

## 3단계 막효소반응기에서 연속적으로 생산된 어피 및 우피 젤라틴 가수분해물의 항산화활성 비교

\*김 세 권·박 표 잠·<sup>1</sup>송 병 권·<sup>2</sup>김 종 배  
부경대학교 화학과, <sup>1</sup>부산지방식품의약청, <sup>2</sup>군산대학교 수산가공학과  
(접수 : 2000. 10. 20., 게재승인 : 2000. 12. 14.)

## Comparison of Antioxidative Activity on Fish and Bovine Skin Gelatin Hydrolysates Produced in a Three-Step Membrane Enzyme Reactor

Se-Kwon Kim\*, Pyo-Jam Park, Byung-Kwon Song<sup>1</sup>, and Jong-Bae Kim<sup>2</sup>  
Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea  
<sup>1</sup>Pusan Regional Food & Drug Administration, Pusan 608-080, Korea  
<sup>2</sup>Department of Sea-Food Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea  
(Received : 2000. 10. 20., Accepted : 2000. 12. 14.)

To compare the antioxidative activities of fish skin and bovine skin gelatin hydrolysate, gelatin hydrolysates from Alaska pollack and bovine skin were prepared by various enzymatic hydrolysis methods (1st step, Alcalase; 2nd step, pronase E; 3rd step, collagenase) using a continuous three-step membrane reactor. The molecular weight distributions of the 1st, 2nd and 3rd step hydrolysates were 7~10 kDa, 2~5 kDa and 0.7~0.9 kDa, respectively. The antioxidative activity of fish skin gelatin hydrolysate was stronger than that of bovine skin gelatin hydrolysate, and in particular, both of 2nd step hydrolysates showed more antioxidative activity than hydrolysates of any other step. The optimum antioxidative activity concentration of the 2nd step hydrolysates of fish and bovine skin were 1% (w/w) in a linoleic acid water-alcohol emulsion. In cultured cells exposed to *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP), the 2nd step hydrolysate of fish skin gelatin delayed cell death most. These results suggest that the antioxidative activity of fish skin gelatin hydrolysate is higher than that of bovine skin gelatin hydrolysate because of their different amino acid contents.

**Key Words** : antioxidative activity, fish skin gelatin, hydrolysate, membrane reactor

### 서 론

항산화제란 산화를 방지하거나 지연시키는 물질을 통칭하는 것으로 크게 두 그룹으로 분류되는데, 첫째 primary 또는 chain-breaking antioxidant로서 지질라디칼과 반응하여 더욱 안정한 생성물로 바꾸는 그룹과 둘째 secondary 또는 preventive antioxidant로서 다른 메카니즘에 의해 자동산화를 지연시키는 그룹으로 분류된다(1).

Primary antioxidant는 상대적으로 안정한 라디칼을 만들기 위해 지질 free radical에 수소원자를 제공함으로써 연쇄반응을 저지하여 자동산화를 막는다. 이러한 형태의 항산화제는 대부분 페놀화합물로서  $\alpha$ -tocopherol과 그 유도체(2) 및 quer-

etin과 caffeic acid(3) 등의 flavonoid계가 알려져 있다. Secondary antioxidant는 순수한 지질에서는 항산화 효과를 나타내지 않지만 primary antioxidant의 효과를 증대시키거나 prooxidant의 효과를 저해시킨다. 이러한 형태의 항산화제는  $\alpha$ -tocopherol과 같은 primary antioxidant와 상승작용을 가지는 인지질(4)과 ascorbic acid(5) 등이 있다.

이상에서 살펴본 바와 같이 항산화활성을 가지는 물질은 대부분 페놀계 화합물이며, 그 외의 경우는 Tagashira 등(6)이 hop에서  $\beta, \beta'$ -triketone 구조를 가진 항산화물질을 분리하였고, Osawa 등(7)은 *Eucalyptus globulus*의 leaf wax에서  $\beta$ -diketone 화합물이 강력한 항산화활성을 나타낸다고 보고하였다. 또한, 수산자원 중 항산화제에 대한 연구로는 Kim 등(8)이 가자미피 젤라틴 가수분해물에서 항산화성 펩타이드를 분리하였고, Suetsuna 및 Osajima(9)는 어육단백질의 가수분해물이 항산화성을 가진다고 보고하였을 뿐 아직 많은 연구가 이루어지지 않고 있다.

또한, 현재까지 합성항산화제 중에서 가장 널리 사용되는

\*Corresponding Author : Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea  
Tel : +82-51-620-6375, Fax : +82-51-628-8147  
E-mail : sknkim@mail.pku.ac.kr

있는 butylated hydroxytoluene (BHT)과 butylated hydroxyanisole (BHA)은 기형발생 또는 암발생에 관여하는 것으로 보고 되어(10), 뛰어난 항산화효과에도 불구하고 부작용으로 인해 사용에 문제시되고 있다. 반면, 천연항산화제는 부작용이 거의 없어 식품첨가물 또는 의약품으로 널리 이용되고 있으나, 공급부족으로 가격이 비싸 사용이 제한되고 있다. 천연항산화제 중 가장 널리 사용되는  $\alpha$ -tocopherol의 경우도 비싼 가격과 지용성이라는 이용상의 제약으로 대체 천연항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 이러한 연구의 일환으로 수산가공 공장에서 대량으로 발생하는 비가식부 중에서 명태피를 고도로 이용하기 위하여 명태피로부터 젤라틴을 추출하고 이를 3단계 효소막반응기를 사용하여 분자량별로 분획한 가수분해물들의 항산화활성을 우피 젤라틴 가수분해물과 비교 검토하였다.

## 재료 및 방법

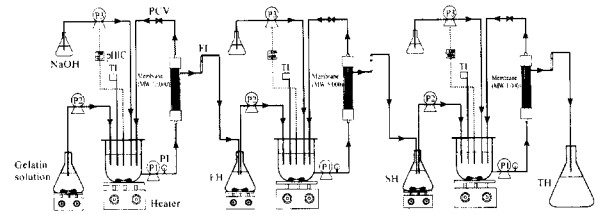
### 시약 및 재료

본 실험에 사용한 명태 (Alaska pollack)피는 부산광역시 장림동 소재의 (주)대림수산에서 구입하여, 젤라틴을 추출하여 사용하였다. 명태피 젤라틴과 우피 젤라틴 ((주)경기젤라틴, 용인)을 가수분해하기 위한 Alcalase는 Novo Co. (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark), pronase E와 collagenase는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

젤라틴의 효소적 가수분해물을 분자량별로 분획하는데 사용된 한외여과막 (molecular weight cut-off (MWCO) 10,000 Da, 5,000 Da)은 A/G Technology Co. (Needham, MA, USA), MWCO 1,000 Da는 Romicon Co. (Needham, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 또한, 항산화활성 측정에 사용한 thiobarbituric acid (TBA), *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP), ammonium thiocyanate 및  $\alpha$ -tocopherol은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였고, 세포배양계에서의 항산화작용을 측정하기 위해 사용한 Donryu rat liver cell (Ac2F)은 Japanese Cancer Research Resources Bank (Tokyo, Japan)로부터 분주받아 사용하였으며, 그 외의 Bulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), dimethyl sulfoxide (DMSO), (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), trypsin-EDTA solution은 Sigma Chemical Co. 제품을 fetal bovine serum (FBS)과 antibiotic-antimycotics는 Gibco Co. (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. 그 외의 모든 시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다.

