

옥수수 글루텐 효소 가수분해물의 Angiotensin I Converting Enzyme 활성 저해 펩타이드의 정제

오광석 · 이동건 · 홍정운 · 성하진*
고려대학교 생명공학원

Peptide Inhibitors for Angiotensin I Converting Enzyme from Corn Gluten Digests. Oh, Kwang-Seok, Dong-Gun Lee, Jeong-Un Hong and Ha-Chin Sung*. Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul, 136-701, Korea - The angiotensin I converting enzyme (ACE) has an important role in the maintenance of blood pressure. The ACE inhibitory activities of foods have recently been studied. We tried to isolate ACE inhibitory peptides from the Flavourzyme (FZ), Pescalase (PE), and Thermolysine (TH) protease digests of corn gluten, which was restricted to the use of food for digestion problem. The FZ, PE, TH/PE protease hydrolyzed corn gluten and the inhibitory activities of the hydrolyzates for ACE were measured. Major fractions were isolated from the digests using ODS chromatography after treating with ethanol in step gradient. The ACE inhibitors were further purified by Bio-Gel P-2 column and reverse phase HPLC. Five inhibitory peptides were isolated. Their amino acids were sequenced as LPF ($IC_{50} = 40 \mu M$), GPP ($IC_{50} = 17.6 \mu M$), PNPY ($IC_{50} = 30.7 \mu M$), SPPPFL ($IC_{50} = 63 \mu M$), and SQPP ($IC_{50} = 17.2 \mu M$).

Key word: Angiotensin I-converting enzyme inhibitor, corn gluten, peptides

ACE[Angiotensin I-converting enzyme(EC 3.4.15.1)] 저해제는 처음 뱀의 독(Bothrops jararaca & Agkistrodon halys blomhoffii)[6]에서 분리된 후, 혈압강하제로서 임상적으로 널리 사용되고 있다. 생리적으로는 renin-angiotensin system에 의한 혈압조절기구에서 중심적 역할을 담당하는 ACE의 활성을 저해함으로써, angiotensin I에서 angiotensin II로의 변환을 저해하여 혈압강하를 일으킨다. 또한, ACE 저해제는 혈압강하작용이 있는 활성 펩타이드인 bradykinin의 ACE에 의한 분해(불활성화)를 저해함으로써, 혈압강하를 유도하기도 한다. 최근에는 proline 유도체인 캐토프릴이 합성되어[4, 10] 강압활성이 확인된 아래 캐토프릴의 구조를 기초로 한 수 종류의 ACE저해물질 합성에 관한 연구가 이루어지고 있어, 말레이산-에나라프릴이나 아리세프릴 등의 화학물질이 임상실험에 제공되고 있다[11]. 그러나 ACE 저해 합성제제의 특징은 급격한 강압효과를 유발하기 때문에 심박동수증가 등의 부작용이 많고 고령자에게 투여하기 어려운 점이 있다. 뿐만 아니라, 미각이상, 가려움, 발진, 두통, 마른기침 등의 부작용이 나타날 수 있고, 백혈구 감소, 빈혈이나 단백뇨가 나타나기도 하며, 신기능장애가 있는 환자에게는 신기능이 악화될 수 있는 우려가 있다[1]. 따라서 체내에서의 안정성과 보다 적은 부작용을 고려한 식품유래의 새로운 ACE 저

해 펩타이드가 요구되고 있는 실정이다. 그러나 ACE 저해 펩타이드 개발의 문제점은 *in vitro* 활성과 반드시 상관성을 갖지 않는데 있다. 이러한 이유 중의 하나는 경구투여 시 소화관 내에서의 소화효소에 대한 안정성과 ACE 자체에 의한 분해 때문이다. 본 논문에서는, 체내에서의 소화가 어려워 식품소재로 이용이 제한되어 왔던 옥수수 글루텐을 단백 소재로 하여 미생물 단백 분해 효소를 이용 기수 분해 한 후 추출, 정제함으로써, 역으로 경구투여 시 ACE 자체에 대한 분해나 소화효소에 대한 안정성이 뛰어날 것으로 생각되어지는 새로운 ACE 저해 펩타이드 개발의 한 방법을 제안하고자 하였다.

