

T0024584

최 종  
연구보고서

## 굴 미이용 자원을 이용한 미생물 배지와 기능성 펩티드의 생산

Production of Microbial Media and Functional  
Peptides Using Under-utilized Oyster

주관기관과제명 : Transglutaminase (TGase) 정제 및  
Transglutaminase (TGase)를 활용한  
새로운 기능성 펩티드의 창출

협동기관과제명 : 유용균주로부터 생리활성물질의  
대량생산 및 활용

2007. 10.

연구기관

주관기관; 경상대학교

협동기관; 부경대학교

해양수산부

# 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “굴 미이용 자원을 이용한 미생물 배지와 기능성 펩티드의 생산” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 9 월

주관연구기관명: 경상대학교  
주관연구책임자: 최 영 준  
협동연구기관명: 부경대학교  
협동연구책임자: 공 재 열  
참 여 기 업 명: 일신케미칼  
참여기업책임자: 김 재 훈  
참 여 기 업 명: (주) 바이오라인즈  
참여기업책임자: 공 재 열

# 요 약 문

## I. 제 목

굴 미이용 자원을 이용한 미생물 배지와 기능성 펩티드의 생산

## II. 연구개발 사업의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발 사업의 목적

- ▶ 굴에 있는 TGase의 정제와 특성
- ▶ 굴 부분 가수분해물의 제조와 기능성 확인
- ▶ 부분 가수분해물의 기능성 펩티드의 분리, 정제
- ▶ 부분 가수분해물의 기능성 펩티드의 구조 결정
- ▶ 굴 TGase를 이용한 새로운 기능성 펩티드의 창출
  
- ▶ 굴 미이용 자원의 미생물배지 전환과 유용균주의 탐색
- ▶ 굴 미이용 자원의 미생물 배지를 이용한 생물 활성 및 기능성 물질의 생산
- ▶ 생물 활성 및 생리활성물질 생산능 및 최적 조건 검토
- ▶ 생리활성물질의 대량 배양분리 공정 및 단위공정설계
- ▶ 생리활성물질 부분정제
- ▶ 굴 미생물 배양 배지로 생산한 생물활성 물질의 응용
  
- ▶ 발효를 통한 굴 음료의 생산과 기능성 제품의 시장 조사

### 2. 연구개발 사업의 필요성

우리나라의 굴 생산은 양식 기술의 발달과 어업권 건수 및 면적 등의 증가로 1998년 176천톤에서 2002년에는 182천톤으로 증가하였다 (Table 1).

Table 1. 양식 굴의 연도별 생산량 (단위: 톤)

년 도	1998	1999	2000	2001	2002
생산량	175,926	177,259	177,079	174,117	182,229

(자료: 통계청)

이와 같이 다량 생산되고 있는 우리나라 양식 굴의 소비는 국내 시장의 경우 생식되거나 김치 제조 시에 조미용으로 일부 이용되고 있는 정도여서 소비량은 연중 약 13천 톤에 불과하다. 한편 수출인 경우 가열조리용 혹은 생식용 생굴의 형태로 일본에 다량 수출하고 있으며, 냉동굴이나 훈제 기름 담금 통조림의 원료로 유럽이나 미국에 다량 수출되고 있어 국내 생산 굴의 소비는 대부분이 수출에 의존하고 있다(Table 2). 그러나 최근 중국산 굴이 다량 생산되어 통조림용으로 가공하고 있는 실정으로 수출 단가 면에서 국내산 통조림에 비하여 월등히 높은 가격경쟁력으로 굴제 굴 통조림 시장을 크게 잠식하였고, 이로 인한 국내 굴 가공 산업에 큰 타격을 입히고 있다.

Table 2. 연도별 굴의 수출 현황(단위 :톤)

년도	계	가열조리용 생굴	생식용 생굴	냉동굴	굴통조림	기타
1999	18,563	4,133	1,663	6,352	5,865	550
2000	22,296	4,502	2,148	9,451	5,469	726
2001	22,544	4,883	2,121	8,945	5,827	768
2002	17,217	3,142	-	7,216	6,155	704

(자료: 관세청)

현재 굴 소비 시장의 형태는 공장 규모 김치의 대량 생산, 조리 방법의 개발 부진, 고차가공품의 개발 부진에 따른 수요 감소 등과 같은 국내적 요인과 2001년 대일 수출 굴에서 패독과 이질균의 검출로 인한 수출 중단, 대일 수출 굴에 대한 일본 정부의 부정적인 시각, FDA 권고 사항 미이행에 따른 수출의 중단 등 대외적인 요인에 의해 극히 부진한 상태이다. 이 같은 현상은 굴의 수요와 공급에 따른 예측을 할 수 없어 굴 가격의 급속한 하락을 초래하였고, 심지어는 월하를 시키는 경우에 도달하였다.

따라서 현재의 양식 규모가 계속 유지된다면 2004년 굴 생산량은 56천톤으로서 소비량약 42천톤(수출 시장의 경우 20천톤, 내수시장의 경우 22천톤)을 제외하면 약 14천톤의 과잉 생산이 예상된다. 그러나 환경 및 위생적인 요인으로 인해 예측한 수출 물량이 소화되지 않을 경우 잉여 생산량은 더욱 증가할 것이다.

이 같은 문제를 개선하기 위해 생산자 및 업계 중심의 자율 관리 정착 등의 자구 노력에 의한 수급 조절, 어장 휴식년제의 도입 등과 같은 제도 개선을 통한 수급 조절 방안 강구, 굴 박신장 위생관리의 강화, 굴 수출 확대, 국내 소비 기반 확보를 통한 냉동품 및 훈제 통조림 소비 확대 방안 등을 고려하고 있으나 잉여 생산량의 소비를 위한 적극적인 대책은 되지 않고 있다.

포장 생굴을 생산할 때 기준 중량에 미달하거나 부서진 굴 등은 상품 가치가 없기 때문에 폐기하고 있으며, 알굴 생산을 위한 탈각 시에 이 물질 제거를 위한 세척 과정에서 세척수가 발생한다. 그리고 굴 가공품을 제조할 때 대부분이 탈각을 위한 전처리 공정으로 열처리 과정이 필요하고 자숙액이 부산물로 발생한다. 이들은 상당량의 유기물을 포함하고 있어서 폐기하는 경우 수질 오염의 근원 물질로 작용하기 때문에 세척액은 일부 농축 소스로 활용하고 있으나, 자숙액은 거의 전량 폐기되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 낮은 단가의 굴 (중량미달의 굴, 파손굴 및 IQF 제품의 장기저장으로 인한 freeze burn이 진행된 굴 등)을 이용하여

- 생리활성 물질을 생산하기 위한 미생물 대량 배양용 질소원으로 개발하고,
- 굴에 분포하고 있는 TGase의 정제와 활용성을 검토하며,
- 저가의 굴과 굴 부산물의 미생물 배지 전환과 이들 배지를 활용하여 생산한 생물활성 및 기능성 물질의 대량 생산 및 정제를 통한 고부가가치 제품의 산업화를 시도한다.
- 부분적인 효소 가수분해 조작을 통해 생물학적 활성을 가진 펩티드를 생산하며,
- 효소 합성을 통해 새로운 기능성 펩티드를 창출하고
- 발효와 본 연구를 통해 생산한 기능성 물질의 formulation을 통해 새로운 기능성 제품을 제조하여

낮은 단가의 굴을 생물학적 제품 생산을 위한 자원과 생물학적 활성을 가진

새로운 제품으로 활용하기 위한 연구는 굴의 수급 조절에 기여함으로써 고품질 굴의 적정 가격 유지 기능과 어업인의 소득 안정화에 크게 도움이 될 것으로 예상된다.

### III. 연구개발사업의 내용 및 범위

#### 제 1 장 굴에 있는 Transglutaminase (TGase)의 정제와 특성

제 1 절 TGase의 정제와 특성

제 2 절 패각 단백질의 단백질분해효소 저해효과

#### 제 2 장 굴 부분 가수분해물의 제조와 기능성 확인

제 1 절 산 가수분해물의 제조와 특성

제 2 절 일단 효소 가수분해물의 제조와 특성

제 3 절 이단 효소 가수분해물의 제조와 특성

제 4 절 효소 가수분해물의 극성 기능성 물질의 정제와 구조

제 5 절 효소 가수분해물의 비극성 기능성 물질의 정제와 구조

#### 제 3 장 새로운 펩티드의 생리학적 기능성

제 1 절 새로운 펩티드의 세포 독성과 간 기능 보호 효과

제 2 절 굴 가수분해물과 굴 가수분해 조합물이 SD-렛트 혈청과 간 균질물에 미치는 영향

#### 제 4 장 굴 부분 가수분해물의 응용

제 1 절 기능성 고품 제품 제조와 생리적 기능성

제 2 절 혼합물 실험계획법에 의한 효소가수분해물과 한약추출물들의 최적 혼합비 분석

## 제 5 장 유용균주로부터 생리활성물질 대량 생산 및 활용

제 1 절 해양유래의 유용균주의 탐색

제 2 절 탐색 균주의 생물활성 및 생리활성물질 생산의 최적 조건 검토

제 3 절 생리활성 물질의 분리·정제 및 이화학적 특성

제 4 절 굴 가수분해물을 이용한 생리활성 물질의 대량생산 검토  
및 해양 유래 미생물에 대한 적용

## 제 6 장 기능성 소재로서 활용을 위한 시장 조사

# IV. 연구개발 결과

## 제 1 장 굴에 있는 Transglutaminase (TGase)의 정제와 특성

### 제 1 절 TGase의 정제와 특성

개조개, 굴, 꼬막, 바지락, 백합, 비단가리비, 소라, 홍합 및 돌 담치 수용성 추출물의 transglutaminase 비활성을 측정한 결과, 소라가 가장 높은  $0.82 \pm 0.00$  Units/mg-protein/min인 반면 돌담치는 비활성을 보이지 않았다. 굴은  $0.27 \pm 0.00$  Units/mg-protein/min의 활성을 보였다. 20-80% 포화 ammonium sulfate 분획물을 0.1 M NaCl을 포함하는 TEND 완충액에 투석하여  $-20$  °C에서 동결 저장하면서 단백질 함량과 transglutaminase 활성을 측정한 결과, 저장기간의 증가와 더불어 단백질 함량은 감소하였으나, 효소 활성은 저장 33일까지 거의 변화가 없었다. 2회의 DEAE-Sepharose 이온교환 크로마토그래피와 젤 크로마토그래피(Superdex 200 prep grade)를 통해 굴에서 최종적으로 정제한 transglutaminase의 정제도는 1895배였고, 수율은 1.9%였다. 정제한 transglutaminase의 최적 pH와 온도는 각각 9.0과  $45$  °C였으며, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  농도에서 가장 높은 활성을 보였다.  $55$  °C에서 30분 가열 시 활성의 약 50%를 소실하였으며, NaCl 농도는 transglutaminase의 활성에 거

의 영향을 미치지 않았다.

## 제 2 절 패각 단백질의 단백질분해효소 저해효과

굴 패각 분말의 조단백질 함량은 0.8%였으며, 굴 패각에서 얻은 calcium acetate는 CaO가 전체의 97.15%를 차지하였다. 5% acetic acid 가용성 획분 중 분자량 10 kDa 이하의 획분이 10 kDa 이상의 획분에 비하여 높은 단백질 분해효소 저해효과를 보였으며, 특히 bromelain의 저해에 효과적이었다. 단백질 분해효소 저해제와 calcium acetate에서 세균에 대한 항균 활성과 간세포 독성은 관측되지 않았다. 굴 패각에서 부분정제한 5% acetic acid 추출물은 단백질분해효소 저해제로서의 잠재적인 가능성을 가지는 것으로 보인다.

## 제 2 장 굴 부분 가수분해물의 제조와 기능성 확인

### 제 1 절 산 가수분해물의 제조와 특성

최대 수율의 산가수분해물을 제조하기 위한 최적 조건은 10 N HCl, 96 °C, 가수분해 22 시간이었다. 가수분해에 가장 큰 영향을 미치는 인자는 가수분해 시간, 염산의 농도, 가수분해 온도의 순이었다. 산 가수분해물과 탈염한 산가수분해물의 단백질 함량은 6.5%와 14.0%였고, 염의 함량은 각각 16.2%와 0%였다. 산 가수분해물에 분포하는 peptide의 분자량 400-2500 dalton 사이였다. 산 가수분해물의 아미노산 함량은 Lys>Leu>Tyr≐His≐Gly>Val의 순으로 높았고, Thr, Ser 및 Pro은 검출되지 않았다. 산 가수분해물의 세포 독성은 200 mg/mL까지 유의적인 독성은 보이지 않았다. 산가수분해물은 0.5 mM ascorbic acid와 비슷한 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으며, 탈염한 산가수분해물의 DPPH EC50은 0.28 mg/mL였다. 분획한 peptide의 Linoleic acid에 대한 농도별 항산화 효과는 0.1-0.01 mg/mL의 농도 구간에서 농도에 따른 유의차는 보이지 않았으나, 분자량이 작을수록 강한 항산화 효과를 가지는 것으로 나타났다. ACE 저해능은 탈염 산가수분해물 분자량 500-1000 dalton 획분이 가장 높았다. 산 가수분해물은 기능성 ingredient로서 잠재성인 사용 가능성은 있으나, 안전성에 관한 면밀한 검토가 아울러 이루어져야 할 것이다.



## 제 2 절 일단 효소 가수분해물의 제조와 특성

양식 굴을 효율적으로 이용할 목적으로 4가지의 상업적 효소(Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex)와 2가지의 시약급 효소(pepsin, trypsin)를 이용하여 굴 효소 가수분해물을 제조하고 그 특성에 대하여 살펴보았다. 굴 가수분해물의 항산화능 및 ACE 저해능은 모두 Protamex로 1 시간 동안 가수분해시킨 것이 가장 우수하였고, 이들의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 1.16 mg/mL 및 1.49 mg/mL였다. 항균성은 모든 효소 가수분해물에서 인정되지 않았다. 그리고 ACE 저해능 및 항산화능은 가수분해 시간에 따른 의존성이 인정되지 않았다. Protamex로 1시간 동안 처리한 굴 가수분해물의 경우 가수분해 처리하지 않은 대조구에 비하여 29-66 kDa 획분과 6.5 kDa 부근의 획분이 모두 감소하여 저분자화 하는 경향을 나타내었다.

## 제 3 절 이단 효소 가수분해물의 제조와 특성

일단 가수분해물과 이단 가수분해물들의 부패취에 관능검사를 실시한 결과 일단 및 이단 가수분해물과 같이 가수분해물의 종류에 관계없이 모든 시료구에서 전 관능요인들이 부패취를 감지하지 못하였다. Alcalase, Neutrase, pepsin 및 trypsin 등과 같은 4종의 효소 이단 가수분해물 간의 가수분해율은 유의적인 차이가 인정되지 않았다. Protamex 가수분해물을 Alcalase, Neutrase, pepsin 및 trypsin 등과 같은 4종의 효소로 이단 가수분해한 가수분해물의 경우 모두 ACE 저해의 개선 효과 (Alcalase 가수분해물: 0.86 mg/mL, pepsin 가수분해물: 1.30 mg/mL 및 trypsin 가수분해물: 1.20 mg/mL)가 있었고, 그 중에서도 특히 Neutrase 가수분해물의 IC<sub>50</sub>이 0.40 mg/mL로 가장 개선 효과가 컸다. 2단 가수분해물의 항균성은 관측되지 않았다. 항산화능은 일단 가수분해물의 IC<sub>50</sub>(1.16 mg/mL)에 비하여 Alcalase, pepsin, trypsin 및 Flavourzyme으로 재가수분해한 이단 가수분해물의 IC<sub>50</sub>(Alcalase 가수분해물: 1.19 mg/mL, pepsin 가수분해물: 1.21 mg/mL, trypsin 가수분해물: 1.19 mg/mL 및 flavourzyme 가수분해물: 1.20 mg/mL)의 경우 오히려 낮았고, Neutrase로 재가수분해한 이단 가수분해물의 IC<sub>50</sub>(0.94 mg/mL)의 경우 높았다. 2단 분해시 fraction 22-38번 사이의 고분자 획분(29-150 kDa)은 거의 분해되어 fraction 60-72번 사이의 저분자 획분(6.5 kDa 이하)으로 이행되었으며, 아울러 저분자 획분에서도 보다 분해가 진행이 되어 획분의 감소가 두드러지게 나타났다. 가수분해물의 유리아미노산 함량은 2단 가수분해에 의해 증가하였다.

#### 제 4 절 효소 가수분해물의 극성 기능성 물질의 정제와 구조

상업적으로 많이 사용하고 있는 효소를 바탕으로 1,2차 가수분해를 하였고, 0 - 120 분 동안 20 분 간격으로 가수분해 했을 때 60 분에서 가장 높은 항산화 활성을 나타냈으며, 효소에 대한 기질농도를 0.5, 1, 1.5, 2, 5%로 첨가 했을 때, 최적 농도는 1% 였다. 30 - 70 °C 까지 10 °C 간격으로 반응온도의 영향을 검토 했을 때 최적 온도는 40 °C였다. 수도수를 가하여 마쇄 한 후 가수분해한 것 보다 3% NaCl 용액을 가하고 마쇄하여 가수분해한 것은 염용성 단백질을 추출하여 더 많은 단백질을 얻을 수 있었다. TGase 처리 효소가수분해물과 TGase 미처리 일반 효소가수분해물을 5 kDa 이상과 이하로 한외여과한 후 DPPH radical scavenging activity의 EC<sub>50</sub>를 측정 한 결과 5 kDa 이하의 가수분해물의 활성이 높았다. 지질 산화를 위한 산화 시간을 결정하기 위하여 시료 대신에 탈이온수를 사용하여 측정한 결과 60 °C에서 linoleic acid는 약 72 시간의 유도기를 거쳐 급속히 산화하는 것으로 나타났다. 그러나 1000 Da 이하의 peptide는 168시간까지 85% 이상의 항산화 활성이 나타나 대체로 저분자의 peptide가 강력한 항산화 효과를 유지하는 것으로 나타났다. ACE 저해능은 TGase를 처리한 효소가수분해물이 80 %의 저해율로 다른 가수분해물에 비해 다소 높은 것으로 나타났다. 가수분해물은 환원력이 없는 것으로 나타났다.

#### 제 5 절 효소 가수분해물의 비극성 기능성 물질의 정제와 구조

TGase와 효소를 이용한 곱 가수분해물을 한외여과장치를 이용하여 1 kDa 이하로 분리한 후 이를 size-exclusion column을 이용하여 분자량 별로 ACE 저해활성을 측정하였으며 분자량 500 Da 부근에서 높은 활성을 나타내었다. ACE저해활성을 나타내는 물질이 peptide에서 기인할 것으로 판단하여 이를 정제하여 peptide의 아미노산 구조를 밝히기 위해 reverse-phase HPLC column과 ion-exchange HPLC column을 이용하여 정제한 결과 0.1 % TFA를 포함하는 8 % CH<sub>3</sub>CN에서 단일 peak를 나타내었으며 1/10의 양을 취해 ACE저해활성을 측정한 결과 약 38 %의 저해활성을 보였다. 이렇게 정제된 peptide의 아미노산 서열을 Edman 분해법으로 분석한 결과 분자량이 500 Da 이하인 Ile, Leu, Val, Ala, Asp, Gly, Pro, Asn과 같은 아미노산 잔기로 이루어져 있는 것으로 나타났으며 ESI-MS를 이용하여 peptide의 분자량을 측정한 결과 이와 일치하는 결과를 얻을 수 있었다.

## 제 3 장 새로운 펩티드의 생리학적 기능성

### 제 1 절 새로운 펩티드의 세포 독성과 간 기능 보호 효과

두 종류의 한약제와 효소가수분해물의 최적 혼합물(HepaCae)의 간세포 독성과 간기능 보호효과를 조사하였다. O, I 및 효소 가수분해물은 간 세포에 대하여 독성을 보이지 않았다. 효소 가수분해물인 TGPN과 3PN은 간 세포 독성 회복 효과를 보이지 않는 반면, HepaCare는 대조군에 비하여 50 ug/mL 및 200 ug/mL 농도에서 각각 116와 128%의 유의적인 간세포 독성 보호 효과를 보였다. HepaCare를 경구 투여하여 20일이 경과한 후 GOT와 GPT 활성은 정상적인 수치로 회복되었으며,  $\gamma$ -GOT는 대폭 감소하였다. 그러나 LDH의 감소폭은 크지 않은 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 HepaCare는 급만성 및 알코올성 간염의 치료에 유의적인 효과가 있음을 제시한다. 그러나 정확한 판단을 위해 다양한 간 및 담도계 기능 이상과 관련한 다양한 biomarker의 확인이 필요하다.

### 제 2 절 굴 가수분해물과 굴 가수분해 조합물이 SD-랫트 혈청과 간 균질물에 미치는 영향

기본 식이를 제공한 대조군의 단백질 함량은  $45.16 \pm 2.25$  mg/mL serum이었으며, TGPN 굴 가수분해물과 굴 가수분해물에 허브를 첨가한 혼합시료인 Herb M- 100 식이 섭취군은  $48.34 \pm 3.24$  mg/mL serum으로 7% 증가하였고, Herb M- 200 식이 섭취군의 단백질 함량은  $49.24 \pm 2.55$  mg/mL serum으로 대조군에 대비하여 9.0%의 유의적인 증가를 보여주었다. 그렇지만 TGPN-200 식이 섭취군과 PN-NaCl 가수분해물 식이 섭취군의 경우는 단백질 함량이 오히려 저하되었다. 총 콜레스테롤의 함량은 모든 굴 가수분해 식이군에서 총 콜레스테롤 함량이 감소하는 경향을 보여 주었다. 특히 TGPN-200과 Herb-M-200 식이군에서  $79.04 \pm 12.50$  mg/dL 과  $84.38 \pm 16.20$  mg/dL로 각각 29.9%와 24.1%의 유의적인 감소 효과가 있었다. 대부분의 굴 가수분해 식이 섭취 그룹에서 HDL- 콜레스테롤의 함량이 저하하는 경향을 보여주었다. TGPN 가수분해물 식이군과 TGPN 가수분해 식이군에 허브를 첨가한 허브 혼합 식이군에서 LDL- 콜레스테롤의 혈중 농도가 감소하였다. 중성지방의 혈중 함량은 모든 굴 가수분해 식이군에서 감소하는 경향을 보여 주었다. 대조

군의 경우 수퍼옥시드 라디칼의 함량은  $266.23 \pm 60.96$  nmol/g protein이었으며, TGPN-100, TGPN-200의 경우  $246.49 \pm 125.20$  nmol/g protein 와  $173.82 \pm 75.05$  nmol/g protein으로 대조군에 비해 7.4%와 34.7%의 감소 효과가 있었다. 히드록실 라디칼 (hydroxyl radical)의 함량 변화는 대조군의 경우  $2.34 \pm 0.20$  nmol/mg protein (100%)으로 TGPN 굴 가수분해 식이군과 Herb M-200 그룹에서는 감소하였으나, PN 굴가수분해물 식이군은 약간 증가하였다. 그렇지만 모든 굴가수분해물 식이군에서 어떤 유의적인 증가 및 감소 효과 없었다. 대조군의 카르보닐기 함량은  $13.47 \pm 1.19$  nmol/mg protein (100%)이었고, TGPN-200( $11.98 \pm 2.34$  nmol/mg protein, 88.9%)과 Herb M-200( $12.53 \pm 3.10$  nmol/mg protein, 93.0%) 에서 가장 큰 폭의 카르보닐기 생성 저해 효과를 볼 수 있었다. 혈청의 과산화 지질 함량은 TGPN 굴 가수분해물 식이군과 Herb 혼합식을 섭취한 그룹에서 감소하는 경향을 보여 주었다. 대조군 간균질액중의 SOD 활성은  $3.44 \pm 0.43$  unit/mg protein이었으며 PN-100과 PN-200 그룹에서는 첨가 농도가 증가함에 따라 활성도 증가하였고, 특히 PN-200은 19.0% 증가하였다( $p < 0.05$ ). 카탈라제 활성은 대조군  $10.26 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min (100%)에 비해, TGPN-100과 TGPN-200에서 각각  $0.30 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min와  $0.31 \pm 0.11$  nmol/mg protein/min으로 활성은 14.5%와 20.0% 증가하였다. Herb-100과 200에서도 20%가 넘게 활성이 증가하였으나 유의성은 없었다. 그리고 PN 굴가수분해물은 가장 높은 카탈라아제의 활성증가를 보여 주었다.

## 제 4 장 굴 부분 가수분해물의 응용

### 제 1 절 기능성 고형 제품의 제조와 생리적 기능성

굴 효소 가수분해물을 함유한 기능성 고형 환의 제조를 위해 각 성분의 특성을 측정하였다. Radical 소거능은 I가 가장 높은 활성을 보였으며, 굴 가수분해물, I추출물은 지금까지 알려진 항산화제보다 높은 활성을 나타내었다. 세 물질을 혼합하여 환을 제조하였을 때, 굴 가수분해물, I추출 건조물, O추출 건조물의 함량이 높을수록 radical 소거능도 증가하였으나, 점착력이 증가하여 과량 함유할 경우 성형이 어려웠다. 따라서 기능성 환의 제조 시 밀가루 3.5 g, I추출건조물 0.75 g, O추출 건조물 0.75 g, 굴 효소 가수분해물 2.74

g을 최적 배합비로 선정하였다.

## 제 2 절 혼합물 실험계획법에 의한 효소가수분해물질과 한약추출물의 최적 혼합비 분석

굴 효소 가수분해물질의 응용을 위해 I 및 O추출물 및 효소 가수분해물을 혼합하여 통계적 모델링과 분석을 통해 혼합비에 따른 액상의 음료의 최적화를 검토하였다. 수학적인 canonical model과 trace plot을 이용하여 액상음료의 중요한 요소로 작용하는 antiradical activity와 관능평가를 수행한 결과, 독립적으로 작용하는 선형모델화를 보여주었다. 그 외 색도와 점도는 상호간의 작용을 일으키면서 반응에 기여하는 것을 보여주었다. 굴 효소 가수분해물질 및 허브 추출물들을 이용하여 액상의 최적음료 배합비를 결정하기 위해 각 반응의 canonical 계수를 이용하여 최적화를 한 결과, 굴 효소 가수분해물 3 %, I추출물 3.83 %, O추출물 8.17 %로 나타났고 추후 최적화된 제품을 이용하여 기능성 여부를 계속 추적할 예정이다.

## 제 5 장 유용균주로부터 생리활성물질 대량 생산 및 활용

### 제 1 절 해양유래의 유용균주의 탐색

해안 빨에서 protease inhibitor를 생산하는 해양방선균을 분리한 후 저해력이 가장 우수한 균주 C12을 최종 선별하였다. 최종 선별된 균주 C12의 정확한 동정을 위하여 16S rDNA로 동정한 결과 *Streptomyces thermocarboxydus* C12로 동정하였다. 전자현미경에서 긴 원주모양의 형태를 보였으며, 배양과정 중 ISP 9 배지를 제외한 모든 배지에서 성장하였다. 운동성이 없으며, 그람양성이고 포자를 형성하며, 표면은 smooth type이다. Catalase 양성반응, starch, gelatin 및 casein에 대한 분해 활성이 확인되었으며, 9.0%의 NaCl 및 50 °C에서 성장하였다.

### 제 2 절 탐색 균주의 생물활성 및 생리활성물질 생산의 최적 조건 검토

해안 빨에서 단백질 분해효소 저해력이 우수한 균주 *Streptomyces thermocar-boxydus* C12를 이용하여 최적의 저해제 생산을 위한 조건을 검토하였다. 저해제 생산은 40 °C와 pH 8.0에서 높은 것으로 나타났으며, 탄소원은

1.6% (w/v) galactose에서, 유·무기 질소원으로는 0.5% (w/v) proteose peptone에서 저해활성이 가장 높게 나타났다. 염 농도로는 1% (w/v) NaCl, 금속이온은 1 mM LiCl을 첨가하였을 때 저해활성이 증가하였다. 선정된 최적배양조건에서 배양한 결과, 84 hr 배양시 저해활성은 균주 최적배양 전의 저해율이 최대로 나타났다.

### 제 3 절 생리활성 물질의 분리·정제 및 이화학적 특성

Ammonium sulfate, DEAE Sepharose CL-6B, Superdex 200 column로 정제한 결과 specific activity  $35,620.6 \text{ U mg}^{-1}$ , yield 20.7 %, 119.9 fold로 정제되었다. Native 전기영동에서 단일 band로 나타났다. SDS-PAGE로 측정된 저해제의 분자량은 33.1 kDa의 monomer이었고, IEF 전기영동에서 등전점은 4.4에 해당하였다. 70 °C에서 30 min 전처리한 후에 60%의 저해활성을, pH 6~10범위에서는 80% 이상의 저해활성이 유지되었다. Subtilisin에 대한 저해 형태는 비경쟁적 저해로 나타났으며,  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 는 각각 2.67 mg. 15.33 unit였다. protease inhibitor의 N-말단서열은 DPSALYAPSALVLTVGKGVSAT였다. 이 Sequence는 *Streptomyces albogriseolus*에서 생산되는 *Streptomyces subtilisin inhibitor* (SSI)와 일치하는 것으로 나타났다. *Streptomyces thermocarboxydus* C12에서 생산된 protease inhibitor의 아미노산 조성의 경우 Ser, Ala의 함량이 높았으며, Met, Ile, His, Lys의 함량이 낮은 것으로 나타났다. protease inhibitor를 식품급 저해제로 적용 가능한지 조사한 결과, pork plasma protein과 egg white type p-39보다 각각 1,648.3와 571.6배의 저해효과가 있었다.

### 제 4 절 굴 가수분해물을 이용한 생리활성물질의 대량생산 검토 및 해양 유래 미생물에 대한 적용

*Streptomyces thermocarboxydus* C12의 최적 회분배양 조건은 굴가수분해물 1.5 %, galactose 1.5 %, 100 rpm, 1 vvm, 접종량 1 %에서 335 unit로 원배지에 비해 약 1/3 정도 낮은 protease 저해활성을 보였다. 반면에 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)의 활성은 굴가수분해물을 첨가한 배지가 816 unit로 기존 배지에 비해서 약 2배 정도 높은 결과를 나타내었다. 이는 균주마다 이용하고자 하는 질소원 내의 아미노산 함량의 차이에

다른 특이성을 나타내는 것으로 판단된다. 따라서 균주의 생육조건에 따라 선별적인 질소원을 선택하는 것이 효과적일 것으로 판단된다. 이런 결과를 바탕으로 '스트렙토마이세스 서모카르복시두스 씨 12 (*Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)가 생산하는 섭티리신 유사 단백질 분해효소 저해제 (Subtlisin like protease inhibitor) 및 그의 제조방법' (특허출원번호 : 10-2007-0063517호)를 출원하였다.

## 제 6 장 기능성 소재로서 활용을 위한 시장 조사

기능성 펩티드의 우리나라 시장 규모는 점차 확대되고 있으며, 직접적인 사용이 가능한 시장 규모는 연간 1176억 원인 것으로 추정되며, 미생물 대량 배양 배지를 위한 pepton 시장의 규모는 수입액으로 환산할 때 연간 약 12 억원으로 추정된다. Ex분 추출을 위한 굴을 사용할 때 원료 단가는 거의 없으며, 미이용 IGF 굴과 Ex-분 추출 후의 잔사굴을 이용한 산가수분해물과 펩티드 제조원가는 각각 8,018-17,600원과 7,418-17,000원의 범위였다. 일반적인 펩티드 제품에는 식이당 약 0.2-8.0 g이 첨가되며 1 kg을 사용하여 제품을 제조하는 경우 125개의 제품을 생산할 수 있기 때문에 다른 부원료를 포함하여도 충분한 경제성이 있을 것으로 판단하였다. 바이오 관련 제품의 산업화는 연구 보다는 판매가 큰 비중을 차지하고 있다. 현재 우리나라에서 개발된 대부분의 기능성 식품들은 방문 판매와 홈쇼핑을 통한 판매를 위주로 하고 있기 때문에 초기 시장 진입에 막대한 금액이 소요된다. 따라서 본 연구결과물의 초기 시장 진입은 기능성 대량 생산 제품에 대한 전국적 네트워크를 구축하고 있는 업체와 연계하는 것이 가장 가능성이 큰 것으로 보인다.

## V. 연구개발 결과의 활용계획

2003년 동절기 굴의 가격 동향을 조사한 결과, 대단위 포장 굴 생산 라인에서 상당량의 경제성이 없는 굴이 폐기되었으며, 이 같은 굴은 1000-2000원/kg 정도의 가격으로 회수할 수 있었고, 세척액과 자숙액의 대부분이 폐기되고 있음을 확인하였다.

따라서 본 연구는 낮은 단가의 굴 (중량미달의 굴, 파손굴 및 freeze burn 이 진행된 굴 등), 을 이용하여

- 생리활성 물질을 생산하기 위한 미생물 대량 배양용 질소원으로 개발하고,
- 굴에 분포하고 있는 TGase의 정제와 활용성을 검토하며,
- 저가의 굴과 굴 부산물의 미생물 배지 전환과 이들 배지를 활용하여 생산한 생물활성 및 기능성 물질의 대량 생산과 정제를 통한 고부가가치 상품의 산업화를 시도한다.
- 부분적인 효소 가수분해 조작을 통해 생물학적 활성을 가진 펩티드를 생산하며,
- 효소 합성을 통해 새로운 기능성 펩티드를 창출하고
- 발효와 본 연구를 통해 생산한 기능성 물질의 formulation을 통해 새로운 기능성 제품을 제조하고자 하였다.

낮은 단가의 굴을 생물학적 제품 생산을 위한 자원과 생물학적 활성을 가진 새로운 제품으로 활용하기 위한 연구는 굴의 수급 조절에 기여함으로써 고품질 굴의 적정 가격 유지 기능과 어업인의 소득 안정화에 크게 도움이 될 것으로 예상된다.

### 가. 기술적 측면

저가의 굴과 굴 폐기 자원을 이용한 미생물 대량 생산을 위한 질소 및 탄수화물 급원의 배지 활용; 굴 가공 부산물인 자숙수의 경우, 염농도가 높아 전량이 폐기되고 있고, 세척수의 경우 일부만이 농축되어 저렴하게 수출되는 정도로 대부분이 폐기되어 수질 오염의 원인이 되고 있다. 자숙수와 세척수에는 미생물의 생육에 있어 영양원이 되는 다량의 glycogen 화합물과 단백질 및 아미노산 등이 함유되어 있기 때문에(김 등, 2000) 유용 미생물의 대



량 생산을 위한 배지 및 동물·어류의 사료로 활용 할 수 있을 것이다. 그리고 대사 과정에서 여러 가지 기능성 물질을 생산하는 종들이 속속 발견됨에 따라 산업적 생산을 위한 대량 배양이 절실한 실정이나, 배지의 단가가 너무 높아 유용 미생물의 고기능성 물질의 생산에 경제적인 제약이 되고 있다. 따라서 꿀 폐기 자원 농축물을 미생물 생산을 위한 배지로 활용할 수 있다면 미생물 유래 고기능성 제품의 전체적인 생산 단가를 절감하고 꿀 가공 폐기 자원의 완전 이용화에 기여할 수 있다.

대량 배양 미생물로부터 생리 활성 물질의 분리와 부분 정제; 꿀 가공 자숙수와 세척수를 이용하여 개발한 배지에 대량 배양한 유용 미생물로부터 생리학적 활성을 가진 펩티드의 분리와 부분 정제를 통해 산업화하고자 한다. 미생물 유래 생리활성 물질의 대량 생산에 가장 큰 걸림돌이었던 고가의 배양 배지의 일부를 폐기 수산자원으로 대체함으로써 미생물 유래 기능성물질의 배양과 최종 제품의 단가를 획기적으로 낮출 수 있을 것으로 예상된다.

부분가수분해물의 생산; 최근 단백질 가수분해물의 여러 가지 가공 및 건강 기능성이 알려진 이래 많은 연구가 진행되고 있다 (Hattori et al., 1998; Kim et al., 2001; Saiga et al., 2003). 그러나 이들 단백질 가수분해물의 가공 건강 기능성은 열처리 및 효소 처리 등과 같은 가수분해 방법에 의해서도 달라지지만 가수분해물의 크기, 모양, 아미노산 조성과 결합 순서, 유효 하전, 전하분포, 소수성과 친수성기의 비율, 펩티드 구조, 분자 유연성, 다른 성분과의 반응성 등에 의해 좌우된다. 그러나 대부분의 연구는 단백질의 완전 가수분해로 생성한 펩티드의 기능적 특성을 탐색하였다. 본 연구에서는 과잉 생산되어 냉동 창고에 장기간 저장되어 있거나 수확하지 못하고 해를 넘긴 월하굴을 가수분해물의 소재로 활용하여 TGase 공유결합 단백질 및 비공유결합 단백질의 산 및 부분효소 가수분해를 실시하여 생리활성을 가진 펩티드를 정제하여 아미노산 결합 서열에 따른 특성을 구명하였다.

공유결합 형성을 통한 새로운 기능성 펩티드의 창출; 꿀에 분포하는 유용 효소로서 TGase의 분리, 정제 기술을 확립하고 TGase로 꿀 단백질을 공유결합시킨 후 효소로 가수분해 하여 제거한 가수분해물의 펩티드 조성을 TGase를 활용하지 않은 효소 가수분해물과 비교 검토하고 새로운 가수분해펩티드

의 생성을 시도하였다.

굴 배지를 이용한 생물활성 및 기능성 부분가수분해물의 대량생산과 산업화; 굴 단백질의 산 가수분해물을 미생물 배지로 활용하여 생물 활성 (protease) 및 기능성 물질(항균물질)의 대량 생산 기술을 확립하고, 이들 생산 물질을 사용하여 기능성 굴 단백질 부분 가수분해물의 대량 생산 기술과 산업화를 위한 scale-up과 경제성을 검토하여 실용화 기반을 조성한다.

#### 나. 경제.산업적 측면

저가 굴과 굴 가공 폐기물을 고가의 미생물 배지로 전환; 현재 미생물이 산생하는 기능성 물질이 다양하게 연구되고 있으나, 산업화에 실패하고 있는 가장 큰 이유 중의 하나가 생산 단가이다. 이 같은 측면에서 저가의 굴과 가공 폐기물이 유용 미생물의 대량 배양을 위해 고가로 시판되고 있는 상업적인 배지를 대체할 수 있다면 굴 가공 폐기물을 고부가가치의 상품으로 전환시킬 수 있기 때문에 굴 가공 업체의 수지 개선에 큰 기여를 할 것으로 예상된다.

대량 배양한 미생물로부터 생리활성 물질의 생산을 통한 경제성 창출; 미 활용 굴을 이용하여 미생물 배지를 개발함으로써 유용 미생물의 대량 배양을 위한 배지로 활용할 수 있다면, 고가의 배지 사용에 따른 생산 단가를 하락시켜 미생물을 통한 생리 활성 물질의 생산에 경제성을 부여할 것이다.

가공 적성이 낮은 굴의 유효 이용과 고부가가치 생리활성 물질의 회수; 국내의 양식 굴은 국내의 경우 김치 조미용, 생굴로 소비되고 있으며 수출용인 경우 냉동굴 및 통조림 원료로 이용하고 있다. 이 같이 다양하지 못한 소비 형태와 낮은 가공 적성은 새로운 개념의 신 수요 창출이 미흡한 탓이다. 따라서 낮은 가공 적성 때문에 생산과 소비에 불균형을 이루고 있는 굴을 식품 소재 혹은 건강 기능 소재로 활용함으로써 소비 확대에 기여할 수 있다.

가공 적성이 낮은 굴의 건강 소재 식품화; 중량 미달의 굴, 부서진 굴, freeze burn된 냉동 굴 (냉동굴이 다량 제조되어 유통되지 못하고 장기간 창고에 방치되어 있어 산화 갈변이 일어나 유통이 불가능한 굴) 등과 같이 상

품가치를 잃은 꺾은 굴을 원료로 하여 적절한 균주를 사용하여 건강 기능성 소재를 제조함으로써 굴을 이용한 고차 가공품을 생산하고, 시장 조사를 통하여 시판 가능성을 아울러 검토한다. 건강 기능성 음료 등의 제조는 굴의 고도 이용을 위한 방안을 제시함으로써 소비 촉진에 크게 기여할 것으로 판단된다.

과잉 생산 굴의 안정적 소비를 통한 가격 안정; 미생물 배양배지로 활용, 기능성 물질의 창출 및 건강 음료의 생산은 과잉 생산되는 굴의 안정적인 소비 방법을 확대함으로써 소비 형태의 확충에 기여할 것이다.

저렴한 생산 기반 시설과 쉬운 기술 확보로 어민 단체의 벤처 기업화에 기여; 본 연구 과제 중 미생물 배지 생산과 부분 가수분해물의 제조는 고가의 생산 기반을 확보할 필요가 없기 때문에 생산을 위한 최적화 조건을 제시한다면 산업화가 용이할 것으로 판단된다.

# SUMMARY

## I. Title

### **Production of Microbial Media and Functional Peptides Using Under-utilized Oyster**

## II. Objectives and Significance

### 1. Objectives

The objectives of this project was to develop value added products from under-utilized oyster such as damaged and freeze-burned oyster. We would try to investigate following items to new products.

- Purification and properties of transglutaminase from oyster
- Production of acidic and enzymatic hydrolysate
- New bioactive peptide production using transglutaminase cross-linking reaction
- Purification of bioactive peptides from hydrolysates
- Physiological functions and structure of bioactive peptides
- Nitrogen source for mass production of microorganism.
- Production of protease inhibitor from *Streptomyces* using oyster hydrolysate as nitrogen source

### 2. Significance

The oyster production from Korea is approximately 13,000 metric ton per year, but approximate 3,000 metric ton is remained per year. The remaining oyster is caused by reduction of retail consumption, prohibition

of export due to safety, and the weakened international competitiveness due to price. These complex problems indicate value-added products from oyster. We tried to develop a medium for microorganism as nitrogen source, and physiological products from oyster hydrolysates. These products have a potential application as media for mass production for microorganism and food ingredient for drink and health care products.

### **III. The contents and scope of final report**

#### **Chapter 1. Purification and Properties of Transglutaminase from Oyster**

##### **Section 1. Purification and Properties of Transglutaminase from Oyster**

The specific activities of transglutaminase from water extract of 8 shellfishes were compared, and transglutaminase of oyster was purified. Transglutaminase was purified by 20-80% saturated ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sepharose ion-exchange and Superdex 200 prep grade gel chromatography. The purity and yield of final purified transglutaminase were 1895 fold and 1.9%, respectively. The optimum pH and temperature of transglutaminase were 9.0 and 45 °C against N,N'-dimethylated casein as substrate. The half activity was lost after heating at 55 °C for 30 min. The activity of purified transglutaminase depended on Ca<sup>2+</sup> ion, and showed the highest in 10 mM CaCl<sub>2</sub>. The activity was decreased up to 10 mM NaCl, and not significant difference in the range of 50 -200 mM NaCl (p<0.05).

##### **Section 2. Properties of Protease Inhibitor from Oyster Shell**

The protease inhibitor was investigated from oyster shell. The crude

protein was 0.8%, and calcium oxide was composed of 97.15% in calcium acetate from oyster shell. The fraction below 10 kDa had higher protease inhibitor compared with the fraction above 10 kDa in acetic acid soluble fraction. It was more effective against bromelain inhibition. The antimicrobial and hepatic toxicity were not observed in protease inhibitor fraction and the dried calcium acetate. The acetic acid soluble fraction did not protect ultra-violet ray. The results suggested that partial purified acetic acid soluble fraction had a potential ability as food ingredient for protease inhibition.

## **Chapter 2. Preparation and Functional Properties of Acidic and Enzymatic Hydrolysates from Oyster**

### **Section 1. Preparation and Functional Properties of Acidic Hydrolysate from Oyster**

The objective of this work was to prepare acid hydrolysate based on the functionality such as anti-oxidative effect and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor, and to investigate into properties. The optimum conditions for maximum yield were 10 N for HCl concentration and 22 hr for hydrolysis time. The main parameters for acidic hydrolysis were hydrolysis time, HCl concentration and hydrolysis temperature in order. Protein content of hydrolysate and desalted hydrolysate were 6.5% and 14.0%, respectively. The peptide size of hydrolysate was in the range of 400-2500 dalton. The amino acid of hydrolysate was high in order of lysine, leucine, tyrosine, histidine, glycine and valine. Threonine, serine and proline were not detected. Acidic hydrolysate did not showed toxicity on HepG2 cells up to 200 mg/mL. DPPH radical scavenging activity was showed in acidic hydrolysate, and EC<sub>50</sub> value was 0.28 mg/mL. The anti-oxidative effect for linoleic acid was not significant difference in the range of 0.1-0.0 mg/mL ( $p < 0.05$ ), and was strong with decreasing peptide size. The fraction of desalted hydrolysate with 500-1000 Da showed high ACE inhibition compared with other fraction. The results suggested that the desalted hydrolysate had a potential ability as functional ingredients. However, we need more the safety data of acidic hydrolysate such as 3-MCPD(3-monochloro propano-1,2-diol).

## **Section 2. Preparation and Functional Properties of Enzymatic Hydrolysates from Oyster by One-Step Processing**

The study was carried out to prepare oyster hydrolysates by using Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, pepsin and trypsin, and to investigate its functional properties. The ACE inhibitory activity and antioxidant activity of enzymatic oyster hydrolysates did not increase with hydrolysis time. Among enzymatic oyster hydrolysates, hydrolysates incubated with Protamex for 1 hr (OHP) showed the most excellent ACE inhibitory activity and antioxidant activity, and their  $IC_{50}$  and  $EC_{50}$  values were 1.16 mg/mL and 1.49 mg/mL, respectively. However, Antimicrobial effect was not detected in all hydrolysates. Unhydrolysate from oyster had a higher molecular fraction(29-66 kDa) and lower molecular fraction below 6.5 kDa. The high and low molecular fractions decreased with increasing hydrolysis time. The free amino acid of hydrolysates after 1 hr and 3 hr hydrolysis increased up to 16% and 21% compared with that of raw oyster, respectively.

## **Section 3. Preparation and Functional Properties of Enzymatic Hydrolysates from Oyster by Two-Step Processing**

The objectives of this study were to prepare hydrolysates from oyster by two-step processing and to investigate its physiological functionalities. The putrid odor in all hydrolysates were not observed. The degree of hydrolysis by two-step processing was a similar to that by one-step processing. ACE inhibitory activities were improved by two-step processing. Especially, the hydrolysate of Protamex followed by Neutrase showed the highest ACE inhibitor, and its  $IC_{50}$  value was 0.40 mg/mL. Antimicrobial effect was not observed in all hydrolysates. Antioxidative effect of hydrolysate treated with Protamex and Neutrase in order was improved, compared with Protamex hydrolysate. The fractions of high molecular weight in range of 29-150 kDa shifted to the fraction of lower

molecular weight of 6.5 kDa. The free amino acids were increased with two-step processing.

#### **Section 4 Purification and Structure of Functional Polar Substance from Oyster Hydrolysate**

The objective of this work was to purify and investigate the functional polar substances from oyster enzymatic hydrolysates. The hydrolysates from oyster were prepared by two step processing using Protamex, followed by Neutrase. The optimum conditions for preparing functional polar substances were 60 min for reaction time, 1% for protease concentration, and 40 °C for temperature. The protein yield was higher in 3% NaCl medium than distilled water. DPPH radical scavenging activities of hydrolysates were higher in small molecular size (<5 kDa). Low molecular peptides extended the induced time up to 168 hr in a linoleic acid oxidation, and had antioxidant effect above 85%. TGPN hydrolysate inhibited the angiotensin-I converting enzyme up to 80% compared to control. Most hydrolysates did not have the reducing effect.

#### **Section 5 Purification and Structure of Bioactive Nonpolar Peptides from Oyster Hydrolysate**

The objective of this work was to purify and investigate properties and structure of the functional nonpolar peptides from oyster enzymatic hydrolysates. The nonpolar peptides of TGPN hydrolysate were purified by ultrafiltration (1 KDa), size exclusion chromatography, reverse-phase and ion-exchange HPLC. TGPN hydrolysate had high angiotensin-I converting enzyme(ACE) inhibition below 500 Da molecular size. The purified peptide showed single peak in 8% CH<sub>3</sub>CN containing 0.1% TFA, and 38% ACE inhibition effect composed to control. The amino acid of purified peptide was composed of isoleucine, leucine, valine, alanine, aspartic acid, glycine, proline and asparagine by Edman sequence. The molecular weights of peptides were equal to the results of ESI-MS for



peptide sequence.

## **Chapter 3. Physiological Functions of New Peptides from Oyster Hydrolysate**

### **Section 1. Toxicity and Protective Effect of New Peptides on HepG-2 Cell**

The objective of this work was to investigate the effect of optimum formulation product with two herbs and hydrolysate(HepaCare) on toxicity and cytoprotection of THA-induced toxicity for HepG-2 cell. The toxicity for HepG-2 cell did not find in O and I extracts, and enzymatic hydrolysates. TGPN and 3PN did not show the cytoprotective effect. However, HepaCare revealed survival capacity of 116% for 50 ug/mL and 128% for 200 ug/mL, respectively, compared to control. HepaCare had significantly hepatoprotective effects lowering the activity of GOT, GPT and  $\gamma$ -GOT after oral administration. This results suggested that HepaCare had significant hepatoprotective effect for acute chronic, and alcoholic hepatitis. In addition, HepaCare played a protective role against lipid peroxidation by TGPN and two herbs.

### **Section 2. Effect of Oyster Hydrolysate and Herb Mixture on Serum and Liver Homogenate of SD-Rat**

The effect of enzymatic hydrolysate from oyster and its formulated products with herb on SD-rat were investigated. The protein content of basic diet group was  $45.16 \pm 2.25$  mg/mL for serum, and increased up to 7% for HepaCare-100 and up to 9.0% for Herb-200, significantly. compared with control group( $p < 0.05$ ). However, the protein content of TGPN-200 and PN diet group was decreased, Total cholesterol was decreased in all diet group compared with control group. Especially, the total cholesterol was significantly decreased up to 29.9% for TGPN-200 and 24.1% for Hapacare-200, respectively( $p < 0.05$ ). TGPN and HapaCare group decreased

LDL-cholesterol of serum. The neutral lipid in serum was decreased in all enzymatic hydrolysate. Superoxide radicals of TGPN-100 and TGPN-200 groups was decreased up to 7.4% and 34.7%, respectively, compared with control groups. Hydroxy radicals in hydrolysate and HapaCare group were not significant difference compared with control group. TGPN-200 and HepaCare group decreased greatly carbonyl content in serum. The lipid peroxide in serum was decreased in TGPN and HepaCare groups. PN-100 and PN-200 groups increased superoxide dismutase activity. Especially, PN-200 group showed significant difference compared with control group, and increased superoxide dismutase activity up to 19.0%. The catalase activity was  $10.26 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min for control groups,  $0.30 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min for TGPN-100, and  $0.11$  nmol/mg protein/min for TGPN-200 group. PN group increased the catalase activity significantly ( $p < 0.05$ ).

## **Chapter 4. Application of Oyster hydrolysate**

### **Section 1. Manufacture of the Functional Solid Tablet Using Oyster Hydrolysates and Herb Extracts**

The objective of this work was to manufacture the solid tablet based on the functionality with oyster hydrolysate and extracts from plants such as O and I herb. The hydrolysate was obtained by polymerization with transglutaminase, followed by hydrolysis with Protamex and Neutrase, while O and I herb were extracted with water at 100 °C for 5 hr, and lyophilized. Wheat powder was used as basis of the tablet forming. The functional properties such as radical scavenging activity and angiotensin-I converting enzyme(ACE) inhibitory activity were determined before and after formulation of the tablet. I extract showed the highest radical scavenging activity. On the other hand, the oyster hydrolysate and O extract showed higher radical scavenging activity than positive control such as vitamin C and tocopherol. According to the ACE inhibitory

activity and forming condition, the optimum levels of oyster hydrolysate, O extract, I extract and wheat powder were 2.74g, 0.75 g, 0.75 g and 3.5 g, respectively. Each functional property was verified before and after forming the tablet, and optimum mixing ratio for the solid tablet was provided based on the manufacturing process and functionality.

## **Section 2 Optimun Formation of the Functional Drink with Oyster Hydrolysate and Herb Extract by Using the Mixture Design**

The objective of this work was to manufacture the functional drink with oyster hydrolysate and extracts from plants such as O and I herb by using mixture design and to provide the optimum ratio for the drink using the response surface methodology (RSM). The oyster hydrolysate was obtained by polymerization with transglutaminase, followed by hydrolysis with Protamex and Neutrase, while O and I herb were extracted with water at 100 °C for 5 hr. Interaction effects of these mixtures were investigated by modified distance based design and analyzed by regression canonical model, and trace plot. The optimization of mixture ratio was made by statistical modeling. Antiradical activity and sensory properties which are the important target constraints in drink showed linear canonical form, while color and viscosity of drink showed nonlinear canonical form indicating the highly interaction among mixtures. The reponse trace plot revealed that antiradical activity, sensory properties, color and viscosity were quite sensitive to the drink blending. According to the RSM, the optimum formulation of drink was 3% of oyster hydrolysate, 3.83% of I extract, and 8.17% O extract. This work shows the interaction effects of each mixture and provides the optimum ratio of the functional drinks for antiradical activity, ACE inhibition, color and viscosity.

## Chapter 5. Mass Production and Application of Bioactive Materials from Marine Bacterium

A marine bacteria which produced the subtilisin-like proteinase inhibitor was screened from the sediment in Gwangyang bay of Korea. The cultural, morphological and physiological characteristics of an isolated strain were investigated for identification. Cultural characteristics based on ISP(International *Streptomyces* Project) were as follows: white and gray aerial mycelium and good growth on various medium. The strain did not produce the soluble pigment and this strain could be grown up to 9% salt concentration. Morphological and physiological characteristics showed cylindrical spore chain and smooth spore surface by SEM(Scanning Electron Microscope). A phylogenetic analysis of the 16S rDNA provided a clue that the isolated strain was actually a member of the genus *Streptomyces*, because DNA sequence exhibited a higher homology with *Streptomyces thermocarboxydus*.

A subtilisin-like proteinase inhibitor inhibited effectively the activity of subtilisin and proteinase K by complexing with the enzyme in the ratio of 1 : 1, while did not inhibit the trypsin and collagenase.

The optimum culture conditions for the production of subtilisin-like proteinase inhibitor were determined after cultivation for 3 days at 28 °C. Glucose, galactose, starch and fructose were good carbon sources for the production of the inhibitors. On the other hand, maltose, lactose and mannose was only good for the cell growth, and potently inhibited the production of inhibitor. Natural organic nitrogen sources such as poly peptone and proteose peptone were good for the production of inhibitor, while beef extract, urea, casamino acid and inorganic nitrogen sources such as (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NH<sub>4</sub>Cl were poor. Optimal medium conditions for inhibitor production were composed of 1.6% galactose, 0.5% proteose peptone, 1% NaCl and 1 mM Li<sup>+</sup>, respectively. The optimal temperature and initial pH for production of the subtilisin-like proteinase inhibitor were 40 °C and pH 8.0, respectively. The subtilisin-like protease inhibitor

from *Streptomyces thermocarboxydus* C12 showed a maximum inhibitor activity after the cultivation for 60 h under the optimized medium.

A subtilisin-like proteinase inhibitor produced by *Streptomyces thermocarboxydus* C12 was purified by ultrafiltration, ammonium sulfate fraction, DEAE Sepharose CL-6B and Superdex 200 column chromatography. The inhibitor was purified 119.9 fold, with a yield of 20.7%. The inhibitor has a monomer with a molecular weight of 33.1 kDa by SDS-PAGE. Also, the inhibitor showed one band in native-gel PAGE. The isoelectric point was 4.4. The inhibitor activity was stable in the range of 6.0~10.0 for pH, and 30~60 °C for temperature respectively. The purified inhibitor was slowly activated by  $Mg^{2+}$  and  $K^+$ . The N-terminal sequence of subtilisin-like proteinase inhibitor was determined as DAPSALYAPSALVLTVGKGVSAT. The sequence (residues from 1 to 23) was completely identified with the *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI) produced in the *Streptomyces albogriseolus*. The  $K_m$  and  $V_{max}$  of the inhibitor were calculated to be 2.67 mg and 15.3 unit, respectively. The inhibitor was a noncompetitive inhibitor for subtilisin. As a result of amino acid composition inhibitor had a high level of serine and alanine. The inhibition effect of subtilisin-like proteinase inhibitor was much greater than that of food inhibitor such as bovine plasma, pork plasma and egg white protein.

## **Chapter 6. Market Survey for Application as Functional Ingredients**

# CONTENTS

## **Chapter 1. Purification and Properties of Transglutaminas from Oyster ..... 98**

### **Section 1. Purification and Properties of Transglutaminase from Oyster ..... 98**

1. Distribution of transglutaminase in several shellfish ..... 105
2. Purification of transglutaminase ..... 107
3. Composition of subunits ..... 110
4. Optima pH and temperature ..... 111
5. Thermal stability of transglutaminase ..... 112
6. Effect of Ca ion and NaCl on transglutaminase ..... 113

### **Section 2. Properties of Protease Inhibitor from Oyster Shell .. 119**

1. Proximate and mineral composition ..... 122
2. Partial purification and inhibitory effect of protease inhibitor from  
oyster shell ..... 123
3. Antimicrobial effect and toxicity of protease inhibitor on cell ..... 125

## **Chapter 2. Preparation and Functional Properties of Acidic and Enzymatic Hydrolysates from Oyster ..... 130**

### **Section 1. Preparation and Functional Properties of Acidic Hydrolysate from Oyster ..... 130**

1. Optimum conditions for preparation of acidic hydrolysate ..... 139
2. Peptide size distribution of acidic hydrolysate ..... 142
3. Amino acid composition ..... 143
4. Toxicity of acidic hydrolysate on HepG-2 cell ..... 146
5. Functionalities of acidic hydrolysate ..... 148

<b>Section 2. Preparation and Functional Properties of Enzymatic Hydrolysates from Oyster by One-Step Processing</b>	<b>·· 158</b>
1. Properties of raw material	162
2. Total volatile basic nitrogen, pH and sensory evaluation	162
3. Degree of hydrolysis	166
4. Angiotensin I converting enzyme(ACE) inhibition	167
5. Antimicrobial effect	169
6. Anti-oxidative effect	171
7. Distribution of molecular size	172
8. Free amino acid of hydrolysates	174
<b>Section 3. Preparation and Functional Properties of Enzymatic Hydrolysates from Oyster by Two-Step Processing</b>	<b>·· 181</b>
1. Total volatile basic nitrogen and sensory evaluation	186
2. Degree of hydrolysis	187
3. Effect of two-step hydrolysates on angiotensin I converting enzyme inhibition	189
4. Antimicrobial effect of two-step hydrolysate	191
5. Antioxidative effect of two-step hydrolysate	192
6. Distribution of molecular size	193
7. Free amino acid of hydrolysate	195
8. Safety of hydrolysate	197
<b>Section 4. Purification and Structure of Functional Polar Substance from Oyster Hydrolysate</b>	<b>·· 200</b>
1. Optimum conditions for the preparation of enzymatic hydrolysate from oyster	207
2. Partial purification of functional polar substance	216
3. Amino acid composition of hydrolysates	220

4. Functional properties of hydrolysates .....	221
<b>Section 5. Purification and Structure of Bioactive Nonpolar Peptides from Oyster Hydrolysate .....</b>	<b>236</b>
1. Purification of angiotensin-I converting enzyme inhibitor .....	241
2. Amino acid sequence by Edman degradation .....	253
3. Amino acid sequence by ESI-MS and MS/MS .....	254
<b>Chapter 3. Physiological Function of New Peptides from Oyster Hydrolysate .....</b>	<b>258</b>
<b>Section 1. Toxicity and Protective Effect of New Peptides on HepG-2 Cell .....</b>	<b>258</b>
1. Effect of new peptide on HepG-2 Cell .....	262
2. Protective effect of new peptides on HepG-2 cell .....	263
3. Effect of oral administration of Hepacare .....	264
<b>Section 2. Effect of Oyster Hydrolysate and Herb Mixture on Serum and Liver Homogenate of SD-Rat .....</b>	<b>273</b>
1. Effect on protein content .....	282
2. Effect of hydrolysates on cholesterol composition .....	284
3. Effect of hydrolysates on free radicals .....	291
4. Effect of hydrolysates on oxidative stress .....	296
5. Changes of anti-oxidative enzyme activities .....	300
<b>Chapter 4. Application of Oyster Hydrolysate .....</b>	<b>309</b>
<b>Section 1. Manufacture of the Functional Solid Tablet Using Oyster Hydrolysates and Herb Extracts .....</b>	<b>309</b>
1. Proximate and physical properties .....	313



2. Radical scavenging activity .....	314
3. Preparation of solid tablet from oyster hydrolysate .....	314
4. Antioxidative effect of solid tablet .....	315

**Section 2. Optimum Formation of the Functional Drink with  
Oyster Hydrolysate and Herb Extract by Using the  
Mixture Design .....** 320

1. Design point and drink mixture .....	324
2. Statistical modeling and analysis .....	325
3. Optimization of mixture .....	330

**Chapter 5. Mass Production and Application of Bioactive  
Materials from Marine Bacterium .....** 335

**Section 1. Screen and Isolation of Speices Produced Bioactive  
Materials .....** 335

1. Isolation of species produced protease inhibitor .....	339
2. Identification of species .....	340
3. Comparison of 16S rDNA sequence and neighbour-joining tree .....	343

**Section 2. Optimum Condition for Production of Bioactive  
Materials .....** 348

1. Effect of incubation temperature .....	351
2. Effect of initial pH .....	352
3. Effect of carbon source .....	352
4. Effect of nitrogen source .....	355
5. Effect of NaCl concentration .....	357
6. Effect of metal ion .....	358
7. Production of protease inhibitor under optimum condition .....	358

### **Section 3. Purification and Properties of Protease Inhibitor form**

<i>Streptomyces</i> strain .....	363
1. Purification of Subtilisin-like protease inhibitor .....	372
2. Physico-chemical Properties of Subtilisin-like protease inhibitor .....	379

### **Section 4. Mass Production of Bioactive Materials and It's**

<b>Application</b> .....	<b>394</b>
1. Effect of inoculation on production of protease inhibitor .....	397
2. Effect of C/N ratio on production of protease inhibitor .....	398
3. Effect of stirring rate on production of protease inhibitor .....	399
4. Effect of aeration on production of protease inhibitor .....	400
5. Production of protease inhibitor using oyster hydrolysate .....	401
6. Batch scale production of protease inhibitor .....	402
7. Application of oyster hydrolysate for growth of other marine bacterium as medium .....	404

### **Chapter 6. Market Survey for Application as Functional**

<b>Ingredients</b> .....	<b>409</b>
--------------------------	------------

# 목 차

## 요약문

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	39
제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술 정보 .....	43
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	52
제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ...	82
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	84
제 6 장 참고문헌 .....	85

## 본문

제 1 장 글에 있는 Transglutaminase (TGase)의 정제와 특성 .....	98
제 1 절 TGase의 정제와 특성 .....	98
1. 어종에 따른 transglutaminase 활성과 동결 저장 중 활성의 변화 .....	105
2. Transglutaminase의 정제 .....	107
3. Subunit의 조성 .....	110
4. 최적 pH와 온도 .....	111
5. 열안정성 .....	112
6. Ca <sup>2+</sup> 이온 및 NaCl 농도의 영향 .....	113
제 2 절 패각 단백질의 단백질분해효소 저해효과 .....	119
1. 일반성분과 무기성분 .....	122
2. 단백질 분해효소 저해제의 정제와 저해활성 .....	123
3. 항균효과와 세포독성 .....	125

제 2 장 굴 부분 가수분해물의 제조와 기능성 확인 ..... 130

제 1 절 산 가수분해물의 제조와 특성 ..... 130

1. 산 가수분해물 제조를 위한 굴 가수분해물의 최적 반응 조건 ..... 139
2. 가수분해물의 분자량 분포 ..... 142
3. 아미노산 조성 ..... 143
4. 세포독성 ..... 146
5. 산 가수분해물의 기능성 ..... 148

제 2 절 일단 효소 가수분해물의 제조와 특성 ..... 158

1. 굴의 원료 특성 ..... 162
2. 휘발성 염기질소, pH 및 관능검사 ..... 162
3. 가수분해율 ..... 166
4. Angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해특성 ..... 167
5. 항균특성 ..... 169
6. 항산화능 ..... 171
7. 분자량 분포 ..... 172
8. 가수분해물의 유리아미노산의 변화 ..... 174

제 3 절 이단 효소 가수분해물의 제조와 특성 ..... 181

1. 휘발성 염기질소 및 관능검사 ..... 186
2. 가수분해도 ..... 187
3. 2단 가수분해물의 Angiotensin I converting enzyme 저해효과 ..... 189
4. 이단가수분해물의 항균성 ..... 191
5. 이단가수분해물의 항산화 활성 ..... 192
6. 분자량 분포 ..... 193
7. 가수분해물의 유리아미노산 조성 ..... 195
8. 가수분해물의 안전성 ..... 197

제 4 절 효소 가수분해물의 극성 기능성 물질의 정제와 구조 ..... 200

1. 효소 가수분해에 의한 굴 가수분해물의 제조 조건 ..... 207

2. 효소가수분해물의 부분 정제 .....	216
3. 효소가수분해물의 아미노산 조성 .....	220
4. 효소가수분해물의 기능적 특성 .....	221
<b>제 5 절 효소 가수분해물의 비극성 기능성 물질의 정제와 구조 ..</b>	<b>236</b>
1. ACE 저해 peptide 정제 .....	241
2. 아미노산 서열분석 .....	253
3. ESI-MS & MS/MS .....	254
<b>제 3 장 새로운 펩티드의 생리학적 기능성 .....</b>	<b>258</b>
<b>제 1 절 새로운 펩티드의 세포독성과 간 기능 보호 효과 .....</b>	<b>258</b>
1. 간세포에 미치는 영향 .....	262
2. 간세포 손상의 회복 효과 .....	263
3. HepaCare의 경구 투여 효과 .....	264
<b>제 2 절 굴 가수분해물과 굴 가수분해 조합물이 SD-렛트 혈청과 간 균질물에 미치는 영향 .....</b>	<b>273</b>
1. 단백질 함량 변화 .....	282
2. 콜레스테롤 조성의 변화 .....	284
3. 활성 라디칼에 미치는 영향 .....	291
4. 산화적 스트레스에 미치는 영향 .....	296
5. 항산화 효소의 활성의 변화 .....	300
<b>제 4 장 굴 부분 가수분해물의 응용 .....</b>	<b>309</b>
<b>제 1 절 기능성 고형 제품의 제조와 생리적 기능성 .....</b>	<b>309</b>
1. 일반성분과 물리적 특성 .....	313
2. 라디칼 소거능 .....	314
3. 고형 환 제조 .....	314

4. 고품질 환 추출물의 항산화성 .....	315
<b>제 2 절 혼합물 실험계획법에 의한 효소 가수분해물과 한약추출물들의 최적 혼합비 분석 .....</b>	<b>320</b>
1. Design point and drink mixture .....	324
2. Statistical modeling and analysis .....	325
3. Optimization of mixture .....	330
<b>제 5 장 유용균주로부터 생리활성물질 대량 생산 및 활용 .....</b>	<b>335</b>
<b>제 1 절 해양유래의 유용균주의 탐색 .....</b>	<b>335</b>
1. 저해제 생산 균주의 분리 .....	339
2. 분리균주의 일차동정 .....	340
3. 16S rDNA 염기서열 분석 및 계통도 분류 .....	343
<b>제 2 절 탐색 균주의 생물활성 및 생리활성물질 생산의 최적조건 검토 .....</b>	<b>348</b>
1. 배양온도의 영향 .....	351
2. 초기 pH의 영향 .....	352
3. 탄소원의 영향 .....	352
4. 질소원의 영향 .....	355
5. NaCl 농도의 영향 .....	357
6. Metal Salts의 영향 .....	358
7. 최적배양조건에서 저해제의 생산 .....	358
<b>제 3 절 생리활성 물질의 분리 · 정제 및 이화학적 특성 .....</b>	<b>363</b>
1. Subtilisin-like protease inhibitor의 분리 · 정제 .....	372
2. Subtilisin-like protease inhibitor의 이화학적 특성 .....	379

제 4 절 굴 가수분해물을 이용한 생리활성물질의 대량생산 검토 및 해양 유래 미생물에 대한 적용 .....	394
1. 저해제 대량생산을 위한 접종량의 영향 .....	397
2. 저해제 대량생산을 위한 C/N비의 영향 .....	398
3. 저해제 대량생산을 위한 교반속도의 영향 .....	399
4. 저해제 대량생산을 위한 통기량의 영향 .....	400
5. 미이용 굴가수분해물을 이용한 proteinase inhibitor의 생산 .....	401
6. 저해제 대량생산을 위한 회분배양 .....	402
7. 굴 가수분해물 배지를 이용한 다른 해양유용미생물의 적용 .....	404
 제 6 장 기능성 소재로서 활용을 위한 시장 조사 .....	 409

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 연구개발의 필요성

현재 굴 소비 시장의 형태는 공장 규모 김치의 대량 생산, 조리 방법의 개발 부진, 고차가공품의 개발 부진에 따른 수요 감소 등과 같은 국내적 요인과 2001년 대일 수출 굴에서 패독과 이질균의 검출로 인한 수출 중단, 대일 수출굴에 대한 일본 정부의 부정적인 시각, FDA 권고 사항 미이행에 따른 수출의 중단 등 대외적인 요인에 의해 극히 부진한 상태이다. 이 같은 현상은 굴의 수요와 공급에 따른 예측을 할 수 없어 굴 가격의 급속한 하락을 초래하였고, 심지어는 월하를 시키는 경우에 도달하였다.

따라서 현재의 양식 규모가 계속 유지된다면 2004년 굴 생산량은 56천톤으로서 소비량약 42천톤(수출 시장의 경우 20천톤, 내수시장의 경우 22천톤)을 제외하면 약 14천톤의 과잉 생산이 예상된다. 그러나 환경 및 위생적인 요인으로 인해 예측한 수출 물량이 소화되지 않을 경우 잉여 생산량은 더욱 증가할 것이다.

이 같은 문제를 개선하기 위해 생산자 및 업계 중심의 자율 관리 정착 등의 자구 노력에 의한 수급 조절, 어장 휴식년제의 도입 등과 같은 제도 개선을 통한 수급 조절 방안 강구, 굴 박신 위생관리의 강화, 굴 수출 확대, 국내 소비 기반 확보를 통한 냉동품 및 훈제 통조림 소비 확대 방안 등을 고려하고 있으나 잉여 생산량의 소비를 위한 적극적인 대책은 되지 못할 것이다.

포장 생굴을 생산할 때 기준 중량 미만 및 부서진 굴 등은 상품 가치가 없기 때문에 폐기하고 있으며, 알굴 생산을 위한 탈각 시에 이 물질 제거를 위한 세척 과정에서 세척수가 발생한다. 그리고 굴 가공품을 제조할 때 대부분이 탈각을 위한 전처리 공정으로 열처리 과정이 필요하고 자숙액이 부산물로 발생한다. 이들은 상당량의 유기물을 포함하고 있어서 폐기하는 경우 수질 오염의 근원 물질로 작용하기 때문에 세척액은 일부 농축 소스로 활용하고 있으나, 자숙액은 거의 전량 폐기되고 있는 실정이다.

## 연구개발의 목적

낮은 단가의 굴 (중량미달의 굴, 파손굴 및 freeze burn이 진행된 굴 등)을 이용하여 생리활성 물질을 생산하기 위한 미생물 대량 배양용 질소원으로 개



발하고, 굴에 분포하고 있는 TGase의 정제와 활용성을 검토하며, 저가의 굴과 굴 부산물의 미생물 배지 전환과 이들 배지를 활용하여 생산한 생물활성 및 기능성 물질의 대량 생산과 정제를 통한 고부가가치 상품의 산업화를 시도한다. 부분적인 효소 가수분해 조작을 통해 생물학적 활성을 가진 펩티드를 생산하며, 단백질 공유결합 형성을 통해 새로운 기능성 펩티드를 창출하고 가수분해와 본 연구를 통해 생산한 기능성 물질의 formulation을 통해 새로운 기능성 제품을 제조하여 낮은 단가의 굴을 생물학적 제품 생산을 위한 자원과 생물학적 활성을 가진 새로운 제품으로 활용하기 위한 연구는 굴의 수급 조절에 기여함으로써 고품질 굴의 적정 가격 유지 기능과 어업인의 소득 안정화에 기여할 수 있다.

## 연차별 연구개발 목표와 내용 및 범위

주관연구기관(세부과제) : TGase 정제 및 TGase를 활용한 새로운 기능성 펩티드의 창출

구 분	목 표	내용 및 범위
1차년도 (2004년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○TGase의 정제와 분리 특성</li> <li>○글 부분가수분해물의 제조</li> <li>○패각을 이용한 단백질 분해 효소 및 저해제 확인</li> <li>○기능성의 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○패류에 분포하는 TGase의 활성</li> <li>○TGase 분리·정제 및 특성</li> <li>○기능성 측정</li> <li>○부분 가수분해 효소의 선택</li> <li>○가수분해생성물의 회수</li> <li>○분자량별 분획</li> <li>○획분 별 기능성 측정</li> <li>○Peptide 기능 및 안전성 검토</li> </ul>
2차년도 (2005년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○TGase를 이용한 새로운 펩티드의 창출</li> <li>○기능성 펩티드의 분리, 정제</li> <li>○기능성 펩티드의 구조 특성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○TGase와 부분가수분해물의 최적 반응 조건 확립</li> <li>○새로운 펩티드의 창출</li> <li>○아미노산 서열의 비교분석</li> <li>○기능성 펩티드의 분리·정제 조건의 확립</li> <li>○분리한 펩티드의 기능성 측정</li> <li>○기능성 펩티드의 아미노산 결합 서열 분석</li> <li>○기지 펩티드와 구조 비교</li> <li>○Peptide 기능 및 안전성 검토</li> </ul>
3차년도 (2006년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○생산실용화 기술의 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○생물 활성 및 기능성 물질의 대량생산 기술확립</li> <li>○Scale-up 분리기술의 확립</li> <li>○Peptide 기능 및 안전성 검토</li> <li>○산업화에 따른 경제성과 시장 조사</li> </ul>

협동연구기관(협동과제) : 유용균주로부터의 생리활성물질 대량생산 및 활용

구 분	목 표	내용 및 범위
1차년도 (2004년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○수산폐기자원의 미생물배지로의 응용방안 및 유용균주의 탐색</li> <li>○수산폐기자원의 미생물 배지에서 응용 및 미생물로부터 생리활성물질의 탐색·생산조건 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○문헌 및 자료 수집</li> <li>○수산폐기자원유래 미생물배지 내에서의 생리활성물질 생산 균주탐색 선별 및 생육특성 검토</li> <li>○생리활성물질 생산능 검토 및 유용균주의 최적 배양 조건의 검토</li> <li>○C-source, N-source, C:N ratio, 무기염류, 금속이온의 첨가효과</li> <li>○pH, temperature, growth time, Inoculum volume 등</li> </ul>
2차년도 (2005년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○생물발효기(fermentor)에서 생리활성물질 생산능 검증 및 최적 조건 검토</li> <li>○생리활성물질의 배양분리공정 및 단위공정설계</li> <li>○생리활성물질 부분정제 및 순도 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○7 L, 15 L 생물발효기를 이용한 최적 발효생산능 검증 및 최종 생육 조건 검토 (Growth factor : pH, DO, N<sub>2</sub>, agitation speed 등)</li> <li>○생리활성물질의 분리·정제 공정 개발 및 단위공정설계</li> </ul>
3차년도 (2006년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○생물 활성 및 기능성 물질의 대량 생산 조건의 최적화</li> <li>○기능성 물질의 안전성 검토</li> <li>○산업화 제품 생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○생물 활성 및 기능성 물질의 분리, 정제 공정의 최적화</li> <li>○분리 정제 공정의 scale-up을 위한 단위 공정 설계</li> <li>○발효 기능성 제품의 생산과 기능성의 최적화</li> <li>○공정별 경제성 검토</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보

### TGase 정제 및 TGase를 활용한 새로운 기능성 펩티드의 창출

우리나라에서 굴양식이 언제부터 시작되었는지를 알 수 있는 정확한 자료는 없다. 1908년경의 조사에 의하면, 광양만 내의 섬진강 하구에서 일부 양식하고 있었다고 한다. 이때의 양식방법이 어떠한지 밝혀지지 않았으나, 돌이나 폐각 같은 것을 바다에 던져 넣는 방법인 바닥식을 사용했을 것으로 추측된다. 광복 이후 김 수출의 격감으로 곤경에 빠진 김양식 영세어민을 구제하기 위해, 정부에서 굴 생산의 증대를 위한 조장책을 강구하기 시작하였다. 양식방법도 1950년대 말부터는 뗏목수하식 방법을 사용하여 생산성을 크게 높였으며 1960년대에는 연승수하식 방법도 개발하였다. 1970년대는 수하식 굴양식업의 성숙기로, 충무를 중심으로 한 남해안에서 급속도로 발달하였다. 1980년대에 들어와서도 생산량은 계속 증가하였다. 이와 같은 양식기술의 발달과 어업권 건수 및 면적 등의 증가로 1998년 176천톤에서 2002년에는 182천톤으로 증가하였다 (Jeong et al., 2003).

이와 같이 다량 생산되고 있는 우리나라 양식굴의 소비는 국내 시장의 경우 생식되거나 김치 제조시에 조미용으로 일부 이용되고 있는 정도여서 소비량은 연중 약 13천톤에 불과하다. 한편 수출인 경우 가열조리용 혹은 생식용 생굴의 형태로 일본에 다량 수출하고 있으며, 냉동굴이나 훈제 기름 담금 통조림의 원료로 유럽이나 미국에 다량 수출되고 있어 국내 생산 굴의 소비는 대부분이 수출에 의존하였으나 최근에는 생산 원가 상승으로 인하여 중국산 통조림 제품에 비해 가격 경쟁력을 상실함으로써 거의 수출하지 못하고 있는 실정이다.

현재 굴 소비 시장의 형태는 공장 규모의 김치의 대량 생산에 따른 생굴의 소비량의 급속한 감소, 조리 방법의 개발 부진, 고차가공품의 개발 부진에 따른 수요 감소 등과 같은 국내적 요인과 2001년 대일 수출 굴에서 폐독과 이질균의 검출로 인한 수출 중단, 대일 수출굴에 대한 일본 정부의 부정적인 시각, FDA 권고 사항 미이행에 따른 수출의 중단 등 대외적인 요인에 의해 극히 부진한 상태이다. 그러므로 이와 같이 미이용되는 굴을 활용하기 위한 방안을 모색해야한다.

미국에서 어류의 내장을 포함하는 가공 수산 식품의 판매는 FDA가 금지

하고 있다 (Kristinsson, 2000). 따라서 가수분해물을 식품 첨가물 혹은 식품 구성분으로 사용하기 위해서 어류의 가식부로 만들어야 한다. 특히 pelagic fish의 육은 효소 가수분해를 위한 좋은 기질이 될 수 있다. 어육 단백질의 효소 가수분해물은 단백질의 기능적 특성을 수식하거나 향상시키는 장점을 가진다. 단백질의 기능성을 지배하는 물리화학적 특성들은 펩티드 혹은 단백질의 크기, 아미노산 조성 및 결합서열, 다른 화합물과의 상호반응 등이다 (Damodaran, 1996). 단백질의 효소적 가수분해는 2차 구조가 다른 분자 질량이 적은 물질을 생성하며, 원래의 단백질과는 다른 특성을 가진다 (Adler-Nissen and Olsen, 1979).

근육에서 유래한 펩티드는 항산화성 (Hattori et al., 1998; Saiga et al., 2003), 혈압강화작용 (Arihara et al., 2001; Suetsuna, 2002; Katayama et al., 2004)과 같은 여러 가지 기능적 특성을 가진다. 생물학적 활성을 가진 펩티드는 여러 가지 방법으로 만들 수 있다. 즉 (1) 단백질을 가수분해하는 열과 산·알칼리 조건의 사용, (2) 효소적 가수분해, (3) 발효 식품 중 미생물 활성에 의한 방법이 있다.

식품 첨가물로서 항산화제는 안전하고, 색과 냄새 혹은 이상한 맛이 없어야 하며 가공 식품에 효과적이고, 가격이 낮아야 한다. 대부분의 합성 항산화제는 이런 조건을 만족시키지 못하기 때문에 천연물의 항산화 효과에 관한 연구를 수행하고 있다. 펩신과 산으로 용해한 elastin은 oleic acid의 산화 방지제로 효과적이며 (Hattori et al., 1998), Pronase E로 가수분해한 복양 명태 껍질의 가수분해물은 1.5-4.5 KDa의 분자량 획분에서 높은 항산화 효과를 보였다 (Kim et al., 2001). 항산화 효과와 관련하여 Rival et al.(2001)은 아미노산 결합 서열과 항산화능과 효과에 대한 상관성을 제시하였다.

돼지 골격근의 효소 가수분해물에서 유래한 ACE 저해 펩티드, Met-Asn-Pro-Pro-Lys과 Ile-Thr-Thr-Asn-Pro는 혈압강화 효과를 가진다. ACE 저해 펩티드들은 바지락과 굴의 펩신 소화물에서도 발견되었다(Suetsuna, 2002). 펩티드의 항미생물 효과와 관련하여 난백의 펩신 가수분해물인 Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg는 gram - positive와 gram - negative 세균에 대하여 항균 활성을 보인다 (Mine et al., 2004). 효소 가수분해 펩티드는 여러 생물학적인 활성 때문에 식품 첨가물로 널리 사용되고 있으며, 이 같은 기능성은 펩티드의 아미노산 결합서열, cross-linking과 상관이 있다. TGase 가교 결합은 zein, skim milk 단백질과 gluten 가수분해물의 쓴맛을 감소시키고

(Watanabe et al., 1992), 대두 단백질의 pronase, papain, 키모트립신 및 산 가수분해물의 식품학적 기능성을 개선한다 (Babiker, 2000).

국내의 경우 가수분해물과 가수분해물의 생물 기능성에 관한 연구는 많이 이루어져 있어서, 대구의 고니, 간 및 머리의 수산가공폐기물을 효소 분해하여 생성된 펩타이드성 물질을 기능성 소재로 활용하기 위한 연구를 수행하였으며 (Kim et al., 2000), 수산발효식품의 기능성 향상을 위한 효소 및 starter 개발이란 연구를 통해 멸치 액젓에서 기능성 펩티드를 정제하고 생리활성을 측정하였다. 그러나 대부분의 연구는 효소 분해물에 포함된 펩티드의 생리활성 효과에 집중하였고, 이들 펩티드의 생리 효과 발현에 중요한 펩티드의 아미노산 구조와 서열에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았으며, 특히 대량 생산 공정은 거의 검토하지 않았다. 그리고 굴에 분포하는 TGase 효소의 부분 정제와 이들 효소의 활용 및 가수분해물과 TGase 효소를 이용한 기능성 물질의 창출에 관한 연구는 없다.

O는 단맛, 신맛, 쓴맛, 매운맛, 짠맛 등 다섯 가지 맛이 난다고 해서 그 이름이 붙여졌고, 이들 다섯 가지 맛 중 가장 주된 맛은 신맛으로, 유기산이 다량 함유되어 있기 때문으로 알려져 있다 (Kim et al., 1973). O의 약리학적 효과는 간장보호 (Hikino et al., 1984), 알콜 해독 (Lee et al., 1990), 항 당뇨 (Sheo et al., 1987), 면역 조절작용 (Long et al., 1979), 항균 활성, 아질산염 소거에 의한 암 예방 효과 (Jung et al., 2000), 전자공여에 의한 항산화 효과 (Kim et al., 2004) 등이 보고되어 있다. 그리고, O 추출물의 붉은 색은 anthocyanin에 기인하며 차, 술 등의 가공제품에 아름다운 천연색을 부여한다 (Kim et al., 1973). 한편 I는 특유의 향기와 약효로 인하여 많은 관심을 가지고 여러 식품에 이용하고 있다 (Tanaka, 1976). 주로 야생을 채취하여 사용해 왔으나 수요량이 증가함에 따라 점차 재배가 이루어지고 있다. 대개 4월 상~중순에 과중한 후 5월 하순~6월 상순에 정식하여 10월~11월 상순에 수확되며 최근에는 강원도 지방과 전라북도 진안지역에서 재배하고 있다. I는 정유성분, caffeic acid, 방향족 oxycarbonic acid 및 각종 무기질과 비타민을 함유하고 있으며 (Waterfield et al., 1993; Block et al., 1994, Wu et al., 1998; Wu et al., 2001; Cho et al., 2002; Sheu et al., 2001), I의 정유성분은 약96종 이상의 화합물의 혼합체로써 cineole,  $\beta$ -myrcene, thujone, camphor, caryophyllenemurolene, logniverbenone, borneol 등이 주로 함유되어 있다 (Cho et al., 2001). I 추출물은 혈당량을 저하시키며 체중감소를 막고 혈중지질을 저하시키는 효과가

있으며 (Al-Waili et al., 1986), I 메탄올 추출물은 고지혈증과 당뇨를 개선시킨다고 보고되었다 (Surbran et al., 1997). I의 알코올 추출물은 glutamate-oxaloacetate transaminase(GOT), glutamate-pyruvate transaminase(GPT)의 활성을 감소시켜 간 기능 보호 효과가 있으며, 혈청의 tocopherol 함량을 증가시켜 자유 라디칼에 의한 손상을 방지하여 발암 위험성을 감소시킨다고 보고하였다 (Nam et al., 1999; Kim et al., 1996). 그리고 흰쥐에서 사염화탄소로 유발된 흰쥐의 간 손상의 치료효과를 보고하였다 (Lee, 2005).

대부분의 가공 식품은 여러 물질이 혼합된 형태로, 액상의 음료 역시 다양한 물질이 혼합된 형태이다. 그러나 한 개 이상의 성분으로 되어 있는 혼합물의 경우, 각 성분의 혼합량이 문제가 되는 것이 아니라 혼합비율만이 문제가 되는 경우가 있다. 이처럼 몇 개 성분의 혼합물에 관한 실험에서 어떠한 성분이 목적하는 종속변수에 유의한 영향을 미치며, 종속변수의 반응량을 최대 또는 최소로 만드는 최적혼합비율을 찾고자 하는 실험이 혼합물 실험이다 (Cornell, 1990; Elkaer et al., 1996). 이러한 혼합물 실험 계획과 분석은 식품의 개발 및 최적화를 위한 방법으로 중요하며 (Naes et al., 1999), 적절한 실험계획법 내에서 통계적인 모형의 도입이 이루어졌을 때 바람직하다 (Saguy et al., 1984). 그리고 적절한 통계적 모델링의 수립과 모델에 대한 분석 및 평가가 이루어졌을 때, 혼합물 내에서 각 성분이 미치는 영향을 파악할 수 있다 (Yoon et al., 1997). 특히, 독특한 향을 가지고 있는 굴 가수 분해물과 I 및 O와 같은 한약 추출물들의 혼합을 수용할 수 있는 맛 성분을 위한 최적 혼합 비율이 정해져야 하며, 그 비율에 따른 향산화성과 같은 기능성을 유지하면서 효과가 검증되어야 한다. 본 연구에서는 굴 효소가수 분해물과 I와 O의 추출물을 이용하여, 혼합물 실험계획법과 response surface methodology를 통해 액상의 제품을 만드는 최적 혼합비를 제시하고자 하며, trace plot을 이용하여 각 성분들이 물성에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

#### 유용균주로부터의 생리활성물질 대량생산 및 활용

동·식물·미생물에서 생산해 내는 최종산물인 단백질에 관심을 갖게 되었으며, 이 단백질들은 단백질 분해효소에 의해서 활성화되거나 혹은 파괴되어 세포가 적절한 기능을 수행할 수 있도록 한다(Mala et al., 1998). 단백질 분해효소는 동물, 식물 및 미생물계에 광범위하게 분포되어 있다. 약 40년 전만 해도 주로 식물의 papain, bromelain, 동물의 장기 효소인 pepsin, trypsin,

renin 등 조직효소를 응용하였으나 최근 세포질 외로 분비하는 미생물 단백질 분해효소가 주목을 받고 있다.

단백질 분해효소는 생체 내에서 소화효소의 작용 뿐만 아니라 혈전, 세포융합, 세포증식, 혈액응고, 혈압조절, 방어 등의 기능 뿐만 아니라 세포의 성장, 분화 및 사멸, 세포내외의 단백질 turnover, 세포이동, 침윤, 수정 등 모든 생체기능에 직·간접적으로 관여한다. 생리적으로 단백질 분해효소는 여러 신호에 의해 발현되고 또한 생체내의 저해 단백질에 의해 그 활성의 균형을 조절하고 있다. 그러나 이상 환경에 의해 비정상적으로 발현된 단백질 분해효소는 염증, virus 감염, 호르몬의 성숙, 부종, 발암, 암세포의 전이 등의 다양한 발병과정에 관여하며, 발생에서 노화에 이르는 생명현상과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 이러한 단백질 분해효소에 대해 억제 또는 방어역할을 하는 것이 단백질 분해효소 저해제이다.

의약품으로서 단백질 분해효소 저해제에 관한 연구는 천연물 연구에서 비롯되었다. 유기화학의 발달과 함께 다수의 합성 의약품들이 출현하였으나, 현재 약 50% 정도의 의약품들이 식물, 미생물 등 천연 생물자원 유래의 천연물 또는 천연물 유도체이다. 천연물 유래의 생리활성 연구는 전통적으로 동·식물, 토양 미생물 등 육상생물을 주된 대상으로 하였다. 그러나 근래에 이르러서는 지금까지 천연물의 보고였던 육상생물 및 토양 미생물로부터 새로운 의약활성 물질의 개발이 점차로 정체되는 경향을 나타냄에 따라 의약품의 새로운 탐색원으로서 육상 생태계가 아닌 해양이나 극한 생태계 같은 새로운 환경에 눈을 돌려 연구를 시작하고 있다. 해양은 특이한 생태계를 이루는 환경 때문에 해양생물이 만드는 대사산물은 육상생물에 비하여 특이한 골격의 화학구조를 가지게 되며, 항생물질 이외에 다양한 생리활성 작용을 갖는 효소 저해제를 생산하는 것으로 밝혀졌다. 생물체의 구성성분을 합성하고 생리적 기능을 나타내는 물질의 활성화 및 그 조절은 각각 효소와 효소 저해물질이 상당부분 담당하고 있다. 그러나 조절되지 않은 효소의 과잉작용은 각종 질병의 원인이 되거나 기존의 질환을 악화시키기도 한다. 단백질 분해효소에 의해 일어나는 질병의 치료 목적으로 자연계로부터 단백질 분해효소 저해제를 개발하고자 하는 노력이 진행되었다. 천연에 존재하고 있는 단백질 분해효소에 대한 저해물질의 연구는 미생물의 배양액 중에서 저분자의 저해물질을 발견할 때까지는 주로 동·식물 자원에 대하여수행하였다(Umezawa et al., 1972).



동물유래의 단백질 분해효소 저해물질은 소의 췌장에서 trypsin 저해물질을 결정상으로 단리하였다(Kunitz and Northrop, 1936). 이 저해물질은 Kunitz inhibitor 혹은 염기성 췌장 trypsin inhibitor로 불리며 많은 천연물질 중에서 최초로 일차구조가 결정되었다. 이 저해물질은 급성췌장염 치료 효과를 나타내고 임상적 의미를 가지는 것으로 잘 연구되어 있으며, 이와 유사한 물질은 염소와 돼지의 조직에서도 발견되었다. 췌액에는 또 다른 형태의 저해물질(pancreatic secretory trypsin inhibitor)이 함유되어 있는데 소, 돼지, 개, 쥐와 사람의 췌장추출액에서 얻었다(Pubols et al., 1974). 혈액에 함유된 저해물질에 관해서도 많이 연구되어 있으며(Glaser and Karic, 1978), 그 외 사독(Takahashi et al., 1974), 달팽이(Tschesche et al., 1972), 선충류, 각종 난류(Laskowski, 1955)와 여러 가지 포유동물의 초유(Cechova, 1976)등에서 단백질 분해효소 저해물질이 발견되었다.

식물유래의 단백질 분해효소 저해물질은 Read와 Haas(1938)이 대두에서 발견한 이래로 Ham 및 Bowman et al.(1944)은 각각 독립적으로 대두 중에 trypsin을 저해하는 물질을 발견하였다. 이로 인해 콩과식물을 대상으로 많은 연구자가 저해물질을 분리, 정제 하였다. 특히 Vogel et al.(1968)이 연구한 바에 의하면 대두식물은 거의 대부분이 단백질 분해효소 저해물질을 함유한다고 보고하였다. 식물성의 저해물질은 그 외에도 감자, 옥수수, 대맥, 호맥과 더불어 많은 식물에 존재한다. 그 후 많은 연구자가 다수의 저해물질을 분리·정제 하였지만 상기 저해물질은 Bowman-Birk inhibitor로서 잘 연구되어 있다. 동·식물에서 발견한 많은 저해물질들은 모두 단백질로 산과 열에 안정한 비교적 저분자물질 (분자량 6,000~12,000)과 불안정한 고분자물질 (분자량 20,000~60,000)로 분류된다.

미생물유래의 단백질 분해효소 저해물질에 관한 연구는 Höyen and Skulberg(1962)가 *Clostridium botulinum* (type A, B and E)에서 trypsin에 대한 저해물질을 발견한 이후 활발하게 연구 하였다. 곰팡이류의 단백질 분해효소 저해물질 생성 균주는 주로 *Penicillium cyclopium*에 대해서 많이 연구하였는데 이 균주는 산성 proteinase에 대한 저해물질로서 malic acid가 중합한 고분자의 poly-L-malic acid를 생성한다는 것이 밝혀졌다(Shimada and Matsushima, 1969). *Neurospora sitophilia*와 *Aspergillus japonicus*의 단백질 분해효소 저해물질은 저분자의 thiol proteinase inhibitor였다(Hanada et al., 1978). 미생물 기원의 단백질 분해효소 저해물질 중에서 가장 활발히 연구하

고 있는 actinomyces류가 생성하는 저해물질은 Aoyagi et al.(1969)이 trypsin 과 plasmin을 저해하는 새로운 형태의 저해물질인 leupeptin을 발표하였고, Umezawa et al.(1972)이 *Streptomyces mauvecolor*로 부터 trypsin, papain, cathepsin A, B 등의 단백질 분해효소 저해물질인 antipain을 보고하였다. 그리고 chymotrypsin의 저해물질인 chymostatin이 발견되었다(Umezawa et al., 1972). Kunimoto et al.(1972)은 pepsin과 renin을 저해하는 pepstatin을, Murao et al.(1972)은 *Streptomyces*속에서 단백질성 protease inhibitor인 *Streptomyces subtilisin inhibitor*(SSI)를 분리하였다. 그리고 Faucher et al.(1987)은 암의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 matrix metalloprotease (MMP)의 저해제 중 actinonin은 초기에 actinomyces 으로부터 항생물질로 분리되었으나, 이후 collagenase 저해제로서 다시 탐색된 물질이다. 미생물 기원 단백질 분해효소 저해물질은 동·식물에서 얻은 저해물질과는 크게 다르며 이들 효소 저해물질은 효소의 반응 기작의 해명에 유용할 뿐만 아니라 생리기능 및 의학적으로 중요한 여러 가지의 질병 현상의 해석에 유효한 물질이다.

*Streptomyces testaceus*와 *Streptomyces argenteolusvar*, *Streptomyces toyonakensis*가 생산하는 pepstatin은 pepsin, cathepsin D 및 renin을 특이적으로 저해한다(Kunimoto et al., 1972). Pepstatin 생산균이 생산하는 활성물질을 상세히 검토한 결과 pepstatin의 구조 중의 alanine이 serine으로 치환된 hydroxypepstatin, C말단 (3S, 4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methyl heptanic acid(AHMHA 혹은 statin)이 생합성 최종단계에서 환원받기 전에 탈산된 pepstanone 및 다른 acyl기를 가진 저해물질을 발견하였다. Pepstatin, hydroxypepstatin, pepstanone은 여러 가지 acyl기를 가진 각각의 물질을 총칭한다. Pepstatin은 포유동물 뿐만 아니라 미생물 기원에서 분리한 산성 단백질 분해효소를 저해한다. Pepstatin의 aspartic protease에 대한 선택적 저해작용을 이용하여 pepstatin Sepharose affinity gel을 만들어 대량으로 산성 단백질 분해효소를 분리하는데 사용하였다(Takahashi and Tang, 1981). Pepstatin은 위에서 sialic acid양을 감소시켜 위궤양을 방지하는 효과가 있다. *Streptomyces*로 생산한 다른 pepsin inhibitor로 procidins, SP-1과 pepsinostreptin이 알려져 있다(Murao and Sato, 1970).

*Streptomyces tanashiensis*에 의해 생산되는 phosphopeptide인 phosphor-amidon은 thermolysin을 강력하게 저해한다(Suda et al., 1973).

Phosphor-amidon의 인산부위가 thermolysin의 활성부위에 존재하는 Zn와 결합하여 저해한다. *Streptomyces nigrescens*의 S-MPI, *Streptomyces mozensis*의 talopeptin과 *Streptomyces rishiriensis*의 FMPI는 다른 thermolysin 저해제이다. *Actinomadura altramantaria*가 생산하는 matlystatin은 collagenase type IV를 저해하며, *actinomyces* sp.에서 생산하는 matlystain A는 MMP-2, 9에 강한 저해효과를 나타낸다. 그리고 matrigel을 이용한 *in vitro* 침윤실험에서 HT 1080 섬유육종 세포주의 침윤을 저해하는 것으로 보고하였다(Tanzawa et al., 1992).

Leupeptin, antipain과 chymostatin은 serine과 thiol protease의 강력한 peptide성 저해물질이다. Leupeptin(acetyl 혹은 propionyl-L-leucyl-L-leucyl-L-argininal)은 17종의 *Streptomyces* (즉, *roseus*, *rosechromogenes*, *chartreusis*, *albireticuli*, *thioluteus*, *labendulae*, *roboritoensis* 등)가 생산하였고 trypsin, plasmin, papain과 cathepsin B를 저해한다. 아르기닌구조와 알데하이드기는 중요한 구조적인 인자로서 알데하이드의 carbinol로의 환원이나 carboxyl로의 산화에 의해 저해활성이 상실되었다(Umezawa, 1972). Leupeptin은 뛰어난 약리효과를 가지고 있어 소염, 화상, 진통 및 수포 방지효과가 있는데 이는 kinin 형성을 저해하기 때문이고, 이 외에도 trypsin 저해에 의한 췌장염 치료에 leupeptin의 이용이 기대된다. 혈액응고는 leupeptin에 의해 저해되는데 이는 thrombokinasew와의 반응 때문이다. 또한 leupeptin은 암발생 억제와 암전이 억제효과가 있는 것으로 보고하고 있다(Aoyagi et al., 1977). Antipain(phenyl alaninal-arginine-valine-argininal)은 구조적으로 leupeptin과 관련이 있고 *Streptomyces michiganesis*, *Streptomyces mauvecolor*와 *vokosukanesis*에 의해 생산된다. Antipain은 trypsin, cathepsin A와 cathepsin B를 저해하며 leupeptin에 비해 papain과 trypsin에 더욱 특이적이다. Antipain은 leupeptin과 유사한 약리학적 활성을 가지나 그 활성은 leupeptin보다 낮다.

Chymotrypsin 저해제인 chymostatin은 *Streptomyces hygrosopicus*, *Streptomyces laremdulase*와 다른 일곱 균주에 의해 생산된다. L-Phenyl alanine은 chymostatin 구조와 알데하이드기를 환원시키면 실활의 원인이 된다(Umezawa and Aoyagi, 1973). *S. nigrescens*의 배양여액에서 분리한 알칼리성 단백질 분해효소 저해제 MAPI은 여러 가지 미생물 기원의  $\alpha$ -chymotrypsin과 papain을 저해하지만 trypsin, thermolysin, kallikrein, pepsin은 저해하지 않는다(Murao and Watanabe, 1978). Laskowski and

Kato(1980)가 serine proteinase inhibitor의 family를 발표한 이후 많은 수의 inhibitor들이 새로 발견되었다.

단백질 분해효소 저해물질은 약리학, 식품, 농업에 활용 가능할 뿐만 아니라 단백질 구조의 연구와 반응기작에 대해서 연구할 수 있다(Bode and Huber, 1992; Terashita et al., 1980). 특히 특이적이고 선택적인 단백질 분해효소 저해제는 소염작용, 항종양작용, 변이유발저지, 복수저류저지, 발암 및 암 전이 저지, 폐기종, 관절염, 췌장염, 혈전증, 고혈압, AIDS와 같은 인체 질병의 발병과정에 관여하는 단백질 분해효소들을 불활성화 시킬 수 있다(Demuth, 1990). 단백질 분해효소 저해물질은 세포, 조직, 체액 중에서 단백질 분해효소의 식별, affinity chromatography의 활성기, 물질 정제시에 일어나는 효소적 분해방지용에 이용할 수 있으며, 복잡한 생체반응에 있어서 단백질 분해효소의 역할을 이해하기 위한 시약으로써 널리 이용할 수 있다. 그리고 식품공정 상에서 불필요한 protease의 활성을 억제시키며, 식품원료에 자유 amino acid의 작용을 감소시킬 수 있다(García-Carreño, 1996).

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 연구 수행방법

#### TGase의 정제와 특성

##### Transglutaminase의 추출과 정제

마쇄한 굴 500 g에 2배량의 10 mM NaCl, 5 mM EDTA 및 1 mM DTT를 포함하는 20 mM Tris-HCl 완충액(TEND, pH 8.3)를 가하고, Ultra-Turrax (T25 Works Inc, wilmington, NC)로 8000 rpm에서 2 분 동안 균질화하여 원심분리(10,000xg, 60 분, Hanil SUPRA 25, Korea)하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 6겹의 거즈로 여과하여 지질을 제거하고 조효소로 사용하였다.

조효소는 다음과 같이 정제 정제하였다. 즉 조효소액을 20-80%의 포화 ammonium sulfate로 염석하고 원심분리(5,000xg, 30분)하여 얻은 침전물을 최소량의 TEND 완충액에 현탁하고 같은 완충액에서 하룻밤 투석하였다. 충분한 투석이 이루어지도록 50 배량의 완충액을 4회 교환하였다. 투석 후 얻은 단백질 용액을 원심분리(10,000xg, 60분)하여 변성 단백질과 침전물을 제거한 상층액을 TEND 완충액으로 평행시킨 DEAE Sephacel 칼럼(2.6x30 cm)을 장착한 GradiFrac (Pharmacia-Biotech, Upsala, Sweden)에 loading하고 1.0 N NaCl을 포함한 TEND 완충액을 선형균배하여 단백질을 용출하였다. 이때 유속은 1 mL/min로 하였고, 단백질은 280 nm에서 검출하였다. TGase 활성 획분을 TEND 완충액에 하룻밤 투석하고, 동일 칼럼에서 0.5 M NaCl을 포함하는 TEND 완충액으로 선형 균배하여 활성 단백질 획분을 분획하였다. 활성 획분을 모아 한의여과(Amicon; cut-off limit, 10,000 Da)하여 농축하고 0.1 N NaCl, 1 mM EDTA 및 0.1 mM DTT를 포함하는 10 mM Tris-HCl (pH 7.7)완충액에 투석하여 1차 Superdex 200 prep grade 칼럼(1.6x60 cm)에 loading하고 같은 완충액으로 용출하여 젤 크로마토그래피하였다. 활성 획분은 모아서 -20C에 저장하면서 TGase의 특성 분석에 사용하였다.

##### Transglutaminase 활성의 측정

Transglutaminase 활성은 Kumazawa et al.(1997)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 즉 37 °C의 항온수조에서 미리 항온한 최종 농도 50 mM 1 M

Tris-HCl 완충액(pH 8.5), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM DTT, 15 uM monodansylcadeverine (MDC), 1 mg/mL N,N'-dimethylated casein으로 구성된 혼합용액 2.16 mL에 240 uL의 조효소 및 정제 transglutaminase를 첨가하여 37 °C에서 30분 동안 반응시킨 후 0.5 mL의 0.1 M EDTA 용액을 첨가하여 반응을 중지시키고 형광분광광도계로 excitation 파장 350 nm, emission 파장 480 nm에서 형광강도를 측정하였다. 형광강도는 표준 곡선에 따라 MDC의 nM로 계산하였다. 효소 1 단위는 분당 N,N'-dimethylated casein에 incorporation하는 1 nM의 MDC의 양으로 정의하였으며, 비활성은 분당, 효소 단백질 mg 당의 활성 단위로 표시하였다. 단백질의 농도는 Lowry의 방법(1951)에 따라 bovine serum albumin으로 작성한 검량곡선으로 측정하였다. 완충액에 포함된 DTT는 Lowry법에 의한 단백질 농도 측정 에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다

### **SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)**

최종적으로 정제한 효소를 증류수에 대하여 하룻밤 투석한 후, 효소 용액 1 mL에 대하여 SDS-전기영동 시료 완충액 0.25 mL를 가하여 90 °C에서 3분 동안 가열하여 SDS-PAGE 전기영동용 시료를 조제하였다. SDS-PAGE는 5%의 농축 겔과 10%의 분리 겔에서 Laemmli의 방법(1971)에 따라 well 당 3 mA의 전류로 전개하였다. 전기영동이 끝난 겔은 Coomassie brilliant blue R-250에서 1 시간 염색한 후 methanol:acetic acid:증류수 (1:1:8, v/v/v)용액에서 배경이 깨끗해질 때까지 탈색하였다. 분자량 측정은 광범위 표준단백질 혼합물(Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA)을 사용하였다.

### **최적 pH와 온도 측정**

Transglutaminase 활성 측정을 위한 반응 혼합액 중 완충액의 농도와 pH를 변화시키면서 동일한 효소 단백질 농도로 측정하였다. 최적 pH 측정을 위해 0.25 M sodium phosphate (pH 6.0-7.0), 1 M Tris-HCl (pH 7.0-9.0) 및 1 M glycine-NaOH (pH 9.0-10.5) 완충계를 사용하였으며, pH 0.5 단위로 활성을 측정하였다. 최적 온도를 결정하기 위해 20-70 °C의 온도 범위에 걸쳐 5 °C의 단위로 활성을 측정하였다. 효소 활성은 단위 활성으로 표시하였다.

### **열안정성의 측정**

효소 용액을 시험관(10x130 mm)에 0.60 mL 씩 분취하고 30-80 °C의 온도 구간에 걸쳐 10 °C 단위로 각 온도에서 30분 동안 가열변성시키고 1 M Tris-HCl (pH 8.5), 55 °C의 최적 pH와 온도에서 20분 동안 반응시키고, 0.1 M EDTA 용액 0.5 mL를 가하여 반응을 중지시킨 후 형광강도를 측정하였다.

#### Ca<sup>2+</sup> 이온 및 NaCl 농도의 영향 측정

반응 혼합용액 중 CaCl<sub>2</sub>의 최종농도가 1, 5, 10, 20, 50 및 100 mM이 되도록 조절하고 40 °C에서 30분 동안 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다. 그리고 NaCl 농도의 영향은 NaCl의 최종농도가 각각 5, 10, 50, 100, 200 mM이 되도록 반응 혼합용액에 첨가하고 같은 반응 조건에서 효소 활성을 측정하였다.

#### 패각단백질의 단백분해효소 저해효과

##### 패각 성분의 추출

패각 성분의 추출은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 굴 패각 분말(200 mesh 이하) 150 g에 1.5 L의 5% acetic acid 를 가하여 저어주면서 하룻밤 동안 가용성 성분을 추출하고 원심분리(6,000xg, 20분, Supra 22K, Hanil, Korea)하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액을 250 mL 용량의 Amico stirrer cell (Amicon Co, MW cut-off, 10 kDa)에서 한외여과하고 농축물은 탈이온수에 대하여 하룻밤 투석하여 초산을 제거하고 분자량 10 kDa 이상의 물질(Oys-1)로 사용하였다. 투석 외액은 40 °C에서 감압 농축하고, 농축 중에 발생한 흰색의 결정은 원심분리(6,000xg, 20 min)하여 상층액은 분자량 10 kDa 이하의 물질(Ots-2)로 사용하고, pellet은 105 °C의 오븐에서 건조하여 초산칼슘으로 사용하였다. 5% acetic acid로 추출한 후 원심분리하여 얻은 pellet에 300 mL의 methanol을 첨가하여 저어주면서 2 시간 추출하고 원심분리(6,000xg, 20 min)하여 얻은 상층액을 다시 분자량 500 Da에서 한외여과하고 농축물은 탈이온수에 대하여 하룻밤 투석(분자량 100)하여 methanol 추출물(Oys-3)로 사용하였다. 탈이온수에 대하여 하룻밤 투석하여 얻은 Oys-1은 20 mM Tris-HCl (pH 8.3)으로 평행시킨 HiLoad Q-Sepharose 칼럼 (2.6x30 cm)에서 1 M NaCl로 선형 균배하여 단백질을 희분을 용출하고, 용출한 단백질의 단백분해효소 저해활성은 azocasein을 기질로 하여 시판 bromelain(B4882, Sigma Chemical Co, St Luis, MO)에 대한 저해 효과로 측

정하였다.

#### 일반성분과 무기원소의 측정

수분함량은 가열 건조법, 단백질 함량은 semimicro-Kjeldahl법, 회분은 건식 회화법으로 측정하였다. 무기원소는 X-선 형광분석기(XRF-1700, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다.

#### 단백질 분해효소활성 및 저해활성의 측정

효소 활성은 25 °C에서 온도 평행시킨 250 uL의 2% azocasein 용액(0.03 M potassium phosphate, pH 7.5)과 150 uL의 0.2%의 bromelain, α-chymotrypsin 및 trypsin을 가하고 25 °C의 항온수조에서 15분 동안 반응시킨 후, 1.2 mL의 10% trichloro acetic acid를 첨가하여 가수분해반응을 중지하였다. Azocasein이 완전히 침전하도록 얼음물에 15분 동안 방치한 후 Eppendorf 원심분리기(5415C, CE, USA)로 10,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 1.4 mL의 1.0 N NaOH를 포함하고 있는 시험관에 상층액 1 mL를 가하고 20분 후 분광광도계(UV-1700, Shimadzu Ltd, Kyoto, Japan)로 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해활성은 추출물과 효소용액(20 mg/mL)를 1:1 (v/v) 혼합하여 25 °C에서 30분 동안 항온하여 효소와 저해제를 충분히 반응시킨 후, 효소 활성측정 방법에 따라 활성을 측정하였다. 저해활성은 저해제를 사용하지 않았을 때의 활성에 대한 저해제 첨가시의 활성을 %로 표시하였다.

#### 항균활성의 측정

항균 활성은 paper disc법(Abdel-Baret et al., 1987)으로 측정하였다. 실험용 평판 배지에 tryptic agar 20 mL를 분주하여 건조시키고, 각 균주 (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella tryphimurium*, *Escherichia coli* 및 *Vibrio parahaemolyticus*) 배양액 100 uL 씩을 분주하고 도말하였다. 이어 시료 용액을 멸균된 disc (8 mm, Toyo Seisahusho Co.)에 40 uL 씩 흡수 건조시켜 plate 표면에 붙인 다음 37 °C에서 24-48 시간 배양한 후 disc 주위에 생성된 clear zone을 측정하여 직경(mm)으로 항균활성을 표시하였다.