### 젤라틴의 추출

젤라틴의 추출은 Kim 등(11)의 방법에 따라 동결된 어피를 해동한 후 헹잡물을 제거할 목적으로 수세하였으며, 피하지방 및 콜라겐 이외의 이물질을 제거하기 위하여 수산화칼슘 용액에 3일간 침지하였다. 침지한 어피를 다시 12시간 수세, 중화 및 재수세하여 최적조건하에서 젤라틴을 추출하였다. 추출된 젤라틴을 원심분리 (12,000×g, 20 min)한 후 활성탄으로 탈취시켰으며, 이 용액을 양이온 교환수지 (Amberlite IRA 200)와 음이온 교환수지 (Amberlite IRA 900)로 정제한



**Figure 1.** Schematic diagram of the recycle three step membrane reactor for the production and separation of enzymatic Alaska pollack and bovine skin gelatin hydrolysates. TI, temperature indicator; PI, pressure indicator; FI, flow indicator; P1, recycling pump; P2, feed pump; P3, NaOH pump; PCV, pressure control valve; pHIC, pH indicator controller; FH, first step enzymatic hydrolysate; SH, second step enzymatic hydrolysate; TH, third step enzymatic hydrolysate.

다음 열풍건조 (40°C에서 2일간)하여 4°C에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

### 아미노산 조성

구성 아미노산 조성분석은 시료 50 mg을 정량하여 ampoule에 넣고 6 N HCl 5 ml를 가하여 진공 밀봉한 다음 22시간 동안 110°C 항온기에서 가수분해시켰다. 이 가수분해물을 여과하고, 그 여액을 50°C에서 감압, 건조하여 염산을 제거한 후 sodium loading buffer (pH 2.2) 10 ml로 정용하였다. 이 중 일부를 아미노산 자동분석기 (Hitachi Co., Japan)로 분석하였다. Hydroxyproline 정량은 Cunningham(12)의 방법을 다소 수정하여 정량하였다. 즉, 시료 50 mg을 정량하여 ampoule에 넣고 6 N HCl 5 ml를 가하여 진공 밀봉한 다음, 120°C에서 24시간 동안 가수분해시켰다. 이 가수분해액을 glass filter로 여과하고, 그 여액을 50°C에서 감압 건조하여 HCl을 제거한 후, citrate buffer (pH 6.0~6.5)로 25 ml가 되게 정용하였다. 이 용액을 200배 희석하여 2 ml를 취하고 여기에 0.05 M chloroamine-T용액 1 ml와 aldehyde perchloric acid 1 ml를 가하고 60°C에서 15분간 반응시킨 후, 차가운 물에 냉각한 다음 분광광도계로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 hydroxyproline standard 용액으로 작성된 검량곡선에 의하여 시료 중의 hydroxyproline 함량을 구하였다.

### 젤라틴의 가수분해

연속식 3단계 막반응기 장치는 Figure 1에서와 같이 기질 공급장치, 1단계 막반응기 (first step membrane reactor), 2단계 막반응기 (second step membrane reactor) 및 3단계 막반응기 (third step membrane reactor)장치로 구성하였으며, 기질 공급 장치를 제외한 각각의 막반응기 장치는 한외여과막 (ultrafiltration membrane), 열판교반기 (Nuova II, Stir Plate), pH 자동조절기 (Cole-Parmer Co., Model 5652-20), 유량계 (Manostat Co.), 압력조절밸브, 반응혼합물의 순환펌프 (Cole-Parmer Co., 6~600 rpm) 및 알칼리 공급펌프 (Cole-Parmer Co., 1~100 rpm)로 구성하였다.

또한, 어피 및 우피 젤라틴의 가수분해는 각각의 1% (w/w) 젤라틴 용액에 기질 대 효소비가 100 (w/w)이 되도록 효소를 가한 후 6시간 동안 한외여과막 반응기에서 가수분해시켰다. 각 단계별로 사용한 막은 1단계 막반응기에 분자량

한계범위 (molecular weight cut-off: MWCO)가 10,000 Da, 2 단계 막반응기에서는 분자량 한계범위가 5,000 Da, 3단계 막 반응기에서는 1,000 Da인 막을 사용하였으며, 각 단계별로 사용한 효소는 1단계에서 Alcalase, 2단계에서 pronase E, 그리고 3단계에서 collagenase를 사용하였다.

#### 분자량 측정

각 단계별 가수분해물의 분자량은 고성능액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography: HPLC, Spectra Physics, USA)를 사용하여 측정하였다. 즉, HPLC에 GPC column ( $\phi$  4.7×250 mm)을 연결하여 탈이온수로 평형화시킨 후, 각 가수분해물을 10 mg/ml가 되게 녹인 후 100  $\mu$ l를 주입하여 용출속도 1 ml/min로 용리시켜 UV 검출기로서 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 carbonic anhydrase (MW 29,000 Da), aprotinin (MW 6,500 Da) 및 tetraphenylalanine (MW 667 Da)을 사용하였다.

#### Linoleic acid water-alcohol emulsion 제조

Linoleic acid water-alcohol emulsion은 Osawa 등(7)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, linoleic acid 0.13 ml, ethanol 10 ml, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 10 ml를 섞고 탈이온수로 전체부피가 25 ml가 되게 정용하였다.

#### Malondialdehyde (MDA) 정량법 (TBA method)

MDA정량은 Ohkawa 등(13)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 유지 혼탁액 50  $\mu$ l를 분취하여 증류수 0.8 ml와 8.1% sodium dodecylsulfate (SDS) 0.2 ml, 20% acetic acid (10 N NaOH로 pH 3.5로 조절) 1.5 ml, 0.8% TBA 1.5 ml를 섞은 다음, 그 혼합액을 5°C에서 1시간 방치하여 100°C에서 1시간 발색시킨 뒤 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, MDA정량은 tetramethoxypropane (TMP)을 이용하여 표준곡선을 구해 측정하였다.

#### Lipid peroxidation 측정

Lipid peroxidation은 Mitsuda 등(14)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 유지 혼탁액 0.1 ml에 75% ethanol 4.7 ml, 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml,  $2 \times 10^{-2}$  M ferrous chloride/3.5% HCl 0.1 ml를 가한 후 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다.

