

대구고니 단백질의 효소적 가수분해물로부터 항산화성 펩타이드의 분리·정제 및 특성

김세권[†] · 최영일* · 박표잠 · 최정호 · 문성훈
부경대학교 화학과, *연변의과대학 면역학연구소

Purification and Characterization of Antioxidative Peptides from Enzymatic Hydrolysate of Cod Teiset Protein

Se-Kwon KIM[†], Yong-Ri CHOI*, Pyo-Jam PARK,
Jeoung-Ho CHOI and Sung-Hoon MOON

Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
*Research Institute of Bioimmunity, Yan Bian Medicine College, Yanji 133000, China
[†]Corresponding author. Tel : 82-51-620-6375, Fax : 82-51-628-8147,
E-mail : sknkim@mail.pknu.ac.kr

In order to utilize by-products which would normally be discarded in marine processing plants, cod teiset protein was hydrolyzed and antioxidative activity of the hydrolysate was investigated. Antioxidative peptide was isolated using ultrafiltration membrane, ion-exchange chromatography on a SP-Sephadex C-25 column, gel filtration on a Sephadex G-15 column, high performance liquid chromatography on an ODS column, and capillary electrophoresis chromatography. Antioxidative activities of the cod teiset hydrolysate were compared with α -tocopherol, one of the commercial antioxidant. The hydrolysate passed through a membrane with molecular weight cut-off (MWCO) 1 kDa was shown the strongest antioxidative activity, and the activity was higher 10% as compared with α -tocopherol. In addition, the peptide isolated by ion-exchange chromatography, gel filtration, and HPLC, respectively, was higher 53% as compared with α -tocopherol, and the amino acid sequence was Ser-Asn-Pro-Glu-Trp-Ser-Trp-Asn.

Key words : Purification, Antioxidative peptide, Enzymatic hydrolysate, Cod teiset protein.

서 론

항산화제란 산화를 방지하거나 지연시키는 물질을 통칭하는 것으로 그 작용기작에 따라 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유 라디칼 scavenger, 과산화물을 비라디칼로 분해하여 불활성시키는 과산화물 분해제, 미량금속의 산화 촉진작용을 불활성화하는 금속 불활성화제, 자동산화에 있어서 라디칼 저해제와 공존시 항산화 작용을 증가시키는 상승제 및 각종 활성산소계를 소거하는 singlet oxygen quencher 등으로 분류된다. 항산화제는 다시 크게 두 그룹으로 분류되는데, 첫째 primary 또는 chain-breaking antioxidant로서 지질라디칼과 반응하여 더욱 안정한 생산물로 바꾸는 그룹과 둘째 secondary 또는 preventive antioxidant로서 다른 메카니즘에 의해 자동산화를 지연시키는 그룹으로 분류된다 (Ahmad, 1995).

Primary antioxidant는 상대적으로 안정한 라디칼을 만들기 위해 지질 유리라디칼에 수소원자를 제공함으로써 연쇄반응의 연장을 저지하여 자동산화를 막는다. 이러한 형태의 항산화제는 대부분 페놀화합물로서 α -tocopherol과 그 유도체 (Aoyama et al., 1985) 및 quercetin과 caffeic acid (Hodnick et al., 1988) 등의 flavonoid계가 알려져 있다. Secondary antioxidant는 순수한 지질에서는 항산화 효과를 나타내지 않지만 primary antioxidant의 효과를 증대시키거나 prooxidant의 효과를 저해시킨다. 이러한 형태의 항산화제는 α -tocopherol과 같은 primary antioxidant와 상승작용을 가지는 인지질 (Hudson and Lewis, 1983)과 ascorbic acid

(Bendich et al., 1986) 등이 있다.

대표적인 산화반응인 지질의 산패는 주로 높은 온도나 빛에 의해 생성된 지질 라디칼이나 1O_2 에 의해 과산화물의 생성과 분해가 연쇄적으로 일어나는 반응으로 이들은 페놀성 항산화제가 존재할 때에는 페놀성 OH기가 유지의 유리기 수용체로서 작용하여 유지 산패의 초기 단계에 생성된 유리기들이 안정한 공명 혼성체를 형성하도록 하여 산화작용을 억제하게 된다. 이러한 항산화제는 각종 식물 추출물, 향료, 발효생산물 등에 flavonoid 또는 페놀계 화합물로 대부분 존재한다. 또한, 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소분해하여 얻어진 펩타이드에서도 항산화활성이 나타나는 것으로 보고되어 있는데, Yamaguchi et al. (1979)은 대두단백질 및 우유가제인 가수분해물, Suetsuna and Osajima (1989)은 어육단백질의 가수분해물이 항산화활성을 가진다고 보고하였다.

