

## 단백질 분해 효소 처리가 청국장의 항산화 활성에 미치는 영향 - 연구노트 -

박민경

청운대학교 식품영양학과

### Effect of Enzymatic Hydrolysis by Proteases on Antioxidant Activity of *Chungkukjang*

Min-Kyung Park

Dept. of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Chungnam 350-701, Korea

#### Abstract

*Chungkukjang* and soybean powder were enzymatically hydrolyzed with 20, 100 and 500 mAU of 3 commercially available proteases (alcalase 2.4L, protamex and neutrase 0.8L) at 50°C for 120 min. The degree of hydrolysis and antioxidant activities of hydrolysates were comparably evaluated. Alcalase and protamex yielded higher content of peptide compared to neutrase in both *Chungkukjang* and soybean powder hydrolyzed samples. Both *Chungkukjang* and soybean hydrolysates showed also greater increases of antioxidant activities compared to those prepared with neutrase. The rates of increment of DPPH, ABTS and hydroxyl radical scavenging activities were similar between *Chungkukjang* and soybean powder hydrolyzates. These results show that alcalase and protamex are not specific for *Chungkukjang* but enhance its antioxidant activity.

**Key words:** *Chungkukjang*, soybean powder, alcalase, protamex, neutrase, peptide, antioxidant activity

#### 서론

최근 식품 단백질 유래 펩타이드의 다양한 생리활성에 관한 연구가 주목받고 있으며 유제품에서 최초로 언급된 항고혈압 물질인 angiotensin I 전환효소(angiotensin converting enzyme, ACE) 저해 펩타이드는 가장 많이 연구된 생리활성 펩타이드 중 하나로(1) 된장(2-4), 청국장(5,6), 간장(7) 및 natto(8) 등에서도 분리되어 대두 발효식품의 건강기능성이 주목 받도록 한 요인이다.

또한 다양한 효소처리에 의해 생성된 펩타이드가 심혈관 질환 관련 요인에 미치는 영향이 많은 연구자에 의해 발표되었다. Zhong 등은 상업용 단백질 분해효소인 alcalase 처리 대두 가수분해물이 소화효소인 pepsin 및 pancreatin에도 안정하며 콜레스테롤의 용해도 저해를 통해 장에서의 흡수를 방해하므로 혈청 low density lipoprotein(LDL)-콜레스테롤과 very low density lipoprotein(VLDL)-콜레스테롤을 저하시킨다고 보고하였으며(9), 활성 펩타이드를 분리, 동정하였다(10). Wu와 Ding(11)도 alcalase를 이용하여 대두로부터 ACE 저해 펩타이드를 분리, 동정하고 소화효소에 대한 안정성을 보고하였으며, Chiang 등(12)은 분리대두단백으로부터 ACE 저해 펩타이드 활성이 높은 가수분해물 생산에 가장 효율적인 효소종류 및 반응조건 등을 보고하였다. Ringseis

등(13)은 pepsin, trypsin, chymotrypsin 등의 효소처리로 얻은 대두 가수분해물이 인체 동맥내피세포의 증식 및 nitric oxide(NO), prostaglandin I<sub>2</sub> 등의 분비에 영향을 미치는 것으로 보고하였으며, NO 및 eicosanoids의 비정상적인 분비는 혈관손상 및 동맥경화를 유발하는 것으로 알려져 있다(14,15).

식품단백질 유래 펩타이드의 항산화 기능 또한 중요 생리활성으로 활발히 연구되고 있으며 casein(16), 유청(17), 난백(18), 난황(19)을 비롯하여 대두(20-22)의 효소분해를 통해 얻어진 펩타이드의 항산화 활성이 보고되었다. 펩타이드의 항산화 활성은 특정 아미노산 서열과 관련이 있으며(16), Chen 등(20)은 대두 단백질 가수분해물로부터 분리한 펩타이드를 이용하여 proline-histidine-histidine이 높은 항산화 활성을 나타낸다고 밝혔다.

지금까지 대두 펩타이드에 관한 연구는 주로 분리대두단백을 통해 이루어졌으며, Gibbs 등(23)이 natto 및 temphe를 가수분해하여 얻은 펩타이드의 생리활성을 보고한 바 있으나 발효 대두를 이용한 연구는 미미한 상태이다. 대두 단백질의 효소 가수분해율은 동일 효소에 의해서도 전처리 조건에 의해 달라질 수 있는데(24) 발효로 인한 대두 단백질의 변화 또한 단백질 분해효소 활성에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 청국장을 alcalase, protamex 및

neutrased 등 상업용 단백분해효소로 가수분해하고 펩타이드 생성 및 항산화 활성을 측정한 후 대두분말과 비교하여 차이가 있는지 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

청국장 시료는 발효 후 열풍건조하여 분쇄한 분말을 맛가 마식품(충남 논산)에서 구입하여 사용하였다. 대두분말은 대두(*Glycine max*(L.) Merrill)를 분쇄기(GFM-S401, LG, Seoul, Korea)를 이용하여 분쇄한 것으로 하였으며 두 시료 모두 체(140 mesh)로 친 후 실험에 사용하였다.

