



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사학위논문

항산화 활성 황다랑어(*Thunnus albacare*)

근육 가수분해물의 동정 및 응용



해양수산생명과학부 (생물공학전공)

정세영

공학석사학위논문

항산화 활성 황다랑어(*Thunnus albacare*)

근육 가수분해물의 동정 및 응용

지도교수 김 중 균

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함.

2023년 2월

부경대학교 대학원

해양수산생명과학부 (생물공학전공)

정 세 영

정세영의 공학석사 학위논문을 인준함.



위원장	공학박사	정귀택 (인)
위원	공학박사	이종민 (인)
위원	공학박사	김중균 (인)

목차

List of Tables and Figures	iv
Abstract	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 황다랑어 폐수 제조	6
2. 가수분해	7
2.1 미생물 가수분해	7
2.2 열산 가수분해	8
2.3 효소 가수분해	9
2.4 가수분해도 측정	10
2.4.1 Lowry 단백질 정량법	10
2.4.2 Trichloroacetic acid 침전법	11
3. 정제 및 동정	12
3.1 향산화 물질 추출	12
3.2 Molecular weight cut off	13
3.3 역상 액체 크로마토그래피	14
3.4 액체 크로마토그래피 고성능 혼합형 질량분석	15
4. 응용	17
4.1 식물독성 평가	17

4.2 수경재배	18
4.3 엽록소 및 carotenoids 농도	19
5. 항산화 활성	20
5.1 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 분석 ·	21
5.2 2, 2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABT S) 라디칼 양이온 탈색 분석	22
III. 결과 및 고찰	23
1. 황다랑어 폐수 가수분해	23
1.1 미생물 가수분해	24
1.2 열산 가수분해	26
1.3 효소 가수분해	28
2. 항산화 물질의 정제 및 동정	31
2.1 추출	31
2.2 Molecular weight cut off	32
2.3 역상 액체 크로마토그래피	34
2.4 액체 크로마토그래피 고성능 혼합형 질량분석	36
2.5 항산화 물질의 동정	38
2.6 Hexapeptide의 2차구조 예측	41
3. 식물재배로의 응용	43
3.1 식물 독성	43
3.2 참치 가수분해물의 액체비료 능력	45
3.3 정제된 참치 가수분해물의 액체비료 능력	47
3.4 성장률, 건강도 및 항산화 활성	49

IV. 결론 52

참고문헌 53



LIST OF TABLES AND FIGURES

Table 1. 미생물 가수분해물의 DH 및 항산화 활성	25
Table 2. 열산 가수분해물의 DH 및 항산화 활성	27
Table 3. 효소 가수분해물의 DH 및 항산화 활성	30
Table 4. 정제과정에 따른 분획 별 항산화 활성 비교	33
Table 5. 7일간 수경재배한 밀싹 잎의 성장률, 건강도 및 항산화 활성 ·	51
Fig. 1. < 2 kDa 분획의 RP-HPLC 결과	35
Fig. 2. F11 분획에 대한 Q-TOF MS 분석 결과	37
Fig. 3. peak 24의 MS/MS 스펙트럼(A)과 peak 24의 단편에서 추론된 항산화 펩타이드의 De novo sequencing(B)	40
Fig. 4. Hexapeptide의 예측된 2차 구조	42
Fig. 5. 참치 폐수원액과 참치 가수분해물의 독성평가 비교	44
Fig. 6. 50배 희석된 참치 폐수원액과 참치 가수분해물의 수경재배	46
Fig. 7. 아세톤 침전 후 MWCO 분획의 수경재배	48

Identification and application of antioxidant yellowfin tuna (*Thunnus albacare*) muscle hydrolysates

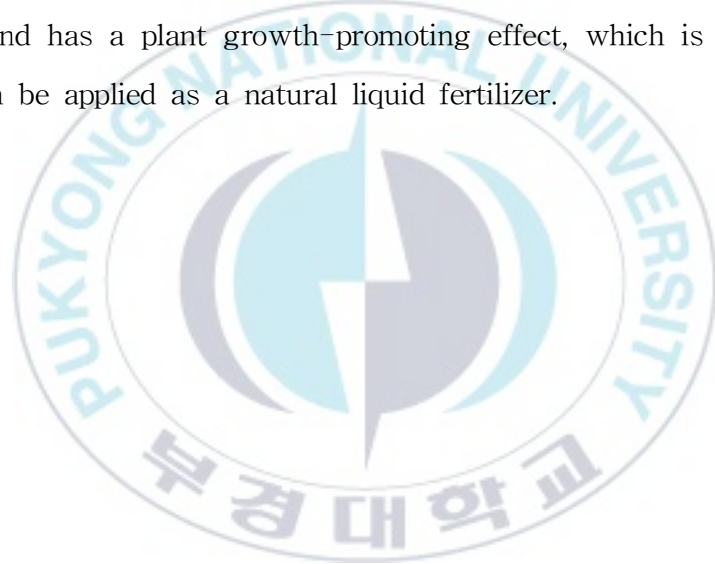
Se Young Jung

School of Marine and Fisheries Life science (Major in Biotechnology)

Abstract

Fish consumption is increasing worldwide, and the consumption of preserved foods such as tuna cans is rapidly increasing due to COVID-19 pandemic, resulting in a significant amount of tuna waste. Efficient treatment means to solve environmental problems caused by such wastes are required. Fish waste is rich in protein and is a valuable raw material for reutilization. In this study, as a means of reutilization yellowfin tuna waste, antioxidant activity peptides were extracted from tuna hydrolysate and plants with high antioxidant activity were cultivated. Among several hydrolysis methods, enzymatic hydrolysis produced tuna hydrolysate with the highest antioxidant activity with 93.75% (DPPH radical scavenging activity). Antioxidant peptide fraction (< 2 kDa) from which impurities were removed by solvent extraction and ultrafiltration was separated. Then, the active antioxidant fraction was applied to an Ultra High Resolution Q-TOF LC

MS/MS system, followed by MS/MS analysis. The antioxidant peptide had linear structure consisting of amino acids with sequence NH-GLLGAP-COOH. Since antioxidant activity helps improve plant growth, it was used for hydroponic cultivation of wheat sprouts as liquid fertilizer. As a result of hydroponic cultivation for 7 days, wheat sprout growth was improved by 9.89% in the fraction with the highest antioxidant activity (< 2 kDa) compared to the control (DW). Therefore, tuna hydrolysate is a useful resource for the production of antioxidant peptides and has a plant growth-promoting effect, which is valuable in that it can be applied as a natural liquid fertilizer.



I. 서론

전 세계 수산물 소비(조류 제외)는 인구 성장률 1.6%에 비해 1961년 이후 연평균 3.0% 증가했으며, 1인당 수산물 소비량은 1960년대 평균 9.9 kg에서 증가하기 시작하여 2020년에는 20.2 kg을 달성하였다. 소득 증가와 도시화, 수확 후 개선 관행과 식이 경향의 변화로 인해 수산 식품 소비는 15% 증가하여 2030년에는 1인당 평균 21.4 kg을 공급할 것으로 예상된다 (FAO, 2022). 2020년 전 세계 참치, 가다랑어, 청어 수출액은 146억 달러로 전체 수산물 수출액의 9.7%에 해당한다. 이 비율은 참치의 인기가 지속되어 왔기 때문에 수십 년 동안 안정적으로 유지되고 있다 (FAO, 2022).

수산물은 거래량의 약 90%가 보존제품으로 구성되며, 그 대부분은 냉동된다(FAO, 2022). 그러나 신선 수산물 수요와 포장 및 물류기술의 발달은 시간이 지남에 따라 교역량에서 신선 제품의 비중이 증가하고 있었지만 COVID-19 팬데믹으로 인해 식품 서비스 중단과 봉쇄 제한 대상 소비자의 구매 형태 변화를 가져오고, 참치 통조림 같은 유통기한이 긴 식품을 서둘러 비축하기 위해 참치캔 등 참치 제품 판매가 폭발적으로 증가했다 (FAO, 2022). 이 때문에 참치캔을 접하는 신규 소비자가 늘면서 소비자들의 참치 수요가 지속적으로 증가하고 있다 (FAO, 2022). 이처럼 참치의 인기는 점차 증가하고 있으며 앞으로의 참치 시장은 더욱 커질 것으로 예상된다.

황다랑어는 지중해를 제외한 전 세계 열대, 온대해역에 분포하고 있으며, 고급 통조림과 저렴한 횡감 등 다양하게 이용되고 있어 상업적 가치가 높고, 그 소비는 꾸준히 증가하고 있다. 2020년 한국 생산량 2위를 차지하고

있으며 2019년 세계 참치 어획량에서도 1,578,830 t으로 2위를 차지하며 점차 증가하는 추세다 (ATUNA, 2022). 그러나 황다랑어는 피부를 포함한 황색 참치 가공 노폐물은 보통 버려져 환경 문제를 일으킨다 (Seo *et al.*, 2012). 이러한 이유로 참치 폐기물의 양이 점차 증가하고 있으며, 이 폐기물로 인한 관련 환경 문제를 해결하기 위한 효율적인 수단이 필요하다.

환경 문제를 해결하기 위해서는 어류 폐기물 관리의 개선이 필요하며, 어류 폐기물의 대체 사용은 경제 성장과 지속 가능한 발전에 기여하고 있다. 생선 노폐물은 양질의 단백질과 지방의 풍부한 공급원이기 때문에 콜라겐, 효소, 생체 활성 펩타이드, 오메가-3 지방산, 바이오디젤 등을 얻을 수 있다. 또한 비타민 (A, B, D 등)과 미네랄 (칼슘, 요오드, 아연, 철, 셀레늄 등)은 어류 폐기물 (Lall and Kaushik, 2021)에서 회수될 수 있어 광범위한 적용이 가능하다. 현재 제약 및 생명공학 산업에서 다양한 생리활성 화합물(단백질, 단백질 가수분해물, 지질, 아스타잔틴, 키틴)의 제조를 위한 가치 있고 새로운 자원으로 여겨지고 있다 (Caruso, 2015). 특히 특이적 또는 다기능적 생리활성을 가지며 높은 수준의 구조적 다양성을 갖는 다양한 신규 펩타이드를 얻을 수 있는데, 항산화 (Jung and Kim, 2016), 항균(Mhina *et al.*, 2020), 항염증(Chakrabarti *et al.*, 2018), 항암 (Suarez-Jimenez *et al.*, 2012), 항고혈압(Je *et al.*, 2009), 오피오이드(Kitts and Weiler, 2003), 항당뇨병(Nhung and Hsu, 2021), 항응고(Jo *et al.*, 2008), 항알레르기(Song *et al.*, 2017), 식물성장(Kim *et al.*, 2021), 면역조절(Rajanbabu and Chen, 2011) 및 프리바이오틱(Betoret *et al.*, 2011) 활성 등을 가질 수 있다.

생리 활성 펩타이드의 활성은 주로 분자 크기, 아미노산 조성 및 배열에

의존한다. 대부분의 생리 활성 펩타이드는 2-20개의 아미노산 잔류물을 가지고 있으며, 일부 경우 펩타이드로는 더 이상일 수 있다. 항산화 펩타이드의 경우 아미노산의 짧은 사슬이 긴 사슬보다 우수한 라디칼 소거 활성을 보이는 것으로 보고되었다(Ajibola *et al.*, 2011).

생리 활성 펩타이드의 적용은 더 다양하다. 생체 활성 펩타이드는 수많은 만성질환의 예방 및 관리에 유익한 기능성 식품으로서 큰 잠재력을 가지고 있다(Alcoulumre *et al.*, 1993). 예를 들어 카제인 유래 인산화 펩타이드는 충치를 예방할 수 있으며, 비정질의 인산칼슘과 결합한 후 비식품 매트릭스(구강세정제, 치약, 껌)에 포함되어 있다 (Shen *et al.*, 2001). 또한, thermolysin 처리 건조 가다랑어로부터 유도된 펜타펩타이드는 혈압강화 잠재력을 보였다(Hartmann and Meisel, 2007). 생리 활성 펩타이드는 기능성 식품 또는 영양제로도 간주되며, 표준 제조 공정의 변형에 의해 보충되거나 농축된다 (Hartmann and Meisel, 2007).