일반적으로 항산화제는 천연항산화제와 합성항산화제로 대별되는데, 합성항산화제는 동물실험에서 발생과 각종 효소군 등에 영향을 주며, 특히 butylated hydroxytoluene (BHT)은 기형발생 또는 암발생에 관여하는 것으로 보고되어 (Branen, 1975) 뛰어난 항산화효과에 비해 부작용으로 인해 문제시 되고 있는 반면, 천연항산화제는 부작용이 거의 없어 식품첨가물 또는 약품으로 현재 널리 이용되고 있다. 그러나 천연항산화제 중 가장 널리 이용되는 α -tocopherol의 경우 비싼 가격과 지용성이라는 이용상의 제약으로 대체 천연항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 수산가공공장에서 부산물로 생산되어 폐기되는 대구의 내장 (고니)을 효율적으로 이용하기 위하여, 단백

질을 효소로 가수분해시켜 3단계 막반응기를 사용하여 분자량별로 분획하였으며, 이들 펩타이드 중에서 항산화활성이 뛰어난 펩타이드를 이온교환 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피 및 HPLC로 분리·정제하여 아미노산 배열을 결정함으로써 새로운 항산화활성을 갖는 물질을 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 대구 (*Gadus macrocephalus*)의 고니는 부산광역시 남천동 소재 활어센터에서 동결된 상태로 구입하여 마쇄한 다음, $-30 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 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 구입하였고, 항산화성 측정에 사용된 linoleic acid, thiobarbituric acid는 Sigma Chemical Co.으로부터 구입하였으며, α -tocopherol은 純情化學 (株) (Japan)에서 구입하였다. 그 외의 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

대구고니 단백질을 가수분해시켜 분자량별로 분획하기 위한 한외여과막 장치 (ultrafiltration membrane system)는 Millipore Co. (Bedford, USA)으로부터 구입하였고, 사용된 막은 분자량 한계범위 (molecular weight cut-off: MWCO)가 각각 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa이었다. 분리·정제시 사용한 수지는 Sigma Chemical Co.에서 구입한 SP-Sephadex C-25와 Sephadex G-15이며, HPLC는 Tosoh Co. (Tokyo, Japan)의 ODS reverse-phase column ($\phi 10.0 \times 250$ mm)이 장착된 Spectra Physics Co. (Riviera Beach, USA)의 P 2000 모델을 사용하였다. 정제한 펩타이드의 순도 결정은 Bio-Rad Co. (BioFocus, USA)의 capillary electrophoresis system을 사용하였다.

단백질의 가수분해도 측정

여러 가지 효소를 이용한 대구 고니의 가수분해도 (degree of hydrolysis) 측정은 각 시료 0.5 g을 Table 1에 나타낸 완충용액 50 ml에 분산시켜 1% (w/v) 기질용액으로 만든 다음, 각 효소별 최적온도에서 반응시켰다. 일정 반응시간의 경과에 따라 반응혼합액에서 2 ml를 취하여 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 2 ml가 들어있는 시험관에 넣고, 혼합한 후 원심분리 (3,000×g, 10 min) 하였으며 이때 사용한 기질 대 효소비는 100:1이 되도록 하였다. 원심분리한 상층액을 일정량 취하여 Lowry 법 (1951)으로 10% TCA 가용성 단백질량을 측정된 후, 다음 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = \frac{10\% \text{ TCA 가용성 단백질량}}{\text{총단백질량}} \times 100$$

단백질 가수분해 조건

기질에 대한 최적의 효소비를 결정하기 위해서 0.1 M disodium

Table 1. Conditions for the hydrolysis of cod teiset protein treated with six different proteases

Enzyme	Buffer	pH	Temp. (°C)
Alcalase	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	7.0	50
Neutrase	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	50
Pronase E	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	37
Papain	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	6.0	37
Trypsin	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	37
α -Chymotrypsin	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	37

hydrogen phosphate-sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 50°C에서 기질 대 효소비를 10에서 1,000까지 변화시켜 가수분해도를 검토하였다. 또한 최적의 기질농도를 결정하기 위하여 0.2%부터 5%까지 기질농도를 변화시키면서 동일한 완충용액과 온도에서 가수분해하여 기질농도를 검토하였고, 기질에 대한 효소의 반응시간에 대한 조건은 동일한 완충용액, 온도하에서 기질농도 1% 및 기질 대 효소비 100:1에서 2, 4, 6, 8, 12 및 24 시간동안 반응시킨 후 가수분해도를 검토하였다.

가수분해물의 제조

가수분해물은 Kim et al. (1996)의 방법에 따라 대구고니의 효소적 가수분해물을 각 단계별로 분자량 크기에 따라 제조하였다. 즉, 효소로 가수분해한 후 한외여과막 장치를 사용하여 분자량 한계범위가 각각 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa인 막에 차례로 통과시켜 분획한 후 동결건조하여 가수분해물을 제조하였다.

