

# 쇠고기 부산물로부터 혈압 상승 억제 펩타이드 분리 및 정제

장성현 · 장애라 · 김기진 · 천용현 · 민중석 · 이상욱 · 이무하

서울대학교 대학원 농생명공학부 근육식품학실

## Purification and Isolation for Antihypertensive Peptides from Beef Heart and Spleen

S. H. Jang, A. Jang, K. J. Kim, Y. H. Cheon, J. S. Min, S. O. Lee and M. Lee

Laboratory of Muscle Food Science and Technology, School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University

### ABSTRACT

Angiotensin- I converting enzyme(ACE)inhibitor was isolated from beef by-products. The beef by-product hydrolysates prepared with various proteases were tested for the inhibitory effects against ACE. The proteases used were proteinase A from bakers yeast, protease type X III fungal and thermolysin. The maximum inhibitory effect was observed after hydrolysis for 12hrs(beef heart) and 24hrs(beef spleen), respectively. After gel filtration, IC<sub>50</sub> value was 0.37mg/ml in beef heart and 1.84mg/ml in beef spleen. After RP-HPLC, the IC<sub>50</sub> value of peak 1, peak 2, peak 3 and peak-4 were 0.28mg/ml, 0.26mg/ml, 0.25mg/ml and 0.35mg/ml, respectively. In the results of amino acid composition of peak 1, peak 2, peak 3 and peak 4, it was observed that peak 1 was consisted mainly of glycine and methionine, peak 2 was proline, cystine and methionine, peak 3 was proline and peak 4 was alanine, methionine and leucine. In conclusion, beef heart hydrolysate treated with thermolysin+ proteinase A was shown to have the highest inhibitory effect for 12hrs incubation at 37°C.

(Key words : Angiotensin- I converting enzyme(ACE), Beef Spleen, Beef Heart, Peptide)

### I . 서 론

우유와 대두 등의 천연단백질에서 얻어지는 펩타이드는 생체내에서 각종의 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 특히 고혈압 억제와 관련된 펩타이드의 기능 특성에 관하여 최근 많은 보고가 있다(송 등, 1994). 안지오텐신전환효소(Angiotensin converting enzyme: ACE)는 1970년경에 뱀독에서 처음 발견되었으며, zinc protease의 일종으로, 활성화되기 위해서는

아연과 염소가 필요하다(Jover and Mimran, 1994). ACE는 혈압강하작용을 가지고 bradykinin을 분해하여 불활성화시키는 한편, 불활성 상태의 angiotensin- I 을 절단하여 강한 혈압상승작용을 나타내는 angiotensin-II로 활성화시킴으로써 고혈압의 원인이 된다고 알려져 있다(신, 1994).

따라서, 쇠고기 부산물에서의 ACE저해 peptide의 탐색은 혈압상승억제기능을 가진 새로운 식품소재의 개발이라는 면에서 중요한 의미를

Corresponding author : Mooha Lee. School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon, 447-744, Korea. E-mail : moohalee@snu.ac.kr

가지고 있다. 식품 중에 존재하는 ACE 활성 저해인자는 가열 조건에 안정하며 체내에서의 흡수도 용이한 비교적 저분자 물질이다. 이들의 활성 저해효과는 혈압 강하제와 비교했을 때 비교적 낮은 활성을 나타내지만 대량으로 항상 섭취하는 식품 중에 존재한다는 점에서 그 유용성이 기대되어진다. 또한, 최근에는 동식물 단백질을 각종 효소를 이용하여 가수분해시킨 가수분해물의 올리고 펩타이드를 분리 및 정제하여 생리활성을 검토한 연구가 많이 진행되고 있다(Casteels 등, 1989).

본 연구에서는 쇠고기의 비 선회부위를 고도로 이용하기 위한 연구의 일환으로 쇠고기의 염통과 지라를 각종효소로 가수분해하여 얻은 펩타이드를 한외여과, gel 여과, RP-HPLC를 통해 분리 및 정제하여 얻은 펩타이드의 ACE저해 활성을 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험에 사용될 샘플은 지라, 염통, 허파, 간을 예비실험 하여 ACE저해 활성이 좋은 쇠고기 염통과 지라를 선택하여 무균 상태에서 근내지방을 완전히 제거한 후 수용성 단백질을 추출하여 동결 건조시킨 deep freezer에 보관하였다. Rabbit lung acetone powder, Proteinase A (bakers yeast), Protease type XIII fungal, Thermolysin, 기질로 쓰이는 Hippuryl-histidyl-leucine (Hip-His-Leu)는 Sigma Chemical Co.(ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 2. 단백질 추출

염통과 지라에서 최대한 가시지방을 제거한 후에 시료 20g에 pH7.0으로 맞춘 20mM Phosphate buffer 200ml를 첨가한다. 이 시료를 균질기(Ultra-turrax T25 blender)로 이용하여 균질한

후 4℃, 10,000×g에서 20분 동안 원심 분리시켜 침전물을 버리고 상등액을 취한다. 이 샘플을 0.45μm pore size filter를 이용해 여과한다.

