

참치 자숙액의 Angiotensin 전환효소 저해작용

여생규* · 이태기 · 안철우* · 김인수** · 구연숙 · 박영호 · 김선봉†

부경대학교 식품공학과
*부산정보대학 레저산업계열
**경상대학교 식품과학과 · 해양산업연구소

Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity of Skipjack/Yellowpin Tuna Cooking Broth

Saeng-Gyu Yeo*, Tae-Gee Lee, Cheol-Woo Ahn*, In-Soo Kim**, Yeun-Suk Gu,
Yeung-Ho Park and Seon-Bong Kim†

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
**Group-department of Leisure Industry, Pusan College of Information Technology, Pusan 616-737, Korea*
***Department of Food Science · Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea*

Abstract

This study was designed to investigate the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of skipjack/yellowpin tuna cooking broth. The cooking broth was pretreated with membrane filter (MW cut-off 5,000) to obtain the peptide fraction with ACE inhibition. The crude peptides fractionated with Amberlite IR-120 (H⁺ form) and followed by Bio-gel P-2, were separated into nine fractions (T-1 to T-9). The maximum inhibitory activity was observed in the fraction T-4 (IC₅₀ value, 0.619mg protein/ml). The abundant amino acids obtained from active fraction T-4 were phenylalanine, leucine and glutamic acid.

Key words : angiotensin converting enzyme (ACE), tuna cooking broth, amino acid composition

서 론

사람의 질병에 의한 사망자수 중에서 그 비율이 높은 질병으로서 뇌혈관질환, 심장질환 및 암에 의한 질환 등이 있는데, 이 중 뇌혈관질환과 심장질환은 고혈압증과 밀접한 관계가 있다¹⁾. 그래서, 최근 생체조절기능을 갖는 식품성분

에 대한 관심이 높아져 그 기능성 인자의 성상이나 생체내 작용기작에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

생체내의 혈압을 조절하는 기구는 여러 가지가 있으나, renin-angiotensin계가 혈압상승에 크게 관여한다는 것이 밝혀져 있다²⁾. 즉 혈액 중의 당단백질인 angiotensinogen이 신장에서 분비되는 단백질분해효소인 renin의 작용으로 분

† Corresponding author

해되어 angiotensin I을 생성하게 되고, 이것은 다시 angiotensin 전환효소 (angiotensin converting enzyme, ACE)인 dipeptidyl carboxypeptidase에 의하여 그 대부분이 angiotensin II로 전환하게 된다. 이 angiotensin II는 말초혈관을 수축시켜 강한 혈압상승작용을 나타내는 물질이다. 뿐만 아니라 ACE는 혈액 중의 혈압강하작용을 가지는 bradykinin을 분해하여 불활성화 시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승하게 하는 구실을 한다³⁻⁵⁾.

따라서, 혈압의 상승을 억제하기 위해서 ACE의 작용을 저해하는 것이 효과적인 방법의 하나라고 할 수 있다. 실제로 ACE 저해활성을 갖는 peptide형 및 비 peptide형의 성분들이 각종 식품소재로부터 분리되고 있다⁶⁻¹²⁾.

본 연구는 우리나라 수산가공 통조림 중에서 약 70%를 차지하는¹³⁾ 참치 통조림 제조시 부산물로 대량 배출되는 참치 자숙액으로부터 혈압상승에 크게 관여하는 ACE의 작용을 저해하는 기능성 peptide를 제조하여 그 특성을 밝혀, 고부가가치 기능성 식품 소재로서의 이용 방안에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 참치 자숙액

참치 자숙액은 원료인 가다랑어(*Euthynnus pelamis*) 및 황다랑어(*Thunnus albacares*)를 해동하여 자숙 후에 나오는 유출액을 100mesh 체로 여과한 것을 경남 창원시 소재(주) 동원산업으로부터 운반하여 -18°C의 동결고에 저장하여 두고, 사용할 때 저온실(4°C)에서 정치해동하고, 부유하는 협잡물을 제거하기 위하여 망사를 통과시켜 증류수를 동량 가한 것을 원료액으로 하였다(이의 수분은 94.6%, 지방은 0.9% 단백질은 4.1% 회분은 1.5% 이었고, 염도는 1.3%, pH는 5.8이었다). 한외여과막 전단부에 10 μ m 공경의 micro filter를 장착하여 상기의 전처리액을 통과시킨 후 막여과기(Superane Membrane Testing System, 선경인더스트리사, 한국)를 이용하여 분자량 5,000의 한외여과막(SKUS-206-0805, MWCO ; 5,000)을 투과하여 고분자 물질을 제거시킨 후, 그 여액을 40°C에서 감압농축한 것을 시료액으로 하였다.

