

대두 펩타이드의 표면소수도가 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도 및 분변 스테로이드의 배설량에 미치는 영향

한응수 · 이형주* · 손동화**

농협전문대학 식품제조과, *서울대학교 식품공학과
**한국식품개발연구원 이화학연구부

Effect of Surface Hydrophobicity of Soybean Peptides on the Concentration of Serum Cholesterol and Fecal Steroid Excretion in Rats

Eung-Soo Han, Hyong-Joo Lee* and Dong-Hwa Shon**

Department of Food Technology, Agricultural Cooperative Junior College
*Department of Food Science and Technology, Seoul National University
**Division of Food Science, Korea Food Research Institute

Abstract

Effect of surface hydrophobicity of soybean peptides on serum cholesterol in rats was investigated. Soybean protein(ISP), casein(CNP), and their peptic hydrolyzates fractionated by acid precipitations (SHT, SH8, SH6, SH4, CHT, CH6, CH5, CH4) were fed to rats and the concentration of serum cholesterol and the fecal steroid excretion were measured. And surface hydrophobicities of the peptide fractions were measured by determining by the ANS fluorescence intensity and SDS binding capacity. It was found that the higher the surface hydrophobicity of peptides was, the more the fecal steroids excreted($r=0.801$) and the lower the concentration of serum cholesterol became($r=-0.868$). However, there was no relationship between SDS surface hydrophobicity and fecal steroids or serum cholesterol. ANS surface hydrophobicity of soybean protein was increased by enzymatic hydrolysis. These results suggest that high surface hydrophobicity of peptides formed during digestion is responsible for the hypocholesterolemic effect of soybean protein through the hydrophobic interaction between the peptides and bile salts in rats.

Key words: Soybean peptides, surface hydrophobicity, serum cholesterol, fecal steroids

서 론

심장병(허혈성심질환)과 매우 밀접한 관계를 갖는 혈청 콜레스테롤은 대두 단백질을 섭취한 경우 카세인 섭취 시에 비해서 그 농도가 낮아지는 것으로 널리 알려져 있으며^(1,2), 또한 분변으로 배설되는 스테로이드 화합물의 양도 대두 단백질을 섭취한 경우에 크게 증가하는 것이 다수 보고되었다^(3,4). 대두 단백질 섭취시 혈청 콜레스테롤 농도가 낮아지는 기작에는 단백질의 소화성⁽⁵⁾, 아미노산 조성⁽⁶⁾ 및 평균소수도⁽⁷⁾ 등과 관련이 있다고 제시되었다. 한편, Iwami 등⁽⁸⁾은 소화관에서 생성된 소수성 펩타이드가 영향을 미칠 수 있음을 시사하였는데, 소화효소에 의해 생성된 펩타이드 중에서 표면소수도가 높은 소수성 펩타이드들이 간장에서 배출된 담즙염과 소수성 결합을

한 채로 소장을 통과하여 분변으로 배설되므로서, 담즙염이 간장으로 재흡수되는 것이 억제되어 간장에서는 콜레스테롤이 담즙산으로 더 많이 전환되고, 전환된 양만큼의 콜레스테롤은 혈액으로부터 흡수되거나 생합성을 통해서 보충되어지므로⁽⁹⁾, 이 과정에서 혈액중의 콜레스테롤 농도가 낮아진다는 것이다⁽¹⁰⁾.

그런데, 펩타이드의 표면소수도 측정방법은 여러가지가 있어서 동일한 펩타이드에 대해서도 측정방법에 따라 각기 상이한 표면소수도의 값이 얻어지므로, 펩타이드의 표면소수도와 혈청 콜레스테롤 농도와의 관계를 구명하기가 어렵다. 즉, 같은 형광측정방법이라도 형광측정용 탐침으로 1-anilino-8-naphthalene sulfonate(ANS)⁽¹¹⁾와 p-toluidinyl naphthalene sulfonate 등의 방향족 물질을 이용하는 방법⁽¹²⁾과, cis-parinaric acid와 같은 지방족 물질⁽¹³⁾을 쓰느냐에 따라 달라진다. 또한, sodium dodecyl-sulfate(SDS)⁽¹⁴⁾를 탐침으로 이용하는 방법도 있다.

