

## 꽃게(*Ovalipes punctatus*) 단백질 유래 항산화 기능성 펩타이드 제조 최적공정 확립 및 이화학적 특성

하유진<sup>1</sup> · 김도현<sup>1</sup> · 이병의<sup>2</sup> · 유선균<sup>1,3†</sup>

<sup>†</sup>충부대학교 식품생명과학과

<sup>2</sup>순천향대학교 산학협력단

<sup>3</sup>천연웰푸드

(2018년 5월 29일 접수; 2018년 6월 26일 수정; 2018년 6월 27일 채택)

### Process Optimization of Peptides Production from Protein of Crab (*Ovalipes punctatus*) and Its Antioxidant Capacity Analysis

Yoo Jin Ha<sup>1</sup> · Do Hyun Kim<sup>1</sup> · Byung Hee Lee<sup>2</sup> · Sun Kyun Yoo<sup>3†</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, Joongbu University

<sup>2</sup>Industry Academy Cooperation Foundation, Soon Chungyang University

<sup>3</sup>Research Institute, Natural Well Food

(Received May 29, 2018; Revised June 26, 2018; Accepted June 27, 2018)

**요약** : 깨다시 꽃게(*Ovalipes punctatus*)는 갑각류로서 우리나라에서 잡히는 매끈 꽃게속, 주름 꽃게속, 톱날 꽃게속, 민 꽃게속, 두갈래 민꽃게속 들 중에 하나이다. 대부분의 꽃게는 가공되지 않은 상태로 찜 또는 찜육 등 반 가공 형태로 산업화 되었지만 최근에 게로부터 생리활성을 나타내는 펩타이드를 생산하는 연구가 발표되고 있다. 본 연구는 항산화 기능을 나타내는 펩타이드를 선별하고 생산 최적 공정 확립에 연구를 수행 하였다. 사용된 효소 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex들 중에서 bromelain으로 생산된 꽃게육 단백질 가수분해물이 가장 높은 활성을 보여 주었다. 꽃게육 단백질의 bromelain 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포는 500-3,200 Da로서 7 종류의 이상의 펩타이드들로 구성되었다. 가수분해물의 구성아미노산 분포는 항산화 기능성에 관련된 소수성 아미노산은 전체 42.54%를 차지하였다. 가수분해물의 최적 생산 수율 조건을 확립하기 위하여 공정 조건, 효소 반응 온도 40-60°C, pH 6-8, 효소의 농도 1-3%(w/v)로 표면반응 분석법을 수행한 결과 효소 반응 온도 55°C, 반응 pH 6.5, 효소의 양은 3%(w/v)에서 결정되었다. 최적 조건에서 단백질 가수분해도는 최대 71.60%에 도달하였다.

**주제어** : 꽃게육, bromelain, 펩타이드, 가수분해, 표면반응

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: skyoo@joongbu.ac.kr)

**Abstract** : Swimming crab(*Ovalipes punctatus*) is produced in Korea and utilized as semi-processed food at steamed cooked state. Recently, protein hydrolysates have been known as having function such as antioxidant, suppression of hypertension, immunomodulatory, alleviation of pain, and antimicrobial activity. This research was investigated to find the functional antioxidant from crab hydrolysates. To find optimal protease enzyme, alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, and protamex were selected to evaluate the DPPH radical scavenging activity and finally bromelain to show the best activity was selected. The molecular weight of bromelain hydrolysates were distributed with range from 500 to 3,200 Da and 7 different molecules or more. The amino acids related to antioxidant capacity was about 42.54%. The process optimization study used was the response surface methodology. 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 55°C, pH of 6.5, and enzyme concentration of 3%(w/v). In these conditions, degree of hydrolysates were maximum 71.60%. Therefore, we expect that those products are useful as functional food ingredients.

**Keywords** : crab hydrolysates, bromelain, peptides, hydrolysis, response surface methodology

## 1. 서론

프리라디칼에 관련된 지방의 산화, 산화적 스트레스 및 항산화제에 관한 연구들은 최근에 집중적으로 연구되어 왔다. BHA(butylated hydroxy-anisole) 및 BHT(butylated hydroxytoluene) 등 합성 항산화제들이 상업화하여 사용되고 있지만 최근 이들 유도체에 의한 DNA 손상 및 독성에 대하여 밝혀지고 있다[1]. 생리 활성 펩타이드들은 그들이 속해있던 단백질에서는 불활성화 상태로 있지만 가수분해에 의하여 생리 활성을 나타내면 호르몬과 같은 기능을 나타내는 것으로 발표되고 있다[2-4]. 다양한 원료들 중에서 수산물 단백질에서 항산화, 항고혈압, 항암, 엔지오텐신 전환효소억제 기능을 나타내는 펩타이드 형태의 단백질 가수분해물들이 보고되고 있다[5-9].

