

표면반응분석을 이용한 오계 날개육 단백질 가수분해 최적 생산 공정 개발과 생산물의 특성 분석

김아연* · 유선균*†

*중부대학교 식품생명과학과

(2016년 6월 9일 접수; 2016년 6월 16일 수정; 2016년 6월 16일 채택)

Process Optimization of Meat Protein Hydrolysate of Ogae Wings by Response Surface Methodology and Its Characteristics Analysis

A Yeon Kim* · Sun Kyun Yoo*†

**Department of Food and Biotechnology, Joongbu University.*

(Received June 9, 2016; Revised June 16, 2016; Accepted June 16, 2016)

요약 : 식물 및 동물성 유래 펩타이드 형태의 단백질 가수분해물은 항산화, 고혈압 완화, 면역조절, 진통완화 및 항균작용 등 생리활성이 있는 것으로 알려져 왔다. 본 연구는 연산 오계의 날개육 단백질로부터 bromelain 프로티아제를 이용하여 펩타이드 형태의 단백질 가수분해 최적공정을 수행하고 생성물의 특성을 분석하였다. 최적공정은 표면반응 분석법을 이용하여 수행을 하였고 공정의 범위는 반응온도 40-60°C, 반응 pH 6-8, 효소의 농도 1-3%(w/v)이었다. 오계 날개육의 단백질 최적 효소가수분해 공정조건은 효소 반응온도 48-50°C, 반응 pH 7.0-7.2, 효소의 양은 3%(w/v)에서 결정 되었다. 이때 단백질 가수분해 수율은 68-69%에 도달하였다. 생산된 대부분 가수분해물의 분자량들은 전형적인 펩타이드인 분자량 500-1,200 Da로 분포되었다. 생산된 펩타이드 중에 항산화 기능을 보여주는 소수성 아미노산들 histidine, proline, methionine, cystein, tyrosine, tryptophan, phenylalanine 등이 43.07%를 차지하였다. 또한 구성아미노산의 함량 glutamic acid가 전체 구성아미노산의 13.6%로 가장 많은 함량을 차지하여 건강 기능 식품소재로서 활용할 가치가 높을 것으로 기대를 한다.

주제어 : 연산오계, 프로티아제, 표면반응, 최적공정, 가수분해

Abstract : Protein hydrolysate that shows physiological function such as antioxidant, suppression of hypertension, immunodulatory, alleviation of pain, and antimicrobial activity has been known as playing important role like hormone. This study was performed to optimize the hydrolysis of the wing's meat of Yosan-Ogae by a commercial protease. The ranges of processes were the reaction temperature of 40 to 60°C, pH 6 to 8, and enzyme concentration 1 to 3%(w/v). As a result, the optimization of process was determined at temperature of 48-50°C, pH of 7.0-7.2, and enzyme

†Corresponding author
(E-mail: skyoo@joongbu.ac.kr)

concentration of 3%(w/v), and degree of hydrolysis was 68 to 69% at above conditions. The molecular weight of hydrolysate was distributed to 500 -1,200 Da and showed typical peptides. The amino acids of peptides showing presumably antioxidant activity such as histidine, proline, methionine, cysteine, tyrosine, tryptophan, phenylalanine comprised about 43.07%. The glutamic acid was 13.6%. Therefore, we expect that those products are useful as functional food ingredients.

Keywords : Yeosan-Ogae, proteases, optimization process, hydrolysis, surface methodology

1. 서론

오골계는 예로부터 질병을 예방하고 건강을 개선하는 식품으로 알려져 왔는데, 효능으로는 적혈구의 생성을 촉진하여 빈혈과 출혈 예방, 항산화, 항고혈압, 항염증, 진통완화, 및 간 보호에 효과가 있는 것으로 보고되어 왔다[1-3]. 그 중 한국 재래 오골계인 연산 오계는 1980년 4월 우리나라 천연기념물 265호로 지정되어 중국이 원산지인 백봉 오골계와는 전혀 다른 품종으로서 몸집이 더 크고 깃털은 검고 발가락 수는 4개 인 것이 특징이다[4].

