

리놀레산 과산화물이 펩신 활성도에 미치는 영향

최갑성 · 김재욱* · 문태화**

순천대학교 식품공학과, *서울대학교 식품공학과, **한림대학교 식품영양학과

Effect of Linoleate Hydroperoxide on Pepsin Activity

Kap-Seong Choi, Ze-Uook Kim* and Tae-Wha Moon**

Department of Food Science and Technology, Suncheon National University

*Department of Food Science and Technology, Seoul National University

**Department of Food Science and Nutrition, Hallym University

Abstract

The effect of linoleate hydroperoxides(LAHP) on pepsin activity was investigated. The activity of pepsin was largely decreased by LAHP at various temperatures and pH. The inactivation of pepsin seems to be the radicals in the system because ascorbate and metal ions enhanced the inactivation of enzyme by LAHP. It was shown by SDS-PAGE that LAHP caused scission of the enzyme in the model system.

Key words : linoleate hydroperoxide, pepsin activity

서 론

식품의 저장이나 가공 중 지방질의 산화는 불쾌취나 생리적 활성물질 등의 생성으로 식품의 품질을 저하시키는 원인이 되고 있다⁽¹⁾. 이러한 산화적 변패는 지방산의 종류, 온도, 수분, 산화 촉진 물질 및 산화방지제에 따라 영향을 받는다. 또한, 불포화지방산은 일정한 촉매 작용이 없어도 산소와 접촉하게 되면 하이드로페록사이드를 형성하게 되며 특히, 이물질이 분해되어 생성된 말론알데하이드 등은 단백질, 비타민 및 색소와 반응하는 것으로 알려져 있다^(2,3). 지방질 산화생성물과 효소간에 생길 수 있는 반응결과에 대해서는 잘 연구되어 있지 않으나 지방질 산화로 생성된 라디칼은 쉽게 단백질로 이전된다고 보고된 바 있다^(4,5). 특히, Matsushita 등⁽⁵⁾은 지방질 산화생성물이 효소와 복합체를 형성한다고 보고한 바 있으며 Ohta 등⁽⁶⁾은 지방질 산화가 일어나는 batch system에서 생성된 비활성 반응물질에 의해 lipase의 안정성이 낮아진다고 하였다.

그러나 지금까지 보고된 연구는 산화생성물 전체를 효소 등의 단백질과 작용시켜 시행된 결과가 대부분이다. 이와 같이 많은 지방질 산화물질을 작용시키게 되면 그 생성물의 종류도 많아져서 작용 결과 및 기작을 알아내기 힘들다. 따라서 본 연구에서는 불포화지방산의 과산화

물이 효소 단백질에 미치는 영향을 알아보기 위해 반응결과를 알아보는데 편리한 펩신에 리놀레산의 산화 중 생성된 과산화물만을 작용시켜 효소의 활성 변화 등을 분석하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 리놀레산(linoleic acid : octadeca-9c, 12c-dienoic acid ; analytical grade)과 펩신(EC 3.4.23.1, 3×crystallized)은 Sigma사 제품을, 기타 시약은 특급을 사용하였다.

리놀레산 과산화물(LAHP)의 분리

40℃에서 자동산화시킨 리놀레산 중 과산화물의 분리는 silica gel(Merck, G-60)를 사용하여 Gamage 등⁽⁷⁾의 방법에 따라 chromatography를 시행하고 분획물을 233 nm에서 흡광도를 확인하여 농축, hexane에 녹여 냉장실에 보존하면서 사용할 때마다 silica gel 60 PF254(Merck사)판을 사용하여 자외선 하에서 검출한 후 과산화물 spot만을 모아 85% methanol을 사용하여 회수하였으며 순도 결정 후 1주일 이내에 사용하였다.

반응시스템

본 실험의 단백질 시료로 사용한 효소는 모델시스템에 사용되는 각각의 buffer에 녹여 Sephadex G-25가 충전된 컬럼(1×30 cm)에 통과시켜 잔존하는 산화물과 활성을 나타내지 않는 확분이 섞이지 않는 void volume에서

Corresponding author : Kap-Seong Choi, Department of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-070, Korea

Table 1. Treatment code and concentration of various chemicals added in model systems

