

GOVP1199904529

664

L293C

최 종
연구보고서

대두 식품으로부터 고기능성 펩타이드
소재의 개발

(Development of high functional peptides
from soybean foods)

연구기관

(주)농심 상품개발연구소

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “대두식품으로부터 고기능성 펩타이드 소재의 개발”에 관한 연구과제의
최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20

주관연구기관명 : (주) 농심
총괄연구책임자 : 신 재 익
 연구원 : 남 희 섭
 연구원 : 이 호 봉
 연구원 : 안 창 원
 연구원 : 안 상 원
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 이 형 주
협동연구기관명 : 한국식품개발연구원
협동연구책임자 : 김 승 호
협동연구기관명 : 경희대학교
협동연구책임자 : 정 대 균

요 약 문

I. 제목

대두식품으로부터 고기능성 펩타이드 소재의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

대두식품으로부터 고기능성, 고부가가치 펩타이드 소재(혈압강하, 항암, 항혈전)의 개발기술을 정립하고, 펩타이드 소재를 이용한 건강지향성 식품개발에 이바지함.

2. 연구개발의 중요성

가. 기술적 측면

최근 식품연구의 발전에 힘입어 식품성분의 기능성이 속속 밝혀지고 있는 가운데 미국에서는 이른바 식품성분과 건강과의 관계를 나타내는 Health claim을 인정하고 있으며, 일본에서는 식품의 기능성에 대한 연구가 활발히 이루어져 특정보건용식품제도가 도입되었다. 여러 식품 성분중에서 식품단백질은 풍부한 자원의 하나로서 영양가치 이외에 여러가지 기능성(Opioid활성, 면역증강활성, 항혈전활성, 혈압강하활성, 칼슘흡수촉진활성, 항콜레스테롤활성 등)을 갖는 펩타이드를 생산하는 소재로 선진국에서는 새로운 식품으로서 암예방식품(미국)이나 특정보건용식품(일본)이 등장하고 있는 실정이다. 이에 국내에서도 독자적인 연구를 통하여 기능성 식품소재의 생산기술의 확보가 절실히 요구되는 시점이다. 고부가가치의 식품소재인 고기능성 펩타이드의 생산을 위하여 요구되는 핵심기술로는 효소공학, 분리 및 정제기술, 단백질공학, 유전공학, 생물공학 등을 들수 있으며

이러한 분야의 통합적이고 체계적인 연구체제로 기술의 진보를 가져올 수 있다. 특히 본 연구에서 시도하는 유전공학 기법을 이용한 고기능성 펩타이드의 대량생산 균주개발은 선진국형 기술의 축적을 위한 중요한 기술이 될 것이다. 또한 고기능성 펩타이드는 그 생리적 활성 뿐아니라 단백질 효소분해물이 가지는 일반적인 물리적, 영양적 기능도 우수하여 용도별로 최적화하여 식품산업에 폭넓게 활용할 수도 있어 식품산업에 미치는 파급효과도 크다.

나. 경제·사회적 측면

WTO체제 출범 후 각종 농수축산물의 수입이 날로 증가하고 있으며, 식품과학 및 식품가공기술의 발달로 고가의 식품소재나 건강보조식품의 수입도 늘어나고 있다. 이러한 농수축산물 및 다양한 식품의 수입개방에 대응하기 위한 방안의 하나로 고부가가치의 식품소재개발이 요구는 실정에서 다양한 기능을 갖는 식품소재를 개발하고 이를 새로운 식품의 창출에 활용함으로써 외국식품의 수입억제 효과 및 국내 식품산업의 해외진출에 기여할 수 있다. 그 중에서도 식품단백질 유래의 펩타이드는 여러가지 기능을 나타냄이 폭넓게 보고되고 있어 이를 이용하는 방안모색이 요구된다. 단백질의 중요원료중 하나인 대두박은 국내 연간 약 700,000톤 생산되고 있으며 가격은 410원/kg이나, 그 가수분해물은 일본의 경우 2,000-5,000엔/kg(일본, 1992년)으로 판매되고 있어 고기능성 펩타이드는 단순한 가수분해물 이상의 경제적 가치와 경쟁력을 가지고 있다.

다. 사회적 측면

국민소득의 증대에 따라 육류의 소비가 증가하는 등 생활패턴이 달라지면서 고혈압, 동맥경화 등 심순환기 계통의 질병 및 각종 암의 발생율이 증가하고 있다. 최근 보건복지부의 보고에 의하면 사망원인별 1위는 암, 2위는 순환계 질환이었다. 따라서 국민보건의 차원에서 이에 대한 대책이 시급히 요망되며, 의료분야

의 대응책 이외에 의식동원이라는 관점에서 식생활의 개선을 통한 접근이 필요하다. 현재 국내외에서는 고소득사회에 따른 건강욕구형 식품의 수요가 날로 급증할 것으로 예상되며 이에 대한 식품산업의 대비가 필요한 실정이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 대두식품으로부터 항고혈압 펩타이드 소재의 개발
 - 1) 여러 대두식품으로부터 항고혈압 활성의 탐색
 - 2) 대두박 가수분해물로부터 항고혈압 펩타이드의 분리

2. 한외여과를 이용한 펩타이드의 대량생산공정 개발

3. 대두식품으로부터 항암 펩타이드 소재의 개발
 - 1) 항암 펩타이드 검색법의 정립
 - 2) 대두박 가수분해물로부터 항암 펩타이드의 분리

4. 대두식품으로부터 항혈전 펩타이드 소재의 개발
 - 1) 항혈전 펩타이드 검색법의 정립
 - 2) 대두박 가수분해물로부터 항혈전 펩타이드의 분리

5. 유전공학기법을 이용한 고기능성 생산균주의 개발
 - 1) 기능성 펩타이드의 대량생산을 위한 expression vector 개발
 - 2) 기능성 펩타이드의 대량생산을 위한 발현 system 개발

6. 기능성 펩타이드의 *In vivo* 효능검정법 정립
 - 1) 대두박 가수분해물의 항고혈압 *In vivo* 효능검정

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 대두식품으로부터 항 고혈압 펩타이드 소재의 개발

대두를 이용한 식품중 혈압강하 활성이 높은 재료를 얻고자 상품화된 대두기원식품과 (주)농심 상품개발연구소에서 제조한 대두박 가수분해물의 ACE 저해활성을 비교, 분석한 결과 (주)농심 상품개발연구소에서 제조한 대두박 가수분해물이 가장 ACE 저해활성이 높았다. 이를 대량제조하여 한외여과를 통하여 저분자 펩타이드를 회수하고 Reverse phase column, Ion exchange column, Gel permeation column을 이용하여 ACE 저해펩타이드를 정제한 결과 처음의 탈지대두박 가수분해물에서는 ACE 저해활성이 140 µg/ml으로 나타났으나 최종 6차 분취물에서는 ACE 저해활성이 1.0 µg/ml로 감소하여 140배의 정제효과를 보였다. 6차 정제물의 아미노산 분석결과 최종 6차 정제물은 Glu, Ser, Gly, Arg, Ala, Pro, Met을 함유하는 펩타이드로서 친수성 아미노산인 Glu, Ser, Gly, Arg를 갖고있는 특징을 보였다.

2. 한외여과를 이용한 펩타이드의 대량생산공정 개발

탈지대두박 가수분해물의 산업적 생산 공정은 다음과 같다. 정제수 1,000 kg이 들어있는 3 ton용량의 효소분해조에 원료 탈지대두박 분쇄물을 300 kg 투입하고 90℃에서 10분 가열한 후 교반하면서 정제수 1,000 kg 을 추가로 투입하여 탈지대두박의 농도를 15%(W/W)로 조정하였다. 온도가 60℃에 도달하면 pH가 8.0이 되도록 조정 한 다음 endopeptidase인 Promod 278을 기질의 0.4% 투입하여 2시간 효소분해하였다. 1차 효소분해가 완료되면 55℃로 냉각한 후 pH를 5.0으로 조절하여 exopeptidase인 Promod 279를 기질의 0.8% 첨가하여 4시간 동안 효소분해하고 분해가 완료되면 90℃에서 15분간 가열하여 효소를 실활시켰다. 이상의 공정으로 얻은 탈지대두박 가수분해물을 press filter로 여과하고 그 여과액을 plate and frame type의 한외여과 장치를 이용하여 막의 종류, 시스템의 온도, 분자량크기, 시료농도, 운전압력 등을

최적화한 결과 50,000 dalton의 평균분획분자량을 갖는 polysulfone계통의 GR type 한외여과막으로 55℃에서 5.5 bar의 압력으로 여과 할 때 ACE 저해활성이 가장 높았으며 비교적 높은 평균투과유속을 유지하였다. 한외여과 결과 1.8배의 정제효과를 볼 수 있었으며 여과액을 분무건조하여 분체물성이 양호한 분말을 얻을 수 있었다.

3. 대두식품으로부터 항암 펩타이드 소재의 개발

대두단백 가수분해물의 항암활성을 알아보고 이 물질을 정제하기 위해 본 연구를 시작하였다. 탈지대두박을 16가지 protease로 가수분해한 뒤 water, methanol, ethanol, butanol, acetone, hexane, mixture of chloroform and methanol로 각각의 가수분해물을 추출하였다. 추출된 가수분해물들을 P388D1에 대해 항암활성을 실험해 본 결과 bromelain-HSP ethanol추출물, thermoase-HSP ethanol 추출물이 높은 항암활성을 보였다. 먼저 bromelain-HSP ethanol 추출물을 한외여과를 이용하여 분자량 10,000이상(B1), 분자량 1,000과 10,000사이(B2), 분자량 1,000이하(B3)로 분획을 하고, 각각의 시료를 P388D1에 대하여 실험한 결과 B1이 가장 높은 항암활성을 보였다. 가장 높은 항암활성을 보인 B1을 역상 HPLC를 이용하여 13가지의 분획으로 나누어 각각의 분획을 항암활성을 측정시 B1-12가 높은 항암활성을 보였다. B1-12의 아미노산 조성은 Asp, Glu, Gly, Pro, Leu이 다량 존재하였으며 TLC 분석에서 당을 포함하고 있는 glycopeptide임이 밝혀졌다. 또한 bromelain-HSP ethanol 추출물외에 활성이 높았던 thermoase-HSP ethanol 추출물을 분획하기 위해 XAD-2 adsorption chromatography를 수행하여 hydrophobic(To)한 부분과 hydrophilic(T1)한 부분으로 나누고 이를 P388D1에 대해 활성실험을 한 결과 To분획의 활성이 T1에 비해 현저히 높았으며, To의 IC₅₀ value 는 63.37 µg/ml이었다. 따라서 To를 더 분획하기 위해 anion exchange chromatography를 수행하여 다섯분획으로 나누었는데 이중 To2의 활성이 가장 높았으며, 이의 IC₅₀ value 는 19.24 µg/ml이었다. To2 fraction은 RP-HPLC에 의해 12분획으로 나누어졌으며 이중 To2-9의 활성이 가장 높았고 IC₅₀ value 는 19.24 µg/ml이었다. Gel permeation chromatography를 수행하여 이를 To2-9-G0,

G1, G2, G3, G4, G5라 명명했으며, 이중 To2-9-G5의 활성이 가장 높았다. 이 fraction에 대해서는 HPLC에 의해 단일 peak임을 확인하였고, MALDI-TOF MS에 의해 분자량 1330 Da. 을 가지는 peptide임을 확인하였다.

4. 대두식품으로부터 항혈전 펩타이드 소재의 개발

순환기계 질병의 원인인 혈전을 예방하고 치료하기 위하여 식품으로부터 항혈전 활성을 갖는 활성 펩타이드를 찾고자 하였다. 대두단백 가수분해물로부터 항혈전 활성을 갖는 펩타이드를 찾고자, SD 흰쥐의 세척혈소판(washed platelet)을 이용하여 ADP 자극으로 유도되는 혈소판응집의 저해정도를 aggregometer에서의 탁도로 측정하였다. 증류수로 추출한 대두단백 가수분해물을 gel permeation chromatography를 행하여 활성이 높은 한 획분을 분취한 후 reverse phase HPLC를 행하였다. Vydac C₁₈ column에 의한 HPLC에 의해 많은 획분이 분리되었으며 모든 획분에서 높은 활성을 나타냈다. 특히 retention time 60분에서 분취한 획분이 항혈전 활성이 가장 높았으므로 이 획분에 대하여 cation exchange chromatography를 행한 결과, 2 개의 획분으로 분리되었으며 모두 높은 항혈전 활성(약 80%의 혈소판응집 저해활성)을 나타냈다. 분리된 펩타이드분획을 각각 HPLC로 desalting한 후 LC-MS를 행하여 순수한 물질임을 확인하였으며 protein sequencer로 그 아미노산 서열을 밝혔다 (H-Asp-Glu-Glu-OH, H-Ser-Ser-Gly-Glu-OH). 이 펩타이드들은 peptide synthesizer를 이용하여 대량으로 합성한 후 reverse-phase HPLC로 분리·정제하였다. 합성된 peptide는 IC₅₀이 각각 485 μ M 과 458 μ M 로서 항혈전 활성이 매우 우수한 것으로 확인되었다.

5. 유전공학기법을 이용한 고기능성 펩타이드 생산균주의 개발

E. coli codon usage 를 바탕으로 합성한 HHL 유전자를 결합시켜주어 HHL 유전자를

반복하여 가진 multiple copy의 HHL 유전자 cassette를 확보하여 cloning vector에 ligation한 결과 3copy의 oligonucleotide expression cassette, 즉, 9 copy의 HHL peptide를 encoding 하고 있음을 DNA sequencing을 통하여 확인하였다. HHL 유전자가 cloning된 overexpression vector를 각각 pMAL-c2-HHL₉, pMAL-p2-HHL₉ 라고 하였고 이는 HHL 유전자 cassette를 3 copy 가지고 있으며, 총 9 copy의 His-His-Leu peptide를 갖는 MBP-HHL fusion protein을 생산할 수 있다. 따라서 pMAL-c2-HHL₉, pMAL-p2-HHL₉를 항고혈압성 His-His-Leu 펩타이드를 생산하는 expression vector frame으로 이용할 수 있으며 한편으로 His-His-Leu를 9 copy coding 하는 expression cassette를 cloning한 pMAL-c2-HHL₉, pMAL-p2-HHL₉를 protease deficient 균주, CAG597, CAG629, KS1000, ER2508 등에 transformation 하였다. 이들 균주는 특정 protease 들이 결핍되어 MBP-HHL fusion protein을 더욱 안정하게 해 주는 역할을 한다. 또한 HHL 펩타이드 생산균주를 0.5 mM IPTG 농도로 P_{tac} promoter를 30°C에서 4시간 동안 induction 하였다. IPTG로 induction한 시료와 induction 하지않은 시료를 12% SDS-PAGE gel에서 electrophoresis를 수행하였다. 그 결과, MBP-HHL₉-β-gal-α fusion protein의 예상 size인 55 kDa 근처인 50~60 kDa에서 induction 되어진 protein band가 확인되었다. crude cell extract를 amylose resin을 이용하여 affinity chromatography 한 결과 각각의 fraction에서 MBP-HHL₉-β-gal-α fusion protein과 cell 안에서 MBP상태로 cleavage가 일어난 protein 및 몇가지의 알 수 없는 protein 등이 확인되었다. 또한 6% prep SDS-PAGE gel electrophoresis를 수행하여서도 단일 band로 정제된 MBP-HHL₉-β-gal-α을 얻을 수 있었다. fusion된 상태에서 활성을 가지지 않는 MBP-HHL₉-β-gal-α을 정제하는 방법으로는 prep SDS-PAGE의 사용이 더욱 유리하였다. 또한 Amicon사의 Centriprep 30으로 정제된 MBP fusion protein을 농축한 후, 농축한 MBP fusion protein에 Factor Xa enzyme을 넣고 반응시켰다. 반응 결과는 SDS-PAGE와 Western Blotting으로 확인하였다. 발현된 fusion protein의 상태는 55 kDa MBP-HHL₉-β-gal-α으로 MBP는 42 kDa, HHL₉-β-gal-α는 13kDa의 size를 갖는다. SDS-PAGE 결과 55 kDa MBP-HHL₉-β-gal-α이 42 kDa의 MBP과 13 kDa의 HHL₉-β-gal-α으로 Factor Xa cleavage가 일어남을 확인하였다. 13 kDa의 HHL₉-β-

gal- α 에 α -chymotrypsin을 넣어주고 반응한 후, HPLC 로 분석한 결과, 다양한 peptide fraction을 얻을 수 있었다. 이들 중 분자량 405 을 포함하는 fraction을 MALDI mass spectroscopy 로 확인한 결과, tripeptide HHL의 peak임을 확인할 수 있었다.

6. 기능성 펩타이드의 *In vivo* 효능검정법 정립

된장 펩타이드에서 분리 정제된 펩타이드 HHL은 *In vitro*에서 강력한 ACE저해활성을 나타내며, HHL을 합성하여 검토한 결과 HHL은 *In vivo*에서 혈압강하효과를 나타낼수 있음이 확인되었다. 또한, 대두 가수분해물 유래 펩타이드 첨가식이 자발성 고혈압 흰쥐에게서 혈압강하효과를 나타낼수 있음이 확인되었으며, 대두 펩타이드의 항고혈압효과는 대두펩타이드의 ACE저해활성 및 혈중 지질 수준의 개선작용을 통해 발현되는 것으로 평가되었다. 이들 결과로 보아, 대두 펩타이드는 고혈압 예방 및 동맥경화 예방을 위한 새로운 기능성 식품소재로서의 활용가치가 매우 높을 것으로 기대된다.

Summary

Recently, not only cancer but also circulatory diseases, such as hypertension, arteriosclerosis, cardiovascular disease are markedly increasing according to the change of food habit from traditional to western style. For the protection and prevention of cancer, hypertension and thrombosis, it was studied to find active peptides from soy foods and to develop novel functional food additives.

First, to produce anti-hypertensive peptides inhibiting angiotensin-I converting enzyme(ACE), screening of ACE inhibitory activity of various soybean foods and purification process were performed. the soybean enzymatic hydrolyzate of soybean had much higher ACE inhibitory activity than other soybean foods such as soybean paste and soy sauce. The enzymatic hydrolyzate was purified with ultrafiltration membrane in order to remove high molecular weight polypeptides. The ACE inhibitory peptide was isolated from reverse phase, ion exchange, gel permeation column. The ACE inhibitory activity of the peptide increase 140 times during purification steps from soybean hydrolyzate. The amino acid composition of this peptides was Gly, Ser, Glu, Arg, Pro, Met, and hydrophilic amino acids(Gly, Ser, Glu, Arg) enriched in this peptides.

Second, mass production of soybean hydrolyzate was made by following method : Distilled water (1,000 kg) was added to defatted soybean 15%(w/w) and heated at 90°C, 10 min, and sample was hydrolyzed with Promod 278(endo-peptidase, Biocatalyst Co. Ltd.) enzyme concentration was 0.4%(w/w), at 60°C, pH 8.0, for 2 hours. Promod 279(exo-peptidase, Biocatalyst Co. Ltd.) was added after first enzyme hydrolysis with enzyme concentration 0.8%(w/w), at 55°C, pH 5.0 for 4 hours, and followed by inactivation at 90°C for 15 min. Using this

hydrolyzate, process optimizations for mass production of ACE inhibitory peptides with ultrafiltration were performed. Among the various kinds of membrane, the GR type, the hydrophobic membrane, had a higher average permeate flux and recovery yield of nitrogen than HEKLA type or ETNA type, the hydrophilic membranes. But their permeates showed similar ACE inhibitory activity ($IC_{50} = 75.3$ to 78.8 ug/ml). As the molecular weight cut-off of membrane increased, the average permeate flux and recovery yield of nitrogen was increased, but their permeates showed similar ACE inhibitory activity. So, the GR60PP membrane, the molecular weight cut-off was 25,000 dalton, had the highest total inhibitory activity. During the ultrafiltration process, average permeate flux was increased according to the temperature increasing, but ACE inhibitory activity was decreased. Considering the next evaporation process, it was determined that optimal temperature was $55^{\circ}C$. As the initial nitrogen concentration for ultrafiltration process effected average permeate flux to decrease, but recovery content of nitrogen to increase, it was determined that optimal initial nitrogen concentration was 0.87 %(w/w). The final ultrafiltrate obtained from overall process was mainly consisted of low molecular weight peptides(83.8 %) lower than 2,000 dalton and had a 1.8 times purified ACE inhibitory activity.

Third, to characterize the anticancer activities of peptides from soybean, defatted soybean was hydrolyzed by various peptidases and the peptides were tested for the cytotoxic activity on several cell lines. Defatted soybean was hydrolyzed by 16 endopeptidases and extracted by water, ethanol, methanol, buthanol, acetone, hexene, a mixture of chloroform and methanol. Among these, ethanol fractions of bromelain-HSP and thermoase-HSP had significant cytotoxic activity on P388D1. The bromelain-HSP was further fractionized by ultrafiltration into B1-B3. Cytotoxicity assay revealed that B1 fraction had

the strongest anticancer activity and its IC_{50} value was $230\mu\text{g}/\text{mL}$. The B1 fraction was further fractionized into 13 fractions by RP HPLC. B1-8 and B1-12 fractions showed strong anticancer activity in cytotoxic assay. Thin layer chromatography and amino acid analysis showed that these fractions contained glycopeptides and comprised high contents of Asp, Glu, Pro, and Leu. The thermoase-HSP was fractionized by XAD-2 adsorption chromatography into hydrophobic (To) and hydrophilic (Ti) fractions. To and Ti were tested for cytotoxicity on P388D1 (mouse monocyte - macrophage: ATCC HB 8065). The fraction To showed stronger anticancer activity than Ti and its IC_{50} value was $63.37\mu\text{g}/\text{mL}$. The fraction To was further fractionized into five fractions by anion exchange chromatography. Among these, To2 fraction showed the strongest anticancer activity and its IC_{50} value was $19.24\mu\text{g}/\text{mL}$. To2 fraction was further fractionized by reverse-phase high performance liquid chromatography into 12 fractions. Among these, To2-9 had the strongest anticancer activity and its IC_{50} value was $30.60\mu\text{g}/\text{mL}$. The fractions obtained by gel filtration chromatography were named as To2-9-G0, G1, G2, G3, G4, and G5. Among these fractions, To2-9-G5 had relatively high anticancer activity. This fraction was confirmed in a HPLC as a single peak, and its molecular weight was determined as 1330Da by MALDI-TOF MS.

Fourth, in order to search for antithrombotic peptides from soyprotein hydrolyzates, the inhibitory activities of soyprotein hydrolyzates and the peptide fraction on ADP-induced aggregation of washed platelets were assayed. The cold water extracts of soyprotein hydrolyzate was fractionated by gel permeation chromatography. Only one fraction showed antithrombotic activity. When the fraction was divided into many fractions by reverse phase HPLC with Vydac C_{18} column, all fractions had high antithrombotic activities. The most antithrombotic active peak at 60 minutes retention time among several active

fractions was separated into two different active fraction by cation exchange HPLC, all of which appeared to be high antithrombotic activity (inhibition rate of platelet aggregation, 80%). The peptide fractions were further purified and identified by a combination of automated Edman degradation and ion-spray mass spectrometry. The sequence of peptides were *Asp-Glu-Glu* and *Ser-Ser-Gly-Glu*. The peptides were synthesized with the Fastmoc solid-phase peptide synthesis and purified by reversed-phase HPLC. The synthetic peptides had high antithrombotic activities (IC₅₀ value were 485 & 458 μ M).

Fifth, the tripeptide His-His-Leu, derived from Soybean paste is identified as the angiotensin converting enzyme inhibitor which lowers blood pressure. To overproduce this antihypertensive peptide in *E.coli*, we constructed oligonucleotide cassette encoding three times repeated His-His-Leu, and subcloned into maltose-binding-protein fusion vector pMAL-c2 and pMAL-p2 and resulting in pMAL-c2-HHL₃ and pMAL-p2-HHL₃, respectively. The fusion protein, His-His-Leu fused to maltose-binding-protein(MBP) was overexpressed in protease-deficient *E.coli* transformants bearing pMAL-c2-HHL₃ and pMAL-p2-HHL₃ by 1mM IPTG induction and purified by amylose affinity chromatography and preparative SDS-PAGE. Factor Xa and α -chymotrypsin was used to isolate the tripeptide His-His-Leu from the MBP-HHL fusion protein. The digested fusion peptides including recombinant tripeptide HHL was fractionated by gel filtration chromatography. The tripeptide HHL that has same molecular weight with synthesized HHL was identified by MALDI mass spectroscopy.

Sixth, to develop a novel functional food for preventing hypertension or atherosclerosis, soybean peptide was investigated for its antihypertensive or antiatherosclerotic activities *In vivo*. Effects of soybean hydrolysates UF-peptide prepared by ultrafiltration and soybean peptide (soypep279) by modification of the UF-peptide were evaluated their action on blood pressure,

selected biochemical changes in spontaneously hypertensive rats (SHR). Male SHR were divided into three groups and fed diets with UF-peptide or soypep279 for 6-8 weeks. Development of hypertension was determined by tail cuff method during the experimental period. After the experimental period, angiotensin I converting enzyme (ACE) activity and vascular tissue, and lipids level in serum or plasma were measured. Spontaneous elevation of blood pressure was suppressed by the UF-peptide supplementation after two weeks of feeding. After five weeks of feeding the development of hypertension was significantly inhibited in the UF-peptide administered groups compared to control. There were no histological changes in various organs in SHR fed UF-peptide or soypep279. In addition, the UF-peptide and soypep279 were effective for lowering serum/plasma lipids level such as triglyceride and total cholesterol, and LDL-cholesterol as well as lowering atherosclerotic index, indicating that the soybean peptide exerts antiatherosclerotic activity, as well as antihypertensive activity *In vivo*. The active site of the peptide derived from Korean soybean fermented paste for inhibiting ACE activity *In vitro* has been shown to be His-His Leu (HHL). In order to confirm whether the HHL exerts antihypertensive activity *In vivo*, we prepared synthetic HHL and investigated its antihypertensive effect *In vivo* on SHR. HHL was injected into vein femoralis in SHR and then the change of systolic blood pressure in artery of vervis was measured for 100 min by using poly-graph 1000 (Letica Scientific Instrument). Synthetic peptide HHL resulted in significant decrease of blood pressure in SHR. After 20 min of the third injection of HHL, the blood pressure was significantly decreased compared to control ($p < 0.01$). Our results demonstrated that soybean hydrolysates exerted antihypertensive and antiatherosclerotic activities *In vivo*, which were associated with the inhibitory activity of ACE and the lowering activity of lipids levels in serum

or plasma. Soybean peptide could be useful to develop a novel functional food additive for preventing hypertension or atherosclerosis.

CONTENTS

SUMMARY

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. Development of antihypertensive peptides from soybean foods

Section 1. Purification of antihypertensive peptides from soybean foods

Section 2. Development of plant scale production with ultrafiltration

Chapter 3. Development of anticancer peptides from soybean foods

Chapter 4. Development of antithrombotic peptides from soybean foods

Chapter 5. Development of bioactive peptides overproduction from soybean foods

Chapter 6. *In vivo* test of functional peptides

Chapter 7. Development of functional peptides in food ingredients

References

목 차

제 1 장 서론 -----	31
제 2 장 대두식품으로부터 항고혈압 펩타이드소재의 개발 -----	48
제 1 절 대두식품으로부터 항고혈압 펩타이드의 분리 및 정제 -----	48
1. 연구수행방법 -----	48
가. 여러 대두식품으로부터 항고혈압 활성의 탐색 -----	48
나. 혈압강하 펩타이드의 추출 -----	48
다. 1차 HPLC 분취 -----	48
라. 2차 HPLC 분취 -----	49
마. 3차 HPLC 분취 -----	49
바. 4차 chromatography -----	49
사. 5차 chromatography -----	49
아. 6차 chromatography -----	50
자. Total Nitrogen(TN) 분석 -----	50
차. ACE 저해활성 측정 -----	50
카. 총 아미노산 분석 -----	50
2. 연구수행결과 -----	51
가. 여러 대두식품으로부터 항고혈압 활성의 탐색 -----	51
나. 혈압강하 펩타이드의 추출 -----	51
다. 1차 chromatography -----	51
라. 2차 chromatography -----	52
마. 3차 chromatography -----	52
바. 4차 chromatography -----	52
사. 5차 chromatography -----	52
아. 6차 chromatography -----	52

자. Chromatography 정제도에 따른 ACE 저해활성 비교 -----	53
차. 각 column chromatography의 step별 아미노산 분석 -----	54
제 2 절 한외여과를 이용한 펩타이드의 대량생산 공정개발 -----	55
1. 연구수행방법 -----	55
가. 탈지대두박 가수분해물의 산업적 제조 -----	55
나. 한외여과 이용한 펩타이드의 대량생산 -----	55
다. 산업적 분리공정의 최적화 -----	56
2. 연구수행결과 -----	56
가. 최적 막의 종류 선정 -----	56
나. 최적 운전온도 선정 -----	57
다. 최적 시료농도 선정 -----	58
라. 최적 운전압력 선정 -----	58
마. 산업적 분리공정의 최적화 -----	58
제 3 장 대두식품으로부터 항암펩타이드의 분리 및 정제 -----	60
1. 연구수행방법 -----	60
가. 대두단백 가수분해물의 제조 -----	60
나. 펩타이드의 용매 추출 -----	60
다. 펩타이드 용매 추출물의 항암활성 분석 -----	60
라. 함암 펩타이드의 정제 -----	62
2. 연구수행결과 -----	62
가. Bromelain/EtOH 항암 펩타이드의 정제 -----	62
1) Fractionation by ultrafiltration -----	62
2) Bromelain/EtOH B1 분획의 역상 HPLC 수행 -----	62
3) Bromelain/EtOH B1-8 및 B1-12 분획의 아미노산 분석 -----	63
4) Bromelain/EtOH B1-8 및 B1-12 분획의 박층 크로마토그래피 -----	63
5) Bromelain/EtOH 항암 펩타이드의 특성 -----	64

나. Thermoase/EtOH 추출물 항암 펩타이드의 정제 -----	64
1) XAD-2 흡착 크로마토그래피에 의한 소수성 펩타이드의 분획 -----	64
2) Thermoase/EtOH 소수성 펩타이드 분획의 항암활성 분석 -----	65
3) Thermoase에 의한 가수분해도 측정 -----	65
4) Thermoase To 소수성 펩타이드 분획의 이온교환 크로마토그래피 -----	65
5) Thermoase/EtOH To 세부분획들의 염 제거 -----	66
6) Thermoase/EtOH To 세부분획들의 항암활성 분석 -----	66
7) Thermoase/EtOH To2 분획의 역상 HPLC 수행 -----	67
8) Thermoase/EtOH To2 역상 HPLC 세부분획들의 항암활성 검정 -----	67
9) Thermoase/EtOH To-9 분획에 대한 gel filtration chromatography -----	68
10) Thermoase/EtOH To2-9-G 분획에 대한 항암활성 -----	68
11) Re-RP HPLC 수행 -----	69
12) Re-RP HPLC peak의 분자량 확인 -----	69
제 4 장 대두식품으로부터 항혈전 펩타이드 소재의 분리 및 정제 -----	70
1. 연구수행방법 -----	70
가. 대두단백가수분해물의 항혈전 검정(<i>in vitro</i>) -----	70
1) 항혈전 assay (<i>in vitro</i>) -----	70
2) 혈소판 분리 -----	70
3) 혈소판 응집 실험 -----	70
나. 대두단백 가수분해물의 항혈전 펩타이드의 분리 -----	71
다. 분리된 획분의 동정 -----	72
라. 동정한 펩타이드의 합성 및 분리 -----	72
마. 합성 펩타이드의 항혈전 검정(<i>in vitro</i> 와 <i>in vivo</i>) -----	72
2. 연구수행결과 -----	73
가. 대두단백가수분해물의 항혈전 검정(<i>in vitro</i>) -----	73
나. 대두단백가수분해물의 항혈전 펩타이드의 분리 -----	73

1) Gel permeation chromatography에 의한 분리 -----	73
2) Semi-preparative reverse phase HPLC에 의한 분리 -----	73
3) 새로운 protocol에 의한 분획 -----	74
4) Gel permeation chromatography에 의한 충분한획분의 확보 -----	74
5) 새로운 조건에서의 reverse phase HPLC에 의한 분리 -----	75
6) Cation exchange HPLC에 의한 분리 및 reverse phase HPLC에 의한 desalting -----	75
다. 분리된 획분의 동정 -----	76
1) LC-MS에 의한 동정 -----	76
2) Sequencer에 의한 동정 -----	76
라. 동정한 펩타이드의 합성 및 분리 -----	76
1) 동정한 펩타이드의 합성 -----	76
마. 합성 peptide들의 항혈전 검정(<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>) -----	77
 제 5 장 유전공학기법을 이용한 고기능성 펩타이드의 대량생산균주의 개발 ----	78
1. 연구수행방법 -----	78
가. 혈압강하 펩타이드(ACE inhibitory peptide)발현 vector 개발 -----	78
1) 혈압강하펩타이드 유전자의 합성 -----	78
2) multiple copy의 HHL 유전자 cassette 제작 -----	78
3) Cloning vector 와 HHL 유전자의 Ligation -----	78
4) E.coli 로의 Transformation -----	79
5) PCR을 통한 HHL 유전자의 확인 -----	79
6) DNA Sequencing을 통한 HHL 유전자의 확인 -----	79
나. 혈압강하 펩타이드(ACE inhibitory peptide)의 발현 시스템 구축 및 대량생산 균주 개발 -----	80
1) overexpression vector pMAL-p2, pMAL-c2 로의 subcloning -----	80
2) 유전공학기법을 이용한 혈압강하 펩타이드 생산 균주의 확보 -----	80

3) IPTG induction을 통한 혈압강하 펩타이드 생산균주의 확인 -----	80
다. 혈압강하 펩타이드의 대량생산 -----	81
1) IPTG induction & Sonication -----	81
2) Amylose affinity chromatography -----	81
3) Preparative SDS-PAGE -----	82
4) Factor Xa 처리 -----	82
5) Chymotrypsin 처리 -----	82
6) HPLC를 통한 HHL의 정제 -----	83
7) MALDI(Matrix-associated laser desorption/ionization) mass-spectroscopy를 이용한 HHL의 확인 -----	83
2. 연구수행결과 -----	83
가. 혈압강하 펩타이드발현 vector 개발 -----	83
1) 혈압강하펩타이드 유전자의 합성 -----	83
2) multiple copy의 HHL 유전자 cassette 제작 -----	84
3) Cloning vector 와 HHL 유전자의 Ligation -----	84
4) <i>E. coli</i> 로의 Transformation -----	84
5) PCR을 통한 HHL 유전자의 확인 -----	84
6) DNA Sequencing을 통한 HHL 유전자의 확인 -----	85
나. 혈압강하 펩타이드의 발현 시스템 구축 및 대량생산 균주 개발 -----	85
1) overexpression vector pMAL-p2, pMAL-c2 로의 subcloning -----	85
2) 유전공학기법을 이용한 혈압강하 펩타이드 생산 균주의 확보 -----	86
3) IPTG induction을 통한 혈압강하 펩타이드 생산균주의 확인 -----	86
다. 혈압강하 펩타이드의 대량생산 -----	86
1) Amylose affinity chromatography -----	86
2) preparative SDS-PAGE -----	87
3) Factor Xa 처리 -----	87
4) Chymotrypsin 처리 -----	87

