

단백질 분해효소를 이용한 오계란 가수분해물의 항산화 활성

하유진* · 지중구 · 유선균*†

*중부대학교 식품생명과학과
중부대학교 한방건강관리학과
(2017년 8월 12일 접수: 2017년 9월 2일 수정: 2017년 9월 4일 채택)

Antioxidant Activity of Ogae Egg White Protein Hydrolysates using commercial Protease

Yoo Jin Ha* · Joong Gu Ji · Sun Kyun Yoo*†

*Department of Food and Biotechnology, Joongbu University
Department of Oriental Health Care, Joongbu University
(Received August 12, 2017; Revised September 2, 2017; Accepted September 4, 2017)

요약 : 식물 및 동물성 단백질 유래 펩타이드 형태의 단백질 가수 분해물들은 항산화, 고혈압 완화, 면역조절, 진통완화 및 항균작용 등 생리활성이 있는 것으로 알려져 왔다. 본 연구는 6가지 프로티아제를 이용하여 오계란 단백질 가수분해물을 생산하고, 생산된 펩타이드의 항산화 능력을 평가하였다. 그 결과 가수분해도의 최대값은 protamex(46.3%)이고, DPPH 라디칼 소거능 최대값은 bromelain(57.23%), 하이드록시 라디칼 소거능 최대값은 alcalase(30.21%), 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 최대값은 alcalase(58.07%), Fe^{2+} 킬레이션 능력 최대값은 alcalase(72.06%)로 나타났다. 더 나아가 효소별 항산화 저해 능력 IC_{50} 평가하였다. 그 결과 alcalase에 의한 최대값은 금속 킬레이션 능력(IC_{50} , 1.24 mg/mL)이고, bromelain에 의한 최대값은 DPPH 소거능(IC_{50} , 2.46 mg/mL)이고, flavourzyme에 의한 최대값은 금속 킬레이션 능력(IC_{50} , 1.25 mg/mL)이고, neutrase에 의한 최대값은 DPPH 소거능(IC_{50} , 3.64 mg/mL)이고, papain에 의한 최대값은 DPPH 소거능(IC_{50} , 3.82 mg/mL)이고, protamex에 의한 최대값은 DPPH 소거능(IC_{50} , 1.93 mg/mL)이었다. 따라서 protease를 이용하여 오계란 단백질에서 추출한 펩타이드는 항산화 기능성 식품소재로서 활용할 가치가 높을 것으로 기대한다.

주제어 : 오계란, 단백질분해효소, 펩타이드, 가수분해, 항산화 활성

Abstract : Protein hydrolysates derived from plants and animals having antioxidant, suppression of hypertension, immunodulatory, alleviation of pain, and antimicrobial activity has been known as playing important role like hormone. This study was performed to hydrolysis of Ogae egg white protein using the six proteases. The antioxidant activity of the produced peptides was analyzed.

As a result, the maximum value of hydrolysis was protamex(46.3%), DPPH radical scavenging

†Corresponding author
(E-mail: skyoo@joongbu.ac.kr)

was bromelain(57.23%), hydroxy radical scavenging was alcalase(30.21%), superoxide radical scavenging was alcalase(58.07%), and Fe^{2+} chelation ability was alcalase(72.06%). Furthermore, the antioxidant Inhibition concentration (IC_{50}) of peptides was evaluated for each enzyme. As a result, the maximum value of alcalase was Fe^{2+} chelating ability(IC_{50} , 1.24 mg/mL), bromelain was DPPH radical scavenging(IC_{50} , 2.46 mg/mL), flavourzyme was Fe^{2+} chelating ability(IC_{50} , 1.25 mg/mL), neutrase was DPPH radical scavenging(IC_{50} , 3.64 mg/mL), papain was DPPH radical scavenging(IC_{50} , 3.82 mg/mL) and protamex was DPPH radical scavenging(IC_{50} , 1.93 mg/mL). Therefore, we expect that peptides produced from Ogae egg white protein using protease enzyme are useful as an antioxidant functional food ingredients.

Keywords : Ogae egg white, protease, peptides, hydrolysis, antioxidant activity

1. 서론

최근 증가하고 있는 환경오염 물질, 환경 호르몬, 흡연 및 알코올 등은 인체 내 산화적 스트레스를 가중시키고 있다. Hydroxyl radical($\cdot OH$), superoxide anion radical($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide(H_2O_2), peroxy radical($ROO\cdot$), singlet oxygen(1O_2) 등의 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 정상적인 대사과정 중 미토콘드리아와 같은 세포 내 소기관에서 자연적으로 생성된다[1,2]. 생체 내에는 이들에 대한 방어기작이 자체적으로 존재하여 체내 항산화 시스템에 의해 제거되지만[3,4], 과도한 스트레스 등과 같은 여러 요인에 의해 산화-항산화 시스템의 균형이 깨지면서 체내에 활성산소가 다량으로 존재하게 되면 세포의 구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등을 비가역적으로 파괴되고 암을 비롯한 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 면역 질환 등의 각종 질병이 발생하는 것으로 알려져 있다[5-7]. 따라서 이러한 활성산소를 제거하는 항산화 작용은 인체 내의 산화적 스트레스를 감소시켜 질병 예방에 크게 기여한다[8-10].

작은 분자량의 펩타이드는 항산화 작용, 면역 기능, 고혈압 완화, 진통완화 및 항균작용 등 생리활성 기능이 높은 것으로 보고되고 있으며, 이러한 기능성으로 인해 노화를 억제시킬 수 있는 기능성 식품, 치료식, 그리고 천연 약품으로 개발의 가능성을 높여오고 있다[11-14]. 이러한 기능성 펩타이드는 주로 동물성 단백질을 가수분해하여 생산하고 있는데, 최근 가금류에 관련된 것으로 닭 가공 공정 부산물 단백질, 닭 가슴살 단백

질, 닭 날개 단백질, 난 단백질, 닭 피부 단백질로부터 기능성 펩타이드 생산 및 생리활성에 대한 연구들이 발표되고 있다[15-21].