2) 실험시약

Angiotensin I 전환효소(ACE)는 토끼의 허파로부터 얻은 아세톤 침전분말(Sigma Co.) 1g에 봉산완충액(pH 8.3, containing 400mM NaCl) 10ml를 가하여 5°C에서 24시간 교반한 후 원심분리(10,000 rpm, 30분)하여 얻은 상층액을 조효소액으로 하였으며, 기질로는 hippuryl-histidyl-leucine(Sigma Co.)을 사용하였다. 그리고 이 밖에 사용한 모든 시약은 시약용 특급품을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 일반성분의 분석

수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 Kjeldahl법, 회분은 건식회화법, 염도는 More법¹⁴⁾으로 측정하였다.

2) 단백질 정량

단백질 함량은 Lowry 등¹⁵⁾의 비색법과 280nm에서의 흡광도로써 측정하였다.

3) Angiotensin I 전환효소(ACE) 활성 측정

ACE 활성은 Cushman과 Cheung¹⁶⁾의 방법을 개량한 Yamamoto 등¹⁷⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 소정농도의 시료 100 μ l에 ACE 조효소액 100 μ l 및 봉산완충액(pH 8.3, containing 400mM NaCl) 200 μ l를 가한 후, 37°C에서 preincubation 시켰다. 여기에 기질로써 12.5 mM의 hippuryl-histidyl-leucine 용액 100 μ l를 가하여 다시 37°C에서 1시간 반응시킨 후 1N HCl 300 μ l를 가하여 반응을 정지시켰다(공시험은 시료 용액 대신에 봉산완충액 100 μ l를 사용하였으며, 대조구는 1N HCl 300 μ l를 가한 다음 ACE 조효소액 100 μ l를 가하였다). 여기에 ethyl acetate 1.5ml를 가하여 15초간 교반한 후, 3,000rpm에서 10분간 원심분리시켜 상층액 1ml를 취하였다. 이 상층액을 140°C에서 20분간 건조시킨 다음 실온에서 5분간 방치한 후 1M NaCl 3ml를 가하여 15초간 교반하여 용해시키고 228nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가 전후 잔존 활성의 백분율로써 ACE 저해율을 나타내었다.

4) ACE 저해 peptide의 분리

① Ion exchange chromatography에 의한 분획

조제한 시료액 5ml를 강산성 양이온교환수지인 Amberlite IR-120(H⁺ form)을 충전한 column(3.0 × 30cm)에

주입하고 흡착시킨 다음 탈이온수로 세정후, NH₄OH용액을 사용하여 농도구배법(0.01~1.0 M)으로 용출(유속, 30ml/hr; 분획량 5ml/tube)시켰다.

② Gel chromatography에 의한 분리

분획한 ACE 저해 활성 획분을 40°C에서 감압농축한 후, Bio-gel P-2(Bio-Rad 사)를 충전한 column(2.2 × 80cm)을 사용하여 각 시료액 2ml를 탈이온수로써 용출(유속, 20 ml/hr; 분획량 5ml/tube)시켰다. 분획한 각 용출액을 280 nm에서 흡광도를 측정하고 Lowry법에 의한 단백질의 함량을 구하였다.

5) 아미노산 분석

아미노산 분석은 단백질 함량으로 15mg되는 시료 1ml를 ample에 넣고, 진한 염산 1ml를 가하여 질소가스로 치환한 뒤 봉한 다음 110°C의 dry bath에서 24시간 가수분해하였다. 분해액을 glass filter로 여과하고 감압건고하여 염산을 완전히 제거한 다음 증류수 10ml를 가하여 다시 감압건고한 후, 구연산완충액(pH 2.2, Sigma Co.)으로써 25ml로 정용하였다. 이의 일정량을 취하여 아미노산 자동분석기(Hitachi 835)를 사용하여 정량하였다.