재료 및 방법

Corn Gluten

옥수수 펩타이드 제조에 사용한 corn gluten은 (주)두산종합식품 전분공장에서 전분 제조 공정(Fig. 1) 중 부산물로 생산되는 옥수수 글루텐 혼탁액을 사용하였다.

옥수수 글루텐의 전분질 제거

글루텐 혼탁액의 pH를 2N-NaOH를 사용하여 6.0으로 조정한 후 85°C 이상에서 Selvey사의 amylase KT를 사용하여 전분의 액화를 실시하고 여과지를 이용 여과하여 전분질을 제거하였다.

Flavourzyme에 의한 가수분해

상기의 방법으로 전처리된 옥수수 글루텐 혼탁액을

*Corresponding author
Tel. 82-2-3290-3418, Fax. 82-2-923-9923
E-mail: hcsung@korea.ac.kr

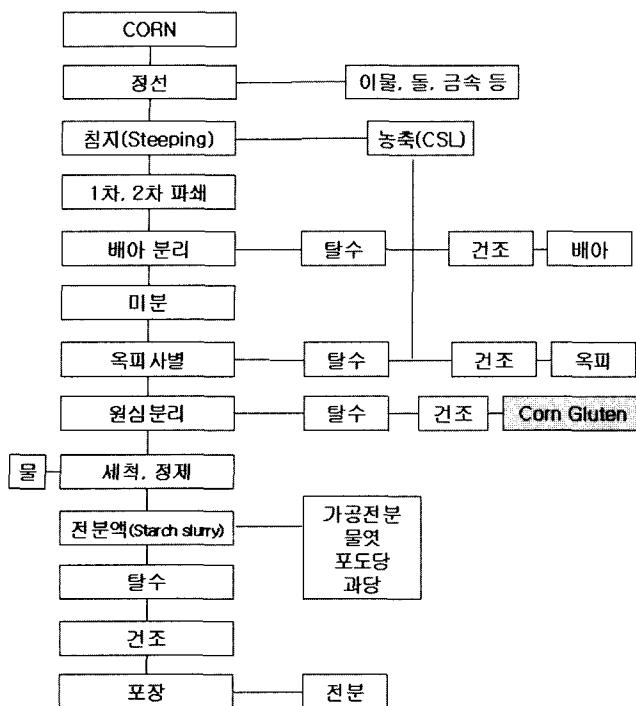


Fig. 1. Wet milling process of corn starch.

Aspergillus oryzae 유래의 Endo-Exo 복합형 효소인 Novo사의 Flavourzyme을 이용하여 가수분해하였다. 효소는 혼탁액 중 단백량의 1%를 첨가시켰고 반응조건은 pH 7.0, 50°C에서 48시간 동안 가수분해 시키면서 반응시간에 따른 ACE 저해 효과를 측정하였다.

Pascalase, Thermolysine/Pascalase에 의한 가수분해
Bacillus subtilis 유래의 Endo형 효소인 GB사의 Pascalase, Thermolysine 효소를 각각 이용하여 전처리된 옥수수 글루텐 혼탁액을 가수분해하였다. 효소는 혼탁액 중 조단백량의 1%를 첨가하였고, pH 8.0, 60°C에서 10시간 동안 가수분해 시키면서 반응시간에 따른 ACE 저해효과를 측정하였다.

Ultra-Filtration 분획

가수분해 종료 후 원심분리(8,000 g, 30분)를 통해 얻어진 상등액을 Millipore Prep/Scale TFF Ultra-Filtration System을 사용하여 분자량 10K, 5K cartridge를 사용하여 분자량 차례로 분획하고 filtrate를 얻었다.

살균 및 건조

Ultra-Filtration을 통하여 얻어진 펩타이드 수용액을 autoclave로 살균하고 분무 건조하여 최종 건조 펩타이드 파우더를 얻었다.

