

단백질 분해효소를 이용한 연산오계 내장 펩타이드 생산 최적화 및 특성분석

최소영*, 김아연*, 송유림*, 지중구**, 유선균*
중부대학교 식품생명과학과*
중부대학교 한방건강관리학과**

Optimization of enzymatic hydrolysis of viscera waste proteins of black body fowl(Yeonsan Ogae) to produce peptides using a commercial protease and it's characters analysis

So-Young Choi*, A-Yeon Kim*, Yu-Rim Song*, Joong-Gu Ji**, Sun-Kyun Yoo*

Department of Food Science and Biotechnology, Joongbu University*

Department of Oriental Health Care, Joongbu University**

요 약 연산오계는 오래전부터 건강기능 증진 및 치료 효능이 높은 것으로 알려져 왔다. 최근 건강 기능식품 소재로 기능성 펩타이드 효능이 알려짐에 따라, 연산오계 내장 부산물로 부터 올리고 펩타이드 최적 생산 공정 및 생성물 특성에 대하여 연구를 수행하였다. 최적 효소가수 분해 공정 표면반응 분석을 이용하여 수행하였다. 최적 공정 조건을 확립하기 위해서 온도 (40, 50, 60℃), pH (pH 6.0, 7.0, 8.0), 효소 (1, 2, 3%) 범위에서 수행을 하였다. 생성물에 대한 가수분해도, 아미노산, 분자량 분포를 분석하였다. 효소 가수분해 최적 온도는 58℃, pH 7.5, 효소의 농도는 3% 이었다. 최적 조건에서 2 시간 효소 가수분해를 한 결과 75-80% 이었다. 구성 아미노산의 총 함량은 386.15 mg/100 g 이었고 유리 아미노산 총량은 155.26 mg/100 g. 분자량을 Maldi-TOF 으로 분석을 한 결과 90% 이상이 300-1,000 Da 분포를 보여주었다.

주제어 : 연산오계, 내장, 펩타이드, 효소 가수분해, 최적 공정

Abstract Yeonsan Ogae has been known as supporting health and high efficacy of treatment. In recent days, as the efficacy of functional peptides has known, the optimization of oligo peptides production and its characteristics from Ogae viscera has been performed. Response surface method was used to perform the optimization of enzyme hydrolysis. The range of processes was temperature (40, 50 and 60℃), pH(6.0, 7.0 and 8.0), and enzyme(1, 2 and 3%). The degree of hydrolysis, amono acids, molecular weight of products were analyzed. The optimum process of enzyme hydrolysis were determined as temperature 58℃, pH 7.5, and enzyme concentration 3%. At optimum conditions, the degree of hydrolysis after 2 h reaction was 75-80%. The total amino acids of amino acid and were 386.15 mg/100 g and 155.26 mg/100 g, respectively. The molecular weight of products by using Maldi-TOF was ranged from 300 to 1,000 Da.

Key Words : YeonsanOgae, Viscera, Peptide, Enzyme hydrolysis, Optimization

* This research was supported by 'Development of functional ingredients and processed foods using special resources of Korean poultry(314040-3)' Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

Received 12 November 2015, Revised 14 December 2015

Accepted 20 January 2016

Corresponding Author: Sun Kyun Yoo

(Department of Food Science and Biotechnology)

Email: skyoo@joongbu.ac.kr

ISSN: 1738-1916

© The Society of Digital Policy & Management. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

닭은 다른 식용 동물에 비하여 가식부분이 닭 무게의 55%에 지나지 않으며 내장, 머리, 발 등 불가식 부분이 닭 무게의 45%가 되어, 대량의 도계 부산물이 발생되고 있다. 지금까지 외국에서는 닭 부산물에 관한 이용 및 연구가 활발하며 도계 시 기계적으로 처리하여 MDPM (mechanically-deboned-poultry meat)을 개발하여 이용하고 있다. 그 밖에도 내장 단백질, 혈액, 지방 등을 식품 및 의약품으로 유용하게 활용하고 있다[1]. 박 등[2]은 가열 시간에 따른 닭 뼈 용출액 내의 유리 아미노산과 무기질에 관하여 연구하였다. 이처럼 부산물을 이용하기 위한 많은 연구가 수행되었다. 최근 도계장이 대형화되면서 일정한 장소에서 대량의 도계 부산물이 생산되어 수집상의 문제가 적음에도 불구하고 이들 부산물의 체계적인 사료화 및 이용이 이루어지지 못하고 있으며, 오히려 환경오염과 질병전파의 위험마저 따르고 있다. 그러나 도계부산물은 가압, 열처리하고 착유, 건조 및 분쇄 등의 가공과정을 거치며, 다른 풍부한 자원으로 이용 될 수 있다고 한다[3,4].

그 중 오골계는 우리 고유의 재래닭이며, 단백질이 풍부한 식품으로 알려져, 허약자를 위한 건강식으로 주로 이용하였다. 허준의 동의보감[5]에서 간장과 신장에 피가 부족 시 좋고 어혈을 제거하고 피를 새롭게 하여 체력을 향상시킨다는 오골계육에 대한 증탕액 효능을 검증[6]하기도 하였다. 그 중 우리나라 재래 연산오계(천연기념물 265호)의 경우 중국, 일본, 동남아 등의 오골계와 비교하여 생김새가 다를 뿐만 아니라, 그 효능이 우수하다고 알려져 있으며[7], 천연기념물 제 265호 연산오계는 세계 문화유산인 동의보감 탕약편 금수부에 오자계(烏雌鷄)로 기술되어 있고 부위별 효능이 기재되어 있어 있다.

