

해삼 단백질로부터 펩타이드 제조 최적공정 확립 및 항산화 특성

하유진* · 유선균*†

*중부대학교 식품생명과학과
(2017년 5월 30일 접수: 2017년 6월 24일 수정: 2017년 6월 29일 채택)

Process Optimization of Peptides Production from Protein of Sea Cucumber and Its Antioxidant Capacity Analysis

Yoo Jin Ha* · Sun Kyun Yoo*†

**Department of Food and Biotechnology, Joongbu University
(Received May 30, 2017; Revised June 24, 2017; Accepted June 29, 2017)*

요약 : 식물 및 동물성 단백질 유래 펩타이드 형태의 단백질 가수분해물들은 항산화, 고혈압 완화, 면역조절, 진통완화 및 항균작용 등 생리활성이 있는 것으로 알려져 왔다. 본 연구는 건조 해삼으로부터 해삼육 슬러리를 제조하고 flavourzyme 프로티아제를 이용하여 단백질 가수분해 최적공정을 수행하였다. 이어서 생산된 펩타이드의 항산화 특성을 연구하였다. 효소반응 최적공정은 표면반응 분석법을 이용하여 수행을 하였고 공정의 범위는 반응온도 40-60 °C, 반응 pH 6-8, 효소의 농도 0.5-1.5%(w/v) 이었다. 해삼의 단백질 최적 효소가수분해 공정조건은 효소 반응온도 48-50 °C, 반응 pH 7.0-7.2, 효소의 양은 1.0-1.1%(w/v)에서 결정 되었다. 이때 단백질 가수분해 수율은 43-45%에 도달하였다. 생산된 대부분 가수분해물의 분자량들은 전형적인 펩타이드인 분자량 500-3,500Da로 분포되었다. 펩타이드들은 항산화 능력은 금속 킬레이션 능력(IC₅₀, 1.25 mg/mL), DPPH 소거능(IC₅₀, 3.40 mg/mL), 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능(IC₅₀, 10.3 mg/mL), 하이드록시 라디칼 소거능(IC₅₀, 22.11 mg/mL) 순서로 저해농도가 낮음을 보여 주었다. 따라서 해삼 단백질 가수분해물은 건강 기능 식품소재로서 활용할 가치가 높을 것으로 기대를 한다.

주제어 : 해삼, flavourzyme, 펩타이드, 가수분해, 표면반응

Abstract : Protein hydrolysates derived from plants and animals having 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 protein of sea of cucumber by a flavourzyme. The ranges of processes were the reaction temperature of 40 to 60 °C, pH 6 to 8, and enzyme concentration 0.5 to 1.5%(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 concentration of 1.0-1.1%(w/v), and degree of hydrolysis was 43-45 at above conditions. The

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

molecular weight of hydrolysate was distributed to 500–3,500 Da and showed typical peptides. Inhibition concentration (IC₅₀) of peptides of DPPH radical scavenging activity, Superoxide anion radical scavenging activity, Hydroxy radical scavenging activity, Fe²⁺ chelating activity was 1.25, 3.40, 10.3, and 22.11 mg/mL, respectively. Therefore, we expect that those products are useful as functional food ingredients.

Keywords : sea of cucumber, flavourzyme, peptides, hydrolysis, response surface methodology

1. 서론

해삼(*Stichopus japonicus*)은 열대 지역의 따뜻한 바닷물과 차갑고 깊은 바다 해구와 다양한 서식지에서 발견되는 무척추동물이다[1]. 인도양과 서태평양 지역에 위치한 말레이시아, 필리핀, 일본, 한국, 중국 등 여러 나라에서 해삼은 중요한 식품으로 여겨지며, 세계적으로 1,500종 이상이 분포하고 있으며, 또한 동물 등의 세포간 조직, 신경 조직 및 연골 조직에서 발견되는 점질 다당체인 황산 콘드로이친(Chondroitin sulfate)을 2.6–3.2%를 함유하고 있다[2]. 이 중에서 경제적 가치가 높은 돌기해삼(*Apostichopus japonicus*)이 국내에 주로 분포하고 있다[3–4]. 최근에 해삼의 추출물 또는 건조물은 항산화, 항바이러스, 항암, 항 응고, 항 골다공증, 위 염증 완화 등의 효능이 발표되었다[5–9].

