

열수 및 효소적 가수분해로 제조된 틸라피아 비늘 젤라틴 가수분해물의 ACE 저해 활성

안용석^{1,2}·이원우³·이승홍³·안긴내³·고창익³·오창경⁴
오명철⁴·김동우⁵·전유진^{3,6}·김수현^{1*}

¹제주대학교 식품생명공학과, ²(주)청룡수산 수산식품연구소, ³제주대학교 해양생명과학과
⁴제주산업정보대학 관광호텔조리과, ⁵(주)네추럴 F&P 중앙연구소, ⁶제주대학교 해양과환경연구소

Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Effects of Gelatin Hydrolysates Prepared from *Tilapia mossambica* Scales by Hot Water and Enzymatic Extraction

Yong-Seok Ahn^{1,2}, Won-Woo Lee³, Seung-Hong Lee³, Ginnae Ahn³,
Chang-Ik Ko³, Chang-kyung Oh⁴, Myung-Cheol Oh⁴,
Dong-Woo Kim⁵, You-Jin Jeon^{3,6} and Soo-Hyun Kim^{1*}

¹Department of Food Bioengineering, Jeju National University,
Jeju 690-756, Korea

²Research Institute of Processing from Jeju Fisher Food,
Choung Ryong Fisheries Co., LTD, Jeju 697-943, Korea

³Department of Marine Life Science, Jeju National University,
Jeju 690-756, Korea

⁴Department of Tourism Hotel Culinary Art, Jeju College of Technology,
Jeju 690-140, Korea

⁵Central Research Center, Natural F&P Co., Ltd., O-Chang,
Chungbuk 363-883, Korea

⁶Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University,
Jeju 690-814, Korea

Fish scales have potential in functional food preparation due to their antioxidant and antihypertensive properties. We investigated the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of *Tilapia mossambica* scale extracts. Hydrolysates of tilapia scales were prepared by enzymatic extraction using five proteases (α -chymotrypsin, Alcalase, Kojizyme, Protamex and trypsin) after scales were treated with hot water for 3 hr. Scale enzymatic hydrolysates prepared using both hot water and enzyme treatments exhibited elevated hydrolysis (about 25%–55%) compared to only enzyme treatment (about 15%–45%). Enzymatic hydrolysates (1 mg/mL) prepared by both hot water and enzyme treatments also showed significantly increased ACE inhibitory activities from about 20%–75%. The pattern of ACE inhibitory activities was similar to the degree of hydrolysis. Alcalase and α -chymotrypsin hydrolysates displayed the highest ACE inhibitory activities (IC_{50} = 0.83 mg/mL and 0.68 mg/mL, respectively). In addition, the ACE inhibitory effects of α -chymotrypsin hydrolysates increased with decreasing molecular weight (5 kDa>, 10 kDa> and 30 kDa>), with the 5 kDa> fraction displaying the highest ACE inhibitory activity (about 89.9% and IC_{50} = 0.1 mg/mL). We suggest that the peptide compounds of enzymatic hydrolysates prepared from tilapia scale enhances ACE inhibitory activity and might be useful as an antihypertensive material.

Key words: Tilapia, Tilapia scale, Hydrolysate, Gelatin peptide, Antihypertension

서 론

고혈압은 전세계적으로 성인의 15~20%가 겪고 있는 질환으로, 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색 및 당뇨병 등 심각한 만성 질환을 야기시켜 사회적으로나 경제적으로 막대한 손실을 일으키고 있다. 이는 정상적인 혈압을 유지하는 기구들이 천천히 붕괴되는 질환으로 순환기계 질환의 원인이 되는 동시에

앞서 언급한 질환과 함께 합병증으로 나타날 경우 치사율이 매우 높은 만성 퇴행성 질환으로 발전하게 된다(Frohlich (1982)). 고혈압의 원인은 대부분 밝혀져 있지 않지만 혈압을 상승시킬 수 있는 여러 가지 요인들 가운데 Renin-Angiotensin-Aldosterone 고리는 생체 내에서 혈압과 체액량을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Weiss et al., 2001; Walmor et al., 2000; Richard and Re 2002; Ursula et al., 2004). 생체 중에 존재하고 있는 불활성형의 decapeptide인 angiotensin I은

*Corresponding author: kshyun@jejunu.ac.kr

angiotensin I converting enzyme (ACE)에 의하여 C-말단의 His-Leu이 떨어져 나감으로서 혈관벽 수축작용이 있는 octapeptide인 angiotensin II로 전환되며, 이렇게 생성된 angiotensin II는 직접적으로 혈관을 수축하고, 신장에서 aldosterone의 분비를 증가시켜 체액량을 증가시킴으로 혈압을 상승시키는 작용을 한다 (Maruyama et al., 1985 and 1989; Matsui, 1993). 이러한 ACE의 활성을 억제시킴으로써 혈압상승 원인이 되는 angiotensin II의 생성을 저하시켜 혈압의 상승을 억제할 수 있게 된다. 따라서 Renin-Angiotensin-Aldosterone 고리의 작용을 효과적으로 조절하는 약물의 발견은 고혈압 치료제 연구에 있어 중요한 점이다.

