

도축 폐혈액 단백질로부터의 Angiotensin I Converting Enzyme 저해 펩타이드의 생산

†현 창 기 · 신 현 길
한동대학교 생물식품공학부
(접수 : 1999. 9. 13., 게재승인 : 1999. 10. 18.)

Production of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Bovine Blood Plasma Proteins

Chang-Kee Hyun[†] and Heuyn-Kil Shin
School of Bioscience and Food Technology, Handong University, Pohang 791-940, Korea
(Received : 1999. 9. 13., Accepted : 1999. 10. 18.)

For the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides as a material for antihypertensive functional foods from animal blood produced in slaughterhouse, the optimum condition for enzymatic hydrolysis to yield a peptide fraction of the highest activity were investigated with a respect of industrial production. Among several industrially-useable enzymes tested, Alcalase® produced hydrolysates of the highest activity from total plasma and purified albumin. IC₅₀ values of albumin hydrolysate and its third fraction separated by gel chromatography were 0.5 and 0.02 mg/mL, respectively. The fraction was found to be obtained by a simple ultrafiltration using a membrane of MW cutoff 1,000. The possibility for the industrial production of antihypertensive peptides from animal blood plasma proteins was suggested.

Key Words : bovine blood, plasma proteins, angiotensin I converting enzyme(ACE), peptides

서 론

가축혈액은 도축장으로부터 생산되는 축산부산물로서 혈장부분에는 albumin과 globulin이 약 8%, 혈구부분에는 globin이 28%까지 함유되어 있어 각종 단백질이 풍부한 유용가치가 높은 자원이다. 그러나 우리나라에서는 이 가축혈액이 자원으로 이용되는 것이 아니라 거의 대부분 폐기되고 있기 때문에 유용자원의 낭비는 물론 환경의 주요 오염원으로서도 문제를 냉고 있다. 우리나라에서 연간 도축되는 가축의 두수는 1997년에 소가 약 1,125,000두, 돼지가 약 10,738,000두로서 그로부터 방혈되는 도축혈액은 각각 17,000여톤, 53,000여톤으로서 약 70,000톤 이상의 가축혈액이 폐기되고 있다(1, 2). 뿐만 아니라 이러한 도축혈액의 폐기는 1973년을 기준할 때 1980년까지 7년간 1.1배 정도밖에 늘지 않았으나 85년에는 1.9배, 90년, 92년, 94년, 96년에는 각각 2.1배, 2.5배, 2.9배, 3.2배로 늘어나 그 증가율이 계속 상승하고 있어 상황은 더욱 심각해지고 있는 실정이다. 한편 선진국에서는 이 가축 폐혈액을 이용하여 각종 유용물질을 생산하는

연구를 계속하여 왔고 또한 몇 가지는 상품화되어 제품으로 공급되고 있으며, 우리나라에서는 오히려 이들을 다량 수입하고 있는 실정이다. 현재 가축혈액이 주로 이용되고 있는 것은 동물성 단백질 농후사료로서, 도축장의 가축의 피를 모아 건조, 분말화한 혈분(blood meal)으로 공급되고 있으며, 일부분이기는 하나 혈액내의 혜모글로빈 등 특정 성분을 분리해내어 기능성 식품소재, 의약품소재 등으로 이용되고 있다(3). 즉 가축혈액의 이용은 혈액 자체를 간단한 처리만 거쳐 사료첨가제로 사용하고 있는 분야가 주를 이루고 있으며, 혈액내의 단백질 또는 그 외 특정 유용성분을 개별적으로 추출해내어 이용하는 방법은 그 동안 산발적으로 연구되어 왔으나 아직 본격적인 이용단계에는 이르지 못하고 있는 실정이다. 그러나 사료첨가제로의 이용도 혈분 자체의 높은 염농도와 최종 제품에 미치는 암적색 등에 의한 악영향으로 인해 그 사용량은 감소추세에 있고, 기능성 식품소재로의 이용은 앞으로 확대 성장해 나갈 전망을 보여주고 있으나 현재로서는 응용분야가 빈약하고 제조 기술이 충분히 연구되어 있지 않아 여러 가지 장애물이 앞에 놓여있는 형편이다. 따라서 엄청난 양으로 끊임없이 생산되어 버려지고 있는 가축혈액을 이용하여 여러 가지 고부가가치의 유용물질을 생산해낸다면, 자원 낭비의 차단은 물론 환경오염의 방지에 이르기까지 다방면으로의 성과를 기대할 수가 있다. 특히 최근에 위생적인 시설을 가진 도축장이 새롭게 설치되고 있어 위생적인 가축혈액의 수집이

[†] Corresponding Author : School of Bioscience and Food Technology, Handong University, Heungae, Pohang 791-940, Korea
Tel : 0562-60-1361, Fax : 0562-61-4603
E-mail : ckhyun@han.ac.kr

가능해지고 있기 때문에 가축혈액을 이용하는 응용연구의 필요성은 절실하며 또한 시급한 시점에 이르렀다 하겠다.