최근 동물성 유래 천연물로부터 단백질 가수분해물에 대한 기능성 및 생리적 활성에 대한 연구가 광범위하게 보고되어 왔다. 이들 중에 우유 단백질, 해산물, 육류, 및 난으로 부터 항산화 및 면역기능 증진 등 생리활성 펩타이드 물질들의 분리 공정 및 특성에 관여 발표되어 왔다[5-8]. 생리 활성 기능 펩타이드들은 단백질의 기능적, 영양적 특성을 대폭 향상시키는 것으로 알려졌다[9]. 생리활성 단백질 가수분해물은 호르몬처럼 특정 세포의 수용기에 반응을 하여 생리적인 기능을 활성화하는 물질로 항산화, 고혈압 완화, 면역조절, 진통완화 및 항균작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 기능성 식품, 치료식, 그리고 천연약품으로 사용될 수 있다[10-11]. 또한 단백질 분해 효소에 의한 부분적 가수분해는 물성이나 용해도 등의 기능성을 크게 개선시킬 뿐 아니라, 영양적으로도 우수하고 산 또는 알칼리 가수분해에 비해 독성이 거의 없으며, 생성되는 염의 양도 적기 때문에 식품소재로 적합한 것으로 알려졌다[12]. 따라서 효소 반응으로 생산되는 저분자형 펩타이드들은 새로운 생물활성 소재로 이용될 가능성이 크다고 하였다[13].

표면반응분석은 단백질 가수 분해물 제조에 대한 최적 공정 확립에 성공적으로 적용되어 왔다. 이들 중에 가금류 부산물로부터 유래한 단백질 가수분해 최적공정, 닭의 난 단백질로부터 알려지 완화 기능 지닌 펩타이드제조, 오징어 단백질로부터 항산화 기능 펩타이드제조 최적 공정 확립 등 보고되어 왔다[2, 12-14].

이러한 배경에서 본 연구에서 천연기념물 연산 오계의 날개 육의 단백질을 bromelain 프로티아제 효소 와 표면 반응 모델링 분석법을 이용하여 펩타이드 형 가수분해물 생산 최적공정을 확립하였다. 가수분해물의 분자량과 구성 아미노산의 분포 및 함량으로 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

실험에 사용이 된 오계육은 지산농원(Nonsan City, Korea)에서 냉동 된 상태로 제공받았다. 단백질 분해 효소 bromelain은 Nobozymes Korea LTD (Seoul, Korea)에서 구입을 하였다. Folin ciocalteu's phenol(FCP) 시약과 trichloroacetic acid(TCA)는 Sigma Company(Seoul, Korea)사로부터 구입을 하였다.

2.2. 효소 반응을 위한 오계 날개육 제조

오계 날개를 분리 하기 전 진공포장 된 냉동 오계육은 40℃ 항온수조에서 20분 동안 해동이 되었다. 해동이 된 오계육 포장을 제거하고 날개육을 분리하여 고기갈개(MG510, Kenwood Appliances Co. Ltd., Donguan, China)를 이용하여 갈개 재료쟁반에 넣고 분쇄 칼날로 육을 잘게 자른 다음 스크린을 통하여 동글고 가는 형태로 성형하였다.

2.3. 표면반응실험 계획

날개육 단백질 가수분해 표면 반응 실험 계획은 3개의 독립변수 즉, 효소반응온도(°C), 반응 pH, 효소의 농도(%)를 각각 50°C, pH 7, 2%로 하는 중심 run을 5번 반복을 포함하여 총 17개의 처리 조합으로 설계를 하였다. 박스-벤켄 설계 첫째는 계획된 실험에 따라 통계적으로 실험을 수행하고, 둘째는 수식 모델의 계수를 구하고, 셋째는 모델의 적합성을 판정하는 것으로 진행이 된다. 본 실험에서의 반응 변수는 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 Z로 하였다.

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

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.

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

여기서 Y는 predicted response 이고 본 실험처럼 3개의 변수가 있을 경우에는 k값이 3이 되고 궁극적으로 다음과 같은 식으로 표현된다.

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

실험 후에 확정 된 결과들의 통계분석은 Design Expert (Stat-ease Inc., Minneapolis, USA)를 사용하였다. 독립변수들의 값의 선택은 예비 실험에서 얻은 결과로부터 선택을 하여 X_1 (온도)는 40°C (-1), 50°C (0), 60°C (+1) 로 정하고, X_2 (pH)는 5.0 (-1), 6.0 (0) 7.0 (+1) 로하고 X_3 는 1 (-1), 2 (0), 3 (+1)%로 하였다(Table 1).

