

## 청국장 발효과정 중 항고혈압성 peptide의 생산 및 분리

조영제\* · 차원섭 · 복수경 · 김명옥 · 천성숙<sup>1</sup> · 최응규<sup>1</sup>

상주대학교 식품공학과, <sup>1</sup>영남대학교 식품가공학과

**초 록 :** 한국 전통장류의 기능성 탐색 연구의 일환으로 청국장 발효과정 중 고혈압을 유발하는 angiotensin converting enzyme(ACE)의 저해 peptide를 분리하고 저해효과를 검토하였다. 청국장은 *Bacillus subtilis* CH-1023을 이용하여 제조하였고, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C에서 0~72시간동안 배양하면서 protein양, protease activity, ACE 저해율을 측정하고 저해활성을 가지는 peptide를 정제 후 아미노산조성을 분석하였다. 청국장의 발효시간이 경과함에 따라 protein 함량이 증가하여 40°C, 60시간에서 최대를 나타낸 후 감소하였으며, 발효시간에 따른 protease activity와 ACE 저해율은 40°C, 60시간에서 최대로 나타난 후 점차 감소하였다. 따라서 *Bacillus subtilis* CH-1023을 이용한 청국장 제조는 40°C에서 60시간 배양이 최적의 배양조건이었다. 최적 발효조건에 따라 청국장을 제조한 후 20mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 추출한 추출물을 Amicon YM-3 membrane filtration과 Sephadex G-10, G-25를 이용한 gel filtration으로 부분정제 하였다. 또한 정제한 peptide는 첨가함량이 높아질 수록 저해활성은 높게 나타났으며, 0.5 mg 정도의 peptide 함량으로 94.3%의 저해율을 나타내었다. 정제한 peptide의 아미노산 조성은 histidine, alanine, phenylalanine 함량이 높은 것으로 나타났다. (2000년 7월 21일 접수, 2000년 9월 14일 수리)

### 서 론

식생활 서구화에 따른 성인병이 날로 증가하고 있으며 이것의 치료와 예방의 방법을 기능성 식품에서 찾고자 하는 노력이 시도되고 있다.

고혈압 발생기작에서 angiotensin converting enzyme(ACE)은 renin에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I으로부터 강력한 혈관수축작용을 갖는 angiotensin II를 합성하는 단계에 관여하는 효소이다.<sup>1)</sup> ACE는 또한 혈관이완작용을 가진 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화 시킴으로서 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다.<sup>2-3)</sup> ACE 저해작용을 갖는 물질에 관해서는 고 renin증 환자뿐만 아니라 정상인에게도 혈압강화작용을 가지는 peptide<sup>4)</sup> 등이 발견되어 ACE억제제들이 고혈압 치료제로 개발된 후 ACE 저해제에 대한 많은 연구가 있었다.<sup>5-7)</sup>

대두 중에는 아미노산,<sup>8)</sup> 불포화 지방산<sup>9)</sup>등이 풍부하여 영양학적인 측면에서도 매우 효율적인 열량원이다.<sup>10)</sup> 대두를 이용한 발효식품 중 청국장은 발효숙성과정 중에 *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis*류가 생산하는 효소의 작용으로 대두의 여러 단백질이 분해되어 가용성 질소 화합물인 peptone, polypeptide, amino acid등이 생성되어 소화되기 쉽고, 청국장 특유의 구수한 맛을 형성함과 동시에 끈끈한 점질물이 생성되면서 특유의 향을 내는 우리 고유의 대두발효가공식품이다. 청국장에 대해서는 청국장 발효 중 유효세균을 분리 동정,<sup>11)</sup> 청국장 제조 방법을 위한 최적조건의 검토,<sup>12-14)</sup> 청국장 제조과정 중 생성된 아미노산 및 펩티드,<sup>8)</sup> 질소화합물,<sup>15)</sup> 휘발성 향기 성분,<sup>16)</sup> 당류<sup>17)</sup> 및 유지성분<sup>18)</sup> 등의 변화에 관한 보고가 있으며, Lee 등<sup>19,20)</sup>은

