

## 대구의 간 단백질의 효소적 가수분해물로부터 안지오텐신 I 전환효소 저해 펩타이드의 분리·정제 및 특성

최영일<sup>1</sup> · 박표잠 · 최정호 · 변희국 · 정인철<sup>2</sup> · 문성훈 · 김세권\*

부경대학교 화학과  
<sup>1</sup>연변의과대학 면역학연구소  
<sup>2</sup>고신대학교 의학부 생화학교실

## Purification and Characterization of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Enzymatic Hydrolysate of Cod Liver Protein

Yong-Ri Choi<sup>1</sup>, Pyo-Jam Park, Jeoung-Ho Choi, Hee-Guk Byun, In-Cheol Jeong<sup>2</sup>,  
Sung-Hoon Moon and Se-Kwon Kim\*

Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea  
<sup>1</sup>Research Institute of Bioimmunity, Yan Bian Medicine College, Yanji 133000, China  
<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Kosin University College of Medicine, Pusan 602-709, Korea

### Abstract

In order to utilize marine processing waste which would normally be discarded, cod liver protein was hydrolysed by  $\alpha$ -chymotrysin, and the hydrolysate was investigated for the new angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor. The hydrolysate was separated into three major types, with molecular weight cut-off (MWCO) values less than 10 kDa, 5 kDa and 1 kDa of ultrafiltration membranes, respectively. ACE inhibitory peptides were isolated from the fractions passed through MWCO 1 kDa membrane, and purified by using ion-exchange chromatography on a SP-Sephadex C-25 column, gel filtration on a Sephadex G-15 column, and HPLC on an ODS column. The purity was identified with capillary electrophoresis. The amino acid sequences of two purified peptides were Met-Ile-Pro-Tyr-Tyr ( $IC_{50}=10.9 \mu M$ ) and Gly-Leu-Arg-Asn-Gly-Ile ( $IC_{50}=35.0 \mu M$ ).

**Key words** – Purification, Angiotensin converting enzyme inhibitor, cod liver protein, hydrolysate

### 서 론

고혈압의 발병과 혈압의 유지에는 많은 인자가 관여하므로 지금까지의 수많은 연구에도 불구하고 아직 그 기전이

완전하게 밝혀지지는 않았지만, 인체에서 혈압을 조절하는 기구인 renin-angiotensin계와 kallikrein-kinin계의 항상성이 유지되지 않을 때 혈압조절에 문제가 생겨 나타나는 병으로 알려져 있으며 [17], 이는 주로 renin-angiotensin계에 의한 생리 생화학적 기전으로 설명되어지고 있다.

안지오텐신전환효소 (Angiotensin I converting enzyme; ACE)는 안지오텐신 I의 C-말단 dipeptide (His-Leu)를 절

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 82-51-620-6375, Fax : 82-51-628-8147  
E-mail : sknkim@mail.pknu.ac.kr

단하여 활성형인 안지오펩신 II로 전환시킴으로써 혈압을 상승시키는 작용을 수행하는 동시에 생체내에서 혈압강화 작용을 갖는 bradykinin을 분해하는 작용을 한다. 또한, ACE에 의하여 생성된 안지오펩신 II는 혈압을 높이는 작용에 동반하여, 지방산의 산화를 촉진시키거나 과산화화를 증가시키므로 동맥경화의 위험을 높이는 것으로 알려져 있다[4].

ACE는 dipeptide를 생성하는 것 외에도 pancreatic carboxypeptidase A와 유사한 효소-기질 반응기작을 나타내는 것으로 추정되고 있어 이를 토대로 Captopril 혹은 Enalapril과 같은 화학 합성 ACE 저해제가 시판되고 있으나 [16], 두통, 식욕부진, 미각이상, 발진, 백혈구 감소 등 각종 부작용이 많은 것으로 보고되어 있어 최근에는 천연 ACE 저해제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다.

천연 ACE 저해활성 물질의 탐색에 있어서 단백질의 효소적 가수분해물로부터 분리한 펩타이드에 관한 연구로서는 casein 분해[10,12], zein[15,16], 무화과 유액[11], 대두 [17,18], 정어리육[13,14] 및 가다랑어육과 내장[1] 등이 있으며, 이들 가수분해물로부터 ACE 저해 펩타이드를 분리하여 아미노산 배열을 밝히고, 이를 기초로 펩타이드를 화학적으로 합성하여 ACE 저해효과에 미치는 펩타이드들의 C 및 N말단 아미노산의 영향에 대하여 검토되어졌다.

한편, 미생물 유래의 ACE 저해제는 Yamato 등[21]이 발견한 *Streptomyces* K-26과 Koguchi 등[7]이 발견한 *Actinomyces spiculosospora*에서 추출한 추출물에서 ACE 저해활성이 있다고 보고되어져 있다. 이와 같이 미생물 및 단백질 유래의 효소적 가수분해물을 이용한 ACE 저해 성분들은 천연물이라는 측면에서 안전성이 높지만 ACE 저해에 대한 역가가 Captopril보다 최소한 20배 이상 낮아 우수한 ACE 저해능을 가지는 천연물질에 대한 탐색과 개발에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 수산가공공장에서 원료어 처리시 대량으로 발생하는 비가식부의 하나인 대구의 간을 고도로 이용하기 위한 연구의 일환으로서 단백질을 효소로 가수분해하여 한외여과막을 이용하여 분자량별로 분획하였으며, 이들 가수분해물 중 ACE 저해활성을 가지는 펩타이드를 이온교환 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피 및 HPLC로 분리·정제하여 그 아미노산 서열을 결정하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 대구의 간부위는 부산광역시 남천동 소재 활어센터에서 동결된 상태로 구입하여 마쇄한 다음,  $-30\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 동결고에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

