유단백질 가수분해에 의해 생성된 저분자 Peptides의 항산화 활성

우성호 · 주진우 · 김거유*

강원대학교 동물생명과학대학 동물식품응용과학과

Antioxidant Activity of Low Molecular Peptides Derived from Milk Protein

Sung-Ho Woo, Jin-Woo Jhoo, and Gur-Yoo Kim*

Department of Animal Products and Food Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

The principal objective of the current study was to prepare low molecular weight peptides from milk proteins using enzymatic hydrolysis techniques, in an effort to assess the antioxidant activity of these peptides. The casein and whey proteins isolated from fresh milk were treated with several proteolytic enzymes, such as chymotrypsin, pepsin, and trypsin and the resulting low molecular weight peptides were collected by TCA precipitation. Their identity was confirmed by SDS-PAGE analysis. The hydrolysis experiments indicated that whey protein treated with chymotrypsin displayed the highest degree of protein hydrolysis. The antioxidant activity of milk protein hydrolysates was determined by measuring the ABTS-radical scavenging activity. The results of these experiments showed that hydrolysis of the milk protein was effective in increasing their antioxidant activities. Especially, the tryptic digested casein displayed the highest radical scavenging activity (80.7%). The hydrolyzed low molecular weight milk protein was isolated using an ultrafiltration membrane. The casein hydrolysate passed through a membrane with molecular weight cut-off (MWCO) of 3 kDa displayed the strongest antioxidant activity.

Key words : Antioxidative peptide, Enzymatic hydrolysate, Milk protein

서 론

고등 동물의 생명 유지에 있어 필수성분 중의 하나인 산소는 전자전달계의 최종 전자수용체가 되며, 체내의 각종 대사과정에도 관여하고, 대사과정 중에 독성효과를 나타낼 수 있는 물질, 즉 superoxide anion($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical($\cdot OH$), peroxy radical($ROO\cdot$), alkoxyl radical($RO\cdot$) 등의 불안정한 유리라디칼을 생성한다고 알려져 있다(Fridovich, 1975). 유리라디칼은 *in vivo*에서 생명체의 정상적인 대사과정에서 끊임없이 생성되는 성분으로 대식세포의 살균작용, 정보전달 및 오래된 단백질 제거 등에 이용되는 필수적인 물질이다.

유리라디칼은 생체내에서 적정량이 생성되어야 하나, 그 생성량이 방어기작을 벗어나게 되면, 일시적 혹은 영구적인 세포손상을 줄 수 있다. 또한 금속이온의 존재 하에서 유리라디칼의 생체 손상능력은 더욱 더 증가하는데

(Asbeck, 1990), 동맥경화(atherosclerosis), 암(cancer), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 염증(inflammation) 등의 질환과도 깊은 관련이 있다고 보고되고 있다(Halliwell *et al.*, 1989; Pace and Leaf, 1995). 생체내의 유리라디칼에 대한 방어기작은 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathion peroxidase(GPX), glutathion-S-transferase(GST)와 같은 효소들과 저분자량의 항산화제인 glutathion(GSH), ascorbate, β -carotene, transferrin, vitamin E, ceruloplasmin 등이 담당한다(Halliwell, 1990). 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소분해하여 얻어진 펩타이드에서도 항산화 활성이 나타나는 것으로 보고되어 있는데, Yamaguchi 등(1979)은 대두단백질 및 우유 카제인 가수분해물, Suetsuna와 Osajima(1989)는 어육단백질의 가수분해물이 항산화 활성을 가진다고 보고하였다. Kunio 등(2000)은 pepsin에 의한 카제인 가수분해물로부터 합성된 펩타이드가 superoxide anion radical에 대하여 소거 활성을 나타낸다고 보고하였다.

