

도루묵 가수분해물 유래 항염증 펩타이드 제조를 위한 효소 가수분해 최적 조건

장혜림¹ · 윤경영^{1,*}
¹영남대학교 식품영양학과

Optimal conditions of enzymatic hydrolysis for producing anti-inflammatory peptides from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) hydrolysate

Hye Lim Jang¹ and Kyung Young Yoon^{1,*}

¹Department of Food and Nutrition, Yeungnam University

Abstract In this study, the hydrolysis conditions for the production of anti-inflammatory peptides from meat and roe hydrolysates of sandfish (*Arctoscopus japonicus*) were determined by measuring the nitric oxide (NO) scavenging enzymatic activity, experimental pH, temperature, enzyme concentration, and hydrolysis time. The optimal conditions determined when using meat hydrolysate were a pH value of 5.0, at a temperature of 30°C, 1% enzyme concentration, and 4 h hydrolysis time. The optimal conditions when using roe hydrolysate were a pH of 5.0, a temperature of 70°C, enzyme concentration of 3%, and hydrolysis time of 3 h. The NO scavenging activities of meat and roe hydrolysate were determined to be 18.94 and 19.81%, respectively. In summary, this study determined the optimum enzymatic hydrolysis conditions for the production of anti-inflammatory peptides from sandfish.

Keywords: sandfish, *Arctoscopus japonicus*, enzymatic hydrolysis, hydrolysis conditions, anti-inflammatory peptide

서 론

염증반응은 산화질소(NO)(nitric oxide, NO), 활성산소종(reactive oxygen species, ROS), 프로스타글란딘(prostaglandin, PG), cytokine 등 다양한 염증매개인자에 의해 일어난다(Jang 등, 2017a). 그 중에서도 NO는 인체 내에서 혈관 확장 및 신경 전달을 비롯한 여러 생리화학적·병리학적 과정의 조절에 중요한 역할을 하는 세포 신호분자이다(Choi 등, 2013). 그러나 NO는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 촉매 작용으로 합성되는 라디칼(radical)로 매우 불안정하며, 인체 내에서 독성을 나타낸다(Bogdan, 2001). Superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$)과 반응하여 DNA를 손상시키는 peroxynitrite (ONOO⁻)를 형성할 뿐만 아니라 세포내에서 산화를 일으키는 유발인자인 hydroxy radical ($\cdot OH$)로 쉽게 전환될 수 있다(Liu 등, 2002). 이에 따라 NO의 억제는 염증성질환 또는 산화에 의해 일어나는 노화를 예방하고 치료하는데 중요한 지표가 된다.

전 세계적으로 현대의 소비자들은 경제 성장 및 삶의 질 향상으로 건강한 식문화와 개인의 건강에 대한 관심이 증가하고 있다. 이에 따라 건강기능식품 및 천연물에 대한 수요와 식품 안전에 대한 관심이 증가하였으며, 이를 통해 건강한 삶을 영위하고

자하는 새로운 라이프스타일을 추구하고 있는 추세이다. 폴리페놀, 플라보노이드 및 카로테노이드와 같은 천연물은 항산화, 항암, 항균, 항염증과 같은 다양한 생리활성을 나타낸다. 일부 단백질 및 펩타이드 또한 그들이 가진 항산화 및 항염증 효과에 대해 보고된 바 있다. 이러한 천연물은 다양한 방법에 의해 얻어지는데 그중 단백질이 풍부한 식품으로부터 효소적 가수분해에 의해 얻어진 펩타이드가 항염증을 비롯한 다양한 생리활성에 관여한다는 연구결과가 보고되고 있다(Dia 등, 2009; Hernández-Ledesma 등, 2009; De Mejia과 Dia, 2009; Nam 등, 2012; Udenigwe 등, 2009).

효소 가수분해물은 고분자인 당질, 단백질, 지질 등의 대사에 장애가 있는 사람 또는 환자를 위한 식이로 사용되고 있다. 특히 단백질 가수분해물은 오래전부터 단백질이 필요한 운동선수나 노인을 위한 식이보충제로, 값비싼 단백질 급원을 대체하는 동물사료의 급원으로 사용되는 등 다양한 가공 분야에서 이용된다(Córdova-Murueta과 García-Carreño, 2002; Schmidl 등, 1994). 고분자인 단백질에 비해 저분자의 펩타이드가 함유된 가수분해물은 소화·흡수가 용이할 뿐만 아니라 다양한 식품 및 가공품에서의 이용성이 높다.

