

멸치육 단백질 효소가수분해물의 항산화작용

염동민 · 이태기* · 박영호* · 김선봉*
양산전문대학 식품영양과, *부경대학교 식품공학과

Antioxidative Activity of Enzymatic Hydrolysates Derived from Anchovy Muscle Protein

Dong-Min YEUM, Tae-Gee LEE* Yeung-Ho PARK* and Seon-Bong KIM*

Department of Food and Nutrition, Yangsan College, Yangsan 628-800, Korea

*Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

This study was designed to investigate the antioxidative activity of enzymatic hydrolysates prepared from defatted anchovy muscle by various proteases. In these hydrolysates, the hydrolysates derived from pepsin and Protamex showed the strongest antioxidative activity. Enzymatic hydrolysates also showed the synergistic effects on antioxidative activity of α -tocopherol, and almost no change in butylated hydroxytoluene (BHT). Peroxidation of metal ions (Fe^{3+} , Cu^{2+}) was inhibited by enzymatic hydrolysates.

Ten fractions (P-1 to P-10) were fractionated from the peptic hydrolysates by Amberlite IR-120 and Bio-gel P-2 column chromatography. The maximum antioxidative activity was observed in the fraction P-2 (fraction No. 26~31). In amino acid composition of before and after hydrolysis of defatted anchovy muscle and the active fractions (P-2), contents of aspartic acid and glutamic acid were increased, but alanine, cysteine, tyrosine and phenylalanine were decreased.

Key words : anchovy muscle protein, enzymatic hydrolysates, antioxidative activity, synergistic effects, amino acid composition

서 론

지질의 산화는 식품에 있어서 색, 향미 및 품질저하의 요인으로서 뿐만 아니라 산화에 의하여 생성되는 각종 산화생성물은 그 자체가 발암성과 관련된 돌연변이원성을 나타낸다고 알려져 있으며, 생체 내에서의 노화나 발암과도 밀접한 연관이 있는 것으로 보고되고 있다(大澤·竝木, 1982; Kim et al., 1987; 太田, 1985). 특히 지질의 산화에 의하여 생성되는 저분자의 carbonyl 화합물 및 각종 활성 radical은 식품중의 지질산화나 생체내에서도 생성되어(Kang et al., 1987), 단백질이나 DNA 등의 생체성분에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그러므로 이러한 지질의 산화를 억제하는 것은 식품의 안전성과 품질유지 뿐만 아니라 생체내에서의 지질 과산화반응의 억제 및 활성 radical에 의한 노화나 발암과 관련된 성인병의 억제측면에서 중요한 의미를 지닌다고 할 수 있다.

지질의 산화를 방지하기 위한 방법으로 항산화제의 사용이 가장 널리 이용되고 있는데 이들 항산화제 가운데 페놀계 합성항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT) 나 butylated hydroxyanisole (BHA) 등은 다른 항산화제에 비하여 항산화능이나 가공식품에의 효력 이행성이 높

으며 장기 보존식품에도 유효하다고 알려져 있으나 다량 투여 및 연용시에는 그 안전성에 의문이 제기되고 있으며, 특히 BHT에 의한 돌연변이원성이 보고됨으로써 그 사용이 기피되고 있어(新村, 1979), 항산화력이 크고 인체에 무해한 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 현재 사용되고 있는 천연항산화제로는 tocopherol이 항산화력이 우수하고 실용적인 것으로 알려져 있으며(Aoyama et al., 1985), 여러가지 천연물을 이용한 천연 항산화제의 개발을 위한 연구가 진행되고 있다(Hayase and Kato, 1984; Kim et al., 1987; Matsuzaki and Hara, 1985; Rhi and Shin, 1993; Yeo et al., 1995; Kim et al., 1993; Lee, 1993; Byun et al., 1986a; Byun et al., 1986b).

이러한 연구 가운데 단백질의 가수분해산물인 peptide는 그 구조나 생리활성 등에 있어서 주목을 받고 있어 이들 peptide류의 항산화작용에 대한 연구가 진행되고 있으나(Yamaguchi et al., 1975a; Yamaguchi et al., 1975b; Yamaguchi et al., 1979; Kim et al., 1989; Kim et al., 1996), 우리나라는 삼면이 바다로 둘러싸여 식량자원의 수산식품 의존도가 매우 높음에도 불구하고 수산식품이 갖는 기능특성 해명에 대한 연구나 수산식품 단백질 유래 peptide류의 항산화작용이나 그 기구에 대해서는 연구가

미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 수산식품 단백질의 기능특성 해명을 위한 연구의 일환으로 수산발효식품의 원료로써 널리 이용되고 있는 멸치를 사용하여 멸치육 유래 peptide의 항산화작용 및 항산화인자의 특성을 살펴보고자 각종 소화효소 및 식품가공용 효소로써 가수분해시킨 다음 생성된 가수분해물의 항산화작용을 살펴보고 다른 항산화제인 BHT 및 α -tocopherol과의 상승작용, 금속이온 봉쇄작용 및 이온교환크로마토그래피 및 겔 여과 등을 통한 유효성분의 분리 및 항산화작용, 아미노산 조성 등을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 멸치 (*Engraulis japonica* : 체장, 11~16 cm ; 체중, 8~24 g ; 산지, 한국 동해안 ; 어획일, 1994년 5월 3일)는 선도 양호한 것을 구입하여 단백질 가수분해물 시료로 사용하였으며, 이 때 시료 멸치의 일반성분은 수분이 69.0%, 조지방 8.7%, 단백질 17.5% 및 회분이 3.4%이었다.