본 연구는 대두 단백질의 섭취에 의한 혈청 콜레스테롤 저하의 작용기작을 설명하기 위한 일련의 시도로서, 대

Corresponding author: Eung-Soo Han, Department of Food Technology, Agricultural Cooperative Junior College, 38-27 Wondang-Dong, Koyang-Si, Kyonggi-Do 411-707, Korea

두단백질과 카세인으로 제조한 펩타이드의 표면소수도를 ANS법과 SDS법으로 측정하고, 이들을 섭취시킨 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도 및 분변으로 배설된 스테로이드의 양을 측정하였으며, 그들간의 상관관계를 분석하였다.

재료 및 방법

재료

대두 단백질은 미국 ADM사의 isolated soy protein (ISP, ARDEX DHV)을, 카세인 단백질은 네덜란드 DMV사의 sodium caseinate(CNP, EM HV)를 사용하였으며, SDS 및 ANS를 비롯하여 특별한 언급이 없는 효소와 시약은 Sigma사 제품을 사용하였다.

펩타이드 제조

전보^(15,16)에서와 같은 방법으로 ISP 및 CNP를 펩틴으로 가수분해후 pH에 따른 용해도 차이를 이용하여 각각의 펩타이드 획분을 분리하여 실험에 사용하였다.

표면소수도 측정

ANS법: 동결건조한 펩타이드를 0.1% 수용액으로 만들고 이것을 0.01 M 중탄산나트륨 용액(pH 8.0)으로 순차적으로 0.001%(w/v)까지 희석하면서, 각 펩타이드 용액 5ml에 8 mM ANS 용액 25 ml를 혼합하고 형광광도계(Aminco Bowman)로 형광을 측정하였다. 이때 최대 여기파장은 380 nm, 방출파장은 465 nm였으며, 형광도는 BSA(bovine serum albumin)에 ANS를 처리한 경우를 100으로 한 상대치로 표시하였고, 표면소수도는 펩타이드 농도변화에 대한 형광도의 변화율로 표시하였다.

SDS법: 펩타이드 용액의 농도를 1 mg/ml로 조정하여 1% SDS 용액을 혼합(peptide/SDS : 5/1)하고 24시간 투석한 다음, 펩타이드와 결합한 SDS의 양을 비색법으로 측정하였다. 즉, 시험관에 콜로로포름 5 ml를 취하고 시료 500 μ l를 넣어 강하게 흔든 다음 2.5 mM methylene blue 용액 2 ml를 넣고 교반하였다. 이것을 10분간 방치한 후 콜로로포름층의 흡광도를 650 nm에서 측정하여 SDS의 농도를 구하였다. 표면소수도는 펩타이드 500 μ g에 결합하는 SDS의 μ g량으로 표시하였다.

동물 실험

전보^(15,16)에서와 같은 방법으로 처리구당 6마리씩 4주령의 웅성 흰쥐(Wistar strain)에 펩타이드 급원(ISP, SHT, SH8, SH6, SH4, CNP, CHT, CH6, CH5 및 CH4) 25%의 분말식이료를 4주간 자유급여하였다. 단, 분변은 2주마다 처리구별로 채취하여 동결건조하고 무게를 측정하였다.

콜레스테롤 분석

전보^(15,16)에서와 같은 방법으로 8주령 래트로부터 얻은

혈청중의 콜레스테롤 양을 효소kit(Sigma)로 측정하였다⁽¹⁷⁾.

