

연구노트

**멸치 가공선 자숙폐액 Pepsin 가수분해물의
Angiotensin 전환효소 저해작용**

지청일 · 이지혜 · 박덕천 · 구연숙 · 김인수¹
이태기² · 정규진² · 박영호 · 김선봉*

부경대학교 식품생명공학부/수산식품연구소,
¹경상대학교 해양생물이용학부, ²남도대학 해양식품산업과

**Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity in Peptic
Hydrolysates of Cooking Discards from Anchovy Factory Ship**

Cheong-II Ji, Ji-Hye Lee, Douck-Choun Park, Yeun-Suk Gu, In-Soo Kim¹,
Tae-Gee Lee², Kyoo-Jin Jung², Yeung-Ho Park and Seon-Bong Kim*

Faculty of Food and Biotechnology/Institute of Seafood Science, Pukyong National University

¹Division of Marine Bioscience/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University

²Department of Marine Food Industry, Provincial College of Namdo

The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity in peptic hydrolysate of raw anchovy cooking discards was 51.3% at 1 mg of protein per 100 μL sample solution. While, after the treatment of pepsin for 4 h, was 65.8%. The crude peptides fractionated through Bio-gel P-2 column chromatography consisted of five fractions (P-1~P-5) and had maximum inhibitory activity in the fraction P-2 (IC₅₀ = 0.319 mg protein/mL). The fraction P-2 was rich in aspartic acid, glutamic acid, and glycine.

Key words: ACE inhibitory activity, peptic hydrolysate, anchovy cooking discards

서 론

체내에 널리 분포되어 있는 angiotensin 전환효소(angiotensin converting enzyme, ACE; peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3.4.15.1)는 angiotensinogen이 renin의 특이적 분해를 받아서 생성된 불활성형인 angiotensin I의 말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 octapeptide인 활성형의 angiotensin II로 전환시키며, 이렇게 생성된 angiotensin II는 직접적으로 혈압상승 작용을 하거나 adrenal로부터 sodium-retaining steroid hormone인 aldosterone의 유리를 촉진시켜 체내 나트륨을 저류시킨다. 또한 이 효소는 혈관 이완작용을 지니는 혈압 강하물질인 bradykinin의 분해를 촉진한다⁽¹⁾.

이와같이 혈압강하를 위해서는 혈압상승에 관계가 깊은 ACE의 저해가 필수적으로, 최근 이러한 ACE 저해제들이 심장질환 및 뇌혈관질환 등 고혈압증과 관련이 깊은 질환 치

료제로 널리 쓰여지고 있으며, 미국에서는 연간 그 매출액이 꾸준히 증가되고 있다⁽²⁾.

한편, 근년에는 식품이 가지는 생체조절기능에 대한 관심이 높아져 그 기능성 인자 및 특성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 실제로 ACE 저해활성을 갖는 peptide형 및 비peptide형 성분들이 식품소재들로부터 분리되고 있는데, 최근 식품성분 중의 ACE 저해효과는 식물성 단백질⁽³⁻⁵⁾ 및 어육단백질⁽⁶⁻⁸⁾ 등에 유래하는 구조와 활성이 다양한 잠재적 생리활성 peptide류를 중심으로 주로 연구되고 있다.

본 연구는 이와같은 식품단백질이 가지는 잠재적 기능을 널리 생물자원 전반에서 구하고 그들 자원을 유효이용하기 위한 기초 연구의 일환으로 수행되었다. 즉 우리나라 연근해 자원중 어종별 생산 순위의 수위를 차지하고 있는 멸치는 주로 자건품의 형태로 가공되고 있는데, 대부분이 기선권현망 조업방법으로 어획되어 바로 선상에서 자숙처리하고 있다. 이 때 자숙 가공선 1척당 1일 15여톤의 자숙 폐액이 발생하여 1999년도 기준으로 보유 가공선이 71척인 점을 감안할 때 주 어획기에 1일 약 1,000여톤으로 추정되는 많은 양이 바다로 폐기되어 해양오염까지 유발하고 있는 실정이다. 그리하여 이들 미이용 수산가공부산물을 대상으로 기능성 조미소재로서의 이용가치 및 산업적 개발가능성을 살펴보고자