단백질의 효소가수분해물로부터 ACE(angiotensin I converting enzyme) 저해 펩타이드를 생산하는 연구는 우유 단백질인 casein으로부터 본격적으로 시작되어 무화과 수액, 대두 단백질, 옥수수 단백질인 zein, 참치, 정어리, 가다랭이 등의 근육 단백질 또는 내장, 오징어, 난백 단백질 등, 80년대 말부터 최근까지 다양한 원료로부터 얻어진 펩타이드들의 ACE 저해 활성이 보고되었다(4, 5). 최근 10여 년간 보고된 이들 각 원료들로부터 생산된 펩타이드들은 그 구조가 다양하였으며 IC₅₀(ACE의 활성을 50% 저해하는 펩타이드의 농도)도 1 μM 이하인 것에서부터 200 μM에 이르기까지 다양한 활성을 갖고 있는 것을 알 수 있다. 한편 가축혈액의 단백질에 대해서도 ACE 저해 펩타이드가 얻어졌는데, 이들은 소 혈청 albumin을 trypsin으로 가수분해하여 얻은 펩타이드와(6), 소 혈액의 hemoglobin을 pepsin으로 가수분해하여 얻은 펩타이드(7), 그리고 돼지 혈장에 pepsin이나 trifluoroacetic acid를 처리하여 펩타이드를 얻은 경우(8, 9) 등이 보고되고 있다. 그러나 지금까지 가축혈액으로부터의 ACE 저해 펩타이드 생산에 관한 연구는 모두가 생성되는 펩타이드의 구조와 활성(IC₅₀)을 밝히는 실험들이었다. 즉 특정 단백질 원료에 대하여 특정 단백분해효소를 이용하여 펩타이드를 생산하였을 때 얻어진 가장 활성이 좋은 펩타이드의 아미노산 배열을 규명하고 그 펩타이드의 순수한 용액이 나타내는 ACE 저해활성을 주로 보고하였다. 이러한 연구내용에 의한다면 생성되는 펩타이드를 기준의 항고혈압 약제로 시판중인 captopril 등과 같이 순수한 물질로 분리해내어 주사제 또는 정제 등으로 실용화할 수 있겠다. 실제로 한 예를 든다면 상기의 돼지 혈장 단백질을 이용하는 내용의 특허 역시 4가지 고활성의 ACE 저해 펩타이드의 구조를 밝히고 이를 주사제, 과립제, 정제 등으로 사용하는 방법을 제시하고 있다(8). 그러나 이러한 내용들은 이 펩타이드를 기능성 식품소재로 실용화하고자 할 때에는 충분한 정보를 주지 못하는 것이며, 이 때 필요한 것은 그 펩타이드 생산에 있어서의 생산성에 관한 연구라야 할 것이다. 항고혈압 기능성 식품소재로서의 펩타이드는 비교적 다량의 펩타이드가 음료 등에 배합되는 형태이기 때문에 고활성의 펩타이드의 순수분리(순도)보다는 고활성 펩타이드가 고농도로 함유되는 분획의 생산조건이 더 중요한 요인이 되는 것이다.

현재 ACE 저해 펩타이드가 산업화되어있는 일본에서도 ACE 저해기능을 표시한 식품은 아직 없기 때문에 표면적인 ACE 저해 펩타이드 시장은 없는 셈이다. 그러나 앞서 실용화 현황에서 설명한 바와 같이 가다랭이포(かつお節)와 casein 등으로부터 얻어진 여러 형태의 ACE 저해 펩타이드가 영양보조식품 내지는 특정보건용식품에 배합되어 시판 또는 표시허가(혈압강하효과)를 받기 위한 절차 중에 있다(10). 즉 이미 상품화된 일반식품용 항고혈압 소재 '가다랭이포 oligopeptide', 영양보조식품 'Peptide ACE', 청량음료 'BEFORE'와, 펩타이드 성분은 아니지만 두충엽 배당체(杜仲葉 配糖體)를 성분으로 한 청량음료 '杜仲120' 등, 항고혈압 기능성 식품 또는 식품소재의 시장은 활발히 전개되고 있는 현실이다. 이 외에도 현재 일본에서는 난백 albumin의 pepsin 가수분해로 얻어지는 ovokinin, 옥수수 단백질 zein의 가수분해물 등을 실용화하기 위해 연구 중에 있다. 본 연구에서 다루고 있는 소 혈장 단백질로부터 생산된 ACE 저해 펩타이드

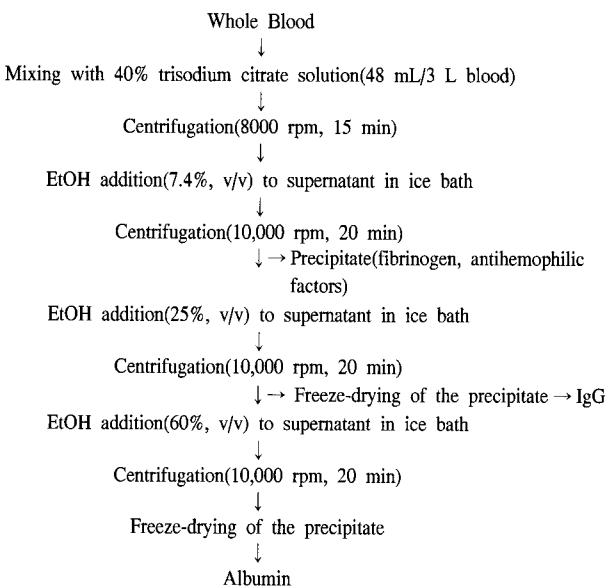


Figure 1. Separation procedure for blood plasma proteins.

