

안기오펜신변환효소저해에 미치는 산유의 발효조건과 몇가지 인자들의 영향

김 금 혁

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 지적하시였다.

《당의 예방의학적방침을 관철하는데서 질병을 미리막기 위한 투쟁을 강화하는것이 매우 중요합니다.》(《김정일선집》 제11권 증보판 71페이지)

젖산균을 리용하여 우유를 발효시킬 때 생성되는 일부 펩티드들은 안기오펜신변환효소(ACE)에 대한 저해작용을 통하여 혈압내림효과를 나타낸다. 혈압조절에서 중요한 역할을 하는 레닌-안기오펜신계에서 ACE의 작용에 의하여 생성되는 안기오펜신-II는 혈관을 수축시켜 혈압을 높인다. 이로부터 안기오펜신변환효소저해제를 리용하여 혈압을 낮추기 위한 많은 방법들이 연구되였다. 최근에 고혈압병치료에서 이러한 저해제를 리용한 약물치료보다도 건강식품을 리용한 치료방법들이 나오고있다.

우리는 젖산균들가운데서 단백질분해력이 높은것으로 알려진 *Lactobacillus helveticus* 1604와 *Lactobacillus helveticus* 894로 우유를 발효시킬 때 균배양조건과 몇가지 인자들이 ACE저해에 미치는 영향을 연구하였다.

재료와 방법

균주로는 국가균주보존연구소에 보관되어있는 *Lactobacillus helveticus* 1604, *Lac. helveticus* 894를 리용하였다.

기구로는 형분광광도계(《PF 1305001》), 정온기(《E12110880》), 항온수욕조, 원심분리기(《Z233MK-2》)를 리용하였다.

시약으로는 폴린시약(《Sigma》), Hip-his-Leu(《Sigma》, Hip: 히프릴산)와 분석순급의 여러가지 무기시약들(HCl, NaOH, Na₂CO₃, NaCl, CuSO₄, Na₂B₄O₇)을 리용하였다.

단백질정량 단백질정량은 폴린-로우리법으로 진행하였는데 분광광도계에서 측정파장은 $\lambda = 750\text{nm}$ 로 하였다. 단백질량은 소혈청알부민(BSA)표품을 리용하여 작성한 단백질검량선으로부터 구하였다.

균배양방법 균배양배지로는 탈지우유가루를 증류수에 일정한 농도되게 푼것을 리용하였다. 10mL의 MRS배양액에 균주들을 한백금이씩 접종하고 37℃에서 24h동안 배양하였다. 다음 10% 탈지우유용액을 120℃에서 15min동안 멸균한 다음 균주들을 1%씩 접종하고 실험에서 정한 조건에 따라 배양하였다. 시료를 배양기간에 4h 간격으로 분석에 리용하였으며 pH는 pH미터로 측정하였다.

ACE저해률측정 ACE저해률은 히프릴-히스티딜-로이신(Hip-His-Leu)을 리용하여 선행

연구의 방법[1]에 따라 측정하였는데 필요한 ACE는 다음과 같은 방법으로 준비하였다.

신선한 토끼피 100g을 잘게 잘라서 0.1mol/L 린산완충용액(pH 7.0) 1 000mL와 혼합하고 마쇄한 다음 그것을 4 500r/min의 속도로 15min간 원심분리하여 상등액(효소액)을 얻었다. 이 상등액을 류안염석(1.2—2.5mol/L)하여 투석한 다음 0.1mol/L 린산완충용액(pH 8.0)에 푼것을 효소액으로 리용하였다.

분석시료는 다음과 같이 준비하였다.

발효시킨 우유를 50% 젖산을 리용하여 pH 3.4로 맞춘 다음 10min동안 6 000×g에서 원심분리하였다. 상등액에 10mol/L NaOH를 첨가하여 pH 8.3으로 높이고 다시 상등액을 10min 동안 6 000×g에서 원심분리한 마지막 상등액을 시료로 리용하였다.

효소와 시료와의 반응은 다음과 같은 공정을 거쳐 진행하였다.

