

in vitro gastrointestinal digestion 동안 gastric lipase가 조단백질 소화율에 미치는 영향

서강민*, 조현우*, 전중환*, 김찬호*, 정지연*, 김기현*, 전주란*

*농촌진흥청, 국립축산과학원

e-mail: julanchun@korea.kr

Effects of gastric lipase on crude protein digestibility during *in vitro* gastrointestinal digestion

Kangmin Seo*, Hyun-Woo Cho*, Jung-Hwon Jeon*, Chan Ho Kim*, Jiyeon Jung*, Ki Hyun Kim*, Ju Lan Chun*

*National Institute of Animal Science, Rural Development Administration

요 약

본 연구에서는 반려견을 위한 체외 위장관 소화모델 (*in vitro* gastrointestinal digestion model)의 구축을 목적으로 위장에서 분비/작용된다고 알려진 gastric lipase의 첨가가 시험관 소화모델에서 단백질의 소화율에 미치는 영향을 확인하고자 실시되었다. *in vitro* 위장관 소화는 Biagi 등(2016)이 제안한 반려견을 위한 체외 위장관 소화모델을 참고하여 실시하였다. gastric lipase는 위장 소화 단계에서 첨가 후 위장(39°C, 2 hr.)과 소장 (39°C, 4 hr.) 단계에서 소화 후 비소화 분획을 분리하여 Cunniff (1995)의 방법에 따라 조단백질(Crude protein; CP)의 소화율을 측정하였다. 가소화건물(Dry matter; DM) 소화율은 위장 소화단계에서 무처리군(Control)은 56.53%, gastric lipase 처리군 (GL) 그룹은 57.82%의 소화율을 보여주었으며, 소장 소화단계의 경우 Control 68.54%, GL 은 67.29%의 소화율을 보여주었다. 하지만, DM과 CP 소화율에서 Control과 GL 사이에서 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$). CP 소화율은 위장 소화단계에서 Control은 73.60%, GL은 74.22%의 소화율을 보여주었으며, 소장 소화단계의 경우 Control 86.27%, GL은 86.50%의 소화율을 보여주었으며, DM과 CP 소화율 모두 Control과 GL 사이에서 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$). 우리는 다양한 조성분(단백질, 지방, 탄수화물 등)에 의해 조밀한 매트릭스 구조를 갖는 사료가 위장에서 gastric lipase에 의하여 변화하고, 결과적으로 pepsin 효소에 의한 조단백질의 소화를 촉진 할 수 있다고 예상 했다. 하지만, 우리의 연구결과는 gastric lipase의 존재가 DM과 CP의 소화율에는 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다. 이와 같은 연구결과는 반려견의 체외 위장관 소화 모델의 개발을 위해 gastric lipase의 적용을 검토하는데 기여할 수 있을 것이다. 또한, 본 연구의 보다 명확한 검증을 위해서는 향후, 사료의 다양한 입자크기와 gastric lipase에 의한 다른 조성분 (지방, 탄수화물)들의 소화율에 미치는 영향에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

1. 서론

생체의 소화 과정을 시험관 내에서 시뮬레이션하는 체외 위장관 소화모델(*in vitro* gastrointestinal digestion model)은 재현성과 제어된 조건의 선택 등의 장점을 바탕으로 영양소 및 비영양소의 생물학적 접근성 또는 영양소 (예: 지질, 단백질 및 탄수화물)의 소화율 등의 분석이 가능하고 새로운 가설을 스크리닝하고 구축하는데 적합한 것으로 알려져 있다. 게다가, 최근에는 윤리적으로 논쟁의 여지가 있는 동물실험을 보완하기 위한 대안으로써 식품 및 영양학 분야에서 주목받고 있다. 한편, 이와 같은 실험방법은 구강, 위, 소장 및 대장의 생리적 조건을 선택적으로 모방하기 때문에 각 소화단계의 생리적 조건 (소화 효소 및 농도, pH 및 소화 시간 등)의

매개변수들이 신중히 고려되어야 한다[1]. 한편, 1901년 Volhard (1901)[2]은 인간의 위액에서 Triacylglycerols의 가수분해 능력을 갖는 gastric lipase의 발견을 시작으로 다양한 종류의 포유동물에서 그 존재가 확인 되었다[3]. 하지만, 현재까지 이 효소의 생리학적 역할과 중요성에 대해 여전히 불분명한 점이 존재한다[4]. 이와 같은 이유에서, 본 연구에서는 반려견을 위한 시험관 소화모델의 구축을 목적으로 위에서 분비/작용된다고 알려진 gastric lipase의 첨가가 시험관 소화모델에서 조단백질(Crude protein; CP)의 소화율에 미치는 영향을 확인하고자 실시되었다.

