Journal of Oil & Applied Science
Vol. 34, No. 3. September, 2017. 673~682
ISSN 1225-9098 (Print)
ISSN 2288-1069 (Online)
http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2017.34.3.673

오계란 단백질 가수 분해물 제조 및 한외여과 분획물의 *in vitro* 항산화 활성 특성

하유진* · 김슬기* · 유선균*†

*중부대학교 식품생명과학과

(2017년 8월 2일 접수: 2017년 8월 27일 수정: 2017년 9월 10일 채택)

In vitro Antioxidant Activity of Ogae (Korean Native Black Fowl) Egg White Protein Hydrolysates Fractionated by Ultrafiltration

Yoo Jin Ha* · Seul Ki Kim* · Sun Kyun Yoo*†

†*Department of Food and Biotechnology, Joongbu University

(Received August 2, 2017; Revised August 27, 2017; Accepted September 10, 2017)

요 약 : 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 연산오계란 단백질 가수 분해물을 Ultrafiltration를 이용하여 HDS(분획되지 않은 가수 분해물), 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa로 분획된 기능성 펩타이드의 DPPH radical scavenging activity, superoxide anion radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity 및 Fe^{2+} chelation ability을 평가하였다. 그 결과 DPPH radical scavenging activity 최대값은 1 kDa(70.83 %), hydroxyl radical scavenging activity 최대값은 5 kDa (47.01 %), superoxide anion radical scavenging activity 최대값은 5 kDa(40.57 %), Fe^{2+} chelation ability 최대값은 5 kDa(29.87 %)로 나타났다. Ultrafiltration를 이용하여 fractionation된 단백질 가수 분해물의 항산화 저해 능력 IC_{50} 평가하였다. 그 결과 HDS의 최대값은 superoxide anion radical scavenging activity($IC_{50,}$ 5.42 mg/ml)이고, 1 kDa의 최대값은 Fe^{2+} chelation ability($IC_{50,}$ 1.67 mg/ml)이고, 5 kDa의 최대값은 Fe^{2+} chelation ability($IC_{50,}$ 2.09 mg/ml)이고, 10 kDa의 최대값은 Fe^{2+} chelation ability($IC_{50,}$ 2.61 mg/ml)이고, 50 kDa의 최대값은 Fe^{2+} chelation ability($IC_{50,}$ 4.53 mg/ml)이다. 그러므로 본 연구 결과를 바탕으로 5 kDa를 이용하여 오계란 단백질에서 분획한 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 fractioned to hydrolysis of Ogae egg white

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

protein using the ultrafiltration. The antioxidant activity of the produced peptides was analyzed. As a result, the maximum value of DPPH radical scavenging was 1 kDa(70.83 %), hydroxy radical scavenging was 5 kDa(47.01 %), superoxide anion radical scavenging was 5 kDa(40.57 %), and Fe^{2+} chelation ability was 5 kDa(29.87 %). Furthermore, the antioxidant Inhibition concentration (IC_{50}) of peptides was evaluated for each fraction. As a result, the maximum value of HDS was superoxide anion radical scavenging(IC_{50}, 5.42 mg/ml). 1 kDa was Fe^{2+} chelation ability(IC_{50}, 1.67 mg/ml), 5 kDa was Fe^{2+}cheating ability(IC_{50}, 2.09 mg/ml), 10 kDa was Fe^{2+}cheating ability(IC_{50}, 2.61 mg/ml), papain was Fe^{2+}cheating ability(IC_{50}, 4.53 mg/ml). Therefore, we expect that peptides produced from Ogae egg white protein using 5 kDa fraction are useful as an antioxidant functional food ingredients.

