

博士學位論文

옥돔 및 틸라피아 비늘
효소가수분해물의 생리활성



濟州大學校 大學院

食品工學科

安 容 奭

2010年 2月

옥돔 및 톨라피아 비늘
효소가수분해물의 생리활성

指導教授 金 洙 賢

安 容 奭

이 論文을 工學 博士學位 論文으로 提出함

2010年 2月

安容奭의 工學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 宋 大 鎭 印

委 員 河 璣 桓 印

委 員 吳 榮 周 印

委 員 吳 明 哲 印

委 員 金 洙 賢 印

濟州大學校 大學院

2010年 2月

**Biological Activity of *Branchiostegus japonicus* and *Tilapia mossambica* Scale
Prepared by Enzymatic Hydrolysis**

Yong-Seok Ahn

(Supervised by Professor Soo-Hyun Kim)

**A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Doctor of Engineering**

2010. 2.

Department of Food Science and Engineering

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	v
List of Figures	vi
Summary	viii
Part 1. Biological activity of enzymatic hydrolysate from <i>Branchiostegus japonicus</i> scale	viii
Part 2. Biological activity of enzymatic hydrolysate from <i>Tilapia mossambica</i> scale	x
I. 서론	1
II. 연구사	3
1. 수산어류가공 및 부산물	3
2. 기능성 단백질	5
3. Collagen 및 Collagen Peptide	6
4. Gelatin 및 Gelatin Peptide	7
5. 천연 항산화제	8
6. 항고혈압활성	12
7. 미백 및 주름개선	13

Part 1. 옥돔(*Branchiostegus japonicus*)비늘 효소가수분해
 물의 생리활성 15

III. 재료 및 방법 16

1. 실험재료 16

- (1) 옥돔 비늘 16
- (2) 시판틸라피아 16
- (3) 우피(牛皮) 콜라겐 16
- (4) 우피 및 돈피 젤라틴 16

2. 실험방법 16

- (1) 옥돔 비늘의 일반성분 측정 16
- (2) Hydroxyproline 함량 측정 17
- (3) 옥돔 비늘에서 젤라틴 추출 17
- (4) 겔강도 및 녹는점 18
- (5) 탁도 및 색도 18
- (6) 옥돔비늘로부터 콜라겐의 추출 18
- (7) 옥돔 비늘의 젤라틴 제조 19
- (8) 아미노산 조성 19
- (9) 옥돔 비늘 젤라틴의 효소 및 시간대별 가수분해 20
- (10) 옥돔 비늘 젤라틴의 가수분해 조건 20
- (11) 가수분해도 측정 21
- (12) 젤라틴 가수분해물의 분자량별 분획 21
- (13) DPPH radical scavenging activity 22
- (14) Hydrogen peroxide scavenging activity 22
- (15) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) 활성저해 23
- (16) Tyrosinase 활성저해 23
- (17) Elastase 활성저해 24

IV. 결과 및 고찰	25
1. 옥돔 비늘의 일반성분 및 추출수율.....	25
2. 옥돔 비늘의 아미노산 조성.....	26
3. 옥돔 비늘 추출 젤라틴의 물리화학적 특성.....	28
4. 옥돔 비늘 젤라틴의 겔강도.....	30
5. 옥돔 비늘 젤라틴의 녹는점.....	32
6. 옥돔 비늘 콜라겐 및 젤라틴의 아미노산 조성.....	34
8. 반응시간에 따른 옥돔젤라틴의 가수분해도.....	39
9. 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물의 항산화 효과.....	41
10. 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물의 ACE 활성저해.....	47
11. 젤라틴 가수분해물의 가수분해 조건과 ACE 활성저해.....	49
12. Alcalase 젤라틴 가수분해 분획물의 ACE 저해활성.....	54
13. 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물의 tyrosinase 활성저해.....	56
14. 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물의 elastase 활성저해.....	58
V. 요약	60

Part 2. 틸라피아(<i>Tilapia mossambica</i>)비늘 효소가수분해물의 생리활성	63
VI. 재료 및 방법	64
1. 실험재료	64
2. 실험방법	64
(1) 일반성분	64
(2) 아미노산 조성	64
(3) 틸라피아 비늘로부터 효소적 가수분해물의 제조	64
(4) 가수분해도 측정	65
(5) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) 활성저해	66
(6) 틸라피아 비늘 젤라틴 가수분해 조건	66
(7) 젤라틴 가수분해물의 분자량별 분획	67
(8) Tyrosinase 활성저해	67
(9) Elastase 활성저해	67
VII. 결과 및 고찰	68
1. 일반성분	68
2. 아미노산 조성	69
3. 틸라피아 비늘의 효소 반응시간에 따른 가수분해도	71
4. 틸라피아 비늘 젤라틴 가수분해물의 ACE 저해 효과	74
5. 틸라피아 비늘 젤라틴 가수분해물의 가수분해 조건	78
6. α -Chymotrypsin 젤라틴 가수분해 분획물의 ACE 저해활성	81
7. 틸라피아 비늘 젤라틴 가수분해물의 Tyrosinase 저해 효과	83
8. 틸라피아 비늘 젤라틴 가수분해물의 elastase 저해 효과	84
VIII. 요약	85
V. 참고문헌	88

List of Tables

Table 1. Characteristics of proteases used in hydrolysis.....	20
Table 2. Proximate composition of <i>B. japonicus</i> scale.....	25
Table 3. Yields of collagen extracts and gelatin from <i>B. japonicu</i> scale	26
Table 4. Amino acid compositions of <i>B. japonicus</i> scale.....	27
Table 5. Comparison of physicochemical properties of <i>B. japonicus</i> and commercial scale gelatins.....	29
Table 6. Amino acid compositions of collagen extracts from <i>B. japonicus</i> scale.....	36
Table 7. Amino acid compositions of <i>B. japonicus</i> scale, bovine and porcine skin gelatins.....	37
Table 8. Tyrosinase inhibitory activities for enzymatic hydrolylates of gelatin from <i>B. japonicus</i> scale.....	57
Table 9. Elastase inhibitory activities for enzymatic hydrolylates of gelatin form <i>B. Japonicus</i> scale.....	59
Table 10. Characteristics of proteases used in the hydrolysis of <i>T. mossambica</i>	65
Table 11. Proximate composition of <i>T. mossambica</i> scale.....	68
Table 12. Amino acid compositions of <i>T. mossambica</i> scale.....	70
Table 13. Tyrosinase inhibitory activities for enzymatic hydrolylates of gelatin from <i>T. mossambica</i> scale.....	83
Table 14. Elastase inhibitory activities for enzymatic hydrolylates of gelatin from <i>T. mossambica</i> scale.....	84

List of Figures

Fig. 1. Mimetic diagram of ultrafiltration membrane system.....	21
Fig. 2. Gelling temperature of gelatins extracted from <i>B. japonicus</i> and commercial Tilapia fish scales.....	31
Fig. 3. Gelling temperature of gelatins extracted from various fish scales.....	33
Fig. 4. Comparison of hydrolysis degrees for enzymatic hydrolysates from <i>B. japonicus</i> scale.....	38
Fig. 5. Comparison of hydrolysis degrees for enzymatic hydrolysates of gelatin from <i>B. japonicus</i> scale.....	40
Fig. 6. DPPH radical scavenging activities for enzymatic hydrolysates(10mg/ml) of gelatin from <i>B. japonicus</i> scale.....	42
Fig. 7. DPPH radical scavenging activities for neutrase hydrolysate of gelatin from <i>B. japonicus</i> scale by concentrations.....	43
Fig. 8. Hydrogen peroxide(H ₂ O ₂) scavenging activities for enzymatic hydrolysates(10mg/ml) of gelatin from <i>B. japonicus</i> scale.....	45
Fig. 9. Hydrogen peroxide(H ₂ O ₂) scavenging activities for α-chymotrypsin hydrolysate of gelatin from <i>B. japonicus</i> scale by concentrations.....	46
Fig. 10. ACE inhibitory activities for enzymatic hydrolysates(1mg/ml) of gelatin from <i>B. japonicus</i> scale.....	48
Fig. 11. Comparison of hydrolysis degrees for alcalase hydrolysates of gelatin from <i>B. japonicus</i> scale by substrate/enzyme ratios.....	51
Fig. 12. Comparison of hydrolysis degrees for alcalase hydrolysates of gelatin from <i>B. japonicus</i> scale by substrate concentrations.....	52
Fig. 13. ACE inhibitory activities for alcalase hydrolysate of gelatin from <i>B. japonicus</i> scale.....	53

Fig. 14. ACE inhibitory activities for alcalase hydrolysates of gelatin from <i>B. japonicus</i> by concentrations.....	55
Fig. 15. Comparison of hydrolysis degrees for enzymatic hydrolysates from <i>T. mossambica</i> scale.....	72
Fig. 16. Comparison of hydrolysis degrees for enzymatic hydrolysates of gelatin from <i>T. mossambica</i> scale.....	73
Fig. 17. ACE inhibitory activities for enzymatic hydrolysates(1mg/ml) of gelatin from <i>T. mossambica</i> scale.....	76
Fig. 18. ACE inhibitory activities for α-chymotrypsin and alcalase hydrolysates of gelatin from <i>T. mossambica</i> scale by concentrations.....	77
Fig. 19. Comparison of hydrolysis degrees for α-chymotrypsin hydrolysates of gelatin from <i>T. mossambica</i> scale by substrate/enzyme ratios.....	79
Fig. 20. Comparison of hydrolysis degrees for α-chymotrypsin hydrolysates of gelatin from <i>T. mossambica</i> scale by substrate concentrations.....	80
Fig. 21. ACE inhibitory activities for α-chymotrypsin hydrolysates of gelatin from <i>T. mossambica</i> by concentration.....	82

Summary

Part 1. Biological activity of enzymatic hydrolysate from *Branchiostegus japonicus* scale

Gelatin derived from collagen has been widely used in food, medicine and photographic industries over the years. However, gelatins from mammalian resource are limited in utility of processing in functional food, cosmetic and pharmaceutical products because frequent occurrences of bovine spongiform encephalopathy(BSE) and foot/mouth diseases(FMD) are to be serious problems for human health.

This study includes extraction of gelatin from *B. japonicus* scale, manufacturing of hydrolysate by means of subcritical water and enzyme, and examination of DH(degree of hydrolysis), antioxidant, antihypertensive, whitening and antiwinkle effects.

In order to investigate physicochemical characteristics of *B. japonicus* scale and gelatin from *B. japonicus* scale, proximate components, gel strength, gelling point, amino acid composition were measured.

This study was conducted to investigate the gelatin hydrolysates processed from *B. japonicus* scale containing high protein content(about 46.1%) has been the reactive oxygen species(ROS) scavenging, angiotensin I converting enzyme(ACE) inhibitory activity, tyrosinase inhibitory activity and elastase inhibitory activity were prepared the enzymatic gelatin hydrolysates by four proteases (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase and trypsin) from *B. japonicus* scale gelatin prepared according to different reaction times, substrate/enzyme ratios and substrate concentrations.

The gel strength of *B. japonicus* scale gelatin was lower than commercial gelatin(150 and 200bloom) from tilapia scale, while gelling point were lower.

As a result of measuring DH of gelatin hydrolysate by means of four proteases (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase and trypsin), it turned out that in reaction of *B. japonicus* scale gelatin for 6 hrs, DH was 50~65%. As the reaction time of hydrolysis increased, DH increased accordingly. In addition, the values of alcalase hydrolysate were higher than those of other enzymes hydrolysate at the each section. Then, its identified that respective gelatin hydrolysates of neutrase and α -chymotrypsin showed the highest DPPH radical and H_2O_2 scavenging activities(IC_{50} value; 9.18mg/ml and 9.74mg/ml), but the activities were not significant. its observed that the four gelatin hydrolysates significantly increased ACE inhibitory activities from about 20% to 60% with their hydrolysis degrees. Among them, the alcalase gelatin hydrolysates showed the higher ACE inhibitory activity(IC_{50} value; 0.73mg/ml).

Almost all of enzyme hydrolyastes of gelatin from *B. japonicus* scale showed the inhibitory activities against tyrosinase and elastase. Alcalase hydrolysate showed more than 70% of the inhibitory activity tyrosinase. α -chymotrypsin hydrolysate showed more than 90% of the inhibitory activity elastase.

These results suggest that the enzymatic gelatin hydrolysates prepared from *B. japonicus* scale might have a potential function in ACE, tyrosinase and elastase inhibitory effect. Therefore, *B. japonicus* scale could be used to industrial application for functional food materials.

Part 2. Biological activity of enzymatic hydrolysate from *Tilapia mossambica* scale

Recently, fish scale has been reported as a potential material in functional food industry due to its antioxidant and antihypertensive effects. In this study were investigated the ACE inhibitory activity of tilapia(*T. mossambica*) scale. Enzymatic hydrolysates of the tilapia scale were prepared by the enzymatic extraction technique using five proteases (α -chymotrypsin, alcalase, kojizyme, protamex and trypsin) after tilapia scale was applied to the hot water extraction for 3hr. its identified that the tilapia scale enzymatic hydrolysates prepared using both hot water and enzymes treatment markedly increased the hydrolysis degree(from about 25% to 55%), comparing to only enzyme treatment(from about 15% to 45%). In addition, the enzymatic hydrolysates(1 mg/ml) prepared by both hot water and enzymes treatment significantly increased the ACE inhibitory activities from about 20% to 75% and they consisted of their hydrolysis degree. Especially, the alcalase and α -chymotrypsin hydrolysates showed the higher ACE inhibitory activities (IC_{50} values; 0.83mg/ml and 0.68mg/ml, respectively) than the others. In addition, its identified that the ACE inhibitory effects of α -chymotrypsin hydrolysates were increased as decreasing their molecular weights. its also showed that the 5 kDa> fraction has the highest ACE inhibitory activity (about 89.9% and IC_{50} values; 0.1mg/ml) among three fractions (5kDa>, 10kDa> and 30kDa> fractions). There results indicated that its could be suggested that the peptide compounds of enzymatic hydrolysates prepared from tilapia scale induced the ACE inhibitory activities and might be used as the potential antihypertensive materials.

I. 서 론

우리나라 수산업은 국민의 어패류 선호도의 증가 추세에 따라 수산가공공장의 가공율은 매년 증가하면서 어체가공부산물, 어뼈, 어피, 어두, 내장, 비늘 등과 같은 수산가공부산물의 발생량도 증가하고 있는 실정이다. 이들 부산물의 대부분은 폐기되고 있으며, 어체의 가공잔사 이외의 가식부라도 수세 등의 공정에 의해 많은 수용성 단백질, 부상분리물 및 어유 등이 폐기액과 함께 씻겨 나가 자원의 효율적 활용이 제대로 이루어지지 않을 뿐만 아니라 환경오염까지도 유발하고 있다. 따라서 수산가공부산물 중 함유되어 있는 유용성분을 이용하여 부가가치가 높은 기능성 소재를 개발할 필요가 있다(1).

제주도는 다양한 해양생물들이 서식하고 있는 청정해역으로 매년 많은 수산물들이 어획되어 소비자들에게 공급되고 있으며, 이 중 농어목 옥돔과에 속하는 옥돔은 제주도를 대표하는 어종으로써 소비자들의 선호도가 높아 가공품으로서도 판매가 된다. 그러나 대부분의 어류 가공시, 어류 가공부산물이 다량 발생하게 되고, 수산폐기물로 폐기되고 있다(2~4). 그 중 어류 뼈나 껍질 등 부산물이 약 30% 정도를 차지하고 있는데, 옥돔 역시 가공과정 중에 상당량의 내장, 비늘 등의 부산물이 발생된다. 옥돔 가공과정에서도 비늘이 발생하고 이를 폐기하기 위한 비용이 발생될 수 있으며(5), 그리고 난분해성인 비늘이 해양으로 바로 투기될 경우 해양환경에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있어 이를 산업적으로 이용할 수 있는 방안 연구가 필요할 것으로 생각된다.

젤라틴은 척추동물에서 무척추동물에 이르기까지 뼈 또는 껍질에 널리 분포하는 생체단백질인 비수용성의 콜라겐으로부터 열수로 부분적인 가수분해를 시켜 얻어지는 수용성의 유도단백질이다(6~8).

젤라틴은 다양한 산업분야에서 널리 이용되고 있는 중요한 기능성 바이오 중합체로써, 특히 의약품과 식품 분야에서 그들이 가지는 화학적, 물리적 특성들로 인해 유용하게 이용되고 있다(9). 유용성 젤라틴을 생산하기 위해, 많은 연구자들은 젤라틴의 원료로서 주로 소뼈(牛骨), 우피(牛皮)와 돈피(豚皮) 등을 이용하여

왔으나, 최근 들어 어류의 어피(魚皮), 비늘 등의 이용이 증가하고 있는 실정이다(10~11). 어류유래 젤라틴의 경우, 축산물 유래의 젤라틴의 원료 단가 보다 더 비싸며, 켈강도, 응고점 및 녹는점 등 물리적 특성이 낮고, 어취를 가지고 있어 상업적으로 대량 생산이 거의 이루어지지 않고 있었으나, 최근에 발생한 광우병 파동과 구제역, AI, SI 등 육상동물 원료의 위생안전성에 대한 소비자의 우려와 종교상 축산물을 섭취하지 않은 국가에서는 축산물 유래 젤라틴의 사용을 꺼리고 있어 젤라틴의 원료에 대한 연구가 많이 진행되고 있다(12).

최근에는 틸라피아 비늘로부터 유용한 젤라틴을 추출하여 산업화에 성공하였으며, 틸라피아의 비늘로부터 콜라겐 및 젤라틴을 추출하여 식품 및 의약품용으로 일부 생산판매하고 있다(13). 이러한 점으로 미루어 볼 때, 제주도 대표 어종인 옥돔 비늘은 환경부분과 자원재활용 차원에서 연구해 볼 가치가 있다. 옥돔 비늘에는 지질, 회분 등이 일부 함유되어 있으나, 단백질이 주요 성분이기 때문에 옥돔 비늘로부터 적절한 추출방법을 통하여 콜라겐 및 이의 유도체인 젤라틴을 추출하는 것은 매우 가치 있는 일이다. 일반적으로 효소적 가수분해는 식품 단백질의 기능과 영양적 특성을 향상시켜주고, 특히 단백질 가수분해효소를 이용한 식품단백질로부터 펩타이드의 제조는 어피(魚皮)젤라틴 가수분해물 제조 등에 응용되어 생리활성을 가지는 유용 성분으로 전환시키는 것으로 알려져 있다(14). 콜라겐과 젤라틴이 고분자물질로서 체내 섭취가 어려울 수 있다는 점을 감안할 때, 옥돔의 비늘로부터 젤라틴을 추출하여 단백질 가수분해효소를 이용하여 젤라틴 펩타이드로 가수분해하는 것은 체내 흡수율을 높일 수 있어, 기능성 식품 소재와 천연 의약 소재 등과 같은 다양한 분야에서 널리 이용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 옥돔 비늘을 식품 및 화장품 산업에 이용하고자 옥돔과 틸라피아 비늘로부터 젤라틴을 제조한 후, 젤라틴의 체내 흡수율을 증가시키기 위해, 단백질 가수분해 효소의 가수분해능력을 이용하여 효소별, 시간대별 젤라틴 가수분해물을 제조하여 최적 추출조건을 확립하고, 추출된 젤라틴 가수분해물의 항산화, 항고혈압, 미백, 주름개선과 같은 생리활성을 검토하였다.

II. 연구사

1. 수산어류가공 및 부산물

최근 수산물은 연간 1인당 소비량이 1990년대 후반 30kg대에서 2001년에 40kg, 2005년에는 48.1kg으로 2001년에 비해 14.0% 증가하였으며, 우리 국민의 어패류 선호도의 증가 추세에 따라 수산가공공장의 가공율은 매년 증가하여 총공급량의 85%이상을 차지함으로써 상대적으로 어체가공잔사, 어뼈, 어피, 어두, 내장, 비늘 등과 같은 수산가공부산물의 양도 증가하고 있는 실정이다. 그러나, 이들 부산물은 대부분 사료로 이용되거나 폐기되고 있으며, 수산가공부산물 이외의 가식부라도 수세 등의 공정에 의해 많은 수용성 단백질, 부상분리물 및 어유 등이 폐기액과 함께 씻겨 나가 자원의 효율적 활용이 제대로 이루어지지 않을 뿐만 아니라 환경오염까지도 유발하고 있다(1, 15). 따라서 수산가공 부산물 중에 함유되어 있는 유용성분을 이용하여 부가가치가 높은 새로운 기능성 소재를 개발할 필요가 있다. 또한 잠재적인 생리활성물질인 당, 단백질, 지질 등이 많이 함유되어 있는 수산가공부산물을 이용하여 생리활성물질을 개발하는 것은 그 경제적 효과가 클 것으로 판단된다(16).

최근 기능성을 갖는 단백질의 수요가 늘어남에 따라 단백질의 기능성을 개량하려는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 또한 단백질 가수분해물에 존재하는 생리활성 펩타이드의 탐색에 관한 연구도 시도되고 있다(17~18).

단백질 가수분해물은 각종 가공식품이나 조미료, 삼푸, 화장품 등 기타 여러 분야에서 필수적으로 이용되고 있지만, 국내에서는 거의 단백질의 산가수분해물을 이용하고 있는 실정이다(19). 그러나 단백질을 산이나 알칼리로 가수분해 할 경우 tryptophan, cysteine과 같은 필수 아미노산이 손실될 뿐만 아니라 lysinoalanine과 같은 독성이 있는 부산물이 생성되어 일본을 비롯한 구미 선진국에서는 단백질의 산가수분해물의 안전성 문제가 대두되고 있다(20).

특히 일본에서는 거의 효소로 가수분해시킨 단백질을 이용하고 있으며, 미국에

서도 단백질의 산가수분해물에 대하여 사용금지 조치가 취해지고 있지만, 우리나라의 식품산업은 지금까지 많은 연구노력에도 불구하고 과학적 인식의 부족과 과감한 연구투자 부족으로 인하여 많은 부분에서 상당히 낙후되어 있는 것이 사실이다. 특히 수산물로부터 새로운 기능성 신소재의 개발에 대한 국민의 요구에 부응하지 못하고 있으며, 대다수 국민들로부터 안전한 식품 요구에 과학적으로 적절하게 대처하지 못하고 있다. 수산가공관련 연구로는 어류가공부산물을 이용한 조미료 제조 및 상업적인 공정화 및 크릴간장 제조에 관한 연구(21), 어패류의 정미성분 및 조미료 소재 개발에 관한 연구(22~23) 등이 보고되어 있다.

어류 가공 시 버려지는 껍질, 뼈, 내장, 비늘 등 대략 30%로 많은 양이 버려지고 있으며, 이들은 풍부한 collagen을 함유하고 있다(24). 일반적으로 어류 유래의 collagen은 육상동물 유래의 collagen보다 낮은 함량의 imino acid를 가지고 있으며, 열안정성 또한 낮게 나타나 이용에 제한을 받고 있다(25). 어류 유래 collagen에 관한 연구로는 bigeye snapper의 껍질과 뼈로부터 산가용성 콜라겐의 추출특성(26), 대구(*Gadus morhua*)의 뼈, 껍질 등 부산물에서 collagen을 추출(27), 참돔(*Pagrus major*)과 tilapia의 비늘로부터 추출한 type I collagen의 물리적 특성 연구 등이 있다(28).

해양생물을 gelatin으로 이용하기 위해 많은 연구가 이루어져 왔으며, 특히 수산물의 뼈, 어피 등 부산물을 이용하기 위한 많은 선행연구가 진행되어 왔으나(29~31), 이를 식품, 화장품 및 의약품 산업에 적용하기 위해서 두 가지 선결조건이 충족되어야 하는데, 첫째는 대량생산이 가능하고 지속적인 원료공급이 가능해야 하며, 둘째는 겔강도, 겔, 졸화온도, 변성온도 등의 물리적 성질을 가져야 하는 것이다. 하지만, 상어를 원료로 한 gelatin의 경우 육상동물 유래 gelatin과 대동소이한 물리적 성질을 가진다고 보고하고 있으나(32), 대부분 해양생물의 경우 개체의 크기가 작으며, lumpfish(33), tilapia(34), conger and squid(5) 등의 연구에서 보듯이 물리적 성질이 다소 뒤떨어져 물리적 성질을 향상시키기 위한 연구가 진행되고 있다(35).

2. 기능성 단백질

최근 기능성을 갖는 단백질의 수요가 늘어남에 따라 단백질의 기능성을 개량하려는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 또한 단백질 가수분해물에 존재하는 생리활성 펩타이드의 탐색에 관한 연구도 시도되고 있다(36).

생리활성 펩타이드 연구에 관한 역사는 1889년에 당뇨병의 발병이 췌장에 존재하는 물질의 결핍에 의해 일어난다는 사실이 개의 췌장을 절제하여 얻은 결과로부터 최초로 입증되었으며, 1895년에는 뇌하수체 추출물 중에 혈압을 상승시키는 물질과 항이노작용을 나타내는 물질이 함유되어 있다는 것도 증명되었다(37). 그 후 이러한 물질들에 대한 화학적 연구가 진행되어 펩타이드계 호르몬으로서 최초로 vasopressin과 oxytosin의 화학 구조가 해명되었고, 다음으로 인슐린, 부신피질자극 호르몬인 adrenocorticotropic hormone(ACTH)의 구조가 해명되었으며, 또한 혈압상승 물질로서 angiotensin의 구조가 밝혀졌다. 화학적 구조해명과 병행하여 이들 펩타이드계 호르몬으로서 최초로 합성된 것은 oxytocin(38)과 vasopressin(39) 등이 있다. 그리고 1960년대에 화학적으로 합성한 이들 펩타이드들의 생리활성을 연구한 결과, vasopressin은 미약하지만 oxytocin의 자궁수축 및 유즙분비작용을 나타내었으며, 또한 oxytocin은 약하게 vasopressin의 항이노작용을 보여 천연 추출물질에서 상호 미량의 물질이 혼재되어 있기 때문인 것으로 이해되었던 생리활성작용이 이들 펩타이드의 본질적인 구조에서 기인된 것으로 밝혀졌다. 즉, 펩타이드의 종류에 따라 다른 생리활성 작용을 발현하는데 펩타이드를 이루고 있는 모든 아미노산 잔기가 활성을 나타내는 것이 아니라 특정 잔기의 펩타이드에서 생리활성 작용을 나타내는 것으로 확인되었다. 그 후 1970년에 들어 뇌하수체전엽 호르몬의 분비를 자극하는 시상하부 펩타이드 중에 갑상선자극호르몬·분비호르몬(thyrotropin releasing hormone, TRH)과 황체화호르몬·분비호르몬(luteinizing hormone releasing hormone, LH-RH)의 구조가 해명되었다(37).

이와 같이 인체내에서 생체조절기능을 갖는 펩타이드계 의약소재로 이용되는

대부분의 펩타이드는 사람과 동물의 기관으로부터 추출하여 의약품으로서 이용되어 왔으며, 이들 생리활성 펩타이드를 화학적 합성으로 대량 생산하고 있다. 그러나 현재의 합성기술로서는 실험실에서 원하는 아미노산 잔기가 30개 이상으로 연결된 작용기들이 관여하기 때문에 아미노산 잔기가 약 15~30개 정도의 펩타이드로 제한되고 있는 실정이다.

따라서 최근에는 동·식물 단백질을 각종 효소를 이용하여 가수분해시킨 올리고펩타이드를 분리·정제하여 생리활성의 검토에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(40~44). 생체조절 기능을 나타내는 펩타이드에 관한 연구는 의약품 소재로써 이용하려는 시도에서 비롯되었으며, 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

3. Collagen 및 Collagen Peptide

Collagen은 세포 간 결합조직의 주된 구성 성분인 경단백질로서 생체 전체 단백질의 50% 이상을 차지하며 생체 내 광범위하게 분포한다. 최소 19 종류(Type I ~ XIX) 이상이 밝혀져 있고 조직이나 장기의 보호 및 생체 조절 기능을 하며(45), 특히 피부, 연골, 뼈 등 결합조직의 주요한 구성 성분으로 전 collagen 량의 40%는 피부, 20%는 뼈와 연골, 그 외 현관과 내장 등 전신에 넓게 분포하고 있다. 기본구조는 3중 나선구조를 이루고 있으며 직경 약 14~15Å, 길이 2,800Å 평균 분자량 약 300kDa으로 tropocollagen의 가교결합 형태로 물리·생물학적으로 안정한 구조를 이루고 있다(46~47).