분변 스테로이드 분석

담즙산 분석: Grundy 등⁽¹⁸⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 사육 6주째부터 2주간 채취하고 냉동건조한 분변에 증류수 5배량(W/W)을 넣고 균질화시킨 후 2.0g을 취하였다. 여기에 90% ethanol로 만든 1 N NaOH 20 ml와 비등석을 넣어 1시간 동안 reflux시키고 상온으로 냉각시킨 다음, 증류수 10 ml와 석유 에테르 50 ml를 넣고 강하게 교반하였다. 상등액을 원심분리(1000 \times g, 5 min)하여 침전물을 제거하고 담즙산 분석용 및 중성 steroid 분석용 시료로 사용하였다. 담즙산은 일본 Wako사의 효소kit(code No. 431-15001)를 써서 측정하였다. 즉, 시료 200 μ l에 효소액 500 μ l를 넣고 흔들어 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 다음, 반응정지액 500 μ l를 넣고 흔들어 반응을 정지시키고, 560 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준액으로 구한 표준곡선을 이용하여 분변중의 담즙산 양을 mg/g dry feces 단위로 구하였다.

중성 스테로이드 분석: Miettinen 등의 방법⁽¹⁹⁾에 따라 GLC(gas liquid chromatography) 법으로 분석하였다. 시료는 분변을 처리하여 얻은 석유 에테르층을 회전 증발기로 용매를 제거하고 다시 vial에 녹여낸 다음, 질소가스로 용매를 완전히 제거하고 여분의 수분을 건조기로 완전히 제거하였다. 시료 중 스테로이드의 GLC 분석을 위해 3번 탄소의 수산기를 trimethylsilane으로 silylation시켰다. 즉, vial에 N,N-dimethyl formamide, hexamethyldisilazane 및 trimethylchlorosilane을 각각 400 μ l, 400 μ l 및 10 μ l씩 넣고 마개를 하여, 실온에서 30분간 반응시키고 마개를 열어 반응 용매를 증발시킨 다음, ethyl acetate를 용매로 하여 GLC로 분석하였다⁽²⁰⁾. 각 성분의 양은 silylation 직전에 일정량의 콜레스테롤을 첨가하여 표준곡선을 얻어 mg/g dry feces 단위로 구하였다. 이때 GLC 분석 조건은 다음과 같다: Gas chromatograph는 HP 5890을, detector는 FID, column은 50 m \times 0.2 mm OV-101, fused silica capillary column을, carrier gas는 nitrogen을 사용하였으며, temperature program은 170~280 $^{\circ}$ C, 15 $^{\circ}$ C/min로, injector와 detector의 온도는 280 $^{\circ}$ C로 하였다.

실험 data의 통계분석

실험결과를 평균 \pm 표준편차로 표시하였고 각 실험군 별로 평균차이가 있는가를 검정하기 위해 분산분석(ANOVA test)을 시행하였으며 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan법에 의하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다. 데이터분석에는 Statistical Analysis System(SAS) program package를 사용하였고, 각 항목별 상관관계는 Pearson's R계수로 검정하였다⁽²¹⁾.

Table 1. ANS and SDS surface hydrophobicity of the proteins and their peptide fractions

Peptide ¹⁾	Surface hydrophobicity	
	ANS ²⁾	SDS ³⁾
ISP	96.0	19.2
SHT	109.4	20.7
SH8	104.9	15.7
SH6	71.0	18.3
SH4	111.0	22.7
CNP	67.0	30.2
CHT	65.8	20.3
CH6	65.3	16.3
CH5	65.9	18.8
CH4	66.2	21.2

¹⁾Dietary nitrogen sources fed to rats: ISP, isolated soy protein; SHT, total precipitate of peptic hydrolyzate of ISP; SH8, pH 8.0 fraction of the ISP hydrolyzate; SH6, pH 6.0 fraction of the ISP hydrolyzate; SH4, pH 4.0 fraction of the ISP hydrolyzate; CNP, sodium caseinate; CHT, total precipitate of peptic hydrolyzate of CNP; CH6, pH 6.0 fraction of the CNP hydrolyzate; CH5, pH 5.0 fraction of the CNP hydrolyzate; CH4, pH 4.0 fraction of the CNP hydrolyzate.

