

옥돔(*Branchiostegus japonicus*) 비늘 유래 젤라틴의 가수분해 및 가수분해물의 기능성

안용석^{1,2}·이원우³·이승홍³·안긴내³·고창익³·오창경⁴
오명철⁴·김동우⁵·전유진^{3,6}·김수현^{1*}

¹제주대학교 식품생명공학과, ²(주)청룡수산 수산식품연구소, ³제주대학교 해양생명과학과
⁴제주산업정보대학 관광호텔조리과, ⁵(주)네추럴 F&P 중앙연구소, ⁶제주대학교 해양과환경연구소

Processing and Biological Activity of Gelatin Hydrolysate from *Branchiostegus japonicus* Scales

Yong-Seok Ahn^{1,2}, Won-Woo Lee³, Seung-Hong Lee³, Ginnae Ahn³,
Chang-Ik Ko³, Chang-kyung Oh⁴, Myung-Cheol Oh⁴,
Dong-Woo Kim⁵, You-Jin Jeon^{3,6} and Soo-Hyun Kim^{1*}

¹Department of Food Bioengineering, Jeju National University,
Jeju 690-756, Korea

²Research Institute of Processing from Jeju Fisher Food,
Choung Ryong Fisheries Co., LTD, Jeju 697-943, Korea

³Department of Marine Life Science, Jeju National University,
Jeju 690-756, Korea

⁴Department of Tourism Hotel Culinary Art, Jeju College of Technology,
Jeju 690-140, Korea

⁵Central Research Center, Natural F&P Co., Ltd., O-Chang,
Chungbuk 363-883, Korea

⁶Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University,
Jeju 690-814, Korea

The potential utility of fish scales to the functional food industry has been investigated due to its antioxidant and antihypertensive characteristics. In this study, we report on the reactive oxygen species (ROS) scavenging and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of gelatin hydrolysates processed from *Branchiostegus japonicus* scales, which are also high in protein content (about 46.1%). We prepared the enzymatic gelatin hydrolysates with four proteases (α -chymotrypsin, Alcalase, Neutrase and trypsin) from *B. japonicus* scale gelatin, which was prepared according to different reaction times, substrate/enzyme ratios and substrate concentrations. The enzymatic hydrolytic degrees of the gelatin increased time-dependently up to 6 hrs, while the Alcalase gelatin hydrolysates showed the highest hydrolysis degrees compared to the others. Furthermore, gelatin hydrolysates of Neutrase and α -chymotrypsin showed the highest DPPH radical and H₂O₂ scavenging activities (IC₅₀value; 9.18 mg/mL and 9.74 mg/mL), respectively. However, the activities were not significant ($P<0.05$). We also observed that the four gelatin hydrolysates significantly increased ACE inhibitory activities from approximately 20% to 60% ($P<0.05$). Among them, the Alcalase gelatin hydrolysates showed the higher ACE inhibitory activity (IC₅₀ value; 0.73 mg/mL) compared to the others. These results suggest that the enzymatic gelatin hydrolysates prepared from *B. japonicus* scales may possess a potentially useful function as an ACE inhibitory agent. As such, the utility of *B. japonicus* scales should be given due consideration for application in the functional food industry.

Key Words : *Branchiostegus japonicus*, *Branchiostegus japonicus* scale, Gelatin, Gelatin peptide, Antihypertension

서 론

젤라틴은 척추동물에서 무척추동물에 이르기까지 뼈 또는 껍질에 널리 분포하는 생체단백질인 비수용성의 콜라겐으로부터 열수로 부분적인 가수분해를 시켜 얻어지는 수용성의 유도단백질이다 (Mark et al., 1957; Ward et al., 1977; Hao

et al., 2009). 이러한 젤라틴은 다양한 산업분야에서 널리 이용되고 있는 중요한 기능성 바이오 중합체로써, 특히 의약품과 식품 분야에서 그들이 가지는 화학적, 물리적 특성들로 인해 유용하게 이용되고 있다 (Rahman, Al-Saidi and Guizani, 2008). 이러한 유용성의 젤라틴을 생산하기 위해, 많은 연구자들은 젤라틴의 원료로서 주로 소뼈, 소껍질과 돼지껍질 등을 이용하여 왔으나, 최근 들어 어류의 비늘 등의 이용이 증가하고

*Corresponding author: kshyun@jejunu.ac.kr

있는 실정이다 (Bowes et al., 1955; Cho et al., 2005; Sobral and Habitate 2001; Gudmundsson and Hafsteinsson 1997; Jamilah and Harvinder 2002; Cho et al., 2006). 어류 비늘 유래의 젤라틴의 경우, 축산물 유래의 젤라틴의 원료 단가 보다 더 비싸며, 젤강도, 응고점 및 녹는점 등 물리적 특성이 낮고, 어취를 가지고 있어 상업적으로 대량 생산이 거의 이루어지지 않고 있었으나, 최근에 발생한 광우병 파동과 구제역, AI, SI 등 육상동물 원료의 위생안전성에 대한 소비자의 우려와 종교 상 축산물을 섭취하지 않은 국가에서는 축산물 유래 젤라틴의 사용을 꺼리고 있어 새로운 어류 비늘 유래 젤라틴의 탐색과 기능성 식품 및 천연 의약 소재로서의 개발은 현시점에서 의미 있는 연구로 여겨진다.

제주도는 다양한 해양생물들이 서식하고 있는 청정해역으로 매년 많은 청정 수산물들이 어획되고 있고 그것들은 소비자들에게 공급되고 있다. 이러한 청정 수산물 중, 농어목 옥돔과에 속하는 옥돔은 제주도를 대표하는 어종으로써 소비자들의 선호도가 높으며 그에 따라 가공품으로서 판매가 되고 있는 실정이다. 그러나, 대부분의 어류 가공시, 어류 가공부산물이 어체 중의 약 75% 정도가 발생하게 되고, 수산폐기물로 폐기되고 있는 실정이다 (Songchotikunpan et al., 2008; Kim et al., 1997 and 1999). 그 중 어류 뼈나 껍질이 약 30% 정도를 차지하고 있는데, 옥돔 역시 가공과정 중에 상당량의 어체가 공잔사, 어뼈, 내장, 비늘 등의 부산물을 발생시킨다. 2004년 한해 2,582톤의 옥돔가공과정에서 약 390톤의 옥돔비늘이 발생하였으며, 이 수치는 제주 옥돔의 생산량이 증가함에 따라 같이 증가하여, 2007년에는 3,157톤의 옥돔 가공과정에서 약 470톤의 옥돔 비늘이 발생하였다. 이렇게 발생된 약 470톤의 옥돔 비늘을 폐기하기 위해서는 약 9,470만원의 폐기비용이 들며, 원료로서 사용되는 틸라피아 비늘의 가격 (20,000원/kg)으로 비교해 보았을 때, 원료로서의 손실액은 약 95억원의 손실이 발생하여, 총 96억원의 손해가 발생하게 된다 (Jeju Special Self-Governing Province Office of Fisheries policy., 2008).

