오징어 (*Todarodes pacificus*) 껍질로부터 Angiotensin I 전환효소 저해 펩티드의 분리 정제

이정권·전중균·변희국*
강릉원주대학교 해양생물공학과

Purification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Squid *Todarodes pacificus* Skin

Jung Kwon Lee, Joong-Kyun Jeon, Hee-Guk Byun*
Department of Marine Biotechnology, Gangneung-Wonju National University

In this study, an angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor from squid skin was purified and characterized. Squid (Todarodes pacificus) skin protein isolates were hydrolyzed using six commercial proteases: alcalase, α-chymotrypsin, neutrase, papain, pepsin, and trypsin. The peptic hydrolysate had the highest ACE inhibitory activity. The ACE inhibitory peptide was purified using Sephadex G-25 column chromatography and reverse phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with a C_{18} column. The purified ACE inhibitory peptide was identified and sequenced, and found to consist of seven amino acid residues: Ser-Ala-Gly-Ser-Leu-Val-Pro (657Da). The IC_{50} value of the purified ACE inhibitory peptide was 766.2 μM, and Lineweaver-Burk plots suggested that the purified peptide acts as a noncompetitive ACE inhibitor. These results suggest that the ACE inhibitory peptide purified from the peptic hydrolysate of squid skin may be of benefit in developing antihypertensive drugs and functional foods.

Key words: Squid skin, Angiotensin I-converting enzyme inhibitor, Peptide, Enzymatic hydrolysis

서 론

어류껍질과 같은 수산가공 부산물은 연간 약 15만톤 정도 발생되며, 일부만이 사료원으로 이용되고 있고, 대부분이 폐기되어 환경오염을 일으키고 있다. 이러한 수산가공 부산물 중 어류껍질에는 단백질 및 유용성분이 다량 함유되어 있어 자원의 재이용이 가능하다 (Kim et al., 1997). 어류껍질에는 콜라겐이 다량 함유되어 있으며, 열변성 단백질인 젤라틴으로 전환 및 기능성 펩티드 제조 원료로 이용하여 새로운 생리활성 소재를 개발한다면 부산물의 유효이용 측면에 상당한 의미가 있다 (Tharanathan, 2003). 이러한 이유로, 다양한 어류껍질로부터 생리활성 물질의 분리 및 정제 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 어류껍질 유래의 단백질 가수분해물에서 얻어진 펩티드의 항산화 활성, 항고혈압성, 항균성 및 항암성 등의 생리활성 물질을 탐구하려는 연구가 계속적으로 보고되고 있다 (Kristinsson and Rasco, 2002). 최근 일본에서는 어육단백질 및 부산물을 이용하여 혈압강하 및 항산화 작용이 있는 펩티드가 함유된 기능성 식품들이 판매되고 있다.

성인병으로서 가장 문제가 되고 있는 고혈압 질환은 뇌졸중이나 심근경색, 당뇨병 그리고 심부전의 발병을 초래할 뿐만 아니라 심장과 혈관의 근육이 비대해지고 동맥경화도 일으킨다 (Do, 2000). 따라서 고혈압 자체가 직접적인 증상을 나타내지는 않지만 혈압을 정상적으로 유지시키는 일은 성인병의 발병을 미연에 방지할 수 있다. 고혈압은 발병과 혈압의 유지에 많은 인자가 관여하기 때문에 지금까지의 수많은 연구에도 불구하고 아직 그 기전이 완전하게 밝혀져 있지는 않지만 인체에서 혈압을 조절하는 기구인 renin-angiotensin system (RAS)과 kallikrein-kinin system의 항상성이 유지되지 않을 때 혈압조절에 문제가 생기는 것으로 알려져 있다 (Axena, 1992). Renin-angiotensin system에 의하면 혈압이 낮아지거나 혈액중의 Na^+ 농도가 저하될 때에 신장으로부터 방출되는 renin은 간장에서 생합성 되어 혈중으로 방출되는 분자량 55～60 kDa의 혈장 당단백질로 α-글로불린 획분인 renin기질 (angiotensinogen)에 작용하여 decapeptide인 angiotensin I을 생성시킨다. 생성된 angiotensin I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)은 생리활성을 가지지 않지만 주로 폐나 신장에 존재하는 분자량 150～200 kDa인 angiotensin I-converting enzyme (ACE ; peptidyldipeptide hydrolase, EC 3. 4. 15. 1)에 의하여 C-말단의 dipeptide (-His-Leu)가 절단되어 octapeptide인 angiotensin II (Asp-Arg-Val- Tyr-Ile-His-Pro-Phe)로 된다. 이 angiotensin II는 강력한 혈관수축작용을 갖으며, 부신피질 (adrenal cortex)에서 aldosterone의 분비를 촉진함으로써 물과 Na^+의 배설을 억제한다 (Ondetti and Cushman, 1982).

ACE 저해제로서는 1960년대 *Bothrops jararaca*독사의 독에서 BPFs (bradykinin potentiating factor)가 발견되었고 (Kato and Suzuki, 1969), BPFs 중 nonanpeptide인 SQ20881이 Engel et al. (1972)에 의해서 우수한 ACE저해제로 제시되었다. 1977년 ACE의 강력한 저해제인 captopril이 개발되었고 이후 enalapril, benazepril 등 수종의 ACE저해제가 상품화되어 고혈