Code	Concentration in systems
C(control)	Enzyme(0.1 mg/ml)
L(LAHPO)	Enz. + LAHPO(2 $\mu\text{mol/ml}$)
L-F ₁	Enz. + LAHPO + FeCl ₃ (1 $\mu\text{mol/ml}$)
L-F ₂	Enz. + LAHPO + FeSO ₄ (1 $\mu\text{mol/ml}$)
L-Ta	Enz. + LAHPO + Thioglycolic acid(2 $\mu\text{mol/ml}$)
L-S	Enz. + LAHPO + SOD(1 $\mu\text{mol/ml}$)
L-A	Enz. + LAHPO + Ascorbic acid(2 $\mu\text{mol/ml}$)
L-C	Enz. + LAHPO + Catalase(2 $\mu\text{g/ml}$)
L-Tr	Enz. + LAHPO + TRIS(10 $\mu\text{mol/ml}$)
L-M	Enz. + LAHPO + Mannitol(5 $\mu\text{mol/ml}$)
L-B	Enz. + LAHPO + BHT(1 $\mu\text{mol/ml}$)
L-a	Enz. + LAHPO + α -tocopherol(2 $\mu\text{mol/ml}$)
L-A-a	L-a + Ascorbic acid(1 $\mu\text{mol/ml}$)

수거하였으며 단백질 농도를 결정하고 Matsushita⁽⁸⁾의 방법을 변형하여 다음과 같이 리놀레산과 반응액을 제조하였다. 즉, 2×10^{-2} M 농도의 LAHPO를 0.1 mg/ml 효소액에 최종농도가 2 $\mu\text{mol/ml}$ 이 되도록 가하여 대조구와 함께 반응시키고 시간별 효소 활성도를 측정하였다. 이때 pH와 온도 조건은 pH 3, 10°C이었다. 온도 변화에 따른 활성도를 측정할 때에는 위의 조건하에서 리놀레산 과산화물 첨가 후 온도를 달리하여 4, 10, 20, 30°C가 유지되도록 하여 효소 활성을 조사하였다. pH조건에 따른 영향을 알아볼 때 사용된 buffer는 0.02 M HCl-KCl buffer(pH 1.5, 2), 0.01 M acetate buffer(pH 3, 4), 0.01 M sodium citrate buffer(pH 5, 6), 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7)이었으며 과산화물을 첨가하고 1시간 후 효소 활성도를 비교하였다. 과산화물 농도에 의한 효소 활성을 비교할 때에는 LAHPO의 최종농도가 1~4 $\mu\text{mol/ml}$ 이 되도록 하고 대조구와 함께 1시간 동안 반응시켜 상대 활성도로 나타냈다. 한편, 위의 모든 실험구의 control은 반응액 중 리놀레산 과산화물 대신 8.5% methanol을 첨가하여 비교하였고 효소 활성도의 단위는 상기 조건하에서 1분당 흡광도 0.001 증가를 이루게 하는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다. 금속이온 및 지방질 산화억제 시약이 반응계에 미치는 영향을 조사할 때에는 효소액에 첨가제, 리놀레산 과산화물을 첨가하였는데 혼합종류와 농도는 Table 1과 같다.

단백질의 전기영동

반응물 중 펩신의 분자량 변화를 알기 위하여 Laemmli의 buffer system⁽⁹⁾을 이용한 불연속 SDS-PAGE를 시행하였다. LAHPO를 제거한 단백질 시료 중 250 μl 를 취해 2% SDS와 15 μl -mercaptoethanol을 함유한 sample buffer를 1 : 1 비율이 되도록 혼합하여 4°C에서 3시간 방치한 후 polyacrylamide gel에 20 μl 씩을 주입하고 15 mA 하에서 예비영동 후 30 mA로 약 5시간 동안 전기영동을 실시하고 영동을 마친 gel은 0.2% Coomassie

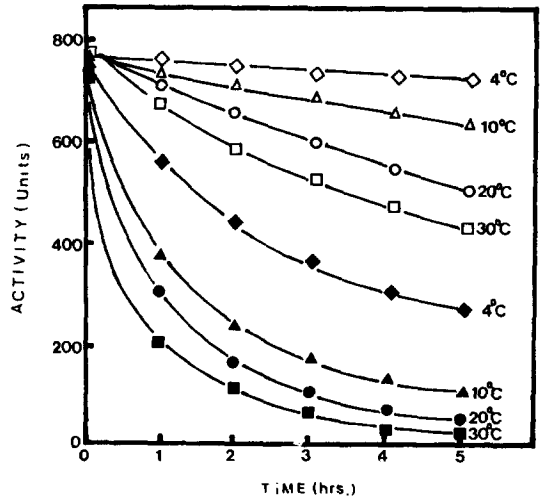


Fig. 1. Inactivation of pepsin by linoleate hydroperoxide at various temperatures

Pepsin(0.1 mg/ml) was incubated with 2×10^{-3} M linoleate hydroperoxide in a mixture of 0.01 M acetate buffer, pH 3 at designated temperature for a specific time period. Open symbols : control ; closed symbols : reacted enzyme

blue R-250을 함유하는 염색액으로 2시간 염색하였다.

