

최 종
연구보고서

명태가공부산물로부터 기능성 간장의 개발
Development of Functional Fish Sauce from Alaska
Pollack Processing Wastes

명태가공부산물로부터 생리기능성 소재의 개발
Development of Biological Function Material from Alaska Pollack
Processing Wastes

명태가공부산물을 이용한 기능성 간장의 개발
Development of Functional Fish Sauce Using Alaska Pollack
Processing Wastes

연구기관

부경대학교

해양수산부



제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “명태가공부산물로부터 기능성 간장의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 11월 20일

주관연구기관명 : 부경대학교

총괄연구책임자 : 김세권(부경대학교 화학과 교수)

연 구 원 : 문성훈(부경대학교 화학과 부교수)

연 구 원 : 남경수(동국대학교 의과대학 부교수)

연 구 원 : 양현필((주)키토라이프)

연 구 원 : 장지태((주)키토라이프)

연 구 원 : 정원교, 천충길, 박지영

R.P.N.P. Rajapakse, B.E.P. Mendis

(부경대학교 화학과)

요 약 문

I. 제 목

명태가공부산물로부터 기능성 간장의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리 나라 수산물의 연간 총어획량은 3,244천톤 (2001년도)이고, 수입 및 전년도 재고량을 합친 총공급량은 4,420천톤이다. 우리 국민의 어패류 선호도의 증가 추세에 따라 수산가공공장의 가공율은 매년 증가하여 총공급량의 85%이상을 차지함으로써 상대적으로 어체가공잔사, 어뼈, 어피, 어두, 내장, 비늘 등과 같은 수산가공 잔사의 양도 증가하고 있는 실정이다. 이들 잔사는 대부분 사료로 이용되거나 폐기되어져 자원의 효율적 활용이 제대로 이루어지지 않을 뿐만 아니라 환경오염까지도 유발하고 있다. 또한, 어체의 가공잔사 이외의 가식부라도 수세 등의 공정에 의해 많은 수용성 단백질, 부상분리물 및 어유 등이 폐기액과 함께 씻겨져 나간다. 따라서 수산가공 부산물 중에 함유되어 있는 유용성분을 이용하여 부가가치가 높은 새로운 기능성 소재를 개발할 필요가 있다.

한편, 최근 식품은 생명공학 기술의 발전과 더불어 많은 과학화가 진행되어 단지 영양적 가치의 수단에서 벗어나 건강 지향적인 기능성 식품시대를 맞이하고 있다. 외국의 선진국들은 식품분야의 선진화를 위하여 안전하고 우수한 생리기능성 소재 개발에 매년 막대한 비용을 투자하고 있으며, 특히 생

리기능성 신소재를 이용하여 성인병 예방 등과 같은 기능성 식품 소재 개발을 위하여 집중적인 연구개발에 박차를 가하고 있다. 그러나, 우리나라의 식품산업은 지금까지 많은 연구노력에도 불구하고 과학적 인식의 부족과 과감한 연구투자 부족으로 인하여 많은 부분에서 상당히 낙후되어 있는 것이 사실이다. 특히 수산물로부터 새로운 기능성 신소재의 개발에 대한 국민의 요구에 부응하지 못하고 있으며, 대다수 국민들로부터 안전한 식품 요구에 과학적으로 적절하게 대처하지 못하고 있는 실정이다. 또한, 단백질의 가수분해물은 각종 가공식품이나 조미료, 삼푸, 화장품 등 기타 여러 분야에서 필수적으로 이용되고 있지만, 국내에서는 거의 단백질의 산가수분해물을 이용하고 있는 실정이다. 그러나 단백질을 산이나 알칼리로 가수분해 할 경우 tryptophan, cysteine과 같은 필수 아미노산이 손실될 뿐만 아니라 lysinoalanine과 같은 독성이 있는 부산물이 생성되어 일본을 비롯한 구미 선진국에서는 단백질의 산가수분해물의 안전성 문제가 대두되고 있다. 특히 일본에서는 거의 효소로 가수분해시킨 단백질을 이용하고 있으며, 미국에서도 단백질의 산가수분해물에 대하여 사용금지조치가 취해지고 있다.

국내장류업계는 1960년대 주택구조의 변화 등으로 도시화에 힘입어 점차 장류의 수요가 증가하기 시작하면서 1962년에는 대한장류공업협동조합이 설립되어 업계의 공동발전을 위한 구심점이 형성되었고 군수장류납품의 일괄계약 등 많은 일을 시작하였으며, 70년대에는 시장경쟁이 치열해져 중소기업체의 폐업이 속출하였으나, 1980년대는 안정을 찾기 시작하였다. 그러나, 1990년대초 산분해간장의 MCPD (3-Monochloro-1,2-propanediol) 파동으로 사회적 인 문제가 대두되어 이보다 안전한 양조간장, 효소분해간장 및 기능성간장으로 소비자의 관심이 증대되고 있다. 국내업계에서도 단백질을 산분해하여 제조되는 화학간장의 수명을 향후 5년정도 내다보고 대체간장의 개발에 노력을 기울이고 있다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 고등어 내장에

서 고효성의 복합효소를 개발하여 이 복합효소로 명태가공잔사의 단백질을 분해시켜 쓴맛이 없는 가수분해물을 얻고 이들의 생리기능성을 밝힌 다음, 독특한 맛과 향을 부여하기 위하여 패류를 자가숙성시켜 제조한 패류 발효조미액을 단백질 가수분해물과 혼합하여 천연기능성 간장을 개발하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제 1 세부과제 명태가공부산물로부터 생리기능성 소재 개발

- ▶ 어류내장으로부터 단백질 분해효소 추출조건 확립
- ▶ 어체가공잔사로부터 단백질 회수 최적조건 규명
- ▶ 효소막반응기시스템을 이용한 분자량별 분획 조건 확립
- ▶ 가수분해물로부터 항고혈압 물질 분리정제 및 구조 확인
- ▶ 가수분해물로부터 항산화 물질 분리정제 및 구조 확인
- ▶ 세포내에서의 생리활성 확인
- ▶ *in vivo* 상에서의 생리활성 확인

제 2 세부과제 명태가공부산물의 이용한 기능성 간장의 개발

- ▶ 굴을 이용한 발효조미액의 제조조건 확립
- ▶ 발효조미액의 분석방법 확립
- ▶ 자가숙성된 굴 발효조미액로부터 항고혈압물질의 분리정제 및 구조 확인
- ▶ 가수분해물과 굴 발효조미액을 이용하여 맛과 향이 좋은 기능성 간장 제조

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

● 연구개발결과

본 연구에서는 수산가공공장에서 어육을 얻기 위해 필렛 작업 (filleting) 후 발생하는 명태 frame (Alaska pollack frame)을 활용하여 고등어 내장으로 부터 추출한 고탄성 복합효소를 이용해서 가수분해하여 한외여과막 반응기를 이용하여 분자량별로 대량 분획하였으며, 이들로부터 항산화성 및 항고혈압성이 높은 펩타이드를 이온교환 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피 및 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography)로 정제하여 아미노산 배열을 결정하였으며 작용기작에 관한 특성도 확인하였다. 또한 세포배양과 SHR (spontaneously hypertensive rat)를 이용한 *in vivo* 실험으로 각각 항산화활성과 항고혈압활성을 확인하였다. 이들 생리활성 펩타이드를 본 과제의 최종목표인 기능성 천연효소분해 간장 제조에 원료로 사용하였다.

또한 폐류 중 향미성분이 뛰어난 굴을 발효를 통하여 자가분해시켜 간장의 제조시 향미성분으로 활용하였으며, 최종적으로 명태가공잔사 가수분해물과 굴 발효조미액을 이용하여 각종 상업용 천연분말성분과 잘 배합하여 기능성 천연효소분해 간장을 제조하였으며 관능검사를 통하여 제품성과 기능성이 뛰어난 기능성 천연효소분해 간장을 제조하였다.

[제 1 세부과제] 명태가공부산물로부터 생리기능성 소재 개발

1. 천연기질인 casein과 hemoglobin에 대한 고등어 내장 유래 조효소 (MICE)의

고유활성을 측정하였다. MICE의 고유활성은 casein에 대하여 0.65 U/mg protein으로 나타났으며, hemoglobin에 대하여 0.24 U/mg protein으로 나타났다. 이것은 Kim 등 (1997)이 보고한 참치유문수에서 추출한 조효소의 casein 및 hemoglobin에 대한 고유활성이 0.54, 0.197 U/mg protein 보다 높은 수치이다.

2. MICE (mackerel intestine crude enzyme)의 합성기질에 대한 활성은 trypsin의 ester 합성기질인 benzol-L-arginine ethyl ester (BAEE)에 대한 활성 (6.456 U/mg protein)이 가장 높았으며, trypsin의 nitroanilide 합성기질인 benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide-naphthylamide (BAPNA)에 대한 활성은 0.124 U/mg protein으로 비교적 낮았다. α -Chymotrypsin의 합성기질인 benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE)와 acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE)에 대한 MICE의 활성은 5.660, 0.856 U/mg protein이었다. 이러한 사실로 볼 때, 고등어 내장의 단백질 분해효소 활성은 상당히 높음을 알 수 있다. 또한, 이러한 고등어 내장의 조효소에는 trypsin 및 α -chymotrypsin의 ester 합성기질에 특이적인 활성을 나타내는 proteinase가 많이 함유되어 있음을 알 수 있다.
3. 추출한 고등어 내장 유래 조효소를 명태가공잔사 단백질을 가수분해하기 위한 pH 조건을 검토한 결과, 명태 가공잔사의 가수분해율은 pH 10.0, 반응온도 50 °C, 기질 농도 1%, 기질 대 효소비 50 : 1 (w/w)이고 반응시간은 12 h으로 결정되었으며, 이 조건에서 실시한 가수분해도는 67 % 정도로 나타났다.
4. 가수분해물들을 한외여과막 반응기에서 분자량 크기별로 분획하고 이들의 생리활성을 측정한 결과 분자량 범위가 1 kDa 이하인 APH V에서 가장 높은 항산화활성과 항고혈압활성을 나타내었다.

5. 항산화활성 펩타이드를 분리하기 위해 크로마토그래피를 이용하여 최종 분리정제 하였다.
6. 세포실험을 통하여 명태 frame 유래 항산화 펩타이드의 세포독성을 검토해 본 결과, 가수분해물을 첨가한 군에서는 모두 100% 이상의 생존율을 보였으며, 5 mg/ml의 농도에서 APH V (1 kDa 이하)의 경우 119 %의 생존율을 나타내었다. 따라서, 본 실험에 사용한 가수분해물들은 배양 간세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 또한 *t*-BHP의 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물의 항산화작용을 측정한 결과, 가수분해물 첨가군이 미첨가군에 비하여 15~28 % 정도의 세포 생존율이 증가함을 볼 수 있었다. APH V가 *t*-BHP로 유발된 세포괴사에 대한 가수분해물의 농도에 대한 항산화 효과를 검토한 결과 1.0 mg/ml 일 때 75 %의 세포 생존율을 나타내는 것으로 나타났다.
7. 항고혈압활성을 나타내는 펩타이드를 크로마토그래피를 이용하여 분리정제 하였으며, 분자량은 882 Da으로 나타났고 아미노산 서열은 Phe-Gly-Ala-Ser-Thr-Arg-Gly-Ala의 여덟 개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 정제된 펩타이드의 ACE 저해 패턴을 Lineweaver-Burk plot으로 측정한 결과 non-competitive inhibition을 나타내었고, 최종 항고혈압 활성이 IC₅₀ 값이 1.47 μM로 아주 우수하였다.
8. 선천적으로 고혈압을 유발시킨 spontaneously hypertensive rats (SHR)를 이용하여 *in vivo*에서 항고혈압활성을 측정하기 위해서 체중 1 kg당 10 mg의 펩타이드를 경구투여한 결과, 시판용 혈압강화제인 captopril의 효과보다는 다소 낮으나 투여한 후 3시간 후 23 mmHg의 혈압 강하가 나타났다. 따라서

이 펩타이드를 기능성 천연효소분해 간장의 재료로 이용하면 그 활용이 기대된다.

9. 본 과제 of 최종목표인 기능성 천연효소분해간장을 제조하기 위하여 생리활성 성분으로써 수산가공잔사인 명태 frame의 가수분해물을 이용하였으며, 효소로 가수분해한 결과 APH V 획분에서 가장 우수한 항산화활성과 항고혈압 활성이 나타나 이를 간장의 제조 원료로 결정하였다.

[제 2 세부과제] 명태가공부산물 of 이용한 기능성 간장 of 개발

1. 삼천포 어패류 시장에서 구입한 굴 (*Crassostrea gigas*)을 수회 수세한 후 30분 정도 물을 뺀 다음, 무게를 측정하여 소금을 25 % (w/w)되게 첨가한 후 20℃에서 숙성시킨 후 월별로 달여서 발효조미액을 만들어 시료로 사용하였다. 또한 굴 발효조미액 of 최적 제조 조건을 검토하기 위하여 월별로 굴 발효조미액 of 성분분석을 실시하였고, 이들의 생리활성도 검토하였다.
2. 굴 발효조미액 of 구성 아미노산 of 경우 glutamic acid, aspartic acid, glycine, proline 및 lysine of 함량이 비교적 높았으며, 숙성기간이 경과함에 따라 threonine, glutamic acid, alanine, lysine of 함량은 감소하였으며, valine, aspartic acid, phenylalanine 및 leucine of 함량은 증가하였다. 월별로 다른 굴 발효조미액 of 유리아미노산 조성분석에 대한 결과, 월별로 다른 큰 차이는 없었지만 최근 동맥경화, 고혈압, 뇌졸중 및 심부전 등의 성인병에 유효한 생리기능성 아미노산으로 밝혀진 taurine이 14.6% 정도 of 높은 함량을 나타내었고 다음으로 glutamic acid, alanine 및 proline 등이 많이 함유되어 있었다. Taurine of 함량이 높은 굴 발효조미액으로 천연 기능성 간장 of 제조시 그 활용이 기대된다. 굴 발효조미액 of 핵산관련물질 of 경우 발효과정을 지나면서 ATP of 양

은 줄어들고 ADP, AMP, IMP, inosine 및 hypoxanthine의 함량이 증가하였으며 특히 발효과정이 지날수록 IMP의 양이 축적되었다. IMP는 그 자체가 정미성분일 뿐만 아니라 열에 비교적 안정하며 glutamic acid와 같은 아미노산과 공존시 맛의 상승작용을 일으키는 것으로 알려져 있어 간장의 제조시 그 성분의 활용이 기대된다. 이와 같이 숙성기간에 따라 단백질, 당의 함량이 변할 뿐만 아니라 구성아미노산, 유리 아미노산 및 핵산관련물질의 함량에서도 차이가 나타났다.

3. 굴 발효조미액으로부터 생리활성을 검토한 결과, 6개월까지 숙성시킨 발효조미액에서 항고혈압활성이 높았다. 항고혈압활성을 나타내는 물질을 크로마토그래피를 이용하여 분리 정제한 결과 그 활성은 0.0874 mg/ml 였고, SHR을 이용한 *in vivo*에서의 항고혈압 활성 측정에서는 쥐의 체중 1 kg당 10 mg의 ACE 저해활성 조미액을 경구투여한 결과, 투여한 후 3시간에서 10 mmHg의 혈압을 강하하였다. 또한 굴 발효조미액의 ACE에 대한 저해패턴을 Lineweaver-Burk plot으로 측정한 결과 경쟁적 저해패턴을 보였다.
4. 굴 발효조미액의 배양 정상 간세포에서 세포독성을 측정한 결과, 5 mg/ml에서 약 110% 정도의 세포 생존율을 보여 굴 발효조미액은 세포독성이 없는 것으로 나타났다. 굴 발효조미액의 항암활성을 간암 (Hep3B), 자궁경부암 (HeLa) 및 폐암 (A549) 세포에 대한 항암활성을 측정한 결과 폐암 세포에서 약 15% 정도의 항암활성을 나타내었다. 또한 굴 발효조미액의 NCI-H460 human lung cell에 대한 apoptosis의 활성을 검토한 결과 약 30% 정도의 apoptosis를 유도하였고 flow cytometry를 통한 cell cycle 분석을 통하여 G2/M기를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 굴 발효조미액을 간장의 제조시 첨가하면 그 활용이 기대된다.

5. 이상의 결과로부터 명태가공잔사 가수분해물과 굴 발효조미액 (5, 10 및 15% 첨가)을 이용하여 기능성 천연효소분해 간장을 제조하였다. 먼저 항산화 및 항고혈압 활성을 가진 펩타이드들이 존재하는 명태가공잔사의 단백질 가수분해물에 식염, 설탕, 포도당, 핵산, 검은 후추분말, 카라멜 분말, 감초, 생강분말, 마늘분말, 양파분말, 양조식초 및 과당을 첨가하여 조미간장을 제조하였고, 여기에 굴 발효조미액을 5, 10 및 15%를 첨가하여 기능성 천연효소분해 간장을 제조하였다. 관능검사를 통하여 맛, 색깔 및 향을 시판 화학간장 및 양조간장과 비교한 결과 품질이 우수하였고 특히 굴 발효조미액이 10% 정도 첨가하여도 상품으로 이용 가능한 제품을 만들 수 있었다.

● 활용에 대한 건의

최근 식품은 생명공학 기술의 발전과 더불어 많은 과학화가 진행되어 단지 영양적 가치의 수단에서 벗어나 건강지향적인 기능성 식품시대를 맞이하고 있다. 외국의 선진국들은 식품분야의 선진화를 위하여 안전하고 우수한 생리기능성 소재 개발에 매년 막대한 비용을 투자하고 있으며, 특히 생리기능성 신소재를 이용하여 성인병 예방 등과 같은 기능성 식품 소재 개발을 위하여 집중적인 연구개발에 박차를 가하고 있다. 그러나, 우리나라의 식품산업은 지금까지 많은 연구노력에도 불구하고 과학적 인식의 부족과 과감한 연구투자 부족으로 인하여 많은 부분에서 상당히 낙후되어 있는 것이 사실이다. 특히 수산물로부터 새로운 기능성 신소재의 개발에 대한 국민의 요구에 부응하지 못하고 있으며, 대다수 국민들로부터 안전한 식품 요구에 과학적으로 적절하게 대처하지 못하고 있는 실정이다. 또한 국내 장류업계는 대부분 산분해간장과 양조간장을 혼합한 혼합간장을 제조하고 있으나, 대두박을 산분해시 발암물질인 MCPD (3-Monochloro-1,2-propanediol)가 발생하고 필수아미노산의 소실뿐만 아니라 독성물질인 lysinoalanine의 생성되어 국민의

건강에 위협을 주고 있다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 고등어 내장에서 고효성의 복합효소를 개발하여 이 복합효소로 명태가공잔사의 단백질을 분해시켜 쓴맛이 없는 가수분해물을 얻고 이들의 생리기능성을 밝힌 다음, 독특한 맛과 향을 부여하기 위하여 굴을 자가숙성시켜 제조한 굴 발효조미액을 단백질 가수분해물과 혼합하여 천연기능성 간장을 개발하고자 하였다. 그 결과 맛과 향이 우수한 천연 효소분해 간장을 제조할 수 있었고 이를 바탕으로 산업화가 가능할 것으로 판단된다.

목 차

제 1 세부과제 명태가공부산물로부터 생리기능성 소재 개발

제 1 장 서 론	1
제 2 장 재료 및 방법	7
1. 재료	7
2. 고등어 내장으로부터 조효소의 추출 및 활성측정	8
2.1 고등어내장으로부터 조효소의 추출	8
2.2 고등어 내장에서 추출한 조효소의 활성 측정	10
2.2.1. 천연기질에 대한 활성 측정	10
2.2.2. 합성기질에 대한 활성측정	11
2.2.2.1. Trypsin에 대한 합성기질의 활성 측정	11
2.2.2.2. α -Chymotrypsin에 대한 합성기질의 활성 측정	12
3. 명태 frame 단백질에 대한 최적 가수분해조건 검토	12
3.1. 일반성분 분석	13
3.2. 가수분해도 측정	13
3.3. pH 효과	13
3.4. 온도에 대한 효과	13
3.5. 기질농도에 대한 효과	14
3.6. 기질 대 효소비에 대한 효과	14
3.7. 반응시간에 대한 효과	14

3.8. 명태 frame 단백질 가수분해물의 분자량별 분획	14
4. 가수분해물에 대한 항산화활성 측정	14
4.1. Ferric thiocyanate method	15
4.2. Radical scavenging activity (RSA) 측정	15
4.3. 농도에 따른 항산화력 측정	15
4.4. 상승효과 측정	15
4.5. 세포배양계에서의 항산화효과	16
4.5.1. 세포배양	16
4.5.2. 세포정량	16
4.5.3. 항산화활성물질의 세포독성 측정	16
4.5.4. t-BHP 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물의 효과	17
4.5.5. t-BHP의 세포괴사에 대한 가수분해물의 농도별 효과	17
5. 항고혈압 활성 측정	17
5.1. ACE 저해활성을 통한 항고혈압활성 측정	18
5.2. <i>In vivo</i> 에 의한 혈압강하활성 측정	19
5.3. ACE에 대한 저해 패턴의 측정	19
6. 생리기능성 물질의 분리, 정제 및 특성	19
6.1. 이온 크로마토그래피에 의한 분리	19
6.2. 겔여과 크로마토그래피	20
6.3. HPLC를 이용한 생리활성물질의 최종 분리 및 정제	20
6.4. 생리활성 펩타이드의 구성아미노산 분석	20
6.5. 생리활성 펩타이드의 아미노산 서열분석	21
제 3 장 결과 및 고찰	22
1. 명태 frame의 일반성분 분석	22
2. 고등어 내장 유래 조효소의 추출	22

2.1 천연기질에 대한 조효소의 활성화	22
2.2 합성기질에 대한 활성화	25
3. 명태 frame 단백질에 대한 최적 가수분해 조건 검토	27
3.1. 가수분해에 대한 pH의 효과	27
3.2. 가수분해에 대한 온도 효과	27
3.3. 기질농도에 따른 가수분해 효과	30
3.4. 기질 대 효소비에 따른 가수분해 효과	30
3.5. 가수분해에 대한 반응시간의 효과	33
4. 명태 frame 단백질 가수분해물에 대한 생리활성 검토	35
4.1. MICE에 의한 명태 frame 가수분해물의 항산화 활성화	35
4.2. Radical scavenging activity (RSA) 측정	35
4.3. 농도에 따른 항산화 활성화 측정	37
4.4. 가수분해물의 상승효과	41
5. 명태 frame 가수분해물로부터 항산화활성 펩타이드의 분리 및 정제 ..	43
5.1 항산화활성 펩타이드의 분리 및 정제	43
5.1.1. 이온 크로마토그래피	44
5.1.2. 겔 크로마토그래피	44
5.1.3. HPLC에 의한 분리	44
5.1.4. 항산화 펩타이드의 아미노산 조성 및 구조분석	47
5.2. 세포 배양계에서 명태 frame 가수분해물의 항산화활성 검토	50
5.2.1. 배양 정상간세포에 대한 항산화활성 펩타이드의 세포독성	50
5.2.2. t-BHP 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물의 항산화작용	50
5.2.3. t-BHP로 유발된 세포괴사에 대한 가수분해물의 농도에 대한 항산화 효과	53
6. 명태 frame 가수분해물로부터 항고혈압 펩타이드의 분리 및 정제	55
6.1. 이온 크로마토그래피	55

6.2. 겔 크로마토그래피	55
6.3. HPLC에 의한 분리	57
6.4. ACE 저해 펩타이드의 저해 메카니즘 결정	59
6.5. ACE 저해 펩타이드이 아미노산 서열 결정	66
6.6. ACE 저해활성 펩타이드의 <i>in vivo</i> 에서 혈압강하 활성측정	68
제 4 장 요약	71
제 5 장 참고문헌	74

제 2 세부과제 명태가공부산물을 이용한 기능성 간장의 개발

제 1 장 서 론	83
제 2 장 재료 및 방법	86
1. 재료	86
2. 굴을 이용한 발효조미액의 제조	87
3. 굴 발효조미액의 성분분석	87
3.1. 일반성분 분석	87
3.2. 구성아미노산 분석	87
3.3. 유리아미노산 분석	87
3.4. 핵산관련물질 분석	88
4. 굴 발효조미액 성분의 생리활성 검토	88
4.1. 굴 발효조미액의 항고혈압활성	88
4.1.1. ACE 저해활성을 통한 항고혈압활성 측정	88
4.1.2. <i>In vivo</i> 에 의한 혈압강하활성 측정	89
4.1.3. ACE에 대한 저해 패턴의 측정	89
4.2. 항암활성 측정	89
4.2.1. 세포배양	89
4.2.2. 세포정량	90
4.2.3. 세포증식능 측정에 의한 항암활성 측정	90
4.3. Apoptosis 유도활성	90
4.3.1. 형태학적 분석	90
4.3.2. DNA 분절화 분석 (DNA fragmentation analysis)	91

4.3.3. Flow cytometry에 의한 세포주기 분석	91
5. 굴 발효조미액으로부터 생리활성 펩타이드의 분리 및 정제	92
5.1. 이온교환 크로마토그래피	92
5.2. 겔여과 크로마토그래피	92
5.3. HPLC를 이용한 생리활성물질의 최종 분리 및 정제	92
6. 명태 frame 단백질 가수분해물과 굴 발효조미액을 이용한 기능성 천연 효소분해 간장의 제조	93
7. 관능평가	93
제 3 장 결과 및 고찰	95
1. 굴을 이용한 발효조미액의 제조	95
1.1. 발효조미액의 제조	95
1.2. 발효조미액의 일반성분	95
1.3. 발효조미액의 구성아미노산 분석	95
1.4. 굴 발효조미액의 유리아미노산 분석	98
1.5. 굴 발효조미액의 핵산관련물질 분석	98
2. 자가숙성된 굴 발효조미액으로부터 생리활성 탐색	101
3. 굴 발효조미액으로부터 항고혈압 물질의 분리 및 정제	101
3.1. 이온 크로마토그래피에 의한 ACE저해 펩타이드의 분리·정제 ...	101
3.2. 겔 크로마토그래피를 이용한 ACE저해 펩타이드의 분리·정제 ...	104
3.3. 고성능 액체크로마토그래피에 의한 분리	104
3.4. ACE 저해 펩타이드의 저해 메카니즘 결정	112
3.5. ACE 저해활성 펩타이드의 <i>in vivo</i> 에서 혈압강하 활성측정	112
4. 굴 발효조미액의 항암활성	112
4.1. 배양 정상간세포에 대한 발효조미액의 세포독성	115
4.2. 굴 발효조미액의 항암활성	115

4.3. 굴 발효조미액의 apoptosis 유도활성	118
5. 명태 frame 단백질 가수분해물과 굴 발효조미액을 이용한 기능성 천연 효소분해 간장의 제조	121
제 4 장 요약	125
제 5 장 참고문헌	128

제 1 세부과제

명태가공부산물로부터 생리기능성 소재의 개발

**Development of Biological Function Material from Alaska
Pollack Processing Wastes**

제 1 장 서 론

우리나라의 해역은 육지면적의 4.5배이며, 생물자원 또한 30 여만종으로 육지생물의 7배정도로 그 경제적 가치는 연간 100조원으로 추정된다. 현재 육상 생물에서의 기능성, 생리활성 물질의 탐색은 한계점에 도달하였다. 통상적으로 해양에서 가장 많은 항암 선도물질이 발견되고 있으며, 그 종의 다양성과 육상과는 다른 특이한 생태계를 이루는 환경 때문에 육상생물이 나타내지 못하는 새로운 기능을 갖는 물질을 다양하게 함유하고 있다. 그러나, 이러한 잠재적인 생리활성을 가지는 생물종의 다양성과 풍부함에도 불구하고 해양생물로부터 생리활성물질 및 기능성 물질의 탐색에 대한 연구는 초보적인 수준이라 할 수 있다. 선진국의 경우 이미 관심의 초점은 해양 생물 쪽으로 기울어져 집중적인 연구를 하는 추세이나, 우리나라에서는 아직 이들에 대한 기초연구가 미흡한 실정이다. 현재 생물 및 생명공학 산업은 매우 빠른 성장으로 발전되어 있으므로 해양생물을 이용한 생리활성물질, 기능성 물질의 개발은 신소재 제공 및 기술한계의 돌파구로서 가장 적합하며, 해양 생명공학으로부터 창출되는 제품의 가치는 여타 산업부문보다 높은 것으로 평가되고 있어 우리나라도 이에 대한 연구가 시급한 실정이다.

우리나라 수산물의 연간 총어획량은 3,244천톤 (2001년도)이고, 수입 및 전년도 재고량을 합친 총공급량은 4,420천톤이다. 우리 국민의 어패류 선호도의 증가 추세에 따라 수산가공공장의 가공율은 매년 증가하여 총공급량의 85%이상을 차지함으로써 상대적으로 어체가공잔사, 어뼈, 어피, 어두, 내장, 비늘 등과 같은 수산가공 잔사의 양도 증가하고 있는 실정이다. 이들 잔사는 대부분 사료로 이용되거나 폐기되어져 자원의 효율적 활용이 제대로 이루어지지 않을 뿐만 아니라 환경오염까지도 유발하고 있다. 또한, 어체의 가공잔사 이외의 가식부라도 수세 등의 공정에 의해 많은 수용성 단백질, 부상분리

물 및 어유 등이 폐기액과 함께 씻겨져 나간다. 따라서 수산가공 부산물 중에 함유되어 있는 유용성분을 이용하여 부가가치가 높은 새로운 기능성 소재를 개발할 필요가 있다. 또한 해양생물로부터 유래한 생리활성물질은 그 양이 적어 경제적 효과가 미미하므로 잠재적인 생리활성물질인 당, 단백질, 지질 등이 많이 함유되어 있는 수산가공 부산물을 이용하여 생리활성물질을 개발하는 것은 그 경제적 효과가 엄청날 것으로 판단된다.

최근 기능성을 갖는 단백질의 수요가 늘어남에 따라 단백질의 기능성을 개량하려는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 또한 단백질 가수분해물에 존재하는 생리활성 펩타이드의 탐색에 관한 연구도 시도되고 있다 (Whitaker 등, 1977; Kinesella 등, 1987; Quaglia 등, 1987; Casteels 등, 1989; Benson 등, 1990; Uesaka 등, 1991).