### 3. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법을 따라 측정하였으며, Bovine serum albumin(Sigma Co. USA)을 사용한 표준 곡선에 의하여 환산하였다.

### 4. 단백질 가수분해

추출된 수용성 단백질에 효소를 10ml의 샘플에 200μl의 효소를 첨가한다(Proteinase A, Protease type XIII fungal, Thermolysin, Proteinase A+Protease type XIII fungal, Proteinase A+Thermolysin, Protease type XIII fungal+Thermolysin). 효소를 처리한 샘플을 37℃에서 4, 8, 12, 24시간 가수분해시킨 후 사용되기 전까지 deep freezer에 보관한다.

### 5. ACE Inhibition

ACE 저해효과 측정은 Cushman(1971) 등의 방법에 의하여 행하였다. 즉, 반응 구는 0.4M borate-NaCl buffer(pH 8.3)에 기질 12.5mM Hippury-histidyl-leucine (Sigma Co. USA)용액 0.1ml와 분석하고자 하는 시료 0.05ml 혼합하여 37℃에 30분간 방치한다. 여기에 ACE (Sigma Co. USA)를 0.15ml가하고 다시 37℃에서 1시간 동안 반응시키고, 0.5N HCl을 0.25ml 가하여 반응을 중지시킨다. 대조구는 0.5N HCl을 0.25ml가하여 반응을 중지시킨 후 효소액을 첨가하고, 공실험구는 시료용액 대신에 증류수를 0.05ml를 사용한다. 반응을 중지시킨 후 1.5ml의 ethyl acetate (Sigma Co. USA)를 첨가한 후 15초 동안 vortexing한다. 그리고 2500 rpm에서 10분간 원심 분리시켜 상등액을 0.5ml

취한다. 취한 상등액을 120℃에서 15분간 완전히 건조한 후 1M의 NaCl을 3ml 가하여 모두 용해시킨 후 228nm에서 흡광도를 측정한다.

\* ACE 억제 활성 계산 방법

(%)ACE inhibition =

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

## 6. Gel filtration

Pharmachia Biotech XK26을 이용하여 분자량 별로 Auto fraction collector로 받아낸 후 UV-spectrophotometry에서 측정하였다. 이때 Shephadex G-25 Column을 사용하였고 Flow rate는 1.6ml/min, 흡광도는 280nm, Solvent는 20mM phosphate buffer를 사용한다.

## 7. HPLC를 이용한 peptides의 분리

gel 여과를 통하여 분리한 각 fraction별로 ACE inhibitor 활성을 측정한 후 활성이 좋은 fraction을 HPLC(Young-lin. Co. M930)를 사용하여 각각의 peptides를 분리한다. 이때 사용한 Column은 Protein & peptide C18 이며 사용한 Solvent A는 0.1% Trifluoroacetic acid(TFA)/mili-Q water, Solvet B는 0.1% TFA/Acetonitrile 를 1ml/min의 유속으로 흘러 재분획 하였다. Peptide성분 검출은 UV detector를 사용하여 214nm에서 실시하였다.

## 8. Peptide의 아미노산 분석

Peptide의 총 아미노산 분석은 AccQ-Tag 방법에 따랐다. 적당량의 시료에 6N HCl 200μl 를 넣고 Vacuum-nitrogen flushing step을 3차례 교대로 실시한 후 112~116℃에서 20~24시간 가수 분해시킨다. sep-pak C18 cartridge(Waters,

USA)를 통과시켜 단백질, 지질 등의 고분자 물질과 색소를 제거하였다. 전 처리된 시료를 건조시키고 다시 증류수를 첨가한 후, 시료를 유도체화 시킨 후, HPLC 분석을 행하였다. 분석은 Waters™ 600s controller, Waters™ 626pump, Waters™ 474 Scanning Fluorescence Detector를 사용하였고 column은 AccQ-Tag Amino Acid Analysis Column을 사용하였으며 분석중에는 37℃로 유지하였다. 이때 이동상으로는 Eluent A를 사용하였고, Eluent B는 60% acetonitrile를 사용하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 효소에 따른 가수분해물의 ACE 저해 활성