2.4. 오계 날개육 단백질 가수분해

성형 육 5 g을 각각 50 ml 0.1 M phosphate buffer를 플라스틱 비커에 넣고 균질기 (Homogenizer, Daihan scientific Co. Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 날개 육 슬러리를 제조하였다. 박스-벤켄 디자인에 따라 오계 날개육 슬러리에 효소의 농도 1, 2, 3%를 첨가하고 반응 온도 40°C, 50°C, 60°C, 반응 pH 7, 7, 8, 에 맞춰 진탕 배양기에서 4시간 반응시켰다.

2.5. 오계 날개육 단백질 가수분해도 측정

단백질 가수분해 정도는 가수분해물의 아미노산 중에서 tyrosine 양을 대표로 하여 분석을 하였다. 오계 날개 육의 총 가수분해 값은 육 0.1 g을 110°C 에서 24 시간 가수분해를 실시하여 가수분해물의 tyrosine 양으로 측정을 하고 이 값을 D_{max} 로 하였다. 효소 반응 t 시간 후 날개육의 가수분해물의 tyrosine 양으로 측정 된 값을 D_t 로 하였다. 초기 날개 육의 tyrosine 양으로 측정 된 값을 D_0 로 하였다. 가수분해물들의 tyrosine 양은 샘플 1 ml 에 0.5 N NaOH 5 ml 혼합한 후, 1 N FCP 1 ml 넣고 즉시 혼합시킨 후 배양기에 30°C로 15분 반응시켰다. 반응 액

Table 1. Reaction temperature, pH, and enzyme concentration levels of independent variables in Box-Benken design

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

은 578 nm에서 흡광도를 측정하였다. 따라서 가수분해 정도 DH% (degree of hydrolysis)의 값은 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$DH = \frac{D_{\text{at time } t} - D_0}{D_{\text{max}} - D_0} \times 100$$

2.6. 가수분해물의 구성아미노산 분석

최적 공정에서 생산된 오계 날개육 가수분해물을 0.2 μm 시린지 필터로 여과를 하였다. 여과된 샘플을 18 ml test tube에 칭량하여 6 N HCl 5 ml를 가하여 감압 밀봉(질소가스 충전)한 후 110°C에서 24시간 이상 동안 가수분해 시켰다. 가수분해가 끝난 시료는 Sodium 완충용액으로 정용한 다음, 이중 1 ml를 취하여 0.2 μm 필터로 여과시켜 아미노산 자동분석기(S433-H, Sykam GmbH, Germany, Munich)로 분석을 하였다. 아미노산 자동분석기 컬럼은 Cation separation column(LCA K06/Na)을 사용하였고, 컬럼 크기는 4.6 \times 150 mm, 컬럼 온도는 57-74°C, 완충용액과 OPA 시약의 flow rate는 각각 0.45 ml/min, 0.25 ml/min였으며, 이때 완충용액의 pH 범위는 3.45 - 10.85이었고, 파장은 440 nm과 570 nm이었다.

2.7. 가수분해물의 분자량 분포 분석

가수분해물의 분자량 측정을 위해 matrix의 준비는 α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid 1 mg을 0.1 ml 70% acetonitrile, 0.1% formic acid에 용해 후 만들었다. 샘플의 농도는 50-100 ppm 정도로 준비하였으며, matrix시료와 시료를 1:1 비율로 섞었다. 플레이트 위에 1 ml 정도 떨어뜨려 건조한 후 노란색을 띠는 샘플을 취해 질량분석기(MALDI-TOF, Voyager DE-STR, Applied biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 오계 날개육의 단백질 가수분해 최적화 공정

오계 날개육의 단백질 효소가수분해 공정조건 요인들인 반응 온도, pH, 효소양의 3개의 실험변수에 대하여 박스-벤켄 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 가수분해도(%)를 실험결과가 Table

2에서 보여준다. 실험결과 가수분해도의 값은 20.48-68.18% 범위에서 측정값이 얻어졌다.