Keywords : Ogae egg white, fraction, peptides, ultrafiltration, antioxidant activity

1. 서 론

생리활성 단백질 가수 분해물은 호르몬처럼 특정 세포의 수용기에 반응을 하여 항산화, 고혈압 완화, 면역조절, 진통완화 및 항균작용이 있기 때문에 고 기능성 식품 원료로 사용 가능성이 높은 것으로 알려져 왔다[1]. 천연기념물 265호로 지정이 된 한국 재래 오골계인 연산 오계는 예로부터 질병을 예방하고 건강을 개선하는 식품으로 알려져 왔다. 특히 항암효과로 알려진 오계의 난황 단백질인Phosvitin은 아미노산 사슬의 50 % 이상을 인산화 된 serine이 차지하고 있는 특이한 구조로 되어있는데[2], 이러한 특이구조로 인해 phosvitin은 강력한 Fe^{2+} metal chelator로 작용한다고 보고되고 있으며[3], Fe^{2+} chelation ability으로 인해 phosvitin이 항산화제로서 금속이온에 의해 발생되는 지방 산패를 억제할 수 있는 것으로 발표되었다[4, 5]. 이외에 닭 가공 공정 부산물 단백질, 닭 가슴살 단백질, 닭 날개 단백질, 난 단백질, 닭 피부 단백질로부터 기능성 펩타이드 생산 및 생리활성에 대한 연구들이 발표되고 있다[6-12].

막 분리(membrane separation)는 환경 친화적이고 비교적 적은 공정비로 유용한 물질을 분획하는 기술이다[13]. 많은 연구들이 단백질 및 단백질 가수 분해물들의 분획을 pH, 온도, 이온강도 등 조건에 따라 막과 물질과의 상호 연관에 대한 많은 연구들이 발표 되어 오고 있다[14]. 한외 여과막을 이용하여 수산물 및 닭 단백질 가수 분해물들의 분획에 대한 연구들은 단백질 가수 분해물의 크기에 따라 기능성이 다르고 비교적 적은 분자량들의 활성이 높은 것으로 보고하였다[15, 16].

따라서 본 연구는 연산오계란 단백질 가수 분해물을 Ultrafiltration를 이용하여 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa로 분획된 기능성 펩타이드의 DPPH radical scavenging activity, superoxide anion radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, Chelation of metal ion radical activity을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 오계란은 지산농원(Nonsan, Choongnam, Korea)에서 제공하였다. 단백질 분해효소 bromelain은 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 항산화활성 측정에 사용된 시약 DPPH-radical, ascorbic acid, 1,10-phenanthroline, $FeSO_4$, hydrogen peroxid, Tris-HCl buffer(pH 8.3), pyrogallol, $FeCl_2$, methanol, ferrozine, ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA)는 Sigma (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2.2. 오계란 단백질 가수 분해물 제조

본 실험에 사용된 연산 오계란은 지산농원에서 제공되었다. 공급된 오계란은 100 ℃ 항온수조에서 20분 동안 가열하여 오계 노른자와 흰자를 분리하였으며 흰자만을 골라내어 골고루 다진 후 -20 ℃ 냉동 보관하였다. 연산오계란 단백질의 가

수분해는 Bromelain을 선발하여 처리하였다. 시료의 10 % PBS buffer를 넣고 효소처리는 발효기를 이용하여 시료의 3 %를 혼합한 후 반응기에서 50℃, 100 rpm, 4시간 동안 반응시켰다. 반응을 완료한 후 불활성화를 위하여 100 ℃에서 30분 동안 가열하였다. 반응을 완료한 오계란 가수 분해물은 3,000 rpm, 10분 동안 원심분리하여 상등액을 수거하였다. 수거된 가수분해 상등액은 초저온 냉동고(-50 ℃)에서 동결 후 동결건조하였다. 동결건조된 단백질 가수 분해물을 정제수에 용해하였고, 분획 전 가수 분해물을 HDS(hydrolysates)로 명하고, 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa 의 ultrafiltration을 이용하여 각각 분획하여 항산화 능력을 분석하였다. Fig 1.에서 오계란 단백질 가수 분해물 생산과정을 나타내었다.

2.3. DPPH radical scavenging activity 측정

DPPH의 측정 방법은 산소인 free radical이 생체 고분자들인 지질 단백질 등과 결합하여 피부의 노화 및 질병을 유발하는 물질로 밝혀진 이래로 항산화 물질의 radical scavenging activity에 이용되고 있다[17]. DPPH radical scavenging activity은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다[18]. 항산화 특성을 평가하기 위해서 동결건조분말 가수 분해물을 DIW(deionized water)에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리하였다. 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.

