

제주 수산가공부산물 유래 기능성 소재 탐색

Development of Bioactive Substances from Fishery Processing by-products in Jeju

강나래¹, 이원우¹, 고주영¹, 김현수¹, 김준성¹, 안용석², 고창익², 정준범¹, 전유진^{1*}

Nalae Kang¹, WonWoo Lee¹, Ju-Young Ko¹, Hyun-Soo Kim¹, Junseong Kim¹, Yong-Seok Ahn², Chang-Ik Ko², Joon Bum Jeong¹, You-Jin Jeon^{1*}

¹제주대학교 해양생명과학과, 제주특별자치도 690-756, 대한민국

²(주) 청룡수산 수산식품가공연구소, 제주특별자치도 699-943, 대한민국

¹Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea

²Research Institute of Processing from Jeju Fisher Food, Choung Ryong Fisheries Co., LTD, Jeju 699-943, Republic of Korea

(Received 11 December 2014, Revised 22 December 2014, Accepted 22 December 2014)

Abstract In this study, we investigated the bioactive substances of the Alcalase hydrolysate obtained from fishery processing by-products in Jeju by measuring bioactivities including radical scavenging activity, cytoprotective activity against 2,2-azobis-(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), and ACE inhibitory activity. This study is important because of utilization of unused fishery processing by-products in Jeju. The Alcalase hydrolysate was prepared through the hot water extraction and enzymatic hydrolysis, and then further separation of the Alcalase hydrolysate was performed by ultrafiltration using 10 kDa molecular weight cut-off membrane. The Alcalase hydrolysate showed the relatively higher DPPH and peroxyl radical scavenging activity (IC₅₀ value; 1.30 mg/ml and 0.888 mg/ml, respectively). Also, the Alcalase hydrolysate showed the ACE inhibitory activity with 1.87 mg/ml of IC₅₀ value. These biological activities are increased over 1.2 or 2.5 times through the ultrafiltration of the Alcalase hydrolysate. Therefore, the Alcalase hydrolysate obtained from fishery processing by-products in Jeju and the different molecular weight fractions should be given consideration for food and cosmetics ingredient. Furthermore, this research on the utility of fishery processing by-products might be a useful tool into the industry.

Keywords : Alcalase hydrolysate, Fishery processing by-products, Radical scavenging activity, ACE inhibitory activity, Ultrafiltration

서 론

우리나라 국민 1인당 연간 수산물 소비량이 2001년에는 42.2 kg, 2004년에는 48.9 kg, 2006~2007년에는 56.5 kg으로 기록되었으며, 2009년에 49.8 kg 까지 감소하였다가 다시 2012년에 54.9 kg으로 증가하여 현재까지 지속적으로 증가하는 추세를 보이고 있

다. 이처럼 수산물 소비가 늘어나는 것은 국민소득의 향상과 건강에 대한 사회 전반의 관심이 높아져, 수산물이 건강식품으로서 소비자의 선호가 높아졌기 때문이라고 분석되고 있다 [12]. 또한 수산물의 수요가 증가함에 따라 국내 수산업의 수산물 자급률은 2007년부터 꾸준히 75% 내외를 기록하고 있다 [12].

* Corresponding author
Phone: +82 64 754 3475 Fax: +82 64 756 3493
E-mail: youjin2014@gmail.com

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

우리나라 수산업은 냉장, 냉동, 조리 및 보존처리, 염장 등 단순 가공제품이 주를 이루고 있는 실정이다. 또한 수산가공공장에서 상품으로 가공되어 사용되는 양은 우리나라 수산물 총 생산량의 61%에 불과하며, 가공 후에 발생하는 어두, 어피, 어뼈, 내장, 자숙액, 폐각 및 갑각류의 껍데기와 같은 수산가공 부산물은 극히 일부만이 사료로 이용될 뿐, 대부분이 버려지고 있다 [8]. 이에 따라 수산가공부산물을 처리하는 과정에서 수산업 종사자들의 비용부담이 가중되고 있으며, 올바른 절차로 처리되지 않을 경우 환경오염을 야기하는 등의 추가적인 피해가 발생하고 있는 실정이다. 그러므로 수산가공부산물의 회수 및 활용은 미이용·폐자원의 이용이라는 측면뿐만 아니라 환경보호의 측면에서도 매우 중요하다.

