

## Bacillus subtilis JM3 단백분해효소로 속성제조한 멸치액젓 저분자 peptide의 기능성

박종혁 · 김영명 · 김동수 · 김상무<sup>1,\*</sup>

한국식품연구원, <sup>1</sup>강릉대학교 해양생명공학부

## Functionality of Low Molecular Weight Peptides of Acceleratedly Manufactured Anchovy Sauce with *Bacillus subtilis* JM3 Protease

Jong Hyuk Park, Young Myoung Kim, Dong Soo Kim, and Sang Moo Kim<sup>1,\*</sup>

Korea Food Research Institute

<sup>1</sup>Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University

*Bacillus subtilis* JM3 protease from naturally fermented anchovy sauce was partially purified in 40-60% ammonium sulfate fraction. To accelerate fermentation of anchovy sauce, 2 and 4% crude *B. subtilis* JM3 proteases were added to 6 month-ripened anchovy sauce, and their hydrolysis degrees and amino-nitrogen contents were investigated at different storage times. Low molecular weight (LMW) peptide was purified by ultrafiltration and gel permeation chromatography from anchovy sauce manufactured with *B. subtilis* JM3 protease. Anchovy sauces with 2 and 4% proteases increased hydrolysis rate by 27 and 32%, respectively. Amino-nitrogen contents of anchovy sauces fermented with 2 and 4% proteases were twofold higher than that of control. Control showed five peptide peaks on Bio-Rad P2 gel permeation chromatography spectrum, whereas anchovy sauces with 2 and 4% *B. subtilis* JM3 proteases showed six and seven peaks, respectively. ACE inhibitory activity was highest in peak 6 (43.75%) of anchovy sauce with 2% protease, followed by peak 5 (34.82%) of control. DPPH radical-scavenging effect was higher than 50% in all samples. Cytotoxicity was highest in peak 3 (44.12%) of control, followed by peak 5 (42.04%) of anchovy sauce with 4% protease.

**Key words:** *B. subtilis* JM3 protease, anchovy sauce, functionality

### 서 론

식품단백질은 소화 및 가공 공정 중에 각종 효소에 의하여 가수분해 되며 소화, 흡수를 촉진하는 영양적 기능 뿐 아니라 혈압강하, 진통마취, 칼슘흡수촉진, 항알러지 및 혈청콜레스테롤레벨저하작용 등의 생리활성을 가지는 peptide를 생산한다(1). 특히 전통발효식품인 멸치액젓은 peptide, 지질 및 소금을 과량 함유하고 있고 오랫동안 숙성 및 저장이 요구되는 식품으로 항암, 항산화 및 ACE 저해활성과 같은 생리활성을 가지고 있다(2). 사람의 3대 질병은 뇌혈관, 심장 및 암질환이며, 이 중 뇌혈관 및 심장질환은 고혈압증과 밀접한 관계가 있다(3). 그러나 아직까지 고혈압의 발병원인은 정확하게 밝혀지지 않았으며, 고혈압을 치료하지 않고 오랫동안 방치하면 심근경색, 뇌출혈 그리고 심부전의 합병증을 초래할 수 있으며 심장과 혈

관의 근육이 비대해지고 동맥경화가 유발될 수 있다(4). 따라서 고혈압 자체가 심한 증상을 나타내지 않아도 혈압을 정상으로 환원시키는 것은 관상동맥질환, 뇌출증 및 신부전증 등의 발병억제에 아주 중요하다. ACE 저해제(Imidapril, Trandorapril, CS-622, Temocapril, CV-3317 등)는 현재 개발 중에 있지만, 형태는 captopril과 같은 활성체 및 prodrug type으로 화학구조가 다양한 것이 특징이다. 현재, 식품 중에서 ACE 저해효과를 나타내는 성분으로는 효소가수분해물 유래 peptide를 중심으로 주로 연구되고 있으며(5-7), ACE 저해 peptide를 분리하여 아미노산 배열을 해석하고, 이를 기초로 peptide를 화학적으로 합성하여 저해효과에 미치는 C 및 N 말단 아미노산의 영향에 대한 연구가 진행되고 있다. 항산화제란 산화를 방지하거나 자연시키는 물질을 통칭하는 것으로 그 작용기작에 따라 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유 라디칼 소거작용, 과산화물을 비라디칼로 분해하여 불활성 시키는 과산화물 분해제, 자동산화에 있어서 라디칼 저해제와 공존시 항산화 작용을 증가시키는 상승제 및 각종 활성산소제를 소거하는 singlet oxygen quencher 등으로 분류된다(8). 이러한 항산화제는 각종 식물의 추출물, 향료, 발효생산물 등에 flavonoid 또는 phenol 화합물로 대부분 존재하나 동물 및 식물성 단백질의 효소가수분해 peptide에서

\*Corresponding author: Sang Moo Kim, Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea  
 Tel: 82-33-640-2343  
 Fax: 82-33-640-2882  
 E-mail: smkim@kangnung.ac.kr