Table 3은 실험 결과에서 나타난 가수 분해도에 대한 회귀식의 분산분석의 결과를 보여준다. Quadratic 회기 모델의 분석 결과는 모델의 적합성 여부를 나타내는데, bromelain 효소에 의한 오계 날개 육의 가수분해는 반응온도, pH, 및 효소의 양에 의하여 영향을 받는 다는 것이 95% 수준 이내에서 유의성이 인정 되었다. 모델 결정계수(determination coefficient) R^2 값은 실험 값(observed value)과 예측 값(predicted value) 그리고 상호연관(correlation) 정도를 보여주는데 가수분해도 0.97 이었다. 따라서 이 모델은 3% 범위에서 설명되지 않는다는 것을 보여준다. 적합결여(lack of fit) 테스트 검정에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다.

Table 4는 모델의 회귀계수를 나타내는 것으로 오계 날개 육의 단백질의 효소 가수분해는 효소의 반응온도, 반응 pH, 및 효소의 농도에 의해서 영향을 받는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 본 실험 결과 반응온도, 반응 pH, 및 효소의 양은 1차, 2차, 교호항에서 모두 유의성이 나타나 요인들이 단독 또는 교호적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이들의 대한 회귀식은 Table 5에 있다.

3.2. 단백질 가수분해에 대한 반응 온도와 pH의 영향

효소 bromelain에 의한 오계 날개육 슬러리의 가수분해 공정은 반응 온도와 pH의 상호영향을 준다는 것을 보여주었다. Fig. 1은 두 공정변수에 대한 가수분해도(%)의 3D 표면 과 등고선 식을 보여준다. Fig. 1은 효소의 농도를 2%로 하였을 때 반응 온도 범위인 40-60°C와 반응 pH의 범위인 6-8에서 최적 가수분해는 약 48°C와 pH 7.2에서 결정이 됨을 보여준다. 최적 반응 온도에서 반응 pH 6에서의 가수분해도 약 48.6%에서 점차로 증가를 하다가 pH 7.2에서 최적 가수분해도인 약 68.5%을 지나 점차 감소를 하여 pH 8에서는 약 52.5% 까지 떨어졌다. 반대로 최적 반응 pH에서는 반응온도 40°C에서 약 58.5% 이었다가 점차증가를 하여 최적 가수분해를 지나 pH 6에서의 가수분해도 약 48.6%에서 점차로 증가를 하다가 pH 7.2에서 최적 가수분해도인 약 68.5%을 지나 점차 감소를 하여 60°C에서는 약 42.5% 까지 떨어짐을 보여주었다.

Table 2. Experimental data of degree of hydrolysis of wing's meat of Yeonsan Ogae by bromelain protease

Run	Temperature(°C)	pH	Enzyme(%)	Degree of hydrolysis(%)	
				Observed	Predicted
1	40	6	2	34.2	33.6
2	60	6	2	43.2	44.2
3	40	8	2	51.2	50.3
4	60	8	2	19.8	20.4
5	40	7	1	51.2	50.3
6	60	7	1	39.6	37.2
7	40	7	3	59.8	62.2
8	60	7	3	55.2	56.8
9	50	6	1	36.4	37.9
10	50	8	1	33.6	35.4
11	50	6	3	56.2	54.4
12	50	8	3	51.2	49.8
13	50	7	2	67.0	65.1
14	50	7	2	69.2	65.1
15	50	7	2	65.8	65.1
16	50	7	2	62.8	65.1
17	50	7	2	60.9	65.1

Table 3. Analysis of variance(ANOVA) for response surface quadratic model to the degree of hydrolysis of wing's meat of Yeonsan Ogae by bromelain protease

Source	DF	Sum of squares	Probability>F
		Degree of hydrolysis ^a	
Model	9	3051.97	0.0001
Residual	7	70.66	
Lack of Fit	3	26.83	0.5483
Pure Error	4	43.83	
Cor Total	16	3122.64	

^a Coefficient of correlation (R^2) for degree of hydrolysis was 0.97

Table 4. Estimated coefficient for the fitted second order polynomial representing the relationship between the response and process variables

Factor	Coefficient
	Degree of hydrolysis
Intercept	65.14
Linear	
Reaction temperature	-4.82
Reaction pH	-1.77
Enzyme concentration	7.70
Quadratic	
Reaction temperature	-10.47
Reaction pH	-17.57
Enzyme concentration	- 3.22
Interactions	
Reaction pH×Temperature	-10.10
Reaction pH× Enzyme concentration	1.75
Enzyme concentration×Temperature	- 0.55

