

κ-Casein의 Chymosin, Pepsin 및 Trypsin 가수분해물에 대한 안지오텐신 변환효소 저해효과의 탐색

오세종 · 김세현* · 김상교 · 백영진 · 조경현

(주)한국야쿠르트, *고려대학교 응용동물과학과

Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of the κ-Casein Fragments Hydrolysated by Chymosin, Pepsin, and Trypsin

Se-Jong Oh, Sae-Hun Kim*, Sang-Kyo Kim, Young-Jin Baek and Kyung-Hyun Cho

Korea Yakult Co. Ltd., *Department of Animal Science, Korea University

Abstract

The isolated κ-casein on gel permeation chromatography was hydrolyzed by chymosin, trypsin, and pepsin. The 3% TCA soluble portion of the hydrolysates were dialyzed on the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibition rate (%) and inhibitory activity (IC_{50}) were determined. The trypsin hydrolysate exhibited the highest ACE inhibition rate while the chymosin hydrolysation showed the lowest activity. The hydrolysate was dialyzed using dialysis membrane with various molecular cut-offs, and IC_{50} was determined. As the pore size of the dialysis tubing increased, the ACE inhibitory activity decreased.

Key words: angiotensin converting enzyme, inhibition rate, hydrolysate

서 론

안지오텐신 변환효소(angiotensin-I converting enzyme, ACE; peptidyl-dipeptide hydrolase, EC 3.4.1.15)는 1970년 경에 뱀독에서 처음 발견되었으며, zinc protease의 일종으로, 활성화 되기 위해서는 아연과 염소가 필요하다¹⁾.

ACE는 kallikrein/kinin system에서 vasodilator bradykinin의 C-말단을 분해시켜 bradykinin을 불활성 상태로 만들어 혈압을 상승시킨다. ACE 저해제는 angiotensin I을 angiotensin II (ANG II)라고 하는 활성형 호르몬으로 바꾸는 효소에 작용하여 ANG II의 생산을 감소시키고, aldosterone의 분비를 감소시킨다. 궁극적으로 혈관확장제인 bradykinin을 증가시키고 특히 적으로 신장혈관을 확장시켜 sodium 배설을 촉진함으로써 혈압을 강하시킨다^{2,3)}. 상업용 ACE 저해제인 captopril[®]은 인공적으로 합성한 물질로, 복용 시 65% 정도의 생리적 이용성을 나타내며 복용 1시간 이후에 혈액내에서 최고의 농도를 보인다⁴⁾.

식품에 존재하는 ACE 저해인자는 가열조리에 대하여 안정하며 체내에서 흡수가 용이한 상대적으로 저분자의 물질로서, 그 저해능은 혈압강하제와 비교하면 비교적 낮은 활성을 나타내지만 상시 섭취하는 식품중에 존재한다는 보편성과 안전성면에서 그 유용성이 기대된다^{5,7)}.

α_1 -Casein과 β -casein에서 발견된 ACE 저해물질들은 N-말단과 C-말단의 분해물이었으며, κ-casein의 경우에는 현재까지 N-말단쪽의 분해물에서만 ACE 저해 활성이 보고되었다. 그러나 κ-casein은 다른 casein과 마찬가지로 C-말단쪽에 proline 함량이 높기 때문에 ACE 저해물질이 존재하리라 추측된다^{8,9)}.

본 실험은 우유 단백질 분해물에 있어서 ACE 저해 물질을 screening 하기 위한 기초연구로 κ-casein의 chymosin, trypsin 및 pepsin 가수분해물에 대한 ACE 저해 작용을 평가하였다.

재료 및 방법

시료의 제조

κ-casein으로부터 FPLC를 이용하여 gel permeation column으로 κ-casein을 분획한 다음 chymosin (Sigma,

Corresponding author: Sae-Hun Kim, Department of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University, 5-1 Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea

U.S.A.; 23.6 unit/mg), trypsin (Sigma, U.S.A; 20 unit/mg), pepsin (Sigma, U.S.A.; 450 unit/mg)으로 각각 처리하여 3% TCA에서 가용성인 부분을 투석막에 담고 증류수로 투석(MW cut-off 1 kDa)시킨 후 동결건조시켜 시료로 사용하였다.