2. 실험 방법

2.1. 실험 사료

실험에 사용된 사료는 엑스트루전 타입의 시판 반려견용 사

료가 사용되었다(표 1). 실험 사료는 분쇄 후 sieve shaker (> 1.00 mm)를 이용하여 1 mm 이하의 입자 크기만 분리 하였고, dryoven (65°C)에서 일정한 중량이 될 때까지 건조하여 사용 되었다.

2.2. 체외 위장관 소화

체외 위장관 소화는 Biagi등(2016)[5]이 제안한 반려견을 위한 체외 위장관 소화모델을 참고하여 위와 소장 단계의 소화 과정을 시뮬레이션하여 아래와 같은 방법으로 실시되었다. 실험사료 10 g, 0.1 M phosphate buffer (pH= 6.0) 270 ml 그리고 0.2 M HCl 110 ml를 삼각플라스크에 첨가한 후, 0.1 M HCl를 이용하여 pH 2.0으로 조절하였다. 이어서, pepsin 용액 (256 mg/ml; #P7000, ≥250 units/mg, Sigma-Aldrich) 5 ml, gastric lipase 용액(80 mg/ml; #80612, ≥30 units/mg, Sigma-Aldrich) 5 ml 그리고, Chloramphenicol 용액(50 mg/ml EtOH; #C-0378, Sigma-Aldrich) 1 ml을 첨가 후 진탕항온수조에서 2시간 동안 39°C, 150 rpm 조건을 유지하였다. 체외 위장 소화 후 소장의 생리적 환경의 시뮬레이션을 위하여 소화액이 담긴 삼각플라스크에 0.2 M phosphate buffer (pH= 6.8) 260 ml 그리고 0.6 M NaOH 130 ml를 혼합한 후 0.1 M NaOH를 이용하여 pH 6.8로 조절하였다. 이어서, Bile salts (25 g/L; #13805, Merck Millipore) 20 g, Pancreatin (10 g/L; #P7545, 8 × USP specifications, Sigma-Aldrich) 4 g을 첨가 후 진탕항온수조에서 4시간 동안 39°C, 170 rpm 조건을 유지 하였다. 모든 체외 위장관 소화가 종료된 후 비소화 분획은 원심분리(3000 × g, 10 min, 4°C)후, 증류수로 2회 세척하고, 다시 원심분리 (3000 × g, 10 min, 4°C)하여 비소화물을 수집 하였으며, 일정한 중량이 될 때까지 65°C에서 건조 후 무게를 측정하였다.

2.3. 조단백질 소화율 분석

실험사료와 비소화물은 Cuniff (1995)[6]의 방법에 따라 조단백질(Crude protein; CP)을 분석하였으며 소화율은 다음과 같은 계산식(1)을 통하여 산출하였다.

(1)

$$\text{Crude protein digestibility}(\%) = \left(\frac{\text{feed CP, g} - \text{residue CP, g}}{\text{feed CP, g}} \right) \times 100$$

[표 1] 실험사료 화학적 조성

Items	Experimental diet
Crude Protein, %	33
Ether Extract, %	20
Crude Fiber, %	3
Crude Ash, %	13
NFE, %	19
Moisture, %	12
ME, kcal/kg	4,000

Values are calculated value and dry matter basis. NFE, Nitrogen free extract; ME, Metabolic Energy.