기능성 식품과 식, 의약 소재들은 최근에 높은 상업적 관심을 끌고 있다. 작은 분자량의 펩타이드들은 항산화, 고혈압 완화, 면역조절, 진통 완화 및 항균작용이 있는 것으로 연구결과 등이 발표되어 오고 있어 기능성 식품, 치료식, 그리고 천연 약품으로 개발의 가능성을 높여오고 있다[10–12]. 분자량이 약 6,000 Da 이면서 아미노산의 구성이 2–20인 펩타이드들은 본래의 어류, 난, 대두, 우유 단백질에서는 불활성화 된 채로 존재하는 것으로 알려 졌다[13–16]. 이들 중에서 어류에서는 어육, 어육 피부, 내장, 간, 뼈, 난 단백질로부터 항산화 기능성 펩타이드에 대한 연구들이 발표 되어 왔다[17]. 최근에는 해삼의 난으로부터 상업용 단백질 가수분해 효소를 이용하여 금속 결합 기능을 지닌 펩타이드를 생산하고 펩타이드의 크기, 이온 분포, 특정 아미노산의 분포에 따라 기능성이 다르다 는 것을 보고하였다[18].

이러한 배경에서 본 연구는 해삼 단백질을

flavourzyme 프로티아제 효소와 표면 반응 모델링 분석법을 이용하여 펩타이드 형 가수분해물 생산 최적공정을 확립하였고, 분획된 가수분해물의 분자량과 DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

실험에 사용이 된 해삼은 (주)말리고(Seoul, Korea)에서 건조된 상태로 제공받았다. 단백질 분해 효소 flavourzyme은 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. 해삼 전처리 과정

건해삼 100 g을 칭량하여 800 mL 정제수에 넣고 5 °C에서 24시간 냉장 보관하였다. 24 시간 침지가 끝난 해삼은 잘게 잘라서 균질기(Homogenizer, Daihan scientific Co. Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 슬러리 형태로 성형하였다.

2.3. 표면반응실험 계획

해삼 단백질 가수분해 표면 반응 실험 계획은 3개의 독립변수 즉, 효소반응온도(°C), 반응 pH, 효소의 농도(%)를 각각 50 °C, pH 7, 1%로 하는 중심 런을 5번 반복을 포함하여 총 17개의 처리 조합으로 설계를 하였다. Box–Behnken Design은 세 가지의 중요한 절차에 따라 진행되는데, 첫째는 계획된 실험에 따라 통계적으로 실험을 수행하고, 둘째는 수식 모델의 계수를 구하

고, 셋째는 모델의 적합성을 판정하는 것으로 진행이 된다. 본 실험에서의 반응 변수는 단백질 가수분해도(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.

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

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

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

실험 후에 확정 된 결과들의 통계분석은 Design Expert (Stat-ease Inc., Minneapolis, USA)를 사용하였다. 독립변수들의 값의 선택은 예비 실험에

서 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 0.5% (-1), 1% (0), 1.5% (+1)%로 하였다 (Table 1).

2.4. 해삼단백질 가수분해

슬러지 해삼 20 g과 증류수 5 mL을 삼각플라스크에 넣고 Box-Behnken Design에 따라 flavourzyme의 농도 0.5%, 1%, 1.5%를 첨가하고 반응 온도 40 °C, 50 °C, 60 °C, 반응 pH 6, pH 7, pH 8 에 맞춰 진탕 배양기에서 4시간 효소 반응시켰다.

2.5. 해삼단백질 가수분해도 측정

단백질 가수분해 정도는 가수분해물의 아미노산 중에서 tyrosine 양을 대표로 하여 분석을 하였다. 해삼의 가수분해도의 값은 해삼 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 해삼의 가수분해물의 tyrosine 양으로 측정 된 값을 D_t 로 하였다. 초기 해삼의 tyrosine 양으로 측정 된 값을 D_0 로 하였다. 가수 분해물들의 tyrosine 양은 샘플 1 mL 에 0.5 N NaOH 5 mL 혼합한 후, 1 N FCP 1mL 넣고 즉시 혼합시킨 후 배양기에 30 °C로 15분 반응시켰다. 반응액은 578 nm에서 흡광도를 측정하였다. 따라서 가수분해도 DH% (degree of hydrolysis)의 값은 아래 식을 이용하여 계산하였다.

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

Table 1. Reaction temperature, pH, and enzyme concentration levels of independent variables in Box-Behnken 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 (%)	0.5	1	1.5

2.6. 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 1:1비율로 섞었다. 플레이트 위에 1mL 정도 떨어뜨려 건조한 후 노란색을 띠는 샘플을 취해 질량분석기(MALDI-TOF, Voyager DE-STR, Applied biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.7. DPPH 라디칼 소거능

DPPH의 측정 방법은 산소인 자유 라디칼이 생체 고분자들인 지질 단백질 등과 결합을 하여 피부의 노화 및 질병을 유발하는 물질로 밝혀진 이래로 항산화 물질의 라디칼 소거능에 이용되고 있다[19]. DPPH 라디칼 소거활성은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다[20]. 추출된 시료를 일정한 농도로(10%) 증류수에 용해한 후 시료가 포함된 용액 2 mL와 DPPH-radical(0.2 mM) 용액 0.5 mL를 혼합 하였다. 혼합물은 30분 간 실온에서 암실 보관한 후 517 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 대조구로는 ascorbic acid를 이용하였으며 시료와 동일한 조건으로 측정하였다. DPPH-radical scavenging activity는 아래의 식에 의해 값을 산출하였다.