염통단백질과 지라단백질을 0, 4, 8, 12, 24시간 동안 Thermolysin, Protease type XIII, Proteinase A, Thermolysin+Protease type XIII, Thermolysin+Proteinase A, Protease type XIII + Proteinase A의 효소들을 첨가하여 단백질을 가수분해한 단백질의 ACE저해 활성을 측정하였다(Table 1, Table 2).

염통의 ACE 저해 효과는 Table 1처럼 0시간 때에는 ACE 저해 효과를 거의 볼 수가 없었다. 그러나 4시간의 배양후에는 Thermolysin, Thermolysin+Proteinase A, Thermolysin+Protease type XIII에서 54.61%, 43.30%, 42.63%의 ACE 저해 효과를 보였다. 12시간 동일 Thermolysin +Proteinase A를 처리배양한 염통단백질에서 가장 좋은 ACE 저해 효과를 보여준다. 지라의 ACE 저해 효과는 Thermolysin은 8시간배양, Protease type XIII는 12시간배양, Proteinase A, Thermolysin+Proteinase A, Thermolysin+Protease type XIII, Protease type XIII+Proteinase A 는 24시간 배양에서 ACE활성이 가장 좋았다 (Table 2). 그 중에서도 24시간 배양 한 Thermolysin+Protease type XIII가 지라단백질에서 가장 좋은 ACE 저해 효과를 보여주었다. 위에

Table 1. ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates from beef heart at different incubation hours at 37°C(%)

Enzyme \ hrs	0	4	8	12	24
T	-	54.61	64.12	56.20	46.28
A	-	5.28	6.49	7.48	26.25
P	-	-	6.49	18.54	14.86
TA	22.20	43.30	64.40	79.45	67.60
TP	17.72	42.63	65.97	59.27	59.72
AP	-	-	9.28	12.41	-

- : Not Detected.

T: Thermolysin, P: Protease type XIII, A : Proteinase A, AP : A + P, TP : T + P, T A : T + A.

Table 2. ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates from beef spleen at different incubation hours at 37°C(%)

Treatment \ hrs	0	4	8	12	24
T	4.84	26.78	34.41	-	22.14
A	10.97	25.63	20.09	25.63	30.28
P	22.17	34.06	31.52	35.79	19.56
TA	17.78	34.98	27.71	33.14	35.65
TP	0.8	28.63	29.79	-	39.12
AP	13.51	19.28	24.71	15.70	29.69

- : Not Detected.

T: Thermolysin, P: Protease type XIII, A : Proteinase A, AP : A + P, TP : T + P, T A : T + A.

서 살펴본 바와 같이 쇠고기 염통과 지라를 효소별로 가수분해하여 ACE 저해활성을 측정한 결과 효소에 따라 활성이 차이가 생긴다. 이와 같은 결과는 기질의 차이뿐만 아니라 각 효소가 기질에 작용하는 절단 부위가 다르기 때문에 동일한 분자량을 가진 펩타이드라도 N말단 또는 C말단에 위치하는 아미노산의 종류가 다르므로 생리활성이 다르게 나타나는 것으로 판단한다(김 등, 2000).

2. 쇠고기 염통과 지라로부터 ACE inhibitors 분리 및 정제

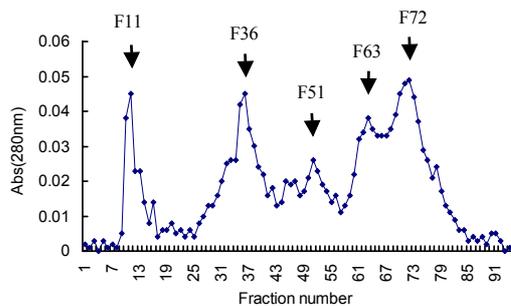


Fig. 1. Sephadex G-25 gel-chromatography of the filtrates obtained by ultrafiltration of beef heart (Thermolysin + Proteinase A, 12hrs)

