

## 천연 숙성 멸치액젓 Peptide의 생리활성

박종혁 · 김상무<sup>†</sup>

강릉대학교 해양생명공학부

### Biofunctionality of Peptides Purified from Naturally Fermented Anchovy Sauce

Jong Hyuk Park and Sang Moo Kim<sup>†</sup>

Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University,  
Gangneung 210-702, Korea

#### Abstract

Bioactive properties of low molecular weight peptides purified from anchovy sauce fermented in underground at  $15 \pm 3^\circ\text{C}$  for 1, 3, and 5 years, respectively, were investigated. The fermented anchovy sauce for 1 year showed 3 peaks on gel permeation chromatography pattern, while 3 and 5 year fermented anchovy sauce showed 4 and 5 peaks, respectively. The longer fermentation period, the lower molecular weight of peptides on gel permeation chromatography pattern. Antioxidative, antitumor, and ACE inhibitory activities of low molecular weight peptides increased as fermentation period increased. Antioxidative and antitumor activities of peptide peak 3 purified from 3 year fermented anchovy sauce were the highest with 34 and 44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $\text{IC}_{50}$  values, respectively, while ACE inhibitory activity ( $\text{IC}_{50}$ , 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of peak 3 purified from 1 year fermented was the highest.

**Key words:** anchovy sauce, peptide, antioxidative, antitumor, ACE inhibitory activity

#### 서 론

최근 식품성분이 가지는 각종 생체조절기능을 해명함으로써 식품의 기능을 새롭게 인식하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 식품에서 peptide는 영양, 맛 그리고 건강에 영향을 줌으로써 매우 중요한 역할을 한다. 일반적으로 생체에는 강한 생리활성(peptide상 hormone, enkephalin, interleukin, 세포 성장 인자, 독성물질, bacteriosin 및 enzyme inhibitor 등)을 갖는 유리 peptide들이 많이 존재하고 있다(1). 또한 이와는 다른 종류의 peptide들이 식품의 발효 및 숙성 등의 가공처리 동안에 생성될 수 있으며, 이들 중에는 종래에 생리활성 peptide의 전구체로 생각되지 않았던 식품단백질이나 혈액단백질 등으로부터 생리활성 peptide가 만들어진다(2). 특히 생리활성 peptide는 구조 및 활성이 다양하고, 유전공학 기술에 의한 생산 및 개조가 가능하며, 높은 안전성을 기대할 수 있다는 특성으로 인하여 주목받고 있는 물질이다(3).

혈압상승에는 angiotensin I converting enzyme[EC 3.4.15.1.]가 관여하며(4), 이 효소는 생체 중의 불활성형의 angiotensin I(decapeptide)의 C 말단의 His-Leu를 분리하여 혈관벽 수축작용을 하는 angiotensin II(octapeptide)로 전환하며, 또한 혈압강하인자인 bradykinin을 불활성하여 혈압을

상승시킨다(5). 현재, 식품유래 ACE 저해 peptide는 주로 효소에 의한 식품의 가수분해물의 연구에 중점적으로 이루어지고 있다. 수산물에는 명태껍질(6), 어육(7-9), 대구가공부산물(10), 닭수어(11), 고등어(12), 멸치(13) 등에 또는 이들의 효소가수분해물에 ACE 저해 peptide가 존재한다고 보고되고 있으며, 수산발효식품에는 정어리어간장(14) 및 수산발효식품(15)에 ACE 저해제가 존재한다고 하였으나, ACE 저해 peptide에 대한 명확한 연구는 없는 실정이다.

항산화제란 산화를 방지하거나 지연시키는 물질을 통칭하는 것으로 그 작용기작에 따라 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유 라디칼 소거작용, 과산화물을 비(非)라디칼(non-radical)로 분해하여 불활성시키는 과산화물 분해제, 자동산화에 있어서 라디칼 저해제와 공존시 항산화 작용을 증가시키는 상승제 및 각종 활성산소계를 소거하는 singlet oxygen quencher 등으로 분류된다(16). 이러한 항산화제는 각종 식물의 추출물, 향료, 발효생산물 등에 대부분 flavonoid 또는 phenolic 화합물로 존재한다. 또한 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소로 분해하여 얻어진 peptide에서도 항산화활성이 보고되고 있다(9,17). 일반적으로 항산화제는 천연 항산화제와 합성항산화제로 대별되는데, 합성항산화제는 동물 실험에서 발생과 각종 효소군 등에 영향을 주며, 특히 butyl-