#### 최적농도 측정

가수분해물 첨가의 최적농도는 2단계 막효소반응기를 통하여 용출된 가수분해물을 각 유지혼탁액의 유지중량에 0.5, 1.0 및 2.0%가 되게 첨가하여 6일차에 MDA 정량 및 lipid peroxidation값을 측정하였다.

#### 세포배양

정상 간세포 (Donryu rat liver cells, Ac2F)를 fetal bovine serum (FBS)이 10% 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)배지로 배양하였다. 즉, 75-cm<sup>2</sup> plastic flask (Falcon Co., Paigton, Devon, UK)에 Ac2F cell을 10% FBS, 7.5% NaHCO<sub>3</sub> 150  $\mu$ g/ml, glutamine 58.4  $\mu$ g/ml 및 antibiotic/

antimycotics 4.4  $\mu$ g/ml 가 함유된 DMEM배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

#### 세포정량

세포가 자란 75-cm<sup>2</sup> plastic flask에서 배지액을 제거하고, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 세척한 후, 0.25% trypsin/EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)를 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 다음 세포배양액으로 중화시켜서 원심분리 (80×g, 3 min) 하였다. 남은 세포의 pellet에 배양액을 가한 다음, 멸균 피펫으로 반복흡입하여 단일 세포부유액을 만든 후 trypan blue를 세포부유액과 9:1의 비율로 혼합하여 광학현미경상에서 혈구계산판 (Hemocytometer)을 사용하여 측정하였다.

#### t-BHP (t-butyl hydroperoxide) 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물의 효과

t-BHP의 농도별 세포괴사에 대한 명태피와 우피 젤라틴 가수분해물의 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 간세포를  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 넣고 2시간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양시킨 다음, 가수분해물의 농도를 well당 5 mg/ml씩 첨가한 후, 10% FBS가 포함된 DMEM배지로 전체부피를 200  $\mu$ l로 조절하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 18시간 배양한 후, PBS로 세척하고 serum free medium (SFM)과 t-BHP를 0.1 mM에서부터 2.0 mM까지 농도별로 전체부피가 200  $\mu$ l가 되게 첨가하였다. 이를 다시 150분 배양시킨 후, MTT assay로 측정하였다 (이때 100% 세포괴사는 0.9% 2-mercaptoethanol을 넣어 150분간 배양시킨 후, MTT assay로 세포의 생존율을 측정할 값으로 하였다).

#### t-BHP의 세포괴사에 대한 가수분해물의 농도별 효과

t-BHP의 세포괴사에 대한 명태피와 우피 젤라틴 가수분해물의 농도별 효과를 관찰하기 위하여, 96-well plate에 간세포를  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 넣고 2시간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양시킨 다음, 가수분해물의 농도를 well당 0.5 mg/ml에서 5.0 mg/ml까지 첨가한 후, 10% FBS가 포함된 DMEM배지로 전체부피를 200  $\mu$ l로 조절하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 18시간 배양시킨 다음, PBS로 세척하고 SFM과 1.0 mM t-BHP의 전체부피가 200  $\mu$ l가 되게 첨가하였다. 이를 다시 150분 배양시킨 후, MTT assay로 측정하였다.

#### MTT assay

MTT assay는 Sladowski 등(15)의 방법에 따라 실행하였다. 즉, 간세포를 배양시킨 96-well plate에 MTT를 총 용량의 10%가 되도록 넣고, 4시간 배양시킨 다음, 원심분리 (80×g, 10 min)하였다. 그 후, 배지를 제거하고 EtOH : DMSO (dimethyl sulfoxide)가 1:1 (v/v)인 용액을 150  $\mu$ l씩 넣고 20분간 shaking 한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]가 blue formazan을 형성하는 것을 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Table 1.** Amino acid compositions of Alaska pollack and bovine skin gelatin (AA/100 g protein)

| Amino acid           | Alaska pollack skin gelatin | Bovine skin gelatin |
|----------------------|-----------------------------|---------------------|
| Hydroxyproline       | 3.5                         | 9.8                 |
| Aspartic acid        | 7.5                         | 4.6                 |
| *Threonine           | 3.1                         | 1.7                 |
| Serine               | 4.6                         | 3.5                 |
| Glutamic acid        | 10.1                        | 7.1                 |
| Glycine              | 27.3                        | 33.3                |
| Alanine              | 11.5                        | 11.2                |
| Cysteine             | 2.0                         | 0.2                 |
| *Valine              | 3.2                         | 2.1                 |
| *Methionine          | 2.2                         | 0.6                 |
| *Isoleucine          | 2.2                         | 1.2                 |
| *Leucine             | 3.4                         | 2.3                 |
| Tyrosine             | 2.1                         | 0.2                 |
| *Phenylalanine       | 2.3                         | 1.3                 |
| *Lysine              | 3.0                         | 2.8                 |
| *Histidine           | 1.2                         | 0.5                 |
| Arginine             | 5.2                         | 4.7                 |
| Proline              | 5.6                         | 12.9                |
| Essential amino acid | 20.6                        | 12.5                |
| Total amino acid     | 100                         | 100                 |

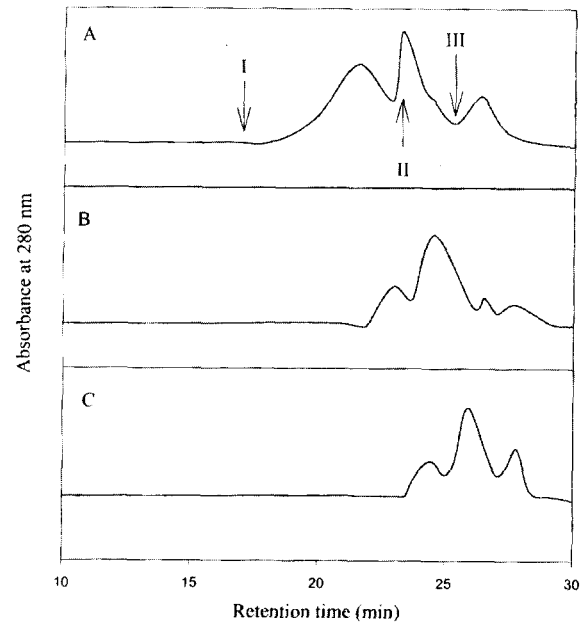
## 결과 및 고찰

### 명태피 및 우피 젤라틴의 아미노산 조성

명태피 및 우피 젤라틴의 아미노산 조성분석 결과는 Table 1에 나타내었다. 즉, Gly, Glu 및 Ala의 함량이 각각 27.3%, 10.0%, 11.4% 및 33.3%, 7.1%, 11.2%로 전체 아미노산 함량의 절반 이상을 차지하였다. 특히, 필수아미노산의 함량은 명태피 젤라틴이 20.6%로 우피 젤라틴의 12.2% 보다 2배 정도 많이 함유되어 있었으며, collagen 유래의 Hyp를 각각 3.5%와 9.8% 정도 함유하고 있었다.