ACE 활성 저해 펩타이드의 정제

옥수수 글루텐 가수 분해물을 10% 에탄올 용액에 용해하

고 원심 분리하여 불용성 성분을 제거 후 10% 에탄올로 평형화된 ODS column(1.5×20 cm)에 주입하고, 에탄올 10-50%의 단계별 농도구배에 의해 3 ml/hr의 속도로 용출하여 1 ml씩 분획한 후, ACE 저해효과가 있는 활성부분을 모아 동결 건조하였다. 10% 에탄올로 평형화된 Bio-Gel P-2 column(1.2×100 cm)에 ODS column으로부터 얻어진 ACE 저해 활성 분획을 주입하고 동일 용액을 4 ml/hr의 속도로 용출하여 1 ml씩 분획한 후, ACE 저해 효과가 있는 부분만을 모아 감압 농축하였다. Bio-Gel P-2 column에서 얻어진 ACE 저해 활성 분획을 역상 HPLC를 이용하여 정제하였다. Column은 Novapak C18, detector는 UV/Vis 486을 사용하여 0.5% TFA 용액 중 acetonitrile 10~80%의 직선 농도구배에 의해 용출(1 ml/min)하여 단일 peak로 정제된 획분을 분취하여 감압 농축하였다.

ACE 활성 저해 펩타이드의 아미노산 서열 결정

HPLC에서 단일 peak로 확인된 정제 펩타이드는 Protein Sequencer(Milligen사 Prosequencer 6600) 기기를 이용하여 분석하였다. Prosequencer는 Edman degradation 반응을 자동화한 Solid phase 아미노산 서열분석기로서 펩타이드의 C-말단을 지지체에 결합시킨 후, 펩타이드의 N-말단부터 자동으로 Edman 반응을 시켜 형성된 PTH-아미노산을 분석함으로써 아미노산의 서열을 결정하였다.

ACE 저해활성 측정

Cushman D. W. 등의 방법[3]을 이용하여 실험하였다. 시료 0.05 ml에 Hip-His-Leu를 0.1 ml 가한 후 37°C에서 5분간 방치하였다. 여기에 ACE 효소액을 0.15 ml 가하고 다시 37°C에서 1시간 반응시킨 후 0.5 N HCl을 0.25 ml 가하여 반응을 정지시켰다. 공실험은 시료용액 대신 중류수 0.05 ml를 사용하였으며 대조구는 HCl을 가한 후 효소액을 가하였다. 여기에 ethyl acetate 1.5 ml를 가하여 15초간 섞어준 후 2,800 rpm에서 10분간 원심 분리시켜 상등액 0.5 ml를 취하였다. 이 상등액을 oil bath 140°C에서 15분간 건조 후 1 M NaCl을 3 ml 가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해율을 측정하였다. IC₅₀값은 각각의 시료를 다양한 농도로 가한 후 ACE 저해활성을 비교하여 ACE 활성을 50% 저해하는데 필요한 시료의 단백질량으로 표시하였다.

단백질 정량

시료의 단백질 농도는 Lowry법[7]에 의해 Bovine serum albumine(BSA)을 표준물질로 환산 측정하였다.

결과 및 고찰

옥수수 글루텐의 효소적 가수분해

Flavourzyme에 의한 가수분해는 반응조건 pH 7.0, 50°C에

서 48시간동안 가수분해 시키면서 반응시간에 따른 ACE 활성 저해 효과를 측정한 결과, 24시간동안 반응을 하면 유리 단백질량은 76 mg/ml, IC₅₀값은 0.155 mg이었다. 48시간동안 반응을 하면 유리 단백질량은 87 mg/ml, IC₅₀은 0.176 mg이었다. 가수분해율은 10시간 이후에는 비교적 완만히 증가함을 볼 수 있으며, ACE 활성 저해 효과에 있어서는 20시간까지 계속적으로 증가하여 IC₅₀값이 0.148 mg으로 가장 우수하였으며 그 후에는 급격히 감소하는 경향을 보였다. 이는 혈압강하를 나타내는 펩타이드 성분이 가수분해가 진행됨에 따라 과분해 되어 ACE 저해 활성이 떨어지는 것으로 사료되어, 최적 반응시간을 20시간으로 하였다. Pescalase, Thermolysine에 의한 가수분해는 pH 8.0, 60에서 10시간 동안 가수분해 시키면서 반응시간에 따른 유리 단백질량, ACE 저해효과 등을 측정한 결과, Pescalase, Thermolysine은 Flavourzyme과는 달리 가수분해가 4시간 이후에는 완만히 진행되었다. 4시간 동안 반응을 하면 유리 단백질량은 각각, 23 mg/ml, 17 mg/ml 이었고, IC₅₀값은 0.21 mg, 0.13 mg이었다. ACE 저해효과가 반응 개시 후 1시간 경과 시 IC₅₀값이 0.166 mg, 0.101 mg으로 최대 활성을 나타내었으며 이후 완만하게 감소함에 따라 최적 반응시간을 1시간으로 하여 다음 실험에 사용하였다.

