

Serratia marcescens S3-R1이 생산한 효소에 의한 유청단백질 가수분해물의 특성과 면역조절 활성

유재민¹ · 렌친핸드¹ · 정석근² · 배형철¹ · 남명수^{1*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 동물바이오시스템학과, ²농촌진흥청 국립축산과학원

Whey protein hydrolytic properties and its immunomodulation activity by produced enzyme from *Serratia marcescens* S3-R1

Jae min Yu¹, G. Renchinkhand¹, Seok Geun Jeong², Hyoung Churl Bae¹, Myoung Soo Nam^{1*}

¹Department of Animal Biosystem Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Republic of Korea

²National Institute of Animal Science, Rural Development Administration Suwon 441-706, Republic of Korea

Received on 12 September 2013, revised on 16 September 2013, accepted on 16 September 2013

Abstract : Degrees of hydrolysis by alkaline protease produced from *Serratia marcescens* S3-R1 is 3.95-6.30% of whey proteins during 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min incubation at 40 °C. Proteolytic pattern of the whey proteins showed that various low molecular weight peptides were generated during the incubation periods. The biological function of in Raw 264.7 cells treated with whey protein hydrolytic peptides, anti-inflammatory effect showed exhibit in the expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, COX-2 and iNOS by PCR analysis. COX-2 and iNOS gene expression inhibited in Raw 264.7 cells on whey protein hydrolysates below 3,000 dalton. The protease from *Serratia marcescens* S3-R1 showed a potential in production of low molecular weight whey protein hydrolysates which could be used for industrial application.

Key words : *Serratia marcescens* S3-R1, Protease, Peptide, Anti-inflammatory

I. 서론

최근에 우유성분은 건강에 유익한 효과를 나타내는 기능성 식품으로 인식되어지고 있고(Gill et al., 2000) 많은 기능성 식품과 건강에 유익한 음료에 첨가제로 잠재적인 가치가 있는 것으로 잘 알려져 있다(Huth et al., 2004). 또한 우유에 함유된 유청단백질은 대사활동에서 폭 넓게 생리활성 기능을 가지고 있는 것으로 알려지고 있다. 유청은 치즈 제조공정에서 얻어지는 부산물로 버려지는 산물로 생각되어져 왔는데 영양학적으로 응용가치를 높일 수 있는 기능성 식품으로서 재발견했다(Walzem et al., 2002). 유청에 포함된 유청단백질은 β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovine serum albumin, lactoferrin, immunoglobulins,

enzymes, glycomacropetides 등이 있는데 면역활성의 향상뿐만 아니라 필수아미노산을 공급한다(Marshall, 2004). 우유단백질의 가수분해물에 대한 생리활성 기능연구는 많이 진행되어 왔는데 지금까지 우유 casein에서 면역조절 peptide로 가장 잘 밝혀진 것은 β -casein(f1-28) 유래 casein phosphopeptide(CPP)이다. CPP는 마우스 비장과 토끼 Peyer's patch 세포에서 mitogen 활성을 나타내고 IgA 생산을 활성화 시킨다(Hata et al., 1998). 또한 β -casein에서 유래된 β -casochemotide-1라 불리는 peptide가 monocyte와 macrophage에서 주화성을 높인다(Kitazawa et al., 2007). 가수분해에 사용되는 효소는 미생물이 생산하는 효소로 효소 시장의 약 40%를 차지하는데(Aasling et al., 1991) 본 실험에 사용한 효소도 한국의 인삼 뿌리에서 자라는 미생물인 *Serratia marcescens* S3-R1 를 분리하여 이 미생물이 생산하는 효소를 분리 정제하여 사용하

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5782

E-mail address: namsoo@cnu.ac.kr

였다(Nam et al., 2013). 본 실험의 목적은 1) *Serratia marcescens* S3-R1로부터 생산된 효소에 의한 유청단백질 가수분해 특성, 2) 유청단백질 가수분해물의 면역활성 기능을 조사하는데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 효소 활성 측정