항산화활성 측정

단백질 가수분해물의 항산화활성은 linoleic acid emulsion을 Osawa et al. (1981)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 자동 산화를 촉진시켰다. Thiobarbituric acid (TBA)에 의한 항산화 측정은 Ohkawa et al. (1978)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 40°C에서 배양시킨 linoleic acid emulsion 50 μ l에 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 방치한 후 95°C에서 60분간 발색시켜 분광광도계 (Hitachi, Japan)를 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화성 펩타이드의 분리·정제 및 아미노산 서열 분석

한외여과막을 사용하여 분자량별로 분획한 가수분해물 중에서 항산화활성이 가장 높은 것으로 나타난 대구고니 가수분해물 0.5 g을 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)로 평형화시킨 SP-Sephadex C-25 양이온 교환수지에 넣어 30분간 방치시킨 후, 비흡착부분을 용출시키고 수지에 흡착된 부분은 0.25 M, 0.5 M 및 1.0

M NaCl 용액 500 ml로 순차적으로 용출한 다음, 전기투석기로 염을 제거한 후 동결건조하여 항산화활성을 측정하였다. 이온교환수지에서 분획한 획분중에서 항산화활성이 가장 우수한 0.5 M~1.0 M NaCl 획분을 겔 크로마토그래피법으로 분리하였다. 즉, 겔 여과용 수지 Sephadex G-15를 충전시켜 탈이온수로 평형화시킨 칼럼 ($\phi 2.5 \times 62$ cm)에 0.5 g/ml의 가수분해액 0.2 ml를 주입하고, 탈이온수로 용출 (유속, 1.0 ml/min; 분획량, 5 ml)하였다. 이 분획물을 분광광도계로 280 nm에서 흡광도를 측정하여 분획하고, 동결건조한 후 일정량을 정평하여 항산화활성을 측정하였다. 가장 뛰어난 항산화활성을 가진 획분을 HPLC상에서 ODS reverse-phase column ($\phi 10.0 \times 250$ mm)을 이용하여 용리하였다. 이때, 용출속도는 2.0 ml/min, 이동상으로는 0.1% trifluoroacetic acid를 함유한 H₂O와 acetonitrile (0~30%, 30 min)을 사용하여 선형상 농도구배법으로 215 nm에서 흡광도를 측정하여 분획하고, 최종적인 순도확인용 모세관 전기영동 (capillary electrophoresis)으로 확인하였다. 또한, 아미노산 서열은 N-말단으로부터 아미노산을 절단하는 Edman법으로 분해한 후, 기체상 자동서열분석기 (Perkin Elmer, New Jersey, USA)를 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

대구의 고니 단백질의 가수분해

대구의 고니 단백질에 대한 시판 효소의 가수분해활성을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 즉, pronase E와 papain으로 가수분해시켰을 때 가수분해도가 약 65%로 높게 나타났으며, 그 다음으로 Alcalase (52%), trypsin (38%), α -chymotrypsin (27%) 및 Neutrase (16%) 순으로 나타났다. 이들 효소들에 대한 가수분해

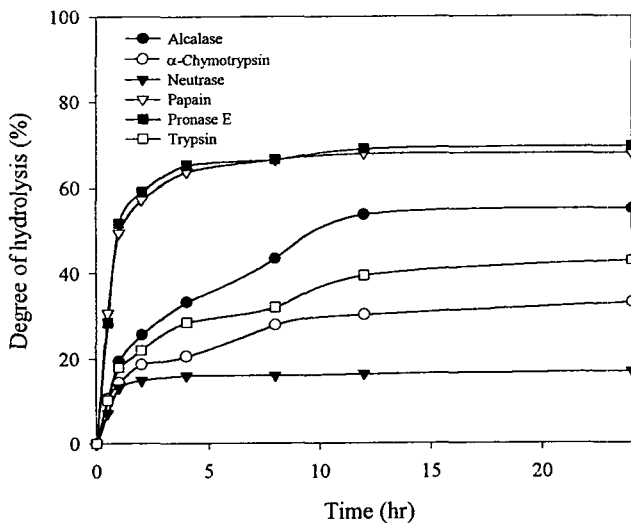


Fig. 1. Effect of incubation time on the hydrolysis of cod teiset protein with various proteases. Substrate concentration was 1% (w/v), and the ratio of substrate to enzyme was 100 : 1.

시간은 5시간이 경과하였을 때부터 가수분해활성이 거의 일정하게 나타남을 알 수 있었다.

효소에 따른 가수분해물의 항산화활성

대구의 고니 단백질을 각 효소별로 가수분해하여 동결건조한 가수분해물의 linoleic acid에서의 항산화활성은 Fig. 2에 나타내었다. 즉, 가수분해물의 항산화활성은 Alcalase로 12시간 가수분해시킨 가수분해물에서 가장 높게 나타났으며, 이는 시판 천연항산화제인 α -tocopherol보다 약 5%정도 활성이 높게 나타났다. 그리고, 가수분해 활성이 높게 나타난 pronase E와 papain으로 가수분해시킨 가수분해물에서의 항산화활성은 대조구보다는 좋았으나, 천연항산화제와 비교하였을 때 아주 낮은 활성을 나타내었다. 이 결과는 가수분해도와 항산화활성과는 상관관계가 없음을 보여주는 것으로, 이러한 결과는 기질의 차이 뿐만 아니라 각 효소가 기질에 작용하는 절단 부위가 다르기 때문에 N말단 및 C말단에 위치하는 아미노산의 종류가 달라지므로 항산화활성이 다르게 나타나는 것으로 판단된다.