DPPH-radical scavenging activity(%)=
[(B－A)/B]×100
A: 시료 첨가시의 흡광도
B: 시료 무 첨가시의 흡광도

2.4. Hydroxyl radical scavenging activity 측정

Hydroxyl radical 에 대한 소거활성 측정은 Fan의 방법을 변형하여 측정하였다[19]. 항산화 특성을 평가하기 위해서 동결건조분말 가수 분해물을 DIW에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리하였다. 표준물질 제조는 ascorbic acid 10 mg을 10 mL DIW에 혼합하였다. 대조구는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)

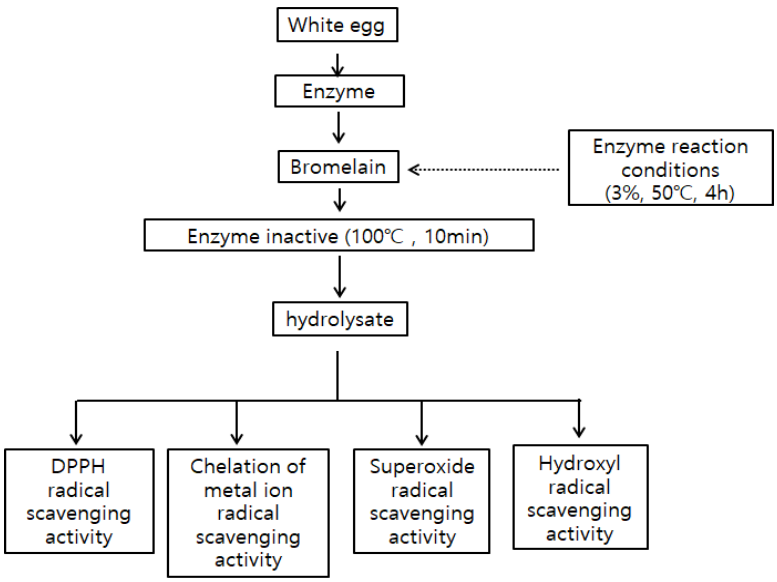

Fig. 1. process of protein hydrolysis by protease and enzymatic conditions.

를 사용하고, 샘플은 10000 ppm, 20000 ppm으로 준비한다. radical scavenging activity 반응은 300 μl 샘플용액, 300 μl 3 mM 1,10-phenanthroline, 300 μl 3 mM $FeSO_4$, 300 μl, 0.01 % hydrogen peroxid를 혼합한 후 37 ℃에서 1시간동안 진탕배양한 후 spectrophotometer를 사용하여 536 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl radical scavenging activity은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

Hydroxyl radical scavenging activity(%)=
{[(⊿A/min)b-(⊿A/min)s]/(⊿A/min)b}×100.
b: 대조구, s: 샘플
⊿A/min : 반응 후 흡광도 -반응 전 흡광도

2.5. Superoxide anion radical scavenging activity 측정

Superoxide anion radical scavenging activity은 Yu의 방법을 변형하여 측정하였다[20]. 항산화 특성을 평가하기 위해서 동결건조분말 가수분해물을 DIW에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리하였다. 대조구는 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)용액을 사용하였다. 반응은 Micro tube를 이용하여 제조된 500 μl 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)용액에 펩타이드 500 μg을 넣고 혼합한 다음 400 μl 1.5 mM pyrogallol 용액을 혼합한 후 실온에서 4분 동안 반응시킨 후 spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide anion radical scavenging activity은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교하여 아래와 같은 식으로 계산하였다.

Superoxide anion scavenging activity(%)
={[(⊿A/min)b-(⊿A/min)s]/(⊿A/min)b}×100.
b: 대조구, s: 샘플
⊿A/min : 반응 후 흡광도 -반응 전 흡광도

2.6. Fe^{2+} chelation ability 측정

시료용액의 Metal chelating effect는 Gulcin의 방법을 약간 변형하여 측정하였다[21]. 동결건조분말 가수 분해물을 DIW에 용해를 한 다음 10 kDa 한 외막을 이용하여 분리하였다. 추출된 시료는 일정한 농도로(0-1 %) 증류수에 용해하였고 test tube에 추출된 시료 500 μl와 100 μl $FeCl_2$(0.6 mM), 900 μl methanol 을 넣고 혼합하였다. 5분 동안 상온에서 반응 시킨 후 100 μl ferrozine(5 mM)을 혼합물에 첨가하여 10분 동안 상온에서 반응시켰다. 562 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구로는 ethylenediaminete-traacetic acid(EDTA)를 시료와 동일한 조건으로 측정하였다.