도루묵(*Arctoscopus japonicus*)은 농어목에 속하는 한류성 어종으로 일본의 중부 이북, 사할린, 알래스카를 비롯하여 한국의 동쪽 해안에 널리 분포되어 있다(An 등, 2011). 다른 어류와 달리 옆줄이 없는 것이 특징이며, 100-200 m의 수심에서 서식하고 새우나 해초 등을 먹고 산다(Jang 등, 2016). 도루묵은 한국의 겨울철 별미 중 하나로 산란기인 겨울철에 어획량이 급증하며, 어육 및 알을 비롯한 가식부위의 단백질 함량이 약 72%로 매우 풍부하다(Jun 등, 2016). 이에 따라 최근 연구에서는 도루묵 유래 가

*Corresponding author: Kyung Young Yoon, Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38541, Korea
Tel: +82-53-810-2878
Fax: +82-53-810-4768
E-mail: yoonky2441@ynu.ac.kr
Received August 14, 2017; revised September 29, 2017;
accepted October 6, 2017

수분해물을 생리활성 펩타이드의 소재로 사용하여 항산화 및 항염증 효과를 입증하였으나(Jang 등, 2017a; Jang 등, 2017b), 항염증 펩타이드를 생산하기 위한 가수분해 조건에 대한 연구는 보고된 바가 없다. 이에 따라 본 연구에서는 도루묵의 어육과 알을 항염증 펩타이드를 생산하기 위한 천연 소재로 사용하였으며, 효소적 가수분해에 대한 최적 조건을 설정하여 도루묵 단백질 가수분해물 유래 항염증 펩타이드 생산을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에서 사용된 도루묵(*A. japonicus*)은 무게 95.0±5.0 g, 길이 20.0±2.0 cm로 2012년 12월 대구에 위치한 수산물도매시장에서 구입하였다. 구입 즉시 얼음과 함께 실험실로 옮겨 차가운 물로 씻은 후 어육과 알을 분리하고, 각각 믹서(M-1211, Starion, Busan, Korea)를 사용하여 갈았으며, -40°C의 초저온냉동고(MDF-435, Sanyo, Tokyo, Japan)에 저장하였다. 도루묵의 어육과 알은 단백질 추출 수율을 높이기 위해 각각 아이소프로필알코올(isopropyl alcohol, IPA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 지질을 제거하였다. 즉 시료와 IPA를 1:4 (w/v)의 비율로 섞어 실온에서 50분간 혼합하였으며, 4°C, 700×g로 30분간 원심분리한 뒤 지질이 녹아있는 상층액을 제거하였다. 남은 침전물을 모아 동결건조기(FD-1, Eyla, Tokyo, Japan)를 사용하여 냉동건조한 후 효소가수분해용 시료로 사용하였다.

가수분해에 사용된 5가지 효소(Alcalase, Collupulin, Flavourzyme, Neutrase, Protamex)는 Novo Nordisk Co. (Bagsvaerd, Denmark)로부터 구입하였으며, 각 효소의 특성, 단백질가수분해 효소(protease) 활성, 최적 pH 및 온도는 Table 1에 제시하였다(Jang 등, 2017b). 효소의 단백질분해효소 활성은 Senphan과 Benjakul(2016)의 방법에 따라 카제인(casein)을 기질로 하여 측정하였으며, 최적 조건에서 단위시간(min) 당 1 μmol의 타이로신(tyrosine)을 생성하는데 필요한 효소의 양을 1 단위(unit)로 정하였다.

단백질 가수분해

가수분해는 Souissi 등(2007)의 방법에 따라 진탕배양기(KMC-8480SF, Vision Scientific Co., Deajeon, Korea)를 사용하여 실시하였다. 지질이 제거된 어육과 알을 증류수와 함께 1:10 (w/v)의 비율로 혼합하여 내인성 효소를 불활성화하기 위해 90°C에서 20분간 끓였으며, 혼합물의 pH와 온도는 각 효소의 최적 pH와 온도로 조정하였다. 즉 1 N 염산(HCl) 또는 수산화소듐(NaOH)을

사용하여 pH를 7.0으로 조정하였으며, 각 효소 Alcalase, Collupulin, Flavourzyme, Neutrase, Protamex를 시료의 2%에 해당하는 양을 첨가하여 55°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 반응물을 90°C에서 20분간 끓여 분해반응을 정지시켰으며, 1,600×g로 30분간 원심분리하여 가수분해물을 얻었다. 가수분해물은 냉동건조하였으며, 다음 실험에 사용할 때까지 -40°C에 보관하였다.

세포주 및 배양

본 연구에서 사용된 쥐의 큰포식세포, RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) (Hyclone, Logan, UT, USA)과 1% 페니실린(penicillin)/스트렙토마이신(streptomycin) (Hyclone)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Hyclone) 배지를 사용하여 37°C의 5% CO₂ 배양기(MCO-17AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 24시간 배양 후 부착되지 않은 세포들을 제거하고 부착된 세포는 즉시 배양액을 교체해주었으며, 계대수가 15회 이상을 넘지 않도록 하였다.