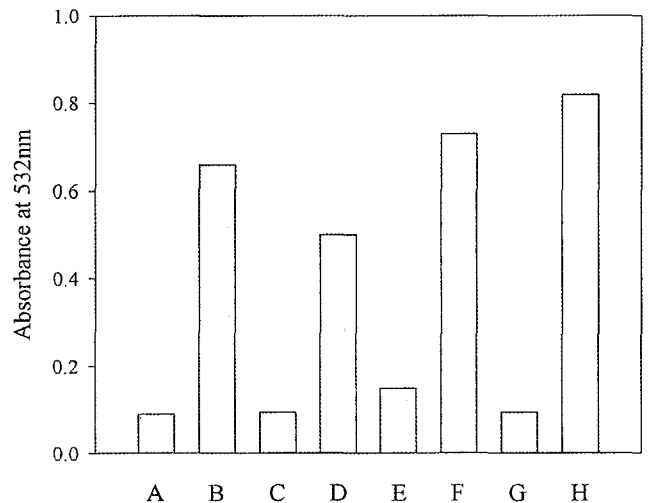


Fig. 2. Effects of antioxidative activity of hydrolysates of various enzymes from cod teiset protein on linoleic acid autoxidation system. A, Alcalase; B, α -chymotrypsin; C, Neutrase; D, papain; E, pronase E; F, trypsin; G, α -tocopherol; H, control.

최적의 가수분해 조건

대구의 고니를 여러 효소로 가수분해시켜 항산화활성을 측정하였을 때 가장 뛰어난 활성을 보인 Alcalase 가수분해물을 제조하기 위한 최적조건을 규명하기 위하여 대구 고니 단백질을 사용하여 기질에 대한 효소비 및 기질 농도 변화에 대한 활성을 측정할 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다. 즉, 기질 대 효소비가 100 : 1일 때 가수분해도가 53%로 가장 우수하였으며 (Fig. 3), 기질 농도는 0.2%에서 가수분해도가 63%로 가장 높았으나 기질농도 1%에 비해 큰 차이가 없으므로 대량 처리시 경제적인 효과를 감안할 때 1% 기질농도가 적합하다고 판단된다 (Fig. 4).

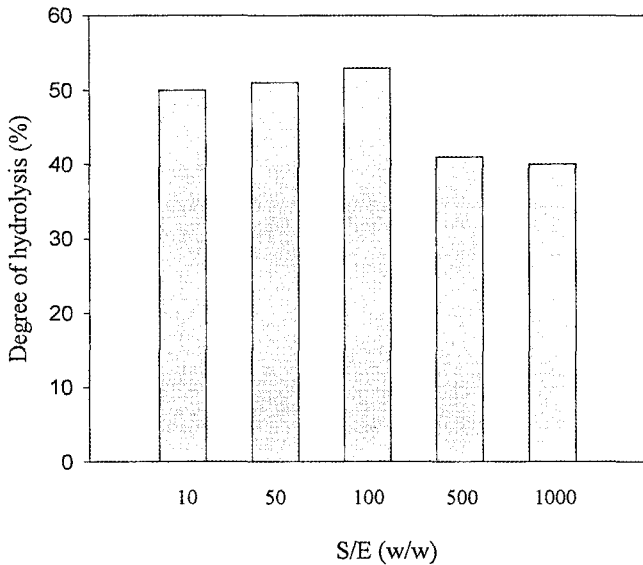


Fig. 3. Effect of substrate/enzyme ratio (S/E) on the hydrolysis of cod teiset protein by Alcalase.

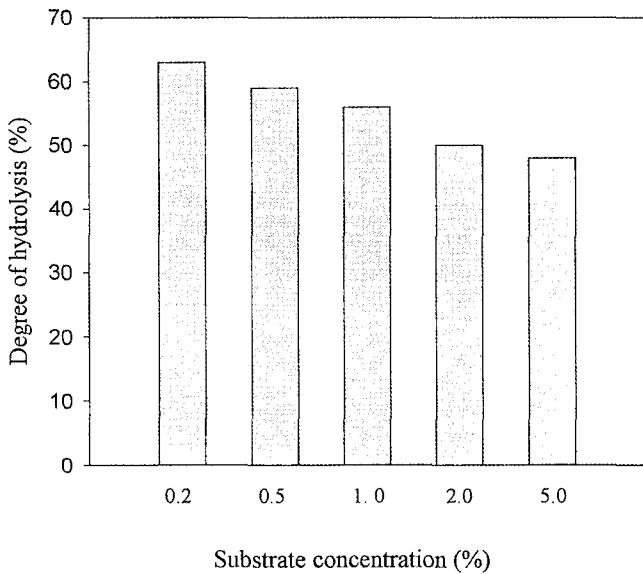


Fig. 4. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of cod teiset protein by Alcalase.

