



Research Article

Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates derived from tuna byproducts

참치 가공부산물로부터 단백가수분해물 제조 및 항산화 활성 평가

Gyu-Hyeon Park[†], Jeong-Min Lee[†], Na-Young Lim, Syng-Ook Lee*

박규현[†] · 이정민[†] · 임나영 · 이승옥*

Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

계명대학교 식품가공학과

Abstract This study aims to investigate the production and characteristics of protein hydrolysates derived from tuna byproducts (TP) using various proteolytic enzymes and to compare the antioxidant activity of the resulting hydrolysates. The TP were subjected to enzymatic hydrolysis using five different proteases: alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, and papain, and the antioxidant activities of the hydrolysates were evaluated. Subsequent analysis of the available amino group contents and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis patterns indicated a high degree of hydrolysis in TP after treatment with all the enzymes, except for papain. Based on the RC₅₀ values obtained from four different antioxidant analyses, all the hydrolysates exhibited similar antioxidant activity, except for the flavourzyme hydrolysate, which showed significantly higher scavenging activity against ABTS radicals and hydrogen peroxide than the other hydrolysates. These findings suggest that protein hydrolysates derived from TP hold promise as potential sources of natural antioxidants.

Keywords tuna byproducts, protein hydrolysates, flavourzyme, antioxidant



OPEN ACCESS

Citation: Park GH, Lee JM, Lim NY, Lee SO. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates derived from tuna byproducts. Korean J Food Preserv, 30(5), 885-895 (2023)

Received: August 04, 2023
Revised: September 15, 2023
Accepted: September 25, 2023

[†]These authors contributed equally to this study.

***Corresponding author**
 Syng-Ook Lee
 Tel: +82-53-580-5570
 E-mail: synglee@kmu.ac.kr

Copyright © 2023 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

다양한 종류의 수산물을 이용한 가공식품이 제조되고 있으며, 이들 수산 가공식품의 제조 시 많은 양의 부산물들이 발생하고 있다. 하지만 수산물의 가공 과정에서 발생하는 부산물들은 대체로 높은 지방함량으로 인해 산화가 빠르게 진행되어 양질의 단백질과 오메가-3 지방산 등의 기능성 성분을 다량 함유하고 있음에도 불구하고 폐기되는 비율이 아주 높다(Kim 등, 2016). 우리나라에서는 수산 폐기물로 인해 발생하는 오염을 방지하기 위해 막대한 비용을 투입하고 있으며(Kim 등, 2022; Park 등, 2021), 세계적으로 수산 부산물을 친환경적으로 자원화하기 위한 정책들이 추진되고 있다. 자원순환 활성화 정책과 더불어 수산 부산물을 활용한 고부가 식품소재 개발 연구가 활발히 추진되고 있으며, 이와 관련된 연구들은 주로 갑각류(crustacean) 및 조개류(shellfish)로부터 발생하는 가공부산물의 자원화에 초점이 맞추어져 왔다(Ahn 등, 2021; Jang 등, 2009).

참치어획량은 전 세계적으로 연간 840만 톤에 달하며 우리나라의 경우 약 37만 톤에 달한다. 어획된 참치는 가공과정을 거쳐 어두, 어피, 어뼈, 꼬리, 심장, 혈압육, 복육, 내장, 자숙액 등의 여러 가지 부산물들이 발생하며 이는 전체 원료의 30-35% 정도를 차지한다(Kim 등, 2015). 또한, 참치 가공품의 제조량이 증가함에 따라 관련 가공공장에서 생성되는 폐기물의 양 또한 증가하고 있으며, 이 중 극히 일부만이 저가 조미료나 식품 중간 소재 그리고 사료로 이용되고 있을 뿐 대부분은 폐기되어 심각한 환경문제를 초래하고 있다(Kang 등, 2000). 참치 가공품 중 하나인 참치액(참치(*Katsuwonus pelamis*))를 머리, 꼬리, 내장을 제거하고 전체를 혼연시킨 후 추출하여 가공된다. 추출이 다 끝난 참치 부산물은 약 85%의 높은 단백질 함량을 보이지만 대부분 폐기되는데, 최근 참치액 및 액젓의 수요가 늘면서 참치액 제조 후 발생하는 참치 부산물의 양도 지속적으로 늘고 있다.