결과 및 고찰

LAHPO 첨가에 의한 펩신의 활성도 변화

온도를 달리하여 LAHPO를 효소용액이 함유된 반응 시스템에 부여하고 pH 3에서 대조구와 함께 시간별 효소 활성도를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, LAHPO를 처리한 효소의 활성도는 감소되었다. 이러한 현상은 RNase 등의 효소를 대상으로 실험한 Matsushita⁽⁸⁾의 보고와 대체로 일치한 결과였다.

10°C에서 pH를 달리하고 Fig. 1과 동일 조건하에서 LAHPO와 반응 후 활성도를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 각 pH 구간 중 활성도는 감소되었다.

LAHPO 농도를 달리함에 따라 효소 활성도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 즉, LAHPO 농도가 증가할수록 펩신의 활성도는 급격히 감소되었다.

기질 농도에 따라 효소반응속도를 plot한 결과는 Fig. 4와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 본 실험에서 사용한 펩신의 농도에서 일반 효소 저해 반응 기작인 길항, 반길항, 비길항 저해의 어느 것에서도 나타나는 현상이 아님을 알 수 있다.

그러나 이들 그림이 주는 효소 저해 반응상수 즉, LAHPO 농도가 0에서 1×10^{-3} M 사이의 처리구에서는 Michaelis 상수($K_{m,app}$ 와 $V_{max,app}$)를 구할 수 있었다(Table 2). 즉, 펩신 대조구의 $K_{m,app}$ 값은 0.42 mM 이었으며 $V_{max,app}$ 값은 0.78(μmol tyrosine liberated/min/ml)이

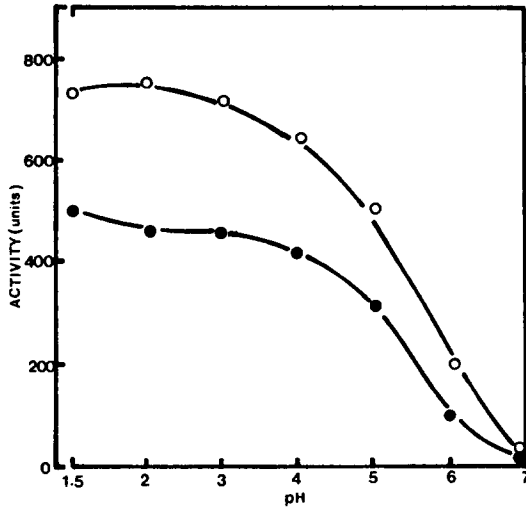


Fig. 2. Effect of pH of medium when pepsin was incubated with linoleate hydroperoxide at 10°C
Other conditions were same as in the case of Fig. 1.
○ : control, ● : sample

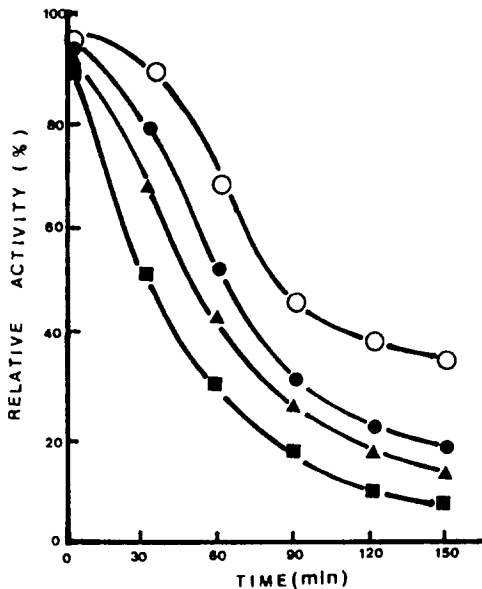


Fig. 3. Effect of linoleate hydroperoxide concentration on the pepsin activity at 10°C
Other conditions were same as in the case of Fig. 1.
○ : 1×10^{-3} M, ● : 2×10^{-3} M, ▲ : 3×10^{-3} M, ■ : 4×10^{-3} M

었다. LAHPO 처리구의 경우 처리농도가 증가함에 따라 두 값은 모두 감소되었다. 이러한 결과는 효소와 기질과의 반응 속도는 예상대로 감소되나 효소-기질의 친화성이 증가된 것으로 사용된 리놀레산 과산화물에 의해 효소의 반응이 가역적으로 저해되지 않음을 보여준다.