가수분해시 사용한 효소인 papain,  $\alpha$ -chymotrypsin, trypsin 및 pronase E는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA), Alcalase와 Neutrase는 Novo Co. (Denmark)으로부터 구입하였고, ACE 저해활성 측정에 사용된 안지오펩신전환효소와 Hippuryl-Histidyl-Leucine (Hip-His-Leu)은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 그 외의 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

대구의 간 단백질을 가수분해시켜 분자량별로 분획하기 위한 한외여과막 장치 (ultrafiltration membrane system)는 Millipore Co. (Bedford, USA)으로부터 구입하였고, 사용된 막의 분자량 한계범위 (molecular weight cut-off : MWCO)는 각각 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa를 사용하였다. 분리·정제시 사용된 수지는 Sigma Chemical Co.에서 구입한 SP-Sephadex C-25와 Sephadex G-15이며, HPLC는 Tosoh Co. (Tokyo, Japan)의 ODS reverse-phase column ( $\phi 10.0\times 250$  mm)이 장착된 Spectra Physics Co. (Riviera Beach, USA)의 P 2000을 사용하였으며, 최종 순도 결정은 Bio-Rad Co. (BioFocus, USA)의 capillary electrophoresis (CE) system을 사용하였다.

### 단백질의 가수분해도 측정

여러 가지 효소를 이용한 대구의 간부분의 가수분해도 (degree of hydrolysis) 측정은 각 시료 0.5g을 Table 1에 나타낸 완충용액 50ml에 분산시켜 1% (w/v) 기질용액으로 만든 다음, 각 효소별 최적온도에서 반응시키면서 일정 반응시간의 경과에 따라 반응혼합액에서 2ml를 취하여 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 2ml가 들어있는 시험관에 넣은 다음 원심분리 (3,000 $\times$ g, 10min) 하였으며, 이때 사용한 기질 대 효소비는 100:1이 되도록 하였다. 원심분리한 상층액을 일정량 취하여 Lowry 법[8]으로 10% TCA 가용성 단백질량을 측정된 후, 다음 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

Table 1. Conditions for the hydrolysis of cod liver protein treated with various proteases

Enzyme	Buffer	pH	Temp (°C)
Alcalase	0.1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.0	50
Neutrase	0.1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.0	50
Pronase E	0.1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.0	37
Papain	0.1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.0	37
Trypsin	0.1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.0	37
α-Chymotrypsin	0.1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.0	37

$$\text{가수분해도(\%)} = \frac{10\% \text{ TCA 가용성 단백질량}}{\text{총단백질량}} \times 100$$

#### 단백질의 가수분해 조건

기질에 대한 최적의 효소비를 결정하기 위해서 0.1M disodium hydrogen phosphate-sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 37°C에서 기질의 농도가 1% (w/v)가 되게 한 후, 기질 대 효소비를 10에서 1,000까지 변화시켜 가수분해도를 검토하였다. 또한 최적의 기질농도를 결정하기 위하여 효소 대 기질비가 1:100으로 한 후, 0.2% 부터 5.0%까지 기질농도를 변화시키면서 동일한 완충용액과 온도에서 2시간 가수분해하여 기질농도를 검토하였다.

#### 가수분해물의 제조

가수분해물은 Kim 등 [6]의 방법에 따라 대구의 간을 효소로 가수분해시켜 얻은 가수분해물을 각 단계별로 분자량 크기에 따라 제조하였다. 즉, 대구의 간을 α-chymotrypsin으로 2시간 가수분해시킨 후, 한외여과막 장치를 이용하여 분자량 한계범위가 각각 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa인 막을 통해 분획한 후 동결건조하였다.

#### 분자량 측정

한외여과막 반응기를 사용하여 분자량 한계범위가 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa의 막을 통과시켜 분획한 가수분해물의 분자량은 고성능 액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography : HPLC, Hewlett Packard, USA)를 사용하여 측정하였다. 즉, GPC column [Zorbax PSM 60 (110~10<sup>3</sup> Da), 300 (3×10<sup>3</sup>~3×10<sup>5</sup> Da), 3000 (10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup> Da), I. D. 6.2mm, 250mm×4.6mm] 3개를 직렬로 연결하여 3차 증류수로 평형화시킨 후, 각 10mg/ml의 시료용액 100μl를 유출속도 1ml/min로 용리시켜 UV 검출기로서

230nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 carbonic anhydrase (MW 29,000 Da), cytochrome C (MW 12,327 Da), aprotinin (MW 6,000 Da) 및 pentaphenylalanine (MW 753.9 Da)을 사용하였다.

#### ACE 저해활성 측정

ACE 저해활성은 Cushman and Cheung[3]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 일정량의 가수분해물을 0.1M sodium borate buffer (pH 8.3, 300mM NaCl 함유)에 녹인 가수분해액 100μl에 25mU/ml ACE용액 100μl를 가한 후, 37°C에서 30분간 항온처리하였다. 여기에 25mM Hip-His-Leu (107.4mg/10ml sodium borate buffer) 50μl를 넣고 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 1N HCl용액 0.5ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate 1.5ml를 가하여 교반한 다음, 원심분리 (2,500×g, 5min)시켜 상층액 1ml를 분취하였다. 이 상층액을 완전히 건조시킨 다음 증류수 1ml를 가하여 용해시키고, 228nm에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해제의 농도는 ACE의 저해활성을 50% 저해시키는 데 필요한 가수분해물의 농도를 계산하여 IC<sub>50</sub> (mg/ml)으로 정의하였다.

