. 간의 경우, pronase E처리 가수분해물에서 ACE 저해활성이 65.9%로 가장 높았으며, α -chymotrypsin 및 trypsin으로 가수분해시킨 가수분해물에서 약 60% 이상의 활성을 보였다. 머리의 경우는 trypsin처리 가수분해물에서 68.2%의 ACE 저해활성을 나타내어 가장 우수하였으며, pronase E처리 가수분해물에서도 55.7%로 비교적 높게 나타났다.

이상에서 살펴본 바와 같이 대구의 고니, 간 및 머리부위를 효소별로 가수분해하여 ACE 저해활성을 측정한 결과 효소에 따라 활성의 차이가 생기는 원인은 기질의 차이뿐만 아니라 각 효소가 기질에 작용하는 절단 부위가 다르기 때문에 동일한 분자량을 가진 펩타이드라도 N말단 또는 C말단에 위치하는 아미노산의 종류가 다르므로 생리활성이 다르게 나타나는 것으로 판단된다.

펩타이드로서의 ACE 저해제에 대한 연구는 정어리의 alkaline protease 가수분해물에서는 Lys-Trp 등이 얻어졌으며,¹¹⁾ 참치육의 carboxypeptidase 가수분해물에서는 Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp,¹²⁾ α -zein 가수분해물에서는 Leu-Arg-Pro-, Leu-Ser-Pro

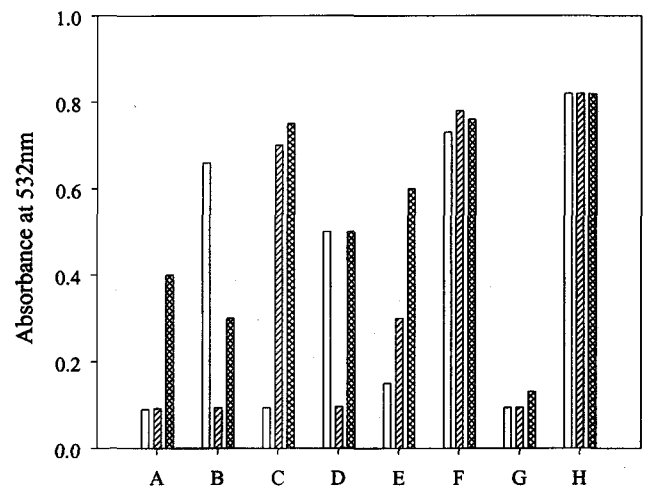


Fig. 2. Antioxidative activity of cod teiset, liver and head hydrolysates prepared with various proteases. A, Alcalase; B, α -Chymotrypsin; C, Neutrase; D, Papain; E, Pronase E; F, Trypsin; G, α -Tocopherol; H, Control, □, Cod teiset hydrolysate; ▨, Cod liver hydrolysate; ▩, Cod head hydrolysate. Values are the mean for the results of three experiments.

및 Leu-Gln-Pro의 tripeptide가 강한 ACE 저해활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다.¹⁶⁾

한편, Kim 등¹⁷⁾은 된장으로부터 ACE 저해물질을 추출하여 겔 크로마토그래피로 부분 정제하여 얻은 두 물질의 ACE 저해활성이 각각 70%와 90%였다고 보고하였다. 이 결과와 비교하여 보면 본 연구에서 대구의 고니와 간을 pronase E로 가수분해시킨 가수분해물과 머리를 trypsin으로 가수분해시켜 얻은 가수분해물 그 자체의 ACE 저해활성과 큰 차이가 없었다.

대구의 부위 및 효소에 따른 가수분해물의 항산화활성

대구의 고니, 간 및 머리부위를 여러 효소를 사용하여 가수분해시켜 제조한 가수분해물에 대한 항산화활성의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 대구 고니의 경우, Alcalase와 Neutrase로 가수분해시킨 가수분해물에서 시판 천연항산화제인 α -tocopherol보다 약 7%정도 뛰어난 항산화효과를 나타내었으며, 간의 경우 Alcalase와 α -chymotrypsin으로 가수분해시킨 가수분해물에서 α -tocopherol과 유사한 효과를 보였다. 그러나 대구의 머리부분을 여러 효소로 가수분해시킨 가수분해물에서는 α -tocopherol보다 뛰어난 항산화 효과를 보이지 않았다.

이러한 단백질 가수분해물에 대한 항산화성 연구보고를 살펴 보면 Yamaguchi 등¹⁸⁾은 대두단백질, 우유카제인 및 난백 알부민의 가수분해물에 대한 항산화력은 vitamin B₁₂보다 약간 큰 분자량을 가진 흰분에서 가장 높았으며, 젤라틴 가수분해물의 경우는 그보다 약간 더 큰 분자량의 흰분에서 항산화활성이 가장 뛰어났다고 하였다.