안기오텐신변환효소(0.1U/mL)의 기질로서 0.3mol/L NaCl이 포함된 0.1mol/L 붕산완충용액(pH 8.3)에 0.005mol/L Hip-His-Leu를 희석하였다. 약 60μL 붕산완충용액을 기질용액 200μL에 추가하고 시료 30μL를 계속하여 첨가한 후 37℃에서 30min동안 사전배양하였다. 다음 효소용액 20μL를 첨가하여 37℃에서 30min동안 배양하였다. 반응은 1mol/L HCl용액 250μL를 첨가하여 정지시킨 다음 1.7mL 초산에틸을 첨가하였다. 방온도에서 10min동안 방치하였다가 초산에틸층(1.4mL정도)을 새 시험관에 옮긴 다음 끓는 수욕조에서 먼저 건조시키고 30min동안 80℃의 건조로에서 건조시켰다. 1.4mL의 초산에틸을 제거한 후 남아있는 찌꺼기는 버리었다. 건조된 히프릴산을 1mL 탈이온수에 푼 다음 자외가시선스펙트르분석기로 흡광도를 측정하였다.(측정파장 228nm)

저해률(%)은 다음의 공식을 리용하여 계산하였다.

$$ACE저해률 = \left(1 - \frac{C - D}{A - B}\right) \cdot 100$$

여기서 A는 ACE만 첨가하고 시료를 넣지 않았을 때의 흡광도, B는 ACE와 시료를 모두 넣지 않았을 때의 흡광도, C는 ACE와 ACE저해성분이 모두 있을 때의 흡광도, D는 시료는 첨가하고 ACE는 첨가하지 않았을 때의 흡광도.

결과 및 고찰

1) 배양조건이 ACE저해률에 미치는 영향

일반적으로 우유속에서 젖산균이 리용할수 있는 유리아미노산들과 펩티드의 량은 매우 적다. 따라서 젖산균은 증식을 위하여 우유단백질을 분해하는 단백질분해대사에 의존한다.

먼저 탈지우유를 일정한 농도로 희석하여 배지로 리용할 때 농도에 따르는 ACE저해률을 보았다.(그림 1) 그림 1은 매 농도에서 균주들을 리용하여 39℃에서 24h동안 발효시킬 때 최대ACE저해률값을 취한것이다.

젖산발효가 시작되어 일정한 시간이 지나면

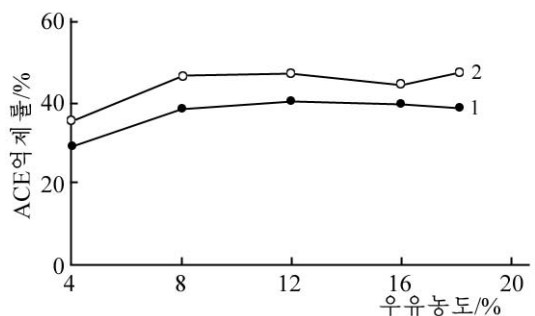


그림 1. 농도에 따르는 우유용액에서 ACE저해률의 변화.

1—Lac. helveticus 1604, 2—Lac. helveticus 894

우유단백질들의 분해산물들인 펩티드들이 생성되기 시작한다. 우유단백질들 가운데서 기본은 카제인단백질인데 이 단백질이 분해되어 생긴 펩티드들이 ACE저해활성을 가진다.[2, 3] 그림 1에서 보는바와 같이 12%이상의 탈지우유용액에서 두 젖산균의 ACE저해활성은 거의 변화가 없었다. 4% 탈지우유용액에서 ACE저해활성이 낮은 것은 젖산균들이 유기질소영양원으로서 우유단백질을 충분히 리용하지 못하는 것과 관련될 수 있는데 이로 하여 ACE저해활성을 나타내는 펩티드들이 적게 생성되는 것 같다.

다음으로 젖산발효시간에 따르는 ACE저해활성을 보았다.(그림 2)

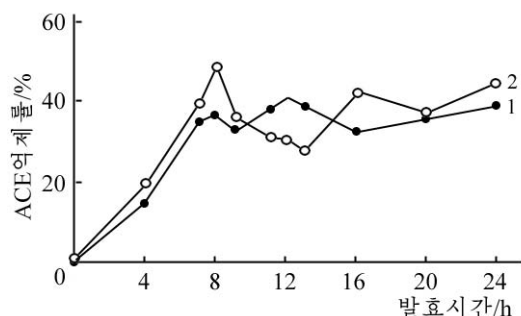


그림 2. 발효시간에 따르는 ACE저해활성의 변화

1-L. helveticus 1604, 2-L. helveticus 894;

