

합성 항산화제가 단백질 분해효소에 미치는 영향

—제 1 보, α -Chymotrypsin 과 Trypsin 의 활성화에 미치는 영향—

The Effect of Synthetic Antioxidants on the Proteolytic Enzymes

1. The Effect of Synthetic Antioxidants on the Activity of the α -Chymotrypsin and Trypsin

大邱 嶺南專問大學 家政科

教授 金 尙 玉

Daegu Young Nam Junior College, Dept. of Home Economics

Professor; Sang Ock Kim

<目 次>

I. 서 론

II. 실험 재료 및 방법

III. 결과 및 고찰

IV. 결 론

참고문헌

<Abstract>

This study was conducted to investigate the effects of synthetic antioxidants on the degradation of angiotensin II which is made up of 8 amino acids: Asp-Arg-Val-Try-Ile-Gly-Pro-Phe, by the α -chymotrypsin and trypsin.

The results obtained were as follow;

1. Dibutyl hydroxytoluene, butyl hydroxyanisole and sodium L-ascorbate showed no inhibitory effect on the activity of α -chymotrypsin on the angiotensin II, but ethyl protocatechuate inhibited. its activity at the concentration of 100ppm. However, the angiotension II was gradually degraded by α -chymotrypsin after one hour incubation with ethylprotocatechuate.

2. Butyl hydroxyanisole inhibited trypsin activities above 100ppm, but no inhibitory activities was observed by the other antioxidants used in this experiment.

I. 서 론

최근 널리 이용되고 있는 식품첨가물은 식품제조 가공 및 조리에서 매우 유용하게 사용되고 있는 반면에 이의 과오용으로 인하여 만성 및 급성 중독 현상¹⁾을 일으키는 등 부수적인 공해문제가 크게 대두되고 있는 것도 사실이다.

항산화제는 지방산 산화시의 free radical 에 reactive hydrogen 을 주어 chain reaction 에 의한

산화를 막으며²⁾, 이로 인하여 급성독성을 나타내는 유지의 산화생성물인 linoleic acid methyl hydroperoxide³⁾ 독성 glyceride⁴⁾ aldehyde 및 ketone⁵⁾등의 생성을 막아 품질을 보존시키는 효과가 인정되고 있다. 그러나 別府등⁶⁾은 phenol계 식품첨가물인 o-phenylphenol 이 대장균의 생육과 유도효소의 생합성을 억제하였다고 보고하는 등 합성 식품첨가물의 독성에 관한 많은 연구가 보고^{7~16)}되고 있으므로 식품첨가물에 대한 효율적인 이용을 위한 다각적인 연구점토는 앞으로의 주요한 과

제라고 생각된다.

본 연구에서는 식품첨가물의 phenol 성 OH기가 단백질 및 효소가 갖는 여러가지 functional group과의 반응성이 크다는 보고⁶⁾가 있음에도 dibutyl hydroxytoluene (DHT), butyl hydroxyanisole (BHA) 및 ethyl protocatechuete (Ep) 등 phenal 성 합성항산화제가 생체내 효소 및 단백질 생합성에 미치는 영향에 관한 연구가 이루어 지지 않고 있으므로 이들에 관한 일련의 연구로서 단백질 분해효소인 α -chymotrypsin과 trypsin이 oligopeptide (octapeptide)인 angiotensin II의 분해에 미치는 효과를 paper chromatography에 의하여 검토하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 합성 항산화제는 남영상사 주식회사제 phenol계 항산화제인 DHT, BHA 및 EP와 sodium-L-ascorbate 등 4종을 사용하였으며 기질은 octapeptide (6-GM)인 angiotensin II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-Gly-Pro-Phe)을, 효소로서는 α -chymotrypsin과 trypsin으로서 각각 sigma 제를 사용하였다.