한편 대표적인 ACE 억제제로서 화학합성제인 enalapril이나 captopril 등이 개발되어 고혈압 개선제로 이용되고 있지만, 마른기침, 두통, 안면홍조, 식욕부진, 미각이상, 발진, 백혈구 감소등의 부작용이 많아 최근에는 부작용이 없는 천연물에서의 ACE 억제제의 개발이 중요시되고 있다 (Hong et al., 2006). ACE 저해작용을 나타내는 천연물질로는 펩티드성 물질을 들 수 있다. 펩티드성 저해물질은 뱀독으로부터 처음 분리되어 보고되었고, 다랑어, 고등어, 새우 등의 어패류의 효소 가수분해물, 동물의 혈장 등에서 분리한 펩티드 등이 보고되었다 (Matsui, 1993; Yokokawa et al., 1992). 지금까지는 주로 식품 단백질은 펩신, 트립신 등의 단백질 분해효소로 가수분해하여 얻어진 가수분해물로부터 ACE 천연 저해제를 추출하였다. 그러나, ACE 천연 저해제는 분리·정제의 수율이 낮고, 제조원가 등의 경제적인 문제로 상업성이 떨어지며, 가장 중요한 ACE 억제에 대한 활성이 화학합성저해제에 비하여 현저히 떨어지는 편이다 (Hong et al., 2006). 따라서, 천연 소재물질의 새로운 ACE 억제제를 개발하는 것이 요구된다.

대부분의 어류 가공 시, 어류 가공부산물이 어체 중의 약 75% 정도가 발생하게 되고, 그 중 어류 뼈나 껍질이 약 30% 정도를 차지하고 있다 (Songchotikunpan et al., 2008; Kim et al., 1997 and 1999). 따라서, 어류 가공 시 발생되는 가공 부산물을 이용하여 젤라틴이나 콜라겐 같은 새로운 유용한 성분들을 분리해 내는 기술 개발은 매우 중요하다고 할 수 있다. 이전 연구에서, Kim et al. (1993)은 틸라피아로부터 유용한 젤라틴을 추출하여 산업화에 성공하였으며 (Kim et al., 1993), 틸라피아의 비늘로부터 콜라겐을 추출하여 식품 및 의약품용으로 일부 생산 판매하고 있다. 또한, 단백질 가수분해효소를 이용한 식품단백질로부터 펩티드의 제조는 어류 껍질 젤라틴 가수분해물 제조 등에 응용되어 생리활성을 가지는 유용 성분으로 전환시키는 것 (Shahidi and Kamil, 2001; Kim et al., 2001)으로 알려져 있다. 하지만 아직까지 틸라피아의 비늘을 이용하여 생리활성을 연구한 결과가 없으며, 틸라피아 비늘 유래의 가수분해물 제조에 대한 연구도 부족한 실정이다. 이와 같은 점에서, 가공부산물인 틸라피아 비늘을 이용하여 유용 성분을 추출하고 ACE에 대한 저해 활성을 확인하는 것은 매우 유용한 일이라 할 수 있다.

따라서, 현재 연구에서는 틸라피아의 비늘의 체내 흡수율을 증가시키기 위해, 단백질 가수분해 효소의 가수분해능력을

이용하여 효소별, 시간대별 가수분해물을 제조하여 최적 추출 조건을 확립하고, 추출된 가수분해물의 ACE에 대한 저해 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

재료

틸라피아 (*Tilapia mossambica*) 비늘은 제주도 서귀포시에 위치한 (주)청룡수산에서 제공되었으며, 담수를 이용하여 수세 후 실험에 사용되었다.

틸라피아 비늘의 일반성분 측정

건조된 틸라피아 비늘의 수분, 조단백질, 조지방 및 회분을 측정하였다. AOAC 방법에 준하여 수분함량은 0.002 g 이하의 유의차를 향량으로 하여 105°C 상압가열건조법으로 측정하였고, 조단백질 함량은 Micro Kjeldahl방법으로 측정하였으며, 그리고 회분 함량은 건식법으로 측정하였다.

틸라피아 비늘로부터 효소적 가수분해물의 제조

건조된 틸라피아 비늘 (30 kg)을 고상발효장치 (Biofeeda BF-30, Mitsbishi, Japan)하에서 토양 미생물 균주인 *Bacillus* 호기성 고온 균주 (3 g)을 일본 Seiwa 사에서 구입하여 온도 80-90°C에서 6-10 시간동안 고상발효한 후, 실험에 사용하였다. Table 1에 제시한 것에 따라, 5가지 단백질 가수분해효소 (α -chymotrypsin, Alcalase, Kojizyme, Protamex 및 trypsin)를 이용하여 그 효소에 해당하는 적정 조건하에서 틸라피아 효소적 가수분해물을 제조하였다. 틸라피아 젤라틴 가수분해물의 제조는 다음과 같이 두 가지 방법으로 제조하였다. 첫 번째 제조 방법을 틸라피아 비늘을 열수 추출 없이 곧바로 효소를 이용하여 가수분해하였다. 즉, 틸라피아 비늘 10 g을 증류수 100 mL와 섞은 후, 각각의 효소를 첨가하여 각 효소별 최적 pH와 온도에서 시간 경과 (3, 6, 12, 18, 24시간)에 따라 가수분해하였다. 두 번째 방법으로는, 틸라피아 비늘 10 g을 증류수 100 mL와 혼합한 후, 100°C에서 3시간동안 열수추출한 후, 각각의 효소를 첨가하여 각 효소별 최적 pH와 온도에서 시간 경과 (3, 6, 12, 18, 24시간)에 따라 가수분해하였다. 가수분해 반응 후, 100°C에서 10분간 끓임으로서 효소 반응을 정지시키고 pH를 중성으로 맞춘 후, 원심분리 (3500 rpm, 10 min)와

Table 1. Characteristics of proteases used in the hydrolysis of *Tilapia mossambica*

Enzymes	pH	Temperature(°C)	Origin	
a-chymotrypsin	7.8	25	Bovine Pancreas	
Alcalase	8.0	50	<i>Bacillus licheniformis</i>	
Proteases	Kojizyme	6.0	40	<i>Bacillus</i> sp.
	Protamex	6.0	40	<i>A. oryzae</i>
	trypsin	7.6	25	Procine Pancreas

감압여과로 상층액을 분리하였다. 제조된 효소적 가수분해물은 동결건조하여 시료로 이용하였다.

