

## 酵素에 의한 蛋白質 加水分解物의 抗酸化作用

김선봉·염동민·여생규·지청일·이용우\*·박영호  
부산수산대학 식품공학과, \*동의공업전문대학 식품공학과

### Antioxidative Effects of Food Protein Hydrolysates by Protease

Seon-Bong Kim, Dong-Min Yeum, Saeng-Gyu Yeo, Cheong-Il Ji,  
Yong-Woo Lee\* and Yeung-Ho Park

*Department of Food Science and Technology, National Fisheries  
University of Pusan, Nam-gu, Pusan*

*\*Department of Food Technology, Dong Eui Technical Junior  
College, Pusan Jin-gu, Pusan*

#### Abstract

The antioxidant effects against linoleic acid of various protein hydrolysates from fish protein, defatted soybean cake, egg albumin and casein were investigated. Each protein hydrolysate by enzyme hydrolysis exhibited the antioxidative effects by addition of 5 mg and 10 mg per 1 g linoleic acid. Especially, egg albumin and fish protein hydrolysates had a great antioxidative effects. The protein hydrolysates indicated the synergistic effects with  $\alpha$ -tocopherol, and indicated scavenging effects toward metal ion ( $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) as prooxidants.

Key words: antioxidant effects, protein hydrolysate, peptide.

#### 서 론

식품의 가공 및 저장 중에 일어나는 지질의 산화는 식품에 있어서 변색, 향미의 변화 및 영양가의 저하 등 품질저하 요인으로서 뿐만 아니라 산화에 의해 생성되는 각종 산화생성물은 그 자체가 독성을 나타낸다고 알려져 있으며<sup>(1)~(4)</sup> 그 중에서 저분자 카르보닐화합물은 식품 및 생체단백질의 소화율의 저하 및 기능성의 저하에도 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>(5)</sup>. 특히 어류의 경우는 고도불포화지방산의 함량이 비교적 높아 지질의 산화가 용이하게 진행이 되므로 이러한 지질의 산화를 억제시키는 것은 식품의 품질유지 뿐만 아니라 안전성 측면으로 볼 때 매우 중요한 일이 아닐 수 없다.

이러한 지질의 산화를 방지하기 위하여 여러가지 방법이 강구되어 왔는데 항산화제를 사용하는 방법이 가장 일반적으로 사용되어 왔다. 그러나 현재 사용되고 있는 BHT나 BHA와 같은 페놀계 합성항산화제는 다른 항산화제에 비하여 가열, 가공식품에의 효력 이행성이 높으며 장기 보존식품에도 유효하나 다량투여 및

연용시에는 그 안정성에 의문이 제기되고 있으며, 특히 BHT에 의한 돌연변이원성이 보고됨으로써 그 사용이 기피되고 있어<sup>(6)</sup> 항산화능이 크고 인체에 무해한 천연 항산화제를 필요로 하게 되었다. Yamaguchi 등<sup>(7)~(9)</sup>은 유지의 안정성에 대한 아미노 화합물 및 단백질가수분해물의 영향 및  $\alpha$ -tocopherol과의 상승작용에 대하여 보고하였으며 효소의 종류에 따른 단백질가수분해물의 항산화능에 대하여 보고하였다. Bishov와 Henick<sup>(10)</sup>은 단백질가수분해물과 페놀화합물과의 상승작용에 대하여 보고하였다. 또한 저자 등도 생강추출물<sup>(11)</sup>, 양파 및 겨자추출물<sup>(12)</sup>을 비롯하여 Maillard 반응생성물<sup>(13)</sup>의 어유 및 linoleic acid에 대한 항산화작용을 밝혀서 천연항산화제로서의 유용성을 보고한 바 있다. 그러나 이들 단백질가수분해물의 금속이온 봉쇄능에 의한 항산화능의 발현에 대하여는 연구가 미비한 실정에 있다.

따라서 본 연구에서는 어육단백질, 탈지대두박, egg albumin 및 casein 등 식품단백질의 효소가수분해물을 이용하여 linoleic acid와의 모델계 반응을 통하여 이들의 항산화능과 천연항산화제인  $\alpha$ -tocopherol과의 상승작용에 대하여 살펴보고 특히 이들의 금속이온 봉쇄작용에 의한 항산화성의 발현에 대하여 연구 검토하였다.