또한 그와 더불어 실용화 가능성이 높은 것으로 판단된다. 단백질이 풍부한 폐혈액 혈장으로부터 생산되므로 단백질의 분리과정이 단순하고 원료비용이 절감된다는 측면에서 여타 단백질과의 경쟁력이 확보되는 것이다. 이와 같은 배경을 가지고 본 연구에서는 소 혈장 단백질로부터 고활성 ACE 저해 펩타이드 분획의 생산조건을 조사한 결과, 기능성 식품소재로서의 실용화 가능성이 충분함을 확인하게 되었다.

재료 및 방법

혈액시료 채취 및 혈장 단백질의 분리

경북 포항시 소재 (주)명신산업 도축장으로부터 도축 즉시 위생적으로 채취한 소 혈액에 채혈 즉시 항혈액응고제(0.85% NaCl, 5% sodium citrate 용액)를 혈액부피와 동일한 양을 첨가하여 혈액응고를 방지하였다. 채혈된 혈액은 24시간 이내에 혈장과 혈구를 분리하기 위해 6,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다.

Albumin과 globulins 분획의 분리를 위하여 cold ethanol 침전법(11)을 사용하였다. 즉 cold ethanol의 분획별(15, 20, 25, 30, 40, 50, 55, 60%) 침전물을 얻은 후 전기영동에 의해 분리하고자 하는 각 단백질의 band를 확인함으로써 적절한 침전분획조건을 결정하였다. 이때 전기영동의 조건은 12.5% SDS-polyacrylamide gel로서 pH 8.8에서 실시하였으며 저분자량 size marker (Sigma, USA), 분리전의 혈장과 bovine serum albumin(Sigma, USA)을 함께 전기영동함으로써 분리된 단백질을 확인하였다. Albumin과 globulins 분획의 분리조건은 Figure 1에 나타낸 바와 같이 결정되었으며 이 분리과정에 의해 분리한 두 가지 단백질 용액을 4°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

산 및 효소처리에 의한 단백질의 분해

혈장 원액 및 앞 실험에서 분리된 albumin과 globulins 분획에 대하여 우선 산에 의한 가수분해를 실시하여 무작위로 분해되어 나오는 펩타이드 혼합물을 얻었다. 혈장 원액을 증류수로 2배

희석한 후 1N HCl을 이용하여 pH 2.0으로 맞추고 전공 오븐에서 150°C로 4시간 동안 가열하여 단백질을 가수분해하였다. 가수분해물은 중탕한 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전 단백질을 제거하고, 얻어진 상등액의 펩타이드 농도(mg protein/mL)를 bicinchoninic acid(BCA)법(12)으로 측정함으로써 가수분해 정도를 판별하였다.

혈장 원액, albumin 및 globulins 분획에 대한 효소 가수분해를 위해 반응조건을 확립하였다. 단백분해효소는 산업적으로 이용할 수 있도록 저렴하게 공급할 수 있는 효소들을 실험에 사용하였는데, 식품산업용 효소인 Novo Nordisk사(Denmark)의 Alcalase® 및 Neutrase®(각각 미생물 유래)와 시약용 조효소로서 동물유래의 trypsin(Type II-S, Sigma) 및 pepsin(1:2,500, Sigma), 식물유래의 papain(Crude powder, Sigma) 등에 대하여 펩타이드 생산실험을 실시하였다. 기질용액으로는 혈장 원액을 사용하였으며 albumin과 globulins 분획의 경우는 건조분말 약 900 mg을 50 mM PBS buffer(pH 7.4) 10 mL에 녹인 후 용해되지 않고 남은 성분들을 8,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 제거하고 얻어지는 상등액을 사용하였는데, 이들 모든 기질 용액의 단백질 농도를 측정하여 50 mg protein/mL로 일정하게 되도록 중류수로 각각 희석하였다. 기질용액 10 mL에 각 효소를 효소제품의 중량기준으로 기질 단백질 함량에 대하여 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5% (w/w)의 농도로 각각 첨가하고 효소반응온도와 pH는 각각 Alcalase는 55°C, 7.5, Neutrase는 45°C, 6.2, pepsin과 trypsin은 37°C, 2.0 및 7.5, papain은 25°C, 6.2로 하여 매 1시간마다 시료를 1 mL씩 채취하면서 8시간까지 반응시켰다. 효소를 처리한 반응액은 시간별로 시료를 채취한 후 중탕으로 가열하고 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전되는 미분해 단백질 성분을 제거한 후 상등액의 펩타이드 농도를 BCA법으로 측정하여 효소반응정도를 비교하였다.

펩타이드 분획의 분리

최적화된 효소반응조건에 의해 분해하여 얻은 가수분해물 시료를 Sephadex G-25 gel chromatography column(2×60 cm)에 loading하여 3차 중류수로 elution시켰다. 각 분획의 크기는 약 3 mL로 하고 각 분획의 280 nm에서의 UV 흡광도를 측정하여 chromatogram을 얻었다. 단 한외여파에 의해 특정 분자량의 펩타이드들을 제거하고자 할 때는 Amicon PM-10(MW cutoff 10,000), Amicon YM1(MW cutoff 1,000), Amicon YC05(MW cutoff 500) 등의 한외여파막을 통과시킨 후 얻은 여액에 대하여 앞과 동일한 Sephadex G-25 gel chromatography를 실시하였다.