도 항산화활성이 보고되고 있다(9,10). 일반적으로 항산화제는 천연 항산화제와 합성항산화제로 구별되는데, 합성항산화제인 butylated hydroxytoluence(BHT)은 기형발생 또는 암 발생에 관여하는 것으로 보고 되어 뛰어난 항산화제효과에 비해 부작용으로 인해 문제시 되고 있는 반면, 천연항산화제는 부작용이 거의 없어 식품 첨가물 또는 약품으로 현재 널리 이용되고 있다(11). 그러나 천연항산화제 중 가장 널리 이용되는  $\alpha$ -tocopherol의 경우 비싼 가격과 지용성이라는 이용 상의 제약으로 대체 천연항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다(12). 무서운 불치병으로 알려져 있는 암의 발생은 약 75%가 공해 식품 및 그릇된 식생활이 그 주된 원인으로 식생활과 밀접한 관련이 있다(13). 암 발생 기전은 아직까지 규명되어있지 않으며, 인체에 무해한 새로운 항암제의 개발은 현대 의학에 있어 매우 중요한 당면과제라 하겠다(14). 현재 식품 유래 항암활성을 질로는 대두단백분해효소(15-17), phytic acid(18,19), isoflavone(20-23) 등이 있다.

따라서 본 연구에서는 전보(24)에서 내염성 단백분해균으로부터 분리·정제한 *B. subtilis* JM3 단백분해효소(pH 안정성: 5.0-5.5, 온도안정성: 30-60°C, trypsin계 단백분해효소)의 산업적 이용을 위하여 부분정제 단백분해 효소를 첨가하여 멸치액젓을 속성으로 제조하였다. 또한 속성 제조한 멸치액젓에는 다양한 생리활성을 가지는 peptide가 존재할 것으로 생각되며 ultrafiltration 및 gel permeation chromatography로 저분자 peptide를 분리·정제하여 생리활성(항산화, 항암 및 ACE 저해활성)을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 배양 및 *B. subtilis* JM3 단백분해효소 추출

멸치액젓에서 분리한 내염성 단백분해균인 *B. subtilis* JM3균을(24) BHI broth에 접종시켜 37°C에서 5일간 진탕배양한 후 4°C에서 원심분리(3,500×g, 15 min)하여 bacteria cell을 제거하였다. Ammonium sulfate의 농도를 증가하면서 단백분해활성이 가장 높은 농도(40-60%)에서 효소를 분리·정제한 다음, 20 mM sodium acetate 완충용액(pH 5.5) 10 mL에 용해시켜 사용하였으며, 이 효소는 pH 5.0-5.5 및 30-60°C에서 안정하였으며, 분자량은 17.1 kDa<sup>o</sup>였다.

### 멸치액젓의 제조

6개월 숙성된 멸치액젓(풍미식품, 속초시)에 효소액을 2 및 4%를 첨가하여 2시간 간격으로 시료를 채취하여 아미노질소량 및 가수분해도를 분석하였다.

### 가수분해도 측정

가수분해도는 Hoyle 등(25)에 의한 trichloroacetic acid(TCA)법으로 측정하였다. 즉, 멸치액젓 5 mL에 20% TCA 용액 15 mL를 가한 다음 원심분리(3,000×g, 15분)하여 상동액 및 멸치액젓의 총질소함량을 semi-micro Kjeldahl 법(26)으로 측정하였다.

### 아미노질소(Amino Nitrogen)

아미노질소량은 Fomol 법(27)으로 측정하였다. 즉, 멸치액젓 5 mL에 중류수 250 mL를 가하여 30분 동안 교반한 후, 교반용액 25 mL를 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.5로 조정한 다음 formaldehyde 용액(pH 8.5) 20 mL을 가하고 pH가 낮아지면 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.5까지 다시 적정하였다. 같은 조작으

로 0.1 N NaOH 용액의 공시험을 실시하여 아미노질소량을 구하였다.

### Peptide의 정제

저분자 peptide는 가수분해도가 가장 높은 2시간째의 멸치액젓에서 분리·정제하였다. 즉, 액젓을 sulfosalic acid로 제단백하여, 4°C에서 Amicon의 PM10(MWCO 3,000) membrane filter을 사용하여 생리활성이 높을 것으로 생각되는 저분자 peptide를 분리하였다. 한외여과 한 여과액을 40°C에서 감압농축한 후, Bio-gel P-2를 충진한 column(2.6×70.0 cm)을 사용하여 0.5 mL/min의 유속으로 용출 시켰다. 이때 용출액을 5 mL씩 받아 214 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Peptide-nitrogen 측정