틸라피아 비늘 유래 효소적 가수분해물의 가수분해도 측정

틸라피아 비늘 유래 효소적 가수분해물의 가수분해도 (degree of hydrolysis; DH)는 trichloroacetic acid (TCA)법 (Hoyle and Merritt 1994)으로 측정하였다. 즉 반응이 종료된 반응혼합물을 원심분리 (12000 rpm, 15 min)하여 상층액으로부터 2 mL를 취하고 여기에 20% TCA를 동량 첨가하여 원심분리 (3500 rpm, 10 min)한 다음, 상층액의 일정량을 취하여 Lowry법 (1951)으로 10% TCA 가용성 질소량을 측정하여 다음의 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

가수분해도(DH), % = (10% TCA 가용성 질소량/총질소량) × 100

ACE 억제 활성 측정

틸라피아 비늘로부터 제조된 효소적 가수분해물의 항고혈압 활성을 측정하기 위하여 ACE 억제를 측정하는 Cushman and Cheung (1971)의 방법에 준하여 측정하였다. 효소적 가수분해기법과 열수처리와 병행한 효소적 가수분해기법에 의해 제조된 효소적 가수분해물 (1mg/mL) 50 μ L에 25 mU/mL ACE 효소액 50 μ L를 가한 후, 37°C에서 10분간 항온처리하였다. 여기에 기질로서 12.5 mM Hip-His-Leu (HHL)용액 100 μ L를 가하여 다시 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 1N HCl용액 0.25 mL를 가하여 시험관 혼합기로 교반하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate 350 μ L를 가하여 교반한 다음, 원심분리 (4000 rpm, 10 min)시켜 상층액 (ethyl acetate층) 200 μ L를 분취하였다. 이 분취액을 80°C 드라이오븐에서 완전히 건조시켜 증류수 1 mL를 가하여 용해시킨 후, 228 nm에서 흡광도를 측정하여 효소적 가수분해물의 ACE 저해율을 나타내었다.

ACE 저해율(%) = $[1 - \{(S-Sc)/(B-Bc)\}] \times 100$

S = 각 샘플을 측정된 흡광도

Sc = ACE 효소가 들어가지 않고 반응시간이 0인 상태의 각 샘플의 흡광도

B = 샘플을 넣지 않고 측정된 흡광도

Bc = ACE 효소와 샘플을 넣지 않고 반응시간이 0인 상태의 흡광도

틸라피아 비늘 유래 효소적 가수분해물의 최적가수분해 조건

ACE 억제 활성이 높은 효소 가수분해물의 최적가수분해조건을 결정하기 위하여, 기질대 효소비와 기질농도에 따라 가수분해를 수행하였다. 실험을 수행하기 위한, 기질 대 효소비는 10, 20, 50, 100, 200, 500 (wt/wt)였고, 기질인 틸라피아 비늘의 효소적 가수분해물 농도는 1%, 3%, 5%, 10%, 20%였다. 가수분해는 위에서 제시된 방법과 동일하게 수행되었고, 모든 가수분해조건의 검토를 위해 가수분해물의 가수분해도를 측정하였다.

틸라피아 비늘 유래 효소적 가수분해물로부터 분자량별 분획물의 제조와 ACE 저해활성

분자량별 분획물을 제조하기 위해, 틸라피아 효소적 가수분해물은 5 kDa, 10 kDa 및 30 kDa의 막을 사용하는 한외여과막 분리 시스템 (Ultrafiltration membrane)을 이용하여 5 kDa 이하, 10 kDa 이하 및 30 kDa 이하 분획물들을 각각 제조하였다 (Fig. 1).

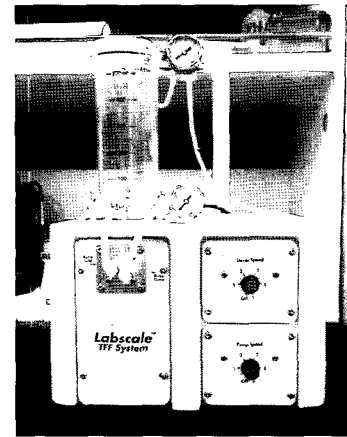


Fig. 1. Mimetic diagram of ultrafiltration membrane system.

제조된 분자량별 분획물들을 가지고 여러가지 농도별 (0.25, 0.5, 1 mg/mL)로 ACE 저해활성을 측정하였다. ACE의 활성을 50% 저해시키는데 필요한 ACE 저해제의 농도는 반응용액 중에 정평하여 첨가된 저해제의 농도를 계산하여 IC₅₀ (mg/mL)로 나타내었다.

통계처리

이 연구의 실험 및 분석 결과의 통계처리는 SPSS program (SPSS Inc., Version 12.0)을 사용하여 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955, $P < 0.05$)로 평균간의 유의성을 검정하였다.

결 과

틸라피아 비늘의 일반성분 측정

Table 2에 제시된 것처럼, 수분함량은 2.6±0.01%, 회분함량은 0.3±0.01%고, 조단백질 함량은 97.06±0.1%였고, 나머지 다른 함량은 0.3±0.01%였다. Jeon 등은 틸라피아와 같은 민물어종인 잉어의 비늘을 대상으로 성분분석을 한 결과 비늘 100 g 중 조단백질이 잉어는 78.66 g이었다는 점을 감안할 때, 이 결과는 같은 민물어종인 틸라피아 비늘의 단백질 함량

Table 2. Proximate composition of *Tilapia mossambica* scale used in this study

Sample	Crude protein	Moisture	Ash	Other
<i>Tilapia mossambica</i>	97.06±0.1	2.6±0.01	0.3±0.01	0.04±0.01

이 매우 높다는 것을 알 수 있었다 (Jeon et al., 1998). 이것으로부터 틸라피아 비늘이 함유한 단백질의 높은 함량은 단백질 원료 산업에서 유용하게 이용될 수 있다는 가능성을 제시해주었다.