Kittiphattanabawon 등(26)은 bigeye snapper의 껍질과 뼈로부터 acid-soluble collagen의 추출 특성을 밝혔으며, Sadowska 등(27)은 대구(Gaids morhua)로부터 collagen을 추출하였다. Ikoma 등(28)은 참돔(Pagrus major)과 tilapia(Oreochromis miloticas)의 비늘로부터 type I collagen을 추출하여 물리적 특성을 밝혔으며, Kolodziejska 등(48)은 오징어 외피로부터 collagen을 추출하여 물리적 특성을 밝혔다. 이들은 대부분 어류의 껍질이나 뼈 그리고 비늘 등 버려지는 부위를 이용하여 collagen을 추출하였다. 어류 가공 시 버려지는 껍질

과 뼈는 대략 30%로 많은 양이 버려지고 있으며, 이들은 풍부한 collagen을 함유하고 있다(25). 일반적으로 어류 유래의 collagen은 육상동물 유래의 collagen보다 낮은 함량의 imino acid를 가지고 있으며, 열안정성 또한 낮게 나타나 이용에 제한을 받고 있다(26). 따라서 버려지는 자원을 이용하여 기존의 주된 육상동물 유래의 collagen보다 열안정성이 뛰어나게 하거나 그들과 비슷한 특성을 가진 어류 유래 collagen 추출은 의미가 깊다고 할 수 있다.

4. Gelatin 및 Gelatin Peptide

Collagen의 열변성에 의해 유도되는 수용성 단백질인 gelatin은 glycine(Gly)-proline(Pro)-hydroxyproline(Hyp)의 아미노산 구조가 반복되는 특징을 가지고 있다. Imino acid인 proline과 hydroxyproline은 gelatin의 열에 대한 안정성을 부여하며 Gly-Pro-Hyp 구조의 함량은 콜라겐 열적 안정성에 영향을 미치는 주된 요인 중에 하나이며(49), 또한 imino acid의 함량이 gelatin의 열안정성에 관련이 있다는 보고도 있고, 어피 gelatin이 포유동물의 gelatin과 아미노산 조성이 다르며 이는 생태환경적 영향을 기인한다는 보고도 있다(50). 일반적으로 육상동물의 gelatin의 glycine함량은 24% 정도이며, 어피 gelatin은 16~18% 정도로 육상동물에 비해 낮다고 보고하고 있다(51).

Gelatin은 collagen의 열변성에 의해 유도되는 단백질로 돈피를 산 처리하여 얻어지는 type A gelatin과 우피를 석회 처리하여 얻어지는 type B gelatin으로 구분되며(2), gelatin은 온도에 의존적인 졸(sol)-겔(gel)의 상변화 특성으로 인해 젤리강도, 점도 및 분자량과 같은 물리적 특성에 따라 많은 분야에서 사용되고 있다. 마이크로캡슐, 정제약, 지혈제 등 의약용으로 사용되기도 하며, 식품산업분야에서는 젤리로 이용될 뿐만 아니라 열가역성, 보수성, 유화성, 광택성, 점성 등을 이용하여 제과제빵, 음료, 빙과, 마요네즈 등의 식품원료로 사용되며 coating제, 가식성 소시지필름 등 식품포장재의 원료로도 사용되는 외에도 산업용 접착제, 사진용 필름, 세균실험용 배지로 사용되는 등 다양한 산업적 용도를 가지고 있다

(10). 또한, gelatin은 생체단백질인 collagen에서 유래되었기 때문에 생체 적합성이 뛰어나 최근에는 인공피부 및 신경세포 재생을 위한 의약품 분야에도 사용되고 있다(52). 특히, 천연 단백질이기 때문에 친환경 및 생분해 특성으로 인해 친환경 소재로써 각광받고 있다(53).

GME(Gelatin Manufacturers of Europe, www.gelatin.org) 보고에 의하면 2005년도 전세계 gelatin 생산량은 306,800톤이며, 그 중 72.1%가 돈피와 우피로부터 생산되고, 뼈(소, 돼지 등) 등의 부산물로부터 26.6%, 기타 원료를 이용한 생산량은 1.3%인 것으로 나타났으며, gelatin 생산 및 소비량은 매년 증가하는 것으로 나타나고 있다. 그러나 식용으로 사용되는 gelatin의 경우 생산량의 80%가 돈피로부터 생산되고 있으며 10%만이 우피를 이용하는 것으로 보고되었다. 우피의 사용량은 감소하고, 돈피와 기타원료의 사용량이 증가하고 있으며, 이것의 주된 원인은 광우병(Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE)에 의한 것이다. 우피를 이용한 collagen 및 gelatin은 광우병 등의 인체전이 위험성이 대두되고 있기 때문이고 돈피 또한 구제역(Foot/Mouth Diseases, FMD) 발생지역에 따른 지역적 제한 등으로 인해 돼지를 이용한 collagen 및 gelation을 추출하는데 문제가 발생되고 있다(28).

이와 같이 위생적 안전성에 대한 소비자의 우려가 사회적으로 대두되어 천연의 안전성이 확보된 새로운 원료소재에 대한 연구가 요구되고 있으며, 안정성이 확보된 신규 gelatin 원료에 대한 연구가 진행되었다. 특히, 수산물의 뼈, 어피 등의 부산물을 이용하기 위한 연구가 진행되고 있다(29).

5. 천연 항산화제

최근에 인간 누구에게나 찾아오는 생체기능의 노화에 대해 많은 관심을 가지게 되었다. 노화의 원인 중의 하나는 산소에 의한 것인데, 산소는 호흡을 통하여 에너지를 체내에 공급하도록 하는 등 생명 유지에 절대적으로 필요한 요소이지만 에너지 생성과정, 정상적인 신진대사 과정 및 면역 체계를 통해 끊임없이 활성화

소(active oxygen)를 생성하게 된다. 즉, 활성산소는 자외선, 방사선, 화학반응, 대사 과정을 통하여 생성되어 DNA 분절, 지질 과산화, 단백질의 비활성화 등을 통하여 암, 당뇨병, 뇌졸중, 동맥경화, 심혈관 질환, 신부전, 빈혈 등 광범위한 질병의 병태 생리적 원인을 제공하고 노화를 촉진 하는 것으로 알려져 있다.

항산화제는 산화를 방지하는 물질을 통칭하는 것으로 그 작용기작에 따라 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유라디칼 scavenger, 과산화물을 비라디칼로 분해하여 불활성화시키는 과산화물분해제(Peroxide decomposer), 미량금속의 산화 촉진작용을 불활성화하는 금속 불활성화제(metal deactivator), 자동산화에 있어서 라디칼저해제와 공존시 항산화작용을 증가시키는 상승제(synergist) 및 각종 활성산소계를 소거하는 singlet oxygen quencher 등으로 분류된다. 항산화제는 다시 크게 두 그룹으로 분류되는데, 첫째 primary 또는 chain-breaking antioxidants로서 지질라디칼과 반응하여 더욱 안정한 생산물로 바꾸는 그룹과 둘째 secondary 또는 preventive antioxidants로서 다른 메카니즘에 의해 자동산화를 지연시키는 그룹으로 분류된다(54).

대기 중에 존재하는 산소는 식품 또는 동물의 세포등과 같은 여러 유기물질에 대해 산화반응을 유발시켜 많은 부작용을 나타내게 된다. 이러한 작용은 산소에서 유래되는 superoxide anion, hydroxyl 및 DPPH 라디칼, singlet oxygen 및 H_2O_2 와 같은 활성산소종(ROS)들이 세포막에 존재하는 지질과 결합하여 과산화물을 만듦으로 인해 진행되게 되는데, 이들의 연속반응에 의하여 alcohol류, aldehyde류, ketone류 등을 생성함으로써 생체 내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발할 뿐만 아니라, 세포노화, 세포막 분해, 지방산화 등 심각한 생리적인 장애를 일으킨다(55).

Primary antioxidant는 상대적으로 안정한 라디칼을 만들기 위해 지질 유리라디칼에 수소원자를 제공함으로써 연쇄반응의 연장을 저지하여 자동산화를 막는다. 이러한 형태의 항산화제는 대부분 페놀화합물로서 α -tocopherol, gallic acid와 그 유도체, quercetin, rhamnetin, kampferol, rutin, quercitrin 및 caffeic acid 등의

flavonoid계가 알려져 있다. Secondary antioxidant는 순수한 지질에서 항산화 효과를 나타내지 않지만 primary antioxidant의 효과를 증대시키거나 pro-oxidant의 효과를 저해시킨다. 이러한 형태의 항산화제는 α -tocopherol과 같은 primary antioxidant와 상승작용을 가지는 인지질과 ascorbic acid 등이 있다(56).

대표적인 산화반응인 지질의 산패는 주로 높은 온도나 빛에 의해 생성된 지질 라디칼이나 $^1\text{O}_2$ 에 의해 과산화물의 생성과 분해가 연쇄적으로 일어나는 반응으로 이들 페놀성 항산화제가 존재시에는 페놀성 OH기가 유지의 유리기 수용체로서 작용하여 유지산패의 초기 단계에 생성된 유리기들이 안정한 공명 혼성체를 형성하도록 하여 산화억제 작용을 하게 된다. 이러한 항산화제는 각종 식물 추출물, 향료, 발효생산물 등에 flavonoid 또는 페놀계 화합물로 존재한다. 또한 동식물의 단백질을 산이나 각종 효소를 이용하여 가수분해시켜 생산한 올리고펩타이드도 항산화활성을 나타낸다고 보고되고 있다(55). 또한 이를 각종 단백질 가수분해물들은 혈압강화작용(56) 및 칼슘흡수 촉진작용(57) 등의 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 대표적인 단백질 가수분해물로부터 얻어지는 펩타이드로는 milk casein 펩타이드, 난(卵)단백질 펩타이드, 어육단백질 펩타이드, 대두 단백질 펩타이드 및 소맥단백질 펩타이드 등이 알려져 있다. 이와 대별하여 합성 항산화제로는 입체장애를 나타내는 큰 치환기를 가져 안정한 라디칼을 형성하여 항산화성을 나타내는 페놀계 화합물과 sulfur계 화합물, 구연산과 그 유도체들, 인산과 그 유도체들(58) 등이 알려져 있다.

이상에서 공통적으로 페놀계 화합물이 항산화성을 가지는 것으로 보고 되었고, 그 외의 경우는 Tagashira 등(59)이 hop에서 분리한 항산화물이 β - β' -triketone 구조를 가지는 물질로 보고하였고, Osawa 등(60)은 eucalyptus globulus의 leaf wax에서 β -diketone화합물이 강력한 항산화성을 나타내는 것으로 보고하였다.

합성항산화제는 동물실험에서 발생과 각종 효소군 등에 영향을 주고, 특히 BHT는 기형발생 또는 암발생에 관여하는 것으로 보고되어(61) 뛰어난 항산화효

과에 비해 부작용이 문제시 되고 있는 반면, 천연항산화제는 부작용이 거의 없어 식품첨가물 또는 약품으로 현재 널리 이용되고 있다. 그러나 천연항산화제 중 가장 널리 이용되는 α -tocopherol의 경우 비싼 가격과 지용성이라는 이용상의 제약으로 대체 천연항산화제의 개발이 시급하며, 현재 항산화제의 연구 방향은 종래의 식품 산화방지제로서의 한정된 연구에서 노화나 발암의 원인이 되는 산소 라디칼이나 산화물 라디칼의 소거제로서의 역할과 생체내 지질과산화 반응의 억제 또는 라디칼의 관여로 발생된다고 추정하는 변이원성 및 암원성의 발현억제 등의 효과에 관한 폭넓은 연구가 이루어지고 있다.

이에 대두단백질을 각종 효소로 가수분해하였을 때, 가수분해율이 6~9%의 펩타이드에서 높은 항산화 활성을 나타내었다고 보고되었으며(62), 채소골격 근육조직에서 발견되는 dipeptide인 anserine(β -alanyl-L-methylhistidine)과 carnosine(β -alanyl-methylhistidine)이 항산화 활성이 우수하다고 보고되었다(63). 어피 유래 젤라틴의 경우도 가자미피 젤라틴의 가수분해물의 항산화 활성이 다른 천연 유래의 항산화제인 α -tocopherol보다 10% 정도 높은 항산화 보였다는 연구 결과가 발표되어 왔다(64). 뿐만 아니라, 일반적으로 Ala을 N말단으로 하는 9종류의 dipeptide 중, Met, Trp, His, Tyr을 다량 함유한 펩타이드일수록 항산화 활성이 높다는 연구 결과가 보고되어진 바 있다(65).

이와 같이 단백질 가수분해물이 갖는 생리활성 작용에 관한 연구는 최근에 큰 관심의 대상이 되고 있고, 우리나라의 경우에는 영양원으로서 수산물 단백질에 의한 의존도가 높음에도 불구하고 이들의 생리활성 특히, 고혈압의 억제 및 항산화 효과와 관련이 있는 연구는 극히 미약한 실정으로 이에 대한 체계적인 탐색, 분리 및 그 이용에 관한 제반기술이 확립되어 있지 않아 장기적인 연구가 필요하다.

6. 항고혈압활성

고혈압은 전세계적으로 성인의 15~20%가 겪고 있는 질환으로, 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색 및 당뇨병 등 심각한 만성 질환을 야기 시켜 사회적으로나 경제적으로 막대한 손실을 일으키고 있다. 이는 정상적인 혈압을 유지하는 기구들이 천천히 붕괴되는 질환으로 순환기계 질환의 원인이 되는 동시에 앞서 언급한 질환과 함께 합병증으로 나타날 경우 치사율이 매우 높은 만성 퇴행성 질환으로 발전하게 된다(66). 고혈압의 원인은 대부분 밝혀져 있지 않지만 혈압을 상승시킬 수 있는 여러 가지 요인들 가운데 renin-angiotensin-aldosterone 고리는 생체 내에서 혈압과 체액량을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(67~70). 생체 중에 존재하고 있는 불활성형의 decapeptide인 angiotensin I은 angiotensin I converting enzyme (ACE)에 의하여 C-말단의 His-Leu이 떨어져 나감으로써 혈관벽 수축작용이 있는 octapeptide인 angiotensin II로 전환되며, 이렇게 생성된 angiotensin II는 직접적으로 혈관을 수축하고, 신장에서 aldosterone의 분비를 증가시켜 체액량을 증가시킴으로써 혈압을 상승시키는 작용을 한다(71~72). 이러한 ACE의 활성을 억제시킴으로써 혈압상승 원인이 되는 angiotensin II의 생성을 저하시켜 혈압의 상승을 억제할 수 있게 된다. 따라서 renin-angiotensin-aldosterone 고리의 작용을 효과적으로 조절하는 약물의 발견은 고혈압 치료제 연구에 있어 중요한 점이다.

ACE 저해활성 물질의 탐색에 있어서 단백질의 효소적 가수분해물로부터 분리한 펩티드류의 연구로서는 casein 분해물(73), zein(74~75), 무화과유액(76), 대두(77~78), 정어리육(79), 가다랑어육(63)과 내장(80) 등이 있으며, 이들 가수분해물로부터 ACE 저해펩티드를 분리하여 아미노산 배열을 밝히고, 이를 기초로 펩티드를 화학적으로 합성하여 ACE 저해효과에 미치는 펩티드들의 C 및 N 말단 아미노산의 영향에 대해 보고하고 있다. 여러 가지 dipeptide를 합성하여 ACE 저해효과에 미치는 펩티드들의 C말단 및 N말단 아미노산 잔기의 영향을 C말단 아미노산 잔기로서 Try, Phe, Tyr 및 Pro을, N말단 아미노산 잔기로는 Val과 Ile을

가지는 펩티드가 높은 ACE 저해효과를 나타내었으며, 저해활성을 발현하는데는 방향족 및 소수성 아미노산 잔기의 기여가 매우 중요한 것으로 밝혀졌다(81).

한편 대표적인 ACE 억제제로서 화학합성제인 enalapril이나 captopril 등이 개발되어 고혈압 개선제로 이용되고 있지만, 머른기침, 두통, 안면홍조, 식욕부진, 미각이상, 발진, 백혈구 감소 등의 부작용이 많아 최근에는 부작용이 없는 천연물에서의 ACE 억제제의 개발이 중요시되고 있다(82). ACE 저해작용을 나타내는 천연물질로는 펩티드성 물질을 들 수 있다. 펩티드성 저해물질은 뱀독으로부터 처음 분리되어 보고되었고, 다랑어, 고등어, 새우 등의 어패류의 효소 가수분해물, 동물의 혈장 등에서 분리한 펩티드 등이 보고되었다(83). 지금까지는 주로 식품 단백질을 펩신, 트립신 등의 단백질 분해효소로 가수분해하여 얻어진 가수분해물로부터 ACE 천연 저해제를 추출하였다. 그러나, ACE 천연 저해제는 분리·정제의 수율이 낮고, 제조원가 등의 경제적인 문제로 상업성이 떨어지며, 가장 중요한 ACE 억제에 대한 활성이 화학합성저해제에 비하여 현저히 떨어지는 편이다(82).

7. 미백 및 주름개선

피부에 탄력을 주어 피부의 주름을 완화 또는 개선하는 기능과 미백기능을 가진 화장품을 주름개선 및 미백 기능성 화장품이라고 한다. 주름개선과 미백화장품의 수요증가에 따라 우수한 주름개선 및 미백 원료의 개발에 많은 연구자들이 연구를 집중하고 있으나 임상에서 뚜렷한 효과를 나타내는 원료는 미미한 실정이다. 그렇기 때문에 주름개선과 미백에 도움을 주는 기능성 화장품은 그 효과를 입증하는데 어려움이 있다. 세계적으로 고령인구의 증가와 경제 수준의 향상에 따라 주름개선을 필두로 하는 피부노화 방지에 대한 관심이 높아지고 있는 추세이다.

피부노화는 몇 가지 내인적 및 외인적 인자들이 복잡한 노화 현상에 기여하고 있다. 만성적인 노화는 다른 장기와 흡사한 방식으로 피부에 영향을 미친다(84).

피부노화는 태양광선에 미일 노출되는 신체 부분에서 자외선에 의해 야기된다. 자외선의 작용으로 피부에 과잉의 활성산소가 생성된다. 자외선에 노출되면 항산화효소와 글루타치온, 비타민 E, 비타민 C 및 유비퀴놀과 같은 저분자량의 항산화제가 감소한다. 이와 같은 자외선으로 생성된 활성산소종은 실질적으로 피부의 효소적 그리고 비효소적 항산화 방어를 위태롭게 만든다. 따라서 균형은 산화상태 쪽으로 유리하게 기울어지고(85~86), 결과적으로 산화적 스트레스는 세포 성분들에 대한 손상을 야기시키고 광노화를 촉진시킨다. 광노화 과정에서 활성산소종은 멜라닌 생성을 촉진시키고 주름을 생성시키는 원인 물질로 받아들여지고 있다.

광노화는 특히 진피 결합조직의 자외선으로 유도된 심각한 손상과 관련되어 있다. 이러한 결합조직의 손상으로 콜라겐 및 엘라스틴 분자의 절단 및 비정상적인 교차결합, 세포외 간질분자들의 함량변화, 세포외 간질분자들을 조직화하는 선유아 세포의 능력 감소 등이 있다(87~90).

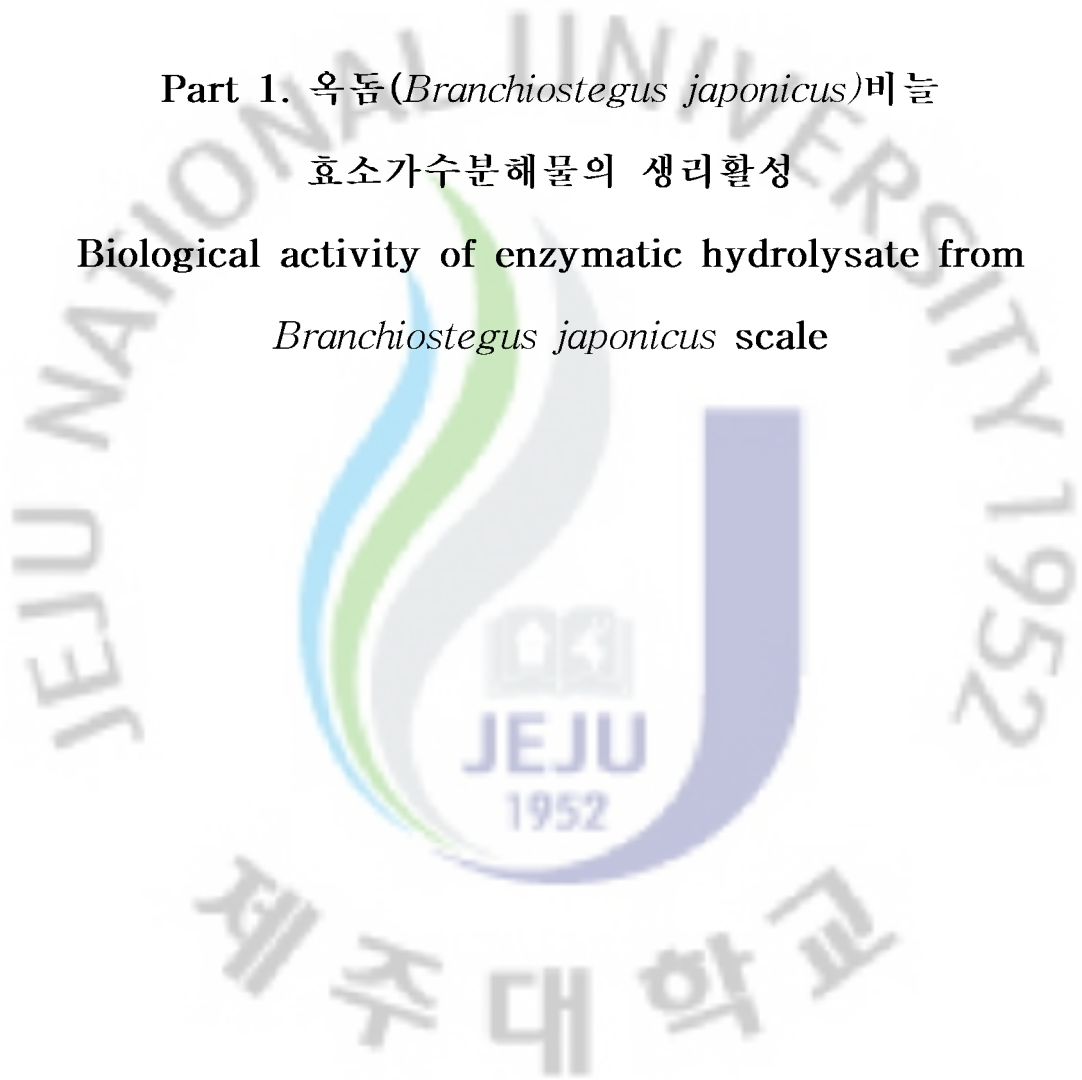
따라서 다양한 접근 방법을 가지고 항노화 화장품 원료를 개발하려는 여러 가지 영역에서 연구가 진행되고 있다. 이 연구분야들을 살펴보면, 콜라겐 생성의 증가 및 분해의 억제(91), 엘라스틴의 생성촉진 및 분해억제(92), 히아루론산 생성증가(93), 노화재생 촉진(94), 반응성 산소라디칼(Reactive oxygen species, ROS) 제거(95) 등의 분야에서 다각적으로 활발한 연구들이 진행되고 있다.

Part 1. 옥돔(*Branchiostegus japonicus*)비늘

효소가수분해물의 생리활성

Biological activity of enzymatic hydrolysate from

Branchiostegus japonicus scale



Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 옥돔 비늘

옥돔(*Branchiostegus japonicas*) 비늘은 제주도 서귀포시에 위치한 ㈜C수산에서 제공받아 담수로 3회 수세한 후 상온건조하여 실험에 사용하였다.

(2) 시판틸라피아

틸라피아 비늘 젤라틴은 부산에 위치한 C사에서 식품용 판매되고 있는 식품용 150Bloom과 의약품인 200Bloom을 구입하여 실험에 사용하였다.

(3) 우피(牛皮) 콜라겐

실험에 사용된 콜라겐은 calf skin 콜라겐(C-97912, EC No 232-673-4, type I collagen from calf skin, Sigma, U.S.A)을 구입하여 사용하였다.

(4) 우피 및 돈피 젤라틴

실험에 사용된 유상동물유래 젤라틴은 우피(bovine skin) 젤라틴(G 9382, 225Bloom)과 돈피(porcine skin) 젤라틴(G 2500, 300Bloom)을 Sigma사(U.S.A)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 옥돔 비늘의 일반성분 측정

건조된 옥돔 비늘의 수분, 조단백, 조지방 및 회분을 측정하였다. AOAC 방법(96)에 준하여 수분함량은 0.003g 이하의 유의차를 항량으로 하여 105℃ 상압가열건조법으로 측정하였고, 조지방은 Soxhlet추출법으로 측정하였으며 조단백질 함량은 Micro Kjeldahl방법으로 측정하였으며, 그리고 회분 함량은 건식법으로 측정하였다.

(2) Hydroxyproline 함량 측정

옥돔 비늘의 hydroxyproline의 함량은 ISO(97)의 방법을 일부 수정한 방법으로 정량하였고 gelatin 및 collagen의 함량은 Sato 등(98)의 방법에 따라 hydroxyproline을 정량한 다음 환산계수(conversion factor) 11.42를 곱한 값으로 하였다. 시료용액 0.5ml에 같은 양의 6N HCl을 가하여 130℃에서 6시간동안 가수분해한 후 여과하여 그 여액을 50℃에서 감압, 건조한 다음 5ml의 증류수를 가하였다. 그 중 1ml을 취하여 chloramine-T용액(Sodium p-toluenesulfon chloramide trihydrate 423mg, DW 6ml, 2-methoxyethanol ethylene glycol monomethyl ether 9ml, acetate-citrate buffer 15ml) 0.5ml을 가하고 30℃에서 5분간 반응시켰다. 여기에 p-dimethylbenzaldehyde용액(p-dimethylbenzaldehyde 6g, 2-methoxy ethanol 30ml) 0.5ml을 가하여 60℃에서 20분간 반응시킨 다음 30℃에서 10분간 냉각하여 분광광도계로 557nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 중의 hydroxyproline함량은 hydroxyproline 표준시약으로 작성한 검량선에 의하여 구하였다.

(3) 옥돔 비늘에서 젤라틴 추출

옥돔 비늘에서 젤라틴 추출은 Kim 등(99)의 방법으로 추출하였다(Fig 1). 건조된 옥돔 비늘을 10배(v/w)의 1.11M Ca(OH)₂을 가하여 교반하면서 2시간 처리 후 흐르는 물에 수세하여 이를 10배(v/w)의 0.5M EDTA-2Na을 넣어 석회질을 제거하였으며, 1.0M acetic acid 넣어 석회질을 침전하여 이를 차가운 물로 수세 후 탈수시켜 107℃에서 70동안 열수 추출한 용액을 원심분리(5,300×g, 15min)하여 고형분을 제거하였다. 상층액은 여과지(5A 110mm, Advantec, Japan)를 이용하여 감압여과한 후 여과된 추출용액은 50℃에서 열풍건조기를 이용하여 건조한 후 이를 분말로 분쇄한 후 물리화학적 특성을 분석하기 위한 시료로 사용하였다.

(4) 겔강도 및 녹는점

겔강도 Hamada(100)의 방법에 따라 측정하였다. 겔강도는 6.67% 젤라틴 용액 100ml를 비커에서 겔화시킨 후 분리한 다음 5°C에서 10mm 직경의 구형 plunger를 2cm/min의 속도로 진행시켰다. 이때 겔 강도는 plunger가 겔에 진입되었을 때의 하중으로 하였다.

녹는점은 Kolodziejaska 등(48)의 방법에 따라 측정하였다. 녹는점은 젤라틴 용액 10ml를 40°C에서 5°C까지 온도를 내리는 중에 점도가 급격히 상승하는 점으로 하였다. 점도의 측정은 6.67% 젤라틴 용액 10ml를 Brookfield viscometer(LVDVII+, Brookfield, New York, NY, USA)를 사용하여 측정하였다.

(5) 탁도 및 색도

옥돔 및 시판 킬라피아 비늘 젤라틴의 탁도는 0.1% 젤라틴 용액을 분광광도계(UV-140-02, Shimadzu, Japan)로 660nm에서 측정한 투과도로 나타내었다.

색도는 젤라틴 분말 그 자체를 시료로 하여 직시색차계(ZE-2000, Nippon Denshoku Industries Co., Japan)로 L, a 및 b 값을 측정한 다음 명도, 적녹도 및 황청도로 나타내었다. 이때 표준백판의 L값은 96.83, a값은 -0.41, b값은 0.64였다.

(6) 옥돔 비늘로부터 콜라겐의 추출

옥돔 비늘로부터 염가용성, 산가용성, 펩틴가용성 콜라겐 추출은 Kimura 등(101)의 방법으로 추출하였다.

