

김 가수분해물로부터 Angiotensin- I Converting Enzyme 저해 Peptide의 분리·정제

이현옥* · 김동수 · 도정룡 · 권대영
한국식품개발연구원

Separation and Purification of Angiotensin- I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Laver Hydrolysate

Heon-Ok LEE⁺, Dong-Soo KIM, Jeong-Ryong DO
and Dae-Young KWAN

Korea Food Research Institute, 46-1 Baekhyun Bundang, Kyonggi-do 462-420, Korea

The angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitors from laver hydrolysate was isolated. Among the 13 kinds of proteases, Maxazyme NNP was most effective for preparing the high ACE inhibitory compound. In extraction conditions of ACE inhibitory peptide from laver hydrolysate, ACE inhibitory activity of hydrolysate treated with diethylether for decolorization and that of 70% ethanol soluble fraction among the different ethanol concentrations were higher than other preparations. Low molecular fraction less than 3,000 dalton of laver hydrolysate separated by ultrafiltration had the highest ACE inhibitory activity. For further separation of ACE inhibitory peptide from laver hydrolysate, gel filtration chromatography (Sephadex G-25), reverse-phase HPLC (ODS & Vydac C-18) and gel permeation chromatography (Superdex Peptide HR) were performed. The molecular mass of the ACE inhibitory peptide fractions of gel permeation chromatography determined by electrospray-mass spectrometer were 413.48 (S1O2V2V1P), 346.86 (S1O2V2V2P) and 320.32 (S2O6V3V1P) dalton and their amino acid sequence were Val-Gln-Gly-Asn, Thr-Glu-Thr and Phe-Arg, respectively.

Key words: Angiotensin- I converting enzyme (ACE), Laver hydrolysate, Column chromatography, Amino acid sequence

서 론

식품이 갖는 여러 기능 중 생체 조절 기능에 대한 관심이 높아지면서 식품으로부터 항암, 항노화 및 항고혈압 등 다양한 생리 활성을 나타내는 기능성 성분들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 생체 조절 기능을 갖는 식품 성분 중 식품 단백질 유래의 펩타이드는 영양기능 및 맛·용해성·유화성 등에 관여할 뿐 아니라 항암, 혈압 강하, 혈청 콜레스테롤 강하, 면역 증강 및 칼슘 흡수 촉진 등의 광범위한 생리 활성을 나타낸다. 그 종류로는 생체내에서 진통, 마취, 장관 등 평활근의 수축, 식욕 조절 등에 관여하는 물질인 opioid peptides, 면역 증강 작용을 하는 phagocytosis peptides, 혈압 강하 작용을 하는 angiotensin- I converting enzyme (ACE) 저해 peptides, 혈소판 응집을 저해하는 antithrombotic peptides 등이 있으며 (Fiat et al., 1993; Mazoyer et al., 1990), 현재 이러한 생리 활성 peptides를 이용한 기능성 식품의 개발이 활발히 진행되고 있다.

한편, 최근 급격히 증가하고 있는 고혈압은 순환기계 질병의 원인인 동시에 뇌출혈, 심장병 및 신장병 등과 합병증으로 나타날 경우에는 치사율이 매우 높은 만성 퇴행성 질환으로 40대 이후의 중노년층에서 발병율이 15~20%로 추정되고 있다. 특히 ACE는 불활성인 angiotensin- I 의 C-말단에서 dipeptide (His-Leu)를 분리시켜 활성형인 angiotensin-II로 전환시킴으로써 혈압을 상승시

킴과 동시에 생체내에서 혈압 강하 작용을 갖는 bradykinin을 불활성화시킴으로써 고혈압의 원인이 되고 있다 (Horovitz, 1981).

본 연구에서는 해조류로부터 ACE 저해능을 가진 기능성 물질을 분리해 냄으로써 해조 자원의 이용도를 증진시키고 고혈압 억제 기능을 가진 새로운 식품 소재를 개발하기 위하여 전보 (Lee et al., 1999)의 결과에 따라 ACE 저해 효과가 가장 큰 김의 Maxazyme NNP 가수분해물을 시료로 하여 여러 단계의 column chromatography 및 reverse-phase (RP) HPLC를 통해 ACE 저해 효과가 큰 단일 peptide를 분리하고, 이의 분자량과 amino acid sequence를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 김 (*Porphyra tenera*, 완도산)은 서울 가락동 농수산물 시장에서 건조품을 구입하여 마쇄하고 20 mesh 체로 걸러 통과한 분말을 시료로 사용하였다.

ACE 저해 효과 측정을 위한 Angiotensin- I 전환 효소 (ACE)는 rabbit lung acetone powder (Sigma Co., St. Louis, MO. USA)를, 기질로는 hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu, Sigma Co.)을 사용하였고, 단백질 가수분해 효소는 Alcalase (Novo Co., Neumatt, Dittingen, Switzerland), bromelain (Sigma Co.), Colluplin (Gist-brocades Co., Charlotte, NC. USA), Esperase (Novo

*Corresponding author: lho1231@hanmail.net

Co.), Flavourzyme (Novo Co.), Maxazyme NNP (Gist-brocades Co.), Neutrase (Novo Co.), papain 30,000 (Genencor Co., Rochester, NY, USA), Promod 192P (Gist-brocades Co.), Promod 194P (Biocatalysts Co., Pontypridd, Wales, UK), Protamex (Novo Co.), Sumizyme MP (新日本化学 Co.), Thermoase (Daiwa Kasei K. K. Co.)를 사용하였다.

각 단계별 column chromatography에 사용된 resin은 Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)와 ODS (octadecylsilica, YMC Co.)였으며, 그 외의 모든 시약 및 유기 용매는 일급 또는 특급품을, HPLC에 사용한 용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 김 가수분해물의 조제

(1) 단백질 가수분해 효소의 선정

김 분말 시료에 30배의 증류수를 가한 다음, 각각의 단백질 분해 효소를 1% (w/w)의 농도로 첨가하여 각 효소별로 최적의 활성 조건 (Alcalase: pH 7.0, 60°C, bromelain: pH 6.0, 43°C, Colluplin: pH 6.5, 60°C, Esperase: pH 8.0, 60°C, Flavourzyme: pH 7.0, 50°C, Maxazyme: pH 5.5, 50°C, Neutrase: pH 6.0, 50°C, papain: pH 6.0, 70°C, Promod 192P: pH 4.5, 50°C, Promod 194P: pH 7.0, 50°C, Protamex: pH 6.0, 40°C, Sumizyme MP: pH 8.0, 50°C, Thermoase: pH 8.0, 70°C)으로 진탕항온수조에서 각각 4시간 동안 가수분해한 후 원심분리 (7,000×g, 30분)하여 감압 여과하였다. 이 여액에 20% TCA (trichloroacetic acid)를 가하여 효소 실험 및 잔존 단백질을 침전시킨 후 다시 4°C에서 7,000×g로 20분간 원심분리하여 상층액만을 취하여 ether로써 잔존 TCA를 제거한 후 동결 건조하여 단백질 가수분해 효소 선정 시료로 사용하였다.