단백질 가수분해물 및 펩타이드 분획에 대한 ACE 저해활성 조사

혈장 원액의 가수분해물, albumin 및 globulins 분획의 가수분해물, 이들로부터 gel chromatography 및 한외여파에 의해 분획하여 얻어진 펩타이드 분획들에 대하여 ACE 저해활성을 측정하였다. ACE 저해활성의 측정은 Cheung 등의 방법(13)을 따라, ACE의 효소반응에 의해 hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL) 펩타이드로부터 hippuric acid가 형성되는 반응에 있어서 첨가하는 펩타이드 시료의 저해작용으로 인해 hippuric acid의 형성이 감소되는 정도를 측정하되, 측정방법은 HPLC에 의한 측정법을 이용하였다. 즉 225 μL의 기질용액(8.3 mM HHL)에 25 μL의 펩-

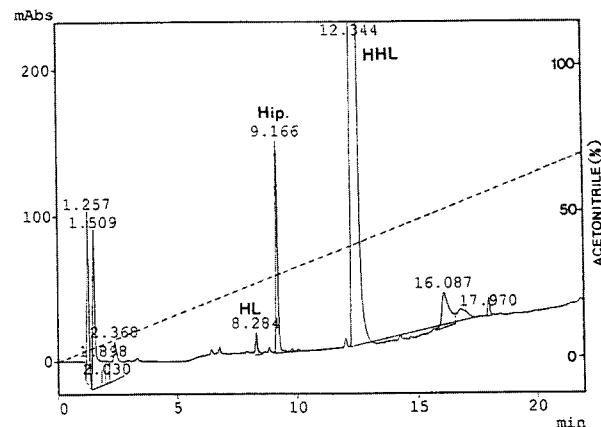


Figure 2. RP-HPLC chromatogram for ACE inhibitory activity assay. HL; L-histidyl-L-leucine, Hip.; hippuric acid, HHL; hippuryl-L-histidyl-L-leucine.

타이드 시료를 섞은 후 37°C에서 5분간 예열한 후 rabbit lung acetone powder로부터 추출한 ACE를 75 μL 가하여 30분간 반응시키고 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) 20 μL를 가하여 반응을 정지시켰다. 생성된 hippuric acid의 HPLC에 의한 측정을 위해서 Novapak C8(3.9 × 150 mm, Waters, USA) column을 HPLC (LC-10A, Shimazu, Japan)에 연결하고 0.1% TFA 수용액을 1 mL/min의 유속으로 흘려주면서 acetonitrile을 linear gradient (0~70% / 20 min)로 걸어주어 분리되어 나오는 펩타이드를 228 nm 흡광도로 측정하였다(Figure 2). Hippuric acid를 나타내는 peak의 높이를 기준으로 50%의 저해활성을 나타내는 펩타이드 농도를 IC₅₀(mg/mL)으로 결정하였다.

결과 및 고찰

혈장 원액의 효소적 가수분해

도축 폐혈액 중에 함유되어 있는 단백질을 가수분해하여 펩타이드를 생산하기 위해서 폐혈액 자체를 아무런 처리없이 이용하는 것은 혈액 중 45%가 적혈구이기 때문에 효과적으로 효소의 분해작용을 일으키기에는 어려움이 따른다. 적혈구 부분은 용혈과정을 거쳐야 하고 효소 가수분해 반응 이전 또는 이후에 heme을 제거하기 위한 과정이 매우 복잡한 점 등 이용하는데 까다로운 측면을 가지고 있기 때문이다. 한편 적혈구 부분을 제거한 혈장 부분에만도 7~9%의 고농도 단백질이 함유되어 있으며, 또한 폐혈액으로부터 혈장을 얻어내는 것은 매우 단순한 원심분리 공정만으로 가능하기 때문에 본 연구에서는 폐혈액 단백질로부터 효과적으로 펩타이드를 얻기 위해 혈장 단백질을 이용하기로 결정하였다. 우선 혈장 원액에 함유되어 있는 모든 혈장 단백질에 대하여 효과적으로 분해반응을 일으킬 수 있는 단백분해효소를 찾기 위하여 Alcalase, Neutrase, trypsin, pepsin, papain 등 특성이 다른 5개 효소를 각각의 최적반응조건에서 반응시켰다. 효소반응이 진행된 정도는 각 효소를 1%(w/w)의 농도로 처리하여 1시간동안 반응시킨 가수분해물에 대하여 효소반응전 단백질 농도에 대하여 반응후 펩타이드 농도의 비로부터 가수분해도(degree of hydrolysis, %)를 계산하여 비교하였다. 그 결과 Alcalase가 80%로 가장 높은 분해도를 보였고 Neutrase 75%, pepsin 24%, papain 9% 등의 순이었으며 trypsin은 거의 분해작

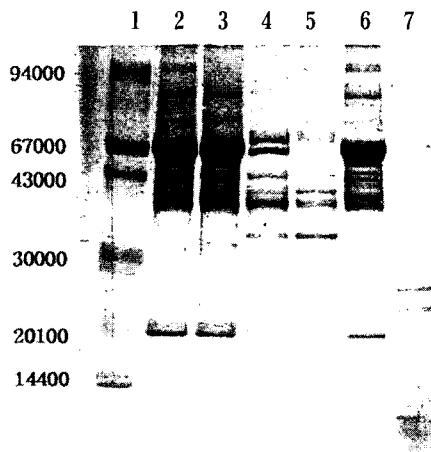


Figure 3. SDS-PAGE of bovine plasma proteins hydrolyzed by Alcalase and Neutrase. Lane 1; Low molecular weight standard, lane 2; bovine plasma proteins, lane 3; bovine plasma proteins with Alcalase(0 h), lane 4 and 5; plasma proteins hydrolyzed by Alcalase for 1 and 2 h, respectively, lane 6; bovine plasma proteins with Neutrase(0 h), lane 7; plasma proteins hydrolyzed by Neutrase for 2 h.