#### 세포독성과 자외선 조사 효과의 측정



96 well plate에 정상 간세포를 100 uL 씩 분주하고 37 °C의 CO<sub>2</sub> 항온기에서 2시간 항온하여 안정시킨 다음, 100 uL의 MTT 용액 2.5 mg/mL를 가하였다. 다시 CO<sub>2</sub> 항온기에서 3시간 안정시킨 후 MTT assay를 실시하였다. 50 uL의 DMSO를 50 uL 씩 분주하고 항온기에서 30분 안정시킨 후 Elisa reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 산가수분해물의 제조와 특성

### 산가수분해물의 제조

최적 가수분해 조건을 설정하기 위해 시료 굴 50 g에 50 mL의 증류수를 가하여 8500 rpm에서 균질화한 후 시험관에 5 mL의 마쇄육을 취하고 표면 반응분석 설계에 따라 3인자(염산의 농도, 가수분해시간, 가수분해 온도) 2수준(3 N과 12 N 염산, 6 시간과 24 시간, 80 °C와 110 °C)으로 설정하여 가수분해물을 조제하였다 (Table 1). 가수분해물은 규조토를 포함하는 3G-4 glass filter로 여과하고 여과물은 회전진공증발기로 염산이 완전히 증발할 때까지 40 °C 이하의 온도에서 감압 농축한 후 25 mL로 정용하였다. 가수분해 조건에 따른 가수분해물의 아미노산 함량은 TBNS법(Spies, 1957), peptide 함량은 Lowry 법(1951)으로 각각 측정하였으며, 아미노산 함량과 peptide 함량은 L-leucine과 bovine serum albumin으로 각각 작성한 검량곡선에 따라 계산하였다. 산가수분해물은 전기투석 장치로 탈염하여 시료로 사용하였다. 산가수분해물의 산업적 응용을 위해 산업적 규모의 대량 조제를 실시하였다. 즉 산 가수분해 탱크에 냉동 굴 2130 kg, 수도수 1000 L와 35% 염산 2000 L를 투입하여 105 °C에서 6 시간 가수분해하고 31%의 식품급 NaOH 820 kg을 투입하여 pH 5.6으로 조정하였다. 탈색을 위해 신기 활성탄 20 kg을 투입하여 여과한 후 고형분 조정을 위해 농축하였다. 최종제품의 양은 1400 L, 비중 1.196, 고형분 함량 35%였다. 염분 농도계로 측정한 염분의 농도는 11.3%였다.

### 분자량 분포의 측정

가수분해물의 분자량 분포는 HiLoad Superdex 30 prep grade 칼럼(1.6x60 cm)에 시료 0.5 mL를 loading하여 0.1 N NaCl을 포함하는 20 mM Tris-HCl (pH 7.7)용액을 1 mL/min의 속도로 용출하면서 206 nm에서 검출하였다. 분자량은 같은 조건에서 용출한 cytochrome c(MW, 12400), aprotinin (MW,

6500), 비타민 B12(MW, 1355.4) 및 carnosine (MW, 226.2)로 작성한 검량곡선에 따라 측정하였다.

Table 1. Surface response design for preparation of acidic hydrolysis

Row	HCl, N	Time, hr	Temp, C
1	12	24	95
2	7.5	24	110
3	7.5	15	95
4	7.5	24	80
5	3	15	80
6	7.5	6	80
7	7.5	15	95
8	12	15	80
9	7.5	15	95
10	12	6	95
11	3	15	110
12	3	6	95
13	12	15	110
14	3	24	95
15	7.5	6	110

#### 아미노산 조성의 측정

아미노산 분석은 시험관 (13x100 mm) 에 시료 용액 1 mL를 넣고 50 mg의 5'-sulfosalicylic acid를 첨가하여 실온에서 30분 동안 방치하여 단백질을 제거하고 Eppendorf 원심분리기에서 원심분리(10,000 rpm, 10분)하여 얻은 상층액을 탈이온수로 25 mL되게 정용하였다. 아미노산 분석은 아미노산 자동분석기 (Biochrom, England)에 40 uL를 주입하여 분석하였다.

### 세포독성의 측정

간암세포인 HepG2 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되도록 배양하였다. 이때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 배지용 항생제를 사용하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 phosphated-buffered saline-EDTA (PBS-EDTA)로 세척한 후 trypsin 처리하여 계대배양하였으며 배지는 48시간마다 교환하여 세포를 배양하였다.

시료는 DMEM (FBS free) 배지에 0.2% PBS 용액에 시료를 녹여 사용하였다. 시료의 농도는 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL이 되도록 하여 실험하였다. MTT assay를 이용한 세포독성 측정은 HepG2 를 96 well plate에 세포농도  $1 \times 10^5$  cells/mL로 100 uL씩을 분주한 후 세포부착을 위해 24시간 배양하고, 시료를 첨가한 FBS free 배지로 교환한 다음 24시간 동안 배양하였다. PBS 용액으로 2회 세척한 다음 MTT 시약으로 처리하여 490 nm에서 Spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

### DPPH radical 소거 활성

Park 등(2005)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 시험관에 시료용액 2 mL를 넣고 2 mL의 ethanol과 1 mL의 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl /ethanol (DPPH) 용액을 첨가하고 25 °C의 실온에서 30분 동안 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference는 시료 대신 2 mL의 탈이온수를 사용하였다. Radical 소거 활성은 다음의 식에 따라 DPPH탈색의 %로 계산하였다.

$$\text{Radical 소거활성(\%)} = 100 \times (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{reference의 흡광도})$$

### Fe-Chelating 활성

Rajapakse 등(2005)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 즉 시험관에 시료용액 0.5 mL를 넣고, 1.85 mL의 증류수, 50 uL의 1% FeCl<sub>2</sub>, 0.1 mL의 5 mM Ferrozine용액을 가하고 25 °C에서 10분 동안 반응시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference는 시료 대신에 증류수 0.5 mL를 사용하였고 blank는 Ferrozine 대신에 증류수 0.1 mL를 사용하였다. 활성은 다음의 식에 따라 계산하여 %로 표시하였다.

$$\text{Chelating 활성(\%)} = [1 - \text{시료의 흡광도} / \text{reference 흡광도}] \times 100$$

### **Ferricyanide의 환원력의 측정**

산가수분해물의 환원력은 Nam 등(2005)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 0.3 mL의 시료가 들어있는 시험관에 0.7 mL의 50 mM phosphate 완충액(pH 6.6)과 0.5 mL의 1% potassium ferricyanide 용액을 넣은 다음 50 °C에서 20 분 동안 항온하였다. 0.5 mL의 10% TCA 용액을 첨가하고 2500xg에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상층액 0.5 mL에 0.5 mL의 탈이온수와 0.1 mL의 0.1% FeCl<sub>3</sub> 용액을 첨가하여 10분 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 시료 대신 동량의 증류수를 사용하였다.

### **Linoleic acid 항산화 활성의 측정**

Chen 등(1996)의 방법을 다소 변형한 Ferric thiocyanate법을 사용하였다. 즉 산화를 위해 1 mL의 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0)과 0.25 mL의 시료용액, 0.25 mL의 탈이온수, 1.0 mL의 50 mM linoleic acid/ethanol 용액을 유리 시험관에서 혼합하고 뚜껑을 닫아 밀봉한 다음 어두운 60 °C의 항온수조에서 1 주일 동안 산화시켰다. 이때 reference 시료는 시료 대신에 탈이온수를 사용하였다. 산화 후 4시간 간격으로 적당량의 시료를 들어내어 반응 혼합용액 50 uL에 75% ethanol 2.35 mL, 30% ammonium thiocyanate 용액 50 uL, 20 mM ferrous chloride/3.5% HCl 용액 50 uL를 첨가하고 실온에서 3분 동안 방치하고 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 blank는 반응 혼합용액 대신 50 uL의 탈이온수를 사용하였다. 항산화 활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{항산화 활성(\%)} = 100 \times (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{reference 흡광도})$$

그리고 ferric thiocyanate법으로 linoleic acid의 항산화 활성을 측정하기 전에 최적의 지질 산화 시간을 결정하기 위하여 시료 대신에 탈이온수를 사용하여 경시적으로 linoleic acid의 산화를 측정한 결과, 60 °C에서 linoleic acid는 약 72 시간의 유도기를 거쳐 급속히 산화하는 것으로 나타났다. 따라서 산가수분해물의 linoleic acid 항산화 능력의 실험은 170시간까지 측정하였다.

### Aniotensin I coverting enzyme (ACE)의 저해능 측정

ACE 저해활성은 Janitha 등(2002)의 방법에 따라 기질로 hippuryl-His-Leu (HHL)을 사용하여 반응 시킨 후 남아있는 HHL의 양을 고속액체 크로마토그래피(Hitachi, Japan)로 정량하였다. 즉 시험관에 3.0 mM HHL 50 uL, 효소용액 50 uL(1.25 units)와 시료용액 50 uL를 가하여 37 °C의 항온수조에서 30분 동안 흔들지 않고 항온한 후 흔들어 주면서 다시 30분 동안 반응시킨다. 150 uL의 glacial acetic acid를 가하여 ACE 활성을 중지시킨 다음 HPLC로 hippuric acid의 함량을 측정하였다. 이때 시약 조제를 위한 완충액은 50 mM Tris-HCl (pH 8.3)을 사용하였다. Hippuric acid(HA)의 정량을 위해 guard column (Bonclone C18, 10 um, 50x1.0 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)와 C18 역상 칼럼 (Bondclone C18, 5 um, 250x4.6 mm)를 장착한 HPLC에 반응 중지용액 10 uL를 injection하고, 12.5%(v/v) acetonitrile 용액 (pH 3.0)으로 용출하면서 280 nm에서 검출하였다. Reference 용액은 시료 대신 50 uL의 완충액을 사용하였다. 저해%는 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{ACE 저해(\%)} = [(\text{Reference의 HA} - \text{시료의 HA}) / \text{Reference의 HA}] \times 100$$

### 효소 가수분해물의 제조

#### 효소 및 항균성 측정을 위한 균주

글 가수분해물의 제조를 위하여 사용한 상업적 효소들 중에서 Alcalase 2.4 L(2.4 AU/g, 이하 Alcalase로 명명), Flavourzyme 500 MG(500 LAPG/g, 이하 Flavourzyme로 명명), Neutrase 0.8 L(0.8 AU/g, 이하 Neutrase로 명명), Protamex 1.5 MG(1.5 AU/g, 이하 Protamex로 명명)는 Novozyme-Korea(Pusan, Korea)에서 pepsin 570 unit/mg solid(이하 pepsin으로 명명) 및 trypsin 12,800 unit/mg solid(이하 trypsin으로 명명)은 Sigma 사(Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다.

글 효소 가수분해물의 항균성 측정을 위한 균주는 gram positive 3균주 (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*)와 gram negative 3균주(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*)를 2004년 8월에 한국미생물보존센터로부터 분양 받아 사용하였다.

## 2단 굴 효소 가수분해물의 제조

2단 효소 굴 가수분해물의 제조 방법은 다음과 같다. 즉 원료굴을 해동한 다음 굴에 동량의 증류수를 가하고 균질화하였다. 여기에 원료 굴 단백질의 1%에 해당하는 효소를 가하고 제조회사에서 제시한 최적 온도와 pH로 조정 한 다음, 진탕 항온기(Orbital shaker, Forma Scientific, USA)에서 일정시간(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 및 6.0 시간)동안 효소와 반응시켰다. 이어서 효소 가수분해물의 실활을 위하여 열탕에서 10분 동안 처리한 후 방냉, 원심분리(1,000xg, 20분) 및 여과하여 1단 효소 굴 가수분해물을 제조하였다. 이 1단 효소 가수분해물에 Protamex(1단 효소 굴 가수분해물의 제조를 위한 최적 효소)를 제외한 5 종류의 효소(Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, pepsin, trypsin)을 가하고 각 효소별로 제조회사에서 제시한 최적온도와 pH에서 1시간 동안 반응시킨 다음 끓는 물에서 10분 동안 실활시켜 방냉하였다. 이어서 방냉시킨 굴 효소 가수분해물을 원심분리(1,000xg, 20분) 및 여과하여 2단 굴 효소 가수분해물(1단 효소 가수분해)을 제조하였다. 한외여과물은 에탄올로 제단백한 2단 굴 효소 가수분해물을 30, 10, 5, 3 kDa의 막이 장착된 한외여과기(8200, Amicon, USA)로 여과시켜 제조하였다.

## pH 및 휘발성 염기질소

pH는 시료에 10배량의 탈이온수를 가한 다음 pH meter (691, Metrohm, Swiss)로 측정하였고, 휘발성 염기질소 함량은 Conway unit를 사용하는 미량확산법으로 측정하였다.

## 가수분해도의 측정

가수분해도의 측정을 위한 시료는 굴 효소 가수분해물에 같은 양의 20%(w/v) trichloro-acetic acid(TCA)를 넣고 혼합하여 제단백한 다음 원심분리(1,000xg, 20분)하여 제조하였다. 가수분해도는 제조한 시료(원심분리한 상층액)의 일정량을 semi-micro Kjeldahl법으로 질소량을 정량하여 다음 식으로부터 계산하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = 10\% \text{ TCA 가용성 질소량} / \text{총 질소량} \times 100$$

한외 여과막을 사용하여 1000 Da, 5000 Da 및 10,000 Da의 분자량 별 획

분을 실시한다.

### 세포독성의 측정

실험에 사용한 HepG2 세포는 한국 세포주은행에서 구입하였다. HepG2 세포 배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)와 fetal bovine serum(FBS)는 HyClone (Canada) 제품을 사용하였으며, 배지용 항생제 (Penicillin-Streptomycin)와 trypsin은 Gibco BRL (Life Technologies, Gibco BRL., Gaithersburg, MD., USA)에서, 세포생존율을 측정하기 위한 CellTiter 96 Aqueous One solution Reagent는 Promega Corporation (Madison, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulphoxide(DMSO)와 silibinin 등은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약들은 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

### 세포의 배양

본 실험에서는 간암세포인 HepG2 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되도록 배양하였다. 이때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기위해 배지용 항생제를 사용하였다. 세포가 80%정도 dish를 덮으면 phosphated-buffered saline-EDTA (PBS-EDTA)로 세척한 후 trypsin처리하여 계대배양하였으며 배지는 48시간마다 교환하였다.

### 시료의 조제

본 실험에 사용한 시료 중 TGPN5KA, PN, OM1, INF, OYDWPS, 3P, 3PN3KB, TGPN5KA, O1O, AH 시료는 DMEM (FBS free)배지에 0.2% PBS 용액에 시료를 녹여 사용하였다. OYRDW, 30TR은 FBS free DMEM 배지에 0.4% DMSO 용액에 시료를 녹여 사용하였다. 모든 시료는 PBS 혹은 DMSO용액에 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL이 되도록 하여 실험하였다.

### 산과 효소 가수분해물의 정제 및 구조 분석

#### 산과 효소가수분해물의 부분 정제

모든 가수분해물의 정제는 다음과 같은 조건으로 정제를 하였다. 사용 기기중 이온크로마토그래피는 GradFrac system(Pharmacia, Sweden)을 사용하

였고, FPLC는 LCC500 PLUS(Pharmacia, Sweden)를 사용하였다. 첫 번째 단계로 이온교환크로마토그래피는 (SP Sepharose, (2.6×30 cm, Pharmacia, Sweden)을 사용하여 다음의 분리 조건으로 행하였다: A 용매, 50 mM sodium acetate(pH4.5); B 용매, 1 M NaCl - 50 mM sodium acetate(pH 4.5); gradient, 0 → 100 % (10 → 50 min); flow rate, 1 mL/min; fraction volume, 5 mL.; sample injection, 5 mL. DPPH의 활성이 가장 높은 부분을 모아서 다음 정제를 시행하였다. 두 번째 단계로 겔크로마토그래피는 (Superdex peptide HR column, (10×30 cm, Pharmacia, Sweden)을 사용하여 분리하였다: elution buffer, 20% acetonitrile / D.W ; flow rate, 0.5 mL/min; fraction volume, 1mL; sample injection, 0.5 mL 로 하였다.

#### 산가수분해물의 분자량 분포

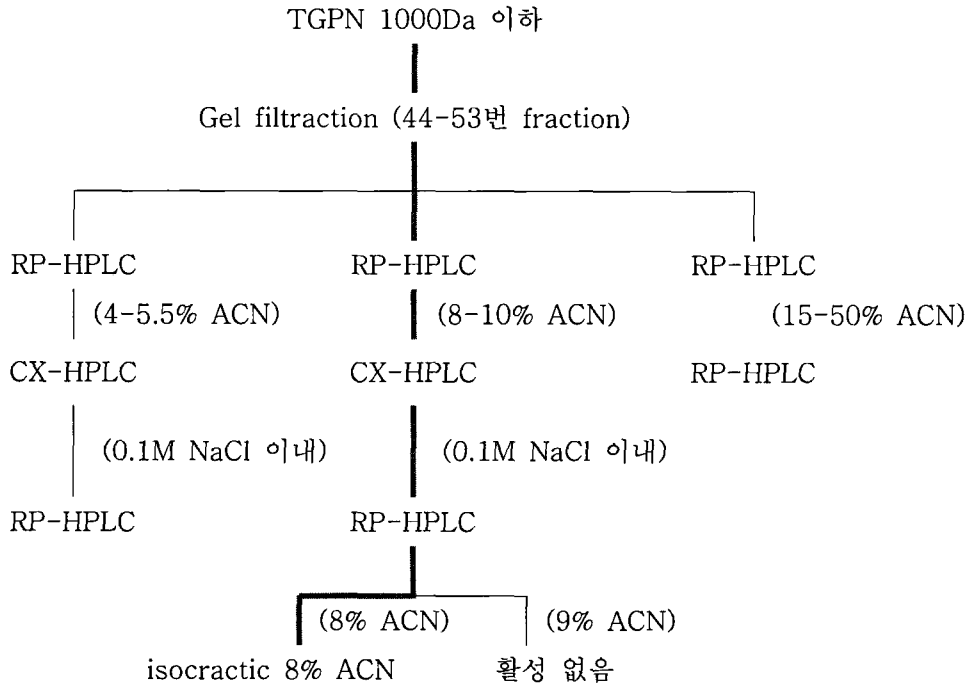
산가수분해한 가수분해물을 0.25 um filter로 여과한 후 분자량 분포를 HiLoad Superdex HR column (1.6×30 cm)에서 gel chromatography 하였다. 이때 용출 용매는 20% CH<sub>3</sub>CN을 isocratic으로 용출 하였으며, 유속은 0.5 mL/min, fraction volume는 1.0 mL로 하면서 흡광도 범위 0 - 1.0 사이에서 280 nm로 검출하였다.

#### 산과 효소가수분해물의 아미노산 조성

아미노산 분석은 시험관(13×100 mm) 에 시료를 넣고 분석 시료 0.5 mL에 대하여 0.1% phenol을 포함하는 0.5 mL의 constant boiling HCl (Sigma H0636)을 가하여 질소를 flushing 한 후 화염으로 봉하고 110 °C의 heating block에서 24시간 가수분해하였다. 가수분해한 시료는 60 °C의 Micro-cenVac(N-Biotek, Inc, Korea)에서 염산을 완전히 휘발 시킨 후, 시료에 0.01 N HCl로 1 mL되게 정용하였다. 아미노산 분석은 아미노산 자동분석기 (Biochrom, England)에 40 µL를 주입하여 분석하였다.



## 비극성 펩티드의 정제



※CX-HPLC, cation-exchange HPLC  
 RP-HPLC, C<sub>18</sub> reverse-phase HPLC  
 ACN, Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN)

실험방법 :

1. TGNP 1000Da 이하 제조  
 3.0154 g/20% ACN(40 mL)  
 TGNP 5000Da 이하의 sample을 한회여과(1000 Da의 membrane 막 사용)  
 DPPH 측정 : EC<sub>50</sub> - 3.988 mg/mL
2. Gel filtration  
 Sample : TGNP 1000 Da 이하

Column : Hiload 16/60 superdex 30pg (16 X 60 cm)

Eluent : 20% CH<sub>3</sub>CN

UV : 226 nm

AU : 2

Flow rate : 1 mL/min

Fraction : 2 mL/bot

Chart speed : 0.5 mm /min

### 3. RP-HPLC (1RP)

Sample : TGNP 1000 Da 이하 gel 이후 (44-53 fraction-분자량 500 이하)

Column : Vydac 218TP510 (1.0X250 mm)

Gradient : 0-100% ACN in 0.1% TFA /100 min

UV : 254 nm

Flow rate : 3 mL/min

### 4. CX-HPLC (2SP)

Sample : TGNP 1000 Da 이하 gel 이후 (44-53 fraction-분자량 500 이하)

RP-HPLC

Column : TSKgel SP-5PW (7.5X75 mm)

Eluent : A - 10 mM PBS(Phosphate buffer, pH 6.5)

B - 1.0 M NaCl in 10 mM PBS

Gradient : 0-1.0 M NaCl / 100 min

UV : 254 nm

Flow rate : 1 mL/min

Temp. : 40 °C

### 5. RP-HPLC (3RP)

Sample : TGNP 1000 Da 이하 gel 이후 (44-53 fraction-분자량 500 Da 이하)

RP-HPLC, CX-HPLC

Column : Watchers 120 ODS-AP (4.6X250 mm)

Gradient : 0-20% ACN in 0.1% TFA / 60min

UV : 220, 254, 280 nm

Flow rate : 1 mL/min

## 6. isocratic

Sample : TGPN 1000 Da 이하 gel 이후 (44-53 fraction-분자량 500Da 이하)

RP-HPLC, CX-HPLC, RP-HPLC

Column : Watchers 120 ODS-AP (4.6X250 mm)

Gradient : 8% ACN in 0.1% TFA

UV : 220, 254, 280 nm

Flow rate : 1 mL/min

## LC-ESI/MS

LC-MS는 Doucet 등의 방법에 따라 guard 칼럼(0.21 id. x 5 cm)을 장착한 Vydac C<sub>18</sub> 칼럼(0.21x15 cm)을 사용하여 RhermoFinnigan Surveyor LC system과 LCQDuo MS system에서 실시하였다. 분석은 0.2 mL/min의 유속에서 용매 A(0.1% TFA in water)와 용매 B(0.09% TFA/90% aqueous acetonitrile)에서 수행하였다. 질량 분석기는 positive ion mode와 m/z 범위 50-2000에 걸쳐 scan하였으며 각 peptide의 아미노산 서열은 MS/MS를 사용하여 결정하였다.

## SD-rat 혈청과 간 균질액에 미치는 항산화 효과

### 실험 동물과 사료의 조제

체중 160± 10 g의 수컷 Sprague Dawley계 랫트를 한국 바이오제노믹스에서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 실험 동물은 실험에 들어가기 전, 항온항습(22 ± 2 °C, 65±2% RH)하에서 12시간 싸이클(06:00~18:00)로 명암이 자동 조절되는 동물사육실에서 2주간 사육하였다.

실험에 사용한 사료의 조제는 사료 100g 당 탄수화물 58.0 g(corn starch 45.0% + sucrose 13.0%), 단백질(sodium-free casein) 18.0g, 지질(lard + corn oil) 15g, 셀룰로오스 3.0g, vitamin mixture, mineral mixture, dL-methionine, choline chloride cholesterol, sodium cholate를 각각 1.0g, 3.5g, 0.3g, 0.2g, 0.5g, 0.2g씩을 잘 혼합하여 사용하였다(Table 2). 대조군은 기본 사료 조성으로, 실험군은 기본 사료 조성에 각 시료별로 100 mg/kg BW/day 및 200 mg/kg BW/day가 섭취될 수 있도록 기본사료에 시료를 첨가하여 조제하였다. 기본 사료 조성으로 섭취한 군은 대조군(control)으로 하였고, 실험군의

로 TGPN 굴 가수분해물 100 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군 (TGPN-100), TGPN 200 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군 (TGPN-200), PN으로 가수분해 물 시료 100 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(PN-100), 200 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군 (PN-200)으로 나누어 실험하였다. 또한 TGPN 굴 가수분해 물과 허브의 혼합 물을 시료로 한 식이 섭취군으로 TGPN: I 추출물 : O 추출물 = 20: 25 : 55 의 비율로 섞어서 만든 시료를 조제하여, 기본 식이에 100 mg/kg BW/day 식이를 급이한 실험군 (HepaCare-100)과, 200 mg/kg BW/day 식이를 급이한 실험군 (HepaCare-200)으로 모두 7그룹으로 나누어 실험을 행하였다. 실험군의 사료는 기본사료조성에 시료 첨가량만큼 탄수화물에서 제하였다.

이렇게 조제한 사료는 SD계 랫트에 6주간 식이로 제공하여 동물실험을 실시하였다. 동물사료는 매일 오후 6시에 정한 사료량을 측정 후 사료를 제공하였다.

Table 2. Experimental diets for oral feeding (%)

Composition	Control	100 FG <sup>*</sup>	200 FG <sup>**</sup>
Oyster hydrolysate (mg/kg BW/day) or hydrolysate+Herb extract	-	0.010	0.020
Carbohydrate (starch+sugar)	58.3 (45.0+13.3)	58.3 (45.0+13.3)	58.3 (45.0+13.3)
Protein(casein)	18.0	18.0	18.0
Lipids (lard:corn oil=2:1)	15.0	15.0	15.0
Cellulose	3.0	3.0	3.0
Vitamin mix <sup>***</sup>	1.0	1.0	1.0
Mineral mix <sup>***</sup>	3.5	3.5	3.5
<i>D,L</i> -Methionine	0.3	0.3	0.3
Choline chloride	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5
Sodium cholate	0.2	0.2	0.2

\* 100 mg/kg BW/day feeding group, \*\* 200 mg/kg BW/day feeding group ,  
\*\*\* AIN-76 mixture

#### 혈액 채취 및 분리

실험 동물의 처리는 실험사육 최종일 12시간 동안 절식시킨 후 단두하여 채혈하였고, 채취한 각 혈액은 실온에 30분간 방치한 후 700 x g에서 10분간 저온 원심분리하여 얻은 상층액의 혈청을 저온(-70 °C)에 동결 보존하면서 분석하였다.

#### 간조직 균질액의 조제

간조직은 4 °C의 완충용액 (10 mM phosphate buffer + 1.15% KCl + 5

mM EDTA, pH 7.4)을 사용하여 간조직의 무게당 10배 (w/v)의 완충용액으로 조직 균질기를 이용하여 균질화한 다음 700 x g에서 원심분리한 후 그 상등액을 취해 간조직 균질액으로 하였다.

#### 단백질 함량의 측정

혈청 및 간조직 균질액의 총단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였다. 혈청 및 간조직 균질액 20 uL 각각 취하여, 1.0% SDS 용액 12 uL를 혼합하고, 증류수로 120 uL가 되도록 6배 희석하였다. 희석된 용액 15, 20 uL를 취해 증류수를 각각 80 uL, 85 uL의 증류수를 넣고 희석하였다. 여기에 반응시약 (0.5% copper sulfate solution : 1.0% sodium tartarate solution : 2.0% sodium carbonate solution = 0.5 : 0.5 : 49.0, v/v)을 1.0 mL씩 첨가하여 약 10초간 혼합하였다. 20분간 실온에서 방치한 후 발색시약으로 1.0 N Folin 시약을 0.1 mL씩 첨가하여 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 다음, 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 의하여 단백질의 함량 (mg protein/mL fraction)을 정량하였다.

#### 총콜레스테롤 함량의 측정

혈청과 간조직 균질액 (mitochondria, microsome)중의 총콜레스테롤 함량은 Rudel 등(1973)의 방법에 따라 o-phthaldehyde법으로 측정하였다. 먼저 시료를 0.1 mL씩 취한 후 33% KOH용액 0.3 mL와 95% 에탄올 3.0 mL를 가하고 잘 혼합한 다음, 혈청은 15 분간, 간조직 균질액은 60 분간 60 °C 수조에서 가열시킨 후 냉각하였다. 여기에 hexan 5.0 mL를 가하여 혼합하고 다시 증류수 3.0 mL를 가한 다음 1분간 잘 혼합한 후 층을 분리하여 1.0 mL의 hexan층을 취하였다. 이 hexan층을 질소로 농축·건조시키고, o-phthaldehyde시약 2.0 mL를 가하여 잘 혼합하고 10 분 후 발색시약으로서 진한 황산 1.0 mL를 가하여 혼합하였다. 황산첨가 후 10 분에서 90 분 이내에 분광광도계를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량선에 의하여 총콜레스테롤의 함량 (mg/dL serum)을 정량하였다.

#### HDL- 콜레스테롤 함량의 측정

혈청 중의 HDL-콜레스테롤 함량의 측정은 HDL-콜레스테롤 (HDL-C 555, 신양화학약품주식회사)의 키트 시약을 사용하였다. 혈청 HDL-콜레스테롤의 함량 측정은 0.2 mL를 시험관에 넣고 여기서 침전 시약 0.2 mL를 넣어 잘 혼합한 다음 실온에서 10

분간 방치후 300 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 50 uL, 표준용액 (100 mg/dL) 50 uL, blank로 증류수 50 uL에 각각 HDL 발색시약 3.0 mL씩을 첨가하고 잘 섞은 후 37 °C 수조상에서 5 분간 가온시킨다. blank를 대조로 하여 555 nm에서 흡광도를 측정하여 HDL-콜레스테롤의 함량 (mg/dL serum)을 정량하였다.

#### LDL-콜레스테롤 함량의 측정

LDL-콜레스테롤의 함량은 Friedewald 외 (1972)의 방법에 따라 총콜레스테롤 함량에 HDL-콜레스테롤과 중성지질/5 를 뺀 값으로 하였다.

#### 중성지질 함량의 측정

혈청과 간조직 균질액 중의 중성지질로서 트리글리세리드 (Triglyceride : TG)의 함량은 GPO 효소법으로 TG 키트시약 (신양화학약품주식회사)을 사용하였다. 먼저 혈청 및 간조직 균질액 10 uL, 표준용액 (300 mg/dL) 10 uL와 blank로 탈 이온수 10 uL에 TG 키트 시약 1.5 mL씩을 첨가하고 잘 섞은 후 37 °C 수조상에서 5분간 반응시킨다. blank를 대조로 하여 505 nm에서 흡광도를 측정하여 TG의 함량 (mg/dL serum)을 정량하였다.

#### 동맥경화 지표의 계산

동맥경화지표(Atherogenic index : AI)는 Haglund 등(1991)의 방법에 따라 총콜레스테롤에 HDL-콜레스테롤의 함량을 뺀 다음, 이것을 다시 HDL-콜레스테롤로 나누어 계산하였다.

$$\text{Atherogenic index(AI)} = \frac{\text{Total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}}{\text{HDL- cholesterol}}$$

#### 수퍼옥시드 라디칼 생성량 측정

수퍼옥시드 라디칼 (superoxide radical: O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 생성량은 McCord et al. (1969)과 Chan et al. (1974)의 방법에 따라 수퍼옥시드 디스무타아제를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원속도를 측정하였다. 0.1 mM EDTA를 함유한 인산완충용액 (pH 7.8) 420 uL에 cyanide의 농도가 50 uM이 되도록 20 mM cyanide 용액을 가한 후 혈청과 간조직 균질액 300 uL와 여기에 0.1

mM cytochrome C 50 uL를 넣어 분광광도계를 사용 550 nm에서 2 분간 흡광도의 차이를 측정하였다. 이때 cytochrome C의 양은 분자흡광계수 19,500  $M^{-1}cm^{-1}$ 로 계산하였다.

#### 히드록실 라디칼 생성량 측정

히드록실 라디칼 (hydroxyl radical) 함량의 측정은 Halliwell et al. (1981)의 방법을 변형하여 측정하였다. 먼저 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.4), 10 mM  $NaN_3$ , 7 mM deoxyribose, 5 mM ferrous ammonium sulfate, 0.54 M NaCl 시약을 각각 60 uL씩 첨가하고 증류수 430 uL와 혈청과 간조직 균질액 200 uL를 첨가한 후 혼합된 용액을 37 °C 항온수조에서 15분간 가온하였다. 이 반응액에 8.1% SDS용액 75 uL, 20%의 acetic acid 500 uL 및 증류수 25 uL를 추가하여 넣고, 1.2% thiobarbituric acid (TBA)용액 400 uL를 넣어 잘 혼합하였다. 30 분간 가열한 후 실온에서 식히고, 800×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 분광광도계로 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량곡선에 따라 검체군과 대조군의 흡광도 차이를 이용하여 히드록실 라디칼 (nmole/mg protein /min)의 생성량을 계산하였다.

#### 산화 단백질 생성량 측정

혈청 및 간조직 균질액 중의 산화단백질 (oxidized protein: OP)의 함량은 Levine et al. (1990)의 방법에 따라 carbonyl group의 생성량을 측정하였다. 0.1 mL의 시료에 30% trichloroacetic acid (TCA)를 0.5 mL를 넣고 잘 혼합한 다음, 800×g에서 10분간 저온 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 남은 잔사에 10 mM dinitrophenyl hydrazine (DNPH) 0.5 mL 첨가하고 15 분마다 혼합하여, 1시간 동안 실온에 방치 후 800×g에서 10분 동안 저온 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 잔사에 ethanol/ethyl acetate (v/v, 1:1) 3.0 mL를 첨가하여 잘 혼합한 다음, 실온에서 10분 방치하였다. 다시 800×g에서 10분 동안 저온 원심분리 후 잔사를 얻은 뒤, 6 M guanidine (20 mM potassium phosphate buffer) 1.0 mL 첨가하고 잘 혼합하였다. 37 °C의 항온수조에서 30 분간 배양한 후, 800×g에서 10 분 동안 저온 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이때 carbonyl group의 생성량은 360 nm와 370 nm사이의 파장에서 분자흡광계수 ( $E=22,000$ )를 이용하여 계산하였다.



### 과산화지질 생성량의 측정

혈청 및 간조직 균질액에 있는 중의 과산화지질의 함량은 Choi and Yu (1990)가 사용한 방법에 따라 TBA법으로 malondialdehyde (MDA) 함량을 측정하였다. 혈청과 간조직 균질액 20 uL에 증류수 180 uL를 혼합한 것을 각 시험관에 취했다. 8.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액 200 uL를 가하여 약 5초간 혼합한 후, 20% 초산 1.5 mL를 넣어 다시 5초간 혼합하였다. 여기에 1.2% TBA 시약 1.0 mL 첨가하여 깨끗한 구슬로 마개한 뒤 30 분간 수조에서 가열하였다. 이 반응액을 800×g에서 10분간 원심 분리하고 상층액을 분광광도계로 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준검량 곡선에 따라 MDA의 함량 (nmol/mg protein)을 정량하였다.

### 수퍼옥시드 디스무타아제 (SOD) 활성 측정

Oyanagui et al.의 방법 (1984)에 따라 혈청과 간조직 균질액을 20.8 mM phosphate buffer (pH 8.2)로 30배 희석하고 희석된 균질액 100 uL에 증류수 0.5 mL, A시약 (52.125 mg hydroxylamine + 102.1 mg hypoxanthine /250 mL D.W) 0.2 mL, B시약 (20 uL xanthine oxidase + 0.9939 mg EDTA/26.7 mL 20.8 mM phosphate buffer, pH 8.2) 0.2 mL를 첨가하여 혼합하였다. 37 °C 항온수조에서 40 분간 가온한 후 C시약 (300 mg sulfanilic acid + N-1-naphthyl- ethylene diamine acid/500 mL 16.7% acetic acid) 2.0 mL를 첨가하였고, 실온에서 20 분간 방치한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량곡선에 따라 SOD 활성 (unit/mg protein)을 측정하였다.

### 카탈라아제 (CAT) 활성 측정

Rigo et al. (1977)의 방법에 따라 혈청과 간조직 균질액 20 uL에 인산완충 용액(130 mM, pH 7.0) 250 uL, 증류수 330 uL를 취했다. 여기에 15 mM의 과산화수소 용액 900 uL를 첨가하고 5초간 잘 혼합한 다음, 즉시 분광광도계로 240 nm에서 경과시간에 대한 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다. 1분 동안 과산화수소가 제거되는 속도를 계산하여 효소의 활성을 측정하였다.

### 최적화 설계

음료의 제조를 위해 첨가물로 구연산 (Daejung, Korea) 0.06%, 고과당

(Daesang, Korea) 5.3%, 배 농축액(MSC, Korea) 2%를 가하였다. 굴 효소 가수 분해물, I 추출물, O 추출물의 혼합 design, data 분석 및 혼합 최적화는 Design Expert 7 (Stat-Easy Co., Minneapolis, USA)을 이용하였고, constraint 값으로는 색도, free radical 소거능, 점도, 관능으로 정하였다. 굴 효소 가수 분해물, I 추출물, O 추출물의 총 함량 15% 내에서 굴 효소 가수 분해물, I 추출물, O 추출물의 최소 및 최대 비율은 0.5~3%, 3~6%, 6~10%로 정하였고, 각 조성에 따른 성분들의 반응을 보기 위하여 trace plot을 이용하였다. 최적화는 canonical 모형의 수치 최적화 (numerical optimization)를 통하여 성분비를 선정하고, 그때의 점을 예측하였다. 수치최적화는 canonical 모형을 근간으로 하는 모델의 수에 각 반응에 대한 목표범위 (goal area)를 설정하고 다음 식에 의하여 구하였다.

$$D=(d \times d \times \dots \times d_n)^{1/n} = \{\prod_{di}\}^{1/n}$$

여기서 D는 overall desirability, d는 각각의 desirability, n은 response의 수이다

수산폐자원을 이용한 미생물배지로의 응용방안 및 유용균주의 탐색

수산물 중 굴의 폐자원의 응용방안으로서 유용물질 생산균주 생육배지의 N-source로서 활용가능성을 검토하고 적합한 균주를 선별해냄과 동시에 그 생산능 및 활성을 검증하였다.

생리활성물질의 최적생산조건 검토

생리활성물질의 대량생산을 위한 수행연구로서 균주로부터의 생리활성물질 생산에 영향을 주는 요소, 즉 탄소원, 질소원, 무기염류, 인, 황, 금속이온 등을 그리고 mineral성분 등을 이용하여 최적배양조건을 검토 후, 생산된 생리활성 물질의 활성 및 생산량을 확인하였다. 생리활성물질 최적생산을 위한 탄소원으로서 탄수화물류는 glucose, fructose, galactose, lactose, sucrose, levulose등과 같은 단당류 및 이당류와 glycerol과 같은 sugar alcohol류 starch, corn flour, molasses등을 사용하여 최적 탄소원을 선정하였다. 질소원 (N-sources)은 수산폐자원인 굴 가수분해물을 생산배지에 농도별로 첨가하고 무기질소원 (ammonium nitrate, ammonium sulfate, ammonium ammonia

등)를 사용하여 균주생육에 필요한 최적 질소원을 선정하였다. 금속이온의 첨가효과를 확인하기 위해  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Pb^{2+}$ , 2-mercaptoethanol 등을 이용하였다. 인의 자원은; ammonium phosphate monobasic 과 dibasic, sodium phosphate monobasic 과 dibasic, photassium phosphate monobasic, 그리고 52 %, 70 % phosphoric acid등을 사용하였다.

#### 플라스크를 이용한 최적배양 확립

발효조 대량생산을 위한 기초연구로서 물리·화학 및 생물학적 인자를 통하여 최적배양 조건을 확립하였다. 생리활성물질의 최적생산을 위한 물리적 인자 즉, 배양온도, 압력, agitation speed, broth viscosity, 가스 유입속도, 탁도, 발효액의 부피, 거품발생변화, baffle 등의 영향을 검토하였다. 최적생산을 위한 화학적 인자 즉, pH, 용존산소 농도의 변화, 각종 영양물질의 농도변화, 배지 중의 기질농도 등을 검토하였다. 생물학적인자, 즉 배양조건중 생체량(dry cell weight, 흡광도에 의한 값), inoculum size, contamination조사, 생산균주의 형태변화, 균주의 물질대사 속도 등에 대한 parameter등을 고려한 최적값을 선정하였다.

#### 생리활성물질 대량생산의 최적 발효조건 검토

생산공정의 개발을 위한 연구로서 소규모 발효조를 대상으로 생산 조건을 검토한 후 그 결과를 생산실용화를 위한 기초자료로 활용하였으며, 생리활성물질의 발효생산시 공정 최적화 조건을 도출, 유도하기 위하여 specific growth rate, production yield를 최적화하여 발효공정의 최적화 범위를 설정하였다.

#### 유용물질 대량분리공정개발

발효배양에서 얻어진 생리활성물질은 원심분리과정 및 용매추출법으로 회수하여 동결건조를 거쳐 분말상태로 얻었다. 이를 HPLC, TLC, GPC 및 FPLC등을 통해 정제, 성분 분석 및 순도를 검증하였다.

## 2. 연구수행 결과

### TGase의 정제와 분리 특성

개조개, 굴, 꼬막, 바지락, 백합, 비단가리비, 소라, 홍합과 들담치 수용성 추출물의 transglutaminase 비활성을 측정하여 비교하고, 굴의 transglutaminase를 20-80% 포화 ammonium sulfate, 2회의 DEAE-Sepharose 이온교환 크로마토그래피와 Superdex 200 prep grade 젤 크로마토그래피로 정제하였다. 정제한 효소의 수율은 1.9%였고, 정제도는 1895배였다. N,N'-dimethylated 카제인에 대한 monodansyl cadaverine 병합의 최적 pH와 온도는 각각 9.0과 45 °C였다. Transglutaminase는 55 °C에서 30분 동안 가열했을 때 활성의 약 50%를 소실하였다. 부분 정제한 transglutaminase는 10 mM의 CaCl<sub>2</sub>에서 가장 높은 활성을 보였고, 그 이상의 농도에서는 감소하였다. NaCl 농도는 10 mM까지 효소 활성이 감소하였으나, 50 mM-200 mM 농도에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

### 굴 패각 단백질의 단백질분해효소 저해효과

굴 패각 분말의 조단백질 함량은 0.8%였으며, 굴패각에서 얻은 calcium acetate는 CaO가 전체의 97.15%를 차지하였다. 5% acetic acid 가용성 획분 중 분자량 10 kDa 이하의 획분이 10 kDa 이상의 획분에 비하여 높은 단백질 분해효소 저해효과를 보였으며, 특히 bromelain의 저해에 효과적이었다. 단백질 분해효소 저해제와 calcium acetate에서 세균에 대한 항균 활성과 간세포 독성은 관측되지 않았다. 굴 패각에서 부분 정제한 5% acetic acid 추출물은 단백질분해효소 저해제로서의 잠재적인 가능성을 가지는 것으로 보인다.

### 산가수분해물의 제조와 기능성

최대 수율의 산가수분해물을 제조하기 위한 최적 조건은 10 N HCl, 96, 가수분해 22 시간이었다. 가수분해에 가장 큰 영향을 미치는 인자는 가수분해 시간, 염산의 농도, 가수분해 온도의 순이었다. 산 가수분해물과 탈염한 산가수분해물의 단백질 함량은 6.5%와 14.0%였고, 염의 함량은 각각 16.2%와 0%였다. 산 가수분해물에 분포하는 peptide의 분자량 400-2500 dalton 사이였다. 산 가수분해물의 아미노산 함량은 Lys>Leu>Tyr>His>Gly>Val의 순으로 높았고, Thr, Ser 및 Pro는 검출되지 않았다. 산 가수분해물의 세포 독성은 200

mg/mL까지 유의적인 독성은 보이지 않았다. 산가수분해물은 0.5 mM ascorbic acid와 비슷한 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으며, 탈염한 산가수분해물의 DPPH EC<sub>50</sub>은 0.28 mg/mL였다. Linoleic acid에 대한 peptide 획분의 농도별 항산화 효과는 0.1-0.01 mg/mL의 농도 구간에서 농도에 따른 유의차는 보이지 않았으나, 분자량이 작을수록 강한 항산화 효과를 가지는 것으로 나타났다. ACE 저해능은 탈염 산가수분해물 분자량 500-1000 dalton 획분이 가장 높았다. 산 가수분해물은 기능성 ingredient로서 잠재성인 사용 가능성은 있으나, 안전성에 관한 면밀한 검토가 아울러 이루어져야 할 것이다.

#### 일단 효소가수분해물의 특성

양식 굴을 효율적으로 이용할 목적으로 4가지의 상업 효소(Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex)와 2종의 시약급 효소(pepsin, trypsin)를 이용하여 굴 효소 가수분해물을 제조하고 그 특성에 대하여 살펴보았다. 상업 효소 굴 가수분해물의 항산화능 및 ACE 저해능은 모두 Protamex로 1 시간 동안 가수분해시킨 것이 가장 우수하였고, 이때 이들의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 1.16 mg/mL 및 1.49 mg/mL였다. 하지만 항균성은 모든 효소 가수분해물에서 확인되지 않았다. 그리고 ACE 저해능 및 항산화능은 가수분해 시간에 따른 의존성이 확인되지 않았다. Protamex로 1시간 동안 처리한 굴 가수분해물의 경우 가수분해 처리하지 않은 대조구에 비하여 29-66 kDa 획분과 6.5 kDa 부근의 획분이 모두 감소하여 저분자화 하는 경향을 나타내었다.

#### 이단 효소가수분해물의 제조와 특성

일단 가수분해물과 이단 가수분해물들의 부패취에 대한 관능검사를 실시한 결과 일단 및 이단 가수분해물과 같이 가수분해물의 종류에 관계없이 모든 시료구에서 전 관능요인들이 부패취를 감지못하였다. Alcalase, Neutrase, pepsin 및 trypsin 등과 같은 4종의 효소 이단 가수분해물 간의 가수분해율은 유의적인 차이가 확인되지 않았다. Protamex 가수분해물을 Alcalase, Neutrase, pepsin 및 trypsin 등과 같은 4종의 효소로 이단 가수분해한 가수분해물의 경우 모두 ACE 저해의 개선 효과 (Alcalase 가수분해물: 0.86 mg/mL, pepsin 가수분해물: 1.30 mg/mL 및 trypsin 가수분해물: 1.20 mg/mL)가 있었고, 그 중에서도 특히 Neutrase 가수분해물의 IC<sub>50</sub>이 0.40 mg/mL로 가장 개선 효과가 컸다. 2단 가수분해물의 항균성은 관측되지 않았다. 항산화능은 일단 가수분해물의 IC<sub>50</sub>(1.16 mg/mL)에 비하여 Alcalase, pepsin, trypsin 및 Flavourzyme으로 재가수분해한 이

단 가수분해물의 IC<sub>50</sub>(Alcalase 가수분해물:1.19 mg/mL, pepsin 가수분해물: 1.21 mg/mL, trypsin 가수분해물: 1.19 mg/mL 및 flavourzyme 가수분해물: 1.20 mg/mL)가 낮았고, Neutrase로 재가수분해한 이단 가수분해물의 IC<sub>50</sub>(0.94 mg/mL)은 높았다. 2단 분해시 fraction 22-38번 사이의 고분자 획분(29-150 kDa)은 거의 분해되어 저분자 획분 (6.5 kDa 이하)으로 이행되었으며, 저분자 획분에서도 분해가 더욱 진행되어 획분의 감소가 두드러지게 나타났다. 가수분해물의 유리아미노산 함량은 2단 가수분해에 의해 증가하였다.

### TGase에 의한 부분 가수분해물의 재조합과 새로운 펩티드의 창출 극성 효소 가수분해물의 극성 기능성 물질의 정제와 구조

TGase를 처리하여 효소가수분해물과 일반 효소가수분해물 그리고 산가수분해물을 5 kDa 이상과 이하로 분획한 후 DPPH radical scavenging activity의 EC<sub>50</sub>를 측정하였다. 5 kDa 이하의 획분의 DPPH 활성이 높았으며, 산가수분해물의 EC<sub>50</sub>이 낮은 것으로 나타났다. 산 가수분해물의 Fe<sup>2+</sup> 킬레이트 효과는 EDTA에 비하여 떨어지는 것으로 나타났다. 지질 산화를 위한 산화 시간을 결정하기 위하여 시료 대신에 탈이온수를 사용하여 측정한 결과 60 °C에서 linoleic acid는 약 72 시간의 유도기를 거쳐 급속히 산화하는 것으로 나타났다. 그러나 1000 Da 이하의 peptide는 168시간까지 85% 이상의 항산화 효과를 보이는 것으로 나타나 대체로 저분자의 peptide가 강력한 항산화 효과를 유지하는 것으로 나타났다. ACE 저해능은 TGase를 처리한 효소가수분해물이 80 %의 저해율로 다른 가수분해물에 비해 높은 것으로 나타났다. 가수분해물의 환원작용은 보이지 않았다. 항산능과 ACE 저해능을 보이는 극성 물질의 구조를 확인하기 위하여 NMR, MS 질량분석을 수행한 결과, 이들 화합물은 다수의 화합물이 혼합된 상태로 구조 결정이 곤란하였으며, 알콜올과 황을 가진 화합물로 확인되었다.

### 효소 가수분해물의 비극성 기능성 물질의 정제와 구조

TGase 반응 후 2단 효소 가수분해로 조제한 가수분해물의 비극성 펩티드 화합물의 정제와 구조 결정을 시도하였다. 다소 비극성인 획분에서 ACE 활성을 가진 화합물을 발견하였으며, 이들을 역상 HPLC로 정제하고 이온크로마토그래피로 정제하여, 펩티드 서열을 측정한 결과, A-X-Z-A, V-X-Z-A (결합서열을 밝힐 수 없음)의 3 가지 펩티드로 구성되어 있었으며, 합성 펩티드

에서도 동일한 ACE 저해능이 확인되었다.

굴 가수분해물 함유 식이가 SD-랫트 혈청과 간 균질액에 미치는 항산화 효과  
기본 식이를 제공한 대조군의 단백질 함량은  $45.16 \pm 2.25$  mg/mL serum이  
있으며, TGPN 굴 가수분해물과 굴 가수분해물에 허브를 첨가한 혼합시료인  
HepaCare- 100 식이 섭취군은  $48.34 \pm 3.24$  mg/mL serum으로 7% 증가하였  
고, HepaCare- 200 식이 섭취군의 단백질 함량은  $49.24 \pm 2.55$  mg/mL serum  
으로 대조군에 대비하여 9.0%의 유의적인 증가를 보여주었다. 그렇지만  
TGPN-200 식이 섭취군과 PN-NaCl 가수분해물 식이 섭취군의 경우는 단백  
질 함량이 오히려 저하되었다. 총 콜레스테롤의 함량은 모든 굴 가수분해 식  
이군에서 감소하는 경향을 보여 주었다. 특히 TGPN-200과 HepaCare-200 식  
이군에서  $79.04 \pm 12.50$  mg/dL와  $84.38 \pm 16.20$  mg/dL로 각각 29.9%와 24.1%의  
유의적인 감소 효과가 있었다. 대부분의 굴 가수분해 식이 섭취 그룹에서  
HDL- 콜레스테롤의 함량이 저하하는 경향을 보여주었다. TGPN 가수분해물  
식이군과 TGPN 가수분해 식이군에 허브를 첨가한 허브 혼합 식이군에서  
LDL- 콜레스테롤의 혈중 농도가 감소하였다. 중성지방의 혈중 함량은 모든  
굴 가수분해 식이군에서 감소하는 경향을 보여 주었다. 대조군의 경우 수퍼  
옥시드 라디칼의 함량은  $266.23 \pm 60.96$  nmol/g protein이었으며, TGPN-100,  
TGPN-200의 경우  $246.49 \pm 125.20$  nmol/g protein 와  $173.82 \pm 75.05$  nmol/g  
protein으로 대조군에 비해 7.4%와 34.7%의 감소 효과가 있었다. 히드록실  
라디칼 (hydroxyl radical)의 함량 변화는 대조군의 경우  $2.34 \pm 0.20$   
nmol/mg protein (100%)으로 TGPN 굴가수분해 식이군과 Herb M-200 그룹  
에서는 감소하였으나, PN 굴 가수분해물 식이군은 약간 증가하였다. 그러나  
모든 굴 가수분해물 식이군에서 대조군과 비교시 어떤 유의적인 증가 및 감  
소 효과는 없었다. 대조군의 카르보닐기 함량은  $13.47 \pm 1.19$  nmol/mg protein  
(100%)이었고, TGPN-200( $11.98 \pm 2.34$  nmol/mg protein, 88.9%)과  
HepaCare-200( $12.53 \pm 3.10$  nmol/mg protein, 93.0%) 에서 가장 큰 폭의 카  
르보닐기 생성 저해 효과를 볼 수 있었다. 혈청의 과산화 지질 함량은  
TGPN 굴 가수분해물 식이군과 Herb 혼합식을 섭취한 그룹에서 감소하는 경  
향을 보였다. 대조군 간균질액중의 SOD 활성은  $3.44 \pm 0.43$  unit/mg protein이  
었으며 PN-100과 PN-200 그룹에서는 활성이 농도가 2배로 증가하였을 때 그  
활성도 증가하였고, 특히 PN-200은 19.0%의 통계적인 유의성도 나타났다.

카탈라제 활성은 대조군  $10.26 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min (100%)에 비해, TGPN-100과 TGPN-200에서 각각  $0.30 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min와  $0.31 \pm 0.11$  nmol/mg protein/min으로 14.5%와 20.0%의 활성증가가 있었다. HepaCare-100과 200에서도 20%가 넘게 활성이 증가하였으나 유의성은 없었다. 그리고 PN 굴 가수분해물은 가장 높은 카탈라아제의 활성증가를 보였다.

#### 기능성 펩티드의 안정성과 간 기능 보호효과

산가수분해물을 비롯한 모든 가수분해물에서 세포독성은 관측되지 않았다. 급만성 및 알콜성 간염 환자를 대상으로 한방제 O, I 및 가수분해물을 액상으로 formulation하여 1일 100 mL 씩 3회 투여하고 기간에 따라 GOT, GPT, GGT 및 LDH를 측정된 결과, 복용 7-10 만에 GOT는 100 Iu/L 미만으로 감소하였으며, 17-20 일에 정상적인 값을 나타내고 있었다. 이 같은 결과는 GTP와 GGT 함량에서도 같은 결과를 보여주고 있었다. 그러나 LDH는 복용 17-20일 후에도 약 80 Iu/L 밖에 감소하지 않은 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 LDH의 경우 초기 값이 간 손상의 지표로 사용될 뿐이며, 초기 이후에는 간 손상의 marker로 사용하지 않는 것에 비추어 문제가 없는 것으로 판단하였다. O와 I 수용성 추출물을 첨가한 혼합물은 알코올성 급만성 간세포의 기능 회복에 뚜렷한 개선 효과를 보이고 있었다.

#### 생산 실용화 기술의 개발

굴 가수분해물을 함유한 기능성 고형 환의 제조를 위해 각 성분의 특성을 측정하였다. Radical 소거능은 I 수용성 추출물이 가장 높은 활성을 보였으며, 굴 가수분해물, I 추출물은 지금까지 알려진 항산화제보다 높은 활성을 나타내었다. 세 물질을 혼합하여 환을 제조하였을 때, 굴 가수분해물, I 추출 건조물, O 추출 건조물의 함량이 높을수록 radical 소거능도 증가하였으나, 점착력이 증가하여 과량 함유할 경우 성형이 어려웠다. 기능성 환의 제조시 밀가루 3.5 g, I 추출건조물 0.75 g, O 추출 건조물 0.75 g, 굴 가수분해물 2.74 g을 최적 배합비로 선정하였다. 굴 가수분해물을 이용하고자 I 및 O 추출물을 혼합하였고, 통계적 모델링과 분석을 통하여 혼합비에 따른 액상의 음료의 최적화를 이루었다. 수학적인 canonical model과 trace plot을 이용하여 액상음료의 중요한 요소로 작용하는 antiradical activity와 관능평가는 각



성분들이 독립적으로 작용하는 선형모델화를 보였다. 그 외 색도와 점도는 상호간의 작용을 일으키면서 반응에 기여하는 것으로 나타났다. 굴 가수분해물 및 한약 추출물들을 이용하여 최적의 액상의 음료 배합비를 결정하기 위해, 각 반응의 canonical 계수를 이용하여 최적화를 한 결과, 굴 가수분해물 3%, I 추출물 3.83%, O 추출물 8.17 %로 나타났다.

#### 전복에 대한 가수분해물의 섭식 촉진효과

3 cm 크기에 전복에 대하여 TGPN 가수분해물은 분자량의 크기에 상관없이 가장 큰 섭식 촉진효과를 보였으며, 산 가수분해물은 2cm 크기의 전복에 대하여 TGPN가수분해물과 같은 섭식촉진 효과를 보였다.

#### 해양미생물 *Streptomyces thermocarboxydus* C12로 부터 생산된 subtilisin-like proteinase inhibitor의 정제 와 특성

남해 해안에서 뽕 또는 해수에서 탐색한 해양 미생물을 단백질 분해효소 저해제로써 적용한 결과 serine 계열인 subtilisin과 proteinase K에 대해서 저해효과가 나타났다. 탐색한 균주를 고전적인 방법으로 조사한 결과, 방선균으로 확인되었다. 더욱 정확한 균주명을 알고자 16s rDNA 분석을 통해 부분서열을 비교한 결과 *Streptomyces thermocarboxydus*로 확인되었으며, 이 균주를 C12로 명명하였다. 전자 현미경으로 관측한방선균 C12는 간균형태이고, 그람 positive인 것으로 확인하였다. *Streptomyces thermocarboxydus* C12는 9% NaCl 농도와 50 °C까지 성장 가능한 것으로 확인하였다.

균주 C12가 생산하는 subtilisin-like proteinase inhibitor의 활성을 증가시키기 위해 최적배양조건을 검토한 결과, 40 °C, 초기 pH 8.0, 1.6% galactose, 0.5% proteose peptone, 1% NaCl, 1 mM LiCl에서 60 h 배양이후 최대 활성을 나타내는 것으로 확인하였다.

이러한 결과를 바탕으로 저해물질들을 분리·정제하였다. 정제단계는 ammonium sulfate, DEAE Sepharose, Superdex 200 column 순서로 이루어졌으며, Gel chromatography에서 단일 peak로 나타났다. 정제한 저해제는 SDS-PAGE에서 33,1 kDa의 mono subunit로 확인되었다. native-gel PAGE에서 단일 band로 확인되었다. 저해제의 pI값은 IEF-PAGE에서 4.4로 나타났다. 70 °C에서 30 min 동안 전처리 한 후, 60%의 저해활성을, pH 6~10범위에서는 80% 이상의 저해활성을 유지하였다. Subtilisin에 대한 저해형태는 비경쟁

적 저해였으며,  $K_i$ 값과  $V_{max}$ 는 각각 2.67mg, 15.33 unit였다. 정제한 저해제는 Subtilisin과 Proteinase K에 대하여 100%의 저해 효과를 보였다.

Inhibitor의 N-말단 아미노산 서열은 DPSALYAPSALVLTVGKGVSAAT였다. 이 서열은 *Streptomyces albogriseolus*이 생산하는 *Streptomyces subtilisin inhibitor*(SSI)와 일치하였다. *Streptomyces thermocarboxydus* C12가 생산하는 subtilisin-like proteianse inhibitor의 구성 아미노산은 Pro, Gly, Asp의 함량이 높았으며, Met, Ile, His, Lys의 함량이 낮았다. Subtilisin-like proteinase inhibitor는 시판 식품 등 단백질 분해효소 저해제인 pork protein과 egg white에 비하여 각각 1,648.3, 571.6배 저해효과가 있었다.

## 제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 연구개발 목표의 달성도

주관연구기관(세부과제) : TGase 정제 및 TGase를 활용한 새로운 기능성 펩티드의 창출

구 분	목 표	달성도(%)
1차년도 (2004년)	○ TGase의 정제와 분리 특성	100
	○ 굴 부분가수분해물의 제조	100
	○ 폐각으로 부터 단백질 분해효소 및 저해제의 확인	100
	○ 기능성의 확인	100
2차년도 (2005년)	○ TGase를 이용한 새로운 펩티드의 창출	100
	○ 기능성 펩티드의 분리, 정제	100
	○ 기능성 펩티드의 구조 특성	100
3차년도 (2006년)	○ 실용화 기술의 개발	
	- 한방 혼합물	100
	- 한방 환의 제조	100
	- 음료수 개발을 위한 최적화	100

협동연구기관(협동과제) : 유

용균주로부터의 생리활성물질 대량생산 및 활용

구 분	목 표	달성도(%)
1차년도 (2004년)	○ 수산폐자원의 미생물배지로의 응용방안 및 유용균주의 탐색	100
	○ 수산폐자원의 미생물 배지로의 응용 및 미생물로부터 생리활성물질의 탐색·생산조건 검토	100
2차년도 (2005년)	○ 생물발효기(fermentor)에서의 생리활성물질 생산능 검증 및 최적조건 검토	100
	○ 생리활성물질의 배양분리 공정 및 단위공정설계	100
	○ 생리활성물질 부분정제 및 순도 검증	100
3차년도 (2006년)	○ 생물 활성 및 기능성 물질의 대량 생산 조건의 최적화	100
	○ 기능성 물질의 안전성 검토	100
	○ 산업화 제품 생산	100

## 연구를 통한 관련분야에의 기여도

가공 적성이 낮은 굴의 유효 이용과 고부가가치 생리활성 물질의 회수 및 가공적성이 낮은 굴을 건강 소재로 식품화하여 굴의 소비 촉진에 기여한다. 과잉 생산되고 있는 굴의 안정적 소비를 통해 가격 안정과 저렴한 생산 기반 시설을 이용한 용이한 기술로 어민 단체의 벤처 기업화에 기여 할 것이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

용 도	활 용 계 획
기술설명 과 현장보급	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 심포지움을 통한 기술 설명과 기술 확산               <ul style="list-style-type: none"> <li>▷ Core University Program을 통해 일본에 기술 소개</li> <li>▷ International 심포지움(한중일)을 통해 중국에 기술 소개</li> </ul> </li> <li>○ 국내외 학회 발표를 통한 기술 설명과 기술 확산               <ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 한국식품과학회, 한국식품영양과학회 및 한국수산과학회를 통한 기술의 소개</li> <li>▷ International Food Technologist Meeting을 통한 기술의 소개</li> </ul> </li> <li>○ 공장 방문을 통한 기술 소개               <ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 연제품 공장 (참여 기업, 한성 기업 등)</li> <li>▷ 수산기계 제작 공장 방문(영남기계)</li> </ul> </li> </ul>
기술이전	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pilot 수준의 기술 이전</li> <li>○ 산업화를 위한 기술 자문</li> </ul>
추가 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식품 의약품 안전청의 건강기능식품 기능성 가이드에 기준한 간기능 보호 관련 및 심장혈관계의 기능성 시험 보강</li> <li>○ 한방 연구소 등과 연계한 생산물질의 이미 확인한 기능성을 제외한 다른 기능성의 탐색</li> <li>○ 가수분해물을 이용한 펩티드 계열 조미소재 활용 기술 개발</li> </ul>
수리미 및 육 가공 분야	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 수리미 제조에 ingredient로 활용</li> <li>○ blend meat의 소재 활용</li> <li>○ 축육 부산물(심장 및 내장 육)의 식품화 공정에 적용</li> </ul>
식품 및 의약품 소재	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 부분가수분해물의 식품 소재 활용               <ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 식품의 기능성 강화를 위한 ingredients 활용</li> <li>▷ 신제품 개발(국수, soup 등)을 위한 ingredients 활용</li> </ul> </li> <li>○ 분말 어육 단백질의 식품 소재 활용               <ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 젤 제품의 첨가물로 활용</li> <li>▷ 육 제품의 기능성 개선제로 활용</li> </ul> </li> <li>○ 건강 기능성 소재 활용               <ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 간기능 개선</li> <li>▷ 심혈관계 기능 개선</li> </ul> </li> <li>○ 의약품 소재               <ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 기능성 펩티드의 합성과 정제</li> <li>▷ 의약품 기초 소재 활용</li> </ul> </li> </ul>

## 제 6 장 참고문헌

### 주관기관부분

- Adler-Nissen J, Olsen HS. 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy proteins. In *Functionality and protein structure*. A Poru-El (ed.), Washington, DC, ACS Symposium Series, p 125-146.
- Ahn B.M. 2000. What is In-Jin-Sook? *Artemisia capillaris*, *Artemisia iwayomogi*, and *Artemisia annua*. *Korean Journal of Hepatology*. 6(4): 548-551.
- Al-Waili N.S. 1986. Treatment of diabetes mellitus by *Artemisia berba-alba* extract : preliminary study. *Clin. Exp. Pharmacol* 13(7): 569-573.
- Babiker EE. 2000. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy proteins. *Food Chemistry* 70: 139-145.
- Burda S, Oleszek WJ. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Agric Food Chem* 49: 2774-2779.
- Block G, Langseth L. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technology* 48: 80-89.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric Food Chem* 44: 2619-2623.
- Cho YH, Chiang MH. 2001. Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia capillaris*, *Artemisia argyi*, and *Artemisia princeps*. *Korean. J Intl Agri* 13(4): 313-320.
- Cho YH, Chiang MH. 2002. Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia capillaris*, *Artemisia argyi*, and *Artemisia princeps*. *Korean J Intl Agri* 13: 313-320.
- Cornell JA. 1990. Experiments with mixtures: Designs, models, and the

- analysis of mixture data. John Wiley & Sons, New York, USA. p 1-8.
- Damodaran S. 1996. Amino acids, peptides, and proteins. In Food Chemistry, Fennema OR (ed.), Marcel Dekker Inc., New York. p 385-398.
- Derringer G, Suich R. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. J Quality Technol 12: 214-219.
- Ellkær MR, Næs T, Baardseth P. 1996. Milk proteins affect yield and sensory quality of cooked sausages. J Food Sci 61: 660-666.
- Hattori M, Yamaji-Tsukamoto K, Kumagai H, Feng Y, Takahashi K. 1998. Antioxidative activity of soluble elastin peptide. J Agric Food Chem 46: 2167-2170.
- Harada K, Eguchi A, Kurosaki Y. 1987. Feeding attraction activities in the combinations of amino acid and other compounds for alalone, oriental weatherfish and yellowtail. Nippon Suisan Gakkaishi 53: 1483-1489.
- Han GH, Kim BY, Lee JK. 2002. Production of extrudates formulated from pacific sand lance sauce by-product and biji. Korean J Food Sci Technol 34(2): 186-193.
- Han GH, Kim BY. 2003. Analysis of optimal mixture ratio for extrudate of the soymilk residue and corn grits by mixture design. Korean J Food Sci Techonol 35: 617-622.
- Harada K, Maruyama S, Nakano K. 1984. Feeding attractants in chemical constituents of brown alga for young albalone. Nippon Suisan Gakkaishi 50: 1541-1544.
- Harada K. 1991. Attraction activities of herbal crude drugs for abalon, oriental weatherfish and yellowtail. Nippon Suisan Gakkaishi 57: 2083-2088.
- Hikino H, Kios Y, Takuchi H, Ikeda Y. 1984. Validity of the oriental medicines 60. Liver-protective drugs. II Antihepatotoxication of lignoids from *S. chinensis* fruits. Planta Med 50: 213-216.
- Jeong BH, Choi BD, Lee JS. 1998. Proximate composition, cholesterol and

- $\alpha$ -tocopherol content in 72 species of Korean fish. J Korean Fish Sci Tech. 1: 129-146.
- Jeong HS, Joo NM. 2003. Optimization of rheological properties for processing of Omija-pyun by response surface methodology. Korean J Soc Food Cookery Sci 19: 429-438.
- Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT(Omija) seed. Korean J Food Sci Technol. 32(4): 928-935.
- Jeong HS, Joo NM. 2003. Optimization of rheological properties for processing of Omija-pyun by response surface methodology. Korean J Soc Food Cookery Sci 19: 429-438.
- Kang HI, Kim JK, Kim SH, Pyeun JH. 1974. Evaluation in the utility of the by-products of oyster processing. J Korean Fish Soc 7(1): 37-40.
- Katayama K, Tomatsu M, Kawahara S, Yamauchi K, Fuchu H, Kodama Y, Kawamura Y, Muguruma M. 2004. Inhibitory profile of nonapeptide derived from porcine troponin C against angiotensin I-converting enzyme. J Agric Food Chem 52:771-775.
- Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelation hydrolysates of Alaska pollack skin. J Agric Food Chem 49: 1984-1989.
- Kim SK, Choi RC, Park PJ, Choi JH, Moon SH. 2000. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of cod teiset protein. J Korean Fish Soc 33(3): 198-204.
- Kim KS, Lee MY. 1996. Effects of *Artemisia selengensis* methanol extract on ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver. J Korean Soc Food Sci Nutr 25(4): 581-587.
- Kim CY, Pyeun JH, Nam JN. 1981. Decomposition of glycogen and protein in pickled oyster during fermentation with salt. J. Korean Fish. Soc. 14(2): 66-71.
- Kim HK., Na GM., Ye SH, Han HS. 2004. Extraction characteristics and antioxidative activity of *Schizandra chinensis* extracts. Korean J



- Food Culture 19(5): 484-490.
- Kim KI, Joo HN, Kwon TW. 1973. On the proximate composition, organic acids and anthocyanins of Omija, *Schizandra chinensis* Baillon. Korean J Food Sci Technol 5: 3.
- Kristinsson HG, Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40: 43-81.
- Kohn AJ. 1983. The mollusca vol. 5, physiology, part 2. ASM. Academic press, New York, p 1-63.
- Lee SG 2005. The therapeutic effect of *Artemisia capillaris* extract on hepatic damage induced by carbon tetrachloride in rats. J Vet Clin 22(3): 206-213.
- Lee JS, Lee SW. 1990. Effect of water extract in fruits of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) on alcohol metabolism. Korean J Dietary Culture 5: 259-262.
- Long ZZ, Xie SS. 1979. Experimental study on the enhancement of the immunosuppressive effect of cortisone by wurenchun, an extract of *Schizandra chinensis* BaILL I. Isolation and structure determination of five new lignans A,B,C,F and G and the absolute structure of schzandrin. Chem Pharmacol Bull 27: 1383-1394.
- Mine Y, Ma F, Lauriau S. 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. J Agric Food Chem 52: 1088-1094.
- Ministry of Maritime Affairs and Fisheries. 2003. Statistical year book of maritime affairs and fisheries. Cly publishing Co. Seoul, Korea. p 1439.
- Ministry of Maritime Affairs and Fisheries. 2004. Fishery production survey. p 146.
- Nam SM, Kim JG, Ham SS, Kim SJ, Chung ME, Chung CK.1999. Effects of *Artemisia iwayomogi* extracts on antioxidant enzymes in rats administered benzo(a)pyrene. J Korean Soc Food Sci Nutr 28(1): 199-204.

- Næs T, Bjerke F, Færgestad EM. 1999. A comparison of design and analysis techniques for mixtures. *Food Qual Prefer* 10: 209-217.
- Park BH. 1995. Chemical composition of marine products in Korea. National Fisheries Research Development. p 60-159.
- Park, EY, Murakami H, Mori O, Matsumura Y. 2005. Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. *J Agric Food Chem* 53: 137-144.
- Rival SG, Boeriu CG, Wichers HJ. 2001. Caseins and casein hydrolysates. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agric Food Chem* 49: 295-302.
- Saguy I, Mishkin MA, Karel M. 1984. Optimization methods and available software. Part 1. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 20: 275-299.
- Sheu SJ, Chieh CL, Weng WC. 2001. Capillary electrophoretic determination of the constituents of *Artemisia capillaris* Heba. *J Chromatography* 911: 285-293.
- Surbran OA, Pushpanadan P, Rajasekharan S, Evana DA, Latha PG, Val SR. 1997. Effects of *Artemisia pallens* on blood glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 50(1): 13-17.
- Saiga A, Okumura T, Makihara T, Katsuta S, Shimizu T, Yamada R, Nishimura T. 2003. Angiotension I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *J Agric Food Chem* 51: 1741-1745.
- Suetsuna K. 2002. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of the short-necked clam *Tapes philippinarum* and the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Fisheries Science* 68: 233-235.
- Sakata K, Ina K. 1985. Digalactosyldiacylglycerols and phosphatidylcholines isolated from a brown alga as effective phagostimulants for a young abalone. *Nippon Suisan Gakkaishi* 51: 659-666.
- Sakata K, Iwase Y, Kato K, Ina K, Machiguchi Y. 1991. A simple feeding inhibitor assay for marine herbivorous gastropods and the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* and its application to

- unpalatable extracts. Nippon Suisan Gakkaishi 57: 261-265.
- Sakata K, Iwase Y, Ina K, Fujita D. 1991. Halogenated terpenes isolated from the red alga *Plocamium leptophyllum* as feeding inhibitors for marine herbivores. Nippon Suisan Gakkaishi 57: 743-746.
- Sheo HJ, Lee MY, Hwang JS. 1987. Effect of *Schizandrae fructus* extract on blood constituents of alloxan induced diabetic rabbits. J Korean Soc Food Sci Nutri 16: 262-268.
- Tanaka T. 1976. Tanaka's cylopedia of edible plants of the world. Keigaku Pub. Co., Tokyo.
- Taniguchi K, Kurata K, Suzuki M, Shiraishi K. 1992. Feeding deterrent activity of diterpenes from the brown alga *Dilophus okamurai* against the abalone *Haliotis discus hannai*. Nippon Suisan Gakkaishi 58: 1931-1936.
- Waterfield CJ, Turton JA, Scales MD. 1993. Investigations into the effects of various hepatotoxic compound on urinary and liver taurine levels in rats. Arch Toxicol 67: 244- 254.
- Wu TS, Tsang ZJ, Wu PL, Liou MJ, Leu YL, Chan YY, Lin RW, Shi LS. 1998. Phenylalkynes from *Artemisia capillaris*. Phytochemistry 47: 1645-1648.
- Wu TS, Tsang ZJ, Wu PL, Lin FW, Li CY, Teng CM, Lee KH. 2001. New constituents and antiplatelet aggregation and anti-HIV principles of *Artemisia capillaris*. Bioorganic and Medicinal Chemistry 9: 77-83.
- Wi JH, Lee DS, Oh EK, Yu HD, Kim PH. 2002. Sanitary research of the designated area for shellfish production in the south sea of Korea July-December. Nation Fisheries Research Development. Yeosu, Korea. p 204-206.
- Yoon WB, Kim BY, Hahm YT. 1997. Study upon the rheological properties and optimization of tofu bean products. J Korean Agric Chem Soc 40: 225-231.
- Yoon WB, Park JW, Kim BY. 1997. Surimi-starch interactions based on mixture design and regression models. J Food Sci 62: 555-560.
- Yoo SK. 2000. Mariculture in the coastal water. Guduck publishing Co.

Busan, Korea. p 639.

- Yoon HD, Byun HS, Chun SJ, Kim SB, Park YH. 1986. Lipid composition of oyster, arkshell and sea-mussel. *J Korean Fish Soc* 19(4): 321-326.
- 김세권. 문성훈. 남경수. 정인철. 변희국. 전유진. 1998. 수사가공폐기물로부터 고기능성 소재 개발에 관한 연구. 해양수산부.
- 해양수산부. 2004. 어업통계연보.

#### 협동기관 부분

- Aoyagi, T. 1990. Small molecular protease inhibitors and their biological effects. p. 312-363. In H. Kleinkauf & H. Dohren (eds.), *Biochemistry of Peptide Antibiotics*, Walter de Gruyter, Berlin.
- Aoyagi, T., M. Ishizuka, T. Takeuchi and H. Umezawa. 1977. Enzyme inhibitors in relation to cancer therapy. *J. Antibiot.* 30: 121-132.
- Aoyagi, T., T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, S. Kondo, M. Hamada, K. Maeda and H. Umezawa. 1969. Leupeptins, new protease inhibitors from *Actinomyces*. *J. Antibiot.* 22: 283-286.
- Ardelt, W. and M. Laskowski, Jr. 1985. Tukey ovomucoid third domain inhibits eight different serine proteinases of varied specificity on the same...Leu18-Glu19...reactive site. *Biochemistry.* 24: 5313-5320.
- Beynon, R. J. and J. S. Bond. 1989. *Proteolytic enzyme*. IRL Press. Oxford.
- Bode, W. and R. Huber. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204: 433-451.
- Bowman, D. E. 1946. Differentiation of soy bean antitryptic factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 63: 547-550.
- Cechova, D. 1976. Trypsin inhibitor from cow colostrum. *Methods in Enzymology.* 45: 806-813.
- Choi, H. J., M. J. Jung and Y. K. Jeong. 2002. Optimization of the production of an immunostimulant from a marine bacterium. *Korean Journal of Life Science.* 12: 759-764.
- Demuth, H. U. 1990. Recent developments in inhibiting cysteine and serine proteases. *J. Enzyme Inhibition.* 3: 249-278.
- Estell, D. A. and M. Laskowski, Jr. 1980. *Dermasterias imbricata* trypsin 1:

- An enzyme which rapidly hydrolyzes the reactive-site peptide bonds of protein trypsin inhibitors. *Biochemistry*. 19: 124-131.
- Faucher, D. C., Y. Lelievre and T. Cartwright. 1987. An inhibitor of mammalian collagenase active at micromolar concentrations from an actinomycete culture broth. *J. Antibiot.* 40: 357-359.
- Fukuhara, K. I., M. Katsura and S. Murao. 1982. Purification and some properties of Talopeptin (MK-1), a novel proteinase inhibitor produced by *Streptomyces mozunensis* MK-23. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1707-1710.
- Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips. 1981. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Glaser, C. B. and L. Karic. 1978. Spectral studies on two genetic forms of the human serum proteinase inhibitor, alpha-1-antitrypsin. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 12: 284-292.
- Ham, W. E. and R. M. Sandstedt. 1944. A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soy bean meal. *J. Biol. Chem.* 154: 505-506.
- Hanada, K., M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka. 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 42: 523-528.
- Hartley, B. S. 1960. Proteolytic enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* 29: 45-72.
- Höyen, T. and A. Skulberg. 1962. Trypsin inhibitors produced by *Clostridium botulinum* cultures. *Nature*. 195: 922-923.
- Ikenaka, T., S. Odani, M. Sakai, Y. Nabeshima, S. Sato and S. Murao. 1985. Amino acid sequence of an alkaline proteinase inhibitor (Streptomyces subtilisin inhibitor) from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *J. Biochem. (Tokyo)* 76: 1191-1209.
- Kang, S. I., Y. M. Kim, Y. B. Jang, D. J. Lim and J. Y. Kong. 2004. The optimal culture condition for the collagenolytic protease production from *Vibrio vulnificus* CYK279H. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 19:

- 295-300.
- Kim, I. S., H. T. Kim, H. S. Lee and K. J. Lee. 1991. Protease inhibitor production using *Streptomyces* sp. SMF13. J. Microbiol. Biotechnol. 1: 288-292.
- Kreig, N. R. and J. G. Holt. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. IV, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Kunimoto, S., T. Aoyagi, H. Morishima, T. Takeuchi and H. Umezawa. 1972. Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. J. Antibiot. 25: 251-255.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. J. Gen. Physiol. 30: 291-310.
- Kunitz, M. 1947. Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin-inhibitor. J. Gen. Physiol. 30: 311-320.
- Kunitz, M. and J. H. Northrop. 1936. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. J. Gen. Physiol. 19: 991-1007.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Laskowski, M. 1955. Naturally occurring trypsin inhibitors. Methods in Enzymology. 2: 36-54.
- Laskowski, M., Jr. and I. Kato. 1980. Protein inhibitors of proteinases. Ann. Rev. Biochem. 49: 593-626.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Macfaddin, J. F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Mala, B. R., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Bio. Rev. 62: 597-635.
- Massaki, Y., S. Kazuo and M. Mitsuo. 1984. Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3405. Agric. Biol. Chem. 48:

1637-1645.

- Miyairi, K., A. Ogasawara, A. Tonouchi, K. Hosaka, M. Kudou and T. Okuno. 2004. Low-molecular-weight pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*. J. Appl. Glycosci. 51: 1-7.
- Moore, S. and W. H. Stein. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. 176: 367-388.
- Murao, S. and S. Sato. 1972. S-SI, a new alkaline protease inhibitor from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. Agric. Biol. Chem. 36: 160-163.
- Murao, S., S. Sato and N. Muto. 1972. Isolation of alkaline protease inhibitor producing microorganisms. Agric. Biol. Chem. 36: 1737-1744.
- Murao, S. and Sato, S. 1970. New Pepsin Inhibitors (S-PI) from *Streptomyces* EF-44-201. Agric. Biol. Chem. 34: 1265-1267.
- Murao, S. and S. Sato. 1972. S-SI, a new alkaline protease inhibitor from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. Agri. Biol. Chem. 36: 160-163.
- Murao, S. and T. Watanabe. 1978. Isolation and identification of microorganism, producing microbial alkaline proteinase inhibitor (MAPI). Agric. Biol. Chem. 42: 2209-2215.
- Nunokawa, Y., Y. Namba and S. Watanabe. 1961. A study of the rice koji protease. J. Soc. Brew. 53: 930-933.
- Pandhare, J., K. Zog, V. V. Deshpande. 2002. Differential stability of alkaline protease inhibitors from *Actinomyces*: effect of various additives on thermostability. Bioresour. Technol. 84: 165-169.
- Park, S. K., N. K. Sung and S. W. Lee. 1989. Production and purification of pepsin inhibitor from *Actinomyces* GF 155-2. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 17: 121-125.
- Peckman, E. V. 1951. *Aspergillus* proteinase. Biochemistry. 5: 321-325.
- Pubols, M. H., D. C. Bartelt and L. J. Greene. 1974. Trypsin inhibitor from human pancreas and pancreatic juice. J. Biol. Chem. 249: 2235-2242.
- Quast, U., J. Engel, E. Steffen, H. Tschesche and S. Kupfer. 1978. Stopped-flow kinetics of the resynthesis of the reactive site peptide bond in Kallikrein inhibitor (Kunitz) by  $\beta$ -trypsin. Biochemistry. 17:

1675-1682.

- Read, J. W. and L. W. Haas. 1938. Studies on the baking quality of flour as affected by certain enzyme action. Part V. Further studies concerning potassium bromate and enzyme activity. *Cereal Chem.* 15: 59-68.
- Read, R. J. and M. N. G. Jaes. 1986. "Introduction to the Protein Inhibitors: X-ray crystallography" in "Proteinase Inhibitors", A. J. Barrett. and G. S. Salvesen, eds., Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, p. 301.
- Read, R. J., M. Fujinaga, A. R. Sielecki and James, M. N. G. 1983. Structure of the complex of *Streptomyces griseus* protease B and the third domain of the turkey Ovomuroid inhibitor at 1.8-Å resolution. *Biochemistry.* 22: 4420-4433.
- Revina, T. A., A. S. Speranskaya, G. V. Kladnitskaya, A. B. Shevelev and T. A. Valueva. 2004. Subtilisin protein inhibitor from potato tubers. *Biochemistry (Moscow).* 69: 1345-1352.
- Righetti, P. G. 1989. Protein structure; A practical approach, T.E. Creighton, ed. IRL press. p 23~63. Oxpord.
- Shimada, K. and K. Matsushima. 1969. A protease inhibitor from *Penicillium cyclopium* part I. Purification and partial characterization. *Agric. Biol. Chem.* 33: 544-548.
- Shimada, K. and K. Matsushima. 1969. A protease inhibitor from *Penicillium cyclopium* part III. The mode of action of the inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 34: 47-52.
- Strickler, J. E., T. R. Berka, J. Gorniak, J. Fornwald, R. Keys, J. J. Rowland, M. Rosenberg and D. P. Taylor. 1992. Two novel *Streptomyces* protein protease inhibitors. purification, activity, cloning, and expression. *J. Biol. Chem.* 267: 3236-3241.
- Suda, H., T. Aoyagi, T. Takeuchi and H. Umezawa. 1973. A thermolysin inhibitor produced by *Actinomycetes*: Phosphoramidon. *J. Antibiot.* 26: 621-623.
- Takahashi, H., S. Iwanaga and T. Suzuki. 1974. Distribution of proteinase



- inhibitors in snake venoms. *Toxicon*. 12: 193-197.
- Takahashi, T. and Tang, J. 1981. *Methods in Enzymology*, 80: 565-581.
- Tanaka, S. 1992. Fermentation processes in screening for new bioactive substances. p 303-326. In S. Omura (ed.). *The search for bioactive compound from microorganism*. Springer-Verlag, New York.
- Tanzawa, K., M. Ishii, T. Ogita and K. Shimada. 1992. Matlystatins, new inhibitors of type IV collagenases from *Actinomadura altramantaria*. II. Biological activities. *J. Antibiot.* 45: 1733-1737.
- Terabe, M., S. Kojima, S. Taguchi, H. Momose and K. I. Miura. 1994. Primary structure and inhibitory properties of a subtilisin-chymotrypsin inhibitor from *Streptomyces virginiae*. *Eur. J. Biochem.* 226: 627-632.
- Terashita, T., M. Kono, and S. Murao. 1980. Promoting effect of S-PI on fruiting of *Lentinus edodes*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 21: 137-140.
- Tschesche, H., T. Diet, R. Marx and H. Fritz. 1972. New polyvalent protease inhibitors for trypsin, chymotrypsin, plasmin and kallikreins from snails (*Helix pomatia*). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 353: 483-486.
- Tsuchiya, K. and T. Kimura. 1978. Production of trypsin inhibitor by a *Cephalosporium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 631-635.
- Ueda, Y., S. Kojima, K. Tsumoto, S. Takeda, K. Miura and I. Kumagai. 1992. A protease inhibitor produced by *Streptomyces lividans* 66 exhibits inhibitory activities toward both subtilisin BPN' and trypsin. *J. Biochem. (Tokyo)*. 112: 204-211.
- Umezawa, H. 1972. *Enzyme inhibitors of microbial origin*, p. 1-114. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Umezawa, H. and Aoyagi, T. 1973. The Structure of chymostatin, achymotrypsin inhibitor. *J. Antibiot.* 26: 625-646.
- Umezawa, S., K. Tatsuta, K. Fujimoto, T. Tsuchiya and H. Umezawa. 1972. Structure of antipain, a new Sakaguchi-positive product of *Streptomcyes*. *J. Antibiot.* 25: 267-270.
- Vernekar, J. V., M. S. Ghatge and V. V. Deshpande. 1999. Alkaline

- protease inhibitor: A novel class of antifungal proteins against Phytopathogenic fungi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262: 702-707.
- Vincent, J-P. and M. Lazdunski. 1972. Trypsin-pancreatic trypsin inhibitor association. Dynamics of the interaction and role of disulfide bridges. *Biochemistry.* 11: 2967-2977.
- Vogel, R., I. Trautschold and E. Werle. 1968. *Natural proteinase inhibitors*, Academic Press, New York; translation of *Natürliche Proteinase-Inhibitoren*. 1966. G. Thieme, Stuttgart.

# 제 1 장 굴에 있는 Transglutaminase (TGase)의 정제와 특성

## 제 1 절 TGase의 정제와 특성

### Abstract

The specific activities of transglutaminase from water extract of 8 species shellfishes were compared, and transglutaminase of oyster was purified. Transglutaminase was purified by 20-80% saturated ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sepharose ion-exchange and Superdex 200 prep grade gel chromatography. The purity and yield of final purified transglutaminase were 1895 fold and 1.9%, respectively. The optimum pH and temperature of transglutaminase were 9.0 and 45 °C against N,N'-dimethylated casein as substrate. The half activities was lost after heating at 55 °C for 30 min. The activity of purified transglutaminase depended on Ca<sup>2+</sup> ion, and showed the highest in 10 mM CaCl<sub>2</sub>. The activity was decreased up to 10 mM NaCl, and not significant difference in the range of 50 -200 mM NaCl.

### 서론

포유동물, 어류 및 수서 무척추동물의 여러 조직에 널리 분포하는 transglutaminase (TGase)는 펩티드 결합한 glutamine 잔기의  $\gamma$ -carboxamide 기와 putresine과 cadaverine 같은 일차 아민의 아미노 기 혹은 펩티드 결합한 lysine 잔기의  $\epsilon$ -아미노기 사이에 가교 연결의 형성을 촉매하는 Ca<sup>2+</sup>-의존성 효소이다(Nozawa et al., 2001). 포유동물에서 TGase는 혈장, 혈소판, placenta, keratinocyte 및 간, prostate gland 및 epidermis 같은 조직에 널리 분포하며, 3개의 그룹, 즉 plasma TGase (factor XIII), type I membrane-bound TGase (keratinocyte type) 및 type II cytosolic TGase (liver type)으로 분류한다(Tokunaga and Iwanaga, 1993).

무척추 동물의 TGase는 일본산 horseshoe crab의 hemocyte lysate에서 처

음으로 확인하였으며(Tokunaga and Iwanaga, 1993), 가리비, botan 새우, 오징어, 잉어, 무지개 송어 및 전갱이 육에서 TGase를 정제하고 이들의 물리화학적 및 효소적 특성을 서로 비교하여 해산 무척추 동물에는 염에 의해 활성화되는 새로운 형태의 TGase 존재를 확인하였다(Nozawa et al., 1997). 굴의 TGase 활성화는 전체의 73%가 아가미와 mantle에서 검출되었으며, 분자량 84000(TGase-1)과 90000(TGase-2)을 가진 두 가지 형태의 TGase를 얻었고, 최적 pH와 온도 및  $Ca^{2+}$ 이온과 NaCl 의존성에 차이가 있으며, 굴 제품의 제조 공정에서 내인성 TGase의 반응 가능성을 제시하였다(Kumazawa et al., 1997). 해산 무척추 동물의 근육에 NaCl-자극 TGase는 널리 분포하며, 활성화 증진 효과의 순서는  $Cl^- = Br^- > I^- = NO_3^-$ 이다. 그러나 기질 없이 NaCl과 사전 항온할 때 TGase는 불활성화된다. 불활성화 속도는 NaCl 농도 및 온도의 증가와 함께 증가한다. 증가한 근육 TGase 활성화는 해수 혹은 체액과 접촉하여 유도되며 상처 치료(wound healing)에 포함될 수 있다(Nozawa et al., 1999). 가리비, 오징어 및 새우 같은 해산 무척추동물의 근육 막이 기계적인 상처 혹은 생화학적인 파괴에 의해 파괴되면 체액과 해수의 접촉이 이루어지는 즉시 근육 TGase가 활성화되고, 단백질 분자 들 사이의 가교-연결을 통해 상처 치료에 중요한 역할을 행사한다(Nozawa et al., 2001). 조직 transglutaminase에 의한 단백질의 가교 연결은 알츠하이머 질병의 amyloid(A $\beta$ ) 침적 특징과 산발적인 inclusion body myositis를 강화한다고 알려져 있다(Boros et al., 2004).

수산 식품 응용과 관련하여 TGase는 주로 중합체를 생성하여 물성을 개선하기 위해 사용하고 있으며(Seki et al., 1990; Wan and Seki, 1992; Seguro et al., 1995; Nakahara et al., 1999; Ramirez-Suarez and Xiong, 2002; Park et al., 2005), 가수분해물에 적용한 경우는 대두 단백질 효소 가수분해물과 산가수분해물을 중합하여 식품 기능성을 개선하거나(Babiker et al., 1996), 가수분해 전후에 TGase와 함께 항온한 sodium caseinate의 기능 특성의 변화에 관한 연구(Flanagna and Fitzgerald, 2003) 외에는 거의 보고되어 있지 않다.

본 연구는 패류 단백질을 TGase로 가교연결하여 중합체를 생성시키고 생성된 중합체 단백질을 가수분해효소로 가수분해하여 새로운 종류의 펩티드를 생성하기 위해, 일차적으로 9종의 해산 패류에 있는 내인성 TGase 활성을 확인하고 굴에 분포하는 TGase를 분리, 정제하여 몇 가지 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용한 바지락, 굴, 소라, 개조개, 비단가리비, 꼬막, 백합, 홍합 및 돌담치는 2005년 3월 19일 경남 통영시 소재 어패류 시장에서 구입한 다음 얼음에 채워 30분 이내에 실험실로 운반하고 탈각한 후 전체를 TGase 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다. 그리고 TGase 분리 정제를 위한 시료는 2005년 3월 24일 통영시 소재 굴 수협에 위판 된 굴을 구매하여 사용하였다.

Monodansyl cadaverine (MDC), Tris, dithiothreitol(D6032), EDTA, N, N'-dimethylated casein (C9801)은 Sigma제(Sigma Chemical Co, St Louis, MO)를 사용 하였으며, DEAE-Sephacel 칼럼(2.6x30 cm)과 Supedex 200 prep 칼럼(1.6 x 60 cm)는 GE (PhanTek Co, Ltd, Korea)에서 구입하여 사용 하였다. 그 외의 시약은 모두 시약급을 사용하였으며, 물은 glass 증류한 탈 이온수를 사용하였다.

### Transglutaminase의 추출과 정제

마쇄한 굴 500 g에 2배량의 10 mM NaCl, 5 mM EDTA 및 1 mM DTT를 포함하는 20 mM Tris-HCl 완충액(TEND, pH 8.3)를 가하고, Ultra-Turrax (Works Inc, wilmington, NC)로 8000 rpm에서 2 분 동안 균질화하여 원심 분리(10,000 x g, 60 분, Hanil SUPRA-25, Korea)하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 6점의 가아제로 여과하여 지질을 제거하고 조효소로 사용하였다.

조효소는 Fig. 1. 과 같은 방법에 따라 정제하였다. 즉 조효소액을 20-80%의 포화 ammonium sulfate로 염석하고 원심분리(5,000 x g, 30 분)하여 얻은 침전물을 최소량의 TEND 완충액에 현탁하여 같은 완충액에서 하룻밤 투석 하였다. 충분한 투석이 이루어지도록 50 배량의 완충액을 4회 교환하였다. 투석 후 얻은 단백질 용액을 원심분리(10,000 x g, 60분)하여 변성 단백질과 침전물을 제거한 상층액을 TEND 완충액으로 평행시킨 DEAE Sephacel 칼럼(2.6x30 cm)을 장착한 GradiFrac (Pharmacia-Biotech, Upsala, Sweden)에 loading하고 1.0 N NaCl을 포함한 TEND 완충액으로 선형균배하여 단백질을 용출하였다. 이때 유속은 1 mL/min로 하였고, 단백질은 280 nm에서 검출하였다. TGase 활성 획분을 TEND 완충액에 하룻밤 투석하고, 동일 칼럼에서 0.5 M NaCl을 포함하는 TEND 완충액으로 선형 균배하여 활성 단백질 획분을 분획하였다. 활성 획분을 모으고 한외여과(Amicon; cut-off limit,

10,000 Da)에서 농축하고 0.1 N NaCl, 1 mM EDTA 및 0.1 mM DTT를 포함하는 10 mM Tris-HCl (pH 7.7) 완충액에 투석하여 Superdex 200 prep grade 칼럼(1.6x60 cm)에 loading하고 같은 완충액으로 용출하여 젤 크로마토그래피하였다. 활성 획득은 모아서 -20 °C에 저장하면서 TGase의 특성 분석에 사용하였다.

### Transglutaminase 활성의 측정

Transglutaminase 활성은 Kumazawa et al.(1997)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 즉 37 °C의 항온수조에서 미리 항온한 최종 농도 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.5), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM DTT, 15 uM monodansylcadaverine (MDC), 1 mg/mL N,N'-dimethylated casein로 구성된 혼합용액 2.16 mL에 240 uL의 조효소 및 정제 transglutaminase를 첨가하여 37 °C에서 30분 동안 반응시킨 후 0.5 mL의 0.1 M EDTA 용액을 첨가하여 반응을 중지시키고 형광분광광도계로 excitation 파장 350nm, emission 파장 480 nm에서 형광강도를 측정하였다. 형광강도는 표준 곡선(Fig. 2)에 따라 MDC의 nM로 계산하였다. 효소 1 단위는 분당 N,N'-dimethylated casein에 incorporation하는 1 n mole의 MDC의 양으로 정의하였으며, 비활성은 분당, 효소 단백질 mg 당의 활성 단위로 표시하였다. 단백질의 농도는 Lowry의 방법(1951)에 따라 bovine serum albumin으로 작성한 검량곡선으로 측정하였다(Fig. 3). 완충액에 포함된 DTT는 Lowry법에 의한 단백질 농도 측정에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다

### Minced oyster (500 g)

Add 2 vol of 20 mM Tris-HCl (pH 8.3) containing 10 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1 mM DTT (TEND buffer)

Homogenize at 8000 rpm for 2 min

Centrifuge at 10,000 x g for 60 min

### Supernatant (crude enzyme)

Filter through 6 layers of cheese clothes to remove lipid

### Filtrate

Fractionate with ammonium sulfate in 20~80% saturation

Centrifuge at 5,000 x g for 30 min

## Precipitate

Resuspend in TEND buffer  
Dialysis against TEND buffer  
Centrifuge at 10,000 x g for 60 min

## Supernatant

Apply to 1st DEAE Sephacel column (2.6x30 cm)  
Wash the column with TEND buffer of 1 bed volume  
Elute protein using a linear salt gradient from 0 to 1.0 N NaCl in TEND buffer  
Pool the active fraction and dialysis against TEND buffer  
Apply to 2nd DEAE Sephacel column (2.6x30 cm)  
Wash the column with TEND buffer of 1 bed volume  
Elute protein using a linear salt gradient from 0 to 0.5 N NaCl in TEND buffer  
Pool the active fraction and concentrate protein with Ultrafiltration (MW, 10,000 Da)  
Dialysis against 10 mM Tris-HCl (pH 7.7) containing 0.1 N NaCl, 1 mM EDTA and 0.1 mM DTT  
Apply to Superdex 200 prep grade column (1.6x60 cm) and elute with the same buffer  
Pool the active fraction and dialysis against deionized distilled water

## Purified transglutaminase

Store at -20 °C for further analysis

Fig. 1. Procedure for purification of the transglutaminase from oyster.

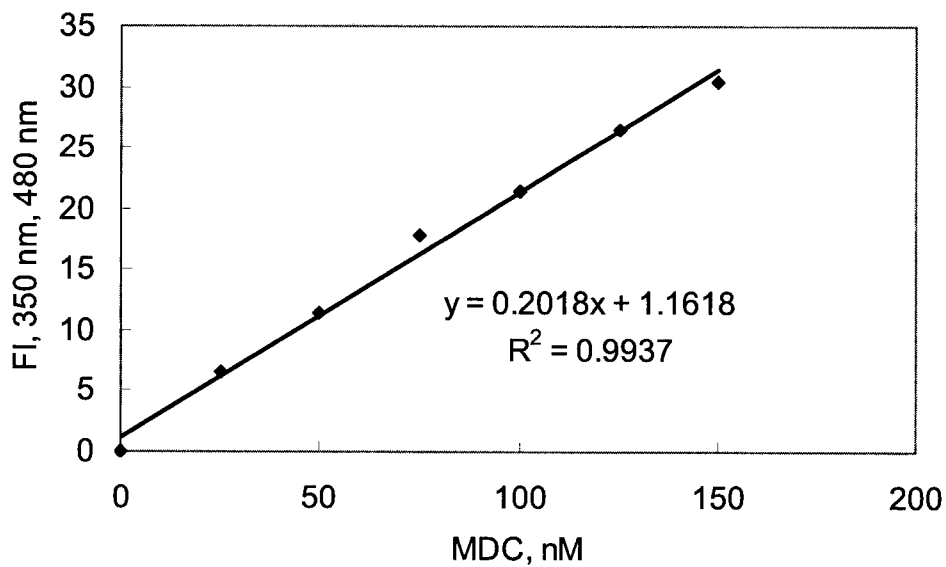


Fig. 2. Standard curve for determination of monodansylcadeverine (MDC)

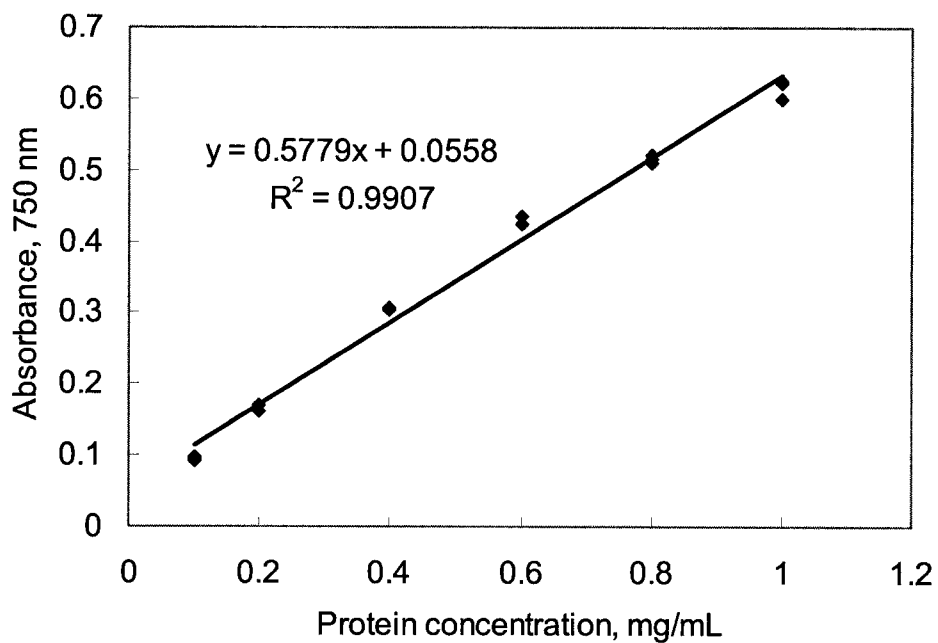


Fig. 3. Standard curve for determination of protein by Lowry's method.



### SDS-polyacrylamide Gel 전기영동(SDS-PAGE)

최종적으로 정제한 효소를 증류수에 대하여 하룻밤 투석한 후, 효소 용액 1 mL에 대하여 SDS-전기영동 시료 완충액 0.25 mL를 가하여 90 °C에서 3분 동안 가열하여 SDS-PAGE 전기영동용 시료를 조제하였다. SDS-PAGE는 5%의 농축 젤과 10%의 분리 젤에서 Laemmli의 방법 (1971)에 따라 well 당 3 mA의 전류로 전개하였다. 전기영동이 끝난 젤은 Coomassie brilliant blue R-250에서 1 시간 염색한 후 methanol:acetic acid:증류수 (1:1:8, v/v/v)용액에서 배경이 깨끗해질 때까지 탈색하였다. 분자량 측정은 광범위 표준단백질 혼합물(Sigma, M3788)을 사용하였다.

### 최적 pH와 온도 측정

Transglutaminase 활성 측정을 위한 반응 혼합액 중 완충액의 농도와 pH를 변화시키면서 동일한 효소 단백질 농도로 측정하였다. 최적 pH 측정을 위해 0.25 M sodium phosphate (pH 6.0-7.0), 1 M Tris-HCl (pH 7.0-9.0) 및 1 M glycine-NaOH (pH 9.0-10.5) 완충제를 사용하였으며, pH 0.5 단위로 활성을 측정하였다. 최적 온도를 결정하기 위해 20-70 °C의 온도 범위에 걸쳐 5 °C의 단위로 활성을 측정하였다. 효소 활성은 단위 활성으로 표시하였다.

### 열안정성의 측정

효소 용액을 시험관(10x130 mm)에 0.60 mL 씩 분취하고 30-80 °C의 온도 구간에 걸쳐 10 °C 단위로 각 온도에서 30분 동안 가열 변성시키고 1 M Tris-HCl (pH 8.5), 55 °C의 최적 pH와 온도에서 20분 동안 반응시키고, 0.1 M EDTA 용액 0.5 mL를 가하여 반응을 중지시킨 후 형광강도를 측정하였다.

### Ca<sup>2+</sup> 이온 및 NaCl 농도의 영향 측정

반응 혼합용액 중 CaCl<sub>2</sub>의 최종농도가 1, 5, 10, 20, 50 및 100 mM이 되도록 조절하고 40 °C에서 30 분 동안 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다. 그리고 NaCl 농도의 영향은 NaCl의 최종농도가 5, 10, 50, 100, 200 mM이 되도록 반응 혼합용액에 첨가하고 같은 반응 조건에서 효소 활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 어종에 따른 transglutaminase 활성과 동결 저장 중 활성의 변화

개조개, 굴, 꼬막, 바지락, 백합, 비단가리비, 소라, 홍합, 돌담치 9종의 패류에서 추출한 조 transglutaminase의 비활성을 측정된 결과(Fig. 4.), 소라 고동이 가장 높은 0.82 units/mg-protein/min을 보인 반면, 개조개는 가장 낮은 0.15 units/mg-protein/min을 보였다. 굴의 비활성은 0.27 units/mg-protein/min으로서 실험한 패류 중에서 비교적 낮은 활성을 보이는 것으로 나타났다. 해산 어류와 무척추 동물 추출물의 TGase 활성은 가리비 0.034 unis/mg-rptein, botan 새우 2.4 unis/mg-protein, 오징어 0.019 units/mg-protein, 잉어 0.36 units/mg-protein, 무지개 송어 0.01 unit/mg-protein, 전갱이 0.14 units/mg-protein라고 보고(Nozawa et al, 1997)한 것에 비추어 굴은 두족류와 해산 어류에 비하여 비교적 높은 TGase 활성을 가진다.

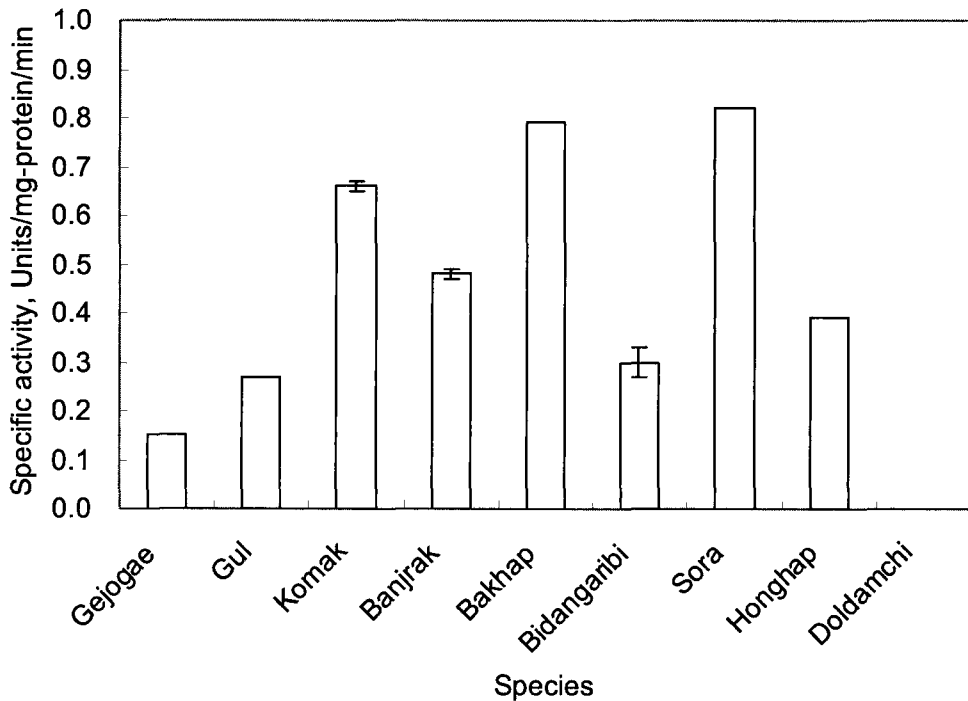


Fig. 4. TGase activity of crude extracts from several shellfish.

TGase 활성을 측정하기 위해 굴에서 추출한 조 추출물을 -20 °C에서 저장

하면서 동결 안정성을 측정하였다(Fig. 5). 조추출물의 TGase 활성은 1.84 units/min로 동결 12일째에 3.68 units/min까지 증가하였으나, 저장 33일까지 4.13 units/min으로 유의적인 차이를 보이지 않았다( $p < 0.05$ ). 그러나 가용성 단백질 농도는 저장 31일까지 크게 감소한 것으로 나타나 비활성은 저장 일수의 증가와 함께 증가하였다. 이 같은 결과는 조 추출물을  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 저장하면 단백질은 변성하면서 응집하여 용해도가 크게 감소하지만, TGase 활성을 보이는 핵분은 유의적인 변화를 보이지 않는 것으로 추정된다. 따라서 조 추출물을  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하면서 정제에 사용해도 활성에 큰 문제가 없음을 제시한다.

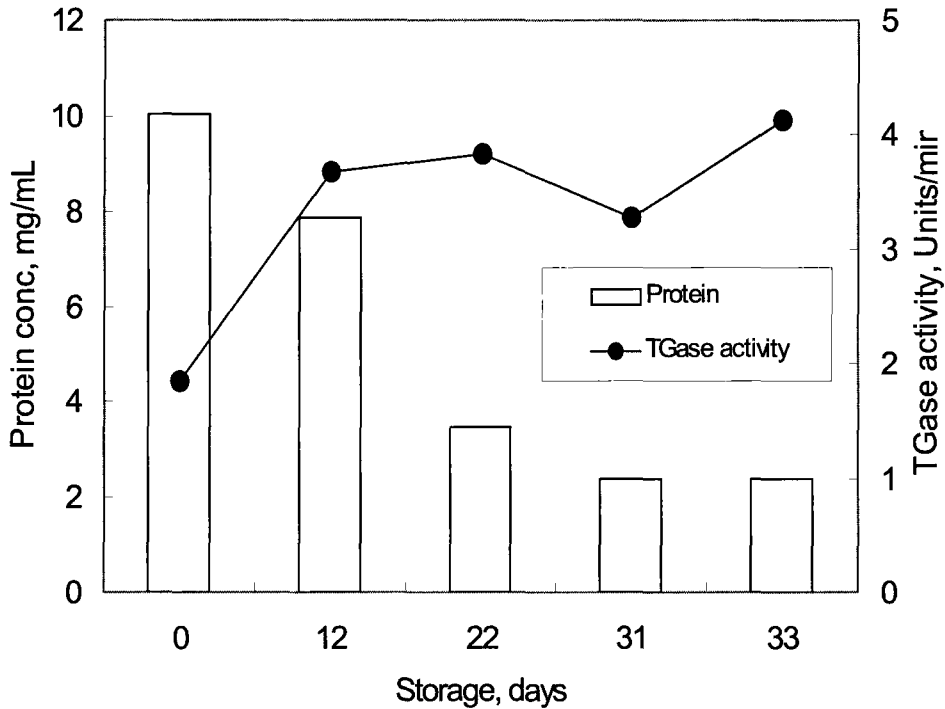


Fig. 5. Changes of protein concentration and TGase activities during storage at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Transglutaminase의 정제

TGase는 Fig. 1의 방법에 따라 TEND 완충액으로 굴에서 조 효소액을 추출하고, 20-80% 포화 ammonium sulfate로 단백질 획분을 모은 다음, 투석하여 1차 및 2차 DEAE 이온교환 크로마토그래피와 1차 젤 크로마토그래피를 통하여 정제하였다. 2차 DEAE-이온교환 크로마토그래피의 결과(Fig. 6), 52번 획분부터 77번 분획까지 활성이 검출되었으며, 56-56 획분 및 57-66 획분까지 비교적 높은 TGase 활성을 보였다. 이 중 단백질 양이 높은 57-66번의 획분을 한외여과(10,000 Da)하고 0.1 N NaCl, 1 mM EDTA 및 0.1 mM DTT를 포함하는 10 mM Tris-HCl (pH 7.7)에 하룻밤 투석하고 Superdex 200 prep grade 칼럼(1.6x60 cm)에서 젤 크로마토그래피하였다(Fig. 7). 젤 크로마토그래피 결과 TGase의 활성 피크와 단백질 농도 피크가 완전히 일치하지 않는 것에 미루어 TGase는 순수하게 정제되지 않은 것으로 추정된다. 2회의 이온교환크로마토그래피와 1회의 젤 크로마토그래피를 통해 부분 정제한 TGase의 순도는 조 효소에 비하여 약 1895배 정제되었으며, 수율은 1.3%였다 (Table 1). Q-Sepharose와 S-Sepharose 크로마토그래피로 정제한 북양명태 간에서 얻은 transglutaminase의 분자량은 SDS-polyacrylamide 전기영동 상에서 약 77 kDa의 분자량을 나타내었고, 단백질 수율과 정제도는 0.02%와 591배라고 보고한 것(Kumazawa et al., 1996)에 비하여 수율과 정제도는 높았다.

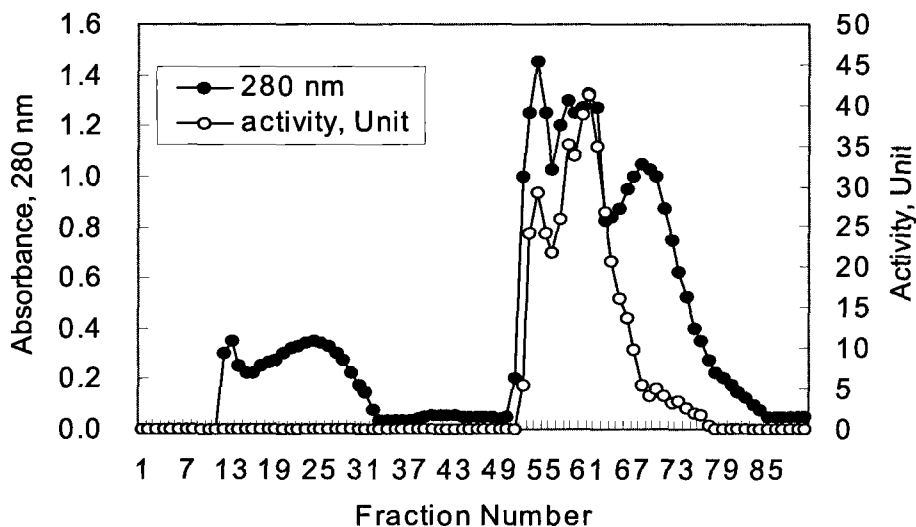


Fig. 6. The 2 nd DEAE-Sepharose column (2.6x35 cm) chromatogram of active fraction from 1st DEAE-Sepharose chromatography. The protein was eluted in TEND buffer (pH 8.3) through a gradient 0-0.5 M NaCl. Flow rate and fraction volume were 1 mL/min and 5 mL, respectively.