(2) 김 가수분해 조건

김 가수분해는 전보 (Lee et al., 1999)의 결과에 따라 김 분말 시료에 30배의 증류수를 가하여 pH 5.5, 50°C의 조건에서 Maxazyme NNP에 의해 8시간 동안 가수분해시켰다.

(3) Peptide-nitrogen 함량 및 ACE 저해 효과 측정

전보 (Lee et al., 1999)와 동일한 방법으로 실험하였다.

(4) 가수분해율의 측정

효소에 의한 가수분해율은 분해 조건에 따라 분해된 가수분해물을 100°C에서 10분간 증탕하여 효소를 실험시키고, 20% TCA 용액을 가수분해물과 동량 가하여 7,000×g로 20분간 원심분리한 후 상층액의 가용성 질소를 Kjeldahl법으로 정량하여 가수분해율 (degree of hydrolysis, DH)을 구하였다.

$$DH(\%) = \frac{\text{시료 중 20\% TCA 가용성 질소}}{\text{시료 중의 총 질소}} \times 100$$

2) ACE 저해 물질의 추출 조건 설정

김 가수분해물로부터 ACE 저해 물질을 효율적으로 추출하기 위한 조건을 검토하였다. 즉, 김의 주 색소 성분인 chlorophyll 및 phycobilin 등 (이와 김, 1999)을 제거하기 위하여 I 처리구는 김 분말 시료에 10배의 diethylether를 가하여 24시간 방치하였으며, II 처리구는 시료에 30배의 증류수를 가하여 98°C에서 3시간동안

교반, III 처리구는 diethylether 처리 후 98°C에서 3시간 동안 교반시킨 후 각각 가수분해하였다. 또한 김의 대부분 성분을 차지하는 다당류 및 고분자 단백질 등 (김, 1987)을 제거하기 위하여 김 분말 시료에 10배의 diethylether로 24시간 처리 후 가수분해한 가수분해액에 최종 농도가 50, 60, 70, 80 및 90%가 되도록 ethanol을 가하여 24시간 정치시킨 후 원심분리하였다. 상층액은 감압 농축하고 동결 건조시켜 ethanol 가용성 획분 시료로 하고, 침전물은 소량의 증류수에 용해시켜 동결 건조하여 ethanol 침전 획분 시료로 하였다.

3) ACE 저해 물질의 분리 및 정제

김 분말 시료에 diethylether 처리 후, 30배의 증류수를 가하고 pH 5.5, 50°C의 조건에서 Maxazyme NNP로 8시간 동안 가수분해한 후 70% ethanol 처리한 상층액으로부터 얻은 김 가수분해물에서 ACE 저해 물질을 분리, 정제하기 위해 다음과 같이 단계별 column chromatography 및 HPLC (ÄKTA explorer 100, pharmacia, sweden)를 행하였다. ACE 저해 물질의 분획은 ÄKTAexplorer 100 (Pharmacia Biotech)을 사용하여 수행하였으며, peptide 성분의 검출은 ÄKTA explorer 100에 장착된 UV detector를 사용하여 215 nm에서 실시하였다.

(1) Ultrafiltration

Ultrafiltration은 Turgeon and Gauthier (1990)의 방법에 따라 행하여졌다. 즉, 김 가수분해물 시료를 molecular weight cut-off가 각각 3,000과 10,000인 한외여과막 (YM-3 and YM-10 membrane, DIAFLO ultrafiltration membrane, Amicon Co., Beverly, MA, USA)을 사용하여 분자량 3,000 이하와 3,000~10,000 사이, 그리고 10,000 이상으로 각각 나누어 농축시킨 후 동결 건조하여 각각의 ACE 저해 효과를 측정하였다.

(2) Sephadex G-25 column에 의한 분리

한외여과물 중 ACE 저해 효과가 가장 높은 분자량의 시료 6g을 HPLC용 증류수 10mL에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 Sephadex G-25 column (7×100 cm)에 주입하고, 0.05 M trifluoroacetic acid (TFA) 용액으로 용출시켜 20mL씩 분취하여 280 nm에서 흡광도와 ACE 저해 효과를 측정하였다.

(3) ODS-AQ column에 의한 분리

ODS-AQ column에 의한 분리는 Matsui et al. (1993)의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉, Sephadex G-25 column에 의해 용출된 분획물 중 ACE 저해 효과가 뛰어난 획분의 동결 건조 시료 0.2g을 HPLC용 증류수 2mL에 녹여 10% 용액으로 만든 후, ODS-AQ column (2.6×30 cm)에 주입하였다. 용매의 공급은 1 mL/min의 속도로 elution volume 500 mL까지 ethanol 농도를 20%까지 직선적으로 증가시킨 후 다시 100 mL를 ethanol 농도 30%까지 직선적으로 증가시켜 10 mL씩 분취하여 획분에 따라 감압 농축시켜 ACE 저해 효과를 측정하였다.

(4) Vydac C-18 column에 의한 분리

Vydac C-18 column에 의한 RP (reverse-phase)-HPLC의 분석은 용매 조건에 따라 두 단계로 나누어 분리하였다.

① Linear gradient elution에 의한 분리

ODS-AQ column에 의해 용출된 획분 중 ACE 저해 효과가 뛰어난 획분을 감압 농축하여 Vydac C-18 column (1.0×25 cm, Vydac)에 주입하였다. 용매의 공급은 2 mL/min의 속도로 elution volume 80 mL까지 0.1% TFA를 함유한 acetonitrile (ACN)의 농도를 10%까지 직선적으로 증가시켜 2 mL씩 분취하여 획분에 따라 감압 농축시켜 ACE 저해 효과를 측정하였다.

② Isocratic elution에 의한 재 분리

Vydac C-18 column에 의해 1차적으로 용출된 획분 중 ACE 저해 효과가 뛰어난 획분을 Vydac C-18 column에 재 주입하였으며, 이 때의 용매 공급은 2 mL/min의 속도로 elution volume 80 mL까지 3% ACN과 0.07% TFA를 함유한 증류수를 일정하게 용출시켜 2 mL씩 분취하여 각각의 획분을 감압 농축하였다.