용을 나타내지 않았는데 이는 혈장에 포함되어 있는 것으로 알려진 각종 trypsin inhibitor에 의한 저해작용이 있었기 때문으로 추측되었다(14). 따라서 사용한 5종의 효소 중에서 Alcalase 및 Neutrase가 혈장 원액 중의 단백질들을 효과적으로 분해하는 것으로 나타났으며, 가격의 측면에 있어서도 이를 식품산업용 효소의 가격은 각각 8,500 원/kg, 10,500 원/kg(98년 수입가격 기준) 수준이어서 기타 시약용 조효소들의 가격(350,000~14,000,000 원/kg)과 비교할 때 상당히 저렴하다는 점 등을 고려할 때 산업적 용용에 있어 매우 유리함을 알 수 있었다. Alcalase는 *Bacillus licheniformis*로부터 생산된 subtilisin 계통의 alkaline protease이며 Neutrase는 *Bacillus subtilis*가 생산한 metallo protease로서 두 품목 모두 식품산업에서 널리 이용되고 있는 단백질 분해효소이다. 일본에서 상품화된 정어리 근육단백질 유래 펩타이드를 생산하기 위해서도 alkaline protease를 이용한 예가 보고되고 있다(10, 15).

이어서 Alcalase와 Neutrase에 대한 혈장 단백질 분해 패턴을 확인하기 위하여 전기영동을 실시하였다(Figure 3). Lane 4와 5는 각각 혈장에 Alcalase를 2%(w/w)의 농도로 처리하여 1시간 및 2시간 동안 반응시킨 가수분해물로서 1시간만에 상당량의 혈장 단백질이 분해되고 2시간째는 반응이 더욱 진행되는 상태를 보여주었다. 생성되는 저분자량의 펩타이드들은 전개선 아래로 빠져나간 것으로 판단되었다. Lane 7은 Neutrase(2%, w/w)에 의한 가수분해물로서 혈장 단백질들의 분해가 Alcalase에 비해 양호하게 이루어졌으나 저분자량의 펩타이드 분획보다는 주로 분자량 10,000 근처의 polypeptide 분획을 다양생산하는데 그치고 있는 것으로 확인되었다. 이러한 가수분해 결과들과 현재까지 알려진 ACE 저해 펩타이드들은 분자량이 대부분 2,000 이하라는 점(5) 등으로 미루어 볼 때 혈장 단백질로부터 ACE 저해 펩타이드를 생산하는데는 가수분해도가 높고 또한 비교적 저분자량의 펩타이드로 분해시킬 수 있는 Alcalase가 적절한 효소인 것으로 판단되었다.

Table 1. ACE inhibitory activities of the proteolytic hydrolysates of blood plasma proteins prepared under various conditions

Hydrolysates	IC ₅₀ values (mg/mL)
Acid hydrolysate	44.2
Alcalase hydrolysate (0.1% Alcalase, 1 h hydrolysis)	2.7
Neutrase hydrolysate (1.0% Neutrase, 1 h hydrolysis)	7.3
Tryptic hydrolysate	-
Peptic hydrolysate (0.25% pepsin, 8 h hydrolysis)	18.9
Papain hydrolysate (2.0% papain, 8 h hydrolysis)	23.5

혈장 원액 가수분해물의 ACE 저해활성

ACE 저해활성 측정에 있어서 흔히 이용되고 있는 hippuric acid의 정량과정(기존의 방법은 생성된 hippuric acid를 ethyl acetate로 추출한 후 건조시키고 0.1M NaCl 용액에 재용해시켜 228nm에서 흡광도를 측정)이 실험실 및 실험자에 따라 오차가 발생하기 쉬운 것으로 알려져 있기 때문에(16) 본 연구에서는 보다 정확한 신뢰성있는 정량치를 얻기 위하여 HPLC 측정법을 적용하여 측정조건을 정립한 결과 Figure 2와 같은 HPLC chromatogram을 통해 정확한 정량이 가능하게 되었다. 이 방법에 따라 혈장 원액에 포함된 혈장 단백질 전체에 대해서 산 가수분해물과 5종의 단백분해효소에 의해 가수분해하여 얻은 가수분해물에 대하여 각각의 ACE 저해활성을 측정 비교한 결과 Alcalase가 가장 효과적으로 ACE 저해 펩타이드를 생산하는 것으로 나타났다(Table 1). Alcalase는 0.1%의 낮은 효소농도에서 반응 1시간만에 IC₅₀치 2.7 mg/mL의 가수분해물을 생산해내었다. 그러나 Neutrase에 의한 가수분해물은 비교적 높은 활성을 나타내었지만(IC₅₀치 7.3 mg/mL) Alcalase에 비하면 상대적으로 높은 효소농도를 필요로 하였고 활성도 낮았다. Pepsin과 papain에 의한 가수분해물은 Alcalase 및 Neutrase 등 미생물 유래 효소에 비해 활성이 상당히 낮았으며 효소반응시간과 효소농도의 측면에서도 효율이 떨어짐을 알 수 있었다. Trypsin의 경우는 혈장 내의 trypsin inhibitor들에 의한 저해작용으로 거의 단백질들을 가수분해시키지 못하였다.