생리활성 펩타이드 연구에 관한 역사는 1889년에 당뇨병의 발병이 췌장에 존재하는 물질의 결핍에 의해 일어난다는 사실이 개의 췌장을 절제하여 얻은 결과로부터 최초로 입증되었으며, 1895년에는 뇌하수체 추출물 중에 혈압을 상승시키는 물질과 항이뇨작용을 나타내는 물질이 함유되어 있다는 것도 증명되었다 (Fujino 등, 1986). 그 후 이러한 물질들에 대한 화학적 연구가 진행되어 펩타이드계 호르몬으로서 최초로 vasopressin과 oxytocin의 화학구조가 해명되었고, 다음으로 인슐린, 부신피질자극 호르몬인 adrenocorticotrop hormone (ACTH)의 구조가 해명되었으며, 또한 혈압상승 물질로서 angiotensin의 구조가 밝혀졌다. 화학적 구조해명과 병행하여 이들 펩타이드계 호르몬으로서 최초에 합성된 것은 oxytocin (Vigneaud 등, 1953)과 vasopressin (Vigneaud 등, 1954) 등이 있다. 그리고 1960년대에 화학적으로 합성한 이들 펩타이드들의 생리활성을 연구한 결과, vasopressin은 미약하지만 oxytocin의 자궁수축 및 유즙분비작용을 나타내었으며, 또한 oxytocin은 약하게 vasopressin의 항이뇨작용을 보여 천연 추출물질에서 상호 미량의 물질이 혼재되어 있기 때문인 것으로 이해되었던 생리활성작용이 이들 펩타이

드의 본질적인 구조에서 기인된 것으로 밝혀졌다. 즉, 펩타이드의 종류에 따라 다른 생리활성 작용을 발현하는데 펩타이드를 이루고 있는 모든 아미노산 잔기가 활성을 나타내는 것이 아니라 특정 잔기의 펩타이드에서 생리활성 작용을 나타내는 것으로 확인되었다.

고혈압은 발병과 혈압의 유지에 많은 인자가 관여하기 때문에 지금까지 수많은 연구에도 불구하고 아직 그 기전이 완전하게 밝혀져 있지는 않지만 인체에서 혈압을 조절하는 기구인 renin-angiotensin system과 kallikrein-kinin system의 항상성이 유지되지 않을 때 혈압조절의 문제가 생기는 것으로 알려져 있다 (Saxena, 1992). 현재에는 이 두 시스템에 관여하는 angiotensin I converting enzyme (ACE)의 저해제 연구가 고혈압 치료제로서의 개발 가능성으로 제시되고 있다. 즉 ACE는 renin-angiotensin system의 angiotensin I의 C-말단의 dipeptide를 절단하여 octapeptide인 angiotensin II로 전환시키는데, 이 angiotensin II는 강력한 혈관수축작용을 가지며, 또한 ACE는 혈관 확장 작용을 갖는 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화 시킴으로써 혈압을 상승시키는 역할을 한다 (Ondetti 등, 1982; Ehlers 등, 1990). 1965년 Ferreira는 대형 독사의 독액중에서 bradykinin의 활성을 강화시키는 물질이 있다는 것을 보고하였고, 1968년에는 Vane에 의해 ACE를 저해시키는 물질이 동일한 뱀독에서 확인되었다. 그 후 이 두 물질의 구조결정에 성공함으로써 동일한 펩타이드로 확인되었다. 이로 인하여 ACE의 저해제에 대한 연구가 활발히 진행되었는데, Squibb사의 Ondetti 등 (1977) 강력한 경구용 혈압강화제인 captopril을 개발하였으나 단백뇨증과 무과립구증 등의 치명적인 부작용이 문제점으로 발견되었다. 따라서 이를 극복하기 위해 다양한 captopril 유도체가 개발되었으나 이를 완전히 극복하기 힘들었다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해서 최근에는 단백질의 효소적 가수분해물로부터 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있는데 casein 분해물 (Maruyama 등, 1982), zein (Miyoshi 등, 1991a), 대두 (Kawamura, 1989), 정어리육 (Suetsuna 등, 1986), 가다랑어육 (Kohama 등,

1991) 및 내장 (Fujii 등, 1993) 등이 있으며, 미생물 유래의 ACE 저해제는 Yamato 등 (1986)이 발견한 *Streptomyces* K-26과 Koguchi 등 (1986)이 발견한 *Actinomadura spiculospora* 등에서 추출한 추출물에서 ACE 저해활성이 있다고 보고되었으며, 특히 *Streptomyces* K-26은 *in vitro*에서 captopril의 ACE 저해활성과 비슷한 활성을 나타내었다고 하였다.

국내에서는 된장 (신 등, 1995; 황, 1997), 유청 (박 등, 1996), 멸치 육 효소가수분해물 (이 등, 1998) 및 오징어 (Suh 등, 1997) 등에 관한 연구로 국한되어 있다.

항산화제 (antioxidants)는 산화를 억제하거나 지연시키는 물질을 말하며, 이에 대한 것은 1940년대 자동산화 (autoxidation)에 대한 연구가 이루어진 이래로 자동산화 방지와 인간의 노화억제라는 측면에서 연구가 진행되어 왔다. Davies (1986)는 세포계에서의 산화적인 방어기작을 primary defense system과 secondary defense system으로 나누었다. Primary defense는 지질과산화 반응의 과정에서 생성되는 free radical 형태의 지질을 보다 안정한 생성물로 변환시킴으로써 지질의 연속적 산화를 방지하는 기작으로 chain-breaking antioxidant라고도하며 α -tocopherol, gallic acid와 그 유도체, flavonoid계와 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 등이 여기에 속한다. 이와는 달리 secondary defense는 primary antioxidant defense를 벗어나 산화제나 free radical 반응에 의해 손상을 입은 분자나 세포의 구성성분을 제거하기 위한 repair system으로 손상된 막의 인지질 수리에 관여하는 효소인 phospholipase A₂와 fatty acyl transferase, 손상된 단백질을 분해시키는 catalytic/multifunctional proteinase complex (Rivett, 1989)와 산화적인 손상을 입은 DNA를 수리하는 DNA glycosylase 및 DNA ligase (Halliwell and Gutteridge, 1989) 등이 있다. 일반적으로 항산화제는 합성 항산화제와 천연항산화제로 구별되는데, 합성 항산화제인 BHT 및 BHA는 생체 효소계 등에 영향을 주어 기형을 발생하거나 암을 유발시킨다고 보고되어

있다 (Branen, 1975; Fujimoto, 1980). 반면, 천연 항산화제인 α -tocopherol은 부작용이 거의 없어 식품첨가물 또는 의약품으로 널리 쓰이고 있으나 비싼 가격과 지용성이라는 이용상의 제약으로 대체 천연 항산화제 개발이 요구되고 있다. 따라서, 합성 항산화제 및 α -tocopherol의 대체하기 위한 천연 항산화제 개발 연구가 활발히 진행되고 있고, 그 중 식품으로부터의 항산화제 연구는 casein (Yamaguchi 등, 1980), 대두단백질 (Pratt 등, 1972), bovine serum albumin (Yukami 등, 1972), oil seed 단백질 (Rhee 등, 1979), wheat gliadin (Iwami 등, 1987), beach pea (Chavan 등, 1999) 및 zein (Wang 등, 1991) 등이 있다.

장(醬)은 우리나라를 비롯한 대부분 동양인들이 즐겨먹고 있는 전통식품으로 여러 종류가 있지만, 액상으로 된 것들을 장류(醬油)라 한다. 장류에는 젓갈, 액즙, 간장 등이 있지만 가장 널리 사용되면서 음식문화를 주도하는 것은 간장이다. 간장은 기본 조미식품이기 때문에 새로운 식생활의 변화에 대해서도 급격히 변할 수 없는 식품이다. 따라서 새롭고 독특한 맛을 가지면서 국민의 건강에 얼마나 안전한가가 매우 중요하다.

종래 우리나라의 간장에 대한 연구는 콩 및 메주에 의한 발효간장의 제조, 간장제조를 위한 미생물의 개발 등과 같은 발효간장의 제조 및 관련 미생물의 동정에 대부분이 편중되었다. 그러나 최근 기능성 간장에 대한 관심이 높아지면서 간장으로부터 항산화성 물질이 분리 (Choi 등, 1993)되었으며, Chung 과 Choi (1997)는 대두발효식품을 이용하여 *in vitro*에서 암세포 성장 억제 실험을 실시한 결과 L1210(mouse leukemia) 세포주에서는 50%의 성장 억제 효과가 나타난다고 하였으며, 처리농도의 증가에 따라 성장 억제 효과가 상승한다고 보고하였다.

한편, 국내장류업계는 1960년대 주택구조의 변화 등으로 도시화에 힘입어 점차 장류의 수요가 증가하기 시작하면서 1962년에는 대한장류공업협동조합이 설립되어 업계의 공동발전을 위한 구심점이 형성되었고 군수장류납품의

일괄계약 등 많은 일을 시작하였으며, 70년대에는 시장경쟁이 치열해져 중소기업체의 폐업이 속출하였으나, 1980년대는 안정을 찾기 시작하였다. 그러나, 1990년대초 산분해간장의 MCPD (3-Monochloro-1,2-propanediol) 파동으로 사회적인 문제가 대두되어 이보다 안정한 양조간장, 효소분해간장 및 기능성간장으로 소비자의 관심이 증대되고 있다. 또한, 단백질의 가수분해물은 각종 가공식품이나 조미료, 삼푸, 화장품 등 기타 여러 분야에서 필수적으로 이용되고 있고, 국내에서는 거의 단백질의 산가수분해물을 이용하고 있는 실정이다. 그러나 단백질을 산이나 알칼리로 가수분해 할 경우 tryptophan, cysteine 과 같은 필수 아미노산이 손실될 뿐만 아니라 lysinoalanine과 같은 독성이 있는 부산물이 생성되어 일본을 비롯한 구미 선진국에서는 단백질의 산가수분해물의 안전성 문제가 대두되고 있다. 또한 효소분해간장의 단점으로 지적된 쓴맛 성분을 제거하기 위한 연구가 거의 이루어지지 않고 있다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 고등어 내장에서 고효성의 복합효소를 개발하고 이 복합효소로 명태가공잔사의 단백질을 분해시켜 막반응기를 통하여 단백질 가수분해물을 효율적으로 회수하여 이들의 생리기능성을 밝힌 다음, 이것에 독특한 맛과 향을 부여하기 위하여 폐류를 자가숙성시켜 제조한 굴 발효조미액을 혼합하여 기능성 천연효소분해간장을 개발하고자 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

1. 재료

원료로 사용된 명태 frame (Alaska pollack frame)은 부산광역시 서구소재의 (주) 대림수산 가공공장에서부터 filleting 후, 남은 잔사인 frame을 제공받아 -20℃에서 냉동보관하였다. 고등어 내장 유래 조효소를 추출하기 위해서 부산광역시 남구 소재 수산물 시장에서 고등어 내장을 회수하여 -70℃에 저장하였다.

조효소에 대한 천연기질인 hammarsten casein은 Merck Co. 제품을, hemoglobin은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다. 또한 합성기질인 BTEE (N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester), ATEE (N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester), BAPNA (N- α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide-naphthylamide), BAEE (N- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester)는 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다.

막반응기에서 얻어진 가수분해물로부터 생리활성 펩타이드를 분리정제하기 위하여 사용된 SP-Sephadex C-25, Sephadex G-50 및 Sephadex G-25 등의 펩타이드 정제용 수지는 Sigma Chemical Co. 제품, HPLC (Thermo Separation Products사, Model Spectra System P2000)로 펩타이드를 분리 정제하는데 필요한 HPLC용 acetonitrile은 Fisher Scientific에서 구입하여 사용하였고, reverse-phase ODS column (Macherey-Nagel사, Nucleosil 100-7 C₁₈, size: \varnothing 10 × 250mm)을 사용하여 최종 분리정제 하였다.

가수분해물의 생산을 위한 한외여과막 장치는 Millipore Co. (Bedford, USA)로부터 구입하였으며, 사용된 막의 분자량 한계범위 (molecular weight cut-off: MWCO)가 각각 10,000, 5,000, 3,000 및 1,000 Da을 사용하였다.

ACE 저해활성 측정에 사용된 angiotensin I converting enzyme (ACE), Hippuryl-Histidyl-Leucine (HHL) 및 captopril 등은 Sigma사에서 구입하였다.

항산화 활성 측정에 사용된 ammonium thiocyanate, diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH)는 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며, 유지인 linoleic acid (순도 99%)는 Sigma사에서, tetramethoxypropane과 대조구 항산화제인 BHT (butylated hydroxytoluene, 순도 99%)는 Fluka사에서, α -tocopherol (순도 95%)은 純情化學(株)에서 구입하였다. 또한, 세포배양계에서의 항산화작용을 측정하기 위해 사용한 정상 간세포 (Chang)는 동국대학교 의과대학 약리학 교실에서 분주받아 사용하였으며, CCK-8 cell counting kits는 일본 Dojindo사로부터 구입하였다. 그 외의 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP), MTT (4,5-dimethyl thiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), L-glutamine, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), nitro blue tetrazolium (NBT)은 Sigma Chemical사로부터, fetal bovine serum (FBS) 및 antibiotic/antimycotics는 Gibco사 (Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, USA)로부터 구입하였으며, 그 외의 모든 시약은 분석용 특급시약을 구입하여 사용하였다.

2. 고등어 내장으로부터 조효소의 추출 및 활성측정

2.1 고등어내장으로부터 조효소의 추출

고등어 내장 유래의 단백질 분해효소는 Kim 등 (1997)의 방법에 따라 추출하였다 (Fig. 1). 즉, 고등어 내장을 잘게 자른 후, 고등어 내장에 대하여 완충용액 (20 mM Tris-HCl buffer containing 5 mM CaCl₂, pH 7.0)을 2배 가량 첨가하여 균질기로 9,500×g에서 2분간 2회 반복하여 균질화시켰다. 이것을 40℃ 항온수조에서 3시간 동안 활성화시킨 후, 원심분리 (9,500×g, 20 min)하여 얻어진 상층액에 동량의 acetone을 첨가하여 2℃ 냉장실에서 6시간 동안 방치하여 두고 침전물을 얻었다. 이것을 다시 원심분리 (2,370×g, 10 min)한 후 침전물을 다시 얻었다. 회수된 단백질에서 불용성 단백질 부분을

Minced mackerel intestine (2 kg : water content 81.35%)

Homogenize (12,000 rpm, 2 min, 2 times) with 2 volume of 20 mM Tris-HCl buffer containing 5 mM CaCl₂ (pH 7.0)

Activate (40°C, 3 hr)

Centrifuge at 9,500×g for 20 min

Supernatant

Add with 1 volume of acetone

Stand up in 2°C refrigerator for 6 hr

Centrifuge at 2,370×g for 10 min

Precipitate

Add with 1 volume of 50% acetone

Centrifuge at 2,370×g for 10 min

Precipitate

Add with 1 volume of D. W.

Centrifuge at 9,500×g for 10 min

Supernatant (mackerel intestine crude enzyme; MICE)

Lyophilization

Fig. 1. Schematic procedure for the extraction of crude enzyme from mackerel intestine (MICE).

제거하기 위하여 동량의 증류수를 첨가하여 원심분리 (9,500×g, 10 min)한 후 그 상층액을 동결건조하여 -20℃에 저장하여 두고 고등어 내장 유래의 조효소 (MICE : mackerel intestine crude enzyme)로 사용하였다.

2.2 고등어 내장에서 추출한 조효소의 활성 측정

2.2.1. 천연기질에 대한 활성 측정

천연기질인 casein에 대한 조효소의 고유활성 (specific activity)은 Anson (1938)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 기질 용액은 2 g의 Hemmarstein casein에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 50 ml 가하고 100℃의 항온수조에서 5분간 가열하여 동일 완충용액으로 100 ml로 정용하여 제조하였다. 반응용액 (완충액 1.5 ml + 기질용액 0.5 ml)에 0.5 ml의 효소용액을 가하여 incubation (40℃, 20 min)시킨 후, 2.5 ml의 5% TCA용액을 가하여 반응을 정지시키고 실온에서 30분간 방치한 다음, 원심분리 (1,500×g, 10 min)하였다. 이 원심분리한 상층액 1 ml를 취하여 2.5 ml의 0.55 M Na₂CO₃를 가하고 3배 희석한 Folin-phenol 시약 0.5 ml를 첨가하여 실온에서 30분간 정치시킨 다음, 660 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 측정하였다. 효소의 활성도는 주어진 반응조건에서 1 mg의 효소단백질이 반응시간 (분)당 1 μmole의 tyrosine을 유리시키는 양을 1 unit (U)라 하고 고유활성 (U/mg protein)으로 나타내었다. 본 실험에서 고유활성의 계산은 다음 식에 따랐다.

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{흡광도 (파장, 660nm)} \times 0.4128 \times \text{희석비}}{\text{분-반응시간/mg-protein}}$$

(U/mg-protein)

(단, 0.4128은 유리 tyrosine의 양과 흡광도 (660 nm) 간의 관계식에서 구

한 기울기)

2.2..2. 합성기질에 대한 활성측정

2.2.2.1. Trypsin에 대한 합성기질의 활성 측정

Nitroanilide 기질에 대한 반응성은 BAPNA에 대한 반응활성으로 나타내었고, Erlanger 등 (1966)의 방법으로 측정하였다. 즉, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 용액으로 만든 0.5 mM BAPNA 0.95 ml와 효소용액 50 μ l를 반응혼합액으로 하고 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰을 때 유리되어 나오는 p-nitroanilide의 양을 분광광도계 (파장: 410 nm)에서 측정하였다. 이 때의 효소활성 단위는 30 $^{\circ}$ C에서 반응시간 (분)당 유리되어 나오는 p-nitroanilide 1 μ mole을 효소단위 1 unit로 표기하였다.

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{흡광도 (파장, 410 nm)/min} \times 1000 \times \text{희석비}}{8800 \times \text{단백질 농도 (mg/ml)}} \quad (\text{U/mg-protein})$$

(단, 8800은 p-nitroanilide의 흡광계수임)

Ester 기질에 대한 분해활성은 BAEE에 대하여 측정하였다. 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 용액으로 만든 0.5 mM BAEE 0.95 ml와 효소용액 50 μ l를 반응혼합액으로 하고 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 유리되어 나오는 benzoyl-L-arginine의 양을 파장 253 nm에서 측정하여 그 고유활성을 계산하였다.

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{흡광도(파장, 253 nm)/min} \times 1000 \times \text{희석비}}{1048 \times \text{단백질 농도(mg/ml)}} \quad (\text{U/mg-protein})$$

(단, 1048은 benzoyl-L-arginine의 흡광계수임)

2.2.2.2. α -Chymotrypsin에 대한 합성기질의 활성 측정

Ester 기질에 대한 반응성은 BTEE와 ATEE에 대한 분해활성으로 측정하였다. BTEE에 대한 활성은 Hummel (1959)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 25.6%의 메탄올을 함유한 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 용액으로 만든 0.5 mM BTEE 0.95 ml와 효소용액 50 μ l를 반응혼합액으로 하고 30°C에서 5분간 반응시켰을 때 유리되어 나오는 benzoyl-L-tyrosine의 양을 파장 256 nm에서 측정하여 그 고유활성을 계산하였다.

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{흡광도(파장, 256nm)/min} \times 1000 \times \text{희석비}}{964 \times \text{단백질 농도(mg/ml)}} \text{ (U/mg-protein)}$$

(단, 964는 benzoyl-L-tyrosine의 흡광계수임)

ATEE에 대한 활성은 BTEE의 활성 측정 방법에서와 같은 반응조건으로 측정하였으며 ATEE에 대한 분해활성은 반응 중에 유리되어 나오는 acetyl-L-tyrosine을 238 nm에서 측정하여 그 고유활성을 결정하였다.

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{흡광도(파장, 238 nm)/min} \times 1000 \times \text{희석비}}{2250 \times \text{단백질 농도(mg/ml)}} \text{ (U/mg-protein)}$$

(단, 2250은 acetyl-L-tyrosine의 흡광계수임)

3. 명태 frame 단백질에 대한 최적 가수분해조건 검토

3.1. 일반성분 분석

일반성분은 상법에 따라 측정하였다. 즉, 수분은 상압 가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법, 조회분은 건식회화법으로 측정하였다.

3.2. 가수분해도 측정

고등어 내장유래 조효소 (MICE)를 이용한 명태 frame의 가수분해도 (degree of hydrolysis: DH)는 각 frame 1 g을 완충용액 100 ml에 분산시켜 1% 기질용액으로 하여 기질 대 효소비가 100 : 1이 되도록 한 후 40℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 종료되면 반응혼합물에서 2 ml를 취하고 여기에 20% TCA 용액을 동량 첨가하여 원심분리 (2,370×g, 5 min)한 다음, 상층액의 일정량을 취하여 Lowry 법으로 10% TCA 가용성 질소량을 측정한 후 아래와 같이 가수분해도를 계산하였다.

$$\text{가수분해도 \%} = \frac{\text{10\% TCA 가용성 질소량}}{\text{총질소량}} \times 100$$

3.3. pH 효과

명태 frame의 가수분해도에 대한 pH 효과는 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 3.0~4.0), 0.1 M sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.0~6.0), 0.1 M disodium hydrogenphosphate-sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0~9.0) 및 0.1 M sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer (pH 10.0~12.0)를 각각 완충용액으로 하여 pH 효과를 검토하였다.

3.4. 온도에 대한 효과

명태 frame의 가수분해도에 대한 최적 pH 조건하에서 온도를 30~60℃까지 변화시키면서 이들의 최적 온도조건을 검토하였다.

3.5. 기질농도에 대한 효과

명태 frame의 가수분해도에 대한 최적 pH 및 온도 조건 하에서 기질농도를 0.5~3%까지 변화시키면서 가수분해에 대한 최적의 기질농도 효과를 검토하였다.

3.6. 기질 대 효소비에 대한 효과

명태 frame의 가수분해도에 대한 최적 pH, 온도 및 기질농도 조건하에서 기질 대 효소비를 변화시키면서 그 가수분해도를 검토하였다.

3.7. 반응시간에 대한 효과

명태 frame의 가수분해도에 대한 최적 pH, 온도, 기질 농도 및 기질 대 효소비 조건하에서 반응시간을 1, 4, 8, 12 및 24시간 동안 반응시킨 후 그들의 가수분해도를 검토하였다.

3.8. 명태 frame 단백질 가수분해물의 분자량별 분획

명태 frame을 해동한 후, 육부분을 분리하여 육 100 g (건조중량)에 가수분해 최적 조건하에서 가수분해하였다. 가수분해 반응 후, 100℃에서 효소를 불활성화시키고, 추출액을 원심분리 (4,650×g)하여 한외여과막 장치 (ultrafiltration membrane system)를 이용하여 분자량 한계 (molecular weight cut-off : MWCO)범위가 각각 10, 5, 3, 1 kDa인 막을 차례로 통과시켜 각각 분획하여 동결건조한 후 생리활성 물질의 시료로 사용하였다.

4. 가수분해물에 대한 항산화활성 측정

4.1. Ferric thiocyanate method

단백질 가수분해물의 항산화활성은 Mitsuda 등 (1966)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, linoleic acid emulsion을 Osawa (1981)등의 방법에 따라 linoleic acid 0.13 ml, ethanol 10 ml, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 10 ml를 혼합하고, 이 혼합물에 가수분해물을 linoleic acid에 대해 각각 1% (w/v)의 농도로 첨가하여 40±1℃로 조절된 항온기내에서 저장하면서 자동산화를 촉진시켰다. Linoleic acid 0.1 ml에 75% ethanol 4.7 ml를 가한 후, 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml를 혼합하였다.

그 다음, 20 mM FeCl₂/3.5% HCl 용액 0.1 ml를 가한 후, 3분동안 상온에서 발색시켜 분광광도계로 흡광도 (파장: 500 nm)를 측정하여 활성을 구하였다.

4.2. Radical scavenging activity (RSA) 측정

RSA는 Hatano 등 (1988)의 방법에 따라, 각 가수분해물 50 mg을 증류수 4 ml에 녹이고, 이를 1.5×10⁻⁴ M DPPH/MeOH 1 ml와 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후, 517 nm에서의 흡광도를 측정하여 남은 DPPH의 양을 결정하였다.

4.3. 농도에 따른 항산화력 측정

가수분해물의 농도에 따른 항산화력 측정은 Ferric thiocyanate법 및 RSA값을 측정하여 구하였다. 즉, 가수분해물을 유지 중량의 0.1~2%까지 되게 첨가하여 각각의 활성을 측정하였다.

4.4. 상승효과 측정

가수분해물의 상승효과는 Ferric thiocyanate 방법에 의해 결정하였다. 즉,

유지혼탁액에 α -tocopherol을 linoleic acid에 대해 0.1%가 되게 첨가하고, 여기에 가수분해물을 유지중량의 1%가 되게 첨가하여 $40\pm 1^\circ\text{C}$ 로 조절된 항온기 내에 저장하면서 Ferric thiocyanate값을 측정하여 대조구로서 가수분해물이 첨가되지 않은 α -tocopherol과 비교하였다.

4.5. 세포배양계에서의 항산화효과

4.5.1. 세포배양

정상 간세포 (human liver cell, Chang)를 fetal bovine serum (FBS)이 10% 함유된 DMEM배지에서 배양하였다. 즉, 75-cm^2 plastic flask (Falcon Co., England)에 Chang cell을 10% FBS, 7.5% NaHCO_3 , 150 $\mu\text{g/ml}$, glutamine 58.4 $\mu\text{g/ml}$ 및 antibiotic/antimycotics 4.4 $\mu\text{l/ml}$ 가 함유된 DMEM배지에서 37°C , 5% CO_2 의 조건하에서 배양하였다. 2~3일마다 한번씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

4.5.2. 세포정량

세포가 자란 75-cm^2 plastic flask에서 배지액을 제거하고, CMF-PBS (calcium magnesium free-phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세척한 후, 0.25% trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 세포배양액으로 중화시켜서 원심분리 (80 \times g, 3min) 하였다. 남은 세포의 pellet에 배양액을 가한 다음, 멸균 피펫으로 반복흡입하여 단일 세포부유액을 만든 후 trypan blue를 세포부유액과 9:1의 비율로 혼합하여 광학현미경상에서 혈구계산판 (hemocytometer)을 이용하여 측정하였다.

4.5.3. 항산화활성물질의 세포독성 측정

가수분해물의 독성측정은 CCK-8 assay를 이용하였다. 즉, 정상세포 (Chang cell)를 96-well plate에 5×10^4 cells/well 되도록 분주하였다. 이를 37°C , 5%

CO₂ 조건의 배양기에서 배양한 후, 10 µl의 다양한 농도의 가수분해물을 첨가하여 48 시간동안 배양하였다. 세포생존율을 48시간 배양시간 Chang cell을 대상으로 CCK-8 kit를 이용하여 가수분해물의 세포독성을 결정하였다.

4.5.4. *t*-BHP 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물의 효과

t-BHP의 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물의 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 간세포를 5×10⁴ cells/well이 되도록 넣고 CO₂ incubator에서 2시간 배양시킨 다음, 가수분해물의 농도를 well당 5 mg/ml씩 첨가한 후, 10% FBS-DMEM배지로 전체부피를 100 µl로 조절하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18시간 배양하였다. 이 배양액을 CMF-PBS로 세척하고 SFM (serum free medium)과 *t*-BHP를 0 µM에서부터 300 µM까지 농도별로 전체부피가 200 µl가 되게 첨가한 다음, 이를 다시 120분 배양시킨 후, CCK-8 kit로 흡광도를 측정하여 그 효과를 결정하였다.

4.5.5. *t*-BHP의 세포괴사에 대한 가수분해물의 농도별 효과

t-BHP의 세포괴사에 대한 가수분해물의 농도별 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 간세포를 5×10⁴ cells/well이 되도록 넣고 CO₂ incubator에서 2시간 배양시킨 다음, 가수분해물의 농도를 well당 0.5 mg/ml에서 7.5 mg/ml씩 첨가한 후, 10% FBS-DMEM 배지로 전체부피를 200 µl로 조절하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18시간 배양하였다. 이 배양액을 CMF-PBS로 세척하고 SFM (serum free medium)과 225 µM *t*-BHP를 농도별로 전체부피가 200 µl가 되게 첨가한 다음, 이를 다시 120분 배양시킨 후, CCK-8 kit로 흡광도를 측정하여 그 효과를 결정하였다.

5. 항고혈압 활성 측정

5.1. ACE 저해활성을 통한 항고혈압활성 측정

ACE 저해활성은 Cushman와 Cheung (1971)의 방법에 따라 측정하였다. 일정량의 가수분해물을 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3, 300 mM NaCl 함유)에 녹인 가수분해액 50 μ l에 25 mU/ml ACE용액 50 μ l를 가한 후, 37°C에서 30분간 항온처리하였다. 여기에 4.15 mM Hip-His-Leu (107.4 mg/10 ml sodium borate buffer) 150 μ l를 넣고 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 1 N HCl 용액 0.25 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate 0.5 ml를 가하여 교반한 다음, 원심분리 (2,500 \times g, 5 min)시켜 상층액 200 μ l를 분취하였다. 이 상층액을 완전히 건조시킨 다음 증류수 1 ml를 가하여 용해시키고, 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해제의 농도는 ACE의 저해활성을 50% 저해시키는데 필요한 가수분해물의 농도를 계산하여 IC₅₀ (mg/ml)로 정의하였다.

SHR/Kist



Origin : Jackson Lab. (USA) ==> Kist ==> Kribb
Charact.: 1963년 Wistar Kyoto rats로부터 유래.
Spontaneous hypertension model로서 항고혈압제
screening에 적합. 적혈구증가증의 모델

5.2. *In vivo*에 의한 혈압강하활성 측정

선천적으로 고혈압을 유발시킨 spontaneously hypertension rat (SHR, 체중 180-220 kg, female, 6~8주령)을 대상으로 ACE 저해 펩타이드를 10 mg/kg (SHR body weight)되게 경구투여하여 angiotensin I의 승압에 대한 피험액의 억제효과를 검토하였다. 생리식염수에 용해한 피시험액은 0.45 ml (투여한 후 세정에 사용한 생리식염수를 포함)로 하였다. 혈압은 경시적으로 비관혈식혈압측정장치로 꼬리혈압을 측정하였으며 대조구로써 시판용 혈압강하제인 captopril을 사용하였다. 이 때 최고혈관압력, 즉 SBP을 기준으로 비교하였다.

5.3. ACE에 대한 저해 패턴의 측정

ACE에 대한 저해 패턴은 Bush 등 (1984)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 다양한 농도의 펩타이드를 반응액에 첨가하고, ACE 저해 활성은 기질 농도를 달리하여 측정하였다. 펩타이드를 첨가한 후 ACE의 반응속도는 Lineweaver-Burk plot를 이용하여 저해 패턴을 결정하였다.