단백질 가수분해효소로는 pepsin (Sigma Co.), trypsin (Sigma Co.), α -chymotrypsin (Sigma Co.), papain (Sigma Co.), bromelain (Sigma Co.), 복합효소 (태평양화학, 한국), Novozym 89 (Novo Nordisk Co., Denmark), Neutrase 0.5L (Novo Nordisk Co., Denmark), Protamex (Novo Nordisk Co., Denmark), Flavourzyme (Novo Nordisk Co., Denmark) 및 Alcalase 0.6L (Novo Nordisk Co., Denmark) 등 11종을 사용하였다. 또한 linoleic acid는 Wako社, 금속이온은 농도 1,000 ppm인 $CuCl_2$ 와 $FeCl_3$ 원자흡광용 표준시약 (純正化學, 日本)을 사용하였으며, 그밖에 실험에 사용한 모든 시약은 시약용 특급품을 사용하였다.

2. 실험방법

멸치육 단백질 효소가수분해물의 조제

멸치육을 세절, 마쇄하고 여기에 5배량의 chloroform/methanol (3 : 2, v/v) 혼합액을 가하여 어두운 곳에서 24시간 방치시킨 후, 흡인 여과한 다음 잔사를 진공동결건조하여 마쇄하고 200 mesh체로 거른 분말을 탈지 멸치육으로 하였다. 여기에 각종 소화효소 및 식품가공용 단백질분해효소를 2% (w/w)의 농도로 첨가하여 각 효소의 최적 활성조건으로 10배량의 완충용액을 가하여 가수분해하였다. 즉, pepsin은 37°C, trypsin, α -chymotrypsin 및 papain은 25°C, bromelain은 45°C, 복합효소, Novozym 89,

Neutrase 0.5L, Protamex 및 Flavourzyme은 50°C, Alcalase 0.6L은 60°C에서 각각 가수분해를 실시하였다. 가수분해 후 배양용액 중에서 5ml를 취하여 효소를 실험시킴을 위하여 95°C 탕욕 중에서 5분간 방치한 다음, 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액에 최종농도가 50%가 되게 냉 ethanol을 가하여 -40°C에서 24시간 방치한 다음 10,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 후, 그 상층액을 40°C에서 감압농축하였다. 이것을 멸치육 단백질 효소가수분해 용액으로 하였다. 일반성분의 측정일반성분은 상법에 따라 측정하였다. 즉, 수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 Kjeldahl법, 회분은 건식회화법으로 측정하였다.

단백질 정량

단백질 함량은 Lowry 등 (1951)의 비색법과 280 nm에서의 흡광도로써 정량하였다.

Peptide-nitrogen 정량

탈지 멸치육의 가수분해시간에 따른 시료단백질 mg당 peptide-nitrogen의 생성량의 변화는 Umemoto (1966)의 개량 biuret법에 의하여 측정하였다. 즉, 시료액을 두 개의 시험관에 각각 0.5ml씩 취하고 증류수 4.5ml씩을 가한 다음, 한 시험관에는 biuret시약 I (0.4% $CuSO_4$, 8% NaOH, 0.2% glycerine)을 5ml 첨가하여 A 반응구로, 다른 시험관에는 biuret시약 II (8% NaOH, 0.2% glycerine)를 5ml 첨가하여 B 반응구로 하였다 (이 때 공시험은 시료용액 대신 증류수 5ml를 사용하였다). 이것을 실온에서 2시간 반응시킨 후 545 nm에서 흡광도를 측정하여 식 (1)에 의하여 가수분해용액중의 peptide-nitrogen 함량을 구하고, 식 (2)에 따라 시료 단백질당 peptide-nitrogen 생성량을 구하였다.

Peptide-nitrogen 함량 (mg/ml)

$$= (A \text{ 반응구의 흡광도} - B \text{ 반응구의 흡광도}) \times 0.94 \dots\dots\dots (1)$$

A 반응구의 흡광도 = A 반응구의 시료 흡광도 - A 반응구의 공시험 흡광도

B 반응구의 흡광도 = B 반응구의 시료 흡광도 - B 반응구의 공시험 흡광도

mg peptide-nitrogen/mg protein

$$= \frac{N \times \text{회색배수} \times \text{가수분해 용액 (ml)}}{\text{시료 단백질 (mg)}} \dots\dots\dots (2)$$

항산화능의 측정

Hayase와 Kato (1984)의 방법에 따라 과산화물가 (peroxide value, POV)를 측정하여 항산화능의 지표로 삼았다. 즉, 250ml용 삼각플라스크에 linoleic acid (POV, 10

meq/kg 이하) 1g과 ethanol 20ml 및 5mg의 단백질 가수분해물을 첨가한 후 0.2 M 인산 완충액 25ml를 가하여 37°C에서 일정기간 동안 저장 후, 이 반응용액을 분취할 대기에 옮겨 chloroform 25ml를 가한 다음 진탕 후 하층 부만 분취하였다. 이 분취액에 빙초산 25ml와 포화 KI 용액 1ml를 가하여 어두운 곳에서 5분간 방치시킨 후 증류수 50ml를 가하고 0.01N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액으로 적정하여 POV를 산출하였다. 또한, 0.02%의 BHT 및 2.5 mg의 α -tocopherol이나 1 ppm의 Cu^{2+} 와 Fe^{3+} 등과 같은 금속이온을 첨가할 경우에는 단백질 가수분해물을 첨가한 직후 이들을 첨가하였다.

