

합성 항산화제가 단백질 분해효소에 미치는 영향
— Pepsin의 활성화에 미치는 합성 항산화제의 영향 및 기질 Octapeptide의 합성 —

金 尚 玉

大邱嶺南專問大學 家政科

The Effect of Synthetic Antioxidants on the proteolytic Enzymes
— The Effect of Synthetic Antioxidants on the Activity of the
Pepsin and Synthesis of Octapeptide as a Substrate —

Kim Sang Ock

Dept. of Home Economics, Daegu Young Nam Junior College

=ABSTRACT=

This study was carried out to understand the activity of pepsin, the proteolytic enzyme, to octapeptide (angiotensin II) in the presence of various synthetic antioxidant as food additives.

1) Dibutyl hydroxytoluene, butyl hydroxyanisole and ethyl protocatechuete did not influence the inhibitory activity of pepsin on the octapeptide as a substrate, but sodium-L-ascorbate inhibited pepsin activity at above 100ppm. However sodium L-ascorbate was completely removed after 30 minutes.

2) Pepsin brought about a quick break up the octapeptide, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Gly-Phe, by splitting the Gly-Phe and Val-Tyr bond.

3) The melting point of synthesized octapeptide was 209~212°C, chemical formula and molecular weight were $C_{43}H_{65}N_{13}O_{12} \cdot CH_3COOH \cdot H_2O$ and 956.05, respectively.

4) The amino acid mole ratio of synthesized octapeptide by acid hydrolysis were Asp:0.98, Arg: 1.02, Val: 1.00, Tyr: 0.95, Ile: 1.00, His: 1.03, Gly: 0.96, Phe: 1.00.

서 론

Pepsin은 동물의 위액에서 pepsinogen 형태로 분리되는 endopeptidase로서 초기에 H⁺에 의하여 pepsin 형태로 활성화되며 pH 5 혹은 그 이하에서 pepsin 자신이 pepsinogen을 활성화시키는 것으로 알려져 있다¹⁾.

그리고 pepsin은 tyrosin과 phenylalanine의 amino기로 형성된 peptide 결합을 쉽게 가수분해하여 proteose, peptone, oligopeptide 및 amino acid를 생성한다²⁾. 그러나 pepsin은 식용 tar 색소³⁾⁴⁾ 및 색소광분해산물⁵⁾ 등 식품첨가물에 의하여 그 작용이 저해를 받는다는 것이 보고되고 있어 첨가물의 효율적 이용을 위한 다각적인 검토가 요망되고 있다.

접수일자: 1981년 5월 4일

본 연구는 몇가지 phenol 제 합성 항산화제와 sodium-L-ascorbate 가 단백질 분해효소에 미치는 영향을 조사하기 위한 일련의 연구로서 전보⁶⁾에서는 α -chymotrypsin 과 trypsin 에 미치는 영향을 검토하였으나 본보에서는 pepsin 의 활성화에 미치는 영향을 조사하였으며, 아울러 pepsin 의 기질로서 octapeptide 를 합성한 결과를 정리하였기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 합성항산화제는 국내 시판품인 남영상사제품 dibutyl hydroxytoluene (DHT), butyl hydroxyanisole(BHA), ethyl protocatechuate(EP) 및 sodium-L-ascorbate 등 4종을 사용하였으며 효소는 Fisher 제품 pepsin 을 기질은 octapeptide(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-Gly-Pro-Phe)를 합성하여 사용하였다.

2. 실험방법

(1) Octapeptide 의 합성 : Octapeptide 합성에 필요한 amino acid 는 L형을 사용하였으며, t-butoxycarbonyl amino acid 및 nitroarginine 은 ⁷⁾의 방법, peptide 는 Merrifield⁸⁾의 고상법 및 Park 등⁹⁾의 방법에 의하였으며, 합성된 octapeptide, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Gly-Phe 의 순도는 paper chromatography, thin layer chromatography 및 electrophoresis 에 의하여 행하였다.