어류단백질 가수분해물은 생리 활성 화합물을 함유한 좋은 영양제이므로 다양한 대사활동에 쉽게 흡수되어 활용된다 (Nese *et al.*, 2011). 따라서, 어류 노폐물로부터 유도된 생체 활성 펩타이드는 대사조절 및 조절에 중요한 역할을 할 수 있다 (Jung and Kim, 2016). 전통적으로 상업적으로 제조된 어류 단백질 가수분해물은 현재 많은 국가에서 건강식품, 기능성 식품, 영양제 등으로 사용되고 있다 (Chalamaiah *et al.*, 2012).

유기체가 외부 환경의 유해한 자극에 노출되면 체내의 다양한 프로테아제의 분비가 통제되지 않아 생물학적 시스템의 활성 산소종(ROS)과 항산화 방어 시스템 사이의 불균형이 발생한다 (Zhang *et al.*, 2016). 특히, 가

수분해물 내의 항산화 기능을 가진 펩타이드의 경우, 저렴한 가격으로 최근 고령화로 인한 노화와 죽상 동맥 경화증, 신경 퇴행성 질환 등 활성산소종(ROS)에 관련된 다양한 질환의 예방 및 치료에 활용할 수 있는 고부가가치 물질로서 주목받고 있다.

항산화 펩타이드는 수소/전자 공여 또는 금속 킬레이트 활성이 있어 연쇄 반응을 종결시키거나 자유 라디칼의 형성을 방지할 수 있다고 알려져 있다 (Nwachukwu and Aluko, 2019). 히스티딘, 티로신, 메티오닌 및 시스테인은 항산화 펩타이드의 구성 부분으로 종종 발견되며, 특히 히스티딘은 이미다졸 고리의 분해로 인해 비교적 강한 라디칼 소거 활성을 보인다 (He *et al.*, 2012). 또한, 소수성 아미노산 (Val, Leu, Phe, Trp)은 강력한 항산화 활성을 나타내는데 (Virtanen *et al.*, 2007), 이러한 아미노산은 활성산소를 억제하거나 금속 양이온을 감소시키는데 기여하는 잉여 전자를 가지고 있기 때문으로 추정된다 (He *et al.*, 2012).

따라서 어류 가수분해물의 항산화 펩타이드는 기능성 성분으로 영양, 의약품, 화장품, 영양제 등에 대한 건강 증진 잠재력이 있으며 (Chalamaiah *et al.*, 2012), 해양자원에서 유래한 천연 항산화제는 합성 항산화제에 비해 용이한 이용 가능성, 저렴한 비용, 부작용이 없는 등의 장점이 있다. 특히, 해양수산폐기물에서 이러한 천연 항산화제를 쉽게 획득할 수 있고 저렴하여 현재 해양자원의 항산화 물질에 관한 많은 연구가 진행되고 있다 (Jung and Kim, 2016).

액체비료는 식물성장에 필요한 양분을 공급하는 데 사용된다. 그러나 화학비료는 환경에 미치는 영향이 커서 과도한 사용에 대한 우려가 커지고

있다. 이를 해결하기 위해 대안으로 대두박과 같은 다양한 천연비료가 개발되고 있다(Kim *et al.*, 2021). 항산화제가 포함된 바이오비료는 식물 내에 항산화 물질이 축적되어, 잠재적으로 인간의 건강에 이롭거나 방사선에 의한 손상으로부터 보호할 수 있는 항산화 활성을 가진 기능성 식물(Heaton and Jones, 2008)을 생성할 수 있다. 수경재배는 토양이 없는 환경에서 영양분, 빛 및 물 용액을 직접 공급하여 식물을 재배하는 방법으로, 약천후와 환경적 영향을 피함으로써 생산성을 높일 수 있다 (Xydis *et al.*, 2017). 식물의 항산화 성분은 산화 손상에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 알려져 있으며 (Cao *et al.*, 2009), 수경재배는 이러한 항산화 활성이 높은 기능성 식물을 재배하기 위한 효율적인 방법이다 (Kim *et al.*, 2021).

따라서 황다량어 폐기물의 가수분해를 통해 항산화 펩타이드를 생산하고, 이를 분리하여 액체비료로 활용하면, 화학비료의 사용을 줄이는 동시에 폐수처리가 가능한 친환경 폐기물 처리방안이 될 수 있다. 또한, 항산화 활성이 높은 기능성 식물을 재배하여 이를 섭취하면, ROS와 관련한 다양한 질환의 예방과 치료에 활용할 수 있다.

II. 재료 및 방법

1. 황다랑어 폐수 제조

황다랑어 폐수 (Yellowfin Tuna waste water, TWW)를 준비하기 위해 현대 F&C (부산, 한국)에서 친절하게 황다랑어 폐기물을 제공해주었다. 참치 폐기물에서 뼈와 찌꺼기를 제거하고, 살을 잘게 썰어 믹서기를 이용해 갈았다. 그 후, 갈린 폐기물을 500 mL 증류수(DW)에 1:1 (v/v) 비율로 담가 믹서를 이용하여 혼합한 후, 121°C에서 15분간 autoclave 하였다. Autoclave 혼합물은 부유하는 생선기름을 제거하기 위해 부드럽게 분리한 다음, 남은 액체 부분을 모았다. 채취한 용액을 4°C에서 120분 동안 homogenize하고, 균질화된 용액을 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 모았다. 상등액의 화학산소요구량(COD) 농도는 $10,000 \pm 538.5$ mg/L, pH 6.5로 조절하여 사용하기 전까지 -70°C에서 냉동 보관되었다.

2. 가수분해 (Hydrolysis)

2.1 미생물 가수분해

미생물 가수분해는 3 L Bioreactor에서 진행하였으며, 10% (v/v)의 working volume으로 45°C, 140 rpm에서 72시간 동안 배양하여 다양한 참치 가수분해물을 얻었다. 혼합 미생물의 구성은 퇴비로부터 분리된 7종의 호기성 분해미생물(Pknufermbacteria (Korean patent No. 10-0822239): *Bacillus subtilis* (DQ219358), *Bacillus licheniformis* (AY468373), *Bacillus coagulans* (AF466695), *Bacillus circulans* (Y13064), *Bacillus anthracis* (AY138279), *Bacillus fusiformis* (AY548950) 및 *Brevibacillus agri* (AY319301))과 지렁이 내장으로부터 분리된 4종의 호기성 분해미생물 (Wormbacteria (Korean patent No. 10-1058245): *Bacillus licheniformis* (EF113324), *Bacillus cereus* (DQ923487), *Brevibacillus agri* (AJ586388) 및 *Brevibacillus parabrevis* (AB215101))이다. 혼합 배양에서 모든 미생물 사이에 길항작용은 없으며, 각 미생물은 사용할 때까지 agar plate에 냉장 보관하고 2주마다 새 plate로 옮겨졌다. 미생물 가수분해를 위해, 모든 미생물은 main culture 이전에 참치 배지에 적응했다. 적응 과정은 영양 배지(Nutrient medium)와 참치 배지(Tuna medium)의 비율에 따라 4단계로 구분되었다. 1단계는 10:0에서 12시간, 2단계는 8:2에서 10시간, 3단계는 5:5에서 8시간, 4단계는 2:8에서 6시간 동안 배양한 후 main culture에 접종하였다. 미생물 가수분해 공정에서 얻어진 모든 시료는 15분 동안 8,000 rpm으로 원심분리하고 상등액을 채취하여 사용하기 전까지 -70°C에서 냉동 보관되었다.

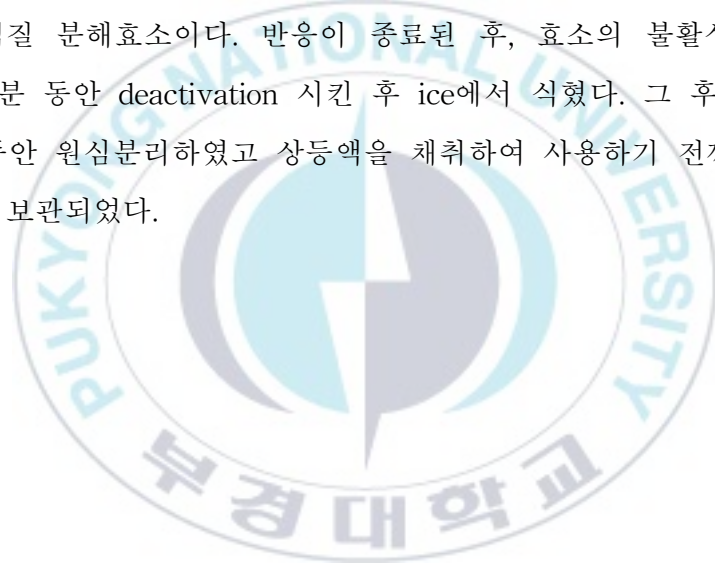
2.2 열산 가수분해

열산 가수분해는 (Gao *et al.*, 2006)에서 설명한 방법을 수정하여 진행했다. 미리 준비된 TWW 50 mL에 6-N HCl을 3.2 mL 첨가하여 pH를 1로 맞춘다. pH를 조절하는 과정은 모두 교반기 위에서 진행되었으며, 마그네틱 바를 이용하여 용액이 균일하게 혼합되도록 하였다. pH 1로 맞춰진 참치폐수 슬러리는 121°C에서 각각 5, 10, 20 min 동안 autoclave를 진행하였고, 10 N NaOH를 사용하여 pH 7로 중화시켰다. 중화된 용액을 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 상등액을 채취하여 사용하기 전까지 -70°C에서 냉동 보관되었다.



2.3 효소 가수분해

미리 준비된 TWW 200 mL을 500 mL flask에 담고 정해진 양의 Protamex를 첨가하여 50°C 및 200 rpm으로 1시간 동안 반응시켰다. 초기 pH는 6.3-6.5이며, 반응 중 pH는 조절하지 않았다. Enzyme/Substrate (E/S) 비율은 1-12% (w/v)로 각각 반응시켜 참치 가수분해물을 제조하였다. Protamex® (from *Bacillus* sp, St. Louis, MO, Sigma-Aldrich, USA, (EC 번호: 3.4.21.14))는 식품 단백질의 가수분해를 위해 개발된 *Bacillus* sp.의 단백질 분해효소이다. 반응이 종료된 후, 효소의 불활성화를 위해 90°C에 10분 동안 deactivation 시킨 후 ice에서 식혔다. 그 후 8,000 rpm에 15분 동안 원심분리하였고 상등액을 채취하여 사용하기 전까지 -70°C에서 냉동 보관되었다.



2.4 가수분해도 측정 (Degree of hydrolysis, DH)

2.4.1 Lowry 단백질 정량법 (Lowry protein assay)

미생물 및 열산 가수분해를 통해 얻은 참치 가수분해물의 가수분해 정도를 측정하였다. 0, 12, 24, 48 and 72 h of biodegradation sample들은 15,000 rpm에 15분 동안 centrifuged 하고, 1 mL의 상등액에 5 mL의 0.5 N NaOH와 1 mL의 1 M Folin & Ciocalteu's phenol reagent를 넣고 vortexing 하였다. 그 후 이 mixture는 water bath 안에서 30°C에 15분 동안 incubate 했다. Incubated mixture는 surfactant-free cellulose acetate syringe filter (0.2 μm , Ministart NML, Sartorius, Germany)를 사용하여 여과하고, 큐벳에 1.5 mL을 담고 UV-Vis spectrophotometer (Opron-3000, Hanson Technology, Korea)를 사용하여 578 nm에서 흡광도를 측정하였다. 가수분해도 (DH)는 알려진 공식에 의해 계산되었다.