Corresponding author: Seon-Bong Kim, Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, 599-1, Daeyeon 3-dong, Nam-gu, Pusan, 608-737

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 단백질 중 어육단백질은 부산 공동어시장에서 구입한 선도양호한 고등어 (*Scomber japonicus*)를 사용하여 육부만을 취하여 세절, 마쇄하고 5배량의 chloroform/methanol(3:2) 혼합액을 가하여 암소에서 24시간 방치시킨 후 흡인여과하여 지질을 제거한 다음 잔사를 진공동결건조시켜 마쇄하여 어육단백질로 하였으며, 탈지대두박은 막자사발을 이용하여 마쇄한 후 200 mesh 체로 거른 분말을, egg albumin 과 casein 은 東京化成(株)(일본)에서 표준시약으로 구입하여 단백질 가수분해물을 얻는데 사용하였다.

단백질 가수분해에 사용한 protease 는 태평양 복합 효소제 2000(태평양화학, 한국)을 사용하였으며, linoleic acid 는 Fluka 사제 linoleic acid 를 -2°C에서 7000 rpm 으로 15분간 원심분리시켜 상층만 분취하여 사용하였으며, 금속이온은 농도 1000 ppm 인 FeCl<sub>3</sub> 와 CuCl<sub>2</sub> 원자흡광분석용 표준시약(순정화학, 일본)을 사용하였다.

실험방법

단백질 가수분해물의 조제

단백질의 가수분해는 반응성이 큰 저분자 peptide 의 함량이 많은 단백질 가수분해물을 얻기 위하여 다음과 같이 실시하였다.

즉, 탈지분말시료에 5배량의 증류수를 가하여 80°C 탕욕상에서 20분간 예비 가열시킨 후 실온에서 방냉시킨 다음 protease 를 가하여 37°C에서 8시간 진탕배양시킨 후 5000 rpm 에서 20분간 원심분리시켰다. 여기서 상층액을 취하여 20% TCA (trichloroacetic acid) 를 가하여 효소실활 및 잔존 단백질을 침전시킨 후 다시 5000 rpm 에서 20분간 원심분리시켜 상층액을 취하였다. 이 상층액에 다시 20% TCA 를 가하여 원심분리시켜 잔존 단백질을 제거하는 조작을 거친 상층액을 분액깔대기로 이행시켜 ether 로써 잔존 TCA 를 제거시킨 뒤 동결건조(FTS System Inc, TD-3-561, FD-8-84, 진공동결건조기)시켜 단백질 가수분해물을 얻었다.

단백질 가수분해물의 protein-N 함량측정

단백질의 가수분해 중 반응용액 중의 protein-N 함량의 변화는 Umemoto(1966)<sup>(14)</sup>의 개량 biuret test

를 이용하여 측정하였다.

즉, 배양용액 25 ml 를 취하여 여기에 20% TCA 용액 10 ml 를 가하여 10분간 방치한 후 5000 rpm 에서 20분간 원심분리시켰다. 그 후 상층액을 취하여 다시 20% TCA 5 ml 를 가하여 5분간 방치시킨 뒤 5000 rpm 에서 20분간 원심분리시켰다. 다시 상층액을 분액 깔대기로 이행시킨 뒤 여기에 ether 를 가하여 잔존 TCA 를 제거시켜서 두 개의 시험관에 각각 5 ml 씩 취하고, 한 시험관에는 biuret 시약 I (0.4% CuSo<sub>4</sub>, 8% NaOH, 0.2% glycerine)을 5 ml 첨가하여 A 반응구로, 다른 시험관에는 biuret 시약 II (8% NaOH, 0.2% glycerine)를 5 ml 첨가하여 B 반응구로 하여 (이 때 blank test 는 시료용액 대신에 증류수 5 ml 씩을 사용하였다) 실온에서 2시간 반응시킨 후 545 mm 에서 흡광도를 측정하여 아래식에 의하여 배양용액 중의 protein-N 함량을 구하였다.