Peptide-nitrogen 함량의 측정은 Umemoto의 개량 biuret 법(28)으로 측정하였다. 즉, 시료를 두개의 시험관에 각각 0.5 mL씩 취하고 중류수 4.5 mL씩 가한 다음, 한 시험관에는 biuret 시약 I(0.4% CuSO<sub>4</sub>, 8% NaOH, 0.2% glycerin)을 5 mL 첨가하여 A 반응구로, 다른 시험관에는 biuret 시약 II(8% NaOH, 0.2% glycerin)을 5 mL 첨가하여 B 반응구로 하였다. Blank는 시료용액 대신 중류수 5 mL를 사용하였으며, 실온에서 2시간 반응시킨 후 545 nm에서 흡광도를 측정하여 peptide-nitrogen 함량을 구하였다.

$$\text{peptide-nitrogen 함량}(\text{mg/mL}) =$$

$$(A \text{ 반응구의 흡광도} - B \text{ 반응구의 흡광도}) \times 0.94$$

$$A \text{ 반응구의 흡광도} = A \text{ 반응구의 흡광도} - A \text{ 반응구의 Blank}$$

$$B \text{ 반응구의 흡광도} = B \text{ 반응구의 흡광도} - B \text{ 반응구의 Blank}$$

### ACE 저해능 측정

ACE 활성은 Chsuman과 Cheung(29)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, angiotensin-I 전환효소는 토끼의 혀파에서 아세톤 분말로 정제한 시료 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 상동액을 ACE 조효소액으로 사용하였다. 시료 100  $\mu$ L에 ACE 조효소액 20  $\mu$ L 및 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 200  $\mu$ L를 가한 다음 37°C에서 5분간 pre-incubation 하였다. 여기에 기질로써 0.5 mM His-His-Leu(2.14 mg/mL) 200  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 250  $\mu$ L를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 2 mL를 가하여 15초간 교반한 다음 원심분리(1,350×g, 5 min)하여, 상동액 1 mL를 취하였다. 이 상동액을 완전히 건조시킨 뒤 1 M NaCl 3 mL를 가하여 용해한 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해 활성을 구하였다.

### 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거작용

각 시료의 DPPH radical에 대한 소거효과 측정은 Blois 방법(30)을 사용하였다. Methanol로 농도를 조정한 시료 4 mL를 취하고, 0.15 mM DPPH 1 mL와 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여, DPPH radical 소거활성을 구하였다.

### 함암활성

실험에 사용한 세포주는 성장 속도가 빠르고 비교적 항암제 감수성이 예민한 위암세포주 SNU-1(서울대학교, 서울)을 사용

하였다. SNU-1은 55°C에서 30분간 열처리한 fetal bovine serum (FBS)을 10% 첨가한 RPMI-1640(Life Technologies Inc., USA) 배지에 1% penicillin-streptomycin(Life technologies Inc., USA)과 20 mM HEPES buffer를 첨가하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72 hr 동안 배양하였다. SNU-1에 대한 시료의 세포 독성을 측정하기 위하여 Carmichael 등(31)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. SNU-1을 96 well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/well 이 되게 180 μL씩 주입한 다음, 일정농도(10 μg/mL)로 조정한 시료를 well plate에 20 μL 첨가한 다음 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72 hr 동안 배양하였다(대조구는 중류수를 사용). 72 hr 배양 후 인산생리식염수에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT(Aldrich Chem. Co., USA) 용액을 한 well 당 20 μL씩 넣은 후 각 well 당 DMSO(Dimethylsulfoxide) 150 μL를 가하여 ELISA reader (Molecular Device Co. USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 항암활성을 구하였다.

## 결과 및 고찰

### 가수분해도의 변화

*B. subtilis* JM3 단백분해효소를 첨가한 멸치액젓의 가수분해도는 Fig. 1에 나타내었으며, 2 및 4%의 효소첨가구의 가수분해도는 가수분해 0 시간째에 19.17%에서 가수분해 2 시간째에 각각 27 및 32%으로 증가하였다가, 그 후 숙성기간동안에 약간 증가하였다. Kim 등(32)은 자가 소화액 및 정어리 기질 코오지를 이용한 속성 정어리액젓 제조에 관한 연구에서 숙성 15 일째 *Aspergillus oryzae* 간장용 코오지를 첨가한 정어리액젓의 가수분해도는 40.6%이었으며, *A. sojae* 간장용 코오지를 첨가한 것은 36.8%를 나타내었으며, 본 실험에서 4% *B. subtilis* JM3 단백분해효소를 첨가한 멸치액젓의 가수분해도는 32%로 유사한 경향을 나타내었다. 최적 가수분해 시간인 2시간째에 총질소에 대한 아미노질소량이 차지하는 비율은 2 및 4% 효소첨가구에서 각각 82.9 및 85.8%으로 나타났다. *B. subtilis* JM3 단백분해효소 2 및 4% 첨가구의 가수분해도는 각각  $y = 0.1784x^3 - 2.7601x^2 + 13.357x + 8.9419 (R^2 = 0.9569)$  및  $y = 0.0417x^3 - 0.6482x^2 + 3.0781x + 16.98 (R^2 = 0.8144)$  이었으며, 상관계수( $R^2$ )는 각각 0.9569 및 0.8144로 높은 상관관계를 나타내었다. 수식 중의 y 값은 아미노태질소량, x 값은 가수분해시간이다. 2 및 4%의 *B. subtilis* JM3 단백분해효소 첨가에 의한 가수분해

도의 증가는 저분자 질소화합물인 아미노질소(762 및 798 mg/100 mL)의 함량을 증가시켰으며, *B. subtilis* JM3 단백분해효소의 농도가 증가할수록 높은 가수분해도를 나타내었다.