*Corresponding author: hgbyun@gwnu.ac.kr

압 치료제로서 이용되고 있다 (Ondetti et al., 1977). 그 밖에 식품관련 ACE저해제에는 단백질 가수분해물, 돼지혈장에서 분리된 펩티드 등의 주로 C말단에 proline을 가지는 펩티드를 들 수 있지만 이들 성분은 천연물이라는 측면에서 안전성이 높지만 합성 ACE저해제인 captopril에 비하여 활성이 1/20에 지나지 않아 보다 강력한 ACE 저해능력을 갖는 천연물질에 대한 탐구가 지속적으로 이루어지고 있다 (Ryu and Shin, 1997). 이와 관련하여 해양생물자원 및 수산가공부산물 유래의 단백질 가수분해물로부터 분리한 ACE 저해 펩티드의 연구로서는 tuna frame (Lee et al., 2010), canola meal (Jianping et al., 2009), algae waste (I-Chuan et al., 2009) 및 sardinelle (*Sardinella aurita*) (Ali et al., 2008) 등이 있으며, 이들 ACE 저해 펩티드의 아미노산 배열을 밝히고, 이를 기초로 펩티드를 화학적으로 합성하여 ACE 저해효과에 미치는 펩티드들의 C 및 N 말단 아미노산의 영향에 대한 보고가 있다 (Je et al., 2007).

동해안의 대표적인 수산자원인 오징어는 다양한 가공식품의 원료로 이용되고 있다. 최근 시장에서 오징어는 소비용도가 다양하여 일반 가정과 외식산업용으로서 생선회 또는 조리반찬 등의 재료로 사용되며 이외에 체오징어, 훈제 오징어, 건오징어, 젓갈 및 통조림 등의 식품가공용으로서 이용되고 있으며, 통조림 및 낚시 미끼 등으로 다양하게 이용되고 있다 (Lee et al., 1998).

오징어를 처리할 때 발생되는 껍질, 식도, 위장, 아가미, 신장, 생식선 및 간장 등의 부산물은 단백질과 같은 유용한 성분이 함유되어 있지만 식용화 하기에는 많은 문제점이 있어 보통 사료원으로 이용되거나 일부는 폐기되어 수질오염을 야기 시키고 있다. 버려지고 있는 오징어 껍질에는 콜라겐단백질이 함유되어 있기 때문에 효과적으로 회수하면 건강 기능성 식품 및 화장품 분야에서 유용하게 활용될 수가 있다.

오징어의 이용에 관한 연구는 주로 일본에서 많이 이루어지고 있으며, 건조 및 가공식품 연구에서 건강기능성 소재 분야까지 연구가 진행되어 오고 있다. 또한 오징어의 뼈 (Wang et al., 2009), 껍질 젤라틴 (Giménez et al., 2009), 및 근육 (Rajapakse et al., 2005)으로부터 항고혈압 및 항산화에 관한 연구가 보고되어 있다.

본 연구에서는 동해안의 주요 수산물인 오징어 가공 과정에서 발생되는 껍질로부터 단백질 가수분해물을 제조하고, 그 가수분해물로부터 ACE 저해 펩티드를 분리 정제하여 그 특성을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 오징어 (*Todarodes pacificus*) 껍질은 2010년 6월, 강릉시 주문진항에서 구입하여 사용하였다. 오징어 껍질을 가수분해하기 위해 사용된 효소로 Alcalase와 Neutrase은 Novozyme사 (Denmark)에서 구입하였고, α-chymotrypsin, trypsin, papain은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, pepsin은 Junsei사 (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 오징어껍질 가수분해물로부터 ACE 저해 펩티드를 정제하기 위하여 HPLC (Agilent 1100, California, USA)를 사용하였으며, 펩티드를 분리 정제하는데 필요한 HPLC용 acetonitrile은 J.T. Baker사 (USA)에서 구입하였고, HPLC column은 YMC C_{18} column (Kyoto, Japan)을 사용하였다. ACE 저해활성 측정에 사용된 ACE와 기질로서 Hippuryl-Histidyl- Leucine (HHL)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였으며, 그 밖의 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

오징어 껍질의 아미노산 조성 분석

오징어껍질의 아미노산 조성은 AOAC (1990)방법에 따라 시료 50 mg을 정평하여 ampoule에 넣고, 6 N HCl 2.0 mL를 가하여 110℃에서 24시간 가수분해하였다. 가수분해액을 glass filter로 여과하고 감압 건조하여 HCl을 제거한 후, 아미노산 자동분석기용 sodium citrate buffer (Na^+ form, pH 2.2)로 25 mL 정용하였다. 이 중 일부를 취하여 아미노산 자동분석기 (L-8800, Hitachi사, Japan)로 분석하였다.

단백질 가수분해효소를 이용한 오징어 껍질 가수분해

오징어 껍질의 단백질 가수분해는 산업적 상용 효소인 alcalase (from *Bacillus licheniformis*, 2.4 AU/g), α-chymotrypsin (from bovine pancreas, 40~60 units/mg protein), neutrase (from *Bacillus amyloliquefaciens*, 1.5 AU/g), papain (from papaya latex, 1.5~10 units/mg), pepsin (from porcine gastric mucosa, 400~800 units/mg protein) 및 trypsin (from porcine pancreas, 1,000~2,000 units/mg solid)을 사용하여 실시하였다.

오징어 껍질의 가수분해는 잘게 절단된 생시료의 단백질 함량이 1 g이 되도록 하여 수행하였다. 정평한 시료에 100 mL 완충용액에 넣고 항온조에서 1시간 방치 후, 기질:효소비가 100:1이 되도록 효소를 가하여 6시간 동안 반응시켰다.