청국장 발효과정 중 생성되는 점질물의 성분과 생리활성기의 이화학적 특성을 조사하였으며, Kim 등<sup>21)</sup>은 *Bacillus subtilis* 균주를 이용하여 발효시간에 따른 아미노산 질소와 수용성질소, protease 역가, 유리당 및 유리아미노산 함량 등의 변화를 조사하여 최적발효조건을 설정하였다. 청국장과 유사한 대두발효식품인 된장의 기능성에 관한 연구로는 항돌연변이,<sup>22)</sup> 항혈전펩타이드 탐색,<sup>23)</sup> ACE 저해 펩타이드<sup>24,25)</sup> 등 많은 연구가 이루어져 왔으나 청국장 발효과정 중 생성되는 peptide에 관한 연구보고는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 한국 전통 장류의 기능성 탐색 연구의 일환으로 *Bacillus subtilis* CH-1023을 이용한 청국장 발효과정 중 고혈압 유발인자인 angiotensin converting enzyme의 저해 peptide를 분리하고 저해효과를 검토함으로써 전통발효식품인 청국장이 가지는 새로운 기능성을 입증하고, 한국 전통장류의 우수성을 입증하기 위한 과학적 접근을 하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 청국장의 제조

본 실험에 사용한 대두는 한국산 중립의 태백종을 시중에서 구입하여 사용하였으며, 정선한 콩을 10°C에서 20시간 동안 침지 후 물빼기를 하고 40 g씩 삼각 flask에 넣어 121°C에서 60분간 증자하였다. 증자 후 냉각시키고, 된장에서 분리하여 상주대학교 식품공학과에서 보관중인 *Bacillus subtilis* CH-1023을 공시균으로 사용하여, 균주  $1.16 \times 10^4$  (CFU/ml)을 접종하여 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C에서 0~72시간 동안 배양하면서 6시간 단위로 마쇄하여 실험에 사용하였다.

#### 단백질의 정량

단백질 정량은 Lowry 등<sup>26)</sup>의 방법에 따라 측정하였으며,

찾는말 : 항고혈압성 펩티드, ACE저해, 청국장, *Bacillus subtilis* CH-1023

\*연락처 : Tel : 82-54-530-5265; Fax : 82-54-535-7251

E-mail : yjjo@sangju.ac.kr

bovine serum albumin(Sigma Co. USA)을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

#### 청국장 추출액 제조

제조된 청국장 시료 40 g에 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 200 ml를 가하여 4°C에서 150 rpm으로 6시간 진탕 추출한 후 원심분리하고 상정액을 여과하여 청국장 추출액으로 하였다.

#### Protease 활성측정

추출액의 protease 활성은 Anson-Hagihara의 방법<sup>27)</sup>으로 측정하였으며, 효소액 1 ml가 1분간에 1 µg의 tyrosine을 생성하는 것을 1 unit로 정하였다. 이때 tyrosine을 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

#### ACE 저해 실험

ACE 저해효과 측정은 Cushman 등의 방법<sup>7)</sup>에 의하여 행하였다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 기질 2.5 mM Hippuryl-histidyl-leucine(Sigma Co. USA) 용액 0.15 ml와 ACE(5.1 unit/mg, Sigma Co. USA) 0.1 ml 및 peptide 용액 0.1 ml를 혼합하였으며, 대조구는 peptide대신 동일 buffer 0.1 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고, 1 N HCl 0.35 ml 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3 ml의 ethylacetate를 첨가하였다. Ethylacetate층만을 취한 다음 용매를 증류시킨 잔사에 2 ml의 증류수를 첨가하여 효소에 의해 기질로부터 분리되어 추출된 hippuric acid를 280 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선에서 양을 환산하여 아래의 식에 의해 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 hippuric acid 생성량}}{\text{대조구의 hippuric acid 생성량}}\right) \times 100$$

#### 발효조건에 따른 효소활성 변화

증자한 콩에 균주를 접종하고 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C의 각각의 배양온도에서 0~72시간동안 배양한 후 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 6시간동안 진탕 추출하고 그 여액의 protease activity를 측정하였다.

#### 발효조건에 따른 ACE의 저해효과

증자한 콩에 균주 접종 후 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C의 각각의 배양온도에서 0~72시간동안 배양한 후 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 6시간동안 진탕 추출하고 그 여액의 ACE 저해효과를 측정하였다.

#### ACE 저해물질의 부분정제

청국장 250 g을 분취하여 1 l의 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)와 함께 파쇄하고 6시간 교반한 후 8000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상정액을 Whatman No. 2 여과지로 여과한 여액을 Diaflo membrane YM-3(Amicon Inc. USA)에 통과시키고 농축하였으며, 농축된 시료는 Sephadex G-10(Sigma Co. USA) column(3×60 cm)과 Sephadex G-25(Sigma Co. USA) column(3×60 cm)을 이용하여 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 gel filtration한 후 저해작용을 나타내는 분획만 모아서 동결건조 하였다.

