

장내 가수분해조건에 의한 Casein 가수분해물의 Angiotensin Converting Enzyme 저해 효과

황유진 · 양희진 · 도정룡¹ · 이수원

성균관대학교 식품생명공학과, ¹한국식품연구원

서 론

현대사회는 식생활 패턴의 변화와 심각한 환경오염, 스트레스 등으로 인해 각종 성인병 및 암 발생이 급격히 증가하는 추세이다. 특히, 고혈압, 동맥경화 등의 성인병의 경우 대부분이 식습관과 관련하여 발병하는 것을 고려하여 식품단백질을 이용한 다양한 생리활성을 가지는 기능성 물질에 대한 관심이 고조되고 있다.

Angiotensin-I converting enzyme(ACE)은 renin에 의해 생성된 angiotensin-I 으로부터 강력한 혈관수축작용을 갖는 angiotensin-II를 합성하는 단계에 관여하는 효소이다. 이는 혈관 평활근과 부신 등에 작용하여 강력한 혈관 수축작용을 나타내어 혈압을 상승시키고, 혈관확장제인 bradykinin을 불활성 상태로 만들어 혈압을 상승시키기도 한다. 따라서 혈압 상승을 억제하기 위해서는 ACE의 활성을 억제하는 것이 중요하다⁽¹⁾.

식품 내의 ACE 활성을 억제하는 인자들은 여러 가지 동·식물 및 많은 어육 단백질의 가수분해물 등에서 보고되었고⁽²⁻⁴⁾, casein 유래의 ACE 저해 peptide에 대한 연구도 많이 보고되었다⁽⁵⁻⁷⁾. 이러한 식품 내의 ACE 활성 억제 인자들은 기존의 혈압강하제에 비해서는 낮은 활성을 지니고 있지만, 상시 섭취하는 식품 중에 존재하여 쉽게 섭취할 수 있는 용이성과 안전성을 고려한다면 그 유용성에 대한 기대는 매우 크다⁽⁸⁾.

본 연구는 우유 단백질인 casein에서 ACE 저해 peptide를 검색하기 위한 기초연구로써 casein을 장내 단백질 가수분해효소로 분해시킨 가수분해물에 대한 ACE 저해효과를 확인하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시료 제조

장내 단백질 가수분해효소에 의한 casein 분해산물들의 ACE 저해 활성을 비교하기 위하여 인공위액, 인공장액, 인공위액과 장액 연속처리를 각각 반응 조건에 맞춰 실시하였다.

인공위액은 Kobayashi 등⁽⁹⁾의 방법에 따라 5N HCl을 사용하여 pH 2.0으로 조정된 1% casein에 1% pepsin을 첨가하여 반응시켰다. Pepsin을 첨가한 후 37°C에서 2시간 반응시켰고,

30분 간격으로 가수분해물을 채취하였다. 채취한 시료는 80℃에서 10분간 열처리로 불활성화시켜 실험에 사용하였다.

인공장액은 Fruya 등⁽¹⁰⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. 5N NaOH을 사용하여 pH 8.0으로 조정된 1% casein에 1% pancreatin과 0.1% oxgall을 첨가하여 사용하였다. 시료의 채취는 인공위액에서와 동일하게 실시하였다.

그리고 인체 내에서 연속적인 소화과정 중 가수분해물의 ACE저해효과를 시험하기 위하여 인공위액을 처리한 시료를 다시 인공장액으로 처리하였다. 이것은 인공위액을 30분 처리한 후 인공장액을 첨가하여 위의 실험방법과 동일하게 시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

2. ACE 저해효과의 측정

ACE 저해효과는 Cushman과 Cheung⁽¹¹⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. 가수분해물 50 μ l에 ACE 조효소액 50 μ l와 sodium borate buffer(pH 8.3) 100 μ l를 첨가하여 37℃에서 5분간 전 배양 하였다. 여기에 기질로 Hippuryl-His-Leu 용액을 50 μ l를 첨가하여 37℃에서 30분 반응시킨 후 1N HCl로 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate 1.5mL를 가하고, 15초간 교반한 후 4,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 1mL를 취하였다. 이 상층액을 120℃에서 완전히 건조시킨 후 증류수 3mL를 첨가하여 용해시켜 228nm에서 흡광도를 측정하였다.

전기영동

시간에 따른 casein 가수분해물의 분해정도를 확인하기 위하여 Laemmli⁽¹²⁾의 방법에 준하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다.