Fe^{2+} chelation ability(%)=(1−A/B)×100
A: 시료 첨가시의 흡광도
B: 시료 무 첨가시의 흡광도

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH radical scavenging activity

DPPH radical scavenging activity는 DPPH radical이 항산화제와 같은 프로톤공여(proton donating) 물질과 반응하면 radical이 scavenging 된다. 그리고 항산화제의 프로톤공여 능력에 따라서 짙은 보라색이 탈색되어 노란색으로 변하는 정도를 지표로 하여 항산화력을 측정하는 방법이다[22].

Fig. 2 은 ultrafiltration를 이용하여 HDS, 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa로 fractionation 된 단백질 가수 분해물의 DPPH radical scavenging activity를 나타내었다. 가수 분해물들의 DPPH radical scavenging activity은 약 21.27 %에서 70.83 % 사이의 분포를 나타내었는데 radical scavenging activity은 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa, HDS 순으로 나타났으며. 가장 높은 활성을 보여준 것은 1 kDa로 fraction한 것이며, 70.83 %로 가장 높은 활성을 보여준다. 5 kDa 의 DPPH radical scavenging activity은 1 kDa 와 10 kDa 일 경우 유의수준 5 % 하에서 통계적으로 유의적 차이가 없었고, HDS와 50 kDa의 DPPH radical scavenging activity은 유의수준 5 % 하여서 통계적 유의성이 있다고 볼 수 있었다. 연구 결과에 따르면 펩타이드들의 항산화 능력은 1) 구성아미노산 중에서 비극성 및 방향족 아미노산, 2) 분자량이 작을수록 항산화 능력이 높은 것으로 알려 졌다. 우리 연구 결과와 마찬가지로, 퀴노아 단백질 가수분해물[23], 대마씨 단백질 가수 분해물[24]과 검은 갈치 단백질 가수 분해물은[25] 저 분자량 펩타이드가 더 높은 DPPH 소거활성을 나타낸다

는 보고가 있었다. 반면에 가금류 내장 단백질 가수 분해물, 고등어 단백질 가수 분해물은 고분자량 펩타이드가 더 높은 DPPH radical scavenging activity을 나타낸다는 보고가 있었다 [26-28].

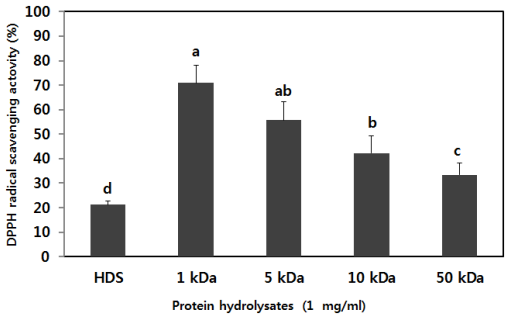

Fig. 2. The degree of DPPH radical scavenging activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates. The protein hydrolysates were fractionated by a ultrafiltration.

3.2. Hydroxyl radical scavenging activity

Hydroxyl radical scavenging activity은 세포 호흡 등 생리과정에서 H_2O_2를 생성하고, 톤 반응에서의 Fe^{2+}이나 Cu^{2+}와 같은 금속이온 사이의 작용에서 발생하는데, 굉장히 반응성이 높고, 수명이 짧으며 DNA, 단백질, 그리고 지질을 파괴적으로 수산화한다고 알려져 있다. 그러므로 Hydroxyl radical scavenging activity는 유발되는 산화스트레스로 인해 생기는 여러 가지 질병들을 방지하는데 중요하다[29].