본 연구에 사용된 갑각류인 꽃게는 대한민국 근해에서 어획되는 꽃게들 중에서 학명이 *Ovalipes punctatus* 인 깨다시 꽃게다. 대부분의 꽃게는 가공되지 않은 상태로 찜 또는 찜육 등 반가공 형태로 상업화하고 있다. 하지만 최근에 블루 또는 머드 게 등으로부터 기능성 펩타이드 생산 및 특성을 밝히는 연구가 진행되어 오고 있다. 머드게로부터 두 가지 종류의 항균활성 펩타이드의 분리 및 특성 연구가 발표되었다[10]. 스노우 게의 가수분해물에서는 항암효과가 있는 분

자량 228, 241, 291, 536 Da 펩타이드가 발-표되었다[11]. 대서양에서 어획되는 바위게의 효소 가수분해물에서 항균작용이 있는 펩타이드들이 분리 동정 되었는데 분자량은 200에서 750 Da이었다[12]. 아미노산들의 구성은 주로 lysine, leucine, arginine, aspartic acid, glutamic acid 으로 이루어 졌다고 보고되었다[12]. 블루 게에서도 역시 분자량이 3.7 kDa인 항균 펩타이드의 분리 및 특성에 대한 연구가 발표되었다[13].

따라서 본 연구에서는 깨다시 꽃게 단백질을 효소종류에 따른 가수분해물들의 항산화 활성을 평가하고, 최적 생산 공정을 조건 및 기능성 가수분해물의 특성을 연구하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료 및 시약

연구개발에 사용된 꽃게는 매끈꽃게속·주름꽃게속·툽날꽃게속·민꽃게속·두갈래 민꽃게속 중에서 학명이 *Ovalipes punctatus* 인 깨다시 꽃게로서 냉동상태로 수산회사로부터 공급되었다. 본 실험에서 단백질 및 펩타이드 분석은 BCA 단백질 분석 키트(Thermo scientific, Seoul, Korea)를 사용하였다. 펩타이드 및 단백질 침전을 위해서 Tri-chloro-acetic(TCA)를 사용하였다(Sigma Company, Seoul, Korea). 단백질 분해효소

alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain와 protamex는 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. Trypsin은 Sigma company (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

**2.2. 냉동 꽃게 전처리**

본 실험에 사용된 꽃게는 냉동된 상태로 공급되었다. 냉동 꽃게는 40°C 항온수조에서 20분 동안 해동하고 껍질이 충분히 연하기 때문에 껍질을 벗기지 않고 그대로 분쇄를 하여 슬러리 형태로 만들어 대부분은 냉동 보관하였다.

**2.3. Pretease 종류에 따른 꽃게육 단백질 가수분해**

꽃게육 단백질 protease에 의한 가수분해반응은 1,000 mL 반응조에서 수행을 하였다. 반응조는 교반기(MS3040D, Lab Srrirer, Yongin Tech., Seoul, Korea)로 작동이 되고 온도는 반응기 자켓에 물은 순화시켜 조절을 하였다. 효소반응 후에 가수분해물 들은 부직포를 사용하여 꽃게 고형물들을 제거한 다음 원심분리를 하여 미세 고형분들을 제거하였다. 정제된 가수분해물들은 다음 실험에 사용할 때까지 동결건조 하여 보관하였다. 각각의 가수분해 반응은 가수분해 물을 동결건조 후에 공급회사에서 제공한 조건을 따라 수행하였다. 최적 protease의 선정은 가수분해 수율에 따라 결정하였다.