분리된 albumin 및 globulins 분획의 효소적 가수분해 및 가수분해물의 ACE 저해활성

혈장으로부터 분리해 낸 albumin과 globulins 등 주요 단백질 분획에 대하여 혈장 원액에 대한 효소반응과 동일한 조건으로 가수분해물을 얻되, 각각의 단백질 분획에 대하여 혈장 원액에 대하여 가장 활성이 높은 가수분해물을 생산한 Alcalase와 혈장 원액에 대해서 가수분해를 일으키지 못했던 trypsin을 이용하여 가수분해하였다. 그 결과 albumin의 Alcalase 가수분해물이 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 2). 분리 단백질 분획 중 albumin의 경우에는 혈장 원액의 가수분해물보다 높은 활성을 나타내었는데 그 중 Alcalase에 의한 가수분해물의 IC₅₀치는 0.5 mg/mL로서 trypsin에 의한 가수분해물보다 활성이 높았다. 그러나 globulins의 두 효소에 의한 가수분해물은 모두 IC₅₀치 7 mg/mL 이상의 낮은 활성을 나타냄으로써 혈장 원액에서 나타나는 ACE 저해활성은 주로 albumin이 분해되어 생산되는 펩타이드들에 의한 것임을 추측할 수 있었다. Albumin에 대한 Alcalase 및 trypsin 농도별 및 반응시간별 가수분해물들의 ACE 저해활성은

Table 2. ACE inhibitory activity of proteolytic hydrolysates of albumin and globulins

Hydrolysates	IC ₅₀ values (mg/mL)
Tryptic hydrolysate of albumin	0.9
globulins	8.1
Alcalase hydrolysate of albumin	0.5
globulins	7.1

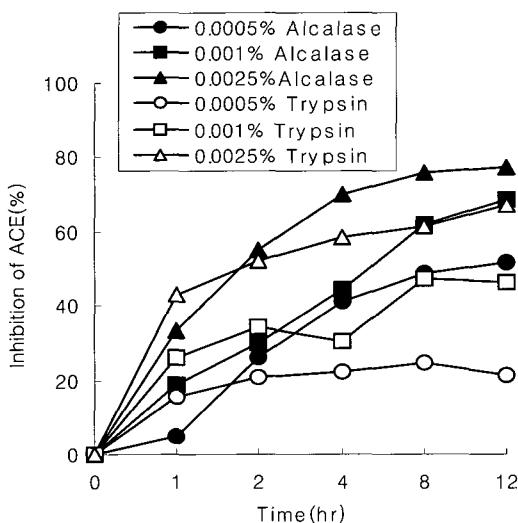


Figure 4. Hydrolysis of albumin(A) and casein(B) by Alcalase and trypsin.

Figure 4와 같다. Albumin 분획에 대한 가수분해반응에 필요한 효소농도는 0.001~0.005%의 수준으로 혈장 원액의 경우(0.05~2%)에 비해 10~100배 정도 낮은 효소농도에서 활성이 나타나는 가수분해물을 얻을 수 있었다. IC₅₀치에 해당하는 50% 저해활성은 Alcalase 및 trypsin 가수분해물이 모두 0.0025%의 효소농도로 2시간만에 달성을 할 수 있었으나 그 Alcalase 가수분해물의 IC₅₀치는 0.5 mg/mL이었던 반면 trypsin 가수분해물은 0.68 mg/mL로서 다소 활성이 떨어짐을 알 수 있었다. 얻을 수 있는 최고 활성에 있어서도 전자는 77.1% 저해가 가능하였으나 후자는 67% 저해에 머무르는 것으로 나타났다. 따라서 효소의 가격과 가수분해물의 활성을 비교할 때 이미 상품화된 casein의 경우와는 다르게 혈장 albumin으로부터 ACE 저해 펩타이드 혼합물을 얻기 위해서는 trypsin 보다는 Alcalase를 이용하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

고활성 ACE 저해 펩타이드 분획의 생산

앞 실험에서 얻어진 혈장 원액 및 albumin의 Alcalase 가수분해물을 Sephadex G-25 gel chromatography에 의해 분획하였다 (Figure 5). 혈장 원액의 Alcalase 가수분해물로부터 얻어진 3분획 중에서는 세 번째 분획이 IC₅₀값 0.8 mg/mL로서 첫 번째, 두 번째 분획의 36.4 mg/mL, 6.8 mg/mL에 비해 가장 높은 활성을 나타내었다 (Figure 5a). Albumin의 Alcalase 가수분해물로부터 얻어진 3분획의 경우에도 첫 번째와 두 번째 분획(IC₅₀값은 각각 21.4 mg/mL, 0.3 mg/mL)에 비해 세 번째 분획이 가장 활성이 높았는데 그 IC₅₀값은 0.02 mg/mL로 매우 높은 활성의 펩타이드 분획임이 확인되었다 (Figure 5b). 또한 혈장 원액의 Alcalase 가

