

대두 미분해성 단백질로부터 Chemiluminescence법에 의한 담즙산 결합 Peptides의 탐색

김영미 · 이영일 · 김복란 · 김종대 · 이해익 · 이상영*

*강원대학교 식품·생명공학부

Screening for the Bile Acid-Binding Peptides from Undigested Soy Bean Protein by Chemiluminescence Method

Young-Mi Kim, Young-Il Lee, Bok-Ran Kim, Jong-Dai Kim, Hae-Ik Rhee and Sang-Young Lee[†]

Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Abstract

Undigested fraction(UDF) from soybean protein reportedly bound bile acids and significantly increased fecal excretion of both neutral and acidic steroid. UDF from Meju also bound bile acids *in vitro*, which was detected by chemiluminescence method. Soybean protein was extracted from Meju with 10 mM Tris-HCl(pH 8.0) followed by a Sephadex G-75 column chromatography, and prepared as partially purified UDF. UDF(5~50ng/well) was coated on the micro tube ; then micro tube was washed with PBS-T. Glycocholic acid, blocking buffer, anti glycocholic acid BSA and horseradish peroxidase-labelled antibody were conjugated as above and activity of the bound enzyme conjugate revealed by the addition of luminol(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine). We were able to detect bile acid binding peptides by chemiluminescence with luminol.

Key words: undigested soy protein, chemiluminescence

서 론

체내에서 콜레스테롤과 같은 지방질의 농도 증가는 동맥경화증(atherosclerosis), 심근경색(myocardial infarction), 허혈성 뇌질환 등과 같은 순환기계 질병을 유발하여 건강을 해치게 된다고 보고되어 오고 있다(1). 최근들어 우리나라도 경제발전과 더불어 국민생활 수준의 향상으로 식습관이 점차적으로 서구화되면서 순환기계 성인병의 발생이 증가하고 있는 실정이다(1). 이러한 질병의 치료와 예방의 한 방법으로써 체내 콜레스테롤 대사에 관한 연구가 활발히 진행 중에 있다(1,2).

대두 단백질은 생체내 콜레스테롤 수준을 조절하는 물질 중의 하나로서 보고된 바 있다(3). 장내 소화 효소 등에 의해 가수분해되지 않은 대두 단백질의 미분해성 분획물(Undigested fraction: UDF)은 담즙산과 결합하여 체외로 배설됨으로써 장벽에서의 재흡수를 억제하게 된다. 그러므로 간접적으로 쥐의 혈청 및 간장

중의 콜레스테롤 수준을 효과적으로 감소시킨다는 것이 연구 보고된 바 있다(3-5). 한편 *in vivo* 실험을 통하여 대두와 담즙산의 결합에 관한 많은 연구가 진행 중이기는 하나(4,5), 여러 문제점이 제시되고 있는 실정이다. 무엇보다도 동물을 사육하는데 소모되는 경비와 시간이 문제되며, 여러 종류의 시료를 단시간 내에 동시에 확인하는 것 또한 어렵다. 따라서 *in vivo*의 여러 단점을 극복하기 위하여 *in vitro*를 통한 연구가 진행되어 오고 있다. 그 예로 isotope를 이용하는 radio-isotope 처리 방법을 들 수 있는데 이 방법은 감도가 뛰어나다는 장점을 갖고 있기는 하지만 isotope를 다루는 전문가가 필요할 뿐만 아니라 환경 및 인체에 미치는 악영향으로 인하여 이의 사용에 많은 제약이 따르고 있는 실정이다. 따라서 동물 실험으로 인한 경비와 시간을 줄이며, radioisotope의 위험으로부터 벗어날 수 있는 안전한 방법을 찾고자 본 연구에서는 luminol(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione ; Lm)

[†]To whom all correspondence should be addressed

을 이용하는 chemiluminescence법을 시도하였다. Luminol과 같은 cyclic diacyl hydrazide의 화학적 발광 반응은 화학 분석에 널리 이용되어 오고 있으며(6), 이에 관한 연구도 광범위하게 이루어지고 있다(7).