Ultra-filtration에 의한 분획 및 건조

옥수수 글루텐 가수 분해물은 열처리(85°C, 15분)에 의해 효소를 실활 시키고 반응을 종료한 후 원심분리(8,000 g, 30분)를 통하여 펩타이드 수용성 상동액을 취하였다. 이 상동액을 Millipore/Scale TFF Ultra-Filtration System을 사용하여 1차로 분자량 10K cartridge로 분획하고, 분획되어 나오는 filtrate를 2차로 분자량 5K cartridge로 분획하였다. 이때 나오는 펩타이드 분획물은 엷은 미색 내지 노란색을 띠는 투명한 액체였다. 상기의 Ultra-filtration을 통하여 얻어진 filtrate는 autoclave(121°C, 15분)로 살균하고, 분부 건조공정을 통하여 수분 함량 5~10%의 미백색 파우더를 얻었다. 최종 얻어진 옥수수 펩타이드 파우더는 분리, 정제 실험에 사용하기에 앞서 각각의 IC₅₀값을 측정한 결과 Flavourzyme의 경우는 7.6 mg/ml, Pescalase의 경우는 1.9 mg/ml, 그리고 Thermolysin/ Pescalase의 경우는 1.3 mg/ml이었다.

ODS column chromatography

Toshiro 등[8]이 초기 분획을 위해 사용한 방법을 응용하여, 각각의 효소(FZ, PE, TH/PE)에 반응시킨 옥수수 글루텐 가수분해물 3 g을 10% 에탄올 용액 10 ml에 용해 후 10% 에탄올 용액으로 평형화된 ODS column에 주입하고 에탄올 10~50%의 단계별 농도구배로 용출하여 1 ml씩 분획하였다. 각 단백질 분획의 농도와 저해율을 측정하고, ACE 저해율이 50% 이상의 활성부분을 모아 동결 건조하여 단백질 분획들을 얻었다. 각 단백질 분획의 농도와 IC₅₀값을 측정한

결과, FZ 경우는 10개의 단백질 분획 중 에탄올 20% 농도 구배에서의 6번째 분획에서 상대적으로 높은 ACE 저해 효과를 보였다. PE 경우는 11개의 단백질 분획 중 에탄올 30, 40% 농도 구배에서 상대적으로 높은 ACE 활성 저해 효과를 보였고, 각 분획별 단백질 농도와 IC₅₀값을 측정하였다. 그리고 TH/PE 경우는 FZ, PE 경우와는 달리, 10개의 단백질 분획 중 에탄올 10% 농도 구배에서 상대적으로 높은 ACE 활성 저해 효과를 보였다(Fig. 2).

Bio-Gel P-2 column chromatography

Seiko 등[12]이 α-zein으로부터, Emiko 등[5]이 간장으로부터 분자량이 100-1800 Dalton 사이의 ACE 저해 펩타이드의 정제에 사용한 gel filtration column인 10% 에탄올로 평형화된 Bio-Gel P-2 column을 이용하였다. ODS column에 의해 얻은 ACE 활성 저해분획 중 150 mg/ml 이하의 IC₅₀