DE-52 cellulose 칼럼 상에서 오징어와 가리비 TGase는 어류의 TGase에 비하여 낮은 염농도 균배인 0.16-0.12 M NaCl에서 용출되는 것에 미루어 어류와 무척추 동물 TGase 사이에 정전기적 특성에 차이가 있다고 하였고, Sephacryl S 300을 통한 겔 여과 크로마토그래피의 결과 어류와 무척추 동물 TGase는 분자량 80-100 KDa에 상당하는 비슷한 위치에서 용출하여 잉어, 무지개 송어, 전갱이, 오징어, 가리비 및 botan 새우의 분자량은 비슷한 것으로 보고하였다(Nozawa et al., 1997). 굴의 아가미와 mantle에 전체 TGase 활성의 73%가 검출되는 것에 미루어(Kumazawa et al., 1997), 본 연구에서 사용한 내장을 포함한 전체 굴의 TGase 정제는 상대적으로 많이 포함된 단백질획분으로 인하여 오염의 가능성이 더 큰 것으로 추정된다.

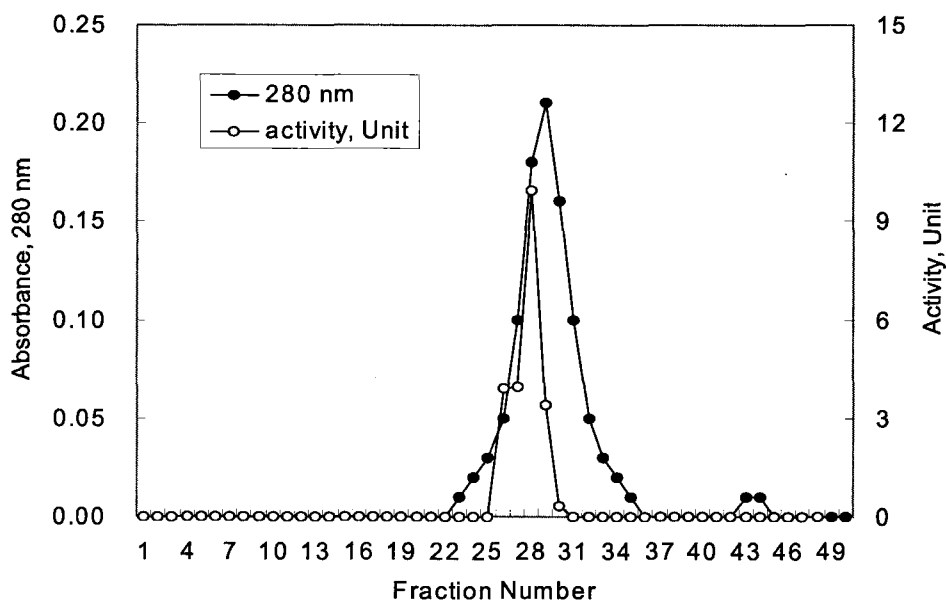


Fig. 7. The Superdex 200 prep column(1.6x60 cm) chromatogram of active fractions from 2-DEAE Sepharose column. The protein was eluted with 10 mM Tris (pH 7.7) containing 0.1 N NaCl, 1 mM EDTA and 0.1 mM DTT. Flow rate and fraction volume were 1 mL/min and 3 mL, respectively.

Table 1. Purity and yield with purification step of TGase from oyster

Step	Protein (mg/mL)	Volume (mL)	Total protein (mg)	Activity (unit)	Specific activity (Unit/mg)	Purity	Yield (%)
Extract	1.99	65	129.35	98.20	0.02	1	100
1st DEAE-ion exchange	0.69	42	29.15	185.26	6.36	424	22.5
2 nd DEAE-ion exchange	2.10	3.7	7.78	102.41	13.16	658	6.0
Superdex	0.77	3.2	2.46	69.94	28.43	1895	1.9

### Subunit의 조성

부분 정제한 TGase는 SDS-PAGE 상에서 5개의 단백질 띠가 검출되었다 (Fig. 8). 이 같은 결과는 정제한 TGase가 다른 단백질에 의해 오염되어 있을 가능성을 제시한다. 최종적으로 Superdex prep 200 column에서 젤 크로마토 그래피한 결과에서도 TGase의 활성 피크와 280 nm에서 측정된 단백질 흡분의 피크가 일치하지 않는 것에 미루어 추정할 수 있다. Red sea bream의 간(Yasueda et al., 1994), 북양명태 간(Kumazawa et al., 1996)의 TGase는 모두 단량체로서 분자량은 각각 78 kDa과 77 kDa에 해당하였고, 굴에서 단리한 TGase-1과 TGase-2의 분자량은 각각 84 kDa과 90 kDa에 해당하였다 (Kumazawa et al., 1997). 그러나 TGase는 자원에 따라 단량체, 이량체 혹은 4량체로 존재할 수 있으며, 혈장 factor XIII은 2개의 이량체 형으로 해리할 수 있는 4량체의 zymogen 형태로 존재하며 이들 이량체 중 하나가 TGase 활성을 나타낸다(Folk, 1983). TGase는 원형질의 가용성 효소 (type II)(Folk and Chung, 1973)이거나 lysosome 혹은 미토콘드리아 (Slife et al., 1985; Juprelle-Soret et al., 1984)의 둘 중 하나이다. 본 연구에서는 TGase 추출을 위한 시료로 굴 전체를 마쇄하여 사용했기 때문에 TGase의 기원인 기관을 확실히 추정할 수 없었다.

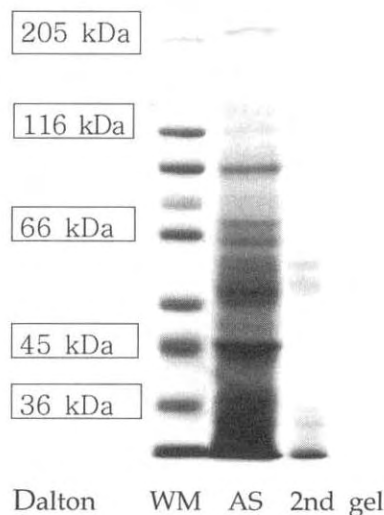


Fig. 8. SDS-PAGE pattern of ammonium sulfate fraction(AS) and partial purified TGase from oyster. WM indicated wide range marker protein. SDS-PAGE was performed in 10% separate polyacrylamide gel.

### 최적 pH와 온도

20-80% 포화 ammonium sulfate 획분은 pH 8.5, 부분 정제한 TGase는 pH 9.0에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 9). 이 같이 정제도에 따라 최적 pH가 다소 다르게 나타나는 것은 잔존하는 다른 단백질 화합물에 기인하기 때문으로 판단된다. 가장 높은 활성을 나타내는 온도도 두 획분 사이에 다소 차이를 보여 포화 ammonium sulfate 획분은 55 °C에서 가장 높은 활성을 보인 반면, 부분 정제한 TGase는 45-55 °C 사이에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 10). 본 연구의 결과는 잉어와 가리비 TGase의 최적 pH는 8.0(Nozawa et al., 1997), red sea bream의 간(Yasueda et al., 1994), 북양명태 간(Kumazawa et al., 1996), 일본 굴(Kumazawa et al., 1997)의 최적 pH와 온도는 각각 9.0, 55 °C, 9.0과 50 °C, 8.0과 40 °C라고 보고한 것과 비교할 때 거의 차이를 보이지 않는다. Ammonium sulfate 획분이 다소 높은 최적 온도를 보이는 것은 혼재하는 알칼리 단백질분해효소의 최적 온도에 의한 영향인 것으로 추정된다.

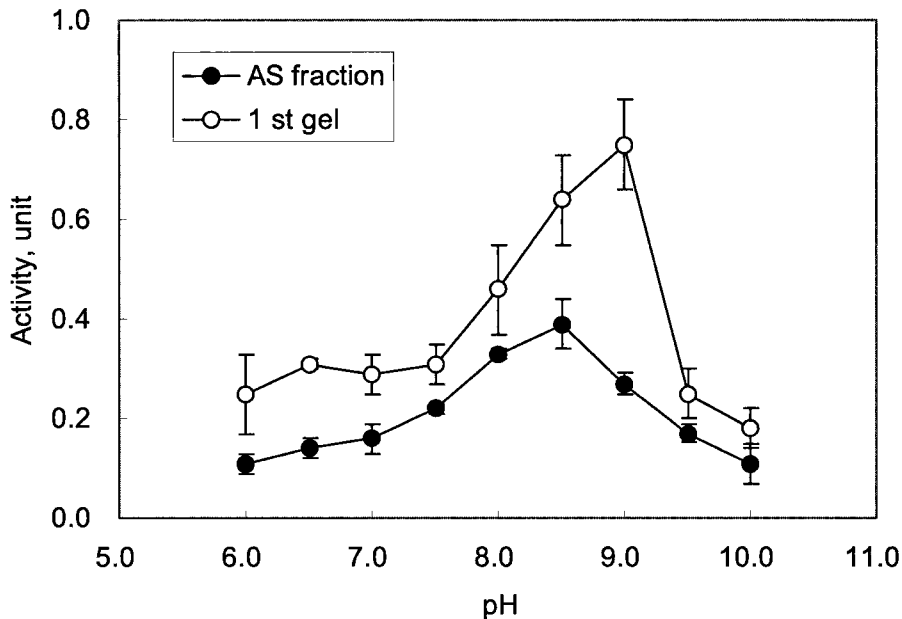


Fig. 9. The optima pH of saturated ammonium sulfate fraction and partial purified TGase. The buffer used in the reaction mixtures; 0.25 M sodium phosphate(pH 6.0-7.0), 1 M Tris-HCl (pH 7.0-9.0) and 1 M glycine-NaOH (pH 9.0-10.0).



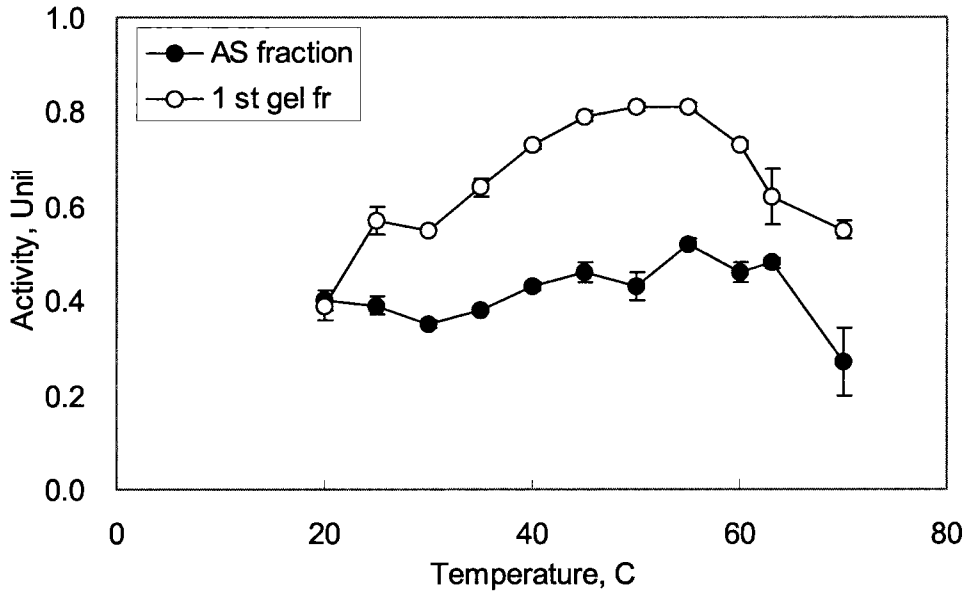


Fig. 10. The optima temperature of saturated ammonium sulfate fraction and partial purified TGase .

#### 열안정성

부분 정제한 TGase의 열안정성은 각 온도에서 30분 동안 가열 변성시킨 후 최적 pH와 온도에서 활성의 변화를 측정하였다. 부분 정제한 TGase는 55 °C에서 약 50%의 활성의 소실을 보였으며, ammonium sulfate 획분은 이보다 다소 높은 온도인 60 °C에서 활성의 약 60%를 소실하였다(Fig. 11). Ammonium sulfate 획분의 열 안정성이 부분정제 TGase에 비하여 다소 높은 것은 혼재한 단백질에 의한 열 변성 보호 효과에 기인하는 것으로 판단된다. 북양명태 간 TGase를 40 °C에서 항온할 때 활성은 항온 시간 증가와 함께 감소하며, Ca<sup>2+</sup> 이온이 있을 때 10분 항온 후 활성은 검출되지 않는 반면 Ca<sup>2+</sup>이온이 없을 때 활성의 50%가 잔존하여 실험의 정도는 Ca<sup>2+</sup> 이온에 존재에 큰 영향을 받는다(Kumazawa et al., 1996).

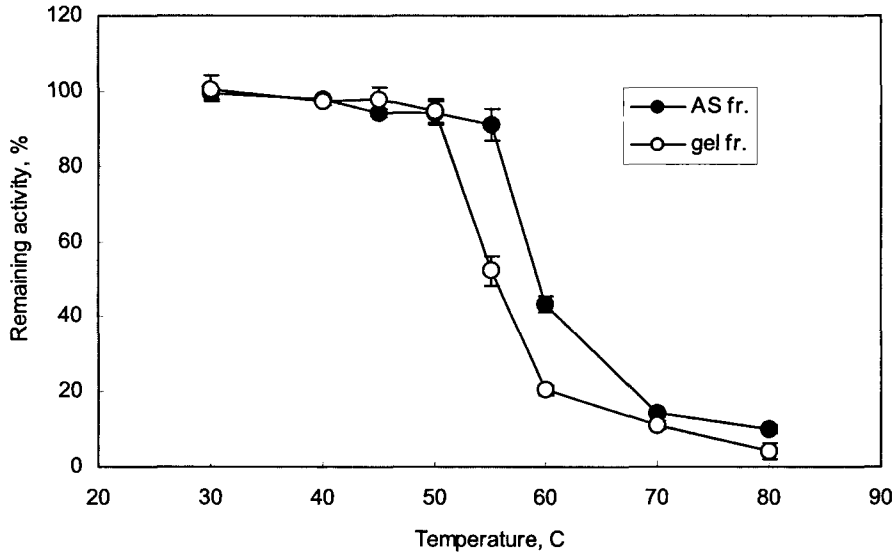


Fig. 11. Thermal stability of saturated ammonium sulfate fraction and partial purified TGase from oyster. The active fraction was denatured during 30 min at indicated temperature.

### Ca<sup>2+</sup> 및 NaCl 농도의 영향

포화 ammonium sulfate 획분과 부분 정제한 TGase는 1 mM에서 10 mM의 CaCl<sub>2</sub> 농도까지 활성이 증가하였으나, 10 mM 이상의 농도에서는 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 12). 그러나 활성의 감소 속도는 부분 정제한 TGase가 ammonium sulfate 획분에 비하여 큰 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 ammonium sulfate 획분에 포함된 다른 단백질의 방해에 기인한 것으로 보인다. 굴에서 얻은 TGase-1은 100 mM 까지 CaCl<sub>2</sub>의 농도 증가와 더불어 활성이 증가하였지만, TGase-2의 완전한 활성에 필요한 농도는 25 mM로서(Kumazawa et al., 1997), 본 연구의 10 mM과 비슷한 수준의 Ca<sup>2+</sup> 의존성을 보였다. 가리비 TGase는 Ca<sup>2+</sup> 의존성이며, pCMB, N-ethylmaleimide, Cu<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup> 이온에 의해 크게 불활성화한다고 보고하였다(Nozawa and Seki, 2001).

부분 정제한 TGase는 NaCl의 농도에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타난 반면, 포화 ammonium sulfate 획분은 NaCl 농도 증가와 더불어 TGase의 활

성도 증가하여 0.2 M NaCl 농도에서 TGase 활성은 NaCl이 없을 때에 비하여 약 2배 증가하였다 (Fig. 13). 해산 패류 TGase의 비활성은 종에 따라 차이가 있으나 담수산 패류는 NaCl 농도 증가와 더불어 효소활성이 감소한 반면, 해산 패류는 활성화 되는 현상을 보여(Nozawa et al., 2001), 본 연구의 부분 정제 TGase와 상반된 결과를 보였다. 해산 무척추동물의 TGase 활성이 어육의 TGase에 비하여 NaCl 혹은 KCl같은 염의 첨가에 의해 크게 증가하는 것은 효소의 구조 및 기능적 차이 때문으로 추정하고 있다(Nozawa et al., 1999). 그러나 굴에서 얻은 TGase-1은 활성이 NaCl의 농도 증가와 더불어 증가하는 반면 TGase-2는 저해된다고 하였다(Kumazawa et al., 1997). 이 같은 보고에 비추어 본 연구의 TGase는 TGase-2와 유사한 특성을 가지는 것으로 추정된다. 한편 기질을 포함시키지 않고 0.5 M NaCl에서 항온한 경우 활성은 감소하고 NaCl에 의해 불활성화한 효소는 염농도를 희석하여 부분적으로 회수됨에 미루어 NaCl-유도 불활성화 과정이 가역적임을 시사하였다 (Nozawa and Seki, 2001).

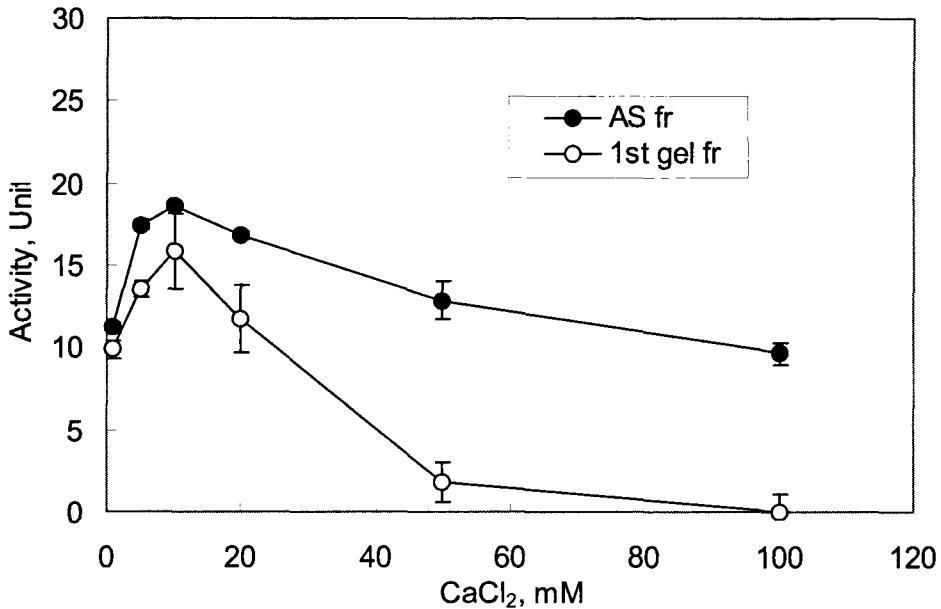


Fig. 12. Effect calcium chloride concentration on TGase activities of saturated ammonium sulfate fraction and partial purified TGase from oyster.

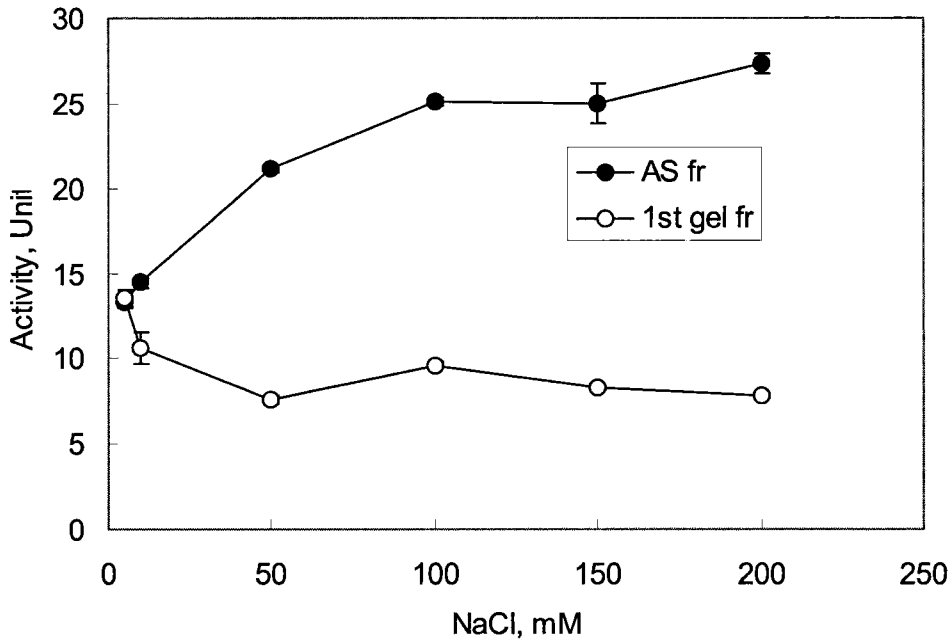


Fig. 13. Effect of sodium chloride concentration on activities of saturated ammonium sulfate fraction and partial purified TGase from oyster.

#### 요약

개조개, 굴, 꼬막, 바지락, 백합, 비단가리비, 소라, 홍합과 돌담치 수용성 추출물의 transglutaminase 비활성을 측정하여 비교하고, 굴의 transglutaminase를 20-80% 포화 ammonium sulfate, 2회의 DEAE-Sepharose 이온교환 크로마토그래피와 Superdex 200 prep grade 젤 크로마토그래피로 정제하였다. 정제한 효소의 수율은 1.9%였고, 정제도는 1895배였다. N,N'-dimethylated 카제인에 대한 monodansyl cadaverine 병합의 최적 pH 와 온도는 각각 9.0과 45 °C였다. Transglutaminase는 55 °C에서 30분 동안 가열했을 때 활성의 약 50%를 소실하였다. 부분 정제한 transglutaminase는 10 mM의 CaCl<sub>2</sub>에서 가장 높은 활성을 보였고, 그 이상의 농도에서는 감소하였다. NaCl 농도는 10 mM까지 효소 활성이 감소하였으나, 50 mM-200 mM 농도에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

## 참고문헌

- Babiker EFE, Khan MAS, Matsudomi N, Kato A. 1996. Polymerization of soy protein digests by microbial transglutaminases for improvement of the functional properties. *Food Research International* 29: 627-634.
- Boros S, Kamps B, Wunderink L, de Bruijn W, de Jong WW, Boelens WC. 2004. Transglutaminase catalyzes differential crosslinking of small heat shock proteins and amyloid- $\beta$ . *FEBS Letters* 576: 57-62.
- Flanagna J, FitzGerald RJ. 2003. Functional properties of *Bacillus* proteinase hydrolysates of sodium caseinate incubated with transglutaminase pre- and post-hydrolysis. *Inetrantional Dairy Journal* 13:135-143.
- Folk JE. 1983. Mechanism and basis for specificity of transglutaminase catalyzed  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine bond formation. *Adv Enzymol* 54: 1-56.
- Folk JE, Chung SI. 1973. Molecular and catalytic properties of transglutaminase. *Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol* 38: 109-191.
- Juprelle-Soret M, Simone WC, Wattiaux R. 1984. Presence of transglutaminase activity in rat liver lysosomes. *Eur J Cell Biol* 34: 271-280.
- Kumazawa Y, Nakanishi K, Yasueda H, Motoki M. 1996. Purification and characterization of transglutaminase from Walleye pollack liver. *Fisheries Science* 62: 959-964.
- Kumazawa Y, Sano K-I, Seguro K, Yasueda H, Nio N, Motoki M. 1997. Purification and characterization of transglutaminase from Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J Agric Food Chem* 45: 604-610.
- Laemmli UK., 1971. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-275.
- Nakahara C, Nozawa H, Seki N. 1999. A comparison of cross-linking of fish myofibrillar proteins by endogenous and microbial

- transglutaminases. *Fisheries Science* 65: 138-144.
- Nozawa H, Mamegoshi S-I, Seki N. 1997. Partial purification and characterization of six transglutaminase from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 118B: 313-317.
- Nozawa H, Mamegoshi S-I, Seki N. 1999. Effect of neutral salts on activity and stability of transglutaminase from scallop adductor muscle. *Comp Biochem Physiol* 124 B: 181-186.
- Nozawa H, Mori T, Seki N. 2001. Different effects of NaCl on activities of transglutaminases from marine and freshwater shellfish muscles. *Fisheries Science* 67: 383-385.
- Nozawa H, Seki N. 2001. Purification of transglutaminase from scallop striated adductor muscle and NaCl-induced inactivation. *Fisheries Science*. 67: 493-499.
- Park S-H, Cho S-Y, Kimura M, Nozawa H, Seki N. 2005. Effect of microbial transglutaminase and starch on the thermal gelation of salted squid muscle paste. *Fisheries Science* 71: 896-903.
- Ramirez-Suarez JC, Xiong YL. 2002. Transglutaminase cross-linking of whey/myofibrillar proteins and the effect on protein gelation. *J Food Sci* 67: 2885-2891.
- Seguro k, Kumazawa Y, Ohtsuka T, Toiguchi S, Motoki M. 1995. Microbial transglutaminase and  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine crosslink effects on elastic properties of Kamaboko gels. *J Food Sci* 60: 305-311.
- Seki N, Uno H, Lee N-H, Kimura I, Toyoda K, Fujita T, Arai K-I. 1990. Transglutaminase activity in Alaska pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin B. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 125-132.
- Slife CW, Dorsett DM, Bouguett GT, Taylor E, Coroy S. 1985. Subcellular localization of a membrane-associated transglutaminase activity in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 241: 329-336.
- Tokunaga F, Iwanaga S. 1993. Horseshoe crab transglutaminase. In *Methods in Enzymology*, vol 223: Proteolytic enzymes in

- coagulation, fibrinolysis, and complement activation part B, L. Lorand and KG. Mann (Eds.), Academic press, Inc., New York, p. 378-388.
- Yasueda H, Kumazawa H, Motoki M. 1994. Purification and characterization of a tissue type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). *Biosci Biotech Biochem* 58: 2041-2045
- Wan J, Seki N. 1992. Effects off salts on transglutaminase-mediated cross-linking of myosin in suwari gel from walleye pollack. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 2181-2187.
- Whitaker JR. 1963. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal Chem* 35: 1950-1953.

## 제 2 절 패각 단백질의 단백질분해효소 저해효과

### Abstract

The protease inhibitor was investigated in oyster shell. The crude protein of oystershell was 0.8%, and oyster shell was composed of 97.15% calcium oxide. The fraction under 10 kDa had higher protease inhibitor, compared with the fraction above 10 kDa in acetic acid soluble fraction. It was more effective against bromelain inhibition. The antimicrobial and hepatic toxicity were not observed in protease inhibitor fraction and calcium acetate. The acetic acid soluble fraction did not protect ultra-violet ray. The results suggested that partial purified acetic acid soluble fraction had a potential ability as food ingredient for protease inhibition.

### 서론

단백질 분해효소 저해제는 생물체 내에서 여러 가지 생명 현상에 관여하는 단백질 분해효소의 생물학적 기능의 분석에 유용하게 사용되며, 여러 조직과 세포에 존재하는 단백 분해효소의 유형 확인과 비정상적인 단백질 분해를 방지함으로써 암 전이의 방지, 양식 어류의 패혈증 치료제와 같은 의약품으로 활용 가능성이 기대되고 있다.

패각은 nanoscale의 규칙성과 강도를 보이는  $\text{CaCO}_3$ 와 유기 단백질의 혼합물에 의해 mineralize되어 있다. 유기물질로서 단백질은 biomineralized 혼합물질 중량의 1-5%에 불과하지만, 단백질들은 혼합물의 organization에 책임이 있고  $\text{CaCO}_3$  결정의 강도를 증강시킨다. 최근 패각 유기 matrix 단백질의 cloning에 대하여 여러 연구가 이루어 지고 있지만(Sudo et al., 1997; Miyashita et al., 2000; Samata et al., 1999), 확인되지 않은 성분들도 패각에 있는 것으로 보인다. 연체동물의 패각은 각피층, 능주층, 진주층으로 나뉘며, 각피층은 껍질의 맨 바깥층을 덮고 있는 비석회 조직으로 다당류와 단백질이 주성분이다. 한편 능주층과 진주층은  $\text{CaCO}_3$ 가 주성분인 석회화 조직으로 안쪽의 진주층은 단백질이 많다. Chonchiolin은 패각과 진주에 들어있는 단백질을 뜻하며, 최근에는 화장품 소재나 항종양제로 사용하고 있다(변과 전, 1994).



연간 280,000톤의 굴폐각이 발생하고 있으나, 이중 180,000톤은 채묘기, 폐화석 비료등으로 재활용하고 있으며, 굴 폐화석 비료의 연간 처리능력은 120,000톤 이상이나 제품 판매의 부진으로 실제 처리량은 40,000톤 수준이다(이, 2004). 그러나 식품 첨가소재 혹은 식품 가공을 위한 소재에 관한 연구로는 가리비 폐각의 생리활성 성분에 관한 연구(Liu et al., 2004)를 제외하고 거의 이루어지지 않다(최, 2004).

본 연구는 굴 폐각에 있는 유효성분을 이용할 목적으로 굴 폐각의 무기질 조성과 단백질 분해효소 저해제를 부분 정제하여 이들의 저해효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

경남 통영 근해에서 생산된 굴의 폐각을 수집하여 철재솔로 폐각에 붙어있는 이물질을 제거하고 수도수로 세척한 다음 실온에서 건조하였다. 건조한 폐각을 소형 절구에서 미세한 크기로 파쇄한 후 pot mill(한국과학진흥상사, 한국)에 넣어 24시간 분쇄하였다. 분쇄된 폐각은 체를 이용하여 200 mesh 이하의 분말을 회수하여 분석에 사용하였다.

### 폐각 성분의 추출

굴 폐각 분말(200 mesh 이하) 150 g에 5% acetic acid 1.5 L를 가하여 저어주면서 하룻밤 동안 가용성 성분을 추출하고 원심분리(6,000 x g, 20분, SUPRA 22K, Hanil, Korea)하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액을 250 mL 용량의 Amicon stirrer cell (Amicon Co, MW cut-off, 10 kDa)에서 한외여과하고 농축물은 탈이온수에 대하여 하룻밤 투석하여 초산을 제거하고 분자량 10 kDa 이상의 물질(Oys-1)로 사용하였다. 농축 여과액은 40 °C에서 감압 농축하고, 농축 중에 발생한 흰색의 결정은 원심분리(6,000 x g, 20 min)하여 상층액은 분자량 10 kDa 이하의 물질(Oys-2)로 사용하고, pellet은 105 °C의 오븐에서 건조하여 초산칼슘으로 사용하였다. 5% acetic acid로 추출한 후 원심분리하여 얻은 pellet에 300 mL의 methanol을 첨가하여 저어주면서 2 시간 추출하고 원심분리(6,000 x g, 20 min)하여 얻은 상층액을 다시 분자량 500 Da에서 한외여과하고 농축물은 탈이온수에 대하여 하룻밤 투석(분자량 100)하여 methanol 추출물(Oys-3)로 사용하였다. 탈이온수에 대하여 하룻

밤 투석하여 얻은 Oys-1은 20 mM Tris-HCl (pH 8.3)으로 평행시킨 HiLoad Q-Sepharose 칼럼(2.6x30 cm)에서 1 M NaCl로 선형 균배하여 단백질 획분을 용출하고, 용출한 단백질의 단백질 분해효소 저해활성은 azocasein을 기질로 하여 시판 bromelain(B4882, Sigma Chemical Co, St Luis, MO)에 대한 저해 효과로 측정하였다.

#### 일반성분과 무기원소의 측정

수분함량은 가열 건조법, 단백질 함량은 semimicro-Kjeldahl법, 회분은 건식회화법으로 측정하였다. 무기원소는 X-선 형광분석기(XRF-1700, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다.

#### 단백질 분해효소활성 및 저해활성의 측정

효소 활성은 25 °C에서 온도 평행시킨 250 uL의 2% azocasein 용액(0.03 M potassium phosphate, pH 7.5)과 150 uL의 0.2%의 bromelain,  $\alpha$ -chymotrypsin 및 trypsin을 가하고 25 °C의 항온수조에서 15분 동안 반응시킨 후, 1.2 mL의 10% trichloroacetic acid를 첨가하여 가수분해반응을 중지하였다. Azocasein이 완전히 침전하도록 얼음물에 15분 동안 방치한 후 Eppendorf 원심분리기(5415C, CE, USA)로 10,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 1.4 mL의 1.0 N NaOH를 포함하고 있는 시험관에 상층액 1 mL를 가하고 20분 후 분광광도계(UV-1700, Shimadzu Ltd, Kyoto, Japan)로 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해활성은 추출물과 효소용액(20 mg/mL)를 1:1 (v/v) 혼합하여 25 °C에서 30분 동안 항온하여 효소와 저해제를 충분히 반응시킨 후, 효소 활성측정 방법에 따라 활성을 측정하였다. 저해활성은 저해제를 사용하지 않았을 때의 활성에 대한 저해제 첨가시의 활성을 %로 표시하였다. 시판 단백질분해효소 측정 시 완충액 용매 조건은 bromelain은 worthington manual(1988), trypsin은 Erlanger et al.(1961),  $\alpha$ -chymotrypsin은 Hummel(1959)의 방법에 따랐다.

#### 항균활성의 측정

항균 활성은 paper disc법(Abdel-Baret et al., 1987)으로 측정하였다. 실험용 평판 배지에 tryptic soy agar 20 mL를 분주하여 건조시키고, 각 균주 (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella tryphimurium*, *Escherichia coli* 및 *Vibrio*

*parahaemolyticus*) 배양액 100 uL 씩을 분주하고 도말하였다. 이어 시료 용액을 멸균된 disc (8 mm, Toyo Seisahusho Co.)에 40 uL 씩 흡수 건조시켜 plate 표면에 붙인 다음 37 °C에서 24-48 시간 배양한 후 disc 주위에 생성된 clear zone을 측정하여 직경(mm)으로 항균활성을 표시하였다.

#### 세포독성과 자외선 조사 효과의 측정

96 well plate에 정상간세포를 100 uL 씩 분주하고 37 °C의 CO<sub>2</sub> 항온기에서 2시간 항온하여 안정시킨 다음, 100 uL의 MTT 용액 2.5 mg/mL를 가하였다. 다시 CO<sub>2</sub> 항온기에서 3시간 안정시킨 후 MTT assay를 실시하였다. 50 uL의 DMSO를 50 uL 씩 분주하고 항온기에서 30분 안정시킨 후 Elisa reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자외선 차단 효과는 자외선 조사 후 생존 세포의 수로 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 일반성분과 무기성분

분쇄한 굴 패각 분말의 수분은 1.1%로 극히 낮았고, 조단백질 0.8%, 조회분 96.9%로서 대부분이 조회분으로 구성되어 있었다(Table 1). 이 같은 결과는 진주 패각의 조단백질과 조회분이 각각 3.5%와 93.4%인 것에 비추어 단백질 함량은 낮은 반면, 회분의 함량은 높았다.

Table 1. Proximate composition of oyster and pearl shell (unit;%)

Shell	Moisture	Crude protein	crude ash
Oyster	1.1±0.0	0.8±0.0	96.9±0.3
Pearl oyster	1.1±0.0	3.5±0.1	93.4±0.4

굴 패각에서 단백질 분해효소 저해제를 추출하는 동안 부수적으로 얻은 초산칼슘의 조성을 분석하였다. 굴 패각 150 g에서 얻은 초산칼슘의 함량은 33.8 g로 건조물의 수분함량은 2.4%였다. 따라서 고형물 함량으로 계산한 초산칼슘의 수율은 22.3%로서 비교적 높은 회수율을 보였다. 회수한 초산칼슘의 조성을 분석한 결과 (Table 2), 10종의 무기성분으로 이루어져 있었고, Ca 이온이 전체의 97.15%로 대부분을 차지하고 있었다. 다음으로는 Cl 이온>Na

이온>Sr 이온> SO<sub>3</sub> 이온의 순으로 많았다. 굴 패각 비료는 수분 함량이 0.5%, 유기물과 무기물의 함량은 5.7%와 93.8%이고, 무기물 중에서 CaCO<sub>3</sub>가 80.2%를 차지한다고 보고하여 (최, 2004) 본 연구의 결과보다 다소 낮았다. 이 같은 결과는 굴 패각 비료를 제조하기 위해 700 °C에서 15-20분 동안 소성하는 공정을 거쳐 분석 대상의 시료에 차이가 있기 때문인 것으로 보인다.

Table 2. Mineral composition of calcium acetate from oyster shell (unit; %)

Mineral	Amount	Mineral	Amount
CaO	97.15	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.05
Cl	1.38	K <sub>2</sub> O	0.05
Na <sub>2</sub> O	0.60	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.03
SrO	0.35	Br	0.02
SO <sub>3</sub>	0.34	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.01

#### 단백질 분해효소 저해제의 정제와 저해활성

굴 패각 분말 150 g을 사용하여 5% acetic acid로 가용성 성분을 추출하여 10 kDa의 한외여과막으로 농축하고 탈 이온수에 대하여 하룻밤 투석한 투석물의 총부피는 45 mL, 단백질 농도는 0.261 mg/mL로 총단백질 함량은 11.75 mg에 해당하였다. 이 같은 결과는 시료 중 조단백질의 함량이 1200 mg인 것에 미루어 약 1%에 상당하는 단백질이 5% acetic acid에서 용출되었음을 뜻한다. 농축한 단백질을 HiLoad Q-Sepharose (2.6x 10 cm)에 loading 하고 20 mM Tris-HCl (pH 8.3)의 완충액으로 0-1.0 M NaCl로 선형 균배하여 단백질을 분리하였다 (Fig. 1).

이들 단백질획분을 회수하여 azocasein을 기질로 시판 bromelain (B4882, Sigma), trypsin (T8003, Sigma) 및 chymotrypsin (C4129, Sigma)에 대한 저해효과를 측정하였다. 단백질 분해효소 활성 저해는 분자량 10 kDa 이상의 부분 정제한 단백질획분에 비하여 10 kDa 미만의 여과액이 성분이 더 큰 효과를 나타내었다 (Fig. 2). 10 kDa 이상의 부분정제물은 bromelain에 대하여 약 50%의 저해효과를 보였고, 10 kDa 이하의 물질은 serine 계열의 단백질 분해효소인 trypsin과 cysteine 계열의 단백질 분해효소인 bromelain을 각각

87.3%와 88.6%까지 저해하였다. chymotrypsin의 잔여활성은 34.7%였다. 그리고 5% acetic acid로 추출한 후의 잔사물을 methanol로 추출한 추출물은 trypsin 활성을 완전히 저해하는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 5% acetic acid 추출물 중 분자량 10 kDa 이하의 물질은 cysteine 계열의 단백질분해효소 저해제로서 잠재적인 가능성을 제시한다.

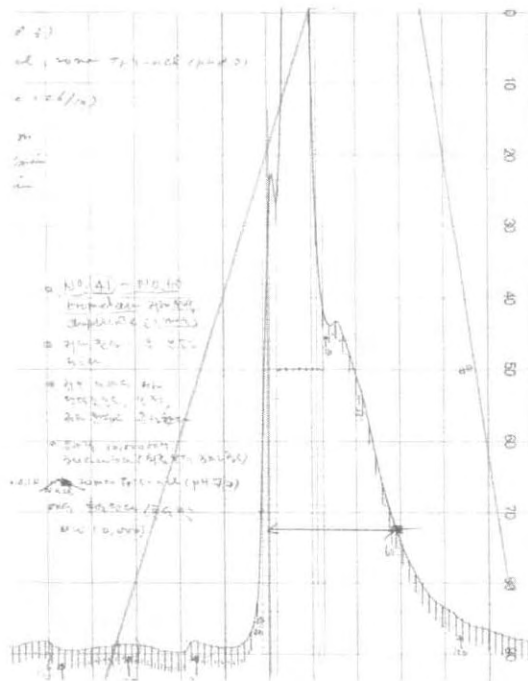


Fig. 1. HiLoad Q-Sepharose chromatogram of concentrated extract with 5% acetic acid from powdered oyster shell. Protein was detected at 280 nm. Flow rate and fraction volume were 1 mL/min and 3 mL, respectively.

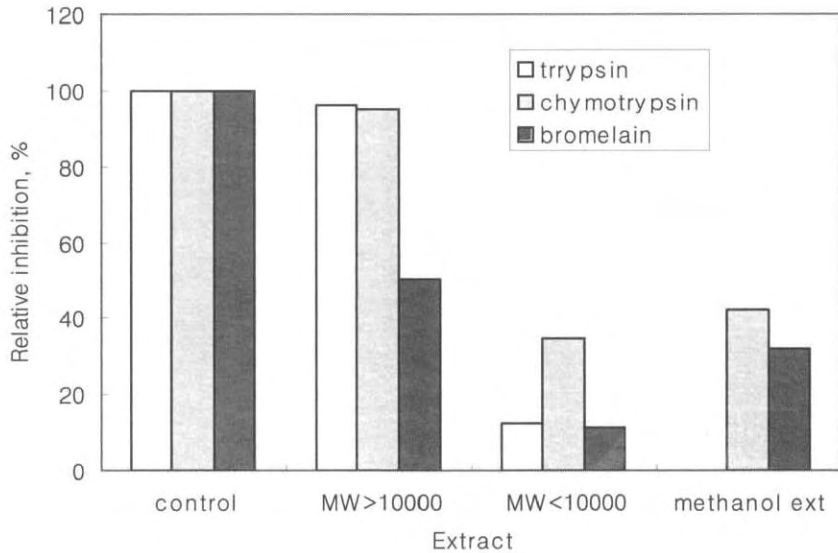


Fig. 2. Effect of protease inhibition of extract from oyster shell.

#### 항균 효과와 세포독성

3% 글 초산 칼슘과 단백분해효소 저해제는 *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Samonella typhimurium* 및 *Vibrio parahaemolyticus*에 대하여 항균 효과를 보이지 않았으며(Table 3), 단백질 분해효소 저해제는 희석비 10-1000배의 범위에서 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 3). 이 같은 결과는 단백질 분해효소 저해제가 안전함을 뜻한다. 우렁쉥이에서 브롬을 함유하는 펩티드 계열의 halocyanine의 항균성이 확인되었으며(Azumi et al., 1990), 수 종류의 원색동물에서 sulfate 계의 항균성 물질이 보고되어 있으나(Tsukamoto et al., 1994), 항균 활성을 보이는 단백질로는 transferrin, immunoglobulin, ovoglobulin 등이 있으나 대체로 단백질은 세포독성과 항균 활성을 보이지 않는다고 보고하였다(Stopforth et al., 2005).

Table 3. Antimicrobial effect of protease inhibitor and calcium acetate from oyster shell on some bacteria

Bacteria	Protease inhibitor	Methanol fraction	Calcium acetate
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND
<i>Salmonella typhimurium</i>	ND	ND	ND
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ND	ND	ND

ND; not detected

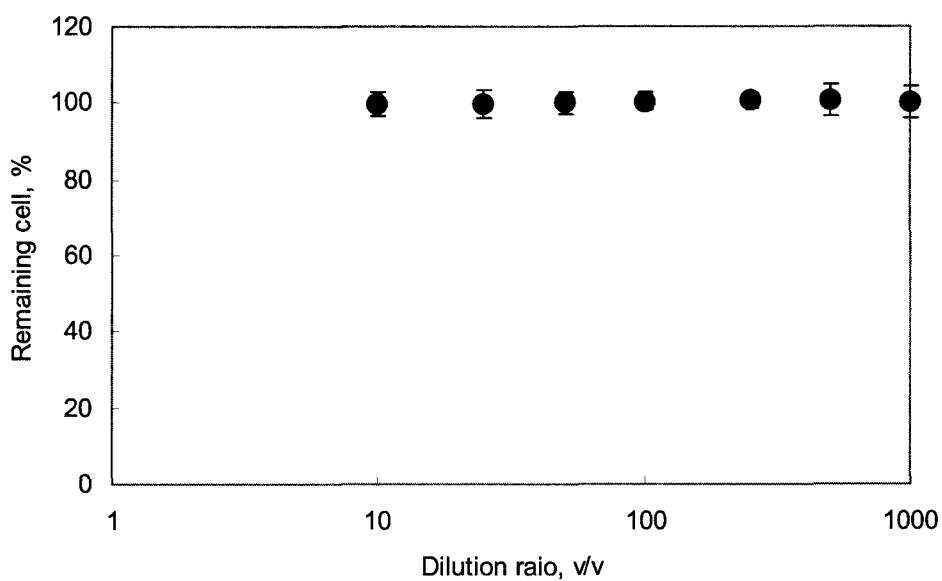


Fig. 4. Toxic effect of protease inhibitor on liver cell.

## 요약

굴 패각 분말의 조단백질 함량은 0.8%였으며, 굴패각에서 얻은 calcium acetate는 CaO가 전체의 97.15%를 차지하였다. acetic acid 가용성 획분 중 분자량 10 kDa 이하의 획분이 10 kDa 이상의 획분에 비하여 높은 단백질 분해효소 저해효과를 보였으며, 특히 bromelain의 저해에 효과적이었다. 단백질 분해효소 저해제와 calcium acetate에서 세균에 대한 항균 활성과 간세포 독성은 관측되지 않았다. 그리고 acetic acid 추출물의 자외선 차단 효과도 관측되지 않았다. 굴 패각에서 부분 정제한 acetic acid 추출물은 단백분해효소 저해제로서의 잠재적인 가능성을 가지는 것으로 보인다.



## 참고문헌

- Abdel-Baret N, Harris ND, Rill RL. 1987. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. J Food Sci 52: 411-415.
- Azumi K, Yoosawa H, Ishii S-I. 1990. Halocyamines: Novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia rozetzi*. Biochemistry 29: 159-165.
- Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives Biochem Biophys 95: 271-278.
- Hummel BCW. 1959. modified spectrophotometric determination of cymotrypsin, trypsin and thrombin. Can J Biochem Physiol 37: 1393-
- Liu YC, Uchiyama K, Natsui N, Hasegawa Y. 2004. Biological activities of the components from scallop shells. In More efficient utilization of fish and fisheries products, M Sakaguchi (Ed.), Elsevier, N.Y. p 233-241.
- Miyashita T, Taiaha R, Okushima M, Nakano S, Miyamoto H, Nishikawa E, Matsushiro A. 2000. Complementary DNA cloning and characterization of pearlins a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. Mar Biotechnol 2: 409-418.
- More S, Stein WH. 1948. Photometric ninhydrin method. j Biol Chem 176: 367- .
- Samata T, Hayashi N, Kono M, Hasegawa K, Horita C, Akera S. 1999. A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. FEBS Lett 462: 225-229.
- Stopforth JD, Skandamis PN, Davidson PM, Sofos JN. 2005. Naturally occurring compounds-animal sources. In Antimicrobials in food , PM Davidson, JN Sofos and AL Branen (3d Ed.), Taylor & Francis, NY., p 453-505.
- Sudo S, Kujikawa T, Nagakura T, Okubo T, Sakaguchi K, Tanaka M,

- Nakashima K, Takahashi T. 1997. Structure of mollusc shell framewok proteins. *Nature* 387: 563-564.
- Tsukamoto S, Kato H, Hirota H, Fusetani N. 1994. Antibacterial and antifungal sulfated alkane and alkenes from the hepatopancreas of the ascidian *Halocynthia Roretzi*. *J Nat Prod* 57: 1606-1609.
- Wede I, Altindag ZZ, Widner B, Wachter H, Fuchs D. 1998. Inhibition of xanthine oxidase by pterins. *Free Rad Res* 29: 331-338.
- Worthington CC. 1988. *Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals*. Worthington Biochemical Co, Freehold, NJ, USA. p 320-325.
- 변재형. 전중균. 1994. 수산이용화학, 수학사, 서울, p 272-274.
- 이종훈. 2004. 굴 패각의 생산 및 처리현황. 굴 패각의 활용과 제도개선 방안 심포지움 별책, 통영, p 4-12
- 최광수. 2004. 굴 패각 재활용의 연구현황 및 전망. 굴 패각의 활용과 제도 개선 방안 심포지움 별책, 통영, p 29-81

## 제 2 장 굴 부분 가수분해물의 제조와 기능성 확인

### 제 1 절 산 가수분해물의 제조와 특성

#### Abstract

The objective of this work was to manufacture acid hydrolysate based on the functionality such as anti-oxidative effect and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor. The optimum conditions for maximum yield were 10 N for HCl concentration and 22 hr for hydrolysis time. The main factor for acid hydrolysis were hydrolysis time, HCl concentration and hydrolysis temperature in order. The protein of acid hydrolysate and desalted acid hydrolysate was 6.5% and 14.0%, respectively. The peptide size in acid hydrolysate was in the range of 400-2500 dalton. The amino acid of acid hydrolysate was high in order of lysine, leucine, tyrosine, histidine, glycine and valine. Threonine, serine and proline were not detected. Acid hydrolysate did not showed toxicity on HepG2 cells up to 200 mg/mL. DPPH radical scavenging activity was showed in acid hydrolysate, and EC<sub>50</sub> value was 0.28 mg/mL. The anti-oxidative effect for linoleic acid was not significant difference in the range of 0.1-0.01 mg/mL, and stronger with decreasing peptide size. The fraction of desalted acid hydrolysate with 500-1000 showed high ACE inhibition compared with other fraction. The results suggested that the desalted acid hydrolysate had a potential application as functional ingredients. However, we need more the safety data of acid hydrolysates for 3-monochloro-propane-1,2-diol (3-MCPD).

#### 서론

우리나라 남해안의 연간 굴 생산량은 40,000여 톤으로 수출량은 2001년 22,500톤에서 2005년 11,300톤으로 감소하였으며, 제품별 생산현황을 보면 대일생굴 통조림, 마른 굴 및 냉동굴의 생산량은 현격히 감소하였으나, 내수용은 2001년 11,000톤에서 24,150톤으로 다소 증가하였다. 그러나 여전히 과잉 생산되어 상품가치가

현저히 떨어지는 굴의 대량 가공 및 이용방법이 필요한 실정이다 (이, 2006).

어류 가공 부산물 혹은 이용성이 떨어지는 어패류를 회수하여 산, 염기, 내인성 효소, 소화 효소 혹은 상업 효소를 사용하여 가수분해물을 제조하고, 이들의 기능을 개선하여 식품 ingredient 혹은 제품으로 활용하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다 (Benjakul and Morrissey, 1997; Kristinsson and Rasco, 2000; Mendis et al., 2005). 어육 단백질의 가수분해에 관한 연구의 대부분은 개발도상국을 위해 저가의 단백질 공급원과 동물 사료를 생산하기 위해 수행되었고(Sen et al. 1962), 최근까지 거의 어육 단백질 농축물에 관한 연구는 수행되지 않았다. 그러나 최근 식품 formulation에 분말 가수분해물 사용의 잠재성이 확인되었고, 특히 가수분해의 결과로 생성된 아미노산과 peptide에서 여러 가지 생리활성이 확인됨에 따라 유장 단백질(Boza et al., 1995), 대두 단백질 (Chen et al., 1995), 어육단백질 (Suetsuna, 2000; Kim et al., 2001; Jao and Ko, 2002)등에서 생리활성을 가진 가수분해물 제조에 관한 많은 연구가 진행되었다. 단백질 가수분해는 산 혹은 알칼리를 사용하는 화학적 가수분해와 단백질분해효소, 자가소화 등을 이용한 생화학적 가수분해 방법을 이용한다(Kristinsson and Rasco, 2000). 화학적 가수분해는 공정을 조절하기 어려우나 다양한 화학 조성과 기능 특성을 가진 제품을 일정하게 생산한다(Skanderby, 1994; Blenford, 1994). 강산과 염기에 의한 단백질 가수분해는 극단적인 온도와 pH를 사용하기 때문에 영양가가 낮고, 식품학적 기능성이 낮기 때문에 향미 강화제로서 사용을 제한하고 있으나(Loffler, 1986), 가수분해 조건을 조절함으로써 생리활성을 가진 무작위 펩티드를 생산할 수 있고, 분자량이 작은 아미노산과 펩티드를 생산함으로써 용해도를 높일 수 있는 특징이 있다. 그러나 염산 가수분해 중에 시료에 함유된 당과 dichloride 화합물을 생성하여 세포 독성을 나타낼 우려가 있기 때문에 사용에 제한이 있다(한국식품공업협회, 2000).

아미노산은 단백질 합성 유지, 면역반응의 상승, 상처 후 조직 치료의 가속화, 인슐린 혹은 성장 호르몬의 자극을 포함하여 다양한 생물학적 기능에서 중요한 역할을 행사하는 단백질의 기본적인 구조 단위다(Grimble, 2001; Tom and Nair, 2006). 최근의 연구는 아미노산이 간 손상, 식욕부진, 만성질환에 의한 고도의 건강 불안 상태, 만성염증 질환, 노화로 인한 근육의 소모를 포함하여 수많은 의학적 조건의 처치를 위한 치료제로서 가능성을 보고하였다(van Eys, 1985; Pisters and Pearlstone, 1993; Dreyer and Volpi, 2005). Katayama and Mine(2007)은 Val, Ile, Leu 같은 가지 달린 측쇄를 가진 아미노산은 glutathione S-transferase(GST)와 catalase의 활성을 상승시키고 Trp, His 및 Lys은 GST 활성 증가의 원인이라고 보

고하였다. His와 Lys은 내장 상피 세포(Caco-2)에서 산화적 스트레스로 유발된 IL-8 생성을 저해하며, His와 같은 특별한 아미노산은 IL-8의 전사 표현을 위한 조절 요소인 transcription 인자, nuclear factor-kappaB(NF- $\kappa$ B)의 inactivator로 영향을 미친다(Son et al., 2005).

본 연구는 굴 산가수분해물의 식품 ingredient로서 활용하기 위한 가능성을 확인할 목적으로 상업적 가치가 떨어지는 냉동 굴을 산가수분해하여 기능성 펩티드를 생성하는 최적 조건과 생성된 펩티드의 생리적 기능을 측정하고 아울러 이들 펩티드의 세포독성을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용한 냉동 굴은 IQF 용으로 처리하여 2년동안  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 냉동 창고에서 보관한 것을 경남 통영시 소재 대홍물산에서 구입하여 흐르는 수도수에서 세척하고 최종 제품의 비린내 제거를 위해 끓는 물에서 부상할 때까지 soaking한 후 플라스틱 상자에 담아 표면이 마를 때까지 수분을 제거한 후 가수분해를 위한 시료로 사용하였다.

### 산가수분해물의 제조

최적 가수분해 조건을 설정하기 위해 시료 굴 50 g에 50 mL의 증류수를 가하여 8500 rpm에서 균질화한 후 시험관에 5 mL의 마쇄육을 취하고 표면 반응분석 설계에 따라 3인자(염산의 농도, 가수분해시간, 가수분해 온도) 2수준(3 N과 12 N 염산, 6 시간과 24 시간,  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 와  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ )으로 설정하여 가수분해물을 조제하였다 (Table 1). 가수분해물은 구조토를 포함하는 3G-4 glass filter로 여과하고 여과물은 회전진공증발기로 염산이 완전히 증발할 때까지  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  이하의 온도에서 감압 농축한 후 25 mL로 정용하였다. 가수분해 조건에 따른 가수분해물의 아미노산 함량은 TNBS법(Nielsen et al., 2001), peptide 함량은 Lowry 법(1951)으로 각각 측정하였으며, 아미노산 함량과 peptide 함량은 L-leucine과 bovine serum albumin으로 작성한 검량곡선에 따라 계산하였다(Fig. 1, 2). 산가수분해물은 전기투석 장치로 탈염하여 시료로 사용하였다. 굴 산 가수분해물의 산업적 응용을 위해 산업적 규모의 대량 조제를 실시하였다. 즉 산 가수분해 탱크에 냉동 굴 2130 kg, 수도수 1000 L와 35% 염산 2000 L를 투입하여  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 6 시간 가수분해하고 31%의 식

품급 NaOH 820 kg을 투입하여 pH 5.6으로 조정하였다. 탈색을 위해 신기 활성탄 20 kg을 투입하여 여과한 후 고형분 조정을 위해 농축하였다. 최종제품의 양은 1400 L, 비중 1.196, 고형분 함량 35%였다. 염분 농도계로 측정된 염분의 농도는 11.3%였다.

### 분자량 분포의 측정

가수분해물의 분자량 분포는 HiLoad Superdex 30 prep grade 칼럼(1.6x60 cm)에 시료 0.5 mL를 loading하여 0.1 N NaCl을 포함하는 20 mM Tris-HCl (pH 7.7)용액을 1 mL/min의 속도로 용출하면서 206 nm에서 검출하였다. 분자량은 같은 조건에서 용출한 cytochrome c(MW, 12400), aprotinin (MW, 6500), 비타민 B12(MW, 1355.4) 및 carnosine (MW, 226.2)로 작성한 검량곡선에 따라 측정하였다(Fig. 3).

Table 1. Surface response design for preparation of acid hydrolysis

Row	HCl, N	Time, hr	Temp, °C
1	12	24	95
2	7.5	24	110
3	7.5	15	95
4	7.5	24	80
5	3	15	80
6	7.5	6	80
7	7.5	15	95
8	12	15	80
9	7.5	15	95
10	12	6	95
11	3	15	110
12	3	6	95
13	12	15	110
14	3	24	95
15	7.5	6	110

### 아미노산 조성의 측정

아미노산 분석은 시험관(13x100 mm)에 시료 용액 1 mL를 넣고 50 mg의 5'-sulfosalicylic acid를 첨가하여 실온에서 30분 동안 방치한 다음 단백질을 제거하고 Eppendorf 원심분리기에서 원심분리(10,000 rpm, 10분)하여 얻은 상층액을 탈이온수로 25 mL되게 정용하였다. 아미노산 분석은 아미노산 자동분석기 (Biochrom, England)에 40 uL를 주입하여 분석하였다.

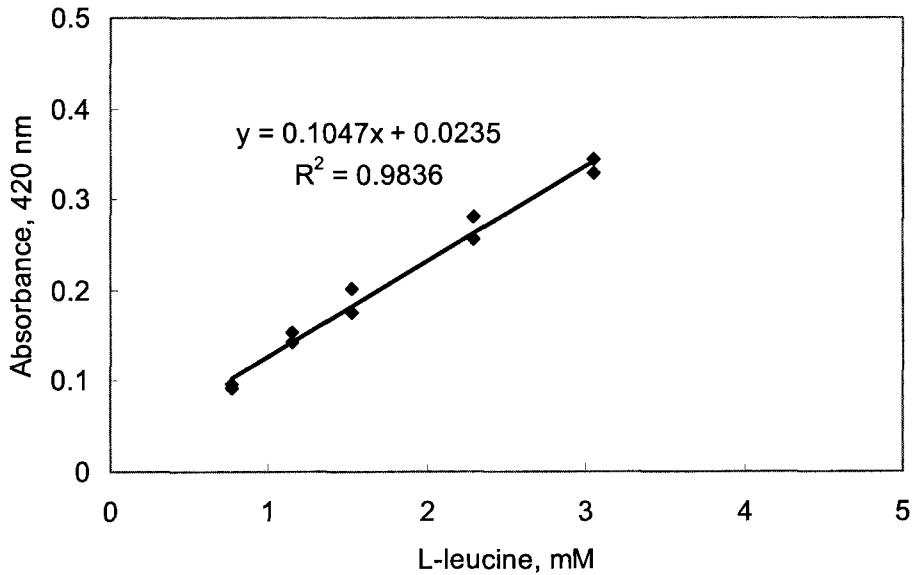


Fig. 1. Standard curve for determination of amino acid by TNBS method.

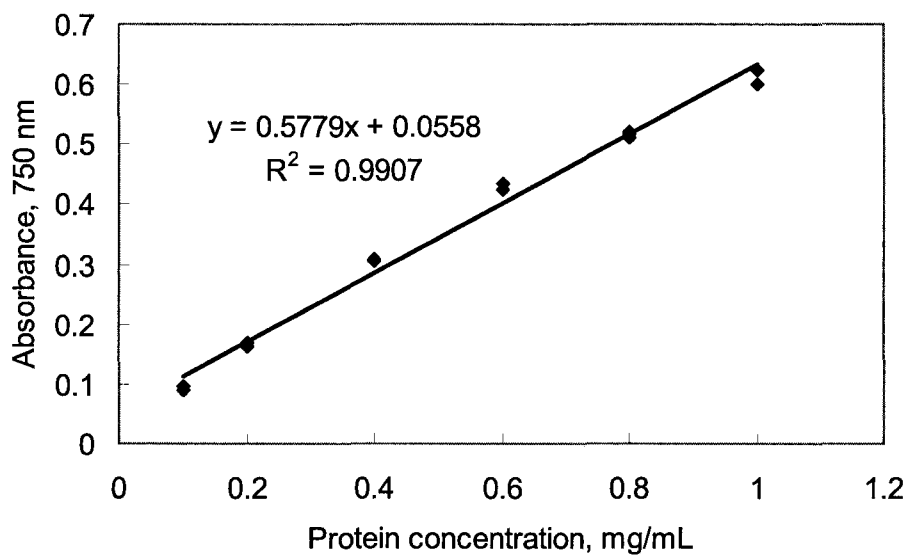


Fig. 2. Standard curve for determination of peptide by Lowry method

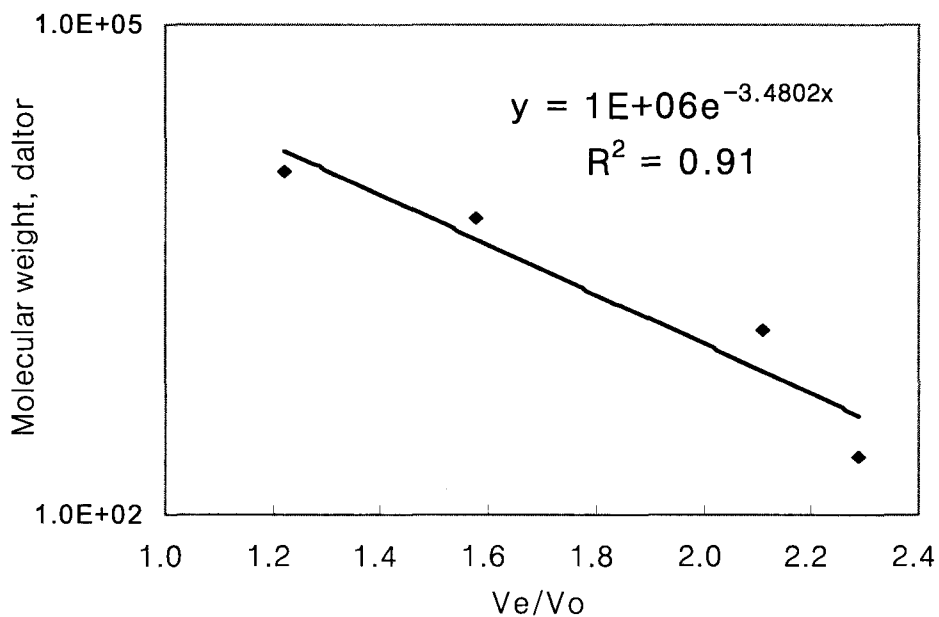


Fig. 3. Standard curve for determination of molecular weight by HiLoad Superdex 30 prep grade column (1.6x60 cm).



### 세포독성의 측정

간암세포인 HepG2 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되도록 배양하였다. 이때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 배지용 항생제를 사용하였다. 세포가 80%정도 dish를 덮으면 phosphated-buffered saline-EDTA (PBS-EDTA)로 세척한 후 trypsin처리하여 계대배양하였으며 배지는 48시간마다 교환하여 세포를 배양하였다.

시료는 DMEM (FBS free)배지에 0.2% PBS 용액에 시료를 녹여 사용하였다. 시료의 농도는 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL이 되도록 하여 실험하였다. MTT assay를 이용한 세포독성 측정은 HepG2 를 96 well plate에 세포농도  $1 \times 10^5$  cells/mL로 100 uL씩을 분주한 후 세포부착을 위해 24시간 배양하고, 시료를 첨가한 FBS free 배지로 교환한 다음 24시간 동안 배양하였다. PBS 용액으로 2회 세척한 다음 MTT 시약으로 처리하여 490 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다.

### DPPH radical 소거 활성

Park et al.(2005)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 시험관에 시료용액 2 mL를 넣고 2 mL의 ethanol과 1 mL의 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl /ethanol (DPPH) 용액을 첨가하고 25 °C의 실온에서 30분 동안 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference는 시료 대신 2 mL의 탈이온수를 사용하였다. Radical 소거 활성은 다음의 식에 따라 DPPH 탈색의 %로 계산하였다.

$$\text{Radical 소거활성(\%)} = 100 \times (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{reference의 흡광도})$$

### Fe-Chelating 활성

Rajapakse et al.(2005)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 즉 시험관에 시료용액 0.5 mL를 넣고, 1.85 mL의 증류수, 50 uL의 1% FeCl<sub>2</sub>, 0.1 mL의 5 mM Ferrozine용액을 가하고 25 °C에서 10분 동안 반응시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference는 시료 대신에 증류수 0.5 mL를 사용하였고 blank는 Ferrozine 대신에 증류수 0.1 mL를 사용하였다. 활성은 다음의 식에 따라 계산하여 %로 표시하였다.

$$\text{Chelating 활성(\%)} = [1 - \text{시료의 흡광도} / \text{reference 흡광도}] \times 100$$

### **Ferricyanide의 환원력의 측정**

산가수분해물의 환원력은 Nam et al.(2005)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 0.3 mL의 시료가 들어있는 시험관에 0.7 mL의 50 mM phosphate 완충액 (pH 6.6)과 0.5 mL의 1% potassium ferricyanide 용액을 넣은 다음 50 °C에서 20분 동안 항온하였다. 0.5 mL의 10% TCA 용액을 첨가하고 2500 x g에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상층액 0.5 mL에 0.5 mL의 탈이온수와 0.1 mL의 0.1% FeCl<sub>3</sub> 용액을 첨가하여 10분 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 시료 대신 동량의 증류수를 사용하였다.

### **Linoleic acid 항산화 활성의 측정**

Chen et al.(1996)의 방법을 다소 변형한 ferric thiocyanate법을 사용하였다. 즉 산화를 위해 1 mL의 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0)과 0.25 mL의 시료용액, 0.25 mL의 탈이온수, 1.0 mL의 50 mM linoleic acid/ethanol 용액을 유리 시험관에서 혼합하고 뚜껑을 닫아 밀봉한 다음 어두운 60 °C의 항온수조에서 1 주일 동안 산화시켰다. 이때 reference는 시료 대신에 탈이온수를 사용하였다. 산화 후 4시간 간격으로 적당량의 시료를 들어내어 반응 혼합용액 50 uL에 75% ethanol 2.35 mL, 30% ammonium thiocyanate 용액 50 uL, 20 mM ferrous chloride/3.5% HCl 용액 50 uL를 첨가하고 실온에서 3분 동안 방치하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 blank는 반응 혼합용액 대신 50 uL의 탈이온수를 사용하였다. 항산화 활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{항산화 활성(\%)} = 100 \times (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{reference 흡광도})$$

그리고 ferric thiocyanate법으로 linoleic acid의 항산화 활성을 측정하기 전에 최적의 지질 산화 시간을 결정하기 위하여 시료 대신에 탈이온수를 사용하여 경시적으로 linoleic acid의 산화를 측정한 결과(Fig. 4), 60 °C에서 linoleic acid는 약 72 시간의 유도기를 거쳐 급속히 산화하는 것으로 나타났다. 따라서 산 가수분해물의 linoleic acid 항산화 능력의 실험은 170시간까지 측정하였다.

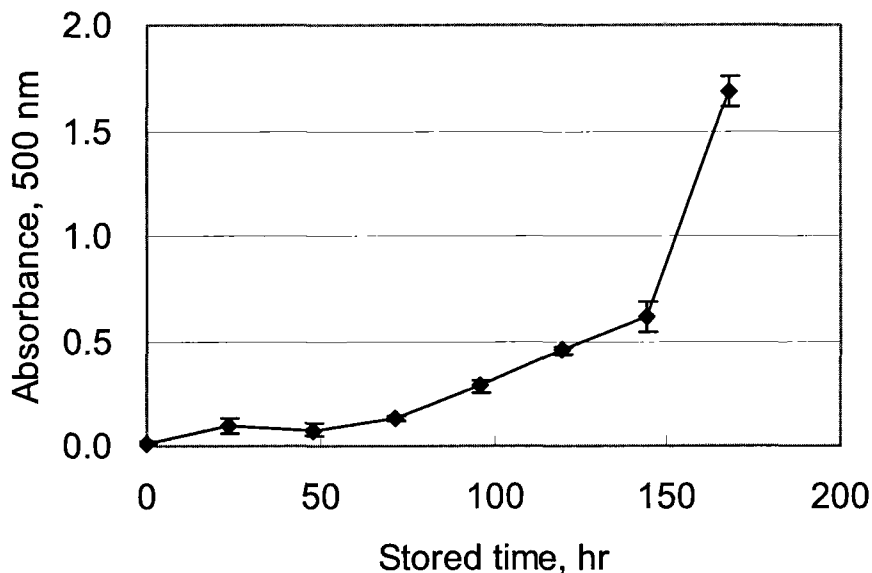


Fig. 4. Increase of absorbance of linoleic acid by ferric cyanate method. The reaction mixture was incubated at 60 °C.

#### Angiotensin I converting enzyme (ACE)의 저해능 측정

ACE 저해활성은 Janitha et al.(2002)의 방법에 따라 기질로 hippuryl-His-Leu (HHL)을 사용하여 반응 시킨 후 남아있는 HHL의 양을 고속액체 크로마토그래피(Hitachi, Japan)로 정량하였다. 즉 시험관에 3.0 mM HHL 50 uL, 효소용액 50 uL(1.25 units)와 시료용액 50 uL를 가하여 37 °C의 항온수조에서 30분 동안 흔들지 않고 항온한 후 흔들어 주면서 다시 30분 동안 반응시킨다. 150 uL의 glacial acetic acid를 가하여 ACE 활성을 중지시킨 다음 HPLC로 hippuric acid의 함량을 측정하였다. 이때 시약 조제를 위한 완충액은 50 mM Tris-HCl (pH 8.3)을 사용하였다. Hippuric acid(HA)의 정량을 위해 guard column (Bondclone C<sub>18</sub>, 10 um, 50x1.0 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)와 C<sub>18</sub> 역상 칼럼 (Bondclone C<sub>18</sub>, 5 um, 250x4.6 mm)를 장착한 HPLC에 반응 중지용액 10 uL를 injection하고, 12.5%(v/v) acetonitrile 용액(pH 3.0)으로 용출하면서 280 nm에서 검출하였다. Reference 용액은 시료 대신 50 uL의 완충액을 사용하였다. 저해%는 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{ACE 저해(\%)} = \left[ \frac{\text{Reference의 HA- 시료의 HA}}{\text{Reference의 HA}} \right] \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 산 가수분해물 제조를 위한 굴 가수분해물의 최적 반응 조건

시료 A (1년 동결 저장한 굴)의 경우 최대 수율의 아미노산을 얻기 위한 최적 조건은 10 N HCl, 96 °C에서 22 시간 동안 가수분해하는 조건이 적당하였으며, 이때의 아미노산 예측 값은 9,399 mg/100 mL이었다. 그리고 시료 B(2년 동결 저장한 굴)의 경우는 염산 농도 12.7 N, 104 °C에서 17시간 동안 가수분해하는 것이 최적이었으며, 이때의 아미노산 예측 값은 7,030 mg/100 mL이었다 (Table 2). 이 같이 동결저장기간에 따라 최적 가수분해 조건이 다른 것은 시료 B가 시료 A에 비하여 장기간 동결 저장하여 높은 갈변 현상을 보이고 있었으며, 이 같은 갈변 현상에 의해 생성된 고분자 화합물들이 산 가수분해에 저항하거나 아미노산과 환원당의 반응이 아미노산을 파괴하기 때문인 것으로 추정된다. 아미노산과 환원당의 반응은 아미노산을 파괴하며, 특히 ε-아미노기를 가진 필수 아미노산인 L-lysine이 단백질 분자의 일부일 때 반응할 수 있기 때문에 중요하다(BeMiller and Whistler, 1996). ε-아미노산과 환원당의 반응은 lysine의 소화율을 감소시키며, 갈변 중 생성된 dicarbonyl 화합물에 의한 단백질의 가교연결은 단백질의 용해도를 감소시키고, 단백질의 소화능력이 떨어진다(Damodaran, 1996). 가수분해를 위한 염산 10 N에서 12 N 까지의 농도에서는 농도 증가에 따른 가수분해도의 증가는 나타나지 않았으며, 가수분해 시간은 증가할수록 유리 아미노산의 함량도 증가하였으며, 온도는 95 °C에서 가장 높은 아미노산 함량을 보였다(Fig. 4). 가수분해에 가장 큰 영향을 미치는 인자는 가수분해 시간, 염산의 농도, 가수분해 온도의 순이었다.

산업적 규모로 산가수분해하여 NaOH로 중화하는 과정에서 생성된 NaCl의 탈염을 시도한 결과(Fig. 5), NaCl 농도 약 3%까지는 탈염 시간의 경과와 더불어 염농도는 선형의 상관으로 감소하였으나, 이후부터는 탈염 속도가 급속히 감소하여 24시간 탈염 후 약 0.5% 수준을 유지하였다. 이 같이 탈염 시간의 경과에 따라 탈염의 속도가 크게 감소하는 것은 전해질 농도의 감소에 기인한다. 산업적 규모로 제조한 산 가수분해물의 질소함량은 1.04 g/100 mL로 16.2%의 회분을 포함하고 있었으며, 탈염 후 수분은 상대적으로 증가하였으나, 질소함량은 14.0 g/100 mL였고 회분의 거의 포함되어 있지 않았다(Table 3).

Table 2. Response value for optimum preparation of acid hydrolysis (mg/100 mL)

Row	HCl, N	Time, hr	Temp, °C	Sample	
				A	B
1	12	24	95	9358.7	8202.8
2	7.5	24	110	10775.5	6357.2
3	7.5	15	95	9321.4	7177.5
4	7.5	24	80	8724.8	7065.6
5	3	15	80	5145.4	5331.8
6	7.5	6	80	4996.3	5462.3
7	7.5	15	95	9414.6	6413.1
8	12	15	80	9135.0	5872.5
9	7.5	15	95	6636.8	6021.6
10	12	6	95	5331.8	6431.8
11	3	15	110	8519.8	5630.1
12	3	6	95	3486.2	4194.6
13	12	15	110	7028.3	6935.1
14	3	24	95	3821.8	7830.0
15	7.5	6	110	7084.3	7345.3

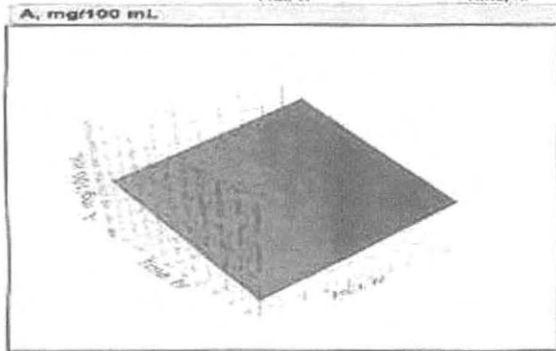
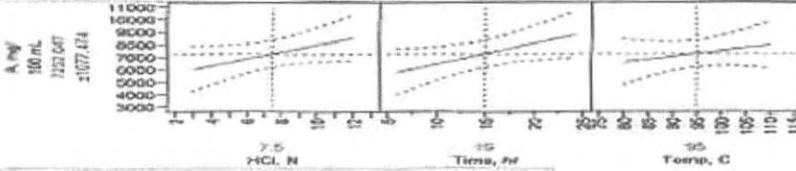
oyster acid hydrolysate- Fit Least Squares

Response A, mg/100 mL

Sorted Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Time, hr	163.64167	74.48142	2.20	0.0503
HCl, N	274.46111	148.96226	1.84	0.0625
Temp, C	45.05333	44.85685	1.01	0.3050

Prediction Profiler



oyster acid hydrolysate- Fit Least Squares

Response B, mg/100 mL

Sorted Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Time, hr	83.63333	32.65546	2.58	0.0205
HCl, N	123.76864	65.31691	1.90	0.0547
Temp, C	21.120107	10.35327	1.08	0.3034

Prediction Profiler

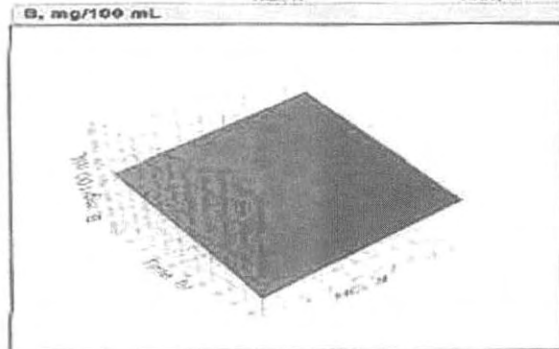
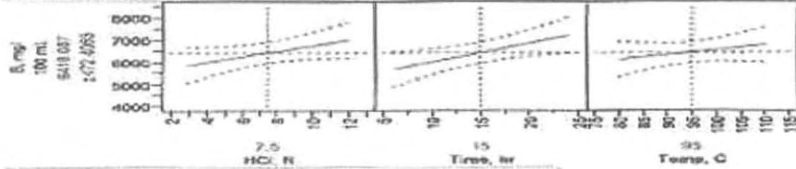


Fig. 4. Predicted surface plot of HCl concentration, hydrolysis time and temperature on acid hydrolysate.

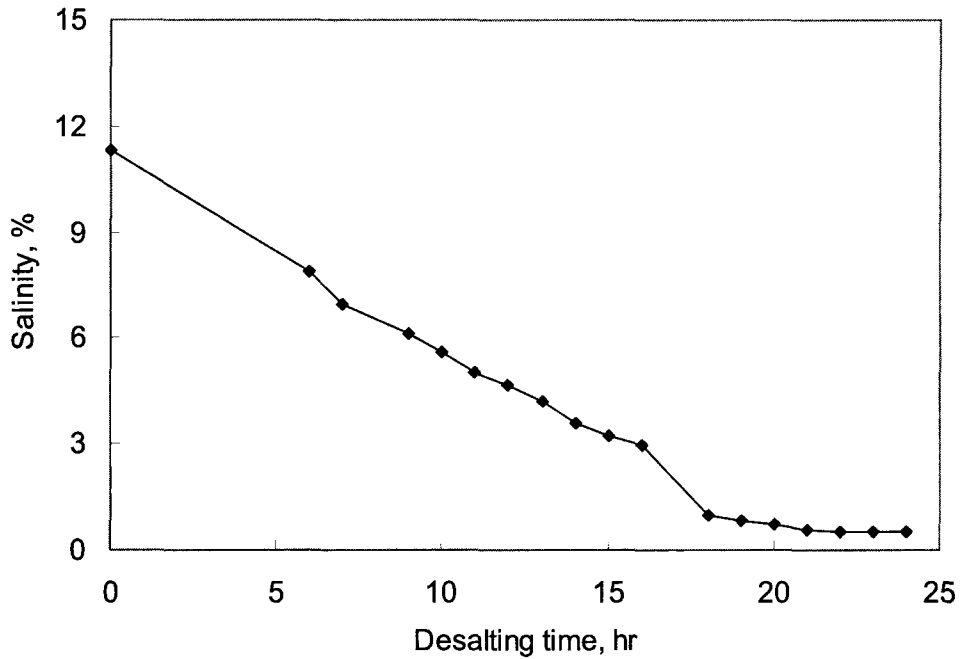


Fig. 5. Change of salt concentration with desalting time by electro-dialysis.

Table 3. Proximate composition of acid and desalted hydrolysate from industrial scale processing (unit;%)

Hydrolysate	Moisture	Protein	Ash	Total
		6.5±0.0		
acid	75.9±0.7	(1.04±0.01	16.2±1.5	98.6
		g/100 mL)		
desalted	85.6±0.5	14.0±0.1	0.0±0.0	99.6

#### 가수분해물의 분자량 분포

산업적으로 조제한 산 가수분해물과 탈염한 가수분해물의 peptide 분자량 분포를 확인한 결과 (Fig. 6), 산가수분해물과 탈염한 시료 사이에 분자량 분포의 차이는 관측되지 않았으며 대부분의 peptide는 분자량 400-2500 dalton 사이에 분포하였고 그 이하의 분자량에 해당하는 획분 47-67은 아미노산에 해당

하였다. 이 같은 결과는 일반적인 조건(6 N HCl, 110 °C, 24 시간 가수분해)에서 산 가수분해한 단백질은 거의 모두가 아미노산으로 전환할 것이라는 일반적인 생각과 많은 차이를 보이고 있었다. 단백질에 있는 아미노산의 엄밀한 분석을 위한 문제는 24 시간 가수분해 후에 남아있는 intact peptide 결합이며, 이런 peptide 결합은 주로 valine, leucine, isoleucine과 phenylalanine과 같은 소수성 아미노산에 의해 형성된다고 하였다(Aristoy and Toldra, 2004). 이들 아미노산들을 포함하는 peptide 결합은 가수분해에 저항하기 때문에 96 시간까지의 긴 가수분해 시간이 필요하다.

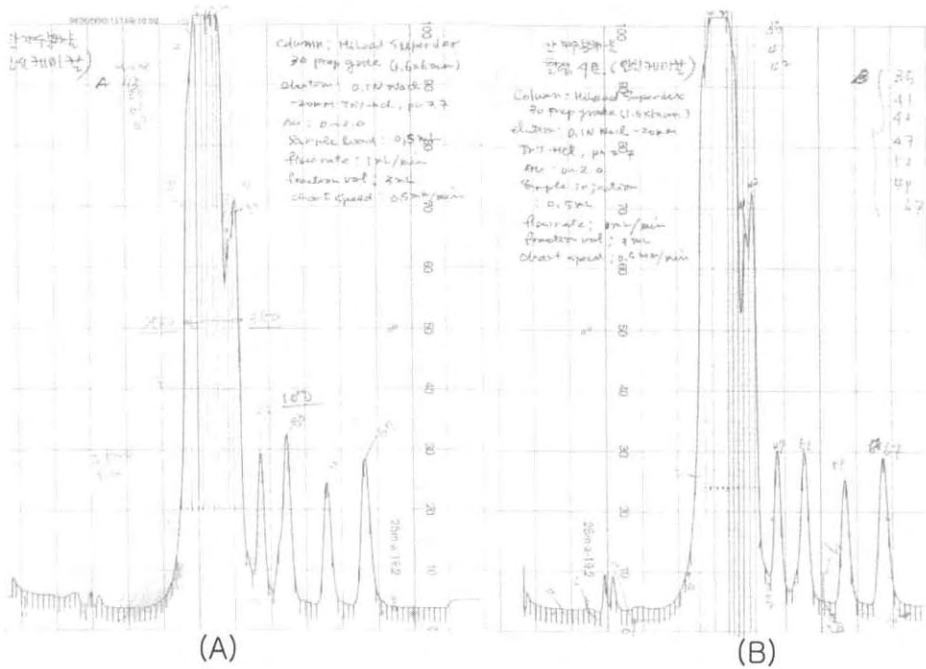


Fig. 6. Gel chromatogram of acid (A) and desalted hydrolysate (B) from industrial scale processing.

### 아미노산 조성

산 가수분해물과 탈염한 산 가수분해물에서 threonine, serine 및 proline은 검출되지 않았으며, 특이한 것은 탈염 조작 후 aspartic acid, glutamic acid, tyrosine, phenylalanine과 histidine 함량이 감소하였다 (Table 4). 산 가수분



해에 민감한 아미노산은 tyrosine, serine, threonine, methionine, cysteine이며, 특히 tryptophan은 완전히 파괴되기 때문에 다른 정량 방법이 필요하고, 다른 아미노산은 가수분해 0 time으로 환산할 필요가 있으며 아미노산은 다량의 탄수화물을 포함하는 시료에서 크게 손실된다고 보고하였다(Aristoy and Toldra, 2004). 이 같은 보고에 비추어 비교적 높은 함량의 글리코젠을 포함하고 있는 굴은 이들 아미노산의 손실이 일어날 가능성이 큰 것으로 보인다.

Table 4. Amino acid composition of acid and desalted hydrolysates from industrial scale processing

Amino acid	Acid N-mg/100 mL	Desalted N-mg/100 mL
Asp	4.34	1.76
Thr	-	-
Ser	-	-
Glu	4.83	1.00
Pro	-	-
Gly	27.95	40.52
Ala	1.12	17.09
Cys	7.14	10.16
Val	20.00	29.02
Met	6.03	6.20
Ile	14.23	16.42
Leu	28.69	33.33
Tyr	27.71	8.87
Phe	13.12	9.70
His	27.26	35.59
Lys	53.53	79.55
NH <sub>4</sub> Cl	178.23	250.59
Arg	15.80	23.40
Total	430.00	563.21
N-mg/100 mL	1036.00	2242.00
Recovery, %	42.08	25.12

회수한 질소는 전체 질소의 약 42%와 25%로서 나머지 질소 화합물은 peptide 상태로 존재할 가능성을 제시하였다. 이 같은 결과는 산 가수분해물의 분자량 분포를 나타내는 크로마토그램(Fig. 6)에서 확인할 수 있다.

한외 여과 막을 사용하여 산가수분해물을 분자량별로 분획하고 peptide의 양을 Lowry법으로 정량하였으며, 아미노산 함량은 TNBS법으로 측정하여 leucine 상당량으로 환산하였다(Table 5). A1과 A12 산 가수분해물에서 1000 dalton 이상에 해당하는 다량의 peptide를 확인할 수 있었으며, Acid와 desalted 가수분해물 젤 크로마토그래피 획분에서 분획의 수가 증가할수록 peptide의 양은 감소하였다. 이 같은 결과는 분자량의 감소와 일치한다. A1과 A12에서 아미노산의 양은 대체로 비슷하였는데 이는 한외여과되지 않고 남아있는 아미노산의 양에 기인한 것으로 추정된다. 산과 탈염 가수분해물에서 획분이 증가함에 따라 아미노산의 함량이 감소하는 것은 TNBS법이 N-말단의  $\alpha$ -아미노기와 반응하여 아미노산 단량체와 반응이 국한되지 않기 때문이다.

Table 5. Peptide and amino acid content after ultrafiltration

Sample		peptide*, mg/mL	Sample	amino acid**, mg/mL	
A1***	original	4.53±0.04	B 1	original	0.77±0.02
	>1000 Da	13.05±0.55		>1000 Da	0.90±0.01
	500-1000 Da	4.30±0.06		500-1000 Da	0.72±0.04
	<500 Da	3.49±0.03		<500 Da	0.66±0.07
A12	original	4.85±0.01	B 12	original	0.41±0.02
	>3000 Da	10.38±0.21		>3000 Da	0.65±0.05
	1000-3000 Da	6.72±0.08		1000-3000 Da	0.60±0.01
	500-1000 Da	6.01±0.13		500-1000 Da	0.53±0.02
Industrial scale	<500 Da	3.91±0.03	Industrial scale	<500 Da	0.43±0.02
	peak 35	0.173±0.001		peak 35	1.088±0.058
	peak 43	0.040±0.004		peak 43	0.014±0.001
	peak 47	0.032±0.002		peak 47	0.000±0.000
Desalted	peak 35	0.216±0.000	Desalted	peak 35	1.002±0.060
	peak 43	0.196±0.002		peak 43	0.121±0.010
	peak 47	0.046±0.002		peak 47	0.047±0.013

\* Peptide content was assayed by Lowry method

\*\* amino acid content was assayed by TNBS method

\*\*\* Numeric number indicated row in Table 2.

### 세포독성

산가수분해물이 간세포에 미치는 영향을 측정한 결과(Fig. 7), 50 mg/mL 를 첨가했을 때 대조군에 비하여 91.8%로서 유의적인 차이를 보이지 않았으

며 100 mg/mL 첨가 군은 대조군과 유의적인 차이를 보였다( $p>0.05$ ). 그러나 200 mg/mL 첨가 시에는 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았고 ( $p>0.05$ ) 잔존 세포 수는 84.4%에 해당하였다. 200 ug/mL 첨가 시에 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않으면 세포독성이 없다고 판단하는 기준에 비추어 산 가수분해물은 세포독성을 나타내지 않는 것으로 판단하였다. 이 같은 결과는 산 가수분해하는 동안 글에 포함된 글리코젠이 분해되어 포도당이 되고 이들의 OH기에 Cl이 치환되어 독성물질을 만든다는 보고(한국식품공업협회, 2000)와 상반되지만, 독성의 문제는 섭취량과 상관이 있는 것으로 추정된다.

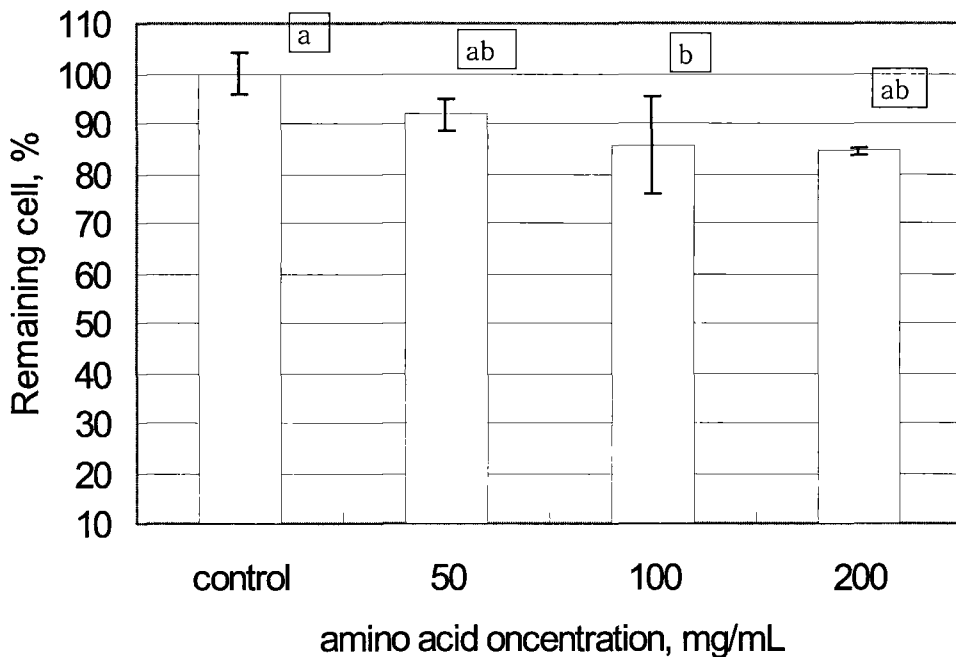


Fig. 7. Toxicity of acid hydrolysate on HepG2 cell.

### 산 가수분해물의 기능성

A12 분자량획분의 시료를 제외한 나머지 시료들은 0.5 mM ascorbic acid와 비슷한 DPPH antiradical 활성을 보였다(Fig. 8). 50%의 DPPH antiradical을 보이는 농도 값(EC<sub>50</sub>)을 측정한 결과 A1 시료가 A12에 비하여 낮은 값을 보였으며 탈염한 시료가 탈염하지 않은 것에 비하여 낮은 EC<sub>50</sub> 값을 보였다.

그러나 탈염한 시료를 분자량별로 분석했을 때 분석하지 않은 것에 비하여 낮은 EC<sub>50</sub> 값을 보였다 (Table 6). Alcalase와 Flavourzyme으로 가수분해한 가수분해도 20%, 40% 및 60%의 scad 육 가수분해물의 경우 Flavourzyme 가수분해물이 Alcalase 가수분해물에 비하여 높은 DPPH 라디칼 소거 활성과 환원력을 가지나 Fe-chelating 능력은 반대라고 하였으며, 이들 활성은 가수분해도에 의존한다고 보고하였다(Thiansilakul et al., 2007)

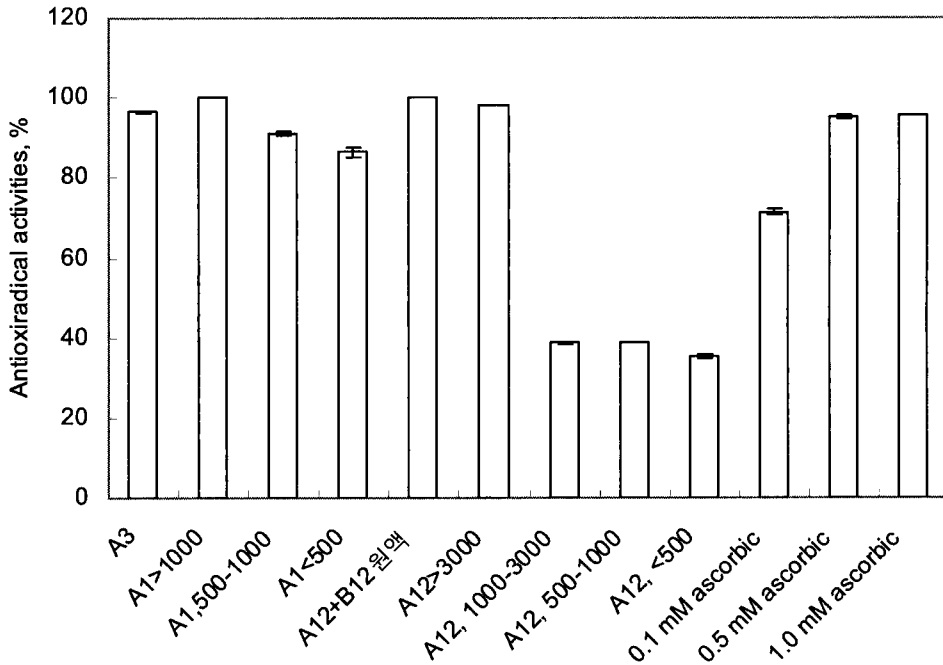


Fig.8. DPPH antiradical activities of acid hydrolysate of oyster and ascorbic acid. The concentration of hydrolysate was adjusted to 0.5 mg/mL by Lowey method.

Flavourzyme, Neutrase, Protease 2000과 Prozyme로 가수분해한 whelk 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능과 linoleic acid 과산화물 생성 저해 능력 및 Fe-chelating 능력은 가수분해효소의 종류와 가수분해 시간에 따라 차이가 있으며, Neutrase로 8시간 가수분해한 whelk 가수분해물이 가장 높은 효과를 가진다고 보고하였다(Son et al., 2003). 한편 염장 발효한 홍합에서 유래한 라디칼 소거 활성을 가진 peptide의 아미노산 서열은 HFGBPFH 이고, 이들 peptide는 200 ug/mL 농도에서 superoxide 소거(98%), hydroxyl 소거(96%), carbon-centered 소거(91%) and DPPH radicals 소거 활성을 가지며, EC<sub>50</sub> 값은 각각 21, 34, 52 과 96 uM이라고 보고하였다(Rajapakse 등, 2005). 이상의 보고에 비추어 정제 peptide와 직접적인 비교는 어려우나, 탈염한 산 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거 EC<sub>50</sub> 값은 정제 peptide의 약 0.32배이다. 이 같은 결과는 탈염 산가수분해물은 보고와 달리 정제하지 않은 peptide임에 비추어 상당히 높은 DPPH 라디칼 소거능을 갖는 것으로 보인다.

Table 6. The EC<sub>50</sub> value of DPPH antiradical activity acid, desalted and fractionated hydrolysates from oyster

Sample	EC <sub>50</sub> , mg/mL
A1	8.41
A12	34.35
Acid (industrial scale)	3.03
desalted	0.28
desalted, >1000 Da	5.21
desalted, 500-1000	2.34
desalted, <500 Da	2.73
ascorbic acid	0.28 mM

Fe 이온 킬레이트 효과는 Rajapakse et al. (2005)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 산 가수분해물의 Fe<sup>2+</sup> 킬레이트 효과는 EDTA에 비하여 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 9). 가수분해물의 농도에 따른 결과에서도 산업적 규모로 산가수분해물을 제조하여 탈염한 시료에서는 실험한 농도 구간에서 Fe<sup>2+</sup> 킬레이트 활성을 전혀 보이지 않은 반면, 탈염 전의 시료는 1-2 mg/mL의 농도에서 8.5-9.5%의 킬레이트 활성을 보이다가 점차 감소하여 0.1 mg/mL의 농도에서는 킬레이트 활성이 소실되었다(Fig. 10). 이 같은 결과는 DPPH 라디칼 소거능과 Fe-chelating 능력은 Alcalase 가수분해물과 Flavourzyme 가수분해물 사이에 반대의 결과를 보인다는 사실에 비추어 가수분해 정도에 따른 차이로 추정된다.

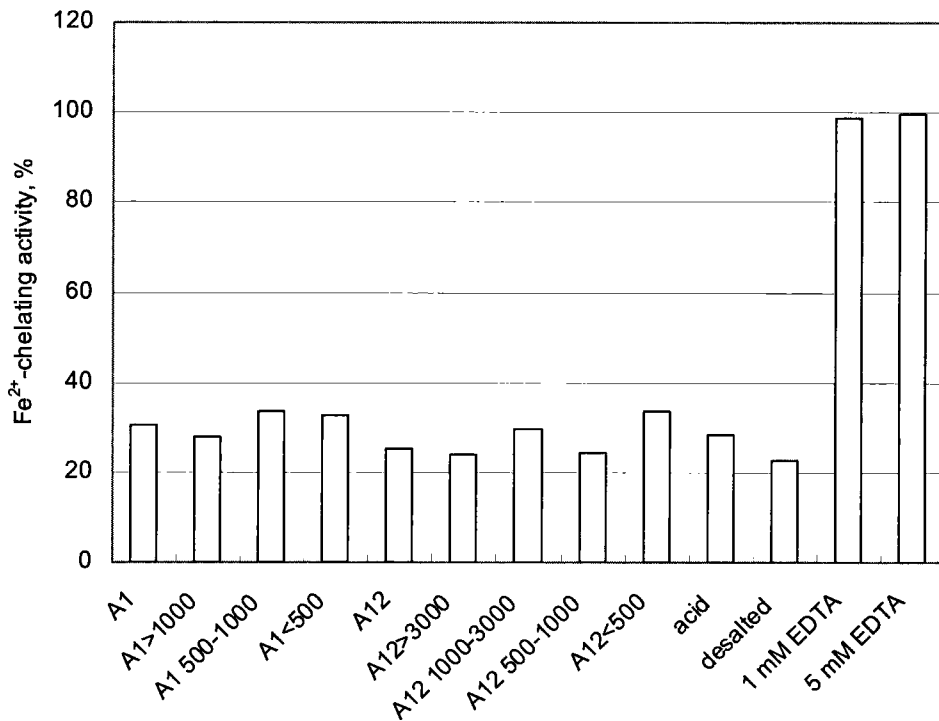


Fig. 9. Fe-chelating activities of acid hydrolysate of oyster and EDTA. The concentration of hydrolysate was adjusted to 0.5 mg/mL by Lowry method.

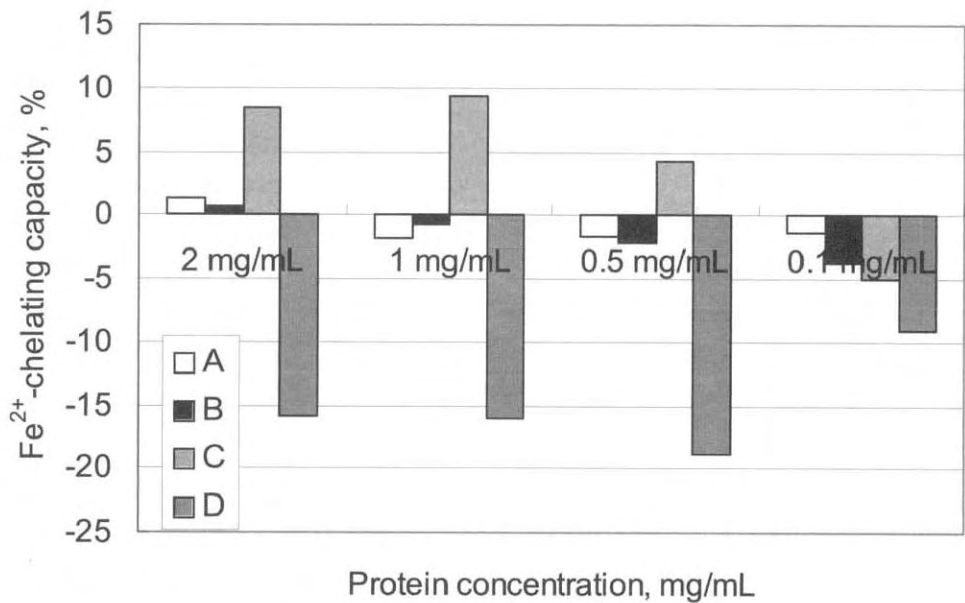


Fig.10 Effect of hydrolysate concentration on Fe<sup>2+</sup>-chelating capacity. A, 12.5 N acid hydrolysate; B, 3.0 N acid hydrolysate; C, Industrial hydrolysate before desalting; D, Industrial hydrolysate after desalting.

향온 시간에 따른 산 가수분해물, 산업적 규모로 제조한 산 가수분해물과 이들의 탈염 물질 및 분자량 획분 물질의 linoleic acid 항산화 효과를 측정 한 결과(Fig. 11), 향온 시간이 길어짐에 따라 항산화 활성은 감소하여 148 시간 이후에는 거의 항산화 활성이 없는 것으로 나타났다. 그러나 1000 Da 이하의 peptide는 168시간까지 85% 이상의 항산화 활성을 보여 대체로 저분자의 peptide가 강력한 항산화 효과를 유지하는 것으로 보인다.



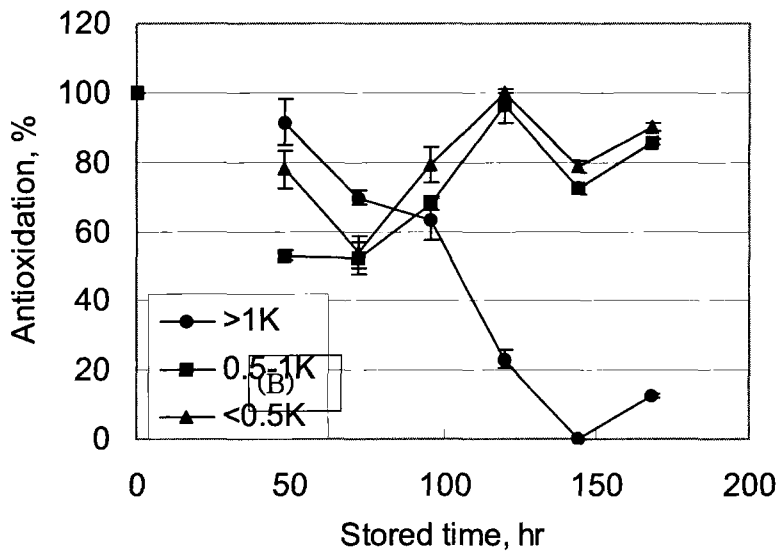
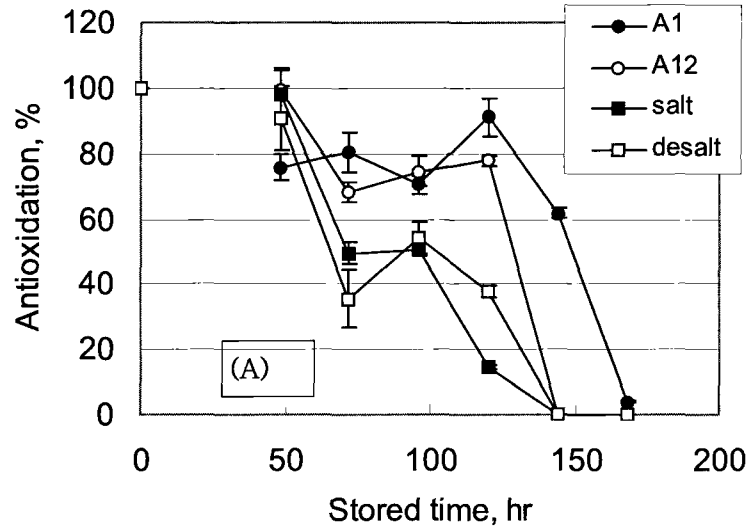


Fig. 11. Antioxidant effect of acid, desalted (A) and fractionated (B) hydrolysate.

분획한 peptide의 농도별 항산화 효과는 0.1-0.01 mg/mL의 농도 구간에서 농도에 따른 유의차는 보이지 않았으나, 분자량이 작을수록 강한 항산화

효과를 가지는 것으로 나타났다(Fig. 12).

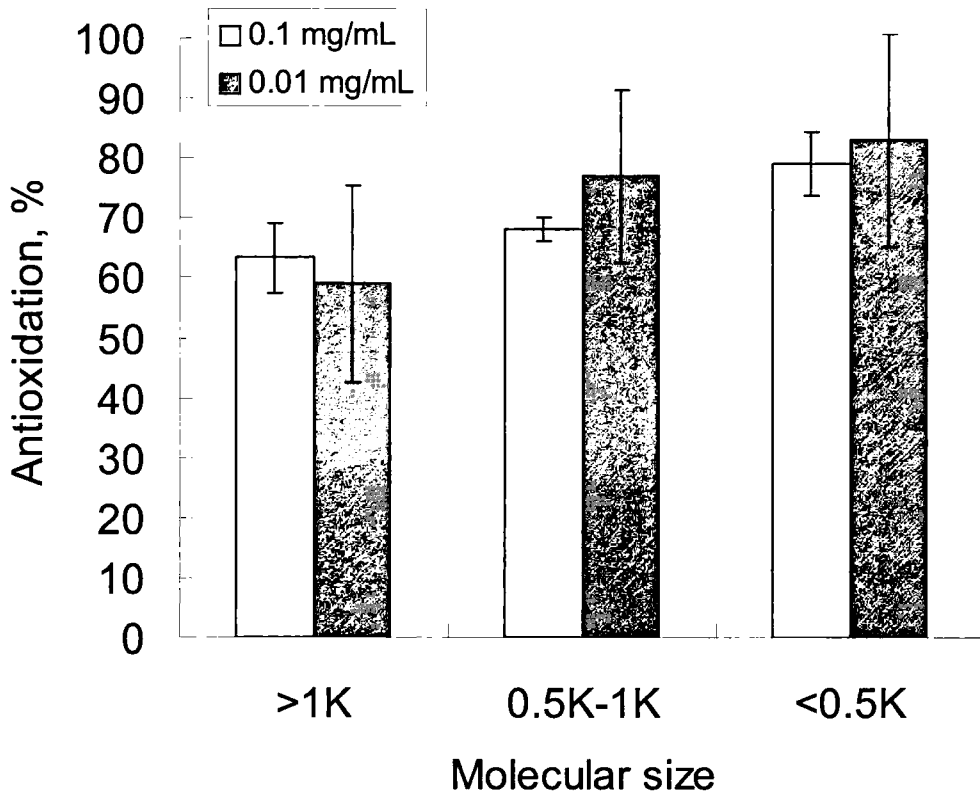


Fig.12. Effect of concentration on antioxidant of fractionated hydrolysates.

ACE 저해능은 산가수분해물, 탈염 산가수분해물, 분자량에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나, 탈염 산가수분해물 중 분자량 500-1000 dalton의획분이 가장 높은 ACE 저해능을 보이고 있었다(Table 7). 기질로 N-(3(2-furyl)acryloyl)-Phe-Gly - Gly(FAPGG)를 사용하여 측정된 시판 화합물인 환원 glutathione (GSH), carnosine, homocarnosine 및 anserine의 ACE 저해능(IC<sub>50</sub>)은 reference로서 captopril이 0.00781 uM인데 반하여 각각 , 32.4 uM, 5.216 mM, 6.147 mM, and 6.967 mM,이라고 보고하였다(Hou et al., 2003). 이 같은 보고와 비교하여 산 가수분해물의 ACE 저해능은 carnosine, homocarnosine 및 anserine과 비슷한 것으로 나타났다. 탈지한

연어육 단백질의 5% thermolysin 가수분해물은 높은 ACE 저해능( $IC_{50}=27.9$  ug/mL)을 보이며, 크로마토그래피로 정제한 6개의 활성 peptide는 Trp-Ala, Val-Trp, Trp-Met, Met-Trp, Ile-Trp 및 Leu-Trp로서 모두 Trp를 포함하고 있는 dipeptide로서  $IC_{50}$ 은 2.5 uM-277.3 uM의 범위였다(Ono et al., 2003).

Table 7. ACE inhibition of acid, desalted and fractionated hydrolysates

Sample	ACE inhibition		$IC_{50}$ , mg/mL
	protein, mg/mL	Inhibition, %	
Acid	11.27	77.7	1.82
Desalted	21.79	79.5	1.79
Desalted, >1000 Da	22.09	72.3	1.50
Desalted, 500-1000 Da	12.53	78.3	1.45
Desalted <500 Da	11.29	68.4	1.60

#### 요약

최대 수율의 산가수분해물을 제조하기 위한 최적 조건은 10 N HCl, 96, 가수분해 22 시간이었다. 가수분해에 가장 큰 영향을 미치는 인자는 가수분해 시간, 염산의 농도, 가수분해 온도의 순이었다. 산 가수분해물과 탈염한 산가수분해물의 단백질 함량은 6.5%와 14.0%였고, 염의 함량은 각각 16.2%와 0%였다. 산 가수분해물에 분포하는 peptide의 분자량은 400-2500 dalton 사이였다. 산 가수분해물의 아미노산 함량은 Lys>Leu>Tyr≈His≈Gly>Val의 순으로 높았고, Thr, Ser 및 Pro는 검출되지 않았다. 산 가수분해물의 세포 독성은 200 mg/mL까지 유의적인 독성은 보이지 않았다. 산가수분해물은 0.5 mM ascorbic acid와 비슷한 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으며, 탈염한 산가수분해물의 DPPH  $EC_{50}$ 은 0.28 mg/mL였다. Linoleic acid에 대한 분획한 peptide의 농도별 항산화 효과는 0.1-0.01 mg/mL의 농도 구간에서 농도에 따른 유의차는 보이지 않았으나, 분자량이 작을수록 강한 항산화 효과를 가지는 것으로 나타났다. ACE 저해능은 탈염 산가수분해물 분자량 500-1000 dalton 획분이 가장 높았다. 산 가수분해물은 기능성 ingredient로서 사용 가능성은 있으나, 안전성에 관한 면밀한 검토가 아울러 이루어져야 할 것이다.

## 참고문헌

- Aristoy MC, Toldra F. 2004. Amino acids. In Handbook of food analysis. LmL Nollet (Ed.), Marcel Dekker Inc, NY, 83-123.
- BeMiller JN, Whistler RL. 1996. Carbohydrates. In Food Chemistry, OR Fennema (Ed.), Marcel Dekker Inc, NY, p 171-174.
- Benjakul S, Morrisey MT. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *J Agric Food Chem* 45: 3423-3430.
- Blenford DE. 1994. Protein hydrolysates: functionalities and uses in nutritional products. *Int Food Ingr* 3: 45-49.
- Boza JJ, Martinez-Augustin O, Gil A. 1995. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 43: 872-875.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F. 1995. Structural analysis of antioxidant peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin. *J Agric Food Chem* 43: 574-578.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem* 44: 2619-2623.
- Damodaran S. 1996. Amino acid, peptides, and proteins. In Food Chemistry, OR Fennema (Ed.), Marcel Dekker Inc, NY, p 321-429.
- Dreyer HC, Volpi E. 2005. Role of protein and amino acids in the pathophysiology and treatment of sarcopenia. *J Am Coll Nutr* 24: 140S-145S.
- Grimble RF. 2001. Nutritional modulation of immune function. *Proc Nutr Soc* 60: 389-397.
- Hou W-C, Chen H-J, Lin Y-H. 2003. Antioxidant peptides with angiotension converting enzyme inhibitory activities and applications for and applications for angiotensin converting enzyme purification. *J Agric Food Chem* 51: 1706-1709.
- Janitha PK, Wanasundara PD, Ross ARS, Amarowicz R, Ambrose SJ, Pegg RB, Shand PJ. 2002. Peptide with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibiting activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. *J Agric Food Chem* 50: 6981-6988.
- Jao C-L, Ko W-C. 2002. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice. *Fisheries Science* 68: 430-435.
- Katayama S, Mine Y. 2007. Antioxidative Activity of Amino Acids on Tissue Oxidative Stress in Human Intestinal Epithelial Cell Model. *J Agric Food Chem* 55: 8458-8464.
- Kim S-K, Kim Y-T, Byun H-G, Nam K-S, Joo D-S, Shahidi F. 2001.