(5) Superdex Peptide HR 10/30 column에 의한 분리

Vydac C-18 column에서 용출된 획분들을 Superdex Peptide HR column (1.0×30 cm, Pharmacia Biotech)에 주입하고 HPLC 용 증류수로 용출시켜 1 mL씩 분취하여 감압 농축함으로써 최종적으로 잔존하는 염 등의 불순물을 제거하고 분리, 정제하였다.

4) ACE 저해 물질의 분자량 측정 및 구조 분석

Superdex Peptide HR column chromatography에 의해 최종적으로 분리, 정제된 ACE 저해 peptide 획분들의 분자량은 LC-Electrospray Mass Spectrometer (MassLynx, 2.1, Micromass Platform II, Manchester, U.K.)를 이용하여 측정하였으며, amino acid sequence의 분석은 Applied Biosystems 473A Protein Sequencer (Perkin Elmer)를 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 단백질 가수분해 효소의 선정

ACE 저해 효과가 큰 저분자 peptide의 함량이 많은 가수분해물을 얻기 위한 가수분해 효소를 선정하기 위하여 13종의 식품 가공용 단백질 분해 효소를 시험한 결과 (Table 1), ACE 저해 효과는 6.0%에서 37.2%로 전보 (Lee et al., 1999)의 물 추출물에 비하여 활성이 높았다. 이는 담수어의 열수 추출물과 효소 가수분해물의 ACE 저해 효과 비교시 효소 가수분해물의 ACE 저해 효과가 높다는 Kim et al. (1996)의 보고와 일치하는 것으로 효소 가수분해가 물 추출에 비해 ACE 저해 효과를 갖는 다양한 peptide를 생성하기 때문으로 생각된다.

효소별 ACE 저해 효과는 Maxazyme NNP에 의한 가수분해물이 37.2%로 가장 높았으며 papain 30,000 (34.9%), Neutrase (34.3%), bromelain (34.2%), Esperase (32.8%), Alcalase (31.0%) 순으로 비교적 높은 저해율을 보였고 Promod 194P (19.9%), Thermoase (19.8%), Protamex (19.5%), Sumizyme MP (19.4%)가 그 다음 순이었으며 Colluplin (15.1%), Flavourzyme (11.7%), Promod 192P (6.0%)가 비교적 낮은 저해율을 보였다. 가수분해율 및 peptide-nitrogen 함량도 효소의 종류에 따라 차이가 있었는데, 가수분해율의 경우 Maxazyme NNP에 의한 가수분해물이 60.1%로 가장 높았다. Peptide-nitrogen 함량은 Alcalase에 의한 가수분해물

Table 1. Yield, degree of hydrolysis (DH), peptide-nitrogen content and ACE inhibitory activity of laver hydrolysate with various proteases

Enzyme	Yield (%)	DH (%)	Peptide-nitrogen content (mg/g)	ACE inhibitory activity (%)
Alcalase	77.6	57.6	1.73	31.0
Bromelain	82.9	52.4	1.43	34.2
Colluplin	65.7	40.9	0.90	15.1
Esperase	77.4	53.9	1.69	32.8
Flavourzyme	68.5	44.8	0.47	11.7
Maxazyme NNP	75.9	60.1	1.47	37.2
Neutrase	79.5	50.7	1.41	34.3
Papain 30,000	86.9	51.3	1.50	34.9
Promod 192P	87.8	29.7	0.26	6.0
Promod 194P	66.1	55.1	1.26	19.9
Protamex	79.6	51.9	1.50	19.5
Sumizyme MP	72.8	53.7	1.22	19.4
Thermoase	73.8	52.7	1.65	19.8

이 1.73 mg/g으로 가장 높았고, 다음으로 Esperase (1.69), Thermoase (1.65), papain 30,000 (1.50), Protamex (1.50), Maxazyme NNP (1.47), bromelain (1.43), Neutrase (1.41), Promod 194P (1.26), Sumizyme MP (1.22)의 순이었으며 Colluplin (0.90), Flavourzyme (0.47), Promod 192P (0.26) 등은 매우 낮게 나타났다.

이상의 결과에서 볼 때, 효소에 따른 김 가수분해물에 있어서 ACE 저해능과 가수분해율 및 peptide 함량 사이에는 상관성이 없었다. 수율 또한 65.7~87.8% 정도로 나타났으나 가수분해율이나 peptide-nitrogen 함량 및 ACE 저해 효과와의 상관성은 없는 것으로 나타났다. Suh et al. (1997)도 pronase와 actinidin을 이용한 오징어 가수분해물에서 ACE 저해능과 가수분해율 사이에 상관성이 없음을 보고하였고, Kim et al. (1996)도 담수어의 효소 가수분해물에 있어서 peptide 함량과 ACE 저해 효과 사이의 상관성이 없다고 보고하여 본 실험과 같은 결과를 나타내었다.

이와 같은 현상 등으로 미루어 ACE 저해 효과는 가수분해율이나 peptide의 함량보다는 조성 peptide의 종류에 따른 영향이 클 것으로 생각되며, 효소의 종류에 따라 기질 특이성이나 작용 부위가 다르기 때문에 가수분해시 생성된 peptide의 사슬 길이나 구성 아미노산의 배열이 달라지는데도 원인이 있다고 생각되었다.

2. ACE 저해 물질의 추출 조건

(1) 색소 제거를 위한 전처리에 따른 ACE 저해 효과

색소 성분 제거를 위해 diethylether 처리를 한 후 가수분해하여 70% ethanol로 처리한 시료를 I 처리구, 98°C에서 3시간 동안 교반한 후 가수분해하여 70% ethanol로 처리한 시료를 II 처리구, diethylether 처리 후 98°C에서 3시간 동안 교반하고 가수분해하여 70% ethanol로 처리한 시료를 III 처리구로 하여, 전처리 없이 가수분해하여 70% ethanol로 처리한 대조구 시료와 ACE 저해 효과, 수율 및 peptide-nitrogen 함량을 각각 비교하였다 (Table 2).

ACE 저해 효과와 peptide-nitrogen 함량은 모든 처리구에서 ethanol 가용성 획분이 침전 획분에 비해 높게 나타났으나, 수율은

Table 2. Yield, peptide-nitrogen content and ACE inhibitory activity of soluble and precipitated fractions of laver hydrolysate with different treatments for decolorization

Treatment		Yield (%)	Peptide-nitrogen content (mg/g)	ACE inhibitory activity (%)
Control	Soluble	24.3	4.96	69.9
	Precipitate	15.6	0.89	25.4
I ^a	Soluble	23.9	4.33	67.7
	Precipitate	17.8	0.92	26.0
II ^b	Soluble	20.9	3.54	59.7
	Precipitate	22.5	0.66	20.1
III ^c	Soluble	19.5	3.41	55.0
	Precipitate	25.6	0.70	21.1

a: laver hydrolysate treated with diethylether for 24 hrs.
 b: laver hydrolysate treated with distilled water at 98°C for 3 hrs.
 c: laver hydrolysate treated with distilled water at 98°C for 3 hrs after diethylether preparation.

