

한우에서 추출한 Myosin B의 Pepsin 가수분해물의 Ultrafiltration 에 의한 Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해 활성 분석

김영주 · 최담미 · 진구복*

전남대학교 동물자원학부 식육과학연구소

서 론

현대인들의 성인병 중 고혈압은 순환기계 질병의 원인이 되면서 뇌출혈, 심장병 및 신장병 등과 합병증이 될 경우 치사율이 높은 질환으로 혈압강하를 위한 연구들이 행하여졌다. 화학적으로 합성되어 사용되어오고 있는 enalapril, benazepril, captopril 등의 합성 고혈압 억제제들은 급격한 강압효과를 유발하며 두통과 기침, 피부발진, 빈혈, 백혈구 감소 등의 부작용이 많아 안전하고 부작용이 적은 천연의 혈압 저해제 개발이 요구되어졌다⁽¹⁾. 혈압조절 시스템에서 혈압의 상승과 유지에 중요한 작용을 하는 효소인 Angiotensin-I converting enzyme(ACE)는 C말단에서 dipeptide인 His-Leu를 분리하여 octapeptide인 angiotensin II를 생성하고 강한 혈관확장작용을 가지는 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화 시키는 효소이다^(2,3). 천연의 ACE 저해제에 대한 연구가 진행되면서 참치근육의 산 추출물⁽⁴⁾과 다양한 발효식품으로부터 ACE 저해 펩티드의 존재가 보고되었으며⁽⁵⁾ 동물의 유즙으로부터도 ACE활성을 띄어 우유단백질로부터 ACE 저해 peptide에 대한 연구가 이루어졌다^(6,7). 이러한 천연에서 얻어진 ACE 억제 peptide는 안전성에서는 좋지만 ACE 저해에 대한 역가가 captopril에 비해 낮아 보다 효능이 좋은 ACE 저해활성을 갖는 천연물질에 대한 연구가 계속 이루어지고 있다⁽⁸⁾. 이와 관련하여 본 연구에서는 한우로부터 혈압조절 기능성 성분의 발견 및 ACE 억제 활성 peptide를 분리하기 위해 pepsin으로 단백질을 가수분해처리하여 얻은 가수분해물들의 ACE 저해활성도를 가수분해 시간별로 비교하여, 가장 활성이 좋은 가수분해물을 ultrafiltration을 이용하여 ACE 저해 활성도를 확인하여 차후 ACE 저해 peptide의 서열을 확인하기 위한 실험을 위한 단계로 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

본 실험에서 사용한 한우는 등심과 우둔을 식육도매점에서 구입하여 외부지방과 결체조직을 제거하고 Weber-Edsall solution (0.6 M KCl, 0.04 M NaHCO₃, 0.01M Na₂CO₃)과 섞어 4°C에서 40시간동안 교반 후 0.6 M KCl과 1:2의 비율로 섞어 상등액을 취해 증류수로 15배 희석하여 12,000× G에서 30분간 원심분리를 실시하여 얻은 Myosin B의 농도를 Lowry-Folin method (1951)⁽⁹⁾ 로 측정하였다. 가수분해 반응은 효소(pepsin):기질의 비를 1:100으로 하고 37°C에서 0, 1, 3 및 6시간 간격으로 반응시켰다. 97°C에서 10분간 가열함으로써 효소를 불활

성화 시킨 후, 15,000× G에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 취해 Lowry 정량⁽⁹⁾을 하였다. ACE 저해효과의 측정은 Cushman과 Cheung (1971)⁽¹⁰⁾의 방법을 변형하여 실시하였으며, 228 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의하여 ACE 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = (E_c - E_s) / (E_c - E_b) * 100$$

E_c = 시료 대신 증류수 첨가 시의 흡광도

E_s = 시료 첨가 시의 흡광도

E_b = 반응정지 후 시료 첨가 시의 흡광도

ACE 억제 활성도가 가장 좋은 시간처리구의 가수분해물 시료를 고분자량의 분획과 저분자량의 분획으로 나누기 위해서 PM-10 membrane(MWCO, 10,000; Amicon Co., Beverly, MA)를 이용하여 ultrafiltration을 실시하였다. 10,000 dalton 이상의 가수분해물과 10,000 dalton 이하의 가수분해물의 ACE 저해율을 위와 같은 방법으로 실시하였다.

