

Microplate법에 의한 된장유래의 항혈전 펩타이드 탐색

손동화 · 이경애 · 김승호 · 안창원* · 남희섭* · 이형재* · 신재익*

한국식품개발연구원

*(주)농심 기술개발연구소

Screening of Antithrombotic Peptides from Soybean Paste by the Microplate Method

Dong-Hwa Shon, Kyung-Ae Lee, Seung-Ho Kim, Chang-Won Ahn*

Hee-Sop Nam*, Hyung-Jae Lee*, and Jae-Ik Shin*

Korea Food Research Institute

*Research & Development Center, Nong Shim

Abstract

In order to search for antithrombotic peptides from soybean paste, the inhibitory activity of water extract of soybean paste and its peptide fractions on ADP-induced aggregation of washed platelets was assayed. Soybean paste extract treated with ultrafiltration (M.W. cut off, 3,000 daltons) was found to have inhibitory activity of 90% at the dose of 96 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by the method of turbidometric aggregometer. Soybean paste extract was fractionated to 19 fractions (No.B-18) by Dowex 50W X-2 ion exchange column chromatography and activity test was performed by the microplate method. All of the fractions had antithrombotic activity (IC_{50} , 10-1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and most fractions had higher activity than positive control, RGDS (IC_{50} , 205 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Especially, basic fractions No.16-18 showed higher activity than soybean paste extract (IC_{50} , 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The fraction No.16 with the highest activity (IC_{50} , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was purified and analysed for amino acid composition. The results showed that histidine, arginine, and alanine were major residues in the peptide part of the fraction.

Key words: antithrombotic peptide, soybean paste, microplate method

서 론

혈소판은 생체 내에서 혈관의 손상시 신속히 활성화되어 응집됨으로써 혈액유실을 방지한다. 그러나 혈소판이 비정상적으로 활성화되어 형성되는 혈전들은 혈관 내에서 혈액의 흐름을 방해하여 병적인 상태인 혈전증 (thrombosis)을 일으킨다. 정맥혈전의 경우 해당부위에 부종이나 염증 등의 증상이 나타나고 동맥혈전에서는 어혈 또는 경색을 초래하여 심근경색증, 뇌졸중, 폐동맥경색증 등으로까지 발전된다. 또한 이들 미세혈전들은 각종 혈전성 질환뿐 아니라 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병 등 성인병의 일차적인 원인으로 밝혀지고 있으며 소화기병, 신경통 등 만성난치병의 원인도 되는 것으로 보고되고 있다^(1,2).

콩(대두)은 중요한 단백질 급원일 뿐 아니라 전통발효식품인 된장, 간장의 주원료이다. 또한 콩 단백질은 발효시 미생물들이 생산하는 효소에 의해 가수분해되어 여러종류의 펩타이드가 생성되며 이들 펩타이드는 다양한 생리활성을 나타낼 것으로 생각된다. 실제로 펩타이드의 생리적 기능성에 관한 최근의 연구에서 호중구나 대식세포의 탐식작용 촉진, ACE 저해, 담즙산 결합 등의 활성을 갖는 대두 펩타이드들이 보고되고 있으나 항혈전 활성에 대한 연구는 미미하다⁽³⁾.

본 연구에서는 된장으로부터 혈소판 응집저해 활성을 갖는 펩타이드를 검색하고자 하였으며, 항혈전 활성의 분석에 microplate를 활용하는 방법을 개발하여 활용하였다.

재료 및 방법

재료

된장은 (주)세우농산에서 제조한 시판용을, 항혈전

Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Food Chem. & Physics Division, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

실험에 사용된 ADP (adenosine-5'-diphosphate)는 Chrono-log사 제품을, 표준물질인 RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) 등은 Sigma사 제품을, 기타의 시약은 GR급을 사용하였다. 실험동물인 Sprague Dawley (SD) 흰쥐 숫컷은 삼육실험동물연구소에서 구입하여 사용하였다. 혈소판 응집실험을 위한 장치로서 aggregometer는 Chrono-log사의 model No. 560 Ca를, microplate reader는 Molecular Devices사의 THERMOmax™를 이용하였다. 96w-Microplate는 Nunc사 제품(No. 446612)을, 혈소판 현탁액의 보온 및 교반을 위하여 Pierce사의 Reacti-Therm III™ heating/stirring module을 이용하였다.

