

2단 가수분해에 의한 굴 가수분해물의 기능성 개선

정인권 · 김진수 · 허민수*
경상대학교 해양생명과학부/해양산업연구소

Improving the Functional Properties of Oyster Hydrolysates by Two-step Enzymatic Hydrolysis

In-Kwon CHUNG, Jin-Soo KIM and Min Soo HEU*
Division of Marine Life Science, Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,
Tongyeong 650-160, Korea

This study prepared functional oyster hydrolysates using two-step enzymatic hydrolysis and investigated their functional properties. To prepare two-step enzymatic hydrolysates (TSEH), oysters were hydrolyzed using 1% Protamex (PR) at 40°C and pH 6.0 for 1 hr before sequential treatment with one of the following enzymes for 1 hr: Alcalase (AL), Flavourzyme (FL), Neutrase (NE), pepsin (PE), and trypsin (TR). The PRAL, PRNE and PRTR hydrolysates had significantly greater angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity than did PR and the other TSEHs. Only the antioxidant activity of the PRNE hydrolysate was significantly different ($p < 0.05$), while none of the TSEHs had antimicrobial activity. The oyster hydrolysate prepared by sequential treatment with Protamex and Neutrase (PRNE) had the best ACE inhibitory activity and antioxidant activity, with IC_{50} values of 0.40 and 0.94 mg/mL, respectively. The PRNE hydrolysate was processed through an ultrafiltration (UF) series with molecular weight cut-off (MWCO) membranes of 3, 5, 10, and 30 kDa, and the ACE inhibitory, antioxidant, and antimicrobial activities of the permeates were determined. The permeate through the 3-kDa MWCO membrane had greater ACE inhibitory activity and antioxidant activity than did the other PRNE permeates, with IC_{50} values of 0.11 and 0.40 mg/mL, respectively.

Key words: Oyster hydrolysates, Oyster, Two-step enzymatic hydrolysis, ACE inhibitory activity, Antioxidant activity, Antimicrobial activity

서 론

굴은 타우린, 글리코젠, 셀레늄 및 아연 등과 같은 건강 기능에 아주 우수한 식품 재자원이다(Kim et al., 1981; NFRDA, 1995). 이로 인해 우리나라에서는 10월부터 3월까지의 가공하지 않은 생굴의 형태로 고가에 주로 유통되나, 이후 산란기에 해당하는 4월부터 7월 사이에는 동결 굴, 건조 굴 및 통조림용 자숙 굴 등의 형태로 제조되어 국외로 수출되고 있다(Kim et al., 2002). 이와 같은 굴의 소비 형태는 지난 1980년 이후 안정적이어서 거제, 통영, 남해, 고성, 여수, 고흥 등과 같은 청정해역에 해당하는 남해안 일대에서 굴을 대량 생산할 목적으로 여러 가지 양식기술을 검토를 통해 수하식 양식 기술의 개발로 조밀하게 양식장이 자리 잡게 되었다.

현재 우리나라 굴 소비 시장의 형태는 공장규모 김치의 대량 생산, 조리 방법 및 고차 가공품으로의 개발 부진에 따른 수요 감소 등과 같은 국내적 요인과 대일 수출 굴에서 패독과 이질균의 검출로 인한 일본 정부의 부정적인 시각 및 자국 굴의 보호를 위한 여러 가지 정책과 미국 FDA 권고 사항 미 이행에 따른 수출의 중단 등과 같은 대외적인 요인에 의해

극히 부진한 상태이며, 그에 따른 양식 굴의 잉여 생산량은 더욱 증가할 것으로 판단된다. 또한, 중국에서는 굴을 냉동품, 건조품 및 통조림 등과 같은 제품을 생산하여 저렴한 가격으로 우리의 수출시장을 위협하고 있다. 이러한 일면에서 볼 때, 소비자 기호에 맞는 새로운 굴 가공품의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 특히 중국 등과 건주어 시장성이 있는 건강 기능성이 있는 신제품의 개발이 절실히 요구되고 있다.

그러나 굴에 관한 국내외 연구들의 대부분은 굴의 성분특성에 관한 결과가 주류를 이루었고(Jeong et al., 1998; Yoon et al., 1986; Hosoi et al., 2003; Li et al., 2000; Soudant and Chu, 2001), 일부 개발을 시도한 가공품의 경우도 단지 저차 가공인 천연 조미료 등의 개발에 불과하여 양식산 굴의 소비에 획기적으로 기여하지 못하고 있는 실정이다(Cook et al., 1988; Shiao and Chai, 1990; Kim and Heu, 2001).

본 연구에서는 양식기술의 발달에 의해 청정해역인 남해안 일대에서 다량 생산되면서 영양성분이 우수한 굴의 소비 촉진과 더불어 중국과 경쟁력이 있는 제품의 개발을 위하여 2단 효소 가수분해 및 한외여과 처리에 의해 건강 기능성 굴 가수분해물의 제조를 시도하였고, 이를 이용한 굴 가수분해물의 건강 기능 특성에 대하여 살펴보았다.

*Corresponding author: minsheu@gsnu.ac.kr

재료 및 방법

재 료

실험에 사용한 굴은 양식산 참굴(*Crassostrea gigas*, 각장 4.6 ± 2.3 cm, 각중 9.9 ± 3.2 g)로, 경남 통영 인근 양식장에서 생굴 시판을 목적으로 채취한 것을 빙장 상태에서 30분 이내에 실험실로 옮긴 다음 지퍼 팩에 일정량씩 포장한 후 냉동고(-25°C)에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

효소 및 균주

굴 가수분해물의 제조를 위하여 사용한 상업적 효소들 중에서 Alcalase 2.4 L (이하 Alcalase로 명명), Flavourzyme 500 MG (이하 Flavourzyme으로 명명), Neutrase 0.8 L (이하 Neutrase로 명명), Protamex 1.5 MG (이하 Protamex로 명명)는 Novozymes 사(Novonordisk Bioindustrials, Inc., Denmark)에서, Pepsin 570 unit/mg solid (이하 pepsin으로 명명) 및 Trypsin 12,800 unit/mg solid (이하 trypsin으로 명명)는 Sigma사(Sigma Chemical Co., USA)에서 각각 구입하여 사용하였다.