Fig. 3 은 ultrafiltation를 이용하여 HDS, 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa로 fractionation 된 단백질 가수 분해물의 hydroxyl radical scavenging activity 분석 결과를 보여준다. 가수 분해물들의 Hydroxyl radical scavenging activity 은 약 9.23 %에서 47.00 % 사이의 분포를 보여주었는데, hydroxyl radical scavenging activity은 5 kDa, 1 kDa, 10 kDa, 50 kDa, HDS 순으로 나타났으며. 가장 높은 활성을 보여준 것은 5 kDa로 fraction한 것이며, 47.01 %로 가장 높은 활성을 보여준다. 1 kDa 와 5 kDa 의 hydroxyl radical scavenging activity은 유의수준 5 % 하에서 통계적으로 유의적 차이가 없었고, HDS, 10 kDa와 50 kDa의 hydroxyl radical scavenging activity은 유의수준 5 % 하여서 통계적 유의성이 있다고 볼 수 있었다. 반면에 수수의 hydroxyl radical scavenging activity은 70.01 % 로 높은 활성을 보여주었고, 이는 수수에 포함되어있는 항산화 펩타이드는 free radical을 보다 안정한 생성물로 전환시키고 급진적인 연쇄반응을 종결시킬 수 있다고 가정할 수 있다[30].

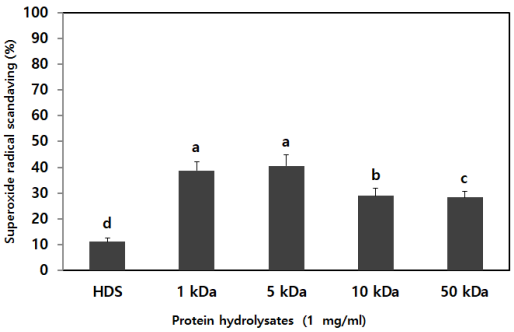

Fig. 3. The degree of hydroxy radical scavenging activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates. The protein hydrolysates were fractionated by a ultrafiltration.

3.3. Superoxide anion radical scavenging activity

Superoxide anion radical anion scavenging activity은 굉장히 유독한 radical 종(species)이며 무수한 생체적 작용에서 생성되며, 반응성이 높은 물질의 전구물(precursor)이다. 세포는 천부적으로 효소 산화방지제의 생물학적 방어 기제를 갖춰 superoxide dismutase(SOD)를 통해 superoxide anion ($\cdot O_2^-$)를 O_2와 H_2O_2로 전환한다. 하지만, 생체의 능력으로 radical을 제거함은 지나치게 생산되는 free radical에 압도될 수 있다[31-33].

Fig. 4 은 ultrafiltration를 이용하여 HDS, 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa로 fractionation 된 단백질 가수 분해물의 superoxide anion radical scavenging activity 분석 결과를 보여준다. 가수 분해물들의 superoxide anion radical scavenging activity은 약 11.27 %에서 40.57 % 사이의 분포를 보여 주었는데, superoxide anion radical scavenging activity은 5 kDa, 1 kDa, 10 kDa, 50 kDa, HDS 순으로 나타났으며. 가장 높은 활성을 보여준 것은 5 kDa로 fraction한 것이

며, 40.57 %로 가장 높은 활성을 보여 준다. 1 kDa 와 5 kDa 의 superoxide anion radical scavenging activity은 유의수준 5 % 하에서 통계적으로 유의적 차이가 없었고, 또한 10 kDa 와 50 kDa 의 Superoxide anion radical scavenging activity도 마찬가지로 유의수준 5 % 하여서 통계적으로 유의적 차이가 없다고 볼 수 있었다. 우리 연구와 비슷한 결과로 옥수수 단백질 가수 분해물의 펩타이드는 Radical scavenging activity 이 47.45 %로 높은 활성을 보여주었다. 이는 옥수수 단백질 즉 제인 단백질의 펩타이드는 우수한 과산화물 radical scavenging activity 제거제일 수 있다[34, 35].