²⁾Unit: ANS fluorescence intensity/% peptide

³⁾Unit: µg of bound SDS/500 µg of peptide

결과 및 고찰

펩타이드의 표면소수도

식이 단백질과 펩타이드의 표면소수도는 Table 1과 같다. 대두단백질의 ANS 표면소수도는 96.0으로 카세인의 67.0에 비하여 높게 나타났으나, SDS 표면소수도는 대두단백질이 19.0로 카세인의 30.2보다 훨씬 낮았다. 이는 ANS의 구조가 방향족 탄화수소로 되어 있어서 ANS가 단백질의 표면에 작용하는데 비해서, SDS는 소수성의 긴 탄화수소 부분이 단백질의 구조에 따라 내부까지 침투하는 것이 용이하기 때문으로 생각된다. 즉, 대두단백질은 용액중에서 구형의 구조를 갖는데 비하여, 카세인은 특정한 고차구조를 갖지 않는 random coil상으로 존재하기 때문에⁽²²⁾ SDS의 침투가 용이한 것으로 생각된다.

또한, 대두단백질을 펩신으로 1시간 가수분해하였을 때 ANS 표면소수도는 최초 96.0에서 109.4(SHT)로 높아졌으며 카세인의 경우는 67.0에서 65.8(CHT)로 크게 변하지 않았다. 한편 가수분해시 SDS 표면소수도는 대두단백질의 경우 19.2에서 20.7로 약간 증가하였으나, 카세인의 경우는 30.2에서 20.3으로 감소하였다. 그 이유는, 일반적으로 내부에 묻혀 있던 소수성 부분이 가수분해에 의하여 표면으로 노출되어 소수도가 상승하지만, 비교적 느슨한 구조를 갖고 있는 카세인의 경우는 최초에 SDS가 쉬 결합하나 가수분해에 의하여 생성된 조각들은 전체적으로 SDS와의 결합력이 감소하기 때문으로 생각된다.

Table 2. Serum cholesterol levels and fecal steroid excretion in rats fed with different nitrogen sources

Experiment 1						
Diet ¹⁾	ISP	SHT	CNP	CHT		
Cholesterol ²⁾ (mg/dl)	77.3 ± 5.2 ^{b3)}	70.5 ± 5.7 ^b	100.0 ± 1.1 ^a	95.2 ± 2.7 ^a		
Fecal steroids ⁴⁾ (mg/head/day)	23.2 ^b	26.2 ^a	13.1 ^d	18.7 ^c		
Experiment 2						
Diet	SH8	SH6	SH4	CH6	CH5	CH4
Cholesterol (mg/dl)	73.8 ± 5.3 ^b	74.5 ± 7.0 ^b	68.6 ± 7.6 ^b	98.9 ± 5.9 ^a	98.5 ± 7.4 ^a	91.0 ± 6.9 ^a
Fecal steroids	23.6 ^a	24.4 ^a	25.1 ^a	17.8 ^b	18.2 ^b	17.2 ^b

¹⁾Dietary nitrogen sources: same as shown in Table 1.

²⁾Values represent the mean±SD.

³⁾Values followed by the same letter are not significantly different at p<0.05 level.

⁴⁾Feces gathered from each group of mice for last 2 weeks were analyzed.