그러나 연산오계의 경우 국내 천연기념물로 지정되었음에도 개인에 의해 소규모적이고 단편적인 민간 차원에서 보존되고 있으며, 기초자료가 없는 상태에서 생리활성 연구가 진행되고 있고, 식·의약품으로써의 기능성 소재화에 대한 제품 개발은 미비한 상태로 기능성 물질의 소재화 및 산업화를 증진할 필요가 요구되고 있는 실정이다.

생리활성 펩타이드는 일반적으로 생리활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드로 정의 되는데[8] 보통 3-20

개의 아미노산으로 구성되어 있고 아미노산의 조성이나 서열에 따라 펩타이드의 활성이 다양하다[9]. 특히 단백질에 비해 크기가 작은 생리활성 펩타이드는 생체내로 쉽게 흡수 될 수 있으며, 다양한 기능적 특성을 갖는다[10]. 생리활성 펩타이드의 효과로는 미네랄운송[11,12], 항고혈압[13], 항균활성[14] 등이 있으며, 일부 생리활성 펩타이드는 다기능적인 특성을 가지고 있다고 보고되었다[15]. 닭의 부산물인 닭털의 단백질로부터 가수분해물 제조 및 철분 결합 펩타이드의 분리[16] 등의 연구는 진행되고 있으나 닭, 특히 연산오계의 대부분을 차지하는 내장, 난황, 육질 등의 단백질 및 기능성 펩타이드의 제조 및 이의 기능성 규명에 대한 연구는 전무한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 천연기념물 제 265호 연산오계의 도계 부산물인 내장을 이용하여 산업화에 활용하는 기초자료를 확보하고자 효소 가수분해를 통해 펩타이드를 분리하였으며, 펩타이드 제조 시 최적반응조건(pH, 온도, 분해시간 등)을 확립하고 여러 원료로 사용할 수 있도록 특성을 규명하고자 하였다. 또한, 품질특성(일반성분, 기능성 및 아미노산 분석을 통한 분해율 및 수율 등) 및 품질지표를 선정하고자 분석실험을 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료 및 시약

본 실험에 사용된 Folin ciocalteu's phenol(FCP)과 Tri-chloro-acetic(TCA)산 시약은 Sigma Company (Seoul, Korea)사로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 분해효소 bromelain 1200 GDU(BMI200)은 대종상사 (Seoul, Korea)로부터 구입을 하였다. BMI200 효소는 pineapple로부터 얻어진 식물성프로테아제이다.

효소의 역가를 측정하기 위한 단백질은 카제인으로 대정화금(Daejeon, Korea)에서 구입을 하였다. 실험에 사용된 연산오계육은 (주)지산농원(Nonsan, Chungnam, Korea)에서 제공을 하였다.

2.2 연산오계 내장분리

연산오계의 내장을 분리하기 위하여 냉동된 연산오계를 상온에서 해동하였다. 해동이 된 연산오계 내장을 수세하고, 부산물안의 불순물을 제거하였다. 불순물이 제거

된 내장은 실험 전까지 -20℃ 냉동보관을 하였다.

2.3 연산오게 내장 균질화

불순물이 제거된 연산오게 내장을 상온에서 해동하였다. 해동 된 연산오게 내장 3 g을 0.1 M phosphate 30 ml 이 담긴 플라스크 비커에 넣고 homogenizer를 이용하여 균질화 하였다. 균질화 된 연산오게 내장을 지퍼백에 넣고 샘플이름, 제조날짜를 기입을 하였다.

2.4 연산오게 내장 단백질 가수분해 최적

공정을 위한 표면반응실험 계획(RSM)

연산오게 내장의 단백질 가수분해 생산 최적 조건을 구하기 위하여 Hwang[17]의 방법을 이용하여 실행하였다. 모든 실험 계획은 3개의 독립변수 즉, 효소반응온도, 반응 pH, 효소의 농도(%)를 각각 50℃, pH 6.0, 2%로 하는 center run을 5번 반복을 포함하여 총 17개의 처리조합으로 구성을 하였다[17]. Box-Benken design은 세 가지의 중요한 절차에 따라 진행이 되는데, 첫째는 계획된 실험 (designed experiment)에 따라 통계적으로 실험을 수행하고, 둘째는 수식 모델의 계수 (coefficients of model)를 구하고, 셋째는 모델의 적합성을 판정하는 것으로 진행이 된다. 본 실험에서의 반응 변수들은 TCA 용해 펩타이드 양과 단백질 가수분해율(DH, degree of hydrolysis)로 하였다.