98°C에서 3시간 동안 교반시킨 II 처리구와 III 처리구의 경우 ethanol 가용성 획분보다 침전 획분에서 더 높게 나타났는데 이는 98°C에서 교반하는 동안 추출된 다량의 다당류들이 ethanol에 의해 침전되었기 때문으로 생각되었다 (박, 1996). Ethanol 가용성 획분을 처리구별로 비교해 보면, ether로만 처리한 I 처리구의 ACE 저해 효과는 67.7%로 대조구 (69.9%)에 비해 약간 낮게 나타난 반면, 98°C에서 처리한 II, III 처리구의 ACE 저해 효과는 각각 59.7%와 55.0%로 I 처리구에 비해 더 낮게 나타났다. 또한 peptide-nitrogen 함량도 대조구 (4.96 mg/g)에 비해 I 처리구 (4.33 mg/g)는 약간 낮게, II 처리구 (3.54 mg/g) 및 III 처리구 (3.41 mg/g)는 더 낮게 나타나 ACE 저해 효과와 같은 경향을 보였다. 이상의 결과로 김 가수분해물로부터 ACE 저해 물질을 추출하기 위한 색소 제거 전처리는 diethylether로 처리한 후 가수분해한 I 처리구로 선정하였다.

(2) Ethanol 농도별 처리에 따른 ACE 저해 효과

김의 대부분의 성분을 차지하는 다당류와 고분자 단백질 등을 제거하기 위하여 Maxazyme NNP로 가수분해시킨 김 가수분해물에 최종 농도가 50~90%가 되도록 ethanol을 가하여 각각의 가용성 획분과 침전 획분의 ACE 저해 효과와 수율 및 peptide-nitrogen 함량을 비교하였다 (Fig. 1).

전 처리구 모두 가용성 획분이 침전 획분에 비하여 ACE 저해 효과가 높게 나타나 ACE 저해능을 가진 peptide는 저분자 물질인 것으로 생각되었다. 이는 담수어류 열수 추출물 및 효소 가수분해물에 70% ethanol을 사용한 결과 침전 획분보다 가용성 획분에서 ACE 저해 효과가 월등히 높았다는 Kim et al. (1996)의 보고와도 일치하였다.

50~90% ethanol 가용성 획분에 있어서 ACE 저해 효과는 각각 51.9, 55.0, 67.7, 65.6 그리고 62.7%로, ethanol 농도 70%에서 급격히 증가했다가 ethanol 농도가 높아짐에 따라 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 이 때의 peptide-nitrogen 함량 또한 각각 3.06, 3.28, 4.33, 4.02, 3.81 mg/g으로 ACE 저해 효과와 밀접한 상호 관

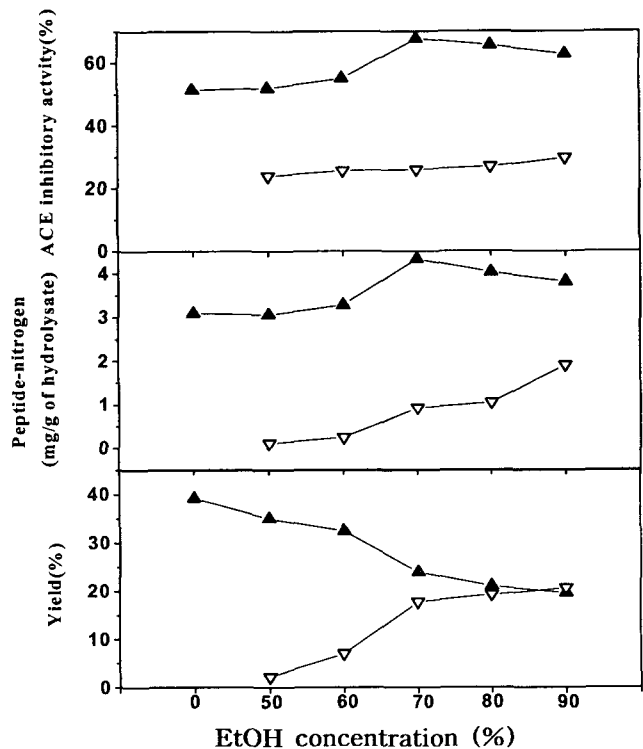


Fig. 1. Yield, peptide-nitrogen content and ACE inhibitory activity of soluble and precipitated fractions of laver hydrolysate with different ethanol concentrations. Laver hydrolysate was treated with maxazyme for 8 hrs after decolorization. ▲, soluble; ▽, precipitate.

련성을 나타내어 김 가수분해물이 나타내는 ACE 저해 작용에는 가수분해 중에 생성된 peptide가 커다란 역할을 함을 알 수 있었다. 수율은 35.0~19.6%로 ethanol 농도가 증가함에 따라 서서히 감소하다가 70%에서 급격히 감소하였고 그 이후로 다시 서서히 감소하는 경향을 나타내었다.

3. ACE 저해 물질의 분리 및 정제

김 분말 시료에 diethylether 처리 후 Maxazyme NNP에 의해 8시간 동안 가수분해한 다음 70% ethanol 가용성 물질을 동결 건조한 김 가수분해물로부터 ACE 저해 물질을 단계별 column chromatography를 통해 분리, 정제한 결과는 다음과 같았다. 이 때 김 가수분해물의 ACE IC₅₀은 150.72 µg/mL였다.