된장 펩타이드의 분리

동결건조한 된장 분말 200 g을 1 l의 증류수와 함께 blender로 10분간 교반한 후 10,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 상층액을 Whatman No. 42로 여과한 여액을 다시 Amicon사의 한외여과 장치를 이용하여 35 psi에서 분자량 3,000 이하를 통과하는 막(Amicon No. YM-3)으로 처리하여 여액을 얻었다. 이를 된장추출물로 사용하였으며 펩타이드의 농도는 240 mg/ml이었다.

된장추출물 20 ml에 0.1 M pyridine-formic acid 완충액(pH 2.8)을 1,000 ml 첨가하여 희석한 후, 같은 완충액으로 평형화한 강양이온교환수지 Dowex 50W X-2의 column (6.6×14.6 cm)을 이용하여 pH (3-5) 및 이온강도(0.1-3 M)의 불연속구배에 의하여 19개의획분을 얻었다. 이때 유속은 825 ml/hr이었다.

펩타이드 정량

Cliffe 등⁽⁴⁾의 방법을 수정하여 행하였다. 시료 0.1 ml와 0.1 M NaOH 1.0 ml을 1.5 ml의 eppendorf tube에 넣고 110±2°C에서 하룻밤 가열하였다. 그 잔사에 30% 초산 수용액을 넣고 끓는 수조에서 6분간 방치한 후 식혔다. 여기에 다시 ninhydrin 용액 0.1 ml를 넣고 끓는 수조에서 15분간 방치하고 식혔다. 여기에 50%의 ethanol 1 ml를 넣고 30초간 vortex한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 ninhydrin 용액은 분석 당일에 제조하였는데, DMSO 7 ml에 ninhydrin 0.2 g과 hydrindantin 30 mg을 녹인 후, 갈색병에 보관중인 4 M lithium acetate 완충액(pH 5.5) 2.5 ml를 혼합하여 준비하였다. 또한, L-leucine을 표준물질로 하였다.

획분의 정제 및 아미노산 분석

이온교환 크로마토그래피로 얻은 된장 펩타이드의

획분을 Sep-Pak C18 cartridge로 처리한 후, 역상 HPLC를 이용하여 정제하였다. HPLC의 운전조건은 다음과 같다. Column은 YMC ODS-H80 (150×4.6 mm, 5 μm, 80 Å)를, 용출용매는 (A) trifluoroacetic acid (TFA)를 0.1% 함유한 정제수 및 (B) TFA를 0.1%함유한 acetonitrile을 사용하였으며, 용매의 구배는 12분간 0%에서 8%의 (B)가 되도록 하였다. 유속은 0.5 ml/min (Waters Pumps 501, 510)을 유지하였으며, 검출은 220 nm에서 행하였다(Waters detector 484).

아미노산 분석은 Waters PICO-TAG Standard Method I에 준하여 행하였다.

혈소판의 준비

Diethyl ether로 마취한 흰쥐의 복부 대동맥으로부터 채혈하였다. 채혈시 항응고제로 ACD-용액(12.5 g trisodium citrate dihydrate, 7.5 g citric acid monohydrate, 10 g glucose / 100 ml water)을 사용하였으며, 이를 혈액과 1 : 6의 비율로 혼합한 후 150×g에서 15분간 원심분리하여 상층의 혈소판 풍부 혈장(PRP, platelet rich plasma)을 취하였다. 이를 다시 500×g에서 10분간 원심분리하여 혈소판 pellet을 얻었다. 이를 세척완충액(11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 163.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 11.2 mM α-D-Glucose, 2.0 mM EDTA, 0.35% Bovine Serum Albumin, pH 7.4)으로 원심세척 후, 현탁완충액(11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 163.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 11.2 mM α-D-Glucose, pH 7.4)에 부유시켰다. 최종적으로, 밀도를 5×10⁶/ml로 조절한 혈소판 현탁액을 세척혈소판 (WP, washed platelet)으로 사용하였다.