세포독성(cell cytotoxicity) 측정

RAW 264.7 세포는 96 well plate에 5×10⁴개로 분주하였으며, 37°C의 5% CO₂ 배양기(MCO-17AIC, Sanyo)에서 배양되었다. 24시간 배양 후 시료 20 μL을 첨가하고 37°C의 5% CO₂ 배양기(MCO-17AIC)에서 다시 24시간 동안 배양하였으며, 각 well에 5 mg/mL 농도의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT, Sigma-Aldrich), 용액 20 μL을 첨가하여 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 상층액을 제거하고 비수용성의 MTT 포마잔(formazan)을 용해시키기 위해 150 μL의 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma-Aldrich)를 첨가하였다. 흡광도는 마이크로플레이트 분광광도계(microplate spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

산화질소 소거활성 측정

NO는 iNOS에 의해 생성되며, 염증반응을 일으키는 염증매개 물질이다(Southan과 Szabó, 1996). 이는 O₂⁻와 반응하여 DNA 손상물질인 ONOO⁻를 형성하고 세포내에서 ·OH로 전환된다(Pacher 등, 2007). 또한 ONOO⁻는 염증매개인자인 PG 생합성 조절 효소, cyclooxygenase (COX)를 활성화한다(Salvemini 등, 1993). 이에 따라 NO의 생성억제는 자체 생성량뿐만 아니라 염증매개인자의 생성량을 감소시킴으로써 항염증 활성을 나타내는 지표로 사용될 수 있다.

Table 1. The specification, optimal pH, and temperature for anti-inflammatory activity of various enzymes

Enzyme	Enzyme composition	Protease activity ¹⁾ (unit/g)	Optimal conditions	
			pH	Temperature (°C)
Alcalase	Endopeptidase	2.4	6.5-8.5	55-70
Collupulin	Endopeptidase	4.6	5.0-7.5	50-70
Flavourzyme	Aminopeptidase	5.0	5.0-7.0	40-60
	Exopeptidase			
Neutrase	Endopeptidase	0.8	7.0-8.0	40-60
Protamex	Endopeptidase	1.5	5.0-7.0	50-60

¹⁾One unit of protease activity means as the amount of enzyme that produces 1 μmol of tyrosine from 0.1% casein per min under the optimal conditions.

NO 소거능은 Griess(1879)의 방법에 의해 비색법으로 측정되었다. 즉 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 5×10⁴개로 분주하여 37°C의 5% CO₂ 배양기(MCO-17AIC)에서 배양하였으며, 24시간 후 시료와 1 µg/mL 농도의 lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich)를 각각 20 µL씩 첨가하여 37°C의 5% CO₂ 배양기(MCO-17AIC)에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응액 100 µL를 다른 96 well plate에 옮겨 Griess 시약(Sigma-Aldrich) 100 µL와 혼합하였으며, 이를 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

가수분해 최적 조건 설정

최적의 pH 및 온도를 설정하기 위해 지질이 제거된 어육과 알을 서로 다른 pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) 및 온도(30, 40, 50, 60, 70°C)에서 1시간 동안 가수분해하였다. 이때 효소는 시료의 2%에 해당하는 양을 첨가하였으며, 효소분해하여 얻은 가수분해물을 1,600×g로 원심분리하고, 이때 얻은 상층액의 NO 소거활성을 측정하였다.

최적의 효소 농도를 설정하기 위해 지질이 제거된 어육과 알은 이전 실험결과에서 얻은 최적의 pH 및 온도에서 수행되었다. 시료의 1-5%에 해당하는 각기 다른 효소 농도(Alcalase: 0.12, 0.24, 0.36, 0.48, 0.60, Collupulin: 0.23, 0.46, 0.69, 0.92, 1.15 unit)를 처리하여 1시간 동안 가수분해하였으며, 가수분해물을 1,600×g로 원심분리하여 얻은 상층액의 NO 소거활성을 측정하였다.

최적의 가수분해 시간을 설정하기 위해 어육과 알은 이전 실험에서 결정된 최적의 pH 및 온도에서 최적의 효소농도를 첨가하여 수행되었다. 시료는 1-5시간 동안 가수분해하였으며, 효소 가수분해물을 1,600×g로 원심분리하여 얻은 상층액의 NO 소거활성을 측정하였다.

단백질 함량 및 가수분해도 측정

가수분해물의 단백질 함량은 BCA법(Smith 등, 1985)에 따라 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich)를 표준품으로 하여 작성한 표준곡선에 의해 산출하였다. 가수분해도(degree of hydrolysis)는 Jang 등(2017a)의 방법에 따라 제조한 가수분해물에 동량의 20% 트라이클로로아세트산(trichloroacetic acid, TCA, Sigma-Aldrich) 용액을 넣어 10% TCA 가용성 단백질을 얻은 후 이를 1,600×g로 30분간 원심분리하고 상층액의 단백질 함량을 측정하여 다음과 같은 식에 의해 산출하였다.

$$\% \text{ degree of hydrolysis} = 10\% \text{ TCA-soluble protein} / \text{total protein} \times 100$$

통계처리

각 가수분해 조건에서 측정된 NO 소거활성은 3회 이상의 반복 실험으로 측정된 값에 대한 평균과 표준편차로 나타내었다. 실험군의 유의적 차이를 SPSS 프로그램(Ver. 21.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하여 분석하였으며, 사후검정으로 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 실시하여 실험군 내 유의적 차이를 확인하였다(p<0.05). 통계분석을 통해 나타난 유의적 차이는 서로 다른 문자열을 표기하여 나타내었다.