### 아미노질소량의 변화

*B. subtilis* JM3 단백분해효소를 첨가한 멸치액젓의 아미노질소량의 변화는 Fig. 2에 나타내었으며, 2 및 4% 효소첨가구의 아미노질소량은 가수분해 0시간째에 661 mg/100 mL, 숙성 2시간째에 각각 762 및 798 mg/100 mL로 증가하였고, 그 후에는 일정수준을 유지하였다. 액젓은 천연조미가 주된 역할이고 그 맛의 결정 요인은 여러 가지가 있으나, 핵산 관련물질 및 아미노질소화합물에 의한 것이라고 할 수 있다(33). 핵산관련물질 중 맛의 주성분인 IMP는 숙성된 액젓에는 극히 미량뿐이므로, 숙성 중에 함량이 증가하는 저분자 질소화합물인 아미노질소량이 액젓의 조미에 결정적인 영향을 미치게 되며(33), Kim 등(34)은 시판 멸치액젓의 품질평가 방법에 관한 연구에서 시판 액젓의 경우 아미노질소의 함량은 437.5-1,288.0 mg/100 g로 다양하게 측정 되었다고 보고하고 있으며, 식품공전(35)에서 아미노질소함량은 600 mg/100 g 이상으로 규정하고 있다. 본 실험에서 사용한 멸치액젓은 6개월간 숙성시킨 제품으로 높은 아미노질소량을 나타내었으며, 또한 *B. subtilis* JM3 단백분해효소의 첨가는 아미노질소량을 크게 증가시켰다.

### 저분자 Peptide의 gel chromatography 특성

*B. subtilis* JM3 단백분해효소 2 및 4%를 첨가한 멸치액젓의 가수분해도는 2시간째에 가장 높았으며, 이때의 gelchromatography 결과를 Fig. 3-5에 나타내었다. 대조구는 5개(peak 1: 195-280 mL, peak 2: 430-465 mL, peak 3: 560-600 mL, peak 4: 675-725 mL, peak 5: 810-870 mL), 2% *B. subtilis* JM3 단백분해효소첨가구는 6개(peak 1: 215-250 mL, peak 2: 430-490 mL, peak 3: 545-570 mL, peak 4: 580-625 mL, peak 5: 675-745 mL, peak 6: 840-890 mL), 4% *B. subtilis* JM3 단백분해효소첨가구는 7개(peak 1: 185-265 mL, peak 2: 410-450 mL, peak 3: 475-520 mL, peak 4: 530-560 mL, peak 5: 565-595 mL, peak 6: 620-676 mL, peak 7: 750-825 mL)의 peak가 나타났으며, 이러한 결과는 효소 첨가에 의해 고분자 peptide가 분해되어 저분자의 peptide를 많이 생성한 것으로 보인다. 특히 대조구의 peak 2 및 3의 peptide가 *B. subtilis* JM3 단백분해효소에

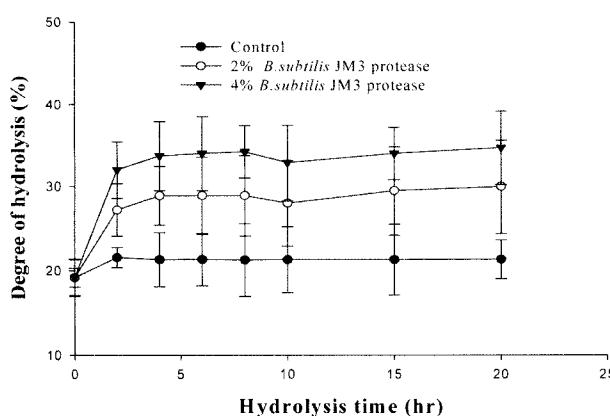


Fig. 1. Changes in hydrolysis degree of anchovy sauce by *B. subtilis* JM3 protease at room temperature and different hydrolysis times.

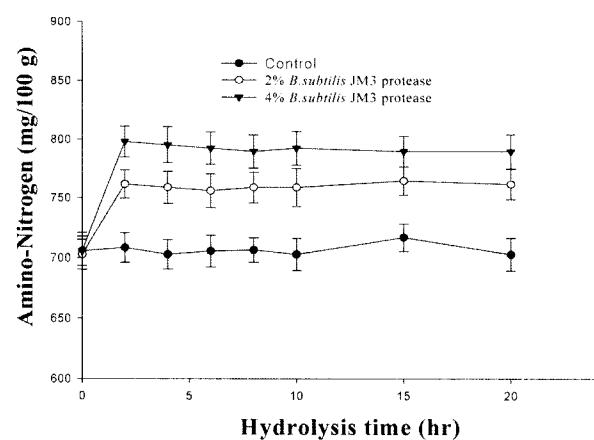


Fig. 2. Amino-nitrogen content changes of anchovy sauce hydrolyzed by *B. subtilis* JM3 protease at room temperature and different hydrolysis times.

