

ABTS 법을 이용한 유단백질 가수분해물의 항산화 활성 측정

우성호* · 김거유

강원대학교 동물생명과학대학 동물식품응용과학과

서 론

사람을 비롯한 생물은 항산화 메커니즘을 가지고 있어 산화적 손상으로 스스로를 보호할 수 있으나 이들 손상을 완전히 제거하기에는 충분하지 않다(Codon, 1987). Free Radical을 소거할 수 있는 화합물이나 과산화 억제물질과 같은 항산화제를 함유한 식품은 인체의 산화적 스트레스에 의한 손상으로부터 보호해 줄 수 있을 것으로 판단되어 식품 첨가물로서의 항산화제가 개발되고 있고, 각종 질병 및 노화 등에 활성산소 및 과산화물이 직접적으로 작용한다는 사실이 밝혀져 질병 예방 및 치료제로서의 항산화 연구가 수행되고 있다. 다양한 합성 및 천연 항산화제가 보고되었으나 이들은 안전성과 약한 활성 등의 한계가 있으므로 천연으로부터 얻은 자연적 항산화제가 바람직한 것으로 판단된다(Haliwell 등, 1984). 식품 단백질에서 유래하는 대표적인 peptide로는 opioid peptide, ACE 저해 peptide, 혈소판 응집 저해 peptide, 콜레스테롤 저해 peptide, 면역 활성 peptide, 항암 peptide 등이 알려져 있으며 특히 우유 단백질은 아주 다양한 생리활성 peptide를 생산할 수 있는 고기능성 단백질원으로 이용되고 있다(이, 1998).

본 실험의 목적은 우유 케이스인과 유청 단백질 가수분해물의 항산화능을 검토해 보고자 ABTS 법을 이용하여 유단백질의 radical cation 소거 활성능을 측정 비교해 보는데 있다.

재료 및 방법

실험에 사용된 주요 시약중 ABTS [2,2-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid)], Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)는 Sigma chemical (USA)사의 것을 사용하였으며, 기타 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다. 우유는 강원대학교 부속 목장의 홀스타인에서 착유한 신선한 혼합유를 사용하였다.

우유로부터 산케이신의 분리는 Barrefors 등(1985)의 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 유청단백질의 분리는 케이스인 분리 후 남은 유청에서 여분의 케이스인 단백질을 제거하기 위해 1N NaOH를 이용하여 pH를 7.5로 올린 후 1N HCl로 천천히 pH를 4.6으로 조정한 후 3,885×g로 4℃에서 20분간 원심분리 하였다. 이 산성 유청에 황산암모늄을 완전 포화시킨 후 하룻밤 방치한 다음 원심분리(3,885×g, 4℃, 20min)하여 유청단백질 침전물을 얻었고 증류수로 투석하여 염을 제거한 후 동결건조 하여 실험에 이용하였다.

유단백질의 가수분해는 Morato 등(2000)의 방법에 준하여 trypsin을 이용하여 casein과 whey를 가수분해하였으며, 0.01M potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 Enzyme/Substrate 비율을 1:20(w/w)으로 하여 37℃에서 30분간 분해하였다. 분해물은 10분 간격으로 채취하여, 95℃에서 15분간 열처리하여 반응을 중지시켰다. 가수분해물의 NPN(Non Protein Nitrogen)은 Lowry 등(1951)의 방법에 준하여 UV/VIS Spectrophotometer를 이용하여 540nm(Jasco V-530, Japan)에서 흡광도를 측정하였으며, Bovine Serum Albumin(Sigma Co, USA)을 사용한 표준 곡선에 의해 환산하였다.

ABTS radical cation decolorization의 측정은 Pellegrini 등(1999)의 방법에 준하여 실시하였다. 일정량의 시료와 ABTS solution 1 mL를 섞은 후 실온에서 10분간 반응시킨 후 734nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의해 저해율을 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \{(\text{Control O.D} - \text{Sample O.D}) / \text{Control O.D}\} \times 100$$

결과 및 고찰

Casein과 whey의 가수분해 물에 대한 항산화 능을 측정하기 위해 연구를 수행하였다. Fig. 1은 pH에 따른 Total antioxidant capacity(TAC)를 나타낸 것으로서 casein 및 whey 모두 pH 6.0에서 보다 pH 7.4에서 더 높은 TAC 결과를 나타내었으며 Chen 등(2003)의 보고와 일치하는 경향을 보였다. Fig. 2는 casein과 whey의 농도에 따른 TAC 값의 변화를 나타낸 것으로 casein이 whey보다 농도가 증가함에 따라 TAC 값이 더 빨리 증가하였으며 이는 배양시간이나 pH에 따른 TAC 측정에서와 같이 casein이 whey보다 더 높은 TAC 값을 나타내고 있다는 것을 확인할 수 있다. 농도가 증가함에 따라 TAC값이 점차 증가하는 경향을 나타내고 있으나 2,000 μ L/mL에서는 TAC 값이 감소하여 casein, whey 모두 유사한 TAC 값을 나타내고 있다. 이는 단백질 농도가 짙어짐에 따라 측정하는 빛의 투과율에 영향을 주었기 때문인 것으로 사료된다. Fig.3은 trypsin에 의한 casein 및 whey의 가수분해 정도를 NPN의 증가를 통하여 간접적으로 알아본 것으로 반응 10분 이후부터는 NPN 량이 더 이상 증가하지 않는 것을 알 수 있으며 casein보다 whey에서 분해율이 낮은 것을 볼 수 있다. Wit 등(1984)에 의하면 whey protein