결과 및 고찰

단백질 가수분해 효소의 영향

항염증 펩타이드 생산을 위한 최적의 효소를 선택하기 위해 5가지 각기 다른 효소(Alcalase, Collupulin, Flavourzyme, Neutrase,

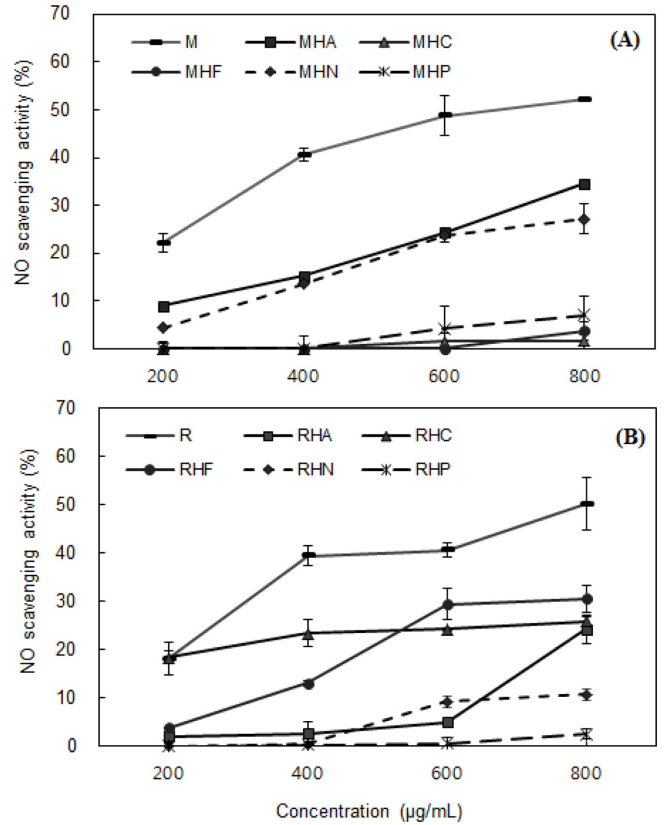


Fig. 1. NO scavenging activity of various enzymatic hydrolysates from meat (A) and roe (B) of *A. japonicus*. M, meat hydrolysate; MHA, meat hydrolysate prepared by Alcalase; MHC, meat hydrolysate prepared by Collupulin; MHF, meat hydrolysate prepared by Flavourzyme; MHN, meat hydrolysate prepared by Neutrase; MHP, meat hydrolysate prepared by Protamex. R, roe hydrolysate; RHA, roe hydrolysate prepared by Alcalase; RHC, roe hydrolysate prepared by Collupulin; RHF, roe hydrolysate prepared by Flavourzyme; RHN, roe hydrolysate prepared by Neutrase; RHP, roe hydrolysate prepared by Protamex. The results are revealed as the Mean±SD of triplicates.

Protamex)를 사용하여 어육과 알을 가수분해하였으며, 각각의 효소에 의해 제조된 가수분해물의 NO 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 어육 및 알 가수분해물은 대부분의 농도에서 가수분해하지 않은 도루묵의 어육과 알에 비해 낮은 활성을 보였다. 그러나 가수분해되지 않은 고분자의 어육은 큰포식세포에 대한 세포독성이 존재하였으며, 대부분의 어육 가수분해물은 큰포식세포에 대한 세포독성이 없었다. 가수분해하지 않은 도루묵의 알은 큰포식세포에 대한 세포독성이 존재하지 않았으며, Alcalase와 Protamex에 의해 얻어진 알 가수분해물을 제외한 모든 가수분해물 또한 큰포식세포에 대한 독성이 없었다. 효소 가수분해물은 저분자의 물질로 소화·흡수가 용이하며, 비가수분해물에 비해 높은 용해도를 가지고 있어 다양한 식품 및 가공품에 사용된다. 이에 따라 비록 가수분해하지 않은 도루묵의 알이 알 가수분해물보다 높은 NO 소거활성을 보였으나 용해도가 높은 가수분해물의 이용성이 더 높을 것으로 판단된다.

Alcalase와 Neutrase에 의해 얻어진 어육 가수분해물은 다른 효소에 의해 얻어진 가수분해물의 NO 소거활성보다 높았으며, 특히 Alcalase에 의해 얻어진 가수분해물의 NO 소거활성은 다른 가수분해물보다 모든 농도에서 가장 높은 소거활성을 보였다(Fig.