In vitro 및 *in vivo*에서 항산화 활성을 검색하기 위한 방법으로 다양한 실험방법들이 이용되고 있다. 최근에는 안정한 양이온 라디칼의 chromatic 특성을 이용한 방법들이

*Corresponding author : Gur-Yoo Kim, Department of Animal Products and Food Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea. Tel: 82-33-250-8647, Fax: 82-33-251-7719, E-mail: gykim@kangwon.ac.kr

널리 이용되고 있다. Blois 등(1958)에 의해 소개된 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)법은 α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl 라디칼의 소거 특성을 이용한 것으로 가장 광범위하게 항산화 활성을 측정하기 위해 이용되는 방법이다. FRAP(ferric reducing/antioxidant power) 방법은 비교적 최근에 Benzie와 Strain(1996)에 의해 개발되어진 총항산화능을 측정하는 방법으로, 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)로 환원되는 것을 이용하여 측정한다. Miller 등(1993)에 의해 개발된 ABTS(2,2-azino-bis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid)) 라디칼을 이용한 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity)법도 총항산화능을 측정하는 방법으로 널리 이용되고 있다. 이들 방법들은 *in vivo*의 총항산화능 측정에만 이용되는 것이 아니라 식품자체의 항산화능을 비교하는 데에도 널리 사용되고 있고 많은 장점이 부각되고 있다.

우유 단백질 유래 펩타이드의 생리활성 기능에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있으나, 연구자에 따른 실험 조건, 사용된 효소, 생성된 펩타이드의 분자량 및 분석 방법에 따라 상이한 결과를 나타내고 있다. 따라서 동일한 분석 조건에서의 카제인과 유청단백질 유래 기능성 펩타이드의 항산화 활성에 대한 연구가 필요하다고 할 수 있다.

따라서 본 연구는 우유로부터 단백질을 분리 정제하여 효소처리에 의한 단백질 가수분해물과 한외여과막 장치를 이용하여 분리한 저분자 펩타이드의 항산화 활성을 ABTS법을 이용하여 측정함으로써 유단백질 유래 저분자 펩타이드의 항산화 활성의 특성을 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 시료는 홀스타인에서 착유한 신선한 혼합우유를 사용하였다. 가수분해 시 사용한 pepsin, trypsin, α -chymotrypsin 및 항산화 활성 측정을 위한 ABTS(2,2-azino-bis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid)), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)는 Sigma-Aldrich(USA)사에서 구입하여 사용하였으며, 기타 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

우유 단백질을 가수분해 시켜 분자량 별로 분획하기 위하여 한외여과막장치(Millipore Co., USA)를 사용하였으며, 사용된 막의 분자량 한계범위(Molecular Weight Cut-Off: MWCO)는 각각 3, 5 및 10 kDa이었다.

카제인 및 유청단백질의 분리

우유로부터 카제인의 분리는 Barrefors 등(1985)의 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 원유를 4°C에서 4,000 rpm으로 20분간 원심분리(J2-21, Beckman Instruments Inc. USA)하여 얻은 탈지유를 20°C에서 1 N HCl로 pH 4.6으로 조정한 후 4°C에서 10분간 20,000 rpm으로 원심분리하여 산카제인을 분리하였다. 분리된 산카제인은 증류수로 2회 세척한 후, 용해된 산카제인을 다시 1N HCl로 침전시킨 후 4°C에서 증류수로 72시간 투석 후 동결건조하여 실험에 이용하였다.

원유로부터 유청단백질의 분리는 Kee와 Hong(1997)의 방법을 이용하였다. 원유를 3,885 g로 4°C에서 20분간 원심분리하여 얻은 탈지유를 1 N HCl로 pH 4.6으로 조정해 단백질을 등전 침전시켰다. 침전된 단백질은 단백질의 침전을 촉진시키기 위하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 4°C에서 1시간 동안 정치시켰다. 침전된 단백질은 원심분리를 실시한 다음 여과지(No. 1, whatman International Ltd, England)로 여과하여 산성유청을 얻었다. 산성유청에 남아 있는 카제인 단백질의 제거를 위해서 1N NaOH로 pH를 7.5로 조정한 다음 1 N HCl로 pH를 4.6으로 다시 조정하여 4°C에서 20분간 20,000 rpm으로 원심분리를 실시하였다. 산성 유청은 완전 포화되도록 황산암모늄을 첨가하여 하룻밤 정치한 다음 원심분리(20,000 rpm, 4°C, 20 min)하여 침전물을 얻었으며, 여기에 증류수를 사용하여 침전물을 용해한 후, 염을 제거하기 위해 분자량 5,600 이상의 투석봉지를 이용하여 4°C 냉장온도에서 교반하면서 5회 이상 증류수를 교환해 주었다. 분리된 유청단백질은 동결건조하여 실험에 이용하였다.

