

국산콩단백질에서 분자가공에 의한  
항콜레스테롤 펩타이드 생산

Production of Hypocholesterolemic Peptides from  
Domestic Soy Protein by Molecular Processing

연구기관  
한국식품연구원

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국산콩단백질에서 분자가공에 의한 항콜레스테롤 펩타이드  
생산연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 12월

주관 연구기관 : 한국식품연구원  
총괄연구책임자 : 권 대 영  
연 구 원 : 윤 석 후

# 요 약 문

## I. 제 목

국산콩단백질에서 분자가공에 의한 항콜레스테롤 펩타이드 생산

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내산 콩의 낮은 자급률은 국산콩의 높은 가격 (국산콩 2000원/kg, 수입콩 700원/kg)에 따른 경쟁력 저하와 이에 따른 콩 재배면적의 감소와 콩의 낮은 단보당 수익률 등에 기인한다. 이와 같이 국산콩은 가격적인 측면에서 수입산에 비해 그 격차가 5~6배 차이가 나므로 국산콩의 경쟁력을 향상시켜 자급율을 끌어올리기 위하여서는 무엇보다도 국산콩으로 만든 고부가가치화 식품을 과학적으로 개발하여 소비를 적극적으로 유도해야 할 필요가 있다. 최근 genome 연구가 활발해지면서 콩단백질의 유전자지도 (DNA map)가 완성되어가고 있다. 따라서 콩단백질의 아미노산배열순서도 (amino acid sequence map)도 완성되어가고 있다. 따라서 전체 단백질의 아미노산 배열순서를 알고 있으므로 본 연구팀이 분리한 특수 기능성펩타이드가 있는 부위도 알 수 있었다. 따라서 이들 알고 있는 정보를 이용하여 특이적인 효소나 다른 물질을 사용하여 분자 level에서 매우 특이적으로 분자가공하여 특수 기능성펩타이드 또는 이를 함유한 분획을 농축할 수 있다. 본 연구의 최종목표는 콩단백질의 genome 연구로 확인된 콜레스테롤저하

펩타이드를 생산하기위한 분자가공 연구를 수행하고 이를 식품에 응용하기 위한 경제적 분자가공조건을 확립하여 최종적으로 식품생산에 활용하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 콩단백질에서 11S 단백질 (glycinine)의 분리방법 개선하고, glycinine 단백질에서 A-B complex 분리하며, 환원작용에 의한 A와 B subunit 분리하고, 전체 glycinine 단백질에서 hypocholesteromic activity 분획 분리한 후, 콜레스테롤 저하 물질 분획을 얻기 위한 분자가공(효소분해 및 농축)한 후 각각의 protease 별로 분해패턴연구와 분획 및 구조 확인함과 동시에 분해조건 확립 (최적 효소 스크리닝, 최적 pH, 온도, 농도 등)을 확립하고자 한다.

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구의 결과 우리나라 전통콩에서 콜레스테롤 저하효과가 있는 펩타이드를 분리 정제하였으며 이의 구조도 밝혀냈다. 이러한 분자가공기술은 앞으로 새로운 기능성 펩타이드의 분리정제에 활용될 수 있으며, subunit A-B의 분리기술 등은 단백질의 구조별 획분별 구조에 따른 펩타이드의 특성을 이용하여 원하는 펩타이드의 생산 농축에도 활용할 수 있다. 또한 콩

단백질의 아미노산배열순서도 (amino acid sequence map)를 알고 있으므로 알고 있는 정보를 이용하여 특이적인 효소나 다른 물질을 사용하여 분자 level에서 매우 특이적으로 분자가공하여 특수 기능성펩타이드 또는 이를 함유한 분획을 농축할 수 있다.

## SUMMARY

I. Title : Production of Hypocholesterolemic Peptides from Domestic Soy Protein by Molecular Processing

The objective of the study is to isolate the hypocholesterolemic peptides from soy protein such as glycinin or A-/B- subunits, which is active for inhibiting the HMG-CoA reductase. And also we investigate how this hypocholesterolemic peptides can be concentrated or isolate efficiently based on the genomic sequence of soy bean protein. For this study, we develop effective isolation method of 11S glycinin protein from soy protein, and A subunit and B subunit was isolate each other from A-B glycinin complex by oxido-reduction reaction. Previously, hypocholesterolemic peptide, sequenced as LPYPR, was isolated and its sequence position was searched in the genomic sequence from map of glycinin of soy protein. For getting the fraction which shows hypocholesterolemic activity against HMG-CoA reductase, peptide fraction was obtained by hydrolyzing the glycinin using substrate specific protease or peptidase so called as molecular processing. Using various proteases, hydrolysis patterns, hydrolyzing conditions such as pH, concentration and temperature were optimized for effective molecular processing.

# CONTENTS

Summary .....	5
Chapter 1. Introduction .....	8
Chapter 2. Materials and Methods .....	21
Chapter 3. Results and Discussion .....	38
Chapter 4. References .....	111

## 목 차

제출문	1
요약문	2
Summary	5
Contents	6
목 차	7
제 1 장 서론	8
제 2 장 재료 및 방법	21
제 3 장 결과 및 고찰	38
제 4 장 참고문헌	111



# 제 1 장 서 론

## 1. 연구개발의 필요성

우리나라 전통콩에서의 추출물이 항암 및 여러 기능이 있는 것으로 알려져 있으나 아직까지 이들 물질의 정확한 획분이나 펩타이드의 구조에 대하여는 알려진 경우는 많지 않다. 다만 본 연구책임자를 중심으로 콩과 두류식품에서 항혈전, 혈압강하 펩타이드를 분리하여 이들 펩타이드의 구조를 확인한 바 있다. 이러한 기술을 식품에서 분자가공기술(molecular processing)이라 한다.

앞으로는 분자적 접근 없이 고기능성식품을 개발하기가 매우 지난하고 첨단기술적 지원없이 개발된 식품소재는 기술적인 측면에서 국제 경쟁력이 없고 식품생명도 오래가지 못할 것이다. 따라서 기능성물질의 구조를 알고 이를 바탕으로 새로운 식품소재를 개발하는 분자가공기술 개발은 모든 식품소재에 적용 가능한 첨단기술이나 아직 우리 농업 및 식품산업에 연구가 매우 부진한 편이다. 실제 분자가공기술에 의한 고부가가치 소재제품이 선진국에서 값비싸게 팔리고 있다.

정부는 오는 2004년까지 식용콩 수요 50만 ton중 50%인 25만ton 자급계획을 수립하였는데 (농림부 발표, 농어민신문, 1999년 2월 22일)(1), 이를 현실화하기 위해서는 다각적인 대책이 필요하다. WTO 체제출범으로 갈수록 국제경쟁화 시대에 우리나라 농업이 살아남는 길은 우리의 기술로 우리나라에서 나는 작물만이 갖는 차별화된 소재의 개발이 필요하다. 이러한 측

면에서 국산 콩에서 이들 기능성을 갖는 펩타이드를 농축하여 식품으로 만드는 고부가가치화하는 우리의 기술로 개발하여야 한다. 또한 장기적인 안목에서 우리 농산물의 국제경쟁력을 갖도록 첨단 기술 개발이 절실하다. 단순한 1차 가공이나 농축 또는 식품제재의 개발로는 WTO 체제에 버티나갈 수 없다. 우리나라 농산물의 가공특성 개발연구는 많이 지원되었으나 본 연구같이 첨단기술개발연구는 많이 지원되지 않아 왔다. 현재 GMO (genetic modified organism) 콩에 국민의 거부감이 매우 팽배하여 있다. 본 연구에서 적용하려는 분자가공기술을 응용한다면 GMO에 대한 유해논란에서 벗어날 수 있어서 콩소비가 늘어날 것으로 보인다. 우리나라 산업 중 반도체 등 일류산업이 많으나 농림가공산업은 첨단 연구사업지원에 상대적으로 인색하여 왔다. 농림어업의 가공산업에 첨단기술개발 사업에 투자하여 장기적인 농업경쟁력을 높일 때다. 분자가공기술을 우리 농산물에 적용하여 먼저 우리 콩단백질을 고부가가치화 경장식이 등 고부가가치화 식품 (병원식, 현재 콩으로 만든 병원식의 연간 매출은 1,000억대 규모로 매년 성장하는 추세임)을 개발하여 우리기술로 경쟁력있는 제품을 개발하여야 할 것이다.

우리밀 사업도 밀의 1차가공 만으로는 소비를 늘리는데 한계에 부딪쳐 거의 실패한 상태이다. 콩에 있어서도 체계적인 우리콩의 연구와 신기술을 이용한 고부가가치화와 우수성을 입증되지 않을 때는 경쟁력이 없을 것이다.

우리나라 심혈관계질환 발생의 3대 위험인자로 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 고혈압으로 알려져 있으나 이중에서 고 콜레스테롤 혈증이 가장 큰 직접적인 위험인자로 알려져 있다. 연간 혈관계 질환으로 발생하는 의료비의 부담은 연간 20억달러정도 되는 것으로 추정되어 있다. 이러한 의료비

부담을 줄일 수 있는 고기능성 펩타이드 식품 개발이 필요하다. GMO (genetic modified organism) 콩에 기피증으로부터 확실히 벗어나게 하여 콩소비를 획기적으로 증대할 필요가 있다. 국내산 콩의 낮은 자급률은 국산 콩의 높은 가격 (국산콩 2000원/kg, 수입콩 700원/kg)에 따른 경쟁력 저하와 이에 따른 콩 재배면적의 감소와 콩의 낮은 단보당 수익률 등에 기인한다. 이와 같이 국산콩은 가격적인 측면에서 수입산에 비해 그 격차가 5~6 배 차이가 나므로 국산콩의 경쟁력을 향상시켜 자급율을 끌어올리기 위하여서는 무엇보다도 국산콩으로 만든 고부가가치화 식품을 과학적으로 개발하여 소비를 적극적으로 유도해야 할 필요가 있다.

본 연구책임자는 두류식품에서 혈압강하 펩타이드를 분리하여 아미노산 배열 순서를 확인한 바 있다. 또한 전통 된장에서의 혈압강하 펩타이드를 분리하여 그 구조를 확인하였으며, 대두단백질 분해물로부터 항혈전 기능이 있는 펩타이드를 2D electrophoresis 등 여러 column을 이용하여 분리하였으며 그 1차구조를 확인하였다.

외국에서는 콩단백질의 구조에 대하여 꾸준한 연구가 이루어져 콩단백질 중 11S의 구조가 이미 밝혀졌다. Glycinin 은 분자량 360 kDa 의 hexamer로 되어 있으며 하나의 subunit은 A-SS-B 구조를 갖고 있으며, 34-44 kDa의 acidic polypeptide 와 20 kDa정도의 basic polypeptide 의 두 polypeptides 는 single disulfide bond 로 연결되어 있다. Glycinin 5개 major subunits 는 A1AB2, A1BB1B, A2B1A, A3B4, A5A4B3 로 분리할 수 있다. 이 5개의 subunit 는 physical property 를 기초로 하여 다른 2개의 groups 으로 나눌 수 있다. acidic and basic polypeptide component 가 single disulfide bond 로 연결되어 있다. 이중 5개의 major subunits는

sequence homology를 기초로하여 2개의 subunit group으로 나눌 수 있다.

최근 게놈(genome) 연구가 활발하여지면서 드디어 콩단백질의 유전자 지도 (DNA map)가 완성되어가고 있다 (표 1). 따라서 콩단백질의 아미노산배열순서도도 (amino acid sequence map) 완성되어가고 있다. (그림 2) 외국에서는 이러한 genome 지도가 완성됨에 따라 post-genomic 연구가 매우 한창 연구되어 신 기능성 물질개발과 농산물의 고부가가치화 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있다.

외국에서는 이러한 genome 지도가 완성됨에 따라 post-genomic 연구가 매우 한창 연구되어 신 기능성 물질개발과 농산물의 고부가가치화 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있다.

국내외에서 콜레스테롤 저하펩타이드에 대한 sequence 위치를 찾고 있으나 아직까지 콩 genome 상에서 아미노산 sequence 위치를 찾은 경우는 없다. (그림 2) 본 연구팀의 예비실험결과 콜레스테롤 저하 효과가 있는 펩타이드는 glycine의 acidic region에 있는 것으로 추측되는데 acidic region중 어느 위치에 있는지는 아직 분명치 않다. (그림 1) 또한 아직까지도 이들 펩타이드를 효과적으로 잘라주고 이들 펩타이드 fraction을 갖는 고부가가치화 기술은 세계 어느 곳에서나 시도되지 못하고 있다. 동시에 이들 펩타이드를 분자가공학적으로 가공하여 농축, 활성은 높일 경우 매우 부가가치가 높아지나 분자가공기술, 단백질 도메인 분리기술, 펩타이드 분획 기술의 부족으로 아직 성공하지 못하고 있다. 이 기술은 기본적인 기술축적 없이는 접근이 불가능하다. 그러나 본 연구팀은 펩타이드분리와 분자가공기술의 know-how가 축적되어 있으므로, 연구에 충분한 지원만 된다면 충분히 성공할 수 있다.

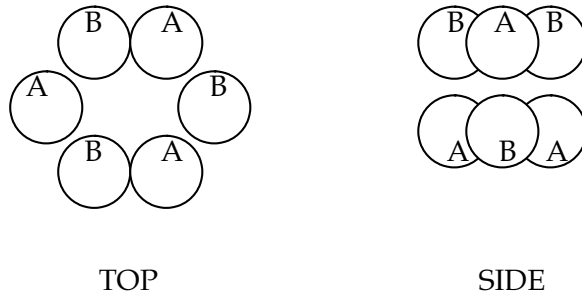


그림 1. Model for glycinin, the major soybean 11S globulin.

A: acidic subunit, B: basic subunit

표 1. Glycinin 의 genome 연구에 대한 자료에 대한 정보

Glycinin	G1	G2	G3	G4	G5
Subunits	A1A, BX	A2, B1 A	A, B	A4, A5, B3	A3, B4
SWISS-PROT	P04776	P04405	P11828	P02858	P04347
GenBank:	M36686	X15122	X15123	X02626	M10962
Amino Acids	A1 287 BX 180	A2 278 B1A 180	A 275 B 180	A4 257 A5 97 B3 185	A3 320 B4 172
Length	495 AA	485 AA	481 AA	562 AA	516 AA
Molecular weight (Da)	55,706	54,391	54,241	63,587	57,956
mRNA Precursor	1743 bp			1899 bp	1786 bp
cDNA Precursor		4617 bp	3573 bp		

Acidic subunits pI 4.8-5.5, basic subunits pI 6.5-8.5

Cho T-J, Nielsen NC (1989) The glycinin Gy3 gene from soybean *Nucleic Acids Res* 17:4388

Fukazawa C, Momma T, Hirano H, Harada K, Udaka K (1985) Glycinin A3B4 mRNA. Cloning and sequencing of double-stranded cDNA complementary to a soybean storage protein *J Biol Chem* 260(10):6234-9

Momma T, Negoro T, Hirano H, Matsumoto A, Udaka K, Fukazawa C (1985) Glycinin A5A4B3 mRNA: cDNA cloning and nucleotide sequencing of a splitting storage protein subunit of soybean *Eur J Biochem* 149:491-6

Nielsen NC, Dickinson CD, Cho TJ, Thanh VH, Scallon BJ, Fischer RL, Sims TL, Drews GN, Goldberg RB (1989) Characterization of the glycinin gene family in soybean *Plant Cell* 1(3):313-28

Staswick PE, Hermodson MA, Nielsen NC (1984a) The amino acid sequence of the A2B1a subunit of glycinin *J Biol Chem* 259:13424-30

A1aBx (NiceProt View of SWISS-PROT : P04776 )

60  
MAKLVFSLCFLLFSGCCFAF SSREQPQQNE CQIQKLNALK PD(G)NRISEGG LIETWNPNNK  
120  
PFQCAGVALS RCTLNRNALR RPSYTNGPQE IYIQQKGIF GMIYPGCP(S)ST FEFPQQPQQR  
180  
GQSSRPQDRHQKIYNF(S)REGDLIAVPTGVAWWMYNNEDTPVVAVSIIDTNS LENQLDQMPR  
240  
RFYLAGNQQEQ EFLKYQQEQG GHQSQKKGKQ QEEENEGGSI LSGFTLEFLE HAFSVDKQIA  
300  
KNLQGENEGE DKGAIIVTVKG GLSVIKPPTD EQQQRQEEE EEEDEKPCQ KGKDKHCQRP  
360  
RGSQSKSRRNGIDETICTMR LRHNIGQTSS PDIYNPQAGS VTTATSLDFP ALSWLRLSAE(G)  
420  
FGSLRKNAME VPHYNLNANS IYALNGRALIQVVNCNGERVFDGELQEGR VLIVPQNFVV  
480  
AARSQSDNFEYVSFKTNDTP MIGTLAGANS LLNALPEEVI QHTFNLKSQQ ARQIKNNNPF  
495  
KFLVPPQESQ KRAVA

NiceProt View of SWISS-PROT : P04405 A2B1a

60  
MAKLVLSLCFLLFSGCFALREQAQQNECQIQKLNALKPD(N,G)N RIESEGGFIE TWNPNNKPFQ  
120  
C(S)AGVALSRCTLNRNALRRPSYTNGPQEIIYQQNGIFGMIFPGCPSTYQE PQESQQR(C)GRS  
180  
QRPQDRHQKVHRFREGDLIAVPTGVAWWMYNNEDTPVVAV SIIDTNSLEN QLDQMPRRFY  
240  
LAGNQEQEFLKYQQQQGGSQSQKQKQEE ENEGSNILSG FAPEFLKEAF GVMNQIVRNL  
300  
QGENEEEDSGAIVTVKGGLRV TAPAMRKPQEEDDDDEEE QPQCVETDKG CQRQSKRSRN  
360  
GIDETICTMRLRQNIQNSSPDIYNPQAGS ITTATSLDFP ALW(S)LLKLSAQ YGSLRKNAMEF  
420  
VPHYTLNANSIIYALNGRALVQVNCNGER VFDGELQEGG VLIVPQNFAV AAKSQSDNFE  
480  
YVSFKTNDRPSIGNLAGANS LLNALPEEVI QHTFNLKSQQ ARQVKNNNPF SFLVPPQESQ  
485  
RRAVA



NiceProt View of SWISS-PROT : P11828 AB

60  
MAKLVLSLCFLLFSGCCFAF SFREQPQQNE CQIQRLNALK PDNRIESEGG FIETWNPNNK  
120  
PFQCAGVALSRCTLNRNALR RPSYTNAPQE IYQQGSGIF GMIFPGCPST FEFPQQKGQS  
180  
SRPQDRHQKI YHFREGDLIA VPTGFAYWMY NNEDTPVAVSLIDTNSFQN QLDQMPRRFY  
240  
LAGNQEQEFL QYQPQKQQGGTQSQKGRQQEEENEGGSIL SGFAPEFLEH AFVVDRQIVR  
300  
KLQGENEEEE KGAIIVTKGGLSVISPTTE QQRPEEEEE PDCDEKDKHC QSQRNGIDE  
360  
TICTMRLRHNIGQTSSPDIF NPQAGSITTA TSLDFPALS W LKLSAQFGSL RKNAMFVPHY  
420  
NLNANSIYALNGRALVQVVNCNGERVFDG ELQEGQVLIV PQNFAVAARS QSDNFEYVSF  
480  
KTNDRPSIGNLAGANLLNA LPEEVIQQTFLNRRQARQV KNNNPFSFLV PPKESQRRVV  
481

NiceProt View of SWISS-PROT : P02858 A5A4 B3

60  
MGKPF~~TLSLS~~ SLCLLLSSACFAISSKL(F)NECQLNNLNAL EPDHRVESEG GLIQ~~TWNSQH~~  
120  
PELKCAGVTVSKLTLNRNGLHS(L)PSYS(L)PYPRMIII(V)AQGKGALGV(IGM)AI(F)PGCPE TFE~~PQE(Q)QSN~~  
180  
RRGSR~~SQKQQLQDSHQKIRH~~ FNEGDVLVIPPSVPYWTYNT GDEPVVAISL LDTSN~~FNNQL~~  
240  
DQTPRVFYLA GNP~~DI~~EYPETM~~QQQQQKSHGGRKQGQHQQ~~ EEEEE~~GGSVL~~ SGFSKH~~F~~LAQ  
300  
SFNTNEDIAEKLE(Q)SP~~DDERKQIVTVEGGLS~~ VISPKWQEQQ DEDEDEDEDD EDEQIP~~SHPP~~  
360  
RRPSHGKRE~~QDEDEDEDEDKPRPSRPSQGKR~~NKTG(EQDQD)QDEDEDEDEDQPRKS REWR~~SKKTQP~~  
420  
RRPRQEPRERGCETRNGVE ENICTLKLHE NIARPSRADF YNPKAGRIST LNSLTL~~PALR~~  
480  
QFQLSAQYVVLYKNGIYSPHWNLNANSVIYVTRGQGKVRV VNCQGN~~AVFD~~ GELRRG~~QLLV~~  
540  
VPQNFVVAEQ AGEQGF~~EYIVFKTHHNAVTSYLKDV~~FRAIP SEVLAHSYNL RQSQVSELKY  
562  
EGNWG~~PLVNP~~ ESQ~~Q~~SPRVK VA

NiceProt View of SWISS-PROT : P04347 A3B4

MGKPFFTLSLSSLCLLLLSS ACFAITSSKF NECQLNNLNA LEPDHRVESE GGLIETWNSQ 60  
HPELQCAGVT VSKRTLNRNG SHLPSYLPYP QMIIVVQGKG AIGFAFPGCP ETFEKPQQQS 120  
SRRGSRSQQQ LQDSHQKIRH FNEGDVLVIP LGVPYWTYNT GDEPVVAISP LDTSNFNQQL 180  
DQNPRVFYLA GNPDIHPET MQQQQQQKSHGGRKQGQHRQEEEEGGSVLS GFSKHFLAQS 240  
FNTNEDTAEKLRSPDDERKQ IVTVEGGLSV ISPKWQEVED EDEDEDEEYG RTPSYPPRRP 300  
SHGKHEDDEDEDEEEDQPRPDHPPQRPSRP EQQEPRGRGC QTRNGVEENI CTMKLHENIA 360  
RPSRADFYNP KAGRISTLNSLTLPALRQFGLSAQYVVLYR NGIYSPDWNL NANSVTMTRG 420  
KGRVRVVCQGNVDFGELRRGQLLVVPQNPVAVAEQGGEQGLEVVFKTH HNAVSSYIKD 480  
516  
VERVIPSEVL SNSYNLGQSQ VRQLKYQGNS GPLVNP

그림 2. Glycinin amino acid sequences. Red part : acidic polypeptides,  
Blue part : basic polypeptides

이 기술이 성공적으로 개발된다면 앞으로 인간을 포함한 모든 genome 연구결과가 속속히 발표되고 있으므로 콩을 비롯한 타 농산물의 고부가가치화 연구에 기폭제가 될 것이다. 앞으로 우리나라 농산물도 genome 연구와 관련한 자료를 활용하지 않고 상품화하지 않는 한 고기능성 식품으로 개발하여 수출하는 데 곧 한계에 도달할 것이다. 따라서의 genome 연구에 근거한 분자가공기술의 확립만으로도 우리나라 농업기술 발전에 크게 기여할 것으로 보인다. 외국의 경우는 본 연구와 다른 고기능성 식품을 개발할 때 genome 연구 data를 활용하여 새로운 식품이나 의약품을 개발하는 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있다. 미국과 일본은 농산물의 고부가가치화로 인한 기능성 식품시장의 선점을 위하여 농무성산하 지역연구소(NRRC, SRRC)와 일본 농수산성 산하 NFRI(일본국립식품종합연구소)에서는 매우 많은 연구비가 투자되고 있다.