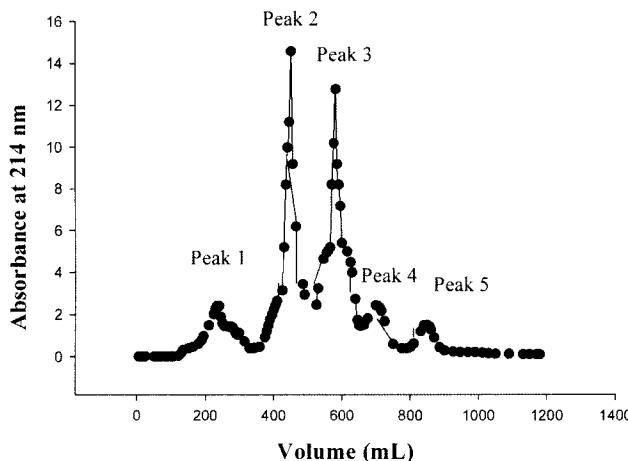


Fig. 3. Bio-Rad P2 gel permeation chromatography pattern of low molecular weight peptides purified from anchovy sauce fermented at 15°C for 6 months.

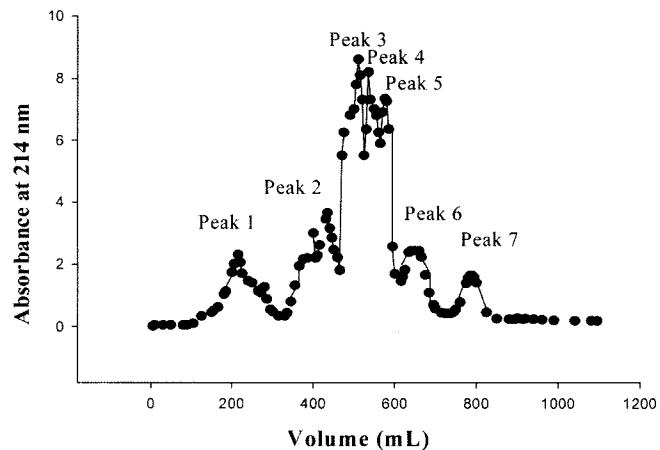


Fig. 5. Bio-Rad P2 gel permeation chromatography pattern of low molecular weight peptides purified from 6 month fermented anchovy sauce hydrolyzed with 4% *B. subtilis* JM3 protease at room temperature for 2 hrs.

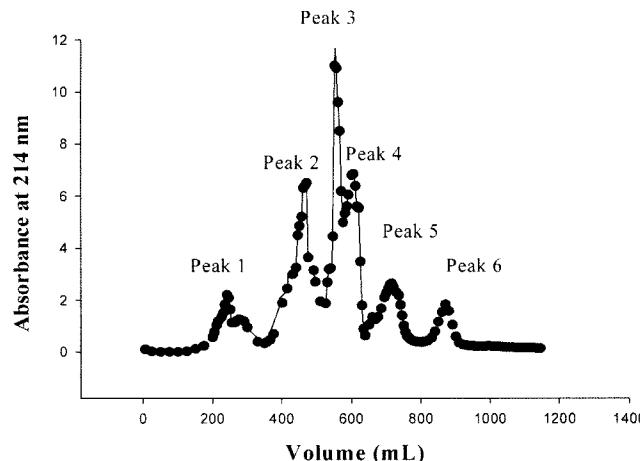


Fig. 4. Bio-Rad P2 gel permeation chromatography pattern of low molecular weight peptides purified from 6 month fermented anchovy sauce hydrolyzed with 2% *B. subtilis* JM3 protease at room temperature for 2 hrs.

의해서 분해되어 2% 효소 첨가구는 3개로, 4% 효소 첨가구는 4개로 분리되었던 것으로 추정되어진다.

#### ACE 저해활성

*B. subtilis* JM3 단백분해효소 첨가에 의해 생성된 멸치육젓 유래 peptide의 ACE 저해활성을 Table 1에 나타내었다. ACE 저해활성은 대조구의 경우 peak 5(34.82%), 2% 효소 첨가구는 peak 6(43.75%), 4% 효소 첨가구는 peak 7(26.34%)에서 높았으며, Yeum 등(36)은 ACE 저해 작용에는 단백질의 함량보다는 그 종의 peptide의 종류에 따른 영향이 크다고 보고 하였으며, Lee 등(37)도 해조류의 ACE 억제효과 연구에서 미역의 경우 가수분해시간이 길어지면서 peptide-nitrogen량은 증가하였으나 ACE 효과는 감소하였다고 하였다. 또한 ACE 저해활성에 차이가 나는 것은 가수분해에 의하여 생성된 peptide의 사슬 길이나 구조 및 그 아미노산의 배열이 다르기 때문으로 보여 진다(36). Yeum 등(36)은 효소에 의한 고등어 근육 단백질 가수분해물의 ACE 저해작용에 관한 연구에서 단백질 가수분해물의  $IC_{50}$ 은 95  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이었다고 하였으며, Kim 등(38)은 멸치육젓 단백질 가수분해물의  $IC_{50}$ 은 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이었다고 하였다. 본 실