DPPH-radical scavenging activity(%)=

$$[(B-A)/B] \times 100$$

A: 시료 첨가시의 흡광도

B: 시료 무 첨가시의 흡광도

2.8. 하이드록시 라디칼 소거능

Hydroxyl 라디칼에 대한 소거활성 측정[21]을 위하여 표준물질 제조는 ascorbic acid 10 mg을 10 mL DIW(deionized water)에 혼합하였다. 대조구는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 사용하고, 샘플은 10,000ppm, 20,000 ppm 으로 준비한다. 라디칼 반응은 300 uL 샘플용액, 300 uL 3 mM 1,10-phenanthroline, 300 uL 3 mM FeSO₄, 300uL 0.01% hydrogen peroxid를 혼합한 후 37 °C에서 1시간동안 진탕

배양한 후 spectrophotometer를 사용하여 536nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl 라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

Hydroxyl radical scavenging activity(%)=

$$[(\Delta A/\text{min})_b - (\Delta A/\text{min})_s] / (\Delta A/\text{min})_b \times 100.$$

b: 대조구, s: 샘플

$\Delta A/\text{min}$: 반응 후 흡광도 -반응 전 흡광도

2.9. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

Superoxide 라디칼 소거활성 측정[22]을 위하여 대조구는 50 mM Tris-HCl buffer(pH8.3)용액을 사용하였다. 반응은 Micro tube를 이용하여 제조된 500 uL 50 mM Tris-HCl buffer(pH8.3) 용액에 peptide 500ug을 넣고 혼합한 다음 400uL 1.5 mM pyrogallol 용액을 혼합한 후 실온에서 4분 동안 반응시킨 후 spectrophotometer를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide에 대한 소거활성은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

Superoxide scavenging activity(%)=

$$[(\Delta A/\text{min})_b - (\Delta A/\text{min})_s] / (\Delta A/\text{min})_b \times 100.$$

b: 대조구, s: 샘플

$\Delta A/\text{min}$: 반응 후 흡광도 -반응 전 흡광도

2.10. Fe²⁺ 킬레이션 능력

추출된 시료는 일정 한 농도로(0-1%) 증류수에 용해하였고 test tube에 추출된 시료 500 uL와 100 uL FeCl₂(0.6 mM), 900 uL methanol을 넣고 혼합하였다. 5분 동안 상온에서 반응시킨 후 100 uL ferrozine(5 mM)을 혼합물에 첨가하여 10분 동안 상온 에서 반응 시켰다. 562 nm에서 흡광도를 측정 하였고, 대조구로는 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 시료와 동일한 조건으로 측정하였다.

Iron chelation activity(%)=(1-A/B)×100

A: 시료 첨가시의 흡광도

B: 시료 무 첨가시의 흡광도

Table 2. Experimental data of degree of hydrolysis of sea of cucumber by flavourzyme protease

Run	X_1	X_2	X_3	Degree of hydrolysis(%)
1	40	6	1	28.66
2	60	6	1	18.82
3	40	8	1	30.50
4	60	8	1	18.10
5	40	7	0.5	37.66
6	60	7	0.5	27.78
7	40	7	1.5	40.62
8	60	7	1.5	28.46
9	50	6	0.5	27.58
10	50	8	0.5	26.89
11	50	6	1.5	27.02
12	50	8	1.5	28.86
13	50	7	1	42.74
14	50	7	1	43.02
15	50	7	1	42.74
16	50	7	1	42.62
17	50	7	1	43.30

3. 결과 및 고찰

3.1. 해삼의 단백질 가수분해 최적화 공정

해삼의 단백질 효소가수분해 공정조건 요인들인 반응 온도, pH, 효소양의 3개의 실험변수에 대하여 Box-Behnken Design으로 실험을 설계하여 얻어진 가수분해도를 실험결과가 Table 2에서 보여준다. 실험결과 가수분해도의 값은 18.10-43.30% 범위에서 측정값이 얻어졌다.