#### 아미노산 분석

유리관에 20 mg의 각각의 시료와 6 N HCl을 넣고 질소 충전시킨 후 밀봉하고 105°C에서 24시간 동안 산 가수분해한 후 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

#### 통계처리

실험 측정결과는 평균점수로 나타내며 그 평균값 사이의 유의차는 ANOVA test를 이용하였고, Duncan's Multiple Range

Table 1. Changes of protease activity during Chunggugjang fermentation by *Bacillus subtilis* CH-1023

Fermentation time (hr)	Protease activity (unit)				
	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
0	1.09±0.01 <sup>a</sup>	1.09 ±0.01 <sup>a</sup>	1.09±0.01 <sup>a</sup>	1.09±0.01 <sup>a</sup>	1.09±0.01 <sup>a</sup>
6	1.10±0.02 <sup>ab</sup>	1.14 ±0.01 <sup>ab</sup>	1.16±0.04 <sup>ab</sup>	1.10±0.03 <sup>ab</sup>	1.13±0.03 <sup>ab</sup>
12	1.12±0.01 <sup>abc</sup>	1.141±0.03 <sup>ab</sup>	1.17±0.02 <sup>ab</sup>	1.11±0.02 <sup>abc</sup>	1.14±0.05 <sup>ab</sup>
18	1.12±0.02 <sup>abc</sup>	1.159±0.02 <sup>b</sup>	1.18±0.02 <sup>ab</sup>	1.14±0.01 <sup>abcd</sup>	1.14±0.02 <sup>ab</sup>
24	1.14±0.02 <sup>abcd</sup>	1.178±0.03 <sup>bc</sup>	1.23±0.03 <sup>bc</sup>	1.16±0.02 <sup>bcd</sup>	1.15±0.05 <sup>ab</sup>
30	1.14±0.04 <sup>abcd</sup>	1.196±0.01 <sup>bc</sup>	1.21±0.02 <sup>abc</sup>	1.17±0.01 <sup>cde</sup>	1.15±0.02 <sup>ab</sup>
36	1.16±0.05 <sup>bcd</sup>	1.193±0.03 <sup>bc</sup>	1.31±0.07 <sup>c</sup>	1.19±0.02 <sup>def</sup>	1.15±0.03 <sup>ab</sup>
42	1.16±0.05 <sup>bcd</sup>	1.21 ±0.02 <sup>c</sup>	1.33±0.02 <sup>c</sup>	1.22±0.01 <sup>efg</sup>	1.16±0.04 <sup>b</sup>
48	1.18±0.02 <sup>cde</sup>	1.27 ±0.03 <sup>d</sup>	1.75±0.05 <sup>d</sup>	1.24±0.04 <sup>fg</sup>	1.16±0.04 <sup>b</sup>
54	1.20±0.01 <sup>de</sup>	1.30 ±0.03 <sup>d</sup>	1.77±0.03 <sup>d</sup>	1.27±0.00 <sup>e</sup>	1.16±0.01 <sup>b</sup>
60	1.22±0.03 <sup>e</sup>	1.41 ±0.04 <sup>e</sup>	2.04±0.23 <sup>e</sup>	1.36±0.02 <sup>h</sup>	1.15±0.03 <sup>ab</sup>
66	1.15±0.03 <sup>abcd</sup>	1.54 ±0.02 <sup>f</sup>	1.96±0.06 <sup>e</sup>	1.37±0.01 <sup>h</sup>	1.15±0.05 <sup>ab</sup>
72	1.14±0.05 <sup>abcd</sup>	1.54 ±0.05 <sup>f</sup>	1.82±0.06 <sup>d</sup>	1.24±0.08 <sup>fg</sup>	1.13±0.07 <sup>ab</sup>

\*At each fermentation time, means with the same alphabet are not significantly different (P>0.05).

\*Protease was reacted with 2.5 ml of 0.6% Hammarstein milk casein and 0.2 ml enzyme at 37°C for 30 min.

Test<sup>28)</sup>로 95% 수준으로 유의성을 검정하였다.

다고 보고한 것과 비교하여 유사한 결과를 얻었다.

