

멸치육 단백질 효소가수분해물로부터 Angiotensin-I 전환효소 저해제의 분리 및 그 특성

김선봉 · 이태기 · 박영범 · 염동민* · 김외경 · 도정룡** · 박영호
부산수산대학교 식품공학과 · *양산전문대학 식품영양과
**한국식품개발연구원

Isolation and Characteristics of Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptic Hydrolyzates of Anchovy Muscle Protein

Seon-Bong KIM · Tae-Gee LEE · Yeung-Beom PARK · Dong-Min YEUM* ·
Oi-Kyung KIM · Jeong-Ryong DO** and Yeung-Ho PARK

*Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea*

**Department of Food and Nutrition, Yangsan Junior College, Yangsan 628-800, Korea*

***Korea Food Research Institute, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea*

Hydrolyzates which inhibit the angiotensin-I converting enzyme(ACE) were prepared from defatted anchovy meal by pepsin. These were tested for inhibitory activity against ACE, which is one of the hypertension inducing factors.

The ACE inhibitory activity of the hydrolyzates increased until 20hrs of hydrolysis had elapsed but slightly decreased after that time. And presence of 50% ethanol soluble peptide-nitrogen increased slowly up to 12hrs of hydrolysis, and then mainly increased until 20hrs of hydrolysis was completed.

From the profiles of gel permeation chromatography on a Bio-gel P-2 of 50% ethanol soluble fraction obtained from hydrolyzate for 20hrs, the higher active fractions were 2' (IC₅₀=45 µg protein/ml) and 4'(IC₅₀=76 µg protein/ml). Amino acid analysis showed major quantities of glutamic acid, leucine, lysine for 2' and aspartic acid, threonine for 4' respectively.

서 론

식품중에 함유되고 있는 성분에 의하여 노화나 발암 등 신체장애의 원인이나 돌연변이원성물질의 생성억제 및 불활성화와 생체의 대사조절기능 등의 해명에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 식품성분이 갖는 생체조절기능 중 최근 식품단

백질의 소화효소에 의한 가수분해물로부터 진통작용을 나타내는 opioid peptide나 혈압상승요인의 하나인 angiotensin-I 전환효소(ACE)의 저해작용을 가진 peptide가 많이 발견되고 있으며(Yoshikawa *et al.*, 1984, 1986; Tani *et al.*, 1990; Maruyama *et al.*, 1985, 1987; 千葉와 吉川, 1987, 1991; Matsumura *et al.*, 1993). 이러한 생리활성을 가지는 peptide의 화

이 연구는 한국과학재단지정 우수공학연구센터인 해양산업개발연구소의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

학적합성이나 protease에 의한 생합성 등에 많은 관심이 모아지고 있다.

이와같이 식품중의 중요한 구성성분으로 함유되어 있는 단백질이 효소에 의하여 가수분해되면 여러가지 생리활성을 가지는 peptide가 생성될 것으로 생각된다.

특히 ACE는 불활성인 angiotensin-I의 C말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin-II로 전환시켜 혈압을 상승시킴과 동시에 생체 내에서 혈압강하작용을 갖는 bradykinin을 분해하여 불활성화시킴으로서 고혈압의 원인이 되고 있다(Manjusri and Richard, 1975; 池本 等, 1981; Horovitz, 1981; 大久保, 1991).

따라서 본 연구에서는 성인병의 하나인 고혈압의 예방과 수산자원의 고도 이용뿐만 아니라 식사요법의 면에서 ACE 저해작용을 갖는 어육 유래 peptide 성분의 특성을 밝히고자 젓갈 및 자건품으로서 널리 이용하고 있는 멸치육 단백질을 소화효소인 pepsin으로 가수분해하여 그 효소가수분해물의 angiotensin-I 전환효소 저해작용에 대하여 살펴 보았다.