5) Mass spectroscopy를 통한 tripeptide His-His-Leu의 확인 -----	87
제 6 장 기능성 펩타이드의 <i>in vivo</i> 활성검증 -----	89
1. 연구수행방법 -----	89
가. 실험동물 및 사료조제 -----	89
나. UF-peptide 제조 -----	89
다. HHL 펩타이드 합성 -----	90
라. 비관혈식 혈압측정 -----	90
마. 관혈식 혈압측정 -----	90
바. 생화학적 검사 및 조직중 ACE 조효소액 조제 -----	90
사. HMG-CoA reductase 효소원 조제 및 활성측정 -----	91
아. 장기중량 측정 및 병리조직학적 검사 -----	92
자. 통계처리 -----	92
2. 연구수행결과 -----	92
가. 대두가수분해물에서 분리한 UF-peptide가 <i>in vivo</i> 에서 자발성 고혈압 흰쥐의 혈압 강하에 미치는 영향 -----	92
나. 합성 펩타이드 His-His-Leu에 의한 자발성 고혈압 흰쥐의 혈압 강하효과 -----	95
다. 분무건조한 대두가수분해물 SoyPep279 식이투여가 자발성 고혈압 흰쥐의 혈중지질수준 및 혈압강하에 미치는 영향 -----	96
제 7 장 기능성 펩타이드 식품소재의 개발 -----	100
1. 연구수행방법 -----	100
가. 기능성 펩타이드 분말(SoyPep279)의 제조 -----	100
나. 기능성 펩타이드 분말(SoyPep279)의 특성분석 -----	100
2. 연구수행결과 -----	100
가. 기능성 펩타이드 분말(SoyPep279)의 제조 -----	100

나. 혈압강하 펩타이드 분말(SoyPep279)의 특성 -----	101
제 8 장 참고문헌 -----	102

List of Table

Table 1. Effect of soy foods on ACE activity -----	106
Table 2. ACE inhibitory activity of permeate and retentate on ultrafiltration -----	107
Table 3. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the ultrafiltration -----	108
Table 4. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the first reverse phase HPLC of the peptide fraction -----	109
Table 5. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the second ion exchange HPLC of the peptide fraction -----	110
Table 6. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the third gel permeation column HPLC of the peptide fraction -----	111
Table 7. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the fourth reverse phase HPLC of the peptide fraction -----	112
Table 8. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the fifth gel permeation column HPLC of the peptide fraction -----	113
Table 9. Purification of ACE inhibitory peptides from the soybean hydrolysate -----	114
Table 10. Total amino acid composition of purification steps -----	115
Table 11. Type of ultrafiltration membranes used in this experiment -----	116
Table 12. Several membranes with different molecular weight cut-off used in experiment -----	117
Table 13. ACE inhibitory activity of permeate on several ultrafiltration membranes -----	118
Table 14. ACE inhibitory activity of permeates on ultrafiltration membrane GR60PP with different operating temperatures -----	119

Table 15. ACE inhibitory activity of permeates on ultrafiltration membrane GR60PP with different feeding concentration -----	120
Table 16. ACE inhibitory activity of permeates on ultrafiltration membrane GR60PP with different operating pressure -----	121
Table 17. Conditions of enzyme hydrolysis for anticancer peptide production -----	122
Table 18. Cytotoxicity of various enzymatic hydrolysates of soybean protein extracts on P388D1: a mouse monocyte-macrophage cell line -----	123
Table 19. Amino acid composition of reverse-phase HPLC fractions : : B1-B, B1-12 -----	124
Table 20. Antithrombic activity of the synthetic peptides -----	125
Table 21. Condition and recipe of PCR -----	126
Table 22. Effect of UF-peptide on the weight of organs in SHR -----	127
Table 23. Effect of His-His-Leu peptide on the change of blood pressure in SHR -----	128
Table 24. Daily SoyPep279-diet intake of young and old SHR -----	129
Table 25. Effect of SoyPep279 on the weight of various organs in young SHR -----	130
Table 26. Effect of SoyPep279 on the weight of various organs in old SHR -----	131
Table 27. Effect of SoyPep279 on the Atherosclerotic index (AI) in young SHR -----	132
Table 28. Effect of SoyPep279 on the Atherosclerotic index (AI) in old SHR -----	133

List of Figure

Fig. 1.	The preparative HPLC of the less than MWCO = 10,000 ultrafiltration permeate on on reverse phase column -----	134
Fig. 2.	The preparative HPLC of the F6 fraction on anion exchange column -----	135
Fig. 3.	The preparative HPLC of the F6 fraction on reverse phase column -----	136
Fig. 4.	The preparative HPLC of the F634 fraction on gel permeation column -----	137
Fig. 5.	The preparative HPLC of the F6342 fraction on reverse phase column -----	138
Fig. 6.	The preparative HPLC of the F6342-B fraction on gel permeation column -----	139
Fig. 7.	Average permeate flux of soybean enzymatic hydrolyzates on different ultrafiltration membrane -----	140
Fig. 8.	Nitragen rejection ratio of permeate on different ultrafiltration membrane -----	141
Fig. 9.	In vitro cytotoxicity of ultrafiltration fractions of Bromelain/EtOH peptides on P388D1, B1 -----	142
Fig. 10.	The reverse-phase HPLC chromatogram and cytotoxicity of HPLC subfractions -----	143
Fig. 11.	Thin layer chromatogram of reverse-phase HPLC subfractions ----	144
Fig. 12.	Cytotoxicity of hydrophilic Ti and hydrophobic To fractions obtained by XAD-2 adsorption chromatography on P388D1 cell line -----	145
Fig. 13.	Standard curve for measuring the degree of soy protein	

hydrolysis -----	146
Fig. 14. Ion exchange chromatogram of thermoase/EtOH To fraction which was obtained by XAD-2 adsorption chromatography -----	147
Fig. 15. Cytotoxicity of To1, To2, To3, To4 and To5 obtained by ion exchange chromatography on P388D1 -----	148
Fig. 16. The reverse-phase HPLC chromatogram of To2 -----	149
Fig. 17. Cytotoxicity of HPLC fractions on P388D1 at 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration of peptides -----	150
Fig. 18. The gel filtration chromatogram of thermoase/EtOH To2-9 fraction -----	151
Fig. 19. Cytotoxicity of To2-9-G0 to To2-9-G5 at 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration of peptides on P388D1 -----	152
Fig. 20. HPLC chromatogram of To2-9-G5 -----	153
Fig. 21. Molecular weight of To2-9-G5 -----	154
Fig. 22. Scheme of antiplatelet aggregation assay by aggregometer -----	155
Fig. 23. Gel permeation chromatography of soy protein hydrolysate developed by Nong Shim Co. Ltd. on Sephadex G-25 column -----	156
Fig. 24. Purification of the antithrombotic peptides from the active fraction of gel permeation chromatography column -----	157
Fig. 25. Cation exchange chromatography of the active fraction from reverse phase HPLC -----	158
Fig. 26. Mass spectrum of the first fraction collected from the HPLC profile -----	159
Fig. 27. Mass spectrum of the second fraction collected from the HPLC profile -----	160
Fig. 28. Purification of the synthetic peptide (DEE) by HPLC -----	161
Fig. 29. Purification of the synthetic peptide (SSGE) by HPLC -----	162

Fig. 30. The oligonucleotide cassette of ACE inhibitory peptide -----	163
Fig. 31. Agarose gel electrophoresis of pUC19-HHL9 that has nine copies of ACE inhibitory peptide -----	164
Fig. 32. The DNA sequences of cloned HHL expression cassette in pUC19	165
Fig. 33. The plasmid map of pMAL-c2-HHL9, pMAL-p2-HHL9 -----	166
Fig. 34. IPTG induction on E. coli ER2580 strains bearing pMAL-c2-HHL9	167
Fig. 35. SDS-PAGE profile of [MBP]-[HHL]9-[β -gal- α] from Amylose affinity chromatography -----	168
Fig. 36. SDS-PAGE analysis of MBP-HHL9- β -gal- α cleavage of Factor Xa treatment -----	169
Fig. 37. Western Blot analysis of MBP-HHL9- β -gal- α cleavage of Factor Xa treatment -----	170
Fig. 38. MALDI mass spectroscopy analysis of HHL ₉ - β -gal- α cleavage fraction -----	171
Fig. 39. Effect of UF-peptide on the change of body weight gain in SHR	172
Fig. 40. Effect of UF-peptide on the serum GOT and GPT activities in SHR -----	173
Fig. 41. Effect of UF-peptide on the change of blood pressure in SHR --	174
Fig. 42. Effect of UF-peptide on the serum lipids level in SHR -----	175
Fig. 43. Effect of UF-peptide on the ACE activity in serum and aorta of SHR -----	176
Fig. 44. Effect of saline (A), captopril (B), HHL (C) on the change of blood pressure in SHR -----	177
Fig. 45. Effect of SoyPep279 on the change of body weight gain in young SHR -----	178
Fig. 46. Effect of SoyPep279 on the change of body weight gain in adult SHR -----	179

Fig. 47. Effect of SoyPep279 diet on the plasma GOT and GPT activities in SHR in young age -----	180
Fig. 48. Effect of SoyPep279-diet on the plasma GOT and GPT activities in old SHR -----	181
Fig. 49. Effect of SoyPep279 on the change of systolic blood pressure and heart rate in young SHR -----	182
Fig. 50. Effect of SoyPep279 on the ACE activity in aorta, kidney, and plasma of SHR in young age -----	183
Fig. 51. Effect of SoyPep279 on the plasma lipid levels in young SHR --	184
Fig. 52. Effect of SoyPep279 on the plasma lipid levels in old SHR ----	185
Fig. 53. Histological change of various organs in young SHR -----	186
Fig. 54. Histological change of various organs in old SHR -----	187
Fig. 55. Particle size distribution of SoyPep279 -----	188

제 1 장 서 론

제 1 절 국내 · 외 연구동향

1. 외국의 경우

식품은 인간의 생존에 가장 중요한 요소의 하나로서, 인체의 항상성 유지, 그 균형의 변화로부터 유발되는 질병, 또는 질병으로부터의 회복에 이르기까지 크고 작게 식품이 관여되고 있다. 근년 이러한 식품의 기능과 관련한 일련의 연구를 통하여 식품기원의 특유한 화합물군은, 생체자신이 가지고 있는 원래의 생리작용에 대하여 영향을 미치고 있음이 명확히 드러나고 있다. 즉, 식품을 통하여 체내에 섭취되는 外來性 인자(식품기원의 생체조절성 인자)가, 생체의 생리기능 조절계(신경계, 순환계, 분비계, 소화계, 세포분화 및 증식계, 생체방어계 등)에 작용하고 있는 內在性 인자와 상호작용(협동, 상승, 길항, 대체 등)하기도 하고, 자극작용(내재성 인자의 생합성이나 분비의 억제, 촉진)하기도 하여, 직·간접으로 생체조절 기능에 관여하고 있음이 밝혀지고 있다(1).

식품은 의약품과는 달리 반복해서 섭취하기 때문에 유효기능을 발휘하는 화합물이 체내에 미량 도입되거나(통상 기능성 물질은 극미량의 극소 농도로 생리활성을 발현함), 그 활성이 매우 작은 경우에도 늘 공급되기 때문에 생체로서는 중요한 영향을 받을 수 밖에 없다. 이와 같이 식품기원의 생체조절 기능성인자는 다종다양하며 계속해서 발견되고 있으나, 이들의 작용기작, 작용부위, 효과가 나타나는 방식도 복잡다단하기 때문에 이같은 물질군의 발견 및 그 구조해석도 쉽지 않다. 이러한 연구 결과는 어떤 경우에도 여러 분야의 학문에 걸쳐서(學際間) 실제 생체내에서의 생리작용 해명이 필요하며, 다른 한편으로 새로운 기능성 식품의 생산을 위한 설계에 필요한 기초자료를 제공해주고 있다(2).

식품기원의 생체조절성 인자 중에서 식품단백질 유래의 펩타이드는 특히 다양한 활성을 나타내는데, 그 기원에 따라 크게 들로 顯在的 펩타이드와 潛在的 펩타이드로 나눌 수 있다(3). 전자에는 비교적 고분자상의 홀몬류 및 효소저해제가 주로 해당된다. 후자는 종래에 기능성 펩타이드의 전구체로 생각되지 않았던 식품단백질이나 혈액단백질 등으로부터도 기능성 펩타이드가 파생되는 것이 판명되면서부터 최근 연구가 활발히 진행되고 있다(3-5). 표 1은 현재까지 밝혀진 식품유래의 기능성 펩타이드를 요약한 것이다. 식품유래 기능성 펩타이드의 일반적인 특징은 다음과 같다: 1) 구조 및 활성이 다양함, 2) protease류에 의하여 분해됨, 3) 흡수되기 어려움, 4) 유전자조작에 의하여 생산 및 개조가 가능함, 5) 활성부위 전후에 protease절단부위가 필요함, 6) 활성은 낮을지 모르나 안전성이 기대됨. 또한, 이러한 펩타이드는 아편상(opioid) 펩타이드, 평활근 작동성 펩타이드 등과 같이 특정의 수용체(receptor)를 통하여 작용하는 것과 효소저해 활성을 보이는 것이 있다. 내인성 기능성 펩타이드와 비교하면, 일반적으로 이러한 외인성 기능성 펩타이드의 비활성은 그다지 크지 않으나, 다른 한편으로 특이한 구조를 갖는 것이 많으며 다기능성을 나타내는 등의 특징이 있다(6).

가. Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 펩타이드

ACE는 혈압상승 물질인 angiotensinII의 생성 및 혈압강하물질인 bradykinin의 분해를 촉매하는 효소이어서, 이 효소에 대한 저해물질은 혈압강하작용을 나타낸다. 식품단백질 유래의 ACE저해 펩타이드는 gelatin, casein 등에서 유래한 것이 상당수가 보고되어 있다(7-9).

일반적으로 경구투여시의 효과는 소화관에서의 펩타이드 안정성, 장관흡수의 용이, 흡수후 안정성 등에 의하여 좌우되는데, ACE저해 펩타이드의 경우 ACE에 대한 안정성이 매우 중요하다. ACE는 기질특이성이 매우 넓은 dipeptidylcarboxypeptidase이므로 많은 펩타이드가 이 효소의 기질이 된다. 문제는 이러한 기질도 *In vitro*분석계에서는 저해활성이 있는 것처럼 나타나

는 것이다. 이런 ACE저해 펩타이드도 정맥주사시에는 수분내에 항암효과가 나타나나, 경구투여시는 전혀 효과가 없다. 그러므로 경구투여시 항암(혈압강하)효과가 나타나는 ACE저해물질이라야 한다. 또한, 미생물유래의 protease에 의하여 생성된 펩타이드 중에는 섭취후 체내에서 소화관 protease나 ACE에 의하여 비로소 ACE저해활성을 나타내는 펩타이드(IVGRPRHQG, IWWHHT, LKPNM 등)가 발견되었다. 이러한 펩타이드는 통상의 ACE저해 펩타이드에 비하여 지속시간이 긴 경향을 띠고 있다(6).

나. Opioid peptides

Enkephalins(YGGFM, YGGFL) 등의 내인성 펩타이드(endorphin)가 뇌, 뇌하수체, 갑상선수질, 장, 혈액, 뇨에서 발견되어 진통, 마취, 평활근의 수축등에 관여함이 밝혀진 이후, Brantl 등(2)이 1979년에 casein peptide로부터 분리한 β -casomorphin (YPPFGPI)이 식품단백질 유래의 receptor결합 펩타이드로서 최초로 보고되었다. 이 펩타이드는 유아의 수면을 조절하는 것으로 추정된다. 그 이후 우유나 인유의 단백질에서 유래한 opioid peptide가 많이 발견되었다(10-16). 이들은 대부분 Y-X-F 또는 Y-X₁-X₂-F의 공통구조를 갖고 있다. 또한, 밀글루텐의 효소분해물에서부터 매우 강력한 opioid활성의 펩타이드(GYYPT, YGGWL, YPISL)가 보고되었는데 이들은 위와 다른 구조를 가지고 있다(10,11). 특히 gluten exorphin A는 경구투여시 혈중 insulin농도가 높아짐이 판명되었다(10). 특히 최근에 opiates가 항암작용을 함이 보고되어, opioid peptides도 항암효능이 있는지에 대한 검토가 필요하다고 생각한다(17).

한편, opioid antagonist 활성의 펩타이드도 분리되었는데(18,6), 이는 opioid활성을 스스로 갖지 않으나 opioid receptor에 결합하여 opioid의 작용을 저해한다(19). 이들중에는 회장의 연동운동을 촉진하여 악성변비를 개선하는 효과를 갖는 것이 많다(20). 또한 casoxin D(YVPFPPF)는 혈중에 존재하는 bradykinin (RPPGFSPFR)처럼 bradykinin receptor와 반응하여 동맥이완작용,

혈압강하작용을 하는 것으로 보고되었다(6).

다. 혈소판응집저해(RDG함유) 펩타이드

혈관내에서 혈액이 응고하게 되면 혈전이 형성되어 혈액순환 상태가 방해될 수 있다. 이러한 혈전들은 동맥, 정맥, 모세혈관, 또는 심장 등 순환기계의 어느 곳에서도 발생할 수 있으며 정맥혈전의 경우 해당부위에 부종이나 염증 등의 증상이 발생되고 동맥혈전에서는 어혈 또는 경색을 초래하여 심근경색증, 뇌졸중, 폐동맥경색증 등의 심각한 혈전성 질환으로 까지 발전된다. 또한 혈소판의 비정상적인 활성화에 의하여 생성되는 미세혈전들은 각종 혈전성 질환뿐만 아니라 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병 등 성인병의 일차적인 원인으로 밝혀지고 있으며 동양 전통 의학에서는 어혈증상이 각종 심혈관성 질환뿐만 아니라 만성 소화기병, 신경통 등의 만성 난치병 들의 원인이 되는 것으로 설명되고 있다.

혈전성질환의 예방과 치료를 위한 약물들로서 혈전용해제, 항응고제 및 항혈소판제 등이 많이 있으나 출혈시간 연장, 위장점막 내출혈 또는 전신성 출혈 등의 부작용이 커서 장기 치료에는 부적합하다. 그러므로 좀더 효과적이고 안전한 항혈전인자를 찾고자 하는 연구가 수행되어 왔다. 그 결과, 천연물 중에서 결명자 (*Cassia obtusifolia* L. ; Anthraquinone), 독활 (*Aralia Continentalis* ; Diterpene acid), 모동청 (*Ilex Pubescens* ; Ilexoside-D), 오가피 (*Acanthopanax* ; 3,4-dihydroxybenzoic acid), 작약 (*Paeony Lactiflora* Pall ; Methyl gallate), 부자 (*Aconitituber* ; Higenamine), 들깨유, 은행이유 등이 보고되고 있다. 한편, fibronectin, fibrinogen, laminin, collagen 등의 세포접착성 단백질은 세포측의 receptor인 integrin과 접착성을 나타내는데 이들 단백질에 함유되어 있는 RDG의 tri-peptide서열이 그 상호작용에 관여하고 있다. 따라서, RGDS 등 RDG서열을 갖는 펩타이드는 혈소판 응집활성 및 암의 전이저해활성을 나타냄이 알려져 있다(21). 인유의 lactoferrin유래의 KRDS (8,9,22,23)가 그 예에 해당되고, 그외에 우유단

백질 κ -casein유래의 MAIPPKKNQDK, PHLSF 그리고 쌀단백질의 trypsin분해물로부터 분리한 RGDLER 등이 혈소판응집저해활성을 나타낸다(24-27).

라. 탐식작용을 촉진하는 펩타이드

호중구나 대식세포(macrophage)의 탐식작용은 생체방어의 초기반응으로서 매우 중요하다. Casein 등에서 유래하는 탐식작용촉진 펩타이드가 다수 발견되었으며(25, 28, 29), Immunoglobulin으로부터 유래한 내재성 탐식작용촉진 펩타이드인 tuftsin(TKPR)과 유사한 펩타이드가 대두단백질인 glycinin(11S) globulin의 효소분해물로부터 분리되었다(30). 즉 HCQRPR 및 QRPR는 macrophage의 식작용 활성화, 항체생산증강, 병원균감염에 대한 방어 작용, TNF분비의 촉진 등의 효과가 있는 것으로 나타났고, 특히 TNF의 분비촉진 효과는 경구투여시에도 확인되었다. 또한 대두의 conglycinin(7S) globulin유래의 soymetide(MITLAIPVNKPGR)도 분리되었다(31). 특히 casoxin C(YIPIQYVLSR) 및 oryzatensin(GYPMYPLPR)은 opioid antagonist활성이외에 이 활성도 동시에 갖고 있음이 밝혀졌다(32).

마. 칼슘흡수촉진 펩타이드

칼슘은 소화관내에서 인산과 반응하여 인산칼슘을 형성하여 침전하므로써 그 흡수가 저해되고 있다. 우유의 α_{s1} -casein, β -casein중 serinephosphate잔기가 많은 부분으로 이뤄진 caseinophosphopeptide는 인산칼슘의 침전을 방지하여 칼슘의 체내흡수를 촉진한다(15, 33).

바. 담즙산 결합 펩타이드

대두단백질의 가수분해물은 콜레스테롤의 흡수저해하는 것으로 널리 알려져 있는데, 소수성이 강한 대두 11S globulin (glycinin)의 acidic subunit 41 잔기로 구성되어 있는 펩타이드가 분리되었다(34, 35). 담즙산과 결합하여 흡수를 저해하므로써 혈중 콜레스테롤 농도를 낮춘다.

사. 기타의 활성 펩타이드

1) Rennet의 처리에 의한 casein micelle의 응고시 κ -casein으로부터 유리되는 C말단부위의 당단백질인 macroglycopeptide는 위액의 분비 및 위의 운동을 억제하는 작용과 비피더스 증식작용, 독소중화작용 등을 갖고 있다(15, 36).

2) para- κ -casein의 C말단부위 (특히 101-105)가 chymotrypsin저해효과를 가진다(37).

3) α_{s1} -casein 분해물(아마도 1-23)은 항균효과를 가진다(15).

4) 우유 및 인유 β -casein유래의 펩타이드가 BALB/c3T3세포의 증식작용을 가진다(38).

그 이외에도 인공합성한 펩타이드가 여러 활성을 나타냄이 보고되었으나 천연 식품유래의 것이 아니므로 자료를 제시하지 않았다.

이상과 같은 식품단백질 유래의 생리활성 펩타이드가 어떻게 receptor를 통하여 작용하느냐는 특히 흥미롭고 중요한 문제이며, 현재까지 밝혀진 바로는 유단백질 유래의 펩타이드는 대부분 receptor 또는 정보전달을 통하여 작용하고 있다. 유단백질이나 혈청단백질로부터 파생된 생리활성 펩타이드는, 이들의 존재가 합목적성을 내포하고 있을 가능성이 있다. 그러나, 식물단백질로부터도 다수의 생리활성 펩타이드가 파생되는 점으로 미루어 우연에 의한 것으로 생각하는 것이 타당하다. 또한 여기서 소개되지 않은 새로운 활성의 식품 펩타이드가 존재할 수 있는 가능성은 매우 높으며, 특히 발효식품의 경우 미생물효소에 의한 단백질의 가수분해로 다양한 종류의 생리활성 펩타이드가 생성될 수 있다.

식품단백질유래의 생리활성 펩타이드에 관한 최대의 관심은, 펩타이드 또는 이를 함유하는 전구체를 섭취하였을 때 과연 어떤 형태로 흡수되어 최종적으로 어떤 생리활성을 나타내는가하는 점이다. 종래에는 단백질의 섭취시 소화관내에서 아미노산으로 분해되어 흡수된다고 생각하였으나 동물실험의 결과

상당히 많은 펩타이드가 소화관에서의 분해나 장관흡수라는 장벽을 넘어 통과됨이 밝혀졌다. 또한 유리 아미노산보다 di- 또는 tripeptide의 흡수가 훨씬 효과적이었으며 흡수된 아미노산의 pattern도 유리 아미노산을 혼합하여 투여한 경우보다 평준화된 것으로 나타나, 현재까지 아미노산 단독으로서 보다는 아미노산 3개까지로 된 펩타이드의 흡수효율이 우수하다는 결론에 이르고 있다(39,40). 영양학적인 관점에서 이같은 펩타이드의 영양은 체내 단백질 합성에는 아무런 영향을 미치지 않으나 아미노산 장애자, 수술후 환자의 회복에 매우 유리할 것으로 생각된다.

이상과 같은 현상론적인 연구에 비하여 펩타이드 수송계상의 해석은 복잡하여 연구가 진전되지 못하였으나 1973년 Hopfer 등(41)에 의하여 소장상피세포로부터 BBMV(brush boarder membrane vesicle)의 분리법을 개발함으로써 아미노산 및 펩타이드 수송기구에 대한 해석에 커다란 진전을 이루게 되었다. 이 방법을 실험에 도입한 결과 펩타이드의 수송은 아미노산의 수송과는 다른 계를 통하여 흡수되며, 이때 carrier가 개입된 수송계가 존재함이 밝혀졌다(42). 그러나 구체적인 carrier의 구조나 작용기구, 그리고 소장점막의 상피세포를 통과한 펩타이드는 어떤 형태로 수송되는지에 대하여는 아직 의문으로 남아 있다.

다른 한편 고분자성의 단백질이나 펩타이드의 소장막투과도 가능성이 오래 전부터 알려져 있는데, 이는 상피세포의 endocytosis에 의한 흡수와 세포간 간극을 통한 흡수로 생각된다(43). 전자의 경우 receptor 특이성, 후자의 경우 desmosome 및 tight junction을 경유한 흡수의 억제에 대하여는 더 연구되어야 하며, 특히 이는 장관면역과 식품알레르기와의 깊은 관련이 있다.

2. 국내의 경우

본 세부연구과제와 연관된 '식품단백질 유래의 기능성 소재'에 관한 국내의 연구사례를 살펴보면, 비교적 최근에 수행되었거나 진행되고 있는 1) 된

장, 쌀, 오징어유래의 ACE저해활성 펩타이드의 검색, 2) 치즈곤죽, 된장, 간장으로부터 항암활성 펩타이드의 검색, 3) 식물단백질 가수분해물의 조제에 의한 특수질병치유 펩타이드식의 연구, 4) 대두단백질 가수분해에 의한 항콜레스테롤 펩타이드 소재의 연구, 5) 유청단백질의 가수분해에 의한 저알러지성 펩타이드 소재의 연구 등에 국한되고 있다. 1), 2)의 경우는 활성 펩타이드의 구조가 조만간 밝혀 질 것으로 예상된다. 특히 2)의 연구는 외국에서도 시도되지 않았던 독특한 연구로서 향후 그 연구결과가 기대된다. 또한 이러한 연구결과를 산업에 활용한 예는, 국내의 경우 5)의 항알러지성 펩타이드를 유아용 조제분유나 이유식의 제조에 부분적으로 이용하고 있는 정도이다.

3. 연구개발의 필요성

환경 및 사회변화와 함께 암, 성인병 등의 발생을 증가와 노령화추세에 따라 건강에 대한 욕구를 충족시키는 특수식품의 수요가 급격히 증가할 것으로 예상된다. 또한 효능면에서 과학적 근거를 가진 기능성식품은 기존의 건강식품에 대신하여 상당부분 대체되고 이와 함께 커다란 시장 이 새로이 창출될 것으로 추측된다. 선진 외국의 경우 건강에 미치는 식품의 중요성을 잘 인식하고 생리적 기능성식품에 대한 연구와 제품개발에 몰두하고 있으나, 국내의 경우 최근에서야 그 중요성을 인식하기 시작하고 있다. 국내에 널리 알려져 활용되고 있는 기능성 식품소재는 식이섬유, 올리고당, 다가불포화 지방산, CPP, 녹차추출물 등이며, 그나마 생리활성에 대한 기본적인 연구자료가 극히 미비하다. 또한 국내의 기능성 식품 연구는 일본이나 미국의 경우처럼 조직적, 체계적, 동시다발적으로 진행되지 못하고 일부 대학이나 연구소에서 산발적으로 행해지고 있다. 단, 식이섬유와 올리고당에 대한 연구는 HAN project에 포함되어 있어 1992년부터 진행되고 있다. 그러나, 신약개발과 관련한 '신기능 생리활성물질에 관한 연구'나 '신동의약 개발에 관한 연구' 등에 비하면 기능성 식품분야에 연구투자가 너무도 미흡한 실정이다. 21세기의

풍요로운 사회에서 국민들이 요구하게 될 건강장수에의 욕구 충족을 위해서 식품에 대한 올바른 지식과 이해, 건전한 식품산업의 육성이 필요하다. 그 목표달성을 위하여 식품 전반에 대한 체계적이고 학제적인 연구가 선행되어야 한다. 특히 그중에서도 예방의학적 기능을 갖는 한국적인 신기능성 식품의 개발을 위한 다각적인 연구가 시급히 요구된다.

제 2 절 국내·외 기술수준

1. 국·내외 기술수준의 비교

생리활성 펩타이드는 최종적으로 기능성 식품 - 일반식품과는 달리 기능성 식품은 특정 생체조절기능(펩타이드)이 발현되도록 가공된 식품 - 의 제조에 활용되거나, 경우에 따라서는 신규 약품의 형태로 활용할 수 있다. 기능성 식품을 만들기 위하여는 특수한 기술, 안전성, 효능을 검증하는 해석법이 정비되어 있어야 할 뿐아니라, 항상성 유지, 질병으로부터의 회복 또는 예방, 성인병 대책 등을 의도하여 기능성 식품을 창출하는 기반 해석이 충분히 달성되어 있어야 한다. 현재 국내에서 혈압강하, 항암, 항혈전 펩타이드의 생리활성 검색법은 확립되어 있어 연구를 수행하여 오고 있으며, 펩타이드의 구조결정이나 분리기술도 선진 외국의 경우와 큰 차이가 없다. 다만 공업적인 대량 생산을 위한 유전자재조합기술이나 대량분리기술 등을 자체 개발하여 최적화하는 것이 문제이다.

2. 공정단위별로 주요 기술사항 및 기술수준의 분석

펩타이드를 이용한 기능성 식품의 개발을 위하여는, 여러 단계의 고려사항들이 있는데, 1) 목적에 따른 기능성 펩타이드의 선택, 2) 구조 및 작용기작의 해명, 3) 펩타이드 생성조건 최적화, 4) 이용형태의 설정, 5) 섭취후의 효과 확인, 6) 안정성의 확인 등이다(44).

우선, 대상 연령층과 작용을 고려하여 어떤 생리활성을 검색할 것인가를 결정하고 그 기능성 인자를 각종 효소분해물로부터 검색한다. 이때 *In vivo*(동물실험)나 *In vitro*(배양세포의 이용, 효소활성의 측정, 기타 생화학적 반응의 측정)의 검색시스템을 이용한다. 강력한 활성물질을 찾고자 하는 경우는 검출감도가 낮아도 검출이 가능하나, 약한 활성물질인 경우는 놓칠 수 있다. 식품에서는 낮은 활성이라도 유효하게 이용될 수 있다는 전제하에 예민한 검

출법을 도입한다. 이미 다른 데서 활성이 확인된 것과 유사한 서열을 단백질 서열상에서 찾아내어 펩타이드를 합성하고 이를 검색에 이용하거나 phage vector에 발현된 random peptide library로부터 검색할 수도 있다. 식품중에 함유되어있는 펩타이드의 다양성은 이와 같은 library에는 못 미치겠지만, 각종 단백질의 효소분해물은 천연계에 있어서 펩타이드의 출현빈도를 반영하고 있는 펩타이드 library의 일종으로 간주할 수 있다.

생리활성 펩타이드를 선별하고 그 구조 및 작용기작을 밝힌다. 종래의 내인성 생리활성 펩타이드와는 현저히 다른 구조를 띠면서 활성을 나타내는 펩타이드는 새로운 ligand의 설계시 선도물질로서 활용될 수 있다. 이러한 선도물질을 이용한 drug design으로 독특한 agonist나 antagonist의 창출이 기대된다.

다음으로 기능성 펩타이드의 제조방법이나 생성조건을 최적화한다. 제조방법에는 ① 효소공학적 방법, ② 유전자조작에 의한 단백질공학이나 생물공학적 방법(미생물, 동식물세포, transgenic animal/plant), ③ 펩타이드의 합성, ④ extruder나 초고압을 이용한 물리적 방법 등이 있다(2). 그러나 생산된 펩타이드의 섭취시 그 활성이 잘 나타날지는 의문이다. 왜냐하면 생체내에서 이들의 흡수가 용이하지 않을 수 있고, protease에 의하여 분해될 수도 있기 때문이다. 그러므로 각 펩타이드의 장관내 흡수 및 *In vivo*반감기 등에 대한 자료가 필요하다. 한편, 생체내에서 활성의 펩타이드가 생성되도록 할 수도 있는데, 경우에 따라 적절한 발현방법을 강구해야 한다. 예를들면, 해당 proteolysis가 소화관 내에서 생기지 않는 경우, 적절한 protease로 전처리를 하므로써 발현이 가능하게 할 수도 있다. 또는, 활성펩타이드를 emulsion이나 liposome화하므로써 흡수를 개선시키는 방법을 이용할 수도 있다.

다음으로 식품소재로서의 이용형태를 결정해야 한다. 즉, 최종 어떤 식품의 형태(예: 기능성 음료, 환자용 유동식, 기능성 과자 등 / 육아용, 스포츠 식품, 노인식, 미용식 등 / 항고혈압 간장, 항암성 된장, 항혈전 두부 등)로 제품화되는 것이 바람직한가, 활성의 안정화 조건은 어떠 해야 하는가, 흡수는

용이한가를 고려해야 한다. 특히 소화흡수조건, 투여방법 등의 개선으로 경구 투여시의 유효성을 더욱 증대시킬 수 있을 것이다.

마지막으로 *In vivo* 동물실험 및 임상실험을 통하여, 섭취후의 효과를 검정하고 안전성을 확인하여야 한다.