굴 효소 가수분해물의 항균성 측정을 위한 균주는 gram positive 3균주(*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*)와 gram negative 3균주(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 및 *Vibrio parahaemolyticus*)를 2004년 8월에 한국미생물보존센터로부터 각각 분양받아 사용하였다.

2단 굴 가수분해물 및 한외여과물의 제조 및 수율

1단 굴 가수분해물의 제조를 위하여 굴을 해동한 다음 동량의 증류수를 가하고 균질화 하였다. 여기에 굴의 단백질 함량에 대하여 1%의 Protamex를 첨가한 후 제조회사에서 제시한 최적 온도(40°C)와 pH (6.0-7.0)로 조정된 다음 진탕항온조(Orbital shaker, Forma Scientific, USA)에서 1시간동안 반응시켰다. 효소의 반응정지는 끓는 물(100°C)에서 10분간 증탕하여 효소를 실활시키고, 이를 원심분리($3,000 \times g$, 20 min) 및 여과하여 제조하였다. 이어서 1단 굴 가수분해물에 Protamex를 제외한 5종의 효소(최종 농도 1%)를 첨가하여 제조회사에서 제시한 최적 온도 및 pH (Alcalase, 55°C 및 pH 7.0; Flavourzyme, 50°C 및 pH 7.0; Neutrase, 50°C 및 pH 6.0; pepsin, 37°C 및 pH 3.0; trypsin, 37°C 및 pH 8.0)로 조정된 다음 진탕항온조(Orbital shaker, Forma Scientific, USA)에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어서 끓는 물(100°C)에서 10분간 증탕하여 효소를 실활시키고, 방냉, 원심분리($3,000 \times g$, 20 min) 및 여과하여 2단 굴 가수분해물을 제조하였다. 또한, 2단 굴 가수분해물로부터 한외여과물의 제조는 2단 굴 가수분해물을 에탄올로 제단백한 후, 30, 10, 5, 3 kDa의 분리력을 가진 membrane이 장착된 한외여과장치(8200, Amicon, USA)로 분획하여 제조하였다. 이와 같은 방법으로 얻어진 2단 굴 가수분해물 및 한외여과물은 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

가수분해도는 2단 굴 가수분해물에 대하여 동량의 20%

(w/v) trichloroacetic acid (TCA)를 넣고, 혼합하여 제단백한 다음 원심분리($3,000 \times g$, 20 min)한 상층액을 시료로 하여 semimicro Kjeldahl법으로 질소함량을 정량하였다. 가수분해도의 계산은 2단 가수분해물의 총질소량에 대하여 10% TCA 가용성 질소의 상대비율(%)로 나타내었다.

한편, 한외여과물의 수율은 에탄올로 제단백한 2단 굴 가수분해물 200 mL를 3, 5, 10, 30 kDa의 membrane으로 pore size의 크기가 작은 순서로부터 순차적으로 40 mL씩 분획한 후, 에탄올로 제단백한 2단 굴 가수분해물의 총질소 함량에 대한 한외여과막을 통과한 분획여과물의 질소 함량의 상대비율(%)로 하였다.

일반성분, pH 및 휘발성 염기질소

일반성분은 AOAC법(1995)에 따라 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 Semimicro Kjeldahl법으로 질소를 정량한 후 질소계수(6.25)를 이용하여 계산하였고, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 건식회화법으로 측정하였다. pH는 시료에 10배량의 탈이온수를 가한 다음 pH meter (691, Metrohm, Swiss)로 측정하였고, 휘발성 염기질소 함량은 Conway unit를 사용하는 미량화산법(Ministry of Social Welfare of Japan, 1960)으로 측정하였다.

Angiotensin I converting enzyme (ACE)의 저해능, 항균성 및 항산화능

ACE 저해능은 Horiuchi et al. (1982)의 방법에 따라 $15 \mu\text{L}$ 의 가수분해물과 $50 \mu\text{L}$ 의 Angiotensin I converting enzyme (60 mU/mL)을 전단계 반응(37°C , 5분) 시킨 후, $125 \mu\text{L}$ 의 5 mM hippuryl-histidyl-leucine을 함유하는 붕산완충액(pH 8.0, 400 mM NaCl 함유)을 가하여 37°C 에서 30분간 반응시키고, 10% trifluoroacetic acid (TFA) $20 \mu\text{L}$ 를 가하여 반응 정지 시켰다. 이렇게 전처리한 시료 $20 \mu\text{L}$ 를 Zorbax 300SB C_8 column (i.d. 4.6×150 mm, Hewlett Packard Co., USA)이 장착된 역상 HPLC (LC-10AVP, Shimadzu Co., Japan)에 주입하여 분석하였다. ACE 저해능은 ACE의 활성을 50% 저해하는데 요구되는 저해제의 양인 IC_{50} (mg/mL)으로 나타내었다.

항균성 실험은 gram positive 3균주(*B. cereus*, *L. monocytogenes* 및 *S. aureus*)와 gram negative 3균주(*E. coli*, *S. typhimurium* 및 *V. parahaemolyticus*)에 대하여 tryptic soy agar를 사용한 평판배지에서 paper disc법(Davison and Parish, 1989)으로 측정하였다. 항균활성은 disc주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)으로 나타내었다.

항산화능은 ferric thiocyanate법(Mitsuda et al., 1996)에 따라 spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu Co., Japan)로 흡광도(500 nm)를 측정하여 다음 식으로부터 계산하였다.

