

한우 등심과 우둔에서 추출한 Myosin B를 pepsin으로 가수분해한 단백질의 변화와 Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 효과

김영주 · 최담미 · 진구복*

전남대학교 동물자원학부 식육과학연구소

서 론

최근 소비자들은 Well-being시대를 맞이하여 건강과 관련하여 기능성 육제품을 선호하고 있는 추세로 식품 단백질로부터 다양한 생물학적 활성단백질이 연구되고 있다. Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해제는 고혈압을 억제하는 능력을 갖고 있으며 ACE는 불활성형인 Angiotensin I을 활성형의 Angiotensin II로 바꿔 혈압상승작용을 하여 고혈압을 유발하였고, 혈관 이완작용을 하여 혈압을 저하시키는 bradykinin의 분해를 촉진한다⁽¹⁾. 이러한 ACE의 활성을 억제하기 위해서 동물의 유즙에서 유래되는 우유 단백질을 이용한 ACE 저해 펩타이드에 관해 연구하였고⁽²⁾, 멸치 가공 부산물인 자숙폐액을 이용하여 pepsin으로 가수분해시켜 ACE 저해 효과를 연구하였으며⁽³⁾, 돼지 골격근 단백질의 가수 분해물로부터 ACE 저해단백질을 연구하였다⁽⁴⁾. 하지만 우리나라 고유의 전통소인 한우에 관한 ACE 연구는 그리 많이 수행되고 있지 않기 때문에 한우에 ACE를 저해하는 기능성 펩타이드를 탐색하여 항 고혈압인자를 규명한다면 한우의 소비촉진에 크게 기여할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구는 한우의 등심과 우둔으로부터 추출한 Myosin B를 단백질 분해효소인 pepsin을 이용하여 가수분해시키고, 그 가수분해시간 별로 전기영동으로 분석하여 단백질의 변화를 검토하고, ACE저해 활성을 측정하여 IC50 값을 구하여 한우 ACE 연구에 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

재료 및 방법

한우의 등심과 우둔을 식육도매점에서 구입하여 외부지방과 결체조직을 제거하고 분쇄기(M-12s, 한국후지 플랜트(주), 부산, 한국)로 만육시켰다. 고기의 pH를 측정하였고, AOAC(1995)⁽⁵⁾에 따라서 일반성분을 측정하였다. 분쇄한 한우 고기 시료를 1:3의 비율로 1 mM NaN3가 첨가된 Weber-Edsall solution (0.6 M KCl, 0.04 M NaHCO₃, 0.01M Na₂CO₃)과 섞어 약하게 냉장고에서 40시간동안 교반 후 0.6 M KCl과 1:2의 비율로 섞어 30,000×G으로 1시간동안 원심분리를 실시하여 상등액을 취했다. 이것을 증류수로 15배 희석하여

12,000× G에서 30분간 원심분리하여 pellet을 수거하고, 최종농도를 0.5 M NaCl, 1 mM Na₃N으로 맞춰 Myosin B의 농도를 Lowry-Folin method (1951)(6) 로 측정하였다. 등심과 우둔의 Myosin B 농도를 0.5 NaCl로 희석하여 10 mg/mL로 조절하고 그것의 절반은 98℃의 끓는 물에 10분간 끓이고 다시 냉각하였다. 가열한 것과 가열하지 않은 것 모두 pH를 2로 맞춰주고 가수 분해 효소 pepsin은 0.05 M Citrate buffer와 0.05 M tris-HCl buffer를 이용하여 5 µg/uL 농도로 1 mL 씩 준비하였다. 등심과 우둔의 가열, 비가열 Myosin B의 5 mL를 효소와 100:1의 비율로 50 uL 첨가한 후 각 1, 3, 6시간 간격으로 37℃에서 반응시켰다. 반응은 97℃에서 10분간 가열함으로써 종료시켰고 pH 7.5로 조정 한 후, 15,000× G에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 취해 Lowry 정량⁽⁶⁾을 하였다. 가수분해물의 농도를 15 µg/uL로 조정하여 Laemmli(1970)⁽⁷⁾의 방법으로 전기영동을 실시하였다. ACE 저해효과의 측정은 Cushman과 Cheung (1971)⁽⁸⁾의 방법을 이용하여 ACE 억제 활성을 검사하였다. 가장 활성이 좋은 ACE의 농도를 찾아 10 µg/mL의 농도의 각각의 가수분해물의 ACE를 위와 같은 방법으로 실시하여 ACE 저해활성을 측정하여 IC₅₀ 값을 산출하였다. IC₅₀은 ACE를 50% 저해하는데 필요한 mL를 계산하여 peptide의 양으로 환산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = (E_c - E_s)/(E_c - E_b) * 100$$

E_c= 시료 대신 증류수 첨가 시의 흡광도

E_s= 시료 첨가 시의 흡광도

E_b= 반응정지 후 시료 첨가 시의 흡광도

결과 및 고찰

일반성분과 SDS-PAGE 전기영동

일반성분 분석결과 등심 부위의 수분, 지방 그리고 단백질 함량은 각각 63.66, 11.09 그리고 14.57%이고, pH는 5.77이었으며 우둔 부위는 각각 73.45, 2.65, 그리고 17.17%이고 pH는 5.45로 등심이 우둔보다 지방의 함량이 높았고 단백질은 우둔이 등심보다 더 많이 함유하고 있었다.