염통과 지라에서 ACE 저해 활성이 가장 좋은 가수분해물을 한외여과 시스템을 통해 10,000Da 이하로 여과한 다음 gel 여과를 통해 분획한 결과이다. 그 결과 염통에서는 5개의 큰 fraction(F11, F36, F51, F63, F72)을 얻게 되었고(Fig. 1), 이들 fraction들의 ACE 저해 활성을 측정결과, F72에서 IC<sub>50</sub>값 0.37mg/ml로 ACE 저해 활성이 가장 좋았다. 지라에서는 4개의 큰 fraction(F30, F55, F71, F91)을 얻게 되었고(Fig. 2), 이들 fraction들의 ACE 저해 활성을 측정한 결과, F30에서 IC<sub>50</sub>값 1.84mg/ml로 ACE 저해 활성이 가장 좋았다.

여러가지 효소 처리한 염통단백질 중에서 Thermolysin+Proteinase A를 12시간 배양한 후 얻은 가수분해물이 가장 ACE 저해 활성이 가장 좋았다. ultrafiltration과 gel 여과를 통해 얻은 분획물에서, ACE 저해 활성이 가장 좋은 분획물(F72)을 가지고, RP-HPLC를 사용하여 다시 분리 및 정제하여 4개의 피크들을 얻었다(Fig. 3). 이 피크들을 분획한 다음 각각의 분획물의 ACE 저해 활성을 측정하였다. 그 결과

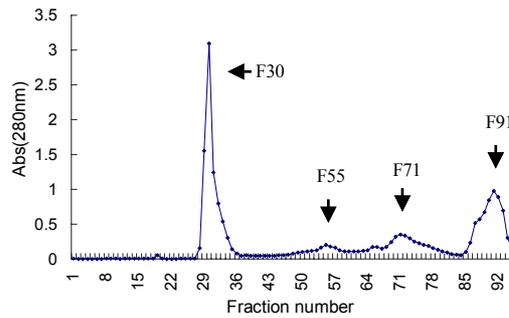


Fig. 2. Sephadex G-25 gel-chromatography of the filtrates obtained by ultra-filtration of beef spleen(Thermolysin +Protease type XIII, 24hrs).

peak 1, peak 2, peak 3, peak 4의 각각 IC<sub>50</sub>값은 0.28, 0.26, 0.25, 0.35mg/ml 값을 얻을 수 있었다. 이 피크들의 분획물의 ACE 저해활성은 이제까지 보고된 ACE 저해 펩타이드들의 IC<sub>50</sub>값들과 비교하였을 때 다소 낮은 값을 나타내었다(Ariyoshi 등, 1993).

RP-HPLC 통해서 얻은 분획물(peak 1, peak 2, peak 3, peak 4)을 AccQ-Tag 방법으로, RP-

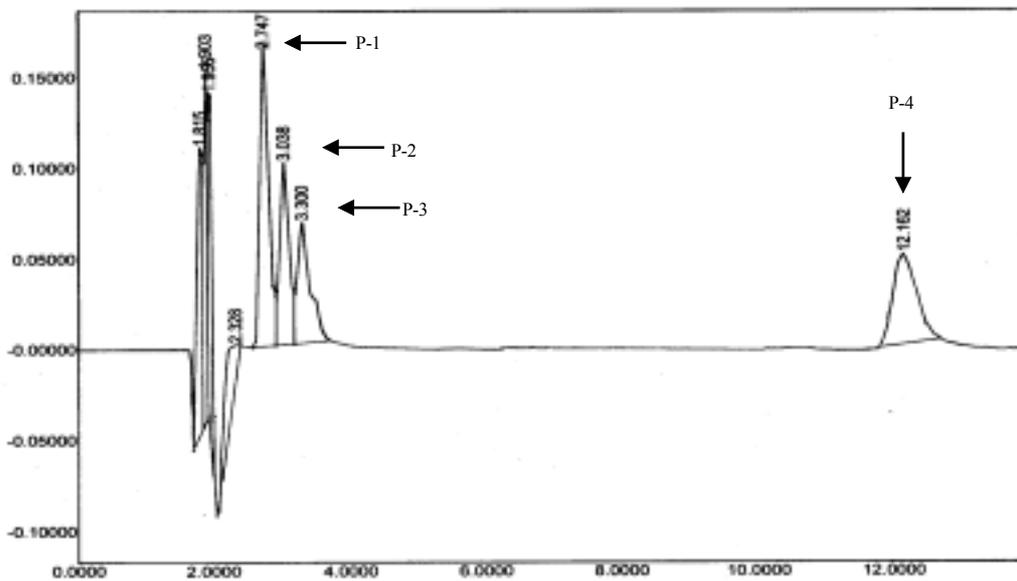


Fig. 3. Reversed-phase HPLC chromatograms of peaks from gel-filtrated fractions possessing high ACE inhibition activity of protein hydrolyzates (fractions from 72, beef heart)

