

연자육(Lotus Nelumbo nucifera Seed) 단백질로부터 항산화 펩타이드 분리 정제 및 특성

Chathuri K. Marasinghe · 김현우¹ · 정원교² · 제재영^{3*}

부경대학교 식품생명과학과, ¹부경대학교 자원생물학전공, ²부경대학교 의공학전공, ³부경대학교 휴먼바이오융합전공

Purification and Characterization of Antioxidant Peptides from Lotus *Nelumbo nucifera* Seed Protein

Chathuri K. Marasinghe, Hyun-Woo Kim¹, Won-Kyo Jung² and Jae-Young Je^{3*}

Department of Food and Life Science, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

¹Major of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

²Major of Biomedical Engineering, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

³Major of Human Bioconvergence, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

Lotus *Nelumbo nucifera* seed protein (LSP) was isolated by alkaline solubilization after removing fat and phenolics by hexane and ethanol treatment. Antioxidant peptides from LSP were produced with Alcalase[®] and pepsin and hydroxyl radical scavenging activities were determined. LSP-Alcalase[®] hydrolysates showed higher hydroxyl radical scavenging activity than LSP-pepsin hydrolysates. To purify antioxidant peptides, LSP-Alcalase[®] hydrolysates were subjected to high performance liquid chromatography (HPLC) separation on the C18 column and the active fraction was further purified using a Superdex[™] peptide 10/300 GL column. Finally, the active fraction (F8-2) was evaluated for antioxidant activities by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl radical scavenging, and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays. The EC₅₀ values of the F8-2 were 105.81±0.02 µg/mL for DPPH and 32.26±0.02 µg/mL for hydroxyl radical and the F8-2 exhibited 7.22 µM trolox equivalent (TE)/100 µg F8-2. Glutathione (GSH), which is a positive control, showed EC₅₀ values of 19.87±0.01 µg/mL for DPPH and 15.95±0.03 µg/mL for hydroxyl radical and an ORAC value of 14.17±0.03 µM TE/100 µg GSH. Finally, sixteen peptides were identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Among them, Ile-Tyr and Leu-Tyr showed higher antioxidant scores.

Keywords: Lotus seed protein, Antioxidant peptides, Antioxidant activity, ROS

서 론

항산화제란 산화를 방지할 수 있는 물질을 말한다. 항산화제에는 다양한 종류가 있는데 대표적으로 식물에 존재하는 폴리페놀, 단백질로부터 유도된 펩타이드가 천연 항산화제로 알려져 있으며 안전하고 부작용이 적어 식품첨가제 및 건강기능식품 소재로 널리 이용되고 있다(Wen et al., 2020). 생명체는 호흡 과정에서 필연적으로 부산물인 활성산소종을 생성하며 체내 항산화 방어 기작에 의해 생성된 활성산소종은 적절하게 제거되

지만 과도하게 생성된 활성산소종은 세포 손상을 유발하고 만성질환 발병에 깊은 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Barbosa et al., 2020). 체내 및 식품에 포함된 항산화제는 생성된 활성산소종을 효율적으로 제거하여 산화적 손상에 의한 세포 보호 역할을 하기 때문에 안전하고 건강 증진 효능을 갖는 새로운 항산화제 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 식품에 포함되어 있는 단백질은 체내에 영양소 기능과 더불어 건강증진 효능을 가지는 다양한 생리활성 펩타이드 생산에 이용되고 있다. 일반적으로 생리활성 펩타이드는 2-20개의 아미노산이 펩타이

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 4633 Fax: +82. 51. 629. 4639

E-mail address: jyj1915@pknu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0021>

Korean J Fish Aquat Sci 56(1), 21-27, February 2023

Received 8 December 2022; Revised 9 January 2023; Accepted 12 January 2023

저자 직위: Chathuri K. Marasinghe(대학원생), 김현우(교수), 정원교(교수), 제재영(교수)

드 결합으로 형성되어 있다(Zaky et al., 2022). 식품 단백질로부터 생리활성 펩타이드를 생산하는 방법에는 단백질 가수분해 효소를 이용하여 비활성 형태의 단백질을 활성형 형태의 펩타이드로 전환하는 방법이 있으며 이 방법은 특정 펩타이드 서열의 생산 및 영양소 파괴가 거의 일어나지 않아 널리 사용되고 있다(Lorenzo et al., 2018). 최근 연구를 살펴보면 근단백질, 계란, 유단백질, 대두, 씨앗 단백질뿐만 아니라 진주담치, 굴, 꼬막, 해조류 등의 다양한 식품 단백질이 생리활성 펩타이드 생산에 사용되고 있음을 알 수 있다(Admassu et al., 2018; Lorenzo et al., 2018; Oh et al., 2020; Hao et al., 2022; Marasinghe et al., 2022; Zaky et al., 2022). 이렇게 생산된 생리활성 펩타이드는 다양한 건강 증진 효능을 나타내는데 대표적으로 항산화, 항고혈압, 항염증, 항균, 면역증강, 항암, 당뇨병 예방 등의 효능이 보고되고 있다(Kim et al., 2016; Kim et al., 2018; Lorenzo et al., 2018; Oh et al., 2020).

