

단백질 가수분해효소에 의한 카제인 가수분해물에서 Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해 펩티드의 분획

윤장호 · 윤주옥 · 홍광원
동국대학교 식품공학과

Fractionation of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Casein Hydrolysates by Proteases

Jang Ho Yoon, Joo Ok Yoon and Kwang Won Hong

Department of Food Science and Technology, Dongguk University

Abstract

In order to isolate angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides lowering blood pressure from protein hydrolysates, casein from bovine milk was treated with intestinal proteases such as trypsin, chymotrypsin and pepsin. After 24 hr digestion, tryptic, chymotryptic and peptic hydrolysates of casein were found to have ACE inhibitory activity of 86%, 85%, and 49%, respectively. Tryptic hydrolysate showed the highest ACE inhibitory activity was separated with Sephadex G-25 gel filtration, in which three fractions with high ACE inhibitory activity of 84%, 55%, and 64%, respectively, were obtained.

Key words: angiotensin-converting enzyme (ACE), casein, trypsin, chymotrypsin, pepsin, inhibitory activity

서 론

체내에 널리 분포되어 있는 angiotensin I converting enzyme(ACE)은 혈압조절에 관여하는 dipeptidyl carboxypeptidase로서 Zn^{2+} -당단백질이다. ACE의 기질이 되는 angiotensin I(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)은 먼저 신장에서 분비된 가수분해효소인 renin이 혈액내의 전구물질인 angiotensinogen을 특이적으로 분해함으로써 생성된다. 이어서 ACE가 불활성 형태인 angiotensin I의 카르복시 말단에서 디펩티드인 His-Leu를 절단함으로써 강한 혈압상승 작용을 일으키는 활성형의 octapeptide인 angiotensin II(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)이 생성된다. 이 angiotensin II는 여러 과정을 거쳐 adrenal로부터

sodium- retaining steroid hormone인 aldosterone의 생성을 유발시켜서 체내 나트륨의 흐름을 지연시키므로 신장에서 강한 혈압 상승을 일으키게 된다. ACE는 또 혈관 이완작용을 하는 혈압 강하 물질인 bradykinin(Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)을 분해하여 불활성화시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승시키는 효소이다(Ganten과 Gross, 1977; Ueda *et al.*, 1971; Cheung *et al.*, 1980). 그러므로 ACE를 특이적으로 저해하는 물질은 혈압상승을 억제시켜 심장질환 및 뇌혈관질환 등 고혈압과 관련이 깊은 질환을 치료하는데 사용할 수 있을 것으로 기대가 된다. 최초의 ACE 저해물질은 뱀의 독에서 보고되었으며(Ondetti *et al.*, 1971; Kato와 Suzuki, 1971), 그로부터 ACE를 특이적으로 저해하는 물질을 여러 천연물질로부터 추출하거나 화학적 합성을 통한 강압제의 개발이 연구되어져 왔다(Bakle, 1972; Cushman *et al.*, 1977; Sugiyama *et al.*, 1991). 또한 각종 식품소재로부터 ACE 저해활성을 갖는 다양한 물질들이 분리되었고(Suzuki *et al.*, 1983), 여

Corresponding author: Kwang Won Hong, Department of Food Science and Technology, Dongguk University, 3Ga 26, Phildong, Junggu, Seoul 100-715, Republic of Korea.
Phone: +82-2-2260-3369, Fax: +82-2-2260-3369
E-mail: hkwon@dongguk.edu

러 가지 동, 식물 및 많은 어육 단백질의 가수분해물에서도 ACE 저해펩티드의 존재가 보고되었다 (Matsui *et al.*, 2002; Sugiyama *et al.*, 1991; Sugitama *et al.*, 1990; Maruyama *et al.*, 1985; Kohmura *et al.*, 1989; Yokoyama *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 1995). Ukeda *et al.*(1992)에 따르면 정어리의 펩신 가수분해물에서 얻은 세 가지의 ACE 저해펩티드의 아미노산 배열은 Val-Lys-Ala-Gly-Phe, Lys-Val-Leu-Ala-Gly-Met, 그리고 Leu-Lys-Leu 이며 solid phase method로 똑같이 합성한 펩티드들과 저해활성이 비슷하다고 하였다.

