

특집 : 수산자원의 건강기능성 연구 및 산업화

멸치액젓의 기능성

김 상 무

강릉대학교 해양생명공학부

The Functionality of Anchovy Sauce

Sang Moo Kim

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

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, 유전공학기술에 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 불활성화하여 혈압을 상승시킨다(5). 현재, 식품유래 ACE 저해 biocompound (peptide)는 주로 효소에 의한 식품의 가수분해물의 연구에 중점적으로 이루어지고 있다. 수산물에는 명태껍질(6), 어육(7-9), 대구가공부산물(10), 담수어(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 biocompound에 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 불활성 시키는 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 phenol계 화합물로 존재한다. 또한 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소로 분해하여 얻어진 peptide에서도 항산화활성이 보고되고 있다(9,17). 일반적으로 항산화제는 천연 항산화제와 합성항산화제로 대별되는데, 합성항산화제는 동물실험에서 발생과 각종 효소군 등에 영향을 주며, 특히 butylated hydroxytoluence(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 α -tocopherol의 경우 비싼 가격과 지용성이라는 사용 제약으로 대체 천연항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다(19). 특히 아미노산 및 peptide는 대표적인 금속이온봉쇄능(20,21) 및 hydroperoxides를 imine(22)으로 전환능을 가진 항산화물질이며, 동식물성 단백질을 효소로 분해하여 얻어지는 저분자 peptide에서도 항산화활성이 있다고 알려져 있다(23). 수산식품의 항산화연구는 어육단백질(24), 대구고니(25), 대구가공부산물(10), 가자미(26), capelin(27), 고등어(28) 등의 효소가수분해물에 국한되어 있고 멸치액젓의 수용성 획분(29)에도 항산화 효과가 있다는 연구가 있으나 천연 숙성 멸치액젓의 항산화 biocompound에 관한 연구는 없는 실정이다. 이러한 항산화 물질

E mail: smkim@kangnung.ac.kr
Phone: 033 640 2343, Fax: 033-640-2410

의 항산화 작용은 일차적으로 식품의 품질유지 및 지방질의 과산화방지에 직접 관여할 뿐만 아니라 여러 가지 생물학적 활성 특히, 항노화, 항돌연변이성 그리고 항암성에 직접 관련이 있다고 보고되고 있다(30). 따라서 멸치액젓과 같은 우리나라 고유의 상용 식품이 항산화성과 같은 활성을 지니고 있다면, 멸치액젓이 갖는 영양성과 기호성에 이어 소중한 기능성 식품이 될 수 있을 것으로 생각되기 때문에 멸치액젓의 우수성과 생리적 활성을 구명할 필요가 있다.

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(31). 항암 활성을 가지는 물질로는 대두유래 단백질 분해효소 inhibitor(32,33), phytic acid(34,35), isoflavone(36), 주목(37), 대두발효식품(38) 등 주로 농산물에 국한되어 있으며, 수산물에는 해조류(39)의 항암효과 이외에는 찾아보기가 힘들다.

따라서 본 연구에서는 천연 숙성 멸치액젓의 숙성 기간 별 생성되는 다양한 형태의 기능성 biocompound (peptide)를 분리·정제하여 항암, 항산화 및 ACE 저해효과를 분석하였으며, 또한 가장 시장성이 큰 숙성 5년 액젓 제품의 항산화물질의 구조를 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±3°C에서 각각 1, 3 및 5년 숙성한 것을 실험의 시료로 사용하였다. 숙성 동안 숙성 tank 상부로 모여지는 기름은 주기적으로 제거하였으며, 숙성 1년 후에는 잔사를 제거한 멸치액젓을 별도의 tank로 옮겨 숙성하였다. Biocompound 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 biocompound의 정제

액젓을 sulfosalicylic acid로 제단백한 다음, 4°C에서 PM10 (MWCO 3,000) membrane filter (Amicon, Bedford, MA)를 사용하여 분자량 3,000 daltons 이하로 분획하였다. 분획된 액은 40°C에서 감압 농축한 다음 Bio-Rad P-2 gel을 충전한 column (2.6×70 cm)에서 0.5 mL/min의 유

속으로 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(40)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% CuSO₄, 8% NaOH, 0.2% glycerin)를 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(41)으로 측정하였다.