염가용성 콜라겐은 -20°C로 유지된 acetone을 5배량 가하여 30~60분간 방치한 후 상등액을 버렸다. 상등액이 투명해질 때까지 acetone 처리를 반복하였고 이때 남은 고형물을 상온에서 1~2시간 풍건, 완전 건조시켰다. 건조시료의 20배량에 해당되는 0.15M NaCl 용액을 가하여 4°C에서 24시간 동안 교반하였다. 30,000×g에서 90분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물만 모은 다음 20배량

의 0.5M NaCl을 가하여 4°C에서 24시간 동안 교반 한 후에 7,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 거름종이(Whatman No.1)로 여과한 여액을 투석하여 염가용성 콜라겐으로 사용하였으며, 산가용성 및 펩틴가용성 콜라겐은 옥돔 비늘 50g를 1,000ml 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 넣고 7°C에서 48시간동안 교반하면서 추출한 다음 cheesecloth(60mesh)에 여과한 액을 원심분리(5,000×g, 20분)하여 침전물을 취하고 증류수로 세척한 후 동결 건조하여 콜라겐 함유를 추출하였다. 산가용성 콜라겐은 콜라겐 함유에 20배의 0.5N acetic acid를 가하여 48시간 동안 교반하면서 7°C에서 추출하였고, 펩신 가용성 콜라겐의 추출은 콜라겐 함유에 pepsin 2%를 첨가하고 7°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 원심분리(7,000×g, 1시간)하여 상층액을 취하였다. 이 액을 0.02M Na₂HPO₄ 용액으로 투석하여 동결건조시켰다.

(7) 옥돔 비늘의 젤라틴 제조

옥돔 비늘의 젤라틴 추출은 Kim 등(31)의 방법에 의해 제조하였으며, 옥돔 비늘의 이물질 제거를 위하여 8배의 1N NaOH 알칼리용액을 이용하여 10°C에서 3일간 알칼리 처리하여 비콜라겐 단백질을 제거하였다. 알칼리 처리 후 흐르는 물로 수세하여 1N HCl로 중화시켰다. 중화된 옥돔 비늘에 원료대비 6배(v/w)의 증류수를 가해 60°C에서 3시간 3회 반복하여 열수 추출하였다. 열수 추출한 용액은 여과지(5A 110mm, Advantec, Japan)를 이용하여 감압 여과한 후 여과된 젤라틴 추출용액은 진공농축기를 이용하여 60°C에서 농축한 다음 동결건조하여, 이를 분말로 분쇄한 후 시료로 이용하였다.

(8) 아미노산 조성

옥돔 비늘의 아미노산 조성 분석은 Spackman 등(102)의 방법을 다소 수정하여 측정하였으며, 시료 50~100mg을 정량하여 ampoule에 넣고 6N HCl 2ml를 가하여 봉한 후 110°C에서 24시간동안 산가수분해하였다. 분해액을 glass filter로 여

과하고 감압건고하고 HCl을 제거한 후 citric acid buffer(pH 2.2)로 25ml 되도록 정용하였다. 이 중 일부를 아미노산 정량분석기(L-8900, Hitachi, Japan)를 이용하여 측정하였다.

(9) 옥돔 비늘 젤라틴의 효소 및 시간대별 가수분해

건조되어 분말화된 옥돔 비늘 유래 젤라틴에 4가지 단백질 가수 분해 효소 α -chymotrypsin, alcalase, neutrase 및 trypsin(Novozyme Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)을 이용하여 시간대별로 가수분해하였다. 가수분해물은 다시 원심분리(12000rpm, 15min) 과정을 거쳐 상층액을 분리한 후, 가수분해도를 측정하였다.

Table 1. Characteristics of proteases used in hydrolysis

Enzymes	pH	Temperature	Origin
Neutrase	6.0	50	<i>B. amyloiquefaciens</i>
Trypsin	7.6	25	Procine pancreas
Alcalase	8.0	50	<i>B. licheniformis</i>
α -Chymotrypsin	7.8	25	Bovine pancreas

(10) 옥돔 비늘 젤라틴의 가수분해 조건

옥돔 비늘 젤라틴의 산업적 이용을 위한 효율이 높은 가수분해조건을 결정하기 위하여, 기질대 효소비와 기질농도에 따라 가수분해를 수행하였다. 실험을 수행하기 위한, 기질 대 효소비는 10, 20, 50, 100, 200, 500(wt/wt)였고, 기질인 옥돔 비늘 유래 젤라틴의 농도는 1%, 3%, 5%, 10%였다. 가수분해는 위에서 제시된 방법과 동일하게 수행되었다. 그리고, 모든 가수분해조건의 검토를 위해 가수분해물의 가수분해도를 측정하였다.

(11) 가수분해도 측정

옥돔 비늘 유래 젤라틴의 가수분해도(degree of hydrolysis; DH)는 trichloroacetic acid(TCA)법(103)으로 측정하였다. 즉 반응이 종료된 반응혼합물을 원심분리 (12000rpm, 15min)하여 상층액으로부터 2ml를 취하고 여기에 20% TCA를 동량 첨가하여 원심분리(3500rpm, 10min)한 다음, 상층액의 일정량을 취하여 Lowry법(104)으로 10% TCA 가용성 질소량을 측정하여 다음의 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

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

(12) 젤라틴 가수분해물의 분자량별 분획

옥돔 비늘 젤라틴 효소가수분해물의 분자량별 분획은 5kDa, 10kDa 및 30kDa의 막을 사용하는 한외여과막 분리 시스템 (Ultrafiltration membrane)을 이용하여 5kDa 이하, 10kDa 이하 및 30kDa 이하 분획물들을 각각 제조하였다(Fig. 2).

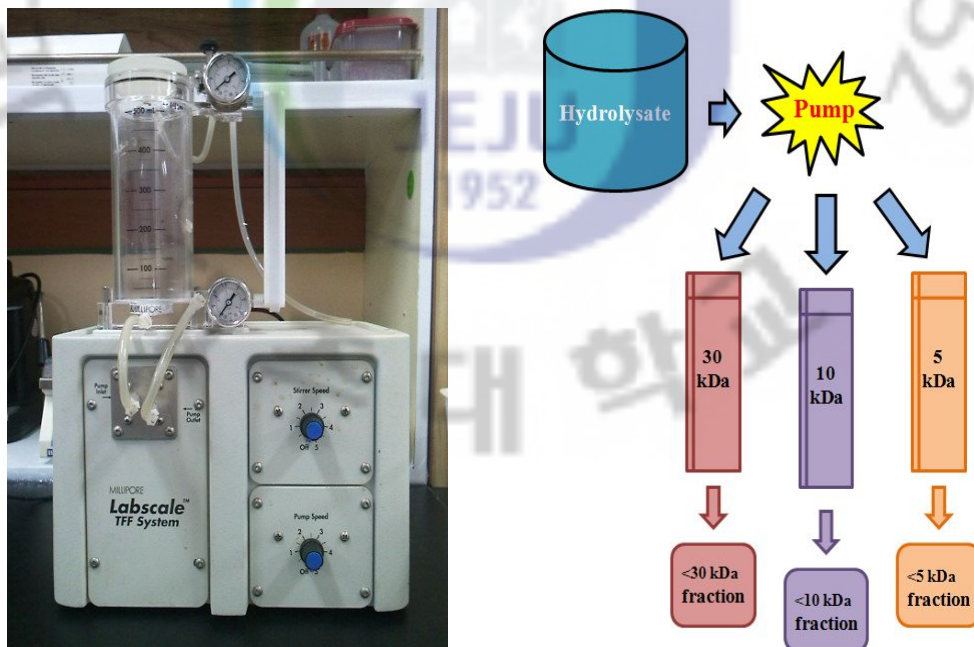


Fig. 1. Mimetic diagram of ultrafiltration membrane system.

(13) DPPH radical scavenging activity

DPPH 자유 라디칼에 대한 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 소거활성은 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 이용하는 Blois(105)의 방법을 변형하여 측정하였다. 4.0×10^{-4} M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 100 μl 에 각 가수분해물 100 μl 를 넣고 5초간 교반하여 30분간 반응시킨 후 ELISA reader(TECAN, AT/sunrise R/C, Switzerland)로 517nm에서 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 흡광도의 감소 비율로 가수분해물의 항산화 활성을 측정하였다. Blank는 DPPH 대신 ethanol을 사용하였고, control은 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물 대신 증류수를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \frac{1 - (\text{Sample OD} - \text{Blank OD})}{\text{Control OD}} \times 100$$

(14) Hydrogen peroxide scavenging activity

과산화수소 소거활성은 Müller 등(106)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0) 100 μl 와 가수분해물 100 μl 를 96 microwell plate에서 혼합시킨다. 다시 20 μl 의 hydrogen peroxide를 첨가시키고 37°C에서 5분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 1.25mM ABTS와 peroxidase (1unit/ml)를 각각 30 μl 씩 첨가하여 최종적으로 37°C에서 10분간 반응시켜 ELISA reader(TECAN, AT/sunrise R/C, Switzerland)로 405nm에서 활성도를 측정한다. Blank는 과산화수소 대신 증류수를 사용하였고, control은 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물 대신 증류수를 사용하였다.

$$\text{Hydrogen peroxide scavenging activity(\%)} = \frac{1 - (\text{Sample OD} - \text{Blank OD})}{\text{Control OD}} \times 100$$

(15) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) 활성저해

옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 항고혈압 활성을 측정하기 위하여 시간대별로 분리된 젤라틴 가수분해물을 가지고 ACE 억제를 측정하는 Cheung 등 (81)의 방법에 준하여 측정하였다. 시간대별로 추출된 젤라틴 가수분해물 50 μ l에 25mU/ml ACE 효소액 50 μ l를 가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 항온처리하였다. 여기에 기질로서 12.5mM HHL용액 100 μ l를 가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시킨 후, 1N HCl용액 0.25ml를 가하여 시험관 혼합기로 교반하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate 350 μ l를 가하여 교반한 다음, 원심분리(4000rpm, 10min)시켜 상층액(ethyl acetate층) 200 μ l를 분취하였다. 이 분취액을 80 $^{\circ}$ C 드라이오븐에서 완전히 건조시켜 증류수 1ml를 가하여 용해시킨 후, 228nm에서 흡광도를 측정하여 시간대별 젤라틴 가수분해물의 ACE 저해율을 나타내었다.

$$\text{ACE 저해율(\%)} = \frac{1 - \left(\frac{S - S_c}{B - B_c} \right)}{\left(\frac{S - S_c}{B - B_c} \right)} \times 100$$

S : the absorbance in the presence of each sample

S_c : the absorbance as S except that enzyme reaction was quenched at zero time

B : the absorbance in the absence of the sample

B_c : the absorbance as S except that enzyme reaction was quenched at zero time

(16) Tyrosinase 활성저해

옥돔 비늘젤라틴 효소 가수분해물의 미백효과를 시험하기 위하여 Fuller 등 (107)의 방법을 이용하여 tyrosinase의 저해활성을 측정하였다. 0.1M 인산염완충액(pH 6.5) 220 μ l와 시료액 20 μ l 그리고 tyrosinase(sigma)(1500U/ml~2000U/ml)액 20 μ l를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5mM trypsin(sigma)액 40 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 10~15분 동안 반응시킨 후 ELISA reader(TECAN, AT/sunrise R/C, Switzerland)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시료액으로 시료액 대신 0.1M인산염완충액(pH 6.5)을 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성저해율(\%)} = \frac{100 - (b - b')}{(a - a')} \times 100$$

a : 공시험액의 반응 후 흡광도

b : 시료액의 반응 후 흡광도

a', b' : tyrosinase 대신 buffer로 대체하여 측정한 흡광도

(17) Elastase 활성저해

옥돔 비늘젤라틴 효소 가수분해물의 주름개선효과를 시험하기 위하여 Cannell 등(108)의 방법을 이용하여 elastase의 저해활성을 측정하였다. Elastase 저해 활성 측정은 기질로서 elastase substrate VIII를 사용하여 실온에서 15분간 반응시켜 p-nitroanilide의 생성량을 측정하였다. 0.2M tris-HCl(pH 8.0) buffer로 희석한 각 시험용액 160 μ l와 5mM elastase substrate VIII(CALBIOCHEM) 용액 20 μ l 그리고 10 μ g/ml elastase(sigma) 효소 20 μ l를 순서대로 넣은 후 25 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시킨 후 ELISA reader(TECAN, AT/sunrise R/C, Switzerland)를 이용하여 410nm에서 흡광도를 측정하였다.

IV. 결과 및 고찰

1. 옥돔 비늘의 일반성분 및 추출수율

옥돔 비늘의 수분, 조단백, 조지방, 회분 및 추출수율은 Table 2와 Table 3에 나타내었다. 옥돔 비늘의 수분함량 8.5%, 조지방 함량 0.4%, 회분함량 45%, 조단백질 함량은 46.1%, 콜라겐 특유의 hydroxyproline의 함량은 4.4% 이었다.

옥돔 비늘을 산, 염 및 효소(펩신)로 추출한 콜라겐의 추출수율은 3.81~20.26% 범위 있었으며 염처리 했을 때 추출수율이 가장 높게 나타났다. 또한 옥돔 비늘의 젤라틴 추출수율은 20.1%이었다.

이는 Hamada와 Kumagai(109)는 정어리 비늘의 조회분 53%, 조단백 41%, 진등(16)은 송어비늘의 조회분은 49.2%, 단백질 함량은 48.6%. 콜라겐 단백질의 물리적 성질에 관여하는 hydroxyproline의 함량은 6.44%라 하였으며 옥돔 비늘의 단백질함량은 해산어종인 정어리와 송어 비늘과 비슷한 함량을 보이는 것으로 나타났다.

따라서 옥돔 비늘의 주성분은 단백질이며 또한 콜라겐 단백질 평가 기준이 되는 hydroxyproline함량도 높아 콜라겐 또는 젤라틴 단백질의 유용 자원으로 활용할 가치가 있는 것으로 판단된다.

Table 2. Proximate composition of *B. japonicus* scale

Sample	Crude protein	Moisture	Ash	Other
<i>B. japonicus</i>	46.1±0.02 (Hydroxyproline 4.4 ± 0.17*)	8.5±0.01	45.0±1	0.4±0.001

*Content of collagen in crude protein from *B. japonicus* scale : $11.42 \times 4.4 = 50.2\%$

Table 3. Yields of collagen extracts and gelatin from *B. japonicus* scale

Sample	Collagen			Gelatin (%)
	Salt soluble	Acid soluble	Pepsin soluble	
	<i>B. japonicus</i>	20.26±0.48	10.91±0.36	

2. 옥돔 비늘의 아미노산 조성

옥돔 비늘의 전처리(건조) 방법에 따른 아미노산 조성을 Table 4와 같다. 옥돔 비늘의 주요 아미노산은 glutamic acid, proline, glycine, arginine이었으며, 콜라겐 품질에 영향을 주는 imino acid 조성은 19.19~19.88%이었다. 옥돔 비늘을 자연건조, 동결건조 및 알칼리 처리 동결건조 등 전처리 방법에 따른 아미노산 조성에 대한 차이는 거의 없었지만 imino acid 함량은 자연건조 시킨 옥돔 비늘에서 약간 높은 함량을 보였다. 따라서 옥돔 비늘을 활용하기 위한 경제적인 측면에서 볼 때 옥돔 비늘 전처리 방법은 자연 건조시키는 것이 바람직하다고 생각된다.

옥돔 비늘의 주요 구성단백질인 콜라겐의 아미노산 조성은 Gly(glycine)-Y-X 배열이 반복되어 있으며, 이들은 3중 나선구조를 이루고 있는데, Gly-X-Y가 Gly(glycine)-Pro(proline)-Hyp (hydroxyproline)일 때 Hyp 잔기는 pyrrolidine ring의 hydroxyl group에 의해 collagen 3중 나선구조의 열 안정성을 높여준다(110). 또한 hydroxyproline의 함량은 collagen으로부터 유도되는 젤라틴의 주요한 기능성 특성인 유동성과 겔 강도 등 물성(rheological properties)에 중요한 영향을 미치며, 함량이 높을수록 좋은 특성을 가진다고 밝혀졌다(51). 따라서 imino acid인 proline, hydroxyproline 잔기의 함량은 젤라틴 추출 및 가수분해물 제조에 있어 매우 중요하다.

Table 4. Amino acid compositions of *B. japonicus* scale

Amino acid	(g/100g)		
	dry	frozen dry	alkali treated over freezen dry
Aspartic acid	5.59	5.59	5.70
Theronine	2.61	2.49	2.56
Hydroxyproline	9.37	9.49	9.30
Serine	3.81	3.62	3.82
Glutamic acid	20.69	20.81	20.35
Proline	10.51	10.20	9.90
Glycine	11.68	11.21	11.62
Valine	3.85	3.92	3.92
Methionine	2.35	2.47	2.61
Isoleucine	1.17	1.21	1.20
Leucine	2.22	2.28	2.28
Tyrosine	1.45	1.51	1.49
Phenylalanine	2.67	2.75	2.75
Lysine	3.73	3.78	3.86
Histidine	1.40	1.47	1.40
Arginine	10.52	10.63	10.72
Alanine	6.38	6.57	6.52
Total	100	100	100
Imino acids*	19.88	19.69	19.19

*Imino acids mean proline and hydroxyproline.

3. 옥돔 비늘 추출 젤라틴의 물리화학적 특성

옥돔 비늘과 시판 틸라피아 비늘(150 bloom과 200 bloom)로부터 추출 제조한 젤라틴들의 물리화학적 특성은 Table 5와 같다. 옥돔 비늘 젤라틴의 수분함량은 8.0%, 조단백질 90.7%, 조지방 0.1%, 회분 0.4%로 시판 틸라피아 비늘 젤라틴(150 bloom과 200 bloom)과 비교했을 때 수분과 단백질은 거의 같은 함량을 보였으며 회분인 경우 0.4%로 약간 낮게 나타났다.

옥돔 비늘에서 추출 제조한 젤라틴의 탁도는 1.3%로, 틸라피아 비늘 젤라틴(150 bloom과 200 bloom)의 0.7% 및 0.5%에 비하여 약간 높게 나타났다. 또한 옥돔 비늘 젤라틴의 색도는 Hunter 색차계를 이용하여 명도(L), 적녹도(a), 황청도(b)로 나타내었는데 명도의 경우 88.5, 적녹도 -0.4, 황청도 27.3이었다. 시판 틸라피아 비늘 젤라틴(150 bloom과 200 bloom)인 경우에도 명도 87.8~88.1, 적녹도 -0.1~-1.7, 황청도 25.4~27.9로 옥돔 비늘 젤라틴과의 명도, 적녹도 및 황청도의 차이는 거의 없었다.

한편, Yoo(1)는 황다랑어피, 우피 및 돈피에서 추출한 젤라틴의 단백질 함량은 각각 90.4%, 90.6% 및 90.7%라고 보고하였으며, 또한 미국 표준 gelatin 규격(FCC, 1994)에 따르면 식품과 의약품에 사용되는 젤라틴의 회분함량은 3% 및 2% 이하로 규정되어 있다(31). 따라서 옥돔 비늘에서 추출제조한 젤라틴은 회분 함량이 낮고 단백질 함량 및 색도가 시판 틸라피아 비늘 젤라틴과 유사하여 옥돔가공공장에서 부산물로 폐기되고 있는 옥돔 비늘은 향후 젤라틴 자원으로 활용할 가치가 있을 것으로 사려된다.

Table 5. Comparison of physicochemical properties of *B. japonicus* and commercial tilapia scale gelatins.

Components		Scale gelatin		
		<i>B. japonicus</i> scale	Commercial tilapia scale (150B)	Commercial tilapia scale (200B)
	Moisture	8.0±0.6	8.9±0.8	8.9±0.1
Proximate composition (g/100g)	Protein	90.7±0.4	89.5±0.4	90.1±0.4
	Lipid	0.1±0.0	0.9±0.2	0.3±0.2
	Ash	0.4±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1
Yield of gelatin (%)		8.8±0.3	-	-
Turbidity % (660nm)		1.3±0.1	0.7±0.1	0.5±0.2
Hunter color value	L	88.5±0.08	88.1±0.80	87.8±0.56
	a	-0.4±0.80	-0.1±0.13	-1.7±0.25
	b	27.3±0.36	27.9±0.11	25.4±0.52

4. 옥돔 비늘 젤라틴의 겔강도

옥돔 비늘과 시판 틸라피아 비늘 (150 bloom과 200 bloom)로부터 추출 제조한 젤라틴들의 겔강도는 Fig. 3과 같다. 옥돔 비늘로 제조한 젤라틴의 겔강도는 120.5g으로 시판 틸라피아 비늘의 156.5g (150 bloom)과 182.7g (200 bloom)에 비하여 낮게 나타났다. 일반적으로 어류에서 추출 제조한 젤라틴의 겔강도는 원료의 선도가 떨어질수록, 서식온도가 낮을수록, 젤라틴의 추출온도 및 건조온도 등이 높을수록 낮다고 알려져 있다(111). 이와 같이 옥돔 비늘 젤라틴의 겔강도가 틸라피아 비늘에 비하여 낮은 것은 두 원료 어종 간에 서식환경, 원료의 선도 및 젤라틴 추출 제조방법에 따른 것으로 추정된다. 젤라틴의 품질은 한국산업규격(KS규격)에서 5종으로 분류하고, 1~5종 모두가 각각 수분 16%이하, 회분 2% 이하 및 유지분 0.5% 이하로 규정하고 있으며, 젤리강도의 경우 1종이 210g 이상, 2종 170g 이상, 3종 130g 이상, 4종 90g 이상 및 5종 50g 이상으로 규정하고 있다(31).

이상의 결과로부터 본 연구에서 추출제조한 옥돔 비늘 젤라틴의 겔 강도는 한국산업규격의 규정에 따라 분류하면 젤라틴 3종에 해당하는 것으로 나타났다.

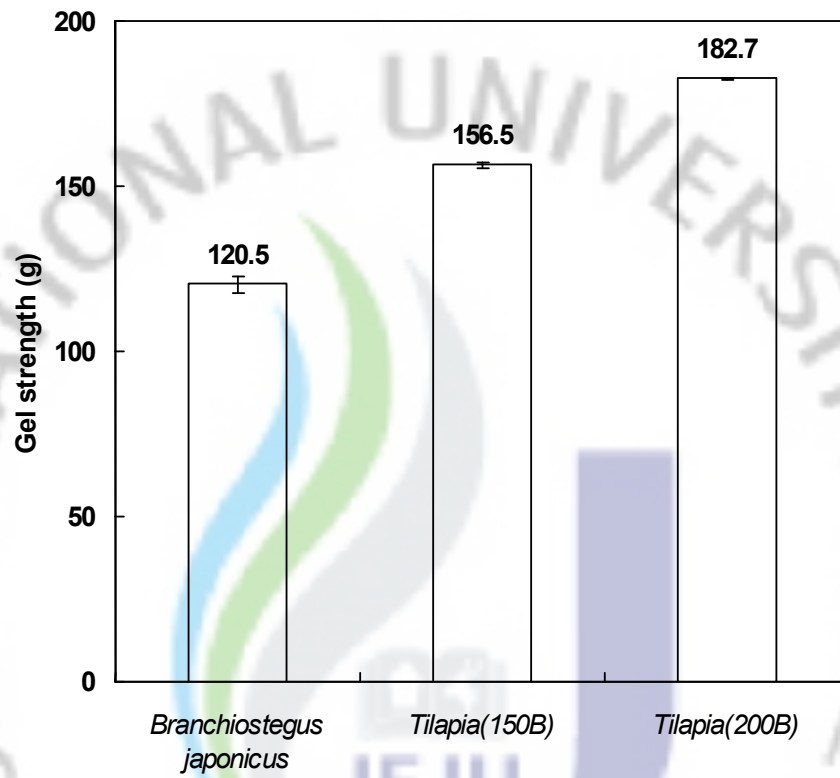


Fig. 2. Gelling temperature of gelatins extracted from *B. japonicus* and commercial tilapia fish scales.

5. 옥돔 비늘 젤라틴의 녹는점

옥돔 비늘과 시판 킬라피아 비늘 (150 bloom과 200 bloom)로부터 제조한 젤라틴의 녹는점(gelling point)은 Fig. 4와 같다. 옥돔 비늘로 제조한 젤라틴의 녹는점은 10°C로 시판 킬라피아 비늘 젤라틴의 17°C (150 bloom)과 19°C(200 bloom)에 비하여 낮게 나타났다.

유 등(112)에 의하면 황다랑어 피 젤라틴의 녹는점은 24.0°C, 우피 33.8°C 및 돈피 36.5°C로 육상동물 젤라틴에 비해 낮게 나타났다고 보고 하였다. 이와 같이 어류 젤라틴의 경우 일반적으로 육상동물 젤라틴에 비해 녹는점이 낮는데 이는 낮은 imino acid 함량 때문이라고 보고되고 있다(51).

상기의 결과로부터 옥돔 비늘 젤라틴의 녹는점이 킬라피아 비늘 및 황다랑어 피 젤라틴의 겔강도 및 녹는점이 낮은 것은 원료 어종 간에 서식환경, 선도 및 젤라틴의 추출방법에 따른 것으로 추측되며 옥돔 비늘의 최적 젤라틴 추출조건에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

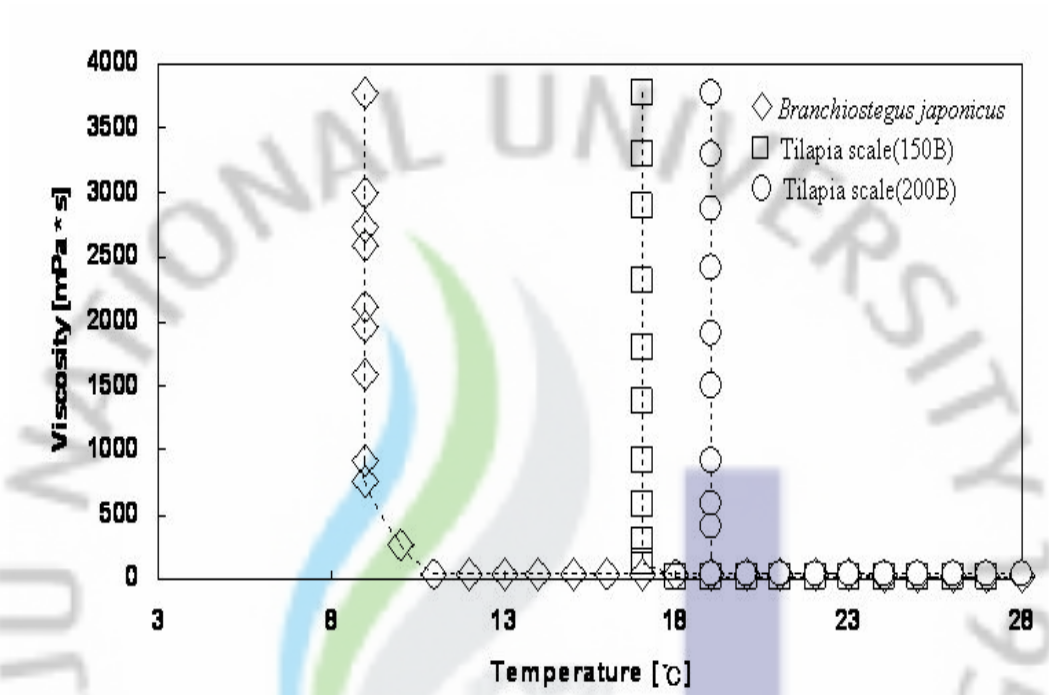


Fig. 3. Gelling temperature of gelatins extracted from various fish scales.

6. 옥돔 비늘 콜라겐 및 젤라틴의 아미노산 조성

옥돔 비늘에서 추출한 산가용성, 염가용성, 펩틴가용성 콜라겐의 아미노산 조성을 시판 우피(牛皮) 콜라겐과 비교하여 Table 6에 나타내었으며, 또한 옥돔 비늘에서 추출한 젤라틴단백질의 아미노산 조성을 시판 우피 및 돈피(豚皮) 젤라틴과 비교하여 Table 7에 나타내었다.

옥돔 비늘에서 추출한 collagen의 아미노산 조성을 살펴본 결과, glycine(Gly) 조성은 옥돔 비늘 펩틴가용성 collagen에서 21.57%, 염가용성 collagen 19.75% 및 산가용성 collagen 20.85%로 시판 우피 collagen의 25.48%에 비해 낮게 나타났다. Hydroxyproline 조성은 펩틴가용성 collagen에서 9.61%, 염가용성 collagen 7.41%, 산가용성 collagen 8.22%, 우피유래 collagen 8.30%로 옥돔 비늘 펩틴가용성 콜라겐에서 높은 조성을 보였으며, proline은 펩틴가용성 collagen 7.05%, 염가용성 collagen 6.58%, 산가용성 collagen 10.43%, 우피유래 collagen 11.99%의 조성으로 우피유래 콜라겐에 비해 현저하게 낮은 조성을 보였다. 또한 imino acid 함량도 펩틴가용성 collagen 16.67%, 염가용성 collagen 13.99%, 산가용성 collagen 18.65%로 우피유래 collagen 20.29%보다 낮았으며, 다른 수산생물 유래 collagen과 같은 경향을 나타내었다(113).