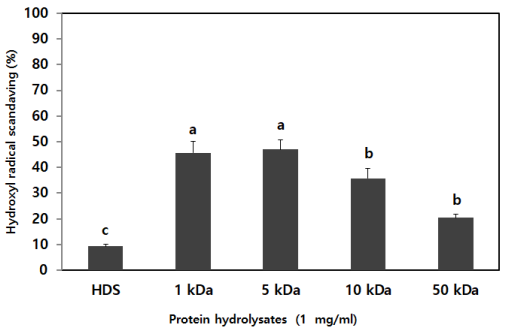

Fig. 4. The degree of superoxide anion radical scavenging activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates. The protein hydrolysates were fractionated by a ultrafiltration.

3.4. Fe^{2+} chelation ability

Fe, Cu, Ni 등과 같은 금속은 지질산화과정에서 촉매로 작용한다[36]. 금속 킬레이트 능력은 ferrozine이 Fe^{2+}와 결합하여 붉은색을 띠게 되는데 이때 킬레이트 효과를 가진 성분이 존재하면 Fe^{2+}-ferrozine 복합체 형성을 방해하여 붉은색이 탈색되어 흡광도가 저해되는 정도를 지표로 하여 항산화 능력을 측정하였다[37]. 또한 일부 단백질과 펩타이드는 Fe^{2+}와 같은 금속 이온을 킬레이트한다고 보고되었고, 산성 및 염기성 아미노산이 펩타이드에 의한 Fe^{2+} chelation ability에 중요한 역할을 하며, 산성 아미노산과 염기성 아미노산의 측쇄에 있는 카르복실기와 아미노기는 단백질과 펩타이드의 Fe^{2+} chelation ability에 관여하기 쉽다고 한다[38].

Ultrafiltration를 이용하여 HDS, 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa로 fractionation된 단백질 가수 분해물의 Fe^{2+} chelation ability을 Fig. 5 에서 보여준다. 단백질 가수 분해물들의 Fe^{2+} chelation ability은 약 11.04 %에서 29.87 % 사이의 분포를 보여 주었는데 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, HDS, 50 kDa 순으로 나타났으며. 가장 높은 활성을 보여준 것은 1 kDa로 fraction한 것이며, 29.87 %로 가장 높은 활성을 보여 준다. HDS 와 50 kDa 의 Fe^{2+} chelation ability는 유의수준 5 % 하에서 통계적으로 유의적 차이가 없었고, 반대로 1 kDa, 5 kDa 와 10 kDa 의 Fe^{2+} chelation ability는 유의수준 5 % 하여서 통계적으로 유의적 차이가 있다고 볼 수 있었다. 이와 비슷하게 Girgih 등 [39] 연구에서도 Fe^{2+} chelation ability은 펩티드 크기가 증가할 때 감소했으며, 낮은 분자량의 펩티드가 Fe^{2+} chelation ability에 더 큰 효과가 나타났다. 따라서 펩타이드에 의한 Fe^{2+} chelation ability는 hydroxyl radical 형성(세포 조직에 매우 반응적이고 파괴적인 화합물)의 예방에 중요한 역할을 할 수 있다[40].

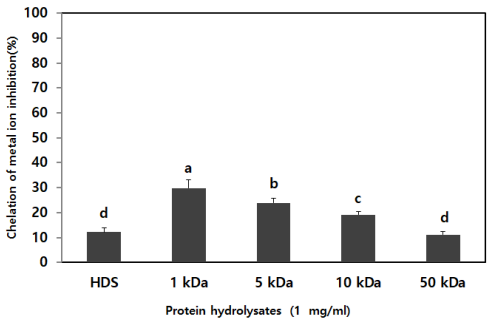

Fig. 5. The degree of chelation activity of Yeonsan Ogae egg white protein hydrolysates. The protein hydrolysates were fractionated by a ultrafiltration.

3.5. 오계란 단백질 가수 분해물의 항산화 저해농도

Ultrafiltration를 이용하여 HDS, 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa로 fractionation된 오계란 단백질 가수 분해물들의 DPPH radical scavenging activity, superoxide anion radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, Fe^{2+} chelation ability이 다르게 나타났다. 가수 분해물들의 항산화 저해 능력을 비교하

Table 1. Inhibition concentration (IC_{50}) of antioxidant capacity of protein hydrolysate of Ogae egg white