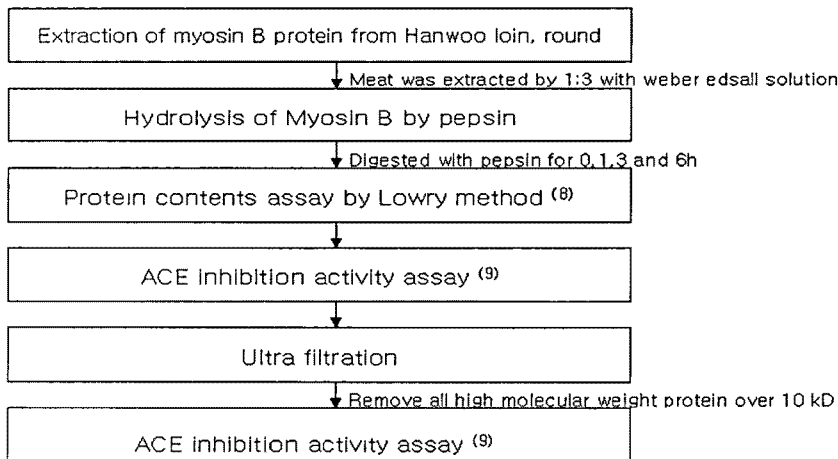


Fig. 1. Flow chart of ACE inhibitory activity(%) assay.

결과 및 고찰

등심과 우둔의 단백질 함량은 61.55와 24.2 mg/mL이었는데 pepsin으로 가수분해시킨 결과 단백질의 함량이 감소한 것을 알 수 있었다. 이는 가수분해 효소에 의해서 단백질이 쪼개져 농도가 감소한 것으로 사료되고, 우둔은 가수분해 시간별로 단백질의 함량이 유사하였으나 등심은 우둔에 비해서 고농도의 단백질이었으며 3시간 동안 가수분해 시킨 처리구에서 단백질의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다(Table 1). 단백질 가수분해 효소 pepsin에 의한 가수분해산물들의 ACE 저해활성을 가수분해 시간과 부위별 차이에 따라 비교하였다. 등심에서는 1, 3 및 6시간에서 ACE 저해활성을 보였으며, 우둔에서는 0, 1, 3 및 6시간의 모든 처리구에서 ACE 저해활성을 보였다(Table 2). 등심의 0시간 처리구에서 저해활성이 보이지 않았으며, 장 등⁽¹¹⁾도 염통 ACE 저해 효과 중 0시간 때에 ACE 저해 효과를 거의 볼 수 없었다고 보고하였다. 가수분해 시간이 경과함에 따라 단백질의 ACE 저해 효과가 증가할 것으로 보였으나, 본 실험 결과 등

심에서는 3시간 가수분해물이 44.5%로 가장 좋은 ACE 저해 활성을 보였으며 우둔에서는 가수분해 시간이 가장 많은 6시간 처리구에서 40.2%로 유의적으로 ACE 저해활성이 가장 높게 나타났다($p<0.05$). 한우의 부위별로 가수분해 시간에 따른 ACE 저해효과에서는 3시간과 6시간 가수분해물이 부위별로 유의적인 차이를 보였으며($p<0.05$), 가수분해시간이 경과함에 따라 ACE 저해 능력이 반드시 증가하지 않는다는 것을 알 수 있었으며, ACE 저해력을 갖는 단백질의 특이 서열의 존재와 그 서열이 가수분해에 의해 깨어지게 되었을 경우 저해 능력을 잃는 것으로 보였다. 따라서 pepsin으로 가수분해한 Myosin B 단백질의 ACE 저해 활성은 등심에서는 3시간, 우둔에서는 6시간 처리구에서 가장 좋았다. 이 가수분해물에서 우수한 ACE 저해활성을 보이는 peptide를 분리하고자 ultra filtration을 실시하여 분자량 10 kDa이상의 분획물과 10 kDa 이하의 분획물로 나눠 ACE 저해 활성을 측정하였다(Figure 2). 그 결과 10 kDa 이하 peptide의 ACE 저해활성도가 10 kDa 이상의 peptide에 비하여 높았다. 이는 folding 되어 있는 고분자 peptide가 가수분해에 의해서 분해, 변형되고 ultra filtration을 통해 10 kDa을 기준으로 분자량에 따라 분획이 나뉘지는데, 아미노산 서열이 ACE를 저해하기 좋은 위치에 있을 때 인 저분자 peptide 분획에서 ACE 저해율이 가장 좋았던 것으로 사료된다.