특히 항암효과로 알려진 난황 단백질인 포스비틴(Phosvitin)은 아미노산 사슬의 50% 이상을 인산화 된 serine이 차지하고 있는 특이한 구조로 되어있는데[22], 이러한 특이구조로 인해 phosvitin은 강력한 금속 킬레이트제(metal chelator)로 작용한다고 보고되고 있으며[23]. 금속 킬레이트 능력으로 인해 phosvitin이 항산화제로서 금속이온에 의해 발생하는 지방 산패를 억제할 수 있다[24-26].

가금류 중 계육은 필수 지방산 및 필수 아미노산의 함량이 높고 지방과 콜레스테롤의 함량은 낮아 영양학적으로 매우 우수하여 소비량이 매년 증가하는 추세이다[27]. 오골계는 예로부터 다양한 생리활성을 지닌 것으로 알려져 왔다. 오골계로부터 생산된 올리고 펩타이드는 항 고혈압에 효과가 있는 것으로 보고되었으며[28], 특히 오골계 중에서 연산오계는 한국 재래종으로서 1980년 천연기념물 265호로 지정이 되었으며, 연산 오계의 생리활성에 한 부분의 연구들은 증탕액에 한 것으로 지질대사 개선, 조골세포 분화 및 파골세포 분화억제, 면역개선 등의 효능이 발표되었다[29-32]. 또한, 펩타이드 형태의 단백질 가수분해물을 제조하는 방법에서 효소를 이용하여 제조하는 것이 물성이나 용해도 등의 기능성을 크게 개선시킬 뿐 아니라, 영양적으로도 우수하고 산 또는 알칼리 가수분해에 비해 독성이 거의 없으며, 생산되는 저분자형 펩타이드들은 새로운 생물활성 소재로 이용될 가능성이 크다고 하였다[33-35]. 최근 파파인으로부터 추출된 프로티아

제는 오계육으로부터 향산화 기능을 지닌 펩타이드를 생산하는 것으로 보고되었다[36]. 그러나 연산오계란 단백질로부터 유래된 펩타이드에 대한 연구들을 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 연산오계란 단백질을 다양한 프로티아제 효소를 이용하여 펩타이드형 가수분해물을 생성하고, 오계란 단백질에서 추출된 기능성 펩타이드의 DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 Folin ciocalteu's phenol (FCP) 시약은 Sigma Company(Seoul, Korea)사로부터 구입을 하였다. Tri-chloro-acetic(TCA) 산은 Sigma Company(Seoul, Korea)사로부터 구입을 하였다. 단백질 분해효소 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain와 protamex는 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입을 하였다. 실험에 사용된 오계란은 지산농원(Nonsan, Choongnam, Korea)에서 제공 하였다.

2.2. 오계란 단백질 가수분해를 제조 및 추출

본 실험에 사용된 연산 오계란은 지산농원에서 제공되었다. 공급된 오계란은 100 °C 항온수조에서 20분 동안 가열하여 오계 노른자와 흰자를 분리하였으며 흰자만을 골라내어 골고루 다진 후 지퍼백에 넣고 샘플 명, 제조날짜를 기입하고 -20 °C 냉동 보관하였다. 연산오계란 단백질의 가수분해를 위해서 protease type별로 6종을 선발하여 사용하였다. Serine protease 계열의 Alcalase, Protamex, aspartic protease 계열의 flavourzyme 등을 선발하여 처리하였다. 상기 protease들은 추후 향산화 건강기능식품 개발 가능성을 고려하여 식품에 사용 가능한 것들만을 선발하였다. 시료의 10% 물 또는 PB buffer를 넣고 효소처리는 발효기를 이용하여 시료의 3%를 혼합한 후 반응기에서 50 °C, 100 rpm, 4시간 동안 반응시켜주었다. 반응을 완료 한 후 불활성화를 위하여 100°C에서 30분 동안 가열하였다. 반응을 완료한 오계란 가수 분해물은 3,000 rpm, 10분 동안 원심분리하여 상등액을 수거하였다. 수거된 가수분해 상등액은 초저온냉동고(-80 °C)에서 동결 건조하여 분

말화하였다.

2.3. 연산 오계란 단백질 가수분해도 측정

단백질 가수분해 정도는 가수분해물의 아미노산 중에서 tyrosine 양을 대표로 하여 분석을 하였다. 가수 분해도는 오계란 0.1 g을 110 °C 에서 24시간 가수분해를 실시하여 가수분해물의 tyrosine 양으로 측정을 하고 이 값을 D_{max} 로 하였다. 효소 반응 t 시간 후 오계란의 가수분해물의 tyrosine 양으로 측정 된 값을 D_t 로 하였다. 초기 오계란의 tyrosine 양으로 측정 된 값을 D_0 로 하였다. 가수 분해물들의 tyrosine 양은 샘플 1 mL 에 0.5 N NaOH 5 mL 혼합한 후, 1 N FCP 1 mL 넣고 즉시 혼합시킨 후 배양기에 30 °C로 15분 반응시켰다. 반응액은 여과 필터 후 578 nm에서 흡광도를 측정하였다. 따라서 가수 분해도 DH% (degree of hydrolysis)의 값은 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$DH = \frac{D_{at\ time\ t} - D_0}{D_{max} - D_0} \times 100$$