Fractionation	Antioxidant activities (IC_{50} values, mg/ml)			
	DPPH radical scavenging activity	Superoxide anion radical scavenging activity	Hydroxyl radical scavenging activity	Fe^{2+} chelating activity
HDS	2.35	5.42	4.44	4.13
1 kDa	0.71	1.09	1.29	1.67
5 kDa	0.90	1.06	1.23	2.09
10 kDa	1.18	1.40	1.73	2.61
50 kDa	1.50	2.45	1.76	4.53

기 위해서 각각 가수 분해물에 대하여 IC_{50} 평가하였다. (Table 1). HDS 가수 분해물의 superoxide anion radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, Fe^{2+} chelation ability 및 DPPH radical scavenging activity 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었고 그 값은 각각 5.42, 4.44 4.13 및 2.35 mg/ml 이었다. 1 kDa에 의하여 생산된 가수 분해물은 Fe^{2+} chelation ability, hydroxyl radical scavenging activity, superoxide anion radical scavenging activity 및 DPPH radical scavenging activity 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었으며 그 값은 1.67, 1.27, 1.09, 및 0.71 mg/ml 이었다. 5 kDa에 의하여 생산된 가수 분해물은 Fe^{2+} chelation ability, hydroxyl radical scavenging activity, superoxide anion radical scavenging activity 및 DPPH radical scavenging activity 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었고, 그 값은 각각 2.09, 1.23, 1.06 및 0.90 mg/ml 이었다. 10 kDa에 의하여 생산된 가수 분해물은 Fe^{2+} chelation ability, hydroxyl radical scavenging activity, superoxide anion radical scavenging activity 및 DPPH radical scavenging activity 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었으며 그 값은 각각 2.61, 1.73, 1.40 및 1.18 mg/ml이었다. 50 kDa에 의하여 생산된 가수 분해물은 Fe^{2+} chelation ability, superoxide anion radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity 및 DPPH radical scavenging activity 순서로 저해농도가 높음을 보여 주었고, 그 값은 각각 4.53, 2.45, 1.76 및 1.50 mg/ml 이었다. 이와 비슷한 결과로 옥수수의 단백질 가수 분해물의 hydroxyl radical scavenging activity은 IC_{50} 값이 0-4 mg/ml 로 높은 활성을 나타낸다[34].

4. 결 론

본 연구는 오계란 단백질 가수 분해물을 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa ultrafiltration를 이용하여 분획된 기능성 펩타이드의 DPPH radical scavenging activity, superoxide anion radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity 및 Fe^{2+} chelation ability을 평가하였다.

1. DPPH radical scavenging activity은 약 21.27 %에서 70.83 % 사이의 분포를 보여 주었는데 1 kDa 일 때 70.83 % 로 가장 높았고, HDS 일 때 21.27 %로 가장 낮게 나타내었다.
2. Hydroxyl radical scavenging activity은 약 9.23 %에서 47.01 % 사이의 분포를 보여 주었는데 5 kDa 에서 47.01 %로 가장 높았고, HDS 에서 9.23 %로 가장 낮게 나타내었다.
3. Superoxide anion radical scavenging activity은 약 11.27 %에서 40.57 % 사이의 분포를 보여 주었는데 5 kDa 에서 40.57 %로 가장 높았고, HDS 에서 11.27 %로 가장 낮게 나타내었다.