본 연구에서는 이와 같은 식품 단백질의 가수분해물로부터 ACE 저해활성이란 생리적 기능성을 지닌 펩티드를 분리하기 위한 실험의 일환으로 우유의 카제인 단백질에 트립신, 키모트립신, 펩신과 같은 단백질 가수분해 효소로 처리하여 얻은 가수분해물들의 ACE 저해활성도를 비교한 결과 ACE에 대한 저해활성 물질이 존재함을 확인하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 ACE(EC 3.4.15.1 from rabbit lung, 6 units/mg), 카제인(from bovine milk), Hippuryl-L-His-L-Leu은 Sigma Co.에서 구입하였다. 그리고 펩신(EC 3.4.23.1 from porcine gastric mucosa, 680 units/mg)과 트립신(EC 3.4.21.4 from bovine pancreas, 10,500 units/mg)은 Sigma Co.에서 구입하였고 키모트립신(EC 3.4.21.1 from bovine pancreas, 90 units/mg)은 동경화성공업주식회사에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

카제인의 가수분해

효소처리는 Sugiyama *et al.*(1991)의 방법과 Bergmeyer(1974)의 방법을 참고하였다. 트립신 처리의 반응조건에 있어 효소:기질의 비는 1:10으로 하였다. 즉 시료용액은 시료 2g을 0.1 M 인산칼륨 완충액(pH 8.0) 100 mL에 용해시켜 2% 용액을 만들고 효소용액은 0.2 g 트립신을 동일한 인산칼륨 완충액 100 mL에 용해시켜 0.2%용액을 만들고 안정제로서 toluene 1방울을 첨가하였다. 시료용액과 효소용액으로부터 각각 5 mL을 취하여 뚜껑이 있는 시험관에 넣고 진탕배양기에서 pH는 8.0, 온도는

37°C, 반응시간은 8시간, 12시간, 24시간, 48시간으로 나누어 행하였다. 키모트립신의 반응조건은 트립신의 반응조건과 동일하게 하였다. 펩신 처리의 반응조건은 0.1 M HCl-KCl 완충액(pH 2.0)을 사용하고 나머지는 트립신의 반응조건과 동일한 방법으로 행하였다. 효소반응이 모두 이루어지면 끓는 물에 5분간 시험관들을 넣어 반응을 정지시켰다. 이 가수분해물을 0.5 N HCl 또는 0.5 N NaOH로 중화시킨 후 3,000 g에서 20분간 원심분리 하고 얻어진 반응물 중에서 상층액을 취하였다.

ACE 저해활성 측정

ACE 400 m units를 350 mM 인산칼륨 완충액(pH 8.3) 10 mL에 용해시켜 이 중에서 0.3 mL 씩(40 m units/ml)을 시험관에 취하여 반응시켰다. 기질인 Hippuryl-L-His-L-Leu(HHL)은 350 mM 인산칼륨 완충액(pH 8.3) 100 mL에 0.429 g을 가하여 10 mM의 HHL 기질용액을 만들고 이 중에서 0.25 mL씩을 반응에 취하였다. 위의 두 반응액을 취한 후 앞에서 얻어진 가수분해물의 상층액을 0.25 mL 가한 다음 안정제로서 1.2 M NaCl을 0.25 mL 가하고 온도 37°C에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응이 끝나면 1 N HCl 0.25 mL를 가하여 반응을 정지시키고 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 vortex로 강하게 15초간 교반하였다. Ethyl acetate에 의해 Hippuric 산이 추출된 상층액을 1 mL 취하여 80°C의 thermoblock에서 완전히 건조시킨 다음 3차 증류수 1 mL를 가하여 잘 녹인 후 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조실험으로 시료인 가수분해물 대신 멸균수를 넣어 반응시켰으며 공실험은 반응액에 먼저 1 N HCl 을 가하여 반응을 정지시킨 후 효소액을 넣었다. 얻어진 흡광도를 다음 식에 대입하여 각 시간과 효소의 종류에 따른 ACE 저해활성도를 계산하였다. 이 값은 3회의 중복실험을 하여 그 평균치를 구하였다.

$$AIA(\%) = \frac{B-A}{B-C} \times 100$$

AIA : ACE Inhibitory Activity(ACE 저해 활성도)

A : Abs at 228 nm of sample solution

B : Abs at 228 nm of dd H₂O (instead of sample solution)

C : Abs at 228 nm of pre-added reaction stopping solution

Table 1. ACE inhibition by enzymatic hydrolysate of casein

Protease	ACE Inhibitory Activity (%)
Trypsin	59
Chymotrypsin	55
Pepsin	31

Casein from bovine milk was hydrolyzed with intestinal proteases for 8 h. ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates were measured as described in Materials and Methods.