· A 반응구의 흡광도 = A 반응구의 시료 흡광도 - A 반응구의 blank 흡광도

· B 반응구의 흡광도 = B 반응구의 시료 흡광도 - B 반응구의 blank 흡광도

· Protein-N (mg/ml) = (A 반응구의 흡광도 - B 반응구의 흡광도) × 0.94

또한, 동결건조시킨 단백질 가수분해물 중의 protein-N 함량도 동일한 방법으로 측정하였는데 배양용액 대신에 진공동결 건조시킨 단백질 가수분해물을 일정량을 취하여 증류수 10 ml 에 녹이고 이것을 2개의 시험관에 각각 5 ml 씩 취하여 위와 동일한 방법으로 측정하여 각 단백질 가수분해물 중의 protein-N 함량을 Table 1 에 나타내었다.

항산화능의 측정

Hayase 등(1984)<sup>(15)</sup>의 방법에 따라 과산화물가(Peroxide value, POV)를 측정하여 항산화능의 지표

Table 1 Total peptide contents in each protein hydrolysates

Protein hydrolysates <sup>a)</sup>	Total peptide(μg / mg) <sup>b)</sup>
Fish protein	346.9
Defatted soybean cake	190.7
Egg albumin	267.5
Casein	372.6

a) Each protein was hydrolyzed with protease at 37°C for 8 hrs and then, lyophilized to obtain protein hydrolysate powders.

b) Total peptide was determined with biuret test.

로 삼았다.

즉, 250 ml 용 삼각플라스크에 linoleic acid(POV, 9 meq/kg) 1g 과 ethanol 20 ml 및 소정량의 단백질 가수분해물을 첨가한 후 0.2M 인산 완충액 25 ml 를 주입하여 37°C에서 일정기간 동안 저장 후 이 반응용액을 분액깔대기에 옮겨 chloroform 25 ml 를 가한 후 하층부만 분취하였다. 이 분취액에 빙초산 25 ml 와 포화 KI 용액 1 ml 를 가한 후 암소에서 5분간 방치시킨 후 증류수 50 ml 를 가하고 0.01 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 용액으로 적정하여 POV 를 산출하였다.

그리고 단백질가수분해물과의 상호관계를 검토하기 위하여 α-tocopherol 같은 항산화제나, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 등과 같은 금속이온을 첨가할 경우에는 단백질가수분해물을 첨가한 직후 이들의 소정량을 첨가하였다.

결과 및 고찰

단백질 가수분해물의 항산화능

Linoleic acid 1g 에 각 단백질 가수분해물 0.5, 2, 5, 10 mg 의 농도로 첨가하여 37°C에서 7일간 저장하여 항산화능을 측정 한 결과를 Fig.1에 나타내었다. 그 결과, 각 단백질가수분해물의 항산화능이 강하게 인정되었으며 특히, egg albumin 가수분해물의 항산화능이 매우 우수한 것으로 나타났으며, 이러한 항산화능은 농도의 증가와 함께 증가되는 것으로 나타났다.

이러한 결과를 토대로 linoleic acid 1g 에 각 단백질

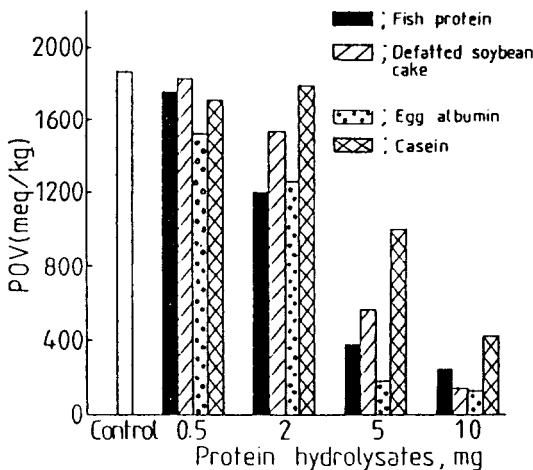


Fig. 1. Antioxidative effects of each protein hydrolysate. Each amount of protein hydrolysate was incubated with linoleic acid at 37°C for 7 days.