#### ACE 저해 펩타이드의 분리·정제

한외여과막을 사용하여 분자량별로 분획한 가수분해물 중에서 ACE 저해활성이 가장 높은 것으로 나타난 대구의 간 가수분해물 0.5g을 20mM sodium acetate buffer (pH 4.0)로 평형화시킨 SP-Sephadex C-25 양이온 교환수지에 넣어 30분간 방치시킨 후, 비흡착부분을 용출시키고 수지에 흡착된 부분은 0.25M, 0.5M 및 1.0M NaCl 용액 500ml로 순차적으로 용출한 다음, 전기투석기에서 염을 완전히 제거하고 동결건조하여 ACE 저해활성을 측정하였다. 이온 교환수지에서 분획한 획분중에서 ACE 저해활성이 가장

우수한 획분을 겔 크로마토그래피방법으로 분리하였다. 즉, 겔 여과용 수지 Sephadex G-15를 충전시켜 탈이온수로 평형화시킨 칼럼 ( $\phi 2.5 \times 62\text{cm}$ )에 0.5g/ml의 가수분해액 0.2 ml를 주입하고, 탈이온수로 용출 (유속, 1.0ml/min; 분획량, 5ml)하였다. 이 분획물을 분광광도계로 280nm에서 흡광도를 측정하고, 동결건조한 후 일정량을 정평하여 ACE 저해 활성을 측정하였다. 가장 뛰어난 ACE 저해활성을 가진 획분을 HPLC상에서 ODS reverse-phase column ( $\phi 10.0 \times 250\text{mm}$ )을 이용하여 용리하였다. 이때, 용출속도는 2.0ml/min, 이동상으로는 0.1% trifluoroacetic acid를 함유한 H<sub>2</sub>O와 acetonitrile (0~20%, 30min)을 사용하여 선형상 농도구 배법으로 215nm에서 흡광도를 측정하여 분획하고, 그 활성을 측정하였다. 최종적인 순도확인에는 capillary electrophoresis (Bio Rad Co., USA)를 사용하였다.

#### 아미노산 서열 분석

아미노산 서열은 N-말단으로부터 아미노산을 절단하는 Edman법으로 분해한 후, 기체상 자동서열분석기 (Perkin Elmer, USA, New Jersey)로 분석하였다. 즉, 염기 조건하에서 해리를 억제시킨 아미노산을 phenylisothiocyanate (PITC)에 부착시켜 phenylthiocarbonyl (PTC) 펩타이드로 만들고 과잉시약과 반응 유도체를 제거한 후, 산성 조건하에서 절단하여 anilinothiozoline (ATZ) 유도체로 변환시키고, 더 안정한 유도체인 phenylthiohydantoin (PTH) 아미노산으로 변형시켜 동정하였다. 남은 펩타이드의 N-말단에 대해서도 위의 과정을 반복하여 서열을 결정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 대구의 간 단백질의 가수분해

대구의 간 단백질에 대한 시판 효소의 가수분해활성을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 즉, pronase E로 가수분해시켰을 때 가수분해도가 약 50%로 가장 높게 나타났으며, 그 이외의 효소들로 가수분해시켰을 때에는 약 34%에서 40%로 큰 차이가 없었다. 이와 같이 가수분해도가 전체적으로 낮은 이유는 대구의 간에 포함되어 있는 지방이 이들 효소의 활성에 영향을 미쳐 가수분해도가 낮게 나타난 것으로 판단된다.

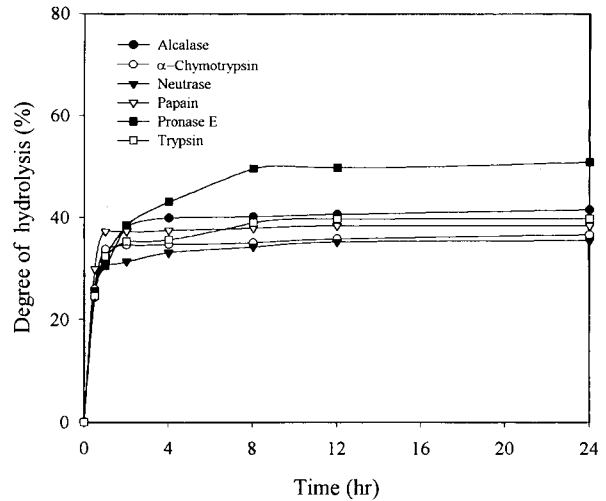


Fig. 1. Effect of incubation time on the hydrolysis of cod liver with various proteases. Substrate concentration used in this experiment was 1% (w/v), and the ratio of substrate to enzyme (S/E) was 100/1.

#### 효소에 따른 가수분해물의 ACE 저해활성

대구의 간 단백질을 각 효소별로 시간에 따라 가수분해하여 동결건조한 가수분해물의 ACE 저해활성을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 즉, 가수분해물의 ACE 저해활성은 가수분해도가 상대적으로 낮은  $\alpha$ -chymotrypsin으로 2시간 동안 가수분해시킨 가수분해물에서 IC<sub>50</sub>값이 1.64 mg/ml로 가장 높았으며, 가수분해도가 가장 높은 pronase E로 2시간 동안 가수분해시킨 가수분해물의 IC<sub>50</sub>값은 1.79 mg/ml로 나타났다. 이 결과는 가수분해도와 ACE 저해활성과는 상관관계가 없음을 보여주는 것으로 이러한 원인은 기질의 차이 뿐만 아니라 각 효소가 기질에 작용하는 절단 부위가 다르기 때문에 N말단 및 C말단에 위치하는 아미노산의 종류가 달라지므로 ACE저해활성이 다르게 나타나는 것으로 판단된다.

Wako 등 [20]은 오징어의 간과 몸통육을 자가분해시켜 얻은 추출물에서 ACE 저해활성을 측정한 결과 IC<sub>50</sub>값이 1.42 mg/ml였다고 하였으며, Yeo 등 [22]은 한외여과막으로 참치 자숙액을 분자량 5,000 Da 이하로 분리하여 그 분획물의 IC<sub>50</sub>값을 측정한 결과 1.79 mg/ml로 본 연구에서와 유사한 결과를 보고하였다. 따라서, 본 연구에서  $\alpha$ -chymotrypsin으로 대구의 간을 가수분해하여 얻은 가수분해물은 ACE 저해제로서 활용이 가능할 것으로 판단된다.