이 기술은 선진국과 경쟁적으로 수행하고자 하는 과제이므로 이 국산 콩으로부터 콜레스테롤 저하펩타이드 개발기술은 기술도입필요성이 없다. 만일 우리가 연구가 진행되지 못하고 있고 외국에서 기술을 들어온다면 우리는 기술적으로 종속되어 독자기술력을 개발할 수 없고 막대한 royalty를 지불할 뿐만 아니라 국내농산물은 설자리가 없을 것이다.

## 2. 연구의 목표

본 연구는 콩단백질에서 11S 단백질 (glycinine)의 분리방법 개선하고, Glycinine 단백질에서 A-B complex 분리하며, 환원작용에 의한 A와 B subunit 분리하고, 전체 glycinine 단백질에서 hypocholesteromic activity 분획 분리한 후, 콜레스테롤 저하 물질 분획을 얻기 위한 분자가공 (효소분해 및 농축)한 후 각각의 protease 별로 분해패턴연구와 분획 및 구조 확인함과 동시에 분해조건 (최적 효소 스크리닝, 최적 pH, 온도, 농도 등)을 확립하고자 한다.

## 제 2 장 재료 및 방법

### 1. Crude 11S의 분리

근본적으로 콩단백질은 11S (glycinin)과 7S (conglycinin)으로 구성되어 있다. 주로 11S가 대부분을 차지하고 있으며 7S가 그 다음을 차지하고 있다. 따라서 11S와 7S는 비중이나 원심분리 방법을 이용하여 분리하였다. 대두단백질은 glycinin (11S)와 conglycinin (7S)로 대별되는 데 분자량의 크기와 pI의 차이에 따라 다음 (그림 3)과 같은 방법에 따라 column을 쓰지 않고 원심분리 방법에 의하여 분리하였다. 또한 분리효율을 높이기 위하여 Nagano 방법 (그림 4)의 방법에 따라 분리를 시도하였다.

### 2. 추출 방법에 따른 11S enriched fraction의 수율 비교

11S enriched fraction의 추출 방법에 따른 수율 비교에는 그림 5의 3가지 방법을 이용하였다.

### 3. 11S의 순수분리

수율이 향상된 Crude 11S 단백질을 subunit 별로 나누기 위하여 column chromatography 방법에 의하여 순수분리하였다. 탈지대두분을 0.01M  $\beta$ -mercaptoethanol 과 0.02% sodium azide을 함유하는 0.03M Tris

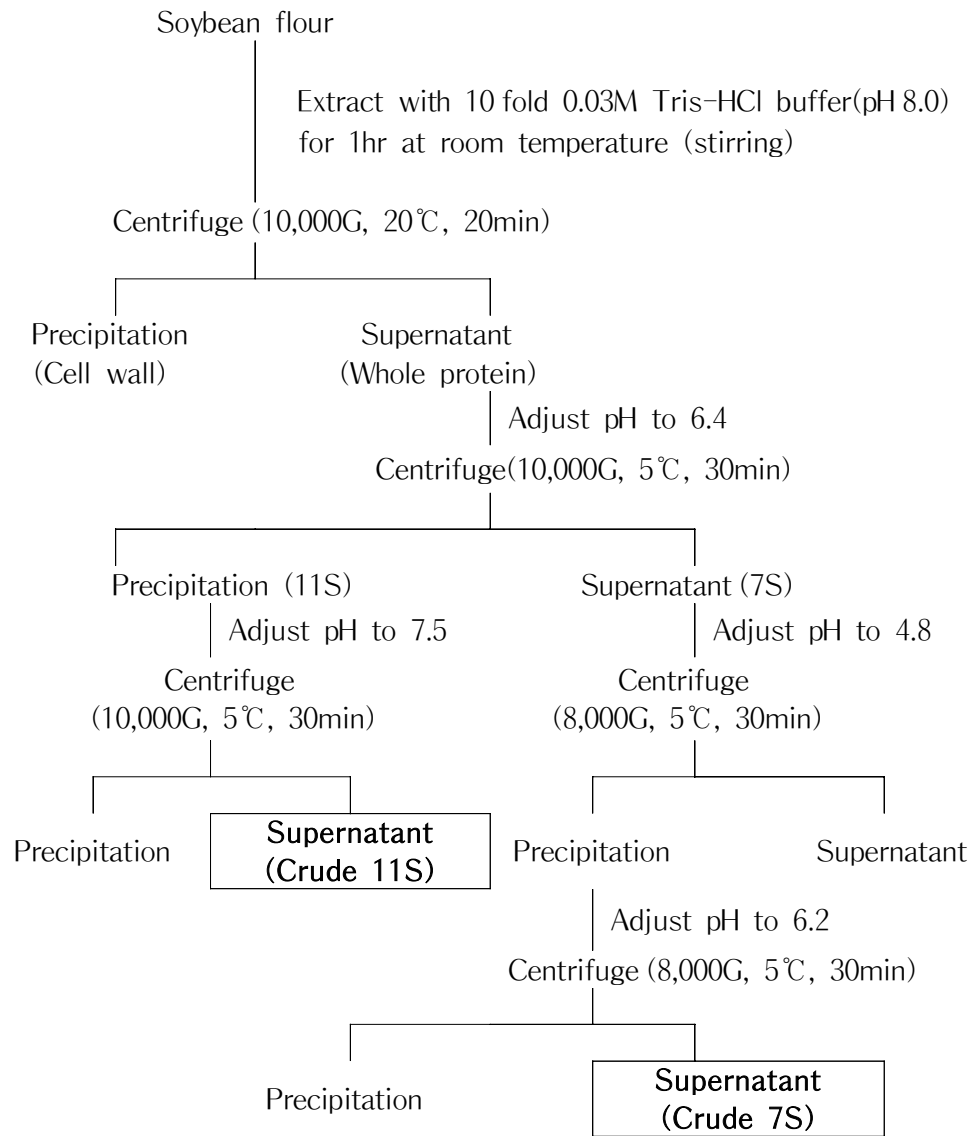


그림 3. The procedure of 11S and 7S purification by Thanh method (Than et al., 1975)

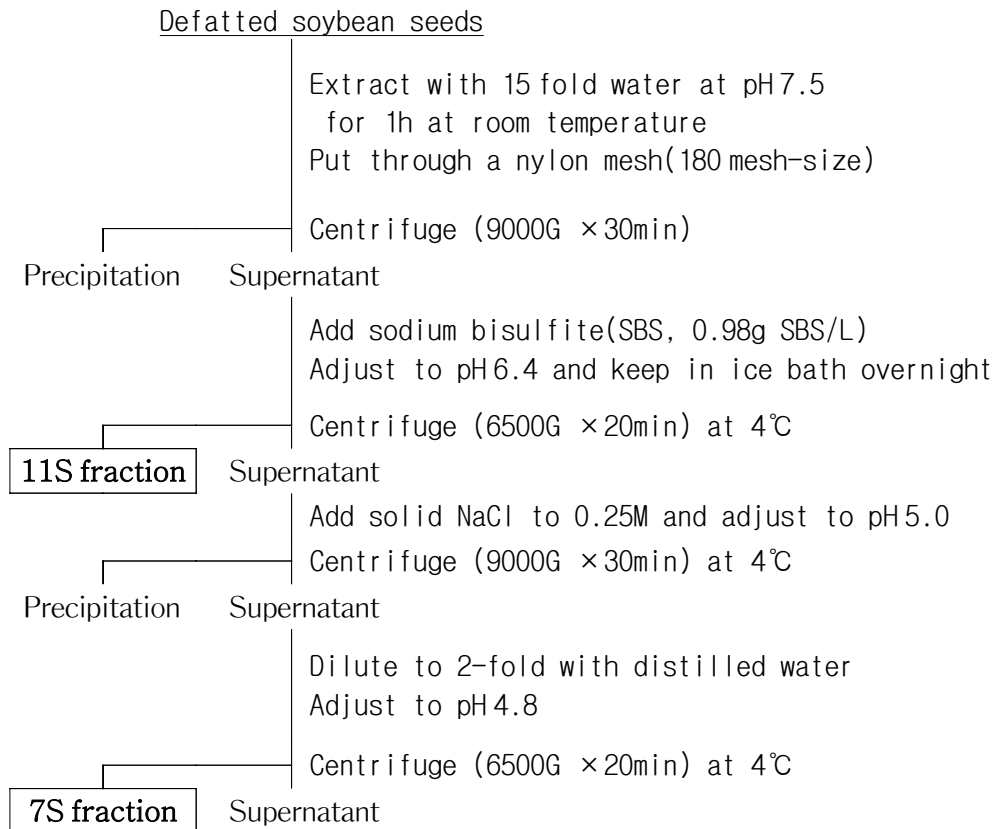


그림 4. Modified purification of 11S and 7S purification by Nagano (1992)



11S enriched fraction의 recovery method에 따른 수율 비교

Aqueous extraction method:

Soy bean flour+DW (1:10, wt:wt) → stirring → pH 7.5 fixing → centrifugation at 8000 rpm for 30 min → supernatant pH 6.4 → overnight at 4°C → centrifugation → precipitate recovery as 11S (시료 10 g +D.W. 100 mL)

Nagano method:

Soy bean flour+DW (1:10, wt:wt) → stirring → pH 7.5 fixing → centrifugation at 8000 rpm for 30 min → addition of sodium bisulfite (0.98g/1L) to the supernatant → pH 6.4 fixation → overnight at 4°C → centrifugation → precipitate recovery as 11S

Thanh Method:

Soy bean flour+0.03M tris-HCl buffer, pH 8.0 (1:10, wt:wt) → stirring → pH 7.5 fixing → centrifugation at 8000 rpm for 30 min → supernatant pH 6.4 → overnight at 4°C → centrifugation → precipitate recovery as 11S

그림 5. 11S enriched fraction의 recovery method에 따른 수율 비교

buffer (pH 7.5)로 상온에서 1시간 suspension 시키고 6,000 rpm으로 원심 분리하여 cell wall을 제거하였다. Supernatant를 pH 6.4로 맞추어 11S protein을 isoelectric precipitation 시켰다. 침전된 precipitate를 10,000 rpm으로 harvest하여 상기에서 사용한 0.03M potassium phosphate buffer (standard buffer)로 washing 하여 crude 11S를 얻었다. Crude 11S protein의 purity는 SDS PAGE의 densitometer scanning으로 확인하였다.

#### (1) Ion exchange chromatography

DEAE Sephadex A-50 chromatography (7×42cm)을 이용하여 분리하였다. 사용한 buffer는 0.03M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 0.01M  $\beta$ -mercaptoethanol) 이었으며, 0.25-0.65M NaCl로 gradient를 걸었으며, flow rate 는 60 ml/hr로 조정하였다. Crude glycinin (11S protein)의 purity를 높이기 위하여 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography를 수행하였다. Activation된 DEAE-Sephadex A-50 resin을 standard buffer에 suspension 시키고, size가 7×45cm인 column에 packing 시켰다. Crude sample protein을 column에 loading 시키고 0.25-0.65M NaCl gradient를 apply하였다. 이때 buffer의 flow rate는 60ml/hr 였으며 각 fraction의 volume은 7ml로 하였다. Column effluents의 protein profile을 280nm로 확인하고 11S protein에 해당하는 fraction을 0.45M sodium chloride을 함유하는 standard buffer로 dialysis 시켜 gel filtration chromatography를 수행하였다.

#### (2) Gel filtration chromatography

Sephrose CL-6B column (4.5×100cm)을 이용하여 11S를 분리하였다. 0.01M  $\beta$ -mercaptoethanol이 함유된 buffer (0.45M NaCl, 0.03M potassium phosphate buffer: pH 7.5)로 15ml/hr 속도로 elution 하였다. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography를 이용하여 얻은 purified 11S protein을 고순도로 정제하기 위하여 gel filtration chromatography를 수행하였다. 본 실험을 위하여 사용된 resin은 Sepharose CL-6B이었다. Column size는 4×90cm였으며 사용한 buffer는 0.45M sodium chloride를 함유하는 standard buffer 이었다. Fraction volume과 flow rate는 각각 7ml, 15ml/hr로 하였다.

### (3) Affinity column chromatography

Concanavalin A (2×25cm) 컬럼을 이용하여 0.45M NaCl, 0.03M potassium phosphate buffer(pH 7.5)로 분리하였다 (flow rate : 50ml/hr).

## 4. 분리 단백질 및 단백질의 분자량 측정

Glycinin 및 subunit 별 분자량을 측정하기 위하여 의 분자량을 확인하기 위하여 다음과 같은 standard molecular weight marker protein과 gel filtration chromatography를 행하였다. 표준 단백질로는 Urease (tetramer) 480kDa, urease (dimer) 240kDa, alcohol dehydrogenase 150kDa를 사용하였고, 컬럼 크기는 2.5×90cm, 유속은 50ml/hr, fraction volume은 5ml이었다. 표준 완충용액은 0.45M sodium chloride이었다.

## 5. Basic subunit와 acidic subunit의 분리

먼저 defatted soybean flour를 0.03 M tris-HCl buffer (pH 8.0)에 분산시키고  $\beta$ -mercaptoethanol의 농도가 0.01 M, sodium azide의 농도가 0.01% 되도록 buffer에 용해시켰다. 3시간 동안 교반하면서 대두단백질을 용출시킨 후 8,000 rpm에서 30분간 centrifugation을 하여 cell debris를 제거하였다. 상등액을 HCl로 pH 6.4로 고정시킨 후 4°C에서 overnight하여 crude 11s protein을 침전시켰다. 침전된 단백질을 10,000 rpm에서 4°C, 30분의 조건으로 회수하여 dialysis 시킨 후 동결건조를 시켜 acidic subunit와 basic subunit의 분리에 필요한 starting material로 하였다. 건조된 crude 11S protein을 6M urea와 0.02 M  $\beta$ -mercaptoethanol 이 들어있는 0.1 M phosphate buffer (pH 6.6: 이하 equilibrium buffer)에 용해시킨 후 동일한 buffer로 washing된 DEAE-Saphadex A-50 colum (2.5 x 50 cm)에 loading하였다. Column bed volume의 2배에 해당하는 equilibrium buffer를 column에 통과시켜 basic subunit를 얻었다. 한편 acid subunit를 얻기 위하여 equilibrium buffer에 NaCl gradient를 0-0.4 M로 하여 column에 통과시켰다. Purified basic subunit와 acidic subunit를 dialysis시켜 후 동결건조시켰다. 얻어진 시료의 purity는 SDS-PAGE로 확인하였다.

## 6. 아미노산 조성 및 함량 측정

Purified 11S 0.25 g을 칭량하여 ampule에 넣고 6N-HCl 15 mL로 가한 다음 N<sub>2</sub>로 치환하여 신속하게 밀봉하였다. 이를 110°C 오븐에서 24시간 가

수분해시킨 뒤 방냉하여 탈이온수로 50 mL 정용플라스크에 정용 후 0.2  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 AccQ-Tag 방법으로 유도체화시킨 다음 아미노산을 HPLC로 분석사용하였다. 이때 column은 Nova-Pak C<sub>18</sub> (3.9×150 mm), injection volume는 5 $\mu$ l, flow rate는 1 mL/min이고, 검출기는 fluorescence, 이동상은 0.14M sodium acetate(A), 60% acetonitrile(B)를 gradient법으로 분석하였다.

## 7. 콜레스테롤 저하능 측정

콜레스테롤 저하능력은 *in vitro* test로 콜레스테롤 배출과 관련되는 담즙산 결합능(bile acid binding capacity)로 측정하였다.

### (1) *In vitro* 담즙산 결합능 측정

Camiere 등(1993)의 방법에 따라 분해 단백질의 담즙산(bile acid)은 cholic acid, deoxycholic acid, glycocholic acid, taurocholic acid의 4종을 사용하여 그림 6과 같은 방법으로 실험하였고, Sigma사의 bile acid kit를 이용하여 정량하였다.

### (2) Cholic affinity column을 이용한 담즙산 결합력 측정

적은량의 sample로 친화 크로마토그래피의 matrix는 Pattinson 등 (1980)의 방법을 변형하여 제조하였다. 99.9% ethanol 15.8 ml에 cholic acid 250mg을 녹여 20% ethanol에 미리 팽윤시킨  $\mu$ -aminohexyl-Sepharose 4B gel 35ml에 섞었다. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl

450mg을 녹인 50% ethanol 50ml를 gel 현탁액에 천천히 첨가한 후 24°C에서 16시간동안 교반하면서 공유결합시켰다. 제조한 친화 크로마토그래피 matrix를 컬럼에 충전한 후 buffer A (0.1mM dithiothreitol, 0.02% sodium azide를 함유한 10mM Tris-HCl(pH 8.0))를 흘려주어 결합하고 남은 cholic acid를 제거하였다.

가수분해물을 dialysis (M.W. 100)한 후 동결건조한 시료 6mg을 buffer B (5mM dithiothreitol, 0.02% sodium azide를 함유한 10mM Tris-HCl (pH 8.0))에 녹여 컬럼에 걸어주었다. Buffer A 에 이어서 buffer C (0.1mM dithiothreitol, 0.02% sodium azide, 0.15M NaCl을 함유한 10mM Tris-HCl(pH 8.0))를 washing buffer로 흘려주었고 elution buffer로는 0.5%의 sodium deoxycholate가 함유된 buffer C를 흘려주어 matrix에 결합되어 있던 펩타이드를 용리시켰고 마지막으로 8M urea가 함유된 buffer A를 흘려 비특이적 결합체를 용리시켰다. 모든 buffer는 30ml/hr의 유속으로 흘려주었고 흡광도는 280nm에서 측정하였다.

## 8. 11S 단백질의 효소처리 및 분해 패턴

Nagano (1992)에 의한 방법으로 분리된 11S를 14종의 동물성 및 식물성, 미생물 protease로 최적 온도 및 최적 pH에서 24시간동안 가수분해하였다. 각 protease는 기준 units로 환산하였을 때 기질의 1%가 되도록 하였다.

### (1) 가수분해도(degree of hydrolysis) 측정

가수분해도는 Alder-Nissen (1979)의 방법에 따라 측정하였다. 11S를

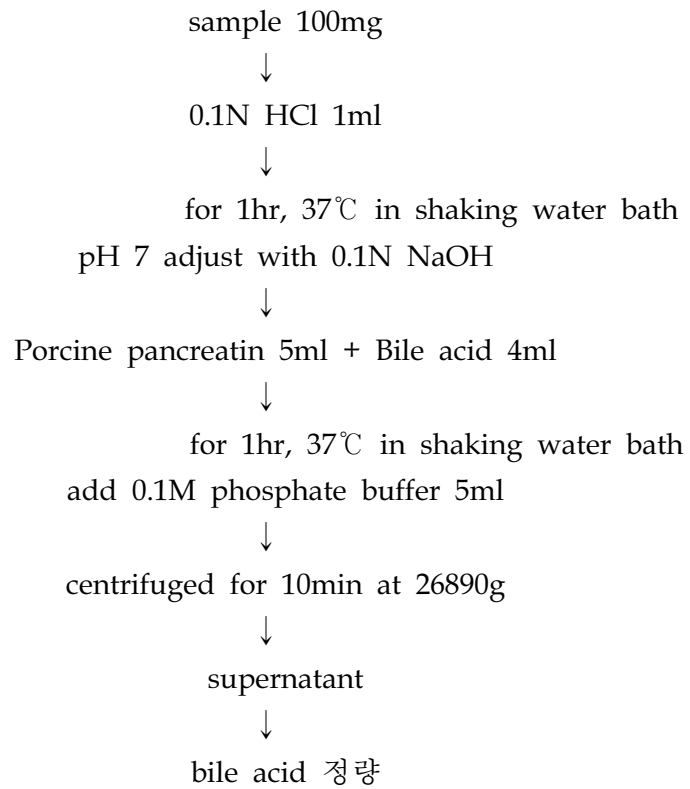


그림 6. Modified method for bile acid binding capacity determination with peptide hydrolyzate.

효소의 종류에 따라 24시간동안 가수분해 한 후(표 2) 반응용액을 각각 채취하여 1% sodium dodecyl sulfate에 넣은 후 75℃에서 15분간 가열하여 효소를 불활성화시켰다.

시료 0.25 ml을 pH 8.2, 0.2125M sodium phosphate buffer (2.0ml)에 넣고 0.1% trinitro- benzenesulfonic acid (2.0ml)를 첨가한 후 알루미늄 랩으로 반응시험관을 싸서 빛을 차단하고 50℃ 항온수조에서 60분간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위해 0.1N HCl (4.0ml)을 첨가하고 상온에서 30분 방치한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하여 L-leucine 표준곡선과 비교하여 상대적인 가수분해도를 측정하였다. 시료 단백질의 peptide-nitrogen 생성량은 개량 Buret법 (Umemoto,1996)으로 측정하였다.

## (2) 분리된 대두 펩타이드의 분해 패턴

### (가) 분해조건

Column chromatography로 분리한 순수 단백질을 protease에 대한 분해 패턴을 조사하기 위하여 특이성이 강한 trypsin (Lys과 Arg에 대하여 특이성이 강함)과 API (lysylendopepdidase; Lys에만 특이성이 있음)를 이용하여 11S 분해패턴을 보았다. Trypsin과 API 분해조건은 0.2M Tris-HCl buffer (pH 7.0), 37℃에서 1시간동안 효소와 기질 1: 100으로 분해하였다.