### 명태피 및 우피 젤라틴 가수분해물의 분자량

각 단계별 막효소반응기 (Figure 1)에서 분리한 가수분해물의 분자량 분포는 250~30,000 Da 범위까지 측정이 가능한 GPC column을 장치하여 탈이온수로 평형화시킨 다음, 표준물질 (carbonic anhydrase, MW 29,000 Da; aprotinin, MW 6,500 Da; tetra-phenylalanine, MW 667 Da)을 용리시킨 후, retention time을 비교하여 각 가수분해물의 분자량 분포를 확인하였다. 즉, Figure 2에서와 같이 명태피의 1단계 가수분해물 (분자량 한계범위가 10,000 Da인 막을 통과하고 5,000 Da인 막은 통과하지 않은 가수분해물)의 경우 7,000~10,000 Da 및 5,000~6,500 Da의 분자량 범위에서 주된 피크가 확인되었으며, 600~700 Da의 피크도 일부 존재해 있었다. 2단계 가수분해물 (분자량 한계범위가 5,000 Da인 막을 통과하고 1,000 Da인 막은 통과하지 않은 가수분해물)의 경우는 2,000~5,000 Da의 분자량을 가지는 것이 주된 성분으로 나타났으며,



**Figure 2.** Molecular weight distribution profiles of enzymatic hydrolysates of Alaska pollack skin gelatin on HPLC with GPC column ( $\phi$  4.7 × 250 mm). HPLC operation was carried out with deionized water as mobile phase at flow rate of 1.0 ml/min. A, hydrolysate of fish skin gelatin passed through a membrane with molecular weight cut-off (MWCO) 10 kDa but not passed through a membrane with MWCO 5 kDa; B, passed through a membrane with MWCO 5 kDa but not passed through a membrane with MWCO 1 kDa; C, passed through a membrane with MWCO 1 kDa; I, carbonic anhydrase (MW 29,000 Da); II, aprotinin (MW 6,500 Da); III, tetra-phenylalanine (MW 667 Da).

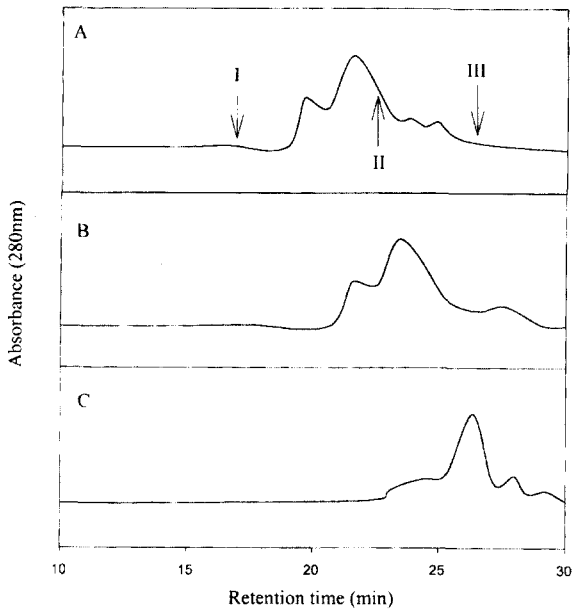
며, 6,500 Da 및 650 Da의 분자량을 가지는 것도 일부 나타났다. 3단계 가수분해물 (분자량 한계범위가 1,000 Da인 막을 통과하여 나온 가수분해물)은 700~900 Da 및 300 Da 정도의 분자량을 가지는 성분은 주된 성분으로 나타났으며, 1,500 Da 근처에서도 일부 존재해 있었다.

우피의 분자량 분포는 Figure 3에 나타난 바와 같이 명태피 가수분해물들의 분포와 유사한 경향을 보였다. 즉, 1단계 가수분해물에서는 6,500~10,000 Da의 영역에서 주된 피크가 나타났으며, 2단계 가수분해물에서는 4,000~6,000 Da 근처에서 3단계 가수분해물에서는 600~800 Da에서 주된 피크가 나타났다.

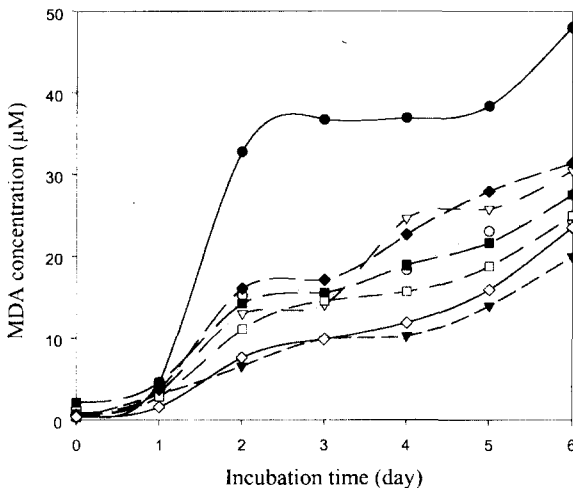
Weiss(16)는 pepsin으로 가수분해시킨 우피 젤라틴 가수분해물의 분자량은 69 kDa 및 21 kDa이었다고 보고하였으며, Kim 등(17)은 대구피 젤라틴을 pronase E로 가수분해시킨 가수분해물의 분자량은 10~20 kDa 범위였고, pronase E로 처리한 것은 15 kDa이 주종을 이루었으나, collagenase로 1시간 분해 후, pronase E로 다시 3시간 분해시킨 것은 7~10 kDa 범위였다고 하였다.

한편, Turgeon과 Gauthier(18)는 2단계 막 (1단계 30,000 MWCO, 2단계 1,000 MWCO)반응기에서 trypsin과  $\alpha$ -chymotrypsin으로 whey protein concentrate를 가수분해하여 분자량을 측정 한 결과, 1단계에서는 5~20 kDa이었으나 2단계에서는 유리 아미노산 및 2 kDa이하였다고 보고한 바 있다.