**2.4. 표면반응실험 계획**

꽃게육 단백질 가수분해 생산 최적 조건을 구하기 위하여 모든 실험 계획은 3개의 독립변수 즉, 효소반응 온도, 반응 pH, 효소의 농도(%)를 각각 50°C, pH 7, 2%로 하는 center run을 5번 반복을 포함하여 총 17개의 처리 조합으로 구성된 Box-Benken Design을 전 연구에서 수행된 방법을 조정하여 수행을 하였다[14]. 본 실험에서

의 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),  $X_3$  (효소 농도)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.  $\Delta X$ 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 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 (Coursy: Stat-ease Inc., Statistics Made Easy, 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

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

$X_3$  (효소의 농도)는 1 (-1), 2 (0), 3 (+1)로 하였다.(Table 1.) Bromelain에 의한 꽃게육 가수분해 공정은 생산은 건조 가수분해물 10%와 50 mL 0.1M PBS용매를 250 mL 플라스크에 넣고 디자인에 주어진 조건에 따라 4시간 반응을 하였다. 반응 후에 BCA 방법에 의하여 가수분해도를 분석하였다.

### 2.5. 꽃게육단백질 가수분해도 측정 (degree of hydrolysis)

꽃게육 단백질 가수분해도 측정은 BCA 방법에 의하여 수행되었다. 꽃게 단백질 가수분해 반응 후에 생성물을 원심분리를 하여 상등액을 취하였다. 상등액 0.1 mL 에 2 mL BCA 시약을 넣은 다음 37°C에서 30분간 반응 시킨 후에 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 가수분해도(DH, degree of hydrolysis)도는 꽃게 슬러리를 해동 후에 원심 분리하여 꽃게 고형물을 제거 한 후 동결 건조한 꽃게 육의 양에 해당하는 흡광도를  $D_{max}$ 로 하였다. 가수분해 후 TCA 침전물을 제거한 상등액의 양을  $D_{at\ time\ t}$  하였다. 따라서 가수분해도는 아래와 같은 식으로 계산되었다.

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

### 2.6. 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능 측정은 단백질 가수분해 시료를 일정한 농도(10%)를 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. DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 값을 산출하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = [(B - A) / B] \times 100$$

A: 시료 첨가시의 흡광도

B: 시료 무 첨가시의 흡광도

### 2.7. 단백질 가수분해물의 분자량 분석

가수분해물 분자량 측정을 위해 matrix는 alpha-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. MS plate위에 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.

### 2.8. 단백질 가수분해물 구성 및 유리 아미노산 분석

동결건조 단백질 가수분해물 0.1 g을 18 mL test tube에 칭량하여 6 N HCl 5 mL를 가하여 감압 밀봉(질소가스 충전)한 후 110°C로 setting된 heating block에 24시간 이상 동안 가수분해시켰다. 가수분해가 끝난 후 50°C에서 rotary evaporator로 산을 제거한 후 Sodium dilution buffer로 10 mL 정용한 다음, 이중 1 mL를 취하여 membrane filter 0.2  $\mu$ m로 여과시켜 아미노산 자동분석기(S433-H, Sykam GmbH, Germany, Munich)로 정량 분석하였다. 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. 유리아미노산 분석은 동결건조 단백질 가수분해물 0.1 g을 1 mL에 용해를 한 후에 구성 아미노산 분석 방법과 같이 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 효소별 생산된 꽃게육 단백질 가수분해물의 항산화 활성

꽃게육 단백질의 가수분해물의 항산화 활성은 protease 효소의 종류에 따라서 다르게 나타났다 (Fig. 1). 항산화 활성의 능력은 bromelain, flavourzyme, protamex, papain, neutratse, alcalase 순으로 높았다. 단백질 가수분해물들의 항산화 활성의 차이는 protease 마다 단백질의 펩타이드 결합을 분해하는 지점이 다르기 때문으로 다른 아미노산 서열을 지닌 가수분해물이 생산되기 때문인 것으로 사료된다. Bromelain으로 생산된 단백질 가수분해물이 가장 높은 항산화 활성(68.9%)을 보여 후속 실험을 위하여 선택을 하였다.

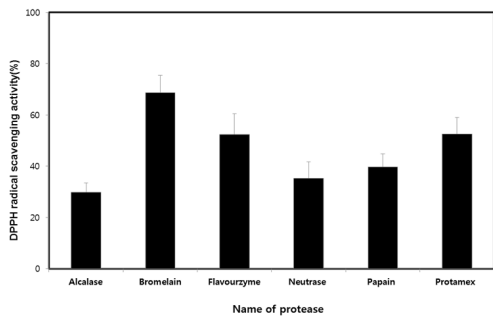


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity (%) of protein hydrolysates manufactured by commercial enzymes. Conditions of enzyme reaction were followed by supplied from enzyme manufacturer.