(1) Ultrafiltration에 의한 분리

지금까지 밝혀진 대부분의 ACE 저해 peptide는 분자량이 2,000 이하인 것으로 보고 (Ariyoshi, 1993)되고 있으므로, 고분자의 polypeptide를 제거하고 저분자 peptide만을 얻어서 이후의 분리 과정을 효율적으로 수행하기 위하여 molecular weight cut-off가 각각 3,000과 10,000인 환외여과막을 사용하여 ultrafiltration을 실시하였다 (Table 3). 분자량 3,000 이하 분획물의 수율이 86.4%로 대부분을 차지했고 3,000~10,000 사이는 6.6%, 10,000 이상 분획물은 7.0%로 매우 낮게 나타나 김 가수분해물의 대부분이 분자량 3,000

Table 3. Yield and ACE inhibitory activity of ultrafiltrate with different molecular weights

Range of molecular weight (daltons)	Yield (%)	ACE inhibitory activity (%)
>10000	7.0	48.3
10000~3000	6.6	57.1
<3000	86.4	69.4

이하의 저분자 물질인 것으로 나타났다. 이는 김이 Maxazyme (from *Bacillus subtilis*)에 의해 저분자 물질로 가수분해 되었음을 나타내는 것으로, Matsui et al. (1993)도 정어리 단백질을 *Bacillus licheniformis* alkaline protease로 가수분해했을 때 분자량 250~1,000의 저분자 peptide가 93% 정도였음을 보고하였다. ACE 저해 효과 또한 분자량 3,000 이하 분획물이 69.4%로 가장 높았으며, 3,000~10,000 사이가 57.1%, 10,000 이상이 48.3%로 분자량이 낮을수록 ACE 저해 효과는 높게 나타나 김 가수분해물의 ACE 저해 peptide 또한 저분자임을 알 수 있었으며, ACE 저해 효과가 가장 높은 분자량 3,000 이하 분획물의 ACE IC₅₀은 134.82 µg/mL였다.

(2) Sephadex G-25 column에 의한 분리

김 가수분해물을 ultrafiltration하여 얻은 분자량별 분획물 중 ACE 저해 효과가 높은 분자량 3,000 이하의 저분자 물질을 Sephadex G-25 column에 주입하여 gel filtration chromatography를 행하였다. 0.05 M TFA 용액으로 용출한 분획물의 흡광도를 280 nm에서 측정했을 때 Fig. 2와 같았으며, 이 chromatogram을 fraction peak에 따라 4개의 분획으로 나누어 각 분획물의 수율 및 ACE 저해 효과를 측정하였다 (Table 4).

수율은 S1이 88.2%로 대부분을 차지했으며, S2가 11.5%, S3와 S4는 각각 0.2%와 0.1%로 매우 낮았다. 한편 ACE 저해 효과는 S3가 92.3%로 가장 높았으며, S2가 73.4%, S1 58.6%, S4 53.2%의 순으로 나타났으나 수율과 ACE 저해 효과를 동시에 고려하여 S1과 S2를 다음 분리 단계의 시료로 선정하였다. 시료로 선정된 S1과 S2의 ACE IC₅₀은 각각 186.80 µg/mL와 132.22 µg/mL였다.

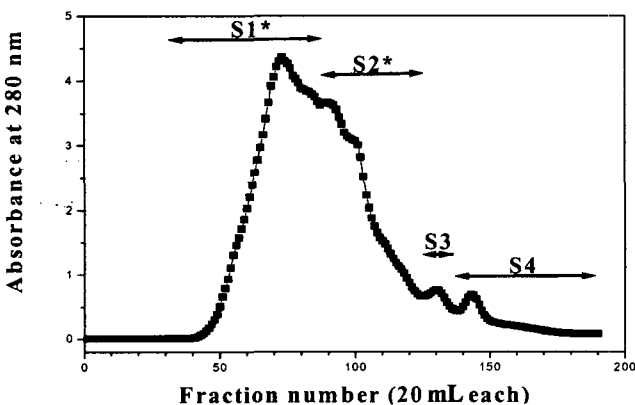


Fig. 2. Gel filtration chromatogram of laver ultrafiltrate (M.W<3,000) on a Sephadex G-25; eluent, 0.05 M trifluoroacetic acid (TFA). Tubes 31~87 were S1, 88~125 were S2, 126~138 were S3 and 139~190 were S4 fractions.

Table 4. Yield and ACE inhibitory activity of the fractions of laver ultrafiltrate (M.W<3,000) on a Sephadex G-25

Fraction No.	Yield (A)	ACE inhibitory activity (B)	(A)×(B)/100
S1	88.2	58.6	51.69
S2	11.5	73.4	8.44
S3	0.2	92.3	0.19
S4	0.1	53.2	0.05

(3) ODS-AQ column에 의한 분리

Sephadex G-25 column chromatography에서 시료로 선정된 S1과 S2 분획물로부터 전 단계에서 함께 용출된 염의 제거와 peptide 분획을 동시에 실시할 목적으로 ODS-AQ column을 사용하였다 (Fig. 3).

이 chromatogram을 elution volume 600 mL까지 S1은 5개의 분획으로, S2는 6개의 분획으로 나누어 각 분획물의 ACE 저해효과를 측정하였다. S1의 경우 10~30% ethanol 용액으로 용출시킨 분획물들을 5개의 분획 (S1O1~S1O5)으로 나누었는데 S1O1은 ACE 저해 효과를 나타내지 않았으나 S1O2, S1O3, S1O4 및 S1O5는 각각 81.9, 33.6, 55.3, 73.0%의 ACE 저해 효과를 나타내었다. 그 중 10~20% ethanol 용액에서 용출된 S1O2가 81.9%로 ACE 저해 효과가 가장 높아 다음 분리 단계 시료로 선정되었다. S2의 경우도 마찬가지로 10~30% ethanol 용액으로 용출시켜 6개의 분획 (S2O1~S2O6)으로 나눈 결과 이들 모두가 각각 31.7, 71.4, 84.3, 91.3, 91.0, 90.2%의 ACE 저해 효과를 나타내었으며, 10~20% ethanol 용액에서 용출된 S2O4, S2O5와 S2O6가 각각 91.3%, 91.0%, 90.2%의 높은 ACE 저해 효과를 나타내어 S1O2와 같이 다음 분리 단계 시료로 선정되었다. 다음 단계 시료로 선정된 S1O2 및 S2O4, S2O5, S2O6의 ACE IC₅₀은 Table 5와 같이 나타나 S1이나 S2에 비해 정제 되었다.

(4) Vydac C-18 column에 의한 분리

① Linear gradient elution에 의한 분리

ODS-AQ column chromatography에서 시료로 선정된 분획물들을 각각 감압 농축한 후 Vydac C-18 column으로 분리하였다 (Fig. 4). Elution volume 80 mL까지 S1O2는 3개의 분획으로, S2O4, S2O5 및 S2O6는 각각 5개의 분획으로 나누어 각 분획물의 ACE 저해 효과를 측정하였다. S1O2의 경우 분리된 3개의 분획물 중 S1O2V2만이 29.1%의 ACE 저해 효과를 보였고, S2O4, S2O5 및 S2O6 분리시에는 10.8~44.1%의 ACE 저해효과를 나타내었으

Table 5. IC₅₀ value of active fractions on a ODS-AQ column chromatography

Sample	IC ₅₀ ^a (µg/mL)
S1O2	88.65
S2O4	76.52
S2O5	75.73
S2O6	50.46

a: IC₅₀ defined as the concentration of ACE inhibitor required to inhibit 50% of the ACE activity.