펩타이드획분의 ANS 표면소수도는 대두 펩타이드(SH 8, SH6, SH4)의 경우 대체로 단백질보다 높게 나타났으나, 카세인 펩타이드(CH6, CH5, CH4)의 경우는 CNP와 같거나 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

혈청 콜레스테롤의 농도

Table 2에서와 같이 대두단백질 계통을 먹인 처리구 들은 카세인 계통을 먹인 처리구보다 혈청 콜레스테롤 농도가 낮게 나타났다. 펩타이드 획분을 처리한 결과, 서로 다른 단백질 계통간에는 차이가 있었으나 같은 계통내에서는 유의한 차이가 없었다. 다만 대두 펩타이드나 카세인 펩타이드에서 모두 pH 4획분(SH4, CH4)에서 혈청 콜레스테롤 농도가 각각 68.6과 91.0 mg/dl로 가장 낮은 값을 보였다.

분변 스테로이드 배설량

분변으로 배설된 총 스테로이드(담즙산과 중성스테로이드)의 양은 대두단백질 계통보다 카세인 계통에서 높았다(Table 2). 이는 혈청 콜레스테롤의 농도와는 반대의 경향을 나타내었다. 또한, 같은 계통내에서는 단백질의 총가수분해물(SHT, CHT)에서 가장 높았다. 대두 펩타이드 중에서는 SH4의 처리시 스테로이드의 배설량이 25.1 mg/ml로 가장 높게 나타났고, 카세인 펩타이드의 경우는 CH5의 처리시 18.2 mg/ml로 가장 높았다.

펩타이드의 표면소수도와 분변 스테로이드 배설량

펩타이드의 표면소수도와 분변 스테로이드 배설량과의 상관관계는 Fig. 1A와 같다. 즉, 상관계수 0.801로서 ANS 표면소수도가 높을수록 분변스테로이드 배설량이 많아

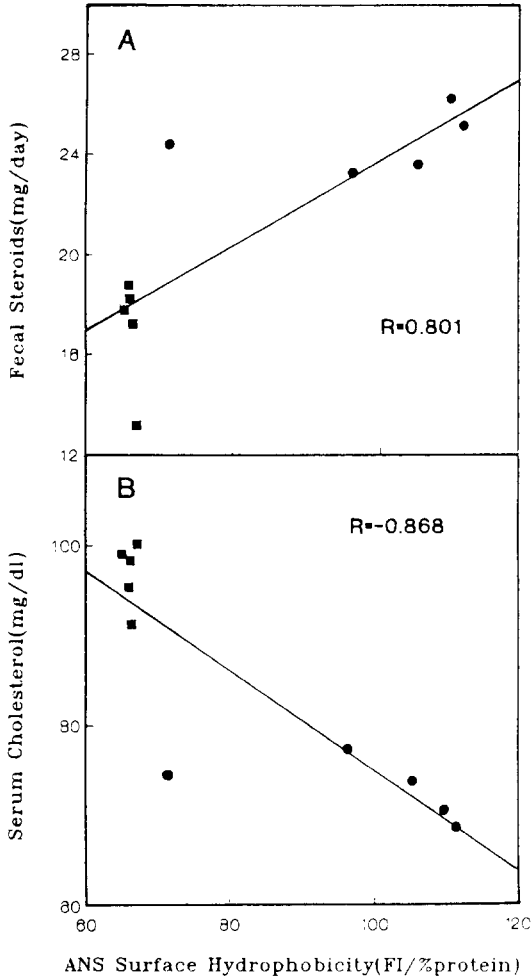


Fig. 1. Relationship between ANS surface hydrophobicity of peptides and serum cholesterol level(A) or fecal steroids excretion(B) in rats

FI fluorescence intensity. ●; soybean peptides, ■; casein peptides

졌다. 특히, 표면소수도가 높은 대두 펩타이드군에서 스테로이드 배설량이 많았으며, 표면소수도가 낮은 카세인 펩타이드군에서는 적었다. 그러나, SDS 표면소수도와는 상관관계가 없었다. 펩타이드의 ANS 표면소수도가 분변 스테로이드 배설량과 밀접한 상관관계가 있는 것은 ANS의 구조가 담즙산과 유사한 방향족 탄화수소로 되어 있어서 식이 펩타이드에 대해서 담즙산과 같은 작용기 작으로 소수성 상호작용을 할 수 있기 때문으로 생각된다.