연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertn)은 다년생 수생 식물로 동아시아 지역에서 오래전부터 민간에서 다양한 질병치료에 사용되어 왔다(Cho et al., 2022). 연자육은 연꽃의 종자로 가을에 수확하여 과피를 제거하여 말린 것으로 건조 중량 약 20% 내외의 단백질을 포함하고 있다고 알려져 있다(Zeng et al., 2013). 연자육의 건강 증진 효능은 피부 미백, 항암, 항당뇨, 항균, 항비만, 신경세포보호 효능 등이 밝혀졌으며 생리활성 성분으로는 프로안토시아닌, 알카로이드, 플라보노이드, 올리고당 등이 보고되었다(Bangar et al., 2022; Lei et al., 2022; Shin et al., 2022; Yu et al., 2022). 이처럼 연자육에 관한 연구가 활발히 진행되고 있지만 연자육 단백질에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 연자육에 풍부하게 포함되어 있는 단백질을 분리한 후 단백질 분해 효소로 항산화 펩타이드를 제조하였고 항산화 펩타이드의 분리, 정제 및 구조 분석을 통해 연자육 단백질을 기능성 식품 소재로의 활용가능성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

연구에 사용된 연자육은 베트남 산으로 재래시장에서 구입하였다(Busan, Korea). 펩타이드 제조를 위해 사용한 효소(pepsin 1:10,000)는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 Alcalase®는 Novozyme Korea (Biosis, Busan, Korea)에서 구입하였다.

항산화 활성 측정에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), trolox, fluorescein sodium salt, trichloroacetic acid (TCA), thiobarbituric acid (TBA), trifluoroacetic acid (TFA), AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride), deoxyribose 및 glutathione (GSH)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 그 밖의 모든 시약은 분석용 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

연자육 단백질 분리 및 펩타이드 제조

연자육으로부터 단백질 분리는 Kim et al. (2018)이 보고한 방법을 약간 수정하여 수행하였다. 즉 20% (w/v) hexane을 2시간 동안 처리하여 연자육에 포함되어 있는 지질을 제거한 후 70% (w/v) ethanol을 가하여 polyphenol 성분 제거하였다. 상온에서 건조 후 증류수에 10% (w/v) 농도로 제조하고 2 N NaOH를 이용하여 pH를 11로 조정하였다. pH를 일정하게 유지하면서 2 시간 동안 교반한 다음 원심분리(12,300 g, 4°C, 30분; 1248R; Labogene, Seoul, Korea)하여 잔사를 제거하였다. 분리된 단백질 용액에 3 N HCl을 가하여 pH를 7로 조정한 후 동결건조하였다.

펩타이드를 제조하기 위해서 pepsin과 Alcalase® 단백질 분해 효소를 사용하였고 추출 조건은 Kim et al. (2018)과 Oh et al. (2019)가 보고한 방법에 따라 수행하였다. 증류수에 10% (w/v) 농도로 단백질 용액을 제조한 후 효소:기질비(1:100), pH 2, 37°C 조건에서 2시간 동안 pepsin으로 반응시켰고, Alcalase®는 pH 8, 50°C에서 8시간 반응시켜 제조하였다. 반응 종결 후 95°C에서 10분간 효소를 불활성시켰고 원심분리(5,000 rpm, 20분)하여 상층액을 회수 및 동결 건조하였다.

Hydroxyl radical 소거 활성 측정

시료의 hydroxyl radical 소거 활성 측정은 Li (2013)의 방법을 수정하여 측정하였다. 5 mM FeCl₃, 10 mM EDTA, 10 mM deoxyribose 용액 각 0.1 mL와 시료 용액 0.5 mL, 0.1 mL 10 mM H₂O₂, 0.1 mL 2 mM ascorbic acid를 잘 혼합하여 45°C에서 25분간 방치한 후 0.5 mL 2.8% TCA 및 1.0% TBA 용액을 첨가하였다. 95°C에서 10분간 가열한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다(Multiskan™ GO; Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). Hydroxyl radical 소거 활성은 아래의 식을 이용하였고, 50% 저해 농도(EC₅₀)를 계산하였다. 대조구는 시료 대신 동량의 sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4)를 첨가하였다.