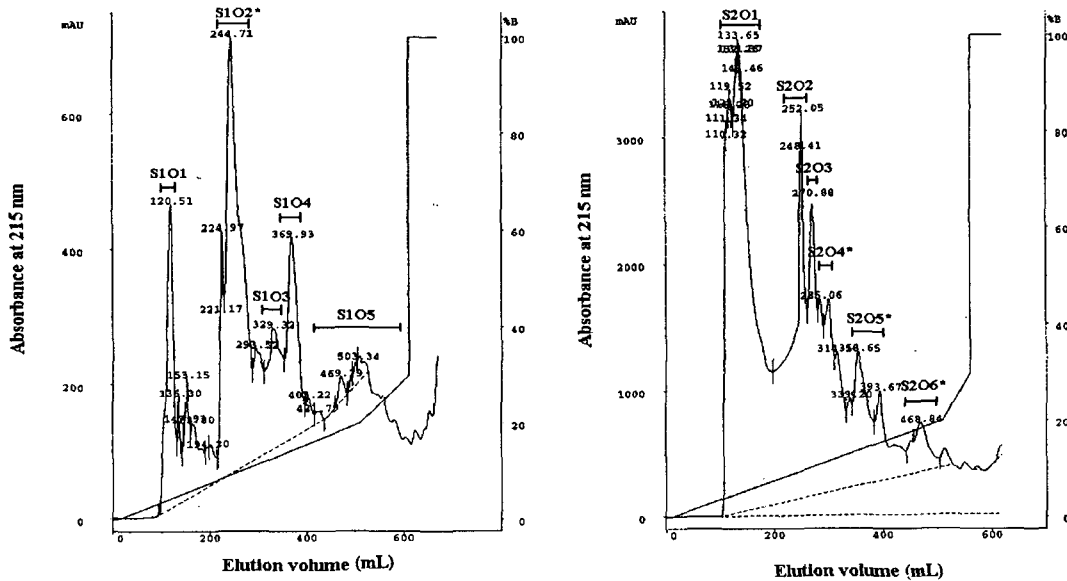


Fig. 3. Reverse-phase HPLC chromatogram on a ODS-AQ column of active fraction (S1 & S2) eluted from Sephadex G-25 column. Column: ODS-AQ (26×300 mm), Mobile phase: 0 to 30% ethanol (600 mL), Flow rate: 1.0 mL/min, Fraction size: 10 mL, Monitoring absorbance: 215 nm, AU: Absorbance Unit.

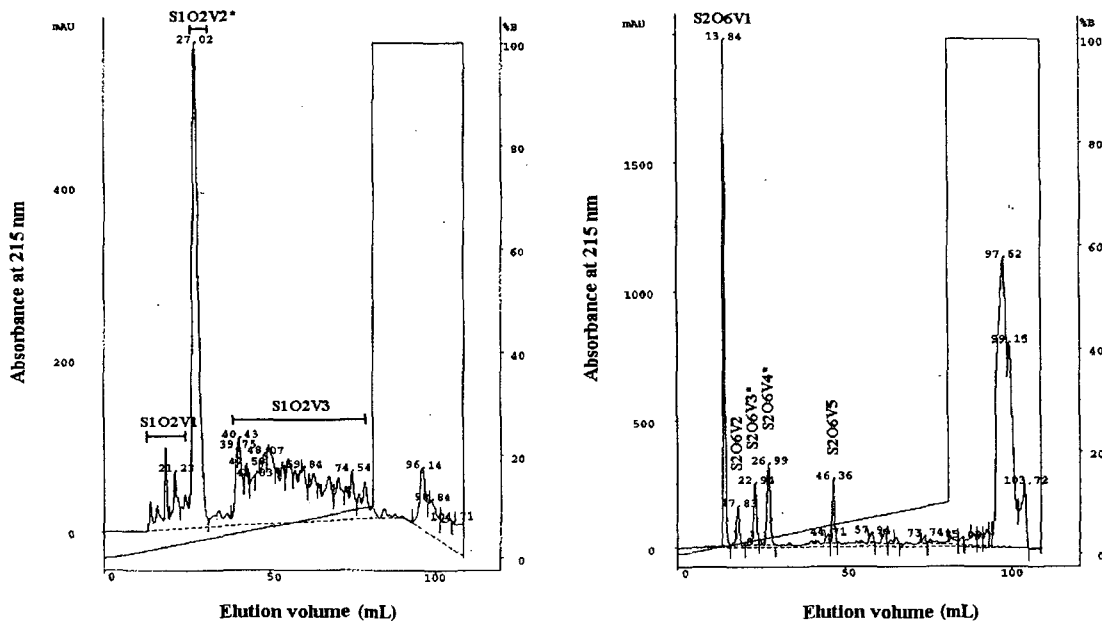


Fig. 4. Reverse-phase HPLC chromatogram on a Vydac C-18 column of active fraction (S1O2 & S2O6) eluted from ODS-AQ column. Column: Vydac C-18 (10×250 mm), Mobile phase: 0 to 10% acetonitrile (ACN) containing 0.1% TFA (80 mL), Flow rate: 2.0 mL/min, Fraction size: 2 mL, Monitoring absorbance: 215 nm.

며 그 중 S2O6V3와 S2O6V4의 ACE 저해 효과가 각각 43.2%와 44.1%로 가장 높았다.

② Isocratic elution에 의한 재 분리

일반적인 column chromatography에서 용매의 pH 및 이동상은 peak 분리에 중요한 인자가 된다. 본 실험에서도 0.1% TFA를 함

유한 0~10% ACN 용액으로 용출시킨 회분물 중 ACE 저해 효과가 높은 S1O2V2 (29.1%), S2O6V3 (43.2%) 및 S2O6V4 (44.1%)를 모아 각각 감압 농축한 후 이동상을 바꾸어 rechromatography를 행한 결과 (Fig. 5), S1O2V2는 2개의 회분으로, S2O6V3는 1개의 회분 그리고 S2O6V4는 2개의 회분으로 뚜렷하게 분리

되었다.

(5) Superdex Peptide HR 10/30 column에 의한 분리

Vydac C-18 column chromatography에서 분리된 획분들에 최종적으로 남아 있는 염 등의 불순물들을 제거하고 각각의 정제 정도를 확인하기 위하여 Superdex Peptide HR column에 의한 gel permeation chromatography를 실시하여 단일 peak (S1O2V2V1P, S1O2V2V2P, S2O6V3V1P, S2O6V4V1P 및 S2O6V4V2P)를 분리하였다.