항혈전 assay

Aggregometer 및 microplate reader를 사용하여 37°C에서 세척혈소판의 응집시 일어나는 탁도의 변화를 측정하였다^(5,6). 전자의 경우, aggregometer상에서 480 μl의 WP에 CaCl₂용액(최종농도, 1.0 mM)을 첨가한 1분 후에 된장추출물을 2분간 처리하고, 이어서 ADP용액(최종농도, 10 μM)을 넣어 혈소판응집을 유도한 후 추가로 5분가량 transmittance의 변화를 관찰하였다.

한편, 후자의 경우 WP에 CaCl₂용액(최종농도, 1.0 mM)을 첨가하여 37°C로 3분간 유지한 다음 96w-microplate에 well당 180 μl씩 분주하였다. 여기에 된장 펩타이드용액 10 μl씩을 첨가한 후 흡광도를 신속히 측정하고 2분간 처리한 다음, 10 μl씩의 ADP (최종농

도, 10 μM)를 넣어 응집을 유도하고 7분 후에 다시 흡광도를 측정하였다. 이때 microplate는 heating module상에서 시종 각 well마다 400 rpm의 교반 및 37°C 보온을 유지하였다. 또한, 흡광도 측정은 microplate reader 내에서 37°C의 온도와 진동을 유지하면서 540 nm에서 신속하게 행하였다.

혈소판 응집의 저해활성은, 생리식염수를 넣은 대조군의 응집력(흡광도변화)을 100%로 잡고 시험물질 처리시의 저해율을 산출하였다⁽⁹⁾. 또한, microplate법에 의한 펩타이드의 IC₅₀값은 농도별 저해활성을 logarithmic linear regression에 대입하여 얻은 회귀식으로부터 구하였다.

결과 및 고찰

된장 추출물의 혈소판응집 저해활성

우선 된장추출물의 혈소판응집 저해활성을 확인하

기 위하여, aggregometer에 의한 분자량 3,000 dalton 이하의 환외여과액의 활성을 측정하였다. 완충액에 부유한 혈소판인 WP (washed platelet)와 activator로서 ADP를 사용하여 활성을 측정하였을 때, 양성대조구인 RGDS를 500 μM (약 216 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리시 95%이상의 저해효과를 보였고, 된장 추출물을 96 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리시 그 저해활성이 90% 가량으로 매우 높게 나타났다(Fig. 1).

다른 한편, 혈소판으로서 PRP (platelet rich plasma)와 activator로서 thrombin이나 ADP를 사용한 경우에는 RGDS 및 된장추출물의 저해활성이 전혀 관찰되지 않았다(data 생략). 이는 PRP에 존재하는 albumin 등의 혈장단백질이 활성물질의 작용을 방해하기 때문인 것으로 추정되었다⁽¹⁰⁾.

따라서, 본 연구에서는 낮은 혈소판 응집 저해활성 일지라도 이를 보다 민감하게 분석할 수 있는 WP/ADP system을 활성시험에 이용하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

된장 펩타이드의 분획

앞에서 된장 추출물의 혈소판 응집 저해활성이 확인되었으므로, 활성 펩타이드를 분획하기 위하여 강양이온교환 크로마토그래피를 행하였다. Dowex 50W X-2 칼럼을 이용하여 된장 추출물을 19개(No. B-18)의 획분으로 분획하였으며, 그 크로마토그램은 Fig. 2와 같다. 대체로 앞부분에서 펩타이드가 가장 많