어류 가공 시 발생되는 가공 부산물을 이용하여 젤라틴이나 콜라겐 같은 새로운 유용한 성분들을 분리해 내는 기술 개발은 매우 중요하다고 할 수 있다. 이전 연구에서, Kim et al. (1993)은 틸라피아로부터 유용한 젤라틴을 추출하여 산업화에 성공하였으며 (Kim et al. 1993), 틸라피아의 비늘로부터 콜라겐을 추출하여 식품 및 의약품용으로 일부 생산판매하고 있다. 이러한 점으로 미루어 볼 때, 제주도 대표 어종인 옥돔의 난분해성인 비늘은 환경부분과 자원재활용 차원에서 연구해 볼 가치가 있다. 또한, 옥돔 비늘에는 지질, 회분 등이 일부 함유되어 있으나, 단백질이 주요 성분이기때문에, 옥돔 비늘로부터 적절한 추출방법을 통하여 콜라겐 및 이의 유도체인 젤라틴을 추출하는 것은 매우 가치있는 일이다. 일반적으로 효소적 가수분해는 식품 단백질의 기능과 영양적 특성을 향상시켜주고, 특히 단백질 가수분해효소를 이용한 식품단백질로부터 펩티드의 제조는 어류 껍질 젤라틴 가수분해물 제조 등에 응용되어 생리활성을 가지는 유용 성분으로 전환시키는 것으로 알려져

있다 (Shahidi and Kamil., 2001; Kim et al., 2001). 이것은 콜라겐과 젤라틴이 고분자물질로서 체내 섭취가 어려울 수 있다는 점을 감안할 때, 옥돔의 비늘로부터 젤라틴을 추출하여 단백질 가수분해효소를 이용하여 젤라틴 펩티드로 가수분해하는 것은 체내 흡수율을 높일 수 있어, 기능성 식품 소재와 천연 의약 소재 등과 같은 다양한 분야에서 널리 이용될 수 있을 것이다.

현재 연구에서는 옥돔의 비늘로부터 젤라틴을 제조한 후, 젤라틴의 체내 흡수율을 증가시키기 위해, 단백질 가수분해효소의 가수분해능력을 이용하여 효소별, 시간대별 젤라틴 가수분해물을 제조하여 최적 추출조건을 확립하고, 추출된 젤라틴 가수분해물의 항산화나 항고혈압과 같은 생리활성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물을 얻기 위하여 본 실험에 사용한 옥돔 (*Branchiostegus japonicas*) 비늘은 제주도 서귀포시에 위치한 (주)청룡수산에서 제공되었으며, 담수를 이용하여 수세 후 자연건조하여 실험에 사용되었다.

옥돔 비늘의 일반성분 측정

건조된 옥돔 비늘의 수분, 조단백질, 조지방 및 회분을 측정하였다. AOAC 방법에 준하여 수분함량은 0.002 g 이하의 유의차를 향량으로 하여 105°C 상압가열건조법으로 측정하였고, 조지방 함량은 Soxhlet 추출법으로 측정하였으며 조단백질 함량은 Micro Kjeldahl방법으로 측정하였으며, 그리고 회분 함량은 건식법으로 측정하였다.

젤라틴의 제조

옥돔 비늘의 이물질 제거를 위하여 옥돔 비늘 8배의 1N NaOH 알칼리용액을 이용하여 10°C에서 3일간 알칼리 처리하여 비콜라겐 단백질을 제거하였다. 알칼리 처리 후 흐르는 물로 수세하여 6N HCl로 중화시켰다. 중화된 옥돔비늘에 원료대비 6배 (v/w)의 증류수를 가해 60°C에서 3시간 3회 반복하여 열수 추출하였다. 열수 추출한 용액은 여과지 (5A 110 mm, advantec, Japan)를 이용하여 감압 여과한 후 여과된 젤라틴 추출용액은 진공농축기를 이용하여 60°C에서 농축한 다음 동결건조하여, 이를 분말로 분쇄한 후 시료로 이용하였다.

Table 1. Characteristics of proteases used in hydrolysis of *Branchiostegus japonicus*

	Enzymes	pH	Temperature(°C)	Origin
Proteases	a-chymotrypsin	7.8	25	Bovine Pancreas
	Alcalase	8.0	50	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Neutrased	6.0	50	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	trypsin	7.6	25	Procine Pancreas

옥돔 비늘 유래 젤라틴의 효소 및 시간대별 가수분해 건조되어 분말화된 옥돔 비늘 유래 젤라틴에 4가지 단백질 가수 분해 효소 (α -chymotrypsin, Alcalase, Neutrase 및 trypsin)를 이용하여 시간대별로 가수분해하였다. 가수분해물은 다시 원심분리 (12000 rpm, 15 min) 과정을 거쳐 상층액을 분리한 후, 가수분해도를 측정하였다.

가수분해도 측정

옥돔 비늘 유래 젤라틴의 가수분해도 (degree of hydrolysis; DH)는 trichloroacetic acid (TCA)법 (Hoyle and Merritt., 1994)으로 측정하였다. 즉 반응이 종료된 반응혼합물을 원심분리 (12000rpm, 15min)하여 상층액으로부터 2 mL를 취하고 여기에 20% TCA를 동량 첨가하여 원심분리 (3500 rpm, 10 min)한 다음, 상층액의 일정량을 취하여 Lowry법 (1951)으로 10% TCA 가용성 질소량을 측정하여 다음의 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

가수분해도(DH), %=(10% TCA 가용성 질소량/총질소량)× 100

DPPH radical scavenging activity

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 자유 라디칼에 대한 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 소거활성은 전자공여능 (Electron donating ability, EDA)을 이용하는 Blois (1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 4.0×10^{-4} M DPPH 용액 100 μ L에 각 가수분해물 100 μ L를 넣고 5초간 교반하여 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 흡광도의 감소 비율로 가수분해물의 항산화 활성을 측정하였다. Blank는 DPPH 대신 ethanol을 사용하였고, control은 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물 대신 증류수를 사용하였다.