틸라피아 비늘로부터 제조된 효소적 가수분해물의 가수분해도 측정

고상발효된 틸라피아 비늘의 효소적 가수분해물들의 효율적인 제조를 위해, 다양한 단백질 가수분해 효소 및 반응시간, 열수추출기법의 조합 등에 따른 여러가지 조건으로 실험을 수행하였다. 따라서, 고상발효된 틸라피아 비늘로부터 다양한 효소적 가수분해물들이 제조되었고, 그들의 가수분해도를 측정하였다. 우선, 틸라피아 비늘의 열수추출 과정 없이 효소적 가수분해만을 수행한 경우, 3시간부터 12시간까지의 시간 의존적으로 모든 5종의 효소적 가수분해물 (α -chymotrypsin, Alcalase, Kojizyme, Protamex 및 trypsin)의 가수분해도가 증가한 것을 확인하였고, 그 뒤에는 거의 유사하거나 다소 감소하는 경향을 보였다. 이 중, Alcalase 가수분해물이 12시간까지 다른 효소 가수분해물들보다 다소 높은 가수분해도를 보였으나, 그 이후에는 다소 감소된다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 한편, 틸라피아 비늘의 열수처리 후, 효소적 가수분해로 제조된 가수분해물들은 효소만을 이용하여 제조한 가수분해물들에 비해 상당히 높은 가수분해도를 보였다. 또한, 열수처리 후, 효소적 가수분해를 시도하였을 때 그 가수분해도는 α -chymotrypsin을 제외하고 6시간까지 급격히 증가하다가 그 이후까지 가수분해도는 일정하게 유지되었다. 하지만, α -chymotrypsin에 의해 제조된 가수분해물은 12시간까지 지속

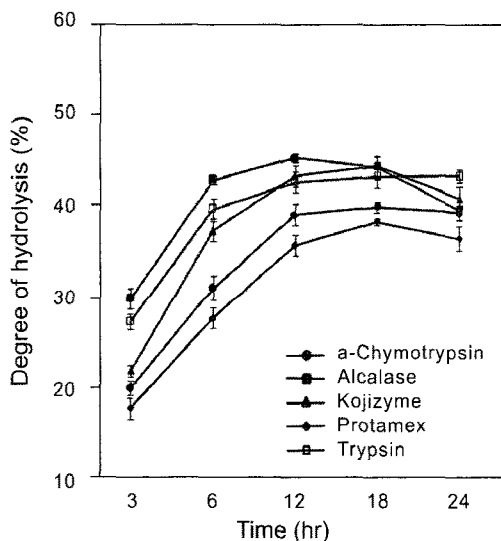


Fig. 2. Comparison of hydrolysis degrees of the tilapia scale enzymatic hydrolysates prepared by enzymatic extraction technique. The hydrolysates were prepared from tilapia scale according to various proteases (α -chymotrypsin, Alcalase, Kojizyme, Protamex and trypsin) and reaction times (3, 6, 12, 18, and 24 hr). The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

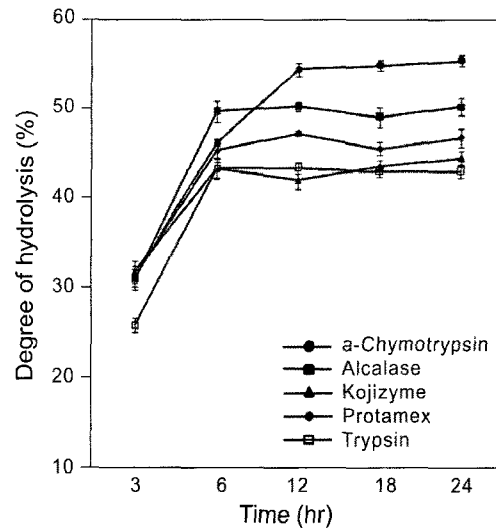


Fig. 3. Comparison of hydrolysis degrees of the tilapia scale enzymatic hydrolysates prepared by both hot water and enzymatic extraction technique. After the hot water extraction of tilapia scale (for 12 hr), the hydrolysates were prepared from the tilapia scale hot water extracts according to various proteases (α -chymotrypsin, Alcalase, Kojizyme, Protamex and trypsin) and reaction times (3, 6, 12, 18, and 24 hr). The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

적으로 가수분해도의 증가를 보였으며 12시간 가수분해에서 약 55%의 가장 높은 가수분해도를 보였다 (Fig. 3). 이것은 열수추출 없이 α -chymotrypsin만 처리하여 가수분해도를 측정하였을 때보다 약 15% 가수분해도 증가를 보였다. 따라서, 틸라피아 비늘의 경우 열수처리 후, α -chymotrypsin 효소를 처리하는 것이 가장 효율적으로 가수분해 되었다는 것을 알 수 있었다.