펩타이드의 표면소수도와 혈청 콜레스테롤 농도

ANS 표면소수도와 혈청 콜레스테롤 농도와의 상관관계는 Fig. 1B에서와 같이 상관계수 -0.868 로서(99%

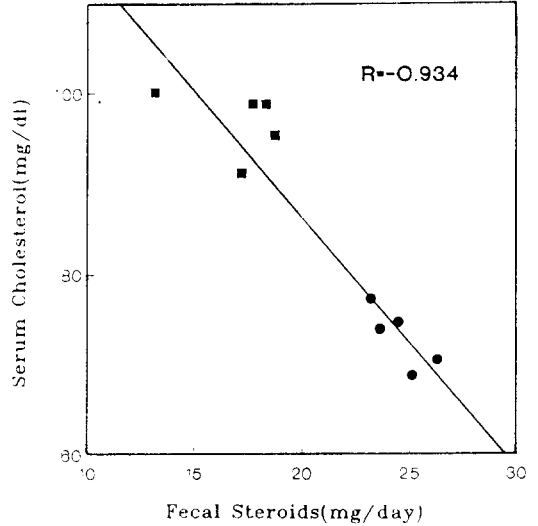


Fig. 2. Relationship between amount of fecal steroids and serum cholesterol level in rats

●; soybean peptides, ■; casein peptides

신뢰성), 펩타이드의 ANS 표면소수도가 높으면 혈청 콜레스테롤 농도가 낮아졌다. 이는 전보⁽²³⁾에서 Krigbaum 평균소수도로 구한 상관계수(-0.736)보다 그 상관성이 높게 나타나 ANS 표면소수도가 펩타이드의 섭취에 의한 혈청 콜레스테롤의 농도를 예측하는데 더욱 효과적임을 알 수있었다. 또한, 분변 스테로이드 량과 혈청 콜레스테롤 농도와의 강한 음의 상관관계($r = -0.934$)를 나타내어 분변으로 배설되는 스테로이드 량이 많을수록 혈청 콜레스테롤의 농도가 낮아졌다(Fig. 2).

전보^(15,16)와 이상의 결과를 종합하면, 소화관에서 생성된 소화물이 낮고 ANS 표면소수도가 높은 대두 펩타이드가 혈청 콜레스테롤의 농도를 낮추고 분변 스테로이드의 양을 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 대두단백질의 섭취시 소화중에 생성된 소수성 펩타이드가 담즙산과 상호작용하여 스테로이드의 흡수가 저해되므로서 혈청 콜레스테롤의 농도를 낮춘다는 이론^(8, 10)을 지지하고 있다.

요 약

대두 펩타이드의 표면소수도가 혈청 콜레스테롤의 농도에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 대두 단백질(ISP), 카세인(CNP), 이들 단백질을 펩신으로 가수분해하여 pH에 따른 펩타이드 침전 회분들(SHT, SH8, SH6, SH4, CHT, CH6, CH5, CH4)을 흰쥐에 섭취시키고 혈청 콜레스테롤 농도 및 분변 스테로이드의 배설량을 측정하였다. 그리고 각 펩타이드의 표면소수도를 ANS 형광법 및 SDS 결합법으로 측정하여, 이들의 상관관계를 분석한 결과, 펩타이드의 ANS 표면소수도가 높아질수록 분변

으로 배설된 스테로이드량은 증가하였으며($r=0.801$), 혈청 콜레스테롤 농도는 낮아졌다($r=-0.868$). 그러나 SDS 표면소수도는 그들과 상관관계가 없었다. 또한, 대두 단백질은 가수분해에 의하여 ANS 표면소수도가 증가하였다. 이상의 결과는 흰쥐의 담즙염이, 소화중 생성된 높은 표면소수도의 펩타이드와 결합하여 체외로 배출되므로서 대두단백질의 섭취에 의한 혈청 콜레스테롤 농도가 낮아짐을 시사하였다.

