

식품착색료가 α -Chymotrypsin 작용에 미치는 영향

崔 清·金 尙 玉

영남대학교 농축산대학 식품가공학과

(1977. 3. 12 접수)

The Effect of Coloring Food Additives on the α -Chymotrypsin Activity

Cheong Choi and Sang Oek Kim

Department of Food Science and Technology, Yeung Nam University,
Gyeongsan, Korea

(Received March 12, 1977)

요 약. 단백질 분해효소인 α -chymotrypsin 이 식품발색제의 존재하에 어떻게 oligopeptide 에 작용하여 분해하는가를 알기 위하여 본 실험을 실시하였다.

1. Oligopeptide 인 Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala (8-D-Ala · angiotensin II)의 용점은 210 ~ 212 °C, 분자식은 $C_{44}H_{67}N_{13}O_{12} \cdot 2CH_3COOH \cdot H_2O$, 분자량은 970.08 이었다.

2. 산으로 가수분해 하였을때 몰 비율은 Asp : 1.01, Arg : 1.03, Val : 1.00, Tyr : 0.94, Ile : 1.00, His : 1.05, Pro : 1.04, D-Ala : 1.03 이었다.

3. (8-D-Ala) angiotensin II 의 oligopeptide 에 α -chymotrypsin 의 작용은 Tyr-Ile 결합에만 분해 작용을 하였다.

4. 식품착색제의 첨가는 paper chromatogram 방법에 의해서 추정할때 oligopeptide, (8-D-Ala) angiotensin II 에 대한 α -chymotrypsin 의 저해작용에 아무런 영향을 끼치지 않았음을 볼 수 있다.

ABSTRACT. This study was carried out to understand the activity of α -chymotrypsin, a proteolytic enzyme, to a oligopeptide in the presence of various coloring food additives.

1. The melting point of synthetic oligopeptide, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala, ((8-D-Ala) angiotensin II) was 210~212 °C. Chemical formula and molecular weight were $C_{44}H_{67}N_{13}O_{12} \cdot 2CH_3COOH \cdot H_2O$ and 970.08, respectively.

2. The amino acid rations by acid hydrolysis were Asp : 1.01, Arg : 1.03, Val : 1.00, Tyr : 0.94, Ile : 1.00, His : 1.05, Pro : 1.04, D-Ala : 1.03.

3. α -Chymotrypsin cleaved the oligopeptide bond between tyrosine and isoleucine (Tyr-Ile).

4. The addition of food coloring additives as determined by paper chromatogram, did not influence the inhibitory activity of α -chymotrypsin on oligopeptide, (8-D-Ala) angiotensin II.

1. 서 론

동물의 취장에서 분리된 chymotrypsin A 는 그 활성 과정에서 5종의 다른 chymotrypsin 으로 활성화되며¹ 이 중 특히 연구가 많이 행해진 것은 α -chymotrypsin 으로 이 효소에 대하여 그 일차 구조가 Hartley² 및 Kunitz³ 에 의해서 결정 되었고 이 효소에 대한 효소학적 연구들은 Hartley⁴ 와 Ball⁵ 들에 의하여 diisopropyl phosphofluoridate (DEP), diethyl-*p*-nitrophenyl phosphate, *p*-nitrophenol, 중금속등에 대한 저해현상에 관한 연구들이 시작되어 있다. Yoshida^{6,7} 등은 방향족 diazonium 화합물에 의한 저해현상을 발표하였다. 식품공업의 발달로 말미암아 식품의 본래 목적을 손실 하지않는 범위내에서 식품에 인위적으로 첨가되는 여러가지 화학적 합성품, 즉 식품첨가물 (현재 보사부에서 허용된 식품첨가물의 수, 256 종)들이 사용되고 있다. 이들 첨가물 가운데 식품착색제와 발색제들이 단백질 분해효소에 미치는 영향을 검토하고자 solid phase 방법으로 octapeptide, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-*D*-Ala 을 합성, 이를 기질로하여 식품착색제와 발색제를 첨가 했을 때 α -chymotrypsin 의 작용을 실험한 그 결과를 보고하는 바이다.

2. 실험

실험재료

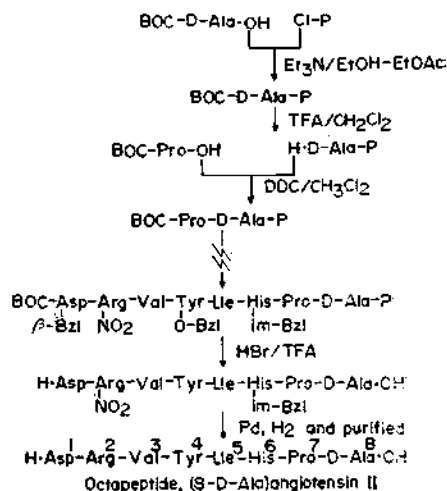
(1) 식품착색제 : 식용색소 적색 2 호와 3 호, 황색 4 호와 5 호, 혼합콜라, 혼합초록, 혼합효코레트(서울 남영상사 주식회사), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Fe_2O_3 (日本 林純藥工業 Co.)