**결과 및 고찰**

**배양온도 및 배양시간에 의한 protease activity 측정**

증자한 콩에 *Bacillus subtilis* CH-1023 균주를 접종 후 20°C, 30 °C, 40°C, 50°C, 60°C의 정온기에서 0~72시간 동안 배양하면서 6시간 간격으로 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 6시간 동안 진탕 추출 후 그 여액의 protease activity를 측정된 결과 Table 1과 같이 20°C와 60°C 배양 시에는 각각 60시간과 54시간 경과 후 1.22±0.03와 1.16 ±0.01 unit로 최대의 protease activity를 나타내었지만 대조구와 비교할 때 큰 차이는 없었고 30°C, 40°C, 50°C의 온도에서 각각 66, 60, 66시간 배양했을 때 1.54±0.02, 2.04±0.23, 1.37±0.01 unit로 최대의 protease activity를 나타내었다. 따라서 최대 protease activity를 나타낸 40°C, 60시간 배양이 최적 배양조건으로 판단되었다. 이는 Suh 등<sup>14)</sup>이 청국장 제조시 48~60시간 발효시켰을 때 protease activity가 최대를 나타내었

**배양온도 및 배양시간에 따른 protein 용출량 변화**

증자한 콩에 *Bacillus subtilis* CH-1023 균주를 접종 후 20°C, 30 °C, 40°C, 50°C, 60°C의 정온기에서 0~72시간 동안 배양하면서 6시간 간격으로 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 6시간 동안 진탕 추출 후 그 여액의 protein 용출량을 측정된 결과 Table 2와 같이 20°C, 60°C 배양 시 각각 60시간과 54시간 경과했을 때 241.67±3.55, 242.83±4.19 µg/ml로 최대의 protein 용출량을 나타내었지만 대조구와 비교할 때 큰 차이는 없었고, 30°C, 40°C, 50°C에서 각각 66, 60, 66시간 배양 시 270.50±17.44, 278.50±1.73, 256.17±4.48 µg/ml로 최대의 protein 용출량을 나타내었으며, protein 용출을 위한 최적조건은 40°C에서 60시간 배양이었다.

**발효조건에 따른 angiotensin converting enzyme(ACE) 저해효과**

증자한 콩에 *Bacillus subtilis* CH-1023 균주 접종 후 20°C,

**Table 2. Changes of protein content during Chunggugjang fermentation by *Bacillus subtilis* CH-1023**

Fermentation time (hr)	Protein Content (µg/ml)				
	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
0	226.50±4.77 <sup>a</sup>	226.50±4.77 <sup>a</sup>	226.50±4.77 <sup>a</sup>	226.50±4.77 <sup>a</sup>	226.50±4.77 <sup>a</sup>
6	228.17±2.75 <sup>a</sup>	229.33±1.53 <sup>ab</sup>	229.00±8.35 <sup>a</sup>	227.33±6.81 <sup>ab</sup>	229.17±6.81 <sup>a</sup>
12	228.83±9.02 <sup>a</sup>	226.67±7.82 <sup>a</sup>	232.33±5.13 <sup>ab</sup>	228.33±7.01 <sup>ab</sup>	229.83±5.35 <sup>a</sup>
18	229.00±4.77 <sup>a</sup>	230.67±8.43 <sup>abc</sup>	237.00±4.33 <sup>b</sup>	229.50±7.37 <sup>ab</sup>	233.17±4.01 <sup>ab</sup>
24	234.17±1.26 <sup>ab</sup>	233.33±4.65 <sup>abcd</sup>	247.66±4.54 <sup>c</sup>	236.33±1.89 <sup>3bc</sup>	235.17±8.61 <sup>ab</sup>
30	234.50±1.50 <sup>ab</sup>	238.17±10.89 <sup>abcde</sup>	258.33±3.33 <sup>d</sup>	241.00±7.70 <sup>de</sup>	235.83±2.57 <sup>ab</sup>
36	239.67±11.54 <sup>b</sup>	237.17±2.57 <sup>abcde</sup>	262.33±4.31 <sup>de</sup>	241.33±1.04 <sup>de</sup>	231.17±8.61 <sup>a</sup>
42	236.00±1.80 <sup>ab</sup>	240.33±5.03 <sup>bcde</sup>	250.00±6.39 <sup>c</sup>	239.67±3.25 <sup>cd</sup>	233.17±4.01 <sup>ab</sup>
48	231.50±3.00 <sup>ab</sup>	244.33±2.47 <sup>de</sup>	257.67±0.76 <sup>d</sup>	247.50±2.50 <sup>def</sup>	235.17±5.35 <sup>ab</sup>
54	233.17±4.48 <sup>ab</sup>	247.50±3.91 <sup>e</sup>	268.17±4.93 <sup>ef</sup>	247.17±0.58 <sup>def</sup>	242.83±4.19 <sup>b</sup>
60	241.67±3.55 <sup>b</sup>	243.50±1.80 <sup>cd</sup>	278.50±1.73 <sup>g</sup>	248.00±6.61 <sup>def</sup>	233.83±1.16 <sup>ab</sup>
66	231.83±3.75 <sup>ab</sup>	270.50±17.44 <sup>f</sup>	276.83±2.75 <sup>g</sup>	256.17±4.481 <sup>f</sup>	230.67±3.79 <sup>a</sup>
72	229.00±8.32 <sup>a</sup>	250.50±0.50 <sup>e</sup>	273.17±3.33 <sup>fg</sup>	250.33±1.04 <sup>ef</sup>	232.17±6.71 <sup>a</sup>