*Corresponding author : Seon-Bong Kim, Faculty of Food and Biotechnology, Pukyong National University, Daeyeon 3-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-737, Korea
Tel: 82-51-620-6418
Fax: 82-51-626-8494
E-mail: owlkim@pknu.ac.kr

소화효소인 pepsin에 의한 가수분해와 젤크로마토그래피를 이용하여 ACE저해 peptide를 검색하고 그 효과를 살펴보았다.

재료 및 방법

멸치 자숙액

멸치 자숙액은 경남 통영시 근해 멸치 가공선에서 나오는 자숙 폐액을 그대로 수집하여 냉장 상태로 운반한 후 -18°C 의 동결실에 저장하여 두고, 사용할 때 저온실(4°C)에서 정지해동한 후 부유하는 협잡물을 제거하기 위하여 감압여과하여 이를 시료액으로 하였다. 이때 시료 멸치 자숙액의 일반성분은 수분 93.9%, 단백질 0.4%, 지방 0.2% 및 회분 4.8% 이었으며 pH는 6.2이었다.

시약

Angiotensin 전환효소(ACE)는 토끼의 허파로부터 얻은 아세톤 침전분말(Sigma Co., USA) 1g에 봉산완충액(pH 8.3, 400 mM NaCl 함유) 10 mL를 가하여 5°C 에서 24시간 교반한 후 원심분리(20,000×g, 30분)하여 얻은 상층액을 조효소액으로 하였으며, 기질로는 hippuryl-histidyl-leucine(Sigma Co., USA)을 사용하였다. 그리고 단백질가수분해효소인 pepsin은 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다. 이 외에 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

멸치 자숙액의 pepsin 가수분해

소화효소인 pepsin을 시료의 건물당 2%(w/w)의 농도로 첨가하고 10배량의 염산 완충용액(pH 2.0)을 가한 다음 37°C 에서 가수분해를 실시하였다. 가수분해후 배양 용액 중에서 5 mL를 취하고 효소를 실험시키기 위하여 95°C 탕욕 중에서 5분간 가열처리한 다음 원심분리(3,200×g, 20분)하여 얻어진 상층액을 멸치 자숙액 pepsin 가수분해 용액으로 하였다.

일반성분 및 pH

수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 Kjeldahl법 그리고 회분은 건식회화법으로 각각 측정하였다.

단백질 정량

단백질 함량은 Lowry 등⁹⁾의 비색법과 280 nm에서의 흡광도로써 측정하였다.

아미노산 분석

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

Angiotensin I 전환효소 (ACE)의 활성 측정

ACE 활성은 Cushman과 Cheung¹⁰⁾의 방법을 개량한 Yama-

moto 등¹¹⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 소정농도의 시료 100 μL 에 ACE 조효소액 100 μL 및 봉산완충액(pH 8.3, 400 mM NaCl 함유) 200 μL 를 가한 후, 37°C 에서 preincubation시켰다. 여기에 기질로써 12.5 mM의 hippuryl-histidyl-leucine 용액 100 μL 를 가하여 다시 37°C 에서 1시간 반응시킨 후 1 N HCl 300 μL 를 가하여 반응을 정지시켰다(공시험은 시료 용액 대신에 봉산완충액 100 μL 를 사용하였으며, 대조구는 1 N HCl 300 μL 를 가한 다음 ACE 조효소액 100 μL 를 가하였다). 여기에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 15초간 교반한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 상층액 1 mL를 취하였다. 이 상층액을 140°C 에서 20분간 건조시킨 다음 실온에서 5분간 방치한 후 1 M NaCl 3 mL를 가하여 15초간 교반하여 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가 전후 잔존 활성의 백분율로써 ACE 저해율을 나타내었다.