Table 5. Polynomial equation calculated by response surface program

Response	Second order polynomial equations	R ²
Degree of protein hydrolysis (%)	$Y = 65.14 - 4.83X_1 - 1.78X_2 + 7.70X_3 - 10.47X_1^2 - 17.57X_2^2 - 3.22X_3^2 - 10.10X_1X_2 + 1.75X_1X_3 - 0.55X_2X_3$	0.97

X_1 : Reaction temperature(°C), X_2 : Reaction pH, X_3 : Enzyme concentration (%)

3.3. 단백질 가수분해에 대한 반응 온도와 효소 농도의 영향

Fig. 2는 반응온도 및 효소의 농도 두 공정변수에 대한 가수분해도(%)의 3D 표면과 등고선식을 보여준다. Fig. 2는 최적 pH 7.2로 하였을 때 반응 온도 범위인 40-60°C와 투입한 효소의 농도 범위인 1-3%에서 최적 가수분해는 약 48°C에서 결정이 되었고, 효소의 농도는 범위 3%를 지나 약 3.5%에서 결정이 되었다. 이때의 가수분해도는 약 71.5% 이었다. 최적 온도에서 효소 양에 따른 가수분해는 1% 일 때 약 54%에서 점차를 약 3.5% 까지 증가하는 하는 것을 보여주었다. 이것은 실험 범위를 벗어난 이어서 능선 분석을 통해서 결정 되었다. 최적 효소 농도에서는 반응 온도가 증가함에 따라서 점차 증가를 하다가 최적 가수분해 온도를 지나서는 감소를 하여 약 56% 에 도달을 하였다.

3.4. 단백질 가수분해에 대한 반응 pH 와 효소 농도의 영향

Fig. 3는 반응온도 및 효소의 농도 두 공정변수에 대한 가수분해도(%)의 3D 표면과 등고선식을 보여준다. Fig. 3는 최적 반응온도에서 반응 온도 pH 범위인 5-7과 투입한 효소의 농도 범위에서 가수분해 도를 보여준다. 최적 pH는 6.8-7에서 최적 효소의 농도는 역시 3%를 넘어 능선 분석결과 약 3.5%에서 결정되었음을 보여 준다. 이때의 가수분해 도는 약 69.7% 이었다. 최적 pH에서 효소 양에 따른 가수분해는 1% 일 때 약 49.8%에서 계속증가를 하여 약 3.5% 까지 증가하는 하는 것을 보여주었다. 반면에 최적 효소농도에서는 pH 6에서 약 48.5%에서 점차를 증가를 하다가 최적 점을 지나면서 감소를 하여 pH 8에서는 약 45.5%를 보여 주었다.

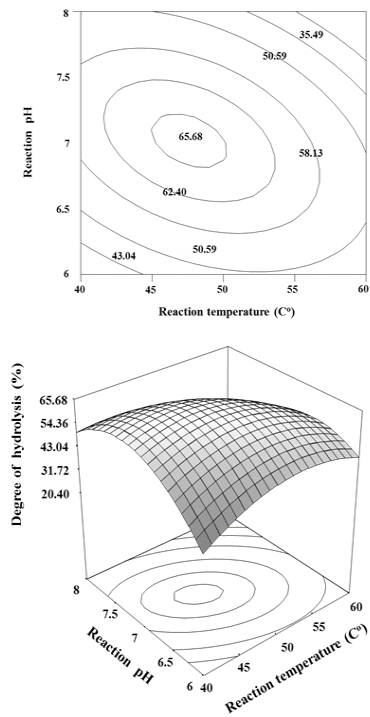


Fig. 1. Contour and 3D plot of degree of hydrolysis of wing's meat of Ogae. Enzyme reaction was performed at shaking incubator with conditions of pH range of 6 to 8 and temperature of 40 to 60°C.

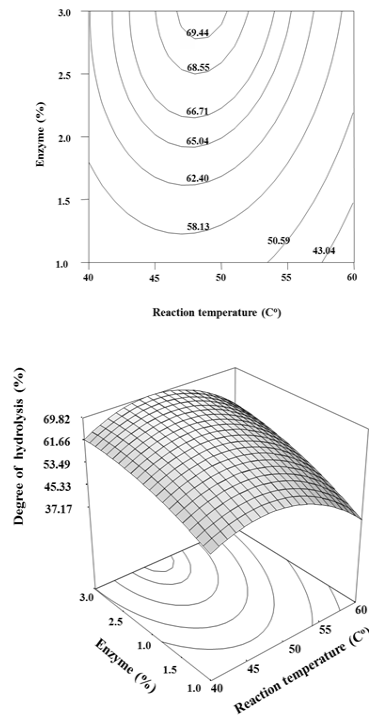


Fig. 2. Contour and 3D plot of degree of hydrolysis of wing's meat of Ogae. Enzyme reaction was performed at shaking incubator with conditions of enzyme concentration of 1.0 to 3.0% and temperature of 40 to 60°C.