참치 가공부산물에 대한 국내 연구로는 참치 가공부산물의 부위별 성분 분석(Kang 등, 2000), 참치 가공부산물로부터 단백질 분해효소를 이용한 기능성 천연조미료 개발(Kim과 Cha, 1996), 참치 자숙액의 항산화 활성에 감마선 조사가 미치는 영향(Lee 등, 2008) 및 항염증 활성(Cheng 등, 2015) 등이 있다. 한편, 참치 가공부산물을 이용한 단백질 가수분해물의 제조와 이들의 생리활성에 관한 연구는 보고된 바가 거의 없는 실정이다. 단백질가수분해물은 보통 2-20개의 아미노산으로 이루어진 저분자 펩타이드를 함유하며(Kim 등, 2022), 원료의 아미노산 조성과 서열 차이에 따라 다양한 생리적 기능을 가지게 된다(Pihlanto-Leppala, 2000). 특히 저분자 펩타이드는 단백질에 비해 분자량이 적어 생체 내로 흡수가 용이할 뿐만 아니라 다양한 생리활성을 나타내며(Moh 등, 2011), 지금까지 연구된 식품 유래 단백질가수분해물 및 저분자 펩타이드의 생리활성으로는 항혈전, 항고혈압, 항산화, 간 기능 개선 등 다양하며 이들을 대상으로 한 생리활성 연구가 최근까지도 활발하게 진행되고 있다(Kim 등 2023; Ozon 등, 2022; Yu 등, 2017). 특히 항산화 활성을 확인한 식품 유래 단백질가수분해물은 크릴새우(Park 등, 2016), 들깨박(Park 등, 2019), 사차인치(Suwanangul 등, 2022), 잉어 부산물(Gonzalez-Serrano 등, 2022) 등으로 다양한 식품을 소재로 한 가수분해물의 항산화 연구가 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 참치 액젓 제조 후 버려지는 부산물을 활용하여 효소적 가수분해를 통한 단백질가수분해물의 가수분해도를 조사하였으며, 효소제별 단백질가수분해물의 항산화 활성 비교를 통해 수산 가공부산물의 재활용을 통한 항산화 신소재 개발의 가능성을 탐색하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 실험에서 사용한 참치(*Katsuwonus pelamis*) 가공부산물은 (주)한라식품(경북 상주시 함창읍)에서 제공받았으며, 탈지 대두 분말은 증안리 약초마을 협동조합(경기 양평군)에서 생산된 것을 구입하였다. 또한, 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor*, mealworm)은 오엠오(전남 담양군)에서 동결 건조된 갈색거저리 유충을 구입하여 사용하였다. 모든 시료는 -20°C 동결고에 저장하며 실험에 사용하였다. Alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase 및 papain 단백질 분해 효소는 Novozymes사(Bagsvaerd, Denmark) 제품을 구입하였다. 가수분해도 측정을 위해 사용된 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS)는 G-Bio-Sciences 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, sodium dodecyl sulfate(SDS)는 Wako Chemical사(Osaka, Japan)로부터 구입하였다. Tetramethylethylenediamine(TEMED), 30% acrylamide/bis solution 29:1은 Bio-Rad(Hercules, CA, USA)로부터 구입하였다. 그 밖의 언급이 없는 분석용 시약 및 유기용매는 모두 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2.2. 참치 가공부산물 단백질 가수분해물 및 추출물 제조

참치 가공부산물을 증류수에 현탁하여 4%(w/v)의 기질 용액으로 제조한 후, 90°C 에서 20분 동안 증탕시켜 자가 효소를 불활성화시켰다. 그 후 방냉하고 비효소균을 제외한 나머지 효소균들은 기질 대비 단백질 가수분해효소(alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain)를 각각 1%(w/w)의 효소가 되도록 첨가하여 55°C , 100 rpm에서 12시간 동안 가수분해하였고, 90°C 에서 20분간 가열하여 효소를 불활성화하였다. 방냉한 후 가수분해물을 $13,000 \times g$ 에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 상등

액은 저분자 펩타이드의 분리를 위해 cell strainer로 여과한 후 0.22 μm membrane filter(Steritop Threaded Bottle Top Filter 250 mL, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)를 이용하여 여과하여 단백가수분해물을 얻었다. 단백가수분해물을 72시간 동안 동결 건조하였으며 -20°C 의 동결고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 가수분해물의 수율은 가수분해물 제조에 사용한 참치 가공부산물 무게 대비 동결 건조한 단백가수분해물의 무게를 % (w/w) 로 나타내었다.

밀웜(갈색거저리 유충) 및 탈지 대두 단백가수분해물의 제조는 alcalase 단백질 가수분해효소를 이용하여 진행하였으며, 탈지 hemp seed 단백가수분해물 제조와 동일한 방법으로 진행하였다.

참치가공부산물 열수추출물은 분말 중량 10배 (w/v) 의 증류수를 첨가하여 80°C 에서 3시간씩 2회 반복 추출하였으며, 30% 주정 추출물은 분말 중량 10배 (w/v) 의 30% 주정을 첨가하여 25°C , 120 rpm에서 18시간씩 2회 반복 추출하였다. 추출물은 여과지(Whatman No. 3, Little Chalfont, England)로 여과 후 55°C 수욕상에서 회전식 감압농축기로 농축 후 동결 건조하여 -20°C 의 동결고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2.3. 단백질의 가수분해도 측정

효소제별 처리 시간에 따른 참치 가공부산물 단백가수분해물의 가수분해도 측정은 TNBS 방법을 이용하였다(Choi 등, 2013). 각 가수분해물은 13,000 $\times g$, 4°C , 10분 원심분리하여 상등액만 취하여 이용하였다. 100 mM Sodium bicarbonate(pH 8.5) 990 μL 와 1% TNBS 10 μL 를 혼합 (v/v) 하여 0.01% TNBS를 제조하였다. 0.01% TNBS 50 μL 와 효소제 처리 시간별 반응혼합액 100 μL 를 섞어 37°C 에서 2시간 반응시킨 후 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)와 1 N hydrogen chloride(1 N HCl)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그 후 microplate spectrophotometer (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 335 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 L-tyrosine으로 표준 곡선을 작성한 후, 시료의 가수분해도를 tyrosine 함량으로 환산하여 available amino group concentration

($\mu\text{g}/\text{mL}$)을 구하였다.

각 효소별 참치 가공부산물 단백가수분해물의 단백질 가수분해 특성을 확인하기 위하여, SDS-PAGE를 이용하여 가수분해물의 단백질 패턴을 측정하였다. SDS-PAGE는 Yoon 등(2023)의 방법에 따라 수행하였다. 각 가수분해물은 13,000 $\times g$, 4°C 에서 10분간 원심분리 후 얻은 상등액 24 μL 를 15% gel에 loading한 후 80 V로 2시간 전기영동하였다. 0.1% Coomassie brilliant blue를 사용하여 염색하고 10% acetic acid가 함유된 30% methanol로 탈색시켰다. 이때 결과는 Gel Logic 2200 PRO Imaging System (Carestream Health Inc., Rochester, NY, USA)을 이용하여 polyacrylamide gel을 스캐닝한 후 이미지로 영상화시켰다.