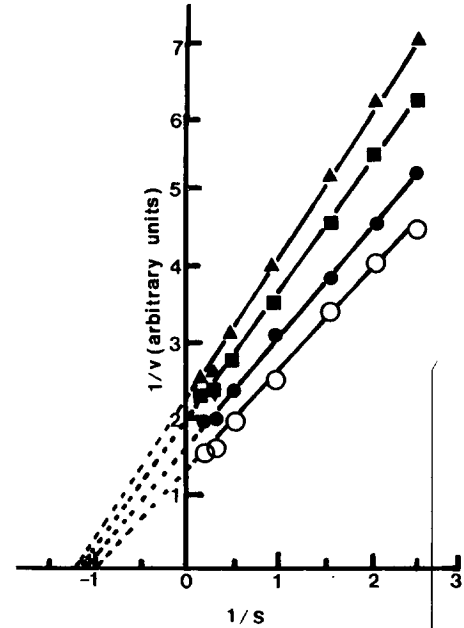


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of pepsin after incubation with linoleate hydroperoxide at pH 3, 10°C
○ : control, ● : 1×10^{-3} M, ■ : 2×10^{-3} M, ▲ : 3×10^{-3} M LAHPO

Table 2. Effect of linoleate hydroperoxide concentration on the kinetic constants for pepsin

LAHPO concentration ($\times 10^{-3}$ M)	0	1	2	3
Km(mM)	0.42	0.36	0.34	0.33
Vmax($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)	0.78	0.63	0.51	0.43

따라서 본 실험에서 리놀레산 과산화물 존재시 효소의 활성도 감소는 효소자체나 효소-기질복합체와의 결합에서 비롯된 것으로 생각할 수 있었다.

리놀레산 과산화물의 라디칼에 의한 효소의 손상

상기한 결과에 의거 효소 활성 감소가 반응계의 라디칼에 의한 것을 예상하고 금속 이온 및 산화 억제 시약이 반응계에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 즉, 펩신과 LAHPO가 존재하는 system에서 각각의 처리에 의한 효소 활성은 금속 이온과 ascorbic acid 처리구를 제외하면 LAHPO만을 처리한 구보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 효소의 LAHPO에 의한 활성 감소가 과산화물의 라디칼에 의한 것임을 추측케 하였다. Schaich와 Karel⁽¹⁰⁾은 LAHPO의 radical을 ESR의 분석으로 밝혀낸 바 있으며 단백질과 반응시 radical이 단백질에 내포된다고 보고한 바 있고 Mastushita⁽⁸⁾도 RNase 등의 효소를 가지고 실험한 결과 ascorbic acid가

Table 3. Influences of various chemicals on remaining activities of pepsin in formulated model system

Sample code	Remaining activity
C(control : enzyme only ; 0.1 mg/ml)	97.1± 0.8
L(LAHPO ; 2 μmol/ml)	37.5± 1.9
L-F1(LAHPO+ FeCl ₃)	27.3± 2.1
L-F2(LAHPO+ FeSO ₄)	36.2± 3.6
L-Ta	92.2± 1.7
L-S	38.1± 2.2
L-A	28.8± 3.4
L-C	62.1± 1.2
L-Tr	64.7± 1.8
L-M	72.5± 2.3
L-B	53.8± 1.5
L-a	49.8± 3.1
L-A-a	55.4± 1.8

지방산 산화생성물과 효소가 존재하는 계에 처리되면 효소 활성이 더욱 심하게 감소되었으며 LAHPO radical의 효소 내포가 LAHPO만을 처리한 구보다 더 많이 이루어졌으며 BHT를 처리한 구에서는 라디칼의 단백질 이전이 적은 것으로 보아 LAHPO에 의한 효소 활성 감소는 radical mechanism에 의한 것이라고 추측한 바 있다.