### 3.2. 꽃게육 단백질 가수분해물 분자량

꽃게육 단백질의 bromelain 가수분해물의 펩타이드들의 분자량 분포는 7 종류의 이상의 펩타이드들로 구성되었음을 보여준다 (Fig. 2). 펩타이드 분자량의 분포는 500 - 3,200 Da으로 이루어 졌음을 보여주었다. 수산물 유래 단백질에 대한 효소 bromelain를 이용한 전갱이 단백질 가수분해물은 항바이러스를 보이는 5 kDa 펩타이드 생산을 보고하였다[15], 새우 가공 부산물로부터 생산된 펩타이드는 699 Da, 고등어 근육 1,400 Da, 참치육 가수분해물에서는 분자량이 각각 1305 Da, 938 Da, 584 Da로 보고되었다 [16-18].

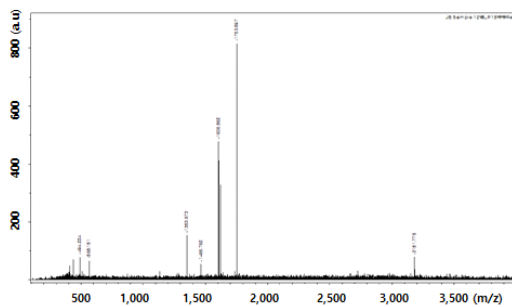


Fig. 2. MALDI-TOF mass spectra of crab meat hydrolysates. Protein hydrolysates was produced at enzyme reactor with optimized conditions such as temperature 55°C, pH 6.5, and 3% enzyme concentration.

### 3.3. 꽃게육 단백질 가수분해물의 구성

#### 아미노산 분포

꽃게육 단백질을 bromelain 효소로 가수분해하였을 때의 구성아미노산의 분포를 Fig. 3. 에 나타내었다. 구성아미노산 분포는 glutamic acid (6.08%), aspartic acid(10.07%), arginine(8.72%) 순으로 높은 함량으로 나타났고, 그 중에서 필수 아미노산 (threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, histidine, lysine)의 함량이 40.55%으로 나타났다. 단백질 및 단백질 가수분해물의 아미노산 구성은 기능성에 크게 영향을 미치는 것으로 알려졌다[19]. 펩타이드 소수성의 특성은 세포막의 인지질 층의 통과하여 표적 지점에 도달하기 용이 하기 때문에 기능성이 높은 것으로 알려졌다[19]. 꽃게 단백질 가수분해물의 소수성 아미노산은 전체 42.54%를 차지하여 항산화 기능과 관련된 것으로 보인다. 항산화 기능을 나타내는 라이신과 타이로신은 전자를 제공하는 반면에 히스티딘은 이미다졸 구조로 강한 라디칼 소거능력을 지닌 것으로 발표되었다[20-21].

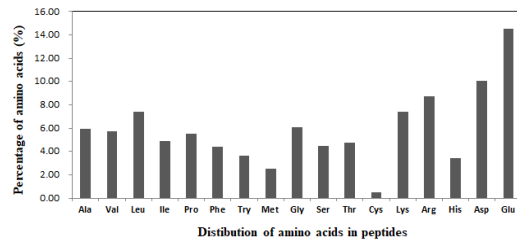


Fig. 3. Amino acid composition distribution of crab meat hydrolysates. Enzyme used was bromelain and protein hydrolysates was produced at enzyme reactor with optimized conditions such as temperature 55°C, pH 6.5, and 3% enzyme concentration.

### 3.4. 꽃게육의 단백질 가수분해 최적화 공정

꽃게육의 단백질 효소가수분해 공정조건 요인들인 반응 온도, pH, 효소양의 3개의 실험변수에 대하여 Box-Behnken Design으로 실험을 설계하여 얻어진 가수분해도(%)를 실험결과가 Table 2 에서 보여준다. 실험결과 가수분해도의 값은 실험 범위 내에서 15.07-70.70% 범위에서 측정값이 얻어졌다.

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

Run	Temperature (°C)	pH	Amount of enzyme (%)	Degree of hydrolysis (%)
1	40	6	2	20.40
2	40	8	2	34.13
3	60	6	2	17.83
4	60	8	2	26.53
5	50	6	1	17.80
6	50	8	1	15.07
7	50	6	3	38.47
8	50	8	3	44.50
9	40	7	1	16.90
10	60	7	1	21.77
11	40	7	3	70.70
12	60	7	3	55.87
13	50	7	2	59.93
14	50	7	2	66.13
15	50	7	2	55.13
16	50	7	2	67.07
17	50	7	2	55.93

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

Source	DF	Sum of Squares
		Degree of hydrolysis <sup>a</sup>
Model	9	6234.84 <sup>b</sup>
Residual	7	348.62
Lack of Fit	3	224.37
Pure Error	4	124.25
Cor Total	16	6583.47

<sup>a</sup> Coefficient of correlation ( $R^2$ ) was 0.947

<sup>b</sup> Significant at 5% level.