Ion exchange chromatography

조제한 각 시료액 5ml를 강산성 양이온교환수지인 Amberlite IR-120 (H^+ form)을 충전한 column (3.0×30 cm)에 주입하고 흡착시킨 다음 탈이온수로 세정후, NH_4OH 용액을 사용하여 농도구배법 (0.01~1.0 M)으로 용출 (유속, 30ml/hr ; 분취량 5ml/tube)시켰다.

Gel chromatography

분취한 활성 회분을 40°C에서 감압농축한 후, Bio-gel P-2 (Bio-Rad社)를 충전한 column (2.2×80 cm)을 사용하여 각 시료액 2ml를 탈이온수로써 용출 (유속, 20ml/hr ; 분취량 5ml/tube) 시켰다. 분취한 각 용출액을 280 nm에서 흡광도를 측정하고 Lowry법에 의한 단백질의 함량을 정량하였다.

아미노산 분석

아미노산 분석은 단백질 함량으로 15 mg되는 시료 1 ml를 ampule에 넣고, 진한 염산 1ml를 가하여 질소가스로 치환한 뒤 봉한 다음, 110°C의 dry bath (Thermolyne dry bath, Model DB28125)에서 24시간 가수분해하였다. 분해액을 glass filter로 여과하고 감압건조하여 염산을 완전히 제거한 다음, 증류수 10ml를 가하여 다시 감압건조한 후, 구연산완충액 (pH 2.2, Sigma Co.)으로써 25ml로 정용하였다. 이의 일정량을 취하여 아미노산 자동분석기 (Hitachi 835)를 사용하여 아미노산을 분석하였다.

결과 및 고찰

지질의 산화는 식품의 품질저하 및 안전성과 관련하여 매우 중요한 의미를 지니고 있는데 이러한 지질의 산화를 억제하기 위한 연구의 하나로 단백질 효소가수분해물의 항산화작용을 살펴보고자 한다. 현재 우리나라의 대표적인 전통발효식품인 젓갈 및 김치 등의 재료가 되는 멸치육을 사용하여 여러 가지 소화효소 및 식물성 단백질분해효소와 식품가공용 효소를 이용하여 가수분해시간에

다른 배양액중의 50% ethanol 가용성 peptide-nitrogen의 생성량을 살펴본 결과는 Fig. 1 및 2와 같다. 그 결과 peptide-nitrogen의 생성량은 대부분의 효소에 있어서 8 내지 12시간 가수분해시까지 크게 증가하다가 그 후로는 완만하게 증가하였으며, 24시간 이상 가수분해한 경우에는 일부에서 불쾌한 냄새를 나타내어 가수분해시간에 대하여 상대적으로 peptide-nitrogen의 생성량이 많은 8시간을

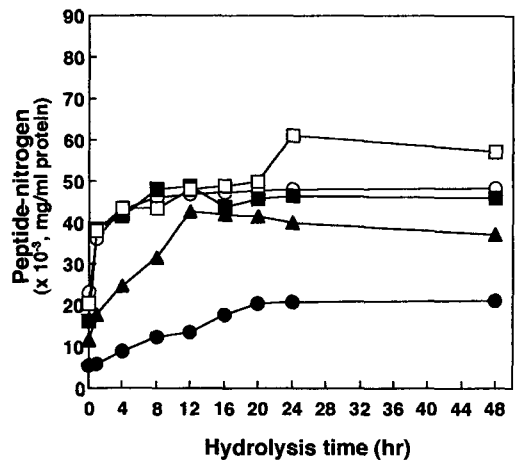


Fig. 1. Time course of 50% ethanol soluble peptide-nitrogen content in anchovy muscle protein hydrolysed by several proteases.

* Anchovy muscle protein was hydrolysed with 2% protease.

(●; Pepsin, ○; Trypsin, ■; α -Chymotrypsin, □; Papain △; Bromelain)

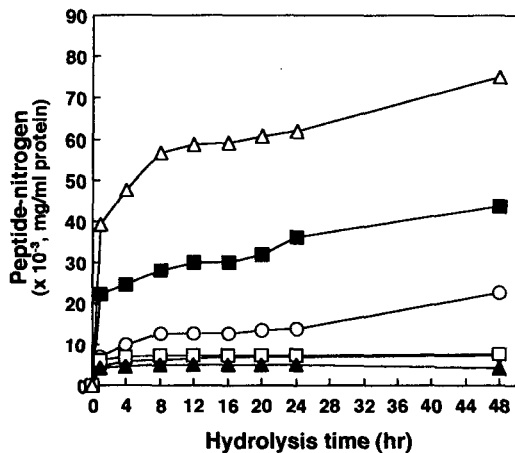


Fig. 2. Time course of 50% ethanol soluble peptide-nitrogen content in anchovy muscle protein hydrolysed by several proteases.

