

## 고등어 유래 항고혈압 peptide의 분리 정제

도 정 룡  
한국식품개발연구원

# Separation and Purification of Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory peptide from Mackerel

Jeong-Ryong DO

Korea Food Research Institute, 46-1 Baekhyun Bundang, Kyunggi-Do, Korea

Hydrolysate which inhibit the Angiotensin I-converting enzyme (ACE) was prepared from mackerel muscle by protease. The ACE inhibitory activity of mackerel muscle hydrolysate (MMH) was 967  $\mu$ g of IC<sub>50</sub>. ACE inhibitory peptides were isolated by ultrafiltration, gel permeation column chromatography (GPC), reversed phase column chromatography (RPC), reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC), and gel permeation high performance liquid chromatography (GP-HPLC) from the MMH. The amino acid sequence of the ACE inhibitory peptides was Tyr-Val-Ala. The IC<sub>50</sub> of this peptide for ACE from rabbit lung was 1.4  $\mu$ M.

Key words: ACE inhibitory peptide, Ultrafiltration, GPC, RPC, RP-HPLC, GP-HPLC

### 서 론

고등어는 선어 및 통조림의 원료로 주로 이용되며, 일부는 염건 품으로도 이용되는 다획성 어류로서 국내의 연간 생산량은 10만톤 이상이다. 고등어는 양질의 아미노산 및 고도 불포화 지방산이 다 량 함유되어 있으며, 생산량도 많아 효율적으로 이용할 수 있는 가공기술의 개발이 필요하다. 식품 성분중의 ACE 저해효과에 관 한 연구로는 기호음료성분 (Do et al., 1993), 정어리육 (Matsuda et al., 1992), 간장 (Kinoshita et al., 1993)을 위시한 많은 보고가 있다. 주로 ACE 저해활성을 나타내는 성분으로는 단백질의 가수 분해시 생성되는 peptide이며, 이들의 분리정제 방법에 관한 연구 가 수행되어왔다 (Matsuda et al., 1992; Matsumura et al., 1993). 본 연구에서는 고등어를 효소로 가수분해하여 항고혈압 기능성 peptide를 제조하여 Sephadex G-25 column, ODS AQ column, Vydac column, superdex peptide column을 이용하여 분리, 정제 하고 이들 peptide의 ACE저해효과를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험재료

본 실험에 사용한 고등어는 가락동 농수산물 시장에서 선도가 양호한 선어를 구입하여 사용하였으며, 사용한 고등어는 체장 32~33 cm, 체중 380~430 g이었다. 시료의 전처리 는 두부, 내장 및 뼈를 제거하여 고등어육을 채취하였으며, 혈액 등 이물질을 제거 하기 위해 수세하였다. 지질을 제거하기 위하여 4배량의 알칼리 용액 (0.05%의 NaCl이 함유된 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액)을 첨가하고 콜로이드밀로 마쇄하였다. 다음으로 원심분리 (7000×g, 20분)하여 어육 잔사를 취하고 진공동결건조하여 탈지 분말을 제조하였다.

Angiotensin I-converting enzyme (ACE)는 토끼의 허파로부터 얻

은 아세톤 침전분말 (Sigma Co.)을 사용하였고, 기질은 hippuryl-histidyl-leucine (Sigma Co.)을 사용하였다. 고등어육 가수분해에 사용한 Papain 30,000은 Novo사, Promod 192p는 Gist-brocades 사에서 구입하여 사용하였다. Peptide의 분리정제에 사용한 용매는 HPLC용을 사용하였다.

#### 2. 실험방법

##### 효소 가수분해

고등어 peptide를 제조하기 위하여 탈지한 고등어 분말을 endo 형의 Papain 30,000으로 70°C에서 4시간 1차 가수분해하고, exo형의 Promod 192p효소로 50°C에서 2시간 2차가수분해 하였다. 그리고, 효소를 불활성화 시키기 위하여 5분간 끓인 다음 규조토를 사용하여 감압 여과한 후 용액의 부피를 줄이기 위해 감압 농축하고 진공동결 건조하여 고등어 가수분해물 분말을 제조하였다.