(2) Pepsin 의 활성화 : Pepsin 의 활성화에 미치는 합성항산화제 영향의 검토는 항산화제가 처리된 효소반응액중의 분해생성물을 PPC 법에 의하여 분리하고, 분리된 spot area 를 상호 비교함으로써 행하였다. 즉 기질 octapeptide 3mg 과 합성 항산화제 0~1000ppm 및 pepsin 0.1mg을 각각 함유하는 0.02M phosphate buffer

용액(pH 2.1) 0.6ml 을 36°C 에서 0~60분간 반응시킨 후 즉시 ice bath 로 옮겨 0.1N NaOH 0.05ml 을 가하여 반응을 중지시켰으며, 이 액 20ml 씩을 chromatography 용 Whatman No. 1 filter paper (40×40cm)에 spot 한 다음 n-butanol: acetic acid: water(4:1:5 v/v), n-butanol: acetic acid: pyridine: water(30:6:20:24 v/v)을 전개용매로 한 PPC 법에 의하여 분해산물을 분리하였다. 그리고 분리된 spot 를 동정하기 위하여 ninhydrin, Pauly's 및 Sakaguchi's 시약에 의한 정색여부를 조사하였으며, ninhydrin 에 의하여 정색된 spot area 를 상호비교함으로써 pepsin 의 활성화정도 를 검토하였다.

결과 및 고찰

1. Octapeptide

상기의 방법에 준하여 합성된 octapeptide 의 순도를 PPC, TLC 및 electrophoresis 에 의하여 측정된 결과 90.5%의 순도를 나타내었으며, Koffer hot stage 에 의하여 용점을 측정하였던 바 209~212°C 의 값을 나타내었다(Table 1). 그리고 합성된 octapeptide 2mg 을 6N HCl 3ml 에 녹여 질소기류 하에서 110°C, 40시간 가수분해한 후 amino acid autoanalyzer 에 의하여 mole 비율을 측정된 결과 Asp: 0.98, Arg: 1.02, Val: 1.00, Tyr: 0.95, Ile: 1.00, His: 1.03, Gly: 0.96, Phe: 1.00 이었으며, 분자식과 분자량은 각각 $C^{48}H^{85}N^{13}O^{12} \cdot CH^3COOH \cdot H_2O$ 및 956.05 이었다.

2. 합성 항산화제가 Pepsin 의 활성화에 미치는 영향

기질 octapeptide(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Gly-Phe) 와 효소 pepsin 만을 작용시킨 결과는 Fig. 1과 같다.

즉 기질 octapeptide 는 pepsin 에 의하여 3개의 spot (A,B,C)로 분해되었다. 그리고 분해산물 A,B,C 는 다

Table 1. The physical properties and the Rf values of synthesized octapeptide from paper chromatography and migration value from electrophoresis.

Octapeptide	Rf values		EG*	MP(°C)	Yield(%)
	BAW(4:1:5)	BAPW (30:6:20:24)			
Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Gly-Phe	0.32	0.25	1.29	209~212	55

*EG: migration value of octapeptide in comparison with that of glutamic acid as a standard.

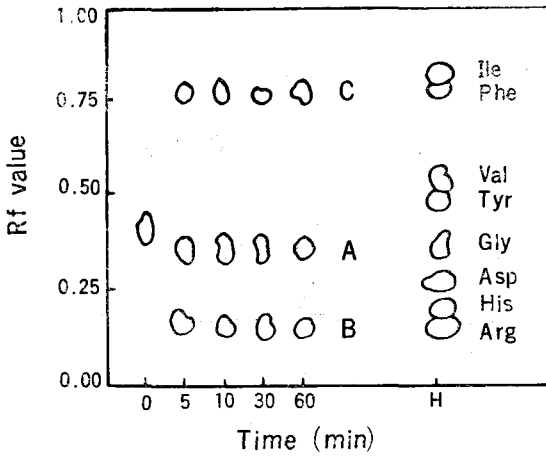


Fig. 1. Paper chromatogram of degradation products of octapeptide, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Gly-Phe, by pepsin.
A: Asp-Arg-Val, B: Tyr-Ile-His-Gly, C: Phe, H: hydrolyzed products with 6N-HCl for 40 hours.

같이 ninhydrin 에 의하여 양성반응을 나타내었으며, guanidine 기를 가진 특유한 반응으로 arginine 에 양성을 나타내는 Sakaguchi's 시약에 의하여 A부분만이 양성을 나타내었고, spot B에는 tyrosine 과 histidine 의 존재가 Pauly's 시약에 의하여 확인되었다.