통계적인 계산을 원활히 하기 위하여 독립 변수를 다음과 같이 표준화 (code)하여 사용을 하였다. 세 개의 변수들을 각각 X_1 (온도), X_2 (pH), X_3 (효소농도)로 하였다. 표준화의 값들은 다음과 같은 공식에 의하여 구할 수 있고 그 값을 Z 로 하였다.

$$Z = (X - X^0) / \Delta X \quad (1)$$

X^0 는 표준화 값의 중심 값이고 X 는 표준화 값이다. ΔX 는 1 단위만큼의 증가 또는 감소하는 값의 크기이다. 실험결과에 대한 분석은 표면 반응 분석법으로 사용을 하였으며 최적 공정 조건을 나타내는 다중 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=j=1}^k B_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

여기서 Y 는 predicted response 이고 본 실험처럼 3개의 변수가 있을 경우에는 k 값이 3이 되고 궁극적으로 다음과 같은 식으로 표현된다.

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{12} X_2 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 \quad (3)$$

실험 후에 확정 된 결과들의 통계분석은 Design Expert (Coursery: Stat-ease Inc., Statistics Made Easy, Minneapolis, USA)를 사용하였다. 독립변수들의 값의 선택은 예비 실험에서 얻은 결과로부터 선택을 하여 X_1 (온도)는 40℃ (-1), 50℃ (0), 60℃ (+1) 로 정하고, X_2 (pH)는 5.0 (-1), 6.0 (0) 7.0 (+1) 로하고 X_3 (효소의 양)는 1 (-1), 2 (0), 3 (+1)% 로 하였다<Table 1>. 연산오게 내장 펩타이드 생산은 50 ml PBS용매를 담고 있는 250 ml 삼각 플라스크를 이용하였는데, 각각 플라스크 용매에 대하여 효소 양을 넣어주었다.

<Table 1> Levels of independent variables in Box-Benken design

X_i	Independent variables	Level		
		-1	0	+1
X_1	Culture temperature(°C)	40	50	60
X_2	Culture pH	6	7	8
X_3	Enzyme (%)	1	2	3

2.5 연산오게 내장 단백질 가수분해

효소 반응 pH 변화에 따른 연산오게 내장 단백질 가수분해를 실행하기 위하여 냉동된 상태로 보관된 균질화된 연산오게 내장 5 g 을 phosphate 완충용액 50 ml 를 담고 있는 플라스틱 비커에 넣어 homogenizer를 이용해 내장을 균질화 하였다. 균질화 된 내장액을 250 ml 삼각 플라스크에 옮겨 효소 BMI200을 첨가하고 배양기에 1시간 반응시켰다. 2시간 반응하여 효소 가수분해 된 것 1 ml 을 tube에 옮긴 후 9 ml 의 증류수를 더해 희석해 주었다. 희석용액 2.5 ml를 취하여 다른 tube에 옮겨, 0.3 M TCA (Trichloroacetic acid) 5 ml 넣고, 상온에 20분간 단백질 침전을 시킨 후 3000 RPM에서 10분 원심분리 후 상등액만을 취한 것이 연산오게 내장의 단백질 가수분해물이다.

2.6 연산오게 내장 단백질 가수분해도 측정

효소가수분해도의 측정은 Hoyle and Merritt[18]의 방법을 조정을 하여 수행하였다. 연산오게 내장의 단백질 가수분해물 1 ml에 0.5 N NaOH 5 ml 혼합한 후, 1 N FCP 1 ml 넣고 vortex를 이용하여 즉시 혼합시킨 후 배양기에 30°C 온도로 15분 반응시켜 여과필터 해주었다. 필터 된 용액을 578 nm absorbance를 측정한다. 프로테아제 가수분해 양은 L-tyrosine 표준곡선을 이용하여 측정하였고 표준곡선을 구하여 절편의 값은 다음과 같다. $Y=0.0078X + 0.0182$ 절편식을 이용하여, 한 후 가수분해 양은 DH(%)의 값을 구하는 가수분해 정도를 이용해 계산하였다.

$$DH = \frac{D'_{at\ time\ t} - D_0}{D_{max} - D_0} \times 100$$

2.7 연산오게 내장 펩타이드 아미노산 분석

2.7.1 구성아미노산 분석

분석 전 처리로 시료 0.1 g을 18 ml test tube 넣고 6 N HCl 3 ml를 가하여 감압 밀봉(질소가스 충전)한 후 110°C로 setting된 heating block에 24시간 이상 동안 가수분해 시켰다. 가수분해가 끝난 시료는 50°C에서 rotary evaporator로 산을 제거한 후 Sodium dilution buffer로 10 ml 정용한 다음, 이중 1 ml를 취하여 membrane filter 0.2 μm로 여과시켜 <Table 2>와 같이 아미노산 자동분석기(S433-H, Sykam GmbH, Germany)로 정량 분석하였다.

<Table 2> Operating conditions of Essential amino acid auto-analyzer

Instrument	S433-H(SYKAM)
Column	Cation separation column(LCA K06/Na)
Column size	4.6 × 150 mm
Column temperature	57 ~ 74°C
Flow rate	Buffer 0.45 ml/min, reagent 0.25 ml/min
Buffer pH range	3.45 ~ 10.85
Wavelength	fluorescence spectrophotometer (440 nm and 570 nm)

2.7.2 유리아미노산 분석

전처리로 내장에서 추출한 펩타이드 액체시료 10ml에 sulfosalicylic acid 0.2 g을 첨가 하여 4°C에서 1시간 방치하였다. 방치가 끝난 시료는 0.2 μm membrane filter로

여과하고 이중 1 ml를 lithium citrate buffer(0.12 N, pH 2.2)와 혼합하여 적절한 농도로 희석한 후 그중 1 ml를 취하여 <Table 3>과 같이 아미노산 자동분석기 automated amino acid analyzer(Sykam GmbH, Germany)를 이용하여 정량분석하였다.