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: smkim@kangnung.ac.kr  
Phone: 82-33-640-2343, Fax: 82-33-640-2410

ated hydroxytoluene(BHT)은 기형발생 또는 암 발생에 관여하는 것으로 보고되어(18) 뛰어난 항산화효과에 비해 부작용으로 인해 문제시 되고 있는 반면, 천연항산화제는 부작용이 거의 없어 식품첨가물 또는 약품으로 많이 이용되고 있다. 그러나 천연항산화제 중 가장 폭넓게 이용되는  $\alpha$ -tocopherol의 경우 비싼 가격과 지용성이라는 사용 제약으로 대체 천연항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다(19). 수산식품의 항산화연구는 어육단백질(20), 대구고니(21), 대구가공 부산물(10), 가자미(22), capelin(23), 고등어(24) 등의 효소가 수분해물에 국한되어 있고 멸치액젓의 수용성 획분(25)에도 항산화 효과가 있다는 연구가 있으나 천연 숙성 멸치액젓의 항산화 peptide에 관한 연구는 없는 실정이다.

암은 오늘날 급속한 의학의 발달에도 불구하고 아직도 우리의 생명을 위협하는 무서운 불치병으로 알려져 있다. 암의 발생은 약 75%가 공해 식품 및 그릇된 식생활이 그 주된 원인으로 식원병이라고 할 만큼 식생활과 큰 관련이 있다(26). 항암 활성을 가지는 물질로는 대두유래 단백질분해효소 inhibitor(27,28), phytic acid(29,30), isoflavone(31), 주목(32), 대두발효식품(33) 등 주로 농산물에 국한되어 있으며, 수산물에는 해조류(34)의 항암연구 외에는 찾아보기가 힘들다.

따라서 본 연구에서는 천연 숙성 멸치액젓의 숙성 기간별 생성되는 다양한 형태의 기능성 peptide을 분리·정제하여 항암, 항산화 및 ACE 저해효과를 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에서 사용된 액젓 시료는 풍미식품(숙초)에서 제조된 멸치액젓 제품으로 멸치 20 ton에 중량당 30%의 식염을 가하여  $15 \pm 3^\circ\text{C}$ 에서 각각 1, 3 및 5년 숙성한 것을 시료로 사용하였다. 숙성 동안 숙성 tank 상부로 모여지는 기름은 주기적으로 제거하였으며, 숙성 1년 후에는 잔사를 제거한 멸치액젓을 별도 tank로 옮겨 숙성하였다. Peptide 정제에 사용된 수지는 Bio-Rad P-2 gel(Bio-Rad Co., California, USA)를 사용하였으며, 항산화 작용 측정용 지방산은 linoleic acid(Sigma Chemical Co., St Louis, MO)이며 실험에 사용된 나머지 시약은 모두 특급을 사용하였다.

### 저분자 peptide의 정제

액젓을 sulfosalicylic acid로 제단백 한 다음,  $4^\circ\text{C}$ 에서 PM10(MWCO 3,000) membrane filter(Amicon, Bedford, MA)를 사용하여 분자량 3,000 dalton 이하로 분획하였다. 분획된 액은  $40^\circ\text{C}$ 에서 감압 농축한 다음 Bio-Rad P-2 gel을 충전한 column( $2.6 \times 70$  cm)에서 0.5 mL/min의 유속으로 용출하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광계의 흡광도를 초과하는 농도의 fraction은 증류수로 희석하여 흡광도를 측정한다. 다음 희석배수를 곱하여 농도를 표시하였다. 최대 흡광도의 50% 이상의 fraction을 pooling하여 실험에 사용하였다.

### Peptide-nitrogen 함량

Peptide-nitrogen 함량의 측정은 Umemoto의 개량 biuret법(35)으로 측정하였다. 즉, 시료를 두 개의 시험관에 각각 0.5 mL씩 취하고 증류수 4.5 mL씩을 가한 다음, 한 시험관에는 biuret 시약 I(0.4%  $\text{CuSO}_4$ , 8% NaOH, 0.2% glycerin)을 5 mL 첨가하여 A 반응구로, 다른 시험관에는 biuret II(8% NaOH, 0.2% glycerin) 5 mL를 첨가하여 B 반응구로 하였다. Blank는 시료용액 대신 증류수 5 mL를 사용하였다. 실온에서 2시간 반응시킨 후 545 nm에서 흡광도를 측정하여 peptide-nitrogen 함량을 구하였다.

### NaCl 함량

시료의 NaCl 함량 측정은 Mohr 법(36)으로 측정하였다.