\*At each fermentation time, means with the same alphabet are not significantly different (P>0.05).

**Table 3. Angiotensin converting enzyme Inhibition of extract during Chunggugjang fermentation by *Bacillus subtilis* CH-1023**

Fermentation time (hr)	Angiotensin converting enzyme inhibition (%)				
	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
0	-	-	-	-	-
6	-	2.70	5.41	-	-
12	-	2.70	8.11	2.70	5.41
18	4.05	12.16	13.51	2.70	12.16
24	5.41	16.22	21.62	8.11	18.92
30	5.41	20.27	25.68	13.51	24.32
36	10.81	21.62	29.73	20.27	29.73
42	14.87	21.62	35.14	28.38	32.43
48	14.87	25.68	35.14	28.38	35.14
54	22.97	29.73	39.19	36.49	29.73
60	35.14	36.49	45.95	43.24	29.73
66	28.38	31.08	35.14	33.78	24.32
72	25.68	25.68	27.03	35.14	25.68

\*Angiotensin converting enzyme was reacted with 0.15 ml of 2.5 mM Hippuryl-histidyl- leucine, 0.1 ml peptide at 37°C for 30 min.

**Table 4. Angiotensin converting enzyme inhibition of extract from *Chunggugjang* by *Bacillus subtilis* CH-1023**

Step	Hippuric acid ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition (%)
Control	185.00 $\pm$ 12.12 <sup>a</sup>	-
Crude extract	85.00 $\pm$ 12.29 <sup>b</sup>	54.05
YM-3 membrane	72.00 $\pm$ 10.82 <sup>b</sup>	61.08

\*Means with the same alphabet are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

\*Angiotensin converting enzyme was reacted with 0.15 ml of 2.5 mM Hippuryl-histidyl-leucine, 0.1 ml peptide at 37°C for 30 min.

**Table 5. Angiotensin converting enzyme inhibition of fraction after Sephadex G-10 gel filtration of extract from *Chunggugjang* by *Bacillus subtilis* CH-1023**

Fraction	Hippuric acid ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition (%)
Control	173.33 $\pm$ 11.93 <sup>a</sup>	-
A	118.33 $\pm$ 8.74 <sup>b</sup>	31.37
B	23.00 $\pm$ 14.93 <sup>c</sup>	86.73
C	169.00 $\pm$ 47.57 <sup>a</sup>	0.025

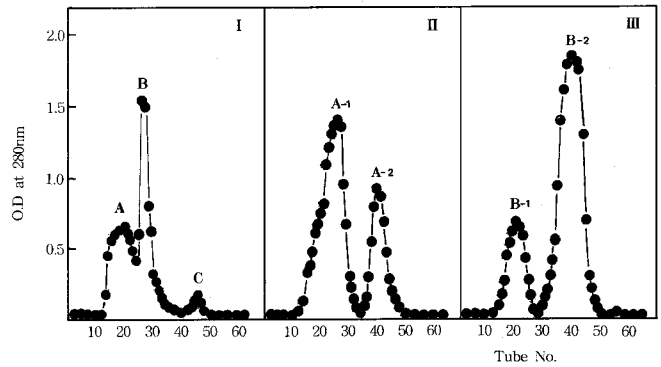
\*Means with the same alphabet are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

\*Angiotensin converting enzyme was reacted with 0.15 ml of 2.5 mM Hippuryl-histidyl-leucine, 0.1 ml peptide at 37°C for 30 min.