<Table 3> Operating conditions of free amino acid auto-analyzer

Instrument	S430 (SYKAM)
Column	Cation separation column (LCA K07/Li)
Column size	4.6 × 150 mm
Column temperature	37 ~ 74°C
Flow rate	Buffer 0.45ml/min, reagent 0.25ml/min
Buffer pH range	2.90 ~ 7.95
Wavelength	440 nm and 570 nm

2.8 연산오게 내장 펩타이드 분자량 측정

연산오게 내장 펩타이드 분자량 측정을 위해 alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid 사용하였고, 70% ACN 과 0.1% formic acid 로 하여 10 m / ml의 matrix 시료를 만들었다. Sample을 50-100 ppm 정도 준비하였다. Matrix시료와 샘플을 1:1비율로 섞었다. 깨끗한 plate 위에 1 ml 정도 떨어뜨려 열풍건조 시켰다. 건조 후에 노란색을 띄는 샘플을 취해 질량분석기로 (MALDI-ToF, Voyager DE-STR, Applied biosystems, USA) 레이저 (Laser : Nitrogen, 337 nm, 3ns pulse)를 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 연산오게 부산물 중 내장을 이용한 효소가수분해 생산 최적화

BM1200에 효소를 이용하여 연산오게 내장으로부터 효소가수분해하여 최적 조건요인들인 온도, pH, 효소의 양의 3개의 실험변수에 대하여 Box-Benken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험결과 즉 가수분해도를 <Table 4>에 나타내었다. 가수분해 효율성을 나타내는 중요한 요인들인 가수분해도, 총 수율, 생산속도 측정값을 보여준다. 실험 결과 가수분해도의 값은 15.07-94.38 범위에서 측정값이 얻어졌으며, 수율은 16.439-102.915 %, 생산속도는 0.822-4.311 g/h-L의 범위에서 측정되었

다. 실험결과를 이용한 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다. Quadratic 회기 모델의 분석 결과가 <Table 5> 에서 보여준다. 이들의 결과에 따르면 가수분해도, 총 수율, 생산속도들은 온도, pH, 효소의 양에 영향을 받는다는 것이 95% 수준 이내에서 유의성이 인정되었다.

<Table 4> Experimental data of degree of hydrolysis by black body fowl(Ogae) viscera

Sample	Temp.(℃)	pH	Enzyme(%)	Degree of hydrolysis(%)
1	-1	-1	0	15.07
2	1	-1	0	70.61
3	-1	1	0	26.21
4	1	1	0	70.48
5	-1	0	-1	25.35
6	1	0	-1	46.48
7	-1	0	1	46.63
8	1	0	1	94.38
9	0	-1	-1	43.77
10	0	1	-1	56.39
11	0	-1	1	79.04
12	0	1	1	64.31
13	0	0	0	66.61
14	0	0	0	71.34
15	0	0	0	59.98
16	0	0	0	65.75
17	0	0	0	65.88

<Table 5> Analysis of variance(ANOVA) for fitted second order polynomial model and lack of fit for black body fowl(Ogae) viscera

Source	DF	Sum of Squares
		DH ^a
Model	9	6576.25
Residual	7	290.62
Lack of Fit	3	225.41
Pure Error	4	65.20
Cor Total	16	6866.87

^a Coefficient of correlation (R^2) for black body fowl(Ogae) viscera was 0.96

^b Significant at 5% level.

모델 결정계수(determination coefficient) R^2 값은 실험값 (observed value)와 예측값(predicted value)과 상호 연관(correlation) 정도를 보여주는데 가수분해도 0.96 이므로 이 모델은 10% 범위에서 설명되지 않는다는 것을 보여준다. 적합결여(lack of fit) 테스트 검증에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절

함을 알 수 있다. <Table 6>에서는 모델의 회귀계수를 나타내는 것으로 가수분해도, 가수분해 수율, 생산속도들이 3가지의 요인들에 대하여 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. ($P<0.05$). 본 실험결과 반응온도, pH, 효소의 농도에 대한 영향은 1차, 2차, 교호항(cross product term)에서 유의성이 나타나 요인들의 단독 또는 교호적으로 영향을 미침을 알 수 있다. 이들에 대한 회귀식은 <Table 7> 에 있다.

<Table 6> Estimated coefficient for the filled second order polynomial representing the relationship between the response and process variables.

Factor	Coefficient DH
Intercept	65.91
Linear	
Temperature	21.09
pH	1.11
Enzyme	14.05
Quadratic	
Temperature	-13.99
pH	-6.33
Enzyme	1.29
Interactions	
pH×Temperature	-2.82
pH×Enzyme	-6.84
Enzyme×Temperature	6.65

<Table 7> Polynomial equations calculated by response surface program.