- Isolation and characterization of antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J Agric Food Chem* 49: 1984-1989.
- Kristingson HG, Rasco BA. 2000. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *J Agric Food Chem* 48:657-666.
- Loffler A. 1986. Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food Technol* 40: 63-70.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-275.
- Mendis E, Rajapakse N, Kim S-K. 2005. Antioxidant properties of radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem* 53: 581-587.
- Nam SH, Choi SP, Kang MY, Kozukue N, Friedman M. 2005. Antioxidant, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assay. *J Agric Food Chem* 53: 816-822.
- Nielsen PM, Petersen D , and Dambmann C. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *J Food Sci* 66: 642-646.
- Ono S, Hosokawa M, Miyashita K, Takahashi K. 2003. Isolation of peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory effect derived from hydrolysate of upstream chum salmon muscle. *J Food Sci* 68: 1611-1614.
- Park EY, Murakami H, Mori O, Matsumura Y. 2005. Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. *J Agric Food Chem* 53: 137-144.
- Pisters PW, Pearlstone DB. 1993. Protein and amino acid metabolism in cancer cachexia: investigative techniques and therapeutic interventions. *Criti Rev Clin Lab Sci* 30: 223-272.
- Rajapakse N, Mendis E, Jung W-K, Je J-Y, Kim S-K. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International* 38: 175-182.
- Sen DP, Sripathy NV, Lahiry NL, Sreenivasan A, Subrahmayan V. 1962. Fish hydrolysates 1. Rate of hydrolysis of fish flesh with papain. *Food Technology* 5: 138-141.
- Skanderby M. 1994. Protein hydrolysates: their functionality and applications. *Food Technol Int Eur* 10: 141-144.
- Son DO, Satsu H, Shimizu M. 2005. Histidine inhibits oxidative stress- and TNF- $\alpha$ -induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.* 579: 4671-4677.
- Son M-H, Park J-H, Lee S-C. 2003. Antioxidant activity of enzymatic

- hydrolysates from whelk (*Buccinum middendorffi* Verkrii) internal organ. *Food Science Biotechnol* 12: 683-686.
- Suetsuna. 2000. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. *Marine Biotechnology* 2: 5-10.
- Thiansilakul Y, Benjakul S, Shahidi F. 2007. Antioxidant activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *J Food Biochem* 31: 266-287.
- Tom A, Nair KS. 2006. Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers. *J Nutr* 136: 324S-330S.
- van Eys J. 1985. Nutrition and cancer: physiological interrelationships. *Annu. Rev. Nutr.* 5: 435-461.
- 이종훈. 2006. 굴산업 현황 및 발전 방향. 패류양식산업발전을 위한 세미나, 통영,
- 한국식품공업협회. 2000. 식품 중 3-MCPD(3-monochloropropane-1,2-diol)의 분석법 확립 및 오염도 조사, 국립독성연구원.

## 제 2 절 일단 효소 가수분해물의 제조와 특성

### Abstract

The study was carried out to prepare oyster hydrolysates by using Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, pepsin and trypsin, and to investigate its functional properties. The ACE inhibitory activity and antioxidant activity of enzymatic oyster hydrolysates did not increase with hydrolysis time. Among enzymatic oyster hydrolysates, oyster hydrolysates incubated with Protamex for 1 hr (OHP) showed the most excellent ACE inhibitory activity and antioxidant activity, and their  $IC_{50}$  and  $EC_{50}$  values were 1.16 mg/mL and 1.49 mg/mL, respectively. However, all enzymatic oyster hydrolysate were not detected in antimicrobial activity. Unhydrolysate from oyster have a higher molecular fraction(29-66 kDa) and lower molecular fraction below 6.5 kDa. The high and low molecular fractions decreased with lapsed hydrolysis time. The free amino acid of hydrolysates after 1 hr and 3 hr hydrolysis increased up to 16% and 21%, respectively.

### 서론

굴은 예로부터 타우린, 글리코겐, 셀레늄 및 아연 등을 다량 함유한 건강기능성 식품소재로 널리 알려져 있다 (Kim et al., 1981). 우리나라에서는 이와 같은 건강기능성 식품 소재인 굴을 다량 생산할 목적으로 청정 해역인 남해안의 거제, 통영, 남해, 고성, 여수, 고흥 등을 중심으로 수하식 양식을 실시하였고, 그 결과 이들 지역을 중심으로 생산량이 급진적으로 증가하게 되었다. 한편 우리나라의 탈각굴 생산 및 소비량은 1997년에 각각 30,100톤 및 14,000톤을 기록하였으며, 이후 1998년부터 2001년까지는 각각 27,000톤 및 13,000톤 내외로 다소 감소하기 시작하였다. 그러나 2002년 이후 탈각굴 생산이 37,000톤으로 급격히 증가하여 2003년에는 그 생산 및 소비량이 42,000톤 및 20,000톤 이상을 기록하였고 현재 탈각굴의 년 평균 생산량은 35,000톤에 외이며, 그 소비는 18,000톤 가량 이루어지고 있다(MOMAF, 2003). 이와같이 청정 해역에서 다량 생산되고 있는 우리나라 양식 굴의 소비는 국내 시장의

경우 생식되거나 김치제조 시에 조미용 등으로 이용되고 있는 정도이며, 그 소비량은 약 18,000톤에 불과하다. 따라서 국내에서 생산한 양식 굴 소비의 50% 이상은 가열 조리용 또는 냉동 굴의 형태로 일본에, 건조 굴의 형태로 대만을 비롯한 화교권에, 냉동 굴 및 통조림의 형태로 미국 및 유럽 등에 수출되고 있어, 양식 굴 소비의 대부분은 수출에 의존하고 있다. 현재 우리나라 굴 소비 시장의 형태는 공장 규모 김치의 대량생산, 조리방법 및 고차 가공품의 개발 부진에 따른 수요 감소 등과 같은 국내적 요인과 대일 수출 굴에서 패독과 이질균의 검출로 인한 일본 정부의 부정적인 시각과 FDA 권고 사항 미 이행에 따른 수출의 중단 등과 같은 대외적인 요인에 의해 극히 부진한 상태이며, 그에 따른 양식 굴의 잉여 생산량은 더욱 증가할 것으로 판단된다. 이러한 일면에서 볼 때 소비자 기호에 맞는 굴 가공품의 개발이 절실히 요구되고 있다.

그러나 굴에 대한 국내외 연구들의 대부분은 굴의 성분 특성에 관한 결과가 주류를 이루었고(Jeong et al., 1998; Li et al., 2000; Soudant and Chu, 2001; Hosoi et al., 2003; ), 일부 개발을 시도한 가공품의 경우도 단지 저차 가공인 천연 조미료 개발(Shiau and Chai, 1990; Kim and Heu, 2001)에 불과하며 양식 굴의 소비에 크게 기여하지 못하고 있는 실정이다.

본 연구에서는 양식 기술의 발달에 의해 다량 생산되면서 영양 및 기능 특성이 우수한 양식산 굴을 이용하여 효소 가수분해 및 한외여과 처리로 굴 효소 가수분해물의 제조를 시도하였고, 아울러 이의 건강 기능 특성에 대하여 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용한 굴은 양식산 참굴(*Crassostrea gigas*, 각장  $4.6 \pm 2.3$  cm, 각중  $9.9 \pm 3.2$  g)은 경남 통영 인근 양식장에서 생굴 시판을 목적으로 채취한 것을 빙장 상태에서 30분 이내에 실험실로 옮긴 다음, 지퍼백에 일정량씩 포장한 후 냉동고( $-25$  °C)에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

### 효소 및 균주

굴 가수분해물의 제조를 위하여 사용한 상업적 효소들 중에서 Alcalase 2.4



L(2.4 AU/g, 이하 Alcalase로 명명), Flavourzyme 500 MG(500 LAPG/g, 이하 Flavourzyme로 명명), Neutrase 0.8 L(0.8 AU/g, 이하 Neutrase로 명명), Protamex 1.5 MG(1.5 AU/g, 이하 Protamex로 명명)는 Novozyme-Korea(Pusan, Korea)에서 pepsin 570 unit/mg solid(이하 pepsin으로 명명) 및 trypsin 12,800 unit/mg solid(이하 trypsin으로 명명)은 Sigma 사(Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다.

굴 효소 가수분해물의 항균성 측정을 위한 균주는 gram positive 3균주 (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*)와 gram negative 3균주(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*)를 2004년 8월에 한국미생물보존센터로부터 분양 받아 사용하였다.

#### 굴 가수분해물의 제조 및 가수분해물

가수분해물 제조를 위하여 냉동 보관한 굴을 해동한 다음 동량의 증류수를 가하여 균질화 하였다. 여기에 굴의 단백질 함량에 대하여 1%에 해당하는 효소를 첨가한 후 각 효소의 제조회사에서 제시한 최적온도 및 pH (Alcalase, 55 °C 및 pH 7.0; Flavourzyme, 50 °C 및 pH 7.0; Neutrase, 50 °C 및 pH 6.0; Protamex, 40 °C 및 pH 7.0; pepsin, 37 °C 및 pH 3.0; trypsin, 37 °C 및 pH 8.0)로 조정된 다음, 진탕항온수조(Orbital shaker, Forma Scientific, USA)에 일정시간(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0 시간)동안 반응시켰다. 효소 반응의 정지는 끓는 물(100 °C)에서 10분 동안 중탕하여 효소를 실효시키고 이를 원심분리(3,000 x g, 20 분)하여 얻은 상층액을 여과하여 굴 효소 가수분해물을 제조한 다음, 동결건조 처리하여 시료로 사용하였다.

가수분해물은 굴 효소 가수분해물에 같은 양의 20%(w/v) trichloroacetic acid(TCA)를 넣고 혼합하여 제단백한 다음 원심분리(3,000 x g, 20분)한 상층액을 시료로 하여 semi-micro Kjeldahl법으로 질소를 정량한 후 측정하였다. 가수분해물의 계산은 가수분해물의 총질소량에 대하여 10% TCA 가용성 질소의 상대비율(%)로 표시하였다.

#### 일반성분, pH 및 휘발성 염기질소

일반성분은 AOAC법(1995)에 따라 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법으로 질소를 정량한 후 질소계수(6.25)를 이용하여 계산하였고, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 건식회화법으로 측정하였다. pH는 시

료에 10배량의 탈이온수를 가한 다음, pH meter(model 691, Metrohm, Swiss)로 측정하였고, 휘발성 염기질소 함량은 Conway unit를 사용하는 미량확산법(MSWJ, 1960)으로 측정하였다.

#### Angiotensin I converting enzyme(ACE)의 저해능, 항균성 및 항산화능

ACE 저해능은 Horiuchi et al.(1982)의 방법에 따라 시료를 전처리한 다음 20 uL를 Zorbax 300SB C<sub>8</sub> 칼럼(i.d. 4.6 x 150 mm, Hewlett Packard Co., USA)이 장착된 역상 HPLC(LC-10AVP, Shimadzu Co., Japan)에 주입하여 분석하였다. ACE 저해능은 ACE 활성을 50% 저해하는 데 필요한 저해제의 양을 IC<sub>50</sub>(mg/mL)로 표시하였다.

항균성은 gram positive 3 균주 (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*)와 gram negative 균주 (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* 및 *Vibrio parahaemolyticus*)를 이용하여 paper disc법(Davidson and Parish, 1989)으로 측정하였다. 항균성은 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)으로 나타내었다.

항산화능은 ferric thiocyanate법(Mitsuda et al., 1996)에 따라 분광광도계(UV-1601, Shimadzu Co., Japan)로 500 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 다음의 식에 따라 계산하여 %로 표시하였다.

$$\text{항산화활성(\%)} = [1 - (\text{시료 흡광도} / \text{대조군 흡광도})] \times 100$$

#### 분자량의 분포 측정

분자량 측정을 위하여 시료를 여과(0.45 um)한 다음 이를 0.1 M NaCl을 함유하는 0.01 M sodium phosphate 완충액(pH 7.0)으로 평행시킨 Sephadex G-50 칼럼(i.d. 1.6x100 cm)에 주입하였다. 이어서 칼럼을 같은 완충액으로 0.75 mL/min으로 용출하면서 5 mL 씩 분취하였다. 용출 단백질은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 검출하였다. 가수분해물의 획분별 분자량의 분포는 표준단백질(aprotinin, 6.5 kDa; cytochrome, 12.4 kDa, carbonic anhydrase, 29 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa)을 사용하여 작성한 분자량 검량곡선에 따라 측정하였다.

## 통계처리

각 실험항목의 반복횟수는 3회 실시하였으며, 실험결과는 평균과 표준편차 (mean±SD)로 나타내었다(Steel and Torrie, 1980).

## 결과 및 고찰

### 굴의 원료 특성

굴 효소 가수분해물의 제조 원료로 사용한 생굴의 일반성분, 휘발성 염기 질소 함량 및 pH는 Table 1과 같다. 원료로 사용한 생굴의 수분, 단백질, 조지방 및 조회분 함량은 각각 82.2%, 11.6%, 2.1% 및 1.1%로 수분을 제외하면 단백질이 주성분이었다. 본 실험에서 원료로 사용한 굴의 수분 및 단백질 함량은 Cha and Kim(1995)이 가수분해물의 원료로 사용한 굴의 수분 및 단백질 함량 (각각 78.5% 및 9.6%)에 비하여 높았다. 이는 두 시료 간에 채취시기, 채취지역 및 크기 등에 의한 차이 때문이라 생각되었다(Park et al., 1995). 한편 본 실험에서 사용한 원료 생굴의 신선도는 휘발성 염기질소 함량 및 pH가 각각 6.8 mg/100 g 및 6.40을 나타내어 아주 신선한 것으로 판단하였다. 일반적으로 수출용 굴의 휘발성 염기질소 및 pH는 각각 20 mg/100 g 이하 및 6.0 이상이어야 한다(Kim, 2003).

Table 1. Proximate composition, pH and volatile basic nitrogen (VBN) of raw oyster

Proximate composition (%)				VBN (mg/100 g)	pH
Moisture	Protein	Lipid	Ash	6.8±1.4	6.40±0.03
82.2±0.8*	11.6±0.4	2.1±0.3	1.1±0.3		

\* Values are the means±SD of three determinations.

### 휘발성 염기질소, pH 및 관능검사

효소의 종류 및 가수분해 시간에 따른 굴 효소 가수분해물의 휘발성 염기 질소 함량의 변화는 Fig. 1과 같다. 휘발성 염기 질소 함량은 생시료가 6.8 mg/100 g 이었고, 굴 효소 가수분해물의 경우 상업적 효소의 종류에 관계없이 가수분해 시간이 경과함에 따라 증가하였다. 가수분해 중 휘발성 염기질

소의 증가속도는 가수분해 시간 6시간까지는 서서히 증가하여 6시간 후에 18.1-20.2 mg/100 g의 범위였고 그 이후에는 급격히 증가하여 12 시간 후에 35.0-40.2 mg/100 g의 범위였다. 상업적 효소의 종류에 따른 가수분해물의 휘발성 염기질소 함량은 가수분해 시간 6시간까지는 크게 차이가 없었고 그 이후에는 약간의 차이가 있어서 Neutrase, trypsin, pepsin으로 가수분해한 것이 Alcalase, Flavourzyme, Protamex로 가수분해 한 것에 비하여 낮았다.

효소의 종류 및 가수분해 시간에 따른 굴 효소 가수분해물의 pH 변화는 Fig. 2와 같다. 생시료의 pH가 6.40인데 반하여 가수분해물의 pH는 효소의 종류에 관계없이 가수분해 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같이 가수분해 시간에 따른 가수분해물의 pH가 감소하는 것은 첨가한 효소의 작용으로 단백질이 분해되면서 산성 아미노산의 carboxyl 기의 유리화 더불어 굴에 함유되어 있는 글리코젠이 가수분해가 진행됨에 따라 해당 작용에 의하여 젖산으로 분해되었기 때문이라 판단된다(Park et al., 1995).

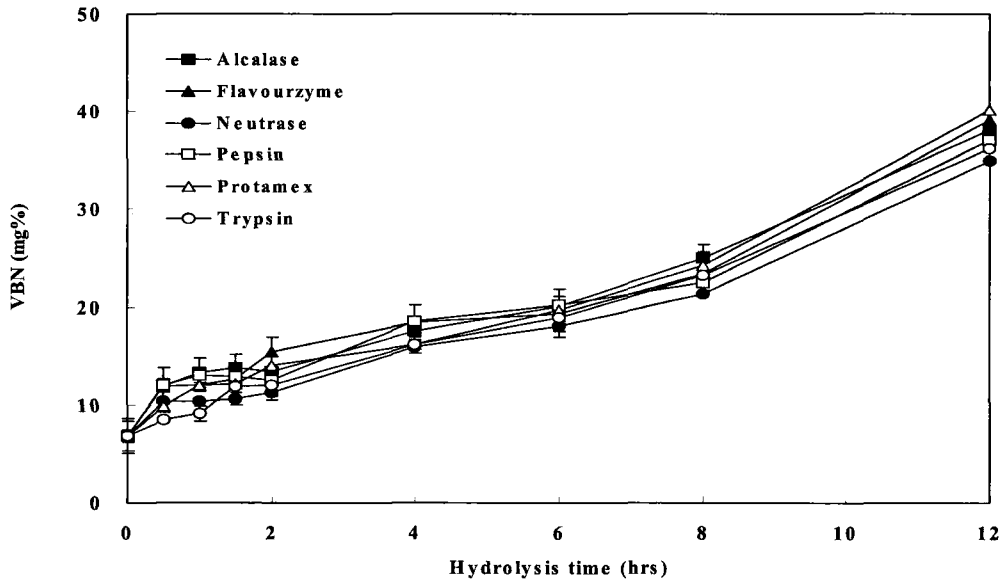


Fig. 1. Volatile basic nitrogen (VBN) of oyster hydrolysates with proteases and hydrolysis time.

그리고 효소에 의한 굴 가수분해물 중 pH의 감소속도는 가수분해 8시간까지는 서서히 감소하여 12 시간 후에 4.43-5.54의 범위였다. 효소의 종류에 따른 가수분해물의 pH는 가수분해 8시간까지는 크게 차이가 없었고, 그 이후에는 차이가 있어서 Protamex 가수분해물이 가장 낮았고 다음으로 Neutrase, pepsin, trypsin 그리고 Alcalase 가수분해물의 순이었으며, Flavourzyme 가수분해물이 가장 높았다.

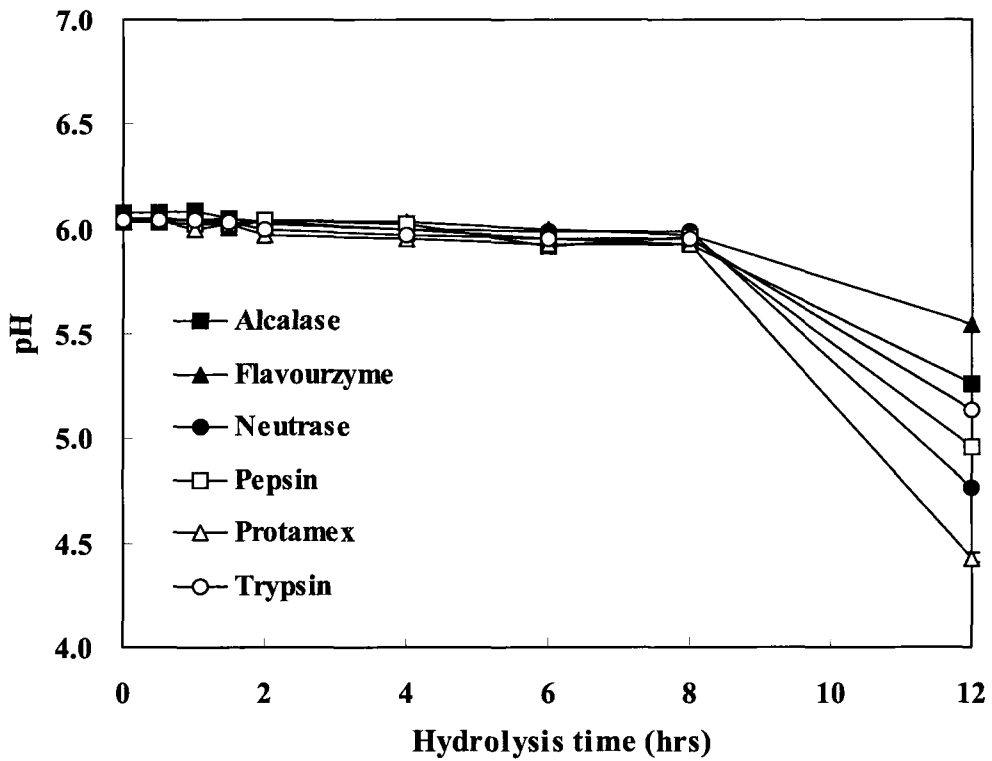


Fig. 2. pH of oyster hydrolysates with proteases and hydrolysis time.

상업적 효소의 종류 및 가수분해 시간에 따른 굴 효소 가수분해의 부패취 정도를 관능검사한 결과는 Table 2와 같다. 생시료는 관능검사 결과 전 관능요원이 굴 특유의 신선한 향을 나타낸다고 보고하였다. 하지만 상업적 효소와 가수분해 시간을 달리하여 가수분해물을 제조한 다음 관능검사를 실시한 결과 상업적 효소의 종류에 관계없이 가수분해 6시간까지는 전 관능요원이 부패취를 전혀 감지 못하였으나, 가수분해 8시간 후에는 전 가수분해물에서 5-7명의 범위에서 부패취를 감지하였고 가수분해 12 시간 후에는 전 가수분해물에서 모든 관능요원들이 부패취를 감지하였다.

가수분해 시간에 따른 휘발성 염기질소 함량, pH 및 관능검사의 결과로 미루어 6종의 상업적 효소를 이용한 굴 효소 가수분해물의 제조 시 적절한 가수분해 시간은 6시간 이하로 판단되었다.

Table 2. Sensory evaluation of oyster hydrolysates with proteases and hydrolysis

Enzymes	Hydrolysis time (hr)							
	0.5	1.0	1.5	2.0	4.0	6.0	8.0	12.0
Alcalase	0 <sup>1)</sup>	0	0	0	0	0	6	9
Flavourzyme	0	0	0	0	0	0	7	9
Neutrase	0	0	0	0	0	0	5	9
Protamex	0	0	0	0	0	0	5	9
Pepsin	0	0	0	0	0	0	6	9
Trypsin	0	0	0	0	0	0	6	9

1) Values indicate the number of panel member felt a putrid smell from oyster hydrolysates.

## 가수분해율

효소의 종류 및 가수분해 시간에 따른 굴 효소 가수분해물의 가수분해율의 변화는 Fig. 3과 같다. 가수분해율은 효소 처리하지 않은 대조구의 경우 15.2% 였다. 이를 6종의 상업적 효소로 가수분해하는 경우 효소 가수분해물의 가수분해율은 효소의 종류에 관계없이 2시간까지는 가수분해 시간이 경과함에 따라 급격히 증가하여 31.2-32.8% 범위였고 그 이상의 가수분해 시간에서는 완만한 증가를 하였으며, 6시간 이후에는 38.3-41.3% 범위, 12시간 후에는 42.2-46.6% 범위였다. 상업적 효소로 1시간 처리한 가수분해물의 가수분해율은 Protamex와 Alcalase 가수분해물이 각각 29.0% 및 28.0%였으며, 다음으로 Flavourzyme이 27.0%, Neutrase 24.7%로 가장 낮았다. Pepsin 및 trypsin을 사용한 가수분해물의 가수분해율은 1시간까지 급격한 증가를 하여 모두 22.3%를 나타내었으나, 그 이후에는 pepsin 가수분해물의 경우 거의 증가하지 않아 6시간 후에는 23.9%, 12 시간 후에는 24.8%를 나타내었고 trypsin 가수분해물의 경우 미미하게 증가하여 6시간 후에는 27.9%를 12 시간 이후에는 30.0%를 나타내었다. 이 같은 결과에 미루어 굴에 대한 가수분해능은 endoprotease가 주로 함유된 Alcalase 및 Protamex가 endo- 및 exoprotease의 혼합형태인 Neutrase와 Flavourzyme 보다 우수하였다. 또한 상업적 효소가 기질 특이성이 높은 pepsin이나 trypsin과 같은 소화 효소에 비하여 우수하였다.

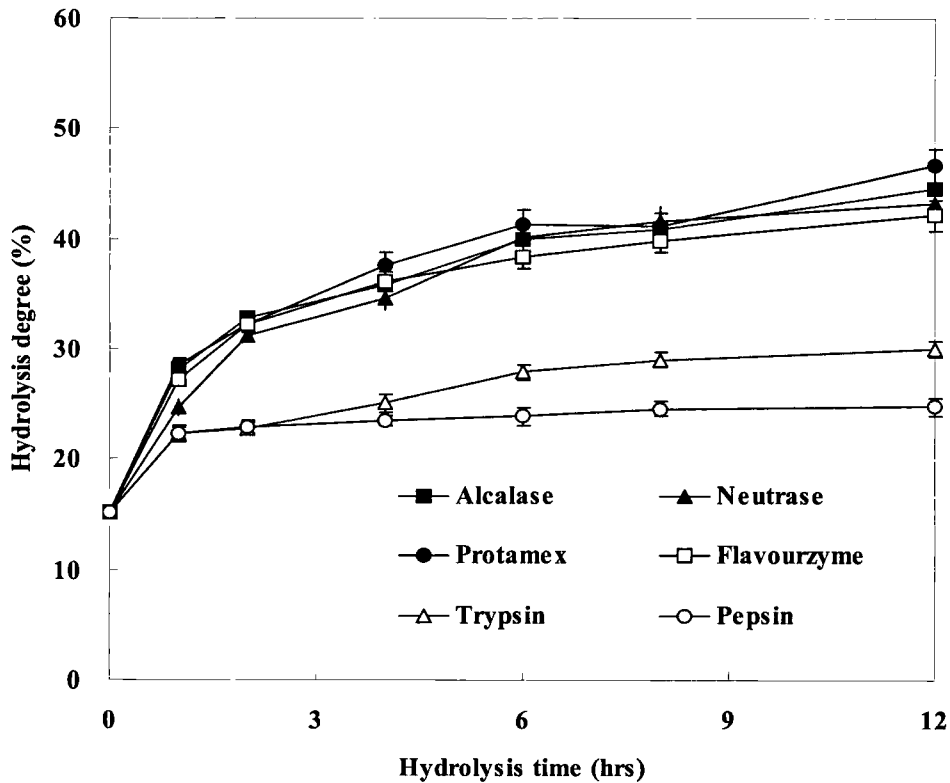


Fig. 3. Hydrolysis degree of one-step processing for preparation of oyster hydrolysates with proteases and hydrolysis times.

### Angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해 특성

효소의 종류 및 가수분해 시간에 따른 굴 효소 가수분해물의 angiotensin-I converting enzyme (ACE) 저해능의 변화는 Table 3과 같다. ACE 저해능은 산업적 효소의 종류에 관계없이 가수분해 시간에 따른 의존성, 즉 가수분해율에 따른 의존성은 없었다. 이와 같은 결과는 단백질 가수분해물의 기능성이 peptide를 구성하는 아미노산의 종류에 의해 결정되므로 적정 이상으로 가수분해되는 경우 기능성 함유 peptide의 생성보다 오히려 분해가 많았기 때문이라 판단되었다. 한편 Byun과 Kim(2001)도 산업적 효소를 이용하여 명태껍질 가수분해물을 제조하여 ACE 저해능을 살펴본 결과 가수분해율과 ACE 저해능 간에는 상관성이 없었다고 보고한 바 있다. 효소의 종류에 따른 굴 효소 가수분해물의 ACE 저해능(IC<sub>50</sub>)은 가수분해를 1시간 실시한 경우,



Protamex가 1.49 mg/mL로 농도가 가장 낮아 저해능이 강하였으며, 다음으로 Alcalase(1.70 mg/mL), trypsin(2.15 mg/mL), Neutrase(4.19 mg/mL) 그리고 pepsin 가수분해물(7.39 mg/mL)의 순이었으며, Flavourzyme 가수분해물이 16.13 mg/mL로 가장 높아 저해능이 가장 낮았다.

Table 3. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity (IC<sub>50</sub>) of one-step processing for preparation of oyster hydrolysates with proteases and hydrolysis times (mg/mL)

Enzymes	Hydrolysis time (hrs)					
	0.5	1.0	1.5	2.0	4.0	6.0
Alcalase	3.091±0.20	1.698±0.10	2.123±0.10	2.341±0.10	2.501±0.10	2.346±0.10
Flavourzyme	6.836±0.40	16.312±0.70	9.320±0.40	11.585±0.60	16.727±0.90	11.839±0.70
Neutrase	3.451±0.10	4.190±0.20	4.060±0.20	3.960±0.10	6.643±0.30	8.690±0.50
Pepsin	7.730±0.50	7.390±0.30	9.070±0.40	9.420±0.30	11.121±0.50	11.378±0.60
Protamex	1.627±0.10	1.490±0.10	2.688±0.20	4.837±0.20	2.833±0.10	3.610±0.20
Trypsin	3.835±0.20	2.147±0.10	3.450±0.20	3.548±0.10	2.918±0.10	4.103±0.20

그리고 효소 가수분해물의 시간에 따른 ACE 저해능(IC<sub>50</sub>)이 Alcalase, Protamex, pepsin 및 trypsin은 가수분해 1시간에서 Flavourzyme(6.84 mg/mL) 및 Neutrase(3.45 mg/mL)는 가수분해 30분에서 우수한 것으로 나타났다. 이와 같은 효소의 종류에 따른 굴 효소 가수분해물의 ACE 저해능의 차이는 효소 기질 특이성에 의해 생성된 peptide의 아미노산 구성에 차이가 있기 때문이다(Suetsuna et al., 1988). 한편 Byun and Kim(2001)은 명태 껍질을 기질로 하여 Pronase E로 2시간 처리한 가수분해물의 ACE 저해능(IC<sub>50</sub>)

은 0.66 mg/mL라고 보고하였고, Ukeda 등(1992)은 정어리 근육을 기질로 하여 pepsin으로 처리한 가수분해물의 ACE 저해능(IC<sub>50</sub>)은 0.62 mg/mL라고 보고하였다. 이 같은 보고로 미루어 본 실험에서 검토한 굴을 기질로 하여 Protamex로 1시간 동안 처리한 가수분해물의 ACE 저해능이 명태 및 정어리 가수분해물들의 ACE 저해능(IC<sub>50</sub>)에 비해 낮았으나, Protamex의 단가가 Pronase E 및 pepsin의 단가에 비하여 확연히 낮아 이를 이용한 제품 개발 시에 경제성의 측면에서 장점이 있을 것으로 판단하였다.

#### 항균 특성

효소의 종류 및 가수분해 시간을 달리하여 제조한 굴 효소 가수분해물의 gram positive 3종(*B. cereus*, *L. monocytogenes* 및 *S. aureus*), gram negative 3종(*E. coli*, *S. Typhimurium* 및 *V. parahaemolyticus*)에 대한 항균성은 Table 4와 같다.

Table 4. Antimicrobial effects of one-step processing for preparation of oyster hydrolysates with protamex and hydrolysis time

Enzymes	Microorganisms	Hydrolysis time (hrs)						
		0.5	1.0	1.5	2.0	4.0	6.0	
Alcalase	Gram (+) bacterial	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
	Gram (-) bacterial	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-
Flavour zyme	Gram (+) bacterial	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
	Gram (-) bacterial	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-
Neutrase	Gram (+) bacterial	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
	Gram (-) bacterial	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-
Pepsin	Gram (+) bacterial	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
	Gram (-) bacterial	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-
Protamex	Gram (+) bacterial	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
	Gram (-) bacterial	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-
Trypsin	Gram (+) bacterial	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
	Gram (-) bacterial	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-

- : Not inhibition

효소의 종류와 가수분해 시간에 따른 굴 가수분해물은 항균성 측정에 사용된 모든 균주에 대하여 항균 활성을 나타내지 않았다. 이상의 결과로 미루어보아 굴 효소 가수분해물이 항균성 보다는 오히려 미생물들의 영양원으로 이용되었을 것으로 판단하였다. 한편 Pellegrini et al.(2001)도 효소로 단백질 가수분해물을 제조한 다음 *E. coli*와 같은 gram 음성균주에 대하여 항균성을 살펴본 결과 항균성은 인정되지 않았다고 보고하였다.

### 항산화능

효소의 종류 및 가수분해 시간을 달리하여 제조한 굴 효소 가수분해물의 항산화능은 Table 5와 같다.

Table 5. Antioxidant activity (EC<sub>50</sub>) of one-step processing for preparation of oyster hydrolysates with proteases and hydrolysis time (mg/mL)

Enzymes	Hydrolysis time (hrs)					
	0.5	1.0	1.5	2.0	4.0	6.0
Alcalase	6.441±0.40	5.060±0.30	2.561±0.20	3.970±0.20	4.023±0.30	3.876±0.20
Flavour zyme	2.716±0.10	1.809±0.20	4.129±0.20	5.982±0.40	8.243±0.50	5.724±0.40
Neutrase	3.651±0.20	1.803±0.10	1.520±0.10	2.137±0.20	4.250±0.30	9.272±0.60
Pepsin	4.120±0.30	2.501±0.10	1.482±0.10	1.781±0.20	3.674±0.10	3.972±0.20
Protamex	2.397±0.20	1.164±0.10	3.320±0.20	6.199±0.50	4.287±0.30	5.624±0.30
Trypsin	1.901±0.20	4.787±0.30	7.141±0.50	5.106±0.30	4.624±0.20	6.827±0.50

굴 효소 가수분해물의 항산화능은 ACE 저해능과 같이 상업적 효소의 종류에 관계없이 가수분해율에 따른 의존성은 없었다. 이 같은 결과는 단백질에 가수분해물의 기능성은 peptide를 구성하는 아미노산의 조성 특히 말단기를

구성하는 아미노산의 종류에 결정적으로 영향을 받기 때문에 과도하게 가수분해되는 경우 기능성 함유 peptide가 오히려 분해되기 때문이라 판단된다. 한편 Wu et al.(2003)도 자가소화 효소 및 상업적 효소를 이용하여 고등어 근육 가수분해물을 제조하여 항산화능을 살펴본 결과 가수분해 시간과 항산화능 간에는 상관성이 없었고 anserine 및 carnosine과 같은 유리아미노산과 몇몇 peptide가 상관성이 있었다고 보고하였다. 효소의 종류에 따른 굴 효소 가수분해물의 항산화능은 가수분해를 1시간 실시한 경우 Protamex 가수분해물(1.16 mg/mL)이 가장 높았고 다음으로 Neutrase(1.80 mg/mL), Flavourzyme(1.81 mg/mL), pepsin(2.50 mg/mL) 그리고 trypsin 가수분해물(4.79 mg/mL) 등의 순이었으며, Alcalase 가수분해물(5.06 mg/mL)이 가장 낮았다. 그리고 총 6시간의 가수분해 시간 중에서 Alcalase(2.56 mg/mL), Neutrase(1.52 mg/mL) 및 pepsin(1.48 mg/mL)은 가수분해 1.5시간에서, Flavourzyme 및 Protamex는 가수분해 1시간에서, trypsin(1.90 mg/mL)은 가수분해 0.5 시간에서 항산화능이 우수한 것으로 나타났다. 이 같이 효소의 종류에 따른 굴 효소 가수분해물 간의 항산화능의 차이는 효소의 기질 특이성에 의해 생성된 peptide의 아미노산 조성에 차이가 있기 때문이다. 본 연구에서 6종의 상업적 효소를 이용하여 6시간 동안 처리한 가수분해물 간의 항산화성은 Protamex로 1 시간동안 가수분해하여 제조한 가수분해물이 가장 우수하였다.

#### 분자량 분포

가수분해 시간(0시간, 0.5 시간, 1시간 및 2 시간)을 달리하여 제조한 Protamex 굴 가수분해물의 분자량 분포는 Fig. 4와 같다.

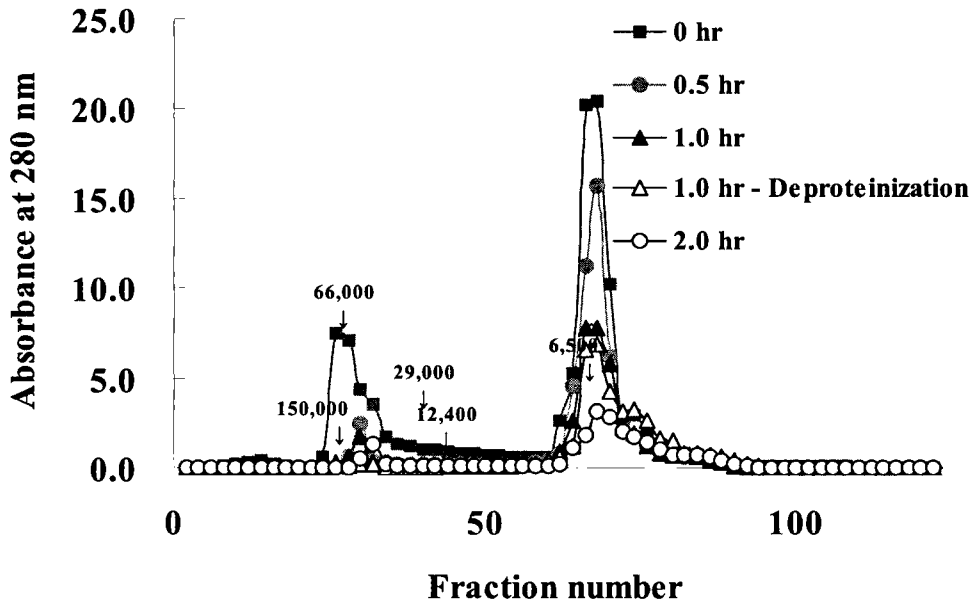


Fig. 4. Molecular weight distribution of oyster hydrolysates with Protamex and hydrolysis time.

가수분해 하지 않은 대조구는 크게 fraction 22-38번 사이의 고분자 획분(29-66 kDa)과 fraction 60-72번 사이의 저분자 획분(6.5 kDa 이하)으로 구성되어 있었고, 가수분해 시간이 경과함에 따라 고분자 획분과 저분자 획분이 모두 감소하는 경향을 나타내었다. 아울러 TCA를 사용하여 제단백한 1시간 가수분해물의 분자량 분포에서는 제단백 처리하지 않은 가수분해물에 비해 29-66 kDa의 고분자 획분의 확연한 감소를 나타내어 TCA에 의한 고분자량 단백질의 제거효과가 있는 것으로 나타났으며, 이들 고분자 획분은 효소 가수분해 시간을 연장하며 고분자 획분의 가수분해를 높일 수 있을 것으로 판단되나, 본 실험 결과(2 시간 이상의 가수분해)에서도 나타났듯이 가수분해 시간의 연장에 의해 저분자 획분(6.5 kDa 이하)도 과도한 분해로 그 분자량의 분포가 감소함으로서 ACE 저해능과 항산화능과 같은 기능 특성이 감소하는 결과를 보였다. 따라서 Protamex를 이용하여 가수분해물을 제조하는 경우 가수분해 시간은 기능 특성을 고려하여 1시간이 적절한 것으로 판단되었고 차후의 연구에서는 기능성 개선을 위해 고분자 획분을 제거하기 위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 가수분해물의 유리아미노산의 변화

가수분해 시간 (30 분, 1 시간 및 2 시간)을 달리하여 제조한 Protamex 굴 가수분해물의 유리아미노산 함량 및 조성은 Table 6과 같다. 유리아미노산 총 함량은 30 분 동안 가수분해한 가수분해물이 1,216.0 mg/100g이었고, 1 시간 가수분해한 가수분해물 및 2 시간 가수분해한 가수분해물이 각각 1,411.8 mg/100g 및 1,465.4 mg/100g으로 각각 약 16% 및 약 21% 증가하였다. Protamex 굴 가수분해물의 주요 유리아미노산은 가수분해 시간에 관계없이 주요 유리아미노산은 aspartic acid (8.4-10.6%), glutamic acid (12.2-13.7%), proline (7.3-8.0%), glycine (8.0-8.2%), alanine (6.7-8.2%), isoleucine (7.6-7.7%) 및 leucine (7.3-8.4%) 등이었다. 한편, ACE 저해능이 가장 우수하였던 1 시간 가수분해한 가수분해물의 아미노산이 다른 시간 (30 분 및 2 시간) 동안 가수분해한 가수분해물보다 aspartic acid와 glutamic acid가 약간 낮았고, proline, alanine, leucine 및 arginine 등이 약간 높았다.

Table 6. Free amino acid (FAA) composition of one-step enzymatic oyster hydrolysates incubated with Protamex for different times

Amino acid	0.5 hr		1.0 hr		2.0 hrs	
	mg/100g	FAA %	mg/100g	FAA %	mg/100g	FAA %
Aspartic acid	117.2	9.6	118.4	8.4	155.3	10.6
Threonine	44.5	3.7	56.0	4.0	64.9	4.4
Serine	48.7	4.0	57.9	4.1	67.6	4.6
Glutamic acid	163.8	13.5	172.9	12.2	201.2	13.7
Proline	89.0	7.3	112.7	8.0	108.5	7.4
Glycine	99.6	8.2	112.4	8.0	116.7	8.0
Alanine	85.8	7.1	115.9	8.2	97.8	6.7
Cysteine	22.6	1.9	22.7	1.6	12.7	0.9
Valine	67.0	5.5	74.9	5.3	67.9	4.6
Methionine	40.8	3.4	44.5	3.2	47.4	3.2
Isoleucine	93.5	7.7	107.2	7.6	110.7	7.6
Leucine	91.2	7.5	119.7	8.4	106.3	7.3
Tyrosine	34.0	2.8	37.6	2.7	42.1	2.9
Phenylalanine	55.1	4.5	56.6	4.0	63.8	4.4
Histidine	19.7	1.6	22.5	1.6	26.1	1.8
Lysine	77.5	6.4	91.9	6.5	94.8	6.5
Arginine	66.0	5.4	88.0	6.2	81.6	5.6
Total	1,216	100.1	1,411.8	100.0	1,465.4	100.2

한편 Cho et al.(2000)은 납두 발효과정 중 생성된 ACE 저해 peptide를 분리하여 아미노산 조성을 살펴 본 결과 alanine이 30.8%로 가장 높았다고 보고하였고, Yeum et al.(1992)은 고등어 근육 단백질을 복합효소 및 bromelain로 가수분해한 가수분해물에서 ACE 저해능이 있는 peptide를 분리, 정제하고, 이의 아미노산 조성을 살펴본 결과 aspartic acid, glutamic acid, lysine, leucine, valine 및 alanine의



조성비가 높았다고 보고 한 바 있으며, Suetsuna et al.(1988)은 12 종의 어육과 3 종의 폐류를 pepsin으로 가수분해한 다음 ACE 저해 peptide를 분리하고 아미노산 조성을 살펴 본 결과 aspartic acid, glutamic acid, arginine, proline 및 leucine의 함량이 특징적으로 많았다고 보고한 바 있다. 한편, Cheung et al.(1980)은 peptide들의 ACE 저해효과에 미치는 C 말단 및 N 말단 아미노산 잔기의 영향에 대하여 검토한 결과, C 말단에는 tryptophan, phenylalanine, tyrosine 및 proline 등이, N 말단에는 histidine을 비롯한 염기성 아미노산과 방향족 아미노산 및 소수성 아미노산이 자리 잡고 있다고 보고한 바 있다. 그리고, Miyoshi et al.(1991)은 효소 옥수수 배유 가수분해물 중 ACE 저해능이 있는 peptide의 경우 C말단에는 proline이, N말단에는 leucine이 자리 잡고 있었다고 보고한 바 있다. 또한, Matsumura et al.(1993)은 효소 가다랑어 내장 가수분해물 중 ACE 저해능이 우수한 peptide의 경우 공통적으로 N 말단에는 valine, isoleucine 및 leucine과 같은 소수성 아미노산이 중앙에는 arginine 및 lysine과 같은 염기성 아미노산이, 그리고, C말단에는 proline이 위치하고 있었다고 보고한 바 있다. 이와 같은 보고와 본 Protamex 굴 가수분해물의 유리아미노산 조성비의 결과로 미루어 보아 Protamex 굴 가수분해물 중 proline, alanine, leucine 및 arginine 등으로 구성된 peptide가 angiotensin I 과 경쟁적으로 결합하여 ACE의 활성을 감소시키는데 주요하게 관여 하리라 판단되었다. 그리고, Chen et al.(1995)과 Rajapakse et al.(2005)은 단백질 가수분해물의 경우 항산화성을 가지기 위해서는 소수성이 높아야 한다고 보고하였고, 본 연구의 Protamex 굴 가수분해물의 경우도 glutamic acid, aspartic acid 등과 같은 친수성 아미노산의 함량이 많았으나, proline, alanine 및 leucine 등과 같은 소수성 아미노산의 함량도 높았고, 특히 Protamex 로 굴을 30 분 및 2 시간 가수분해하여 제조한 가수분해물에 비하여 1시간 가수분해시킨 가수분해물이 arginine을 제외한다면 proline, alanine 및 leucine 등과 같은 소수성 아미노산의 함량이 높아, 이들로 적절히 구성된 peptide들이 Protamex 굴 가수분해물 중 항산화능에 지대하게 관여하리라 추정되었다.

## 요약

양식 굴을 효율적으로 이용할 목적으로 6가지의 상업적 효소(Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, pepsin, trypsin)를 이용하여 굴 효소 가수분해물을 제조하고 그 특성에 대하여 살펴보았다. 상업적 효소 굴 가수분해물의 항산화능 및 ACE 저해능은 모두 Protamex로 1 시간 동안 가수분해시킨 것이 가장 우수하였고, 이때 이들의  $EC_{50}$ 과  $IC_{50}$  값은 각각 1.16 mg/mL 및 1.49 mg/mL였다. 항균성은 모든 효소 가수분해물에서 인정되지 않았다. 그리고 ACE 저해능 및 항산화능과 가수분해 시간은 상관이 없었다. Protamex로 1시간 처리한 굴 가수분해물의 경우 가수분해 처리하지 않은 대조구에 비하여 29-66 kDa 획분과 6.5 kDa 부근의 획분이 모두 감소하여 저분자화 하는 경향이였다.

## 참고문헌

- AOAC. 1995. Official method of analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemests. Washington. DC.
- Byun HG, Kim SK. 2001. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry* 36: 1155-1162.
- Cha YJ, Kim EJ. 1995. Response surface methodology in development of oyster hydrolysate. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 427-433.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 43 : 574-578.
- Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF, Cushman DW. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin I converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.*, 255: 401-407.
- Cho YJ, Cha WS, Bok SK, Kim MU, Chun S, Choi UK, Kim SH and Park KS. 2000. Production and separation of angiotensin converting enzyme inhibitor During *Natto* fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 29 : 737-742.
- Davisdon PM, Parish ME. 1989. Methods for testing the efficacy of food anti-microbials. *Food Technol* 1: 148-151.
- Horiuchi M, Fujimura KI, Terashima T, Iso T. 1982. Method for determination of angiotensin-converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 233: 123-130.
- Hosoi M, Kubota S, Toyohara M, Toyohara H, Hayashi I. 2003. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. *Fisheries Science* 69: 395-400.
- Jeong BY, Choi BD, Moon SK, Lee JS. 1998. Proximate composition, cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol content in 72 species of Korean fish. *J Korean Fish Sci Tech* 1: 129-146.
- Kim CY, Pyeun JH, Nam JN. 1981. Decomposition of glycogen and protein in pickled oyster during fermentation with salt. *J Korean*

- Fish Soc 14: 66-71.
- Kim JS. 2003. Food Chilling and Freezing. Hyoil Publishing Co., Seoul. p 236-239.
- Kim JS, Heu MS. 2001. Preparation of instant powdered soup using canned oyster processing waste water and its characteristics. J Korean Fish Soc 34: 285-290.
- Li Q, Osada M, Mori K. 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. Fisheries Science 66: 502-508.
- Matsumura N, Fujii M, Takeda Y and Shimidzu T. 1993. Isolation and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *BioSci. Biotech. Biochem.*, 57: 1743-1744.
- Ministry of Social Welfare of Japan. 1960. Volatile basic nitrogen. In Guide to Experiment of Sanitary Infection. Kenpaku, Tokyo. p 30-32.
- Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. 1996. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyoto Shokuryo* 19: 210-214
- Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka H and Maruyama. 1991. Structures and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitors in an  $\alpha$ -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 55: 1313-1318.
- MOMAF. 2003. Statistical Year Book of Maritime Affairs and Fisheries. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Seoul. p 1439.
- National Fisheries Research and Development Agency. 1995. Supplemented Chemical composition of Marine Products in Korea. Yemoon Publishing Co., Seoul. p. 139-143.
- Park YH, Chang DS, Kim SB. 1995. Processing and Utilization of Seafood. Hyungsul Publishing Co., Seoul. p 347-361.
- Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P. 2001. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochem Biophysics Acta* 1526: 131-140.
- Rajapakse N, Mendis E, Jung W-K, He J-Y, Kim S-K. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its

- antioxidant properties. *Food Research International* 38: 175-182
- Shiau CY, Chai T. 1990. Characterization of oyster shucking liquid wastes and their utilization as oyster soup. *J Food Sci* 55: 374-378.
- Soudant P, Chu FL. 2001. Lipid class and fatty acid composition of the protozoan parasite of oysters, *Perkinsus marinus* cultivated in two different media. *J Eukaryotic Microbiology* 48: 309-319.
- Steel RGD, Torrie JH. 1980. *Principle and Procedures of Statistics*. 1st Ed. Kogakusha. McGraw-Hill, Tokyo. p. 187-221.
- Suetsuna K, Yamagami M, Kuwata K. 1988. Inhibitory activity against angiotensin I converting enzyme of peptides originating from fish and shellfish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1853-1858.
- Ukeda H et al. 1992. Peptides from Peptic Hydrolyzate of Heated Sardine Meat That Inhibit Angiotensin I Converting Enzyme. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 66: 25-29.
- Wu HC, Chen HM, Shiau CY. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International* 36: 949-957.
- Yeum DM, Lee TG, Byun HS, Kim SB, Park YH. 1992. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Bull. Korean Fish. soc.*, 25 : 229-235.

### 제 3 절 이단 효소 가수분해물의 제조와 특성

#### Abstract

The objectives of this study were to prepare hydrolysates from oyster by two-step processing and to investigate its physiological functionalities. The putrid odor in all hydrolysates were not observed. The degree of hydrolysis by two-step processing was a similar to that by one-step processing. ACE inhibitory activities were improved by two-step processing. Especially, the hydrolysate of Protamex followed by Neutrase showed the highest ACE inhibitor, and its I C<sub>50</sub> value was 0.40 mg/mL. Antimicrobial effect was not observed in all hydrolysates. Antioxidative effect of hydrolysate treated with Protamex and Neutrase in order was improved, compared with Protamex hydrolysate. The fractions of high molecular weight in range of 29-150 kDa shifted to the fraction of lower molecular weight of 6.5 kDa. The free amino acids were increased with two-step processing.

#### 서론

우리나라 탈각굴의 년 평균 생산량은 35,000톤 내외이나, 소비량은 18,000톤 정도로 해마다 많은 굴이 과잉 생산되고 있다(MOMAF, 2003). 국내 굴의 소비는 굴 수협이 적극적인 홍보로 인해 다양한 레스토랑 조리 식품의 형태로 소비를 진작하고 있으나, 대부분이 생식되거나 김치 제조에 사용되고 있다. 국외적으로 중국이 대량의 굴을 생산하여 가격에 따른 경쟁력을 무기로 소비처를 개발함에 따라 국내에서 통조림의 형태로 가공하여 수출을 주도하던 업체의 물량을 대부분 대체함에 따라 국내의 업체에 큰 타격을 가하였고, 현재는 생굴의 형태로 수입됨에 따라 국내산 굴의 시장 규모는 더욱 축소되고 있는 실정이다. 이 같은 실정에 비추어 국내산 굴의 잉여 생산량은 더욱 늘어날 것으로 예측되어 신규 어장 허가의 억제와 축소 등 정책적인 대책을 수립하고 있으나 어민들의 반발로 부진한 실정이다. 이 같은 실정에 미루어 다양한 용도로 사용이 가능한 부가가치가 높은 식품 소재 개발이 절실하다. 그러나 굴에 대한 국내외 연구들의 대부분은 굴의 성분 특성에 관한 결과가

주류를 이루었고 (Jeong et al., 1998; Li et al., 2000; Soundant and Chu, 2001; Hosoi et al., 2003), 일부 개발을 시도한 가공품의 경우에도 저차 가공인 천연 조미료 개발(Shiau and Chai, 1990; Kim and Heu, 2001)에 불과하며 양식 굴의 소비에 크게 기여하지 못하는 실정이다.

본 연구에서는 현재 잉여 생산되고 있으나 단백질 함량이 비교적 높고, 풍부한 아연을 함유하고 있으며, 미지 식물성 플랑크톤으로 인한 기능성을 기대할 수 있는 양식산 굴을 이용하여 기능성 식품 소재로 개발하기 위해 상업용 효소를 사용하여 2단 가수분해물을 제조하고 이들의 기능적 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용한 굴은 양식산 참굴(*Crassostrea gigas*, 각장  $4.6 \pm 2.3$  cm, 각중  $9.9 \pm 3.2$  g)은 경남 통영 인근 양식장에서 생굴 시판을 목적으로 채취한 것을 빙장 상태에서 30분 이내에 실험실로 옮긴 다음, 지퍼백에 일정량씩 포장한 후 냉동고( $-25$  °C)에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

### 효소 및 균주

굴 가수분해물의 제조를 위하여 사용한 상업적 효소들 중에서 Alcalase 2.4 L( $2.4$  AU/g, 이하 Alcalase로 명명), Flavourzyme 500 MG( $500$  LAPG/g, 이하 Flavourzyme로 명명), Neutrase 0.8 L( $0.8$  AU/g, 이하 Neutrase로 명명), Protamex 1.5 MG( $1.5$  AU/g, 이하 Protamex로 명명)는 Novozyme-Korea(Pusan, Korea)에서 pepsin 570 unit/mg solid(이하 pepsin으로 명명) 및 trypsin 12,800 unit/mg solid(이하 trypsin으로 명명)는 Sigma사(Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다.

굴 효소 가수분해물의 항균성 측정을 위한 균주는 gram positive 3균주(*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*)와 gram negative 3균주(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*)를 2004년 8월에 한국미생물보존센터로부터 분양 받아 사용하였다.

## 2단 굴 효소 가수분해물의 제조

2단 효소 굴 가수분해물의 제조 방법은 Fig. 1과 같다. 즉 원료 굴을 해동한 다음 굴에 동량의 증류수를 가하고 균질화하였다. 여기에 원료 굴 단백질의 1%에 해당하는 효소를 가하고 제조회사에서 제시한 최적 온도와 pH로 조정된 다음(Table 1), 진탕 항온기(Orbital shaker, Forma Scientific, USA)에서 일정시간(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 및 6.0 시간)동안 효소와 반응시켰다. 이어서 효소 가수분해물의 실활을 위하여 열탕에서 10분 동안 처리한 후 방냉, 원심분리(1,000 x g, 20분) 및 여과하여 1단 효소 굴 가수분해물을 제조하였다. 1단 효소 가수분해물에 Protamex(1단 효소 굴 가수분해물의 제조를 위한 최적 효소)를 제외한 5 종류의 효소(Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, pepsin, trypsin)를 가하고 각 효소별로 제조회사에서 제시한 최적온도와 pH에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 끓는 물에서 10분 동안 실활시켜 방냉하였다. 이어서 방냉시킨 굴 효소 가수분해물을 원심분리(1,000 x g, 20분) 및 여과하여 2단 효소 굴 가수분해물(1단 효소 가수분해)을 제조하였다. 한외여과물은 에탄올로 제단백한 2단 효소 굴 가수분해물을 30, 10, 5, 3 kDa의 막이 장착된 한외여과기(8200, Amicon, USA)로 여과시켜 제조하였다.

### Frozen oyster

thawing

add water

homogenize

### Homogenate

add enzyme (Protamex)

react at optimal temperature with different time

heat in boiling water for 10 min

centrifuge (10,000 x g, 20 min)

filter

### One-step enzymatic hydrolysates

Add enzyme (Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, pepsin, trypsin)

react at optimal temperature for 1 hr

heat in boiling water for 10 min

cool at ice water



centrifuge (1,000 x g, 20 min)  
 filter  
 Two-step enzymatic hydrolysate  
 precipitate protein with ethanol  
 ultrafiltrate with various membrane (30, 10, 5, 3 kDa)  
 Enzymatic hydrolysate

Fig. 1. Flow chart for enzymatic hydrolysates from oyster by two-step processing.

Table 1. Properties of protease used in experiment

Enzyme	Optimal conditions		Manufacture origin
	Temp., °C	pH	
Alcalase 2.4 LFG	55-70	6.5-8.5	Bacillus licheniformis
Flavourzyme 500 MG	50	7.0	Aspergillus oryzae
Neutrase 0.8 L	45-55	6.0	Bacillus amyloliiensquefaciens
Protamex 1.5 MG	40	6.0-7.0	Bacillus sp.
Pepsin 570 unit/mg solid	37	2.0-4.0	Procine gastric mucosa
Trypsin 12,800 unit/mg solid	37	7.0-9.0	Bovine pancreas

#### pH 및 휘발성 염기질소

pH는 시료에 10배량의 탈이온수를 가한 다음 pH meter (691, Metrohm, Swiss)로 측정하였고, 휘발성 염기질소 함량은 Conway unit를 사용하는 미량확산법(MSWJ, 1960)으로 측정하였다.

#### 가수분해도의 측정

가수분해도 측정을 위한 시료는 굴 효소 가수분해물에 같은 양의 20% (w/v) trichloroacetic acid(TCA)를 넣고 혼합하여 제단백한 다음 원심분리

(1,000 x g, 20분)하여 상층액을 사용하였다. 가수분해도는 제조한 시료 일정량을 semi-micro Kjeldahl법으로 정량하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = 10\% \text{ TCA 가용성 질소량} / \text{총 질소량} \times 100$$

### Angiotensin I converting enzyme(ACE)의 저해능, 항균성 및 항산화능

ACE 저해능은 Horiuchi 등(1982)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 소정 농도의 시료 15 uL에 정제 ACE(60 mU/mL) 50 uL를 가한 후 preincubation(37 °C, 30분)시킨 후 10% trifluoroacetic acid (TFA) 20 uL를 가하여 반응을 정지시켰다. 이어서 반응용액 20 uL를 Zorbax 300SB C<sub>8</sub> 칼럼(i.d. 4.6x150 mm, Hewlett Packard Co., USA)이 장착된 역상 HPLC(LC-10AVP, Shimadzu Co., Japan)에 주입하여 분석하였다. ACE 저해능은 ACE 활성을 50% 저해하는 데 필요한 저해제의 양을 IC<sub>50</sub>(mg/mL)로 표시하였다.

항균성은 paper disc법으로 측정하였다(Davisdon and Parish, 1989). 실험용 평판 배지는 tryptic soy agar 15-20 mL를 분주하여 건조시켰으며, 그 위에 gram positive 3 균주 (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*)와 gram negative 3 균주 (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* 및 *Vibrio parahaemolyticus*) 배양액을 100 uL 씩 분주 및 도말하였다. 이어서 굴 효소 가수분해물을 멸균된 disc (8 mm, Toyo Seisakusho Co., Japan)에 40 uL 씩 흡수 건조시켜 plate 표면에 붙인 다음 배양 (37 °C, 24-48 시간)하였다. 항균성은 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)으로 나타내었다.

항산화능은 ferric thiocyanate법(Mitsuda et al., 1996)에 따라 분광광도계(UV-1601, Shimadzu Co., Japan)로 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 즉 항산화능 측정을 위해 자동 산화물 5 mL tube에 가수분해물 0.25 mL, 증류수 0.25 mL, 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 7.0) 1 mL, 그리고 ethanol을 용매로 하는 50 mM linoleic acid 1 mL를 각각 넣어 혼합하여 제조하였고, 이를 60 °C 교반항온기(Orbital shaker, Forma Scientific, USA)에서 24시간 동안 자동산화시켜 산화물을 제조하였다. 과산화물은 산화 시료 50 uL, 75% ethanol 2.35 mL, 30% ammonium thiocyanate 50 uL 그리고 20 mM ferrous chloride 용액 50 uL를 각각 시험관에 가하여 3분 동안 혼합한 후 분광광도계(UV-1601, Shimadzu Co., Japan)로 측정하였다. 항산화능은 다음의

식에 따라 계산하여 %로 표시하였다.

$$\text{항산화활성(\%)} = [1 - (\text{시료 흡광도} / \text{대조군 흡광도})] \times 100$$

### 총 아미노산 분석

총 아미노산의 시료 조제를 위하여 일정량의 시료 (약 50 mg)에 6 N 염산 2 mL를 가하고 밀봉한 다음, 이를 heating block (HF21, Yamato, Japan)에서 가수분해(110, 24 시간)하였다. 이어서 가수분해물을 glass filter로 여과 및 감압건조한 다음 citric acid 완충액(pH 2.2)로 정용하여 아미노산 자동 분석계 (Biochrom 20, Cambridge, England)로 총 아미노산 분석을 실시하였다.

### 분자량의 분포 측정

분자량 측정을 위하여 시료를 여과(0.45  $\mu\text{m}$ )한 다음 이를 0.1 M NaCl을 함유하는 0.01 M sodium phosphate 완충액(pH 7.0)으로 평행시킨 Sephadex G-50 칼럼(i.d. 1.6x100 cm)에 주입하였다. 이어서 칼럼을 같은 완충액으로 0.75 mL/min으로 용출하면서 5 mL 씩 분취하였다. 용출 단백질은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 검출하였다. 가수분해물의 획분별 분자량의 분포는 표준단백질(aprotinin, 6.5 kDa; cytochrome, 12.4 kDa, carbonic anhydrase, 29 kDa; bovine serum albumin, 66kDa)을 사용하여 작성한 분자량 검량곡선에 따라 측정하였다.

### 통계처리

각 실험항목의 반복횟수는 3회 실시하였으며, 실험결과는 평균과 표준편차 (mean $\pm$ SD)로 나타내었다(Steel and Torrie, 1980).

### 결과 및 고찰

#### 휘발성염기질소 및 관능검사

일단 효소 굴 가수분해물 (one-step enzymatic oyster hydrolysate)을 기질로 하여 Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, pepsin 및 trypsin과 같은 5종의 효소로 이단 굴 가수분해물 (two-step enzymatic oyster hydrolysate)의 제조 중 효소 종류에 따른 이단 굴 가수분해물의 휘발성염기질소 함량 및 부패취에 대한 관능검사의 결과는 Table 2와 같다. Protamex를 이용하여 제조한 일단 굴 가수분해물의 휘

발성염기질소 함량은 9.7 mg/100g이었다. 일단 굴 가수분해물을 기질로 하여 Alcalase, Neutrase, trypsin, pepsin 및 Flavourzyme과 같은 5 종의 효소로 일단 가수분해물을 제조한 결과 가수분해물의 휘발성염기질소 함량은 10.4-10.8 mg/100g 범위로 일단 가수분해물과 유의적인 차이가 없었고 ( $p < 0.05$ ), 또한 일단 가수분해물 간에도 유의적인 차이가 인정되지 않았다 ( $p < 0.05$ ). 한편 일단 가수분해물과 일단 가수분해물들의 부패취에 관능검사를 실시한 결과 일단 가수분해물의 모든 시료구에서 전 관능요원들이 부패취를 감지하지 못하였다. 일단 효소 굴 가수분해물의 휘발성염기질소 함량 및 관능검사의 결과로 미루어 보아 일단 효소 굴 가수분해물은 선도 측면에서는 전혀 문제가 없으리라 판단되었다.

Table 2. Volatile basic nitrogen (VBN) and sensory evaluation based on putrid smell of oyster hydrolysates by sequential treatment of two enzymes for 2 hrs (Protamex for 1 hr and the other enzymes for 1 hr)

Enzymes	VBN (mg/100g)	Sensory evaluation
Protamex	9.7±0.6	0 <sup>(1)</sup>
Protamex→Alcalase	10.6±0.7	0
Protamex→Neutrase	10.8±0.2	0
Protamex→Pepsin	10.4±0.1	0
Protamex→Trypsin	10.5±0.3	0
Protamex→Flavourzyme	10.6±0.3	0

<sup>(1)</sup>This values indicate the number of panel member felt a putrid smell from oyster hydrolysate.

#### 가수분해도

일단 Protamex 굴 가수분해물 (one-step Protamex oyster hydrolysate)을 기질로 하여 Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, pepsin 및 trypsin과 같은 5종의 효소로 일단 효소 굴 가수분해물 (two-step enzymatic oyster hydrolysate)의 제조시 효소

종류에 따른 이단 효소 굴 가수분해물의 가수분해도는 Fig. 2와 같다. Protamex 단독으로 실시한 일단 효소 굴 가수분해물의 가수분해도는 28.5%이었고, 이의 가수분해물을 기질로 하여 Alcalase, Neutrased, pepsin 및 trypsin 등과 같은 4종의 효소는 14-16%의 가수분해 개선 효과를 나타내었으나, Flavourzyme은 가수분해 개선 효과가 전혀 인정되지 않았다. 이와 같이 Flavourzyme으로 이단 분해하였을 때 가수분해효과가 나타나지 않는 것은 일단 Flavourzyme의 경우 가수분해율에 개선 효과를 가져오는 endoprotease의 성격보다는 맛의 개선에 영향을 주는 exoprotease의 특성이 강하기 때문이라 추정된다. 한편, Alcalase, Neutrased, pepsin 및 trypsin 등과 같은 4종의 효소 이단 가수분해물 간의 가수분해율은 유의적인 차이가 인정되지 않았다 ( $p < 0.05$ ).

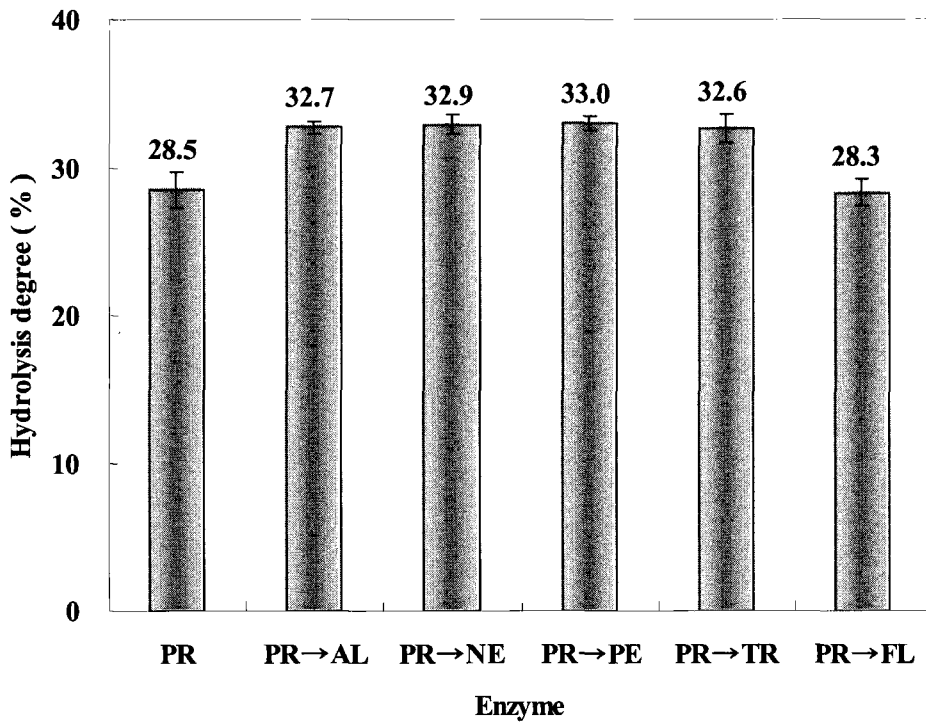


Fig. 2. Hydrolysis degree of oyster hydrolysates by sequential treatment of two enzymes for 2 hrs ; Protamax for 1 hr and the other enzymes for 1 hr.

PR : Protamex, AL : Alcalase, NE : Neutrased, PE : Pepsin, TR : Trypsin, FL : Flavourzyme

## 2단 가수분해물의 Angiotensin I converting enzyme 저해 효과

최적 효소 일단 가수분해 조건으로 얻어진 Protamex 굴 가수분해물에 Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, trypsin 및 pepsin을 사용하여 재가수분해물의 제조를 시도하였고, 이를 이용하여 ACE 저해능 및 항산화능과 같은 건강 기능성의 개선 정도를 검토하였다.

일단 효소 굴 가수분해물 (one-step enzymatic oyster hydrolysate)을 기질로 하여 Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, pepsin 및 trypsin과 같은 5종의 효소로 일단 굴 가수분해물 (two-step enzymatic oyster hydrolysate)의 제조 중 효소 종류에 따른 일단 굴 가수분해물의 angiotensin I converting enzyme (ACE) 저해능 ( $IC_{50}$ )은 Fig. 3과 같다. ACE 저해능은 Protamex로 효소 가수분해한 일단 효소 가수분해물의 경우 1.49 mg/mL이었으나, 이를 기질로 하여 Alcalase, Neutrase, pepsin 및 trypsin 등과 같은 4종의 효소로 일단 가수분해한 가수분해물의 경우 모두 개선 효과 (Alcalase 가수분해물: 0.86 mg/mL, pepsin 가수분해물: 1.30 mg/mL 및 trypsin 가수분해물: 1.20 mg/mL)가 있었고, 그 중에서도 특히 Neutrase 가수분해물의  $IC_{50}$ 이 0.40 mg/mL로 가장 개선 효과가 컸다. 하지만, Flavourzyme으로 일단 가수분해한 가수분해물의 경우 ACE 저해능 ( $IC_{50}$ )이 일단 가수분해물에 비하여 유의적인 차이가 인정되지 않았다 ( $p < 0.05$ ). 이와 같은 효소의 종류에 따른 일단 가수분해물의 ACE 저해능에 대한 차이는 사용한 효소의 절단 부위 즉 기질 특이성 때문이라 판단되었다. 이상의 결과에 미루어 가수분해도와 ACE 저해능과의 상관성보다는 ACE 저해능과 효소의 기질 특이성과의 상관성이 높으리라 추정되었다.

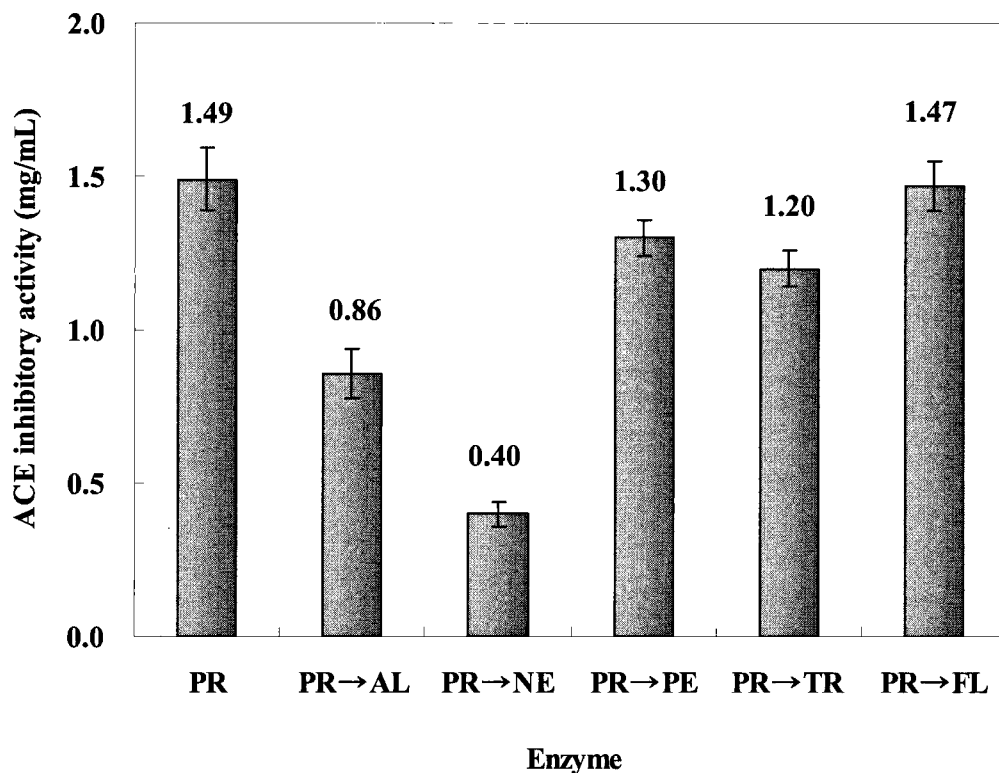


Fig. 3. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of oyster hydrolysates by sequential treatment of two enzymes for 2 hrs ; Protamex for 1 hr and the other enzymes for 1 hr.

PR : Protamex, AL : Alcalase, NE : Neutrased, PE : Pepsin, TR : Trypsin, FL : Flavourzyme

이단가수분해물의 항균성

일단 효소 굴 가수분해물 (one-step enzymatic oyster hydrolysate)을 기질로 하여 Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, pepsin 및 trypsin과 같은 5 종의 효소로 제조한 이단 굴 가수분해물 (two-step enzymatic oyster hydrolysate)의 paper disk법으로 측정한 항균성은 Table 3과 같다.

Table 3. Antimicrobial effects of two-step enzymatic oyster hydrolysates by sequential treatment of two enzymes for 2 hrs

Microorganisms	Enzymes					
	PR	PR→ AL	PR→ NE	PR→ PE	PR→ TR	PR→ FL
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
Gram (+) <i>Listeria</i>	-	-	-	-	-	-
bacterial <i>monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	-	-
Gram (-) <i>typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
bacterial <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio</i>	-	-	-	-	-	-
<i>parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-

- : Not inhibition

PR : Protamex, AL : Alcalase, NE : Neutrase, PE : Pepsin, TR : Trypsin, FL : Flavourzyme

가수분해물의 항균성은 Protamex로 가수분해한 일단 굴 가수분해물은 물론이고, 이를 기질로 하여 Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, trypsin 및 pepsin과 같은 효소로 이단 가수분해한 가수분해물의 경우도 ACE 저해능 및 항산화능과는 달리 여러 가지 균주 (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Bacillus cereus* 와 같은 gram positive 3 종, *Salmonella typhimurium*gram, *Escherichia coli* 및 *Vibrio parahaemolyticu-s* 와 같은 gram negative 3 종)에 대한 항균성은 인정되지 않았다.



### 이단가수분해물의 항산화 활성

일단 효소 굴 가수분해물 (one-step enzymatic oyster hydrolysate)을 기질로 하여 Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, pepsin 및 trypsin과 같은 5종의 효소로 제조한 이단 굴 가수분해물 (two-step enzymatic oyster hydrolysate)의 항산화능을 살펴 본 결과는 Fig. 4와 같다. 항산화능은 일단 가수분해물의  $IC_{50}$ (1.16 mg/mL)에 비하여 Alcalase, pepsin, trypsin 및 Flavourzyme로 재가수분해한 이단 가수분해물의  $IC_{50}$ (Alcalase 가수분해물:1.19 mg/mL, pepsin 가수분해물: 1.21 mg/mL, trypsin 가수분해물: 1.19 mg/mL 및 flavourzyme 가수분해물: 1.20 mg/mL)의 경우 오히려 낮았고, Neutrase로 재가수분해한 이단 가수분해물의  $IC_{50}$ (0.94 mg/mL)의 경우 높았다. 이와 같이 일단 가수분해물의 항산화능에 비하여 Alcalase, pepsin, trypsin 및 Flavourzyme으로 재가수분해하여 제조한 이단 가수분해물의 항산화능이 낮은 것은 이단 가수분해에 의하여 항산화능이 있는 peptide의 생성은 적은 반면, 이미 생성된 peptide가 일부 분해되었기 때문이라 판단되었다. 이단 가수분해물의 항산화성이 일단 가수분해물에 비하여 항산화능이 높았던 Protamex 및 Neutrase 이단 가수분해물 (농도 7.646 mg/mL)은 비타민 C (15 mM)의 항산화능 (61.8%)에 비하여 84.6%로 우수하였다. 한편, 굴을 소재로 Protamex와 Neutrase로 가수분해하여 제조한 가수분해물은 ACE 저해능 및 항산화성이 모두 우수하였다.

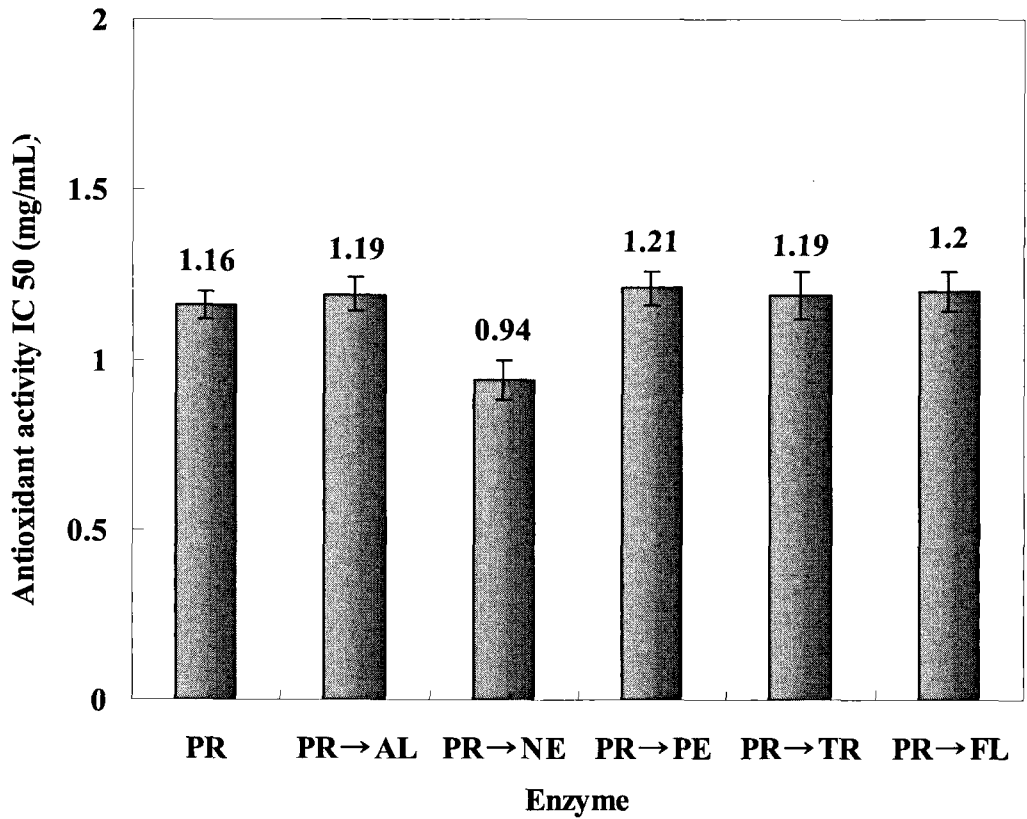


Fig. 4. Antioxidant activity of oyster hydrolysates by sequential treatment of two enzymes for 2 hrs ; Protamex for 1 hr and the other enzymes for 1 hr.

PR : Protamex, AL : Alcalase, NE : Neutrase, PE : Pepsin, TR : Trypsin, FL : Flavourzyme

#### 분자량 분포

일단 가수분해물(Protamex, 1hr)에 대하여 5종의 상용효소를 사용하여 제조한 이단 가수분해물의 Sephadex G-50 column( $\varnothing$ 1.6 x 100 cm)에 의한 분자량 분포는 Fig. 5와 같다. 전체적으로 1단 분해(PR)에 비하여 2단 분해시 fraction 22-38번 사이의 고분자 획분(29-150 kDa)은 거의 분해되어 fraction 60-72번 사이의 저분자 획분 (6.5 kDa 이하)으로 이행되었으며, 저분자 획분에서도 더

육 분해가 진행이 되어 획분의 감소가 두드러지게 나타났다. 이단 분해를 위해 사용한 pepsin의 경우, 일단 Protamex 가수분해물에 비하여 저분자 획분(6.5 kDa 이하)의 분해가 분자량 분포상으로 가장 현저하게 감소되었으며, 다음으로 Alcalase, trypsin, Flavourzyme 순이었다. Neutrase의 경우, 고분자 획분 (29-150 kDa)은 거의 분해된 것으로 나타났으나, fraction 60-72번 사이의 저분자 획분(6.5 kDa 이하)의 분자량 분포는 일단 Protamex 가수분해물과 거의 차이가 없었다.

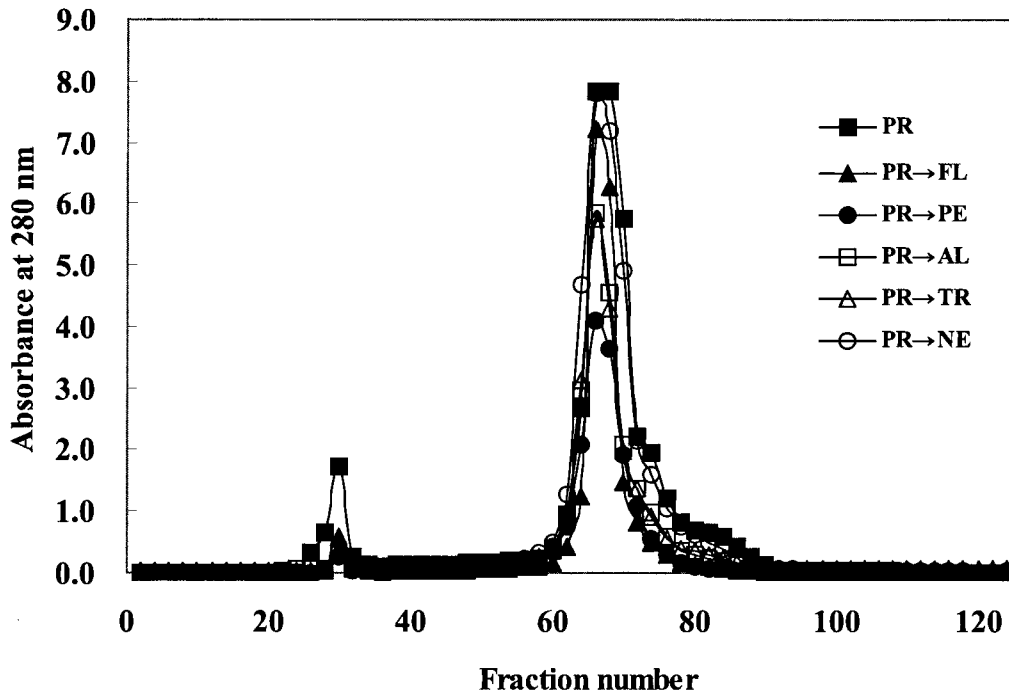


Fig. 5. Molecular weight distribution of oyster hydrolysates by sequential treatment of two enzymes for 2 hrs : Protamex for 1 hr and the other enzymes for 1 hr.

PR : Protamex, AL : Alcalase, NE : Neutrase, PE : Pepsin, TR : Trypsin, FL : Flavourzyme

이와 같은 분자량 분포와 이단 가수분해물의 ACE 저해능과 항산화능의 결과에 미루어 일단 가수분해물을 Neutrase로 재가수분해하여 생산한 새로운 peptide

중 건강 기능성이 우수한 peptide가 다수 존재하였으리라 판단되고, 또한, 건강 기능성이 미약한 peptide의 경우 Neutrase로 재분해되어 유리아미노산 이하의 저분자로 분해되어, 본 칼럼에서 detector가 되지 않았으리라 추정되었다.

#### 가수분해물의 유리 아미노산 조성

일단 굴 가수분해물 (Protamex로 1 시간 동안 가수분해한 굴 가수분해물)과 이단 굴 가수분해물 (일단 가수분해물을 기질로 하여 Nutrase로 1 시간 동안 이단 가수분해한 가수분해물)의 아미노산 조성은 Table 4와 같다. 유리아미노산의 총합량은 일단 굴 가수분해물의 경우 1,411.8 mg/100g이었고, 이를 기질로 하여 Neutrase로 이단 가수분해한 가수분해물의 경우 1,709.3 mg/100g으로 증가하였다. 한편, 일단 가수분해물과 이단 가수분해물에 관계없이 조성비가 높은 유리아미노산으로는 aspartic acid, glutamic acid, proline, glycine 및 leucine 등이었다. 한편 유리아미노산의 조성비가 일단 가수분해물에 비하여 ACE 저해능이 우수하면서 항산화능이 유사한 이단 가수분해물은 glutamic acid, tyrosine 및 lysine의 조성비가 다소 높았고, alanine 및 isoleucine의 조성비가 다소 낮았다. 이로 미루어 보아 일단 가수분해물 중의 단백질 등과 같은 고분자 물질은 Neutrase에 의하여 저분자 물질로 분해되어 일단 가수분해물과 또 다른 형태의 peptide를 생산하였고, 이들 peptide들에 의하여 이단 가수분해물은 일단 가수분해물과 또 다른 형태의 건강 기능성을 나타내리라 추측되었다. 한편, Byun and Kim(2001)은 명태 껍질을 상업적 효소로 이단 가수분해하여 ACE 저해능 및 항산화능과 같은 건강 기능성을 개선하였고, 이는 이단 가수분해에 의하여 일단 가수분해물과 또 다른 형태를 peptide를 산생하였기 때문이라고 보고한 바 있다. 이상의 결과와 보고에 미루어 Protamex에 의한 일차 굴 가수분해물을 기질로 하여 Alcalase, Flavourzyme, trypsin 및 pepsin과 같은 효소로 이단 가수분해하는 경우 일차 가수분해물로부터 생산된 새로운 peptide가 ACE 저해능에는 크게 관여하나, 항산화능에는 크게 관여하지 않는 구조를, Neutrase로 이단 가수분해하는 경우 일차 가수분해물로부터 산생된 새로운 peptide의 경우 ACE 저해능은 물론이고, 항산화능에 대하여도 일부 관여하리라 판단되었다. 그러나, 이단 가수분해물의 항산화능 및 ACE 저해능에 대한 정확한 메커니즘 및 구조 등에 대하여는 추후 분리, 정제 및 합성에 의하여 확인되어야 하리라 판단되었다.

Table 4. Comparison of free amino acid (FAA) composition between oyster hydrolysates incubated by a single protease and two protease (Protamex and Neutrase) for 2 hrs

Amino acid	Hydrolysates by			
	Single enzyme (Protamex)		Two enzymes (Protamex and Neutrase)	
	mg/100g	% to FAA	mg/100g	% to FAA
Aspartic acid	118.4	8.4	146.7	8.6
Threonine	56.0	4.0	64.3	3.8
Serine	57.9	4.1	79.2	4.6
Glutamic acid	172.9	12.2	231.1	13.5
Proline	112.7	8.0	132.4	7.7
Glycine	112.4	8.0	137.3	8.0
Alanine	115.9	8.2	108.5	6.3
Cysteine	22.7	1.6	17.9	1.0
Valine	74.9	5.3	78.2	4.6
Methionine	44.5	3.2	65.0	3.8
Isoleucine	107.2	7.6	95.5	5.6
Leucine	119.7	8.4	144.1	8.4
Tyrosine	37.6	2.7	60.9	3.6
Phenylalanine	56.6	4.0	72.5	4.2
Histidine	22.5	1.6	34.2	2.0
Lysine	91.9	6.5	125.7	7.4
Arginine	88.0	6.2	115.8	6.8
Total	1,411.8	100.0	1,709.3	99.9

### 가수분해물의 안전성

효소 가수분해물의 세포 독성은 희석 비율 1/25까지 거의 나타나지 않는 것으로 보인다(Table 5). 효소 가수분해물은 산가수분해물과 같은 화학적 가수분해와는 달리 온화한 조건에서 가수분해시킴으로 인해 가수분해물의 아미노산이 수식되거나 하는 변화없이 원래의 단백질 조성과의 같다는 장점이 있어 생리활성 peptide의 생산에 가장 유효하게 사용되고 있다.

Table 5. Cell toxicology of partial enzymatic hydrolysate

Control	1/1000 <sup>a</sup>	1/500	1/250	1/100	1/50	1/25	1/10
100.0 <sup>b</sup>	101.4	103.1	101.4	95.6	100.5	98.3	88.5

<sup>a</sup>dilution ratio

<sup>b</sup>percentage of survival cell

### 요약

이단 가수분해물은 효소의 종류에 관계없이 모든 시료구에서 부패취를 감지하지 못하였다. Alcalase, Neutrased, pepsin 및 trypsin 등과 같은 4종의 효소 이단 가수분해물 간의 가수분해율은 유의적인 차이가 인정되지 않았다. Protamex 가수분해물을 Alcalase, Neutrased, pepsin 및 trypsin 등과 같은 4종의 효소로 이단 가수분해한 가수분해물의 경우 모두 ACE 저해의 개선 효과 (Alcalase 가수분해물: 0.86 mg/mL, pepsin 가수분해물: 1.30 mg/mL 및 trypsin 가수분해물: 1.20 mg/mL)가 있었고, 특히 Neutrased 가수분해물의 IC<sub>50</sub>이 0.40 mg/mL로 가장 개선 효과가 컸다. 2단 가수분해물의 항균성은 관측되지 않았다. 항산화능은 일단 가수분해물의 EC<sub>50</sub>(1.16 mg/mL)에 비하여 Alcalase, pepsin, trypsin 및 Flavourzyme으로 재가수분해한 이단 가수분해물의 EC<sub>50</sub>(Alcalase 가수분해물:1.19 mg/mL, pepsin 가수분해물: 1.21 mg/mL, trypsin 가수분해물: 1.19 mg/mL 및 flavourzyme 가수분해물: 1.20 mg/mL)은 오히려 낮았고, Neutrased로 재가수분해한 이단 가수분해물의 EC<sub>50</sub>(0.94 mg/mL)은 높았다. 2단 분해시 fraction 22-38번 사이의 고분자 획분(29-150 kDa)은 거의 분해되어 fraction 60-72번 사이의 저분자 획분 (6.5 kDa 이하)으로 이행되었으며, 저분자 획분의 분해가 진행이 되어 획분의 감소가 두드러지게 나타났다. 가수분해물의 유리아미노산 함량은 2단 가수분해에 의해 증가하였다.

## 참고문헌

- Byun HG, Kim SK. 2001. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry* 36: 1155-1162.
- Davisdon PM, Parish ME. 1980. Methods for testing the efficacy of food anti-microbials. *Food Technol* 1: 148-151.
- Horiuchi M, Fujimura KI, Terashima T, Iso T. 1982. Method for determination of angiotensin-converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 233: 123-130.
- Hosoi M, Kubota S, Toyohara M, Toyohara H, Hayashi I. 2003. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. *Fisheries Science* 69: 395-400.
- Jeong BY, Choi BD, Moon SK, Lee JS. 1998. Proximate composition, cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol content in 72 species of Korean fish. *J Korean Fish Sci Tech* 1: 129-146.
- Li Q, Osada M, Mori K. 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Science* 66: 502-508.
- Ministry of social Welfare of Japan. 1960. Volatile basic nitrogen. In *Guide to Experiment of Sanitary Infection*. Kenpaku, Tokyo. p. 30-32.
- Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. 1996. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyoto shokuryo*. 19: 210-214.
- MOMAF. 2003. *Statistical Year Book of Maritime Affairs and Fisheries*. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Seoul. p 1439.
- MSWJ. 1960. *Guide to experiment of Sanitary infection*. III. Volatile basic nitrogen. Kenpakusa, Tokyo. P 30-32.
- Shiau CY, Chai T. 1990. Characterization of oyster shucking liquid wastes and their utilization as oyster soup. *J Food Sci* 55: 374-378.
- Soudant P, Chu FL. 2001. Lipid class and fatty acid composition of the

protozoan parasite of oysters, *Perkia mariaus* cultivated in two different media. *J Eukaryotic Microbiology* 48: 309-319.

Steel RGD, Torrie JH. 1980. *Principle and Procedures of Statistics*. 1st Ed. Kogakusha. McGraw-Hill, Tokyo. p. 187-221.



## 제 4 절 효소 가수분해물의 극성 기능성 물질의 정제와 구조

### Abstract

The objective of this work was to purify and investigate the functional polar substances from oyster enzymatic hydrolysates. The hydrolysates from oyster were prepared by two step hydrolysis using commercial protease such as Protamex and Neutrase. The optimum conditions for preparing functional substances were 60 min for reaction time, 1% for protease concentration, and 40°C for temperature. The protein yield was higher in 3% NaCl medium than distilled water. DPPH radical scavenging activities of hydrolysates were higher in small molecular size (<5 kDa). The linoelic acid had oxidative induced-time of 72 hr at 60°C. however, low molecular peptides extended the induced time up to 168 hr, and had antioxidant effect above 85%. TGPN hydrolysate inhibited the angiotensin-I converting enzyme up to 80%. Most hydrolysates did not have the reducing effect.

### 서론

현재 굴 소비 시장의 형태는 공장 규모의 김치의 대량 생산에 따른 생굴의 소비량의 급속한 감소, 조리 방법의 개발 부진, 고차가공품의 개발 부진에 따른 수요 감소 등과 같은 국내적 요인과 2001년 대일 수출 굴에서 패독과 이질균의 검출로 인한 수출 중단, 대일 수출굴에 대한 일본 정부의 부정적인 시각, FDA 권고 사항 미이행에 따른 수출의 중단 등 대외적인 요인에 의해 극히 부진한 상태이다. 그러므로 이와 같이 미이용되는 굴을 활용하기 위한 방안을 모색해야한다.

미국에서 어떤 종류의 내장을 포함하는 가공 수산 식품의 판매는 FDA가 금지하고 있다 (Kristinsson, 2000). 따라서 가수분해물을 식품 첨가물 혹은 식품 구성분으로 사용하기 위해서 어류의 가식부로 만들어야 한다. 특히 pelagic fish의 육은 효소 가수분해를 위한 좋은 기질이 될 수 있다. 어육 단백질의 효소 가수분해물은 단백질의 기능적 특성을 수식하거나 향상시키는

장점을 가진다. 단백질의 기능성을 지배하는 물리화학적 특성들은 펩티드 혹은 단백질의 크기, 아미노산 조성 및 결합서열, 다른 화합물과의 상호반응 등이다 (Damodaran, 1996). 단백질의 효소적 가수분해는 2차 구조가 다른 분자 질량이 적은 물질을 생성하며, 원래의 단백질과는 다른 특성을 가진다 (Adler-Nissen and Olsen, 1979).

근육에서 유래한 펩티드는 항산화성 (Hattori et al., 1998; Saiga et al., 2003), 혈압강화작용 (Arihara et al., 2001; Suetsuna, 2002; Katayama et al., 2004)와 같은 여러 가지 기능적 특성을 가진다. 생물학적 활성을 가진 펩티드는 여러 가지 방법으로 만들 수 있다. 즉 (1) 단백질을 가수분해하는 열과 산·알칼리 조건을 사용하는 식품 가공, (2) 식품 단백질의 효소적 가수분해, (3) 발효 식품 중 미생물 활성에 의한 방법이 있다.

식품 첨가물로서 항산화제는 안전하고, 색과 냄새 혹은 이상한 맛이 없어야 하며 가공 식품에 효과적이고, 가격이 낮아야 한다. 대부분의 합성 항산화제는 이런 조건을 만족시키지 못하기 때문에 천연물의 항산화 효과에 관한 연구를 수행하고 있다. 펩신과 산으로 용해한 elastin은 oleic acid의 산화 방지제로 효과적이며 (Hattori et al., 1998), Pronase E로 가수분해한 복양 명태의 껍질 가수분해물은 1.5-4.5 KDa의 분자량 범위에서 높은 항산화 효과를 보였다 (Kim et al., 2001). 항산화 효과와 관련하여 Rival et al.(2001)은 아미노산 결합 서열과 항산화능과 효과에 대한 상관성을 제시하였다.

돼지 골격근의 효소 가수분해물에서 유래한 ACE 저해 펩티드, Met-Asn-Pro-Pro-Lys과 Ile-Thr-Thr-Asn-Pro는 혈압강화 효과를 가진다 (Arihara et al., 2001). ACE 저해 펩티드들은 바지락과 굴의 펩신 소화물에서도 발견되었다(Suetsuna, 2002). 펩티드의 항미생물 효과와 관련하여 난백의 펩신 가수분해물인 Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg는 gram - positive와 gram - negative 세균에 대하여 항균 활성을 보인다 (Mine et al., 2004). 효소 가수분해 펩티드는 이 같은 생물학적인 활성 때문에 식품 첨가물로 널리 사용되고 있으며, 이 같은 기능성은 펩티드의 아미노산 결합서열, cross-linking과 상관성이 있다. TGase 가교 결합은 zein, skim milk 단백질과 gluten 가수분해물의 쓴맛을 감소시키고, 대두 단백질의 pronase, papain, 키모트립신 및 산 가수분해물의 식품학적 기능성을 개선한다 (Babiker, 2000).

국내의 경우 가수분해물과 가수분해물의 생물 기능성에 관한 연구는 많이 이루어져 있어서, 대구의 고니, 간 및 머리의 수산가공폐기물을 효소 분해하

여 생성된 펩타이드성 물질을 기능성 소재로 활용하기 위한 연구를 수행하였으며 (Kim et al., 2000), 수산발효식품의 기능성 향상을 위한 효소 및 starter 개발이란 연구를 통해 멸치 액젓에서 기능성 펩티드를 정제하고 생리활성을 측정하였다. 그러나 대부분의 연구는 효소 분해물에 포함된 펩티드의 생리활성 효과에 집중하여 연구하였고, 이들 펩티드 생리 효과 발현에 중요한 펩티드의 아미노산 구조와 서열에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았으며, 특히 대량 생산 공정에 관하여는 거의 검토하지 않았다. 그리고 굴에 분포하는 TGase 효소의 부분 정제와 이들 효소의 활용 및 가수분해물과 TGase 효소를 이용한 기능성 물질의 창출에 관한 연구는 없다.

따라서 본 연구에서는 transglutaminase를 이용하여 굴 단백질을 가교결합하고, 상업용 단백질 가수분해효소인 Protamex와 Neutrase로 이단 가수분해하여 효소 가수분해물을 제조하고 가수분해물에 포함된 펩티드를 크로마토그래피로 정제하여 이들의 기능 특성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

시료인 참굴 (*Crassostrea gigas*, 각장  $4.6 \pm 2.3$  cm, 각중  $9.9 \pm 3.2$  g)은 경남 통영 인근 양식장에서 채취하여 인근의 가공공장에서 IQF(Individual Quick Frozen)로 가공한 제품으로 1-2년 동안 냉동보관한 것을 시료로 사용하였다. 굴 가수분해물의 제조를 위하여 상업용 효소인 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase 및 Protamex는 Novozymes Co. (Novonordisk Bioindustrials, Inc., Denmark)에서 구입 하였으며, TGase(TG-K)는 Ajinomoto 사 제품, chymotrypsin은 Sigma사 제품을 사용하였다.

### 효소 가수분해물의 제조

효소가수분해는 5L Jar fermenter(Korea Fermenter Co.)에서 150 rpm으로 교반하면서 가수분해하였다. 1차 효소 굴 가수분해물의 제조를 위해 해동한 굴을 1 분 동안 끓는 물에 데친 후 수도수와 3% NaCl을 포함하는 수도수를 각각 2배 양을 가한 후 2 분간 3000 rpm에서 마쇄하였다. 마쇄 후 마쇄물의 단백질 농도에 대하여 0.5, 1, 1.5, 2, 5%의 농도가 되도록 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex를 첨가하여 0, 20, 40, 60, 80, 100 및 120 분 동안 30, 40, 50, 60 및 70 °C에서 반응 후 100 °C에서 1 시간 동안 불활

성 시켰다. 최적 가수분해 조건은 Lowry법에 의한 단백질 정량과 DPPH법에 의한 antiradical 소거능으로 선정하였다. 1차 효소 가수분해의 최적 반응 조건으로 생성한 가수분해물의 2차 가수분해를 위해서 Neutrase,  $\alpha$ -chymotrypsin을 각각 첨가하고 1차 효소 가수분해물 제조와 같은 조건에서 가수분해하여 효소가수분해물의 제조와 최적 조건을 검토하였다.

한편 글 마쇄물에 transglutaminase를 첨가하여 글 단백질을 cross-linking 한 후 Protamex와 Neutrase로 2단 가수분해물의 조제는 Fig. 1과 같은 방법에 따라 조제하였다.

#### 효소 가수분해물의 부분 정제

모든 가수분해물의 정제는 다음과 같은 조건으로 정제를 하였다. 이온크로마토그래피는 GradFrac System(Pharmacia, Sweden)을 사용하였고, FPLC는 LCC500 PLUS(Pharmacia, Sweden)를 사용하였다. 첫 번째 단계로 이온교환 크로마토그래피는 XK column(SP Sepharose, 2.6 × 30 cm, Pharmacia, Sweden)을 사용하여 다음의 분리 조건으로 행하였다: A 용매, 50 mM sodium acetate(pH4.5); B 용매, 1 M NaCl - 50 mM sodium acetate(pH4.5); gradient, 0 → 100 % (10 → 50 min); flow rate, 1 mL/min; fraction volume, 5 mL.; sample injection, 5 mL. DPPH의 활성이 가장 높은획분을 모아서 젤크로마토그래피를 실시하였다. 젤 크로마토그래피는 Superdex peptide HR column(1.0 × 30cm, Pharmacia, Sweden)을 사용하여 elution buffer, 20% acetonitrile / D.W ; flow rate, 0.5 mL/min; fraction volume, 1mL; sample injection, 0.5 mL의 조건에서 극성 물질을 분리하였다.

#### 아미노산 조성의 측정

아미노산 분석은 13 × 100 mm 시험관에 시료를 넣고 분석 시료 0.5 mL에 대하여 0.1% phenol을 포함하는 0.5 mL의 constant boiling HCl (Sigma H0636)을 가하여 질소를 flushing 한 후 화염으로 봉하고 110 °C의 heating block에서 24시간 가수분해하였다. 가수분해한 시료는 60 °C의 Micro-cenVac(N-Biotek, Inc, Korea)에서 염산을 완전히 휘발시킨 후, 0.01 N HCl에 용해시켜 1 mL로 정용하였다. 아미노산 분석은 아미노산 자동분석기 (Biochrom 20 plus, England)에 40  $\mu$ L를 주입하여 분석하였다.

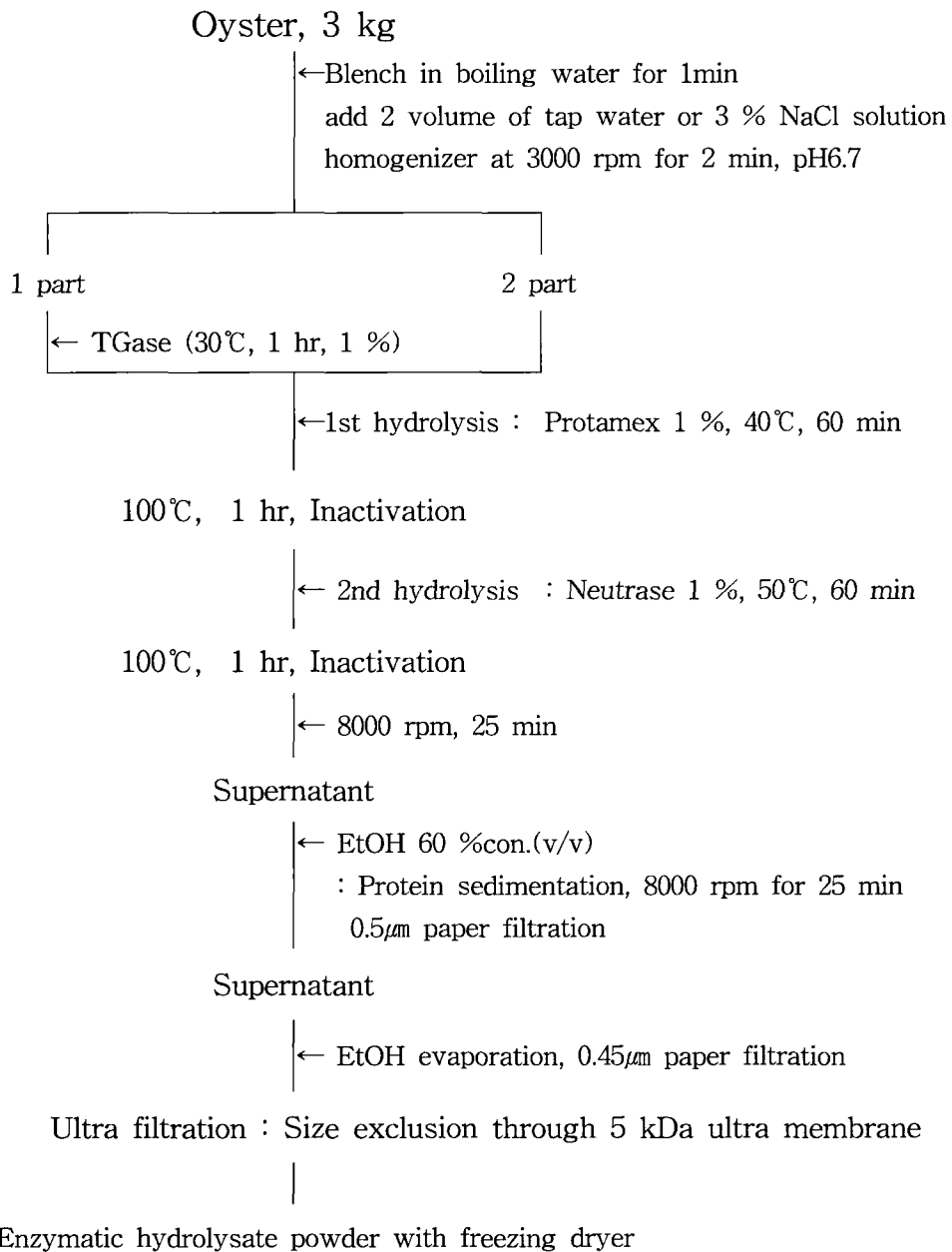


Fig. 1. Procedure for preparation of enzymatic hydrolysate.

### Radical 소거능의 측정

Park et al.(2005)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 시험관에 시료 용액 500

uL를 넣고, 500 uL의 ethanol과 250 uL의 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) /ethanol 용액을 첨가하여 25 °C의 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference는 시료 대신 500 uL의 탈이온수를 사용하였으며, blank는 DPPH와 증류수 대신 750 uL의 ethanol을 사용하였다. Antiradical 활성은 다음의 식에 따라 DPPH 탈색의 %로 계산하였다.

$$\text{Antiradical 활성} = 100 \times (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{reference의 흡광도})$$

### Fe<sup>2+</sup> - chelating 활성 측정

Rajapakse et al.(2005)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 즉 시험관에 시료 용액 0.5 mL를 넣고, 1.85 mL의 증류수, 50 uL의 1% FeCl<sub>2</sub>, 0.1 mL의 5 mM Ferrozine 용액을 가하고 25 °C에서 10 분 동안 반응시킨 후, 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference는 시료 대신에 증류수 0.5 mL를 사용하였고, blank는 Ferrozine 대신에 증류수 0.1 mL를 사용하였다. 활성은 다음의 식에 따라 계산하여 %로 표시하였다.

$$\text{Chelating 활성(\%)} = [1 - (\text{시료의 흡광도} / \text{reference 흡광도})] \times 100$$

### Angiotensin I converting enzyme(ACE)의 저해능

ACE 저해활성은 Janitha et al. (2002)의 방법에 따라 기질로 hippuryl-His-Leu (HHL)을 사용하여 반응 후 유리하는 hippuric acid의 양을 고속액체 크로마토그래피(HPLC, Hitachi, Japan)로 측정하였다. 시약 조제를 위한 완충액은 50 mM Tris-Cl (pH 8.3)을 사용하였다. 시험관에 3.0 mM HHL 50 uL, 효소 용액 50 uL(1.25 Units)와 시료 용액 50 uL를 가하여 37 °C의 항온수조에서 30분 동안 흔들지 않고 항온한 후, 흔들어 주면서 다시 30분 동안 반응시킨다. 150 uL의 glacial acetic acid를 가하여 ACE 활성을 중지시킨 다음 HPLC로 hippuric acid의 함량을 측정한다. Hippuric acid (HA)의 정량을 위해 guard column (Bondclone C<sub>18</sub>, 10 um, 50 x 1.0 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)와 C<sub>18</sub> 역상 칼럼(Bondclone C<sub>18</sub>, 5 um, 250 x 4.6 mm)를 장착한 HPLC에 반응 중지 용액 10 uL를 injection하고, 12.5% (v/v) acetonitrile 용액 (pH 3.0)으로 용출하면서 280 nm에서 검출하

였다. Reference 용액은 시료 대신 50 uL의 완충액을 사용하였으며, 효소 저해 %는 다음 식으로 계산한다. 시료 농도별로 ACE 저해 활성을 측정하여 농도별 저해 활성을 선형 회귀분석한 후 ACE 활성의 50%를 저해하는 데 필요한 시료 농도를 IC<sub>50</sub>으로 정의하였다.

$$\text{ACE 저해(\%)} = \frac{\text{Reference의 HA} - \text{시료의 HA}}{\text{Reference의 HA}} \times 100$$

### Xanthin oxidase 활성 측정

Xanthine oxidase 활성은 Worthington manual(1988)에 따라 측정하였다. 즉 290 nm에서 흡광도 증가로 hypoxanthine으로부터 urate의 생성 속도를 측정하였다. 먼저 cell에 1.9 mL의 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.5), 시료인 효소 가수분해물 1.0 mL, 0.1 mL의 0.25 unit/mL xanthine oxidase를 넣어 25 °C로 조절하고 기질인 1.0 mL(20 ug)의 hypoxanthine 용액을 첨가하여 반응 시간 간격으로 흡광도의 증가를 측정하였다. control은 기질 대신 증류수를 사용하였다. 계산은 uric acid의 molar 흡광계수를 사용하여 다음의 식으로 계산하였다. 25 °C에서 분당 1 umole의 urate 생성을 활성 단위로 하였다.

$$\begin{aligned} \text{units/mg protein} &= \Delta A/\text{min} \times 1000/1.22 \times 10^4 \times \text{mg/mL reaction mixture} \\ \text{units/mL} &= \Delta A/\text{min} \times 1000 \times 3\text{mL} \times \text{dilution}/1.22 \times 10^4 \times 0.1\text{mL} \end{aligned}$$

### Ferricyanide의 환원력 측정

펩티드 추출물의 환원력은 Nam et al.(2005)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 0.3 mL의 시료가 들어있는 시험관에 0.7 mL의 50 mM phosphate buffer(pH 6.6)와 0.5 mL의 1% potassium ferricyanide 용액을 넣은 다음 50 °C에서 20 분 동안 항온하였다. 0.5 mL의 10% TCA 용액을 첨가하고 2500 × g에서 10 분 동안 원심분리하여 얻은 상층액 0.5 mL에 0.5 mL의 탈이온수와 0.1 mL의 0.1% FeCl<sub>3</sub> 용액을 첨가하여 10분 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. blank는 시료 대신 동량의 증류수를 사용하였다.

### Linoleic acid의 항산화 활성

Chen et al.(1996)의 방법을 다소 변형한 Ferric thiocyanate법을 사용하였

다. 즉 산화를 위해 1 mL의 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0)과 0.25 mL의 시료 용액, 0.25 mL의 탈이온수, 1.0 mL의 50 mM linoleic acid/ethanol 용액을 유리 시험관에서 혼합하고 뚜껑을 닫아 밀봉한 다음, 어두운 60 °C의 항온 수조에서 48 시간 동안 산화시켰다. 이때 reference는 시료 대신 탈이온수를 사용하였다. 산화 후 4시간 간격으로 적당량의 시료를 취해 반응 혼합 용액 50 uL에 75% ethanol 2.35 mL, 30% ammonium thiocyanate 용액 50 uL, 20 mM ferrous chloride/3.5% HCl 용액 50 uL를 첨가하고 실온에서 3 분 동안 방치한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 blank는 반응 혼합 용액 대신 50 uL의 탈이온수를 사용하였다. 항산화 활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{항산화 활성} = 100 \times (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{reference의 흡광도})$$

## 결과 및 고찰

### 효소 가수분해에 의한 굴 가수분해물의 제조 조건

상업적으로 많이 사용하고 있는 효소를 이용하여 1, 2차 가수분해를 하였고, 효소 반응시간에 대한 영향은 0 - 120 분 동안 20 분 간격으로 실험하였으며, 효소 농도에 대한 실험은 0.5, 1, 1.5, 2, 5%를 첨가하였으며, 반응온도는 30 - 70 °C 까지 10°C 간격으로 실험을 수행 하였다. 수도수를 가하고 마쇄하여 가수분해한 것과 추출물의 단백질 농도를 증가시키기 위해 3% NaCl 용액을 가하고 마쇄하여 가수분해하였다. 3% NaCl에 녹여 마쇄한 것은 염용성 단백질을 추출하여 더 많은 단백질을 얻을 수 있었다.