DH는 다음 공식에 따라 계산되었다.

$$DH(\%) = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

A_0 은 참치 폐수(Blank)의 흡광도이고, A 는 참치 가수분해물의 흡광도이다.

2.4.2 Trichloroacetic acid 침전법 (TCA precipitation)

효소 가수분해를 통해 얻은 참치 가수분해물의 DH를 측정하였다. TCA는 단백질을 침전시키는 성질이 있어 효소와 같이 크기가 큰 단백질을 제외한 펩타이드의 양을 측정할 수 있다. DH는 총 단백질의 양에 대한 펩타이드양의 비율로부터 계산하였다. 참치 가수분해물과 20% TCA를 1:1 (v/v) 비율로 섞어 10분간 vortexing 하였다. 그리고 이 혼합물을 4°C에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하고, TN(Total Nitrogen) kit를 사용하여 상등액에 용해된 펩타이드의 양을 측정하였다.

DH는 다음 공식에 따라 계산되었다.

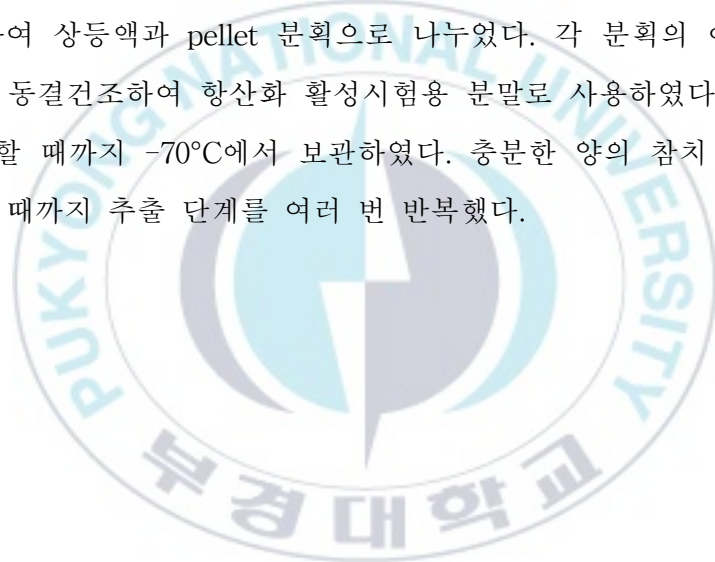
$$DH(\%) = \frac{(B - B_T)}{B_0} \times 100 \quad (2)$$

B는 sample 상등액의 TN값, B_T는 참치 폐수 상등액의 TN값, B₀는 참치 폐수(Blank) 원액의 TN값이다.

3. 정제 및 동정

3.1 항산화 물질 추출

참치 가수분해물을 4°C 및 4,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액 1 volume를 차가운 아세톤 4 volume (1:4 v/v; Guaranteed Reagent (GR) grade, Junsei, Japan)과 혼합하여 15분 동안 vortexing 하였다. 혼합물을 -20°C에서 1시간 동안 정치한 뒤, 4°C 및 9,500 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액과 pellet 분획으로 나누었다. 각 분획의 아세톤을 증류시킨 후 동결건조하여 항산화 활성시험용 분말로 사용하였다. 최종 추출물은 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였다. 충분한 양의 참치 가수분해물이 얻어질 때까지 추출 단계를 여러 번 반복했다.



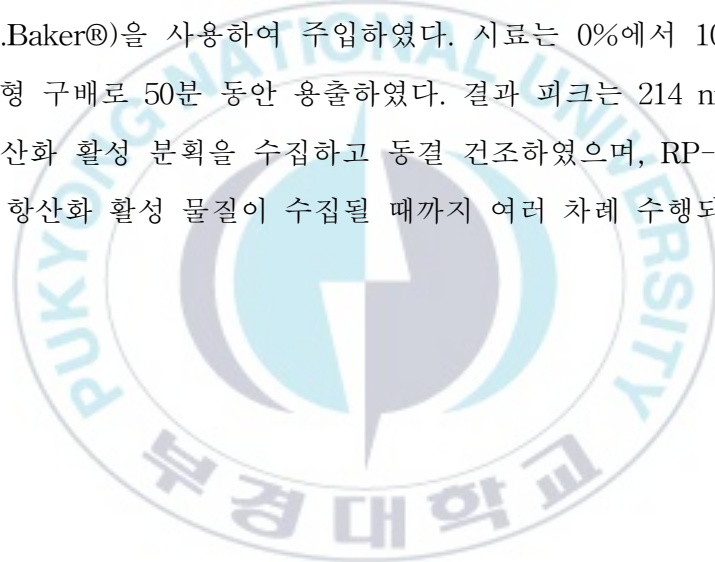
3.2 Molecular weight cut off (MWCO)

항산화 활성시험에 기초하여 펠릿을 DW 15 mL에 녹인 다음 5 kDa membrane (Vivaspin turbo 15, VS15T11; Hanover, Germany)과 2 kDa membrane (Vivaspin 15R, VS15RH91)으로 30분간 MWCO를 실시하였다. 각 여과액을 채취하여 동결건조한 뒤 얻은 powder를 항산화 활성 테스트에 사용하였다.



3.3 역상 액체 크로마토그래피 (Reversed-phase liquid chromatography, RP- HPLC)

활성이 있는 분획을 정제하기 위해 역상 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC)가 수행되었다. 0.2 μm Cellulose Acetate filter (CORNING®, Germany)를 사용하여 여과된 시료 1 mL을 Shim-pack GIS C18 column (4.6 \times 250 mm, 5 μm)에 0.5 mL/min의 유량으로 100% Water (solution A; HPLC grade, J.T.Baker®)과 100% Methanol (solution B; HPLC grade, J.T.Baker®)을 사용하여 주입하였다. 시료는 0%에서 100%까지 용액 B의 선형 구배로 50분 동안 용출하였다. 결과 피크는 214 nm에서 관찰되었다. 항산화 활성 분획을 수집하고 동결 건조하였으며, RP-HPLC는 충분한 양의 항산화 활성 물질이 수집될 때까지 여러 차례 수행되었다.



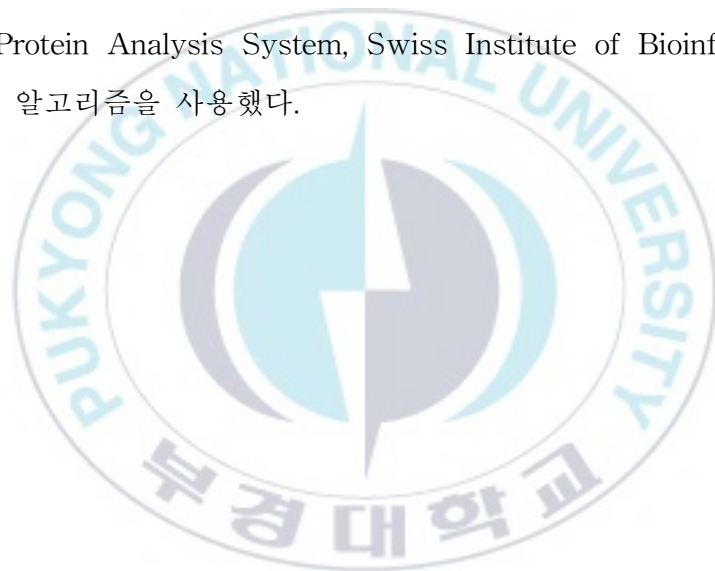
3.4 액체 크로마토그래피 고성능 혼합형 질량분석 (Ultra High Resolution Q-TOF LC MS/MS, Q-TOF MS)

항산화 활성을 나타낸 분획의 총 분자량을 확인하기 위해 부산 부경대학교 연구시설센터에 의뢰하여 Ultra High Resolution Q-TOF LC MS/MS system(Q-TOF MS)에 연결되었다. UPLC 시스템에 연결된 maXis HD(Bruker Daltonics, Bremen, Germany)를 사용하여 UPLC, C18 column (100 × 2.1cm, 1.7 μ m, Waters)을 0.1% formic acid/Water (이동상 A, LC-MS grade, Honeywell) 및 0.1% formic acid/acetonitrile (이동상 B, LC-MS 등급, Honeywell)과 함께 사용하여 0.2 mL/min 의 유속으로 진행하였다. 0.2- μ m filter로 여과된 샘플 20 μ L을 로딩하고 0%에서 100%까지 용액 B의 선형 구배로 용출했다. 생성된 피크는 214 nm에서 관찰되었다.

MS 스캔 분석은 ESI를 이용하여 positive 모드에서 수행되었다. Capillary voltage와 End plate offset은 각각 4500V와 -500V이고, Scan 분석은 m/z 범위 50 - 3000에서 수행되었다. MS 스캔의 이온은 daughter and parent scan mode 에서 MS/MS 분석을 위해 선택되었다. 질소(99.9%, KOSE M, Korea)를 탈용매화 가스로 200°C, 8.0 l/min에서 사용하였고, 수집된 모든 데이터는 활성 물질 확인을 위해 Bruker Compass Data Analysis software (버전 4.2, Bruker Daltonics)를 사용하여 변환 및 분석되었다. 이 분석을 위해 특정 펩타이드에 대한 정보는 non-set, ESI에 의한 missed cleavage는 1, 질량 허용 오차는 2 ppm으로 설정하였다. 원시 데이터를 peak 목록 파일로 내보내고 변환한 후 BioTools(버전 3.2, Bruker Daltonics)를 사용하여 새로운 펩타이드 서열을 추론하였다. 이온 formula, MS/MS 데이터 및 아미노산 서열은 다른 database (Norine (<http://bioinfo.lifl.fr/norine>))

e)과 UniProt (<http://www.uniprot.org/>))에서도 검색되었다. 항산화물질 동정을 위한 UPLC-ESI-MS/MS 분석은 5회 수행하였다.

정제된 펩타이드의 확인은 Genome Net(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) 에서 BLASTP 2.2.10를 이용하여 상동성 검색을 수행하였다. PEP-FOLD(<https://mobyli.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD>) 프로그램을 사용하여 정제된 항산화 펩타이드의 2차구조를 예측하였다. 식별된 펩타이드의 물리화학적 매개변수를 분석하기 위해 ExPASy(Expert Protein Analysis System, Swiss Institute of Bioinformatics)의 ProtParam 알고리즘을 사용했다.



4. 응용

4.1 식물독성 평가 (Phytotoxicity test)

참치 가수분해물의 식물독성을 평가하기 위해 Jung and Kim, 2020에서 보고한 방법을 사용하여 종자 발아 테스트를 수행하였다. 비료로 사용하기 위해 멸균 페트리 접시 안에 여과지(Whatman #1, Sigma-Aldrich, St. Louis)에 비료 용액 5 mL을 주입하여 식물 독성 검사를 수행하였다. 본 연구에서는 cress의 씨앗 (*Lepidium sativum*)을 사용하여 어두운 곳에서 25°C 12시간 동안 배양하고 각 페트리 접시에 10개의 씨앗을 무작위로 배치하고 DW를 대조군으로 사용하였다. 판은 25°C, 습도 60%의 어두운 Plant Growth Chamber에서 배양하였으며 72시간 배양 후 각 판에서 성장한 종자의 발아 횟수와 뿌리 길이를 측정하였다.