펩타이드 등 생리활성 성분을 이용한 기능성 식품의 일반적인 요건은 다음과 같다: 1) 명확한 제조목표가 있을 것, 2) 경구섭취로 효과가 발휘될 수 있을 것, 3) 화학구조가 해명된 기능성 인자를 함유할 것, 4) 식품중의 존재형태(결합 또는 유리)가 명확할 것, 5) 기능성 인자의 작용기작이 해명되어 있을 것, 6) 안전성이 높을 것, 7) 식품중에 안정하게 존재할 것, 8) 식품으로서의 受諾性을 충족할 것 등이다(2).

제 3 절 원료 수급현황

1. 원재료의 국내·외 수급현황(생산, 수요, 수출입량 등) 및 그 전망

세계의 대두생산량은 연간 약 7,800만톤 규모이다. 우리나라에서는 1990년 약 23만톤, 1993년 약 17만톤의 생산량을 보이고 있다. 연간 수요량은 93년도 기준 약 127만톤으로 추정된다. 이 중 식용 9만2천톤, 가용용 25만6천톤, 사료용 91만4천톤으로 생산량이 수요량을 충족시키지 못해 전체 자급률이 13.8%(식용 자급률 48.9%)밖에 되지 않는 실정이다. 유지, 사료용 콩은 국내 유지 3사에서 직접 수입하고 있으며, 식용콩은 유통공사에서 국영무역방식으로 관리하고 있다. 수입량은 75~85년간 급증하였으며, 그 후에는 가공용의 경우 증가추세를 지속하고 있고 유지, 사료용의 경우는 국제시세에 따라 다소 변동이 있다. 1993년도의 수입량은 111만3천톤(2억8천6백만달러)이며, 수입량의 90%는 미국으로부터 수입한다. 이 중 제유용으로 수입하여 탈지된 대두박은 주로 사료로 이용되고 있는 실정이다.

국내 생산량의 약 15% 정도가 수매되고 있으며, 이는 89년까지는 거의 가공용으로 공급되었으나 90년부터는 시장가격의 상승으로 방출량이 대폭 늘었다.

2. 원재료에 관련된 국내·외 기술의 현상분석 및 전망

대두는 가공을 하지 않은 상태에서도 단백질 함량이 40% 이상으로 높아 그 자체가 단백질 식품이라 할 수 있으며, 우리나라에서는 예로부터 대두를 간장, 된장등의 발효식품을 제조하는데 있어서의 원료로 이용해 왔다. 이러한 전통장류가 국내에서 활발한 연구가 되기도 전에 주로 일본을 비롯한 외국에 의해 먼저 연구가 진행되어 우리나라에서의 체계적이고 과학적인 기술력 축적이 담보상태를 면치 못하고 있다.

최근에는 탈지대두박등을 원료로 하여 농축단백과 분리단백을 제조하는 등의 이를 소재로 한 연구가 활발히 진행중으로 90년대에 들어서는 장류에 대한 기능성에 대한 연구가 발표되고 있다. 특히, 간장은 조미료로서의 세계적으로 그 영역을 넓혀가는 경향으로 해외 진출의 가능성이 많을 것으로 기대된다.

제 4 절 산업계 현황

일본의 경우 후생성은 기능성 식품에 대한 학계의 움직임에 발맞추어 식품으로 질병을 예방하려는 목적으로 보건행정에 기능성 식품의 제도화를 기하였다. 1991년 '특정보건식품'이라는 용어를 '식생활에 있어서 특정보건의 목적으로 섭취하는 자에 대하여, 그 섭취에 의한 해당보건의 목적이 기대가능하다는 표시를 한 것'으로 정의하고 특정보건식품으로 표시허가신청을 기업으로부터 받기 시작하였다. 그 결과, 1993. 6월에 저알러지성 쌀(상품명:파인라이스) 및 저인산우유(상품명:저인밀크L.P.K.)의 2개 품목에 이어서, 10월에 올리고당, 당알콜, 미네랄, 기타의 4가지 식품성분, 11개 품목의 허가가 났다. 식이섬유, 다가불포화지방산, 펩타이드 및 단백질류, 당알콜, 배당체 isoprenoid 및 비타민류, 알콜, 레시틴, 유산균류 등의 성분에 대한 검토가 진행중이다. 또한, 이들 소재류는 특정보건식품의 표시허가를 후생성으로부터 아직 받지 않았으나 기능성 식품(주로 음료)에 응용되고 있다. 현재 기능성 펩타이드소재의 생산업체 현황은 다음과 같다: 1) 모리나가유업: 항균 펩타이드, 저알러지성 펩타이드 소재로서 아미노산 5 또는 10잔기로 구성된 우유단백질 효소가수분해에 의한 영양 펩타이드 혼합물, CPP, 저알러지성, 2) 테루모사: 난백 가수분해물을 이용한 경장제, 3) 후니제과: 대두 단백질을 원료로 하여, 아미노산 잔기수별로 다종의 올리고펩타이드, 4)한큐고에붓산: 인지질 대사용 펩타이드. 10여 회사에서 소화, 흡수가 용이한 펩타이드 소재를 생산하고 있다.

국내에서 상품화되고 있는 기능성 식품소재는 식이섬유, 올리고당, 다가불포화 지방산, CPP, 녹차추출물 등이며, 식품단백질유래의 기능성소재 및 이를 이용한 제품은 CPP, 조제분유, 이유식이외에는 거의 없다. 그나마 유아용의 경우에는 기본원리를 제조공정상에 부분적으로 활용하고 있는 정도이다.

참고문헌

1. 千葉英雄. 1992. 食品の生體調節機能. 學會出版センター, 東京.
2. Brantl, V., H. Teschmacher, A. Henschen, F. Lottspeich. 1979. Hoppe-seyler's *Z. Physiol. Chem.* 360:1211.
3. 千葉英雄, 吉川正明. 1987. 化學と生物 25:396.
4. Yoshikawa, M. and H. Chiba. 1992. Frontiers and new horizons in amino acid research. p403.
5. 吉川正明, 千葉英雄. 1990. 食品工業 33(4):20.
6. 吉川正明. 1994. 바이오サイエンスとインダストリ 52:289.
7. 芦田勝郎. 1993. 食品工業 7.30:27.
8. 長谷川昌康. 1992. 食品と開發. 27(12):43.
9. 丸山進. 1993. 바이오메디카 8:40.
10. Fukudome, S. and Yoshikawa, M. 1992. *FEBS Lett.* 296:107.
11. Fukudome, S. and Yoshikawa, M. 1993. *FEBS Lett.* 316:17.
12. Loukas, S., D. Varoucha, C. Zioudrou, R.A. Streaty, and W.A. Klee. 1983. *Biochem.* 22:4567.
13. Yoshikawa, M., T. Yoshimura, and H. Chiba. 1984. *Agric. Biol. Chem.* 48:3185.
14. Zioudrou, C., R.A. Streaty, and W.A. Klee. 1979. *J. Biol. Chem.* 254:2446.
15. 水町功子. 1990. 食品工業 1.30:31.
16. 吉川正明, 千葉英雄. 1991. 化學物質が解き明かす生體の謎. 化學同人, 東京. p159.
17. Kim, H.D., H.J. Lee, and H.J. Woo. 1994. Abstract of papers, the 52nd Meeting of Kor. Society Food Sci. Technol. May, p63.
18. Yoshikawa, M., H. Suganuma, A. Shiota, F. Tani, F. Usui, K. Karahashi, and H. Chiba. 1993. 'Peptide chemistry 1992'. ESCOM Sci. Pub. B.V. Pp.572-575.
19. Chiba, H., F. Tani, and M. Yoshikawa. 1989. *J. Dairy Res.* 56:363.
20. Nakamura, T., Y. Syukunobe, T. Sakurai, and T. Idota. 1993. *Milchwissenschaft* 48:11.
21. D'Souza, S.E., M.H. Ginsberg, and E.F. Plow. 1991. *Trends Biochem. Sci.* 16:246.
22. 編集部. 1991. 食品と開發 26(11):33.

23. 編集部. 1993. 食品と開発 28(3):23.
24. Fiat, A.-M., S. Lavy-Toledano, J.P. Caen, and P. Jolles. 1989. *J. Dairy Sci.* 56:355.
25. Fiat, A.-M., D. Migliore-Samour, P. Jolles, L. Drouet, C.B.D. Sollier, and J. Cean. 1993. *J. Dairy Sci.* 76:301.
26. Mazoyer, E., S. Levy-Toledano, F. Rendu, L. Hermant, H. Lu, A.-M. Fiat, P. Jolles, and J. Cean. 1990. *Eur. J. Biochem.* 194:43.
27. 吉川正明, 森口盛雄, 高橋正和, 藤田裕之, 佐佐木隆造. 1994. 日本農藝化學會大會講演要旨集. p7.
28. Fujita, H. and Yoshikawa, M. 1993. 'Peptide chemistry 1992'. ESCOM Sci. Pub. B.V. p609.
29. Parker, F., D. Migliore-Samour, F. Flo'h, A. Zerial, G.H. Warner, J. Jolles, M. Casaretto, H. Zahn, and P. Jolles. 1984. *Eur. J. Biochem.* 176:677.
30. Yoshikawa, M., K. Kishi, M. Takahashi, A. Watanabe, T. Miyamura, M. Yamazaki, and H. Chiba. 1993. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 685:375.
31. 田中實, 岸克樹, 吉川正明. 1994. 農藝化學會誌 68:341.
32. 高橋正和, 吉川正明. 1993. 日本農藝化學會關西·西日本支部合同大會講演要旨集. p82.
33. Kitts, D.D. and Y.V. Yuan. 1992. *Trends Food Sci. Technol.* 3(2):31.
34. Minami, K., R. Moriyama, Y. Kitagawa, and S. Makino. 1990. *Agric. Biol. Chem.* 54:511.
35. 金谷昌廣, 角岡五月, 杉山薫, 伊吹文男, 岩見公和. 1994. 日本農藝化學會大會講演要旨集. p7.
36. 金丸義敬, 宋項光, 長岡利, 源宣之, 島村誠一, 海老各卓三郎. 1994. 日本農藝化學會大會講演要旨集. p6.
37. Lahav, E. 1967. Presented at the Int. Dairy Fed., Annual Session, Tel Aviv, Israel.
38. Azuma, N., S. Nagaune, Y. Ishino, H. Mori, S. Kaminogawa, and K. Yamauchi. 1989. *Agric. Biol. Chem.* 53:2631.
39. Hara, H. 1984. *J. Nutr.* 114:1122.
40. Silk, D.B.A. 1980. *J. Parent Ent. Nutr.* 4:548.
41. Hopfer, U. 1973. *J. Biol. Chem.* 248:25.
42. Ganapathy, V. 1981. *J. Biol. Chem.* 256:118.
43. 河村幸雄. 1991. 食品と開発 26(11):28.

44. 吉川正明. 1988. 食品と開発 23(4):39

제 2 장 대두식품으로부터 항고혈압 펩타이드소재의 개발

제 1 절 대두식품으로부터 항고혈압 펩타이드의 분리 및 정제

1. 연구수행방법

가. 여러 대두식품으로부터 항고혈압 활성의 탐색

: 대두를 이용한 식품중의 혈압강하 활성이 높은 재료를 얻고자 상품화된 대두기원 식품과 (주)농심 상품개발연구소에서 제조한 대두박 가수분해물의 ACE 저해활성을 비교, 분석하였다.

나. 혈압강하 펩타이드의 추출

: 실험에 사용한 대두박 가수분해물은 (주)농심 상품개발연구소에서 제조하여 사용하였고 PM-10 membrane(Amicon, molecular weight cut-off = 10,000 Dalton)으로 한외여과(Ultrafiltration)하여 대두박 가수분해물로부터 저분자 peptide만을 얻었다.

다. 1차 HPLC 분취

: Ultrafiltration으로 얻은 저분자 물질을 reverse phase preparative column (Jai-ODS-A-343-10, 20×300 mm, Japan analytical industry Co., Ltd.)을 사용하여 분취를 실시하였다. 용매공급은 처음 20분간 5% acetonitrile 용액으로 흘려준 다음 12% acetonitrile로 1분간 직선적으로 상승시켜준 후 40분까지 계속 흘려주고 30% acetonitrile로 1분간 linear하게 증가시킨 후 60분까지 유지시켰다. 그리고 60% acetonitrile을 3 ml/min유속으로 61분부터 80분까지

흐르게 하였다.

라. 2차 HPLC 분취

: 1차 reverse phase column chromatography에서 얻은 분취물을 ion-exchange preparative column(Jai-ES-2502N, 20×300 mm, Japan analytical industry Co., Ltd.)을 사용하여 분취를 실시하였다. 용매는 20 mM sodium acetate buffer를 eluent A로 사용하고 50 mM sodium acetate buffer와 0.5 M NaCl solution을 eluent B로 하여 분취하였으며 용매의 공급은 초기 20분간 eluent A용액으로 흘려주고 eluent A를 60분동안 linear gradient에서 eluent B로 바꾸어 준 다음 80분까지 공급하였다. 이때 용매속도는 4 ml/min로 하였다.

마. 3차 HPLC 분취

: 2차 ion-exchange preparative column chromatography에서 얻은 분취물을 preparative gel permeation column(Jai-ES-2502N, 20×500 mm, Japan analytical industry Co., Ltd.)을 사용하여 분취를 실시하였다. 용매로 20% methanol을 4 ml/min 흘려주었다.

바. 4차 chromatography

: 펩타이드의 분획은 reverse phase column (μ Bondapak C₁₈, 3.9×300 mm, Waters Co., Ltd.)을 이용하여 분리하였다. 15% acetonitrile solution을 1 ml/min의 속도로 흘려주면서 214 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

사. 5차 chromatography

: 펩타이드의 분획은 gel permeation chromatography column (Shodex KW-802.5, 8×300 mm, Shoko Co., Ltd.)을 이용하여 분리하였다. Eluent로 0.5% sodium dodecyl sulfate solution을 사용하여 1 ml/min의 유속으로 흐르게 하면서 214 nm에서 흡광도를 측정, 분석하였다.

아. 6차 chromatography

: 6차 정제는 gel permeation chromatography column (Shodex KW-802.5, 8 × 300 mm, Shoko Co., Ltd.)을 이용하여 실시하였다. 용매로는 deionized distilled water를 1 ml/min의 유속으로 흘려주면서 214 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

자. Total Nitrogen(TN) 분석

: 각 분획물의 TN 함량은 ANTEK nitrogen analyzer를 이용하여 분석하였다.

차. ACE 저해활성 측정

: ACE 저해활성은 Cushman⁽¹⁾의 방법을 응용한 방법으로 측정하였다.

카. 총 아미노산 분석

: 시료의 총 아미노산 분석은 Chang등⁽²⁾의 방법에 따랐다. 시료 0.5 ml에 6 N HCl 7.5 ml을 섞은 후 105℃ 항온 반응조에서 24시간 반응을 시켜서 단백질 및 peptide를 아미노산 단위로 분해하여 전처리를 한 다음, Sep-pak C₁₈ cartridge(Waters, U.S.A)를 통과시켜 단백질, 지질등의 고분자 물질과 색소를 제거하고 용액 50 µl를 취하여 진공펌프가 정착된 Pico-Tag Workstation (Waters)에서 건조를 한 후, water : methanol : triethylamine (2:2:1) 혼합 용액 20 µl를 첨가하여 위와 같은 방식으로 재건조하였다. 재건조된 시료에 methanol : water : triethylamine : phenylisothiocyanate (7:1:1:1) 혼합용액을 10 µl 첨가하여 phenyl thiocarbonyl-아미노산으로 유도체화시킨후 앞서와 같이 Pico-Tag Workstation에서 건조를 하였다. 여기에 sample diluent(Waters) 250 µl를 첨가하여 건조된 시료를 용해시킨 후 HPLC를 실시하였다. 분석은 Waters 510 HPLC system, 486 UV detector, 746 data module 로 이루어진 HPLC system에서 실시하였고 column은 Pico-Tag column(3.9 X

150 mm, Waters) 을 사용하였으며, 분석중 온도는 45℃로 유지하였다. Mobile phase로 Eluent A(Acetate buffer, Waters)와, Eluent B(60% acetonitrile)를 각각 이용하였다.

2. 연구수행결과

가. 여러 대두식품으로부터 항고혈압 활성의 탐색

: 대두를 이용한 식품중의 혈압강하 활성이 높은 재료를 얻고자 상품화된 대두기원 식품과 (주)농심 상품개발연구소에서 제조한 대두박 가수분해물을 비교하여 분석한 결과 soybean paste 나 soy milk보다 soy sauce가 ACE 저해활성이 더 높았으며 그중에서도 농심에서 제조한 탈지대두박 가수분해물이 가장 ACE 저해활성이 높았다(Table 1).

나. 혈압강하 펩타이드의 추출

: ACE 저해물질중에는 주로 저분자 물질이 많다는 논문^(3,4)에 의거하여 저분자 물질의 회수를 목적으로 molecular weight 10,000 Dalton 이상의 물질을 저지하는 PM-10 amicon membrane을 사용하여 ultrafiltration을 실시하였다. 그 결과 Table 2.을 보면 분자량 10,000 Dalton 이하에서 IC₅₀은 84.7로 원래 탈지대두박 가수분해물의 140.7보다 감소했으며 회수율은 50.2%로 약 절반정도가 회수되었다. 위와 같은 과정에 의해 얻은 시료는 동결건조 하여 -20℃ 냉동고에 보관하였다.

다. 1차 chromatography

: Reverse phase column(JAIGEL-ODS-A-343-10)을 이용해서 1차 정제를 수행하였다. 동결건조 시료를 10% 농도로 조절하고 3 ml씩 injection 하여서 Fig. 1과 같이 총 6개의 뚜렷한 peak가 포함된 chromatogram을 얻었다. 이들 모두 분취하여서 각 분해물의 ACE 저해활성을 측정하였다. (Table 3) ACE 저

해활성은 F2, F4, F6 분획물에서 비교적 높게 나타났으며 특히 F6 분획물은 IC₅₀이 40.1 µg/ml로 가장 높은 ACE 저해활성을 보였고 이를 모두 회수해서 동결건조 처리하였다.

라. 2차 chromatography

: 1차 ODS column을 사용해서 얻은 ACE 저해활성이 가장 높은 F6 분획물을 ion-exchange column (JAIGEL-ES-2502N)을 이용해서 계속 정제하였다. F6 동결건조물 시료에 10% 농도로 eluent A 용액을 첨가하고 3 ml씩 injection 하여 Fig. 2와 같은 총 13개의 peak가 포함된 chromatogram을 얻었다. 이를 모두 분획하여서 각 분획물의 ACE 저해활성을 측정한 결과(Table 4) fraction 3이 21.8 µg/ml로 가장 ACE 저해 활성이 높았다.

마. 3차 chromatography

: 탈지대두박 가수분해물의 2차 ion exchange column에 사용되었던 buffer는 염을 많이 포함하고 있으므로 3차 HPLC의 column은 염류제거와 펩타이드의 동시분획을 실시하고자 GPC column을 사용하였다. GPC column에 20% methanol을 흘려보내서 분석한 chromatogram을 보면(Fig. 3) 크게 5가지의 peak로 뚜렷이 구분됨을 알 수 있었다. 5개의 peak에 대한 ACE 저해활성은 (Table 5) retention time으로 보아 비교적 저분자인 F623과 F624분획물이 높았다.

바. 4차 chromatography

: 탈지대두박 가수분해물의 1,2,3차 chromatography에서는 현재 널리 사용중인 방법인 분자량, 소수성도, 이온강도에 의한 분리법을 이용하였으나 4차 chromatography에서는 탈염과정을 거쳐야 하는 ion chromatography나 분리능이 떨어지는 GPC보다는 유기용매를 이용하여 소수성도에 의해 분리하는 reverse phase chromatography를 실시하였다. 또한 시료의 양이 많지 않고,

시료의 세밀한 정제를 위해 분취용 column보다는 분석용 column을 사용하기로 하였다. 이와같이 하여 분리한 chromatogram은 Fig. 4.와 같으며 크게 3개의 peak로 분리되었다. 분리된 peak의 활성은 양이 적으므로 일정한 TN 농도에서 inhibition rate를 측정하였으며 그 결과는 Table 6.와 같이 F634-2가 가장 활성이 높은 것으로 나타났다. F634-2의 경우 다른 peak보다 양도 많고 비교적 분리된 형태도 overlap이 덜된 형태로서 분취한 량을 동결건조하여 5차 분취를 시행하였다.

사. 5차 chromatography

: 5차정제과정에서 column으로 분자량측정용 gel permeation chromatography column을 사용하였기에 분자량 차이에 의해 분획을 분취할 수 있었다. 그 결과를 보면 Fig. 5.에서와 같이 F6342-A 와 F6342-B를 얻었으며 ACE 저해활성은 Table 7.에서와 같이 F6342-B가 inhibition rate가 TN이 1.8 ppm에서 12.3%로서 F6342-A의 8.2%보다 높았으며 또한 분취된 양도 많았다. 그 후 분취하여 얻은 시료는 동결건조하여 보관하였다.

아. 6차 chromatography

: 5차 column chromatography에서 얻은 동결건조물에는 sodium dodecyl sulfate 가 존재하므로 이를 제거하는 과정이 필요하다. 이를 위하여 5차 column chromatography와 동일한 column을 이용하고 대신 용매로 증류수를 사용하였다. 분리한 결과를 보면(Fig. 6) 6342B-1, F6342B-2, F6342B-3의 총 3개의 peak를 얻었으며 그중 F6342B-3이 가장 활성이 높았다(Table 8).

자. Chromatography 정제도에 따른 ACE 저해활성 비교.

: 각 step 별로 정제하여 얻은 분취물의 ACE 저해활성을 나타낸 표를 보면 (Table 9) 처음의 탈지대두박 가수분해물에서는 ACE 저해활성이 140 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타났으나 한외여과에 의하여 84 $\mu\text{g/ml}$ 으로 증가했으며 그후 2차 분취물까

지 약 2배정도 증가하였다. 다음 3차 분취물부터 5차 분취물까지는 활성의 증가가 크지않았다. 그러나 최종 6차 분취물에서는 ACE 저해활성이 7.8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 으로 큰 폭으로 감소하였다.

차. 각 column chromatography의 step별 아미노산 분석.

: 초기 한외여과와 1차 분취물(F6)에서는 모든 아미노산이 다 존재하였으며 2차 분취물에서는 His가 검출안되었고 4차분취물부터는 많은 아미노산이 제거되면서 비교적 정제가 많이 된 것을 관찰할 수 있었다. 최종 6차정제물은 Glu, Ser, Gly, Arg, Ala, Pro, Met을 함유하는 peptide로서 친수성 아미노산인 Glu, Ser, Gly Arg를 갖고있는 특징을 보였다(Table 10).

제 2 절 한외여과를 이용한 펩타이드의 대량생산 공정 개발

1. 연구수행방법

가. 탈지대두박 가수분해물의 산업적 제조

: 탈지대두박 가수분해물을 다음과 같이 제조하였다. 각각 정제수 1,000 kg 이 들어 있는 2 ton 용량의 효소분해조 2대에 원료 탈지대두박 분쇄물(20 mesh통과분)을 각각 300 Kg 투입하고 교반하면서 정제수 1,000 kg을 추가로 투입하여 탈지대두박의 농도를 15%(W/W)로 조정하였다. 90℃에서 10분 가열한 후 60℃로 냉각하였다. 이것을 pH가 8.0이 되도록 조정한 후, endopeptidase 인 Promod 278을 기질의 0.4% 투입하여 2시간 효소분해하였다. 1차 효소분해가 완료되면 55℃로 냉각한 후 pH를 5.0로 조절하여 exopeptidase인 Promod279를 기질의 0.8% 첨가하여 4시간동안 효소분해하고 분해가 완료되면 90℃에서 15분 가열하여 효소를 실활시켰다.

나. 한외여과를 이용한 펩타이드의 대량생산 공정개발

: 한외여과 system은 plate and frame type의 ultrafiltration Lab unit-10 module(DOW, Denmark)에 0.0336 m²의 한외여과막을 setting하여 open loop방식으로 설계하였다. 실험용 한외여과막은 동일 분획분자량을 갖는 GR, ETNA, HEKLA의 3가지 종류와(Table 11) 6가지의 분획분자량별 한외여과막을 사용하였다(Table 12). 시료 100 g을 2차 증류수 3,000 ml에 용해하여 Feed tank에 넣고 순환식 water bath로 조절하여 온도를 45℃로 일정하게 유지시켰다. 한외여과시 막에 걸리는 압력은 outlet pressure valve로 2 bar로 고정하였으며, pump speed는 700 rpm으로 고정하였다. 한편, 각 실험전후에 동일조건에서 물의 평균투과유속을 측정하였으며, 실험이 끝난 후 알칼리 세제와 물로 1

시간 이상 세정하여 실험 초기의 물의 평균투과유속이 회복되도록 하였다. 평균투과유속은 일정시간에 투과되는 여과액을 모아 막의 면적과 시간으로 나눈 부피로($L/m^2/hr$) 표현하였다. 위와 동일한 조건에서 시스템의 온도를 35, 45, 55, 65℃로 달리하며 각각 2시간 한외여과하였다. 이때 압력을 2 bar로 고정하여 투과액의 평균투과유속, 단백질 회수율, ACE 저해활성을 분석하고, 총활성(TIA)이 가장 좋은 온도를 선정하였다. 또한, 선정된 온도에서 압력을 2 bar로 고정하고 3,000 ml의 2차 증류수에 시료를 100 g, 200 g, 300 g, 450 g, 600 g으로 달리 첨가하여 위와 동일한 방법으로 최적 농도를 결정하였다. 또한 선정된 온도와 시료 농도에서 막에 걸리는 압력의 차를 1.5 bar, 2.5 bar, 3.5 bar로 증가시키면서 상기와 같은 방법으로 최적 압력을 결정하였다.

다. 산업적 분리공정의 최적화

: 제조된 탈지대두박 가수분해물로부터 혈압강하 펩타이드의 산업적 분리공정을 최적화 하였다. 한외여과조건의 최적화에 앞서 press filter로 1차 여과하였다. 한외여과 조건은 연구결과 선정된 공정조건들을 기초로 plant용 M37 한외여과장치(DOW, Denmark)를 사용하여 최적화 하였다.

2. 연구수행결과

가. 최적 막의 종류 선정

: 실험에 사용한 대두박 가수분해물의 일반성분은 수분이 10.0%, 단백질이 47.4%, 탄수화물이 42.2%이었으며, 지방과 회분이 각각 0.2% 함유되어 있었다. 최적 한외여과막의 종류를 선정하기 위해서는 일반적으로 대상 성분이 친수성일 경우에는 소수성 막이, 소수성일 경우에는 친수성 막이 유리한데, 이는 친수성 성분은 친수성 막에 쉽게 흡착되어 fouling을 일으켜 투과유속을 감소시키며, 동시에 배제계수(Rejection coefficient)가 커져 대상성분의 회수율이 낮아지기 때문이다^(5,6). ACE저해 펩타이드의 경우 대부분 소수성 펩타

이므로 보고되어 왔으나 최근에는 친수성 펩타이드도 보고되고 있어 막의 type에 따라 ACE저해활성에 차이를 보일 것이 예상되었다. 실험결과 평균투과유속은 GR type이 HEKLA나 ETNA type에 비하여 비교적 높은 투과유속을 보여 14.0 L/m²/hr의 값을 보였다(Fig. 7). ETNA type의 경우 초기에는 비교적 낮은 투과유속을 보였지만 증반 이후에는 오히려 HEKLA type에 비하여 높은 유속을 나타내었다. 한편, 각 시간별로 투과액의 질소농도는 큰차이를 보이지 않아 일정한 질소 배제율을 보였으며 막의 종류에 의한 차이도 크지 않았다(Fig. 8). 막의 종류에 의한 차이가 크지 않은 것은 시료내의 펩타이드가 중간극성을 가졌을 것으로 추정되었으며, 시간의 경과에 따라 TN농도가 일정하게 유지되는 것은 저분자 peptide가 분리막을 일정한 속도로 투과되기 때문으로 사료된다. 한편, 한외여과막의 종류에 따라 ACE저해활성도는 큰차이를 보이지 않았다(Table 13). 그러나 각 한외여과막의 종류에 따라 질소회수율에는 다소 차이가 있어 GR61PP 타입이 높았으며, 따라서 총저해활성(TIA)과 저해활성 회수율이 가장 높아 탈지대두박 효소 가수분해물로 부터 ACE저해펩타이드를 생산하기 위한 최적의 한외여과막으로 GR61PP 타입을 선정하였다.

나. 최적 운전온도 선정

: 선정한 최적 한외여과막 GR61PP(분획분자량 25,000)을 사용하여 최적 한외여과 운전조건을 선정하였다. 최적 한외여과 운전 온도를 선정하기 위하여 각각 35℃, 45℃, 55℃, 65℃에서 평균투과유속과 ACE 저해활성을 비교하였다. 2시간 한외여과시 평균투과유속은 온도가 높을수록 증가하였으며, 총질소 회수율도 높았다. 그러나 ACE 저해활성의 경우 35℃에서 IC₅₀=54.0 µg/ml로 상대적으로 높았으며, 그 이상의 온도에서는 비교적 낮은 활성을 보였다. 35℃ 이하의 경우 plant단위의 한외여과공정에서는 미생물 오염이 문제시 될 수 있으며 65℃이상의 경우 활성 감소가 우려된다. 또한 한외여과 공정이후의 농축공정을 고려할 때 55℃가 효율적일 것으로 판단되었다. 55℃에서 투과액의 질소 회수율은 46.0 %였으며 ACE IC₅₀=71.9 µg/ml, 총활성은 52.4로 1.8배의 정제효

과를 보였다(Table 14).

다. 최적 시료농도 선정

: 한편 시료의 농도가 질소 및 ACE 저해활성 회수율에 미치는 영향을 알아보기 위해 시료농도를 질소농도기준으로 0.3%에서 1.8%까지 조정하여 한외여과를 실시하였다. 2시간 한외여과시 평균투과유속은 농도가 낮을수록 높아져 질소농도 0.3%에서 22.4 L/m²/hr의 최대 평균투과유속을 보였고 이때 44.0%의 단백질 회수율을 보였다. ACE 저해활성은 모든 농도에서 비슷한 값이 나타났다. 그러나 회수된 질소의 절대량은 처리액의 질소농도가 낮을수록 낮아지는 경향이 있으며, 또한 질소농도가 낮을수록 회수율이 높아지므로 이들이 서로 보상되어 회수되는 질소의 절대량은 일정농도에서 최대값을 가지게 된다. 본실험에서는 질소농도 0.87%에서 최대값을 보였다. 이때 91.41 L/m²/hr의 평균투과유속을 보였으며, 활성의 정제효과는 1.8배 였다(Table 15).

라. 최적 운전압력 선정

: 선정된 최적 온도와 농도조건에서 pilot scale의 한외여과장치를 사용하여 최적 운전압력을 선정하였다. 막에 걸리는 압력을 1.5 bar, 2.5 bar, 3.5 bar로 달리하여 실험한 결과 평균투과유속은 2.5 bar에서 78.5 L/m²/hr의 최대값을 보였다. 일반적으로 막에 걸리는 압력이 높을수록 평균투과유속이 높아지는 경향이 있으나 본 시료와 같이 한외여과 초기에 막에 gel polarization과 압착이 급격히 일어나는 시료의 경우는 오히려 압력이 높을수록 평균투과유속이 감소하는 경향이 있어서 3.5bar보다 2.5 bar에서 최대 평균투과유속을 보인 것으로 해석된다. 이때 ACE IC₅₀은 63.0 µg/ml로 2.3배의 정제효과를 보였다(Table 16). 이상과 같이 선정된 한외여과 조건은 plant scale에 적용할 예정이다.

마. 산업적 분리공정의 최적화

: 제조된 탈지대두박 가수분해물로부터 혈압강하 펩타이드의 산업적 분리공정을 최적화 하였다. 한외여과조건의 최적화에 앞서 press filter로 1차 여과하였다. 이때 여과액 2,700kg을 얻었으며 고형분 회수율은 39.7%였다. 한외여과 조건은 앞의 연구결과 선정된 공정조건들을 기초로 plant용 M37한외여과장치(DOW, Denmark)를 사용하여 최적화 하였다. 즉, 초기 고형분 농도 10%, 운전 온도 55℃, 압력 5.5 bar로 고정하고 분획분자량 2,000 dalton과 50,000 dalton의 GR type 한외여과막(polysulfone계)에서의 평균투과유속과, fouling parameters, 총 ACE 저해활성, 단백질 회수율, 정제도 등을 비교하였다. 분획분자량 2,000 dalton인 한외여과막을 사용한 경우 평균투과유속은 plugging현상으로 급속히 감소하였으며 분획분자량 50,000 dalton의 경우 비교적 높은 평균투과유속을 유지하였다. 또한 ACE저해 총활성의 경우도 분획분자량 50,000 dalton의 한외여과막이 14.7×10^7 로 상대적으로 높아 최적 한외여과막으로 결정하였다.

제 3 장 대두식품으로부터 항암펩타이드의 분리 및 정제

1. 연구수행방법

가. 대두단백 가수분해물의 제조

: 여러 가지 상업용 효소들을 사용하여 대두단백 가수분해물을 제조하였다. 이때 사용된 대두단백 가수분해효소는 Table 17와 같다. 탈지 대두박 20 g을 100 ml의 증류수에 현탁 시킨 후 121 °C에서 15분간 열처리하여 단백질을 변성시켰다. 현탁액을 2.5 N NaOH와 2.5 N HCl을 이용하여 각각 단백분해 효소의 최적 pH로 맞춘 후 1%의 단백가수분해효소를 첨가하여 최적 온도에서 2시간 동안 가수분해를 실시하였다. 가수분해가 끝난 후 100 °C에서 15분간 진탕하여 효소를 불활성화 시켜서 가수분해를 종료하였다. 가수분해가 끝난 시료를 7000 x g에서 20분 동안 원심분리를 하여 상징액을 취한 뒤 다음 추출에 사용하기 위해 동결건조하여 냉동보관하였다.

나. 펩타이드의 용매 추출

: 각각의 가수분해물을 water, methanol, ethanol, butanol, chloroform+methanol(2:1), acetone, hexane으로 추출하였다. 가수분해물의 무게에 20배에 해당하는 용매를 넣어 24시간동안 균질화 시킨 후 Whatman No. 41 filter paper를 이용하여 용매에 녹아있는 부분만 취하였다. 이렇게 모아진 시료를 55°C에서 rotary evaporator를 이용하여 농축하였고 각각의 가수분해물의 용매추출물들은 동결건조하여 냉동보관하였다.