Hydroxyl radical 소거 활성

$$= \left[\frac{\text{Control}_{532} - \text{Sample}_{532}}{\text{Control}_{532}} \right] \times 100$$

DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH radical 소거 활성은 Kim et al. (2018)의 방법을 이용하여 측정하였다. 시료 용액 70 µL와 동량의 0.15 mM DPPH radical 용액을 혼합한 후 상온에서 30분간 빛을 차단하여 방치하였다. 반응 용액의 흡광도는 517 nm에서 측정하여 아래의 식을 이용하여 50% 저해 농도(EC₅₀)를 계산하였다. 대조구는 시료 대신 동량의 증류수를 첨가하였다.

DPPH radical 소거 활성

$$= \left[\frac{\text{Control}_{517} - \text{Sample}_{517}}{\text{Control}_{517}} \right] \times 100$$

ORAC 측정

시료 용액의 ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 측정은 Zulueta et al. (2009)의 방법을 수정하여 측정하였다. 50 μL 시료 용액과 동량의 78 nM fluorescein을 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시킨 후 221 mM AAPH 25 μL 를 가하였다. 반응 용액의 형광은 fluorescence microplate reader를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 60분 동안 5분 간격으로 모니터링하였다(TECAN Infinite 200 Pro, Tecan Austria; GmbH, Grödig, Austria). 시료의 ORAC 값은 μM trolox equivalents (TE)/100 μg sample로 표시하였다.

펩타이드 분리 및 구조 동정

펩타이드는 C_{18} column (Hypersil Gold, 250 \times 20mm, 5 μm ; Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA)이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC; Dionex UltiMate 3000; Thermo Scientific)를 이용하여 분리하였다. 펩타이드 용출은 이동상 A (0.1% TFA 함유 증류수)와 이동상 B (0.1% TFA 함유 acetonitrile)를 이용하여 선형 농도구배(0-5분, 0% B; 5-45분, 0-50% B; 45-50분, 100% B; 50-60분, 0% B) 방법으로 분리하였다. 각 분획물은 매 3분간 수집하였고 동결 건조한 다음 항산화 활성 평가를 실시하여 활성이 가장 우수한 분획물을 Superdex™ Peptide 10/300 GL column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용하여 추가 분리하였다. 펩타이드 모니터링은 215 nm와 280 nm에서 수행하였다.

펩타이드 구조 동정은 Q-TOF LC-MS/MS (사중극자비행 시간-질량분석기, maXis-HD™; Bruker Daltonics, Bremen, Germany)를 이용하여 Kim et al. (2018)이 보고한 바와 같이 분석하였다.

통계처리

실험 결과는 SigmaPlot® (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)으로 통계 처리하여 3회 측정된 값의 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 유의성 검정은 Student *t*-test 또는 분산분석(ANOVA)를 한 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 따라 분석하여 유의적 차이를 검증하였다.

결 과

연자육 단백질 분리, 펩타이드 제조 및 hydroxyl radical 소거능

알칼리 가용화 방법으로 연자육으로부터 단백질을 분리하였다. 그 결과 단백질 분리 수율은 25.32% 분리된 단백질의 단백질 함량은 82%로 측정되었다. Pepsin과 Alcalase® 효소를 사용하여 제조한 연자육 단백질유래 펩타이드의 hydroxyl radical 소거 활성은 Table 1에 나타내었다. Alcalase® 효소를 사용하여

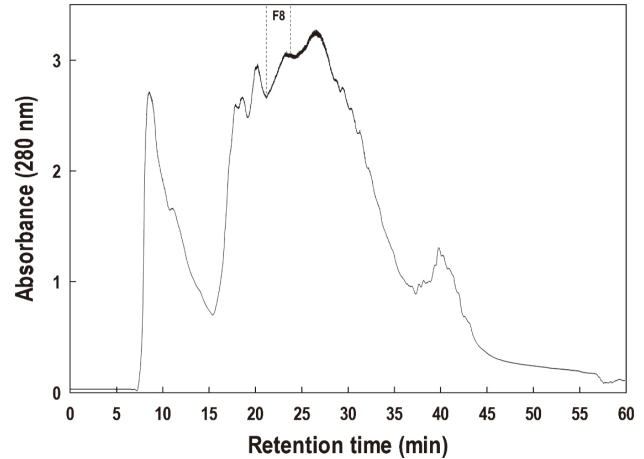


Fig. 1. Purification of antioxidant peptides from NNAH on HPLC equipped with a Hypersil Gold C_{18} column. F8 indicates the fraction showing highest hydroxyl radical scavenging activity. NNAH, *Nelumbo nucifera* seed protein-Alcalase® hydrolysates; HPLC, High performance liquid chromatography.