식물독성은 GI 값을 통해 표현하였으며, 다음과 같이 계산하였다.

$$RSG(\%) = \frac{\text{Number of seeds germinated in sample}}{\text{Number of seeds germinated in control}} \times 100 \quad (3)$$

$$RRG(\%) = \frac{\text{Mean of root length in sample}}{\text{Mean of root length in control}} \times 100 \quad (4)$$

$$GI(\%) = \frac{RSG \times RRG}{100} \quad (5)$$

(RSG : 상대적 종자 발아율, RRG : 상대적 뿌리 성장률, GI : 발아지수)

4.2 수경재배 (Hydroponics)

참치 가수분해물의 비료 효능을 측정하기 위해, 미니 수경재배 화분($5 \times 12 \times 8 \text{ cm}^3$)에서 밀싹 (*Triticum aestivum*)을 재배하는 수경재배 시스템을 사용하였다. 참치 폐수원액, 참치 가수분해물 그리고 대조군으로 DW를 사용하여 시험을 수행하였다. 식물독성 평가 결과에 근거하여 각 시료는 50 배 희석하여 비료로 사용하였다. 각 화분에는 희석된 각각의 용액 350 mL을 채운 뒤 플라스틱 씨앗 받침대를 놓고 밀 씨앗 20개를 배치하였다. 씨앗은 이전에 어두운 곳에서 이틀 동안 25°C 에서 배양한 후, 살아있는 씨앗을 선택하여 사용하였다. 화분은 25°C , 명/암 주기 14/10 시간, 상대습도 60%로 Growth chamber에서 재배하였다. 비료 용액은 3일마다 교체해주었고, 7일간의 수경재배 후 각 식물의 길이, 무게, chlorophyll a, b와 carotenoid 농도 및 항산화 활성을 측정하였다.

4.3 엽록소(chlorophyll a, chlorophyll b) 및 carotenoids(car) 농도

식물 건강을 추정하기 위해 7일 동안 자란 밀싹의 잎에서 chl a, b 및 car의 함량을 측정했다. 80% 아세톤 1 mL과 밀싹 잎 50 mg을 혼합하여 4°C에서 밤새 chl과 car를 추출하였다. 추출물은 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상등액을 채취하여 470, 645 및 663 nm에서 흡광도를 측정하였다.

chl a, chl b 및 car의 함량(in mg per g of plants)은 다음 공식을 사용하여 추정했다.

$$Chla = 12.72 \times OD_{663} - 2.59 \times OD_{645} \quad (6)$$

$$Chlb = 22.88 \times OD_{645} - 4.67 \times OD_{663} \quad (7)$$

$$Car = (1000 \times OD_{470} - 3.27 \times Chla - 104 \times Chlb) / 229 \quad (8)$$

5. 향산화 활성

밀싹의 향산화 성분을 측정하기 위하여 수경재배에서 7일간 재배한 밀싹의 잎에 대하여 향산화 활성을 추정하였다. 밀싹 잎 1 g을 에탄올 96% 10 mL에 24시간 동안 담아 추출하고 0.2 μm 아세테이트 필터를 통해 여과한 후 분석에 사용하였다.



5.1 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 분석

시료와 0.1 mM DPPH 용액을 80% 에탄올에 1:2 (v/v)로 반응시켜 DPPH 유리 라디칼 소거 활성을 분석하였다. 혼합물을 어두운 곳에서 30분 동안 반응시켰으며, 흡광도는 517 nm에서 blank에 대해 측정하였다. 대조군은 80% 에탄올을 이용하여 상기 방법으로 수행하였으며, 필요에 따라 DPPH 용액을 80% 에탄올로 치환한 후 시료에 위와 같은 것을 혼합하여 시료 blank를 측정하였다. Positive control은 0.1 mM L-ascorbic acid를 사용하였다.

DPPH radical scavenging 활성은 다음 공식을 사용하여 계산되었다.

$$\text{Scavenging activity}(\%) = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100(9)$$

5.2 2, 2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼 양이온 탈색 분석

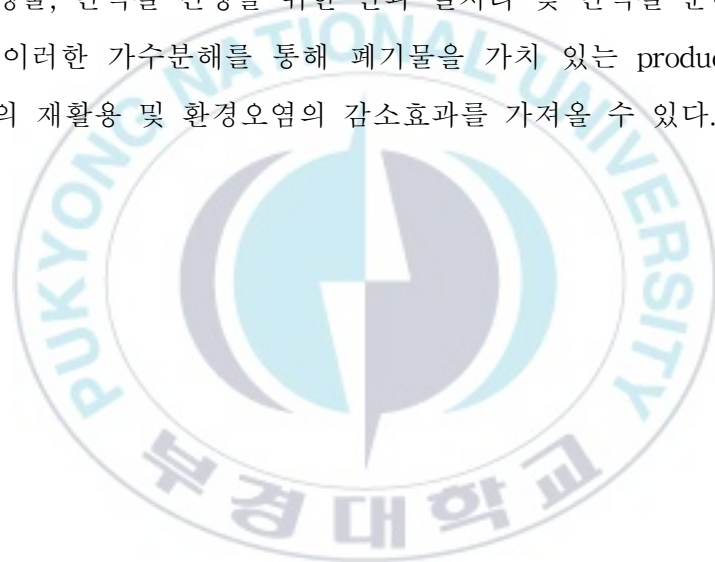
ABTS 라디칼 양이온에 대한 항산화 활성은 탈색 분석을 사용하여 평가되었다. ABTS 항산화 분석을 위해 ABTS 라디칼 양이온 시약은 미리 5 mL의 7 mM ABTS와 5 mL의 4.9 mM 과황산칼륨($K_2S_2O_8$)을 혼합하여 준비하였다. 혼합물을 암실에서 16시간 동안 정치한 후, 80% 에탄올로 734 nm에서 흡광도를 0.72로 조정하였다. 그 후 시료 100 μ L를 준비된 ABTS 라디칼 양이온 시약 900 μ L와 혼합하고 최종적으로 6분간 정치한 혼합물의 흡광도를 734 nm에서 측정하였다. 대조군은 상등액을 DW로 교체하여 준비하였고, 0.3 mM L-ascorbic acid를 양성 대조군으로 사용하였다. Blank는 ABTS 시약을 80% 에탄올로 교체하였다. ABTS 항산화 활성은 다음 공식을 사용하여 계산된 억제 백분율 값으로부터 결정되었다.

$$\% inhibition = \frac{Absorbance\ of\ control - Absorbance\ of\ sample}{Absorbance\ of\ control} \times 100 \quad (10)$$

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 황다랑어 폐수 가수분해

황다랑어 폐수(TWW) 가수분해물을 얻기 위해 생분해, 열산 가수분해 및 효소 가수분해 방법을 이용하였다. 참치 폐수는 대부분 단백질로 구성되어있어, 단백질을 분해하기 위해 각각의 방법에는 단백질 분해효소를 합성하는 미생물, 단백질 변성을 위한 산과 열처리 및 단백질 분해효소를 사용하였다. 이러한 가수분해를 통해 폐기물을 가치 있는 product로 전환하여 폐기물의 재활용 및 환경오염의 감소효과를 가져올 수 있다.



1.1 미생물 가수분해

단백질의 생분해는 세 단계로 나눌 수 있다. 첫 번째로 미생물이 고분자의 표면에 결합하는 Biodeterioration, 두 번째로 단백질 분해효소의 분비로 고분자를 저분자로 단편화시키는 Biofragmentation, 마지막으로 생성된 저분자를 흡수하는 Assimilation로 이루어진다. 이러한 생분해 방법은 폐수의 화학적 및 물리적 처리 방식보다 경제성과 안전성 측면에서 우수하다.

TWW의 생분해 정도를 확인하기 위해 DH를 측정하였다(Table 1). DH 값은 6, 12, 24 및 48 h에서 12.96, 16.47, 17.59, 19.44%이고, 그에 따른 항산화 활성은 85.62, 86.85, 88.78, 86.16%였다. 따라서 혼합 미생물은 시간이 지남에 따라 TWW에서 증식 및 단백질 분해효소 합성으로 TWW 단백질을 분해시켰고 이로 인해 점차 DH 값이 높아졌음을 나타낸다. Bioactive peptide의 활성은 주로 분자 크기, 아미노산 구성 및 서열에 따라 달라지는데, 항산화 펩타이드의 경우 짧은 잔기의 펩타이드가 긴 잔기의 펩타이드보다 우수한 라디칼 소거 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Ajibola *et al.*, 2011). 따라서 DH 값이 증가함에 따라 항산화 활성을 가지는 펩타이드의 양이 증가하면서 항산화 활성이 높아졌고, 48 h에서 항산화 활성이 감소한 것은 과도한 가수분해로 인해 활성을 가지는 펩타이드까지 분해되었기 때문이다.

Table 1. 미생물 가수분해물의 DH 및 항산화 활성

가수분해 시간 (h)	DH (%)	DPPH 항산화 활성* (%)
0	0	70.54 ± 1.84 ^c
6	12.96 ± 0.25 ^d	85.62 ± 0.54 ^b
12	16.47 ± 0.34 ^c	86.85 ± 0.31 ^{ab}
24	17.59 ± 0.57 ^b	88.78 ± 0.80 ^a
48	19.44 ± 0.48 ^a	86.16 ± 0.96 ^b

Positive control (0.1mM Ascorbic acid) : 83.72 ± 2.26%

1.2 열산 가수분해

열산 가수분해는 산 가수분해보다 짧은 시간 내에 가수분해가 가능하고, 열 처리로 인해 적은 양의 산으로 가수분해할 수 있다. 참치 폐수의 열산 가수분해를 위해 6N HCl을 첨가하고 autoclave 시간을 달리하여 가수분해 정도를 측정하고 그에 따른 항산화 활성을 확인했다(Table 2).

DH 측정값이 점차 증가함을 통해, Autoclave 시간이 증가할수록 열과 산에 의한 분해 정도가 더 높아짐을 알 수 있다. 그러나 항산화 활성은 DH 값이 증가함에 따라 함께 증가하지 않았다. 참치 폐수원액의 항산화 활성과 비교하여 열산 가수분해물의 항산화 활성은 더 낮았다.

산을 이용하는 가수분해는 seaweed와 같이 bonding (α -helix, β -sheet) 이 많아 구조가 복잡한 carbohydrate와 같은 물질은 분해하기 어렵지만, 아미노산의 단순한 연결구조로 이루어진 단백질은 상대적으로 분해하기 쉽다. 그러나 산을 이용한 단백질의 가수분해는 hydroxyamino acids들이 파괴된다는 단점이 있다. 항산화 활성에 기여하는 아미노산 중 cysteine, methionine은 산 처리에 의해 완전히 파괴되고, tyrosine은 부분적으로 파괴되는 것으로 알려져 있다. 따라서 산 처리로 인한 낮은 항산화 활성은 항산화 활성에 기여하는 아미노산의 손상으로 인한 것이다. 더욱 효과적인 항산화 활성 물질을 생산하기 위해서는 이러한 amino acid의 파괴를 막을 수 있는 가수분해 방법이 필요하다.

Table 2. 열산 가수분해물의 DH 및 항산화 활성

Sample	고압멸균 시간 (min)	DH (%)	DPPH 항산화 활성* (%)
Tuna waste (control)	0	–	71.72 ± 0.17
After acid treatment	5	52.35 ± 1.79 ^c	61.22 ± 0.58 ^c
	10	57.72 ± 3.93 ^b	62.61 ± 0.29 ^b
	20	59.73 ± 1.54 ^a	65.14 ± 0.02 ^a
	30	61.07 ± 1.48 ^a	62.95 ± 0.31 ^b

*Positive control (0.1mM Ascorbic acid) : 83.72 ± 2.26%

1.3 효소 가수분해

수산 폐기물의 효소 가수분해는 최종 제품에 잔류 유기물이나 화학물질이 없어서 선호되는 방법 중 하나다. 효소 가수분해는 기능성과 영양가가 높은 화합물을 생산할 수 있으므로 특히 식품 산업에서 단백질 회수에 사용된다. 높은 비용과 효소 회수의 까다로움 등의 단점이 있지만, scale up이 쉽고 반응시간이 짧아 적절한 온도와 pH 조건에서 효소 가수분해를 수행하면 다양한 활성과 크기를 가진 가수분해물을 생성할 수 있다.