다. 펩타이드 용매 추출물의 항암활성 분석

: 암세포주에 대한 *In vitro* 세포독성 실험으로 분석하였다. 이 때 사용한 세포주

는 P388D1 (mouse monocyte-macrophage ATCC HB 8065)이었다. 실험에 사용된 암 세포들은 10% fetal bovine serum(FBS)을 포함하는 RPMI-1640 배양액 중에서 37 °C 5% CO₂ incubator 내에서 계대, 유지하였다. 세포들을 96 well microtiter plate에 1 × 10⁴ cells/100 μl/well의 농도로 분주하고, 각 펩타이드 시료는 microtiter plate에 미리 분주된 세포용액에 100, 250, 500, 1000 μg/ml의 농도로 첨가하였으며 그 후 37°C, 5%의 조건으로 배양하였다. 각 well의 최종 용량은 세포 및 시료를 포함하여 200 μl로 맞추었다. 모두 72 시간에 걸쳐 배양을 계속한 후 각 well의 배양 상정액을 제거하고 0.25% glutaraldehyde로 10분간 상온에서 고정을 실시하였다. 고정후 수도수에 의해 세척된 세포들은 2% 에탄올에 녹인 0.2% crystal violet으로 10분간 염색하였고, 세척 후 건조된 각 well에 1% SDS를 100 μl씩 첨가함으로써 색소를 추출하였다. 각 well에서 추출된 색소의 흡광도는 ELISA reader(microplate spectrophotometer)로 540 nm에서 측정하였다. 540 nm에서 측정된 흡광도는 살아있는 세포의 수와 비례하게 된다. 그러므로 항암활성을 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다. :

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \left(1 - \frac{A_{540} \text{ in sample}}{A_{540} \text{ in control}} \right) \times 100$$

모든시료의 항암효과 분석은 3반복 실험하여 평균값을 취하였다. 대두 가수분해물과 용매추출 펩타이드에 대한 항암활성 검정 결과를 요약한 결과는 Table 18 에 나타나있다. Table 5 에서 볼 수 있듯이 thermoase-hydrolysed soyprotein(HSP)/EtOH extract, bromelain-HSP/EtOH extract, esperase-HSP/EtOH extract, protamex-HSP/acetone extract, subtilisin carlsberg-HSP/hexane extract의 활성은 다른 가수분해물의 용매추출물들 보다 매우 높게 나타났으며, 따라서 활성이 높은 thermoase-HSP/EtOH extract, bromelain-HSP/EtOH extract를 가지고 다음 단계 실험의 시료로 이용하였다.

라. 항암 펩타이드의 정제

: 여러 용매로 추출한 가수분해물 중 가장 활성이 높은 bromelain/EtOH 펩타이드를 PM-10 membrane (Amicon, M.W. cut off = 10,000)과 PM-1 membrane (Amicon, M.W. cut off = 1,000)을 이용하여 한외여과를 수행하였고 그 이후 Ultrafiltration으로 나눈 분획 중 활성이 가장 높은 분획(B1)을 가지고 역상 chromatography, 박층 chromatography 그리고 ion exchange chromatography를 수행하여 정제하고 항암 펩타이드 분획의 glycosylation 여부를 확인하였다.

2. 연구수행결과

가. Bromelain/EtOH 항암 펩타이드의 정제

1) Fractionation by ultrafiltration

: 여러 용매로 추출한 가수분해물 중 가장 활성이 높은 bromelain/EtOH 펩타이드를 PM-10 membrane (Amicon, M.W. cut off = 10,000)과 PM-1 membrane (Amicon, M.W. cut off = 1,000)을 이용하여 용액의 부피가 반이 되는 시점까지 한외여과를 실시하였다. 한외여과를 실시한 후 bromelain/EtOH 펩타이드는 분자량 10,000 이상(B1), 분자량 1,000과 10,000 사이 (B2), 분자량 1,000 이하(B3)의 3분획으로 나누어졌고, 각 분획에 대하여 항암활성을 앞에서와 같은 방법으로 분석하였다. 세포주 P388D1에 대해 항암활성을 실험한 결과(Fig. 9.) 분자량 10,000 이상(B1) 분획이 가장 높은 항암활성을 보임을 알 수 있었다. 이 때의 IC₅₀ 값은 200 µg/ml로 나타났다.

2) Bromelain/EtOH B1 분획의 역상 HPLC 수행

: Ultrafiltration으로 나눈 분획 중 활성이 가장 높은 분획(B1)을 가지고 역상 HPLC를 수행하였다. Column으로는 Delta pak C18 (7.8x300, Waters, USA)을 이용

하였고, 시료 농도는 10 mg/ml로 하였으며 200 μ l 씩 injection하여 214 nm에서 이를 detection하였다. 용매로는 double distilled water와 acetonitrile을 이용하였고, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)를 첨가하였다. 유속을 2 ml/min으로 하면서, stepwise gradient로 0 ~ 72% 까지 acetonitrile을 32분 동안 흘려주었다. 모두 13분획으로 나누어 각각의 분획을 B1-1 ~ B1-13으로 명명하였고(Fig. 10.), 역시 각 분획에 대하여 항암활성 분석 실험을 실시하였다. 세포주 P388D1에 대해 항암활성을 실험한 결과 B1-8과 B1-12 분획이 가장 높은 항암활성을 보임을 알아내었다 (Fig. 10.). 이 때의 IC₅₀ 값은 각각 310 μ g/ml 과 210 μ g/ml 이었다.

3) Bromelain/EtOH B1-8 및 B1-12 분획의 아미노산 분석

: 아미노산 조성 분석은 HPLC 분획 중 활성이 가장 좋았던 B1-8과 B1-12 분획에 대하여 산 가수분해 방법으로 시행하였다. 각각의 시료에 6 N HCl을 200 μ l씩 넣고, N₂ gas로 충전 시킨 후 150 °C에서 1시간동안 가수분해하였다. 산 가수분해가 끝난 후 시료를 PITC로 유도체화 시킨 다음 pico-tag HPLC로 각 펩타이드 분획의 아미노산 조성을 분석하였다. 이 때, HPLC 조건으로 eluent A에는 0.1% tetraethylamine과 0.6% acetonitrile을 1.4 mM NaHAc에 녹이고, eluent B에는 60 % acetonitrile로 만들어 18분 동안 eluent B를 100 %까지 linear gradient로 올려주었다. 항암 펩타이드 분획인 B1-8과, B1-12의 아미노산 조성 분석표는 Table 19 와 같다. Table 19 에서 알 수 있듯이 B1-8은 Gly, Pro, Leu의 함량이 많고, B1-12는 Asp, Glu, Pro, Gly, Leu의 함량이 많았고, 이로서 항암활성을 나타내는 펩타이드가 주로 소수성 펩타이드로 되어있음을 알 수 있었다.

4) Bromelain/EtOH B1-8 및 B1-12 분획의 박층 크로마토그래피

: 박층 크로마토그래피는 항암 펩타이드 분획의 glycosylation 여부를 확인하기 위하여 수행하였다. 두 분획을 silica gel로 coating 되어있는 thin layer plate에 찍은 후 butanol, acetone, acetic acid, water를 7:4:2:4로 혼합한 용매로 전

개시했다. 30분동안 전개가 끝난 후 건조시키고, 펩타이드 반응을 알아보기 위한 ninhydrin 시약과 당을 알아보기 위한 50% 황산 용액을 각각 분무하여 발색여부를 확인하였다(Fig. 11.). Fig. 11. 에서 보는바와 같이, B1-8과 B1-12 분획은 ninhydrin과 황산에 모두 반응을 나타냈다. 이는 항암활성을 보이는 펩타이드 분획이 glycopeptide일 것이라는 가능성을 시사해주는 것이다.

5) Bromelain/EtOH 항암 펩타이드의 특성

: 항암 펩타이드로 정제한 B1-8 분획과 B1-12 분획은 분자량도 10,000 이상이고, glycosylation이 되어있는 macromolecule일 것으로 추정되어 그것의 1차 서열을 밝혀내는데에는 많은 어려움이 있을 것으로 예상되었다. 그러므로 bromelain/EtOH 펩타이드 보다는, 또 다른 항암활성을 가진 가수분해물인 thermoase/EtOH 펩타이드를 시료로 항암활성을 분석하였다.

나. Thermoase/EtOH 추출물 항암 펩타이드의 정제

1) XAD-2 흡착 크로마토그래피에 의한 소수성 펩타이드의 분획

: 대부분의 생리 활성을 갖는 펩타이드는 소수성을 나타내므로 Table 17 에서 가장 높은 회수율과 높은 항암활성을 보이는 thermoase/EtOH 추출물에 대해 XAD-2 흡착 크로마토그래피를 수행하였다. XAD-2 nonionic polymeric adsorbent (Amberite, Aldrich Co. Ltd)를 glass column (15 x 300mm)에 충전하여 수행함으로써 친수성 분획과 소수성 분획을 얻었다. 먼저 시료가 resin에 충분히 흡착되도록 하기 위해 시료를 12시간동안 순환 시킨 후 H₂O를 이용하여 친수성 분획을 얻고 그 후 EtOH을 이용하여 소수성 분획을 얻는다. 이 두 분획을 각각 여과지 (Whatman No. 42)를 이용하여 120 mmHg에서 감압여과 한 후 진공 농축기로 50 ℃이하에서 감압증발 후 냉동건조시켜 항암활성 검정을 위해 이용하였다.

2) Thermoase/EtOH 소수성 펩타이드 분획의 항암활성 분석

: XAD-2 흡착 크로마토그래피로 나눈 두 분획, 즉 소수성 분획인 thermoase/EtOH 소수성 분획과(To) 친수성 분획(Ti)의 항암활성을 분석하기 위하여 쥐의 백혈병 세포주인 P388D1 (mouse monocyte - macrophage: ATCC HB 8065)을 이용하였다. 세포주의 배양과 시료첨가 방법은 앞에서와 같다. 모든 시료는 3반복으로 실험하여 평균값을 취했다. 분석 6시간 전에 0.2 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ 의 ^3H -thymidine을 시료가 들어간 우물마다 넣은 후 cellular DNA에 ^3H -thymidine이 흡수되는 정도를 측정함으로써 암세포에 대한 세포독성을 계산하였다. 이에 대한 결과는 Fig. 12. 에 나타내었다. Fig. 12. 에서 보는 바와 같이 To 분획에서 매우 높은 활성을 나타내며 이때의 IC_{50} value는 63.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 반면 친수성 분획 Ti에서는 전혀 활성을 나타내지 않았다. To의 활성은 Bromelain/EtOH 항암 펩타이드의 정제시 보이는 활성보다 훨씬 높은 것이다. 따라서 To 분획을 가지고 다음 실험을 계속 진행시켰다.

3) Thermoase에 의한 가수분해도 측정

: Thermoase에 의한 효소 가수분해도를 측정하기 위해서 trichloroacetic acid(TCA) 침전법을 이용하였다. 가수분해물 400 mg에 40 ml의 H_2O 를 넣고서 20% TCA 40 ml을 첨가시킨 후 10 min 정치하였다. 이를 10,000 x g에서 30 min 원심분리 후 이의 상정액을 따서 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이에 대한 standard로는 bovine serum albumin(BSA)를 이용하였으며, 표준곡선은 Fig. 13. 와 같다. 그림 5. 의 표준곡선을 이용하여 가수분해도를 비교하였을 때 가수분해 전의 농도는 41 mg/ml이었고 가수분해 후의 농도는 54 mg/ml임을 알 수 있었다. 이처럼 가수분해 전과 후의 농도 차를 이용하여 가수분해율을 계산해 본 결과 32%임을 알 수 있었다.

4) Thermoase To 소수성 펩타이드 분획의 이온교환 크로마토그래피

: XAD-2 흡착 크로마토그래피에 의한 소수성 펩타이드 분획인 To 분획의 항암활성이 가장 높았기 때문에 이를 가지고 ion exchange chromatography를 수행하여 5 분획으로 다시 분리하였다. Ion exchange chromatography는 FPLC(Pharmacia Co.)

를 이용하였고, buffer로는 Tris-Cl pH 7.5와 Tris-Cl + 1M NaCl pH 7.5로 조절하였다. Column은 Q-sepharose (Sigma, fast flow anion exchange, functional group: $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$)를 가지고, 각각의 시료의 농도를 20 mg/ml로 맞춘 후 2 ml을 취하여 2 ml/min의 속도로 흘려주면서 215 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 NaCl concentration은 0-20 min 동안은 0%로 20-40 min동안 100%로 높이고, 40-60 min동안 100%를 유지시킨 후 60-80 min 동안 다시 0%로 하였다. 결과는 Fig. 14. 에 나타난 것과 같다.

5) Thermoase/EtOH To 세부분획들의 염 제거

: 이온교환 크로마토그래피로 얻은 To의 5개의 peak를 각각 To1, To2, To3, To4, To5 라고 하였으며 이를 각각 XAD-2 흡착 크로마토그래피를 재 수행함으로써 염을 제거시켰다. 염은 친수성이므로 H₂O에 의해 먼저 용출되어 나오고, To1, To2, To3, To4, To5 fractions들은 XAD-2에 흡착되어 남아있게 된다. 시료를 재순환 흡착시킨 후 H₂O를 이용하여 염을 제거하고 EtOH을 이용하여 염이 제거된 To1, To2, To3, To4, To5 분획을 얻었다. 이를 여과지 (Whatman No.42)를 이용하여 120 mmHg에서 감압여과 한 후 진공 농축기로 50℃이하에서 감압건조 후 냉동건조시켜 항암활성 분석을 위한 시료로 이용하였다.

6) Thermoase/EtOH To 세부분획들의 항암활성 분석

: 이온교환 크로마토그래피 분획들을 XAD-2 흡착 크로마토그래피로 염을 제거 한 후 각 분획(To1, To2, To3, To4, To5)의 항암활성을 확인하기 위해서 쥐의 백혈병 세포주인 P388D1 (mouse monocyte - macrophage: ATCC HB 8065)을 이용하였다. 항암활성 분석은 앞에서와 같은 방법을 사용하였다. 각 시료는 microtiter plate 에 미리 분주된 세포용액에 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가되었으며 그 후 37 °C, 5% CO₂ 항온기 내에서 72시간 동안 배양되었다. 각 우물의 최종용량은 세포 및 시료를 포함하여 200 μl 로 맞추어졌다. 모든 시료는 3반복 실험 후 평균값을 취하였다. 분석 6시간 전에 0.2 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ 의 ³H-thymidine을 시료가 들어

간 우물마다 넣은 후 cellular DNA에 ^3H -thymidine이 incorporation 되는 정도를 측정함으로써 세포독성을 계산하였다. To1을 제외한 To2, To3, To4, To5 의 4개의 fractions 모두에서 항암활성을 보였고 그것의 IC_{50} value 는 각각 $19.24 \mu\text{g}/\text{ml}$, $352.99 \mu\text{g}/\text{ml}$, $372.69 \mu\text{g}/\text{ml}$, $756.39 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 그 중 To2의 항암활성이 가장 높은 것으로 나타났으며 결과는 Fig. 15. 에서 보는 바와 같다.

7) Thermoase/EtOH To2 분획의 역상 HPLC 수행

: 이온교환 크로마토그래피 분획들 중 가장 활성이 높은 To2 분획을 가지고 역상 HPLC를 수행하였다(Fig. 16). Column으로는 Delta pak C_{18} (7.8x300, Waters, USA)을 이용하였고, sample 농도는 $20 \text{ mg}/\text{ml}$ 로 하였으며 $200 \mu\text{l}$ 씩 injection하여 214 nm 에서 이를 detection하면서 12 분획을 각각 분취하여 다음의 동물 세포 실험을 위한 시료로 사용하였다. 용매로는 H_2O 와 acetonitrile을 유속 $2 \text{ ml}/\text{min}$ 으로 흘려주었다. 우선 0~10 min동안 10% acetonitrile을 isocratic하게 흘려준 후 10~50 min까지 90% acetonitrile이 되도록 gradient를 주었다. 그후 다시 50~65 min까지 90% acetonitrile을 유지시켜 준 후 다시 65~75 min까지 10% acetonitrile로 용출 하였다.

8) Thermoase/EtOH To2 역상 HPLC 세부분획들의 항암활성 검정

: HPLC를 수행한 분획에 대해서 항암활성을 확인하기 위해서 앞에서와 같이 쥐의 백혈병 세포주인 P388D1 (mouse monocyte - macrophage: ATCC HB 8065)을 이용하였다. 각 시료는 microtiter plate에 미리 분주된 세포용액에 31.25 , 62.5 , 125 , $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가되었으며 그 후 37°C , 5 % CO_2 항온기 내에서 72시간 동안 배양되었다. 각 우물의 최종용량은 세포 및 시료를 포함하여 $200 \mu\text{l}$ 로 맞추어졌다. 모든 시료는 3반복 실험 후 평균값을 취하였다. 분석 6시간 전에 $0.2 \mu\text{Ci}/\text{well}$ 의 ^3H -thymidine을 시료가 들어간 우물마다 넣은 후 cellular DNA에 ^3H -thymidine이 흡수되는 정도를 측정함으로써 세포독성을 계산하였다. 이 중 To2-9의 항암활성이 가장 크게 나타났으며 이의 IC_{50} value는 $30.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.

각 fraction의 항암활성의 차이가 $62.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 뚜렷이 구분되므로 이 농도에서의 항암활성을 Fig. 17.에 나타내었다.

9) Thermoase/EtOH To-9 분획에 대한 gel filtration chromatography

: 앞의 결과에 의해 가장 높은 활성을 가지는 To2-9 분획을 gel filtration chromatography를 이용하여 다시 분리하였다. Gel filtration chromatography는 FPLC (Pharmacia Co.) system을 이용하였고, column으로는 3,000 ~ 70,000 Da 사이의 분자량의 범위를 가지는 Superdex 75 (15×300, Pharmacia Co.)를 이용하였다. 용매로는 double distilled water를 이용하였고, flow rate를 0.7 ml/min으로 하여 흘려주었다. sample 농도는 10 mg/ml로 하였고, 214 nm에서 detection하였다. 그래서 To2-9-G0 ~ To2-9-G5까지 다섯 fractions를 얻었으며 이에 대한 결과는 다음의 Fig. 18. 에 나타내었다.

10) Thermoase/EtOH To2-9-G 분획에 대한 항암활성

: Gel filtration chromatography의 결과에 의해 얻은 To2-9-G0 ~ To2-9-G5의 분획을 가지고 항암활성을 확인하기 위해서 쥐의 백혈병 세포주인 P388D1 (mouse monocyte - macrophage: ATCC HB 8065)을 이용하였고, 실험방법은 앞에서와 동일한 방법을 사용하였다. 각 시료는 microtiter plate에 미리 분주된 세포용액에 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가되었으며 그 후 37 °C, 5% CO₂ 항온기 내에서 72시간 동안 배양되었다. 72시간 동안 배양된 각 우물의 최종용량은 세포 및 시료를 포함하여 200 μl 로 맞추어졌다. 모든 시료는 3반복 실험한 후 평균값을 취하였다. To2-9-G2 의 농도가 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 활성이 나타났으며, 따라서 항암활성이 구분되는 농도인 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 이들의 항암활성을 분석한 결과는 Fig. 19.에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 G0-G5 분획 중 G2 분획이 가장 큰 항암활성을 나타내 암세포주인 P388D1의 세포가 가장 많이 사멸되는 것을 알 수 있었다.

11) Re-RP HPLC 수행

Gel filtration chromatography에서 분리한 To2-9-G5 fraction이 단일peak인가를 알아보기 위해 Re-RP HPLC 수행하였다. Column으로는 Nova pak phenyl (60Å, Waters, USA)를 이용하였고, sample 농도는 30 mg/ml로 하였으며 20 µl 씩 injection하여 214 nm에서 이를 detection하였다. 용매로는 double distilled water와 Acetonitrile을 이용하여 flow rate을 1 ml/min으로 흘려주었다. 우선 0 ~3 min동안 1% acetonitrile을 isocratic하게 흘려준 후 3~13 min까지 100% acetonitrile이 되도록, 그리고 나서 다시 13~18 min까지 100% acetonitrile을 유지시켜 준 후 다시 8~23 min 까지 1% acetonitrile로 내려주었다. chromatogram은 Fig. 20.에서 보는 바와 같고, 단일 peak가 얻어졌다.

12) Re-RP HPLC peak의 분자량 확인

Re-RP PHPC에서 단일 peak를 얻었으므로 이의 분자량을 확인해보기 위해서 MALDI- TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry)를 실시하였다. 그 결과 1330 Da의 분자량을 가진 peptide임을 확인할 수 있었고 Fig. 21.에 그 결과를 나타내었다.

제 4 장 대두식품으로부터 항혈전 펩타이드 소재 의 분리 및 정제

1. 연구수행방법

가. 대두단백 가수분해물의 항혈전 검정 (*In vitro*)

1) 항혈전 assay (*In vitro*)

Aggregometer (Chrono-log, No. 490)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다.

2) 혈소판 분리⁽⁷⁻⁹⁾

Rat을 diethylether로 마취하여 개복한 후, 항응고제인 ACD용액 (12.5 g Trisodium citrate dihydrate, 7.5 g Citric acid monohydrate, 10 g Glucose)을 1 : 6 (v/v)으로 미리 넣어놓은 syringe로 채혈하여, 상온에서 1,000 rpm (Vision scientific Co. Vs-5000)으로 15 분간 원심분리하고 상층의 PRP (Platelet rich plasma)를 취한 후에 다시 1,800 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 침전된 platelet에 washing buffer (11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 163.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 11.2 mM α-D-Glucose, 2.0 mM EDTA, 0.35 % Bovine Serum Albumin, pH 7.4)를 넣고 1,800 rpm으로 10 분간 원심분리하여 분리된 washed platelet을 suspension buffer (11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 16.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 11.1 mM α-D-Glucose, pH 7.4)에 현탁시켜 hemacytometer (Superior, Germany)로 platelet의 수를 $5 \times 10^8/\text{ml}$ 로 조정하였다.

3) 혈소판 응집 실험

Aggregometer를 이용하여 혈소판 응집실험을 다음과 같이 행하였다⁽¹⁰⁾.

가.의 방법으로 분리한 platelet suspension 450 μ l를 37 $^{\circ}$ C로 맞춘 aggregometer의 hole에 꽂아 1,000 rpm으로 5 분간 preincubation 시킨 후에 CaCl_2 용액 (final concentration 1.0 mM)을 첨가하여 2 분간 반응시키고, 된장으로부터 분리된 peptide fraction 들을 시험물질 (inhibitor)로 하여 농도별로 10 μ l씩 첨가하여 2 분 동안 반응을 시킨다음 혈소판 응집 유도물질인 ADP (final concentration 10 μ M)용액을넣어 5 분간 반응시킨 뒤에 transmittance를 측정하였다. 시험물질의 억제율 (inhibition rate)은 다음과 같이 산출하여 혈소판 응집을 50% 억제하는 농도인 IC_{50} 값을 구하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: Control aggregation %

B: Sample aggregation %

나. 대두단백 가수분해물의 항혈전 펩타이드의 분리

: 대두단백가수분해물을 증류수로 추출하여 pH 4.5로 조정하여 냉동 건조한 후, gel permeation chromatography (Sephadex G-25)를 행하였다. 분리된 분획들에 대하여 Fig. 22.과 같이 각각 항혈전 검정을 하여 활성이 가장 높은 획분을 분취한 후 semi-preparative reverse phase HPLC (C_{18} , 10 x 25cm)를 행하였다. 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)를 포함하는 5% acetonitrile을 eluant로 하여 analytical column을 사용하여 isocratic 조건으로 분리하였으며, 이 조건에서 지름 1 cm의 semi-preparative column으로 HPLC를 행하여 각 획분들에 대하여 항혈전 검정을 하였다. 이들중 가장 활성이 높은 획분을 분리하여 ion exchange chromatography를 행하고 reverse phase HPLC로 desalting한 후 냉동건조 시켜 보관하였다.

다. 분리된 획분의 동정

LC-electrospray ionization mass spectrometer (*MassLynx 2.1, Micromass platform II, manchester U.K*)를 이용하여 분리된 획분의 분자량을 확인하고, 그 sequencing은 Procise™(perkin Elmer, protein sequencing system, USA)를 이용하여 biobrene으로 처리한 여지에 peptide를 담은 상태로 Edman degradation method를 이용하여 자동분석하였다⁽¹¹⁾.

라. 동정한 펩타이드의 합성 및 분리

펩타이드의 합성은 433A peptide synthesizer (Perkin Elmer, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 FastMoc chemistry (HMP resin, benzoic anhydride)⁽¹²⁾에 의해 자동합성 하였으며 합성된 peptide는 TFA cleavage procedure와 ether extraction방법을 사용하여 다음과 같이 분리한 후 회수하였다. 냉장고에 넣어 차게 만든 flask에, 합성된 peptide resin (350 mg)과 cleavage mixture (0.5 mL distilled water + 9.5 mL TFA, 2.5 mL)를 넣고 상온에서 1.5 시간동안 충분히 반응(stirring)시켜 peptide로부터 resin이 분리되도록 하였다. TFA로부터 peptide를 분리 하기 위한 ether extraction을 위하여 반응액을 vacuum filtration (glass funnel 사용)하고 1 mL의 TFA로 reaction flask를 세척한 후 flask와 Funnel을 다시 10 mL의 DCM (dichloromethane) 으로 세척하여 여과액에 합쳐 1-2 mL이 되도록 농축시켰다. 이때 온도는 peptide의 손실을 방지하기 위하여 40℃ 이하로 하였다. 농축액에 10 mL의 물을 넣어 희석시키고 차게 식힌 ether를 동량 넣어 peptide 침전물을 추출하고 2번 이상 반복하여 peptide를 회수한 후 냉동건조하여 reverse phase HPLC로 분리·정제하였다⁽¹³⁾.

마. 합성 펩타이드의 항혈전 검정 (*In vitro*와 *In vivo*)

냉동건조시킨 두 개의 합성 peptide에 대하여 항혈전 검정(*In vitro, In vivo*)을 실시하였다. Aggregometer를 이용한 *In vitro* test이외에 *In vivo* test는 bleeding time을 측정하는 방법을 사용하여 다음과 같이 행하였다.

Male sprague-Dawley rat (150±30 g)에 합성 peptide를 농도별로 물에 희석하여 1회 경구투여한 후 꼬리로부터 5 mm되는 부분을 잘라 꼬리가 5 cm 정도 되는 곳까지 37.5℃ 식염수에 잠기게 놓아둔 후 지혈이 될 때까지의 시간을 측정하였다

2. 연구수행결과

가. 대두단백가수분해물의 항혈전 검정 (*In vitro*)

: 쥐의 혈소판을 분리하여 ADP로 자극하였을때 일어나는 응집을 저해하는 정도를 aggregometer로 측정하였다. PRP (platelet rich plasma)에 존재하는 albumin등의 혈장단백질이 활성물질의 작용을 방해할 수 있으므로 ⁽¹⁴⁾ PRP 대신 세척한 혈소판 (washed platelet: WP)을 사용하여 저해활성을 검색하였다. ADP에 의해 유도되는 혈소판 응집을 저해하는 활성을 측정하였을때, 대두단백 가수분해물을 증류수로 추출하여 pH 4.5로 조정한 추출물은 IC₅₀이 2 mg/ml로 상당한 항혈전 활성이 있음을 확인하였다.

나. 대두단백가수분해물의 항혈전 펩타이드의 분리

1) Gel permeation chromatography(Sephadex G-25)에 의한 분리

: 추출물을 냉동 건조한 후, gel permeation chromatography(Sephadex G-25)에 의해 얻은각획의 항혈전 검정을 한 결과, 항혈전 활성이 매우 넓게 분포한 경향을 보였다(Fig. 23). 이중 활성이 가장 높은 두 획분(1, 2)을 다음 단계의 분리를 위해 냉동 건조하였다.

2) Semi-preparative reverse phase HPLC(C₁₈, 10x25cm)에 의한 분리

: Gel permeation chromatography에서 활성이 높게 나타난 두 획분들에 대하여 각각 semi-preparative reverse phase HPLC (C₁₈, 10x25cm)를 행하여 주요 peak

들을 분취하고 항혈전 검정을 하였다. 그 결과, 둘째 획분에서는 높은 활성을 보이는 peak가 없었으며, 첫째 획분에서는 거의 대부분을 차지하는 제일 큰 peak에서는 활성이 낮게 나타났지만, 다른 4 개의 peak들에서 비교적 높은 항혈전 활성이 나타났다 (자료 제시하지 않음). 따라서 gel permeation chromatography에서 활성이 높은 첫째 획분(1)에 대하여 semi-preparative reverse phase HPLC(C_{18} , 10x25cm)를 행하여 그 중에서 항혈전 활성이 높게 나타난 획분을 분리하여 6회 분취한 후 peptide 함량을 정량한 결과 2 μ g밖에 안되는 매우 적은 양으로 확인되었다.

3) 새로운 protocol(ultrafiltration, ion exchange chromatography)에 의한 분획
: 상기 분리 방법과는 별도로 새로운 protocol에 의한 분리를 시도해 보았다. 본 연구진의 연구 경험에 의해, 된장에서 항혈전 펩타이드 활성이 염기성에서 가장 높았다는 결과⁽¹⁵⁾를 참고로 하여 아래와 같은 새로운 protocol에 의해 염기성 펩타이드를 분리하여 그 항혈전 활성을 검색해 보았다. 즉 원료인 단백질수분해물을 ultrafiltration(Amicon ultrafiltration kit, Amicon, Beverly, MA, USA; molecular weight cut-off 3,000의 ultrafiltration membrane YM-3, Amicon, Beverly, MA, USA)한 후, ion exchange chromatography(Dowex X-2, 30x2.6 cm)하여 염기성 획분들을 얻은 후 이들의 항혈전활성을 측정한 결과 극히 미미한 활성을 보였을 뿐이므로 이 protocol을 포기하고 원래의 protocol로 회귀하였다.

4) Gel permeation chromatography(Sephadex G-25, 5x95 cm)에 의한 충분한획분의 확보
: 이미 언급한 바와 같이 semi-preparative reverse phase(C_{18}) HPLC에서 얻는 분획의 양이 너무 작고 또한 semi-preparative reverse phase(C_{18}) HPLC의 원료가 되는 gel permeation chromatography(Sephadex G-25, 5 x 95 cm)에서의 항혈전 획분의 양도 얼마 되지 않아(1주에 column당 불과 1-2 mg을 얻음) column을 하나 추가하여(총 2개의 column) 약 3개월간 분취를 수행하여 충분하다고 생각되는 양을 확보하였다.

5) 새로운 조건 (isocratic조건에서 5% acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 eluant로 한 조건)에서의 reverse phase(C₁₈) HPLC(1x25 cm)에 의한 분리

: 지금까지는 gradient로 reverse phase HPLC를 행하였으며 이때 전반부에서 용출되는 peptide들에서 항혈전 활성이 비교적 높게 나와서 이들을 분리라는 것이 좋을 것으로 생각되어 이들의 분리를 더욱 효율적으로 하기 위해 isocratic조건에서 analytical column으로 예비 실험한 결과, 5% acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 eluant로 했을 때 gradient에서보다 훨씬 대부분의 관심 peak들을 잘 분리할 수 있었다.

이 조건에서 지름 1 cm의 semi-preparative column으로 HPLC를 행하고 예비실험 결과 활성이 높을 것으로 예상되는 획분들에 대한 항혈전 검정 결과는 Fig. 24. 과 같다. 이 Figure에 의하면, retention time 30분에서 70분사이의 관심 peak의 대부분이 잘 분리되었으며 retention time 70분 부근의 즉 Figure 마지막 부분의 완전히 보이지 않는 peak는 major peak로 활성이 거의 없는 peak이다. 이들중 가장 활성이 높은 획분(화살표 표시 획분)을 다음 단계(ion exchange chromatography)에 의해 분리하였다. 한편 optical density에 의해 계산했을 때 이 획분은 전체의 0.5%이므로 한번 주입시 이 획분을 약 2.5 μ g을 얻을 수 있었다($500 \mu\text{g} \times 0.5/100 = 2.5 \mu\text{g}$).

6) Cation exchange HPLC에 의한 분리 및 reverse phase HPLC에 의한 desalting

: 2.5 μ g의 peptide가 들어 있는 냉동건조물에 5 mM KH₂PO₄ (pH 3.0) buffer를 100 μ l 넣어 녹인 후 cation exchange HPLC를 행하여 Fig. 25.과 같은 결과를 얻었다. Column에 retain되지 않은 두 개의 peak가 분리되었으며 이들을 분취하여 냉동건조시킨 획분들을 각 각 reverse phase HPLC로 desalting하여 단일 peak들을 얻어 냉동건조시킨 후 100 μ l의 물에 녹여 10 μ l를 항혈전 검정을 실시한 결과, 두 획분 모두에서 약 80% 정도의 높은 항혈전 활성을 보였다.

다. 분리된 획분의 동정

1) LC-MS에 의한 동정

: 상기 두 peak(Fig. 25.)들을 LC-electrospray ionization mass spectrometer (MassLynx 2.1, Micromass platform II, manchester U.K)로 LC-MS한 결과, 분자량이 각각 381.30(Fig. 26.)과 391.3(Fig. 27.)의 거의 순수한 물질들임을 확인하였다. Cone angle을 높여도 더 이상 깨지지 않아 구조가 안정한 물질로 생각되며, 따라서 본 물질이 peptide라 가정하면 sequencing은 LC-MS로 불가능하였으므로 sequencer를 이용하여 다음과 같이 수행하였다.

2) Sequencer에 의한 동정

: LC-MS에 의해 확인된 peptide의 sequencing은 Procise™(perkin Elmer, protein sequencing system, USA)를 이용하여 bobrene으로 처리한 여지에 peptide를 담은 상태로 Edman degradation method를 이용하여 분석하였다. 분자량 381.3의 peptide의 sequence는 Ser-Ser-Gly-Glu로, 391.3의 peptide는 Asp-Glu-Glu로 동정되었다.

라. 동정한 펩타이드의 합성 및 분리

1) 동정한 펩타이드의 합성

: 아미노산 서열이 밝혀진, 두 개의 항혈전성 peptide들 (H-Asp-Glu-Glu-OH, H-Ser-Ser-Gly-Glu-OH)의 합성은 433A peptide synthesizer (Perkin Elmer, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 자동합성한 후 TFA cleavage procedure와 ether extraction방법을 사용하여 분리하였다. TFA로부터 Peptide를 분리하기 위한 ether extraction을 위하여 반응액을 vacuum filtration (glass funnel 사용)하고 1 mL의 TFA로 reaction flask를 세척한 후 flask와 Funnel을 다시 10 mL의 DCM (dichloromethane) 으로 세척하여 여과액에 합쳐 1-2 mL이 되도록 농축시켰다. 농축액에 10 mL의 물을 넣어 희석시키고 차게 식힌 ether를 동량

넣어 peptide 침전물을 추출하고 2번 이상 반복하여 peptide를 회수한 후 냉동 건조 시켰다. 이 때에 10 mL의 물을 넣어 희석하지 않고 냉장고에서 차게 식힌 ether만으로 여러번 추출하는 것이 peptide 회수율을 최대로 하는 방법이었다 (0.3 g의 합성 peptide를 cleavage하였을 때, 최대수율은 약 50%). 추출된 peptide를 냉동건조 시킨 후, 1 mL의 증류수에 녹이고 다시 30 배 희석하여 0.1% TFA가 포함된 acetonitril gradient를 사용하여 reverse phase HPLC로 분리·정제하였다. 각 획분들을 분취하여 LC-MS로 분자량을 재확인한 후, 활성획분 (Fig. 28, Fig. 29, 화살표 표시)을 냉동건조시켰다.