2.4. 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) radical 소거 활성 측정

ABTS radical 소거 활성 실험은 Yoon 등(2023)의 방법에 따라 측정하였으며, 소거 활성은 radical을 50% 저해시키는 데 필요한 농도를 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위하여 양성대조군으로 trolox를 사용하였으며, trolox를 사용하여 0-13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위에서 표준 곡선을 작성한 후 시료의 항산화 활성을 계산하여 trolox equivalent (TE; $\mu\text{g TE}/\text{mg}$)으로 나타내었다.

2.5. Hydrogen peroxide(H_2O_2) 소거 활성 측정

H_2O_2 소거 활성 측정은 Yoon 등(2023)의 방법에 따라 측정하였다. H_2O_2 소거 활성은 가수분해물이 H_2O_2 를 50% 감소시키는 데 필요한 농도를 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로 trolox를 사용하여 0-13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위에서 표준 곡선을 작성한 후 시료의 항산화 활성을 계산하여 trolox equivalent($\mu\text{g TE}/\text{mg}$)으로 나타내었다.

2.6. 2-Deoxy-D-ribose 산화법

2-Deoxy-D-ribose 산화 억제 활성은 Yoon 등(2023)의 방법에 따라 측정하였다. 2-Deoxy-D-ribose(10 mM), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mM), ethylene-diamine-tetraacetic

acid(EDTA; 10 mM) 용액을 각각 100 μ L 가한 반응 용액에 증류수에 희석한 일정 농도(250, 500, 1,000 μ g/mL) 시료 용액 100 μ L, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 500 μ L, 10 mM H₂O₂ 100 μ L를 가하여 최종 반응액이 1 mL가 되도록 혼합한 후 37°C에서 4시간 반응시켰다. 반응 용액 100 μ L에 10% trichloroacetic acid (TCA, w/v) 50 μ L를 가하여 반응을 정지시킨 후 1% thiobarbituric acid(TBA, w/v) 50 μ L를 가하여 95°C에서 10분간 반응시킨 후 냉각하여 100 μ L의 상등액을 microplate spectrophotometer를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 비교를 위하여 양성대조군으로 butylated hydroxyanisole(BHA)을 사용하였다.

2.7. Linoleic acid에 대한 산화 억제 활성 측정

Linoleic acid에 대한 산화 억제 활성은 Yoon 등(2023)의 방법에 따라 측정하였다. Absolute alcohol 1 mL, 5% linoleic acid 1 mL, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 2 mL와 시료 1 mL를 혼합한 후 40°C에서 100 rpm으로 진탕하며 하루 간격으로 thiobarbituric acid (TBA)를 측정하여 각 시료의 linoleic acid에 대한 산화 억제 활성을 측정하였다. 20% TCA(w/v) 100 μ L, 0.8% TBA(w/v) 100 μ L와 linoleic acid 반응기질 용액 50 μ L를 잘 혼합하여 95°C 이상에서 20분간 반응하였다. 반응 용액을 20°C, 1,850 \times g에서 15분간 원심분리하여 180 μ L의 상등액을 흡광도 532 nm에서 측정하였다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로서 trolox를 사용하였다.

2.8. 통계 분석

모든 데이터는 최소 3번 반복하여 평균과 표준편차 (mean \pm SD)로 나타내었으며, 통계 분석에는 SPSS Statistics 26(Statistical Package for the Social Science, Version 26.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)가 사용되었다. 또한, 그룹 간의 유의성 차이 검증에는 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 사용하였으며, Duncan’s multiple range test 방법을 통한 사후 검증을 시행하였다. 유의확률 (p-value)이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 효소별 단백질가수분해물의 제조 특성

총 5종(alcalase, flavourzyme, neutrase, bromelain 및 papain)의 효소를 이용하여 참치 가공부산물로부터 단백질가수분해물의 제조 특성을 조사하기 위해 우선 TNBS assay를 이용하여 처리 시간별로 available amino group의 농도를 측정함으로써 효소별 시간에 따른 가수분해도의 차이를 확인하였다. 단백질의 가수분해도에 비례하여 available amino group 농도가 증가하는데, 이는 가수분해도를 나타내는 지표가 될 수 있다(Choi 등, 2013). 효소별로 시간에 따른 가수분해도를 tyrosine 함량으로 환산하여 나타낸 결과, 12시간 반응 후 available amino group의 농도는 alcalase군 3.44 mg/mL, flavourzyme군 3.26 mg/mL, neutrase군 2.99 mg/mL, bromelain군 2.88 mg/mL, papain군 1.64 mg/mL, 비효소군 1.33 mg/mL로 각각 확인되었다(Fig. 1). Alcalase군, bromelain군, neutrase군은 0-24시간 동안 available amino group 농도가 조금씩 증가하였으며, flavourzyme군의 경우 12시간 이후부터 그 증가 폭이 현저히 감소하는 경향을 보였다. 한편, papain군의 경우 24시간 처리에도 불구하고 가수분해도의 유의한 증가를 보이지 않았으며, 높은 가수분해도를 나타낸 효소군들의 경우 8시간 또는 12시간이 경과한 시점의 available amino group 농도가 24시간 동안 가수분해한 결과와 유

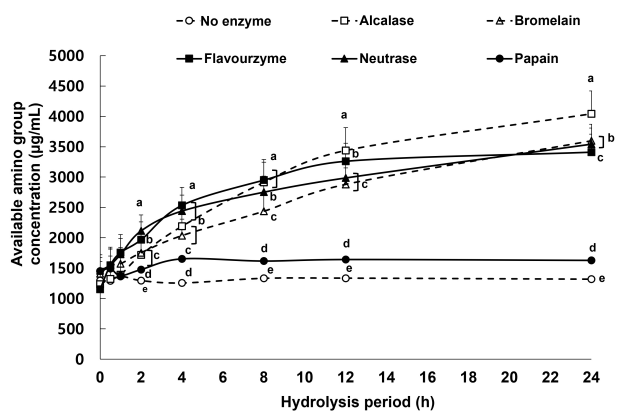


Fig. 1. Degree of hydrolysis of tuna byproducts by five different proteases at 55°C on TNBS assay. Each value is mean \pm SD (n \geq 3) and different superscripts (a-e) are significantly different at p<0.05 by Duncan’s multiple range test.