ACE 저해효과의 측정

Cushman과 Cheung⁽¹⁰⁾의 방법을 변형하여 다음과 같이 수행하였다. Borate buffer는 2 M boric acid (H_3BO_3) 와 0.045 M sodium borate ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)를 4.5:5.5의 비율(v/v)로 섞어서 pH를 8.3으로 조정한 후, 최종 농도가 0.4 M이 되도록 sodium chloride (NaCl)를 첨가하여 제조하였다. 시료 50 μ L에 borate buffer로 3.8 mM이 되도록 Hippuric acid-Histidine-Leucine (Hip-His-Leu; Sigma, U.S.A)을 첨가한 기질 용액 250 μ L을 가한 후, ACE 효소 용액 2 milli unit를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 0.5 N HCl을 250 μ L 첨가하여 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 혼합하고 상징액을 1 mL 취하였다. 이 상징액을 80°C의 dry oven에서 건조시킨 후, 1 M NaCl을 3 mL 가하여 용해시킨 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하였으며 ACE 저해율은 다음식에 의거 계산하였다.

$$\text{저해율 } (\%) = \frac{(Ec-Es)}{(Ec-Eb)} \times 100$$

Ec =시료대신 증류수 첨가 시의 흡광도

Es =시료 첨가 시의 흡광도

Eb =반응정지 후 시료 첨가 시의 흡광도

IC_{50} 의 측정

제거된 시료를 일정한 농도로 회석한 후에 ACE 저해효과를 측정한 다음 이를 농도에 대한 회귀곡선을 산출하여 IC_{50} 을 구하였다. 회귀곡선은 각각의 투석 단계에서 얻은 시료를 각각 25, 50, 100 및 200 μ L를 가한 후 ACE 저해율을 조사한 다음 직선식을 산출하여 ACE를 50% 저해하는데 필요한 mL수를 계산하여, peptide양으로 환산하였다. Peptide 함량은 Samples 등⁽¹¹⁾의 방법을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

가수분해 효소에 따른 κ -casein 분해물에 대한 ACE 저해율은 Fig. 1에 나타난 바와 같이 κ -casien을 trypsin으로 분해시킨 경우 측정된 ACE 저해율이 94.7%로 가장 높게 나타났으며, pepsin 가수분해물은 89.1

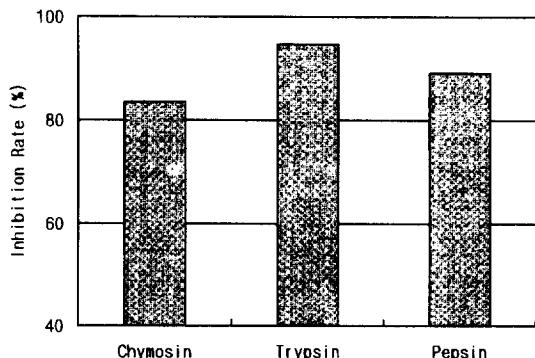


Fig. 1. ACE inhibition rate of κ -casein hydrolysate by different enzyme.

%, chymosin 가수분해물은 83.5%로 각각 나타났다. IC_{50} 의 결과에서도 ACE 저해율과 유사한 경향을 나타내었는데, chymosin 분해물은 115.7 μ g/mL, trypsin 가수분해물은 98.1 μ g/mL, pepsin 가수분해물은 116.2 μ g/mL로 각각 나타났다.

이와 같은 결과는 효소간의 단백질 분해능력과 반응부위가 서로 달라 각기 다른 분해물을 생성하였기 때문인 것으로 추정되었다. 지금까지 ACE 저해활성을 보이는 대부분의 peptide가 10개 미만의 아미노산 잔기로 이루어져 있는 것으로 보고되고 있어, 상대적으로 분자량이 큰 편인 chymosin 분해물의 경우 ACE 저해율이 낮게 나타나는 것으로 생각되고 있다⁽¹²⁾.

Chymosin 분해물을 다시 투석막의 크기(MW cut-off)에 따라 투석시킨 후 얻은 시료에 대한 IC_{50} 을 측정한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

우유 중에 존재하는 α_{s1} -casein을 분해하여 ACE 저해효과를 측정한 결과 carboxypeptidase A로 가수분해한 경우에는 IC_{50} 이 350 μ M로 나타났으나, trypsin으로 가수분해시킨 경우의 IC_{50} 은 16 μ M로 나타났다고 보고하여 효소의 종류에 따라 ACE 저해효과는 많은 차이를 보이는 것으로 생각된다^(13,14).

Table 1. ACE inhibitory activity of κ -casein hydrolysate dialysed using various dialysis membranes

MW Cut off (Da) ¹⁾	IC_{50} (μ g/ml) ²⁾
5000	497.8
3500	238.6
2000	109.2
1000	115.7
2% TCA insoluble	163.6

¹⁾The κ -casein hydrolysates were dialysed against membrane with each molecular weight cut-off.