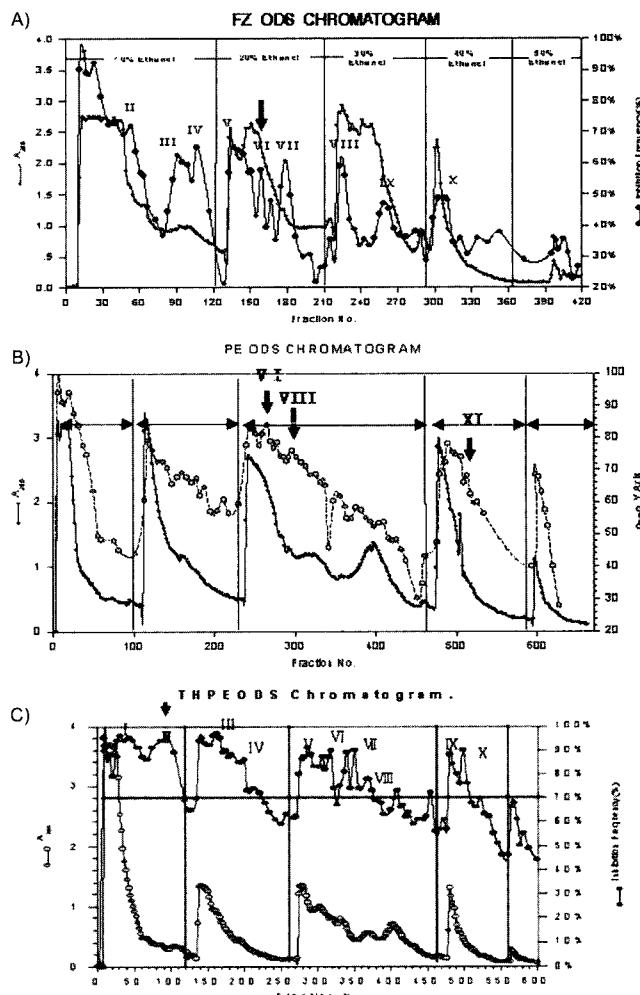


Fig. 2. Chromatogram of Corn gluten FZ (A), PE (B), TH/PE (C) hydrolyzate on ODS column. The column (1.5×20 cm) was eluted with 10, 20, 30, 40, 50% ethanol at 3 ml/hr; 1 ml fractions were collected (● A_{280nm}; indicated elution profile, ○ indicated inhibition activity profile).

값을 보인 단백질 분획들을 정제하였다. 그 결과, 각각 46, 88, 50.4, 86, 그리고 $58 \mu\text{M}$ 정도의 IC_{50} 값을 보이는 다섯개의 활성 분획을 얻을 수 있었다(Fig. 3). 이를 각각 감압 농축하여 다음의 정제 실험에 사용하였다.

HPLC

Bio-Gel P-2 column에서 정제되어진 분획 중 ACE 활성 저해 효과가 가장 좋은 분획을 펩타이드 정제에 가장 많이 사용되는 Novapak C18 column에서 acetonitrile 10-80%의