Table 3은 실험 결과에서 나타난 가수 분해도에 대한 회귀식의 분산분석의 결과를 보여준다. Quadratic 회기 모델의 분석 결과는 모델의 적합성 여부를 나타내는데, flavourzyme 효소에 의한 해삼의 가수분해는 반응온도, pH, 및 효소의 양에 의하여 영향을 받는다는 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

0.9996 이었다. 따라서 본 결정계수 값은 반응 변수의 95% 이상이 가수분해 수율에 대한 반응 변수의 함수로 표면반응 모델로 적용될 수 있다는 것을 보여준다. 적합결여(lack of fit) 테스트 검정에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다. 실험 결과 해삼의 단백질의 효소 가수분해는 효소의 반응온도, 반응 pH, 및 효소의 농도에 의해서 영향 받는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 효소반응온도와 효소의 농도가 pH 보다 영향을 더 미치는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 2차 항에서도 비슷한 경향을 보여주었다. 반응온도, 반응 pH, 및 효소의 양은 교호항에서 모두 유의성이 나타나 요인들이 단독 또는 교호적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이들에 대한 이들의 대한 회귀식은 Table 4에 있다.

Table 3. Analysis of variance(ANOVA) for response surface quadratic model to the degree of hydrolysis of sea cucumber by flavourzyme protease

Source	DF	Sum of squares		F value	P value
		Degree of hydrolysis ^a			
Model	9	1180.61		1874.57	<0.0001
X_1	1	245.13		3503.03	<0.0001
X_2	1	0.69		9.02	0.0162
X_3	1	4.62		66.03	<0.0001
X_1^2	1	1.63		23.34	<0.0001
X_2^2	1	1.30		18.57	0.0019
X_3^2	1	0.44		6.22	0.0035
X_1X_2	1	173.73		2482.68	0.0413
X_1X_3	1	651.54		9310.70	<0.0001
X_2X_3	1	33.73		482.06	<0.0001
Residual	7	0.49			
Lack of Fit	3	0.19		0.82	0.5450
Pure Error	4	0.30			
Cor Total	16	1181.10			

^a Coefficient of correlation (R^2) for degree of hydrolysis was 0.9996.

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

Factor	Regression coefficient
Intercept	42.88
X_1	-5.54
X_2	0.29
X_3	0.76
X_1^2	-6.42
X_2^2	-12.44
X_3^2	-2.83
X_1X_2	-0.64
X_1X_3	-0.57
X_2X_3	0.33

X_1 : reaction temperature(°C), X_2 : reaction pH, X_3 : enzyme concentration (%).

3.2. 해삼 단백질 가수분해에 대한 반응 온도와 pH의 영향

효소 flavourzyme에 의한 해삼슬러리의 가수분해 공정은 반응 온도와 pH의 상호영향을 준다는 것을 보여주었다. Fig. 1은 두 공정변수에 대한 가수분해도(%)의 3D 표면과 등고선 식을 보여준다. Fig. 1은 효소의 농도를 1%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 31.53%에서 점차로 증가를 하다가 pH 7.2에서 최적 가수분해도인 약 44.07%을 지나 점차 감소를 하여 pH 8에서는 약 32.57%까지 떨어졌다. 반대로 최적 반응 pH에서는 반응온도 40 °C에서 약 42.07%이었던가 48 °C에서 최적 가수분해도인 약 42.88%을 지나 점차 감소를 하여 60 °C에서는 약 31.27%까지 떨어짐을 보여주었다.

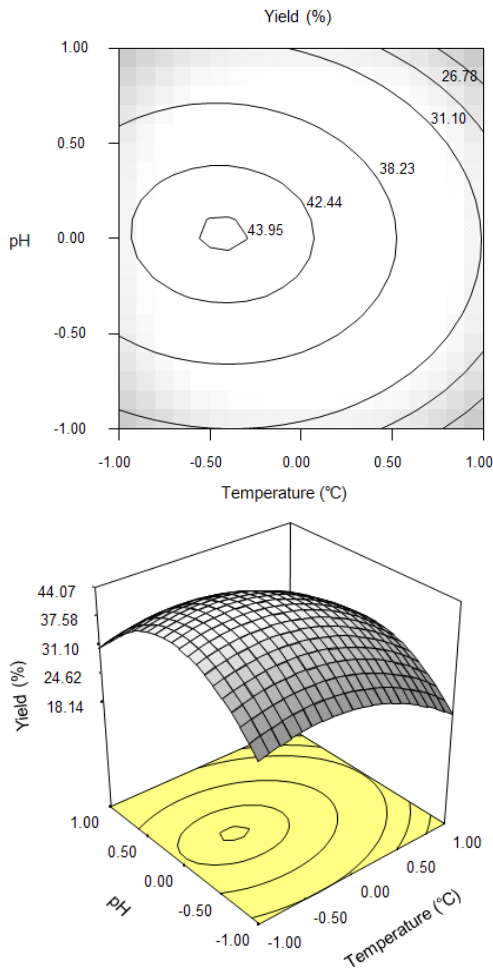


Fig. 1. Contour and 3D plot of degree of hydrolysis of sea of cucumber. Enzyme reaction was performed at shaking incubator with conditions of pH range of 6 to 8 and temperature of 40 to 60°C.