정제된 효소의 활성 측정은 Kunitz (1947)의 방법을 변형하여 실시하였다. 기질로 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)에 0.6% bovine milk casein을 녹여 2.5 mL를 40°C 에서 10분 동안 반응 시킨 후 0.5 mL 효소 용액을 넣어 가수분해시켰다. 10분 후, 2.5 mL TCA 혼합액 (50% TCA 36 mL, 1M CH₃COONa 220 mL, CH₃COOH 330 mL/L)을 넣고 반응을 중지시킨다. 반응 혼합물은 실온에 유지하면서 Whatman No.2 filter paper (Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과한다. 여과액 1 mL을 tube에 넣고, 0.55M Na₂CO₃ 2.5 mL와 Folin reagent 0.5 mL를 혼합하고, 1/3 농도로 희석한다. 혼합액은 30°C에서 30분간 유지한 후 혼합액의 흡광도를 660 nm에서 측정한다. 단백질 효소 활성 1 unit는 1분 동안 Folin-stained amino acids 1 µg 또는 peptides 가 요구하는 효소의 양으로 tyrosine을 표준아미노산으로 사용하였다.

2. 전기영동

SDS-PAGE는 Laemmli (1970) 방법을 변형하여 실시하였다.

3. 유청단백질의 가수분해

유청단백질의 pH는 0.5 M NaOH을 사용하여 8로 조정하였다. 효소는 증류수에 1% 녹여 용액을 만들고 효소와 기질을 1:100 비율로 첨가하였다. 단백질 가수분해는 40°C 에서 수행하였고 가수분해물은 -20°C에 보관하면서 HPLC 분석 시료로 사용하였다. 가수분해도 측정(degree of hydrolysis, DH)은 반응물을 넣은 후 5, 60, 120, 240분 반응시키면서 측정하였다. 반응 혼합물의 효소는 90°C에서 10분간 가열하여 실활시켰고 -4°C로 냉각하였다. 상등

액은 유청단백질 가수분해물로 취하였고 침전물은 버렸다. 가수분해물은 분자량 3,000 dalton 용 Vivaspin concentrator 20(GE Healthcare, Sweden)을 이용하여 3,000 이상과 이하로 분리하여 동결건조 후 사용하였다.

4. Tricine 전기영동과 RP-HPLC

Tricine 전기영동은 각각의 반응시간에서 얻은 가수분해물의 변화를 관찰하기 위해 수행했다. *Serratia marcescens* S3-R1이 생산한 alkaline protease에 의한 유청단백질 가수분해물은 역상 HPLC system(Waters Associates, Milford, MA, USA) 으로 분석하였는데 solvent A(0.1% TFA in H₂O)로 평형화시킨 C₁₈ column (4.6 × 250 mm, Vydac, Hesperia, CA, U.S.A)을 사용하였고 solvent B(0.1% TFA in acetonitrile)로 40 분 동안 linear gradient로 용출시켰다. HPLC system 작동은 실온에서 1 mL/min 유속으로, 흡광도는 214 nm로 작동시켰다. 시료주입 양은 10 µL, 단백질 농도는 0.5 mg/mL이었다. 모든 시료는 0.22 µm Acrodisc Syringe Filters(Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA)로 C₁₈ column에 주입하기 전에 여과 후 사용하였다.

5. 세포 배양

수컷 BALB/c mouse의 복강내에 아벨슨 쥐 류케미아 바이러스를 주입해 생긴 복수종양으로부터 생성된 mouse macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 KRIBB (Daejeon, Korea)에서 분양 받았고 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum(FBS)과 1%(100 U/mg) penicillin/streptomycin을 첨가하여 세포를 배양하였다. 배양기는 37°C, 5% CO₂와 대기습도가 유지되는 조건에서 배양하였다. 12-well(Nunc, Denmark)에 5×10⁵/well 조정하여 12 h 배양 후 시료를 처리하였다. 시료는 3군으로 나누어 RAW 264.7에 처리하였다. 첫 번째는 가수분해물만 처리한 대조군과 두 번째는 가수분해물 10 µg/mL을 처리하고 30분 후에 lipopolysaccharide(LPS) 1 µg/mL을 처리하여 3시간 배양한 군, 세 번째는 가수분해물 50 µg/mL을 처리하고 30분 후에 LPS 1 µg/mL을 처리하여 3시간 배양한 군으로 나누었다.

6. Total RNA 추출과 cDNA 합성

mRNA 추출은 TRIzol reagent(Invitrogen, USA)을 조 작방법에 따라 사용하여 분리하였고 cDNA는 oligo dT, dNTP, M-MLV RT, RNAs inhibitor(Promega, USA)를 사용하여 합성하였다.