30°C, 40°C, 50°C, 60°C의 정온기에서 0~72시간 동안 배양하면서 6시간 간격으로 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가해 6시간 동안 진탕 추출 후 6시간 간격으로 ACE저해효과를 측정한 결과는 Table 3과 같이 단백질 용출율과 protease activity가 높았던 40°C, 60시간의 배양조건에서 ACE 저해율이 가장 높은 45.95%의 저해를 나타내었다. 이는 protease activity가 가장 높은 조건에서 대두단백질의 분해에 의해 용출된 peptide량이 가장 많아 ACE 저해활성도 높은 것으로 판단되었다.

#### 청국장으로부터 항고혈압성 peptide의 분리 및 부분정제

*Bacillus subtilis* CH-1023에 의해 최적조건에서 제조된 청국장에 5배의 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가하여 균질화 시켜준 뒤 4°C에서 24시간동안 교반하여 추출하고 여과한 후 8000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상정액인 청국장 추출물을 얻었다. 추출물은 Diaflo YM-3 membrane ultrafiltration을 통하여 분자량 3000이하의 peptide를 얻은 후 각각의 용액에 대해 ACE저해활성을 측정한 결과는 Table 4와 같이 추출물의 ACE저해활성은 54.1%였고, 분자량 3,000이하의 peptide획분의 ACE저해활성은 61.1%로 높게 나타났다. 이는 Shin 등<sup>25)</sup>의 ultrafiltrate한 된장 peptide의 ACE저해활성 41.8% 보다 높게 나타났다. 분자량 3,000이하의 peptide획분을 농축한 후 Sephadex G-10 column(3×60 cm)에 주입하고 0.43 ml/min의 유속으로 6 ml/tube씩 분획한 결과 Fig. 1-I과 같이 A, B, C, 3개의 분획으로 나타났다. 용출된 분획별로 ACE저해활성을 측정한 결과는 Table 5와 같이 B에서 86.73%로 ACE저해활성이 높게 나타났고, A에서도 약 31%의 저해가 나타났다. 이는 peptide가 완전히 분리되지 않아서 A와 B 분획에 동시에 저해활성이 나타난 것으로 판단되었으며, ACE저해활성이 나타난 A, B 분획은 각각 동결건조 하여 농축하였다.



**Fig. 1. Gel filtration of extract from *Chunggugjang* by *Bacillus subtilis* CH-1023. I: Sephadex G-10 gel filtration of extract, II: Sephadex G-25 gel filtration of fraction A, III: Sephadex G-25 gel filtration of fraction B.**

**Table 6. Angiotensin converting enzyme inhibition of fraction after Sephadex G-25 gel filtration of extract from *Chunggugjang* by *Bacillus subtilis* CH-1023**

Fraction	Hippuric acid ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition (%)
Control	214.67 $\pm$ 33.25 <sup>a</sup>	-
A-1	216.00 $\pm$ 24.43 <sup>a</sup>	-
A-2	34.00 $\pm$ 14.93 <sup>b</sup>	84.16
B-1	210.33 $\pm$ 15.50 <sup>a</sup>	2.05
B-2	33.67 $\pm$ 16.50 <sup>b</sup>	84.30

\*Means with the same alphabet are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

\*Angiotensin converting enzyme was reacted with 0.15 ml of 2.5 mM Hippuryl-histidyl-leucine, 0.1 ml peptide at 37°C for 30 min.

**Table 7. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitory rate by peptide concentration**

Content (mg)	Inhibitory rate (%)
Control	-
0.1	6.36
0.2	35.71
0.5	94.27
1.0	96.84

\*Angiotensin converting enzyme was reacted with 0.15 ml of 2.5 mM Hippuryl-histidyl-leucine, 0.1 ml peptide at 37°C for 30 min.

