

Purification and Screening of Bioactive  
Peptides from Enzyme Hydrolysates of  
Animal Protein

장 애 라 박사

이화여자대학교 식품영양학과



# Purification and screening of bioactive peptides from enzyme hydrolysates of animal protein

장애라

이화여대 식품영양학과

## 서 론

선진국에서는 주로 식물성 농산물 및 우유를 이용하여 여러 가지 질병을 치료하거나 특수한 건강 증진 효과를 가지는 기능성 식품을 많이 생산하고 있으나 식육에서는 거의 연구가 되어있지 않고 동물성 식품에서 연구도 미흡하다. 이러한 기술 개발을 위해서는 단백질이 주된 구성 요소인 저급 식육자원이 가지는 혈압 저하 기능성, 콜레스테롤 저하기능성, 면역 증진의 효과를 나타내는 펩타이드나 건강 증진 효과물질의 분리, 정제를 위한 기술개발이 요구된다. 이에 따른 펩타이드의 분리 및 정제를 위해서 적절한 효소를 이용한 단백질의 분해 조건의 개발이 필요하다. 점차로 소비자는 건강에 대한 관심의 증가로 식품의 생리활성에 관한 폭넓은 지식을 가지고 있을 것이며 결국 과학적 근거가 부족한 제품은 시장에서 사라질 위험이 있기 때문에 생산된 식육을 이용하여 우수한 기능성 식육제품을 생산할 수 있다면 국민건강에 이바지할 수 있을 뿐만 아니라 축산물 수입 개방에 대비하여 국내 축산의 기반을 유지시킬 수 있는 소비 촉진 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 식품내에 존재하는 생리활성조절 기능을 갖는 펩타이드에는 동물성 식품 유래의 호르몬류나 식물성 식품 유래의 효소저해 물질등과 같은 현재적 생리활성 펩타이드와 소화과정이나 식품 가공 과정 중에 부분가수분해 되어 생성되는 잠재적 생리 활성 펩타이드로 분류된다.(남희섭, 1999) 이 중에서 앞으로 주목되는 부분은 잠재적 생리활성 펩타이드라 할 수 있다. 잠재적 생리활성 펩타이드에는 그 효과에 따라 opioid 펩타이드류 (Christine, 1978), 혈관 수축저해 펩타이드류 (Manjusri, 1975) 콜레스테롤 흡수저해 펩타이드류(Kohji, 1999), 면역활성 펩타이드류(Jerome, 1996)등이 알려져 있다. 일본에서는 쇠고기에서 펩타이드를 추출하여 에너지 대사 촉진 소재로 다이어트 식품이나 스포츠 식품에 활용되어 선풍적인 인기를 얻고 있다. 콜라겐 펩타이드는 피층 콜라겐 대사촉진 작용에 의한 미용효과가 있음이 알려져 미용식으로의 개발이 기대되고 있다. 이외에도 참치에서 어육 단백질 유래의 혈압강화 펩타이드가 개발되어 이용되고 있는 실정이다. (남희섭, 1999) 부산물을 이용한 펩타이드의 이용면에서 보면 돈혈에서 채취한 혈청에서 Angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitors가 분리되어 이용되고 있다. ACE inhibitor는 강력한 혈관 수축신경으로 전환되는 것을 억제하기

때문에 항고혈압작용에 효과가 있다고 보고 되고 있다.( Keizo , 1999) Hughes et. al.(1975)은 morphine과 같은 작용 즉, 세포막의 아편제 수용체와 상호작용함으로써 아편제와 같은 효과를 나타내는 천연산 펩타이드 [Met<sup>5</sup>] enkephalin, [Leu<sup>5</sup>] enkephalin을 뇌에서 발견했으며, Lox et al(1975)은 뇌하수체로부터 [Met<sup>5</sup>] enkephalin과 작용이 유사한  $\beta$ -lipotropin을 발견했다. 그 외 다양한 식품 단백질 소재로부터 ACE 억제 인자의 분리, 추출이 이루어 졌다.(Ariyoshi, 1993) 국외에서는 기능성 펩타이드에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있는 반면에 국내의 기능성 식품소재의 개발은 아직도 미흡한 단계에 있다고 할 수 있다. 생리활성 펩타이드는 유제품에 CPP(칼슘 흡수 촉진 펩타이드)를 사용하는 것이 주류를 이루어 왔고 그 제품을 시장에서 볼 수가 있다. 콩에서는 혈압 강화 기능을 갖는 펩타이드가 개발되었고 라면, 요구르트, 두유 등의 식품에 사용되고 있다 (남희섭, 1999). 우유단백질에서 발견되는 생리 기능성 펩타이드에는 특히 casein에서 분자량이 1000-5000 dalton 사이의 소화흡수 되기 어려운 macropeptide가 생성되는 펩타이드 분획을 섭취한 흰쥐에서 혈청 콜레스테롤농도가 낮아졌다는 보고가 있으며, 혈소판응집 저해 활성 펩타이드도 보고되고 있다.(이형주, 1998) 또한 장등(2004)은 우유에서 효소를 이용하여 분리한 펩타이드 V-L-A-Q-Y-K가 138.34ug/ml의 IC50 값을 보이며 LDL-콜레스테롤이 61.3±1.7에서 36.4 ± 1.4mg의 함량으로 크게 감소했음을 보였다고 하였다.