한편 합성 항산화제 DHT, BHA, EP 및 sodium-L-ascorbate 를 100ppm 농도로 첨가하였을 때의 분해산물을 PPC 법에 의하여 분리한 결과는 Fig. 2와 같으며, 농도 및 시간별에 따른 pepsin 의 작용정도를 paper chromatogram 상의 spot area 로서 나타낸 결과는 Table 2와 같다.

즉 DHT, BHA 및 EP 는 저농도에서 고농도에 이르기까지 저해작용을 나타내지 않았으나, sodium-L-ascorbate 는 그 농도가 증가 될수록 octapeptide 의 분해에 보다 많은 시간이 요구되어 저해현상을 나타내었다. 그러나 반응시간이 더욱 경과됨에 따라서 기질의 분해가 일어남을 관찰할 수 있었다.

일반적으로 phenol 성 OH 기를 가지는 첨가물은 phenol 성 OH 기의 특이적인 반응성¹⁰⁾으로 인한 효소활성의 저해가 예상되나 전보⁶⁾에서는 phenol 성 OH 기를 2개 가지는 EP 가 1개씩 만을 가지는 DHT 및 BHA 에 비하여 α -chymotrypsin 의 활성을 더욱 저해하였다. 그러나 trypsin 에 있어서는 오히려 BHA 에서 저해현상을 나타내어 첨가물과 효소의 구조적 특성도 저해활성에 관여 하리라고 추정할 수 있다.

한편 pepsin 에 있어서는 phenol 계 합성 항산화제들이 저해를 나타내지 않음에도 sodium-L-ascorbate 가 pepsin 의 활성을 저해하는 특이한 현상을 볼 수 있는데 이러한 현상은 L-ascorbic acid 가 tyrosinase 의 활성을 촉진¹¹⁾¹²⁾하는 것과는 반대되는 결과이나 pepsin 이 L-

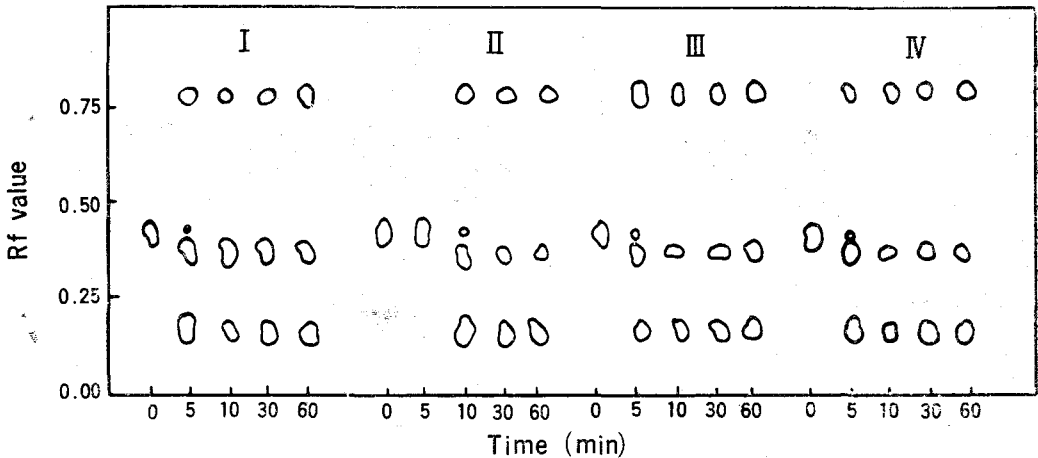


Fig. 2. Degradation products of octapeptide, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Gly-Phe after incubation with pepsin at 36°C and pH 2.1 for 0, 5, 10, 30 and 60 min. Paper chromatogram of peptides obtained from octapeptide cleaved by pepsin interacted with antioxidants at 30°C.
I: DHT, II: Sodium-L-ascorbate, III: EP, IV: BHA

Table 2. The effect of synthetic antioxidants and its concentration on the octapeptide degradation by pepsin

Antioxidants	Conc(ppm)		10		20		50		100		500		1000				
	Time(min)		0	5	10	30	60	0	5	10	30	60	0	5	10	30	60
None			-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
DHT			-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
BHA			-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
EP			-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Sodium-L-ascorbate			-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+

+ : degradation, - : no degradation

ascorbic acid 에 의하여 산화분해 된다는 설과 加納¹³⁾의 결과와 일치한다고 볼 수 있다. 그리고 sodium-L-ascorbate 의 위생법상의 첨가허용량이 햄, 소세지의 경우 증량으로서 1/2000, 냉동어육(침지액)의 경우 1%로 되어 있으나 이보다 저농도에서도 pepsin의 활성을 저해하는 것으로 보아 사용기준에 대한 재평가가 요망된다고 하겠다.