제조한 펩타이드의 hydroxyl radical에 대한 50% 소거 농도는 $45.12 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타났고 pepsin으로부터 제조된 펩타이드는 $55.23 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타나 Alcalase® 효소에 의한 펩타이드가 높은 hydroxyl radical 소거 활성을 보였다. 대조구인 GSH는 $15.95 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 으로 강력한 hydroxyl radical 소거 활성 보여주었다.

펩타이드의 분리, 정제 및 항산화 활성

Hydroxyl radical 소거 활성이 우수한 Alcalase® 효소 가수분해물을 사용하여 분리 및 정제를 시작하였다. C_{18} column이 장착된 HPLC에서 총 16개의 분획물을 얻었고 동결 건조 후 hydroxyl radical 소거 활성을 측정하였다(Fig. 1). 분획물들의 hydroxyl radical에 대한 소거 활성은 다양하게 나타났으며 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 F8 분획물이 42.35%로 가장 우수한 hydroxyl radical 소거 활성을 보였다. Hydroxyl radical 소거 활성이 우수

Table 1. EC_{50} value of lotus seed protein isolate hydrolysate for hydroxyl radical

Sample	EC_{50} **** ($\mu\text{g/mL}$)
NNAH*	45.12 ± 0.21^b
NNPH**	55.23 ± 0.12^c
GSH***	15.95 ± 0.01^a

Nelumbo nucifera* seed protein-Alcalase® hydrolysates. *Nelumbo nucifera* seed protein-pepsin hydrolysates. ***Positive control. **** EC_{50} means the concentration for eliminating 50% of hydroxyl radical. ^{a-c}Different letters represent significant differences at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Results are represented as mean \pm S.D (n=3).

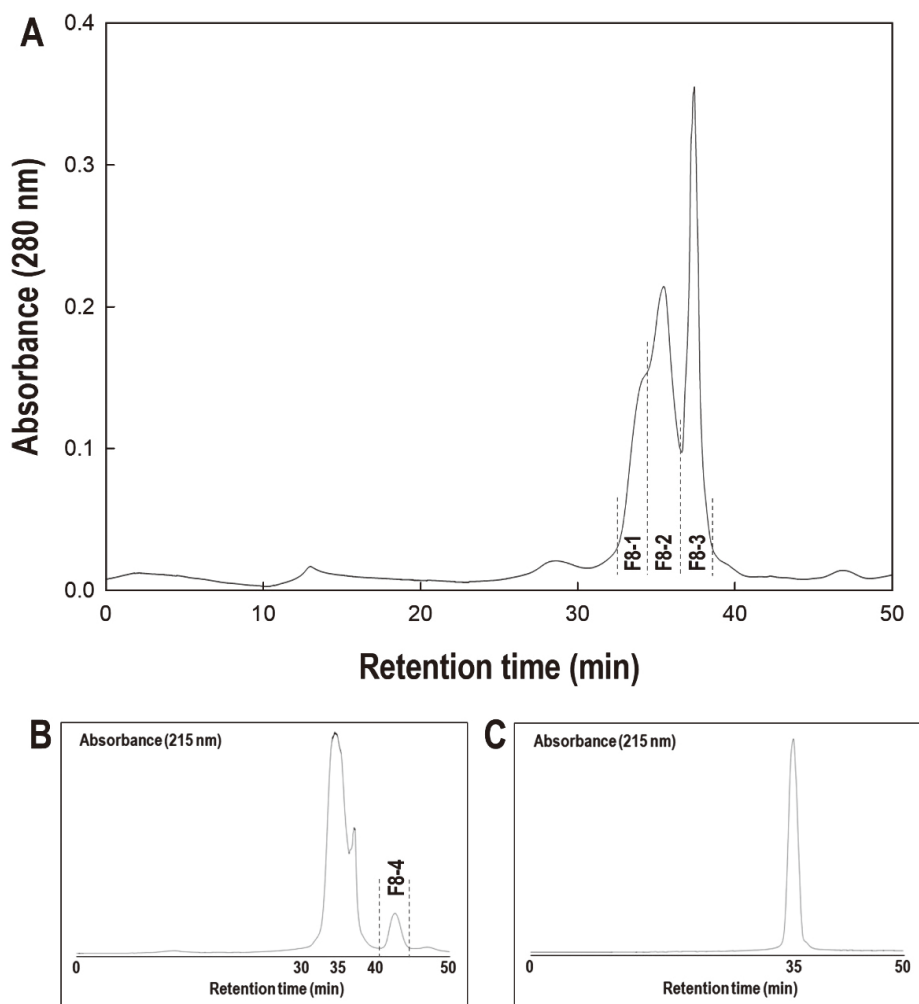


Fig. 2. Gel filtration chromatogram of the active fraction (F8) from HPLC. A, Superdex™ Peptide 10/300 GL column chromatogram detected with 280 nm; B, Superdex™ Peptide 10/300 GL column chromatogram detected with 215 nm; C, rechromatogram of F8-2 fraction. HPLC, High performance liquid chromatography.