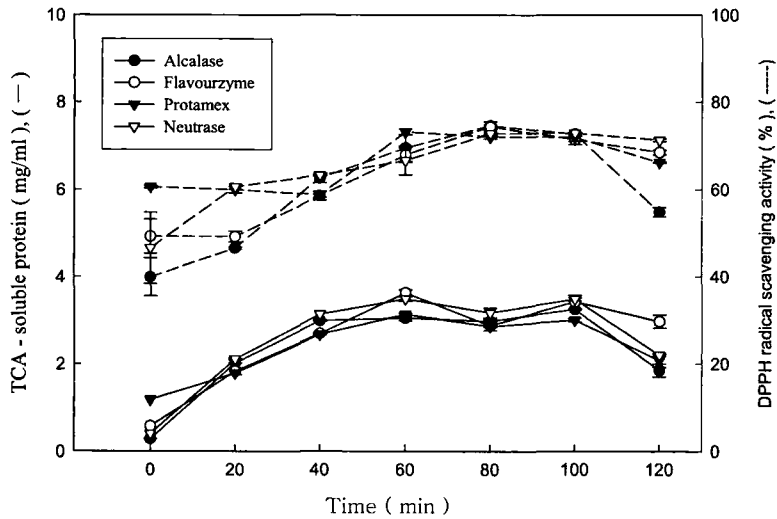
최적의 조건에서 1차 효소 가수분해물을 얻어 효소를 불활성화 시킨 후 2차 효소 가수분해를 하였다. 2차 가수분해효소는 Neutrase와 chymotrypsin을 사용하였다. 2차 효소 가수분해 또한 3 % NaCl을 가하여 가수분해한 것이 다소 높은 단백질량과 활성을 나타냈다. Fig. 2에서 A는 3% NaC 용액을 가하여 마쇄한 시료로 실험을 하였으며, B는 수도수를 가하여 마쇄한 것으로 시료를 만들어 실험을 수행하였다.

효소 가수분해시 단백질량은 반응시간 60 분에서 가장 높은 값을 나타내었고 60 분 이후부터는 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 그리고 DPPH법에 의한 radical scavenging activity도 60 분에서 다소 높은 값을 나타냈으며, 60 분 이후부터는 거의 유사한 활성이 나타났다. 그리고 A와 B를 비교하였을



때 A보다 B 즉, 3% NaCl용액으로 추출하여 가수분해한 것이 단백질량은 약 2 mg/mL 정도 더 높았으며, antiradical 활성 또한 약 5% 높게 나타났다. 이것으로 보아 수도수를 가하여 가수분해한 것보다 3% NaCl 용액을 첨가하여 가수분해 하는 것이 효과적인 것으로 판단된다(Fig. 2). 선행실험에서 얻은 60분에서 반응한 결과물을 효소 농도에 대한 영향을 검토한 결과 단백질량은 전체적으로 유사한 결과였다 (Fig. 3).

(A)



(B)

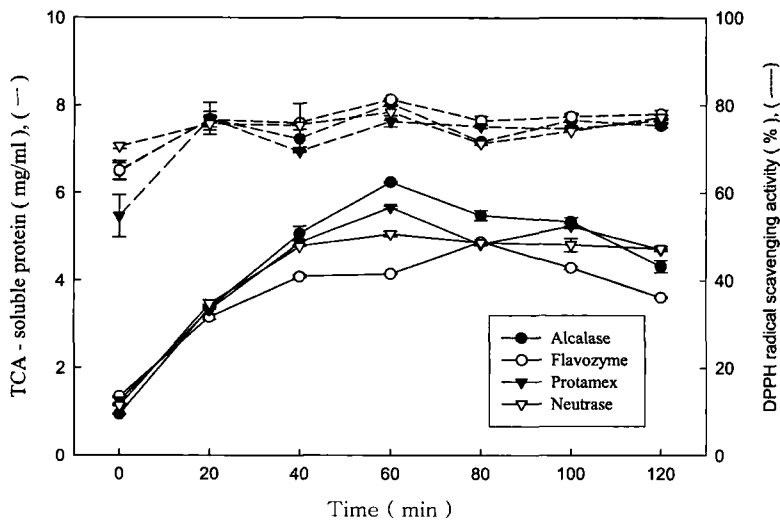
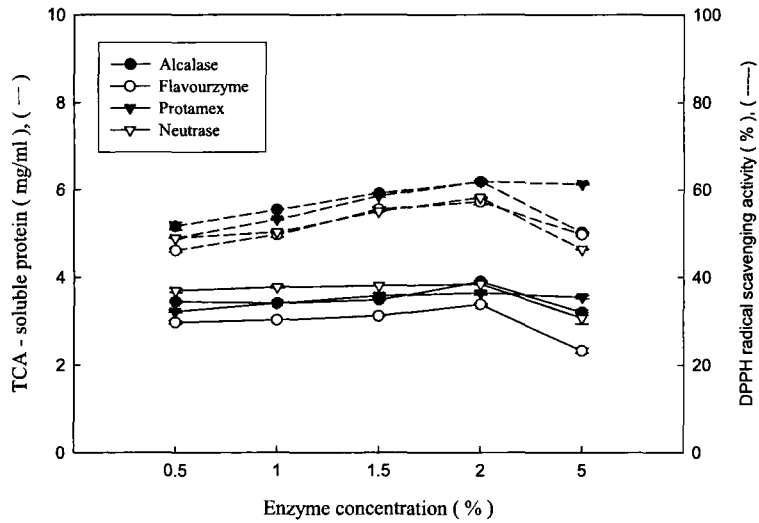


Fig. 2. Effect of protein and DPPH radical scavenging activity of one - step enzymatic hydrolysates from oyster incubated with different times. (A), 3% NaCl extract; (B), tap water extract.

(A)



(B)

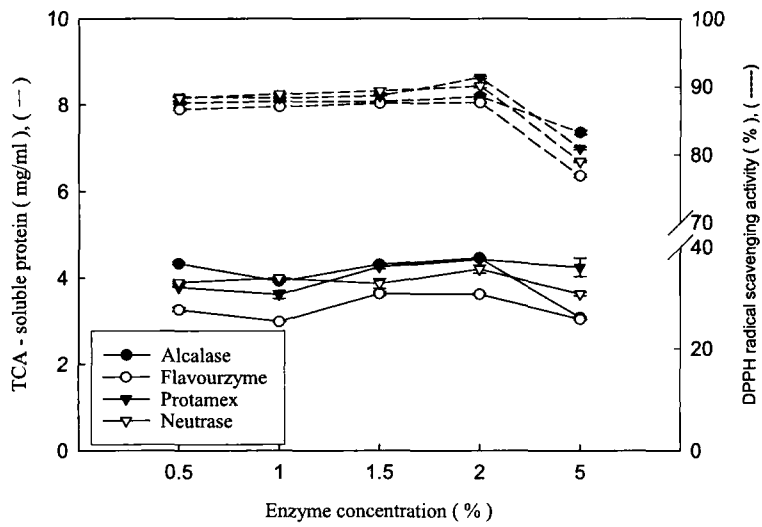


Fig. 3. Effect of protein and DPPH radical scavenging activity of one-step enzymatic hydrolysates from oyster incubated with enzyme concentration. (A), 3% NaCl extract; (B), tap water extract.

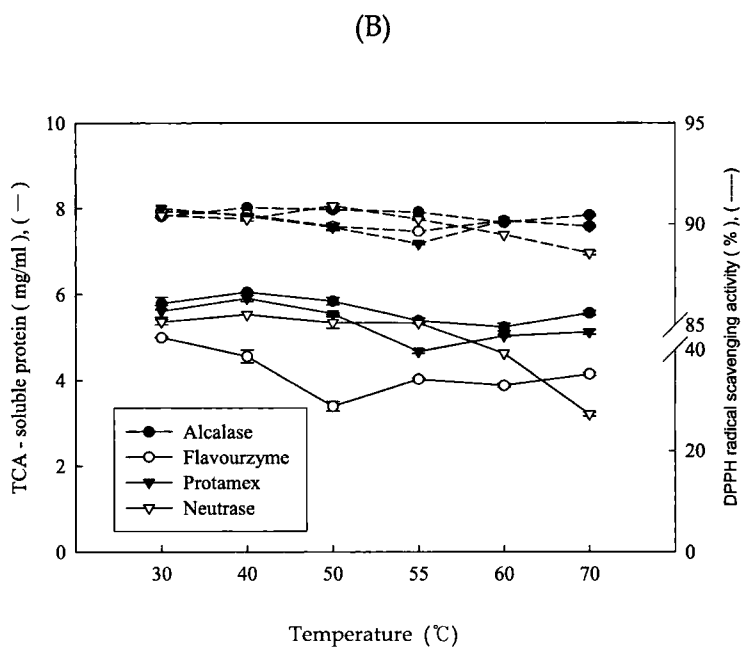
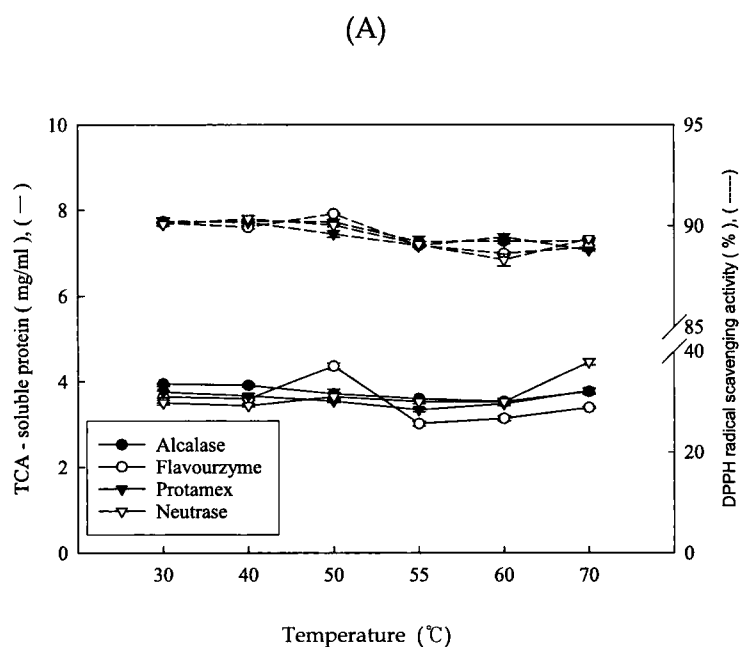
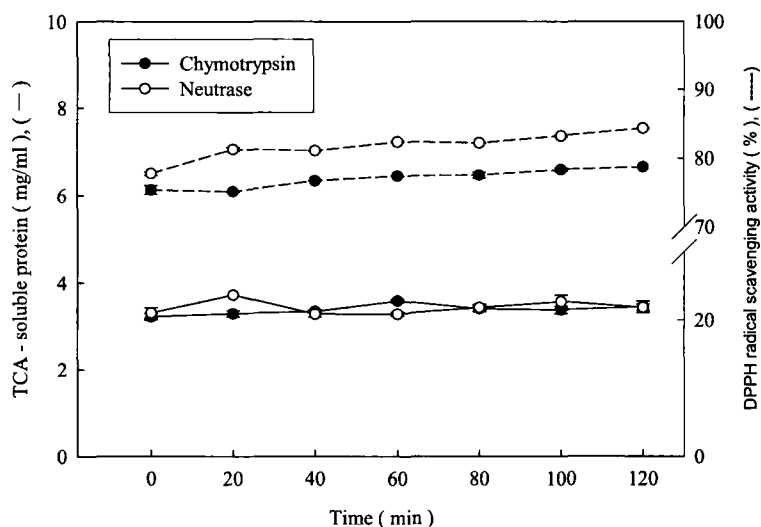


Fig. 4. Effect of protein and DPPH radical scavenging activity of one - step enzymatic hydrolysates from oyster incubated with temperature. (A), 3% NaCl extract; (B), tap water extract.

DPPH radical scavenging activity는 Fig. 3A는 효소농도가 증가함에 따라 점차 증가하였으나, A에 비해서 B는 다소 높은 DPPH 활성을 보였다(Fig. 3). 최적의 반응시간과 효소농도 조건에서 효소 가수분해시 반응온도에 대한 영향을 살펴본 결과(Fig. 4), 단백질량은 유사한 결과 값을 가졌으며 DPPH법에 의한 라디칼 소거능은 40 °C에서 다소 높은 값을 보였다. A와 B를 비교하였을 때 DPPH radical scavenging activity의 활성은 유사하였고, 반응시간과 효소농도에 반해서 온도에 대한 영향은 차이가 없는 것으로 확인되었다 (Fig. 4). 2차 효소가수분해에서도 단백질량과 DPPH radical scavenging activity는 반응시간 60 분에서 다소 높게 나타났으며 (Fig. 5), 효소 농도에 대한 영향을 검토한 결과 단백질량은 전체적으로 유사한 결과였으나 1%에서 상대적으로 높은 값을 나타내었다 (Fig. 6). 반응온도에 대한 영향을 살펴본 결과 40 °C에서 단백질량과 DPPH radical scavenging activity는 다소 높게 나타났다 (Fig. 7).

(A)



(B)

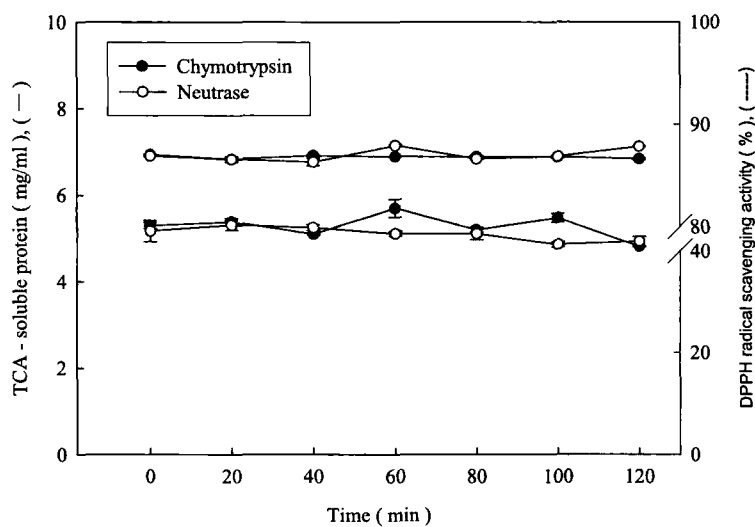


Fig. 4. Effect of protein and DPPH radical scavenging activity of two-step enzymatic hydrolysates from oyster incubated with hydrolysis times. (A), 3% NaCl extract; (B) tap water extract.

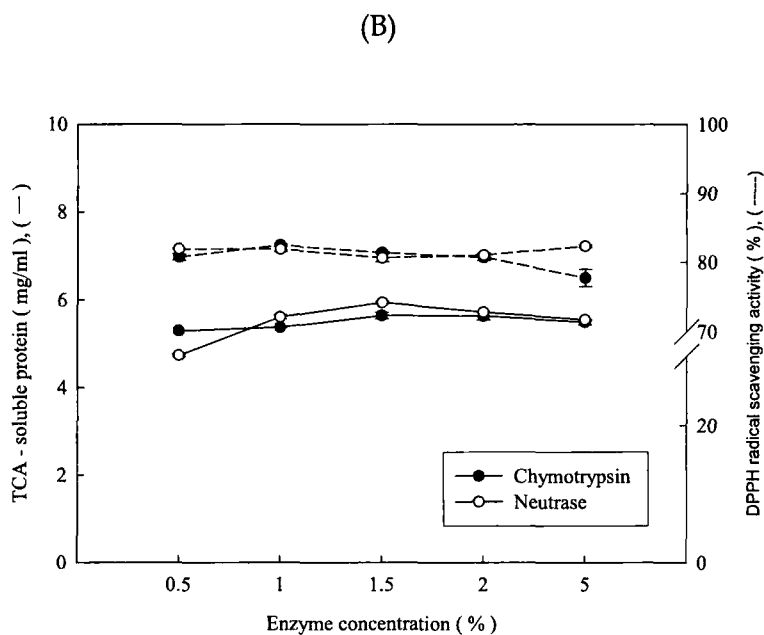
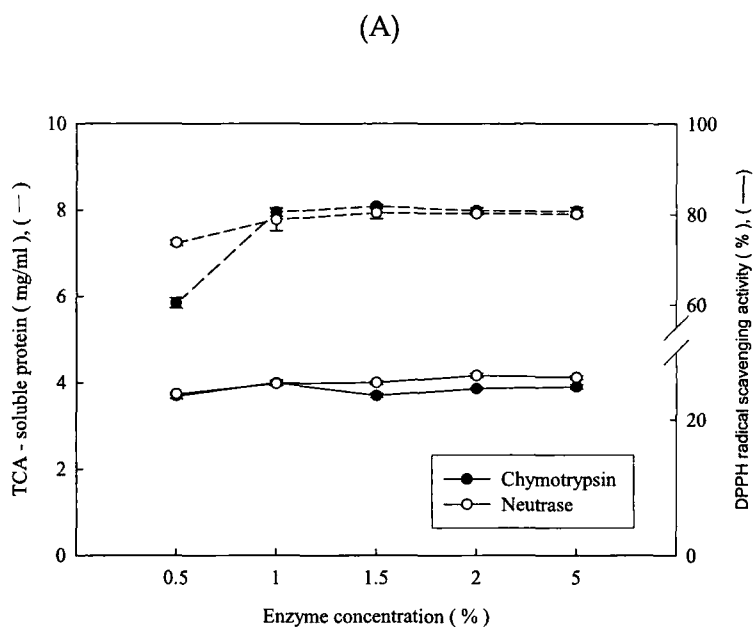


Fig. 5. Effect of protein and DPPH radical scavenging activity of two - step enzymatic hydrolysates from oyster incubated with enzyme concentration. (A), 3% NaCl extract; (B), tap water extract.

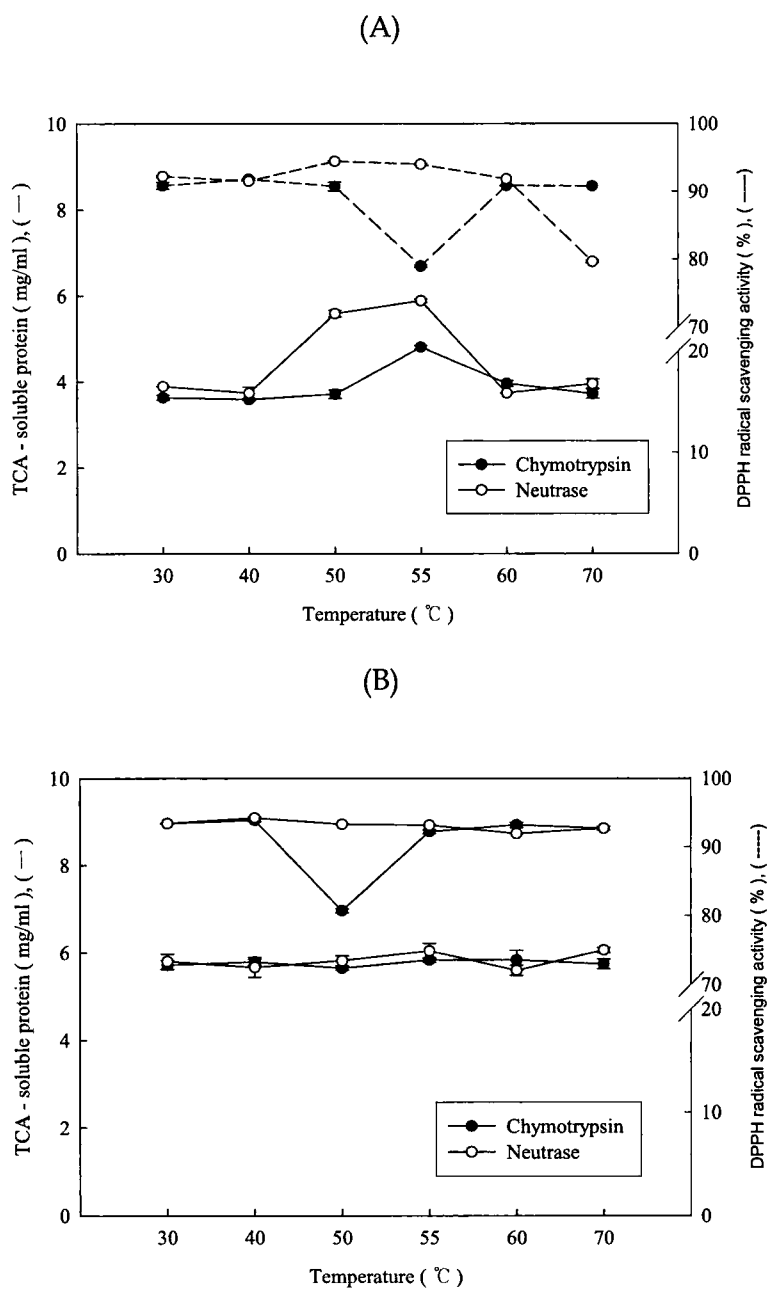


Fig. 7. Effect of protein and DPPH radical scavenging activity of two - step enzymatic hydrolysates from oyster incubated with temperature. (A), 3% NaCl extract; (B), tap water extract.



### 효소가수분해물의 부분 정제

이온교환크로마토그래피는 GradiFrac System에서 XK column(SP Sepharose,  $2.6 \times 30$ , Pharmacia, Sweden)을 사용하여 분리하였다. TGNP 시료의 단백질은 28 - 33 획분에서 주로 분리되었으며(Fig. 8A), 이들의 항산화 활성을 측정하였다. 항산화 활성은 79%였다. PN 시료의 단백질은 29 - 34 획분을 취하였으며(Fig. 8B), 항산화 활성은 79%였다. TGNP와 PN의 이온크로마토그램 사이에 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 transglutaminase에 의한 공유결합의 형성은 가수분해 fragments의 하전에 영향을 미치지 않음을 뜻한다. 이온크로마토그래피에서 DPPH radical 소거능을 보인 활성 획분은 FPLC System을 사용하여 Superdex peptide HR column( $1.0 \times 30$ , Pharmacia, Sweden)에 loading한 후 elution buffer, 20% acetonitrile / D.W ; flow rate, 0.5 mL/min; fraction volume, 1 mL; sample injection, 0.5 mL로 활성 획분을 분리하였다(Fig. 9).

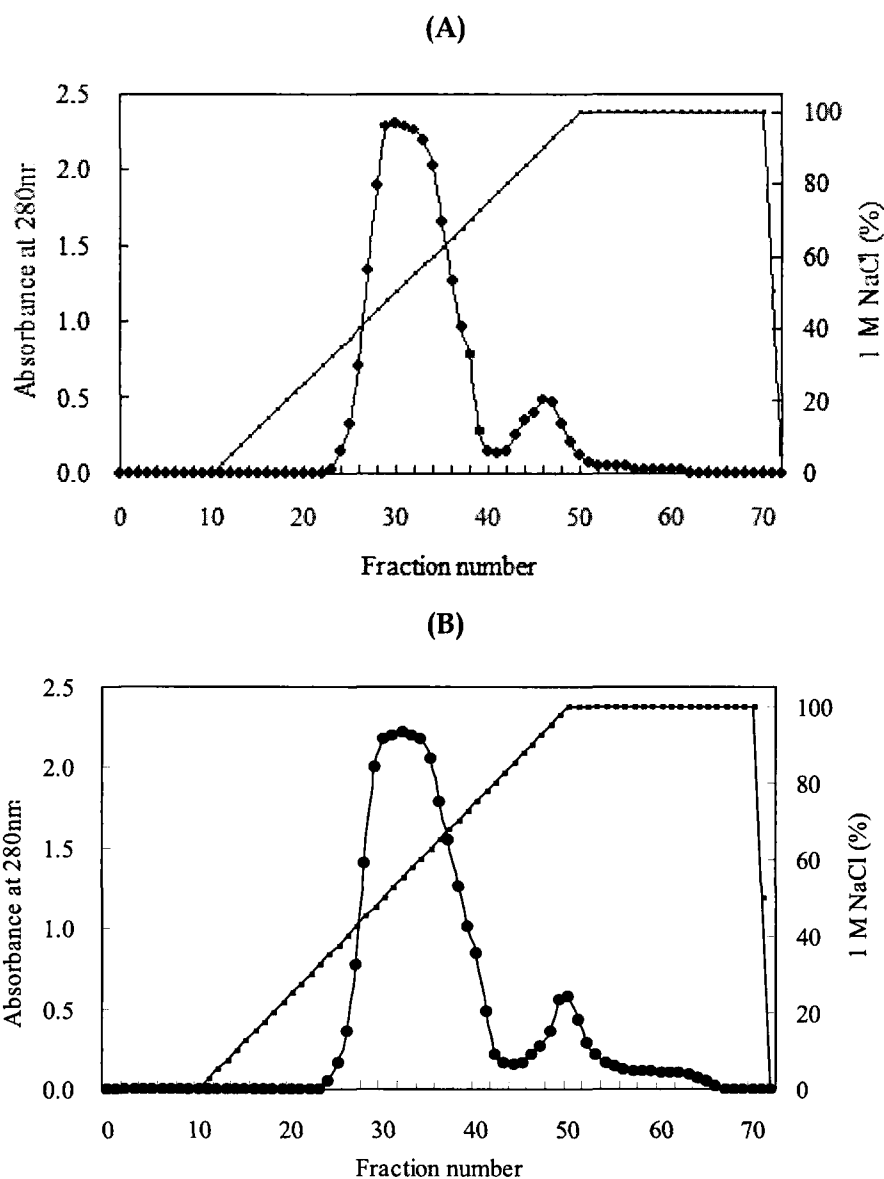
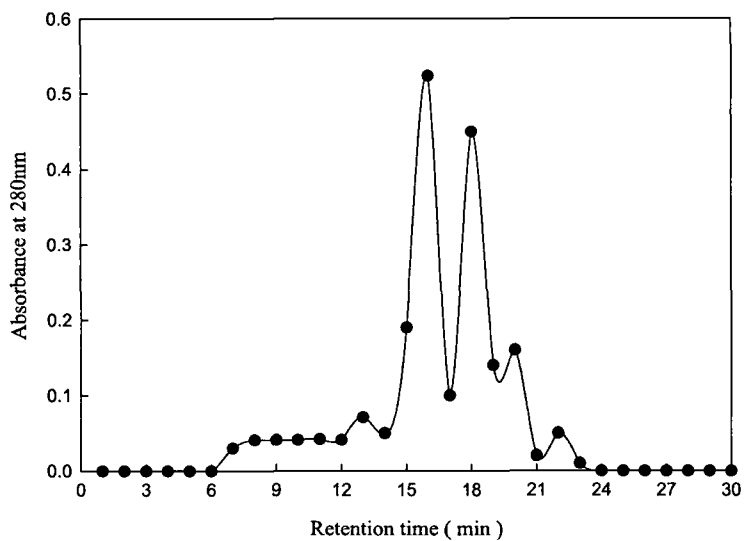


Fig. 8. Chromatogram of SP Sepharose(2.6 x 30 cm) column chromatography. The column (4.6x30cm, flow rate; 1.0 mL/min) was equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5). The hydrolysate was eluted with a linear gradient of 0-1 M NaCl and every fraction were collected. Sample; (A), TGPN; (B), PN.

젤 크로마토그래피 상에서 TGPN과 PN은 retention time 20- 22 사이에서 TGPN 효소 가수분해물의 분자량이 PN 효소 가수분해물의 분자량에 비하여 다소 크다는 사실을 보여주고 있다. 이 같은 결과는 분자량이 적은 fragments 사이에 TGase의 cross-linking에 의한 분자량의 변화를 시사한다. 젤 크로마토그래피에서 DPPH radical 소거능을 보이는 분자 획분은 약 1000 dalton 미만에 해당하는 것으로 나타났다.

(A)



(B)

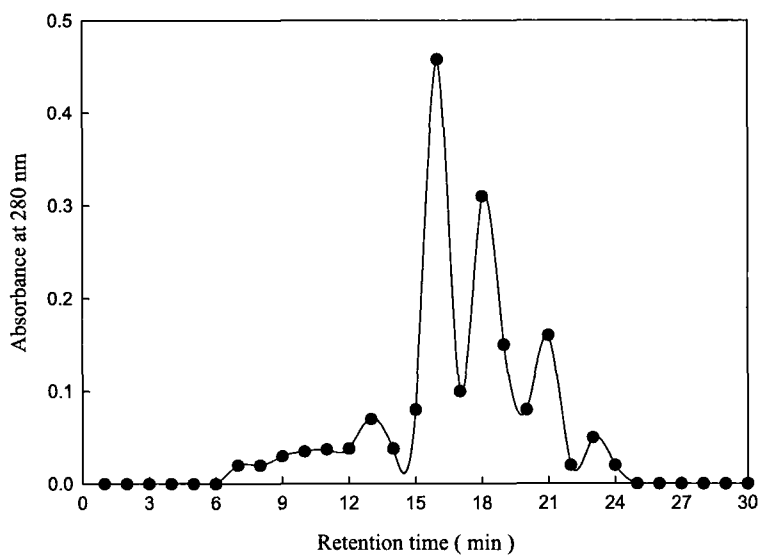


Fig. 9. Chromatogram of Superdex peptide HR column (1.6x30 cm) chromatography. The gel chromatography was performed superdex peptide HR column (10 × 30 cm, flow rate ; 0.5 mL/min) with distilled water containing 20 % acetonitrile for eluent. Sample; (A), TGPN; (B), PN.

### 효소가수분해물의 아미노산 조성

젤 크로마토그래피에서 DPPH radical 소거능을 보이는획분을 분획하여 구성 아미노산을 분석하고 1000 dalton에 해당하는 분자량을 구성하는 아미노산 조성을 계산한 결과( Table 1), TGPN은 한 잔기의 Asp, Thr, Ser, Glu, Ala, Leu 및 Phe로 구성되어 있으며, PN가수분해물은 여기에 한 잔기씩의 Pro, Val 및 Ile이 이 더 존재하는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 TGase에 의해 가교결합이 형성되어 단백질 1차 결합 서열에 차이를 보이는 일부 새로운 단백질이 형성되고 이들 단백질이 효소에 의해 가수분해됨으로서 PN과 다소 다른 결과를 보이는 것으로 추정된다. 같은 방법에 따라 부분 정제한 산 가수분해물의 아미노산 조성은 한 잔기의 Asp, Glu, Gly Ala과 2 잔기의 Pro, Met으로 구성되어 있으며, 이 같은 결과는 효소 가수분해물의 결과와 많은 차이를 보인다.

Table 1. Amino acid composition of TGPN and PN hydrolysate

Amino acid	TGPN	PN	산가수분해물
Asp	1	1	1
Thr	1	1	0
Ser	1	1	0
Glu	1	1	1
Pro	0	1	2
Gly	1	1	1
Ala	1	1	1
Cys	0	0	0
Val	0	1	0
Met	0	0	2
Ieu	0	1	0
Leu	1	1	0
Tyr	0	0	0
Phe	1	0	0
His	0	0	0
Lys	0	0	0
Arg	0	0	0

효소가수분해물의 기능성 특성

**Antiradical activity;** TGPN과 PN 효소 가수분해물과 산가수분해물을 5 kDa의 막으로 한외여과하여 분자량 별로 분획하고 이온교환 크로마토그래피 및 젤 크로마토그래피로 극성 물질을 분획한 후 DPPH radical 소거능을 측정하였다(Table 2). 정제 단계를 거침에 따라 DPPH radical 소거능은 5 kDa 미만의 분자에서 TGPN 가수분해물 40.8배, PN 가수분해물 25.58 배, 산 가수분해물 12.6배 증가하여 5 kDa 이상의 TGPN가수분해물 12.8배, PN 가수분해물 13.6배에 비하여 큰폭으로 증가하였다. 이 같은 결과는 5 kDa 이하의 가수분해물이 5 kDa 이상의 가수분해물에 비하여 DPPH radical 소거능이 우수함을 제시한다. DPPH radical 소거에 대한 EC<sub>50</sub> 값은 5 kDa 이상의 TGPN가수분해물이 0.30 mg/mL로 가장 낮은 값을 보여다.

Table 2. EC<sub>50</sub> of Antiradical activity of hydrolysates by measuring DPPH

Sample	Original (mg/ml)	SCE (mg/ml)	Size exclusion (mg/ml)
TGPN hydrolysate (<5 kDa)	3.26	1.68	0.08
PN hydrolysate (<5 kDa)	4.86	2.04	0.19
Acid hydrolysate (<5 kDa)	0.63	0.56	0.05
TGPN hydrolysate (>5 kDa)	3.85	2.89	0.30
PN hydrolysate (>5 kDa)	3.81	2.86	0.28
Acid hydrolysate (>5 kDa)	None detection	None detection	None detection

**Fe<sup>2+</sup> - chelating 효과;** 가수분해물의 Fe<sup>2+</sup> 킬레이트 효과는 1 mM 및 5 mM의 EDTA에 비하여 떨어지는 것으로 나타났으며, 정제 단계를 거침에 따라 킬레이트 효과는 더욱 감소하였다(Table 2). 가수분해물의 농도가 증가함에 따라 킬레이트 효과는 유의적인 변화를 보이지 않거나(TGPN) 오히려 증가하는 것(PN, acid)으로 나타났다(Table 3). 이 같은 결과는 단백질 가수분해물인 펩티드는 Fe-킬레이트 효과를 갖지 않음을 제시한다.

Table 3. Fe<sup>2+</sup> -chelating activity of hydrolysate (unit: OD)

Sample	Original	SCE	Size exclusion
TGPN hydrolysate ( < 5 kDa)	0.961	0.987	0.975
PN hydrolysate ( < 5 kDa)	0.962	0.930	1.001
Acid hydrolysate ( < 5 kDa)	1.007	0.985	1.007
EDTA.2Na		1 mM; 0.929 5 mM; 0.793	

Table 8. Fe<sup>2+</sup>-chelating activity of hydrolysates with substrate concentration

Sample		1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL
TGPN hydrolysate	Original	0.964	0.962	0.960
	SCE	0.956	0.962	0.968
PN hydrolysate	Original	0.964	0.975	0.981
	SCE	0.957	0.957	0.988
Acid hydrolysate	original	1.002	1.069	1.112
	SCE	0.990	0.970	1.014
		1 mM	5 mM	
EDTA.2Na		0.929	0.793	

**Linoleic acid** 활성; TGPN 가수분해물의 linoleic acid 항산화 효과를 측정 한 결과(Fig. 10) 원액은 1% 농도, 이온교환크로마토그래피 활성획분은 0.5%에서 linoleic acid 산화에 따른 유도기를 연장하는 것으로 나타났으며, 2와 3% 농도에서는 항산화 효과를 보이지 않았다. PN 가수분해물은 원액인 경우 0.5% 농도가 가장 항산화 효과가 좋았고, 이온교환크로마토그래피 획분은 0.5%와 1%가 좋은 효과를 보였다(Fig. 11). 한편 산 가수분해물 원액은 linoleic acid 항산화능을 보이지 않았으나, 이온교환크로마토그래피 분획물은 0.5%, 1% 및 5% 농도에서 TGPN과 PN에 비하여 높은 항산화능을 보였다(Fig. 12). 이 같은 결과는 TGPN과 산 가수분해물은 정제 단계가 증가함에 따라 linoleic acid의 항산화 효과도 wd가하는 것으로 보인다.



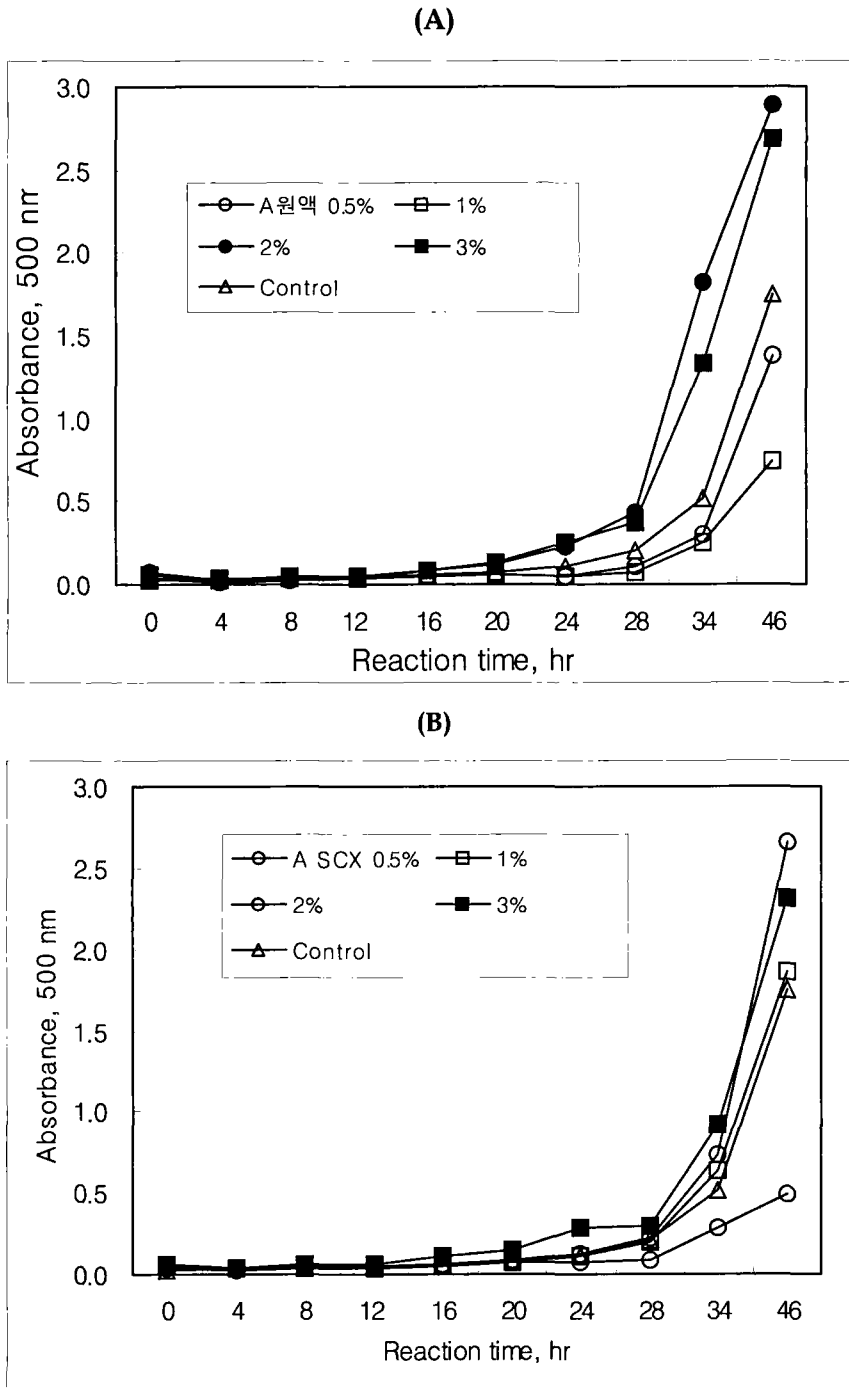
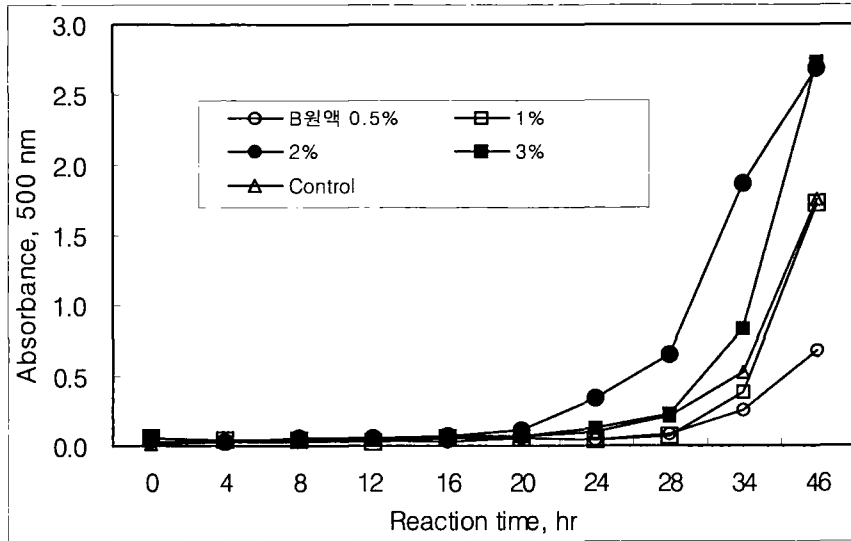


Fig. 10. Antioxidative effect of TGPN hydrolysate(A) and ion-exchange fraction on oxidation of linoleic acid.

(A)



(B)

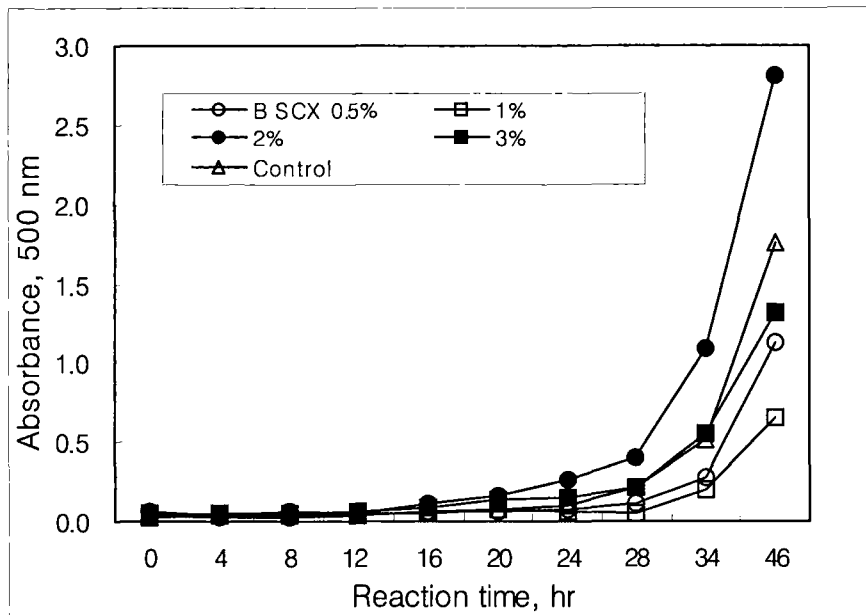
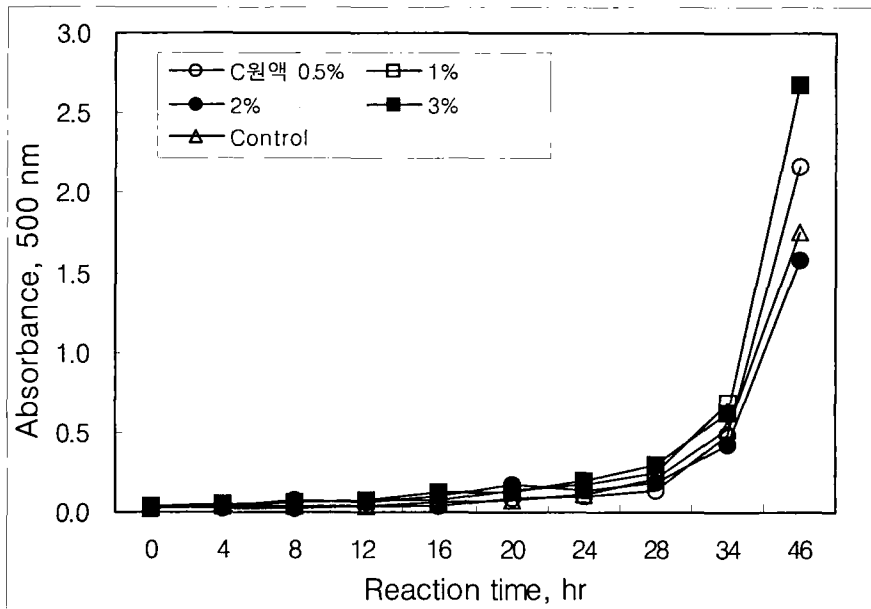


Fig. 11. Antioxidative effect of PN hydrolysate(A) and ion-exchange fraction on oxidation of linoleic acid.

(A)



(B)

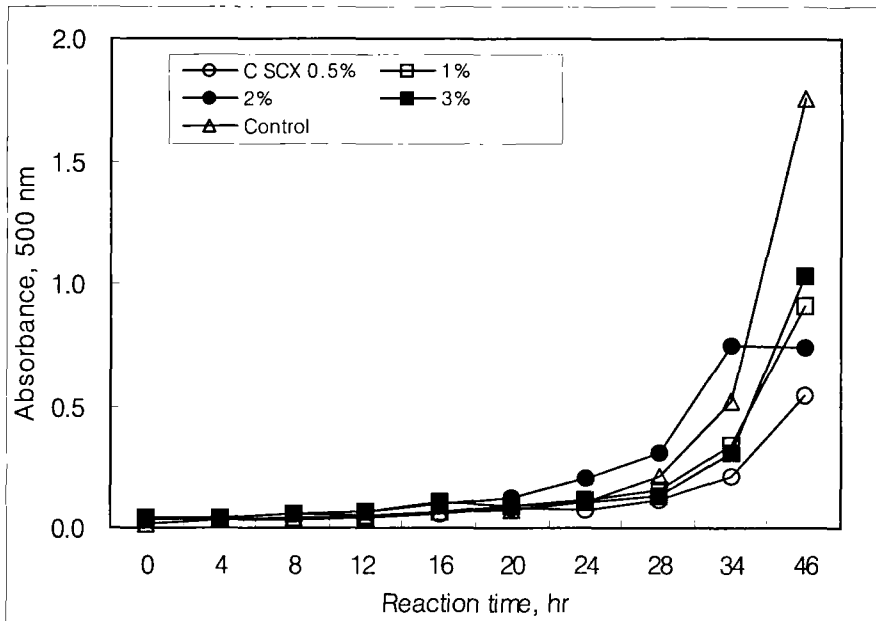


Fig. 12. Antioxidative effect of acid hydrolysate(A) and ion-exchange fraction on oxidation of linoleic acid.

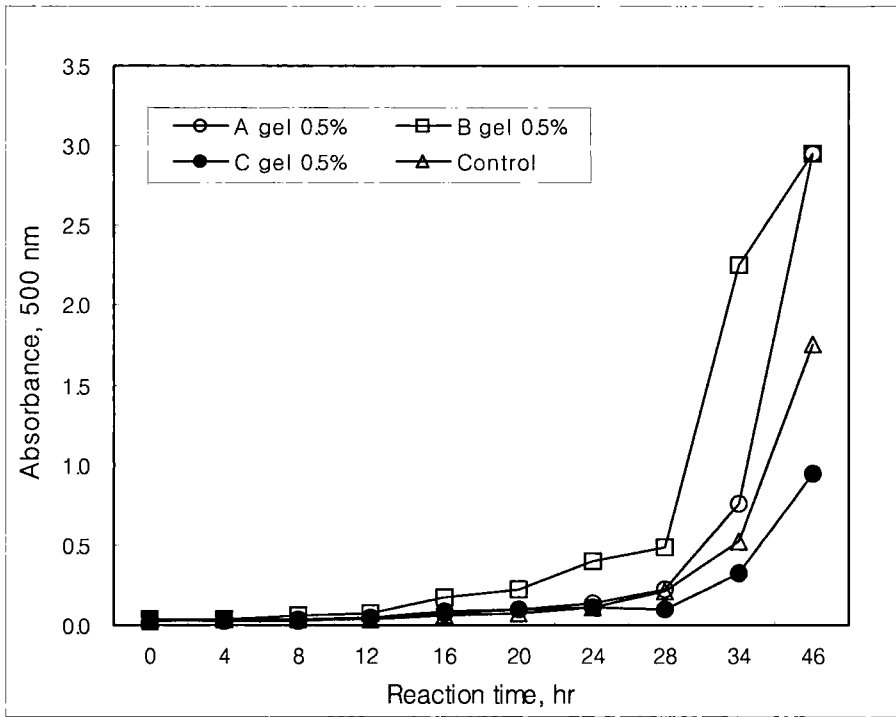


Fig. 13. Antioxidative effect of DPPH active fraction in gel chromatography of TGP (A), PN (B) and acid (C) hydrolysate on oxidation of linoleic acid.

DPPH radical 소거능을 보이는 TGP, PN 및 산 가수분해물의 젤 크로마토그래피 획분은 산 가수분해물에서만 linoleic acid 산화에 따른 유도기의 연장 효과를 보였다(Fig. 13). 이 같은 결과는 산 가수분해물이 가장 효과적인 항산화제임을 제시하며, DPPH radical 소거능과 지질의 항산화 효과는 일치하지 않음을 뜻한다.

**Angiotensin I converting enzyme inhibition;** TGP, PN 및 산 가수분해물의 농도를 증류수로 희석하여 0.5 mg/mL로 동일하게 조절한 후 ACE 저해효과를 측정된 결과(Table 9), TGP와 PN 효소 가수분해물은 이온교환 크로마토그래피 획분에서 각각 2.3배와 1.8배 증가하였으나, 산 가수분해은 오히려 33.8%까지 현저히 감소하였다. 한편 젤 크로마토그래피 획분은 이온

교환 크로마토그래피 획분에 비하여 ACE 저해능은 동일 펩티드 농도에서 다소 감소하는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 ACE 저해능은 DPPH radical 소거능과 달리 펩티드의 분자량에 따라 차이가 있음을 제시한다.

Table 9. ACE inhibition of TGPN, PN and acid hydrolysates\* (unit; %)

Sample	Original	SCE	Size exclusion
TGPN (<5 kDa)	38.1	86.7	80.0
PN (<5 kDa)	48.9	87.0	79.8
Acid hydrolysate (< 5kDa)	85.1	33.8	73.5

\* protein concentration was 0.5 mg/mL.

**Fe<sup>2+</sup> - ion reducing powder of hydrolysates;** 동일 농도(0.5 mg/mL)의 TGPN, PN 및 산 가수분해물의 환원력을 700 nm에서 흡광도 값으로 비교하였다(Table 10). 원액의 경우 효소 가수분해물이 산 가수분해물에 비하여 높은 환원력을 보였으며, 원액과 이온교환크로마토그래피 획분은 거의 동일한 환원력을 보였으나, 젤 크로마토그래피 획분의 환원력은 현저히 감소하였다. 젤 크로마토그래피에 의하여 가수분해물의 환원력에 영향을 미치는 미지 물질이 제거되었기 때문인 것으로 추정된다. 한편 산 가수분해물은 이온교환 크로마토그래피 획분이 원액에 비하여 높은 환원력을 보였다. 그러나 효소 가수분해물과 산가수분해물의 환원력은 positive 대조군으로 사용한 1 mM ascorbic acid에 비하여 5%-35%에 불과하였다. 농도에 따라 각 가수분해물의 환원력을 측정한 결과(Table 11), 농도가 증가함에 따라 환원력은 오히려 감소하였으며, 이온교환크로마토그래피 획분에서도 같은 결과를 보였다.

Table 10. Fe<sup>2+</sup> - ion reducing powder of TGPN, PN and acid hydrolysate(unit; OD)

Sample	Original	SCE	Size exclusion
TGPN hydrolysate(<5 kDa)	0.270	0.269	0.962
PN hydrolysate(< 5 kDa)	0.279	0.269	1.286
Acid hydrolysate (< 5 kDa)	0.510	0.125	0.261
1 mM Ascorbic acid		0.044	

\* Protein concentration; 0.5 mg/mL, absorbance at 700 nm

Table 11. Fe<sup>2+</sup>-ion reducing powder of TGPN, PN and acid hydrolysates with concentration (unit; OD)

Sample		Concentration, mg/mL		
		1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL
TGPN hydrolysate	original	0.394	0.635	0.928
	SCE	0.413	0.695	0.937
PN hydrolysate	original	0.407	0.811	1.085
	SCE	0.388	0.653	0.799
Acid hydrolysate	original	0.911	1.401	1.759
	SCE	0.205	0.353	0.433
Ascorbic acid	0.1 mM	0.130	0.138	0.041
	0.5 mM			
	1.0 mM			

\* absorbance at 700 nm

**Xanthine oxidase** 저해활성; TGPN, PN 및 산 가수분해물의 xanthine oxidase 저해활성을 측정한 결과(Table 12), 산 가수분해물의 저해활성이 효소 가수분해물보다 큰 것으로 나타났으며, TGPN>PN 가수분해물의 순이었다. 이온교환크로마토그래피 획분에서 저해활성은 원액에 비하여 현저히 감소하였다. 이 같은 결과는 원액이 가지고 있는 시료의 색이 효소 활성을 측정하는 자외선 영역에 영향을 미쳤기 때문으로 추정된다. 시료에 황색이 거의 보이지 않는 이온교환크로마토그래피 획분과 젤 크로마토그래피 획분을 비교해보면, TGPN 가수분해물은 정제 단계에 따라 저해 활성이 다소 증가한 반면, PN과 산 가수분해물은 다소 감소한 결과를 보여, 정제 단계에 따른 미지 물질의 제거가 저해 활성에 영향을 미치는 것으로 나타났고, 펩티드의 분포가 가수분해물의 종류에 따라 차이가 있음을 제시한다.

Table 12. Xanthine oxidase inhibitor activity of TGPN, PN and acid hydrolysate (units / mg-protein)

Sample	Original	SCE	Size exclusion
TGPN hydrolysate (<5 kDa)	61475	8702	12039
PN hydrolysate (<5 kDa)	46106	8197	5379
Acid hydrolysate (<5 kDa)	135245	9221	5635

\* protein concentration; 0.5 mg/mL

## 요약

상업적으로 많이 사용되고 있는 효소를 바탕으로 1,2차 가수분해를 하였고, 효소 반응시간에 대한 영향은 0 - 120 분 동안 20 분 간격으로 실험하였을 때 60 분에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, 효소 농도에 대한 실험은 0.5, 1, 1.5, 2, 5%를 첨가하였으며, 최적 농도는 1% 였다. 반응온도는 30 - 70 °C 까지 10 °C 간격으로 실험을 수행 하였을 때 최적 온도는 40 °C였다. 수도수를 가하여 마쇄하고 가수분해한 것 보다 3% NaCl을 가하여 마쇄하고 가수분해한 것은 염용성 단백질의 추출 때문에 단백질 함량이 높은 추출물을 얻을 수 있었다. TGPN, PN 및 산 가수분해물의 DPPH radical 소거능은 5 kDa 이하의 분획물이 5 kDa 이상의 분획물에 비하여 높았으며, 정제 단계를 거침에 따라 EC<sub>50</sub> 값은 감소하였다. Linoleic acid에 대한 항산화 효과는 산가수분해물이 효소 가수분해물에 비하여 산화 유도기를 더 연장하였으며, 0.5% 농도의 이온교환크로마토그래피 획분이 가장 높은 항산화 효과를 보였다. TGPN과 PN가수분해물의 이온교환크로마토그래피 분획물은 약 80% 전후의 ACE 저해능을 보였다. TGPN, PN및 산 가수분해물은 Fe-chelating 능과 환원력을 보이지 않았다.



## 참고문헌

- Adler-Nissen J, Olsen HS. 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy proteins. In *Functionality and protein structure*. A Pour-E (ed.), Washington, DC, ACS Symposium Series, p 125-146.
- Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa S, Tltoh M. 2001. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolyssates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science* 57: 319-324.
- Aristoy, MC. and Toldra, F. 2004. amino acids. In *Handbook of food analysis*. LML Nollet (Ed.), Marcel Dekker Inc, NY, 83-123.
- Babiker EFE, Khan MAS, Matsudomi N, Kato A. 1996. Polymerization of soy protein digest by microbial transglutaminase for improvement of the functional properties. *Food Research International* 29:627-634.
- BeMiller JN, Whistler RL. 1996. Carbohydrates. In *Food Chemistry*, OR Fennema (Ed.), Marcel Dekker Inc, NY, p. 171-174.
- Benjakul S, Morrisey MT. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *J Agric Food Chem* 45:3423-3430.
- Blenford DE. 1994. Protein hydrolysates: functionalities and uses in nutritional products. *Int Food Ingr* 3:45.
- Boza JJ, Martinez-Augustin O, Gil A. 1995. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 43: 872-875.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F. 1995. Structural analysis of antioxidant peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin. *J Agric Food Chem* 43: 574-578.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from                    digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem* 44: 2619-2623.
- Damodaran S. 1996. Amino acid, peptides, and proteins. In *Food*

- Chemistry, OR Fennema (Ed.), Marcel Dekker Inc, NY, p. 321-429.
- Hattori M, Yamaji-Tsukamoto K, Kumagai H, Feng Y, Takahashi K. 1998. Antioxidative activity of soluble elastin peptide. *J Agric Food Chem* 46: 2167-2170.
- Hou W-C, Chen H-J, Lin Y-H. 2003. Antioxidant peptides with ngiotension converting enzyme inhibitory activities and applications for and applications for angiotensin converting enzyme purification. *J Agric Food Chem* 51: 1706-1709.
- Janitha PK, Wanasundara PD, Ross ARS, Amarowicz R, Ambrose SJ, Pegg RB, Shand PJ. 2002. Peptide with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibiting activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. *J Agric Food Chem* 50: 6981-6988.
- Jao C-L, Ko W-C. 2002. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice. *Fisheries Science* 68: 430-435.
- Katayama K, Tomatsu M, Satoshi K, Yamauchi K, Fuchu H, Kodama Y, Kawamura Y, Muguruma M. 2004. Inhibitory profile of nonapeptide derived from porcine troponin C against angiotensin I-converting enzyme. *J Agric Food Chem* 52: 771-775.
- Kim SK, Choi RC, Park PJ, Choi JH, Moon SH. 2000. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of cod teiset protein. *J Korean Fish Soc* 33: 198-204.
- Kim S-K, Kim Y-T, Byun H-G, Nam K-S, Joo D-S, Shahi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J Agric Food Chem* 49: 1984-1989.
- Kristinson HG, Rasco BA. 2000. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *J Agric Food Chem* 48:657-666.
- Loffler A. 1986. Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food Technol* 40:63.
- Mendis E, Rajapakse N, Kim S-K. 2005. Antioxidant properties of radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared

- fish skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem* 53: 581-587.
- Mine Y, Ma F, Lauriau S. 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric Food Chem* 52: 1088-1094.
- Nam SH, Choi SP, Kang MY, Kozukue N, Friedman M. 2005. Antioxidant, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assay. *J Agric Food Chem* 53: 816-822.
- Ono S, Hosokawa M, Miyashita K, Takahashi K. 2003. Isolation of peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory effect derived from hydrolysate of upstream chum salmon muscle. *J Food Sci* 68: 1611-1614.
- Park EY, Murakami H, Mori O, Matsumura Y. 2005. Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. *J Agric Food Chem* 53: 137-144.
- Rajapakse N, Mendis E, Jung W-K, Je J-Y, Kim S-K. 2005. Purification of radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International* 38: 175-182.
- Rival SG, Boeriu CG, Wichers HJ. 2001. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agric Food Chem* 49: 295-302.
- Rudepan W, Nakayama T, Beuchat LR. 1995. Characteristics of acid hydrolysate from defatted peanut flour. *J Food Sci* 60:443-445.
- Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J Agric Food Chem* 51: 3661-3667.
- Sen DP, Sripathy NV, Lahiry NL, Sreenivasan A, Subrahmayan V. 1962. Fish hydrolysates 1. Rate of hydrolysis of fish flesh with papain. *Food Technology* 5: 138-141.
- Skanderby M. 1994. Protein hydrolysates: their functionality and applications. *Food Technol Int Eur* 10:141.
- Son M-H, Park J-H, Lee S-C. 2003. Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from whelk (*Buccinum middendorffi* Verkrii) internal organ. *Food Science Biotechnol* 12: 683-686.

- Suetsuna. 2000. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. *Marine Biotechnology* 2: 5-10.
- Suetsuna. 2002. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of the short-necked clam *Tapes philippinarum* and the pearl oyster *Pinctada fucata martensi*. *Fisheries Science* 6: 233-235.
- Thiansilakul Y, Benjakul S, Shahidi F. 2007. Antioxidant activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *J Food Biochem* 31: 266-287.
- Worthington CC. 1988. Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals. Worthington Biochemical Co, New Jersey, USA.
- 이종훈. 2006. 굴산업 현황 및 발전 방향. 패류양식산업발전을 위한 세미나, 통영,

## 제 5 절 효소 가수분해물의 비극성 기능성 물질의 정제와 구조

### Abstract

The objective of this work was to purify and investigate the functional nonpolar peptides in enzymatic hydrolysates from oyster. The nonpolar peptides of TGPN were purified by ultrafiltration (1 KDa), size exclusion chromatography, reverse-phase and ion-exchange HPLC. TGPN hydrolysate had high angiotensin-I converting enzyme inhibition below 500 Da molecular size. The purified peptide showed single peak in 8% CH<sub>3</sub>CN containing 0.1% TFA, and 38% inhibition effect. The amino acid composition of purified peptide composed of isoleucine, leucine, valine, alanine, aspartic acid, glycine, proline and asparagine by Edman sequence. The molecular weight of some peptides was equal to the results of ESI-MS for peptide sequence.

### 서론

Angiotensin-I converting enzyme(ACE)는 혈관과 신장의 근위세뇨관 내피 심장, 폐, 활성화된 대식세포, 뇌조직 등에서 발견되는 dicarboxy peptidase(Lapointe et al., 2002)로서 포유류의 혈압 및 수분균형 조절기구인 renin-angiotensin system(Esther et al., 1997)에서 renin에 의해 angiotensinogen으로부터 활성화된 angiotensin I을 angiotensin II로 전환시킨다. angiotensin II는 부신, 혈관평활근 세포, 신장, 심장 등에 존재하는 4종의 AT receptor에 작용하며 이들은 혈관수축, aldosterone과 vasopressin의 방출, 세뇨관의 나트륨 흡수, 신장으로의 혈류량 감소 등을 유발함으로써 심혈관, 신장 및 중추에 여러 가지 병변을 가져온다(Unger et al., 2002). ACE의 저해물질인 ACE inhibitor는 뇌출혈, 심장병 및 신장병 등과 합병증으로 나타나는 고혈압을 직접적으로 억제할 수 있는 물질로서 많은 연구가 되어왔다. 그리고 만성신장병, 동맥경화, 심장발작과 그로 인한 사망 등을 효과적으로 감소시킬 수 있으며 이러한 효과는 여러 임상실험결과가 뒷받침하고 있다(Thurman and Schrier, 2003; Bakris, 2001). 현재 captopril, enalapril 등 많은 ACE 저해제를 화학적으로 합성하여 고혈압 치료제로 사

용하고 있다(Cheung et al., 1980). 그러나 이러한 ACE 저해제는 다른 세포에 작용하여 두통, 식욕부진, 미각이상 등 부작용이 있기 때문에 더욱 안전하고 효과적인 천연의 ACE 저해제에 대한 탐색과 개발이 이루어 지고 있다(Webster and Koch, 1996).

식품 유래의 ACE 저해제는  $\alpha$ -zein(Miyoshi et al., 1991a), 정어리(Matsui et al., 1993), 참치(Kohama et al., 1988), 가다랭이(Yokoyama et al., 1992) 등의 식품단백질 가수분해물에서 보고되었다. 이러한 식품내의 ACE 활성 억제 인자는 다양한 동물, 식물 및 어류의 단백질 가수분해물에 존재한다고 알려져 있다(Miyoshi et al., 1989; Kohmura et al., 1990; Miyoshi et al., 1991b; Seki et al., 1993). 이는 단백질의 가수분해시 생성되는 peptide이며 따라서 이들의 분리정제 방법에 관한 연구가 수행되었다(Matsuda et al., 1992). 이들의 활성 저해효과는 기존의 혈압강화제에 비해 낮은 활성을 가지고 있지만 섭취량이 대량인 측면과 식품이라는 안정적 측면에서 그 유용성이 기대되고 있다(Shimizu, 1994). 그리고 효소를 이용한 가수분해방법을 사용하면 수용성 추출물로서 생리활성물질을 식품의 첨가제나 건강식품소재로 사용하여 생체 내에 쉽게 전달할 수 있는 장점과 화학약품을 사용하지 않기 때문에 안전성에 대한 문제도 감소하며 단백질의 효소적 가수분해는 2차 구조가 다른 분자 질량이 적은 물질을 생성한다(Alder-Nissen et al., 1979). 일반적으로 ACE저해작용은 3000 Da 이하의 저분자 peptide에서 높은 효과를 나타낸다고 보고하였으며, 식품 단백질의 ACE 저해효과가 높은 peptide의 분자량 1000 Da 이하이다(Ariyoshi, 1993).

본 연구는 천연 식품인 굴을 원료로 효소 가수분해물을 제조하고, 가수분해물 중에서 ACE 저해활성이 우수한 저분자의 펩티드를 분리, 정제하여 구조를 결정함으로써 펩티드 합성을 위한 기초자료와 의약품 소재로 활용하기 위하여 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

참굴(*Crassostrea gigas*, 각장  $4.6 \pm 2.3$  cm, 각중  $9.9 \pm 3.2$  g)은 경남 통영 연안의 양식장에서 채취하여 인근의 가공공장에서 IQF(Individual Quick Frozen)로 가공한 제품으로서 1-2년 동안 냉동보관하여 갈변 때문에 상품 가치를 잃은 제품을 가수분해 시료로 사용하였다. 가수분해를 위한 상업용 효소는 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase 및 Protamex는 Novozyme-Korea에서

구입하였으며, transglutaminase(TGase, TG-K)와 chymotrypsin은 각각 Ajinomoto 사(Japan)와 Sigma 사에서 구입하였다. 분리, 정제를 위한 acetonitrile, methanol 및 TFA는 모두 HPLC 급(Fisher Scientific.)을 사용하였으며, ACE저해능 측정을 위한 angiotensin-I 전환효소(ACE)는 토끼의 허파에서 얻은 아세톤 침전 분말(Sigma A6778)를 사용하였고, 기질로 hippuryl-His-Leu(Sigma H1635)를 사용하였다. 그 외의 모든 시약은 모두 시약급을 사용하였다.

### 효소를 이용한 글가수분해물의 제조

장(2007)의 방법에 따라 기능성 글 가수분해물(이하 TGPN)을 제조하였다. 즉, 양식산 글을 TGase로 30 °C에서 1시간동안 처리한 후 Protamex (Novozyme-Korea, Pusan)로 1시간동안 가수분해하고, 100 °C에서 1시간 가열 처리하여 불활성화 시켰다. 기능성 향상을 위해 1차 효소 가수분해물을 Neutrase (Novozyme-Korea, Pusan)로 1 시간동안 재 가수분해 한 뒤 100 °C에서 1시간 불활성화 시켰다. 가수분해물은 원심분리(Hanil Supra 22, 8000xg, 25분)하여 불용성 물질을 제거하였다. 회수한 상층액에 최종 농도 60%가 되도록 ethanol을 첨가하여 4 °C의 저온실에 1시간 방치하여 에탄올 불용성 물질과 잔여 단백질을 침전시키고 원심분리(8000xg, 25분)하여 제거하였다. 상층액은 0.45 µm의 막으로 여고하고 회전진공증발기(N-1 type, EYELA, Japan)로 40 °C 이하의 온도에서 ethanol을 증발시켰다. 증발 건고물은 탈이온수에 녹인 후 5 kDa의 막을 장착한 한외여과기(8200, Amicon, USA)로 한외 여과한 후 농축물과 여과물을 각각 진공동결 건조하여 건조 분말을 만든 후 -20 °C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### Angiotensin-I converting enzyme(ACE) 저해능의 측정

ACE 저해활성은 Wu et al.(2002)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 즉 0.3 M NaCl을 첨가한 0.1 M borate buffer(pH 8.3)로 5 mM hippuryl-His-Leu (HHL)과 0.25 mUnit ACE를 제조하였다. Eppendorf tube에 시료 40 µL, ACE 150 µL를 첨가하여 37 °C 항온수조에서 10분간 반응시킨 후 100 µL HLL을 가하여 37 °C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 150 µL의 1 M HCl을 가하여 효소 반응을 중지시킨 다음 HPLC(Hitachi, Japan)로 유리한 hippuric acid (HA)의 함량을 측정하였다. HA의 정량을 위해 역

상 column (Watchers 120 ODS-AP, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Daiso, Japan)를 장착한 HPLC에 반응 중지용액 20  $\mu$ L를 주입하고, A 용매로 0.1 % TFA를 포함하는 H<sub>2</sub>O, B 용매로는 0.1 % TFA를 포함하는 100 % CH<sub>3</sub>CN을 사용하였으며 B용매로 선형 균배하면서 용출하는 펩티드는 228 nm에서 흡광도로 검출하였다. Reference 용액은 시료대신 40  $\mu$ L의 H<sub>2</sub>O를 사용하였으며, 효소저해능은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{ACE 저해(\%)} = (\text{Reference의 HA} - \text{시료의 HA}) / \text{Reference의 HA} \times 100$$

### ACE저해 peptide 정제

ACE저해 peptide를 정제하기 위해 동결건조되어 있는 굴 가수분해물을 20% CH<sub>3</sub>CN으로 용해하여 1 kDa membrane 막을 장착한 한회여과기(8050, Amicon, USA)로 여과한후 size-exclusion column(Hiroad 16/60 superdex 30pg, 16 x 600 mm, Pharmacia, Sweden)을 이용하여 기능성을 측정 한 후 활성이 좋은 부분을 2종류의 역상 HPLC column (218TP510 Protein & peptide C<sub>18</sub>, 10 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Grace Vydac, USA; Watchers 120 ODS-AP, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Daiso, Japan), 양이온 교환 HPLC column(TSK-gel SP-5PW, 7.5 x 75 mm, Tosoh, Japan)을 교대로 사용하여 정제하였다(Fig. 1). 모든 역상 HPLC 정제단계에서 A용매로는 0.1 % TFA를 포함하는 H<sub>2</sub>O와 B용매로는 0.1 % TFA를 포함하는 CH<sub>3</sub>CN을 이용하여 B용매 gradient로 분리, 정제하였다. 또한 size exclusion HPLC는 20 % CH<sub>3</sub>CN으로 용출시켰다. 각 단계에서 얻어진 분획들의 ACE저해활성을 측정하여 높은 활성을 가진 분획만을 정제하였다.



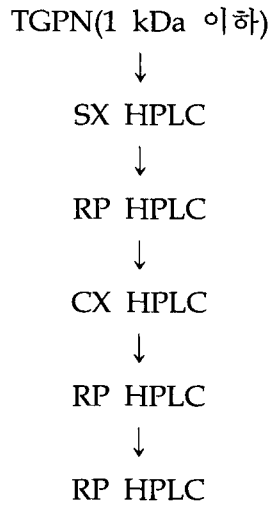


Fig. 1. Summarized procedures for the purification of TGPN. TGPN, TGase-Protamex-Neutrase hydrolysate. SX HPLC, size-exclusion HPLC. RP HPLC, reverse-phase HPLC. CX HPLC, cation-exchange HPLC.

#### 아미노산 서열분석

굴 가수분해물의 기능성 peptide의 아미노산 서열을 결정하기 위해서 한국 기초과학지원 연구원의 Procise cLC Sequencing System Model 492 cLC (Apply Biosystem, Foster city, CA, USA)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석하였다.

#### ESI/QTOF-MS/MS에 의한 분석

전기분무이온화(ESI)법을 이용하여 질량분석기로 분자량 이온 및 분해된 이온을 검출하여 정제된 peptide의 분자량을 확인하였다. 질량스펙트럼은 QTOF2 (Micromass, U.K) 질량분석기에 Nano-ESI interface를 이용하여 data dependant MS/MS 방법으로 얻었다.

## 결과 및 고찰

### ACE 저해 peptide 정제

동결건조한 TGPN을 20% CH<sub>3</sub>CN으로 용해하여 1 kDa membrane 막을 장착한 한회여과기(8050, Amicon, USA)로 여과하고 size-exclusion column(Hiroad 16/60 superdex 30pg, 1.6 x 60 cm, Pharmacia, Sweden)에 loading하여 20% CH<sub>3</sub>CN으로 용출하였다. 4개의 주요 획분으로 분획되었으며(Fig. 2), 분획 A와 B에서 ACE 저해활성이 나타났고 각 분획의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 2,310 mg/mL와 1,647 mg/mL였다(Table 1).

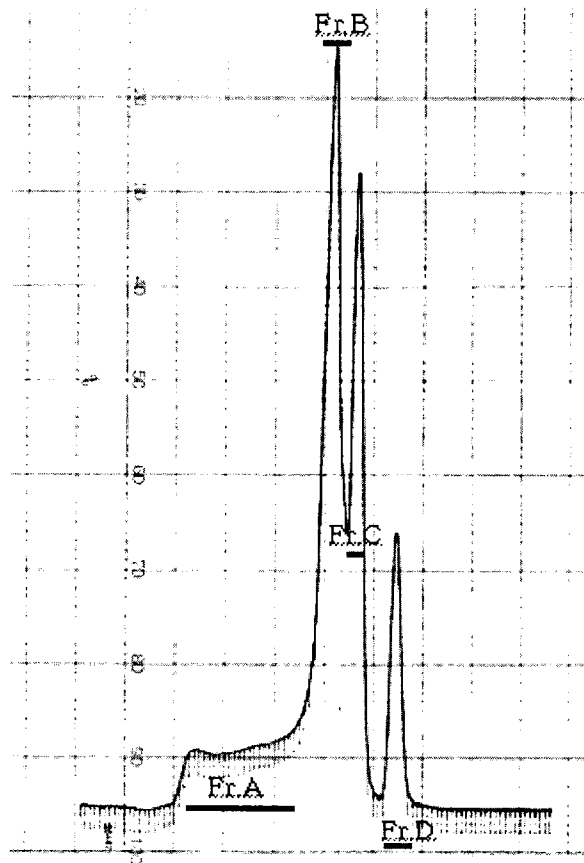


Fig. 2. Size-exclusion HPLC profile of the TGPN(< 1 kDa). The TGPN(<1 kDa) was loaded onto Hiroad 16/60 superdex 30pg (16 x 600 mm) column and eluted with 20 % CH<sub>3</sub>CN at a flow rate of 1.0 mL/min.

Table 1. Inhibition of ACE activity

	ACE저해활성(%)	mg/mL	EC50(mg/mL)
Fr. A	65.12	4.939	
	57.57	2.470	2.310
	40.02	0.988	
Fr. B	85.51	4.247	
	75.09	1.699	
	64.52	0.849	1.647
	55.32	0.212	
Fr. C	-	3.708	
	-	1.854	
	-	1.236	
Fr. D	-	4.176	

DPPH와 ACE 저해활성이 가장 좋은 fraction A와 fraction B를 역상 column (218TP510 Protein & peptide C<sub>18</sub>, 10 x 250 mm, 5 μm, Grace Vydac, USA)에 주입하여 다음과 같은 조건으로 19개 부분으로 분취하였다으며(Fig 3), 분리 조건은 A 용매, 0.1 % TFA를 포함하는 H<sub>2</sub>O; B용매, 0.1 % TFA를 포함하는 CH<sub>3</sub>CN; gradient, 0 → 50 % B (50 min); 흡광도, 254 nm; 유속, 3.0 mL/min을 사용하였다. 분리한 분획들로부터 1/65에 해당하는 양을 취하여 ACE 저해활성을 측정된 결과, 분획 1,9,12,13,14,15,17번에서 높은 ACE 저해능을 보였으나, 1번의 경우 선행연구에서 극성부분으로 펩티드일 가능성이 희박하기 때문에 제외시켰으며 12-15번의 경우 저해능은 우수하나 더 이상의 실험을 수행하기 어려운 정도로 적은 양이었으며 글카수분해물의 ACE 저해능에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 판단하였다(Table 2). 따라서 저해능이 우수하며 분취량이 비교적 충분한 9, 17번 분획을 선택하여 농축하였다.

다음 단계로 활성분획들을 cation-exchange column(TSK-gel SP-5PW, 7.5 x

75 mm, Tosoh, Japan)에 주입하여 A 용매, 10 mM의 Phosphate buffer (PBS) (pH 6.0); B 용매, 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM PBS (pH 6.0); gradient, 0 → 1.0 M B (100 min); 흡광도, 254 nm; 유속, 1.0 mL/min; 온도, 40 °C의 조건에서 펩티드를 정제하였다. ACE저해 활성 측정은 분취한 분획의 1/50에 해당하는 양을 취하여 측정하였다. 역상 HPLC단계에서 분취한 9번 분획에서는 14개 부분으로 분취하였으며(Fig. 4), ACE저해활성을 측정한 결과 1번 분획(RP9SP1)에서 54.58%의 ACE 저해 활성을 보였다(Table 3). 그리고 역상 HPLC 단계에서 분취한 17번 분획에서도 1번 분획(RP17SP1)에서 46.78 %의 ACE 저해능을 보여 이들 물질은 음이온 물질이며, 양이온 column에 결합하지 않은 것으로 미루어 염기성 아미노산이 포함되어 있지 않은 것으로 판단하였다(Fig. 5, Table 4).

세 번째 단계로 양이온 column에서 활성을 가진 각각의 1번 분획을 역상 column (Watchers 120 ODS-AP, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Daiso, Japan)에 주입하여 앞서의 역상 HPLC와 동일한 용매를 사용하여 균배 농도 0 → 20 % B (60 min); 흡광도, 220, 254, 280 nm; 유속, 1.0 mL/min의 조건으로 분리하였다. ACE 저해 활성 측정은 분취한 분획의 1/30에 해당하는 양을 취하여 측정하였다. RP9SP1의 경우 2개의 peak를 제외한 모든 peak들은 254, 280 nm의 흡광도가 220 nm 흡광도 보다 높게 나타났다(Fig 6, Table 5). 그리고 이들 2개의 분획은 ACE 저해능을 보이지 않았다. 그러나 RP17SP1의 경우 20, 24번 분획에서 각각 40.28%와 32.91 %의 ACE 저해능을 보였으며, 8-9% 농도의 CH<sub>3</sub>CN 부근에서 나타났다(Fig.7, Table 6).

네 번째 단계에서는 활성을 가진 분획을 8-9% CH<sub>3</sub>CN의 isocratic 조건으로 분리하였다. 역상 column (Watchers 120 ODS-AP, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Daiso, Japan)에 활성 분획을 주입하고 분리하여 분취한 분획의 1/10에 해당하는 양을 취하여 ACE 저해능을 측정하였다. 20번 분획의 경우 8 % CH<sub>3</sub>CN의 isocratic 조건에서 활성 peak가 나타난 반면(Fig. 9, Table 8), 9 % CH<sub>3</sub>CN의 isocratic 조건에서는 24번 분획에서 활성을 찾을 수 없었다(Fig. 8, Table 7). 20번 분획에서 얻은 활성 peak의 정제도를 높이기 위해 다시 한번 8 % CH<sub>3</sub>CN isocratic 조건으로 분리한 결과 단일 peak로 정제되었다(Fig. 10). 그리고 이들 peak는 220nm에서 흡광도가 가장 큰 것에 미루어 펩티드로 판단하였다.

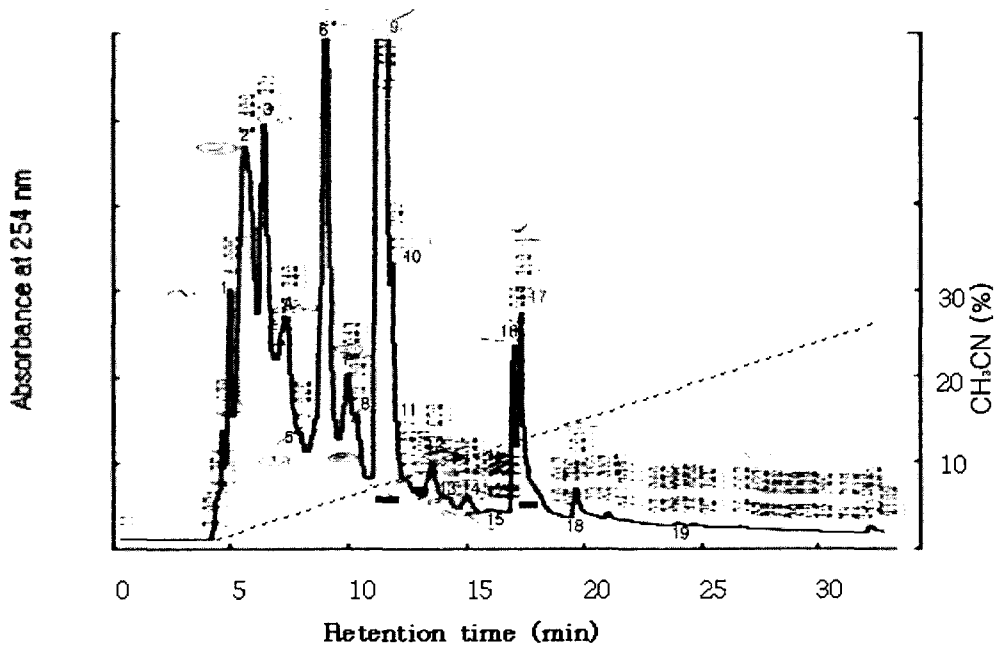


Fig. 3. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction B in Fig. 2. The activity fraction were loaded onto 218TP510 Protein & peptide C<sub>18</sub> (10 x 250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH<sub>3</sub>CN (dotted line) in 0.1 % TFA at a flow rate of 3.0 mL/min.

Table 2. Inhibition of ACE activity from fraction numbers

fraction No.	ACE inhibition(%)	fraction No.	ACE inhibition(%)
1	41.70	11	23.77
2	8.97	12	51.50
3	15.72	13	47.12
4	16.59	14	57.47
5	9.49	15	58.51
6	19.49	16	-
7	9.70	17	50.54
8	8.51	18	12.14
9	55.67	19	-
10	27.39		

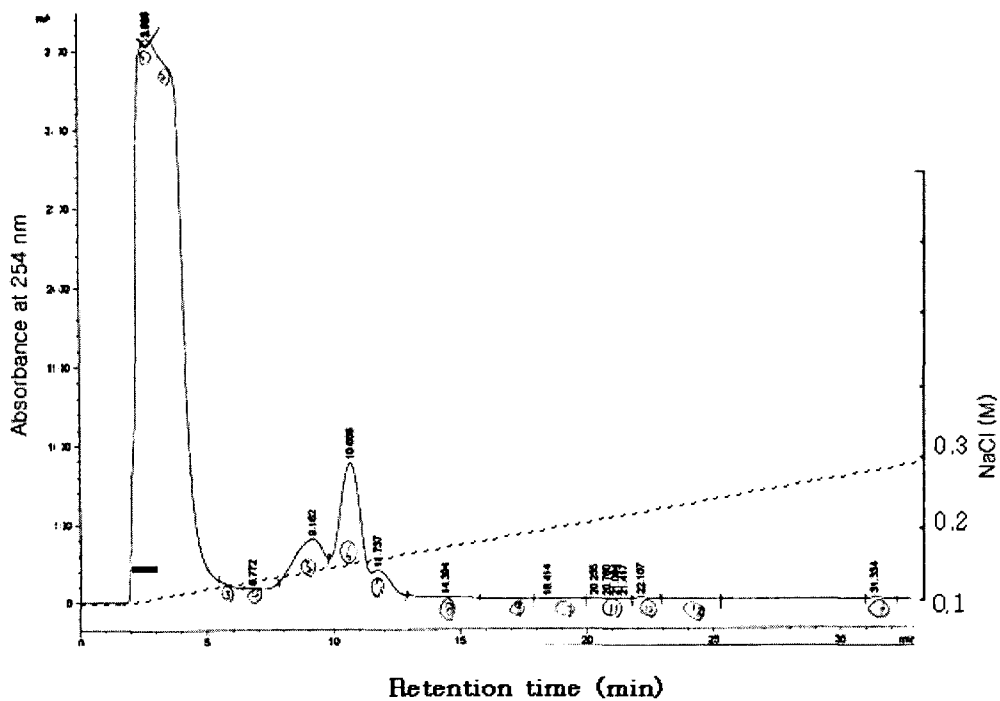


Fig. 4. Cation-exchange HPLC profile of the active fraction 9 in Fig. 3. The activity fraction were loaded onto TSK-gel SP-5PW (7.5 x 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) at a flow of 1.0 mL/min.

Table 3. Inhibition of ACE activity from fraction numbers

Fraction No.	ACE저해율(%)
1	54.58
2	21.24
3	10.64
4	3.91
5	7.90
6	10.01
7	11.38

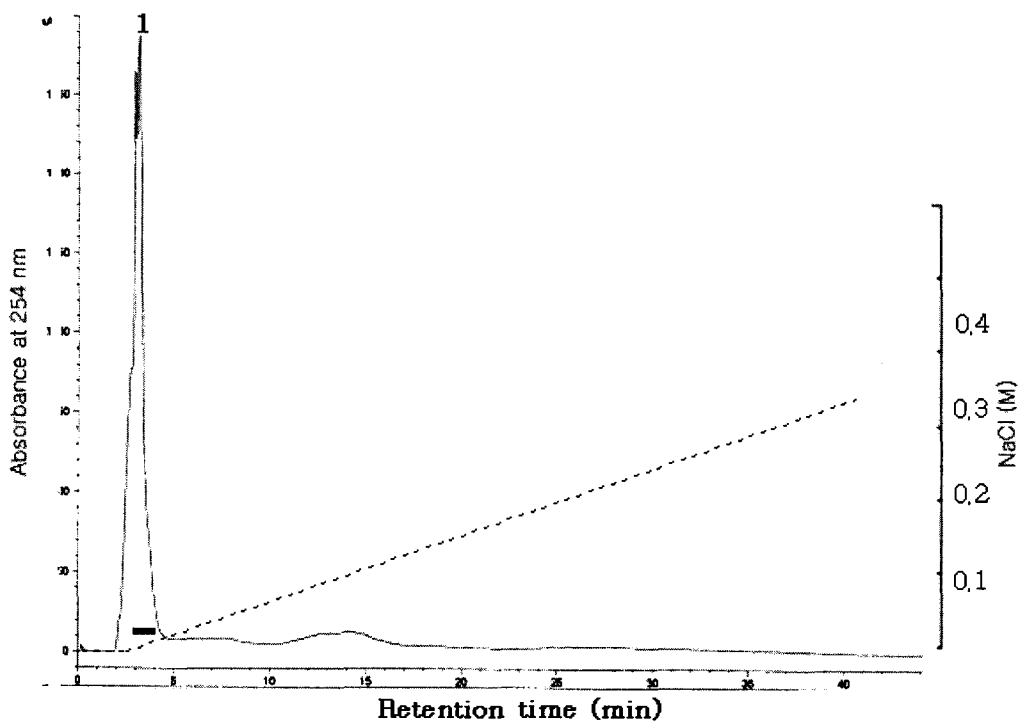


Fig. 5. cation-exchange HPLC profile of the active fraction 17 in Fig. 3. The activity fraction were loaded onto TSK-gel SP-5PW (7.5 x 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) at a flow of 1.0 mL/min.

Table 4. Inhibition of ACE activity from fraction numbers

Fraction No.	ACE저해율(%)
1	46.78



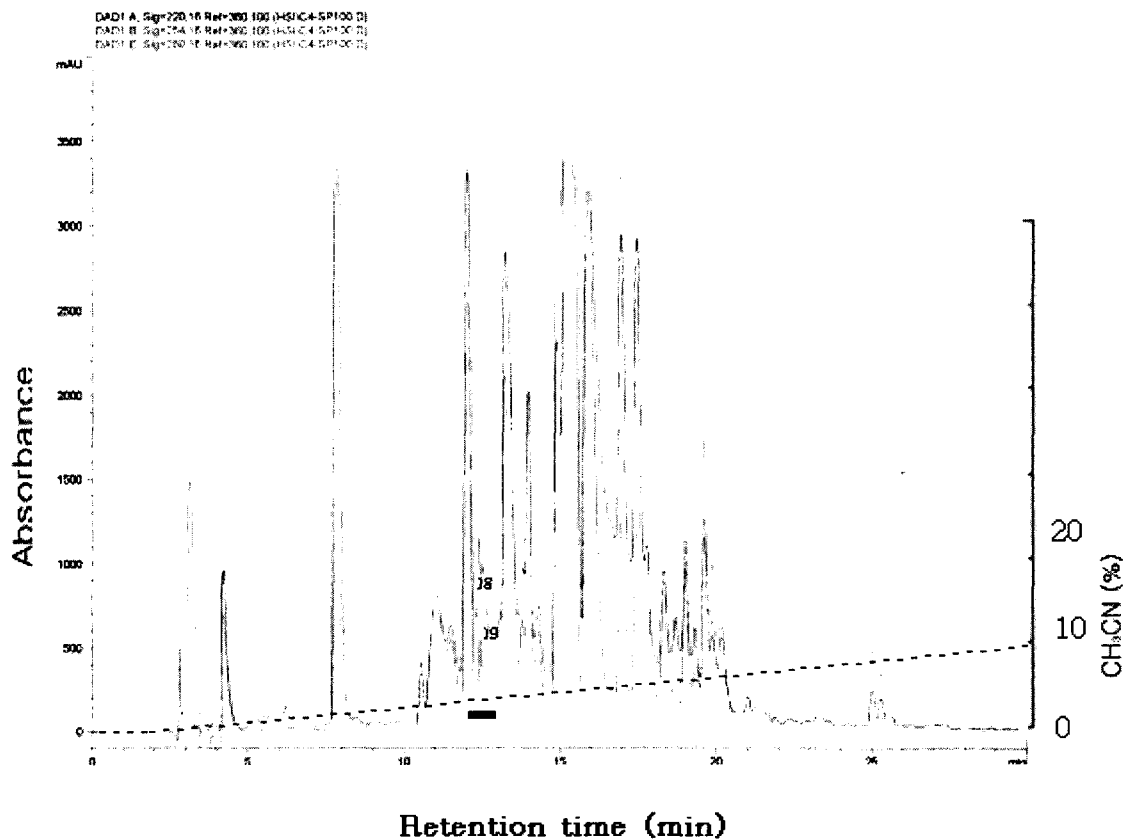


Fig. 6. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction 1 in Fig. 4. The activity fraction were loaded onto Watchers 120 ODS-AP (4.6 x 250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH<sub>3</sub>CN (dotted line) in 0.1 % TFA at a flow rate of 1.0 mL/min.

Table 5. Inhibition of ACE activity from fraction numbers

Fraction No.	ACE 저해율(%)
18	1.92
19	0.20

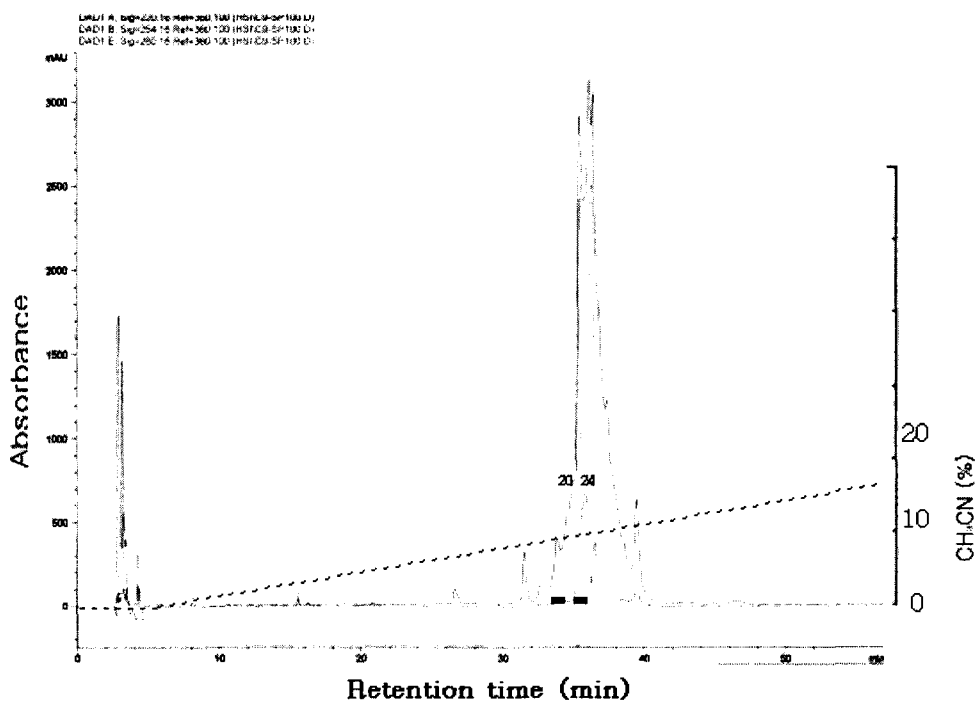


Fig. 7. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction 1 in Fig. 5. The activity fraction were loaded onto Watchers 120 ODS-AP (4.6 x 250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH<sub>3</sub>CN (dotted line) in 0.1 % TFA at a flow rate of 1.0 mL/min.

Table 6. Inhibition of ACE activity from fraction number

Fraction No.	ACE저해율(%)
19	-3.31
20	40.28
21	12.92
22	19.77
23	21.39
24	32.91
25	16.92
26	23.27
27	11.34
28	-5.65

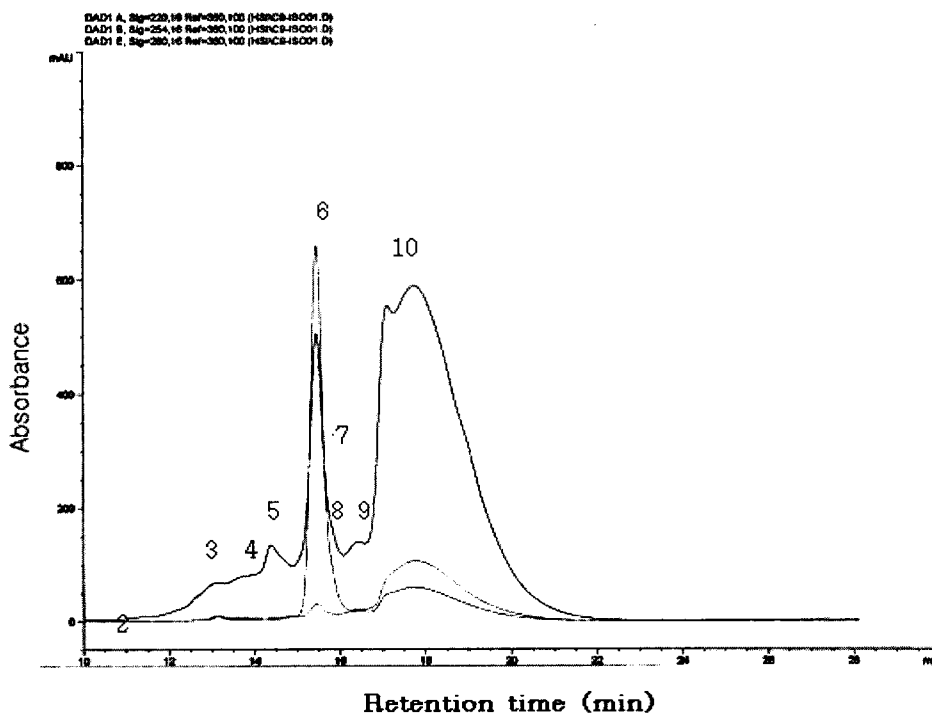


Fig. 8. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction 24 in Fig. 7. The activity fraction were loaded onto Watchers 120 ODS-AP (4.6 x 250 mm) column and eluted with a isocratically 9 % CH<sub>3</sub>CN in 0.1 % TFA at a flow rate of 1.0 mL/min.

Table 7. Inhibition of ACE activity from fraction numbers

Fraction No.	ACE저해율(%)
4	-
5	3.77
6	-
7	-
8	-
9	1.75
10	-

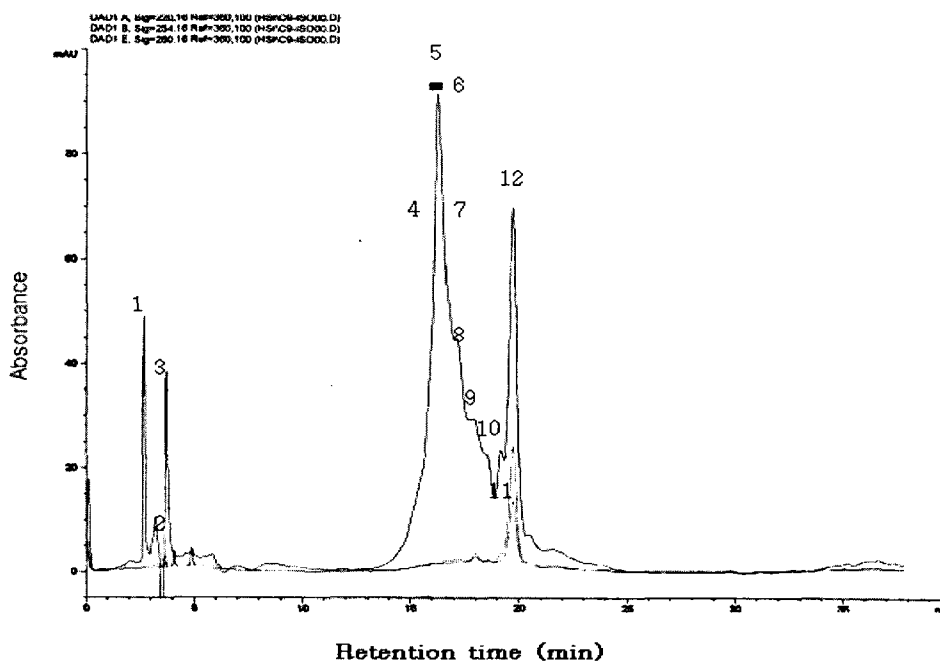


Fig. 9. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction 20 in Fig. 7. The activity fraction were loaded onto Waters 120 ODS-AP (4.6 x 250 mm) column and eluted with a isocratically 8 % CH<sub>3</sub>CN in 0.1 % TFA at a flow rate of 1.0 mL/min.

Table 8. Inhibition of ACE activity from fraction numbers

Fraction No.	ACE저해율(%)
1	-
2	-
3	-
4	1.68
5	37.85
6	17.61
7	0.11
8	0.47
9	-
10	-
11	-
12	-

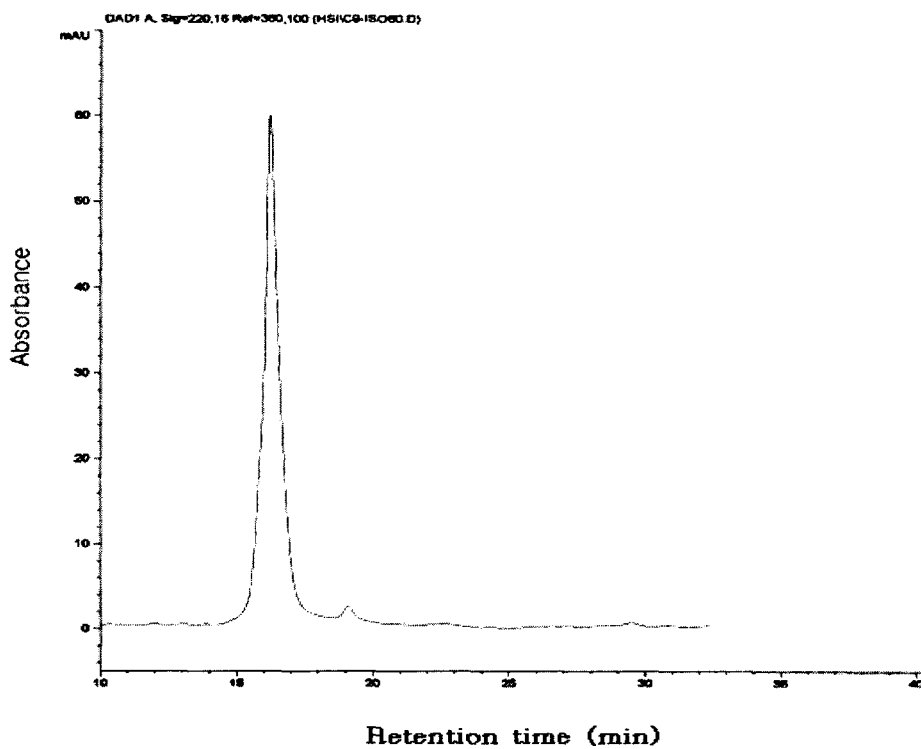


Fig. 10. Final purification of the active fraction 5 in Fig. 9. The activity fraction was loaded onto Watchers 120 ODS-AP (4.6 x 250 mm) column and eluted with a isocratically 8 % CH<sub>3</sub>CN in 0.1 % TFA at a flow rate of 1.0 mL/min.

### 아미노산 서열분석

정제한 ACE 저해 활성 펩티드의 아미노산 서열을 결정하기 위해서 Procise cLC Sequencing System Model 492 cLC (Apply Biosystem, Foster city, CA, USA)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석하였다. 분석 결과, 분자량이 500 Da 이하이며 Ile, Leu, Val, Ala, Asp, Gly, Pro, Asn과 같은 아미노산 잔기로 구성된 펩티드임을 확인하였다(Fig. 11).

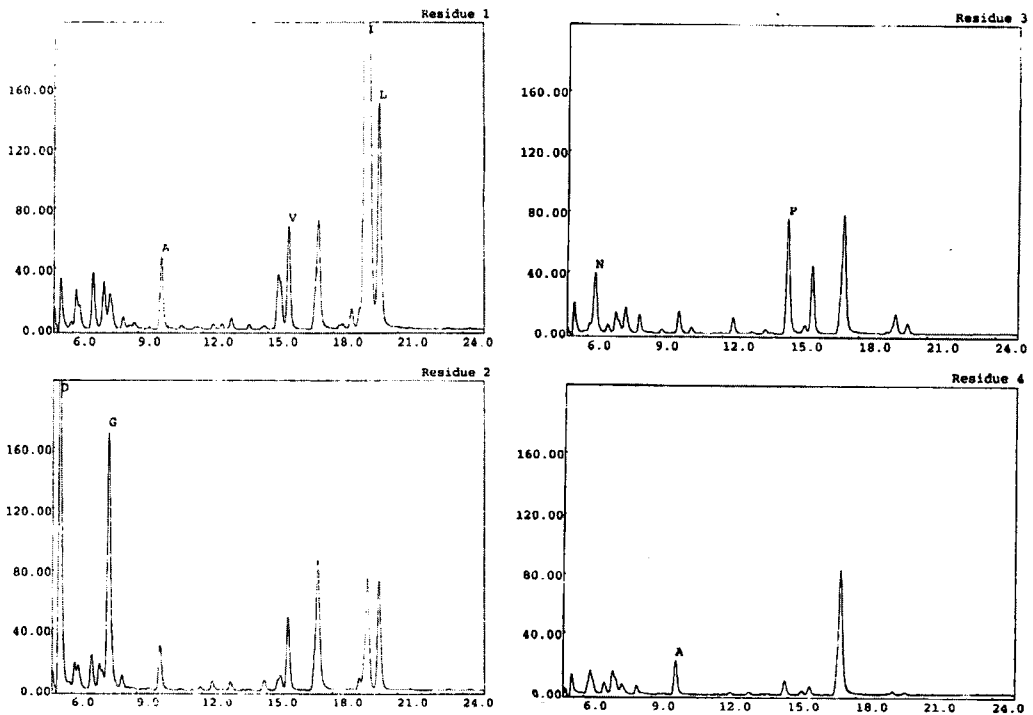


Fig. 11. Amino acid sequence of single peak of Fig. 10 by Edman degradation.

## ESI-MS & MS/MS

아미노산 서열 분석 데이터를 근거로 아미노산 서열과 정확한 분자량의 결과를 얻기 위해 QTOF2 (Micromass, U.K) 질량분석기를 이용하여 전기분무이온화(ESI)법으로 측정된 결과 Edman 법으로 분석한 결과 일치하는 펩티드의 아미노산 서열과 분자량을 확인하였다(Fig. 12).

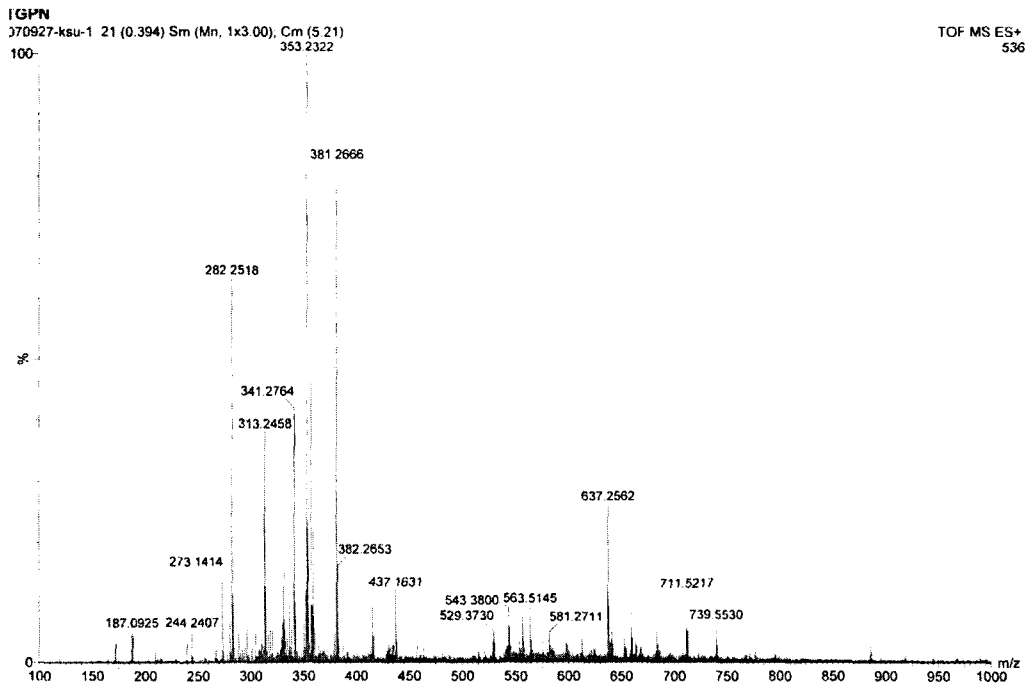


Fig. 12. The molecular weight of single peak of Fig. 10 was determined by ESI analysis

## 요약

TGase와 효소를 이용한 굴 가수분해물을 한외여과장치를 이용하여 1 kDa 이하로 분리한 후 이를 size-exclusion column을 이용하여 분자량 별로 ACE 저해활성을 측정하였으며 500 Da 부근에서 높은 활성을 나타내었다. 이러한 높은 ACE저해활성을 나타내는 물질이 peptide에서 기인할 것으로 판단하여 이를 정제하여 peptide의 아미노산 구조를 밝히기 위해 reverse-phase HPLC column과 ion-exchange HPLC column을 이용하여 정제한 결과 0.1 % TFA를 포함하는 8 % CH<sub>3</sub>CN에서 단일 peak를 나타내었으며 1/10의 양을 취해 ACE저해활성을 측정한 결과 약 38 % 의 저해활성을 보였다. 이렇게 정제된 peptide의 아미노산 서열을 Edman 분해법으로 분석한 결과 분자량이 500 Da 이하인 Ile, Leu, Val, Ala, Asp, Gly, Pro, Asn과 같은 아미노산 잔기로 이루어져 있는 것으로 나타났으며 ESI-MS를 이용하여 peptide의 분자량을 측정한 결과 이와 일치하는 결과를 얻을 수 있었다.



## 참고 문헌

- Aldler-Nissen J, Olsen HS, 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy proteins. In *Functionality and protein structure*. A Poru-El(ed.), Washington, DC, ACS Symposium Series, 125-146.
- Ariyoshi Y. 1993. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food protein. *Trends Food Sci Technol* 4: 139-144.
- Bakris GL. 2001. Angiotensin-converting enzyme inhibition to enhance vascular health-clinical and research models. *Am J Hypertension* 14: 264-269.
- Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF, Cushman DW. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem*. 255: 401-407.
- Esther CR, Jr Marino EM., Bernstein KE. 1997. The role of angiotensin-converting enzyme in blood pressure control, renal function, and male fertility. *Trends Endocrinol Metabol* 8: 181-186.
- Kohama Y, Matsumoto S, Oka H, Teramoto T, Okabe M, Mimura T. 1988. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochim Biophys Res Commun* 155: 332-337.
- Kohmura M., Nio NN, Ariyoshi Y. 1990. Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptide fragment of human k-casein. *Agric Biol Chem*. 54: 853.
- Lapointe N, Rouleau JL. 2002. Activation of vascular tissue angiotensin-converting enzyme(ACE) in heart failure. *J Am College of Cardiol*. 39(5): 776-779.
- Matsuda H, Nagaoka T, Morita H, Osajima K. 1992. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides generated from sardine muscle by protease for food industry, *잡지명* 39(8): 678-683.
- Matsui T, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. 1993. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine

- muscle. *Biosci Biotech Biochem* 57: 922-925.
- Miyoshi S, Ishikawa H, Tanaka H. 1989. Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric Biol Chem* 53: 276.
- Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka H, Maruyama S. 1991a. Structures and activity of angiotensin converting enzyme inhibitors in an  $\alpha$ -zein hydrolysate. *Agric Biol Chem* 55: 1313-1318.
- Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka H, Maruyama S. 1991b. Structure and activity of angiotensin converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agric Biol Chem*. 55: 1313.
- Seki E, Osajima K, Matsui T, Osajima, Y. 1993. Separation and purification of angiotensin converting enzyme inhibitors peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 40: 783.
- Shimizu M. 1994. Bioactive peptides from bovine milk proteins. Paperat Animal Secetions in 24th International Dairy Congress. Melbourne Sept. P.18.
- Thurman JM, Schrier RW. 2003. Comparative effects of angiotensin -converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blokers on blood pressure and the kidney. *Am J Med* 114: 588-598.
- Unger T. 2002. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 89(suppl): 3A-10A.
- Webster J, Koch HF. 1996 Aspects of tolerability of centrally acting antihypertensive drugs. *J Cardiovascular Pharm.* 27: S49-54.
- Wu J, Aluko RE, Muir AD. 2002. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin -converting enzyme-catalyzed reactions. *J Chromatogr A* 950: 125-130.
- Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M. 1992. Peptide inhibitors for angiotensin I -converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1541-1545.

## 제 3 장 새로운 펩티드의 생리학적 기능성

### 제 1 절 새로운 펩티드의 세포독성과 간 기능 보호 효과

#### Abstract

The objective of this work was to investigate the effect of two herbs and optima formulated products with hydrolysate(HepaCare) on toxicity and cytoprotection of THA-induced toxicity for HepG-2 cell. The toxicity for HepG-2 cell did not find in O and I extracts, and enzymatic hydrolysates. TGPN and 3PN did not show the cytoproective effect. However, HepaCare revealed survival capacity of 116% for 50 ug/mL and 128% for 200 ug/mL, respectively, compared to control. HepaCare had significantly hepatoprotective effects lowering the activity of GOT, GPT and  $\gamma$ -GT after oral administration. This results suggest that HepaCare has significant hepatoprotective effect for acute chronic, and alcoholic hepatitis. In addition, HepaCare played a protective role against lipid peroxidation by TGPN and two herbs.

#### 서론

담즙 분비기능, 합성능, 배설능, 대사능 등 간의 여러 기능 중 전부 또는 일부를 개선하거나 염증이나 알코올, 약물 등 외부원인에 의한 간의 손상 정도를 개선하여 간기능 지표에 있어서 반 건강인의 상태를 정상인의 상태로 정상화시키거나 정상인의 상태에 가깝게 호전시키는 것을 건강식품과 관련한 간기능의 개선이라 정의한다(정, 2004). 이때 정상인이란 간기능 지표가 정상 인자와 일시적인 과음, 과로 등에 의해 일시적인 간기능 지표 이상이 발생하지만 휴식을 취하면 곧 정상으로 회복하는 자를 뜻한다. 간의 손상을 가장 쉽게 평가할 수 있는 지표로는 간실질 세포의 손상과 관련하여 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartic aminotransferase(AST), 담도계 손상은  $\gamma$ -glutamyl transferase(GT)와 alkaline phosphatase, 담즙분비 기능손상은

bilirubin과 urobilinogen, 합성기능 손상은 prothrombin time, choline esterase, albumin 및 전단백질이 있다(정, 2004). 식품의 간기능 개선을 위한 연구로 모과 에탄올 추출물은 알코올 투여로 증가된 유리기 해독제 효소인 SOD, catalase 및 GSH-Px 활성을 억제시키고, GSH 함량은 증가시켰으며, 지질과산화물 함량을 저하시킨다고 보고하였으며(Lee et al., 2006), 한약 추출물의 최적화 제품인 간기능개선제 Hepa-1000은 간세포에서 t-BHP의 대사 과정시 발생하는 유리라디칼에 의한 세포내 지질과산화 현상을 방어하며 세포막 손상 시 배양액으로 유출되는 GOT, LDH의 양을 감소시켜 산화적 스트레스에 의한 간세포의 손상을 보호한다고 하였다(Lee 등, 2006).

