

된장으로부터 Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해 Peptide의 분획

신재익 · 안창원 · 남희섭* · 이형재 · 이형주** · 문태화**

(주)농심 기술개발연구소, **서울대학교 식품공학과

Fractionation of Angiotensin Converting Enzyme(ACE) Inhibitory Peptides from Soybean Paste

Zae-Ik Shin, Chang-Won Ahn, Hee-Sop Nam*,
Hyung-Jae Lee, Hyung-Joo Lee** and Tae-Hwa Moon**

Research & Development Center, Nong Shim Co. Ltd.

**Department of Food Science and Technology, Seoul National University

Abstract

Angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides lowering blood pressure were fractionated from a commercial soybean paste(Doenjang). When the freeze-dried sample of soybean paste was extracted with cold water, the recovery yield of total nitrogen(TN) was shown to be 73.3% in 30 minutes. The cold water extract was filtered through PM-10 membrane(Amicon) for 3 hours in order to remove high molecular weight polypeptides. The TN and salt of ultrafiltrate were recovered to 80.8% and 99.2%, respectively, and its ACE IC₅₀ was 41.8 µg/ml. When the ultrafiltrate was divided into 7 fractions by reverse phase prep-HPLC, F5 fraction showed the highest ACE inhibitory activity (IC₅₀=6.8 µg/ml) and salt could be collected into F1 fraction. Subsequently, the F5 fraction was divided into another five fractions by ion exchange prep-HPLC, all of which appeared to be high ACE inhibitory activity(IC₅₀=2.5~8.3 µg/ml). Among them, F53 fraction had the highest ACE inhibitory activity, and its main amino acid component was found to be histidine.

Key words: Soybean paste, ACE inhibitor, Peptide

서 론

최근들어 식품성분이 가지는 각종 생체조절기능을 해명함으로써 식품의 기능을 새롭게 인식하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 생체조절기능을 가지는 식품성분으로는 단백질, peptide, 지질 및 당 등이 있는데, 이 중에서 생리활성 peptide는 1) 구조 및 활성이 다양하고, 2) protease류에 의해 분해되며, 3) 유전공학기술에 의한 생산 및 개조가 가능하고, 4) 높은 안전성을 기대할 수 있다는 특성으로 인하여 주목되고 있다⁽¹⁾. 특히, gelatin의 가수분해물로부터 식품 단백질 유래의 angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 peptide가 발견된⁽²⁾ 이후, 다른 식품 단백질에서 ACE 저해 peptide를 찾으려는 연구가 지속적으로 진행되어 왔다⁽³⁻⁶⁾.

ACE는 혈압강화작용을 가지는 bradykinin을 분해하여 불활성화시키는 한편, 불활성상태의 angiotensin-I을 절단하여 강한 혈압상승작용을 나타내는 angiotensin-II로 활성화시킴으로써 고혈압의 원인이 된다고 알려져 있다⁽⁷⁾.

따라서, 식품에서 ACE 저해 peptide의 탐색은 혈압상승 억제기능을 가진 새로운 식품소재의 개발이라는 면에서 중요한 의미를 가지고 있다. 지금까지 ACE 저해 peptide에 대한 연구는 주로 식품에서 직접 용매추출 및 column chromatography에 의한 정제를 하거나^(3,4), pepsin, trypsin 등의 단백질 분해효소로 분해한 후 추출, 정제하여 특성을 파악하는 연구와^(5,6), 활성peptide의 합성에 관한 연구도 일부 수행되어 왔다⁽⁸⁾.

본 연구에서는 분리능이 뛰어난 preparative HPLC (prep-HPLC)를 이용하여, 미생물이 분비하는 단백질 분해효소에 의해 자연스럽게 분해가 이루어진 전통발효식품인 된장을 대상으로 ACE 저해 효과가 있는 peptide획분을 얻고자 실험하였다.