Alcalase 2.4L(2.4 AU/g), protamex(1.5 AU/g), neutrased 0.8L(0.8 AU/g)은 Novozymes A/S(Bagsvaerd, Denmark), 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS), L-leucine, luminol, 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH), 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS), microperoxidase-8(MP-8), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 및 ascorbic acid는 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며 기타 시약은 일반 특급시약을 사용하였다.

### 효소처리

청국장 및 대두분말 5% 수용액을 95°C에서 20분간 살균한 후 상온에서 냉각하고 반응액으로 사용하였다. 반응액의 pH는 6.8~7.0 사이로 실험에 사용한 세 효소의 적정 pH 범위에 해당되므로 pH 보정 없이 alcalase, protamex 및 neutrased를 각각 20 mAU, 100 mAU 및 500 mAU가 되도록 첨가하고 진탕배양기(SJ808H, Sejong, Seoul, Korea)를 이용하여 온도 50°C, 회전속도 80 rpm의 조건에서 10분, 20분, 30분, 60분 및 120분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 끓는 물에 10분 가열하여 효소를 불활성화하고 원심분리기(Union 32R, Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 2,322×g로 20분 원심분리한 후 상등액을 취하여 펩타이드 생성정도 및 항산화 활성 측정의 시료로 사용하였다. 대조구는 효소를 첨가하지 않고 살균 후 120분간 동일한 진탕과정을 진행한 시료로 하였다.

### 펩타이드 생성 측정

펩타이드의 측정은 TNBS 법으로 측정하였다(25). 즉, 효소처리가 끝나면 원심분리하고 상등액 1 mL에 1%(w/v) SDS 용액 9 mL를 혼합한 후 125 μL를 취하여 1 mL의 phosphate buffer(0.2125 M, pH 8.2)와 1 mL의 0.1% TNBS(w/v) 수용액을 첨가하였다. 교반한 후 50°C 수욕조에서 빛을 차단하고 1시간 반응시킨 후 2 mL의 0.1 N HCl을 첨가하여 반응을 종료하였다. 상온에서 30분 냉각한 후 반응액 200 μL를 취하고 분광광도계(Microplate reader, VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-Leucine을 표준물질로 사용하여 펩타이드 생성정도를 계산하였다.

### 항산화 활성

DPPH radical 소거활성은 건조 고형분 함유량이 0.6~9 mg/mL이 되도록 희석한 시료액 0.5 mL을 0.2 mM DPPH 에탄올 용액 1 mL와 혼합하고 30분간 상온에서 방치한 후 분광광도계를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하여 알아보았다(26).

ABTS radical 소거활성은 Arnao 등(27)과 Obon 등(28)의 방법을 응용하여 측정하였다. 즉, 2 mM ABTS, 0.2 mM MP-8 및 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 함유한 1 mL의 PBS(potassium phosphate-buffered saline, 0.1 M, pH 7.4)와 건조 고형분 함유량이 1~5 mg/mL 되도록 희석한 시료액 0.1 mL을 혼합하고 상온에서 6분간 방치한 후 735 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hydroxyl radical(OH·) 소거활성은 Fenton 반응에 의해 OH·를 생성하고 luminol을 발광증폭제로 사용하여 화학발광법(Chemiluminescence)으로 측정하였다(29,30). 즉, 건조 고형분 함유량이 0.4~2 mg/mL 되도록 희석한 시료액 50 μL와 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μL를 96-well microplate에 넣고 화학발광기(Microtiterplate Luminometer, EG&G Berthold LB96P, Bad Wildbad, Germany)에 장착한 후 자동주입기를 통해 10 mM luminol 100 μL를 자동주입 하였다. 5초 후 1 mM FeSO<sub>4</sub> 50 μL를 자동주입 하고 30초간 화학발광 정도를 측정하였다.

시료의 항산화 활성 즉 DPPH, ABTS 및 hydroxyl radical 소거활성은 vitamin C를 표준물질로 이용하여 환산하고 vit. C eq μM/mg으로 표시하였다.

### 통계처리

결과는 평균±SD로 표시하였으며, 통계적 유의성은 Student's *t*-test 및 ANOVA 실시 후 Tukey's test로 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 펩타이드 생성

효소첨가를 제외한 나머지 실험조건을 동일하게 하여 추출한 청국장 건조분말과 대두분말의 펩타이드 평균함량은 각각 7.02±0.72 및 5.64±0.68 mM로(0 min) 청국장이 유의적으로 높았다(*p*<0.05, Student's *t*-test).