2.4. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH의 측정 방법은 산소인 자유 라디칼이 생체 고분자들인 지질 단백질 등과 결합을 하여 피부의 노화 및 질병을 유발하는 물질로 밝혀진 이래로 향산화 물질의 라디칼 소거능력에 이용되고 있다[37]. DPPH 라디칼 소거활성은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다[38]. 향산화 특성을 평가하기 위해서 동결건조분말 가수 분해물을 DI water에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리를 하였다. 추출된 시료를 일정한 농도로(10%) 증류수에 용해한 후 시료가 포함된 용액 2 mL와 DPPH-radical(0.2 mM) 용액 0.5 mL를 혼합 하였다. 혼합물은 30분간 실온에서 암실 보관한 후 517 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 대조구로는 ascorbic acid를 이용하였으며 시료와 동일한 조건으로 측정하였다. DPPH-radical scavenging activity는 아래의 식에 의해 값을 산출하였다.

$$\text{DPPH-radical scavenging activity(\%)} =$$

$$[(B - A) / B] \times 100$$

A: 시료 첨가시의 흡광도

B: 시료 무 첨가시의 흡광도

2.5. 하이드록시 라디칼 소거능 측정

Hydroxyl 라디칼에 대한 소거활성 측정은 Fan의 방법을 변형하여 측정하였다[39]. 항산화 특성을 평가하기 위해서 동결건조분말 가수 분해물을 DI water에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리를 하였다. 표준물질 제조는 ascorbic acid 10 mg을 10 mL DI water에 혼합하였다. 대조구는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 사용하고, 샘플은 10000 ppm, 20000 ppm 으로 준비한다. 라디칼 반응은 300 μ L 샘플용액, 300 μ L 3 mM 1,10-phenanthroline, 300 μ L, 3 mM FeSO₄, 300 μ L 0.01% hydrogen peroxide를 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 진탕배양한 후 spectrophotometer를 사용하여 536 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl 라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity(\%)} = \frac{[(\Delta A/\text{min})_b - (\Delta A/\text{min})_s]}{(\Delta A/\text{min})_b} \times 100.$$

b: 대조구, s: 샘플
 $\Delta A/\text{min}$: 반응 후 흡광도 -반응 전 흡광도

2.6. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

Superoxide radical에 대한 소거능은 Yu의 방법을 변형하여 측정하였다[40]. 항산화 특성을 평가하기 위해서 동결건조분말 가수 분해물을 DI water에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리를 하였다. 대조구는 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)용액을 사용하였다. 반응은 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)용액 500 μ L 에 peptide 500 μ g을 넣고 혼합한 다음 400 μ L 1.5 mM pyrogallol 용액을 혼합한 후 실온에서 4분 동안 반응시킨 후 spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide scavenging activity는 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Superoxide scavenging activity(\%)} = \frac{[(\Delta A/\text{min})_b - (\Delta A/\text{min})_s]}{(\Delta A/\text{min})_b} \times 100.$$

b: 대조구, s: 샘플
 $\Delta A/\text{min}$: 반응 후 흡광도 -반응 전 흡광도

2.7. Fe₂⁺ 킬레이션 능력

시료용액의 metal chelating effect는 Gulcin의

방법을 약간 변형하여 측정하였다[41]. 동결건조분말 가수 분해물을 DI water에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리를 하였다. 추출된 시료는 일정 한 농도로(0 ~ 1%) 증류수에 용해하였고 test tube에 추출된 시료 500 μ L와 100 μ L FeCl₂(0.6 mM), 900 μ L methanol 을 넣고 혼합하였다. 5분 동안 상온에서 반응 시킨 후 100 μ L ferrozine(5 mM)을 혼합물에 첨가하여 10분 동안 상온 에서 반응 시켰다. 562 nm에서 흡광도를 측정 하였고, 대조구로는 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 시료와 동일한 조건으로 측정하였다.

$$\text{Iron chelation activity(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료 첨가시의 흡광도

B: 시료 무 첨가시의 흡광도

3. 결과 및 고찰

3.1. 오계란의 단백질 가수분해도

6종의 효소를 각각 이용하여 오계란 0.1 g을 110 °C 에서 24시간 가수분해하였고 가수분해를 위한 추출분말의 무게/오계란 무게×100 으로 가수분해도를 계산하였다(Table 1). 가수분해도의 범위는 19.5% 에서 46.3% 사이이고, protamex hydrolysate의 가수분해도는 46.3%로 가장 높았으며, alcalase hydrolysate의 가수분해도는 19.5%로 가장 적은 값을 보였다. 유사한 결과로 Shon 등[41] 연구에서도 protease를 이용하여 닭고기 부산물을 24시간 효소 가수분해하였을 때 가장 높은 가수분해도를 보여주었다.

3.2. DPPH 라디칼 소거능

DPPH radical 소거능은 DPPH radical이 항산화 활성을 갖는 물질과 반응하면 짙은 보라색이 탈색되어 흡광도가 감소하는 원리를 이용하여 측정하는데 Gulcin 등[42] 방법이 간단하고 단시간 내에 많은 시료의 항산화능을 측정할 수 있어 널리 이용되고 있다. DPPH 라디칼 소거반응을 이용한 항산화능 측정방법은 화학적으로 안정화된 자유라디칼을 가지는 DPPH가 전자를 내어주면서 DPPH는 항산화제와 같은 프로톤공여(proton donating) 물질을 만나면 라디칼이 소거(scavenging)된다. 그리고 항산화제의 프로톤공여 능력에 따라 용액의 색이 퍼플에서 노란색으로

Table 1. Yield of protein hydrolysates of Yeonsan Ogae egg white.