효소 가수분해는 Protamex를 1, 3, 5, 8, 12% (w/v)의 E/S ratio로 같은 환경조건에서 수행하여 효소량에 따른 다양한 DH를 얻었다(Table 3). 최대 DH 값은 27.48%까지 얻어졌으며, DH가 25.49%를 나타내는 시료에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거 활성(93.75%)과 ABTS 라디칼 양이온 탈색 활성(98.12%)을 얻었다. 이는 펩타이드 서열 또는 amino acid의 성분이 항산화 활성에 영향을 미쳤음을 의미한다. 항산화 펩타이드는 화학 구조의 다양한 특성에 따라 활성이 달라진다. 특히 저분자량(< 1 kDa), His, Trp, Phe, Pro, Gly, lys, Ile 및 Val과 같은 소수성을 갖는 아미노산, Indole/imidazole/pyrrolidine ring, C 또는 N-말단에 위치한 일부잔기 등의 영향이 항산화 활성이 많은 영향을 미친다고 알려져 있다. 특히, Histidine은 imidazole ring의 분해로 인해 상대적으로 강한 라디칼 소거 활성을 나타내는데(He *et al.*, 2012) 이러한 Histidine은 참치, 고등어와 같은 등푸른 생선에 풍부하다. 또한, 소수성 아미노산은 자유 라디칼을 억제하거나 금속 양이온을 감소시키는 데 기여하는 잉여 전자를 보유하고 있어 강력한 항산화 활성을 나타낸다(He *et al.*, 2012).

Protamex는 *Bacillus* sp.의 단백질 분해효소이며 제약, 식품 및 폐기물 처리 산업에서 광범위하게 사용된다. 이러한 Protamex는 소수성 아미노산에 대해 더 넓은 특이성을 가지고 있어, 소수성 아미노산의 N-말단을 끊는 것으로 추정된다 (Fernandez and Kelly, 2016). 항산화 활성 펩타이드에서 C와 N 말단에 존재하는 아미노산 잔기는 항산화 활성에 중요한 역할을 한다(Zou *et al.*, 2016). 따라서 이러한 Protamex는 항산화 활성 펩타이드를 제조하기에 적합한 효소이다.



Table 3. 효소 가수분해물의 DH 및 항산화 활성

(concentration: 80 mg/mL)

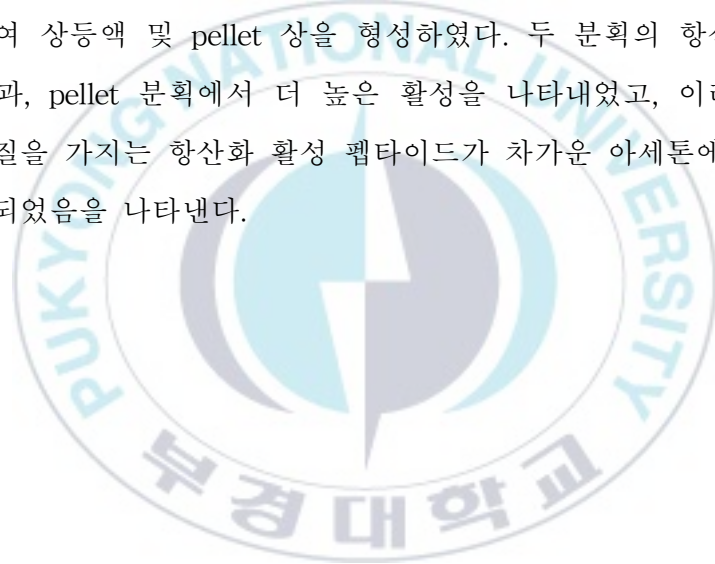
E/S ratio (%)	DH (%)	항산화 활성* (%)	
		DPPH	ABTS
1	17.82 ± 0.85 ^a	86.54 ± 0.84 ^d	90.20 ± 0.45 ^d
3	22.87 ± 0.66 ^b	89.71 ± 0.31 ^c	95.50 ± 0.48 ^c
5	23.97 ± 0.87 ^{cd}	92.43 ± 0.96 ^{ab}	97.10 ± 0.24 ^b
8	25.49 ± 0.48 ^{de}	93.75 ± 0.45 ^a	98.12 ± 0.16 ^a
12	27.48 ± 0.79 ^e	91.48 ± 0.80 ^{bc}	97.55 ± 0.34 ^{ab}

*Positive control (0.1mM Ascorbic acid) : 83.72 ± 2.26%

2. 향산화 물질의 정제 및 동정

2.1 추출

용매 추출은 처리비용이 적고 조작이 쉽다는 장점이 있다. 그중 아세톤 침전법은 가장 보편적인 단백질 침전 방법으로, 복잡한 물질로부터 단백질을 분리하는 방법이다. 참치 가수분해물의 활성 펩타이드를 정제하는 방법으로 차가운 아세톤 추출법을 통해 가수분해물을 친수성/소수성 성질에 따라 분리하여 상등액 및 pellet 상을 형성하였다. 두 분획의 향산화 활성을 측정된 결과, pellet 분획에서 더 높은 활성을 나타내었고, 이러한 결과는 소수성 성질을 가지는 향산화 활성 펩타이드가 차가운 아세톤에 의해 적절하게 침전되었음을 나타낸다.



2.2 Molecular weight cut off

항산화 활성 펩타이드의 추가 정제를 위해 pellet 부분을 선택하여 DW에 녹여 추출 전 시료의 농도(80 mg/mL)와 같은 항산화 물질 용액으로 제조하였다. 그 후, 5 kDa 및 2 kDa 크기의 막으로 Molecular weight cut off (MWCO)을 진행하여, 항산화 펩타이드의 대략적인 분자량을 추정하였다. MWCO는 비용 효율적이며 빠른 시간 내에 여과할 수 있다는 장점이 있다. > 5 kDa, 2-5 kDa 및 < 2 kDa의 세 분획으로 나누어, 항산화 활성을 시험한 결과, 가장 높은 항산화 활성을 나타낸 < 2 kDa 부분을 선택하였다(Table 4). 항산화 활성 펩타이드는 주로 3개 이상의 아미노산 잔기를 가지고 있으며, < 1 kDa의 분자량을 가지는 3-6개의 아미노산으로 구성되어있다고 알려져 있다 (Cai *et al.*, 2022). 펩타이드의 크기가 클수록 라디칼 소거활성을 나타내는 펩타이드의 희석효과가 증가하기 때문이다. 이러한 이유로 < 2 kDa 분획에 항산화 펩타이드가 가장 많이 존재함을 알 수 있다.

Table 4. 정제과정에 따른 분획 별 항산화 활성 비교

정제과정	분획	DPPH 항산화 활성* (%)
아세톤 추출 (80 mg/mL)	Supernatant	27.06 ± 0.54 ^b
	Pellet	96.86 ± 0.80 ^a
MWCO	> 5 kDa	16.16 ± 1.39 ^c
	2-5 kDa	20.89 ± 0.97 ^b
	< 2 kDa	55.65 ± 1.14 ^a

*Positive control (0.1mM Ascorbic acid) : 83.72 ± 2.26%

2.3 역상 액체 크로마토그래피

항산화 물질의 정제를 위해 RP-HPLC를 진행하였다 (Fig. 1). 앞선 정제 과정에서 소수성이 높은 물질을 정제하였으며, 소수성 아미노산 잔기 구성에 영향을 받는 항산화 펩타이드의 특징에 따른 적절한 정제 방법으로 RP-HPLC를 선택하였다. LC의 분해능은 column, 이동상의 구성과 유속, 농도구배 속도, 펩타이드 자체의 크기 및 구성에 따라 달라진다(Meek and Rossetti, 1981). 이런 요인들을 고려하여 이동상의 농도구배, 유속을 변경하는 등 더 나은 분리를 위한 시도가 이루어졌다. 여과된 < 2 kDa 시료 20 μ L을 주입한 결과 retention time 5, 7.5, 11분에서 크게 3가지의 peak를 확인하였고, 용출되는 3 peak의 항산화 활성을 측정한 결과 11분에 용출되는 peak에서 항산화 활성이 측정되었다. 충분한 양의 활성분획을 모으기 위해 RP-HPLC를 여러 차례 수행하였고, 활성분획은 F11로 명명되었다. 이 이 과정을 통해 목적 물질을 완전히 분리하지는 못했지만, 순도가 향상된 분획물을 채취할 수 있었다.

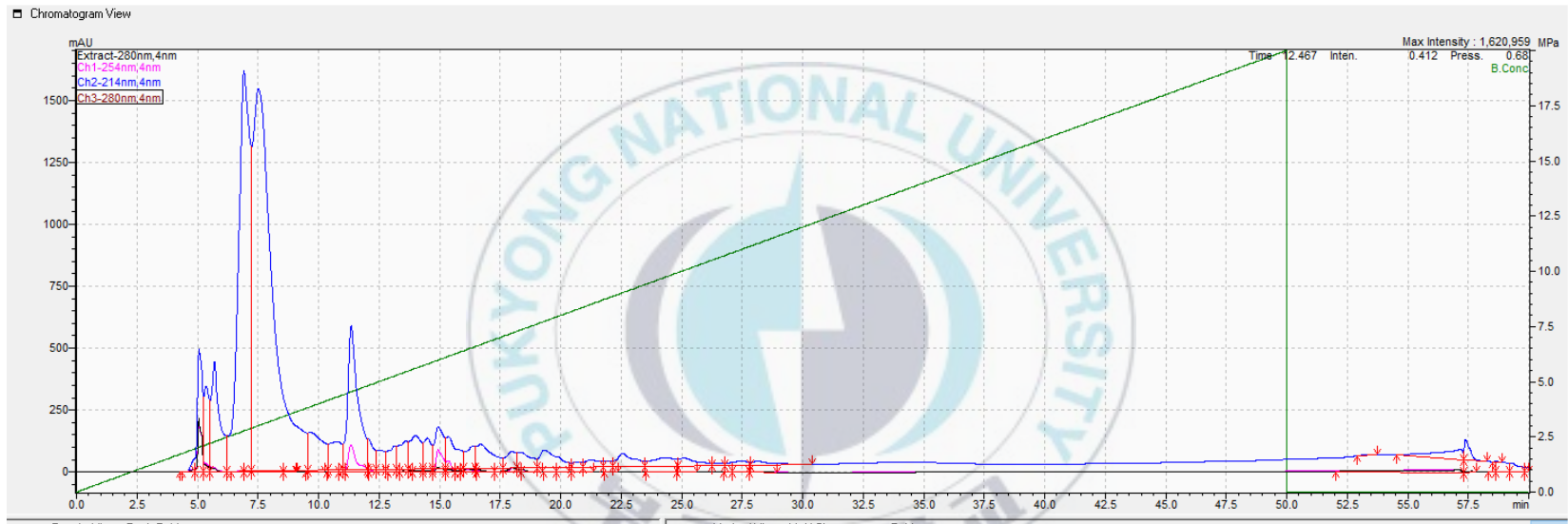
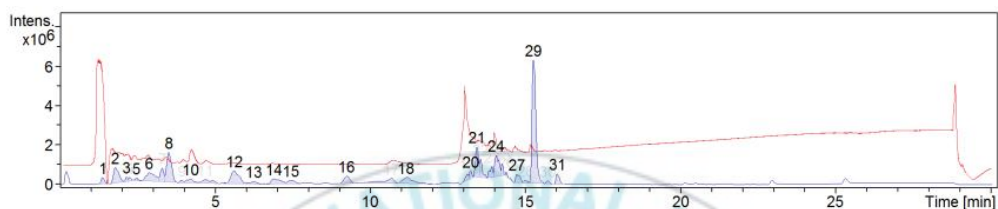


Fig. 1. < 2 kDa 분획의 RP-HPLC 결과

2.4 액체 크로마토그래피 고성능 혼합형 질량분석

RP-HPLC에서 얻은 활성 분획을 Q-TOF MS 시스템에 적용하여 시료 내에 존재하는 물질을 분석하였고, 총 31개의 peak가 확인되었다(Fig. 2). 펩타이드로 예측되는 물질을 찾기 위해, 항산화 펩타이드의 분자량 범위(400-700 Da) 및 물질 내의 농도를 고려하여 peak 24, 25, 26, 28로 총 4개의 적절한 peak를 선택하였다.