한 F8 분획물을 Superdex™ peptide 10/300 GL column을 이용하여 분자량 크기에 따라 분리하였다. 용출된 펩타이드를 215 nm 및 280 nm에서 모니터링한 결과 retention time을 비교하여 280 nm에서 3개의 분획물 및 215 nm에서 추가 1개 분획물을 얻을 수 있었다 (Fig. 2A, 2B). 4개의 분획물을 동결 건조한 후 hydroxyl radical 소거 활성을 100 µg/mL 농도에서 측정한 결과 두 번째 분획물(F8-2)에서 89.81%로 가장 우수한 hydroxyl radical 소거 활성을 보였다(Table 2). F8-2 분획물을 동일한 조건에서 다시 용출 시킨 결과 Fig. 2C와 같이 하나의 peak를 확인할 수 있었다.

Gel filtration chromatography에서 최종 분리한 F8-2 분획물의 항산화 활성 평가를 위해 DPPH radical, hydroxyl radical 및 ORAC assay를 수행한 결과는 Table 3과 같다. F8-2 분획물의 항산화 활성은 radical을 50% 소거할 수 있는 농도(EC₅₀)로 표

시하였고 DPPH radical 및 hydroxyl radical에 대한 EC₅₀ 값은 각각 105.81±0.02 µg/mL 및 32.26±0.02 µg/mL로 결정되었다.

Table 2. Hydroxyl radical scavenging activity of the fractions from gel filtration chromatography

Fraction	% hydroxyl radical scavenging activity*
F8-1	78.05±0.19 ^c
F8-2	89.81±0.06 ^a
F8-3	85.65±0.77 ^b
F8-4	55.80±1.78 ^d

*Hydroxyl radical scavenging activity was determined at 100 µg/mL of the fraction. ^{a-d}Different letters represent significant differences at P<0.05 by Duncan's multiple range test. Results are represente as mean±S.D (n=3).

양성 대조구로 사용한 GSH의 DPPH radical 및 hydroxyl radical에 대한 EC₅₀ 값은 19.87±0.01 µg/mL 및 15.95±0.03 µg/mL로 F8-2 획분보다 우수한 항산화 활성을 나타내었다. F8-2 획분물의 ORAC 값은 7.22±0.02 µM TE/100 µg F8-2로 나타났으며 양성 대조구인 GSH는 14.17±0.03 µM TE/100 µg GSH 값을 보여 양성 대조구인 GSH이 우수한 항산화 활성을 보였다.

펩타이드의 구조 분석

F8-2 획분물에서 포함되어 있는 펩타이드 구조 분석을 위해 먼저 Q-TOF LC-MS/MS 장비에서 MS 스펙트럼을 얻었다. 획분물에는 700 Da 이하의 저분자 펩타이드로 구성되어 있음을 알 수 있었고 189.12 Da, 231.17 Da, 233.15 Da, 246.14 Da, 247.13 Da, 288.20 Da, 295.17 Da, 576.24 Da 및 638.24 Da의 peak들을 MS/MS를 수행한 후 *de novo sequencing* 방법으로 펩타이드의 구조를 분석하였다. 대표적으로 항산화 점수가 높은 295.17 Da의 MS/MS chromatogram을 Fig. 3에 나타내었다. N-terminal로부터 생성된 y-ion을 분석한 결과 m/z 295.1653-182.0809=131.0844의 질량 값은 residue mass가 131.0846인 Ile 또는 Leu을 지칭하며 나머지 생성된 y-ion=182.0809의 질량 값은 [M+H]⁺이기 때문에 Tyr (MW 181.2 Da)으로 결정하였다. 따라서 295.17 Da은 Leu-Tyr 또는 Ile-Tyr의 아미노산 서열을 가질 것으로 추정된다. 동일하게 나머지 펩타이드도 *de novo sequencing*을 이용하여 분석하였고 가능한 조합의 1차 서열을 Table 4에 나타내었다. 또한 *de novo sequencing*으로 분석된 1차 서열을 바탕으로 항산화 점수(antioxidant score)를 Conway et al. (2013)의 방법에 따라 분석하였다. 이 방법에 따르면 항산화 활성이 우수한 아미노산이 서열속에 포함되어있고 서열상 특정 위치에 있으면 펩타이드의 항산화 활성에 기여할 수 있음을 나타내며 항산화 점수가 높은 펩타이드가 항산화 활성이 우수한 것으로 보고하였다. 본 연구에서 분석한 펩타이드의 항산화 점수는 2-5.5점으로 나타났다.