가수분해도 측정은 Kim et al. (1990) 이 언급한 방법에 따라 가수분해물 1 mL를 95℃의 물중탕에서 5분간 열처리하여 효소를 불활성화 시킨 다음 20% trichloroacetic acid (TCA)용액 1 mL를 가하여 30분간 방치 후, 반응액은 원심분리 (3000 rpm, 10 min)하여 침전물을 제거하였다. 원심분리 후 얻어진 상층 (징)액의 단백질 정량은 Lowry et al. (1951) 법으로 측정하였으며, 다음 계산식을 이용하여 가수분해도를 구하였다.

$$\text{가수분해도 (\%)} = \frac{\text{가용성 단백질 함량}}{\text{총 단백질 함량}} \times 100$$

오징어 껍질 가수분해물의 ACE 저해활성 측정

오징어 껍질 가수분해물의 ACE 저해활성 측정은 Cushman과 Cheung (1971)의 방법에 준하여 측정하였다. 오징어 껍질 가수분해물 50 μL에 ACE 효소액 50 μL를 가한 후, 37℃에서 10분간 항온처리 하였다. 반응액에 기질인 50 mM HHL용액

100 μL를 가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후, 1 N HCl용액 0.25 mL를 가하여 시험관 혼합기로 교반하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate 0.5 mL를 가하여 교반한 다음, 원심분리 (5,000 rpm, 10 min)시켜 상층액 (ethyl acetate층) 0.2 mL를 분취하였다. 이 분취액을 건조기에서 80℃로 완전히 건조시킨 후 증류수 0.5 mL를 가하여 용해시켜, 분광광도계 (JASCO, V-550)로 흡광도 (228 nm)를 측정하였다. ACE 저해활성은 다음 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \frac{C - S}{C - B} \times 100$$

C : Control absorbance
B : Blank absorbance
S : Sample absorbance

Control 및 blank 군은 가수분해액 대신 증류수 50 μL를 가하여 실험하였으며, ACE 저해 활성은 저해 활성이 50%일 때의 저해제 농도인 IC_{50}값으로 나타내었다.

ACE 저해 펩티드의 분리 및 정제

오징어 껍질 가수분해물로부터 ACE 저해 펩티드를 분리정제하기 위하여, Sephadex G-25 gel column chromatography 및 HPLC (Agilent 1100, USA)를 이용하여 분리정제하였다. 먼저 겔여과는 Sephadex G-25를 충진한 column (∅ 2.5 × 75 cm)에 100 mg/mL의 가수분해물 용액 2.0 mL를 주입하고, 용매인 증류수를 1.5 mL/min으로 용리하였다. 분획량은 7.5 mL로 조절하였으며, 분리된 각 획분은 분광광도계 215 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 분획물들은 동결건조한 후, ACE 저해활성을 측정하였다. ACE 저해활성이 가장 높은 분획물은 HPLC에서 YMC C18 column (5 μm, ∅ 10 × 250 mm)을 사용하여 ACE 저해 펩티드를 분리정제하였다. HPLC에서 용리액은 이동상으로 증류수와 acetonitrile를 사용하였으며, 선형상 농도구배법으로 50분 동안 2.0 mL/min의 유속으로 분획된 용출액을 215 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 획분은 동결건조를 실시한 후, 일정량을 정평하여 ACE 저해활성을 측정하였다. ACE저해활성이 가장 좋은 획분은 동일한 column으로 재 분리하여 단일 획분으로 분리정제하였다.

ACE 저해 펩티드의 아미노산 서열 분석

ACE 저해 펩티드의 분자량은 liquid chromatography-massspectrometry (LC-MS)를 이용하여 electrospray ionization (ESI)방법으로 측정하였다. 또한 아미노산 서열 분석은 Q-TOF 2 Mass Spectrometer (Micromass, Manchester, UK)를 이용하여 Mass Spectrometry에 의하여 실시하였다.

ACE 저해 펩티드의 저해패턴

ACE 저해 펩티드의 저해 패턴은 기질농도에 따른 반응속도를 측정하여 결정하였다. 반응속도를 측정하기 위해 반응액내에 효소와 기질 반응활성을 측정하였으며, Lineweaver-Burk plot을 통하여 산출하였다.

결과 및 고찰

아미노산 조성

오징어 껍질의 아미노산 조성비를 분석한 결과, 주요 아미노산은 glycine (19.62%), alanine (9.45%) 및 aspartic acid (8.48%)로 나타났으며, taurine의 구성비는 2.89%으로 나타났다 (Table 1). Taurine은 식품음료 및 화장품 산업에서 유용한 물질로 널리 이용되고 있으며 (Janeke et al., 2003), Cho et al. (2000) 연구에서 오징어 근육내의 taurine의 조성비는 16.01%로 높은 비율을 갖고 있는 것으로 보고되었다. 본 연구결과와 비교하였을 때, Cho et al. (2000) 연구의 오징어 근육내의 taurine 비율에 오징어 껍질의 taurine 조성비가 낮게 나타났으며, 이는 오징어근육과 껍질의 아미노산 조성 비율에 차이가 있었다.

Table 1. Optimum hydrolysis conditions of squid skin hydrolysates obtained by various enzymes

Enzyme	Buffer	Optimum conditions	
		pH	Temperature (℃)
Alcalase	50 mM S.P*	7.0	50
α-Chymotrypsin	50 mM S.P	7.0	37
Neutrase	50 mM S.P	7.0	50
Trypsin	50 mM S.P	7.0	37
Papain	50 mM S.P	7.0	37
Pepsin	20 mM G.H*	2.0	37
Trypsin	50 mM S.P	7.0	37

S.P*; 50 mM Sodium phosphate buffer.
G.H*; 20 mM Glycine-HCl buffer.