마. 합성 peptide들의 항혈전 검정(*In vitro*, *In vivo*)

냉동건조시킨 두 개의 합성 peptide (Fig. 28, Fig. 29)를 농도별로 증류수로 희석한 후, 항혈전 검정(*In vitro*)을 실시하여 IC_{50} 을 구하였다. 이 농도는 대조군으로 사용된 RGDS의 IC_{50} ($475 \mu M$)과 거의 비슷한 활성을 갖는 것으로 확인되었다. *In vivo* test에서는 SD rat (150 ± 30 g)에 합성 peptide를 1회 경구투여한 후 꼬리부분에서의 bleeding time을 측정하여 지혈이 되는 시간을 측정하였는데 합성 peptide를 투여하지 않은 대조군의 bleeding time (7 min)보다 약간 길어지는 것이 확인되었다. 따라서 이들 합성 peptide들의 효능 및 작용 기전을 규명하고 임상시험을 수행한 후 제품화하므로써 항혈전 및 심혈관계 질환의 예방 및 치료에 기능성식품 및 치료제로서 활용하고자 한다.

제 5 장 유전공학기법을 이용한 고기능성 펩타이드의 대량생산균주의 개발

1. 연구수행방법

가. 혈압강하 펩타이드(ACE inhibitory peptide)발현 vector 개발

1) 혈압강하펩타이드 유전자의 합성

: vector로 이용할 plasmid pUC19를 먼저 선정하고, pUC19의 multiple cloning site중의 하나인 SalI restriction enzyme에 맞추어 혈압강하펩타이드 유전자를 설계하였다. 혈압강하 펩타이드는 (주)농심에서 된장에서 분리한 혈압강하 펩타이드인 Histidine-Histidine-Leucine(His-His-Leu)을 사용하였다.

His-His-Leu를 coding하는 codon을 다양하게 조합하여 3가지 종류의 complementary oligonucleotide를 설계하였다.

2) multiple copy의 HHL 유전자 cassette 제작

: Annealing된 합성 HHL 유전자를 USB사의 T4 DNA Ligase를 처리하여 HHL 유전자 상호간에 결합을 시켜준다. 이렇게 함으로써 HHL 유전자를 반복하여 가진 multiple copy의 HHL 유전자 cassette를 확보하였다. Ligation 반응은 16°C에서 overnight시켜서 수행하였다.

3) Cloning vector 와 HHL 유전자의 Ligation

: cloning vector pUC19를 Sal I 제한효소로 37°C에서 3시간동안 절단하였다. 또한 DNA 말단에 존재하는 phosphate group을 제거하는 CIP(calf intestine alkaline phosphatase)를 1 μ l처리하여 상온에서 1시간동안 반응하였다. Multiple copy로 만든 HHL 유전자 cassette와 pUC19을 3 : 1 비율의 mole수로 하여 ligation하였다. Ligase는 USB사의 T4 DNA ligase (1 unit/ μ l)를 사용하였

고, 16℃에서 overnight시켜서 ligation을 수행하였다.

4) *E. coli* 로의 Transformation

: Ligation된 DNA를 CaCl₂ method와 electroporation 으로 transformation하였다. CaCl₂ method은 Molecular cloning (2nd Edition)의 protocol에 따라 42℃에서 heat shock를 주어 수행하였다. Electroporation은 Bio-Rad Gene Pulser II 기종을 이용하였다. 0.2cm cuvette에 competent cell 40 μl와 ligation mixture 1 μl를 넣어준 후, 2.5 kV, 25 μF, 200 Ω의 조건에서 4.5~4.8 msec동안 pulse를 주었다. 1 mL SOC media에서 1시간동안 recovery 한 후, LB/amp/IPTG/X-Gal plate에 spreading하여 16시간동안 배양하였다.

5) PCR을 통한 HHL 유전자의 확인

: Template DNA로는 white를 띄는 transformation된 cell 자체를 적당량 넣어 주었다. Primer로는 mal E와 insert(P2와 P4)를 사용하였다. Control로는 primer malE와 universal primer(Sal I site에서 42 b.p 아래쪽에 있는 sequence)을 primer로 사용하였다. PCR의 결과는 1.5 % agarose gel electrophoresis를 통한 PCR product의 크기로서 비교하였다. Vent polymerase 는 New England BioLab사의 것을, PCR기계는 RIKOH KAGAKU LAB. INC. 사의 model TPI-241을 사용하였다. PCR의 조건은 Table 18 과 같이 하였다.

6) DNA Sequencing을 통한 HHL 유전자의 확인

: 먼저 Sequencing에 사용할 sample DNA는 PCR로 확인된 colony를 10 mL LB/amp(100 μg/mL)에서 16시간 배양한 후, Quigen 사의 QIAprep Spin Plasmid Kit을 사용하여 대략 5 μg 정도 얻었다. sequencing reaction은 USB사의 T7 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit을 이용해서 Chain termination 방법으로 하였다. Sequencing Gel은 6% polyacrylamide gel을, gel running buffer 는 1 x TBE buffer를 사용하였다. GIBCO BRL sequencing system Model S2을 이

용하여 40 mA, 1600 V 하에서 gel electrophoresis를 수행하였다.

나. 혈압강하 펩타이드(ACE inhibitory peptide)의 발현 시스템 구축 및 대량 생산 균주 개발

1) overexpression vector pMAL-p2, pMAL-c2 로의 subcloning

: overexpression vector로는 maltose binding protein(MBP)을 이용해서 산물을 쉽게 회수할 수 있도록 설계된 pMAL-c2, pMAL-p2로 선정하였다. MBP는 *E. coli* system에서 안정성이 확인된 protein이므로 발현된 HHL 유전자의 안정성도 기대할 수 있다. Blue/white selection과 PCR, DNA sequencing 결과에서 찾아진 pUC19-HHL₉을 *Pst*I 와 *Xba*I의 제한효소를 이용하여 37°C에서 3시간동안 절단하였다. 1.5% Agarose gel electrophoresis 한 후, 이 *Pst*I/*Xba*I 절편을 NaI와 glass beads를 이용하여 gel extraction하여 회수하였다. pMAL-c2, pMAL-p2 vector을 동일한 제한효소를 이용하여 절단한 후, *Pst*I/*Xba*I 절편과 1:3 비율로 16°C에서 15시간 동안 Ligation 반응을 수행하였다.

2) 유전공학기법을 이용한 혈압강하 펩타이드 생산 균주의 확보

: His-His-Leu를 9 copy coding 하는 expression cassette를 cloning한 pMAL-c2-HHL₉, pMAL-p2-HHL₉를 protease deficient 균주, CAG597, CAG629, KS1000, ER2508 등에 transformation 하였다. 이들 균주는 특정 protease들이 결핍되어 MBP-HHL fusion protein을 더욱 안정하게 해 준다. Transformation은 Bio-Rad Gene Pulser II 기종을 이용하여 2.5 kV, 25 μF, 200 Ω의 조건에서 cloning 과정과 동일하게 수행하였다. PCR을 통하여 transformation의 성공여부를 확인하였다.

3) IPTG induction을 통한 혈압강하 펩타이드 생산균주의 확인

: HHL 펩타이드 생산균주를 5 ml LB/glucose/ampicillin (100 μg/ml ampicillin) 배지에 접종하여 37°C에서 overnight culture 한 후, 10 mL의 동일배지에 1/100

희석하여 접종하였다. 접종한 후, 대략 2~3 시간이 지나 Cell 농도가 2×10^8 cells/ml ($OD_{600} \cong 0.5$)에 달했을 때, 0.5 mM IPTG 농도로 P_{tac} promoter를 30°C에서 4시간동안 induction 하였다. IPTG로 induction한 시료와 induction 하지 않은 시료를 각각 1 mL씩 회수하여 14,000 rpm으로 원심분리하여 cell pellet을 회수하였다. 회수한 cell을 100 μ l의 ddH₂O와 2X SDS-PAGE sample buffer를 혼합한 후, water bath에서 100°C, 5분간 끓여주었다. 비교분석은 12% SDS-PAGE gel에서 20 mA 조건에서 수행되었다. electrophoresis 후, SDS-PAGE gel은 commassie briant blue R-250으로 염색하였다.

다. 혈압강하 펩타이드의 대량생산

1) IPTG induction & Sonication

: 재조합 His-His-Leu peptide를 9copy 가진 protease deficient *E. coli* 균주 ER2508 single colony를 10ml LB/glucose/ampicillin (100 μ g/ml ampicillin) 배지에 접종하여 37°C에서 overnight culture 한 후, 4 × 500 mL의 동일배지에 1/100희석하여 접종하였다. 접종한 후, 대략 2~3 시간이 지나 Cell 농도가 2×10^8 cells/ml ($OD_{600} \cong 0.5$)에 달했을 때, 0.5 mM IPTG 농도로 P_{tac} promoter를 30°C에서 4시간동안 induction 하였다. 배양후, 6000×g에서 20분간 원심분리하여 cell pellet을 회수하였다. 회수된 cell은 곧바로 2.5ml amylose column buffer(Tris • Cl, NaCl, Sodium Azide)에 녹여 -20 °C에서 대략 12~16 시간동안 freezing 하고, ice-cold water에서 3~4 시간 thawing 하였다. Sonics & Materials사의 VCX 400 model의 sonicator를 사용하여 50% duty cycle로 3분간 sonication을 수행하였다. Sonication 후, 13,000×g에서 30분간 원심분리하여 pellet인 cell debris 제거하고 supernatant인 crude cell extract를 회수하였다.

2) Amylose affinity chromatography

: 원심분리로 회수한 crude cell extract를 5 volume의 column buffer를 이용

해 희석하였다. 2.5×10 cm column에 amylose resin 10ml 을 붓고 amylose resin 을 8 volume 의 column buffer 로 washing 하였다. 희석한 cell extract 를 1 ml/min의 flow rate로 loading한 후, 12 volume의 column buffer로 washing하였다. 20 mM maltose가 첨가된 column buffer로 MBP fusion protein을 elution하였다. 1/5 column volume으로 fraction을 15 ~ 20 개 정도 받았다. 각각의 fraction을 SDS-PAGE을 통해 확인하였다.

3) Preparative SDS-PAGE

: Bio-Rad 사의 model 491 prep cell kit을 이용하여 amylose affinity를 통해 1차 정제된 MBP-HHL fusion protein을 정제하였다. 6% SDS-PAGE gel에서 50 mA 로 electrophoresis 하였다. 염색시약(coomassie brilliant blue R-250)이 빠지기 시작한 한 후부터 1 ml/min의 flow rate으로 fraction을 받기 시작하였다. 각각의 fraction은 SDS-PAGE 을 통하여 분석하였다.

4) Factor Xa 처리

: Amicon사의 Centriprep 30으로 정제된 MBP fusion protein을 농축한 후, Factor Xa buffer(20 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM Sodium Azide, pH 8.0)를 넣어주고 한번 더 농축하였다. 농축한 MBP fusion protein에 1%(w/w)의 NEB 사의 Factor Xa enzyme을 넣고, 상온(25°C)에서 5 시간정도 반응 시켰다. Factor Xa cleavage는 SDS-PAGE와 Western Blotting 으로 확인하였다. Factor Xa cleavage를 확인한 후, Centricon 30 이용하여 [HHL]₉-[β -gal- α] 을 모았다.

5) Chymotrypsin 처리

: HHL9- β -gal- α 을 centricon 10 을 이용해 α -chymotrypsin buffer(50 mM Ammonium bicarbonate , 1 mM CaCl_2 , 0.1% SDS, pH 8.0) 로 치환하였다. 1%(w/w) 농도로 α -chymotrypsin을 넣어주고 상온(25°C)에서 overnight 처리하

였다. α -chymotrypsin은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

6) HPLC를 통한 HHL의 정제

: Shodex사의 GPC(gel permeation chromatography) 용 column에 0.5% SDS 용매를 0.7ml/min 유속으로 흘려주었다. peptide의 detection은 214 nm 에서 수행하였고, Sigma 사의 peptide standard로 molecular weight를 측정하였다. 시료는 HHL9- β -gal- α 를 α -chymotrypsin으로 digestion한 것으로 하였다.

7) MALDI(Matrix-associated laser desorption/ionization) mass-spectroscopy

를 이용한 HHL의 확인

: 서울 농대 SRC에 의뢰하여 MALDI mass spectroscopy(Kratos Kompact MALDI, Manchester, England)을 이용하여 recombinant HHL의 분자량을 확인하였다. 시료와 비교할 수 있게 합성 HHL을 standard로 하여 분자량을 비교분석하였다.

2. 연구수행결과

가. 혈압강하 펩타이드발현 vector 개발

1) 혈압강하펩타이드 유전자의 합성

: 혈압강하 펩타이드 HHL의 유전자 제작단계는 다음과 같이 수행되었다.

가) cloning vector의 *Sa*I site에 맞게 양쪽 말단에 cohesive end(TCGA)를 가진다

나) 5' 말단의 염기서열로부터 His-His-Leu의 codon을 배열하였다.

다) 만들어진 oligonucleotide와 결합할 complementary oligonucleotide의 염기서열을 결정하였다.

라) multiple copy와 ligation을 위해 5'말단에 phosphate group을 붙여주었다. 이렇게 만들어진 각각의 oligonucleotide을 100 μ M로 맞추고 이중 일부를 취하여 95 $^{\circ}$ C에서 5분동안 가열하였다가 천천히 식혀서 annealing 시켰다. 그 결과

단일가닥의 oligonucleotide가 이중가닥의 HHL 유전자가 되었다. (Fig. 30.)

2) multiple copy의 HHL 유전자 cassette 제작

: 위에서 Annealing된 합성 HHL 유전자를 T4 DNA Ligase를 처리하여 HHL 유전자 상호간에 결합을 시켜준다. 이렇게 함으로써 HHL 유전자를 반복하여 가진 multiple copy의 HHL 유전자 cassette를 확보하였다.

3) Cloning vector 와 HHL 유전자의 Ligation

: Cloning 효율이 좋고 high copy number plasmid인 pUC19를 vector로 선택하여 *Sal* I 제한효소와 CIP(calf intestine alkaline phosphatase)를 처리하여 pUC19 끼리의 self-ligation을 방지하였다. Multiple copy로 만든 HHL 유전자 cassette와 pUC19를 3 : 1 비율의 mole수로 하여 ligation을 수행하였다.

4) *E. coli* 로의 Transformation

: Competent cell은 *E. coli* XL1-blue strain을 이용하였다. XL1-blue strain은 [*lacZ* Δ*M15*]의 genotype을 가지므로 IPTG와 X-Gal을 이용한 Blue/White selection 통한 HHL 유전자의 존재여부의 간접적 확인이 가능하다. Ligation된 DNA를 CaCl₂ method와 electroporation 으로 transformation하였다. 그 결과 총 400 여개의 transformation된 colony를 획득하였다.

5) PCR을 통한 HHL 유전자의 확인

: *lac Z* gene의 α-complementation를 이용하여 cloning된 vector를 Blue/White selection을 하였다. 이 과정에서 transformant 가 1차 선별되었다. Template DNA로는 white를 띄는 transformation된 cell 자체를 적당량 넣어 주었다. Primer로는 mal E와 insert(P2와 P4)를 사용하였다. Insert를 primer로 사용했을 때, PCR 산물이 나온다면 inser가 삽입된 것이고, 나오지 않는다면 insert 가 없는 상태의 plasmid이다. 150여개의 transformant를 PCR 한 결과, Fig. 31.

에서의 agarose gel electrophoresis 사진에서 보이는 대략 300 bp 정도의 PCR product를 가지는 P3-P4 oligonucleotide cassette의 transformant가 있었다. 이것은 P3-P4 oligonucleotide cassette가 3 copy 로 cloning 되었을 때의 size 이다.

6) DNA Sequencing을 통한 HHL 유전자의 확인

: sequencing reaction은 T7 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit을 이용해서 Chain termination 방법으로 하였다. 그 결과 DNA sequencing을 통하여 PCR을 통해 selection한 plasmid 중에서 3copy의 P3-P4 oligonucleotide cassette가 반복하여 cloning된 pUC19-HHL₉을 찾았다. 또한 이 pUC19-HHL₉는 His-His-Leu을 대량생산하기 위한 방향성에 일치하게 cloning 되었음을 알 수 있었다(Fig. 32.). 또한, 각각의 oligonucleotide cassette를 1~2copy 가지는 transformant와 방향성이 일치하지 않는 다양한 조합의 oligonucleotide cassette를 가지는 transformant 들도 찾아내었다.

나. 혈압강하 펩타이드의 발현 시스템 구축 및 대량생산 균주 개발

1) overexpression vector pMAL-p2, pMAL-c2 로의 subcloning

: DNA sequencing 결과에서 방향성이 일치하며 3copy의 oligonucleotide cassette 가진 pUC19-HHL₉을 *Pst*I 와 *Xba*I의 제한효소를 이용하여 절단하여 pMAL-c2, pMAL-p2 vector에 subcloning 하였다. 그 결과, HHL 유전자가 Ptac promoter에 fusion된 malE 유전자의 downstream에 목적하는 대로 cloning 되었음을 확인하였다. HHL 유전자가 cloning된 overexpression vector를 각각 pMAL-c2-HHL₉, pMAL-p2-HHL₉ 라고 하였다. pMAL-c2-HHL₉, pMAL-p2-HHL₉ 는 HHL 유전자 cassette를 3 copy 가지고 있으며, 이는 총 9 copy의 His-His-Leu peptide를 갖는 MBP-HHL fusion protein을 생산할 수 있다. 따라서 pMAL-c2-HHL₉, pMAL-p2-HHL₉ 를 항고혈압성 His-His-Leu 펩타이드를 생산하는 expression vector frame으로 이용할 수 있다(Fig. 33.).

2) 유전공학기법을 이용한 혈압강하 펩타이드 생산 균주의 확보

: His-His-Leu 를 9 copy coding 하는 expression cassette를 cloning한 pMAL-c2-HHL₉, pMAL-p2-HHL₉ 를 protease deficient 균주, CAG597, CAG629, KS1000, ER2508 등에 transformation 하였다. 이들 균주는 특정 protease 들이 결핍되어 MBP-HHL fusion protein을 더욱 안정하게 해 준다. PCR을 통하여 transformation의 성공여부를 확인하였다.

3) IPTG induction을 통한 혈압강하 펩타이드 생산균주의 확인

: HHL 펩타이드 생산균주를 0.5 mM IPTG 농도로 P_{tac} promoter를 30°C에서 4시간 동안 induction 하였다. IPTG로 induction한 시료와 induction 하지않은 시료를 12% SDS-PAGE gel에서 electrophoresis를 수행하였다. 그 결과, MBP-HHL₉-β-gal-α fusion protein의 예상 size인 55 kda 근처인 50~60 kda에서 induction 되어진 protein band가 확인되었다(Fig. 34.).

다. 혈압강하 펩타이드의 대량생산

1) Amylose affinity chromatography

: 재조합 His-His-Leu peptide 를 9copy 가진 각각의 protease deficient *E. coli* 균주 ER2508 의 cell 농도가 2×10^8 cells/ml($OD_{600} \cong 0.5$)에 달했을 때, 0.5 mM IPTG 농도로 induction 하였다. 배양후, 원심분리하여 cell pellet을 회수하였다. 회수된 cell은 곧바로 amylose column buffer에 녹여 freezing-thawing 하였다. Sonication한 시료는 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 원심분리로 회수한 crude cell extract를 amylose resin을 통과하고 washing 하였다. 20mM maltose가 첨가된 column buffer로 MBP fusion protein을 elution하였다. 1/5 column volume 으로 fraction을 15~20 개 정도 받았다. 각각의 fraction을 SDS-PAGE을 통해 확인하였다(Fig. 35.) 그 결과 각각의 fraction에서 MBP-HHL₉-β-gal-α fusion protein과 cell 안에서 MBP상태로 cleavage가 일어난 protein 및 몇가지의 알수

없는 protein등이 확인되었다. 그러나 주된 protein은 MBP-HHL₉-β-gal-α fusion protein으로 나타났다.

2) preparative SDS-PAGE

: 6% SDS-PAGE gel electrophoresis를 수행하여 총 70여개의 fraction을 얻었다. 이들중 39~44번 fraction에서 단일 band로 정제된 MBP-HHL₉-β-gal-α을 얻을 수 있었다.

3) Factor Xa 처리

: Amicon사의 Centriprep 30으로 정제된 MBP fusion otein을 농축한 후, 농축한 MBP fusion protein에 Factor Xa enzyme을 넣고 반응시켰다. 반응 결과는 SDS-PAGE와 Western Blotting으로 확인하였다(Fig. 36, 37). 발현된 fusion protein 의 상태는 55 kDa MBP-HHL₉-β-gal-α으로 MBP는 42 kDa, HHL₉-β-gal-α는 13kDa의 size를 갖는다. SDS-PAGE 결과 55 kDa MBP-HHL₉-β-gal-α이 42 kDa의 MBP과 13 kDa의 HHL₉-β-gal-α으로 Factor Xa cleavage가 일어남을 확인하였다(Fig. 36). Western blot 의 결과는 MBP의 위치를 보여주는 것으로, factor Xa 으 로 인해 55 kDa MBP-HHL₉-β-gal-α에서 13kDa의 HHL₉-β-gal-α가 잘려진 42 kDa 의 MBP 의 band를 확인하였다. 이것으로서 Factor Xa에 의하여 정확히 MBP와 HHL₉-β-gal-α이 잘려짐을 확인하였다(Fig. 37.).

4) Chymotrypsin 처리

: HHL₉-β-gal-α에 α-chymotrypsin을 넣어주고 반응한 후, HPLC 로 분석한 결과, 다양한 peptide fraction을 얻을 수 있었다.

5) Mass spectroscopy를 통한 tripeptide His-His-Leu의 확인

:HHL과 유사한 분자량으로 추정되는 peptide fraction을 포집하여 MALDI mass spectroscopy 로 분자량을 확인한 결과 합성 HHL과 동일한 406 daltons 정도의

분자량에서 peak를 보여준다(Fig. 38.). 이로써 유전공학 기법을 이용해서 recombinant tripeptide HHL을 생산할 수 있음을 알수 있었다.

제 6 장 기능성 펩타이드의 *In vivo* 활성검증

1. 연구수행방법

가. 실험동물 및 사료조제

: SHR (6주령-14주령) 수컷을 울산대학교 의과대학 실험동물실로 부터 분양받아, 수축기혈압(systolic blood pressure, SBP) 이 145 mmHg이상인 SHR을 사용하였다. 동물을 시판사료 (삼양사)로 예비사육한후 무작위로 군당 6마리씩 대조군, 3% UF-peptide 투여군, 10% UF-peptide 투여군의 3군으로 분류하여 6주간 사육하였다. 사료성분은 조단백질 23.2%이상, 조지방 4.0% 이상, 조섬유 6.0%이하, 조회분 10.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.45%이상이었다. 미세입자로 분쇄한 사료에 UF-peptide분말을 소정 농도로 첨가하여 충분히 혼합하였다. 또한, 대두가수분해물(SoyPep279) 식이첨가 실험의 경우, 기본 AIN-76 식이성분을 고려하여, 0, 3, 10 % SoyPep279 식이를 조제하였다. AIN-76 사료성분은 100 g 당 constarch 52 g, casein 20 g, dextrose 13 g, corn oil 5 g, cellulose 5 g, methionine 0.3 g, choline bitartrate 0.2 g, vitamin mix 1 g, mineral mix 3.5 g을 함유하였다. 첨가하게 되는 SoyPep279의 protein, lipid, carbohydrate, Ash의 함량을 AIN-76 식이에서 제외시킨 후, 충분히 혼합하여 실험에 사용하였다. 실험기간중 먹이와 물을 자유섭취케 하였으며, 3-4일마다 체중을 측정하며 동물의 외관, 행동 및 증상을 관찰하였다.

나. UF-peptide 제조

: 실험식이에 첨가한 UF-peptide 제조는 다음과 같다. 대두 단백질을 endopeptidase로 pH 8, 60 °C 에서 2시간, exopeptidase로 pH 5, 55 °C 에서 4시간, 그리고 계속해서 amylase 와 exopeptidase로 12시간 가수분해 한후, 이것을 ultrafiltration하여 동결건조하였다 (UF-peptide). 이 UF-peptide를 전술한 바와같은 농도로 사료에 첨가하였다

다. HHL 펩타이드 합성

: 합성 펩타이드 HHL (순도 99%) 은 포항공과대학 단백질 연구소에서 의뢰 합성하여 실험에 사용하였다.

라. 비관혈식 혈압측정

: Rat의 꼬리동맥의 수축기 혈압 (SBP)을 tail cuff 법 (Natsume Kn-210, japan)으로 측정하였다⁽¹⁶⁾. 즉, Rat를 약 섭씨 38도 보온상자속에서 10분간 가온 한후, holder로 고정하여 실온에서 소동물 비관혈식 자동혈압계를 사용하여 SBP를 측정하였다. 측정치는 rat가 정지상태에 있을 때 SBP를 5회이상 측정한뒤 평균값을 사용하였다. 혈압측정은 전 실험기간중 정기적으로 3일간격으로 10:00-12:00 am사이에 측정하였다.

마. 관혈식 혈압측정

: Rat의 경부동맥의 수축기 혈압 (SBP)을 Poly-graph 1000 (Letica Scientific Instruments, Spain)를 사용하여 측정하였다. 즉, Rat를 nembutal로 마취시킨 후, 적외선 전열등을 부착한 hot plate (섭씨 38도) 위에서 10분간 가온 하며 고정시켜, 경부동맥과 대퇴부 정맥으로 미세관을 삽입하였다. 대퇴부 정맥으로 삽입된 미세 카테타관(내경 0.28mm, 외경 0.61mm)을 통해 saline (control), 기존의 혈압강하제인 captopril (2mg/20분 x 3회), HHL (2mg/20분, 3회)를 주입하였고, 동맥으로 삽입한 카테타관 (내경 0.58mm, 외경 0.96mm)과 연결된 Poly-graph 혈압측정기로 약 3시간에 걸친 혈압변화를 관찰하였다.

바. 생화학적 검사 및 조직중 ACE 조효소액 조제

: 실험기간 종료후 rat를 희생시켜 채혈 및 각 주요 장기를 적출하였다. 혈액을 원심분리 (3,000 rpm, 10 min) 하여 혈청을 얻었고, 시판 kit(아산제약)로 glutamate oxaloacetate transaminase(GOT) 및 glutamate pyruvate

transaminase(GPT) 총콜레스테롤, 중성지질을 측정하였고, Iyatron kit(Iyatron Ltd., Japan)로 인지질을 측정하였다⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

흉부 대동맥 또는 신장을 적출하여, 0.9% 생리식염수로 세척하였다. 조직을 세분한 후 homogenize (1,300 rpm, 3 min)하여 원심분리 (3,500 rpm, 20 min, 4℃)한 후 그 상층액을 혈관조직의 ACE 조효소액으로 사용하여 효소활성을 측정하였다⁽²⁰⁾.

사. HMG-CoA reductase 효소원 조제 및 활성측정

: Rat의 간 조직 4 g을 약 40 ml 정도의 Buffer A(인산완충용액, PH 7.0, 50 mM, sucrose 0.2 M, dithiothreitol 2 mM)를 넣고 homogenize 한 후, 원심분리 (15,000 g, 10 min, 4℃) 한다. 원심분리한 상등액에서 흰색의 지방층을 가제와 면봉으로 제거하고, 다시 초원심분리 (100,000 g, 75 min, 4℃)하여 microsome pellet을 얻었다. 이 pellet에 buffer A를 넣어 잘 분산시키고 다시 초원심분리 (100,000 g, 60 min, 4℃)를 하여 microsome pellet을 얻고, 여기에 소량의 suspension buffer (buffer A + 50 mM EDTA, PH 7.0)를 넣고, BCA법으로 단백질을 정량한 후, HMG-CoA reductase 효소원으로 이용하였다.

HMG-CoA reductase 활성은 반응용액중의 $[3-^{14}\text{C}]$ HMG-CoA가 mevalonate로 전환되는 양으로 측정하였다(Kleinsek). 반응용액의 구성은 다음과 같다: 총 $35\mu\text{l}$ 로 인산완충용액 (0.5M, PH 7.0, $11\mu\text{l}$), NADPH (0.1 M, $2\mu\text{l}$), HMG-CoA (cold, 3 mM, $4\mu\text{l}$), $[3-^{14}\text{C}]$ HMG-CoA(hot, 0.02 mCi, $3\mu\text{l}$), microsome suspension (20 mg/ml , $10\mu\text{l}$). 이 반응용액을 37℃에서 30분간 반응시킨 후 6 N HCl $5\mu\text{l}$ 를 가하여 반응을 정지하고, 생성물인 mevalonic-lactone의 형성을 위해 다시 37℃에서 30분간 반응시킨다. 이 반응액을 원심분리 (10,000 rpm, 5 min)하여 얻은 상등액으로 TLC를 행한다. silica gel G plate ($20\times 10\text{ cm}$)에 시료를 점적한후, benzene:aceton (1:1, v/v)으로 전개시키고 생성물을 요오드 증기 또는 image analyzer로 확인한 후, 방사능 활성을 측정하였다.

아. 장기중량 측정 및 병리조직학적 검사

: 각 주요장기조직, 즉, 간, 심장, 신장, 부신, 폐 등을 적출하여 생리식염수로 세정후 중량을 측정하여 체중에 대한 상대 중량비 (%)를 구하였다. 한편, 본 실험에 의해 병변이 예상되는 심장, 신장 및 뇌는 중성 완충 포름알데히드액으로 고정후 기존의 방법에 따라 헤마톡신-에오신 염색을 하여 병리학적인 검사를 하였다⁽²¹⁾.

자. 통계처리

: 측정값은 평균±표준오차로 나타냈고, ANOVA 및 Student's t-test 로 유의차 검정을 하였다.

2. 연구수행결과

가. 대두가수분해물에서 분리한 UF-peptide가 *In vivo*에서 자발성 고혈압 흰 쥐의 혈압 강하에 미치는 영향

: Fig. 29. 에 실험기간중의 SHR의 체중변화를 나타냈다. 대조군과 3% UF-peptide 군 및 10% UF-peptide투여군 모두 실험기간 4주이후의 체중변화에 있어서 차이가 관찰되지 않았으나, 실험 기간 전반부에서 대조군에 비해 10% UF-peptide투여군에서 체중저하 현상이 관찰되었다. 이것은 실험 초기 얼마동안 10% UF-peptide 군의 먹이 섭취량이 다른 군에 비해 저조했던 것이 그 원인일 것으로 사료되며, 실험 중반기로 접어들면서 각 군간에 체중 증가율은 큰 차이를 보이지 않았다. Table 19 에 체중에 대한 장기중량 %를 나타냈다. 각 군사이에 중량비의 차이는 없었으며, 일반적으로 독성물질의 연속투여시 관찰되는 간장 비대등 장기 비대현상은 관찰되지 않았다. 한편 혈압상승에 수반되는 병변이 예상되는 주요 장기조직을 중성 완충 포름알데히드액으로 고정후 기존의 방법에 따라 헤마톡신에오신 염색을 하여 병리학적인 검사를 하였으나, 심장, 신장, 부신 및 뇌조직의 병변정도에 있어서 각 군간의 차이를 명확히 구별할 수는 없었

다. 부신의 경우 UF-peptide를 투여하지 않은 대조군의 부신수질내에 비정상적인 수축 또는 확장이 관찰된 반면, UF-peptide투여군에서는 그러한 현상이 관찰되지 않았다. (Data not shown). 이것은 UF-peptide섭취가 고혈압성 스트레스로 여겨지는 부신의 병변을 완화시키는 작용을 하고 있음을 시사하는 것으로 추정된다. Fig. 40. 에 UF-peptide 투여에 따른 간장 GOT 및 GPT효소 활성을 나타냈다. 각 군사이에 GPT활성의 차이는 없었으나, 대조군에 비해 UF-peptide투여군의 GOT활성이 높은 것으로 나타났다. UF-peptide의 아미노산 조성을 살펴 보면 유리 아미노산 함량은 His, Leu, Phe이 다른 아미노산 보다 약 3-7배 정도 높으며, 총 아미노산의 경우 Asp, Glu, Leu함량이 높은 편이다⁽²²⁾. 그러나, 일반적으로 사용되는 카제인의 아미노산 조성과의 비교할 때 본 실험에서 사용된 UF-peptide중의 이들 특정 아미노산이 독성을 나타내는 수준에 있다고는 생각되지 않는다. 그럼에도 불구하고, 간장장애의 지표로 사용되는 이들 효소의 활성변화가 관찰된 점을 고려하여 UF-peptide성분을 조금 더 정제하는 등 *In vivo*에서의 UF-peptide투여 영향에 대해 지속적인 검토가 필요하다고 생각된다. Fig. 41. 에 UF-peptide투여에 따른 SHR의 수축기 혈압의 변화를 나타냈다. UF-peptide투여 3주이후, 대조군에 비해 UF-peptide 투여군의 혈압이 강하하기 시작하였고, 5주이후에는 통계학적인 유의성이 관찰되었다($p < 0.05$). 혈압강하 효과는 3% UF-peptide군에서 가장 큰 것으로 평가되었는데, 10% UF-peptide군의 경우 보다도 3% UF-peptide군에서 혈압강하효과가 큰 이유는 현재로서 명확하지가 않다. 10% UF-peptide투여군의 경우, 실험 초기에 대조군 보다도 혈압이 상승했던 시기가 있었던 점등으로 보아 10% UF-peptide의 섭취가 혈압강하에 효과가 있기는 하지만 UF-peptide시료에 포함된 다른 성분들에 의해 저해작용의 가능성을 시사하는 것이라고도 추측된다. 현재, 10% UF-peptide중 혈압강하작용을 하는 분획만의 회수하는 실험을 계속 진행중에 있으며, 이들의 특이적인 혈압강하 효과가 확인될 것으로 기대된다. Fig. 42. 에 UF-peptide투여가 혈청중 지질수준에 미치는 영향을 나타냈다. 대조군에 비해 UF-peptide투여군의 혈중 중성지질, 총콜레스테롤 및 인지질 수준이 낮은 경향을 띠었다. 대두 단백질이 혈중 콜레스테

를 수준을 낮추는 효과는 대두 단백질중 난소화성펩타이드가 대변으로의 steroid 분비를 촉진하며 담즙산과 효율적으로 결합하기 때문에 혈중 콜레스테롤 수준을 저하시키는 작용을 하는 것으로 이해되고 있다^(23,24). 또한, 대두단백질은 지방산의 합성 및 지방분해 촉진작용을 통해 혈중 중성지방의 수준을 낮춘다고 알려져있다⁽²⁵⁾.