발효온도 42°C, 우유용액의 농도 12%,

발효시간 24h

그림 2에서 보는바와 같이 *Lac. helveticus* 894는 발효가 시작되어 8h만에 최대 ACE저해특성을 나타냈다가 13~16h 사이에 다시 ACE저해가 증가되는 경향성을 나타냈으며 *Lac. helveticus* 1604는 12h만에 최대값을 나타냈다. 이것은 젖산균마다 ACE저해특성을 나타내는 펩티드들의 생성이 발효시간에 따라 달라진다는 선행연구의 결과[4]와도 일치한다. 일반적으로 ACE저해특성을 나타내는 IPP, VPP, YG, YPFPGPIPNLS과 같은 펩티드들의 아미노산배열은 카제인의 1차구조속에 들어있다. 발효가 진행됨에 따라 체외분비효소들이 카제인을 분해한 결과 생겨난 펩티드들 가운데서 일부가 젖산균세포안으로 수송되어 다시 2차, 3차 가공과정을 거치게 된다.

이 과정에 디 또는 트리펩티드들이 생성되는데 그것의 일부만이 ACE저해특성을 나타내므로 ACE저해활성이 균주마다 차이나는 것 같다. 또한 발효기간에 이러한 펩티드들의 분해와 생성이 진행되므로 발효시간에 따라 산유의 ACE저해특성이 달라지게 된다고 본다.

발효온도에 따르는 ACE저해활성의 변화특성을 비교한 결과는 그림 3과 같다.

젖산균은 체외분비효소로서 세린프로테아제를 분비하는데 이 효소가 카제인을 일정한 크기의 펩티드들로 분해한다. 세포안으로 수송된 펩티드들은 N말단가공효소인 프롤린프로테아제와 C말단가공효소인 시스테인프로테아제, 펩티다제들에 의하여 디펩티드, 트리펩티드들로 분해된다.

그림 3에서 보는바와 같이 발효온도를 높일수록 ACE저해활성은 높아지지만 45°C부터는 낮아진다. 이것은 ACE저해펩티드를 생성하는데 참가하는 프로테아제들과 펩티다제들의 활성이 39~42°C 사이에서 가장 높아져 ACE저해펩티드들의 생성량이 증가된 결과라고 볼 수 있다.

젖산균에 의한 우유발효 때 최종대사산물은 젖산이다. 따라서 젖산생성량이 증가됨에 따라 배지의 pH는 내려가게 되며 젖산균의 단백질 분

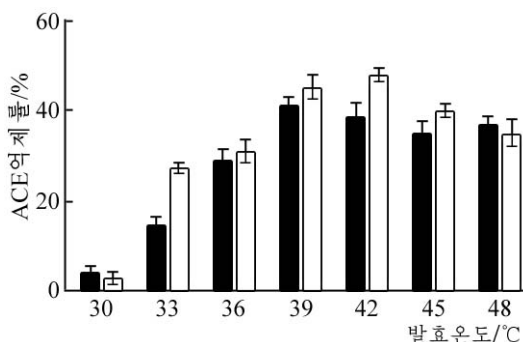


그림 3. ACE저해활성에 미치는 발효온도의 영향

■ *Lac. helveticus* 1604, □ *Lac. helveticus* 894
ACE저해활성은 매 온도구간에서 24h 동안 발효시킬 때 최대 나타낸 ACE저해활성값임

해활성에 영향을 미친다. 이로부터 배지의 초기pH를 보정하여 24h동안 발효시킬 때 펩티드생성량은 조절될수 있다.

이것을 검토하기 위하여 0.1mol/L NaOH용액으로 배지초기pH를 약알카리성으로 보장하는 경우 pH를 보정하지 않은 우유배지(6.5~7.0)와 비교하여 ACE저해물의 변화정도를 보았다.(표 1)

표 1에서 보는바와 같이 초기pH의 보정은 ACE저해물에 큰 영향을 주지 못하였다. 오히려 알카리성쪽으로 pH가 기울어지면 ACE저해물은 보다 떨어졌다. 젖산균은 일반적으로 중성pH에서 균증식이 빨라지므로 pH를 조절하지 않아도 된다고 본다.