### (나) 분해패턴 분석

Protein-Pak™ 300SW column을 이용한 gel chromatography로



Table 2. List of protease for hydrolysis of soy protein to make soy protein hydrolyzate.

Protease	Units	pH	Temp. (°C)	Standard Units (units/mg solid)
<b>Animal</b>				
Trypsin <sup>a</sup>	1580 BAEE units/mg	7.5	25	1500
Trypsin <sup>b</sup>	1250 tryp-USP/mg	7.5	48	1500
Pepsin <sup>a</sup>	439 units/mg	2.0	37	1500
<b>Plant</b>				
Papain <sup>a</sup>	1.7 units/mg	6.2	25	20
Bromelain <sup>a</sup>	2.8 units/mg	4.6	25	20
<b>Fungi</b>				
Protease from <i>Aspergillus saitoi</i> <sup>a</sup>	0.9 units/mg	2.8	37	3
Protease from <i>Aspergillus oryzae</i> <sup>a</sup>	3.6 units/mg	7.5	37	20
Protease from <i>Aspergillus sojae</i> <sup>a</sup>	0.44 units/mg	7.5	37	3
Protease from <i>Rhizopus species</i> <sup>a</sup>	0.26 units/mg	3.0	37	3
Flavourzyme <sup>b</sup>	500 LAPU/g	7.0	50	1500
<b>Bacteria</b>				
Protease from <i>Bacillus polymyxa</i> <sup>a</sup>	0.6 units/mg	7.5	37	3
Protamex <sup>b</sup>	1.5 AU/g	6.0	40	1500
Neutrase <sup>b</sup>	0.8 AU/g	6.0	40	1500
Alcalase <sup>b</sup>	0.6 AU/g	8.0	60	1500

a. Sigma product; b, novo products

glycinin (11S)의 trypsin과 API의 분해 패턴을 분석하였다. Elution buffer로는 30mM phosphate buffer (pH7.0) (0.45M NaCl과 10mM mercaptoethanol을 포함)으로 분리하였다. Flow rate는 1.0ml/min이며 reversed phase HPLCdp 의한 패턴분석은 solvent : 0.08% trifluoroacetic acid를 포함하는 2-propanol/acetonitrile (7:3, v/v)을 solvent B로하여 gradient를 주어가면서 동시에 분석하였다.

## 9. 콜레스테롤 저하 대두 펩타이드 분리

대두단백질 중 우선 콜레스테롤 저하 기능성이 우수한 것으로 나타난 11S와 이를 프로테아제로 분해할 때 우수한 효소로 판명(in vitro bile acid binding 결과란 참조)난 pepsin 분해물에 대하여 펩타이드 분리 작업을 수행하였다.

### (1) 펩신 분해물 분리

#### (가) 한외여과

펩신에 의하여 가수분해된 펩타이드를 먼저 ultrafiltration (MWCO, 10,000) membrane을 이용하여 분자량별 분획을 시켜가면서 콜레스테롤 저하효과를 측정하였다.

#### (나) ODS column chromatography

한외여과에서 콜레스테롤 저하 펩타이드로 분획한 희분을 ODS-AQ 120-S50 column(1.7×20cm)에 loading한후 acetonitrile gradient를 걸어가면

서 콜레스테롤 저하 펩타이드를 분획하였다(분해조건 Table 3).

(다) Reversed phase HPLC에 의한 분리

ODS column에서 콜레스테롤 저하 펩타이드 활성이 가장 높은 peak를 받아서 reversed phase HPLC column (Vydac C<sub>18</sub> column)으로 1차, 2차 분리과정을 거쳐서 콜레스테롤 저하 펩타이드 분획을 추가 분리하였다 (분해조건 Table 3).

Table 3. HPLC conditions for hypocholesterolemic soy peptide hydrolyzate.

Pepsin hydrolyzate		
	ODS column	RP-HPLC
Column	Capcell C18 (UG120 S)	Vydac C18 (218TP510)
Column size	1.0×2.5cm (Semi-preparative)	1.0×25cm (Semi-preparative)
Eluent	Acetonitrile(0.1% TFA) 0 - 100 %	Acetonitrile(0.1% TFA) 10 - 45 %
	Water(0.1% TFA) 0 - 100 %	Water(0.1% TFA) 90 - 65 %
Flow rate	1ml/min	2ml/min
Detector	UV (220nm)	UV (220nm)

## 10. 항콜레스테롤 저하 peptide의 구조분석

### (1) Electrospray-MS를 이용한 분자량 측정

HPLC에서 얻은 항콜레스테롤 기능성이 있는 획분을 받아서 HMG-reductase 분석 등을 통하여 콜레스테롤 저하 물질임을 확인하였고, 이 펩타이드의 구조를 알기위하여 분자량을 LC-Electrospray Mass Spectrometer (Platform II, Micromass, UK)를 이용하여 분석하였다. 이때 용매는 water: acetonitrile : formic acid로 사용하였다. 분석조건은 electrospray<sup>+</sup>를 이용하여 data collection을 하였으며 cone voltage와 resolution은 조정하여가면서 측정하였다.

### (2) 아미노산 배열 (amino acid sequence)의 분석

11S의 pepsin 가수분해물 중 콜레스테롤 저하물질로 추정되는 peptide의 amino acid sequence의 분석은 Edman degradation 법에 의한 아미노산 sequence를 측정하였다 (Procise<sup>TM</sup>; Perkin Elmer, Protein Sequencing System, Foster City, USA)을 이용하여 측정하였다.

## 11. 혈중 콜레스테롤 측정

Glycine를 각각의 monomer로 분리한 다음 각각의 분획물에 대한 rat에서 혈중 콜레스테롤 측정은 분광 assay kit를 이용하여 측정하였다. 사용된 rat의 수는 30마리였고, 주입된 분획물의 양은 50 mg/kg으로 0.5%

methylcellulose 용액에 녹여서 주입하였다. 1, 2, 3일 동안 경구투여 후 4일 될 때의 rat를 마취시킨 후 혈액을 채취한 후 혈중 콜레스테롤을 측정하였다.

단백질 정량은 Lowry methods (Lowry, 1951) 와 micro BCA protein assay kit (Pierce Co.)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 반응액에 단백질을 넣고 60℃에서 30분간 반응시켜 582 nm에서 흡광도를 측정하였다. BSA를 사용하여 standard calibration curve를 만들었다.

## 제 3 장 결과 및 고찰

### 1. Glycinin의 순수분리

#### (1) 단백질의 추출, 분리 및 회수율 비교

대두로부터 11S enriched fraction을 추출하는데 있어 주로 사용되는 방법은 Thanh method, Nagano method, aqueous extraction method 등 3가지이다. 각 방법의 추출 수율을 살펴본 결과를 그림 7에 나타내었다. Thanh method과 증류수를 이용한 추출 방법은 (aqueous extraction method) 단백질 수율이 28-32%로 비교적 낮게 나타났으나 Nagano method은 수율이 43% 정도로 비교적 높게 나타났다. Defatted soy flour를 이용하여 11S enriched fraction을 추출할 경우 full fat soy flour를 이용할 경우와 같이 유사한 경향을 나타냈으나, 수율은 모든 방법에 있어 전반적으로 10-15% 가량 높게 나타났다 (그림 8). 그러나 3가지 방법 모두 11S의 회수율 측면에서 서로 큰 차이를 보이지 아니하였으므로 subsequent experiments에서는 Thanh 방법을 이용하였다.

Precipitation pH에 따른 대두단백질의 수율은 pH 3.5-4.5에서 가장 높게 나타났으나 (그림 9) pH 5.5 이하에서는 11S protein 이외에도 7S 등 contaminant의 침전량이 증가하므로 회수된 단백질에서 11S protein의 순도는 감소하게 된다. 따라서 11S protein으로 구성된 두부를 제조하기 위해서는 precipitation pH를 6.4로 유지하여야 하며 이때 단백질의 yield는 15%에 해당한다. Defatted soy flour를 원료로 하여 추출할 경우 pH 6.4에서 11S protein의 수율은 42%로 급격히 증가 하였다. 이는 defatted soy flour

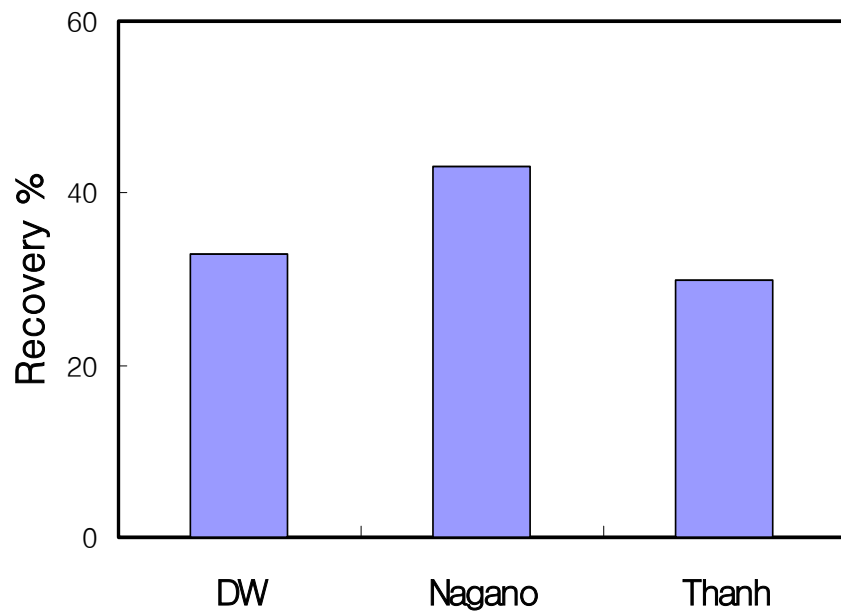


그림 7. Recovery of 11S enriched fraction according to different isolation methods. Full fat soybean flour was used as the protein source. Recovery percentage is defined as (recovered 11S / total 11S) x 100.



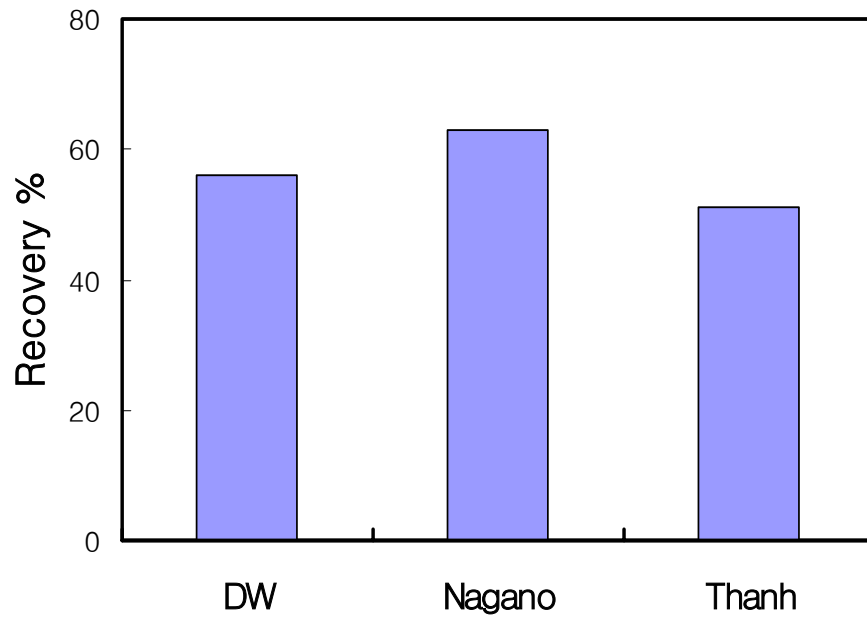


그림 8. Recovery of 11S enriched fraction according to different isolation methods. Defatted soybean flour was used as the protein source. Recovery percentage is defined as  $(\text{recovered 11S} / \text{total 11S}) \times 100$ .

의 경우 full fat soy flour와 달리 지방에 의한 단백질의 추출이 영향을 받지 않기 때문인 것으로 사료된다 (그림 10).

pH 6.4에서 precipitate된 단백질에 증류수를 넣고 단백질을 용해시키기 위하여 NaOH를 첨가하여 단백질 용액의 pH를 8.0로 조정한 경우와 NaOH를 넣지 않은 경우를 비교하였다. 결과에서와 같이 단백질 용액의 pH를 약염기로 만든 경우에 있어 11S enriched fraction의 수율이 높게 나타났다 (그림 11). 따라서 11S protein의 효과적인 추출을 위하여서 raw material로 defatted soy flour를 사용하였고, 11S protein의 selective precipitation을 위하여 추출액의 pH를 6.4로 조정하였으며, final protein solution의 pH를 8.0으로 adjust하여 시료를 준비하였다.

## (2) 단백질의 추출 및 분리 순도 비교

Thanh et al (1975)에 의한 방법과는 달리 Nagano(1992)에 의한 방법은 pH와 NaCl의 농도 차이에 따른 용해도의 차이에 의하여 7S와 11S globulin을 분리하는 방법이다. 또한 이 방법에서는 정제 순도와 수율을 높이기 위하여 mercaptoethanol 대신에 SDS를 이용하였다.

SDS-PAGE를 행하여 Nagano(1992)에 의한 방법에 의해 얻어진 7S와 11S, Thanh et al (1975)에 의한 방법에서 얻어진 crude 7S와 11S globulin fractions의 순도를 비교하였다. 그림 12에서와 같이 crude 7S와 11S globulin fractions보다 정제순도가 더 높은 것으로 나타났다. 그림 13과 비교해 보면 여러 column을 거친 Thanh 등에 의한 최종 11S보다는 순도가 떨어지는 것으로 여겨지나, 11S 성분과 interaction하는 7S성분을 보고하고 있는 논문들도 있고 yield가 낮은 column을 쓰지 않기 때문에 경

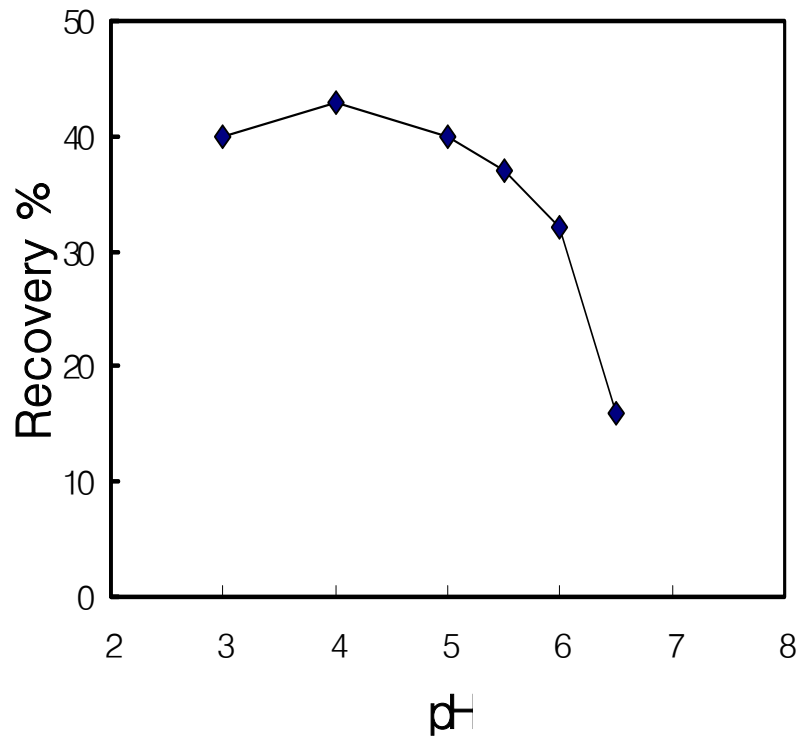


그림 9. Recovery of the protein from full fat soy flour according to precipitation pH

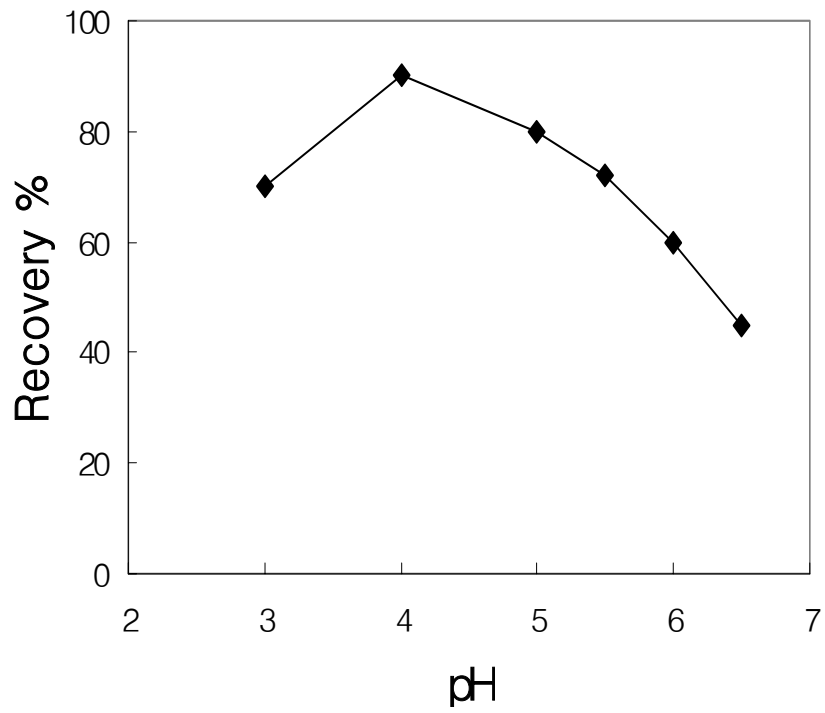


그림 10. Recovery of the protein from defatted soy flour according to precipitation pH

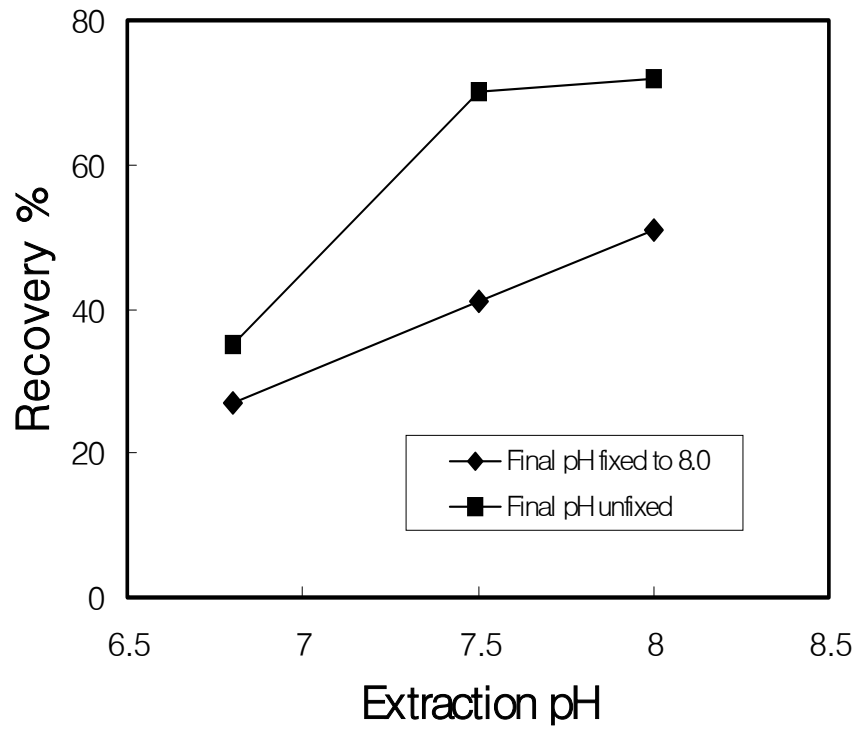
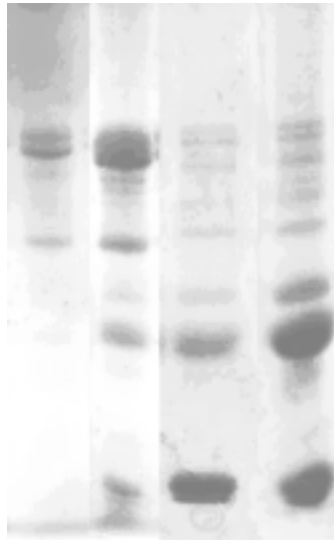


그림 11. Extraction yield of protein from defatted soy flour, at different extraction pH, with and without adjusting pH of the final 11S solution to 8.0.



1 2 3 4

그림 12. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of 7S and 11S globulin fractions. (Lane 1<sup>a</sup> and 2<sup>b</sup>) 7S globulin fractions; (lane 3<sup>a</sup> and 5<sup>b</sup>) 11S globulin fractions. a : The 7S and 11S globulin fractions were isolated by the method of Nagano (1992). b : Crude 7S and crude 11S globulin fractions were isolated by the method of Thanh et al (1975)

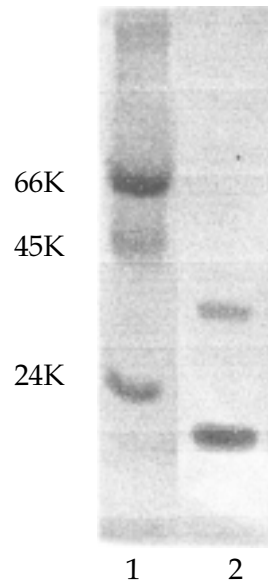


그림 13. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of 11S globulin fractions.  
Lane 1, marker proteins (24K, 45K, 66K); lane 2, 11S globulin fractions  
(Thanh et al, 1975)

제성이 높다.

칼럼을 쓰지 않고 분리한 결과 Nagano 방법을 개선한 결과 수율이 20%이상 개선됨을 SDS-PAGE상에서 확인할 수 있었다.

### (3) 단백질의 순수분리

11S protein을 isoelectric point precipitation, ion exchange chromatography, gel filtration, affinity chromatography를 이용하여 purify 한 결과, 순도가 96% 이상 되는 것으로 확인되었다 (그림 12, 그림 13).

#### (가) Ion Chromatography

Crude 11S protein을 고순도로 정제하기 위하여 DEAE-Sephadex A-50 chromatography에 0.3-0.5 M NaCl gradient로 수행한 결과 분리 패턴은 단순하게 나타났으며(그림 14), 0.25-0.65M의 NaCl gradient에서 단백질의 단일 피크를 나타내었다(그림 15).