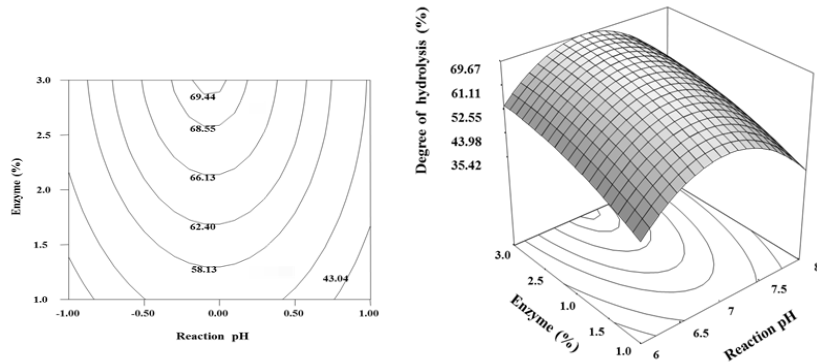


Fig. 3. Contour and 3D plot of degree of hydrolysis of wing's meat of Ogae. Enzyme reaction was performed at shaking incubator with conditions of enzyme concentration of 1.0 to 3.0% and pH 6 to 8.

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

Essential amino acid	Composition of amino acids of peptides
	(mg/100g)
Aspartic acid	989.65
Threonine	688.32
Serine	303.42
Glutamic acid	1,603.23
Proline	554.82
Glycine	976.98
Alanine	747.89
Cystine	130.17
Valine	581.69
Methionine	266.92
Isoleucine	564.18
Leucine	861.61
Tyrosine	391.39
Phenylalanine	453.36
Histidine	456.52
Lysine	1,009.05
Arginine	757.54
Total	11,336.64

3.5. 오계육 단백질 가수분해물 분자량

오계육 단백질의 프로테아제를 이용한 가수분해 최적 조건에서 생산된 가수분해물의 분자량을 측정하였다. Fig. 4는 MALDI-TOP 크로마토그램을 보여준다. MALDI-TOP의 그래프에서 x축은 분자량(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화된 물질의 강도를 나타낸다. 크로마토그램상의 분자량의 범위는 500-1,500 Da인데 대부분 가수분해물의 전형적인 펩타이드인 분자량 1,200 Da 이하이었다. 다른 연구를 보면 새우 가공 부산물로부터 가수분해물의 펩타이드를 동정한 결과 699 Da의 평균 분자량을 가진 펩타이드가 보고되었다. 항산화 기능을 가진 펩타이드 3가지가 참치육 가수분해물로부터 생산이 되었는데 분자량은 각각 1305 Da, 938 Da, 584 Da이었다[15]. 항바이러스 효능을 보이는 전갱이 단백질 가수분해물은 5 KDa 이었다[16]. 닭 근육 단백질로부터 철분 결합력을 가지는 주요 가수분해물은 2-5 KDa로 보고하였다[17].

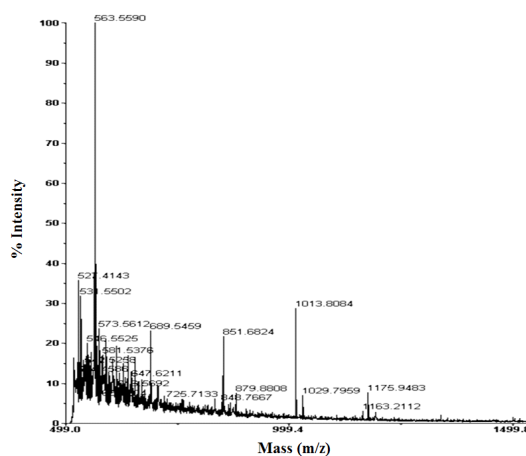


Fig. 4. MALDI-TOF mass spectrum of peptides produced from hydrolysis of wing's meat of Ogae by protease bromelain. Enzyme reaction was performed at 50°C, pH 6, and enzyme concentration 3%(w/v).