결과 및 고찰

1. 참치 자숙액의 ACE 저해작용

자숙액 중의 고분자 단백질을 제거하기 위하여 막분리를 행하고, 막분리 전후 참치 자숙액의 ACE 저해효과를 Table 1 나타내었다. 그 결과, 막분리 전후 IC₅₀ 값(ACE의 활성을 50% 저해하는데 요구되는 저해제의 양)이 각각 1.790mg protein/ml 및 1.658mg protein/ml로 그다지 큰 차이를 보이지 않았다.

이와 관련하여 Yeum 등¹⁸⁾은 탈지대두박, egg albumin 및 casein 등의 식품단백질 효소가수분해물의 ACE 저해효과를 검토하고, 그 저해작용에는 단백질이나 peptide의 양보다는 어떤 종류의 peptide가 존재하는가에 영향을 받는다고 하였으며, Cheung 등¹⁹⁾도 peptide들의 ACE 저해효과에 미치는 C 말단 및 N 말단 아미노산 잔기의 영향에 대하여 검토한 결과, C 말단에는 tryptophan, phenylalanine, tyrosine 및 proline 등이, N 말단에는 histidine을 비

Table 1. ACE inhibition effect of fractions separated from Skipjack/yellowpin tuna cooking broth by membrane filtration, Amberlite IR-120 and Bio-gel P-2 column

Fraction	IC ₅₀ (mg protein/ml)
Unfractionated	1.790
Membrane filtrate	1.658
Amberlite IR-120 column	
Part T	1.278
Bio-Gel P-2 column	
Part T-1(Fraction No. 21~24)	5.438
Part T-2(Fraction No. 25~30)	2.588
Part T-3(Fraction No. 34~37)	1.525
Part T-4(Fraction No. 38~41)	0.619
Part T-5(Fraction No. 45~48)	2.120
Part T-6(Fraction No. 52~54)	2.720
Part T-7(Fraction No. 59~64)	2.927
Part T-8(Fraction No. 83~86)	3.578
Part T-9(Fraction No. 87~92)	4.235

롯한 염기성 아미노산과 방향족 및 소수성 아미노산들이 있고, 이들 peptide들은 ACE에 대하여 angiotensin I과 경쟁적으로 결합하여 ACE의 활성을 감소시키는 것으로 추정된다고 하였다.

한편, Matsumura 등²⁰⁾은 가다랑어 내장으로부터 ACE 저해작용을 나타내는 6종류의 peptide를 분리하여 이들의 아미노산 배열을 밝히고, 이를 기초로 peptide를 화학적으로 합성하여 ACE 저해작용을 검토한 결과, 강한 저해활성을 나타내는 4종류의 tripeptide들은 공통적으로 N 말단 아미노산 잔기로서 valine, Isoleucine 및 leucine과 같은 소수성 아미노산을 가지고, 중앙에는 arginine 및 lysine과 같은 염기성 아미노산을, C 말단 아미노산 잔기로는 proline을 가졌다고 하였다.

2. 참치 자숙액으로부터 ACE 저해 peptide의 분리 및 특성

막분리한 참치 자숙액으로부터 ACE 저해 peptide를 분리하기 위하여, Amberlite IR-120 수지를 충전한 column으로 이온교환 크로마토그래피를 행한 결과를 Fig. 1에 나

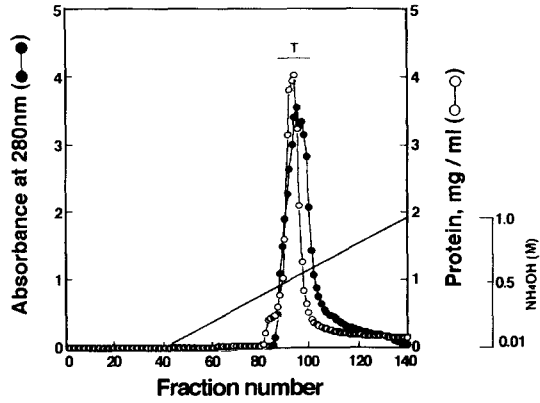


Fig. 1 Ion exchange chromatogram of membrane filtrate of skipjack/yellowpin tuna cooking broth by an Amberlite IR-120(H⁺) column(3.0×30cm).

타내었으며, ACE 저해 peptide는 NH₄OH 용액 농도 0.46~0.66 M 정도에서 용출되었다.