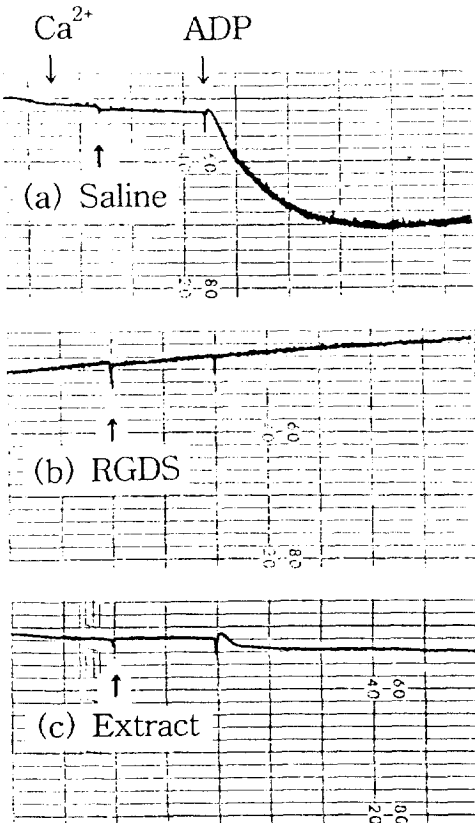


Fig. 1. Effect of soybean paste extract on ADP-induced aggregation of washed platelet (a) Saline, (b) RGDS (500 μM , 215 $\mu\text{g}/\text{ml}$), tetrapeptide as a positive control, (c) Extract of soybean paste (96 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

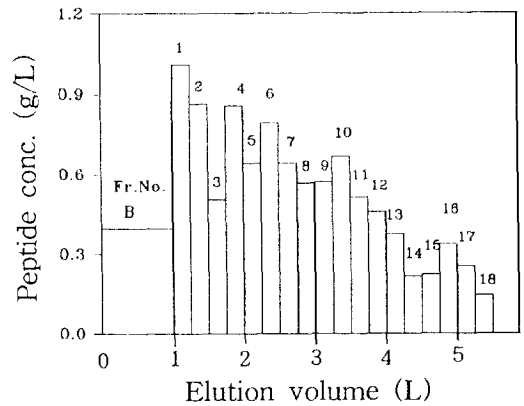


Fig. 2. Chromatogram of soybean paste extract on Dowex 50W X-2 ion exchange column Elution conditions: Fraction No.B, sample diluted in pyridine formic acid buffer (0.1M, pH 2.8); No.1 and 2, 0.1 M, pH 2.8; No.3 and 4, 0.2 M, pH 2.9; No.5 and 6, 0.3 M, pH 3.0; No.7 and 8, 0.4 M, pH 3.5; No.9 and 10, 0.5 M, pH 4.0; No.11 and 12, 0.75 M, pH 4.5; No.13 and 14, 1.0 M, pH 5.0; No.15-18, 3.0 M, pH 5.0

이 용출되었고 중간, 뒷 부분에서는 점차 적게 용출되었다. 이들은 산성, 중성, 염기성 펩타이드의 순으로, 일본 된장의 경우 그 구성비가 각각 52.7-58.4, 33, 8.2-13.2%인 점과 유사한 경향을 보였다⁽¹¹⁾.

펩타이드 획분의 혈소판 응집 저해활성

이들 19개 획분에 대한 혈소판 응집 저해활성을 mi-

croplate reader를 이용하여 측정하였다. 확립한 분석법의 최적조건은 실험방법에 명시한 바와 같다. 이 방법은 aggregometer방법에 비하여 감도는 다소 낮게 나타났으나 한꺼번에 많은 수의 시료를 동시에 검색할 수 있는 장점이 있었으므로 예비적인 활성평가에 효과적으로 활용가능한 것으로 판단되었기 때문이다. 그러나 분석방법의 차이에 의하여 동일한 시료에 대하여 활성을 나타내는 농도가 달라, 두 방법에 의한 결과를 일률적으로 비교하기는 어려움이 있었다.