3. 결과

표 2와 표 3에는 Biagi 등이(2016)[5] 제안한 반려견을 위한 체외 위장관 소화모델에서 gastric lipase의 첨가가 DM과 CP의 소화율에 미치는 영향을 나타내었다. DM 소화율은 위장 소화단계에서 Control은 56.53%, GL은 57.82%의 소화율을 보여주었으며, 소장 소화단계의 경우 Control 68.54%, GL은 67.29%의 소화율을 보여주었다. 하지만, DM과 CP 소화율에서 Control과 GL 사이에서 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$). CP 소화율은 위장 소화단계에서 Control은 73.60%, GL은 74.22%의 소화율을 보여주었으며, 소장 소화단계의 경우 Control 86.27%, GL은 86.50%의 소화율을 보여주었으며, DM과 CP 소화율 모두 Control과 GL 사이에서 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$).

[표 2] Effect of gastric lipase on DM digestibility during *in vitro* gastro-intestinal digestion

Digestion phase	Control	GL	p value
Gastric phase, %	56.53 ± 0.17	57.82 ± 0.58	0.17
Intestinal phase, %	68.54 ± 1.85	67.29 ± 2.16	0.68

The results were expressed as mean ± SEM. GL; gastric Lipase. DM; dry matter digestibility.

[표 3] Effect of gastric lipase on CP digestibility during *in vitro* gastro-intestinal digestion

Digestion phase	Control	GL	p value
Gastric phase, %	73.60 ± 0.09	74.22 ± 0.64	0.44
Intestinal phase, %	86.27 ± 0.38	86.50 ± 0.27	0.66

The results were expressed as mean ± SEM. GL; gastric Lipase. CP: crude protein as % in dry matter.

4. 결론 및 고찰

과거의 연구자들은 위장에서 gastric lipase의 활성화는 위장과 소장에서 지방의 소화를 촉진 할 수 있다고 제안한 바 있다[7]. 따라서, 우리는 다양한 성분(단백질, 지방, 탄수화물 등)으로 구성된 사료의 조밀한 매트릭스 구조가 위장 소화과정에서 gastric lipase에 의하여 변화하고, 결과적으로 pepsin 효소에 의한 단백질의 소화작용을 촉진 할 수 있다고 예상 했다. 하지만, 우리의 연구결과는 gastric lipase의 존재가 DM과 CP의 소화율에는 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다. 이와 같은 연구결과는 반려견의 체외 위장관 소화 모델의 개발을 위해 gastric lipase의 적용을 검토하는데 기여할 수 있을 것이다. 본 연구의 보다 명확한 검증을 위해서는 향후, 사

료의 다양한 입자크기와 다른 조성분 (탄수화물, 지방)들의 소화율에 미치는 영향에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- [1] Minekus, M., Alvinger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Brodtkorb, A. "A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus". *Food & function*, 5(6), 1113-1124, 2014.
- [2] Volhard, F. "Über das fettsplattende Ferment des Magens: Habilitationsschrift einer hohen medicinischen Fakultät der Grossherzoglich Hessischen Ludwigs-Iniversität Giessen zur Erlangung der Venia legendi" (Doctoral dissertation, Verlag nicht ermittelbar). 1901.
- [3] Carriere, F., Moreau, H., Raphel, V., Laugier, R., Benicourt, C., Junien, J. L., & Verger, R. "Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase". *European Journal of Biochemistry*, 202(1), 75-83. 1991.
- [4] Carrière, F., Raphel, V., Moreau, H., Bernadac, A., Devaux, M. A., Grimaud, R., ... & Verger, R. "Dog gastric lipase: Stimulation of its secretion in vivo and cytolocalization in mucous pit cells. *Gastroenterology*". 102(5), 1535-1545. 1992.
- [5] Biagi, G., Cipollini, I., Grandi, M., Pinna, C., Vecchiato, C. G., & Zaghini, G. "A new in vitro method to evaluate digestibility of commercial diets for dogs". *Italian Journal of Animal Science*, 15(4), 617-625. 2016.
- [6] Cunniff, P. "AOAC international. Official methods of analysis of AOAC International". 16th ed. p.448, AOAC International, pp.382 - 382. 1995.
- [7] Carriere, F., Laugier, R., Barrowman, J. A., Douchet, I., Priymenko, N., & Verger, R. "Gastric and pancreatic lipase levels during a test meal in dogs". *Scandinavian journal of gastroenterology*, 28(5), 443-454. 1993.