#### (나) Gel filtration

Sepharose gel permeation chromatography에 의한 glycinin의 elution pattern과 분리 패턴은 다음 그림 16와 같았다. 환원제인 mercaptoethanol을 첨가하여 gel filtration을 수행한 결과 확연하게 두 개의 peak를 보여주고 있다 (그림 17). 이는 subunit A와 B가 분리됨을 알 수 있다. 즉 A-subnit와 B-subunitrks에 한 개 이상의 disulfide 결합을 하고 있음을 보여주고 있음을 gel filtration chromatography에서 보여주고 있다. 역시 DTT에 의한 환원 구조에도 soy protein의 구조는 파괴됨을 알 수 있다. 그



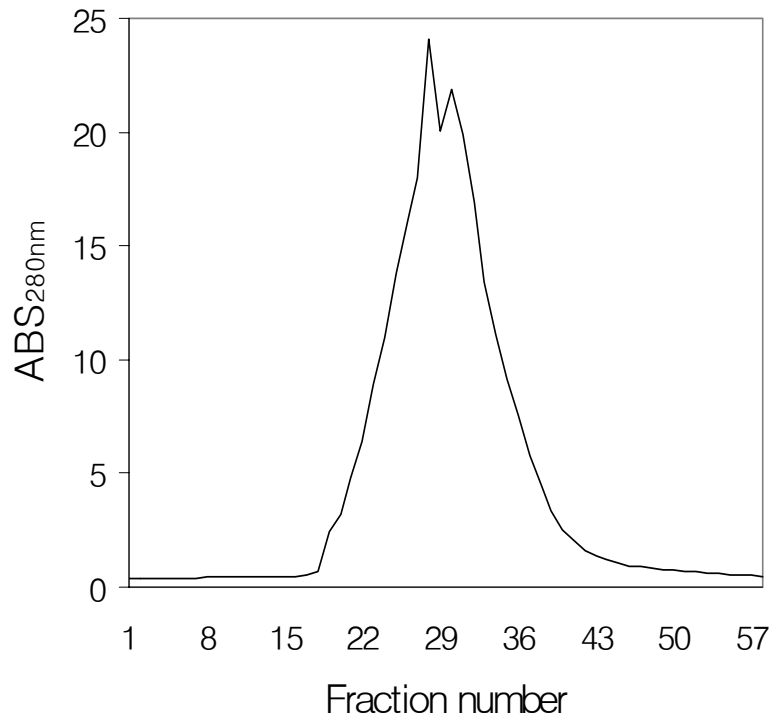


그림 14. DEAE Sephadex A-50 chromatography of 11S soy globulin. Buffer used was 0.03M phosphate buffer, pH 7.5 and concentration of NaCl was increased from 0.3 to 0.5M

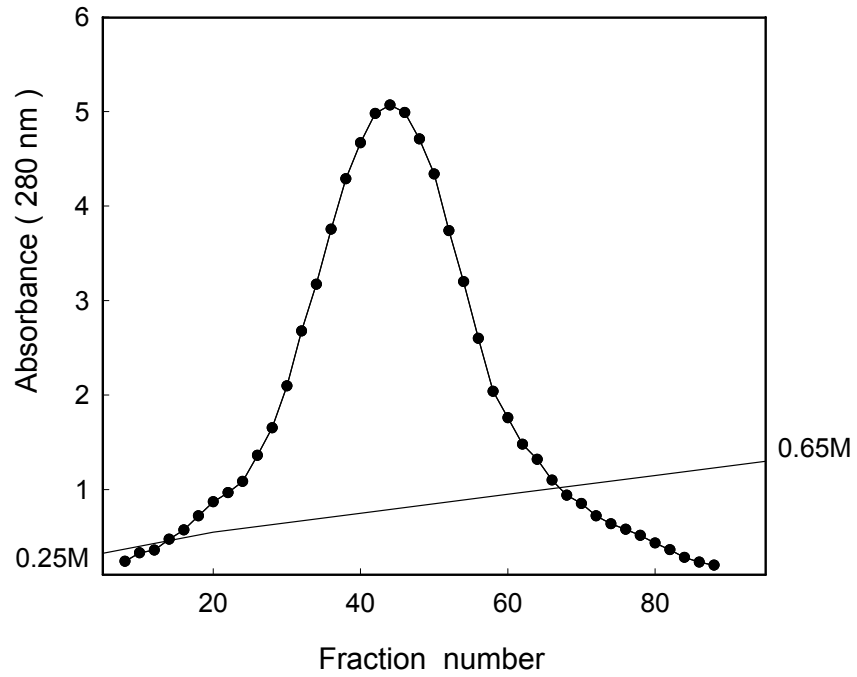


그림 15. Elution profile of 11S soy protein on DEAE-Sephadex A-50. Buffer used was 30mM phosphate buffer, pH 7.5 and NaCl gradient was 0.25-0.65M. Fraction volume and flow rate were 7ml, 60 ml/hr, respectively.

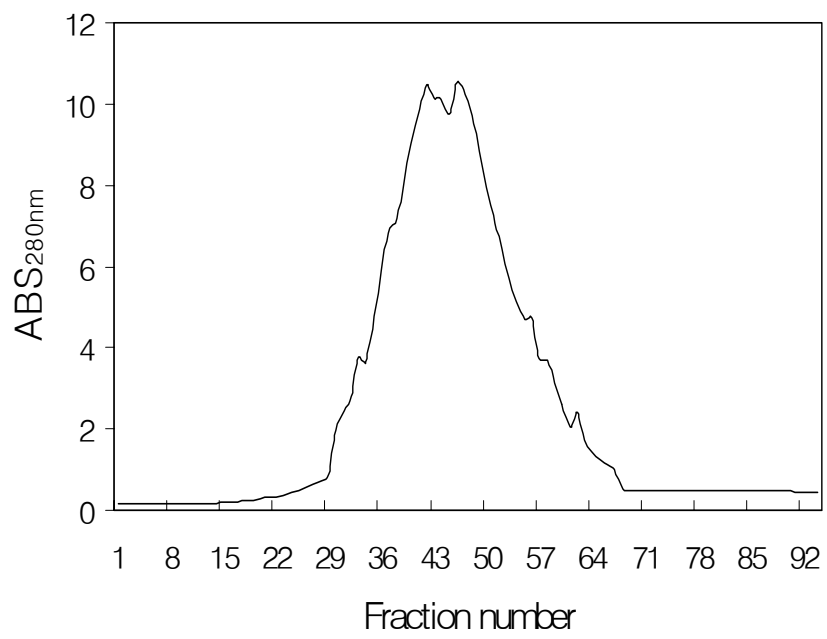


그림 16. Gel filtration pattern of 11S soy globulin. Buffer used was 0.03M phosphate buffer (pH 7.5, 0.45M NaCl)

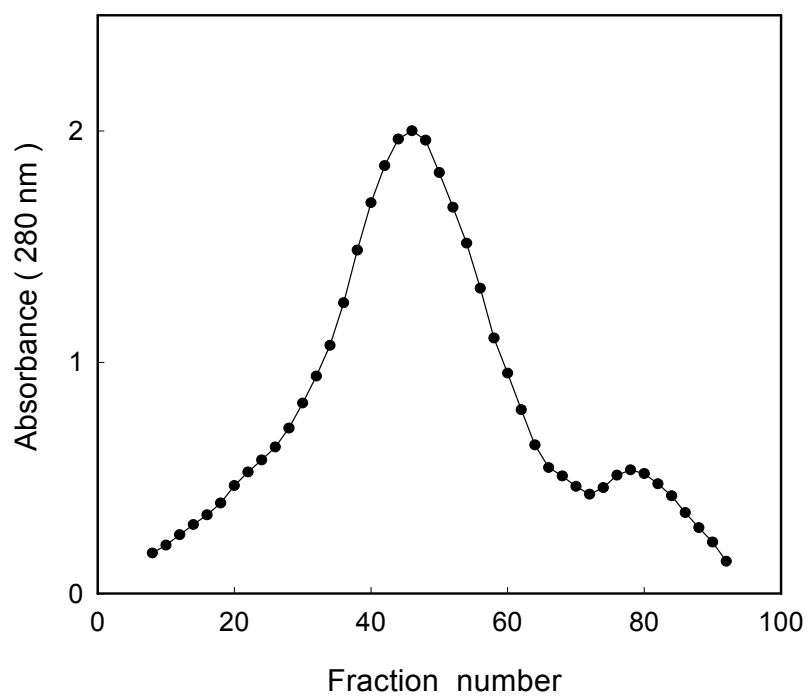


그림 17. Elution profiles of 11S soy glycinin on Sepharose CL-6B. Buffer used was 30mM phosphate buffer containing 0.45M NaCl and 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 7.5. Fraction volume and flow rate were 7ml, 15 ml/hr, respectively.

러나 DDT를 처리하여 A-subunit와 B-subunit로 분리한 단백질도 어느 정도의 salt 농도 (0.5 M)에서는 구조가 좀 더 안정한 형태를 유지하고 있음을 보여주고 있다.

#### (다) Affinity chromatography

Concanavalin A affinity chromatography에 glycinin의 최종 순수분리한 결과 완전한 단일 peak로 분리됨을 알 수 있다.

#### (라) Native 분자량 확인

Glycinin의 분자량을 확인하기 위하여 Sepharose CL-6B의 resin을 사용한 gel permeation chromatography를 행하여 standard molecular weight marker protein을 이용한 결과 11S protein의 molecular weight는 320 kDa 이었다 (그림 19). 즉 acidic unit와 basic unit로 분리되지 않은 native whole glycinin의 분자량은 320 kDa임을 알 수 있다.

#### (4) 단백질 정량 및 순도확인

등전점을 이용하여 crude 11S로 분리한 후 ion chromatography column과 gel filtration column, affinity chromatography column을 차례로 통과시켰다. 각각의 column마다 280nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도가 1.0이상인 fraction을 취하여 ultrafiltration으로 농축하면서 다음 column에서 사용되는 buffer로 equilibrium 한 후 다음 column에 loading 하였다.

각각의 column에 의한 분리패턴은 앞서 그림에서와 같이 나타났다.

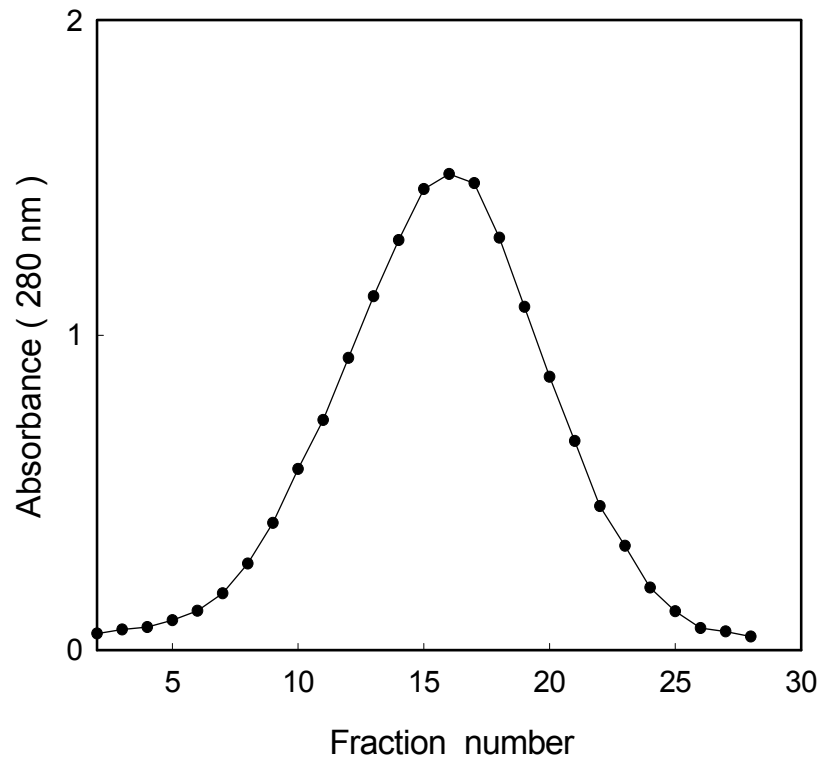


그림 18. Elution profiles of 11S soy protein on Concanavalin A. Buffer used was 30mM phosphate buffer containing 0.45M NaCl without  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 7.5. Fraction volume and flow rate were 7ml, 15 ml/hr, respectively.

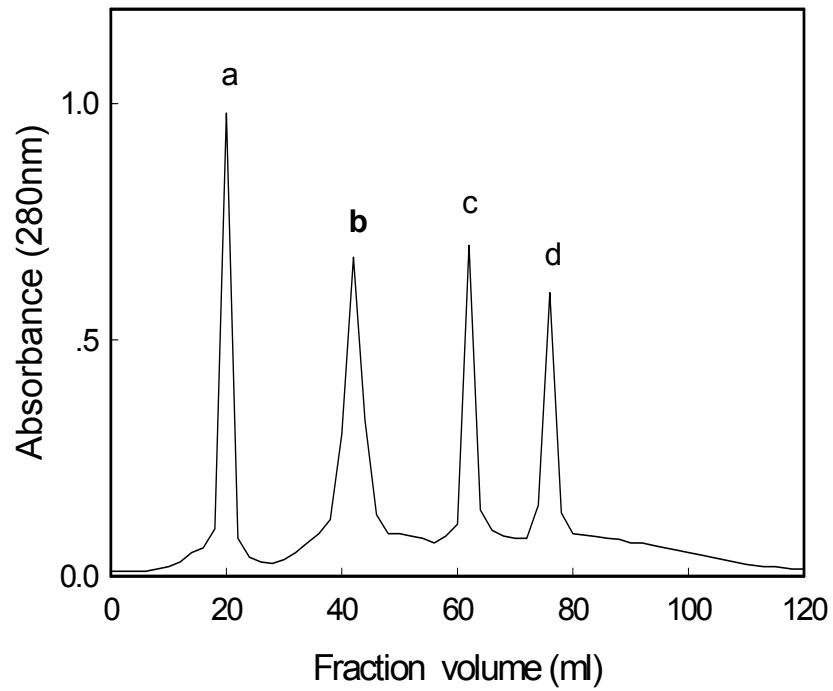


그림 19. Chromatogram of 11S soy protein by GPC on Sepharose CL-6B. Samples : (a) urease(tetramer), 480kDa; (b) glycinin; (c) urease(dimer), 240kDa; (d) alcohol dehydrogenase, 150kDa. Column : 2.5×90cm, flow rate 50ml/hr, fraction volume 5ml. The protein concentration was 0.1-0.5%.

최종적으로 얻어진 11S globulin fraction의 순도를 알아보기 위하여 SDS PAGE를 실행하였다 (그림 13). Marker protein과 비교해 보면 11S globulin fraction에서는 여러 논문에서 보고된 바와(그림 20) 마찬가지로 acidic subunit (35kDa)와 basic subunit (20kDa)가 관측되었다. 그러나 gel filtration에서는 전체 분자량이 320kDa로 나타나고 SDS-PAGE로서는 그림 20과 같이 35kDa와 20kDa로 나타나는 결과로 11S단백질이 hexamer로 존재한다는 사실은 알 수 있다. 이를 확인하기 위하여 Native PAGE를 수행하였다. (그림 21). 이의 결과도 hexamer임을 다시 한번 확인시켜 주었다.

1차 분리한 다음 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 걸어 순도를 확인하였으며 (Laemmli, 1970) 이 때 분자량도 표준단백질을 maker로 사용하여 측정하였다. SDS-PAGE는 Phast System (Pharmacia, Sweden)을 사용하였으며 destaining은 Phast System에 부착되어 있는 자동화 시스템을 사용하여 자동적으로 destaining 하였다. Native-PAGE도 동시에 수행하였다 (그림 21).



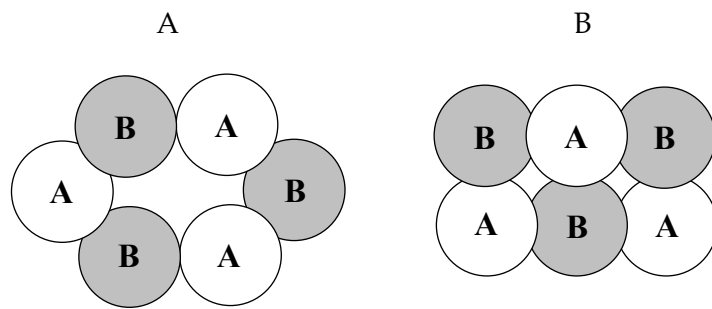


그림 20. Schematic representation of quaternary structure for glycinin (11S protein) of soy protein. (A) Top point of view to glycinin composed with hexameric subunits. (B) Front point of view. White subunits represent the acidic regions and gray subunits represent basic regions.



그림 21. Native PAGE of glycinin

#### (4) 아미노산의 조성

Purified 11S protein의 amino acid composition을 표 4에 나타내었다. 11S protein의 아미노산은 aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, histidine, threonine, arginine, alanine, proline, cysteine, tyrosine, valine, methionine, lysine, isoleucine, leucine, phenylalanine으로 17종이 분석되었는데, 이 중 glutamic acid, aspartic acid 순으로 비교적 높은 것으로 나타났다. 11S protein의 methionine 함량은 soy protein의 평균 methionine 함량에 비해 높게 나타났다.

表 4. Amino acid composition of soy 11S protein

(unit: mg/gprotein)

Amino acid	Soy 11S globulin
Asx	325
Thr	127
Ser	159
Glx	580
Pro	177
Gly	214
Ala	149
Val	165
Met	25
Ile	126
Leu	203
Tyr	81
Phe	111
His	72
Lys	148
Arg	136
Cys	41
Trp	16
Total	2840

Number of residues per protein molecule

## 2. 11S의 A, B subunit 분리 및 시작품 제작

칼럼을 이용하여 순수분리한 11s 단백질을 acid subunit과 basic subunit 별로 환원-산화 작용을 이용하여 분리하였다. Urea, DTT등을 다양한 방법을 처리하였다.

### (1) Urea 처리

Denaturant인 urea를 처리한 gel filtration 실험을 한 결과, 그림 22와 같이 결과 chromatogram을 얻었다. 이를 다시 SDS-PAGE gel로 marker protein과 비교해 보면 11S globulin fraction에서의 결과와 마찬가지로 acidic subunit (35KDa)와 basic subunit (20KDa)가 관측되었다 (그림 23). 이는 위의 그림 22의 fraction 중 처음 부분은 A-subunit와 B-subunit의 complex 임 (A-B unit) 을 보여주고 있다.

즉 A-subunit와 B-subunit는 disulfide 결합과 같은 공유 결합으로 연결될 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다. 따라서 Urea로 처리하면 대부분 11S 단백질은 denaturation 될 것이고 A-B unit로 분리됨을 알 수 있었다. 이는 A-subunit와 B-subunit 간에 적어도 한 개 이상의 disulfide 결합이 있음을 보여주고 있다. 그러나 이 결합 (disulfide 결합) 은 SDS-PAGE에 의하여 분리가 됨을 알 수 있다. 그림 23은 6M urea로 acidic subunit와 basic subunit 사이의 hydrophobic interaction을 제거하고 ion exchange chromatography를 통하여 acidic subunit와 basic subunit를 각각 분리한 후 SDS PAGE를 이용하여 실험결과를 확인한 data이다. Acidic subunit와 basic subunit가 성공적으로 분리되었음을 확인할 수 있다.

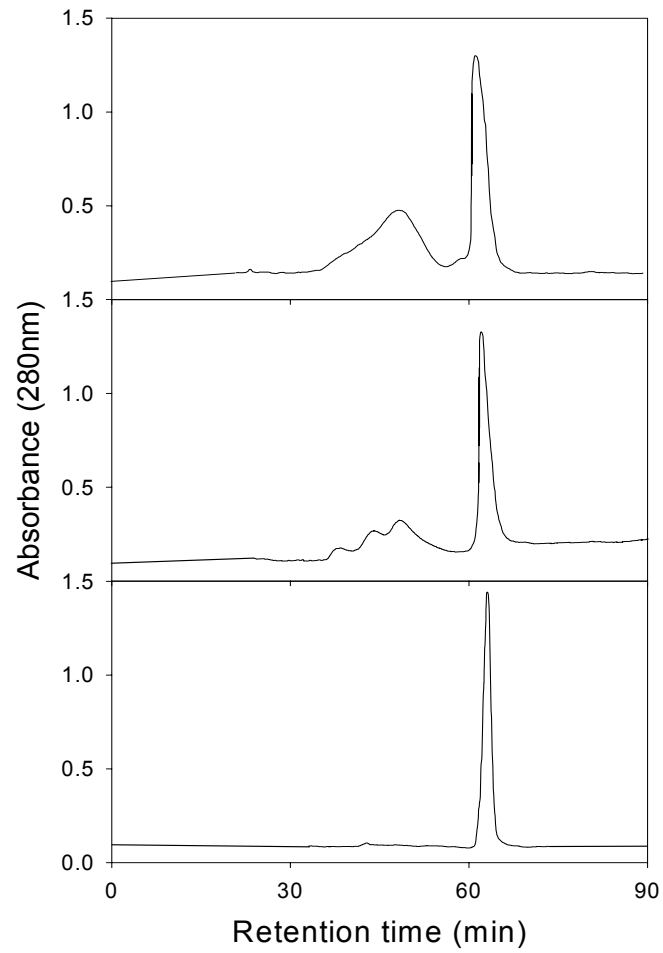


그림 22. Gel filtration chromatography of urea treated 11S protein (top), dithiothritol treated protein (middle) and marker protein (bottom).

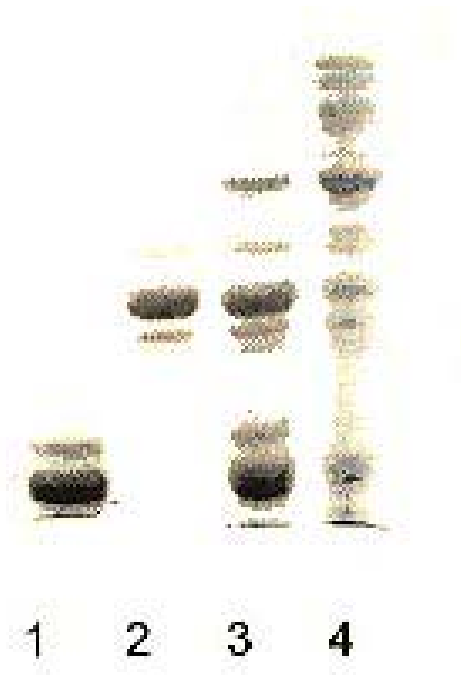


Fig. 23. 11S on SDS -PAGE

Lane 1. Basic subunit

Lane 2. Acidic subunit

Lane 3. After DEAE Sephadex A-50

Lane 4. Crude 11S

## (2) DTT 처리

Disulfide 결합은 cysteine의 thiol의 산화형인 cystine 형태이므로 이번에는 강력한 환원제인 dithiothreitol (DTT)을 이용하여 A-subunit와 B-subunit를 분리하고자 하였다. Gel filtration으로 확인 결과 그림 24에서와 같이 두 개의 peak가 확연히 구분되었다. 단백질 3은 A-subunit (분자량 35 K)이고 단백질 4는 B-subunit임이 분명하다. 이를 SDS-PAGE로 분자량을 분석한 결과 위의 결과 맞음이 확인되었다. 즉 A-subunit와 B-subunit 간에는 disulfide 결합으로 결합되었다는 결론을 내릴 수 있었다.