6. 생리기능성 물질의 분리, 정제 및 특성

스크리닝을 통하여 항산화 및 항고혈압을 나타내는 분자량별로 분획된 가수분해물의 특성을 파악하기 위하여 생리활성 물질의 분리 및 정제를 수행하였다. 즉 이온교환 크로마토그래피, 겔여과 크로마토그래피 및 HPLC 등을 이용하여 각 정제 단계마다 생리활성을 측정하여 가장 활성이 높은획분에서 기능성 물질을 분리 정제한 후, 생리기능성 물질의 생화학적인 특성, 구조 및 기능을 파악하는 시료로서 이용하였다.

6.1 이온 크로마토그래피에 의한 분리

미리 평형화시킨 SP-Sephadex C-25 column ($\varnothing 2.5 \times 45$ cm)에 가수분해시료를 주입하고, 동일한 완충용액 250 ml로 비흡착부분을 용출시킨 후, 흡착된

부분은 완충용액과 1 M NaCl용액을 사용하여 선형상 농도구배법으로 분별 용출시켰다. 단백질 함량은 Lowry법으로 측정하였으며 분획별 단백질 함량이 동일하도록 희석하여 상기와 같은 방법으로 각 분획물의 항산화 및 항고혈압 활성을 측정하여 비교하였다. 용출된 획분 중 활성이 가장 높은 획분을 계속 정제하였다.

6.2. 겔여과 크로마토그래피

SP-Sephadex C-25를 충전시킨 column에서 분리한 획분 중에서 각 활성이 높은 분획물을 완충용액으로 평형화시킨 Sephadex G-25 column ($\varnothing 2.5 \times 98$ cm)에 주입하고, 탈이온수로 용출시켰다. 각 분획물을 280 nm 및 220 nm에서 흡광도를 측정한 후, 동결건조한 후, 정평하여 각 분획물의 항산화 및 항고혈압 활성을 측정하였다. 용출된 획분 중 활성이 가장 높은 획분을 계속 정제하였다.

6.3. HPLC를 이용한 생리활성물질의 최종 분리 및 정제

겔 크로마토그래피를 이용하여 분리된 분획물 중에서 항산화 및 항고혈압 활성이 가장 높은 획분의 동결건조물을 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 용액에 녹여 HPLC에 주입하였다. HPLC (Dionex Co.)에서 ODS reverse-phase column (Shodex Co.)을 사용하였으며, 이동상은 0.1% TFA/H₂O와 0.1% TFA/acetonitrile로 하여 선형상 농도구배법 (0~50% acetonitrile, 40 min)으로 용출시킨 다음, 각 획분을 분리하였다. 분리된 획분을 대상으로 항산화 및 항고혈압 활성을 측정한 후 용출된 획분 중 활성이 가장 높은 획분을 대상으로 다음의 분석들을 실시하였다.

6.4. 생리활성 펩타이드의 구성아미노산 분석

아미노산 분석은 시료 50 mg을 ampoule에 넣고 6 N HCl 2 ml를 가하여

밀봉한 후 110℃에서 24시간 가수분해하였다. 분해액을 여과하고 감압건조하여 염산을 제거한 후 sodium loading buffer (pH 2.2)로 25 ml가 되게 정용하여 이 중 일부를 아미노산 자동분석기에 주입하여 정량하였다.

6.5. 생리활성 펩타이드의 아미노산 서열분석

아미노산 서열은 N-말단으로부터 아미노산을 절단하는 Edman법으로 분해한 후, 기체상 자동서열분석기 (Perkin Elmer, New Jersey, U.S.A.)로 분석하였다. 즉, 염기 조건하에서 해리를 억제시킨 아미노산을 PICT (phenylisothiocyanate)에 부착시켜 phenylthiocarbamyl (PTC)펩타이드로 과잉시약과 반응 유도체물을 제거한 후, 산성 조건하에서 절단하여 anilinothiozoline (ATZ) 유도체로 변환시키고, 더 안정한 유도체인 phenylthiohydantoin (PTH) 아미노산으로 변형시켜 동정하였다. 남은 펩타이드의 N-말단에 대해서 위의 과정을 반복하여 서열을 결정하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. 명태 frame의 일반성분 분석

원료로 사용한 명태가공 잔사는 (주)대림수산 가공공장에서부터 filleting한 후, 남은 잔사인 frame (수분 : 78.13%, 뼈 : 8.51%, 육 : 13.36%)을 제공받아 -20℃에서 냉동보관하여 두고 실험에 사용하였으며, 명태 frame의 육부분 전체를 대상으로 일반성분 분석한 결과는 Table 1에 나타낸 바와 같이 수분, 단백질, 지질 및 회분의 함량이 각각 81.52%, 13.55%, 3.29% 및 1.64% 였다.

2. 고등어 내장 유래 조효소의 추출

고등어 내장으로부터 유래되는 proteinase 조효소의 추출은 Fig. 1과 같이 먼저 고등어 내장을 잘게 자른 후, 고등어 내장에 대하여 완충용액 (20 mM Tris-HCl buffer containing 5 mM CaCl₂, pH 7.0)을 2배 가량 첨가하여 균질기로 9,500×g에서 2분간 2회 반복하여 균질화시켰다. 이것을 40℃ 항온수조에서 3시간 동안 활성화시킨 후, 원심분리 (9,500×g, 20 min)하여 얻어진 상층액에 동량의 acetone을 첨가하여 2℃ 냉장실에서 6시간 동안 방치하여 두고 침전물을 얻었다. 이것을 다시 원심분리 (2,370×g, 10 min)한 후 침전물을 다시 얻었다. 회수된 단백질에서 불용성 단백질 부분을 제거하기 위하여 동량의 증류수를 첨가하여 원심분리 (9,500×g, 10 min)한 후 그 상층액을 동결건조하여 -20℃에 저장하여 두고 고등어 내장 유래의 조효소 (MICE : mackerel intestine crude enzyme)로 사용하였다.

2.1 천연기질에 대한 조효소의 활성

천연기질인 casein과 hemoglobin에 대한 고등어 내장 유래 조효소 (MICE)의 고유활성은 Fig. 2에 나타내었다. MICE의 고유활성은 casein에 대하여 0.65

Table 1. Proximate compositions of Alaska pollack frame muscle

Components	Contents (%)
Moisture	81.52 (-)
Protein	13.55 (73.32)
Lipid	3.29 (17.80)
Ash	1.64 (8.88)

(), percentage on dry basis.

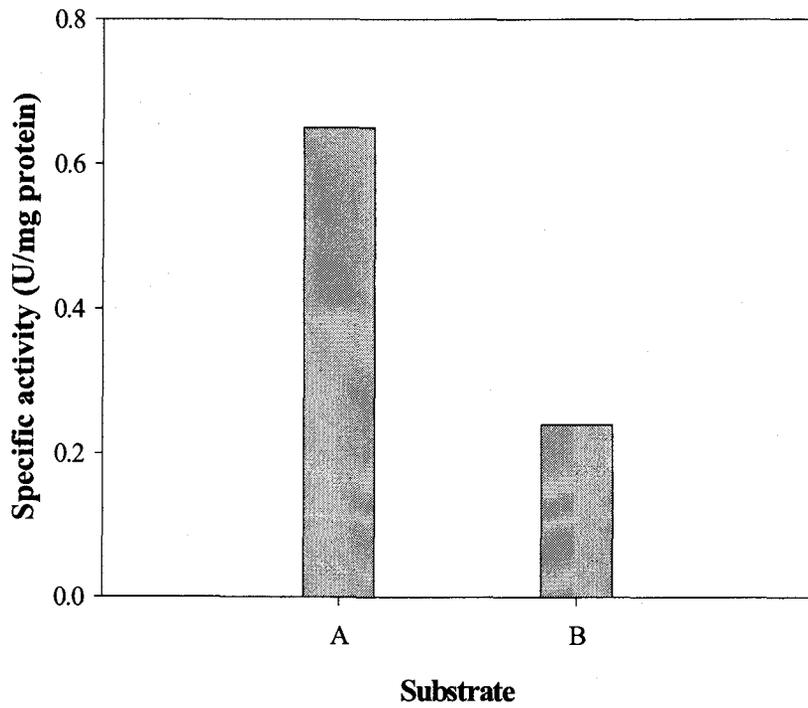


Fig. 2. Comparing the activities of MICE on natural substrates. A, Casein; B, Hemoglobin

U/mg protein으로 나타났으며, hemoglobin에 대하여 0.24 U/mg protein으로 나타났다. 이것은 Kim 등 (1997)이 보고한 참치유문수에서 추출한 조효소 (TICE)의 casein 및 hemoglobin에 대한 고유활성이 0.54, 0.197 U/mg protein보다 높은 수치일 뿐만 아니라 참치유문수에서 추출한 조효소의 casein분해 활성의 경우 시판효소인 Neutrase 0.5 L, Alcalase 0.6L, α -chymotrypsin 및 pronase E보다는 활성이 낮고, papain보다는 높으며, trypsin과는 유사한 수치를 나타내었다고 보고하였다. TICE가 시판 효소보다 활성이 낮은 이유는 TICE가 참치유문수로부터 단지 부분정제만 행한 조효소의 상태이므로 효소 반응에 저해할 수 있는 지방이 일부 함유하고 있기 때문이다. Marishita (1964)는 양식산 방어, 갯장어, 무지개 송어 및 은어의 각 장기 중에 분포하는 단백질분해효소의 활성을 측정한 결과, 위장에서 분리한 것은 산성 측에서, 유문수와 소화관에서 분리한 것은 알칼리 측에서 높은 활성을 보였다고 보고한 바 있다. 이와 같이 어류의 내장 조직 중 내장에서는 거의 대부분 알칼리성 단백질분해효소가 존재하고 있는 것으로 알려져 있다.

2.2 합성기질에 대한 활성

MICE의 합성기질에 대한 활성은 Fig. 3에 나타내었다. Trypsin의 ester 합성기질인 benzol-L-arginine ethyl ester (BAEE)에 대한 활성 (6.456 U/mg protein)이 가장 높았으며, trypsin의 nitroanilide 합성기질인 benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide-naphthylamide (BAPNA)에 대한 활성은 0.124로 비교적 낮았다. α -Chymotrypsin의 합성기질인 benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE)와 acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE)에 대한 MICE의 활성은 5.660, 0.856 U/mg protein이었다. Pyeon 등 (1993)은 멸치 내장과 황다랭이 유문수에서 추출한 조효소의 BAPNA에 대한 활성이 각각 0.05와 0.02 U/mg protein으로 나타났다고 하였으며, Uchida 등 (1973)은 연어 유문수에서 분포하고 있는 trypsin, chymotrypsin 및 carboxypeptidase의 전구체에 관하여 보고하였

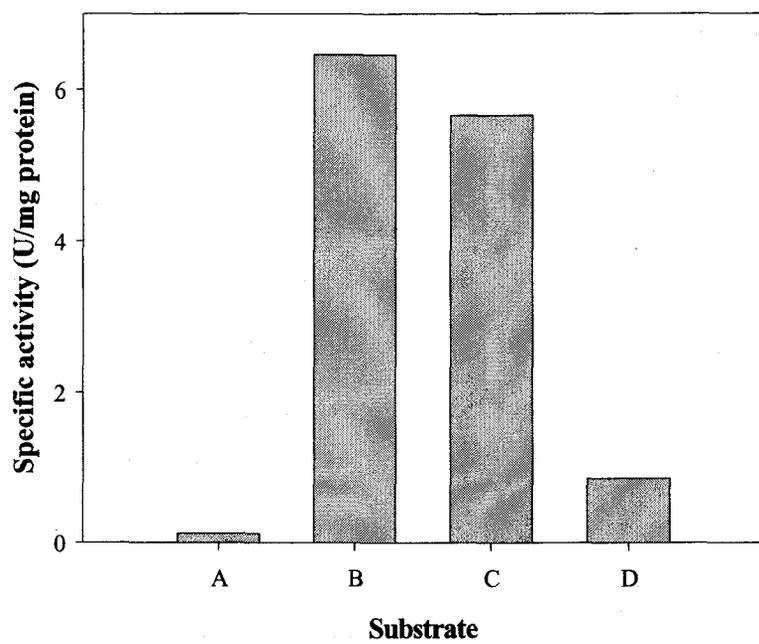


Fig. 3. Activities of MICE on synthetic substrates. A, BAPNA; B, BAEE; C, BTEE; D, ATEE.

고, Kolodzeiskaya 등 (1988)은 극동산 연어류의 유문수에 분포하는 trypsin에 관하여, 그리고 Genicot 등 (1987)은 남극어의 유문수에 존재하는 trypsin에 대하여 보고하였다. 따라서, 고등어 내장의 조효소에는 trypsin 및 α -chymotrypsin의 ester 합성기질에 특이적인 활성을 나타내는 proteinase가 많이 함유되어 있음을 알 수 있다.

3. 명태 frame 단백질에 대한 최적 가수분해 조건 검토

3.1. 가수분해에 대한 pH의 효과

명태 가공잔사 단백질을 가수분해하기 위한 pH 조건을 검토한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 명태 가공잔사의 가수분해율은 pH 10.0과 11.0에서 활성이 높았으며, 특히 pH 10.0에서 약 40%로 가장 효율이 높은 것으로 보아, 사용된 고등어 내장 조효소는 알칼리성 proteinase의 활성이 강하게 나타내고 있음을 알 수 있다. Murakami와 Noda (1981)는 정어리의 유문수에서 추출한 알칼리 proteinase가 pH 10.0에서, Kim 등 (1986)은 고등어와 정어리의 내장 조직중에 분포하는 단백질 분해효소의 최적 pH는 채장 유래에서는 각각 9.0과 9.8, 그리고 유문수 유래에서는 9.4와 10.0이었다고 보고하였다. 그러나 어류의 근육에서 추출한 알칼리 proteinase의 최적 pH를 보면, 잉어와 새우 모두 pH 8.0에서 최대활성을 나타낸다고 하였다. 이러한 결과로 볼 때, 어류의 근육에서 추출한 단백질 분해효소의 최적 pH는 대개 8.0 부근이지만, 유문수나 채장에서 추출한 단백질 분해효소는 주로 10.0 부근에서 활성이 가장 높다는 것을 알 수 있다.

3.2. 가수분해에 대한 온도 효과

명태 가공잔사 단백질의 가수분해에 대한 온도의 효과는 Fig. 5에서와 같이 50°C에서 최대활성을 나타내었으며, 그 이후부터 급격하게 감소하는 것을

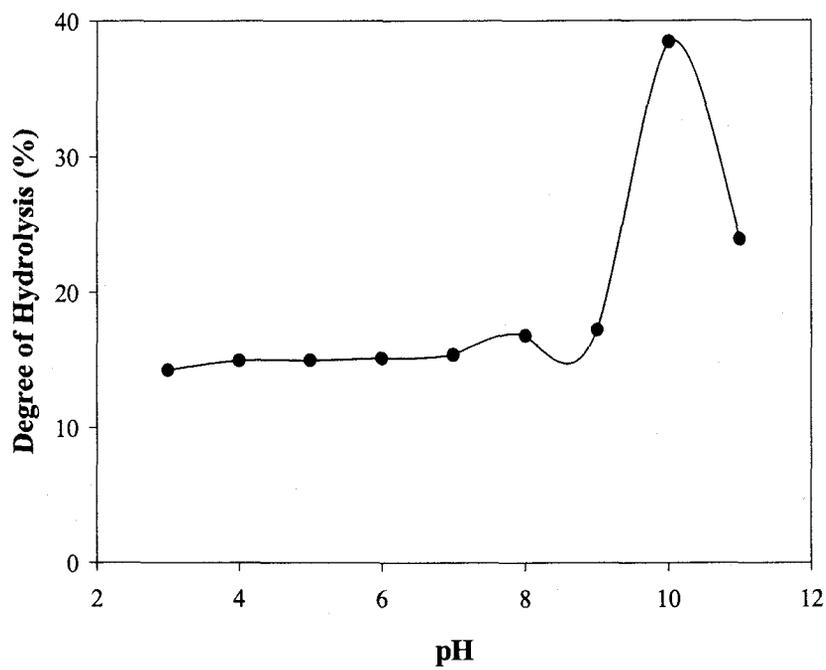


Fig. 4. Effect of pH on the hydrolysis of Alaska pollack frame by MICE.

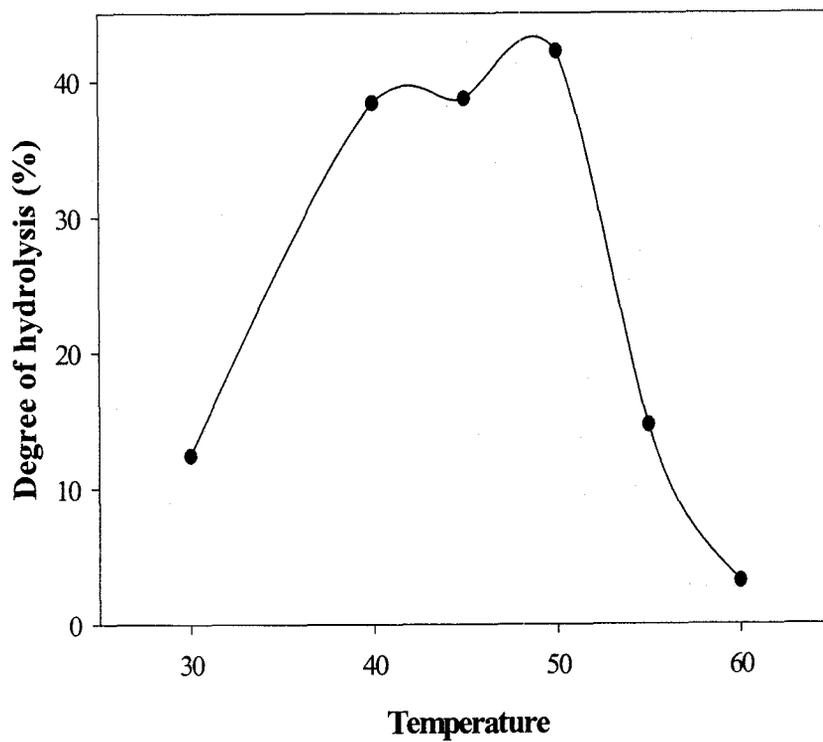


Fig. 5. Effect of temperature on the hydrolysis of Alaska pollack frame by MICE.

알 수 있었다. Doke와 Ninjoor(1987)는 새우 근육에서 유래한 알칼리 proteinase는 60℃에서 최대활성을 나타낸다고 하였고, Iwata 등 (1974)은 해산 어류 21종류와 담수산 어류 4종류의 근육에서 유래된 알칼리 proteinase는 대개 60~65℃에서 최대활성을 보인다고 보고하였다. Pyeun과 Kim (1986)은 고등어 유문수에서 추출한 조효소는 45℃에서 최대활성을 보이다가 50℃ 이후에 급격하게 감소하여 70℃에서는 거의 불활성화된다고 보고하였다. 그러나, 고등어 유문수 유래의 정제 proteinase (Ooshiro, 1971)와 대구 유문수 유래의 정제 trypsin (Simpson 등, 1990)의 온도 효과를 보면, 둘 다 40℃ 부근에서 최대활성을 보이다가 그 이후 50℃에서는 활성이 각각 75%와 60%로 감소하였다고 보고하였다. 이러한 사실은 유문수 유래의 proteinase는 정제되었을 경우보다는 조효소 상태일 때가 높은 온도에서 더 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 내장과 근육에서 유래한 알칼리 proteinase의 활성을 비교해 보면, 내장에서는 약 40~50℃로 근육의 60~65℃보다 대개 낮은 온도에서 최대활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

3.3. 기질농도에 따른 가수분해 효과

명태 가공잔사 단백질에 대한 가수분해에서의 기질농도 효과는 Fig. 6에서와 같이 1%의 기질농도에서 가장 효율이 높은 것으로 나타났고, 이 때의 가수분해율은 약 42%였다. 일반적으로 단백질의 가수분해반응에서의 기질농도는 1~5% 정도인데, 본 실험에서도 기질농도에 대한 최적효과는 1%였으며, 낮은 기질농도에는 가수분해가 효율적으로 일어나지 않았다. 이러한 결과에 대한 이유는 명태 가공잔사 단백질이 물에 불용성 기질이기 때문이라 판단된다.

3.4. 기질 대 효소비에 따른 가수분해 효과

기질 대 효소비의 효과 (Fig. 7)에서는 기질 대 효소비가 500:1까지는 가수

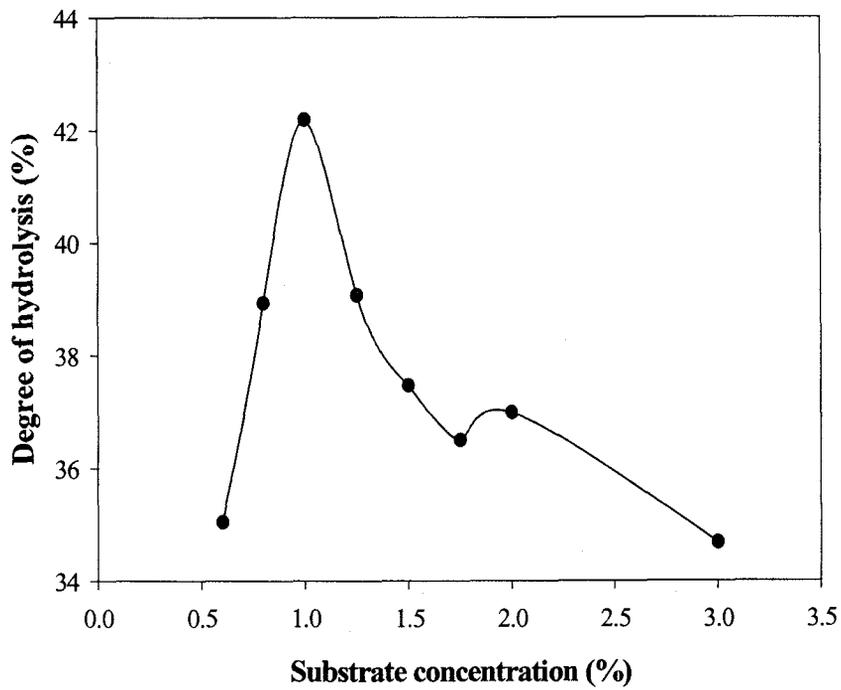


Fig. 6. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of Alaska pollack frame by MICE.

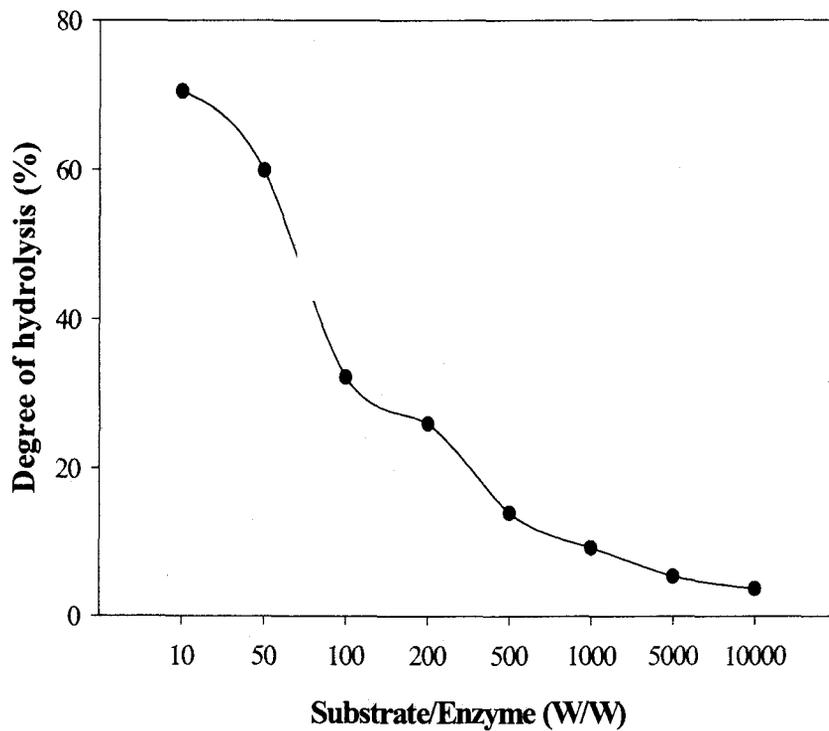


Fig. 7. Effect of substrate/enzyme ratio on the hydrolysis of Alaska pollack frame by MICE.

수분해가 완만하게 진행되다가 그 이후부터는 가수분해가 급격하게 진행되었다. 따라서, 효소첨가량에 따른 가수분해물의 생산성을 감안하여 50:1이 최적의 기질 대 효소비라고 판단된다.

3.5. 가수분해에 대한 반응시간의 효과

고등어 내장 유래의 조효소를 명태 가공잔사 단백질에 대하여 시간의 변화 (1, 2, 4, 8, 12, 24 및 48)에 따른 가수분해도를 검토한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 고등어 내장 유래의 조효소는 명태 가공잔사 단백질에 대하여 반응시간이 12시간까지 증가하여 약 67%의 가수분해율을 보였으며, 그 이후 24시간까지 증가속도가 감소하긴 하였지만 계속적인 증가를 보여 약 70%까지 도달하였다. Hale (1969)은 어류 단백질의 가수분해에서 상업적으로 유용한 효소의 상대활성을 비교한 결과, 24시간 가수분해 후의 가수분해율은 pronase E가 papain보다 약 3배 가량 더 높았다고 보고하였다. 또한, Kim 등 (1997)은 참치유문수 유래의 조효소로 민태 frame을 가수분해할 때 pronase E와 α -chymotrypsin보다는 각각 10%와 5%정도 가수분해율이 낮았으나, papain보다는 약 15%정도 높았다고 보고하였다. 한편, casein을 기질로 사용하였을 때의 시간변화에 따른 가수분해도는 8시간까지는 약 75%로 급격하게 증가하였으며, 24시간까지는 완만하지만 증가하여 약 81%의 가수분해 효율을 나타내었다.

Ooshiro (1971)는 고등어 유문수에서 추출한 proteinase와 소 유래의 trypsin으로 casein을 4시간 동안 가수분해하였을 때의 가수분해도를 비교한 결과, 고등어 유문수 proteinase의 경우 펩티드 결합의 약 70% 정도를 가수분해하였으나 소의 trypsin은 기질특이성으로 인하여 약 15%만을 가수분해하였다고 보고하였다. 또 Ramakrishna 등 (1987)도 어류 chymotrypsin과 bovine chymotrypsin을 시간경과에 따른 활성을 비교한 실험에서, collagen 기질을 사용하여 35°C에서 8시간 반응시켰을 경우와 어류의 불용성 단백질부분을 기질로 사용하여 37°C에서 5시간 반응시켰을 경우 모두 어류 chymotrypsin이

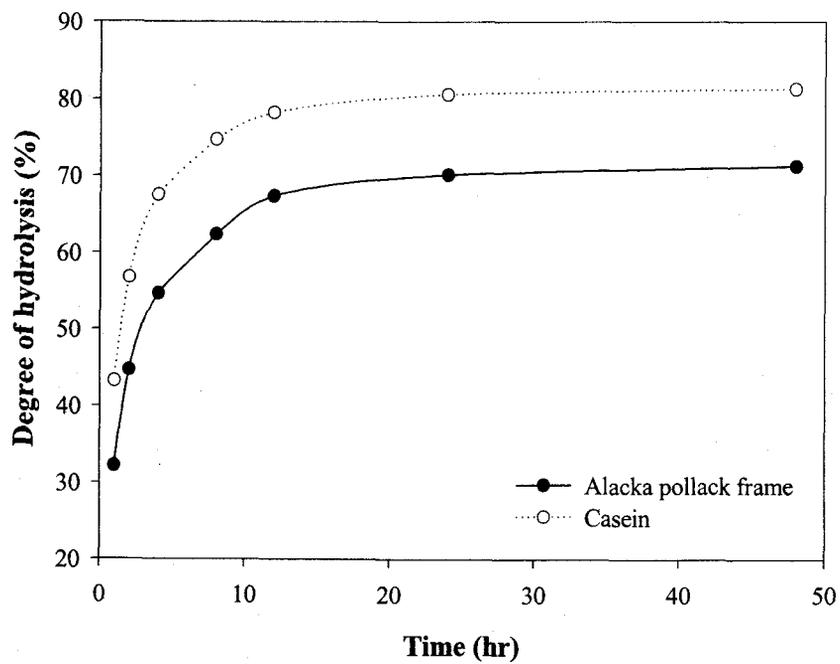


Fig. 8. Effect of incubation time on the hydrolysis of Alaska pollack frame and casein by MICE.

약 2배 가량 활성이 더 높았다고 보고하였다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때, 어류 단백질을 가수분해하기 위해서는 어류 유래의 효소를 이용하는 것이 보다 효율적일 것으로 판단된다.

4. 명태 frame 단백질 가수분해물에 대한 생리활성 검토

효소마다 단백질 기질을 분해하는 부위가 달라서 가수분해물 (peptide)이 가지는 작용특성은 다르다. 따라서 효소의 최적조건에서 분해시킨 명태 가공 잔사 가수분해물들을 대상으로 항산화, 항고혈압, 항암 등 다양한 생리활성을 검토해 본 결과, 항산화 및 항고혈압에 대한 활성이 검토되었다.

4.1. MICE에 의한 명태 frame 가수분해물의 항산화 활성

이상의 결과에서 MICE로 명태 frame 단백질을 효율적으로 회수하기 위하여 가수분해 최적 조건으로 가수분해하였다. 즉, 기질농도 1%, 기질 대 효소 비 50:1, pH 10, 온도 50℃ 및 12시간 가수분해하였다. 가수분해 후 가수분해물을 한외여과막을 통하여 분자량 크기별로 분획하였으며, 한외여과막에 사용한 막은 분자량 한계범위가 10, 5, 3 및 1 kDa의 막을 사용하여 최종 다섯 개의 분획물을 얻었다 (APH I: 10 kDa 이상, APH II: 10~5 kDa, APH III: 5~3 kDa, APH IV: 3~1 kDa 및 APH V: 1 kDa 이하). 이렇게 얻은 가수분해물을 ferric thiocyanate 법에 의해 항산화활성을 검토한 결과 APH V에서 가장 높은 항산화활성을 나타내었고, 시판 천연 항산화제인 α -tocopherol 보다 10.37%정도 항산화력이 더 높았다 (Fig. 9).