Table 2. ACE inhibitory activity of hydrolysates of various enzymes from cod liver protein on various incubation time

Enzyme	ACE inhibitory activity IC <sub>50</sub> (mg/ml)						
	0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	12 hr	24 hr
Alcalase	9.56	10.30	10.10	10.00	12.96	5.37	3.20
$\alpha$ -Chymotrypsin	2.20	2.84	1.64	1.99	2.29	2.30	2.33
Neutrase	6.25	10.50	36.01	37.33	5.40	7.01	4.35
Papain	8.17	4.50	3.56	3.88	7.55	5.13	11.29
Pronase E	2.19	1.91	1.79	1.81	1.69	2.14	2.26
Trypsin	2.28	2.76	1.84	1.86	2.15	1.90	2.15

최적의 가수분해 조건

대구의 간 단백질을 여러 효소로 가수분해시켜 ACE 저해활성을 측정하였을 때 가장 뛰어난 활성을 보인  $\alpha$ -chymotrypsin 가수분해물을 제조하기 위한 최적조건을 규명하기 위하여 기질에 대한 효소비, 기질 변화에 대한 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 즉, 효소비가 증가할수록 가수분해활성은 증가하였으나, 100:1 이상에서는 효소의 농도를 변화시켜도 가수분해활성은 큰 값으로 증가되지 않았다 (Fig. 2). 또한, 기질농도는 0.2%에서 가수분해활성이 43%로 가장 높았으나 기질농도 1%에 비해 큰 차이가 없었으므로 대량 처리시 경제적인 효과를 감안할 때 1% 기질농도가 적합하다고 판단되었다 (Fig. 3).

가수분해물의 분자량 분포

대구의 간을  $\alpha$ -chymotrypsin으로 2시간 가수분해시켜

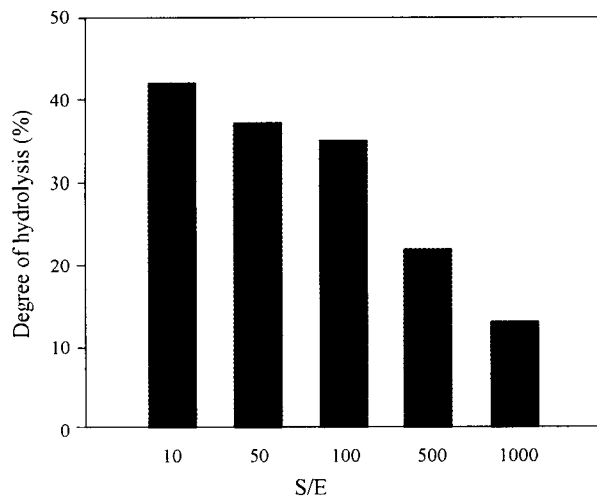


Fig. 2. Effect of substrate/enzyme ratio on the hydrolysis of cod liver protein by  $\alpha$ -chymotrypsin.

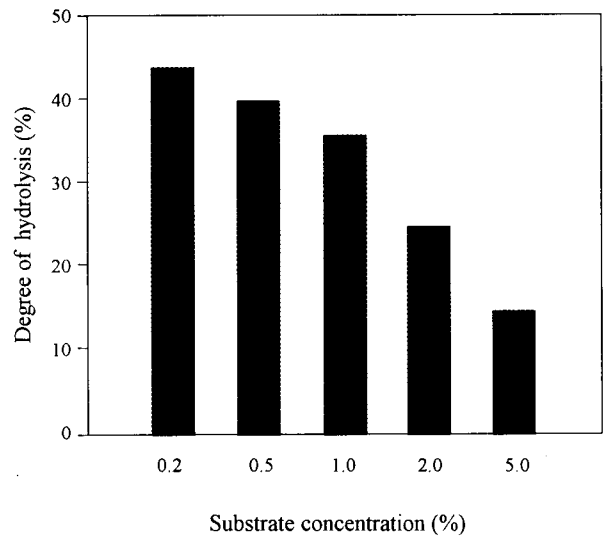


Fig. 3. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of cod liver protein by  $\alpha$ -chymotrypsin.

제조한 가수분해물을 한외여과막을 사용하여 분자량 한계 범위가 10,000 Da, 5,000 Da 및 1,000 Da인 막을 통과시켜 나온 분획물의 분자량 분포는 Fig. 4와 같다. 즉, 분자량 한계범위가 10,000 Da인 막을 통과하여 나온 가수분해물은 대부분 12,000~5,000 Da의 분자량 범위에 분포하고 있음이 확인되었으며, 주로 10,500 Da과 9,000 Da의 분자량이 주요 획분이었다. 분자량 한계범위가 5,000 Da인 막을 통과하여 나온 가수분해물은 5,500~1,800 Da의 범위에 분포되어 있었으며, 주요 획분으로는 5,000 Da, 4,000 Da 및 2,000 Da이었다. 그리고, 분자량 한계범위가 1,000 Da인 막을 통과하여 나온 가수분해물은 주로 800~650 Da의 분자량 범위에 분포하였다. 이와 같이 각각의 막을 통과하여 나온 가수분해물이 그 막의 분자량 이상에서도 일부 분포되어 있는 것은 그 막의 제조공정상의 분자량 한계에 의한