Alcalase는 *Bacillus licheniformis* 유래의 endoproteinase로 20 mAU를 처리한 청국장의 경우 10, 20, 30, 60 및 120분에서 각각 15.32±1.34, 20.77±1.79, 25.69±2.37, 26.42±2.41, 27.18±2.76 mM의 펩타이드 생성을 보였으며, 100 mAU에서는 26.55±2.17, 37.26±3.73, 46.89±4.48, 47.31±4.54, 47.46±4.65 mM 및 500 mAU의 처리에 의해서는 33.77±2.56, 44.54±3.94, 50.78±4.83, 51.67±4.76, 51.34±4.91 mM의 펩타이드 생성을 보였다(Fig. 1).

대두분말은 alcalase 처리 시 20 mAU에서 13.01±1.38,

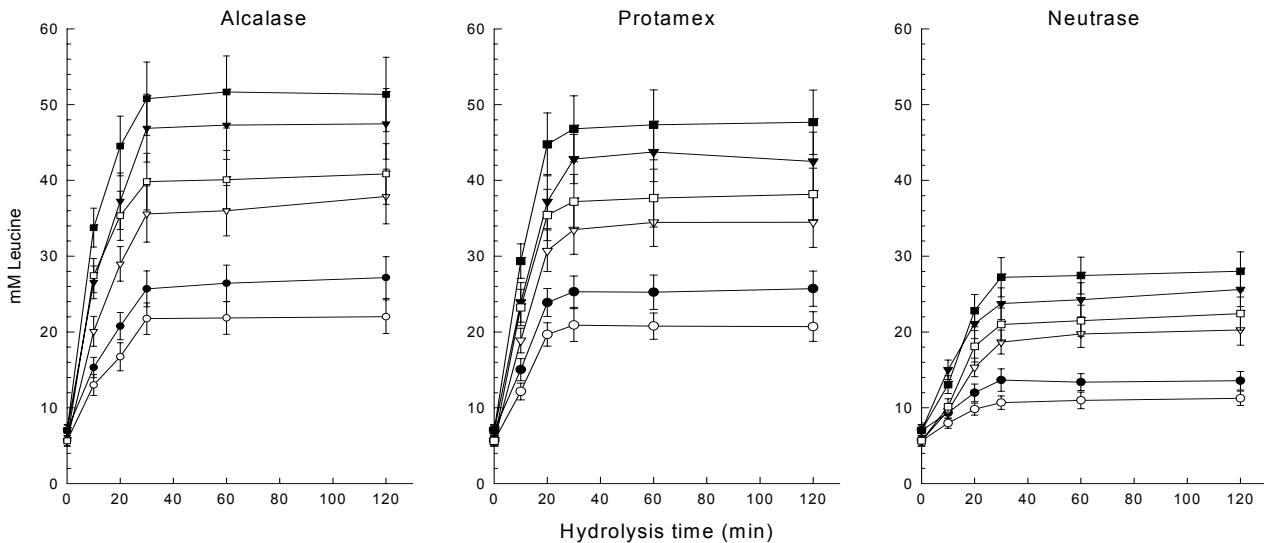


Fig. 1. Peptide contents of *Chungkukjang* (C) and soybean (S) hydrolysates prepared with different concentrations of alcalase, protamex and neutrase. ●, 20 mAU-C; ○, 20 mAU-S; ▼, 100 mAU-C; ▽, 100 mAU-S; ■, 500 mAU-C; □, 500 mAU-S.

16.74±1.85, 21.76±2.09, 22.42±2.15, 21.59±2.22 mM, 100 mAU에서는 20.08±1.98, 28.98±2.28, 35.57±3.71, 36.01±3.32, 37.88±3.61 mM 및 500 mAU의 처리에 의해서는 27.44±2.26, 35.34±3.24, 39.85±3.73, 40.11±3.85, 40.85±4.01 mM의 펩타이드 생성을 보였다. 즉, 청국장 및 대두분말 두 시료 모두에서 효소량이 증가함에 따라 펩타이드 생성량이 증가하였으며 10분 및 20분에 급격히 증가하여 30분 이후 최대에 이르렀으며 이는 alcalase를 사용하여 분리대두단백(24) 및 탈지대두(31)를 분해한 연구보고와 유사하였다.

Protamex는 *Bacillus protease complex*로 청국장의 경우 20 mAU 처리 시 10, 20, 30, 60 및 120분에서 각각 15.03±1.26, 23.89±1.85, 25.31±2.07, 25.24±2.27, 25.72±2.31 mM, 100 mAU에서는 23.92±2.61, 37.20±3.58, 39.98±3.25, 40.62±3.91, 40.75±3.85 mM 및 500 mAU의 처리에 의해서는 29.36±2.26, 44.75±4.54, 45.81±4.35, 45.96±4.16, 45.65±4.24 mM로 alcalase와 유사한 결과를 보였다(Fig. 1).

대두분말을 protamex 처리 시 20 mAU에서 12.15±1.01, 19.67±1.54, 20.91±2.17, 20.78±1.73, 20.71±1.95 mM, 100 mAU에서는 18.88±1.63, 30.72±2.74, 33.50±3.25, 34.47±3.49, 34.51±3.61 mM 및 500 mAU의 처리에 의해서는 24.24±2.40, 35.43±3.39, 36.79±3.18, 35.90±3.28, 36.65±3.45 mM의 펩타이드 생성을 보였다.