4.2. Radical scavenging activity (RSA) 측정

RSA는 Hatano 등 (1988)의 방법에 따라 측정하였다. 각 가수분해물 50 mg을 증류수 4 ml에 녹이고, 이를 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 1 ml와 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후, 517 nm에서의 흡광도를 측정하여 남은 DPPH

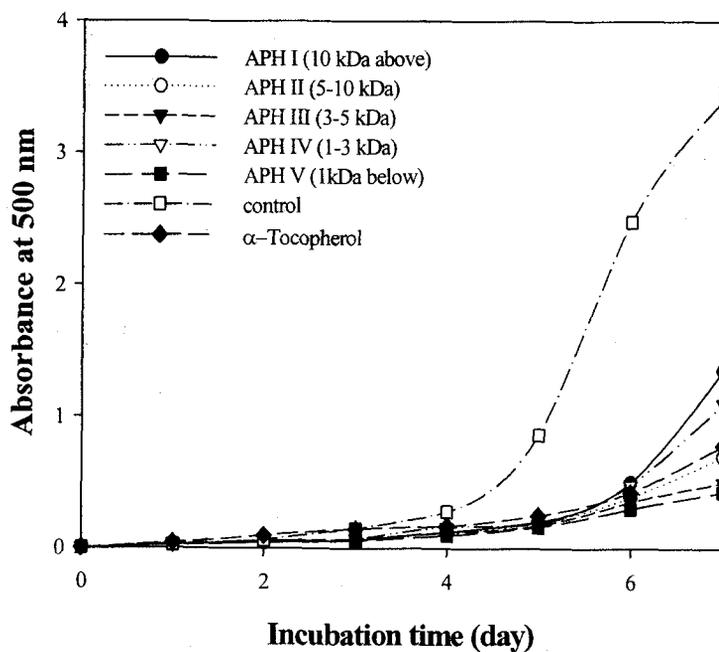


Fig. 9. Antioxidative activity of alaska pollack frame hydrolysates (APH) from in linoleic acid autoxidation system measured by the Ferric thiocyanate method.

의 양을 결정하였고, 시판 천연 항산화제인 α -tocopherol 과 합성 항산화제인 BHT를 대조구로 사용하였다. 측정결과 모든 가수분해물에서 DPPH에 소거능을 나타내었고, 특히, APH V에서 DPPH 소거능이 가장 높았지만 시판 천연 항산화제인 α -tocopherol 과 합성 항산화제인 BHT보다는 낮았다 (Fig. 10).

4.3. 농도에 따른 항산화 활성 측정

항산화력이 가장 높은 APH V의 농도별 항산화력을 ferric thiocyanate 법 및 radical scavenging activity (RSA)로 측정하였다. Ferric thiocyanate 법의 경우 APH V의 농도가 1% 이상일 때 α -tocopherol 보다 항산화력이 우수하였고 0.1 및 0.5%에서도 α -tocopherol 보다 낮았지만 항산화력이 다소 높았다 (Fig. 11).

RSA의 경우, DPPH에 대한 APH V의 농도별 radical scavenging 효과는 1% 까지 점진적으로 증가하다가 그 이상에서는 거의 일정하였다 (Fig. 12). 이러한 결과는 펩타이드의 첨가농도가 낮을 경우에는 펩타이드 자체의 산화정도가 펩타이드의 항산화력에 크게 영향을 미치지 않지만, 펩타이드를 1%이상 첨가하였을 때 펩타이드의 산화정도가 항산화 효과에 영향을 미치는 중요한 하나의 요소로서 작용하기 때문이라고 생각되며, 본 연구에서 가수분해물의 항산화성에 대한 최적농도는 1% 임을 알 수 있었다.

지 등 (1992)은 향신료 추출물을 식용대두유에서 항산화성을 측정한 결과, 유지중량의 1%의 농도에서 가장 높은 항산화능을 나타내었다고 보고하였고, Saiga 등 (2003)은 돼지 근섬유 단백질을 papain과 actinase E로 가수분해한 가수분해물이 2% 농도일 때 vitamin E보다 항산화활성이 높았고, papain 가수분해물이 다소 활성이 높다고 하였다. 또한 Park 등 (2001)은 계란 노른자에서 추출한 가수분해물의 농도가 1%와 2%가 큰 차이없이 항산화효과를 나타내었다고 보고하였다. 이러한 보고는 각 가수분해물의 원료는 다르지만 최

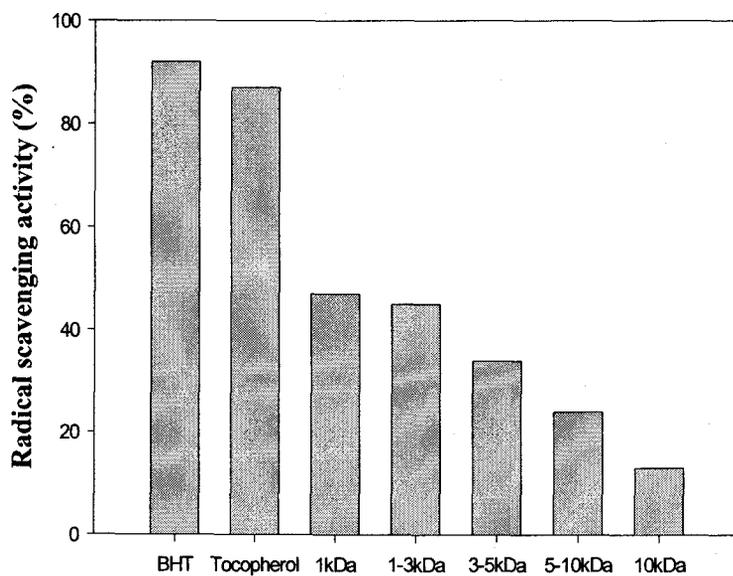


Fig. 10. Antioxidative activities of MICE hydrolysates from Alaska pollack on DPPH radical.

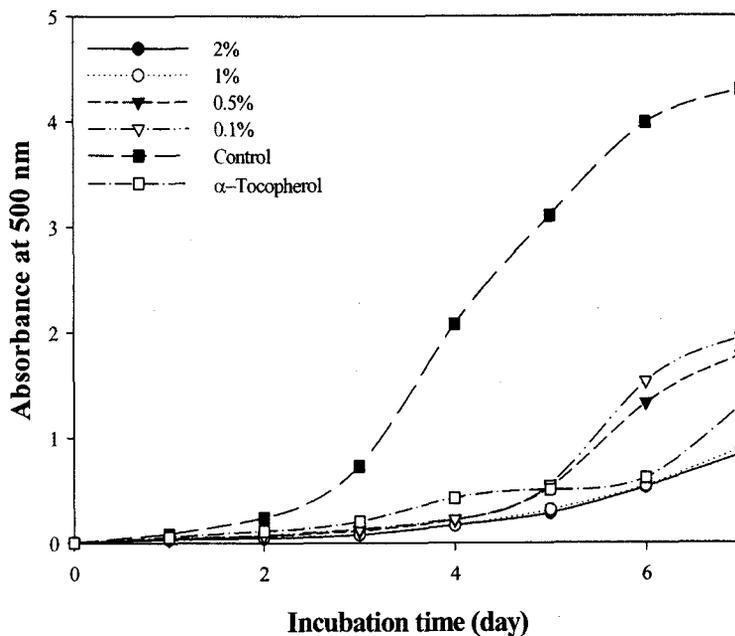


Fig. 11. Antioxidative activity of APH V at various concentration in linoleic acid autoxidation system measured by the ferric thiocyanate method.

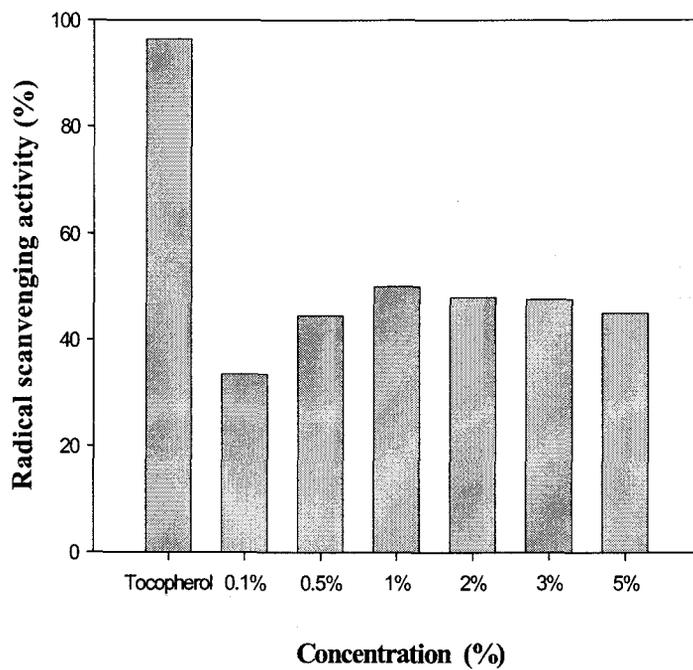


Fig. 12. DPPH radical scavenging activity of APH V at various concentrations.

적농도는 비슷한 농도에서 나타남을 보여준다.

4.4. 가수분해물의 상승효과

가수분해물의 상승효과는 ferric thiocyanate 방법에 의해 결정하였다. 즉, 유지혼탁액에 α -tocopherol을 linoleic acid에 대해 0.1%가 되게 첨가하고, 여기에 가수분해물을 유지중량의 1%가 되게 첨가하여 $40\pm 1^\circ\text{C}$ 로 조절된 항온기 내에 저장하면서 ferric thiocyanate값을 측정하여 대조구로서 가수분해물이 첨가되지 않은 α -tocopherol과 비교한 결과, APH I을 첨가한 군에서만 α -tocopherol보다 약간 낮은 항산화력을 나타냈고 다른 군에서는 모두 항산화력이 높았으며, 특히, APH V를 첨가한 군에서 가장 높은 항산화력을 나타내었다 (Fig. 13). 이상의 결과에서 명태 frame 단백질 가수분해물을 시판 항산화제인 α -tocopherol과 병용하면 아주 높은 상승효과를 나타냄을 알 수 있었다.

Yamaguchi 등 (1979)은 대두단백질 가수분해물이 α -tocopherol의 항산화효과를 상승시키는 작용을 한다고 보고하였고, Saito 등 (2003)은 Tyr-His-Tyr, Tyr-Lys-Tyr 및 Tyr-Arg-Tyr의 서열을 갖는 펩타이드를 합성하여 그들의 항산화활성을 측정한 결과, Tyr-His-Tyr이 가장 우수한 활성을 보인다고 하였고, 또한 BHA 및 δ -tocopherol 존재하에 대조구보다 30배 이상 높은 상승효과를 나타낸다고 하였으나, citric acid 및 α -tocopherol 존재하에서는 상승효과가 없다고 보고하였다. 그러나, Tyr-Lys-Tyr 및 Tyr-Arg-Tyr은 어떠한 화합물과도 상승효과를 나타내지 않았다고 하였다. Yamaguchi (1989)는 대두단백질, 우유카제인, 젤라틴, 알부민 등의 가수분해물과 α -tocopherol 과의 상승효과를 검토한 결과, 모든 가수분해물이 비교적 상승효과가 높다고 하였으며, Kawashima 등 (1979)은 시판 젤라틴 가수분해물이 vitamin C, 구연산의 병용사용에 의해 매우 뛰어난 상승효과를 나타낸다고 보고하였다.

Saiga 등 (2003)은 돼지 근섬유 단백질을 papain 및 actinase E로 가수분해

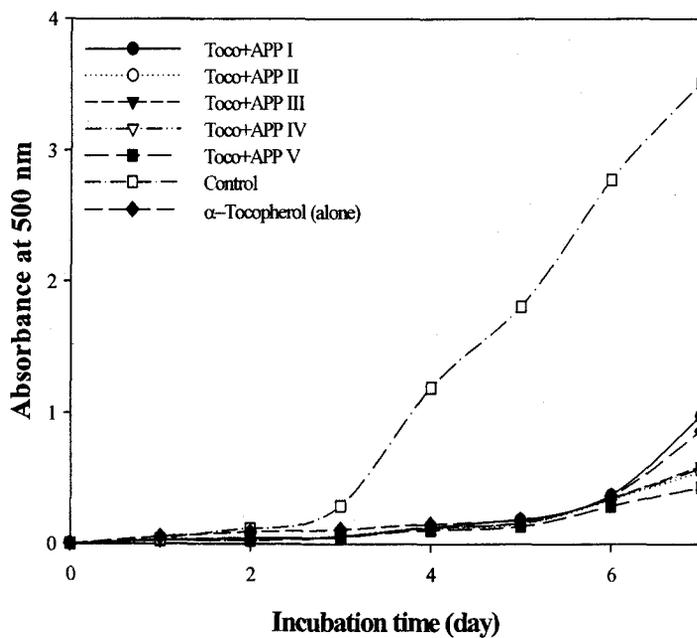


Fig. 13. Synergistic effects of α -tocopherol and APH in linoleic acid autoxidation system measured by the ferric thiocyanate method

시킨 가수분해물들의 pH에 대한 항산화활성은 pH 7.1에서 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다고 하였으나, Krogull 등 (1987)은 질소화합물인 단백질, 펩타이드 및 아미노산은 자체적으로 산화가 일어나며, pH, 온도, 수분활성 및 산화촉매제나 저해제의 존재 여부에 따라 항산화활성의 차이가 있다고 보고하였다. 즉, 펩타이드의 항산화 활성은 그들의 구조와 측정 시스템에 많이 좌우되는데, Chen 등 (1996)은 대두단백질 가수분해물로부터 분리한 Leu-Leu-Pro-His-His의 항산화활성 부위가 Pro-His-His라고 하였으나, 측정조건을 달리하였을때는 Pro-His-His의 활성이 다소 떨어진다고 하였다. 또한, 이들의 서열을 바탕으로 다양한 펩타이드를 합성하여 연구한 결과, histidine을 가진 펩타이드의 활성이 높다고 하였는데, 이것은 histidine이 금속이온 킬레이트 및 활성산소 소거제로 작용하기 때문이라고 보고하였다. Hatate 등 (1997)도 소혈청알부민의 효소적 가수분해물로부터 분리한 Asp-Thr-His-Lys 펩타이드가 α -tocopherol과 sodium ascorbate의 항산화활성을 상승시킨다고 하였다. 비록 펩타이드의 항산화활성에 있어서 정확한 메카니즘은 분명치 않으나 histidine 잔기가 활성에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

가수분해물의 항산화력은 각각의 아미노산, 즉 radical scavenger로서 작용하여 과산화물 생성을 억제하는 항산화성이 높은 아미노산들에 의해 영향을 받지만 펩타이드는 그 구성 아미노산의 성분과 위치에 따라 항산화성에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한 단백질 가수분해물과 페놀계 항산화제와의 상승효과는 아미노산 등이 산화된 항산화제를 환원시켜 재생시킴으로써 나타나는 것으로 판단된다.

5. 명태 frame 가수분해물로부터 항산화활성 펩타이드의 분리 및 정제

5.1 항산화활성 펩타이드의 분리 및 정제

각 단계별 막 반응기에서 분리한 가수분해물들 중에서 항산화력이 높은

가수분해물에서 가장 강한 항산화력을 나타내는 단일 펩타이드만을 분리하기 위해 ion-exchange chromatography, gel chromatography 및 HPLC를 이용하여 분리하였다.

5.1.1. 이온 크로마토그래피

먼저 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)로 평형화시킨 SP-Sephadex C-25 수지를 충전시킨 column ($\phi 4 \times 40$ cm)에 시료용액 5ml를 용리하여 분획한 분획별 항산화성을 측정한 결과를 Fig. 14에 나타내었다. 양이온 교환수지가 충전된 칼럼에 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) 1l를 용리하고 1.0 M NaCl용액 300ml와 동일한 완충용액 300ml를 사용하여 선형상 농도구배법으로 분리한 결과 (flow rate: 60 ml/hr, collection volume: 5 ml), 6개의 획분으로 분리되었다. 각 획분을 탈염 및 동결건조한 후, ferric thiocyanate 법에 의한 항산화성을 측정한 결과, 획분 IV (73~82)에서 가장 뛰어난 항산화효과가 나타났다.

5.1.2. 겔 크로마토그래피

양이온 크로마토그래피의 분획물 중에서 항산화성이 뛰어난 펩타이드가 함유되어 있는 획분 IV의 동결건조물을 증류수에 녹인 후, 분리범위가 분자량 1,000~5,000 Da인 Sephadex G-25 수지를 충전시킨 column ($\phi 2.5 \times 90$ cm)에 증류수로 평형화시킨 다음 GradiFrac System (Pharmacia Biotech., Sweden)을 사용하여 네 개의 주요 획분을 얻었으며, 이 획분의 항산화성을 측정한 결과, 두 번째 획분에서 가장 높은 항산화 활성이 나타났다 (Fig. 15). 이를 동결건조한 후, HPLC로 재분리 하였다.

5.1.3. HPLC에 의한 분리

ODS column이 장착된 HPLC를 이용하여 H₂O와 acetonitrile 용액으로 선형

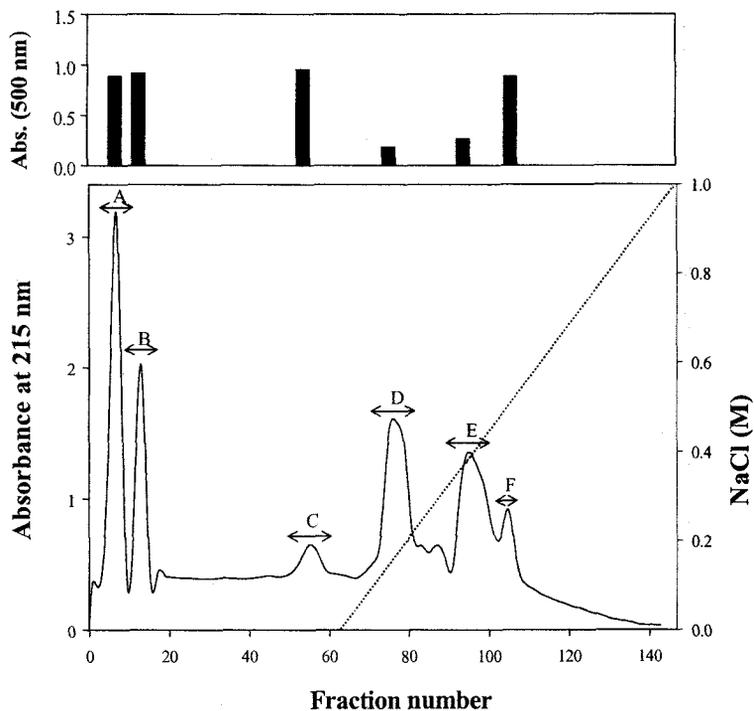


Fig. 14. Separation of APH-V by SP-Sephadex C-25 column chromatography (down panel) and antioxidative activities (upper panel). Elution was performed at 1ml/min of flow rate with a linear NaCl gradient (0~1M) in 20mM sodium acetate buffer, pH 4.0.

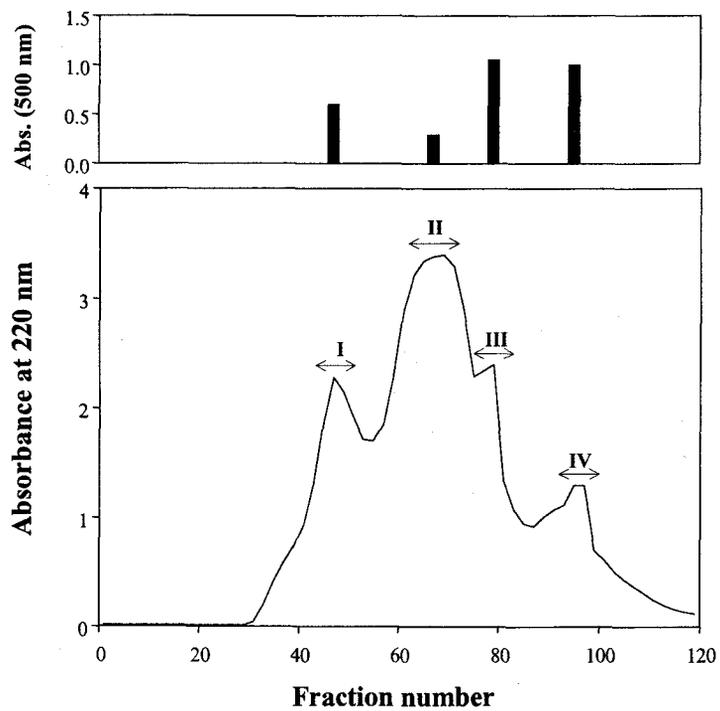


Fig. 15. Gel filtration chromatogram using Sephadex G-25 of active fraction (down panel) and antioxidative activities (upper panel).

상 농도구배법 (0~35%, 40min)으로 용출시켜 (2 ml/min) 분리한 결과, Fig. 16에서 볼수 있는 바와 같이 3개의 주요 획분이 분획되어, 이들의 항산화성을 측정한 결과, 첫 번째 획분에서 가장 우수한 항산화력이 나타나 이 획분을 Capcell Pak C₁₈-VG column이 장착된 HPLC로 H₂O와 acetonitrile을 이용하여 선형상 농도구배법(0~15%, 30 min)으로 다시 분리 정제한 결과, 세 개의 주요 획분으로 분리되었으나 P3 획분에서 가장 우수한 항산화 활성을 나타내었다(Fig. 17).

5.1.4. 항산화 펩타이드의 아미노산 조성 및 구조분석

항산화성 펩타이드의 아미노산 서열분석은 N-말단에 Val이 위치하였으며 서열중에 Gly, Thr, Glu, Pro, His 및 Asn 잔기를 포함하고 있었다. Murase 등(1993)은 histidine이 포함된 펩타이드가 항산화활성이 높다고하였는데 이것은 histidine의 이미다졸 ring의 금속 킬레이팅 및 지질 라디칼 trapping에 의한 것이라 하였다. 또한 histidine을 포함한 펩타이드는 histidine 그 자체보다 뛰어난 항산화활성을 나타내었는데, 이것은 histidine이 펩타이드의 hydrophobicity를 증가시키기 때문이라 하였다. Saito 등 (2003)은 histidine과 tyrosine이 포함된 tripeptide 세 개를 합성해서(Tyr-His-Tyr, Try-Lys-Tyr 및 Try-Arg-Tyr) 항산화활성을 검토한 결과, Try-His-Tyr가 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다고 하였다. Yamaguchi 등 (1975)은 펩타이드의 서열에 따라 항산화능에 차이를 보고하였는데 dipeptide의 경우 alanine을 N-말단으로 하였을 때 Ala-His, Ala-Met, Ala-Tyr 및 Ala-Try의 항산화력이 좋은 것으로 나타났는데, 이것은 특정 아미노산이 N-말단 또는 C-말단에 위치하는가에 따라 항산화력이 크게 영향을 받기 때문이라고 설명하였다. Chen 등 (1995)은 대두단백질인 β -conglycinin을 효소적으로 가수분해한 가수분해물 중에서 항산화성을 가지는 펩타이드는 N-말단에 소수성 아미노산인 valine이나 leucine를 포함하고 있으며, 배열중에 proline, histidine 및 tyrosine를 가지는 5~16개 아

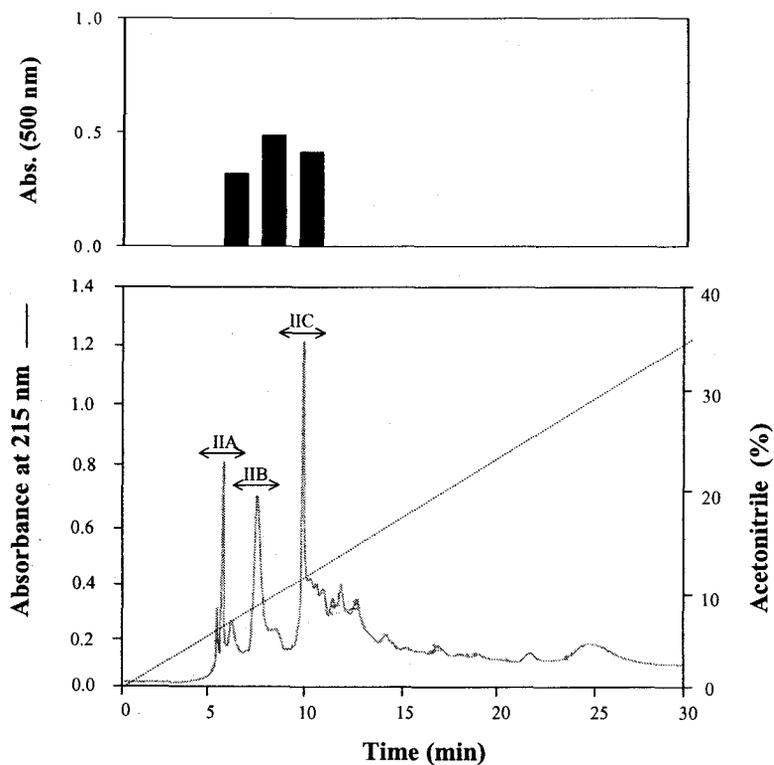


Fig. 16. Reverse-phase HPLC pattern on a Primesphere 10 C₁₈ column of active fraction II (down panel) and antioxidative activities (upper panel). HPLC operation was carried out with 35% acetonitrile as mobile phase at 2 ml/min of a flow rate using UV detector as 215nm.

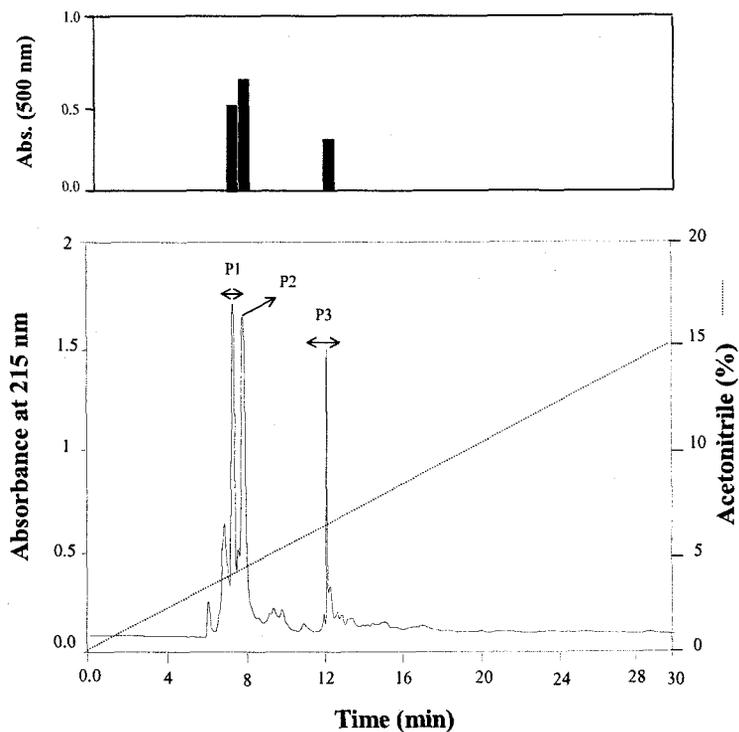


Fig. 17. Reverse-phase HPLC pattern on a Capcell Pak C₁₈-VG column of active fraction IIA (down panel) and antioxidative activities (upper panel). HPLC operation was carried out with 15% acetonitrile as mobile phase at 2 ml/min of a flow rate using UV detector as 215nm.

미노산 잔기로 이루어져 있다고 보고한 바 있다.

본 연구에서도 분리정제한 아미노산 서열 중에 His 잔기를 포함하고 있었고, α -tocopherol보다 우수한 항산화활성을 나타내었다.

5.2. 세포 배양계에서 명태 frame 가수분해물의 항산화활성 검토

5.2.1. 배양 정상간세포에 대한 항산화활성 peptide의 세포독성

명태 frame 유래 단백질 가수분해물의 배양 정상간세포에서 세포독성을 측정된 결과를 Fig. 18에 나타내었다. Fig. 18에서 보듯이 가수분해물을 첨가하지 않은 것의 세포 생존율을 100%로 볼 때 가수분해물 첨가군에서는 100% 이상으로 나타났는데, 특히 APH V(1 kDa 이하) 가수분해물을 첨가하였을 경우에는 5 mg/ml의 농도에서 119% 정도의 생존율을 보였다. 따라서 본 실험에 사용한 가수분해물들은 배양 간세포에 어떠한 독성도 나타나지 않아 안정한 것을 확인하였다.

5.2.2. *t*-BHP 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물의 항산화작용

t-BHP의 농도에 따른 정상 간세포의 생존력을 *t*-BHP를 2시간 처리 후 측정된 결과, 225 μ M의 *t*-BHP 처리군에서 50% 정도의 세포생존율을 보였으므로 225 μ M *t*-BHP를 IC₅₀으로 정하였다 (Fig. 19). *t*-BHP 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물의 항산화작용을 측정된 결과, 가수분해물 첨가군이 비첨가군에 비해 15~28% 정도 세포 생존율이 증가함을 볼 수 있었다. 현재까지 *t*-BHP에 의한 간세포의 괴사를 설명하기 위하여 2가지의 메카니즘이 보고되어 있는데, 그 하나는 Masaki 등 (1989)에 의해 보고된 세포막의 지질과산화와 관련된 것으로 DPPD (N,N'-diphenyl-*p*-phenylene diamine)와 같은 항산화제들은 지질과산화 유발물질인 *t*-BHP에 의한 세포괴사를 방지할 수 있다는 것이고, 다른 하나는 세포괴사의 메카니즘은 항산화제의 영향을 받지 않고

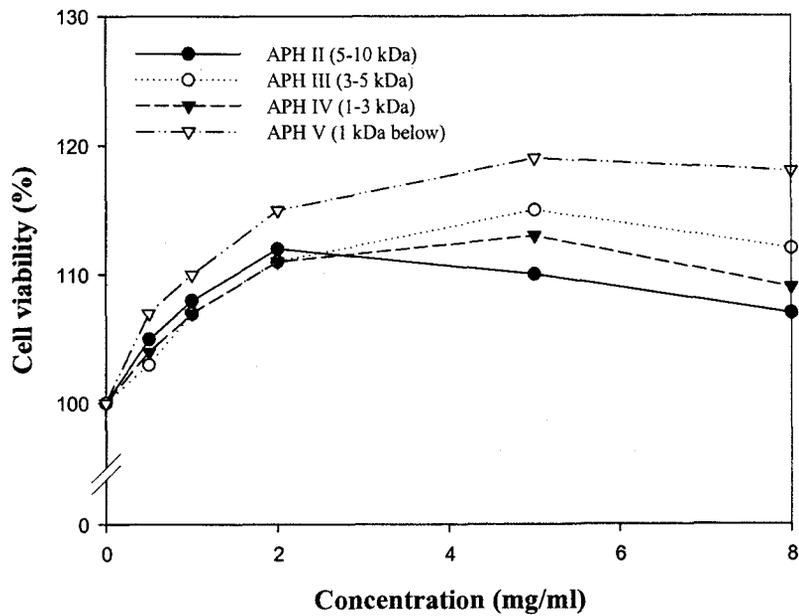


Fig. 18. Cytotoxicity of antioxidative peptide from APH on cultured normal human liver cells (Chang). Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C.