Anti-oxidative activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

분자량 패턴

분자량 측정을 위하여 시료를 여과(microfilter, pore size 0.45 μm)한 다음 이를 0.1 M NaCl을 함유하는 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 평형화 시킨 Sephadex G-50칼럼 (i.d. 1.6×100 cm)에 주입한 다음, 동일 완충액으로 용출(0.75 mL/min)하면서 일정량(5 mL)씩 분취하였다. 이 때 용출되는 단백질은 280 nm에서 흡광도로 검출하였다. 가수분해물의 획분별 분자량분포는 표준 단백질(aprotinin, 6.5 kDa; cytochrome, 12.4 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa)을 사용하여 작성한 검량곡선에 따라 측정하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 데이터의 표준편차 및 유의성 검정(5% 유의수준)은 SPSS 통계 패키지(Systat version 7.5K, SPSS, Inc., Richmond, VA)에 의한 ANOVA test를 이용하여 분산 분석한 후, Duncan의 다중위 검정을 실시하였다(Steel and Torrie, 1980).

결과 및 고찰

2단 가수분해물의 휘발성염기질소 및 관능검사

1단 Protamex 가수분해물(PR)을 기질로 하여 Alcalase (PRAL), Flavourzyme (PRFL), Neutrase (PRNE), pepsin (PRPE) 및 trypsin (PRTR)과 같은 5종의 효소로 반응시킨 2단 굴 가수분해물의 휘발성염기질소 함량 및 부패취에 대한 관능검사의 결과는 Table 1과 같다. 2단 가수분해물의 휘발성염기질소 함량은 10.4-10.8 mg/100 g 범위로 1단 가수분해물(PR, 9.7 mg/100 g)과 거의 차이가 없으며, 또한 2단 가수분해물 간에도 유의적인 차이(p<0.05)가 인정되지 않았다. 한편, 1단 가수분해물과 2단 가수분해물들의 부패취에 대한 관능검사를 실시한 결과 가수분해물의 종류에 관계없이 모든 시료구에서 전 관능요원들이 부패취를 감지하지 못하였다. 이상의 2단 굴

Table 1. Volatile basic nitrogen (VBN) contents and results of sensory evaluation on putrid smell of two-step enzymatic oyster hydrolysates prepared by sequential treatment of Protamex for 1 hr and the other enzymes for 1 hr

Hydrolysate	VBN (mg/100 g)	Sensory evaluation
Protamex (PR)	9.7±0.6 ^{a1)}	0 ²⁾
Protamex→Alcalase (PRAL)	10.6±0.7 ^a	0
Protamex→Flavourzyme (PRFL)	10.6±0.3 ^a	0
Protamex→Neutrase (PRNE)	10.8±0.2 ^a	0
Protamex→Pepsin (PRPE)	10.4±0.1 ^a	0
Protamex→Trypsin (PRTR)	10.5±0.3 ^a	0

¹⁾Values are means±standard deviation of three determinations.

²⁾Values indicate the number of panel member felt a putrid smell from oyster hydrolysate.

Means within VBN column followed by the same letter are not significantly different (p<0.05).

가수분해물의 휘발성염기질소 함량 및 관능검사의 결과로 미루어 보아 2단 굴 가수분해물은 선도 면에서는 가공소재로서 전혀 문제가 없으리라 판단되었다.

2단 가수분해물의 가수분해도

1단 효소(PR, Protamex) 가수분해물을 기질로 하여 Alcalase (AL), Flavourzyme (FL), Neutrase (NE), pepsin (PE) 및 trypsin (TR)과 같은 5종의 효소로 반응시킨 2단 굴 가수분해물의 가수분해도는 Fig. 1과 같다. PR단독으로 실시한 1단 굴 가수분해물의 가수분해도는 28.5%이었고, 이를 기질로 하여 제조한 2단 가수분해물인 PRAL, PRNE, PRPE 및 PRTR은 14-16% 범위의 유의적인 가수분해 개선 효과를 나타내었으나, PRFL은 가수분해 개선 효과가 전혀 인정되지 않았다. 이와 같이 PR에 대해 Flavourzyme으로 2단 가수분해하였을 때 가수분해 효과가 나타나지 않는 것은 가수분해율에 개선효과를 가져오는 endoprotease의 영향보다는 맛의 개선에 영향을 주는 exoprotease의 특성이 강하기 때문이라 추정되었다(Heu and Ahn, 1999). 한편, Alcalase, Neutrase, pepsin 및 trypsin을 사용한 4종의 2단 가수분해물 (PRAL, PRNE, PRPE 및 PRTR)간의 가수분해율은 유의적인 차이가 인정되지 않았다(p<0.05).

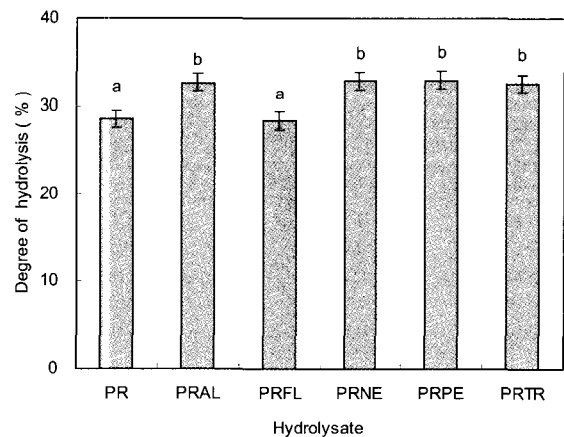


Fig. 1. Degree of hydrolysis of two-step enzymatic oyster hydrolysates prepared by sequential treatment of Protamex for 1 hr and the other enzymes for 1 hr.

PR, Protamex; AL, Alcalase; FL, Flavourzyme; NE, Neutrase; PE, pepsin; TR, trypsin. Different letters on the bars indicate a significantly different at p<0.05.