Horseradish-peroxidase(HRP)(8)는 과산화수소 존재시 luminol의 산화를 촉매시키고, 산화된 luminol은 들뜬 상태에서 바닥 상태로 되는 가운데 빛을 발산하게 된다. 본 연구는 이러한 원리에 입각하여 개량 메주로부터 분리한 단백질의 미분해성 분획물을 micro tube에 부착시키고, glycocholic acid 및 anti glycocholic acid 그리고 peroxidase가 연결된 anti rabbit Ig G를 결합시켰다. Luminol이 포함된 기질 반응액을 peroxidase가 연결된 anti rabbit Ig G가 결합된 micro tube에 첨가하였을 때 빛의 발산을 luminometer에 의해 측정할 수 있었다. 이로써 저자 등은 발산된 빛의 농도로써 담즙산과 결합한 미분해성 분획물이 결합한다는 사실을 측정 확인하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

Glycocholic acid는 Nacalai Tesque(일본), anti glycocholic acid는 Cosmo(일본), peroxidase conjugated anti rabbit Ig G는 Wako(일본), luminol, acrylamide는 Sigma사(Mo. USA) 제품을 사용하였고 기타 시약은 특급시약을 이용하였다.

단백질 미분해성 분획물(UDF)의 제조

샘표식품공업주식회사(서울)에서 제조한 개량 메주를 동결 건조시킨 후 분쇄하고, 메주 분말 1g당 10ml의 n-hexane으로 2회 추출하여 지질을 제거하였다. 탈지된 메주를 건조시킨 후 메주 분말 1g당 10ml의 0.01M Tris-HCl (pH 8.0) 완충액을 가하여 교반하면서 37°C에서 2시간 동안 메주 단백질을 2번 반복하여 추출하였다. 추출된 메주 단백질은 2N HCl을 이용하여 pH 6.8로 조정된 후 7,000×g에서 원심분리하여 침전물을 pH 6.8 분획물로서 얻었다. 상층액을 다시 pH 4.5로 조정하여 생성된 침전물을 10,000×g에서 원심분리하여 pH 4.5 분획물을 얻었다(9). Pepsin에 의해 가수분해되지 않은 대두 기원의 미분해성 분획물은 일본 구주대학 Sugano 교수로부터 분주받았다.

미분해성 분획물의 부분 정제

개량 메주의 pH 6.8, pH 4.5 분획물과 대두 기원 미

분해성 분획물을 75mg당 8M urea 1ml에 현탁시킨 후 각기 20분간 초음파 처리를 하고, 24시간 동안 증류수에 대하여 투석하였다(molecular cut-off : 6KD.). 투석으로 얻어진 각각의 분획물들은 Sephadex G-75 column chromatography(3.4×54cm)로 부분 정제하였다.

미분해성 분획물과 glycocholic acid의 결합 능력 측정

부분 정제하여 얻은 pH 6.8과 pH 4.5 분획물(Fig. 1의 I, Fig. 2의 I부분)들은 coating buffer(carbohydrate-bicarbonate, pH 9.6)로 희석을 한 후 0°C에서 하룻밤 동안 luminometer용 micro tube에 부착시켰다. 부착시킨 후 미분해성 분획물을 제거한 후 micro tube를 phosphate buffered saline-Tween 20(pH 7.4, PBS-T)으로 3번 씻고 제거하였다. PBS-T로 희석한 glycocholic acid를 미분해성 분획물이 부착된 micro tube에 넣고 37°C에서 2시간 동안 결합시켰다. 위의 과정과 동일한 방법으로 결합하지 않은 담즙산을 제거 세척한 다음, blocking buffer(10)를 넣고 37°C에서 2시간 방치하였다. Glycocholic acid에 대한 rabbit 기원의 1차 항체, 즉 anti glycocholic acid를 넣고 37°C에서 1시간 결합시켰다. 그 다음 1차 항체를 인식하는 peroxidase가 conjugated goat 기원의 2차 항체, 즉 peroxidase conjugated anti rabbit Ig G를 37°C에서 1시간 동안 결합시켰다. 결합이 끝난 micro tube에 0.79μM luminol(8), 0.0025% H₂O₂(11), 0.17M Tris-HCl buffer(pH 7.75)(12)와 enhancer로써 140μM p-chlorophenol 등을 혼합한 반응액을 첨가한 다음 결합능을 luminometer(BERTHOLD LB9505, 독일)로 측정하였다. 한편 4-Cl-1-naphthol과 4-aminoantipyrine을 기질 반응액으로써 첨가하여 일어난 발색의 정도를 ELISA reader로 측정하였다.