본 실험에서도 1단계 막반응기에서 Alcalase로 가수분해시

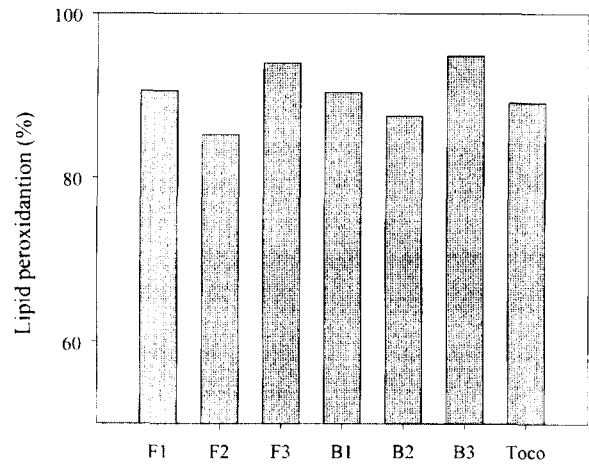


**Figure 3.** Molecular weight distribution profiles of enzymatic hydrolysates of bovine skin gelatin on HPLC with GPC column ( $\phi$  4.7×250 mm). HPLC operation was carried out with deionized water as mobile phase at flow rate of 1.0 ml/min. A, hydrolysate of bovine skin gelatin passed through a membrane with molecular weight cut-off (MWCO) 10 kDa but not passed through a membrane with MWCO 5 kDa; B, passed through a membrane with MWCO 5 kDa but not passed through a membrane with MWCO 1 kDa; C, passed through a membrane with MWCO 1 kDa; I, carbonic anhydrase (MW 29,000 Da); II, aprotinin (MW 6,500 Da); III, tetra-phenylalanine (MW 667 Da).



**Figure 4.** Antioxidative activity on enzymatic hydrolysates of Alaska pollack and bovine skin gelatin in linoleic acid autoxidation system measured by the TBA method. Each values are the means of triplicate experiments. ●, control; ○, 1st step hydrolysate of Alaska pollack skin gelatin; ▼, 2nd step hydrolysate of Alaska pollack skin gelatin; ▽, 3rd step hydrolysate of Alaska pollack skin gelatin; ■, 1st step hydrolysate of bovine skin gelatin; □, 2nd step hydrolysate of bovine skin gelatin; ◆, 3rd step hydrolysate of bovine skin gelatin; ◇,  $\alpha$ -tocopherol.

켜 분자량 한계범위가 10,000 Da인 막을 통과시킨 1단계 가



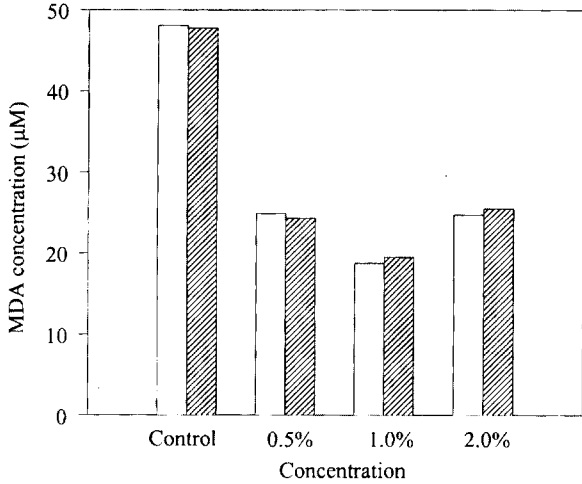
**Figure 5.** Antioxidative activity on enzymatic hydrolysates of Alaska pollack and bovine skin gelatin in linoleic acid autoxidation system measured by the ferric thiocyanate method. Each values are the means of triplicate experiments. F1, 1st step hydrolysate of Alaska pollack skin gelatin; F2, 2nd step hydrolysate of Alaska pollack skin gelatin; F3, 3rd step hydrolysate of Alaska pollack skin gelatin; B1, 1st step hydrolysate of bovine skin gelatin; B2, 2nd step hydrolysate of bovine skin gelatin; B3, 3rd step hydrolysate of bovine skin gelatin; Toco,  $\alpha$ -tocopherol.

수분해물에 비해 2단계 막반응기에서 pronase E로 가수분해시켜 분자량 한계범위 5,000 Da인 막을 통과시켜 생산된 2단계 가수분해물 및 3단계 막반응기에서 collagenase로 가수분해시켜 분자량 한계범위 1,000 Da의 막을 통과시켜 얻은 3단계 가수분해물의 분자량이 저분자화 펩타이드로 됨을 알 수 있었다.

**명태피와 우피 젤라틴 가수분해물의 항산화성 비교**

명태피와 우피 젤라틴의 단계별 가수분해물에 대한 항산화 활성은 Figure 4 및 Figure 5에 나타내었다. 즉, 단계별 가수분해물의 항산화력을 40±1℃로 조절된 항온기에서 자동산화시킨 후 비교한 결과, linoleic acid에서의 항산화력은 가수분해물을 첨가시키지 않은 경우에 비해 명태피 젤라틴 가수분해물에서 MDA정량값에서 35~56% (Figure 4), lipid peroxidation에서는 8~15% (Figure 5) 감소하였다. 반면 우피 젤라틴 가수분해물에서는 MDA정량값에서 32~48% (Figure 4), lipid peroxidation은 5~10% (Figure 5)의 감소를 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때 우피 젤라틴 가수분해물 보다는 명태피 젤라틴 가수분해물이 항산화활성이 더 높은 것으로 나타났으며, 특히 각 단계별 가수분해물 중에서 항산화력이 가장 우수한 것은 2단계 가수분해물이었다, 그 중 명태피 젤라틴 2단계 가수분해물은 시판 천연 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol보다 MDA 정량값 및 lipid peroxidation값 측정에서 각각 8%와 3% 정도 높은 항산화활성을 나타내었다.

Yee 등(19)은 대두단백질의 pepsin 가수분해물의 항산화성 측정에서 지질과산화물이 약 80% 감소하였다고 보고하였고, Yamaguchi 등(20)은 일반적으로 항산화력이 높다고 알려진 아미노산 중에서 Met과 His은 C말단에 위치할 때 높은 항산화력을 나타내고, Tyr과 Trp은 N말단에 위치할 때 높은 항산화성을 나타낸다고 보고하였다. 또한, Chen과 Nawar(21)은 물의 존재하에서 유지에 대한 항산화효과에 대해 기질과의



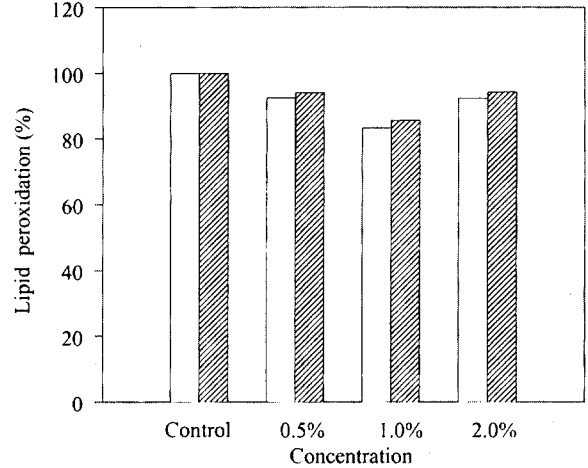
**Figure 6.** Antioxidative activity on 2nd step hydrolysates of Alaska pollack and bovine skin gelatin at various concentration in linoleic acid autoxidation system measured by the TBA method. Each values are the means of triplicate experiments. □, 2nd step hydrolysate of Alaska pollack skin gelatin; ▨, 2nd step hydrolysate of bovine skin gelatin.