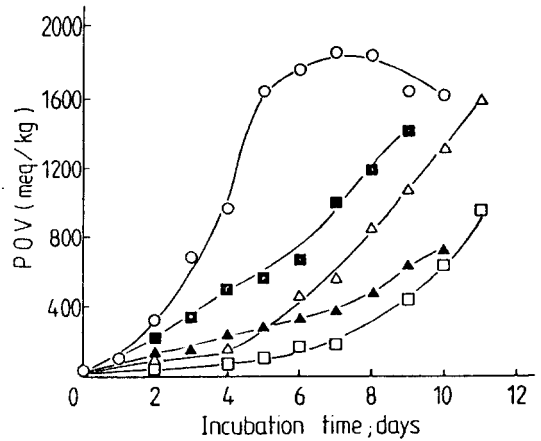


Fig. 2. Antioxidative effects of protein hydrolysates. 5 mg of protein hydrolysates was incubated with linoleic acid at 37°C. Linoleic acid(LA) alone, ○ ; LA + Fish protein, ▲ ; LA + De-fatted soybean cake, △ ; LA + Egg albumin, □ ; LA + Casein, ■

가수분해물을 5 mg 씩 첨가하여 37°C에서 저장하면서 항산화능을 경시적으로 측정하여 Fig.2에 나타내었다.

Casein 가수분해물은 대조구와 비교해 볼 때 유도기의 연장효과가 다소 적은 것으로 나타났으나 egg albumin 가수분해물의 경우는 유도기의 연장효과가 매우 크게 나타나 항산화능이 우수한 것으로 나타났다. 또한 어육단백질 가수분해물이나 탈지대두박 가수분해물의 경우도 유도기의 연장효과가 크게 나타나 항산화능이 큰 것으로 나타났다. 이 결과와 단백질 가수분해물 중 total peptide 함량(Table 1)과 관련지어 생각해 볼 때 단백질 가수분해물의 항산화효과는 이들 중의 peptide 함량보다는 생성된 peptide 의 종류 즉 peptide 의 길이나 구성 아미노산의 종류 등에 기인하는 것으로 생각된다.

Yamaguchi 등<sup>(7)</sup>도 구성 peptide 의 성상에 따라 항산화능에 다소 차이가 나타난다고 지적하면서 dipeptide 의 경우 alanine 을 N 말단으로 하였을 때 Ala-His, Ala-Met, Ala-Tyr 및 Ala-Try 의 항산화력이 좋은 것으로 나타났으며 이것은 특정 아미노산이 N 말단에 위치하는가 C 말단에 위치하는가에 의하여 항산화력이 크게 영향을 받기 때문에 peptide 중의 아미노산의 위치에 의한 입체배위가 항산화력에 크게 관여한다고 추정하고 있다. 또한 Yamaguchi 등<sup>(8)</sup>은 단백질 가수분해물의 항산화능은 vitamin B<sub>12</sub>(MW 1357.4)의 분자량 부근의 획분이 우수한 것으로 나타났다고 보고하였다.

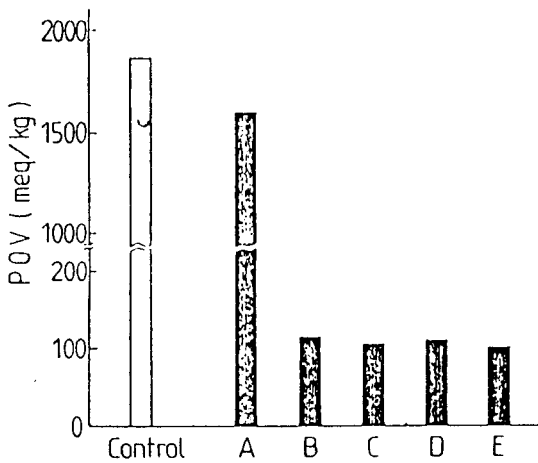


Fig. 3. Synergistic effects of protein hydrolysates on antioxidant action of  $\alpha$ -tocopherol. 2 mg of  $\alpha$ -tocopherol and 5 mg of protein hydrolysates were incubated with linoleic acid at 37°C for 7 days. A, Linoleic acid (LA) +  $\alpha$ -tocopherol( $\alpha$ -T); B, LA +  $\alpha$ -T + Fish protein; C, LA +  $\alpha$ -T + Defatted soybean cake; D, LA +  $\alpha$ -T + Egg albumin; E, LA +  $\alpha$ -T + Casein