본 실험에서 사용한 대두 UF-peptide는 한외여과시 분자량 50,000 dalton 이상을 cut off 하여 얻어진 펩타이드로서⁽²²⁾ 생체내에서 가수분해효소의 작용을 받지 않은 UF-peptide의 일부가 전술한 바와 유사한 기작을 통해 혈중 지질수준의 개선에 기여했을 가능성이 높을 것으로 사료된다. Fig. 43. 에 UF-peptide투여가 혈청 및 흉부대동맥의 ACE 활성에 미치는 영향을 나타냈다. 혈청중 ACE활성의 차이는 관찰되지 않았으나, 흉부대동맥의 ACE활성은 대조군에 비해 UF-peptide 투여군에서 약간 저하하는 경향을 보였다. 본 실험에 사용한 UF-peptide는 *In vitro*에서 ACE 저해 활성을 나타내는 것이 이미 확인되어 있는데⁽²⁶⁾, 본 실험결과 *In vivo*에서도 혈관조직의 ACE활성을 억제하는 작용을 하고 있는 것으로 확인되었다. ACE저해제의 연속투여에 따른 혈중ACE활성의 상승이 관찰된 바 있으나⁽²⁷⁾, 혈중 ACE활성과 혈압과의 관계는 의문시되고 있다. 한편, 국소 ACE활성, 특히, 혈관조직의 ACE활성은 고혈압 발병과 그 관련성이 높은 것으로 알려져 있다⁽²⁸⁾. 따라서, 본 실험에서 UF-peptide투여에 따른 흉부대동맥에서의 ACE활성저하는 혈중 지질 개선작용과 더불어 UF-peptide의 혈압강하 효과와 관련되어 있을 것으로 사료된다. 이 결과는, 또한, UF-peptide의 경구 섭취에 따른 소화 흡수과정 중 ACE저해활성을 나타내는 펩타이드의 형태로 흡수가 가능했음을 시사하는 것으로 사료되며, UF-peptide의 식품첨가물로서의 활용가능성이 매우 클 것으로 기대된다. 이들 결과를 종합하면, 대두 가수분해물인 UF-peptide는 *In vitro*에서도 혈압강하효과를 나타낼수 있는 것으로 평가되며, 이러한 효과는 UF-peptide의 ACE활성 저해작용 및 혈중 지질 수준의 개선작용과 밀접한 관련을 가지고 발현되고 있을 것으로 사료된다. 대두 UF-peptide를 식품에 첨가함으로써 항고혈압 성분을 포함한 새로운 기능성 식품의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

나. 합성 펩타이드 His-His-Leu에 의한 자발성 고혈압 흰쥐의 혈압 강하효과 : Table 20 에 각 시료 투입에 따른 SHR의 수축기 혈압의 경시적인 변화를 나타냈다. 식염수를 주입한 대조군의 초기 혈압은 160 mmHg이었으며, 생리적 식염수 주입에 따른 혈압변화는 관찰되지 않았고 측정시간중 일정한 상태를 유지하였다 (Fig. 44A). ACE저해 혈압강하제로서 널리 사용되고 있는 captopril (2 mg captopril/0.5 ml/300 g BW) 투여군의 경우, 초기 혈압이 165 mmHg을 나타냈으나, captopril 1차 투여직후 혈압이 강하하기 시작하여 20분 경과후의 혈압은 96 mmHg으로 20분 사이에 약 69 mmHg이 저하하여 유의적인 혈압강하효과 ($p < 0.01$)를 나타냈다 (Fig. 44B.). 2차 및 3차투여에 따른 혈압강하효과는 더 이상 관찰되지 않았다. 한편, HHL주입에 따른 변화를 Fig. 44C.에 나타냈다. 초기혈압 160 mmHg인 SHR에게 HHL (2 mg HHL/0.5 ml/300 g BW)를 1회 주입한지 20분후의 혈압강하는 미미한 정도였으나 (11 mmHg저하), 2회 주입후 즉 실험개시로 부터 40분 경과후 26 mmHg가 저하되어 그 유의성이 인정되었으며 ($p < 0.05$), HHL의 3회 주입후, 즉 총 60분 경과시 총 56 mmHg의 유의적인 혈압강하효과 ($p < 0.01$)를 나타내며 혈압상태가 정상수준으로 저하되는 것이 확인되었다. 또한, HHL의 혈압강하효과의 발현은 captopril 보다 점진적인 것으로 평가되었다. 혈압의 상승과 유지에 중요한 작용을 담당하고 있는 효소인 ACE는 angiotensin I을 angiotensin II로 전환시키는 효소이며⁽²⁹⁾, 또한, 이 ACE는 혈압강하 펩타이드인 bradykinin을 불활성하는 효소이기도 하다⁽³⁰⁾. 따라서, ACE활성을 저해하는 저해인자는 renin-angiotensin system의 정상화를 통해 혈압을 강하시키는 효과를 나타낸다⁽³¹⁾. 일반적으로, 혈압강하 효과를 나타내는 펩타이드들은 ACE 저해효과를 나타내거나, angiotensin II receptor의 blocker로서 작용한다. ACE은 기질인 angiotensin I (+Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-*His-Leu-)의 *부위에 작용한다^(32,33). ACE 반응 생성물인 His-Leu는 ACE의 feed back 저해제로 작용하며, 또한 합성펩타이드인 benzoyl-Gly-His-Leu 또는 benzyloxycarbonyl-Phe-His-Leu 은 ACE의 기질과 경쟁적으로 작용하여 ACE저해

효과를 나타낸다고 알려져 있다^(23,34-35). 본 연구진은, 이미, 대두 가수분해산물인 UF-peptide가 혈압강하효과를 나타내는 사실을 보고한바 있으며⁽³⁶⁾, 이러한 효과는 UF-peptide에 다량으로 관찰되는 특징적인 아미노산 배열인 HHL에 의한 ACE저해작용과 밀접한 관련을 가질것으로 추정한바 있다⁽²²⁾. 이러한 사실을 근거로, 본 연구에서는 합성펩타이드인 His-His-Leu의 즉시적인 혈압강하 효과를 검토한 결과 합성펩타이드 HHL 혈압강하효과가 확인되었으며, 이러한 효과는 ACE 작용부위를 가지고 있는 HHL이 ACE 저해활성을 통해 발현되고 있음을 뒷받침하고 있다. 본 합성 펩타이드에 의한 혈압강하 작용은 captopril 의 경우 약 20분후에 관찰되는데 비해 동일한 수준의 혈압강하가 관찰되기까지 약 60분정도가 소요된 점으로보아, HHL에 의한 ACE 저해작용은 captopril에 비해 비교적 점진적으로 나타나는 것으로 평가된다. Captopril (2-D-mercapropanoyl-L-prolin)은 ACE와 구조적으로 매우 유사한 활성부위를 가진 carboxypeptidase A의 강력한 경쟁적 저해제이며, 따라서 ACE에 대해서도 강력한 저해작용을 나타낸다⁽³⁷⁾. Captopril에 비해 합성 펩타이드인 HHL의 경우 점진적인 혈압강하가 관찰된 이유로는, HHL를 한 번에 걸쳐서 투여한 경우에 비해 20분정도의 시간적인 간격을 두고 HHL을 주입하였을 경우 그 혈압강하효과가 컸던 점으로 보아, 혈과내로 주입된 HHL의 일부가 혈관계에 존재하는 펩타이드 분해효소의 작용을 받아 부분적으로 His-Leu부위가 절단되어 ACE저해활성을 상실했을 가능성을 들 수 있다. 이들 결과를 종합하면, 합성 펩타이드인 HHL은 *In vivo*에서도 ACE 저해제로서의 기작을 통해 혈압강하 효과를 나타낼 수 있는 것으로 평가된다. 이러한 효과는 합성 펩타이드 HHL의 의약품으로서의 활용가능성을 시사하는 것으로 사료되며, 나아가, HHL의 다량생산을 통해 항고혈압 기능성 식품 소재로서의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

다. 분무건조한 대두가수분해물 SoyPep279 식이투여가 자발성 고혈압 흰쥐의 혈중지질수준 및 혈압강하에 미치는 영향

: 대두가수분해물에서 분리된 UF-peptide가 항고혈압 활성을 나타낼수 있다는 제

1 차년도 연구결과를 바탕으로, UF-peptide의 제조방법을 대량생산이 가능한 제조 공정으로 개량하였다. 즉, 기존의 UF-peptide의 제조과정에 사용한 동결건조법 대신에 대량생산이 가능한 분무건조법으로 전환하여 대두가수분해 펩타이드 시료를 제조하였고, 이와같이 제조된 대두가수분해물 분무건조 펩타이드 (SoyPep279)가 SHR의 지질수준 개선효과 및 항고혈압활성에 대해 조사하였다. Fig. 45.에 실험기간중의 ySHR (young SHR, 4주령/실험개시-11주령/실험종료)의 체중변화를 나타냈다. 대조군과 10% SoyPep279 투여군간에는 실험 전 기간에 걸쳐서 체중변화의 차이가 없었으나, 대조군에 비해 3% SoyPep279 투여군에서 체중증가현상이 관찰되었다. 실험기간중 각 군의 먹이 섭취량은 10% SoyPep279투여군이 가장 높았으나 (Table 21), 체중증가는 오히려 낮은 경향을 보였다. 연령이 높은 실험군 oSHR (old SHR, 10주령/실험개시-22주령/실험종료)의 경우에도 유사한 경향이 관찰되었으며 (Fig. 46), 특히 15% SoyPep279투여군의 체중증가율이 낮은 것으로 평가되었다. 체중에 대한 장기증량 %를 조사한 결과, 각 군사이에 증량비의 차이는 없었으며 (Table 22, Table 23), 일반적으로 독성물질의 연속투여시 관찰되는 간장 비대등 장기 비대현상은 관찰되지 않았다. 또한, SoyPep279투여에 따른 간장 GOT 및 GPT효소 활성을 조사한 결과 (Fig. 47, Fig. 48), 각 군사이에 차이가 없었으며, SoyPep279의 경우, UF-peptide투여시에 관찰되었던 GOT활성의 증가는 관찰되지 않았다. Fig. 49.에 SoyPep279 투여에 따른 ySHR의 수축기 혈압의 변화를 나타냈다. 10% SoyPep279투여군의 혈압증가는 대조군과 거의 유사한 경향을 보였으나, 3% SoyPep279 투여군의 혈압증가는 높은 것으로 나타났다. 한편, oSHR 실험군의 경우, 대조군에비해 SoyPep279투여군의 혈압증가가 억제되는 경향은 관찰되지 않았다. Fig. 50.에 SoyPep279투여에 따른 ySHR의 흉부대동맥, 신장, 혈장중의 ACE활성 변화를 조사한 결과를 나타냈다. 흉부대동맥의 ACE활성은 대조군에 비해 SoyPep279투여군에서 유의적으로 낮았으며($p < 0.01$), 3% SoyPep279투여군에서 가장 낮았다. 신장 및 혈장중의 ACE 활성도 대조군에 비해 SoyPep279투여군에서 낮은 경향을 보였다. Fig. 51.과 Fig. 52.에 SoyPep279투여가 ySHR 및 oSHR의 혈중지질 수준에 미치는 영향을 나타냈다. SoyPep279를 투여한 SHR의 혈중 중성지질

(triglyceride, TG)은 대조군에 비해 ySHR 및 oSHR 모두의 경우 유의적으로 낮았다($p < 0.01$). 그러나, ySHR실험군의 경우, HDL-콜레스테롤 및 총 콜레스테롤, 인지질 수준은 대조군보다 높은 경향을 보였으며, oSHR의 경우는 대조군에 비해 낮은 경향을 보였다. 한편, 간 마이크로솜 HMG-CoA reductase 활성 증가등을 확인할수 있었다 (Fig. 50). 동맥경화지수는 대조군에 비해 3% 또는 10% SoyPep279을 투여한 ySHR의 경우 유의적으로 감소하였으며(Table 24), 이러한 효과가 oSHR의 경우 관찰되지 않은 점으로 보아(Table 25), SoyPep279의 항동맥경화활성 발현은 성장시기에 더 큰 것으로 평가되었다. 한편, SoyPep279의 혈중 지질개선효과를 비롯해, *In vivo*에서의 ACE활성 저해효과가 높았음에도 불구하고, SHR모델계에서 직접적인 혈압강화효과가 관찰되지 않은 배경을 설명하기 위해서는 계속적인 연구가 요구된다. 그러나, 전술한 혈중 지질수준 및 동맥경화지수에 관한 결과들은 SoyPep279식이 혈중 콜레스테롤 및 지질 수준의 개선작용, 즉 항동맥경화 효과가 있음을 강력히 시사하고 있다. 한편, SoyPep279투여에따른 ySHR 및 oSHR의 각 주요장기 심장, 간장, 신장, 부신에서의 조직병리학적 변화는 인정되지 않았다 (Fig. 54.). 심장에서의 조직학적 변화로 좌심실(left ventricle)의 심장속막(endocardium)은 대조군에 비하여 3%와 5%의 펩타이드 투여군에서 다소 확장되는 소견을 보였고, 심방과 심실사이에서는 결합조직이 풍부한 섬유돌레가 모든 군에서 확인되었으나, 심장근육층(myocardium)의 두께 등은 차이가 없었다. 따라서, 전체적으로 심실에서 심장근육층의 변화가 인정되지는 않았으며 심실비대 등의 변화도 확인되지 않았다. 간장의 경우, 간실질의 소엽에서 중심정맥(central vein)을 둘러싸고 간세포판(liver cell plate), 동모양 혈관(sinusoid)의 형태 및 분포는 대조군과 실험군에서 주목할 만한 변화가 관찰되지 않았다. 아울러 내피세포(endothelial cell) 및 별모양큰포식세포(Kupffer cell)의 출현은 펩타이드 투여군에서 비특이적으로 다소증가되는 양상을 보이기도 하였으나 뚜렷하지는 않았다. 신장은, 사구체(glomerular) 부위의 신장소체(renal corpuscle)의 크기는 펩타이드 투여에 따라서 작아지고 위축되며 벽층층(parietal layer)의 단면이 불규칙해지는 양상을 나타내었고, 15% 투여군에서는 근위소관(proximal tubule) 및 원위 소관

(distal tubule)의 영역이 증가되어 나타났다. 치밀반 (macula densa) 및 사구체 결세포 (juxtaglomerular cell) 등은 크기 및 형태에서는 펩타이드 투여로 인한 영향으로 인정할 만한 실험군간 유의한 변화를 관찰하지 못하였다. 부신의 피질부는 사구층 (zona glomerulosa), 다발층 (zona fasciculosa), 그물층 (zona reticularis)으로구분하여 관찰하였는데, 각 층에 따라서 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다. 아울러 펩타이드 투여군에서 전반적으로 부신 수질 내분비 세포 (medullar cell)의 밀집도가 증가되어 나타났으며 지방방울 (lipid droplets)의 출현이 펩타이드 투여에 따라서 다소 증가되는 양상을 관찰하였으나 뚜렷한 병리학적 변화로 인정되지는 않았다. 이들 결과를 종합해볼 때, 분무건조한 대두 가수 분해물인 SoyPep279은 *In vivo*에서 혈중 중성지질, 총콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 수준을 낮추는등 혈중지질개선작용을 할수 있으며, 동맥경화지수의 저하를 통해 항동맥경화활성을 나타낼수 있는 것으로 평가되며, 이러한 효과는 SoyPep279에 대한 항동맥경화성 식품첨가제로서의 활용 가능성을 시사하는 것으로 사료된다.

제 7 장 기능성 펩타이드 식품소재의 개발

1. 연구수행방법

가. 기능성 펩타이드 분말(SoyPep279)의 제조

: 기능성 펩타이드의 대량생산공정에 따라 제조된 분획분자량 50,000dalton 투과액을 55℃에서 40 brix까지 감압증발 시킨 후 Basic Model spray dryer(Niro, Denmark)를 사용하여 inlet 온도 180℃, outlet 온도 95℃, atomizer speed 15,000 rpm 조건으로 펩타이드 분말을 제조하였다. 이 분말을 SoyPep279로 명명하였다.

나. 기능성 펩타이드 분말(SoyPep279)의 특성분석

: 분무건조된 기능성 펩타이드 SoyPep279의 분체물성을 ABD분체특성측정기(통정이화학주식회사, 일본)를 사용하여 겔보기밀도, 압축밀도, 압축도, 쌓임각 등을 측정하였으며 particle size analyzer(Model analysette 22, Fritsch사, 독일)로 평균입자직경과 입자균일도를 분석하여 ABD 유동성지수표로 유동성을 판단하였다. 분말의 일반성분은 A.O.A.C법에 따라 분석하였다.

2. 연구수행결과

가. 기능성 펩타이드 분말(SoyPep279)의 제조

: 기능성 펩타이드의 대량생산 공정에 따라 제조된 분획분자량 50,000dalton 투과액을 55℃에서 40 brix까지 감압증발 시킨 후 분무건조하여 펩타이드 분말을 제조하였다. Basic Model spray dryer(Niro, Denmark)를 사용하여 inlet 온도 180℃, outlet 온도 95℃, atomizer speed 15,000 rpm 조건으로 펩타이드 분말을 제조하여 이를 SoyPep279로 명명하였다. 분무건조에 따른 ACE저해활성의 변화를

측정한 결과 건조 전, 후의 ACE IC₅₀값이 각각 34.5 ug/ml, 35.3 ug/ml로 건조시 열에 의한 활성의 변화는 없는 것으로 판단되었다.

나. 혈압강하 펩타이드 분말(SoyPep279)의 특성

: 분무건조된 혈압강하 펩타이드 SoyPep279의 분체특성은 압축도 19.3~19.6 %, 쌓임각 $32 \pm 1^\circ$, 입자균일도 2.12~2.42, 평균입자 직경 $52.1 \pm 7.2 \mu\text{m}$ (Fig. 49.)로 전체적인 유동성(flowbility)지표는 82.5의 값을 보여 양호한 것으로 나타났다. 한편, 분말의 일반성분은 수분 4.91%, 단백질 44.44%, 지방 5.34%, 회분 30.57%로 분석되었으며 탄수화물은 30.57%로 계산되었다. 분말의 ACE 저해활성은 IC₅₀값이 35.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 기능성 식품소재로 충분히 활용될 수 있는 것으로 판단되며 개발완료된 기능성 펩타이드소재 SoyPep279는 현재 면, 스낵, 스프, 음료에 적용 실험을 진행 중이다.

참 고 문 헌

1. Cushman, D. W. and Cheung, H. S. : Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharm.*, 20, 1637(1971)
2. Chang, K. C., Skarge, L. H. and Satterlee, L. D. : Analysis of amino acids in soy isolates and navy beans using precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 54, 756(1989)
3. Pearson, S., Stern, S. and MaGarack, T.H. : A rapid accurate method for the determination of total cholesterol and serum. *Anal. Chem.*, 25, 813(1953)
4. *Medocal Technology*, 8, 1068(1980)
5. Cushman, D.W. and Cheung, H.S. : Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharm.*, 20, 1637(1971)
6. Bernirschke, K., Garner, F.M. and Jones, T.C. : Pathology of laboratory animals. Springer-Verlag, New York(1978)
7. George, F., Gary E. and Mohammad Y. : A review of platelet Function and Testing. *J. of medicine tech.*, 47:723 (1981)
8. *Methods in Enzymology*. Academic press, Inc., p169 (1989)
9. Zwierzina, W. D., and Kunz F. : A method of testing platelet aggregation in native whole blood. *Thromb. research*, 38, 91 (1985)
10. *Methods in Enzymology*. Academic press, Inc., p80 (1981)
11. Siuzdak, G. : Mass spectrometry for biotechnology, Academic press, Inc. (1996)
12. Laureto, P. P., Scaramella, E., Filippis, V., Marin, O., Doni, M. G.

- and Fontana, A.: Chemical synthesis and structural characterization of the RGD-protein decorsin: A potent inhibitor of platelet aggregation. *Protein Science*, **7**, 433-444 (1988)
13. Mant, C. T. and Hodges, R. S.: High performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analysis, and conformation, CRC Press, Inc.(1991)
 14. 류근호, 이주영, 정진호: 자연식품에 의한 혈소판 응집 억제능의 효율적 검색. *J. of Food Hygiene and safety*, **9**(1), 23 (1994)
 15. Shon, D.H., Lee, K.A., Kim, S.H., Ahn, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J., and Shin, J. : Screening of antithrombotic peptides from soybean paste by the microplate method, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**(4), 684 (1996)
 16. 長谷天 昌康: かつお節オリゴペプチドの降壓作用と食品への利用. *食品と開発*, **31**(8), 50(1996)
 17. Matsuda, H., Ishizaki, T., Moritani, H., Nagaoka, T., Osajima, K. and Osajima, N. : Digestion of peptides from sardine muscle that inhibit angiotensin-I converting enzyme by intestinal enzyme of pigs. *Nippon Nogeigaku Kaishi*, **66**(11), 1645(1992)
 18. Su, S. K., Liu, J. C. and Wiley, R. C.: Cross flow microfiltration with gas backwash of apple juice. *J. Food Sci.*, **58**, 638(1993)
 - 19 Turgeon, S. I. and Gauthier, S. F.: Whey peptide fractions obtained with a two step ultrafiltration process. *J. Food Sci.*, **55**(1), 106(1990)
 20. Otsuka, M. and Kubo, T. : Action of a Shiitake(*Lentinus edodes*)-fructo-oligosaccharide mixture on hypertension in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **48**, 109(1995)
 21. Sardesai, V.M. and Manning, J.A. : The determination of triglyceride in plasma and tissues. *Clin. Chem.*, **14**, 156(1968)

22. 신재익 : 대두식품으로부터 유래된 혈압강하 펩타이드의 특성 및 생산공정 최적화. 서울대학교 농과대학 박사학위논문, p.79(1997)
23. Iwami, K., Sakakibara, K. and Ibuki, F. : Involvement of post-digestion hydrophobic peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agri. Biol. Chem.*, **50** , 1217(1986)
24. Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T. and Kimoto, M. : Cholesterol-lowering activity of various undigested fraction of soybean protein in rats. *J. Nutr.*, **120**, 977(1989)
25. Iritani, N., Hosomi, H., Fukuda, H., Tada, K. and Ikeda, H. : soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in wistar fatty rats. *J. Nutr.*, **126**, 380(1996)
26. Shin, J.I., Ahn, S.W., Ahn, C.W., Nam, H.S. and Lee, H.J. : Angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from fermented soybean paste and enzymatic soybean hydrolyzed. Proceedings of IUFost 96 Regional Symposium, p.265(1996)
27. Muracami, T., Hayashi, M. and Yoshizumi, H. : Hypotensive effect of euglena pepsin hydrolysate. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **48**, 399(1995)
28. Mizuno, K., Nakamura, M., Higashimori, K. and Inagami, T. : Local generation and release of angiotensin II in peripheral vascular tissue. *Hypertension*, **11**, 223(1988)
29. Robert, I. : Prevalence and epidemiology of cardiovascular disease. In "Cecil textbook of medicine" Wyngaarden, J.B. and Smith, L.H.(eds.), 17th ed., Philadelphia, WB, Saunders Company, p.155(1985)
30. Erdos, E.G. : Angiotensin I converting enzyme. *Circ. Res.*, **36**, 247-255 (1975)
31. Skeggs, L.T., Kahn, J.R., Shumway, N.P. : Preparation and function of the hypertension-converting enzyme. *J. Exp. Med.* **103**, 295(1956)

32. Mant, C. T. and Hodges, R. S.: High performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analysis, and conformation, CRC Press, Inc. (1991)
33. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56(1957)
34. Horovitz, Z.P(ed). : Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. Mechanisms of Action and Clinical Implications. Baltimore, Urban and Schwarzenberg, (1981)
35. Piquilloud YA, Reinharz A, Roth M: Action de l'enzyme de conversion sur des substrates synthetiques. *Helv Physiol Pharmacol Acta*, **26**, CR231(1973)
36. Yu, R., Park, S.A., Chung, D.K., Nam, H.S. and Shin, J.L. : Effect of soybean hydrolysate on hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **25(6)**, 1031(1996)
37. Ondetti, M.A., Rubin, B., Cushman, D.W. : Design of specific inhibitors of angiotensin coverting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science*, **196**, 441(1977)

Table 1. Effect of soy foods on ACE activity

Soy foods(company)	Total nitrogen (%)	ACE IC ₅₀ (µg/ml)
Soybean paste		
SW	4.6	276.3
SC	4.6	229.3
SS	3.9	233.5
CJ	4.6	171.4
Soy sauce		
KK	1.7	259.3
SP	1.2	290.9
SW	2.6	188.0
NS	3.1	63.0
Soy milk		
CH	0.4	N. D ^a
SY	0.5	N. D

a: not detected

Table 2. ACE inhibitory activity of permeate and retentate on ultrafiltration.

	Yield (%)	IC ₅₀ (µg/ml)	RTIA
Soybean hydrolysate	100	140.7	1
Retentate	39.4	156.5	0.35
Permeate	54.2	84.7	0.89

Table 3. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the ultrafiltration

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	265	91.2	167	100	210	40.1

Table 4. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the first reverse phase HPLC of the peptide fraction

Fractions	F6 ₁	F6 ₂	F6 ₃	F6 ₄	F6 ₅	F6 ₆	F6 ₇
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	78.9	27.6	21.8	84.2	125.6	74.4	250.3
Fractions	F6 ₈	F6 ₉	F6 ₁₀	F6 ₁₁	F6 ₁₂	F6 ₁₃	F6 ₁₄
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	140	122	157	181	N. D ^a	N. D	N. D

Table 5. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the second ion exchange HPLC of the peptide fraction

	F631	F632	F633	F634	F635
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	205	103	23	15	-

Table 6. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the third gel permeation column HPLC of the peptide fraction

	F634-1	F634-2	F634-3
TN (ppm)	3.9	3.9	3.9
Inhibition rate (%)	0	16.3	3.9

Table 7. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the fourth reverse phase HPLC of the peptide fraction

	F6342-A	F6342-B
TN (ppm)	1.8	1.8
Inhibition rate (%)	8.2	12.3

Table 8. ACE inhibitory activity of each fraction obtained from the fifth gel permeation column HPLC of the peptide fraction

	F6342-B-1	F6342-B-2	F6342-B-3
TN (ppm)	2.2	0.2	1.1
Inhibition rate (%)	44.6	9.6	56.8

Table 9. Purification of ACE inhibitory peptides from the soybean hydrolysate.

Purification step	peak number	ACE inhibitory activity (IC ₅₀ , µg/ml)
Soybean hydrolysate		140
Ultrafiltration	(<10,000 dalton)	84
1st chromatography	F6	40
2nd chromatography	F63	21
3rd chromatography	F634	15
4th chromatography	F6342	9
5th chromatography	F6342B	7.8
6th chromatography	F6342B3	1.0

Table 10. Total amino acid composition of purification steps

Amino acid	U.F	F6	F63	F634	F6342	F6342B	F6342B3
Asp	83099	59208	2202	41.5	10.9	7.8	0
Glu	126385	6914	2461	59.9	11.7	7.9	5.7
Ser	51928	2494	926	33.8	22.1	12.5	7.6
Gly	60923	4227	1626	68.7	18.3	11.2	6.8
His	1730	779	0	0	0	0	0
Arg	47508	1241	375	72.1	27.6	4.4	2.3
Thr	34442	1762	953	20.1	0	0	0
Ala	58685	2484	782	142	5.8	6.0	1.4
Pro	40235	5364	3178	452	6.2	6.8	2.2
Tyr	10443	2120	255	65.2	7.4	5.5	0
Val	19357	3639	1005	388	6.5	5.6	0
Met	3261	907	643	338	9.8	6.9	1.5
Cys	2362	917	38	0	0	0	0
Ile	2001	3873	137	87.5	0	0	0
Leu	2589	4024	131	51.0	0	0	0
Phe	12509	2386	217	11.9	0	0	0
Lys	63543	1235	325	7.8	1.9	0	0
Total	621009	103582	15263	1842	128	74.6	27.6

Table 11. Type of ultrafiltration membranes used in this experiment.

Membrane	Characteristics	MWCO ^{a)}
GR 61 PP	Hydrophobic (polysulfone)	20,000
ETNA 10A	Coated hydrophilic	20,000
HEKLA 10A	Coated hydrophilic	20,000

a: MWCO means molecular weight cut off expressed as dalton

Table 12. Several membranes with different molecular weight cut-off used in experiment.

Membrane	MWCO
GR 90 PP	2,000
GR 81 PP	6,000
GR 61 PP	20,000
GR 60 PP	25,000
GR 60 -> 90 PP ^{a)}	25,000 - 2,000
GR 60 -> 81 PP	25,000 - 6,000

a) Permeate on GR 60PP membrane was ultrafiltrated on GR 90PP, and then obtained retentate

Table 13. ACE inhibitory activity of permeate on several ultrafiltration membranes

	GR61PP	ETNA10A	HEKLA10A
Flux at 2hr ($L/m^2 \cdot hr$)	14.0	12.1	11.9
Permeation rate at 2hr	0.31	0.23	0.22
Nitrogen Recovery			
Yield (%)	31.5	27.2	26.6
Nitrogen weight			
at 2hr (mg)	2,580	2,229	2,178
ACE IC_{50} ($\mu g/ml$)	78.8	78.5	75.3
TIA ($\times 10^3$)	33.7	28.4	28.9
Recovery yield of inhibitory activity(%)	57.2	48.2	49.1

Table 14. ACE inhibitory activity of permeates on ultrafiltration membrane GR60PP with different operating temperatures.

	35°C	45°C	55°C	65°C
Flux at 2hr (L/m ² • hr)	13.2	19.2	22.4	25.6
Permeation rate at 2hr	0.39	0.47	0.50	0.57
Nitrogen recovery Yield(%)	38.0	48.2	46.0	58.7
Nitrogen weight at 2hr (mg)	3110	3950	3770	4810
ACE IC ₅₀ (µg/ml)	54.0	75.3	71.9	82.5
TIA	57.6	52.5	52.4	58.3
Recovery yield of inhibitory activity (%)	98.0	89.0	89.0	99.0

Table 15. ACE inhibitory activity of permeates on ultrafiltration membrane GR60PP with different feeding concentration

Solid Concentration	3.3%	6.6%	10.0%	15.0%	20.0%
Nitrogen concentration	0.30	0.63	0.87	1.28	1.83
Flux at 2hr (L/m ² · hr)	22.4	13.6	12.4	8.4	5.6
Permeation rate at 2hr	0.50	0.31	0.28	0.23	0.18
Nitrogen recovery Yield(%)	44.0	29.8	27.2	16.8	10.9
Nitrogen weight at 2hr (mg)	3770	5621	7173	6468	6002
ACE IC ₅₀ (µg/ml)	71.9	78.0	78.5	75.1	74.7
TIA	52.4	72.1	91.4	86.1	80.3
Recovery yield of inhibitory activity (%)	81.0	53.0	48.7	31.2	20.3

Table 16. ACE inhibitory activity of permeates on ultrafiltration membrane GR60PP with different operating pressure.

	1.5	2.5	3.5
Flux at 1hr ($L/m^2 \cdot hr$)	57.8	78.5	60.5
Nitrogen recovery Yield(%)	34.0	51.0	31.0
Nitrogen weight at 1hr (g)	120	180	110
ACE IC_{50} ($\mu g/ml$)	57.0	63.0	72.0
TIA ($\times 10^6$)	2.1	2.9	1.5

Table 17. Conditions of enzyme hydrolysis for anticancer peptide production.

Enzyme	Optimal pH	Optimal temperature(℃)
Corolase 7092	7.0	50
Alcalase	8.0	60
Esperase	8.0	60
Bioprotease AV	7.0	50
Neutrased	6.0	45
Thermoase	8.0	60
Promod 278	8.0	60
Protamex	6.0	40
Pepsin	2.5	37
Trypsin + Chymotrypsin	8.0	37
Subtilisin carlsberg	8.0	60
Bromelain	7.5	50
Fungal protease from <i>Asp. niger</i>	2.8	40
Thermolysin	8.0	60
Papain	6.1	55
Fungal protease from <i>Asp. oryzae</i>	7.0	40

Table 18. Cytotoxicity of various enzymatic hydrolysates of soybean protein extracts on P388D1: a mouse monocyte-macrophage cell line

solvent enzyme	water	methanol	ethanol	butanol	chloroform+ methanol	acetone	hexane
Alcalase	-	-	+	-	-	-	-
Esperase	-	-	++	-	-	-	-
Neutrase	-	-	-	-	-	-	-
Corclase 7092	-	-	-	-	-	-	-
Bioprotease AV	-	-	-	-	-	-	-
Promod 278	-	-	-	-	-	-	-
Pepsin	-	-	-	-	-	-	-
Thermoase	-	-	++	-	-	-	-
Protamex	-	-	-	-	-	++	-
Trypsin + Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-
Bromelain	-	-	++	+	-	-	-
Papain	-	-	-	-	-	-	-
Fungal protease from <i>Asp. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-
Subtilisin carlsberg	-	-	-	-	-	-	++
Thermolysin	-	-	-	-	-	+	-
Fungal protease from <i>Asp. nigar</i>	-	-	-	-	-	-	-

++ : strong cytotoxic effect

+ : mild cytotoxic effect

- : no cytotoxic effect

Table 19. Amino acid composition of reverse-phase HPLC fractions : B1-8, B1-12

sample amino acid	B1-8	B1-12
Asp	2.0	13.0
Glu	3.1	20.1
Ser	8.4	3.3
Gly	12.5	10.9
His	2.1	0
Arg	2.1	2.1
Tyr	5.3	4.6
Ala	8.5	7.1
Pro	12.0	9.8
Tyr	3.0	0.9
Val	6.6	4.6
Met	2.8	3.2
Cys2	1.0	0
Ile	6.7	3.2
Leu	14.0	9.5
Phe	6.8	4.7
Lys	3.0	2.9
계	100	100

Table 20. Antithrombotic activity of the synthetic peptide

Peptide	IC₅₀
DEE	458.0 μ M
SSGE	485.0 μ M

Table 21. Condition and recipe of PCR

a) Compositions of PCR mixture

PCR mixture	부피 (volume)
template DNA	
Primer 1 (mal E : 100 μ M)	0.5 μ l
Primer 2 (P2, P4, puc : 100 μ M)	0.5 μ l
10 x reaction buffer	2 μ l
dNTP mix (10 mM)	0.4 μ l
ddH ₂ O	16.4 μ l
Vent DNA polymerase (2,000U/ml)	0.2 μ l
Total	20 μ l

b) Conditions of PCR reaction

pre-denaturation	1 cycle	94°C	3 min
annealing		94°C	1 min
elongation	30 cycle	50°C	1 min
denaturation		72°C	1 min
post-elongation	1 cycle	72°C	5 min

Table 22. Effect of UF-peptide on the weight of organs in SHR

Organs	Groups		
	Control (n=5)	3% UF-peptide (n=6)	10% UF-peptide (n=5) (g/100g, BW)
Liver	4.03±0.32	3.52±0.14	3.39±0.29
Spleen	0.20±0.04	0.17±0.01	0.19±0.01
Lung	0.85±0.13	0.75±0.10	0.77±0.07
Kidney	0.70±0.05	0.63±0.02	0.72±0.02
Adrenal glands	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Thymus	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.01
Heart	0.35±0.04	0.35±0.02	0.38±0.02

*Values are means ± S.E.