문 헌

1. Sugano, M.: Nutritional studies on the regulation of cholesterol metabolism. The effects of dietary protein. 日本營養食糧學會誌, 40, 93(1987)
2. Tanaka, K., Aso, B. and Sugano, M.: Biliary steroid excretion in rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixture. *J. Nutr.*, 114, 26(1984)
3. Nagata, Y., Ishiwaki, N. and Sugano, M.: Studies on the mechanism of anti hypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats. *J. Nutr.*, 112, 1614(1982)
4. Sugiyama, M., Ohishi, A. and Muramatsu, K.: Comparison between the plasma cholesterol-lowering effect of glycine and taurine in rats fed on high cholesterol diets. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1647(1989)
5. Woodward, C.J.H. and Carroll, K.K.: Digestibility of casein and soybean protein in relation to their effects on serum cholesterol in rabbits. *Br. J. Nutr.*, 54, 355(1985)
6. Tanaka, K. and Sugano, M.: Effect of modification of the arginine/lysine ratio of dietary protein on the absorption and turnover of cholesterol in rats. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1351(1989)
7. 菅野道廣: タンパク質の消化によって發現する營養機能-脂質代謝機能を有するペプチドの生成. 食品機能, p.30(1988)
8. Iwami, K., Sakakibara, K. and Ibuki, F.: Involvement of postdigestion hydrophobic peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1217(1986)
9. Brown, M.S. and Goldstein, J.L.: A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232, 34(1986)
10. Brown, M.S., Kovanen, P.T. and Goldstein, J.L.: Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptor. *Science*, 212, 628(1981)
11. Kella, N.K.D., Robert, D.D. and Goldstein, I.J.: Fluorescence energy transfer studies on lima bean lectin. *J. Biol. Chem.*, 259, 4777(1981)
12. Hayakawa, S. and Nakai, S.: Relationship of hydrophobicity and charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.*, 50, 486(1985)
13. Turner, D.C. and Brand, L.: Quantitative estimation of protein binding site polarity. *Biochemistry*, 7, 3381(1968)
14. Kato, A., Matsuda, T. and Kobayashi, K.: Determination of protein hydrophobicity using a sodium dodecylsulfate binding method. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 284(1984)
15. Han, E.S., Lee, H.J. and Shon, D.H.: Effect of amino acid composition and average hydrophobicity of soybean peptides on the concentration of serum cholesterol in rats. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25, 552(1993)
16. Han, E.S., Lee, H.J. and Shon, D.H.: Effect of digestibility of soybean peptides on the concentration of serum cholesterol in rats. *Korean J. Nutr.*, 26, 585(1993)
17. Sale, F.O., Marchesini, S. and Berra, B.: A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extraction. *Anal. Biochem.*, 142, 347(1984)
18. Grundy, S.M., Ahrens, E.H. and Miettinen, T.A.: Quantitative isolation and gas liquid chromatographic analysis of total fecal bile acids. *J. Lipid Res.*, 6, 397(1965)
19. Miettinen, T.A., Ahrens, E.H. and Grundy, S.M.: Quantitative isolation and gas liquid chromatographic analysis of total dietary and fecal neutral steroids. *J. Lipid Res.*, 6, 411(1965)
20. Miettinen, T.A.: Gas liquid chromatographic determination of fecal neutral steroids using a capillary column. *Clinica Chimica Acta*, 124, 245(1982)
21. SAS Institute: SAS/STAT user's guide for personal computers, Cary, NC, SAS Institute Inc.(1985)
22. Swaisgood, H.E.: *Developments in dairy chemistry*, Atomic Press, New York, p.1(1981)

(1993년 8월 23일 접수)