일반적으로 collagen의 아미노산 구성은 Gly(glycine)-Y-X 배열이 반복되어 있으며, 이들은 3중 나선구조를 이루고 있는데, Gly-X-Y가 Gly-Pro(proline)-Hyp(hydroxyproline)일 때 Hyp 잔기는 pyrrolidine 고리의 hydroxyl group에 의하여 collagen 3중 나선구조의 열 안정성을 높여주는 것으로 알려져 있다(110). 또한 hydroxyproline의 조성은 collagen으로부터 유도되는 젤라틴의 주요 물리적 특성인 유동성(rheological properties)과 겔 강도 등에 중요한 영향을 미치며, 이 함량이 높을수록 좋은 특성을 가진다고 밝혀졌다(51). 따라서 imino acid인 proline 및 hydroxyproline 잔기의 함량은 collagen에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있다.

한편, 옥돔 비늘의 gelatin 추출물의 경우 imino acid 조성이 20.50%로 우피

22.83%, 돈피 22.64% 유래 gelatin보다 낮게 나타났으며, Gly 함량도 옥돔 비늘 gelatin 19.30%로 우피 20.34% 및 돈피 유래 gelatin보다 낮은 함량을 보였다 (Table 7). 보통 어류 gelatin은 포유동물의 gelatin에 비해 낮은 imino acid(Pro + Hyp) 보인다. 옥돔 비늘 비늘 gelatin처럼 그 조성이 낮았다. 냉수성 어류는 Hyp 함량이 매우 낮으며 더불어 낮은 겔 형성점 및 녹는점(gelling and melting point)을 가지는 것으로 보고하였다. 포유동물 gelatin의 경우는 10%농도로 상온 (20℃)에서 겔을 형성하는 반면, 대구(cod)와 같은 냉수성 어류의 경우 10% 농도로 2℃에서 저장할 경우에 겔을 형성하는 것으로 보고하였다(51).

일반적으로 gelatin의 아미노산조성 및 배열은 glycine(Gly), Proline(Pro) 및 hydroxyproline(Hyp)이 많은 양으로 구성되어 있으며, Gly-Pro-Hyp의 구조가 반복되는 특징을 가지고 있다. 이 때 imino acid인 proline과 hydroxyproline의 분자구조 내 위치는 gelatin의 열적 안정성을 부여하므로 Gly-Pro-Hyp 구조의 총 함량의 collagen의 열적 안정성에 영향을 미치는 주된 요인 중 하나이다(49). 또한 Ledward(114)는 pyrrolidine 및 imino acid의 총함량이 gelatin의 안정성과 관련이 있다고 보고하였으며, Arnesen and Gildberg(115)는 어류 gelatin은 육상 포유동물 유래 gelatin과 아미노산의 비율이 다르며, 이는 포유동물과 다른 기능성 특성에 기인한다고 보고하였다. 일반적으로 포유동물의 gelatin의 Gly 함량은 대략 24% 정도이고 어류 gelatin 16~18% 정도로 포유동물에 비해 그 함량이 낮다고 보고하고 있다(51).

본 실험결과에 따르면 우피 및 돈피 gelatin은 20℃에서 겔이 형성되었으나, 옥돔 비늘 gelatin의 경우 겔이 형성되지 않아 imino acid가 겔형성점 및 녹는점에 주된 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

Table 6. Amino acid compositions of collagen extracts from *B. japonicus* scale (g/100g)

Amino acid	<i>B. japonicus</i> scale			
	Pepsin-solubility collagen	Salt-solubility collagen	Acid-solubility collagen	Calf skin
Aspartic acid	8.95	8.23	6.61	6.02
Theronine	3.57	2.88	2.20	1.67
Hydroxyproline	9.61	7.41	8.22	8.30
Serine	3.57	4.94	3.96	2.55
Glutamic acid	11.62	11.93	10.87	11.57
Proline	7.05	6.58	10.43	11.99
Glycine	21.57	19.75	20.85	25.48
Valine	5.34	7.82	8.08	4.61
Methionine	2.48	1.23	0.73	0.22
Isoleucine	3.22	3.29	1.32	1.63
Leucine	4.29	5.76	5.58	3.34
Tyrosine	2.09	2.06	1.32	0.31
Phenylalanine	3.07	2.06	1.76	2.11
Lysine	4.10	4.94	3.82	4.31
Histidine	1.73	2.47	1.17	0.70
Arginine	3.67	4.94	6.90	8.57
Alanine	4.07	3.71	6.18	6.63
Total	100	100	100	100
Imino acids*	16.67	13.99	18.65	20.29

*Imino acids mean proline and hydroxyproline.

Table 7. Amino acid compositions of *B. japonicus* scale, bovine and porcine skin gelatins (g/100g)

Amino acid	<i>B. japonicus</i> scale	Bovine	Porcine
Aspartic acid	6.15	6.03	5.72
Theronine	2.50	1.59	1.53
Hydroxyproline	8.73	9.39	9.39
Serine	3.60	2.50	2.40
Glutamic acid	11.92	12.29	11.74
Proline	11.77	13.44	13.25
Glycine	19.30	20.34	21.89
Valine	4.05	4.18	4.30
Methionine	2.04	0.62	0.53
Isoleucine	1.17	1.58	1.23
Leucine	2.31	3.15	3.04
Tyrosine	0.47	0.41	0.59
Phenylalanine	2.79	2.55	2.64
Lysine	4.55	4.45	4.31
Histidine	1.04	0.73	0.72
Arginine	9.93	9.88	10.19
Alanine	7.68	6.87	6.53
Total	100	100	100
Imino acids*	20.50	22.83	22.64

*Imino acids mean proline and hydroxyproline.

7. 옥돔 비늘의 효소별 가수분해

옥돔 비늘의 효소별 8종의 단백질 분해효소(protamax, alcalase, kojizyme, α -chymotrypsin, flavourzyme, trypsin, papain, neutrase)와 열수추출하여 가수분해도를 측정하여 그결과를 Fig. 5에 나타내었다. 8종의 단백질 가수분해 효소를 이용하여 추출한 결과 열수로 추출할때보다 가수분해도가 증가하였으며, 특히 alcalase, α -chymotrypsin, trypsin, neutrase 4종류의 효소에서 25%이상의 가수분해도를 나타내었으며, 4종의 효소를 옥돔젤라틴 가수분해를 위한 효소로 사용하였다.

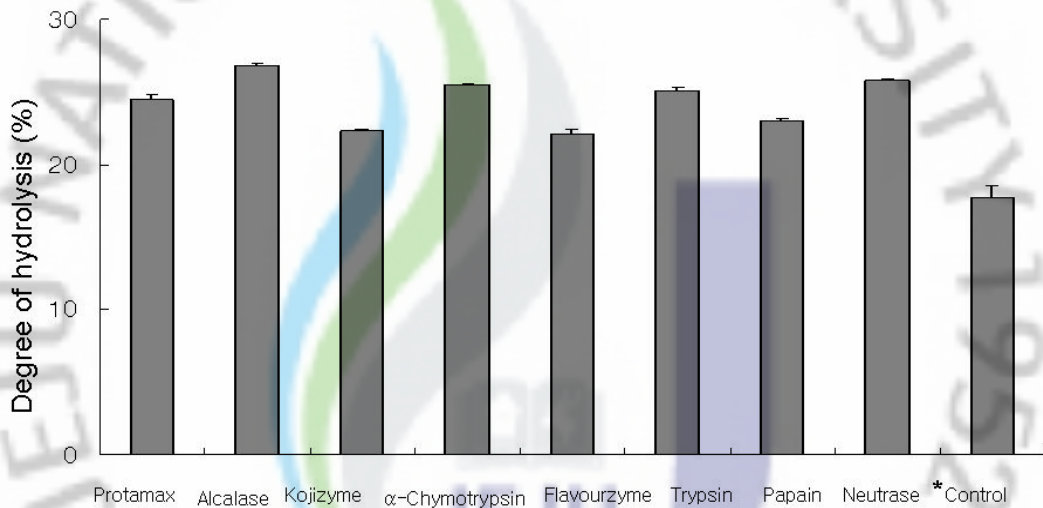


Fig. 4. Comparison of hydrolysis degrees for enzymatic hydrolysates from *B. japonicus* scale. The enzymatic hydrolysates were prepared by enzymes(protamax, alcalase, kojizyme, α -chymotrypsin, flavourzyme, trypsin, papain, neutrase) and reaction 6hrs.

*Control ; Comparison of hydrolysis degrees for heating water from *B. japonicus* scale.

8. 반응시간에 따른 옥돔젤라틴의 가수분해도

건조되어 분말화된 옥돔 비늘 유래 젤라틴을 가수분해하기 위해 4종의 단백질 분해효소 (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase 및 trypsin)를 사용하여 가수분해 반응시간에 따른 가수분해도를 측정하였다. 그 결과, 4종의 단백질 가수분해 효소를 이용하여 추출한 시간대별 가수분해물의 가수분해도는 4종류의 효소 모두 가수분해반응 6시간까지 급격하게 가수분해도의 증가를 보였으나, 그 후에는 거의 일정하였다. 또한, 4종류의 가수분해물 중에서도 특히 alcalase가 가장 효과적으로 옥돔 비늘 젤라틴을 가수분해하였으며, 가수분해반응 6시간 이후에 약 65% 이상의 가수분해도를 나타내었다(Fig. 6).

Kim 등(116)은 참치 유래의 조효소로 민태 frame을 가수분해할 때 pronase E와 α -chymotrypsin보다는 각각 10%와 5%정도 가수분해율이 낮았으나, papin보다는 약 15%정도 높았다고 보고하였다. Ooshiro(117)는 고등어에서 추출한 proteinase와 소 유래의 trypsin으로 casein을 4시간 동안 가수분해하였을 때의 가수분해도를 비교한 결과, 고등어 유래 proteinase의 경우 펩티드 결합의 약 70% 정도를 가수분해하였으나 소의 trypsin은 기질특이성으로 인하여 약 15%만을 가수분해하였다고 보고하였다. 또한 Ramakrishna 등(118)도 어류 chymotrypsin과 bovine chymotrypsin을 시간경과에 따른 활성을 비교한 실험에서, collagen 기질을 사용하여 35°C에서 8시간 반응시켰을 경우와 어류의 불용성 단백질부분을 기질로 사용하여 37°C에서 5시간 반응시켰을 경우 모두 어류 chymotrypsin이 약 2배가량 활성이 더 높았다고 보고하였다.

이전 연구논문들은 어류의 살이나 비늘성분, 혹은 포유동물의 껍질로부터 다양한 젤라틴이나 젤라틴 펩티드들을 분리, 추출하였고, 그에 따른 추출효율을 높이고자 노력하여 왔다(119). 최근 들어, 효소적 추출기법은 수용성의 성분들을 효율적으로 추출하고, 환경적으로 유익하며, 비용이 적게 들고, 특히 상당한 추출효율의 증대를 얻을 수 있는 장점을 가짐으로써, 다양한 분야에서 이용되고 있다(120~122). 이 연구에서도 우리는 옥돔 비늘 유래의 젤라틴 가수분해물의 제조를

위해 alcalase를 이용하는 경우, 높은 가수분해도를 가짐으로써 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 제조를 위한 효율적인 효소이며, 효소적 추출기법이 유용하다는 것을 확인할 수 있었다.

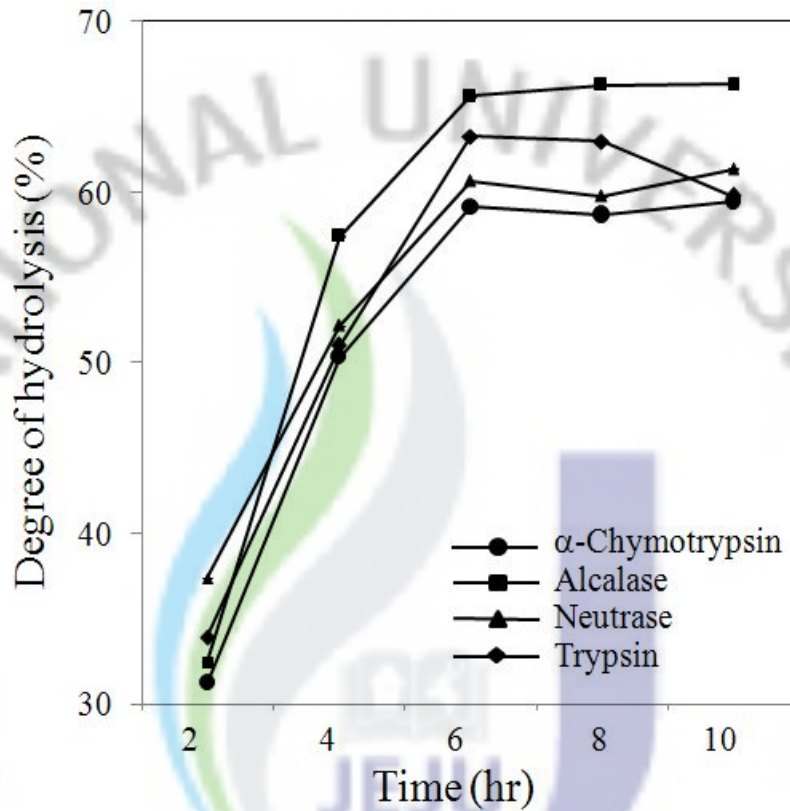


Fig. 5. Comparison of hydrolysis degrees for enzymatic hydrolysates of gelatin from *B. japonicus* scale. The enzymatic hydrolysates of gelatin were prepared by enzymes (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase and trypsin) and reaction times. Conditions of reaction : Substrate/Enzyme ratio=100 (wt/wt), Substrate concentration = 3%.

9. 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물의 항산화 효과

대기 중에 존재하는 산소는 식품 또는 동물의 세포등과 같은 여러 유기물질에 대해 산화반응을 유발시켜 많은 부작용을 나타내게 된다. 이러한 작용은 산소에서 유래되는 superoxide anion, hydroxyl 및 DPPH 라디칼, singlet oxygen 및 H_2O_2 와 같은 활성산소종 (ROS)들이 세포막에 존재하는 지질과 결합하여 과산화물을 만듦으로 인해 진행되게 되는데, 이들의 연속반응에 의하여 alcohol류, aldehyde류, ketone류 등을 생성함으로써 생체 내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발할 뿐만 아니라, 세포노화, 세포막 분해, 지방산화 등 심각한 생리적인 장애를 일으킨다(54). 이 중 특히 DPPH는 가장 안정한 free radical로서 천연물의 항산화실험에 가장 많이 사용되고 있다(123). 또한 hydrogen peroxide은 체내 각 기관들의 DNA에 심각한 손상을 일으켜 각종 질병과 노화를 유발한다고 알려져 있다(123). 이에 따라 옥돔 비늘 젤라틴 효소 가수분해물의 DPPH와 hydrogen peroxide의 소거활성에 대하여 살펴보았다.

1) DPPH radical 소거활성

옥돔 비늘 유래의 젤라틴으로부터 제조된 젤라틴 가수분해물에 대하여 DPPH 라디칼 소거활성은 Fig. 7과 Fig. 8에서 나타내었다.

옥돔 유래 비늘 젤라틴 효소처리 가수분해물들의 DPPH 라디칼 소거활성은 시료농도와 가수분해시간이 높을수록 소거활성이 증가하였으며, 가수분해도의 양상과 비슷한 활성변화를 보였다. 즉, 젤라틴 가수분해 처리 효소 중 nutrase에 의한 젤라틴 가수분해물이 가장 높은 DPPH 소거활성을 보였는데, nutrase 가수분해물은 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거활성을 증가시켜 6~8시간 가수분해시켰을 때 약 50% 이상의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으며 IC_{50} 값은 9.18 mg/ml였다(Fig. 8). 상기의 결과에서 보면, 옥돔 비늘 유래 젤라틴의 가수분해물은 활성산소종인 DPPH 라디칼 소거활성과 매우 밀접한 관계에 있다는 것을 알 수 있다. 즉, 활성산소종인 DPPH 라디칼 소거활성 패턴이 젤라틴의 가수분해시간에

따른 가수분해율의 페틴과 유사한 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 효소 종류에 따른 가수분해도의 변화와는 DPPH 라디칼에 대한 소거활성과는 연관이 없는 것으로 여겨진다. 이 결과로부터 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물이 항산화 활성을 가진다는 것을 확인하였고, 효소의 종류와 시간에 따라 활성산소종에 대한 각기 다른 소거활성을 보일 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

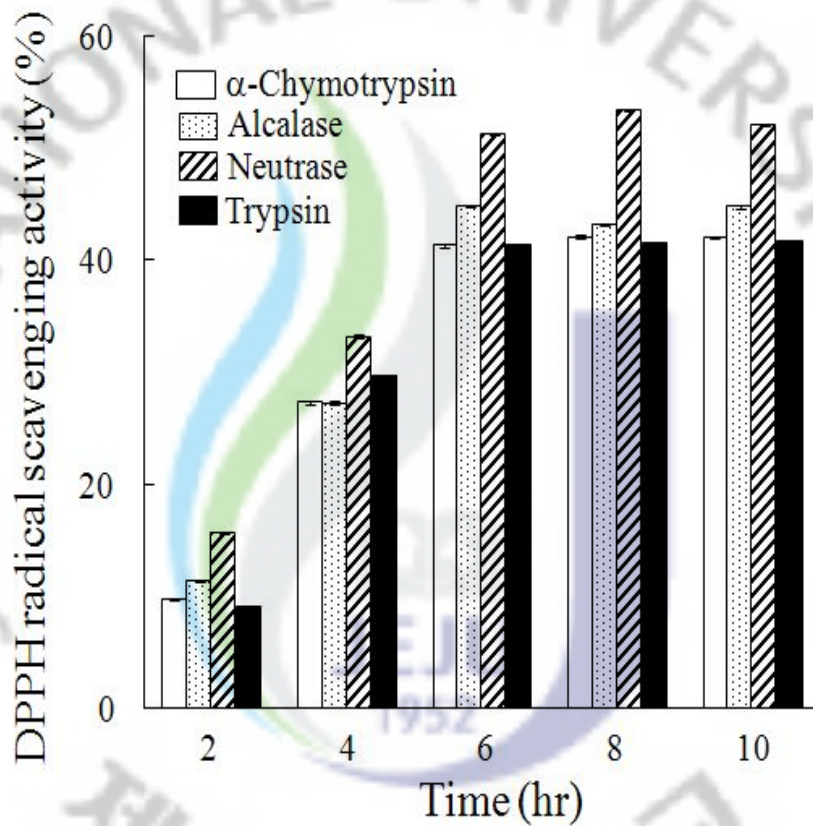


Fig. 6. DPPH radical scavenging activities for enzymatic hydrolysates (10mg/ml) of gelatin from *B. japonicus* scale.

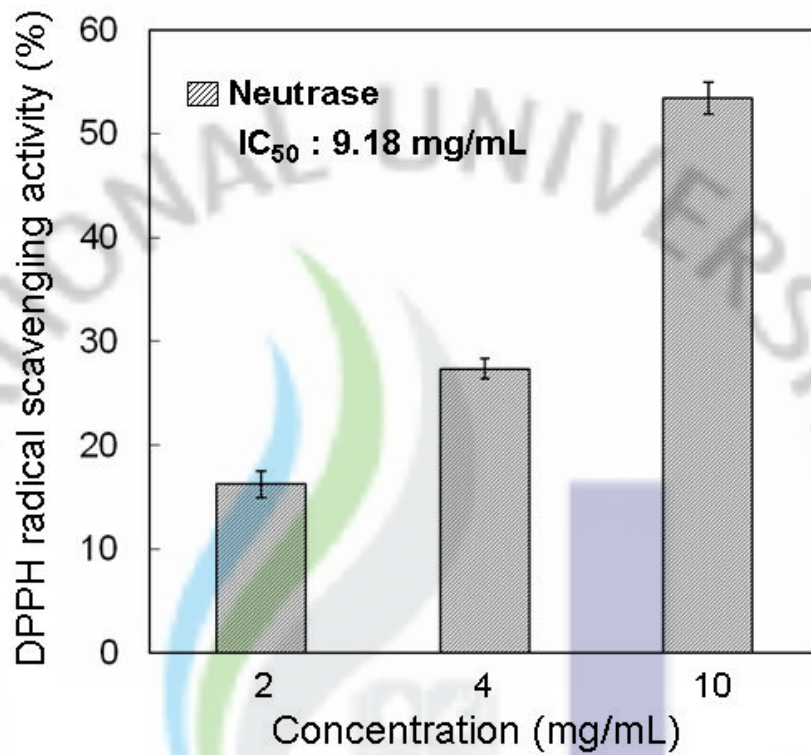


Fig. 7. DPPH radical scavenging activities for neutrased hydrolysate of gelatin from *B. japonicus* scale by concentrations. The value of IC₅₀ was expressed as the concentration of neutrased gelatin hydrolysate inhibiting the 50% of DPPH radical.

2) Hydrogen peroxide(H₂O₂) 소거활성

옥돔 비늘 유래의 젤라틴으로부터 제조된 젤라틴 가수분해물에 대하여 hydrogen peroxide(H₂O₂) 소거활성은 Fig. 9와 Fig. 10에 나타내었다.

옥돔 유래 비늘 젤라틴 가수분해물의 hydrogen peroxide에 대하여 시료농도와 가수분해 시간에 따라 소거활성을 증가하였으며, 가수분해도의 양상과 비슷한 활성변화를 보였다. hydrogen peroxide 소거활성은 α-chymotrypsin을 사용한 젤라틴 가수분해물에서 가장 높게 나타났으며, 가수분해도 및 DPPH 소거활성의 증가와 마찬가지로 가수분해 반응 6시간 이상 시켰을 때 급격한 소거활성 증가를 나타내었다. 그리고 시료의 농도가 증가함에 따라 hydrogen peroxide 소거활성도 IC₅₀ 값 : 9.74mg/ml로 증가하였다(Fig. 10).

효소처리 가수분해물에 대한 항산화 활성연구로는 대두단백질을 각종 효소로 가수분해하였을 때, 가수분해율이 6~9%의 펩티드에서 높은 항산화 활성을 나타내었다고 보고되었으며(42), 채소골격 근육조직에서 발견되는 dipeptide인 anserine (β-alanyl-L-methylhistidine)과 carnosine (β-alanyl-methylhistidine)이 항산화 활성이 우수하다고 보고되었다(124). 어피 유래 젤라틴의 경우도 가자미 피 젤라틴의 가수분해물의 항산화 활성이 다른 천연 유래의 항산화제인 α-tocopherol보다 10% 정도 높은 항산화력을 보인다고 하였으며, 일반적으로 Ala을 N말단으로 하는 9종류의 dipeptide 중, Met, Trp, His, Tyr을 다량 함유한 펩티드일수록 항산화 활성이 높다는 연구 결과가 보고되어진 바 있다(64).

이상의 결과로부터, 효소에 의해 제조된 옥돔 비늘 유래의 젤라틴 가수분해물이 DPPH와 과산화수소와 같은 활성산소종을 억제하여 항산화 활성을 나타내었지만 이전 연구들의 젤라틴 펩티드의 항산화 활성과 비교하였을 때, 다소 낮은 항산화 활성을 보인다는 것을 알 수 있다. 따라서 향후 옥돔 비늘 젤라틴 효소 가수분해물에 대한 분자량별 분획, 젤라틴추출방법의 개선 등을 통한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

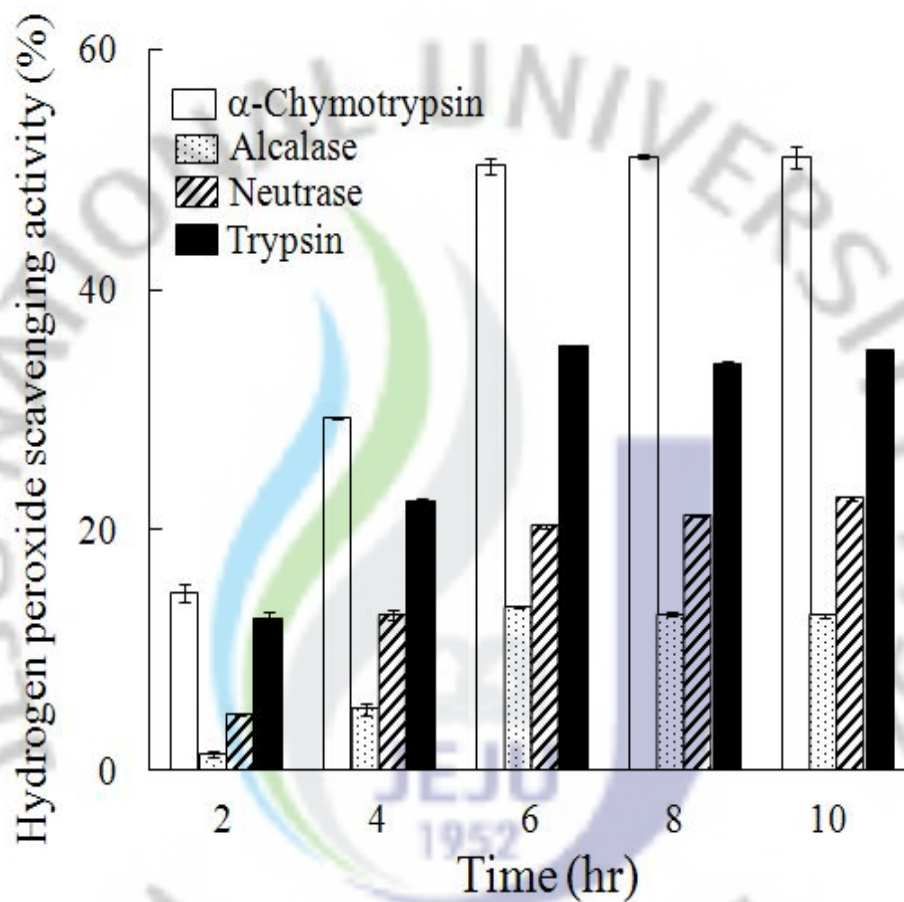


Fig. 8. Hydrogen peroxide(H_2O_2) scavenging activities for enzymatic hydrolysates (10mg/ml) of gelatin from *B. japonicus* scale.

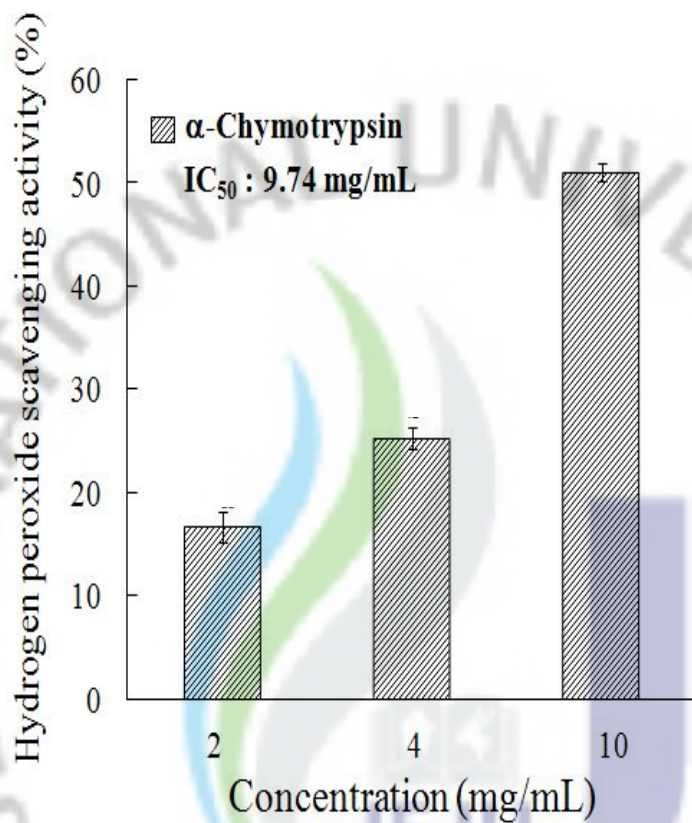


Fig. 9. Hydrogen peroxide(H_2O_2) scavenging activities for α -chymotrypsin hydrolysate of gelatin from *B. japonicus* scale by concentrations. The value of IC_{50} was expressed as the concentration of α -chymotrypsin hydrolysate of gelatin inhibiting the 50% of hydrogen peroxide.