Table 3은 꽃게육 단백질 가수분해도에 대한 분산분석의 결과를 보여준다. Quadratic 회기 모델의 분석 결과는 모델의 적합성 여부를 나타내는데, bromelain 효소에 의한 꽃게육의 가수분해는 반응온도, 반응 pH 및 효소의 농도에 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 0.95 이었다. 따라서 본 결정계수 값은 반응변수의 95% 이상이 가수분해 수율에 대한 반응변수의 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. Table 4에서는 모델의 회귀 계수를 나타내는 것으로 꽃게육의 단백질의 효소 가수분해는 효소의 반응 온도, 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 농도는 단독 또는 교호적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이들에 대한 이들의 대한 회귀식은 Table 5 에 있다.

**3.5. 꽃게육 단백질 가수분해에 대한 효소**

**반응 온도, pH 및 효소의 농도의 영향**

반응 온도와 pH의 영향에 대한 꽃게육 단백질 가수분해는 Fig. 4A 3D 표면과 등고선 식으로

보여준다. 투입한 효소 농도를 2% 로 고정하고 반응 온도 범위인 40-60°C와 반응 pH 범위인 6-8 에서 표면 반응의 분석결과 반응 온도와 pH는 단백질 가수분해에 영향을 주는 것으로 나타났다. 반응 온도에 따른 가수분해는 40°C에서 50°C까지 점차 증가하다가 약 52°C부근에서 정상점을 지나 점차 감소하였고, pH에 따른 가수분해는 pH 6에서 서서히 증가하다가 약 pH 6.8 일 때 정상점을 지나 서서히 감소하였다. 따라서 투입한 효소 농도를 2%로 하였을 때 가수분해도의 최대값은 정상점(stationary point)으로 반응온도 약 52°C와 반응 pH 약 6.8에서 결정되었으며, 이때의 가수분해도는 약 61.06% 이었다. 반응 온도와 bromelain 농도의 영향에 대한 꽃게육 단백질 가수분해는 Fig. 4B 에서 3D 표면과 등고선 식으로 보여준다. 효소 반응 pH를 7 로 고정하

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

Factor	Coefficient
	Degree of hydrolysis
Intercept	+60.84
Linear	
Temperature	+3.22
pH	-2.52
Enzyme concentration	+17.25
Quadratic	
Temperature <sup>2</sup>	-24.23
pH <sup>2</sup>	-11.88
Enzyme concentration <sup>2</sup>	-7.65
Interactions	
Temperature × pH	-1.26
Temperature × enzyme concentration	+2.19
pH × enzyme concentration	-4.93

Table 5. Polynomial equations calculated by response surface program

Response	Second order polynomial equations	R <sup>2</sup>
Degree of Hydrolysis	$Y = 60.84 + 3.22X_1 - 2.52X_2 + 17.25X_3 - 24.23X_1^2 - 11.88X_2^2 - 7.65X_3^2 - 1.26X_1X_2 + 2.19X_1X_3 - 4.93X_2X_3$	0.947

X<sub>1</sub> : pH, X<sub>2</sub> : Temperature (°C), X<sub>3</sub> : Enzyme concentration (%)

고 반응 온도 범위인 40-60°C와 효소 농도 범위인 1-3% 에서 표면 반응의 분석결과 반응 온도와 효소 농도는 단백질 가수분해에 영향을 주는 것으로 나타났다. 반응 온도에 따른 가수분해는 40°C에서 50°C까지 점차 증가하다가 약 51°C 부근을 지나서부터 점차 감소하는 경향을 보여주었고, 효소 농도에 따른 가수분해는 효소 1%에서부터 서서히 증가하다가 효소 3%까지도 꾸준히 증가하는 경향을 보여주었다. 따라서 반응 pH를 7로 고정하였을 때 가수분해도의 최대값은 실험 범위에 나타나지 않았지만 능선 분석 결과 반응 온도 약 51°C와 효소 농도 3%에서 결정되었으며, 이때의 가수분해도는 약 70.74% 이었다.