7. pro-inflammatory cytokine의 유전자 발현

RAW 264.7 세포에 처리한 유청단백질 가수분해물의 영 향으로 발현된 interleukin-6(IL-6), iNOS, COX-2, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 유전자는 RT-PCR로 분석하 였다. RT-PCR 조건은 94°C에서 5분(싸이클), 94°C에서 30초, 58°C에서 30초(22-3싸이클), 72°C에서 30초, 72°C 에서 7분(1싸이클)로 하였고 사용한 PCR용 Primer는 Table 1에 나타난 바와 같다.

III. 결과 및 고찰

1. Alkaline protease에 의한 유청단백질의 가 수분해 특성

유청단백질 가수분해물의 RP-HPLC 분석은 Fig. 1에 나 타난 바와 같다. *Serratia marcescens* S3-R1로부터 얻은 단백질 분해효소로 유청단백질을 40°C에서 5, 60, 120, 240분 가수분해하고 각각의 분해산물을 RP-HPLC로 분석 한 양상은 다양한 peptide가 생성되었음을 알 수 있었다. 따라서 정제된 alkaline protease는 유청단백질을 가수분 해시켜 저분자 peptide 생성을 할 수 있는 능력이 있음을 보여주었다. 가수분해 시간이 5, 60, 120, 240분으로 길어 짐에 따라 peptide 생성 양상은 조금씩 다르게 나타났다. 유청단백질의 가수분해도는 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180,

240 분으로 시간이 증가함에 따라 39.5에서 63.0% 로 증가 됨을 알 수 있었다(Fig. 2). 가수분해물의 전기영동 양상은 Tricine gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하여 나 타내었는데 Fig. 3과 같다. *Serratia marcescens* S3-R1 으로부터 생산된 alkaline protease는 유청단백질의 주요

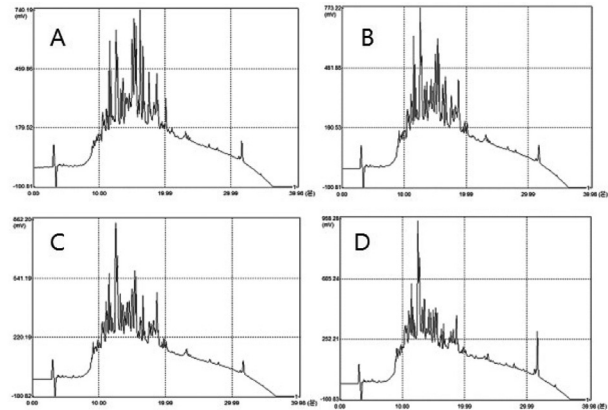


Fig. 1. RP-HPLC chromatogram of whey protein hydrolysates with protease from *Serratia marcescens* S3-R1 for 5min (A), 60min (B), 120min (C), 240min (D).

The mobile phase were equilibrated with solvent A (0.1% TFA in H₂O) and eluted with a linear gradient of solvent B (0.1% TFA in acetonitrile) for 40 min.

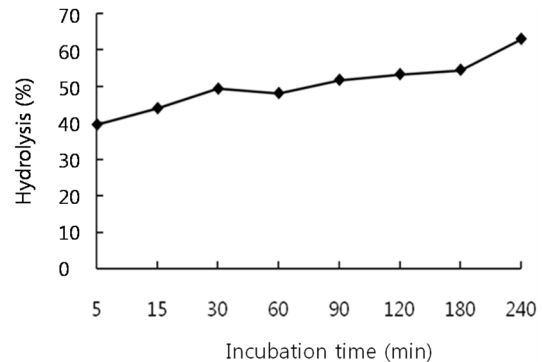


Fig. 2. Degrees of hydrolysis on whey proteins by the alkaline protease produced from *Serratia marcescens* S3-R1 during 5 to 240 min incubation periods at 40°C temperature.

Table 1. List of primer sets used RT-PCR.