재료 및 방법

1. 실험재료

멸치육 단백질은 선도가 양호한 멸치(*Engraulis japonica*, 체중: 8~16g, 체장: 11~15cm)의 육만을 취하여 세절 마쇄하고 여기에 5배량의 chloroform/methanol(3:2)혼합액을 가하여 어두운 곳에서 24시간 방치시킨 후, 흡인 여과한 다음 잔사를 진공 동결건조하여 마쇄하고 200mesh 체로 거른 분말을 멸치육 단백질로 하였다. 단백질분해효소는 pepsin(Sigma Co.)을 사용하여 단백질의 가수분해에 사용하였다.

Angiotensin-I 전환효소(ACE)는 토끼의 허파로부터 얻은 아세톤 침전분말(Sigma Co.) 1g에 봉산 완충액(pH 8.3) 10ml를 가하여 5℃에서 24시간 교반한 후, 원심분리(10,000rpm, 30분)하여 얻은 상층액을 조효소액으로 하였으며, 기질로는 hippuryl-His-Leu(Sigma Co.)를 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 멸치육 단백질 가수분해물의 제조

멸치육 단백질 가수분해물의 제조는 탈지분말시료에 10배량의 증류수를 가한 다음, pepsin(pH 2.0,

37℃)에서 가수분해시켰다.

(2) 단백질 및 peptide-nitrogen 함량

가수분해시간에 따른 단백질 함량 및 시료단백질 mg당 peptide-nitrogen의 생성량의 변화는 Lowry법(Lowry *et al.*, 1951) 및 개량 biuret법(Uemoto, 1966)으로 측정하였다.

(3) Angiotensin-I 전환효소(ACE) 저해작용의 측정

ACE 저해작용은 Cushman과 Cheung(1971)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 소정농도의 단백질 가수분해물 50 μl에 ACE 조효소액 50 μl 및 봉산완충액(pH 8.3) 100 μl를 가한 후, 37℃에서 5분간 preincubation시켰다. 여기에 기질로써 hippuryl-His-Leu 용액(25mg/2.5ml 봉산완충액) 50 μl를 가하여 다시 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 250 μl를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 1.5ml를 가하여 15초간 교반한 후, 3,000 rpm에서 5분간 원심분리시켜 상층액 1ml를 취하였다. 이 상층액을 완전히 건조시킨 뒤 증류수 3ml를 가하여 용해시키고 228nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 가수분해물 첨가 전후의 백분율로써 ACE 저해율을 나타내었다.

(4) Gel 여과에 의한 멸치육 단백질 가수분해물의 분획

Bio-Gel P-2(Bio-Rad사)를 충전한 column(φ 2.2 × 80cm)을 사용하여 멸치육 단백질 가수분해물 1g을 2ml의 증류수에 용해시켜 20ml/hr의 유속으로 용출시켰다. 이 때 용출액 5ml씩을 받아 280nm에서의 흡광도 및 Lowry법(Lowry *et al.*, 1951)에 의한 단백질의 함량을 구하였다.

(5) 아미노산의 분석

시료 0.2g을 ample에 넣고, 6N HCl 10ml를 가하여 질소가스로 치환한 뒤 봉한 다음, 110℃ sand bath에서 24시간 가수분해하였다. 분해액을 glass filter로 여과하고 감압건고하여 HCl을 완전히 제거한 다음 증류수 10ml를 가하여 다시 감압건고한 후, 구연산 완충액(pH 2.2)으로써 25ml로 정용하였다. 이의 일정량을 취하여 아미노산 자동분석기(LKB 4150)로서 정량하였다.

결과 및 고찰

소화효소에 의한 멸치육 단백질 가수분해물의 ACE 저해효과

Angiotensin-I 전환효소(ACE)는 불활성인 angio-

tensin-I의 C말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin-II로 전환시킴으로서 혈압상승의 요인의 하나로 알려져 있다.

멸치육 단백질 가수분해물의 ACE 저해작용에 가수분해중에 생성되는 peptide의 역할을 검토하기 위하여 생체내 소화효소인 pepsin을 사용하여 가수분해시간에 따른 멸치육 단백질 가수분해중의 peptide-nitrogen 생성량의 변화를 살펴본 결과(Fig. 1), 가수분해 12시간까지는 peptide-nitrogen 생성량이 서서히 증가하다가 그 후 20시간까지 급격히 증가하였다.