(2) 식품발색제 : KNO_3 , KNO_2 , NaNO_2 및 NaNO_3 (日本 林純藥工業 Co.)

(3) 효 소 : α -chymotrypsin (Mann Res. Lab., N. Y., U. S. A.)

실험방법

(1) Octapeptide, (8-*D*-Ala)angiotensin II 의 합성. 본 실험에 사용된 아미노산은 *D*-alanine 을 제외한 모든 아미노산은 *L*형을 사용하였으며 BOC-(*t*-butoxycarbonyl)amino acid,



P: Polymer, BOC: *t*-butoxy carbonyl, Et_3N : triethylamine, O-Bz: *O*-benzyl, EtOH: ethanol, im-Bz: imidazol benzyl, EtOAc: ethylacetate, DDC: NN' -dicyclohexyl carbodiimide.

Fig. 1. Route of octapeptide (8-*D*-Ala. angiotensin. II) synthesis by solid phase method.

nitroarginine 은 Schwyzer⁸ 들의 방법, peptide 의 합성은 Merrfield⁹ 의 solid phase 법과 Park¹⁰ 들의 개량된 방법에 의하여 octapeptide 인 Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-*D*-Ala 을 합성하였으며 (8-*D*-Ala) angiotensin II 의 합성과정은 Fig. 1 과 같다.

(2) α -chymotrypsin. 식품착색제 및 발색제에 의한 α -chymotrypsin 의 효소학적 활성을 실험하기 위하여 효소 0.1 mg 을 0.1 ml 의 0.2 M phosphate 완충용액 (pH=7.1) 에 용해시켜 상기의 octapeptide 2 mg 을 0.2 ml 의 완충용액에 용해시킨 다음 5, 10, 20, 50, 100 및 1000 ppm 용액의 착색료와 발색제 용액을 0.3 mg 을 가하여 36°C 에서 0, 5, 10, 30 및 60 분간 incubation 하였다. 상기의 시간에 배양된 시료를 0.08 ml 를 취하여 0.05 ml 의 0.1 N HCl 로 산성화 시켜 ice bath 상에서 시료 20 μl 의 일정량을 chromatography 용 거름종이 (Whatman No. 1) 에 spot 한 후 BAW (*n*-BuOH : AcOH : H_2O = 4 : 1 : 5 v/v) BAPW (*n*-BuOH : AcOH : Pyridine : H_2O = 30 : 6 : 20 : 24 v/v) 의 용매를 사용하여

Table 1. The physical properties and the R_f value of octapeptide (8-D-Ala-angiotensin II) from paper and thin layer chromatography and migration value from electrophoresis.

*EG: migration value of 8-D-Ala-angiotensin II in comparison with that of glutamic acid as a standard.

| Octapeptide (8-D-Ala-angiotensin II) | R_f value | | | | EG* | M. P (°C) | Yield (%) |
|---|-------------|------|------|------|------|--------------|--------------|
| | PC | | TLC | | | | |
| | BAW | BAPW | BAW | BAPW | | | |
| H·Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala·OH | 0.34 | 0.47 | 0.34 | 0.78 | 1.26 | 210~212 | 55 |

상승법으로 전개하였으며 chromatogram의 증색 반응을 확인하기 위하여 처음 ninhydrin으로 증색반응시킨 다음 Pauly's 및 Sakaguchi's 시약을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

Peptide의 순도는 PC(paper chromatography) TLC(thin layer chromatography) 및 electrophoresis에 의하여 결정하였으며 용접은 koffer hot stage에 의해 측정하였으며 그 물리적인 분석은 Table 1과 같다.

아미노산의 분석은 질소하의 밀폐된 유리관 안에 6N HCl로 110°C에서 40시간 가수분해한 후 Technicon-amino acid autoanalyzer (캐나다)에 의하여 분석하였으며 가수분해한 후 아미노산의 mol 비율은, Asp : 1.01, Arg : 1.03, Val : 1.00, Tyr : 0.94, Ile : 1.00, His : 1.05, Pro : 1.04, D-Ala : 1.03이며 분자식은 $C_{44}H_{67}N_{13}O_{12} \cdot 2CH_3COOH \cdot H_2O$, Mw는 970.08이었다.

식품착색제 및 발색제인 α -Chymotrypsin에 미치는 영향. Octapeptide(8-D-Ala)angiotensin II의 기질과 α -chymotrypsin 효소만을 작용시킨 대조구는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 5분경에 벤젠핵을 가지는 아미노산의 카르복실기에 이루어진 peptide 결합에 α -chymotrypsin의 작용에 의하여 Asp-Arg-Val-Tyr (A)와 Ile-His-Pro-D-Ala(B) 부분으로 완전 분해하였다. 상기의 확인 반응은 첫째 ninhydrin 반응에 의하여 A와 B 부분이 양성반응을 나타내었으며 다음은 guani-