##### Peptide의 함량 및 분자량 측정

Peptide의 함량은 Superdex peptide column을 장착한 AKTA explorer 100 (Pharmacia Biotech)을 이용하여 면적비로 계산하였다. Peptide 표품으로는 Angiotensin II (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, MW 1002.2)를 사용하였다. peptide의 분자량도 Superdex peptide column으로 측정하였으며, 이때 사용한 peptide 표품으로는 Cytochrome C (M.W. 12,500), Aprotinin (M.W. 6,500), ACTH (M.W. 2,934), Substance P (M.W. 1,348), Angiotensin II (M.W. 1,002) 그리고 Glycyl-L-Leucine (M.W. 188)을 사용하였다.

##### Angiotensin I-converting enzyme (ACE)의 저해활성 측정

ACE저해작용의 측정은 Cushman과 Cheung (1971)의 방법으로 측정하였다. 즉, 소정농도의 시료 50  $\mu$ l에 ACE 조효소액 50  $\mu$ l 및 sodium borate buffer (pH 8.3) 100  $\mu$ l를 가한후 37°C에서 5분간 preincubation시킨다. 여기에 기질로써 Hippuryl-His-Leu용액 (25

mg/2.5 ml sodium borate buffer) 50  $\mu$ l를 가하여, 다시 37°C에서 30 분간 반응시킨후 1N HCl 250 ml를 가하여 반응을 정지시킨다. (공시험은 시료용액 대신에 증류수 50  $\mu$ l를 사용하며 대조구는 1N HCl 250 ml를 가한 다음 ACE조효소액 50  $\mu$ l를 가한다). 여기에 ethyl acetate 1.5 ml를 가하여 15초간 vortex한 후 3000 rpm에서 5 분간 원심분리시켜 상층액 1 ml를 취한다. 이 상층액을 완전히 건조시킨 후 증류수 3 ml를 가하여 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의하여 ACE저해율로써 나타내었다.

$$\text{ACE저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: 시료 첨가구의 흡광도

B: 시료 무첨가구의 흡광도

단, A, B 모두 대조구의 흡광도를 제외한 수치임

IC<sub>50</sub>은 위의 식에서 구한 ACE저해율이 50%를 나타낼때의 반응액중의 저해물질의 농도를 농도를 나타낸다.

#### 한외여과 (Ultrafiltration)

고등어 가수분해물을 cut-off 10,000 dalton의 membrane (YM10, Amicon Co.)을 장착한 한외여과장치 (Amicon Co)로 10,000 dalton이상의 획분과 10,000 dalton이하의 획분으로 분리하고 감압농축 후 진공동결 건조하여 고등어 peptide를 제조하였다.

Sephadex G-25 column에 의한 gel permeation chromatography

Ultrafiltration에 의해 분리한 고등어 peptide를 Sephadex G-25를 충전한 column (50×950 mm, Vt : 1,865 ml)으로 분리정제하였다. 이때 용출액은 0.1M trifluoroacetic acid (TFA), 유속은 2.2 ml/min로 용출시켜 20 ml씩 분취 하였으며, 280 nm에서 흡광도를 측정하고, 각 peak를 모아 감압농축한후 진공동결건조하였다.

#### ODS AQ column에 의한 reverse-phase chromatography

Sephadex G-25 column으로 분획한 peptide를 ODS AQ를 충전한 column (26×300 mm, Vt : 160 ml)으로 분리정제하였다. 이때 용출액은 HPLC용 water를 A용매, HPLC용 ethanol을 B용매로 하여 gradient조건에서 분리하였다. 유속은 1 ml/min로 용출시켜 10 ml씩 분취 하였으며, 215 nm, 280 nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압농축한후 진공동결건조하였다.

#### Vydac C18 column에 의한 reverse-phase chromatography

ODS AQ column으로 분획한 peptide를 Vydac column (10×250 mm, Vt : 19.6 ml)으로 분리정제하였다. 이때 용출액은 0.1% TFA in water를 A용매, 0.1% TFA in acetonitrile (ACN)을 B용매로 하여 gradient 조건에서 분리하였다. 유속은 2 ml/min로 용출시켜 2 ml씩 분취 하였으며, 215 nm, 280 nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압농축한후 진공동결건조하였다.

