

유제품의 기능성 펩타이드 Health Functional Peptides From Milk Products

이 형 주
서울대학교 식품공학과

Lee, Hyong Joo

Department of Food Science and Technology

College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University

Suwon, 441-744 Korea

Abstract

Various peptides derived from food are among the most potent physiologically active agents known, and include anticancer peptides, angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitor exhibiting antihypertension action, opioid peptides, antithrombotic peptides, hypocholesterolemic peptides, immunomodulators, calcium absorption enhancers, and other peptides. Hydrophobic peptides extracted from a Cheddar-type cheese slurry were fractionated by gel chromatography and repeated HPLC. A peptide fraction from HPLC showed high cytotoxicity on the tumor cell lines such as a human colon carcinoma, and comprised of Tyr, Ser, Leu, Gly, and others. Hypocholesterolemic peptides were isolated from peptic hydrolyzates of casein and soy proteins. Macropeptides of 1,000~5,000 dalton were effective on reducing the cholesterol level of mouse serum. Peptides showing high Krigbaum hydrophobicity and ANS surface hydrophobicity resulted in high hypocholesterolemic effect and fecal steroid concentrations. Caseinomacropeptides(CMP) were isolated from whey powder and treated with soluble and immobilized trypsin to obtain antithrombotic peptides. One fraction from the CMP hydrolyzed with immobilized trypsin for 24h exhibited high antithrombotic activity with 52.5% inhibition of platelet aggregation. These results suggested that peptides from various milk products could be utilized as a good bioactive agents for developing health functional foods.

I. 서 론

펩타이드는 다양한 조합의 아미노산이 펩타이드 결합에 의해 중합물을 형성하고 있는 것으로 일반적

으로 분자량 10,000 이하의 것을 말한다. 식품 중에 존재하는 펩타이드는 아미노산을 공급하는 영양 기능, 맛이나 용해성, 유화성 등에 관여하는 감각 기능, 여러 생리활성을 나타내는 생체조절 기능 등에 모두 관여하는데 최근에는 특히 펩타이드의 생체조절 기능에 대한 관심이 높아지고 있다.

생체 내에 존재하는 펩타이드는 여러 가지 생리활성을 나타내는 경우가 많다. 각종 펩타이드 호르몬은 대표적인 예로서 당 대사에 관여하는 insulin이나 glucagon, 위산과 펩신 분비를 조절하는 gastrin, 성장촉진 호르몬인 somatotrophin, 갑상선 자극 호르몬, 자궁 수축에 관여하는 oxytocin, 염증을 제어하는 bradykinin 등이 있다. 기타의 펩타이드 생리활성 물질로서는 면역 반응에 관여하는 interleukins, 신경전달 물질로서 통증에 관여하는 enkephalin, 펩타이드 항생물질 등이 있다. 이와 같이 각종 펩타이드가 생체 내에서 다양한 생리활성을 나타내므로, 우유나 발효 유제품 등에 존재하는 펩타이드로 여러 가지 생체조절 기능을 나타낼 수 있고, 또 이를 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

II. 식품 펩타이드의 생체조절 기능성

생체조절 기능을 갖는 식품 성분으로서는 탄수화물, 펩타이드 혹은 단백질, 지질, 배당체 등이 알려져 있는데, 그 중 펩타이드 성분은 항암, 혈압강하, 혈청 콜레스테롤 강하, 면역증강, 칼슘흡수 촉진 등 광범위한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되었다(1~4).

1. 혈압강하 펩타이드

Angiotensin converting enzyme(ACE)은 angiotensin I을 절단하여 강한 혈압상승 작용을 나타내는 angiotensin II를 활성화시키는 한편, 혈압강하 작용을 갖는 bradykinin을 분해함으로써 고혈압의 원인이 되는 효소인데, 이 효소에 대한 저해물질은 혈압강하 작용을 나타내게 된다. 식품 중의 여러 펩타이드도 ACE 저해효과에 의해 혈압강하 효과를 낸다고 보고되었는데 카제인, 젤라틴, 정어리, 참치, 무화과, zein, ovalbumin, lactoferrin, 대두단백질, 보리 단백질, 돼지혈액, 청주, 발효유 등과 함께 멸치젓, 된장, 대두단백 가수분해물 등이 그 예이다(5,6).