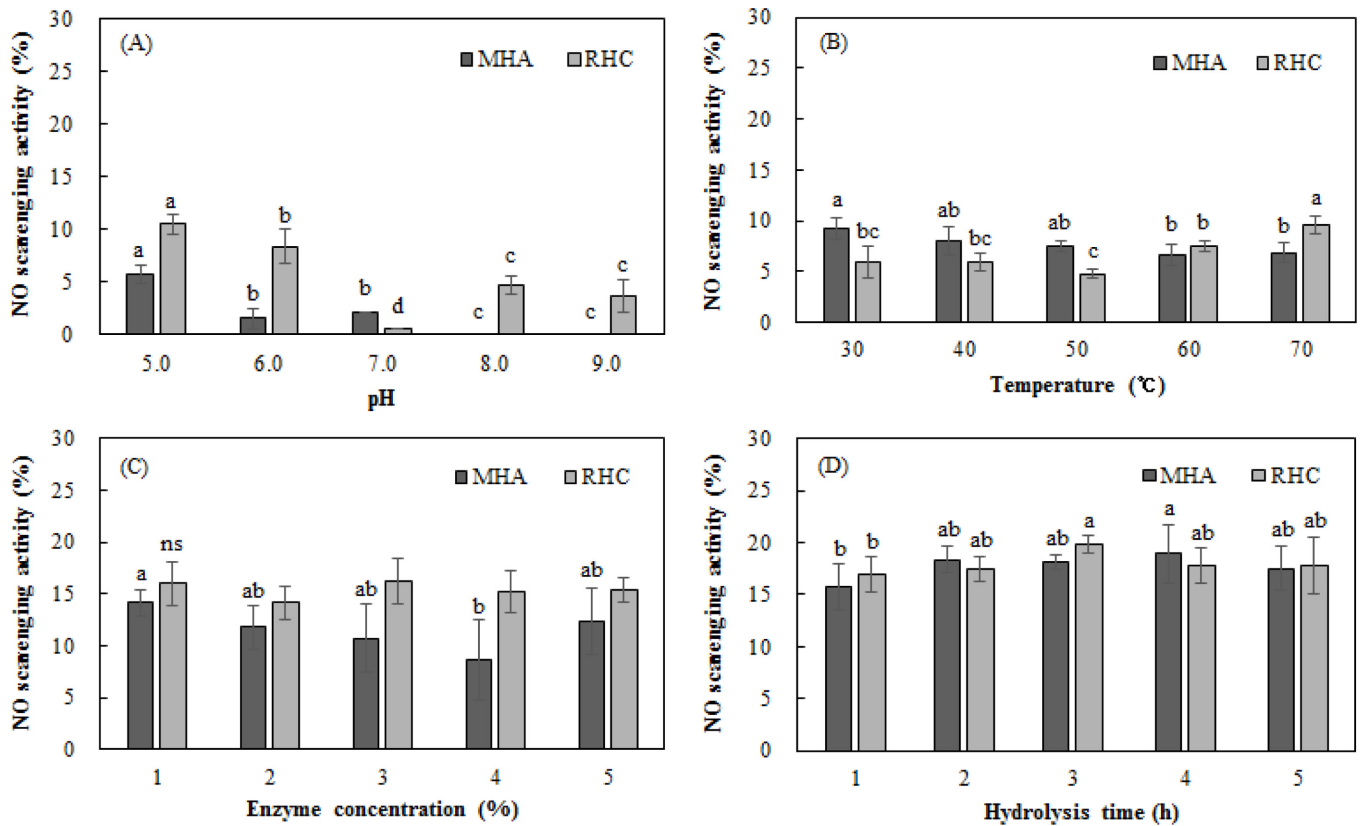


Fig. 2. NO scavenging activity of hydrolysates under the different (A) pH, (B) temperature, (C) enzyme concentration, and (D) hydrolysis time. MHA, meat hydrolysate prepared by Alcalase; RHC, roe hydrolysate prepared by Collupulin. The results are revealed as the Mean±SD of triplicates. Values with different small letters in the same sample are significantly different ($p < 0.05$). ns, not significant.

1A). 즉 Alcalase에 의해 얻어진 가수분해물은 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 34.55%의 소거활성을 보여 Neutrase에 의해 얻어진 가수분해물보다 1.2배 이상 높은 것으로 확인되었다. Collupulin, Flavourzyme 및 Protamex에 의해 얻어진 어육 가수분해물은 NO 소거활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 항염증 펩타이드 생산을 위한 도루묵 어육 가수분해물은 Alcalase를 사용하여 제조되었다.

Collupulin에 의해 얻어진 알 가수분해물의 NO 소거활성은 600 및 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 Flavourzyme에 의해 얻어진 알 가수분해물의 NO 소거활성보다 약간 낮았다(Fig. 1B). 그러나 Collupulin에 의해 얻어진 가수분해물은 200 및 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 Flavourzyme에 의해 얻어진 알 가수분해물보다 적게는 1.7배, 많게는 4.9배 이상 높은 소거활성을 보였다. Protamex에 의해 얻어진 가수분해물은 NO에 대한 소거활성이 거의 없었으며, Neutrase에 의해 얻어진 가수분해물 또한 활성이 낮은 것으로 측정되었다. 이에 따라 항염증 펩타이드 생산을 위한 도루묵 알 가수분해물은 Collupulin을 사용하여 제조되었다.