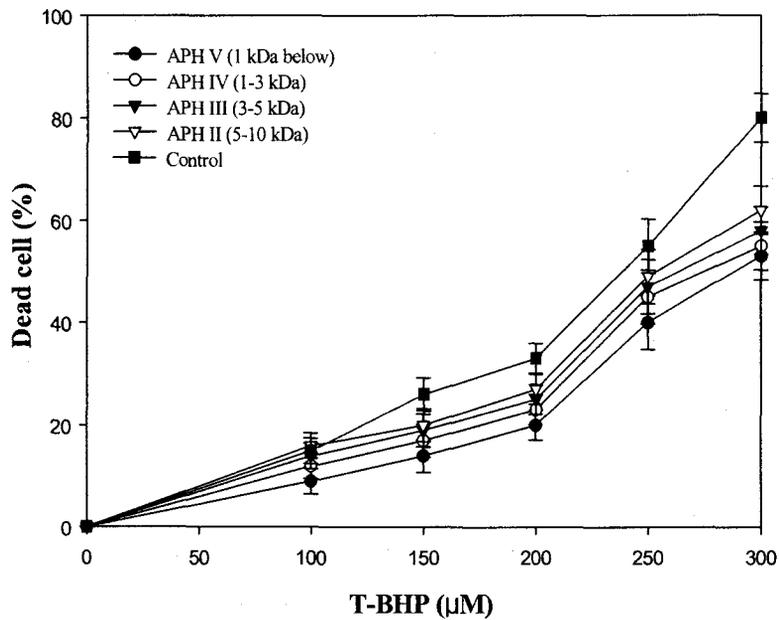


Fig. 19. Effect of *t*-BHP concentration on cell killing of cultured cells without and with APH. Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C.

지질과산화물을 발생하여 미토콘드리아의 기능을 손실시킨다는 것이다. 또한, Frankel (1984)은 지질의 산화에 의해 생성되는 MDA 같은 지질 2차 생성물은 효소, 단백질, DNA의 아미노 그룹과 반응하는 강력한 교차결합제라고 하였고, Pascoe 등 (1987)은 $\cdot\text{OH}$ (hydroxyl radical)나 $\text{LOO}\cdot$ (lipid radical)과 같은 활성산소계는 α -tocopherol과 같은 소수성 막과 결합되어 있는 항산화제의 소비를 유도하여 세포의 방어효과를 감소시킨다고 보고하였다. Fariss 등 (1984)은 간세포 세포질에서 가장 풍부한 비단백질 thiol인 reduced glutathione (GSH)의 감소가 세포의 생존에 영향을 미친다고 하였으며, Masaki 등 (1989)은 *t*-BHP의 세포독성에 대해 철 킬레이트제인 deferoxamine이 GSH의 소비를 억제함으로써 세포사를 지연시키고, 항산화제인 DPPD나 catechol은 glutathione의 대사과정이나 칼슘의 세포내 항상성에는 관계없이 *t*-butyl alkoxy radical에 의해 생성되는 $\text{L}\cdot$ 을 소거함으로써 세포사를 지연시킨다고 보고하였다. Benjamin 등 (1993)은 calf thymus로부터 분리한 6 kDa 정도의 thymic 펩타이드가 간의 MDA생성을 감소시키는 동시에 간 glutathione의 감소를 막으며 vascular endothelial cell에서는 endogenous 항산화물질을 증가시켜서 세포사를 지연시킨다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 아미노산 중에 histidine이 lipid radical을 제거해 지질과산화물인 MDA의 생성을 억제하여 세포의 생존율을 높이는 것으로 판단된다.

5.2.3. *t*-BHP로 유발된 세포괴사에 대한 가수분해물의 농도에 대한 항산화 효과

가수분해물의 농도에 따른 항산화효과를 관찰하기 위하여 배양 간세포에 가수분해물을 전처리한 다음, *t*-BHP로 세포의 산화작용을 유발시켜 세포의 생존율을 측정된 결과, 가수분해물을 농도별로 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 및 7.5 mg/ml을 첨가하였을 때 1.0 mg/ml가 75% 정도로 가장 높은 세포 생존율을 나타내었다 (Fig. 20). Pascoe 등 (1987)은 항암제인 adriamycin(ADR)이 GSH

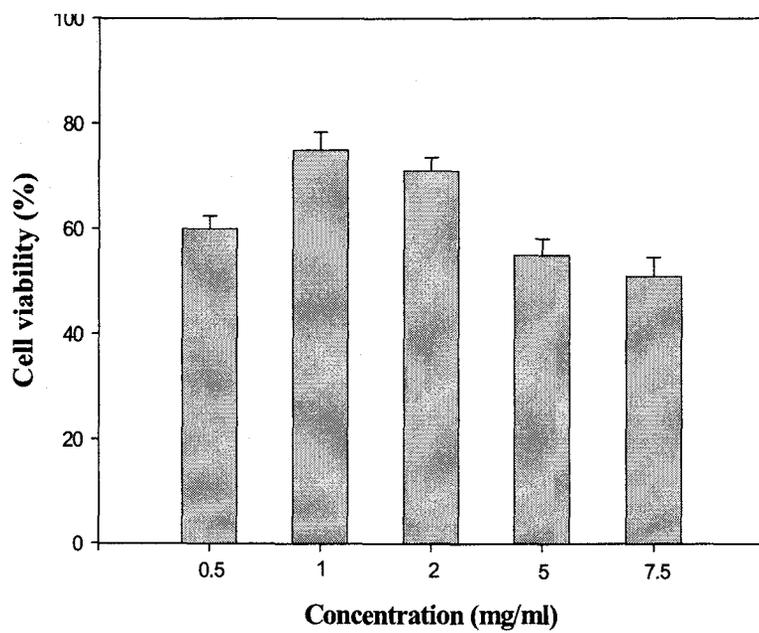


Fig. 20. Effect of various concentrations of APH V on cell viability of cultured liver cells exposed to *t*-BHP.

를 소비하여 활성산소종을 발생시킴으로써 심근경색을 일으킨다고 하였는데, ADR이 산화-환원되는 동안 활성 산소계의 생성과 GSH의 소비와 관련이 있다고 판단하여 이에 대한 vitamin E의 효과를 측정한 결과, 세포내 α -tocopherol의 함량이 증가하였으며, 0.6~1.0 nmole/cells의 농도에서 세포생존율이 가장 높게 나타나 vitamin E는 자유라디칼 소거제로서 작용한다고 추정하였다. 또한 ADR과 GSH를 직접적으로 고갈시키는 ethacrynic acid를 처리한 간세포에서 α -tocopherol의 영향을 측정한 결과, 화학물질의 독성에 의해 산화-환원 반응이 일어나는 동안 thiol기의 감소가 세포내에 존재하는 α -tocopherol의 감소와 밀접한 관계가 있기 때문에, thiol기의 함량이 감소하면 세포의 방어기작도 약화되는 것으로 보고하였다.

6. 명태 frame 가수분해물로부터 항고혈압 펩타이드의 분리 및 정제

명태 frame 단백질을 MICE로 가수분해하여 분자량별로 분획한 가수분해물의 항고혈압 활성을 측정한 결과를 Table 2에 나타내었다. Table 2에 나타난 바와 같이 APH V (1 kDa 이하)에서 저해 활성이 87.62%로 가장 높은 항고혈압 활성을 나타내어 이를 이용하여 항고혈압 물질을 분리정제 하였다.

6.1. 이온 크로마토그래피

막을 통과한 분획 중 항고혈압활성이 가장 좋은 1 kDa을 통과한 가수분해물 (APH V)을 이온 크로마토그래피법으로 분리하였다. 즉, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)로 평형화시킨 SP-Sephadex C-25 수지로 충전된 column ($\phi 1.0 \times 25$ cm)에 시료용액 1 mg/ml의 가수분해액 5 ml를 주입하고, 동일한 완충용액 500 ml로 비흡착부분을 용출시킨 후, 흡착된 부분을 완충용액 300 ml와 2 M NaCl용액 300 ml를 사용하여 선형상 농도구배법으로 분별용출 (flow rate, 2 ml/min; collection volume, 5 ml)하여 다섯 개의 획분으로 분리하였다. 이 획분들을 탈염하여 동결건조시킨 후 항고혈압활성을 측정한 결과,

Table 2. ACE inhibitory activity of Alaska pollack frame hydrolysates by MICE

Hydrolysates	ACE inhibitory activity (%)
APH V (MW 1 kDa below)	87.62
APH IV (MW 1 - 3 kDa)	78.95
APH III (MW 3 - 5 kDa)	73.84
APH II (MW 5 - 10 kDa)	68.24
APH I (MW 10 - 30 kDa)	59.60

IV 획분에서 IC_{50} 값이 0.11 mg/ml로 활성이 가장 높았다 (Fig. 21, Table 3).

6.2. 겔 크로마토그래피

양이온 교환수지 SP-Sephadex C-25에서 분리한 획분 중에서 가장 뛰어난 항고혈압활성을 나타내는 획분을 Sephadex G-25 겔 수지로 충전된 column ($\varnothing 2.5 \times 98$ cm)에 용출시킨 결과 네 개의 주요 획분을 얻었다. 이를 동결건조한 후 ACE 저해활성을 측정한 결과, 획분 D에서 IC_{50} 값이 0.035 mg/ml로 가장 우수하였다(Fig. 22, Table 4). 따라서 획분 D를 계속해서 겔 크로마토그래피를 행하여 모은 후 진공회전 농축기로 농축하여 동결건조하였고, 이 시료를 ACE 저해활성에 가장 효과가 있는 단일물질로 분리하기 위해 HPLC를 사용하여 재분리를 시도하였다.

6.3. HPLC에 의한 분리

Sephadex G-25를 충전시킨 column에서 분리된 분획물 중에서 항고혈압 활성이 가장 높은 획분의 동결건조물을 0.1% TFA가 함유된 탈이온수에 녹여 HPLC로 다시 분리하였다. 즉, reverse-phase column이 장착된 HPLC를 사용하여 이동상으로 0.1% TFA가 함유된 탈이온수와 acetonitrile (0~70%, 50min)을 사용하여 선형상 농도구배법으로 용출한 결과, 여섯 개의 주요 획분으로 분리되었으며 이들의 항고혈압활성을 측정한 결과, 두 번째 획분이 0.023 mg/ml로 가장 활성이 높았다 (Fig. 23, Table 5). 이를 다시 탈이온수와 acetonitrile의 농도를 85:15로 조절한 HPLC로 분리하여 단일 피크를 얻었다 (Fig. 24, Table 6).

6.4. ACE 저해 펩타이드의 저해 메카니즘 결정

최종 분리정제된 펩타이드의 저해 메카니즘을 결정하기 위해 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 결정하였다. 즉, 저해 펩타이드를 13, 26 μ g/ml

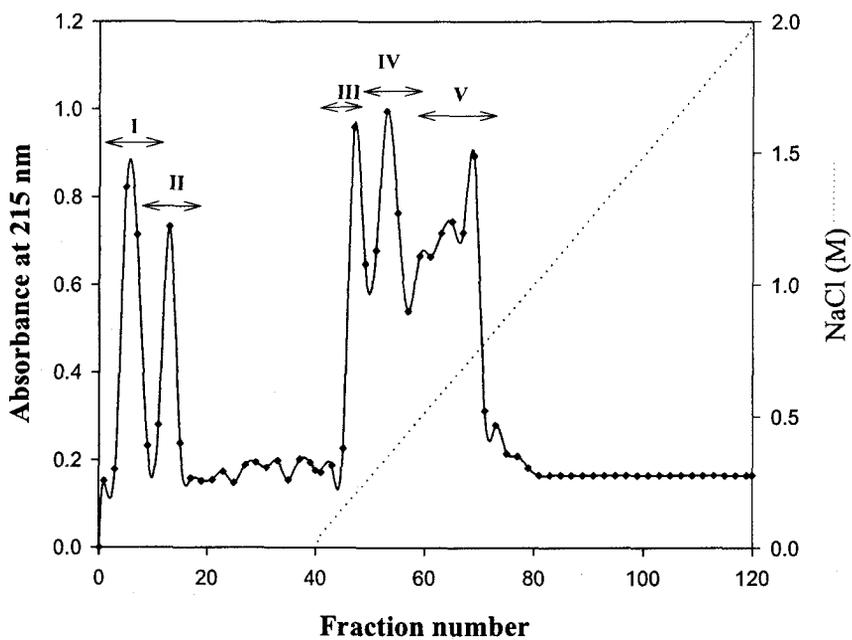


Fig. 21. Purification of ACE inhibitory peptide from APH V on SP-Sephadex C-25 column. Elution was performed at 1 ml/min of flow rate with a linear NaCl gradient (0~2 M) in 20 mM sodium acetate buffer, pH 4.0.

Table 3. ACE inhibitory activity of fractions from SP-Sephadex C-25

Fractions	IC ₅₀ value (mg/ml)
I	0.98
II	0.76
III	0.32
IV	0.11
V	0.45

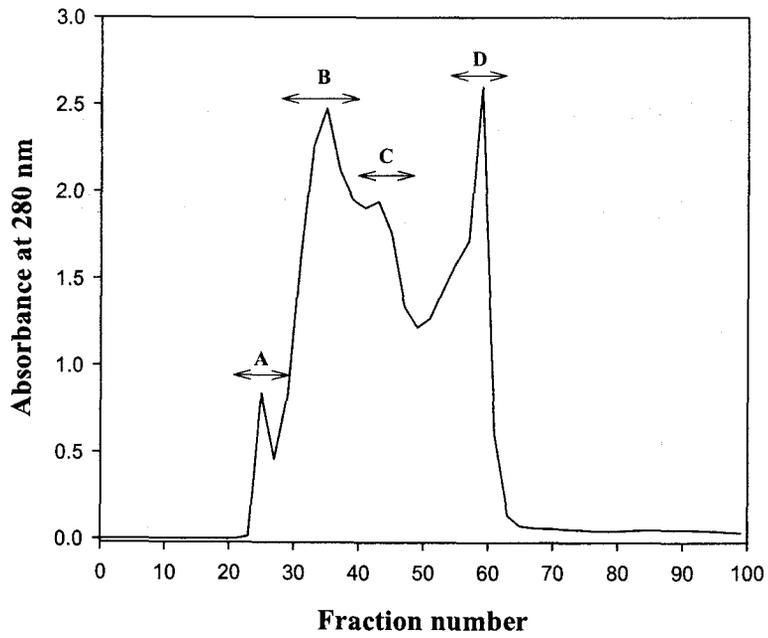


Fig. 22. Gel filtration chromatography of active fraction on Sephadex G-25.

Table 4. ACE inhibitory activity of fractions from Sephadex G-25

Fractions	IC ₅₀ value (mg/ml)
A	0.134
B	0.066
C	0.078
D	0.035

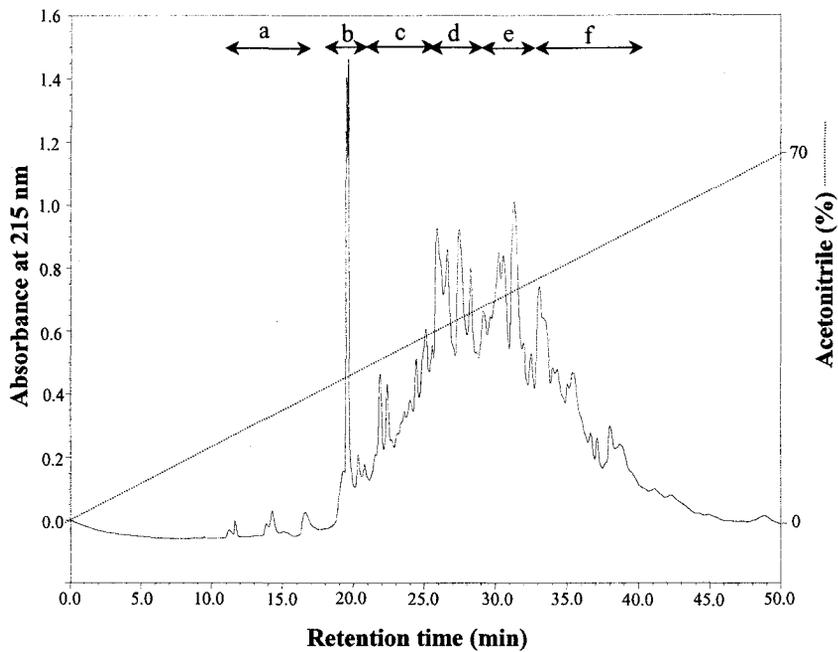


Fig. 23. Reverse-phase chromatography of active fraction D on Capcell Pak C₁₈. HPLC operation was carried out with 70% acetonitrile as mobile phase at 4 ml/min of a flow rate using UV detector as 215nm.

Table 5. ACE inhibitory activity of fractions from reverse-phase chromatography

Fractions	IC ₅₀ value (mg/ml)
a	0.424
b	0.023
c	0.058
d	0.042
e	0.078
f	0.194

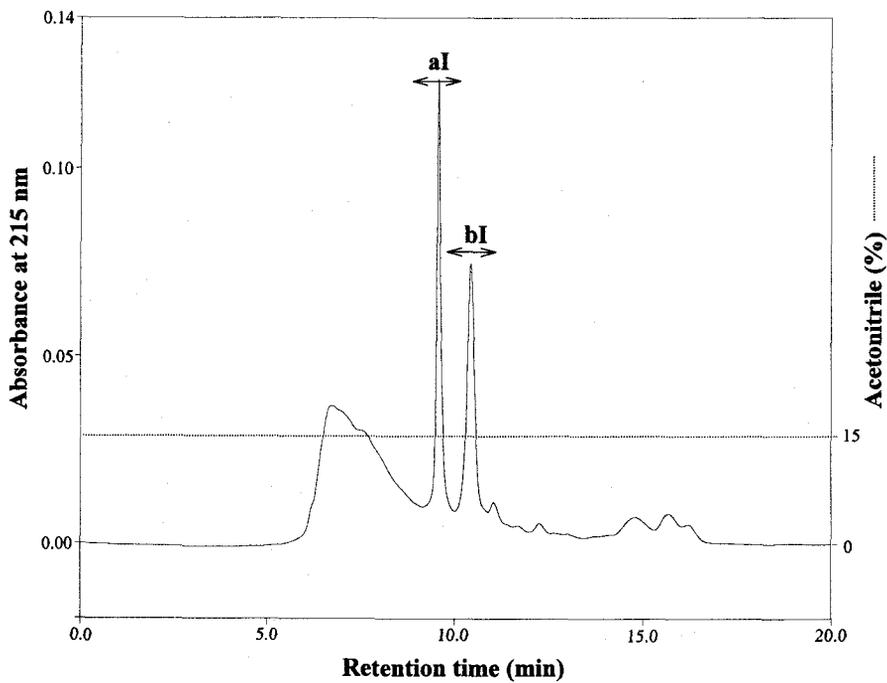


Fig. 24. Rechromatography of active fraction b on Capcell Pak C₁₈-VG column.

Table 6. ACE inhibitory activity of fractions from RP-HPLC

Fractions	IC ₅₀ value (mg/ml)
aI	0.145
bI	0.013

을 첨가하고 기질의 농도 변화에 따른 저해율을 측정 결과, 비경쟁적 저해 메커니즘을 나타내었다 (Fig. 25). Ondetti 와 Cushman (1982)는 C-말단의 세 개의 펩타이드가 ACE 저해 활성에 강력한 영향을 미친다고 하였는데, 이는 C-말단의 아미노산이 ACE의 활성부위와 반응하기 때문이라고 보고하였고, Cheung 등 (1980)은 C-말단에 tryptophan, tyrosine, phenylalanine 및 proline 등의 잔기가 존재할 때 ACE 저해활성이 우수하다고 하였으며, N-말단에는 dipeptide가 지방족 아미노산으로 된 것이 ACE의 활성부위와 효과적으로 결합하여 저해 활성이 우수하다고 보고하였다. 또한 Nakamura 등 (1995)은 단백질 중에 proline 잔기가 ACE 저해활성에 가장 영향을 미치나, C-말단에 존재하는 Arg도 그 구조상 구아니딘의 양전화가 저해활성에 영향을 미친다고 하였다.

6.5. ACE 저해 펩타이드의 아미노산 서열 결정

HPLC를 통하여 최종 정제물질을 분리한 후 Edman 분해법을 이용한 기체상 자동서열분석기로 아미노산 서열을 분석한 결과, 정제된 펩타이드는 Phe-Gly-Ala-Ser-Thr-Arg-Gly-Ala의 8개 아미노산으로 구성되어 있었고, 그 최종 ACE 저해 활성은 1.47 μM 이었다.

일반적으로 항고혈압활성의 보고를 살펴보면, Kim 등 (2001)은 우피 젤라틴 가수분해물의 ACE 저해 펩타이드를 분리 정제한 결과 두 개의 펩타이드를 분리하였는데, 그 서열은 Gly-Pro-Val 과 Gly-Pro-Leu으로 확인되었고 활성은 각각 4.67 μM 및 2.55 μM 였다. Byun 등 (2001)은 명태피 가수분해물로부터 두 개의 ACE 저해 펩타이드를 분리하였으며, 각각 Gly-Pro-Met (17.13 μM) 및 Gly-Pro-Leu (2.55 μM)로 확인되었다. Wako 등 (1996)은 오징어 간과 몸통육을 자가분해시켜 얻은 추출물로부터 ACE 저해활성이 높은 펩타이드를 분리 정제하여 아미노산 서열을 결정한 결과 Try-Ala-Leu-Pro-His-Ala (IC_{50} =9.8 μM) 및 Gly-Tyr-Ala-Leu-Pro-His-Ala (IC_{50} =27.3 μM)였으며, Maruyama

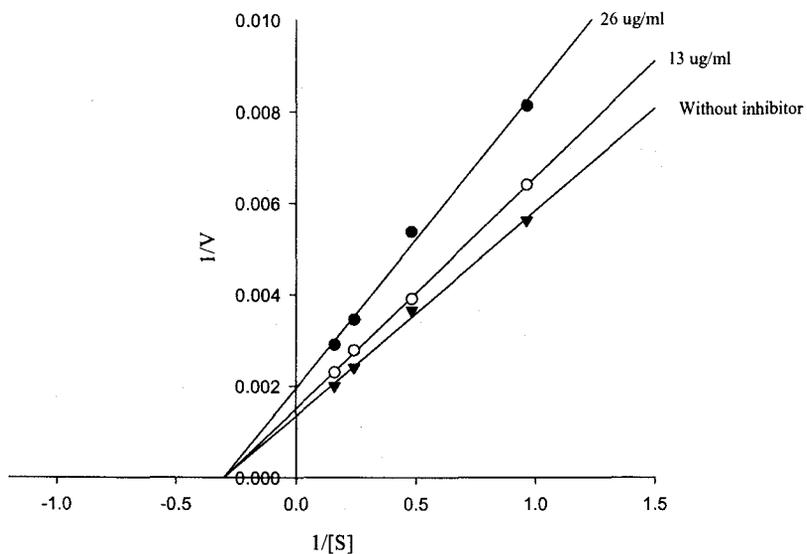


Fig. 25. Lineweaver-Burk plot of ACE inhibitory activity in the presence of inhibitory peptide.

등 (1985)은 casein의 효소적 가수분해물로부터 ACE 저해활성이 높은 펩타이드의 아미노산 서열은 Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg ($IC_{50}=15.0 \mu M$) 및 Phe-Phe-Val-Ala-Pro ($IC_{50}=6.0 \mu M$)으로 보고하였다. 또한, Yokoyama 등 (1992)은 가다랑어의 효소적 가수분해물로부터 ACE 저해활성이 높은 펩타이드의 서열은 Ile-Lys-Pro-Leu-Asn-Tyr ($IC_{50}=43.0 \mu M$) 및 Asp-Tyr-Gly-Leu-Tyr-Pro ($IC_{50}=62.0 \mu M$)이라고 하였으나, 이들을 부분적으로 절단된 형태인 Ile-Lys-Pro, Leu-Asn-Tyr, Asp-Tyr-Gly 및 Leu-Tyr-Pro의 ACE 저해활성은 각각 $1.7 \mu M$, $81 \mu M$, $2700 \mu M$ 및 $6.6 \mu M$ 이었다고 보고하였다. 한편, Kawakami 등 (1995)은 Leu-Lys-Tyr ($IC_{50}=9.78 \mu M$)과 유사한 tripeptide를 합성하여 ACE 저해활성을 측정한 결과, Leu-Lys-Pro ($IC_{50}=2.8 \mu M$) 및 Val-Lys-Pro ($IC_{50}=2.6 \mu M$)의 활성이 우수하다고 보고한 바 있다.

이상의 결과를 살펴볼 때 ACE 저해활성을 나타내는 펩타이드의 구조는 과거 강력한 ACE 저해제로 알려져 있는 뱀독 유래 펩타이드의 C말단 부분인 Pro-Pro 및 Ala-Pro과 깊은 관계가 있는 것으로 생각되어 왔으나, 최근에는 α -zein (Leu-Arg-Pro, $IC_{50}=0.27 \mu M$)과 같이 다른 조합의 아미노산에서도 강한 ACE 저해활성을 나타내는 것으로 보고되어 있고, 뿐만 아니라 펩타이드의 길이 역시 저해활성에 중요한 영향요인이 될 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 ACE 저해활성은 구성 아미노산의 조성에 따라 다소 영향을 받을 것으로 생각되지만, 그 구성 펩타이드의 종류와 아미노산의 서열에 의해 더 큰 영향을 받을 것으로 생각된다. 본 연구에서 밝혀진 ACE 저해 펩타이드 역시 위의 결과들과 비교해 볼때 C-말단에 구성하는 세 개의 아미노산의 배열들과 유사한 Arg-Gly-Ala으로 구성되어 있었고, 활성도 $1.47 \mu M$ 로 우수하였다.

6.6. ACE 저해활성 펩타이드의 *in vivo*에서 혈압강하 활성측정

선천적으로 고혈압을 유발시킨 spontaneously hypertension rat (SHR, 체중 180-220 g, female, 6-8주령)을 대상으로 ACE 저해 peptide를 10 mg/kg (SHR

body weight)되게 경구투여하여 angiotensin I의 승압에 대한 억제효과를 살펴본 결과, 시판용 혈압강하제인 captopril의 효과보다는 다소 낮으나 투여한 후 3시간일 때 23 mmHg의 최고 혈압강하를 나타내었다 (Fig. 26). 최근 많은 ACE 저해 펩타이드가 단백질로부터 분리되었고 그들의 SHR을 이용한 항고혈압 효과가 검토되고 있는데, Fujita 등(1999)은 어육단백질 가수분해물로부터 얻은 Leu-Lys-Pro-Asn-Met이 prodrug 타입의 ACE 저해 펩타이드라고 하였는데, 이것은 Leu-Lys-Pro-Asn-Met이 ACE에 의하여 가수분해되어 Leu-Lys-Pro으로 되는데 Leu-Lys-Pro은 Leu-Lys-Pro-Asn-Met보다 무려 8배나 상승된 ACE 저해 효과를 나타내었다고 보고하였다. 또한 SHR에 경구 투여 후, Leu-Lys-Pro-Asn-Met은 6시간에서 혈압강하가 최대였으나, Leu-Lys-Pro은 4시간에서 최대 혈압강하를 나타내었다. 몇몇 혈압 강하제는 경구 투여 후 비정상적인 혈압상승이나 기침등의 부작용을 나타낸다고 보고되었지만, 본 실험에 사용된 펩타이드는 경구 투여 후 부작용이 나타나지 않아 기능성 간장의 제조시 그 활용이 기대된다.

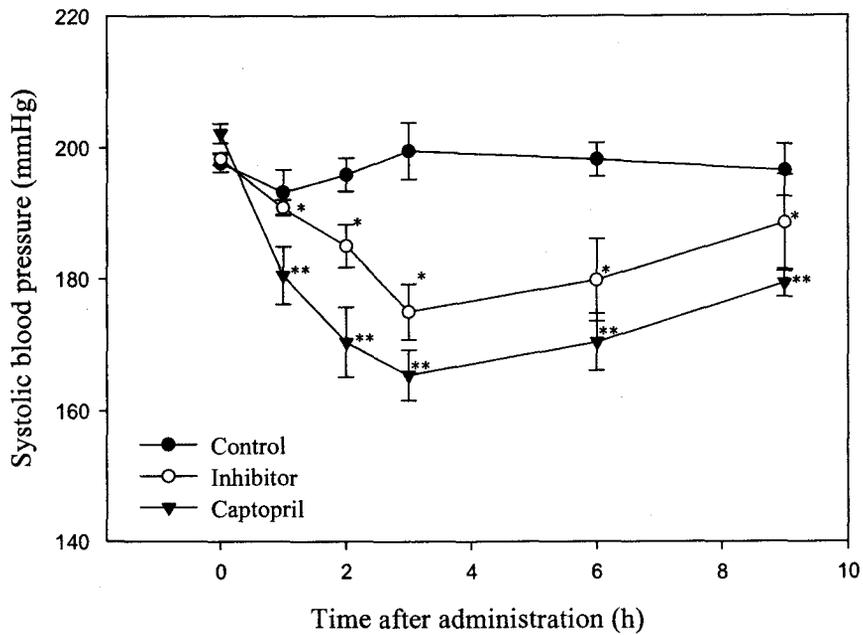


Fig. 26. Change in systolic blood pressure of SHR by administering ACE inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of alaska pollack. Single oral administration was performed with the dose of 10 mg/kg body weight, and SBP was measured 0, 1, 2, 3, 6 and 9h after the administration. Different from control at * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

제 4 장 요약

본 연구에서는 수산가공공장에서 어육을 얻기 위해 필렛 작업 (filleting) 후 발생하는 명태 frame (Alaska pollack frame)을 활용하여 고등어 내장으로 부터 추출한 조효소를 이용해서 명태 frame 단백질을 가수분해하여 막반응기를 이용하여 가수분해물을 분자량별로 대량 분획하였으며, 이들로부터 항고혈압 활성 및 항산화 활성이 높은 펩타이드를 이온교환 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피 및 HPLC로 분리정제하여 아미노산 배열을 결정하였으며 작용기작에 관한 특성도 확인하였다. 또한 세포배양과 SHR *in vivo* 실험을 통하여 각각 항산화활성과 항고혈압활성을 확인하였고, 이들 생리활성 펩타이드는 본 과제의 최종목표인 기능성 천연효소분해 간장의 기능성 첨가성분으로써 활용하고자 하였다.