2단 가수분해물의 기능 특성

효소 종류에 따른 2단 굴 가수분해물의 angiotensin I converting enzyme (ACE) 저해능(IC₅₀)은 Fig. 2와 같다. ACE 저해능은 1단 가수분해물(PR)의 경우 1.49 mg/mL이었으나, 이를 기질로 하여 Alcalase, Neutrase, pepsin 및 trypsin과 같은 효소로 2단 처리한 가수분해물의 경우 모두 개선 효과(PRAL, 0.86 mg/mL; PRPE, 1.30 mg/mL; PRTR, 1.20 mg/mL)가 있었고, 특히 Neutrase 가수분해물(PRNE)이 IC₅₀ 0.40 mg/mL로 가장 ACE 저해능이 강하였다. 그러나 Flavourzyme으로 2단 처리한 가수분해물(PRFL)의 경우 ACE 저해능(IC₅₀)이 1단 가수

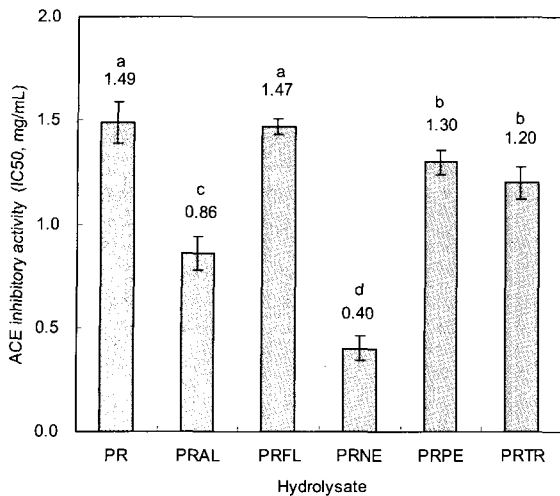


Fig. 2. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of two-step enzymatic oyster hydrolysates prepared by sequential treatment of Protamex for 1 hr and the other enzymes for 1 hr. PR, Protamex; AL, Alcalase; FL, Flavourzyme; NE, Neutrase; PE, pepsin; TR, trypsin. Different letters on the bars indicate a significantly different at $p < 0.05$.

분해물(PR)에 비하여 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 이와 같은 효소의 종류에 따른 2단 가수분해물의 ACE 저해능에 대한 차이는 사용한 효소의 절단 부위 즉 기질 특이성 때문이라 판단되었다(Byun and Kim, 2001). 이상의 결과와 2단 가수분해물의 가수분해도를 연관하여 고찰하는 경우 가수분해도와 ACE 저해능과의 상관성보다는 ACE 저해능과 효소의 기질 특이성과의 상관성이 높을 것으로 추정되었다.

2단 굴 가수분해물의 paper disc로 살펴 본 항균성은 Table 2와 같다. 가수분해물의 항균성은 1단 굴 가수분해물(PR)은 물론이고, 5종의 2단 처리한 가수분해물의 경우도 사용균주 gram positive 3종(*B. cereus*, *L. monocytogenes* 및 *S. aureus*), gram negative 3종(*E. coli*, *S. typhimurium* 및 *V. parahaemolyticus*)에 대한 항균성은 인정되지 않았다. 따라서 실험에 사용한 시판 효소로 제조한 굴 효소 가수분해물에는 사용균주에 대하여 항균활성을 나타내지 않았다.

2단 굴 가수분해물의 항산화능을 비타민 C와 비교하여 살펴 본 결과는 Fig. 3과 같다. 항산화능은 1단 가수분해물(PR)의

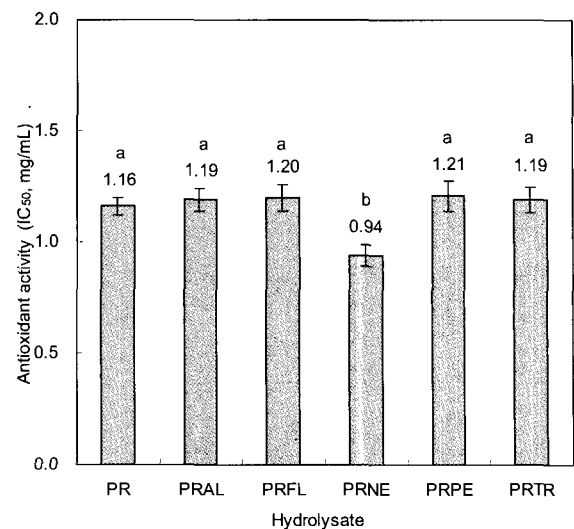


Fig. 3. Antioxidant activity of two-step enzymatic oyster hydrolysates prepared by sequential treatment. Different letters on the bars indicate a significantly different at $p < 0.05$.

IC₅₀ (1.16 mg/mL)에 비하여 Alcalase, Flavourzyme, pepsin 및 trypsin을 사용한 2단 가수분해물의 IC₅₀이 각각 1.19 mg/mL, 1.20 mg/mL, 1.21 mg/mL 및 1.19 mg/mL로서 2단 가수분해 전보다 오히려 높은 반면에, Neutrase 가수분해물(PRNE, 0.94 mg/mL)만이 향상된 것으로 나타났다. 이와 같이 1단 가수분해물(PR)의 항산화능에 비하여 Alcalase, Flavourzyme, pepsin, 및 trypsin으로 재가수분해한 2단 가수분해물들의 항산화능이 개선되지 못한 것은 2단 가수분해에 의하여 항산화능이 있는 peptide의 생성은 적은 반면, 이미 생성되어 있는 peptide의 분해는 다소 진행되었기 때문이라고 판단되었다.

1단 가수분해물(PR, IC₅₀=1.16 mg/mL)에 비하여 항산화능이 향상되었던 2단 가수분해물 (PRNE, IC₅₀=0.94 mg/mL)은 15 mM 비타민 C의 항산화능(61.8%)에 비하여 84.6%로 우수하였다.

이상의 결과로부터 굴을 소재로 하여 Protamex와 Neutrase로 연속처리한 2단 가수분해물(PRNE)은 ACE 저해능 및 항산화능이 모두 우수하여, 이와 같이 효소의 연속처리(2단 가수분해)를 통해 ACE 저해능과 항산화성이 동시에 우수한 가수분

Table 2. Antimicrobial effects of two-step enzymatic oyster hydrolysates by sequential treatment

Microorganisms	Hydrolysate					
	PR	PRAL	PRFL	PRNE	PRPE	PRTR
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-

-, Not inhibition.