10. 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물의 ACE 활성저해

일반적으로, 고혈압의 원인 물질이라고 알려진 Angiotensin-I 전환 효소 (ACE)의 저해활성은 단백질이나 펩티드와 연관이 깊은 것으로 알려져 있다. 따라서, 4종의 단백질 가수분해효소 (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase 및 trypsin)를 이용하여 제조한 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 ACE의 저해활성을 측정하여 그 결과를 Fig. 11에 나타내었다. 4종의 효소와 가수분해시간에 따라 제조된 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물들은 ACE 활성을 저해시킨다는 것으로 나타났다. 특히, 가수분해효소 alcalase를 이용하여 제조된 젤라틴 가수분해물이 가장 높은 ACE 저해작용을 가진다는 것으로 확인되었다. 옥돔 비늘 젤라틴 유래 가수분해물의 ACE 저해 패턴도 항산화 활성과 마찬가지로 가수분해 시간과의 밀접한 연관성을 보여 주고 있다.

고혈압은 그 자체만으로는 뚜렷한 증상이 나타나지 않아 무시하기 쉬운 상태이거나, 혈압이 높더라도 증상이 없는 사람이 대부분이다. 하지만 고혈압은 뇌졸중, 뇌출혈, 동맥경화, 심근경색증, 협심증 등과 같은 심혈관 및 순환계 계통 합병증의 중요 원인인자로 알려져 있어서 이러한 성인병 치료의 일환으로 새로운 고혈압 치료제의 개발을 위한 연구가 계속적으로 진행되고 있다(125~126). 이러한 고혈압의 발생기전을 살펴보면 대부분이 angiotensin I-converting enzyme (ACE)에 의해 일어나는 것으로 알려져 있는데, 각 연구에서 목표로 하는 항고혈압제 즉, ACE저해제는 ACE의 작용을 저해함으로써 angiotensin II의 생성저해, aldosterone 분비 감소, 혈관확장제인 bradkinin의 증가 등의 과정을 통해 신장혈관을 확장시켜 sodium의 배설을 촉진함으로써 혈압을 낮추어 줄 수 있다(126). 많은 연구자들은 단백질 분해효소로 가수분해된 젤라틴과 그 가수분해물, 펩티드들이 ACE활성을 저해시킨다고 보고하였는데, ACE 활성을 억제하는 펩티드의 경우 C말단에 Proline과 방향족 아미노산(tryptophan, tyrosine, phenylalanine) 등의 잔기를 주로 함유하고 있고, 그것이 주요 활성 성분이라는 것을 보고하였다(81).

본 연구에서도 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물이 상당히 높은 ACE 저해 활성을 보이는 것으로 나타났는데, 이것은 아마도 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물이 효소적 가수분해력에 의해 제조됨으로서 보다 더 효율적으로 펩티드로 전환되어지고, 또한 그 성분이 C말단에 proline과 방향족 아미노산 (tryptophan, tyrosine, phenylalanine) 등의 잔기를 주로 함유하고 있다는 것을 제시해주었다.

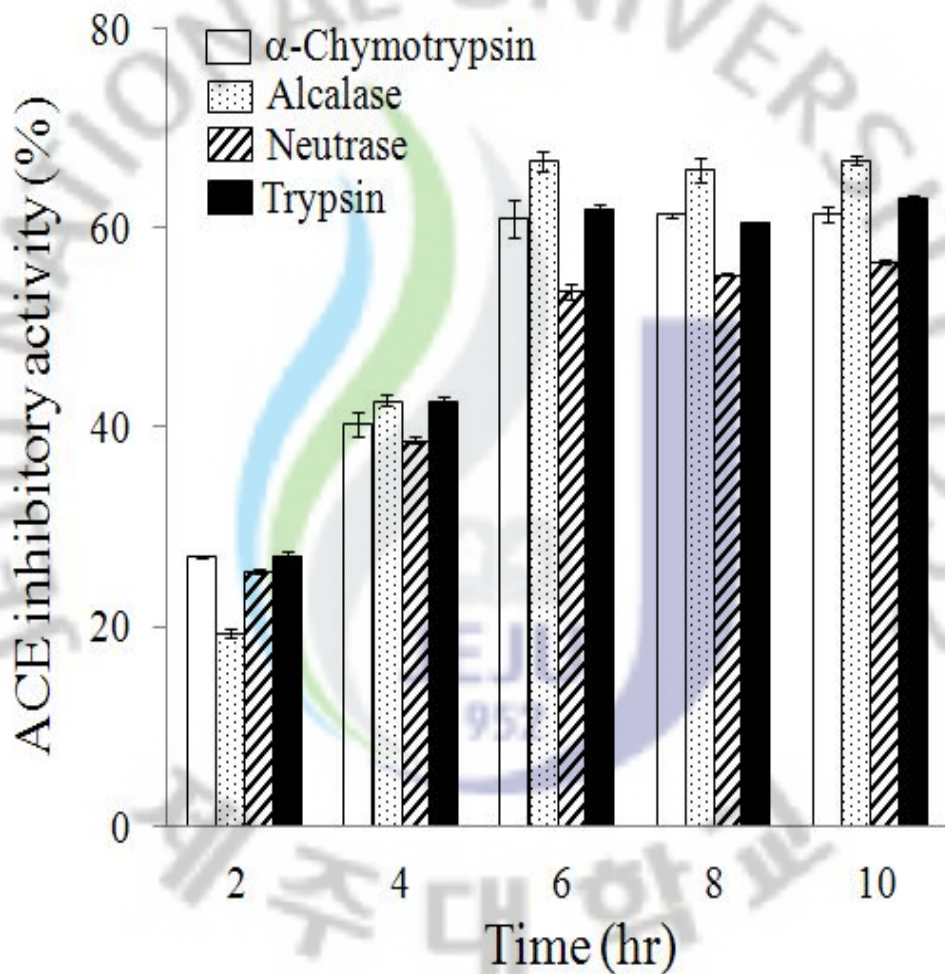


Fig. 10. ACE inhibitory activities for enzymatic hydrolysates(1mg/ml) of gelatin from *B. japonicus* scale.

11. 젤라틴 가수분해물의 가수분해 조건과 ACE 활성저해

단백질 가수분해효소 (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase 및 trypsin)를 이용하여 제조한 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 ACE의 저해활성을 측정한 결과, 가장 높은 ACE 저해활성을 보인 alcalase 젤라틴 가수분해물의 최적 가수분해 조건을 찾기 위하여, 기질 대 효소비와 기질농도에 따른 다양한 조건으로 실험을 행하였다. 먼저, alcalase 젤라틴 가수분해물을 가지고 기질 대 효소비를 10, 20, 50, 100, 200 및 500(wt/wt)으로 하여 가수분해도를 각각 측정한 결과, Fig. 12에서 나타낸 바와 같이 옥돔 비늘 유래 젤라틴 대 효소의 비가 감소할수록 즉, 효소의 농도가 증가할수록 높은 가수분해도를 나타내었다. 또한, 젤라틴 대 효소의 비율이 10부터 100(wt/wt)까지 증가함에 따라 가수분해도가 60% 이상 높게 나타났고, 200(wt/wt)부터는 가수분해도가 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 상기의 결과로 보아 다양한 기질 대 효소비 중, 기질 대 효소비 100 (wt/wt) 일때 가수분해도에 대한 가장 우수한 효율성을 보인다는 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 옥돔 비늘 유래 젤라틴을 100(wt/wt)에서 기질농도를 1%, 3%, 5%, 10% 및 20%로 각각 조절하여 젤라틴 가수분해물의 가수분해도를 측정하였다 (Fig. 13). 그 결과, 기질의 농도가 낮을수록 가수분해도는 증가하였지만, 기질 농도가 5% 이하일때는 거의 유사한 가수분해도를 보여 대량 생산 측면을 고려해 볼 때, 기질 농도 5%가 가장 적당한 것으로 판단된다.

이상의 결과로부터 옥돔 비늘 유래의 젤라틴으로부터 다양한 효소를 이용하여 시간, 기질 대 효소 비, 기질 양에 따른 다양한 조건하에서 가수분해도를 수행하였다. 그 결과 alcalase를 이용하여 pH 8.0, 50°C, 6 hr, 기질 대 효소비는 100 (wt/wt) 및 기질 농도는 5%의 조건으로 가수분해 한 경우, 가장 높은 가수분해도를 확인하였고, 이것이 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 제조를 위한 최적 조건임을 확인할 수 있었다.

상기의 결과로부터 옥돔 비늘 유래 젤라틴의 최적가수분해조건에서 제조한 젤라틴 가수분해물로 다양한 농도별 (0.25, 0.5 및 1 mg/ml)로 ACE 저해활성을 측

정한 결과, 농도 의존적으로 ACE의 활성을 약 70%까지 억제하였고, 그것의 IC₅₀ 값이 0.73mg/ml인 것을 확인할 수 있었다(Fig. 14). 이러한 결과는 ACE에 대한 저해활성 패턴이 젤라틴 가수분해물의 제조를 위한 가수분해시간에 따른 가수분해율의 패턴과 유사하였다. 즉, 앞에서 서술한 것처럼 가수분해 시간이 2시간부터 6시간까지 증가하면서 젤라틴 가수분해물의 가수분해도가 증가하였고, 그 뒤에는 더 이상 증가하지 않았는데, 이것은 ACE에 대한 저해활성과 일치하였다. 뿐만 아니라, 가장 높은 가수분해도를 보인 alcalase 젤라틴 가수분해물이 가장 높은 ACE 저해 활성을 보였다. 이 결과로부터 alcalase의 높은 가수분해 능력이 젤라틴을 다양한 펩티드로 가수분해함에 따라 ACE 저해 작용이 크게 나타나는 것으로 여겨진다. 또한, 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물이 ACE 저해 활성을 가짐으로써 새로운 항고혈압제의 원료로서 활용할 가치가 있는 것으로 판단된다.

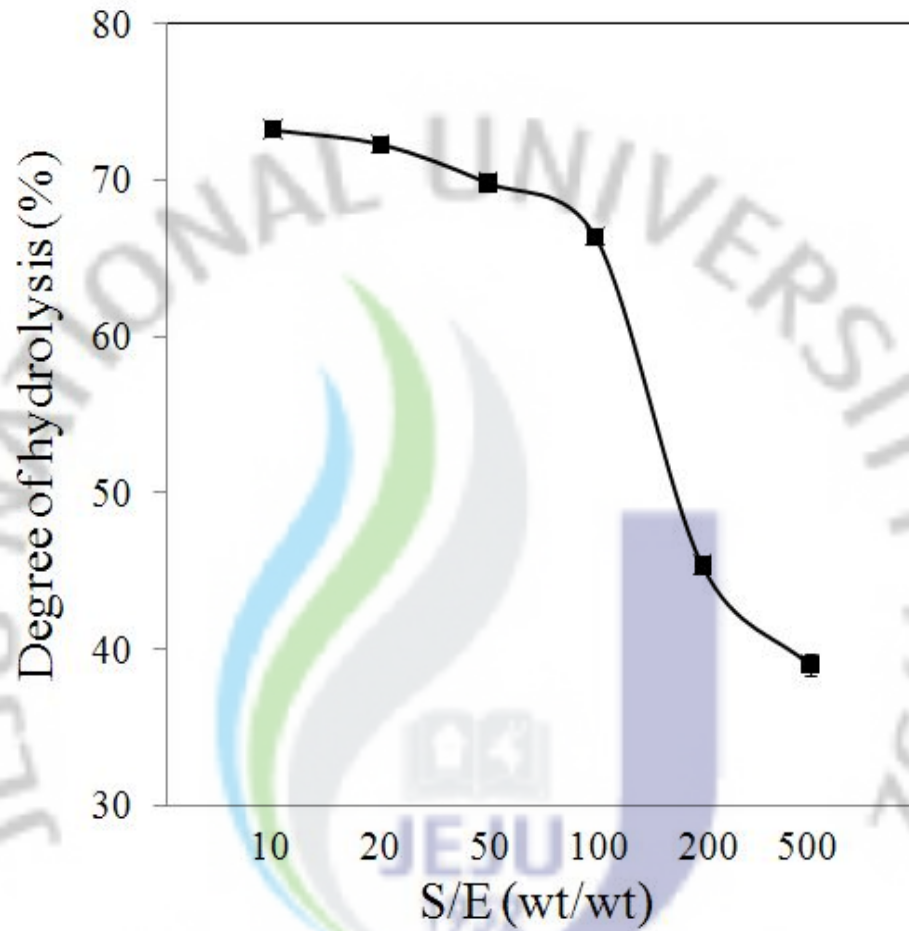


Fig. 11. Comparison of hydrolysis degrees for alcalase hydrolysates of gelatin from *B. japonicus* scale by substrate/enzyme ratios. The hydrolysis degree of alcalase hydrolysates of gelatin were determined by various substrate/enzyme ratios with 3% substrate (wt/vol) in pH 8.0 at 50°C for 6 hr.

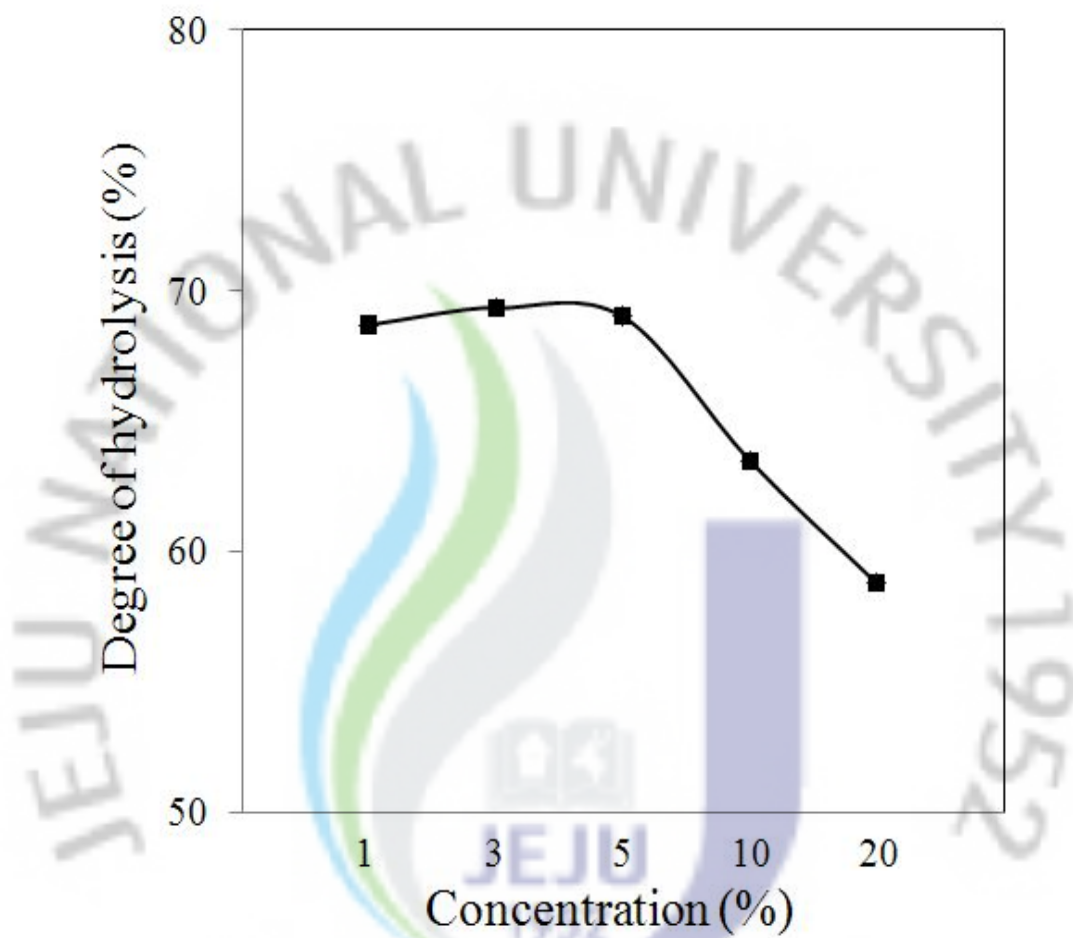


Fig. 12. Comparison of hydrolysis degrees for alcalase hydrolysates of gelatin from *B. japonicus* scale by substrate concentrations. The hydrolysis degrees of alcalase hydrolysates of gelatin were determined by various substrate concentrations with substrate/enzyme ratio(100wt/wt) in pH 8.0 at 50°C for 6 hr.

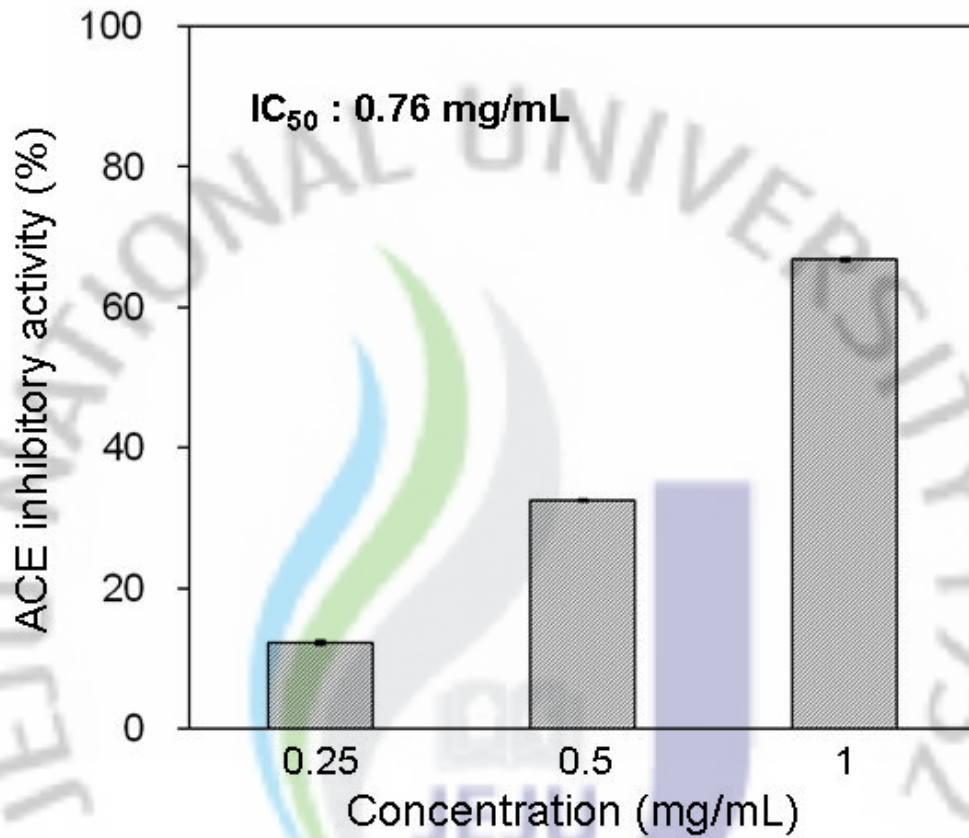


Fig. 13. ACE inhibitory activities for alcalase hydrolysate of gelatin from *B. japonicus* scale. The value of IC₅₀ was expressed as the concentration of alcalase hydrolysate of gelatin inhibiting the 50% of ACE.

12. Alcalase 젤라틴 가수분해 분획물의 ACE 저해활성

옥돔 비늘 젤라틴 alcalase 가수분해물의 분자량에 따른 ACE 저해활성을 확인하기 위하여 옥돔 비늘 alcalase 가수분해물을 한외여과막분리 시스템(Ultrafiltration membrane)에 의해 5 kDa 이하, 10 kDa 이하 및 30 kDa 이하 분획물들을 제조하였다. 3가지 분획물을 가지고 다양한 농도별 (0.25, 0.5 및 1 mg/ml)로 ACE 저해활성을 측정한 결과를 Fig. 15에 나타내었다. 모든 분획물의 농도가 증가할 수록 ACE의 저해 활성이 유의성 있게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 15). 특히, 모든 농도에서 5 kDa 이하 분획물의 ACE에 대한 IC₅₀ 값이 0.663mg/ml로서, 10 kDa(IC₅₀; 0.726 mg/ml) 및 30 kDa(IC₅₀; 0.797mg/ml)이하 보다 상당히 높은 ACE 저해 활성을 보였다. 또한, 5 kDa 이하 분획물의 농도가 0.25 mg/ml에서 1mg/ml까지 증가할수록 약 60%에서 70%까지 ACE 저해활성도 증가하였다. 이러한 결과들은 한외여과막 시스템에 의해 분리된 옥돔 비늘 젤라틴 alcalase 가수분해물의 5 kDa 이하 분획물이 ACE에 대한 효율적인 저해 작용을 가지는 것으로 나타났다. 이것은 alcalase의 높은 가수분해 능력이 옥돔 비늘에 존재하는 단백질 성분을 다양한 펩티드로 가수분해하고 일정한 분자량 이하로 분해되어질 때, ACE 저해 작용이 크게 증가하는 것으로 판단된다. 따라서 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물이 ACE 저해 활성을 가짐으로써 새로운 항고혈압제의 원료로 활용할 가치가 높은 것으로 여겨진다.

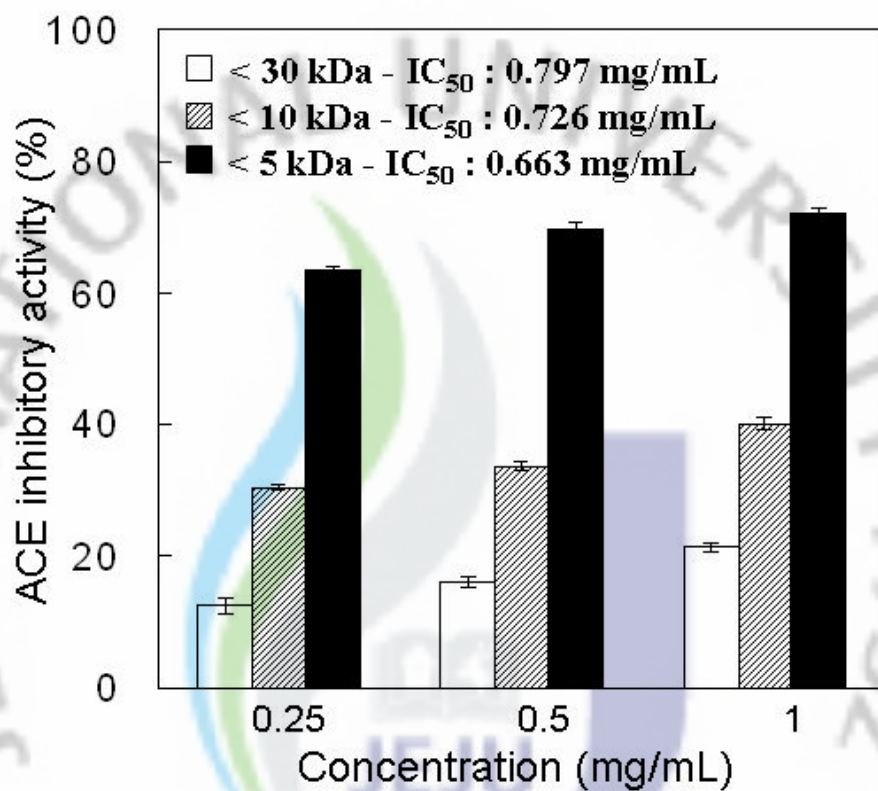


Fig. 14. ACE inhibitory activities for alcalase hydrolysates of gelatin from *B. japonicus* by concentrations. The value of IC₅₀ was expressed as concentration of alcalase hydrolysate inhibiting the 50%

13. 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물의 tyrosinase 활성저해

멜라닌 합성은 아미노산의 하나인 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanin(DOPA)와 DOPA quinone 이후의 반응은 크게 적갈색이나 황색을 결정하는 pheomelanin과 흑갈색에서 갈색을 결정하는 eumelanin 생성의 2가지로 나뉘어지며, 따라서 멜라닌 생성의 주요 효소인 tyrosinase의 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제시켜 미백효과를 기대할 수 있다(127).

이에 본 실험에서는 4종의 각기 다른 단백질 가수분해효소 (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase 및 trypsin)를 이용하여 제조한 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 tyrosinase 저해활성을 측정하여 그 결과를 Table 8에 나타내었다. 다양한 효소와 가수분해시간에 따라 제조된 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물들은 낮은 농도에서 tyrosinase 저해활성은 거의 나타나지 않았으나, 높은 농도에서 저해활성을 보였다. 특히, 옥돔젤라틴 α -chymotrypsin 추출물 50mg/ml에서 53%, Alcalase 추출물에서 64.7%의 억제 활성을 보였지만 화장품 미백기능성 고시원료인 arbutin에 비해 상당히 낮은 활성을 보여주고 있다.

천연물로부터 tyrosinase 저해활성에 대한 연구로 홍경천, 인삼, 갈근, 오미자, 연교, 홍화씨, 창출은 300ppm의 농도에서 40%미만인 억제활성을 보고하고 있으며(128), 목단피의 물추출물에서 tyrosinase 500ppm에서 40%미만의 저해활성을 보였다고 보고하였다(129).

옥돔 비늘 젤라틴 유래 가수분해물의 tyrosinase 활성 저해패턴도 고농도에서 50~60%의 억제활성을 보여주고 있어 가수분해물의 농도에 밀접한 연관성을 보여 주고 있다. 이러한 결과로 볼 때, 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물이 일정한 분자량 이하로 분해되어야만 여러 가지 생리활성을 보일 것으로 추측되며 향후 이에 대한 연구가 요구된다.

Table 8. Tyrosinase inhibitory activities for enzymatic hydrolylates of gelatin from *B. japonicus* scale

Sample(mg/ml)	Tyrosinase inhibition(%)				
	α -Chymotrypsin	Alcalase	Neutrase	Trypsin	
<i>B. japonicus</i>	1.5	4.8±5.4	7.9±2.8	3.4±4.3	0.9±4.5
	3.1	8.5±8.7	16.0±2.5	2.9±6.9	0.1±0.8
	6.25	12.4±10.5	26.9±1.2	7.5±7.6	3.3±4.1
	12.5	18.2±10.1	36.3±4.8	16.8±9.4	6.4±2.3
	25	25.3±10.9	56.9±1.5	19.1±2.0	15.6±0.6
	50	53.0±7.6	64.7±2.2	28.7±4.9	30.6±2.9
arbutin(μ g/ml)	0.25		44.9±2.6		
	0.50		62.3±2.3		
	1.00		77.8±0.7		

14. 옥돔 비늘 젤라틴 가수분해물의 elastase 활성저해

인체의 노화과정 중 피부의 변화는 필수적이며 피부의 질을 높이는 방법의 일환이 미용이다. 특히, 탄력적인 피부를 원하는 사람들의 증가로 피부의 주름개선을 포함한 노화 방지용 화장품 원료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 진피는 섬유성과 기질성분으로 구성되어 있으며 섬유성분으로는 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 주고, 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층의 90%를 차지하고 있으며, elastin은 진피층의 3~4% 정도를 차지하며 피부의 탄력에 영향을 준다. 콜라겐은 섬유아세포의 작용에 의해 합성되며 collagenase와 elastase에 의해 분해된다. 진피 층은 피부의 물리·화학적 성질을 결정하는 중요한 역할을 하며 모세혈관과 신경이 표피에 영양분을 보충해주므로 피부의 노화와 밀접한 관련이 있다(131). 나이가 증가하면 섬유아세포의 작용과 세포수가 감소하여 섬유성분(콜라겐과 엘라스틴)의 합성량이 줄어들고 피부세포내 수분이 손실되며, 각질층의 구조가 변화된다. 또한 collagenase와 elastase의 작용이 증가하여 콜라겐의 가교된 형태가 증가함으로써 매끄러움, 보습, 팽팽함이 감소된다(131).

이에 본 실험에서는 4종의 각기 다른 단백질 가수분해효소 (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase 및 Trypsin)를 이용하여 제조한 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 elastase 저해활성을 측정하여 그 결과를 Table 9에 나타내었다. 옥돔 젤라틴 α -chymotrypsin 추출물 50mg/ml에서 94.2%, alcalase 78.5%, neutrase 66.0%, trypsin 74.0%의 억제 활성을 보였다.

천연물에서 elastase의 저해활성 연구에서 홍화씨 추출물은 5mg/ml의 농도에서 약 30%, retinol 0.5mg/ml 약 50%, ursolic acid 1.0mg/ml 약 40%의 활성을 보인다고 하였다(132). 하지만 이는 화장품 미백기능성 고시원료인 빈랑자(*Arecae Semen*)추출물보다 현저하게 낮은 활성을 보여주고 있다(Table 9).