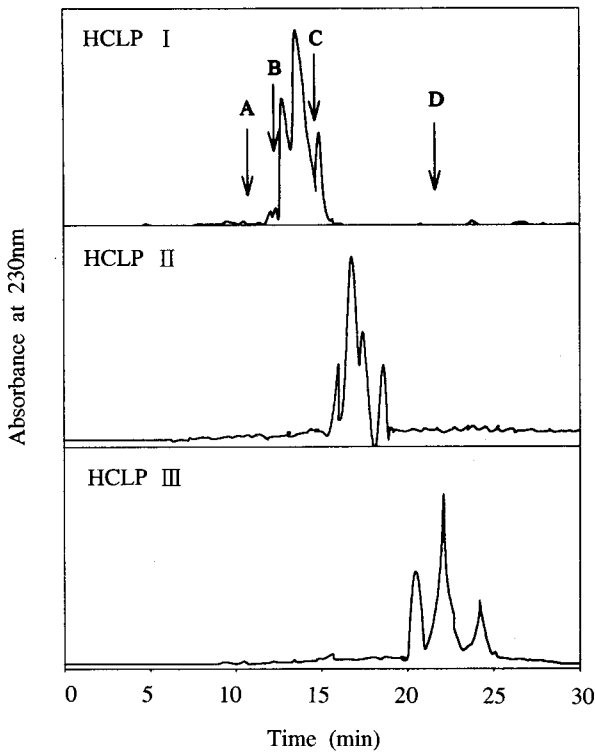


Fig. 4. Molecular weight profiles of hydrolysates of cod liver protein (HCLP) on HPLC using GPC column. HPLC was carried out using deionized water as mobile phase at flow rate of 1.0ml/min. A, Carbonic anhydrase (MW 29,000 Da); B, Cytochrome C (MW 12,327 Da); C, Aprotinin (MW 6,000 Da); D, Pentaphenylalanin (MW 753.9 Da). HCLP I, Hydrolysate of cod liver protein passed through a membrane with molecular weight cut-off (MWCO) 10 kDa but not passed through a membrane with MWCO 5 kDa; HCLP II, Passed through a membrane with MWCO 5 kDa but not passed through a membrane with MWCO 1 kDa; HCLP III, Passed through a membrane with MWCO 1 kDa.

것으로 판단된다.

Turgeon and Gauthier [19]는 2단계 막반응기에서 trypsin과  $\alpha$ -chymotrypsin으로 유장 단백질을 가수분해하여 분자량을 측정된 결과, 분자량 한계범위가 30,000 Da인 막에서 분리한 분자량의 분포는 5,000~20,000 Da이 주종을 이루었으며, 분자량 한계범위가 1,000 Da인 막에서 분리한 분자량은 2,000 Da이하였다고 보고한 바 있다.

ACE 저해 펩타이드의 분리·정제 및 아미노산 서열 분석 대구의 간을  $\alpha$ -chymotrypsin으로 2시간 가수분해하여 제조한 가수분해물을 분자량 한계범위가 10,000 Da, 5,000 Da 및 1,000 Da인 막을 통과시켜 나온 분획물을 각각 동결 건조하여 ACE 저해활성을 측정된 결과는 Table 3에 나타내었다. 즉, 분자량 한계범위가 1,000 Da인 막을 통과하여 나온 가수분해물이 ACE 저해활성에서 IC<sub>50</sub>값은 1.31mg/ml로 10,000 Da과 5,000 Da인 막을 통과하여 나온 가수분해물보다 활성이 더 좋았다. 따라서, 본 실험에서 ACE 저해활성은 고분자의 펩타이드보다는 저분자의 펩타이드가 더 뛰어나다는 것을 알 수 있었으며, 이후로는 1,000 Da의 막을 통과하여 나온 분획물을 이용하여 ACE 저해활성 펩타이드의 분리·정제용 시료로 사용하였다.

각 단계별 막반응기에서 분리한 가수분해물들 중에서 ACE 저해활성이 가장 우수한 펩타이드를 분리하기 위하여, 먼저 양이온 교환수지인 SP-Sephadex C-25를 사용하여 분리하였다. 즉, 분자량 1,000 Da 이하의 가수분해액을 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)로 평형화시킨 SP-Sephadex C-25 양이온 교환수지에 넣어 30분간 반응시킨 후, 비흡착부분을 용출시키고 수지에 흡착된 부분은 0.25M, 0.5M 및 1.0M NaCl 용액 500ml를 순차적으로 각각 용출하여 4개의 획분으로 분리하였다. 이들 각 분획물을 동결건조한 후 일정량을 정평하여 ACE 저해활성을 측정하였다. 그 결과는 Table 4에서와 같이 4개의 획분 중에서 ACE 저해활성이 가장 우수한 획분은 0.25~0.5M NaCl 농도범위에서 용출된 획분으로 IC<sub>50</sub> 값이 0.99mg/ml였다. 이 획분을 다시 Sephadex G-15를 충전시킨 컬럼 ( $\phi$  2.5×62cm)에 용

Table 3. ACE inhibitory activity of hydrolysates of  $\alpha$ -chymotrypsin from cod liver protein

	ACE inhibitory activity IC <sub>50</sub> (mg/ml)
HCLP I <sup>*</sup>	1.31
HCLP II <sup>**</sup>	1.68
HCLP III <sup>***</sup>	1.91

<sup>\*</sup>HCLP I: Hydrolysate of cod liver protein passed through a membrane with molecular weight cut-off (MWCO) 10 kDa but not passed through a membrane with MWCO 5 kDa.

<sup>\*\*</sup>HCLP II: Passed through a membrane with MWCO 5 kDa but not passed through a membrane with MWCO 1 kDa.

<sup>\*\*\*</sup>HCLP III: Passed through a membrane with MWCO 1 kDa.