한약재 O의 약리적인 효과는 간장보호(Hikino et al., 1984), 알코올 해독(Lee et al., 1990), 항당뇨(Sheo et al., 1987), 면역 조절작용(Long et al., 1979), 항균활성 및 아질산염 소거에 의한 암 예방 효과(Jung et al., 2000), 전자공여에 의한 항산화효과 (Kim et al., 2004)이 보고되어 있다. 그리고 한약재 I 추출물은 혈당량을 저하시키며 체중 감소를 막고 혈중 지질을 저하시키는 효과를 얻으며(Al-Waili et al., 1986), I의 알코올 추출물은 gluamate-oxaloacetate transaminase(GOT), glutamate-pyruvate transaminase (GTP)의 활성을 감소시켜 간기능을 보호하는 효과가 있고, 혈청의 tocopherol 함량을 증가시켜 자유 라디칼에 의한 손상을 방지하여 발암 위험을 감소시킨다(Kim et al., 1996; Nam et al., 1999). 그리고 사염화탄소로 유발시킨 간 손상에 대한 치료효과가 관측되었다(Lee, 2005). 근육에서 유래한 펩티드 혹은 아미노산의 간 기능 개선과 관련한 직접적인 보고는 거의 이루어지지 않았으나, 항산화작용과 관련한 다수의 보고(Hattori et al., 1998; Saiga et al., 2003; Katayama and Mine, 2007)가 있고, 최근에는 아미노산이 간 손상, 만성 염증 및 노화로 인한 근육 소모를 포함한 의학적 소견의 처치를 위한 치료제로서 가능성이 제시되었다(van Eys, 1985; Pister and Pearlstone, 1993; Dreyer and Volpi, 2005).

본 연구는 굴의 산가수분해물, 가교결합 효소 가수분해물, 효소 가수분해물, O와 I의 수용성 추출물을 간기능 개선제로 활용할 목적으로 각각의 세포독성을 측정하고 이들 물질의 최적화를 통한 간기능 개선 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

시료인 참굴 (*Crassostrea gigas*, 각장  $4.6 \pm 2.3$  cm, 각중  $9.9 \pm 3.2$  g)은 경남 통영 인근 양식장에서 채취하여 인근의 가공 공장에서 IQF(Individual Quick Frozen)로 가공한 후 1-2년 동안 냉동보관한 것으로 실험에 사용하였다. 굴 가수분해물의 제조를 위하여 상업적으로 이용되는 효소 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase 및 Protamex는 Novozymes Korea (Pusan)에서 구입하였으며, transglutaminase(TGase, TG-K)는 Ajinomoto사 제품(Japan)을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 HepG2 세포는 한국 세포주은행에서 구입하였다. HepG2 세포 배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)와 Fetal bovine serum(FBS)는 HyClone사(Canada) 제품을 사용하였으며, 배지용 항생제 (Penicillin-Streptomycin)와 trypsin은 Gibco BRL사 (Life Technologies, Gibco BRL., Gaithersburg, MD., USA)에서, 세포생존율을 측정하기 위한 CellTiter 96 Aqueous One solution Reagent는 Promega Corporation (Madison, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulphoxide(DMSO)와 silibinin 등은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약들은 모두 특급 시약을 사용하였다.

### 효소 가수분해물의 제조

효소가수분해는 5L Jar fermenter(Korea Fermenter Co.)에서 가수분해하였다. 해동한 굴 3 kg에 2배량의 수도수를 가한 후 균질기로 3000 rpm에서 잘 마쇄한 후 굴 단백질 함량에 대하여 1%의 transglutaminase를 첨가하여 30 °C에서 1 시간 동안 중합하였다. 중합한 단백질과 중합하지 않은 단백질 혼합물에 각각 1%의 Protamex를 첨가하여 150 rpm으로 교반하면서 40 °C에서 1시간 가수분해하였다. 가수분해물은 100 °C의 열탕에서 1시간 효소를 불활성화 시킨 후, 단백질 농도에 대하여 1%가 되도록 Neutrase를 가하여 50 °C에서 1 시간 가수분해하고 위와 동일한 방법에 따라 효소를 실험시켰다. 효소가수분해 조작 전에 transglutaminase를 c첨가하여 효소가수분하여 얻은 가수분해물을 TGPN이라 하였고, Protamex와 Neutrase로 2단 가수분해한 가수분해물을 3PN이라 하였다.

## 한약제 추출물의 제조

건조한 한약제 O와 I를 4겹의 가아제에 싸서 봉한 후, 각각 4 배량과 9 배량의 증류수를 첨가하고 95-100℃의 가열 추출기에서 4시간 추출한 후 압착하여 얻은 수용성 추출물을 실온에서 냉각하였다. 냉각한 추출물을 원심분리(8000xg, 25분)하고 상층액을 Toyo No2 여과지로 감압여과한 후 동결건조하여 100 mesh 이하로 분쇄하여 실험에 사용하였다.

## 세포독성의 측정

간암세포인 HepG2 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되도록 배양하였다. 이때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 배지용 항생제를 사용하였다. 세포가 80%정도 dish를 덮으면 phosphated-buffered saline-EDTA (PBS-EDTA)로 세척한 후 trypsin처리하여 계대 배양하였으며 배지는 48시간마다 교환하여 세포를 배양하였다.

시료는 DMEM (FBS free)배지에 0.2% PBS 용액에 시료를 녹여 사용하였다. 시료의 농도는 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL이 되도록 하여 실험하였다. MTT assay를 이용한 세포독성 측정은 HepG2를 96 well plate에 세포농도  $1 \times 10^5$  cells/mL로 100 uL씩을 분주한 후 세포부착을 위해 24시간 배양하고, 시료를 첨가한 FBS free 배지로 교환한 다음 24시간 동안 배양하였다. PBS 용액으로 2회 세척한 다음 MTT 시약으로 처리하여 490 nm에서 분광광도계 (UV-1700, Shimadzu, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 그리고 간세포의 독성을 유도하기 위해 간세포 배양 1.5 시간 후에 0.25 mM THA을 함유한 배양액, 0.25 mM THA에 TGPN, PN 및 HepaCare를 각각 50 ug/mL, 100 ug/mL 및 200 ug/mL을 포함시킨 배양액으로 갈아주고 14시간 동안 세포를 배양하여 간세포의 회복을 측정하였으며, positive control로 sillimarine을 사용하였다.

## 임상실험

급만성 및 알콜성 간염 환자를 대상으로 HepaCare(O: I: TGPN=8.2: 3.8: 3, w/w/w)을 1회 50 mL 씩 하루에 3회 투여하고 7-10일, 17-20일 사이에 간의 회복 정도를 측정하기 위하여 Reitman-Frankel의 방법에 따라 제조한 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성 측정용 stick kit (신양화학)을 사용하여 자동분석기(Model SP-4410, Kyoto, Japan)에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 간세포에 미치는 영향

간세포 독성을 측정한 결과, O와 I 수용성 추출물의 농도 200 ug/mL까지 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 1,  $p < 0.05$ ). 증류수로 추출한 굴 단백질에 transglutaminase를 첨가하여 단백질을 중합시킨 후 Protamex와 Neutrase로 2 단 가수분해한 TGPN은 첨가 농도가 증가함에 따라 간 세포의 성장을 다소 저해하는 것으로 나타났으나, 대조군과 유의적인 차이는 보이지 않았으며( $p < 0.05$ ), PN과 HepaCare 역시 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 2,  $p < 0.05$ ). 이 같은 결과는 한약재 단독, 가수분해물 및 이들 혼합물의 안정성을 확인해준다. 농어 비늘의 효소 가수분해물 펩티드는 일일 300 mg/kg의 경구 투여에도 rat의 성장에 영향을 미치지 않았으며(Falmi et al., 2004), 효소 가수분해 단백질은 의약품의 재료는 물론 기능 및 영양 식품의 ingredient로 널리 사용하고 있다(Feng and Xiong, 2003).

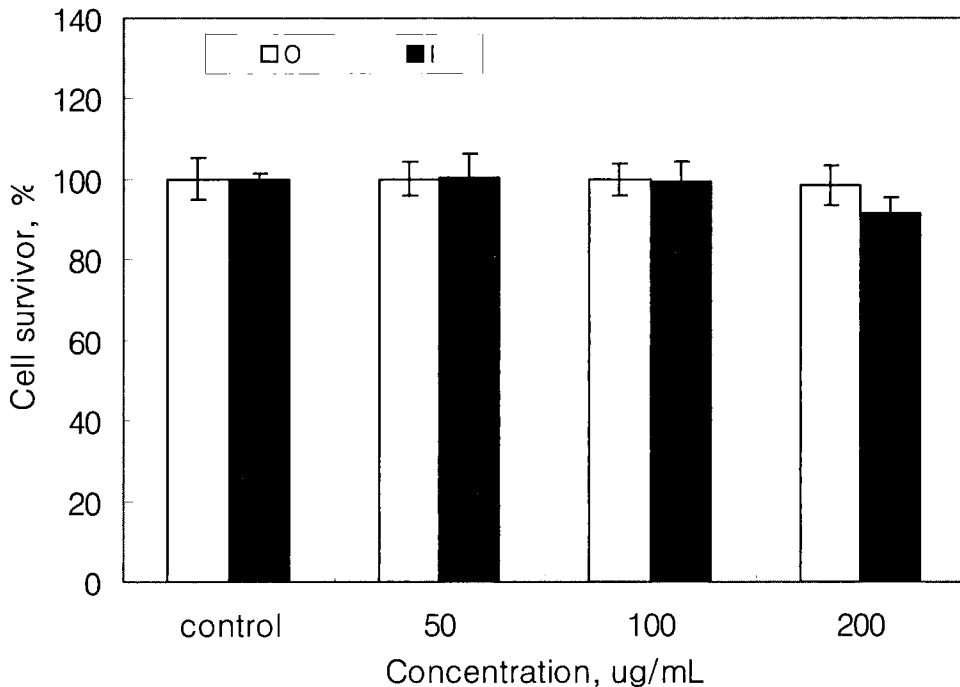


Fig. 1. Effect of water extracts from O and I on HepG2 cells.

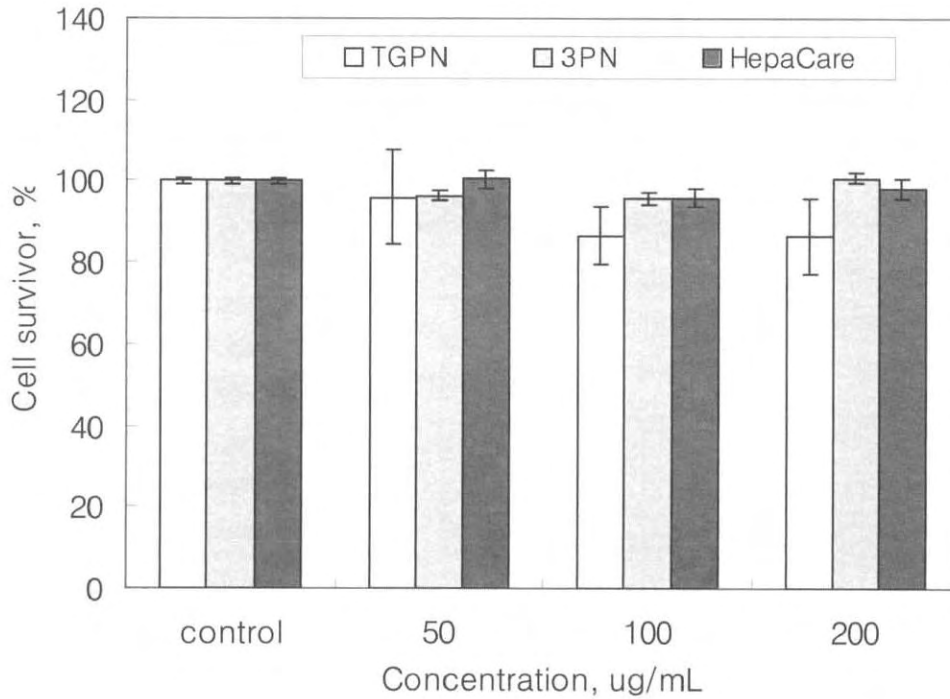


Fig. 2. Effect of TGPN, 3PN and HepaCare on HepG2 cells. .

### 간세포 손상의 회복 효과

간세포를 0.25 mM THA로 손상시키고, TGPN, 3PN 및 HepaCare의 간세포 회복 효과를 positive 물질로 사용한 silymarin과 비교하였다(Fig. 3). TGPN과 3PN은 무첨가군과 유의적인 차이를 보이지 않았으나, HepaCare는 50 ug/mL 및 200 ug/mL 첨가군에서 각각 116%와 128%의 유의적인 간보호 효과를 보였다. 이 같은 결과에 비추어 간보호 효과는 효소 가수분해물보다 첨가한 한약재의 효과 기인하는 것으로 판단된다. 그러나 TGPN은 동물 실험에서 총 콜레스테롤, LDH 콜레스테롤 및 항산화 효과가 인지되었다. 한약재의 간보호 효과와 효소 가수분해물 TGPN의 항산화 및 지질 개선 효과는 HepaCare의 생리적 효과를 강화할 것으로 추정된다. Positive 물질인 Silymarin의 효과가 무첨가군과 유사한 것은 실험에 다소 문제가 있는 것으로 보인다. 알코올 섭취로 유도된 지방간 및 손상된 간 조직을 보호하는 머



위 에탄올 추출물의 효과는 항산화 효과에 기인하는 것으로 추정하였으며 (Cho et al., 2007), Microrcluster-water는 간 해독 효소의 일종인 GST의 활성을 증가시키고 동시에 항산화 작용에 의한 해독 작용을 추정하여 (Park et al., 2007) 간세포의 손상 회복은 투여물질의 항산화 작용과 밀접한 상관이 있음을 제시하였다. 간기능 개선제(Hepa-1000)은 2750 ug/mL 농도 이하에서 농도에 비례하여 t-BHP 처리에 의한 간세포의 괴사에 대하여 강한 보호작용이 있다고 보고하였다(Lee et al., 2006). 이 같은 보고에 비추어 본 연구의 간보호 효과가 다소 낮은 것은 농도 차이에 기인하는 것으로 추정된다.

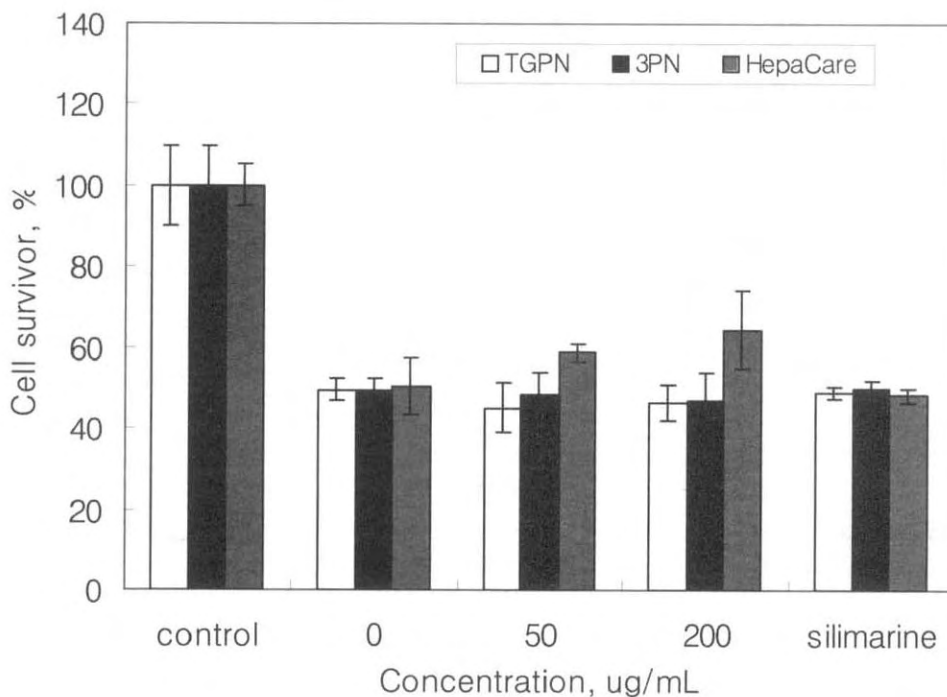


Fig. 3. The hepatoprotective effect of TGPN, 3PN and Hepacare in HepG2 cells on THA-induced cytotoxicity.

#### HepaCare의 경구 투여 효과

20일 동안 HepaCare를 경구 투여한 급만성 간염 환자의 GOT, GPT,

GGT 및 LDH 함량의 변화를 측정하였다(Fig. 4, 5, 6, 7). 초기  $336.6 \pm 404.9$  IU/L의 GOT 값을 보이던 15명의 환자들은 경구 투여 7-10일에 약  $97.3 \pm 163.0$  IU/L 까지 대폭 감소하였고, 17-20일째  $33.8 \pm 19.9$  IU/L의 정상적인 값을 유지하는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 약물 비투여군이 없고, 약물 투여군에서도 약물 뿐 아니라 식이를 통제할 수 없었기 때문에 약물에 의한 효과로 단정하기는 어려우나, HepaCare의 효과를 반영하는 것으로 추정하였다. 이 같은 간 기능 biomarker인 GPT, GGT에서도 뚜렷한 개선 효과를 보였다.

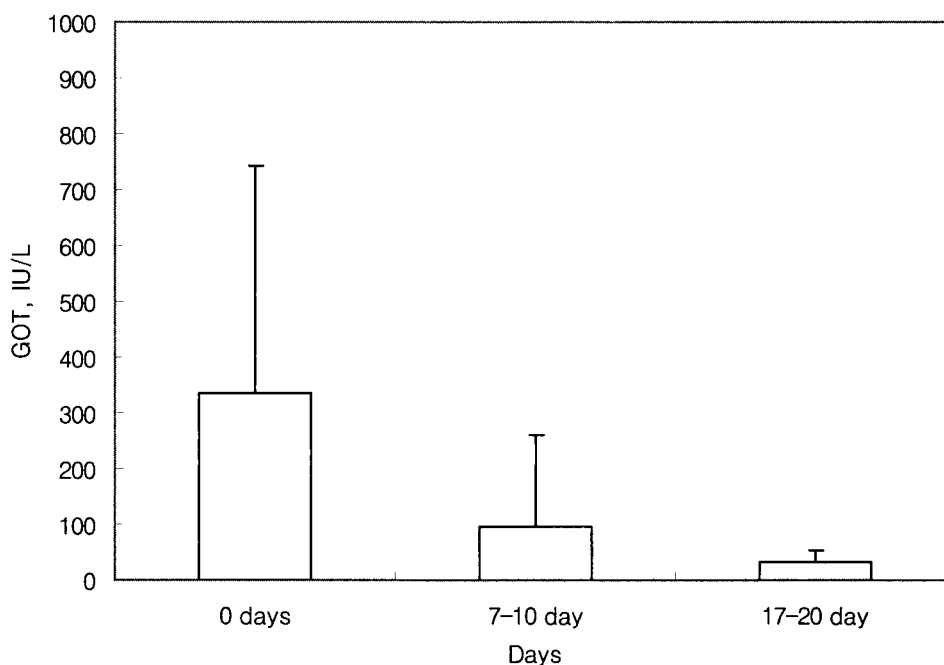


Fig. 4. Liver protective effects of HepaCare on human liver by GOT

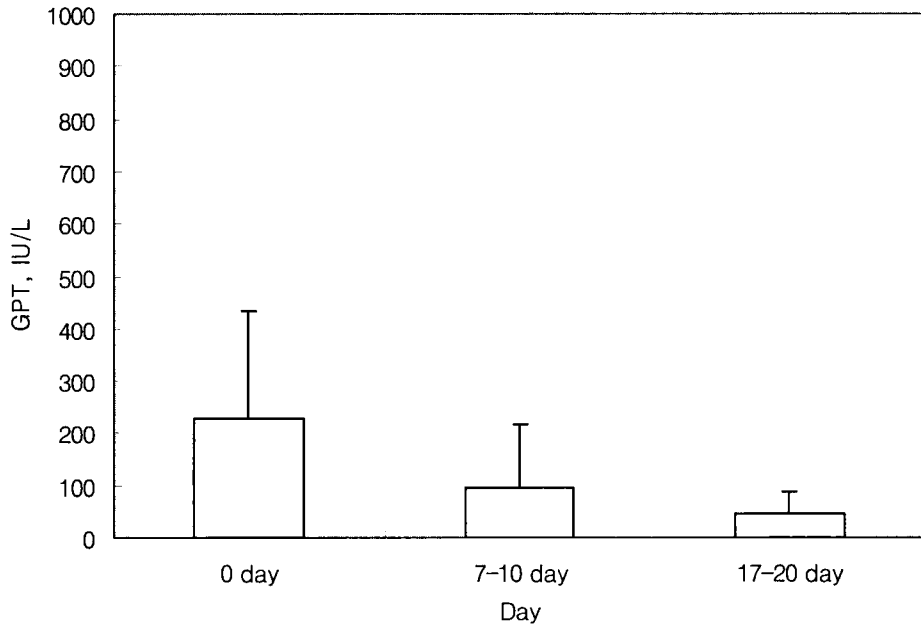


Fig. 5. Liver protective effect of HepaCare on human liver by GTP.

한편 초기 환자의 GPT 값은  $227.5 \pm 205.6$  IU/L로서 상당히 높은 수준이었으나, 경구 투여 7-10일 째에  $94.6 \pm 123.9$  IU/L까지 대폭 감소하여 17-20일째에는  $44.8 \pm 43.1$  IU/L를 유지하여 GOT와 GPT 모두 정상치를 유지하였다. 성인인 경우 정상 GOT 및 GPT는 각각 8-35 IU/L과 10-40 IU/L이다(정, 2004). 간염에서 GOT와 GPT의 증가를 확인하였으며, 이들 효소 활성치의 증가는 세포장애 정도와 비교적 상관성이 좋을 뿐 아니라 다른 혈중 유출 효소에 비하여 예민하게 변동하기 때문에 간질환의 진단 뿐 아니라 다른 질환의 감별 등에 널리 이용하고 있다(정, 2004). 대상 환자 중에는 GOT 값이 1000을 상회하는 급성 간염 소견이 3명 이었고, 100-500 사이의 환자가 4명, 100 이하의 환자가 5명이었다. GOT와 GPT 활성 이상을 보이는 질환으로 전격성 간염과 급성 간염 등은 500 IU/L 이상, 만성간염, 알코올성 간염은 100-500 IU/L로 판단하는 것에 미루어(정, 2004) 본 연구에서 사용한 HepaCare은 급성 및 만성 간염에 유의저긴 효과를 보이는 것으로 판단하였다.

초기 환자의 GGT( $\gamma$ -GT)는 115-1036 IU/L(평균  $485.4 \pm 313.0$  IU/L)로서

경구 투여 17-20일 후에는 88-391 IU/L까지 감소하였다.  $\gamma$ -GT의 고도 증가는 만성 담즙 울체이고 원발성 담도성 간경변증이나 경화성 담판염으로 추정 진단하며, 급성 간염이나 임신 때는 증가하지 않는 단점이 있으며, 정상값은 여성과 남성 각각 124 IU/L와 2-30 IU/L의 범위이다(정, 2004). 이 같은 보고에 비추어 본 연구의 HepaCare는  $\gamma$ -GT의 감소에 미치는 영향은 GOT와 GPT에 비하여 크지 않은 것으로 판단하였다.

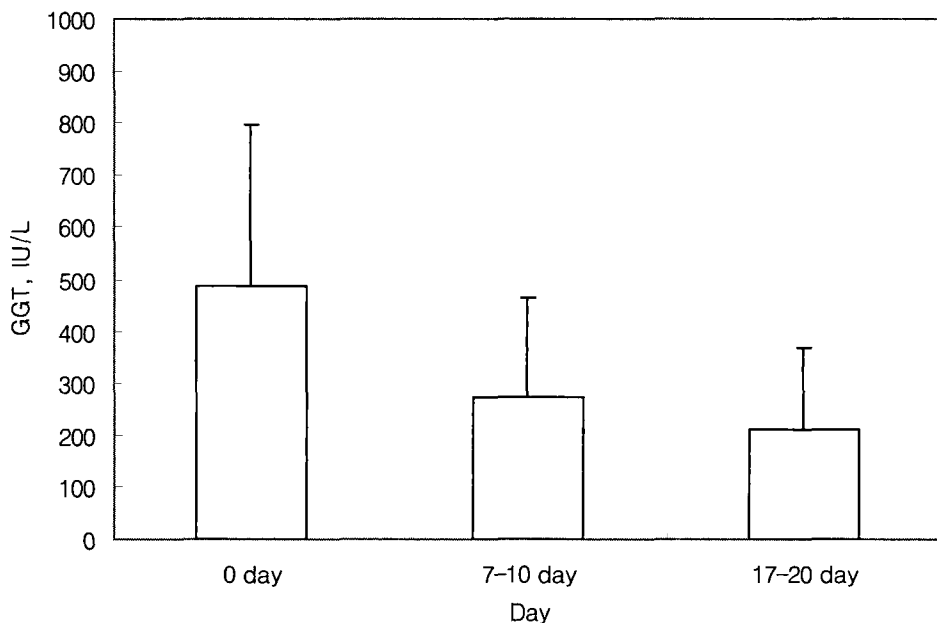


Fig. 6. Liver protective effect of HepaCare on human liver by GGT

LDH의 감소 폭은 크지 않은 것으로 나타났으며, 초기 환자의 범위 200-416 IU/L(평균  $288.8 \pm 68.0$  IU/L)에서 경구 투여 17-20일째에 211-232 IU/L까지 감소하였다(Fig. 7). 간질환에서 총 LDH의 활성도가 증가하기는 하나 비특이적이기 때문에 유용하지 않으며, 다만 LDH와 ALP(alkaline phosphatase)가 함께 많이 증가하고 대신 aminotransferase는 증가하지 않는다면 이는 주로 전이성 암이 간에 존재하는 것으로 의심해 볼 수 있다(정, 2004). 이 같은 보고에 비추어 본 연구에서 LDH의 감소는 급만성 간질환의

치료와 유의적인 상관은 없는 것으로 판단하였다.

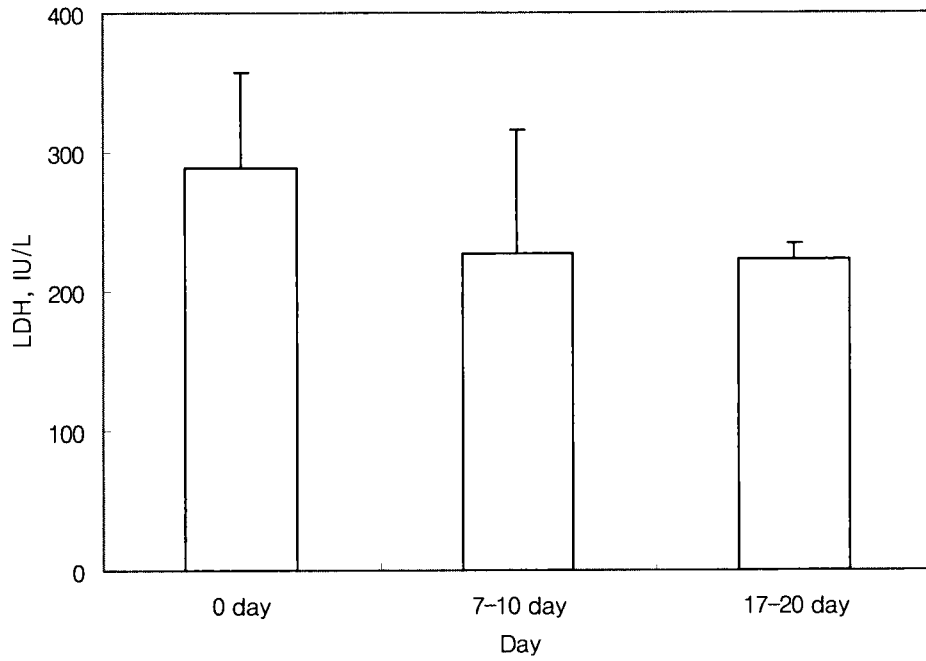


Fig. 7. Liver protective effect of Hepacare on human liver by LDH.

## 요약

두 종류의 한약제와 효소가수분해물의 최적 혼합물(HepaCae)의 간세포 독성과 간기능 보호효과를 조사하였다. O, I 및 효소 가수분해물은 간세포에 대하여 독성을 보이지 않았다. 효소 가수분해물인 TGPN과 3PN은 간세포 독성 회복 효과를 보이지 않는 반면, HapaCare는 대조군에 비하여 50 ug/mL 및 200 ug/mL 농도에서 각각 116와 128%의 유의적인 간세포 독성 보호 효과를 보였다. HepaCare를 경구 투여하여 20일이 경과한 후 GOT와 GPT활성은 정상적인 수치로 회복되었으며,  $\gamma$ -GT는 대폭 감소하였다. 그러나 LDH의 감소폭은 크지 않은 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 HepaCare는 급만성 및 알코올성 간염의 치료에 유의적인 효과가 있음을 제시한다. 그러나 정확한 판단을 위해 다양한 간 및 담도계 기능 이상과 관련한 간기능 biomarker의 확인이 필요하다.

## 참고문헌

- Al-Waili NS. 1986. Treatment of diabetes mellitus by *Artemisia berba-alba* extract: preliminary study. *Clin Exp Pharmacol* 13: 569-573.
- Cho BS, Lee JJ, Lee MY. 2007. Effects of ethanol extracts from *Petasites japonicus* S. et Z. max on hepatic antioxidative systems in alcohol treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 298-304.
- Dreyer HC, Volpi E. 2005. Role of protein and amino acids in the pathophysiology and treatment of sarcopenia. *J Am Coll Nutr* 24: 140S-145S.
- Fahmi A, Morimura S, Guo HC, Shigematsu T, Kida K, Uemura Y. 2004. Production of angiotensin I onverting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry* 39:1195-1200.
- Feng J, Xiong YL. 2003. Interaction and functionality of mixed myofibrillar and enzyme-hydrolyzed soy proteins. *J Food Sci* 68:803-809.
- Hattori M, Ymaji-Tsukamoto K, Kumagai H, Feng Y, Takahashi K. 1998. Antioxidative activity of soluble elastin peptide. *j Agric Food Chem* 46: 2167-2170.
- Hikino H, Kios Y, Takuchi H, Ikeda Y. 1984. Validity of the oriental medicines 60. Liver-protective drug. II Antihepatotoxication of lignoidsfrom *S. chinensis* fruits. *Planta Med* 50: 213-216.
- Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.
- Katayama S, Mine Y. 2007. Antioxidative activity of amino acids on tissue oxidative stress in human intestinal epithelial cell model. *j Agric Food Chem Web* 09/21.
- Kim HK, Na GM, Ye SH, Han HS. 2004. Extraction characteristics and antioxidative activity of *Schizandra chinensis* extracts. *Korean j Food Culture* 19: 484-490.
- Kim KS, Lee MY. 1996. Effects of *Artemisia selengensis* methanol extract on ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver. *J Korean Soc Food*

- Sci Nutr. 25: 581-587.
- Lee SG. 2005. The therapeutic effect of *Artemisia capillaris* extract on hepatic damage induced by carbon tetrachloride in rats. *J Vet Clin* 22: 206-213.
- Lee E-G, Kim K-B, Jeong J-M. 2006. Hepatoprotective effects of poly herbal formulation(Hepa-1000) on t-BHP-induced toxicity in human hepatoma cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1121-1126.
- Lee JS, Lee SW. 1990. Effect of water extract in fruits of *Omija* (*Schizandra chinensis* Baillon) on alcohol metabolism. *Korean J Dietary Culture* 5: 259-262.
- Lee YM, Lee JJ, Shin HD, Lee MY. 2006. Protective effects of *Chaenomeles sinensis* Koehne extract on ethanol-induced liver damage in rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1336-1342.
- Long ZZ, Xie SS. 1979. Experimental study on the enhancement of the immunosuppressive effect of cortisone by wurenchum, an extract of *Schizandra chinensis* Baill I. Isolation and structure determination of five new lignans A, B, C, F and G the absolute structure of Schzandrin. *Chem Pharmacol Bull* 27: 1383-1394.
- Nam SM, Kim JG, Ham SS, Kim SJ, Chung ME, Chung CK. 1999. Effect of *Artemisia iwayomogi* extracts on antioxidant enzymes in rats administered benzo(a)pyrene. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 199-204.
- Park B-H, Back K-Y, Lee S-I, Kim S-D. 2007. Detoxification effect of microcluster-water on bromobenzene-induced liver damaged mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 291-297.
- Pisters PW, Pearlstone DB. 1993. Protein and amino acid metabolism in cancer cachexia: investigative techniques and therapeutic interventions. *Crit Rev Clin Lab Sci* 30: 223-272.
- Saiga A, Okumura T, Makihara T, Katsuta S, Shimizu T, Yamada R, Nishimura T. 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *J Agric Food Chem* 51: 1741-1745.



- Sheo HJ, Lee MY, Hwang JS. 1987. Effect of Schizanderae fructus extract on blood constituents of alloxan induced diabetic rabbits. *J Korean Soc Food Sci Nutri* 16: 262-268.
- van Eys J. 1985. Nutrition and cancer: physiological interrelationships. *Annu Rev Nutr* 5: 435-461.
- 정기화. 2004. 간기능 관련 기능성 시험. *건강기능식품의 기능성 시험가이드*. 식품의 약안전청. p. 215-297.

## 제 2 절 굴 가수분해물과 굴 가수분해 조합물이 SD-랫트 혈청과 간 균질물에 미치는 영향

### Abstract

The effect of enzymatic hydrolysate from oyster and its formulation with herb on SD-rat was investigated. The protein content with basic diet was  $45.16 \pm 2.25$  mg/ml for serum, and increased up to 7% for HepaCare-100 and up to 9.0% for Herb-200, significantly, compared with control group. However, The protein content of TGPN-200 and PN diet group was decreased, Total cholesterol was decreased in all diet group compared with control group. Especially, the total cholesterol was significantly decreased up to 29.9% for TGPN-200 and 24.1% for Hapacare-200, respectively. Enzymatic hydrolysates decreased HDL-cholesterol, TGPN and HapaCare group decreased LDL-cholesterol of serum. The neutral lipid in serum was decreased in all enzymatic hydrolysate. Superoxide radicals of TGPN-100 and TGPN-200 groups was decreased up to 7.4% and 34.7%, respectively, compared with control groups. Hydroxy radicals in hydrolysate and HapaCare group were not significant difference compared with control group. TGPN-200 and HepaCare group decreased greatly carbonyl content in serum. The lipid peroxide in serum was decreased in TGPN and HepaCare groups. PN-100 and PN-200 groups increased superoxide dismutase activity. Especially, PN-200 group showed significant difference compared with control gorup, and increased superoxide dismutase activity up to 19.0%. The catalase activity was  $10.26 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min for control groups,  $0.30 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min for TGPN-100, and 0.11 nmol/mg protein/min for TGPN-200 group. PN group increased the catalase activity significantly.

### 서론

과도한 콜레스테롤은 심장 질환을 포함하여 심장병과 관련된 가장 중요한 위험 인자 중의 하나이(Kannel et al., 1971; Martin et al., 1986; Law, 1999).

우리나라에서 심혈관 질환으로 사망은 3번째 사망원인에 해당할 만큼 심각하며, 서구식 식생활 형태로 인하여 이 같은 현상은 더욱 심화될 것으로 추정하고 있다(보건복지부, 2006). 과도한 콜레스테롤의 예방 및 처리와 관련하여 식품과 상관성을 중요하게 고려하고 있다(Grundy and Denke, 1990; Ginsberg et al., 1990). 식이 단백질은 혈청 콜레스테롤 농도의 조절자로서 유용하다(Anderson et al., 1999). 하루에 25 g의 대두 단백질을 포함하는 포화지방과 콜레스테롤이 낮은 식이는 심장 질환의 위험을 낮출 수 있다. 미국 FDA가 만든 health claim은 하루에 25 g의 대두 단백질의 섭취가 5-10%까지 혈청 콜레스테롤 농도를 낮춘다고 보고하였다(FDA, 1999) “특별한 건강 use를 위한 식품”은 일본에서 과도한 콜레스테롤과 같은 생활습관 관련 질병의 예방과 처리를 위해 생산하고 있다. 특히 최근에는 CSPHP (혹은 c-SPHP)라 불리는 대두 인지질을 결합한 대두 펩티드를 사용하는 식품을 제조하였다(Nagaoka et al., 1999; 2002; Hori et al., 2001). 식이 동물 단백질은 식물 단백질에 비하여 쥐에 더 높은 혈청 콜레스테롤 농도를 생성하는 것으로 알려져 있다(Carroll and Hamilton, 1975; Lovati et al., 1990). 그러나 동물 실험에서 혈청 콜레스테롤에 미치는 식이 단백질의 효과에 관한 많은 연구는 대두 단백질과 카제인 사이의 비교에 초점을 맞추는 경향이 있다(Nagata et al., 1982; Saeki et al., 1987; Kritchevsky, 1979; Jacques et al., 1986; Balmir et al., 1996; Nagaoka et al., 2002). 혈청 콜레스테롤 수준에 미치는 카제인과 다른 동물 단백질의 효과와 관련한 유용한 data는 제한적이다. 그러나 유장 단백질과 이들의 펩티드(Nagaoka, 1996; Nagaoka et al., 2001), 난 단백질 및 이들의 펩티드(Asato et al., 1996; Honda et al., 1999), 쇠고기 단백질과 이들의 펩티드, 돼지 펩티드(Morimatsu et al., 1996) 및 어류 단백질(Zhang and Beynen, 1993)과 같은 동물성 펩티드들이 혈장 콜레스테롤 수준에 미치는 영향에 관하여 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 수산 단백질 중에서 무척추 동물, 특히 굴 혹은 굴 효소 가수분해물이 혈청 지질과 간에 미치는 영향에 관한 연구는 전혀 이루어져 있지 않다.

본 연구는 굴의 단백질을 transglutaminase로 가교 결합시키고, Protamex와 Nuetrase로 2단 가수분해하여 얻은 새로운 펩티드 가수분해물이 SD-rat의 혈청과 간에 미치는 영향을 transglutaminase를 사용하지 않고 가수분해한 가수분해물과 비교하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

참굴(*Crassostrea gigas*, 각장  $4.6 \pm 2.3$  cm, 각중  $9.9 \pm 3.2$  g)은 경남 통영 연안의 양식장에서 채취하여 인근의 가공공장에서 IQF(Individual Quick Frozen)로 가공한 제품으로서 1-2년 동안 냉동보관하여 갈변 때문에 상품 가치를 잃은 제품을 가수분해 시료로 사용하였다. 가수분해를 위해 상업용 효소인 Neutrase 및 Protamex는 Novozyme-Korea에서 구입하였으며, transglutaminase(TGase, TG-K)는 Ajinomoto 사(Japan)에서 구입하였다. 분리, 그 외의 모든 시약은 모두 시약급을 사용하였다.

### 효소를 이용한 굴가수분해물의 제조

장(2007)의 방법에 따라 기능성 굴 가수분해물(이하 TGPN)을 제조하였다. 즉, 양식산 굴을 TGase로 30 °C에서 1시간동안 처리한 후 Protamex (Novozyme-Korea, Pusan)로 1시간동안 가수분해하고, 100 °C에서 1시간 가열 처리하여 불활성화 시켰다. 기능성 향상을 위해 1차 효소 가수분해물을 Neutrase (Novozyme-Korea, Pusan)로 1 시간동안 50 °C에서 재 가수분해 한 뒤 100 °C에서 1시간 불활성화 시켰다. 가수분해물은 원심분리(Hanil Supra 22, 8000xg, 25분)하여 불용성 물질을 제거하였다. 회수한 상층액에 최종 농도 60%가 되도록 ethanol을 첨가하여 4 °C의 저온실에 1시간 방치하여 에탄올 불용성 물질과 잔여 단백질을 침전시키고 원심분리(8000xg, 25분)하여 제거하였다. 상층액은 0.45 µm의 막으로 여과하고 회전진공증발기(N-1 type, EYELA, Japan)로 40 °C 이하의 온도에서 ethanol을 증발시켰다. 증발 건고물은 탈이온수에 녹인 후 5 kDa의 막을 장착한 한외여과기(8200, Amicon, USA)로 한외 여과한 후 농축물과 여과물을 각각 진공동결 건조하여 건조 분말을 만든 후 -20 °C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. Transglutaminase를 사용하여 마쇄육 단백질을 중합반응 후 효소로 가수분해하여 얻은 가수분해물을 TGPN, transglutaminase를 사용하지 않은 가수분해물을 PN, TGPN 가수분해물에 O와 I의 수용성 추출물을 최적화하여 첨가한 시료를 Hepacrae라 하였다.

### 실험 동물 및 사료의 조제

체중  $160 \pm 10$  g의 수컷 Sprague Dawley계 랫트를 한국 바이오제노믹스에

서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 실험 동물은 실험에 들어가기 전, 항온항습(22 ± 2°C, 65±2% RH)하에서 12시간 싸이클(06:00~18:00)로 명암이 자동 조절되는 동물사육실에서 2주간 사육하였다.

실험에 사용한 사료의 조제는 사료 100g 당 탄수화물 58.0 g(corn starch 45.0% + sucrose 13.0%), 단백질(sodium-free casein) 18.0 g, 지질(lard + corn oil) 15 g, 셀룰로오즈 3.0 g, vitamin mixture, mineral mixture, DL-methionine, choline chloride cholesterol, sodium cholate를 각각 1.0 g, 3.5 g, 0.3 g, 0.2 g, 0.5 g, 0.2 g씩을 잘 혼합하여 사용하였다(Table 1). 대조군은 기본 사료 조성으로, 실험군은 기본 사료 조성에 각 시료별로 100 mg/kg BW/day 및 200 mg/kg BW/day가 섭취될 수 있도록 기본사료에 첨가하여 조제하였다. 기본 사료 조성으로 섭취한 군을 대조군(control)으로 하였고, 실험군으로 TGPN 굴 가수분해물 100 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(TGPN-100), TGPN 200 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(TGPN-200), PN 100 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(PN-NaCl-100), 200 mg/kg BW/day 함유 식이를 섭취한 실험군(PN-NaCl-200)으로 나누어 실험하였다. 또한 TGPN 굴 가수분해 물과 한약재 수용성 추출물의 혼합물을 시료로 한 식이 섭취군으로 TGPN: I : O = 20: 25 : 55 의 비율로 섞어서 만든 시료를 조제하여, 기본 식이에 100 mg/kg BW/day 식이를 급이한 실험군 (Hepacare 100)과, 200mg/kg BW/day 식이를 급이한 실험군 (Hepacare 200)으로 모두 7그룹으로 나누어 실험을 행하였다. 실험군의 사료는 기본사료조성에 시료 첨가량만큼 탄수화물에서 제하였다. 이렇게 조제한 사료는 SD계 랫트에 6주간 식이로 제공하여 동물실험을 실시하였다. 동물사료는 매일 오후 6시에 정한 사료량을 측정 한 후 사료를 제공하였다

Table 1. Experimental diets for oral feeding (%)

Composition	Control	100 FG*	200 FG**
Oyster hydrolysate (mg/kg BW/day)	-	0.010	0.020
Carbohydrate (starch+ sugar)	58.3 (45.0+ 13.3)	58.3 (45.0+ 13.3)	58.3 (45.0+ 13.3)
Protein(casein)	18.0	18.0	18.0
Lipids (lard:corn oil=2:1)	15.0	15.0	15.0
Cellulose	3.0	3.0	3.0
Vitamin mix***	1.0	1.0	1.0
Mineral mix***	3.5	3.5	3.5
<i>D,L</i> -Methionine	0.3	0.3	0.3
Choline chloride	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5
Sodium cholate	0.2	0.2	0.2

\* 100 mg/kg BW/day feeding group, \*\* 200 mg/kg BW/day feeding group ,

\*\*\* AIN-76 mixture

#### 혈액 채취 및 분리

실험 동물의 처리는 실험사육 최종일 12시간 동안 절식시킨 후 단두하여 채혈하였고, 채취한 각 혈액은 실온에 30분간 방치한 후 700 x g에서 10분간 저온 원심분리하여 얻은 상층액의 혈청을 저온(-70℃)에 동결 보존하면서 분석하였다.

### 간조직 균질액의 조제

간조직은 4 °C의 완충용액 (10 mM phosphate buffer + 1.15% KCl + 5 mM EDTA, pH 7.4)을 사용하여 간조직의 무게 당 10배 (w/v)량의 완충용액을 첨가하고 조직 균질기를 이용하여 균질화한 다음 700 x g에서 원심분리한 후 그 상층액을 취해 간조직 균질액으로 하였다.

### 단백질 함량의 측정

혈청 및 간조직 균질액의 총단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였다. 즉 혈청 및 간조직 균질액 20 uL를 각각 취하여, 여기에 1.0% SDS 용액 12 uL를 혼합하고, 증류수로서 120 uL가 되도록 6배 희석하였다. 희석된 용액 15, 20 uL를 취해 증류수를 각각 80 uL와 85 uL를 넣고 희석하였다. 여기에 반응시약 (0.5% copper sulfate solution : 1.0% sodium tartarate solution : 2.0% sodium carbonate solution = 0.5 : 0.5 : 49.0, v/v/v)을 1.0 mL씩 첨가하여 약 10초간 혼합하였다. 20분간 실온에서 방치한 후 발색시약으로 1.0 N Folin 시약을 0.1 mL씩 첨가하여 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 다음, 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 의하여 단백질의 함량 (mg protein/mL fraction)을 정량하였다.

### 총 콜레스테롤 함량의 측정

혈청과 간조직 균질액 (mitochondria, microsome)중의 총콜레스테롤 함량은 Rudel et al.(1973)의 방법에 따라 *o*-phthaldehyde법으로 측정하였다. 먼저 시료 0.1 mL씩 취한 후 33% KOH용액 0.3 mL와 95% 에탄올 3.0 mL를 가하고 잘 혼합한 다음, 혈청은 15분간, 간조직 균질액은 60분간 60 °C 수조에서 가열시킨 후 냉각하였다. 여기에 hexan 5.0 mL를 가하여 혼합하고 다시 증류수 3.0 mL를 가한 다음 1분간 잘 혼합한 후 층을 분리하여 1.0 mL의 hexan층을 취하였다. 이 hexan층을 질소로 농축·건조시키고, *o*-phthaldehyde시약을 2.0 mL를 가하여 잘 혼합하고 10분 후 발색시약으로서 진한 황산을 1.0 mL 가하여 혼합하였다. 황산첨가 후 10분에서 90분 이내에 분광광도계를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량곡선을 이용하여 총콜레스테롤의 함량 (mg/dL serum)을 정량하였다.

### 리포단백-콜레스테롤 함량의 측정

**HDL-콜레스테롤 함량의 측정 ;** 혈청중의 HDL-콜레스테롤 함량의 측정은 HDL-콜레스테롤 (HDL-C 555, 신양화학약품주식회사)의 키트 시약을 사용하였다. 혈청 HDL-콜레스테롤의 함량 측정은 혈청 0.2 mL를 시험관에 넣고 여기서 침전 시약 0.2 mL를 넣어 잘 혼합한 다음 실온에서 10분동안 방치한 후 300 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액 50 uL, 표준용액 (100 mg/dL) 50 uL, blank로 증류수 50 uL에 각각 HDL 발색시약 3.0 mL씩을 첨가하고 잘 섞은 후 37 °C 수조상에서 5분간 항온 하였다. Blank를 대조로 하여 555 nm에서 흡광도를 측정하여 HDL-콜레스테롤의 함량 (mg/dL serum)을 정량하였다.

**LDL-콜레스테롤 함량의 측정;** LDL-콜레스테롤의 함량은 Friedewald et al.(1972)의 방법에 따라 총콜레스테롤 함량에 HDL-콜레스테롤과 중성지질/5 를 뺀 값으로 하였다.

#### 중성지질 함량의 측정

혈청과 간조직 균질액 중의 중성지질로서 트리글리세리드 (triglyceride : TG)의 함량은 GPO 효소법으로 TG 키트시약 (신양화학약품주식회사)을 사용하였다. 먼저 혈청 및 간조직 균질액 10 uL, 표준용액 (300 mg/dL) 10 uL와 blank로 탈이온수 10 uL에 TG 키트 시약 1.5 mL씩을 첨가하고 잘 섞은 후 37 °C 수조상에서 5분간 항온한 다음 blank를 대조로 하여 505 nm에서 흡광도를 측정하여 TG의 함량 (mg/dL serum)을 정량하였다.

#### 동맥경화 지표의 계산

동맥경화지표(Atherogenic index : AI)는 Haglund et al.(1991)의 방법에 따라 총콜레스테롤에 HDL-콜레스테롤의 함량을 뺀 다음, 이것을 다시 HDL-콜레스테롤로 나누어 계산하였다.

$$\text{Atherogenic index(AI)} = \frac{\text{Total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}}{\text{HDL- cholesterol}}$$

#### 활성 라디칼 생성량의 측정

수퍼옥시드 라디칼 생성량 측정; 수퍼옥시드 라디칼 (superoxide radical: O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 생성량은 McCord et al. (1969)과 Chan and Bielski (1974)의 방법에 따



라 수퍼옥시드 디스무타아제를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원속도를 측정하였다. 0.1 mM EDTA를 함유한 인산완충용액 (pH 7.8) 420 uL에 cyanide의 농도가 50 uM이 되도록 20 mM cyanide 용액을 가한 후 혈청과 간조직 균질액 300 uL와 여기에 0.1 mM cytochrome C 50 uL를 넣어 분광광도계를 사용 550 nm에서 2분간 흡광도의 차이를 측정하였다. 이때 cytochrome C의 양은 분자흡광계수  $19,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 계산하였다.

히드록실 라디칼 생성량 측정; 히드록실 라디칼 (hydroxyl radical) 함량의 측정은 Halliwell et al. (1981)의 방법을 변형하여 측정하였다. 먼저 0.1 M의 인산 완충용액(pH 7.4), 10 mM의  $\text{NaN}_3$ , 7 mM의 deoxyribose, 5 mM의 ferrous ammonium sulfate, 0.54 M NaCl 시약을 각각 60 uL씩 첨가하고 증류수 430 uL와 혈청 및 간조직 균질액 200 uL를 첨가한 후 혼합된 용액을  $37^\circ\text{C}$  항온수조에서 15분간 가온하였다. 이 반응액에 8.1% SDS용액 75uL, 20%의 acetic acid 500 uL 및 증류수 25 uL를 추가하여 넣고, 1.2% thiobarbituric acid (TBA)용액 400 uL를 넣어 잘 혼합하였다. 30분간 가열한 후 실온에서 식히고,  $800\times\text{g}$ 에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 분광광도계를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량곡선에 따라 실험군과 대조군의 흡광도 차이를 이용하여 히드록실 라디칼 (nmole/mg protein /min)의 생성량을 계산하였다.

### 산화적 스트레스 분석

산화 단백질 생성량 측정; 혈청 및 간조직 균질액 중의 산화단백질 (oxidized protein: OP)의 함량은 Levine et al.(1990)의 방법에 따라 carbonyl group의 생성량을 측정하였다. 0.1 mL의 시료에 30% trichloroacetic acid (TCA)를 0.5 mL를 넣고 잘 혼합한 다음,  $800\times\text{g}$ 에서 10분간 저온 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 남은 잔사에 10 mM dinitrophenyl hydrazine (DNPH) 0.5 mL를 첨가하고 15분마다 혼합하여, 1시간 동안 실온에 방치 후  $800\times\text{g}$ 에서 10분 동안 저온에서 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후 잔사에 ethanol/ethyl acetate (v/v, 1:1) 3.0 mL를 첨가하여 잘 혼합한 다음, 실온에서 10분 방치하였다. 다시  $800\times\text{g}$ 에서 10분 동안 저온 원심분리 후 잔사를 얻은 뒤, 6 M guanidine (20 mM Potassium phosphate buffer) 1.0 mL를 첨가하고 잘 혼합하였다.  $37^\circ\text{C}$ 의 항온 수조에서 30분간 배양한 후,  $800\times\text{g}$ 에서 10분 동안 저온에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이때 carbonyl group의

생성량은 360 nm에서 분자흡광계수 ( $E=22,000$ )를 이용하여 계산하였다.

과산화지질 생성량 측정; 혈청 및 간조직 균질액 중의 과산화지질의 함량은 Choi and Yu(1990)가 사용한 방법에 따라 TBA법으로 malondialdehyde (MDA) 함량을 측정하였다. 혈청과 간조직 균질액 20 uL에 증류수 180 uL를 혼합한 것을 각 시험관에 취했다. 8.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액 200 uL를 가하여 약 5초간 혼합한 후, 20% 초산 1.5 mL를 넣어 다시 5초간 혼합하였다. 여기에 1.2% TBA 시약 1.0 mL를 첨가하여 깨끗한 구슬로 마감한 뒤 30분간 수조에서 가열하였다. 이 반응액을  $800\times g$ 에서 10분간 원심분리하고 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였으며, 표준검량 곡선에 따라 MDA의 함량 (nmol/mg protein)을 정량하였다.

#### 항산화 효소 활성 측정

수퍼옥시드 디스무타아제 (SOD) 활성 측정; Oyanagui et al.(1984)의 방법에 따라 혈청과 간조직 균질액을 20.8 mM phosphate buffer (pH 8.2)로 30배 희석하고 희석된 균질액 100 uL에 증류수 0.5 mL, A시약 (52.125 mg hydroxylamine + 102.1 mg hypoxanthine /250 mL D.W) 0.2 mL, B시약 (20 uL xanthine oxidase + 0.9939 mg EDTA/26.7 mL 20.8 mM phosphate buffer, pH 8.2) 0.2 mL를 첨가하여 혼합하였다. 37 °C 항온수조에서 40분간 가온한 후 C시약 (300 mg sulfanilic acid + N-1-naphthyl- ethylene diamine acid/500 mL 16.7% acetic acid) 2.0 mL를 첨가하였고, 실온에서 20분간 방치한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량곡선에 따라 SOD 활성 (unit/mg protein)을 측정하였다.

카탈라아제 (CAT) 활성 측정; Rigo and Rotilio(1977)의 방법에 따라 혈청과 간조직 균질액 20 uL에 인산완충용액(130 mM, pH 7.0) 250 uL, 증류수 330 uL를 취했다. 여기에 15 mM 의 과산화수소 용액 900 uL를 첨가, 5초간 잘 혼합한 다음, 즉시 분광광도계로 240 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다. 1분 동안 과산화수소가 제거되는 속도를 계산하여 효소의 활성을 측정하였다.

#### 통계 처리

통계 처리에 사용된 유의성 검정은 Student's t-test를 이용하여 통계학적인 신뢰도를 검토하였다. 모든 통계 결과는 대조군에 대비하여  $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,

p<0.001 일 때 유의한 차이가 있다고 보았다.

## 결과 및 고찰

### 단백질 함량 변화

굴 가수분해 물을 함유한 식이를 6주간 먹인 후 혈청의 단백질 함량을 측정해 본 결과는 Table 2와 같다. 기본 식이를 제공한 대조군의 단백질 함량은  $45.16 \pm 2.25$  mg/ml serum이었으며, TGPN 굴 가수분해물과 TGPN 굴 가수분해물에 한약재 추출물을 첨가한 혼합시료인 Hepacare- 100 식이 섭취군은  $48.34 \pm 3.24$  mg/ml serum으로 7% 증가하였고, Hepacare- 200 식이 섭취군의 단백질 함량은  $49.24 \pm 2.55$  mg/mL serum으로 대조군에 대비하여 9.0%의 유의적인 증가를 보여주었다. 그렇지만 TGPN-200 식이 섭취군과 PN 가수분해물 식이 섭취군의 경우는 단백질 함량이 오히려 저하되었다. 혈중 단백질 함량은 생체의 영양 상태를 보여 주는 것으로 본 실험에서는 굴 가수분해물보다 한약 추출물과 혼합한 굴 가수분해물 식이군에서 더 높은 단백질 함량을 보여주었고, TGPN 굴 가수분해물 섭취군 중에서도 TGPN 굴 가수분해물 섭취군이 조금 높은 단백질 함량을 보여 주었다.

간조직 균질액의 단백질 함량은 Table 3과 같다. 간조직 균질액의 단백질 함량은 대조군 ( $74.63 \pm 2.69$  mg/g liver)에 비하여 혈청의 경우와 마찬가지로 한약 추출물 혼합물을 첨가한 굴 가수분해물 식이 섭취군인 Hepacare-100 과 Hepacare-200 식이 섭취군에서 가장 높은 단백질 함량  $80.92 \pm 4.14$  mg/g liver (107.0%)과  $82.02 \pm 7.72$  mg/g liver (109.9%)를 보여주었다. 그리고 혈청에서처럼 TGPN-200 그룹은 단백질 함량이 오히려 감소하는 경향을 보여 주었다.

Table 2. Feeding effect of oyster hydrolysate on protein content of SD rat serum for 6 weeks

Groups	Protein content (mg/ml serum)	
Control	45.16±2.25 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	46.77±2.54	103.6% <sup>b</sup>
TGPN-200	41.94±1.25 <sup>**</sup>	92.9%
PN-NaCl-100	41.28±4.83	91.4%
PN-NaCl-200	39.96±4.21 <sup>*</sup>	88.5%
Hepacare-100	48.34±3.24	107.0%
Hepacare-200	49.24±2.55 <sup>**</sup>	109.0%

TGPN-100 and 200: TGPN hydrolysate of 100 and 200 mg/kg added to control group; PN-100 and 200: PN hydrolysate of 100 and 200 mg/kg added to control group; Hepacare-100 and 200: Herb mixture of 100 and 200 mg/kg added to control group; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7); <sup>b</sup>Percent of control; <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01 compared with control group.

Table 3. Feeding effect of oyster hydrolysate on protein content of SD rat liver homogenate for 6 weeks

Groups	Protein content (mg/g liver)	
Control	74.63±2.69 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	69.82±4.30 <sup>*</sup>	93.6% <sup>b</sup>
TGPN-200	68.35±3.54 <sup>**</sup>	91.6%
PN-100	77.04±4.96	103.2%
PN-200	72.13±4.15 <sup>*</sup>	96.7%
Hepacare-100	80.92±4.14 <sup>***</sup>	108.4%
Hepacare-200	82.02±7.72 <sup>**</sup>	109.9%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7); <sup>b</sup>Percent of control; <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 compared with control group.

### 콜레스테롤 조성의 변화

총 콜레스테롤의 함량; 각 식이군의 혈청 중 총 콜레스테롤의 함량은 Table 4와 같다. 대조군에 대비하여 총 콜레스테롤의 함량은 모든 굴 가수분해 식이군에서 총 콜레스테롤 함량이 감소하는 경향을 보여 주었다. 특히 TGPN-200과 Hepacare-200 식이군에서  $79.04 \pm 12.50$  mg/dL와  $84.38 \pm 16.20$  mg/dL로 각각 29.9%와 24.1%의 유의적인 감소 효과가 있었다. 그리고 TGPN-100 그룹, PN-100, PN-200 과 Hepacare-100 그룹의 경우도 모두 1.5-10.0%의 감소효과는 있었으나 유의성은 찾을 수 없었다. 이 같은 결과에 미루어 TGPN 가수분해물이 혈청 콜레스테롤 함량을 떨어뜨리는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 간조직 균질액의 콜레스테롤 함량을 측정해 본 결과 (Table 5), 혈청에서의 콜레스테롤 함량과 마찬가지로 대조군과 비교하였을 때 모든 실험군에서 감소하는 경향을 보여주었다. 그 중 TGPN-200 그룹은 총 콜레스테롤의 함량이  $40.55 \pm 7.86$  mg/dL liver homogenate으로 26.1%의 유의적인 감소효과를 볼 수 있었다.

Table 5. Feeding effect of oyster hydrolysate on total cholesterol content of SD rat serum for 6 weeks.

Groups	Total cholesterol content (mg/dL)	
Control	111.23±23.73	100.0%
TGPN-100	109.49±28.52	98.4% <sup>b</sup>
TGPN-200	79.04±12.50*	71.1%
PN-100	108.50±17.90	97.5%
PN-200	107.45±16.56	96.6%
Hepacare-100	100.14±10.47	90.0%
Hepacare-200	84.38±16.20*	75.9%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values; \*p<0.05 compared with control group.

Table 6. Feeding effect of oyster hydrolysate on total cholesterol content of SD rat liver homogenate for 6 weeks.

Groups	Total cholesterol content (mg/dL liver homogenate )	
Control	54.88±3.73	100.0%
TGPN-100	52.57±6.46	95.8% <sup>b</sup>
TGPN-200	40.55±7.86***	73.9%
PN-100	53.66±7.22	97.8%
PN-200	51.42±6.19	93.7%
Hepacare-100	53.91±7.06	98.2%
Hepacare-200	51.50±3.15	93.8%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values; \*\*\*p<0.001 compared with control group.

혈청 중 **HDL-cholesterol** 함량; 혈청 지단백 중 심혈관계 질환을 일으키는 과량의 혈중 콜레스테롤을 제거하여 간으로 운반하는 지단백인 HDL-콜레스테롤의 혈청 중 함량의 변화를 측정된 결과(Table 7), 대조군의 HDL-콜레스테롤 함량은  $32.39 \pm 3.30$  mg/dL 이었으며, 대조군의 함량과 비교하였을 때, 대부분의 굴 가수분해 식이 섭취 그룹에서 HDL-콜레스테롤의 함량이 저하하는 경향을 보여주었다. 단지 TGPN-200 식이군에서는 그 함량이  $33.00 \pm 2.27$  mg/dL로 1.9% 증가하였으나 유의성은 없었다. 이 실험에서의 결과에 미루어 굴 가수분해물 식이 섭취가 HDL-콜레스테롤의 혈중 농도에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 추정된다.

혈청 중 **LDL-cholesterol** 함량; 콜레스테롤에는 초저밀도(VLDL)-콜레스테롤, 저밀도(LDL)-콜레스테롤 및 고밀도(HDL)-콜레스테롤이 있다. 지단백중 콜레스테롤을 운반하는 LDL-콜레스테롤은 혈중 함량이 높을 시 콜레스테롤의 함량이 높아 심혈관계 질환의 위험인자로 알려져 있다. 굴 가수분해 물 함유 식이가 LDL-콜레스테롤 함량에 미치는 영향은 Table 8과 같다. 대조군 ( $55.41 \pm 20.81$  mg/dL)에 비하여 TGPN 가수분해물 식이군과 TGPN 가수분해 식이군에 한약추출물을 첨가한 Hepacare 식이군에서 LDL-콜레스테롤의 혈중 농도가 감소하였다. 또한 가수분해물의 첨가량이 많을 때 더 큰 감소 효과를 보였다. 특히 TGPN 식이 첨가군에서 가장 많이 감소하였는데, TGPN-100 그룹에서는  $44.87 \pm 21.55$  mg/dL, TGPN-200 그룹에서는  $33.67 \pm 18.06$  mg/dL로 각각 19%와 39.2%로 크게 감소하였으나 모든 군에서 표준편차가 매우 큰 관계로 유의성은 찾을 수가 없었다.

Table 7. Feeding effect of oyster hydrolysate on HDL- cholesterol content of SD rat serum for 6 weeks.

Groups	HDL-cholesterol content (mg/dl )	
Control	32.39± 3.30 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	29.43± 6.92	90.8% <sup>b</sup>
TGPN-200	33.00± 2.27	101.9%
PN-100	30.86± 3.09	95.3%
PN-200	29.46± 7.64	91.0%
Hepacare-100	32.25±10.55	99.6%
Hepacare-200	31.18± 6.12	96.3%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values.

Table 8. Feeding effect of oyster hydrolysate on LDL-cholesterol content of SD rat serum for 6 weeks.

Groups	LDL-cholesterol content(mg/dl )	
Control	55.41±20.81	100.0%
TGPN-100	44.87±21.55	81.0% <sup>b</sup>
TGPN-200	33.67±18.06	60.8%
PN-100	53.49±26.09	96.5%
PN-200	53.38±10.93	96.3%
Hepacare-100	49.70±14.00	89.7%
Hepacare-200	42.42±17.53	76.5%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values.



중성지질 (TG)의 함량; 고 지방식이나 에너지원의 과다 섭취시 혈액이나 조직내에서 중성지질의 함량이 증가하게 된다. 혈액 내 높은 중성지질 함량도 심혈관계 질환의 위험인자로 밝혀져 있다. Table 9는 굴 가수분해 물 식이 섭취시 혈액 중 중성지질 함량 변화를 측정된 결과이다. 중성지질의 혈중 함량은 모든 굴 가수분해 식이군에서 감소하는 경향을 보여 주었다. 그 중 굴 가수분해물에 한약추출물을 첨가한 Hepacare 식이군인 Hepacare-100군에서는  $87.78 \pm 9.32$  mg/dL로 7.8%의 감소 효과가 있었고, Hepacare-200군에서는  $77.44 \pm 10.86$  mg/dL로 18.6%의 유의적인 감소 효과가 인지되었다. TGPN 굴 가수분해 물과 PN 굴 가수분해물의 중성지질 (TG) 함량은 TGPN 가수분해의 경우 2.4%에서 5.4%까지 감소하였으며, PN 굴 가수분해물의 경우는 3.3%에서 16.9%까지 감소하였으나 유의성은 없었다.

한편 간에서의 중성지질 함량은 Table 10에 나타내었다. TGPN 함유식이를 섭취한 TGPN-100, 200, Hepacrae-100 과 Hepacare-200 그룹에서는 중성지질 함량이 감소하였다. 특히 TGPN-100 그룹은 대조군  $95.17 \pm 24.24$  mg/dL에 비교하여 함량이  $199.36 \pm 5.96$  mg/dL로 6.3%의 유의적인 감소 효과가 있었다. 굴 가수분해 식이 섭취 시 중성 지질 함량은 TGPN 식이군과 Hepacare 식이군에서는 혈청과 간조직 모두에서 감소효과를 볼 수 있었다. 그러나 PN 가수분해 식이섭취군의 경우는 혈청에서는 약간 감소하였으나, 간조직의 경우는 대조군에 비하여 오히려 중성지질의 함량이 증가하는 경향을 보여 주었다.

동맥경화 지수(Atherogenic index)의 측정; 노화현상의 시작은 동맥의 경화에서 시작된다고 보고 있으며, 성인병을 일으키는 초기 증상이 동맥경화증이기 때문에 동맥경화의 지표로 활용하고 있는 동맥경화 지수(Atherogenic index)를 성인병 발병의 지표로 널리 활용하고 있다. 동맥경화 지수에 미치는 굴 가수분해 물 섭취 효과를 비교하여 보면 Table 11과 같다. 대조군에 비하여 PN-100과 200 그룹에서는 거의 비슷한 동맥경화 지수를 보였다. TGPN-200 그룹과 Hepacare-200 그룹에서는 각각 33.5%와 21.4%의 동맥경화 지수 감소 효과를 보였으나, 표준 편차가 크기 때문에 유의성을 찾을 수가 없었다. 이상과 같은 혈액 내의 지질 함량 변화를 볼 때 TGPN 굴 가수분해 물의 섭취가 혈중 지질 함량 개선에 효과적으로 작용하고 있음을 알 수 있었다. 그리고 굴 가수분해물 단독 섭취시 보다 한약 추출물 혼합물의 섭취가 혈중 지질 함량 개선에 훨씬 효과적으로 나타나, 동맥경화와 같은 심혈관 질

환의 예방에 크게 기여할 것으로 기대된다. 그리고 PN 굴 가수분해물 섭취군에서는 혈중 지질을 개선하지 못했다.

Table 9. Feeding effect of oyster hydrolysate on triglyceride content of SD rat serum for 6 weeks.

Groups	Triglyceride content (mg/dl)	
Control	95.17±24.24 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	92.93±18.38	97.6% <sup>b</sup>
TGPN-200	90.00±10.60	94.6%
PN-NaCl-100	79.06±12.03	83.1%
PN-NaCl-200	92.07±31.46	96.7%
Herb M-100	87.78± 9.32	92.2%
Herb M-200	77.44±10.86*	81.4%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values; \*p<0.05 compared with control group.

Table 10. Feeding effect of oyster hydrolysate on triglyceride content of SD rat liver homogenate for 6 weeks.

Groups	Triglyceride content (mg/dl)	
Control	212.81±12.38 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	199.36± 5.96*	93.7% <sup>b</sup>
TGPN-200	196.70±18.55	92.4%
PN-NaCl-100	275.47±25.22**	129.4%
PN-NaCl-200	235.47±13.22***	110.7%
Herb M-100	207.93±17.55	97.7%
Herb M-200	205.57±17.06	96.6%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=6/group); <sup>b</sup>Percent of control values; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 compared with control group.

Table 11. Feeding effect of oyster hydrolysate on atherogenic index of ICR mouse serum for 6 weeks.

Groups	Atherogenic index(AI)	
Control	2.36±0.94 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	2.41±1.44	102.2% <sup>b</sup>
TGPN-200	1.57±0.47	66.5%
PN-NaCl-100	2.28±1.04	96.6%
PN-NaCl-200	2.46±0.75	104.1%
Herb M-100	2.24± 0.91	94.8%
Herb M-200	1.86± 0.99	78.6%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values.

## 활성 라디칼에 미치는 영향

노화현상은 나이가 들어감에 따라 점차적으로 개체의 생물학적인 기능이 감소함과 동시에 질병에 대한 감수성이 증가하는 현상이라고 볼 수 있다. 이러한 노화 현상이 일어나는 원인에 관한 많은 이론들이 있으나, 여러 학자들이 많이 인용하고 있는 노화 학설은 프리 라디칼이론이다(Harman, 1956; 1984). 이 이론에 의하면 생체 내에서의 대사반응 혹은 여러 환경오염인자(VOCs, 환경호르몬, 중금속, 다이옥신 등), 자외선(UV; ultraviolet) 조사 등에 의해 산소 분자로부터 생체 내에 프리라디칼이 생성된다고 한다. 프리라디칼은 홀수 전자를 갖고 있어 안정한 산물로 되기 위해 전자를 받아 짝을 형성하려는 강력한 성질을 가지고 있다. 슈퍼옥시드 라디칼( $O_2^{\cdot -}$ )과 히드록실 라디칼( $\cdot OH$ )과 같은 프리라디칼 외에도 과산화수소( $H_2O_2$ )나 일중항 산소( $^1O_2$ ) 등도 발생되는데 이것을 활성산소라고 한다. 이러한 활성 산소들로부터 생체를 방어하기 위해 생체 내에는 vitamin E, vitamin C, ubiquinol, glutathione 등과 같은 항산화제가 존재하며, 또한 슈퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase: SOD), 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase: GPx), 카탈라아제(catalase: CAT)와 같은 항산화효소를 합성하여 이러한 활성 산소종을 제거한다. 그러나 나이가 들면서 이러한 방어시스템은 약해지고, 계속적인 외인성 인자들에 의해 생체 방어시스템은 파괴된다. 이로 인해 산화적 스트레스가 일어나 지질 과산화의 생성 증가로 인한 세포막의 손상, 단백질 산화로 인한 단백질의 변성 및 돌연변이 등이 일어나게 된다. 본 실험에서는 굴 가수분해물의 섭취가 항산화 효과에 미치는 영향을 조사하였다. 굴 가수분해물 함유 식이가 활성 산소종을 효율적으로 제거하고 있는지를 알기 위해 슈퍼옥시드 라디칼과 히드록실 라디칼의 함량 변화를 측정해 보았다. 그리고 항산화효소인 슈퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase: SOD), 카탈라아제(catalase: CAT)와 같은 항산화효소의 활성에 미치는 영향을 조사하였고, 산화적 스트레스의 지표로 산화 단백질 함량과 과산화물의 함량을 측정하였다. 활성산소는 단백질과 가교결합을 형성하여 효소 활성을 저해하고, DNA나 RNA에 손상을 입혀 유전 정보의 오류를 일으키며, 세포막 기능의 손상 등을 일으켜 생체의 기능을 손상시킨다. 결과적으로 생체에 병적 노화 현상이 일어나거나 암, 치매 등의 여러 가지 질병을 유발한다. 따라서 효과적인 활성 산소종의 제거는 노화와 질병의 발생을 억제할 수 있는 수단이 될 수 있다.

수퍼옥시드 라디칼 생성량 비교; Superoxide radical( $O_2^{\cdot-}$ )은 삼중항산소(triplet oxygen)가 전자를 받아( $3O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ ) 생성되며, hydroperoxide radical( $\cdot OOH$ ), hydrogen peroxide, hydroxyl radical( $\cdot OH$ )이나 일중항산소(singlet oxygen)로 전환하기 때문에 free radical 손상의 초기단계에서 발생한다. 활성산소 생성 기전동안 초기에 생성되는 superoxide radical에 의한 산화적 손상을 측정하기 위하여 굴 가수분해물을 농도를 달리하여 6주간 사육한 다음, 혈청에서 superoxide radical 함량을 측정 한 결과(Table 12), 대조군의 경우 수퍼옥시드 라디칼의 함량은  $266.23 \pm 60.96$  nmol/g protein이었으며, TGNP-100, TGNP-200의 경우 각각  $246.49 \pm 125.20$  nmol/g protein 와  $173.82 \pm 75.05$  nmol/g protein으로 대조군에 비해 7.4%와 34.7%의 감소하였다. PN 굴 가수분해물 식이군의 경우, PN-100그룹은 오히려 대조군에 비해 함량이 28%까지 증가하였으며, PN-200그룹은 거의 유사하였다. Hepacare 그룹은 모두 큰 폭의 감소 효과가 있었으며, 특히 Hepacare-200그룹은  $179.34 \pm 46.20$  nmol/g protein으로 32.6%까지 유의적으로 감소하였다. 그리고 TGNP 그룹과 Hepacare 그룹의 수퍼옥시드 라디칼 함량은 농도에 따라 감소하는 것으로 보아 TGNP 섭취가 수퍼옥시드 라디칼 함량의 생성에 크게 기여함을 알 수 있었다.

간조직 균질액 대조군의 수퍼옥시드 라디칼의 함량은  $64.79 \pm 24.36$  nmol/g protein이었으며, PN-200 그룹을 제외한 모든 그룹에서 감소하는 경향을 보여 주었다(Table 13). 즉, TGNP-100과 TGNP-200 그룹은 각각  $54.47 \pm 18.95$  nmol/g protein 과  $57.31 \pm 14.63$  nmol/g protein 으로 15.9%와 11.6% 감소하였고, Hepacare-100 그룹은  $48.64 \pm 15.29$  nmol/g protein으로 24.9%, Hepacare-200 그룹은  $53.25 \pm 12.41$  nmol/g protein으로 17.8% 감소하였다. 그러나 표준편차가 큰 관계로 유의성은 찾지 못했다.

Table 12. Feeding effect of oyster hydrolysate on superoxide radical content of SD rat serum for 6 weeks.

Groups	Superoxide radical content (nmol/g protein)	
Control	266.23±60.96 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	246.49±125.20	92.6% <sup>b</sup>
TGPN-200	173.82± 75.05*	65.3%
PN-100	340.88±156.82	128.0%
PN-200	266.27±84.68	100.2%
Hepacare-100	206.76± 98.34	77.7%
Hepacare-200	179.34± 46.20*	67.4%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values; \*p<0.05 compared with control group.

Table 13. Feeding effect of oyster hydrolysate on superoxide radical content of SD rat liver homogenate for 6 weeks.

Groups	Superoxide radical content (nmol/g protein)	
Control	64.79±24.36 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	54.47±18.95	84.1% <sup>b</sup>
TGPN-200	57.31±14.63	88.4%
PN-100	56.15±15.09	86.7%
PN-200	66.63±20.97	102.8%
Hepacare-100	48.64±15.29	75.1%
Hepacare-200	53.25±12.41	82.2%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values.

히드록실 라디칼의 생성량 비교; 초기반응에서 생긴 superoxide radical은  $H_2O_2$ 로 전환된다.  $H_2O_2$ 는 조직 중에 존재하는  $Fe^{2+}$ 와 반응하여 즉  $H_2O_2+Fe^{2+}\rightarrow\cdot OH+OH+Fe^{3+}$ 의 Fenton 반응을 일으켜 hydroxyl radical( $\cdot OH$ )을 생성하고 이렇게 생성된 hydroxyl radical이 단백질의 여러 아미노산 잔기에 작용하여 carbonyl기를 생성하는 것으로 알려져 있다. 굴 가수분해물 식이 섭취군에서의 혈청내의 히드록실 라디칼 (hydroxyl radical)의 함량 변화는 Table 14와 같다. 대조군의 경우  $2.34\pm 0.20$  nmol/mg protein (100%)으로 TGPN 굴가수분해 식이군과 Hepacare-200 그룹에서는 감소하였으나, PN 굴가수분해물 식이군은 약간 증가하였다. 그러나 모든 굴가수분해물 식이군에서 대조군과 비교할 때 어떤 유의적인 증가 및 감소 효과는 발견되지 않았다.

간조직 균질액에서 측정된 히드록실 라디칼 함량 변화는 Table 15와 같다. 혈청에서와 마찬가지로 모든 PN 굴가수분해 식이군에서 다소간의 히드록실 라디칼 함량이 증가하는 경향이었으나 통계적인 유의성은 없었다. TGPN-100과 TGPN-200 그룹의 히드록실 라디칼 함량은 대조군의 히드록실 라디칼 함량( $16.18\pm 2.77$  nmol/g protein)과 거의 비슷하였다. 한약 추출물을 첨가한 식이군인 Hepacare-100과 Hepacare-200은 각각 대조군에 비해 8.6%와 11.6%의 히드록실 라디칼 감소효과를 보여주었으나 유의성은 없었다.

Table 14. Feeding effect of oyster hydrolysate on hydroxyl radical content of SD rat serum for 6 weeks.

Groups	Hydroxyl radical content (nmol/g protein)	
Control	2.34±0.20 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	2.11±0.43	90.5% <sup>b</sup>
TGPN-200	2.11±0.25	90.2%
PN-100	2.57±0.41	109.8%
PN-200	3.14±0.46 <sup>**</sup>	134.4%
Hepacare-100	2.34±0.23	100.0%
Hepacare-200	2.26±0.25	96.6%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values; <sup>\*\*</sup>p<0.01 compared with control group.

Table 15. Feeding effect of oyster hydrolysate on hydroxyl radical content of SD rat liver homogenate for 6 weeks.

Groups	Hydroxyl radical content (nmol/g protein)	
Control	16.18±2.77 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	16.11±4.91	99.5% <sup>b</sup>
TGPN-200	15.88±1.06	98.1%
PN-100	16.51±1.85	102.0%
PN-200	17.40±2.51	107.5%
Hepacare-100	14.39±2.63	88.9%
Hepacare-200	14.80±1.61	91.4%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values; <sup>\*\*</sup>p<0.01 compared with control group.



### 산화적 스트레스에 미치는 영향

산화 단백질의 생성; 단백질을 이루고 있는 아미노산의 곁사슬들은 산화제나 활성산소종의 공격을 받기 쉽다. 활성산소종의 공격을 받은 단백질은 그 구조가 변형되어 단백질의 효소적 기능 저하, 수용성 단백질의 응고 및 교차결합, 세포막의 구조변화, 세포 기능의 변질 등을 일으킨다. 이 같은 단백질 변성을 일으키는 물질인 카르보닐기는 주로 지질의 과산화반응이나 당류 산화반응의 분해 산물로 카르보닐기의 생성량을 측정함으로써 산화 단백질 함량을 측정할 수 있다.

식이에 따른 혈청 중 산화 단백질의 생성량을 비교한 결과(Table 16), 대조군의 카르보닐기 함량은  $13.47 \pm 1.19$  nmol/mg protein (100%)이었고, TGPN-200 ( $11.98 \pm 2.34$  nmol/mg protein, 88.9%)과 Hepacare-200( $12.53 \pm 3.10$  nmol/mg protein, 93.0%) 에서 가장 큰 폭의 카르보닐기 생성 저해 효과를 볼 수 있었다.

간조직 균질액에서의 산화 단백질 생성량을 비교해 본 결과는 Table 17과 같다. 산화단백질의 함량은 한약 추출물을 첨가한 혼합물에서 높은 산화단백질 생성 저해효과를 보였다. 특히 Hepacare-100 그룹은 대조군 ( $0.84 \pm 0.27$  nmol/mg protein)에 비해, 그 함량이  $0.41 \pm 0.07$  nmol/mg protein으로 무려 51.6%나 감소하였고, 통계적으로도 매우 높은 유의성을 보여 주었다. TGPN 그룹은 TGPN-100 식이군의 경우 산화단백질 생성량은 감소하였으나, TGPN-200군은 오히려 증가하였으며, PN-굴 가수분해물 식이군도 오히려 산화단백질의 생성량이 증가하였다.

Table 16. Feeding effect of oyster hydrolysate on oxidized protein content of SD rat serum for 6 weeks.

Groups	Oxidized protein content (nmol/mg protein)	
Control	13.47±1.19	100.0%
TGPN-100	13.19±2.01	97.9% <sup>b</sup>
TGPN-200	11.98±2.34	88.9%
PN-100	13.47±2.75	100.0%
PN-200	14.47±2.64	107.4%
Hepacare-100	13.13±1.50	97.4%
Hepacare-200	12.53±3.10	93.0%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values.

Table 17. Feeding effect of oyster hydrolysate on oxidized protein content of SD rat liver homogenate for 6 weeks.

Groups	Oxidized protein content (nmol/mg protein)	
Control	0.84±0.27	100.0%
TGPN-100	0.72±0.15	85.2% <sup>b</sup>
TGPN-200	1.01±0.37	119.4%
PN-100	0.87±0.42	103.5%
PN-200	1.26±0.68	149.4%
Hepacare-100	0.41±0.07**	48.4%
Hepacare-200	0.65±0.29	77.6%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values.

과산화지질 (LPO)의 생성량 비교; 체내 활성 산소종들이 제대로 제거되지 않으면 세포막의 주성분인 인지질의 과산화를 유발하고, 체내 지질의 산화를 일으킨다. 세포막의 과산화는 막의 유동성을 저해하여 세포에 필요한 화학물질의 유입이 제한되고, 노폐물의 제거가 적절히 이루어지지 않는다. 이로 인해 세포의 손상이 일어나고 인체에 암과 같은 질병이 생긴다. 따라서 과산화지질을 제거함으로써 각종 질병이나 노화현상을 지연시킬 수 있다. 혈청에서의 과산화지질 함량을 측정해 본 결과(Table 18), TGPN 굴 가수분해물 식이군과 Hepacare를 섭취한 그룹에서 감소하는 경향을 보여 주었다. 대조군 ( $1.04 \pm 0.27$  nmol/mg protein)의 생성량을 100%로 보았을 때 TGPN 식이그룹은 약 9.5~12.5% 감소하였으나 유의성은 없었다. Hepacare-100과 200 식이군은  $0.85 \pm 0.13$  nmol/mg protein과  $0.73 \pm 0.10$  nmol/mg protein으로 각각 17.8%와 20.1%까지 과산화 지질이 감소하였다( $p < 0.05$ ).

간조직 균질액의 과산화지질 생성 저해효과는 Table 19와 같다. 대조군의 과산화지질 생성량은  $15.65 \pm 3.34$  nmol/mg protein (100%)으로 TGPN-100의 경우는 대조군과 거의 비슷하였고, TGPN-200 식이군은 그 생성량이  $8.45 \pm 3.23$  nmol/mg protein으로 크게 감소하였다. 그리고, Herb M-100은  $12.96 \pm 3.64$  nmol/mg protein으로 17.2%의 감소효과를, Hepacare-200은  $12.03 \pm 2.21$  nmol/mg protein으로 생성량이 23.2%나 저해되었다( $p < 0.05$ ). 그러나 PN-식이군은 모두 대조군과 비슷한 과산화지질의 생성량을 보였다.

Table 18. Feeding effect of oyster hydrolysate on lipid peroxide (LPO) of SD rat serum for 6 weeks.

Groups	Lipid peroxide content (nmol/mg protein)	
Control	1.04±0.27	100.0%
TGPN-100	0.91±0.13	87.8% <sup>b</sup>
TGPN-200	0.94±0.24	90.5%
PN-100	1.07±0.15	103.3%
PN-200	1.04±0.21	100.0%
Hepacare-100	0.85±0.13	82.1%
Hepacare-200	0.73±0.10 <sup>*</sup>	69.9%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values; <sup>\*</sup>p<0.05 compared with control group.

Table 19. Feeding effect of oyster hydrolysate on lipid peroxide (LPO) of SD rat liver homogenate for 6 weeks.

Groups	Lipid peroxide content (nmol/mg protein)	
Control	15.65±3.34	100.0%
TGPN-100	15.90±2.96	101.6% <sup>b</sup>
TGPN-200	8.45±3.23	54.0%
PN-100	15.24±5.32	97.4%
PN-200	15.14±4.07	96.7%
Hepacare-100	12.96±3.64	82.8%
Hepacare-200	12.03±2.21 <sup>*</sup>	76.8%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values; <sup>\*</sup>p<0.05 compared with control group.

### 항산화 효소의 활성의 변화

수퍼옥시드 디스무타아제 (SOD) 활성 비교; 생체 내에는 프리 라디칼 (free radical)에 의해 생성되는 수퍼옥시드 라디칼이나 과산화수소 및 히드록실 라디칼 등의 활성산소를 제거하기 위한 방어체계가 체내의 혈액이나 모든 장기에 존재한다. 생체 내 방어체계로 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase, glutathione S-transferase), catalase (CAT) 등이 알려져 있다. 인간의 혈청에서 SOD 중 Cu/Zn-SOD의 활성이 가장 높으며 혈청의 Cu/Zn-SOD 활성 변화를 측정 한 결과는 Table 20과 같다. 대조군의 혈청 SOD 활성은  $4.05 \pm 0.58$  unit/mg protein이었으며, TGPN-100 그룹은  $4.26 \pm 0.38$  unit/mg protein으로 5.2%의 활성 증가가 있었고, TGPN-200 그룹은  $4.63 \pm 0.74$  unit/mg protein으로 14.4%의 활성 증가는 있었으나 유의성은 없었다. PN-100과 200 그룹은 가장 높은 활성 증가(16.1~35.3%)를 보여주었으나, Hepacare 200 그룹은  $3.58 \pm 0.36$  unit/mg protein으로 오히려 SOD 활성이 11.6% 정도 감소하였다.

대조군 간균질액중의 SOD 활성은  $3.44 \pm 0.43$  unit/mg protein이었으며 PN-100과 PN-200 그룹에서는 농도가 2배로 증가했을 때 활성도 증가하였고, 특히 PN-200은 19.0%의 유의적인 증가를 보였다(Tanle 21). 그러나 TGPN 식이군과, Hepacare 식이군의 경우는 오히려 활성이 감소하였다.

Table 20. Feeding effect of oyster hydrolysate on superoxide dismutase activity of SD rat serum for 6 weeks.

Groups	Superoxide dismutase activity (unit/mg protein)	
Control	4.05±0.58 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	4.26±0.38	105.2% <sup>b</sup>
TGPN-200	4.63±0.74	114.4%
PN-100	4.70±0.88	116.1%
PN-200	5.48±0.60 <sup>**</sup>	135.3%
Hepacare-100	4.60±0.70	113.6%
Hepacare-200	3.58±0.36	88.4%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values; <sup>\*\*</sup>p<0.01 compared with control group.

Table 21. Feeding effect of oyster hydrolysate on superoxide dismutase activity of SD rat liver homogenate for 6 weeks.

Groups	Superoxide dismutase activity (unit/mg protein)	
Control	3.44±0.43 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	3.43±0.37	99.6% <sup>b</sup>
TGPN-200	2.22±0.14 <sup>***</sup>	64.5%
PN-100	3.84±0.28	111.5%
PN-200	4.10±0.51 <sup>*</sup>	119.0%
Hepacare-100	2.83±0.34	82.2%
Hepacare-200	3.19±0.48	92.7%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values; <sup>\*\*</sup>p<0.01 compared with control group.

카탈라아제 (CAT) 활성 비교; 굴 가수분해 물 식이에 따른 혈청 중의 카탈라아제의 활성의 변화는 Table 22와 같다. 굴 가수분해물을 섭취한 모든 그룹에서 높은 활성의 증가를 보였고, 대조군  $10.26 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min (100%)에 비해, TGPN-100과 TGPN-200에서 각각  $0.30 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min와  $0.31 \pm 0.11$  nmol/mg protein/min으로 14.5%와 20.0%의 활성증가가 있었다. Hepacare-100과 200에서도 20%가 넘게 활성이 증가하였으나 유의성은 없었다. 그리고 PN 굴가수분해물은 가장 높은 카탈라아제의 활성증가를 보였다.

간조직 균질액에서의 카탈라아제 활성은 혈청에서와 다른 경향으로 나타났다(Table 23). 대조군  $3.67 \pm 1.73$  에 대비하여 PN-100과 200 그룹에서만 섭취용량이 증가함에 따라 그 활성이 증가하였다. TGPN-200 그룹은 27.7%의 감소가, Hepacare-100과 Hepacare-200 그룹은  $3.27 \pm 0.94$  nmol/mg protein/min과  $3.08 \pm 0.65$  nmol/mg protein/min으로 10.7%와 15.9%까지 감소하였다. 활성산소를 제거하는 항산화 효소의 활성은 효소에 따라 조직에 따라 그 활성이 증가되기도 하였고, 감소되기도 하였다. 항산화 효소는 활성 산소를 안정된 물질로 전환시키는 역할을 하여 활성 산소를 제거시켜 주지만, 활성 산소의 생성량이 감소한다면 그 활성도 저하할 것으로 추정하였다. 항산화 효과에 대한 굴 가수분해물의 식이 효과는 TGPN 굴 가수분해물 식이에서 항산화효과를 인지할 수 있었고, TGPN 굴 가수분해물에 O와 I를 최적 비율로 혼합한 Hepacare는 이 같은 효과를 상승시키는 것으로 나타났다.

Table 22. Feeding effect of oyster hydrolysate on catalase activity of SD rat serum for 6 weeks.

Groups	Catalase activity (nmol/mg protein/min)	
Control	0.26±0.10 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	0.30±0.10	114.5% <sup>b</sup>
TGPN-200	0.31±0.11	120.0%
PN-100	0.33±0.06	128.1%
PN-200	0.38±0.09	145.9%
Hepacare-100	0.32±0.05	124.7%
Hepacare-200	0.32±0.14	123.7%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values.

Table 23. Feeding effect of oyster hydrolysate on catalase activity of SD rat liver homogenate for 6 weeks.

Groups	Catalase activity (nmol/mg protein/min)	
Control	3.67±1.73 <sup>a</sup>	100.0%
TGPN-100	3.68±1.47	100.5% <sup>b</sup>
TGPN-200	2.66±0.90	72.5%
PN-NaCl-100	4.77±1.74	130.2%
PN-NaCl-200	4.17±1.76	113.8%
Herb M-100	3.27±0.94	89.3%
Herb M-200	3.08±0.65	84.1%

Refer to the comment in Table 2; <sup>a</sup>Mean±SD (n=7/group); <sup>b</sup>Percent of control values.



## 요약

기본 식이를 제공한 대조군의 단백질 함량은  $45.16 \pm 2.25$  mg/ml serum이었으며, TGPN 굴 가수분해 물과 굴 가수분해 물에 한약 추출물을 첨가한 혼합물인 Hepacare-100 식이 섭취군은  $48.34 \pm 3.24$  mg/ml serum으로 7% 증가하였고, Hepacare-200 식이 섭취군의 단백질 함량은  $49.24 \pm 2.55$  mg/ml serum으로 대조군에 대비하여 9.0%의 유의적인 증가를 보여주었다. 그러나 TGPN-200 식이 섭취군과 PN-NaCl 가수분해물 식이 섭취군의 경우는 단백질 함량이 오히려 저하되었다. 총 콜레스테롤의 함량은 모든 굴 가수분해 식이군에서 감소하는 경향을 보였다. 특히 TGPN-200과 Hepacare-200 식이군에서  $79.04 \pm 12.50$  mg/dL와  $84.38 \pm 16.20$  mg/dL로 각각 29.9%와 24.1%까지 감소하였다( $p < 0.05$ ). TGPN 가수분해물 식이군과 Hepacare 식이군에서 혈중 LDL-콜레스테롤은 감소하였다. 혈청 중 중성지방의 함량은 모든 굴 가수분해 식이군에서 감소하는 경향을 보였다. 대조군의 경우 수퍼옥시드 라디칼의 함량은  $266.23 \pm 60.96$  nmol/g protein이었으며, TGPN-100, TGPN-200의 경우  $246.49 \pm 125.20$  nmol/g protein 와  $173.82 \pm 75.05$  nmol/g protein으로 대조군에 비해 7.4%와 34.7%의 감소하였다. 히드록실 라디칼 (hydroxyl radical)의 함량 변화는 대조군의 경우  $2.34 \pm 0.20$  nmol/mg protein (100%)으로 TGPN 굴가수분해 식이군과 Hepacare-200 그룹에서 감소하였으나, PN 굴가수분해물 식이군에서는 약간 증가하였다. 대조군의 카르보닐기 함량은  $13.47 \pm 1.19$  nmol/mg protein (100%)이었고, TGPN-200( $11.98 \pm 2.34$  nmol/mg protein, 88.9%)과 Hepacare-200( $12.53 \pm 3.10$  nmol/mg protein, 93.0%)에서 가장 큰 폭의 카르보닐기 생성 저해 효과를 볼 수 있었다. 혈청의 과산화 지질 함량은 TGPN 굴 가수분해물 식이군과 Hepacare 그룹에서 감소하는 경향을 보였다. 대조군 간균질액중의 SOD 활성은  $3.44 \pm 0.43$  unit/mg protein이었으며 PN-100과 PN-200 그룹에서는 그 활성이 농도 증가와 더불어 증가하였고, 특히 PN-200은 19.0%까지 증가하였다. 카탈라제 활성은 대조군의  $10.26 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min에 비해, TGPN-100과 200에서 각각  $0.30 \pm 0.10$  nmol/mg protein/min와  $0.31 \pm 0.11$  nmol/mg protein/min으로 14.5%와 20.0%의 활성증가가 있었다. Hepacare-100과 200에서도 20%가 넘는 활성의 증가가 있었다. PN 굴가수분해물이 가장 높은 카탈라아제의 활성증가를 보였다.

## 참고 문헌

- Anderson JW, Johnstone, Cook-Newell ME. 1995. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 333: 276-282.
- Asato L, Wang MF, Chan YC, Yeh SH, Chung HM, Chung SY, Chida S, Uezato T, Suzuki I, Yamagata N, Kokubu T, Yamamoto S. 1996. Effect of egg white on serum cholesterol concentration in young women. *J Nutr Sci Vitaminol* 42: 87-96.
- Balmir F, Staack R, Jeffrey E, Jimenez MBB, Wang L, Potter SM. 1996. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. *J Nutr* 126: 3046-3053.
- Chan PC, Bielski BHJ. 1974. Enzyme catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotide. *J Biol Chem* 249: 1317-1319.
- Choi JH, Yu BP. 1990. Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *AGE* 13: 61-64.
- Carroll KK, Hamilton RMG. 1975. Effects of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol levels in relation to atherosclerosis. *J Food Sci* 40: 18-23.
- Food and Drug Administration. 1999. Soy proteins and coronary heart disease. *Fed Regist* 64: 57688-57733.
- Friedewald WT, Levy RL, Fredrickson DS,, 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol without the use of the preparation ultracentrifuge. *Clic Chem* 18: 499-452,
- Ginsberg HN, Barr SL, Gilbert A. 1990. Reduction of plasma cholesterol levels in normal men on an American Heart Association Step I diet or a step I diet with added monosaturated fat. *N Engl J Med* 322: 574-579.
- Grundty SM, Denke MA. 1990. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 31: 1149-1172.

- Haglund O, Luostarinen R, Wallin R, Wibell L, Saldeen T. 1991. The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E. *J Nutr* 121: 165-169.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1981. Formation of a thiobarbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Lett.* 128: 347-350.
- Harman D. 1956. Aging; A theory base on free radical and radical chemistry. *J Gerontol* 11: 299-300.
- Harman D. 1984. Free radical theory of aging: the free radical diseases. *AGE* 7: 111-131.
- Honda K, Suzuki M, Numata T, Nakamura T, Futamura Y, Kanamaru Y, Nagaoka S. 1999. Effect of dietary protein hydrolyzate in livestock products on the plasma and liver lipid components in rats. Congress proceedings of 45th International Congress of Meat Science and Technology. Vol III, Yokohama, p 698-699.
- Hori G, Wang MF, Chan YC, Komatsu T, Wong Y, Chen TH, Yamamoto K, Nagaoka S, Yamamoto S. 2001. Soy protein hydrolyzate with bound phospholipids reduces serum cholesterol levels in hypercholesterolemic adult male volunteers. *Biosci Biotech Biochem* 65: 72-78.
- Jacques H, Deshaies Y, Savoie L. 1986. Relationship between dietary proteins, their in vitro digestion products, and serum cholesterol in rats. *Atherosclerosis* 61: 89-98.
- Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. 1971. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 74: 1-12.
- Kritchevsky D. 1979. Vegetable protein and atherosclerosis. *J Am Oil Chem Soc* 56: 135-140.
- Law MR. 1999. Lowering heart disease risk with cholesterol reduction: evidence from observational studies and clinical trials. *Eur Heart J* (Suppl 1): S3-S8.

- Levine RL, Garland CN, Oliver AA, Climent AG, Lenz BA. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Methods in Enzymol.* vol 186: Academic press, NY, p. 464-478.
- Lovati MR, West CE, Sirtori C, Beynen AC. 1990. Dietary animal proteins and cholesterol metabolism in rabbits. *Br j Nutr* 64: 473-485.
- Lowry OH, Roseborough NJ, Farr LA, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Martin MJ, Hully SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D. 1986. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* 2: 933-936.
- McCord JM, Fridovch, I. 1969. Superoxide dismutase; An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244: 6049-6055.
- Morimatsu F, Ito M, Budijanto S, Watanabe I, Furukawa Y, Kimura S. 1996. Plasma cholesterol-suppressing effect of papain-hydrolyzed pork meat in rats fed hypercholesterolemic diet. *J Nutr Sci Vitaminol* 42: 145-153.
- Nagaoka S. 1996. Studies on regulation of cholesterol metabolism induced by dietary food constituents or xenobiotics. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 49: 303-313.
- Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Kojima T, Kuwata T. 2001. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 11-17.
- Nagaoka S, Hori G, Yamamoto K, Yamamoto S. 2002. Improvements in cholesterol metabolism induced by soy peptides with bound phospholipids. *J Nutr* 132: 604S.
- Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G, Yamamoto K, 1999. Soyprotein peptic hydrolysate with bound phospholipids decrease micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. *J Nutr* 129: 1725-1730.

- Nagata Y, Ishiwaki N, Sugano M. 1982. Studies on the mechanism of antihypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino mixtures in relation to the casein counterparts in rats. *J Nutr* 112: 1614-1625.
- Oyanagui Y. 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* 42: 290-296.
- Rigo A, Rotilio G. 1977. Simultaneous determination of superoxide dismutase and catalase in biological materials by polarography. *Anal. Biochem.* 81: 157-166.
- Rudel LL, Morris MD, 1973. Determination of cholesterol using *o*-phthaldehyde. *J Lipid. Res* 14: 364-366.
- Saeki S, Nishikawa H, Kiriyaama S. 1987. Effects of casein or soybean protein on plasma cholesterol level in jejunectomized or ileectomized rats. *J Nutr* 117: 1527-1531.
- Zhang X, Beynen AC. 1993. Influence of dietary fish proteins on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *Br J Nutr* 69: 767-777.
- 보건복지부. 2006. 대한민국의 주요 사망원인

## 제 4 장 굴 부분 가수분해물의 응용

### 제 1 절 기능성 고형 제품의 제조와 생리적 기능성

#### Abstracts

The objective of this work was to manufacture the solid tablet based on the functionality with oyster hydrolysate and water extracts such as O and I herb. The oyster hydrolysate was obtained by polymerization with transglutaminase, followed by hydrolysis with Protamex and Neutrase, while O and I herb were extracted with water at 100°C for 5 hr, and powdered with freeze dryer. Wheat powder was used as basis of the tablet forming. The functional properties such as DPPH radical scavenging activity and angiotensin-I converting enzyme(ACE) inhibitory activity were determined before and after formulation of the tablet. I extract showed the highest DPPH radical scavenging activity. On the other hand, the oyster hydrolysate and O extract showed higher radical scavenging activity than other materials such as vitamin C and tocopherol. According to the ACE inhibitory activity and forming condition, the optimum levels of oyster hydrolysate, O extract, I extract and wheat powder were 2.74g, 0.75 g, 0.75 g and 3.5 g, respectively. Each functional property was verified before and after forming the tablet, and optimum mixing ratio for the solid tablet was provided based on the manufacturing process and functionality.

#### 서론

굴은 연체동물의 부족장, 사새아강, 및 굴과에 속하는 패류로서 세계적으로 100 여종 이상 알려져 있다. 이중 우리나라에서 산업적으로 대량 생산되고 있는 굴은 참굴(*Crassostrea gigas*)로서, 참굴은 남해안 조간대 부근의 염분 농도가 낮은 해역에 서식한다 (Yoo, 2000). 굴은 다량의 타우린과 글리코젠을 함유하고 있어 심장 및 간장의 기능 강화와 콜레스테롤 감소에 의한 고혈압,

동맥경화에 예방 효과가 있으며, 셀레늄을 다량 함유 (0.44 ug/g)하고 있어 중금속 해독기능을 갖는 등의 건강 기능성이 널리 알려져 있다. 그리고 꿀은 아연을 다량 함유하고 있어 남성들의 건강에도 아주 우수하다고 알려져 있다 (Park, 1995; Jeong et al., 1998). 이러한 건강 기능성 효과에도 불구하고, 해마다 상품가치가 저하된 꿀의 양은 늘어나고 있으며, 대부분 폐기되고 있다. 우리나라의 꿀 생산량은 1998년 176천톤에서 2002년 182천톤으로 증가했지만, 수출 꿀에서 패독과 이질균이 검출되고, FDA 권고 사항 미 이행 등의 이유로 2000년 22천톤에서 2002년 17천톤으로 수출량은 감소하고, 내수 소비도 대부분 생식형태로 연간 13천톤으로 일정하여 과잉 생산된 꿀의 양은 늘어난다고 있다 (MOMAF, 2004).

O의 약리학적 효과는 간장보호 (Hikino et al., 1984), 알콜 해독 (Lee and Lee, 1990), 항 당뇨 (Sheo et al., 1987), 면역 조절작용 (Long and Xie, 1979), 항균 활성, 아질산염 소거에 의한 암 예방 효과 (Jung et al., 2000), 전자공여에 의한 항산화 효과 (Kim et al., 2004) 등이 보고되어 있다. 그리고 O 추출물의 붉은 색은 anthocyanin에 기인하며, 차, 술 등의 가공제품에 아름다운 천연색을 부여한다 (Kim et al., 1973)).

I는 정유성분, caffeic acid, 방향족 oxycarbonic acid 및 각종 무기질과 비타민을 함유하고 있으며 (Block and Langseth, 1994; Wu et al., 2001; Cho et al., 2002; Sheu et al., 2001), I의 정유성분은 약 96종 이상의 화합물의 혼합체로써 cineole,  $\beta$ -myrcene, thujone, camphor, caryophyllenemurolene, logniverbenone, borneol 등이 주로 함유되어 있다 (Cho and Chiang, 2001). I 추출물은 혈당량을 저하시키며 체중감소를 막고 혈중지질을 저하시키는 효과를 얻으며 (Al-Waili, 1986), I의 메탄올 추출물을 고지혈증과 당뇨를 개선시킨다고 보고되었다 (Surbran et al., 1997). I의 알코올 추출물은 glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate-pyruvate transaminase(GPT)의 활성을 감소시켜 간 기능 보호 효과가 있으며, 혈청의 tocopherol 함량을 증가시켜 자유 라디칼에 의한 손상을 방지하여 발암 위험성을 감소시킨다고 보고되었다 (Kim and Lee, 1996).

최근 경제수준의 향상과 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 건강식품 또는 기능성 식품의 개발, 판매가 활발해지고 있으며, 건강유지에 대한 개념이 치료를 목적으로 하는 의학적 관점보다 예방적 측면이 대두되고 있다. 이에 따라 전래의학에 대한 정보들이 생리적 기능 유지 및 향상을 위해 광범위하

게 이용되고 있으며, 이들을 이용한 건강식품 또는 기능성 식품으로의 활용을 위한 연구가 활발해지고 있다. 식품단백질 유래의 건강기능성 펩타이드는 그 활성은 다른 화학물질에 비해 낮을 수도 있지만, 인체에 안전성이 기대되며, 특이한 구조를 가지는 것이 많고, 다기능성을 나타내는 특징이 있다고 알려져 있다 (Park et al., 2005; 정, 2006; ). 그러나 위에서 제시된 기능성 펩타이드와 한약성분 각각의 기능성만 밝혀졌을 뿐, 이를 제품화 할 경우의 공정 및 성분비의 최적화에 관한 연구는 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 굴 효소 가수 분해물과 O 및 I 수용성 추출물을 이용한 고형제품 개발을 그 목적으로 하고 있다.

## 재료 및 방법

### 재료

참굴(*Crassostrea gigas*, 각장  $4.6 \pm 2.3$  cm, 각중  $9.9 \pm 3.2$  g)은 경남 통영 연안의 양식장에서 채취하여 인근의 가공공장에서 IQF(Individual Quick Frozen)로 가공한 제품으로서 1-2년 동안 냉동보관하여 갈변 때문에 상품 가치를 잃은 제품을 가수분해 시료로 사용하였다. 가수분해를 위한 상업용 효소, Neutrase 및 Protamex는 Novozyme-Korea에서 구입하였으며, transglutaminase(TGase, TG-K)는 Ajinomoto 사(Japan)에서 구입하였다.

### 효소를 이용한 굴가수분해물의 제조

장(2007)의 방법에 따라 기능성 굴 가수분해물(이하 TGPN)을 제조하였다. 즉, 양식산 굴을 TGase로 30 °C에서 1시간동안 처리한 후 Protamex (Novozyme-Korea, Pusan)로 1시간동안 가수분해하고, 100 °C에서 1시간 가열 처리하여 불활성화 시켰다. 기능성 향상을 위해 1차 효소 가수분해물을 Neutrase (Novozyme-Korea, Pusan)로 1 시간동안 재 가수분해 한 뒤 100 °C에서 1시간 불활성화 시켰다. 가수분해물은 원심분리(Hanil Supra 22, 8000xg, 25분)하여 불용성 물질을 제거하였다. 회수한 상층액에 최종 농도 60%가 되도록 ethanol을 첨가하여 4 °C의 저온실에 1시간 방치하여 에탄올 불용성 물질과 잔여 단백질을 침전시키고 원심분리(8000xg, 25분)하여 제거하였다. 상층액은 0.45 μm의 막으로 여고하고 회전진공증발기(N-1 type, EYELA, Japan)로 40 °C 이하의 온도에서 ethanol을 증발시켰다. 증발 건고물은 탈이온수에 녹인 후 5 kDa의 막을 장착한 한외여과기(8200, Amicon,



USA)로 한외 여과한 후 농축물과 여과물을 각각 진공동결 건조하여 건조 분말을 만든 후 -20 °C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### O와 I 수용성 추출물의 제조

O에 I에 각각 4배량과 9배량의 수도수를 가하고 95 °C-100 °C에서 5시간동안 가열하였다. 이것을 원심분리(5000xg, 20분)한 후 상층액은 Toyo No. 2여과지로 감압여과하여 -20 °C의 동결고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 일반성분과 물리적 특성의 측정

수분함량은 동결건조기 (FD5508, Ilshin Lab Co., LTD, Korea)를 이용하여 동결 건조하여 측정하였고, pH는 pH meter (Orion 520A+, Thermo Electron Corporation, USA)로, 색도는 색차계 (JC801, Color Techno System Co., LTD, Japan)을 이용하여 Hunter 색차법으로 측정하였다. Brix는 당도계 (13-946-20, Fisher, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 라디칼 소거능의 측정

Free radical 소거능은 Burda and Oleszek (2001)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 500 uL ethanol (99.5%, Daejung Chemicals and Metals Co., Korea), 500 uL 시료, 250 uL DPPH 용액 (0.5 mM DPPH in ethanol, Sigma, Germany)을 혼합하여 25 °C에서 30분간 어두운 곳에 보관하였다. 이것을 90 초 동안 원심분리(10000 rpm) 하여 상층액을 UV-visible spectrophotometer (S-3150 Scinco Co., LTD)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료는 동결 건조하여 획득한 고형분을 물에 용해하여 농도별로 측정하였다. Antiradical activity는 다음과 같은 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Antiradical activity} = 100 \times (1 - \text{Abs of sample} / \text{Abs of reference})$$

#### 고형 환 제조

고형 환의 성형을 위한 물질로 밀가루 (중력 자목적용 곰표 밀가루, 대한제분주식회사)를 이용하여 고형 환을 만들었다. 굴 가수분해물을 제외한 분말의 중량을 10 g으로 하여 밀가루는 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 g 첨가하였고, I와 O는 동결 건조하여 각각 1 g (밀가루 3.0 g일 때), 0.75 g(밀가루 3.5 g), 0.5 g (밀가

루 4.0 g), 0.25 g (밀가루 4.5 g)을 첨가하여 밀가루와 혼합하였다. 여기에 밀가루 중량의 78.3%의 액상 글 가수 분해물을 첨가하여 성형 후 중량에 변화가 없을 때까지 20°C에서 자연건조 하였다.

### 고형 환의 추출

성형한 환의 free radical 소거능을 보기 위해 에탄올 60%에 추출하였다. 에탄올 추출물은 건조되어 마쇄한 환 1 g에 60% 에탄올 100 mL에 가한 뒤, 150 rpm에서 24시간 교반 추출한 후 10,000 rpm으로 15분간 원심분리하고, 각각의 상층액을 Whatman No.1 여과지로 여과하여 시료로 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 일반성분과 물리적 특성

고형 및 액상의 기능성 제품을 만들기 위한 시료의 조성상태와 물리적 특성은 Table 1 과 같다.

Table 1. Composition and physical properties of the enzyme hydrolysate from oyster, water extracts from I and O

	Moisture(%)	Solid(%)	Brix(%)	pH	색도		
					L	a	b
Oyster hydrolysate	86.29±0.33	13.71±0.33	11.84	6.36	-5.66	0.63	2.67
O water extract	85.70±0.03	14.30±0.03	13.78	2.81	-1.79	6.62	13.29
I water extract	95.56±0.10	4.48±0.10	5.02	4.99	25.29	21.09	54.36

가공하지 않은 생굴의 조성은 수분 82±0.8%, 총질소 1.86±0.02g/100 g, 회분 1.1±0.3%, 지방 2.1±0.3% 라고 알려져 있다. 글 가수분해물의 경우 생굴과 비교했을 때, 효소에 의한 가수분해로 수분함량은 86%로 매우 높아졌다. I와 O도 열수 추출 방식 때문에 수분함량이 85.7-95.6%로 높아졌다. 반면, 고형분 함량은 많은 차이를 보였다. O 추출물의 고형분 함량이 14.30%로 가장 높았

고, 굴 가수분해물의 고형분 함량은 13.71%로 O 추출물과 비슷한 수치를 보였다. 그러나 I 추출물은 4.48%로 상대적으로 낮은 함량을 나타냈다. 건조에 의한 획득 수율은 고형분 함량이 높은 O 추출물이 가장 높았다. 가용성 고형분 함량을 나타내는 Brix는 고형분 함량과 비슷한 수치를 나타냈다. 이는 굴 가수분해물은 물을 가하여 분해하고, O 및 I 추출물 역시 물을 용매로 추출한 것이기 때문에 대부분의 물질이 물에 용해되어 있기 때문이다.

pH는 O 추출물이 2.81로 가장 낮았으며, 신맛도 매우 강했다. O 추출물의 신맛은 유기산에 의한 것으로, O 열매에는 3.5% citric acid, 1.4% malic acid, 0.2% succinic acid가 함유되어 있다(Kim et al., 1973). 굴 가수분해물은 짙은 색의 부유물이 존재하여 명도가 낮았으며, I는 부유물도 적고 비교적 맑은 용액 상태여서 O 추출물과 굴 가수분해물에 비해 상대적으로 명도가 높게 측정되었다.