#	RT [min]	Area	Int. Type	I	S/N	Chromatogram	Max. m/z	FWHM [min]
1	1.4	2568410	Chromatogram	362539	70.2	BPC +All MS	241.1305	0.1
2	1.8	9690153	Chromatogram	860932	163.7	BPC +All MS	329.1942	0.2
3	2.2	1024673	Chromatogram	377412	45.6	BPC +All MS	325.1879	0.1
4	2.3	986581	Chromatogram	363758	36.9	BPC +All MS	317.1466	0.1
5	2.5	861263	Chromatogram	336512	27.5	BPC +All MS	369.1886	0.1
6	2.9	8603385	Chromatogram	587367	83.5	BPC +All MS	244.1306	0.4
7	3.3	5267520	Chromatogram	833570	139.9	BPC +All MS	358.1732	0.1
8	3.5	15968417	Chromatogram	1619722	304.9	BPC +All MS	343.1622	0.2
9	3.9	748304	Chromatogram	221233	25.3	BPC +All MS	347.1933	0.1
10	4.2	2602927	Chromatogram	293884	40.0	BPC +All MS	339.2034	0.2
11	4.7	3704133	Chromatogram	246512	33.0	BPC +All MS	334.1615	0.4
12	5.6	12046446	Chromatogram	692958	134.6	BPC +All MS	418.1941	0.3
13	6.2	1809158	Chromatogram	155302	24.9	BPC +All MS	388.1832	0.2
14	6.9	5097959	Chromatogram	281128	49.9	BPC +All MS	315.1672	0.4
15	7.5	2541062	Chromatogram	213782	34.0	BPC +All MS	372.1886	0.3
16	9.2	4635757	Chromatogram	416745	73.1	BPC +All MS	345.1780	0.2
17	10.7	6596940	Chromatogram	309549	50.0	BPC +All MS	414.1992	0.3
18	11.2	7277141	Chromatogram	351741	61.0	BPC +All MS	297.1091	0.3
19	13.1	2198788	Chromatogram	520296	59.9	BPC +All MS	375.1885	0.1
20	13.2	1838372	Chromatogram	673651	74.5	BPC +All MS	359.1935	0.1
21	13.4	10161233	Chromatogram	1902636	311.8	BPC +All MS	343.1986	0.1
22	13.6	5460469	Chromatogram	1282411	187.7	BPC +All MS	359.1935	0.1
23	13.9	4039821	Chromatogram	900832	108.2	BPC +All MS	393.1776	0.2
24	14.1	9849066	Chromatogram	1465421	217.8	BPC +All MS	527.2833	0.2
25	14.3	2890330	Chromatogram	1033215	118.4	BPC +All MS	654.2375	0.1
26	14.4	1415925	Chromatogram	633904	41.4	BPC +All MS	677.2893	0.1
27	14.7	4307651	Chromatogram	513259	87.5	BPC +All MS	320.1251	0.2
28	15.0	738782	Chromatogram	209796	25.4	BPC +All MS	467.2142	0.1
29	15.3	53952648	Chromatogram	6281144	1279.6	BPC +All MS	331.1412	0.1
30	15.7	1053083	Chromatogram	181829	28.5	BPC +All MS	331.1409	0.1
31	16.0	4307660	Chromatogram	540844	109.0	BPC +All MS	315.1463	0.1

Fig. 2. F11 분획에 대한 Q-TOF MS 분석 결과

2.5 항산화 물질의 동정

펩타이드로 예측되는 4개의 peak(peak 24, 25, 26 및 28)를 MS/MS로 분석하였다. peak 24를 발생시키는 펩타이드 서열은 충돌 에너지가 24-36eV, peak 25, 26은 32-48eV, peak 28은 16-24eV로 설정되었을 때 결정되었다. 이들의 분자량은 각각 527.2833, 654.2375, 677.2893 및 467.2142이다. BioTools를 사용한 라이브러리 데이터와 비교한 결과 4가지 물질 모두 펩타이드인 것으로 나타났고, 각각의 서열은 GIIGPA/GILGPA/GLLGAP/GIIGAP, DGDGGSF/DGGDGSF, AGTAPNF, SDVF로 확인되었다. 항산화 펩타이드를 찾기 위해 이전에 보고된 항산화 펩타이드의 특징과 비교하였다. 항산화 펩타이드의 길이와 순서는 다양하지만, 소수성이 강할수록 더 좋은 활성을 나타낸다(Zou *et al.*, 2016). 또한 양이온성일수록 막과의 상호작용이 쉬워 세포에 작용하기에 용이하다(Nguyen *et al.*, 2011). 펩타이드 서열 내에서 Proline의 pyrrolidine ring은 hydrogen donor로서 hydroxyl radical scavenger 역할을 수행할 수 있으며(Zou *et al.*, 2016), 2차구조의 구성을 파괴하여 막 내 유입을 돕는다(Li *et al.*, 2020). Val, Leu, Ile과 같은 Branched-chain 아미노산의 잔기는 hydrogen donor로서 작용할 수 있어 펩타이드의 항산화 활성을 높이는데 기여한다고 알려져있다(Kawashima *et al.*, 1979). 따라서 이러한 특징들을 고려하였을 때, 서열 GLLGAP가 위의 기준을 가장 잘 충족하였다. Fig. 3(A)는 peak 24에 대한 MS/MS 스펙트럼을 나타낸 결과이며, peak 24의 혼합물 중 하나가 펩타이드로 확인되었다. Fig. 3(B)는 peak 24의 단편으로부터 유추된 항산화 펩타이드의 De novo sequencing을 나타내었다.

식별된 펩타이드의 신규성을 조사하기 위해 Norine, BIOPEP 및 Uniprot

데이터베이스의 아미노산 서열을 비교하였다. 그러나 라이브러리의 어떤 서열도 식별된 펩타이드의 서열과 일치하지 않았으므로 식별된 펩타이드는 신규한 황다량어 유래 펩타이드인 것으로 결론지었다.



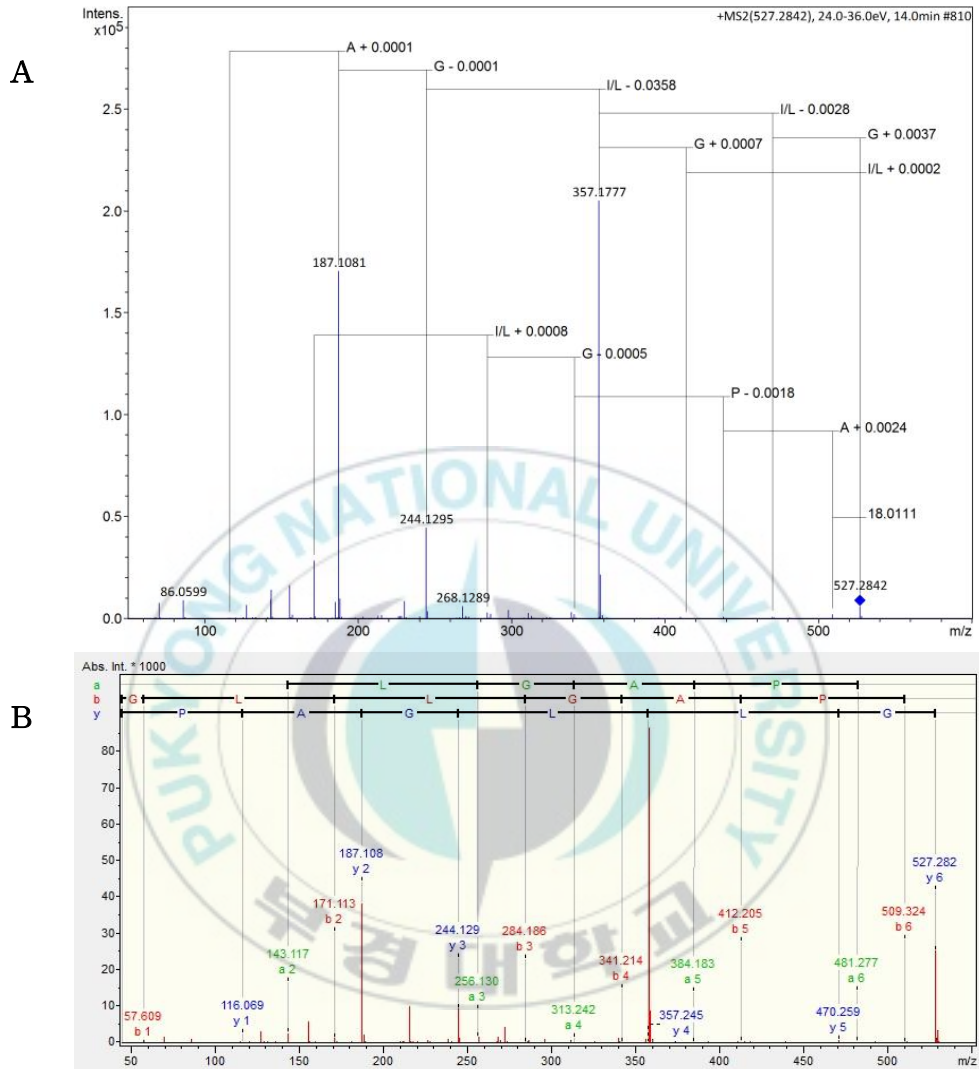


Fig. 3. peak 24의 MS/MS 스펙트럼(A)과 peak 24의 단편에서 추론된
 항산화 펩타이드의 De novo sequencing(B)

2.6 Hexapeptide의 2차 구조 예측

PEP-FOLD 프로그램을 사용하여 hexapeptide의 2차구조를 예측하였고, 그 서열은 α -나선 또는 β -시트 구조보다는 선형 구조를 형성할 가능성이 가장 높았다. ProtParam 알고리즘의 결과에 따라, 식별된 펩타이드는 분자식 $C_{24}H_{42}N_6O_7$, 분자량 526.63, 소수성 66.67%, 등전점 6.0을 가지는 것으로 나타났다.





Fig. 4. Hexapeptide의 예측된 2차 구조

3. 식물재배로의 응용

3.1 식물 독성

참치 폐수 가수분해물에는 항산화 활성을 나타내는 물질이 많고, 이는 항산화 활성이 높은 식물을 재배하기 위한 비료로 사용될 수 있다. 수경재배에 앞서 참치 폐수원액과 참치 가수분해물을 대상으로 식물 독성시험을 실시하여 비료용액의 적정 희석도를 결정하였다(Fig. 5). 본 실험에서는 참치 폐수와 참치 가수분해물의 비료로서의 능력을 비교하고, 농도에 따른 독성을 평가하였다.

대조군(DW)과 비교하여 참치 폐수를 비료로 사용하여 자란 잎의 길이는 10배, 50배와 100배 희석에서 각각 33.37, 65.75 및 93.79% 증가하였고, 참치 가수분해물에서 각각 36.75, 97.10 및 154.25% 증가하였다. 희석배수의 증가에 따라 독성물질의 양이 감소하고, 이에 따른 생육효과가 증가하였다. 참치 가수분해물은 가수분해 작용으로 인해 참치 폐수보다 식물 독성이 완화되었으며, 식물 독성이 없는 기준 ($GI > 50\%$)에 따라 두 시료 모두 50배 이상 희석되어야 식물 독성이 없어짐을 알 수 있다(Zucconi, 1985). 이 결과를 바탕으로 50배 희석된 시료(200 mg/L)를 밀싹의 수경재배에 사용하였다.