오징어 껍질에는 풍부한 양의 콜라겐이 존재하며, 오징어 껍질로부터 추출한 콜라겐의 아미노산 조성에 관한 많은 연구가 보고되었다. Giménez et al. (2009)의 연구에 따르면, 오징어 껍질로부터 추출된 콜라겐의 주요 아미노산은 glycine, alanine, arginine 및 imino acids인 proline과 hydroproline으로 보고되고 있다. 또한 콜라겐은 어류에 껍질에도 다량 존재하며, 이들의 주요 구성 아미노산은 glycine, leucine 및 proline이다 (Cho et al., 2004) 일반적으로, 어류 및 포유류의 껍질의 아미노산 조성은 그들의 근육의 아미노산 조성에 비하여 glycine, leucine 및 proline 함량이 높다고 알려져 있다 (Gomez-Guillen et al., 2002). 본 연구 결과에서는 유용 단백질인 콜라겐의 주요 구성 아미노산인 glycine 및 leucine이 다량 포함되어 있었으며, proline 및 hydroproline의 비율도 보고된 Gomez-Guillen et al. (2002) 연구결과와 유사하였다.

Table 2. The amino acid composition of squid skin

Amino acids	Contents (%)
Tau	2.89
Asp	8.48
Thr	4.43
Ser	4.78
Glu	8.51
Gly	19.62
Ala	9.45
Val	4.25
Cys	0.81
Met	2.40
Ile	3.50
Leu	6.87
Tyr	2.21
Phe	3.28
Trp	2.21
Lys	6.26
His	1.92
Asn	0.12
Arg	6.40
Pro	0.32
Hypro	1.29
Total	100

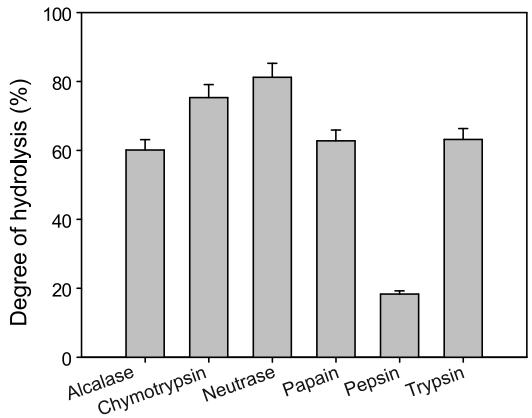

Fig. 1. Degree of hydrolysis of squid skin by various commercial enzymes.

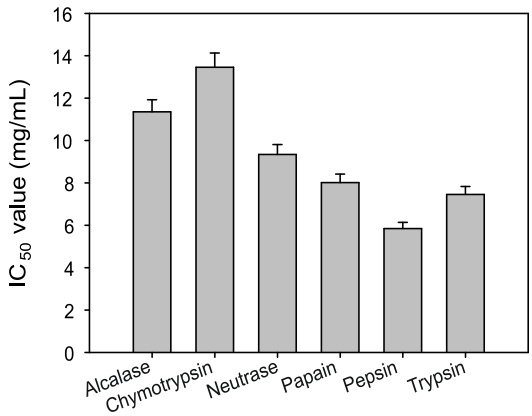

Fig. 2. ACE inhibitory activity of squid skin hydrolysate obtained by various commercial enzymes as IC_{50} vaule (mg/mL).

단백질 가수분해 및 가수분해물의 ACE 저해 활성

오징어 껍질 유래의 단백질 가수분해물의 가수분해도를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 6종의 효소에 의한 오징어 껍질의 가수분해도는 neutrase를 이용하였을 때81.23%로 다른 효소에 비해 가장 높게 나타났다. 각 가수분해물들의 ACE 저해활성은 Fig. 2에서와 같이, pepsin 가수분해물의 IC_{50}값이 5.84 mg/mL로 다른 가수분해물들에 비해 높은 ACE 저해활성을 나타내었다.

오징어껍질과 같은 수산가공부산물은 높은 단백질을 함량을 갖고 있기 때문에, 단백질의 성분과 이를 구성하는 아미노산의 종류 및 함량에 따라 가수분해반응을 통해 다양한 생리활성 펩티드 소재로 전환된다 (Je et al., 2007). 이와 같은 이유로, 단백질의 가수분해 반응을 통하여 생리활성 펩티드에 관한 연구가 다양하게 보고되고 있다. 수산가공부산물인 tuna frame (Lee et al., 2010) 및 algae waste (I-Chuan et al., 2009)은 pepsin을 이용하여 제조된 가수분해물의 항고혈압성이 우수하였다. 가수분해에 이용되는 효소 중에 pepsin은 펩티드 내에서 phenylalanine 및 tyrosine과 같은 방향족 아미노산이 있는 부분을 절단하며, N말단에 위치한 leucine 및 proline을 절단하지만 valine, alanine, glycine과 같은 아미노산이 있는 부분은 분해하지 못하는 가수분해효소이다 (Berstad, 1970). 이러한 특징을 나타내는 pepsin에 의하여 생산된 가수분해물은 이를 구성하고 있는 아미노산에서 특이적인 서열을 갖게 되며, 아미노산 서열에 따라 다양한 생리활성 갖는 것으로 보고되고 있다 (Je et al., 2007).