유단백질의 가수분해

카제인과 유청단백질의 가수분해는 각 단백질을 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 용해시켜 1%(w/v) 기질용액으로 만든 다음 α -chymotrypsin, pepsin과 trypsin을 enzyme/substrate 비율이 1:100(w/v)이 되도록 첨가하여 각 효소별 최적 조건에서 반응시켰다(Table 1).

Table 1. Conditions for the hydrolysis of casein and whey protein treated with three different proteolytic enzymes

Enzyme	Buffer	E/S ratio ¹⁾	pH	Temp (°C)
α -Chymotrypsin	0.1 M potassium phosphate buffer	1/100	7.4	37°C
Trypsin	0.1 M potassium phosphate buffer	1/100	7.4	37°C
Pepsin	0.1 M potassium phosphate buffer	1/100	2.0	37°C

¹⁾E/S ratio=enzyme/substrate ratio

Pepsin에 의한 유단백질의 가수분해는 기질용액에 6N HCl용액을 넣어 pH를 2.0으로 조정하여 다음 증류수에 용해시킨 pepsin을 기질용액과 혼합하여 37°C에서 반응시킨 후 5 N NaOH로 pH를 7.4로 조절하여 반응을 종료시켜 pepsin 가수분해물을 획득하였다. Trypsin에 의한 유단백질의 가수분해는 Morato 등(2000)의 방법에 의하여 기질용액을 증류수에 용해시킨 trypsin과 혼합하여 37°C에서 가수분해하였다. 분해물은 95°C에서 10분간 열처리하여 반응을 종료시켜 trypsin 가수분해물을 획득하였다. α -Chymotrypsin에 의한 유단백질의 가수분해는 trypsin과 동일한 조건으로 처리하여 α -chymotrypsin 가수분해물을 획득하였다.

단백질의 가수분해도 측정

효소에 의한 단백질의 가수분해도는 α -chymotrypsin, pepsin과 trypsin 가수분해물에 20% trichloroacetic acid를 동량 첨가하여 원심분리(2,370 g, 5 min)한 다음 상층액을 일정량 취하여 Lowry법(1951)에 준하여 10% TCA 가용성 단백질량을 측정한 후, 다음 식으로부터 측정하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = \frac{10\% \text{ TCA 가용성 단백질량}}{\text{총단백질량}} \times 100$$

효소에 의한 유단백질의 가수분해 특성은 전기영동(SDS-PAGE)을 Laemmli법(1970)에 따라 실시하였다.

한외여과막을 이용한 유단백질의 분리

우유 단백질의 가수분해에 의한 분자량별 분획의 획득은 한외여과막장치를 사용하였다. 사용된 막의 MWCO는 각각 3, 5, 10 kDa이며 1%농도(w/v)의 유단백질 가수분해물을 filter device에 1 mL 넣은 후 3,800 g에서 40분간 원심분리 하여 분자 크기가 3 kDa, 5 kDa 및 10 kDa인 유단백질 분획물을 획득하여 실험에 이용하였다.

ABTS법에 의한 항산화 활성 측정

유단백질의 항산화 활성측정은 Re 등(1999)의 방법에 준하여 실시하였다. 7 mM ABTS 5 mL에 140 mM potassium persulfate($K_2S_2O_8$) 88 μ L를 첨가 후 암실에서 12시간 방치하여 ABTS stock solution을 제조하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)와 혼합하여 ABTS radical working solution을 제조하였다. ABTS radical working solution의 농도는 단백질 용액 1 mL와 ABTS radical working solution 1 mL를 혼합하였을 때 734 nm에서의 최초 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 조정하였다.