재료 및 방법

재료

(주)세우에서 제조한 된장을 구입하여 동결건조한 후 마쇄하여 표준망체 20 mesh를 통과시킨 된장 분말을 시료로 사용하였다. 이 시료의 일반성분은 수분 13.3%, 단백질 24.1%, 지방 7.2%, 탄수화물 34.4%, 회분이 21.0% (NaCl 17.8%)였다. 용매추출용 시약은 G.R.등급의 것을

Corresponding author: Hee-Sop Nam, Research & Development Center, Nong Shim Co. Ltd., 203-1, Dangjeong-dong, Kunpo-si, Kyungki-do 435-030, Korea

정제없이 사용하였으며, HPLC 및 preparative HPLC (prep-HPLC)에 사용한 용매는 HPLC등급을 사용하였다. ACE저해활성 측정시 사용한 ACE 및 기질(Hipuryl-His-Leu)은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

일반성분분석

수분, 지방, 단백질, 회분 등의 일반성분의 분석은 A.O. A.C.법⁹⁾에 따라 측정하였다. 이때, 된장의 질소계수는 5.71로 하였으며, 염도는 염분농도계(Model NS-3P, Merbabu Trading Co., Ltd., Japan)를 사용하여 측정하였다.

Peptide의 추출 및 분획

Peptide의 용매추출은 김 등의 방법¹⁰⁾을 변형하여 수행하였다. 일정량의 건조 시료에 시료무게의 10배를 가수한 후, 4℃에서 homomixer로 각각 10초, 15분, 30분, 45분, 60분간 추출하였다. 각 추출물을 Whatman No.4 여과지를 사용하여 여과하고, 남은 잔사는 재추출, 여과하여 여액을 먼저의 여액과 합하였다. 이 용액을 진공농축기로 50℃ 이하에서 감압 농축하고, 이틀 농축액을 일정량의 HPLC등급의 물로 용해한 후, 4℃에서 16,500×g로 10분간 원심분리하여 용매추출액을 얻었다. 이때, 각 추출 시간별 추출율은 사용된 시료된장의 총 질소함량에 대한 용매추출액의 총 질소함량의 비로 계산하였다.

용매추출액을 Amicon사의 PM-10 membrane을 사용하여 26±2℃에서 한외여과하였다. 이때, 투입한 용매추출액의 총 질소함량과 투과액의 총 질소함량의 비로부터 한외여과 회수율을 계산하였다. 한외여과액은 동결건조하여 다음 분리단계의 시료로 사용하였다. Peptide의 분획은 두차례에 걸쳐 모두 prep-HPLC(Model LC20, Japan Analytical Industry Co., Ltd. Japan)를 사용하여 수행하였다. 먼저 reverse phase column(JAIGEL-ODS-A-343-10, 20×250 mm)을 이용하여 극성의 정도에 따라 peptide를 분획하였다. 용매의 공급은 5 ml/min 속도로 2% acetonitrile을 5분간 흘려준 다음 2분동안 acetonitrile의 농도를 4%까지 직선적으로 상승시킨 후 그 농도에서 20분간 유지하였으며, 다시 5분동안 65%까지 acetonitrile의 농도를 직선적으로 상승시켜준 후 30분간 유지하였다. 여기에서 얻은 여러 분획중 ACE저해활성이 가장 높은 분획을 ion exchange column(JAIGEL-ES-502CP, 20×100 mm)상에서 20% acetonitrile을 함유한 10 mM sodium succinate buffer(pH 4.3)를 4 ml/min의 유속으로 흘려 재분획하였다. Peptide성분의 검출은 UV detector를 사용하여 214 nm에서 실시하였다.

ACE 저해활성의 측정

각 분획의 ACE저해활성 측정은 Cushman과 Cheung의 방법¹¹⁾에 따랐다. ACE저해활성은 ACE의 활성을 50% 저해할 수 있는 질소농도로 나타내었으며 이것을 IC₅₀

으로 표현하였다. 한편, 각 분획이 가지고 있는 총 ACE저해활성의 상대적인 값을 다음의 식으로부터 구하여 RTIC(relative total inhibition concentration)로 표현하였다.

$$TIC_n = \frac{\text{total nitrogen content of fraction number } n}{IC_{50} \text{ of fraction number } n}$$

$$RTIC_n = \frac{TIC_n}{TIC_a}$$

이때, n은 각 분획의 번호이며, a는 여러 분획중 ACE저해활성이 가장 높은 분획을 의미한다.