#### 라디칼 소거능

굴 가수분해물, I와 O 추출물의 radical 제거 효과를 측정한 결과, 모든 성분들에는 radical 제거 효과가 있음을 보여주었다. 세 물질 모두 농도가 증가할수록 radical 소거능이 일정하게 증가하였다. 50% 활성의 농도를 나타내는 EC<sub>50</sub>은 굴 가수분해물인 경우 10.00 mg/mL, O 추출물의 경우에는 0.67 mg/mL, I 추출물의 경우에는 0.10 mg/mL로 I의 EC<sub>50</sub>수치가 가장 낮아, radical 소거능이 가장 높게 측정되었다. I에 함유된 flavonoid 성분들은 높은 항산화 효과를 가지고 있으며, 이미 강력한 항산화물질로 알려진 quercetin, apigenin, eriodictyol과 vitamin E보다 높은 항산화 효과를 가진 것으로 알려져 있다 (Lee et al., 1999).

#### 고형 환 제조

예비실험 결과 성형을 위한 물질은 옥수수 전분 보다 밀가루가 적합했다. 옥수수 전분은 환의 형태를 이루지 못하고, 동일 중량의 환을 제조할 때 밀가루보다 굴 가수분해물의 함량이 낮았다. 반면, 밀가루는 성형이 용이하고, 굴 가수분해물의 함량도 높았다. 각 성분비에 따른 환의 건조 후 모습은 Fig 1에 나타내었다. (A)는 밀가루 3 g, (B)는 밀가루 3.5 g, (C)는 밀가루 4 g, (D)는 밀가루 4.5 g로 제조한 환의 건조 후 사진이며, (A)는 환의 제조 시 표

면이 울퉁불퉁하고 형태가 일그러졌다. 이것은 밀가루 함량에 비해 인진과 오미자의 함량이 높기 때문에 점착력이 증가된 것으로 추측된다. 이는 성분 함량 및 건조 전 환의성형가능 여부를 나타낸 Table 2에도 나타나 있다. 밀가루 함량이 가장 적은 (A)는 성형 시 일정한 형태를 갖추지 못하였다. (C), (D)의 경우는 일정 형태를 갖추었으나 건조 과정에 갈라짐이 발생했다. (D)의 경우 갈라지는 정도가 더욱 심했다. (B)는 굴 가수 분해물 첨가량은 (C), (D)에 비해 적고, O와 I 추출 건조물의 함량은 (A)보다 적었지만, 성형과정에 갈라짐이나 형태 일그러짐이 발생하지 않았다.

### 고형 환 추출물의 항산화성

고형 환의 건조 후 에탄올 추출물의 free radical 소거능은 Table 2의 A, B, C, D는 각각 42.56%, 36.65%, 32.60%와 20.64%였다. 굴 가수분해물, O와 I 추출 건조물의 함량이 높을수록 free radical 소거능도 높은 것을 알 수 있다. 그러나 Table 2와 Fig 1에서 (B)의 경우가 성형상태가 가장 좋았으므로, 굴 가수분해물이 함유된 기능성 환의 제조는 밀가루 3.5 g, I 추출 건조물 0.75 g, O 추출 건조물 0.75 g, 굴 가수분해물 2.74 g의 배합비가 가장 적합한 것으로 판정하였다.

Table 2. Properties of the tablets before drying

	(A)	(B)	(C)	(D)
Shape*	+	+++	++	+
Oyster hydrolysate(g)	2.34	2.74	3.13	3.52
O extract (dry powder, %)	13.60	8.57	6.14	2.93
I extract (dry powder, %)	13.60	8.57	6.14	2.93

\* +:not good    ++:good    +++:very good

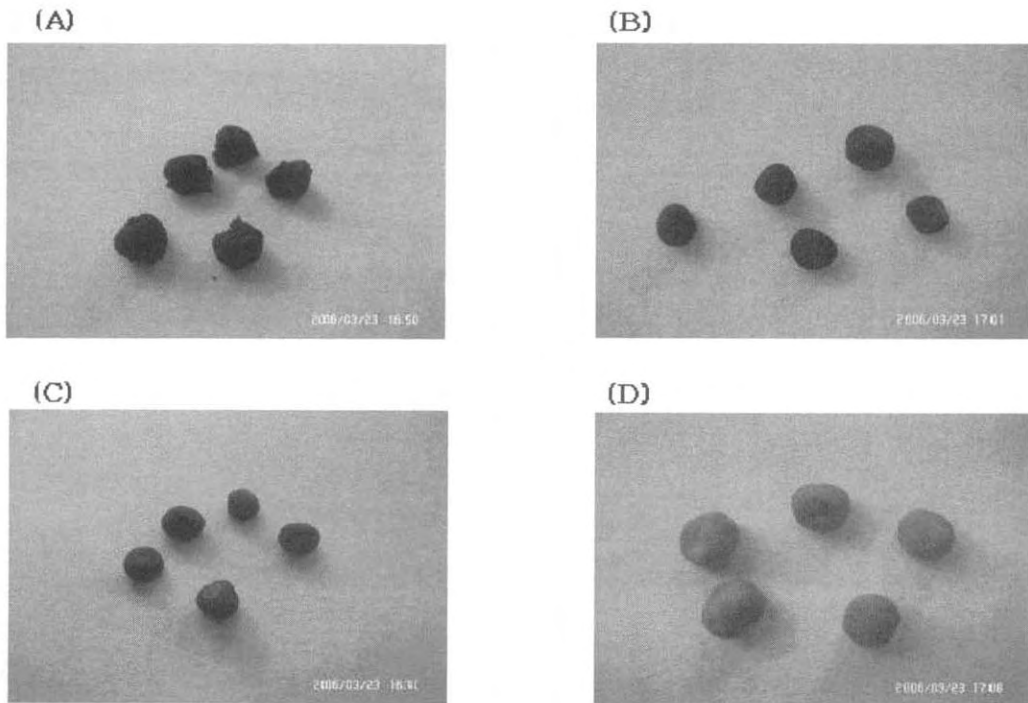


Fig 1. Preparation of the tablet using the wheat flour, I, O and hydrolysate from oyster, (A) 3.0 g wheat flour; (B) 3.5 g wheat flour; (C) 4.0 g wheat flour; (D) 4.5 g wheat flour

#### 요약

굴 가수 분해물을 함유한 기능성 고형 환의 제조를 위해 각 성분의 특성을 측정하였다. DPPH radical 소거능은 I 수용성 추출물이 가장 높은 활성을 보였으며, 굴 가수 분해물, I 추출물은 지금까지 알려진 항산화제보다 높은 활성을 나타내었다. 세 물질을 혼합하여 환을 제조하였을 때, 굴 가수분해물, I 추출 건조물, O 추출 건조물의 함량이 높을수록 radical 소거능도 증가하였으나, 점착력이 증가하여 과량 함유할 경우 성형이 어려웠다. 따라서 기능성 환의 제조 시 밀가루 3.5 g, I 추출건조물 0.75 g, O 추출 건조물 0.75 g, 굴 가수분해물 2.74 g을 최적 배합비로 선정하였다.

## 참고문헌

- Al-Waili NS. 1986. Treatment of diabetes mellitus by *Artemisia berba-alba* extract : preliminary study. *Clin Exp Pharmacol* 13: 569-573.
- Block G, Langseth L. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technology* 48: 80-89.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Burda S, Oleszek W. J. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Agric Food Chem* 49: 2774-2779.
- Cho YH, Chiang MH. 2001. Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia capillaris*, *Artemisia argyi*, and *Artemisia princeps*. *Korean J Intl Agri* 13: 313-320.
- Cho YH, Chiang MH. 2002. Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia capillaris*, *Artemisia argyi*, and *Artemisia princeps*. *Korean J Intl Agri* 13: 313-320.
- Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Yoon SL, Lee KH. 2005. Comparison of physiological activities between hot-water and ethanol extracts of Bokbunja(*Rubus coreanum* F.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 790-796.
- Hikino H, Kios Y, Takuchi H, Ikeda Y. 1984. Validity of the oriental medicines 60. Liver-protective drugs. II Antihepatotoxic action of lignoids from *S. chinensis* fruits. *Plant Med* 50: 213-216.
- Jeong BH, Choi BD, Lee JS. 1998. Proximate composition, cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol content in 72 species of Korean fish. *J Korean Fish Sci Tech* 1: 129-146.
- Kim KI, Joo HN, Kwon TW. 1973. On the proximate composition, organic acids and anthocyanins of Omija, *Schizandra chinensis* Baillon. *Korean J Food Sci Technol* 5: 3.
- Kim KS, Lee MY. 1996. Effects of *Artemisia selengensis* methanol extract on ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 581-587.

- Lee J.S., Lee S.W. 1990. Effect of water extract in fruits of Omija(*Schizandra chinensis* Baillon) on alcohol metabolism. Korean J Dietary Culture 5: 259-262.
- Lee SJ, Chung HY, Lee I.K, Yoo ID. 1999. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of *Artemisia vulgaris* and their antioxidant activity. Korean J Food Sci Technol 31: 825-822.
- Long ZZ, Xie SS. 1979. Experimental study on the enhancement of the immunosuppressive effect of cortisone by wurenchun, an extract of *Schizandra chinensis* BaILL I. Isolation and structure determination of five new lignans A,B,C,F and G and the absolute structure of schzandrin. Chem Pharmacol Bull. 27: 1383-1394.
- MOMAF. 2004. Fishery production survey. p 146
- Nam SM, Kim JG, Ham SS, Kim SJ, Chung ME, Chung CK. 1999. Effects of *Artemisia iwayomogi* extracts on antioxidant enzymes in rats administered benzo(a)pyrene. J Korean Soc Food Sci Nutr 28: 199-204.
- Park B.H. 1995. Chemical composition of marine products in Korea. National Fisheries Research Development. p 60-159.
- Park, EY, Murakami H, Mori O, Matsumura Y. 2005. Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. J Agric Food Chem 53: 137-144.
- Sheo HJ, Lee MY, Hwang JS. 1987. Effect of *Schizandrae fructus* extract on blood constituents of alloxan induced diabetic rabbits. J Korean Soc Food Sci Nutri 16: 262-268.
- Sheu SJ, Chieh CL, Weng WC. 2001. Capillary electrophoretic determination of the constituents of *Artemisia capillaris* Heba. J Chromatography 911: 285-293.
- Surbran OA, Pushpanadan P, Rajasekharan S, Evana DA, Latha PG, Val SR. 1997. Effects of *Artemisia pallens* on blood glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. J Ethanopharmacol 50: 13-17.
- Wu TS, Tsang ZJ, Wu PL, Lin FW, Li CY, Teng CM, Lee KH. 2001. New

- constituents and antiplatelet aggregation and anti-HIV principles of *Artemisia capillaris*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 9: 77-83.
- Yoo SK. 2000. Mariculture in the coastal water. Guduck publishing Co. Busan, Korea. p 639.
- 장영부. 2007. 굴 가수분해물의 기능 특성 및 식품에의 응용. 부경대학교 대학원. 공학박사학위논문.
- 정인권. 2006. 굴 효소 가수분해물의 제조 및 이를 이용한 요구르트의 기능성 개선. 경



## 제 2 절 혼합물 실험계획법에 의한 효소 가수분해물과 한약추출물들의 최적 혼합비 분석

### Abstract

The objectives of this work were to manufacture the functional drink with oyster hydrolysate and extracts from O and I herb by using mixture design and to provide the optimum ratio for the drink using the response surface methodology (RSM). The oyster hydrolysate was obtained by polymerization with transglutaminase, followed by hydrolysis with Protamex and Neutrase, while O and I herb were extracted with water at 100°C for 5 hr. Interaction effects of these mixtures were investigated by modified distance based design and analyzed by regression canonical model, and trace plot. The optimization of mixture ratio was made by statistical modeling. Antiradical activity and sensory properties which are the important target constraints in drink showed linear canonical form, while color and viscosity of drink showed nonlinear canonical form indicating the highly interaction among mixtures. The response trace plot revealed that antiradical activity, sensory properties, color and viscosity were quite sensitive to the drink blending. According to the RSM, the optimum formulation of drink was 3% of oyster hydrolysate, 3.83% of I extract, and 8.17% O extract. This work shows the interaction effects of each mixture and provides the optimum ratio of the functional drinks for antiradical activity, ACE inhibition, color and viscosity.

### 서론

최근에는 기능성 식품의 개발이 광범위하게 이루지고 있다. 식품단백질 유래의 건강기능성 펩타이드는 가공 건조 시에도 활성을 유지하고 있으며 한약 성분과 혼합하여 고형 환을 제조하였을 때 좋은 성형상태를 보여주었다. 그러나 고형 환을 제조하기 위해서는 다량의 밀가루가 필요하였으며, 굴 가수분해물, I 및 O 추출 건조물을 과량 함유할 경우 성형이 어려웠다. 따라서 건조 및 성형과정이 첨가되는 고형 환제품 외에 액상의 제품을 제조할 필요

성이 제기되었다.

대부분의 가공 식품은 여러 물질이 혼합된 형태이며 액상의 음료 역시 다양한 물질이 혼합된 형태이다. 그러나 한 개 이상의 성분으로 되어 있는 혼합물의 경우, 각 성분의 혼합량이 문제가 되는 것이 아니라 혼합비율만이 문제가 되는 경우가 있다. 이처럼 몇 개 성분의 혼합물에 관한 실험에서 어떠한 성분이 목적하는 종속변수에 유의한 영향을 미치며, 종속변수의 반응량을 최대 또는 최소로 만드는 최적혼합비율을 찾고자 하는 실험이 혼합물 실험이다 (Cornell, 1990; Ellkar et al., 1996)). 이러한 혼합물 실험 계획과 분석은 식품의 개발 및 최적화를 위한 방법으로 중요하게 작용하는데 (Nas et al., 1999), 적절한 실험계획법 내에서 통계적인 모형의 도입이 이루어졌을 때 바람직하다 (Saguy et al., 1994). 그리고 적절한 통계적 모델링의 수립과 모델에 대한 분석 및 평가가 이루어졌을 때, 혼합물 내에서 각 성분이 미치는 영향에 대해 알아볼 수 있다 (Yoon et al., 1997). 특히, 독특한 향을 가지고 있는 굴 가수 분해물과 I 및 O와 같은 한약 추출물들의 혼합에는 받아들여질 수 있는 맛성분을 위한 최적혼합 비율이 정해져야 하며, 그 비율에 따른 향산화성과 같은 기능성 또한 유지하여야 하고 그 효과를 검증해야 할 것이다. 따라서 본 연구에서는 굴 효소가수 분해물과 I와 O 추출물을 이용하여, 혼합물 실험계획법과 response surface methodology를 통해 액상의 제품을 만드는 최적 혼합비를 제시하고자 하며, trace plot을 이용하여 각 성분들이 물성에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

참굴(*Crassostrea gigas*, 각장  $4.6 \pm 2.3$  cm, 각중  $9.9 \pm 3.2$  g)은 경남 통영 연안의 양식장에서 채취하여 인근의 가공공장에서 IQF(Individual Quick Frozen)로 가공한 제품으로서 1-2년 동안 냉동보관하여 갈변 때문에 상품 가치를 잃은 제품을 가수분해 시료로 사용하였다. 가수분해를 위한 상업용 효소, Neutrase 및 Protamex는 Novozyme-Korea에서 구입하였으며, transglutaminase(TGase, TG-K)는 Ajinomoto 사(Japan)에서 구입하였다.

### 효소를 이용한 굴가수분해물의 제조

장(2007)의 방법에 따라 기능성 굴 가수분해물(이하 TGPN)을 제조하였다.

즉, 양식산 꿀을 TGase로 30 °C에서 1시간동안 처리한 후 Protamex (Novozyme-Korea, Pusan)로 1시간동안 가수분해하고, 100 °C에서 1시간 가열 처리하여 불활성화 시켰다. 기능성 향상을 위해 1차 효소 가수분해물을 Neutrase (Novozyme-Korea, Pusan)로 1 시간동안 재 가수분해 한 뒤 100 °C에서 1시간 불활성화 시켰다. 가수분해물은 원심분리(Hanil Supra 22, 8000xg, 25분)하여 불용성 물질을 제거하였다. 회수한 상층액에 최종 농도 60%가 되도록 ethanol을 첨가하여 4 °C의 저온실에 1시간 방치하여 에탄올 불용성 물질과 잔여 단백질을 침전시키고 원심분리(8000xg, 25분)하여 제거하였다. 상층액은 0.45 um의 막으로 여고하고 회전진공증발기(N-1 type, EYELA, Japan)로 40 °C 이하의 온도에서 ethanol을 증발시켰다. 증발 건고물은 탈이온수에 녹인 후 5 kDa의 막을 장착한 한외여과기(8200, Amicon, USA)로 한외 여과한 후 농축물과 여과물을 각각 진공동결 건조하여 건조 분말을 만든 후 -20 °C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 한약재 수용성 추출물의 제조

O에 I에 각각 4배량과 9배량의 수도수를 가하고 95 °C-100 °C에서 5시간 동안 가열하였다. 이것을 원심분리(5000xg, 20분)한 후 상층액은 Toyo No. 2 여과지로 감압여과하여 -20 °C의 동결고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 점도와 색도의 측정

제조한 음료의 점도측정은 Capillary 점도계(Cannon Instrument Co. No. 300, USA)를 이용하여 상온(25°C)에서 측정하였다. 각 음료는 비중과 시간을 측정하여 relative viscosity를 측정하고, 아래의 식을 이용하여 specific viscosity를 측정하였다.

$$\text{Relative viscosity } (n_{rel}) = n_s / n_0$$

$$\text{Specific viscosity } (n_{sp}) = (n_s - n_0) / n_0 = n_{rel} - 1$$

where,  $n_s$  : viscosity of drink

$n_0$  : viscosity of H<sub>2</sub>O

색도는 색차계 (JC801, Color Techno System Co., Japan)을 이용하여 L (lightness), a (redness), b (yellowness) 값을 10회 측정된 뒤 평균값을 나타

내었다.

### 라디칼 소거능의 측정

DPPH 유리 radical 소거능은 Blois의 방법(1958)에 따라 측정하였다. 즉 500 uL ethanol (99.5%, Daejung Chemicals and Metals Co., Korea), 500 uL 시료, 250 uL DPPH 용액 (0.5 mM DPPH in ethanol, Sigma, Germany)를 혼합하여 25°C, 30분간 어두운 곳에 보관하였다. 이것을 90초 동안 원심분리 (10000 rpm)하여 상층액만을 UV-visible spectrophotometer (S-3150 Scinco Co., USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.. Antiradical activity는 Burda and Oleszk (2001)의 방법에 따라 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{Antiradical activity} = 100 \times (1 - \text{Abs of sample} / \text{Abs of reference})$$

### 음료 제조 및 최적화

음료의 제조를 위해 첨가물로 구연산 (Daejung, Korea) 0.06%, 고과당 (Daesang, Korea) 5.3%, 배 농축액(MSC, Korea) 2%를 가하였다. 굴 효소 가수 분해물, I 추출물, O 추출물의 혼합 design, data 분석 및 혼합 최적화는 Design Expert 7 (Stat-Easy Co., Minneapolis, USA)를 이용하였고, constraint 값으로는 색도, 자유 radical 소거능, 점도, 관능으로 정하였다. 굴 효소 가수 분해물, I 추출물, O 추출물의 총 함량 15% 내에서 굴 효소 가수 분해물, I 추출물, O 추출물의 최소 및 최대 비율은 0.5~3%, 3~6%, 6~10%로 정하였고, 각 구성에 따른 성분들의 반응을 보기 위하여 trace plot을 이용하였다.

최적화는 canonical 모형의 수치 최적화 (numerical optimization)를 통하여 성분비를 선정하고, 그때의 점을 예측하였다. 수치최적화는 canonical 모형을 근간으로 하는 모델의 수에 각 반응에 대한 목표범위 (goal area)를 설정하고 다음 식에 의하여 구하였다.

$$D = (d \times d \times \dots \times d_n)^{1/n} = \{\prod d_i\}^{1/n}$$

여기서 D는 overall desirability, d는 각각의 desirability, n은 response의 수이다 (Derringer and Suich, 1980; Han et al., 2002).

## 관능검사

경희대 식품공학과 대학원생 10명을 선발하여 관능검사요원으로 활용하였다. 화학적인 냄새와 맛의 강도측정은 평점법으로 하였고, 종합적인 평가는 기호도 측정법으로 하였으며 각각 9점 채점법으로 1 (매우 나쁘다)에서 9 (매우 좋다)까지의 점수를 사용하여 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### **Design point and drink mixture**

각 성분의 제한 범위를 글 효소 가수분해물은 0.5%에서 3%로, I 추출물의 경우는 3%에서 6%까지, O 추출물의 경우 6%에서 10%로 설정하였고, 그 범위들을 modified distance design에 적용하여 혼합물 내 실험 점을 설정하였다. 6개의 실험점이 선정되었으며, lack of fit의 계산을 위한 5개의 실험점과 4개의 반복점이 설정되었다. 이에 따라 선정된 총 실험 점 및 측정 결과는 Table 1에 나타내었다. 모든 실험순서 (Run)는 실제 실험디자인에 의해 배열되는 순서에 대한 구획의 오차를 없애기 위해 무작위로 실행하였다.

**Table 1. Level and composition of design for the formulation of drink**

Run	Oyster hydrolysate	I extract	O extract	Specific viscosity	Color			DPPH activity(%)	Sen sory
					L	a	b		
1	0.50	6.00	8.50	0.24	5.87	-1.40	14.05	89.53	4.07
2	2.00	3.00	10.00	0.38	5.87	-1.30	11.80	86.13	4.05
3	2.00	3.00	10.00	0.38	5.87	-1.30	11.80	86.13	4.05
4	2.40	3.75	8.85	0.41	5.48	-1.63	12.90	88.71	4.56
5	3.00	3.00	9.00	0.35	6.33	-2.38	12.60	91.26	4.43
6	1.75	6.00	7.25	0.28	5.08	-1.19	14.86	87.79	4.52
7	3.00	3.00	9.00	0.35	6.33	-2.38	12.60	91.26	4.43
8	0.50	6.00	8.50	0.24	5.87	-1.40	14.05	89.53	4.06
9	0.50	5.25	9.25	0.42	4.24	-1.27	19.98	91.22	3.43
10	2.40	4.50	8.10	0.49	5.19	-1.72	15.77	89.09	4.16
11	3.00	6.00	6.00	0.34	5.58	-2.34	17.68	84.08	4.85
12	1.525	4.125	9.35	0.49	4.28	-1.68	20.06	81.80	3.66
13	2.40	5.25	7.35	0.44	4.77	-1.37	19.76	85.54	4.32
14	3.00	6.00	6.00	0.34	5.58	-2.34	17.68	84.08	4.85
15	0.50	4.50	10.00	0.43	3.29	-1.63	33.25	90.36	3.52

**Statistical modeling and analysis**

혼합물 내의 각 성분이 미치는 영향을 알아보기 위해 설정된 반응별로 모델링 화를 하였고 (Table 2), 분석은 모델에 대한 F-test를 통하여 유의성 검사를 하였다. 또한 trace plot을 이용하여 일정한 비율에서 다른 요소들이 고정되는 동안 각 혼합물 성분변화에 따른 영향을 나타내었다 (Fig. 1-3).

Specific viscosity와 명도(L), 적색도(a), 황색도(b) 및 antiradical activity는 모두 quadratic model( $p < 0.05$ )이 선택되었고, 순수오차와 잉여오차의 비교에

의한 lack of fit test는 specific viscosity는 0.0001 미만의 낮은 probability를 나타내었으며, 명도 0.0007, 적색도 0.0034, 황색도 0.0039, antiradical activity 0.0242의 비교적 낮은 probability 값을 가져 모델에 대한 적합성을 확인하였다 (Table 2). 특히, 예측된 canonical 식에서 결정된 계수들은 굴 가수분해물, I 및 O 추출물과 같은 성분들이 반응에 미치는 영향을 수치로 보여주고 있는 것으로 (Han et al., 2002), 관능검사에서는 모든 혼합성분들이 기여하는 정도는 같은 정도의 기여도 및 linear 모델화를 나타내어 각 성분들의 독립적 기여도를 나타내었다. 이와 antiradical activity, specific 점도 및 색도들은 비선형인 quadratic model을 나타내어 각 첨가한 성분들의 상호작용 효과를 볼 수 있었다. 이와 같은 첨가한 성분 등의 상호작용을 나타내는 비선형 모델 (non-linear model)은 surimi와 첨가한 전분과의 상호작용 (Yoon et al., 1997), 두유박과 옥분의 압출성형물 (Han et al., 2002), 까나리액젓과 건조비지를 섞어 만든 압출 성형물 (Han and Kim, 2003)에서도 볼 수 있었다.

Table 2. Analysis of selected models and regression at polynomial equations for the six responses.

Response	Model	Prob>F	Equation in terms of pseudo component
Specific viscosity	Quadratic	<0.0001	0.1A+ 0.34B+ 0.17C+ 0.98AB+ 1.35AC+ 0.042BC
Color	L Quadratic	0.0007	8.87A+ 5.47B+ 4.86C-7.70AB-11.61AC+ 2.13BC
	a Quadratic	0.0034	-2.19A-2.30B-3.44C-0.57AB+ 5.87AC+ 7.06BC
	b Quadratic	0.0039	-1.78A+ 18.75B+ 36.08C+ 40.01AB+ 28.49AC-61.95BC
Antiradical activity	Quadratic	0.0242	90.79A+ 84.57B+ 103.68C+ 11.02AB-43.58AC-25.13BC
Preference	Linear	<0.0001	4.22A+ 4.88B+ 3.23C

A, extract from Injin; B, extract from Omija; C, hydrolysate from Oyster.

각 성분들이 specific viscosity, 색도, antiradical activity, 관능에 미치는 영향을 나타낸 trace plot은 Fig 1-3에 나타내었다. Trace plot에서 보여주는 기

울기도 canonical model에서 나타낸 기여도와 같이, 성분들이 각 반응에 미치는 영향을 보여 준다 (Han and Kim, 2003). Fig 1의 specific 점도의 trace plot의 경우 굴 가수분해물(C-C선)의 함량에 따라 specific 점도의 증감의 변화를 보여주었으며, O 추출물(B-B선)과 굴 가수분해물(C-C선)의 함량이 증가할수록 specific viscosity는 감소하였다. 적색도는 I(A-A선)과 O 추출물(B-B선)의 함량이 증가 할수록 감소하고 있다 (Fig 1). 이것은 붉은 색을 띄는 I와 O의 함량이 감소함에 따라 녹색을 띄는 굴 가수분해물의 색이 발현되었기 때문으로 추측할 수 있다.

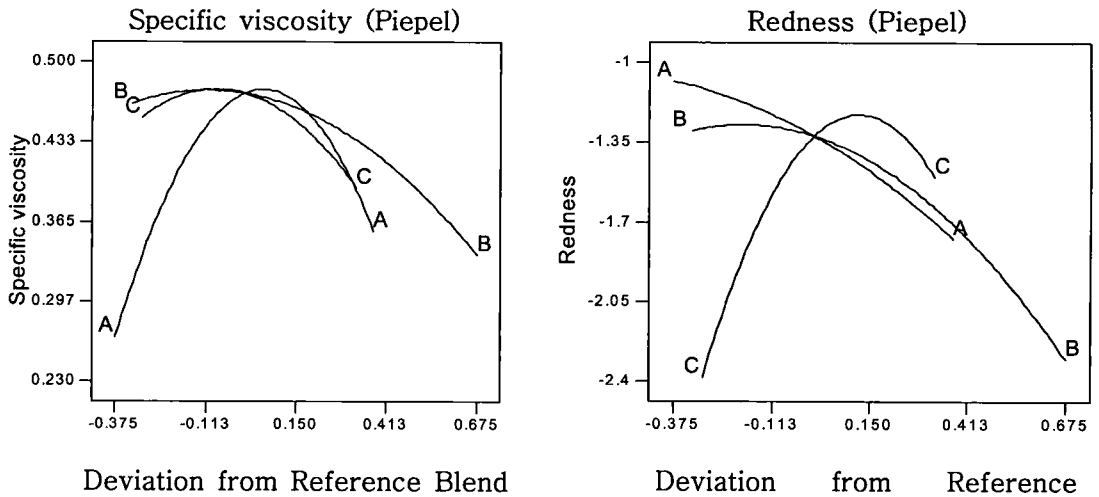


Fig 1. Trace plot describing the effects of hydrolysate from Oyster, I and O extracts on specific viscosity and redness.

A, I extract; B, O extract; C, hydrolysate from oyster.

각 성분은 lightness와 yellowness에도 복합적으로 영향을 미치고 있다 (Fig 2). O 추출물(B-B선)의 함량이 증가하면 lightness는 증가하나, yellowness는 감소하고 있다. 반면, 굴 가수분해물(C-C선)은 함량이 증가하면 lightness는 감소하고, yellowness는 증가하고 있다. 이러한 현상은 세 성분이 복합적인 상호 작용에 의해 발생하고 있으며, 특히 specific viscosity의 경우



세 성분이 복합적으로 작용하는 현상이 두드러지게 나타났다.

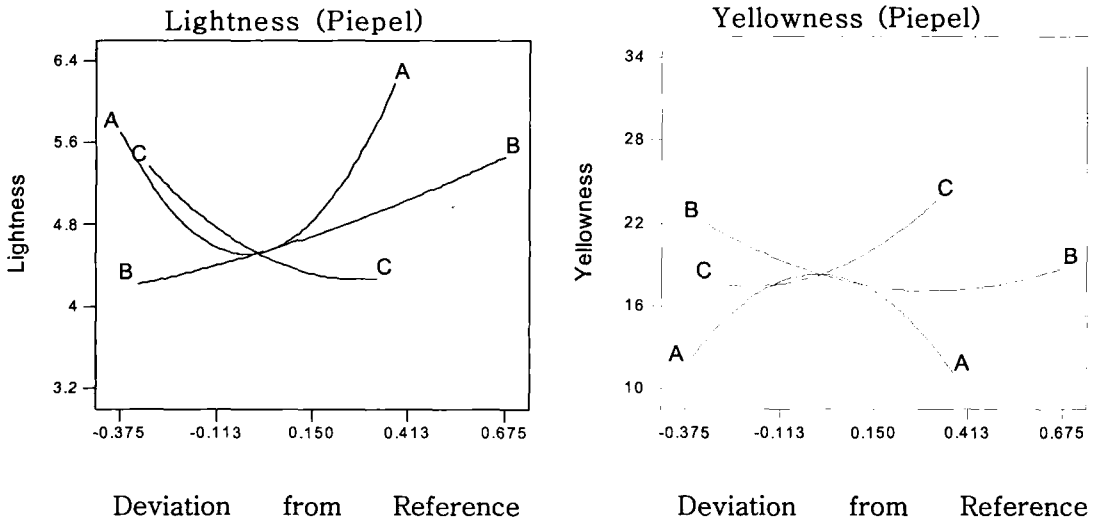


Fig 2. Trace plot describing the effects of hydrolysate from oyster, I and O extract on lightness and yellowness.

A, I extract; B, O extract; C, hydrolysate from oyster.

자유 radical 자유 radical 소거능 역시 세 성분이 복합적으로 작용하는 것으로 나타났다 (Fig 3). 특히 I 추출물(A-A선)과 굴 가수분해물(C-C선)은 자유 radical 소거능에 미치는 영향이 O 추출물(B-B선)에 비해 더 큰 것으로 나타났다. I와 O오미자 추출물, 굴 가수분해물 각각은 독립적으로 자유 radical 소거능을 갖고 있으나, 음료 제조를 위해 혼합하였을 때, 세 성분간 상호작용에 의해 Fig 3 과 같은 결과가 나왔으리라 생각되며, 성분간 상호작용의 구체적 효과는 추후 연구해 볼 필요성이 있다.

이러한 결과 specific viscosity, lightness, redness, yellowness, antiradical activity는 비선형모델(nonlinear model)을 통해 성분간 상호작용 효과를 확인할 수 있었다.

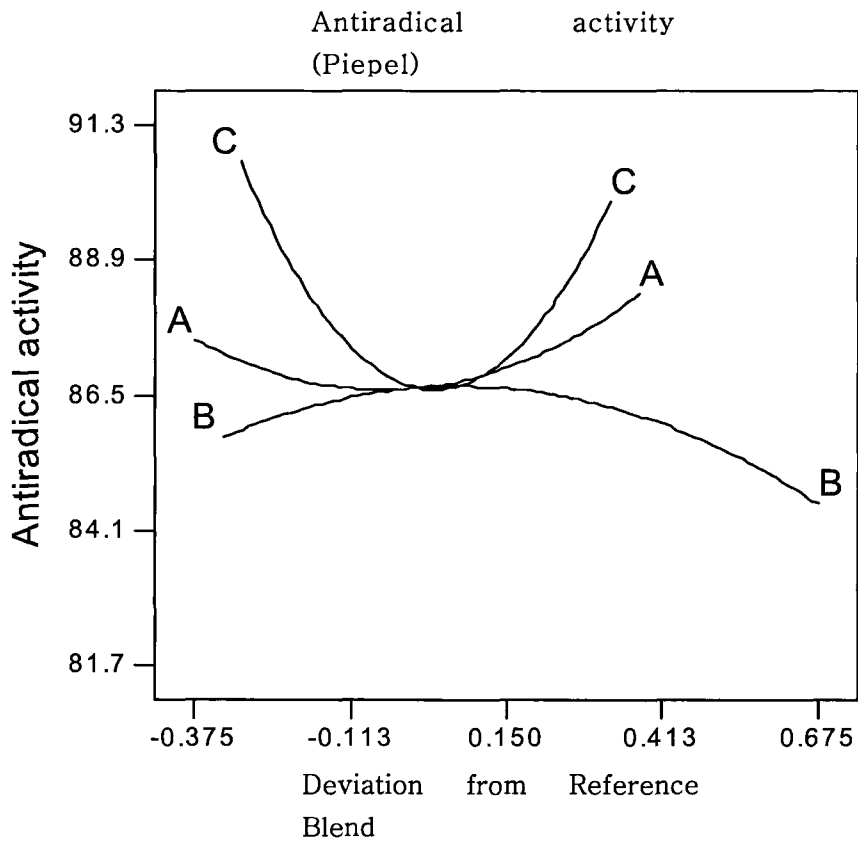


Fig 3. Trace plot describing the effects of hydrolysate from oyster, I and O extracts on antiradical activity.  
A, I extract; B, O extract; C, hydrolysate from oyster.

이와는 반대로, 선호도의 경우 성분들의 상호작용 없이 굴 가수분해물, I 추출물, O 추출물이 각각 독립적으로 작용하였다. 각 성분의 작용 효과는 Fig 4 에 나타내었다.

I(A-A선)의 함량이 증가할수록 관능평가에 의한 선호도는 증가하였고, O(B-B선) 역시 함량이 증가할수록 선호도는 증가하였다. 반면, 굴 가수분해물 (C-C선)은 함량이 증가할수록 선호도는 급격히 감소하였다. 이것은 O의 새콤한 맛과 I의 청량한 향이 굴 가수분해물의 비린 맛을 가려 I 추출물과 O 추출물의 함량이 증가할수록 선호도가 증가한 것으로 예상된다.

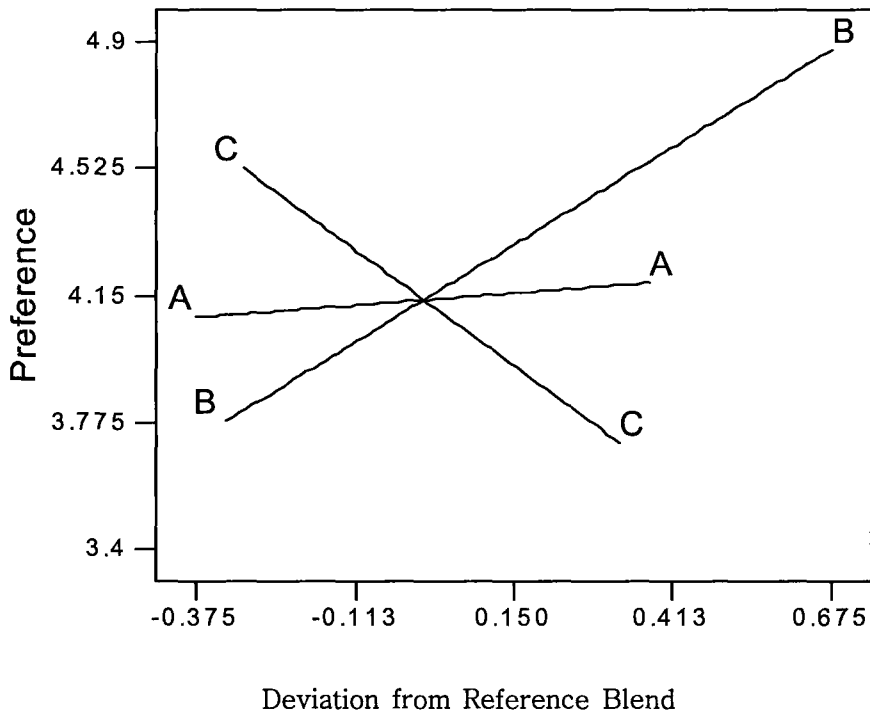


Fig 4. Trace plot describing the effects of hydrolysate from Oyster, I and O extracts on preference.

A, I extract; B, O extract; C, hydrolysate from oyster.

### Optimization of mixture

음료의 배합 최적화 방법은 Derringer와 Suich (1980)의 방법을 바탕으로 하여 선정하였다. 우선 canonical 계수를 이용하여 목적 성분을 I 추출물, O 추출물, 꿀 가수분해물로 하고, 원하고자 하는 반응은 antiradical activity와 선호도로 결정하였다. 목적 범위로는 antiradical activity와 선호도 모두 최대 (maximize)로 예측하였다. 이것을 만족하는 수치점(numerical point)을 예측한 결과 I 추출물 3.831%, O 추출물 8.169%, 꿀 가수분해물 3% 이었고, 이 혼합비에 대한 예측 반응치는 antiradical activity가 90.677%, 선호도는 4.522로 계산되었다 (Table 4).

Table 4. Optimum constraint values using numerical optimization method.

Constraints name	Goal	Numerical optimization solution
I extract	is in range	3.831%
O extract	is in range	8.169%
Oyster hydrolysate	is in range	3.000%
DPPH Antiradical activity	maximize	90.677%
Preference	maximize	4.522%

이러한 최적화 방법은 Fig 5.의 그래프로도 이해할 수 있다. 이 그래프는 각 성분과 반응에 대한 모형을 이용하여 그래프의 중첩되는 범위를 나타내는데, 그 최적화 정도의 척도로 desirability를 사용한다. 최대의 desirability는 반복 연산도중 계산되어, 여러 결과들 사이에 최적화되어진 한 값에 수렴하며 이 값은 Fig 5.의 0.849의 값을 나타낸다. 이 값에 해당하는 성분비 및 예측되는 반응치는 Table 4.에 나타내었다.

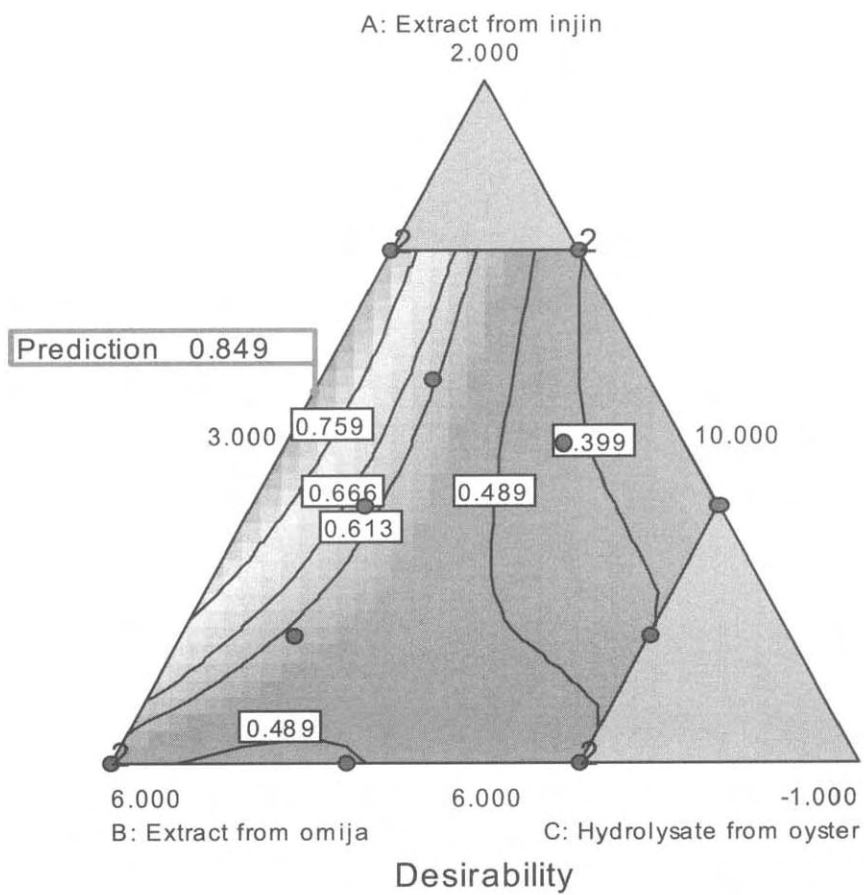


Fig 5. Contour plot of desirability of the optimum result.

## 요약

굴 가수분해물질을 이용하고자 인진 및 오미자 추출물을 혼합하였고, 통계적 모델링과 분석을 통하여 혼합비에 따른 액상의 음료의 최적화를 이루었다. 수학적인 canonical model과 trace plot을 이용하여 액상음료의 중요한 요소로 작용하는 antiradical activity와 관능평가는 각 성분들이 독립적으로 작용하는 선형모델화를 보여주었다. 그 외 색도와 점도는 상호간의 작용을 일으키면서 반응에 기여하는 것을 보여주었다. 굴 가수분해물질 및 한약 추출물들을 이용하여 최적의 액상의 음료 배합비를 결정하기위해, 각 반응의 canonical 계수를 이용하여 수적 최적화를 한 결과, 굴 가수분해물질 3 %, I 추출물 3.83 %, O 추출물 8.17 %로 나타났고 추후 최적화된 제품을 이용하여 항산화성과 같은 기능성 여부를 계속할 예정이다.

## 참고문헌

- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Burda S, Oleszek WJ. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Agric Food Chem.* 49: 2774-2779.
- Cornell J.A. 1990. Experiments with mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture data. John Wiley & Sons, New York, USA. p 1-8.
- Derringer G, Suich R. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *J Quality Technol* 12, 214-219.
- Ellkær M.R., Næs T., Baardseth P. 1996. Milk proteins affect yield and sensory quality of cooked sausages. *J. Food Sci.* 61: 660-666
- Han, G.H. Kim, B.Y. 2003. Analysis of optimal mixture ratio for extrudate of the soymilk residue and corn grits by mixture design. *Korean J Food Sci Technol* 35: 617-622.
- Han GH, Kim BY, Lee JK. 2002. Production of extrudates formulated from pacific sand lance sauce by-product and biji. *Korean J. Food Sci Technol* 34: 186-193.
- Næs T, Bjerke F, Færgestad EM. 1999. A comparison of design and analysis techniques for mixtures. *Food Qual Prefer* 10: 209-217.
- Saguy I, Mishkin MA, Karel M. 1984. Optimization methods and available software. Part 1. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 20: 275-299.
- Yoon WB, Kim BY, Hahm YT. 1997. Study upon the rheological properties and optimization of tofu bean products. *J. Korean Agric Chem Soc* 40: 225-231
- Yoon WB, Park JW, Kim BY. 1997. Surimi-starch interactions based on mixture design and regression models. *J Food Sci* 62: 555-560.
- 장영부. 2007. 굴 가수분해물의 기능 특성 및 식품에의 응용. 부경대학교 대학원.

# 제 5 장 유용균주로부터 생리활성물질 대량 생산 및 활용

## 제 1 절 해양유래의 유용균주의 탐색

서론

Protease는 동물, 식물 및 미생물계에 광범위하게 분포되어 있으며, 모든 생체기능에 직·간접적으로 관여한다. 그러나 이상 환경에 의해 다양한 질병 발발 과정에 관여하며 생명현상과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 이러한 protease에 대해 억제 또는 방어역할을 하는 것이 protease inhibitor이다.

Protease inhibitor는 serine, cystein, aspartic, metallo inhibitor 등으로 분류되어지며, 동·식물과 미생물에 의해 생산되고 있다(1,2).

Animal inhibitor는 간, 혈관 내피세포, 태반 등에서 합성되며 일부는 혈액 응고, 면역 체계에 관여하며, 일부는 조직염증을 제어하는 생체 방어반응에 관여한다(3,4). Plant에서는 미생물 및 곤충 등의 외적으로부터 종자방어, 내재성 protease의 조절과 보호작용, 소화기관 내에서 종자 보호 등 여러 기능을 갖고 있다(5,6). Microbial inhibitor는 방선균종 *Streptomyces* 속에서 많이 발견되어지고 있으며 분자량이 적고, 열과 산에 비교적 안정한 물질이다(7,8).

더욱이 이들 Protease inhibitor는 약리학, 식품, 농업에 활용 가능할 뿐만 아니라 단백질 구조의 연구와 반응기작에 대해서 연구할 수 있다(9,10). 특히, 특이적이고 선택적 protease inhibitor는 소염작용, 항종양작용, 변이유발저지, 복수저류저지, 발암 및 암 전이 저지, 폐기종, 관절염, 췌장염, 고지혈증, 고혈압, AIDS와 같은 인체 질병발병 과정에 관여하는 단백질 분해효소들을 불활성화 시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(11). 특히, 수산식품의 맛살류의 경우 제품의 원료인 어류의 근육조직의 연화와 파괴, 제품의 겔(gel)화를 위한 가열공정 동안 단백질이 분해되어 독특한 조직감을 구성하는 gel 구조가 파괴되는 것을 방지하여 제품의 유통기간 연장 및 품질을 향상시켜준다(12,13).

현재 알려져 있는 천연 단백질 분해효소 저해제는 달걀흰자, 소혈장, 감자전분 등에서 분리한 것이 있으나, 소혈장 유래 단백질 분해효소 저해제는 광우병 문제로 사용이 금지되었으며 아직까지 수·해양에서 분리한 것은 많지 않



은 실정이다(14-16). 따라서, 본 연구에서는 새로운 protease inhibitor의 개발이 점차로 정체되는 경향을 나타냄에 따라 육상 생태계가 아닌 해양자원 중 미생물에서 protease inhibitor에 대한 저해활성 물질을 생산하는 균주를 탐색하여 분리·동정하여 최적생산조건을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

효소들은 subtilisin (Fluka, Switzerland), trypsin, α-chymotrypsin, aminopeptidase, collagenase (Sigma, USA)와 protease K (Promega, USA)를 사용하였고, 저해제 반응에 사용된 발색시약은 ninhydrin (Lancaster, England)을 사용하였으며, 그 외 사용된 모든 시약은 특급 혹은 분석용 시약을 사용하였다.

### 균주분리 및 배양

우리나라의 남해안에서 채집한 해수, 해조류 및 갯벌을 protease inhibitor를 생산하는 방선균의 분리시료로 사용하였다. 채집한 각종시료는 멸균된 해수에 희석하여 항생물질이 첨가된 방선균 및 해양 미생물 선택배지(starch-casein nitrate, humic acid-vitamin, M1, arginin-glyceol medium)에 100 μl를 도말하여 27°C, 4~6주 동안 배양하여 나타난 colony를 순수분리 하였다.(Table 1).

액체배양 기본배지로는 Bennet's 배지(Glucose 10.0 g, Peptone 1.0 g, Yeast extract 1.0 g, Beef extract 1.0 g, pH 7.5)에 증류수 1 l당 NaCl 23.0 g, KCl 0.7 g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10.6 g, CaCl<sub>2</sub> 1.1 g, NaSO<sub>4</sub> 3.9 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 g, Tris-HCl 6.05 g, pH 7.8의 인공해수를 첨가하여 사용하였다. 전배양은 25°C, 3일 동안 진탕배양 하였으며, 본배양은 전배양액 1.0% (v/v)를 접종하여 25°C, shaking incubator 에서 180 rpm으로 4일 동안 진탕배양 하였다.

Table 1. Composition of actinomyces selective medium.

Medium	Composition (artificial sea water per liter)
Starch-casein nitrate medium	Starch 10.0 g, casein 0.3 g, NaCl 2.0 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.0 g, KNO <sub>3</sub> 2.0 g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05 g, CaCO <sub>3</sub> 0.02 g, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.01 g, Cyclohexamide 50 mg, Refampicin 5.0 mg, 1 M Tris-HCl buffer 20 ml, agar 18.0 g, pH 7.5
Humic acid-vitamin medium	Humic acid 1.0 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5 g, KCl 1.7 g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05 g, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.01 g, CaCO <sub>3</sub> 0.02 g, B-vitamins: thiamine HCl, riboflavin, niacin, pyridoxine HCl, inositol, Ca-pantothenate, PABA; 0.5 mg, biotin 0.25 mg, Trace salts: FeSO <sub>4</sub> 10.0 mg, CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 1.0 mg, ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1.0 mg, MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1.0 mg, antibiotics: actidin 50 mg, nystatin 50 mg, polymixin B 4.0 mg, penicillin 0.8 mg, Cyclohexamide 50.0 mg, Refampicin 5.0 mg, 1.0 M Tris-HCl buffer 20.0 ml, agar 18.0 g, pH 7.5
M1 medium	Starch 10.0 g, Yeast extract 4.0 g, Peptone 2.0 g, Refampicin 5.0 mg, Cyclohexamide 50.0 mg, 1.0 M Tris-HCl buffer 20.0 ml, Agar 18.0 g, pH 7.5
Arginin-glyceol medium	Arginine 1.0 g, Glycerol 12.5 ml, ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.0005 g, MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O 0.0005 g, CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0.0005 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5 g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.25 g, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.005 g, cyclohexamide 50.0 mg, Refampicin 5.0 mg, 1.0 M Tris-HCl buffer 20.0 ml, agar 18.0 g, pH 7.5

### 분리균주의 일차동정

분리 선별한 균의 1차 동정은 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을 조사하였으며, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 분류 방법에 따

라 분석하였다(17). 또한 수행한 분석결과를 BLASTN의 data와 비교하여 동정하였으며, 분리균의 형태는 SEM (HITACHI S-2400, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

### 16S rDNA의 PCR 증폭

16S rDNA 분석은 Wizard Genomic DNA Prep. kit (Promega)을 사용하여 chromosomal DNA를 분리하였으며 2개의 보편적인 primer를 사용하는 PCR를 이용하여 16S rDNA를 증폭시켰다. 합성된 oligonucleotides의 각각의 primer는 forward prime (27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', reverse primer (1492R): 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'의 염기서열로 구성되었다. 각각의 0.5  $\mu$ M primer, 200  $\mu$ M deoxynucleoside triphosphate, 10X PCR buffer 10  $\mu$ l, 그리고 EF-Taq polymerase (2.5 unit)를 0.3  $\mu$ l를 사용하여 PCR를 수행하였다.

PCR 반응조건으로 30 cycles (95 $^{\circ}$ C에서 20 sec, 50 $^{\circ}$ C에서 40 sec, 72 $^{\circ}$ C에서 90 sec)동안 계속적으로 증폭하였으며, 72 $^{\circ}$ C에서 3 min 동안 신장시켰다. PCR 산물을 Wizard SV Gel과 PCR Clean-Up System (Promega)을 사용하여 추출하였다. Big Dye Terminator Cycle Sequence kit (Applied Biosystems)와 automatic DNA sequence (Applied Biosystems)를 사용하여 PCR product의 염기 서열 분석을 수행하였다.

### 종족 계통적 분석

염기서열 분석을 통하여 얻어진 분리균주의 부분 염기서열은 Blast network service를 이용하여 GenBank에 등록된 다른 균주의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 각 염기서열의 alignment는 Clustal X software를 사용하여 배열하였다. 계통도는 neighbor-joining 방법을 사용하여 설계하였다(18).

### 효소 저해활성 측정

protease inhibitor 측정은 ninhydrin법(19)을 변형시켜 사용하였다. 즉 50 mM Tris-HCl buffer 50  $\mu$ l에 10  $\mu$ l subtilisin (0.1 mg/ml)과 증류수에 3배 희석된 배양 상층액 10  $\mu$ l용액을 37 $^{\circ}$ C에서 20 min간 전처리한 후 중탕가열한

0.2% (w/v)의 gelatin이 포함된 기질용액 0.5 ml(50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)과 37°C에서 30 min간 반응시켰다. 효소 반응을 정지시키기 위해 10.0% (w/v) trichloroacetic acid(TCA) 0.1 ml를 첨가한 후, ninhydrin 용액 0.5 ml을 혼합하여 100°C, 10 min간 끓인 후, ice-water에서 냉각시킨다. 가수 분해 되지 않은 단백질을 침전시키기 위해 50.0% 1-propanol을 가하여 15 min간 방치한 후, 10,000 rpm에서 10 min간 원심분리 후 570 nm에서 측정하였다. 저해율(%)은 저해제를 첨가한 것의 반응전(A)과 반응후(B)의 흡광도, 저해제를 첨가하지 않은 것의 반응전(C)과 반응후(D)의 흡광도로부터 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(D-C)-(B-A)}{(D-C)} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 저해제 생산 균주의 분리

우리나라의 남해 연안해역에서 해수, 해조류 및 갯벌을 채집하여 protease inhibitor 분리시료로 사용하였다. 채집한 각종 시료는 방선균 및 해양미생물 선택배지를 이용하여 27°C, 4~6주 동안 정지배양 시켜 방선균을 분리한 후 Bennet's 배지에서 protease inhibitor하는 9균주를 plate assay 방법으로 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주들은 배양 상층액으로 paper disk를 이용하여 clear zone 크기로 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주 중 ninhydrin 방법으로 subtilisin에 대한 저해율이 가장 높게 나타난 균주 C12를 최종적으로 선별하였다(Fig. 1).

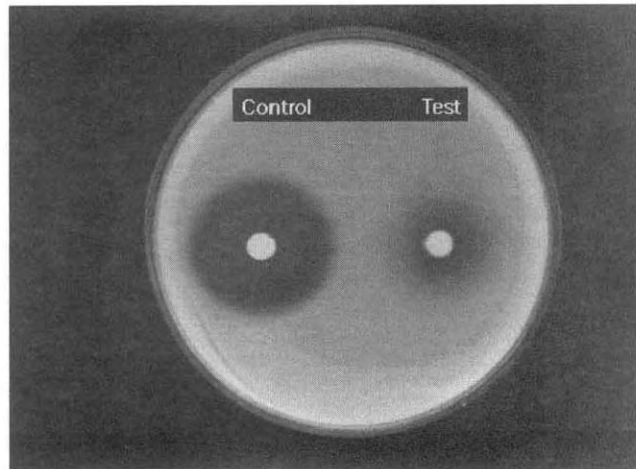


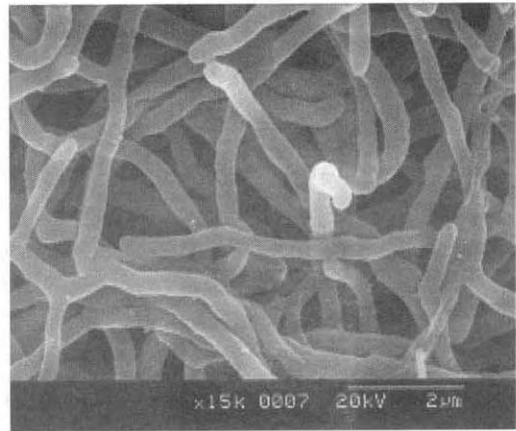
Fig. 1. Plate assay for protease inhibitor produced by the *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

#### 분리균주의 일차동정

Fig. 2(B)와 같이 전자현미경으로 관찰한 결과 긴 원주모양의 형태를 보였다. 배양과정 중 ISP 9 배지를 제외한 모든 배지에서 성장하였으며, 비확산성의 색소를 생산하지 않음을 확인하였다. 포자의 색깔은 배지조건에 따라 하얀색에서 회색의 빛깔을 띠었으며 갈색빛을 띠는 포자가 드물게 관찰되었다(Table 2). 최종 선별된 균주 C12는 운동성이 없고, 그람양성에 포자를 형성, 표면은 smooth type이다. 방선균의 경우 agar plate에 구슬모양의 colony를 형성하였으며 9.0%의 NaCl 및 50°C까지 성장하였다. 분리균주 C12의 당 이용성을 조사한 결과 glucose, maltose, lactose, fructose, mannose는 잘 이용하였지만, sorbitol는 이용하지 않았다. Catalase는 가지고 있으며, citrate를 활용, starch, gelatin 및 casein을 가수분해하는 것으로 조사되었다(Table 3~5).



(A)



(B)

Fig. 2. Light micrograph(A) and scanning electron morphology(B) of *Streptomyces thermocarboxdus* C12.

Table 2. Cultural characteristics of strain C12.

Medium	Growth	Spore mass color	R.S.C*	S.P**
ISP 1 agar	good	gray	green	none
ISP 2 agar	good	white	yellow	none
ISP 4 agar	moderate	gray	gray	none
ISP 9 agar	ND <sup>a</sup>	none	none	none
Starch-glyceol agar	good	gray	brown	none
Starch-casein nitrate agar	moderate	white	yellow	none
Nutrient agar	good	pale yellow	pale yellow	none
Bennet's	good	gray	dark brown	none

\* Reverse side color, \*\* soluble pigment, NDa : no detect

Table 3. Morphological characteristics of strain C12.

Characteristics	Isolated strain	<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)
Spore morphology	Cylindrical spore	Arthrospore
Spore surface	Smooth	Smooth
Fragmentation of substrate mycelium	-	-
Spore mobility	Immotile	Immotile
Arthrospores in verticals	-	-
Growth temperature	15 ~ 50°C	10 ~ 42°C

+ : positive, - : negative

Table 4. Physiological characteristics of strain C12.

Contents	Characteristic
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Casein hydrolysis	+
Melanin pigment	-
Gram staining	+
Growth in 9% NaCl	+
Catalase	+
Utilization of citrate	-

Table 5. Utilization of carbon compounds by strain C12.

Characteristic	C12
Glucose	+
Galactose	+
Maltose	+
Arabinose	+
Mannitol	+
Lactose	+
Sorbitol	-
Fructose	+
Starch	+
Mannose	+
Sucrose	-

+ ; utilized, - ; Not utilized

The growth was checked after 10 days culture at 27°C.

### 16S rDNA 염기서열 분석 및 계통도 분류

분리균주의 보다 정확한 동정을 위하여 16S rDNA sequence를 분석을 실시하였다. 실험균주의 genomic DNA를 추출하여 16S rDNA 유전자 primers를 이용하여 PCR을 수행하였다. 16S rDNA 부분 염기서열을 NCBI GenBank에 등록된 유사 균주와 비교분석하여 유전자간 상관성을 비교한 결과 *Streptomyces* sp. EF-2 (AF112165), *Streptomyces thermocarboxydus* (U94490), (AB098079)와 유사하였다. Neighbor- jointing 방법을 사용하여 계통도를 작성한 결과 Fig. 3의 phylogenetic tree에서와 같이 분리균주 C12는 *Streptomyces thermocarboxydus* (AB098079)와 99.0% 일치하는 것으로 보였다(20). 따라서 본 균주를 *Streptomyces thermocarboxydus*로 동정하였으며, C12로 명명하였다.



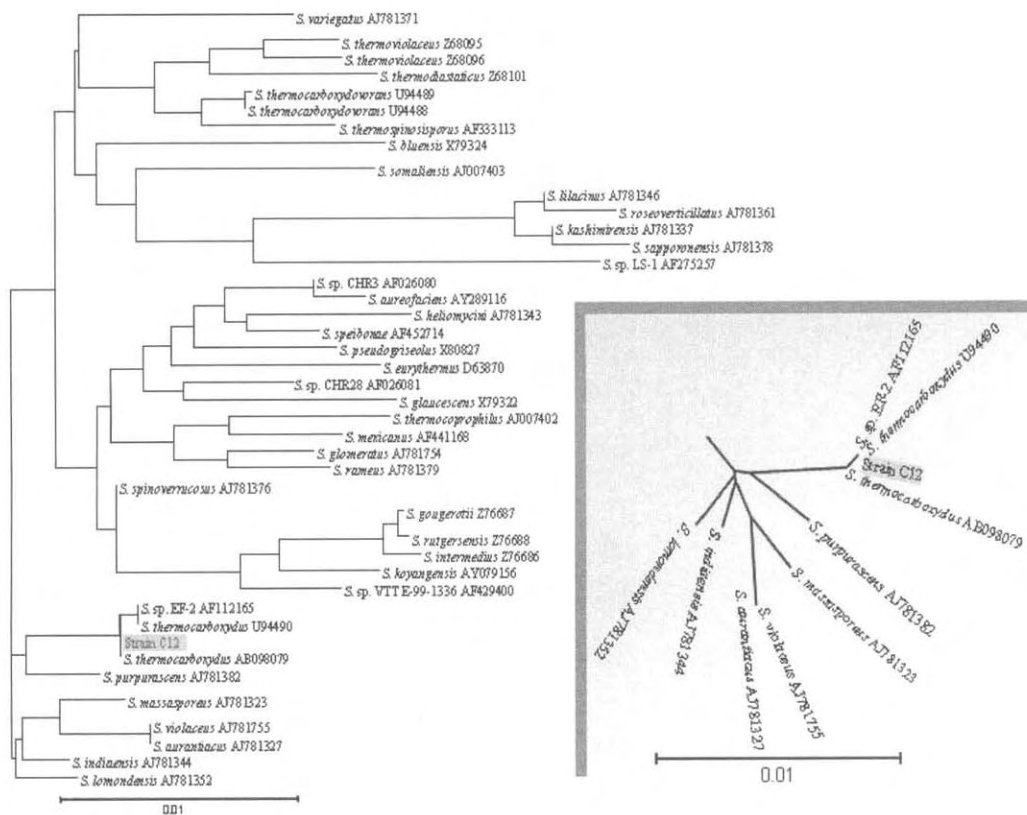


Fig. 3. Neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences of 42 Streptomyces strains.

## 요약

해안 빨에서 protease inhibitor를 생산하는 해양방선균을 분리한 후 저해력이 가장 우수한 균주 C12을 최종 선별하였다. 최종 선별된 균주 C12의 보다 정확한 동정을 위하여 16S rDNA로 동정한 결과 *Streptomyces thermocarboxydus* C12로 동정하였다. 배양학적, 형태학적, 생리학적 형태로서는 전자현미경에서 긴 원주모양의 형태를 보였으며, 배양과정 중 ISP 9 배지를 제외한 모든 배지에서 성장하였다. 또한, 운동성이 없으며, 그람양성에 포자를 형성, 표면은 smooth type이다. Catalase 양성반응, starch, gelatin 및 casein에 대해서 분해한 것을 확인되었으며, 9.0%의 NaCl 및 50°C까지 성장하였다.

## 참고문헌

1. Kenney AJ. 1999. Nomenclature and classes of peptidase. In: Proteolytic Enzyme. Sterchi, E.E. and W. Stocker eds. Springer Lab Manual, New York, p. 1-8.
2. Umezawa H. 1972. Enzyme inhibitors of microbial origin, University of Tokyo Press, Tokyo. p. 1-114.
3. Barrett AJ, Salvesen G. 1986. Protinase inhibitors, Elsevier Science Publishers B. V. p. 3-18.
4. Travis J, Salvesen GS. 1983. Human plasma protease inhibitors. *Ann Rev Biochem* 52: 655-709.
5. Orr GL, Strickland JA, Walsh TA. 1994. Inhibition of diabrotica larval growth by a multicystatin from potato tubers. *J Insect Physiol* 40: 893-900.
6. Ryan CA. 1990. Protease inhibitors in plants : genes for improving defenses against insects and pathogens. 28: 425-449.
7. Pandhare J, Zog K, Deshpande VV. 2002. Differential stability of alkaline protease inhibitors from actinomyces: effect of various additives on thermostability *Bioresour Technol* 84: 165-169.
8. Kato JY, Hirano S, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2005. The Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI) gene in Streptomyces coelicolor A3(2). *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 1624-1629.
9. Bode W, Huber R. 1992. Natural protein protease inhibitors and their interaction with proteases. *Eur J Biochem* 204: 433-451.
10. Terashita T, Kono M, Murao S. 1980. Promoting effect of S-PI on fruiting of *Lentinus edodes*. *Trans Mycol Soc Jpn* 21: 137-140.
11. Demuth HU. 1990. Recent developments in inhibiting cysteine and serine proteases. *J Enzyme Inhibition* 3: 249-278.
12. An H, Peters MY, Seymour TA. 1996. Roles of endogenous enzymes in surimi gelation. *J Food Sci* 7: 321-326.
13. Saeki H, Iseya Z, Sugiura S, Seki N. 1995. Gel forming characteristics of frozen surimi from Chum salmon in the presence inhibitors. *J Food*

Sci 60: 917-922.

14. Weerasinghe VC, Morrissey MT, An H. 1996. Characterization of active components in food grade proteinase inhibitor for surimi manufacture. *J Food Chem* 44: 2584-2590.
15. Ustadi K, Kim KY, Kim SM. 2005. Characteristics of protease inhibitor purified from the eggs of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *J Kor Fish Soc* 38: 83-88.
16. Yamashita M, Konagaya S. 1991. Cysteine protease inhibitor in egg of Chum salmon. *J Biochem* 110: 762-766.
17. Kreig NR, Holt JG. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. IV, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
18. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
19. Moore S, Stein WH. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J Biol Chem* 176: 367-388.
20. Miyairi K, Ogasawara A, Tonouchi A, Hosaka K, Kudou M, Okuno T. 2004. Low-molecular-weight pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*. *J Appl Glycosci* 51: 1-7.

## 제 2 절 탐색 균주의 생물활성 및 생리활성물질 생산의 최적조건 검토

서론

protease는 동물, 식물 및 미생물계에 광범위하게 분포되어 있으며, 모든 생체기능에 직·간접적으로 관여한다. 그러나 이상 환경에 의해 비정상적으로 발현된 protease는 염증, virus 감염, 암세포의 전이 등의 다양한 질병 병발과정에 관여하며 생명현상과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 이러한 protease에 대해 억제 또는 방어역할을 하는 것이 protease inhibitor이다.

지금까지 protease에 대한 inhibitor의 연구는 육상의 동·식물 및 미생물에 대하여 행하여 왔으며(1), 이 중 미생물의 protease inhibitor 중에서 가장 활발히 연구되고 있는 actinomyces류가 생성하는 inhibitor는 Aoyagi 등(2)이 trypsin, plasmin 등을 inhibitor하는 leupeptin을, Umezawa 등(3,4)이 Streptomyces mauvecolor로 부터 trypsin, papain, cathepsin A, B, chymotrypsin의 inhibitor인 antipain 및 chymostatin을 보고하였다. Kunimoto 등(5)은 pepsin과 renin을 inhibitor하는 pepstatin을, Murao와 Sato는 Streptomyces속에서 단백질성 protease inhibitor인 Streptomyces subtilisin inhibitor(SSI)를 분리하였다(6). 이와 같이 미생물 대표산물에서 발견된 protease inhibitor는 동·식물에서 얻은 inhibitor와는 크게 다르며 이들 효소 inhibitor는 효소의 반응 mechanism 해명에 유용할 뿐만 아니라 물질 정제 시에 일어나는 효소적 분해방지용, 식품공정상에서 불필요한 protease의 활성을 억제 및 식품원료에 자유 amino acid의 작용을 감소시킬 수 있다(7-9).

특히, 특이적이고 선택적 protease inhibitor는 변이유발저지, 암 전이 저지, 폐기종 및 췌장염과 같은 인체 질병발병과정에 관여하는 단백질 분해효소들을 불활성화 시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(10).

따라서, 본 연구에서는 산업적으로 경제성이 높은 protease inhibitor를 생산하기 위해 균주를 자연계로부터 새로 탐색하거나 혹은 protease inhibitor 생산균주의 product 향상을 위해 최적화하는 등의 접근방법을 사용해왔다. 따라서, 본 연구는 토양이 아닌 해양미생물이 생산하는 protease inhibitor의 생산성에 미치는 환경 및 영양인자를 최적화하였기에 이에 보고하고자한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

효소들은 subtilisin (Fluka, Switzerland), trypsin, α-chymotrypsin, amino peptidase, collagenase (Sigma, USA)와 protease K (Promega, USA)를 사용하였고, 기질은 gelatine (Yakuri, JAPAN)을 사용하였다. 저해제 반응에 사용된 발색시약은 ninhydrin (Lancaster, England)을 사용하였으며, 그 외 사용된 모든 시약은 특급 혹은 분석용 시약을 사용하였다.

### 균주사용

균주는 분리·동정된 *Streptomyces thermocarboxydus* C12를 사용하였다. 이 균주는 액체배양한 후 glycerol을 첨가하여 -70℃에 동결보존 한 것을 본 실험에 사용하였다.

### 배지조성 및 배양방법

균주의 분리 및 배양을 위한 배지조성으로는 Bennet's 배지(Glucose 10.0 g, Peptone 1.0 g, Yeast extract 1.0 g, Beef extract 1.0 g, pH 7.5)에 증류수 1 l 당 NaCl 23.0 g, KCl 0.7 g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10.6 g, CaCl<sub>2</sub> 1.1 g, NaSO<sub>4</sub> 3.9 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 g, Tris-HCl 6.05 g, pH 7.8의 인공해수를 첨가하여 기본배지로 사용하였다. 평판배지에서 얻어진 각종 분리균주를 액체배지 20 ml를 함유한 전배양에 접종하여 25℃, 3일 동안 진탕배양하였다. 그 후 본배양 액체배지 50 ml에 전배양액 1.0% (v/v)를 접종하여 25℃, shaking incubator 에서 180 rpm으로 4일 동안 진탕배양 하였다.

### 균체량 측정

균 생육도는 배양액의 상층액을 원심분리하여 제거한 후 증류수로 2회 세척한 다음 100℃에서 dry oven으로 건조시켜 dry cell weight(D.C.W)로 측정하였다.

### 단백질 정량

단백질 농도는 Lowry법(11)을 이용하였다. Bovine serum albumin (Sigma chem Co.)를 표준시료로 하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 효소 저해활성 측정

protease inhibitor 측정은 ninhydrin법(12)을 변형시켜 사용하였다. 즉 50 mM Tris-HCl buffer 50  $\mu$ l에 10  $\mu$ l subtilisin (0.1 mg/ml)과 증류수에 3배 희석된 배양 상층액 10  $\mu$ l용액을 37°C에서 20 min간 전처리한 후 중탕가열한 0.2% (w/v)의 gelatin이 포함된 기질용액 0.5 ml(50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)과 37°C에서 30 min간 반응시켰다. 효소 반응을 정지시키기 위해 10.0% (w/v) trichloroacetic acid(TCA) 0.1 ml를 첨가한 후, ninhydrin 용액 0.5 ml을 혼합하여 100°C, 10 min간 끓인 후, ice-water에서 냉각시킨다. 가수 분해 되지 않은 단백질을 침전시키기 위해 50.0% 1-propanol을 가하여 15 min간 방치한 후, 10,000 rpm에서 10 min간 원심분리하여 570 nm에서 측정하였다. 저해율(%)은 저해제를 첨가한 것의 반응전(A)과 반응후(B)의 흡광도, 저해제를 첨가하지 않은 것의 반응전(C)과 반응후(D)의 흡광도로부터 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(D-C)-(B-A)}{(D-C)} \times 100$$

### 저해제 생산을 위한 최적배양조건 검토

해양에서 분리한 *Streptomyces thermocarboxydus* C12의 protease inhibitor 물질 생산을 위한 최적배양조건은 온도, pH, 탄소원, 질소원, NaCl, metal salts 순으로 실행하였다. 균 생육도는 배양액의 상층액을 원심분리하여 제거한 후 증류수로 2회 세척한 다음 100°C에서 dry oven에서 건조시켜 dry cell weight(D.C.W)로 측정하였다. 배양온도는 기본배지에서 10~60°C까지 10°C 간격으로 배양하여 저해활성을 조사하였다. 배양초기 pH는 활성이 높은 온도를 기준으로 pH 3~10까지 달리하여 저해활성을 조사하였다. 탄소원은 저해활성이 높게 나타난 온도, 초기 pH에서 기본배지에 첨가된 glucose를 제외하고, 각종 탄소원 1.0% (w/v)를 첨가하여 배양한 후 저해활성이 높은 탄소원을 선택하였다. 선택된 탄소원은 농도별로 첨가하여 활성을 검토하였다. 질소원은 선택된 탄소원을 첨가한 다음 기본배지의 질소원을 제거하고 각종 유·무기질소원을 0.5% (w/v)씩 첨가하여 배양한 후 활성을 검토하였다. 금속염의 영향은 여러 금속염을 1.0 mM씩 첨가하여 저해활성을 검토하였다. 그리고 저해물질의 최대생산 시기는 정해진 최적배양조건하에서 배양하여 시간별로 활성을 측정함으로써 배양 최적시간을 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### 배양온도의 영향

배양온도는 저해물질 생산에 질소원과 마찬가지로 중요한 요인 중의 하나이다. 따라서, 효소 저해제 생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 10~60°C의 온도 범위에서 4일 동안 배양하여 각 온도에서의 균체성장 및 저해활성을 측정하였다. 본 실험에 사용한 해양 방선균의 경우 40°C에서 저해활성이 높았으며, 균체성장도 가장 잘 성장하므로 좋은 미생물인 것으로 사료된다(Fig. 1). 그러나, 50°C의 경우 균체성장과 저해활성이 급격히 감소되었다. 일반적으로 해양 세균은 저온 미생물로서 20~30°C 부근에서 잘 성장하는 것으로 보고하며, *Streptomyces albogriseolus* S-3253의 경우 30°C에서 균체생장이 최적이고, 저해활성은 45°C에서 가장 높은 것으로 조사되었다(13-15). 그 외 연구자들에 의하면 27~35°C 범위에서 저해활성이 높게 나타났다(16-18).

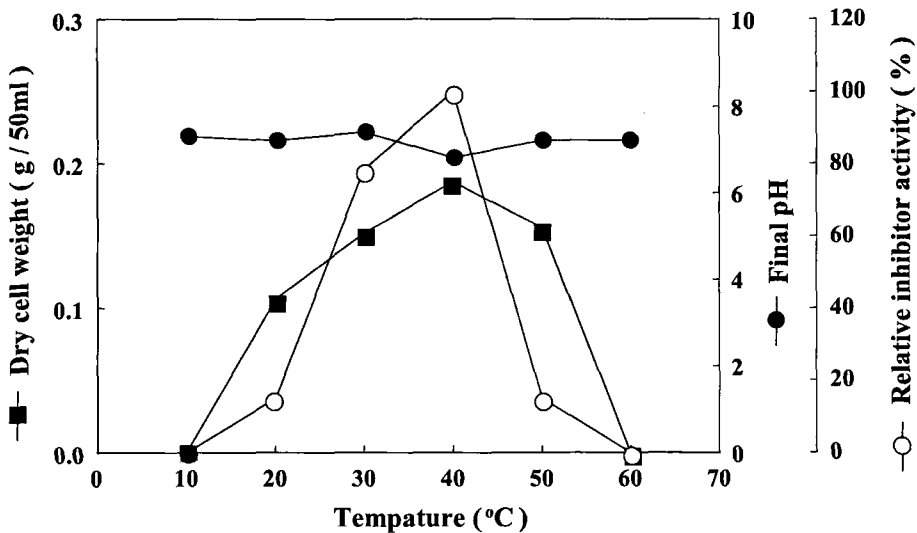


Fig. 1. Effect of temperature on the production of protease inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.



### 초기 pH의 영향

배양액의 pH는 다양한 영양분, 성장인자 등의 세포막 이동속도에 영향을 미치며, 외부의 pH가 변하면 영양물질 분자의 이온화 경향이 달라져 물질 흡수능력이 감소하므로 미생물의 생육성장과 저해물질 생산에 중요한 역할을 한다. 따라서, 효소저해물질 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 배양액의 초기 pH를 3~10까지 조절하여 배양 후 저해활성을 측정하였다. 균체성장은 초기 pH 6~7 범위에서 가장 잘 성장하여 호중성 미생물인 것으로 사료된다. 그러나, 저해활성의 경우 pH 6.5~8.0 중성범위에서 가장 높은 것으로 확인되었다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 Murao 등(15,19)이 pH 7에서 저해활성이 높다고 보고한 결과와 유사하였지만, Kim 등(20)은 알칼리성에서 저해활성이 높다고 보고한 것과는 차이가 있었다. 이 처럼 중성 범위의 pH에서 효소 저해활성이 가장 높게 유지되는 것은 이 부근에서 효소 저해활성이 가장 안정화되기 때문인 것으로 사료된다. 아직까지 강산·강알칼리성에서 저해물질 생성에 대한 보고는 거의 없다.

### 탄소원의 영향

효소저해물질의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 인공해수에 0.2% (w/v) peptone, 0.1% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) malt extract가 첨가된 배지에 glucose, maltose, fructose, galactose, saccharose, starch, lactose, sorbitol, mannose를 각각 1.0% 씩 첨가하여 균체성장 및 저해물질의 활성을 측정하였다. Table 1에서 나타내는 바와 같이 대부분 단당류인 galactose, glucose, fructose와

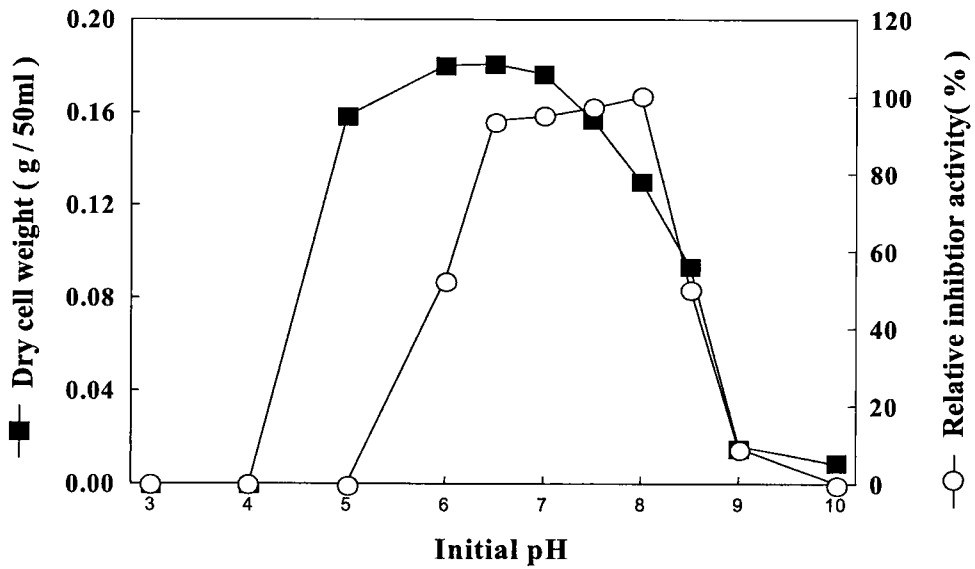


Fig. 2. Effect of initial pH on the production of protease inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

다당류인 starch에서 높은 저해활성을 보였다. Pandhare 등(21)의 경우 starch, glucose, mannose 및 fructose가 저해제 생산에 좋은 탄소원으로 보고 되었고, 그 외 protease inhibitor 생산에서 최적 탄소원으로 glucose와 starch를 사용하는 것으로 보고되고 있어 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다(15,17,19,20). 일반적으로 glucose와 같이 쉽게 이용 가능한 기질은 그 자체가 이차 대사산물의 생합성 관련 효소들을 저해할 뿐만 아니라 방선균 발효에서도 과량의 glucose가 존재할 때 pyruvic acid 및  $\alpha$ -ketoglutaric acid 등의 축적으로 이들에 의한 간접적인 저해효과도 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다(22,23).

특히, 본 연구에서 탄소원을 첨가하지 않을 경우 균체성장 및 저해활성이 나타나지 않으므로 저해물질 생산에 있어 중요한 인자로 사료된다.

최적의 탄소원으로 선정된 galactose를 0.0~2.8% (w/v) 농도별로 첨가하여 균체성장 및 저해활성을 측정하였다(Fig. 3).

그 결과 저해활성은 1.6% (w/v)에서 가장 높았으며, 이 이상의 농도에서는 저해활성이 점차 감소한 반면에 균체성장은 계속 증가하는 것으로 조사되었다.

Table 1. Effect of various carbon sources on the production of protease inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Carbon source ( 1.0 % )	Dry cell weight ( g / 50 ml )	R. I. A* ( % )	Final pH ( - )
Control	0.049	0.0	8.25
Glucose.	0.155	88.2	7.45
Galactose	0.132	100.0	7.76
Fructose	0.156	84.0	7.83
Maltose	0.146	1.9	7.77
Lactose	0.159	15.8	7.98
Sorbitol	0.053	8.3	8.32
Saccharide	0.042	5.6	8.34
Starch	0.138	84.0	7.76
Mannose	0.159	10.8	7.62

\* Relative inhibitor activity

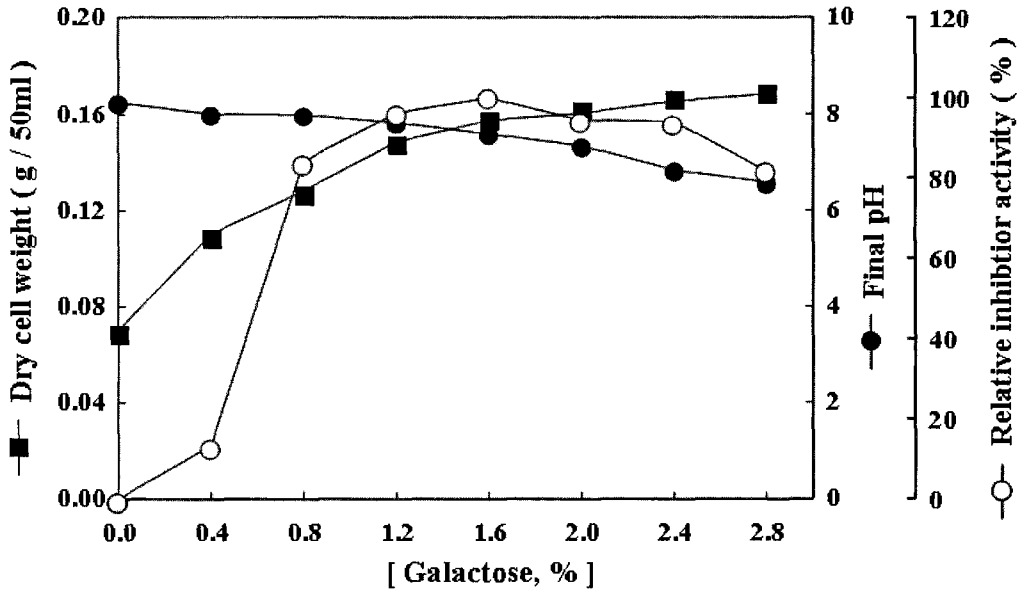


Fig. 3. Effect of galactose concentration on the production of protease inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

#### 질소원의 영향

질소원은 미생물의 대사증식에 결정적인 영향을 미치는 성분으로 알려져 있어 각종 유·무기 질소원으로 나누어 실험을 행하였다. 먼저 기본배지에 peptone, yeast extract, malt extract를 제외하고 각종 유기 질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 균체성장 및 효소 저해활성을 측정하였다.

Polypeptone, yeast extract, casamino acid 경우 균체성장에 많은 도움이 되지만 peptone을 제외한 두 질소원에 대해서는 저해활성이 현저히 낮거나 활성이 나타나지 않았다. Table 2에 나타내는 바와 같이 저해활성은 복합배지인 polypeptone과 proteose peptone에서 가장 높게 조사되어 *Cephalosporium* sp.에서 생산된 trypsin inhibitor와 *Streptomyces albogriseolus* S-3253에서 생산된 alkaline protease inhibitor에서 polypeptone을 사용한 것과 유사한 결과를 보였다(6,16).

Table 2. Effect of organic nitrogen sources on the production of protease inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

nitrogen source ( 0.5% )	Dry cell weight ( g / 50 ml )	R. I. A* ( % )	Final pH ( - )
Control	0.046	0.0	7.38
Poly peptone	0.173	98.9	7.67
Bacto peptone	0.087	66.3	7.99
Beef extract	0.102	7.5	5.19
Yeast extract	0.173	44.1	7.36
Bacto soytone	0.092	90.1	7.93
Meat extract	0.102	72.8	8.00
Proteose peptone	0.098	100.0	8.01
Urea	0.030	0.0	8.17
Casamino acid	0.180	0.0	5.64
Gelatin	0.056	0.0	7.24
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.081	2.2	5.52
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.011	0.0	6.09
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.062	0.0	7.29
NH <sub>4</sub> Cl	0.029	2.4	5.71
NaNO <sub>3</sub>	0.054	1.2	8.01

\* Relative inhibitor activity

이것은 저해제가 두 질소원을 소비한 후 세포 대사물질에 대한 기질로써 활용된 것으로 사료된다. 또한 무기질소 보다는 유기질소가 저해물질의 생합성 과정에서 효과적으로 이용되기 때문일 것이다. 그러나 Pandhare 등(21)은 casein, yeast extract, malt extract에서 저해활성이 높다는 보고와 상이하였다. 그러나 천연 질소원과 무기 질소원의 경우 저해활성이 나타나지 않았다. 본 연구에서 최적 질소원으로는 균체 제거를 고려하여 proteose peptone를

선정하였다. 선정된 proteose peptone은 0.0~3.0% (w/v)까지 농도별로 첨가하여 저해활성을 조사하였다. 그 결과 0.5% (w/v)에서 가장 높았으며, 이상의 농도에서는 점차 감소하였다(Fig. 4).

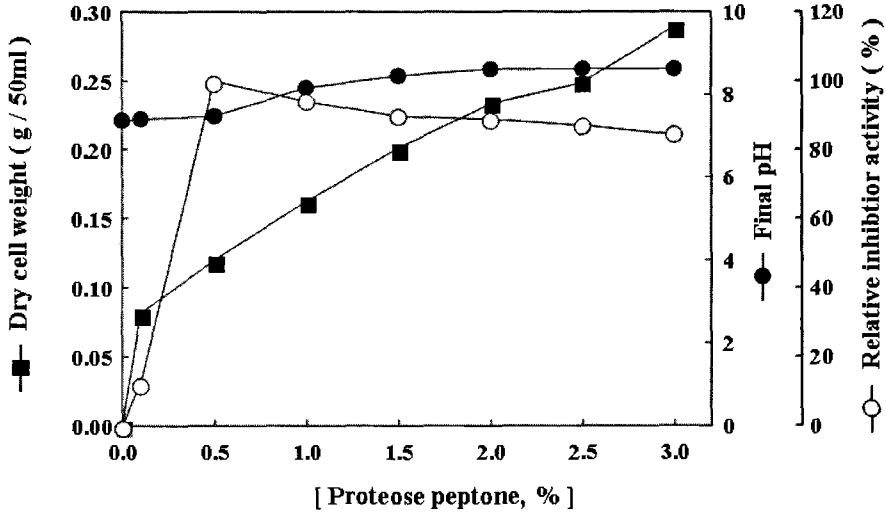


Fig. 4. Effect of proteose peptone concentration on the production of protease inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

#### NaCl 농도의 영향

일반적으로 해수에는 약 3.0% (w/v)의 NaCl이 함유되어 있으므로 NaCl에 따른 균체성장 및 효소 저해활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 5). NaCl 농도를 0.0~9.0% (w/v)까지 조절한 배지에서 배양한 후 효소 저해활성을 측정된 결과, 1.0% (w/v)에서 저해활성이 높았으며 균체성장은 2.0% (w/v)에서 가장 많이 성장하였다. 이는 해양에서 생육하는 미생물의 경우 삼투압 조절과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다. 이것은 Uo 등(24)처럼 2%에서 해양미생물의 성장과 대사물질이 증가한다는 결과와 일치하였다. 또한 5.0% (w/v)의 염 농도에서도 저해활성의 경우 70.0% 이상의 저해율을 나타냈다.

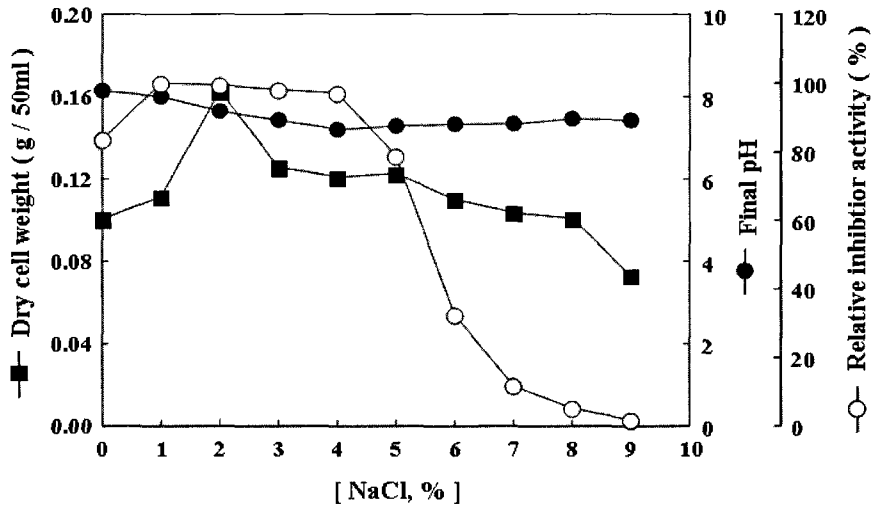


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the production protease inhibitor by *Streptomyces thermocarboxyus* C12.

#### Metal salts의 영향

Galactose 1.6% (w/v), proteose peptone 0.5% (w/v), NaCl 1.0% (w/v)로 고정된 조건에서 각종 금속염을 1 mM의 농도로 첨가하여 균체 성장 및 저해활성을 살펴보았다(Table 3). LiCl, MgCl<sub>2</sub>와 KCl은 대조군보다 높았으며, 이 중 LiCl에서 가장 좋은 활성을 나타내었다. Murao 등(15,19)에 의하면 여러 가지 효소 저해물질의 생산에서 금속염은 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 중금속염의 첨가는 균체성장 및 저해활성을 억제하는 것으로 조사되었다. 이것은 중금속의 경우 -SH 작용기를 지닌 단백질과 결합하면 단백질을 비활성화 시키므로 저해활성이 전혀 나타나지 않은 것으로 사료된다.

#### 최적배양조건에서 저해제의 생산

앞의 결과를 토대로 배지 및 배양 조건을 조절하여 저해제의 생산을 증가시키고자 다음과 같이 실행하였다. 40°C, pH 8.0, 1.6% (w/v) galactose, 0.5% (w/v) proteose peptone, 1% (w/v) NaCl, 1 mM LiCl이 첨가된 500 ml flask에서 *Streptomyces thermocarboxyus* C12균주를 배양하여 시간별로 균체 성장과 저해활성을 조사하였다(Fig. 6). 균체는 12 hr부터 성장하여 48 hr에는 정지기에 도달하였다. 저해활성 경우 48 hr부터 나타났으며, 균체 정지기

84 hr에 최고조에 이르렀다. 이것은 저해물질이 2차 대사산물인 것으로 사료된다. pH의 경우 시간이 경과 할 수록 점차 감소한 후 약 염기성으로 증가하는 것은 전형적인 방선균 발효시의 발견되는 현상이며 pH의 감소는 당으로부터 유기산의 생성에 기인한 것으로 추정된다. 이상의 결과 최적 배양조건에서 84 hr 배양시 저해활성은 균주 최적배양 전의 저해율 33%에 비해, subtilisin을 100% 저해하는 것으로 나타났다.

Table 3. Effect of metal salts on the production of protease inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Metal salt ( 1mM )	Dry cell weight ( g / 50 ml )	R. I. A* ( % )	Final pH ( - )
Control	0.086	94.3	8.02
MgCl <sub>2</sub>	0.075	97.8	7.95
CaCl <sub>2</sub>	0.057	95.4	8.04
FeCl <sub>2</sub>	0.064	85.2	7.92
Fe <sup>3+</sup> -citrate	0.052	90.1	7.91
LiCl	0.081	100.0	8.03
KCl	0.079	97.6	8.01
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.000	0.0	6.53
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.000	0.0	5.94
ZnCl <sub>2</sub>	0.000	0.0	6.69

\* Relative inhibitor activity



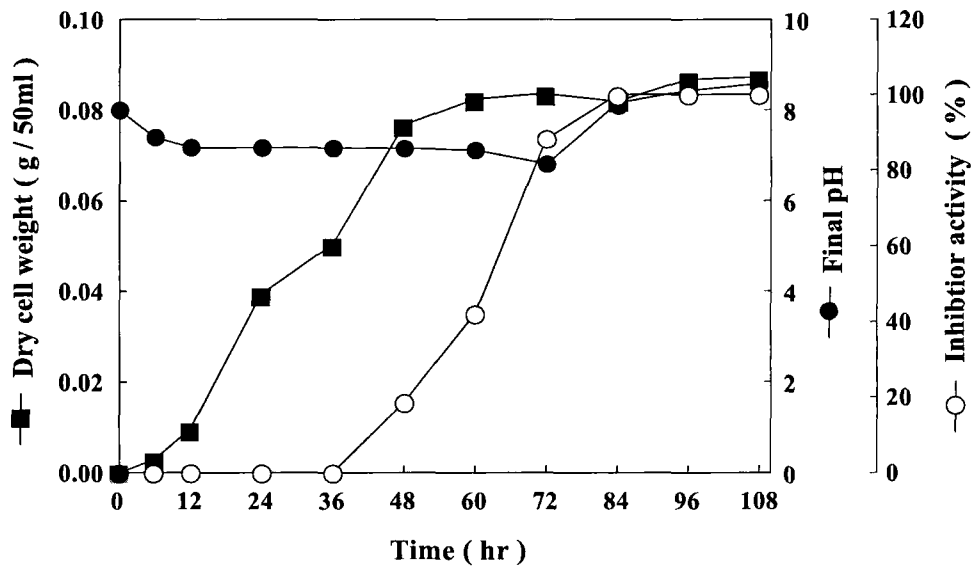


Fig. 6. Time course of protease inhibitor production by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

#### 요약

해안 펄에서 단백질 분해효소 저해력이 우수한 균주 *Streptomyces thermocarboxydus* C12를 이용하여 최적 저해제 활성조건을 검토하였다. 그 결과 온도와 초기 pH는 40°C, 8.0에서 높은 것으로 나타났으며, 탄소원의 영향에서는 1.6% (w/v) galactose에서, 유·무기 질소원으로는 0.5% (w/v) proteose peptone에서 저해활성이 가장 높게 나타났다. 염 농도로는 1% (w/v) NaCl, 금속이온은 1 mM LiCl을 첨가하였을 때 저해활성이 증가하였다. 선정된 최적배양조건에서 배양한 결과, 84 hr 배양시 저해활성은 균주 최적배양 전의 저해율이 최대로 나타났다.

## 참고문헌

1. Umezawa H. 1972. Enzyme inhibitors of microbial origin, University of Tokyo Press, Tokyo. p. 1-114.
2. Aoyagi T, Takeuchi T, Matsuzaki A, Kawamura K, Kondo S, Hamada M, Maeda K, Umezawa H. 1969. Leupeptins, new protease inhibitors from Actinomyces. J Antibiot 22: 283-286.
3. Umezawa S, Tatsuta K, Fujimoto K, Tsuchiya T, Umezawa H. 1972. Structure of antipain, a new Sakaguchi-positive product of Streptomycetes. J Antibiot 25: 267-270.
4. Umezawa H, Aoyagi T. 1973. The Structure of Chymostatin, A Chymotrypsin Inhibitor. J Antibiot 26: 625-646.
5. Kunimoto S, Aoyagi T, Morishima H, Takeuchi T, Umezawa H. 1972. Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. J Antibiot 25: 251-255.
6. Murao S, Sato S. 1972. S-SI, a new alkaline protease inhibitor from Streptomyces albogriseolus S-3253. Agric Biol Chem 36: 160-163.
7. Bode W, Huber R. 1992. Natural protein protease inhibitors and their interaction with proteases. Eur J Biochem 204: 433-451.
8. Terashita T, Kono M, Murao S. 1980. Promoting effect of S-PI on fruiting of Lentinus edodes. Trans Mycol Soc Jpn 21: 137-140.
9. García-Carreño FL. 1996. protease inhibitors. Trends Food Sci Technol 7: 197-204.
10. Demuth HU. 1990. Recent developments in inhibiting cysteine and serine proteases. J Enzym Inhib 3: 249-278.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.
12. Moore S, Stein WH. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J Biol Chem 176: 367-388.
13. Kang SI, Kim YM, Jang YB, Lim DJ, Kong JY. 2004. The optimal culture condition for the collagenolytic protease production from *Vibrio vulnificus* CYK279H. Korean J Biotechnol Bioeng 19: 295-300.
14. Choi HJ, Jung MJ, Jeong YK. 2002. Optimization of the production of

- an immunostimulant from a marine bacterium. *Korean J Life Sci* 12: 759-764.
15. Murao S, Sato S, Muto N. 1972. Isolation of alkaline protease inhibitor producing microorganisms. *Agric Biol Chem* 36: 1737-1744.
  16. Tsuchiya K, Kimura T. 1978. Production of trypsin inhibitor by a *Cephalosporium* sp. *Appl Environ Microbiol* 35: 631-635.
  17. Fukuhara KI, Katsura M, Murao S. 1982. Purification and some properties of Talopeptin (MK-1), a novel protease inhibitor produced by *Streptomyces mozunensis* MK-23. *Agric Biol Chem* 46: 1707-1710.
  18. Park SK, Sung NK, Lee SW. 1989. Production and purification of pepsin inhibitor from *Actinomyces* GF 155-2. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* 17: 121-125.
  19. Murao S, Watanabe T. 1978. Isolation and identification of microorganism, producing microbial alkaline protease inhibitor (MAPI). *Agric Biol Chem* 42: 2209-2215.
  20. Kim IS, Kim HT, Lee HS, Lee KJ. 1991. Protease inhibitor production using *Streptomyces* sp. SMF13. *J Microbiol Biotechnol* 1: 288-292.
  21. Pandhare J, Zog K, Deshpande VV. 2002. Differential stability of alkaline protease inhibitors from actinomyces: effect of various additives on thermostability. *Bioresour Technol* 84: 165-169.
  22. Aoyagi T. 1990. Small molecular protease inhibitors and their biological effects. In H. Kleinkauf & H. Dohren (eds.), *Biochemistry of Peptide Antibiotics*, Walter de Gruyter, Berlin. p. 312-363.
  23. Tanaka S. 1992. Fermentation processes in screening for new bioactive substances. In S. Omura (ed.). *The search for bioactive compound from microorganism*. Springer-Verlag, New York. p. 303-326.
  24. Uo HE, Joo DS, Cho SY. 2006. Screening and cultivation characteristics of alginate degrading bacteria. *J Korea Soc Food Sci Nutr* 333: 164-169.

### 제 3 절 생리활성 물질의 분리 · 정제 및 이화학적 특성

#### 서론

현대사회가 발달함에 따라 동 · 식물 · 미생물에서 생산해 내는 최종산물인 단백질에 관심을 갖게 되었으며, 이 단백질들은 단백질 분해효소에 의해서 활성화되거나 혹은 파괴되어 세포로 하여금 적절한 기능을 수행할 수 있도록 한다고 알려져 왔다(1). 단백질 분해효소는 동물, 식물 및 미생물계에 광범위하게 분포되어 있다. 약 40년 전만 해도 주로 식물의 papain, bromelain, 동물의 장기 효소인 pepsin, trypsin, renin 등이 응용의 대상이었다. 특히 세포질 외로 분비하는 미생물 단백질 분해효소는 다양한 미생물에 의해서 생성된다.

세포 내 및 세포 외 모두에서 일어나며 생체 내에서 소화효소의 작용 뿐만 아니라 혈전, 세포융합, 세포증식, 혈액응고, 혈압조절, 방어 등의 기능 뿐만 아니라 세포의 성장, 분화 및 사멸, 세포내외의 단백질 turnover, 세포이동, 침윤, 수정 등 모든 생체기능에 직 · 간접적으로 관여한다. 생리적으로 단백질 분해효소는 여러 신호에 의해 발현되고 또한 생체내의 저해 단백질에 의해 그 활성의 균형을 조절하고 있다. 그러나 이상 환경에 의해 비정상적으로 발현된 단백질 분해효소는 염증, virus 감염, 호르몬의 성숙, 부종, 발암, 암세포의 전이 등의 다양한 질병 병발과정에 관여하며, 발생으로부터 노화에 이르는 생명현상과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 이러한 단백질 분해효소에 대해 억제 또는 방어역할을 하는 것이 단백질 분해효소 저해제이다.

단백질 분해효소에 대한 저해제 연구에 대하여 의약품 개발과 사용의 역사는 천연물에서 비롯되었다. 지난 수 십년 간 유기화학의 발달에 따라 다수의 합성 의약품들이 출현하였으나, 현재 약 50% 정도의 의약품들이 식물, 미생물 등 천연 생물자원 유래의 천연물 또는 천연물 유도체이다. 천연물 유래의 생리활성 연구는 전통적으로 동 · 식물, 토양 미생물 등 육상생물을 주된 대상으로 하여 왔다. 그러나 근래에 이르러서는 지금까지 천연물의 보고였던 육상생물 및 토양 미생물로부터 새로운 의약활성 물질의 개발이 점차로 정체되는 경향을 나타냄에 따라 의약품의 새로운 탐색원 으로서 육상 생태계가 아닌 해양이나 극한 생태계 같은 새로운 환경에 눈을 돌려 연구를 시작하고

있다. 해양은 특이한 생태계를 이루는 환경 때문에 해양생물이 만드는 대사 산물은 육상생물에 비하여 특이한 골격의 화학구조를 가지게 되며, 항생물질 이외에 다양한 생리활성 작용을 갖는 효소 저해제를 생산하는 것으로 밝혀졌다. 생물체의 구성성분을 합성하고 생리적 기능을 나타내는 물질의 활성화 및 그 조절은 각각 효소와 효소 저해물질이 상당부분 담당하고 있다. 그러나 조절되지 않은 효소의 과잉작용은 각종 질병의 원인이 되거나 기존의 질환을 악화시키기도 한다. 그러므로 단백질 분해효소에 의해 일어나는 질병의 치료 목적으로 자연계로부터 단백질 분해효소 저해제를 개발하고자 하는 노력이 진행되었다.

따라서, 본 연구는 해양자원에서 탐색된 균주에서 생산되는 단백질 분해효소 저해제이용, 분리·정제하여 그 특성을 조사하였다. 또한, 그 특성을 통해 특이적인 저해제인지 확인하여 산업적으로 사용 가능한지를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

효소들은 subtilisin (Fluka, Switzerland), trypsin, α-chymotrypsin, amino peptidase, collagenase (Sigma, USA)와 protease K (Promega, USA)를 사용하였고, 기질은 gelatine (Yakuri, JAPAN)을 사용하였다. 효소반응에 사용된 발색시약은 ninhydrin (Lancaster, England)을 사용하였다. 투석막은 (Spectra/por, MWCO: 12,000~14,000, Texas, USA)를 사용하였으며, 그 외 사용된 모든 시약은 특급 혹은 분석용 시약을 사용하였다.

protease inhibitor의 분리·정제시 분자량 표준품은 (Sigma, USA)의 low-range protein molecular weight markers(MW 6,500 ~66,000 Da)을 사용하였다. 농축은 한외여과막 장치인 Millipore Co.의 제품(Massachusetts, USA)을 사용하였고, 이때의 분리막은 분자량 한계범위(molecular weight cut-off: MWCO)가 10,000인 것을 사용하였다.

### 균주배양

균주의 분리 및 배양을 위한 배지조성으로는 Bennet's 배지(Glucose 10.0 g, Peptone 1.0 g, Yeast extract 1.0 g, Beef extract 1.0 g, pH 7.5)에 증류수 1 l당 NaCl 23.0 g, KCl 0.7 g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10.6 g, CaCl<sub>2</sub> 1.1 g, NaSO<sub>4</sub> 3.9 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 g, Tris-HCl 6.05 g,

pH 7.8의 인공해수를 첨가하여 기본배지로 사용하였다. 평판배지에서 얻어진 각종 분리균주를 액체배지 20 ml를 함유한 전배양에 접종하여 25℃, 3일 동안 진탕배양하였다. 그 후 본배양 액체배지 50 ml에 전배양액 1.0% (v/v)를 접종하여 25℃, shaking incubator 에서 180 rpm으로 4일 동안 진탕배양 하였다.

### 단백질 정량

단백질 농도는 Lowry 법(2)을 이용하였다. Bovine serum albumin (Sigma chem Co.)를 표준시료로 하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며, column chromatography를 사용하였을 때는 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 효소저해활성 측정

protease inhibitor 측정은 ninhydrin방법(3)을 변형시켜 사용하였다. 즉 50 mM Tris-HCl buffer 50  $\mu$ l에 10  $\mu$ l subtilisin (0.1 mg/ml)과 희석된 배양 상층액 10  $\mu$ l용액을 37℃에서 20 min간 전처리한 후 중탕가열한 0.2% (w/v)의 gelatin이 포함된 기질용액 0.5 ml(50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)과 37℃에서 30 min간 반응시켰다. 효소 반응을 정지시키기 위해 10.0% (w/v) trichloroacetic acid(TCA) 0.1 ml를 첨가한 후, ninhydrin 용액 0.5 ml을 혼합하여 100℃, 10 min간 끓이고, ice-water에서 냉각시킨다. 가수분해 되지 않은 단백질을 침전시키기 위해 50.0% 1-propanol을 가하여 15 min간 방치한 후, 10,000 rpm에서 10 min간 원심분리하여 570 nm에서 측정하였다. 효소 저해활성 1 unit는 효소활성 1 unit를 감소시키는 것으로 정의하였다.

### protease inhibitor의 분리·정제

*Streptomyces thermocarboxyus* C12 균주에서 생산되는 저해물질의 정제 단계는 Fig. 1에 나타내었다. 배양액을 25℃에서 4일 동안 배양하여 균체 및 포자를 제거하기 위해 Whatman No 1. 여과지로 여과하였다. 여과액은 원심분리(16,000 g  $\times$  20 min) 하여 상층액 중 잔존 찌꺼기를 제거하였다. 분리한 상층액은 ammonium sulfate 포화농도 0~40%에서 침전시켜 16,000 g  $\times$  20 min 동안 원심분리하고 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)(buffer A)에 대하여 24 hr 동안 3회 완층액을 교환하여 투석하였다. 투석액은 0.20  $\mu$ m로 여과한 후 DEAE Sepharose CL-6B

anion column (26/30, Pharmacia, Sweden)에서 NaCl (0~1.0 M)이 첨가된 buffer A로 step gradient를 하여 저해물질을 용출시켰다. 용출액은 280 mn에서 단백질 함량을 측정하였고 fraction의 저해활성을 측정하였다. 활성이 높은 분획을 모아 YM-10 membrane (MW cut off limit, 10 kDa)으로 한외여과 하여 농축하였다. 농축액은 0.1 M NaCl이 포함된 buffer A로 평형화된 Superdex 200 column (16/60, Pharmacia, Sweden)에서 같은 완충액으로 용출시켰다. 용출액을 탈 이온수에 투석한 후 한외여과 (YM-10 membrane)하여 농축하였다. 정제한 저해물질은 -20℃에서 보관하면서 특성 실험에 사용하였다. 효소활성 1 unit는 37℃에서 1 min당 유리되는 1 μmol의 아미노산 수로 나타내었으며, 표준검량곡선으로 leucine을 사용하였다.

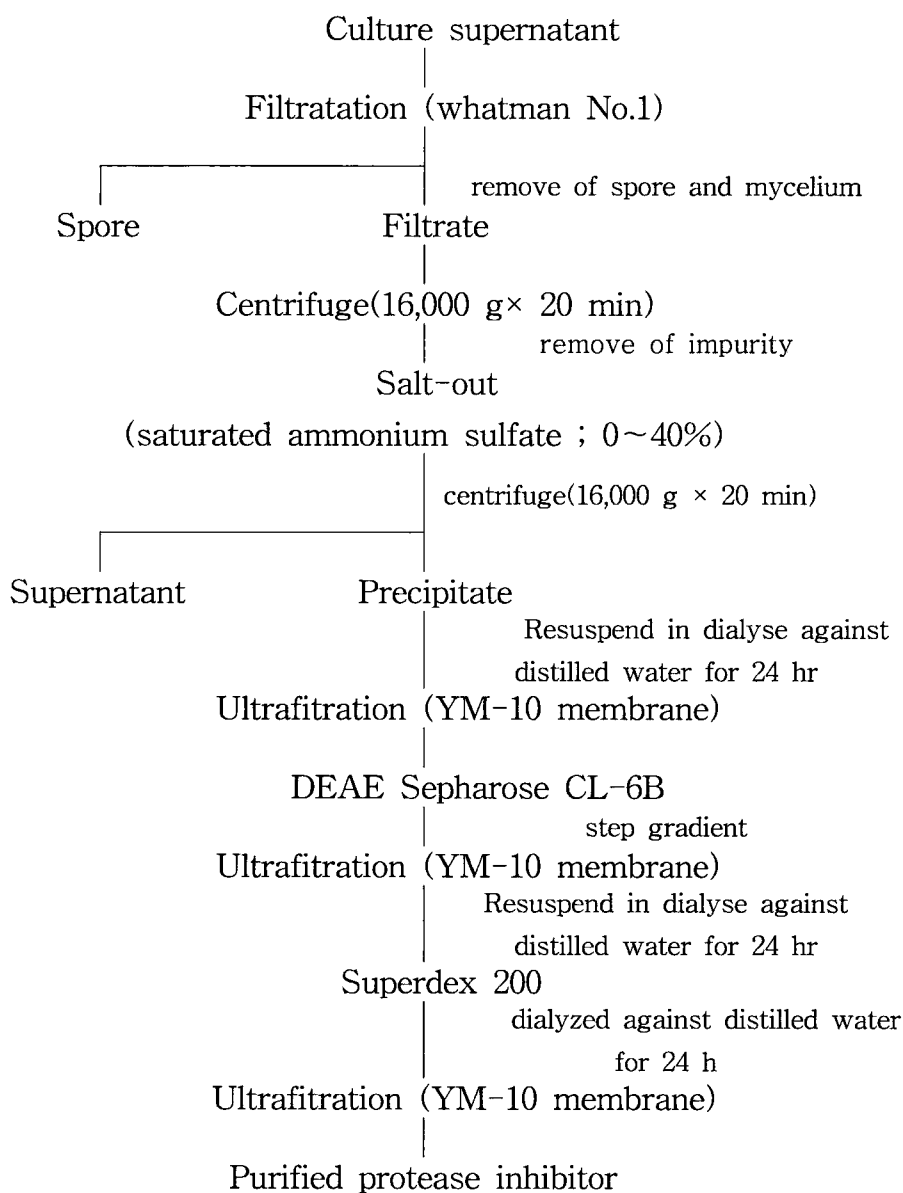


Fig. 1. Schematic representation for the purification of protease inhibitor



## Protease inhibitor의 이화학적 특성조사

### 1. 분자량 측정

protease inhibitor의 정제도 및 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli 법(4)에 따라 12.5% gel에서 SDS-polyacrylamide 전기영동을 수행하였다. 전기영동은 90 V로 행하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하고 탈색용액 (MeOH : glacial acetic acid : D.W = 40 : 10 : 50)으로 염색이 완전히 탈색 될 때 까지 탈색하였다. 분자량 측정을 위한 표준 단백질은 bovine serum albumin (66.0 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36.0 kDa), carbonic anhydrase (29.0 kDa), trypsinogen (24.0 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa),  $\alpha$ -lactalbumin (14.2 kDa), aprotinin (6.5 kDa)을 사용하였다.

### 2. 등전점 측정

protease inhibitor의 등전점을 측정하기 위하여 Righetti 등(5)의 방법에 따라 등전점 전기영동 하였다. Ampholyte pH 3.5~10이 함유된 7.5% acrylamide gel을 사용하여 1500 V (constant voltage), 50 mA, 30 W에서 1 hr 30 min 동안 전개하였다. 전개가 끝난 gel은 10% (w/v) TCA에서 10 min 동안 차례로 침지시킨 후, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색 및 탈색하였다. 등전점 측정을 위한 표준 단백질로 amyloglucosid -ase (pI 3.6), trypsin inhibitor (pI 4.55),  $\beta$ -lactoglobulin A (pI 5.1), bovine carbonic anhydrase isozyme (pI 5.9), human carbonic anhydrase (pI 6.6), myoglobin (pI 6.8, 7.2), lentil (pI 8.2, 8.6, 8.8), trypsinogen (pI 9.3)을 사용하였다.