해물의 제조가 가능할 것으로 기대된다.

2단 가수분해물의 분자량 분포

2단 가수분해물의 Sephadex G-50 column (i.d. 1.6×100 cm)으로 살피본 분자량 분포는 Fig. 4와 같다. 전체적으로 Protamex로 1시간 동안 처리하여 얻어진 1단 가수분해물(PR)에 비하여 Protamex를 제외한 다른 효소로 1시간 동안 연속적으로 처리하여 얻어진 2단 가수분해물(PRAL, PRFL, PRNE, PRPE 및 PRTR)은 fraction 22-38번 사이의 고분자 획분(29-66 kDa)의 경우 거의 분해되어 fraction 60-72번 사이의 저분자 획분(6.5 kDa 이하)으로 이행되었으며, 아울러 저분자 획분(<6.5 kDa)에서도 분해가 더 진행이 되어 저분자 획분의 감소가 두드러지게 나타났다. 저분자 획분(<6.5 kDa)의 감소는 pepsin으로 처리한 2단 가수분해물(PRPE)이 가장 현저하게 감소하였고, 다음으로 PRAL, PRTR 그리고 PRFL의 순이었다. Neutrase로 제조한 2단 가수분해물(PRNE)의 경우, 고분자 획분(29-66 kDa)은 거의 분해된 것으로 나타났으나, fraction 60-72번 사이의 저분자 획분(<6.5 kDa)의 분자량 분포는 1단 가수분해물(PR)과 거의 차이가 없었다.

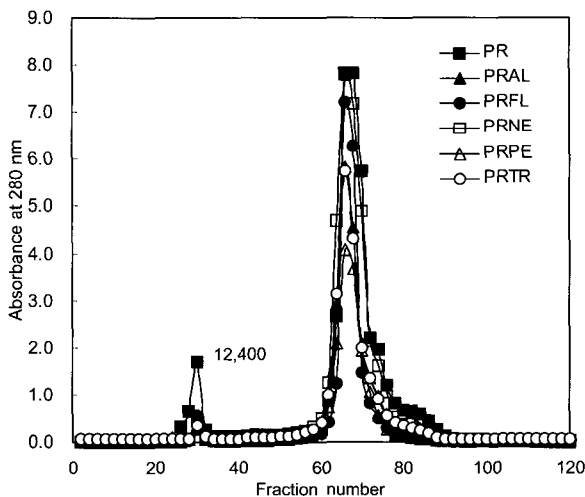


Fig. 4. Molecular weight distribution profile of two-step enzymatic oyster hydrolysates prepared by sequential treatment.

이상의 분자량 분포, 2단 가수분해물의 ACE 저해능(Fig. 2) 및 항산화능(Fig. 3)의 결과로 미루어 보아 1단 가수분해물(PR)을 Neutrase로 2차 가수분해하는 경우에 기능성이 우수한 peptide가 다수 생성된 것으로 추정되었다.

한외여과 획분의 수율

기능성 향상을 목적으로 Protamex (1차)와 Neutrase (2차)를 연속 처리하여 제조한 200 mL의 2단 굴 가수분해물(PRNE)에 대해 앞서 서술한 방법에 따라 한외여과장치(3, 5, 10, 30 kDa)의 분리력을 가진 membrane을 장착하여 저분자량에서 고분자량의 membrane으로 순차적으로 한외여과를 이용하여 40 mL 씩 분획한 분자량별 여과물의 수율은 Fig. 5와 같다. 2단 효소

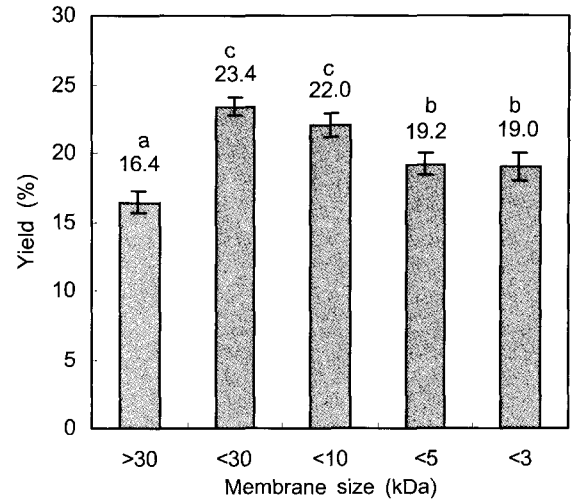


Fig. 5. Yields of permeates fractionated from PRNE by ultrafiltration using four kinds of membranes. Different letters on the bars indicate a significantly different at $p < 0.05$.

굴 가수분해물(PRNE)의 수율을 100%로 하였을 때, 3 kDa membrane을 통과한 분획 여과물(이하 3 kDa 획분)의 수율은 19.0%이었고, 5 kDa membrane을 통과한 분획 여과물(이하 5 kDa 획분)의 수율은 19.2%이었으며, 10 kDa membrane을 통과한 분획 여과물(이하 10 kDa 획분)의 수율은 22.0%이었다. 그리고, 3 kDa, 5 kDa 및 10 kDa의 membrane을 연속적으로 통과하지 않은 상층액을 시료로 하여 30 kDa 막을 통과한 분획 여과물(이하 30 kDa 획분)의 수율은 23.4%이었으며, 통과하지 않은 고분자라 생각되는 상층액(>30 kDa 획분)의 수율은 16.4%이었다. 이와 같이 2차 가수분해물 (PRNE)의 분자량 30 kDa 이하의 획분 수율이 82.6%나 되는 것은 2차에 걸친 효소분해로 인해 고분자량의 단백질이 저분자화 되었음을 나타낸다.