Table 23. Effect of His-His-Leu peptide on the change of blood pressure in SHR

^I: The first injection of sample,

^{II}: The second injection of sample,

	Saline (control)	Captopril	His-His-Leu
Body Weight(g)	358.45 ± 29.44	329.06 ± 14.16	312.50 ± 41.67
(N)	4	5	4
0 ^I (Time)	160.00 ± 8.12 ^a	165.60 ± 5.89	161.00 ± 7.19
10	156.50 ± 6.50	121.06 ± 10.62	161.00 ± 7.77
20 ^{II}	165.00 ± 7.42	96.40 ± 11.71	150.50 ± 5.12
30	163.00 ± 6.61	94.80 ± 10.31 [*]	148.00 ± 2.16
40 ^{III}	159.50 ± 4.35	91.60 ± 17.38 [*]	135.00 ± 8.06 ^{**}
50	157.00 ± 9.26	96.40 ± 10.31 [*]	126.00 ± 10.80 ^{**}
60	156.50 ± 5.32	93.60 ± 14.41 [*]	105.50 ± 14.50 [*]
70	161.00 ± 4.04	96.80 ± 10.97 [*]	105.50 ± 14.50 [*]
80	155.00 ± 5.57	95.20 ± 11.41 [*]	98.00 ± 14.90 [*]
90	156.50 ± 3.59	90.40 ± 13.74 [*]	91.00 ± 15.80
100	155.50 ± 3.50	102.50 ± 10.87 [*]	93.50 ± 11.73 [*]

^{III}: The third injection of sample

(Saline : 0.5ml saline/one dose, Captopril : 2mg captopril/0.5ml saline/one dose, His-His-Leu : 2mg His-His-Leu/0.5ml saline/one dose)

N : number of animal, ^a : Mean ± SE

Statstically significant differences from control group were: ^{*}p<0.05

Statstically significant differences from control group were: ^{**}p<0.01)

Table 24. Daily SoyPep279-diet intake of young and old SHR

Group	Diet intake(g/rat/day)
<Young SHR>	
Control	16.9±1.88
3% SoyPep279	17.7±1.76
10% SoyPep279	18.2±0.29
<Old SHR>	
Control	21.7±1.44
5% SoyPep279	19.4±1.18
15% SoyPep279	3.1±1.96

*Values are means ± SEM

Table 25. Effect of SoyPep279 on the weight of various organs in young SHR

Organ	Groups		
	Control (n=6)	3% soypep279 (n=6)	10% soypep279(n=9) (g/100g, B.W.)
Liver	4.13 ± 0.07	3.82 ± 0.14	4.11 ± 0.32
Kidney	0.66 ± 0.01	0.68 ± 0.02	0.73 ± 0.03
Heart	0.34 ± 0.01	0.38 ± 0.00	0.42 ± 0.04
Adrenal	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Spleen	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.02

*Values are means ± SEM

Table 26. Effect of SoyPep279 on the weight of various organs in old SHR

Organ	Groups		
	Control (n=5)	5% soy pep279 (n=6)	15% soy pep279(n=6) (g/100g, B.W.)
Liver	3.45 ± 0.09	3.21 ± 0.08	3.62 ± 0.15
Kidney	0.64 ± 0.01	0.64 ± 0.01	0.69 ± 0.04
	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01
Adrenal	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.02
Spleen			

*Values are means ± SEM

Table 27. Effect of SoyPep279 on the Atherosclerotic index (AI) in young SHR.

Group	AI value
control	1.31 ± 0.29
3% SoyPep279	0.70 ± 0.06*
10% SoyPep279	0.65 ± 0.01*

Values are mean ± SEM.

* : Significantly different from control ($p < 0.05$)

Table 28. Effect of SoyPep279 on the Atherosclerotic index (AI) in old SHR.

Group	AI value
control	1.43 ± 0.13
5% SoyPep279	1.61 ± 0.16
15% SoyPep279	1.88 ± 0.25

Values are mean ± SEM.

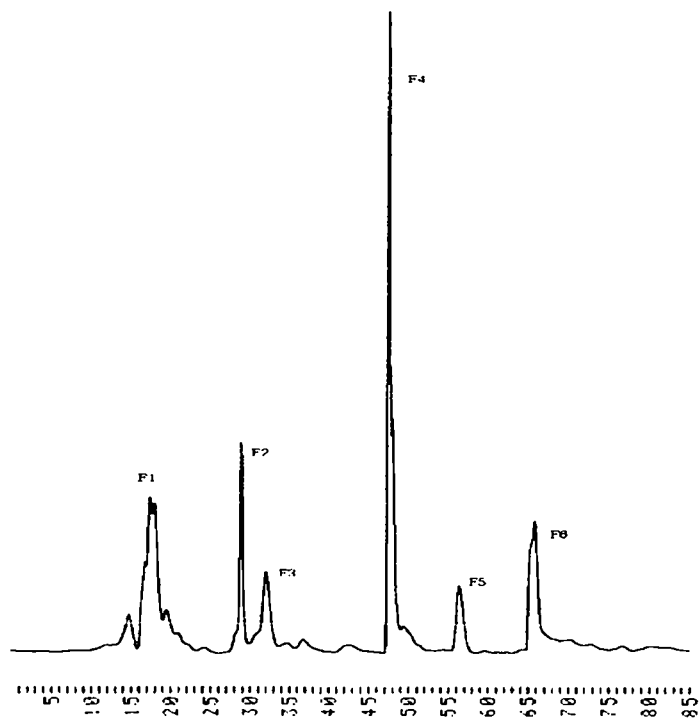


Fig. 1. The preparative HPLC of the less than MWCO = 10,000 ultrafiltration permeate on on reverse phase column

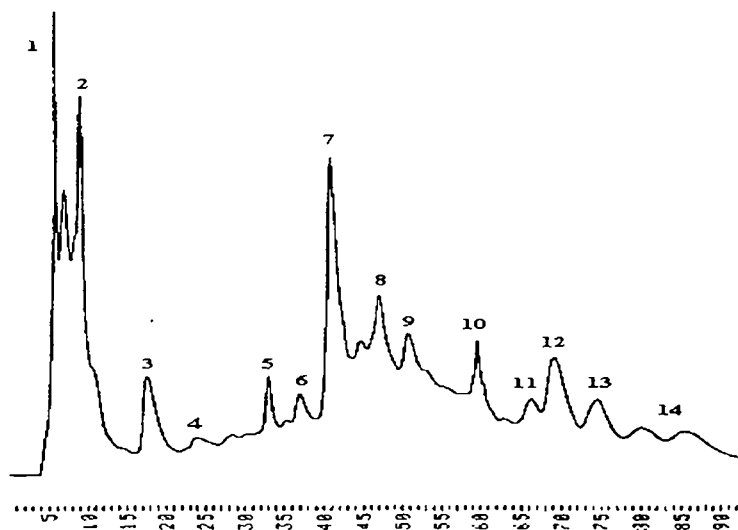


Fig. 2. The preparative HPLC of the F6 fraction on anion exchange column

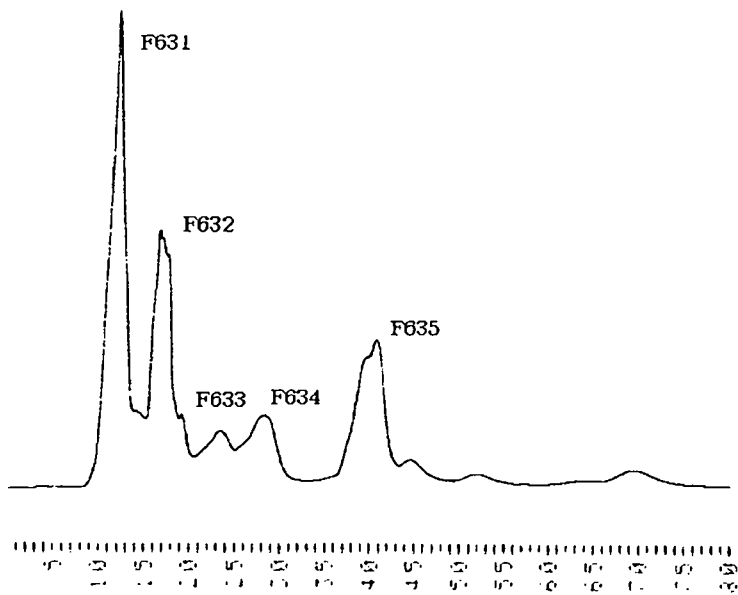


Fig. 3. The preparative HPLC of the F6 fraction on reverse phase column

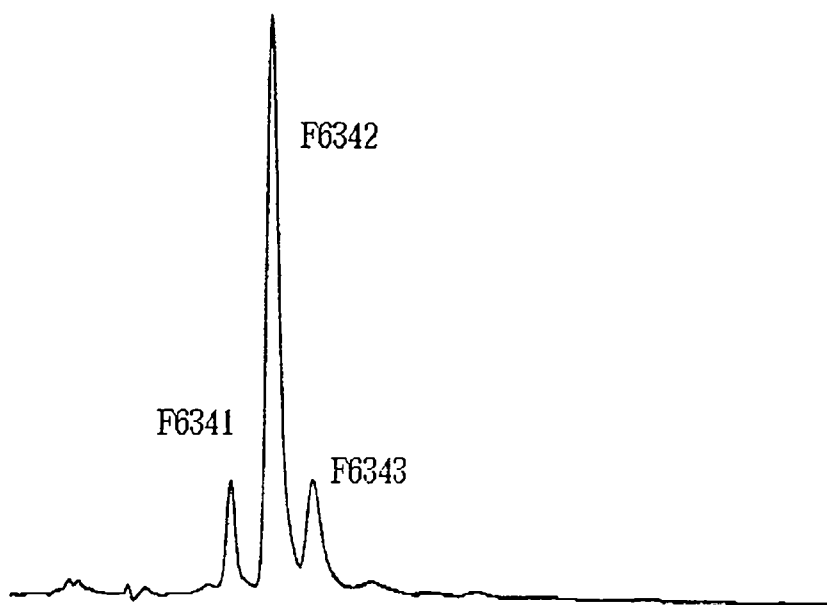


Fig. 4. The preparative HPLC of the F634 fraction on gel permeation column

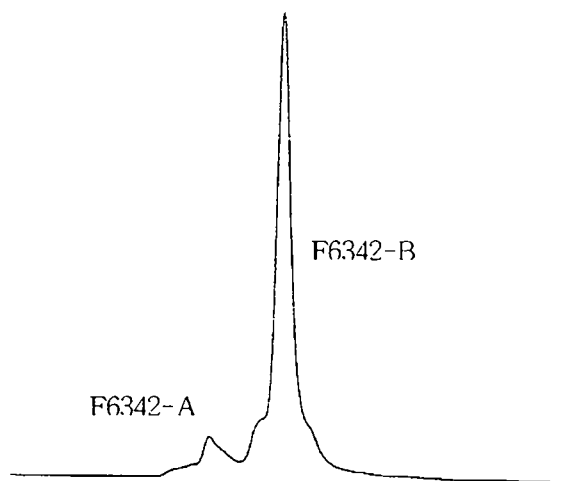


Fig. 5. The preparative HPLC of the F6342 fraction on reverse phase column

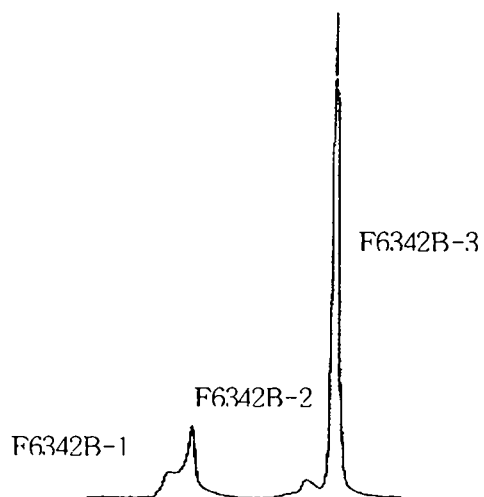


Fig. 6. The preparative HPLC of the F6342-B fraction on gel permeation column.

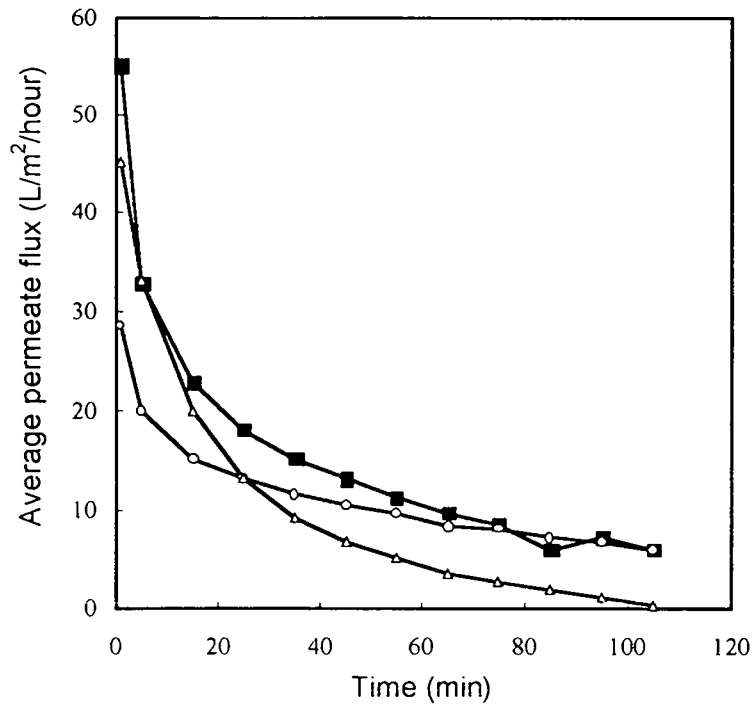


Fig. 7. Average permeate flux of soybean enzymatic hydrolyzates on different ultrafiltration membranes.

■ GR61PP ○ ETNA20A △ HEKLA20A

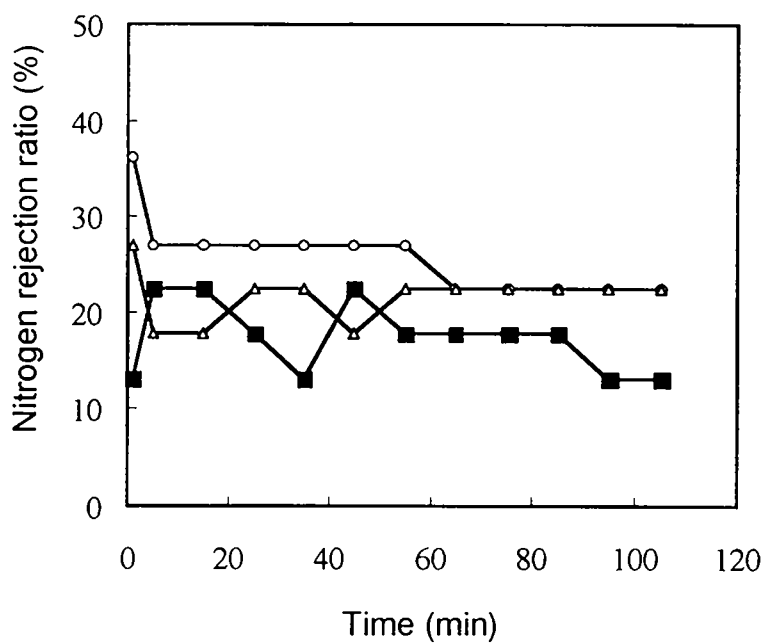


Fig. 8. Nitrogen rejection ratio of permeate on different ultrafiltration membranes.

■ GR61PP ○ ETNA20A △ HEKLA20A

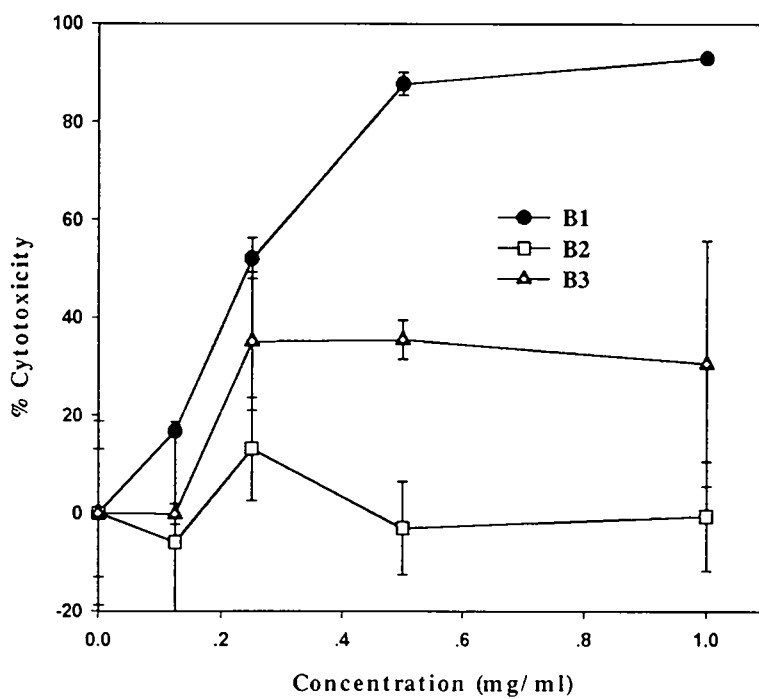


Fig. 9. *In vitro* cytotoxicity of ultrafiltration fractions of Bromelain/EtOH peptides on P388D1. B1 : molecular weight greater than 10,000 Da, B2 : M.W. 1,000-10,000 and B3 : M.W. smaller than 1,000 Da.

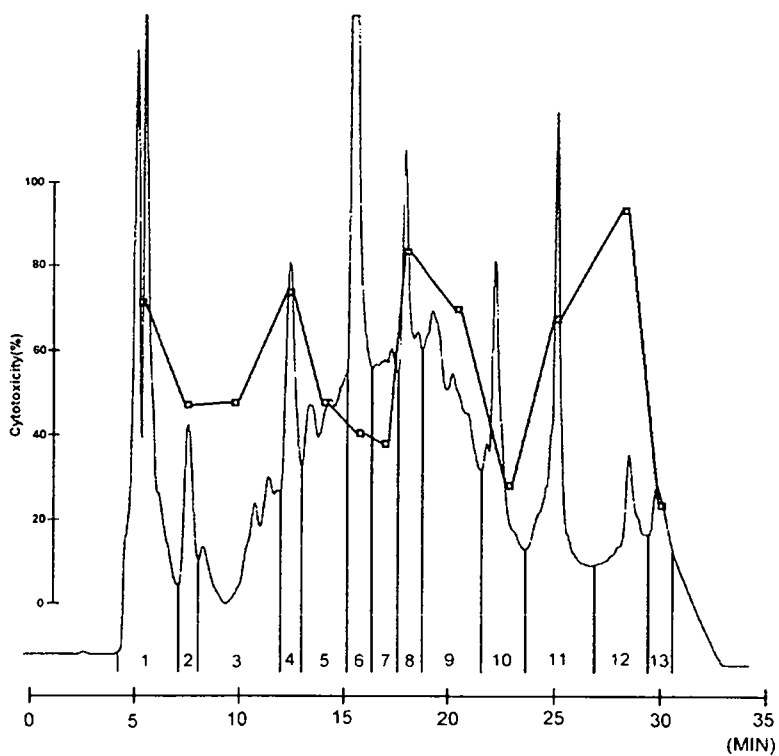


Fig. 10. The reverse-phase HPLC chromatogram and cytotoxicity ($1000 \mu\text{g}/\text{ml}$) of HPLC subfractions. Two micromiliters was loaded on reverse-phase column (Delta-pak C18 7.8×300 , Waters Inc.). Linear gradient of acetonitrile of 10 to 72% was eluted in 32 min. Absorbance was measured at 214 nm.

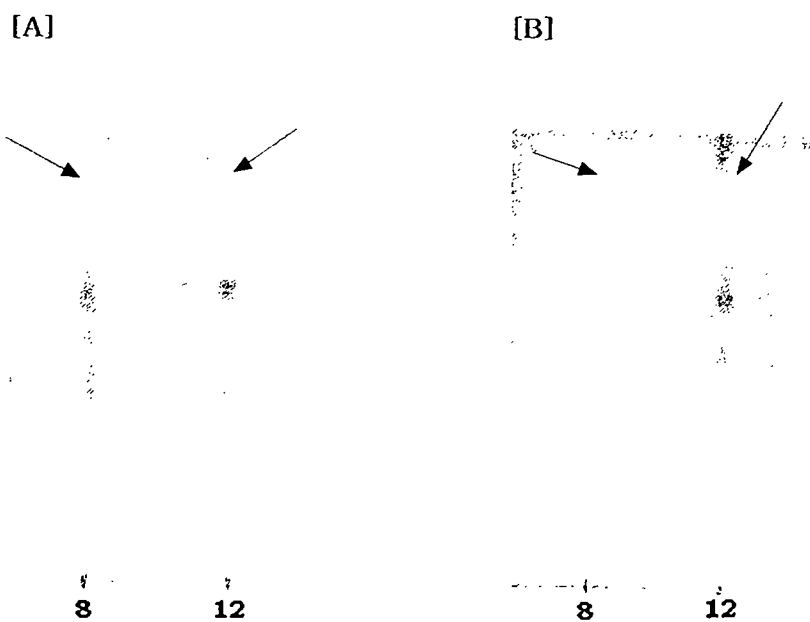


Fig. 11. Thin layer chromatogram of reverse-phase HPLC subfractions : B1-8
B1-12

[A] is ninhydrin detection and [B] is H_2SO_4 detection.

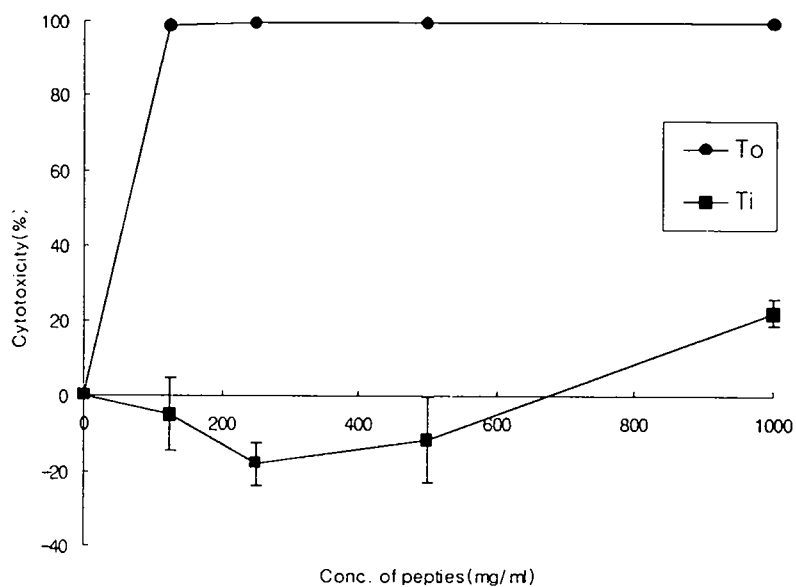


Fig 12. Cytotoxicity of hydrophilic Ti and hydrophobic To fractions obtained by XAD-2 adsorption chromatography on P388D1 cell line. IC_{50} value of To was $63.37 \mu\text{g/ml}$.

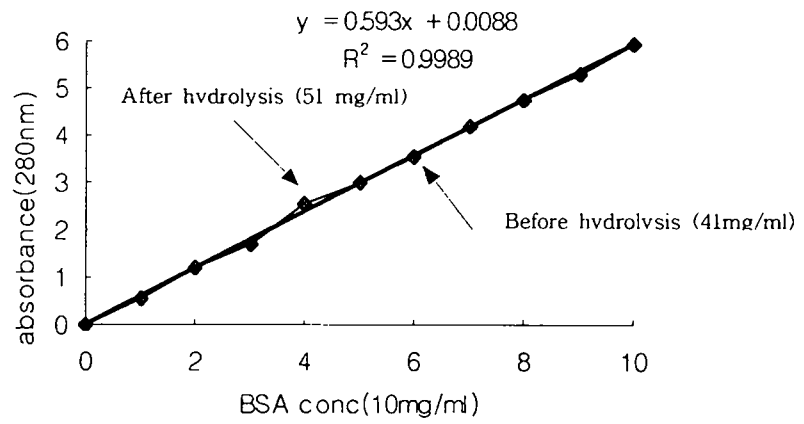


Fig. 13. Standard curve for measuring the degree of soy protein hydrolysis

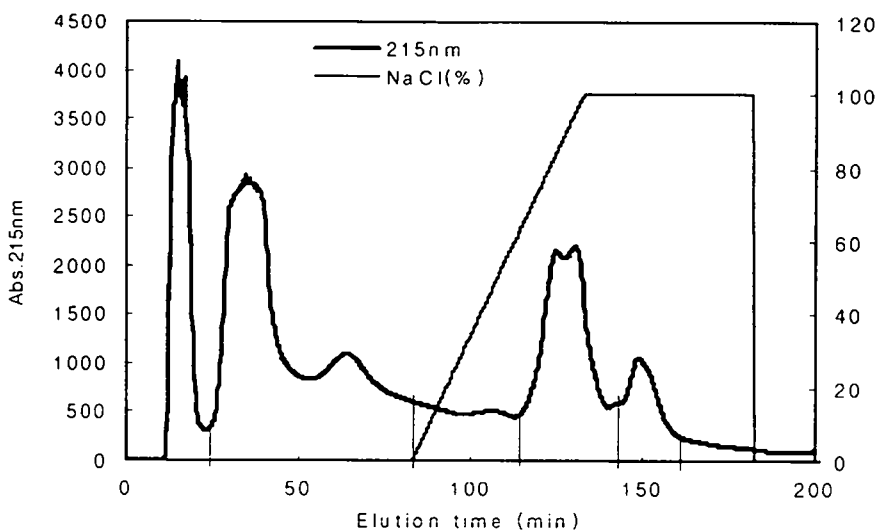


Fig. 14. Ion exchange chromatogram of thermoase/EtOH To fraction which was obtained by XAD-2 adsorption chromatography. Two micromililiters was loaded on Q-sepharose (Sigma, anion exchange) column. Linear gradient of 1 M NaCl 0 to 100% was eluted in 200 min. Absorbance was measured at 215 nm.

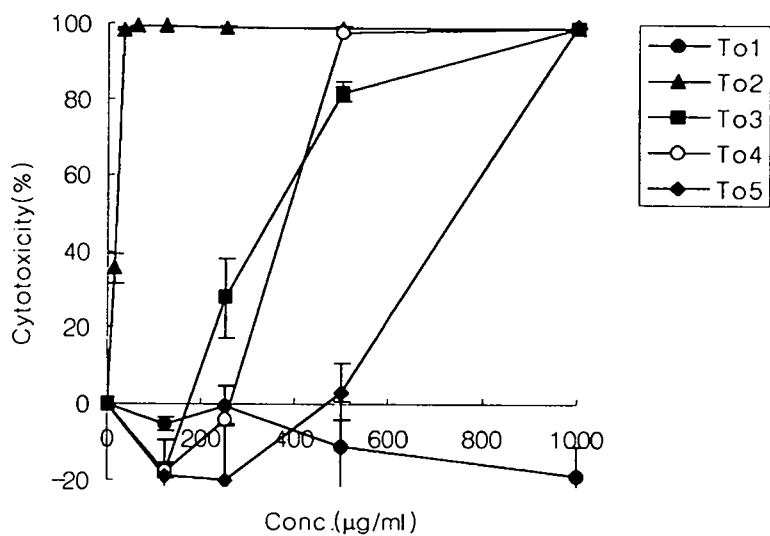


Fig. 15. Cytotoxicity of To1, To2, To3, To4 and To5 obtained by ion exchange chromatography on P388D1. Except To-1, all four fractions showed cytotoxicity and their IC_{50} value were $19.24 \mu\text{g/ml}$, $352.99 \mu\text{g/ml}$, $372.69 \mu\text{g/ml}$, $756.39 \mu\text{g/ml}$, respectively.

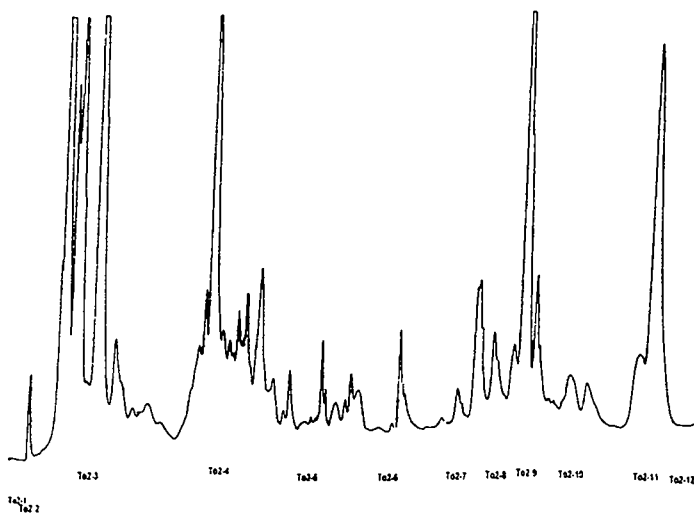


Fig. 16. The reverse-phase HPLC chromatogram of To2. Two micromililiters was loaded on reverse-phase column (Delta-pak C18 7.8x300, Waters Inc.). Linear gradient of acetonitrile 10 to 90% was eluted in 75 min. Absorbance was measured at 214 nm

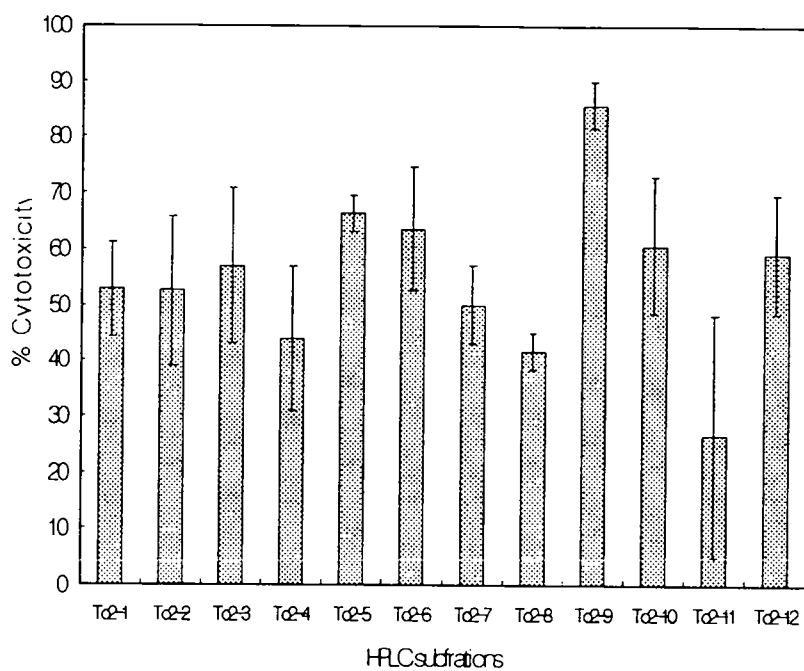


Fig. 17. Cytotoxicity of HPLC fractions (thermoase/EtOH To2-1 ~ To2-12) on P388D1 at 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration of peptides. Among them, To2-9 showed the strongest cytotoxicity and its IC_{50} value was 30.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

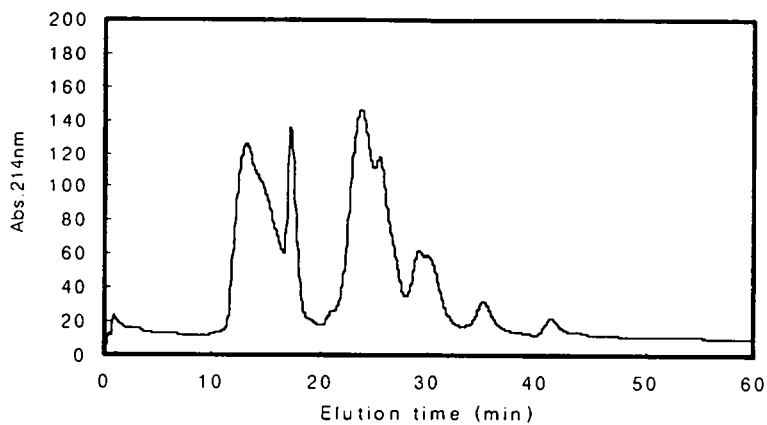


Fig. 18. The gel filtration chromatogram of thermoase/EtOH To2-9 fraction. Two micromililiters was loaded on gel filtration column (Superdex 75, Pharmacia Co.). Double distilled water was eluted in 60 min. Absorbance was measured at 214 nm.