옥돔 비늘 젤라틴 효소 가수분해물이 고농도에서 70~90%까지 억제활성을 보여주고 있어 향후, 옥돔 비늘을 일정한 분자량별로 분획하여 elastase의 저해활성이 높을 것으로 판단되며 이에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

Table 9. Elastase inhibitory activities for enzymatic hydrolylates of gelatin form *B. japonicus* scale

Sample(mg/ml)	Elastase inhibition(%)				
	α -Chymotrypsin	Alcalase	Neutrase	Trypsin	
<i>B. japonicus</i>	1.5	34.4±4.3	9.6±1.7	12.4±3.4	10.9±0.2
	3.1	44.8±3.6	21.6±3.6	20.3±2.1	21.7±1.4
	6.25	55.6±0.7	31.4±2.2	31.3±5.6	37.8±2.4
	12.5	68.9±2.5	44.2±0.7	43.0±4.6	49.9±3.0
	25	79.2±1.4	60.2±0.5	57.7±0.5	64.4±.5
	50	94.2±0.4	78.5±0.7	66.0±6.2	74.0±1.9
<i>Arecae Semen</i>	0.025		36.3±0.7		
	0.05		56.0±3.8		
	0.10		71.7±1.3		

V. 요약

콜라겐에서 열변성으로 유도되는 젤라틴은 대부분 소나 돼지의 가죽, 뼈 그리고 동물성 부산물을 이용하여 생산되어져 왔으며, 현재 식품, 건강보조식품, 화장품, 의료용품 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 그러나 광우병 및 구제역 등으로 인하여 원료 사용에 제약을 받고 있다.

본 연구에서는 미이용 자원으로서 옥돔의 가공부산물이며 위생적 생산이 가능성 옥돔 비늘로부터 gelatin을 추출 후 효소가수분해를 통하여 식품 및 화장품 원료로서의 이용가능성을 살펴보았다.

옥돔 비늘의 일반성분은 수분함량은 8.5%, 조지방 함량은 0.4%, 회분함량은 45%였고, 조단백질 함량은 46.1%이었으며, 옥돔 비늘 젤라틴은 수분 8.0%, 조단백 90.7%, 조지방 0.1%, 회분 0.4%으로 시판 킬라피아젤라틴의 수분 8.9%, 조단백 89.5%, 90.1%, 조지방 0.9%, 0.3% 회분 0.9 %이었으며, 투과도는 옥돔 비늘젤라틴 98.7%, 킬라피아 비늘 젤라틴(150 bloom과 200 bloom)의 99.3%, 99.5%이었고, 색도는 옥돔 비늘 젤라틴 명도 88.5, 적녹도 -0.4, 황청도 27.3, 킬라피아 비늘 젤라틴(150 bloom과 200 bloom) 명도 88.1, 87.8, 적녹도 -0.1, -1.7, 황청도 27.9, 25.4로 시판 킬라피아 비늘 젤라틴과 큰 차이를 보이지 않았다.

또한 젤강도는 옥돔 비늘 젤라틴 120.5g, 시판 킬라피아 비늘 젤라틴이 각각 156.5g(150 bloom), 182.7g(200 bloom)이었고, 녹는점은 옥돔 비늘 젤라틴 10℃, 시판 킬라피아 비늘 젤라틴이 각각 17℃(150 bloom), 19℃(200 bloom)로 젤라틴 물성은 시판 킬라피아 비늘 젤라틴에 비해 다소 떨어졌다.

옥돔 비늘의 gelatin 및 collagen 추출물의 아미노산 조성을 분석한 결과 옥돔 비늘의 collagen의 glycine 조성은 우피유래 collagen에 비해 현저하게 낮게 나타났다. 또한, hydroxyproline 조성은 펩신가용성 collagen 9.61%, 높은 조성을 보였으며, proline은 우피유래 collagen보다 현저하게 낮은 조성을 보였다. 또한 imino acid 함량도 펩신가용성 collagen 16.67%, 열가용성 collagen 13.99%, 산가용성 collagen 18.65%로 우피유래 collagen 20.29%보다 낮았으며, 옥돔 비늘의 gelatin 추출물의 경우 imino acid 조성이 20.50%로 우피 22.83%, 돈피 22.64% 유래

gelatin보다 낮게 나타났으며, glycine 조성도 옥돔 비늘 gelatin 19.30%로 우피 20.34% 및 돈피 유래 gelatin보다 낮은 함량을 보였다.

옥돔 비늘 유래 젤라틴을 가수분해하기 위해 4종의 단백질 분해효소 (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase 및 trypsin)를 이용하여 추출한 시간대별 가수분해물의 가수분해도는 4종류의 효소 모두 가수분해반응 6시간까지 급격하게 가수분해도의 증가를 보였으나, 그 후에는 거의 일정하였다. 또한, 4종류의 가수분해물 중에서도 alcalase가 가장 효과적으로 옥돔 비늘 젤라틴을 가수분해하였으며, 가수분해반응 6시간 이후에 약 65%이상의 가수분해도를 나타내었다.

옥돔 유래 비늘 젤라틴 가수분해물들은 DPPH 라디칼과 과산화수소에 대하여 높은 시료 농도에서 소거활성을 보였으며, 이 중에서, neutrase에 의해 가수분해된 젤라틴 가수분해물이 가장 높은 DPPH 소거활성을 보였는데, 약 50%까지의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였고, IC_{50} 값은 9.18mg/ml이었다. 그리고 과산화수소 소거활성은 α -chymotrypsin을 사용한 젤라틴 가수분해물에서 가장 높게 나타났으며, 시료의 농도가 증가함에 따라 과산화수소 소거활성도 증가하였다(IC_{50} 값: 9.74 mg/ml).

일반적으로, 고혈압의 원인 물질이라고 알려진 Angiotensin-I 전환 효소 (ACE)의 저해활성은 단백질이나 펩티드와 연관이 깊은 것으로 알려져 있다. 따라서, 4종의 단백질 가수분해효소 (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase 및 trypsin)를 이용하여 제조한 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 ACE의 저해활성은 효소와 가수분해시간에 따라 제조된 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물들은 ACE 활성을 명확히 저해시킨다는 것으로 나타났다. 특히, 다른 효소에 비하여 alcalase를 이용하여 제조된 젤라틴 가수분해물이 높은 ACE 저해작용을 가진다는 것으로 확인되었다.

Alcalase 젤라틴 가수분해물의 최적 가수분해 조건을 확인하기 위해, 효소비를 10, 20, 50, 100, 200, 500(wt/wt)으로 하여 가수분해도를 측정된 결과, 옥돔 비늘 유래 젤라틴 대 효소의 비가 감소할수록, 즉 효소의 농도가 증가할수록 높은 가수분해도를 나타내었다. 또한, 젤라틴 대 효소의 비율이 10부터 100(wt/wt)까지

증가하면서 가수분해도가 60% 이상을 보이며 높게 나타났고, 200(wt/wt)부터는 가수분해도가 급격히 떨어졌다. 기질 대 효소비 100 (wt/wt)이 가수분해도에 대한 가장 우수한 효율성을 보였다.

옥돔 비늘 유래 젤라틴을 100(wt/wt)에서 기질농도를 1%, 3%, 5%, 10%, 20%로 각각 조절하였을 때 기질의 농도가 낮을수록 가수분해도는 증가하였지만, 기질 농도가 5% 이하일때는 거의 유사한 가수분해도를 보여 대량 생산 측면을 고려해 볼 때, 기질 농도 5%가 가장 적당하였다.

Alcalase를 이용하여 pH 8.0, 50°C, 6hr, 기질 대 효소비는 100 (wt/wt) 및 기질 농도는 5%의 조건으로 가수분해 한 경우, 가장 높은 가수분해도를 확인하였고, 옥돔 비늘 유래 젤라틴의 최적가수분해조건에서 제조한 젤라틴 가수분해물로 다양한 농도별 (0.25, 0.5 및 1mg/ml)로 ACE 저해활성을 측정한 결과, ACE의 활성을 약 60%까지 억제하였고, 그것의 IC₅₀ 값이 0.73 mg/ml이었다.

단백질 가수분해효소 (α -chymotrypsin, alcalase, neutrase 및 trypsin)를 이용하여 제조한 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 제조된 옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물들은 tyrosinase 저해활성은 낮은 농도에서는 저해활성이 전혀 나타나지 않았으며, 높은 농도에서 저해활성이 나타났다. 특히, 옥돔젤라틴 α -chymotrypsin 추출물 50mg/ml에서 53%, alcalase 추출물에서 64.7%의 억제 활성을 보였으나, 화장품 미백기능성 고시원료인 arbutin에 비해 현저하게 낮은 활성을 보여주고 있다.

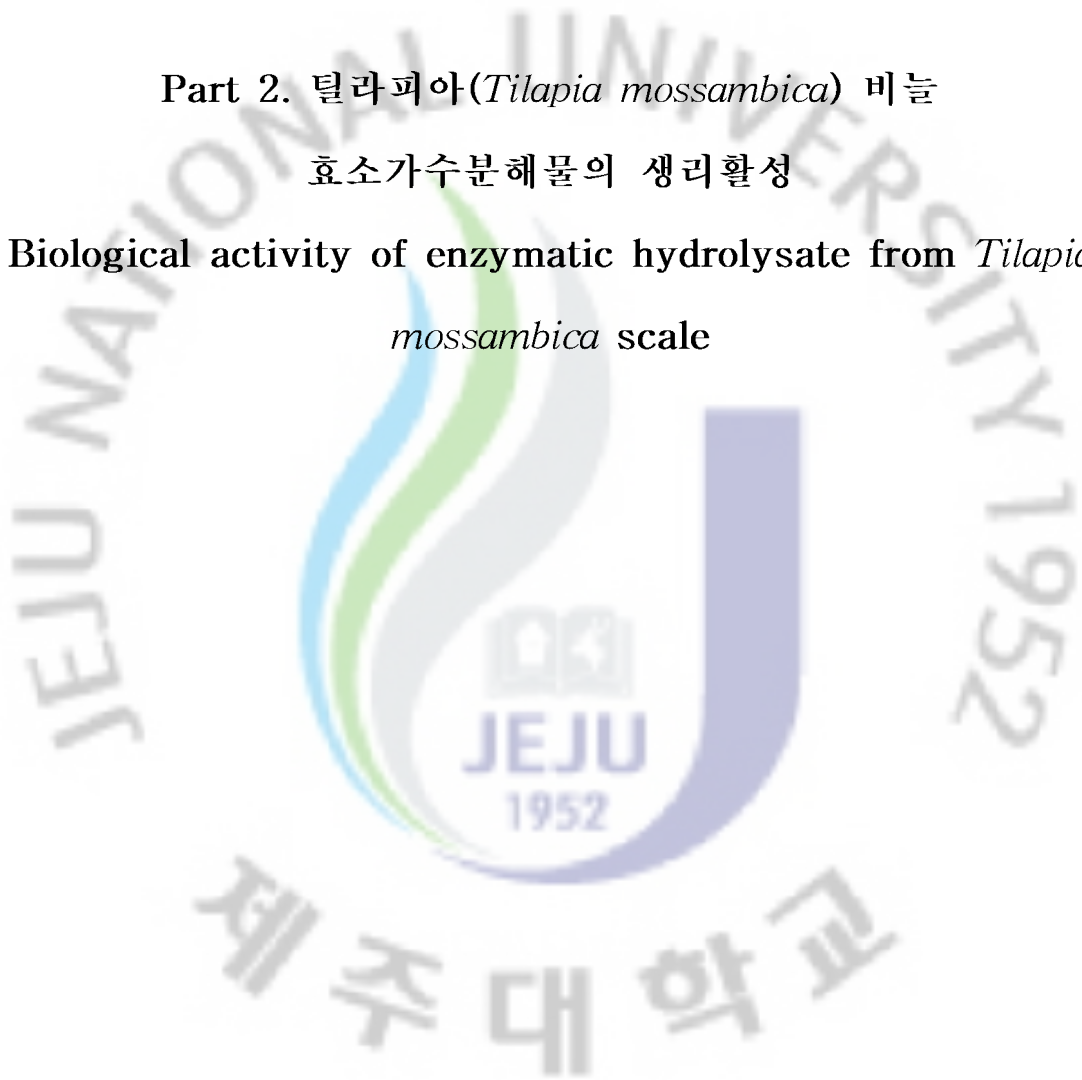
옥돔 비늘 유래 젤라틴 가수분해물의 elastase 저해활성을 측정한 결과 α -chymotrypsin 추출물 50mg/ml에서 94.2%, alcalase 78.5%, neutrase 66.0%, trypsin 74.0%의 억제 활성을 보여주었다. 하지만 이는 화장품 미백기능성 고시원료인 빈랑자(*Arecae Semen*)추출물보다 현저하게 낮은 활성을 보여주고 있다.

따라서 본 연구를 통해 수산가공과정을 중 발생하는 부산물인 제주산 옥돔 비늘 젤라틴의 효소적 가수분해물의 항산화, 항고혈압, 미백, 주름개선 활성과 같은 기능성에 대한 체계적인 접근을 통하여 기능성 식품 및 화장품 소재로서 충분한 가치가 있다고 생각된다.

Part 2. 틸라피아(*Tilapia mossambica*) 비늘

효소가수분해물의 생리활성

Biological activity of enzymatic hydrolysate from *Tilapia*
mossambica scale



VI. 재료 및 방법

1. 실험재료

틸라피아(*Tilapia mossambica*) 비늘은 젤라틴 및 가수분해물 생산을 위해 중국에서 수입한 건조된 틸라피아 비늘을 부산 A사에서 제주도 서귀포시에 위치한 (주)C수산에서 구입한 것을 제공받아 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 일반성분

건조된 틸라피아 비늘의 수분, 조단백질, 조지방 및 회분을 측정하였다. AOAC 방법(96)에 준하여 수분함량은 0.003g 이하의 유의차를 항량으로 하여 105℃ 상압가열건조법으로 측정하였고, 조단백질 함량은 micro Kjeldahl 방법으로 측정하였으며, 그리고 회분 함량은 건식법으로 측정하였다.

(2) 아미노산 조성

건조된 틸라피아 비늘의 아미노산 조성 분석은 시료 50~100mg을 정평하여 ampoule에 넣고 6N HCl 2ml를 가하여 봉한 후 110℃에서 24시간동안 산가수분해하였다. 분해액을 glass filter로 여과하고 감압건고하고 HCl을 제거한 후 citric acid buffer(pH 2.2)로 25ml 되도록 정용하였다. 이 중 일부를 아미노산 정량분석기(L-8900, Hitachi)를 이용하여 측정하였다.

(3) 틸라피아 비늘로부터 효소적 가수분해물의 제조

건조된 틸라피아 비늘(30kg)을 고상발효장치 (Biofeeda BF-30, Mitsbish, Kapan)하에서 토양 미생물 균주인 *Bacillus* 호기성 고온 균주 (3g)을 일본 Seiwa 사에서 구입하여 온도 80-90℃에서 6-10 시간동안 고상발효한 후, 실험에 사용하였다. Table 10에 제시한 것에 따라, 5가지 단백질 가수분해효소 α -chymotrypsin, alcalase, kojizyme, protamex 및 trypsin(Novozyme Nordisk,

Bagsvaerd, Denmark)을 이용하여 그 효소에 해당하는 적정 조건하에서 툴라피아 효소적 가수분해물을 제조하였다. 툴라피아 가수분해물의 제조는 다음과 같이 두 가지 방법으로 제조하였다. 첫 번째 제조 방법을 툴라피아 비늘이 젤라틴 추출과정 없이 곧바로 효소를 이용하여 가수분해하였다. 즉, 툴라피아 비늘 10g을 증류수 100ml와 섞은 후, 각각의 효소를 첨가하여 각 효소별 최적 pH와 온도에서 시간 경과 (3, 6, 12, 18, 24시간)에 따라 가수분해하였다. 두 번째 방법으로는, 툴라피아 비늘을 젤라틴 추출한 후 각각의 효소를 첨가하여 각 효소별 최적 pH와 온도에서 시간경과 (3, 6, 12, 18, 24시간)에 따라 가수분해하였다. 가수분해 반응 후, 100℃에서 10분간 끓임으로서 효소 반응을 정지시키고 pH를 중성으로 맞춘 후, 원심분리 (3500rpm, 10min)와 감압여과로 상층액을 분리하였으며, 동결 건조하여 시료로 이용하였다.

Table 10. Characteristics of proteases used in the hydrolysis of *T. mossambica*

Enzymes	pH	Temperature(°C)	Origin
a-Chymotrypsin	7.8	25	Bovine pancreas
Alcalase	8.0	50	<i>B. licheniformis</i>
Proteases	Kojizyme	6.0	<i>Bacillus sp.</i>
	Protamex	6.0	<i>A. oryzae</i>
	Trypsin	7.6	Procine pancreas

(4) 가수분해도 측정

툴라피아 비늘 유래 효소적 가수분해물의 가수분해도(degree of hydrolysis; DH)는 trichloroacetic acid (TCA)법(103)으로 측정하였다. 즉 반응이 종료된 반응혼합물을 원심분리 (12000rpm, 15min)하여 상층액으로부터 2 ml를 취하고 여기에 20% TCA를 동량 첨가하여 원심분리 (3500rpm, 10 min)한 다음, 상층액의 일정량을 취하여 Lowry법(104)으로 10% TCA 가용성 질소량을 측정하여 다음의 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

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

(5) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) 활성저해

틸라피아 비늘로부터 제조된 효소적 가수분해물의 항고혈압 활성을 측정하기 위하여 시간대별로 분리된 젤라틴 가수분해물을 가지고 ACE 억제를 측정하는 Cheung 등(81)의 방법에 준하여 측정하였다. 시간대별로 추출된 젤라틴 가수분해물 50 μ l에 25mU/ml ACE 효소액 50 μ l를 가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 항온처리하였다. 여기에 기질로서 12.5mM HHL용액 100 μ l를 가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시킨 후, 1N HCl용액 0.25ml를 가하여 시험관 혼합기로 교반하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate 350 μ l를 가하여 교반한 다음, 원심분리(4000rpm, 10min)시켜 상층액(ethyl acetate층) 200 μ l를 분취하였다. 이 분취액을 80 $^{\circ}$ C 드라이오븐에서 완전히 건조시켜 증류수 1ml를 가하여 용해시킨 후, 228nm에서 흡광도를 측정하여 시간대별 젤라틴 가수분해물의 ACE 저해율을 나타내었다.

$$\text{ACE 저해율(\%)} = \frac{1 - (S - S_c)}{(B - B_c)} \times 100$$

S : the absorbance in the presence of each sample

S_c : the absorbance as S except that enzyme reaction was quenched at zero time

B : the absorbance in the absence of the sample

B_c : the absorbance as S except that enzyme reaction was quenched at zero time

(6) 틸라피아 비늘 젤라틴 가수분해 조건

틸라피아 비늘 젤라틴의 산업적 이용을 위한 효율이 높은 가수분해조건을 찾기 위하여, 기질대 효소비와 기질농도에 따라 가수분해를 수행하였다. 실험을 수행하기 위한, 기질 대 효소비는 10, 20, 50, 100, 200, 500(wt/wt)였고, 기질인 옥돔 비늘 유래 젤라틴의 농도는 1%, 3%, 5%, 10%, 20%였다. 가수분해는 위에서 제시된 방법과 동일하게 수행되었다. 그리고, 모든 가수분해조건의 검토를 위해 가수분해물의 가수분해도를 측정하였다.

(7) 젤라틴 가수분해물의 분자량별 분획

텔라피아 비늘 젤라틴 효소가수분해물의 분자량별 분획은 한외여과막 분리 시스템 (Ultrafiltration membrane)을 이용하여 5kDa 이하, 10kDa 이하 및 30kDa 이하 분획물들을 각각 제조하였다.

(8) Tyrosinase 활성저해

텔라피아 비늘 젤라틴 효소 가수분해물의 미백효과를 시험하기 위하여 Fuller 등(107)의 방법을 이용하여 tyrosinase의 저해활성을 측정하였다. 0.1M 인산염 완충액(pH 6.5) 220 μ l와 시료액 20 μ l 그리고 tyrosinase(sigma)(1500U/ml ~ 2000U/ml)액 20 μ l를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5mM trysine(sigma) 액 40 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 10~15분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시료액으로 시료액 대신 0.1M인산염완충액(pH 6.5)을 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성저해율(\%)} = \frac{100 - (b - b')}{(a - a')} \times 100$$

a : 공시험액의 반응 후 흡광도

b : 시료액의 반응 후 흡광도

a', b' : tyrosinase 대신 buffer로 대체하여 측정한 흡광도

(9) Elastase 활성저해

텔라피아 비늘젤라틴 효소 가수분해물의 주름개선효과를 시험하기 위하여 Cannell 등(108)의 방법을 이용하여 elastase의 저해활성을 측정하였다. Elastase 저해 활성 측정은 기질로서 elastase substrate VIII를 사용하여 실온에서 15분간 반응시켜 p-nitoanilide의 생성량을 측정하였다. 0.2M tris-HCl(pH 8.0) buffer로 희석한 각 시험용액 160 μ l와 5mM elastase substrate VIII(CALBIOCHEM) 용액 20 μ l 그리고 10 μ g/ml elastase(sigma) 효소 20 μ l를 순서대로 넣은 후 25 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 410nm에서 흡광도를 측정하였다.

VII. 결과 및 고찰

1. 일반성분

고상발효된 틸라피아 비늘의 수분, 조단백 및 회분 등의 일반성분을 AOAC 방법에 따라 측정하였다. Table 11에 제시된 것처럼, 수분함량은 $2.6\pm 0.01\%$, 회분 $0.3\pm 0.01\%$ 고, 조단백 $97.06\pm 0.1\%$ 이었고, 조지방 및 탄수화물 등의 함량은 $0.3\pm 0.01\%$ 였다. Jeon et al.(16)은 틸라피아와 같은 민물어종인 잉어의 비늘을 대상으로 성분분석을 한 결과 비늘 100g 중 조단백질이 잉어는 78.66g이었다는 점을 감안할 때, 이 결과는 같은 민물어종인 틸라피아 비늘의 단백질 함량이 매우 높다는 것을 알 수 있었다. 이것으로부터 틸라피아 비늘이 함유한 단백질의 높은 함량은 단백질 원료 산업에서 유용하게 이용될 수 있다는 가능성을 제시해주었다.

Table 11. Proximate composition of *T. mossambica* scale

Sample	Crude protein	Moisture	Ash	Others (%)
<i>T. mossambica</i>	97.06 ± 0.1	2.6 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.04 ± 0.01

2. 아미노산 조성

본 실험에 사용된 툴라피아 비늘을 일반건조, 원적외선처리, 고상발효 된 비늘의 아미노산 조성을 분석하여 Table 12에 나타내었다.

툴라피아 비늘의 경우 imino acid 조성이 일반건조 20.62%, 원적외선처리 20.62%, 고상발효 20.38%로 보였으며 Gly의 조성은 일반건조 17.25%, 원적외선처리 17.85%, 고상발효 19.76%로 나타났다. 여기서 일반건조와 원적외선처리에 있어 imino acid, Gly의 조성차이는 없었으며, 고상발효시 Gly 함량이 높게 나타났다.

일반적으로 gelatin의 아미노산조성 및 배열은 glycine(Gly), Proline(Pro) 및 hydroxyproline(Hyp)이 많은 양으로 구성되어 있으며, Gly-Pro-Hyp의 구조가 반복되는 특징을 가지고 있다. 이 때 imino acid인 proline과 hydroxyproline의 분자구조 내 위치는 gelatin의 열적 안정성을 부여하므로 Gly-Pro-Hyp 구조의 총 함량의 collagen의 열적 안정성에 영향을 미치는 주된 요인 중 하나이다. 또한 어류는 육상 포유동물 유래 아미노산의 비율이 다르며, 이는 포유동물과 다른 기능성 특성에 기인한다고 보고하였다. 일반적으로 포유동물의 gelatin의 Gly 함량은 대략 24% 정도이고 어류 gelatin 16~18% 정도로 포유동물에 비해 그 함량이 낮게 나타난다(51).

Table 12. Amino acid compositions of *T. mossambica* scale

Amino acid	Amino acid compositions of <i>T. mossambica</i> scale(g/100g)		
	<i>T. mossambica</i> scale	<i>T. mossambica</i> scale treated from infrared	<i>T. mossambica</i> scale of solidity fermentation
Aspartic acid	5.74	5.73	5.60
Theronine	2.82	2.81	2.97
Hydroxyproline	8.17	8.14	8.24
Serine	3.24	3.21	3.15
Glutamic acid	11.48	11.51	11.28
Proline	12.45	12.48	12.14
Glycine	17.25	17.85	19.76
Valine	3.97	3.97	3.84
Methionine	2.02	2.08	1.41
Isoleucine	1.40	1.42	1.37
Leucine	2.98	2.97	2.92
Tyrosine	1.60	1.49	1.45
Phenylalanine	2.96	2.97	2.88
Lysine	4.27	3.77	3.69
Histidine	1.29	1.32	1.29
Arginine	11.48	11.44	11.24
Alanine	6.88	6.84	6.77
Imino acids ^a	20.62	20.62	20.38

^aImino acids mean proline and hydroxyproline.

3. 텔라피아 비늘의 효소 반응시간에 따른 가수분해도

고상발효된 텔라피아 비늘의 효소적 가수분해물들의 효율적인 제조를 위해, 다양한 단백질 가수분해 효소 및 반응시간, 열수추출기법의 조합 등에 따른 여러가지 조건으로 실험을 수행하였다. 따라서, 고상발효된 텔라피아 비늘로부터 다양한 효소적 가수분해물들이 제조되었고, 그들의 가수분해도를 측정하였다(Fig. 16). 텔라피아 비늘의 열수추출 과정 없이 효소적 가수분해만을 수행한 경우, 3시간부터 12시간까지는 시간 의존적으로 5종의 효소적 가수분해물 (α -chymotrypsin, alcalase, kojizyme, protamex 및 trypsin)의 가수분해도가 증가하는 것으로 나타났고, 그 뒤에는 거의 유사하거나 다소 감소하는 경향을 보였다. 이 중, alcalase 가수분해물이 12시간까지 다른 효소 가수분해물들보다 다소 높은 가수분해도를 보였으나, 그 이후에는 다소 감소된다는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 텔라피아 비늘을 열수처리 후, 효소적 가수분해로 제조된 가수분해물들은 효소만을 이용하여 제조한 가수분해물들에 비해 상당히 높은 가수분해도를 보였다. 또한, 열수처리 후, 효소적 가수분해를 하였을 때 α -chymotrypsin을 제외하고 6시간까지 급격히 증가하다가 그 이후 24시간까지 가수분해도는 일정하게 유지되었다. 하지만, α -chymotrypsin에 의해 제조된 가수분해물은 12시간까지 지속적으로 가수분해도의 증가를 보였으며 12시간 가수분해에서 약 55%의 가장 높은 가수분해도를 보였다 (Fig. 17). 이것은 열수추출 없이 α -chymotrypsin만 처리하여 가수분해도를 측정하였을 때보다 약 15% 가수분해도 증가를 보였다. 따라서, 텔라피아 비늘의 경우 열수처리 후, α -chymotrypsin 효소를 처리하는 것이 가장 효율적으로 가수분해 되었다는 것을 알 수 있었다.

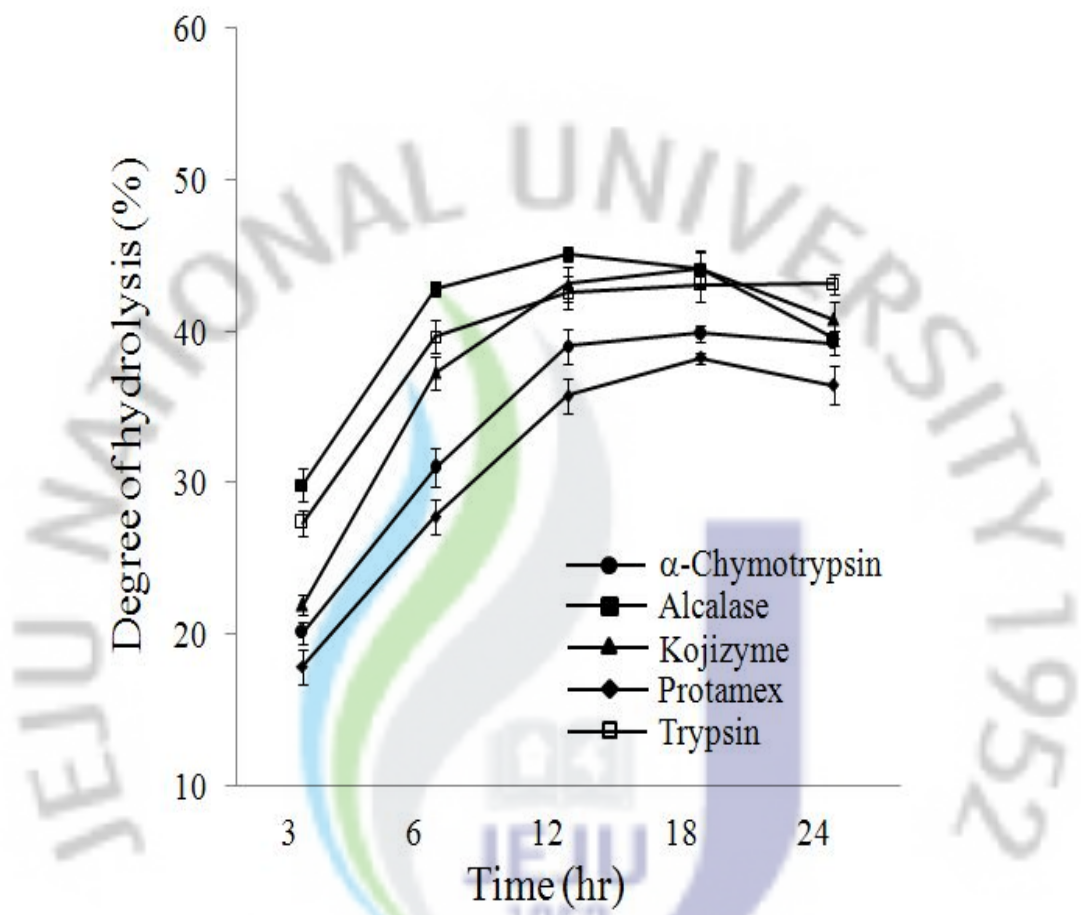


Fig. 15. Comparison of hydrolysis degrees for enzymatic hydrolysates from *T. mossambica* scale. The enzymatic hydrolysates were prepared by enzymes(α -chymotrypsin, alcalase, kojizyme, protamex and trypsin) and reaction times.