틸라피아 비늘로부터 제조된 효소적 가수분해물의 ACE 저해 효과

열수 처리 후, 단백질 가수분해효소 (α -chymotrypsin, Alcalase, Kojizyme, Protamex 및 trypsin)에 따라 제조된 틸라피아 비늘의 효소적 가수분해물들의 ACE 저해활성은 Fig. 4에 나타내었다. 이 결과로부터, 열수 처리 후, 다양한 효소와 가수분해시간에 따라 제조된 틸라피아 비늘의 효소적 가수분해물들이 ACE 저해 활성을 가진다는 것을 확인하였다. 또한, 3시간부터 12시간까지 가수분해시간이 증가함에 따라 모든 효소 가수분해물 (1 mg/mL)의 ACE 저해활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었으나, 12시간부터 24시간까지 가수분해도의 변화가 없는 반응시간대에서는 ACE 저해활성의 증가도 나타나지 않았다. 특히, 다른 효소에 비하여 α -chymotrypsin과 Alcalase를 이용하여 제조된 틸라피아 비늘의 효소적 가수분해물이 상당히 높은 ACE 저해작용 (약 60%에서 75%까지)을 가진다는 것을 확인하였다. 따라서, 높은 ACE 저해작용을 보인 12시간째 α -chymotrypsin과 Alcalase 가수분해물들을 가지고 다양한 농도 (0.25, 0.5 및 1 mg/mL)에서 ACE 저해작용을 확인하였다. Fig. 5에서 제시한 것처럼, α -chymotrypsin과 Alcalase 가수

분해물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 ACE 저해활성이 상당히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 게다가, 12시간째 α -chymotrypsin 가수분해물의 IC₅₀ 값은 0.7 mg/mL였고, 12시간째 Alcalase 가수분해물의 IC₅₀ 값은 0.83 mg/mL였다. 이것으로부터 12시간째 α -chymotrypsin 가수분해물이 12시간째 Alcalase 가수분해물보다 더 높은 ACE 저해활성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 흥미롭게도 ACE에 대한 저해활성 패턴이 열수 처리 후, 효소의 종류와 가수분해시간에 따른 가수분해물의 패턴과 유사하였다. 즉, 앞에서 제시된

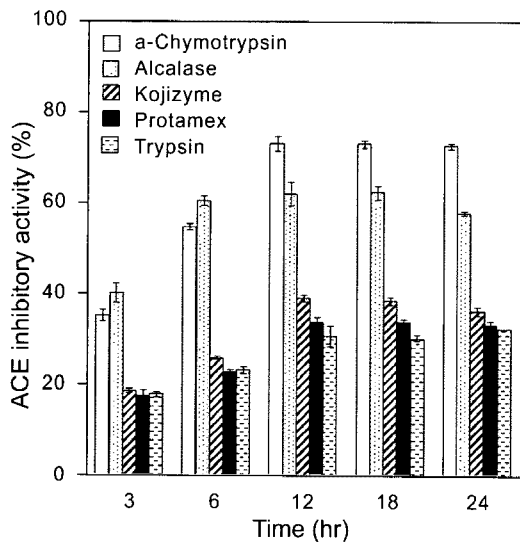


Fig. 4. ACE inhibitory activities of the tilapia scale enzymatic hydrolysates. ACE inhibitory activities of the enzymatic hydrolysates (1 mg/mL) were measured. The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

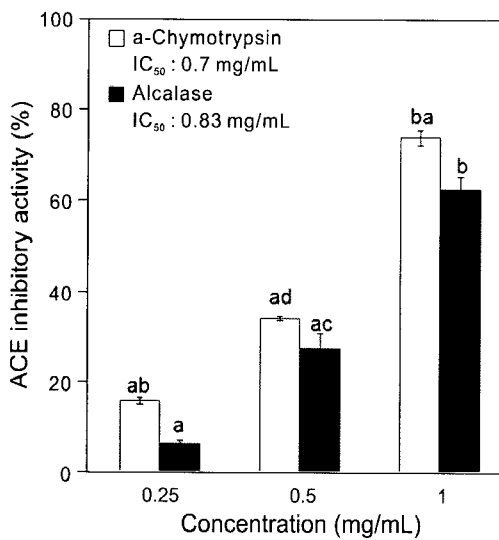


Fig. 5. ACE inhibitory activities of the tilapia scale α -chymotrypsin and Alcalase hydrolysates according to various concentrations (0.25, 0.5, and 1 mg/ml). The value of IC₅₀ was expressed as the concentration of α -chymotrypsin and Alcalase hydrolysate inhibiting the 50% of ACE. The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

것처럼 가수분해 시간이 증가하면서 톨라피아 비늘의 가수분해도가 증가한 구간에서만 ACE의 저해활성의 증가가 확인되었을 뿐만 아니라, 높은 가수분해도를 보인 α -chymotrypsin과 Alcalase 가수분해물이 다른 가수분해물들에 비해 높은 ACE 저해 활성을 보여 ACE 저해활성은 가수분해도와 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다.

12시간째 α -chymotrypsin에 의해 제조된 가수분해물의 최적 가수분해 조건

ACE 저해활성이 가장 높은 α -chymotrypsin 가수분해에 의한 톨라피아 비늘 가수분해물의 최적 가수분해 조건을 확인하기 위해, 기질 대 효소비와 기질농도에 따른 다양한 조건으로 실험을 수행하였다. 먼저, 12시간째 α -chymotrypsin 가수분해물을 가지고 기질 대 효소비를 10, 20, 50, 100, 200, 500 (wt/wt)으로하여 가수분해도를 측정한 결과, Fig. 6에서 나타난 것과 같이 톨라피아 비늘인 기질 대 효소의 비가 증가할수록, 즉 효소의 농도가 감소할수록 가수분해도는 감소하였다. 또한, 톨라피아 비늘 대 효소의 비율이 10 (wt/wt)부터 200 (wt/wt)까지 증가하면서 가수분해도가 약 65%에서 약 45%까지 급격히 감소하였고, 200 (wt/wt)부터 500 (wt/wt)까지는 거의 유사한 가수분해도를 보였다. 이 결과로 보아 다양한 기질 대 효소비 중, 기질 대 효소비 100 (wt/wt)이 가수분해도에 대한 경제적인 효율성을 보인다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 톨라피아 비늘의 α -chymotrypsin 가수분해물을 100 (wt/wt)에서 기질농도를 1%, 3%, 5%, 10%, 20%로 각각 조절하여 다음 실험을 수행하였다. 그 결과, Fig. 7에서 나타난 것처럼 기질의 농도가 낮을수록 가수분해도가 다소 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