Table 3. ACE inhibitory property of each fraction obtained from RP-HPLC

Fractions	peak 1	peak 2	peak 3	peak 4
IC <sub>50</sub> (mg/ml)	0.28	0.26	0.25	0.35

IC<sub>50</sub>-defined as the concentration which inhibits 50% angiotension- I converting enzyme activity.

Table 4. Amino acid composition of ACE inhibitor from HPLC(%)

	peak-1	peak-2	peak-3	peak-4
Ser	-	-	-	1.907
Gly	73.979	4.169	-	2.524
His	-	0.114	-	0.075
Arg	0.593	-	-	0.472
Thr	0.058	1.695	-	8.794
Ala	0.765	2.908	-	19.901
Pro	0.916	17.952	58.445	6.695
Cys	9.023	28.738	19.665	8.131
Tyr	0.499	0.928	19.160	1.101
Met	10.640	36.512	2.730	24.062
Lys	1.045	1.819	-	2.137
Ile	0.124	-	-	1.075
Leu	1.513	3.781	-	21.447
Phe	0.845	1.382	-	1.680

HPLC(AccQ-Tag Amino Acid Analysis Column)를 사용하여 얻은 분획물의 아미노산 조성을 분석한 결과 peak 1에서는 glycine(74.0%) and methionine (10.6%), peak 2는 proline (18.0%), cystine(28.7%), methionine (36.5%), peak 3는 proline(58.5%), peak 4는 alanine(19.9%), methionine(24.1%) and leucine (24.5%)이 주요 구성 성분 아미노산이었다(Table 4).

#### IV. 요약

본 실험은 쇠고기의 비 선히부위를 고도로 이용하기 위한 연구의 일환으로 쇠고기의 염통

과 지라를 각종효소로 가수분해하여 얻은 분획물을 한외여과와 gel-filtration, 그리고 HPLC를 이용하여 분리 및 정제하여 얻은 펩타이드의 ACE 저해 활성을 검토한 실험이다.

쇠고기 염통과 지라에서 수용성 단백질을 추출한 다음 효소 처리하여 4, 8, 12, 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 염통과 지라단백질의 가수분해물의 ACE 저해 활성을 측정한 결과 염통에서는 Thermolysin과 Proteinase A 효소를 12시간 혼합처리한 가수분해물에서 가장 좋은 ACE 저해 효과를 보여주었고 지라에서는 Thermolysin과 Protease 효소를 24시간 혼합처리한 가수분해물에서 ACE 저해 효과가 가장

좋았다. ACE 저해효소가 가장 좋은 가수분해물을 Ultrafiltration 통해 분리하였으며, 분리 정제된 가수분해물을 Gel-filtration을 통해서 분획하였다.

이때 염통에서는 F11, F36, F51, F63, F72의 큰 분획물을 얻었고 지라에서는 F30, F55, F71, F91에서 큰 분획물을 얻었다. 이 분획물들의 ACE 저해 활성을 측정한 결과 염통에서는 F72에서 IC<sub>50</sub>값 0.37mg/ml로 ACE 저해 활성이 가장 좋았다. 지라에서는 F30에서 IC<sub>50</sub>값 1.840 mg/ml로 ACE 저해 활성이 가장 좋았다. 그리고 여기서 활성이 좋은 염통을 가지고 Reversed-Phase HPLC를 이용하여 분리 한 결과 4개의 큰 피크들을 얻을 수 있었다. 그 결과 peak 1, peak 2, peak 3, peak 4의 IC<sub>50</sub>값은 각각 0.28mg/ml, 0.26mg/ml, 0.25mg/ml, 0.35mg/ml이었다. 이 peak들의 아미노산을 분석한 결과, peak 1에서는 glycine과 methionine, peak 2는 proline, cystine, methionine, peak 3는 proline, peak 4는 alanine, methionine, leucine 이 주요 구성 성분 아미노산이었다.

위 실험 결과로서, 염통과 지라에서의 ACE 저해 활성은 염통이 지라보다 좋았고, 특히 Thermolysin과 Proteinase A 효소를 12시간 배양한 염통단백질 가수분해물에서 가장 좋은 ACE 저해 활성 peptide을 얻을 수 있었다.