Neutrase는 *Bacillus amyloliquefaciens*로부터 얻어진 endoproteinase이며, 20 mAU 처리 시 10, 20, 30, 60 및 120분에서 청국장의 경우 각각 9.34±1.02, 11.98±1.16, 13.66±1.47, 13.39±1.11, 13.57±1.23 mM, 100 mAU에서는 15.01±1.29, 21.09±1.96, 23.74±2.09, 24.25±2.24, 25.61±2.26 mM 및 500 mAU의 처리에 의해서는 13.05±1.17, 22.82±2.14, 27.23±2.59, 27.45±2.43, 28.01±2.56 mM의 펩타이드 생성을 보였다.

대두분말은 20 mAU에서 7.97±0.66, 9.82±0.79, 10.69±0.89, 10.98±1.11, 11.25±0.95 mM, 100 mAU에서는 9.61±0.97, 15.33±1.23, 17.62±1.57, 17.73±1.79, 17.82±2.02 mM 및 500 mAU의 처리에 의해서는 10.14±1.05, 18.11±2.07, 20.99±2.18, 21.49±2.05, 22.43±2.19 mM로 효소 첨가량이 증가함에 따라 펩타이드의 생성량이 증가하였으나 alcalase 및 protamex 처리와 비교하여 청국장 및 대두분말 모두에서 펩타이드 생성량이 낮은 것으로 나타났다(Fig. 1).

분리대두단백, β-conglycinin 및 탈지대두 등을 효소분해한 연구보고에 의하면 효소의 종류에 따라 가수분해율에 차이가 있는 것으로 알려졌다(21,24,31). 또한 시료의 가열 전 처리가 효소 가수분해율에 영향을 주어 alcalase의 경우 분해율이 낮아지는 반면 protamex는 증가하는 등 동일효소의 작용이 전처리 조건에 의해 달라질 수 있는 것으로 보고되었다(24). 본 연구의 결과에서도 alcalase 및 protamex가 neutrase와 비교하여 펩타이드 생성량이 높아 효소에 의한 차이가 있음을 보여주고 있다. 반면 청국장과 대두분말 두 시료 모두에서 효소처리하지 않은 대조구(0 min) 대비 펩타이드 증가율이 유사한 것으로 미루어 본 연구조건에서는 가열 및 발효 등 청국장 제조공정에 의한 시료의 변화가 효소 분해에 유의한 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

#### 항산화 활성

청국장 및 대두분말 효소분해물의 항산화 활성은 DPPH, ABTS 및 hydroxyl radical 소거활성 정도를 통해 알아보았으며 통계적 유의성은 효소처리를 하지 않은 대조구와 비교하여 95% 유의수준에서 Tukey's test로 검정하였다.

청국장의 DPPH radical 소거활성은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 고형분 0.6, 1.2, 3, 6 및 9 mg/mL에서 효소처리를 하지 않은 대조구는 123.70±7.12, 213.06±15.45, 479.77±39.09,

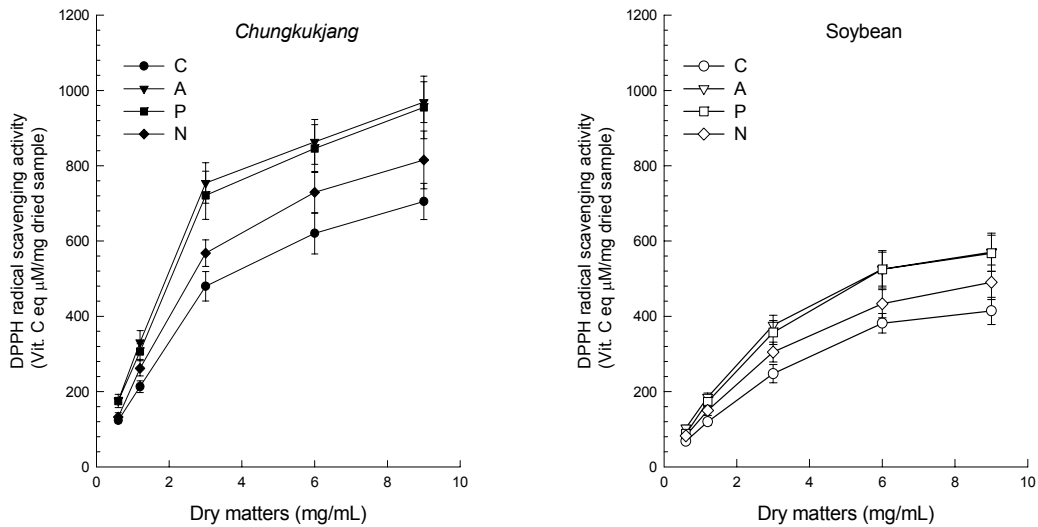


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of *Chungkukjang* and soybean hydrolysates prepared with alcalase (A), protamex (P) and neutrase (N). C: non-enzymatically hydrolyzed sample. The values are means $\pm$ SD, which obtained from alcalase and protamex treatments are significantly different ( $p < 0.05$ ) from the control (C) by Tukey's test.