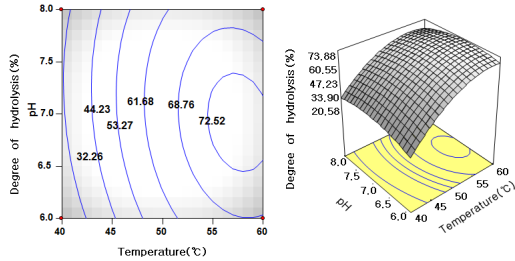
Response	Second order polynomial equations	R^2
Ogae viscera production	$Y=65.91+21.09X_1+1.11X_2+14.05X_3-13.99X_1^2-6.33X_2^2+1.29X_3^2-2.82X_1X_2+6.65X_1X_3-6.84X_2X_3$	0.90

X_1 : Temperature(℃), X_2 : pH, X_3 : Enzyme(%)

3.2 온도와 pH에 따른 최적 생산조건

표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대적으로 판명되어 연산오게 내장을 이용한 효소가수분해도 즉 펩타이드 생산량은 pH보다 온도에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수분해도는 펩타이드 생산효율을 평가하는데 지표가 된다. pH 6-8 사이에서 크게 변화가 없었던 반면 온도의 경우 40℃에서 서서히 증가하다가 약 58℃ 근처에서 최고생산량 72.52%까지 펩타이드 생산량이 높아지는 것으로 확인되었다.

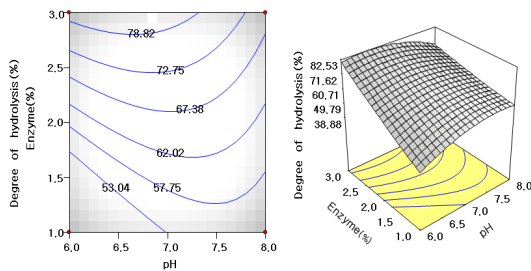
즉 펩타이드 생산에 있어 pH보다 온도에 더 큰 영향을 주는 것으로 나타났다[Fig. 1].



[Fig. 1] Contour 3D plots of response surface. Effect of pH and temperature on the production of black body fowl(Ogae) viscera using commercial protease

3.3 효소와 pH에 따른 최적 생산조건

[Fig. 2]에서 보듯이 효소의 양에 따른 펩타이드 생산량 변화가 pH의 변화보다 민감한 것을 알 수 있다. 효소의 양 1.7% 부터 서서히 증가하여 3%로 올렸을 때 78.82%로 효소의 양을 점차 늘렸을 때 최고 생산량을 보여주었으나 이에 반해 pH의 경우 pH 7-7.5에서 약간의 증가함을 보였으나 pH의 변화에 따른 값이 크게 변화되지 않았음을 확인하였다. 그러므로 pH의 변화 보다는 효소의 양이 3%로 높아졌을 때 펩타이드의 생산량이 증가함을 알 수 있다.



[Fig. 2] Contour 3D plots of response surface. enzyme concentration of pH on the production of black body fowl(Ogae) viscera using commercial protease

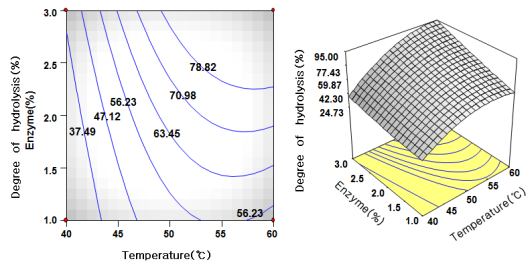
Natta Laohakunjit et al.[19]들은 해초 단백질을 효소 10% 농도로 3시간 반응을 한 결과 수율은 38.15% 및 62.9% 가수분해도를 보고 하였는데 본 연구와 사용 효소

농도는 다르지만 가수분해도는 비슷함을 보여주었다.

3.4 효소와 온도에 따른 최적 생산조건

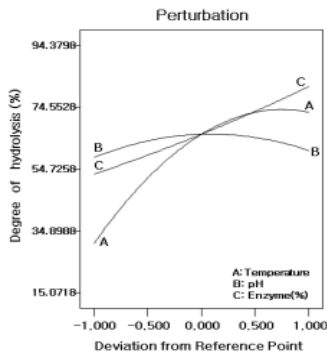
표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 연산오게 내장을 이용한 효소가수분해도는 [Fig. 3] 에서와 같이 효소의 양에 의해 생산되는 가수분해도의 변화보다는 온도의 변화에 상당히 민감하였다. 효소의 값이 높아질수록 펩타이드의 생산량은 미미하게 높아졌다. 그러나 이에 반해 온도가 40℃일 때 약 37.49%였으나 약 58℃로 높아질수록 펩타이드 생산량의 정상점이 나타났다. 이 결과 효소는 약 3%가 되었을 때 그리고 온도는 약 58℃로 반응을 주었을 때 정상점이 나타났다. 이곳이 최대 펩타이드 양이 생산되는 것으로 보이며, 그 값은 약 78.82%로 나타났다.

한 등[20]은 정어리를 통째로 마쇄한 육에 bromelain 을 첨가한 것은 55℃ 부근에서 최대 활성을 나타냈다고 보고되었다. 이는 본 실험의 결과와 유사함을 알 수 있었다.



[Fig. 3] Contour 3D plots of response surface. enzyme concentration of temperature on the production of black body fowl(Ogae) viscera using commercial protease

반응표면 분석 실험의 결과를 종합해 보면 연산오게 내장의 효소가수분해에 따른 펩타이드 생산량에 가장 영향을 미치는 것은 온도이고, 효소의 양과 pH 순으로 나타났다. pH의 영향은 아주 미미한 것으로 판단되었다 [Fig. 4].