Dot blotting 및 microtiter plate상에서의 미분해성 분획물과 담즙산의 결합능력 측정

Dot blotting과 micro plate상에서의 결합 능력 측정은 미분해성 분획물을 micro tube에 부착시키는 방법과 동일하게 nitrocellulose membrane(Advantec, 일본) 또는 96 well micro plate에 부착시켰다. Luminol에 의한 발광은 X-ray film(Konica X-Ray film) 건판에 노출시켜 확인하였다.

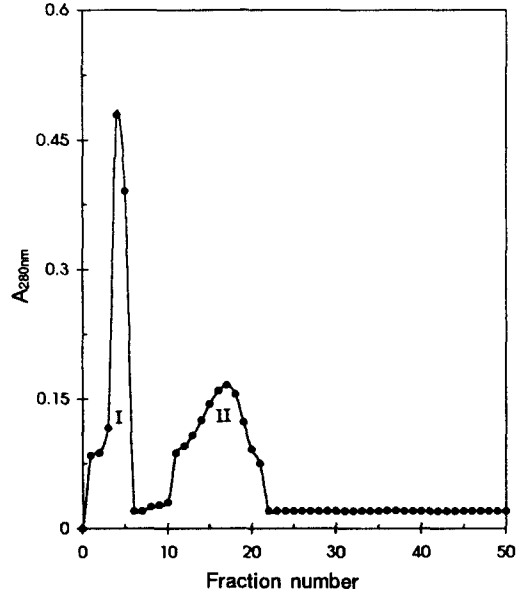
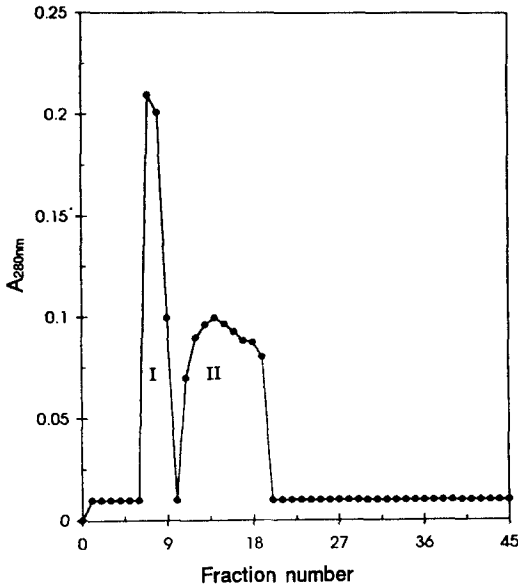


Fig. 1. Elution profile of (A) pH 4.5 fraction and (B) pH 6.8 fraction from Meju on Sephadex G-75 column chromatography.

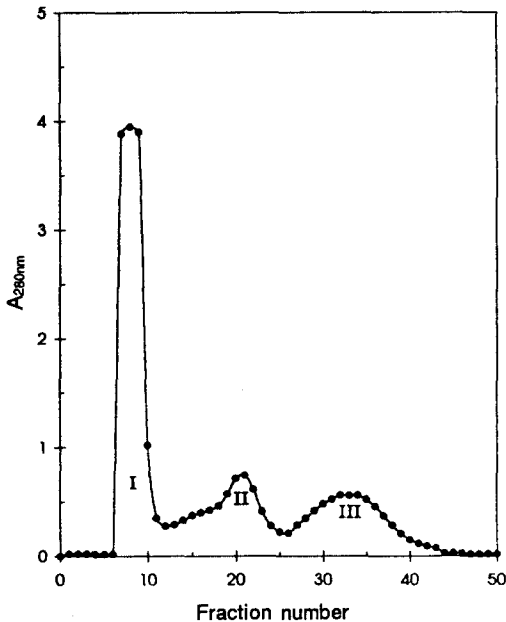


Fig. 2. Elution profile of UDF from soybean on Sephadex G-75 column chromatography.