험에서 대조구의 peak 5(34.82%), 2% 효소첨가구의 peak 6(43.75%) 및 4% 효소첨가구의 peak 7(26.34%)에 있어서 ACE 저해활성이 높았으며, 이 분획물의 구조 및 sequence 규명 등 보충연구가 필요하다고 생각된다.

#### DPPH radical 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성은 대조구, 2 및 4% 효소 첨가구의 peak 5, 6 및 7에서 94.11, 90.91 및 97.00%로 높았다(Table 1). Kim 등(39)은 대구의 고니 단백질을 각 효소별로 가수분해 시킨 가수분해물의 항산화활성은 가수분해도와 항산화 활성과는 상관관계가 없다고 하였으며, 이러한 결과는 기질의 차이 뿐만 아니라 각 효소가 기질에 작용하는 절단 부위가 다르기 때문에 N 말단 및 C말단에 위치하는 아미노산의 종류가 달라지므로 항산화활성이 다르게 나타난다고 보고하였다. Yee 등(40)은 대두단백질을 pepsin으로 가수분해시킨 가수분해물의 항산화 활성을 측정한 결과, 대조구에 비해 약 80% 정도 항산화 활성이 높았다고 하였으며, Yamaguchi(41)는 대두단백질을 효소로 가수분해시킨 가수분해물 중에서 분자량 2.5-3.0 kDa 사이의 peptide가 항산화활성이 가장 뛰어났다고 보고 하였다. Krogull 등(42)은 질소 화합물인 단백질, peptide 및 아미노산은 자체적으로 산화가 일어나며, pH, 온도, 수분활성 및 산화촉매 제나 저해제의 존재 여부에 따라 항산화활성의 차이가 있다고 보고하고 있다. Park 등(43)은 *Sympycycladia latiuscula* 추출물에 대한 항산화 활성에 대한 연구에서 추출물의  $IC_{50}$ 은 3.14-15.44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이었으며, 특히 천연항산화제(L-ascorbic acid 및  $\alpha$ -tocopherol) 및 합성항산화제(BHA 및 BHT)의  $IC_{50}$ 은 각각 1.22 및 1.28, 1.06 및 3.21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이었다고 하였다. 본 연구에서도 대조구는 peak 5( $IC_{50}$ : 5.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 2% 단백분해효소 첨가구는 peak 6( $IC_{50}$ : 5.29  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 4% 효소첨가구는 peak 7( $IC_{50}$ : 5.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서 높은 항산화활성을 나타내었으나, 상업용 항산화제에 비해서는 약 5배 정도 낮은 활성을 나타내었다. Kim 등(44)은 가자미 젤라틴을 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 보고하였으며, Yamaguchi 등(45)은 대두단백질, 우유카제인, 난백알부민 및 젤라틴 가수분해물에 대한 항산화력은 Vitamin B<sub>12</sub>(MW 1,350 Da) 보다 약간 큰 분자

**Table 1. Functionalities of low molecular weight peptides purified from 6 month fermented anchovy sauce hydrolyzed with *B. subtilis* JM3 protease at room temperature for 2 hrs**

Sample	Peptide	Peptide-nitrogen (mg/mL)	Specific ACE inhibition (%) <sup>1)</sup>	Specific reduction of DPPH (%)	Specific Cytotoxicity (%)
Control	peak 1	0.22	0.13	2.65	0.88
	peak 2	0.10	2.46	3.94	1.71
	peak 3	0.14	1.49	6.49	1.55
	peak 4	0.02	11.61	46.75	7.62
	peak 5	0.01	34.32	94.11	38.29
2% <i>B. subtilis</i> JM3 protease	peak 1	0.26	0.41	2.47	1.76
	peak 2	0.10	4.11	9.30	4.92
	peak 3	0.16	2.37	5.71	0.76
	peak 4	0.17	1.50	5.06	2.61
	peak 5	0.04	9.60	22.11	14.49
	peak 6	0.01	43.75	90.91	15.61
4% <i>B. subtilis</i> JM3 protease	peak 1	0.33	0.58	2.51	0.83
	peak 2	0.17	1.16	5.69	2.77
	peak 3	0.19	1.32	5.46	1.98
	peak 4	0.22	0.35	4.71	1.36
	peak 5	0.15	1.96	6.38	3.60
	peak 6	0.18	1.29	5.29	2.76
	peak 7	0.01	26.34	97.00	34.76

<sup>1)</sup> Specific ACE inhibition, reduction of DPPH and cytotoxicity is activity of 10 µg peptide.