### 항산화 활성

Linoleic acid를 사용하여 Hayase and Kato 방법(5)으로 측정하였다. 즉 linoleic acid 1 g를 ethanol 20 mL에 용해하고 일정 농도로 조정된 시료 1 mL 및 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 25 mL를 첨가한 다음  $37^\circ\text{C}$ 에서 24시간 방치하였다. 이 용액을 25 mL chloroform(2~3회)으로 추출한 후 acetic acid 25 mL로 용해하였다. 이 용액에 포화 K 용액 1 mL를 첨가하고 1분간 진탕 후 5분간 암소에서 방치한 다음 증류수 50 mL 및 1% 전분 지시약을 2~3방울 첨가하고 0.01 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 으로 적정하여 항산화활성을 구하였다.

### 항암활성

In vitro 항암실험을 위해 사용된 암세포주는 인체에서 유래한 SNU-1(서울대학교, 한국)이며 한국세포주은행(서울 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 암세포 SNU-1은 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin 및 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 배지를 교환해주며 75 mL cell culture flask에 5 mL씩 분할하여 주입하고 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 동물세포에 대한 시료의 암세포 성장저해효과를 측정하기 위하여 Charnichael 등(4)의 방법에 따라 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazoliumbromide 분석(MTT assay)방법으로 측정하였다. 즉, 동물세포를 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cell/well이 되게끔 분주하고 일정농도의 시료 20  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 96시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL MTT용액 20  $\mu\text{L}$ 를 첨가하고 다시 상기와 같은 조건에서 4시간 더 배양하였다. 이것을 원심분리(8,000  $\times$  g, 10 min)하여 상등액을 제거하고 각 well당 dimethylsulfoxide(DMSO) 150  $\mu\text{L}$ 를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 항암활성을 구하였다.

Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성 측정 ACE 저해활성 측정은 Cushman와 Cheung의 방법(37)으

로 측정하였다. 즉, lung acetone powder(Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 1 g에 400 mM sodium borate buffer(pH 8.3) 10 mL를 가한 다음 5°C에서 24시간 교반한 후 원심분리(8,000×g, 30 min)하여 얻은 상등액을 ACE로 사용하였다. 반응구는 시료 100 µL에 ACE 효소액 20 µL를 가한 다음 37°C에서 5분간 preincubation 하였으며, 대조구로 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 200 µL를 사용하였다. 여기에 0.3 M NaCl을 함유하는 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)에 기질인 hippury-L-histidyl-L-leucine(HHL) 0.5 M을 녹인 용액 200 µL를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1 N HCl 250 µL를 가하여 반응을 중지시킨 뒤 2 mL의 ethyl-acetate 층으로부터 용매를 증류시킨 잔사에 1 M NaCl 3 mL를 첨가하여 추출된 hippuric acid 농도를 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 계산하였다.

**결과 및 고찰**

**Peptide의 정제 및 특성**

1, 3 및 5년 숙성시킨 멸치액젓의 gel chromatography 결과를 Fig. 1~3에 나타내었다. 일반적으로 흡광계를 이용한

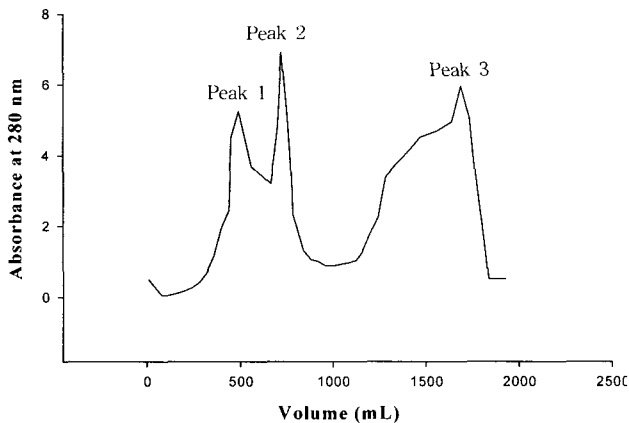


Fig. 1. Gel permeation chromatography pattern of peptides purified from anchovy sauce fermented at 15±3°C for 1 year.

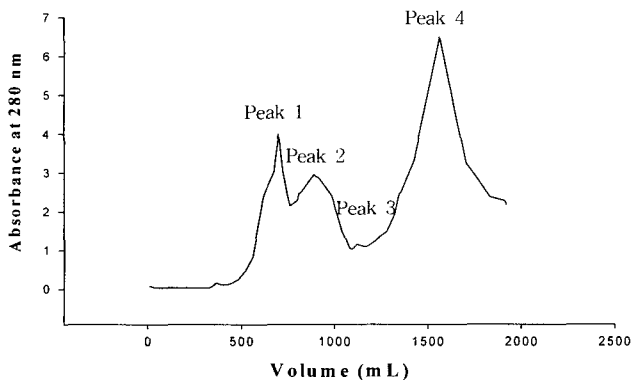


Fig. 2. Gel permeation chromatography pattern of peptides purified from anchovy sauce fermented at 15±3°C for 3 years.