결과 및 고찰

장내 단백질 가수분해효소에 의한 casein 분해산물들의 ACE 저해 활성을 비교하기 위하여 인공위액, 인공장액 및 인공위액과 장액 연속처리를 각각 반응 조건에 맞춰 일정시간 casein을 가수분해한 후 ACE 저해활성 정도를 비교하였다. Fig. 1에서 나타낸 것과 같이 30분 동안 가수분해한 결과, 가수분해물 모두 ACE 활성을 저해하였으며, 저해 활성은 각각 58%, 57% 및 86%로 나타났다. 가수분해 시간을 달리한 결과, 인공위액과 인공장액 처리군은 30분에서 2시간까지 ACE 저해활성이 반응 시간에 비례하여 증가하였으며 2시간에서는 최대의 ACE 저해 활성을 나타내었고, 그 값은 69%와 80%로 측정되었다. 그리고 인공위액 처리군보다 인공장액 처리군의 ACE 저해효과가 더 높게 나타났는데, 이와 같은 결과는 효소간의 단백질 분해 능력과 반응부위가 서로 달라 각기 다른 분해물을 생성하여 ACE 저해율에 차이가 있는 것으로 생각된다.

또한, 인공위액으로 처리한 후 다시 인공장액으로 가수분해한 처리군은 각각 단독으로 처리했을 때보다 ACE 저해율이 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 인공위액에서 생성된 기준의 peptide를 인공장액의 효소가 다시 분해함으로써 새롭게 생성된 peptide들이 ACE 저해율을 상승시키는데 영향을 미치는 것으로 판단되어진다.

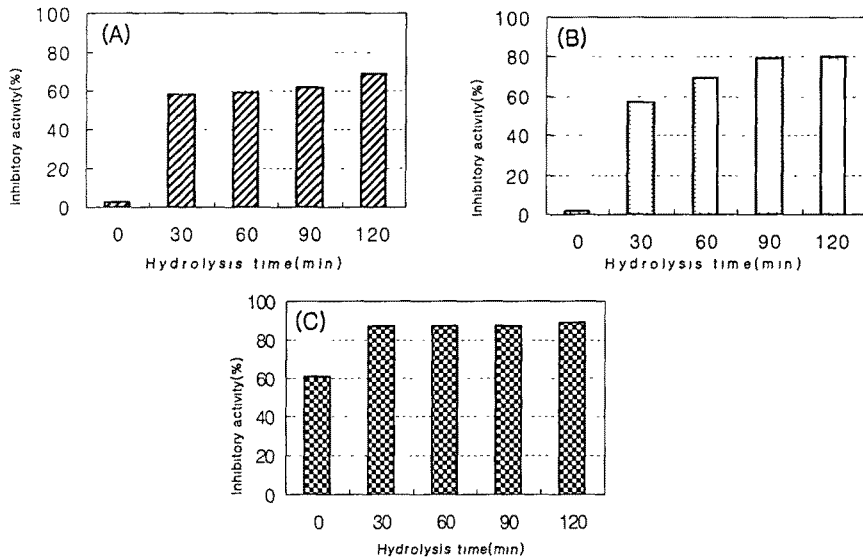


Fig. 1. ACE inhibitory activity of 1% casein hydrolysate by gastrointestinal protease digestion.

Hydrolysis by simulated gastric fluid(A), simulated intestinal fluid(B) and simulated gastric fluid & simulated intestinal fluid(C).

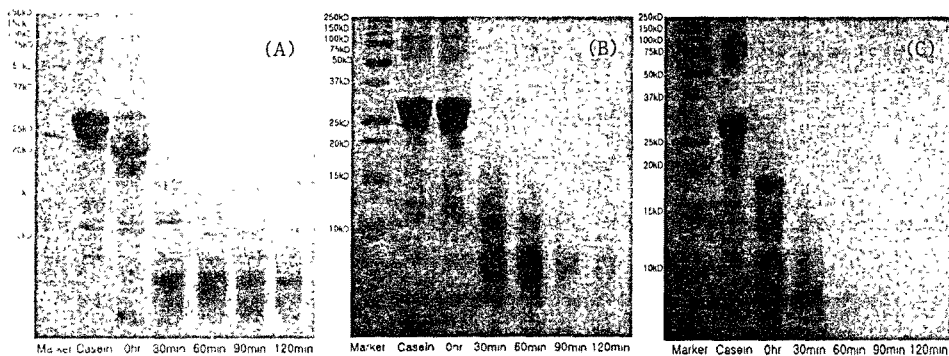


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of casein hydrolysates.