의적인 차이가 크지 않은 것으로 보아 8-12시간이 적절한 효소 처리 시간임을 알 수 있었다.

Je 등(2009)은 참치 가공부산물인 참치 간을 8시간 동안 효소적 가수분해하였을 때, alcalase, flavourzyme, neutrase 중 flavourzyme이 가장 높은 가수분해율을 보였다고 보고하였다. 본 연구 또한 8시간 경과하였을 때, available amino group의 농도가 flavourzyme군 2.95 mg/mL로 가수분해도가 가장 높았으며, alcalase군 2.91 mg/mL, neutrase군 2.75 mg/mL, bromelain군 2.44 mg/mL, papain군 1.62 mg/mL, 비효소군 1.33 mg/mL 순으로 나타났다. 참치 가공부산물의 8-12시간 가수분해도를 비교하였을 때 papain군과 비효소군을 제외한 나머지 효소군의 가수분해도가 증가한 것으로 보아 12시간을 최적의 효소 처리 시간으로 판단하였다.

12시간 동안 가수분해를 진행한 효소별 참치가공부산물 단백질가수분해물의 분자량 분포를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과, 비효소군의 분자량 분포와 비교하였을 때 효소군의 경우 전반적으로 10 kDa 이상의 단백질은 거의 나타나지 않고 10 kDa 이하로 분해된 것을 확인할 수 있다 (Fig. 2). 이는 TNBS assay 결과와 유사하게 12시간 효소 처리 후 단백질의 가수분해가 충분하게 이루어졌으며, alcalase가 다른 효소에 비해 상대적으로 가수분해 효율이

우수함을 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구는 TNBS assay 및 SDS-PAGE 결과를 바탕으로 가수분해 시간을 12시간으로 설정하고, 참치가공 부산물을 각각의 효소로 가수분해하였다. 이때 각 단백질가수분해물의 제조 수율을 측정된 결과는 Table 1과 같다. Alcalase를 이용한 단백질가수분해물의 수율이 15.15%로 가장 높았으며, bromelain군 14.48%, neutrase군 12.13%, flavourzyme군 8.87%, papain군 4.70%, 비효소군 3.15% 순으로 나타나 TNBS assay 결과와 유사한 경향임을 알 수 있었다. 동물성 및 식물성 유래의 다양한 단백질 원료를 대상으로 가수분해물을 제조한 선행연구 결과 (Yoon 등, 2023; Yu 등, 2017)에 따르면 단백질가수분해물의 제조 수율이 낮게는 20% 이상에서 높게는 40% 이상을 보였던 반면, 참치 가공부산물의 경우 단백질가수분해물의 제조 수율이 상대적으로 낮은 것을 확인할 수 있으며, 이는 본 연구에 사용된 참치 가공부산물이 오랜 시간 훈제 및 가열 과정에 의해 단백질이 과변성되어(Song 등, 2011) 가수분해에 부정적 영향을 끼친 것으로 생각된다.

3.2. Reactive oxygen species(ROS) 소거 활성

ABTS와 potassium persulfate의 반응에 의해 생성된 ABTS⁺ free radical에 대한 각 단백질가수분해물의 소거 활성을 측정하였다. ABTS radical에 대한 RC₅₀값은 flavourzyme군 77.29 μg/mL, alcalase군 83.70 μg/mL, bromelain군 88.43 μg/mL, neutrase군 89.57 μg/mL, papain군 155.96 μg/mL, 비효소군 180.97 μg/mL로 나타나 papain

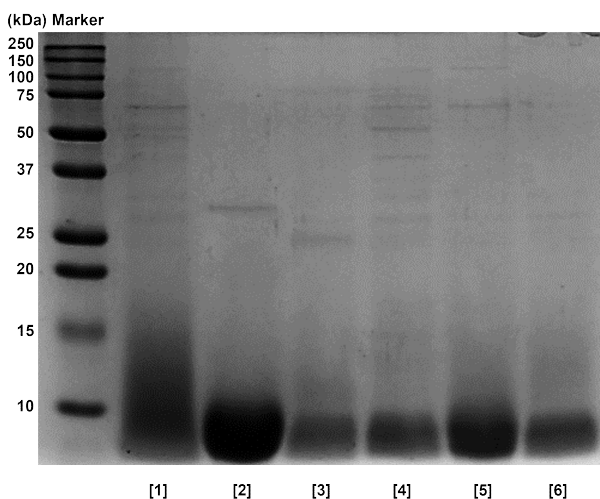


Fig. 2. SDS-PAGE profile of tuna byproduct hydrolysates. SDS-PAGE gel (15%) was used. Lane [1]: no-enzyme; Lane [2]: bromelain; Lane [3]: papain; Lane [4]: alcalase; Lane [5]: flavourzyme; Lane [6]: neutrase.

Table 1. The yield of tuna byproducts with different proteases

Hydrolysates	Yields of protein hydrolysates (%) ¹⁾
No enzyme	3.15±0.00 ^{e2)}
Alcalase	15.15±0.01 ^a
Bromelain	14.48±0.03 ^{ab}
Flavourzyme	8.87±0.00 ^c
Neutrase	12.13±0.01 ^b
Papain	4.70±0.00 ^d

¹⁾Yields (%) = [Total solid content of protein hydrolysate - total solid content of blank (without substrate)] / total substrate content × 100.