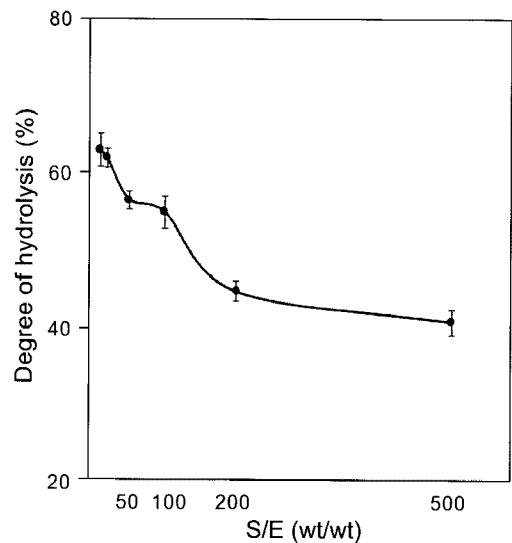


Fig. 6. Comparison of hydrolysis degrees of the tilapia scale α -chymotrypsin hydrolysates according to various substrate/enzyme ratios. The hydrolysis degree of α -chymotrypsin hydrolysates was determined by various substrate/enzyme ratios (10, 20, 50, 100, 200, and 500 wt/wt) with 3% substrate (wt/vol) in pH 7.8 at 25°C for 12 hr. The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

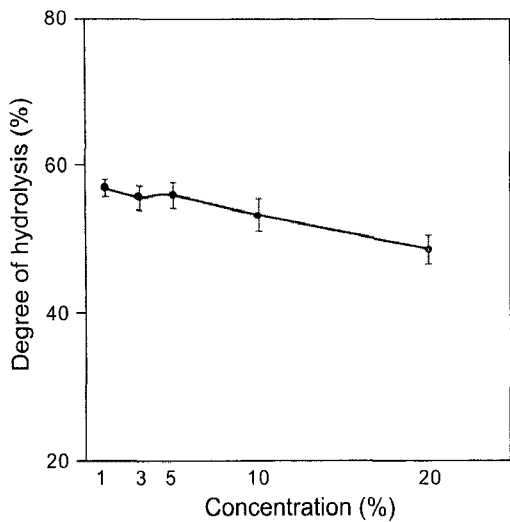


Fig. 7. Comparison of hydrolysis degrees of the tilapia scale α -chymotrypsin hydrolysates (substrate/enzyme ratio; 100 wt/wt) according to various substrate concentrations. The hydrolysis degrees of α -chymotrypsin hydrolysates prepared by 100 wt/wt of substrate/enzyme ratio were determined according to various substrate concentrations (1, 3, 5, 10, and 20%)(wt/vol) in pH 7.8 at 25°C for 12 hr. The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

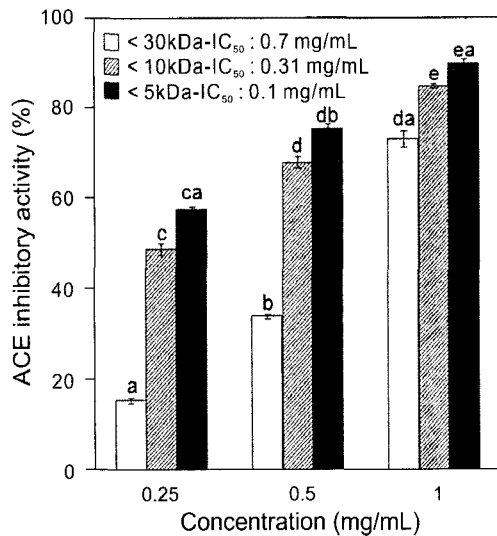


Fig. 8. ACE inhibitory activities of α -chymotrypsin hydrolysates according to various concentrations (0.25, 0.5, and 1 mg/ml). The value of IC₅₀ was expressed as the concentration of α -chymotrypsin hydrolysate (100 wt/wt of substrate/enzyme ratio and 10% of substrate concentration) inhibiting the 50% of ACE. The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

지금까지의 결과로부터 틸라피아 비늘로부터 다양한 효소를 이용하여 시간, 기질 대 효소비, 기질의 양에 따른 다양한 조건하에서 가수분해를 수행하였고, 그것으로부터 α -chymotrypsin 를 이용하여 pH 7.8, 25°C, 12 hr, substrate/enzyme ratio=100 (wt/wt) 및 substrate concentration=10%의 조건으로 가수분해

한 경우, 가장 경제적이고 우수한 가수분해도를 확인하였고, 이것이 틸라피아 비늘 효소적 가수분해물의 제조를 위한 최적 조건임을 확인할 수 있었다.