Gel chromatography에 의한 ACE 저해 peptide의 분리

멸치 자숙 폐액의 pepsin 가수분해물을 40°C 에서 감압농축한 후, Bio-gel P-2(Bio-Rad Laboratories, UK)를 충전한 column(2.2×80 cm)을 사용하여 시료액 2 mL를 탈이온수로써 용출(유속 20 mL/hr, 분획량 5 mL/tube)시켰다. 분획한 각 용출액을 280 nm에서 흡광도를 측정하고 Lowry 등⁹⁾의 비색법으로 단백질 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

먼저, 원료 멸치 자숙 폐액의 단백질농도에 따른 ACE 저해작용을 살펴보기 위해, 단백질 함량을 시료용액 100 μL 당 0.5, 1 및 2 mg으로 하였을 때 ACE 저해효과가 각각 29.3%, 51.3% 및 59.4%를 나타내었다. 그리하여 멸치 자숙 폐액을 단백질분해효소로 가수분해한 후 ACE 저해 효과가 있는 peptide를 제조하기 위하여 소화효소인 pepsin을 멸치 자숙 폐액 중의 건물당 2%(w/w)의 농도로 첨가하여 가수분해 시간에 따른 ACE 저해효과의 경시적 변화를 살펴보았다. 그 결과, 단백질 함량을 시료용액 100 μL 당 1 mg으로 하였을 때, 가수분해 직후에도 약 53% 정도의 저해효과를 나타내었고 4시간째에 65.8%로 가장 높았으며, 그 후 거의 일정한 저해효과를 나타내다가 24시간째에는 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

이는 가수분해에 의해 생성된 ACE 저해작용을 나타내는 peptide가 가수분해의 진행에 따라 다시 분해되어 peptide의 사슬길이나 구조 및 아미노산 배열이 달라지기 때문인 것으로 생각된다. 이로 미루어 단백질 분해효소에 의하여 ACE 저해작용을 가진 peptide가 기질단백질로부터 생성되는 한편 생성된 활성 peptide는 분해될 수 있음을 알 수 있다. 따라서 소화효소인 pepsin에 의한 멸치 자숙액 가수분해물로부터 ACE 저해 peptide의 분리를 위한 최적 가수분해 시간은 4시간으로 하였다. 한편, Ukeda 등¹²⁾은 정어리육을 pepsin, trypsin, chymotrypsin 및 denazyme AP로써 가수분해한 경우, pepsin과 chymotrypsin에 의한 것이 ACE 저해효과가 가장 우수하였고, 특히 chymotrypsin은 peptide 결합의 방향족 아미노산 잔기의 C 말단을 선택적으로 분해하기 때문이라고 하였다.