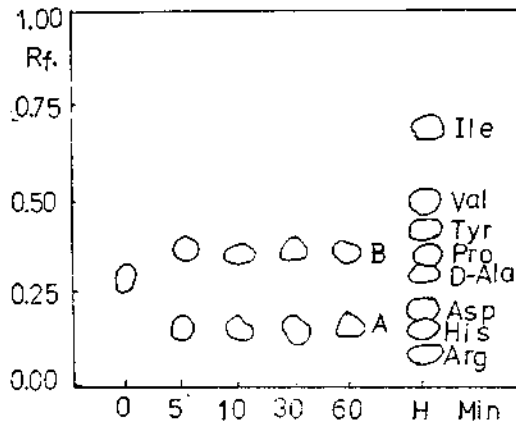


Fig. 2. Degradation products of (8-D-Ala) angiotensin II after incubation with α -chymotrypsin at 37°C and pH 7.1 for 0, 5, 10, 30 and 60 min. Paper chromatogram developed with BAW (*n*-BuOH : AcOH : H₂O=4 : 1 : 5 v/v). Showing Ile-His-Pro-D-Ala (B) and Asp-Arg-Val-Tyr (A) identified by Sakaguchi's reagent. H: Hydrolyzed products with 6N HCl for 40 hours.

dine기를 가진 특유의 반응으로 arginine의 양성을 나타내는 Sakaguchi's 시약에 의하여 A부분만 양성반응을 나타내었다. H는 기질인 octapeptide를 6N HCl로 40시간 가수분해하여 전개한 chromatogram이다. Fig. 3에서는 효소 및 기질의 용액에 식품착색제인 식용색소 황색 5호와 식품발색제 NaNO₂는 5ppm 농도에서 5분경에 완전히 분해되었으며 이밖의 식용색소 적색 2호와 3호 황색 5호, 혼합콜라 혼합초록, 혼합쵸코베트, CuSO₄·5H₂O, Fe₂O₃와 발색제 KNO₃, KNO₂, NaNO₃들도 10, 20, 50, 100, 500 및 1000 ppm의 농도가 높아 저도 leusinamino-

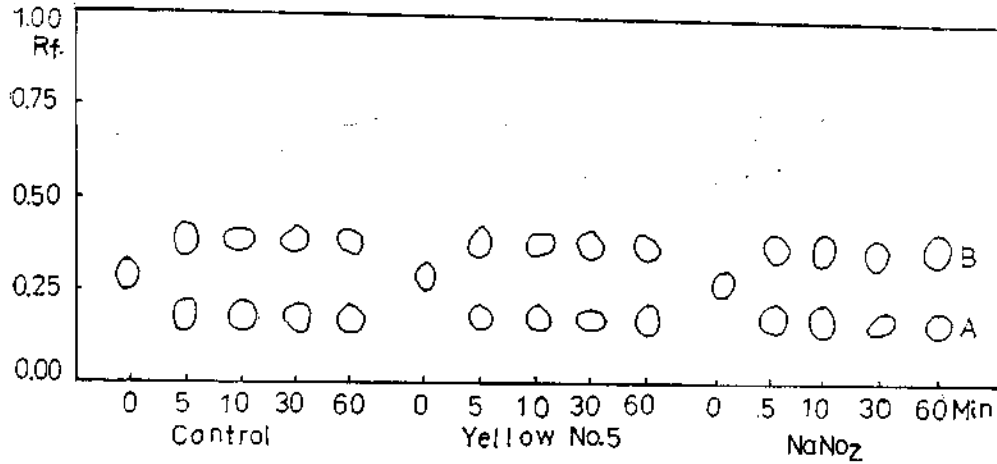


Fig. 3. Paper chromatogram of peptides obtained from octapeptide cleaved by α -chymotrypsin interacted with food coloring additives.

peptidase¹¹와 달리 paper chromatogram에 의한 α -chymotrypsin에 대한 저해작용은 하지않았다.

그러나 현 보사부의 식품착색제 및 발색제의 허용 기준량은 1500 ppm 미만이므로 단백질 분해 효소중 α -chymotrypsin에 대한 저해현상은 문제시 되지않으나 무엇보다도 중요한 것은 식품 제조업체들이 식품첨가물의 사용 기준량을 준수해야 할 것이다.

인 용 문 헌

1. T. B. Summer, "Chemistry and Method of Enzyme", Academic Press, 1963.
2. B. S. Hartley and B. A. Kilby, *Biochem. J.*, **60**, 672 (1952).
3. M. Kunitz and J. H. Northrop, *J. Gen. Phys.*, **32**, 263 (1948).
4. B. S. Hartley, *Nature*, **201**, 1284 (1964).
5. A. K. Ball and E. F. Jansen, *Advances in Enzymology*, **13**, 321 (1952).
6. N. Yoshida and S. Ishil, *J. Biochem.*, **71**, 185 (1972).
7. N. Yoshida and Ishil, *J. Biochem.*, **71**, 193 (1972).
8. H. Schwarz, F. M. Bumpus and I. H. Page, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 5697 (1957).
9. R. B. Merrifield, *J. Biochem.*, **3**, 1385 (1964).
10. W. K. Park and D. Regoli, *Can. J. Biochem.*, **50**, 1755 (1972).
11. 崔 清, 嶺南大學校論文集, **9**, 357 (1975).