농축된 활성분획 A와 B 각각을 소량의 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 후 Sephadex G-25 column(3×60 cm)에 주입하고 0.5 ml/min의 유속으로 5.5 ml/tube씩 분획하였다. 그 결과 Fig. 1-II와 같이 A는 A-1, A-2로 2개의 분획으로 분리되었고, B의 경우도 같은 조건에서 용출시킨 결과 Fig. 1-III과 같이 B-1, B-2로 2개의 분획으로 분리되었다. 용출된 분획의 ACE저해활성을 측정한 결과는 Table 6과 같이 A-2, B-2에서 각각 84.16%, 84.30%로 ACE저해활성이 높게 나타났으며 A-1과 B-1 분획에서는 ACE저해활성이 나타나지 않았다. A-2와 B-2는 Sephadex G-25 gel filtration시 같은 fraction No.에서 분획되는 것으로 보아 동일 peptide로 판단되었다. 청국장 추출물로부터 ACE저해 peptide를 정제한 결과 250 g의 청국장으로부터 271 mg의 건조 peptide를 얻을 수 있었다. *Bacillus subtilis* CH-1023을 이용한 청국장의 정제

**Table 8. Amino acid composition of purified peptide from Chunggugjang by *Bacillus subtilis* CH-1023**

Amino acid	Content (%)
Asp	0.38
Glu	1.20
Ser	0.56
Gly	4.61
His	15.26
Arg	1.43
Thr	2.42
Ala	35.50
Pro	ND
Tyr	2.30
Val	1.82
Met	ND
Cys	ND
Ile	2.91
Leu	2.19
Phe	28.64
Lys	0.78
Total	100.00

ND: Not detected.

peptide의 농도에 의한 ACE 저해 결과는 Table 7과 같이 첨가 peptide 양이 0.5 mg과 1.0 mg일 때 각각 94.27%와 96.84%의 저해를 나타내었고, peptide의 양이 많을수록 ACE 저해활성이 높아지는 것이 관찰되었다.

#### 분리 peptide의 아미노산 분석

유리관에 20 mg의 각각의 시료와 6 N HCl를 넣고 질소를 충전시킨 후 밀봉하고 105°C에서 24시간 동안 가수분해하였다. 가수분해한 액을 여과한 후 rotary evaporator를 사용하여 염산을 완전히 증발시킨 다음 아미노산 자동분석기로 분석한 결과는 Table 8과 같이 alanine, phenylalanine, histidine이 35.50%, 28.64%, 15.26%로 높은 함량을 나타냈다. 이는 Suh 등<sup>24)</sup>이 된장에서 정제한 peptide의 아미노산 조성이 alanine, phenylalanine이 55.50%, 39.84%로 상당히 높은 비중을 차지한다고 보고한 것과 유사한 패턴을 나타내었다.

## 문 헌

- Hollenberg, N. K. (1979) Pharmacologic interruption of the renin angiotensin system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **19**, 559-582.
- Ondette, M. A. and Cushman, D. W. (1982) Enzymes of the renin angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 283-308.
- Cushman, D. W. and Ondetti, M. A. (1980) Inhibitors of angiotensin converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1871-1877.
- Stewart, J. M., Ferreira, S. H. and Greene, L. J. (1971) Bradykinin potentiating peptide Pca-Lys-Trp-Ala-Pro. An inhibitors of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1557-1562.
- Wyvratt, M. J. and Patchett, A. A. (1985) Recent developments in the design of an angiotensin converting enzyme inhibitors. *Medicinal Res. Rev.* **5**, 483-489.
- Ondetti, M. A., Rubin, B. and Cushman, D. W. (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* **196**, 441-444.
- Cushman, D. W., Cheung, E. F., Sabo, B. R. and Ondetti, M. A. (1979) Development of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme (kiniase II). *Fed. Proceed.* **38**, 2778-2782.
- Kim, S. Y., Kim, W. U. (1967) Studies on the Changes of Protein, Peptide and Amino Acid during Preparation. *Kor. J. Agri. Chem.* **8**, 11-20.
- Kim, J. G., Kim, S. K. and Lee, J. S. (1988) Fatty Acid Composition and Electrophoretic Patterns of Protein of Korean Soy beans. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **20**, 263-271.
- Landers, R. E. and Rathmann, D. M. (1981) Vegetable Oils: Effect of processing storage and use on nutritional values. *J. Am. Oil Chem.* **58**, 255-259.
- Park, K. I., Sung, S. H. (1971) Studies on the *Chungkook-jang* Fermentation (I). *Kor. J. Micro. Biol.* **9**, 74-85.
- Suh, J. S., Lee, H. J. (1981) Effect of *Bacillus* Strains on the *Chungkook-jang* Processing(I). *Kor. J. Food. Sci. Nutr.* **14**, 301-307.
- Suh, J. S., Lee, S. G. and Ryu, M. K. (1982) Effect of *Bacillus* Strains on the *Chungkook-jang* Processing(II). *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **14**, 309-314.
- Suh, J. S., Ryu, M. K. and Hur, Y. H. (1983) Effect of *Bacillus* Strains on the *Chungkook-jang* Processing(III). *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **15**, 385-391.
- Sung, N. J., Chung, S. Y. (1984) Changes in Nitrogenous Compounds of Soybean during *Chungkook-jang* koji Fermentation. *Kor. J. Food. Nutr.* **13**, 275-284.
- Kanno, A. and Takamatsu, H. (1987) Changes in the volatile components of *natto* during manufacturing and storage. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **34**, 330-335.
- Kanno, A., Takamatsu, H., Takano, N. and Akimoto, T. (1982) Change of saccharides in soybean during manufacturing of *natto*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **29**, 105-110.
- Rhee, S. H., Kim, S. K. and Cheigh, H. S. (1983) Studies on the Lipids in Korean Soybean Fermented Foods. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **15**, 399-403.
- Lee, B. Y., Kim, K. M. and Kim, K. H. (1991) Physico-Chemical Properties of viscous Substance Extracted from *Chungkook-jang*. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **23**, 599-604.
- Lee, B. Y., Kim, D. M. and Kim, K. H. (1991) Studies on the Change in Rheological Properties of *Chungkook-jang*. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **23**, 478-484.
- Kim, C. J. (1999) Biologically active compound of soybean. The research institute of soybean fermentation foods: Yeungnam University, 2nd. Symposium. p. 9-43.
- Park, K. Y., Moon, S. H., Baik, H. S. and Cheigh, H. S. (1990) Anti-mutagenic effect of *Doenjang* (Korean Fermented Soy Paste) toward Aflatoxin. *Kor. J. Food. Nutr.* **19**, 156-162.
- Shon, D. H., Lee, K. A., Kim, S. H., Ahn, C. W., Nam, H. S.,