결과 및 고찰

미분해성 분획물의 부분 정제

Fig. 1(A)에서 나타낸 바와 같이 탈지 메주 분말에

서 0.01M Tris-HCl(pH 8.0)로 추출 분리한 미분해성 분획물을 등전점 침전에 의하여 pH 6.8과 pH 4.5 획분을 얻었으며 이들을 gel filtration chromatography를 실시하여 각각 부분정제를 하였다. pH 6.8과 pH 4.5 분획물들의 chromatogram은 두 가지 모두 Fig. 1(A) 및 Fig. 1(B)에서 보는 바와 같이 2개의 분획물로 부분적인 정제가 가능하였다. 대두 단백질 기원 pepsin 미분해성 분획물도 마찬가지로 gel filtration chromatography로 부분적인 정제를 행하였다. 그 결과 pepsin 미분해성 분획물은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 개량 메주 분획물과는 달리 3개의 분획물로 분리되었다.

개량 메주에서 분리한 미분해성 분획물과 대두 단백질 기원의 미분해성 분획물들 간의 gel filtration chromatogram 양상이 다르게 나타난 것은 대두 기원의 단백질이 서로 다른 미생물의 작용, 즉 protease의 작용의 결과로 판단된다.

Chemiluminescence에 의한 glycocholic acid와 미분해성 분획물과의 결합능력 검색

최근에 이용되는 방사선 동위원소법의 단점을 극복하고, *in vivo*로 소요되는 시간, 노력 등을 줄이기 위해서 본 연구에서는 luminol을 이용하는 chemiluminescence 방법을 시도하였다. 부분정제가 이루어진 pH 6.8과 pH 4.5 분획물들은 chemiluminescence법을 이용하여 glycocholic acid와의 결합 여부를 살펴보았다. 그 결

과 pH 4.5 분획물이 pH 6.8 분획물에 비해서 glycocholic acid와 월등히 결합을 잘하는 것으로 밝혀졌다. 한편, pepsin에 의해 가수분해되지 않은 대두 기원의 미분해성 분획물일 경우에는 Fig. 2의 I, II, III 분획물의 glycocholic acid와의 결합능을 chemiluminescence법에 의해 살펴 본 결과 3개의 분획물중 I의 분획물이 glycocholic acid와 결합하는 것으로 밝혀졌다. 또한 Fig. 3과 4에서 알 수 있듯이 glycocholic acid가 첨가되었을 때는 glycocholic acid와 미분해성 분획물이 결합하여 발광현상을 나타냈으나 glycocholic acid를 첨가하지 않았을 때는 발광현상을 나타내지 않았다. 위의 결과는 본 연구에서 행하는 chemiluminescence법이 glycocholic acid와 미분해성 분획물간의 결합여부를 측정할 수 있다는 사실을 증명하여 주는 것이라 하였다. Glycocholic acid와 결합하는 2개의 분획물 이외에 결합을 나타내는 미분해성 분획물로는 개량 메주 기원 pH 6.8의 I 분획물을 들 수 있으나 결합 활성이 강한 pH 4.5 분획에 비해서는 약하게 나타났다.

비색법에 의한 glycocholic acid와 결합하는 미분해성 분획물의 측정

비색법에 의해 glycocholic acid와 미분해성 분획물의 결합능을 확인하기 위해서 발색시약으로 4-Cl-1-

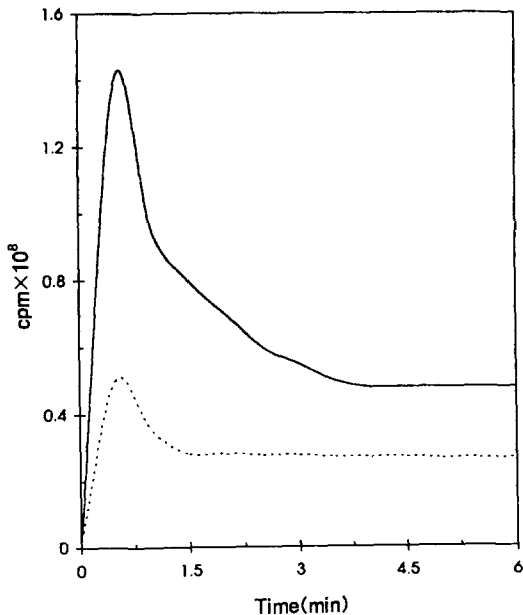


Fig. 3. Search for binding ability of pH 4.5 fraction from Meju by chemiluminescence. — : with bile acid, --- : without bile acid