한외여과막을 이용한 가수분해물의 분리 및 항산화활성

대구의 고니 단백질을 Alcalase로 12시간 가수분해하여 제조한 가수분해물을 분자량 한계범위가 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa인 막을 통과시켜 나온 분획물을 각각 동결건조하여 항산화활성을 측정 한 결과는 Fig. 5와 같다. 즉, 분자량 한계범위가 1 kDa인 막을 통과하여 나온 가수분해물의 경우 7일차에서 대조구보다는 약 87%, 시판 천연항산화제인 α -tocopherol보다 약 10%정도 활성이 높게 나타났으며, 10 kDa과 5 kDa인 막을 통과하여 나온 가수분해물의 항산화활성도 천연항산화제와 거의 유사하였다. Yee et al. (1980)

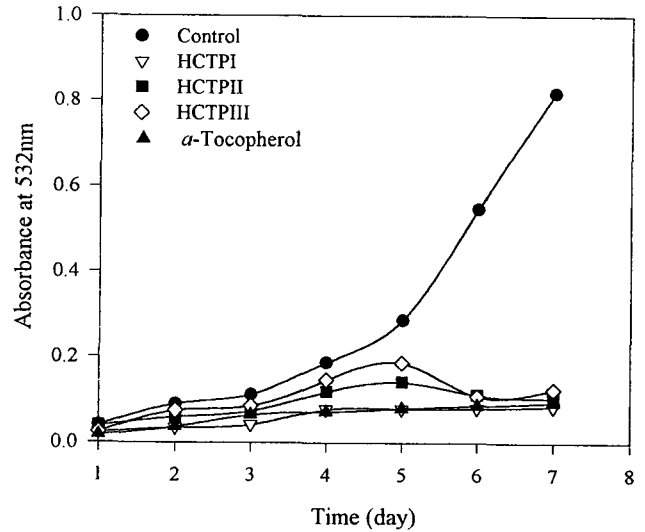


Fig. 5. Antioxidative activity of hydrolysates of Alcalase from cod teiset protein in linoleic acid autoxidation system. HCTP I, hydrolysate of cod teiset protein passed through a membrane with molecular weight cut-off (MWCO) 10 kDa but not passed through a membrane with MWCO 5 kDa; HCTP II, passed through a membrane with MWCO 5 kDa but not passed through a membrane with MWCO 1 kDa; HCTP III, passed through a membrane with MWCO 1 kDa.

은 대두단백질을 pepsin으로 가수분해시킨 가수분해물의 항산화 활성을 측정한 결과, 대조구에 비해 약 80% 정도 항산화활성이 높았다고 하였으며, Yamaguchi (1989)는 대두단백질을 효소로 가수분해시킨 가수분해물 중에서 분자량 2.5~3 kDa 사이의 펩타이드가 항산화활성이 가장 뛰어났다고 보고하였다. 또한, Krogull et al. (1987)은 질소화합물인 단백질, 펩타이드 및 아미노산은 자체적으로 산화가 일어나며, pH, 온도, 수분활성 및 산화촉매제나 저해제의 존재 여부에 따라 항산화활성의 차이가 있다고 보고하였고, Mitsuda et al. (1966)은 indole화합물과 aromatic 아미노산의 항산화활성은 electron-donor로서의 성질과 관계가 있다고 하였다. 즉, 자동산화의 중간체가 indole핵의 C₂~C₃위치를 끊어 전하이동형 화합물을 형성한 후, π 전자 pool에서 전하를 빼앗아 C₂~C₃결합을 개열하고 동시에 자신은 불활성 물질로 변한다고 하였으며, 조사된 아미노산 중에서는 5-hydroxytryptophan이 가장 항산화성이 높았다고 보고하였다.

항산화성 펩타이드의 분리·정제 및 서열결정

항산화활성이 가장 뛰어난 분자량 한계범위가 1 kDa인 막을 통과하여 분리된 가수분해물을 양이온 교환수지인 SP-Sephadex C-25에서 염농도에 따라 4개의획분 (0 M, 0~0.25 M, 0.25~0.5 M, 0.5~1.0 M)으로 분리하였다. 이 중에서 가장 뛰어난 항산화 활성을 보인 분획물은 0.5~1.0 M NaCl 용액으로 용출시킨 분획물로 7일차를 기준으로 할 때 천연항산화제인 α -tocopherol보다 약 17%정도 활성이 높게 나타났다 (Fig. 6).

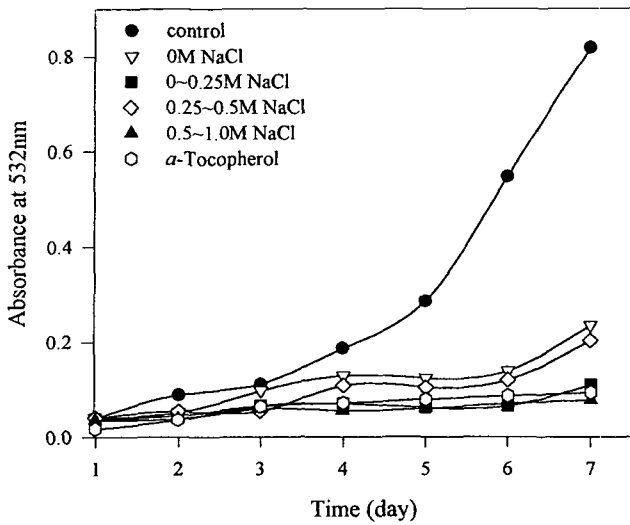


Fig. 6. Antioxidative activity of the fractions isolated from cod teiset hydrolysates using a SP-Sephadex C-25 column chromatography.