명태 frame 단백질의 효율적인 회수를 위하여 고등어 내장으로부터 조효소를 추출하였다. 천연기질인 casein과 hemoglobin에 대한 고등어 내장 유래 조효소 (MICE: makerel intestine crude enzyme)의 고유활성을 측정된 결과, casein에 대하여 0.65 U/mg protein으로 나타났으며, hemoglobin에 대하여 0.24 U/mg protein으로 나타났다. 이것은 Kim 등 (1997)이 보고한 참치유문수에서 추출한 조효소의 casein 및 hemoglobin에 대한 고유활성이 0.54, 0.197 U/mg protein 보다 높은 수치이다. MICE의 합성기질에 대한 활성은 trypsin의 ester 합성기질인 benzyl-L-arginine ethyl ester (BAEE)에 대한 활성 (6.456 U/mg protein)이 가장 높았으며, trypsin의 nitroanilide 합성기질인 benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide-naphthylamide (BAPNA)에 대한 활성은 0.124 U/mg protein으로 비교적 낮았다. α -Chymotrypsin의 합성기질인 benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE)와 acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE)에 대한 MICE의 활성은 각각 5.660, 0.856 U/mg protein이었다. 이러한 사실로

볼 때, 고등어 내장의 단백질 분해효소 활성은 상당히 높음을 알 수 있다. 또한, 이러한 고등어 내장의 조효소에는 trypsin 및 α -chymotrypsin의 ester 합성기질에 특이적인 활성을 나타내는 proteinase가 많이 함유되어 있음을 알 수 있다.

추출한 고등어 내장 유래 조효소로 명태가공잔사 단백질을 가수분해하기 위한 pH 조건을 검토한 결과, 명태 가공잔사의 가수분해율은 pH 10.0, 반응 온도 50 °C, 기질 농도 1%, 기질 대 효소비 50 : 1 (w/w)이고 반응시간은 12 h으로 결정되었으며, 이 조건에서 실시한 가수분해도는 67 % 정도로 나타났다.

MICE를 이용하여 명태 frame 단백질을 가수분해하여 가수분해물들을 한외여과막 반응기에서 분자량 크기별로 분획하고 이들의 생리활성을 측정한 결과 분자량 범위가 1 kDa 이하인 APH V에서 가장 높은 항산화활성과 항고혈압활성을 나타내었다. 항산화활성 펩타이드를 분리하기 위해 이온 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피 및 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 최종 분리정제 하였다.

세포실험을 통하여 명태 frame 유래 항산화 펩타이드의 세포독성을 검토한 결과, 가수분해물을 첨가한 군에서는 모두 100% 이상의 생존율을 보였으며, 5 mg/ml의 농도에서 APH V (1 kDa 이하)의 경우 119 %의 생존율을 보여 본 실험에 사용한 가수분해물들은 배양 간세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다. 또한 *t*-BHP의 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물의 항산화 작용을 측정된 결과, 가수분해물 첨가군이 미첨가군에 비하여 15~28 % 정도의 세포 생존율이 증가함을 볼 수 있었다. APH V가 *t*-BHP로 유발된 세포괴사에 대한 가수분해물의 농도에 대한 항산화 효과를 검토한 결과 1.0 mg/ml 일 때 75 %의 세포 생존율을 나타내는 것으로 나타났다.

한편, 가수분해물 중 항고혈압활성을 나타내는 펩타이드를 이온 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피 및 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 분리

정제한 결과, 분자량은 882 Da 였으며 아미노산 서열은 Phe-Gly-Ala-Ser-Thr-Arg-Gly-Ala의 여덟 개의 아미노산으로 구성되어 있었다.

정제된 펩타이드의 ACE 저해 패턴을 Lineweaver-Burk plot으로 측정한 결과 non-competitive inhibition을 나타내었고, 최종 항고혈압 활성이 1.47 μM 의 IC_{50} 값으로 아주 우수하였다. 선천적으로 고혈압을 유발시킨 spontaneously hypertensive rats (SHR)를 이용하여 *in vivo*에서 항고혈압활성을 측정하기 위해서 체중 1 kg당 10 mg의 펩타이드를 경구투여한 결과, 시판용 혈압강화제인 captopril의 효과보다는 다소 낮으나 투여한 후 3시간 후 23 mmHg의 혈압 강하가 나타났다. 따라서 이 펩타이드를 기능성 천연효소분해 간장의 재료로 이용하면 그 활용이 기대된다.

본 과제의 최종목표인 기능성 천연효소분해간장을 제조하기 위하여 생리 활성 성분으로써 수산가공잔사인 명태 frame의 가수분해물을 이용하였으며, 효소로 가수분해한 결과 APH V 획분에서 가장 우수한 항산화활성과 항고혈압활성이 나타나 이를 간장의 제조 원료로 결정하였다.

제 5 장 참고문헌

- Adler-Nissen J. (1986) *Protein tailoring and reagents for food and medical uses* (Feeney R.E., Whitaker J.R., Eds., Marcel Dekker Inc. New York, p.97
- Anson, M. L. (1938) The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Physio.*, 22, 79-89.
- Benjamin, H. S. Li, L. L. and Yoon, P. (1993) Thymic peptide protects vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Life Sciences*, 52, 1787-1796.
- Benson, B., I. Ebels and V. J. Hruby (1990) Isolation and structure elucidation of bovine pineal arginine vasopressin: Arginine vasotocin not identified., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 36(2), 109-121.
- Bishov, S. J. and Henick, A. S. (1972) Antioxidant effect of protein hydrolysates in a freeze-dried model system. *J. Food Sci.*, 37, 873-875.
- Branen, A. L. (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59-.
- Brody, J. (1965) Fishery by Product Technology AV 1:1 Chem. 193, 265
- Bush, K., Henry, P. R. and Slusarchyk, D. S. (1984). Muraceins-muramyl peptides produced by *Nocardia orientalis* as angiotensin converting enzyme inhibitors. *J. Antibiotics*, 37, 330-335.
- Byun, H. G. and Kim, S. K. (2001) Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. 36, 1155-1162.
- Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck and P. Tempst (1989) Apidaecins: Antibacterial peptides from honeybees.: *EMBO-J.* 8(8) 2387-2391

- Cheung, H. S., F. L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo and D. W. Cushman (1980) Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.*, **255**(2), 401-407.
- Chung, K. S. and Choi, S. H. (1997) Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumor cells using MTT assay.
- Cushman, D. W. and H. S. Cheung (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, **20**, 1637-1648.
- Davies, K. F. A. (1986) Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: a hypothesis, *J. Free Rad. Biol. Med.*, **2**, 155-173.
- Doke, S. N. and Ninjoor, V. (1987) Characteristics of an alkaline proteinase and exopeptidase from shrimp (*Penaeus indicus*) muscle. *J. Food Sci.*, **52**, 1203-1208.
- Ehlers, M. R. W. and J. F. Riordan (1990) Hypertension : Pathophysiology, diagnosis and management (Edited by Laragh, J. H. and B. M. Brenner). *Angiotensin-Converting Enzyme. Biochemistry and Molecular Biology*. pp. 1217-1231, Raven Press, LTD., New York.
- Erlanger, B. F., Edel, F. and Cooper, A. G. (1966) The action of chymotrypsin on two new chronogenic substrates. *Arch. Biochem. Biophysics*, **115**, 209-210.
- Ferreira, S. H., D. C. Bartelf and L. J. Greene (1970) Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, **9**, 2583-2593.
- Fox, P. F., P. A. Morrissey and D. M. Mulvihill (1982) In *Developments in Food Proteins*, Hudson B.J.F.(Ed.), Applied Science Publishers, London
- Frankel, E. N. (1984) Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological

- significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1908-1917.
- Frohlich, E. D. (1982) Hemodynamic factors in the pathogenesis and maintenance of hypertension. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **41**, 2400-2408.
- Fujii, M., N. Matsumura, K. Mito, T. Shimizu, M. Kuwahara, S. Sugano and H. Karaki (1993) Antihypertensive effects of peptides in autolysate of bonito bowels on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(12), 2186-2188.
- Fujimoto, K. and Kaneda (1980) Screening test for antioxidigenic compounds from marine algae and fractionation from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1125-.
- Fujino, M., C. Kitada (1986) Design of bioactive molecules-Strategies and targets for generation of novel medicines and pesticides., Eds. Yoshioka, H. and K. Shudo, Soft Science Pub., Tokyo, 72-95.
- Fujita, H., Yoshikawa, M. (1999) LKPNM: a prodrug-type ACE inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacol.*, 44, 123-127.
- Haard, N. F. and Simpson, B. K. (1994) Protease from organisms and their used in the seafood industry, pp. 132-154, in *Fisheries Processing: Biotechnological Applications* (ed. by Martin, A. M.), London.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free radicals in biology and medicine*, Clarendon Press, Oxford.
- Hatano, T., Kagawa, H. and Okuda, T. (1988) Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 2090-2097.
- Hummel, B. C. W. (1959) A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 1393-1399.
- Iwata, K., Kobashi, K. and Hase, J., (1974) Studies on fish muscle alkaline protease. 1. Some enzymatic properties of carp muscular alkaline protease. *Bull.*

- Japan. Soc. Sci. Fish.* 40, 189-200.
- Iwami, K., Hattori, M. and Ibuki, F. (1987) Prooxidant antioxidant effect of wheat gliadine on linoleate peroxidation in powder model systems at high water activity, *J. Agri. Food Chem.*, 35, 628-631.
- Kawamura, Y. (1989) Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Kagaku to Seibutu* (in Japanese), 27(12), 766-768.
- Kim, S. K., Byun, H. G., Park, P. J. and Shahidi, F. (2001) Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2992-2997.
- Kim, S. K., Jeon, Y. J. and Byun, H. G. (1997) Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca, *Fisheries Science*, 63(3), 421-427.
- Kinsella, J. E. and K. J. Shetty (1979) Chemical modification for improving functional properties of plant and yeast proteins. *A Survey CRC Critical Food Sci. Nutr.*, 7, 219
- Koguchi, T., Yamada, K., Yamato, M., Okachi, R., Nakayama, K. and Kase, H. (1986) K-4, a novel inhibitor of angiotensin I converting enzyme produced by *Actinomadura spiculosopora*, *J. Antibiotics*, 39, 364-371.
- Kohama, Y., H. Oka, Y. Kayamori, K. Tsujikawa, T. Mimura, Y. Nagase and M. Satake (1991) Potent synthetic analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from muscle. *Agric. Biol. Chem.*, 55(8), 2169-2170.
- Kohmura, M., N. Nio and Y. Ariyoshi (1991b) Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of various β -casein. *Agric. Biol. Chem.*, 54(4), 1101-1102.
- Maruyama, S., H. Suzuki and N. Tomizuka (1985a) Effects of zinc ion on inhibition by angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from casein.

- Agric. Biol. Chem.*, **49**(9), 2809-2810.
- Maruyama, S., K. Nakagomi, N. Tomizuka and H. Suzuki (1985b) Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, **49**(5), 1405-1409.
- Maruyama, S., S. Miyoshi, T. Kaneko and H. Tanaka (1989b) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric. Biol. Chem.*, **53**(4), 1077-1081.
- Maruyama, S., S. Miyoshi and H. Tanka (1989a) Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**(10), 2763-2767.
- Maruyama, S. and H. Suzuki (1982) A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, **46**(5), 1393-1394.
- Masaki, N., Kyle, M. E. and Farber, A. L. (1989) Tert-butyl hydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **269**, 390-399.
- Matsufuji H., T. Matsui, E. Seki, K. Osajima, M. Nakashima, and Y. Osajima (1994) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**(12), 2244-2245.
- Matsumura, N., M. Fujii, Y. Takeda and T. Shimizu (1993a) Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(10), 1743-1744.
- Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Iwami, K. (1966) Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo*, **19**,

210-214.

- Miyoshi, S., H. Ishikawa, T. Kaneko, F. Fukui, H. Tanaka and s. Maruyama (1991a) Structures activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, **55**(5), 1313-1318.
- Murakami, K. and Noda, M. (1981) Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. Purification and characterization of three alkaline proteinase from the pyloric caeca. *Biochem. Biophys. Acta.*, **689**, 17-26.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. and Takano, T. (1995a) Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.*, **78**, 777-783.
- Ondetti, M. A., B. Rubin and D. W. Cushman (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme : New class of orally active antihypertensive agents. *Science*, **196**, 441-444.
- Ondetti, M. A., N. J. Williams, E. F. Sabo, J. Pluscec, E. R. Weaver and O. Kocy (1971) Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry*, **10**, 4033-4039.
- Ondetti, M. A. and D. W. Cushman (1982) Enzyme of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 283-308.
- Ooshiro, Z. (1971) Studies on proteinase in the pyloric caeca of fishes-II. Some properties of proteinase purified from the pyloric caeca of mackerel. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish*, **37**, 145-148.
- Osawa, T. and Namiki, M. (1981) A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 735-739.
- Pascoe, G. A. and Reed, D. J. (1987) Vitamin E protection against chemical-induced cell injury II: Evidence for a threshold effect of cellular α

- tocopherol in prevention of adriamycin toxicity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 256, 159-166.
- Pyeun, J. H. and Kim, H. R. (1986) The proteinase distributed in intestinal organs of fish. 1. Purification of three alkaline proteinases from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber japonicus*, *Bull. Korean Fish. Soc.*, 19, 537-546.
- Ramakrishna, M., Hultin, H. O. and Atallah, M. T. (1987) A comparison of dogfish and bovine chymotrypsin in relation to protein hydrolysis. *J. Food Sci.*, 52, 1198-1202.
- Rhee, K. S. Ziprin, Y. A. and Rhee, K. C. (1979) Water-soluble antioxidant activity of oilseed protein derivatives in model lipid peroxidation systems of meat, *J. Food Sci.*, 44, 1132-1135.
- Rivett, A. J. (1989) The multicatalytic proteinase of mammalian cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, 268, 1-8.
- Pratt, D. E. (1972) Water soluble antioxidant activity of soybeans, *J. Food Sci.*, 37, 322-323.
- Saito, K., Jin, D-H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T. and Nokihara, K. (2003) Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinational chemistry. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3668-3674.
- Saxena, P. R. (1992) Interaction between the renin-angiotensin -aldosterone and sympathetic nervous systems. *Journal of cardiovascular Pharmacology*, 9(6), S80-S88.
- Simpson, B. K., Simpson, M. V. and Haard, N. F. (1990) Properties of trypsin from the pyloric caeca of Atlantic cod (*Gadus morhua*), *J. Food Sci.*, 55, 959.
- Suetsuna, K., M. Yamagami and K. Kuwata (1988) Inhibitory activity against angiotensin I-converting enzyme of peptides originating from fish and shellfish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54(10), 1853.

- Suh, H. J., Cho, S. J. Whang, J. H., Lee, H. and Yang, H. C. (1997) Characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from squid hydrolysate. *Food Sci. Biotechnol.*, 6, 122-124.
- Uesaka, T., Ikeda, I. Kubota, Y. Muneoka and M. Ando (1991) Structure and function of a pentapeptide isolated from the gut of the eel., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180(2), 828-832
- Vigneaud, V., Gish, d. T. and Katsoyannis, P. G. (1954) A synthetic preparation possessing biological properties associated with arginine-vasopressing, *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 4751-4752.
- Vigneaud, V., Ressler, C. Swan, J. M., Roberts, C. W., Katsoyannis, P. G. and Gordon, S. (1953) The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin, *H. Amer. Chem. Soc.*, 75, 4879-4880.
- Yamaguchi, N., Yokoo, Y. and Fujimaki, M. (1979) Antioxidative activity of protein hydrolyzates, *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaish*, 26, 65-70.
- Yee, J. J., Shipe, W. F. and Kinsella, J. E. (1980) Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper-catalyzed methyl linoleate oxidation. *J. Food Sci.*, 45, 1082-1083.
- Yokoyama, K., H. Chiba and M. Yoshikawa (1992) Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(10), 1541-1545.
- 신재익, 안창원, 남희성, 이형재, 이형주, 문태화 (1995) 된장으로부터 ACE 저해 peptide의 분획, *한국식품과학회지*, 27, 230-234.
- 박윤주, 윤여표, 이형주, 장해동 유정으로부터 고정화 트립신을 이용한 기능성 펩타이드의 생산, *한국식품과학회지*, 28, 99-104(1996).
- 이태기, 박경범, 박덕천, 염동민, 김인수, 구연숙, 박영호, 김선봉 멸치액 효소가수분해중의 Angiotensin 전환 효소 저해작용, *한국수산학회지*, 31,

875-881(1998).

황종현, 메주유래 B. Subtilis SCB-3으로 제조된 된장의 Angiotensin I Converting Enzyme 저해효과, 한국식품영양과학회지, 26,775-783(1997).

제 2 세부과제

명태가공부산물을 이용한 기능성 간장의 개발

**Development of Functional Fish Sauce Using Alaska
Pollack Processing Wastes**

제 1 장 서 론

최근 식품은 생명공학 기술의 발전과 더불어 많은 과학화가 진행되어 단지 영양적 가치의 수단에서 벗어나 건강 지향적인 기능성 식품시대를 맞이하고 있다. 외국의 선진국들은 식품분야의 선진화를 위하여 안전하고 우수한 생리기능성 소재 개발에 매년 막대한 비용을 투자하고 있으며, 특히 생리기능성 신소재를 이용하여 성인병 예방 등과 같은 기능성 식품 소재 개발을 위하여 집중적인 연구개발에 박차를 가하고 있다.

식품산업은 그 종류나 규모면에서 아주 다양하지만, 모두 극심한 경쟁력으로 인하여 많은 어려움을 겪고 있다. 식품산업의 생산활동은 원료, 기술, 자본, 인력에 의하여 결정되는데 우리나라 실정을 보면 원료는 대부분이 수입되고 있을 뿐만 아니라 가공기계와 설비도 수입에 의존하는 경우가 많다. 오늘날 우리나라의 식품산업이 크게 성장한 것은 저렴한 노동력에 힘입은 바가 큰데 최근 임금의 급격한 상승으로 성장의 한 요소를 잃게되었다. 따라서 우리나라의 식품산업이 구조적으로 피할 수 없이 안고 있는 원료, 생산시설의 취약점에 임금상승의 압력을 극복할 수 있는 방안은 생산성과 품질을 향상시킬 수 있는 자동화 기술을 시급히 개발하는 것이다.

장(醬)은 우리나라를 비롯한 대부분 동양인들이 즐겨먹고 있는 전통식품으로 여러 종류가 있지만, 액상으로 된 것들을 장류(醬油)라 한다. 장류에는 젓갈, 액즙, 간장 등이 있지만 가장 널리 사용되면서 음식문화를 주도하는 것은 간장이다. 간장은 기본 조미식품이기 때문에 새로운 식생활의 변화에 대해서도 급격히 변할 수 없는 식품이기 때문에 새롭고 독특한 맛을 가지면서 국민의 건강에 얼마나 안전한가가 매우 중요하다.

현재 시판되고 있는 간장의 대다수를 차지하고 있는 것은 양조간장과 산분해간장이다. 양조간장은 오랜 숙성기간을 통하여 특유의 향과 맛을 가지고

있는 장점이 있으나 제조기간이 길고 제조비용이 높다는 단점이 있다. 반면, 산분해간장은 제조기간이 짧고 제조비용이 낮아 양조간장의 단점을 보완할 수 있어 유통간장의 70% 정도로 널리 사용되고 있다. 그러나 양조간장 특유의 맛이 부족하며, 특히 산분해간장은 탈지대두 단백질에 염산을 이용하여 가수분해한 후 중화하여 만든 속성 간장이므로 안전성 및 영양성 측면에서 양조간장보다 뒤떨어진다. 국내장류업계는 1960년대 주택구조의 변화 등의 도시화에 힘입어 점차 장류의 수요가 증가하기 시작하면서 1962년에는 대한장류공업협동조합이 설립되어 업계의 공동발전을 위한 구심점이 형성되었고 군수장류납품의 일괄계약 등 많은 일을 시작하였으며, 70년대에는 시장경쟁이 치열해져 중소기업체의 폐업이 속출하였으나, 1980년대는 안정을 찾기 시작하였다. 그러나, 1990년대초 산분해간장의 MCPD (3-Monochloro-1,2-propanediol) 파동으로 사회적인 문제가 대두되어 이보다 안정한 양조간장, 효소분해간장 및 기능성간장으로 소비자의 관심이 증대되고 있다. 장유 파동 여파로 인하여 보건복지부에서 간장의 특질개선을 독려하여 다소 향상되고 있으나 대부분의 공장규모가 20명 내외의 중소기업으로 여러 가지 문제를 안고 있다. 그러나 간장의 소요는 1996년도 384 kl로 1989년 211 kl에 비해 현저한 증가를 보이고 있다.

한편, 단백질 가수분해물은 각종 가공식품이나 조미료, 삼푸, 화장품 등 기타 여러 분야에서 필수적으로 이용되고 있지만, 국내에서는 거의 단백질의 산가수분해물을 이용하고 있는 실정이다. 그러나 단백질을 산이나 알칼리로 가수분해 할 경우 tryptophan, cysteine과 같은 필수 아미노산이 손실될 뿐만 아니라 lysinoalanine과 같은 독성이 있는 부산물이 생성되어 일본을 비롯한 구미 선진국에서는 단백질의 산가수분해물의 안전성 문제가 대두되고 있다. 특히 일본에서는 거의 효소로 가수분해시킨 단백질을 이용하고 있으며, 미국에서도 단백질의 산가수분해물에 대하여 사용금지조치가 취해지고 있다. 국내업계에서도 단백질을 산분해하여 제조되는 화학간장의 수명을 향후 5년

정도 내다보고 대체간장의 개발에 노력을 기울이고 있다. 그러나, 우리나라의 식품산업은 지금까지 많은 연구노력에도 불구하고 과학적 인식의 부족과 과감한 연구투자 부족으로 인하여 많은 부분에서 상당히 낙후되어 있는 것이 사실이다. 특히 수산물로부터 새로운 기능성 신소재의 개발에 대한 국민의 요구에 부응하지 못하고 있으며, 대다수 국민들로부터 안전한 식품 요구에 과학적으로 적절하게 대처하지 못하고 있는 실정이다. 현재까지 수산물과 관련된 연구로는 어류가공잔사를 이용한 조미료 제조 및 상업적인 공정화 연구 (三宅, 1982), 크릴간장 제조에 관한 연구 (Lee 등, 1984), 알칼리 처리에 의한 멸치추출액의 제조 (Kim 과 Park, 1988), 어패류의 정미성분 및 조미료 소재 개발에 관한 연구 (Lee 등, 1987; Koo 등, 1985), 천연물의 엑기스와 천연조미료 (太田, 1990), 정어리육을 이용한 속성정어리 간장 엑스분의 제조 (Lee 등, 1988), 고등어 분말스프의 제조 및 정미성분에 관한 연구 (Lee 등, 1987), 속성멸치간장 엑기스분에 관한 연구 (Lee 등, 1989), 고등어 가공잔사를 이용한 어간장의 제조 (Lee 등, 1986), 가다랑어 잔사를 이용한 어간장의 제조 (Lee 등, 1989), 말지취 잔사를 이용한 어간장의 제조 (Lee 등, 1988) 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 수산가공부산물로 대량 발생되고 있는 명태 frame 단백질을 고등어 내장 유래 조효소로 가수분해하여 효율적으로 회수하여, 이를 막반응기 장치에서 분자량에 따라 가수분해물들을 대량적으로 분획하였다. 각 가수분해물들의 기능성을 탐색하여 활성이 높은 획분을 기능성 천연효소분해 간장의 기능성 배합성분으로 활용하고 패류 중 향미성분이 뛰어난 굴을 자가발효시켜 만든 굴 발효조미액을 첨가하여 맛과 향이 우수한 간장을 제조하고자 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

1. 재료

삼천포 어패류시장에서 구입한 굴 (*Crassostrea gigas*)를 수회 수세한 후 30 분 정도 물을 뺀 다음, 무게를 측정하여 소금을 25% (w/w)되게 첨가한 후 20℃에서 숙성시킨 후 월별로 달여서 발효조미액을 만들어 시료로 사용하였다.

굴 발효조미액의 생리활성 물질을 정제하기 위하여 사용된 Sephadex G-50 및 SP-Sephadex C-25 등의 펩타이드 정제용 수지는 Sigma사, HPLC (Thermo Separation Products사, Model Spectra System P2000)로 펩타이드를 분리·정제 하는데 필요한 HPLC용 acetonitrile, ethanol 및 water 등은 Fisher Scientific사에서 구입하여 사용하였다.

ACE 저해활성 측정에 사용된 angiotensin I converting enzyme (ACE), Hippuryl-Histidyl-Leucine (HHL) 및 captopril 등도 Sigma사에서 구입하였다.

또한, 세포배양계에서의 항암활성을 측정하기 위해 사용한 간암세포들 (Hep3B 등)은 동국대학교 의과대학 약리학 교실에서 분주받아 사용하였으며, CCK-8 cell counting kits는 일본 Dojindo사로부터 구입하였으며, 그 외의 *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP), MTT (4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), L-glutamine, dimethyl sulfoxide(DMSO), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), nitro blue tetrazolium(NBT)는 Sigma Chemical사로부터 fetal bovine serum (FBS) 및 antibiotic/antimycotics는 Gibco사 (Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, USA)로부터 malondialdehyde tetrabutylammonium salt (MDA)는 Fluka사 (Fluka Chimie AG, Switzerland)로부터 구입하였으며, 그외의 모든 시약은 분석용 특급시약

을 구입하여 사용하였다.

2. 굴을 이용한 발효조미액의 제조

단백질 가수분해물만을 이용하여 간장을 제조할 경우 맛과 향이 없으므로 맛, 향미성분의 향상을 위하여 굴을 숙성시켜 발효조미액을 제조하여 첨가하였다. 먼저, 굴을 수회 수세한 후 30분 정도 물을 뺀 다음, 무게를 측정하여 소금을 25% (w/w)되게 첨가한 후 20℃에서 숙성시킨 후 월별로 달여서 발효조미액을 제조하였다.

3. 굴 발효조미액의 성분분석

3.1. 일반성분 분석

20℃에서 발효숙성 시킨 굴을 달여서 탈염한 후 동결건조하여 상법에 따라 일반성분을 측정하였다. 즉, 수분은 상압 가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법, 조회분은 건식회화법으로 측정하였다.

3.2. 구성아미노산 분석

아미노산 분석은 시료 50 mg을 ampoule에 넣고 6 N HCl 2 ml를 가하여 봉한 후 110℃에서 24시간 가수분해하였다. 분해액을 여과하고 감압건조하여 염산을 제거한 후 sodium loading buffer (pH 2.2)로 25 ml가 되게 정용하여 이 중 일부를 아미노산 자동분석기에 주입하여 정량하였다.

3.3. 유리아미노산 분석

유리 아미노산 분석은 시료를 3 g 정평하여 70% 에탄올 용액에 녹여 100 ml가 되게 정용한 후 원심분리 (4,000×g, 10 min)하였다. 그 상층액을 20 ml

취하여 감압 건조하여 에탄올을 제거한 다음 최종 20 ml가 되게 정용하였다. 이 중 10 ml를 취하고 그 용액속에 5-sulfosalicylic acid 0.5 g을 첨가하여 냉암소에서 1시간 방치한 후 다시 원심분리 (12,000×g, 5 min)하여 상층액 5 ml를 취하고 감압건조한 후 lithium loading buffer (pH 2.2)로 2 ml 되게 정용하였다. 이 중 일부를 취하여 아미노산 자동분석기로 유리 아미노산 조성을 분석하였다.

3.4. 핵산관련물질의 분석

핵산관련 물질은 고성능 액체크로마토그래피 (Dionex Co.)를 사용하여 정량하였으며, HPLC 분석조건으로서 이동상 용매는 triethylamine-phosphoric acid (pH 7.0), 유속은 0.8 ml/min, 컬럼은 μ Bondapak C₁₈ (300×3.9 mm), 컬럼 온도 30°C이며, 용출된 피크는 UV검출기로 254 nm에서 확인하였다.

4. 굴 발효조미액 성분의 생리활성 검토

4.1. 굴 발효조미액의 항고혈압활성

4.1.1. ACE 저해활성을 통한 항고혈압활성 측정

ACE 저해활성은 Cushman와 Cheung (1971)의 방법에 따라 측정하였다. 일정량의 가수분해물을 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3, 300 mM NaCl 함유)에 녹인 가수분해액 50 μ l에 25 mU/ml ACE용액 50 μ l를 가한 후, 37°C에서 30분간 항온처리하였다. 여기에 4.15 mM Hip-His-Leu (107.4 mg/10 ml sodium borate buffer) 150 μ l를 넣고 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 1 N HCl 용액 0.25 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate 0.5 ml를 가하여 교반한 다음, 원심분리 (2,500×g, 5 min)시켜 상층액 200 μ l를 분취하였다. 이 상층액을 완전히 건조시킨 다음 증류수 1 ml를 가하여 용해시키고,

228 nm에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해제의 농도는 ACE의 저해활성을 50% 저해시키는데 필요한 가수분해물의 농도를 계산하여 IC₅₀ (mg/ml)로 정의하였다.

4.1.2. *In vivo*에 의한 혈압강하활성 측정

선천적으로 고혈압을 유발시킨 spontaneously hypertension rat (SHR, 체중 180-220 kg, female, 6-8주령)를 대상으로 ACE 저해 펩타이드를 10 mg/kg (SHR body weight)되게 경구투여하여 angiotensin I의 승압에 대한 피험액의 억제효과를 검토하였다. 생리식염수에 용해한 피시험액 0.45 ml (투여한 후 세정에 사용한 생리식염수를 포함)로 하였다. 혈압은 경시적으로 비관혈식혈압측정장치로 꼬리혈압을 측정하였으며 대조구로써 시판용 혈압강하제인 captopril을 사용하였다. 이 때 최고혈관압력, 즉 SBP을 기준으로 비교하였다.

4.1.3. ACE에 대한 저해 패턴의 측정

ACE에 대한 저해 패턴은 Bush 등 (1984)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 다양한 농도의 펩타이드를 반응액에 첨가하고, 기질 농도를 달리하여 ACE 저해 활성을 측정하였다. 펩타이드를 첨가한 후 ACE의 반응속도는 Lineweaver-Burk plot를 이용하여 저해 패턴을 결정하였다.