낮은 접촉빈도와 물과 아미노기와의 수소결합에 의해 항산화력이 감소한다고 보고하였으며, Decker와 Hultin(22)은 carnosine의 항산화효과는 자유라디칼 소거제 및 수소이온 공여체로서 작용할 뿐만 아니라 금속 킬레이트제로서 작용하기 때문이라고 보고하였다. Krogull 등(23)은 질소화합물인 단백질, 펩타이드, 아미노산은 자체적으로 산화를 일으키며, pH, 온도, 수분활성 및 산화촉매제나 저해제의 존재 여부에 따라 차이가 있다고 보고한 바 있다. His을 포함하는 펩타이드의 항산화력은 imidazole ring의 lipid radical-trapping 작용 및 chelating 작용과 관계있다고 Uchida 등(24)은 보고하였고, Mitsuda 등(14)은 indole 화합물과 aromatic 아미노산의 항산화성은 전자주개로서의 성질과 관계가 있다고 하였다. 즉, 자동산화의 중간체가 indole핵의 C<sub>2</sub>~C<sub>3</sub>위치를 깨어서 전하이동형화합물을 형성한 후, π 전자 pool에서 전하를 뺏아서 C<sub>2</sub>~C<sub>3</sub>결합을 깨열하고 동시에 자신은 불활성 물질로 변화하며 시토프린 아미노산 중에서는 5-hydroxytryptophan이 가장 항산화성이 높은 것으로 보고하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 본 실험에 사용한 가수분해물의 항산화효과에 대한 메카니즘은 확실하게 규명하지는 못하였지만, 질소화합물의 특징인 수소이온 공여체로서의 작용과 자유라디칼을 포착하여 제거하는 라디칼 소거제로서 작용하기 때문인 것으로 판단되며, 특히 명태피 젤라틴 가수분해물의 항산화성이 우피 젤라틴 가수분해물의 항산화활성보다 높은 이유는 일반적으로 항산화활성이 높다고 알려진 His, Met 및 Tyr의 함량차이에서 명태피 젤라틴이 우피 젤라틴 보다 2.7, 4.0 및 14.1배 정도 높기 때문에 나타나는 것으로 판단된다. 또한, 이러한 한외여과막 반응기를 사용함으로써 항산화활성이 우수한 가수분해물을 연속적으로 생산가능하여 산업적으로도 응용이 가능할 것으로 사료된다.

**2단계 젤라틴 가수분해물의 항산화활성 최적농도**

항산화력이 가장 높은 명태피 및 우피 젤라틴 2단계 가수



**Figure 7.** Antioxidative activity on 2nd step hydrolysates of Alaska pollack and bovine skin gelatin at various concentration in linoleic acid autoxidation system measured by the ferric thiocyanate method. Each values are the means of triplicate experiments. □, 2nd step hydrolysate of Alaska pollack skin gelatin; ▨, 2nd step hydrolysate of bovine skin gelatin.

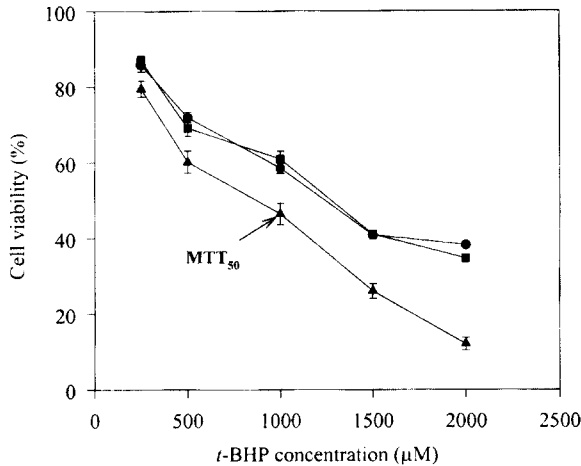
분해물의 첨가농도에 따른 항산화력을 측정된 결과는 Figure 6 및 Figure 7에 나타내었다. 즉, 명태피 및 우피 젤라틴 가수분해물의 첨가농도에 따른 항산화활성은 서로 유사한 경향을 나타내었으며, 우피 젤라틴 가수분해물보다는 명태피 젤라틴 가수분해물의 항산화활성이 조금 더 높았다. 특히 MDA정량값 측정에서 2단계 명태피 젤라틴 가수분해물의 농도가 linoleic acid에 대해 1%일 때 항산화력이 가장 높았으며, 0.5% 및 2% 농도에서는 1% 농도에 비해 항산화력이 감소함을 알 수 있었다 (Figure 6).

Lipid peroxidation에서도 MDA정량값과 마찬가지로 1.0%일 때 가장 높은 항산화활성을 나타내어 MDA값과 동일한 경향을 나타내었다 (Figure 7). 이러한 결과는 펩타이드의 첨가농도가 낮을 경우에는 펩타이드 자체의 산화정도가 펩타이드의 항산화력에 크게 영향을 미치지 않지만, 펩타이드를 1% 이상 첨가하였을 때 펩타이드의 산화정도가 항산화활성에 영향을 미치는 중요한 요인으로 작용하기 때문으로 판단되며, 본 연구에서는 가수분해물의 항산화활성에 대한 최적농도는 1%였다.

Bishov와 Henick(25)은 대두단백질 가수분해물의 농도에 따른 항산화활성을 검토한 결과, 0.01 M~0.2 M 농도범위에서 분자량 700~1,500 Da인 펩타이드의 농도가 높을수록 항산화활성도 증가한다고 보고하였으며, Yamaguchi 등(20)은 단백질 가수분해물을 각종 유지식품에서 산화안정성을 측정 한 결과, 1% 이상의 농도에서는 유지식품의 변패도가 오히려 증가하였다고 보고하였고, Kim 등(8)은 가자미피 젤라틴 가수분해물의 첨가한 농도에 따른 항산화활성 측정에서 유지중량에 대해 1% 첨가한 농도에서 최대 항산화활성을 나타내었다고 보고한 바 있다.