²⁾Each value is mean±SD (n=3) and different superscripts (a-e) are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

을 제외한 모든 효소군에서 비효소군 대비 우수한 ABTS radical 소거 활성을 보였다(Table 2). 그 중 flavourzyme 군의 RC₅₀값이 타 효소군들에 비해 큰 차이는 아니지만 유의적으로 낮은 값을 보여 flavourzyme 단백질가수분해물의 ABTS radical 소거 활성이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

H₂O₂는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 하나로 대사 과정에서 많이 생성되어 DNA 손상, 세포 내 단백질 변성, 세포막 산화 등을 통해 생체 기능 저하, 노화, 성인병 등을 유발하는 주범으로 작용하며, 따라서 H₂O₂ 소거 활성은 항산화제의 기능을 평가하기 위한 유용한 방법 중 하나이다(Lee 등, 2010; Yu 등, 2017). 효소별 참치 가공부산물 단백질가수분해물의 H₂O₂ 소거능을 RC₅₀값으로 나타낸 결과, flavourzyme군 65.96 µg/mL, neutrase군 107.50 µg/mL, bromelain군 109.89 µg/mL, alcalase군 116.38 µg/mL, papain군 159.67 µg/mL, 비효소군 315.54 µg/mL로 나타나 효소군이 비효소군 대비 유의적으로 높은 H₂O₂ 소거 활성을 보였다(Table 3). 특히 flavourzyme 단백질가수분해물 경우 타 효소군에 비해 월등히 낮은 RC₅₀ 값을 보여 H₂O₂ 소거 활성이 가장 높은 것으로 확인되었다. TEAC값 또한 flavourzyme군이 가장 높았으며, 비효소군 대비 flavourzyme 단백질가수분해물의 RC₅₀값과 TEAC값 모두 5배 이상 차이를 보였다.

Table 2. ABTS⁺ radical scavenging activity of tuna byproducts with different proteases

Hydrolysates	RC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	TEAC (µg TE/mg) ²⁾
No enzyme	180.97±2.78 ^{e3)}	31.13±0.43 ^d
Alcalase	83.70±0.77 ^b	66.05±0.34 ^a
Bromelain	88.43±1.01 ^c	62.85±1.11 ^b
Flavourzyme	77.29±0.40 ^a	65.77±0.14 ^a
Neutrase	89.57±1.30 ^c	63.26±0.25 ^b
Papain	155.96±2.73 ^d	33.91±0.02 ^c
Trolox	6.36±0.12	

¹⁾Concentration required for 50% reduction of ABTS⁺ at 1 min after starting the reaction.

²⁾Trolox equivalent antioxidant capacity.

³⁾Each value is mean±SD (n≥3). Different superscripts (a-e) in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3. Hydrogen peroxide radical scavenging activities of tuna byproducts with different proteases

Hydrolysates	RC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	TEAC (µg TE/mg) ²⁾
No enzyme	315.54±5.24 ^{e3)}	13.75±0.08 ^e
Alcalase	116.38±1.81 ^c	39.48±0.15 ^b
Bromelain	109.89±2.09 ^{bc}	36.26±2.84 ^c
Flavourzyme	65.96±0.99 ^a	61.81±0.62 ^a
Neutrase	107.50±5.30 ^b	38.76±2.21 ^{bc}
Papain	159.67±5.27 ^d	28.81±1.96 ^d
Trolox	5.06±0.03	

¹⁾Concentration required for 50% reduction of H₂O₂ at 10 min after starting the reaction.

²⁾Trolox equivalent antioxidant capacity.

³⁾Each value is mean±SD (n≥3). Different superscripts (a-e) in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

3.3. 2-Deoxy-D-ribose 산화 억제 활성

2-Deoxy-D-ribose 산화 억제 활성 측정 실험은 H₂O₂와 Fe²⁺의 반응으로 생성된 hydroxyl radical에 의해 생성되는 2-deoxy-D-ribose의 산화물인 malondialdehyde의 양을 측정함으로써 항산화 활성을 측정하는 방법이다(Lee 등, 2005; Mayank 등, 2014).

각 시료의 농도별 2-deoxy-D-ribose 산화 억제율을 양성대조군인 BHA(50 µM)의 억제 활성과 함께 나타낸 결과는 Fig. 3과 같다. 모든 단백질가수분해물이 비효소군에 비해 처리 농도가 증가함에 따라 유의적으로 높은 산화 억제율을 보였다. 특히 flavourzyme군의 경우 상기 실행한 두 가지

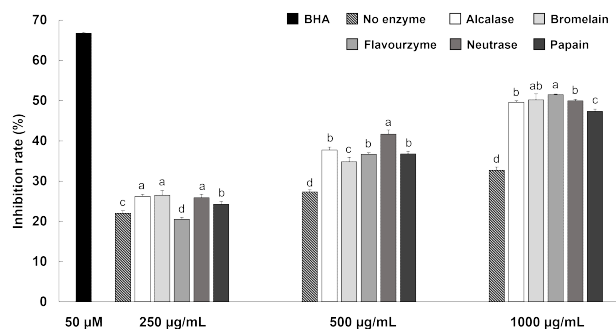


Fig. 3. 2-Deoxy-D-ribose inhibitory effects of BHA and tuna byproduct hydrolysates with different proteases. Each value is mean±SD (n≥3) and different superscripts (a-d) at the same concentration are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

ROS 소거 실험 결과와 같이 다른 효소군에 비해 250-500 $\mu\text{g/mL}$ 농도 구간에서 산화 억제율이 높았음을 확인할 수 있다. 위 결과들로부터 효소군이 비효소군에 비해 hydroxyl radical에 의한 산화를 효과적으로 저해함을 알 수 있으며, 단백가수분해물의 처리 농도가 높아짐에 따라 산화 억제율이 유의적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 상기 두 가지 ROS 소거 실험 결과 papain군이 다른 효소군에 비해 항산화 활성이 낮았으나 본 실험에서는 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도 구간에서 neutrase군, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도 구간에서는 bromelain군보다 높은 산화 억제율을 보였다. 이는 효소별 가수분해로 인해 생성되는 펩타이드 및 아미노산이 다르며 이로 인해 항산화 실험에 따른 항산화 효과가 차이를 나타내는 것으로 생각된다.