* Anchovy muscle protein was hydrolysed with 2% protease.

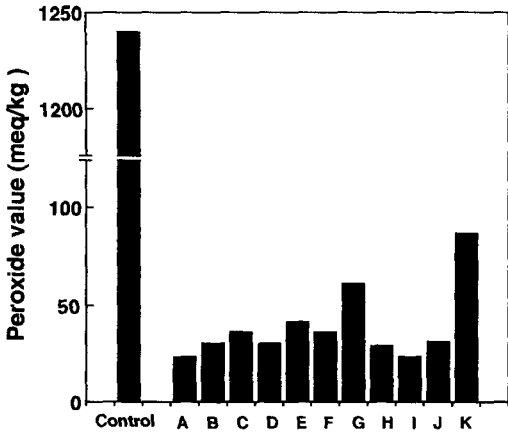


Fig. 3. Antioxidative effects of each anchovy muscle protein hydrolysates by various proteases.
 1 g of linoleic acid was incubated with each anchovy muscle protein hydrolysates containing 5 mg of nitrogen compounds at 37°C for 7 days.
 Control; Linoleic acid only
 A; Pepsin B; Trypsin C; α -Chymotrypsin
 D; Papain E; Bromelain
 F; Complex enzyme G; Novozym 89
 H; Neutrased 0.5L I; Protamex
 J; Flavourzyme K; Alcalase 0.6L

가수분해시간으로 하여 항산화작용을 비교하였다 (Fig. 3). 그 결과 대부분의 멸치육단백질 효소가수분해물의 경우 항산화능이 매우 큰 것으로 나타났으며 특히 인체의 위내 소화효소인 pepsin이나 식품가공용 단백질분해소로 사용되는 Protamex 유래 가수분해물의 항산화능이 다른 것에 비하여 우수한 것으로 나타났다. 그러나 Novozym 89와 Alcalase 0.6L로 가수분해시킨 경우는 다른 효소로 가수분해시킨 경우에 비하여 항산화능이 적은 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 단백질 가수분해물의 항산화능은 효소에 따라 생성된 peptide의 종류에 따라 다를 것으로 생각되며 Yamaguchi 등 (1975a, 1979)도 단백질 가수분해물의 항산화능은 구성 peptide의 성상에 따라 차이가 있으며, 이는 가수분해에 의하여 생성된 peptide의 말단 아미노산에 의하여 그 peptide의 입체구조가 달라지기 때문이라고 추정하고 있다. 또한 이러한 peptide류의 항산화작용은 분자량과도 관련이 있다고 보고하였다.

한편, 식품에 많이 사용되고 있는 다른 항산화제와의 상승작용을 살펴보기 위하여 합성항산화제의 하나인 BHT와 천연항산화제인 α -tocopherol의 항산화작용에 대한 상승효과를 살펴본 결과는 Fig. 4 및 5와 같다. 그 결과

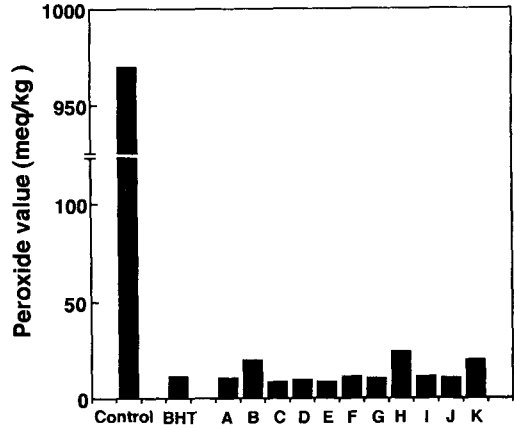


Fig. 4. Synergistic effects of each anchovy muscle protein hydrolysates on the antioxidative effect of BHT.
 0.02% BHT and each hydrolysates containing 2.5 mg of nitrogen compounds were incubated with linoleic acid at 37°C for 7 days.
 Control; Linoleic acid only, BHT; Linoleic acid +BHT
 A; Pepsin B; Trypsin C; α -Chymotrypsin
 D; Papain E; Bromelain F; Complex enzyme
 G; Novozym 89 H; Neutrased 0.5L
 I; Protamex J; Flavourzyme K; Alcalase 0.6L