4.2. 항암활성 측정

4.2.1. 세포배양

암세포 (HeLa, Hep3B 등)를 fetal bovine serum (FBS)이 10% 함유된 RPMI-1640배지로 배양하였다. 즉, 75-cm² plastic flask (Falcon Co., England)에 암세포를 10% FBS, 7.5% NaHCO₃, 150 µg/ml, glutamine 58.4 µg/ml 및 antibiotic/antimycotics 4.4 µ/ml 가 함유된 RPMI-1640배지로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

4.2.2 세포정량

세포가 자란 75-cm² plastic flask에서 배지액을 제거하고, CMF-PBS (calcium magnesium free-phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세척한 후, 0.25% trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 세포배양액으로 중화시켜서 원심분리 (80×g, 3 min) 하였다. 남은 세포의 pellet에 배양액을 가한 다음, 멸균 피펫으로 반복흡입하여 단일 세포부유액을 만든 후 trypan blue를 세포부유액과 9:1의 비율로 혼합하여 광학현미경상에서 혈구계산판 (Hemocytometer)을 이용하여 측정하였다.

4.2.3. 세포증식능 측정에 의한 항암활성 측정

세포 증식능 측정은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay를 이용하여 측정하였다. 즉, 정상세포와 여러 가지 암세포를 배양한 후 분자량별로 분획한 가수분해물을 첨가한 다음, 다시 18시간 배양시키고, 각 세포 부유액을 96-well plate에 100 µl/well되도록 분취하였다. 이를 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양한 후, CCK-8 kit solution을 취하고 배양기에서 다시 1~4 시간동안 배양시켰다. Microplate reader (450 nm)를 이용하여 측정한 값으로 세포증식능을 결정하였다.

4.3. Apoptosis 유도활성

4.3.1. 형태학적 분석

세포의 형태변화는 Hasegawa 등 (1996)에 의한 staining nuclei 방법으로 측정하였다. 즉, 세포를 10⁴ cells/well이 되도록 분주한 다음, 2시간 배양한 후 시료를 첨가하여 24시간 배양하였다. 이들 세포를 수거한 후 4% paraformaldehyde로 고정하고 10 µM Hoechst 33342로 실온에서 2시간 염색한 후 핵의 모양을 형광현미경으로 관찰하였다.

4.3.2. DNA 분절화 분석 (DNA fragmentation analysis)

DNA fragmentation 분석은 Compton and Cidlowky (1998)의 방법으로 측정하였다. 즉, 배양 세포를 원심분리 (300×g, 10 min)한 후 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA (pH 8.0), 1% SDS 및 100 µg/ml DNase-free RNase의 혼합 용액 400 µl를 첨가한 다음, 1시간 후 100 µg/ml 농도가 되도록 proteinase K를 첨가하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 고분자량을 가진 DNA는 phenol-chloroform으로 추출하고 ethanol로 침전시킨 후 1 mM EDTA가 포함된 10 mM Tris-HCl을 섞은 후 DNA 10 µg을 3 µl의 loading buffer (60% glycerol, 0.1% xylene cyanol, and 0.1% bromphenol blue)와 섞어준 후 2% agarose gels에서 전기영동하였다.

4.3.3. Flow cytometry에 의한 세포주기 분석

Flow cytometry에 의한 세포주기 분석은 DNA nick end labeling (TUNEL) assay법에 의하여 측정하였다. 즉, 세포의 부유액을 원심분리 (800×g, 10 min)하여 상층액을 제거한 후 CMF-PBS로 두 번 세포를 세척하고 세포의 수를 counting한 다음 세포 침전물을 0.5 ml의 PBS로 잘 부유시키고, 차가운 ethanol을 0.5 ml 첨가하여 4°C에서 한시간 방치하였다. 4.5×10^6 개의 고정된 세포를 원추형 시험관에 넣어 원심분리 (800×g, 10 min)하여 상층액을 제거한 후, 1% bovine serum albumin (BSA)가 포함된 PBS 용액으로 수세하고 원심분리 (800×g, 5 min)하였다. 세포 침전물을 1% BSA가 포함된 PBS 0.8 ml로 부유시키고, 희석배수 10배인 PI 용액 (propidium iodide, 500 µg/ml in 3.8×10^{-2} M sodium citrate, pH 7.0)을 0.1 ml 처리하고 RNase A 100 µl (10 mg/ml prepared in 10 mM Tris-HCl, PH 7.5)를 0.1 ml 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4°C에서 염색하였다. 이들 세포를 35 µm 정도의 pore size를 가진 nylon mesh에 통과시킨 후 FACScan flow cytometry system (Becton Dickinson,

San Jose, CA) 유세포분석기를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

5. 굴 발효조미액으로부터 생리활성 펩타이드의 분리 및 정제

5.1. 이온교환 크로마토그래피

20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)로 미리 평형화시킨 SP-Sephadex C-25 column ($\varnothing 4.0 \times 45$ cm)에 굴 발효조미액을 주입하고, 동일한 완충용액 250 ml로 비흡착부분을 용출시킨 후, 흡착된 부분은 완충용액 700 ml와 2 M NaCl용액 700 ml를 사용하여 선형상 농도구배법으로 분별용출 (flow rate: 1 ml/min, collection volume: 5 ml)하였다. 각 획분은 280 nm 및 220 nm에서 흡광도를 측정하여, 각 분획물을 동결건조한 후, 일정량을 정평하여 항고혈압 활성을 측정하여 비교하였다.

5.2. 겔여과 크로마토그래피

양이온 교환 수지인 SP-Sephadex C-25를 충전시킨 column에서 분리한 획분 중에서 각 활성이 높은 분획물을 탈이온수로 평형화시킨 Sephadex G-50 column ($\varnothing 2.5 \times 98$ cm)에 주입하고, 탈이온수로 용출(flow rate: 1 ml/min, collection volume: 5 ml)시켰다. 각 분획물을 280 nm 및 220 nm에서 흡광도를 측정한 후, 이를 동결건조한 후, 일정량을 정평하여 항고혈압 활성을 측정하였다.

5.3. HPLC를 이용한 생리활성물질의 최종 분리 및 정제

Sephadex G-50을 충전시킨 겔 크로마토그래피를 이용하여 분리된 분획물 중에서 항고혈압 활성이 가장 높은 획분의 동결건조물을 탈이온수에 녹여 gel permeation column (GPC)이 장착된 고성능 액체크로마토그래피를 이용하

여 탈이온수로 용출(flow rate: 4 ml/min)하였다. 용출된 분획물들을 동결건조한 후, 일정량을 정평하여 항고혈압 활성을 측정하였다. GPC에서 분리된 분획물 중에서 항고혈압 활성이 가장 높은 획분을 octadecyl sililane (ODS) column이 장착된 HPLC 상에서 분리하였으며, 이동상은 0.1% trifluoroacetic acid가 포함된 acetonitrile를 사용하여 H₂O와 선형상 농도구배법 (0~11%, 20 min)으로 용출시켰다.

6. 명태 frame 단백질 가수분해물과 굴 발효조미액을 이용한 기능성 천연 효소분해 간장의 제조

명태 frame 단백질 가수분해물 중 항산화 활성과 항고혈압 활성이 우수한 가수분해물 분획인 APH V를 이용하여 조미간장을 제조하였다. 조미간장의 제조는 가수분해물 30 g, 식염 40 g, 설탕 5 g, 포도당 5 g, 핵산 1 g, 검은 후추분말 (명신화성(주) 제품) 0.2 g, 카라멜분말 0.2 g, 감초 (백경상사) 0.2 g, 생강분말 (명신화성(주) 제품) 0.1 g, 마늘 분말 (명신화성(주) 제품) 0.1 g, 양파분말 (명신화성(주) 제품) 0.1 g, 양조식초 (오뚜기 식품(주) 제품, 총산도 : 6.7~7.0%) 6 ml 및 과당 (명신화성(주) 제품) 6 ml를 혼합하여 물에 녹여 200 ml가 되게 하였다. 이 용액을 냉각관이 붙어 있는 둥근바닥 삼구플라스크에 넣고, 24시간 동안 끓여서 자비환류 시켰다. 반응이 끝난 후, 그 용액을 식혀 여과포로 여과하고 얻어진 여액을 조미간장 원액으로 하였다. 이 원액에 맛과 향을 높이기 위하여 굴 발효조미액을 5, 10 및 15%를 첨가하여 기능성 천연효소분해 간장을 제조하였다.

7. 관능평가

관능검사는 잘 훈련된 대학원생 중 10인을 선발하여 관능검사요원을 구성하고 5단계 평점법 (5점: 매우좋다, 4점: 좋다, 3점; 보통이다, 2점; 나쁘다, 1점 매우나쁘다) 으로 실시하였다. 가수분해물 (APH V)로 제조한 조미간장

및 굴 발효조미액을 다양하게 혼합하여 제조한 기능성 천연효소분해간장과 시판 간장인 화학간장과 양조간장과 함께 맛 (taste), 냄새 (odor), 색상 (color) 등 3가지 항목으로 구분하여 실시하고, 그 결과에 대한 유의성은 Student t-test로 검정하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. 굴을 이용한 발효조미액의 제조

1.1. 발효조미액의 제조

삼천포 어패류시장에서 구입한 굴 (*Crassostrea gigas*)를 수회 수세한 후 30분 정도 물을 뺀 다음, 무게를 측정하여 소금을 25% (w/w)되게 첨가한 후 20℃에서 숙성시킨 후 월별로 달여서 발효조미액을 만들어 시료로 사용하였다.

1.2. 발효조미액의 일반성분

20℃에서 발효숙성시킨 굴을 달여서 탈염한 후 동결건조하여 상법에 따라 일반성분을 측정하였다. 즉, 수분은 상압 가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법, 조회분은 건식회화법으로 측정하였다. 먼저, 굴의 월별에 따른 일반성분은 Table 1에 나타내었다. 즉, 단백질의 함량은 첫째 달 34.42%에서 여섯째 달 65.58%로 약 2배정도 증가하여 숙성이 될수록 단백질의 양이 증가하였으며, 당의 경우는 반대로 약 2배정도 감소하였다.

1.3. 발효조미액의 구성아미노산 분석

월별에 따른 굴 발효조미액의 구성아미노산 조성분석에 대한 결과는 Table 2에 나타내었다. 굴 발효조미액의 경우 glutamic acid, aspartic acid, glycine, proline 및 lysine의 함량이 비교적 높았으며, 숙성기간이 경과함에 따라 threonine, glutamic acid, alanine 및 lysine의 함량은 감소하였으나, valine,

Table 1. Proximate compositions of fermented oyster (*Crassostrea gigas*) sauce

Components	Contents (%)					
	1월	2월	3월	4월	5월	6월
Moisture	28.83	27.82	19.6	18.37	17.27	16.01
Protein	34.42	36.61	59.93	61.33	63.02	65.58
Lipid	1.48	1.36	1.21	1.13	1.12	1.12
Ash	1.43	1.61	1.59	1.61	1.53	1.49
Carbohydrate	33.85	32.60	17.67	17.57	17.06	15.80

Table 2. Amino acid composition of fermented oyster sauce

(AA/100 g protein)

Amino acid	Fermented oyster sauce		
	2월	4월	6월
Aspartic acid	9.74	11.36	11.44
*Threonine	1.75	1.53	1.25
Serine	0.70	0.58	0.22
Glutamic acid	17.79	17.64	17.67
Proline	7.86	6.86	6.61
Glycine	11.05	10.02	9.77
Alanine	9.06	8.29	8.44
Cystine	1.18	0.88	0.64
*Valine	5.23	5.69	5.74
*Methionine	2.40	2.41	2.33
*Isoleucine	3.39	3.91	4.23
*Leucine	5.88	6.81	7.61
Tyrosine	1.70	2.07	2.21
*Phenylalanine	3.98	4.50	4.50
*Histidine	2.35	2.45	2.69
*Lysine	9.78	9.41	8.97
Arginine	6.14	5.57	5.68
Essential amino acid	34.76	36.71	37.32
Total amino acid	100	100	100

aspartic acid, phenylalanine 및 leucine의 함량은 증가하였다. 이와 같이 숙성 기간에 따라 단백질, 당의 함량이 변화 될 뿐만 아니라 구성아미노산의 함량에서도 차이가 나타났다.

1.4. 굴 발효조미액의 유리아미노산 분석

굴 발효조미액의 유리아미노산을 분석한 결과를 Table 3에 나타내었다. 굴 발효조미액의 유리 아미노산의 경우 taurine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine 등의 함량이 비교적 높았다. 숙성기간이 경과함에 따라 asparagine 및 β -alanine 함량은 감소하였으나 대부분의 아미노산 함량은 증가하였다. 특히 아미노산 성분 중 glutamic acid 등은 핵산성분인 IMP와 만나 좋은 맛을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 또한 심근경색이나 뇌졸중, 동맥경화, 고혈압등의 성인병에 유효한 생리기능성을 나타내는 taurine의 함량이 매우 높아 굴 발효조미액을 이용하여 천연효소분해 간장을 제조시 그 활용이 기대된다.

1.5. 굴 발효조미액의 핵산관련물질 분석

굴을 자가숙성시켜 대표적으로 2, 4, 6 개월째 핵산관련물질을 조사한 결과 Table 4에 나타난 바와 같이 시간이 갈수록 ATP 함량은 감소하였으며 ADP, AMP, IMP, inosine 및 hypoxanthine의 함량은 증가하였다. 그 이유는 일반적으로 식육의 경우, 사후 강직 전의 육에서는 미량의 ADP 및 AMP 그리고 다량의 ATP가 함유되어 있으나 강직 후에는 다량의 IMP와 미량의 ATP, ADP 및 AMP가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. Terasaki 등 (1969)은 사후의 근육내 ATP 분해경로는 $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow IMP \rightarrow inosine \rightarrow hypoxanthine$ 라고 보고하였다.

본 연구에서 IMP가 다량 검출된 것은 ATP가 굴의 사후 젖산의 생성으로 pH가 일정 수준으로 내려갈 때 까지 IMP로 잘 분해되어 축적되었기 때문이

Table 3. Free amino acid composition of fermented oyster sauce

(AA/100 g protein)

Amino acid	Fermented oyster sauce		
	2 월	4 월	6 월
Phosphoserine	-	-	-
Taurine	17.62	16.44	16.91
Phosphoethanolamine	-	-	-
Aspartic acid	2.29	2.64	2.86
Hydroxyproline	-	-	-
Threonine	3.34	3.85	4.08
Serine	3.32	3.66	3.69
Asparagine	1.35	1.21	1.33
Glutamic acid	10.00	10.57	10.54
Sarcosine	-	-	-
α -aminoapicidic acid	-	-	-
Proline	0.19	5.32	5.78
Glycine	6.16	7.35	6.96
Alanine	4.86	6.85	6.63
Citulline	6.99	0.24	0.27
α -aminobutyric acid	0.22	0.19	0.17
Valine	2.18	4.68	4.76
Cystine	-	-	-
Methionine	2.13	2.48	2.27
Cystathionine	-	-	-
Isoleucine	3.13	3.95	4.06
Leucine	6.13	7.14	7.18
Tyrosine	2.98	3.25	2.51
β -alanine	0.94	0.79	0.74
Phenylalanine	2.91	3.31	3.52
β -aminoisobutyric acid	0.32	-	-
γ -aminobutyric acid	0.39	-	-
5-hydroxylysine	1.23	1.02	1.48
Ornithine	0.52	0.44	0.55
Lysine	8.07	6.92	7.09
1-methylhistidine	-	-	-
Histidine	1.22	1.13	1.21
3-methylhistidine	1.38	1.51	1.50
Anserine	0.79	-	-
Carnosine	1.10	1.43	1.22
Argine	3.70	3.65	3.71
Total amino acid	100	100	100

Table 4. Contents of nucleotides and their related compounds in fermented oyster sauce

Nucleotides and their related compounds	Contents ($\mu\text{mole/g}$)		
	2 월	4 월	6월
ATP	0.55	0.31	-
ADP	0.45	0.65	0.81
AMP	0.32	0.42	0.68
IMP	1.03	1.52	2.15
Inosine	0.13	0.20	0.38
Hypoxanthine	0.02	0.04	0.18

라고 판단되며, IMP는 열에 비교적 안정하고 그 자체가 정미성분이며, 굴 발효조미액내 glutamic acid와 같은 유리아미노산 (Table 3)과 공존하면 맛의 상승작용이 있는 것으로 보고되었다 (Terasaki 등, 1969).

이와 같이 굴의 자가숙성시킨 발효조미액에는 IMP와 같은 맛의 상승작용을 일으키는 핵산관련 물질이 다량 함유되어 있어 천연효소분해 간장을 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

2. 자가숙성된 굴 발효조미액으로부터 생리활성 탐색

굴 발효조미액을 매달 일정한 날짜를 정하여 잘 섞은 후 분취하여 다양한 생리활성에 대해 스크리닝을 실시한 결과, 항고혈압활성과 항암활성이 나타났다. 기간별로 유의한 차이가 거의 없었으며 6 개월째 숙성시킨 발효조미액이 가장 높은 활성을 나타내었다.

3. 굴 발효조미액으로부터 항고혈압 물질의 분리 및 정제

3.1. 이온 크로마토그래피에 의한 ACE저해 펩타이드의 분리·정제

먼저 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)로 평형화시킨 SP-Sephadex C-25 수지로 충전된 column (\emptyset 4×40 cm)에 시료용액 5ml를 주입한 후 완충용액 1l를 용리하고 1.0 M NaCl용액 700ml와 동일한 완충용액 700ml를 사용하여 선형상 농도구배법으로 분리한 결과 (flow rate: 60 ml/hr, collection volume: 5 ml), 3개의 획분으로 분리되었고 (Fig. 1), 분획별 항고혈압 활성을 측정된 결과를 Table 5에 나타내었다. Table 5에서와 같이 세 번째 획분에서 IC₅₀ 값이 1.54 mg/ml로 ACE 저해활성이 가장 높았다.

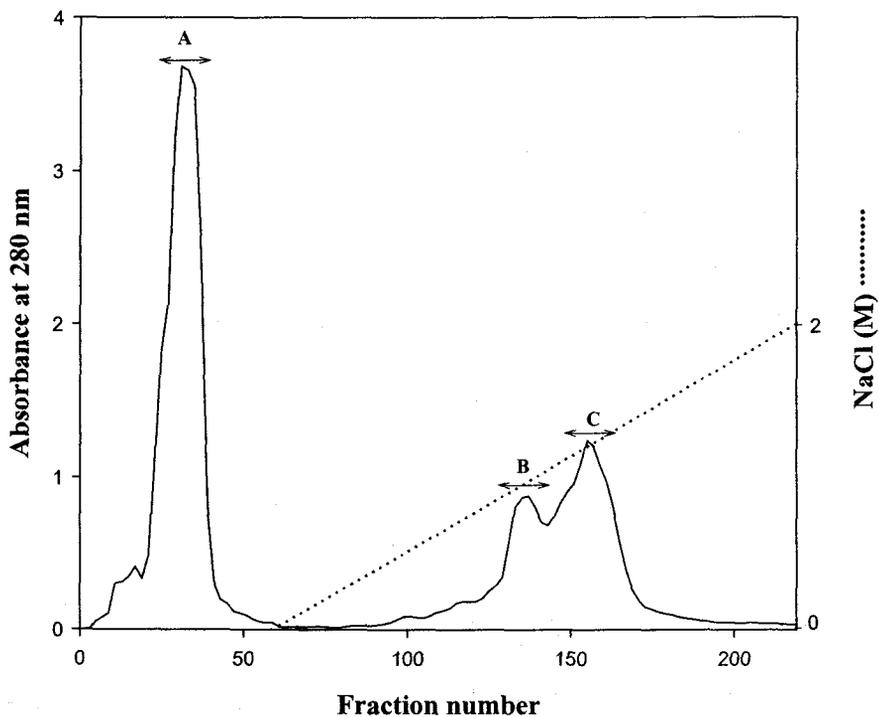


Fig. 1. Ion-exchange chromatography of FOS on SP-Sephadex C-25 column. The separation was performed with a linear gradient from 0 to 2 M NaCl in the 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) at flow rate of 1.0 ml/min.

Table 5. ACE inhibitory activity of fractions from SP-Sephadex C-25

Fractions	IC ₅₀ value (mg/ml)
A	2.54
B	1.98
C	1.54

3.2. 겔 크로마토그래피를 이용한 ACE저해 펩타이드의 분리·정제

양이온 교환수지 SP-Sephadex C-25에서 분리한 획분 중에서 가장 뛰어난 항고혈압활성을 나타내는 획분을 Sephadex G-50 겔 수지로 충전된 column ($\phi 2.5 \times 98$ cm)에 용출시켜 분리하여 얻은 각 획분을 280 nm에서 흡광도를 측정하여 두 개의 주요 획분으로 분리하여 동결건조한 후 ACE 저해활성을 측정한 결과, 획분 CII에서 IC_{50} 값이 0.47 mg/ml로 가장 우수하였다 (Fig. 2, Table 6). 따라서 획분 CII를 계속해서 겔 크로마토그래피를 행하여 모은 후 진공회전 농축기로 농축하여 동결건조한 다음, 이를 HPLC로 재분리하여 단일 피크를 얻었다.

3.3. 고성능 액체크로마토그래피에 의한 분리

Sephadex G-50를 충전시킨 column에서 분리된 분획물 중에서 항고혈압 활성이 가장 높은 획분을 동결건조하여 이를 탈이온수에 녹여 HPLC로 분리하였다. 즉, gel permeation column (GPC)를 이용하여 탈이온수로 용출(flow rate: 4ml/min)한 결과(Fig. 3), 다섯 개의 주요 획분으로 분리되었으며, 이들의 ACE 저해활성을 측정한 결과, 다섯 번째 획분에서 가장 우수한 ACE 저해활성을 나타내었다 (Table 7). 이 획분은 계속해서 GPC로 모은 후 다시 reverse-phase column이 장착된 HPLC를 사용하여 이동상으로 0.1% TFA가 함유된 탈이온수와 acetonitrile (0~11%, 20min)을 사용하여 선형상 농도구배법으로 용출시켜 분리하여 두개의 주요 획분을 얻었으며 이들의 항고혈압활성을 측정한 결과 두 번째 획분의 활성이 0.0874 mg/ml로 가장 우수하였다 (Fig. 4, Table 8). 이렇게 해서 얻어진 펩타이드의 정제과정을 Table 9에 요약하여 나타내었다. ACE 저해 펩타이드는 네 개의 정제과정을 거치면서 약 28.03배의 활성 증가를 보였으며 IC_{50} 값은 0.0874 mg/ml 였다.

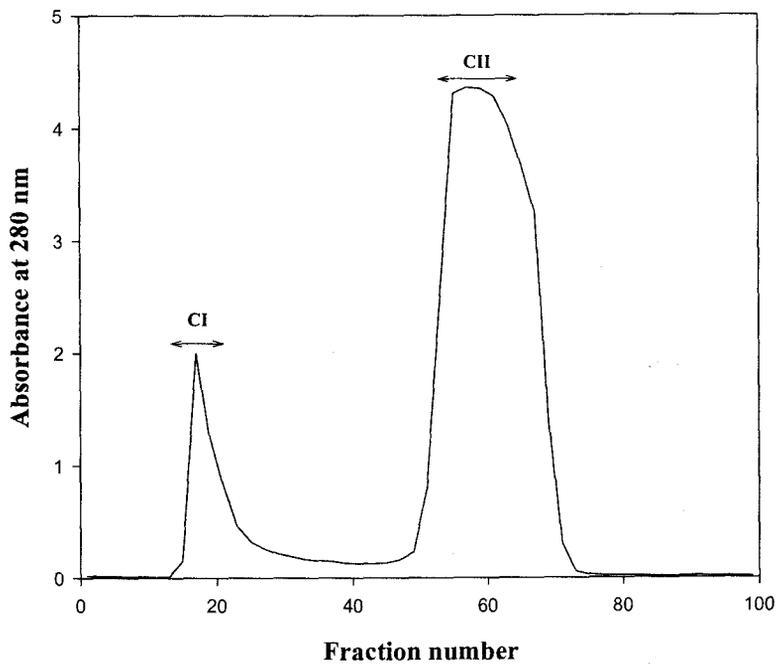


Fig. 2. Gel filtration chromatography of active fraction C on Sephadex G-50 column. The separation was performed at a flow rate of 1.0 ml/min.

Table 6. ACE inhibitory activity of fractions from Sephadex G-50

Fractions	IC ₅₀ value (mg/ml)
CI	2.54
CII	0.47

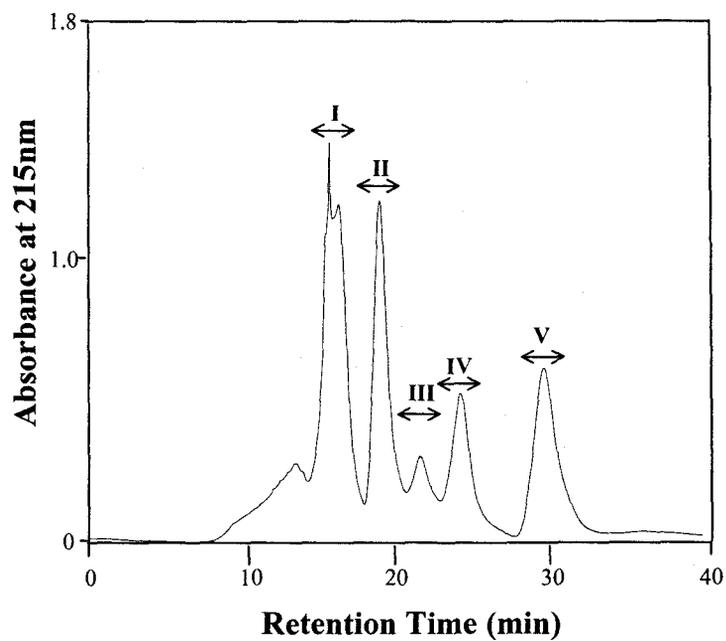


Fig. 3. Gel permeation chromatography of active fraction CII on the gel permeation chromatography (GPC) column. The separation was performed at a flow rate of 4 ml/min.

Table 7. ACE inhibitory activity of fractions from GPC column

Fractions	IC ₅₀ value (mg/ml)
I	1.350
II	1.020
III	0.571
IV	0.251
V	0.134

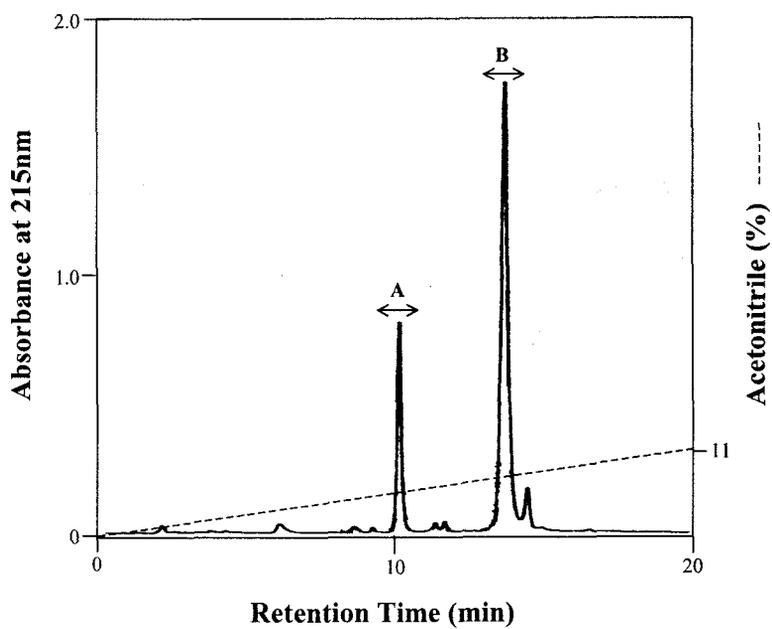


Fig. 4. Reverse-phase HPLC pattern on ODS C₁₈ column of active fraction V. The separation was performed with a linear gradient from 0 to 11% acetonitrile at a flow of 1.0 ml/min.

Table 8. ACE inhibitory activity of fractions from ODS C₁₈ column

Fractions	IC ₅₀ value (mg/ml)
A	0.890
B	0.087

Table 9. Purification of ACE inhibitory peptide

Step	Amount of peptide (mg)	IC ₅₀ values (mg/ml)	Purification fold
Fermented oyster	7000	2.4500	1
SP-Sephadex C-25	5302	1.5430	1.59
Sephadex G-50	103	0.4725	5.19
ODS column	0.008	0.0874	28.03

3.4. ACE 저해 펩타이드의 저해 메카니즘 결정

굴 발효조미액의 ACE 저해 펩타이드의 저해 메카니즘을 결정하기 위해서 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 결정하였다. ACE 저해 펩타이드를 50 및 25 μ l를 첨가하고 기질의 농도를 변화시켜 저해율을 측정한 결과, 경쟁적 저해를 나타내는 것으로 확인되었다 (Fig. 5). ACE의 활성부위를 저해하는데는 C-말단의 아미노산 조성에 따라 매우 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있는데 대부분 C-말단의 아미노산이 imino acid와 방향족 아미노산 등의 잔기로 구성되어 있는 펩타이드가 ACE 저해활성이 매우 양호한 것으로 보고되어 있다 (Cheung 등, 1980). 특히 C-말단의 dipeptide 아미노산 잔기에 의해 가장 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있으나, N-말단의 dipeptide가 지방족 아미노산으로 된 펩타이드도 ACE의 활성부위와 효과적으로 결합하여 저해하였다는 보고도 있다.

3.5. ACE 저해활성 펩타이드의 *in vivo*에서 혈압강하 활성측정

선천적으로 고혈압을 유발시킨 spontaneously hypertension rat (SHR, 체중 180-220 g, female, 6-8주령)를 대상으로 ACE 저해 peptide를 10 mg/kg (SHR body weight)되게 경구투여하여 angiotensin I의 승압에 대한 억제효과를 살펴본 결과 Fig. 6과 같이 나타났다. 시판용 혈압강하제인 captopril의 효과보다는 다소 낮으나 투여한 후 3시간일 때 10 mmHg의 최고 혈압강하를 나타내었고 8시간까지 지속되었다. 몇몇 혈압 강하제는 경구 투여 후 비정상적인 혈압상승이나 기침등의 부작용을 나타낸다고 보고되었지만, 본 실험에 사용된 펩타이드는 경구 투여 후 부작용이 나타나지 않아 기능성 간장의 제조시 그 활용이 기대된다.