한외여과 획분의 기능 특성

2단 굴 가수분해물을 4종의 membrane (MWCO, 3, 5, 10 및 30 kDa)이 장착된 한외여과장치로 분획한 여과물의 ACE 저해능(IC₅₀)은 Fig. 6과 같다. ACE 저해능(IC₅₀)은 2단 굴 가수분해물(PRNE)이 0.40 mg/mL이었고, 3 kDa 획분이 0.11 mg/mL, 5 kDa 획분이 0.20 mg/mL, 10 kDa 획분이 0.38 mg/mL, 30 kDa 획분이 0.43 mg/mL로, 한외여과 membrane의 pore size가 작을수록 유의적으로 ACE 저해능이 우수하였고($p < 0.05$), 10 kDa 이상의 막으로 여과하는 경우 ACE 저해능의 개선 효과가 전혀 인정되지 않았다. 한편, Jeon et al. (1999)도 대구 fillet 가공 부산물인 대구 frame의 효소 가수분해물을 기능성 개선을 위하여 3 kDa, 5 kDa, 10 kDa 및 30 kDa의 pore size를 가진 membrane이 장착된 한외여과장치로 분획 여과물을 제조한 다음 ACE 저해능을 살피 본 결과 membrane의 pore size가 작을수록 ACE 저해능이 개선되는 효과가 있었다고 보고한

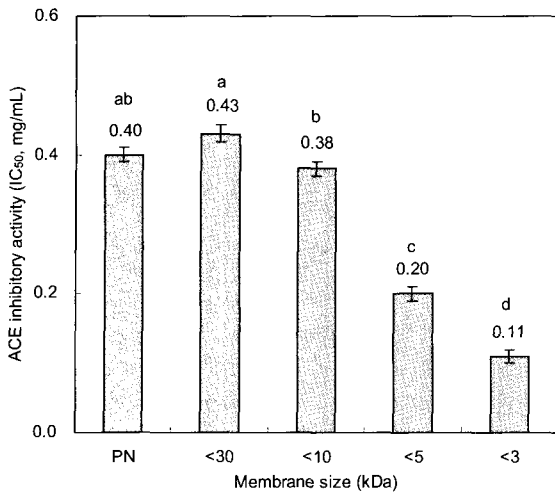


Fig. 6. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of permeates fractionated from PRNE by ultrafiltration using four kinds of membranes. Different letters on the bars indicate a significantly different at $p < 0.05$.

바 있다.

2단 굴 가수분해물(PRNE)을 pore size (3, 5, 10, and 30 kDa)별로 membrane을 장착한 한외여과장치로 분획한 여과물의 항산화능은 Fig. 7과 같다. 항산화능(IC₅₀)은 2단 굴 가수분해물(PRNE)의 경우 0.94 mg/mL이었고, 3 kDa 획분의 경우 0.40 mg/mL, 5 kDa 획분은 0.50 mg/mL, 10 kDa 획분이 0.76 mg/mL, 30 kDa 획분의 경우 0.96 mg/mL으로 한외 여과 membrane의 pore size가 작을수록 항산화능이 우수하여, ACE 저해능의 결과와 유사하였다. 한편, 2단 굴 가수분해물을 10 kDa 이상의 pore size를 가진 membrane으로 분획하는 경우 항산화능의 개선 효과가 전혀 인정되지 않았다. 한편, Jeon et al. (1999)은

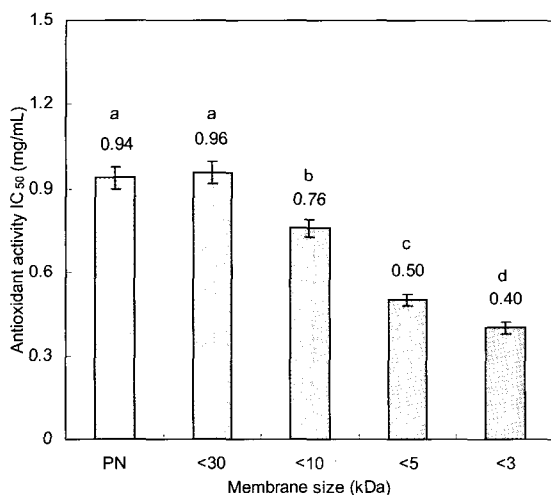


Fig. 7. Antioxidant activity of permeates fractionated from PRNE by ultrafiltration using four kinds of membranes. Different letters on the bars indicate a significantly different at $p < 0.05$.

대구 frame 효소 가수분해물을 membrane의 pore size에 따라 분리하여 항산화능을 살펴 본 결과 10 kDa 분획여과물이 가장 우수하였고, 다음으로 3 kDa 분획여과물, 30 kDa 분획여과물의 순이었으며, 5 kDa으로 분획한 여과물이 가장 낮아, 본 실험의 결과와는 다소 차이가 있었다. 이와 같이 항산화능이 본 실험의 굴 가수분해물 유래 한외여과 획분과 Jeon et al. (1999)의 대구 frame 효소 가수분해물 유래 한외여과물이 membrane의 pore size에 따라 일정한 경향을 나타내지 않는 것은 가수분해물의 제조에 사용한 시료 및 효소의 종류, 한외여과장치 및 분획조건, 가수분해물을 형성하고 있는 아미노산이나 peptide의 종류 및 항산화능을 나타내는 peptide의 말단기 등에 있어 차이가 있었기 때문이라 판단되었다.

이상의 결과로 미루어 보아 2단 굴 가수분해물은 3 kDa의 membrane이 장착된 한외여과장치의 통과에 의해 ACE 저해능과 항산화능을 상당히 개선할 수 있으리라 판단되었다.