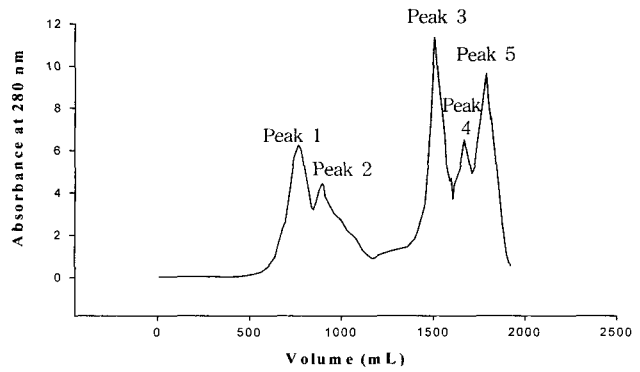


Fig. 3. Gel permeation chromatography pattern of peptides purified from anchovy sauce fermented at 15±3°C for 5 years.

oligopeptide의 분자량 측정은 214~230 nm에서 측정되었지만 본 실험에서는 한외여과의 cut-off 분자량이 3,000 dalton 이었고 또 280 nm에서 측정하였을 경우와 뚜렷한 차이가 없었기 때문에 peptide 분자량 측정은 280 nm에서 행하였다. 1년 숙성 멸치액젓은 3개의 peak, 3년 및 5년 숙성시킨 멸치액젓은 각각 4 및 5개의 peak를 나타내었다. 숙성 1년 멸치액젓(Fig. 1)의 peak 1 및 2부분(고분자 peptide)은 숙성 5년(Fig. 3)에서 크기가 감소하여 후반부(peak 3~5)의 저분자 peptide의 생성으로 진행되었음을 알 수 있다. 그러므로 gel chromatography 상에서 숙성기간이 길수록 저분자 peptide가 많이 생성되었기 때문에 숙성동안에 멸치의 단백질 및 고분자 peptide가 자가소화효소 및 미생물이 분비하는 단백질 분해효소에 의해 분해되어 저분자의 peptide를 생성하였다고 보여진다. 1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 유래 peptide의 정제 효율은 각각 2.98, 4.35 및 5.10%로 숙성 기간이 길수록 peptide의 생성량이 높았다(Table 1). 전통적으로 멸치액젓은 고농도(25~30%)의 식염을 사용하기 때문에 생리활성 측정애 소금의 영향을 최대한 제거하여야 한다. 본 실험에 사용한 Bio-Rad P2 gel은 시료의 식염함량을 약 26%에서 0.22% 이하로 효과적으로 낮추어 생리활성에 대한 소금의 영향은 무시하여도 문제가 없었다고 본다(Table 1).

**항산화활성**

1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 저분자 peptide의 총항산화활성은 각각 56.4, 90.3 및 185.3%로 숙성기간이 길수록 증가하였으며, 특히 5년 숙성 멸치액젓 peptide의 총항산화활성은 1 및 3년 숙성보다 각각 3.3 및 2.1배 정도 높았다(Table 1). 숙성기간의 증가에 따른 peptide 함량의 증가는 크지 않은데 비해 항산화활성이 크게 증가한 이유는 저분자 peptide일수록 높은 항산화활성을 가지는 것을 알 수 있다. Peak 별 항산화활성은 5년 숙성 peak 2(84.7%), 3년 숙성의 peak 3(62.9%), 5년 숙성의 peak 1(42.6%), 1년 숙성의 peak 2(38.7%) 순으로 높은 수치를 나타내었다. 그러나 비활성(specific activity)은 3년 숙성 peak 3(1,462.8%·mL/mg), 5년 숙성 peak 2(1,283.3), 1년 숙성 peak 2(624.2) 순으로 3년 숙성의 peak