### 3. 아미노산 조성분석

아미노산 조성분석은 13 × 100 mm 시험관에 시료를 넣고 분석시료 0.5 ml에 대하여 0.1% phenol을 포함하는 0.5 ml의 constant boiling HCL (sigma H0636)을 가하여 질소를 flushing 한 후 화염으로 봉하고 110°C의 heating block에서 24 hr 가수분해하였다. 가수분해한 시료는 60°C의 Micro-cenVac (N-Biotec, Inc, Korea)에서 염산을 완전히 휘발 시킨 후, 시료에 0.01 N HCl로 1 ml되게 정용하였다. 아미노산 분석은 아미노산 자동 분석기 (Biochrom, Inc, Korea)에 40  $\mu$ l를 주입하여 분석하였다.

#### 4. N-terminal sequence 분석

##### 1) 단백질 추출

단백질 추출은 다음과 같이 실시하였다. 겔은 10배 부피의 7.0 M urea, 2.0 M Thiourea, 4.0% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 1.0%(w/v) dithiothreitol (DTT), 2.0% (v/v) pharmalyte, 1.0 mM benzamidine로 구성된 시료용액과 혼합되어 homogenizer(PowerGen125, Fisher Scientific)에 의해 분해되었다. 그리고, 단백질 추출을 위해서 1 hr 동안 혼합하였으며, 15℃에서 15,000 rpm으로 1 hr 동안 원심분리하여 상층액을 이차원전기영동의 시료로 사용하였다.

##### 2) 이차원전기영동

일차 Isoelectric focusing(IEF)를 위하여 IPG strips은 7.0 M urea, 2.0 M thiourea, 2.0% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 1.0% dithiothreitol(DTT), 1.0% pharmalyte로 구성된 reswelling 용액으로 상온에서 12~16 hr 정도 reswelling 하였다. Strip 당 각각 200 µg이 시료를 loading하여, Amersham Biosciences 사의 Multiphore II system을 이용하여 제조회사의 사용 메뉴얼을 준수하여 20℃에서 IEF를 수행하였다. IEF 조건은 150 V에서 3,500 V까지의 도달시간을 3 hr 되게 하였으며, 3,500 V에서 26 hr 지속되도록 하여 최종적으로 96 kWh 가 되도록 설정하였다. 이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG Strips을 1.0% DTT를 함유한 equilibration buffer(50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6.0 M urea, 2.0% (w/v) SDS, 30.0% glycerol)로 10 min동안 incubation 하였으며, 곧바로 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10 min 동안 더 incubation 하였다. 평형이 완료된 strips을 SDS-PAGE gels (20 × 24 cm, 10.0~16.0%) 위에 배열시키고, Hoefer DALT 2D system (Amersham Biosciences)을 이용하여 20℃에서 최종적으로 1.7 kWh가 되게 전개하였다. 이차원전기영동이 완료된 이차원 겔은 Coomassie Brilliant G250으로 염색하였다. 염색된 이차원 겔은 AGFA 사의 Duoscan T1200 스캐너로 스캐닝하여 확장자가 TIFF 인 파일의 형태로 컴퓨터에 저장하였다.

##### 3) 이미지분석(image analysis)

스캐닝한 이미지로부터 단백질 spots의 발현변화 확인을 위한 정량적인 분

석은 PDQuest software (version 7.0, BioRad)를 이용하여 수행하였다. 각 spot의 정량은 total valid spots의 intensity로 평균화 되었으며, 대조군에 비해 두 배 이상의 유의한 발현변화를 보여주는 단백질 spots을 선정하였다.

#### 4) 질량분석을 위한 단백질 절편화

단백질 spots은 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 분해하였다. 젤 조각에서 SDS, 유기용매, 염색시약 등의 불순물을 제거하기 위하여 50.0% acetonitrile로 세척하였다. 세척 후 spot을 100.0% acetonitril로 탈수, 건조시켜 trypsin(8~10 ng/ $\mu$ l)으로 reswelling 하고 8~10 hr 동안 37°C에서 항온시켰다.

#### 5) 단백질 절편들의 sulfonation과정을 위한 SPITC처리

Trypsin처리된 용액에 SPITC(4-sulfophenyl isothiocyanate)를 20 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.5)가 되도록 처리한 후, sulfonation과정을 위하여 55°C에서 5-30 min 동안 항온시켰다. SPITC로 sulfonation한 수용액은 C18 ZipTips (Millipore)을 이용하여 1-5  $\mu$ l로 탈염 및 농축되었다. 이 농축액은 동량의 50.0% aqueous acetonitrile에 포화한  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합하였고, 질량분석을 위하여 target plate 위에 적하하였다.

#### 6) 단백질 서열 분석

질량분석기는 Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences)를 사용하였다. Target plate 상에 적하한 단백질 단편들을 337 nm의 N<sub>2</sub> laser 조사로 기화시킨 다음, 20 kV injection pulse에 의해 가속되었다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 서열 분석 후 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 PepFrag 검색엔진 (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl/pepfrag.html>)을 이용하여 N-terminal sequence 서열 결정에 사용하였다.

### 5. 저해제 온도 안정성

최종 정제된 protease inhibitor를 여러 온도(30~80°C)에서 30 min 동안 전처리 한 후, 4°C에서 30 min 동안 냉각시켜 저해제의 잔존 활성을 측정하였다.

## 6. 저해제 pH 안정성

정제된 protease inhibitor를 50 mM sodium citrate-citric acid (pH 4.0~6.0), 50 mM Tris-HCl (pH 7.0~8.5), 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>- NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.0~10.0)의 완충액에 12 hr 동안 실온에서 방치한 후 subtilisin을 첨가하여 37°C, 20 min간 전처리 한 후, 저해제의 잔존 활성을 측정하였다.

## 7. 금속이온의 영향

protease inhibitor를 metal ions(Cu<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>)이 첨가된 buffer에 1 hr 동안 실온에서 방치한 후, subtilisin을 첨가하여 37°C, 20 min간 전처리하여 저해제의 잔존활성을 측정하였다.

## 8. 여러 가지 단백질 분해효소에 대한 저해효과

protease inhibitor가 여러 단백질 분해효소에 대해서 저해작용이 일어나는지 확인하였다. 사용된 단백질 분해효소는 *Vibrio vulnificus* CYK279에서 생산되는 metalloprotease, collagenase type I, II, III, IV, trypsin과 α-chymotrypsin(0.01 mg/ml)농도에서 활성을 조사하였으며, subtilisin과 protease K는 (0.1 mg/ml)에서 저해활성을 조사하였다.

## 9. Subtilisin에 대한 inhibitor의 kinetics

Subtilisin을 기질인 gelatin 농도 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg 범위에서 활성을 측정하였다. 또한, subtilisin에 대한 subtilisin-like protease inhibitor의 저해활성을 기질의 농도에 따라 측정하였다. 반응속도 역수와 기질농도의 역수에 대하여 Lineweave-Birk plot를 사용하여 Km와 Vmax의 값을 구한 후, 저해형태를 확인하였다.

## 10. 식품급 저해제와 저해율 비교

*Streptomyces thermocarboxydus* C12에서 생산하는 protease inhibitor를 식품 저해제로 사용가능한지 조사하였다. 대조군은 상업적으로 많이 사용하고 있는 식품급 저해제 pork plasma protein과 egg white type p-39를 농도별 (0.1~1.0%)로 첨가하여 비교하였다.

## 11. 세포독성의 측정

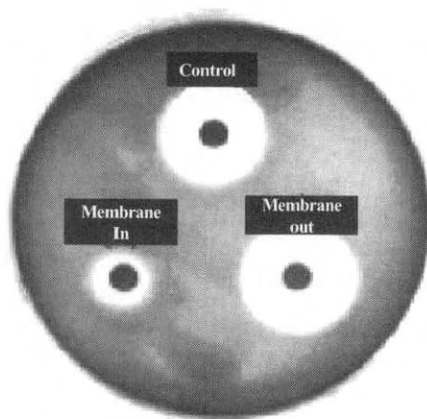
간암세포인 HepG2 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되도록 배양하였다. 이때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 배지용 항생제를 사용하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 phosphated-buffered saline-EDTA (PBS-EDTA)로 세척한 후 trypsin처리하여 계대배양하였으며 배지는 48시간마다 교환하여 세포를 배양하였다.

시료는 DMEM (FBS free)배지에 0.2% PBS 용액에 시료를 녹여 사용하였다. 시료의 농도는 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL이 되도록 하여 실험하였다. MTT assay를 이용한 세포독성 측정은 HepG2 를 96 well plate에 세포농도 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 100 uL씩을 분주한 후 세포부착을 위해 24시간 배양하고, 시료를 첨가한 FBS free 배지로 교환한 다음 24시간 동안 배양하였다. PBS 용액으로 2회 세척한 다음 MTT 시약으로 처리하여 490 nm에서 Spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. 간세포의 독성을 유도하기 위해 간세포 배양 1.5 시간 후 0.25 mM THA을 함유한 배양액, 0.25 mM THA에 TGPN, 3% NaCl을 포함한 PN 및 HepaCare를 각각 50 ug/mL, 100 ug/mL 및 200 ug/mL을 포함시킨 배양액으로 갈아주고 14시간 동안 세포를 배양하여 간세포의 회복을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Subtilisin-like protease inhibitor의 분리·정제

*Streptomyces thermocarboxydus* C12가 생산하는 protease inhibitor가 protein 또는 peptide인지를 확인하기 위해 투석막을 사용하여 확인한 결과 투석내액에서 저해활성이 조사되었다(Fig. 2). 이 저해물질은 고분자 물질인 것으로 추정하였으며, 이러한 결과를 바탕으로 초기에는 ammonium sulfate 침전법을 사용하지 않고 정제를 하였다. 그 결과 yield는 5.3%, 순도는 18.5 fold 정제되었다(data not shown). 정제 순도를 높이기 위해 상층액을 ammonium sulfate을 사용하여 최적 포화농도를 조사한 결과, (0~20, 20~40%)농도 범위에서 각각 yield는 3.8, 17.9%이며, 정제도는 11.4, 7.4 배로 확인되었다(Table 1).



Membrane cutting weight  
14,000~15,000

Fig. 2. Diagram of plate assay for protease inhibitor utilized in the dialysis membrane.

이후의 실험은 상층액을 ammonium sulfate(0~40%) 범위까지 침전시켜 투석하였으며, 투석액은 DEAE Sepharose CL-6B column (26/30, Pharmacia, Sweden)에서 step gradient를 주어 저해물질을 용출시킨 결과 0.6~0.8 M 범위에서 나타난 peak에서 저해활성을 조사하였다(Fig. 3). 그 중, 활성이 높은 획분을 농축하여, 0.1 M NaCl이 포함된 buffer A로 평형화된 Superdex 200 column (16/60, Pharmacia, Sweden)으로 용출시킨 결과 52~53 fraction에서 저해활성이 90% 이상인 단일 peak를 나타내어 최종적으로 정제된 것으로 확인되었다(Fig. 4). 이 두 획분을 탈 이온수에 투석, 농축하여 특성조사에 사용하였다. 최종 정제된 저해물질의 specific activity는 35,620.6 U mg<sup>-1</sup>, yield는 20.7%, 정제도는 119.9 fold로 나타났다(Table 2). 또한, 순도를 검정하기 위하여 native gel 전기영동을 한 결과 Fig. 5과 같이 단일밴드로 나타났다.

Table 1. Ammonium sulfate precipitation of protease inhibitor from the culture supernatant of *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Conc.	Total vol. ( ml )	Total activity ( Unit )	Total protein ( mg )	Specific activity ( U mg <sup>-1</sup> )	Yield ( % )	Purification ( fold )
Supernatant	100.0	251,700	300.5	837.6	100.0	1.0
0 ~ 20%	0.65	9,594	1.0	9,594.0	3.8	11.4
20 ~ 40%	1.50	45,000	7.3	6,164.4	17.9	7.4
40 ~ 60%	1.20	13,284	4.6	2,887.8	5.3	3.5
60 ~ 80%	2.20	6,336	4.5	1,408.0	2.5	1.7

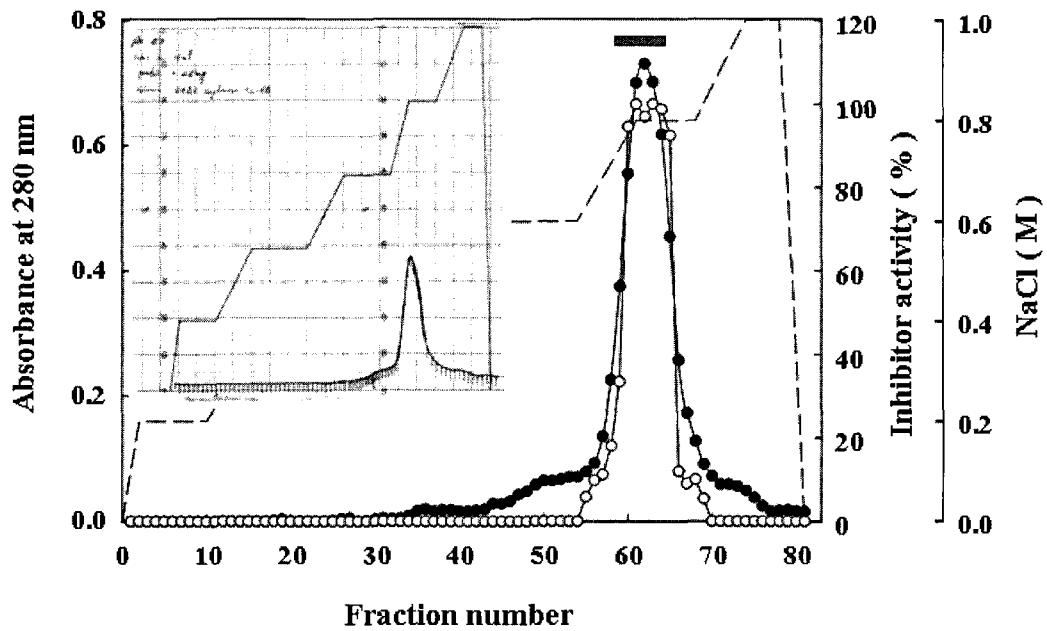


Fig. 3. Elution profiles of subtilisin-like protease inhibitor from a DEAE Sepharose CL-6B anion column.

—●— protein —○— inhibitor activity --- NaCl



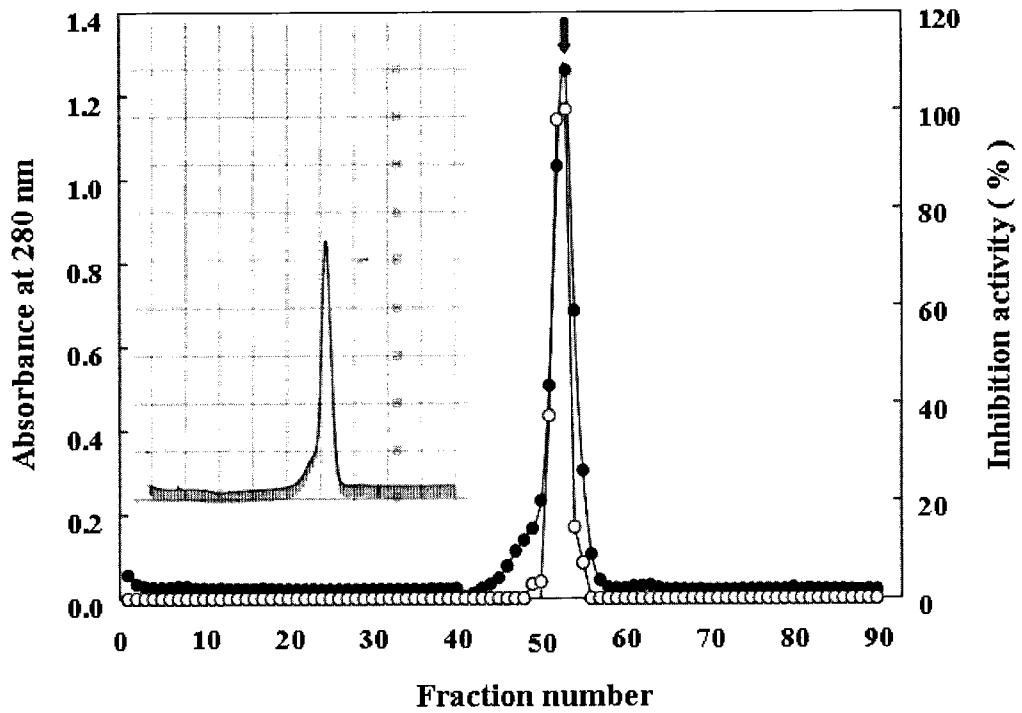


Fig. 4. Elution profiles of subtilisin-like protease inhibitor from a Superdex 200 gel column.

—●— protein    —○— inhibitor activity

Table 2. Summary of the purification steps for the protease inhibitor from the culture supernatant of *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Purification Step	Total activity ( Unit $\times 10^3$ )	Total protein ( mg )	Specific activity ( U mg $^{-1}$ )	Yield ( % )	Purification ( fold )
Supernatant	499.0	1,680.2	296.9	100.0	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0 ~ 40%)	359.3	53.7	6,690.8	72.0	22.5
DEAE Sepharose CL-6B	335.2	9.5	35,284.2	67.2	118.8
Superdex 200	103.3	2.9	35,620.6	20.7	119.9



Fig. 5. Native polyacrylamide gel electrophoresis of purified protease inhibitor from the *Streptomyces thermocarboxydus* C12. Lane 1, Ammonium sulfate; lane 2, DEAE Sepharose CL-6B; lane 3, Superdex 200.

#### 분자량 측정

단백질성 저해제의 분자량을 조사하기 위해 Fig. 6에서 보는 바와 SDS-PAGE에서 분자량은 약 33,100 daltons에 해당하였으며 단일 band로 나타났다. 대부분 subtilisin inhibitor의 경우 두 개의 동일 subunit로 이루어진 dimer protein으로 알려져 있다(6,7). 그러나 *Streptomyces hirosimensis*과 Potato tubers(*Solanum tuberosum*)의 subtilisin inhibitor의 분자량의 경우 14,200, 21,000 Da인 monomer로 보고하였으며, 토양에서 분리한 *Streptomyces* sp. 경우 dimer로 이루어진 분자량이 28 kDa 인 것으로 보고하였다(8~10).

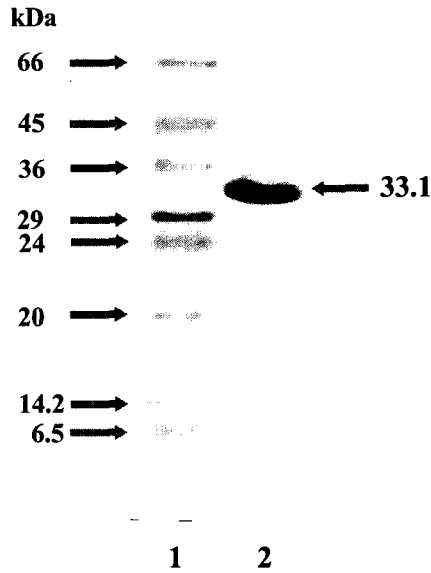


Fig. 6. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of purified rotease inhibitor. Lane 1, mark proteins: lane 2, purified inhibitor.

### Subtilisin-like protease inhibitor의 이화학적 특성

#### 1. 저해제의 온도 및 pH 안정성

*Streptomyces thermocarboxydus* C12가 생산하는 subtilisin-like protease inhibitor에 대한 온도 안정성을 조사하기 위해 30~70℃까지 30 min 동안 water bath에서 전처리한 후 잔존 저해활성을 측정한 결과 Fig. 7에서와 같이 50℃까지 활성을 유지하였으나 70℃에서는 60%의 저해활성을 가지고 있는 것으로 조사되었다. 이것은 *Streptomyces* sp. (NCIM 5127)은 40~95℃까지 열에 안정하다는 보고와 유사하였지만, *Streptomyces hirosimensis*에서 생산하는 저해제의 경우 40~50℃에서 안정한 것과는 상이하였다(8,10).

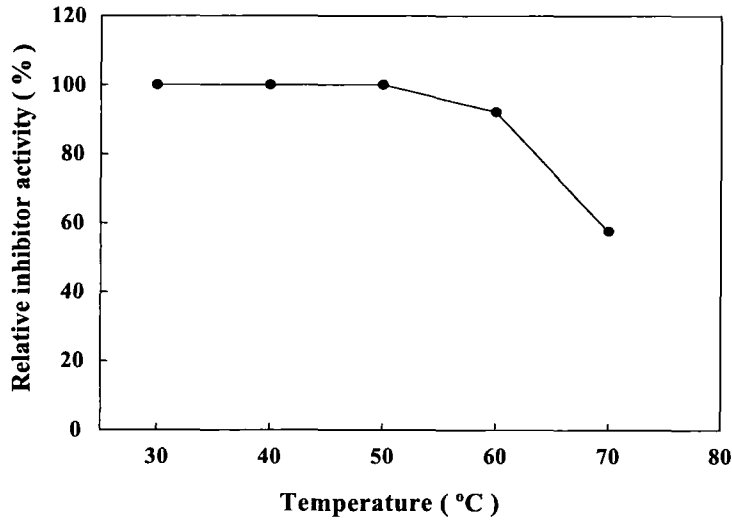


Fig. 7. Effect of temperature stability on the subtilisin-like protease inhibitor. The inhibitor was preincubated at the various temperatures for 30 min.

저해제의 pH 안정성을 검토하기 위하여 각 pH별로 제조한 buffer 용액에 37°C에서 12 hr 동안 전처리한 후 저해제의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과, 중성 pH 6에서 강 염기성인 pH 10까지 저해활성이 80% 이상 유지하였다(Fig. 8). 이것은 방선균 *Streptomyces* sp.에서 생산되는 저해제의 경우 pH 5~12 범위에서 안정하다는 보고와 유사하였다(8,10,11). 이처럼 넓은 범위의 온도와 pH에서 저해제가 안정할 경우 해충과 병원균에 대해서 저항성에 대한 이식 유전자 조사나 환경 생물제재로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 단백질성 저해제가 넓은 범위의 pH와 온도에서 안정한 것은 disulfide 결합이 존재하는 것으로 생각되어진다.

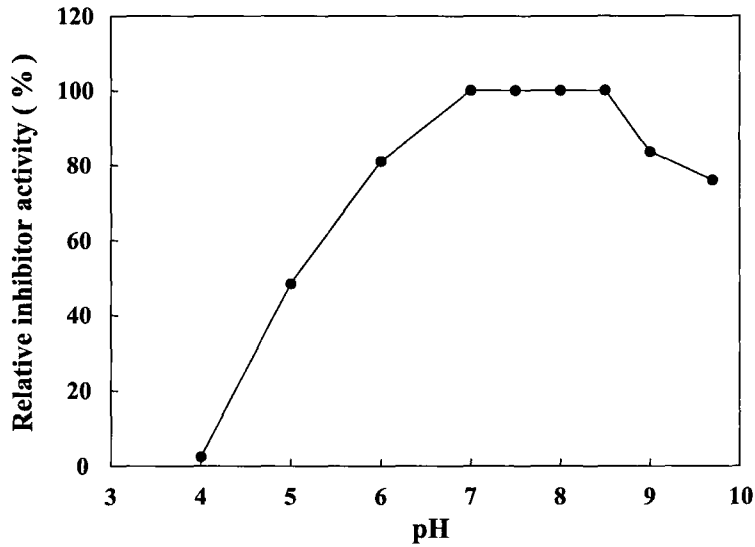


Fig. 8. Effect of pH stability on the subtilisin-like protease inhibitor. To determine the pH stability of the inhibitor, the reactions were preincubated at the 37°C for 12 hr.

## 2. 저해제의 등전점

저해제의 등전점은 isoelectric focusing 전기영동으로 확인하였으며, subtilisin-like protease inhibitor의 pI 값은 4.4였다(Fig. 9). *Streptomyces* sp. 에서 생산하는 alkaline protease inhibitor와 *Streptomyces albobriseolus* S-3253에서 생산하는 subtilisin inhibitor의 pI값은 각각 3.8, 4.7이다(10,12).

## 3. 금속이온의 영향

저해제에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위해 각종 금속이온 1 mM이 첨가된 buffer 용액에 37°C에서 30 min간 방치한 후 잔존 저해활성을 조사한 결과는 Table 3와 같다. K<sup>+</sup>과 Mg<sup>2+</sup>의 존재하에서 다소 증가하였다. Ca<sup>2+</sup>의 경우 단백질 구조의 안정화에 관여하며, 열 불활성에 대해 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있지만(13,14) 본 연구결과는 상이하였다.

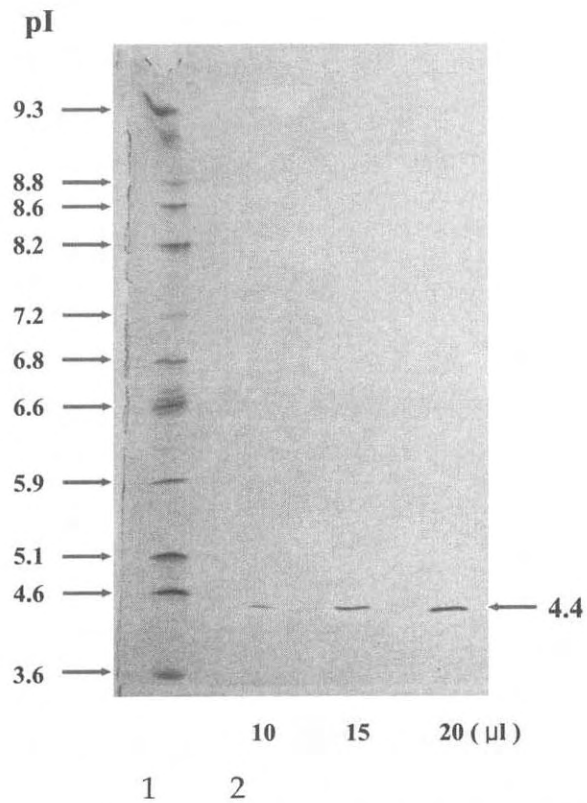


Fig. 9. Analytical thin-layer isoelectric focusing of the protease inhibitor. Lane 1, isoelectric focusing standards: lane 2, various concentration of purified inhibitor

Table 3. Effect of metal ions on the protease inhibitor.

Metal ions ( 1mM )	Relative inhibitor activity ( % )
Control	100.0
Cu <sup>2+</sup>	78.1
Li <sup>+</sup>	100.4
Ca <sup>2+</sup>	99.7
Mg <sup>2+</sup>	104.1
Mn <sup>2+</sup>	96.7
Cd <sup>2+</sup>	101.0
K <sup>+</sup>	105.1

#### 4. 여러 가지 단백질 분해효소에 대한 저해효과

*Streptomyces thermocarboxydus* C12에 생산된 저해물질을 여러 단백질 분해효소에 적용하여 저해율을 조사하였다. 실험에 이용한 단백질 분해효소는 *Vibrio vulnificus* CYK27H에서 생산되는 protease, collagenase I, II, III, IV, thermoase PC10, leucine amino peptidase, α-chymotrypsin(10 μg/ml), protease K, subtilisin(100 μg/ml)의 농도에서 조사하였다. 그 결과 serine protease계열중 protease K와 subtilisin에 대해서만 저해효과가 강하게 나타났다(Table 4). 특히, C12에서 생산된 저해물질을 70배 희석하여 subtilisin과 protease K에 대해서 저해활성을 측정하였다. 그 결과 subtilisin에 대해서 저해효과가 동일하게 유지되었지만, protease K에 대해서는 20.4%의 저해효과가 나타났다(data not shown). 이러한 결과로 미루어 볼 때 strain C12에서 생산되는 저해물질은 subtilisin만을 특이적으로 저해작용을 가진 *Streptomyces subtilisin inhibitor*(SSI)인 것으로 판단된다.



Table 4. Activity of the purified inhibitor against a various proteases.

Proteases ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition ( % )
Collagenase type I, II, III, IV ( >10 )	0.0
Thermoase PC10 ( >10 )	0.0
$\alpha$ -chymotrypsin ( >10 )	0.0
Leucine amino peptidase ( >10 )	0.0
Subtilisin ( >100 )	100.0
protease K ( >100 )	100.0
Metalloprotease <sup>1)</sup> ( >10 )	0.0

1) Protease produced by *Vibrio vulnificus* CYK 279H

### 5. Subtilisin에 대한 inhibitor의 kinetics

정제된 inhibitor의 subtilisin에 대한 저해형태를 알아보기 위하여 기질 농도 (0.25~2.0 mg)를 달리하면서 저해효과를 측정하였다. 그 결과, 기질을 증가시켜 저해제를 첨가한 것과 첨가하지 않았을 때 Km은 변하지 않고 V만 감소하므로 비경쟁적 저해인 것으로 나타났다. 따라서, 저해제를 첨가했을 때 Km값은 2.67 mg, Vmax 15.33 unit이다(Fig. 10).

### 6. 아미노산 조성분석

단백질성 저해제를 110°C에서 24 hr 동안 12 N HCl 용액에서 산 가수분해한 후, Micro-cenVac (N-Biotec, Inc, Korea)에서 염산을 완전히 휘발 시켰다. 아미노산 분석은 아미노산 자동 분석기 (Biochrom, Inc, Korea)로 분석하였다. 저해제를 구성하는 아미노산의 수는 저해제의 분자량을 기초로 하여 각 아미노산 peak 면적비로부터 계산하였다(Table 5).

본 저해제의 전체 아미노산 조성 중 Ser, Ala의 잔기 수가 비교적 많았으며, Met, Ile, His, Lys의 잔기 수가 적은 것으로 조사되었다. *Streptomyces* sp.

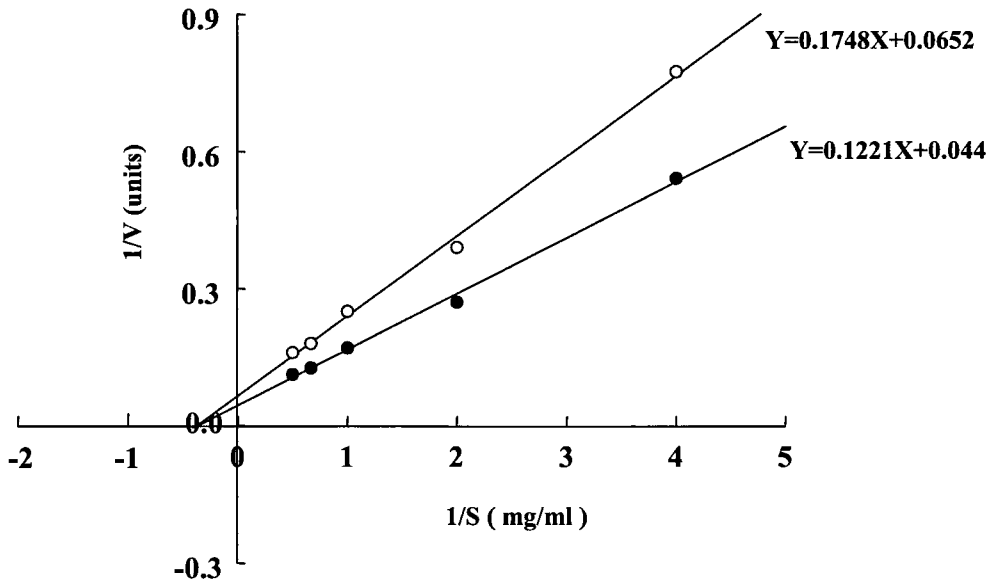


Fig. 10. Lineweaver-Burk plot of the subtilisin-like protease inhibitor.

●: In the absence inhibitor ○: In the presence inhibitor

에서 생산된 SI-1-72 저해제의 경우 Glu, His, Arg의 함량이 많은 것과 Val, Ala의 함량이 낮은 것과는 상이하였다(15). 이것은 자유 thiol 기가 존재하지 않거나, -S-S결합을 소유하지 않기 때문인 것으로 사료된다.

### 7. N-terminal sequence 분석

정제된 단백질성 저해제의 아미노산 서열분석은 질량분석기 Ettan MALDI-TOF (Amersham bioscience)를 사용하였다. Target plate 상에 적혀 되어 있는 단백질 단편들을 337 nm의 N2 laser 조사에 의해 기화하였다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. 단백질 서열 분석 후 동정을 위하여 PepFrag 검색엔진 (<http://prowlockefeller.edu/prowl/pepfrag.html>), SWISS-PROT 및 BLAST 의 data bank에 자료들과 비교시에 이용하였다. 확인된 N-terminal sequence는 DAPSALYAPSALVLTVGKGVSAT이었다(Fig. 11). 기존에 보고된 식물 및 미생물에서 발견된 subtilisin inhibitor의 N-terminal의 partial sequence (1~23 residue)는 Table 6의 경우 Streptomyces albobriseolus에서

생산하는 subtilisin inhibitor의 homology가 100% 일치하였다. 하지만, *Streptomyces albogriseolus*의 경우 분자량이 11,487 Da이며 strain C12에서 생산되는 저해제의 경우는 분자량이 33,100 Da이므로 전체 아미노산을 조사할 경우 다른 물질일 것으로 사료된다. 그리고 strain C12에서 생산되는 저해제는 *Streptomyces subtilisin inhibitor*(SSI)인 것으로 조사되었다.

Table. 5. Amino acid composition of the protease inhibitor from *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Amino acid	Amount, ( nM )	Residues
Aspartic acid	333.8	20
Threonine	279.1	17
Serine	512.0	31
Glutamic acid	164.8	10
Proline	360.6	22
Glycine	365.7	22
Alanine	582.0	36
Cystein	279.6	17
Valine	319.7	20
Methionine	86.4	5
Isoleucine	88.8	5
Leucine	302.8	19
Tyrosine	124.8	8
Phenylalanine	130.2	8
Histidine	89.7	6
Lysine	88.7	5
Arginine	148.7	9

Table 6. N-terminal sequence of protease inhibitor and comparison with that of other protease inhibitor.

Strain	N-terminal sequence	Reference
<i>S. thermocarboxydus</i> C12	DAPSALYAPSALVLTVGKGVSAT	This study
<i>S. albogriseolus</i>	DAPSALYAPSALVLTVGKGVSATTAAPERA	Ikenaka, et al., 1974
<i>S. virginiae</i>	SLYAPSAMVFSVAQGDDVAAPT VVRATTVS	Terabe, et al., 1994
<i>S. lividans</i>	SLYAPSALVLTVGHGESAATAAPLRAVTLTCAP	Ueda, et al., 1992
<i>S. longisporus</i>	ASLYAPSALVLTVGHGTSAAAATPLRAVTLN	Strickler, et al., 1992
<i>S. cacaoi</i>	SLYAPSAVVISK TQGASA-DAPAQRAVTLRCL	Kojima, et al., 1994
<i>S. parvulus</i>	TAPASLYAPSALVLTIGQGESA AATSPLRAVTL	Taguchi, et al., 1993

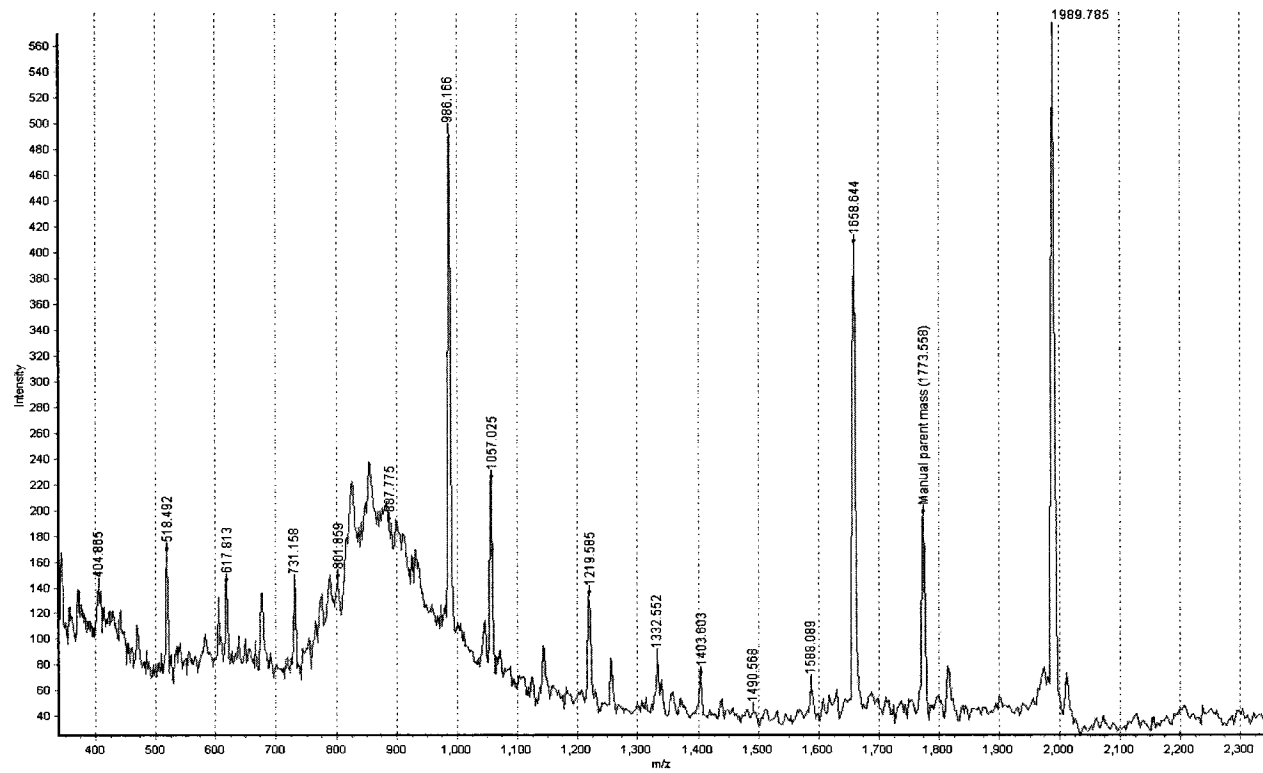


Fig. 11. Ettan MALDI-TOF of protease inhibitor purified from *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

### 8. 식품급 저해제와 저해율 비교

식품 저해제로써 응용 가능한지를 조사하기 위해 식품에서 가장 많이 사용되는 pork plasma protein과 egg white type p-39를 농도별로 (0.1~1.0%) subtilisin(0.1 mg/ml)과 protease K(0.1 mg/ml)에 적용하여 저해율을 조사하였다(Table 7). 그 결과 protease K 보다 subtilisin에 대해서 저해율이 높았으며, pork plasma protein 보다 egg white type p-39의 저해효과가 좋았다. 그러나, *Streptomyces thermocarboxydus* C12에서 생산된 protease inhibitor보다 두 단백질의 저해효과는 상당히 낮은 것으로 조사되었다. 따라서, 방선균에서 생산된 저해물질이 in vivo, in vitro 실험에서 무해할 경우 식품 저해제로써 사용 가능할 것으로 판단된다.

Table 7. Comparison of food inhibitor and protease inhibitor produced from *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Substrate	Protein conc. ( mg/ml )	Subtilisin inhibition ( % )	protease K inhibition ( % )
Pork protein	1.63	1.94	0
	4.73	16.3	10.5
	9.89	61.7	14.7
Egg white	0.78	16.7	14.5
	3.43	100	47.2
	8.39	100	95.8
Subtilisin-like protease inhibitor	0.54	100	100
	0.006	100	35

### 9) HepG-2 cell에 대한 독성

식품 저해제로 적용 가능성을 확인하기 위하여 간세포 HepG-2에 대한 세포

독성을 측정된 결과(Fig. 12), 100 ug/mL의 첨가 농도까지 유의적인 세포독성은 관측되지 않았으나, 200 ug/mL 첨가 농도에서는 대조군에 비하여 유의적인 저해 효과가 있는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 이 같은 결과는 고농도의 저해제를 첨가하는 경우 간세포의 대사 저해에 관여하는 것으로 추정할 수 있으나, 간기능 보호 효과를 측정할 목적으로 간세포 독성 유도제인 THA와 함께 사용한 protease inhibitor는 첨가농도 200 ug/mL까지 protease inhibitor를 전혀 첨가하지 않는 군과 유의적인 차이를 보이지 않는 것에 미루어 간독성 효과는 없는 것으로 판단하였다.

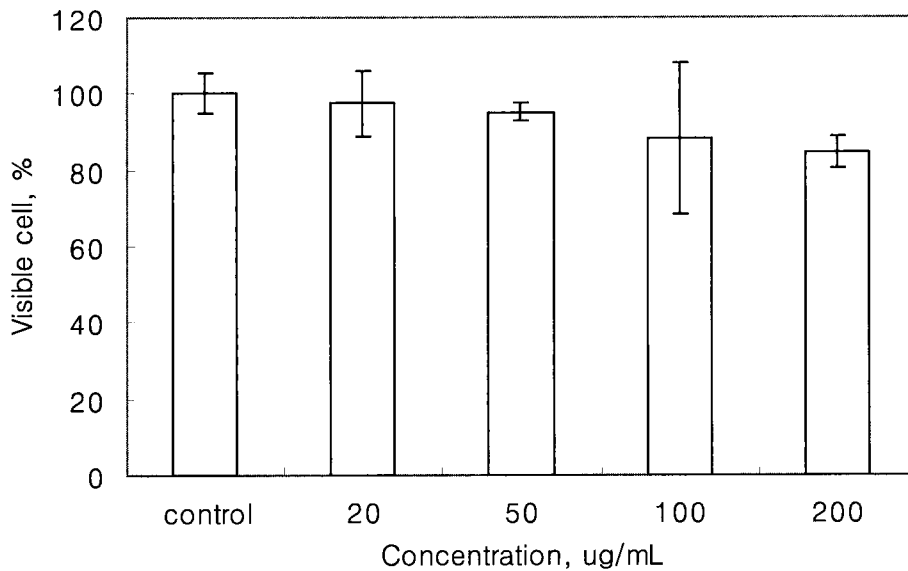


Fig. 12. Toxicity of protease inhibitor on HepG-2 cell.

## 요약

정제는 ammonium sulfate, DEAE Sepharose CL-6B, Superdex 200 column으로 specific activity 35,620.6 U mg<sup>-1</sup>, yield 20.7 %, 119.9 fold로 정제하였다. Native 전기영동에서는 단일 band로 나타났다. SDS-PAGE로 측정된 저해제의 분자량은 33.1 kDa monomer이었고, 등전점은 4.4에 해당하였다. 저해제의 물리·화학적 특성에서는 70℃에서 30 min 전처리한 후에 60%의 저해활성을, pH 6~10범위에서는 80% 이상의 저해활성이 유지되었다. Subtilisin에 대한 저해형태는 비경쟁적 저해로 나타났으며, Km값과 Vmax는 각각 2.67mg, 15.33 unit였다. protease inhibitor의 N-terminal sequence는 DPSALYAPSALVLTVGKGVSAI였다. 이 Sequence는 Streptomyces albobogrosolus에서 생산되는 Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI)와 일치하는 것으로 조사되었다. Streptomyces thermocarboxydus C12에서 생산된 protease inhibitor의 아미노산 조성분석의 경우 Ser, Ala의 함량이 높았으며, Met, Ile, His, Lys의 함량이 낮은 것으로 조사되었다. protease inhibitor를 식품급 저해제로 적용 가능한지 조사하였다. 비교 대조군은 상업적 저해제로 사용되는 pork plasma protein과 egg white type p-39이며, 단백질 농도로 subtilisin에 대해 저해율을 비교하였다. 그 결과 subtilisin에 대하여 pork plasma protein과 egg white type p-39보다 1,648.3, 571.6배의 저해효과가 있었다. 간세포 HepG-2 cell에 대하여 protease inhibitor는 200 ug/mL의 농도까지 세포 독성을 보이지 않았다.



## 참고문헌

1. Mala BR, Tanksale AM, Ghatge MS and Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 62: 597-635.
2. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
3. Moore S and Stein WH. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176: 367-388.
4. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
5. Righetti PG. 1989. Protein structure; A practical approach, T.E. Creighton, ed. IRL press. p 23~63. Oxford.
6. Kojima S, Terabe M, Taguchi S, Momose H and Miura K. 1994b. Primary structure and inhibitory properties of a protease inhibitor produced by *Streptomyces cacaoi*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1207: 120-125.
7. Ueda Y, Kojima S, Tsumoto K, Takeda S, Miura K and Kumagai I. 1992. A protease inhibitor produced by *Streptomyces lividans* 66 exhibits inhibitory activities toward both subtilisin BPN' and trypsin. *J. Biochem.* 112: 204-211.
8. Nitta M, Goto M, Shibuya N and Okawa Y. 2002. A novel protein with alkaline phosphatase and protease inhibitor activities in *Streptomyces hirosimensis*. *Bio. Pharm. Bull.* 25: 833-836.
9. Revina TA, Speranskaya AS, Kladrnitskaya GV, Shevelev AB and Valueva TA. 2004. Subtilisin protein inhibitor from potato tubers. *Biochemistry (Moscow).* 69: 1345-1352.
10. Vernekar JV, Ghatge MS and Deshpande VV. 1999. Alkaline protease inhibitor: A novel class of antifungal proteins against Phytopathogenic fungi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262: 702-707.
11. Pandhare J, Zog K, Deshpande VV. 2002. Differential stability of alkaline protease inhibitors from actinomycetes: effect of various additives on thermostability. *Bioresour. Technol.* 84: 165-169.

12. Murao S and Sato S. 1972. S-SI, a new alkaline protease inhibitor from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *Agric. Biol. Chem.* 36: 160-163.
13. Donaghy JA and McKay AM. 1993. Production and properties of an alkaline protease by *Aureobasidium pululans*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 662-666.
14. Häse CC and Finkelstein RA. 1993. Bacterial extracellular zinc-containing metalloprotease. *Microbiol. Rev.* 57: 823-837.
15. Kourteva Y and Boteva R. 1989. A novel extracellular subtilisin inhibitor produced by a *Streptomyces* sp. *FEBS Lett.* 247: 468-470.

## 제 4 절 굴 가수분해물을 이용한 생리활성물질의 대량생산 검토 및 해양 유래 미생물에 대한 적용

### 서 론

1942년 Waksman이 방선균에서 결핵과 그람양성 및 음성균에 유효한 Strptomycin을 발견한 이후(2) 방선균을 중심으로 새로운 생리활성물질의 탐색이 시작되면서 1만 여종의 다양한 생리활성물질이 알려져 있으며(2,3), 그 중에서 방선균이 50% 이상을 차지하고 있다(4,5). 근래에 개발된 유용한 생리활성물질 중에는 항암제, 항바이러스제, 면역 억제제 및 증강제, 에이즈 치료제, 고혈압, 당뇨병 치료제 등이 있다(6-9).

protease는 동물, 식물 및 미생물계에 광범위하게 분포되어 있으며, 모든 생체기능에 직·간접적으로 관여한다. 그러나 이상 환경에 의해 비정상적으로 발현된 protease는 염증, virus 감염, 암세포의 전이 등의 다양한 질병 병발과정에 관여하며 생명현상과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 이러한 protease에 대해 억제 또는 방어역할을 하는 것이 protease inhibitor이다.

protease에 대한 inhibitor의 주목할만한 약리작용으로는 소염제, 물질의 염증 제거 작용, 혈액의 항응고작용, 항암작용(결장, 식도, 유선, 간장, 림프 종양) 등이 알려져 있다(10,11).

지금까지 protease에 대한 inhibitor의 연구는 육상의 동·식물 및 미생물에 대하여 행하여 왔으며(11), 이 중 미생물의 protease inhibitor 중에서 가장 활발히 연구되고 있는 actinomyces류가 생성하는 inhibitor는 Aoyagi 등(12)이 trypsin, plasmin 등을 inhibitor하는 leupeptin을, Umezawa 등(13,14)이 Streptomyces mauvecolor로 부터 trypsin, papain, cathepsin A, B, chymotrypsin의 inhibitor인 antipain 및 chymostatin을 보고하였다. Kunimoto 등(15)은 pepsin과 renin을 inhibitor하는 pepstatin을, Murao와 Sato는 Streptomyces속에서 단백질성 protease inhibitor인 Streptomyces subtilisin inhibitor(SI)를 분리하였다(16). 이와 같이 미생물 대표산물에서 발견된 protease inhibitor는 동·식물에서 얻은 inhibitor와는 크게 다르며 이들 효소 inhibitor는 효소의 반응 mechanism 해명에 유용할 뿐만 아니라 물질 정제 시에 일어나는 효소적 분해방지용, 식품공정상에서 불필요한 protease의 활성을 억제 및 식품원료에 자유 amino acid의 작용을 감소시킬 수 있다(17-18).

현재 미생물이 생산하는 기능성 물질이 다양하게 연구되고 있으나, 산업화에

실패하고 있는 가장 큰 이유 중의 하나가 생산 단가이다. 이 같은 측면에서 저가의 굴과 가공 폐기물이 유용 미생물의 대량 배양을 위해 고가로 시판되고 있는 상업적인 배지를 대체할 수 있다면 굴 가공 폐기물을 고부가가치의 상품으로 전환시킬 수 있기 때문에 굴 가공 업체의 수지 개선에 큰 기여를 할 것으로 예상된다.

따라서, 본 연구에서는 산업적으로 경제성이 높은 protease inhibitor를 대량 생산하기 위해 해양으로부터 새로이 탐색된 *Streptomyces thermocarboxyus* C12의 protease inhibitor를 대량생산하기 위하여 최적조건을 탐색하였고, 생산 단가를 낮추기 위하여 굴가수분해물을 배지원으로 대체하여 protease inhibitor의 대량생산을 검토하였다. 그리고, 배지로서의 적합성을 검토하기 위하여 다른 해양유래 미생물의 배지로서 사용하여 product 생산능을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

효소들은 subtilisin (Fluka, Switzerland), trypsin, α-chymotrypsin, amino peptidase, collagenase (Sigma, USA)와 protease K (Promega, USA)를 사용하였고, 기질은 gelatine (Yakuri, JAPAN)을 사용하였다. 저해제 반응에 사용된 발색시약은 ninhydrin (Lancaster, England)을 사용하였으며, 그 외 사용된 모든 시약은 특급 혹은 분석용 시약을 사용하였다.

### 균주사용

균주는 분리·동정된 *Streptomyces thermocarboxyus* C12를 사용하였다. 이 균주는 액체배양한 후 glycerol을 첨가하여 -70℃에 동결보존 한 것을 본 실험에 사용하였다.

### 배지조성 및 배양방법

균주의 분리 및 배양을 위한 배지조성으로는 NaCl 10 g, KCl 0.7 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10.6 g, CaCl<sub>2</sub> 1.1 g, NaSO<sub>4</sub> 3.9 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 g, Tris-HCl 6.05 g, pH 7.8의 인공해수에 galactose 16g, proteose peptone 5g, LiCl 1mM을 첨가하여 기본배지로 사용하였다. 본배양에서는 전배양액 1.0% (v/v)를 접종하여 25℃, 100 rpm으로 7일 동안 배양하였다.

### 균체량 측정

균 생육도는 배양액의 상층액을 원심분리하여 제거한 후 증류수로 2회 세척한 다음 100℃에서 dry oven으로 건조시켜 dry cell weight(D.C.W)로 측정하였다.

### 단백질 정량

단백질 농도는 Lowry 법(2)을 이용하였다. Bovine serum albumin (Sigma chem Co.)를 표준시료로 하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며, column chromatography를 사용하였을 때는 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 효소 저해활성 측정

protease inhibitor 측정은 ninhydrin방법(3)을 변형시켜 사용하였다. 즉 50 mM Tris-HCl buffer 50  $\mu$ l에 10  $\mu$ l subtilisin (0.1 mg/ml)과 회석된 배양 상층액 10  $\mu$ l용액을 37℃에서 20 min간 전처리한 후 중탕가열한 0.2% (w/v)의 gelatin이 포함된 기질용액 0.5 ml(50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)과 37℃에서 30 min간 반응시켰다. 효소 반응을 정지시키기 위해 10.0% (w/v) trichloroacetic acid(TCA) 0.1 ml를 첨가한 후, ninhydrin 용액 0.5 ml을 혼합하여 100℃, 10 min간 끓이고, ice-water에서 냉각시킨다. 가수분해 되지 않은 단백질을 침전시키기 위해 50.0% 1-propanol을 가하여 15 min간 방치한 후, 10,000 rpm에서 10 min간 원심분리하여 570 nm에서 측정하였다. 효소 저해활성 1 unit는 효소활성 1 unit를 감소시키는 것으로 정의하였다.

### 미이용 굴가수분해물을 이용한 **protease inhibitor**의 생산

플라스크 배양의 최적조건 중 질소원을 굴가수분해물로 농도를 달리하여 (0.5, 1.0, 1.5, 2) 세포농도 및 inhibitor의 활성을 검토하였다.

### 회분배양

해양에서 분리한 *Streptomyces thermocarboxydus* C12의 protease inhibitor 물질 대량생산을 위해 7L Jar fermentor(BEST KOREA Co., Ltd.)에 working volume을 3L로 하여 배양온도 40℃, 초기 pH7.5 접종량 0.5, 1, 1.5, 2%(v/v), C/N ratio 1~6, 교반속도 50~300rpm, 통기량 0.5~3vvm로 달리하여 배양을 실시하였다.

## 미이용 굴가수분해물을 이용한 **Protinase inhibitor**의 대량생산

앞선 회분배양법을 바탕으로 기존의 질소원을 대체하여 굴가수분해물로 대체하여 대량생산에 응용을 하였다.

## 굴가수분해물 배지를 이용한 다른 해양유용미생물의 적용

*Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 18012P의 탄소원과 질소원이 미치는 영향을 조사하기 위해서 탄소원으로 fish oil과 olive oil, 질소원으로 yeast extract, trypton과 굴가수분해물을 복합적으로 첨가하여 그 결과를 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 저해제 대량생산을 위한 접종량의 영향

발효조내 균체량의 증가는 종배양액의 균체량에 비례하지만, 종배양액을 적당량 이상 접종하면 배지내의 각종 영양원이 희석될 뿐만 아니라, 종배양액 내에 축적된 노폐물이 많이 혼입되어 세포의 노화를 촉진하게 되므로 성공적인 배양을 수행할 수 없다. 따라서 발효조 배양시 종균의 접종량에 따른 균체 생육의 영향 및 protinase inhibitor의 생산량에 미치는 영향을 조사하였다.

1.5 %(v/v)의 종균을 접종하였을 경우, 1.0 %(v/v)보다 세포 농도는 높았지만 생산량은 떨어졌다(Fig. 1). 이는 종균량이 많아짐으로서 배양초기에 영양원의 희석이나 종균배양시 축적된 노폐물이 미치는 원인으로 판단된다. 또한 0.5, 1.0, 1.5 %(v/v) 접종량보다 2.0 % (v/v)의 DO(용존 산소량)가 낮으므로 높은 세포 농도에서는 산소 소모 속도가 공급속도를 초과하여 산소 부족이 야기되고, 이것이 생산량 감소로 이어진 또 다른 원인으로 예상할 수 있었다.

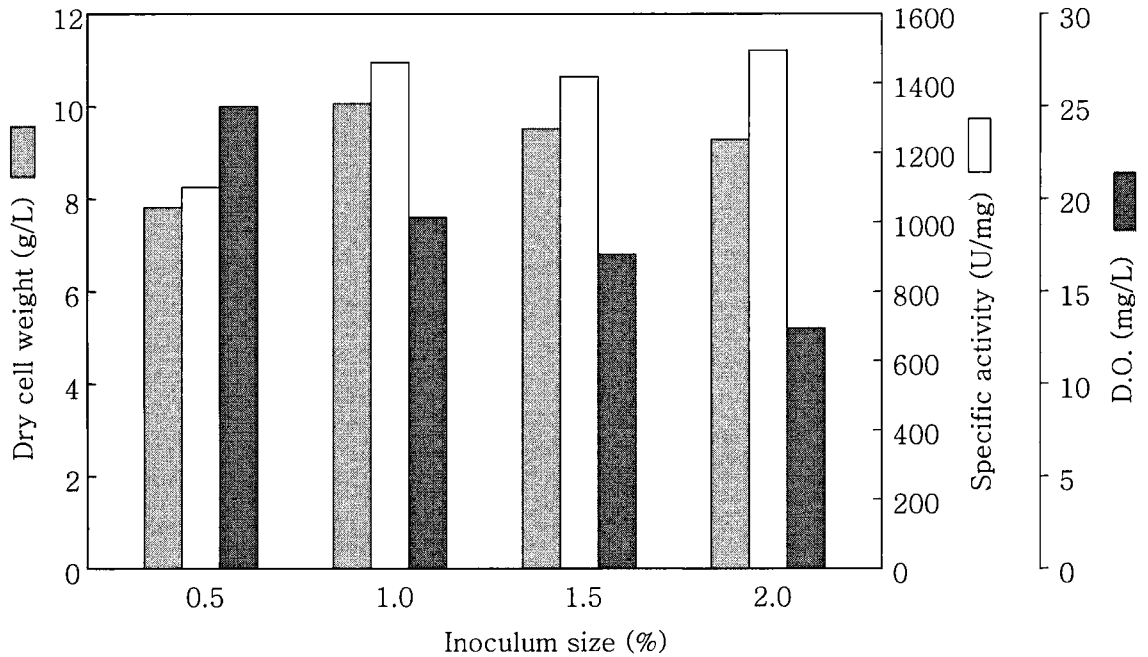


Fig. 1. Effect of inoculum size on the cell growth, protinase inhibitor production and DO by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

#### 저해제 대량생산을 위한 C/N비의 영향

Protinase inhibitor 생산에 영향을 미치는 C/N 비의 효과를 대량 배양을 통하여 살펴보았다. C/N비의 범위는 1~6 까지 실험하였으며, C/N 비 3까지는 protinase inhibitor 생산이 증가하였으나 그 이후 감소하는 경향을 나타내었다. 최대 protinase inhibitor의 활성은 C/N 비가 3일 때 1330.0U/mg이었다 (Table 1).

Table 1. Effect of the C/N ratio on the production of protease inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

C/N ratio	galactose concentration (g/L)	protease peptone (g/L)	Dry cell weight ( g / L )	Specific activity (U/mg)	Final pH ( - )
1	5	5	7.41	888.4	7.98
2	10	5	8.65	1230.2	7.93
3	15	5	10.80	1330.0	7.84
4	20	5	11.21	1014.8	7.21
5	25	5	10.42	963.0	6.76
6	30	5	10.76	566.7	6.32

#### 저해제 대량생산을 위한 교반속도의 영향

7 L Jar fermentor에 working volume을 3 L로 하여 교반속도별(50, 100, 150, 200, 250, 300 rpm)로 회분배양을 실시하였다.

배양결과, 100 rpm에서 가장 많은 protinase inhibitor가 생산되는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 교반속도를 100 rpm 이상으로 올릴 경우 생산량이 계속 감소하는데, 이것은 높은 교반속도로 인하여 전단 속도 (shear rate)가 증가하여 배양조의 혼합은 잘 되지만, 교반기 주위에 소용돌이(eddy)가 많이 생겨 균체 세포막에 손상을 줌으로 protinase inhibitor 생산에 영향을 미치는 것으로 추정되는 결과이다.



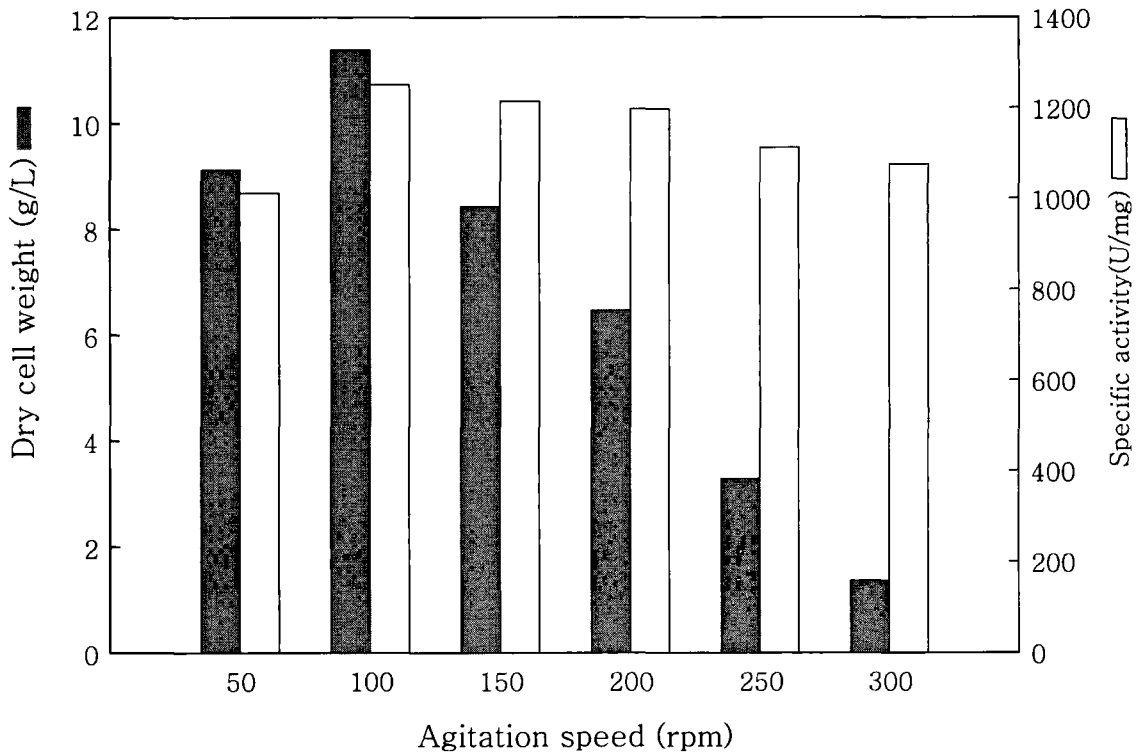


Fig. 2. Effect of agitation speed on the cell growth and protinase inhibitor production by *Streptomyces thermocarboxydus* C12 at a batch fermentation condition

#### 저해제 대량생산을 위한 통기량의 영향

교반속도 100 rpm, galactose 15g/L, 온도 40℃의 배양조건에서 7 L Jar fermentor를 이용하여 working volume 3 L로 통기량별 (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 vvm) 희분배양을 실시하였다. 배양결과, 1.0 vvm 에서 가장 많은 protinase inhibitor 생산이 나타났으나(Fig. 3) 생산량에 비해 활성 및 세포 농도에는 큰 영향을 주지는 못하였다.

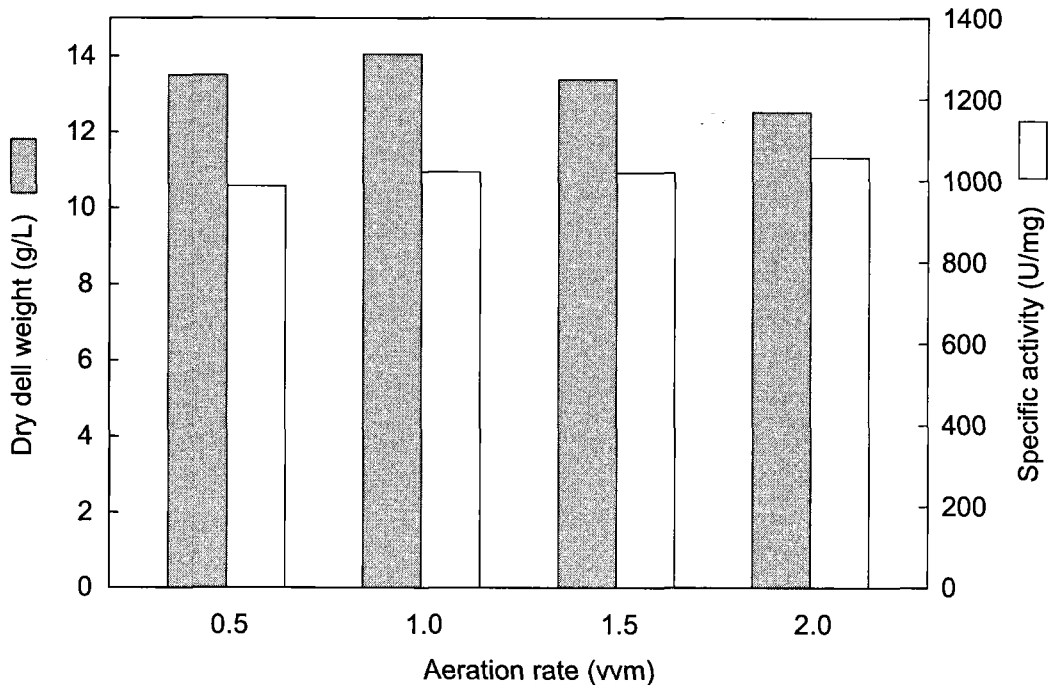


Fig. 3. Effect of aeration rate on the cell growth and proteinase inhibitor production by *Streptomyces thermocarboxydus* C12 at a batch fermentation condition

#### 미이용 굴가수분해물을 이용한 **protease inhibitor**의 생산

질소원은 효소의 합성을 조절하는데 중요한 역할을 하며 미생물의 세포생장에도 중요한 역할을 한다. 굴가수분해물을 이용하여 균체의 생육을 위한 최적 농도를 살펴보았다.(Fig. 4) 굴가수분해물의 농도가 증가함에 따라 세포의 농도는 증가하였으며 pH의 변화는 차이가 없었다. 활성은 1.5%의 농도에서 682U/mg의 가장 높은 값을 나타내었으나 원배지에 비해서 현저히 낮은 값을 나타내었다.

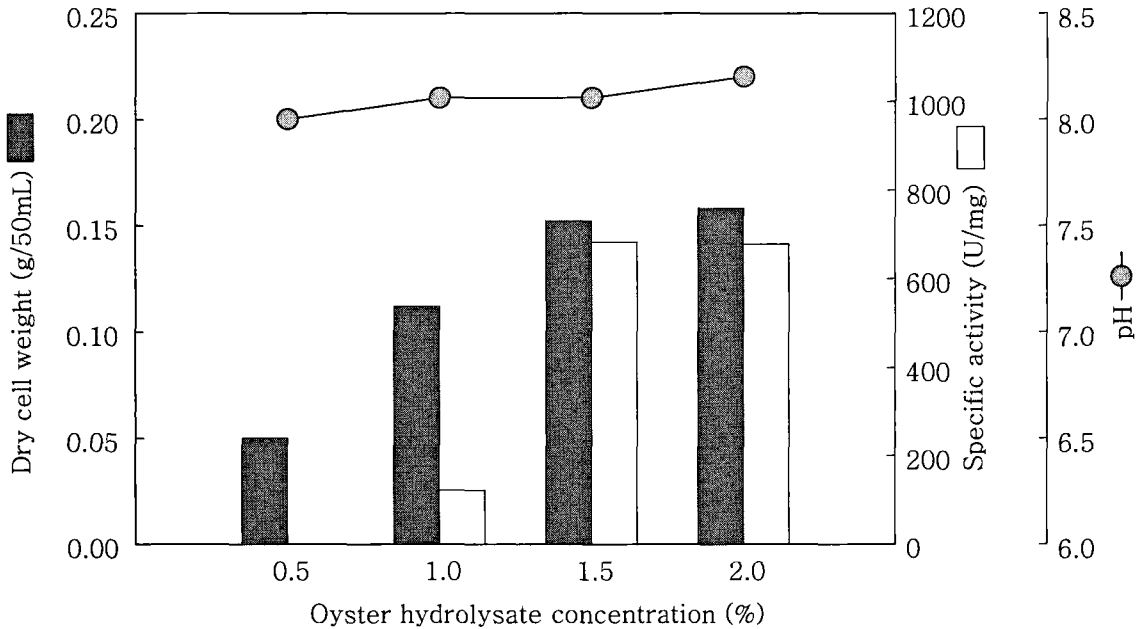


Fig. 4. Effect of Oyster hydrolysate concentration for the Subtilisin inhibitor activity producing from the *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

#### 저해제 대량생산을 위한 회분배양

앞선 결과들을 바탕으로 최적배양조건의 원배지 및 굴가수분해물 첨가 배지에서 균을 배양한 결과를 각각 Fig. 5, 6에 나타내었다. 원배지의 경우 192 시간에서 1080 unit의 protease 저해활성을 보였으며, 굴가수분해물 첨가 배지의 경우는 168 시간에서 335 unit로 원배지에 비해 약 1/3 정도 낮은 protease 저해활성을 보였다. 이는 질소원인 굴가수분해물의 단백질 함량이 proteose peptone에 비해 낮은 값을 나타내는데(Table. 2) 여기에 따른 아미노산조성 및 함량의 차이에 의해서 protease 저해활성이 많이 감소된 것으로 사료된다.

비록 굴가수분해물 배지를 이용한 대량생산 체제는 확립하지 못하였지만 이런 결과를 바탕으로 신규주를 등록하고 이 균주가 생산하는 매우 유용한 단백질 분해효소 저해제를 2007년 9월 6일자로 '스트렙토마이세스 서모카르복시두스 씨 12 (*Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)가 생산하는 섭티리신 유사 단백질 분해효소 저해제(Subtilisin like protease inhibitor) 및 그의 제조방법' (특허출원번호 : 10-2007-0063517호)를 출원하였습니다. 이 단백질 분해 저해제의 상용화가 매우 크게 기대된다 하겠다.

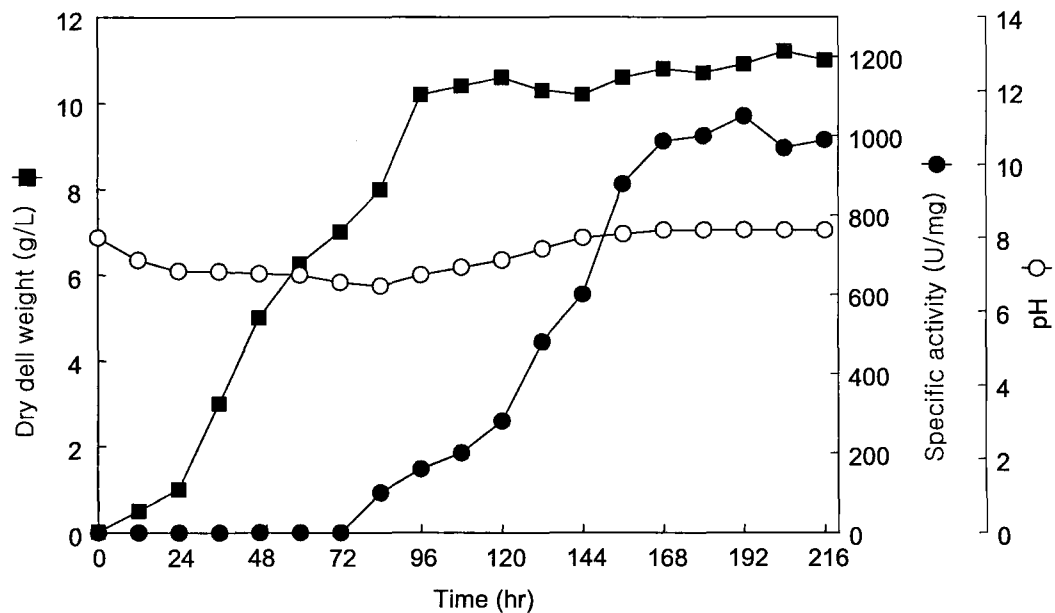


Fig. 5 Time course of the cell growth and protinase inhibitor production by *Streptomyces thermocarboxydus* C12 in 7L fermentor with the batch culture 0.5 % proteose peptone, 1.5 % glactose, 100 rpm, 1 vvm, 1 % inoculum size.

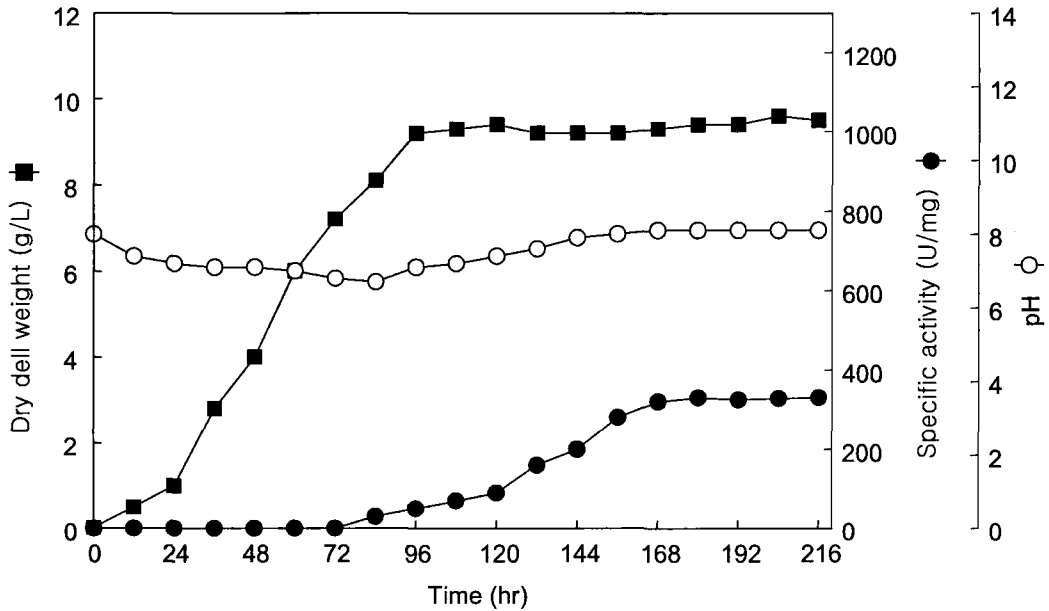


Fig. 6 Time course of the cell growth and protease inhibitor production by *Streptomyces thermocarboxydus* C12 in 7L fermentor with the batch culture 1.5 % oyster hydrolysate, 1.5 % glucose, 100 rpm, 1 vvm, 1 % inoculum size.

Table. 2. Amino acid weight of nitrogen source

Nitrogen source	protein concentration(mg/ml)
Bacto peptone	10.54
peptone C	26.23
peptone G	9.92
Trytone peptone	20.55
protease peptone	9.64
yeast extract	26.74
Oyster hydrolysate	7.71

굴 가수분해물 배지를 이용한 다른 해양유용미생물의 적용

해양 관련 오염중에서 국부적으로 단시간에 심각한 피해를 주는 것은 각종

선박들의 해난 사고에 의해 해양으로 유출되는 기름일 것이다. 이러한 기름은 일단 유출이 되고 나면 해수 표면에 비교적 두꺼운 막을 형성하게 된다. 이로 인해 햇빛이 차단되며, 조류의 다량 폐사와 산소 부족을 일으키게 된다. 이를 제거하는 방법으로는 오일펜스나 직접 기름을 빨아들이는 도구를 이용하여 기계적으로 긁어모으는 방법, 기름을 태워 없애는 방법과 화학유화제를 이용하는 방법이 있으나 2차 오염을 유발할 수 있다. 그러므로 자연정화에 관계하고 있는 생물, 즉 자연에 존재하는 생물을 이용하여 기름에 대한 오염을 제거하는 방법이 시도되었으며, 그 중 미생물이 생산하는 생물유화제(Biosurfactant)를 이용하는 것이 효과적이라 볼 수 있다. 그 중 하나인 본 연구실에서 보유하고 있는 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)가 있다. 본 균주의 경우는 한 균주가 rhamnolipid와 rhamnolipid methyl ester를 동시에 생산한다는 점이 밝혀진바 있으며 이러한 점은 *Pseudomonas aeruginosa* 연구에 있어서 현재까지 전혀 보고된 적이 없는 새로운 균학적 특성으로 밝혀졌다. 그러므로 이 생물유화제를 생산하는 본 균주의 생육을 위한 배지로서의 활용을 검토하였다.

굴 가수분해물을 질소원으로 사용하기 위해서 기존에 사용하였던 BSM과 LB를 혼합하여 사용한 배지와 BSM에 굴가수분해물을 첨가하고 1%의 olive oil을 탄소원으로 하여 균체의 성장과 활성을 비교하였다(Table. 3). 균체 성장의 경우 기존의 배지가 더 좋았으나 활성은 굴가수분해물을 첨가한 배지가 816 unit로 기존 배지에 비해서 약 2배 정도 높은 결과를 나타내었다. 하지만 탄소원을 olive oil로 사용할 경우 분리 정제를 하는데 있어서 많은 비용과 복잡한 절차를 거치게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 기존의 연구결과를 바탕으로 대체 탄소원으로써 비교적 활성이 높고 분리 정제가 용이한 fructose를 선정하여 비교하였다(Table. 3). Olive oil의 결과와 마찬가지로 균체의 성장은 기존 배지에서 더 잘 자랐으나 활성은 기존 배지에 비해서 290 unit로 약 1.5배 높은 결과를 나타내었다. 이와 같이 굴가수분해물을 첨가한 배지가 기존 배지에 비해 더 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었고 olive oil에 비해 fructose를 첨가한 경우 활성이 더 낮으나 분리정제의 경제성을 비교해 볼 때 잠재적인 가능성을 나타냄을 알 수 있었다.

Table 3. Effect of nitrogen sources and carbon sources on the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 18012P

N-sources	C-sources	Cell Concentration (g-D.C.W./L))	Emulsifying activity (Unit)
1% yeast extract + 1% tryptone	1% fish oil	8.10	408
1% yeast extract + 1% tryptone	1% fructose	5.81	213.6
2% oyster hydrolysate	1% fish oil	6.83	816.5
2% oyster hydrolysate	1% fructose	4.68	290.6

#### 요약

*Streptomyces thermocarboxydus* C12의 최적 회분배양 조건은 굴가수분해물 1.5 %, galactose 1.5 %, 100 rpm, 1 vvm, 접종량 1 %에서 335 unit로 원배지에 비해 약 1/3 정도 낮은 protease 저해활성을 보였다. 반면에 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)의 활성은 굴가수분해물을 첨가한 배지가 816 unit로 기존 배지에 비해서 약 2배 정도 높은 결과를 나타내었다. 이는 균주마다 이용하고자 하는 질소원 내의 아미노산 함량 차이에 따른 특이성을 나타내는 것으로 사료된다. 그러므로 균주의 생육조건에 따라 선별적인 질소원을 선택하는 것이 효과적일 것으로 판단된다. 이런 결과를 바탕으로 2007년 9월 6일자로 '스트렙토마이세스 서모카르복시두스 씨 12 (*Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)가 생산하는 셉티리신 유사 단백질 분해효소 저해제(Subtlisin like protease inhibitor) 및 그의 제조방법' (특허출원번호 : 10-2007-0063517호)를 출원하였습니다.

## 참고문헌

1. Florey HW, Cheng E, Heatley NG, Jennings MA, Saunders AG, Abranram EP, Florey ME. 1949. Antibiotics, Vol. 2, Oxford University Press, p. 1144-1151.
2. Gottlieb D. 1976. The production and role of antibiotics in soil, *J Antibiotics* 35: 987-1000.
3. Wagman FH, Weinstein IJ. 1980. Antibiotics from micromonospora, *Ann Rev Microbiol* 34: 537-558.
4. 屈指内末治. 1995. 放線菌の抗生物質生産, 蛋白質核酸酵素 40: 986-998.
5. 上芳夫, 大村智. 1982. 微生物薬品化学, 南江堂, 東京, p. 106-115.
6. Umezawa H, Demain AL, Hata H. 1982. Trends antibiotic research, Japan Antibiotics Research Association, Tokyo.
7. 大野雅二, 大村智. 1987. 抗生物質研究の最尖端, 東京化学同人, 東京, p. 155-172.
8. Giancarlo L, Parenti F. 1977. Antibiotics, Springer-Verlag, New York.
9. 大岳望. 1985. 生理活性 微生物化学, 公立出版社, 東京, p. 208-212.
10. Aoyagi T, Umezawa. 1975. Structure and activities of protease inhibitor of microbial origin, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 429-454.
11. Umezawa H. 1972. Enzyme inhibitors of microbial origin, University of Tokyo Press, Tokyo. p. 1-114.
12. Aoyagi T, Takeuchi T, Matsuzaki A, Kawamura K, Kondo S, Hamada M, Maeda K, Umezawa H. 1969. Leupeptins, new protease inhibitors from Actinomyces. *J Antibiot* 22: 283-286.
13. Umezawa S, Tatsuta K, Fujimoto K, Tsuchiya T, Umezawa H. 1972. Structure of antoreyipain, a new Sakaguchi-positive product of Streptomycetes. *J Antibiot* 25: 267-270.
14. Umezawa H, Aoyagi T. 1973. The Structure of Chymostatin, A Chymotrypsin Inhibitor. *J Antibiot* 26: 625-646.
15. Kunimoto S, Aoyagi T, Morishima H, Takeuchi T, Umezawa H. 1972. Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. *J Antibiot* 25: 251-255.
16. Murao S, Sato S. 1972. S-SI, a new alkaline protease inhibitor from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *Agric Biol Chem* 36: 160-163.



17. Bode W, Huber R. 1992. Natural protein protease inhibitors and their interaction with proteases. *Eur J Biochem* 204: 433-451.
18. Terashita T, Kono M, Murao S. 1980. Promoting effect of S-PI on fruiting of *Lentinus edodes*. *Trans Mycol Soc Jpn* 21: 137-140.

## 제 6 장 기능성 소재로서 활용을 위한 시장조사

### 1. 서론

단백질 분해효소는 생체 내 소화효소의 작용 뿐 아니라 혈전, 세포융합과 증식, 혈액응고, 혈압조절, 방어 등의 기능과 세포의 성장과 분화, 사멸, 세포 내외 단백질의 turnover, 세포이동, 침윤, 수정 등 생체 기능에 직·간접적으로 관여한다. 생리적으로 단백질 분해효소는 여러 신호에 의해 발현되고 저해제에 의해 활성을 조절한다. 미생물 유래의 단백분해효소 저해제는 Høyen and Skulberg(1962)이 *Clostridium botulinum* (type A, B, E)에서 trypsin에 대한 저해물질을 발견한 이래 활발하게 연구되고 있다. 곰팡이류 단백분해효소 저해제 생성균주는 주로 *Penicillium cyclopium*에 대하여 많은 연구가 수행되었으며 이 균주는 산성 단백분해효소 저해제로 poly-L-malic acid를 생성한다(Shimada and Matsuchima, 1969). *Neurospora sitophilia*와 *Aspergillus japonicus*의 단백질 분해효소 저해물질은 저분자의 thiol proteinase 저해제였다(Hanada et al., 1978). Aoyagi et al.(1969)은 *Actinomyces*에서 trypsin, plasmin 등을 저해하는 leupeptin을 보고하였고, Umezawa et al.(1972)는 *Streptomyces mauvecolor*에서 trypsin, papain, cathepsin A, B 등의 저해물질인 antipain을 보고하였다. 그리고 pepstain(Kunimoto et al., 1972), *Streptomyces subtilisin inhibitor*(SSI)(Murao et al., 1972)가 보고되어 있다. 미생물이 생산하는 단백분해효소 저해물질은 동식물체에서 얻은 것과 현저히 차이가 있으며, 효소반응 기작과 질병의 해석에 사용하며, 독성이 없다면 자가소화 방지를 위한 식품첨가물로 사용할 수 있다.

바이오 산업은 건강, 식량, 환경 등 인류 난제의 해결과 직결된 기술집약적 고부가가치 지식산업으로 대표적인 high risk, high return 산업이다. 신약 개발에 평균 14.9년, 약 6억불이 소요되며, 물질 특허제도에 따라 15-20년 시장 지배력을 확보하나 성공률은 0.01% 이하이다. 그리고 연구 능력 보다는 상업화 능력이 중요하여 성공한 바이오 클러스터는 연구능력이 9배 상업화 능력이 20배 더 우수한 것으로 나타났다(박, 2005). 일본에서 peptide를 이용한 특정 보건용 식품의 종류는 콜레스테롤치가 높은 사람을 위한 식품(23품목), 혈압이 높은 사람을 위한 식품(12품목), 미네랄 흡수를 도와주는 식품(12 품목), 혈당치 조절식품(10품목)이며, peptide 제품으로 성공한 예는 아밀 S(칼피스(락토트리펩티드, ACE 저해작용)이다(이, 2005).

식품을 조리, 가공, 섭취할 때 맛을 증진시키거나 강화시킬 목적으로 사용하는 조미료는 초기에 소금, 장류 등의 기본 조미료에서 MSG, 핵산 등의 발효 조미료를 거쳐 현재는 펩타이드계 조미료, 효모 엑기스, 어장, 효소분해형의 고도가공천연조미료 시대로서 고부가가치 산업으로 전환을 시도하고 있다(임 등, 2004)

## 2. 수산식품산업에서 가수분해효소 저해제의 사용

### 1) 단백질분해효소 저해제

수리미 젤(수리미 수산식품)의 품질에 영향을 미치는 주요 인자는 어류의 선도이며, 가열 젤의 품질에서 다른 중요한 인자는 선도와 직접적인 관련이 없으나, 내인성 단백 가수분해효소에 의한 myosin과 actomyosin의 분해이며, 특히 어육은 포유동물 육에 비하여 약 10배 이상의 속도로 자가소화가 진행된다(Siebert, 1958). 어육의 연화는 조리에 의해 유도되며 myosin의 급격하고 결정적인 분해로 특징지을 수 있다. lysosomal 단백질분해효소, 알칼리 단백질분해효소, calpain 및 collagenase들은 어육의 가열 연화에 기여한다(Morrissey, 1995) 단백질 분해효소의 작용에 의한 어육의 분해는 Pacific whiting, arrowtooth flounder, Atlantic menhaden 및 white croaker의 surimi에서 심각하게 일어나 최종 제품의 품질에 큰 영향을 미친다(Porter et al., 1993; Boye and Lanier, 1988; Makinodanet al., 1985; Shimizu et al., 1981). 따라서 단백질 가수분해에 민감한 어육 가공을 위해서는 적절한 식품급 단백질분해효소 저해제의 사용이 필수적이다.

단백분해효소 저해제는 반응 기작, 기원 혹은 구조 유사성에 기초하여 나누며, 특이성에 근거하여 3가지 그룹으로 나눈다. 즉 (i) 한 가지 분류 이상의 단백질 분해효소와 반응, (ii) 한 부류 이내의 모든 단백질분해효소에 대하여 특이적인 저해제, (iii) 한 가지 부류 내의 단일 단백질분해효소에 대한 높은 특이성을 가진 저해제로 분류한다(Salvesen and Nagase, 1989). 효소 저해는 가역적 혹은 불가역적으로 일어나며, 불가역적 저해제는 물리적 수단으로 효소활성을 회복할 수 없으나, 가역적 저해제는 저해분자를 제거하거나 치환하여 재생할 수 있다(Garcia-Carreno, 1996). 잘알려진 대부분의 불가역적 저해제는 일차적으로 단백질분해효소의 활성 부위를 분류하기 위해 사용하는 합성물질이고, 가역적 저해제는 천연에 존재하는 단백질로 kinetic binding 상수를 측정할 수

있다. 특이적인 저해제는 active-site-directed 물질이며 효소의 촉매 혹은 기질-결합 위치와 조합하여 안정한 복합체를 만든다. 천연 기원의 특이적인 단백질 저해제는 기질의 대표적인 특징을 가진 단백질이거나 peptide이지만 비특이적인 저해제는 모든 부류의 단백분해효소를 저해하는  $\alpha$ -2 macroglobulin을 제외하고 자연에는 거의 존재하지 않는다(Garcia-Carreno FL, Hernandez-Cortes. 2000).

Serine 단백분해효소의 저해제는 여러 체계에 따라 여러 그룹으로 나눈다 (Salvesen and Nagase, 1989). Ovoidinhibitor는 serine 단백분해효소 저해제로 특성은 ovomucoid와 비슷하다(Stevens, 1991). Ovoidinhibitor는 bovine trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, subtilisin 및 *Asperigillus oryzae* alkaline proteinase를 저해한다. Trypsin과  $\alpha$ -chymotrypsin (혹은 subtilisin)에 대한 위치는 독립적이며 비경쟁적이다. ovoidinhibitor의 trypsin-저해 활성에 대하여 arginine 잔기가 필수적이다(Liu et al., 1971). 단백질성 단백분해효소 저해제는 식물군에 널리 분포한다. Trypsin과 chymotrypsin 저해제는 두류 씨앗, 즉 eoenm lima 콩, garden bean과 ground nut에서 확인되었다(Lorand, 1976). 대두에 있는 2가지의 유력한 저해제는 Kunitz 대두 저해제와 Bowman-Birk 저해제이다. 이들은 크기, 아미노산 조성, 구조 및 생화학적 특성에서 현저한 차이가 있다.

## 2) 식품급 단백분해효소 저해제

Pacific whiting 수리미에 소 혈청 단백질의 첨가함으로써 가열 젤의 분해를 방지할 수 있다는 발견은 이들 어류를 수리미 자원으로 활용하는 계기를 제공함으로써 미국 수산가공산업의 발전에 크게 기여하였으며(Hamann et al., 1990), 어육 단백질 분해효소의 저해하기 위한 식품급 저해제에 관심을 갖는 계기가 되었다. 현재 불필요한 자가소화를 방지하기 위해 동물, 식물 및 미생물의 여러 조직에 있는 단백분해효소 저해제를 탐색하고 있다(표 1). 이들 중에서 과거에는 beef plasma protein (BPP), egg white, whey protein 및 감자 추출물을 식품급 저해제로 수리미에 사용하였다(Weerasinghe et al., 1996; Wasson et al., 1992; Lanier et al., 1981). BPP와 egg white는 Pacific whiting(Morrissey et al., 1993), arrowtooth flounder와 Alaska pollack(Reppond and Babbitt, 1993), 대서양 menhaden(Hamann et al., 1990), 의 수리미 젤에 효과적이었다. BPP는 가장 높은 papain (cysteine 계열 단백분해효소) 조해 활성을 보였인 반면, 난백은 가장 우수한 trypsin (serine 계열 단백분해효소) 저해제였다(Weerasinghe et al., 1996). 일반적으로 serine 계열

의 단백질 분해효소는 대서양 및 걸프만 menhaden과 white croaker에 중요한 것으로 알려져 있다.

표 1. 수산식품에 사용가능한 식품급 단백분해효소 저해제

Inhibitors	Target Proteinase Type	Remark
Plasma Protein		
Bovine	serine, cysteine	Bovine and pig plasma was prohibited in USA
Pig	cysteine	
Chicken	serine	
Egg white	serine, cysteine	New product was recently developed by Henningen
Whey protein	cysteine	depend on manufacture
Legume	serine	
Potato extract	metallo	off-color
Green tea polyphenols	metallo	
Spinach extract	serine	

일반적으로 식용 가능한 저해제들은 수리미 식품의 품질에 부정적인 영향을 미친다. 즉 BPP는 off-flavor와 색 난백은 유황취, 감자 추출물은 off-color를 발현한다. 나아가 많은 사람들이 이들 물질의 비저해제 성분에 대하여 알러지 반응을 가지며 BPP는 여러 종교 및 문화적 측면에서 식품 첨가물로 사용을 꺼려할 뿐 아니라 광우병의 우려 때문에 세계적으로 사용을 금지하고 있다. BPP의 대체물로 스페인에서 돼지 혈청 단백질을 개발하였으나, 미국은 수입 금지 품목으로 설정하여 식품에 사용을 금지하고 있다. 천연 저해제 물질의 한계를 극복할 수 있는 식품급 단백분해효소 저해제를 개발하기 위해 최근 재조합 기술을 이용하여 저해제를 개발하였으나(Abrahamson et al., 1988) 단가로 인한 경제성의 문제 때문에 식품급으로 사용하지 못하고 있다. 입증된 미생물을 효소 저해제 생산의 주요 자원으로 사용할 때 일정한 조성의 저해제 생산, 낮은 농도에서 효율적인 저해로 인한 부정적인 관능적 문제의 해결, 알

러지 가능성의 방지의 장점이 있으며, 부가적으로 생산성과 안전성을 개선하기 위해 다른 형태의 저해제 자원과 미생물 host로 사용할 수 있다. 따라서 안전성이 확보되고 대량 생산이 가능하며 제품의 균일성을 보장할 수 있는 미생물 산생 단백질 분해효소 저해제의 생산이 시급하다.

### 3. 펩티드의 기능성

#### 1) 기능성

식품 단백질은 소화관에서 아미노산까지 분해한 다음 소장에서 흡수된다. 아미노산과 펩티드는 흡수경로가 다르다. 소장에는 4 종류의 아미노산 흡수구와 1 종류의 펩티드 흡수구가 확인되었으며, 비교적 저분자의 펩티드이면 종류에 상관없이 흡수되며 아미노산에 비하여 복수로 한번에 흡수되기 때문에 단위시간 당 흡수량은 아미노산에 비하여 더 많다. 대부분의 단백질(카제인, 유장, 난, 소맥 등)에서 유래한 펩티드는 혈장 콜레스테롤을 억제하는 효과를 가진다. 이 같은 효과는 펩티드가 담즙산과 결합하여 콜레스테롤의 흡수를 억제하기 때문이다(Nagaoka, 2006).

근육에서 유래한 펩티드는 항산화성 (Hattori et al., 1998; Saiga et al., 2003), 혈압강화작용 (Arihara et al., 2001; Suetsuna, 2002; Katayama et al., 2004)와 같은 여러 가지 기능적 특성을 가지며, 항산화 효과와 관련하여 Rival et al.(2001)이 아미노산 결합서열과의 상관을 제시하였다. 돼지 골격근의 효소가수분해물에서 유래한 ACE 저해 펩티드는 MNPPK와 ITTNP였으며, 북양명태 껍질 가습누해물의 항산화 펩티드는 8개의 아미노산으로 이루어져 있다 (Kim et al., 2001). 그러나 아미노산이 5개 이상으로 구성된 펩티드는 장관에서 흡수가 용이하지 않고, 장관에 분포하는 dipeptidase에 의해 분해되기 때문에 in vitro에서 검증된 효과를 in vivo에서도 보증하지 못한다. 따라서 비슷한 효과를 얻기 위해서는 아미노산 잔기 수 4개 미만의 펩티드를 제조할 필요가 있다.

#### 2) 기능성 펩티드의 시장 규모

2005년 우리나라 굴 생산량은 약 39,430톤으로서(이, 2006) 대일 생굴 수출, 통조림은 위생적인 문제와 통조림 산업의 가격 경쟁력의 저하로 인해 현격히 저하하였고, 내수용은 2001년에 비하여 2배 이상 증가하였다(표 2). 그러나 장

기보관으로 인하여 상품가치를 상실한 IQF 굴이나 Ex분 추출을 위해 사용하는 굴은 각 가공회사의 기밀이기 때문에 명확하게 집계되지는 않지만 Ex분 추출에 사용하는 굴의 양으로 추정할 때 연간 약 20-60 톤으로 추정된다. Ex분 추출용 굴은 Ex분 추출후 잔사를 그대로 폐기하거나 건조 분쇄하여 저가의 사료로 사용하고 있기 때문에 산 혹은 효소 가수분해를 위한 좋은 원료일 뿐 아니라 펩티드 생산 원가를 절감할 수 있다.

표 2. 굴의 제품별 생산현황과 미이용 굴의 발생량

품목	2001		2005	
	물량(톤)	금액(백만원)	물량(톤)	금액(백만원)
계	40,530	93,310	39,430	125,008
대일생굴	7,010	21,030	1,900	7,600
통조림	8,970	13,455	4,850	7,760
마른굴	4,600	6,900	2,660	4,256
냉동굴	8,950	13,425	5,870	9,392
내수용	11,000	38,500	24,150	96,000
상품가치 상실, Ex분 추출용 및 미이용 냉동굴*			20-60	

\* 미발표로 인한 추정치(Ex분 추출을 위한 굴 사용량에서 역으로 추정)

굴을 이용한 산 가수분해물을 제조할 때 분말 kg 당 단가는 7418-8018원이 소요되는 것으로 타나났으며, peptide 분말 제조 시에는 분말 kg 당 17,000-17,600원이 소요되는 것으로 나타났다(표 3). 이 같은 계산의 결과는 순수한 생산단가이며, 공정에 필요한 기계의 사용료는 Bio21 센타의 비입주 업체의 임대 비용을 적용하였다.

표 3. 글 펩티드 생산에 따른 경제성 분석

원료명	원료단가 (원/kg)	제 품			
		산가수분해물 (분말/kg)	계 (원/kg)	Peptide* (분말/kg)	계 (원/kg)
미이용 IQF	700	산가수분해공정; 1,818원 탈염공정; 2,000원 분무건조공정; 3,500원	8,018원	가수분해: 14,100 분무건조; 3,500 원	17,600
Ex분 추출후	100	상동	7,418원	상동	17,000

상업화에 성공한 대표적인 대두 펩티드는 일본에서 후지제유가 1987년 식품소재로 판매하기 시작하여 2004년 아미노산 붐의 후속상품으로 기대를 모으기 시작하면서 신상품이 출시되어 본격적인 시장이 형성되었고, 2005년 일본의 대두 펩티드 시장 규모는 약 80억엔을 상회하였다(다(임과 김, 2006). 2003년 건강식품이 87.5% 드링크류가 12.5%를 점하였으나, 2004년 이후 드링크 타입 제품의 시장이 급속히 성장하였다. 초기 판매형태는 통신판매나 스포츠 전문점에서만 판매가 이루어졌으나, 대부분은 홈쇼핑 전문 채널을 통한 판매가 주류를 이루고 있다. 일본의 향후 마케팅 전략은 대두 펩티드의 기능 인지도를 높이고 효능 체감을 위하여 피로회복 효과를 체감시키는 시스템적 시도가 필요할 것으로 보고있다(임과 김, 2006).



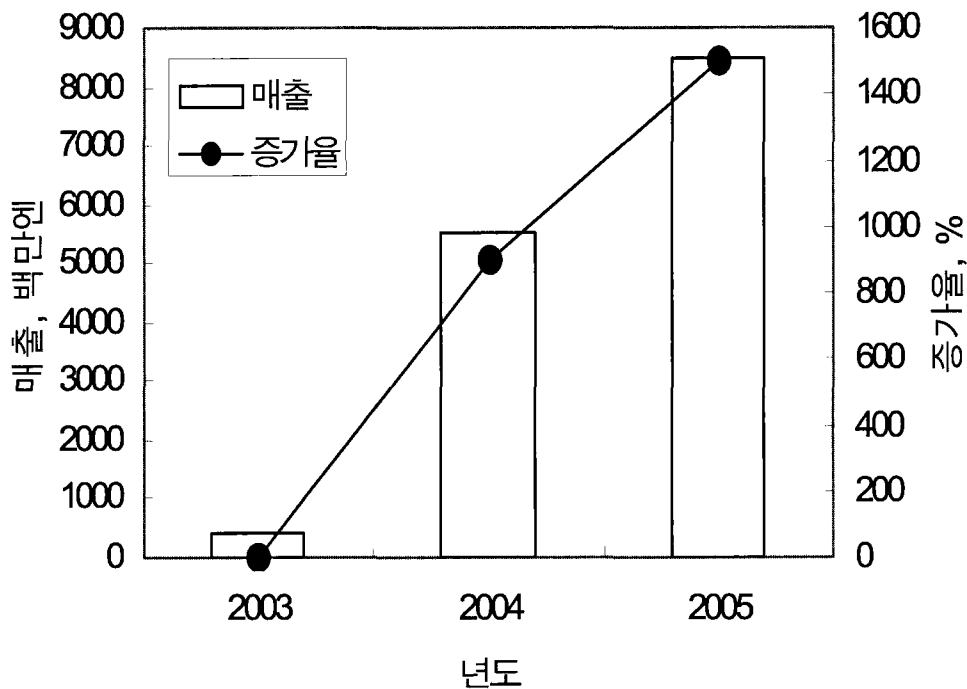


그림 1. 대두 펩티드의 시장 규모

2002년 우리나라의 기능성 음료 시장의 규모는 7,224억원의 규모로 이 중에서 기능성 발효유 시장이 43.6%를 차지하고 있다. 이 중에서 기능성 펩티드의 사용이 가능한 시장의 규모는 숙취해소, 콜레스테롤 저하, 특정 기능강화를 위한 제품을 포함하여 총 1176억으로서 10.4%에 해당한다(표 2). 비교적 시장 규모가 큰 숙취해소 음료는 소비자의 대부분이 피로회복의 효과를 기대하며, 간장보호 및 갈증해소의 순으로 숙취음료가 간장회복에 효과가 있을 것이라는 기대는 미미한 것으로 나타났다(표 4). 따라서 탁월한 간장 보호 및 간 기능 개선 효과를 가진 숙취 해소 음료의 개발은 틈새시장 공략을 위한 전략이 될 수 있다.

일본에서 펩티드는 피로회복과 다이어트를 목적으로 많은 제품이 출시되어 있으며(표 5-7), 펩티드 함유량은 식당 200-800 g으로서 대체로 피로회복을 목적으로 한 제품이 다이어트를 목적으로 한 제품에 비하여 함유량이 훨씬 높다.

표 4. 기능성 음료 시장의 규모

구분	2000 (억원)	2001 (억원)	2002 (억원)	성장률 (%)	2003 추정치(억원)
스포츠	1,690	1,660	1,900	14.5	2,200
숙취해소	300	600	830	38.3	1,000
다이어트, 미용	900	1,000	1,283	28.3	1,500
콜레스테롤 저하	-	93	146	57.0	300
특정기능강화	-	-	200	-	500
두유	1,294	1,609	2,000	24.3	2,500
기능성 발효유	3,040	4,050	4,920	21.5	5,200
합계	7,224	9,012	11,279	25.2	13,200
전체음료	28,000	32,000	34,000	6.3	35,000

표 5. 숙취음료의 소비자 기대효과와 구입이유

기대효과	%	구입이유	%
피로회복	71.5	피로회복	60
간장보호	4.2	두통	10
갈증해소	2.9	숙취	7
		속쓰림	6

표 6. 일본에서 피로회복을 목적으로 한 대두 펩티드 제품

제품명	함유량(mg/식)	판매처
THE PEPTIDE POWDER	8000	후지제유
THE PEPTIDE	8000	토우제유
THE PEPTIDE	8000	후지제유
워더 Recover Block	4000	모리나가 제과
PEPTIDE Power	4000	카루피스
워더 인 젤리 대두 펩타이드 인	4000	모리나가 제과
파워에이드	4000	일본 코카 콜라

표 7. 다이어트를 목적으로 한 대두 펩타이드 제품

제품명	함유량 (mg/식)	판매자
Amino body 연소계 아미노산	2300	오리히로
Amino perfect 슬림 콘트롤	1500	키린 웰 푸드
Amino body 아미노산+ 구연산	2000	만난푸드
워더 Body design	2000	모리나가 제과
타스케페 사프리	200	시세이도뷰티푸드
My caloriet	불명확	미로비너스
Soy peptie energie charge	6000	리얼 넷
BADIET	불명확	코모리 제약
Slim UP Slim	1000	아사히 푸드 & 헬스

#### 4. 펩티드계 조미료의 개발

시장 요구에 부응하기 위해 천연 조미료 개발은 크게 3가지 방향, 즉 (1) 자연과 건강, (2) 발효, (3) 맛과 편이성으로 수행하고 있다. 펩티드는 주로 의약품으로 이용되고 식품에서의 이용은 활발하지 않다. 그 이유는 고가이고, 식품에 대한 펩티드의 중요성이 인식되어 있지 않으며, 종래 식품의 중요한 정미성분이 아미노산, 핵산, 유기산, 당류, 무기질, 유지 및 고분자물질이었기 때문이다. 현재 천연의 각종 식품에서 많은 펩티드가 분리되었고 정미성이 부각되었다. 펩티드는 맛의 주역이라기 보다는 맛을 조정하여 kokumi를 부여하는 도역으로서 식품에 불가결한 성분이다. kokumi 펩티드는 glutamyl 잔기를 가진  $\gamma$ -L-glutamyl-L-leucine,  $\gamma$ -L-glutamyl-L-valine 및,  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-alanine 이다(Dunkel et al., 2007). 향후 식품가공의 방향은 지미의 강화와 더불어 맛의 복잡화, 고도화를 추구하는 경향이기 때문에 펩티드의 이용이 활발해 질것으로 보인다.

일본의 천연계 조미료 시장의 규모는 아미노산계가 연간 320억엔으로서 동물성과 식물성 소재가 각각 120억엔과 200억엔으로서 동물성 소재가 다소 높은 편이다(표 8). 이들은 동식물성 소재를 사용하여 효소 혹은 산 가수분해한 제품이다. 특히 산 가수분해물은 mouthfulness, thickness 뿐 아니라 입속에서 지속적인 맛을 유지하는 kokumi 성분이 부족하기 때문에 kokumi peptide의 첨가가 필수적이다(임, 2004). 따라서 효소 가수분해 펩티드의 활용 가능성이 매우 높은 분야로 판단된다.

표 8. 천연계 조미료 시장의 시장 규모 (단위 생산량: 톤/년, 매출액: 억엔/년)

분류	단품형		배합형		
	생산량	매출액	생산량	매출액	
엑기스계	어패류	18,000	200	26,000	300
	축육계	42,000	230	63,000	630
	야채계	4,000	50	6,000	70
	계	63,000	480	95,000	1,000
아미노산계	HVP 계	8,000	80	13,000	120
	HAP 계	10,000	100	15,000	200
	계	18,000	180	28,000	320
효모엑기스	국산품	4,300	43	6,700	67
	수입품	700	7	1,000	10
	계	5,000	50	7,700	77
총계	86,000	710	130,000	1,397	

## 5. 결론

수산식품 가공에 사용에 사용 가능한 단백질 가수분해효소 저해제의 시장 규모는 연제품 제조에서만 연간 5억원으로 추정되며, 정제도에 따라 의약품 시장에 진출이 가능할 것으로 추정되며, 이 같은 경우 용도에 따라 시장 규모는 크게 증가할 것이다. 연간 기능성 펩티드의 우리나라 시장 규모는 점차 확대되고 있으며, 직접적인 사용이 가능한 시장 규모는 연간 1176억원인 것으로 추정되고, 미생물 대량 배양 배지를 위한 pepton 시장의 규모는 수입액으로 환산할 때 연간 약 12억원으로 추정된다. Ex분 추출을 위한 굴을 사용할 때 원료 단가는 거의 없으며, 미이용 IGF 굴과 Ex-분 추출 후의 잔사굴을 이용한 산가수분해물과 펩티드 제조원가는 각각 8,018-17,600원과 7,418-17,000원의 범위였다. 일반적인 펩티드 제품에는 식이 당 약 0.2-8.0 g이 첨가되며 1 kg을 사용하여 제품을 제조하는 경우 125개의 제품을 생산할 수 있기 때문에 다른 부원료를 포함하여도 충분한 경제성이 있을 것으로 판단하였다. 바이오 관련

제품의 산업화는 연구 보다는 판매가 큰 비중을 차지하고 있다. 현재 우리나라에서 개발된 대부분의 기능성 식품들은 방문 판매와 홈쇼핑을 통한 판매를 위주로 하고 있기 때문에 초기 시장 진입에 막대한 금액이 소요된다. 따라서 본 연구결과물의 초기 시장 진입은 기능성 대량 생산 제품에 대한 전국적 네트워크를 구축하고 있는 업체와 연계하는 것이 가장 가능성이 큰 것으로 보인다.

## 참고문헌

- Aoyagi T. 1990. Small molecular protease inhibitors and their biological effects. In Kleinkauf H, Dohren H. (eds.), *Biochemistry of Peptide Antibiotics*, Walter de Gruyter, Berlin, p 312-363.
- Abrahamson M, Dalboege H, Olafasson I, Carlsen S, Grubb A. 1988. Efficient production of native, biologically active human cystatin C by *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 236: 14-18.
- Boye SW, Lanier TC. 1988. Effects of heat-stable alkaline protease activity of Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) on surimi gels. *J Food Sci* 53: 1340-1342, 1398.
- Dunkel A, Koster J, Hiofmann T. 2007. Molecular and sensory characterization of  $\gamma$ -glutamyl peptides as key contributors to the Kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 55: 6712-6718.
- Garcia-Carreño FL. 1996. Proteinase inhibitors. *Trends Food Technol* 7:197-204.
- Garcia-Carreño FL, Hernandez-Cortés P. 2000. Use of protease inhibitors in seafood products. In *Seafood enzymes*, NF Harrod and BK Simpson (eds.), Marcel Dekker Inc, New York, p 531-547.
- Hamann DD, Amato PM, Wu MC, Foegeding EA. 1990. Inhibition of modori (gel weakening) in surimi by plasma hydrolysate and egg white. *J Food Sci* 55: 665-669, 795.
- Hanada K, Tamai M, Yamagishi M, Ohmura S, Sawada J, Tanaka I. 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric Biol Chem* 42: 523-528.
- Hoyen T, Skulberg A. 1962. Trypsin inhibitors produced by *Clostridium botulinum* cultures. *Nature* 195: 922-923.
- Kunimoto S, Aoyagi T, Morishima H, Takeuchi T, Umezawa H. 1972. Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. *J Antibiot* 25: 251-255.
- Makinodan Y, Toyohara H, Niwa E. 1985. Implication of muscle alkaline proteinase in the textural degradation of fish meat gel. *J Food Sci*

50: 1351-1355.

- Morrissey MT, Hartley PS, An H. 1995. Proteolytic activity in Pacific whiting and effect of surimi processing. *J Aquat Food Prod Tech* 4: 5-18.
- Morrissey MT, Wu JW, Lin DD, An H. 1993. Effect of food grade protease inhibitor on autolysis and gel strength of surimi. *J Food Sci* 58: 1050-1054
- Murao S, Sato S. 1972. SSI, a new alkaline protease inhibitor from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *Agric Biol Chem* 36: 160-163.
- Nagaoka S. 2006. Cholesterol-lowering proteins and peptides. In *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*. Y Mine and F Shahidi (Eds.), Taylor & Francis, Boca Raton, FL, p. 41-68.
- Lanier TC, Lin TS, Hamann DD, Thomas FB. 1981. Effects of alkaline protease in minced fish on texture of heat processed gels. *J Food Sci* 46: 1643-1645.
- Liu W-H, Means GE, Feeney RE. 1971. The inhibitory properties of avian ovoidin against proteolytic enzyme. *Biochim Biophys Acta* 229: 176-185.
- Lorand L. 1976. Proteolytic enzymes Part B. In *Methods in enzymology Vol XLV*, Academic press, New York, p 695-739.
- Porter RW, Koury B, Kudo G. 1993. Inhibition of protease activity in muscle extracts and surimi from Pacific whiting, *Merucius productus*, and arrowtooth flounder, *Atheresthes stomias*. *Marine Fih Rev* 55:10-15.
- Reppond KD, Babbitt JK. 1993. Protease inhibitors affect physical properties of arrowtooth flounder and walleye pollock surmi. *J Food Sci* 58: 96-98.
- Salvesen G, Nagase, H. 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. In *Proteolytic enzymes: A practical Approach*. RJ Beynon and JS Bond (eds.), New York, IRL Press, p 83-104.
- Shimada K, Matsushima K. 1969. A protease inhibitor from *Penicillium cyclopium* Part I. Purification and partial characterization. *Agric Biol Chem* 34: 47-52.



- Shimizu Y, Machida R, Takenami S. 1981. Species variations in the gel-forming characteristics of fish meat paste. *Bull Jap Soc Sci Fish* 47: 95-104.
- Siebert G. 1958. Protein-splitting enzyme activity of fish flesh. *Experientia*. 14: 65-66.
- Stevens L. 1991. Egg white proteins. *Comp Biochem Physiol* 110B: 1-9.
- Wasson DH, Repond KD, Babbitt JK, French JS. 1992. Effects of additives on proteolytic and functional properties of arrowtooth flounder surimi. *J Aquat Food Prod Technol* 1: 147-164.
- Weerasinghe VC, Morrissey MT, An H. 1996. Characterization of active components in food-grade protease inhibitors for surimi manufacture. *J Agric Food Chem* 44: 2584-2590.
- 박정수. 2005. 바이온 산업의 역설: 상품화를 중심으로. 기능성 생물소재의 산업화 전략 심포지움. 연세대학교.
- 이강표. 2005. 건강기능식품 산업의 현황과 나아갈 길. 기능성 생물소재의 산업화 전략 심포지움. 연세대학교.
- 이부용. 2006. 대두 펩타이드의 생리활성기능과 응용. *식품산업과 영양* 11(1): 1-12.
- 이종훈. 2006. 굴 산업 현황 및 발전방안. 패류양식산업발전을 위한 세미나. 경상대학교. p. 81-90.
- 임재각. 2004. 조미산업. *식품산업*, 9: 68-91.
- 임재각, 김도연. 2006. 대두 펩타이드의 시장형성과 마케팅 전략-일본시장을 중심으로. *식품산업과 영양* 11(1): 13-18.