량을 가진 획분에서 가장 높았다고 하였다. 본 실험에서 항산화활성 peptide의 분자량은 1,000 Da 내외로 생각되며, 분자량 및 아미노산 조성 등 구조분석에 대한 보충연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 항암활성

대조구의 경우 peak 5(38.29%), 2% 효소 첨가구는 peak 6 (15.61%), 4% 첨가구는 peak 7(34.76%)에서 항암활성이 높았으며(Table 1), Chung 등(46)은 대두발효식품의 암세포주에 대한 세포 독성 조사 실험에서 된장 메탄을 추출물 및 청국장 메탄을 추출물은 사람의 암세포 SNU-1에 대해서 성장 억제 효과를 나타내었다고 하였으며, 이때의 IC<sub>50</sub>은 각각 13.38 및 0.756 mg/mL이었다. Yang 등(47)은 전통 약용식물 및 각종 식물의 항암 효과에 대한 연구에서 약용식물의 추출물은 10-100 µg/mL 사이에서 SNU-1에 대한 항암활성을 나타내었다고 보고하였으며, 본 실험에서 대조구의 peak 5(38.29%) 및 4% 효소첨가구 peak 7(34.76%)의 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

### 요약

본 연구는 *B. subtilis* JM3 단백분해효소 첨가 멸치액젓에서 분리한 peptide의 기능성(항산화, 항암 및 ACE 저해활성)에 대하여 분석하였으며, 그 결과는 다음과 같다. 아미노질소 및 가수분해도는 단백분해효소 첨가구가 대조구에 비해 높았으며, 대조구, *B. subtilis* JM3 단백분해효소 2 및 4% 첨가구의 멸치액젓은 gel chromatography 상에서, 각각 5, 6 및 7개의 peak를 나타내었다. ACE 저해, DPPH 라디칼소거 및 항암활성을 대조구의 경우 peak 5에서 각각 34.82, 94.11 및 38.29%, 2% 효소첨가구는 peak 6에서 각각 43.75, 90.01 및 15.61%로 4% 효소첨가구는 peak 7에서 각각 26.34, 97.00 및 34.76%이었다. 가수분해시 생성된 peptide는 다양한 생리활성을 가지고 있었으며,

앞으로 생리활성을 갖는 peptide의 구조 분석에 관한 연구 및 그 억제 기작에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 본다.

### 감사의 글

본 연구는 2002년도 해양수산부 수산특정과제(과제번호 20020129) 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

### 문헌

- Yoshikawa MF, Tani F, Ashikaga T, Yoshimura T, Chiba H. Purification and characterization of an opioid antagonist from a peptic digest of bovine k-casein. Agric. Biol. Chem. 50: 2951-2984 (1986)
- Park JH, Kim SM. Biofunctionality of peptides purified from naturally fermented anchovy sauce. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 1120-1125 (2003)
- Seki E, Osajima K, Matsui T, Osajima Y. 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 (1993)
- Jeong SH. Angiotensin converting enzyme and its inhibitors. Medicine Information. 9: 152-158 (1994)
- Maruyama S, Suzuki H, Tomizuka N. Effects of zinc ion on inhibition by angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from and enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. Agric. Biol. Chem. 1915: 1405-1409 (1985)
- Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka Maruyama, S. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α-zein hydrolysate. Agric. Biol. Chem. 55: 1313-1318 (1991)
- Satio Y, Wanezaki K, Kawato A, Imayasu S. Antihypertensive effects of peptide in sake and its by products on spontaneously hypertensive rats. Biosci. Biotech. Biochem. 58: 812-816 (1994)
- Ahmael S. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology.