한우의 우둔과 등심으로부터 추출한 Myosin B를 pepsin으로 가수분해시킨 가수분해물의 전기영동의 결과 가수분해 시간이 길어질수록 나타나는 밴드의 수가 감소하는 경향이였다. 이러한 결과는 가수분해 시간이 길어질수록 더욱 분해가 촉진됨을 시사하고 있다. 12%의 Separating gel로 전기영동한 결과(Fig. 1.) 등심의 Myosin B를 가열처리하여 pepsin으로 가수분해 시키지 않은 것은 96 kDa이하 그리고 1시간 또는 3시간동안 가수분해한 처리구는 약 44 kDa이하의 분자량을 갖는 밴드가 나타났으며, 가수분해 1시간째에 25와 44 kDa의 밴드가 점차 소실되는 경향이였다. Myosin B를 가열하지 않은 등심의 경우 가수분해를 시키지 않은 경우 91 kDa이하의 분자량을 갖는 단백질로부터 1, 3, 6시간의 가수분해물은 44 kDa이하의 단백질 밴드가 나타났으며, 27 kDa의 분자량을 갖는 밴드는 그대로 유지가

되었으며, 37 kDa은 가수분해 시간이 증가할수록 밴드가 진해지는데 비해, 32, 40 및 44 kDa의 분자량을 갖는 단백질의 밴드가 사라지는 것으로 보아 가수분해가 진행됨에 따라 소멸되어지는 것을 알 수 있었다(Fig. 1. A). 따라서 pepsin으로 가수분해할 경우 44-45 kDa 이상의 분자량을 갖는 단백질은 분해가 되었음을 알 수 있었고, 20 kDa이하의 단백질은 가수분해에 의하여 더욱 손실됨을 알 수 있었다. 우둔의 Myosin B의 가수분해물의 전기영동을 살펴보면(Fig. 1. B), 가열처리한 것을 Pepsin으로 1, 3 그리고 6시간 가수분해한 경우 44 kDa이하의 단백질 밴드부터 나타났으며, 가수분해 1시간째 25, 32, 40 및 44 kDa의 분자량을 갖는 단백질 밴드가 소실되었다. 가열하지 않은 것은 가수분해 3시간째에 25와 33 kDa, 6시간째에는 44 kDa의 단백질 밴드가 가수분해에 의해서 소멸되는 반면, 28과 41 kDa의 분자량을 갖는 단백질 밴드는 점차 진해지는 경향이였다. 가열처리한 경우 가열하지 않은 단백질에 비해 열에 의한 변성으로 인해 단백질의 수와 양이 감소되었으며, 가열함에 따라 특정 단백질에 영향을 주어, 가수분해의 시간이 경과 할 수록 분해되어지는 단백질들이 많아지고, 분해된 물질로 인해서 생성되는 단백질도 있었다.

ACE 억제 활성도(%)

ACE 억제 활성도를 측정한 결과 단백질의 농도가 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일때 ACE의 농도가 60 mU는 58%, 100 mU는 38%, 500 mU는 38%, 1 U에서는 14%의 저해율을 가졌다. ACE의 농도가 높을 때에는 HHL에 강하게 반응하여 hippuric acid의 생성이 많아진 것으로 사료되며, 가수분해물의 농도가 높아짐에 따라 hippuric acid의 생성이 감소되는 것 또한 ACE를 억제하는데 중요한 조건이 되는 것임을 알 수 있었다. 60 mU의 ACE로 가수분해물의 ACE 억제활성도를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 등심에서 가수분해를 하지 않은 경우 가열과 비가열에서는 유의차가 보이지 않았으며($P>0.05$), 가수분해 1시간에서는 가열한 가수분해물의 저해율이 비 가열에 비하여 높았으며, 가수분해 시간이 늘어남에 따른 ACE의 저해율은 상승하는 경향을 보였다. 우둔은 가열처리여부와 가수분해 시간과의 상관관계의 유의차가 없었으므로($P>0.05$) 가열처리여부와 분해시간으로 종합하여(Pooled) 표시하였다. 가열처리여부에 따른 유의차가 발견되지 않았지만($P>0.05$), 가수분해 시간의 증가에 따른 저해율은 유의차가 있게 상승하였다($P<0.05$)(Table 1). 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도일 때 ACE Inhibition(%)로 IC 50을 살펴보면 가수분해 시간이 긴 단백질에서 먼저 IC 50값을 구할 수 있었으며, 본 실험에서는 6시간에서 IC50이 나타났다.