**t-BHP 농도별 세포괴사에 대한 가수분해물의 항산화작용**

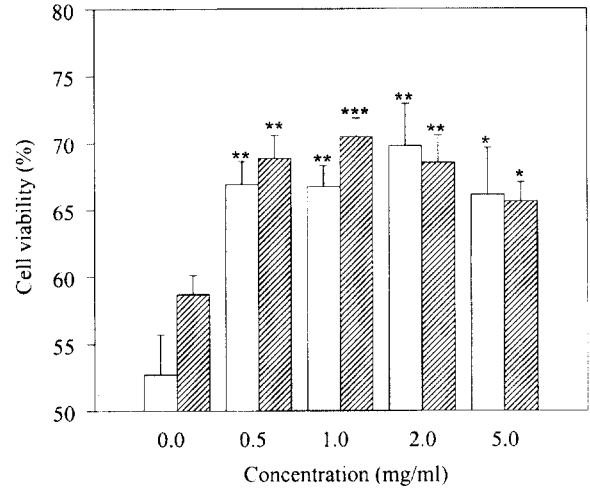
t-BHP의 농도에 따른 정상 간세포의 생존력을 t-BHP 2시간 처리 후 측정된 결과, 1 mM의 t-BHP 처리군에서 50%



**Figure 8.** Effect of *t*-BHP concentration on cell killing of cultured cells (Ac2F) without and with the 2nd step hydrolysates of Alaska pollack and bovine skin gelatin. Cells were incubated for 150 min. Values are given as means±standard error of the mean. ▲, control; ■, 2nd step hydrolysate of Alaska pollack skin gelatin; ●, 2nd step hydrolysate of bovine skin gelatin.

정도의 세포생존을 보였으므로 1 mM *t*-BHP를 IC<sub>50</sub>으로 정하였다 (Figure 8). 또한, *t*-BHP 농도별 세포괴사에 대한 명태피 및 우피 젤라틴 가수분해물의 세포 생존율을 측정 한 결과, 명태피와 우피 젤라틴 가수분해물간에는 비슷한 경향을 나타내었으며, 가수분해물 첨가구가 무첨가구에 비해 *t*-BHP의 독성을 5~15% 정도 감소시켰으며, 특히 2 mM의 높은 농도에서도 40% 정도의 생존율을 나타내었다 (Figure 8).

현재까지 *t*-BHP에 의한 간세포의 괴사를 설명하기 위하여 2가지의 메카니즘이 사용되어져 오고 있는데, 그 하나는 Masaki 등(26)에 의해 보고된 세포막의 지질과산화와 관련된 것으로 DPPD (N,N'-diphenyl-*p*-phenylene diamine)와 같은 항산화제들은 지질과산화 유발물질인 *t*-BHP에 의한 세포괴사를 방지할 수 있다는 것이다. 다른 하나는 세포괴사의 메카니즘은 항산화제의 영향을 받지 않고 지질과산화물을 발생시켜 미토콘드리아의 기능을 손상시킨다는 것이다(27). 또한, Pascoe와 Reed(28)는 ·OH (hydroxyl radical)나 LOO· (lipid radical)과 같은 활성산소계는  $\alpha$ -tocopherol과 같은 소수성 막과 결합되어 있는 항산화제의 소비를 유도하여 세포의 방어 효과를 감소시킨다고 보고하였고, Fariss 등(29)은 간세포 세포질에서 가장 풍부한 비단백질 thiol인 reduced glutathione (GSH)의 감소가 세포의 생존에 영향을 미친다고 보고하였으며, Masaki 등(26)은 *t*-BHP의 세포독성에 대해 철 킬레이트제인 deferoxamine이 GSH의 소비를 억제함으로써 세포괴사를 지연시켰으며, 항산화제인 DPPD나 catechol은 GSH의 대사과정이나 칼슘의 세포내 항상성에는 관계없이 *t*-butylalkoxyl radical에 의해 생성되는 L·을 소거함으로써 세포괴사를 지연시킨다고 보고하였다. Benjamin 등(30)은 calf thymus로부터 분리한 6 kDa 정도의 thymic 펩타이드가 간의 MDA생성을 감소시키는 동시에 간 GSH의 감소를 막으며 혈관내피 (vascular endothelium) 세포에서는 endogenous 항산화물질을 증가시켜서 세포괴사를 지연시킨다고 보고한 바 있다.



**Figure 9.** Effect of antioxidative hydrolysates on cell viability of cultured liver cells (Ac2F) exposed to *t*-BHP. Cells were incubated with 1 mM *t*-BHP for 150 min. Values are given as means±standard error of the mean. □, 2nd step hydrolysate of Alaska pollack skin gelatin; ▨, 2nd step hydrolysate of bovine skin gelatin. \*P<0.05, \*\*P<0.02, \*\*\*P<0.01.

***t*-BHP로 유발된 세포괴사에 대한 가수분해물의 농도에 따른 항산화작용**

명태피 및 우피 젤라틴 가수분해물의 농도에 따른 항산화 효과를 관찰하기 위하여 배양 간세포에 가수분해물을 전처리 한 다음, *t*-BHP로 세포의 산화작용을 유발시켜 세포의 생존율을 측정하였다 (Figure 9). 가수분해물의 농도가 1.0 mg/ml까지는 명태피 젤라틴 가수분해물을 첨가한 첨가군이 우피 젤라틴 가수분해물을 첨가한 첨가군보다 세포생존율이 더 높았으나, 2.0 mg/ml 이상에서는 우피 젤라틴 가수분해물의 첨가군이 약간 더 높았다. 특히, 명태피 젤라틴 가수분해물을 1.0 mg/ml를 첨가한 첨가군에서 70% 정도로 가장 높은 세포 생존율을 나타내었다. Pascoe와 Reed(31)는 항암제인 adriamycin (ADR)의 사용에 의해 발생하는 심근경색 (cardiomyopathy)은 ADR이 산화·환원되는 동안 반응산소종의 생성과 GSH의 소비에 관련이 있다고 판단하여 이에 대한 vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol succinate)의 효과를 측정 한 결과, 세포내  $\alpha$ -tocopherol의 함량이 증가하였으며, 0.6~1.0 nmol/cells의 농도에서 세포생존율이 가장 높게 나타났다고 보고하였다. 또한, Younes 등(32)은 세포의 지질과산화는  $\alpha$ -tocopherol의 항산화효과에 있어서 ascorbic acid의 작용을 검토한 결과, ascorbic acid 단독으로 사용했을 때는 prooxidant로 작용하였으나,  $\alpha$ -tocopherol과 병용사용하였을 때는  $\alpha$ -tocopherol의 감소를 방지하는 작용을 나타내었다고 보고하였다.

이상의 결과로서 명태피 및 우피 젤라틴 2단계 가수분해물을 배양간세포에서 전처리 한 다음, 지질과산화에 의해서 세포괴사를 유발하는 *t*-BHP를 처리하였을 때 가수분해물을 첨가한 첨가군이 첨가하지 않은 군에 비해 세포생존율이 높았으며, 특히 명태피 젤라틴 가수분해물을 1.0 mg/ml로 첨가하였을 때 70% 정도로 가장 높은 세포생존율을 나타내었다.

## 요 약

재순환 연속식 3단계 막 (MWCO 10,000, 5,000 및 1,000 Da) 효소반응기에서 Alcalase (1단계), pronase E (2단계) 및 collagenase (3단계)를 이용하여 제조된 각 단계별 명태피 및 우피 젤라틴 가수분해물의 항산화활성을 비교하였다.