2. 혈소판 응집저해 펩타이드

혈관 내에서 혈액이 응고하게 되면 혈전이 형성되어 혈액순환이 방해를 받게 되는데, 이 결과 심근경색, 뇌졸중, 폐동맥 경색증, 혹은 부종이나 염증을 유발할 수도 있다. Fibrinogen, fibronectin, laminin 등의 세포접착성 단백질은 세포의 수용체인 integrin과 접착성을 나타내는데 이들 단백질에 포함되어 있는 RDG 등의 특정 펩타이드 서열이 그 상호작용에 관여하고 있으며, 따라서 RDGS 등 RDG 서열을 갖는 펩타이드는 혈소판 응집 및 암의 전이에 대한 저해활성을 나타냄으로써 혈전저해 효과를 나타낸다고 알려져 있다(7). 모유의 lactoferrin과 우유의 κ -casein, 쌀 단백질, 대두 단백질, 된장 등이 혈전저해 펩타이드를 함유하고 있는 것으로 보고된 바 있다(2,7)

3. 칼슘흡수촉진 펩타이드

칼슘은 식품 중에 불용성 상태로 존재하거나 소화관 내에서 인산과 결합함으로써 흡수가 어려울 수 있는데, 펩타이드 중 인산 그룹을 함유하고 있는 phosphopeptide는 칼슘의 침전을 방지하여 흡수를

촉진하는 효과를 나타내게 된다. 우유 중에 존재하는 α_{s1} -, α_{s2} -, β -casein은 인산 그룹을 많이 함유하고 있는 펩타이드 부분이 있고 이들 caseinophosphopeptide는 칼슘의 흡수를 촉진하는 펩타이드로서 조제분유나 유아식에 이용되고 있다(8).

4. 면역증강 펩타이드

생체방어를 위한 면역반응의 초기단계에서 호중구나 대식세포의 탐식작용 등이 관여하게 되는데, 많은 펩타이드가 탐식작용 등을 촉진함으로써 면역증강 효과를 나타내는 것으로 보고되었다. 우유와 모유의 α_{s1} - 및 β -casein, immunoglobulin, 그리고 대두 globulin, ovalbumin, 쌀 단백질 등에서 탐식작용 촉진 펩타이드가 발견되었는데, 이들 펩타이드들은 탐식작용 활성화, 항체생산 증가, 병원균 감염에 대한 방어작용 등의 효과가 있는 것으로 알려졌다(2,3).

5. 아편상 펩타이드

Enkephalin 등의 내인성 펩타이드는 진통, 마취, 평활근 수축 등에 관여하는 endorphin으로 작용하는데, 식품 중에도 이들과 유사한 작용을 하는 아편상 펩타이드(opioid peptide)가 존재하는 것으로 알려져 있다. 식품 중의 아편상 펩타이드는 진통, 마취 이외에도 장관연동, 동맥이완, 혈압강하, 수면 조절, 식이섭취 조절에도 관여하는 것으로 보고되었다. 이러한 아편상 펩타이드로 카제인으로부터 β -casomorphin이 보고된 이래, 우유와 모유의 α_{s1} -, β -casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin에서 많이 발견되었고, 밀의 gluten 가수분해물에서도 보고된 바 있다. 한편 opioid antagonist 활성의 펩타이드도 분리되었는데, 이들은 opioid 활성은 갖지 않으면서 opioid 수용체와 결합하여 opioid의 작용을 저해한다. Opioid antagonist 펩타이드는 우유와 모유의 α_{s1} -, κ -casein 및 lactoferrin 그리고 쌀 단백질 등에서 발견되었다(9).