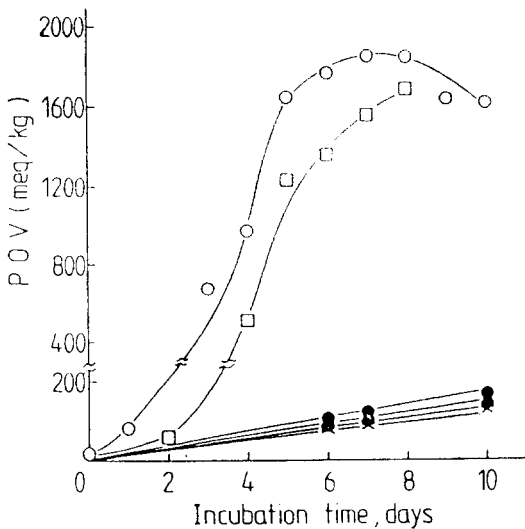


Fig. 4. Synergistic effects of protein hydrolysates on antioxidant action of  $\alpha$ -tocopherol. 5 mg of protein hydrolysates and 2 mg of  $\alpha$ -tocopherol( $\alpha$ -T) were incubated with linoleic acid at 37°C. Linoleic acid(LA) alone, ○; LA +  $\alpha$ -T, LA +  $\alpha$ -T + Fish protein, ●; LA +  $\alpha$ -T + Defatted soybean cake, ■; LA +  $\alpha$ -T + Egg albumin, ▲; LA +  $\alpha$ -T + Casein, ×

단백질 가수분해물과 천연항산화제와의 상승작용

식품에 많이 이용되고 있는 천연항산화제인  $\alpha$ -tocopherol 과 단백질 가수분해물과의 항산화능에 대한 상승작용을 검토하여 그 결과를 Fig.3에 나타내었다.

즉, linoleic acid 1g에 각 단백질 가수분해물 5mg 과  $\alpha$ -tocopherol 2mg씩 첨가하여 37°C에서 7일간 저장시킨 후 항산화능을 측정된 결과, 서로간의 항산화능에 대한 상승효과는 상당히 큰 것으로 나타났으며, 단백질 가수분해물과  $\alpha$ -tocopherol의 상승작용에 있어서 단백질 가수분해물간의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 또한 각 단백질 가수분해물과  $\alpha$ -tocopherol과의 상승작용을 더욱 구체적으로 조사하기 위하여 각 단백질 가수분해물을 사용하여 경시적으로 측정된 결과를 Fig.4에 나타내었다. 그 결과  $\alpha$ -tocopherol 단독으로 사용한 것에 비하여 단백질 가수분해물과 혼합 사용한 것이 유도기를 현저하게 연장시키는 것으로 나타났다.

금속이온의 봉쇄작용

유지의 자동산화를 촉진시키는 큰 요인 중의 하나로 알려져 있는 금속이온에 대한 단백질 가수분해물의 반응성 여부를 검토하기 위하여 linoleic acid 1g에 각 단백질 가수분해물 5mg 및 10mg 과 금속이온( $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ; 1ppm)을 첨가하여 37°C에서 6일간 저장시킨 후 항산화능을 측정된 결과를 Fig.5 및 6에 각각 나타내었다.

그 결과, 일반적으로 알려져 있는 것과 마찬가지로 미량금속의 존재로 인하여 linoleic acid의 산화가 상당히 촉진되는 것으로 나타났으며  $Cu^{2+}$  ion의 산화촉진효과가  $Fe^{3+}$  ion에 비하여 크게 나타났다. 또한 linoleic acid에 단백질 가수분해물과  $Fe^{3+}$  ion을 첨가한 경우 단백질 가수분해물 무첨가구에 비하여 현저한 항산화효과가 나타났으며 (Fig.5) 단백질 가수분해물의 농도에 따른 차이는 탈지대두박 가수분해물과 casein 가수분해물의 경우만 약간의 차이가 있을 뿐 어육단백질 가수분해물과 egg albumin 가수분해물의 경우에는 농도에 따른 차이는 거의 나타나지 않았다.  $Fe^{3+}$  ion 대신에  $Cu^{2+}$  ion을 첨가하여 동일한 조건하에서 항산화능을 측정된 결과도 정도의 차이는 있지만 단백질 가수분해물 무첨가구에 비하여 항산화효과가 크게 나타났으며 그 중에서도 egg albumin 가수분해물의 항산화능이 가장 강하게 나타났다. 그리고 농도가 높을수록 그 효과 또한 큰 것으로 나타났다 (Fig.6).