한외여과 획분의 아미노산

1단 굴 가수분해물(PR), 2단 굴 가수분해물(PRNE) 및 2단 가수분해물의 한외여과 3 kDa 획분에 대한 아미노산 조성은 Table 3과 같다. 유리아미노산의 총 함량은 1단 굴 가수분해물의 경우 1,411.8 mg/100 g이었고, 이를 기질로 하여 Neutrase로 재처리한 2단 굴 가수분해물(PRNE)의 경우 1,709.3 mg/100 g으로, 1단 가수분해물(PR)에 비하여 약 21%가 증가하였다. 그리고, 2단 가수분해물의 한외여과장치로 분획한 3 kDa 획분의 경우 분획으로 인해 PRNE에 비하여 약 20%에 해당하는 함량인 341.9 mg/100 g으로 감소하였다. 1단 가수분해물, 2단 가수분해물 및 한외여과 획분에 관계없이 조성비가 높은 유리아미노산으로는 aspartic acid, glutamic acid, proline, glycine 및 leucine 등이었다. 한편, 3 kDa 획분의 유리아미노산 조성비는 PR이나 PRNE에 비하여 proline, cysteine, valine, methionine, tyrosine 및 phenylalanine 등이 높아진 반면에, aspartic acid, threonine, serine, glycine, isoleucine 및 lysine 등은 낮아졌다. 이와 같이 PR과 PRNE간의 아미노산 조성 차이는 PR이 Neutrase에 의해 2차 가수분해되어 저분자 peptide가 증가에 의한 것이라 판단되었고, PRNE와 3 kDa 획분 간의 아미노산 조성 차이는 한외여과장치에 의한 분획과정 중에 고분자량 획분이 걸러졌기 때문이라 판단되었다.

일반적으로 단백질 가수분해물의 생리활성은 아미노산 배열에 의해 영향을 받으며(Byun and Kim, 2001), ACE 저해능의 경우 Cheung et al. (1980)은 C-terminal에는 phenylalanine, tyrosine 등과 같은 방향족 아미노산이, N-terminal에는 쇠상 아미노산이 구성되어 있는 peptide가 저해효과가 있다고 보고하였고, Hazato and Kase (1986)는 돼지 혈장으로부터 분리한 Leu-Val-Leu 아미노산 배열을 가진 peptide가, Astawan et al. (1995)은 C-terminal에 Leucine 잔기가 있고, N-terminal에 Gly-Leu 잔기가 있는 peptide가, Byun and Kim (2001)은 명태껍질 젤라틴 가수분해물에서 분리한 Gly-Pro-Met와 Gly-Pro-Leu의 tripeptide가, Kim et al. (2001a)은 소껍질 젤라틴 가수분해물

Table 3. Free amino acid (FAA) composition of PR, PRNE and 3 kDa permeates fractionated from PRNE by ultrafiltration

Amino acid	Hydrolysates				Permeates	
	PR		PRNE		3 kDa fraction of PRNE	
	mg/100 mL	g/100 g of FAA	mg/100 mL	g/100 g of FAA	mg/100 mL	g/100 g of FAA
Aspartic acid	118.4	8.4	146.7	8.6	25.8	7.5
Threonine	56.0	4.0	64.3	3.9	11.7	3.4
Serine	57.9	4.1	79.2	4.6	12.9	3.8
Glutamic acid	172.9	12.2	231.1	13.5	41.9	12.3
Proline	112.7	8.0	132.4	7.7	29.7	8.7
Glycine	112.4	8.0	137.3	8.0	25.3	7.4
Alanine	115.9	8.2	108.5	6.3	27.1	7.9
Cysteine	22.7	1.6	17.9	1.0	6.5	1.9
Valine	74.9	5.3	78.2	4.6	20.0	5.8
Methionine	44.5	3.2	65.0	3.8	15.6	4.6
Isoleucine	107.2	7.6	95.5	5.6	17.7	5.2
Leucine	119.7	8.4	144.1	8.4	30.6	8.9
Tyrosine	37.6	2.7	60.9	3.6	12.9	3.8
Phenylalanine	56.6	4.0	72.5	4.2	15.8	4.6
Histidine	22.5	1.6	34.2	2.0	5.9	1.7
Lysine	91.9	6.5	125.7	7.4	19.8	5.8
Arginine	88.0	6.2	115.8	6.8	22.7	6.6
Total	1,411.8	100.0	1,709.3	100.0	341.9	100.0

Values are the means of three determinations.

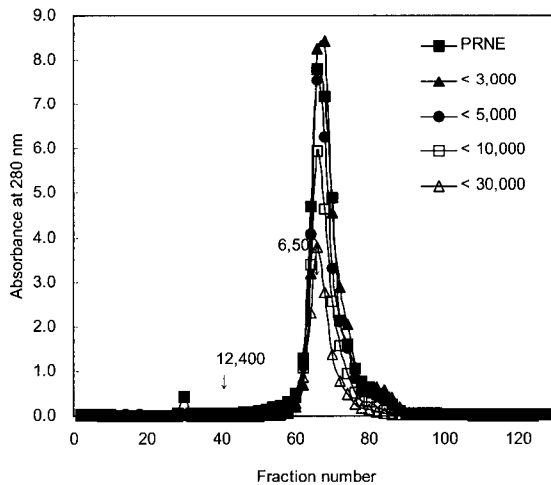


Fig. 8. Molecular weight distribution profile of permeates fractionated from PRNE by ultrafiltration using four kinds of membranes. Different letters on the bars indicate a significantly different at $p < 0.05$.

로부터 분리한 Gly-Pro-Val와 Gly-Pro-Leu의 아미노산 배열을 가진 peptide가 우수하였다고 보고한 바 있다. 또한 항산화성은 일반적으로 N-terminal에 valine 또는 leucine과 같은 소수성 아미노산이 위치하여야 한다고 알려져 있다(Kim et al., 2001b).

한편, 본 실험에서 한외여과 처리에 의하여 증가한 아미노산들은 여러 연구자들에 의하여 ACE 저해능 및 항산화능이 있다고 보고한 peptide의 말단 잔기를 구성하고 있는 아미노산들이어서, 2단 가수분해에 의하여 생성된 peptide와 한외여과

장치로 분획한 peptide들이 ACE 저해능 및 항산화능에 직접 관여하리라 추정되었다.