반응 pH와 bromelain 농도의 영향에 대한 꽃게육 단백질 가수분해는 Fig. 4C 에서 3D 표면과 등고선 식으로 보여준다. 효소 반응 온도를 50°C로 고정하고 반응 pH 범위인 6-8 와 효소 농도 범위인 1-3% 에서 표면 반응의 분석결과 반응 pH와 효소 농도는 단백질 가수분해에 영향을 주는 것으로 나타났다. 반응 pH에 따른 가수분해는 pH 6 에서 서서히 증가하다가 약 pH 6.5 부근을 지나서부터 점차 감소하는 경향을 보여주었고, 효소 농도에 따른 가수분해는 효소 1%에서부터 서서히 증가하다가 효소 3%까지도 꾸준히 증가하는 경향을 보여주었다. 따라서 온도를 50°C로 고정하였을 때 가수분해도의 최대값은 실험 범위에 나타나지 않았지만 능선 분석 결과 반응 온도 약 pH 6.5 와 효소 농도 3%에서 결정되었으며, 이때의 가수분해도는 약 71.60% 이었다. 이러한 결과들로부터 표면 반응 분석에서 얻어진 최적 공정은 효소 반응 온도 55°C, 반응 pH 6.5, 효소의 양은 3%(w/v)에서 결정되었다. 최적 조건에서 단백질 가수분해도는 71.60%에 도달하였다.

단백질 가수분해 효소는 단백질의 펩타이드 결합을 절단하는데 특이성에 관련된 활성부위에 따라 4종류 serine, thiol, carboxyl 및 metallo로 구분된다[22]. 가수분해 메커니즘에 따라서 endoproteinases 와 exopeptidases로 구분이 되고 각각 단백질의 내부에 존재하는 펩타이드 결합과 N 말단 및 C 말단으로부터 가수분해한다. 식품 산업에서는 주로 endoproteinases를 사용하나 혼합하여 사용하기도 한다[23]. Bromelain은 파인애플의 조직 안에 존재하는 단백질 가수분해효소로서 식품, 제약 및 화장품 원료제조 분야에 널리 사용되어 지고 있다[24-25]. Bromelain을 이

용한 블루 게육 단백질 최적 가수분해는 약 3.1%의 효소농도에서 2시간 반응에서 생산되었다[26].

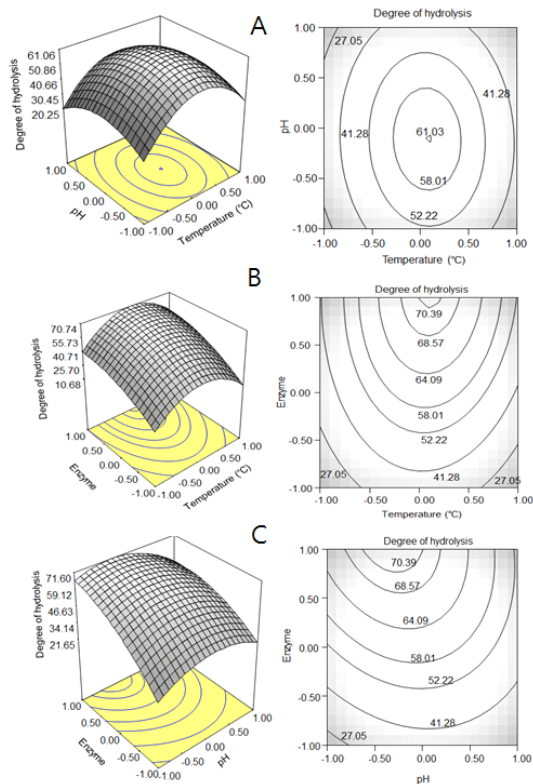


Fig. 4A. Contour plot (left) and 3D surface on the response. Effect of enzyme reaction pH and temperature on the hydrolysis of crab meat. Enzyme reaction was performed at enzyme concentration 2%.

Fig. 4B. Contour plot (left) and 3D surface on the response. Effect of temperature and enzyme concentration on the hydrolysis of crab meat. Enzyme reaction was performed at reaction pH 7.0.

Fig. 4C. Contour plot (left) and 3D surface on the response. Effect of temperature and enzyme concentration on the hydrolysis of crab meat. Enzyme reaction was performed at temperature 50°C.