고 찰

일반적으로 생리활성 펩타이드는 모단백질의 구조에 포함되어 불활성화된 상태로 존재하지만 모단백질이 분해되면 활성형 형태로 전환된다. 활성형 형태의 생리활성 펩타이드 생산에 사용되는 방법으로는 효소 분해 방법이 널리 이용되고 있으며 주로 식품 단백질로부터 제조된 생리활성 펩타이드는 항고혈

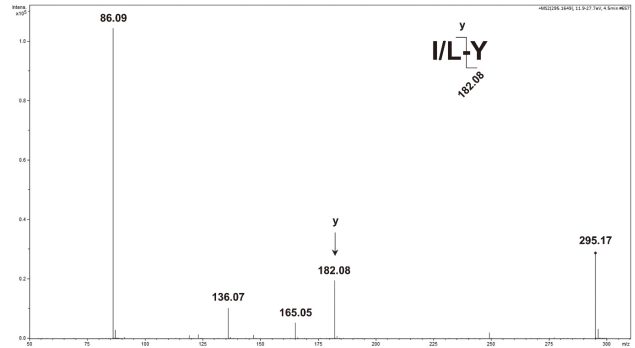


Fig. 3. Representative MS/MS profile of F8-2 fraction with m/z 295.17.

압, 항산화, 항혈전, 항노화, 면역증강, 항균 등의 다양한 생리활성을 나타낸다고 보고되고 있다(Akbarian et al., 2022). 생성되는 생리활성 펩타이드 종류는 사용된 단백질 분해 효소의 모단백질 종류에 따라 다르며, 가수분해율도 영향을 미친다고 알

Table 4. Identification and antioxidant score of antioxidant peptides from F8-2 fraction

Amino acid sequence	Observed mass	Antioxidant score
Leu-Gly (LG)	189.12	2.5
Ile-Gly (IG)		3
Ile-Val (IV)	231.17	4
Leu-Val (LV)		3.5
Thr-Ile (TI)	233.15	3
Thr-Leu (TL)		2
Asn-Leu (NL)	246.14	2
Asn-Ile (NI)		3
Asp-Ile (DI)	247.13	3
Asp-Leu (DL)		2
Arg-Ile (RI)	288.20	3
Arg-Leu (RL)		2.5
Ile-Tyr (IY)	295.17	5.5
Leu-Tyr (LY)		5
Met-Ala-Pro-Glu-Glu (MAPEE)	576.24	3
Ala-Met-Pro-Glu-Glu (AMPEE)		3
Gly-Asp-Gly-Gly-Gly-Phe-Glu (GDGGGFE)	638.24	3
Asp-Gly-Gly-Gly-Gly-Phe-Glu (DGGGGFE)		3

Table 3. EC₅₀ and ORAC values of F8-2 fraction

Sample	EC ₅₀ (µg/mL)		ORAC (µM TE/100 µg sample)
	DPPH radical	Hydroxyl radical	
F8-2	105.81±0.02	32.26±0.02	7.22±0.02
GSH**	19.87±0.01*	15.95±0.03*	14.17±0.03*

*P<0.05 vs F8-2. **Positive control. ORAC, oxygen radical absorbance capacity. Results are represented as mean±S.D (n=3).