ABTS radical 소거활성 측정은 일정농도의 유단백질 시료 1 mL와 ABTS radical working solution 1 mL를 섞은 후 실온에서 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를

측정하여 다음 식에 의해 ABTS 라디칼 소거활성을 구하였다.

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

결과 및 고찰

유단백질의 가수분해

카제인과 유청단백질의 단백질 분해효소에 의한 최적의 가수분해 조건을 확립하고자 각 효소의 최적 반응 조건에서 16시간 동안 가수분해하여 가수분해도를 측정한 결과 반응시간이 경과함에 따라 유단백질의 가수분해도가 전반적으로 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). 유청단백질을 α -chymotrypsin 처리(WC) 하였을 때 효소반응 10분에 급격하게 가수분해되어 반응 8시간 이후 가수분해가 거의 진행되지 않았다. 전체 처리구들 중 WC의 가수분해도가 가장 높게 나타났으며, 유청단백질의 가수분해 시 pepsin(WP)에 의한 가수분해가 가장 낮게 나타났다. 카제인을 α -chymotrypsin 처리하였을 때(CC) 가수분해도가 가장 높았으나 반응 16시간에는 trypsin 처리구(CT)와 비슷한 가수분해도를 나타내었다. 카제인을 pepsin으로 처리 하였을 때(CP) 가수분해도가 가장 낮았다. 본 실험에서는 유단백질을 α -chymotrypsin으로 가수분해 하였을 때 가수분해도가 가장 높았으며, pepsin에 의한 가수분해는 trypsin 및 α -chymotrypsin에 비하여 매우 낮은 가수분해도를 보였다.

전반적으로 효소에 의한 가수분해도가 8시간 이후부터 큰 변화를 나타내지 않았기 때문에 본 실험에서는 최적 가수분해시간을 8시간으로 정하여(Fig. 2) 가수분해물의 항

Fig. 1. Effect of incubation time on the hydrolysis of casein and whey protein by α -chymotrypsin, pepsin and trypsin. Substrate concentration was 1%(w/v). CC, casein + α -chymotrypsin; WC, whey protein + α -chymotrypsin; CT, casein + trypsin; WT, whey protein + trypsin; CP, casein + pepsin; WP, whey protein + pepsin.

산화 활성을 측정하였다.

유단백질 가수분해물의 전기영동 특성

효소에 의한 유단백질의 가수분해 특성을 확인하고자 SDS-전기영동을 실시하였다(Fig. 3). Pepsin으로 카제인을 가수분해한 결과 카제인 단백질이 분해되어 밴드의 수가 증가하였으며, 분자량 20,000 이하의 저분자 단백질이 생성되어진 것을 확인할 수 있었다. Chymotrypsin 및 trypsin 처리하였을 때 카제인이 모두 분해가 되어 밴드가 나타나지 않았다. Pepsin에 의한 카제인의 가수분해는 chymotrypsin 및 trypsin보다 가수분해도가 낮다는 것을 확인하였으며,

Fig. 2. Effect on the hydrolysis of milk protein with α -chymotrypsin, pepsin and trypsin. Substrate concentration was 1% (w/v) and the incubation time was 8 h. CC, casein + α -chymotrypsin; WC, whey protein + α -chymotrypsin; CT, casein + trypsin; WT, whey protein + trypsin; CP, casein + pepsin; WP, whey protein + pepsin.

Fig. 3. SDS-PAGE patterns on 12.5% gel of casein hydrolysate by α -chymotrypsin, pepsin and trypsin for 8 h. Lane ①, Low molecular weight maker (Phosphorylase b : 97,000, albumin : 66,000, ovalbumin : 45,000, carbonic anhydrase : 30,000, trypsin inhibitor : 20,100, α -lactalbumin : 14,400). Lane ②, unhydrolyzed casein, Lane ③, casein + α -chymotrypsin, Lane ④, casein + pepsin, Lane ⑤, casein + trypsin. Sample concentration was 2.5 mg/mL.