#### Superdex peptide column에 의한 gel permeation chromatography

Vydac C18 column으로 분획한 peptide를 Superdex peptide column (10×30 mm, Vt : 24 ml)을 이용하여 분리정제하였다.

이때 용출액은 HPLC용 water, 유속은 0.5 ml/min로 용출시켜 1 ml씩 분취 하였으며, 215 nm, 280 nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압농축한 후 진공동결건조하였다.

#### 아미노산 배열 (amino acid sequence)의 분석

고등어 육에서 분리한 peptide의 아미노산 배열 분석은 Procise TM (Perkin Elmer, protein sequencing system, Foster, C.A., USA)을 이용하였다. 분석시 Bio-Brene액을 처리하여 standard를 측정한 다음, 시료 20  $\mu$ l를 사용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 고등어의 일반성분 및 수율

실험에 사용한 고등어의 일반성분을 살펴본 결과, 수분 68.1%, 단백질 20.2%, 지질 10.4%, 회분 1.3%로 건물당 함량으로 보면 단백질이 63.3%로 단백질이 풍부한 고단백 식품소재임을 알 수 있다. 또한 건물당 지질의 함량이 32.6%로 고등어 육으로부터 peptide 제조시에는 지질의 제거공정이 필요한 것으로 나타났다. 선어로부터 두부, 내장 및 뼈를 제거하여 얻은 고등어 육의 수율은 65.5%였으며, 지질을 제거하기 위하여 알칼리 처리한 후 동결 건조한 고등어 단백질의 수율은 고등어 육에 대하여 18.2%로 나타났고, 고등어 단백질을 효소가수분해하여 제조한 고등어 가수분해물의 수율은 고등어 단백질에 대하여 50.6%로 나타났다.

### 한외여과 (Ultrafiltration)

고등어 가수분해물 cut-off 1만 dalton의 membrane으로 ultrafiltration한 결과, MW 10,000이하가 79.6%, 10,000 이상이 20.4%였으며, ACE 저해효과는 10,000이하 획분이 10,000이상 획분보다 좋은 것으로 나타났다 (Table 1). 위의 결과로부터 저분자의 peptide가 높은 ACE저해효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

### Sephadex G-25 column에 의한 gel permeation chromatography

Sephadex G-25 수지는 분자량 5,000이하의 단백질을 분리할 때 주로 사용되며, 이 과정에서 저분자의 염을 제거할 수 있다. 한외여과하여 얻은 1만 이하의 획분을 Sephadex G-25 column으로 분획하여, 7개의 획분을 얻었고 (Fig. 1), 이들 획분을 동결건조하여 MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6 그리고 MS7으로 하였고, 이 가운데 MS2획분의 ACE저해효과가 가장 높았다 (Table 2).

Table 1. Fractionation of ACE inhibitors by ultrafiltration from mackerel muscle hydrolysate

sample	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g)	content (%)
Hydrolyzate	185	100
Ultrafiltrate		
10,000 MW below	138	79.6
10,000 MW above	216	20.4

Chromatography의 앞에서 용출되는획분의 ACE저해효과가 좋은 것으로 나타난 것은 protease로 가수분해할 때 생성된 아미노산이 제거되는 영향으로 사료되었다.

ODS AQ column에 의한 reverse-phase chromatography

ACE 저해효과가 가장 좋은 MS2획분을 ODS AQ column으로 분획하여, MS2O1, MS2O2, MS2O3 그리고 MS2O4로 하였고 (Fig. 2), 이 가운데 MS2O3획분의 ACE저해효과가 가장 높았다 (Table 3). Matsuda 등 (1992)은 ODS충진 칼럼을 이용하여 정어 리로부터 peptide를 분획하였을 때 에탄올 농도 10~25%에서 분획된 peptide가 ACE저해효과가 좋았다는 보고하였으며, 본 결과와 일치하였다.