Sephadex G-25 gel filtration

앞에서 얻어진 카제인 가수분해물의 원심분리 상층액을 동결건조하여 농축시킨 후 Sephadex G-25 칼럼(2.6x69 cm)에서 1 mL/min 용출속도로 gel filtration 하였다. 용출된 분획은 peptide의 양을 비교하기 위하여 220 nm에서 흡광도를 측정하였으며 (Carles와 Martin, 1985), peptide 함량이 높은 각 분획별로 ACE 저해활성 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

카제인 가수분해물의 조제 및 ACE 저해활성

장내 단백질 가수분해효소에 의한 카제인 분해산물들의 ACE 저해활성을 비교하기 위하여 트립신, 키모트립신 그리고 펩신을 각각의 반응조건에 맞추어 일정 시간 카제인을 가수분해한 후 ACE 저해활성 정도를 비교하였다. 먼저 8시간 가수분해한 결과, 가수분해물 모두 ACE 활성을 저해하였으며 사용한 효소 중 트립신과 키모트립신 가수분해물의 저해활성은 각각 59%와 55%로 펩신 가수분해물에 비해 약 2배의 ACE 저해활성을 나타내었다(Table 1).

Maruyama와 Suzuki(1982)도 트립신을 이용하여 우유의 카제인을 18시간 가수분해하여 ACE의 저해활성을 조사한 바 있으며, 본 실험에서는 여러 효소를 사용하고 또한 가수분해 시간을 달리하여 각기 다른 조건에서 얻어진 분해산물의 ACE 저해활성을 비교하기 위하여 반응시간을 8, 12, 24 및 48시간으로 나누어 카제인을 가수분해하였다. 가수분해 시간을 달리한 결과, 8시간에서 24시간까지는 모든 가수분해물들의 ACE 저해활성이 반응시간에 비례하여 24시간에서 최대의 ACE 저해활성을 나타내었으며(트립신: 86%, 키모트립신: 85%, 펩신: 49%) 그 이상 가수분해하더라도 저해활성의 차이는 없는 것으로 보아 본 실험조건에서는 24시간 가수

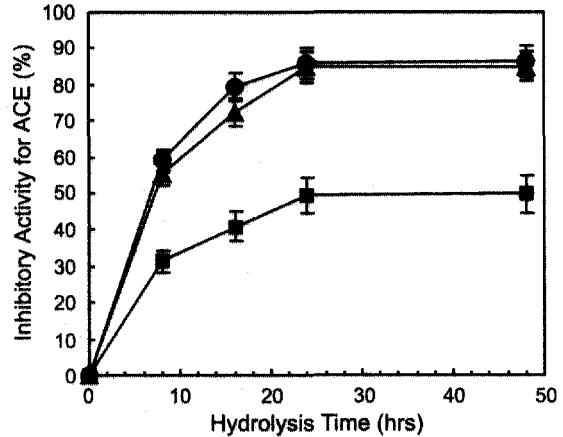


Fig. 1. Time course of ACE inhibitory activities of various enzymatic hydrolysates.

trypsin (●); chymotrypsin (▲); pepsin (■)

분해가 최적인 것으로 나타났다(Fig. 1). 효소에 따른 저해활성의 차이도 트립신과 키모트립신 가수분해물의 경우 반응시간을 달리하더라도 저해활성은 거의 유사하였으며 역시 펩신 가수분해물에 비해 우수한 저해활성을 나타내었다.