분획한 획분 T(IC₅₀=1.278mg protein/ml)를 감압농축한 후, Bio-gel P-2를 충전한 column을 사용한 겔 크로마토그래피를 실시하고 280nm에서 흡광도 및 그 때의 단백질 함량을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

그 결과, T-1~T-9 까지 9개의 획분으로 분리되었다. 이

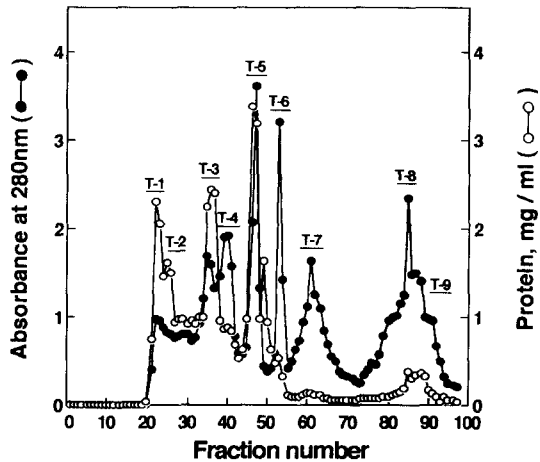


Fig. 2 Gel chromatogram of fraction T by a Bio-Gel P-2 column(2.2 ×80cm).

Table 2. Amino acid composition of membrane filtrate of Skipjack/yellowpin tuna cooking broth and active fraction T-4 separated by Bio-gel P-2 column

(% to total amino acids)

Amino acid	Membrane filtrate	Active fraction T-4
Aspartic acid	6.5	2.3
Threonine	3.8	2.3
Serine	3.9	1.5
Glutamic acid	11.0	10.4
Glycine	10.2	6.4
Alanine	8.8	5.5
Cysteine	2.2	1.7
Valine	4.4	6.8
Methionine	2.9	4.9
Isoleucine	2.7	6.0
Leucine	5.9	11.9
Tyrosine	6.9	7.8
Phenylalanine	3.1	15.9
Lysine	8.0	9.6
Histidine	8.7	4.1
Arginine	5.1	0.9
Proline	5.9	2.0
Total	100.0	100.0

들 각 획분들의 ACE 저해효과를 살펴본 결과(Table 1), 그 저해효과가 가장 우수한 획분은 T-4(fraction No. 38~41) 획분이었고, 그 저해효과는 IC₅₀ 값이 0.619mg protein/ml인 것으로 나타났다. 또한 단백질 함량은 적으나 tyrosine이나 tryptophan과 같은 방향족 아미노산에 의해 280nm에서 높은 흡광도치를 나타낸 T-6~T-9 획분의 저해효과는 낮았다.

한편, 겔 여과에 의한 ACE 저해 활성 획분인 T-4 획분과 막여과액의 아미노산 조성은 Table 2에 나타내었다. 그 결과 T-4 획분은 phenylalanine의 함량이 15.9%로 가장 많았으며, 그 다음으로 leucine과 glutamic acid가 각각 11.9%와 10.4%로 나타나, 이 3종류의 아미노산이 약 38% 정도를 차지하였다. 막여과액은 glutamic acid와 glycine의

함량이 각각 11.0% 및 10.2%로 많았다.

이와 관련하여 Suetsuna와 Osajima²¹⁾는 정어리와 갈치 육 가수분해물로부터 ACE 저해효과를 갖는 염기성 peptide를 분리하였으며, Suetsuna 등²²⁾도 12종의 어육과 3종의 패류육의 pepsin 가수분해물에서 ACE 저해효과를 가지는 peptide를 검색·분리하였으며, ACE 저해 peptide의 아미노산 조성은 aspartic acid, glutamic acid, arginine, proline, isoleucine 및 lysine의 함량이 특징적으로 많다고 하였다. Yeum 등²³⁾도 고등어 근육단백질의 복합효소 및 bromelain에 의한 가수분해물에서 ACE 저해 활성획분의 분자량은 약 1,450으로 추정하고, 아미노산 조성은 aspartic acid, glutamic acid, lysine, leucine, valine 및 alanine의 함량이 많았다고 보고되고 있다.

이상의 결과를 종합하면 참치자숙액의 ACE 저해작용은 그 구성 아미노산의 조성이나 함량에도 영향을 받을 것으로 생각되나, 그 구성 peptide의 종류나 아미노산의 배열에 더 큰 영향을 받을 것으로 추정된다.