### 3.6. 반응 조건들의 꽃게육 단백질 가수분해에 미치는 영향

꽃게육 단백질 가수분해에 대한 반응 변수들에 대한 가수분해 경향은 Fig. 5 에서 보여준다. 결과를 종합해 보면 표면 반응의 분석결과 최대값은 실험 범위에 나타나지 않았지만 능선 분석 결과 꽃게육 단백질 가수분해에 미치는 가장 영향을 미치는 것은 온도이다. 온도는 올라갈수록 급격하게 가수분해도가 증가하였다가 또한 급격하게 감소하는 것을 볼 수 있다. 반면에 가장 영향을 받지 않는 것은 효소의 농도이며 반응 pH 및 온도에 상관없이 효소의 농도가 증가함에 따라서 가수분해도는 꾸준히 증가하는 경향을 보여주었다. 따라서 가수분해에 미치는 영향이 온도, pH, 효소의 농도 순으로 크다고 볼 수 있다.

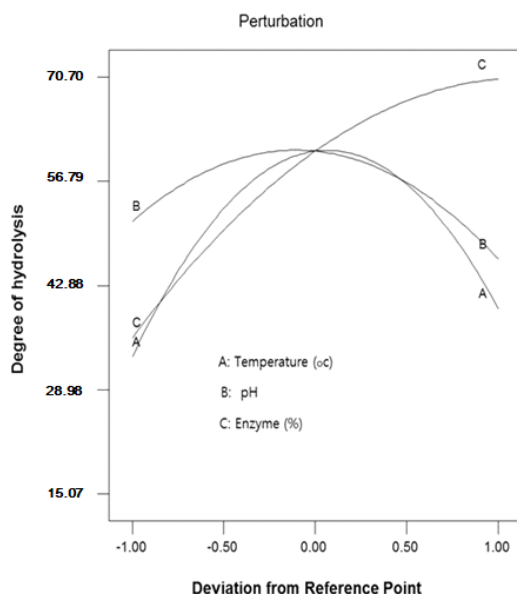


Fig. 5. Effect of enzyme pH, reaction temperature, and enzyme concentration, on degree of hydrolysis. A, B, and C represent the temperature, pH, and enzyme concentration.

### 4. 결론

1. 상업용 protease(bromelain, flavourzyme, protamex, papain, alcalase, neutratse)를 이용하여 꽃게육 슬러리로부터 단백질 가수분

해물을 생산 한 후에 항산화 능을 비교한 결과 가장 높은 항산화 능을 보여준 bromelain를 선택하였다.

2. 꽃게육 단백질 가수분해물들의 분자량을 MALDI-TOF를 이용하여 분석한 결과 분자량 500-3,200 Da 분포를 보여주었고, 구성아미노산 분포는 glutamic acid(6.08%), aspartic acid(10.07%), arginine(8.72%) 순으로 높은 함량으로 나타났고, 항산화 기능성에 관련된 소수성 아미노산은 전체 42.54%를 차지하였다.
3. bromelain을 이용하여 꽃게육 단백질 효소 가수분해 공정조건 요인들인 반응 온도 (40-60°C), pH(6-8), 효소양(1-3%)의 3개의 실험변수에 대하여 Box-Benken design으로 실험을 설계하여 얻어진 가수분해도를 수행한 결과 가수분해도 값은 15.07-70.70% 범위에서 얻어졌다.
4. 꽃게육의 단백질 최적 효소가수분해 공정조건은 효소 반응온도 55°C, 반응 pH 6.5, 효소의 양은 3%(w/v)에서 결정 되었다. 이때 가수분해도는 71.60%에 도달하였다.

### 감사의 글

본 연구논문은 중소기업청의 첫걸음기술개발사업(C0513705)의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### References

1. S. Assaad, B. Ali, "Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review", *Journal of Functional Foods*, Vol.21, pp.10-26, (2016).
2. O. O. John, T. G. Abraham, N. Ifeanyi, I. S. Shiva, R. Pema, N. Thomas, E. A. Rotimi, A. Michel, "A metabolomics approach for investigating urinary and plasma changes in spontaneously

