

醫藥 및 食品添加物の 消化酵素 Trypsin 活性에 미치는 影響

慶熙大學校 藥學大學

金光湖 · 玄如珠

Influence of Additives for Food and Drug upon the Activity of Trypsin

Kwang Ho, Kim · Yeo Joo, Hyun

College of Pharmacy, Kyung Hee University

= Abstract =

The effects of additives for food and drug upon the tryptic hydrolysis of casein and a Synthetic substrate, N^α-Benzoyl-L-arginine ethylester (BAEE) in vitro has been studied.

The results of this study were summarized as follows

1) It was found that the action of inhibition became stronger in the following order: Methyl parabene > Rose Bengal > Phloxine > Sod. DHA > Erythrosine by the colorimetric method using BAEE.

These results also showed that other additives had no effect on the activity of trypsin.

2) All samples tested showed respectively same tendency using casein in this method. But the activity by Erythrosine and Sod. DHA was slightly increased in this experiment.

I. 緒 論

近年 醫藥 및 食品添加色素가 發癌性和 같은 毒性 때문에 再檢討¹⁻⁴⁾되고 있는 實情에 있다. 添加物の 安全性을 檢討하는 方法으로서는 動物實驗에 의한 慢性 및 急性試驗, 長期投與後的 組織解剖學的 檢索, 發育狀態의 觀察 및 發癌性試驗 등이 있으며 이에 따라서 使用基準을 規制하게 되는 것이다. 그러나 醫藥 및 食品添加物이 攝取되어 消化吸收時에 消化酵素作用에 미치는 影響에 對한 系統的인 報告는 別로 없었다. 한편 添加物은 食物과 마찬가지로 消化酵素와 接觸하여 어떤 相互作用 때문에 飲食物의 消化吸收에 影響이 있는지의 如否를 判斷하므로써 添加物の 安全性을

檢討하는 項目으로서 採用될 수가 있다. 伊藤⁵⁾ 등은 保存料에 對하여 天然基質 Casein을 使用하여 Trypsin의 作用을 檢討하여 報告하였고 또 Tar 色素의 Trypsin 活性에 미치는 影響⁶⁾을 追求하여 Xanthene系 色素의 阻害가 強함을 報告한 바 있었다. 또 계속하여 合成基質 N^α-Benzoyl-L-Arginine Amide (BAA)을 使用하여 Trypsin의 Amidase 活性⁷⁾에 미치는 Xanthene系 色素 등의 影響을 檢討, 報告하였다. Amidase 性活 測定에는 Schwert 등의 微量擴散法에 準하여 測定하였다. 한편 古武⁸⁾ 등은 食用, 醫藥品用 色素의 Pepsin의 蛋白消化作用에 미치는 影響에 對한 報告를 한바 있었다. 今般 著者들은 添加物の 消化酵素活性에 對한 系統的인 研究를 할 目的으로 우선 蛋白質分解

酵素 Trypsin에 대하여 合成物質 BAEE (N^α-Benzoyl-L-Arginine-Ethylester)와 天然物質 Hammarsten casein을 基質로 하여 數種添加物의 添加時에 있어서의 酵素作用을 測定한바 몇가지 知見을 얻었으므로 發表하는 바이다.

II. 實 驗

A. 試藥·試液

(1) 法: 合成基質 BAEE를 사용한 Trypsin活性測定法

1. M/20-Tris-HCl buffer (PH 8.0) 溶液: THAM (Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane) 6.057g을 適當量의 再蒸留水에 溶解하여 HCl로 pH8.0으로 調節하여 再蒸留水를 加해서 1,000ml로 하였다.

2. 0.0025N-HCl 溶液: 再蒸留水로서 調製하였다.

3. 0.017M-CaCl₂ 溶液: 再蒸留水로서 調製하였다.

4. Trypsin 溶液: 結晶 Trypsin(2×Crystallized, lyophilized) 1mg을 秤取하여 0.0025N-HCl 10ml에 溶解하여 280m μ 에서 吸光度를 測定하여 酵素蛋白質量을 算出하고 冷凍狀態에서 保存하였다.

5. 0.003M-BAEE: N^α-Benzoyl-L-Arginine Ethylester 10.287mg을 0.017M-CaCl₂ 溶液으로 溶解하여 10ml로 하였다.

6. 被檢液: Sod. Dehydroacetate (DHA), Pot. Sorbate, Sod. Benzoate, Methyl paraoxy benzoate, Pot. Nitrate, Sod. Nitrate, Sod. Nitrite, Pot. Bromate, Butyl hydroxy anisol, Butyl hydroxy toluene Sod. Cyclamate, Sod. Glutamate, Glycine 등은 각각 10⁻²M로 하였고 Dulcin은 5×10⁻³M로 하였으며 Rose Bengal, Phloxine, Amaranth, Erythrosine, Tartrazine, Sunset yellow FCF, 등은 각각 最終濃度가 10⁻³M가 되도록 秤量하여 Tris-HCl buffer 溶液으로 pH 7.6으로 調節, 溶解하여 100ml로 하였다.