사실 이러한 수산가공부산물은 다양한 기능성 물질들을 함유하고 있다. 문어 자숙액에 포함되어 있는 타우린 [5], 수산가공부산물 유래 콜라겐 또는 젤라틴 [3,6], 갑각류 부산물 유래의 키틴 [1], 홍어류 껍질에서 분리한 collagenase-1 저해 펩타이드 [11] 등 수산가공부산물 유래의 다양한 기능성 물질이 연구되어 있다. 따라서 버려지는 미이용 수산가공부산물은 잠재적 가치가 충분하며, 이를 고부가가치 상품으로 활용할 수 있는 연구가 필요하다.

제주도에서 생산되는 주요 어종은 갈치, 옥돔, 넙치, 고등어 등이 있으며, 전국 생산량 대비 갈치는 30% 이상, 옥돔은 74% 이상, 넙치는 50% 이상이 생산되고 있다 [7,13]. 최근 10년 동안 제주지역의 수산물 생산실적은 연평균 7.0%, 생산금액은 9.8%씩 증가하였다. 이에 따라 2011년 가공부산물 발생량이 187.4 톤으로 집계되었으며, 현재까지 지속적으로 증가하고 있는 추세이다. 따라서 이 연구에서는 제주 수산가공부산물의 자원화 및 고부가가치화를 위해 수산가공부산물 유래 가수분해물의 기능성을 탐색함으로써 재이용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

수산가공부산물

제주도내 수산식품 회사인 (주)청룡수산으로부터 갈치 머리, 갈치 꼬리, 고등어 뼈, 옥돔 비늘 등의 가공부산물을 건조된 상태로 제공받았으며, 가공부산물 (30 kg)을 고상발효장치 (Biofeeda BF-30,

Mitsubishi, Japan)하에서 호기성 고온 균주인 *Bacillus* (Seiwa co., Japan) (3 g)을 이용하여 80~90°C에서 6~10 시간동안 고상발효한 후, 실험에 사용하였다.

수산가공부산물의 효소가수분해

수산가공부산물의 가수분해물은 Ahn et al., (2009)의 방법을 사용하여 열수 및 효소적 추출법을 이용하여 제조하였다 [2]. 여러 가지 식품 및 산업용 단백질 분해효소 중에서 가격이 저렴하고 가수분해 수율이 높아 산업적으로 자주 이용되는 Alcalase를 선택하였다. 우선, 수산가공부산물을 10% (w/v)로 24시간동안 열수추출을 하였으며, 유용성분을 최대한 확보하기 위해 이를 다시 Alcalase의 최적 활성조건 (pH 8.0, 50°C)에서 10%의 기질 대 효소비로 효소가수분해를 수행하였다. 가수분해 반응 후, 효소 불활성화를 위해 100°C에서 10분간 끓이고, 원심분리 (3500 rpm, 10분) 및 감압여과를 수행하여 상층액을 분리한 후, 이를 동결건조하여 실험에 사용하였다.

수산가공부산물 효소가수분해물의 분자량별 분획

효소로서 Alcalase를 이용하여 얻어진 Alcalase 가수분해물의 분자량별 분획은 Ahn et al., (2009)의 방법을 사용하였다 [2]. 10 kDa의 막을 장착한 한외여과막 분리 시스템 (Ultrafiltration membrane)을 이용하여 10 kDa 이상 및 10 kDa 이하의 분획물을 제조하였다.

전자스핀공명흡수분광기(Electorn Spin Resonance Spectrometer(ESR))를 이용한 라디칼 소거활성 측정

가수분해물의 라디칼 소거활성은 Nanjo et al., (1996)의 방법을 변형하여 전자스핀공명흡수분광기(JES-FA machine, JOEL, Tokyo, Japan)로 측정하였다 [10]. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성은 효소가수분해물 60 μ l와 DPPH (60 μ mol/l in MeOH) 60 μ l를 반응시킨 후, ESR spectrometer에서 측정하였다. Hydroxyl 라디칼 소거활성은 효소가수분해물 20 μ l와 0.3 M DMPO (in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) 20 μ l, 10 mM FeSO₄ 20 μ l, 10 mM H₂O₂ 20 μ l 를 반응시킨 후, ESR spectrometer에서 측정하였다. Peroxyl 라디칼 소거활성은 효소가수분해물 20 μ l, 40 mM 2,2-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (A

APH) (in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) 20 μ l, 40 mM POBN (in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) 20 μ l를 37°C 에서 반응시킨 후, ESR spectrometer에서 측정하였다.