Gene Name	Size (bp)	Forward	Reverse
GAPDH	346bp	CCATCACCATCTTCCAGGAG	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT
TNF- α	354bp	TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGG TCC	GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGT GGG
IL-6	139bp	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG
COX-2	583bp	TTGAAGACCAGGAGTACCGC	GGTACAGTCCCATGACATCG
iNOS	311bp	CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG	GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA

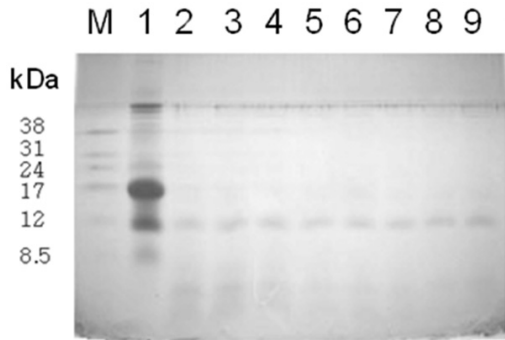


Fig. 3. Tricine gel pattern of whey protein hydrolysis with protease from *Serratia marcescens* S3-R1.; M : Molecular mass standards : phosphorylase *b* (97.4 kDa), Serum albumin (66.2kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), Lysozyme (14.4 kDa); SDS-PAGE lanes are; 1 : Whey protein, 2: Whey protein hydrolysates for 5 min, 3: Whey protein hydrolysates for 15 min, 4: Whey protein hydrolysates for 30 min, 5: Whey protein hydrolysates for 60 min, 6: Whey protein hydrolysates for 90 min, 7: Whey protein hydrolysate for 120 min, 8: Whey protein hydrolysates for 180 min, 9 : Whey protein hydrolysates for 240 min.

성분들을 성공적으로 가수분해시켜 분자량이 작은 다양한 peptide를 생성시켰다. 이러한 결과는 alkaline protease가 유청단백질을 가수분해시켜 생성된 peptide들이 기능성식품소재로 이용 가능성이 있다는 것을 의미한다. 효소가수분해에 의한 초유 유청으로부터 iron-binding peptides의 생성에 관한 연구와 비교해보면 alcalase를 이용한 가수분해는 유청단백질의 주요 성분들을 가수분해시켰으나 pepsin은 그렇지 않았다(Kim et al., 2010). 열처리된 초유 유청을 120분 동안 가수분해한 가수분해도는 alcalase 25.31%, pepsin 12.42%, papain 10.66%, trypsin 10.83%이었다. 다른 단백질 분해효소에 비해 alcalase에 의한 유청단백질의 가수분해가 우수하다고 Smyth와Fitz-Gerald (1998), Kim 등 (2007)이 보고하였다. 이러한 보고들은 기능성 식품들과 의약품 소재로 유청단백질 가수분해물의 산업적으로 응용을 위한 가능성을 보여주었고, 본 연구에서 밝힌 alkaline protease의 특성과 같이 가수분해효소의 종류에 따라 가수분해물의 이용 가능성은 높다는 것을 제시하였다.

2. 유청단백질 가수분해물의 면역조절 기능

Raw264.7 cell을 12-well에 5×10^5 /well로 세포를 배양하고 유청단백질, 유청단백질 가수분해물, 유청단백질 가

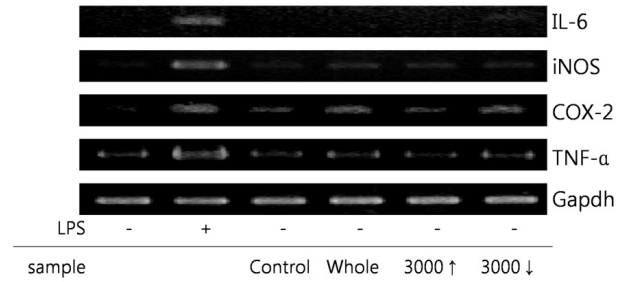


Fig. 4. Effect of whey protein hysrolysate at Raw 264.7 cells. Whey protein (control), hydrolysate whole (whole), hydrolysate over 3000 (3000 Dalton \uparrow), hydrolysate below 3000 (3000 Dalton \downarrow) treated with 20 μ g/mL.

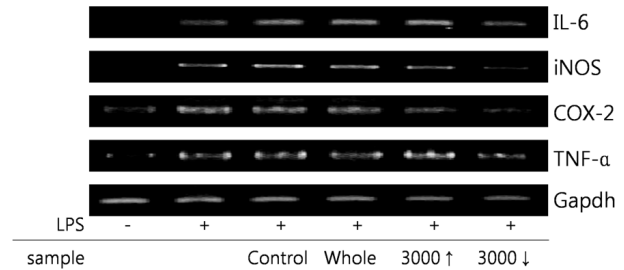


Fig. 5. Effect of whey protein hysrolysate at Raw 264.7 cells. Treated with whey protein and hydrolysate 10 μ g/ml for 30 min before treated with LPS 1 μ g/mL.