요 약

한우의 Myosin B 단백질을 단백질 가수분해 효소인 pepsin으로 처리한 다음 단백질의 함량과 혈압상승 펩티드 생성효소인 angiotensin-I converting enzyme(ACE)에 대한 저해활성을 측정

Table 1. Protein content (mg/mL) of raw myosin B treated by pepsin with various digestion times

	Digestion time(hrs)			
	0	1	3	6
Loin	4.52 ^b	6.68 ^b	9.39 ^{aX}	7.28 ^{bX}
Round	1.67	1.70	1.68 ^Y	1.68 ^Y

^{a,b} Means with same superscript having same row are not different ($p<0.05$).

^{X,Y} Means with same superscript having same column are not different ($p<0.05$).

Table 2. ACE inhibitory activity (%) of enzymatic hydrolysates from non-heated Korean native beef (round vs. loin) at different incubation times at 37°C

	Digestion time (hrs)			
	0	1	3	6
Loin	10.7	23.2 ^{ab}	44.5 ^{aX}	6.0a ^{bY}
Round	13.3	12.1	14.6 ^Y	40.2 ^X

^{a,b} Means with same superscript having same row are not different ($p<0.05$).

^{X,Y} Means with same superscript having same column are not different ($p<0.05$).

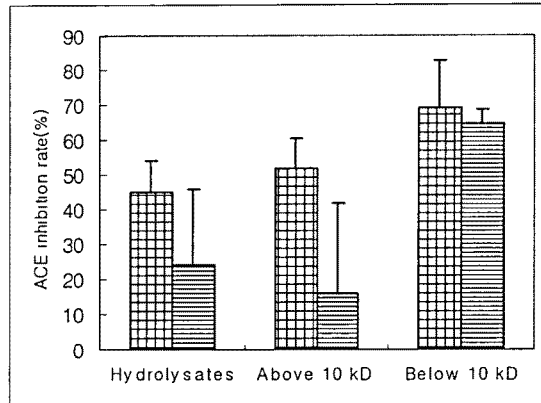


Fig. 2. ACE inhibitory activity (%) after ultrafiltration of hydrolysate for Korean native beef (田: 3hr-incubation of loin, □ : 6h-incubation of round).

하였다. 등심이 우둔에 비해 단백질의 함량이 높았으며, 가수분해 처리 후 우둔과 다르게 등심은 3시간 가수분해 처리구에서 단백질의 함량이 높게 나타났다. ACE 저해활성은 등심에서는 3시간, 우둔에서는 6시간동안 가수분해시켰을 때 ACE 저해율이 유의적으로 가장 높게 나타났으며, 3, 6시간동안 가수분해시켰을 경우 부위 별로 유의적인 차가 있었으나($p < 0.05$), 0, 1시간동안 가수분해 시켰을 때는 부위간의 유의적인 차는 없었다($p > 0.05$). ACE 저해율이 가장 좋은 가수분해 처리구를 ultrafiltration시킨 결과, 저분자 peptide 상태의 가수분해물이 고분자에 비하여 ACE 저해율이 높은 것으로 나타났다. 차후 ACE 억제활성도가 높은 단백질을 분리하여 가장 우수한 분획을 찾아 아미노산 염기서열을 밝혀 고혈압 억제제로 합성 개발하는 연구를 추진할 예정이다.

참고 문헌

1. Oh, K. S. et al. (2003) *Kor. J. Microbial. Biotechnol.* 31, 51-56.
2. Noh, H. et al. (2001) *Agric. Chem. Biotechnol.* 44, 98-99.
3. Oh, S. J. et al. (1997) *Korean J. Food Sci. Technol.* 29, 1316-1318.
4. Kohama, Y., et al. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 155, 332-337.
5. Okamoto, A., et al. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1147-1152.
6. 이정희., et al. (2002) 한국유가공기술과학회지. 20,110.
7. 김동운., et al. (2002) 한국유가공기술과학회지. 20, 9.
8. Yasantha Athukorala., et al. (2005) *J. Food Sci. Nutr.* 10, 134-139.
9. Lowry, OH. et al. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
10. Cushman, D. W and Cheung, H. S. (1971) *Biochem. Pharmacol.* 20, 1637-1647.
11. S. H. Jang. et al. (2003) *J. Anim. Sci. & Technol.* 45(2), 319-326.