DPPH 소거율 (%)={1-(Sample OD-Blank OD)/Control OD}×100

Hydrogen peroxide scavenging activity

과산화수소 소거활성은 Müller et al. (1995)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0) 100 μ L와 가수분해물 100 μ L를 96 microwell plate에서 혼합시킨다. 다시 20 μ L의 hydrogen peroxide를 첨가시키고 37°C에서 5분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 1.25 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulphonic acid) (ABTS)와 peroxidase (1 unit/mL)를 각각 30 μ L씩 첨가하여 최종적으로 37°C에서 10분간 반응시켜 405 nm에서 활성도를 측정한다. Blank는 과산화수소 대신 증류수를 사용하였고, control은 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물 대신 증류수를 사용하였다.

과산화수소 소거율 (%)={1-(Sample OD-Blank OD)/Control OD}×100

ACE 억제 활성 측정

옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 항고혈압 활성을 측정하기 위하여 시간대별로 분리된 젤라틴 가수분해물을 가지고 ACE 억제를 측정하는 Cushman and Cheung (1971)의 방법에 준하여 측정하였다. 시간대별로 추출된 젤라틴 가수분해물

50 μ L에 25 mU/mL ACE 효소액 50 μ L를 가한 후, 37°C에서 10분간 항온처리하였다. 여기에 기질로서 12.5 mM Hip-His-Leu (HHL)용액 100 μ L를 가하여 다시 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 1N HCl용액 0.25 mL를 가하여 시험관 혼합기로 교반하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate 350 μ L를 가하여 교반한 다음, 원심분리 (4000 rpm, 10 min)시켜 상층액 (ethyl acetate층) 200 μ L를 분취하였다. 이 분취액을 80°C 건조기에서 완전히 건조시켜 증류수 1 mL를 가하여 용해시킨 후, 228 nm에서 흡광도를 측정하여 시간대별 젤라틴 가수분해물의 ACE 저해율을 나타내었다.

$$ACE \text{ 저해율 } (\%) = [1 - \{(S - Sc) / (B - Bc)\}] \times 100$$

S = 각 샘플을 측정한 흡광도

Sc = ACE 효소가 들어가지 않고 반응시간이 0인 상태의 각 샘플의 흡광도

B = 샘플을 넣지 않고 측정한 흡광도

Bc = ACE 효소와 샘플을 넣지 않고 반응시간이 0인 상태의 흡광도

옥돔 비늘 유래 젤라틴의 최적가수분해 조건과 농도 별 ACE 저해활성

ACE 억제 활성이 높은 효소 가수분해물의 최적가수분해조건을 결정하기 위하여, 기질대 효소비와 기질농도에 따라 가수분해를 수행하였다. 실험을 수행하기 위한, 기질 대 효소비는 10, 20, 50, 100, 200, 500 (wt/wt)였고, 기질인 옥돔 비늘 유래 젤라틴의 농도는 1%, 3%, 5%, 10%였다. 가수분해는 위에서 제시된 방법과 동일하게 수행되었다. 그리고, 모든 가수분해조건을 검토를 위해 가수분해물의 가수분해도를 측정하였다.

가장 저해율이 좋았던 시간대와 효소, 기질대 농도비, 기질 농도를 선정하여, 가수분해물의 농도별 (0.25, 0.5 및 1 mg/mL)로 ACE 저해활성을 측정하였다. ACE의 저해활성을 50% 저해시키는데 필요한 ACE 저해제의 농도는 반응용액 중에 정평하여 첨가된 저해제의 농도를 계산하여 IC₅₀ (mg/mL)으로 정의하였다.

통계처리

이 연구의 실험 및 분석 결과의 통계처리는 SPSS program (SPSS Inc., Version 12.0)을 사용하여 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan (1955) $P < 0.05$)로 평균간의 유의성을 검정하였다.

결 과

옥돔 비늘의 일반성분 측정

건조된 옥돔 비늘의 일반성분을 분석한 결과, Table 2에서와 같이 수분, 조지방, 회분 및 조단백질은 각각 8.5%, 0.4%, 45% 및 46.1%를 차지하였다. Hamada and Kumagai (1988)는

Table 2. Proximate composition of *Branchiostegus japonicus* scale used in this study

Sample	Crude protein	Moisture	Ash	Other
<i>Branchiostegus japonicus</i>	46.1±0.02	8.5±0.01	45.0±1	0.4±0.001

해산어종인 정어리의 비늘을 대상으로 성분분석을 한 결과 비늘 100 g 중 조회분은 53.16 g이며 콜라겐 단백질은 41 g으로서 이들의 함량이 비슷하게 차지하고 있다고 보고한 바 있다 (Hamada and Kumagai, 1988). 이러한 결과는 본 연구의 옥돔비늘과 큰 차이를 보이지 않았다. 이것으로부터 옥돔 비늘은 다른 성분에 비해 단백질 함량을 높게 함유하였으며, 다른 어종의 비늘과 비교해서도 젤라틴 추출 부분에 있어 유용한 원료가 될 수 있음을 확인하였다.

효소 및 시간대별 가수분해에 따른 젤라틴의 가수분해

건조되어 분말화된 옥돔 비늘 유래 젤라틴을 가수분해하기 위해 4종의 단백질 분해효소 (α -chymotrypsin, Alcalase, Neutrase 및 trypsin)를 사용하여 가수분해 반응시간에 따른 가수분해도를 측정하였다. 그 결과, 4종의 단백질 가수분해 효소를 이용하여 추출한 시간대별 가수분해물의 가수분해도는 4종류의 효소 모두 가수분해반응 6시간까지 급격하게 가수분해도의 증가를 보였으나, 그 후에는 거의 일정하였다. 또한, 4종류의 가수분해물 중에서도 특히 Alcalase가 가장 효과적으로 옥돔 비늘 젤라틴을 가수분해하였으며, 가수분해반응 6시간 이후에 약 65%이상의 가수분해도를 나타내었다 (Fig. 1).