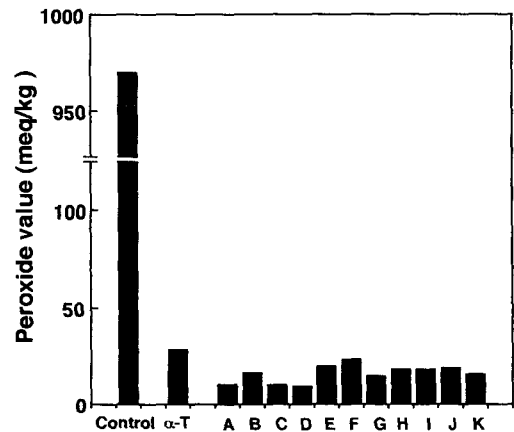


Fig. 5. Synergistic effects of each anchovy muscle protein hydrolysates on the antioxidative effect of α -tocopherol.
 2.5 mg of α -tocopherol (α -T) and each hydrolysates containing 2.5 mg of nitrogen compounds were incubated with linoleic acid at 37°C for 7 days.
 Control; Linoleic acid only, α -T; Linoleic acid + α -T
 A; Pepsin B; Trypsin C; α -Chymotrypsin
 D; Papain E; Bromelain F; Complex enzyme
 G; Novozym 89 H; Neutrased 0.5L
 I; Protamex J; Flavourzyme K; Alcalase 0.6L

BHT에 대한 상승효과는 확인할 수 없었는데, 이는 BHT 자체의 강한 항산화능 때문으로 생각되며, 오히려 trypsin이나 Neutrase 0.5L 및 Alcalase 0.6L 유래 가수분해물의 경우는 오히려 약간 촉진되는 경향을 나타내었다. 그러나 천연항산화제인 α -tocopherol에 대해서는 상승효과가 인정되었으며, 특히 소화효소인 pepsin, α -chymotrypsin 및 식물 기원의 thiol protease인 papain으로 가수분해시킨 가수분해물에서 상승효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 이상의 결과와 앞의 peptide-nitrogen 생성량과 비교해 볼 때 멸치육 단백질 효소가수분해물에 있어서 항산화능과 peptide-nitrogen의 생성량과는 반드시 상관관계가 일치하는 것은 아니며 효소의 단백질에 대한 선택적 절단특이성에 따라 항산화효과가 결정되는 것으로 생각된다.

이러한 멸치육 단백질 효소가수분해물의 금속이온 봉쇄작용을 보기 위하여 Fe^{3+} 및 Cu^{2+} 이온을 첨가하여 이들의 지질산화 촉진작용에 대한 멸치육 단백질 효소가수분해물의 항산화능을 살펴본 결과는 Fig. 6 및 7과 같다. 결과에서 알 수 있듯이 Fe^{3+} 및 Cu^{2+} 이온에 의하여 지질의 산화는 현저히 촉진되었으며 Cu^{2+} 이온이 Fe^{3+} 이온에 비하여 산화촉진효과가 큰 것으로 나타났는데 이러한 Cu^{2+} 및 Fe^{3+} 이온의 지질산화 촉진작용은 멸치

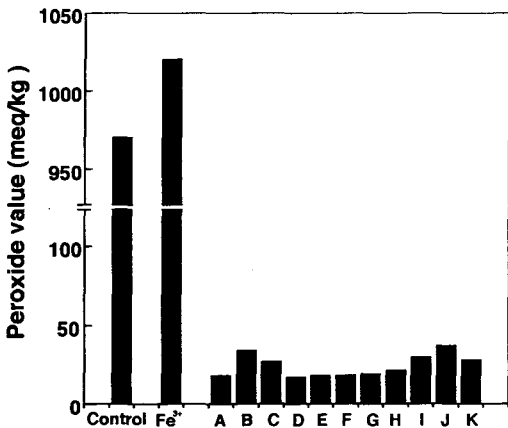


Fig. 6. Antioxidative effects of each anchovy muscle protein hydrolysates on the Fe^{3+} ion catalyzed peroxidation in linoleic acid. Each hydrolysates containing 5 mg of nitrogen compounds and Fe^{3+} (1 ppm) were incubated with linoleic acid at 37°C for 7 days. Control; Linoleic acid only, Fe^{3+} ; Linoleic acid + Fe^{3+}
 A; Pepsin B; Trypsin C; α -Chymotrypsin
 D; Papain E; Bromelain F; Complex enzyme
 G; Novozym 89 H; Neutrase 0.5L
 I; Protamex J; Flavourzyme K; Alcalase 0.6L

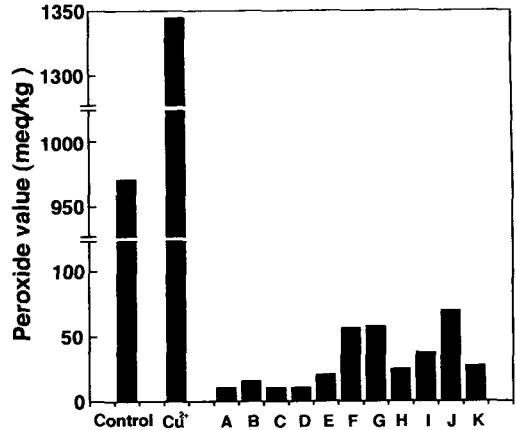


Fig. 7. Antioxidative effects of each anchovy muscle protein hydrolysates on the Cu^{2+} ion catalyzed peroxidation in linoleic acid. Each hydrolysates containing 5 mg of nitrogen compounds and Cu^{2+} (1 ppm) were incubated with linoleic acid at 37°C for 7 days. Control; Linoleic acid only, Cu^{2+} ; Linoleic acid + Cu^{2+}
 A; Pepsin B; Trypsin C; α -Chymotrypsin
 D; Papain E; Bromelain F; Complex enzyme
 G; Novozym 89 H; Neutrase 0.5L
 I; Protamex J; Flavourzyme K; Alcalase 0.6L