3.4. 지질 과산화 억제 활성

앞선 ROS 소거 활성 실험들에서 가장 우수한 활성을 보였던 flavourzyme 단백가수분해물을 이용하여 지질 과산화 억제 활성을 조사하였으며, 과산화물 생성량은 Yu 등 (2017)의 방법에 따라 TBA가 측정을 통해 확인하였다. 즉 불포화 지방산인 linoleic acid의 과산화로 생성되는 malonaldehyde와 같은 저분자 활성 화합물이 TBA와 결합하여 적색의 화합물을 형성하는 원리를 이용하여 지질 과산화물 생성 억제 활성을 측정하였다.

Flavourzyme 단백가수분해물(TPF; 100 $\mu\text{g/mL}$)의 linoleic acid에 대한 산화 억제 활성은 양성대조군인 trolox(2 $\mu\text{g/mL}$) 및 비효소군과 비교하여 시간별로 확인하였으며, 반응 시간에 따른 흡광도 변화율은 Fig. 4와 같다. Linoleic acid는 반응 3일째를 시작으로 4일째부터 급격한 지질 과산화가 진행되었으며, trolox를 비롯하여 모든 시료 처리군이 반응 5일째까지 유의적인 지질 과산화 억제 활성을 나타내었다. 한편, 반응 6일째에는 TPF와 trolox의 경우 대조군 대비 다소 낮은 과산화물 생성량을 보였지만 통계학적 유의성은 관찰되지 않아 모든 처리군이 과산화 억제 활성을 보이지 않았다. 반응 5일째부터 지질 과산화 억제 활성이 낮아졌으나 TPF와 비효소군을 비교하였을 때 TPF의 지질 과산화 억제 활성이 높은 것으로 보아 앞선 다양한 항산화 실험에서 나타난 결과들과 상응하는 양상임을 알 수 있었다.

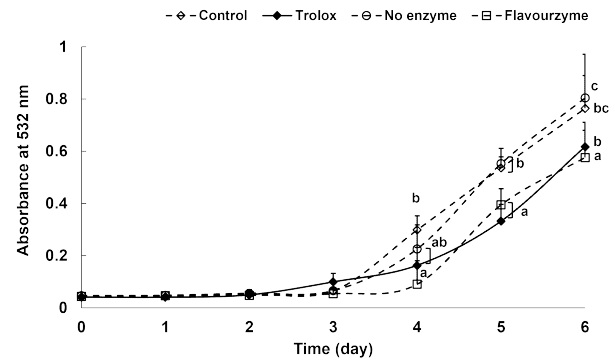


Fig. 4. Inhibitory effects of trolox and TPF on linoleic acid peroxidation. Each value is mean \pm SD ($n \geq 3$) and different superscripts (a-c) at the same day are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3.5. 다양한 단백가수분해물과 참치 가공부산물 flavourzyme 단백가수분해물의 항산화 활성 비교

앞선 실험에서 우수한 항산화 활성을 보인 TPF를 이용하여 참치 가공부산물로부터 제조한 추출물(열수 추출물 및 30% 주정 추출물)과 항산화 활성을 비교하였다. ABTS radical 소거 활성의 경우 동일한 처리 농도(100 $\mu\text{g/mL}$)에서 TPF 56.71%, 열수 추출물 처리군 21.93%, 30% 주정 추출물 처리군 9.44%로 나타났으며, H_2O_2 소거 활성의 경우 TPF 57.97%, 열수 추출물 처리군 21.45%, 30% 주정 처리군 22.85%로 나타났다(Fig. 5). 이 결과들로 볼 때 참치 가공부산물의 단순한 추출물에 비해 단백가수분해물의 항산화 활성이 우수한 것을 확인할 수 있으며, 이는 가수분해물 제조 시 생성되는 다양한 종류의 저분자 펩타이드들이 가지는 항산화 활성에 기인하는 것으로 판단된다.

또한 선행연구(Castro와 Sato, 2015; Yu 등, 2017)에서 우수한 항산화 활성이 보고된 밀웜(갈색거저리 유충) 및 탈지 대두 유래 단백가수분해물과의 항산화 활성도 함께 비교하였다. 밀웜과 탈지 대두는 선행연구에서 가장 높은 항산화 활성을 보였던 alcalase를 이용하여 단백가수분해물을 제조하였으며, 이들과 TPF의 항산화 활성을 동일한 처리 농도(100 $\mu\text{g/mL}$)로 비교한 결과, 밀웜 alcalase 단백가수분해물은 TPF와 유사한 ROS 소거 활성을 보인 반면 탈지 대두 alcalase 단백가수분해물의 경우 TPF에 비해 유의적으로 낮은 활성을 보였다(Fig. 5).