따라서 A-B subunit를 얻으려면 urea 처리를 하여 얻을 수 있고, A-subunit와 B-subunit를 각각 따로 따로 얻을 경우는 DDT와 같은 환원제를 이용하여 A-subunit와 B-subunit 간의 결합을 환원시켜 free thiol 기로 한 다음 분리하여야 하였다.

## (3) Subunit 분리 후 subunit 별 구조차이점 분석

11S 단백질의 subunit 분리과정 중에 conformation 즉 구조변화를 알기 위하여 circular dichroism (CD, Jasco 710)으로 구조의 변화를 분석하였다. 11S 단백질의 A-subunit B-Subunit 분리 전에 단백질의 conformation은 그림 25에서 보듯이 안정한 구조를 취하고 있으며 pH에서도 중성 pH 이상에서는 큰 차이가 없었다. 이는 상당히 안정한 구조를 형성하고 있음을 보여주고 있다. 그러나 urea를 처리한 후 A-B unit로 된 단백질의 CD 분석결과 분리한 A-B unit는 이상한 형태의 불안정한 구조 즉 변성(denaturation) 구조를 보여주고 있다. 따라서 urea 처리한 11S 단백질은 매우 uncommon한 구조로 바꾸면서도 disulfide 결합은 유지함을 알



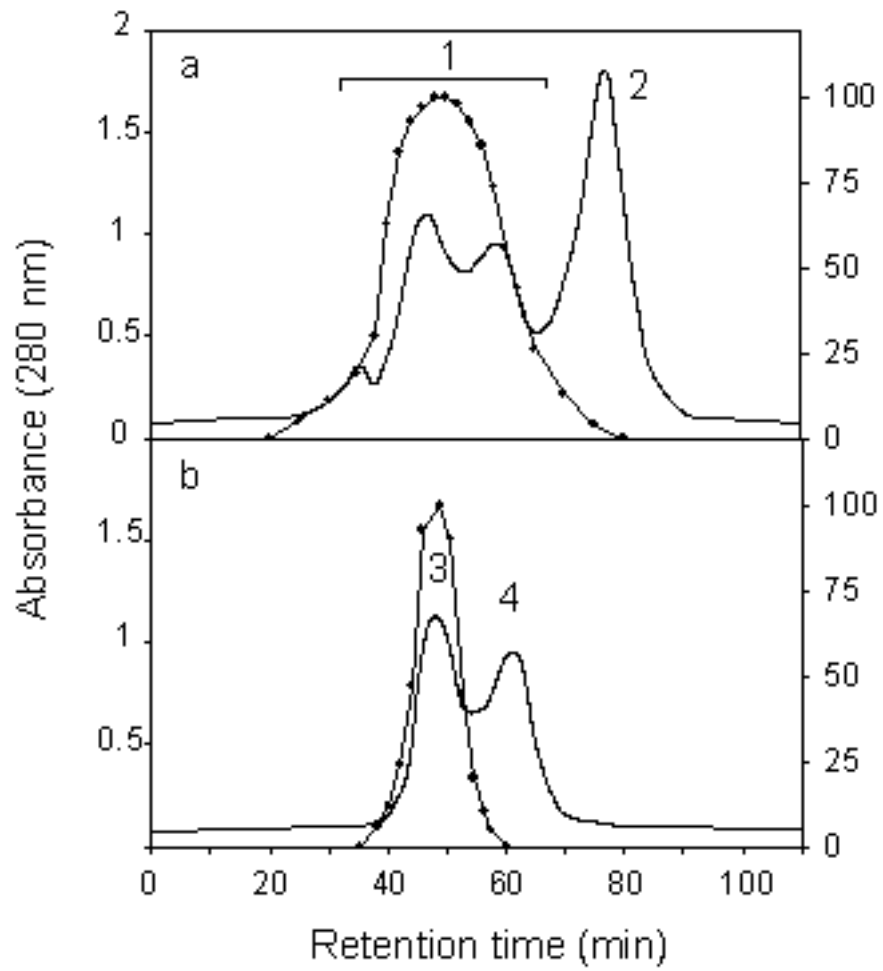


그림 24. Gel filtration chromatography of dithiothritol treated soy protein : with marker protein 2 (top) and without marker protein.

수 있었다. 환원제를 이용하여 분리한 A-subunit와 B-subunit의 합인 구조도 random coil에 가까운 구조를 보여주고 있다.

역시 DTT에 의한 환원 구조에도 soy protein의 구조는 파괴됨을 알 수 있다. 그러나 DTT를 처리하여 A-subunit와 B-subunit로 분리한 단백질도 어느 정도의 salt 농도 (0.5 M)에서는 구조가 좀 더 안정한 형태를 유지하고 있음을 보여주고 있다. 이는 soy protein이 salt가 있는 경우 단백질의 구조변화를 DSC를 통하여 분석한 결과 안정하다는 결과와 일치한다. 즉 각각의 subunit로 분리한 경우에도 salt에는 구조가 안정됨을 알 수 있다.

DTT에 의하여 각각 분리된 A-subunit와 B-subunit의 경우 dialysis에 의하여 DTT를 제거하여 제조한 각각의 A-subunit와 B-subunit의 합에 대한 단백질의 구조 변화를 측정된 결과 (그림 25), 단일 monomer 각각 있어도 hexameric polymer로 존재한 11S 단백질은 원래의 conformation을 유지하고 있음을 보여주고 있다.

따라서 일단 A-subunit와 B-subunit를 분리한 다음 desalting과 refolding을 시키면 monomer로 존재할 때도 원래의 구조와 차이가 없음을 보여주고 있다.

물론 NMR이나 x-ray crystallography에 자세한 3차구조를 분석할 경우 약간 달라질 수는 있으나 monomer로 분리했을 때의 conformation은 원래의 11S 단백질의 구조와 거의 일치함을 보여주고 있다.

#### (4) 시작품 제작

DTT와 같은 환원제를 이용하여 A-subunit와 B-subunit 간의 결합을 환원시켜 free thiol 기로 한 다음 A-subunit와 B-subunit를 각각 따로 따로

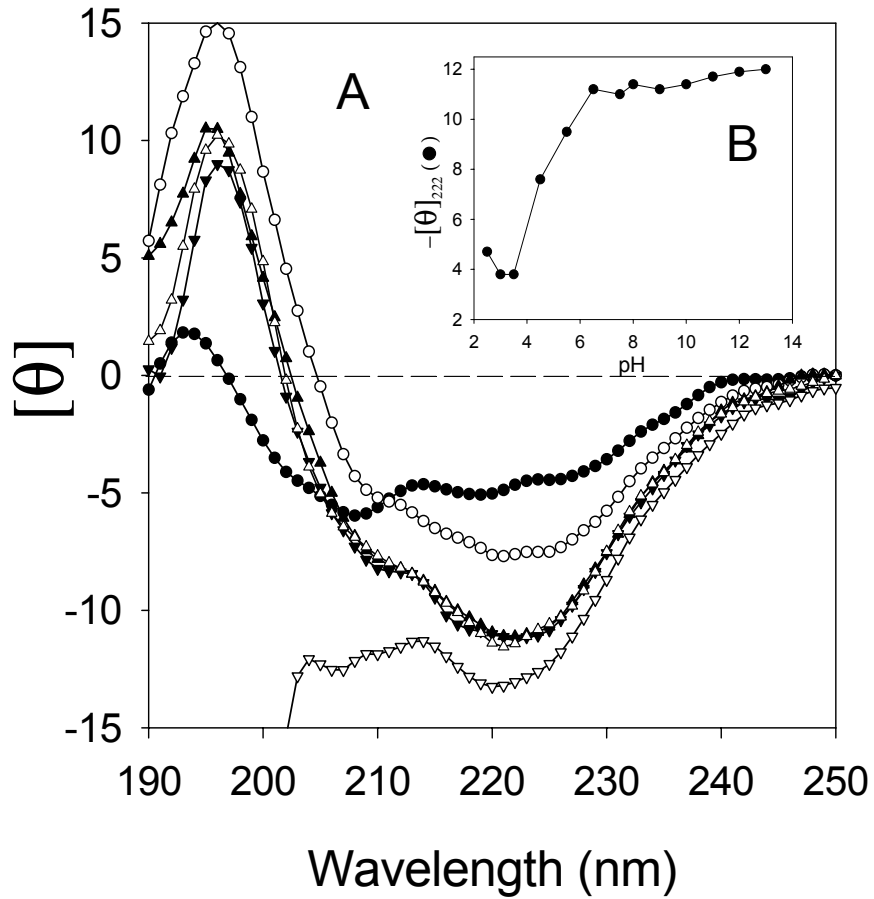


그림 25. Circular dichroism spectra of 11S soy protein ( $\blacktriangledown$ ), urea treated ( $\nabla$ ), DDT treated ( $\bullet$ ), DDT treated with 0.5 M NaCl salt ( $\circ$ ) and renatured by dialysis dlycinine ( $\triangle$ ). The inserted Figure (B) represented molar ellipticity at 222 nm of soy protein for the various pHs.

얻어 그림 26과 같은 동결건조된 시작품을 얻었다. 얻어진 시작품을 이용하여 rat에 주입하여 혈중 및 간에서의 콜레스테롤 저하효과를 측정하였다. (그림 43 참조)



그림 26. 분리된 A-subunit와 B-subunit의 시작품 제작

### 3. 콜레스테롤 저하능 기능성 평가

#### (1) 담즙결합능을 이용한 기능성 평가

##### (가) 용액에서의 담즙산 결합능 분석법

체내에 담즙산이 적어지면 콜레스테롤이 담즙산으로 전환되어 전체적으로 콜레스테롤의 농도가 낮아지는 것으로 알려져 있다. 이 원리를 이용하여 콜레스테롤 저하능력을 담즙산 결합능력을 분석하여 측정할 수 있다. 원래 담즙산 결합능력으로 콜레스테롤 저하효과를 측정하는 것은 섬유소와 같이 거대분자로 소화되지 않고 체외로 배출되는 물질의 콜레스테롤 저하효과를 *in vitro* 간접 측정하는 방법으로 알려져 있다 (Camire et al., 1993). 따라서 glycine과 A-subunit 또는 B-subunit과 같은 물질과 같이 거대물질에 결합되는 담즙산(bound bile acid)과 유리담즙산(non-bound bile acid)을 centrifuge에 의해서 쉽게 partition할 수 있었다 (표 5).

Glycine 자체로 bile acid binding capacity 능력이 상당히 있음을 보여주고 있다. 그러나 A-B subunit로 부분 분리하여도 거의 glycine과 비슷하였으나 오차 범위내에서라고 볼 수 있는 정도에서 bile acid binding capacity가 낮았다. 확실히 A-subunit B-subunit로 분리하면 bile acid binding capacity가 차이가 나서 A-subunit는 강한 bile acid binding capacity가 나타났고 B-subunit는 확실히 bile acid binding capacity가 낮았다. 이는 A-subunit가 콜레스테롤 저하능력이 높다는 증거이다. 그러나 또한 이 방법은 많은 양의 시료가 필요하다는 단점이 있었다.

5. *In vitro* cholic acid binding capacity of 11S protein and its derivatives on the resin.

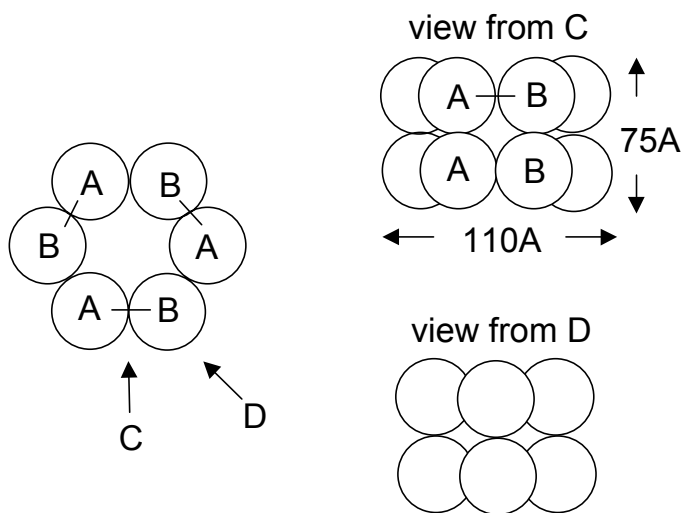
Sample <sup>d</sup>	Bound cholic acid (area/mg)
11-S(glycinine)	60.12
A-B subunit <sup>a</sup>	54.70
A- Subunit <sup>b</sup>	70.82
B- Subunit <sup>a</sup>	6.37

Cholic acid binding capacities were determined with cholic affinity column

a was purchased from Sigma Chemical Co.

b was purchased from Novo Nordisk.

d. Subunit are defined as follows:



#### (나) Column에서의 담즙산 결합능 측정법

이러한 결합담즙산과 유리 담즙산의 분리, 재현성 문제를 극복하기 위해서 담즙산을 resin에 prebinding 시킨 후 이 resin의 담즙산과 결합능력을 측정하여 단백질 분해물의 콜레스테롤 저하능력을 측정하였다 (표 6). 앞의 방법보다는 재현성과 분리능력이 상당히 개선되었다. 그리고 bile acid adsorption 되는 양도 bile acid binding 패턴과 거의 비슷하게 나타나 두 결과가 일치함을 보여주고 있다.

### 4. 대두 단백질의 가수분해

#### (1) 가수분해율

각 protease 별로 whole protein을 9종의 효소로 24시간동안 가수분해한 후 개량 Buret법 (Umemoto, 1996)에 의해 분해단백질의 peptide-nitrogen 생성량을 측정하였다. 또한 가수분해 정도를 비교하기 위하여 가수분해하기 전의 whole protein의 peptide-nitrogen에 대한 분해단백질의 peptide-nitrogen 생성량의 백분율로 나타내었다 (표 7). 동시에 Novo enzyme까지 포함한 각 protease의 11S에 대한 가수분해율을 각각 TNBS방법으로 측정하였다 (표 8). 그 결과 pepsin에 의한 가수분해율이 52.1%로 가장 높았고 9.4%로 trypsin이 가장 낮은 가수분해율을 보였으며 다른 효소들에 의한 가수분해율은 22.5 ~ 37.5%로 비교적 비슷한 경향을 보였다. 그러나 11S protein 에 대하여 실험을 수행한 결과, pepsin, trypsin에 비하여 미생물에서 추출한 protease 가 분해능이 가장 높았다. 특히 *Aspergillus oryzae* protease는 가수분해율이 62%정도 되었다. 물론 가수분해율이 높다



Table 6. *In vitro* adsorption of conjugated bile acids by column chromatography.

Sample	Bound glycocholic acid ( $\mu\text{mol}/100\text{mg}$ )	Bound taurocholic acid ( $\mu\text{mol}/100\text{mg}$ )
11-S(glycinine)	7.6 $\pm$ 0.5	12.5 $\pm$ 2.9
A-B subunit <sup>a</sup>	8.1 $\pm$ 0.6	11.9 $\pm$ 1.6
A- Subunit <sup>b</sup>	10.8 $\pm$ 0.2	17.9 $\pm$ 2.1
B- Subunit <sup>a</sup>	5.6 $\pm$ 0.9	8.4 $\pm$ 1.4

고 콜레스테롤 저해작용이 높은 것은 아니지만 일단 각각 효소에 대한 활성도 측정결과 대부분 효소가 단백질 분해능력이 강함을 보여주고 있다.

## (2) 대두단백질의 가수분해 패턴

앞서 언급한 바대로 단백질의 가수분해능도 중요하지만 기능성 펩타이드는 펩타이드 sequence에 의한 기능이 많이 결정되므로 가수분해되는 분해산물의 구조가 중요하다. 따라서 본 연구에서는 특이효소에 대한 11S 단백질의 가수분해 패턴을 조사하였다.

### (가) Whole 단백질

본 연구에서는 protease 중 기질특이성이 매우 강한 trypsin (Lys과 Arg에 대하여 특이성이 강함)과 API (lysylendopeptidase; Lys에만 특이성이 있음)를 이용하여 whole protein, 11S protein에 분해패턴을 보았다. Whole protein의 가수분해 패턴을 먼저 조사하였다 (그림 27). Glycinin (11S), conglycinin (7S)으로 구성된 whole protein을 API 또는 trypsin으로 가수분해 시켰을 때의 분해 패턴과 API로 가수분해 시켰을 때의 패턴을 비교하였다. API로 가수분해시켰을 때 분해물의 분획가능한 peptide는 7개 검출되었으며 Lys-와 Arg-C를 가수분해하는 효소 trypsin으로 가수분해했을 경우는 9개인 것으로 나타났다.

### (나) 11S-Protein

정제된 glycinin을 API로 가수분해하였을 경우의 분획가능한 peptide는 18개 정도로 나타났으며 (그림 28), trypsin 처리의 경우 lysine을 포함

Table 7. Peptide-nitrogen content of protein hydrolysate and degree of hydrolysis (DH) of whole protein by various proteases for 24 hr determined by Biurette method.

Enzymes	mg peptide-nitrogen / mg whole protein	DH(%)
Trypsin	0.0006	9.4
Pepsin	0.0035	52.1
Papain	0.0015	22.5
Bromelain	0.0017	25.5
Protease from <i>Aspergillus saitoi</i>	0.0017	24.7
Protease from <i>Aspergillus oryzae</i>	0.0024	34.7
Protease from <i>Rhizopus species</i>	0.0025	37.5
Protease from <i>Aspergillus sojae</i>	0.0017	25.1
Protease from <i>Bacillus polymyxa</i>	0.0017	25.6

All proteases are from Sigma.

Table 8. Degree of hydrolysis (DH) of 11S protein by various proteases for 24 hr determined by TNBS method.

Protease	DH(%)
Animal	
Trypsin <sup>a</sup>	9
Trypsin <sup>b</sup>	27
Pepsin <sup>a</sup>	30
Plant	
Papain <sup>a</sup>	27
Bromelain <sup>a</sup>	30
Fungi	
Protease from <i>Aspergillus saitoi</i> <sup>a</sup>	48
Protease from <i>Aspergillus oryzae</i> <sup>a</sup>	62
Protease from <i>Aspergillus sojae</i> <sup>a</sup>	39
Protease from <i>Rhizopus species</i> <sup>a</sup>	45
Flavourzyme <sup>b</sup>	33
Bacteria	
Protease from <i>Bacillus polymyxa</i> <sup>a</sup>	36
Protamex <sup>b</sup>	24
Neutrase <sup>b</sup>	18
Alcalase <sup>b</sup>	48

a was purchased from Sigma Chemical Co.

b was purchased from Novo Nordisk.

해 arginine까지 절단하여 peak는 API보다 더욱 세분화되었으며 분획가능한 peak 수는 20개 이상인 것으로 나타났다. 11S 단백질은 API 또는 trypsin으로 완전 가수분해 가능한 것으로 나타났다. 그 이유는 11S 단백질의 구조적인 안정성 때문일 것으로 보인다. 특히 단백질의 1차구조의 특성도 분해 패턴에 영향을 많이 미친다.