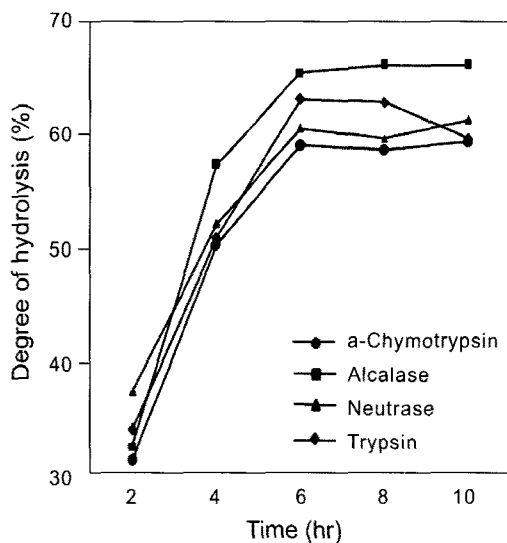


Fig. 1. Comparison of hydrolysis degrees of enzymatic gelatin hydrolysates. The enzymatic gelatin hydrolysates were prepared by various enzymes (α -chymotrypsin, Alcalase, Neutrase and trypsin) and reaction times (2, 4, 6, 8, and 10 hr). Conditions of reaction : Substrate/Enzyme ratio=100 (wt/wt), Substrate concentration = 3%.

옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물의 항산화 효과

옥돔 비늘 유래의 젤라틴으로부터 제조된 젤라틴 가수분해물에 대하여 DPPH 라디칼과 과산화수소와 같은 활성산소종에 대한 소거 활성 능력을 확인함으로써 그들이 항산화제로서의 가능성을 검토하였다.

Fig. 2와 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 옥돔 유래 비늘 젤라틴 가수분해물들은 DPPH 라디칼과 과산화수소에 대하여 높은 시료 농도에서 소거활성을 보였으며, 가수분해도의 양상과 비슷한 활성변화를 보였다. 즉, 가수분해 6시간짜리 가수분해도의 급격한 증가와 마찬가지로 DPPH 소거활성도 6시간째 급격한 활성증가를 보였다. 이 중에서, Neutrase에 의해 가수분해된 젤라틴 가수분해물이 가장 높은 DPPH 소거활성을 보였는데, 약 50%까지의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다. 또한, Neutrase에 의해 가수분해된 젤라틴 가수분해물은 농도의존

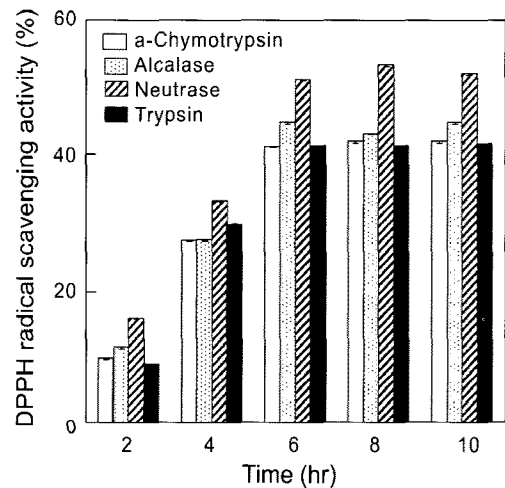


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities of the enzymatic gelatin hydrolysates (10 mg/mL). The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

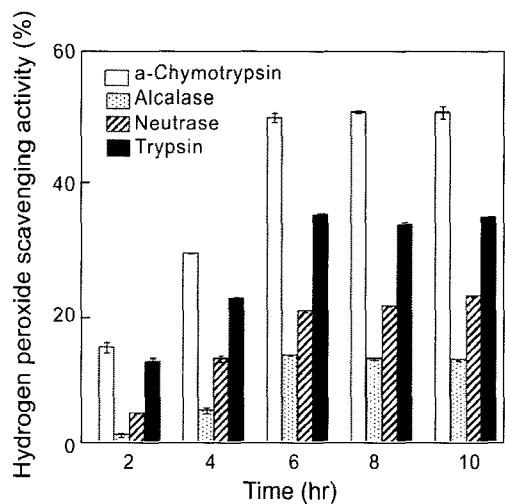


Fig. 3. Hydroxyl radical scavenging activities of the enzymatic gelatin hydrolysates (10 mg/mL). The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

적으로 DPPH 라디칼 소거활성을 증가시켰고, 그것의 IC₅₀ 값은 9.18 mg/mL였다 (Fig. 4). 그리고, 과산화수소 소거활성은 α -chymotrypsin을 사용한 젤라틴 가수분해물에서 가장 높게 나타났으며, 가수분해도 및 DPPH 소거활성의 증가와 마찬가지로 가수분해 반응 6시간까지 급격한 소거활성 증가를 나타내었다. 그리고 시료의 농도가 증가함에 따라 과산화수소 소거활성도 IC₅₀ 값 : 9.74 mg/mL로 증가하였다 (Fig. 5). 지금까지

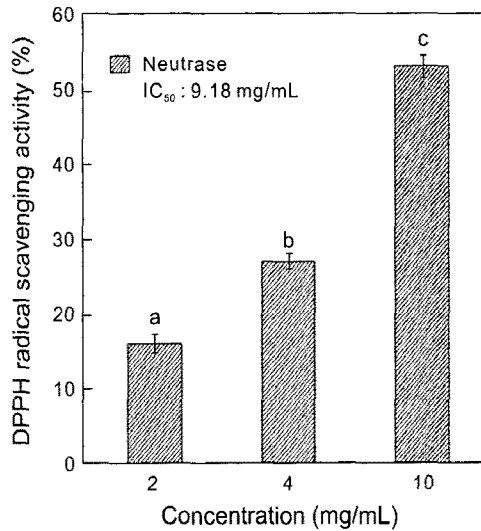


Fig. 4. DPPH radical scavenging activities of Neutrased gelatin hydrolysate according to various concentrations (2, 4, and 10 mg/ml). The value of IC₅₀ was expressed as the concentration of Neutrased gelatin hydrolysate inhibiting the 50% of DPPH radical. The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