3.3. 해삼 단백질 가수분해에 대한 반응 온도와 효소 농도의 영향

Fig. 2는 반응온도 및 효소의 농도 두 공정변수에 대한 가수분해도(%)의 3D 표면 과 등고선식을 보여준다. Fig. 2는 최적 pH 7.2로 하였을 때 반응 온도 범위인 40-60°C 와 투입한 효소의 농도 범위인 0.5-1.5% 에서 최적 가수분해는 약 48 °C에서 결정이 되었고, 효소의 농도는 약 1.1%에서 결정이 되었다. 이때의 가수분해도는

약 42.88% 이었다. 최적 온도에서 효소 양에 따른 가수분해는 0.5%일 때 약 40.29%에서 점차 증가하다가 약 1.1%에서 최적가수분해도인 약 42.88%을 지나 점차 감소하여 1.5%에서 42.34% 까지 감소하는 것을 보여주었다. 최적 효소 농도에서는 반응 온도에 따른 가수분해는 40 °C일 때 42.29%에서 점차 증가하다가 48 °C에서 최적가수분해도인 약 42.88%을 지나 점차 감소하여 60 °C에서 31.38%까지 감소하는 것을 보여주었다.

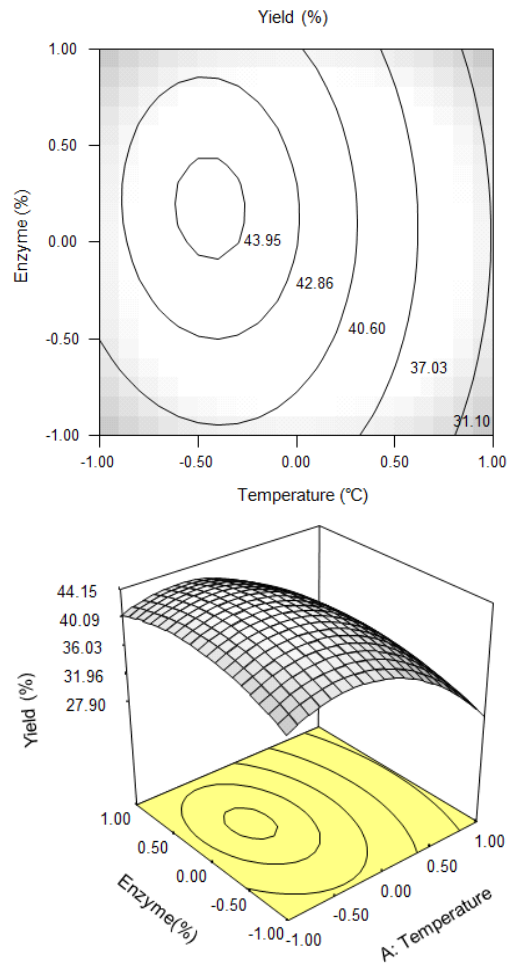


Fig. 2. Contour and 3D plot of degree of hydrolysis of sea of cucumber. Enzyme reaction was performed at shaking incubator with conditions of enzyme concentration of 0.5 to 1.5% and temperature of 40 to 60 °C.