Name of enzymes	Degree of hydrolysis(%)
Alcalase hydrolysate	19.5
Bromelain hydrolysate	29.7
Flavourzyme hydrolysate	39.4
Neutrase hydrolysate	35.4
Papain hydrolysate	45.7
Protamex hydrolysate	46.3

변하는 정도를 지표로 하여 항산화능을 측정하는 방법이다[43]. Fig. 1은 서로 다른 프로티아제 및 가수분해 조건에서 생산이 된 가수분해물의 DPPH 항산화 능력 분석 결과를 보여준다. 오계란 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 가수 분해물들의 DPPH 항산화 능력은 약 25%에서 60% 사이의 분포를 보여 주었는데 alcalase, flavourzyme, neutrase, papain의 DPPH 항산화능은 유의수준 5% 하에서 통계적으로 유의하였으며, bromelain와 protamex의 DPPH 항산화능 또한 유의수준 5% 하에서 통계적으로 유의하였다. bromelain와 protamex에 의한 가수 분

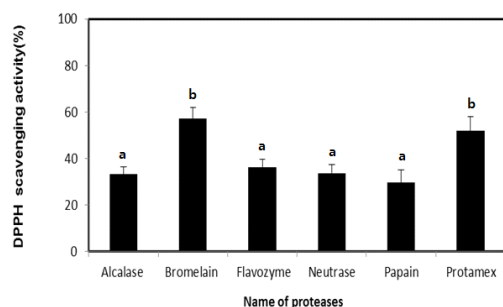


Fig. 1. The degree of DPPH radical scavenging activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration. Tukey's multiple comparison tests was used to determine mean treatment differences for all main variables($p < 0.05$).

해물은 비교적 항산화능이 높았다. 연구 결과에 따르면 사용된 프로티아제 효소들에 따라 펩타이드의 항산화능력이 다르게 나타났다. Aluko 등 [44] 연구에서는 분자량이 작을수록 DPPH 라디칼 소거활성이 높은 것으로 보고되어 왔다.

3.3. 하이드록시 라디칼 소거능 측정

활성산소(reactive oxygen species, ROS) 중 hydrogen peroxide와 superoxide는 반응성이 약하여 직접적으로 조직 손상에 참여하는 경우는 드물지만, hydroxyl radical과 같은 반응성이 매우 큰 라디칼 종은 생체분자들에 심각한 손상을 초래한다. 또한 세포 호흡 등 생리과정에서 필수적인 금속인 철(Fe, iron)의 과잉현상은 생체 내에 존재하는 hydrogen peroxide와의 fenton reaction에 의해 단백질 및 DNA 산화, 세포노화와 세포손상을 야기하는 강력한 hydroxyl radical을 생성한다[45]. 그러므로 하이드록실 라디칼 제거는 이러한 라디칼에 의해 유발되는 산화스트레스로 인해 생기는 여러 가지 질병들을 방지하는데 필요하다. Fig. 2는 서로 다른 프로티아제를 사용하여 생산된 오계란 단백질 가수분해물의 하이드록시 라디칼 소거능 분석 결과를 차이점을 보여준다. 오계란 가수 분해물들의 하이드록시 라디칼 소거능은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수 분해물들의 항산화 능력은 약 20.0%에서 30.0% 사이의 분포를 보여 주었는데 alcalase, bromelain, protamex의 하이드록시 라디칼 소거능은 유의수준 5% 하에서 통계적으로 유의하였고, 또한 flavourzyme, neutrase, papain의 하이드록시 라디칼 소거능은 유의수준 5% 하에서 통계적으로 유의하였다. 그 중 alcalase에서 제일 높은 값이 나왔고 neutrase에서는 제일 낮은 값이 나왔다. 20% 이상을 보여주어 DPPH 라디칼 소거능과 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능의 경우와 비슷한 경향을 보

여주었다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. Jamdar 등[46] 연구 결과에 따르면 낮은 분자량을 가진 펩티드가 더 높은 분자량을 가진 펩티드보다 강한 하이드록시 라디칼 소거제로서 더 효과가 좋다고 보고되었다.

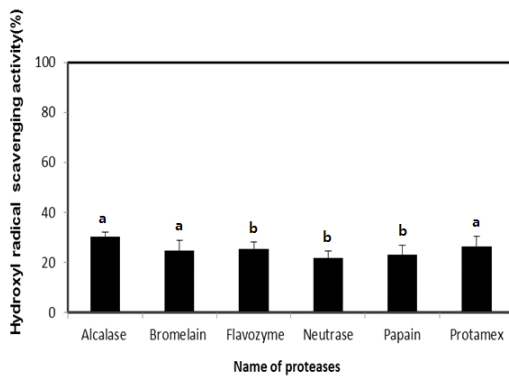


Fig. 2. The degree of hydroxy radical scavenging activity of Yeosan Ogae egg white protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration. Tukey's multiple comparison tests was used to determine mean treatment differences for all main variables($p < 0.05$).

3.4. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능

세포는 천부적으로 효소 산화방지제의 생물학적 방어 기제를 갖춰 reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/NOS)를 무해한 분자들로 전환하는 원인이 된다. 항산화 효소 중의 하나인 superoxide dismutase(SOD)는 체내에 존재하는 superoxide anion ($\cdot O_2^-$)를 O_2 와 H_2O_2 로 전환하여 superoxide를 제거하는 효소로서 세포막, DNA, 단백질 등에 손상에 대한 방어 작용을 한다[47, 48]. SOD 유사활성물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide로부터 생체를 보호한다고 알려져 있다[49]. 하지만, 생체의 능력으로 라디칼을 제거함은 지나치게 생산되는 프리 라디칼 (free radical)에 압도될 수 있다. Fig. 3는 서로 다른 프로티아제를 사용하여 생산이 된 오계란 단백질 가수분해물의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능력 분석 결과를 보여준다. 오계란 가수 분해물들의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수 분해물들의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 능력은 약 20.0%에서 60.0% 사이의 분포를 보여 주었는데 alcalase의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능이 가장 높은 값이 나타났고, 그 다음으로 높은 값은 neutrase, papain, protamex의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능의 값이며 이 값들은 유의수준 5% 하에서 통계적으로 유의하였다. 또한 가장 낮은 값으로 bromelain, flavozyyme의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능이 나타났고, 이 값들은 유의수준 5% 하에서 통계적으로 유의하였다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 또한 가수 분해물에 따라서 소거하는 라디칼의 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다.