3.6. 오계 날개육 가수분해물의 아미노산 구성

펩타이드의 생리활성 기능은 생체이용률과 깊은 관계가 있다. 펩타이드들이 고유의 기능성을 나타내기 위해서는 목적하는 기관 또는 장소에 도달 할 때 까지 간에 대사작용, 소장 또는 위, 혈액에 존재하는 단백질 분해 요소에 저항하여야 한다. 펩타이드들은 다양한 메카니즘에 의하여 흡수되고 운반되어진다. 짧은 소수성 펩타이드는 전형적으로 2-6개로 되어있는 짧은 펩타이드들은 펩타이드 트랜스포트 기능에 의하여 흡수되어질 수 있다[18]. 본 연구에서 생산 한 펩타이드들의 아미노산 분포는 Table 6에서 보여준다. 구성아미노산의 총 함량은 11,336.64 mg/100g 중에 glutamic acid가 전체 구성아미노산의 14.14%로 가장 많은 함량을 차지하고 있었다. 다음으로 lysine(8.90%), aspartic acid(8.73%), glycine(8.62%), leucine(7.60%) 등의 순서였다. 금속 이온들을 키일레이션 또는 하이드로젠 및 음이온을 제공 가능한 항산화 물질들은 프리 라디칼과 반응을 하여 자동산화반응을 종식시키는 역할을 한다 [20-21]. 펩타이드를 구성하는 아미노산들 중에서 소수성 아미노산들 histidine, proline, methionine, cystein, tyrosine, tryptophan, phenylalanine 등이 항산화 기능을 보여준다고 보고되었다[24-25] 본 연구에서 생산된 펩타이드는 이러한 아미노산의 함량은 약 43.07%를 차지해서 높은 항산화 기능을 가질 것으로 본다. 한편 홍계의 자숙 가수분해물의 구성아미노산의 함량 glutamic acid가 전체 구성아미노산의 13.6%로 가장 많은 함량을 차지하고 있다고 보고한바 있어 본 연구에서 생산 한 펩타이드 양이 14.4%를 차지해 유사한 함량을 보여 주었다[10].

4 결론

본 연구는 전통적으로 빈혈과 출혈 예방, 항산화, 항고혈압, 항염증, 진통완화, 및 간 보호 등 다양한 효능을 보여온 천연 기념물인 연산오계의 날개육으로부터 상업용 프로테아제를 이용하여 펩타이드 형태의 가수분해물 최적 제조공정에 관한 것으로 표면 반응 분석 기법을 이용하여 수행된 연구 결과들은 다음과 같다.

1. 상업용 효소 bromelain을 이용하여 오계 날개육의 단백질 효소가수분해 공정조건 요인들인 반응 온도, pH, 효소양의 3개의 실험 변수에 대하여 박스-벤켄 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 가수분해도(%)를 실험한 결과 가수분해 값은 20.48-68.18% 범위 얻어졌다.
2. 오계 날개육의 단백질 최적 효소가수분해 공정조건은 효소 반응온도 48-50°C, 반응 pH 7.0-7.2, 효소의 양은 3%(w/v)에서 결정 되었다. 이때 가수분해 도는 68-69%에 도달하였다.
3. 오계 날개육의 단백질 최적 효소가수분해에 영향을 반응온도, pH, 효소의 농도의 공정 변수들이 단독 또는 상호 영향을 미치는 것으로 나타났고 효소의 농도가 약 3.5% 까지 증가 할수록 가수분해는 높아 졌지만 이상에서는 다른 요인들에 의해서 영향을 받아 감소하는 경향을 보였다. 본 연구에서는 공정의 효율성을 위해서 3%로 결정을 하였다.
4. 오계 날개육의 단백질 가수분해물들의 분자량의 분포를 MALDI-TOF를 이용하여 분석을 한 결과 전형적인 펩타이드인 분자량 1,200 Da 이하이었다. 이러한 펩타이드들은 항산화 기능을 보여주는 소수성 아미노산들 histidine, proline, methionine, cystein, tyrosine, tryptophan, phenylalanine 들이 43.07%를 차지해서 높은 항산화 기능을 가질 것으로 기대를 한다. 또한 구성아미노산의 함량 glutamic acid가 전체 구성아미노산의 13.6%로 가장 많은 함량을 차지하여 건강 기능 식품소재로서 활용할 가치가 높을 것으로 기대를 한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가 식품기술개발사업 (314040-30-1-HD030)에 의해 이루어진 것임