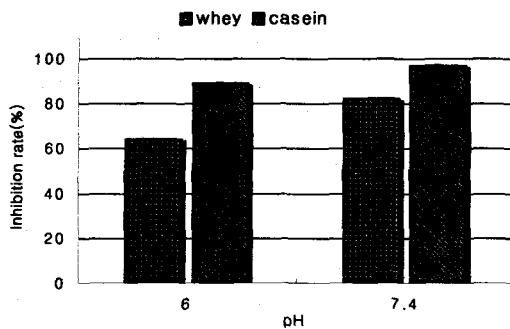


Fig. 1. Antioxidant activity of casein and whey at different pH(400 μ g/mL).

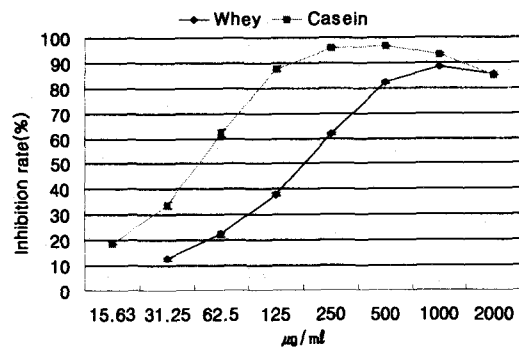


Fig. 2. Antioxidant activity of casein and whey different concentration.

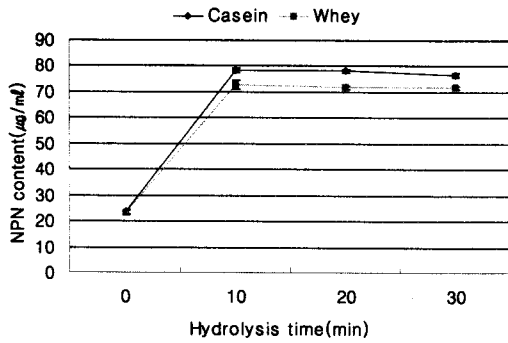


Fig. 3. Hydrolysis rate of casein and whey with different incubation time.

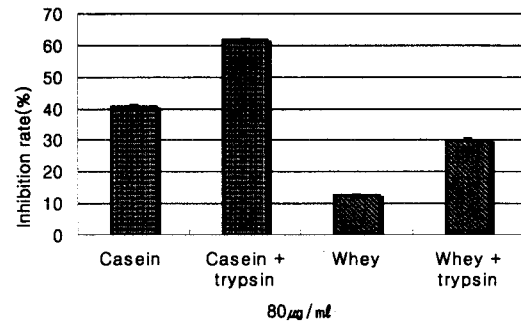


Fig. 4. Antioxidant activity of hydrolyzed casein and whey.

은 단백질 분해 효소에 의해서 분해되기 어려운 3차 구조의 구상 단백질로써 trypsin에 의해 한 정가수분해되어 casein보다 분해율이 낮았던 것으로 생각되어진다. Fig. 4는 trypsin 처리한 casein과 whey의 TAC를 측정된 결과로서 trypsin 처리구에서 모두 무처리구에 비해 높은 TAC 결과를 나타내었으며, trypsin에 의해 가수분해되어진 항산화 관련 peptide들의 증가에 의한 것으로 생각된다.

요 약

Casein과 whey의 가수분해 물에 대한 항산화 능을 측정하기 위해 연구를 수행하였다. pH에 따른 Total antioxidant capacity(TAC)는 casein 및 whey 모두 pH 6.0 에서 보다 pH 7.4에서 더 높은 TAC 결과를 나타내었다. Casein이 whey보다 농도가 증가함에 따라 TAC 값이 증가하였으며 이는 배양시간이나 pH에 따른 TAC 측정에서와 같이 casein이 whey보다 더 높은 TAC 값을 나타내고 있으나, 2,000µg/mL에서는 TAC 값이 감소하여 casein, whey 모두 유사한 TAC 값을 나타내었다. Trypsin에 의한 casein 및 whey의 가수분해는 반응 10분 이후부터는 NPN량이 더 이상 증가하지 않았으며 casein보다 whey가 분해율이 낮았다. Trypsin 처리한 casein과 whey의 TAC를 측정된 결과로서 trypsin 처리구가 무처리구에 비해 높은 TAC 결과를 나타내었다.

참고문헌

1. Barrefors, B. *et al.* (1985) *Milk science international* 40,5.
2. Chen, J. *et al.* (2003) *International Dairy J.*,13, 927-935.
3. Hernandez-Ledesma, B. *et al.* (2002) *International Dairy J.*,12, 805-812.
4. Morato, A. F. *et al.* (2000) *J. Food Composition and Analysis*, 13, 843-857.
5. Pellegrini, N. *et al.* (1999) *Methods in Enzymology*, 299, 379-389.