## 본 론

### - 효소선정 및 분리 방법

#### 1. 최적 분해 조건을 탐색하기위한 상용 효소의 선정

효소에는 thermolysin, Potease A, Protease type XIII fungal, trypsin, protease K, tyrosinase, pepsin, papain, alcalase 등이 있다.

2. 각 효소의 최적 분해온도와 pH 조건으로 효소분해를 실시하여 분해정도를 측정하는 DH(Degree of hydrolysis)를 선정하여 분해한다.

3. 효소분해된 분획물을 분리 및 채취하여 펩타이드의 서열을 확인한 후 in vitro 에서 활성 확인

4. 활성이 확인 된 분획물을 in vivo (SHR을 이용) 실험하여 in vitro에서의 효과 비교 및 확인

#### 5. 확인된 분획물의 여러 다른 기능의 screening

- Antibacterial activity (paper disc assay ; S.typhimurium, E.Coli, Staph.aureus, P.aeruginosa, B. cereus, L.monocytogens)

- Cytotoxic activity (MCF-7, AGS, A549 cell)

- Machrophage stimulation activity

#### 6. 분리된 분획물이 pH와 열처리에 안정함을 확인

- 분리 기기

1. Ultra filtration (MW cut-off: 10,000Da, YM-10 membrane)
2. Gel filtration (Shephadex G-25 resin, XK 2.6mm x1m (Amersham pharmacia))
3. RP-HPLC (C18 Symmetry column, 300x2.1mm)
4. SDS-PAGE (12% polyacrylamide gel; marker : BSA (68KDa), Chymotrypsinogen A (25kDa), Cytochrome C (12.5kDa), Aprotinin (6.5kDa), Ristocetin A sulphate (2.5kDa), Pepstatin (686kDa))
5. Amino acids sequencer (Edman degradation, Model 491, Perkin Elmer, USA)

- Structural assay

Park 등은(1997) 돼지 혈액에서 gly-val-his-gly val 을 분리하여 ACE 억제효과가 2uM 의 IC50 value를 보인다고 하였다. 장 등(2004)은 펩타이드 V-L-A-Q-Y-K이 효과가 좋다고 하였으며 그 외 분리된 펩타이드의 ACE 억제 효과는 Table 1과 같다.

Table. 1. ACE inhibitory peptides derived from various protein sources.

ACE-inhibitory peptides	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	Reference
Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys	580	Pihlanto-Leppala et al. (1998)
Arg-Val-Tyr	205.6	Matsufuji et al. (1994)
Ile-Pro-Ala	141	Abubakar et al. (1998)
Val-Phe-Lys	1092	Pihlanto-Leppala et al. (2000)
Val-Leu-Asp-Thr-Thy-Lys	946	Pihlanto-Leppala et al. (2000)
Leu-Val-Arg	14	Maruyama et al. (1989)
Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg	42.6	Mullally et al. (1997)
Thr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile	500	Kayser and Meisel (1996)
His-Leu-Pro-Leu-Pro	23.6	Kohmura et al. (1989)
Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln	39	Yamamoto et al. (1994)
Gly-Pro-Val	25	Kim et al. (2001)
Leu-Leu-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gln-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Va	1.2	Yamamoto et al. (1994)
Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln	716.9	Gomez-Ruiz et al. (2002)
Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Val-Pro-Lys	>1000	Yamamoto et al. (1994)
Ile-Pro-Ala	141	Abubakar et al. (1998)
Tyr-His	5.1	Suetsuna et al. (2003)
Lys-Trp	10.8	
Lys-Tyr	7.7	
Lys-Phe	28.3	
Phe-Tyr	3.7	
Val-Trp	10.8	
Val-Phe	43.7	
Ile-Tyr	2.7	
Ile-Trp	12.4	
Val-Tyr	11.3	