Table 4. ACE inhibitory activity of fractions isolated on SP-Sephadex C-25 column

Fraction eluted with NaCl (M)	ACE inhibitory activity IC <sub>50</sub> (mg/ml)
0	1.32
0~0.25	1.82
0.25~0.50	0.99
0.50~1.00	2.86

출시켜 분리한 후, 각 획분을 280nm에서 흡광도를 측정하여 분획한 후 (Fig. 5), 이 획분을 동결건조하여 ACE 저해활성을 측정하였다 (Table 5). 이들 획분의 ACE 저해활성은 획분 III에서 IC<sub>50</sub> 값이 0.56mg/ml로 가장 우수하였다. 그리고 획분 IV의 ACE 저해활성은 0.58mg/ml로 획분 III와 거의 비슷하였지만 분획량이 매우 적게 나타나 주된 획분이 아님을 알 수 있었다.

겔 크로마토그래피에서 분리한 획분 중에서 ACE 저해활성이 가장 우수한 III획분을 동결건조한 후, ODS 칼럼이 장치된 HPLC를 이용하여 0.1% TFA가 용해되어 있는 물과 acetonitrile 용액으로 선형상 농도구배법 (0~20% acetonitrile, 30min)으로 용출 (2ml/min)시켜 분리한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 즉, 겔크로마토그래피에서 ACE 저해활성이 뛰어난 획분인 III를 HPLC상에서 선형상 농도구배

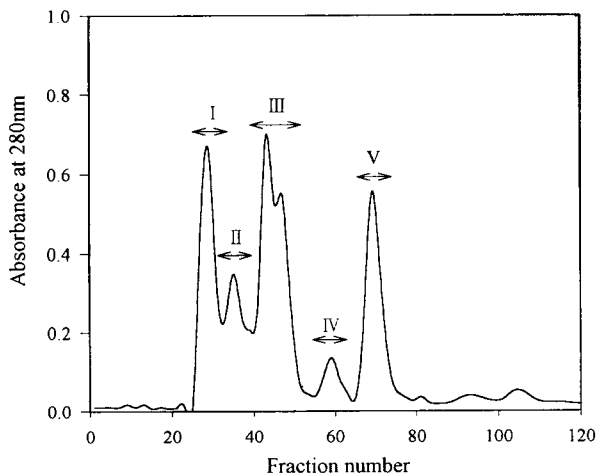


Fig. 5. The Sephadex G-15 column chromatogram of the 0.25~0.5M NaCl fraction obtained by the SP-Sephadex C-25. Elution was performed at 1ml/min of a flow rate and the fraction volume was 5ml/tube.

Table 5. ACE inhibitory activity of fractions isolated from the active fraction of SP-Sephadex C-25 on Sephadex G-15 column

Fraction	ACE inhibitory activity IC <sub>50</sub> (mg/ml)
I	1.38
II	0.91
III	0.56
IV	0.58
V	0.65

법으로 용출시킨 결과, A, B 및 C의 3개의 주된 획분을 얻었다. 이들 획분들의 ACE 저해활성을 측정한 결과, 획분 B에서 IC<sub>50</sub> 값이 14μg/ml로 가장 우수하였으며, 다음으로 획분 C가 IC<sub>50</sub> 값이 39μg/ml로 나타났다 (Table 6). 가장 활성이 좋은 B획분을 HPLC로 재분리하여 2개의 단일 획분을 얻었으며 (Fig. 7), 이 2개의 단일 획분을 capillary

Table 6. ACE inhibitory activity of fractions isolated by HPLC

Fraction	ACE inhibitory activity IC <sub>50</sub> (μg/ml)
A	56
B	14
C	39

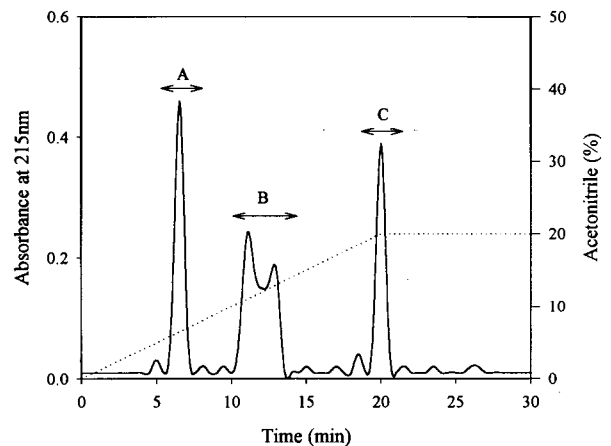


Fig. 6. Reverse-phase HPLC pattern on a Primesphere 10 C-18 column of active fraction III eluted on the Sephadex G-15 gel chromatography. HPLC operation was carried out with 20% acetonitrile as mobile phase at 2ml/min of a flow rate using UV detector at 215nm.

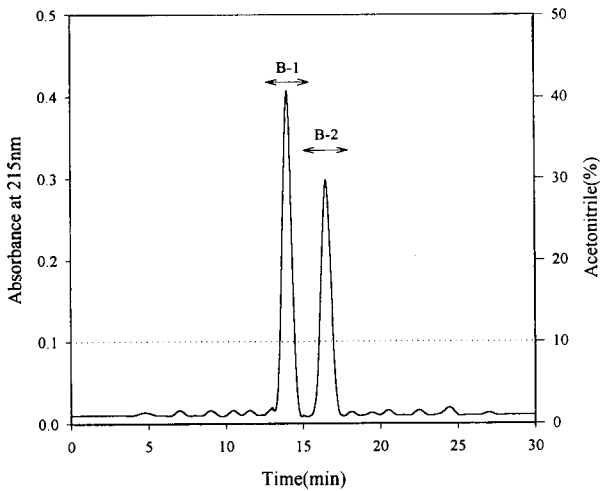


Fig. 7. Reverse-phase HPLC pattern on a Primesphere 10 C-18 column of active fraction B eluted on the HPLC. HPLC operation was carried out with 10% acetonitrile as mobile phase at 2ml/min of a flow rate using UV detector at 215nm.