각 획분은 펩타이드 농도 1.5, 15, 150, 1,500 µg/ml의 처리에서 농도의존적으로 혈소판응집 저해활성을 보였으며, 대체로 후반부의 염기성 획분들에서 활성이 높게 나타났다. 각 획분의 농도별 저해활성으로부터 IC₅₀을 구하여 Table 1에 나타내었으며, 각 획분의 IC₅₀은 10-1,000 µg/ml의 범위를 보였다. 2/3가량의 획분은 그 IC₅₀값이 양성 대조구인 RGDS의 경우(475 µM, 약 205 µg/ml)보다 낮았으며, 분획하지 않은 된장 추출물의 경우 매우 낮았다(30 µg/ml). 또한 16, 17, 18번의 IC₅₀이 현저하게 낮아 (10-20 µg/ml) 이들 획분의 저해활성이 상대적으로 높았다.

또한, 활성시험에서 15 µg/ml의 농도에서는 각 획분별 활성의 차이가 민감하게 나타나, 수차례 활성실험을 반복하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 여기에서도 16, 17, 18번 획분의 저해활성은 60-73%가량으로 추출물의 경우(56%)보다 높았다.

Table 1. IC₅₀ of peptide fractions on ADP-induced platelet aggregation

Fraction No.	IC ₅₀ (µg/ml)
B	150
1	180
2	250
3	150
4	1,000
5	400
6	250
7	200
8	250
9	200
10	600
11	200
12	150
13	125
14	100
15	100
16	10
17	15
18	20
Whole extract	30
RGDS ¹⁾	205

¹⁾RGDS, tetrapeptide as a positive control

Table 2. Amino acid composition of the peptide fraction No.16

Amino acid	Concentration, mole %		
	Total amino acid	Free amino acid	Peptide
Asp	2.48	ND ¹⁾	2.48
Glu	2.87	0.40	2.47
Ser	4.15	1.60	2.55
Gly	3.63	ND	3.63
His	7.30	ND	7.30
Arg	9.07	0.24	8.83
Thr	0.92	0.17	0.75
Ala	49.28	40.52	8.76
Pro	4.76	ND	4.76
Tyr	4.79	1.25	3.54
Val	3.10	2.12	0.99
Met	2.54	0.46	2.08
Ile	0.75	0.66	0.09
Leu	1.42	ND	1.42
Phe	ND	ND	ND
Lys	2.49	ND	2.49
Total	100.00	47.57	52.43

¹⁾ND: Not detected

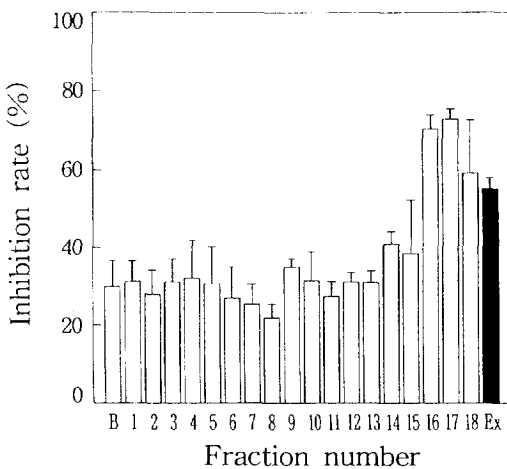


Fig. 3. Inhibitory effect of peptide fractions on ADP-induced platelet aggregation at the dose of 15 µg/ml *Ex, extract of soybean paste

활성 펩타이드의 특성

앞에서 19개의 획분중 IC₅₀이 10 µg/ml로 가장 낮은 16번에 대하여 역상 HPLC를 행한 결과, 용출시간 4.59분에서 단일 피크가 나타났다(data생략). 이는 크로마토그램상에서 용출용매 바로 뒤에서 나타난 것으로 보아, 혈소판 응집 저해활성 펩타이드로 이미 보고된 RGDS나 KRDS의 경우와 같이 친수성이 매우 높은 펩타이드임을 알 수 있었다. 그 HPLC 획분을 아미노산 분석한 결과, 유리 아미노산이 많이 존재하고 구성 아미노산의 비율이 정수에 가깝게 나타나지 않는 점으로 미루어 여전히 단일물질이 아님이 밝혀졌다 (Table 2). 즉, 유리 아미노산으로서 alanine이 다량 존재하며(40.5%), 펩타이드 부분은 histidine, arginine, alanine이 높은 비율로 나타났다(각각 7.3, 8.8, 8.8%).