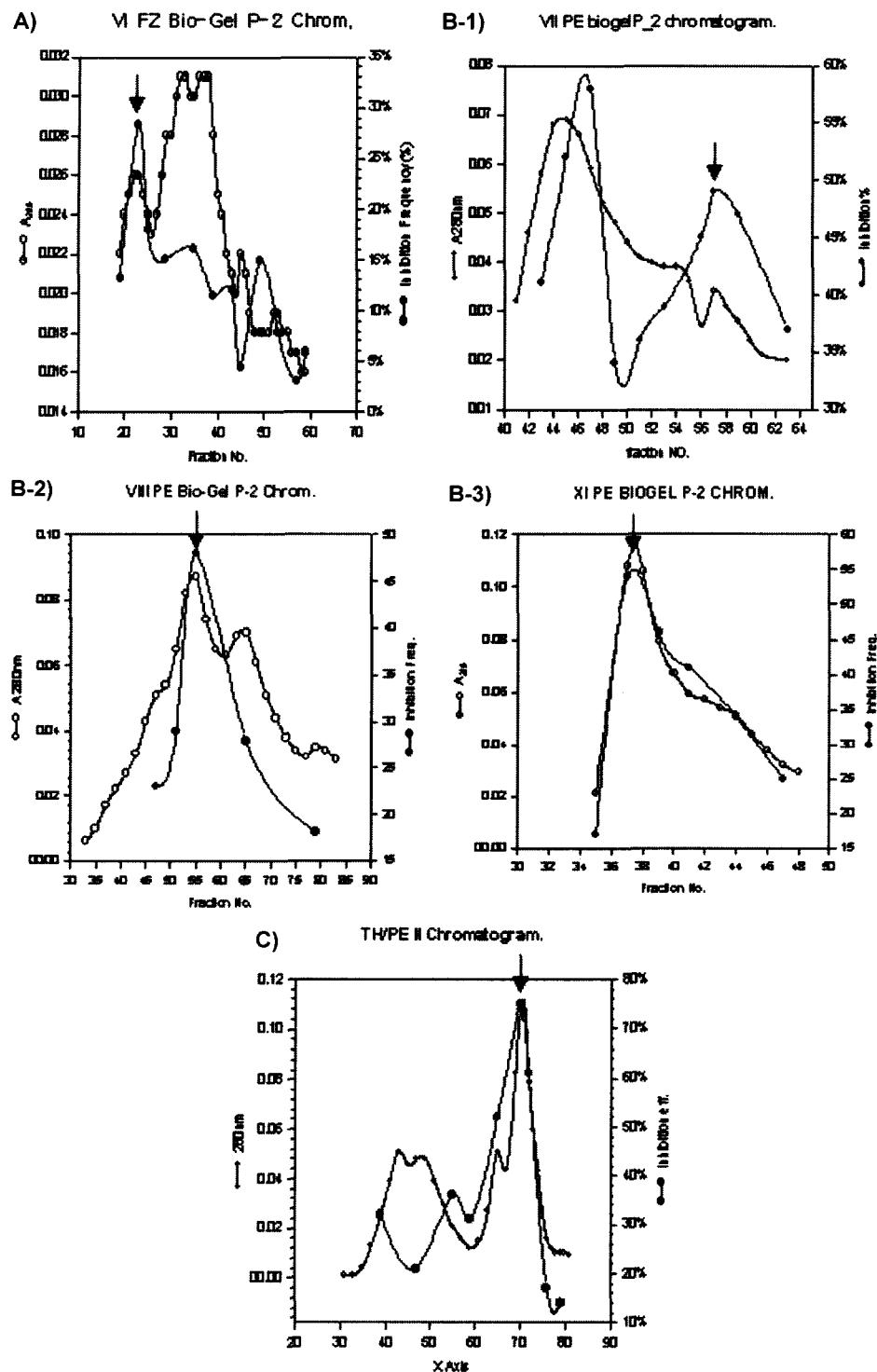


Fig. 3. Chromatogram of fractions [FZ-6 (A), PE-7, -8, -11 (B), TH/PE-2 (C)] from ODS column chromatography on Bio-Gel P-2 column. The column ($1.2 \times 100 \text{ cm}$) was eluted with 10% ethanol at 4 ml/hr ; 1 ml fractions were collected (-○- $A_{280\text{nm}}$; indicated elution profile, -●-; indicated inhibition activity profile).