틸라피아 비늘의 α -chymotrypsin 가수분해물로부터 분자량별 분획물의 제조와 ACE 저해활성

틸라피아 비늘 α -chymotrypsin 가수분해물의 분자량에 따른 ACE 저해활성을 확인하기 위해, 틸라피아 비늘 α -chymotrypsin 가수분해물을 가지고 5 kDa, 10 kDa 및 30 kDa의 막을 사용하는 한외여과막 분리 시스템에 의해 5 kDa 이하, 10 kDa 이하 및 30 kDa 이하 분획물들을 제조하였다. 3가지 분획물을 가지고 다양한 농도별 (0.25, 0.5 및 1 mg/mL)로 ACE 저해활성을 측정된 결과, 모든 분획물의 농도가 증가할수록 ACE의 저해 활성이 유의성 있게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 8). 특히, 모든 농도에서 5 kDa 이하 분획물의 ACE에 대한 IC₅₀ 값이 0.1 mg/mL로서, 10 kDa 및 30 kDa 이하 분획물의 IC₅₀ 값인 0.31 mg/mL과 0.7 mg/mL보다 상당히 높은 ACE 저해 활성을 보였다. 또한, 5 kDa 이하 분획물의 농도가 0.25 mg/mL에서 1 mg/mL까지 증가하면서, 약 60%의 ACE 저해 활성이 약 89%까지 증가하였다. 이 결과들은 한외여과막 시스템에 의해 분리된 틸라피아 비늘 α -chymotrypsin 가수분해물의 5 kDa 이하 분획물이 ACE에 대한 효율적인 저해 작용을 가진다는 것을 제시한다. 이것은 α -chymotrypsin의 높은 가수분해 능력이 틸라피아 비늘에 존재하는 단백질 성분을 다양한 펩티드로 가수분해하고 일정한 분자량 이하로 분해되어질 때, ACE 저해 작용이 크게 증가하는 것으로 판단된다. 따라서 틸라피아 비늘 가수분해물이 ACE 저해 활성을 가짐으로써 새로운 항고혈압제의 원료로서 가치를 가질 수 있다는 것을 확인하였다.

고 찰

틸라피아는 전 세계적으로 잉어, 붕어, 연어와 함께 가장 많은 양식을 하는 민물어종으로, 해마다 그 생산량이 급격히 늘고 있는 어종이다. 2005년에 중국에서만 약 100만 톤이 넘는 틸라피어를 생산하여, 2004년에 비하여 약 15%, 2001년에 비하여 약 55% 증가를 보여주었으며, 우리나라에서 1955년 도입된 후, 꾸준히 양식되고 있다. 생산량이 많아짐에 따라 상대적으로 가공과정에서 어체가공잔사, 어뼈, 어피, 어두, 내장, 비늘 등과 같은 가공 부산물의 양도 증가하고 있는 실정이다. 그 중, 틸라피아의 비늘은 어류 유래의 젤라틴으로 의학 분야와 화장품분야, 식품분야 등에서 캡슐이나 기능성 화장품, 식용 젤라틴 등으로 쓰이고 있으나, 아직 생리활성에 대한 연구가 부족한 실정이었다.

따라서, 이 연구에서 틸라피아의 비늘을 열수 추출하여 체내 흡수율을 증가시키기 위해 단백질 가수분해효소로 가수분해능력을 이용하여 효소별, 시간대별 젤라틴 가수분해물을 제조하여 최적 추출조건을 알아보았고, 그렇게 추출된 가수분해물이 항고혈압 활성을 가진다는 것을 알게 되었다.

일반적으로, 콜라겐과 젤라틴은 고분자물질로서 체내 섭취

가 어려워 그것의 체내흡수율의 증대를 위해 많은 연구가 진행되고 있고 그것을 토대로 기능성 식품 소재와 천연 의약품 소재 등의 개발이 이루어지고 있다. 그에 따라 많은 연구자들이 젤라틴의 원천으로 알려진 어류의 살이나 비늘 성분, 혹은 돼지와 같은 포유동물의 껍질로부터 젤라틴과 젤라틴 펩티드를 다양한 추출기법을 이용하여 추출함으로써 추출효율을 높이고자 노력하고 있다 (Bowes et al., 1955; Cho et al., 2005; Sobral and Habitate 2001; Gudmundsson and Hafsteinsson 1997; Jamilah and Harvinder 2002; Cho et al., 2006). 뿐만 아니라, 수용성 성분들과 저분자량으로 성분을 가수분해할 수 있는 효소적 추출기법은 환경적으로 유익하고, 저비용과 상당히 높은 추출효율을 이끈다는 점에서 다양한 천연 소재의 연구와 개발에서 이용되고 있다 (Heo et al., 2003; Ahn et al., 2008; Athukorala et al., 2006; Yamaguchi et al., 1979; Kim et al., 1996 and 2001, Shahidi et al., 2001).

이 연구에서도 틸라피아 비늘 가수분해물을 효율적으로 제조하기 위해 다양한 단백질 가수분해효소를 이용하여 효소적 가수분해물을 제조하였다. 뿐만 아니라, 열수 추출과 효소적 추출기법을 병행하여 수행하였고, 단독으로 효소만을 이용하였을 때 보다 병행하여 얻은 가수분해물의 가수분해도가 더 높은 것을 알 수 있었다. 이것은 효소추출기법에 의해 추출되어 나오지 못하는 성분들이 열수추출법을 먼저 적용시킴으로써 효율적으로 추출되게 되고, 단백질 가수분해효소를 적용함으로써 고분자의 성분이 저분자의 성분으로 효율적인 전환이 이루어질 수 있어 가수분해도가 증가한 것으로 판단된다. 또한, α -Chymotrypsin이 높은 가수분해도를 유도함에 따라 틸라피아 비늘 유래 가수분해물 제조를 위한 효율적인 효소이며, 열수추출법과 효소적 추출기법의 병행이 저분자 성분 추출에 유용하다는 것을 확인할 수 있었다.