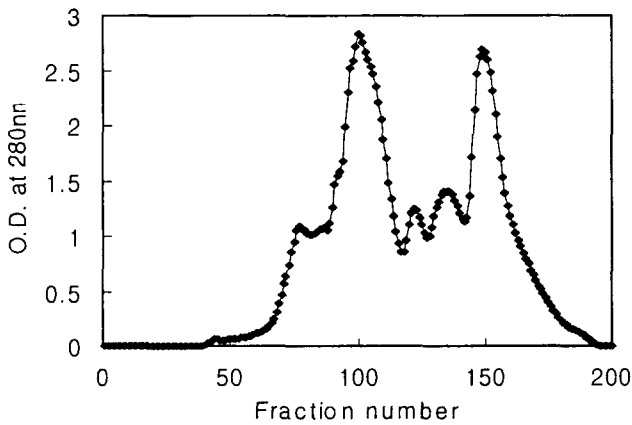


Fig. 1. Gel permeation column chromatogram of mackerel hydrolysate on Sephadex G-25.  
 Eluent : 0.1 M TFA in water  
 Flow rate : 2.2 ml/min  
 Fraction : 20 ml/tube  
 Fractionation : MS1 (tube no. 41-70), MS2 (71-80)  
 MS3 (81-90), MS4 (91-100), MS5 (101-110), MS6 (111-130), MS7 (131-180)

Table 2. Purification of ACE inhibitory peptide by Sephadex G-25 column from mackerel hydrolysate

sample	ACE inhibition ratio, %	
	100 µg	200 µg
MS1 (1.2%)	8.0	17.2
MS2 (20.3%)	21.0	38.1
MS3 (35.3%)	12.6	22.9
MS4 (34.1%)	9.2	18.4
MS5 (6.3%)	8.2	15.6
MS6 (1.4%)	12.4	23.3
MS7 (1.4%)	7.1	15.7

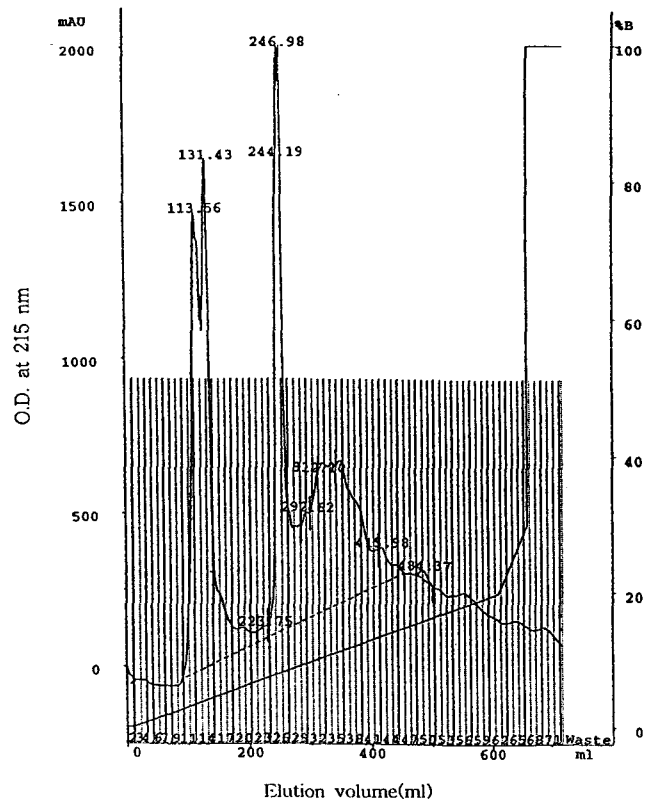


Fig. 2. Reverse phase column chromatogram of mackerel hydrolysate on ODS AQ (2.6x30 cm).  
 Eluent : A solution (water), B solution (ethanol)  
 Flow rate : 1 ml/min Fraction : 10 ml/tube  
 Fractionation : MS201 (tube on. 11-12), MS202 (13-15), MS203 (24-28), MS204 (29-41).