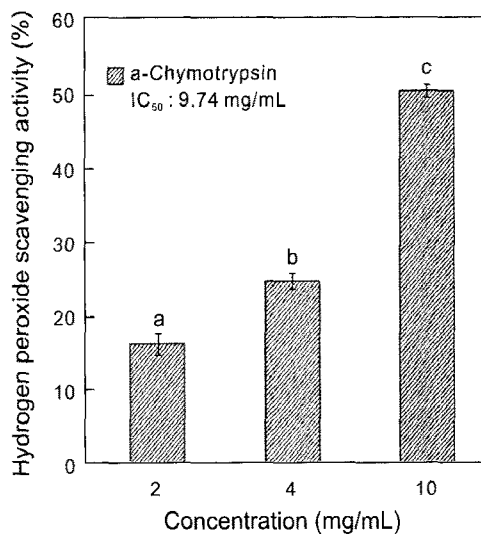


Fig. 5. Hydroxyl radical scavenging activities of α -chymotrypsin gelatin hydrolysate according to various concentrations (2, 4, and 10 mg/ml). The value of IC₅₀ was expressed as the concentration of α -chymotrypsin gelatin hydrolysate inhibiting the 50% of hydroxyl radical. The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

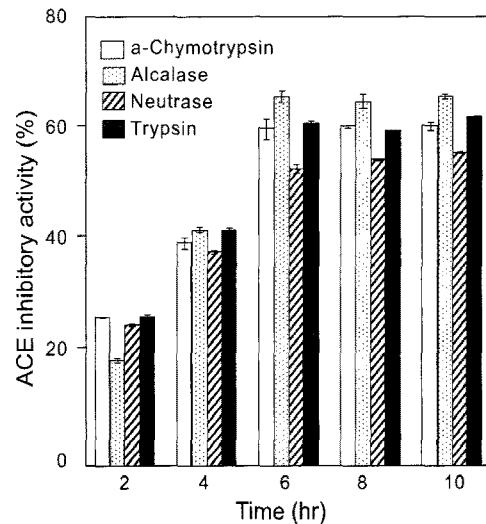


Fig. 6. ACE inhibitory activities of the enzymatic gelatin hydrolysates (1mg/mL). The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

지의 연구결과에서 보면, 옥돔 비늘 유래 젤라틴의 가수분해는 활성산소종의 소거활성과 매우 밀접한 관계에 있다는 것을 알 수 있다. 즉, 활성산소종의 소거활성 패턴이 젤라틴의 가수분해시간에 따른 가수분해물의 패턴과 유사한 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 효소 종류에 따른 가수분해도의 변화는 DPPH 라디칼과 과산화수소에 대한 소거활성과는 연관이 없는 것으로 여겨진다. 이 결과로부터 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물이 항산화 활성을 가진다는 것을 확인하였고, 효소나 시간에 따라 활성산소종에 대한 각기 다른 소거활성을 보일 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 비록 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물이 항산화 활성을 나타내고 있지만, IC₅₀ 값에서 알 수 있듯이 그 활성이 높은 편은 아니기 때문에 항산화제의 원료로서의 이용에 효과적이지 못할 것으로 판단된다.

옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물의 ACE 저해 효과

4종의 각기 다른 단백질 가수분해효소 (α -chymotrypsin, Alcalase, Neutrased 및 trypsin)를 이용하여 제조한 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 ACE의 저해활성을 측정하여 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 다양한 효소와 가수분해시간에 따라 제조된 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물들은 ACE 활성을 명확히 저해시킨다는 것으로 나타났다. 특히, 다른 효소에 비하여 Alcalase를 이용하여 제조된 젤라틴 가수분해물이 높은 ACE 저해작용을 가진다는 것으로 확인되었다. 옥돔 비늘 젤라틴 유래 가수분해물의 ACE 저해 패턴도 항산화 활성과 마찬가지로 가수분해시간과의 밀접한 연관성을 보여주고 있다. 이러한 결과로 볼 때, 옥돔 비늘이 일정한 분자량 이하로 분해되어야만 여러 가지 생리활성을 가지는 것으로 판단된다.

Alcalase에 따른 젤라틴 가수분해물의 최적 가수분해 조건과 ACE 저해활성

가장 높은 ACE 저해활성을 보인 Alcalase 젤라틴 가수분해물의 최적 가수분해 조건을 확인하기 위해, 기질 대 효소비와 기질농도에 따른 다양한 조건으로 실험을 수행하였다. 먼저, Alcalase 젤라틴 가수분해물을 가지고 기질 대 효소비를 10, 20, 50, 100, 200, 500 (wt/wt)으로 하여 가수분해도를 측정한다.

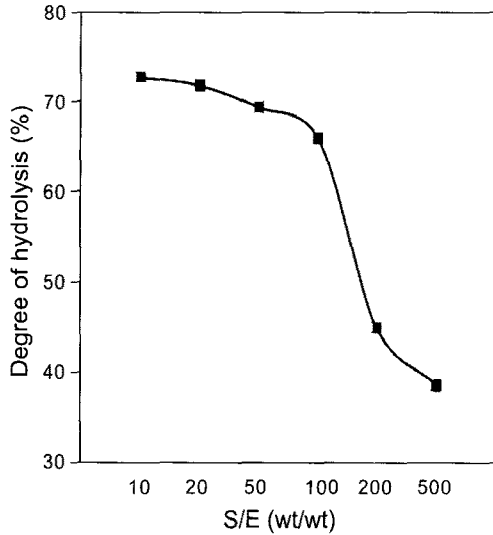


Fig. 7. Comparison of hydrolysis degrees of Alcalase gelatin hydrolysates according to various substrate/enzyme ratios. The hydrolysis degree of Alcalase gelatin hydrolysates were determined by various substrate/enzyme ratios (10, 20, 50, 100, 200, and 500 wt/wt) with 3% substrate (wt/vol) in pH 8.0 at 50°C for 6 hr. The results are mean of three replicates ± standard error (SE).