항산화활성

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°C에서 24시간 방치하였다. 이 용액을 25 mL chloroform으로 추출한 후(2~3회) acetic acid 25 mL로 용해하였다. 이 용액에 포화 KI 용액 1 mL를 첨가하고 1분간 진탕 후 5분간 암소에서 방치한 다음 증류수 50 mL 및 1% 전분 지시약을 2~3방울 첨가하고 0.01 N Na₂S₂O₃으로 적정하여 항산화활성을 구하였다.

5년 숙성 멸치액젓의 항산화물질 정제 및 구조분석에 사용한 항산화활성측정은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 소거효과 측정(Blois, 1958)으로 항산화능의 지표로 삼았다. 즉, methanol로 농도를 조정한 시료 4 mL를 취하고, 0.15 mM DPPH 1 mL와 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여, DPPH radical 소거활성[Reduction of DPPH(%) = (시료 처리구의 흡광도 / 대조구의 흡광도)×100]을 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°C, 5% CO₂ 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 Carmichael 등(4)의 방법에 따라 항암활성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazoliumbromide 분석(MTT assay)방법으로 측정하였다. 즉, 동물세포를 96 well plate에 1×10⁴ cell/well이 되게끔 분주하고 일정 농도의 시료 20 µL를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 96시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL MTT용액 20 µL를 첨가하고 다시 상기와 같은 조건에서 4시간 더 배양하였다. 이것을 원심분리(8,000×g, 10 min)하여 상등액을 제거하고 각 well당 dimethylsulfoxide(DMSO) 150 µL를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 항암활성을 구하였다.

Angiotensin converting enzyme (ACE) 저해활성 측정

ACE 저해활성 측정은 Cushman와 Cheung의 방법(42)으로 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 ethylacetate 층으로부터 용매를 증류시킨 잔사에 1 M NaCl 3 mL를 첨가하여 추출된 hippuric acid 농도를 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 계산하였다.

항산화물질의 정제

멸치액젓으로부터 저분자 항산화물질의 정제방법은 다음과 같다. 저분자 biocompound물질 정제에서 설명한 제단백, 환의여과 및 Bio-Rad P-2 gel permeation chromatography로 정제한 액젓 시료에서 항산화활성이 높은 peak는 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

로 분리·정제하였다. 즉, 제1차 분리·정제는 Vydac C₁₈ column(7.5×250 mm, Shiseido, Japan)으로 부분·정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다. 즉, A 용매: 0.1% TFA를 포함하는 H₂O(pH 2.2), B 용매: 0.1% TFA를 포함하는 100% CH₃CN, B 용액의 농도구배: 0→20%(40 min), 유속: 2.0 mL/min, 파장: 220 nm, 온도: 40°C로 분획하였다. 활성을 나타낸 peak는 다시 Capcell Pak C₁₈ column(7.5×250 mm, Shiseido, Japan)으로 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다. 용매, 유속, 파장은 1차 정제와 동일하며, B 용액의 농도구배는 0→15%(45 min)로 하였다. 2차 정제에서 활성이 나타난 peak를 다시 Capcell Pak C₁₈column(4.6×250 mm, Shiseido, Japan)으로 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다. 용매 및 파장은 1차 정제와 동일, B 용액의 농도구배: 0→10%(30 min), 유속: 1.0 mL/min으로 하였다. 정제에 사용한 HPLC는 Waters Model 486 (Waters Associates, Miliford, MA, USA)을 사용하였으며 HPLC-grade용 water와 acetonitrile은 TEDIA Co. (Ohio, USA) 제품을 사용하였다.

아미노산 함량 측정

아미노산(glutamic acid 및 lysine) 함량은 표준품(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)으로 측정된 표준곡선(농도 vs 항산화활성)으로부터 구하였다.