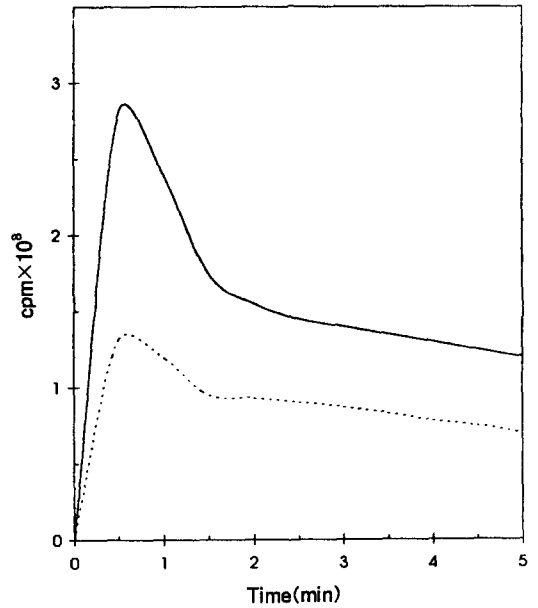


Fig. 4. Search for binding ability of UDF from soybean by chemiluminescence. — : with bile acid, --- : without bile acid

naphthol과 4-aminoantipyrine을 이용하였다. 앞에서 언급한 chemiluminescence법에서 luminol 대신에 기질 반응액으로 발색시약을 사용하는 것을 제외하고는 앞의 연구와 동일하게 실시하였다. 4-Cl-1-naphthol을 발색시약으로 이용하였을 때, glycocholic acid와 미분해성 분획물 사이의 결합 여부에 따른 발색도 차이가 없는 것으로 나타났으며, 4-aminoantipyrine을 이용했을 때도 4-Cl-1-naphthol의 경우와 같았다. 따라서 glycocholic acid와 미분해성 분획물 사이의 결합능을 발색법으로 확인한다는 것은 어렵기 때문에 실제로는 사용할 수 없었다.

Dot blotting에 의한 glycocholic acid와 미분해성 분획물 사이의 결합 능력 검색

Glycocholic acid와 미분해성 분획물 사이의 결합을 시각적으로 확인하기 위한 방법으로 nitrocellulose membrane을 이용하는 감광법이 있다. 그 결과 Fig. 5에서 볼 수 있듯이 담즙산을 2배로 희석한 환이 10, 100배 희석한 환에 비해 상당한 크기의 환과 짙은 농도를 나타내는 것을 볼 수 있다. X-ray film에 많이 감광되었다는 것은 빛의 발산률이 높다는 것을 나타내는 것이다(13). 위의 결과를 통하여 저자 등은 glycocholic acid와 미분해성 분획물이 정량적으로 결합하는 것을

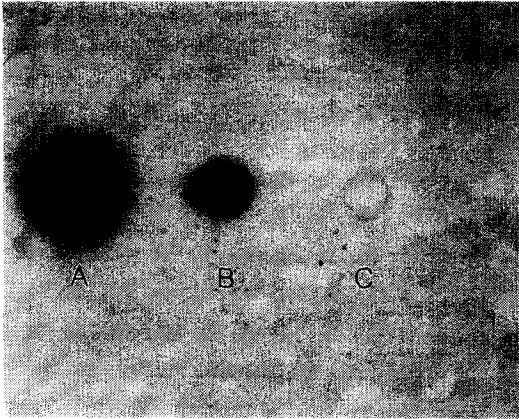


Fig. 5. Detection of glycocholic acid binding-peptides by enhanced chemiluminescence in nitrocellulose membrane.
 A : X1/5(1,150 μ g/ml), B : X1/10(230 μ g/ml), C : X1/100(23 μ g/ml)

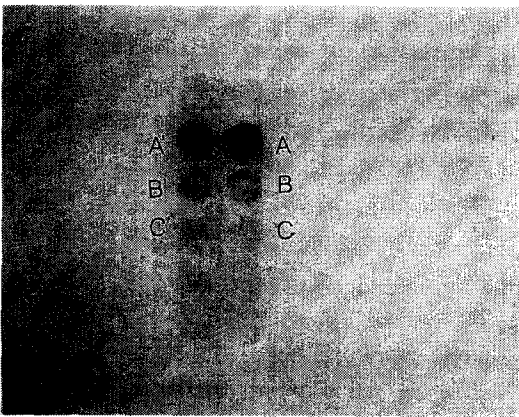


Fig. 6. Detection of glycocholic acid binding-peptides by enhanced chemiluminescence in microtiter plate.
 A : X1/5(1,150 μ g/ml), B : X1/10(230 μ g/ml), C : X1/100(23 μ g/ml)
 A' : X1/5(25 μ g/ml), B' : X1/2.5(12.5 μ g/ml), C' : X1/10(5 μ g/ml)
 A, B and C were from soybean, A', B' and C' were from Meju.