명태피와 우피 젤라틴 가수분해물의 분자량 분포는 서로 유사한 경향을 나타내었으며, 1단계 가수분해물의 경우 7,000~10,000 Da의 분자량을 가지는 펩타이드가 주종을 이루었고, 2단계 막반응기로부터 분리된 가수분해물은 분자량 2,000~5,000 Da에서 3단계 막반응기를 통해 분리된 가수분해물은 700~900 Da 정도의 분자량을 가진 펩타이드가 주종을 이루었다. 또한, 이들의 아미노산 조성분석에서는 일반적으로 항산화활성이 높다고 알려진 His, Met 및 Tyr의 경우 명태피 젤라틴이 우피 젤라틴 보다 2.7, 4.0 및 14.1배 정도 높았다. 각 단계별 막반응기로부터 분리한 가수분해물의 항산화활성은 우피 젤라틴 가수분해물 보다는 명태피 젤라틴 가수분해물이 더 높게 나타났으며, 특히 명태피 젤라틴 2단계 가수분해물에서 시판 천연항산화제인  $\alpha$ -tocopherol보다 MDA 정량 값과 lipid peroxidation 값에서 8%와 3%정도 높은 항산화활성을 나타내었으며, 그 최적농도는 1%였다. 또한, mouse 정상 간세포 (Ac2F)에 2단계 가수분해물을 첨가하여 세포생존율에 미치는 효과를 관찰한 결과, *t*-BHP의 독성에 대해 가수분해물 첨가구의 세포생존율이 무첨가구에 비해 5~21% 정도 높았으며, 특히 명태피 2단계 가수분해물을 1% 농도로 첨가하였을 때 가장 높은 세포생존율을 나타내었다.

## 감 사

본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구비 (951-0100-001-2) 지원으로 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Ahmad, S. (1995), Oxidative stress and antioxidant defenses in biology, Chapman & Hall, New York. 25-42.
- Aoyama, M., T. Maruyama, I. Niiya, and S. Akatsuka (1985), Antioxidant effects of tocopherols on palm oil by frying tests, *Nippon Eiyō to Shokuryō Gakkaishi*, **34**, 714-719.
- Hodnick, W. F., E. B. Milosavljevic, J. H. Nelson, and R. S. Pardini (1988), Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2607-2611.
- Hudson, B. J. F., and J. I. Lewis (1983), Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids as synergists, *Food Chem.*, **10**, 111-120.
- Bendich, A., L. J. Machlin, O. Scandurra, G. W. Burton, and K. U. Ingold (1986) The antioxidant role of vitamin C, *Adv. Free Rad. Biol. Med.*, **2**, 419-444.
- Tagashira, M., M. Watanabe, and N. Uemitsu (1995), Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 740-742.
- Osawa, T. and M. Namiki (1981) A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 735-739.
- Kim, S. K., H. C. Lee, H. G. Byun, and Y. J. Jeon (1996) Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin, *J. Kor. Fish. Soc.*, **29**, 246-255.
- Suetsuna, K. and K. Osajima (1989) Blood pressure reduction and vasodilatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine muscle, *Nippon Eiyō to Shokuryō Gakkaishi*, **42**, 47-54.
- Branen, A. L. (1975), Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59-68.
- Kim, S. K., H. G. Byun, and E. H. Lee (1994), Optimum extraction conditions of gelatin from fish skins and its physical properties, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **5**, 547-559.
- Cunningham, L. W. (1982), Method in enzymology, V.82, p. 375, Academic press, New York.
- Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi (1978), Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- Mitsuda, H., K. Yasumoto, and K. Iwami (1966), Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid, *Nippon Eiyō to Shokuryō Gakkaishi*, **19**, 210-214.
- Sladowski, D., S. J. Steer, R. H. Clothier, and M. Balls (1993), An improved MTT assay, *J. Immunol. Methods* **157**, 203-207.
- Weiss, J. B. (1976), International review of connective tissue reach, *Enzymatic degradation of collagen*, **7**, 102-105.
- Kim, S. K., H. P. Yang, and E. H. Lee (1991), The development of a natural seasoning using the enzymatic hydrolysate of fish skin, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **6**(4), 327-336.
- Turgeon, S. L., and S. F. Gauthier (1990), Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: Production and characterization, *J. Food Sci.*, **55**, 106-110.
- Yee, J. J., W. F. Shipe, and J. E. Kinsella (1980), Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper-catalyzed methyl linoleate oxidation, *J. Food Sci.*, **45**, 1082-1083.
- Yamaguchi, N., Y. Yokoo, and M. Fujimaki (1975), Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils. Part II, Antioxidative activities of dipeptides and their synergistic effects on tocopherol, *Nippon Eiyō to Shokuryō Gakkaishi*, **22**(9), 425-431.
- Chen, Z. Y., and W. W. Nawar (1991), The role of amino acids in the autoxidation of milk fat, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 47-50.
- Decker, E. A., and H. O. Hultin (1990), Factors influencing catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of mackerel muscle, *J. Food Sci.*, **55**, 947-953.
- Krogull, M. K., and O. Fennema (1987), Oxidation of tryptophan in the presence of oxidizing methyl linoleate, *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 66-70.
- Uchida, K., and S. Kawakishi (1992), Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper (II)ascorbate, *J. Agr. Food Chem.*, **40**, 13-16.
- Bishov, S. J., and A. S. Henick (1972), Antioxidant effect of protein hydrolyzates in freeze-dried model system, *J. Food Sci.*, **37**, 873-875.
- Masaki, N., M. E. Kyle, and A. L. Farber (1989),



- Tert*-butyl hydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids, *Arch. Biochem. Biophys.*, **269**, 390-399.
27. Masaki, N., M. E. Kyle, M. E. Serroni, and A. L. Farber (1989), Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by *tert*-butyl hydroperoxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **270**, 672-680.
  28. Pascoe, G. A. and D. J. Reed (1987), Relationship between cellular calcium and vitamin E metabolism during protection against cell injury, *Arch. Biochem. Biophys.*, **254**, 287-296.
  29. Fariss, M. W., K. Olafsdottir, and D. J. Reed (1984), Extracellular calcium protects isolated rat hepatocytes from injury, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 102-110.
  30. Benjamin, H. S., L. L. Li, and P. Yoon (1993), Thymic peptide protects vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury, *Life Sciences*, **52**, 1787-1796.
  31. Pascoe, G. A. and D. J. Reed (1987), Vitamin E protection against chemical-induced cell injury, *Arch. Biochem. Biophys.*, **256**, 159-166.
  32. Younes, M. and C. P. Siegers (1984) Interrelation between lipid peroxidation and other hepatotoxic events, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 2001-2003.