Fig. 2의 pepsin에 의한 가수분해도가 가장 낮았던 결과와 일치하였다. 유청단백질 가수분해물의 전기영동 결과(Fig. 4), chymotrypsin 처리구의 유청단백질 분해가 가장 많이 이루어졌으며, pepsin 처리구의 분해가 가장 적게 이루어졌다. 가수분해도가 높을수록(Fig. 2) 생성되는 밴드의 수가 증가하였으며, 유청단백질을 chymotrypsin 처리하였을 때 락트알부민과 락토글로브린의 분해가 가장 많이 이루어진 것을 전기영동을 통하여 확인하였다.

카제인 및 유청단백질의 항산화 활성

Fig. 5는 농도에 따른 유단백질의 항산화 활성을 항산화 활성측정 지표로 이용되고 있는 vitamin E 유사체인 Trolox와 비교한 결과이다. 시료의 농도가 0.2 mg/mL 이하에서는 Trolox보다 약 2배 정도 높은 항산화 활성을 나타내었

Fig. 4. SDS-PAGE patterns on 12.5% gel of whey hydrolysate by α -chymotrypsin, Pepsin and trypsin for 8 h. Lane ①, Low molecular weight maker (Phosphorylase b : 97,000, albumin : 66,000, ovalbumin : 45,000, carbonic anhydrase : 30,000, trypsin inhibitor : 20,100, α -lactalbumin : 14,400). Lane ②, unhydrolyzed casein, Lane ③, casein + α -chymotrypsin, Lane ④, casein + pepsin, Lane ⑤, casein + trypsin. Sample concentration was 2.5 mg/mL.

Fig. 5. Antioxidant activity of Trolox, casein and whey at different concentrations.

으나, 농도가 높아질수록 항산화 활성이 점점 감소하여 0.6 mg/mL 이상의 농도에서는 Trolox보다 항산화 활성이 낮게 나타났다. 유청단백질도 농도가 높아질수록 항산화 활성이 낮아지는 경향을 나타내었다. Chen(2003) 등은 우유와 유청의 항산화 활성 측정 시 Trolox는 ABTS와 반응 후 농도에 비례하여 항산화 활성이 증가하였으나, 우유와 유청의 항산화 활성도는 농도가 증가할수록 점점 감소하여 농도에 따른 항산화 활성이 비례하여 증가하지 않는다고 하였다. 이러한 이유는 우유나 유청의 농도가 증가할수록 시료용액의 background 흡광도 값이 증가하여 총 흡광도 값에 영향을 주기 때문인 것으로 보고하였다.

유단백질 가수분해물의 항산화 활성

카제인과 유청단백질의 효소 가수분해물에 대한 항산화 활성을 측정하였다(Fig. 6). 카제인과 유청단백질 모두 가수분해 이후 모든 처리구의 항산화 활성이 증가하였으며, α -chymotrypsin 처리한 유청단백질은 항산화 활성이 7.4%에서 72.9%로 약 10배 증가하여 전체 처리구 중 항산화 활성 증가비율이 가장 높았다. 전반적으로 가수분해 이후 모든 유청단백질 처리구의 항산화 활성 증가비율은 카제인의 가수분해 후 항산화 활성 증가비율보다 높았다. 이것으로 보아 유단백질에 효소를 처리하여 가수분해하였을 시 항산화 활성의 상승비율은 유청단백질이 카제인 보다 우수한 결과를 나타내었다. 유단백질 가수분해에 의한 항산화 활성은 카제인을 trypsin 처리하였을 때 항산화 활성이 80.7%로 가장 높게 나타났으며, α -chymotrypsin 처리구의 가수분해도가 93.1%로(Fig. 2) 가장 높았던 결과와는 다르게, 가수분해도와 항산화 활성은 비례하지 않는 결과를 나타냈다. Park 등(2000)은 계란 노른자 단백질을 alcalase로 가수분해하였을 때 항산화 활성이 가장 높았으며, trypsin으로 가수분해하였을 경우보다 alcalase에 의해