본 실험에서는 위의 연구자들이 사용한 라디칼 소거제 뿐만 아니라 활성 산소종을 소거할 수 있는 화학제 또는 효소를 이용하였는데 그 이유는 리놀레산의 산화 과정 중 생성되는 활성 산소종의 영향을 무시할 수 없었기 때문이다. SOD 처리구에 있어서 효소 활성 감소를 회복시키는 효과는 적었으며 ascorbic acid 처리구의 효소 활성 감소는 오히려 LAHPO만을 처리한 구보다 더욱 심했는데, 이러한 결과는 불안정한 superoxide anion이 리놀레산 과산화물의 분리 중 소멸하거나 반응 시스템에 존재하지 않았을 가능성을 내포하였다. Catalase와 Tris, mannitol 처리구의 경우 효소 활성을 회복시키는 데는 비교적 그 효과가 컸는데 이러한 결과로 미루어 보아 리놀레산 과산화물 자체와 그것의 분해된 라디칼 중에 과산화수소나 수산라디칼이 많이 존재했던 것으로 추측된다. 그러나 과산화수소 소거제나 수산라디칼 소거제 자체만으로는 효소 활성 감소를 완전히 회복시킬 수 없는 것으로 보아서는 효소의 활성이 감소되는 기작에 관여 되는 요인은 매우 다양할 것으로 보여진다. Thioglycolic acid나 BHT, α-tocopherol 단독 또는 α-tocopherol과 ascorbic acid의 혼합 처리구에 있어서 thioglycolic acid는 효소 활성 감소를 상당히 회복시켜준 반면 항산화제로 사용되는 BHT나 α-tocopherol과 상승제로서 알려진 ascorbic acid를 혼합한 처리구에 있어서는 그 효과가 별로 없었는데 이러한 결과로 미루어 보더라도 효소의 활성 감소는 주로 시스템에 존재하는 각종 라디칼에 의한 것임을 추측할 수 있었다. 효소 활성 감소가 금속 이온 첨가시 상승되는지를 알아보기 위하여 첨가한 Fe는 예

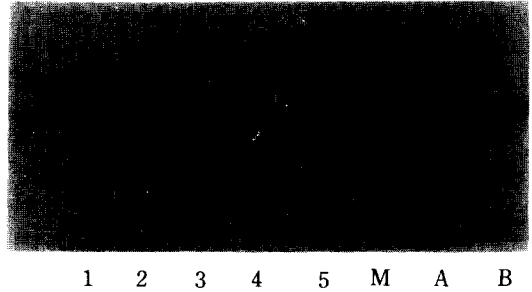


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoretogram of pepsin reacted with linoleate hydroperoxide

Lane 1-5 : pepsin incubated with 2×10^{-3} M linoleate hydroperoxide for 0(1), 1(2), 2(3), 3(4), 4(5) hours ; Lane M : marker proteins ; Lane A and B : concentrated pepsin treated with LAHPO for 0(A) and 5(B) hours

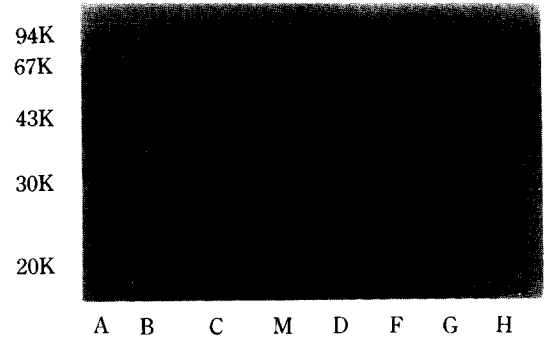


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoretogram of pepsin treated with various chemicals

Lane A-H : pepsin was incubated with linoleate hydroperoxide and 2 mM α-tocopherol(A), 1 mM BHT(B), 10 mM Tris(C), 2 mM thioglycolic acid(D), 5 mM mannitol(F), 1 mM FeCl₃(G), 2 mM ascorbic acid(H) ; Lane M : marker proteins

상된 대로 LAHPO만이 존재하는 시료구 보다 효소 활성이 훨씬 감소되었는데 효소 활성 감소가 주로 라디칼에 의한 것임을 감안한다면 Fe ion은 라디칼의 생성 및 라디칼의 단백질로의 이전에 촉매제 역할을 할 것으로 생각되었다.