## V. 인 용 문 헌

1. Ariyoshi, Y. 1993. Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trend in Food Science & Technol.*, May, 139.
2. Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. and Tempst, P. 1989. Apidaecins: Antibacterial peptides from honeybees. *EMBOJ* 8, 2387-2391.
3. Cushman, D. W. and Cheung, H. S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical pharmacology*, vol. 20. 1637-1638.
4. Jover, B. and Mimran, A. 1994. Angiotensin II receptor antagonists versus angiotensin converting enzyme inhibitors: effect on renal function. *J. Hypertension*, 12. S3.
5. 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.
6. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H. 1985. Angiotensin- I converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolyzate of casein II. Isolation and bradykinin potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, 49(5), 1405.
7. Nakazato, M., Asai, J., Miyazato, M., Matsukura, S., Kangawa, K. and Matsuo, H. 1990. Isolation and identification of isletamyloid polypeptide in normal human pancreas. *Regul. Peptides* 31, 179-186.
8. Nakazato, M., Asai, J., Miyazato, M., Matsukura, S., Kangawa, K. and Matsuo, H. 1990. Isolation and identification of isletamyloid polypeptide in normal human pancreas. *Regul. Peptides* 31, 179-186.
9. Oshima, G., Shimabukuro, H. and Nagasawa, K. 1979. Peptideinhibitors of angiotensin- I converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 556, 128.
10. Parker, F., Migliore-Samour, D., Flo'h, F., Zerial, A., Warner, G. H., Jolles, J., Casaretto, M., Zahn, H. and Jolles, P. Eur. 1984. *J. Biochem.*, 176,677.
11. Prarson, A. M. and Dutson, T. R. 1988. Edible meat by-products. *Advances in meat research* Volume 5, Elsevier Applied Science. p.16.
12. Saito, Y., Nakamura, K., Kawato, A. and Imayasu, S. 1992. Angiotensin- I convertingenzyme inhibitor in sake and itsby-product. *Nippon Nogeigaku Kaishi*, 66(7), 1081.
13. Song, J. Y., Ahn, C. W. and Kim, J. K. 1984. Flavor components produced by microorganism during fermentation of korean ordinary soybean paste. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12: 147-152.
14. Yoshihira, M., Hiddeo, M. and Katsumi, Y. 1985. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in Citrus unshiu peelings. *Agric. Biol.*

- Chem. 49:909-914.
15. Yoshikawa, M., Yoshimura, T. and Chiba, H. 1984. Agric. Biol. Chem, 48, 3185.
  16. 김세권, 최영일, 박표참, 최정호, 문성훈. 2000. 대구가공 부산물로부터 생리기능성 펩타이드의 스크리닝. J. Korean Sci. Agric. Chem. Biotechnol. Vol. 43, No. 3, pp.225-227.
  17. 김용석, 이창호, 박희동. 2001. 된장으로부터 Angiotensin 전환효소 저해제 생산 세균의 분리 및 특성. Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 33, No. 1, pp. 84-88.
  18. 도정룡, 김선봉, 박영호, 김동수. 1993. 기호음료 성분의 Angiotensin-전환효소 저해 작용. Korean J. Food Sci. Technol 25(5):456.
  19. 신재익, 안창원, 남희섭, 이형재, 이형주, 문태화. 1995. 된장으로부터 Angiotensin Coverting Enzyme (ACE)저해 Peptide의 분획. Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 27, No. 2, pp. 230-234.
  20. 신현경. 1994. 기능성 식품의 개발 현황. 식품기술, 7(3):3.
  21. 오세종, 김세현, 김상교, 백영진, 조정현. 1997.  $\kappa$ -Casein의 Chymosin, Pepsin 및 Trypsin 가수분해물에 대한 안지오텐신 변환효소 저해효과의 탐색. Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 29, No. 6, pp. 1316-1318.
  22. 이형주. 1998. 콩 식품의 건강 기능성 펩타이드. Korea Soybean Digest. 15(1):16-22.
  23. 조영제, 차원섭, 복수경, 김명옥, 천성숙, 최용규. 2000. 청국장 발효과정 중 항고혈압성 peptide의 생산 및 분리. 한국농화학회지. 제43권 제4호, pp. 247-252.
- (접수일자 : 2002. 12. 23 / 채택일자 : 2003. 3. 5)