결 론

단백질 분해효소 pepsin의 합성 식품항산화제의 존재하에서 octapeptide (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Gly-Phe)의 분해에 미치는 효과를 측정 한 결과는 다음과 같다.

1) DHT, BHA 및 EP는 pepsin에 대한 저해작용을 나타내지 않았으나 sodium-L-ascorbate는 100ppm 이상의 농도에서 저해작용을 나타내었으며, 이러한 현상은 시간의 경과에 따라 감소되었다.

2) Pepsin은 합성한 octapeptide의 Gly-Phe와 Val-Tyr의 linkage를 분해하여 Asp-Arg-Val, Tyr-Ile-His-Gly 및 Phe을 생성하였다.

3) 합성한 octapeptide의 용점은 209~212°C였으며 분자식은 $C_{43}H_{65}N_{13}O_{12} \cdot CH_2COOH \cdot H_2O$ 분자량은 956.05 이었다.

4) 합성한 octapeptide의 mole 비율은 Asp : 0.98, Arg : 1.02, Val : 1.00, Tyr : 0.95, Ile : 1.00, His : 1.03, Gly : 0.66, Phe : 1.00 이었다.

참 고 문 헌

1) Herriott, R.M.: *Chemistry and method of enzyme*, Academic Press, p.3~10, 1970.

2) Conn, E.E. and stumpf, P.K., *Outline of biochemistry*, John Wiley & Sons Inc: New York, p.187~188, 1976.

3) 吉田勉, 食用ターノレ色素の種混合ガペプシン活性によぼす阻害効果, 營養と食糧, 26(8), 487~497, 1973.

4) 玉水粧子, 栗山久枝, 吉田勉: 食用タルル色素(アゾ系とキサンテン系)의種混合ガペプシン活性およびパプシンナトリブシン活性に及ぼす阻害効果立川短大紀要, 9, 1~10, 1976.

5) 三谷璋子: 食用色素光分解物のパプシン活性に及ぼす影響について, 營養學會誌, 36, 107~112, 1978.

6) 金尙玉: 합성항산화제가 단백질 분해효소에 미치는 영향, 제1보. α -chymotrypsin과 trypsin의 활성에 미치는 영향, 대한가정학회지, 19(2), 183~188, 1981.

7) 崔 濤: Tetradecapeptide renin 基質과 intermediate peptide의 固相法에 의한 peptide 合成에 관한 研究, 東國大學校 博士學位論文, p.7~20, 1975.

8) Merrifield, R.B.: *Solid phase peptide synthesis*, 1, 64~7, 1970.

9) Park, W.K., Choi, C., Rioux, F. and Regoli, D.,: *Synthesis of peptides with the solid phase method*, II. Octapeptide analogues of angiotensin II, *Can. J. Biochem.*, 52, 113~119, 1974.

10) 別府道子, 田中雅子: 食品添加物の大腸菌(*Escherichia coli*: K-12)에對する影響について, OPP-TBZ의大腸菌의生育, 誘導酵素의合成에對する影響および變異原性について, 東京家政學院大學紀要. 18,

111~119, 1977.

- 11) 中嶋洋子, 鈴江緑衣郎, 眞田宏夫, 河田正治・チロシン水酸化酵素におとばすアスコルビン酸の影響, (第3報)アスコルビン酸に対するチロシン水酸化酵素の誘導, 国立營養研究報告, 21, 41~50, 1971.
- 12) 中嶋洋子, 鈴江緑衣郎, 眞田宏夫, 河田正治, チロシン水酸化酵素におよぼすアスコルビン酸の影響, (第4報)チロシン水酸化酵素誘導機構に関する研究, 營養研究所報告, 21, 48, 1971.
- 13) 守康則, 加納三千子: レーアスコルビツ酸によるペプシンの分解について, 營養と食糧, 26(6), 359~365, 1973.