2. 실험방법

(1) α -Chymotrypsin의 활성화

sin α -Chymotrypsin의 활성화도 측정은 기질 angiotensin II 2mg과 항산화제 농도별 (0~1,000 ppm), 효소 0.1mg을 각각 함유하는 0.2M phosphate buffer 용액 (pH7.1) 0.6ml을 36°C에서 0~60분간 시간별로 반응시키고, 이를 빙냉하에서 0.1N HCl 0.05ml을 가하여 산성화시켜 반응을 중지시켰으며, 반응액은 전개용매 n-butanol:acetic acid: water (4:1:5 v/v%), 여지 whatman No. 1 filter paper를 사용한 (paper chromatography (ppc) 법에 의하여 분해산물을 분리시키고, amino산 공통의 정색 시약인 ninhydrin, guanidine기를 가진 특유한 반응으로 arginine 양성을 나타내는 Sakaguchi's 및 tyrosine 특유 정색시약인 pauly's

시약과의 반응에 의하여 분리된 spots를 확인하였으며 ninhydrin에 의한 정색 정도를 조사함으로써 활성정도를 검토하였다.

(2) Trypsin의 활성화

Trypsin의 활성화에 미치는항산화제 영향의 검토는 상기 α -chymotrypsin에서와 동일한 방법에 준하여 기질 angiotensin II 2mg과 항산화제 농도별 (0~1,000ppm), 효소 0.1mg을 함유하도록 조정된 0.01M NaHCO₃ 및 MgCl₂·6H₂O 용액 (pH 7.1) 0.6ml을 36°C에서 0~60분간 시간별로 반응시킨 후 기질의 분해정도를 ppc 법에 의해서 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. α -chymotrypsin의 활성화에 미치는 항산화제의 영향

α -chymotrypsin에 의한 기질 angiotensin II의 분해에 미치는 항산화제의 첨가효과를 검토하기 위하여 α -chymotrypsin 단독처리에서 기질의 분해 상태를 ppc 법에 의하여 검토한 결과는 Fig. 1에 서와 같다.

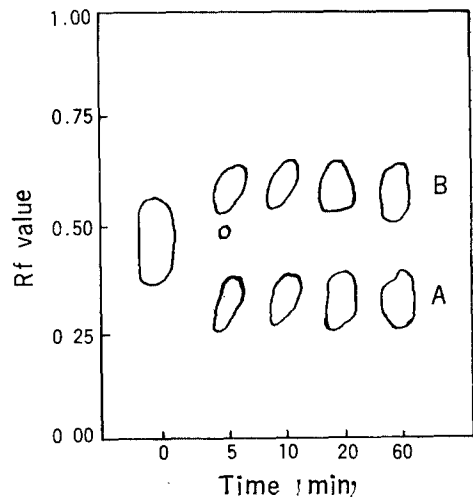


Fig. 1. Paper chromatogram of degradation products of angiotensin II by α -chymotrypsin.

A: tetra peptide (Asp-Arg-Val-Tyr)
B: tetra peptide (Ile-Gly-Pro-Phe)

Table 1. The effects of various concentrations of synthetic antioxidants on the degradation of angiotensin II by α -chymotrypsin.

Antioxidants	Cone (ppm)		10				20				50				100				500				1,000									
	Time (min)		0	5	10	20	60	0	5	10	20	60	0	5	10	20	60	0	5	10	20	60	0	5	10	20	60	0	5	10	20	60
None			-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
DHT			-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
EP			-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Sodium-L-ascorbate			-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

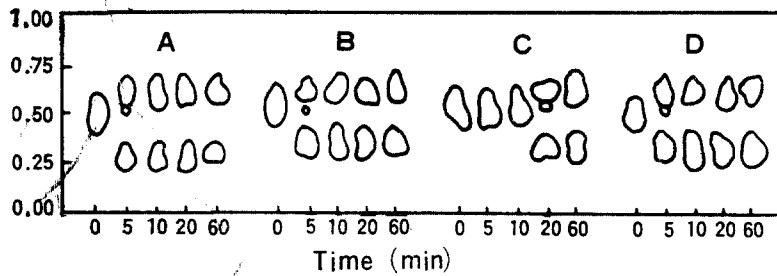


Fig. 2. Paper chromatogram for degradation products of octapeptide, angiotensin II by α -chymotrypsin on the adding antioxidants as food additives.