electrophoresis를 이용하여 순도를 확인한 결과, 모두 단일 피크로 나타났으므로 이 물질은 하나의 순수한 단일 펩타이드임을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

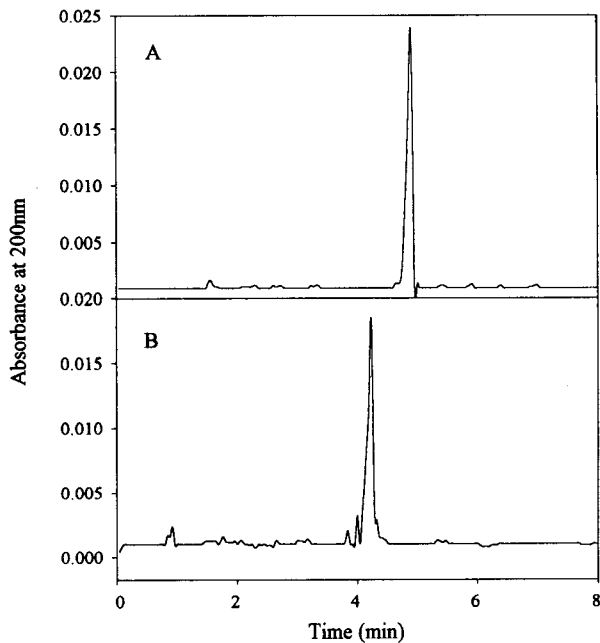


Fig. 8. Capillary electrophoresis chromatogram of fraction B-1 (A) and B-2 (B) isolated from the second HPLC chromatography.

대구의 간 가수분해물로부터 최종적으로 정제된 두 종류의 펩타이드의 아미노산 서열을 분석한 결과는 Table 7에 나타내었다. 즉, 정제된 두 종류의 펩타이드 중에서 획분 B-1의 아미노산 서열은 Met-Ile-Pro-Pro-Tyr-Tyr ( $IC_{50}=10.9\mu M$ )이었으며, 다음으로 획분 B-2는 Gly-Leu-Arg-Asn-Gly-Ile ( $IC_{50}=35.0\mu M$ )으로 구성되어 있었다. 이들 펩타이드는 모두 hexapeptide로 구성되어 있었으며, 이 중에서 활성이 가장 뛰어난 획분은 C말단에 Tyr이 배열되어 있었는데 이 결과는 ACE의 활성부위를 저해하는데는 펩타이드 C말단의 아미노산이 imino acid와 방향족 아미노산 등의 잔기로 구성되어 있는 펩타이드가 ACE 저해활성이 매우 양호한 것으로 보고 [2]되어 있는 결과와 일치하였다.

Wako 등 [20]은 오징어 간과 몸통육을 자가분해시켜 얻은 추출물로부터 ACE 저해활성이 높은 펩타이드를 분리 정제하여 아미노산 서열을 결정한 결과 Try-Ala-Leu-Pro-His-Ala ( $IC_{50}=9.8\mu M$ ) 및 Gly-Tyr-Ala-Leu-Pro-His-Ala ( $IC_{50}=27.3\mu M$ )였다고 보고하였으며, Maruyama 등[9,12]은 casein의 효소적 가수분해물로부터 ACE 저해활성이 높은 펩타이드의 아미노산 서열은 Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys ( $IC_{50}=77.0\mu M$ ), Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg ( $IC_{50}=15.0\mu M$ ) 및 Phe-Phe-Val-Ala-Pro ( $IC_{50}=6.0\mu M$ )였다고 보고하였다. 또한, Yokoyama 등 [23]은 가다랑어의 효소적 가수분해물로부터 ACE 저해활성이 높은 펩타이드의 서열은 Ile-Lys-Pro-Leu-Asn-Tyr ( $IC_{50}=43.0\mu M$ ) 및 Asp-Tyr-Gly-Leu-Tyr-Pro ( $IC_{50}=62.0\mu M$ )였다고 보고하였으며, 이들을 부분적으로 절단된 형태인 Ile-Lys-Pro, Leu-Asn-Tyr, Asp-Tyr-Gly 및 Leu-Tyr-Pro의 ACE 저해활성은 각각  $1.7\mu M$ ,  $81\mu M$ ,  $2700\mu M$  및  $6.6\mu M$ 이었다고 보고하였다. 한편, Kawakami 등 [5]은 Leu-Lys-Tyr ( $IC_{50}=9.78\mu M$ )과 유사한 tripeptide를 합성하여 ACE 저해활성을 측정된 결과, Leu-Lys-Pro ( $IC_{50}=2.8\mu M$ ) 및 Val-Lys-Pro ( $IC_{50}=2.6\mu M$ )이었다고 보고하였다.

Table 7. Amino acid sequence and the activity of ACE inhibitory peptides isolated from cod liver protein

Fraction	Amino acid sequence	ACE inhibitory activity $IC_{50}$ ( $\mu M$ )
B-1	Met-Ile-Pro-Pro-Try-Tyr	10.9
B-2	Gly-Leu-Arg-Asn-Gly-Ile	35



이상에서 살펴본 바와 같이 ACE 저해활성을 나타내는 펩타이드의 구조는 과거 강력한 ACE 저해제로 알려져 있는 뱀독 유래 펩타이드의 C말단 부분인 Pro-Pro 및 Ala-Pro과 깊은 관계가 있는 것으로 생각되어 왔으나, 최근에는  $\alpha$ -zein (Leu-Arg-Pro,  $IC_{50}=0.27\mu M$ ) [27]과 같이 다른 조합의 아미노산에서도 강한 ACE 저해활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 뿐만 아니라 펩타이드의 길이 역시 저해활성에 중요한 영향요인이 될 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 ACE를 저해할 수 있는 펩타이드의 구조 예측을 위해서는 본 연구와 같은 광범위한 ACE 저해 펩타이드를 대상으로 구성 아미노산의 종류 및 길이와 ACE 저해효과와의 상관성 규명이 필요할 것으로 판단된다.