Peptide의 아미노산 분석

Peptide의 총아미노산 분석은 서¹²⁾와 Chang¹³⁾의 방법에 따랐다. 적당량의 시료를 6 N HCl(1% phenol 함유) 15 ml에 넣어 105℃에서 24시간 산분해시켰다. 그뒤 100 ml volumetric flask로 부피를 맞추고, sep-pak C₁₈ cartridge(Waters, USA)를 통과시켜 단백질, 지질 등의 고분자 물질과 색소를 제거하였다. 전처리된 시료 50 μl를 취하여 진공펌프가 장착된 Pico-Tag workstation(Waters, USA)에서 건조한 후, water : methanol : triethylamine(2 : 2 : 1) 혼합용액 10 μl를 첨가하여 재건조시켰다. 재건조된 시료에 methanol : water : triethylamine : phenylisothiocyanate(7 : 1 : 1 : 1) 혼합용액 20 μl를 첨가하여 phenylthiocarbonyl-amino acid로 유도체화시킨 후, 다시 건조시켰다. 여기에 sample diluent(Waters) 250 μl를 첨가하여 건조된 시료를 용해한 후, HPLC 분석을 행하였다. 분석은 Waters 510 HPLC system, 486 UV detector, 746 data module로 이루어진 HPLC system에서 행하였고, column은 Pico-Tag column(3.9×150 mm, Waters)을 사용하였으며, 분석중에는 45℃로 유지하였다. 이때 이동상으로는 Eluent A(Waters)를 사용하였고, Eluent B는 60% acetonitrile을 사용하였다. 유리아미노산 정량의 경우 산분해를 하지 않은 점 이외에는 총아미노산 정량의 경우와 동일한 방법에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

된장 펩타이드의 추출은 식품으로서의 안전성을 고려하여 유기용매 대신 물을 사용하였다. 이때, 사용되는 물의 온도가 높으면 Maillard반응에 의한 성분의 변화가 예상되므로, 이를 최소화 하기 위하여 냉수를 시료의 10배가 되게 가수하여 추출하였다. 총질소의 회수율로 나타난 용매추출액의 추출수율은 시간이 경과함에 따라 계속 증가하여, 30분에는 73.3%의 수율을 보였으며, 그 이후로는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

한편, 지금까지 밝혀진 대부분의 ACE저해 peptide는 분자량이 2,000이하인 것으로 보고되고 있다⁶⁾. 따라서, 용매추출액을 Amicon사의 PM-10 membrane으로 한외여과하여 고분자 polypeptide를 제거하고 저분자 pep-

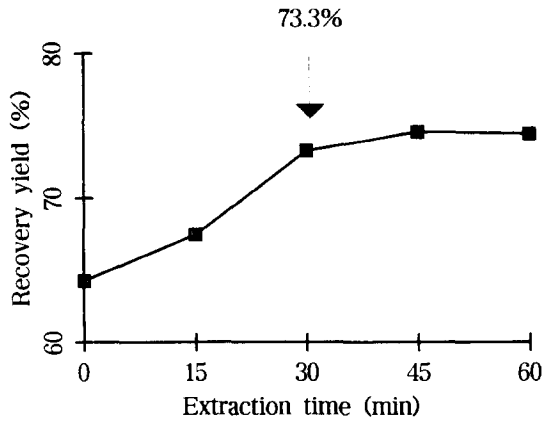


Fig. 1. Recovery yield of total nitrogen in aqueous solution according to extraction time

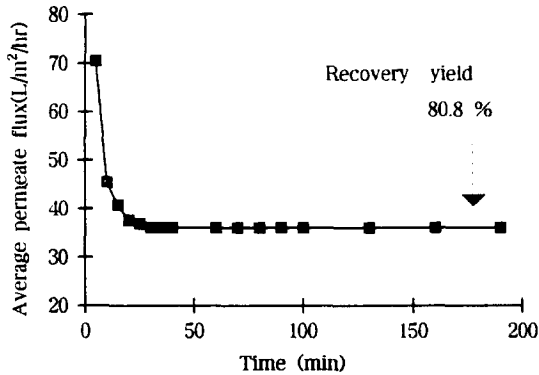


Fig. 2. The average permeate flux of the water extract through PM 10 (Amicon) ultrafilter membrane (26 ± 2 °C, 30 psi)

tide만을 얻어서 이후의 분리과정을 효율적으로 수행하고자 하였다. 용매추출액의 평균투과유속은 여과초기에 급격히 떨어져 일정한 상태가 유지되었는데(Fig. 2), 3시간 운전하였을 때 용매추출액의 82.5%가 투과하여 남은 용액은 더 이상 여과하기 어려웠다. 이때, 질소성분의 회수율은 80.8%, NaCl의 회수율은 99.2%에 달했다. 한편, 투과액의 ACE저해활성은 IC₅₀=41.8 µg/ml로 나타나, 된장으로부터 얻은 용매추출액의 한외여과 투과액은 생리활성을 가지는 조분획물으로써 공업적 생산 가능성이 있음을 알 수 있었다.