(2) 法: 天然基質 Casein을 사용한 Trypsin活性測定法

1. 인酸緩衝液(p-buf): KH₂PO₄ 1.57g, Na₂HPO₄ 12.56g을 再蒸留水 約 990ml에 溶解하여 pH 7.6으로 調節하여 全容을 1l로 하였다.

2. 0.0025N-HCl 溶液: (1) 法과 同一

3. Trypsin 溶液: (1) 法과 同一

4. Casein 溶液: Casein (nach Hammarsten) 1g을 p-buf 100ml에 懸濁시켜 비등 水浴上에서 15分間 加熱, 放冷後 10%-NaOH를 加하여 pH 7.6으로 調節한

後 再蒸留水로 100ml로 하였다.

5. 15w/v%-Trichloroacetic acid Soln.: 再蒸留水로 調製하였다.

6. 10%-NaOH 溶液.

7. 0.05M-NaCl 溶液.

8. Na₂CO₃ 溶液: Na₂CO₃ 1g을 0.1 N-NaOH로 50 ml로 하고 여기에 2% 酒石酸 나트륨 0.5ml 및 1% CuSO₄ 0.5ml의 混液을 加하였다.

9. Folin 試液: 환저 flask에 約 700ml의 純水를 넣고 Na₂WO₄·2H₂O 100g과 Na₂MoO₄·2H₂O 25g을 溶解하여 85% 인산 50ml 및 염산 100ml을 添加한 後 환류 冷却器를 붙여 은은하게 10時間 비등을 繼續한다. Li₂SO₄·H₂O 50g 및 물 約 50ml을 加하여 Br 1-2滴을 加해 過剩의 Br₂를 除去하여 1l로 하였다.

10. Sephadex G-10: Pharmacia製로서 粒子 40~120 μ 을 使用하였다.

11. 被檢液: (1) 法과 同一

B. 裝 置

分光光度計: Beckman DU-2 Spectrophotometer를 使用하였다.

C. 實驗操作

(1) 法: 合成基質 BAEE를 사용한 Trypsin 活性測定法.

Tris-HCl buffer 1.8ml을 Cuvette에 取하고 여기에 Substrat 1ml, Sample 0.1ml을 加하고 즉시 Trypsin 0.1ml을 Rambda pipet으로 取하여 加한 後 잘 混和하여 Spectrophotometer로 253m μ 에서 optical density를 測定하고 對照로 Tris-HCl buffer 1.8ml에 Substrate 1ml, Sample 0.1ml을 다시 加한 後 잘 混和하여 먼저와 같이 optical density를 測定하였다. 이와 같이 enzyme 없이 測定된 群을 blank로 하여 測定되는 순간을 0으로 하고 정확히 10分後에 다시 optical density를 測定하고 Control test를 行하여 差 Spectrum을 計算에 依하여 Trypsin의 activity를 算定하였다.

(2) 法: 天然基質 Casein을 사용한 Trypsin 活性測定法.

1) Kunitz 法

Casein 溶液 2ml을 取하여 35°C에서 45分間 加溫시킨 後 被檢液 1ml을 加한 後 30초後 Trypsin 溶液 1ml을 加하여 잘 混和하여 35°에서 다시 20分間 放置시킨 後 TCA 1ml을 加하여 35°에서 1時間 放置後 여과한다.

(여지는 東洋紙 No.5C, 7cm)이 여액을 OD280m μ 에서 測定하였고 空試驗에서는 Casein溶液 代身 p-buf를 使用하였고 Trypsin 溶液代身에 0.0025N-HCl을 使用하여 같은 操作을 하여 測定하였다.

2) Anson法: 上記 TCA 濾液中에 混在해 있는 添加物이 280m μ 에서 吸收되는 境遇 即 Tartrazine, Methyl parabene 등은 TCA 2ml을 取하고 10% NaOH 0.2ml을 加하여 中和시킨 液中에서 1ml을 取하여 0.05M-NaCl로 25ml가 되게 하였다. 이 溶液 1ml에 Na₂CO₃ 溶液 5ml을 加하여 10分間 放置하고 Folin 試液 0.5ml을 加해 30分後 750m μ 에서 O.D를 測定하고 空試驗을 行하여 算定하였다.

3) 上記 操作中 750m μ 에서 Interfere되는 경우에는 TCA濾液 2ml을 10% NaOH 0.2ml로 中和시키고 그 液 1ml을 Sephadex Column (9 \times 310mm)에 넣어 0.05M-NaCl 1ml 씩으로 3回 세척하고 0.05M-NaCl로 展開시킨 다음 初溶出液 5ml을 버리고 다시 25ml을 mess flask에 모아 Anson法에 準하여 測定하였다.