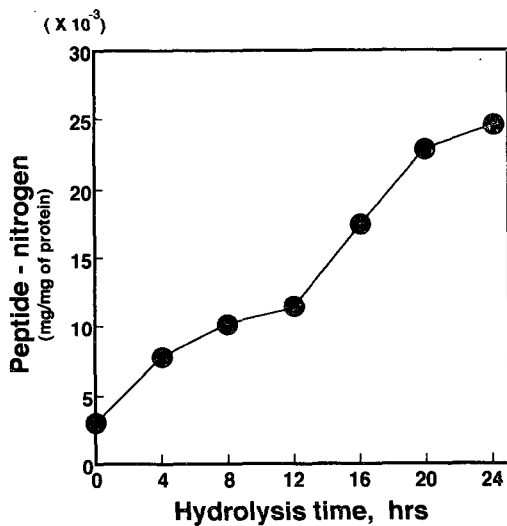


Fig. 1. Production of 50% ethanol soluble peptide-nitrogen in peptic hydrolyzates* of anchovy muscle protein according to hydrolysis time.

* Anchovy muscle protein was hydrolyzed with 2 % pepsin(pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg of protein).

따라서 이러한 peptide-nitrogen 생성량과 ACE 저해작용과의 상관관계를 알아보기 위하여 가수분해에 따른 ACE 저해효과를 살펴본 결과(Table 1), peptide-nitrogen 생성량이 급격히 증가하는 가수분해 20시간째에 ACE 저해효과가 55%로 가장 높았고 그 후 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

이러한 결과로 미루어 ACE 저해작용은 가수분해중에 생성되는 peptide와 매우 밀접한 상관관계가 있는 것으로 생각된다. 또한 24시간 가수분해시 ACE 저해작용이 다소 감소되는 것은 가수분해에 의해 생성된 ACE 저해작용을 나타내는 peptide가 가수분해의 진행에 따라 다시 분해되어 peptide의

사슬 길이나 구조 및 아미노산 배열이 달라지기 때문인 것으로 생각된다. 이로 미루어 소화효소에 의하여 ACE 저해작용을 가진 peptide가 기질단백질로부터 생성되는 한편 생성된 활성 peptide는 분해될 수도 있음을 알 수 있다.

Table 1. ACE inhibition effect of peptic hydrolyzates* of anchovy muscle protein according to hydrolysis time

Hydrolysis time, hrs	ACE inhibition ratio, %**
0	36.9
4	39.3
8	40.4
12	41.8
16	41.8
20	55.0
24	38.0

* Anchovy muscle protein was hydrolyzed with 2% pepsin(pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg of protein).

** ACE inhibition ratio was determined with 50 µl of hydrolyzate containing 50 µg of peptide-nitrogen.

소화효소에 의한 멸치육 단백질 가수분해물로부터 분리한 ACE 저해인자의 정제 및 특성

소화효소인 pepsin을 이용한 멸치육 단백질 가수분해물 중에 함유되고 있는 ACE 저해인자를 보다 구체적으로 살펴보기 위하여 멸치육 단백질 가수분해물을 사용하여 Bio-gel P-2로 gel 여과를 실시하고 각 획분별 280nm에서의 흡광도 및 단백질함량을 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과, peptide-nitrogen의 생성량이 급격히 상승하며 ACE 저해효과 또한 가장 우수하게 나타난 20시간째의 가수분해물로부터 8개의 획분을 얻었다.

분리된 각 획분들의 단백질 함량을 동일하게 조정 한 후 ACE 저해효과를 살펴본 결과(Table 2), 획분 2와 획분 4가 가장 우수한 것으로 나타나 이들을 rechromatography한 결과(Fig. 3), 각각 단일 획분을 얻을 수 있었다. 이때 분리된 2'와 4'획분의 IC₅₀(ACE의 활성을 50% 억제하는데 요구되는 저해제의 양)은 각각 45, 76 µg인 것으로 나타났다 (Table 3).