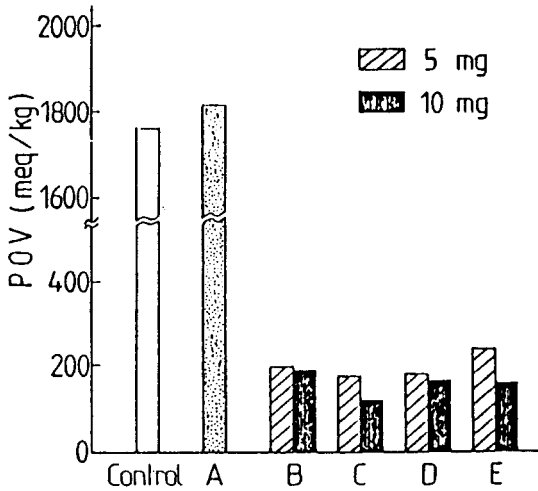


Fig. 5. Antioxidative effects of protein hydrolysates on iron ion catalysed peroxidation of linoleic acid. 5 mg and 10 mg of each protein hydrolysates and  $Fe^{3+}$  (1 ppm) were incubated with linoleic acid at  $37^{\circ}C$  for 6 days. A, Linoleic acid(LA) +  $Fe^{3+}$ ; B, LA +  $Fe^{3+}$  + Fish protein; C, LA +  $Fe^{3+}$  + De fattted soybean cake; D, LA +  $Fe^{3+}$  + Egg albumin; E, LA +  $Fe^{3+}$  + Casein.

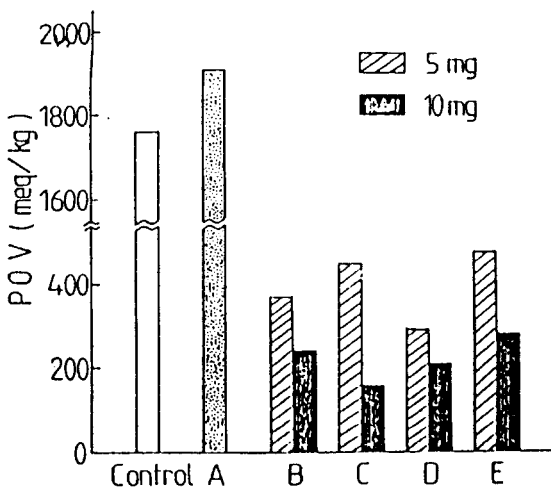


Fig. 6. Antioxidative effects of protein hydrolysates on copper ion catalysed peroxidation of linoleic acid. 5 mg and 10 mg of each protein hydrolysates and  $Cu^{2+}$  (1 ppm) were incubated with linoleic acid at  $37^{\circ}C$  for 6 days. A, Linoleic acid(LA) +  $Cu^{2+}$ ; B, LA +  $Cu^{2+}$  + Fish protein; C, LA +  $Cu^{2+}$  + Defattted soybean cake; D, LA +  $Cu^{2+}$  + Egg albumin; E, LA +  $Cu^{2+}$  + Casein.

그러나 단백질 가수분해물의 금속이온 봉쇄능은 금속이온의 종류에 따라 약간 다른 것으로 나타났으며  $Fe^{3+}$ 에 있어서는 단백질 가수분해물의 첨가량에 따른 차이는 거의 없는 것으로 나타났으나  $Cu^{2+}$ 에 있어서는 단백질 가수분해물의 첨가량이 증가함에 따라 금속이온 봉쇄능이 증가하는 것으로 나타났는데 이러한 차이는 금속이온의 산화촉진능에 영향을 받는 것으로 생각된다.

이상에서와 같이, 단백질 가수분해물의 항산화효과가 우수한 것으로 나타났는데, 이는 단백질 가수분해물이 갖는 기존 항산화제와의 상승작용 뿐만 아니라 단백질의 가수분해로 유리된 peptide 류는 그 자체가 갖는 이온교환능 및 peptide bond로 인하여 금속이온과 강하게 결합하므로 peptide 화합물과 금속복합체의 형성에 의한 단백질 가수분해물의 금속봉쇄작용으로 항산화능을 나타낸다고 생각된다. 또한 岩見<sup>(16)</sup>는 단백질이나 peptide 의 소수성영역 내부에 지방산이 들어가서, 하나의 미립자 구조가 형성되어 그 결과 외부산소와의 접촉이 방지되어 항산화효과가 나타난다고 지적하고 있다.