4. ACE 저해 물질의 분자량 측정 및 구조 분석

(1) Electrospray-MS에 의한 분자량 측정

Superdex Peptide HR column chromatography에 의해 최종 분리된 ACE 저해 peptide 획분들 (S1O2V2V1P, S1O2V2V2P, S2O6V3V1P, S2O6V4V1P 및 S2O6V4V2P)의 분자량을 Electrospray-Mass Spectrometer를 이용하여 측정하였다. S1O2V2V1P의 분자량은 413.48 dalton으로 나타나 아미노산 3~4개로 구성된 단일 peptide일 것으로 추정되었으며, S1O2V2V2P의 경우는 분자량이 346.86과 412.86 dalton으로 나타나 2개의 peptide가 섞여 있을 것으로 생각되었다. 또한 S2O6V3V1P의 분자량은 320.32 dalton으로 확인되었으나, S2O6V4V1P와 S2O6V4V2P의 분자량은 확인되지 않아 이 획분들은 peptide를 비롯한 여러 물질들이 섞여 있는 혼합물일 것으로 사료되었다.

이상과 같이 확인된 분자량들은 모두 저분자로, 지금까지 밝혀진 대부분의 ACE 저해 peptide가 저분자였다는 보고 (Matsui et al., 1993; Ariyoshi, 1993)와 일치하였다.

(2) Amino acid sequence의 분석

단계별 column chromatography에 의해 최종적으로 분리, 정제

된 ACE 저해 peptide들의 amino acid sequence를 분석하였다 (Table 6).

S1O2V2V1P는 아미노산 4개로 구성된 peptide로 amino acid sequence가 Val-Gln-Gly-Asn의 순으로 나타났으며, 이 peptide의 분자량을 계산한 합이 416.45 dalton으로 앞의 electrospray-MS에 의해 측정된 분자량 413.48 dalton과 일치하였다. S1O2V2V2P는 2 종류의 peptide가 섞여 있었는데, 그 중 하나는 electrospray-MS상의 분자량 412.86 dalton으로 S1O2V2V1P의 Val-Gln-Gly-Asn과 동일한 peptide였으며, 다른 하나는 Thr-Glu-Thr의 순으로 나타난 tripeptide로서 분자량의 합이 349.34 dalton으로 electrospray-MS상의 분자량 346.86 dalton과 같은 것이었다. S2O6V3V1P의 경우는 Phe-Arg의 아미노산 배열을 가진 것으로 나타났으며, 이 역시 peptide 분자량의 합 (321.38 dalton)과 electrospray-MS상의 분자량 (320.32 dalton)이 일치하는 동일 물질이었다. 그러나 S2O6V4V1P와 S2O6V4V2P의 아미노산 배열은 나타나지 않았는데, 이는 electrospray-MS에 의한 분자량 측정시와 같은 결과로, 이들 획분이 peptide를 비롯한 여러 물질들이 섞여 있는 혼합물임이 확인되었다.

Cheung et al. (1980)은 여러 가지 dipeptide를 합성하여 ACE 저해 효과에 미치는 C-말단 및 N-말단 아미노산 잔기의 영향에

Table 6. Amino acid sequence and molecular weight of ACE inhibitors from laver hydrolysate

Inhibitors	Amino acid sequence	Molecular weight (dalton)	
		Calculated	LC-Mass
S1O2V2V1P	Val-Gln-Gly-Asn	416.45	413.48
S1O2V2V2P	Thr-Glu-Thr	349.34	346.86
S2O6V3V1P	Phe-Arg	321.38	320.32

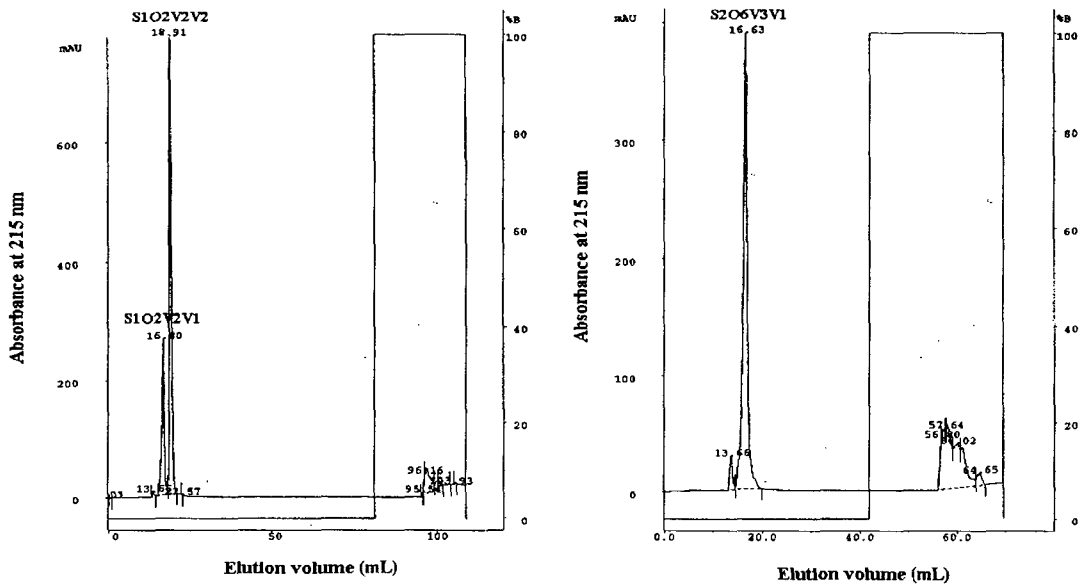


Fig. 5. Reverse-phase HPLC rechromatogram on a Vydac C-18 column of active fraction (S1O2V2 & S2O6V3) eluted from Vydac C-18 column. Column: Vydac C-18 (10×250 mm), Mobile phase: water containing 3% ACN and 0.07% TFA, Flow rate: 2.0 mL/min, Fraction size: 2 mL, Monitoring absorbance: 215 nm.