이드 라디칼 소거능력 분석 결과를 보여준다. 오계란 가수 분해물들의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 능력은 사용 효소의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 가수 분해물들의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 능력은 약 20.0%에서 60.0% 사이의 분포를 보여 주었는데 alcalase의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능이 가장 높은 값이 나타났고, 그 다음으로 높은 값은 neutrase, papain, protamex의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능의 값이며 이 값들은 유의수준 5% 하에서 통계적으로 유의하였다. 또한 가장 낮은 값으로 bromelain, flavozyyme의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능이 나타났고, 이 값들은 유의수준 5% 하에서 통계적으로 유의하였다. 이러한 결과는 사용 효소들의 펩타이드 결합에 대한 작용 부위가 다르기 때문에 가수 분해물들의 펩타이드 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 또한 가수 분해물에 따라서 소거하는 라디칼의 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다.

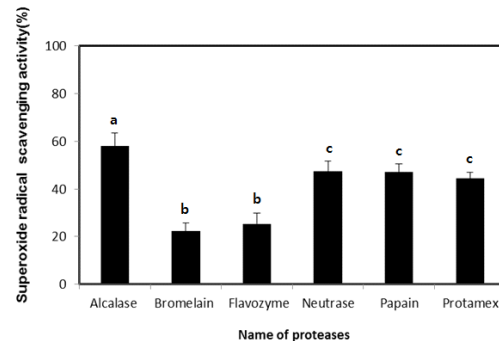


Fig. 3. The degree of superoxide radical scavenging activity of Yeosan Ogae egg white protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration. Tukey's multiple comparison tests was used to determine mean treatment differences for all main variables($p < 0.05$).

3.5. Fe^{2+} 킬레이션 능력

Fe, Cu, Ni 등과 같은 금속은 지질산화과정에서 촉매로 작용한다. 특히 몇몇 식품에 함유되어 있는 hydroxy radical 과 superoxide radical 등의 생성을 촉진하는 Fe^{2+} , Cu^{2+} 등에 대한 결합능

이 우수할수록 높은 항산화 활성을 나타낸다. 이는 금속 이온 chelating 효능과 radical 소거능이 서로 다른 기작으로 작용하기 때문인 것으로 판단된다[50]. 금속 킬레이트 효과는 ferrozine이 Fe^{2+} 와 반응하여 붉은색을 띠게 되고 이 때 시료 추출물 중에 킬레이트 효과를 가진 성분이 존재하면 Fe^{2+} -ferrozine 복합체 형성을 방해하여 발색이 저해되는 원리를 이용하여 측정하였다. 금속 이온을 킬레이트화 하는 가수 분해물들에 대한 능력을 Fig. 4 에서 보여준다. 본 연구에서 가수 분해물들의 킬레이트 효과는 약 30.0%에서 70.0% 사이의 분포를 보여 주었는데, alcalase의 킬레이트 효과가 가장 높은 값이 나타났고, 그 다음으로 높은 값은 bromelain, flavourzyme, papain의 킬레이트 효과이며 이 값들은 유의수준 5% 하에서 통계적으로 유의하였다. 또한 가장 낮은 값으로 neutrase, protamex의 킬레이트 효과가 나타났고, 이 값들은 유의수준 5% 하에서 통계적으로 유의하였다. 다른 연구 결과를 보면 금속 킬레이션 능력은 단백질의 종류, 효소 종류 그리고 효소 농도에 큰 영향을 받는 것으로 보고하고 있다[51]. Alcalase 가수 분해 산물은 pepsin-pancreation 가수 분해 산물보다 금속 킬레이트 효과가 현저히 더 높았고, 이것은 각 효소에서 생성된 펩티드 종류가 다른 것 때문일 가

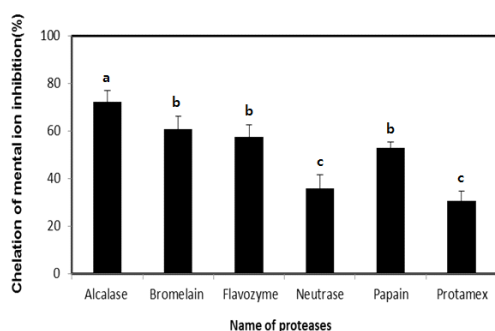


Fig. 4. The degree of chelation activity of Yeosan Ogae egg white protein hydrolysates. Enzyme reaction was performed at condition of optimum temperature and pH, and 3% enzyme concentration. Tukey's multiple comparison tests was used to determine mean treatment differences for all main variables($p < 0.05$).

능성도 있다. 또한 금속 킬레이션 능력은 펩티드 크기가 증가할 때 감소했으며, 이 의미는 낮은 분자량의 펩티드가 금속 킬레이트화에 더 큰 효과를 준다고 제시한다.