A: DHT, BHA, C:EP, D:sodium L-ascorbate

즉 α -chymotrypsin의 영향을 받기전의 온전한 angiotensin II는 Rf 치 0.50 부에 ninhydrin에 의하여 정색되었으며, chymotrypsin을 첨가한 후 시간이 경과됨에 따라 점차 분해되어 Rf 치 0.32와 0.65 부에 정색 area가 대등한 A,B 두개의 spot로 분리되었다. 그리고 반응 5분에서는 기질의 미량 흔적만을 남기고 대부분이 분해되었고, 10분에는 완전히 분해되었으며, 반응시간이 더 이상 경과되어도 2개 이상의 spot는 검출되지 않았다.

기질의 분해 생성물인 ninhydrin에 정색되는 spot A와 B를 동정하기 위하여 arginine의 특유한 정색반응인 sakaguchi's 시약에 의한 정색 정도를 살펴 본 결과 spot A만이 뚜렷이 정색되었으며, pauly's 시약에 의하여도 spot A만이 정색되었으므로 spot A에서는 tyrosine과 Arginine의 존재를 확인할 수 있었다. 따라서 α -chymotrypsin에 의하여 octapeptide의 Tyr-Ile linkage가 분해되어 Asp-Arg-Val-Tyr과 Ile-Gly-Pro-Phe의 두개의 tetra peptide가 생성된 것임을 알 수 있다.

한편 DHP, BHA, EP 및 sodium-L-ascorbate등의 합성 항산화제가 α -chymotrypsin의 angiotensin II 분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 항산화제의 첨가농도 및 시간별로 paper chromatogram 상에 정색된 spot에 의하여 area를 상호비교하여 분해유무를 비교한 결과는 Table 1과 같고, 항산화제의 첨가농도를 100ppm으로 하였을때의 chromatogram은 Fig. 2가 같다.

즉 DHT, BHA 및 sodium L-ascorbate는 10~1,000ppm에서 α -chymotrypsin에 대한 저해작용을 나타내지 않았으나 Ep의 경우는 100ppm 이상의 농도에서 저해현상을 나타내었다. 그러나 Ep에서는 20분이 경과되면서 서서히 분해되기 시작하였다.

phenol성 물질은 Oxidase 등 생체내의 여러가지 효소활성을 저해¹⁷⁾하는 것으로 알려지고 있는데, 이것은 phenol성 OH기가 기질 단백질의 carboxyl group에 작용하든가 아니면 효소단백질의 functional group과 반응하는데 기인된 것으로 사료된

다. 본실험에 있어서 특히 phenol성 OH group을 2개 가지는 Ep가 1개씩 만을 가지는 BHA와 DHT에 비하여 α -chymotrypsin의 합성을 저해하는 것은 상기에서 언급한 바와 같은 이유인 것으로 짐작되나 차후의 보다 깊은 연구가 요망된다. 그리고 Ep의 경우 식품에 따라 다르긴 하지만 허용량이 500ppm이하로 되어있으나²⁾, 100ppm에서 α -chymotrypsin의 합성을 저해한다고 볼때 위생법상에서는 허용한다 하더라도 식품에의 과오용은 삼가해야 할 것으로 생각된다.

2. Trypsin의 활성에 미치는 항산화제의 영향

Angiotensin II에 대한 trypsin의 분해작용은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 chymotrypsin의 작용과는 매우 다른 patten을 나타내었다.

즉, trypsin에 의한 angiotensin II의 분해산물 A', B'는 d-chymotrypsin에 의한 분해산물 (Fig. 1)과는 달리 각각 0.60과 0.23의 Rf치를 나타내었으며, A'부는 Pauly's 시약에 의하여도 정색되지 않았으나, Sakaguchi's 시약에 의하여 정색되었고 반대로 B'부는 Pauly's 시약에 의하여 정색되었으며, tetrapeptide보다 높은 Rf치를 나타내었음. 뿐만 아니라 trypsin은 염기성 amino산의 carboxyl기에 작용하는 것으로 미루어 기질 octapeptide의 Arg-Val linkage가 분해되어 A'는 Asp-Arg, B'는 Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe로 분해된 것임을 알 수 있다.