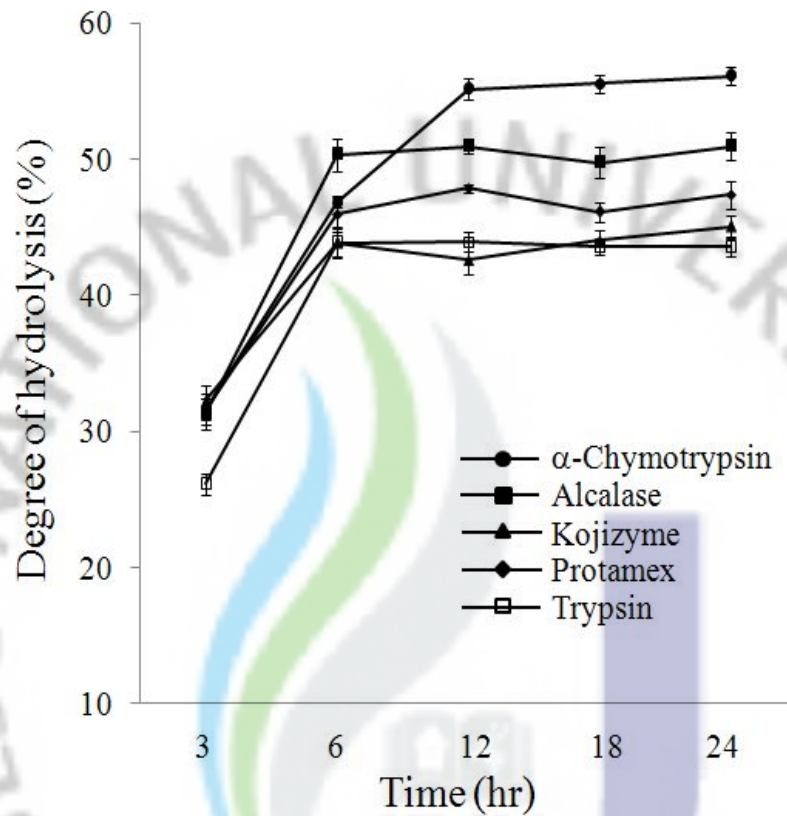


Fig. 16. Comparison of hydrolysis degrees for enzymatic hydrolysates of gelatin from *T. mossambica* scale. The enzymatic hydrolysates of gelatin were prepared by enzymes(α -chymotrypsin, alcalase, kojizyme, protamex and trypsin) and reaction times.

4. 킬라피아 비늘 젤라틴 가수분해물의 ACE 저해 효과

열수 처리 후, 단백질 가수분해효소 (α -chymotrypsin, alcalase, kojizyme, protamex 및 trypsin)에 따라 제조된 킬라피아 비늘의 효소적 가수분해물들의 ACE 저해활성은 Fig. 18에 나타내었다. 단백질 가수분해효소 5종과 가수분해시간에 따라 제조된 킬라피아 비늘의 효소적 가수분해물들이 ACE 저해 활성은 가수분해 시간이 3시간부터 12시간까지 증가함에 따라 모든 효소 가수분해물 (1mg/ml)의 ACE 저해활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었으나, 가수분해 12시간부터 이후 24시간까지 ACE 저해활성은 거의 변화가 없었다. 실험에 사용된 단백질 가수분해효소 5종 중 α -chymotrypsin와 alcalase를 이용하여 제조된 킬라피아 비늘의 효소적 가수분해물이 다른 효소적 가수분해물 보다 상당히 높은 ACE 저해작용 (약 60%~75%)을 가지는 것으로 나타났다.

따라서, 높은 ACE 저해작용을 보인 12시간째 α -chymotrypsin와 alcalase 가수분해물들을 가지고 다양한 농도 (0.25, 0.5 및 1mg/ml)에서 ACE 저해작용을 확인하였다(Fig. 19). α -chymotrypsin와 alcalase 가수분해물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 ACE 저해활성이 상당히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 게다가, 12시간째 α -chymotrypsin 가수분해물의 IC_{50} 값은 0.7mg/ml였고, 12시간째 alcalase 가수분해물의 IC_{50} 값은 0.83mg/ml였다. 이것으로부터 12시간째 α -chymotrypsin 가수분해물이 12시간째 alcalase 가수분해물보다 더 높은 ACE 저해활성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 흥미롭게도 ACE에 대한 저해활성 패턴이 열수 처리 후, 효소의 종류와 가수분해시간에 따른 가수분해물의 패턴과 유사하였다. 즉, 앞에서 제시된 것처럼 가수분해 시간이 증가하면서 킬라피아 비늘의 가수분해도가 증가한 구간에서만 ACE의 저해활성의 증가가 확인되었을 뿐만 아니라, 높은 가수분해도를 보인 α -chymotrypsin와 alcalase 가수분해물이 다른 가수분해물들에 비해 높은 ACE 저해 활성을 보여 ACE 저해활성은 가수분해도와 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다.

이상의 결과로 부터 킬라피아 비늘 가수분해물을 효율적으로 제조하기 위해

단독으로 효소만을 이용하였을 때 보다 병행하여 얻은 가수분해물의 가수분해도가 더 높은 것을 알 수 있었다. 이것은 효소추출기법에 의해 추출되어 나오지 못하는 성분들이 열수추출법을 먼저 적용시킴으로써 효율적으로 추출되게 되고, 단백질 가수분해효소를 적용함으로써 고분자의 성분이 저분자의 성분으로 효율적인 전환이 이루어질 수 있어 가수분해도가 증가한 것으로 판단된다. 또한, α -chymotrypsin이 높은 가수분해도를 유도함에 따라 킬라피아 비늘 유래 가수분해물 제조를 위한 효율적인 효소이며, 열수추출법과 효소적 추출기법의 병행이 저분자 성분 추출에 유용하다는 것을 확인할 수 있었다.



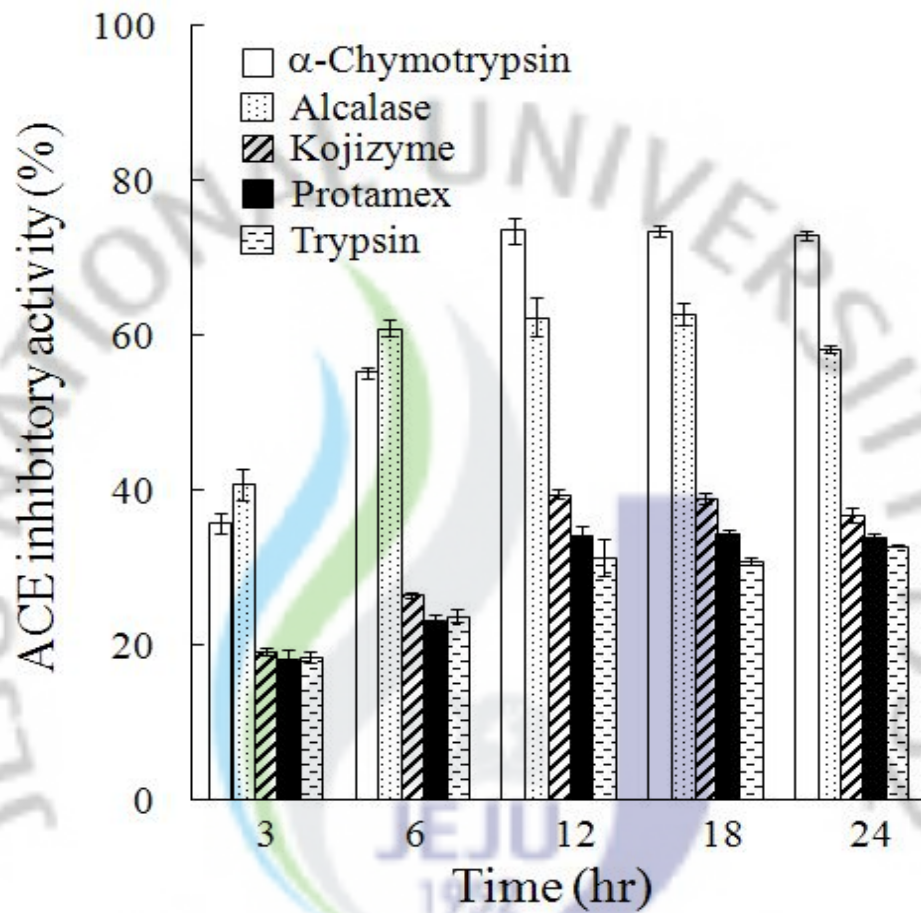


Fig. 17. ACE inhibitory activities for enzymatic hydrolysates(1mg/ml) of gelatin from *T. mossambica* scale.

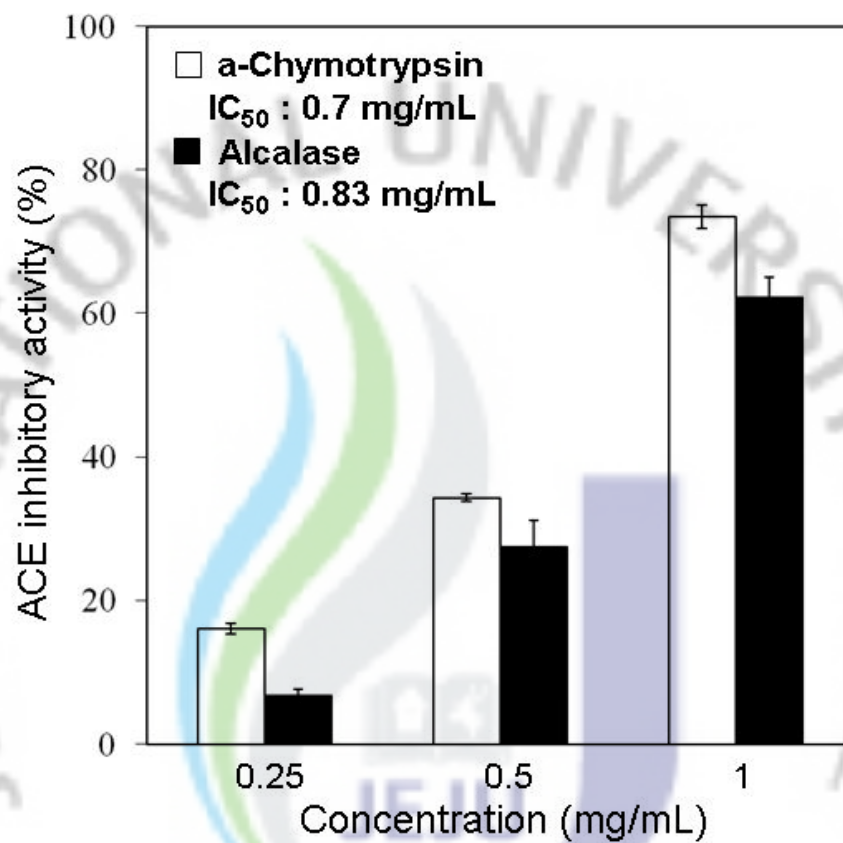


Fig. 18. ACE inhibitory activities for α -chymotrypsin and alcalase hydrolysates of gelatin from *T. mossambica* scale by concentrations. The value of IC_{50} was expressed as concentration of α -chymotrypsin and alcalase hydrolysate inhibiting the 50% of ACE.

5. 킬라피아 비늘 젤라틴 가수분해물의 가수분해 조건

ACE 저해활성이 가장 높은 α -chymotrypsin 가수분해에 의한 킬라피아 비늘 가수분해물의 최적 가수분해 조건을 확인하기 위해, 기질 대 효소비와 기질농도에 따른 다양한 조건으로 실험을 수행하였다. 먼저, α -chymotrypsin 가수분해물을 가지고 기질 대 효소비를 10, 20, 50, 100, 200, 500(wt/wt)으로하여 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 20과 같다. 킬라피아 비늘인 기질 대 효소의 비가 증가할수록, 즉 효소의 농도가 감소할수록 가수분해도는 감소하였다. 또한, 킬라피아 비늘 대 효소의 비율이 10(wt/wt)부터 200(wt/wt)까지 증가하면서 가수분해도가 약 65%에서 약 45%까지 급격히 감소하였고, 200(wt/wt)부터 500(wt/wt)까지는 거의 유사한 가수분해도를 보였다. 이 결과로 보아 다양한 기질 대 효소비 중, 기질 대 효소비 100(wt/wt)이 가수분해도에 대한 경제적인 효율성을 보인다는 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 킬라피아 비늘의 α -chymotrypsin 가수분해물을 100(wt/wt)에서 기질 농도를 1%, 3%, 5%, 10% 및 20%로 각각 조절하여 가수분해를 실시하였다. 그 결과, Fig. 21에서 나타난 것처럼 기질의 농도가 낮을수록 가수분해도가 다소 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 기질의 농도가 증가할수록 가수분해도는 감소하는 경향을 보였다.

상기의 결과로부터 킬라피아 비늘의 α -chymotrypsin에 의한 가수분해 조건은 pH 7.8, 25°C, 12hr, 기질/효소비 100(wt/wt) 및 기질농도 10%의 조건으로 가수분해 할 경우, 킬라피아 비늘 효소적 가수분해물의 제조를 위한 효율적인 조건임을 확인할 수 있었다.

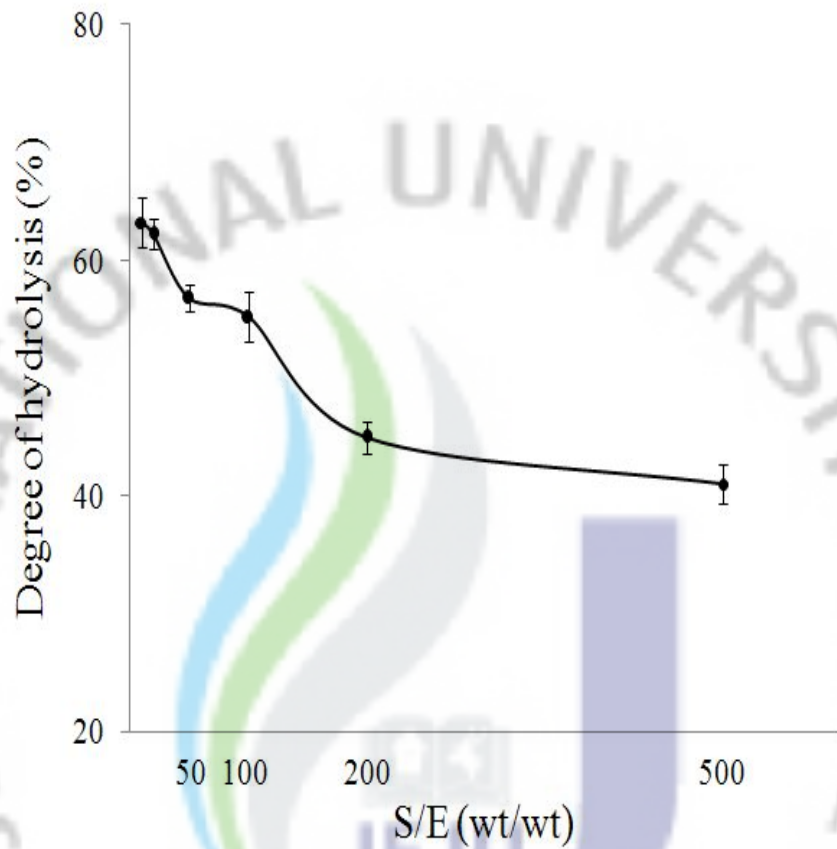


Fig. 19. Comparison of hydrolysis degrees for α -chymotrypsin hydrolysates of gelatin from *T. mossambica* scale by substrate/enzyme ratios. The hydrolysis degree of α -chymotrypsin gelatin hydrolysates was determined by various substrate/enzyme ratios with 3% substrate in pH 7.8 at 25°C for 12 hr.

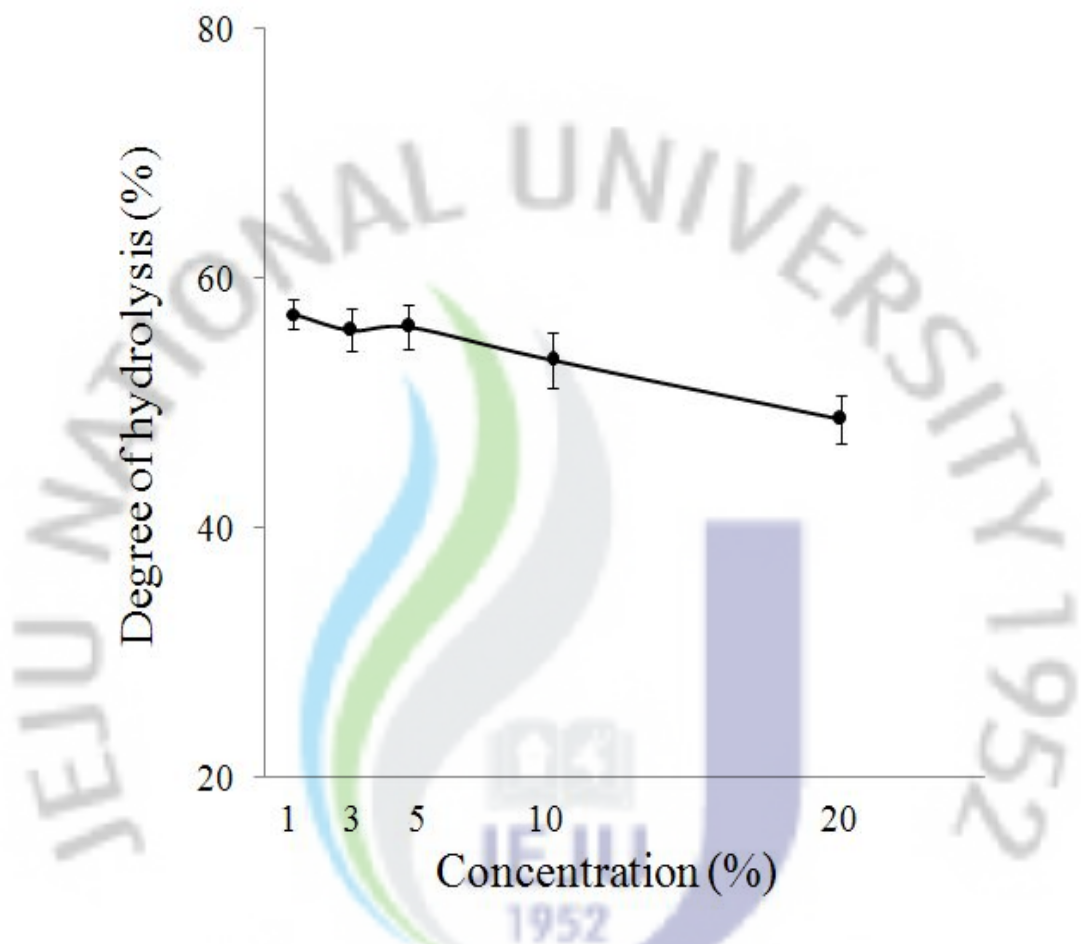


Fig. 20. Comparison of hydrolysis degrees for α -chymotrypsin hydrolysates of gelatin from *T. mossambica* scale by substrate concentrations. The hydrolysis degrees of α -chymotrypsin hydrolysates of gelatin were determined by various substrate concentrations with substrate/enzyme ratio(100wt/wt) in pH 7.8 at 25°C for 12 hr.

6. α -Chymotrypsin 젤라틴 가수분해 분획물의 ACE 저해활성

틸라피아 비늘 α -chymotrypsin 가수분해물의 분자량에 따른 ACE 저해활성을 확인하기 위해, 틸라피아 비늘 α -chymotrypsin 가수분해물을 한외여과막 분리 시스템 (Ultrafiltration membrane)에 의해 5kDa 이하, 10kDa 이하 및 30kDa 이하 분획물들을 제조하였다. 3가지 분획물을 가지고 다양한 농도별 (0.25, 0.5 및 1 mg/ml)로 ACE 저해활성을 측정한 결과, 모든 분획물의 농도가 증가할 수록 ACE의 저해 활성이 유의성 있게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 22). 특히, 모든 농도에서 5kDa 이하 분획물이 ACE에 대한 IC_{50} 값이 0.1mg/ml으로 나타나 10kDa (IC_{50} ; 0.31mg/ml) 및 30kDa 이하 분획물(IC_{50} ; 0.7mg/ml) 보다 상당히 높은 ACE 저해 활성을 보였다. 또한, 5kDa 이하 분획물의 농도가 0.25mg/ml에서 1mg/ml까지 증가할수록 약 60%의 ACE 저해 활성이 약 89%까지 증가하였다. 이러한 결과들은 한외여과막 시스템에 의해 분리된 틸라피아 비늘 α -chymotrypsin 가수분해물의 5kDa 이하 분획물이 ACE에 대한 효율적인 저해 작용을 가지는 것으로 판단된다. 이것은 α -chymotrypsin의 높은 가수분해 능력이 틸라피아 비늘에 존재하는 단백질 성분을 다양한 펩티드로 가수분해 시키고 일정한 분자량 이하로 분해되어질 때, ACE 저해 작용이 크게 증가하는 것으로 판단된다. 따라서 틸라피아 비늘 가수분해물이 ACE 저해 활성을 가짐으로써 새로운 항고혈압제의 원료로서 활용가치가 있을 것으로 판단된다.

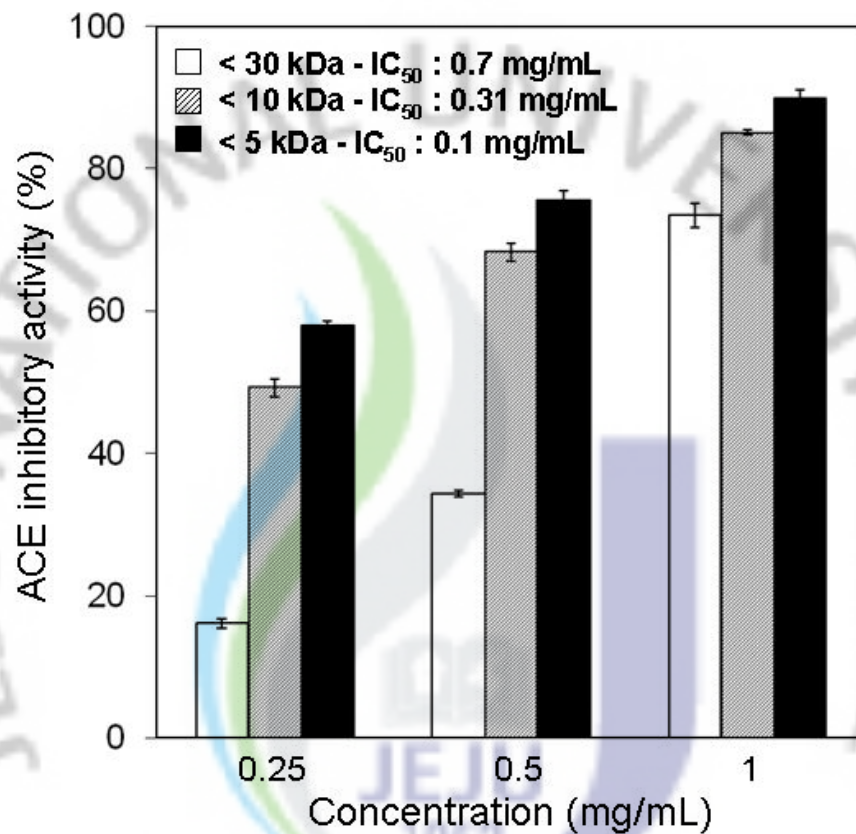


Fig. 21. ACE inhibitory activities for α -chymotrypsin hydrolysates of gelatin from *T. mossambica* by concentrations. The value of IC_{50} was expressed as concentration of α -chymotrypsin hydrolysate inhibiting the 50% of ACE.

7. 티라피아 비늘 젤라틴 가수분해물의 Tyrosinase 저해 효과

단백질 가수분해효소(α -chymotrypsin, alcalase, kojizyme 및 trypsin)에 따라 제조된 티라피아 비늘의 효소적 가수분해물들을 가지고 생리활성 검색의 일환으로 tyrosinase의 저해활성을 측정하여 그 결과를 Table. 13에 나타내었다. 열수 처리 후, 5종의 단백질 가수분해 효소와 가수분해시간에 따라 제조된 티라피아 비늘의 효소적 가수분해물들이 고농도에서도 낮은 tyrosinase저해 활성을 보였다. 이는 화장품 미백기능성 고시원료인 arbutin에 비해 상당히 낮은 활성을 보였으며 옥돔 비늘 젤라틴 유래 가수분해물의 tyrosinase 저해활성도 고농도에서 50~60%의 억제활성을 나타낸것에 비하여 낮은 활성을 보였다.

Table 13. Tyrosinase inhibitory activities for enzymatic hydrolylates of gelatin from *T. mossambica* scale

Sample(mg/ml)	Tyrosinase inhibition(%)				
	α -Chymotrypsin	Alcalase	Kojizyme	Trypsin	
<i>T. mossambica</i>	1.5	-1.4±1.6	-2.0±2.3	-1.8±0.8	-1.0±0.3
	3.1	1.6±5.6	-1.1±3.7	-2.4±1.7	0.0±0.7
	6.25	3.8±4.5	0.1±3.8	-6.9±2.0	-1.0±0.3
	12.5	7.3±3.7	7.3±1.8	-6.0±1.9	2.0±0.6
	25	15.3±1.3	22.9±1.7	4.7±3.0	6.7±1.3
	50	30.5±2.4	44.6±1.5	22.9±0.7	24.1±1.2
arbutin	0.25		44.9±2.6		
	0.50		62.3±2.3		
	1.00		77.8±0.7		

8. 털라피아 비늘 젤라틴 가수분해물의 elastase 저해 효과

열수 처리 후, 단백질 가수분해효소(α -chymotrypsin, alcalase, kojizyme 및 trypsin)에 따라 제조된 털라피아 비늘의 효소적 가수분해물들을 가지고 생리활성 검색의 일환으로 elastase의 저해활성을 측정하여 그 결과를 Table 14에 나타내었다.

털라피아 비늘 효소가수분해물의 elastase 저해활성은 α -chymotrypsin 추출물 50mg/ml에서 81.8%, alcalase 74.9%, kojizyme 68.3%, trypsin 77.2%의 억제 활성을 보여, 옥돔 비늘 젤라틴 유래 가수분해물의 고농도에서 70~90% 억제활성과 유사하게 나타났다. 그러나 화장품 미백기능성 고시원료인 빈랑자(*Arecae Semen*)추출물 상당히 낮은 활성을 보이고 있어, 어류 비늘의 주름개선용 자원으로 활용하고자 할 경우 가수분해조건과 펩타이드 분획 등 이에 대한 더 많은 연구가 요구된다.