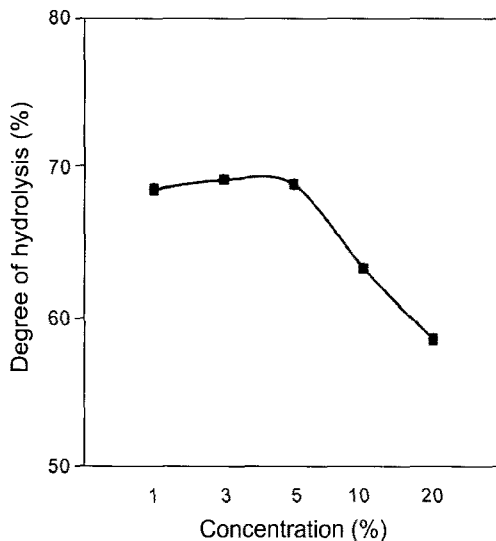


Fig. 8. Comparison of hydrolysis degrees of Alcalase gelatin hydrolysates (substrate/enzyme ratio; 100 wt/wt) according to various substrate concentrations. The hydrolysis degrees of Alcalase gelatin hydrolysates prepared by 100 wt/wt of substrate/enzyme ratio were determined according to various substrate concentrations (1, 3, 5, 10, and 20%)(wt/vol) in pH 8.0 at 50°C for 6 hr.. The results are mean of three replicates ± standard error (SE).

결과, Fig. 7에서 나타난 것과 같이 옥돔 비늘 유래 젤라틴 대 효소의 비가 감소할 수록, 즉 효소의 농도가 증가할 수록 높은 가수분해도를 나타내었다. 또한, 젤라틴 대 효소의 비율이 10부터 100 (wt/wt)까지 증가하면서 가수분해도가 60% 이상을 보이며 높게 나타났고, 200 (wt/wt)부터는 가수분해도가 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로 보아 다양한 기질 대 효소비 중, 기질 대 효소비 100 (wt/wt)이 가수분해도에 대한 가장 우수한 효율성을 보인다는 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 옥돔 비늘 유래 젤라틴을 100(wt/wt)에서 기질농도를 1%, 3%, 5%, 10%, 20%로 각각 조절하여 다음 실험을 수행하였다. 그 결과, Fig. 8에서 나타난 것처럼 기질의 농도가 낮을수록 가수분해도는 증가하였지만, 기질 농도가 5% 이하 일때는 거의 유사한 가수분해도를 보여 대량 생산 측면을 고려해 볼 때, 기질 농도 5%가 가장 적당한 것으로 판단된다.

지금까지의 결과로부터 옥돔 비늘 유래의 젤라틴으로부터 다양한 효소를 이용하여 시간, 기질 대 효소 비, 기질 양에 따른 다양한 조건하에서 가수분해를 수행하였다. 그것으로부터 Alcalase를 이용하여 pH 8.0, 50°C, 6 hr, 기질 대 효소비는 100 (wt/wt) 및 기질 농도는 5%의 조건으로 가수분해 한 경우, 가장 높은 가수분해도를 확인하였고, 이것이 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 제조를 위한 최적 조건임을 확인할 수 있었다.

옥돔 비늘 유래 젤라틴의 최적가수분해조건에서 제조한 젤라틴 가수분해물로 다양한 농도별 (0.25, 0.5 및 1 mg/mL)로 ACE 저해활성을 측정된 결과, 농도 의존적으로 ACE의 활성을 약 60%까지 억제하였고, 그것의 IC₅₀ 값이 0.73 mg/mL인 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 9). 이것은 흥미롭게도 ACE에 대한 저해활성 패턴이 젤라틴 가수분해물의 제조를 위한 가수

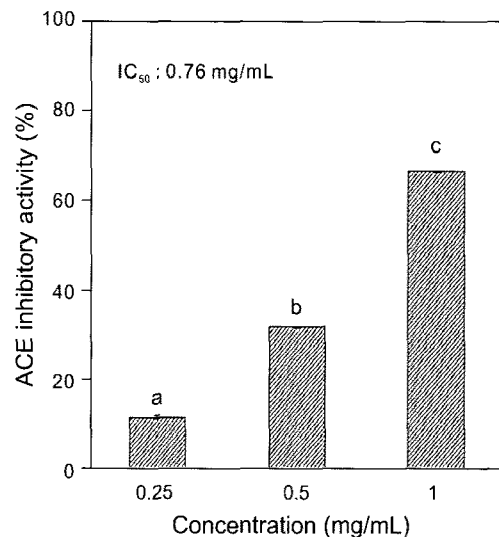


Fig. 9. ACE inhibitory activities of Alcalase gelatin hydrolysate according to various concentrations (2, 4, and 10 mg/ml). The value of IC₅₀ was expressed as the concentration of Alcalase gelatin hydrolysate inhibiting the 50% of ACE. The results are mean of three replicates ± standard error (SE).

분해시간에 따른 가수분해율의 패턴과 유사하였다. 즉, 앞에서 제시된 것처럼 가수분해 시간이 2시간부터 6시간까지 증가하면서 젤라틴 가수분해물의 가수분해도가 증가하였고, 그 뒤에는 더 이상 증가하지 않았는데, 이것은 ACE에 대한 저해 활성과 일치하였다. 뿐만 아니라, 가장 높은 가수분해도를 보인 Alcalase 젤라틴 가수분해물이 가장 높은 ACE 저해 활성을 보였다. 이 결과로부터 우리는 Alcalase의 높은 가수분해능력이 젤라틴을 다양한 펩티드로 가수분해함에 따라 ACE 저해 작용이 크게 나타나는 것으로 여겨진다. 또한, 우리는 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물이 ACE 저해 활성을 가짐으로써 새로운 항고혈압제의 원료로서 가치를 가질 수 있다는 것을 확인하였다.

고 찰

우리나라에서 수산물용 그 기능성을 인정받으며 그 수요가 점차 증가하는 추세이다. 1990년부터 2005년까지 연간 수산물 소비량은 400만톤 미만이었으나, 2006년에는 404만톤을 기록했는데, 이는 2001년에 비해 23.0% 증가하였으며, 우리 국민의 어패류 선호도의 증가 추세에 발맞추어 수산가공공장의 가공율은 매년 증가하여 총 공급량의 85%이상을 차지함으로써 상대적으로 어체가공잔사, 어뼈, 어피, 어두, 내장, 비늘 등과 같은 수산가공 부산물의 양도 증가하고 있는 실정이다.