in vitro 상에서의 항산화 활성 검증

원숭이 유래 상피세포인 Vero 세포 (한국세포주은행)를 사용하였으며, 세포 생존율에 대한 가수분해물의 효능은 Ko et al., (2013)의 방법을 사용하여 MTT assay를 통해 검증하였다 [9]. Vero 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotics를 포함하는 DMEM 배지에 1×10^5 cells/ μ l의 농도로 희석한 후, 96 well plate에 접종하여 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이 후 효소가수분해물을 처리하고, 2시간 뒤에 10 mM의 AAPH를 각 well에 처리한 후, 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한다. 배양이 종료되면 50 μ l의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) (2 mg/ml)를 각 well에 처리한 후, 살아있는 세포에 염색되어 형성된 formazan의 양을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ACE 저해효과 검증

효소가수분해물의 ACE 저해효과는 Cushman and Cheung (1971)의 방법에 따라 측정하였다. 효소가수분해물 50 μ l에 25 mU/ml ACE 효소액 50 μ l를 가한 후, 37°C에서 10분간 항온처리 한 후, 기질로서 12.5 mM HHL용액 100 μ l를 가하여 다시 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응용액에 1 N HCl 0.25 ml를 가하여 반응을 종료시킨 후, ethyl acetate 350 μ l를 가하여 교반한 다음, 원심분리 (4000 rpm, 10분)시켜 상층액 200 μ l를 분취하였다. 이 분취액을 80°C 드라이오븐에서 완전히 건조시켜 증류수 1 μ l를 가하여 용해시킨 후, 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계 분석

이 연구 결과의 통계 및 분석은 SPSS 프로그램 (SPSS Inc. Ver.12.0)을 사용하여 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test ($P < 0.005$)로 평균 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

수산가공부산물의 Alcalase 가수분해물의 항산화 활성

수산가공부산물 Alcalase 가수분해물의 항산화활성을 확인하기 위해서 ESR을 이용하여 자유라디칼 소거 활성을 확인하였다. Table 1에 여러 가지 자유라디칼에 대한 수산가공부산물 Alcalase 가수분해물의 IC₅₀ value를 나타내었다. DPPH 라디칼과 Peroxyl 라디칼 소거활성의 경우, 각각 1.30 mg/ml, 0.888 mg/ml의 IC₅₀ value를 나타내었으며, 이 수치는 가수분해물의 단계에서 비교적 우수한 활성이라고 생각되어진다.

또한 가장 우수한 소거활성을 나타내었던 Peroxyl 라디칼에 초점을 두어 다음 세포실험을 진행하였다. 세포는 Vero cells을 사용하였으며, AAPH로 유도한 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과를 확인하였다.

먼저 세포독성을 확인한 결과, 0.8 mg/ml의 Alcalase 가수분해물에서 90%의 세포 생존율을 나타내고 있기 때문에 위의 농도까지는 독성이 없는 것으로 판단된다 (Figure 1).

Table 1. Radical scavenging activities (RSA) of the Alcalase hydrolysate from fishery processing by-products in Jeju. The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

Radicals	RSA (IC ₅₀ , mg/ml)
DPPH	1.30 \pm 0.005
Hydroxyl	2.01 \pm 0.015
Peroxyl	0.888 \pm 0.007

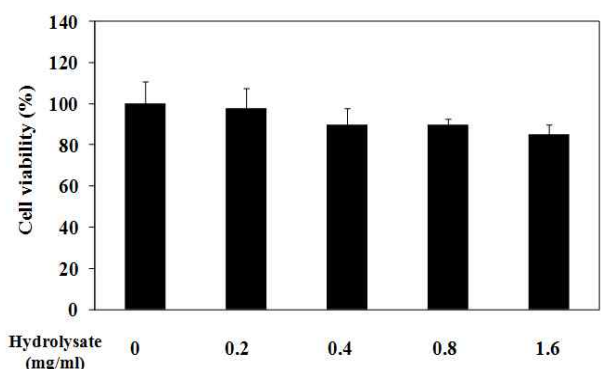


Figure 1. Cytotoxicity of the Alcalase hydrolysate from fishery processing by-products in Jeju. Vero cells were treated with the Alcalase hydrolysate at the indicated concentrations (0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 mg/ml). After the treatment for 24 h, the cell viabilities were assessed by MTT assay. The results are mean of three replicates \pm standard error (SE).