본 연구는 참치 가공부산물 단백가수분해물 제조를 위한

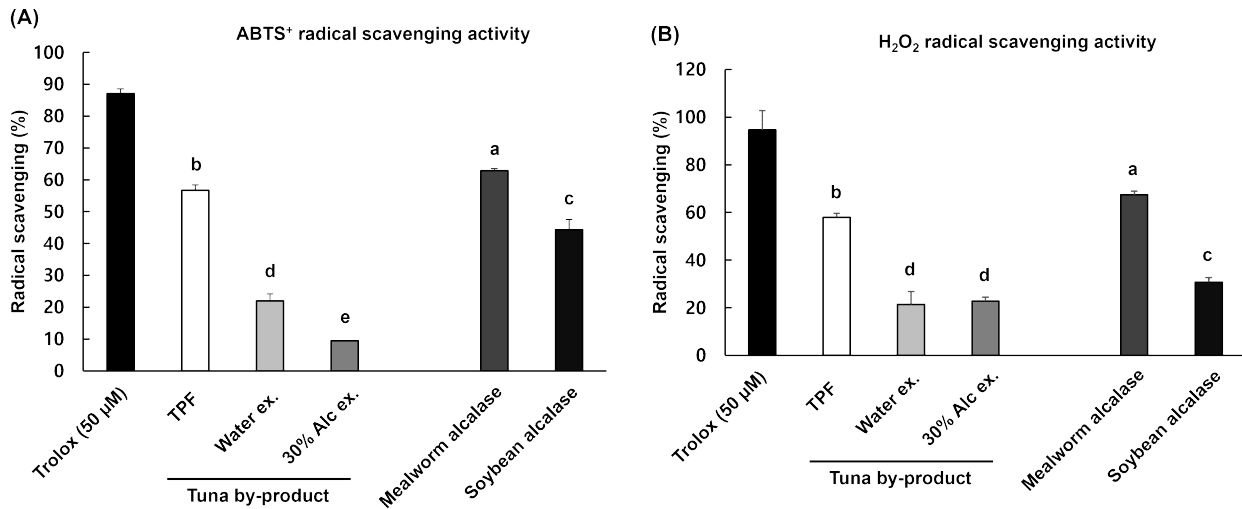


Fig. 5. Comparison of antioxidant activities of TPF and other natural antioxidants. Each value is mean±SD (n≥3) and different superscripts (a-e) at the same concentration are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

최적의 효소제를 선발하였으며, 단백가수분해물의 항산화 활성을 확인하였다. 활성산소 중 radical 소거 활성 실험인 ABTS radical 소거 활성과 비radical 소거 활성 실험인 H₂O₂ 소거 활성에서 flavourzyme군이 가장 높은 소거 활성을 보였다. 또한, DNA의 기본 구성 요소인 2-deoxy-D-ribose hydroxyl radical에 의한 산화를 단백가수분해물이 억제하는지 확인하기 위하여, 2-Deoxy-D-ribose 산화 억제 활성 평가를 진행한 결과, ROS 소거 활성 평가와 같이 다른 효소군과 비교하였을 때, flavourzyme군이 250-500 µg/mL 농도 구간에서 높은 산화 억제율을 보였다. TPF는 지질 과산화 억제 활성 실험의 반응 5일째에서 비효소군과 비교하였을 때 유의적인 억제 활성을 보였으며, 다른 식용 소재 유래의 단백가수분해물들과 항산화 활성 비교에서 유사하거나 우수한 항산화 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이를 통해 새로운 천연 항산화 소재로서 참치 가공부산물의 높은 활용 가치를 확인할 수 있었다.

4. 요약

본 연구에서는 참치 부산물을 활용한 항산화 신소재 개발의 가능성을 탐색하기 위해 부산물을 이용한 단백가수분해물 제조 및 항산화 활성을 평가하였다. 5종의 단백질 분해

효소(alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase 및 papain)를 이용한 단백가수분해물 제조 시 12시간을 최적의 가수분해 시간으로 선정하였으며, 특히 alcalase, flavourzyme, neutrase의 가수분해도가 높게 나타났다. 이를 각 가수분해물의 수율과 비교하였을 때 유사한 경향임을 확인하였다. 각 효소제를 12시간 처리하여 제조한 단백가수분해물의 항산화 활성을 비교한 결과, TPF가 다른 가수분해물에 비해 유의적으로 높은 ROS(ABTS radical 및 H₂O₂) 소거 활성을 보이는 것으로 확인되었다. 또한 TPF는 hydroxyl radical에 의한 2-deoxy-D-ribose의 산화 및 linoleic acid의 과산화에 대해서도 우수한 억제 활성을 나타내었으며, 참치 가공부산물로부터 제조한 추출물, 밀웜 단백가수분해물 및 대두 단백가수분해물과의 ROS 소거 활성 비교 실험에서도 TPF가 상대적으로 우수한 활성을 보였다. 본 연구를 통해 참치 가공부산물을 이용한 항산화 소재 개발 가능성을 확인할 수 있었으며, 본 연구 결과들은 수산 가공부산물을 이용한 신규 생리활성 소재 개발용 기초연구 자료로 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

Acknowledgements

본 연구는 교육부 대학혁신지원사업 K-Cloud College의 지원으로 수행되었다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Lee SO. Methodology: Park GH, Lee JM, Lim NY. Formal analysis: Park GH, Lee JM, Lim NY. Validation: Park GH, Lee JM, Lim NY, Lee SO. Writing - original draft: Park GH, Lee JM, Lim NY. Writing - review & editing: Lee SO.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Gyu-Hyeon Park (First author)

<https://orcid.org/0009-0005-4116-8015>

Jeong-Min Lee (First author)

<https://orcid.org/0009-0009-6976-4432>

Na-Young Lim

<https://orcid.org/0009-0002-2284-969X>

Syng-Ook Lee (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0002-8958-8634>