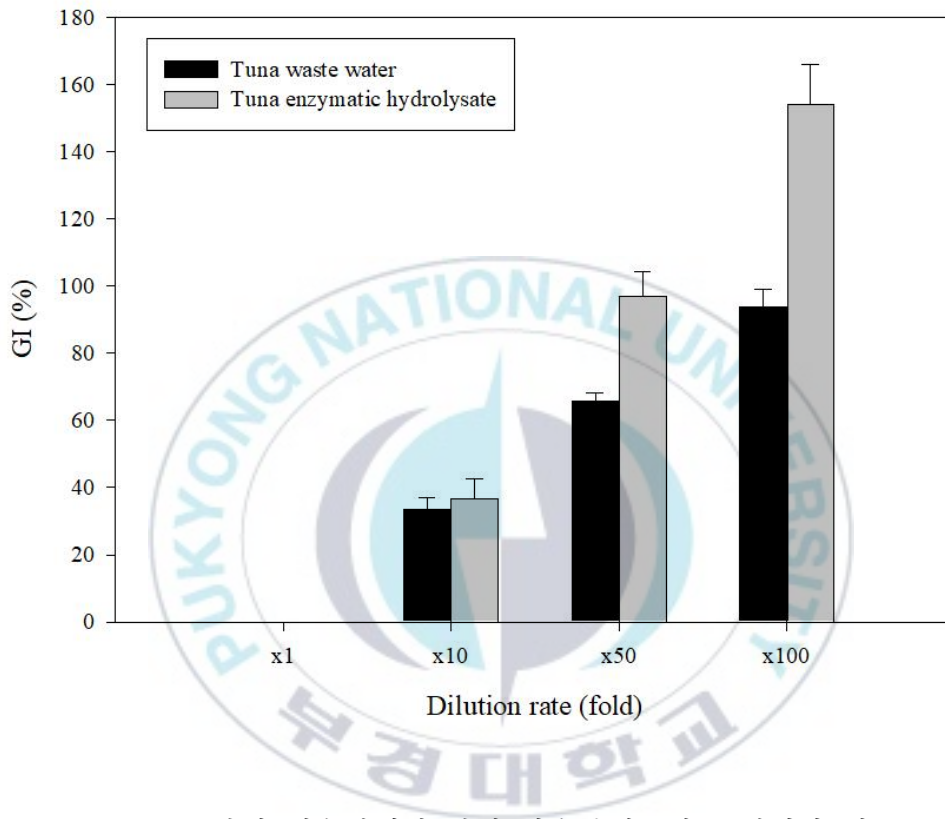


Fig. 5. 참치 폐수원액과 참치 가수분해물의 독성평가 비교

3.2 참치 가수분해물의 액체비료 능력

독성실험 결과를 바탕으로 시료의 희석배수를 50배로 설정하여 수경재배를 진행하였고, 참치 원액과 참치 가수분해물의 밀싹에 대한 비료 능력을 추정하기 위해 7일 동안 수경재배한 밀싹 잎의 길이와 무게를 나타내었다.

가수분해물의 액체비료로의 효능을 평가하기 위해 참치 폐수원액과 참치 가수분해물의 밀싹 수경재배를 진행하였다. 참치 폐수원액과 참치 가수분해물은 50배 희석한 농도 (200 mg/L)로 수경재배에 적용하였다 (Fig. 6). 7일 재배 후 밀싹의 잎의 길이와 무게를 측정된 결과, 참치 가수분해물을 처리한 밀싹은 대조군(DW)에 비해 잎의 길이와 무게가 9.2 및 17.4% 향상되어 유의하게 높은 결과를 나타내었다. 반면, 참치 폐수원액을 처리한 밀싹은 대조군(DW)에 비해 잎의 길이와 무게가 감소하였다. 따라서 참치 가수분해물은 액체비료로의 효능을 가지고 있음을 나타낸다.

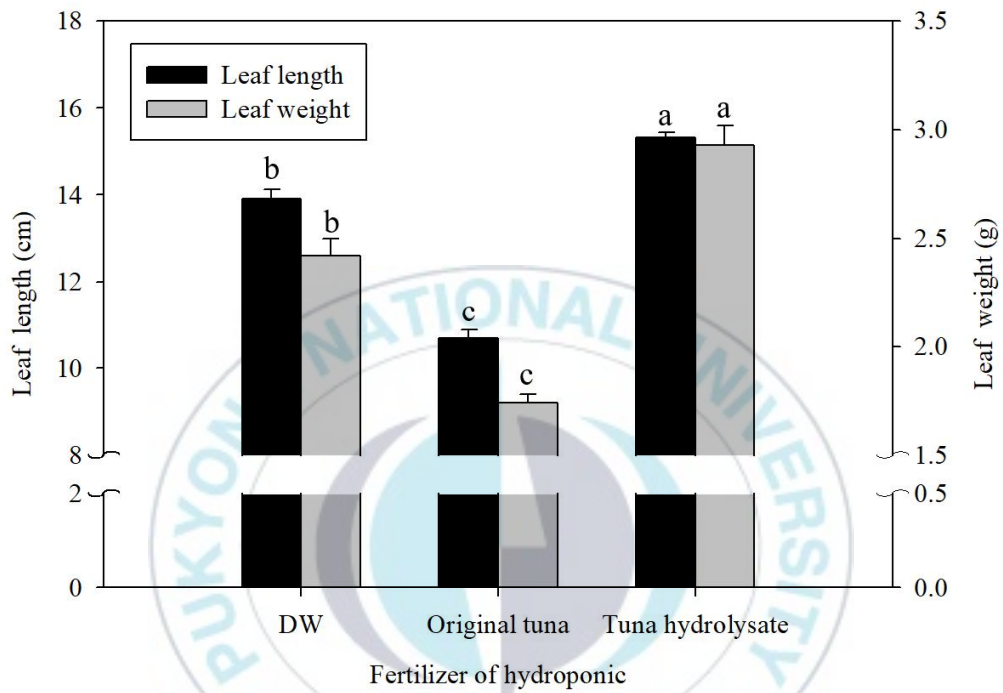


Fig. 6. 50배 희석된 참치 폐수원액과 참치 가수분해물의 수경재배

3.3 정제된 참치 가수분해물의 액체비료 능력

참치 가수분해물의 비료효능을 확인한 후, 참치 가수분해물의 항산화 물질을 정제하기 위해 아세톤 침전과 MWCO를 수행하였다. 항산화 활성시험 결과를 바탕으로, 아세톤 침전으로 얻은 pellet을 MWCO 여과하여 나눈 분획의 수경재배 결과를 나타내었다(Fig. 7). > 5 kDa, 2-5 kDa 및 < 2 kDa의 3개의 분획을 동결건조하여, 나누어진 분획의 분말 양과 비례하게 수경재배 비료용액을 제조하였다. 3가지 분획의 분말 비율은 > 5 : 2-5 : < 2 = 1 : 2 : 10이다. 이에 따른 비료용액의 농도는 각각 20, 40 및 200 mg/L로 설정하여 식물 독성을 나타내지 않도록 하였다. 7일 동안 수경재배한 밀싹 잎의 길이와 무게를 측정하여 성장 효과를 비교하였다(Fig. 5). 그 결과, 항산화 활성이 가장 높았던 < 2 kDa 분획이 대조군 (DW)에 비해 10.84% 향상된 성장률로 가장 유의하게 높은 결과를 나타내었다. 따라서, 참치의 가수분해를 통해 생성된 항산화 물질이 식물의 성장에 도움을 주는 것으로 판단하였다.

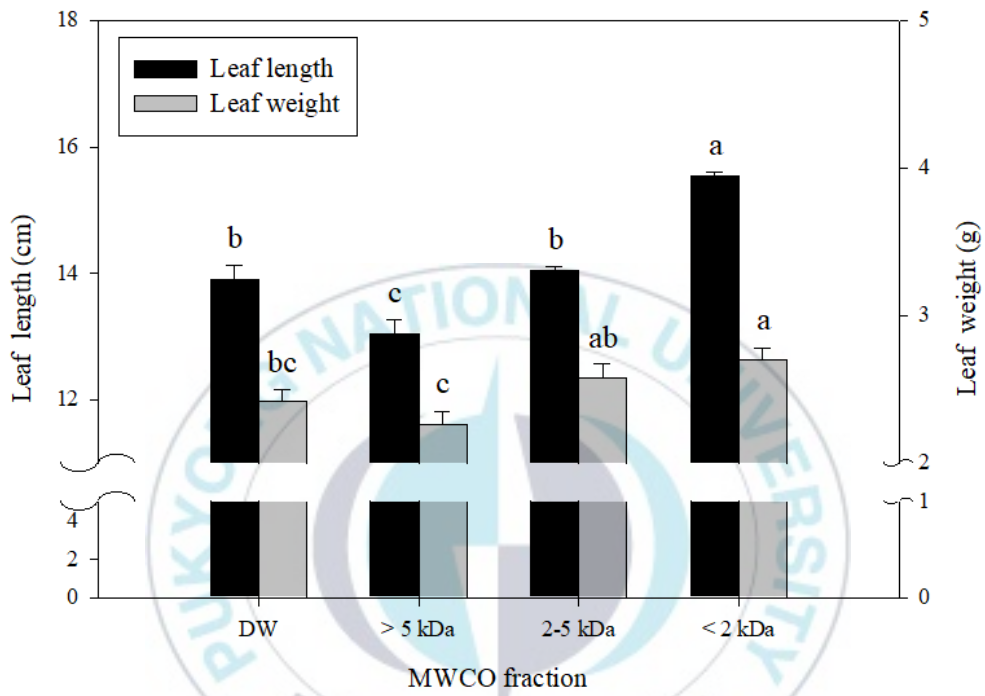


Fig. 7. 아세톤 침전 후 MWCO 분획의 수경재배

3.4 성장률, 건강도 및 항산화 활성

활성산소종(ROS) 또는 자유라디칼은 유기체의 호흡을 통한 산화반응에 의해 자연적으로 생성된다. 이러한 ROS의 양이 과도해지면 산화적 손상을 일으키며 여러 질환을 일으킨다. 항산화 활성 펩타이드는 이러한 ROS와의 결합을 통해 산화적 손상을 방어할 수 있다. 항산화 활성 펩타이드를 수경 재배에 이용하면 bioaccumulation을 통해 ROS로부터 잎의 산화적 손상을 방지할 수 있어, 밀싹의 성장률이 향상되고 항산화 활성이 높은 식물을 생산할 수 있다. 또한, 식물성장과 광합성에 중요한 역할을 하는 엽록소(chl a, b)와 카로티노이드(car)의 함량을 통해 식물 건강도를 판단할 수 있다. 따라서 항산화 펩타이드의 bioaccumulation을 통한 산화적 손상방지 효과를 확인하기 위해, 밀싹 잎의 항산화 활성과 식물 건강을 나타내는 지표인 엽록소(chl a, b), car의 함량을 측정하였다(Table 5).