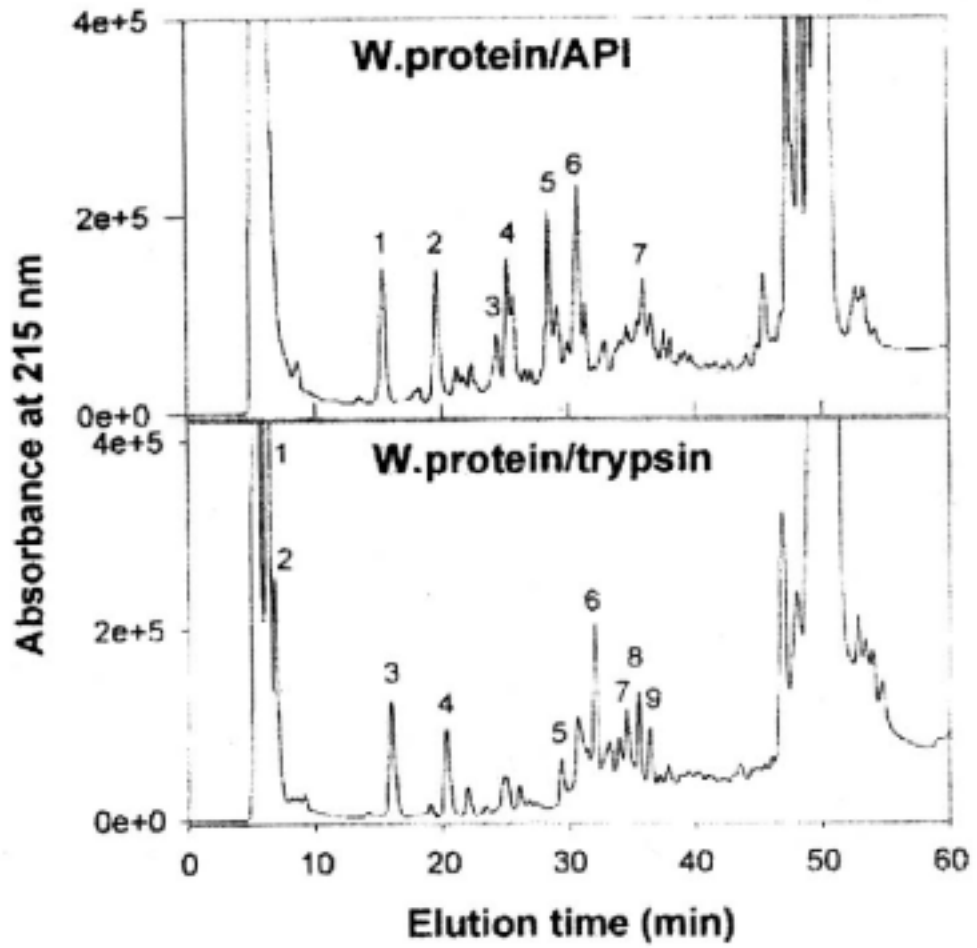


그림 27. RP-HPLC pattern by digestion of whole protein from soybean meal with API or trypsin

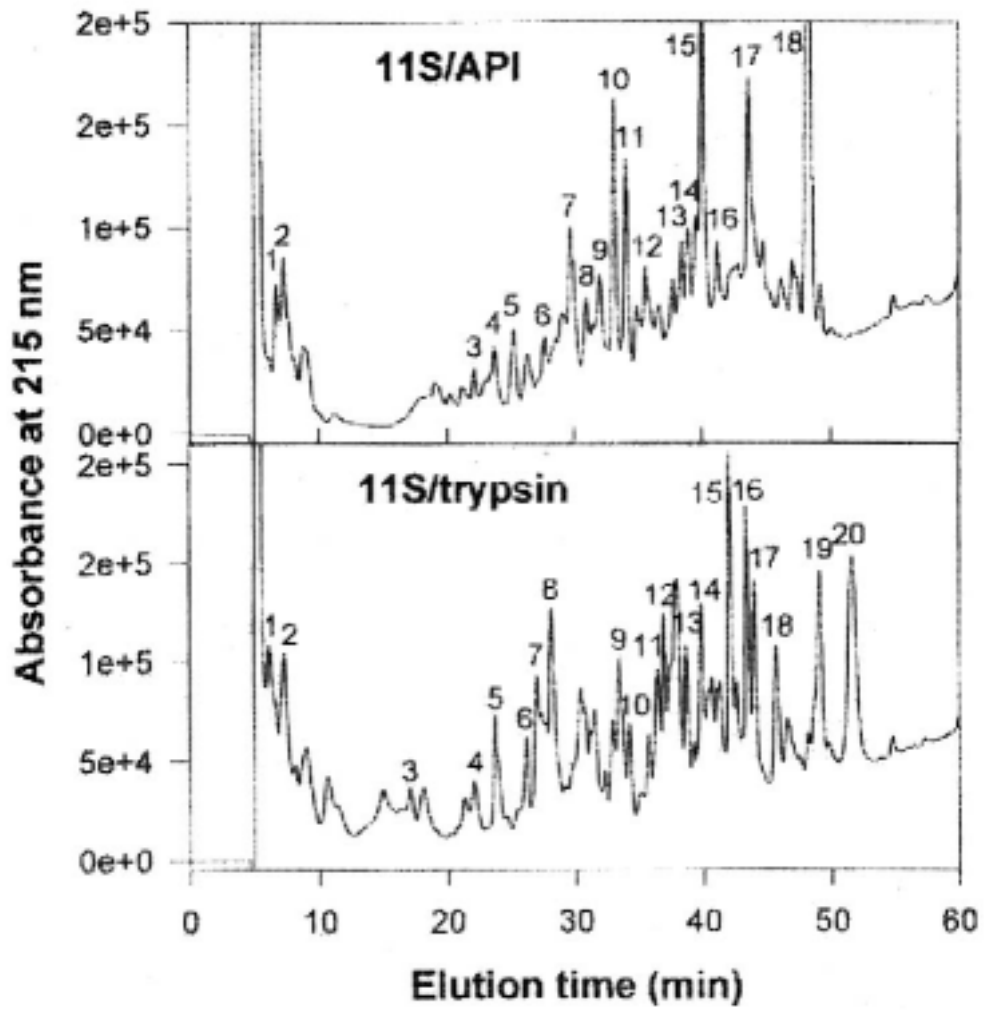


그림 28. RP-HPLC pattern by digestion of 11S soy protein from soybean meal with API or trypsin

## 5. 콜레스테롤 저하 펩타이드 분획 및 동정

이상의 결과를 바탕으로 대두단백질은 11S 단백질과 가수분해 효소로는 pepsin을 선정하여 이에 의한 분해단백질을 제조하여 기능성 단백질획분을 분리하였으며 아울러 기능성 펩타이드에 대한 동정을 수행하였다.

### (1) Pepsin 분해물에 의한 대두단백질 제조와 기능성 펩타이드 분리

#### (가) 분해 peptide의 분리

11S 단백질을 pepsin으로 분해하여 reversed phase column, ionic exchange column등을 이용하여 기능성 펩타이드의 분리를 단계별 시도하였다. Ion exchange인 Sephadex LH-20을 통과한 콜레스테롤 저해 펩타이드획분을 ODS column인 Capcell pak column으로 분리하여(Fig. 29) 시간별로 A, B, C, D로 분획하여 저해도를 측정하였다 (표 9). 측정결과 가장 높은 저해도를 보인 D를 모아 rechromatography하고(Fig. 30) 그 다음 reversed phased HPLC인 Vydac C<sub>18</sub> column을 이용하여 콜레스테롤 저해 기능성 펩타이드 분획을 추적하여 분리하였다 (Fig. 31, 32, 33). 항콜레스테롤이 기능이 가장 강한 획분은 의외로 ion exchange column chromatography의 major 획분에서 발견되는 것이 아니라 minor한 획분에서 강한 콜레스테롤 저해 기능을 보여주고 있다(표 10). 따라서 pepsin으로 가수분해 시 기능성 펩타이드 분리수율은 그다지 높지 않을 것으로 사료된다.



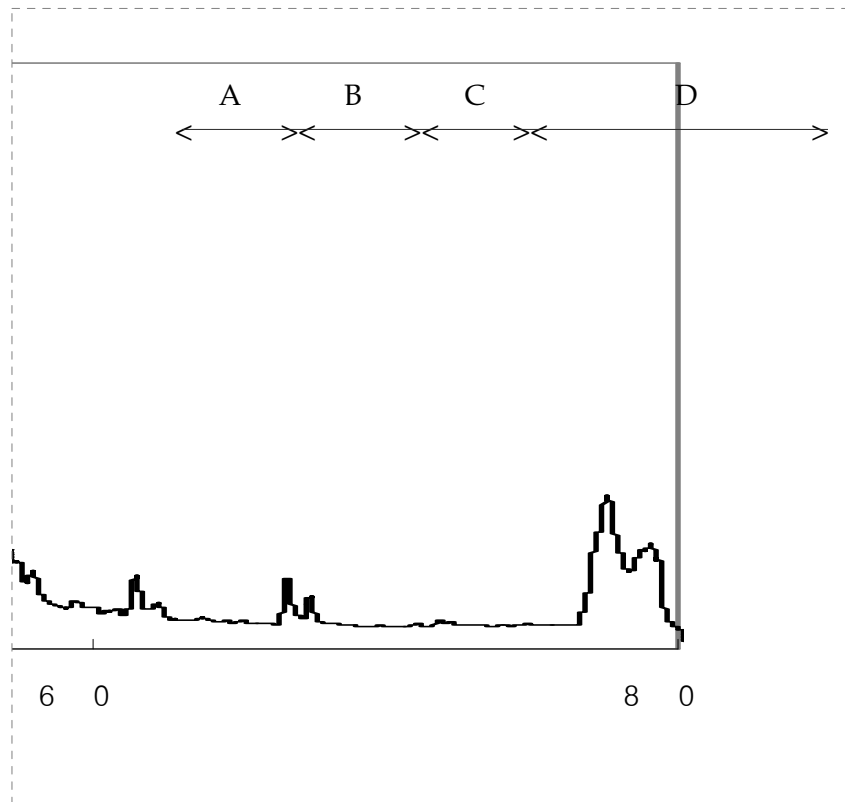


그림 29. Reverse-phase HPLC chromatogram of 11S pepsin hydrolyzates.  
 Conditions for HPLC : column, Capcell C<sub>18</sub> ; mobile phase, acetonitrile  
 (0 ~ 100% for 100min) ; flow rate 2ml/min

Table 9 Inhibition of HMG CoA reductase activity of the fraction on HPLC in Fig. 29.

Fractions	Specific activity <sup>2)</sup>	Inhibition rate (%)
Control	4.55	
A	3.15	31
B	2.49	45
C	2.55	43
D	2.30	50

<sup>1)</sup> test substance 0.2mg/ml

<sup>2)</sup> Unit nmoles of CoA produced/min/mg protein

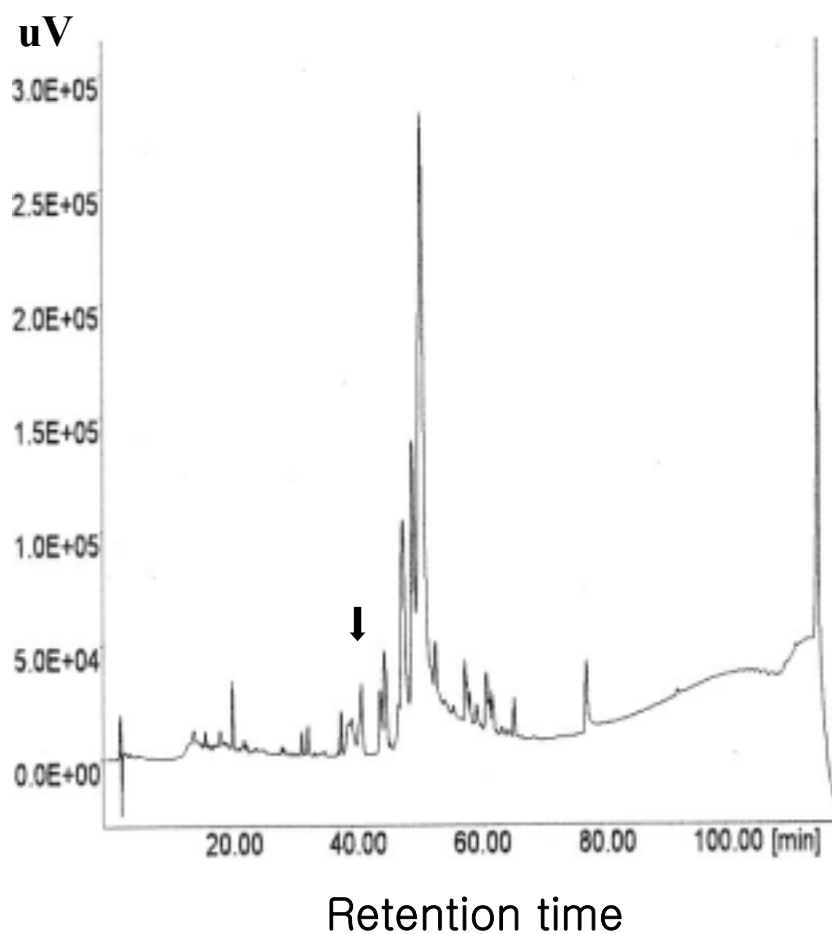


Fig. 30. Reverse-phase HPLC re-chromatogram of 11S pepsin hydrolyzates. Conditions for HPLC : column, Capcell C<sub>18</sub> ; mobile phase, acetonitrile (0-70min, 10-35% ; 70-100min, 35-100%) containing 0.08% TFA ; flow rate ; 1 mL/min. The fraction near 40 min showed maximum activity for bile acid binding capacity

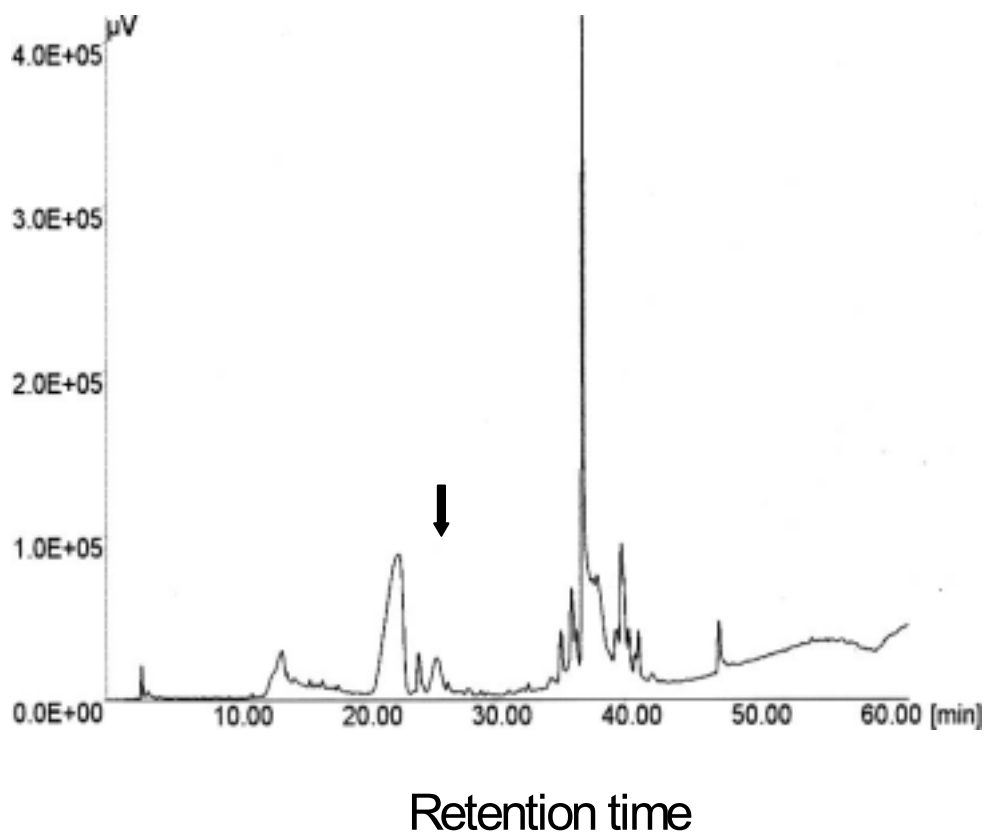


Fig. 31. HPLC chromatogram of hypocholesterol peptide purification from 11S in reversed phase column (Vydac  $\text{C}_{18}$ ). Acetonitrile and water gradient. Arrow indicates the fraction which showed high hypocholesterol activity (high bile acid binding capacity).

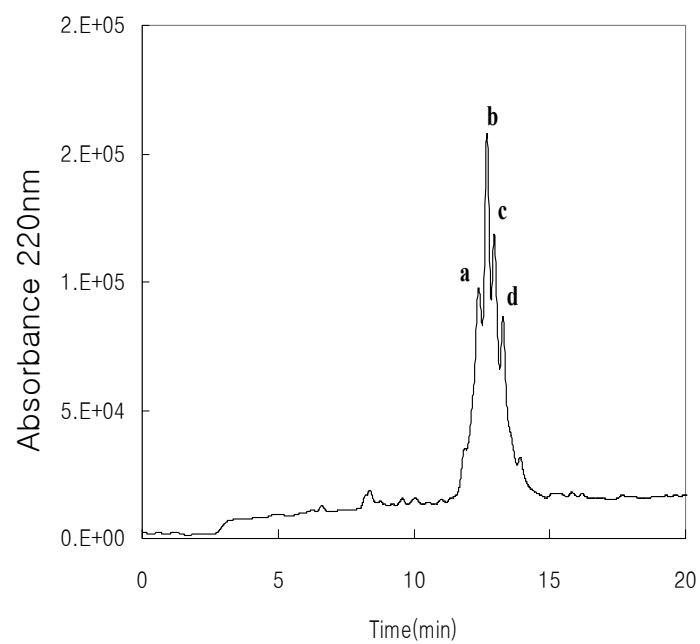


Fig. 32. Reverse phase HPLC re-purification of hypocholesterolemic peptide fraction (Fig. 31) obtained HPLC. Conditions for HPLC : column, semi-preparative C<sub>18</sub> column (Vydac 218TP510); mobile phase, acetonitrile (0 - 20min, 10-35%) ; flow rate 2ml/min

Table 10. Inhibition of HMG CoA reductase activity of peptides (in Fig. 32) from 11S protein hydrolyzate by pepsin<sup>1)</sup>

Peaks	Inhibition rate (%)
a	37
b	75
c	46
d	28

<sup>1)</sup> test substance 0.2mg/100 $\mu$ l

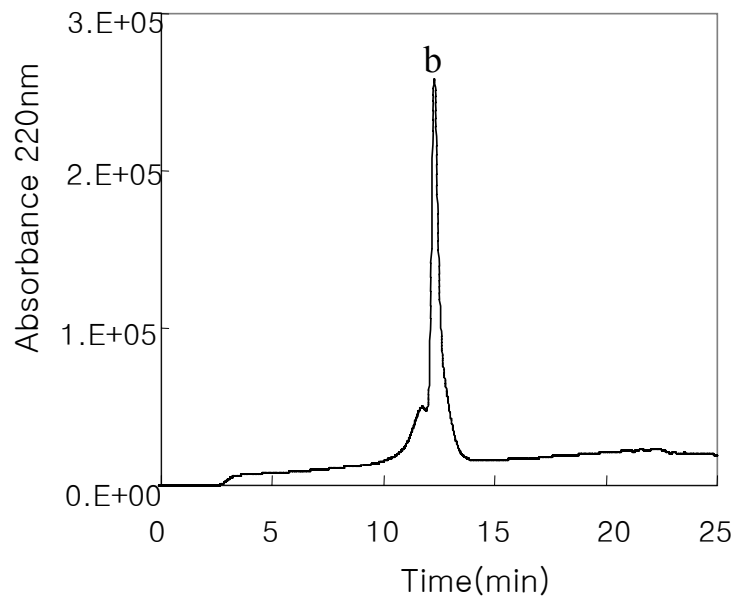


Fig. 33. Reverse phase HPLC rechromatogram of HMG-CoA reductase fraction(Fraction b in Fig. 32) obtained HPLC. Conditions for HPLC : column, semi-preparative C<sub>18</sub> column (Vydac 218TP510); mobile phase, acetonitrile (0 - 25min, 25-35%) ; flow rate 2ml/min

#### (나) Peptide 순도 분석과 분자량 분석

분리한 펩타이드의 분획의 구조를 알아내기 위하여 LC-MS로 우선 분자량을 확인하였다. Electrospray mass spectroscopy를 분석한 결과 약간 분자량이 작은 불순물 peak가 나타나지만 분자량이 상당히 순수한 펩타이드를 얻을 수 있었고 (Fig. 34) 분자량은 645.38 dalton의 펩타이드임을 알아냈다.

#### (다) Peptide 아미노산 배열 순서 분석

그림 33의 fraction을 몇 번에 걸쳐서 받은 후 peptide sequencer (Procise, Perkin Elmer)로 이 기능성 펩타이드의 아미노산 sequence를 분석한 결과 Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg으로 나타났다 (Fig. 35). 이 펩타이드의 분자량 계산값( $113.19 + 97.12 + 163.18 + 97.12 + 156.19 + 18 = 644.80$ )으로 LC spectrum (Fig. 34)에서 뒤의 main peak가 분자량이 645.38이므로 644.80과 큰 차이가 없으므로 이 sequence가 원하는 bile acid 결합능력이 강한 기능성이 강한 펩타이드의 sequence임을 확인 할 수 있었다. 즉 이 결과는 MS 결과와 sequence 결과 정확히 일치함을 알 수 있다.

최근 genomics와 proteomics 기술이 급속히 발달하여 인간의 genome도 밝혀지고 있다. 콩에 관하여도 최근에 알려지기 시작하고 있다. 11S 단백질은 hexamer로 존재하고 이 여섯 개의 globular 단백질은 크게 acid region과 basic region으로 나눈다. acid region의 분자량은 35KD정도되고 basic region은 20KD정도 분자량으로 알려 졌다. 최근 11S 단백질의 아미노산 구조가 DNA의 구조에 의하여 알려지기 시작하였다 (Fig. 36). 11S의



아미노산 배열순서를 분석한 결과 trypsin으로 분해한 11S 분해물에서 찾아낸 콜레스테롤저하 펩타이드 (LPYPR)의 구조가 11S 단백질의 amino acid sequence map에서 찾아냈다. 여러 개의 subunit가 있으나 acid region의 아미노산 90개 정도 근처에 있는 것으로 확인하였다. 어떤 경우 (Fig. 36의 A)는 앞의 Leu대신 Ser으로 대신하여 위치하고 있는 것으로 확인하였다.

### (2) 합성 펩타이드의 분리 및 동정

Trt-resin에 LPYPR과 mutant 펩타이드를 합성한 후 cleavage하여 앞선 조건에서 reversed phase HPLC로 순수 분리할 때 매우 깨끗하게 분리됨을 알 수 있다 (Fig. 37). Electrospray-MS로 동시에 분자량과 순도를 확인한 결과 (Fig. 38), 분리한 펩타이드 보다 훨씬 순도가 높은 펩타이드가 분리되었고, 원하는 펩타이드 sequence가 정확하게 합성되었음을 알 수 있었다.