다음은 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과를 확인하기 위해 Alcalase 가수분해물을 전처리하고 AAPH로 산화적 스트레스를 유도한 세포의 생존율을 측정하였다 (Figure 2). AAPH를 처리한 세포의 경우, 생존율이 control에 비해 2 배로 감소하였다. 이때, Alcalase 가수분해물의 전처리에 의해 세포 생존율이 다시 증가하는 경향을 보이고 있지만 유의적인 결과를 확인하지 못하였다.

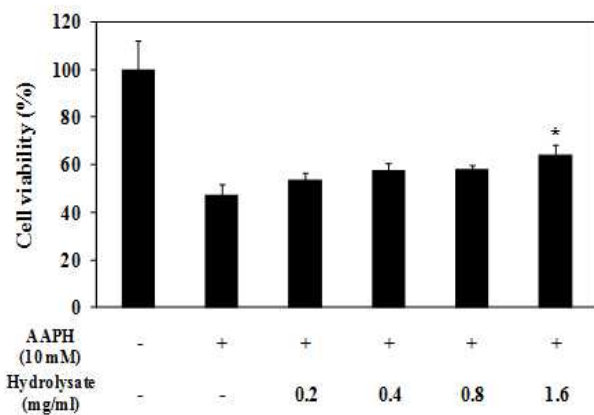


Figure 2. Protective effects of the Alcalase hydrolysate from fishery processing by-products in Jeju against AAPH-induced oxidative damage in Vero cells. The cells were treated with the Alcalase hydrolysate at the indicated concentrations (0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 mg/ml). After the treatment for 24 h, the cell viabilities were assessed by MTT assay. The results are mean of three replicates ± standard error (SE). Value is significantly different at * $P < 0.005$.

수산가공부산물의 Alcalase 가수분해물의 ACE 저해활성

현재 고혈압 치료제로 처방되는 약품인 captopril은 ACE 저해 메커니즘을 나타내는 합성 항고혈압제로 매우 우수한 ACE 저해효과를 나타내지만 흉반, 마른 기침, 단백뇨 등의 심각한 부작용을 초래하기 때문에 사용량에 제한을 두고 있는 실정이다. 따라서 부작용이 없는 천연 항고혈압 소재를 찾는 연구가 매우 중요하다[2].

수산가공부산물 Alcalase 가수분해물의 ACE 저해활성을 Figure 3에 나타내었다. Alcalase 가수분해물은 1.87 mg/ml의 IC_{50} value를 나타내며, ACE를 농도의존적으로 저해하였다. Positive control로 실험에 사용된 captopril은 2.5 μ g/ml의 매우 낮은 농도에서도 80%

이상의 매우 우수한 활성을 나타내었다. Captopril의 활성과 비교했을 때, Alcalase 가수분해물은 낮은 활성을 나타내지만, 식품 부산물로부터 획득한 가수분해물이라는 점에서 활용도가 높다고 판단된다.

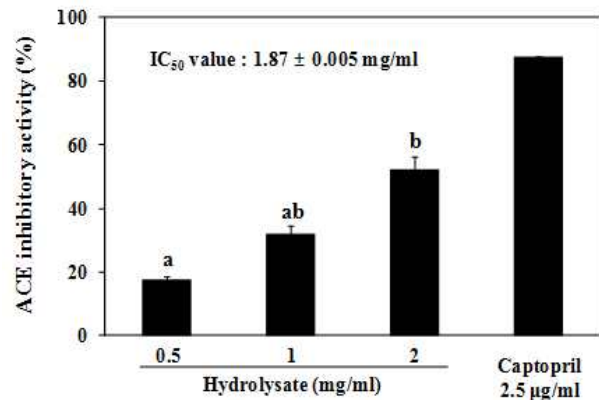


Figure 3. ACE inhibitory activity of the Alcalase hydrolysate from fishery processing by-products in Jeju. ACE inhibitory activity of the Alcalase hydrolysate (0.5, 1 and 2 mg/ml) was measured. The results are mean of three replicates ± standard error (SE). ^{a-b}Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($p < 0.005$).

분자량별 분획물의 항산화활성

한외여과 후 얻어진 10 kDa 이상과 10 kDa 이하의 분획물을 가지고, Alcalase 가수분해물에서 비교적 우수한 활성을 나타내었던 DPPH, peroxy radical 소거활성을 확인하였다. 그 결과, DPPH radical 소거활성은 10 kDa 이하의 분획물이 Alcalase 가수분해물보다 2.5배 가량 증가한 0.485 mg/ml의 IC_{50} value를 나타내었다 (Figure 4). 또한, peroxy radical 소거활성은 두 개의 분획물 모두 Alcalase 가수분해물보다 2배 가량 증가하여 각각 0.409 mg/ml, 0.411 mg/ml의 IC_{50} value를 나타내었다 (Figure 5).