**Table 1. Biofunctionality of peptides from anchovy sauce fermented at 15±3°C for 1, 3, and 5 years**

Fermentation period (year)	Peptide	Peptide concentration (mg/mL)	Yield (%)	NaCl concentration (%)	Antioxidative activity (%)	Specific antioxidative activity (% · mL/mg)	Antitumor activity (%)	Specific antitumor activity (% · mL/mg)	ACE activity (%)	Specific ACE activity (% · mL/mg)
1	Raw	5.238	100	26.0						
	Peak 1	0.048	0.92	0.002	2.7	56.3	0.38	7.9	66.2	1,378.3
	Peak 2	0.062	1.18	0.100	38.7	624.2	10.76	173.6	48.5	781.6
	Peak 3	0.046	0.87	0.016	15.0	326.1	4.52	98.3	97.8	2,126.3
	Total		2.98		56.4		15.66		212.5	
3	Raw	5.718	100	26.1						
	Peak 1	0.053	0.93	0.005	3.5	57.5	0.00	0.0	91.8	1,732.5
	Peak 2	0.074	1.29	0.187	19.2	259.5	4.93	66.6	71.9	971.5
	Peak 3	0.043	0.75	0.220	62.9	1462.8	49.16	1,143.3	62.7	1,458.1
	Peak 4	0.079	1.38	0.058	4.7	59.5	0.00	0.0	23.6	298.9
Total		4.35		90.3		54.09		250.0		
5	Raw	10.825	100	26.2						
	Peak 1	0.112	1.03	0.003	42.6	380.4	15.27	136.3	93.2	832.1
	Peak 2	0.066	0.61	0.003	84.7	1283.3	54.80	830.3	84.9	1,287.0
	Peak 3	0.172	1.59	0.003	26.2	152.3	11.15	64.8	84.3	489.9
	Peak 4	0.042	0.39	0.003	13.8	328.6	6.68	159.0	23.4	558.1
	Peak 5	0.160	1.48	0.003	12.1	75.6	0.00	0.0	23.4	146.5
Total		5.10		185.3		88.70		309.3		

3이 가장 높은 값을 나타내었다. Yamaguchi 등(38)은 대두 단백질을 효소로 가수분해시킨 분해물 중에서 분자량 2.5~3 kDa 사이의 peptide가 항산화활성이 가장 뛰어났다고 보고하였으며, Kim 등(22)은 가자미 gelatin을 한외여과막을 이용하여 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa인 막을 차례로 통과시켜 얻은 가수분해물 중에서 분자량 500~1,000 Da의 가수분해물이  $\alpha$ -tocopherol보다 항산화력이 10% 정도 더 높았다고 보고하였다. 또한 대두단백질, 우유 casein 및 난백 albumin 효소가수분해물의 항산화활성은 vitamin B12(MW 1,350 Da)보다 약간 큰 분자량을 가진 획분에서 가장 높았으며(38), gelatin 가수분해물의 경우는 그보다 더 큰 분자량 획분에서 항산화활성이 높았다고 보고되고 있다(22). Park 등(39)은 *Symphylcladia latiuscula*의 추출물에 대한 항산화 활성에 대한 연구에서 추출물의 IC<sub>50</sub>은 3.14~15.44 µg/mL로 나타났다고 하였으며, 특히 천연항산화제(L-ascorbic acid 및  $\alpha$ -tocopherol) 및 합성항산화제(BHA 및 BHT)의 IC<sub>50</sub>은 각각 1.22 및 1.28, 1.06 및 3.21 µg/mL로 측정되었다고 보고하였다. 본 연구의 멸치액젓 유래 peptide의 IC<sub>50</sub>은 34 µg/mL(3년 숙성 peak 3), 66 µg/mL(5년 숙성 peak 2), 80 µg/mL(1년 숙성 peak 2)로 천연 항산화제 및 합성항산화제에 비해서는 낮은 활성을 나타내었지만, 시료 자체가 100% 완전 정제 peptide가 아니기 때문에 완전 정제된 peptide는 보다 낮은 IC<sub>50</sub>값을 나타낼 것으로 추측된다. 약 10,000 daltons 크기의 대구 frame 효소가수분해물은  $\alpha$ -tocopherol과 비슷한 항산화활성을 가지고 있으나(40), 대구고니 효소가수분해물인 경우 1,000 daltons 이하의 분자량에서 항산화활성이 높았다(21). 멸치액젓의 BuOH층 및 수용액층 모두 항산화활성이 우수하고 항산화물질은 분자량 1,000 daltons 이하의 peptide

일 것으로 추정하였지만(25), 이 논문에서는 식염의 영향을 고려하지 않은 약점이 있다. 어육단백질은 높은 금속이온과 설페노기로 항산화활성을 나타내나, 금속이온봉쇄능은 금속이온의 종류에 따라 차이가 난다(20). Capelin의 효소가수분해물에서 정제한 4개의 peptide 획분 중에서 한개의 획분에서 높은 항산화활성을 나타내었고, 2개의 획분에서는 아주 약한 항산화활성을 나타내었으며, 나머지 1개의 획분에서는 pro-oxidant 활성을 나타내었다고 하였는데(23), 본 실험에서도 이와 유사하게 peptide 종류에 따라 항산화활성은 차이를 나타내고 있다.