Table 1. Activity of Trypsin on BAEE in the presence of Additives

Additives	Concentration mM	Esterolytic activity
Control	1	100
Phloxine	1	34.0
Rose Bengal	1	30.2
Erythrosine	1	49.6
Tartrazine	1	79.0
Amaranth	1	82.2
Sunset yellow FCF	10	93.4
Methylparabene	10	20
Sod. Benzoate	10	106
Sod. DHA	10	49.2
Pot. Sorbate	10	86.9
Pot. Nitrate	10	95
Sod. Nitrate	10	99
Sod. Nitrite	10	104
Pot. Bromate	10	101
Butylhydroxy toluene	10	103.6
Butyl hydroxy anisol	10	94.4
Sod. Cyclamate	10	98.5
Dulcin	5	100
Sod. Glutamate	10	99.4
Glycine	10	98

Table 2—1 Activity of Trypsin on casein in the presence of Additives.

1) Kunitz method

Additives	Concentration mM)	Activity
Control	—	100
Phloxine	1	42
Rose Bengal	1	31.2
Erythrosine	1	60
Tartrazine	1	—
Amaranth	1	—
Sunset yellow FCF	10	—
Methyl parabene	10	—
Sod. Benzoate	10	104.6
Sod. DHA	10	58
Pot. Sorbate	10	90
Pot. Nitrate	10	100
Sod. Nitrate	10	89.5
Sod. Nitrite	10	104.9
Butyl hydroxy toluene	11	101
Butyl hydroxy anisol	10	103
Sod. Cyclamate	10	105
Dulcin	5	102
Sod. Glutamate	10	97
Glycine	10	100
Pot. Bromate	10	99

Table 2—2 Activity of Trypsin on Casein in the Presence of Additives.

2) Anson's method

Additives	Concentration (mM)	Activity
Control	—	100
Tartrazine	1	81
Methyl Parabene	10	40

Table 2—3 Activity of Trypsin on Casein in the presence of Additives

3) Anson's method by Gelfiltration

Additives	Concentration (mM)	Activity
Control	—	100
Amaranth	1	90
Sunset yellow FCF	1	92

Ⅲ. 結果 및 考察

以上과 같은 實驗結果 및 考察을 記述하면 Table 1에 표시한 바와 같이 合成基質 BAEE를 使用하여 Trypsin 活性에 미치는 影響을 본 것으로 즉 基質 BAEE와 Casein을 使用하였을 때에 나타난 結果를 比較하면 Table에 나타난 바와 같이 두 方法은 서로 비슷한 傾向性을 보여 주고 있다.

Ⅳ. 結 論

醫藥 및 食品添加物 20種을 選定하여 消化酵素 Trypsin 活性에 미치는 影響을 合成基質 BAEE와 天然基質 Casein을 使用하여 測定하였다.

1. BAEE를 基質로 使用하였을 때 Phloxine, Rose Bengal, Methyl parabene 등이 강한 酵素阻害作用을 나타냈고 한편 Erythrosine과 Sod. DHA는 약간의 阻害作用이 있음을 認定할 수 있었고 기타 添加物은 阻害作用이 전혀 없음을 알 수 있었다.

2. Casein을 基質로 했을 경우 BAEE를 使用하였을 때 阻害作用을 보였던 添加劑들은 共히 阻害하는 傾向을 보였으나 Erythrosine 및 Sod. DHA는 活性이

약간 增加함을 보여 주었다. 끝으로 本實驗에서 阻害作用을 나타내었던 添加劑에 對하여는 계속 그 阻害作用의 Mechanism과 Type을 규명할 예정에 있다.

本 實驗을 遂行함에 있어서 指導鞭撻을 아끼지 않으신 許鈴 學長님과 權昌鎬 敎授님께 감사를 드린다.

參 考 文 獻

- 1) 相磯和嘉: *Pharmacia* 1, 336 (1965)
- 2) W.H. Hansen, A. A. Nelson: *Toxicol & Appl. Pharmacol.* 5, 105 (1963)
- 3) H.C. Grice et al.: *Toxicol. & Appl. Pharamacol.* 3, 509 (1961)
- 4) 池田良雄: *日藥理* 61, 77 (1965).
- 5) 伊藤利之外 2人: *衛生化學*, 14, 207 (1968).
- 6) 伊藤利之外 2人: *衛生化學*, 15, 253 (1969).
- 7) 伊藤利之, 池澤宏郎, 手島節三, *衛生化學*, 16, 134 (1970).
- 8) 古六彌三, 水田泰子, 櫻本隆, *食衛誌*, 7, 230 (1966).