이들 획분의 아미노산 조성을 살펴본 결과(Table 4), 이들 두 획분의 아미노산 조성은 다소 차이가

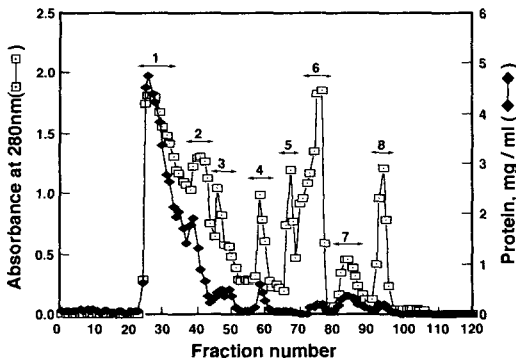


Fig. 2. Gel chromatogram on a Bio-Gel P-2 column of 50% ethanol soluble fraction obtained from peptic hydrolyzate* of anchovy muscle protein. * Anchovy muscle protein was hydrolyzed with 2% pepsin(pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg of protein) for 20 hrs.

Table 2. ACE inhibition effect of each fraction fractionated from peptic hydrolyzate* of anchovy muscle protein on a Bio-Gel P-2 column

Fractions**	ACE inhibition ratio, %
Part 1(Fraction No. 25~37)	17.3
Part 2(Fraction No. 38~44)	20.8
Part 3(Fraction No. 45~51)	4.7
Part 4(Fraction No. 57~61)	23.9
Part 5(Fraction No. 65~69)	7.8
Part 6(Fraction No. 70~77)	6.2
Part 7(Fraction No. 81~88)	4.3
Part 8(Fraction No. 92~96)	-

* Anchovy muscle protein was hydrolyzed with 2% pepsin(pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg protein).

** ACE inhibition was determined with 50 µl of each fraction containing 50 µg of peptide-nitrogen.

Table 3. IC₅₀ of active fraction 2' and 4' fractionated from peptide hydrolyzate* of anchovy muscle protein on a Bio-Gel P-2 column

Fractions**	IC ₅₀ (µg protein/ml)
2'	45
4'	76

* Anchovy muscle protein was hydrolyzed with 2% pepsin(pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg protein).

** ACE inhibition was determined with 50 µl of each fraction containing 50 µg of peptide-nitrogen.

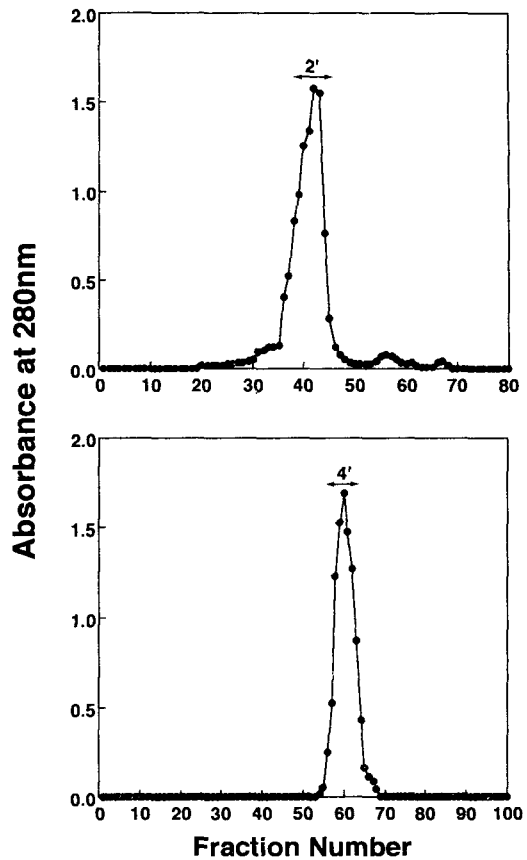


Fig. 3. Rechromatogram on a Bio-Gel P-2 column of active fraction 2' and 4' from peptic hydrolyzate of anchovy muscle protein.

있었으며, 2'획분은 glutamic acid, leucine 및 lysine의 함량이 많은 것으로 나타났으며, 4'획분은 aspartic acid와 threonine의 함량이 많은 것으로 나타났다.

이와 관련하여 ACE 저해작용을 갖는 고등어 근육단백질의 복합효소 및 bromelain에 의한 가수분해물의 아미노산 조성에 대하여 염 등(1992)은 aspartic acid, glutamic acid, lysine, leucine, valine 및 alanine의 함량이 많은 것으로 보고하였다.