Table 14. Elastase inhibitory activities for enzymatic hydrolylates of gelatin from *T. mossambica* scale

Sample(mg/ml)	Elastase inhibition(%)				
	α -Chymotrypsin	Alcalase	Kojizyme	Trypsin	
<i>T. mossambica</i>	1.5	15.8±5.1	12.0±2.5	8.6±1.2	12.4±1.8
	3.1	30.4±1.4	20.0±2.7	16.6±1.7	22.8±3.7
	6.25	42.9±2.0	31.9±2.1	28.9±2.6	35.9±1.7
	12.5	55.8±0.9	44.4±1.6	40.8±1.0	50.4±1.6
	25	73.5±0.6	60.0±1.0	55.3±0.7	65.2±1.7
	50	81.8±0.6	74.9±1.1	68.3±0.5	77.2±1.0
<i>Arecae Semen</i>	0.025		36.3±0.7		
	0.05		56.0±3.8		
	0.10		71.7±1.3		

VIII. 요약

틸라피아 비늘의 일반성분은 수분함량은 2.6%, 회분함량은 0.3%였고, 조단백질 함량은 97.06%으로 대부분 단백질로 이루어 졌으며, 틸라피아 비늘의 아미노산 조성은 imino acid 조성이 일반건조 20.62%, 원적외선처리 20.62%, 고상발효 20.38%로 보였으며 Gly의 조성은 일반건조 17.25%, 원적외선처리 17.85%, 고상발효 19.76%로 나타났다. 여기서 일반건조와 원적외선처리에 있어 imino acid, Gly의 조성차이는 없었으며, 고상발효시 Gly 함량이 높게 나타났다.

틸라피아 비늘의 열수추출 과정 없이 효소적 가수분해만을 수행한 경우, 3시간 부터 12시간까지는 시간 의존적으로 모든 5종의 효소적 가수분해물 (α -chymotrypsin, alcalase, kojizyme, protamex 및 trypsin)의 가수분해도가 증가하였고, 그 뒤에는 거의 유사하거나 다소 감소하는 경향을 보였다. 이 중, alcalase 가수분해물이 12시간까지 다른 효소 가수분해물들보다 다소 높은 가수분해도보였다.

틸라피아 비늘의 열수처리 후, 효소적 가수분해로 제조된 가수분해물들은 높은 가수분해도를 보였으며, 가수분해도는 α -chymotrypsin을 제외하고 6시간까지 급격히 증가하다가 그 이후까지 가수분해도는 일정하게 유지되었다. 하지만, α -chymotrypsin에 의해 제조된 가수분해물은 12시간까지 지속적으로 가수분해도의 증가를 보였으며 12시간 가수분해에서 약 55%의 가장 높은 가수분해도를 보였고, 이는 열수추출 없이 α -chymotrypsin만 처리하여 가수분해도를 측정하였을 때보다 약 15% 가수분해도 증가를 보였다.

틸라피아 비늘의 효소적 가수분해물들이 ACE 저해 활성은 3시간부터 12시간 까지 가수분해시간이 증가함에 따라 모든 효소 가수분해물(1mg/ml)의 ACE 저해 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 다른 효소에 비하여 α -chymotrypsin과 alcalase를 이용하여 제조된 틸라피아 비늘의 효소적 가수분해물이 약 60%~ 75%의 ACE 저해활성 보였다.

높은 ACE 저해작용을 보인 12시간째 α -chymotrypsin와 alcalase 가수분해물들을 가지고 다양한 농도 (0.25, 0.5 및 1mg/ml)에서 농도가 증가함에 따라 ACE 저해활성이 상당히 증가한 것을 확인할 수 있었다. α -chymotrypsin 가수분해물의 IC₅₀ 값은 0.7mg/ml이었고, alcalase 가수분해물의 IC₅₀ 값은 0.83mg/ml이었다.

α -Chymotrypsin 가수분해물을 가지고 기질 대 효소비를 10, 20, 50, 100, 200, 500(wt/wt)으로하여 가수분해도를 측정한 결과, 기질 대 효소의 비가 증가할수록, 즉 효소의 농도가 감소할수록 가수분해도는 감소하였다. 또한, 텔라피아 비늘 대 효소의 비율이 10(wt/wt)부터 200(wt/wt)까지 증가하면서 가수분해도가 약 65%에서 약 45%까지 급격히 감소하였고, 200(wt/wt)부터 500(wt/wt)까지는 거의 유사한 가수분해도를 보였다.

텔라피아 비늘의 α -chymotrypsin 가수분해물을 100(wt/wt)에서 기질농도를 1%, 3%, 5%, 10%, 20%로 각각 조절하여 다음 실험을 결과 기질의 농도가 낮을수록 가수분해도가 다소 증가하는 하였다.

텔라피아 비늘로부터 α -chymotrypsin를 이용하여 pH 7.8, 25°C, 12hrs, Substrate/Enzyme ratio=100 (wt/wt) 및 Substrate concentration=10%의 조건으로 가수분해 한 경우, 텔라피아 비늘 효소적 가수분해물의 제조를 위한 최적 조건이었다.

텔라피아 비늘 α -chymotrypsin 가수분해물을 가지고 5kDa, 10kDa 및 30kDa의 막을 사용하는 한외여과막 분리 시스템(Ultrafiltration membrane)에 의해 5kDa 이하, 10kDa 이하 및 30kDa 이하 분획물들을 제조하여 3가지 분획물을 가지고 다양한 농도별 (0.25, 0.5 및 1mg/ml)로 ACE 저해활성을 측정한 결과, 모든 분획물의 농도가 증가할수록 ACE의 저해 활성이 증가하였다.. 특히, 모든 농도에서 5kDa 이하 분획물의 ACE에 대한 IC₅₀ 값이 0.1mg/ml로서, 10kDa 및 30kDa 이하 분획물의 IC₅₀ 값인 0.31mg/ml과 0.7mg/ml보다 상당히 높은 ACE 저해 활성을 보였다. 또한, 5kDa 이하 분획물의 농도가 0.25mg/ml에서 1mg/ml까지 증가하면서, 약 60%의 ACE 저해 활성이 약 89%까지 증가하였다.

틸라피아 비늘의 단백질 가수분해효소(α -chymotrypsin, Alcalase, Kojizyme 및 Trypsin) 추출물의 tyrosinase의 저해활성은 고농도에서도 낮은 tyrosinase저해 활성을 확인하였다. α -chymotrypsin 추출물 50mg/ml에서 30.5%, Alcalase 추출물에서 44.6%의 억제 활성을 보여주었다. 이는 화장품 미백기능성 고시원료인 albutin에 비해 현저하게 낮은 활성을 보여주고 있다.

틸라피아 비늘의 단백질 가수분해효소(α -chymotrypsin, alcalase, kojizyme 및 trypsin) 추출물의 elastase 저해활성은 α -chymotrypsin 추출물 50mg/ml에서 81.8%, alcalase 74.9%, kojizyme 68.3%, trypsin 77.2%의 억제 활성을 보여주었다. 하지만 이는 화장품 미백기능성 고시원료인 빈랑자(*Arecae Semen*)추출물 현저하게 낮은 활성을 보이고 있다.

이 연구를 통해 수산가공과정을 거쳐 폐기물로 버려지고 있는 가공부산물인 옥돔 비늘과 더불어 틸라피아 비늘의 젤라틴 및 효소적 가수분해물의 저분자 펩티드가 상당히 우수한 항고혈압 활성을 나타냄으로써, 기능성 식품 소재 및 잠재적인 의약품 소재로서 충분한 연구 가치가 있다고 생각되며 좀 더 체계적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

IX. 참고문헌

1. Yoo SJ. Processing optimization and physicochemical properties of gelatin and collagen from yellowfin tuna(*Thunnus albacares*) abdominal skin. Department of Food Science and Technology, Graduate School, Pukyong National University (2009)
2. Songchotikunpan P, Tattiyakul J, Supaphol P. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. International J. of Biological Macromolecules 42; 247-255 (2008)
3. Kim JS, Kim JG, Cho SY. Screening for the raw material of gelatin from the skins of some pelagic fishes and squid. J. Korean Fish. Soc. 30(1); 55-61 (1997)
4. Kim JS, Oh KS. Preparation of conger eel skin gelatin by precipitation with ethanol and its properties. J. Ins. Marine Industry 12; 51-57 (1999)
5. Jeju Special Self-Governing Province Office of Fisheries Policy. The trend of marine products (2008) <http://www.jeju.go.kr/contents/depart.php?depart=51&silkuk=15&mid=08>
6. Mark EM, Steart GF. Advances in food research, Academic Press, London, Ed.; 235 (1957)
7. Ward AG, Counts A. The science and technology of gelatin. Academic Press, London, Ed.; 188 (1977)
8. Hao SL, Li X, Yang J, Cen H, Shi QB, He J. The characteristics of gelatin extracted from sturgeon (*Acipenser baeri*) skin using various pretreatments. Food Chem. 115; 124-128 (2009)
9. Rahman MS, Al-Saidi GS, Guizani N. Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. Food Chem. 108(2); 472-481 (2008)

10. Cho SM, Gu YS, Kim SB. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 19(2); 221-229 (2005)
11. Gudmundsson M, Hafsteinsson H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *J. of Food Science* 62(1); 37-39 (1997)
12. Jamilah B, Harvinder KG. Properties of gelatins from skins of fish-black tilapia(*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia(*Oreochromis nilotica*). *Food Chem.* 77(1); 81-84 (2002)
13. Kim JS, Kim JG, Cho SY, Kang KS, Ha JH, Lee EH. The suitable processing condition for gelatin preparation from yellowfin sole skin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25(6); 716-723 (1993)
14. Shahidi F, Kamil YVA. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 12; 435-464 (2001)
15. Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J. Agric. Food Chem.* 49; 1984 - 1989 (2001)
16. Jeon YS, Kim YT, Kim SK. Analysis of compositions for effective utilization of fish scales. *Korean J. Life Sci.*, 8(5); 589-597 (1998)
17. Kinsella JE, Sheety KJ. Chemical modification for improving functional properties of plant and yeast proteins. *A. Survey CRC Critical Food Sci. Nutr.* 7; 219-222 (1979)
18. Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P. Apidaecins: Antibacterial peptides from honeybees. *EMBO-J.* 8(8); 2387-2391 (1989)

19. Benson B, Ebels I, Hruby VJ. Isolation and structure elucidation of bovine pineal arginine vasopressin: Arginine vasotocin not identified., *Int. J. Peptide Protein Res.* 36(2); 109-121 (1990)
20. Uesaka T, Ikeda T, Kubota I, Muneoka Y, Ando M. Structure and function of a pentapeptide isolated from the gut of the eel., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180(2); 828-832 (1991)
21. Lee EH, Ha JH, Cha YJ, Oh KS, Kwon CS. Preparation of powdered dried sea mussel and anchovy for instant soup. *Bull. Korean Fish. Soc.* 17(4); 299-305 (1984)
22. Lee EH, Oh KS, Ahn CB, Chung BG, Bae YK, Ha JH, Preparation of powdered smoked-dried mackerel soup and its taste compounds. *Bull. Korean Fish. Soc.* 20(1); 41-51 (1987)
23. Koo JK, Lee EH, Ahn CB, Cha YJ, Oh KS. Taste compounds of salted and fermented big eyed herring and slimy. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17(4); 283-288 (1985)
24. Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nileperch(*Latesniloticus*). *Food Chem.* 85; 81-89 (2004)
25. Shahide F. *Seafood processing by-products.* Blackie Academic and Professional; 320-334 (1994)
26. Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper(*Priacanthus tayenus*), *Food Chem.* 89; 363-372 (2005)
27. Sadowska M, Kolodziejska I, Niecikowska C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod(*gadus morhua*). *Food Chem.* 81; 257-262 (2003)

28. Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, Walsh D, Mann S. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*. *Biological Macromolecules* 32; 199–204 (2003)
29. Foegeding E, Lanier TC, Hultin HO. Characteristics of edible muscle tissue, (3rd ed.), in *Food Chem.* New York : Fennema O.R. Macrel Dekker; 879–942 (1996)
30. Cho SM, Kwak KS, Park DC, Gu YS, Ji CI, Jang DH, Lee YB, Kim SB. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark(*Isurus oxyrinchus*) cartilage, *Food Hydrocolloids* 18(4); 573–579 (2004)
31. Kim JS, Cho SY. Screening for raw material of modified gelatin in marine animal skins caught in coastal offshore water in Korea, *Agric. Chem. and Biotech.* 39; 134–139 (1996)
32. Montero P. Gómez-Guillén MC. Extracting conditions for megrim(*Lepidorhombus bascii*) skin collagen affect functional properties of food macromolecules, *Lodon : Elsevier Applied Science Publishers*; 171–201 (2000)
33. Osborne K, Voight MN, Hall DE, Utilization of lumpfish carcasses for production of gelatin, *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability*, Lancaster. Pa. : Technomic Publishing Co.; 143–153 (1990)
34. Kim JS, Cho SY, Ha JH, Lee EH. Effect of additives on physical properties of yellowfin sole skin gelatin prepared by ethanol fractional precipitation. *Agric. Chem. and Biotech.* 38; 330–333 (1995)

35. Yoshimura K, Terashima M, Hozan D, Shirai K. Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali-solubilized collagen from shark skin. *J. of Agric. and Food Chem.* 48; 685-690 (2000)
36. Kinsella JE, Shetty KJ. Chemical modification for improving functional properties of plant and yeast proteins. *A. Survey CRC Critical Food Sci. Nutr.* 7; 219-221 (1979)
37. Fujino M, Kitada C. Design of bioactive molecules-strategies and targets for generation of novel medicines and pesticides. *Soft Science Pub. Tokyo;* 72-95 (1986)
38. Vigneaud V, Ressler C, Swan JM, Roberts CW, Katsoyannis PG, Gorden S. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *H. Amer. Chem. Soc.* 75; 4879-4880 (1953)
39. Vigneaud V, Gish DT, Katsoyannis PG. A synthetic preparation possessing biological properties associated with arginine-vasopressing. *J. Amer. Chem. Soc.* 76; 4751-4752 (1954)
40. Yarleque A, Compos S, Escobar E, Lazo F, Sanchez N, Hyslop S, Marsh NA, Butterworth PJ, Price RG. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake, *lachesis muta*, *Toxicol.* 27; 1189-1197 (1989)
41. Wilson WE, Lazarus LH, Tomer KB. Bradykinin and kiniogens in bovine milk. *J. Biol. Chem.* 264; 17777-17783 (1989)
42. Salzet M, Bulet P, Van-Dorsselaer A, Malecha J. Isolation structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system of the pharngobdellid leech *erpbodella octoculata*. *Eur. J. Biochem.* 217; 897-903 (1993)

43. Quistad GB, Skinner WS. Isolation and sequencing of insecticidal peptides from the primitive hunting spider, *Plectreurys tristis*. *J. Bio. Chem.* 269; 11098-11101 (1994)
44. Astawan M, Wahyuni M, Yasuhara T, Yamada K, Tadokoro T, Maekawa A. Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59; 425-429 (1995)
45. Nakamura YN, Iwamoto H, One Y, Nishimura S, Tabata S. Relationship among collagen amount, distribution and architecture in the *M. Longissimus thoracis* and *M. pectoralis profundus* from pigs. *Meat Science* 64; 43-50 (2003)
46. Lehninger AL. *Biochemistry*, (2nd ed.), New York: Worth Publishers Inc.; 5 (1975)
47. Nimni ME, Hakrness RD. *Molecular structures and functions collagen*. CRC Press; 3-789 (1988)
48. Kolodziejaska I, Sikorski ZE, Niecikowska C. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skins. *Food Chem.* 66; 153-157 (1999)
49. Burjandze TV. New analysis of the phylogenetic change of collagen thermostability. *Biopolymers* 53; 523-528 (2000)
50. Amesen JA, Gildberg A. Preparation and characterisation of gelatine from the skin of harp seal (*Phoca groenlandica*). *Bioresource Technol.* 82; 191-194 (2002)
51. Gilsenan PM, Ross-Murphy SB. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids* 12; 191-195 (2000)

52. Maruyama M, Sato K, Ohtaka A, Ogura A, Hama T. Characteristics of brain injury-derived neurotrophic peptide-binding sites on rat brain synaptosomes and neurons in culture. *Neuroscience* 89; 149-156 (1999)
53. John P, Courts A. The science and technology of Gelatin. Academic Press, New York; 138-142 (1977)
54. Kovatcheva EG, Koleva II, Ilieva M, Pavlov A, Mincheva M, Konushlieva M. Antioxidant activity of extracts from *Lavandula vera* MM cell culture. *Food Chem.* 7; 1069-1077 (2001)
55. Ruberto G, Baratta MT, Biondi DM, Amico V. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *cystoseira* in a micellar model system. *J. Appl. Phycol.* 13; 403-407 (2001)
56. Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka H, Maruyama S. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 55(5); 1313-1318 (1991)
57. Kasai T, Iwasaki R, Tanaka M, Kiriya S. Caseinphosphopeptides in feces and contents in digestive tract of rats fed casein and CPP preparations. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(1); 26-30 (1995)
58. Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ. *Encyclopedia of food science. Food Technology and Nutrition*, Academic Press; 212-237 (1993)
59. Tagashira M, Watanabe M, Uemitsu N. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(4); 740-742 (1995)
60. Osawa T, Namiki M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves, *Agric. Biol. Chem.* 45(3); 735-739 (1981)
61. Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 50; 59-63 (1975)

62. Yamaguchi N, Yokoo Y, Fujimaki M. Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaish* 26(2); 65~70 (1979)
63. Kohen RY. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscles and brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85; 3175-3179 (1988)
64. Kim SK, Lee HC, Byun HG, Jeon YJ. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J. Korean Fish. Soc.* 29(2); 246-255 (1996)
65. Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J. Agric. Food Chem.* 49; 1984-1989 (2001)
66. Frohlich ED. Hemodynamic factors in the pathogenesis and maintenance of hypertension. *Fed. A. Soc. Expbio.* 41; 2400-2408 (1982)
67. Weiss D, Kools JJ, Taylor WR. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoenzyme deficient mice. *Circulation* 103; 448-454 (2001)
68. Walmor C, De-Mello AH, Danser J. Angiotensin II and the heart on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 35; 1183-1188 (2000)
69. Ursula C, Brewster MD, Mark A, Perazella MD. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: Effects on kidney disease. *Am. J. Med.* 116; 263-272 (2004)
70. Richard N, Re MD. The clinical implication of tissue renin angiotensin systems. *Current Opinion in Cardiol.* 16; 317-327 (2002)

71. Maruyama S, Nakagomi K, Tomizuka N, Suzuki H. Angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49; 1405-1409 (1985)
72. Matsui T, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57; 922-925 (1993)
73. Maruyama S, Mitachi H, Tanaka H, Tomizuka N, Suzuki H. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.* 51; 1581-1586 (1987)
74. Miyoshi S, Kaneko T, Yoshizawa Y, Fukui F, Tanaka H, Maruyama S. Hypertensive activity of enzyme hydrolysate, *Agric. Biol. Chem.* 55; 147-148 (1991)
75. Yano S, Suzuki K, Funatsu G. Isolation from α -zein of thermolysin peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60; 661-663 (1996)
76. Maruyama S, Miyoshi S, Kaneko T, Tanaka H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric. Biol. Chem.* 53; 1077-1081 (1989)
77. Shin ZI, Ahn CW, Nam HS, Lee HAJ, Lee HJ, Moon TM. Fractionation of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27; 230-234 (1995)

78. Okamoto A, Hanagata H, Matsumoto E, Kawamura Y, Koizumi Y, Yanagida F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of various fermented foods. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59; 1147-1149 (1995)
79. Matsufuji H, Matsui T, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58; 2244-2245 (1994)
80. Fujii M, Matsumura N, Mito K, Shimizu T, Kuwahara M, Sugano S, Karaki H. Antihypertensive effects peptide in autolysate of bonito bowels on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57; 2186-2188 (1993)
81. Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF, Cushman DW. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.* 255; 401-407 (1980)
82. Hong JH, Son BS, Kim BK, Chee HY, Song KS, Lee BH, Shin HC, Lee KB. Antihypertensive effect of *Ecklonia cava* extract. *Kor. J. Pharmacogn.* 37(3); 200-205 (2006)
83. Yokokawa K, Chiba H, Yoshikawa M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56; 1541-1545 (1992)
84. Uitto J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis : Age-related alterations in collagen and elastin. *Dermatol. Clin.* 4; 433-446 (1986)
85. Witt EH, Motchnik P, Packer L. Evidence for UV light as an oxidative stressor in skin. *Oxidative stress in dermatology.* Marcel Dekker, Inc., N.Y.; 29-47 (1993)

86. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem.* 25; 1058-1071 (1986)
87. Oikarinen A. The aging of skin : Chronoaging versus photoaging, *Photodermatol. Photoimmunol Photomed.* 7; 3-4 (1990)
88. Bailey AJ, Robinson SP, Balian G. Biological significance of the intermolecular cross-links of collagen. *Nature* 251; 105-109 (1974)
89. Yamauchi M, Prisyanyh P, Haque Z, Woodley DT. Collagen cross-linking in sun-exposed and unexposed sites of aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* 97; 938-937 (1991)
90. Marks MW, Morykwas MJ, Wheathly MJ. Fibroblast-mediated contraction in actinically exposed and actinically protected aged skin. *Plast. Reconstr. Surg.* 86; 255-259 (1990)
91. Son ED, Lee JY, Lee S, Kim MS, Lee BG, Chang IS. Topical application of 17 beta-estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating taf-beta signaling in aged human skin in vivo. *The Journal of Invest. Dermatol.* 124; 1149-1161 (2005)
92. Seite S, Zucchi H, Septier D, Igondjo-Techen S, Senni K, Godeau G. Elastin changes during chronological and photo-aging : the important role of lysozyme. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 20; 980-987 (2006)
93. Ghersetich I, Teofoli P, Benci M, Lotti T. Ultrastructural study of hyaluronic acid before and after the use of a pulsed electromagnetic field, electrolysis in the treatment of wrinkles. *International Journal of Dermatology* 33; 661-663 (1994)
94. Petropoulos I, Frigues B. Protein maintenance in aging and replicative senescence : a role for the peptide methionine sulfoxide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1703; 261-266 (2005)

95. Hazane F, Valenti K, Sauvaigo S, Peinnequin A, Mouret C, Favier A. Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays. *J. Photochem. and Photobiol.* 79; 171-190 (2005)
96. AOAC. Official methods of Analysis, Association of official agricultural chemists international, Gaithersburg, AOAC international 38.1.03; (2005)
97. ISO. Meat and meat products determination of L(-)-hydroxyproline content(Reference method). International Organization for Standardization ISO; 3496 (1978)
98. Sato K, Ohashi C, Ohtsuki K, Kawabata M. Type V collagen in trout(*Salmo gairdneri*) Muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *J. Agric. and Food Chem.* 39; 1222-1225 (1991)
99. Kim JS, Cho SY, Ko SH, Ha JH, Shin SJ, Lee EH. The suitable processing condition for gelatin preparation from dover sole skin. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 36(6); 440-448 (1993)
100. Hamada M. Effects of the preparation conditions on the physical properties of the shark-skin gelatin gels. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56(4); 671-677 (1990)
101. Kimura S, Zhu XP, Matsui R, Shijoh M, Takamizawa S. Characterization of fish muscle type I collagen, *J. Food Sci.* 53; 1315-1318 (1988)
102. Spackman DH, Stein WH, Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30; 1190-1206 (1958)
103. Hoyle NT, Merritt JH. Quality of fish protein hydrolysates from herring. (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.* 59(1); 76-79 (1994)

104. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr Al, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193; 265-275 (1951)
105. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26; 1199-1200 (1958)
106. Müller HE. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS peroxidase medium. *Zentralbl. Bakterio. Mikrobio. Hyg.* 259; 151-158 (1995)
107. Fuller BB, Drake MA, Spaulding DT, Chaudhry F. Down regulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell cultures by yohimbine. *J. Invest. Dermatol.* 114; 268-276 (2000)
108. Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianks AM, Walker JM. Results of a large scale screen of micro-algae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* 54; 10-14 (1988)
109. Hamada M, Kumagai H.. Chemical composition of sardine scale, *Nippon Suisan Gakkaishi.* 54(11); 1987-1991 (1988)
110. Johnston-Banks FA. In P. Harris, J.R. *Gelatin in Food gels.* Elsevier Applied Science Publishers; 233-289 (1990)
111. Yoo SJ, Cho SM, Woo JW, Kim SH, Byun SH, Kim TW, Kim SB. Physicochemical characteristics of gelatin from abdominal skin of Yellow Tuna(*Thunnus albacares*). *J Korean Fish. Soc.* 41(6); 419-426(2008)
112. Comez-Guillen MC, Tumay J, Fernandez-Diaz MD, Ulmo N, Lizaebe MA, Montero P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species. *Food Hydrocolloids* 16; 25-34 (2002)

113. Jangjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper(*Lutjanus vitta*). Food Chem. 93; 475-484 (2005)
114. Ledward DA. Gelation of gelatin. In Mitchell. Elsevier Applied Science Publishers; 171-201 (1986)
115. Arnesen JA, Gildberg A. Preparation and characterisation of gelatin from the skin of harp seal(*Phoca groenlandica*). Bioresource Technology 82; 191-194 (2002)
116. Kim SK, Jeon YJ, Byun HG. Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca. Fisheries Science 63(3); 421-427 (1997)
117. Ooshiro Z. Studies on proteinase in the pyloric caeca of fishes-II. Some properties of proteinase purified from the pyloric caeca of mackerel. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 37; 145-148 (1971)
118. Ramakrishna M, Hultin HO, Atallah MT. A comparison of dogfish and bovine chymotrypsin in relation to protein hydrolysis. J. Food Sci. 52; 1198-1202 (1987)
119. Sobral PJA, Habitante AMQB. Phase transitions of pig skin gelatin. Food Hydrocolloids 15(4); 377-382 (2001)
120. Heo SJ, Jeon YJ, Lee JS, Kim HT, Lee KW. Antioxidant effect of enzymatic hydrolyzate from a kelp, *Ecklonia cava*. Algae 18; 341-347 (2003)
121. Ahn G, Hwang, IS, Park EJ, Kim JH, Jeon YJ, Jee YH. Immunomodulatory effects of an enzymatic extract from *Ecklonia cava* on murine splenocytes. Mar. Biotech. 10; 278-289 (2008)

122. Athukorala Y, Jung WK, Vasanthan T, Jeon YJ. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. Carbohydr Polym. 66; 184-191 (2006)
123. Park EJ, Kang MH. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. Kor. J. Nutr. 35; 213-222 (2002)
124. Kohen RY. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscles and brain. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 3175-3179 (1988)
125. Giles TD. Lipid factors in the hypertension syndrome. J Cardiovascular Risk 4; 257-259 (1997)
126. Oh SJ, Kim SH, Kim SK, Baek YJ, Cho KH. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the K-casein fragments hydrolyzated by chymosin, pepsin, and trypsin. Korean J. Food Sci. Technol. 29; 1316-1318 (1997)
127. Marmol V, Ito S, Jackson I, Vactenheim J, Berr P, Ghanem G, Morandini R, Wakamatsu K, Huez G. TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. FEBS Lett. 327; 307-310 (1993)
128. Shin JY. Screening of natural products that have activities against skin-aging. Korean J. Food Nutr. 14; 568-572 (2001)
129. You JK, Chung MJ, Kim DJ, Seo DJ, Park JH, Kim TW, Choe M. Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of *paeonia suffruticosa* water extract. J. Korean Food Sci. Nutr. 38(3); 292-296 (2009)
130. Chung JH. Photoaging in aging, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 19; 109-121 (2003)

131. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195; 298-308 (2004)
132. Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT, Yoon KU. Anti-wrinkle Effect of safflower(*Carthamus tinctorius*) seed extract(I). *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 30(1); 15-22 (2004)



감사의 글

학문의 길로 인도하여 항상 미흡한 저를 세심한 배려와 격려로 지도해 주신 김수현 지도교수님께 깊은 감사를 드립니다.

바쁘신 가운데도 좋은 논문이 되도록 상세하게 검토하여 아낌없는 고견을 주시고 세심하게 다듬어 주신 하진환 교수님, 오영주 교수님, 오명철 교수님 그리고 애정 어린 관심으로 용기를 주신 송대진 교수님, 학위과정 중 많은 학문적 조언과 관심을 아끼지 않으신 강영주 교수님, 고영환 교수님, 임상빈 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

본 연구를 시작하면서 항상 가까이에서 물심양면으로 도움을 주시고 마지막까지 교정에 힘써주신 산업정보대학 오창경 교수님께 진심으로 감사를 드립니다.

논문을 끝까지 마무리할 수 있도록 모든 배려를 맞다하지 않으신 (주)청룡수산에 문영섭 사장님, 문창훈 차장님과 모든 직원 여러분께 깊은 감사를 드립니다.

그리고 평소에 옆에서 용기를 주신 해양대학 전유진 교수님과 이원우 선생님께 감사드립니다. 그리고 식품공학과 대학원의 모든 선생님들께 감사드립니다. 실험실에서 도움을 준 식품화학 실험실 후배님들께도 감사드립니다.

오늘이 오기까지 믿고 참아준 평생의 반려자인 고유경님 어려운 여건 속에서도 희망을 주셨던 아버지, 어머니, 장모님, 작은아버지, 작은어머니, 누님, 동생, 처제들과 친구들에게 깊은 감사를 드리며, 이 작은 결실을 드립니다.