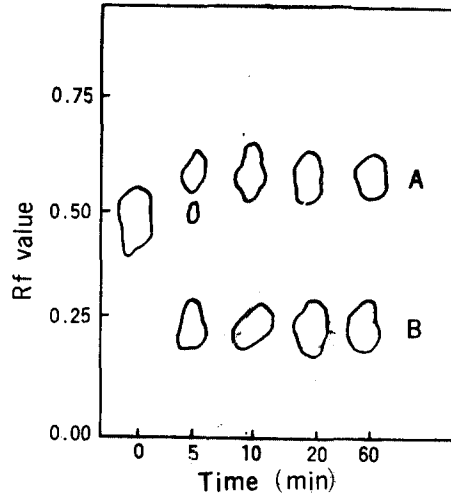


Fig. 3. Paper chromatogram of degradation products of octapeptide (6-Gly), angiotensin II by trypsin.

A': dipeptide (Asp-Arg)

B': hexapeptide (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)

한편 trypsin 의한 기질 angiotensin II 분해에 미치는 합성 항산화제 첨가효과를 조사하기 위하여 첨가농도 및 반응시간별로 chromatogram 상에 정색된 spot에 의하여 분해유무를 비교한 결과는 Table 2와 같고, 항산화제의 첨가농도 100ppm으로 하였을 때의 chromatogram은 Fig. 4와 같다. 즉, BHT, Ep, Sodium-L-ascorbate는 control에서와 같이 처리 5분 경에 기질의 미량 혼적만을

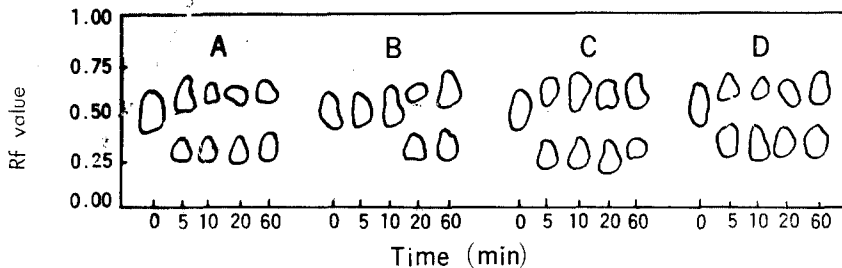


Fig. 4. Paper chromatogram for degradation products of octapeptide (6-Gly), angiotensin II by trypsin on the adding antioxidants as food additives.

A: DHT, B: BHA, C: Ep, D: Sodium L: ascorbate

Table 2. The effects of various concentrations of synthetic antioxidants on the degradation of Angiotensin II by trypsin.

Conc (ppm)	10		20		50		100		500		1,000				
	0	5	10	20	60	0	5	10	20	60	0	5	10	20	60
Antioxidants															
None	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
DHT	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
BHA	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
EP	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Sodium-L-ascorbate	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

+; degradation -; no degradation

남기고 dipeptide hexapeptide 로 분해 되었다. 그러나 BHA 의 경우는 10~20ppm 의 저농도에서 반응 초기에는 저해현상을 나타내었으나, 시간이 경과함에 따라 점차 분해가 이루어졌으며, 100ppm 이상의 농도에서는 시간이 경과되어도 60 분까지는 분해가 전혀 이루어지지 않았다.

BHA 가 trypsin 의 활성을 저해하는 현상과 Ep 가 α -chymotrypsin 의 활성을 저해하는 현상을 상호비교할 때 앞서 α -chymotrypsin 에서 언급한 바와 같이 항산화제가 갖고있는 phenol 성 OH 의 수가 많음에 따라 비례해서 효소활성이 저해된다고는 볼 수 없으며, 첨가물과 효소자체가 갖는 구조적 특이성과도 관련이 있는 것으로 추측할 수 있다. 그리고 BHA 는 타 phenol 성 항산화제에 비하여 특성이 적어 LD50=4.13/kg 쥐 으로 알려져 있으며, 첨가허용량도 적용 식품의 종류에 따라 다르긴 하지만 0.1%이하"로 되어 있으나 반응초기에 10~20ppm 에서 trypsin 의 합성을 저해하고 100ppm 에서는 완전히 저해되는 것으로 보아 이의 허용량에 대한 재검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

IV. 결 론

합성 항산화제가 단백질 분해효소인 α -chymotrypsin과 trypsin 의 octapeptide (6-Gly)인 angiotensin II 의 분해에 미치는 영향을 ppc 범에 의하여 비교 검토한 결과는 다음과 같다.