ACE 저해 펩티드의 분리정제

ACE 저해활성이 가장 우수한 pepsin 가수분해물로부터 ACE 저해 펩티드를 분리정제하기 위해 size exclusion 특징을 갖은 Sephadex G-25 column를 이용하여 분리정제 결과는 Fig. 3 (A)에 나타내었다. 용리된 각 획분을 동결건조한 후 일정량 정평하여 ACE 저해활성을 측정한 결과는 (Fig. 3 (B))에 나타내었다. Sephadex G-25 column에서 분리된 6개의 획분 (F1~F6) 중 F4 획분의 ACE 저해활성이 가장 우수하였다. F4 획분은 ODS column을 사용하여 HPLC에서 분리정제 하여, 그 결과를 Fig. 4 (A)에 나타내었다. HPLC에서 분리된 각 분획물의 흡광도를 측정한 결과, 9개 (A～I)의 획분으로 분리되었다. 분리된 각 획분은 동결건조한 후 ACE 저해활성을 측정하였으며, 획분 C의 IC_{50} 값이 1.30 mg/mL로 다른 획분과 비교하여 가장 높게 나타났다 (Fig. 4 (B)). ACE 저해활성이 가장 높은 획분 C는 HPLC에서 재 분리정제되었다. Miyoshi et al. (1991)의 보고에 따르면 ACE 저해 펩티드의 C말단에 소수성 아미노산 및 방향족 아미노산이 존재할 때 강력한 ACE 저해활성을 나타낸다는 보고가 있기 때문에 소수성 아미노산의 최대 흡수파장인 280 nm에서 각 획분의 흡광도를 측정하였으며, Fig 5에서와 같이 C-4의 단일획분을 얻었다. 분리정제된 C-4의 IC_{50} 값은 0.22 mg/mL로 나타났다. Do et al. (2006)은 어육 펩티드의 항고혈압 효과 연구에서 멸치 육의 유래의 ACE 저해 활성성분의 IC_{50} 값은 0.16 mg/mL이며, 명태육의

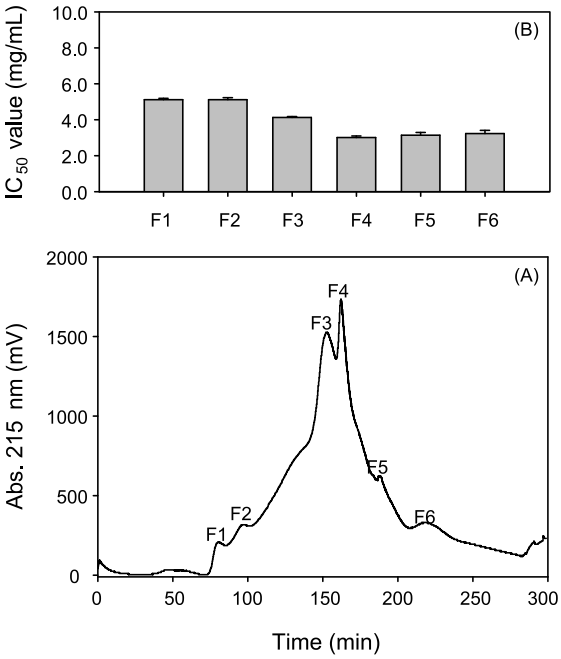

Fig. 3. Sephadex G-25 gel filtration chromatogram of hydrolysates prepared with peptic hydrolysate (A). Separation was performed with 1.5 mL/min and collected at a fraction volume of 7.5 mL. The fractions isolated by Sephadex G-25 Gel column were separated (F1~F6) and ACE inhibitory activity determined as upper panel (B).

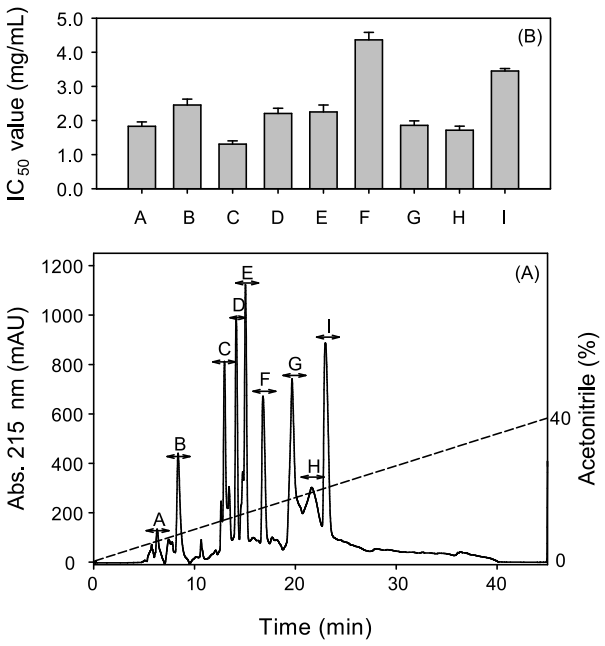

Fig. 4. HPLC chromatogram of potent ACE inhibitory F4 isolated from Sephadex G-25 (A). Separation was performed with linear gradient of acetonitrile from 0% to 40% for 50 min at a flow rate of 2.0 mL/min and YMC C_{18} ODS column (5 μm, 10 × 250 mm). Elution was monitored at 215 nm. (B) The fractions showing ACE inhibitory activity were designated A~I and IC_{50} (mg/mL) were determined as the upper panel.

유래의 ACE 저해 활성성분의 IC_{50}은 0.15 mg/mL로 보고하였으며, Suh et al. (1998)의 연구에서는 오징어 육 가수분해물 유래의 ACE 저해 펩티드의 IC_{50} 값이 0.6 mg/mL로 보고하였다. 이는 오징어 껍질 유래의 ACE 저해 펩티드의 IC_{50} 값은 0.22 mg/mL로 앞선 연구와 유사한 ACE 저해활성을 나타내었다.

본 연구에서 ACE 저해 펩티드의 활성은 pepsin 가수분해물에 비하여 분리정제 단계별로 증가하였으며 (Table 3), 최종 분리정제된 C-4 획분의 ACE 저해활성값은 pepsin 가수분해물에 비하여 26.6배 증가하였다. 분리정제단계에 따른 저해활성값의 증가는 분리정제 단계의 획분에서 유리아미노산 및 불순물이 제거되기 때문이다.