한외여과 획분의 분자량 분포

4종류의 한외여과 membrane (MWCO, 3 kDa, 5 kDa, 10 kDa 및 30 kDa)을 이용한 2단 가수분해물(PRNE)의 분자량 별 획분의 Sephadex G-50겔 여과법에 의한 분자량 분포는 Fig. 8과 같다. 각 단계별 한외여과 획분들은 분자량 한계 (MWCO) 3 kDa membrane을 사용하여 얻은 획분에서 저분자량의 분포가 가장 높게 나타났으며, 단계가 거듭될수록 저분자량의 분포는 감소하는 경향이였다. 이는 한외여과 시 membrane의 분자량 한계가 낮은 쪽에서 높은 쪽으로의 단계를 거듭함으로써 나타난 결과로, 초기단계(MWCO, 3 kDa와 5 kDa)에서 저분자량의 아미노산과 peptide가 효과적으로 분리되는 것을 의미하기 때문에 이들 획분에서 항산화성 및 ACE 저해능이 높게 나타난 것으로 추정된다. 한편, 한외여과 막을 이용한 막 분리에서 가압 상태로 여과가 진행됨으로서 분자량 한계 3 kDa membrane의 분자량 분포는 10 kDa 이하가, 분자량 한계 5 kDa membrane의 분자량 분포는 15 kDa 이하가, 분자량 한계 10 kDa membrane의 분자량 분포는 30 kDa 이하가, 분자량 한계 30 kDa membrane의 분자량 분포는 약 90 kDa 이하의 분자량을 갖는 물질이 분리, 여과된다. 따라서 이 실험에 사용된 2단 가수분해물(PRNE)은 고분자량 획분의 분해가 거의 일어난 상태라고 보았을 때, 기능성 가수분해물을 효과적으로 얻기 위해서는 3 kDa 및 5 kDa의 pore size를 가진 membrane을 이용하여 연속적으로 반복하여 저분자량의 획분을 얻기 위한 과정이 필요할 것으로 생각되었다.

사 사

본 연구는 해양수산부에서 시행하고 해양수산개발원에서 지원한 2004년도 수산특정연구개발사업과제에 의해 수행된 결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC., 69-74
- Astawan, M., M. Wahyuni, T. Ysuhara, K. Yamada, T. Tadokoro and A. Maekawa. 1995. Effects of angiotensin I converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. Biosci. Biotech. Biochem., 59, 425-429.
- Byun, H.G. and S.K. Kim. 2001. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. Proc. Biochem., 36, 1155-1162.
- Cheung, H.S., F.L. Wang, M.A. Ondetti, E.F. Sabo and D.W. Cushman. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin I converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. J. Biol. Chem., 255, 401-407.
- Cook, D.W., T. Chai, C.R. Hackney, R.E. Martin, W.S. Otwell and D.R. Ward. 1988. Liquid loss in shucked oyster (*Crassostrea virginica*) meats during ice storage. J. Food Sci., 53, 1671-1683.
- Davison, P.M. and M.E. Parish. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technol., 1, 148.
- Hazato, T. and R. Kase. 1986. Isolation of angiotensin I converting enzyme inhibitor from porcine plasma. Biochem. Biophys. Res. Commun., 139, 52-55.
- Heu, M.S. and S.H. Ahn. 1999. Development and fractionation of proteolytic enzymes from inedible seafood product. J. Kor. Fish. Soc., 32, 458-465.
- Horiuchi, M., K.I. Fujimura, T. Terashima and T. Iso. 1982. Method for determination of angiotensin-converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 233, 123-130.
- Hosoi, M., S. Kubota, M. Toyohara, H. Toyohara and I. Hayashi. 2003. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. Fish. Sci., 69, 395-400.
- Jeon, Y.J., H.G. Byun and S.K. Kim. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. Proc. Biochem., 35, 471-478.
- Jeong, B.Y., B.D. Choi and J.S. Lee. 1998. Proximate composition, cholesterol and α -tocopherol content in 72 species of Korean fish. J. Kor. Fish. Sci. Tech., 1, 129-146.
- Kim, C.Y. J.H. Pyeun and J.N. Nam. 1981. Decomposition of glycogen and protein in pickled oyster during fermentation with salt. J. Kor. Fish. Soc., 14, 66-71.
- Kim, J.S. and M.S. Heu. 2001. Preparation of instant powdered soup using canned oyster processing waste water and its characteristics. J. Kor. Fish. Soc., 34, 285-290.
- Kim, J.S., D.M. Yeum, H.G. Kang, I.S. Kim, C.S. Kong, T.G. Lee and M.S. Heu. 2002. Fundamentals and Applications for Canned Foods. Hyoil Publishing Co., Seoul, Korea, 321-325.
- Kim, S.K., H.G. Byun, P.J. Park and F. Shahidi. 2001a. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. J. Agric. Food Chem., 49, 2992-2997.
- Kim, S.K., Y.T. Kim, H.G. Byun, K.S. Nam and F. Shahidi. 2001b. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. J. Agric. Food Chem., 49, 1984-1989.
- Li, Q., M. Osada and K. Mori. 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. Fish. Sci., 66, 502-508.
- Ministry of Social Welfare of Japan. 1960. III. Volatile basic nitrogen. In: Guide to Experiment of Sanitary Infection. Kenpakusha, Tokyo, 30-32.
- Mitsuda, H, K. Yasumoto and K Iwami. 1996. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. Eiyoto Shokuryo, 19, 210-214.
- NFRDA. 1995. Supplemented Chemical Composition of Marine Products in Korea. National Fisheries Research and Development Agency, Yemoon Publishing Co., Seoul, Korea, 139-143.
- Shiau, C.Y. and T. Chai. 1990. Characterization of oyster shucking liquid wastes and their utilization as oyster soup. J. Food Sci., 55, 374-378.
- Soudant, P. and F.L. Chu. 2001. Lipid class and fatty acid composition of the protozoan parasite of oysters, *Perkiasus mariaus* cultivated in two different media. J. Eukary. Microbiol., 48, 309-319.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principle and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo, 187-221.

Yoon, H.D., H.S. Byun, S.J. Chun, S.B. Kim and Y.H. Park. 1986. Lipid composition of oyster, arkshell and sea-messel. J. Kor. Fish. Soc.. 19. 321-326.

2006년 3월 27일 접수
2006년 6월 10일 수리