제주의 특산품인 옥돔 역시 마찬가지로서 매년 늘어나는 수요로 인하여 옥돔의 가공과정에서 나오는 수산가공 부산물 또한 대량으로 발생하고 있다. 지금까지 이러한 수산가공 부산물이 수산폐기물로서 버려지고 있어 그 처리비용 또한 많이 들고 있는 실정이다.

따라서, 이 연구에서 옥돔의 비늘로부터 젤라틴을 제조한 후, 젤라틴의 체내 흡수율을 증가시키기 위해, 단백질 가수분해 효소의 가수분해능력을 이용하여 효소별, 시간대별 젤라틴 가수분해물을 제조하여 최적 추출조건을 알아보았고, 그렇게 추출된 젤라틴 가수분해물이 항산화나 항고혈압 활성을 가진다는 것을 알게 되었다.

이전 연구논문들은 어류의 살이나 비늘성분, 혹은 포유동물의 껍질로부터 다양한 젤라틴이나 젤라틴 펩티드들을 분리, 추출하였고, 그에 따른 추출효율을 높이고자 노력하여 왔다 (Bowes et al., 1955; Cho et al., 2005; Sobral and Habitate 2001; Gudmundsson and Hafsteinsson 1997; Jamilah and Harvinder 2002; Cho et al., 2006). 최근 들어, 효소적 추출기법은 수용성의 성분들을 효율적으로 추출하고, 환경적으로 유익하며, 비용이 적게 들고, 특히 상당한 추출효율의 증대를 얻을 수 있는 장점을 가짐으로써, 다양한 분야에서 이용되고 있다 (Heo et al., 2003; Ahn et al., 2008; Athukorala et al., 2006; Yamaguchi et al., 1979; Kim et al., 1996 and 2001, Shahidi et al., 2001). 이 연구에서도 우리는 옥돔 비늘 유래의 젤라틴 가수분해물의 제조를 위해 Alcalase를 이용하는 경우, 높은 가수분해도를 가짐으로써 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 제조를 위한 효율적인 효소이며, 효소적 추출기법이 유용하다는 것을 확인할 수 있었다.

대기 중에 존재하는 산소는 식품 또는 동물의 세포등과 같은 여러 유기물질에 대해 산화반응을 유발시켜 많은 부작용을 나타내게 된다. 이러한 작용은 산소에서 유래되는 superoxide anion, hydroxyl 및 DPPH 라디칼, singlet oxygen 및 H₂O₂와 같은 활성산소종 등이 세포막에 존재하는 지질과 결합하여 과산화물을 만듦으로 인해 진행되게 되는데, 이들의 연속반응에 의하여 alcohol류, aldehyde류, ketone류 등을 생성함으로써 생체 내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발할 뿐만 아니라, 세포노화, 세포막 분해, 지방산화 등 심각한 생리적인 장애를 일으킨다 (Kovatcheva et al., 2001; Ruberto et al., 2001). 이 중 특히 DPPH는 가장 안정한 free radical로서 천연물의 항산화실험에 가장 많이 사용되고 있고, 과산화수소는 체내 각 기관들의 DNA에 심각한 손상을 일으켜 각종 질병과 노화를 유발한다고 알려져 있다 (Park et al., 2002). 이에 따라 지금까지 많은 연구자들이 항산화 활성을 연구하고 있으며, 많은 보고가 이루어지고 있다. 대두단백질을 각종 효소로 가수분해 하였을 때, 가수분해율이 6~9%의 펩티드에서 높은 항산화 활성을 나타내었다고 보고되었으며 (Yamaguchi et al., 1979), 채소골격 근육조직에서 발견되는 dipeptide인 anserine (β -alanyl-L-methylhistidine)과 carnosine (β -alanyl-methylhistidine)이 항산화 활성이 우수하다고 보고 (Kohen et al., 1988) 되었다. 어피 유래 젤라틴의 경우도 가자미피 젤라틴의 가수분해물의 항산화 활성이 다른 천연 유래의 항산화제인 α -tocopherol보다 10% 정도 높은 항산화력을 보였다는 연구 결과가 발표되어 왔다 (Kim et al., 1996). 뿐만 아니라, 일반적으로 Ala를 N말단으로 하는 9종류의 dipeptide 중, Met, Trp, His, Tyr을 다량 함유한 펩티드일 수록 항산화 활성이 높다는 연구 결과가 보고되어진 바 있다 (Kim et al., 1996). 이번 연구로부터, 효소에 의해 제조된 옥돔 비늘 유래의 젤라틴 가수분해물이 DPPH와 과산화수소와 같은 활성산소종을 억제하여 항산화 활성을 가진다는 것을 제시하였다. 그러나, 이전 연구들의 젤라틴 펩티드의 항산화 활성과 비교하였을 때, 다소 낮은 항산화 활성을 보인다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이것은 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물이 가지는 펩티드의 성분에 따른 조건이 항산화 활성이 높다고 알려진 펩티드와는 다름으로써 항산화 활성이 다소 낮을 수 있는 것으로 여겨진다.

고혈압은 그 자체만으로는 뚜렷한 증상이 나타나지 않아 무시하기 쉬운 상태이거나, 혈압이 높더라도 증상이 없는 사람이 대부분이다. 하지만 고혈압은 뇌졸중, 뇌출혈, 동맥경화, 심근경색증, 협심증 등과 같은 심혈관 및 순환계 계통 합병증의 중요 원인인자로 알려져 있어서 이러한 성인병 치료의 일환으로 새로운 고혈압 치료제의 개발을 위한 연구가 계속적으로 진행되고 있다 (Giles et al., 1997; Oh et al., 1997). 이러한 고혈압의 발생기전을 살펴보면 대부분이 ACE에 의해 일어나는 것으로 알려져 있는데, 각 연구에서 목표로 하는 항고혈압제 즉, ACE저해제는 ACE의 작용을 저해함으로써 angiotensin II의 생성저해, aldosterone 분비 감소, 혈관확장제인 bradkinin의 증가 등의 과정을 통해 신장혈관을 확장시켜 sodium의 배설을 촉진함으로써 혈압을 낮추어 줄 수 있다