[Fig. 4] Black body fowl(Ogae) viscera for preparing protein hydrolysate

3.5 구성아미노산의 분석

연산오계 내장 효소가수분해물의 구성아미노산 조성은 <Table 8>과 같다. 구성아미노산의 총 함량은 386.149 mg/100 g 이다. 그 중 glutamic acid가 전체 구성아미노산의 13.4% (51.640 mg/100 g)으로 가장 많은 함량을 차지하고 있었다. 다음으로 aspartic acid (11.1%), lysine (8.2%), leucine (7.2%), glycine (6.8%) 등의 순서였다. 필수아미노산으로는 lysine (31.773 mg/100 g), leucine, valine, isoleucine, tyrosine 순으로 높게 나타났다. 이상의 결과는 Lee[21]의 연구에서와 비슷한 경향을 나타낸 것으로 내장에서 필수아미노산의 함량대비 양은 비슷한 것을 알 수 있다. 도계부산물물의 아미노산조성에 대해서 Allen[22], Lesson과 Summer[23] 및 NRC[24] 등이 보고한 바 있으며, 총 아미노산의 함량의 비율은 내장이 가장 높음을 알 수 있다.

<Table 8> Amino acid composition of black body fowl(Yeonsan O-gae) viscera

Amino acid	Peptide of Ogae viscera (Unit : mg/100g)
Aspartic acid	42.746
Threonine	19.776
Serine	21.929
Glutamic acid	51.640
Proline	18.237
Glycine	26.144
Alanine	23.122
Valine	24.273
Methionine	7.302
Isoleucine	20.048
Leucine	27.938
Tyrosine	17.637
Phenylalanine	16.676
Histidine	14.340
Lysine	31.773
Arginine	22.568
Total	386.149

3.6 유리아미노산의 분석

연산오계 내장을 분리하여 효소가수분해 처리한 가수분해물의 유리 아미노산 함량은 다음과 같다<Table 9>. 연산오계 내장 효소가수분해물에서는 28종류의 유리아미노산이 검출되었으며, leucine이 9.8% (15.163 mg/100 g) 로 가장 많았다. 그 다음으로 arginine (9.5%), alanine (9.1%), lysine (8.1%) 등의 순으로 존재하였다. ethanolamine (0.0%), 1-methylhistidine (0.2%), cystine (0.3%)은 함량이 적은 순이었다.

<Table 9> Free amino acid composition of black body fowl(O-gae) viscera

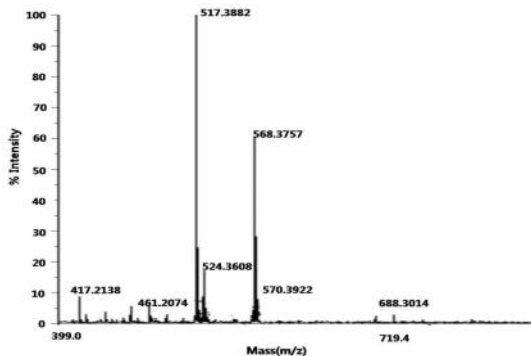
Amino acid	Peptide of Ogae viscera (Unit : mg/100g)
Phosphoserine	0.598
Taurine	0.654
Aspartic acid	4.489
Threonine	5.407
serine	7.555
Asparagine	4.004
Glutamic acid	8.484
Sarcocine	1.544
Proline	6.031
Glycine	5.558
Alanine	14.176
Valine	8.434
Cystine	0.522
Methionine	6.203
Isoleucine	9.339
Leucine	15.163
Tyrosine	11.823
phenylalanine	8.572
β-aminoisobutyric acid	0.587
γ-amino-n-butyric acid	0.721
Histidine	2.140
1-methylhistidine	0.252
Tryptopan	3.219
Hydroxylysine	1.229
Lysine	12.554
Ethanolamine	0.077
Arginine	14.708
Total	155.262

3.7 효소가수분해 한 연산오계 내장의 펩타이드 분자량 결과 (MALDI-ToF)

연산오계 부산물 내장을 단백질 가수분해 효소를 이용하여 분해한 생성물들의 분자량 분포 특성을 분석하고자 MALDI-TOF를 사용하였다. MALDI-TOF는, PMF (Peptide Mass Fingerprint) 분석법으로 특정 효소를 처

리하여 잘라진 peptide fragment들의 mass 값을 측정하고 이를 사용하여 database search를 하여 동정한다. 그러므로 PMF방법은 genomic sequence가 완료된 생물종이나 NCBI에 등재가 된 단백질을 동정하는데 주로 사용한다. 단백질의 모든 아미노산 평균 분자량은 138이지만, 가장 평균은 128이고 축합 중합에 의해 단백질은 각 단위체당 110의 평균 분자량을 갖게 된다. 이를 나타내는 단위는 dalton(달톤)으로 1 kDa는 1000 g/mol이다. 예를 들면 약 500개의 아미노산을 갖는 단백질의 평균적인 분자량은 55000 Da, 즉 55 kDa의 분자량을 갖는다.