3.4. 해삼 단백질 가수분해에 대한 반응 pH와 효소 농도의 영향

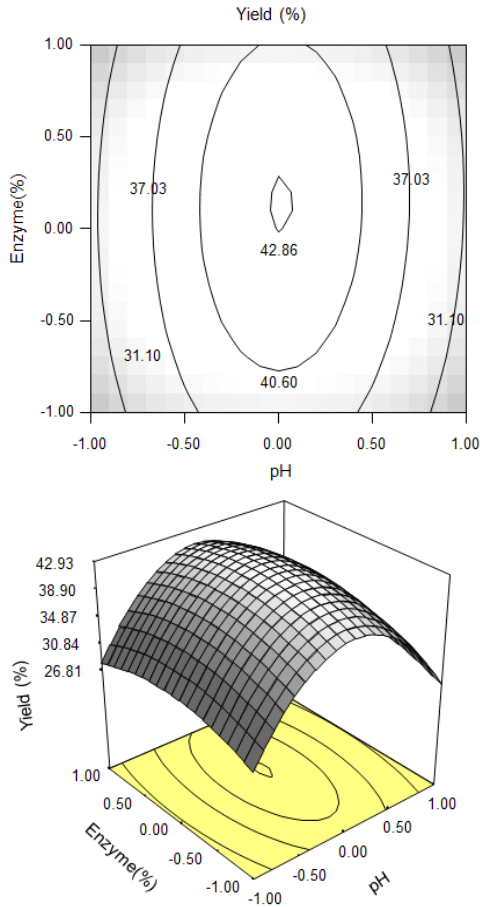


Fig. 3. Contour and 3D plot of degree of hydrolysis of sea of cucumber. Enzyme reaction was performed at shaking incubator with conditions of enzyme concentration of 0.5 to 1.5% and pH 6 to 8.

Fig. 3는 반응 pH 및 효소의 농도 두 공정변수에 대한 가수분해도(%)의 3D 표면과 등고선식을 보여준다. Fig. 3는 최적 반응온도에서 반응 온도 pH 범위인 5-7 과 투입한 효소의 농도 범위인 0.5-1.5% 에서 가수분해도를 보여준다. 최적 pH는 6.8-7에서 최적 효소의 농도는 1.1%에서 결정되었음을 보여준다. 이때의 가수분해도는 약 42.93% 이었다. 최적 pH에서 효소 양에 따른

가수분해는 0.5% 일 때 약 39.39%에서 점차 증가하다가 약 1.1%에서 최적가수분해도인 약 42.93%을 지나 점차 감소하여 1.5%에서 40.84% 까지 감소하는 것을 보여주었다. 반면에 최적 효소농도에서 반응 pH에 따른 가수분해는 pH 6에서 약 30.77%에서 점차를 증가를 하다가 pH 7에서는 최적가수분해도인 약 42.93%를 지나 점차 감소하여 pH 8에서는 약 31.80%를 보여 주었다.

3.5. 해삼 단백질 가수분해물 분자량

해삼 단백질의 프로테아제를 이용한 가수분해 최적 조건에서 생산된 가수분해물의 분자량을 MALDI-TOF를 이용하여 측정하였다. Fig. 4는 크로마토그램을 보여준다. MALDI-TOF의 그래프에서 x 축은 분자량(m/z)를 나타내고 Y축은 이온화 된 물질의 강도를 나타낸다. 크로마토그램 상의 분자량의 범위는 대부분 가수분해물의 전형적인 펩타이드인 분자량인 500-3,500Da 이었다. 다른 펩타이드 연구를 결과를 보면 새우 가공 부산물로부터 가수분해물의 펩타이드를 동정한 결과 699 Da 의 평균 분자량을 가진 펩타이드가 보고되었다. 항산화 기능을 가진 펩타이드 3가지가 참치육 가수분해물로부터 생산이 되었는데 분자량은 각각 1,305 Da, 938 Da, 584 Da이었다 [23]. 항바이러스 효능을 보이는 전갱이 단백질 가수분해물은 5 KDa 이었다[24]. 닭 근육 단백

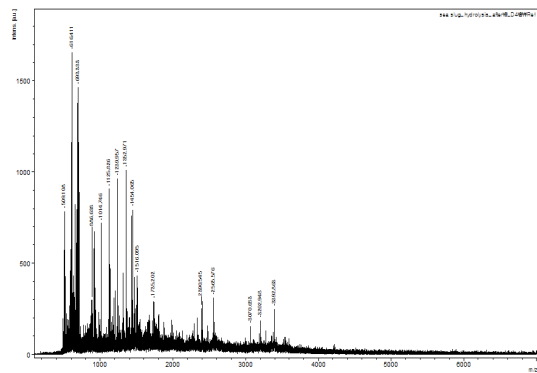


Fig. 4. MALDI-TOF mass spectrum of peptides produced from hydrolysis of sea of cucumber protease flavourzyme. Enzyme reaction was performed at 50 °C, pH 6, and enzyme concentration 1%(w/v).

질로부터 철분 결합력을 가지는 주요 가수분해물은 2-5 KDa 로 보고하였다[25]. bromelain에 의한 고등어 근육 단백질 가수분해물의 분자량은 1,400 Da 로 보고되었다[26].