4. 굴 발효조미액의 항암활성

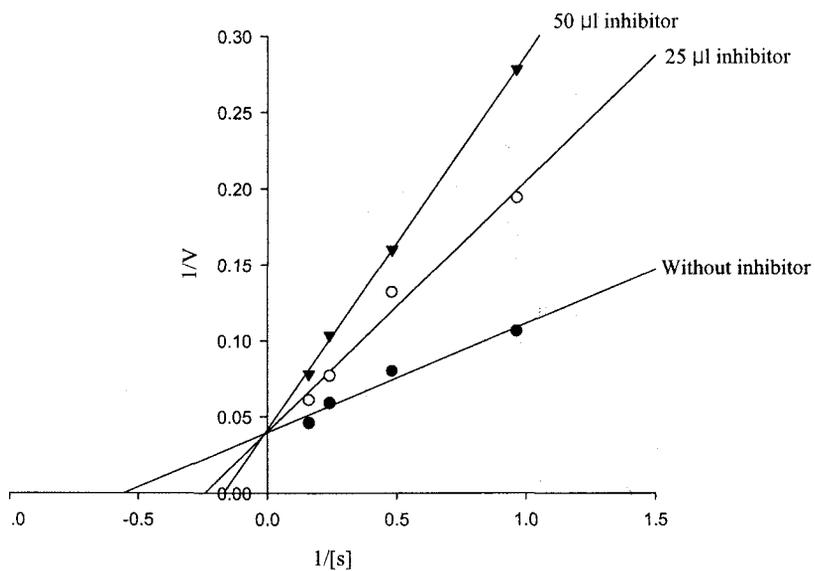


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of ACE inhibitory activity in the presence of inhibitory peptide.

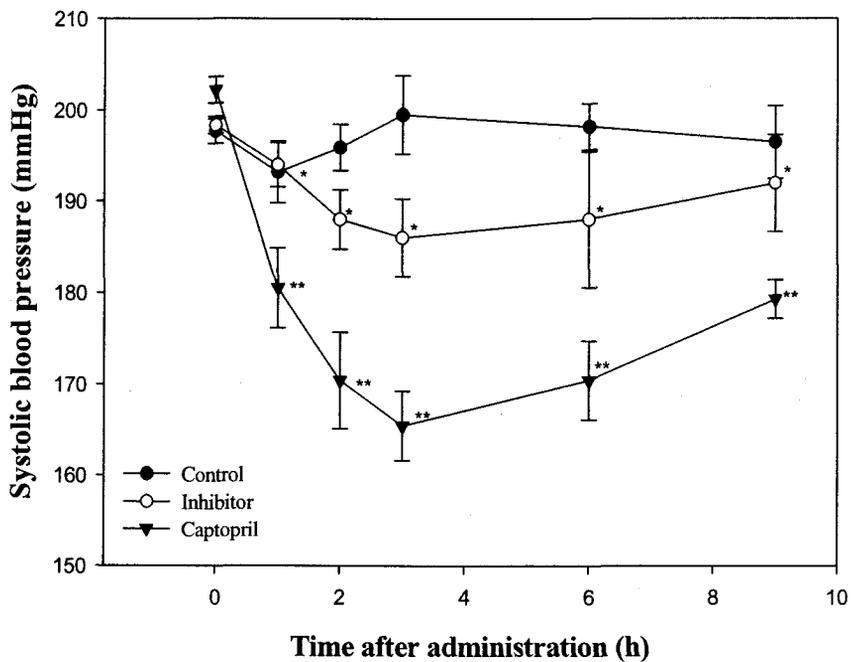


Fig. 6. Change in systolic blood pressure of SHR by administering ACE inhibitory peptide derived from fermented oyster sauce Single oral administration was performed with the dose of 10 mg/kg body weight, and SBP was measured 0, 1, 2, 3, 6 and 9h after the administration. Different from control at * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

4.1. 배양 정상간세포에 대한 발효조미액의 세포독성

굴 발효조미액의 배양 정상간세포에서의 세포독성을 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 굴 발효조미액을 첨가하지 않은 것의 세포 생존율을 100%로 볼 때 첨가한 굴 발효조미액의 농도가 5 mg/ml까지 증가됨에 따라 세포생존율은 다소 증가하는 경향을 보였으나 그 이상의 농도에서는 오히려 약간 감소하였다. 따라서 본 실험에 사용한 발효조미액은 배양 간세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다.

4.2. 굴 발효조미액의 항암활성

굴 발효조미액으로 간암 (Hep3B), 자궁경부암 (HeLa) 및 폐암 (A549) 세포에 대한 항암활성을 측정한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 이들 암세포 중에서 폐암 세포인 A549에서 약 15%정도로 가장 높은 항암활성을 나타내었다. 일반적으로 항암활성의 보고를 살펴보면, 대두발효식품 중 된장 및 청국장 메탄올 추출물은 사람의 암세포주에 대한 세포 독성 조사 실험에서 SNU-1 cell line에 대해서 성장억제효과를 나타냈으며 (Chung 등 1997), 까나리 및 멸치어간장에도 세 개의 아미노산 (Asp, Asn, Phe)으로 이루어진 tripeptide가 주로 항암 작용을 나타내었다고 보고하였다 (Lee 등 2001). 또한 Hwang 등 (1992)은 참치의 ehter 추출물에도 인체 장암세포 및 백혈병성 임파모세포의 증식억제 및 생체내에서의 면역증강 효과를 나타내는 성분이 존재한다는 사실이 밝혔으며, Steube 등 (1992)은 껍질이 없는 연체동물에서 추출한 dolastatin 10이 L1210 leukemia와 다른 leukemia cell line에 아주 강한 독성을 나타낸다고 하였고, 또한 그 이후 Turner 등 (1998)이 dolastatin 10을 human prostate cancer cells에 처리한 결과 1 nM ($IC_{50}=0.5nM$)에서 DU-145 human prostate cancer cell을 완전하게 성장을 저해한다는 사실을 밝혔으며, 이들의 구조는 다섯 개의 잔기(dolavaline, valine, dolaisoleucine, dolaproine, dolaphenine)로 이루어져 있다고 보고하였다.

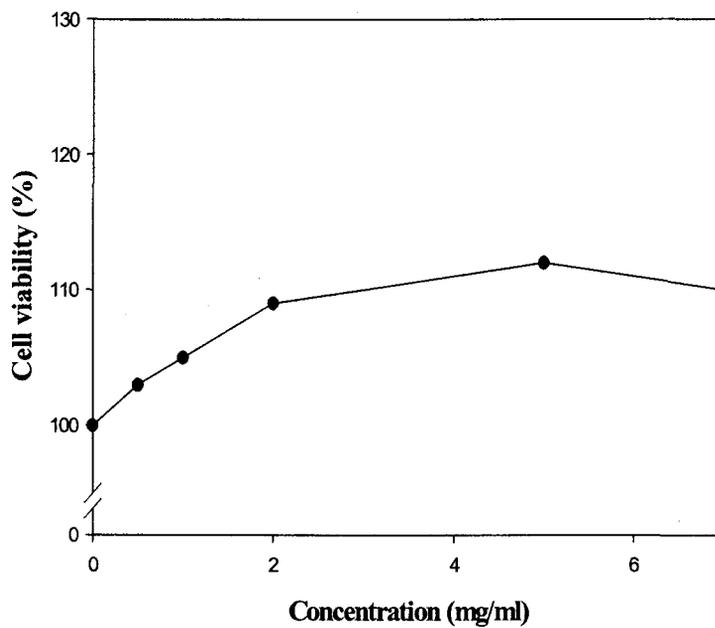


Fig. 7. Cytotoxicity of a fermented oyster on cultured normal human liver cells. Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C. Viable cells were detected by CCK-8 assay.

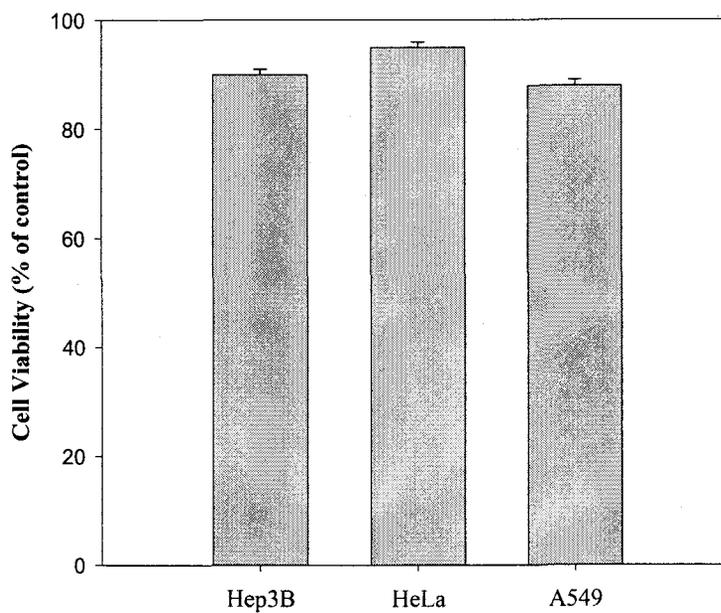


Fig. 8. Antitumor activity of fermented oyster on cultured various cancer cells. Cultured cells were incubated under 5% CO₂ and 37°C. Viable cells were detected by CCK-8 assay.

이상의 결과와 같이 발효식품 및 해양생물을 이용한 항암성 물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 발효식품 중에는 발효과정동안 미생물에 의해 다양한 물질들이 생성되어 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있고, 본 연구에서도 발효과정을 거치는 동안 유용물질이 다량 검출되었고 항고혈압 및 항암활성을 나타내어 본 연구의 최종목표인 기능성 천연효소분해 간장제조시 그 활용이 기대된다.

4.3. 굴 발효조미액의 apoptosis 유도활성

굴 발효조미액의 apoptosis 유도활성은 DNA nick end labeling assay법에 따라 DNA를 염색한 후 FACScan flow cytometry system (Becton Dickinson, Sanjose, CA)의 유세포분석기를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다. Flow cytometry에 의한 apoptosis 및 세포주기 분석 결과 Fig. 9 및 Fig. 10에 나타난 바와 같이 굴 발효조미액은 NCI-H460 human lung cancer에 대하여 약 30%의 apoptosis 유도활성을 나타내었다.

또한 cell cycle 분석을 통하여 굴 발효조미액의 apoptosis 유도 단계를 분석한 결과, 굴 발효조미액을 처리하였을 때 S phase에서의 cell의 숫자가 감소하고 G2/M기에서의 cell 숫자가 증가하는 것으로 보아 굴 발효조미액은 G2/M기를 억제함을 알 수 있었다. Choi 등 (2001)은 된장 핵산 추출물을 human breast carcinoma MCF-7 세포에 처리하였을 때 세포주기의 G1 기를 억제하여 세포사멸 유도한다고 하였고, Chang 등 (2002)은 MCF-7 세포를 면역결핍쥐에 이식한 후 발효대두유를 처리하여 MCF-7 세포의 세포사멸을 확인하였는데 이것은 발효대두유가 MCF-7 세포에서 활성산소종의 생산을 촉진시키기 때문이고, 주요 활성 성분은 isoflavone이라고 하였다. 또한 Matsuu 등 (2003)은 효모균과 유산균을 이용해 만든 발효유인 케피어(kefir)가 방사선에 노출된 세포의 세포사멸을 억제한다고 보고하였는데, 세포사멸에 결정적인 역할을 하는 caspase-3의 활성을 저해시켜 antiapoptotic 효과를 나타낸다

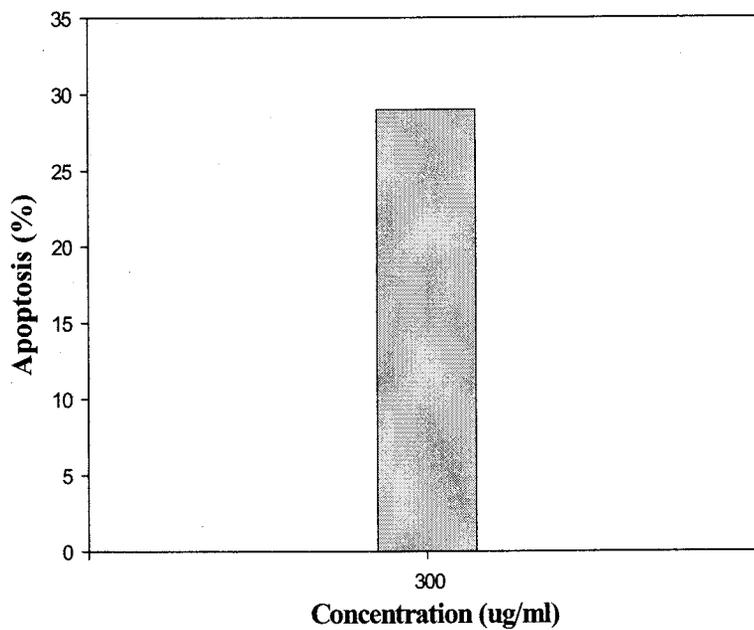


Fig. 9. The effect of the sauce of oyster on NCI-H460 human lung cancer cell cycle distribution determined by FACS analysis and expressed in percentages.

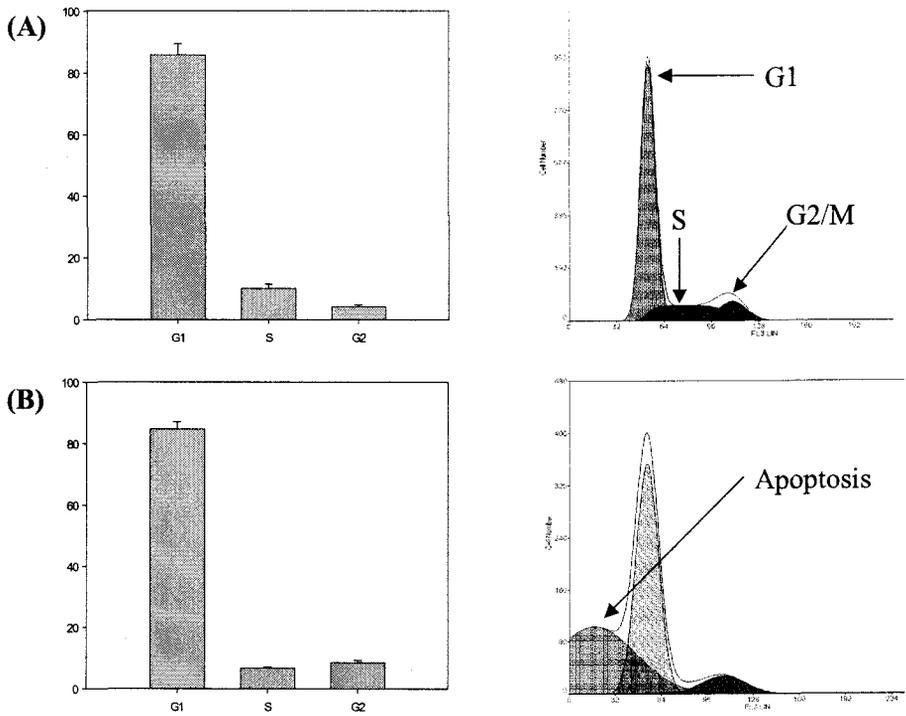


Fig. 10. The NCI-H460 cell cycle distribution (right panel) determined by FACS analysis and expressed in percentage (left panel) after 300 $\mu\text{g/ml}$ of the sauce of oyster for 3 days. A, untreated; B, treated with oyster.

하였다.

5. 명태 frame 단백질 가수분해물과 굴 발효조미액을 이용한 기능성 천연 효소분해 간장의 제조

이상의 결과에서 명태 frame 단백질의 효소적 가수분해물 중 항산화 및 항고혈압획분이 들어있는 APH V와 굴 발효조미액을 기능성 천연효소분해 간장의 제조 원료로 결정하였고, 간장을 제조하기 전에 APH V와 굴 발효조미액의 관능평가를 실시하였다. 굴 발효조미액 및 명태 frame 단백질 가수분해물의 기능성 획분인 APH V의 관능평가는 10인의 관능 검사요원을 구성하여 5단계 평점법 (5점: 매우 좋다, 4점: 좋다, 3점: 보통이다, 2점: 나쁘다, 1점: 매우 나쁘다)으로 실시하였고, 간장은 다음과 같이 제조하였다. 즉, 가수분해물 (APH V) 30 g, 식염 40 g, 설탕 5 g, 포도당 5 g, 핵산 1 g, 검은후추 분말 (명신화성(주) 제품) 0.2 g, 카라멜분말 0.2 g, 감초 (백경상사) 0.2 g, 생강분말 (명신화성(주) 제품) 0.1 g, 마늘 분말 (명신화성(주) 제품) 0.1 g, 양파 분말 (명신화성(주) 제품) 0.1 g, 양조식초 (오뚜기 식품(주) 제품, 총산도 : 6.7~7.0%) 6 ml 및 과당 (명신화성(주) 제품) 6 ml를 혼합하여 물에 녹여 200 ml가 되게 하였다. 이 용액을 냉각관이 붙어 있는 둥근바닥 삼구플라스크에 넣고, 24시간 동안 끓여서 자비환류 시켰다. 반응이 끝난 후, 그 용액을 식혀 여과포로 여과하고 얻어진 여액을 조미간장 원액으로 하였다. 이렇게 만든 조미간장에 맛과 향미성분을 부여하기 위하여 항고혈압 및 항암활성이 있는 굴 발효조미액을 5, 10 및 15% 첨가하여 조미간장의 제품성을 개선하였다. 가수분해물과 굴 발효조미액을 첨가하여 만든 기능성 천연효소분해 간장에 대한 관능검사는 시판 간장인 화학간장과 양조간장을 구입하여 비교 실시하였다.

명태 frame 가수분해물의 항산화 및 항고혈압 획분인 APH V와 굴 발효조미액을 원료로 하여 만든 간장과 시판 간장의 관능검사 결과를 Table 10에

Table 10. Sensory evaluation for functional fish sauce combined with fermented oyster sauce.

Sauce* ¹	Total score	Mean score* ²		
		Taste	Odor	Color
Control (A)	2.98±0.22 ^b	2.87±0.41 ^b	3.03±0.56 ^a	3.13±0.34 ^b
A + 10 ml FOS	3.30±0.46 ^{ab}	3.58±0.44 ^{ab}	3.39±0.35 ^b	3.15±0.47 ^a
A + 20 ml FOS	3.40±0.31 ^{ab}	3.62±0.36 ^{ab}	3.49±0.22 ^{ab}	3.16±0.28 ^a
A + 30 ml FOS	3.41±0.35 ^{ab}	3.63±0.41 ^{ab}	3.45±0.31 ^{ab}	3.15±0.36 ^a
Market product B	3.06±0.46 ^b	3.75±0.42 ^a	3.28±0.21 ^{ab}	3.01±0.33 ^a
Market product C	3.24±0.57 ^a	3.78±0.28 ^a	3.27±0.33 ^a	3.21±0.32 ^a
APH V	2.91±0.44	2.92±0.45 ^b	3.00±0.45	3.02±0.47 ^a
FOS	3.48±0.25	3.68±0.31 ^{ab}	3.64±0.37 ^{ab}	3.12±0.23

*¹Control, Enzymatic-hydrolysis sauce was prepared from APH V.

FOS : fermented oyster sauce, APH V : Alaska pollack hydrolysate (MW, 1 kDa below)

Market product B : Chemical soy sauce, Market product C : fermented soy sauce

*²Means within each column followed by the same letter are not significantly different (P<0.05)

나타내었다. 명태 frame 가수분해물인 APH V만을 이용하여 만든 조미간장은 관능검사에서 맛, 냄새 및 색깔에서 시판간장보다 모두 낮은 점수를 받았지만, 조미간장에 굴 발효조미액을 5, 10 및 15%를 첨가하였을 때는 시판간장보다 우수한 점수를 획득하였다. 특히 15%의 굴 발효조미액을 첨가하였을 때는 오히려 냄새에서 10%를 첨가한 군보다 약간 낮은 점수였는데, 이는 굴 발효조미액의 향이 너무 강해서 이런 결과가 나온 것으로 판단된다. 따라서 굴 발효조미액을 10% 첨가하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

일반적으로 단백질을 가수분해하면 쓴맛이 나는 것으로 알려져 있다 (Alder-Nissen, 1976). 그 예로 대두 단백질의 펩신 분해물에서 많은 쓴맛 펩타이드가 분리되었고, 카제인의 트립신 분해물에서도 비교적 긴사슬의 쓴맛 펩타이드가 분리되었다. Alder-Nissen (1976)은 단백질 가수분해물의 쓴맛은 사용한 효소보다는 단백질을 구성하는 소수성 아미노산의 함량과 관계있다고 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서 사용한 명태 frame 가수분해물은 쓴맛을 나타내지 않았는데 이것은 여러 가지 가수분해효소들이 섞여 있는 조효소인 MICE를 이용하여 가수분해 시켰기 때문에 주로 저분자 펩타이드 및 유리 아미노산이 많았기 때문인 것으로 생각된다.

현재 시판되는 간장들은 대부분이 양조간장과 산분해간장이다. 양조간장은 특유의 향과 맛이 있다는 장점이 있으나 제조기간이 길고, 단가가 높다는 단점이 있다. 화학간장은 제조기간이 짧고 단가가 낮은 장점에도 불구하고, 특유의 맛과 향이 부족하다는 단점이 있다. 게다가 산분해로 인해 발생하는 lysinoalanine, DCP (dichloropropanol) 및 MCPD (monochloropropanol)와 같은 독성이 있는 부산물을 생성하거나, tryptophan과 같은 필수아미노산이 산분해도중 분해되어 손실되므로 안정성 측면에서 여러 가지 문제점이 대두되고 있다. 그러나 명태 frame을 고등어 내장에서 추출한 조효소로 가수분해시킨 가수분해물은 산분해간장에 비해 안정성이 있으며, 영양측면에서도 유리하며, 효소분해에 의해 구수한 맛을 내는 아미노산이 다량 유리되어 나오므로

맛의 상승작용에도 크게 기여한다. 또한 굴 발효조미액의 맛과 향을 내는 성분을 첨가하여 양조간장처럼 특유의 맛과 향을 향상시켜 현재 시판되고 있는 산분해간장 및 양조간장의 대체품으로 충분히 이용될 수 있을것으로 기대된다.

이상의 결과에서 명태 frame 가수분해물과 굴 발효조미액을 첨가하여 만든 기능성 천연효소분해 간장을 제조할 수 있었고, 이러한 결과를 바탕으로 기능성이 부여된 천연효소분해 간장의 산업화가 가능하리라 판단된다.

제 4 장 요약

수산가공부산물로 대량 발생되고 있는 명태 frame 단백질을 고등어 내장 유래 조효소로 가수분해하여 단백질을 효율적으로 회수하였고, 막반응기 장치에서 분자량에 따라 가수분해물들을 분획하였다. 각 가수분해물들의 생리기능성을 탐색하여 활성이 높은 획분을 천연효소분해 간장의 기능성 배합성분으로써 활용하고 굴을 숙성시켜 발효조미액을 만들어 이들이 가지고 있는 뛰어난 향미성분을 첨가하여 간장의 맛과 향을 상승시켜 시판간장보다 우수한 기능성 천연효소분해 간장을 제조하였다.

삼천포 어패류 시장에서 구입한 굴 (*Crassostrea gigas*)을 수회 수세한 후 30 분 정도 물을 뺀 다음, 무게를 측정하여 소금을 25 % (w/w)되게 첨가한 후 20°C에서 숙성시킨 후 월별로 달여서 발효조미액을 만들어 시료로 사용하였다.

또한 굴 발효조미액의 최적 제조 조건을 검토하기 위하여 월별로 굴 발효조미액의 성분분석을 실시하였고, 아울러 이들의 생리활성도 검토하였다.

굴 발효조미액의 구성 아미노산의 경우 glutamic acid, aspartic acid, glycine, threonine 및 lysine의 함량이 비교적 높았으며, 숙성기간이 경과함에 따라 threonine, glutamic acid, alanine, lysine의 함량은 감소하였으며, proline, glycine, valine, arginine의 함량은 증가하였다. 월별에 따른 굴 발효조미액의 유리아미노산 조성분석에 대한 결과, 월별에 따른 큰 차이는 없었지만 최근 동맥경화, 고혈압, 뇌졸중 및 심부전 등의 성인병에 유효한 생리기능성 아미노산으로 밝혀진 taurine이 다른 성분보다 함량이 높았고 다음으로 glutamic acid, alanine 및 proline 등이 많이 함유되어 있었다.

굴 발효조미액의 핵산관련물질의 경우 발효과정을 지나면서 ATP의 양은 줄어들고 ADP, AMP, IMP, inosine 및 hypoxanthine의 함량이 증가하였으며 특히 발효과정이 지날수록 IMP의 양이 축적되었다. IMP는 그 자체가 정미

성분일 뿐만 아니라 열에 비교적 안정하며 glutamic acid와 같은 아미노산과 공존시 맛의 상승작용을 일으키는 것으로 알려져 있어 간장의 제조시 그 성분의 활용이 기대된다.

굴 발효조미액으로부터 생리활성을 검토한 결과, 6개월까지 숙성시킨 발효조미액에서 항고혈압활성이 높았다. 항고혈압활성을 나타내는 물질을 크로마토그래피를 이용하여 분리 정제한 결과 그 활성이 0.0874 mg/ml 이었고 분리정제된 펩타이드의 SHR을 이용한 *in vivo*에서의 항고혈압 활성 측정에서는 쥐의 체중 1 kg당 10 mg의 ACE 저해활성 조미액을 경구투여한 결과, 투여한 후 3시간에서 가장 높은 10 mmHg의 혈압강하활성을 보였다. 또한 굴 발효조미액의 ACE에 대한 저해패턴을 Lineweaver-Burk plot으로 측정한 결과 경쟁적 저해패턴을 나타내었다.

굴 발효조미액의 배양 정상 간세포에서 세포독성을 측정한 결과, 5 mg/ml 에서 약 110% 정도의 세포 생존율을 보여 굴 발효조미액은 세포독성이 없는 것으로 나타났다.

굴 발효조미액의 항암활성을 간암 (Hep3B), 자궁경부암 (HeLa) 및 폐암 (A549) 세포에 대한 항암활성을 측정한 결과 폐암 세포에서 약 15% 정도의 항암활성을 나타내었다. 또한 굴 발효조미액의 NCI-H460 human lung cell에 대한 apoptosis의 활성을 검토한 결과 약 30% 정도의 apoptosis를 유도하였고 flow cytometry를 통한 cell cycle 분석을 통하여 G2/M기를 억제하는 것으로 밝혀졌다.

이상의 결과로부터 명태가공잔사 가수분해물과 굴 발효조미액 (5, 10 및 15% 첨가)을 이용하여 기능성 천연효소분해 간장을 다음과 같이 제조하였다. 먼저 항산화 및 항고혈압 활성을 가진 펩타이드들이 존재하는 명태가공잔사의 단백질 가수분해물에 식염, 설탕, 포도당, 핵산, 검은 후추분말, 카라멜 분말, 감초, 생강분말, 마늘분말, 양파분말, 양조식초 및 과당을 첨가하여 조미간장을 제조하였고, 여기에 굴 발효조미액을 5, 10 및 15%를 첨가하여

기능성 천연효소분해 간장을 제조하였다. 관능검사를 통하여 맛, 색깔 및 향을 시판 화학간장 및 양조간장과 비교한 결과 제조한 기능성 천연효소분해 간장은 품질이 우수하였고 특히 굴 발효조미액이 10% 정도 첨가하여도 상품으로 이용 가능할 것으로 판단된다.

제 5 장 참고문헌

- Alder-Nissen, J. (1976) Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 1096-1103.
- Bush, K., Henry, P. R. and Slusarchyk, D. S. (1984) Muraceins-muramyl peptides produced by *Nocardia orientalis* as angiotensin converting enzyme inhibitors. *J. Antibiotics*, 37, 330-335.
- Chang, W. H., Liu, J. J., Chen, C. H., Huang, T. S. and Lu, F. J. (2002) Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by fermented soy milk. *Nurt. Cancer*, 43(2), 214-226.
- Cheung, H. S., F. L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo and D. W. Cushman (1980) Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.*, 255(2), 401-407.
- Choi, Y. H., Choi, B. T., Lee, W. H., Rhee, S. H. and Park K. Y. (2001) Doenjang hexane fraction-induced G1 arrest is associated with the inhibition of pRB phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21 in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol. Rep.*, 8(5), 1091-1096.
- Compton, M. M. and Cidlowsky, J. A. (1986) Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*, 118, 947-951.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S., (1971) Spectromeric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1637-1648.
- Fujimaki, M. S. Arai, M. Yamashita, H. Kato and Noguchi, M. (1973) *Agricul.*

Biol. Chem., 37, 2891-2899.

- Iwata, K., Kobashi, K. and Hase, J., (1974) Studies on fish muscle alkaline protease. 1. Some enzymatic properties of carp muscular alkaline protease. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 40, 189-200.
- Kim, S. K., Byun, H. G., Jeon, Y. J., Joo, D. S and Kim, J. B. (1999) Development of natural seasoning using desalinated tuna boiled extract. *J. of Korean Fish Soc.* 32(1), 324-328.
- Koo, J. K., Lee, E. H., Ahn, C. B., Cha, Y. J. and Oh, K. S. (1985) Taste compounds of salted and fermented big eyed herring and slimy. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 17(4), 283-288.
- Lee, E. H., Ha, J. H., Cha, Y. J. Oh, K. S. and Kwon, C. S. (1984) Preparation of powdered dried sea mussel and anchovy for instant soup. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 17(4), 299-305.
- Lee, E. H., Oh, K. S., Ahn, C. B., Chung, B. G., Bae, Y. K. and Ha, J. H. (1987) Preparation of powdered smoked-dried mackerel soup and its taste compounds. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 20(1), 41-51.
- Mutsumi, M., Kazuko, S. Kumio, O., Chun, Y. W., Fukuda, E., Nakashima, M., Nakayama, T., Shirahata, S., Tokumaru, S. and Sekine, I. (2003) The protective effect of fermented milk kefir on radiation-induced apoptosis in colonic crypt cells of rats. *J. Radiat. Res.*, 44, 111-115.
- Pyeun, J. H. and Kim, H. R. (1986) The proteinase distributed in intestinal organs of fish. 1. Purification of three alkaline proteinases from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber japonicus*, *Bull. Korean Fish. Soc.*, 19, 537-546.
- Pyeun, J. H., Cho, D. M. and Heu, M. S. (1993) Trypsins from the dark fleshed fish (anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore). 1. Purification and optimal reaction conditions. *J. Korean Soc. Food Nut.*, 22., 448-457.