결론적으로 Alcalase 가수분해물의 분자량별 분획을 통해 라디칼 소거 활성이 증가하였으며, 특히 DPPH 라디칼 소거 활성에 대해서 저분자의 10 kDa 이하의 물질이 보다 우수한 활성을 나타내었다. 이 결과들은 수산가공부산물 Alcalase 가수분해물을 구성하는 단백질 또는 펩타이드들이 한외여과에 의해 분자량 별로 분리되었을 때, 효율적인 항산화 활성을 나타낸다는 것을 설명한다.

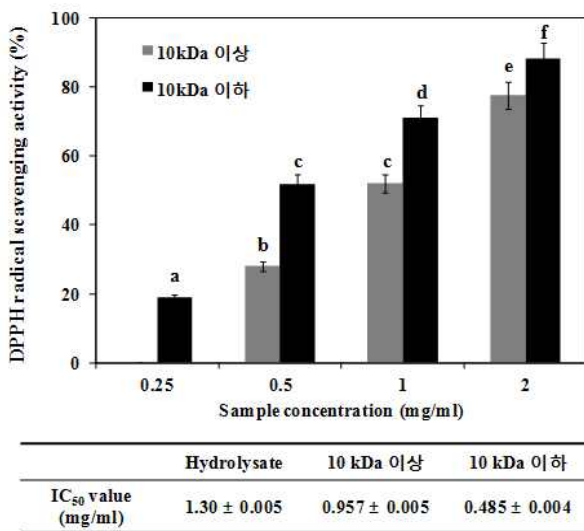


Figure 4. DPPH radical scavenging activity of the different molecular weight fractions from the Alcalase hydrolysate from fishery processing by-products in Jeju. The results are mean of three replicates ± standard error (SE). ^{a-f}Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($p < 0.005$).

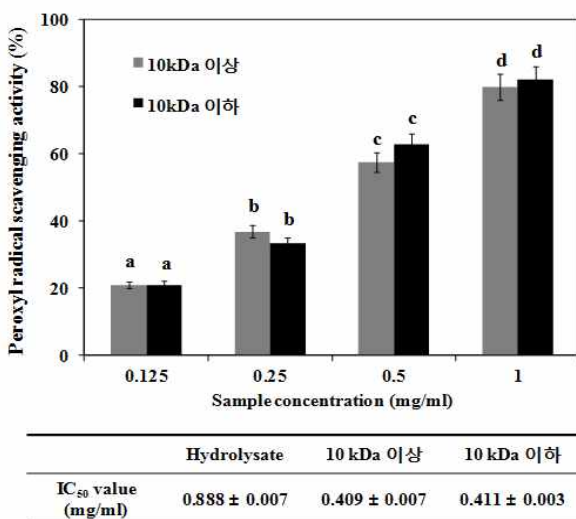


Figure 5. Peroxyl radical scavenging activity of the different molecular weight fractions from the Alcalase hydrolysate from fishery processing by-products in Jeju. The results are mean of three replicates ± standard error (SE). ^{a-d}Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($p < 0.005$).

분자량별 분획물의 ACE 저해활성

한외여과 후 얻어진 10 kDa 이상의 분획물, 10 kDa

이하의 분획물의 ACE 저해활성을 Figure 6에 나타내었다. 두 분획물은 각각 1.51 mg/ml, 1.49 mg/ml의 IC₅₀ value를 나타내며, 1.87 mg/ml의 IC₅₀ value를 갖는 Alcalase 가수분해물보다 활성이 1.2배 가량 증가하였다. 마찬가지로 수산가공부산물 Alcalase 가수분해물이 분자량별로 존재할 때, ACE를 효율적으로 저해하는 것을 확인할 수 있다.