아미노산 서열 결정

HPLC에서 최종 정제한 시료의 아미노산 서열 결정은 protein sequencer(Shimadzu PSQ-1 Protein Sequencer, Japan)를 사용하여 아미노산 서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

Biocompound의 정제 및 특성

1, 3 및 5년 숙성시킨 멸치액젓의 gel chromatography 결과를 Fig. 1~3에 나타내었다. 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 2 부분(고분자 biocompound)은 숙성 5년(Fig. 3)에서 크기가 감소하여 후반부(peak 3-5)의 저분자 biocompound의 생성으로 진행되었음을 알 수 있다. 그러므로 gel chromatography 상에서 숙성기간이 길수록 저분자 biocompound(peptide)가 많이 생성된 이유는 숙성동안에 멸치의 단백질 및 고분자 peptide가 자가소화효소 및 미생물이 분비하는 단백분해효소에 의해 분해되어 저분자의 biocompound를 생성하였다고 보여진다. 1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 유래 biocompound의 정제 효율은 각각 2.98,

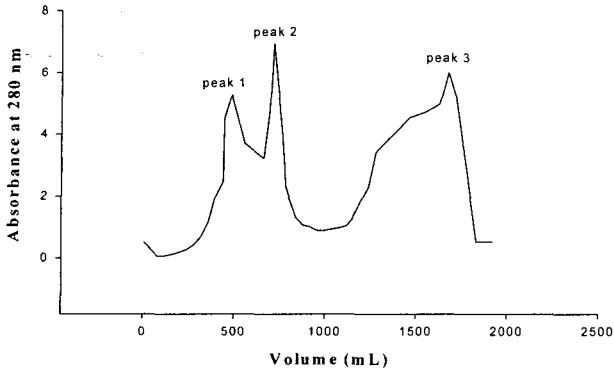


Fig. 1. Gel permeation chromatography pattern of biocompounds purified from anchovy sauce fermented at $15 \pm 3^\circ\text{C}$ for 1 year.

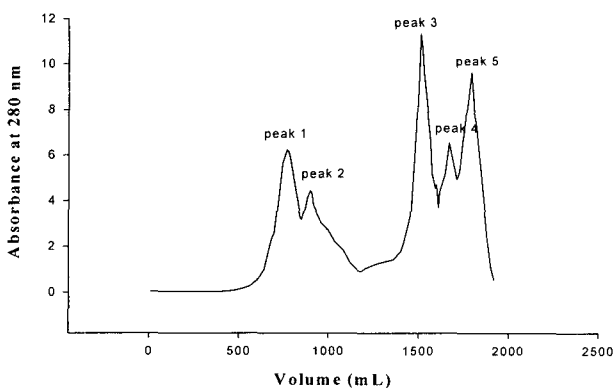


Fig. 2. Gel permeation chromatography pattern of biocompound purified from anchovy sauce fermented at $15 \pm 3^\circ\text{C}$ for 3 years.

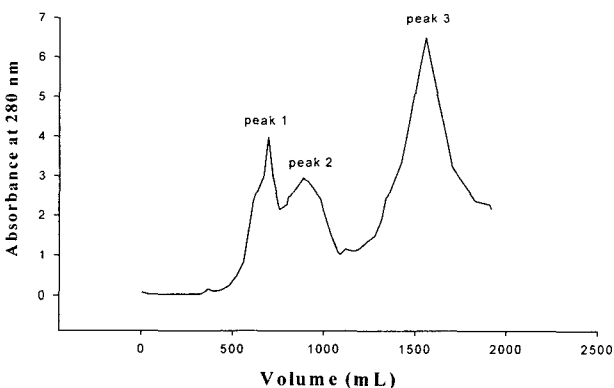


Fig. 3. Gel permeation chromatography pattern of biocompound purified from anchovy sauce fermented at $15 \pm 3^\circ\text{C}$ for 5 years.