620.53 $\pm$ 54.80, 705.01 $\pm$ 47.96, alcalase 가수분해물은 176.05 $\pm$ 6.02, 330.88 $\pm$ 31.00, 754.07 $\pm$ 53.75, 863.33 $\pm$ 59.65, 968.93 $\pm$ 54.12 vit. C eq  $\mu$ M로 alcalase 처리구가 대조구와 비교하여 시료량에 따라 약 37~57% 증가하였다( $p < 0.05$ ). Protamex 가수분해물도 175.00 $\pm$ 17.69, 306.26 $\pm$ 20.66, 721.33 $\pm$ 64.03, 845.66 $\pm$ 63.51, 954.00 $\pm$ 83.14 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 시료량에 따라 35~50% 증가하였다( $p < 0.05$ ). 반면 neutrase 가수분해물은 132.25 $\pm$ 11.45, 261.62 $\pm$ 20.13, 567.84 $\pm$ 35.24, 729.30 $\pm$ 55.50, 815.40 $\pm$ 76.66 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).

대두분말의 DPPH radical 소거활성은 대조구가 68.24 $\pm$ 4.01, 119.72 $\pm$ 8.88, 247.47 $\pm$ 24.19, 381.71 $\pm$ 25.93, 414.36 $\pm$ 36.19 vit. C eq  $\mu$ M이며 alcalase 가수분해물은 103.29 $\pm$ 7.51, 185.16 $\pm$ 11.19, 376.42 $\pm$ 26.35, 525.07 $\pm$ 45.03, 570.19 $\pm$ 50.84 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 37~55% 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). Protamex 가수분해물도 87.66 $\pm$ 3.05, 172.49 $\pm$ 11.05, 356.92 $\pm$ 31.95, 524.67 $\pm$ 49.87, 567.44 $\pm$ 47.90 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 시료량에 따라 36~44% 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). Neutrase 가수분해물은 82.41 $\pm$ 6.14, 150.07 $\pm$ 13.36, 305.00 $\pm$ 26.40, 433.33 $\pm$ 37.52, 490.36 $\pm$ 45.94 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).

ABTS radical 소거활성은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 청국장 가수분해물의 경우 시료 건조 고형분 1, 2, 3, 4 및 5 mg에서 대조구가 44.40 $\pm$ 4.06, 102.05 $\pm$ 10.40, 133.38 $\pm$ 9.07, 169.27 $\pm$ 13.19, 185.33 $\pm$ 15.56 vit. C eq  $\mu$ M인 반면 alcalase 가수분해물은 91.59 $\pm$ 6.63, 169.49 $\pm$ 13.94, 231.66 $\pm$ 24.94, 279.66 $\pm$ 24.11, 294.33 $\pm$ 22.50 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 59~106% 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). Protamex 가수분해물도 77.44 $\pm$ 10.75, 165.80 $\pm$ 16.86, 220.72 $\pm$ 18.15,

268.69 $\pm$ 25.90, 289.52 $\pm$ 18.75 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 56~74% 유의적으로 증가하였으나( $p < 0.05$ ), neutrase 가수분해물은 53.00 $\pm$ 5.56, 119.00 $\pm$ 12.77, 157.50 $\pm$ 10.33, 191.01 $\pm$ 13.18, 211.15 $\pm$ 14.02 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).

대두분말 효소분해물의 ABTS radical 소거활성은 대조구가 24.29 $\pm$ 2.06, 49.11 $\pm$ 2.64, 65.00 $\pm$ 5.04, 85.12 $\pm$ 6.14, 96.96 $\pm$ 7.78 vit. C eq  $\mu$ M이며 alcalase 가수분해물은 38.66 $\pm$ 4.16, 84.16 $\pm$ 6.41, 129.54 $\pm$ 9.95, 135.38 $\pm$ 10.07, 146.44 $\pm$ 12.17 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 51~99% 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). Protamex 가수분해물도 40.42 $\pm$ 3.03, 77.41 $\pm$ 6.07, 101.74 $\pm$ 7.69, 128.00 $\pm$ 10.33, 140.43 $\pm$ 10.82 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 44~66% 유의적으로 높았으나( $p < 0.05$ ), neutrase 가수분해물은 27.16 $\pm$ 3.07, 58.87 $\pm$ 5.22, 77.53 $\pm$ 4.84, 98.80 $\pm$ 10.32, 114.53 $\pm$ 12.36 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).