육 단백질 효소가수분해물의 첨가에 의하여 현저히 억제되는 것으로 나타났다. 특히 소화효소인 pepsin, α -chymotrypsin 및 thiol protease인 papain 유래 멸치육단백질 효소가수분해물에 의하여 Cu^{2+} 이온에 의한 지질산화가 크게 억제되는 것으로 나타났다. 이는 앞의 다른 항산화제와의 상승작용과 비교해 볼 때 상승작용이 큰 가수분해물인 경우가 금속이온에 의한 산화촉진 또한 크게 억제시킨다는 것을 알 수 있었으나 반드시 일치하지는 않는 것으로 미루어 단백질 효소가수분해물의 다른 항산화제에 대한 상승작용과 금속이온에 대한 봉쇄작용은 서로 다른 기작에 의하여 나타나는 것으로 추정된다. 이에 대하여 太田 (1985)은 단백질의 금속이온 봉쇄작용은 1차적 항산화제로서의 작용이 아니라 2차적 항산화제로서의 작용을 가진다고 보고하였다.

따라서 이들 멸치육단백질 효소가수분해물의 항산화인자를 보다 구체적으로 살펴보기 위하여 항산화능, 다른 항산화제와의 상승작용 및 금속이온에 대한 봉쇄작용이 우수한 것으로 나타난 pepsin 유래 가수분해물을 사용하여 이온교환크로마토그래피 및 겔 여과를 통하여 분획하고 이들 획분들의 항산화능을 비교하여 보았다. Amberlite IR-120 수지를 충전한 column에 의한 이온교환크로마토그래피를 행하고, 분획된 획분 P를 감압, 농축한 후, Bio-gel P-2에 의한 겔크로마토그래피를 실시하여 280nm

에서 흡광도 및 그 때의 단백질 함량을 측정하여 본 결과는 Fig. 8 및 9와 같다. 가수분해물은 분취를 위하여 12시간 가수분해시킨 것을 사용하였다. 그 결과 이온교환크로마토그래피로부터 얻어진 활성획분 P를 다시 겔크로마토그래피를 실시한 결과, P-1~P-10까지 10개의 획분을 얻었다. 이들 이온교환크로마토그래피 및 겔크로마토그래피에 의하여 얻어진 획분들의 항산화능을 비교하여 본 결과는 Fig. 10과 같다. 그 결과 P-2획분 (fraction

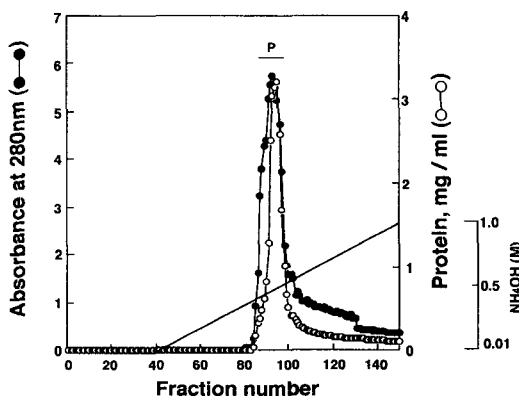


Fig. 8. Ion exchange chromatogram of 50% ethanol soluble fraction obtained from peptic hydrolysate of anchovy muscle protein by Amberlite IR-120 (H⁺) column chromatography (3.0×30 cm).

* Anchovy muscle protein was hydrolyzed with 2% pepsin (pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg of protein) for 12 hrs.

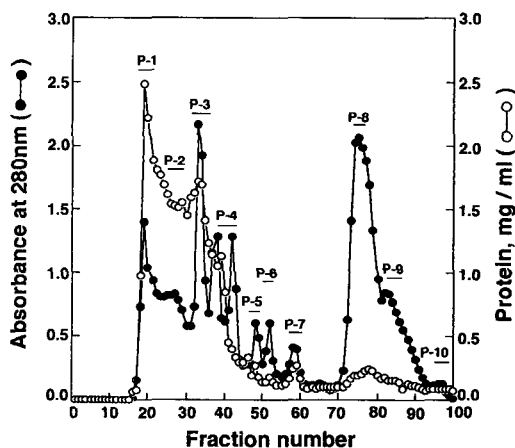


Fig. 9. Gel chromatogram of fraction P by a Bio-Gel P-2 column chromatography (2.2×80 cm).

* Anchovy muscle protein was hydrolyzed with 2% pepsin (pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg of protein) for 12 hrs.