이 분획물은 다시 Sephadex G-15에 의해 3개의 획분(I, 획분 19~29; II, 획분 32~41; III, 획분 56~64)으로 분리되었으며 (Fig. 7), 항산화활성은 7일차에서 획분 II가 천연항산화제인 α -tocopherol보다 45% 정도 높아 가장 우수하였다 (Fig. 8). 항산화성이 가장 높은 획분인 II는 HPLC를 이용하여 역상 ODS column 상에서 5개의 획분으로 분리되었으며 (Fig. 9), 이들 획분 중에서 항산화성은 7일차에서 획분 A가 α -tocopherol에 비해 53% 정도 활성이 높아 가장 우수하였고 (Fig. 10), 이 획분을 모세관 전기영동장치를 이용하여 순도를 확인한 결과 단일 펩타이드로 확인

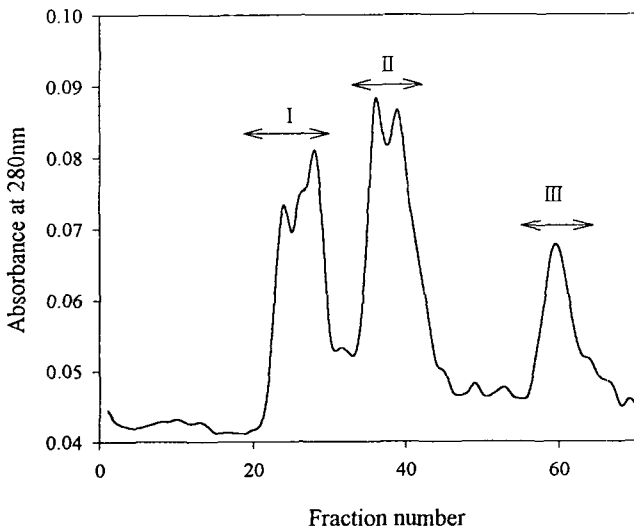


Fig. 7. The Sephadex G-15 column chromatogram of the 0.5~1.0 M NaCl fraction obtained by the SP-Sephadex C-25. Elution was performed at 1ml/min of a flow rate and the fraction volume was 5 ml/tube.

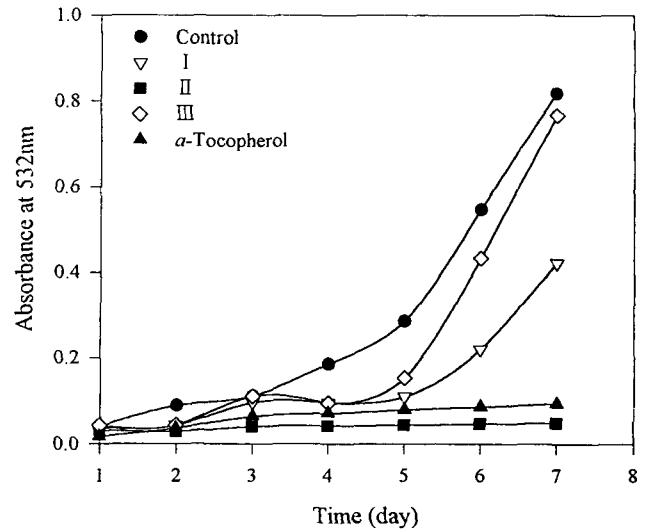


Fig. 8. Antioxidative activity of the fractions isolated on a Sephadex G-15 column in linoleic acid autoxidation system.

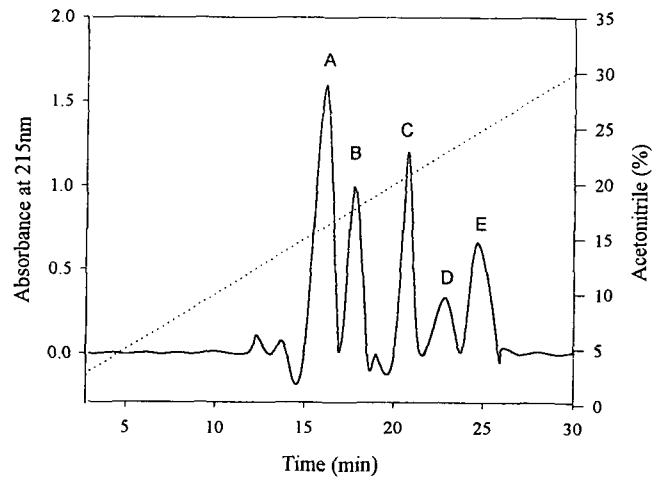


Fig. 9. Reverse-phase HPLC pattern on a Primesphere 10 C-18 column of active fraction II eluted on the Sephadex G-15 gel chromatography. HPLC operation was carried out with 30% acetonitrile as a mobile phase at 2 ml/min of flow rate.