Prep-HPLC는 기존에 분취용으로 사용되어오던 open column chromatography, flash chromatography, medium pressure liquid chromatography 등과는 달리, 고형분이 5g 이상인 시료를 분석용 HPLC수준의 분리능으로 단시간에 분리, 분획이 가능하여 최근 peptide의 정제실험에 널리 사용되고 있다⁽¹⁴⁾. 한편, 한외여과 투과액의 동결건조 시료중에는 다량의 NaCl 등 염이 함유

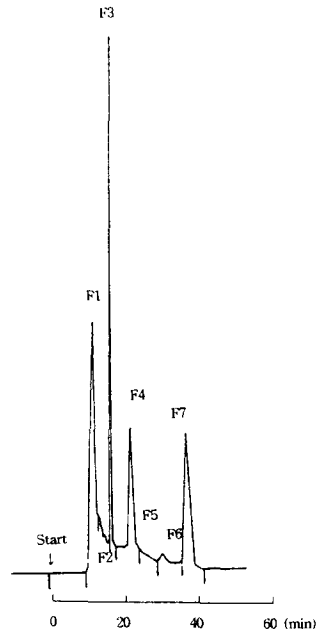


Fig. 3. The preparative high performance liquid chromatogram of the ultrafiltrate on reverse phase column (Detection: 214 nm)

Table 1. ACE inhibitory property of each fraction obtained from reverse phase column by preparative HPLC

Fractions	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
IC ₅₀ ^{a)} (µg/ml)	293.2	14.6	37.4	34.4	6.8	239.7	115.3
RTIC ^{b)}	2.0	2.0	2.9	1.9	1.0	0.1	0.3

^{a)}IC₅₀, defined as the concentration which inhibits 50% of the angiotensin-I converting enzyme activity

^{b)}RTIC, relative total IC₅₀; total IC₅₀, defined as the weight of materials divided by its IC₅₀

되어 있어, 먼저 reverse phase column(JAIGEL-ODS-A-343-10)을 이용하여 desalting과 peptide의 분획을 동시에 실시하고자 하였다. 동결건조 시료 0.6 g을 100 ml 물에 용해한 뒤 3 ml를 injection하여 Fig. 3과 같은 4개의 뚜렷한 peak가 포함된 chromatogram을 얻었다. 이 chromatogram을 7개의 분획으로 나누어 각 분획물의 ACE저해활성을 측정하였다(Table 1). ACE저해활성은 F2, F3, F4, F5분획물에서 비교적 높게 나타났으며, 특히, F5분획물은 IC₅₀=6.8 µg/ml로 가장 높은 ACE저해활성을 보였다. 상대적인 총 ACE저해활성인 RTIC는 F1, F2, F3, F4분획에서 높았으며 F3분획물이 2.9로 가장 높았는데, 이것은 이 분획물의 총질소농도가 상대적으로 높았기 때문이다. 한편, 시료중에 있는 염은 F1분획에서 모두 회수되어 reverse phase prep-HPLC는 peptide의 분획 뿐만 아니라 desalting에도 효과적인 방법임을 알

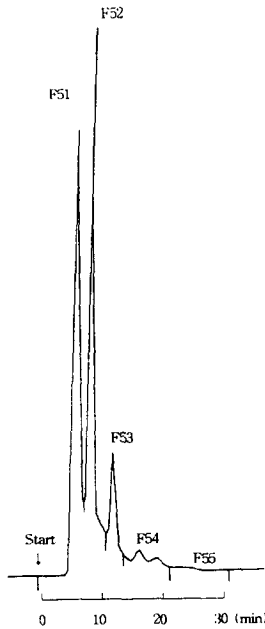


Fig. 4. The preparative high performance liquid chromatogram of F5 fraction on ion exchange column (Detection: 214 nm)

Table 2. ACE inhibitory property of each fraction obtained from ion exchange column by preparative HPLC

Fractions	F51	F52	F53	F54	F55
IC ₅₀ ^{a)} (μg/ml)	6.6	6.0	2.5	3.8	8.3
RTIC ^{b)}	1.3	1.3	1.0	1.0	0.5

^{a)}IC₅₀, defined as the concentration which inhibits 50% of the angiotensin-I converting enzyme activity

^{b)}RTIC, relative total IC₅₀; total IC₅₀, defined as the weight of materials divided by its IC₅₀

았다.