Hydroxyl radical 소거활성은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 청국장 가수분해물의 경우 시료 건조 고형분 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 및 2 mg에서 대조구는 9.53 $\pm$ 1.27, 19.38 $\pm$ 1.59, 28.84 $\pm$ 2.31, 34.90 $\pm$ 2.63, 37.60 $\pm$ 2.44 vit. C eq  $\mu$ M이며 alcalase 가수분해물은 18.52 $\pm$ 1.44, 36.37 $\pm$ 3.20, 50.02 $\pm$ 4.97, 58.17 $\pm$ 4.95, 62.70 $\pm$ 6.04 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 67~94% 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). Protamex 가수분해물도 16.71 $\pm$ 1.34, 30.84 $\pm$ 2.51, 44.75 $\pm$ 3.28, 53.35 $\pm$ 4.21, 57.06 $\pm$ 4.57 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 52~75% 유의적으로 높았으나( $p < 0.05$ ), neutrase 가수분해물은 11.69 $\pm$ 1.04, 23.19 $\pm$ 1.92, 32.57 $\pm$ 2.55, 40.41 $\pm$ 4.06, 42.75 $\pm$ 3.59 vit. C eq  $\mu$ M로 대조구와 비교하여 유의적 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).

대두분말 가수분해물의 hydroxyl radical 소거활성은 대조구가 5.11 $\pm$ 0.71, 11.19 $\pm$ 2.71, 14.63 $\pm$ 3.26, 17.53 $\pm$ 4.06,

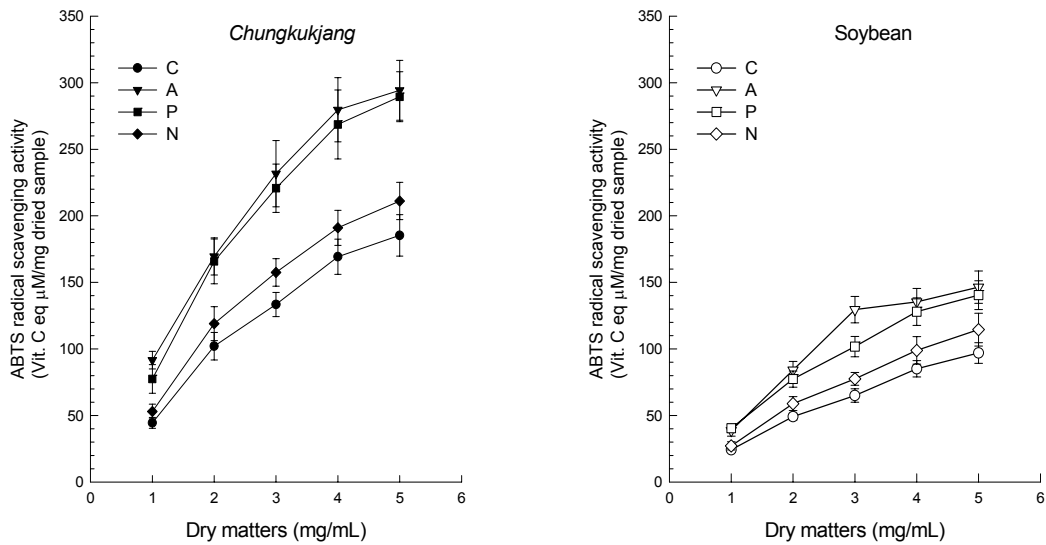


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of *Chungkukjang* and soybean hydrolysates prepared with alcalase (A), protamex (P) and neutrase (N). C: non-enzymatically hydrolyzed sample. The values are means±SD, which obtained from alcalase and protamex treatments are significantly different ( $p<0.05$ ) from the control (C) by Tukey's test.

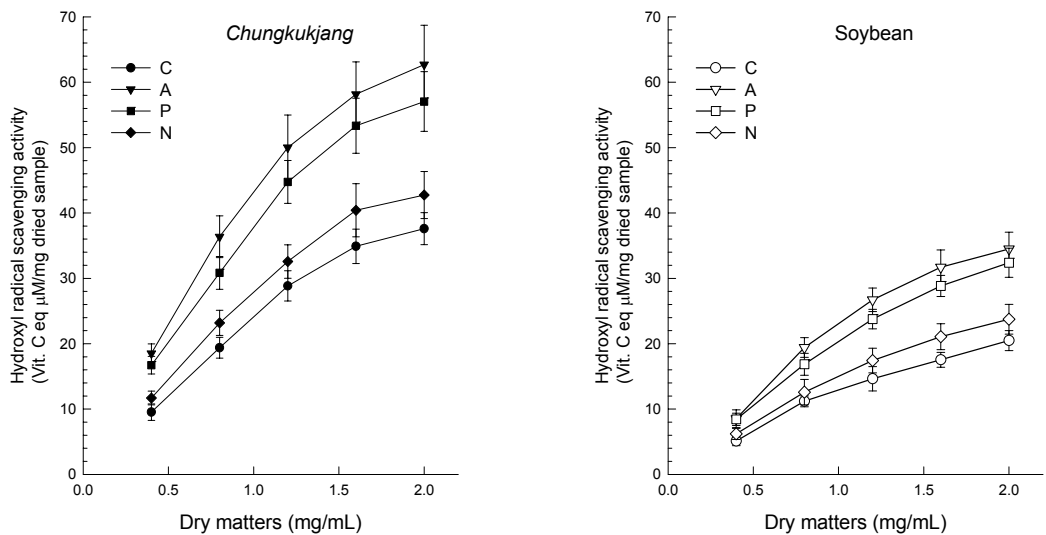


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activity of *Chungkukjang* and soybean hydrolysates prepared with alcalase (A), protamex (P) and neutrase (N). C: non-enzymatically hydrolyzed sample. The values are means±SD, which obtained from alcalase and protamex treatments are significantly different ( $p<0.05$ ) from the control (C) by Tukey's test.