되었다 (Fig. 11). 항산화성 펩타이드의 아미노산 서열을 분석한 결과는 Ser-Asn-Pro-Glu-Trp-Ser-Trp-Asn와 같다. 즉, N말단에 Ser이 위치하며 C말단에는 Asn가 위치하고 있고, 서열중에는 Asn, Pro, Glu 및 Trp로 구성되어진 nanopeptide로 분자량은 약 1,140 Da였다.

Bishov et al. (1972)은 식물 및 효모단백질 가수분해물에서 Sephadex G-10과 G-15를 이용하여 분리한 항산화성 획분이 1.5 kDa 이상임을 보고하였고, Yamaguchi et al. (1979)은 대두단백질을 가수분해하여 Sephadex G-25 column 상에서 겔여과하여 항산화성을 측정 한 결과, 가장 항산화성이 높은 분획은 vitamin

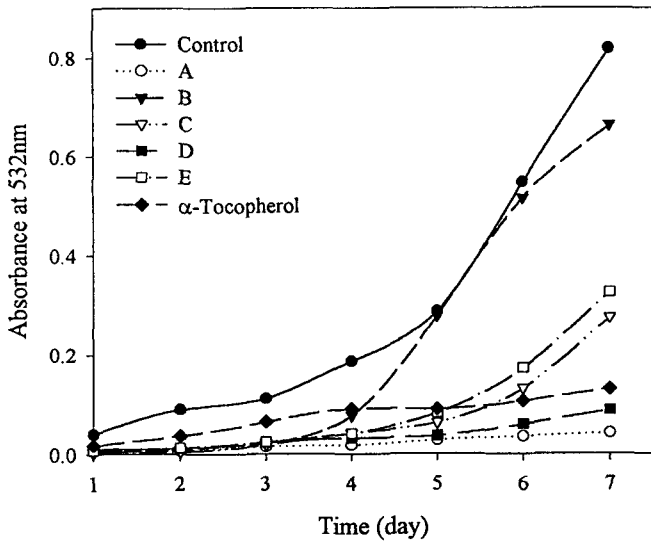


Fig. 10. Antioxidant activity of the fractions isolated on reverse-phase HPLC chromatography in linoleic acid autoxidation system.

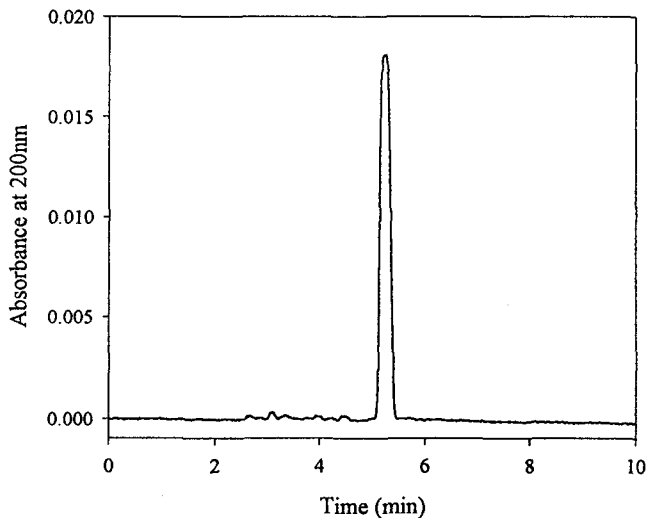


Fig. 11. Capillary electrophoresis chromatogram of a active fraction isolated from the HPLC chromatography.

B₁₂ (MW 1350 Da)보다 약간 큰 분자량의 펩타이드였으며, milk casein, egg-white albumin에서도 이와 비슷한 분자량에서 항산화성이 높은 펩타이드가 분리되었다고 보고하였다. 山口 (1989)는 대두단백질을 효소로 가수분해시킨 가수분해물에서 가장 항산화성이 우수한 가수분해물을 Sephadex G-25 column상에서 분획하여 항산화성을 측정된 결과, 2.5~3.0 kDa의 분자량에서 강한 항산화활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한, Yamaguchi et al. (1980)은 각종 dipeptide와 이를 구성하는 아미노산의 항산화성 비교에서 dipeptide를 구성하고 있는 아미노산 중 Met, His, Trp, Tyr이 강한 항산화활성을 나타낼 때 이 아미노산들의 위치에 대해

Met과 His은 C-말단에, Trp과 Tyr은 N-말단에 위치할 때 그 효과가 상승된다고 보고하였으며, Chen et al. (1995)은 대두 β-conglycinin의 가수분해물에서 분리한 6개의 항산화펩타이드가 N-말단 위치에 Val 또는 Leu의 소수성 아미노산을 포함하고 서열상에서 His, Pro, Tyr를 포함하는 5~16 잔기로 분자량이 약 0.6~1.7 kDa 사이인 펩타이드였다고 보고하였다. 이상에서 살펴본 바와 같이 아직까지 천연항산화제에 대한 정확한 구조와 그 기작에 대해서 확실하게 규명되어 있지 않다. 따라서 항산화활성 펩타이드의 구조 예측을 위해서는 본 연구와 같은 광범위한 항산화 펩타이드를 대상으로 구성 아미노산의 종류 및 길이와 항산화효과와의 상관성 규명이 필요할 것으로 판단된다.