### (3) 합성 펩타이드와 mutant peptide의 콜레스테롤 저하 기능성

분리한 펩타이드의 담즙산 결합능 (bile acid binding capacity) 콜레스테롤 합성 효소 (HMG-CoA reductase)의 저해능력을 측정한 결과 담즙산이 결합된 resin에 adsorption 되지 않고 wash out 됨을 알 수 있었다. LPYPR 뿐만아니라 다른 mutant peptides (SPYPR, LPYP)도 담즙산 결합 정도를 알 수 없었다. Table 11에서 보듯이 LPYPR와 LPYP는 상당히 소수성 (hydrophobicity)가 강한 것으로 나타났지만 column에 결합되어 있는 bile acid와 결합하지 않았다. 기존의 용액상에서 centrifuge에 의한 bile

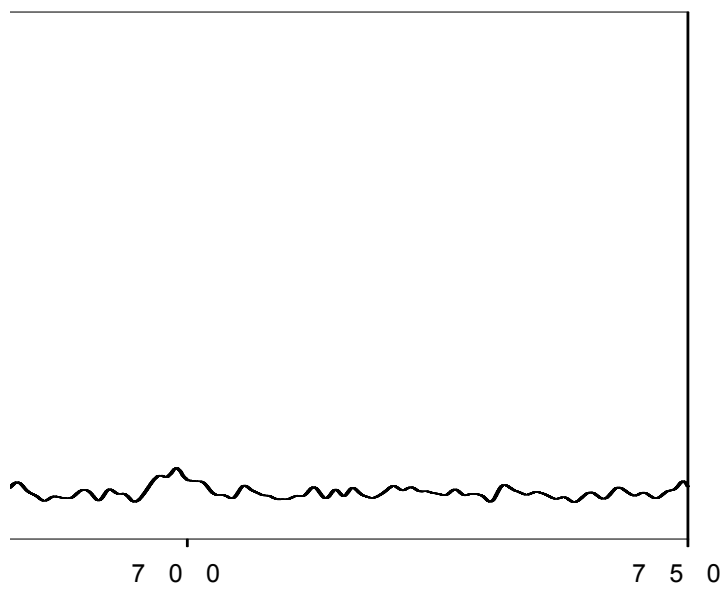


Fig. 34. Electrospray-mass spectrum of active fraction of soyprotein hydrolyzate obtained from HPLC

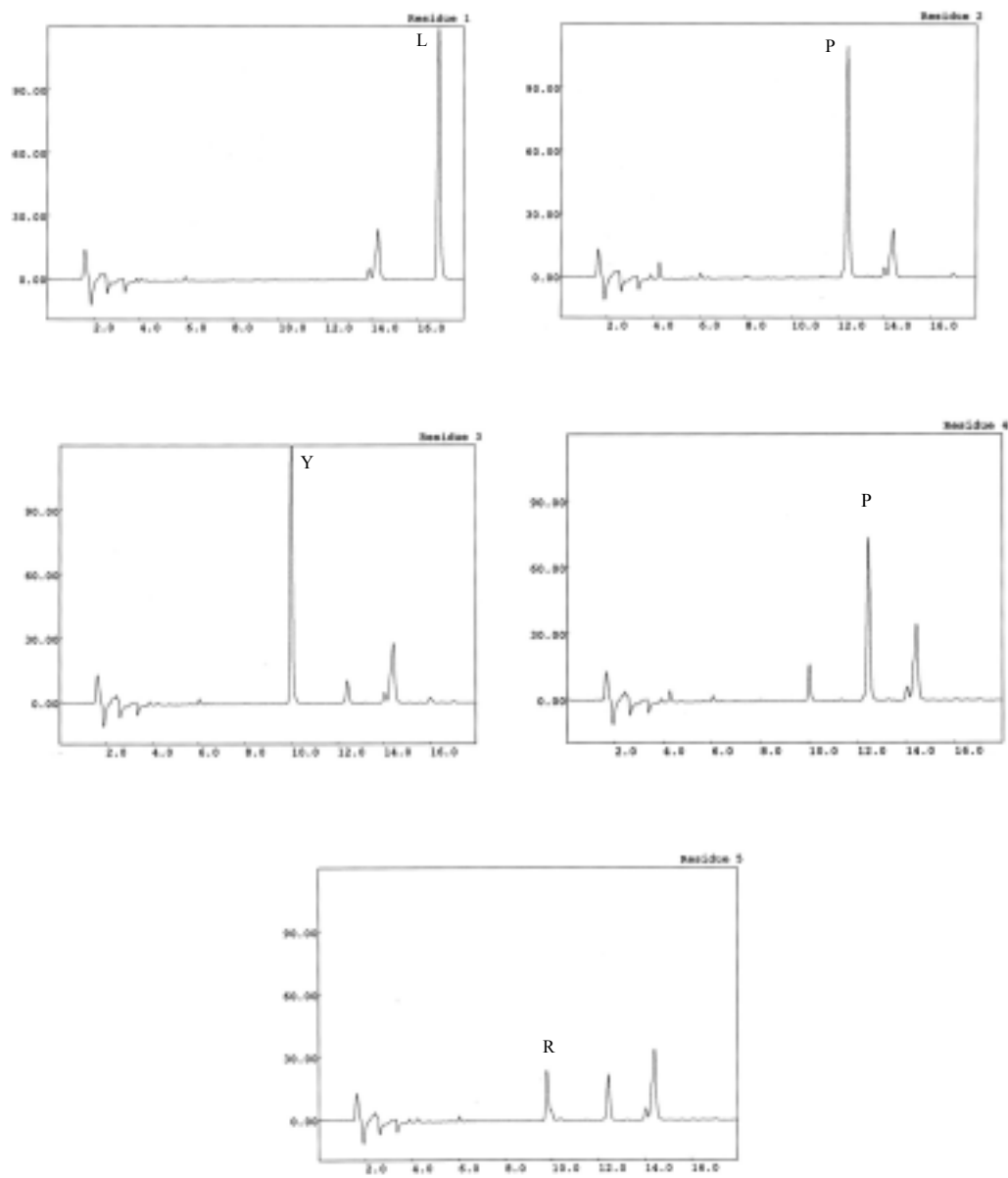


Fig. 35. Chromatograms of the purified hypocholesterolemic peptide from soy protein hydrolyzate by pepsin.

**A****A<sub>5</sub>A<sub>4</sub> B<sub>3</sub>A<sub>a</sub>**

MGKPF<sup>T</sup>LSLS SLCLLLSSA CFAISSKL(F)N ECQLNNLNAL EPDHRVESEG GLIQTWNSQH 60  
 PELKCAGVTV SKLTLNRNGL HS(L)PSYS(L)PYPR MIII(V)AQGKGA LGV(IGM)AI(F)PGCPE 120  
 RRGSR<sup>S</sup>QKQQ LQDSHQKIRH FNEG<sup>D</sup>VLVIP PSVPYWTYNT GDEPVVAISL LDTSN<sup>F</sup>NNQL 180  
 DQTPRVFYLA GNPDI<sup>E</sup>PET MQQQQQQKSH GGRKQ<sup>G</sup>QHQHQQ EEEEEGGSVL SGFSKHFLAQ 240  
 SFNTNEDIAE KLE(Q)SPDDERK QIVTVEGGLS VISPKWQEQQ DEDEDEDEDD EDEQIPSHPP 300  
 RRP<sup>S</sup>HGKREQ DEDEDEDEDK PRPSR<sup>S</sup>PSQ GK RNKTC(EQDQD)QDEDE DEDEDQPRKS REWR<sup>S</sup>SKKTQP 360  
 RRRPQ<sup>E</sup>EPRE RGCETRNGVE ENICTLKLHE NIARPSRADF YNPKAGRIST LNSLTLPALR 420  
 QFQLSAQYVV LYKNGIYSPH WNLNANSVIY VTRGQ<sup>G</sup>KVRV VNCQGN<sup>A</sup>VF<sup>D</sup> GELRRGQLLV 480  
 VPQNFVVAEQ AGEQGF<sup>E</sup>YIV FKTHHNAVTS YLKDV<sup>F</sup>RAIP SEVLAHSYNL RQSQVSELKY 540  
 EGNWG<sup>P</sup>LVNP ESQ<sup>Q</sup>GSPRVK VA 562

**B****A<sub>3</sub>B<sub>4</sub>**

MGKPF<sup>T</sup>LSL SSLCLLLSS ACFAITSSKF NECQLNNLNA LEPDHRVESE GGLIETWNSQ 60  
 HPELQCAGVT VSKRTLNRNG SHLPSY(L)PYPR QMIIVVQGKG AIGFAFP<sup>G</sup>CP ETFEK<sup>P</sup>QQQS 120  
 SRRGSR<sup>S</sup>QQQ LQDSHQKIRH FNEG<sup>D</sup>VLVIP LGVPYWTYNT GDEPVVAISP LDTSN<sup>F</sup>NNQL 180  
 DQNPRV<sup>F</sup>YLA GNPDI<sup>E</sup>HPET MQQQQQQKSH GGRKQ<sup>G</sup>QHRQ QEEEGGSVLS GFSKHFLAQS 240  
 FNTNEDTAEK LRSPDDERKQ IVTVEGGLSV ISPKWQE<sup>Q</sup>ED EDEDEDEEY<sup>G</sup> RTPSYPPRRP 300  
 SHGKHEDDED EDEEEDQPRP DHPPQRPSRP EQQEPRGRGC QTRNGVEENI CTMKLHENIA 360  
 RPSRADFYNP KAGRISTLNS LTLPALRQFG LSAQYVVL<sup>Y</sup>R NGIYSPDWNL NANSVTMTRG 420  
 KGRVRV<sup>V</sup>NCQ GNAVFDGELR RGQLLV<sup>P</sup>QON PAVAEQ<sup>G</sup>GEQ GLEYV<sup>V</sup>FKTH HNAVSSYIKD 480  
 VFRVIPSEVL SNSYNL<sup>G</sup>QSQ VRQLKYQ<sup>G</sup>NS GPLVNP 516

Fig. 36. The amino acid sequence of each subunit of glycinin. In A<sub>4</sub>,A<sub>5</sub>,B<sub>3</sub> and A<sub>3</sub>,B<sub>4</sub>, LPYPR is shown in the acidic regions of glycinin. First 400 amino acid residues are acidic region.

acid binding capacity 측정 (Camiere 방법, 1993)은 펩타이드 분자량이 적고 합성한 펩타이드량이 많지 않아서 적용하기 불가능하였다. 아마도 bile acid binding column에 의한 방법도 적용한 펩타이드량이 적어서 정확한 결합효과를 알 수 없었는지 모른다.

따라서 LPYPR과 mutant 펩타이드에 대하여 HMG-CoA reductase의 저해효과를 측정함으로써 각 펩타이드의 콜레스테롤 저하능을 확인하였다(표 12). 합성 펩타이드가 bile acid binding capacity는 나타내지 않았지만 모든 펩타이드가 HMG-CoA reductase의 저해효과를 보여주고 있다. 특히 LPYPR과 LPYP는 각각 47, 52 % 저해효과를 나타냈다. SPYPR도 약 20%의 저해효과를 보여주고 있다. Bile acid binding 능력은 측정할 수 없지만 (본 결과를 보면 담즙산 결합능력은 있으나 측정하기 어려운 것으로 보인다), 콜레스테롤 합성에 관여하는 효소를 저해하여 콜레스테롤 합성을 막으므로 결과적으로 콜레스테롤 저하능력이 있는 것으로 보인다. 따라서 이들 펩타이드를 이용하여 rat를 이용한 in vivo cholesterol 저하효과를 측정하였다.

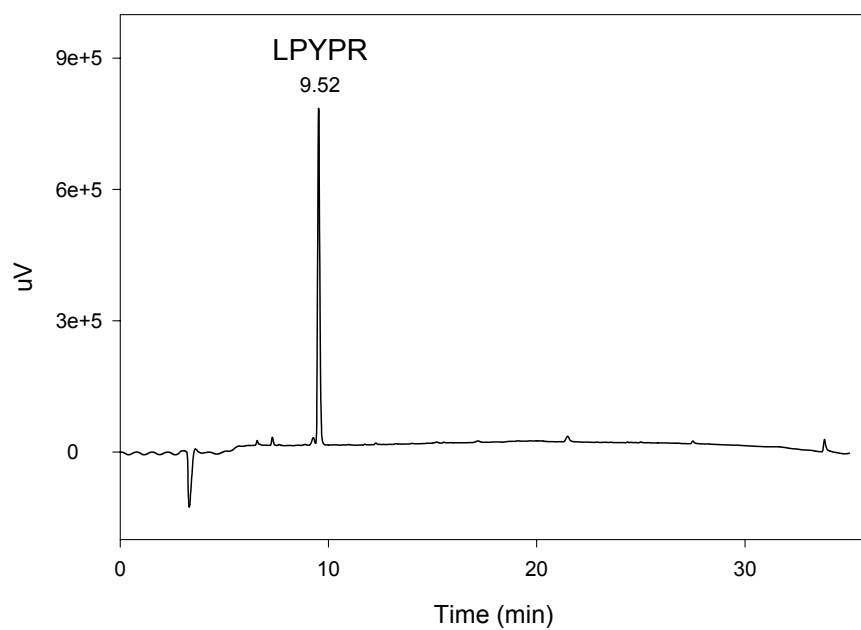


Fig. 37. Reverse-phase HPLC chromatogram of synthesized peptide (Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg). The HPLC conditions for the gradient elution of solvent B (0.1% TFA in acetonitrile) against solvent A (0.1% TFA in water) were as follows; initial, 10% solvent B; 0~30min, 40% solvent B with flow rate of 2.0 mL/min.

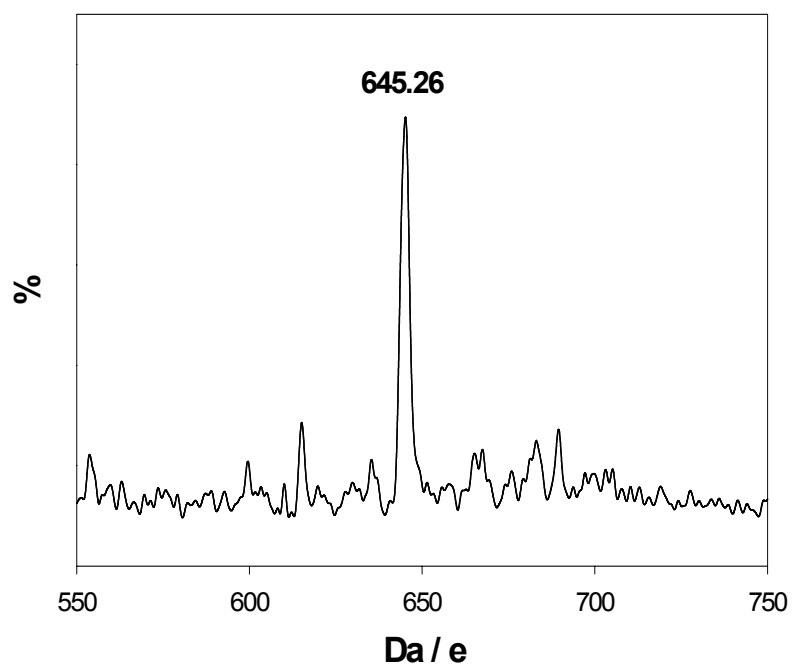


Fig. 38. Electospray-mass spectrum of synthesized Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg peptide. Noise base line is not due to unpure impurity compounds but to the lower concentration of sample.

Table 11. Average hydrophobicity of synthetic peptides <sup>1)</sup>

	Tanford (cal/mol)	Manavalan (cal/mol)	Krigbanm	Meirovitch
LPYP	2.5915	2.0578	7.9835	1.1559
LPYPR	2.1683	1.7692	6.1065	1.0402
SPYPR	1.8487	1.1247	6.1853	0.6967

<sup>1)</sup> The hydrophobicity was calculated as follows ; hydrophobicity =  $\frac{\sum (\text{molecular weight of amino acids}) \times (\text{index of Tanford, Manavalan, Meirovitch and Krigbaum for each amino acids})}{\sum (\text{molecular weight of amino acids})}$



Table 12. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by synthetic peptides.

	Specific activity <sup>1)</sup>	Inhibition rate(%)
None(control)	1.632	0
LPYP	0.860	47
LPYPR	0.860	52
SPYPR	1.315	19

<sup>1)</sup> Unit ; nmoles of CoA produced / min / mg protein

## 6. 대두 단백질의 분자가공조건 확립 및 경제성 연구

### (1) 분해온도 조건

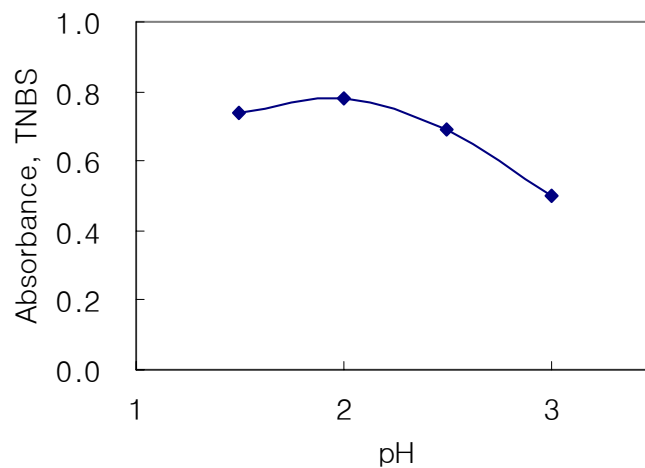
대두단백질의 분해 효소로 pepsin과 trypsin이 bile acid 결합능력이 우수하였으나 앞의 결과를 보면 그중에서 펩신이 분해능, 콜레스테롤 저하 효과, 분리수율, 순서 출현수 그리고 가격면에서 유리하여 우선 펩신을 이용한 대두펩타이드 생산의 조건을 확립하였다.

먼저 pepsin의 효과적인 가수분해 조건을 알아보기 위하여, 기본조건을 pH 2, 40°C, 기질농도 0.045g/ml, pepsin/11S 0.0342g/g으로 하여 온도, pH, 기질농도, 기질에 대한 효소비율을 변화시켜가면서 각각 5시간동안 가수분해하여 TNBS 방법에 따른 분해도를 측정하였을 때 온도 50°C까지도 가수분해도가 올라갔다 (그림 40A). 그러나 동물 protease인 점을 감안하여 온도를 40°C로 고정하여 다음 실험을 수행하였다.

### (2) 분해 pH 조건

많은 pepsin의 반응 조건이 pH 2로 알려져 있다. 하지만 본 실험에서는 이는 확인하기 위하여 앞서 설정한 최적 온도 40°C에서 다른 조건은 동일하게 하고 1.5 - 3의 pH에서의 펩신에 대한 11S의 가수분해도를 측정한 결과 (그림 40B), 예측한 바대로 pH 2.0이 최적 pH이었다. 그러나 pH 2는 매우 강한 산성 pH임으로 실질적 공장 조건에서는 문제가 있을 것으로 사료된다.

**A**



**B**

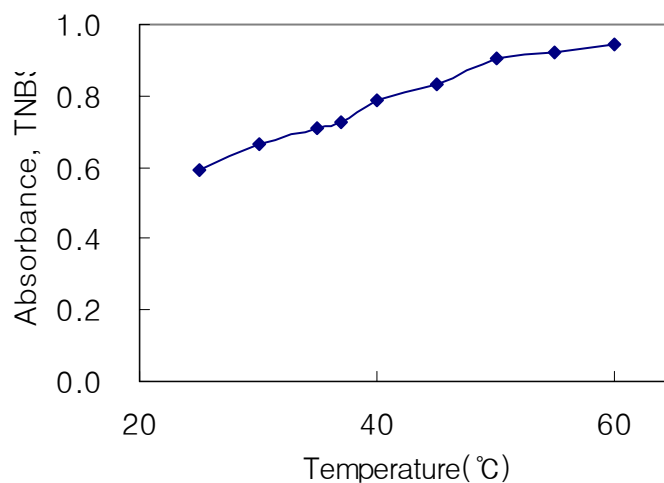


Fig. 40. Effect of temperature (A) and pH (B) for the hydrolytic activity of pepsin on 11S protein. For temperature optimization, the reaction conditions was as follows: pH 2; reaction time, 5 hr; 11S concentration 0.045g/ml, E/S 0.0.342g/g. For pH optimization: the reactions were performed at 37°C for 5hr with 0.045g/ml of 11S concentration and E/S 0.342 (g/g) ratio of E/S.

### (3) 최적 기질농도와 기질/효소 비

기질농도에 의한 영향을 알아보기 위하여 다른 조건은 동일한 상태에서 0.005g/ml - 0.045g/ml의 기질농도에서 가수분해도를 측정하였다. 그림 41A의 결과에 따라 11S의 농도 0.02 g/mL까지는 분해속도가 증가하였으나 그 이상에서는 완만하게 증가하여 일단 0.02g/mL로 정하였다. 그러나 그 이상의 농도로 올려도 크게 문제될 것은 없다고 본다. 기질에 대한 효과적인 효소의 비율을 알아보기 위하여 pH와 온도는 위의 기본 조건과 동일하게 하고 기질농도 0.02g/ml에서 가수분해도를 측정한 결과 (Fig. 41B), 기질에 대한 효소의 비율이 0.02g/g을 최적조건으로 하였다. 여기서 결정한 최적 기질농도와 기질대 효소의 비는 기질을 분리할 때의 경제성, 효소의 원가, 그리고 반응 리액터의 크기에 따라 달라질 수 있으므로 scale-up 실험이 필요하다.

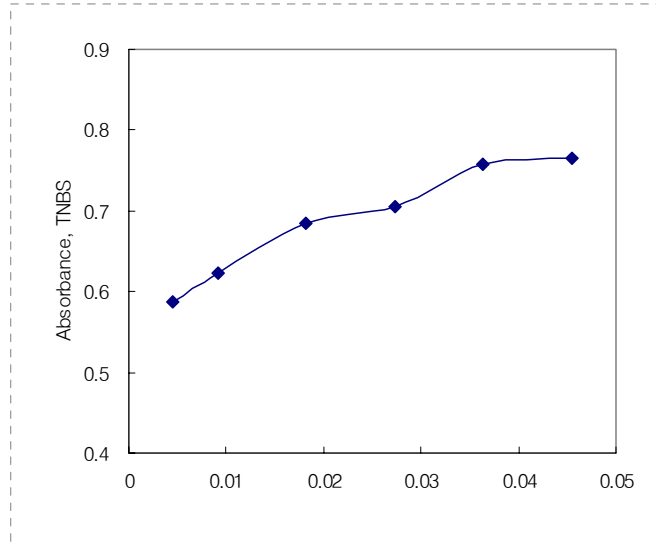
이상의 실험결과 가수분해 최적조건으로 추정되는 조건 (pH 2, 40°C, 기질농도 0.02g/ml, pepsin/11S 0.02g/g)에서 가수분해를 실시하였을 때, 가수분해도 (그림 42A)와 cholic acid binding capacity를 측정한 결과 (그림 42B), 반응시간을 3시간 이내로 하는 것이 경제성이 제일 좋은 것으로 나타났다. 사실 반응시간 5시간 이후에는 가수분해도와 담즙산 결합능력 둘 다 증가하지 않았다.

### (4) 경제성 연구

경제적인 콜레스테롤 저하물질 생산을 위해서 기술적, 경제적 측면에서 검토한 결과 현 상태로서는 단일 peptide로 분리하는 것은 경제성이 없다고 판단되며 단일물질로 제품을 만들기 보다는, 본 연구결과 콜레스테롤

저하 물질로 확인된 peptide물을 함유한 단백질 가수분해물을 생산하는 것이 경제적인 것으로 사료된다. A-B subunit로 분리한 다음 A subunit의 분해물을 만들 것인지, 11S 단백질의 분해물을 만들 것인지에 대한 경제적인 판단은 앞으로 가공공정, 효소가격, 분리공정 등을 종합적으로 검토하여야 할 것으로 본다. 물론 생산 scale에 따라서 경제적인 비용절감이 이루어질 것으로 보인다. 적어도 콩단백질의 가수분해물 보다는 11S 단백질로 분리한 다음 가수분해물을 생산하는 것이 효율적, 경제적 측면에서 상업성이 높을 것으로 판단된다.