References

1. H.S. Chae, C.N. Ahn, Y.M. Yoo, J.S. Ham, J.M. Lee, S.K. Yoon. The effects of the high pressure boiled extracts (HPBE) of the ogol chicken with herbs on the hormones, cytokine, specific antibody of serum in rat. *Korean J. Food Sci. Ani*, 24: 283–292, 2004.
2. H.S. Chae, Y.M. Yoo, C.N. Ahn, B.Y. Cho, J.M. Park, J.M. Lee, Y.K. Kim, S.G. Yun, Y.I. Choi. Chemioal and sensory characteristics of boiled extracted from crossbred chicken as affected by the level of flavourzyme. *K. J. Poultry science*, 3: 11–16. 2003.
3. H.S. Yoo, K.H. Chung, K.J. Lee, D.H. Kim, J.H. An. Effect of *Gallus gallus* var. domesticus (Yeonsan ogolgye) extracts on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 43: 322–329, 2015.
4. C.M. Cho, C.K. Park, M.Y. Lee, I.D. Lew. Physicochemical characteristics of silky fowl (*Gallus domesticus* var. silkies). *Korean J. Food Sci. Ani.* 26: 306–314, 2006.
5. M. Darewicz, A. Iwaniak. Biologically active peptides derived from milk proteins. *Medycyna Weterynaryjna–Veterinary Medicine–Science and Practice*, 70: 348–354, 2014.
6. U. Grienke, J. Silke, D. Tasdemir. Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. *Food Chemistry*, 142: 48–60, 2014.
7. K. Arihara, M. Ohata. Bioactive compounds in meat F. Toldra (Ed.), Meat biotechnology, *Springer Science Business Media, LLC, New York*, 231–249, 2008.
8. B. Cigic, M. Zelenik–Blatnik. Preparation and characterization of chicken egg white hydrolysate. *Acta Chimica Slovenica*, 51: 177–188, 2004.
9. E. Salminen, J. Rintala. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste a review. *Bioresour. Technol.*, 83: 13–26, 2002.
10. E. Haque, R. Chand, S. Kapila. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Reviews International* 25: 28–43, 2009.
11. J.H. Baek, E.J. Jeong, S.Y. Jeon, Y.J. Cha. Taste components of the hydrolysate of snow crab *Chionoecetes japonicus* cooker effluent as precursors of crab flavorings. *Kor J Fish Aquat Sci.*, 45: 232–237, 2012.
12. X. Fang, N. Xie, X. Chen, H. Yu, J. Chen. Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology. *Original Research Article Food and Bioproducts Processing*. 90(4): 676–682, 2012.
13. H.W. Seo, E.Y. Jung, G.W. Go, G.D. Kim, S.T. Joo, H.S. Yang. Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. *Original Research Article Food Chemistry*. 185: 106–111, 2015.
14. Y. Guo, D. Pan, M. Tanokura. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Original Research Article Food Chemistry*. 114: 328–333, 2009.
15. K. Hsu, G. Lu, C. Jao. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with Orientase (*Bacillus subtilis*). *Food Research International*, 42, 647–655, 2009.
16. J. Adler–Nissen. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J Afric Food Chem.* 24: 1090–1093, 1976.
17. D.A. Vatter, R.R. Mahoney. Production of dialyzable iron by in vitro digestion of chicken muscle protein fractions: the size of the dialyzable iron. *J Sci Food Agric*, 85, 1537–1542, 2005.

18. O. Power, P. Jakeman, R.J. FitzGerald. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential application of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acid*, 44: 797-820, 2013.
19. L. You, M. Zhao, J.M. Regenstein, J. Ren. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 120, 810-816, 2010.
20. L. You, M. Zhao, J.M. Regenstein, J. Ren. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International*, 43, 1167-1173, 2010.
21. J. Ren, M. Zhao, J. Shi, J. Wang, Y. Jiang, C. Cui, Y. Kakuda, S.J. Xue. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108, 727-736, 2008.