한편, Kim 등¹⁰⁾은 가자미피 젤라틴을 한외여과막을 이용하여 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa인 막을 차례로 통과시켜 얻은 가수분해물 중에서 분자량 5~1 kDa의 가수분해물이 α -tocopherol보다 항산화력이 10%정도 더 높았다고 보고하여 본 연구에서 얻은 결과와 유사한 정도의 활성을 나타내었다.

이상에서 살펴본 바와 같이 수산가공공장에서 부산물로 발생하는 대구 고니와 간 및 머리부위를 pronase E, trypsin 및 α -chymotrypsin으로 가수분해시킨 가수분해물은 ACE 저해제로 사용이 가능할 것으로 판단된다. 또한 대구 고니와 간을 Alcalase와 Neutrase, Alcalase와 α -chymotrypsin으로 가수분해시킨 가수분해물에서는 천연항산화제로 사용하고 있는 α -tocopherol과 비슷하거나 약간 높은 활성을 나타내었으므로 이 물질을 이용하여 항산화제의 개발도 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 1995년 해양수산부에서 첨단기술개발사업 [(주) 키토타이프와의 산학협동과제] 연구비의 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 연구비를 지원해 준 해양수산부와 (주) 키토타이프에 감사드립니다.

참고문헌

- Kim, S. K., Byun, H. G., Jeon, Y. J., Ahn, C. B., Cho, D. J. and Lee, E. H. (1995) Functional properties of produced fish skin gelatin hydrolysate I a recycle three-step membrane enzyme reactor. *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.* **6**, 984-996.
- Kim, S. K., Lee, C. K., Byun, H. G., Jeon, Y. J., Lee, E. H. and Choi, J. S. (1997) Synthesis and biocompatibility of the hydroxyapatite ceramic composites from tuna bone(I). *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.* **8**, 994-990.
- Kim, S. K., Jeon, Y. J., Byun, H. G., Kim, Y. T. and Lee, C. K. (1997) Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca. *Fisheries Science* **63**, 421-427.
- Kim, G. H., Jeon, Y. J., Byun, H. G., Lee, Y. S., Lee, E. H. and Kim, S. K. (1998) Effect of calcium compounds from oyster shell bound fish skin gelatin peptide in calcium deficient rats. *J. Kor. Fish. Soc.* **31**, 149-159.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. and Tempst, P. (1989) Apidaecins: Antibacterial peptides from honeybees. *EMBOJ* **8**, 2387-2391.
- Nakazato, M., Asai, J., Miyazato, M., Matsukura, S., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1990) Isolation and identification of islet amyloid polypeptide in normal human pancreas. *Regul. Peptides* **31**, 179-186.
- Oh, M. J., Lee, K. S., Son, H. Y. and Kim, S. Y. (1990) Antioxidative components of pueraria root. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **22**, 793-798.
- Maeng, Y. S. and Park, H. K. (1991) Antioxidant activity of ethanol extract from dodok(*Codonopsis lanceolata*). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **23**, 311-316.
- Lee, G. D., Kim, J. S., Bae, J. O. and Yoon, H. S. (1992) Antioxidative effectiveness of water extract and ether extract in wormwood. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**, 17-19.
- Kim, S. K., Lee, H. C., Byun, H. G. and Jeon, Y. J. (1996) Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J. Kor. Fish. Soc.* **29**, 246-255.
- Seki, E., Osajima, K., Matsui, T. and Osajima, Y. (1993) Separation and purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **40**, 783-791.
- Kohama, Y. (1988) Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 332-336.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637-1648.
- Osawa, T. and Namiki, M. (1981) A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 735-739.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1978) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
- Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. (1991) Structures and activity of angiotensin converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1313-1318.
- Kim, S. H., Lee, Y. J. and Kwon, D. Y. (1999) Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from Doenjang. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 848-854.
- Yamaguchi, N., Yokoo, Y. and Fujimaki, M. (1979) Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi* **26**, 65-70.

Screening of Biofunctional Peptides from Cod Processing Wastes

Se-Kwon Kim*, Yong-Ri Choi¹, Pyo-Jam Park, Jeoung-Ho Choi and Sung-Hoon Moon(Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea; ¹Research Institute of Bioimmunity, Yan Bian Medicine College, Yanji 133000, China)

Key words : ACE inhibitory activity, antioxidative activity, hydrolysate, cod processing waste

*Corresponding author