$20.48 \pm 4.59$  vit. C eq  $\mu\text{M}$ , alcalase 가수분해물은  $8.53 \pm 1.36$ ,  $19.42 \pm 1.51$ ,  $26.71 \pm 1.80$ ,  $31.70 \pm 2.65$ ,  $34.49 \pm 2.57$  vit. C eq  $\mu\text{M}$ 로 대조구와 비교하여 67~83% 유의적으로 높았다( $p<0.05$ ). Protamex 가수분해물도  $8.42 \pm 0.94$ ,  $16.85 \pm 1.67$ ,  $23.77 \pm 1.50$ ,  $28.84 \pm 1.61$ ,  $32.39 \pm 2.23$  vit. C eq  $\mu\text{M}$ 로 대조구와 비교하여 51~65% 유의적으로 높았으나( $p<0.05$ ), neutrase 가수분해물은  $6.20 \pm 0.84$ ,  $12.59 \pm 1.96$ ,  $17.42 \pm 1.88$ ,  $21.08 \pm 1.99$ ,  $23.74 \pm 2.28$  vit. C eq  $\mu\text{M}$ 로 대조구와 비교하여 유의한 차이가 없었다( $p>0.05$ ).

이상의 결과는 펩타이드 생성이 상대적으로 높은 alcalase와 protamex 처리 시료가 DPPH, ABTS 및 hydroxyl radical 소거활성이 대조구와 비교하여 유의적으로 증가하는 반면

펩타이드 생성이 적은 neutrase 처리 시료는 유의적 효과가 없으며 항산화 활성의 증가 정도(%)는 대두분말과 청국장 두 시료에서 유사함을 보여주고 있다. 그러나 청국장이 대두분말에 비해 항산화 활성이 높은 것은( $p<0.05$ ) 대조구 비교를 통해 볼 수 있듯이 청국장 자체의 상대적으로 높은 항산화 활성에서 기인한 것으로 보인다.

대두발효식품은 발효하지 않은 콩과 비교하여 항산화 활성이 증가하는데(32,33) 이는 총 폴리페놀 함량 증가(33,34) 및 daidzein과 genestein의 지용성 aglycone 분리 등에 의한 것으로 보고되었으며(35) 발효 중 미생물 효소에 의한 펩타이드 함량 증가도 항산화 활성의 증가에 기여한 것으로 사료된다.

본 연구의 결과는 alcalase와 protamex가 대두분말과 비교하여 청국장에 특이적이지는 않으나 펩타이드 생성을 높여 청국장의 항산화 활성을 더욱 증대시킬 수 있음을 보여주고 있으며 이는 청국장을 이용한 새로운 기능성 가공식품의 개발 등에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 요약

Alcalase, protamex 및 neutrase 효소처리가 청국장의 펩타이드 및 항산화 활성 증가에 미치는 영향을 동일한 조건으로 효소 처리한 대두분말과 비교하였다. 효소 20, 100 및 500 mAU를 50°C에서 120분간 처리한 결과 청국장과 대두분말 모두에서 alcalase 및 protamex에 의한 펩타이드 생성이 neutrase보다 높게 나타났다. 항산화 활성은 청국장의 경우 alcalase 처리에 의해 DPPH, ABTS 및 hydroxyl radical 소거활성이 효소처리를 하지 않은 대조구와 비교하여 시료량에 따라 각각 37~57%, 59~106% 및 67~83%, protamex 처리에 의해 35~50%, 56~74% 및 52~75% 통계적으로 유의하게 증가하였다. 대두분말을 효소 처리한 시료에서도 유사한 결과를 보여 alcalase 처리에 의해 DPPH, ABTS 및 hydroxyl radical 소거활성이 각각 37~55%, 51~99% 및 67~83%, protamex 처리에 의해 36~44%, 44~66% 및 51~65% 증가하였다. 그러나 두 시료 모두에서 neutrase 처리에 의한 항산화 활성의 유의적 증가는 없었다. 이상의 결과는 alcalase와 protamex가 청국장에 특이적이지는 않으나 펩타이드 생성 및 항산화 활성 증가에 효율적임을 보여주고 있다.