이전 연구에서, Cheung et al. 은 C말단의 Proline과 방향족 아미노산 (Tryptophan, Tyrosine, Phenylalanine) 등의 잔기를 주로 함유하고 있는 저분자물질의 펩티드나 그것을 함유한 성분이 ACE 저해 활성을 가진다고 보고한 바 있다 (Cheung et al., 1980). 또한, ACE 저해제가 ACE의 작용을 억제함으로써 Angiotensin II의 생성저해, Aldosterone 분비 감소, 혈관확장제인 bradkinin의 증가 등의 과정을 통해 신장혈관을 확장시켜 나트륨의 배설을 촉진함으로써 혈압을 낮추어 줄 수 있다고 보고하였다 (Oh et al., 1997). 마찬가지로, 우리의 결과도 열수 처리와 효소에 의해 가수분해된 틸라피아 비늘 가수분해물이 상당히 높은 ACE 저해 활성을 보였고, 또한 5 kDa 이하의 분획물이 다른 10 kDa나 30 kDa이하의 분획물들 보다 높은 ACE 저해 활성을 보였다. 이것은 틸라피아 비늘 유래 가수분해물이 열수추출과 효소적 가수분해능력에 의해 제조됨으로서 보다 더 효율적으로 저분자의 펩티드로 전환되어졌고, 저분자량의 펩티드 성분이 C말단의 Proline과 방향족 아미노산 (Tryptophan, Tyrosine, Phenylalanine) 등의 잔기를 주로 함유하고 있다는 것으로 생각된다.

따라서, 이 연구를 통해 수산가공과정을 거쳐 폐기물로 버려지고 있는 가공부산물인 틸라피아 비늘의 열수 및 효소적

가수분해물의 저분자 펩티드가 상당히 우수한 항고혈압 활성을 나타냄으로써, 기능성 식품 소재 및 잠재적인 의약품 소재로서 충분한 연구 가치가 있다고 생각되며 좀 더 체계적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. 14th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC. p. 31.
- Bowes JH, Elliott RG and Moss JA. 1955. The composition of collagen and acidsoluble collagen of bovine skin. *Biochem J* 61, 143-150.
- Cheung HS, Wang FI, Ondetti MA, Sabo EF and Cushman DW. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J Biol Chem* 225, 401-407.
- Cho SM, Gu YS and Kim SB. 2005. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 19, 221-229.
- Duncan DB, 1955. Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics*, 11, 1-42.
- Frohlich ED. 1982. Hemodynamic factors in the pathogenesis and maintenance of hypertension. *Fed Proc* 41, 2400-2408.
- Giles TD. 1997. Lipid factors in the hypertension syndrome. *J Cardiovas Risk* 4, 257-259.
- Gudmundsson M and Hafsteinsson H. 1997. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *J Food Sci* 62, 37-39.
- Hong JH, Son BS, Kim BK, Chee HY, Song KS, Lee BH, Shin HC and Lee KB. 2006. Antihypertensive effect of *Ecklonia cava* Extract. *Kor J Pharmacogn* 37, 200-205.
- Hoyle NT and Merritt JH. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from Herring. (*Clupea harengus*). *J Food Sci* 59, 76-79.
- Jamilah B and Harvinder KG. 2002. Properties of gelatins from skins of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry* 77, 81-84.
- Kim SK, Lee HC, Byun HG and Jeon YJ. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J Korean Fish Soc* 29, 246-255.

- Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS and Shahidi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J Agric Food Chem* 49, 1984-1989.
- Kim JS, Kim JG, Cho SY, Kang KS, Ha JH and Lee EH. 1993. The suitable processing condition for gelatin preparation from yellowfin sole skin. *Korean J Food Sci Technol* 25, 716-723.
- Kim JS and Oh KS. 1999. Preparation of conger eel skin gelatin by precipitation with ethanol and its properties. *J Ins Marine Industry* 12, 51-57.
- Kim JS, Kim JG and Cho SY. 1997. Screening for the raw Material of gelatin from the skins of some pelagic fishes and squid. *J Korean Fish Soc* 30, 55-61.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Maruyama S, Nakagomi K, Tomizuka N and Suzuki H. 1985. Angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and ileum of rats. *Agric Biol Chem* 49, 1405-1409.
- Maruyama S, Miyoshi S, Kaneko T and Tanaka H. 1989. Angiotensin I-converting enzyme activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric Biol Chem* 53, 1077-1081.
- Matsui T, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M and Osajima Y. 1993. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci Biotech Biochem* 57, 922-925.
- Oh SJ, Kim SH, Kim SK, Baek YJ and Cho KH. 1997. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the K-casein fragments hydrolyzated by chymosin, pepsin, and trypsin. *Korean J Food Sci Technol* 29, 1316-1318.
- Richard N and Re MD. 2002. The clinical implication of tissue renin angiotensin systems. *Current Opinion in Cardiol* 16, 317-327.
- Shahidi F and Kamil YVA. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 12, 435 - 464.
- Sobral PJA and Habitante AMQB. 2001. Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocolloids* 15, 377 - 382.
- Songchotikunpan P, Tattiyakul J and Supaphol P. 2008. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *Int J Biol Macromol* 42, 247 - 255
- Ursula C, Brewster MD, Mark A and Perazella MD. 2004. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: Effects on kidney disease. *Am J Med* 116, 263-272.
- Weiss D, Kools JJ and Taylor WR. 2001. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* 103, 448-454.
- Walmor C, De Mello AH and Danser Jan. 2000. Angiotensin II and the Heart On the Intracrine Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 35, 1183-1188.
- Yokokawa K, Chiba H and Yoshikawa M. 1992. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci Biotech Biochem* 56, 1541-1545.

2009년 9월 14일 접수

2009년 9월 21일 수정

2009년 10월 26일 수리