먼저 50배 희석된 참치 가수분해물을 비료로 재배한 밀싹잎의 항산화 활성, 길이와 무게는 각각 85.52%, 15.32 cm 및 2.93 g이었고 chl a, b 및 car 함량은 3.93, 1.32 및 1.39 mg/g로 대조군에 비해 유의하게 높았다. 가수분해를 통해 독성물질의 분해와 항산화 활성물질의 증가로 식물의 성장을 도왔기 때문이다. 따라서 참치 가수분해물 비료의 항산화 효과는 식물 건강에 좋은 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

참치 가수분해물에서 항산화 물질을 정제하기 위해 차가운 아세톤 침전 후, MWCO하여 분리해낸 각 분획의 식물성장 효과를 비교하였다. < 2 kDa 분획에서 자란 밀싹잎의 항산화 활성, 길이와 무게는 각각 89.05%, 15.60 cm, 2.70 g이었고, chl a, b 및 car 함량은 4.69, 1.61 및 1.49 mg/g으

로 대조군에 비해 유의하게 높았다. 참치 가수분해물의 활성과 비교하였을 때 정제 후 분획에서 더 높은 활성을 나타내었기 때문에 이러한 차가운 아세톤 침전과 MWCO는 향산화 물질을 추출하고 농축하는 데 효과적이었다. 결과적으로 참치 가수분해물의 향산화 펩타이드가 식물성장에 도움을 주는 것을 확인하였다.



Table 5. 7일간 수경재배한 밀싹 잎의 성장률, 건강도 및 항산화 활성

Fertiliser solution	Antioxidant activity (DPPH) (%)	Growth indicator		Leaf health		
		Length (cm)	Weight (g)	<i>chl a</i> (mg/g)	<i>chl b</i> (mg/g)	<i>car</i> (mg/g)
DW	83.14 ± 0.17 ^b	13.91 ± 0.21 ^b	2.42 ± 0.08 ^{bc}	3.41 ± 0.18 ^b	1.18 ± 0.05 ^{ab}	1.39 ± 0.08 ^a
Original	79.38 ± 0.45 ^c	10.68 ± 0.21 ^c	1.74 ± 0.04 ^c	2.69 ± 0.09 ^c	0.99 ± 0.13 ^b	0.86 ± 0.02 ^b
Enzymatic hydrolysate	85.52 ± 0.59 ^a	15.32 ± 0.12 ^a	2.93 ± 0.09 ^a	3.93 ± 0.14 ^a	1.32 ± 0.08 ^a	1.39 ± 0.05 ^a
MWCO	> 5 kDa	86.31 ± 0.38 ^c	13.05 ± 0.21 ^c	2.26 ± 0.09 ^c	3.12 ± 0.04 ^c	1.05 ± 0.09 ^b
	2-5 kDa	87.53 ± 0.46 ^b	14.10 ± 0.05 ^b	2.58 ± 0.09 ^{ab}	3.73 ± 0.11 ^b	1.17 ± 0.06 ^b
	< 2 kDa	89.05 ± 0.55 ^a	15.60 ± 0.06 ^a	2.70 ± 0.08 ^a	4.69 ± 0.34 ^a	1.61 ± 0.15 ^a

IV. 결론

본 연구에서는 전 세계적인 참치 소비량 증가에 따라 발생하는 황다랑어 폐기물을 항산화 활성을 가진 펩타이드로 분해하여, 액체비료로 활용하고자 하였다. 효소 가수분해는 항산화 펩타이드를 생산하기 위한 가장 효율적인 방법으로, 25.49%의 DH 값을 나타내는 시료에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거 활성(93.75%)과 ABTS 라디칼 양이온 탈색 활성(98.12%)을 얻었다. 차가운 아세톤 침전, MWCO, RP-HPLC 및 Q-TOF MS를 통해 항산화 펩타이드를 분리하여 정제하였으며, MS/MS 분석으로 항산화 펩타이드의 서열은 GLLGAP로 나타났다. 이러한 항산화 펩타이드를 수경재배의 비료로 활용하여 밀싹의 성장효과를 확인하였고, 항산화 펩타이드 비료 (< 2kDa)의 성장효과는 대조군(DW)과 비교하여 9.89% 향상되었으며 항산화 활성도 함께 향상되었다. 따라서, 참치 가수분해물로부터 분리한 항산화 펩타이드는 처리비용이 많은 어류폐기물의 재사용을 가능케 하고, 항산화 활성이 높은 기능성 식물을 재배하기 위한 액체비료로 활용하여, 활성산소종(ROS)에 관련된 다양한 질환의 예방 및 치료에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N., & Aluko, R. E. (2011). Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International journal of molecular sciences*, 12(10), 6685–6702.
- Alcouloumre, M. S., Ghannoum, M. A., Ibrahim, A. S., Selsted, M. E. and Edwards Jr, J. E. (1993). Fungicidal properties of defensin NP-1 and activity against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(12), 2628 - 2632.
- ATUNA. (2022). Tuna Fishing statistics : World: Tuna Catch By Species In M/T. <https://www.atuna.com/pages/tuna-fishing-statistics>
- Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D. and Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science and Technology*, 22(9), 498 - 508.
- Cai, B., Wan, P., Chen, H., Huang, J., Ye, Z., Chen, D., & Pan, J. (2022). Purification and Identification of Novel Myeloperoxidase Inhibitory Antioxidant Peptides from Tuna (*Thunnus albacares*) Protein Hydrolysates. *Molecules*, 27(9), 2681.
- Cao, S., Zheng, Y., Yang, Z., Wang, K., & Rui, H. (2009). Effect of methyl jasmonate on quality and antioxidant activity of postharvest loquat fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(12), 2064–2070.
- Caruso, G. (2015). Fishery wastes and by-products: A resource to be valorised. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 9(4), 80 - 83.

- Chakrabarti, S., Guha, S. and Majumder, K. (2018). Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*, 10(11), 1738.
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020 - 3038.
- Cho, J. Y. and Kim, J. K. (2018). Isolation and identification of a novel algicidal peptide from mackerel muscle hydrolysate. *Journal of Chromatography B*, 1093, 39-46.
- FAO. (2022). The state of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards blue transformation. Rome, <https://www.fao.org/3/cc0461en/cc0461en.pdf>.
- Fernández, A., & Kelly, P. (2016). pH-stat vs. free-fall pH techniques in the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Food Chemistry*, 199, 409-415.
- Gao, M. T., Hirata, M., Toorisaka, E., & Hano, T. (2006). Acid-hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*, 97(18), 2414-2420.
- Hartmann, R. and Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163 - 169.
- Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H. and Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42(9), 1266 - 1272.

- Jo, H. Y., Jung, W. K. and Kim, S. K. (2008). Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *Urechis unicinctus*. *Process Biochemistry*, 43(2), 179 - 184.
- Jung, H. Y. and Kim, J. K. (2016). Eco-friendly waste management of mackerel wastewater and enhancement of its reutilization value. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 111, 1 - 13.
- Jung, H. Y. and Kim, J. K. (2020). Complete reutilisation of mixed mackerel and brown seaweed wastewater as a high-quality biofertiliser in open-flow lettuce hydroponics. *Journal of Cleaner Production*, 247, 119081.
- KAWASHIMA, K., ITOH, H., MIYOSHI, M., & CHIBATA, I. (1979). Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 27(8), 1912-1916.
- Kim, E. J., Fathoni, A., Jeong, G. T., Jeong, H. D., Nam, T. J., Kong, I. S. and Kim, J. K. (2013). *Microbacterium oxydans*, a novel alginate- and laminarin-degrading bacterium for the reutilization of brown-seaweed waste. *Journal of Environmental Management*, 130, 153 - 159.
- Kim, J. K. and Dao, V. T. (2011). Scaled-up bioconversion of fish waste to liquid fertilizer using a 5 L ribbon-type reactor. *Journal of Environmental Management*, 92(10), 2441 - 2446.
- Kim, J. K., Jung, H. Y. and Cho, J. Y. (2017). Zero-emission management of organic fisheries' waste and its favorable impact on the environment. In: Collins, M. (Ed.), *Organic Waste*. New York,

- NY, USA: Nova Science Publishers, Inc., pp. 39-69.
- Kim, J. K., Kong, I. S. and Lee, H. H. (2010). Identification and characterization of microorganisms from earthworm viscera for the conversion of fish wastes into liquid fertilizer. *Bioresource Technology*, 101(14), 5131 - 5136.
- Kim, N. Y., Jung, H. Y. and Kim, J. K. (2021). Identification and characterisation of a novel heptapeptide mackerel by-product hydrolysate, and its potential as a functional fertiliser component. *Journal of Chromatography B*, 1180, 122881.
- Kitts, D. D. and Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1309 - 1323.
- Lall, S. P., & Kaushik, S. J. (2021). Nutrition and metabolism of minerals in fish. *Animals*, 11(09), 2711.
- Li, T., Shi, C., Zhou, C., Sun, X., Ang, Y., Dong, X., Huang, M. & Zhou, G. (2020). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from duck breast protein hydrolysates. *LWT*, 125, 109215.
- Lv, R., Dong, Y., Bao, Z., Zhang, S., Lin, S., & Sun, N. (2022). Advances in the activity evaluation and cellular regulation pathways of food-derived antioxidant peptides. *Trends in Food Science & Technology*.
- Meek, J. L., & Rossetti, Z. L. (1981). Factors affecting retention and resolution of peptides in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 211(1), 15-28.

- Mhina, C. F., Jung, H. Y. and Kim, J. K. (2020). Recovery of antioxidant and antimicrobial peptides through the reutilization of Nile perch wastewater by biodegradation using two *Bacillus* species. *Chemosphere*, 253, 126728.
- Nese, N., Martignoni, G., Fletcher, C. D., Gupta, R., Pan, C. C., Kim, H., ... & Amin, M. B. (2011). Pure epithelioid PEComas (so-called *epithelioid angiomyolipoma*) of the kidney: a clinicopathologic study of 41 cases: detailed assessment of morphology and risk stratification. *The American journal of surgical pathology*, 35(2), 161-176.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*, 29(9), 464-472.
- Nhung, N. T. P. and Hsu, J. L. (2021). Characteristics of food protein-derived antidiabetic bioactive peptides: A literature update. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9508.
- Nwachukwu, I. D., & Aluko, R. E. (2019). Structural and functional properties of food protein derived antioxidant peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12761.
- Rajanbabu, V. and Chen, J. Y. (2011). Antiviral function of tilapia hepcidin 1-5 and its modulation of immune-related gene expressions against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Chinook salmon embryo (CHSE)-214 cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1), 39 - 44.
- Seo, J. K., Lee, M. J., Go, H. J., Park, T. H., & Park, N. G. (2012).

- Purification and characterization of YFGAP, a GAPDH-related novel antimicrobial peptide, from the skin of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 743-752.
- Shen, P., Cai, F., Nowicki, A., Vincent, J. and Reynolds, E. C. (2001). Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal of Dental Research*, 80(12), 2066 - 2070.
- Song, R., Shi, Q. Q., Gningue, A., Wei, R. B. and Luo, H. Y. (2017). Purification and identification of a novel peptide derived from by-products fermentation of spiny head croaker (*Collichthys lucidus*) with antifungal effects on phytopathogens. *Process Biochemistry*, 62, 184 - 192.
- Suarez-Jimenez, G. M., Burgos-Hernandez, A. and Ezquerra-Brauer, J. M. (2012). Bioactive peptides and depsipeptides with anticancer potential: Sources from marine animals. *Marine Drugs*, 10(5), 963 - 986.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S. and Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 106 - 115.
- Xydis, G. A., Liaros, S., & Botsis, K. (2017). Energy demand analysis via small scale hydroponic systems in suburban areas - An integrated energy-food nexus solution. *Science of the total environment*, 593, 610-617.
- Zhang, R., Chen, J., Jiang, X., Yin, L., & Zhang, X. (2016). Antioxidant

and hypoglycaemic effects of tilapia skin collagen peptide in mice. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(10), 2157-2163.

Zhang, Y., Ma, L. and Otte, J. (2016). Optimization of hydrolysis conditions for production of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from Basa fish skin using response surface methodology. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(5), 684 - 693.

Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., & Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 72.

Zuconi, F. (1985). Phytotoxins during the stabilization of organic matter. *Composting of agricultural and other wastes*, 73-85.