6. 항암 펩타이드

최근에 펩타이드는 각종 종양세포에 대하여 세포독성을 나타냄으로서 항암효과를 나타낸다고 보고된 바 있다. 즉 우리나라의 재래식 간장, 된장, 대두 가수분해물, 치즈균속에서 분리된 각종 펩타이드가 생쥐의 대식세포 종양세포주, 생쥐 섬유아세포주, 인간 대장암 세포주 등에 대하여 항암활성을 나타낸다고 보고된 바 있다(10,11).

7. 혈중 콜레스테롤 감소 펩타이드

식품 중에 포함되어 있는 펩타이드 중 일부는 소화과정 중 담즙산과 결합함으로써 분변 중에 배설되는 콜레스테롤량을 증가시키고 따라서 혈중 콜레스테롤 함량을 낮추는 것으로 보고되었다. 대두단백질 가수분해물에 함유된 펩타이드의 경우, 펩타이드의 표면소수도가 높을수록 콜레스테롤 감소효과는 더욱 커지는 것으로 보고되었고 그중 일부 펩타이드는 분리된 바 있다(12-14).

8. 기타 건강 기능성 펩타이드

이상에서 살펴본 펩타이드 이외에도 몇 종의 펩타이드가 건강 기능성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 우유를 응고효소인 chymosin으로 처리할 때 κ -casein으로부터 해리되는 glycomacropeptide는 위

액 분비 및 위 운동 억제작용, 독소중화 작용, 면역증강 작용, 비피더스 생육촉진 효과를 보이며, 기타 α_{s1} -, β -, κ -casein으로부터 유래된 펩타이드가 항균효과, 세포증식작용, 효소저해 역가를 나타낸다고 보고된 바 있다(3).

III. 치즈 곤죽의 항암 펩타이드

발효유제품 중의 하나인 치즈류의 기능성 펩타이드를 분석하기 위하여, 체다형의 치즈 곤죽을 제조하였다. 치즈 곤죽을 chloroform과 methanol의 혼합용매로써 추출하여 소수성 펩타이드를 분리한 다음 여과하고, Sephadex G-25 gel chromatography와 C18 HPLC 등을 사용해 순차적으로 분획하였다. 모든 분획의 항종양 활성은 생쥐 섬유아세포인 NIH/3T3, 생쥐의 백혈병 세포주인 P388D₁, 생쥐 림프암 세포주인 Yac-1, 인간 위암 세포주인 SNU-1, 인간 직장암 세포주인 SNU C2A 등을 사용하여 *in vitro* 세포독성 검색을 함으로써 항암활성을 확인하였다.

치즈곤죽 펩타이드를 HPLC로 분획하고 각 분획을 각각 여러 암 세포주에 대하여 세포독성을 분석하였는데, 그림 1은 그 중 직장암 세포주에 대한 결과를 보여주고 있다. 그림의 세 분획 중 CSF-11이 가장 높은 항암 활성을 보였으며, IC₅₀ 값은 0.75mg/ml로 나타났다. 이 CSF-11 분획은 P388D₁에도 활성을 보였으나, NIH/3T3나 SNU-1 세포주에는 활성을 나타내지 않았다. 활성분획 CSF-11을 더 분획하였을 때 그 중의 하나인 CSF-112 분획만이 활성을 보였으며, IC₅₀ 값은 0.5mg/ml로 나타나 원 분획보다 높은 활성을 나타냈다.

단일 펩타이드들을 분리하기 위하여 HPLC를 계속하였는데, 그림 2는 그 결과를 보여주고 있다. 그림 중 CSF 112-2222 분획의 아미노산 조성을 분석한 결과 Tyr, Ser, Leu, Gly 등 주로 소수성 아미노산으로 이루어진 것을 알 수 있었다(11).