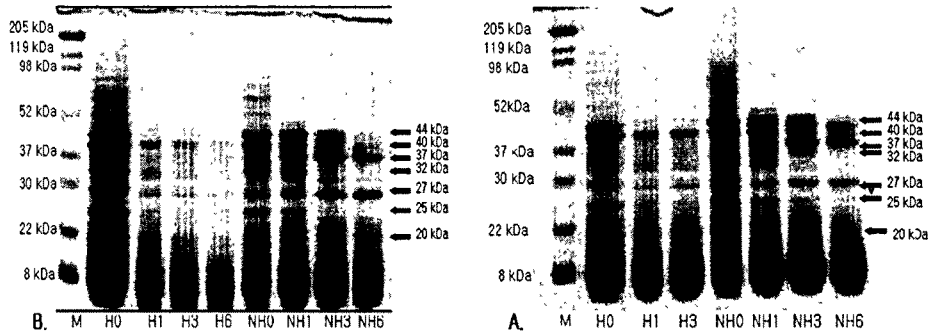


Figure 1. SDS-PAGE profile of myosin B extracted from Korean Native beef, Hanwoo, with different meat cuts and digestion time. (A = Loin, B = Round)

Table 1. ACE inhibitory activity (%) of enzymatic hydrolysates from heated or non-heated Korean native beef(round and loin) at different incubation times at 37°C.

		0 hr	1 hr	3 hrs	6hrs
Loin	Heating(H)	23.09±9.61b	45.60±0.13a	42.27±1.45a	-
	Non-heating(NH)	20.26±0.41c	30.88±2.3bc	40.39±3.61a	48.08±9.76a
Round	Pooled	27.62±0.18b	41.47±11.8a	42.53±3.59a	46.57±5.98a

^{a-c} Means with same superscript having same row are not different ($p < 0.05$)

^{A,B} Means with same superscript having same column are not different ($p < 0.05$)

요약

본 연구는 고혈압을 억제하는 ACE inhibitory peptide가 한우에 함유되어 있는지를 조사하기 위한 기초연구로 한우의 우둔과 등심으로부터 Myosin B를 추출하여 가열한 것과 가열하지 않은 것으로 구분하여 pepsin으로 0, 1, 3, 6시간 동안 37°C에서 가수분해 시켰다. 가수분해물을 전기영동을 실시하여 pepsin 처리시간에 따른 단백질의 변화를 검토하였고, ACE 저해 활성을 측정하였다. 전기영동의 결과 가열한 것은 가열하지 않은 것에 비해서 단백질의 변성과 소멸이 많이 일어나 밴드의 수가 적었다. Pepsin으로 가수분해한 시간이 길어짐에 일부 단백질이 소실되었고, 저분자의 단백질이 생성되었다. Pepsin으로 가수분해함에 따라 등심과 우둔에서 25, 32, 40 및 44 kDa는 소실되었고, 37 kDa의 분자량을 갖는 밴드는 생성되었으며, 27 kDa의 단백질은 처음상태 그대로 유지되었다. 가수분해물을 이용

하여 ACE 저해활성도를 측정한 결과, 등심은 1시간 가수분해시 유의차가 있었으나, 우둔은 가열여부에 따라 유의차가 발견되지 않았다. 반면 등심과 우둔 모두 가수분해 시간이 증가하면 ACE 저해율은 상승하는 경향을 보였다. 이와 같은 결과를 토대로 한우로부터 추출한 Myosin B의 ACE 억제활성이 우수한 단백질을 찾아 아미노산 염기서열을 밝히고 고흡압 억제제로 합성 개발하는 연구를 차후 추진할 예정이다.

참 고 문 헌

1. Ondetti, M.A. and Cushman, D.W. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51, 283-308.
2. Yamamoto, N. et al. (1994) *J. Dairy Sci.* 77, 917-922
3. Cheong-II, Ji. et al. (2002) *Korean J. Food Sci. Technol.* 34(3), 529-532
4. Arihara, K. et al. (2001) *Meat Science*, 57, 319-324.
5. AOAC. (1995) Association of official analytical chemists, Washington DC.
6. Lowry, OH. et al. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
7. Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, 227, 680-685.
8. Cushman, D. W and Cheung, H. S. (1971) *Biochem. Pharmacol.* 20, 1637-1647