ACE 저해 펩티드 분획의 분리

많은 연구에 의해 ACE 저해활성을 갖는 물질들이 여러 식품에 존재하고 있음이 보고되고 있으며 최근 각종 식품소재로부터 단백질을 추출하여 그 가수분해 산물에서 ACE 저해활성을 갖는 다양한 펩티드를 분리하는 연구가 활발히 진행되고 있다. Matsuda *et al.*(1992)은 정어리 고기단백질을 펩신, 트립신 그리고 키모트립신으로 처리한 연구에서 사용한 효소 중 펩신 가수분해물에서 분리된 펩티드의 활성이 가장 높았다고 보고한 바 있으며, Yokoyama *et al.*(1992)의 보고에서는 소금에 절인 bonito 생선을 thermolysin으로 가수분해하여 높은 활성을 갖는 네 가지의 펩티드를 얻었다고 하였으며 맛과 향에서 우수한 품질을 보였다고 하였다. Maruyama와 Suzuki(1982)는 트립신을 이용한 카제인의 가수분해물 중에서 ACE 저해 활성을 보이는 비교적 긴 사슬의 펩티드(Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys)를 분리하였으며 쓴맛을 갖는 펩티드와 같은 구조를 갖는다고 하였다(Matoba *et al.*, 1969).

본 실험에서도 장내 단백질 가수분해효소에 의한

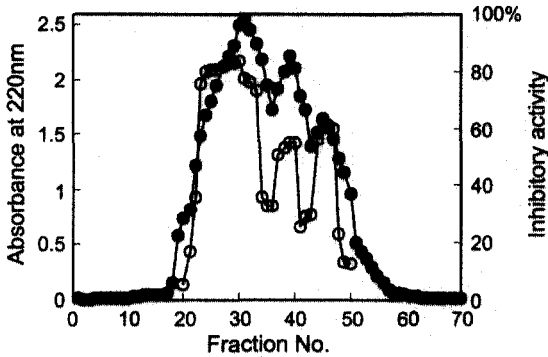


Fig. 2. Gel chromatogram of tryptic hydrolysate of casein on Sephadex G-25.
After 24 hr digestion, the hydrolysate was chromatographed on a Sephadex G-25 column (2.6x69 cm). Effluent was collected as 3 mL fractions at a flow rate of 1 mL/min. Absorbance at 220 nm (●); ACE inhibitory activity (○).

우유의 카제인 단백질 가수분해물 중에서 우수한 ACE 저해활성을 보이는 펩티드를 분리하고자 gel filtration을 이용하여 저해활성을 나타내는 분획을 분리하였다. 먼저 ACE 저해활성이 상대적으로 가장 높게 나타난 트립신의 24시간 가수분해물을 원심분리한 다음 상층액을 동결건조하여 농축하였다. 이 농축물을 Sephadex G-25 column으로 gel filtration한 결과 ACE 저해활성이 높은 세 분획을 얻었다(Fig. 2). 첫 번째 분획은 가장 높은 84%의 저해활성을 보였으며 두 번째와 세 번째 분획은 각각 55% 및 64%의 저해활성을 나타내었다. 실험 결과 트립신, 펩신, 키모트립신과 같은 장내 단백질 가수분해효소에 의한 카제인 단백질의 가수분해물들이 우수한 ACE 저해활성을 갖는다는 것을 확인하였다. 트립신 가수분해물이 ACE 저해활성을 갖는다는 것은 이미 알려져 있으나 가수분해 반응조건의 차이로 Maruyama와 Suzuki(1982)의 실험과는 달리 ACE 저해활성이 높은 세 분획을 얻었으며 새로운 저해활성 펩티드들의 아미노산 조성이나 아미노산 서열 등을 조사하기 위하여 세 분획에서 펩티드들을 분리하는 실험이 진행 중에 있다.

요 약

우유의 카제인 단백질을 트립신, 키모트립신 그리고 펩신과 같은 장내 단백질 가수분해효소로 처리한 다음 각 효소 가수분해물들이 혈압상승 펩티드 생성효소인 angiotensin-converting enzyme(ACE)

에 대한 저해활성을 측정하였다. 24시간 효소 처리하였을 때 트립신, 키모트립신 및 펩신 가수분해물들은 각각 86%, 85%, 및 49%의 ACE 저해활성을 보였다. ACE 저해활성을 나타내는 펩티드를 분리하기 위하여 이들 중 트립신 가수분해물을 Sephadex G-25 칼럼으로 gel filtration한 결과 저해활성이 각각 84%, 55%, 64%인 세 분획을 얻었다.