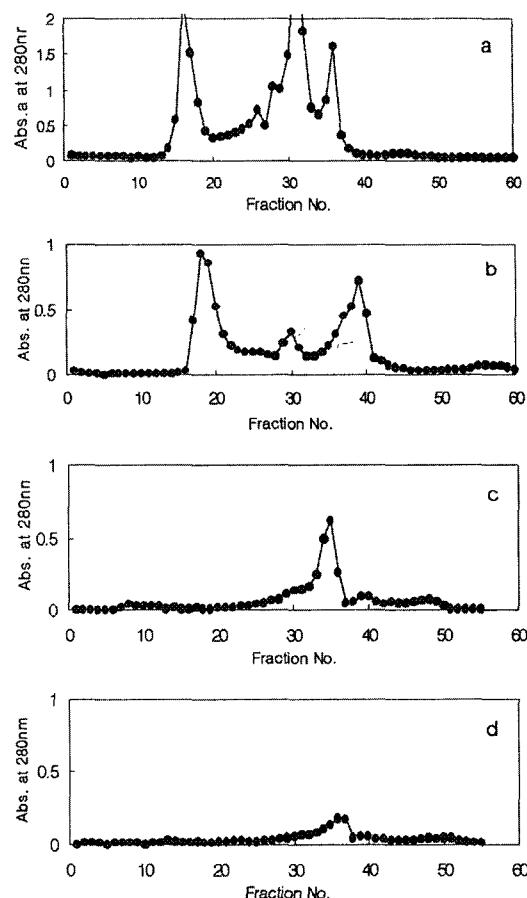


Figure 5. Sephadex G-25 gel chromatograms of Alcalase hydrolysate of total plasma (a) and albumin (b), the ultrafiltrates from Alcalase hydrolysate of total plasma passed through MW cutoff 1,000 (c) and 500 (d) membrane.

수분해물을 MW cutoff 1,000의 한외여과막으로 한외여과한 후 Sephadex G-25 gel chromatography를 실시한 결과 한외여과 이전의 분획 중 첫 번째 및 두 번째 분획이 제거되고 세 번째 분획만 나타남으로써 이 활성 분획은 분자량 1,000 이하의 펩타이드 혼합물임을 알 수 있었다 (Figure 5c). 그리고 MW cutoff 500의 한외여과막으로 한외여과한 경우는 세 번째 분획까지 거의 제거되어 이 펩타이드 혼합물은 또한 분자량 500이 넘는 펩타이드들을 주성분으로 하고 있음이 확인되었다 (Figure 5d). 따라서 산업적으로 albumin의 Alcalase 가수분해물을 제조하여 그로부터 고활성 ACE 저해 펩타이드 분획을 얻는 것은 분자량 1,000 이상의 펩타이드 성분들을 제거하기 위한 한외여과 공정만 거치면 될 것이므로 매우 단순하게 구성된 분리정제 공정으로 생산이 가능할 것으로 추정되었다.

지금까지 보고된 각종 식품 단백질로부터의 가수분해물 중 가장 높은 활성은 가열처리한 정어리 근육단백질의 pepsin 가수분해물로서 IC₅₀값 0.03 mg/mL이었으며(4) 그 외에는 대부분 0.5~1 mg/mL 수준이었고, 가수분해물로부터 펩타이드 혼합물 분획을 나눈 경우에는 가장 높은 것이 정어리 근육단백질의 *Bacillus licheniformis* alkaline protease 가수분해물을 ODS column으로 분획한 IC₅₀값 0.015 mg/mL의 펩타이드 혼합물이었으며(15) 대부분은 0.03~1 mg/mL 사이의 값들을 보여주었다(4, 15, 17-20). 또한 된장으로부터 한외여과로 분리된 IC₅₀값 0.0418 mg/mL의

펩타이드 혼합물 등(21) 발효식품으로부터 추출된 주요 펩타이드 혼합물들의 ACE 저해활성 역시 IC_{50} 값 0.16~10.05 mg/mL 사이의 다양한 경우들이 보고되었다(22). 이러한 연구결과들을 종합해 볼 때 본 연구에서 얻어진 펩타이드 혼합물이 0.02 mg/mL의 IC_{50} 값을 나타내는 것은 매우 높은 활성을 갖는 것임을 알 수 있었으며, 이는 산업적인 생산에 있어서도 중요한 경쟁력 제고 요인이 될 것으로 판단되었다. 이와 같이 폐혈액 혈장 단백질로부터 항고혈압 식품소재용 ACE 저해 펩타이드 분획을 생산하는 공정은 얻을 수 있는 고활성 펩타이드 분획의 분리 정제과정이 간단하고 또한 그 활성도 매우 높다는 사실을 토대로 평가할 때 그 실용화 가능성이 매우 높은 공정임을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구는 도축 폐기물인 가축혈액을 이용하여 항고혈압 기능성 식품소재로서의 angiotensin I converting enzyme 저해 펩타이드 분획을 생산하기 위한 조건과 가능성을 조사하기 위하여 수행되었다. 산업적으로 이용 가능한 단백분해효소 중 Alcalase가 혈장 원액 및 그로부터 분리된 albumin에 대하여 가장 높은 활성의 가수분해물을 생성하였다. 특히 albumin의 Alcalase 가수분해물과 이를 gel chromatography를 통해 분획하여 얻은 고활성 분획의 IC_{50} 값은 각각 0.5 및 0.02 mg/mL로서 지금까지 보고된 식품단백질 유래 펩타이드 혼합물들과 비교할 때 활성이 매우 높은 것에 속함을 알 수 있었다. 또한 이 고활성 펩타이드 분획은 혈장 원액으로부터 단순한 한외여과만을 거쳐도 얻을 수 있음을 확인함으로써 산업적 실용화 가능성이 높은 공정임을 알게 되었다.