4. Fe^{2+} chelation ability은 약 11.04 %에서 29.87 % 사이의 분포를 보여 주었는데 1 kDa 에서 29.87 %로 가장 높았고, 50 kDa 에서 11.04 % 로 가장 낮게 나타내었다.
5. Ultrafiltration를 이용하여 HDS, 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa로 fractionation된 단백질 가수 분해물의 항산화 저해 능력 IC_{50} 평가한 결과, HDS에 의하여 항산화 저해농도가 가장 높은 값은 superoxide anion radical scavenging activity($IC_{50,}$ 5.42 mg/ml)이고, 1 kDa에 의하여 항산화 저해농도가 가장 높은 값은 Fe^{2+} chelation ability($IC_{50,}$ 1.67 mg/ml)이고, 5 kDa에서는 Fe^{2+} chelation ability($IC_{50,}$ 2.09 mg/ml), 10 kDa에서는 Fe^{2+} chelation ability($IC_{50,}$ 2.61 mg/ml), 50 kDa에서는 Fe^{2+} chelation ability($IC_{50,}$ 4.53 mg/ml)이었다.
6. 그러므로 본 연구 결과를 바탕으로 5 kDa를 이용하여 오계란 단백질에서 분획한 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. Salminen, J. Rintala, "Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste a review", *Bioresour. Technol,* Vol. 83, pp. 13-26, (2002).
2. RC. 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).
3. G. Tarborsky, Interaction between phosvitin and iron and its effect on a rearrangement of phosvitin structure, *Biochem.-US,* Vol. 2, pp. 266-271, (1963).
4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. 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).
11. 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).
12. 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).
13. L. Vandanjon, S. Cros, P. Jaouen, F. Quemeneur, P. Bourseau, "Recovery by nanofiltration and reverse osmosis of marine flavours from seafood cooking waters". *Desalination*, Vol. 144, No.1-3, pp. 379-385, (2002).
14. Z.Y. Li, A.H. Kittikun, W. Youravong, "Separation of protease from yellowfin tuna spleen extract by ultrafiltration: Effect of hydrodynamics and gas sparging on flux enhancement and selectivity", *Journal of Membrane Science*, Vol. 311, No. 1-2, pp. 104-111, (2008).
15.. L. Chabeaud, P. Vandanjon, P. Bourseau, M. Jaouen, F. Chaplain-Derouiniot, "Guerard Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions", *Separation and Purification Technology,* Vol. 66, No. 3, pp. 463-471, (2009).
16. K.C. Hsu, E.C.Y. Li-Chan, C.L. Jao, "Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7", *Food Chemistry*, Vol. 126, No. 2, pp. 617-622, (2011).
17. 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).
18. M.S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radica", *Nature*, Vol. 18, pp. 1000, (2004).
19. 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).
20. 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).
21. I. Gulcin, "Antioxidant activity of caffeic acid (3,4 dihydroxycinnamic acid)". *Toxicol.*, Vol. 217, No. 2, pp. 213-220, (2006).
22. 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).
23. R.E. Aluko, E. Monu, "Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates", *Journal of Food Science*, Vol. 68, pp. 1254-1258. (2003).
24. 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).
25. I. Batista, C. Ramos, J. Coutinho, N.M. Bandarra,M.I. Nunes, "Characterisation of protein hydrolysates and lipids obtained from blackscabbard fish (Aphanopus carbo) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced", *Process Biochemistry*, Vol. 45, pp. 18-24, (2009).

26. 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).
27. C.C. Udenigwe, Y.L. Lu, C.H. Han, W.C. Hou, R.E. Aluko, "Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages". *Food Chemistry*, Vol. 116, pp. 277-284, (2009).
28. H.C. Wu, H.M. Chen, C.Y. Shiau, "Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomberaustiasicus)". *Food Research International*, Vol. 36, pp. 949-957, (2003).
29. 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).
30. H. Agrawal, R. Joshi, M. Gupta, "Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (Pennisetum glaucum) protein hydrolysate", *Food Chemistry,* Vol. 204, pp. 365-372, (2016).
31. 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).
32. H.W. Kang, "Antioxidative activity of extracts from Cichorium endivia L.", *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol. 41, pp. 1487-1492, (2012).
33. 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).
34. D.X. Jin, X.L. Liu, X.Q. Zheng, X.J. Wang, J.F. He, "Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and, evaluation of three novel corn antioxidant peptides", *Food Chemistry 204*, pp.427-436, (2016).
35. H.M. Li, X. Hu, P. Guo, P. Fu, L. Xu, X.Z. Zhang, "Antioxidant properties and possible mode of action of corn protein peptides and zein peptides". *Journal of Food Biochemistry*, Vol. 34, pp. 44-60. (2010).
36. 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).
37. E. Graf, J.W. "Eaton Antioxidant functions of phytic acid", *Free Radic Biol Med*, Vol. 8, pp. 61-69, (1990).
38. A. Saiga, S. Tanabe, T. Nishimura, "Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 3661-3667, (2003).
39. 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).
40. D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, "The chemistry behind antioxidant capacity assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, pp. 1841-1856, (2005).