Table 3. Purification of ACE inhibitory peptide by ODS-AQ column from mackerel peptide (MS2)

sample	ACE inhibition ratio, %
MS2O1	38.7
MS2O2	88.9
MS2O3	89.2
MS2O4	86.5

\* sample : adding 50 µl among each fraction 2 ml

Vydac C18 column에 의한 reverse-phase chromatography (RPC)

단백질 가수분해물로부터 peptide의 분리정제에 있어서 RPC에 의한 분리법은 매우 효과적인 방법으로 알려져 있다 (Herraiz, 1997). MS2O3획분을 Vydac column으로 재분획하여 MS2O3V1 (tube no 9), MS2O3V2 (tube no 21), MS2O3V3 (tube no 22-23), MS2O3V4 (tube no 24-25), MS2O3V5 (tube no 27-28), MS2O3

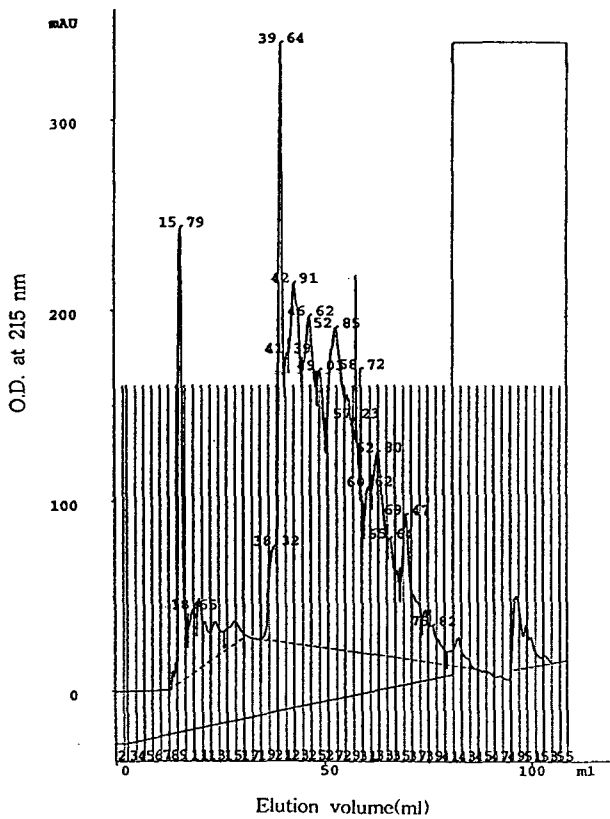


Fig. 3. Reverse phase chromatogram of mackerel peptide on Vydac 218TP column (1.0×25 cm).  
Eluent : A solution (0.1% TFA in water), B solution (0.1% TFA in ACN)  
Flow rate : 2 ml/min Fraction : 2 ml/tube