감 사

본 연구는 농림수산 첨단기술개발사업(1995. 12.~1998. 12.)의 지원 일부와 1998년도 한국학술진흥재단 과학기술기초중점연구 지원 생물화학공학 연구사업에 의해 수행되었습니다. 지원에 감사드립니다.

참 고 문 현

- 미트저널사 (1998), 국내통계-도축실적, 미트저널, 98년 4월호, p. 162, 미트저널사, 서울.
- 박형기, 오홍록, 문윤희, 강종욱, 김언현, 김천제, 오동환, 신현길, 박태규, 하정숙, 이근택, 이영진, 박창일, 이보명, 김안규, 문영덕 (1994), 식육의 과학과 이용, pp. 278-292, 선진출판사, 서울.
- Ockerman, H. W. and C. L. Hansen (1988), Blood Utilization, In *Animal By-Product Processing*, p. 233, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Ariyoshi, Y. (1993), Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors Derived from Food Proteins, *Trends Food Sci. Tech.*, **4**, 139-144.
- Yamamoto, N. (1997), Antihypertensive Peptides from Food Proteins, *Biopolymer*, **43**, 129-134.
- 千葉英雄, 吉川正明 (1991), 食品タンパク質に由來する生理活性ペプチド, *化學と生物*, **29**, 454-458.
- Zhao, Q., F. Sannier, I. Garreau, D. Guillochon, and J. M. Piot (1994) Inhibition and Inhibition Kinetics of Angiotensin Converting Enzyme Activity by Hemorphins, Isolated from a Peptic Bovine Hemoglobin Hydrolysate, *Biochem. BioPhys. Res. Commun.*, **204**, 216-223.
- 末綱 陽子 (1995), 新規なトリペプチドおよびアンジオテンシン変換酵素阻害剤, 日本特許平7-188283.
- Park, E., M. Won, H. H. Lee, and K. B. Song (1996), Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Pentapeptide Isolated from Supernatant of Pig Plasma Treated by Trichloroacetic Acid, *Biotech. Tech.*, **10**, 479-480.
- 日本産經新聞社 (1997), アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害ペプチド, 日経バイオ年鑑96/97, p. 699, 日本産經新聞社, 東京.
- Heide, K., H. Haupt, and H. G. Schwick (1984), Plasma Protein Fractionation, In *The Plasma Proteins*, Vol. IV F.W. Putnam, Eds., p. 545, Academic Press, New York.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goek, B. J. Olson, and D. C. Klenk (1985), Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
- Cheung, H. S. and D. W. Cushman (1973), Spectrometric Assay and Properties of Angiotensin-converting Enzyme of Rabbit Lung, *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 451-463.
- Putnam, F.W. (1984), Alpha, Beta, Gamma, Omega- The Structure of the Plasma Proteins, In *The Plasma Proteins*, Vol. IV F.W. Putnam, Eds., p. 76, Academic Press, New York.
- Matsui, T., H. Matsufuji, E. Seki, K. Osajima, M. Nakashima, and Y. Osajima (1994), Inhibition of Angiotensin I-converting Enzyme by *Bacillus licheniformis* Alkaline Protease Hydrolysates Derived from Sardine Muscle, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 922-925.
- 丸山 進 (1995), Angiotensin 變換酵素 沖害物質, 食品中の生體機能調節物質研究法, 川岸舜朗, p. 116, 學會出版センタ-, 東京.
- 안창원, 이호봉, 남희섭, 신재익, 김재훈 (1998), 탈지대두박 가수분해물로부터 Angiotensin-I Converting Enzyme 저해 펩티드의 산업적 생산공정 연구, 춘계 공동학술발표회 초록집, 1998년도 한국식품과학회 한국식품영양학회 춘계 공동학술발표회 및 종회, 부산, p. 216.
- Wako, Y., S. Ishikawa, and K. Muramoto (1996), Angiotensin I-Converting enzyme Inhibitors in Autolysates of Squid Liver and Mantle Muscle, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1353-1355.
- Astawan, M., M. Wahyuni, T. Yasuhara, K. Yamada, T. Tadokoro, and A. Maekawa (1995), Effects of Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Substances Derived from Indonesian Dried-salted Fish on Blood Pressure of Rats, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 425-429.
- 오세종, 김세현, 김상교, 백영진, 조경현 (1997), κ-Casein의 Chymosin, Pepsin 및 Trypsin 가수분해물에 대한 안지오텐신 변환효소 저해효과의 탐색, *한국식품과학회지*, **29**(6), 1316-1318.
- 신재익, 안창원, 남희섭, 이형재, 이형주, 문태화 (1995), 된장으로부터 Angiotensin converting Enzyme(ACE) 저해 Peptide의 분획, *한국식품과학회지*, **27**(2), 230-234.
- Okamoto, A., H. Hanagata, E. Matsumoto, Y. Kawamura, Y. Koizumi, and F. Yanagida (1995), Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activities of Various Fermented Foods, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1147-1149.