## 문헌

- Berthou J, Migliore-Samour D, Lifchitz A, Delettre J, Floc'h F, Jolles P. 1987. Immunostimulating properties and three-dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. *FEBS Lett* 218: 55-58.
- Kim SH, Lee YJ, Kwon DY. 1999. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from *Doenjang*. *Korean J Food Sci Technol* 31: 848-854.
- Shin JI, Yu R, Park SA, Chung DK, Ahn CW, Nam HS, Kim KS, Lee HJ. 2001. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *J Agric Food Chem* 49: 3004-3009.
- Rho SJ, Lee JS, Chung YI, Kim YW, Lee HG. 2009. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochem* 44: 490-493.
- Cho YJ, Cha WS, Bok SK, Kim MU, Chun SS, Choi UK. 2000. Production and separation of anti-hypertensive peptides during *Chunggugjang* fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43: 247-252.
- Matsui T, Yoo HJ, Hwang JS, Lee DS, Kim HB. 2004. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Chungkookjang*. *Korean J Microbiol* 40: 355-358.
- Kinoshita E, Yamakoshi J, Kikuchi M. 1993. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1107-1110.
- Okamoto A, Hanagata H, Kawamura Y, Yanagida F. 1995. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto. *Plant Foods Hum Nutr* 47: 39-47.
- Zhong F, Liu J, Ma J, Shoemaker CF. 2007. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Res Int* 40: 661-667.
- Zhong F, Zhang X, Ma J, Shoemaker CF. 2007. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein alcalase hydrolysates. *Food Res Int* 40: 756-762.
- Wu J, Ding X. 2002. Characterization of inhibition and stability of soy protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res Int* 35: 367-375.
- Chiang WD, Tsou MJ, Tsai ZY, Tsai TC. 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chem* 98: 725-732.
- Ringseis R, Matthes B, Lehmann V, Becker K, Schops R, Ulbrich-Hofmann R, Eder K. 2005. Peptides and hydrolysates from casein and soy protein modulate the release of vasoactive substances from human aortic endothelial cells. *Biochimica Biophysica Acta* 1721: 89-97.
- Var A, Yildirim Y, Onur E, Kuscü NK, Uyanik BS, Goktalay K, Guvenc Y. 2003. Endothelial dysfunction in preeclampsia. Increased homocysteine and decreased nitric oxide levels. *Gynecol Obstet Investig* 56: 214-221.
- Haperen R, Waard M, Deel E, Mees B, Kutryk T, Aken T, Hamming J, Grosveld A, Dunckre DJ, Crom R. 2002. Reduction of blood pressure, plasma cholesterol, and atherosclerosis by elevated endothelial nitric oxide. *J Biol Chem* 277: 48803-48807.
- Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J Nutr Biochem* 11: 128-131.
- Hernandez-Ledesma B, Davalos A, Bartolom B, Amigo L. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 53: 588-593.
- Davalos A, Miguel M, Bartolom B, Lopez-Fandino R. 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J Food Prot* 67: 1939-1944.
- Ishikawa S, Yano Y, Arihara K, Itoh M. 2004. Egg yolk phosphatidylcholine inhibits hydroxyl radical formation from the Fenton reaction. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1324-1331.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the anti-oxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem* 44: 2619-2623.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin. *J Agric Food Chem* 43: 574-578.
- Takenaka A, Annaka H, Kimura Y, Aoki H, Igarashi K. 2003. Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 278-283.
- Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res Int* 37: 123-131.

24. Pena-Ramos EA, Xiong YL. 2002. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *Food Chem Toxicol* 67: 2952-2956.
25. Adler-Nissen J. 1979a. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzene-sulfonic acid. *J Agric Food Chem* 27: 1256-1262.
26. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
27. Arnao MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 73: 239-244.
28. Obon JM, Castellar MR, Cascales JA, Fernandez-Lopez JA. 2005. Assessment of TEAC method for determining the antioxidant capacity of synthetic red food colorants. *Food Res Int* 38: 843-845.
29. Hirayama O, Yida M. 1997. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging ability by chemiluminescence. *Anal Biochem* 251: 297-299.
30. Yildiz G, Demiryurek T. 1998. Ferrous iron-induced chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study. *J Pharmacol Toxicol Method* 39: 179-184.
31. Kong XZ, Guo MM, Hua YF, Cao D, Zhang C. 2008. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresource Technol* 99: 8873-8879.
32. Berghofer E, Grzeskowiad B, Mundigler N, Sentall WB, Walcak J. 1998. Antioxidative properties of faba bean-, soybean-, and oat tempeh. *Int J Food Nutr* 49: 45-54.
33. Lin CH, Wei YT, Chou CC. 2006. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. *Food Microbiol* 23: 628-633.
34. Muktan B, Saha J, Sarkar PK. 2008. Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema. *Food Res Int* 41: 586-593.
35. Esaki H, Onozaki H, Osawa T. 1994. Antioxidative activity of fermented soybean products. In *Food Chemicals for Cancer Prevention I: Fruits and Vegetables*. Huang MT, ed. American Chemical Society, Washington, DC, USA. p 353-360.

(2010년 11월 15일 접수; 2011년 1월 24일 채택)