ACE 저해 펩티드의 아미노산 서열 및 분자량

HPLC에서 분리정제된 C-4 획분의 분자량 및 아미노산 서열을 분석한 결과, 분자량은 657 Da 이였으며, 아미노산 서열은 Ser-Ala-Gly-Ser-Leu-Val-Pro의 7개의 아미노산 잔기로 구성되어 있었다 (Fig 6). 최종 분리정제된 ACE 저해 펩티드의 IC_{50}값은 766.2 μM로 나타났다. 어류의 부산 물로부터 분리정제된 ACE 저해 펩티드를 살펴보면, tuna frame (Lee et al.,

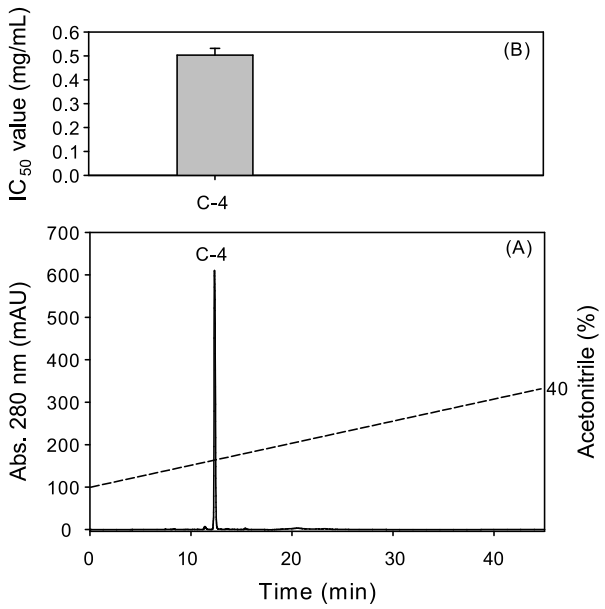

Fig. 5. The reverse-phase HPLC pattern of active fraction C on a C_{18} column (particle size, 5 mm; 4.6 × 250 mm) eluted at a flow rate of 0.5 mL/min.

Table 3. Purification of inhibitors of ACE from squid skin

Fraction	Step	IC_{50} value (mg/mL)	Purification fold*
Pepsin hydrolysate	Hydrolysis	5.84	1.00
F4	Sephadex G-25	2.49	2.34
C	C_{18} ODS column	1.30	4.49
C-4	C_{18} ODS column	0.22	26.54

*Relative value of reciprocal of ACE inhibitory activity by IC_{50} value.

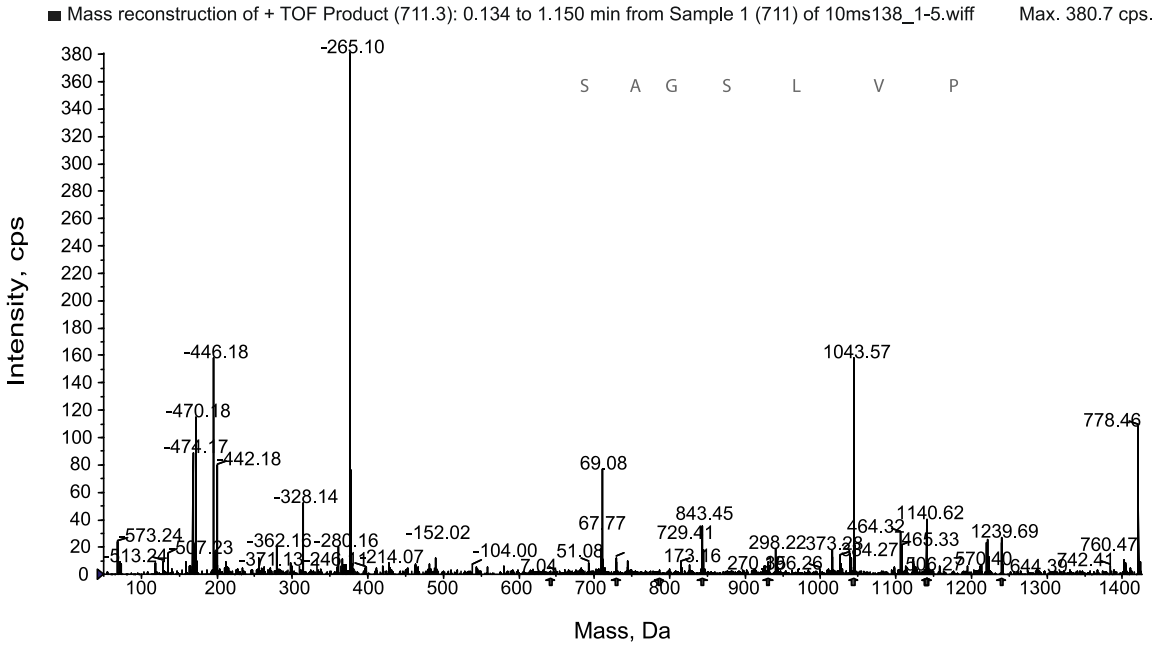

Fig. 6. Identification of molecular mass and amino acid sequence of the purified peptide from squid skin peptic hydrolysate by HPLC. MS/MS experiments were performed on a Q-TOF tandem mass spectrometer equipped with a nano-ESI source.

2010)은 Gly-Asp-Leu-Gly-Lys-Thr-Thr-Thr-Val-Ser-Asn-Trp-Ser-Pro-Pro-Lys-Try-Lys-Asp-Thr-Pro의 21개의 아마노산으로 구성되어 있었고, cuttlefish (Balti et al., 2010)는 Val-Tyr-Ala-Pro, Val-Ile-Ile-Phe 및 Met-Ala-Trp로 나타났다. Tuna frame 및 cuttlefish 유래의 ACE 저해 펩티드의 아미노산 서열에서 공통적으로 C말단 위치에서 proline 및 phenylalanine이 존재하였으며, proline 및 phenylalanine이 존재하는 펩티드의 ACE 저해활성이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 본 연구결과와 비교하였을 때, 오징어 껍질에서 분리된 ACE 저해 펩티드의 아미노산 서열에서도 C말단에 proline이 존재하였다.