3.6. 오계란 단백질 가수분해물의 항산화 저해 농도

오계란 단백질 가수분해물들은 사용된 효소의 종류에 따라서 DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력이 다르게 나타났다. DPPH 소거능과 하이드록시 라디칼 소거능 소거능은 가수분해물에 대하여 능력은 다르지만 경향은 유사하였고, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능과 금속 킬레이션 능력에 차이는 있지만 유사한 경향을 보여주었다. 이러한 이유들은 사용 효소마다 생산한 가수 분해물의 분자량의 차이와 펩타이드 종류의 차이에 원인이 있다고 볼 수 있다. 좀 더 가수 분해물들의 항산화 저해 능력을 비교하기 위해서 각각 가수 분해물에 대하여 IC_{50} 평가하였다. 전체적으로 보면 항산화 저해능은 사용한 효소 및 항산화 저해 대상에 따라 크게 차이가 있었다 (Table 2). alcalase에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, DPPH 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었고 그 값은 각각 1.24, 4.88, 5.30 및 19.72 mg/mL 이었다. bromelain에 의하여 생산된 가수 분해물은 DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었으며 그 값은 2.46, 3.99, 12.40 및 24.76 mg/mL 이었다. flavourzyme에 의하여 생산된 가수 분해물은 금속 킬레이션 능력, DPPH 소거능 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었고, 그 값은 각각 1.25, 3.40, 10.30 및 22.11 mg/mL 이었다. neutrase에 의하여 생산된 가수 분해물은 DPPH 소거능 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 금속 킬레이션 능력 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었으며 그 값은 각각 3.64, 6.10, 6.36 및 19.08 mg/mL 이었다. papain에 의하여 생산된 가수 분해물은 DPPH 소거능, 금속 킬레이션 능력, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 및 하이드록시 라디칼 소거능 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었고 그 값은 각각

Table 2. Inhibition concentration (IC₅₀) of antioxidant capacity of protein hydrolysate of Ogae egg white

Hydrolysates	Antioxidant activities (IC ₅₀ values, mg/mL)			
	DPPH radical scavenging activity	Superoxide anion radical scavenging activity	Hydroxy radical scavenging activity	Fe ²⁺ chelating activity
Alcalase hydrolysate	4.88	5.3	19.72	1.24
Bromelain hydrolysate	2.46	12.4	24.76	3.99
Flavourzyme hydrolysate	3.40	10.3	22.11	1.25
Neutrase hydrolysate	3.64	6.1	19.08	6.36
Papain hydrolysate	3.82	6.5	14.37	4.58
Protamex hydrolysate	1.93	6.8	14.54	17.56

3.82, 4.58, 6.50, 및 14.37 mg/mL 이었다. protamex에 의하여 생산된 가수 분해물은 DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력 순서로 저해능도가 높음을 보여 주었고, 그 값은 각각 1.93, 6.80, 14.54 및 17.56 mg/mL 이었다.

4. 결론

본 연구는 6가지 프로티아제(alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain, protamex) 효소를 이용하여 연산오계란 단백질 가수분해공정으로 생산된 기능성 펩타이드의 DPPH 소거능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능 및 금속 킬레이션 능력을 평가하였다.

1. 오계란 단백질 가수분해물의 가수분해도(%)의 범위는 19.5에서 46.30% 사이의 범위를 보여주었는데 protamex의 가수분해도는 46.3%로 가장 높았으며, alcalase의 가수분해도는 19.5%로 가장 작은 값으로 나타났다.
2. DPPH 라디칼 소거능은 약 25%에서 60% 사이의 분포를 보여 주었는데 bromelain 일 때 57.23% 로 가장 높았고, papain 일 때 29.50%로 가장 낮게 나타내었다.
3. 하이드록시 라디칼 소거능은 약 20.0%에서

30.0% 사이의 분포를 보여 주었는데 alcalase 에서 30.21%로 가장 높았고, neutrase 에서 21.64%로 가장 낮게 나타내었다.

4. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능은 약 20.0%에서 60.0% 사이의 분포를 보여 주었는데 alcalase 에서 58.07%로 가장 높았고, bromelain에서 22.22% 로 가장 낮게 나타내었다.
5. Fe²⁺ 킬레이션 능력은 약 30.0%에서 70.0% 사이의 분포를 보여 주었는데 alcalase 에서 72.06%로 가장 높았고, protamex 에서 30.66% 로 가장 낮게 나타내었다.
6. 효소별 가수 분해물의 항산화 저해 능력 IC₅₀ 평가한 결과, alcalase에 의하여 항산화 저해능도가 가장 높은 값은 금속 킬레이션 능력(IC₅₀, 1.24 mg/mL)이고, bromelain에 의하여 항산화 저해능도가 가장 높은 값은 DPPH 소거능(IC₅₀, 2.46 mg/mL)이고, flavourzyme에 의하여 항산화 저해능도가 가장 높은 값은 금속 킬레이션 능력(IC₅₀, 1.25 mg/mL)이고, neutrase에 의하여 항산화 저해능도가 가장 높은 값은 DPPH 소거능(IC₅₀, 3.64 mg/mL)이고, papain에 의하여 항산화 저해능도가 가장 높은 값은 DPPH 소거능(IC₅₀, 3.82 mg/mL)이고, protamex에 의하여 항산화 저해능도가 가장 높은 값은 DPPH 소거능(IC₅₀, 1.93 mg/mL)이다.

7. 그러므로 본 연구 결과를 바탕으로 protease 를 이용하여 오계란 단백질에서 추출한 펩타이드는 항산화 기능성 식품소재로서 활용할 가치가 높을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가 식품기술개발사업 (314040-30-1-HD030)에 의해 이루어진 것임.