LAHPO에 의한 효소의 분자량에 변화를 일으키는지를 알아보기 위하여 SDS-PAGE를 시행한 결과는 Fig. 5와 같다. 즉, LAHPO를 2×10^{-3} M 처리하여 2시간 이상 반응시킨 결과 대조구에서 나타나지 않은 band를 관찰할 수 있었는데 분자량은 30 kdalton으로 확인되었다. 본 실험의 시스템에 존재하는 효소외에 다른 단백질은 없었고 대조구에서 펩신의 다른 band가 나타나지 않았으므로 나타난 minor band는 리놀레산 과산화물이나

분해된 라디칼에 의해 화학적으로 절단된 cleaved band로 추정된다.

Fig. 6은 formulate된 시스템에서 1시간 incubation한 후 분리된 펩신의 전기영동 패턴이다. Thioglycollic acid (C), Tris(D)를 제외한 각 처리구의 경우 cleaved band가 약간씩 나타났으며 단백질 주 band 부근에서는 doublet band를 보였다. 특히 FeCl₃를 처리한 구(G)에서는 분자량 30,000 이하의 cleaved bands를 잘 보여주고 있다. Zirlin과 Karel⁽¹¹⁾은 dehydrated state에서 냉동 건조된 gelatin이 산화된 methyl linoleate에 의해 scission이 일어났으며 peroxidation에 의한 단백질 amide group의 분석을 통해 cleavage가 α -carbon에서 비롯된 것이라고 보고한 바 있고 Leake와 Karel⁽¹²⁾은 lysozyme을 산화된 methyl linoleate와 반응시킨 결과 lysozyme oligomers가 생성함을 gel filtration을 통해 밝힌 바 있다.

본 실험에서 linoleate hydroperoxide 존재시 펩신의 활성 감소는 free radical에 의한 효소자체의 손상에서 비롯된 것으로 생각되며 이러한 결과가 리놀레산 과산화물이 효소단백질을 구성하는 아미노산과 반응함으로써 비롯된 것인지는 앞으로 더 연구할 문제이다.

요 약

리놀레산 과산화물이 펩신의 활성도에 미치는 영향을 실험한 결과 여러 온도와 pH 조건하에서 리놀레산 과산화물에 의해 펩신 활성도는 감소되었다. 또한, 각종 라디칼 소거제와 금속 이온 존재하에서 펩신 활성을 측정된 결과와 전기영동 결과에 비추어 볼 때 효소의 활성감소는 시스템내에 존재했던 라디칼에 의한 효소자체의 손상에서 비롯된 것으로 생각되었다.

감사의 말

본 연구는 1990년도 문교부 학술연구조성비의 지원으로 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Gunsten, D. and Norris, A. : *Lipid in Food*. Pergamon Press, Oxford, p.58(1982)
2. Simic, M.G. and Karel, M. : *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Plenum Press, New York, p.191 (1980)
3. Karel, M. : Symposium protein interaction in biosystem, Protein lipid interaction. *J. Food Sci.*, **38**, 756 (1973)
4. Schaich, K.M. and Karel, M. : Free radicals in lysozyme reacted with peroxidizing methyl linoleate. *J. Food Sci.*, **40**, 456(1975)
5. Matsushita, S., Kobayashi, M. and Nitta, Y. : Inactivation of enzymes by linoleic acid hydroperoxides and linoleic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 817(1979)
6. Ohta, Y., Yamane, T. and Shimizu, S. : Inhibition and inactivation of lipase by fat peroxide in the course of batch and continuous glycerolyses of fat by lipase. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 885(1989)
7. Gamage, R.T., Mori, T. and Matsushita, S. : The effect of linoleate hydroperoxide and their secondary products on the growth of *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 33(1983)
8. Matsushita, S. : Specific interactions of linoleic acid hydroperoxides and their secondary degraded products with enzyme proteins. *J. Agr. Food Chem.*, **23**, 150 (1975)
9. Laemmli, U.K. : Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molarity tris buffer system without urea. *Nature(London)*, **227**, 680(1970)
10. Schaich, K.M. and Karel, M. : Free radical reactions of peroxidizing lipid with amino acids and proteins. an ESR study. *Lipids*, **10**, 441(1976)
11. Zirlin, A. and Karel, M. : Oxidation effects in freeze-dried gelatin-methyl linoleate system. *J. Food Sci.*, **34**, 160(1969)
12. Leake, L. and Karel, M. : Polymerization and denaturation of lysozyme exposed to peroxidizing lipids. *J. Food Sci.*, **47**, 737(1982)

(1991년 1월 31일 접수)