2) 펩티드생성량에 따르는 ACE저해물의 변화

펩티드들가운데서 일부만이 안기오텐신변환효소에 대한 저해를 나타내므로 펩티드생성량이 높은 균주로 우유를 발효시켰다고 하여 ACE저해물이 높다고는 볼수 없다. 이것을 확인하기 위하여 두 젖산균주들로 12% 탈지우유용액을 24h동안 발효시킬 때 최대ACE저해물을 나타내는 시점에서 펩티드함량을 비교하였다.(표 2)

표 2에서 보는바와 같이 *Lac. helveticus* 1604의 펩티드함량은 *Lac. helveticus* 894에 비해 1.4배정도 높으나 ACE저해물은 1.2

표 2. 젖산균주들에 따르는 산유의 펩티드농도와 ACE저해물의 비교

균주	배양온도 /°C	펩티드농도 /%	ACE저해물 /%
대조(우유)		0.00±0.00	0.00±0.0
<i>Lac. helveticus</i> 1604	39	0.26±0.02	41.7±1.4
<i>Lac. helveticus</i> 894	41	0.19±0.01	48.3±1.1

초기pH 6.5±0.4

표 1. 배지초기pH가 ACE저해물에 미치는 영향

젖산균	pH	ACE저해물/%
<i>Lac. helveticus</i> 1604	6.5	41.1±2.5
	8.0	39.2±1.6
<i>Lac. helveticus</i> 894	7.0	49.3±1.7
	8.0	47.2±1.4

배정도 더 낮다. 이것은 *Lac. helveticus* 1604에 의하여 생성된 펩티드들가운데서 안기오텐신변환효소에 대한 저해를 나타내는 펩티드들의 생성량이 *Lac. helveticus* 894보다 낮다는것을 보여준다.

3) 보관기일이 ACE저해물에 미치는 영향

발효가 끝난 다음 젖산발효제품들은 대체로 4°C 조건에 한주일정도 보관하는데 이 기간에 ACE저해물변화를 보았다.(그림 4)

그림 4에서 보는것처럼 첫 4일동안에 두 젖산균들에 의해 각각 발효된 우유용액에서 ACE저해물은 크게 달라지지 않았으나 5일째부터 점차 감소되어 7일째만에는 약 1.1배정도 감소된다. 그것은 젖산균에 의한 카제인의 물작용분해가 이 기간에도 계속 진행될뿐아니라 이미 생성된 펩티드들도 최종생성물인 아미노산까지 분해되어 젖산균의 영양원으로 리용되는 과정이 계속 진행되게 되는것과 관련될수 있다. 즉 이 과정에 ACE저해펩티드들도 분해되어 결과적으로 ACE저해물이 감소되는것 같다.

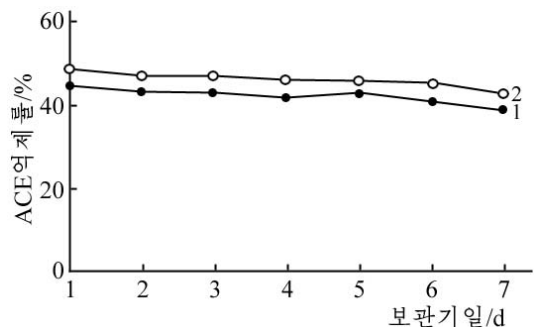


그림 4. 산유를 4°C에서 한주일간 보관하였을 때 ACE저해물의 변화

1-*Lac. helveticus* 1604, 2-*Lac. helveticus* 894

맺는말

- 1) *Lac. helveticus* 균주들로 발효시킨 우유의 ACE저해률은 발효온도 39~40°C, 발효시간 8~12h 사이에 최대로 된다.
- 2) *Lac. helveticus* 894의 펩티드생성량은 *Lac. helveticus* 1604에 비해 약 1.4배정도 낮았으나 ACE저해률은 약 1.2배 더 높았다.
- 3) 산유를 4°C에서 보관할 때 ACE저해률은 5일째부터 약간 감소되기 시작하여 7일째 만에는 약 1.1배 감소된다.

참고문헌

- [1] L. Ramchandran et al.; J. Food Science, 73, M368, 2008.
- [2] S. Maruyama et al.; Agric. Biol. Chem., 51, 6, 1581, 1987.
- [3] D. A. Clare et al.; J. Dairy Sci., 83, 1187, 2000.
- [4] O. N. Donkor et al.; International Dairy Journal, 17, 1321, 2007.

주체103(2014)년 5월 5일 원고접수

**The Effect of Fermentation Condition of Acidophilus Milk and
Some Factors on the Inhibition of Angiotensin
Converting Enzyme**

Kim Kum Hyok

The ability of peptides to inhibit the activity of angiotensin converting enzyme(ACE) in acidophilus milk(AM) fermented by *Lactobacillus helveticus* 1604 and *Lac. helveticus* 894 were measured by UV-Vis spectrometry.

The content of peptides in different culture condition(pH and temperature) was determined by protein measuring method, while the inhibition ratio(IR) of ACE by peptides in AM was calculated by His-His-Leu method

Key words: acidophilus milk, milk peptide, ACE