문 헌

Bakle, Y.S. 1972. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. In: *Hypertension*. J. Genest and E. Koive (ed.), Springer, pp. 541-549

Bergmeyer, H.U. 1974. Protease. *Methods of Enzymatic Analysis* 2: 1006-1024

Carles, C. and P. Martin. 1985. Kinetic study of the action of bovine chymosin and pepsin A on bovine kappa-casein. *Arch. Biochem. Biophys.* 242(2): 411-416

Cheung, H.S., F.L. Wang, M.A. Ondetti, E.F. Sabo and W. Cushman. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of Angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 255(2): 401-407

Cushman, D.W., H.S. Cheung, E.F. Sabo and M.A. Ondetti. 1977. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry* 16(25): 5484-5491

Ganten, D. and F. Gross. 1977. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Handbook of Experimental Pharmacology* 39: 517-522

Kato, H. and T. Suzuki. 1971. Amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A. Tryptic and chymotryptic peptides of the cyanogen bromide fragment FI, *Biochemistry* 10(6): 938-950

Kohmura, M., N. Nio, K. Kubo, Y. Minoshima, E. Muneketa and Y. Ariyoshi. 1989. Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme by Synthetic Peptides of Human β -Casein. *Agric. Biol. Chem.* 53(8): 2107-2114

Matoba, T., C. Nagayasu, R. Hayashi and T. Hata. 1969. Bitter Peptides in Tryptic Hydrolysate of Casein. *Agric. Biol. Chem.* 33(11): 1162-1163

Matsui, L., T. Matsumoto, K. Yamasaki and T.R. Kawasaki. 2002. Latent production of angiotensin 1 converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. *J. Pept. Sci.* 8(6): 267-274

Matsuda, H., T. Ishizaki and H. Osajima. 1992. Digestion of Peptides from Sardine Muscle that Inhibit ACE by Intestinal Enzyme of Pigs. *日農化* 66(11): 1645-1647

Maruyama, S. and H. Suzuki. 1982. A peptide Inhibitor of Angiotensin-Converting Enzyme in the Tryptic Hydrolysate of Casein. *Agric. Biol. Chem.* 46(5): 1393-1394

- Maruyama, S., K. Nakagomi, N. Tomizuka and H. Suzuki. 1985. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Derived from an Enzyme Hydrolysate of Casein. *Agric. Biol. Chem.* **49**(5): 1405-1409
- Okamoto, A., H. Hanagen and E. Matsumoto. 1995. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of various fermented food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**(6): 1147-1149
- Ondetti, M.A., N.J. Williams, E.F. Sabo and O. Kocy. 1971. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry* **10**(22): 4033-4039
- Saito, T., T. Namura, H. Kitazawa, Y. Kawai and T. Itoh. 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.* **83**(7): 1434-1440
- Sugitama, K., H. Onzuka, K. Takada and K. Oba. 1990. Volatile Components of Fish Protein Hydrolysates. *日農化* **64**(9): 1461-1465
- Sugiyama, K., K. Takada and M. Egawa. 1991. Hypotensive Effect of Fish Protein Hydrolysate. *日農化* **65**(1): 35-43
- Suzuki, T., N. Ishikawa and H. Meguro. 1983. ACE inhibiting Activity in Food. *日農化* **57**(10): 1143-1146
- Ueda, E., T. Kokubu, H. Akutsu and Y. Yamamura. 1971. Angiotensin-converting enzyme inhibiting activity in food. *Jpn. Circulation J.* **35**(5): 801-804
- Ukeda, H., H. Matsuda and K. Osajima. 1992. Peptide from Peptic Hydrolysate of Heated Sardine Meat That Inhibit Angiotensin-Converting Enzyme. *日農化* **66**(1): 25-29
- Yokoyama, K., H. Chiba and M. Yoshikawa. 1992. Peptide Inhibitors for Angiotensin-Converting Enzyme from Thermolysin Digest of Dried Bonito. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(9): 1541-1545