4.35 및 5.10%로 숙성 기간이 길수록 biocompound의 생성량이 높았다(Table 1). 전통적으로 멸치액젓은 고농도(25~30%)의 식염을 사용하기 때문에 생리활성 측정에 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 biocompound의 총항산화활성은 각각 56.4, 90.3 및 185.3%로 숙성기간이 길수록 증가하였으며, 특히 5년 숙성 멸치액젓 biocompound의 총항산화활성은 1 및 3년 숙성보다 각각 3.3 및 2.1배 정도 높았다(Table 1). 숙성기간의 증가에 따른 biocompound 함량의 증가는 크지 않은데 비해 항산화활성이 크게 증가한 이유는 저분자 biocompound일수록 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 3이 가장 높은 값을 나타내었다. Yamaguchi 등(43)은 대두단백질을 효소로 가수분해시킨 분해물 중에서 분자량 2.5~3 kDa 사이의 peptide의 항산화활성이 가장 뛰어났다고 보고하였으며, Kim 등(26)은 가자미 gelatin을 한외 여과막을 이용하여 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa인 막을 차례로 통과시켜 얻은 가수분해물 중에서 분자량 500~1,000 Da의 가수분해물이 α -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(43), gelatin 가수분해물의 경우는 그보다 더 큰 분자량 획분에서 항산화활성이 높았다고 보고되고 있다(26). Park 등(44)은 *Symphylcladia latiuscula*의 추출물에 대한 항산화활성에 대한 연구에서 추출물의 IC_{50} 은 3.14~15.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다고 하였으며, 특히 천연항산화제(L-ascorbic acid 및 α -tocopherol) 및 합성항산화제(BHA 및 BHT)의 IC_{50} 은 각각 1.22 및 1.28, 1.06 및 3.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었다고 보고하였다. 본 연구의 멸치액젓 유래 biocompound의 IC_{50} 은 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3년 숙성 peak 3), 66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (5년 숙성 peak 2), 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1년 숙성 peak 2)로 천연 항산화제 및 합성항산화제에 비해서는 낮은 활성을 나타내었지만, 시료 자체가 100% 완전 정제된 것이 아니기 때문에 완전 정제된 biocompound는 보다 낮은 IC_{50} 값을 나타낼 것으로 추측된다. 약 10,000 daltons 크기의 대구 frame 효소가수분해물은 α -tocopherol과 비슷한 항산화활성을 가지고 있으며(45), 대구고니 효소가수분해물인 경우 1,000 daltons 이하의 분자량에서 항산화활성이 높았다고 한다(25). 멸치액젓의 BuOH층 및 수용액층 모두 항산화활성이 우수하고 항산화물질은 분자량 1,000 daltons 이하의 peptide일 것으로 추정하였지만(29), 이 논문에서는 식염의 영향을 고려하지 않은 약점이 있다. 어육

Table 1. Bioactivity of low molecular weight biocompounds from anchovy sauce fermented at 15±3°C for 1, 3 and 5 years

Fermentation period (year)	Biocompound	Biocompound 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	1,462.8	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	1,283.3	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		

단백질은 높은 금속이온 봉쇄능으로 항산화활성을 나타내나, 금속이온 봉쇄능은 금속이온의 종류에 따라 차이가 난다(24). Capelin의 효소가수분해물에서 정제한 4개의 peptide 획분 중에서 한개의 획분에서 높은 항산화활성을 나타내었고, 2개의 획분에서는 아주 약한 항산화활성을 나타내었으며, 나머지 1개의 획분에서는 prooxidant 활성을 나타내었다고 하였는데(27), 본 실험에서도 이와 유사하게 biocompound 종류에 따라 항산화활성은 차이를 나타내고 있다.

항암활성

멸치액젓에서 정제한 저분자 biocompound(peptide)의 항암활성도 항산화활성과 같이 숙성기간이 길수록 증가하였다. 즉 1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 저분자 biocompound의 항암활성은 각각 15.66, 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, 비항암활성(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 IC₅₀은

각각 1,338 및 756.2 µg/mL이었으며(38), 전통 약용식물은 추출물 농도 10~100 µg/mL 사이에서 항암활성을 나타내었다고 하였다(45). 본 실험의 항암 biocompound의 IC₅₀은 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(46)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(47).

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(48). 그러나 수산물의 효소가수분해물은 높은 용해도를 가지면서도 쓴맛을 나타내지 않기 때문에 ACE 저해활성을 가진 기능성 첨가물로 이용 가능성이 높다(49). 효소가수분해물의 ACE 저해활성은 분자량이 적을수록 증가하였으며(45), 단백질분해가 많을수록 증가하였다고

한다(48). 본 실험에서는 1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 저분자-biocompound의 ACE 저해활성은 각각 212.5, 250.0 및 309.3%로 숙성기간이 길수록 증가하였으며, 특히 숙성 5년의 총 ACE 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). Peak 별 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(50)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.