해양생물 이외에 육상생물에서도 ACE 저해 펩티드의 분리정제에 관한 다양한 연구가 보고되고 있으며, 옥수수 글루텐 유래의 항고혈압 펩티드 (Oh et al., 2003)는 본 연구 결과와 유사한 아미노산 서열인 Ser-Pro-Pro-Pro-Phe-Tyr-Leu 및 Ser-Gln-Pro-Pro으로 이루어져 있는 것으로 밝혀졌다. 보고된 ACE 저해 펩티드의 아미노산 서열과 비교하였을 때, 본 연구에서 분리된 ACE 저해 펩티드에서도 serine 및 proline이 많이 포함되어 있었다. Yoshiyuki et al. (1994)의 보고에 따르면 ACE 저해 펩티드는 proline을 많이 포함하고 있다는 것과 일치하였다. Kim et al. (1996)에 의하면, 효소 가수분해물의 ACE 저해활성은 가열이나 효소에 의한 단백질 가수분해시 생성되는 저분자 펩티드의 길이나 구조 및 구성 아미노산의 종류나 배열순서 등 복합적인 작용에 의해 나타난다고 보고하였다. 일반적으로 tri-, tetra- 펩티드들은 경구 투여시 체내 가수분해효소에 대하여 분해율이 적고, 안전성이 뛰어나며 소장에서 쉽게 소화된다고 알려져 있다 (Cushman et al., 1979). 그리고 생리활성이 동일한 펩티드 중에서 저분자량의 펩티드가 체내의 부작용의 위험이 적어 안전하다는 보고가 있다. 자연계의 단백질에는 tri-, tetra- 펩티드의 존재 확률이 매우 적다. 그러므로 오징어 껍질로 분리정제된 ACE 저해 펩티드는 저분자량이며, C말단에 proline를 가지고 있으므로 생리활성 및 체내의 안전성이 우수하여 기능성 식품 소재로 이용가능성이 높을 것으로 사료되었다.

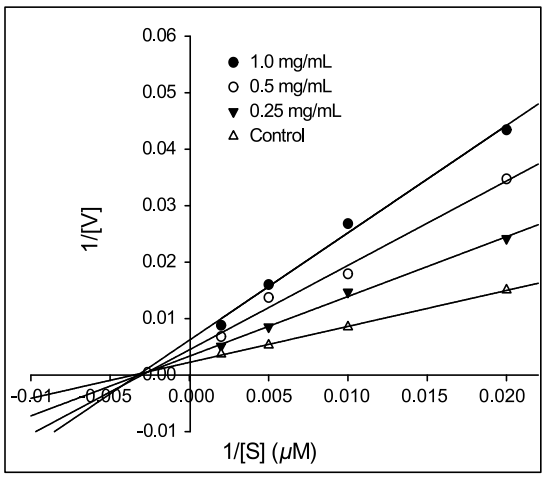

Fig. 7. Lineweaver-Burk plots of ACE inhibition by the purified peptide from squid skin.

ACE 저해 펩티드의 저해패턴

ACE 저해 펩티드의 저해 패턴은 비경쟁적 저해 (non-competitive inhibition)로 나타났다 (Fig. 7). 비경쟁적 저해는 저해제가 기질과 유사성이 없어 효소의 활성부위가 아닌 다른 부위에 결합하여 효소의 분자 구조를 변화시킴으로서 효소활

성을 감소시키는 저해형태를 말한다 (Teipel and Hill, 1968). Tuna frame (Lee et al., 2010) 및 cuttlefish (Balti et al., 2010) 유래의 ACE 저해 펩티드는 오징어 껍질로부터 분리정제된 ACE 저해 펩티드와 동일하게 비경쟁적 저해패턴을 나타내었다. 일반적으로 ACE 저해 펩티드는 아연 결합 ligand, hydrogen 결합 및 C말단의 아미노산 그룹과 같은 여러 개의 작용부위를 가지고 있다 (Andrews, Carson, Caselli, Spark and Woods, 1985). 오징어 껍질 유래의 ACE 저해 펩티드는 보고된 ACE 저해 펩티드가 가지고 있는 아미노산 서열의 C말단에서 강력한 ACE 저해 활성을 나타내는 아미노산인 tyrosine, phenylalanine, proline 중 proline이 존재하였다. Cheung et al. (1980)의 연구에 따르면, C말단 잔기로서는 tyrosine, phenylalanine, proline을, N말단 잔기로는 valine과 isoleucine을 가지는 di-펩티드가 높은 ACE 저해활성을 가진다. C말단에 존재하는 tyrosine, phenylalanine, proline 및 소수성 아미노산은 강력한 ACE 저해활성을 나타내는데, 그 이유는 ACE에 존재하는 3개의 효소활성부위인 S1, S'1 및 S'2에 강력하게 결합하기 때문이다 (Pihlanto, 2000). 본 연구 결과에서, 오징어 껍질로부터 분리정제된 ACE 저해 펩티드는 C말단에 proline를 가지고 있어 ACE 저해활성을 나타내는 것으로서 항고혈압제 및 기능성 식품소재로의 이용성이 높을 것이라 기대된다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부, 강원도, 강릉시, 강릉과학산업진흥원의 연구개발사업으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

Ali B, Naima NA, Rozenn RP, Yves L, Didier G, Ahmed B. and Moncef N. 2008. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. J Agr Food Chem 111, 350-356.

Andrews PR, Carson JM, Caselli A, Spark MJ and Woods R. 1985. Conformational analysis and active site modeling of angiotensin converting enzyme inhibitors. J Med Chem 28, 393-399.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, U.S.A.