본 연구에서 연산오게 내장 단백질 가수분해물의 여러 종류의 펩타이드 분자량 분포에 대한 분석을 시행하였는데 MALDI-TOF의 그래프에서 X 축은 mass(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화 된 물질의 강도를 나타낸다. 불순물이 어느 정도 포함이 되어있지만 대부분의 펩타이드 들은 m/z 500에서 1,400 이하 분자량 분포를 보여 주었다. 따라서 연산오게 내장 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5, 6, 8, 10개로 이루어져 있었다[Fig. 5].



[Fig. 5] MALDI-TOF mass spectra of peptides produced from black body fowl(Ogae) viscera for preparing protein hydrolysate.

Reddy et al.[25] 들은 bromelain 효소를 이용하여 어류인 전갱이 단백질을 가수분해를 하여 항바이러스를 보이는 5 kDa 펩타이드 생산을 보고하였다.

또한 Huang 등[26]의 새우 가공 부산물로부터 펩타이

드를 동정한 결과 699 Da의 분자량을 가진 펩타이드가 보고되었고, Vattam과 Mahoney[27]의 연구에서도 닭 근육 단백질로부터 철분 결합력을 가지는 주요 분획이 2-3.5 kDa에 존재하였다고 보고한 바 있다.

4. 결론

연산오게 내장으로 부터 펩타이드를 분리하기 위하여 효소가수분해 최적 공정을 개발하기 위하여 온도 (40, 50, 60℃), pH (pH 6.0, 7.0, 8.0), 효소 (1, 2, 3%) 별로 가수분해율을 분석하였다. 가수분해도는 온도, pH 그리고 효소의 양에 영향을 받는다는 것이 95% 수준 이내에서 인정되었으며, 연산오게 내장의 효소가수분해에 따른 펩타이드 함량은 효소의 값이 3%로 높아질수록 또 온도가 약 58℃로 높아질수록 가수분해도는 높아졌다. 하지만 pH 변화에 따른 펩타이드의 생산량은 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

구성아미노산의 총 함량은 386.149 mg/100g 이다. 그중 glutamic acid가 전체 구성아미노산의 13.4% (51.640 mg/100 g)으로 가장 많은 함량을 차지하고 있었다. 다음으로 aspartic acid(11.1%), lysine(8.2%), leucine(7.2%), glycine(6.8%) 등의 순서였다.

유리아미노산은 총 28종류의 유리아미노산이 분석되었으며, leucine(9.8%)로 가장 높게 나타났다.

연산오게 내장 가수분해물 펩타이드들은 아미노산 염기 4에서 12개 정도의 분포를 보여 주었다. 그리고 대부분의 펩타이드들이 염기서열 10개 이하로 이루어져 있었다. 평균 분자량으로 환산을 한다면 다수를 차지하는 펩타이드의 분자량들은 아미노산 잔기가 5, 6, 8, 10개로 이루어져 있음을 확인하였다.

이 연구 결과 연산오게 내장을 이용하여 기능성 소재의 생산체계 확보를 위한 제조 공정을 표준화, 추출물 및 분말 등 대량 생산 공정을 매뉴얼, 소비자 맞춤형 가공식품 생산 체계 및 실용화에 필요한 기초자료를 확보할 수 있었다.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by 'Development of

functional ingredients and processed foods using special resources of Korean poultry (314040-30-1-HD030) Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA).

REFERENCES

- [1] Song KW, "The Science of Meat and Meat Product". SunJinMoonHwa Publishing Co., 1986.
- [2] Park HO, Lee HJ, "A study on the Free Amino Acid and Minerals of Chicken Bone Extracts by Boiling time. Korean J. Soc. Food Sci". Vol. 11, No. 3, pp.244-248, 1995.
- [3] El Boushy, "Rendering poultry offals means profits" Poultry Misset Vol. 2, No. 1, pp.44-47, 1985.
- [4] Lee K.H, "Chemical Composition and Biological Feed Value of Autoclaved Poultry By-products for Poultry. Korean J. Poult. Sci". Vol. 24, No. 4, pp.185-191, 1997.
- [5] Hur, "Jongbo Dongebogam". Namsadong, Seoul. pp.1172(in Korea). 1981.
- [6] Hyun Seok Chae, Chong-Nam Ahn, Young-Mo Yoo. "The Effects of the High Pressure Boiled Extracts (HPBE) of the Ogol Chicken with Herbs on the Hormones, Cytokine, Specific Antibody of Serum in the Rat. Korean J. Food SCI. ANI. RESOUR". Vol. 24, No. 3, pp.283-292, 2004.
- [7] Kang-Hyun, Lee, Sang-Woo, Park, Joong-Gu, Ji. "A Study on Convergence Medical Efficacy of Native Chicken. Journal of Digital Convergence". Vol. 13, No. 9, pp.439-444, 2015.
- [8] Kitts DD, Weiler K, "Bioactive proteins and peptides from food sources. Application of bioprocesses used in isolation and recovery. Curr Pharm Des"., Vol. 9, No. 16, pp.1309-1323, 2003.
- [9] Anne Pihlanto-Leppälä, "Bioactive peptides derived from bovine whey protein: opioid and ACE-inhibitory peptides. Trends Food Sci Technol". Vol. 11, No. 9-10, pp.347-356. 2001.
- [10] Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, et. al., "Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. Meat Sci", Vol. 57, No. 3, pp.319-324, 2001.
- [11] Lee SH, Song KB. "Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. Process Biochem", Vol. 44, No. 3, pp.378-381, 2009.
- [12] Huang G, Ren Z, Jiang J. "Separation of iron-binding peptides from shrimp processing by-products hydrolysates. Food Bioprocess Technol", Vol. 4, No. 8, pp.1527-1532, 2011.
- [13] Lee SH, Song KB. "Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from irradiated bovine blood plasma protein hydrolysates. J Food Sci", Vol. 68, No. 8, pp.2469-2472, 2003.
- [14] Mine Y, Ma F, Lauriau S. "Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. J Agric Food Chem", Vol. 52, pp.1088-1094. 2004.
- [15] FitzGerald RJ, Meisel H. "Milk protein-derived peptide inhibitor of angiotensin-I-converting enzyme. Br J Nutr", Vol. 84, pp.33-37. 2000.
- [16] Nam Ho Kim, Dong won Choi, Kyung Bin Song. "Preparation of chicken feather protein hydrolysates and isolation of iron-binding peptides. Korean J Food Preserv". Vol. 20, No. 3, pp.435-439, 2013.
- [17] Seung Kyun Hwang, Jun Taek Hong, Kyung Hwan Jung, Byung Chul Chang, Kyung Suk Hwang, Jung Hee Shin, Sung Paal Yim, Sun Kyun Yoo, "Process Optimization of Dextran Production by *Leuconostoc* sp. strain YSK. Isolated from Fermented Kimchi. J. Life Sci". Vol. 18, No. 10, pp.1377-1383, 2008.
- [18] Hoyle NT., and Merritt JH, "Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). J. Food Sci". Vol. 59, No. 1, pp.76 - 79, 1994.
- [19] Natta Laohakunjit, Orrapun Selamassakul, Orapin Kerdchoechuen. "Seafood-like flavour obtained from the enzymatic hydrolysis of the protein by-products of seaweed (*Gracilaria* sp.). Food Chemistry". Vol.