References

1. E.S. Harold, E. A. Darrell, I. F. Evan, A. M. John, "A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species", *Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol. 18, pp. 567-79. (2007).
2. D.S. Jung, "Player's training of physical strength and reactive oxygen", Vol. 86, pp. 32-39, (2003).
3. Bernard, "Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity", *J Ethnopharm* Vol. 82, pp. 155-158, (2002).
4. D.A. Dalton, L. Langeberg, N.C. Treneman, "Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules", *Physiol Plant*, Vol. 87, pp. 365-370, (1993).
5. O.I. Aruoma, "Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidant", *Food and Chem. Toxicol.*, Vol. 32, No 7 pp.671-683, (1994).
6. B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Loliger, O.I. Aruoma, "The characterization of antioxidants", *Food Chem Toxicol.*, Vol. 33, No 7 pp. 601-617, (1995).
7. G. Samak, R.P. Shenoy, S.M. Manjunatha, K.S. Vinayak, "Superoxide and hydroxyl radical scavenging actions of botanical extracts of *Wagatea spicata*", *Food Chem.*, Vol. 115, No 2 pp. 631-634, (2009).
8. C.T. Ho, *Phenolic compounds in food*, In : *Phenolic compounds in food and their effects on health II*. Maple Press, New York. p. 2-7. Huan MT, Ho CT, Lee CY Editors, (1992).
9. K. Azuma, M. Kakayama, M. Koshika, K. Ippoushi, Y. Yamaguchi, K. Kohata, Y. Yamauchi, H. Ito, H. Higashio, "Phenolic antioxidant from the leaves of *Corchorus olerium*L", *J Agric Food Chem*, Vol. 47, pp. 3963-3966, (1999).
10. S.S. Ham, J.K. Hong, J.H. Lee, "Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs", *J Food Sci Nutr*, Vol 2, pp. 155-161, (1997).
11. E. Salminen, J. Rintala, "Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste a review", *Bioresour. Technol*, Vol. 83, pp. 13-26, (2002).
12. A.L. McCarthy, Y.C. O'Callaghan, N.M. O'Brien, "Protein Hydrolysates from Agricultural Crops-Bioactivity and Potential for Functional Food Development", *Agriculture*, Vol 3, pp 112-130, (2013).
13. L. Qing, L.i. Yi, M. Peter, I. Brent, "Commercial proteases: Present and future", *FEBS Letters*, Vol. 587, pp. 1155-1163, (2013).
14. B. Cigic, M. Zelenik-Blatnik, "Preparation and characterization of chicken egg white hydrolysate", *Acta Chimica Slovenica*, Vol. 51, pp. 177-188, (2004).
15. K. Elavarasan, B.A. Shamasundar, B. Faraha, H. Howell, "Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and structural properties of oven- and freeze-dried protein hydrolysate from fresh water fish (*Cirrhinus mrigala*)", *Food Chemistry*, Vol. 206, pp. 210-216, (2016).
16. I.V. Nikolaev, S. Sforza, F. Lambertini, D.Y. Ismailova, V.P. Khotchenkov, V.G. Volik, A. Dossena, V.O. Popov, O.V. Koroleva, "Biocatalytic conversion of poultry processing leftovers: Optimization of hydrolytic conditions and peptide

- hydrolysate characterization”, *Food Chemistry*, Vol. 197, pp. 611–621, (2016).
17. Y.Y. Sun, D.D. Pan, Y.X. Guo, J.J. Li, “Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity”, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 50, pp. 3397–3404, (2012).
 18. T. Mesut, E. Nevzat, O Serkan, “Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61Original”, *Food and Bioproducts Processing*, Vol. 90, pp. 773–779, (2012).
 19. F. Nahed, K. Naourez, H. Anissa, H.M. Ibtissem, D. Ines, N. Moncef, “Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity”, *Process Biochemistry*, Vol. 46, pp. 1731–1737, (2012).
 20. O. John, O.G. Abraham, T.M. Sunday, A.A. Rotimi, E.A. Michel, “Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats”, *Journal of Functional Foods*, Vol. 14, pp. 133–143, (2015).
 21. S. Jain, A.K. Anal, “Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis”, *LWT – Food Science and Technology*, Vol. 69, pp. 295–302, (2016).
 22. R.C. Clark, “The primary structure of avian phosvitins. Contributions through the Edman degradation of methylmercaptovitins prepared from the constituent phosphoproteins”. *Int. J. Biochem.* Vol. 17, pp. 983–988. (1985).
 23. G. Tarborsky, Interaction between phosvitin and iron and its effect on a rearrangement of phosvitin structure. *Biochem.-US.* 2, 266–271, (1963).
 24. I. Choi, C. Jung, H. Seog, H. Choi, “Purification of phosvitin from egg yolk and determination of its physicochemical properties”. *Food Sci. Biotechnol.* Vol. 13, pp. 434–437. (2004).
 25. S.K. Lee, J.H. Han, E. A. Decker, “Antioxidant activity of phosvitin in phosphatidylcholine liposomes and meat model systems”. *J. Food Sci.* Vol. 67, pp. 37–41.(2002).
 26. C.L. Lu, R.C. Baker, “Characteristics of egg yolk phosvitin as an antioxidant for inhibiting metal-catalyzed phospholipid oxidations”. *Poultry Sci.*, Vol. 65, pp. 2065–2070. (1986).
 27. J. Park, S. Na, Y. Lee, “Present and future of nonthermal food processing technology.” *Food Sci. Ind.* Vol. 75, pp. 1–20. (2010).
 28. R.Z. Gu, W.Y. Liu, F. Lin, Z.T. Jin, L. Chen, W.X. Yi, J. Lu, M.Y. Cai, “Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of oligopeptides derived from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle”, *Food Research International*, Vol. 49, pp. 326–333, (2012).
 29. H.S. Chae, Y.M. Yoo, C.N. Ahn, S.H. Cho, B.D. Sang, Y.G. Kim, J.M. Lee, S.K. Yun, Y.I. Choi, “Feeding Effects of the High Pressure Boiled Extract(HPBE) of the Ogol Chicken on Weight Gain and Serum Lipid Composition of Rat”, *Korean J Poult Sci*, Vol. 30, pp. 135–143, (2003).
 30. H.S. Chae, Y.M. Yoo, C.N. Ahn, S.H. Cho, B.Y. Park, J.M. Lee, Y.K. Kim, S.G. Yun, Y.I. Choi, “Chemical and Sensory Characteristics of Boiled Soup Extracted from Crossbred Ogol Chicken as Affected by the Level of Flavourzyme”, *Korean J Poult Sci*, Vol. 30, pp. 11–16, (2003).
 31. H.S. Yoo, K.H. Chung, K.J. Lee, D.H. Kim, J.H. An, “Effect of *Gallus gallus* var. *domesticus* (Yeonsan ogolgye) Extracts