려져 있다(Tadesse and Emire, 2020). 본 연구에서는 연자육의 단백질을 활용할 목적으로 연자육으로부터 알칼리 가용화 방법으로 단백질을 분리한 후 두 가지의 단백질 분해 효소를 사용하여 다양한 항산화 펩타이드가 생성되도록 하였다. 항산화 활성 평가에는 체내에서 생성되는 활성산소종 중 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical을 대상으로 소거 활성을 평가하였고 Alcalase®에 의해 생성된 펩타이드가 항산화 활성이 더욱 우수함을 알 수 있었다. 따라서 역상 크로마토그래피와 크기-배제 크로마토그래피를 이용하여 활성 펩타이드 분획물을 분리하였고 활성 획분의 항산화 활성 평가는 전자공여능을 측정하는 DPPH radical 소거능과 수소 원자 전이 반응에 기반한 hydroxyl radical 소거능과 ORAC assay를 이용하여 평가하였다. 본 연구에서 분리한 활성 분획물은 양성 대조구인 GSH보다는 항산화 활성이 조금 낮았지만 일반적으로 단백질 효소 분해에 의한 가수분해물 형태의 항산화 펩타이드 보다는 우수한 항산화 활성을 나타내었다(Liu et al., 2021; Norman et al., 2022; Zhi et al., 2022). 따라서 활성 분획물에는 전자공여능 및 수소 원자 전이 관여하는 펩타이드가 다수 포함되어 있음을 추정할 수 있었다. Q-TOF LC-MS/MS 분석으로 활성 분획물에 포함되어 있는 항산화 펩타이드의 구조를 동정하였으며 최종 18개의 펩타이드 서열을 확인하였는데 대부분이 dipeptide로 구성되어 있었다. 항산화 펩타이드의 작용 기전은 아직까지 불분명하지만 대체적으로 분자량, 서열 및 수소성 성질이 영향을 준다고 알려져 있다(Sarmadi and Ismail, 2010). 특히 항산화 활성을 나타내는 아미노산인 Tyr, Trp, Met, Leu, Cys, His, Phe 및 Pro 등이 펩타이드 서열에 포함되어 있으면 항산화 활성에 긍정적인 영향을 준다고 보고되었다(Udenigwe and Aluko, 2011). 분자량 측면에서는 대체적으로 1,000 Da 미만의 펩타이드가 우수한 항산화 활성을 나타낸다고 알려져 있다(Akbarian et al., 2022). Conway et al. (2013)에 따르면 항산화 점수는 펩타이드 서열에 Trp 이 포함되어 있으면 5점, Tyr이 포함되어 있으면 2점, 펩타이드가 2-10의 아미노산으로 구성되어 있으면 2점, 그 외 His, Lys, Pro, Phe, Val, Ile을 포함하고 있으면 1점, N-terminal에 Tyr, Trp, Val, Leu가 있으면 0.5점, C-terminal에 Trp, Try, Met가 있으면 0.5점을 부여하였다. 본 연구에서는 확인된 dipeptides에는 항산화 활성에 긍정적인 영향을 주는 Tyr, Leu, Ile, Val 등을 포함하고 있었다. 특히 강력한 전자공여능 및 수소 원자 전이 능력을 가지고 있는 Tyr을 포함하는 항산화 펩타이드인 Ile-Tyr, Leu-Tyr은 높은 항산화 점수를 나타내어 활성 분획물의 항산화 활성에 크게 기여했을 것으로 판단된다(Xu et al., 2017). 문헌 조사를 통해 확인한 결과 Leu-Tyr은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) free radical에 대한 소거 활성이 보고되었으며 angiotensin converting enzyme 저해 활성 보여 항고혈압 펩타이드로서 활용 가능할 것으로 나타났다(Song et al., 2020; Liu et al., 2021). 그 외 다른 펩타이드에 대한 정보는 없어 추후 항산화 점수가 높은 펩

타이드를 합성하여 항산화 활성 평가 및 세포실험 나아가 동물 실험으로 항산화 효능을 검증하여 기능성 식품 소재로서 활용 가능성을 검토할 필요가 있을 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2022년 부경대학교 국립대학육성사업 지원비에 의하여 연구되었음.

References

- Admassu H, Gasmalla MAA, Yang R and Zhao W. 2018. Bioactive peptides derived from seaweed protein and their health benefits: Antihypertensive, antioxidant, and antidiabetic properties. *J Food Sci* 83, 6-16. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14011>.
- Akbarian M, Khani A, Eghbalpour S and Uversky VN. 2022. Bioactive peptides: Synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. *Int J Mol Sci* 23, <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>.
- Bangar PS, Dunno K, Kumar M, Mostafa H and Maqsood S. 2022. A comprehensive review on lotus seeds (*Nelumbo nucifera Gaertn.*): Nutritional composition, health-related bioactive properties, and industrial applications. *J Funct Foods* 89, 104937. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104937>.
- Barbosa ML, de Meneses A-APM, de Aguiar RPS, de Castro e Sousa JM, de Carvalho Melo Cavalcante AA and Maluf SW. 2020. Oxidative stress, antioxidant defense and depressive disorders: A systematic review of biochemical and molecular markers. *Neurol Psychiatry Brain Res* 36, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.npbr.2020.02.006>.
- Cho WK, Yang HJ and Ma JY. 2022. Lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn.*) leaf water extracts suppress influenza a viral infection via inhibition of neuraminidase and hemagglutinin. *J Funct Foods* 91, 105019. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105019>.
- Conway V, Gauthier SF and Pouliot Y. 2013. Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. *J Agric Food Chem* 61, 364-372. <https://doi.org/10.1021/jf304309g>.
- Hao L, Wang X, Cao Y, Xu J and Xue C. 2022. A comprehensive review of oyster peptides: Preparation, characterisation and bioactivities. *Rev Aquac* 14, 120-138. <https://doi.org/10.1111/raq.12588>.
- Kim SS, Ahn CB, Moon SW and Je JY. 2018. Purification and antioxidant activities of peptides from sea squirt (*Halicynthia roretzi*) protein hydrolysates using pepsin hydrolysis. *Food Biosci* 25, 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.010>.
- Kim YS, Ahn CB and Je JY. 2016. Anti-inflammatory action of high molecular weight *Mytilus edulis* hydrolysates fraction in LPS-induced RAW264.7 macrophage via NF-κB