Alcalase는 펩타이드 내부 분해효소로 펩타이드 사슬의 내부에 있는 펩타이드 결합을 절단하고 동시에 펩타이드의 말단부분도 분해하는 효소이다. *Bacillus licheniformis*로부터 생산되며, 세린 (serine) 가수분해효소인 subtilisin A를 주요성분으로 하고 있어 serine 단백질분해효소라고도 한다(Yust 등, 2003). 효소활성은 g 당 2.4 unit이며, 가수분해 최적 조건의 범위가 넓고 다양하여 생리활성 펩타이드를 생산하는데 효과적인 것으로 알려져 있다. Collupulin은 papain의 일종으로 파파야로부터 추출된 단백질분해

효소이다. 이 효소는 미세한 과립형태를 띠고 있으며 루신(leucine), 글리신(glycine)과 같은 염기성 아미노산의 펩타이드 사슬 부위를 특이적으로 절단한다(Menard 등, 1990). 물에 잘 용해될 뿐만 아니라 식품에 첨가 시 이취나 이미를 부여하지 않아 다양한 식품 산업에 이용되고 있다. 효소활성은 g 당 4.6 unit이며, Alcalase와 마찬가지로 가수분해 최적 조건의 범위가 넓고 다양하다. 그러나 가수분해효소의 활성은 기질의 종류에 따라 다르며, 가수분해 조건에 따라 다르게 나타난다(Jang 등, 2017b). 이는 가수분해에 의해 생성되는 가수분해물의 아미노산 조성이 가수분해에 사용된 특정 효소에 따라 달라지기 때문이며, 특정 아미노산의 존재가 항염증 활성에 관여하기 때문인 것으로 생각된다.

pH의 영향

Alcalase를 사용하여 얻은 어육 및 Collupulin을 사용하여 얻은 알 가수분해물의 최적 pH를 설정하기 위해 시료는 다양한 pH에서 가수분해 되었으며, 항염증 활성을 평가하기 위한 NO 소거활성이 측정되었다(Fig. 2A). 대부분의 어육 가수분해물은 소거활성이 없거나 매우 낮았으나 pH 5.0, 6.0, 7.0에서 각각 5.79, 1.58, 2.11%로 pH 5.0에서 가장 높은 소거활성이 확인되었다. 알 가수분해물 또한 pH 5.0에서 10.53%의 가장 높은 NO 소거활성을 보였으며, pH 7.0에서는 0.53%의 가장 낮은 활성을 나타내었다. 이에 따라 도루묵의 어육과 알은 각각 pH 5.0의 최적 pH에서 제조되었다. 이상의 결과 항염증 활성은 pH에 따라 다르게 나타나며, 어육과 알 가수분해물 모두 중성 및 알칼리보다 산성 조건에서 더 우수한 것으로 확인되었다. 이는 면역기능에 있어 pH가 영

Table 2. The optimal hydrolysis conditions for *A. japonicus* meat- and roe-derived hydrolysates

	Optimal conditions				NO scavenging activity (%)	Protein concentration (mg/mL)	Degree of hydrolysis (%)
	pH	Temperature (°C)	Enzyme concentration (%)	Hydrolysis time (h)			
Meat	5.0	30	1	4	18.94±2.77	2.14±0.02	57.30±0.98
Roe	5.0	70	3	3	19.81±0.79	1.13±0.02	71.41±0.52

The results are revealed as Mean±SD of triplicates.

향을 미치며, 산성의 pH가 알칼리성 pH보다 백혈구에 대한 항체 결합을 증가시켜 체액성 및 세포성 면역이 산성 pH에서 더 우수하게 나타난다는 Lardner(2001)의 연구결과와 일치하였다. 그러나 이러한 연구결과는 인체 내 세포성 면역에 미치는 영향이므로 pH에 의한 효소활성의 변화가 항염증 활성에 미치는 영향은 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

온도의 영향

적절한 온도는 효소 활성 및 가수분해도를 증가시킴으로써 가수분해를 촉진시킨다. 그러나 펩타이드 및 단백질은 가열이나 건조, 기계적 교반 및 pH와 같은 여러 가지 물리적 요인에 의해 변성된다. 특히 열에 의한 변성은 본래의 펩타이드 구조의 파괴와 생리활성의 상실을 초래한다(Bell과 Labuza, 1991; Bell, 1997). 이에 따라 어육 및 알 가수분해물의 최적 온도를 설정하기 위해 각각의 최적 pH에서 각기 다른 온도로 조정하여 가수분해하였으며, 제조된 각 가수분해물의 NO 소거활성을 측정하였다(Fig. 2B). 어육 가수분해물의 경우, 30°C에서 9.25%의 가장 높은 NO 소거활성을 보였으며, 60 및 70°C의 온도에서는 비교적 낮은 NO 소거활성을 나타내었다. 또한 어육 가수분해물의 NO 소거활성은 온도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 알 가수분해물의 경우, 70°C에서 가장 높은 소거활성을 보였으며, 50°C에서 얻어진 가수분해물을 제외한 가수분해물의 NO 소거활성이 온도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 이상의 결과 가수분해물의 항염증 활성은 온도에 따라 다르게 나타나며, 사용된 기질 및 효소에 따라 경향 또한 상이한 것으로 확인되었다.