- Chapman and Hall. New York. pp. 25-42 (1995)
9. Yamaguchi N, Yokoo Y, Fujimaki M. Antioxidative activities of protein hydrolysates. *Nippon Shokuhin Kogyo Giakkaishi*. 26: 65-70 (1979)
  10. Suetsuna K, Osajima K. Blood pressure reduction and vasodilatory effects in vivo of peptides originating from Sardine muscle, *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*. 42: 47-54 (1989)
  11. Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Food Sci.* 37: 873-875 (1975)
  12. Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Ingold KU. The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free Radic. Biol. Med.* 2: 419-44 (1986)
  13. Doll K, Pet R. The causes of cancer, quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States. *J. Nat. Cancer Inst.* 66: 1192-1308 (1981)
  14. Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Korean Fish. Sci.* 23: 345-352 (1990)
  15. Kennedy AR, Little JB. Effects of protease inhibitors on radiation transformation in vitro. *Cancer Res.* 41: 2103-2109 (1981)
  16. Yavelow J, Finlay TH, Kennedy AR, Troll W. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res.* 43: 2454-2459 (1983)
  17. Elair WH, Billings PC, Carew JA, McGandy CK, New Berne P, Kennedy AR. Suppression of dimethylhydrazine induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res.* 50: 580-587 (1990)
  18. Shamsuddin AM, Ullah A, Chakravarthy AK. Inositol and inositol hexaphosphate suppress cell proliferation and tumor formation in CD-1 mice. *Carcinogenesis* 10: 1461-1469 (1989)
  19. Shamsudolion AM, Elsaife AM, Ullah A. Suppression of large intestinal cancer in F344 rats by inositol hexaphosphate. *Carcinogenesis* 9: 577-584 (1988)
  20. Coward L, Barnes NC, Stechell KDR, Barnes S. Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates, antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1961-1966 (1995)
  21. Okura A, Rakawa H, Oka H, Yoshinari T, Monden T. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val12] Ha-ras-transformed NIH 3T3cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 157: 183-189 (1988)
  22. Peterson G, Barnes S. Genistein inhibition of the human breast cancer: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179: 661-669 (1991)
  23. Tiisala S, Majuri ML, Carpen O, Renkonen R. 1994. Genistein enhances the ICAM-1 and its counter receptors. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 203: 443-448 (1994)
  24. Lee SS, Kim SM, Park UY, Kim HY, Shin IS. Studies on proteolytic and fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* JM3 isolated from anchovy sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 283-289 (2002)
  25. Hoyle NT, Meirrett JH. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harergus*). *J. Food Sci.* 59: 76-79 (1994)
  26. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA (1990)
  27. Lee KY, Kim HS., Lee HG, Han O, Chang UJ. Studies on the prediction of the shelf-life of kochujang through the physico-chemical and sensory analyses during storage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 588-594 (1997)
  28. Umemoto S. A modification method for estimation of muscle protein by biuret method. *Bull. Japanese Soc. Fish* 32: 427-435 (1996)
  29. Cheung HS, Chaman DW. Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20: 1637-1647 (1971)
  30. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1119-1200 (1958)
  31. Charmichael J, Degraff EG, Gazda AF, Minna JD, Michell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-943 (1987)
  32. Chung CH, Toyomizu M. Studies on the browning of dehydrated food as a function of water activity: 1. Effect of Aw on browning in amino acid-lipid systems. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 42: 697-70 (1976)
  33. Choi YJ, Kim IS, Cho YJ, Seo DH, Lee TG, Park YB, Park JW. Peptide properties of rapid salted and fermented anchovy sauce using various protease. *J. Korean Fish. Soc.* 32: 488-494 (1999)
  34. Lee DS, Heu MS, Kim DS, Pyeon JH. Some properties of the crude protease from fish for application in seafood fermentation industry. *J. Korean Fish. Soc.* 29: 309-319 (1996)
  35. Korea Food and Drug Administration. *Food Code*. Seoul, Korea pp. 128-136 (2000)
  36. Yeum DM, Lee TG, Byum HS, Kim SB, Park TH. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Bull. Korean Fish. Soc.* 25: 229-235 (1992)
  37. Lee HO, Yoon HD, Jang YS, Suh SB, Ko YS. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. *J. Korean Fish. Soc.* 32: 738-746 (1999)
  38. Kim SB, Lee TG, Park TB, Yeun DM., Kim OK, Do JK, 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 (1994)
  39. Kim SK, Choi YR, Park PJ. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of cod teiset protein. *J. Korean Fish. Soc.* 33: 198-204 (2000)
  40. Yee JJ, Shippe WF, Kinsella JE. Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper-catalyzed methyl linoleate oxidation. *J. Food Sci.* 45: 1082-1083 (1980)
  41. Yamaguchi NS, Naito S, Yokoo Y, Fujimaki M. Application of protein hydrolysate to biscuit as antioxidant. *J. Japanese Soc. Food Sci. Technol.* 27: 56-59 (1980)
  42. Krogull MK, Fennema O. Oxidation of tryptophan in the presence of oxidizing methyllinoleate. *J. Agric. Food Chem.* 35: 66-70 (1981)
  43. Park HJ, Choi JS, Chung HY. The antioxidant activity in extracts of *Symplocladia latiuscula*. *J. Korean Fish. Soc.* 31: 927-932 (1998)
  44. Kim SK, Lee HC, Byun HG, Jeon YJ. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J. Korean Fish. Soc.* 29: 246-255 (1999)
  45. Yamaguchi NS, Naito S, Yokoo Y, Fujimaki M. Application of protein hydrolysate to biscuit as antioxidant. *J. Japanese Soc. Food Sci. Technol.* 27: 56-59 (1980)
  46. Chung KS, Yoon KD, Kwon DJ, Hong SS, Choi SY. Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumour cells using MTT assay. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 477-482 (1997)
  47. Yang YM, Hyun JW, Lim KH, Sung MS, Kang SS, Paik WH, Bae KW, Cho H, Kim HJ, Woo ER, Park HK, Park JG. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants (III). *Korean J. Pharmacogn.* 27: 105-110 (1996)