한편 단백질이나 peptide 류는 Met., Trp., His. 등 구성하는 아미노산의 종류에 따라 라디칼을 형성할 수 있으므로, 이들 라디칼이 지방산 유래의 활성라디칼과 안정한 라디칼 복합체를 형성하여 활성라디칼을 봉쇄함으로써 단백질 가수분해물의 항산화효과 발현에 一助가 된다고 생각된다.

요 약

천연식품성분에 의한 항산화기작을 해명하기 위하여 어육단백질, 탈지대두박, egg albumin 및 casein 등의 단백질 가수분해물을 사용하여 linoleic acid 와의 모델계 반응을 통하여 이들의 항산화능과  $\alpha$ -tocopherol 과의 상승작용 및 금속이온 봉쇄능 등에 대하여 연구 검토하였는데 그 결과 각 단백질 가수분해물은 항산화능이 매우 큰 것으로 나타났으며, 특히 egg albumin 가수분해물의 항산화능이 매우 강한 것으로 나타났다. 또한 천연항산화제인  $\alpha$ -tocopherol 과의 상승작용도 우수한 것으로 나타났는데 단백질 가수분해물간의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 금속이온 봉쇄능 또한 높게 나타났으며 단백질 가수분해물의 금속이온 봉쇄능은 금속이온의 종류에 따라 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

문 헌

1. 大澤俊彦, 並木滿夫: 脂質의 過酸化와 變異原性, 變異原と毒性, 5(3), 243-252(1982).
2. 金田尙志: 變敗油의 毒性, 食品衛生學誌, 15(1), 1-10(1974).
3. 김선봉, 강진훈, 박영호: 지질산화생성물의 DNA 손상 작용 및 그 억제기구, 한국수산학회지, 20(5), 419-430(1987).
4. 太田靜行: 酸化した油脂의 毒性, 食の科學, 91, 43-48(1985).
5. Ory, R.C. and A.J. ST. Angels: Effects of lipid oxidation on proteins of oil seeds. In "Food protein deterioration" J.P. Cherry ed. ACS Symposium Series 206, Washington, D.C. p.55(1982).
6. 新村壽夫: 食品添加物의 生化學と安全性, 地人書館, 日本, p.192(1979).
7. 山口直彦, 橫尾良夫, 藤卷正生: 脂質의 安全性に及ぼす アミノ化合物의 影響, 日本食品工業學會誌, 22(9), 425-429(1975).
8. 山口直彦, 橫尾良夫, 藤卷正生: 脂質의 安全性に及ぼす 아미노化合物의 影響, 日本食品工業學會誌, 22(9), 431-435(1975).
9. 山口直彦, 橫尾良夫, 藤卷正生: 蛋白質 加水分解物의 抗酸化力, 日本食品工業學會誌, 26(2), 65-70(1979).
10. S.J. Bishov and A.S. Henick: Antioxidant effect of protein hydrolyzates in freeze-dried model systems, *J. Food Sci*, 40, 345-348(1975).
11. 변한석, 윤호동, 김선봉, 박영호: 생강추출물의 魚油에 대한 항산화 효과, 한국수산학회지, 19(4), 327-332(1986).
12. 변한석, 윤호동, 김선봉, 박영호: 양파 및 겨자 분말추출물의 魚油에 대한 항산화 효과, 한국수산학회지, 19(5), 453-458(1986).
13. 金善奉, 朴榮浩, 朴震宇, 早瀬文孝, 加藤博通: D-glucose-glycine 系 Maillard 반응생성물의 항산화작용, 한국수산학회지, 20(1), 52-56(1987).
14. Umemoto: A modified method for estimation of muscle protein by biuret method. *Bulletin of the Japanes Society of Scientific Fisheries*, 32(5), 427-435(1966).
15. Hayase, F. and H. Kato: Antioxidative components of sweet potatoes, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30, 37-40(1984).
16. 岩見公和: 食品蛋白質抗酸和機能의 再發見, 化學と生物, 26, 216(1988).

(1989년 3월 23일 접수)