항산화 물질의 분리정제 및 구조분석

멸치액젓에 존재하는 항산화물질의 구조를 분석하기 위하여 숙성 5년 멸치액젓에서 Bio-Rad P-2 gel로 분획한 획분 중 항산화활성이 가장 높은 peak 1 및 2를 HPLC로 단계별로 정제하였으며, 그 중 대표적인 2차 HPLC 정제 분석 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 본 논문에서는 나타내

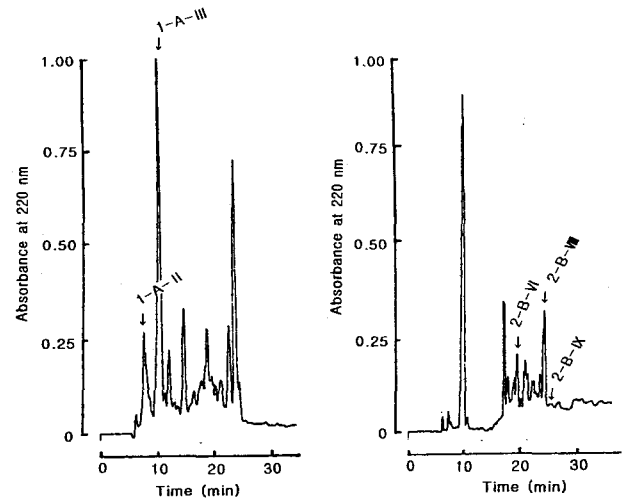


Fig. 4. 2nd HPLC pattern of biocompounds purified from anchovy sauce fermented at $15 \pm 3^\circ\text{C}$ for 5 years.

지 않았지만 1차 HPLC 정제에서 peak 1은 5개(peak 1-A-E), peak 2는 9개(2-A-J)의 세부 분획을 나타내었다. 그 중 항산화활성이 높은 1-A 분획을 HPLC로 2차 정제하여 11개의 분획(I-XI)을 얻었으며, 2-B는 9개의 분획(I-IX)을 나타내었다(Fig. 4). 이중 항산화활성이 높은 1-A-II분획은 HPLC로 3차 정제하여 4개의 peak(1-A-II-a-d)를 얻었으며, 그 중 1-A-II-d 분획의 항산화활성은 9%를 나타내었다. 또한 1-A-III 분획은 64%를 나타내었다. 2-B-VI-b 및 e는 각각 3 및 82%, 2-B-VIII-d 및 2-B-IX 분획은 각각 23 및 5%의 항산화활성을 나타내었다. 천연 숙성 멸치액젓 분획 중 항산화활성이 높은 1-A-II-d와 1-A-III을 sequence analyzer로 분석한 결과 각각 glutamic acid 및 lysine의 단일 아미노산으로 나타났다. HPLC로부터 정제한 시료의 양은 극미량이어서 아미노산 함량측정은 현실적으로 불가능하다. 그러므로 관례적으로 구조분석을 한 다음 해당 표준품으로 측정된 표준곡선으로부터 아미노산의 함량을 측정하고 있다. 아미노산 함량에 따른 항산화활성의 표준곡선은 glutamic acid인 경우 $y = 0.18x + 101.1$ ($R^2 = 0.8526$)이었으며, lysine인 경우 $y = 4.9x + 5$ ($R^2 = 0.9471$)이었다. 표준곡선에서 항산

Table 2. Antioxidative activity of low molecular weight biocompounds purified from anchovy sauces fermented at 15°C for 5 years

Biocompound	1st HPLC	2nd HPLC	3rd HPLC	Antioxidative activity (%)	Amino acid	Concentration (g/mL)
Peak 1	1-A	1-A-II	1-A-III-d	9	Glutamic acid	6.11
		1-A-III		64		
Peak 2	2-B	2-B-VI	2-B-VI-b	3	NA ¹⁾	
			2-B-VI-e	82	NA	
		2-B-VIII	2-B-VIII-d	23	NA	
		2-B-IX		5	NA	

¹⁾NA: Not analyzed.