3.6. 해삼 단백질 가수분해물의 항산화 특성

해삼단백질 가수분해물들의 항산화 특성을 측정하기 전에 환외여과막과 TCA(three chloro acetic acid)를 이용하여 분획을 하였다. DPPH 라디칼 소거반응을 이용한 항산화능 측정방법은 화학적으로 안정화된 자유라디칼을 가지는 DPPH가 전자를 내어주면서 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 자색이 탈색되는 정도를 지표로 하여 항산화능을 측정하는 방법이다[27]. 분획된 해삼 단백질 가수분해물들의 DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력이 다르게 나타났다(Table 5). DPPH 소거능과 하이드록시 라디칼 소거능 소거능은 가수분해물에 대하여 능력은 다르지만 경향은 유사하였고, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능과 금속 킬레이션 능력에 차이는 있지만 유사한 경향을 보여주었다. 이러한 이유들은 효소에 따른 생산한 가수 분해물의 분자량의 차이와 펩타이드 종류의 차이에 원인이 있다고 볼 수 있다. 환외여과 분획 가수분해물은 금속 킬레이션 능력, DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해능도가 낮음을 보여 주었다. 반면에 TCA 분획 가수 분해물 DPPH 소거능슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 금속 킬레이션 능력, 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해능도가 낮음

을 보여 주었다.

4. 결론

해삼(*Stichopus japonicus*)은 최근에 해삼의 추출물 또는 건조물들은 항산화, 항바이러스, 항암, 항 응고, 항 골다공증, 위 염증 완화 등 효능을 나타낸다고 보고를 하고 있다[5-9]. 상업용 프로테아제를 이용하여 펩타이드 형태의 가수분해물 최적 제조공정에 관한 것으로 표면 반응 분석 기법을 이용하여 수행된 연구 결과들은 다음과 같다.

1. 상업용 효소 flavourzyme을 이용하여 해삼 단백질 효소가수분해 공정조건 요인들인 반응 온도, pH, 효소양의 3개의 실험변수에 대하여 박스-벤젠 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 가수분해도(%)를 실험한 결과 가수분해 값은 18.10-43.30% 범위 얻어졌다.
2. 해삼의 단백질 최적 효소가수분해 공정조건은 효소 반응온도 48-50 °C, 반응 pH 7.0-7.2, 효소의 양은 1.0-1.1%(w/v)에서 결정되었다. 이때 가수분해 도는 43-45%에 도달하였다.
3. 해삼 단백질 최적 효소가수분해에 영향을 반응온도, pH, 효소의 농도의 공정변수들이 단독 또는 상호 영향을 미치는 것으로 나타

Table 5. Inhibition concentration (IC₅₀) of antioxidant capacity of protein hydrolysate of sea cucumber

Hydrolysates	Antioxidant activities			
	DPPH radical scavenging activity	Superoxide anion radical scavenging activity	Hydroxy radical scavenging activity	Fe ²⁺ cheating activity
	(mg/mL)			
A	3.40	10.3	22.11	1.25
B	2.40	7.30	25.11	5.25

A and B were the protein hydrolysates of fractionated by 10 k ultra-membrane and precipitated by three chloro acetic acid, respectively

났고 효소의 농도가 약 1.0% 까지 증가 할 수록 가수분해는 높아 졌지만 이상에서는 다른 요인들에 의해서 영향을 받아 감소하는 경향을 보였다. 본 연구에서는 공정의 효율성을 위해서 1%로 결정을 하였다.

4. 해삼 단백질 가수분해물들의 분자량을 MALDI-TOF를 이용하여 분석을 한 결과 전형적인 펩타이드인 분자량 500-3,500 Da 분포를 보여주었다. 이러한 펩타이드들은 항산화 기능을 보여주었는데 한외여과 분획 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력(IC₅₀, 1.25 mg/mL), DPPH 소거능(IC₅₀, 3.40 mg/mL), 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능(IC₅₀, 10.3 mg/mL), 하이드록시 라디칼 소거능(IC₅₀, 22.11 mg/mL) 순서로 저해농도가 낮음을 보여 주었다. 따라서 해삼 단백질 가수분해물은 건강 기능 식품소재로서 활용할 가치가 높을 것으로 기대를 한다.