Axena PR. 1992. Interaction between the renin-a ngiotensin aldosterone and sympathetic nervous systems. J Cardiovasc Pharm 9, 80-88.

Balti R, Naima NA, Ali B, Didier G and Moncef N. 2010. Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases. Food Res Int 43, 1136-1143.

Berstad A. 1970. "Gastroenterol". Inform a healthcare.com by University of California San Diego. U.S.A., 31-38.

Cheung HS, Wang FL, Miguel AO, Emily FS and David WC. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-Iconverting enzyme. J Biol Chem 255, 401-407.

Cho SH, Michael LJ and Eun JB. 2004. Nutritional composition and microflora of the fresh and fermented skate (*Raja Kenojei*) skins. International J Food Sci Nutri 55, 45-51.

Cushman DW and Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol 20, 1637-1648.

Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Rubin B and Ondetti MA. 1979. Development of specific inhibitors of angiotensin I converting enzyme (kininase II). Fed Proced 38, 2778-2784.

Do JR. 2000. Separation and purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from mackerel. J Korean Fish Soc 33, 153-157.

Do JR, Heo IS, Jo JH, Kim DS, Kim HK, Kim SS and Han CK. 2006. Effect of antihypertensive peptides originated from various marine protein on ACE inhibitory activity and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Korean J Food Sci Technol 38, 567-570.

Engel Sl, Schaeffe TR, Gold BL and Rubin B. 1972. Inhibition of pressure effects of angiotensin I and augmentation of pressure effects of bradykinin by synthetic peptides. Proc Soc Exp Biol Med 140, 240-245.

Gime´nez B, Go´mez-Estaca J, Alema´n A, Go´mez-Guille´n MC and Montero MP. 2009. Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. Food Hydrocolloid 23, 1322- 1327.

Gomez-Guillen MC, Yurnay J, Fernandez-Diaz MD, Ulmo N, Lizarbe MA and Montero P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted form different marine species: a comparative study. Food Hydrocolloid 16, 25-34.

I-Chuan S, Fang TJ and Wu TK. 2009. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. J Agr Food Chem 115, 279-288.

Janeke G, Siefken W, Carstensen S, Springmann G, Bleck O, Steinhart H, Höger P, Wittern KP, Wenck H, Stäb

F, Sauermann G, Schreiner V and Doering T. 2003. Role of taurine accumulation in keratinocyte hydration. J Invest Dermatol 121, 354-61.

Je JY, Qian ZJ, Byun HG and Kim SK. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochem 42, 840-846.Jeong S.H. 1994. Angiotensin converting enzyme and its inhibitors. Medicine Information 9, 152-158.

Jianping W, Rotimi EA and Alister DM. 2009. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from defatted canola meal. Bioresource Technol 100, 5283-5287.

Kato H. and Suzuki T. 1969. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of Agkistrodon halys blomhoffii. Experientia 25, 694-695.

Kim JS, Kim JG and Cho SY. 1997. Screening for the raw material of gelatin from the skin of some pelagic fishes and squid. J Korean Fish Soc 31, 55-61

Kim SY, Park PSW and Rhee KC. 1990. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. J Agric Food Chem 38, 651-656.

Kim TJ, Yoon HD and Lee DS. 1996. Angiotensin Ⅰ converting enzyme inhibitory activity of hot-water extract and enzymatic hydrolysate of fresh water fish. J. Korean Soc. Food Sci Nutri 25, 871-877.

Kristinsson HG and Rasco, B.A. 2002 Fish protein hydrolysates and their potential use in the food industry. Recent Adv Mar Biotechnol 7, 157-181.

Lee KS, Kim YB, Park KY, You BJ, Jeon JK and Jeong IH. 1998. Effects of Diet Supplimented with Squid Intestine on Growth and Body Composition of the Catfish (*Parasilurus asotus*). J Korean Fish Soc 31, 31-36.

Lee SH, Qian ZJ and Kim SK. 2010. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. J Agr Food Chem 118, 96-102.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. J Biol Chem 193, 265-275.

Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka H and Maruyuma S. 1991. Structures and activity of angiotensin converting enzyme inhibitor in an α-zein hydrosate. Agric Bial Chem 55, 1313-1318.

Oh KS, Lee DG, Hong JU and Sung HC. 2003. Peptide inhibitors for angiotensin I converting enzyme from corn gluten digests. Kor J Microbiol Biotechnol 31, 51-56.

Ondetti MA and Cushman DW. 1982 Enzyme of the renin-angiotensin system and their inhibitors. Ann Rev Biochem 51, 283-308.

Ondetti MA, Rubin B, and Cushman DW. 1977 Design of specific inhibitors of angiotensin. Science 196, 441-444.

Pihlanto L. 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE inhibitory. Trends Food Sci Tech 11, 347-356.

Rajapakse N, Mendisa E, Byun HG and Kim SK. 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. J. Nutri Biochem 16, 562-569.

Ryu IW and Shin YS. 1997 Inhibition effect of ACE (angiotensin converting enzyme) and kinetics of aloe acethyl mannan. Korean J Food Sci Technol 29, 1269-1274.

Teipel JW and Hill RL. 1968. The number of substrate-and inhibitor-binding sites of fumarase. J Biol Chem 21, 5679-83.

Tharanathan RN. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. Trend. Food Sci Technol 14, 71-78.

Wang SL, Lin CL, Liang TW, Liu KC and Kuo YH. 2009. Conversion of squid pen by Serratia ureilytica for the production of enzymes and antioxidants Bioresource Technol 100, 316-323.

Yoshiyuki S, Keiko W, Akitsugu K and Satoshi I. 1994. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees, Biosci Biotech Biochem 58, 1767-1770.

2011년 2월 25일 접수
2011년 4월 7일 수정
2011년 4월 12일 수리