효소 농도의 영향

도루묵의 어육과 알은 최적 pH 및 온도에서 가수분해 되었으며, 최적 효소 농도를 설정하기 위해 다양한 농도의 효소를 첨가하여 가수분해하였다. 가수분해된 혼합물의 NO 소거활성을 측정하여 항염증 효과를 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 2C에 나타내었다. 어육의 경우, 1% 농도의 효소를 첨가한 가수분해물의 NO 소거활성이 2, 3, 4 및 5% 농도의 효소를 첨가한 가수분해물의 NO 소거활성보다 높았으며, 이는 가장 낮은 활성을 보인 4% 효소를 첨가한 가수분해물과 약 두 배의 차이를 보였다. 또한 효소의 농도가 높아질수록 소거활성이 떨어지는 경향을 보였으나 5% 농도의 효소를 첨가하였을 때에는 오히려 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 가수분해 시 생성된 펩타이드가 지속적인 효소의 작용으로 더 많은 생성물을 생성하게 되었을 때 NO의 발현이 억제되기 때문인 것으로 생각된다. 알의 경우, 3% 농도의 효소를 첨가한 가수분해물의 NO 소거활성이 16.23%로 다른 가수분해물에 비해 가장 높았으나 각 가수분해물의 소거활성에 유의적인 차이는 없었다. 또한 알 가수분해물은 효소 농도에 따른 NO 소거활성에 뚜렷한 상관관계가 보이지 않았다. 이상으로 어육 및 알 가수분해물의 최적 효소 농도는 각각 1, 3%로 결정되었다.

가수분해 시간의 영향

도루묵 가수분해물의 최적 가수분해 시간을 설정하고자 이전 실험에서 결정된 최적 pH, 온도 및 효소 농도를 바탕으로 어육과 알의 가수분해물을 제조하였으며, 이를 1-5시간 동안 가수분해하여 각 가수분해물의 NO 소거활성을 측정하였다(Fig. 2D). 1시간 동안 가수분해된 어육 가수분해물의 NO 소거활성은 15.77%로 가수분해물 중 가장 낮은 활성을 보였으며, 4시간 동안 가수분해된 어육 가수분해물의 NO 소거활성이 18.94%로 가장 높은 활성을 보였다. 각 실험군 간 유의적인 차이는 거의 없었으나 가장 높은 소거활성을 보인 가수분해물과 가장 낮은 소거활성을 보인 가수분해물은 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 알 가수분해물의 NO 소거활성은 3시간까지 증가하였으나 다시 감소하여 3시간 동안 가수분해하였을 때 가장 높은 NO 소거활성을 나타내었다. 이때의 소거활성은 약 20%로 1시간 동안 가수분해된 가수분해물을 제외한 다른 가수분해물의 NO 소거활성과 유의적인 차이는 보이지 않았다. 즉 NO 소거활성은 가수분해 시간에 따른 영향이 적은 것으로 판단된다.

이상의 결과로 본 연구에서는 도루묵 어육과 알 가수분해물의 최적 가수분해 조건이 설정되었다(Table 2). 어육 가수분해물은 5.0의 pH 및 30°C의 온도에서 1% 농도의 효소를 첨가하여 4시간 동안 가수분해한 가수분해물이 가장 높은 항염증 활성을 나타내었으며, 알 가수분해물은 5.0의 pH 및 70°C의 온도에서 3% 농도의 효소를 첨가하여 3시간 동안 가수분해한 가수분해물이 가장 강한 항염증 활성을 보였다. 이러한 최적의 가수분해 조건에서 어육 및 알 가수분해물의 단백질 함량은 각각 2.14 mg/mL와 1.13 mg/mL이었으며, 가수분해도는 57.30% 및 71.41%였다. 또한 어육과 알 가수분해물의 NO 소거활성은 각각 18.94 및 19.81%로 확인되었다. 즉 최종 가수분해물의 NO 소거활성은 초기 조건에서 얻어진 가수분해물의 NO 소거활성보다 어육은 약 3배, 알은 약 2배 높은 것으로 조사되었다. 그러나 최적 조건에서 얻어진 가수분해물의 항염증 효과는 400 µg/mL 농도에서 NO 소거능이 약 50%로 측정된 연어 펩타이드의 항염증 활성과 큰 차이를 보였다(Ahn 등, 2012). 또한 틸라피아 껍질로부터 제조된 펩타이드(1 mg/mL)의 NO 소거활성은 약 30%를 보여, 본 연구결과에서 확인된 도루묵 펩타이드의 활성이 다른 천연 항염증 소재에 비해 활성이 다소 낮은 것을 확인하였다(Zhuang과 Sun, 2011). 이에 따라 분리정제를 통한 증가된 항염증 효과뿐만 아니라 항염증 활성을 가지는 아미노산의 조성 및 서열에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 항염증 펩타이드를 생산하기 위해 도루묵 (*Arctoscopus japonicus*)의 어육과 알로부터 가수분해물을 제조하였으며, 단백질분해효소, pH, 온도, 효소 농도 및 가수분해 시간에