A



B

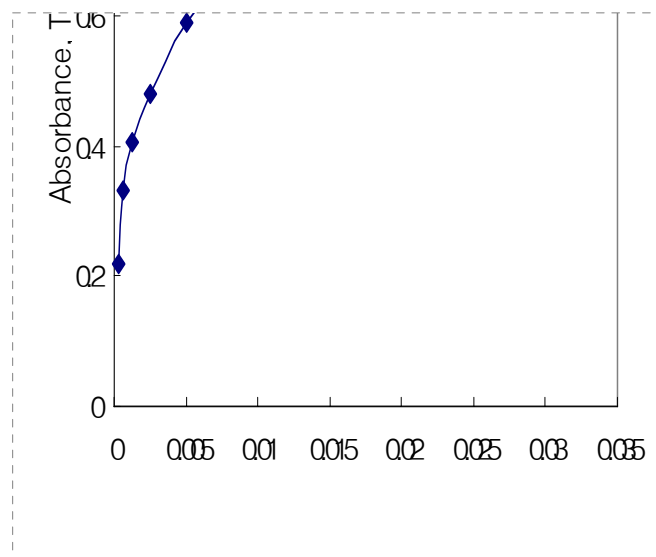
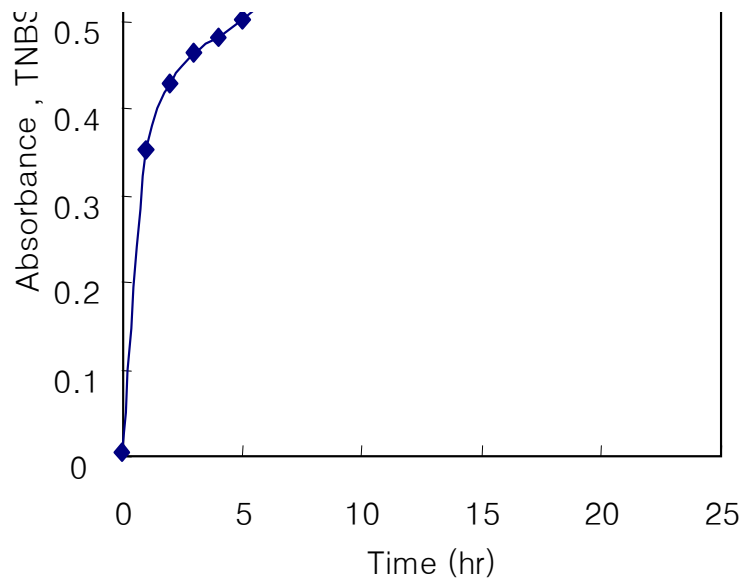


Fig. 41. Effect of 11S concentration (A) and pepsin-11S ratio (B) for the hydrolytic activity of pepsin. The reaction conditions (A): 40°C, pH 2, reaction time 5hr, pepsin concentration 0.004g/ml; (B) 40°C, pH 2, reaction time 5hr, 11S concentration 0.02g/ml.

A



B

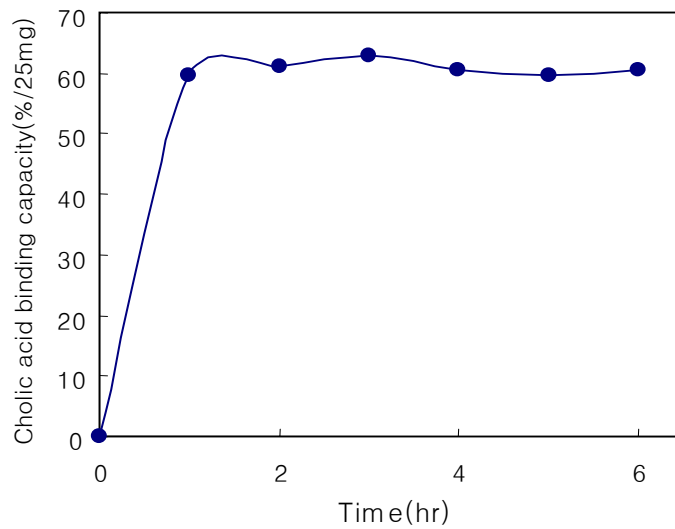


그림 42. Optimizing the hydrolytic reaction time for pepsin catalyzed hydrolysis (A) and cholic acid binding (B). Reaction conditions; 40°C, pH 2, concentration 0.02g/ml, E/S 0.02g/g.

## 7. 11S 분획 및 분자가공획분(peptide)의 콜레스테롤 저하 효과

### (1) HMG-Co A reductase 저해효과 (*in vitro* 효과)

Trypsin 분해물에서 콜레스테롤 저하 펩타이드로 분획한 LPYPR, SPYPR, LPYP를 화학합성 하였으며 이들에 대한 콜레스테롤 저하 효과를 *in vitro* 실험으로 기능성을 확인하였다. SPYPR은 11S의 amino acid sequence를 볼 때, 어느 subunit에서는 LPYPR의 Leu 대신해 Ser으로 치환 (SPYPR) 되어 보이므로 SPYPR을 선정하였으며, LPYPR의 C-terminal 부분에 charge가 있는 arginine을 제거하면 소수성이 증가될 것으로 보임으로 Arg을 제거한 LPYP mutant를 design 하여 아미노산 치환에 따른 콜레스테롤 저하 효과를 보았다.

분리한 펩타이드의 담즙산 결합능 (bile acid binding capacity), 콜레스테롤 합성 효소 (HMG-CoA reductase)의 저해능력을 측정할 결과 담즙산이 결합된 resin에 adsorption 되지 않고 wash out 됨을 알 수 있었다. LPYPR 뿐만아니라 다른 mutant peptides (SPYPR, LPYP)도 담즙산 결합 정도를 알 수 없었다. 표 13에서 보듯이 LPYPR와 LPYP는 상당히 소수성 (hydrophobicity)가 강한 것으로 나타났지만 column에 결합되어 있는 bile acid와 결합하지 않았다. 기존의 용액상에서 centrifuge에 의한 bile acid binding capacity 측정 (Camiere 방법, 1993)은 펩타이드 분자량이 적고 합성한 펩타이드량이 많지 않아서 적용하기 불가능하였다. 아마도 bile acid binding column에 의한 방법도 적용한 펩타이드량이 적어서 정확한 결합효과를 알 수 없었는지 모른다.

따라서 LPYPR과 mutant 펩타이드에 대하여 HMG-CoA reductase의



저해효과를 측정함으로 각 펩타이드의 콜레스테롤 저하능을 확인하였다 (표 14). 합성 펩타이드가 bile acid binding capacity는 나타내지 않았지만 모든 펩타이드가 HMG-CoA reductase의 저해효과를 보여주고 있다. 특히 LPYPR과 LPYP는 각각 47, 52% 저해효과를 나타냈다. SPYPR도 약 20%의 저해효과를 보여주고 있다. Bile acid binding 능력은 측정할 수 없지만 (본 결과를 보면 담즙산 결합능력은 있으나 측정하기 어려운 것으로 보인다), 콜레스테롤 합성에 관여하는 효소를 저해하여 콜레스테롤 합성을 막으므로 결과적으로 콜레스테롤 저하능력이 있는 것으로 보인다.

Table 13. Average hydrophobicity of synthetic peptides <sup>1)</sup>

	Tanford (cal/mol)	Manavalan (cal/mol)	Krigbaum	Meirovitch
LPYP	2.5915	2.0578	7.9835	1.1559
LPYPR	2.1683	1.7692	6.1065	1.0402
SPYPR	1.8487	1.1247	6.1853	0.6967

<sup>1)</sup> The hydrophobicity was calculated as follows ; hydrophobicity =  $\frac{\sum (\text{molecular weight of amino acids}) \times (\text{index of Tanford, Manavalan, Meirovitch and Krigbaum for each amino acids})}{\sum (\text{molecular weight of amino acids})}$

㉔ 14. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by synthetic peptides.

	Specific activity <sup>1)</sup>	Inhibition rate(%)
None(control)	1.632	0
LPYP	0.860	47
LPYPR	0.860	52
SPYPR	1.315	19

<sup>1)</sup> Unit ; nmoles of CoA produced / min / mg protein

(2) 혈중 콜레스테롤 저하 측정 (*in vivo* 실험)

11S, 분획된 A-B subunit, A-subunit, B-subunit를 이용하여 rat에 주입하여 혈중 및 간에서의 콜레스테롤 저하효과를 측정하였다. (그림 43). 11S는 control 보다 27%이상 콜레스테롤 저하효과가 있었으며, A-B subunit와 비슷하게 간, 혈중 콜레스테롤을 저하시켜 주었다. 즉 이 단백질은 *in vitro* 실험 (bile acid binding 및 adsorption)과 마찬가지로 *in vivo* 혈중 또는 간에서의 콜레스테롤 저하 효과 매우 우수한 것으로 나타났다. 그러나 A-B subunit는 11S 보다 약간 떨어지거나 (혈중), 비슷하게 나타났다 (간내). 그러나 B-subunit는 콜레스테롤 저하 효과가 간, 혈중 모두에서 유의적으로 떨어짐을 알 수 있었다.

이들 결과를 종합하여 보면 분명 콜레스테롤 저하 펩타이드가 A-subunit에 있음을 보여주고 있다. 앞으로 분자가공시 11S를 가지고 시행할 것인지 A-subunit로 분해 후 시행할 것인지 자세한 검토가 필요할 것으로 보인다.

(3) 분자가공에 의한 획분의 *in vivo* 콜레스테롤 저하 능력

LPYPR 펩타이드와 LPYP, SPYPR를 rat에 주입하여 혈액내에서의 콜레스테롤 저하효과를 측정하였다. 비교를 위하여 상품화 되어있는 cholestyramine, lovastatin과 그 값을 비교하였다 (그림 44). 여기에서 본바와 같이 LPYPR과 LPYP는 cholestyramine과 lovastatin과 비슷하게 혈중 콜레스테롤을 저하시켜 주었다. 즉 이 펩타이드는 *in vitro* 실험과 마찬가지로 *in vivo* 혈중 콜레스테롤 저하 효과 매우 우수한 것으로 나타났다. 그러나

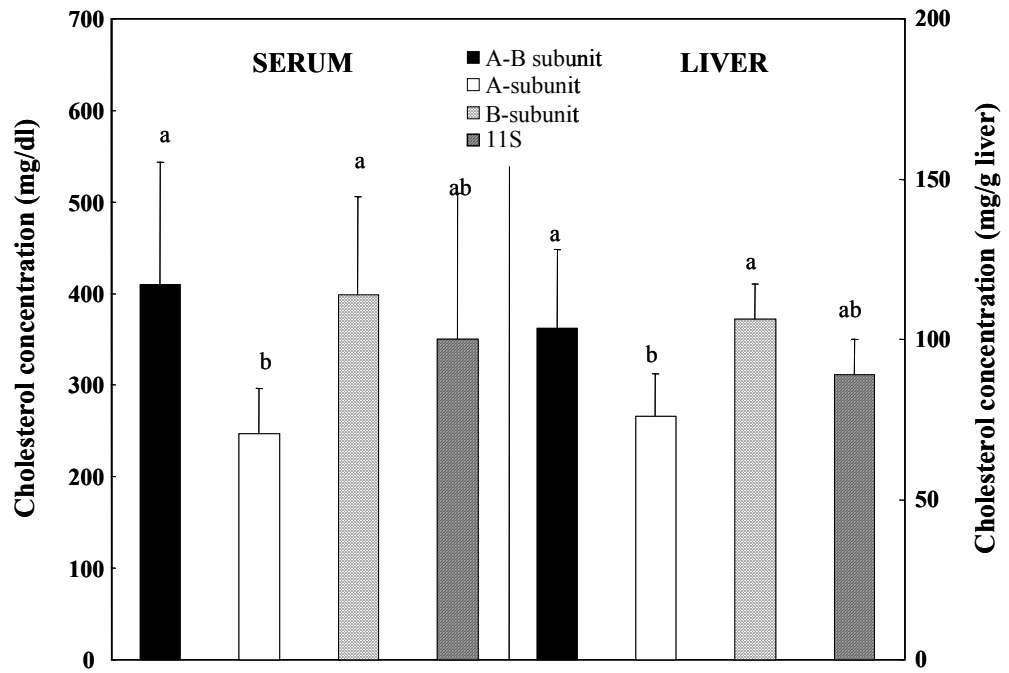


그림 43. Effects of soy protein and ist subunit on serum and liver cholesterol levels in hypercholesterolemia induced rats. Values not sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

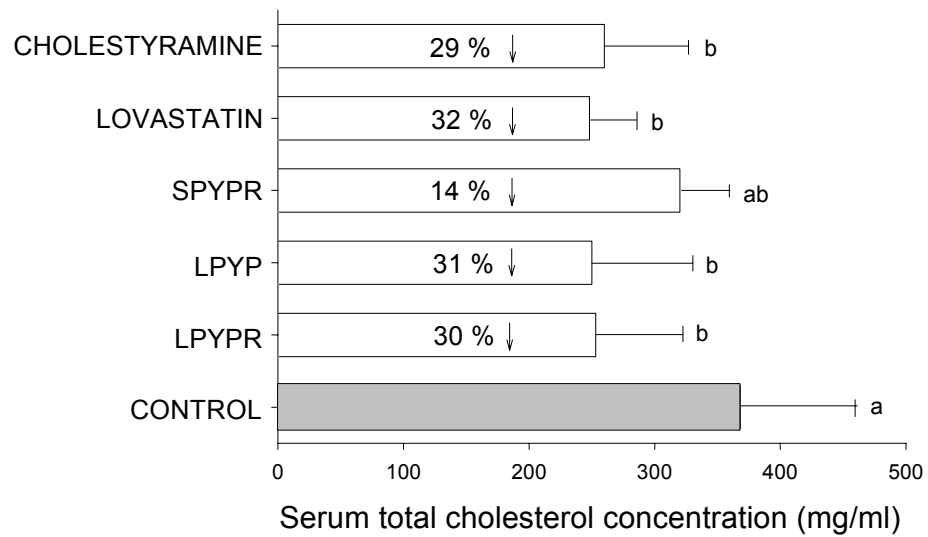


Fig. 44. Effects of LPYP, LPYPR and SPYPR on the reduction of total serum cholesterol in mice. Administration amount of each peptide was 50 mg/kg body per day for LPYP, LPYPR and SPYPR and lostatin, but 500 mg of cholestyramine per kg body was dosed per day. Values are means  $\pm$  SD for 8 mice per group. Values not sharing common letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

N-terminal의 leucine을 serine으로 치환한 SPYPR은 콜레스테롤 저하 효과가 유의적으로 떨어짐을 알 수 있었다. 물론 SPYPR은 LPYPR에 비하여 hydrophobicity가 떨어지지만 콜레스테롤 저하효과도 상당히 떨어졌다. 콜레스테롤 저하효과가 펩타이드의 소수성에 크게 좌우된다고 보고한 논문 (Han, et al, 1993)이 있는 데 단순히 소수성에 의하여 콜레스테롤 저하능력이 있는 것은 아니다. 전체적으로 펩타이드 구조에 의하여 콜레스테롤 저하능이 달라진다. 즉 펩타이드의 1차구조 즉 amino acid sequence에 의하여 결정된다 (Kawamura, 1991). 따라서 단순히 소수성 측정법으로 콜레스테롤 저하 펩타이드를 찾는 것은 받아들일 수 없는 결과로 본다. 특히 LPYP의 경우 LPYPR보다 charge를 띠고 있는 arginine이 제거되었으므로 소수성이 증가되었지만 콜레스테롤 저하능력의 차이에는 큰 변화가 없다.

본 연구 결과는 특이적인 효소나 다른 물질을 이용하여 분자 level에서 매우 특이적으로 가공하는 분자가공기술 이용에 획기적인 전기를 마련한 것으로 보인다. 본 기술을 이용하면 각종 기능성 식품, 항암, 항고혈압, 당뇨, 비만등의 예방식품개발에 크게 활용될 것이다. 분자가공기술을 우리 농산물에 적용하여 먼저 우리 콩단백질을 고부가가치화 경장식이 등 고부가가치화 식품으로 연간 매출은 1,000억대 규모의 시장로 부가가치확대 효과가 있을 것으로 보인다. 좀더 적극적으로 보면 본연구결과를 상업적으로 이용할 때 특히 콜레스테롤 감소 경장식품으로 펩타이드소재 개발에 적극 이용될 것으로 본다.

또한 본 연구의 결과를 현재 SCI 논문 3편 비 SCI인 한국식품과학회지에 1편 발표하였다. 개발기술의 SCI 잡지에 발표로서 우리기술의 세계에 홍보하였다.

## 제 4 장 참 고 문 헌

- Amin D., Gustafson S.K., Weinacht J.M., Cornell S.A., Neuenschwander K, Scotese A.C., Regan J.R., Perrone M.H., M.G. and 12561 (Dalvastatin). A novel synthetic inhibitor of HMG-CoA reductase and cholesterol-lowering agent. *Pharmacology* 46: 13-22 (1993)
- Badley, R. A., Atkinson, O., Oldani, A., Green, J. P. and Stubbs, J. M. 1975. The structure, physical and chemical properties of soybean protein glycinin. *Biochem. Biophys. Acta* 412: 214-219.
- Camire, M. E., Zhao, J. and Violette, D. A. *In vitro* binding of bile acids by extruded potato peels, *J. Agric. Food Chem.* 41: 2391-2393 (1993)
- Cho, W. I. and Moon, T. W. Isolation and partial physicochemical characterization of bile acid-binding fraction from rice bran protein hydrolysates. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 417-426 (1997)
- Cho T-J, Nielsen NC (1989) The glycinin Gy3 gene from soybean *Nucleic Acids Res* 17:4388
- Composition of conformations of 7S and 11S soybean globulins by optical rotatory dispersion and circular dichroism studies. American Association of General Chemists. Inc., 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, Minnesota 55121.
- Edwards, P.A., Lemongello, D. and Fogelman, A.M. Improved methods for the solubilization and assay of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, *J. Lipid Res.*, 20: 40 (1979)



- Farmer, J.A. and Gotto A.M.Jr. Choosing the right lipid-regulating agent. *Drugs* 52: 649-661 (1996)
- Fox, P. F. and Condan, J. J. 1982. *Food Proteins*, Applied Science Publishers, London. p147.
- Fukazawa, C., Momma, T., Hirano, H., Harada, K. and Udaka, K. Glycinin A3B4 mRNA. Cloning and sequencing of double-stranded cDNA complementary to a soybean storage protein. *J. Biol. Chem.* 260: 6234-6239 (1985)
- Han, U.S., Lee, H.J. and Sohn, D.-H. Effect of surface hydrophobicity of soybean peptides on the concentration of serum cholesterol and fecal steroid excretion in rats. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 25: 571-575 (1993)
- Hoshi, Y. and Yamauchi, F. 1983. Determination of sulfhydryl and disulfide contents of soybean 11S globulin and their change by lyophilization. *Agric. Biol. Chem.* 47: 2435-2440.
- Hulcher F.H. and Oleson, W.H. Simplified spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by measurement of coenzyme A. *J. Lipid Res.* 14: 625-631 (1973)
- Iwami, K., Sakakibara, K. and Ibuki, F. Involvement of post-digestion hydrophobic peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins, *Agric. Biol. Chem.* 50; 1217-1222 (1986)
- Kim, S., Kwon, D.Y., Yang, H.J. and Kim, K.S. Glycinin conformation due to pH, Heat, and salt determined by DSC and CD. *Int. J. Food Chem. Technol.* (submitted) (2001)

- Koshiyama, I. 1973. Composition of conformations of 7S and 11S soybean globins by optical rotatory dispersion and circular dichroism studies. American Association of General Chemists. Inc., 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, Minnesota 55121.
- Kwon, D.Y., Yun-Jeong Hong, Suk Hoo Yoon (2000) Enantiomeric synthesis of (S)-2-Methylbutanoic acid methyl ester, apple flavor, using lipases in organic solvent 48(2): 524-530
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680
- Lee, Jung Ran, Dae Young Kwon, Hyun-Kyung Shin, Cha-Bum Yang (1999) Purification and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from kidney bean protein hydrolyzate 8(3):172-178
- Makino S., Nakashima H., Minami K., Moriyama R. and Takao S., Bile acid-binding protein from soybean seed : Isolation, partial characterization and insulin-stimulating activity., *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3, 803-809 (1988)
- Momma T, Negoro T, Hirano H, Matsumoto A, Udaka K, Fukazawa C (1985) Glycinin A5A4B3 mRNA: cDNA cloning and nucleotide sequencing of a splitting storage protein subunit of soybean *Eur J Biochem* 149:491-6
- Nielsen N.C., Dickinson C.D., Cho, T.J., Thanh, V.H., Scallon B.J., Fischer, R.L., Sims, T.L., Drews, G.N. and Goldberg, R.B.

- Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell* 1: 3113-328 (1989)
- Nielson, N.C. 1985. Structure and complexity of the 11S polypeptides in soybean. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 62(12): 1680-1685
- Nielsen NC, Dickinson CD, Cho TJ, Thanh VH, Scallan BJ, Fischer RL, Sims TL, Drews GN, Goldberg RB (1989) Characterization of the glycinin gene family in soybean *Plant Cell* 1(3):313-28
- Nielson, N.C. 1985. Structure and complexity of the 11S polypeptides in soybean. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 62(12): 1680-1685
- Pattinson, N., Collins, D. and Campbell B. Covalent coupling of cholic acid to aminohexylamino-Sepharose 4B and its use in affinity chromatography of serum albumin. *J. Chromat.* 187: 409-412 (1980)
- Qureshi, A.A., Mo, H., Packer, L. and Peterson, D.M. Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3130-3140 (2000)
- Staswick PE, Hermodson MA, Nielsen NC (1984a) The amino acid sequence of the A2B1a subunit of glycinin *J Biol Chem* 259:13424-30
- Sugano, M., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T. and Kimoto, M. The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis* 72: 115-122 (1988)
- Thanh, V. H. and Shibasaki, K. 1976. Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food*

*Chem.* 24: 1117-1121.

Thanh, V. H., Obuko, K. and Shibasaki, K. 1975. The heterogeneity of 7S soybean protein by Sepharose gel chromatography and disc gel electrophoresis. *Agric. Biol. Chem.* 39: 1501-1506.

Umemoto, S. A modified method for estimation of fish muscle protein by biuret methods, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 32, 427-435 (1966)

Yashiro, A., Oda, S. and Sugano, M. Hypocholesterolemic effect of soybean protein in rats and mice after peptic digestion. *J. Nutr.* 115: 1325-1336 (1985)

Waggle, D. H. and Kolar, C. Q. 1978. In: *Soy protein and human nutrition*, P.19. Academic Press, New York.

김승호, 이윤진, 권대영 (1999) 전통된장으로부터 angiotension converting enzyme 저해물질 분리 31(3): 848-854

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.