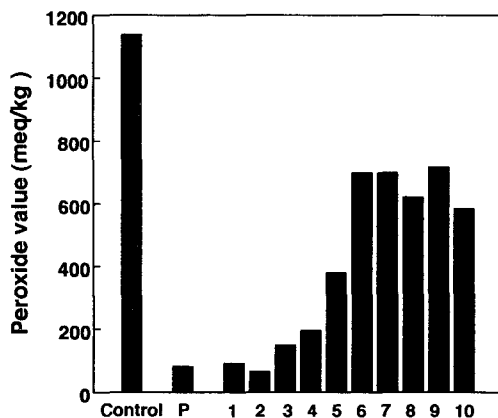


Fig. 10. Antioxidative effect of each fractions fractionated from anchovy muscle protein hydrolysate prepared from pepsin separated on a Bio-gel P-2 column.

1 g of linoleic acid was incubated with the fractions containing 5 mg of nitrogen compounds at 37°C for 7 days.

Control : Linoleic acid alone

P : Peptic hydrolysate of anchovy muscle protein

1 : Part P-1 2 : Part P-2 3 : Part P-3

4 : Part P-4 5 : Part P-5 6 : Part P-6

7 : Part P-7 8 : Part P-8 9 : Part P-9

10 : Part P-10

* Anchovy muscle protein was hydrolyzed with 2% pepsin (pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg of protein) for 12 hrs.

No. 26~31)의 항산화능이 가장 우수한 것으로 나타났으며 P-5 (fraction No. 47~50)부터는 거의 항산화능이 없는 것으로 나타났다. 한편 이들의 분자량을 bacitrasin (MW ; 1422.7)과 streptomycin sulfate (MW ; 1457.4)의 최대 peak (fraction No. 40, 41)와 비교하여 볼 때 pepsin에 의한 멸치육 단백질 효소가수분해물의 항산화관련 peptide의 분자량은 이들보다는 클 것으로 추정된다.

이러한 결과로 미루어 이들 멸치육 단백질 효소가수분해물의 항산화작용에는 그 구성 peptide의 크기와의 관련이 있는 것으로 생각되며, 단백질 효소가수분해물의 분자량과 항산화능과 관련하여 Yamaguchi 등 (1979)도 대두단백질, 우유카제인 및 난백 albumin 가수분해물의 항산화획분은 vitamin B₁₂ (MW ; 1357.4)의 분자량 부근 획분이라고 하였다. 이러한 peptide류의 항산화작용에 대하여 岩見 (1988)은 peptide류의 소수성 영역내부에 지방산이 들어가 하나의 미립자구조를 형성함으로써 외부산소와의 접촉이 방지되어 항산화효과가 나타난다고 지적하고 있다. 이러한 peptide류의 항산화작용에 미치는 구성아미노산 조성의 영향을 살펴보기 위하여 가수분해전

의 탈지 멸치육 및 pepsin유래 가수분해물, 항산화 활성 확분인 P-2의 아미노산 조성을 살펴본 결과는 표 1과 같다. 표에서 알 수 있듯이 가수분해 및 분획에 의하여 aspartic acid와 glutamic acid의 함량이 증가한 반면 alanine, cysteine, tyrosine 및 phenylalanine은 감소하는 것으로 나타나 단백질 가수분해물의 항산화작용에는 구성 peptide의 종류나 분자량 뿐만 아니라 구성 아미노산의 종류에도 영향을 받을 것으로 생각된다. 이로 미루어 단백질 가수분해물의 항산화작용은 아미노산의 조성과 함께 peptide內 또는 말단 잔기로서의 특정 아미노산의 존재도 이러한 항산화능의 발현에 크게 기여할 것으로 생각된다.

Table 1. Amino acid composition of defatted anchovy muscle, peptic hydrolysate of anchovy muscle protein* and active fraction P-2 separated by Bio-Gel P-2 column
(% to total amino acids)

Amino acid	Defatted anchovy muscle	Peptic hydrolysate	Active fraction P-2
Aspartic acid	9.0	8.6	13.0
Threonine	4.9	4.9	4.9
Serine	4.1	3.7	4.0
Glutamic acid	5.4	14.1	19.0
Glycine	5.8	7.4	5.9
Alanine	13.8	10.3	7.2
Cysteine	3.1	2.3	1.7
Valine	4.1	5.6	5.2
Methionine	4.0	4.1	3.0
Isoleucine	4.8	3.9	3.4
Leucine	8.8	9.4	7.7
Tyrosine	4.1	2.0	1.3
Phenylalanine	4.9	3.5	2.4
Lysine	6.6	8.5	8.0
Histidine	0.8	0.6	1.0
Arginine	5.9	5.3	3.5
Proline	9.9	5.8	8.8
Total	100.0	100.0	100.0

* Anchovy muscle protein was hydrolysed with 2% pepsin (pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg protein) for 12 hrs.