²⁾ IC_{50} , the concentration κ -casein hydrolysate which inhibits 50% of the angiotensin-I converting enzyme activity.

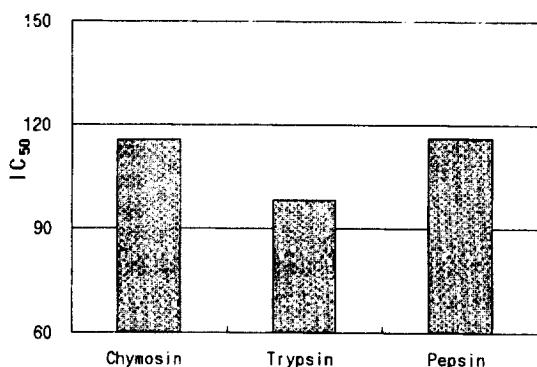


Fig. 2. ACE inhibitory activity of κ -casein hydrolysate by different enzyme. IC₅₀, the concentration κ -casein hydrolysate which inhibits 50% of the angiotensin-I converting enzyme activity.

본 실험의 경우 MW cut-off 1 kDa와 2 kDa의 IC₅₀은 각각 115.7와 109.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났으며, MW cut-off 3.5 kDa와 5 kDa의 경우에는 각각 238.6와 497.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타나 투석막의 pore size가 증가할수록 ACE 저해효과는 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 결과로 이루어 볼 때 ACE 저해활성을 보이는 물질의 분자량이 3.5 kDa이하인 것으로 추측되며 이에 관해서는 계속적으로 연구가 진행될 필요가 있다고 사료된다.

요 약

산 casein으로부터 FPLC를 이용하여 gel permeation column으로 κ -casein을 분획한 다음, 이를 chymosin, pepsin, trypsin으로 각각 처리하여 3% TCA에서 soluble한 부분을 중류수로 투석(MW cut-off 1kDa)시킨 후 ACE 저해 효과를 측정한 결과, trypsin으로 분해 시킨 경우 ACE 저해율이 94.7%로 가장 높게 나타났으며, chymosin 가수분해물은 가장 낮았다. GMP를 투석막의 종류에 따라 투석 시킨 후 IC₅₀을 측정한 결과, MW cut-off의 크기가 증가할수록 ACE 저해효과는 감소하는 것으로 나타났으며, MW cut-off 2 kDa의 경우가 가장 높은 저해율을 보였고 MW cut-off 5kDa에서는 저해율이 가장 낮았다.

문 현

- Jover, B. and Mimran, A.: Angiotensin II receptor antagonists versus angiotensin converting enzyme in-

hibitors: effect on renal function. *J. Hypertension*, **12**, S 3 (1994)

- 김재완, 황만석, 박의순, 유희순 : ACE inhibitor가 각광 받는 최신약제. 의학정보, **1**, 16 (1990)
- Yamazaki, T., Shiojima, I., Komuro, I., Nagai, R. and Yazaki, Y.: Involvement of the renin-angiotensin system in the development of left ventricular hypertrophy and dysfunction. *J. Hypertension*, **12**, S23 (1994)
- Bernard, R., Cushman, D.W. and Ondetti, M.A.: Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. In *New Class of Orally Active Antihypertensive*, p.31 (1977)
- Maruyama, S. and Suzuki, H.: A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1393 (1982)
- Shimizu, M.: Bioactive peptides from bovine milk proteins. Paper presented at *Animal Sessions in 24th International Dairy Congress*. Melbourne Sept. 18-22, Australia (1994)
- 염동민, 노승배, 이배기, 김선봉, 박영호 : 식품단백질 효소 가수분해물의 angiotensin-I 저해작용. 한국영양식량학회지, **22**, 2262 (1993)
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. and Suzuki, H.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α_{s1} -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2557 (1987)
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein: II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1405 (1985)
- Cushman, D.W. and Cheung, H.S.: Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637 (1971)
- Samples, D.R., Richter, R.L. and Dill, C.W.: Measuring proteolysis in cheddar cheese slurries: Comparison of Hull and Trinitrobenzene sulfonic acid procedures. *J. Dairy Sci.*, **67**, 60 (1984)
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. and Takano, T.: Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.*, **78**, 777 (1995)
- Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N. and Suzuki, H.: Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1581 (1987)
- Karaki, K., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U. and Takemoto, S.: Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, **96C**, 367 (1990)

(1997년 5월 16일 접수)