158, pp.162 - 170, 2014.

- [20] Han, B.H., J.H. Pyeon, K.T. Lee, S.I. Choi and S.Y. Cho. "A study on rapid fermentation of whole sardine for sauce production. Bull. Fish. Res. Dev. Agency". Vol. 29, pp.59-70, 1982.
- [21] K.H. Lee, "Chemical composition and Biological feed value of autoclaved poultry by-products for poultry. Korean J. Poult. Sci". Vol. 24, No. 4, pp.185-191, 1997.
- [22] Allen, R.D., "Feedstuffs ingredient analysis table. Feedstuffs". Vol. 61, No. 31, pp.25-30, 1989.
- [23] Leeson S. and J. D. "Summers Commercial Poultry Nutrition". University Book. Guelp, Ontario, Canada. 1991.
- [24] NRC "Nutrient requirements of poultry, 9th Rev. Ed". National Academy Press. Washington DC., 1994.
- [25] Junus Salamessy, Narsimha Reddy, Kasipathy Kailasapathy, Michael Phillips, "Functional and potential therapeutic ACE-inhibitory peptides derived from bromelain hydrolysis of trevally proteins. journal of functional foods". Vol. 14, pp.716-725, 2015.
- [26] Huang G, Ren Z, Jiang J, Chen W. "Purification of a hepta-peptide with iron binding activity from shrimp processing by-products hydrolysates. Adv J Food Sci Technol", Vol. 4, No. 4, pp.207-212, 2012.
- [27] Vatterm DA, Mahoney RR. "Production of dialysable iron by in vitro digestion of chicken muscle protein fractions: the size of the dialysable iron. J Sci Food Agric", Vol. 85, No. 9, pp.1537-1542, 2005.

최 소 영(Choi, So Young)



- 2006년 2월 : 목원대학교 미생물학과(이학석사)
- 2007년 3월 ~ 2013년 4월 : 프로바이오틱
- 2015년 8월 ~ 현재 : 중부대학교 식품생명과학과 재직
- 관심분야 : 식품 미생물
- E-Mail : sy0509@lycos.co.kr

김 아 연(Kim, A Yeon)



- 2013년 8월 : 중부대학교 식품생명과학과 (이학학사)
- 2014년 11월 ~ 현재 : 중부대학교 식품생명과학과
- 관심분야 : 식품가공, 식품 미생물
- E-Mail : ayoun922@naver.com

송 유 림(Song, Yu Rim)



- 2012년 3월 ~ 현재 : 중부대학교 식품생명과학과 재학
- 관심분야 : 식품가공, 식품 미생물
- E-Mail : yurim0202@naver.com

지 중 구(Ji, Joong Gu)



- 1997년 7월 : 중국산동중의약대학 (의학학사)
- 2001년 7월 : 중국산동중의약대학 중의내과학의학석사
- 2004년 7월 : 중국산동중의약대학 중의내과학의학박사
- E-Mail : jjg1970@jbmac.k

유 선 균(Yoo, Sunl Kyun)



- 1993년 12월 : 미국 루이지애나 주립대 식품과학과(석사)
- 1997년 12월 : 미국 루이지애나 주립대 식품과학과(박사)
- 2001년 3월 ~ 현재 : 중부대학교 식품생명과학과 교수
- 관심분야 : 기능성식품, 발효
- E-Mail : skyoo@jbmac.kr