Hydrolysates by simulated gastric fluid(A), simulated intestinal fluid(B) and simulated gastric fluid & simulated intestinal fluid(C).

Fig. 2는 인공위액, 인공장액 및 연속적인 인공위액과 인공장액의 처리에 의한 casein의 가수분해 정도를 확인하기 위한 전기영동 결과이다. 인공위액으로 처리된 casein 가수분해물보다 (Fig. 2(A)) 인공장액으로 처리된 가수분해물의(Fig. 2(B)) band가 더 작은 분자량을 가진 물질로 분해되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 인공 위액과 장액 처리를 함께 받은 가수분해물

은 가수분해 1시간 안에 대부분 분해가 이루어졌으며 인공위액과 인공장액을 단독처리한 군에 비해 훨씬 작은 분자량을 가지는 것으로 관찰되었으며 본 실험에서 행한 전기영동으로는 분자량을 관찰할 수가 없었다(Fig.2(C)). ACE 저해활성을 보이는 대부분의 peptide가 10개 미만의 아미노산 잔기로 이루어져 있는 것으로 알려져 있고, 위의 전기영동의 결과에서 상대적으로 큰 분자가 많은 인공위액 분해물의 경우 ACE 저해율이 인공장액 분해물보다 낮게 나타나는 것으로 생각된다. 그리고 가장 많이 분해된 인공위액과 장액 연속 처리 군은 가장 높은 ACE 저해율을 나타내는 것 또한 이와 같은 이유라고 생각된다.

본 실험의 결과는 우리가 항상 섭취하는 우유 중에 ACE 저해물질이 존재한다는 점에서 그 유용성이 기대되어진다. 이것을 고혈압 예방을 위한 기능성 식품이나 의약품으로 개발하기 위해서는 ACE 저해 peptide 중 혈압강하 효과를 나타내는 성분에 대한 구체적인 연구와 동물모델을 이용한 효능 및 안전성 검증과 같은 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

장내 단백질 가수분해효소에 의한 casein 분해산물들의 ACE 저해 활성을 비교하기 위하여 인공위액, 인공장액 및 인공위액과 장액 연속처리를 각각 반응조건으로 일정시간 casein을 가수분해한 후 각 효소 가수분해물이 혈압상승 peptide 생성효소인 Angiotensin converting enzyme (ACE)에 대한 저해활성을 측정하였다. 각 소화액에 따른 가수분해물은 모두 ACE 저해활성을 나타내었으며, 2시간 효소처리를 하였을 때, 인공위액, 인공장액, 인공위액과 장액 가수분해물은 각각 69%, 80% 및 88%로 최대 ACE 저해활성을 보였다. 그리고 casein의 가수분해 정도를 확인하기 위한 SDS-PAGE에서는 인공위액으로 처리한 군보다 인공장액으로 처리한 군이 더 작은 분자량으로 분해되는 것을 확인할 수 있었고, 인공위액과 장액을 함께 처리한 군에서는 1시간 안에 대부분의 분해가 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다.

참고문헌

1. Manjusri, D. and Richard, L. S. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 6762-6768.
2. Matsui, L. T. et al. (2002) *J. Pept. Sci.*, 8(6), 267-274.
3. Saito, T. T. et al. (2000) *J. Dairy Sci.*, 83(7), 1434-1440.
4. Okamoto, A. H. et al. (1995) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59(6), 1147-1149.
5. Maruyama, S. et al. (1989) *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2763-2767.
6. Yamamoto, N. et al. (1994) *J. Dairy Sci.*, 77, 917-922.
7. Nakamura, Y. et al. (1995) *J. Dairy Sci.*, 78, 777-783.
8. Shimizu, M. (1994) *Animal Sessions in 24th International Dairy Congress.*, 18-22.
9. Kobayashi, Y. et al. (1974) *Jpn J. Microbiol.*, 29, 691-697.
10. Furuya, S. et al. (1979) *Br. J. Nutrition.*, 41, 511-520.
11. Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971) *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1637-1648.
12. Laemmli, U. K. (1970) *Nature*. 227(259), 680-685.