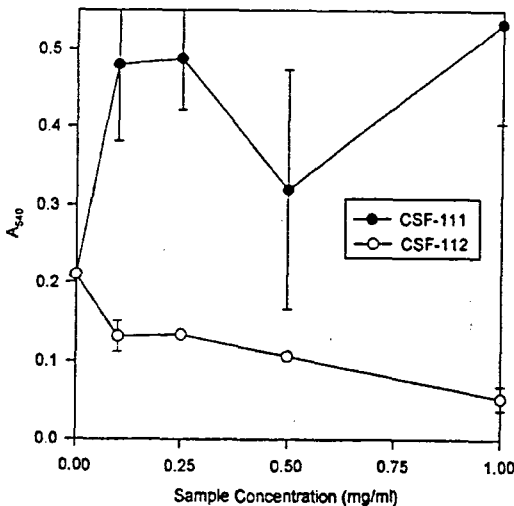


Fig. 1. *In vitro* cytotoxicity of CSF-111 and CSF-112 on SUN-C2A a human colon cancer cell; ATCC CCL 250.1.

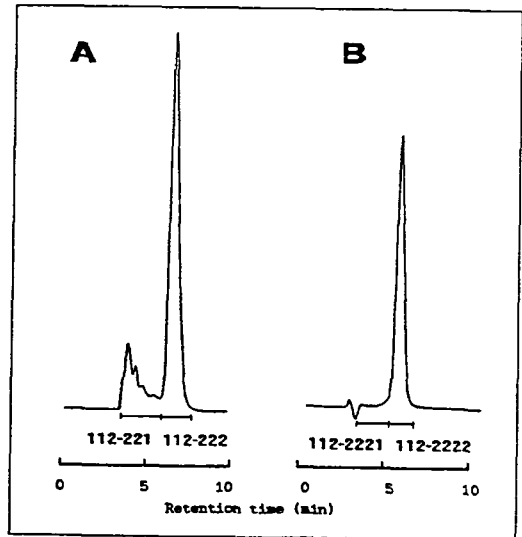


Fig. 2. HPLC chromatograms of isolated peptides from CSF-112-22.

IV. 카제인 가수분해물의 혈중 콜레스테롤 저하 펩타이드

카제인 가수분해물의 소화율이 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 카제인 단백질(CNP), 대두단백질(ISP), 이들 단백질 펩신 가수분해물의 pH에 따른 펩타이드 침전분획들, 그리고 같은 조성의 아미노산 혼합물로 사육한 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도를 측정하였다(16). 그리고, 펩타이드 분획을 펩신과 pancreatin으로 가수분해하여 FPLC로 분석한 분자량 분포로부터 이들의 *in vitro* 소화율을 구하고, 혈청 콜레스테롤 농도와의 상관관계를 구하였다. 그 결과, *in vitro* 소화율이 낮은 식이 펩타이드를 섭취한 흰쥐일수록 혈청 콜레스테롤 농도가 낮아졌으며($r=0.986$), 분획물 1,000~5,000 dalton의 소화 흡수되기 어려운 macropeptide가 많이 생성되는 펩타이드 분획을 섭취한 흰쥐일수록 혈청 콜레스테롤 농도가 낮아졌다($r=-0.932$)(그림 3). 이상으로부터 단백질의 *in vitro* 소화율이 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 영향이 매우 크며, 특히 소화과정에서 생성되는 분자량 1,000 dalton 이상의 macropeptide 및 oligopeptide가 혈청 콜레스테롤 농도를 낮추는 효과가 있음을 알 수 있었다(14).

카제인 가수분해물의 아미노산 조성 및 평균소수도가 혈청 콜레스테롤의 농도에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 카제인, 대두 단백질, 이들 단백질을 펩신으로 가수분해하여 pH에 따른 침전 분획들 및 각 단백질과 같은 조성의 아미노산 혼합물을 흰쥐에 섭취시키고 혈청 콜레스테롤 농도를 측정하였다(15). 각 펩타이드의 아미노산 조성을 분석하고, 이로부터 구한 Lys/Arg 비율 및 소수성 아미노산의