또한 Matsumura *et al.*(1993)은 가다랭이 내장으로부터 ACE 저해작용을 나타내는 6종류의 peptide를 분리하여 이들의 아미노산 배열순서를 밝히고, 이를 기초로 peptide를 화학적으로 합성한 것의 ACE 저해작용을 검토하였다. 그 결과 이들중 특히 강한 ACE 저해작용을 나타내는 4종류의 tripeptide들은 공통적으로 N말단 아미노산 잔기로서는 valine, isoleucine 및 leucine과 같은 소수성 아미노

Table 4. Amino acid composition of active fraction 2' and 4' fractionated from peptic hydrolyzates* of anchovy muscle protein on a Bio-Gel P-2 column

Amino acids	Fractions	
	2'	4'
Aspartic acid	5.64	38.20
Threonine	5.13	2.25
Serine	4.18	2.48
Glutamic acid	8.76	2.88
Proline	5.35	-
Glycine	5.50	2.56
Alanine	7.98	2.92
Cysteine	0.55	0.09
Valine	7.78	2.16
Methionine	4.67	2.21
Isoleucine	4.87	1.14
Leucine	8.64	2.59
Threonine	3.27	11.12
Phenylalanine	5.09	8.67
Histidine	7.64	6.75
Lysine	9.47	4.64
Arginine	5.48	9.43
Total	100.00	100.00

*Anchovy muscle protein was hydrolyzed with 2% pepsin(pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg protein).

산을 가지고, 중앙에는 arginine 및 lysine과 같은 염기성 아미노산을, C말단 아미노산 잔기로서는 proline을 함유하고 있다고 보고하고 있다.

한편 Cheung *et al.*(1980)은 여러가지 dipeptide를 합성하여 ACE 저해효과에 미치는 C말단 및 N말단 아미노산 잔기의 영향에 대하여 검토한 결과, C말단 아미노산 잔기로서는 tryptophan, phenylalanine, tyrosine 및 proline을, N말단 아미노산 잔기로서는 방향족 및 염기성 아미노산을 가지는 peptide가 ACE에 대하여 경쟁적으로 저해함으로써 활성을 나타낼 것이라고 추정하고 있다.

이상의 결과를 종합하면 소화효소에 의한 멸치육 단백질 가수분해물의 ACE 저해작용은 그 구성 아미노산의 조성이나 함량에도 영향을 받을 것으로 생각되나 그 구성 peptide의 종류나 아미노산의 배열에 더 큰 영향을 받을 것으로 생각된다. 따라서 멸치육 단백질 가수분해물이 나타내는 ACE 저해작용은 단백질의 가수분해에 의하여 생성된 저분자 peptide의 길이나 구조 및 아미노산의 종류나

배열순서 등의 복합적인 작용에 의하여 angiotensin-I 전환효소에 대하여 저해작용이 있는 것으로 추정된다.

요 약

수산식품중에 함유되어 있는 기능성 물질의 계통적 해석을 위한 연구의 일환으로 소화효소에 의한 멸치육 단백질 가수분해물의 angiotensin-I 전환효소(ACE) 저해물질을 추출, 분리하여 이들 각획분들의 특성에 대하여 살펴보았다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 가수분해에 따른 ACE 저해효과는 pepsin에 의한 멸치육 단백질 가수분해물에 있어서는 peptide-nitrogen의 생성량이 급격히 증가한 가수분해 20시간째에 가장 우수한 것으로 나타났다.

2. Gel 여과에 의하여 분리된 멸치육 단백질 가수분해물의 획분별 ACE 저해작용을 검토한 결과, 획분 2와 4가 ACE 저해작용이 우수하여 이들을 rechromatography하여 분리한 단일획분인 2'와 4'획분의 IC₅₀은 각각 45, 76 µg인 것으로 나타났다.