화활성 9 및 64%에 해당하는 glutamic acid 및 lysine의 함량은 6.11 및 1.20 g/mL이었다(Table 2). 한편 Park 등(29)은 멸치액젓 수용액층에서 분리·정제한 항산화물질을 methionine 유도체로 추정하였으며, Yamaguchi 등(51)은 유리아미노산도 항산화능이 있으나 유리아미노산이나 tripeptide보다 dipeptide가 더 우수하다고 하였으며 N-말단의 구성아미노산에 따라 항산화능이 달라진다고 하였다. 그러나 peak 2는 sequence analyzer로 구조분석이 되지 않았는데, 이는 색소들이 결합된 갈변물질일 것으로 추정되어진다. 왜냐하면 어류는 고도불포화지방을 많이 함유하고 있기 때문에 어유의 산화를 방지하는 물질 역시 많이 존재하며, 또한 액젓의 숙성 중에 생겨나는 갈변물질 또한 항산화활성을 가지고 있기 때문인 것으로 보여진다. 일반적으로 아미노산은 amine 반응 및 sulphur group들이 hydroperoxide와 반응하여 imines, sulphides, thiosulphinates, sulfoxides를 형성하여 항산화활성을 가진다고 알려져 있다(22). 그러므로 본 실험에서 정제된 glutamic acid 및 lysine은 imine을 형성하여 항산화활성을 가지는 아미노산이라고 본다. 청어기름으로부터 정제한 11개 아미노산의 항산화활성을 측정하였을 때, 10개의 아미노산이 항산화활성을 나타내었으며, 그 중 histidine, tryptophan, lysine이 강한 활성을 가지고 있는데 반해 glutamic acid 및 alanine 등은 다소 약한 항산화활성을 나타내었다(52). 이들 아미노산은 산화촉진물질과 결합하든지 아니면 산화된 1차 항산화물질을 재생함으로써 항산화활성을 나타낸다고 한다(52). 특히 histidine을 함유하고 있는 peptide는 금속뿐만 아니라 histidine의 imidazole ring이 지방 radical의 봉쇄(53), 또는 hydroxyl radical 및 singlet oxygen을 봉쇄(54)하여 항산화활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 어육단백질 가수분해물은 항산화물질 및 산화촉진제를 동시에 함유하고 있으나(55), 대두 및 우유단백질 가수분해물보다 뛰어난 항산화활성을 가지고 있다고 한다(56). 한편 Cheigh 등(57)은 양조간장의 항산화성은 melanoidin related products(MRPs)가 free radical scavenger 기능, 항산화 효력 상승제의 기능과 금속 킬레이트로서의 기능, lipoxygenase 활성 저해능을 가진다고 하였는데 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 비효소적갈변반응(Maillard reaction) 물질들은 항산화활성을 가지고 있으나 아직 상업용으로는 개발되지 못하고 있는데(58,59), 그 이유는 갈변으로 인하여 식품첨가시 변색이 되기 때문이다(60).

위의 실험결과를 보면 멸치액젓의 항산화활성은 발효과정 중 생성된 여러 가지 아미노산 및 아미노산의 유도체 그리고 발효과정 중 형성된 갈변물질들 등이 oligopeptide들과 어울려 상승효과를 나타내는 것으로 생각된다. 최근 김치, 간장, 액젓 등 우리나라 전통발효 식품에 우수한 생

리활성 물질을 많이 가지고 있음이 확인(30,57)되고 있으므로 더 깊은 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

숙성기간(1, 3 및 5년)이 다른 멸치액젓으로부터 추출한 biocompound는 정제과정에서 숙성 1년의 멸치액젓은 3개, 숙성 3년의 멸치액젓은 4개, 숙성 5년의 멸치액젓은 5개의 peak를 각각 나타내었다. 숙성기간이 길수록 멸치액젓의 biocompound는 저분자화 되었으며, gel chromatography상의 후반부에 나타났다. 숙성기간이 다른 멸치액젓으로부터 추출한 biocompound들의 생리활성(항산화, 항암, ACE 저해활성)은 숙성기간이 길수록 증가하였다. 특히 항산화 및 항암활성은 IC₅₀이 각각 34 및 44 µg/mL인 3년 숙성 peak 3이 제일 높았으나, ACE 저해활성은 IC₅₀이 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. 5년 숙성 멸치액젓 분획 중 항산화활성이 높은 1-A-II-d와 1-A-III을 sequence analyzer로 분석한 결과 각각 glutamic acid 및 lysine의 단일 아미노산으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. 손동화. 1997. 건강기능성 식품 펩타이드 및 그 응용. 식품과 학과 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 Aric 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, Byum 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 hydroxytoluene. *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, Fujimabi M. 1979. Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 26: 65-70.
 20. Fujimoto K, Neff WE, Frankle EN. 1984. The reaction of DNA of lipid oxidation products, metal reducing agent. *Biochem Biophys Acta* 795: 100-107.
 21. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin. *J Agric Food Chem* 43: 574-578.
 22. Zaleska FJ. 2000. Antioxidant properties of α -tocopherol, methionine and selenomethionine in olive oils. *Riv Ita Sostanze Grasse* 77: 543-547.
 23. Kim SK, Lee HC, Byun HK, Jeon YJ. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J Korean Fish Soc* 29(2): 246-255.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. Amarowicz R, Shahidi F. 1997. Antioxidant activity of peptides fractions of capelin protein hydrolysates. *Food Chem* 58: 355-359.
 28. 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.
 29. Park JO, Yoon MS, Cho EJ, Kim HS, Rye BH. 1999. Antioxidant effects of fermented anchovy. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1378-1385.
 30. Cheigh HS, YO Lee, YS Choi. 1998. Antioxidative activity of Kimchi and Kimchi sub-ingredient. *Food Ind and Nutr* 3(2): 47-54
 31. Kennedy AR, Little JB. 1981. Effects of protease inhibitors on radiation transformation in vitro. *Cancer Res* 41: 2103-2108.
 32. Yavelow J, Finlay TH, Kennedy AR, Troll W. 1983. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res* 43: 2454-2459.
 33. 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.
 34. Shamsuddin AM, Ullah A, Chakravarthy AK. 1989. Inositol and inositol hexaphosphate suppress cell proliferation and tumor formation in CD-1 mice. *Carcinogenesis* 10: 1461-1463.
 35. Shamsudolion AM, Elsafeel AM, Ullah A. 1988. Suppression of large intestinal cancer in F344 rats by inositol hexaphosphate. *Carcinogenesis* 9: 577-580.
 36. Coward L, Barnes NC, Stechell KDR, Barnes S. 1995. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates, antitumor isoflavones in soybean fuels from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 41: 1961-1967.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. 1990. Antitumor effect and