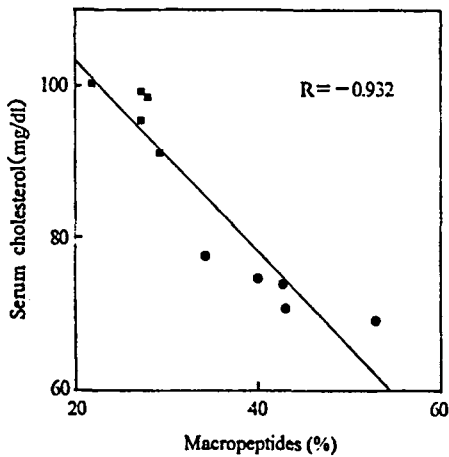


Fig. 3. Relationship between ratio of macropeptides (1,000<MW<5,000) formed by peptic/pancreatic hydrolysis of the dietary peptides and concentration of serum cholesterol in rats.

- : casein peptides,
- : soybean peptides

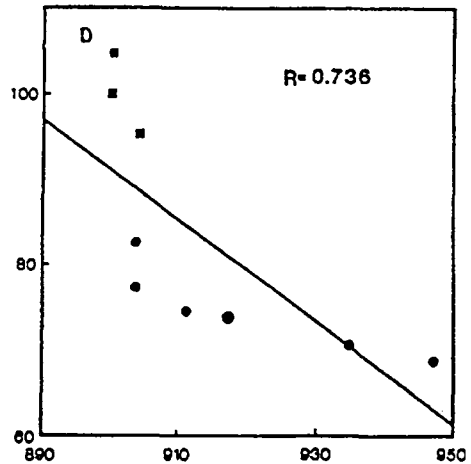


Fig. 4. Relationship between Krigbaum Hydrophobicity of peptides fractions and serum level in rats.

- : casein peptides,
- : soybean peptides

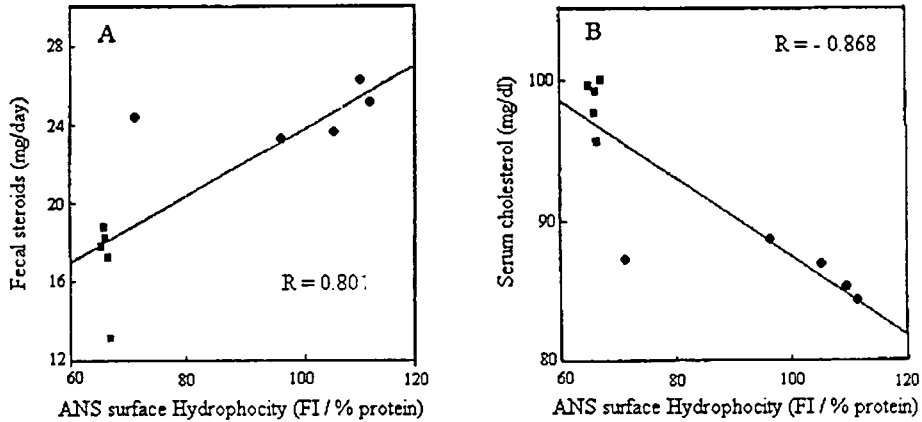


Fig. 5. Relationship between ANS surface hydrophobicity of peptides and serum cholesterol level (A) or fecal steroids excretion (B) in rats.

FI : fluorescence intensity, ■ : casein peptides, ● : soybean peptides.

물분율은 혈청 콜레스테롤의 농도와 상관관계가 없었으며, Tanford, Manavalan 및 Meirovitch법으로 구한 평균소수도와도 상관관계가 없었다. 그러나, Krigbaum법으로 구한 평균소수도와는 상관계수가 -0.736 으로 음의 상관관계이어서, 식이 펩타이드의 Krigbaum 평균소수도가 높을수록 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도가 낮아졌다(13)(그림 4).