요 약

Pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, papain, bromelain, 복합효소, Novozym 89, Neutrase 0.5L, Protamex 및 Alcalase 0.6L 등으로 가수분해하여 얻은 멸치육 단백질 효소가수분해물의 항산화작용을 살펴본 결과, 항산화작용이 매우 우수한 것으로 나타났으며 특히 생체내 소화효소의 하나인 pepsin과 식품가공용 단백질분해효소인 Protamex에

의한 가수분해물의 항산화작용이 우수한 것으로 나타났다. 이들의 다른 항산화제와의 상승작용에 있어서는 α -tocopherol과는 상승작용이 있는 것으로 나타났으나 BHT에 대해서는 BHT 자체의 강한 항산화능으로 상승작용을 확인할 수 없었다. 금속이온 (Fe^{3+} , Cu^{2+})에 대한 봉쇄작용 또한 우수한 것으로 나타났으며, 특히 pepsin, α -chymotrypsin 및 papain유래 가수분해물이 Cu^{2+} 이온에 대하여 높은 억제작용을 나타내었다. Pepsin 유래 멸치육 단백질 효소가수분해물을 이온교환크로마토그래피 및 겔 크로마토그래피에 의하여 분획하고 얻어진 확분별 항산화작용은 P-2 (fraction No. 26~31) 확분에서 가장 큰 것으로 나타났다. 이 때 가수분해전후 및 활성확분의 아미노산조성은 aspartic acid와 glutamic acid가 증가한 반면 alanine, cysteine, tyrosine 및 phenylalanine은 감소한 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1996학년도 양산전문대학 교내 학술연구 지원에 의하여 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Aoyama, M., T. Maruyama, I. Niiya and S. Akatsuka. 1985. Antioxidant effects of tocopherols on palm oil by frying tests. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaishi*, 34, 714~719 (in Japanese).
- Byun, H. S., S. B. Kim, Y. H. Park and H. D. Yoon. 1986a. Antioxidative effect of ginger extracts on fish oil. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 19, 327~332 (in Korean).
- Byun, H. S., H. D. Yoon, S. B. Kim and Y. H. Park. 1986b. Antioxidative effect of onion and mustard powder extracts on fish oil. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 19, 453~458 (in Korean).
- Hayase, F. and H. Kato. 1984. Antioxidative components of sweet potato. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30, 37~40.
- Kang, J. H., D. M. Yeum, S. A. Choi, S. B. Kim and Y. H. Park. 1987. Formation of active oxygens by linoleic acid peroxidation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 19, 471~474 (in Korean).
- Kim, S. B., H. Kang and Y. H. Park. 1987. DNA damage of lipid oxidation products and its inhibition mechanism. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 20, 419~430 (in Korean).
- Kim, S. B., Y. H. Park, J. W. Park, F. Hayase and H. Kato. 1987. Antioxidative action of Maillard reaction products derived from D-glucose and glycine system. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 20, 52~56 (in Korean).
- Kim, J. S., G. D. Lee, J. H. Kwon and H. S. Yoon. 1993.

- Antioxidative effectiveness and oxidized products in mixture of methyl linoleate and phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25, 379~385 (in Korean).
- Kim, S. B., D. M. Yeum, S. G. Yeo, C. I. Ji, Y. W. Lee and Y. H. Park. 1989. Antioxidative effects of food protein hydrolysates by protease. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 21, 492~497 (in Korean).
- Kim, S. K., H. C. Lee, H. G. Byun and Y. J. Jeon. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J. Korean Fish. Soc.*, 29, 246~255 (in Korean).
- Lee, K. Y. 1993. Antioxidant effects of phenolic compounds isolated from defatted Perilla seed flour. *Korean J. Food Technol.*, 25, 9~14 (in Korean).
- Lim, D. K., U. Choi and D. H. Shin. 1996. Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 83~89 (in Korean).
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Roudall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275
- Matsuzaki, T. and Y. Hara. 1985. Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 59, 129~134 (in Japanese).
- Rhi, J. W. and H. S. Shin. 1993. Antioxidant effect of aqueous extract obtained from green tea. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25, 759~763 (in Korean).
- Umamoto, S. 1966. A modification method for estimation of muscle protein by biuret method. *Bull. J. Soc. Sci. Fish.*, 32, 427~435 (in Japanese).
- Yamaguchi, N., Y. Yokoo and M. Fujimaki. 1975a. Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils. Part II. Antioxidative activities of dipeptides and their synergistic effects on tocopherol. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaishi*, 22, 425~429 (in Japanese).
- Yamaguchi, N., Y. Yokoo and M. Fujimaki. 1975b. Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils. Part III. Antioxidative activities of soybean protein hydrolysates and synergistic effects on tocopherol. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaishi*, 22, 431~435 (in Japanese).
- Yamaguchi, N., Y. Yokoo and M. Fujimaki. 1979. Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaishi*, 26, 65~70 (in Japanese).
- Yeo, S. G., C. W. Ahn, Y. W. Lee, T. G. Lee, Y. H. Park and S. B. Kim. 1995. Antioxidative effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24, 299~304 (in Korean).
- 大澤俊彦, 竝木満夫. 1982. 脂質の過酸化と變異原性, 變異原と毒性, 5, 243~252.
- 太田靜行. 1985. 酸化した油脂の毒性, 食の科學, 91, 43~48.
- 新村壽夫. 1979. 食品添加物の生化學と安全性, 地人書館, 日本, p. 192.
- 太田靜行. 1985. 天然物中の酸化防止劑. *New Food Industry*, 27, 85~91.
- 岩見公和. 1988. 食品蛋白質抗酸化機能の再發見, 化學と生物, 26, 216~217.

1997년 6월 2일 접수

1997년 9월 4일 수리