수분해물 3,000 dalton이상, 3,000 dalton 이하를 각각 20 μ g/ml 처리한 다음 염증반응과 관련이 있는 사이토카인으로 알려진 IL-6, iNOS, COX-2, TNF- α 의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. Mitogen으로 LPS를 처리한 구는 IL-6, iNOS, COX-2, TNF- α , Gapdh 유전자 모두 발현이 되었고, 유청단백질, 유청단백질 가수분해물, 유청단백질 가수분해물 3,000 dalton이상, 3,000 dalton 이하를 처리한 구에서는 LPS를 처리하지 않은 구와 비슷하게 TNF- α 가 강하게 발현이 되었고 COX-2와 iNOS는 약하게 발현되었다. Fig. 5는 유청단백질 가수분해물 10 μ g/mL을 RAW 264.7 세포에 처리하고 30분 후에 LPS 1 μ g/mL을 처리하여 12시간 배양하여 사이토카인의 발현을 분석한 결과이고, Fig. 6는 유청단백질 가수분해물 50 μ g/mL을 RAW 264.7 세포에 처리한 결과이다. Fig. 5와 Fig. 6을 비교하여 보면 iNOS의 발현이 뚜렷한 차이를 보이고 있는데 Fig. 5에서는 유청단백질 가수분해물 중 분자량 3,000 dalton 이하 처리구에서 발현이 억제된 것으로 나타났다. Fig. 6에서는 가수분해물 전체와 3,000 dalton이하 처리구에서 뚜렷하게 억제된 것을 확인할 수 있는데 이는 분자량 3,000 dalton이하의 저분자

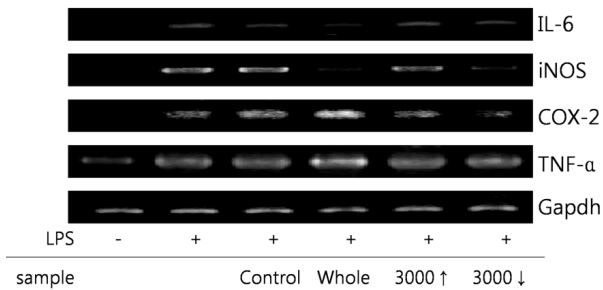


Fig. 6. Effect of whey protein hysrolysate at Raw 264.7 cells. Treatedn with whey protein and hydrolysate 50 µg/ml 30 min before treated with LPS 1 µg/ml.

peptide가 iNOS의 발현을 저해하는 것으로 판단된다. 또한 COX-2의 발현도 Fig. 5와 Fig. 6에서 분자량 3,000 이하의 처리구에서 발현이 억제되는 것을 알 수 있었다. 억제 기전은 최근에 Lskandar(2013)가 유청단백질은 Toll-like receptor(TLR4)의 binding을 억제한다는 보고에서 유추가 가능하다. Toll-like receptor는 소화계와 innate immune system에서 중요한 역할을 하는 단백질의 종류로 macrophage와 dendritic cells에서 발현된다. Toll like receptor family의 하나인 TLR4는 Gram-negative bacteria에서 생성된 lipopolysaccharide(LPS)를 감지할 수 있고 innate immune system의 활성화에 중요한 역할을 하고 있다(Lu et al., 2008). 본 연구는 *Serratia marcescens* S3-R1가 생산한 효소로 유청단백질 가수분해물을 얻었고 이것을 Raw264,7 cell에 처리하여 분자량 3,000 dalton에서 억제효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 가수분해되지 않은 유청단백질에 비해 3,000 dalton이하의 가수분해물이 LPS가 TLR4에 결합되는 것을 방해하여 pro-inflammatory cytokine의 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 50 µg 을 처리한 Fig. 6에서는 가수분해물 전체에서도 억제효과가 나타났는데 이는 처리농도가 높아짐에 따라 분자량 3,000 dlaton이하의 저분자 가수분해물의 농도가 높아져서 TLR4에 결합되어 LPS의 결합능을 저감시키는 것으로 추정된다.

최근에 진행되고 있는 유청단백질 가수분해물에 대한 연구는 Hernandez-Ledesma 등(2008)은 β-lactoglobulin 유래 생리활성 peptide 연구, Hernandez-Ledesma 등 (2002)등은 양과 염소의 β-lactoglobulin 가수분해물에 대한 ACE 저해 활성 연구, Lacroix와 LI-Chan(2012)과 Nongonierma와 FitzGerald (2013)은 type-2당뇨병과 관련된 유청단백질 가수분해물에 대한 dipeptide peptidase-IV

저해 활성과 항산화작용에 관한 연구 등이 있다.