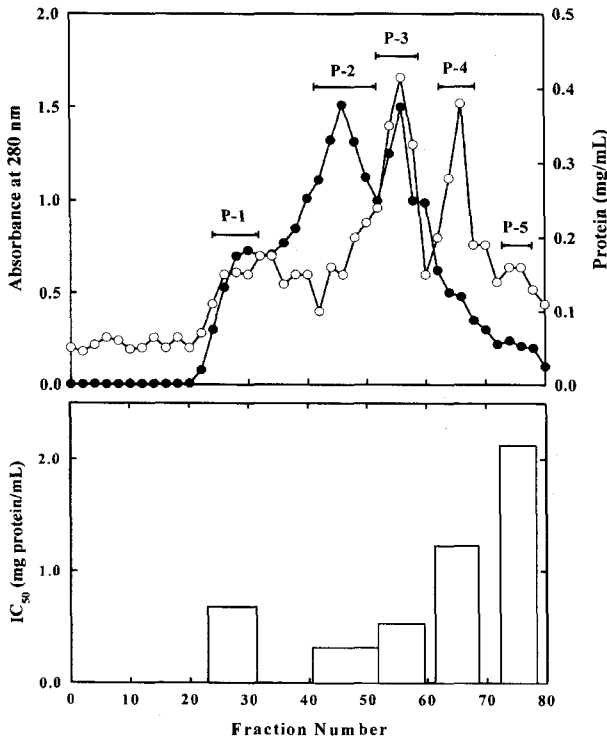


Fig. 1. Gel chromatogram and ACE inhibitory activities of fractions separated from peptic hydrolysate of anchovy cooking discards by a Bio-gel P-2 column(2.2×80 cm).

- ● -, absorbance at 280 nm; - ○ -, protein (mg/mL). Anchovy cooking discards were hydrolyzed with 2% pepsin (pH 2.0, 37°C, 945 unit/mg of protein) for 4 h. IC₅₀ means the concentration which inhibits 50% of the angiotensin I converting enzyme activity.

한편, pepsin을 이용한 멸치 지속액 단백질 가수분해물로부터 ACE 저해 peptide를 분리하기 위하여 Bio-gel P-2 수지를 충전한 gel chromatography를 실시하고 280 nm에서의 흡광도 및 그 때의 단백질 함량을 측정하여 5개의 획분(P-1~P-5)을 분리하였으며, 각 획분들의 IC₅₀값(ACE 활성을 50% 저해하는데 요구되는 저해제의 양)을 측정하여 ACE 저해효과를 살펴보고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이 때 저해효과가 가장 우수한 획분은 P-2(fraction No. 43~50) 획분이었고, 그 저해효과는 IC₅₀값으로 0.319 mg protein/mL이었다. 이와 관련하여 Kim 등⁽¹³⁾은 멸치육의 단백질을 pepsin으로 가수분해하고 겔 여과 등을 통해 분리, 정제한 두 개의 ACE 저해 활성 획분의 IC₅₀은 각각 0.045 및 0.076 mg protein/mL인 것으로 보고한 바 있다. 한편, 분자량 추정을 위하여 peptide 화합물인 bacitracin(분자량; 1,422.71)과 streptomycin sulfate(분자량; 1,457.4)를 사용하여 동일 조건에서 겔 여과를 실시하여 비교한 결과, 활성 획분 P-2의 분자량은 약 1,450 전후로 추정되었다.

겔 여과에 의한 ACE 저해활성 획분인 P-2 획분의 아미노산 조성은 Table 1에 나타낸 바와 같다. P-2 획분은 aspartic acid, glutamic acid 및 glycine의 함량이 각각 11.6%, 11.6% 및 10.6%로 나타나 이 3종류의 아미노산이 약 34% 정도를 차지하였다. 이와 관련하여 Yeum 등⁽¹⁴⁾은 탈지대두박, egg albumin 및 casein 등의 식품단백질 효소가수분해물의 ACE

Table 1. Amino acid composition of the active fraction (P-2) separated from peptic hydrolysate of anchovy cooking discards by a Bio-gel P-2 column chromatography

| Amino acids | % to total amino acids |
|---------------|------------------------|
| Aspartic acid | 11.6 |
| Threonine | 6.1 |
| Serine | 5.8 |
| Glutamic acid | 11.6 |
| Glycine | 10.6 |
| Alanine | 1.8 |
| Cysteine | 2.1 |
| Valine | 8.9 |
| Methionine | 2.9 |
| Isoleucine | 1.9 |
| Leucine | 6.4 |
| Tyrosine | 3.7 |
| Phenylalanine | 2.6 |
| Lysine | 5.8 |
| Histidine | 7.3 |
| Arginine | 3.9 |
| Proline | 7.0 |
| Total | 100.0 |

저해효과를 갖는 획분의 분자량은 1,400 부근으로 이들의 아미노산 조성은 glutamic acid의 함량이 특히 많았다고 보고하였다. 또한 Matsui 등⁽⁶⁾은 정어리육을 alkaline protease인 *Bacillus licheniformis*를 이용한 가수분해물로부터 분리한 ACE 저해 peptide는 산성 아미노산인 aspartic acid와 glutamic acid의 함량이 많고, 소수성 아미노산인 valine, leucine 및 tryptophan의 함량은 적었다고 보고한 바 있다.