(Oh et al., 1997). 따라서, 많은 연구자들은 단백질 분해효소로 가수분해된 젤라틴과 그 가수분해물, 펩티드들이 ACE활성을 저해시킨다고 보고하여 왔다. 또한, ACE 활성을 억제하는 펩티드의 경우 C말단에 Proline과 방향족 아미노산 (Tryptophan, Tyrosine, Phenylalanine) 등의 잔기를 주로 함유하고 있고, 그것이 주요 활성 성분이라는 것을 보고 (Cheung et al., 1980)하였다. 우리의 결과는 홍미롭게도 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물이 상당히 높은 ACE 저해 활성을 보인다는 것을 제시하였다. 이것은 아마도 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물이 효소적 가수분해능력에 의해 제조됨으로서 보다 더 효율적으로 펩티드로 전환되어지고, 또한 그 성분이 C말단에 Proline과 방향족 아미노산 (Tryptophan, Tyrosine, Phenylalanine) 등의 잔기를 주로 함유하고 있다는 것을 제시해주었다.

따라서, 이 연구를 통해 수산가공과정을 거쳐 폐기물로 버려지고 있던 제주산 옥돔 비늘 유래 젤라틴의 효소적 가수분해물이 항고혈압 활성과 같은 기능성이 높아 이 분야에서의 기능성 식품 소재로서 충분한 가치가 있다고 사료되어 좀 더 체계적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

- Jeju Special Self-Governing Province Office of Fisheries policy. 2008. The trend of marine products. Retrieved from <http://www.jeju.go.kr/contents/depart.php?depart=51&siluk=15&mid=08>.
- Ahn G, Hwang IS, Park EJ, Kim JH, Jeon YJ and Jee YH. 2008. Immunomodulatory effects of an enzymatic extract from *Ecklonia cava* on murine splenocytes. *Mar Biotechnol* 10, 278-289.
- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. 14th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC., p. 31.
- Athukorala Y, Jung WK, Vasanthan T and Jeon YJ. 2006. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydr Polym* 66, 184-191.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26, 1199-1200.
- Bowes JH, Elliott RG and Moss JA. 1955. The composition of collagen and acidsoluble collagen of bovine skin. *Biochem J* 61, 143-150.
- Cheung HS, Wang FI, Ondetti MA, Sabo EF and Cushman DW. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J Biol Chem* 225, 401-407.
- Cho SM, Gu YS and Kim SB. 2005. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 19, 221-229.
- Duncan DB. 1955. Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics* 11, 1-42.
- Giles TD. 1997. Lipid factors in the hypertension syndrome. *J Cardiovas Risk* 4, 257-259.
- Gudmundsson M and Hafsteinnsson H. 1997. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *J Food Sci* 62, 37-39.
- Hamada M and Kumagai H. 1988. Chemical composition of sardine scale. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 1987.
- Hao S, Li L, Yang X, Cen J, Shi H, Bo Q and He J. 2009. The characteristics of gelatin extracted from sturgeon (*Acipenser baeri*) skin using various pretreatments. *Food Chem* 115, 124-128.
- Heo SJ, Jeon YJ, Lee JS, Kim HT and Lee KW. 2003. Antioxidant effect of enzymatic hydrolyzate from a kelp, *Ecklonia cava*. *Algae* 18, 341-347.
- Hoyle NT and Merritt JH. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from Herring. (*Clupea harengus*). *J Food Sci* 59, 76-79.
- Jamilah B and Harvinder KG. 2002. Properties of gelatins from skins of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chem* 77, 81-84.
- Johnston-Banks FA. 1990. Gelatin. In: Harris, P. (Ed.), *Food Gels*. Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 233-289.
- Khantaphant S and Benjakul S. 2008. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151, 410-419.
- Kim SK, Lee HC, Byun HG and Jeon YJ. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J Korean Fish Soc* 29, 246-255.
- Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS and Shahidi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J Agric Food Chem* 49, 1984-1989.
- Kim JS, Kim JG, Cho SY, Kang KS, Ha JH and Lee EH. 1993. The suitable processing condition for gelatin preparation from yellowfin sole skin. *Korean J Food Sci Technol* 25, 716-723.
- Kim JS and Oh KS. 1999. Preparation of conger eel skin gelatin by precipitation with ethanol and its properties. *J Ins Marine Industry* 12, 51-57.

- Kim JS, Kim JG and Cho SY. 1997. Screening for the raw Material of gelatin from the skins of some pelagic fishes and squid. *J Korean Fish Soc* 30, 55-61.
- Kovatcheva EG, Koleva II, Ilieva M, Pavlov A, Mincheva M and Konushlieva M. 2001. Antioxidant activity of extracts from *Lavandula vera* MM cell culture. *Food Chem* 7, 1069-1077.
- Kohen RY, Yamamoto Y, Cundy KC and Ames BN. 1988. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscles and brain. *Proc Nat Acad Sci USA* 85, 3175-3179.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Mark EM and Steart GF. 1957. *Advances in Food research*, Academic press, London, Ed., III, 235.
- Müller HE. 1995. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS peroxidase medium. *Zentralbl Bakterio. Mikrobio Hyg* 259, 151-158.
- Oh SJ, Kim SH, Kim SK, Baek YJ and Cho KH. 1997. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the K-casein fragments hydrolyzated by chymosin, pepsin, and trypsin. *Korean J Food Sci Technol* 29, 1316-1318.
- Park EJ and Kang MH. 2002. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *Kor J Nutr* 35, 213-222.
- Rahman MS, Al-Saidi GS and Guizani N. 2008. Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. *Food Chem* 108, 472-481.
- Ruberto G, Baratta MT, Biondi DM and Amico V. 2001. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *J Appl Phycol* 13, 403-407.
- Shahidi F and Kamil YVA. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 12, 435-464.
- Sobral PJA and Habitante AMQB. 2001. Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocolloids* 15, 377-382.
- Songchotikunpan P, Tattiyakul J and Supaphol P. 2008. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *Int J Biol Macromol* 42, 247 - 255
- Ward AG and Counts A. 1977. *The science and technology of gelatin*. Academic press, London, p. 188.
- Yamaguchi N, Yokoo Y and Fujimaki M. 1979. Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaish* 26, 65-70.

2009년 9월 14일 접수

2009년 9월 21일 수정

2009년 10월 26일 수리