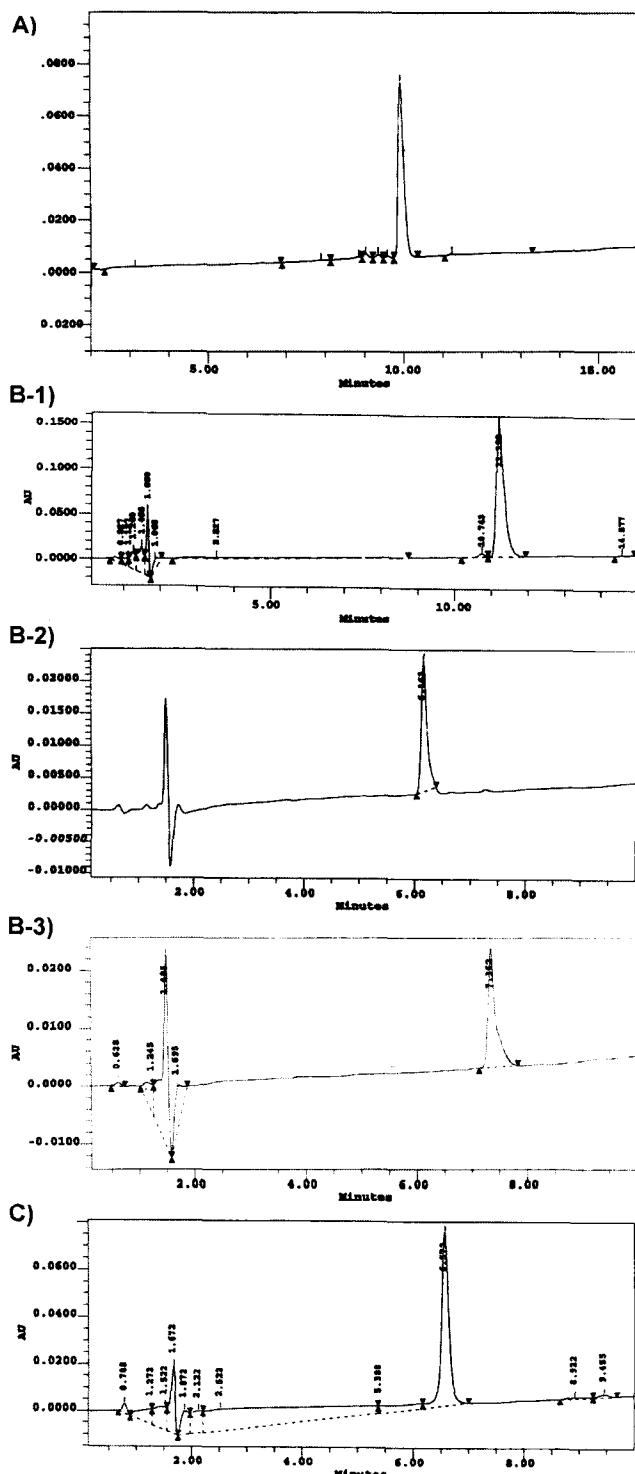


Fig. 4. Chromatogram of fractions [FZ-6 (A), PE-7, -8, -11 (B), TH/PE-2 (C)] from Bio-Gel P-2 column by RP-HPLC (Nova-pak C18). The column was eluted with 10-80% acetonitrile at 1 ml/min.

직선적 농도구배로 용출하여, 결국, 40, 17.6, 30.7, 63 그리고 17.2 μM 정도의 ACE 활성 저해효과를 보이는 peak들을 얻었다(Fig. 4).

Table 1. Purification of ACE inhibitory peptides from Corn Unit ($\mu\text{g/ml}$)

Purification step	FZ (VI)	PE			TH/PE (II)
		VII	VIII	XI	
^a Digest of corn gluten	300,000	300,000	300,000	300,000	300,000
^b ODS	2,700	8,500	7,100	3,700	7,500
^b Bio-Gel P-2	270	430	375	450	238
^b RP-HPLC	67	86	228	356	11

^aThe total protein concentration was determined by dry weight.

^bThe peptide concentration was determined by a Lowry Assay using bovine serum albumin as the standard.

Table 2. ACE inhibitory activities of peptides isolated.

peptide	Sequence ^a	IC ₅₀ (M)
FZ-VI	LPF	40
PE-VII	GPP	17.6
PE-VIII	PNPY	30.7
PE-XI	SPPPFYLY	63
TH/PE-II	SQPP	17.2

^aAmino acid sequences are presented from amino terminal (left) to carboxyl terminal (right). All amino acids are in the L-configuration.

ACE 활성 저해 펩타이드의 아미노산 서열 결정

HPLC에서 얻은 5개의 peak를 Milligen 6600 기기를 이용하여 각각의 아미노산 서열을 결정한 결과, LPF($\text{IC}_{50} = 40 \mu\text{M}$), GPP($\text{IC}_{50} = 17.6 \mu\text{M}$), PNPY($\text{IC}_{50} = 30.7 \mu\text{M}$), SPPPFYLY($\text{IC}_{50} = 63 \mu\text{M}$), and SQPP ($\text{IC}_{50} = 17.2 \mu\text{M}$)로 밝혀졌다(Table 1, 2).