카제인 가수분해물의 표면소수도가 혈청 콜레스테롤의 농도에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 카제인(CNP), 대두 단백질(ISP), 이들 단백질 펩신 가수분해물의 pH에 따른 펩타이드의 침전 분획들을 흰쥐에 섭취시키고 혈청 콜레스테롤 농도 및 분변 스테로이드의 배설량을 측정하였다(14). 그리고 각 펩타이드의 표면소수도를 ANS 형광법 및 SDS 결합법으로 측정하여, 이들의 상관관계를 분석한 결과, 펩타이드의 ANS 표면소수도가 높아질수록 분변으로 배설된 스테로이드량은 증가하였으며($r=0.801$), 혈청 콜레스테롤 농도는 낮아졌다($r=-0.868$)(그림 5). 그러나 SDS 표면소수도는 그들과 상관관계가 없었다. 또한 대두 단백질은 가수분해에 의하여 ANS 표면소수도가 증가하였다. 이상의 결과는 흰쥐의 담즙염이, 소화중 생성된 높은 표면소수도의 펩타이드와 결합하여 체외로 배출됨으로써 대두단백질의 섭취에 의한 혈청 콜레스테롤 농도가 낮아짐을 시사하는 것이다(12).

V. 카제인 가수분해물의 혈전 저해 펩타이드

유청 단백질 가수분해물의 혈소판 응집 저해 활성을 분석하였다. 유청 단백질을 12% trichloroacetic acid로 처리하여 탄수화물이 제거된 caseinomacropeptide(CMP)를 분리하고, 펩타이드의 특성을 보기 위해 SDS-PAGE와 아미노산 조성 분석을 실시하였다. CMP를 수용성 및 고정화 trypsin으로 가수분해한 다음, Bio-Gel P4 겔 크로마토그래피로서 분획하고 각 분획의 혈소판 응집 저해 활성을 aggregometer로서 분석하였다.

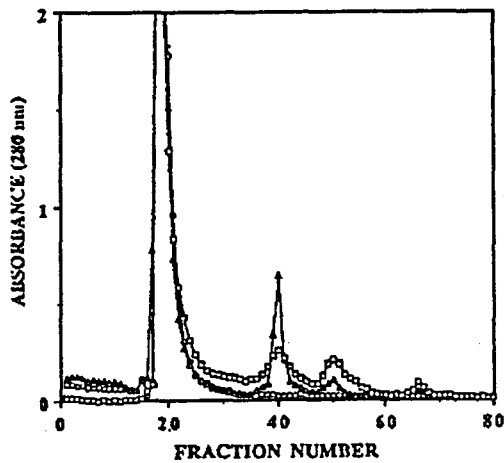


Fig. 6. Gel filtration chromatogram of CMP hydrolyzed by immobilized trypsin on Bio-Gel P4 column(1.5×120cm) ○-○; 0 hr, △-△; 12hr, □-□; 24 hr.

보였으나, 고정화 트립신으로 처리한 경우에는 12 및 24h 분해물에서 활성이 나타났다. 가장 높은 활성은 고정화 트립신으로 24h 처리했을 때 나타났으며, 그 때의 응집저해 활성은 52.5%로서 나타났다.

VI. 결 론

앞의 여러 실험결과에서 보는 바와 같이 우유 단백질에서 유래된 여러 펩타이드들은 인간 대장암 세포주 등의 생육을 저해함으로써 항암 활성을 나타내었고, 분변 스테로이드의 배설량을 높임으로서 혈청 콜레스테롤 감소효과를 나타냈으며, 또한 혈소판 응집저해 물질로 작용하여 혈전저해 효과를 나타낼 수 있었다.

이와 같은 결과는 유제품에서 유래된 여러 종류의 펩타이드들이 항암, 혈청 콜레스테롤 강하, 혈전저해 활성 등을 갖는 신기능 식품소재로서 응용될 수 있는 가능성을 보여주는 것이다. 이들 우유 펩타이드의 생체조절 기능성에 대한 연구는 아직 초기 단계에 있으므로 해당 펩타이드의 일차구조 결정, 작용기작 규명, 미생물 등에 의한 대량발현 등에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것이다. 이와 같은 연구가 성공적으로 수행된다면 우유로부터 여러 가지 생리활성을 갖는 펩타이드의 신소재가 개발되어 각종 생체조절 기능성 식품개발에 응용될 수 있을 것이며 국민보건 향상 및 식품 및 의학관련 산업 발전에 기여할 수 있을 것이다.