- immunology activity of seaweeds toward Sarcoma-180. *Bull Korean Fish Sci* 23: 345-352.
40. Umemoto S. 1996. A modification method for estimation of muscle protein by biuret method, *Bull Japanese Soc Fish* 32: 427-435.
 41. AOAC International. 1995. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD.
 42. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
 43. 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.
 44. Park HJ, Choi JS, Chung HY. 1998. The antioxidant activity in extracts of *Symphyclocladia latiuscula*. *J Korean Fish Soc* 31: 927-932.
 45. Jeon YJ, Byun HG, Kim SK. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Proc Biochem* 35: 471-478.
 46. Lee KW, Kim JY, Lee HJ. 2001. Characterization of antitumor peptides fractionated from lance and anchovy sauce. Abstract No Tu 09-7 presented at 11th World Congress Food Sci. Technol. April 22-27, COEX center, Seoul.
 47. Hwang EI, Baik NG, Hwang YK, Lee SD. 1992. Antitumor and immunological effects of tuna extract. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 353-366.
 48. 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.
 49. 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.
 50. 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.
 51. Yamaguchi N, Yokoo Y, Fujimaki M. 1979. Antioxidative activity of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaishi* 26(2): 65-70.
 52. Marcusk R. 1960. Antioxidative effect of amino acids. *Nature* 185: 886-887.
 53. Murase H, Nagao A, Terao J. 1993. Antioxidant and emulsifying action of N-(long-chain-acyl)histidine and N-(long-chain-acyl) carnosine. *J Agric Food Chem* 41: 1601-1604.
 54. Wade AM, Turcker HN. 1998. Antioxidant characteristics of L-histidine. *J Nutr Biochem* 9: 308-315.
 55. Shahidi F, Amarowicz R. 1996. Antioxidative activity of protein hydrolyzates from aquatic species. *JAOCS* 73: 1197-1199.
 56. Kim SB, Yeam DM, Ji SG, Lee YW, Park YH. 1989. Antioxidative effects of food protein hydrolysates by protease. *Korean J Food Sci Technol* 21: 492-497.
 57. Cheigh HS, Moon GS, Park KY. 1993. Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. *J Korean Soc Nutr* 22(5): 565-569.
 58. Dworschak E, Szoabo L. 1986. Formation of antioxidative materials in the preparation of meals. *Dev Food Sci* 13: 311-319.
 59. Dworschak E, Tarjan V, Turos S. 1986. Characteristics of some new flavoring materials produced by the Maillard reaction. *AOCS Symp Ser* 215: 159-168.
 60. Yamaguchi N. 1991. Antioxidative properties of decolorized melanoidin. *New Food Ind* 33: 76-80.