따라서, 계속하여 활성획분 16, 17, 18번을 중심으로 단일 펩타이드를 분리하고, 그 특성을 규명할 필요가 있다고 생각한다.

요 약

전통식품인 된장으로부터 혈소판 응집 저해활성을 갖는 항혈전 펩타이드를 탐색하고자 하였다. 증류수로 추출한 된장액을 한외여과하여 얻은 분자량 3,000 dalton 이하의 여액에 대하여, SD흰쥐의 세척혈소판(washed platelet)을 이용하여 ADP 자극으로 유도되는 혈소판응집의 저해정도를 aggregometer에서의 탁도로 측정하였을 때, 96 µg/ml로 처리시 90% 가량의 응집 저해효과가 확인되었다. 추출물을 Dowex 50W X-2 강양이온 교환칼럼을 이용하여 pyridine-formic acid 완충액의 pH (2.8-5.0) 및 몰농도(0.1-3.0 M)를 단계별로 증가시키면서 용출시켜 19개의 획분(No.B-18)으로 분리하였다. 이들 획분의 활성을 microplate를 이용한 방법으로 측정하였을 때, 전체적으로 앞의 방법보다는 감도가 낮게 나타났으나 모든 분획에서 응집억제 효과가 확인되었다. 이때 용량반응곡선으로부터 구한 각 획분의 IC₅₀은 10-1,000 µg/ml의 범위를 보였으며, 대부분의 획분들은 양성대조구인 RGDS (IC₅₀, 205 µg/ml)보다 높은 활성을 나타내었다. 또한, 후반부의

염기성 획분(IC₅₀, 10-20 µg/ml)에서 된장추출물(IC₅₀, 30 µg/ml)보다 활성이 높게 나타났다. 이들 중 활성이 가장 높은 16번 획분을 아미노산 분석한 결과, 펩타이드 부분에 histidine, arginine, alanine 등이 높은 비율로 존재하였다.

감사의 말

본 연구를 수행함에 있어 혈소판 응집 저해활성시험에 많은 도움을 준 서울대학교 약학대학의 정진호 교수께 감사드립니다.

문 헌

1. Arthur, C.G.: *Hemostasis of Blood Coagulation. Textbook of Medical Physiology.* 6th ed., F. A. Davis Company, Philadelphia, PA, p. 76 (1986)
2. Epstein, F.H., Fuster, V., Badiomon, L., Badimon, J. and Chesbro, J.H.: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *New Engl. J. of Med.*, **326**, 242 (1982)
3. 손동화 : 식품단백질 유래의 생리활성 펩타이드. *식품기술*, **7**(3), 25 (1994)
4. Cliffe, A., Revell, D. and Law, D.: A method for the reverse phase high performance liquid chromatography of peptides from cheddar cheese. *Food Chemistry*, **34**, 147 (1989)
5. George, F., Gary, E. and Mohammad, Y.: A review of platelet function and testing. *J. of Medicine Tech.*, **47**, 723 (1981)
6. *Methods in Enzymology.* Academic Press, Inc., New York. p. 169 (1989)
7. Zwierzina, W.D. and Kunz, F.: A method of testing platelet aggregation in native whole blood. *Thromb. Research*, **38**, 91 (1985)
8. *Methods in Enzymology.* Academic Press, Inc., New York. p. 80 (1981)
9. 윤혜숙 : 신물질 창출을 위한 생물활성 연구법. 한국생화학회, 서울 (1995)
10. 류근호, 이주영, 조연숙, 김미정, 정진호 : 자연식품에 의한 혈소판 응집 억제능의 효율적 검색. *한국식품위생학회지*, **9**, 23 (1994)
11. Takeuchi, T.: Low molecular weight peptide in soybean miso. *J. Ferment. Technol.* (Japan), **52**, 256 (1974)

(1996년 2월 26일 접수)