ACE저해활성이 가장 높은 F5분획물을 시료로, ion exchange column(JAIGEL-ES-502-CP)을 이용하여 계속 정제를 하였다. 일반적인 ion exchange chromatography에서 용매의 pH 및 ionic strength는 peak분리에 중요한 인자가 된다. 한편, ion exchange chromatography에 있어서 이동상에 종종 유기용매를 사용하는 경우가 있는데, 이것은 통상 exchange capacity를 감소시키는 경향이 있으나, 시료성분에 따라 용해도 및 selectivity coefficient에 서로 다른 정도의 영향을 주어 분리가 잘 되는 경우가 있기 때문이다⁽¹⁵⁾. 본 실험에서도 10 mM sodium succinate buffer(pH 4.3)용액에 20%의 acetonitrile을 첨가한 결과 Fig. 4에서와 같이 뚜렷한 peak분리를 할 수 있었다. 이 chromatogram을 retention time 30분까지 5개의 분획으로 나누어 각 분획물의 ACE저해활

Table 3. Amino acid composition of F53 fraction

Amino acid	Concentration, n mole/ml				
	Total amino acid	(mole %)	Free amino acid	(mole %)	Peptide (mole %)
Asp	88	(1.5)	NDa)		88 (2.1)
Glu	171	(2.8)	ND		171 (4.1)
Ser	82	(1.4)	ND		82 (2.0)
Gly	272	(4.5)	ND		272 (6.6)
His	4504	(74.2)	1681	(86.6)	2823 (68.5)
Arg	25	(0.4)	ND		25 (0.6)
Thr	128	(2.1)	ND		128 (3.1)
Ala	ND		ND		ND
Pro	ND		ND		ND
Tyr	ND		ND		ND
Val	107	(1.8)	NAb)		107 (2.6)
Met	ND		ND		ND
Cys	ND		ND		ND
Ile	164	(2.7)	ND		164 (4.0)
Leu	ND		ND		ND
Phe	478	(7.9)	261	(13.4)	217 (5.3)
Lys	45	(0.7)	ND		45 (1.1)
Total	6064	(100.0)	1942	(100.0)	4122 (100.0)

^{a)}Not Detected

^{b)}Not Available

Table 4. ACE inhibitory activity of each sample

Sample	IC ₅₀ (μg/ml)	RTIC	Purification fold ^{a)}
Ultrafiltrate	41.8	85.4	1.0
F5 fraction	6.8	4.2	6.2
F5 fraction(FD) ^{b)}	6.8	4.1	6.2
F53 fraction	2.5	1.0	16.7

^{a)}Relative value of reciprocal of ACE IC₅₀

^{b)}Freeze-dried sample of F5 fraction

성을 측정된 결과(Table 2), 모든 분획물이 2.5~8.3 μg/ml의 높은 IC₅₀을 나타내었으며 그중 F53분획물이 가장 높았다. F53분획물의 ACE저해활성은 이제까지 보고된 ACE저해 peptide들의 IC₅₀값들⁽⁸⁾과 비교하였을 때 상당히 높은 값을 알 수 있었다.

ACE 활성에 저해를 나타내는 peptide들의 C말단에는 tryptophan, phenylalanine, tyrosine, proline 등이, N말단에는 histidine을 비롯한 염기성 아미노산과 여러 방향족 아미노산들이 있고, 이들 peptide들은 ACE에 대해 angiotensin-I과 경쟁적으로 결합하여 ACE의 활성을 감소시키는 것으로 추정되고 있다^(5,16). ACE저해활성이 가장 높은 F53분획물의 총아미노산과 유리아미노산을 분석한 결과(Table 3), 유리아미노산은 총아미노산의 32.0%였으며, histidine이 86.6%, phenylalanine이 13.4%를 차지하였다. 총아미노산에는 이들 아미노산외에 aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, arginine, threonine,

valine, isoleucine, lysine 등이 존재하였지만, 모두 합하여 17.9%에 불과하였다. 따라서, F53분획물은 소량의 아미노산들이 함께 존재하는 peptide획분으로 염기성 아미노산인 histidine의 함량이 특징적으로 높으며, 이것이 ACE저해 활성과 관계있을 것으로 추정된다.