요 약

참치 통조림 가공시 부산물로 유출되는 자숙액은 상압하에서 가열, 농축하여 부가가치가 낮은 조미소재로서 이용되고 있다. 따라서 참치 자숙액을 시료로 하여, 이 중에 함유되어 있는 ACE 저해물질을 분리하여 그 특성에 대하여 살펴보았다.

막분리한 참치 자숙액으로부터 ACE 저해인자를 분리하기 위하여, Amberlite IR-120(H⁺ form) column을 이용한 이온교환 크로마토그래피, Bio-gel P-2를 충전한 겔 크로마토그래피로 분리하여 9개 획분(T-1~T-9)을 얻었으며, 이 중 획분 T-4의 ACE 저해효과(IC₅₀=0.619mg protein/ml)가 가장 우수하였다.

또한 참치 자숙액으로부터 분리한 ACE 저해 활성획분인 T-4의 아미노산 조성은 phenylalanine, leucine 및 glutamic acid의 함량이 많은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 논문은 1997년도 부산정보대학 학술연구소 연구비의 일부 지원에 의하여 수행되었음을 밝히며, 이에 감사를 드

립니다.

참 고 문 헌

1. Seki, 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. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 0(11), 783-791(1993).
2. Saxena, P. R. : Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 19(6), S80-S88(1992).
3. Ondetti, M. A. and Cushman, D. W. : Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 283-308(1982).
4. Ehlers, M. R. W. and Riordan, J. F. : *Angiotensin-converting enzyme. Biochemistry and molecular biology*. pp. 1217-1231, Edited by Laragh, J. H. and Brenner, B. M. Hypertension : Pathophysiology, diagnosis and management. Raven Press, LTD., New York(1990).
5. Waeber, B., Nussberger, J. and Brunner, H. R. : *Angiotensin-converting-enzyme inhibitors in hypertension*. pp. 2209-2232, Edited by Laragh, J. H. and Brenner, B. M. Hypertension : Pathophysiology, diagnosis and management. Raven Press, LTD., New York(1990).
6. Maruyama, S. and Suzuki, H. : A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, 46(5), 1393-1394(1982).
7. Yano, S., Suzuki, K. and Funatsu, G. : Isolation from α -zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(4), 661-663(1996).
8. Matsufuji H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y. : Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58(12), 2244-2245(1994).
9. Astawan, M., Wahyuni, M., Yasuhara, T., Yamada, K., Tadokoro, T. and Maekawa, A. : Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(3), 425-429(1995).
10. Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y. and Shimizu,

- T. : Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(10), 1743-1744(1993a).
11. Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kikuchi, M. : Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(7), 1107-1110(1993).
 12. Saito, Y., Nakamura, K., Kawato, A. and Imayasu, S. : Angiotensin I converting enzyme inhibitors in sake and its by-products. *Nippon NŌgeikagaku Kai-shi*, 66(7), 1081-1087(1992)
 13. 한국수산회 : 수산연감, p. 550, 서울(1994).
 14. 日本藥學會編 : 衛生試驗法·注解 pp. 73-75, 金原出版株式會社, 東京(1990)
 15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275(1951).
 16. Cushman, D. W. and Cheung, H. S. : Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637-1648(1971).
 17. Yamamoto, S., Toida, I. and Iwai, K. : Re-examination of the spectrophotometric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Japan. J. of Thoracic Diseases*, 18(5), 297-303(1980).
 18. Yeum, D. M., Roh, S. B., Lee, T. G., Kim, S. B. and Park, Y. H. : Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of food protein. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22(2), 226-233(1993).
 19. 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. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.*, 255(2), 401-407(1980).
 20. Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K. and Shimizu, T. : Angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(5), 695-697(1993b).
 21. Suetsuna, K. and Osajima, K. : The inhibitory activities against angiotensin I -converting enzyme of basic peptides originating from sardine and hair tail meat. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 2(11), 1981-1984(1986).
 22. Suetsuna, K., Yamagami, M. and Kuwata, K. : Inhibitory activity against angiotensin I -converting enzyme of peptides originating from fish and shellfish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54(10), 1853(1988).
 23. Yeum, D. M., Lee, T. G., Byun, H. S., Kim, S. B. and Park, Y. H. : Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 25(3), 229-235(1992).