## 요 약

수산가공물의 증가에 따라 원료어 처리시 대량으로 발생하는 비가식부분의 하나인 대구의 간을 효율적으로 이용하기 위하여 단백질을 효소적으로 가수분해한 후 한외여과막을 이용하여 분자량별로 분획하였으며, 이들 가수분해물 중 ACE 저해활성이 높은 펩타이드는 이온교환 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피 및 HPLC로 분리 정제하여 그 아미노산 서열을 결정하였다.

대구 간 단백질을 여러 효소로 분해시켜 얻은 가수분해물 중에서 ACE 저해활성이 가장 우수한 것은  $\alpha$ -chymotrypsin으로 2시간 가수분해시킨 가수분해물이었으며, 이 가수분해물을 한외여과막으로 분자량 10, 5 및 1 kDa의 3종류로 분리하여 ACE 저해활성을 측정한 결과 1 kDa의 막을 통과하여 분리된 가수분해물의  $IC_{50}$ 값이 1.31mg/ml로 가장 높았다. 이 획분으로 SP-Sephadex C-25를 사용하여 이온교환 크로마토그래피를 한 결과, 염농도에 따라 4개의 획분으로 분리되었으며 ACE 저해활성은 0.25~0.5M NaCl 용액에서 용출된 획분이 0.99mg/ml로 가장 높았다. 이 획분을 이용하여 Sephadex G-15로 겔여과를 하여 5개의 획분으로 분리하였으며, 이중 획분 III에서 0.56mg/ml로 활성이 가장 높았다. 이것을 역상 HPLC에서 3개의 획분으로 분리되었으며, 이들 중에서 ACE 저해활성이 가장 높은 획분 B를 재분리하여 2개의 획분을 얻어 아미노산 서열을 결정한 결과 Met-Ile-Pro-Pro-Tyr-Tyr ( $IC_{50}=10.9\mu M$ )와 Gly-Leu-Arg-Asn-Gly-Ile ( $IC_{50}=35.0\mu M$ )의 hexapeptide임을 확

인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 1995년 해양수산부에서 첨단기술개발사업 [(주) 키토라이프와의 산학협동과제] 연구비의 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 연구비를 지원해 준 해양수산부와 (주) 키토라이프에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Astawan, M., Wahyuni, M., Yasuhara, T., Yamada, K., Tadokoro, T. and Maekawa, A. 1995. Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 425-429.
2. Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. and Cushman, D. W. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.* **255**, 401-407.
3. Cushman, D. W. and Cheung, H. S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637-1648.
4. Gavras, I. 1992. Bradykinin-mediated effects of ACE inhibition. *Kidney International* **42**, 1020-1029.
5. Kawakami, A., Kayahara, H. and Tadase, K. 1995. Taste evaluations of angiotensin I enzyme inhibitors. Leu-Lys-Tyr analogues. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 709-710.
6. Kim, S. K., Lee, H. C., Byun, H. G. and Jeon, Y. J. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J. Kor. Fish. Soc.* **29**, 246-255.
7. Kohuchi T., Yamada, K., Yamato, M., Okachi, R., Nakayama, K. and Kase, H. 1986. K-4, a novel inhibitor of angiotensin I converting enzyme produced by *Actinomadura spiculospora*. *J. Antibiotics* **39**, 364-371.
8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
9. Maruyama, S. and Suzuki, H. 1982. A peptide inhib-

- itor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1393-1394.
10. Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. and Suzuki, H. 1987. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of  $\alpha_{s1}$ -casein. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2557-2561.
  11. Maruyama, S., Miyoshi, S., Kaneko, T. and Tanaka, H. 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**, 1077-1081.
  12. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H. 1985. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1405-1409.
  13. Matsufuji H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y. 1994. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 2244-2245.
  14. Matsui T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y. 1993. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 922-925.
  15. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. 1991. Structures activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an  $\alpha$ -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1313-1318.
  16. Miyoshi, S., Kaneko, T., Yoshizawa, Y., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. 1991. Hypertensive activity of enzyme. hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1407-1408.
  17. Okamoto, A., Hanagata, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y., Koizumi, Y. and Yanagida, F. 1995. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of various fermented foods. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1147-1149.
  18. Teranaka, T., Ezawa, M., Matsuyama, J., Ebine, H. and Kiyosawa, I. 1995. Inhibitory effects of extracts from rice-koji miso, barley-koji miso and soybean-koji miso on the activity of angiotensin I converting enzyme. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **69**, 1163-1169.
  19. Turgeon, S. L. and Gauthier, S. F. 1990. Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: Production and characterization. *J. Food Sci.* **55**, 106-110.
  20. Wako, Y., Ishikawa, S. and Muromoto, K. 1996. Angiotensin I enzyme inhibitors in autolysates of squid liver and mantle muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 1353-1355.
  21. Yamato, M., Koguchi, T., Okachi, R., Yamada, K., Nakayama, K., Kase, H., Karasawa, A. and Shuto, K. 1986. K-26, a novel inhibitor of angiotensin I converting enzyme produced by an *Actinomycete* K-26. *J. Antibiotics* **39**, 44-52.
  22. Yeo, S. Y., Lee, T. G., Ahn, C. W., Kim I. S., Gu, Y. S., Park, Y. H. and Kim, S. B. 1998. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of skipjack/yellowpin tuna cooking broth. *Korean J. Life Sci.* **8**, 312-317.
  23. Yokoyama, K., Chiba, H. and Yoshikawa, M. 1992. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1541-1545.