육안으로 확인할 수 있었다(Fig. 5). 한편 많은 수의 시료를 일시에 확인하는 방법을 찾고자 본 연구실에서는 luminometer용 micro tube 대신에 96개의 well을 지닌 microtiter plate를 이용하였다. Dot blotting에서의 경우와 마찬가지로 glycocholic acid의 희석 배수가 높아질수록 X-ray film에 감광된 정도는 약하게 나타났다(Fig. 6).

이는 본 연구에서 시도한 chemiluminescence방법이 glycocholic acid와 미분해성 분획물 사이의 결합능력을 *in vitro*에서 간편하고 정확하게 탐색할 수 있다는 사실을 다시 한 번 증명할 수 있었다.

대두는 여러가지 생리 활성 성분을 함유하고 있으며 그 중에서도 특히 대두 단백질 성분은 혈액 중의 콜레스테롤 농도를 낮추는 것으로 보고되어 오고 있으므로 기능성 식품으로서의 개발 가능성이 높다고 생각된다(14).

이로 인하여 대두 단백질의 콜레스테롤 조절 작용에 관한 많은 가설이 제시되어 오고 있다(15). 본 연구에서는 많은 가설중에서 특히 Sugano 등에 의해 보고된(16-18), 대두 단백질 기원 pepsin 미분해성 분획물이 담즙산과 결합하여 체외로 배설됨으로써 체내 콜레스테롤을 낮춘다는 가설에 초점을 맞추었다. *in vivo*에서 나타나는 단점을 *in vitro*에서 극복하기 위한 방안으로 미분해성 분획물과 담즙산이 결합하는 것을 확인하기 위하여 luminol을 이용하는 chemiluminescence법을 독자적으로 고안하게 되었다. 본 실험 결과에 의하면 chemiluminescence법은 여러 가지면에 있어서 *in vivo* 실험이나 radioisotope에 비해 다음과 같은 몇 가지 장점을 갖고 있는 것으로 판단된다.

첫째, 동물을 이용하는 *in vivo* 실험에 비해 저렴하고, 실험 동물을 사육하는데 소모되는 시간과 노력을 줄일 수 있다는 이점을 갖고 있다.

둘째, 방사선 동위원소를 이용하는 radioisotope는 감도가 뛰어나다는 장점이 있기는 하나, 방사능의 악영향으로 인하여 실험실이나 기업체에서 사용상에 많은 제약점과 한계를 갖고 있는 반면에 chemiluminescence법은 인체에 해도 없고 환경 오염면에서 안전성을 준다는 의미에서 널리 이용될 가능성을 보여주고 있다.

셋째, 발색법에 비해 감도가 상당히 뛰어나다는 점을 들 수 있다.

넷째, fluorescence 방식은 기질이 빛을 발산하기 위해서는 외부에서 광원이 가해져야 하며 이 경우 fluorescence만을 검색하기 위해서는 또 다른 filter를 사용해야 하므로 chemiluminescence법에 비해 감도가 떨어질 수 있다고 한다. 이상과 같은 장점을 고려해 볼 때 적어도 담즙산 결합능 검색을 위해서는 사용상의 편리함 그리고 stripping, reprobing 등을 자유로이 할 수 있다는 이점으로 인하여 chemiluminescence법이 보다 쉽고 광범위하게 이용될 수 있음을 강조한다.

본 연구자들은 chemiluminescence을 이용하여 단백질의 미분해성 분획물과 담즙산이 정량적으로 결합

하는 것을 확인하였고, 담즙산과 결합하는 미분해성 분획물을 계속 정제하고 있는 중이다. 또한 현재 본 실험실에서는 *in vitro*에서 확인되어진 담즙산과 결합하는 개량 메주를 쥐에게 급여했을 때 *in vivo*에서 콜레스테롤 수준에 어떠한 영향을 끼치는 지에 관한 연구도 진행중에 있음을 밝혀 둔다.