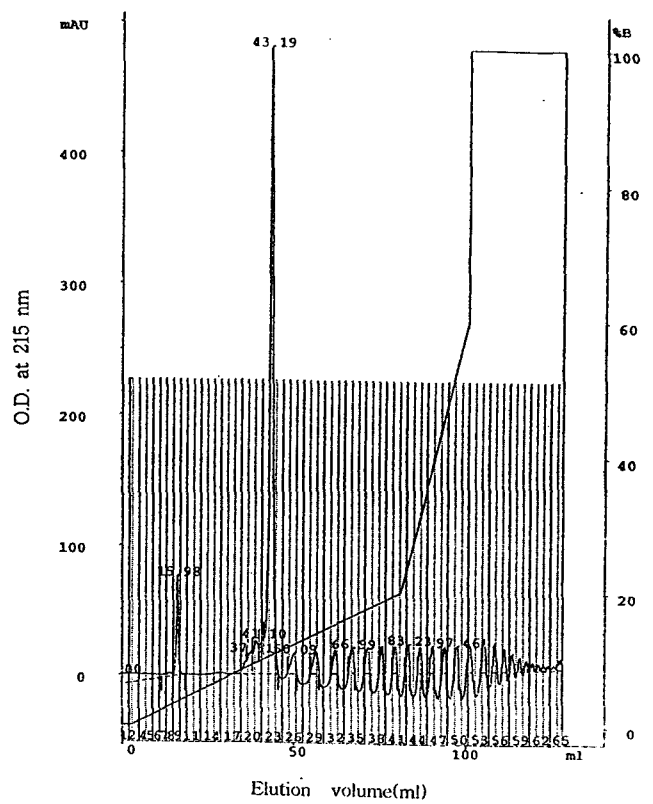


Fig. 4. Reverse phase chromatogram of mackerel peptide (MS 203V5) on Vydac 218TP column (1.0×25 cm).  
Eluent : A solution (0.1% TFA in water), B solution (0.1% TFA in ACN)  
Flow rate : 2 ml/min Fraction : 2 ml/tube

Table 4. Purification of ACE inhibitory peptide by Vydac 218 TP column from mackerel peptide (MS2O3)

sample	ACE inhibition ratio, %
MS2O3V1	15.3
MS2O3V2	7.8
MS2O3V3	8.5
MS2O3V4	20.5
MS2O3V5	25.4
MS2O3V6	13.2
MS2O3V7	15.4
MS2O3V8	14.0

\* sample : adding 50 μl among each fraction 1 ml

V6 (tube no 32-33), MS2O3V7 (tube no 35-36) 그리고 MS2O3V8 (tube no 49-50) 획분으로 분취하였다 (Fig. 3). 이 가운데 MS2O3V5 획분의 ACE저해효과가 가장 높았다 (Table 4). MS2O3V5 획분을 재분획하여 단일 peak를 얻었으며 (Fig. 4), fraction no 23

을 취하였다.

Superdex peptide column에 의한 gel permeation chromatography

MS2O3V5 획분을 Superdex peptide column으로 정제하였으며 (Fig. 5). MS2O3V5P 시료로 하고 아미노산 배열을 조사하였다.

아미노산 배열 (amino acid sequence)의 분석

고등어 육으로부터 Sephadex G-25 column, ODS AQ column, Vydac column, Superdex peptide column을 이용하여 순차적으로 분리, 정제한 peptide의 N-말단으로부터 아미노산 배열 (amino acid sequence)은 Tyr-Val-Ala으로 나타났으며, ACE저해활성은 IC<sub>50</sub>이 1.4 μM로 나타났다. Matsumura 등 (1992)은 정어리 가수분해물로부터 5개의 dipeptide를 분리하고, ACE저해활성을 측정 한 결과, IC<sub>50</sub>이 51~2,440 μM이라고 보고하였으며, Matsumura 등 (1993)은 가다랭이 가수분해물로부터 6개의 peptides를 분리하고 ACE저해활성을 측정하여, IC<sub>50</sub>이 1.8~1,100 μM이라고 하였으며, 4개의 tripeptide의 ACE저해활성이 높았다고 하였다.