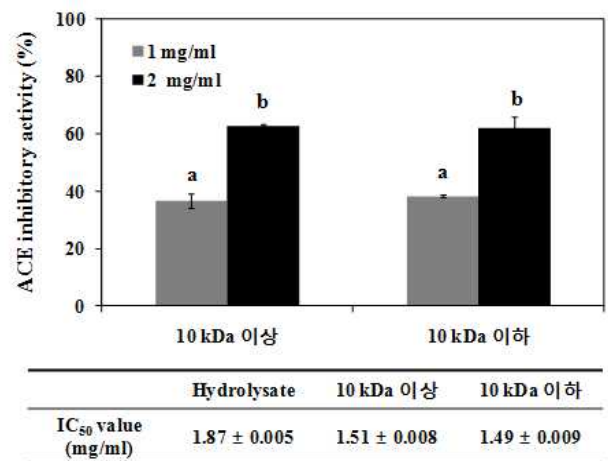


Figure 6. ACE inhibitory activity of the different molecular weight fractions from the Alcalase hydrolysate from fishery processing by-products in Jeju. ACE inhibitory activities of the Alcalase hydrolysate (1 and 2 mg/ml) were measured. The results are mean of three replicates ± standard error (SE). ^{a-b}Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($p < 0.005$).

결론

수산물의 소비가 증가함에 따라 수산가공부산물의 발생량이 증가하고 있으며, 이의 효율적인 활용을 위해 수산가공부산물의 생리활성 검증이 요구되고 있다. 이 연구에서는 제주 특산 수산물인 갈치, 고등어, 옥돔 등을 포함하는 수산가공부산물을 고상발효시킨 후, Alcalase 가수분해물을 제조하였으며, 이 가수분해물의 항산화 및 항고혈압 활성을 확인하였다. 또한 한외여과막 분리를 통한 분자량별 분획이 가수분해물의 기능성을 최대 2.5배 가량 증진시켰음을 확인하였다. 결론적으로 가수분해 및 한외여과 공정을 통해 버려지는 미이용 수산가공부산물을 활

용하여 기능성 식품 및 화장품 소재로 이용할 가치가 있다고 판단되며 이를 통해 수산가공부산물의 고부가가치화를 이끌 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2012년 교육부와 한국연구재단의 지역 혁신인력양성사업(NRF-2012H1B8A2025863)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Ahn, C. B. and Lee, E. H. 1992. Utilization of Chitin Prepared from the Shellfish Crust. *Bull. Korean Fish. Soc.* **25** (1), 45-50.
- Ahn, Y. S., Lee, W. W., Lee, S. H., Ahn, G., Ko, C. I., Oh, C., Oh, M. C., Kim, D. W., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2009. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Effects of Gelatin Hydrolysates Prepared from *Tilapia mossambica* Scales by Hot Water and Enzymatic Extraction. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* **42**(5), 426-433.
- Ahn, Y. S., Lee, W. W., Lee, S. H., Ahn, G., Ko, C. I., Oh, C., Oh, M. C., Kim, D. W., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2009. Processing and Biological Activity of Gelatin Hydrolysate from *Branchiostegus japonicus* Scale. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* **42**(5), 417-425.
- Cheung, H. S., Wang, F. I., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. and Cushman, D. W. 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.
- Choi, J., Kim, Y. J., Sung, N. Y., Kim, J. H., Ahn, D. H., Chun, B. S., Cho, K. Y., Byun, M. W. and Lee, J. W. 2009. Investigation on the Increase of Antioxidant Activity of Cooking Drip from *Enteroctopus dofleini* by Irradiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**(1), 121-124.
- Do, J. R., Heo, I. S., Jo, J. H., Kim, D. S., Kim, H. K., Kim, S. S. and Han, C. K. 2006. Effect of antihypertensive peptides originated from various marine proteins on ACE inhibitory activity and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive Rats. *Korean J Food Sci. Technol.* **38**, 567-570.
- Kim, J. O. and Kang, S. K. 2011. Economic Impact Effect Analysis of Flounder Aquaculture Industry in Jeju. *J. Fish. Bus. Adm.* **42**(1), 85-96.
- Kim, S. K. 2003. Development of Novel Bioactive Substances from Fishery Byproducts. *Food Ind. Nutr.* **8**(3), 1-8.
- Ko, J. Y., Lee, J. H., Samarakoon, K., Kim, J. S. and Jeon, Y. J. 2013. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive protease. *Food Chem. Toxicol.* **52**, 113-120.
- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M. and Hara, Y. 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 895-902.
- Park, S. H., Lee, J. K., Jeon, J. K. and Byun, H. G. 2011. Characterization of a Collagenase-1 Inhibitory Peptide Purified from Skate *Dipturus chilensis* Skin. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **44**(5), 456-463.
- StatisticsKorea. 2014. (http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=1317)
- StatisticsKorea. 2014. (http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=2748)