요 약

현재 우리나라 남해안에서 많이 가공되고 있는 멸치 자건품은 통상 멸치 가공선에서 어획 즉시 지속처리를 하여 제조되고 있는데, 이때 가공부산물로서 다량 배출되는 지속액은 현재로서는 이용가치가 없을 뿐만 아니라 그대로 바다에 폐기되어 해양오염까지 유발시키고 있는 실정이다. 그리하여 이들 멸치 지속 폐액을 대상으로 기능성 조미소재로서의 이용가치를 살펴보기 위해 소화효소인 pepsin에 의한 가수분해와 겔크로마토그래피를 이용하여 angiotensin 전환효소(ACE) 저해 peptide를 검색하고 그 효과를 살펴보았다.

먼저, 멸치 지속 폐액의 단백질 농도에 따른 ACE 저해작용을 살펴 본 결과 시료 용액 100 µL당 1 mg으로 하였을 때 51.3%의 저해능을 나타내었다. 한편, pepsin을 이용하여 가수분해할 경우, ACE 저해효과는 4시간째에 65.8%로써 가장 높게 나타내었다. 이 가수분해물을 Bio-gel P-2 column chromatography에 의하여 분리한 결과, P-1~P-5의 5개의 획분을 얻었고 ACE 저해효과가 가장 우수한 획분은 P-2(IC₅₀=0.319 mg protein/mL)로 나타났으며 이 획분의 아미노산 조성을 살펴본 결과 aspartic acid, glutamic acid 및 glycine의 함량이 높았다.

문 헌

1. Ondetti, M.A. and Cushman, D.W. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 283-308 (1982)
2. Anonymous. Development of protein and peptides ingredients and it's market trend. *Food and Development* 35: 18-23 (2000)
3. Yano, S., Suzuki, K. and Funatsu, G. Isolation from α -zein of thermolysin peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 661-663 (1996)
4. Okamoto, A., Hanatata, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y., Koizumi, Y. and Yanagida, F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of various fermented foods. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 1147-1149 (1995)
5. Shin, Z.I., Ahn, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J., Lee, H.J. and Moon, T.H. Fractionation of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 230-235 (1995)
6. Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y. Inhibitor of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus Licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 922-925 (1993)
7. 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 rat. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 425-429 (1995)
8. Lee, T.G., Park, Y.B., Park, D.C., Yeum, D.M., Kim, I.S., Gu, Y.S., Park, Y.H. and Kim, S.B. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in enzymatic hydrolysates of anchovy muscle protein. *J. Korean Fish. Soc.* 31: 875-879 (1998)
9. 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)
10. 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)
11. Yamamoto, S., Toida, I. and Iwai, K. Re-examination of the spectrophotometric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Japan. J. of Thoracic Diseases* 18: 297-303 (1980)
12. Ukeda, H., matsuda, H., Kuroda, H., Osajima K., Matsufuji, H. and Osajima, Y. Preparation and separation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Nippon N gelkagaku Kai-shi* 65: 1223-1228 (1991)
13. Kim, S.B., Lee, T.G., Park, Y.B., Yeum, D.M., Kim, O.K., Do, J.R. and Park, Y.H. Isolation and characteristics of angiotensin- I converting enzyme inhibitory activity of peptic hydrolyzates of anchovy muscle protein. *Bull. Korean Fish. Soc.* 27:1-6 (1994)
14. 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: 226-233 (1993)

(2001년 11월 27일 접수)