따른 NO 소거활성을 측정함으로써 최적 가수분해 조건을 설정하였다. 어육 가수분해물의 최적 조건은 pH 5.0, 온도 30°C, 효소 농도 1%, 가수분해 시간 4시간으로 확인되었으며, 알 가수분해물의 최적 조건은 pH 5.0, 온도 70°C, 효소 농도 3%, 가수분해 시간 3시간으로 확인되었다. 이러한 최적의 가수분해 조건에서 어육 및 알 가수분해물의 NO 소거활성은 각각 18.94 및 19.81%로 측정되었다. 이는 도루묵 단백질 가수분해물 유래 항염증 펩타이드를 생산하기 위한 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

References

- Ahn CB, Je JY, Cho YS. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Res. Int.* 49: 92-98 (2012)
- An HC, Lee KH, Lee SI, Park HH, Bae BS, Yang JH, Kim JB. Behaviour habitats of sailfin sandfish, *Arctoscopus japonicus* approaching toward the eastern coastal waters of Korea in the spawning season. *Jour. Fish. Mar. Sci. Edu.* 23: 35-42 (2011)
- Bell LN. Peptide stability in solids and solutions. *Biotechnol. Progr.* 13: 342-346 (1997)
- Bell LN, Labuza TP. Aspartame degradation kinetics as affected by pH in intermediate and low moisture food systems. *J. Food Sci.* 56: 17-20 (1991)
- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2: 907-916 (2001)
- Choi KH, Nam HH, Choo BK. Effect of five Korean native *Taraxacum* on antioxidant activity and nitric oxide production inhibitory activity. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 21: 191-196 (2013)
- Córdova-Murueta JH, García-Carreño FL. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210: 371-384 (2002)
- De Mejia EG, Dia VP. Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF- κ B pathway in the macrophage. *Peptides* 30: 2388-2398 (2009)
- Dia VP, Wang W, Oh VL, De Lumen BO, De Mejia EG. Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and *in vitro* evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chem.* 114: 108-115 (2009)
- Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt "Ueber einige Azoverbindungen". *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 12: 426-428 (1879)
- Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, Ben O. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 390: 803-808 (2009)
- Jang HL, Liceaga AM, Yoon KY. Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. *J. Funct. Foods* 20: 433-442 (2016)
- Jang HL, Liceaga AM, Yoon KY. Isolation and characteristics of anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysates of sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein. *J. Aquat. Food Prod. T.* 26: 234-244 (2017a)
- Jang HL, Shin SR, Yoon KY. Hydrolysis conditions for antioxidant peptides derived from enzymatic hydrolysates of sandfish (*Arctoscopus japonicus*). *Food Sci. Biotechnol.* 26: 1191-1197 (2017b)
- Jun JY, Lim YS, Lee MH, Kim BM, Jeong IH. Changes in the physiochemical quality of sailfin sandfish *Arctoscopus japonicus* sauces fermented with soybean koji or rice koji during storage at room temperature. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 101-108 (2016)
- Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function. *J. Leukocyte Biol.* 69: 522-530 (2001)
- Liu B, Gao HM, Wang JY, Jeohn GH, Cooper CL, Hong JS. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann. NY Acad. Sci.* 962: 318-331 (2002)
- Menard R, Khouri HE, Plouffe C, Dupras R, Ripoll D, Vernet T, Tessier DC, Laliberte F, Thomas DY, Storer AC. A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain. *Biochemistry* 29: 6706-6713 (1990)
- Nam HJ, Oh AR, Nam ST, Kang JK, Chang JS, Kim DH, Lee JH, Hwang JS, Shong KE, Park MJ, Seok H, Kim H. The insect peptide CopA3 inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J. Pept. Sci.* 18: 650-656 (2012)
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87: 315-424 (2007)
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *P. Natl. Acad. Sci.* 90: 7240-7244 (1993)
- Schmidl MK, Taylor SL, Nordlee JA. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. *Food Technol.* 48: 77-85 (1994)
- Senphan T, Benjakul S. Comparative study on virgin coconut oil extraction using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp and Alcalase. *J. Food Process. Pres.* 41: 1-12 (2016)
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85 (1985)
- Souissi N, Bougateg A, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technol. Biotech.* 45: 187-194 (2007)
- Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem. Pharmacol.* 51: 383-394 (1996)
- Udenigwe CC, Lu YL, Han CH, Hou WC, Aluko RE. Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chem.* 116: 277-284 (2009)
- Yust M, Pedroche J, Giron-Calle J, Alaiz M, Millán F, Vioque J. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chem.* 81: 363-369 (2003)
- Zhuang Y, Sun L. Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: Optimization using response surface methodology. *J. Food Sci.* 76: C483-C489 (2011)