VI. 결론

Serratia marcescens S3-R1로부터 얻은 alkaline protease를 이용하여 유청단백질을 가수분해시켰고 가수분해물은 저분자의 다양한 peptide를 생산하였다. 단백질 가수분해 능력은 우수하였고 전기영동을 통해 가수분해물의 분자량을 확인한 결과 저분자 peptide가 생산되었기에 alkaline protease 가 유청단백질 가수분해에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. Raw264.7 cell을 이용하여 유청단백질 가수분해물에 대한 염증반응 관련 cytokine의 발현은 3,000 dalton이상, 3,000 dalton 이하를 각각 20 ug/ml 처리후 IL-6, iNOS, COX-2, TNF-α를 RT-PCR로 조사하였다. iNOS와 COX-2의 발현이 유청단백질 가수분해물 중 분자량 3,000 dalton 이하 처리구에서 억제된 것으로 나타났는데 이는 분자량 3,000 dalton이하의 저분자 peptide가 iNOS의 발현을 저해하는 것으로 판단된다. 저해 기전은 3,000 dalton이하의 저분자 가수분해물이 LPS가 TLR4에 결합되는 것을 방해하여 pro-inflammatory cytokine의 발현을 억제하는 것으로 판단된다. 앞으로 과제는 가수분해효소에 의해 생산되어진 iNOS저해peptide의 분리 및 아미노산 조성을 밝히고, 생리활성 기능과 기능성 식품에 응용 뿐만 아니라 의약품 소재로 이용하기 위한 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 2013년 농촌진흥청 국립축산과학원의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Aasling D, Gormsen E, Malmos H. 1991. Mechanistic studies of protease and lipase for the detergent industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 50:321-330.
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, 2000. Bovine milk : a unique source of immunomodulatory ingredients for functional foods. In Buttriss J, Saltmarsh M, eds. *Functional Food II-Claims and Evidence.* Cambridge, England: Royal Society of Chemistry Press pp. 82-90. Royal Society of Chemistry Press, Cambridge, England.

- Hernandez-Ledesma B, Recio I, Ramos M, Amigo I. 2002. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal*. 12:805-812.
- Hernandez-Ledesma B, Recio I, Amigo I. 2008. β -lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*. 35:257-265.
- Huth PJ, Layman DK, Brown PH. 2004. The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. *Journal of Nutrition*. 134:961S.
- Kim SB, Ku MJ, Cho WM, Ki KS, Kim HS, Nam MS. 2010. Production of Iron-Binding Peptides from Colostral Whey by Enzymatic Hydrolysis. *Korea Journal of Animal Food Science and Resource*. 20:566-577.
- Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Nam MS, Kim HS. 2007. Separation of iron-binding protein whey through enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*. 17:625-631.
- Kitazawa H, Yonezawa K, Tohno M, Shimosato T, Kawai Y, Saito T, Wang JM. 2007. Enzymatic digestion of the milk protein β -casein releases potent chemotactic peptide(s) for monocytes and macrophages. *International Immunopharmacology*. 7:1150-1159.
- Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal of Genetic Physiology* 30:291-297.
- Lacroix IME, LI-Chan ECY. 2012. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*. 25:97-102.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lskandar M.M, Dauletbaev N, Kubow S, Mawji N, Lands LC. 2013. Whey protein hydrolysates decrease IL-8 secretion in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated respiratory epithelial cells by affecting LPS binding to Toll-like receptor 4. *British Journal of Nutrition*. 110:58-68.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151.
- Marshall K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*. 9:136-156.
- Nam MS, Whang KS, Choi SH, Bae HC, Kim YK, Park YW. 2013. Purification, characterization, and properties of an alkaline protease produced by *Serratia marcescens* S3-R1 inhabiting in Korean Ginseng Rhizosphere. *Journal of Science Food Agriculture*. (In press)
- Nongonierma AB, FitzGerald RJ. 2013. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides* 39:157-163.
- Smyth M, Fitz-Gerald RJ. 1998. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. *International Dairy Journal*. 8:819-827.
- Walzem RL, Dillard CJ, German JB. 2002. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42:353-375.