**항암활성**

멸치액젓에서 정제한 저분자 peptide의 항암활성도 항산화활성과 같이 숙성기간이 길수록 증가하였다. 즉 1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 저분자 peptide의 항암활성은 각각 15.6%, 54.09 및 88.70%로 숙성기간이 길수록 증가하였으며, 특히 숙성 5년의 총항암활성은 숙성 1 및 3년보다 각각 약 5.7 및 1.6배 정도 높았다. Peak 별 항산화활성은 5년 숙성의 peak 2(54.80%), 3년 숙성의 peak 3(49.16%), 5년 숙성의 peak 1(15.27%), 1년 숙성의 peak 2(10.76%) 순으로 높았으며, 항암활성(specific antitumor activity)은 3년 숙성의 peak 3(1,143.3% · mL/mg), 5년 숙성의 peak 2(830.3% · mL/mg), 1년 숙성의 peak 2(173.6% · mL/mg)의 순으로 높았다(Table 1). 대두발효식품의 암세포주에 대한 세포 독성 조사 실험에서 된장 및 청국장 메탄올 추출물은 사람의 암세포 SNU-1에 대해서 성장억제효과를 나타내었는데, 이때의 IC<sub>50</sub>은 각각 1,338 및 756.2 µg/mL이었으며(33), 전통 약용식물은 추출물 농도 10~100 µg/mL 사이에서 항암활성을 나타내었다고

하였다(40). 본 실험의 항암 peptide의 IC<sub>50</sub>은 3년 숙성 peak 3이 44 µg/mL로 된장 및 청국장 추출물보다 낮아 훨씬 우수한 항암활성을 나타내어 천연숙성 멸치액젓에도 우수한 항암활성을 가진 물질(peptide)이 존재하는 것으로 판명되었다. Lee 등(41)은 까나리 및 멸치어간장에도 항종양 peptide가 존재한다고 하였으며, 세 개의 아미노산(Asp, Asn, Phe)으로 이루어진 dipeptide가 주 항암 peptide라고 하였으나 어간장 원료 및 자세한 실험방법은 아직 제시되지 않고 있다. 또한 참치의 ether 추출물에도 인체 장암세포 및 백혈병성 임파모세포의 증식억제 및 생체 내에서의 면역증강 효과를 나타내는 성분이 존재한다는 사실이 밝혀져 있으나 정확한 물질 규명은 이루어지지 않고 있다(42).

#### Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성

최근 여러 식품으로부터 ACE 저해 peptide가 분리 및 정제되고 있으나 이들 ACE 저해 peptide는 소수성 및 방향족 아미노산을 함유하고 있어 용해도가 낮고 또한 강한 쓴맛을 나타내기 때문에 식품첨가제로의 이용에는 한계가 있다(43). 그러나 수산물의 효소가수분해물은 높은 용해도를 가지면서도 쓴맛을 나타내지 않기 때문에 ACE 저해활성을 가진 기능성 첨가물로 이용 가능성이 높다(44). 효소가수분해물의 ACE 저해활성은 분자량이 적을수록 증가하였으며(40), 단백질 분해가 많을수록 증가하였다고 한다(43). 본 실험에서는 1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 저분자 peptide의 ACE 저해활성은 각각 212.5, 250.0 및 309.3%로 숙성기간이 길수록 증가하였으며, 특히 숙성 5년의 총ACE 저해활성은 숙성 1 및 3년보다 각각 약 1.5 및 1.2배 정도 높았으며, 항산화 및 항암활성에 비해 숙성기간이 증가할수록 상대적으로 활성의 증가폭은 낮았다(Table 1). Peak별 항산화활성은 1년 숙성의 peak 3 (97.8%), 5년 숙성의 peak 1(93.2%), 3년 숙성의 peak 1(91.8%), 5년 숙성의 peak 2(84.9%) 순으로 아주 높았으며, 나머지 peak들도 상대적으로 높은 ACE 저해활성을 나타내었다. 비ACE 저해활성(specific ACE inhibitory activity)은 1년 숙성의 peak 3(2,126.3% · mL/mg), 3년 숙성의 peak 1(1,732.5% · mL/mg), 1년 숙성의 peak 1(1,378.3% · mL/mg), 5년 숙성의 peak 2(1,287.0% · mL/mg)의 순으로 높았다(Table 1). 고등어 근육 효소가수분해물의 ACE 저해 작용에서는 단백질의 함량보다는 peptide의 종류(12) 및 적용 효소(14)에 따른 영향이 더 크다고 한다. 해조류의 ACE 억제효과 연구(45)에서 미역의 경우 가수분해시간이 길어지면서 peptide-nitrogen 함량은 증가하였으나 ACE 효과는 감소하였다. 또한 Fujita와 Yoshikawa(7)는 어육단백질에서 8개의 ACE 저해 peptide를 분리하였으나 활성은 peptide에 따라 차이가 있으며 이중 LKPNM peptide는 ACE에 의해 LKP로 분해되었을 경우 ACE 저해활성은 8배나 높았으며 상업용 항고혈압 치료제인 captopril의 91% 정도의 ACE 저해활성을 나타내었다고 하였다. ACE 저해활성은 peptide-nitrogen 생성량과도 관련이 있지만 peptide의 종류에 더 큰 영향을 받았으며

(12,15), 본 실험에서도 같은 원리가 적용되어진다고 본다.