- on Osteoblast Differentiation and Osteoclast Formation”, *Microbiol. Biotechnol. Lett.* Vol. 43, pp. 322-329, (2015).
32. H.S. Chae, C.N. Ahn, Y.M. Yoo, J.S. Ham, J.M. Lee, S.K. Yoon, Y.I. Choi, “The Effects of the High Pressure Boiled Extracts (HPBE) of the Ogot Chicken with Herbs on the Hormones, Cytokine, Specific Antibody of Serum in the Rat”, *Korean J Food Sci Anim Res.*, Vol. 24, pp. 283-292, (2004).
 33. W.J. Lahl, S.D. Braun, “Enzymatic production of protein hydrolysates for food use”, *Food Technol.* Vol. 48, pp. 68-71, (1994).
 34. R.D. Bernardini, P. Harnedy, D. Bolton, J. Kerry, E. O’Neill, A.M. Mullen, M. Hayes “Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products”, *Food Chemistry*, Vol. 124, pp. 1296-1307, (2011).
 35. H.W. Seo, E.Y. Jung, G.W. Go, G.D. Kim, S.T. Joo, H.S. Yang, “Optimization of ydrolisis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology”, *Original Research Article Food Chemistry*. Vol. 185, pp. 106-111, (2015).
 36. S. Zhu, C.Y. Wang, P. Zhang, “Characterization and in vitro antioxidation of papain hydrolysate from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle and its fractions”, *Food Research International*, Vol. 44, pp. 133-138, (2011).
 37. S.S. Pitchumoni, P.M. Doraiswamy, “Current status of antioxidant therapy for Alzheimer’s disease”, *J Am Geriatr Soc.*, Vol. 46, pp. 1566-1572. (1998).
 38. M.S. Blois, “Antioxidant determinations by the use of a stable free radica”, *Nature*, Vol. 18, pp. 1000, (2004).
 39. X.B. Fan, C.J. Li, D.N. sha, “The establishment of o-phenanthroline chemiluminescent system for measuring OH radica”, *Basic Medical Sciences and Clinics*. Vol. 18, No. 6 pp. 468-471. (1998).
 40. W. Yu, Y. Zhao, Z. Xue, H. Jin, D. Wang, “The antioxidant properties of lycopene concentrate extracted from tomato paste”, *Journal of the American oil Chemists Society*. Vol. 78, No. 7 pp. 697-701. (2001).
 41. I. Gulcin, “Antioxidant activity of caffeic acid (3,4dihydroxycinnamic acid)”, *Toxicol.*, Vol. 217 No. 2 pp. 213-220, (2006).
 42. S.H. Shon, I.H. Cho, Y.S. Kim, “Comparison of pyrazines formed in chicken by products hydrolyzed by Enzymes”, *Korea J. Soc. Food Cookery Sci.*, Vol. 20, pp. 265-270, (2004).
 43. I. Gulcin, D. Berashvili, A. Gepdiremen, “Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne”, *J. Ethmopharmacol.*, Vol. 101, No 1-3 pp. 287-293, (2005).
 44. RE. Aluko, E. Monu, “Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates”, *Journal of Food Science*, Vol. 68, pp. 1254-1258, (2003).
 45. S. Sakanaka, Y. Tachibana, Y. Okada, “Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha)”, *Food Chemistry*, Vol.89, pp.569-575. (2005).
 46. S.N. Jamdar, V. Rajalakshmi, A. Sharma, “Antioxidant and ACE inhibitory properties of poultry viscera protein hydrolysate and its peptide fractions”, *Journal of Food Biochemistry*, Vol. 36, pp. 494-501, (2012).
 47. T.Y. Kim, T.W. Jeon, S.H. Yeo, S.B. Kim, J.S. Kim, J.S. Kwak, “Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of Jubak extracts”, *Korean J Food Nutr*, Vol. 23, pp. 299-305. (2010).
 48. H.W. Kang, “Antioxidative activity of extracts from *Cichorium endivia* L.”, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol. 41, pp. 1487-1492, (2012).

49. K. Kitani, C. Minami, T. Yamamoto, S. Kanai, G.O. Ivy, M.C. Carrillo, "Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders : potentials of propargylamines for human use." *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 959, pp. 295-307, (2002).
50. M.Y. Yoo, S.K. Kim, J.Y. Yang, "Characterization of an antioxidant from sporophyll of *Undaria pinnatifida*", *Korean J Microbiol Biotechnol*, Vol. 32, pp. 307-311, (2004).
51. A.T. Girgih, C.C. Udenigwe, R.E. Aluko, "In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions", *Journal of the American Oil Chemists Society*, Vol. 88, pp. 381-389, (2010).