가수분해도는 높았으나 항산화 활성은 낮다고 하였다. 이러한 결과는 가수분해도와 항산화 활성과는 상관관계가 없음을 보여주는 것으로 기질의 차이뿐만 아니라 각 효소가 기질에 작용하는 절단부위가 다르기 때문에 N말단 및 C말단에 위치하는 아미노산의 종류가 달라지므로 항산화 활성이 다르게 나타나는 것으로 판단된다고 보고하였다. Yamaguchi 등(1980)은 각종 dipeptide와 이를 구성하는 아미노산의 항산화성 비교에서 dipeptide를 구성하고 있는 아미노산 중 methionine, histidine, tryptophan, tyrosine이 강한 항산화 활성을 나타낼 때 이 아미노산들의 위치에 대해 Met과 His는 C-말단에, Trp과 Try는 N-말단에 위치할 때 그 효과가 상승한다고 보고하였다.

한외여과막을 이용하여 분획한 유단백질의 항산화 활성

한외여과막 장치를 이용하여 유단백질 가수분해물을 분자량 3, 5 및 10 kDa으로 분획하여 항산화 활성을 측정하였다(Fig. 7, 8). Chymotrypsin과 trypsin에 의한 카제인 3kDa 분획물의 항산화 활성이 각각 89.2%, 88.2%로 가장 우수하였고, 유청단백질은 분획전의 항산화 활성과 비교하여 chymotrypsin 처리구는 뚜렷한 차이가 없었으며, trypsin 처리구를 3 및 5 kDa으로 분획하였을 때 항산화 활성이 증가하였다. 전체적으로 카제인 가수분해물의 저분자 분획물이 유청단백질 분획물보다 항산화 활성이 높았다. Yamaguchi(1989)는 대두단백질 효소로 가수분해시킨 가수분해물 중에서 분자량 2.5-3 kDa 사이의 펩타이드가 항산화 활성이 가장 뛰어났다고 보고하였다. Anne(2006)은 우유에서 유래된 항산화 단백질들의 조성이 친수성 아미노산, proline, histidine, tyrosine과 tryptophan을 포함하는 5-11개의 아미노산으로 되어있을 때 항산화력이 높다는 연구 결과를 보고하였다. Gómez-Ruiz 등(2008)의 보고에서도 Ovine의 κ -casein 가수분해물을 RP-HPLC-MS/MS

Fig. 6. Antioxidant activity of hydrolyzed casein and whey. (E/S : 1/100), C, casein; CC, casein + α -chymotrypsin; CP, casein + pepsin; CT, casein + trypsin; W, whey; WC, whey + α -chymotrypsin; WP, whey + pepsin; WT, whey + trypsin. Protein concentration was 62.5 mg/mL.

Fig. 7. ABTS radical scavenging activity of hydrolysates of α -chymotrypsin, pepsin and trypsin from casein. Hydrolysates of casein passed through a membrane with molecular weight cut-off (MWCO) 3 kDa, 5 kDa and 10 kDa. Protein concentration was 50 $\pm$ 1.25 mg/mL.

Fig. 8. ABTS radical scavenging activity of hydrolysates of α -chymotrypsin, pepsin and trypsin from whey protein. Hydrolysates of whey protein passed through a membrane with molecular weight cut-off (MWCO) 3 kDa, 5 kDa and 10 kDa. Protein concentration was 50 ± 1.25 mg/mL.

로 확인결과 12개의 peptide 조성에서 항산화 활성을 갖는다고 보고하였다.