결론

본 논문은 2016년도 중부대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

References

1. Y. Zhao, B. Li, Z. Liu, S. Dong, X. Zhao, M. Zeng, "Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysis", *Process Biochem*, Vol.42, pp. 1586-1591, (2007).
2. I. Wijesekara, S. K. Kim, "Angiotensin-I-converting enzyme(ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry", *Mar. Drug*, Vol.8, pp. 1080-1093, (2010).
3. Y. Zhong, M. A. Khan, F. Shahidi, "Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*)", *J. Agric. Food Chem*, Vol.55, pp. 1188-1192. (2007).
4. T.I. Kim, M.H. Son, J.K. Cho, Y.G. JIN, "Observation of External Injury and Morphological Movement for Analysis of Recovery Possibility after Storage of the Juvenile Sea Cucumber", *Apostichopus japonicus JF M S E*, Vol. 28, No. 4 pp. 1006-1013, (2016).
5. D. L. Aminin, B. V. Pinegin, L. V. Pichugina, T. S. Zaporozhets, I. G. Agafonova, V. M. Boguslavski, "Immunomodulatory properties of Cumaside", *Int Immunopharmacol*, Vol.6, pp. 1070-1082, (2006).
6. J. Mamelona, E. Pelletier, K. Girard-Lalancette, J. Legault, S. Karbouned, S. Kermasha, "Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*", *Food Chem.*, Vol.104, pp. 1040-1047, (2007).
7. A. Husni, I. S. Shin, S. G. You, D. Chung, "Antioxidant properties of water and aqueous ethanol extracts and their crude saponin fractions from a far-eastern sea cucumber, *Stichopus japonicus*", *Food Sci Biotechnol.*, Vol.18, pp. 419-424, (2009).
8. M. S. Maier, A. J. Roccatagliata, A. Kuriss, H. Chludil, A. M. Seldes, C. A. Pujol, E. B. Damonte, "Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*", *J Nat Prod.*, Vol.64, pp. 732-736, (2001).
9. M. Kaneko, F. Kisa, K. Yamada, T. Miyamoto, R. Higuchi, "Structure of a new neuritogenic-active ganglioside from the sea cucumber *Stichopus japonicus*". *Eur J Org Chem*. pp. 1004-1008, (2003).
10. B. Cigic, M. Zelenik-Blatnik, "Preparation and characterization of chicken egg white hydrolysate", *Acta Chimica Slovenica.*, Vol.51, pp. 177-188, (2004).
11. E. Salminen, J. Rintala, "Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste a review", *Bioresour.*

- Technol*, Vol.83, pp. 13–26, (2002).
12. E. Haque, R. Chand, S. Kapila, "Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin", *Food Reviews International*, Vol.25, pp. 28–43, (2009).
 13. R. Florisa, I. Recio, B. Berkhout, S. Visser, "Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives there of Current, *Pharmaceutical Design*, Vol.9, pp. 1257–1275, (2003).
 14. M. Yoshikawa, H. Fujita, N. Matoba, Y. Takenaka, T. Yamamoto, R. Yamauchi, H. Tsuruki, K. Takahata, "Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases", *BioFactors*, Vol.12, No.1–4 pp. 143–146, (2000).
 15. P. Harnedy, R. J. FitzGerald, "Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review", *Journal of Functional Foods*, Vol.4, No.1 pp. 6–24, (2012).
 16. J. R. Chen, T. Okada, K. Muramoto, K. Suetsuna, S. C. Yang, "Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from the peptic digest of soybean protein", *Journal of Food Biochemistry*, Vol.26, pp. 543–554, (2002).
 17. M. Chalamaiyah, B. Dinesh kumar, R. Hemalatha, T. Jyothirmayi, "Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review", *Food Chemistry*. Vol.135, pp. 3020–3038, (2012).
 18. N. Sun, P. Cui, Z. Jin, H. Wu, Y. Wang, S. Lin, "Contributions of molecular size, charge distribution, and specific amino acids to the iron-binding capacity of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) ovum hydrolysates", *Food Chemistry*. Vol.230, pp. 627–636, (2017).
 19. S. S. Pitchumoni, P. M. Doraiswamy, "Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's disease", *J Am Geriatr Soc.*, Vol.46, pp. 1566–1572. (1998).
 20. M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol.18, pp. 1000, (2004).
 21. X. B. Fan, C. J. Li, D. N. sha, "The establishment of o-phenanthroline chemiluminescent system for measuring OH radical", *Basic Medical Sciences and Clinics*. Vol.18, No.6 pp. 468–471, (1998).
 22. W. Yu, Y. Zhao, Z. Xue, H. Jin, D. Wang, "The antioxidant properties of lycopene concentrate extracted from tomato paste", *Journal of the American oil Chemists Society*. Vol.78, No.7, pp. 697–701, (2001).
 23. K. Hsu, G. Lu, C. Jao, "Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with Orientase (*Bacillus subtilis*)", *Food Research International*. Vol.42, pp. 647–665, (2009).
 24. J. Adler-Nissen, "Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility", *J Afric Food Chem.*, Vol.24, pp. 1090–1093, (1976).
 25. 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*, Vol.85, pp. 1537–1542, (2005).
 26. D. M. Yeum, Y. S. Kim, "Antioxidative action of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein", *Korean J. Food & Nutrition*, Vol.7, No.2 pp. 128–136, (1994).
 27. A. H. Ding, C. F. Nathan, D. J. Stuhr, "Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages", *J Immunol*, Vol.141, pp. 240–241. (1988).