## 요 약

숙성기간(1, 3 및 5년)이 다른 멸치액젓으로부터 추출한 peptide는 정제과정에서 숙성 1년의 멸치액젓은 3개, 숙성 3년의 멸치액젓은 4개, 숙성 5년의 멸치액젓은 5개의 peak를 각각 나타내었다. 숙성기간이 길수록 멸치액젓의 peptide는 저분자화 되었으며, gel chromatography상의 후반부에 나타났다. 숙성기간이 다른 멸치액젓으로부터 추출한 peptide들의 생리활성(항산화, 항암, ACE 저해활성)은 숙성기간이 길수록 증가하였다. 특히 항산화 및 항암활성은 IC<sub>50</sub>이 각각 34 및 44 µg/mL인 3년 숙성 peak 3이 제일 높았으나, ACE 저해활성은 IC<sub>50</sub>이 32 µg/mL인 1년 숙성 peak 3이 제일 높았다. 천연 숙성 멸치액젓의 저분자 peptide는 뛰어난 생리활성을 갖고 있음이 밝혀졌으나 구조분석 등의 추가 연구가 필요하다고 본다.

## 감사의 글

본 연구논문은 2001년도 한국과학재단 지역협력연구센터 사업(한림대 실버생물산업기술연구센터 R12-2001-047-03004-0) 및 1999년도 해양수산부 수산특정과제(과제번호 19990016)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다. 또한 멸치액젓을 제조한 속초시 풍미식품에게도 감사사를 드립니다.

## 문 헌

1. 손동화. 1997. 건강기능성 식품 펩타이드 및 그 응용. 식품과학과 산업 30: 22-29.
2. Mohr VM. 1982. Fish protein concentrate production by enzyme hydrolysis. In *Biochemical Aspects of New Protein Food*. J. Alder-Nissen ed. BO. Eggum.
3. Shin ZI, Ahn CW, Nam HS, Lee HJ, Lee HJ, Moon TH. 1985. Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J Food Sci Technol* 27: 230-234.
4. Charmichael J, Degraff EG, Gazdaar AF, Minna JD, Michell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
5. Hayase F, Kato H. 1984. Antioxidative components of sweet potatoes. *J Nutr Sci Vitaminol* 30: 37-40.
6. Byun HG, Kim SK. 2001. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochem* 36: 1155-1162.
7. Fujita H, Yoshikawa M. 1999. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacol* 44: 123-127.
8. Kohama Y, Matsumoto S, Oka H, Teramoto T, Okabe M, Mimura T. 1998. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem Biophys Res*