요 약

본 연구는 유단백질에 단백질 분해효소를 처리하여 가수분해 후 저분자 peptide를 ABTS법을 이용하여 항산화 활성을 측정하여 유단백질 유래 저분자 peptide의 항산화력을 측정하고자 하였다. Chymotrypsin 처리한 유청단백질의 가수분해도가 가장 높았으며, 유청단백질의 락트알부민 및 락토글로브린 분해되어 분자량 20 kDa 이하의 저분자 단백질이 생성된 것을 전기영동을 통하여 확인하였다. 유단백질의 농도에 따른 항산화 활성을 측정한 결과, 카제인의 항산화 활성이 유청단백질보다 높게 나타났다. 유단백질을 효소에 의하여 가수분해 시 항산화 활성이 증가하였으며, 카제인 가수분해물이 유청단백질 가수분해물과 비교하여 항산화 활성이 더 높았으나, 가수분해도와 항산화 활성도의 관계는 일치하지 않았다. Trypsin에 의한 카제인 가수분해 물의 항산화 활성이 80.7%로 가장 높았다. 본 연구에서는 chymotrypsin과 trypsin에 의한 분자량 3 kDa의 카제인 분획물의 항산화 활성이 가장 우수하였으며, 유청단백질을 trypsin으로 분해하였을 때 항산화 활성이 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 강원대학교 동물자원공동연구소의 일부 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Anne, P. (2006) Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* **16**, 1306-1314.
- Asbeck, B. S. V. (1990) Oxygen toxicity: Role of hydrogen peroxide and iron. *Adv. Exp. Med. Biol.* **264**, 235-246.
- Barrefors, P., Ekstrand, B., Fagersam, L., Larsson-Ranznikiewicz, M., Schaar, J., and Steffner, P. (1985) Fast protein liquid chromatography (FPLC) of bovine caseins. *Milchwissenschaft* **40**, 257.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Chen, J., Lindmark-Mansson, M., Gorton, L., and Akesson, B. (2003) Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *Int. Dairy J.* **13**, 927-935.
- Fridovich I. (1975) Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 147-159.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Lopez-Exposito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., and Recio I. (2008) Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Eur. Food Res. Technol.* **227**, 1061-1067.
- Halliwell, B. (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* **9**, 1-32.
- Halliwell, B. and Gutteridge J. M. C., eds. (1989) Free radicals in biology and medicine, 2nd ed., Clarendon Press. Oxford.
- Kee, H. J. and Hong, Y. H. (1997) Separation and purification of α -lactalbumin from whey protein concentrate. *Kor. J. Dairy Sci.* **19**, 131-140.
- Kunio, S., Hiroyuki, U., and Hiroto, O. (2000) Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.* **11**, 128-131.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage. *Nature* **227**, 680.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Miler, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., and Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sci.* **84**, 407-412.
- Morato, A. F., Carreira, R. L., Junqueira, R. G., and Silvestre, M. P. C. (2000) Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: Use of subtilisin and trypsin. *J. Food Compos. Anal.* **13**, 843-857.
- Pace, G. W. and Leaf, C. D. (1995) The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 523-528.
- Park, P. J., Jung, W. K., Choi, Y. I., Kim, S. K. (2000) Antioxidative effect of enzymatic protein hydrolysate from lecithin-free egg yolk. *Kor. J. Life Sci.* **10**, 131-139.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an

- improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
20. Suetsuna, K. and Osajima, K. (1989) Blood pressure reduction and vasolilatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine mucle, *Nippon shokuin Kogyo Gakkaish* **42**, 47-54.
21. Yamaguch, M. (1989) *New Food Industry* **31**, 18-21.
22. Yamaguchi, N., Naito, S., Yokoo, Y., and fujimaki, M. (1980) Application of protein hydrolyzate to biscuit as anti-oxidant. *J. Japan. Soc. Food Sci. Technol.* **27**, 56-59.
23. Yamaguchi, N., Yokoo, Y., and Fujimaki M. (1979) Antioxi-dative activities of protein hydrolysates. *Nippon shokuin Kogyo Gakkaish* **26**, 65-70.

(Received 2009.5.29/Revised 2009.8.3/Accepted 009.9.4)