References

- Ahn S, Lee WK, Jang D, Kang DH. Current status and evaluation of fisheries by-products: Major options to marine bioindustrial application. *Ocean Polar Res*, 43, 149-164 (2021)
- Castro RJS de, Sato HH. Synergistic actions of proteolytic enzymes for production of soy protein hydrolysates with antioxidant activities: An approach based on enzymes specificities. *Biocatal Agric Biotechnol*, 4, 694-702 (2015)
- Cheng ML, Wang HC, Hsu KC, Hwang JS. Anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysates of tuna cooking juice. *Food Agric Immunol*, 26, 770-781 (2015)
- Choi DW, Kim NH, Song KB. Isolation of iron-binding peptides from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed protein hydrolysates. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 42, 1162-1166 (2013)
- Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotech Bioch*, 61, 118-123 (1997)
- Gangwar M, Gautam MK, Sharma AK, Tripathi YB, Goel RK, Nath G. Antioxidant capacity and radical scavenging effect of polyphenol rich *Mallotus philippensis* fruit extract on human erythrocytes: An *in vitro* study. *Sci World J*, 2014, 1-12 (2014)
- Gonzalez-Serrano DJ, Hadidi M, Varcheh M, Zarei Jelyani A, Moreno A, Lorenzo JM. Bioactive peptide fractions from collagen hydrolysate of common carp fish byproduct: Antioxidant and functional properties. *Antioxidants*, 11, 509 (2022)
- Jang JT, Seo WH, Baek HH. Enzymatic hydrolysis optimization of a snow crab processing by-product. *Korean J Food Sci Technol*, 41, 622-627 (2009)
- Je JY, Lee KH, Lee MH, Ahn CB. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Res Int*, 42, 1266-1272 (2009)
- Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR, Ahn NK, Choi YU, Bae NY, Park JH, Ahn DH. Anti-atopic activity of tuna heart ethanol extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 44, 1-6 (2015)
- Kang CH, Jung HY, Lee DH, Park JK, Ha JU, Lee SC, Hwang YI. Analysis of chemical compounds on tuna processing by-products. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 29, 981-986 (2000)
- Kim EB, Kim DW, Choi HS, Kim YH, Kim MK. Preparation of β -aminoisobutyric acid and branched chain amino acid-enhanced hydrolysates from chicken breast: Effect of protease types and hydrolysis conditions. *Korean J Food Preserv*, 29, 276-291 (2022)

- Kim EJ, Cha YJ. Development of functional seasoning agents from Skipjack processing by-product with commercial proteases 2. Flavor compounds in powdered Skipjack hydrolysate. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 25, 617-626 (1996)
- Kim HY, Lee GO, Shin J, Kim CE, Kang GH, Kim SH, Kang HW, Lee HS, Kim JY. Validation of an analytical method for the quantification of a marker compound and determination of its biological activities in skate skin collagen peptides. *Korean J Food Preserv*, 29, 1174-1188 (2022)
- Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Cho YJ, Ahn DH. Anti-inflammatory effect of water extract from tuna heart on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *KSBB J*, 30, 326-331 (2015)
- Kim SH, Shin J, Kim HJ, Kim JH, Yang JY. Purification and characterization of fish oil obtained from hydrolysates of mackerel (*Scomber japonicus*) by-products. *J Life Sci*, 26, 1049-1055 (2016)
- Kim SW, Gal SW, Chi WJ, Bang WY, Park SJ, Kim TW, Bang KH. Antioxidant properties of peptides extracted from *Tenebrio molitor* Larvae. *J Life Sci*, 33, 383-390 (2023)
- Lee HS, Kim HJ, Choi JI, Kim JH, Kim JG, Chun BS, Ahn DH, Chung YJ, Kim YJ, Byun MW, Lee JW. Antioxidant activity of the ethanol extract from cooking drips of *Thunnus thynnus* by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37, 810-814 (2008)
- Lee KH, Senevirathne M, Ahn CB, Je JY. Biological compounds extracted from *Codium fragile* by enzymatic hydrolysis and their biological activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39, 953-959 (2010)
- Moh SH, Jung DH, Kim HS, Cho MJ, Seo HH, Kim SJ. Characteristics and applications of bioactive peptides in skin care. *KSBB J*, 26, 483-490 (2011)
- Ozon B, Cotabarren J, Valicenti T, Parisi MG, Obregon WD. Chia expeller: A promising source of antioxidant, antihypertensive and antithrombotic peptides produced by enzymatic hydrolysis with alcalase and flavourzyme. *Food Chem*, 380, 132185 (2022)
- Park BY, Yoon KY. Biological activity of enzymatic hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions from perilla seed meal protein. *Czech J Food Sci*, 37, 180-185 (2019)
- Park SY, Je JY, Ahn CB. Protein hydrolysates and ultrafiltration fractions obtained from krill (*Euphausia superba*): Nutritional, functional, antioxidant, and ACE-inhibitory characterization. *J Aquat Food Prod Technol*, 25, 1266-1277 (2016)
- Park YE, Gwak YJ, Kim J, Guan Y, Hong WH, Park SJ, Yoon NY, Kim YK, Han SK, Chun J. Analysis of A and E vitamer profiles in domestic raw and processed seafood consumed in Korea. *Korean J Food Preserv*, 28, 926-936 (2021)
- Pihlanto-Leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol*, 11, 347-356 (2000)
- Song R, Wei R, Zhang B, Yang Z, Wang D. Antioxidant and antiproliferative activities of heated sterilized pepsin hydrolysate derived from half-fin anchovy (*Setipinna taty*). *Mar Drugs*, 9, 1142-1156 (2011)
- Suwanangul S, Aluko RE, Sangsawad P, Kreungnernd D, Ruttarattamongkol K. Antioxidant and enzyme inhibitory properties of sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) protein hydrolysate and its peptide fractions. *J Food Biochem*, 46, e14464 (2022)
- Yoon HJ, Park GH, Lee YR, Lee JM, Ahn HL, Lee SO. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *Korean J Food Preserv*, 30, 434-445 (2023)
- Yu JS, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Kang TS, Jeong

HS. ACE inhibitory and antioxidative activities of silkworm larvae (*Bombyx mori*) hydrolysate. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 136-140 (2008)
Yu MH, Lee HS, Cho HR, Lee SO. Enzymatic

preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Tenebrio molitor* Larvae (Mealworm). J Korean Soc Food Sci Nutr, 46, 435-441 (2017)