- hypertensive rats (SHR) fed with chicken skin protein hydrolysates diets", *Journal of Functional Foods*, Vol. 22, pp.20–23, (2016).
3. D. B. Roberta, H. Pagraigin, B. Declan, K. Joseph, O. Eileen, M. M. Anne, H. Maria, "Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products", *Food Chemistry*, Vol.124, pp.1296–1307, (2011).
  4. S. Y. Choi, A. Y. Kim, S. K. Yoo, "Optimization of enzymatic hydrolysis of legs proteins of black body fowl(Ogae) to produce peptides using a commercial protease", *J. of Korean Oil Chemists' Soc*, Vol.33, pp. 176–185, (2016).
  5. K. H. S. Farvin, L. L. Andersen, H. H. Nielsen, C. Jacobsen, G. Jacobsen, I. Jacobsen, F. Jessen, "Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion", *Food Chemistry*, Vol.149, pp.326–334, (2014).
  6. S. K. Kim, E. Mendis, "Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review", *Food Research International*, Vol.39, pp.383–393, (2006).
  7. J. T. Ryan, R. P. Ross, D. Bolton, G. F. Fitzgerald, C. Stanton, "Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish", *Nutrients*, Vol.3, pp.765–91, (2011).
  8. H. Wergedah, B. Liaset, o. A. Gudbrandsen, E. Lied, M. Espe, Z. Muna, S. Mork, R. K. Berge, "Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats", *J Nutr.*, Vol.134, pp.1320–1327, (2004).
  9. Y. J. Ha, S. K. Yoo, "Process Optimization of Peptides Production from Protein of Sea Cucumber and Its Antioxidant Capacity Analysis", *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, Vol.34, No.2 pp. 338–348, (2017).
  10. C. Imjongjirak, P. Amparyup, A. Tassanakajon, "Two novel antimicrobial peptides, arasin likeSp and GRPSp, from the mud crab *Scylla paramamosain*, exhibit the activity against some crustacean pathogenic bacteria", *Fish Shellfish Immunol*, Vol.30, No.2 pp. 706–712, (2011).
  11. D. Alain, B. Lucie, S. Linda, P. Yves, B. Laurent, "Demonstration of in vitro anticancer properties of peptide fractions from a snow crab by-products hydrolysate after separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes", *Separation and Purification Technology*, Vol.79, pp. 321–329, (2011).
  12. L. Beaulieu, J. Thibodeau, C. Bonnet, P. Bryl, M. E. Carbonneau, "Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products", *Pharma Nutrition*, Vol.1, pp. 149–157, (2013).
  13. L. Khoo, D. W. Robinette, E. J. Noga, "Callinectin, an Antibacterial Peptide from Blue Crab, *Callinectes sapidus*, Hemocytes", *Marine Biotechnology*, Vol.1, pp. 44–51, (1999).
  14. Y. J. Ha, A. Y. Kim, S. K. Y., "Optimization of Peptide Production from Leg Meat of Yeonsan Ogae by High Hydrostatic Pressure and Protein Hydrolytic Enzyme and Its Characteristic Analysis", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.17, No.7 pp. 182–191, (2016).
  15. J. Adler-Nissen, "Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility", *J Afric Food Chem.*, Vol.24, pp. 1090–1093, (1976).
  16. Z. Liu, K. L. Schey, "Optimization of a MALDI TOF-TOF Mass Spectrometer for Intact Protein Analysis", *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, Vol.16, pp. 482–490, (2005).

17. 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).
18. 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).
19. R. He, A. T. Girgih, S. A. Malomo, X. Ju, R. E. Aluko, "Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions", *Journal of Functional Foods*, Vol.5, pp. 19-227, (2013).
20. A. G. P. Samaranyaka, E. C. Y. L. Chan, "Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications", *Journal of Functional Foods*, Vol.3, pp. 229-254, (2011).
21. C. C. Udenigwe, R. E. Aluko, "Chemometric Analysis of the Amino Acid Requirements of Antioxidant Food Protein Hydrolysates", *Int. J. Mol. Sci.*, Vol.12, No.5 pp. 3148-3161, (2011).
22. H. G. Kristinsson, B. A. Rasco, "Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol.40, No.1 pp.43-81, (2000).
23. W. J. Lahl, S. D. Braun, "Enzymatic production of protein hydrolysates for food use", *Food Technol.*, Vol.58, No.10 pp.68, (1994).
24. H. H. Umesh, B. Sumana, K. S. M. S. Raghavarao, "Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes", *Bioresour Technol*, Vol.99, pp. 4896-4902, (2008).
25. S. Ketnawa, S. Rawdkuen, P. Chaiwut, "Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar", *Biochem Eng J.*, Vol.52, pp. 205-211, (2010).
26. A. A. V. Sara, R. S. F. Sandra, H. Haiko, "Enzymatic Hydrolysis of Blue Crab (*Callinectes Sapidus*) Waste Processing to Obtain Chitin, Protein, and Astaxanthin-Enriched Extract", *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, Vol.3, pp. 81-92, (2017).