- Lee, H. J. and Shin, J. I. (1996) Screening of Antithrombotic Peptides from Soybean Paste by the Microplate Method. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **28**, 684-688.
24. Suh, H. J., Suh, D. B., Chung, S. H., Whang, J. H., Sung, H. J. and Yang, H. C. (1994) Purification of ACE inhibitor from Soybean Paste. *Kor. J. Agric. Chem. and Biotechnology.* **37**, 441-446.
25. Shin, Z. I., Ahn, C. W., Nam, H. S., Lee, H. H., Lee, H. J. and Moon, T. H. (1995) Fractionation of Angiotensin Converting Enzyme(ACE) Inhibitory Peptides from Soybean Paste. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 230- 234.
26. Lowry, C. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-272.
27. Hagihara, B. (1956) In 'Method of Enzymatic analysis,' Vol. 2, p. 237-246, Tokyo, Japan.
28. Cho, J. C. and Lee, K. J. (1996) In 'Experimental statistics,' p. 188-192, Sunjin Press Inc., Seoul, Korea.

---

**Production and Separation of Anti-hypertensive Peptide during *Chunggugjang* Fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023**

Young-Je Cho\*, Woen-Suep Cha, Su-Kyung Bok, Myoung-Uk Kim, Sung-Sook Chun<sup>1</sup> and Ung-Kyu Choi<sup>1</sup>  
 (Department of Food Engineering, Sangju National University, Sangju 742-711; <sup>1</sup>Department of Food Sci. & Technol. Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea)

**Abstract:** As functionality investigation of Korean traditional soybean fermentation foods, an antihypertensive peptide was separated during *Chunggugjang* fermentation by *Bacillus subtilis* CH-1023 and investigated inhibitory effect against angiotensin converting enzyme. After incubation at 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C for the 0~72 hrs, protein content, protease activity and angiotensin converting enzyme inhibitory rate were determined. The protein content and protease activity were increased and reached maximum at 60 hrs fermentation with 40°C and decreased after the 60 hrs fermentation. The optimum condition for antihypertensive peptide from *Chunggugjang* was appeared for 60 hrs at 40°C. Crude extract of *Chunggugjang* was partially purified by Amicon YM-3 membrane filtration and Sephadex G-10, G-25 gel filtration. The purified peptide showed inhibitory rate of 94.3% with 0.5 mg peptide content. The most prominent amino acid composition of the peptide from *Chunggugjang* was alanine, followed by phenylalanine, histidine.

---

Key words : antihypertensive peptide, *Chunggugjang*, *Bacillus subtilis* CH-1023, angiotensin converting enzyme inhibition.

\*Corresponding author