Table 1. Effects of fractionated peptides obtained from whey on the ADP-stimulated aggregation of human plateletes

Frac- tion	Inhibition(%)					
	Soluble trypsin			Immobilized trypsin		
	0	12	24(hr)	0	12	24(hr)
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	14.7	52.5
3	0	0	28.1	0	23.9	0
4	0	0	0	0	0	0

트립신 가수분해물을 분획 범위 800~4,000 dalton의 Bio-Gel P4로서 분획한 결과는 그림 6에 나타나 있다. CMP를 수용성 및 고정화 트립신으로 가수분해하였을 때, 두 경우 모두 4 분획으로 나뉘어졌으며 각 분획의 혈소판 응집 저해 활성을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다. 수용성 트립신으로 가수분해한 경우에는 24h 분해물 만이 활성을

참고문헌

1. Clare Mills, E.N., M.J.C. Alcocer, and M.R.A. Morgan. Biochemical interactions of food-derived peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, 3:64 (1992).
2. Fiat, A.M., D. Migliore-Samour, P. Jolles, L. Drouet, C.B.D. Sollier, and J. Cean. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.* 76:301 (1993).
3. Lee, H.J. Health functional peptides from foods. *Proceed. IUFoST '96 Regional Symp. on Non-Nutritive Health Factors for Future Foods.* pp. 192-200. 1996. Seoul.
4. 손동화. 건강기능성 식품 펩타이드 및 그 응용. *식품과학과 산업* 30(1):22 (1997).
5. Yoshikawa, A. Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Technol.*, 4:139 (1993).
6. 신재익, 안창원, 남희섭, 이형재, 이형주, 문태화. 된장으로부터 angiotensin converting enzyme (ACE) 저해 peptide의 분획. *한국식품과학회지* 27:230 (1995).
7. Jolles, P., S. Levy-Toledano, A.M. Fiat, C. Soria, D. Gillessen, A. Thomaidis, F.W. Dunn, and J.P. Chen. Analogy between fibrinogen and casein: effect of an undecapeptide isolated from κ -casein on platelet function. *Eur. J. Biochem.* 158:379 (1993).
8. Kitts, D.D. and Y.V. Yuan. Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends Food Sci. Technol.* 3:31 (1992).
9. Drewnowski, A. Food preference and the opoid peptide system. *Trends Food Sci. Technol.* 3:97 (1992).
10. Lee, H.J., H.J. Woo, and H.D. Jang. Tumor suppressing and antithrombotic peptides from milk products. *Proceed. 8th AAAP Animal Science Congress.* pp. 197-201. 1996. Makuhari Messe, Japan.
11. Kim, H.D., H.J. Lee, Z.I. Shin, H.S. Nam, and H.J. Woo. Anticancer effects of hydrophobic peptides from a cheese slurry. *Foods Biotechnol.* 4:268 (1995).
12. 한응수, 이형주, 손동화. 대두 펩타이드의 표면소수도가 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도 및 분변 스테로이드의 배설량에 미치는 영향. *한국식품과학회지* 25:571 (1993).
13. 한응수, 이형주, 손동화. 대두 펩타이드의 아미노산 조성 및 평균소수도가 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 영향. *한국식품과학회지* 25:552 (1993).
14. 한응수, 이형주, 손동화. 대두 펩타이드의 소화율이 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 영향. *한국영양학회지* 25:585 (1993).
15. 박윤주, 윤여표, 이형주, 장해동. 유청으로부터 고정화 트립신을 이용한 기능성 펩타이드의 생산. *한국식품과학회지.* 28:99 (1996).