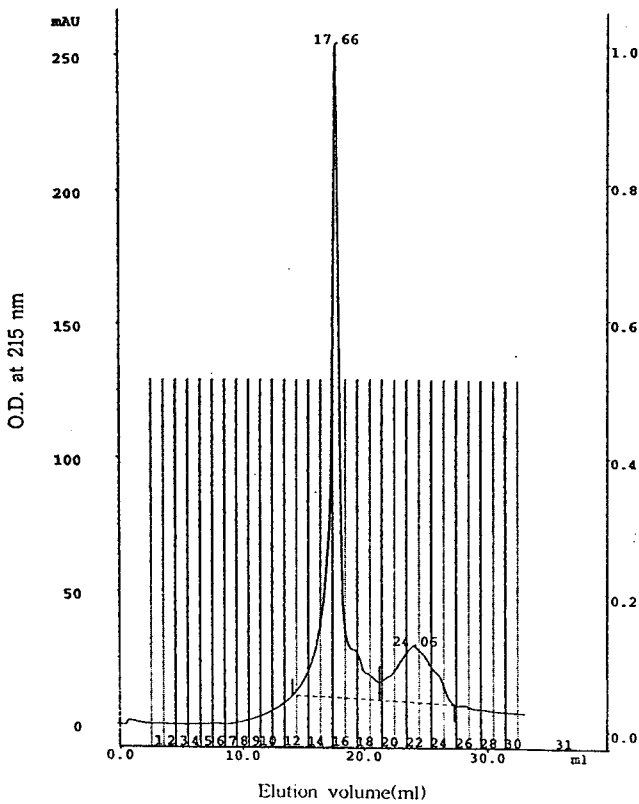


Fig. 5. Gel permeation chromatogram of mackerel peptide on Superdex Peptide HR column (1×30 cm).  
Eluent : Water Flow rate : 0.5 ml/min Fraction : 1 ml /tube

요 약

고등어 유래의 peptide를 제조하고, Sephadex G-25 column, ODS AQ column, Vydac column, Superdex peptide column을 이용하여 순차적으로 분리, 정제하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

고등어 선어로부터 두부, 내장 및 뼈를 제거하여 얻은 고등어육의 수율은 65.5%였으며, 고등어육의 단백질 함량은 63.3%, 그리고 지질함량은 32.6%로 나타났다. 지질을 제거하기 위하여 알칼리 처리한 후 동결 건조한 고등어 단백질의 수율은 고등어육에 대하여 18.2%로 나타났고, 고등어 단백질을 효소가수분해하여 제조한 고등어 가수분해물의 수율은 50.6%로 나타났다. 고등어 가

수분해물 cut-off 1만의 membrane으로 ultrafiltration한 결과, MW 10,000이하가 79.6%, 10,000 이상이 20.4%였으며, ACE저해효과는 10,000이하 획분이 10,000이상 획분보다 높은 것으로 나타났다 (Table 1). 1만 이하의 획분을 Sephadex G-25 column으로 분획하여, 7개의 획분을 얻었고 (Fig. 1), 이 가운데 MS2획분의 ACE저해효과가 가장 높았다 (Table 2). ACE저해효과가 가장 좋은 MS2획분을 ODS AQ column으로 분획하여 4개의 획분으로 분획하였고 (Fig. 2), 이 가운데 MS2O3획분의 ACE저해효과가 가장 좋았다 (Table 3). MS2O3획분을 Vydac column으로 재분획하여 8개의 획분으로 분획하였다 (Fig. 3). 이 가운데 MS2O3V5획분의 ACE저해효과가 가장 좋았다 (Table 4). Superdex peptide column으로 재정제하여 얻은 peptide의 N-말단으로부터 아미노산 배열은 Tyr-Val-Ala으로 ACE저해활성은 IC<sub>50</sub>이 1.4 μM로 나타났다. Matsumura 등 (1993)은 가다랭이 가수분해물로부터 분리한 6개의 peptides 가운데 tripeptide의 ACE저해활성이 높았다고 하였으며, 본 연구 결과에서도 유사한 경향을 나타내었다.

참 고 문 헌

Cushman, D.W. and H.S. Cheung. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. cal Pharma.* 20, 1637~1648.  
Do, J.R., S.B. Kim, Y.H. Park and D.S. Kim. 1993. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity by the component of traditional tea materials. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25 (5), 456~460 (in Korean).  
Herraiz, T., 1997. Sample preparation and reversed phase-high performance liquid chromatography analysis of food-derived peptide. *Analytica Chimica Acta*, 352, 119~139.  
Kinoshita, E., J. Yamakoshi and M. Kikuchi. 1993. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (7), 1107~1110.  
Matsuda, H., T. Isohizaki, H. Morita, T. Nagaoka, K. Osajima and Y. Osajima. 1992. Digestion of peptides from sardine muscle that inhibit angiotensin I converting enzyme by intestinal enzymes of pags. *Nippon nogekagaku Kaishi*, 66 (11), 1645~1647 (in Japanese).  
Matsuda, H., T. Nagaoka, H. Morita, K. Osajima and Y. Osajima. 1992. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides generated from sardin muscle by protease for food industry, 39 (8), 678~683 (in Japanese).

1999년 8월 17일 접수  
2000년 3월 17일 수리