본 정제 과정에서 각 단계별 ACE IC₅₀, RTIC, 정제도는 Table 4와 같았다. 동결건조된 된장분말 시료를 냉수 추출한 뒤, 한외여과를 하면 상당히 높은 ACE저해활성을 갖는 용액을 얻을 수 있었으며(Table 4), 이 결과로 생리활성을 갖는 식품소재 분획에 한외여과법이 유용하게 사용될 수 있음을 알았다. 또한, 시료의 안정적 보관과 농축을 위해 만든 F5분획의 동결건조 분말은 ACE저해활성이 거의 손실되지 않았다. 한편, ACE저해 활성도를 기준으로 한 정제도는, 한외여과액을 reverse phase column과 이어 ion exchange column을 통과시켰을 때 각각 6.2, 16.7배로 나타나, prep-HPLC에 의한 ACE저해 peptide의 분획은 효과적인 정제방법임을 알 수 있었다. 앞으로 F53분획물로부터 다른 column을 이용하여 ACE저해 peptide를 분리하고 그 아미노산 서열을 밝힐 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

식품 유래의 생리활성 peptide를 분리할 목적으로 전 통발효식품인 된장으로부터 혈압강화기능을 가지는 ACE (angiotensin converting enzyme)저해활성 peptide를 분획하였다. 시판 된장의 동결건조분말을 냉수로 추출했을 때 총질소의 회수율은 추출시간 30분에 73.3%를 보였다. 용매추출액에서 고분자 polypeptide를 제거하고 저분자 peptide만을 얻기 위해 PM-10 membrane(Amicon)을 이용하여 3시간 동안 한외여과한 결과, 질소성분의 회수율은 80.8%, 염의 회수율은 99.2%에 달했고 투과액의 ACE IC₅₀은 41.8 µg/ml이었다. 한외여과 투과액을 reverse phase prep-HPLC로 분획하여 7개의 획분을 얻었으며, 그 중 F5분획물의 ACE저해활성이 IC₅₀=6.8 µg/ml로 비활성이 가장 높았다. 염은 F1분획물에서 모두 회수되었다. F5분획물을 ion exchange prep-HPLC로 다시 분획하여 얻은 5개의 모든 획분에서 높은 비활성을 보였다(IC₅₀=2.5~8.3 µg/ml). 그 중 F53분획물의 비활성이 가장 높았으며(IC₅₀=2.5 µg/ml), F53의 구성아미노산 분석 결과 histidine의 함량이 특징적으로 높았다.

문 헌

1. 손동화: 식품단백질 유래의 생리활성 펩타이드. 식품기

술, 7(3), 25 (1994)

2. Oshima, G., Shimabukuro, H. and Nagasawa, K.: Peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **566**, 128 (1979)
3. Maruyama, S., Miyoshi, S. and Tanaka, H.: Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from *Ficus Carica*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**(10), 2763 (1989)
4. Saito, Y., Nakamura, K., Kawato, A. and Imayasu, S.: Angiotensin-I converting enzyme inhibitors in Sake and its by-product. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **66**(7), 1081 (1992)
5. 김선봉, 이태기, 박영범, 염동민, 김외경, 도정룡, 박영호: 멸치육 단백질 가수 분해물로부터 angiotensin-I 전환 효소 저해제의 분리 및 그 특성. *한국수산학회지*, **27**(1), 1 (1994)
6. Seiki, E., Osajima, K., Matsui, T. and Osajima, Y.: Separation and purification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *日本食品工業學會誌*, **40**(11), 783 (1993)
7. 신현경: 기능성 식품의 개발 현황. *식품기술*, **7**(3), 3 (1994)
8. Ariyoshi, Y.: Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trend in Food Science & Technol.*, May, 139 (1993)
9. A.O.A.C.: *Official methods of analysis*, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., p.189 (1980)
10. 김수호, 이형주: 치즈 및 된장에서의 쓴 맛 펩타이드 특성. *한국식품과학회지*, **17**(4), 4 (1985)
11. Cushman, D.W. and Cheung, H.S.: Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharm.*, **20**, 1637 (1971)
12. 서동순, 김광욱, 김용수, 이형준: 효모 자가분해물을 사용한 된장찌개 믹스 조성물의 최적화. *한국식품과학회지*, **25**, 411 (1993)
13. Chang, K.C., Skarge, L.H. and Satterlee, L.D.: Analysis of amino acids in soy isolates and navy beans using precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, **54**, 756 (1989)
14. Marston, A. and Hostettman, K.: Modern separation methods. *Natural Product Reports*, 391 (1991)
15. Mikes, O.: Ion exchange chromatography. In *Separation Methods*, Deyl, Z.(ed), Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam, p.221 (1984)
16. Cheung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F. and Cushman, D.W.: Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **255**(2), 401 (1980)

(1994년 12월 15일 접수)