대하여 검토한 결과, C-말단 아미노산 잔기로는 tryptophan, phenylalanine, tyrosine 및 proline을, N-말단 아미노산 잔기로는 valine과 isoleucine과 같은 branched-chain aliphatic 아미노산을 가지는 peptide가 ACE에 대하여 경쟁적으로 저해함으로써 활성을 나타낼 것이라고 추정하였으며, Wyvratt and Patchett (1985)은 효소 가수분해에 의해 분리된 대부분의 ACE 저해 peptides는 C-말단이 proline 또는 aromatic amino acid 잔기를 가진다고 보고하였다. 또한 Maruyama et al. (1985)은 bovine casein의 trypsin 분해물을 proline-specific endoprotease로 다시 분해하여 C-말단이 Ala-Pro이며, N-말단 아미노산이 phenylalanine인 ACE 저해 활성이 강한 pentapeptide (Phe-Phe-Val-Ala-Pro)를, Seki et al. (1993)은 가열한 정어의 alkaline protease 분해물로부터 Thr-Tyr의 dipeptide를 분리하였다. 이상의 보고들과 비교할 때, 본 실험에서 분리된 peptide들의 경우 N-말단 아미노산 잔기들만이 valine, phenylalanine 및 threonine으로 일치할 뿐, C-말단 아미노산 잔기의 배열은 이들과는 다른 종류의 것이었다. 그러나 Maruyama et al. (1989)은 효소 분해하지 않은 무화과 유액에서 ACE 저해 효과가 우수한 Ala-Val-Asn-Pro-Ile-Arg, Leu-Tyr-Pro-Val-Lys 및 Leu-Val-Arg과 같은 ACE 저해 peptide를 분리하였는데, 그 중 2 종류의 C-말단 아미노산 잔기가 arginine으로 나타나 본 실험에서 분리된 Phe-Arg과 같은 경향을 보였다.

결과적으로 본 실험에서 분리된 peptide들의 amino acid sequence의 경우 N-말단 아미노산 잔기는 기존의 보고된 대부분의 ACE 저해 peptide와 같은 경향을 나타내는 반면, C-말단 아미노산 잔기는 arginine을 제외하고 asparagine이나 threonine으로 나타나 기존의 ACE 저해 peptide와는 다른 배열을 보여 주었다. 그러므로 본 실험에서 분리한 peptide들의 ACE 저해 활성을 peptide synthesizer를 이용한 화학 합성으로 알아 보고, *in vivo* 실험을 통하여 그 효과를 검증해야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 김의 Maxazyme NNP 가수분해물로부터 여러 단계의 column chromatography 및 HPLC를 통해 ACE 저해 peptide를 분리, 정제하여 이의 분자량과 amino acid sequence를 분석하였다. ACE 저해 효과가 큰 저분자 peptide의 함량이 많은 가수분해물을 얻기 위한 최적의 단백질 가수분해 효소를 선정하기 위하여 시험한 결과, Maxazyme NNP에 의한 가수분해물의 ACE 저해 효과가 37.2%로 가장 높게 나타났다. 김의 효소 가수분해물로부터 ACE 저해 peptide만을 효율적으로 분리하기 위한 추출 조건 시험에서, 색소 제거를 위해서는 diethylether 처리가, 다당류 및 고분자 단백질을 제거를 위해서는 70% ethanol 처리가 각각 선정되었다. 김 가수분해물로부터 ACE 저해 peptide를 분리, 정제하기 위한 첫 단계로 ultrafiltration을 한 결과, 분자량 3,000 이하 분획물의 ACE 저해 효과가 69.4%로 가장 높았으며, 이 분획물을 gel filtration chromatography (Sephadex G-25), reverse-phase HPLC (ODS & Vydac C-18) 및 gel permeation chromatography (Superdex Peptide HR)와 같은 단계별 column chromatography

를 행하여 최종적으로 단일 peptide peak들을 분리하였다. 이들 단일 peptide peak들의 분자량을 Electrospray-Mass Spectrometer로 측정된 결과, 각각 413.48 (S1O2V2V1P), 346.86 (S1O2V2V2P) 그리고 320.32 (S2O6V3V1P) dalton이었으며, 이들 peptide의 amino acid sequence는 N-말단으로부터 아미노산 잔기를 분석한 결과, 각각 Val-Gln-Gly-Asn, Thr-Glu-Thr 및 Phe-Arg으로 확인되었다.

참 고 문 헌

- Ariyoshi, Y. 1993. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. Trends in Food Science & Tech., 4, 139~144.
- Cheung, H.S., F.L. Wang, M.A. Ondetti, E.F. Sabo and D.W. Cushman. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. J. Biol. Chem., 255, 401~407.
- Fiat, A.M., D. Migliore-Samour, P. Jolles, L. Drouet, C.B.D. Sollier and J. Cean. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. J. Dairy Sci., 76, 301~310.
- Horovitz, Z.P. 1981. Angiotensin converting enzyme inhibitors. Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich, 3~25.
- Kim, T.J., H.D. Yoon, D.S. Lee, Y.S. Jang, S.B. Suh and D.M. Yeum. 1996. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hot-water extract and enzymatic hydrolysate of fresh water fish. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 25, 871~877 (in Korean).
- Lee, H.O., D.S. Kim, J.R. Do and Y.S. Ko. 1999. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. J. Korean Fish. Soc., 32, 427~431 (in Korean).
- Maruyama, S., K. Nakagomi, N. Tomizuka and H. Suzuki. 1985. Angiotensin converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. Agric. Biol. Chem., 49, 1405~1409.
- Maruyama, S., S. Miyoshi and H. Tanaka. 1989. Angiotensin-I converting enzyme inhibitor derived from *Ficus carica*. Agric. Biol. Chem., 53, 2763~2767.
- Matsui, T., H. Matsufuji, E. Seki, K. Osajima, M. Nakashima and Y. Osajima. 1993. Inhibition of angiotensin-I converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. Biosci. Biotech. Biochem., 57, 922~925.
- Mazoyer, E., S. Levy-Toledano, F. Rendu, L. Hermant, H. Lu, A.M. Fiat, P. Jolles and J. Cean. 1990. A new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. Eur. J. Biochem., 194, 43.
- Seki, E., K. Osajima, T. Matsui and Y. Osajima. 1993. Separation and purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 40, 783~791 (in Japanese).
- Suh, H.J., S.J. Cho, J.H. Whang, H. Lee and H.C. Yang. 1997. Characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from squid hydrolysate. Foods and Biotechnology, 6, 122~124.
- Turgeon, S.L. and S.F. Gauthier. 1990. Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process. J. Food Sci., 55, 106~110.
- Wyvratt, M.J. and A.A. Patchett. 1985. Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. Med. Res. Rev., 5, 483~531.

김우준. 1987. 수산화학. 세진사, 서울, 222p.

박진희. 1996. 한국산 김 (*Porphyra yezoensis*) 중의 porphyran 추출 및 그 특성에 관한 연구. 한양대학교 박사학위논문.

이성갑, 김동수. 1999. 수산 식품 가공 이용학. 광문각, 서울, 65p.

2001년 2월 2일 접수

2001년 3월 27일 수리