요 약

담즙산과 결합을 하여 콜레스테롤 농도에 영향을 주는 것으로 보고된 대두 단백질의 생체내 효소에 의한 미분해성 분획물을 개량 메주로부터 분리하였다. 개량 메주로부터 pH 6.8 과 pH 4.5의 분획물들을 분리하여, 초음파 처리와 투석을 행한 후 Sephadex G-75 column chromatography를 실시하여 부분 정제하였다. 부분 정제된 분획물들을 chemiluminescence 방법에 의해 *in vitro*에서 검색을 한 결과, pH 4.5 분획물중의 하나가 담즙산과 강하게 결합하는 것으로 밝혀졌다. 또한 대두 기원의 pepsin 미분해성 분획물 또한 pH 4.5 분획물의 chemiluminescence 결과와 일치하였다. 따라서 본 연구에서 고안한 chemiluminescence법은 *in vitro*에서 담즙산 결합 활성도 측정 및 콜레스테롤 대사에 관한 연구의 기본적인 연구 수단으로 평가되며 따라서 본 연구 결과는 이 분야의 연구에 기초 자료로 제공될 수 있는 가능성을 제시하였다.

감사의 글

이 연구는 강원대학교 우당학술진흥재단의 연구비로 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. Kritchevsky, D. : Diet and atherosclerosis. *Am. J. Pathol.*, **84**, 615(1976)
2. Yudkin, J. : Diet and coronary thrombosis. *Lancet*, **2**, 155(1957)
3. Sugano, M. and Yamada, Y. : The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis*, **72**, 115(1988)
4. Sugano, M. and Yamada, Y. : Hypocholesterolemic effect of the undigested fraction of soy protein. *Atherosclerosis*, **16**, 85(1990)
5. Ogawa, T. and Yee, M. G. : Hypocholesterolemic effect of the undigested fraction of soybean protein in rats fed no cholesterol. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1845(1992)
6. Whitehead, T. P. and Thorpe, G. H. G. : Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. *Nature*, **305**, 8(1983)
7. Geiger, R. and New, M. W. : Ultrasensitive detection systems for enzyme immunoassay. II. Bioluminescence enhanced enzyme immunoassay. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **25**, 31(1987)
8. Thorpe, G. H. G. and Kricka, L. J. : Enhanced chemiluminescence reactions catalysed by horseradish peroxidase. *Methods in Enzymology*, **133**, 331(1986)
9. Kurosawa, Y. and Yamauchi, F. : Factors in the formation of acid-sensitive fraction from soybean protein. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **28**, 216(1981)
10. Turin, L. and Bonami, F. : Immunochemical detection of ovalbumin in dairy-based foods. *J. Sci. Food Agric.*, **64**, 39(1994)
11. Williams, L. A. and Thorpe, G. H. G. : Enhanced chemiluminescent polyphenol reactions catalyzed by peroxidase. *Bioluminescence and Chemiluminescence*, p.163(1991)
12. Näsland, B. and Amer, P. : Assays of free fatty acids and glucose by hoseradish peroxidase catalyzed luminol reaction. *Bioluminescence and Chemiluminescence*, p.385(1991)
13. Thorpe, G. H. G. and Kricka, L. J. : Phenolic enhancers of the horseradish-luminol-hydrogen peroxide reaction. *Clin. Chem.*, **31**, 1335(1985)
14. Carroll, K. K. : Hypercholesterolemia and atherosclerosis ; Effect of dietary protein. *Federation Proc.*, **41**, 2792(1982)
15. Sugano, M. : Nutritional studies on the regulation of cholesterol metabolism ; The effect of dietary protein. *J. Japan. Nutri.*, **40**, 93(1987)
16. Iwami, K. and Sakakibara, K. : Involvement of post-digestion 'Hydrophobic' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1217(1986)
17. Sugano, M. and Goto, S. : Steroid-binding peptides from dietary proteins. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **36**, S147(1990)
18. Sugano, M. and Goto, S. : Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. *J. Nutr.*, **120**, 977(1990)

(1996년 2월 6일 접수)