Phe-Tyr	1.67	Matsui et al. (2002)
Lys-Phe	116	
Ile-Phe	930	
Ile-Val-Tyr	0.48	
Ile-Met-Tyr	1.80	
Asp-Gly-Leu	2.16	
Thr-Lys-Tyr	2.31	
Leu-Thr-Phe	2.73	
Phe-Asn-Phe	6.91	
Ala-Val-Leu	7.11	
Gly-Leu-Tyr	8.84	
Ser-Tyr	66.3	Suetsuna (1998)
Gly-Tyr	72.1	
Phe-Tyr	3.74	
Asn-Tyr	32.6	
Ser-Phe	130.2	
Gly-Phe	277.9	
Asn-Phe	46.3	Karaki et al. (1993)
Gly-Val-Tyr-Pro-His-Lys	1.6	
Ile-Arg-Pro-Val-Gln	1.5	

a Protein concentration needed to inhibit 50% the original ACE activity

이렇듯이 펩타이드의 기능은 그 펩타이드의 구조에 영향을 많이 받는다. Matsumura 등 (1993)은 tripeptide 즉 펩타이드가 valine이나 leucine/isoleucine으로 시작되거나 proline 으로 끝나면 강한 ACE 억제 효과를 갖는다고 보고하였다. Cheung 등(1980)은 펩타이드의 C-terminal에 아미노산이 가장 중요하게 ACE active site에 바인딩하며 가장 흔히 결합되는 아미노산은 tryptophan, tyrosine, phenylalanine과 proline 이라고 하였다.

#### Synthetic peptide

아직 구조에 입각한 ACE 억제 활성이 확실하게 정립된 것은 아니지만 이러한 펩타이드는 공통된 구조를 보이기 때문에 제약회사 등지에서는 비슷한 구조로 합성하여 그 기능을 탐색하고 있다.

#### Safe product (toxicity of peptides)

최근 다양한 ACE 억제 펩타이드들이 식품원료에서 분리되고 있으나 많은 ACE 억제물들이 필수적으로 소수성이고 또는 방향족 아미노산 잔기의 구조를 이루고 있다. 따라서 이들의 쓴맛 때문에 분리해서 직접 식품으로 적용할 수는 없다. 그 외의 부작용의 여지도 확인하여 안전성을 확보하는 것이 필요하다.

## 결 론

동물성 식품에서 효소를 이용하여 생리활성기능을 갖는 펩타이드의 분리가 활발하게 이루어지고 있다. 이에 원하는 펩타이드의 분리를 위해 size와 구조특성에 알맞은 분리 방법의 선택이 필수적이며 분리된 펩타이드의 서열분석 및 생리활성기능의 screening 방법을 정확하게 이용하는 것이 필요하다. 또한 분리된 펩타이드의 안정성을 pH 와 온도 중심으로 확인하는 작업이 요구된다.

## 참 고 문 헌

Cheung, H.-S., Wang, F.-L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F., & Cushman, D.W. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.* 25, 255 (2), 401-407

Christine Zioudrou, Richard A. Streaty, Werner .A. Klee. 1978 . Opioid Peptides Drived from Food Proteins. *J. Biol Chem.* Vol. 254. No. 7. April 10. pp. 2446-2449

Jang, A., Cho,Y.J., Lee, J.I., Shin, J.H., Kim, I.S., & Lee, M. 2004. The Effect of Beef Peptide on Blood Pressure and Serum Lipid Concentration of Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor)*, 46(1), 147-114

Jerome C. Pekas. 1996. Immunogenicity of Choecystokinin Octapeptide-Conjugated Antigens in Pig. *J. Anim. Sci.* 74 : 1953-1958

Karaki Hideaki, Kuwahara Masayoshi, Sugano Shigeru, Doi Chiyo, Doi Kunio, Matsumura Nobuyasu and Shimizu Toshio.1993. Oral administration of peptides derived from bonito bowels decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats by inhibiting angiotensin converting enzyme *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, Volume 104, Issue 2, Part 3, February .Pages 351-353

Matsui T, Yukiyoishi A, Doi S, Sugimoto H, Yamada H, and Matsumoto K. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR .*The Journal of Nutritional Biochemistry*, Volume 13, Issue 2, February 2002, pp 80-86

Matsumura, N., Fugii, M., Takeda, Y., Sugita, K. and Shimizu, T. 1993. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from dried bonito bowels autolysate.*Biosci.Biotechnol.Biochm.*57:695-673

Suetsuna K. 1998. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from the red alga *Porphyra yezoensis*. *Mar Biotechnol* -a: 6:163-167.

이형주. 1998. 유제품의 기능성 펩타이드. 한국 유가공 기술 과학회, 우유 및 유제품의 기능성. 22-29

남희섭. 1999. 생리활성 펩타이드의 개발 및 시장동향. *식품산업과 영양* 4(2). 17-19