- and MAPK pathways. *Food Chem* 202, 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.114>.
- Lei Y, Zhang Y, Wang Q, Zheng B, Miao S and Lu X. 2022. Structural characterization and in vitro analysis of the prebiotic activity of oligosaccharides from lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn.*) seeds. *Food Chem* 388, 133045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133045>.
- Li X. 2013. Solvent effects and improvements in the deoxyribose degradation assay for hydroxyl radical-scavenging. *Food Chem* 141, 2083-2088. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.084>.
- Liu WY, Zhang JT, Miyakawa T, Li GM, Gu RZ and Tanokura M. 2021. Antioxidant properties and inhibition of angiotensin-converting enzyme by highly active peptides from wheat gluten. *Sci Rep* 11, 5206. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84820-7>.
- Lorenzo JM, Munekata PES, Gómez B, Barba FJ, Mora L, Pérez-Santaescolástica C and Toldrá F. 2018. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products - A review. *Trends Food Sci Technol* 79, 136-147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>.
- Marasinghe CK, Jung WK and Je JY. 2022. Anti-inflammatory action of ark shell (*Scapharca subcrenata*) protein hydrolysate in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophages. *J Food Biochem* 46, e14493. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14493>.
- Noman A, Wang Y, Zhang C, Yin L and Abed SM. 2022. Fractionation and purification of antioxidant peptides from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) protein hydrolysates prepared using papain and alcalase 2.4L. *Arabian J Chem* 15, 104368. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104368>.
- Oh Y, Ahn CB, Nam KH, Kim YK, Yoon NY and Je JY. 2019. Amino acid composition, antioxidant, and cytoprotective effect of blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate through the inhibition of caspase-3 activation in oxidative stress-mediated endothelial cell injury. *Mar Drugs* 17, 135. <https://doi.org/10.3390/md17020135>.
- Oh Y, Ahn CB and Je JY. 2020. Blue Mussel-Derived Peptides PIISVYWK and FSVVPSPK Trigger Wnt/beta-Catenin Signaling-Mediated Osteogenesis in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Mar Drugs* 18, 510. <https://doi.org/10.3390/md18100510>.
- Sarmadi BH and Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31, 1949-1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>.
- Shin HJ, Kim M, Shin BS and Bae S. 2022. Anti-melanogenic effect of lotus seed and seedpod extracts via downregulation of tyrosinase stability in B16F10 murine melanoma cells. *Asian J Beauty Cosmetol* 20, 111-120. <https://doi.org/10.20402/ajbc.2022.0004>.
- Song CC, Qiao BW, Zhang Q, Wang CX, Fu YH and Zhu BW. 2020. Study on the domain selective inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) by food-derived tyrosin-containing dipeptides. *J Food Biochem* 45, e13779. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13799>.
- Tadesse SA and Emire SA. 2020. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. *Heliyon* 6, e04765. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04765>.
- Udenigwe CC and Aluko RE. 2011. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *Int J Mol Sci* 12, 3148-3161. <https://doi.org/10.3390/ijms12053148>.
- Wen C, Zhang J, Zhang H, Duan Y and Ma H. 2020. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends Food Sci Technol* 105, 308-322. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.019>.
- Xu N, Chen G and Liu H. 2017. Antioxidative categorization of twenty amino acids based on experimental evaluation. *Molecules* 22, 2066. <https://doi.org/10.3390/molecules22122066>.
- Yu Y, Wei X, Liu Y, Dong G, Hao C, Zhang J, Jiang J, Cheng J, Liu A and Chen S. 2022. Identification and quantification of oligomeric proanthocyanidins, alkaloids, and flavonoids in lotus seeds: A potentially rich source of bioactive compounds. *Food Chem* 379, 132124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132124>.
- Zaky AA, Simal-Gandara J, Eun JB, Shim JH and Abd El-Aty AM. 2022. Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: A review. *Front Nutr* 8, 815640. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.815640>.
- Zeng HY, Cai LH, Cai XL, Wang YJ and Li YQ. 2013. Amino acid profiles and quality from lotus seed proteins. *J Sci Food Agric* 93, 1070-1075. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5848>.
- Zhi T, Li X, Sadiq FA, Mao K, Gao J, Mi S, Liu X, Deng W, Chitrakar B and Sang Y. 2022. Novel antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop (*Argopecten irradians*) mantle using enzymatic and microbial methods: Preparation, purification, identification and characterization. *LWT* 164, 113636. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113636>.
- Zulueta A, Esteve MJ and Frígola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem* 114, 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>.