본 실험에서 분리된 ACE 저해 활성 펩타이드는 α -zein과 γ -zein 등[13, 14]의 보고된 ACE 저해 펩타이드와 마찬가지로 proline이 많이 분포되어 있다. 이것은 식품유래의 ACE 저해 펩타이드는 proline을 많이 함유하고 있다는 Yoshiyuki 등의 보고와 일치한다[15]. 또한, 공통적으로 C-말단의 아미노산이 phenylalanine, proline, tyrosine, leucine 등의 소수성 아미노산으로 구성되어 있다. 이것은 C-말단에 benzene ring이나 branched-chain의 아미노산을 갖는 펩타이드가 competitive inhibitor로서 ACE에 binding되는 가장 적합한 펩타이드라고 분석한 Cheung 등의 보고서와 부합되는 결과이다[3]. 경구투여시, 일반적으로 Tri-, tetra peptide들은 가수분해 효소에 대해 체내에서의 안정성이 뛰어나고, 소장에서도 쉽게 흡수가 된다고 알려져 있다. 또한, 복용한 펩타이드의 양은 같은 molar activity를 갖는 분자량이 큰 펩타이드의 양보다는 훨씬 적어 그 만큼 부작용의 위험성이 적어 안전하다. Tri-, tetra peptide는 확률적으로 아미노산 서열의 조합이 작기 때문에 자연계의 많은 다른 단백질에도 존재 할 것으로 기대되므로 다른 식품소재에서의 검색이 용이할 것

으로 사료된다[9]. 또한, 식품 소재로의 이용시 저분자의 경우 가열조리 등의 가공 등에서도 안정하기 때문에 상시 섭취하는 식품이나 음료에 첨가하여 이용한다면 그 유용성이 기대된다.

요 약

안정성이 확보된 식품에서 ACE 저해 활성 물질을 검색하는 연구의 일환으로, 옥수수 글루텐을 Flavourzyme, Pescalase, 그리고 Thermolysine/Pescalase 등으로 가수분해하여 얻은 가수 분해물로부터 ACE 활성 저해 펩타이드를 다음과 같은 과정으로 분리, 정제하였다. 10% 에탄올로 평형화된 ODS chromatography를 이용 단백질 분획들을 얻고, Bio-Gel P-2 column과 reverse phase HPLC를 통해 5개의 ACE 저해 펩타이드를 분리, 정제하였다. 그 아미노산 서열은 LPF($IC_{50} = 40 \mu\text{M}$), GPP($IC_{50} = 17.6 \mu\text{M}$), PNPy($IC_{50} = 30.7 \mu\text{M}$), SPPPFYL($IC_{50} = 63 \mu\text{M}$), and SQPP($IC_{50} = 17.2 \mu\text{M}$)로 밝혀졌다. 이 펩타이드들은 경구투여 시 가수분해 효소에 대응하여 체내에서 안정성이 뛰어나고, 소장에서도 쉽게 흡수될 것으로 사료되어 상시 섭취하는 식품이나 음료에 첨가하여 이용한다면 그 유용성이 기대된다.

REFERENCES

- 유언호. 1990. 고혈압의 합병증, 의약정보 2: 74-79.
- Cheung, H. S. and D. W. Cushman. 1971. Spectrometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**: 1637-1642.
- Cheung, H. S., F. L. Wang, M. A. Ondetti, and D. W. Cushman. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **255**: 401-405.
- Cushman, D. W., H. S. Cheung, E. F. Sabo, B. Rubin, and M. A. Ondetti. 1979. Development of specific inhibitors of angiotensin I converting enzyme (kininase II). *Fed. Proced.* **38**: 2778-2784.
- Emiko, K., Y. Jun, and K. Mamoru, 1993. Purification and identification of an angiotensin-converting enzyme inhibitor for soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1107-1109.
- Kato, H. and T. Suzuki. 1969. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *Experientia*. **25**: 694-695.
- Lowry, O. H., N. J. Resbraough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-272.
- 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 hydrolysates derived from sardin muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 922-926.
- Nobusyasu, M. and S. Toshio. 1993. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from Bonito Bowels autolysate. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 695-699.
- Ondetti, M. A., B. Rubin, and D. W. Cushman. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science*. **196**: 248-253.
- Patchett, A. A., E. Harris, E. W. Tristram, and C. A. Stone. 1980. A new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature*. **288**: 280-282.
- Seiko, Y., S. Kazumasa, and F. Gunki. 1996. Isolation from -zein of thermolysis peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 661-667.
- Shinsuke, M., I. Hiromi, and M. Susumu, 1991. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an γ -zein hydrolysates. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1313-1317.
- Susumu, M., M. Shinsuke, K. Toshiyuki, and T. Hideoki. 1989. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1077-1079.
- Yoshiyuki, S., W. Keiko, K. Akitsugu, and I. Satoshi. 1994. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1767-1770.

(Received Oct. 4, 2002/Accepted Dec. 6, 2002)