① Dibutyl hydroxytoluene, butyl hydroxy-

anisole 및 sodium-L-ascorbate : α -chymotrypsin 의 작용에 영향을 미치지 않았으나 ethyl protocatechuate 는 100ppm 이상의 농도에서 저해작용을 나타내었다. 그러나 시간이 경과됨에 따라 점차 분해되었다.

② Butyl hydroxyanisole 은 100ppm 이상의 농도에서 trypsin 을 완전히 저해하였으나 다른 항산화제는 저해작용을 나타내지 않았다.

참 고 문 헌

1. 張智鉉, 文範洙, 金教昌, 食品衛生學, 修學社 p. 25~31, 1981
2. 金東勲, 食品化學, 探求堂, p.438~484, 1980
3. 天野立爾, 油脂の變敗に關する研究 (第5報), ソノール酸メチハイトロペーオキサ이드の酸化物およびとの急性毒性, 食衛誌, Vol. 13 (4), p. 293, 1972
4. 山田正人, 金田尙志, 油揚げ用油中の有毒グリセリドダイマ1の存在, 日食工會誌, Vol. 22 (2), p. 91, 1975
5. 金田尙志, 變敗油の毒性, 食衛誌, Vol. 15(1), p. 1, 1974
6. 別府道子, 田中 雅子, 食品添加物の大腸菌 (*Escherichia coli* k-12) に對する影響について, OPP・TBZの大腸菌の生育, 誘導酵素の合成に對する影響すよび變異原性について, 東京家政學院大學紀要, Vol. 18, p.117~119, 1977
7. 竹村洋, 山本榮, 石原英子, 石坂音治, クロレ

- ラによる食品添加物の毒性實驗(第4報), アミノ酸の取り込みにおよぼす保存料の影響, 食衛誌, Vol. 10(5), p.328, 1969
8. 野地玲子, 安部一紀, 食品添加にする酵素活性變動(第1報), Amylase 活性によるぼす食品添加物の影響, 福岡女子學院短大紀要, Vol.6, p.105, 1970
 9. 野地玲子, 安部一紀, 食品添加物による酵素活性の變動(第2報), Trypsin 活性におよぼす食品添加物の影響, 福岡女子學院短大紀要, Vol. 7, p.82, 1970
 10. 西田ミツエ, 食品添加物に関する研究, 交叉涙紙泳動による保存料の人血清蛋白に對する反應 山口女子短大研究報告, Vol. 25, p.1, 1970
 11. 西田ミツエ, 食品添加物に関する研究, 交叉涙紙泳動法による保存料の人血清蛋白に對する反應(2), 山口女子短大研究報告, Vol. 27, p.1, 1972
 12. 天野憲子, 齊藤美佐子, 楯博, 食品添加物の毒性試験に関する研究(第1報), 色素およびトルエンの家兎肝に對する影響について, 東横學園女子短大紀要, Vol.9, p.68, 1971
 13. 後藤たへ・遠藤一・木須靖子・加藤節子, 保存料テヒドロ酢酸および食用色素色1號のでんぷん分解酵素, たん白分解酵素ならびに脂肪分解酵素活性に及ぼす影響について, 宮城學院女子大學生活科研究所研究報告, Vol.6, p.37, 1972
 14. 後藤たへ, 遠藤一, 木須靖子, 加藤節子, 保存料テヒドロ酢酸および食用色素紫色1號のでんぷん分解酵素, たん白質分解酵素ならびに脂肪分解酵素活性に及ぼす影響について, 栄養と食糧 Vol.25(6), p.480, 1972
 15. 引地弘子, 森宏枝, 石澤敬子, 酵素に及ぼす食品添加物の影響についてⅢ報, アルギナーゼトランスアミナーゼに及ぼす食品添加物の影響東京家政學院大學紀要, Vol.17, p.87, 1977
 16. 槌本六良, 食品添加物の相乗毒性に関する研究 活水女子短大活水論文集, Vol. 21, p.71, 1978
 17. Zenk, M.H. and Müller, G., *In Vivo* destruction of exogenously applied indole-3-acetic acid as influenced by Naturally occurring phenolic acid, Nature, Vol.23, p.761~763, 1963