- Commun* 155: 332-337.
9. Suetuna K, Osajima K. 1989. Blood pressure reduction and vasodilatory effects in vivo of peptides originating from sardine muscle. *Nippon Eiyou Shokuryou Gakkaishi* 52: 47-51.
  10. Kim SK, Choi YR, Park PJ, Choi JH, Moon SH. 2000. Screening of biofunctional peptides from cod processing wastes. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43: 225-227.
  11. Kim TJ, Yoon HD, Lee DS, Jang YS, Suh SB, Yeum DM. 1996. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of hot-water extract and enzymatic hydrolysate of fresh water fish. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 871-877.
  12. Yeum DM, Lee TG, Byun HS, Kim SB, Park TH. 1992. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Bull Korean Fish Soc* 25: 229-235.
  13. Kim SB, Lee TG, Park YB, Yeum DM, Kim OK, Do JR, Park YH. 1994. Isolation and characteristics of angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of peptic hydrolysates of anchovy muscle protein. *Bull Korean Fish Soc* 27: 1-6.
  14. Lee TG, Park YB, Park DC, Yeum DM, Kim IS, Gu YS, Park YH, Kim SB. 1998. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in enzymatic hydrolysates of anchovy muscle protein. *J Korean Fish Soc* 31: 875-881.
  15. Yeum DM, Lee TG, Do JR, Kim OK, Park YB, Kim SB, Park YH. 1993. Characteristics of angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from fermented fish product. *Bull Korean Fish Soc* 26: 416-423.
  16. Ahmael S. 1995. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman and Hall, New York. p 25-42.
  17. Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylate hydroxyanisole and butylated hydroxytoluence. *J Food Sci* 37: 873-875.
  18. Doll K, Pet R. 1981. The causes of cancer, quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States. *J Natl Cancer Inst* 66: 1192-1308.
  19. Yamaguchi N, Yokoo Y, Fujimaki M. 1979. Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 26: 65-70.
  20. Kim SB, Yeum DM, Yeum SG, Ji CI, Lee YW, Park YH. 1989. Antioxidative effects of food protein hydrolysates by protease. *Korean J Food Sci Technol* 21: 492-497.
  21. Kim SK, Choi YR, Park PJ, Choi JH, Moon SH. 2000. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of cod teiset protein. *J Korean Fish Soc* 33: 198-204.
  22. Kim SK, Lee HC, Byun HG, Jeon YJ. 1996. Isolation and Characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J Korean Fish Soc* 29: 246-255.
  23. Amarowicz R, Shahidi F. 1997. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. *Food Chem* 58: 355-359.
  24. Iwamoto T, Watanabe S, Nishimura M, Onda R, Iwamoto M, Kurata H, Matsumoto A, Itakura H, Kondo K. 1997. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by fish protein (mackerel peptide). Abstract presented at 11th International Symposium on Atherosclerosis. October 8, Paris. p 223.
  25. Park JO, Yoon MS, Cho EJ, Kim HS, Rye BH. 1999. Antioxidant effects of fermented anchovy. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1378-1385.
  26. Kennedy AR, Little JB. 1981. Effects of protease inhibitors on radiation transformation in vitro. *Cancer Res* 41: 2103-2108.
  27. Yavelow J, Finlay TH, Kennedy AR, Troll W. 1983. Bowman Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res* 43: 2454-2459.
  28. Elair WH, Billings PC, Carew JA, McGandy CK, Newberne P, Kennedy AR. 1990. Suppression of dimethylhydrazine induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res* 50: 580-586.
  29. Shamsuddin AM, Ullah A, Chakravarty AK. 1989. Inositol and inositol hexaphosphate suppress cell proliferation and tumor formation in CD-1 mice. *Carcinogenesis* 10: 1461-1463.
  30. Shamsudolion AM, Elsafeel AM, Ullah A. 1988. Suppression of large intestinal cancer in F344 rats by inositol hexaphosphate. *Carcinogenesis* 9: 577-580.
  31. Coward L, Barnes NC, Stechell KDR, Barnes S. 1995. Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates, antitumor isoflavones in soybean feeds from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 41: 1961-1967.
  32. Hwang BH, Zhao JL, Choi KP, Jung SW, Kim EJ, Ham SS. 1996. The antimutagenic and anticancer effect of *Taxus cuspidata* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 1062-1068.
  33. Chung KS, Yoon KD, Kwon DJ, Hong SS, Choi SY. 1997. Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumour cells using MTT assay. *Korean J Appl Microbial Biotechnol* 25: 477-482.
  34. Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward Sarcoma-180. *Bull Korean Fish Sci* 23: 345-352.
  35. Umamoto S. 1996. A modification method for estimation of muscle protein by biuret method. *Bull Japanese Soc Fish* 32: 427-435.
  36. AOAC International. 1995. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD.
  37. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
  38. Yamaguchi NS, Naito S, Yokoo Y, Fujimaki M. 1980. Application of protein hydrolyzate to biscuit as antioxidant. *J Japanese Soc Food Sci Technol* 27: 56-59.
  39. Park HJ, Choi JS, Chung HY. 1998. The antioxidant activity in extracts of *Symphyocladia latiuscula*. *J Kor Fish Soc* 31: 927-932.
  40. Jeon YJ, Byun HG, Kim SK. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultra-filtration membranes. *Proc Biochem* 35: 471-478.
  41. Lee KW, Kim JY, Lee HJ. 2001. Characterization of anti-tumor peptides fractionated from lance and anchovy sauce. Abstract No Tu09-7 presented at 11th World Congress Food Sci. Technol. April 22-27, COEX center, Seoul.
  42. Hwang EI, Baik NG, Hwang YK, Lee SD. 1992. Antitumor and immunological effects of tuna extract. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 353-366.
  43. Matsui T, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. 1993. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 922-925.
  44. Kim SK, Jeon YJ, Byun HG, Kim YT, Lee CK. 1997. Enzymatic recovery of cod frame protein by crude proteinase derived from tuna pyloric caeca. *Fish Sci* 63: 421-427.
  45. Lee HO, Yoon HD, Jang YS, Suh SB, Ko YS. 1999. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. *J Korean Fish Soc* 32: 738-746.

(2003년 6월 2일 접수; 2003년 8월 25일 채택)