요 약

수산물공공장에서 원료어 처리시 대량으로 발생하는 비가식부의 하나인 대구의 고니부분을 효율적으로 이용하기 위하여 단백질질을 효소로 가수분해시킨 후 한외여과막을 사용하여 분자량별로 분획하였으며, 이들 가수분해물 중 항산화활성이 뛰어난 펩타이드를 이온교환 크로마토그래피, 겔크로마토그래피 및 HPLC로 분리·정제하여 그 아미노산 서열을 결정하였다.

여러 가지 단백질 분해효소로 분해시켜 얻은 가수분해물 중에서 항산화활성이 가장 우수한 것은 Alcalase로 천연 항산화제인 α-tocopherol보다 5%정도 뛰어난 효과를 나타내었으며, 이 가수분해물을 한외여과막으로 분자량 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa의 세 종류로 분리하여 항산화활성을 측정된 결과, 1 kDa의 막을 통과하여 분리된 가수분해물이 가장 높은 활성을 나타내었으며, 이는 천연 항산화제인 α-tocopherol보다 10%정도 높았다. 이 확분으로 SP-Sephadex C-25를 사용하여 이온교환 크로마토그래피를 한 결과, 0.5~1.0 M NaCl 용액으로 용출시킨 분획물에서 α-tocopherol보다 약 17% 활성이 높게 나타났으며, 이것을 다시 Sephadex G-15로 겔여과하여 3개의 확분을 얻었으며 이 중 확분 II에서 α-tocopherol보다 약 45%가 높은 항산화활성을 보인 확분을 얻었다. 이것을 역상 HPLC를 이용하여 5개의 확분을 얻었으며, 항산화활성은 확분 A에서 α-tocopherol보다 약 53%정도 높게 나타나 가장 우수하였다. 이 확분을 capillary electrophoresis로 순도를 확인하여 아미노산 서열을 결정한 결과 Ser-Asn-Pro-Glu-Trp-Ser-Trp-Asn였다.

감사의 글

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

참 고 문 헌

- Ahmad, S. 1995. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology, Chapman & Hall, New York. 25~42.
- Aoyama, M., T. Maruyama, I. Niiya and S. Akatsuka. 1985. Antioxidant effects of tocopherols on palm oil by frying tests. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaishi*, 34, 714~719 (in Japanese).
- Bendich, A., L.J. Machlin, O. Scandurra, G.W. Burton and K.U. Ingold. 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free Rad. Biol. Med.*, 2, 419~444.
- Bishove, S.J. and A.S. Henick. 1972. Antioxidant effect of protein hydrolyzates in freeze-dried model system. *J. Food Sci.*, 37, 873~875.
- Branen, A.L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59~68.
- Hodnick, W.F., E.B. Milosavljevic, J.H. Nelson and R.S. Pardini. 1988. Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 2607~2611.
- Hudson, B.J.F. and J.I. Lewis. 1983. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids as synergists. *Food Chem.*, 10, 111~120.
- Kim, S.K., H.C. Lee, H.G. Byun and Y.J. Jeon. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolyzates of yellowfin sole skin gelatin. *J. Kor. Fish. Soc.*, 29, 246~255 (in Korean).
- Krogull, M.K. and O. Fennema. 1987. Oxidation of tryptophan in the presence of oxidizing methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 66~70.
- 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.
- Mitsuda, H., K. Yasumoto and K. Iwami. 1966. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi*, 19, 210~214 (in Japanese).
- Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi. 1978. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351~358.
- Osawa, T. and M. Namiki. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 735~739.
- Suetsuna, K. and K. Osajima. 1989. Blood pressure reductim and vasolatory effects in vivo of peptides originating from sardine muscle, *Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi*, 42(1), 47~54 (in Japanese).
- Yamaguchi, N., S. Naito, Y. Yokoo and M. Fujimaki. 1980. Application of protein hydrolyzate to biscuit as antioxidant. *J. Japanese Soc. Food Sci. Technol.*, 27, 56~59 (in Japanese).
- Yamaguchi, N., Y. Yokoo and M. Fujimaki. 1979. Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon shokuin Kogyo Gakkaishi*, 26, 65~70 (in Japanese).
- Yee, J.J., W.F. Shipe and J.E. Kinsella. 1980. Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper-catalyzed methyl linoleate oxidation. *J. Food Sci.*, 45, 1082~1083.
- 山口直彦. 1989. 펩티드의 항산화성, In *New Food Industry*, 31(8), 18~22 (in Japanese).

2000년 3월 2일 접수

2000년 5월 6일 수리