3. 분리한 단일 획분인 2'와 4'획분의 아미노산 조성은 다소 차이가 있었으며, 2'획분은 glutamic acid, leucine 및 lysine의 함량이 많은 것으로 나타났으며, 4'획분은 aspartic acid와 threonine의 함량이 많은 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Cheung, H. S., F. L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo and D. W. Cushman. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.*, 255, 401~407.
- Cushman, D. W. and H. S. Cheung. 1971. Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637~1648.
- Horovitz, Z. P. 1981. Angiotensin converting enzyme inhibitors. *Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich*, 3~25.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the

- folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- Manjusri, D. and L. S. Richard. 1975. Pulmonary angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, 250(17), 6762~6768.
- Maruyama, S., H. Mitachi, J. Awaya, M. Kurono, N. Tomizuka and H. Suzuki. 1987. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α_{s1} -casein. *Agric. Biol. Chem.*, 51(9), 2557~2561.
- Maruyama, S., K. Nakagomi, N. Tomizuka and H. Suzuki. 1985. Angiotensin-I converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolyzate of casein. II. Isolation and bradykinin potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, 49(5), 1405~1409.
- Matsumura, N., M. Fujii, Y. Takeda, K. Sugita and T. Shimizu. 1993. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(5), 695~697.
- Tani, F., K. Iio, H. Chiba and M. Yoshikawa. 1990. Isolation and characterization of opioid antagonist peptides derived from human lactoferrin. *Agric. Biol. Chem.*, 54(7), 1803~1810.
- Yoshikawa, M., F. Tani, T. Ashikaga, T. Yoshimura and H. Chiba. 1986. Purification and characterization of an opioid antagonist from a peptic digest of bovine κ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, 50(11), 2951~2954.
- Yoshikawa, M., T. Yoshimura and H. Chiba. 1984. Opioid peptides from human β -casein. *Agric. Biol. Chem.*, 48(12), 3185~3187.
- 麻生慶一. 1985. 프로테아제による機能성オリゴペプチ드의合成. *化學と生物*, 28(4), 267~270.
- 千葉英雄·吉川正明. 1987. 食品研究の新しい潮流-5. 10. 食品起源の生體調節因子. *化學と生物*, 25(6), 396~405.
- 千葉英雄·吉川正明. 1991. 食品タンパク質に由来する生理活性ペプチド, *化學と生物*, 29(7), 454~458.
- 藤券正生. 1987. 食品研究の新しい潮流-1. *化學と生物*, 25(2), 109~110.
- 池本文彦·岩尾 洋·山本研二郎. 1981. 高血壓の生化學, *化學と生物*, 19(8), 482~488.
- 岩井和夫. 1987. 食品研究の新しい潮流-5. 9. 食品成分による酵素の分泌調節機能. *化學と生物*, 25(6), 392~405.
- 上野川修一·東 德洋·山内邦男. 1987. 食品研究の新しい潮流-2. 4. 食品中に存在する細胞成長因子. *化學と生物*, 25(3), 207~211.
- 小林彰夫. 1987. 食品研究の新しい潮流-2. 3. 外因性および内因性の食欲調節因子. *化學と生物*, 25(3), 203~206.
- 松下雲郎. 1987. 食品研究の新しい潮流-4. 8. 生體の老化を抑制する食品. *化學と生物*, 25(5), 336~340.
- 水野健作·松尾壽之. 1985. 生理活性ペプチド前驅體のプロセシングに關するプロテアーゼ. *化學と生物*, 23(1), 2~3.
- 村上浩紀·大村浩久. 1987. 食品研究の新しい潮流-3. 5. 食品成分による生體防御. *化學と生物*, 25(4), 268~279.
- 大久保博晶. 1991. 血壓調節機構の分子生物學的研究-レニン·アンギオテンシン系を中心にする. *日本生化學會誌*, 63(12), 1419~1440.
- 梅本 滋. 1966. ビユレット反應による魚肉タン白定量改良. *日水誌*, 32(5), 427~435.
- 염동민·이태기·변한석·김선봉·박영호. 1992. 효소에 의한 고등어 근육단백질 가수분해물의 Angiotensin-I 전환효소 저해작용. *한국수산학회지*, 25(3), 229~235.

1993년 9월 8일 접수

1994년 1월 3일 수리