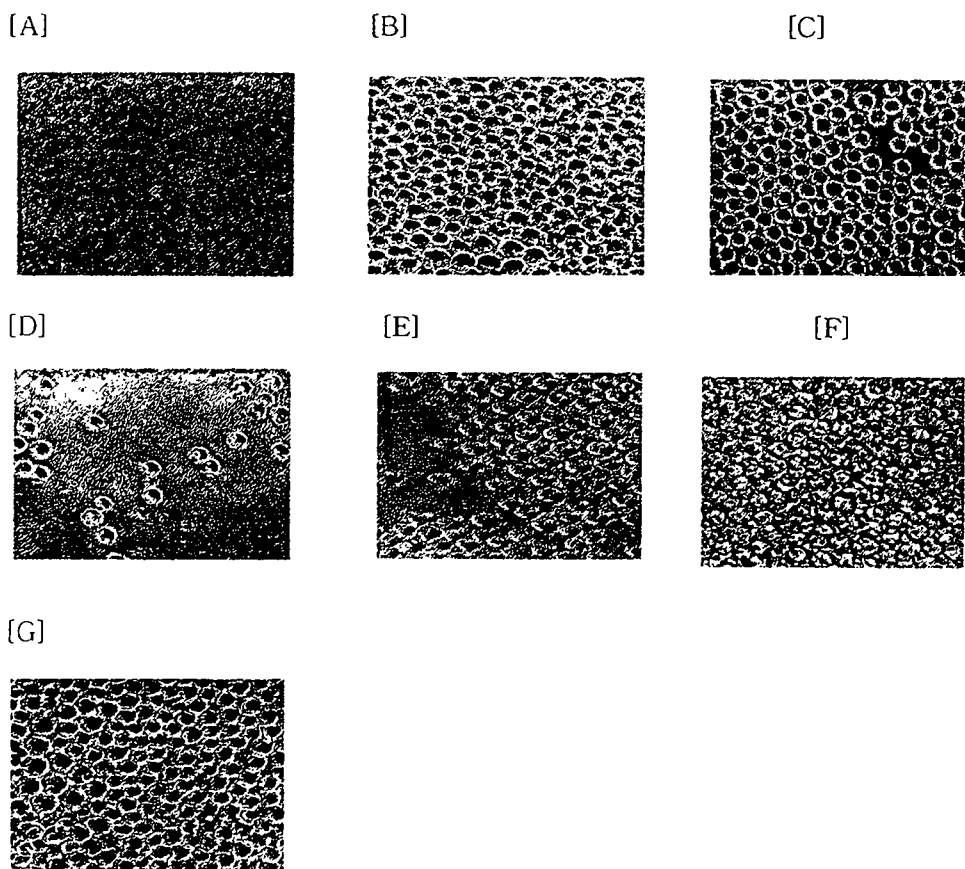


Fig. 19. Cytotoxicity of To2-9-G0 to To2-9-G5 at 500 $\mu\text{g/ml}$ concentration of peptides on P388D1(mouse monocyte - macrophage: ATCC HB 8065). Among them, only To2-9-G2 showed anticancer activity.

[A] : control [B] : To2-9-G0 [C] : To2-9-G1 [D] :
To2-9-G2

[E] : To2-9-G3 [F] : To2-9-G4 [G] : To2-9-G5

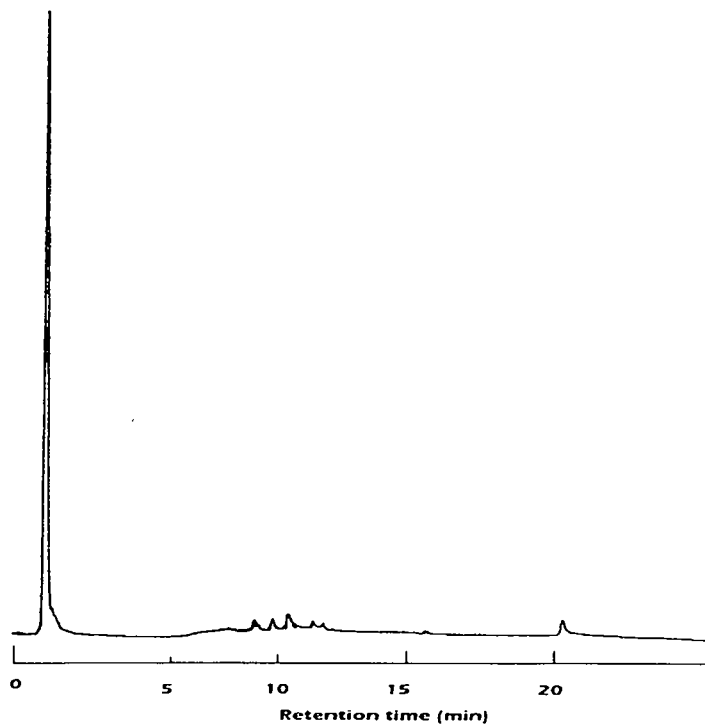


Fig. 20. HPLC chromatogram of To2-9-G5. Twenty microliters was loaded on reverse-phase column (nova-pak phenyl, Waters Inc.). Linear gradient of acetonitrile 1 to 100% was eluted in 23 min. Absorbance was measured at 214 nm.

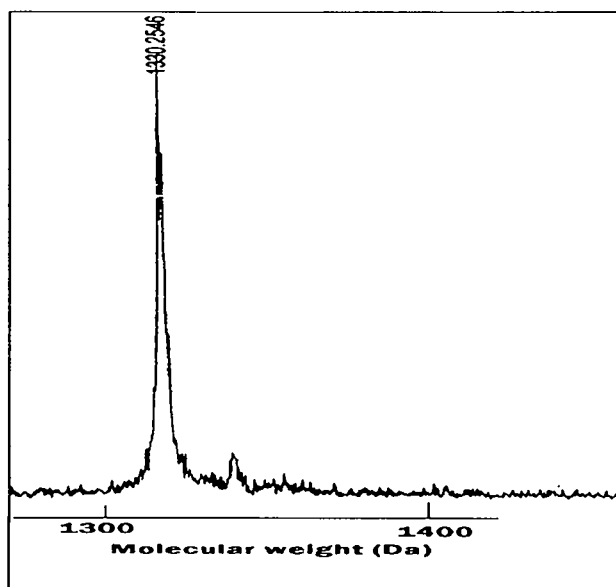


Fig. 21. Molecular weight of To2-9-G5 was determined as 1300Da by MALDI-TOF MS.

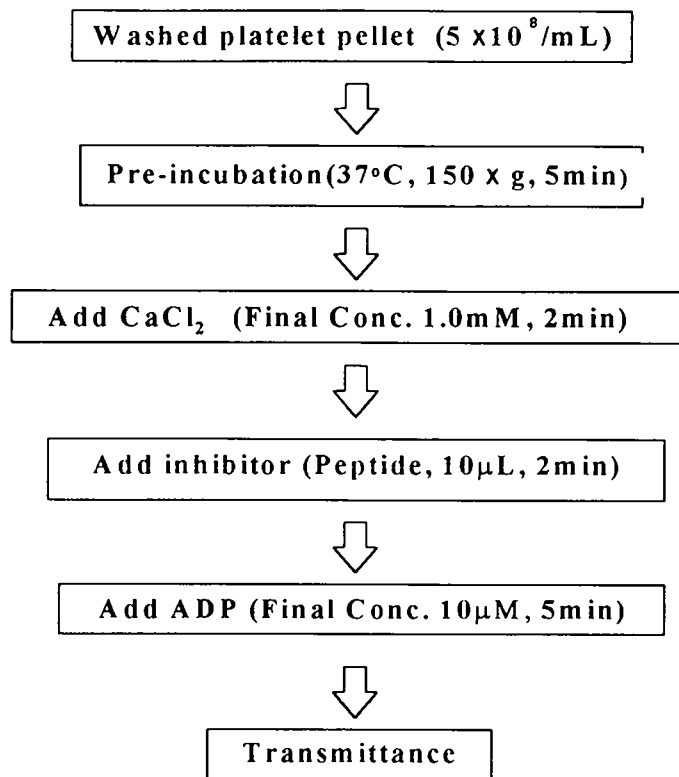


Fig. 22. Scheme of antiplatelet aggregation assay by aggregometer.

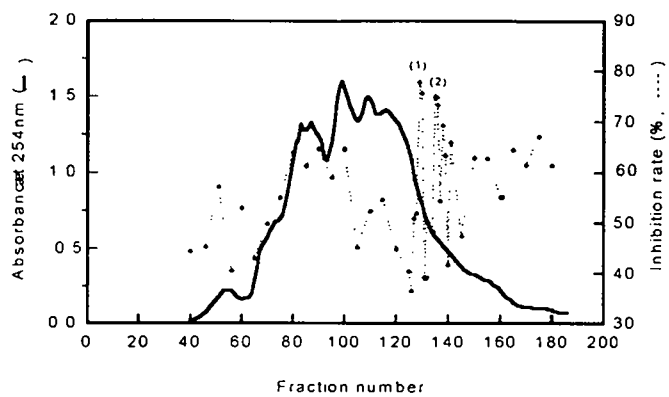


Fig. 23. Gel permeation chromatography of soy protein hydrolyzate developed Nong Shim co, Ltd. On Sephadex G-25(95x5cm).
 Eluant: 0.1 M acetic acid; flow rate: 01 ml/hr; fraction size: 20ml.
 6g of sample was loaded. 10 μ l of the fractions was assayed for antithrombotic activity as is. The active fractions collected are shown by --.

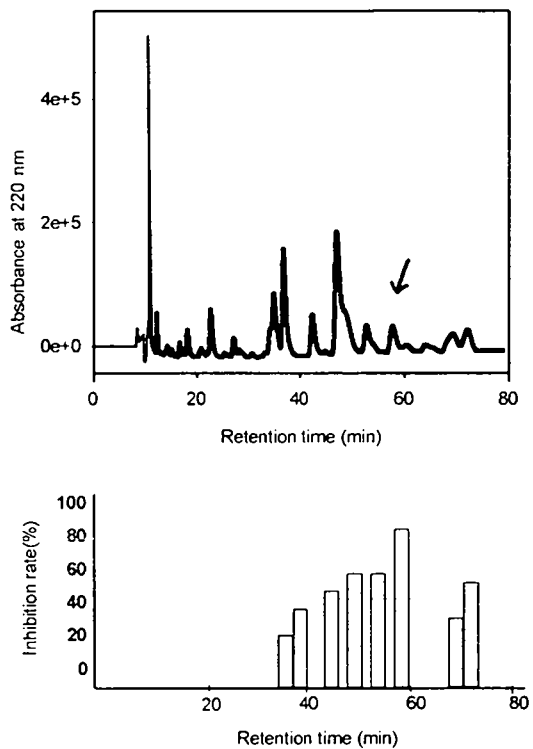


Fig. 24. Purification of the antithrombotic peptides from the active fraction of gel permeation column chromatography (Sephadex G-25) by HPLC. 500 μ l of the active fraction (1 mg/ml) was loaded on a reverse-phase column (Vydac C₁₈; 218TP510; 10x250 mm); The Separations Group, Hesperia, CA, USA). Eluant, 5% acetonitrile water containing 0.1% trifluoroacetic acid; flow rate, 1.5 ml/min. The fraction were freeze-dried, solubilized in 100 μ l water and 10 μ l was assayed for antithrombotic activity.

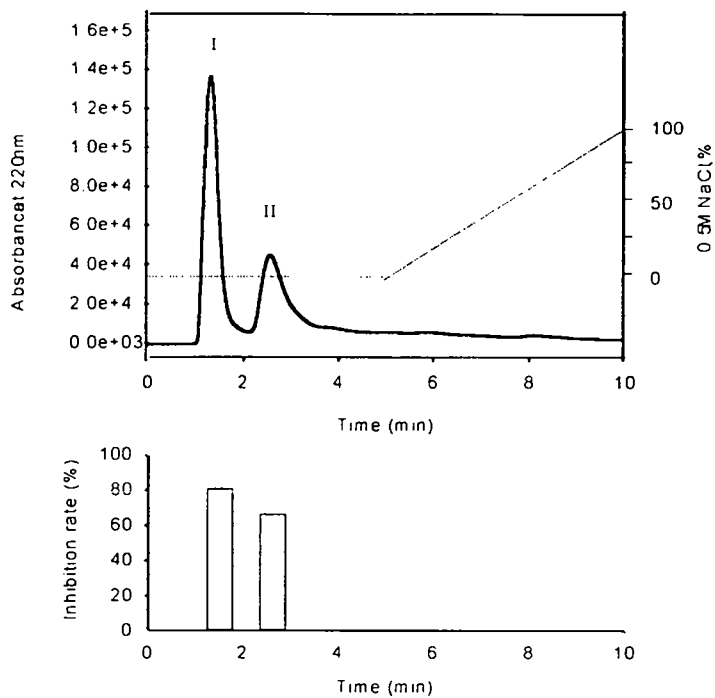


Fig. 25. Cation exchange chromatography of the active fraction from reverse phase HPLC. Column, Vydac 400VHP575(5 μ , 7.5x 50mm, The Separations Group, Hesperia, CA, USA); Eluant, 5mM KH_2PO_4 (pH 3.0); 0.5M NaCl gradient; flow rate, 1ml/min.

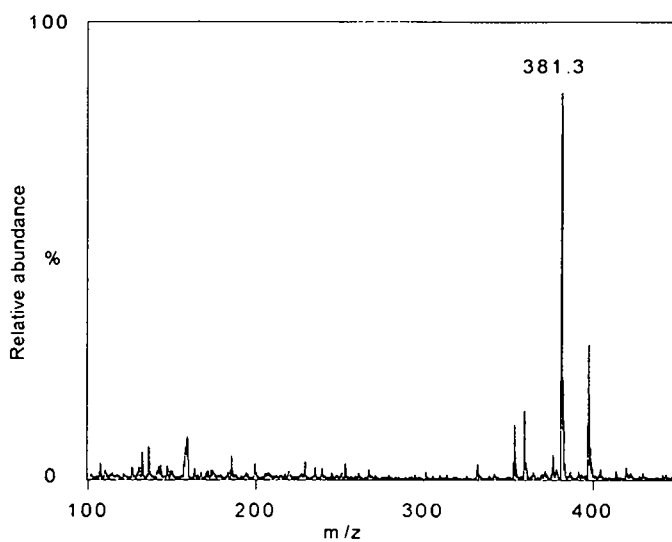


Fig. 26. Mass spectrum of the first fraction collected from the HPLC profile

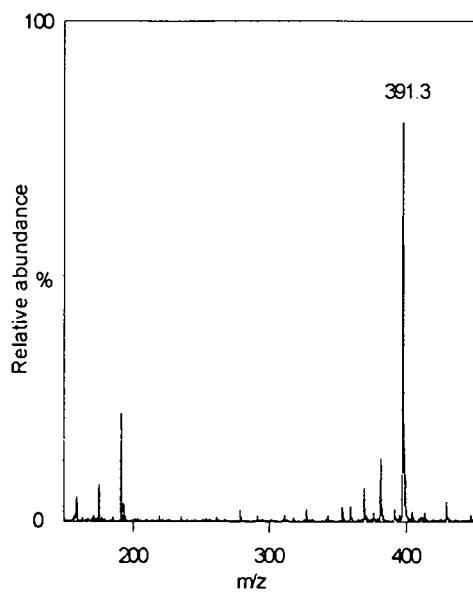


Fig. 27. Mass spectrum of the second fraction collected from the HPLC profile
(by MassLynx 2.1, Micromass platform II, Manchester, U.K)

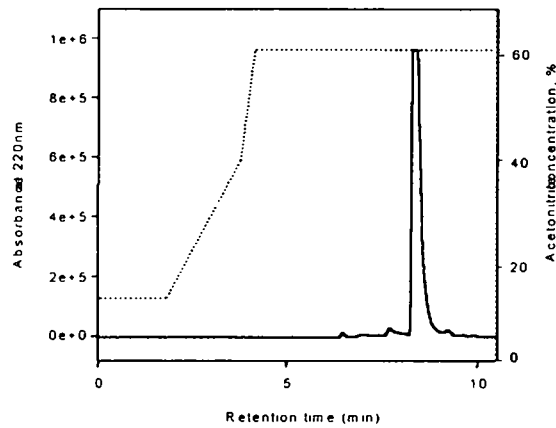


Fig. 28. Purification of the synthetic peptide(DEE) by HPLC. 100 μ l of the peptide in 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) water was on a reverse-phase column (Vydac C₁₈; 218TP510; 10x250mm); The Separation Group Hesperia, CA, USA). Dotted line is percentage acetonitrile in the eluting solution containing 0.1% TFA. The fraction freeze-dried, solubilized in 100 μ l water and 10 μ l was assayed antithrombotic activity.

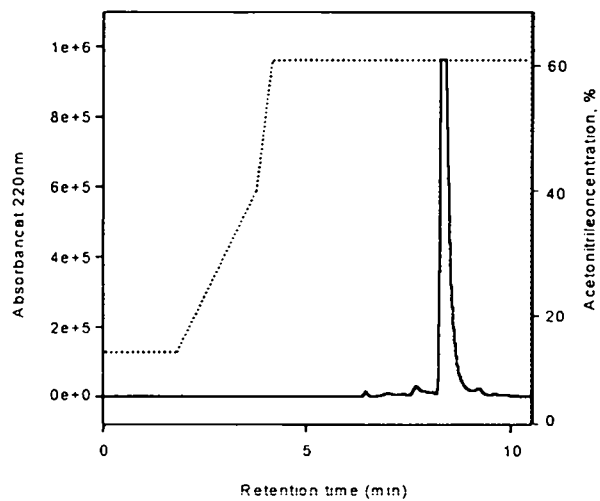


Fig. 29. Purification of the synthetic peptide(SSGE) by HPLC. 100 μ l of the peptide in 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) water was on a reverse-phase column (Vydac C₁₈; 218TP510; 10x250mm); The Separation Group, Hesperia, CA, USA). Dotted line is percentage acetonitrile in the eluting solution containing 0.1% TFA. The fraction freeze-dried, solubilized in 100 μ l water and 10 μ l was assayed antithrombotic activity.

Sal-5 5'ⓅTCGACCTGCACCACCTGCACCACCTGCACCACCTGCACCACCTGC3

Sal-3

3'GGACGTGGTGGACGTGGTGGACGTGGTGGACGTGGGGACGAGCTⓅ5'

P-1 5'ⓅTCGACCTGCACCACCTGC3'

P-2 3'GGACGTGGTGGACGAGCTⓅ5'

P-3 5'ⓅTCGACCTGCACCACCTTCATCATCTTCACCATCTGC3'

P-4 3'GGACGTGGTGGAAAGTAGTAGAAGTGGTAGACGAGCTⓅ5'

Figure 30. The oligonucleotide cassette of ACE inhibitory (His-His-Leu) peptide

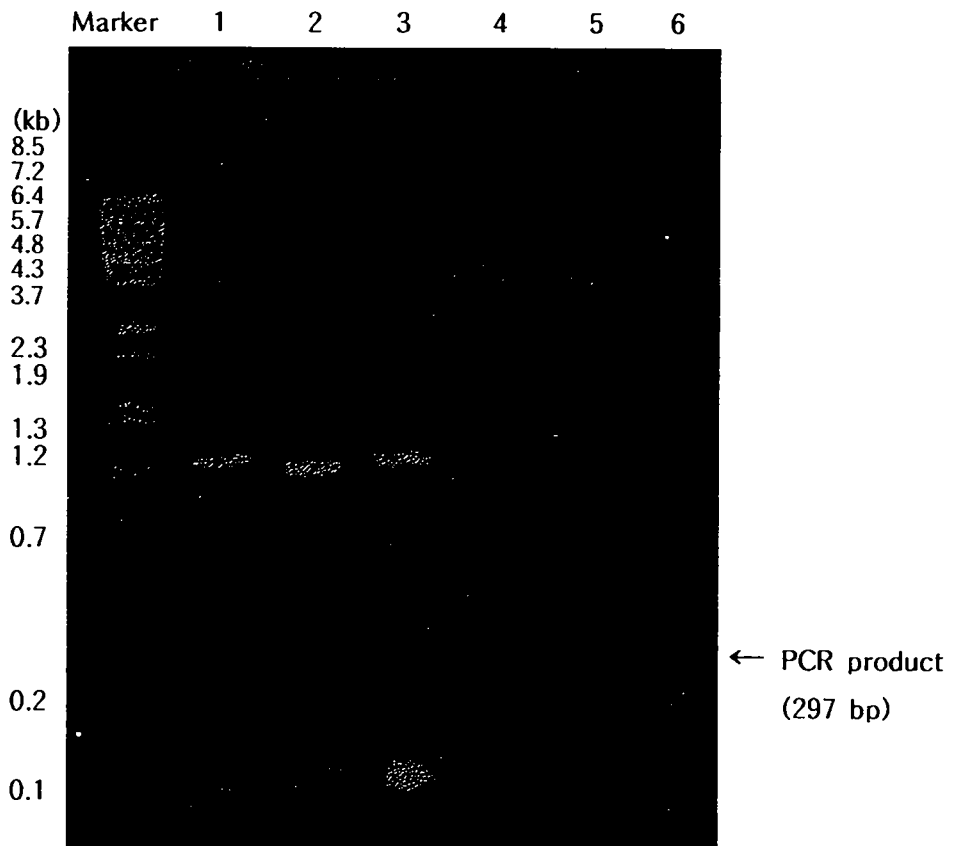


Figure 31. Agarose gel electrophoresis of pUC19-HHL9 that has nine copies of ACE inhibitory peptide. (1.5% agarose gel)

Marker: λ DNA-*Bst*PI marker, lane 1-6: transformants

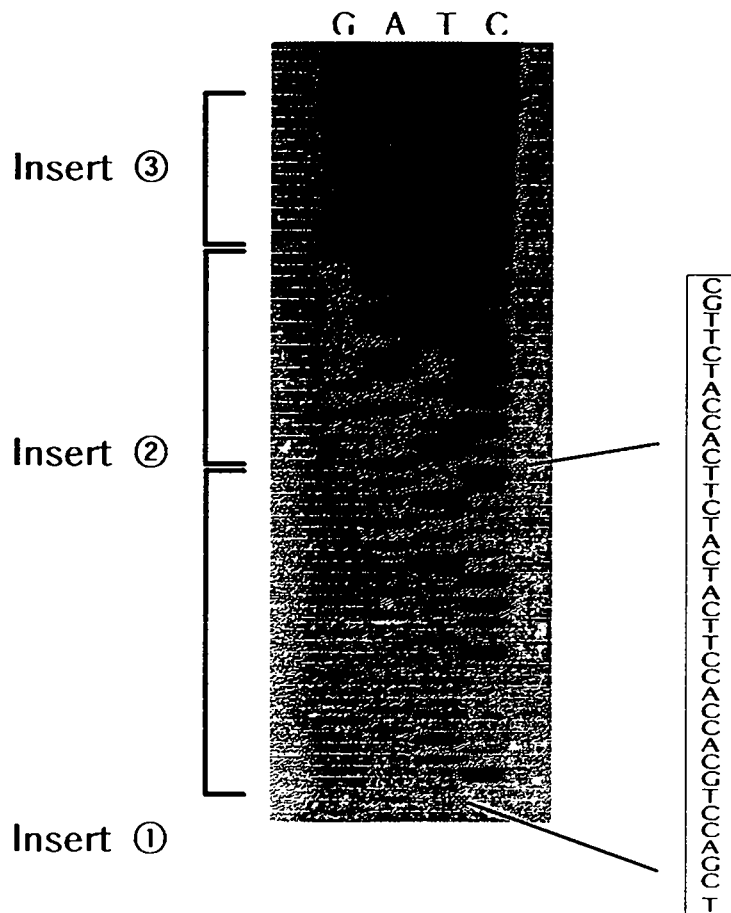
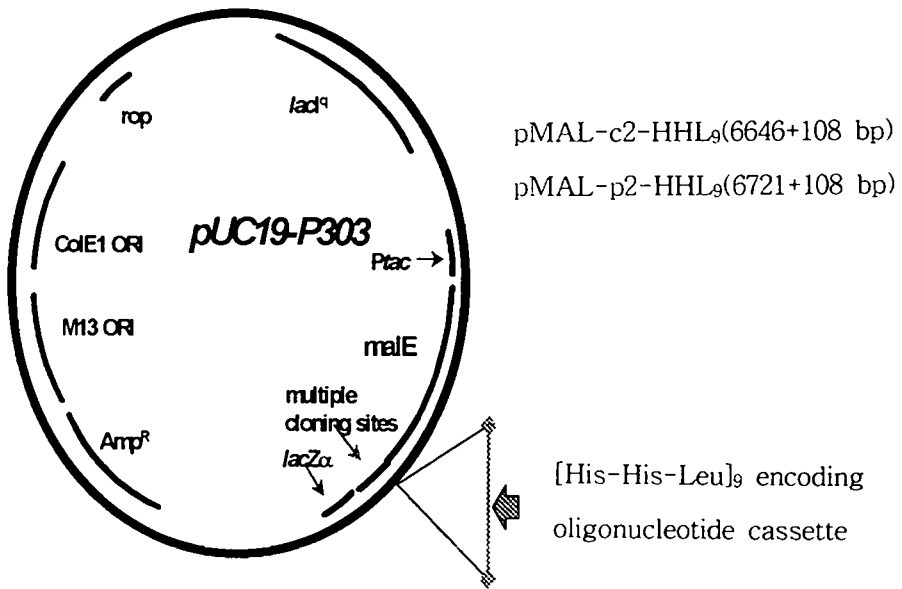


Figure 32. The DNA sequences of cloned HHL expression cassette in pUC19



MCS XmnI-EcoRI BamHI XbaI SalI PstI HindIII

 ATC CAG GGA AGG ATT TCA GAA TTC GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA AGC TTG
 Ile Glu Gly Arg ↑

Figure 33. The plasmid map of pMAL-c2-HHL₉, pMAL-p2-HHL₉.

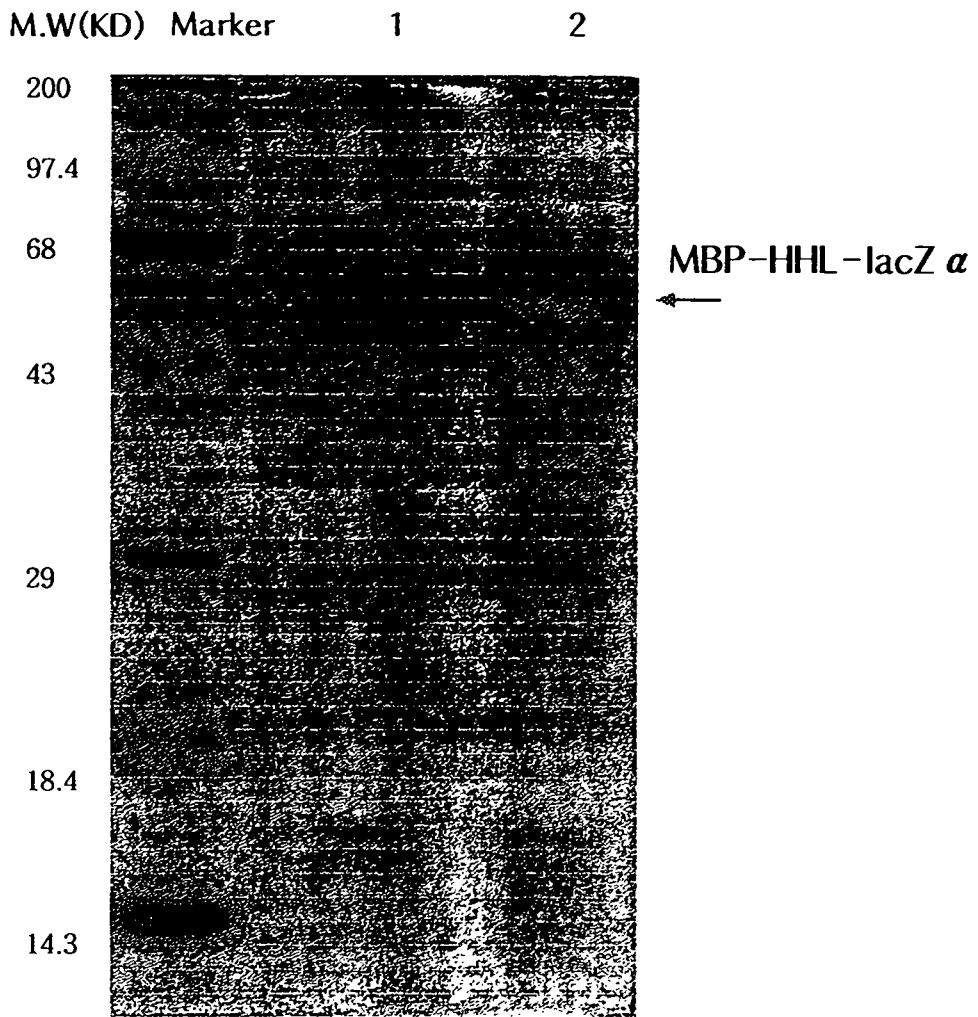


Figure 34. IPTG induction on *E. coli* ER2580 strains bearing pMAL-c2-HHL9.

Marker : Gibco BRL prestained high range marker

Lane 1 : uninduced cell

Lane 2 : induced cell with 0.5 mM IPTG for 4 hours

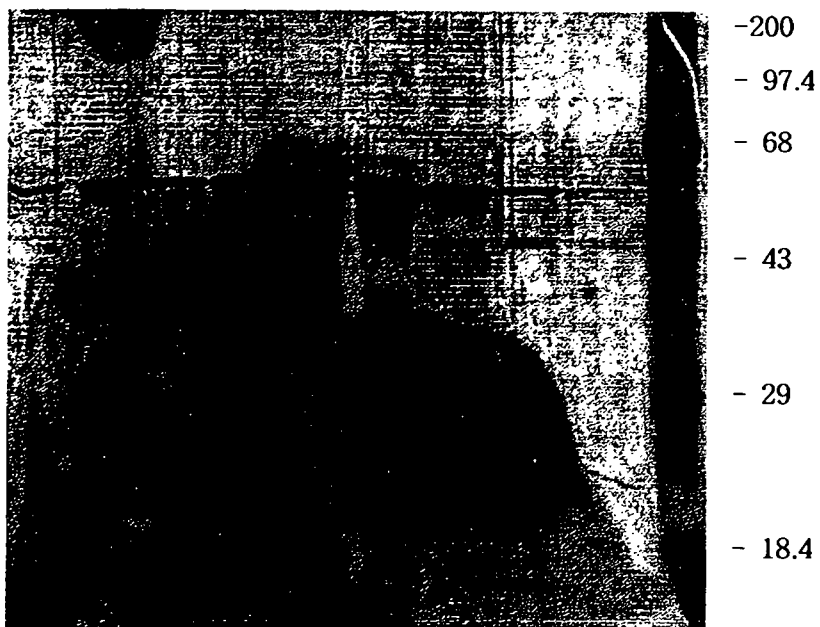


Figure 35. SDS-PAGE profile of [MBP]-[HHL]9-[β -gal- α] from Amylose affinity chromatography.

M : Gibco-BRL high range marker, lane 1~9 : Amylose column fraction # 2~10

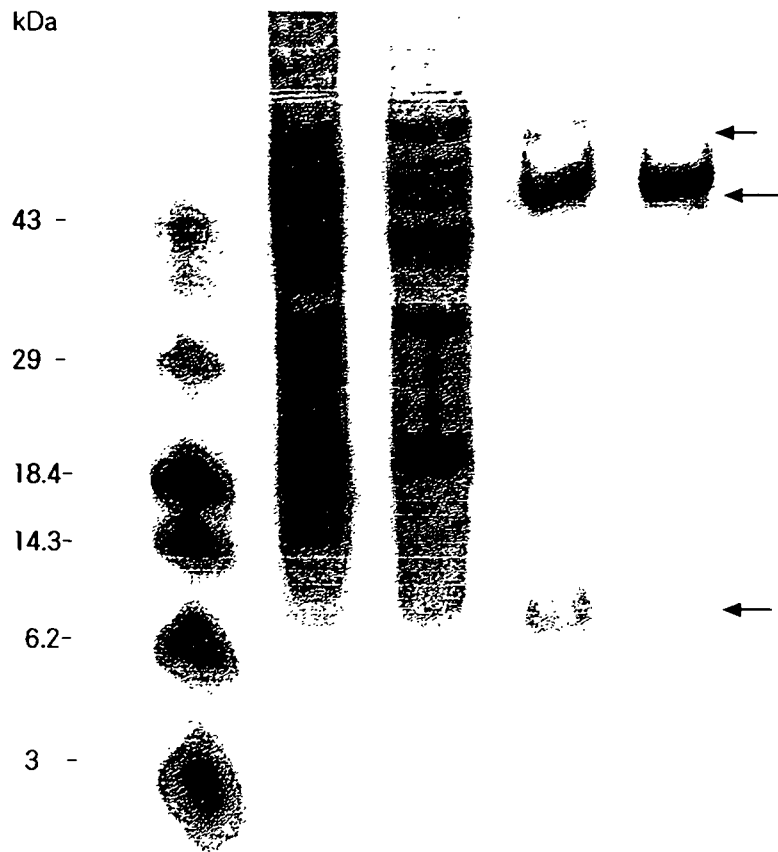


Figure 36. SDS-PAGE analysis of MBP-HHL9-β-gal-α cleavage of Factor Xa treatment.

M : Gibco-BRL Low range marker, lane 1 : no induction,

lane 2 : 0.5mM IPTG induction

lane 3 : MBP-HHL₉-β-gal-α + Factor Xa, 3 hours,

lane 4 : MBP-HHL₉-β-gal-α + Factor Xa, 5 hours

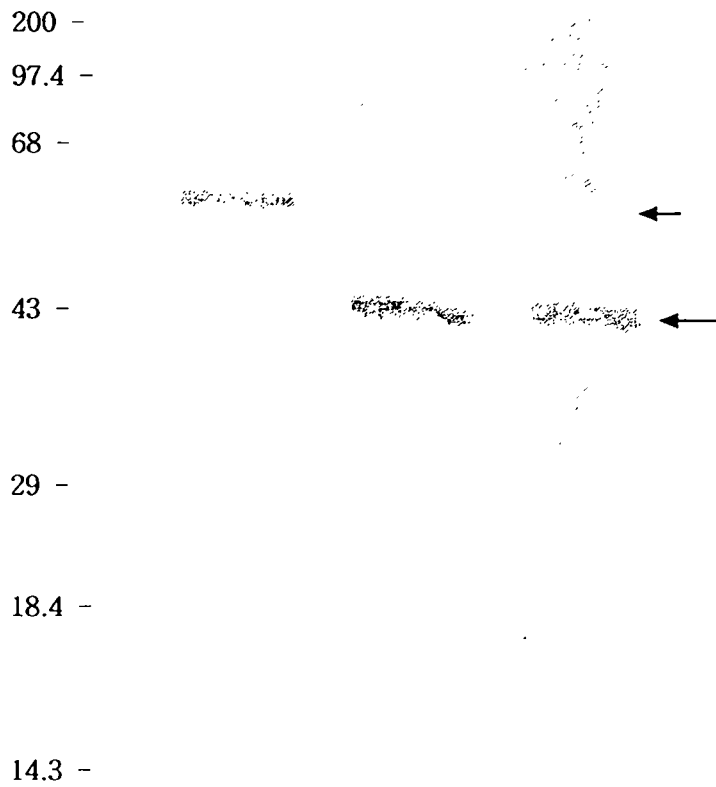


Figure 37. Western Blot analysis of MBP-HHL9- β -gal- α cleavage of Factor Xa treatment. (1st Antibody : Anti-MBP, 2nd antibody : anti-IgG)

Lane 1 : [MBP]-[HHL]₉-[β -gal- α]

Lane 2, 3 : [MBP]-[HHL]₉-[β -gal- α] + Factor xa

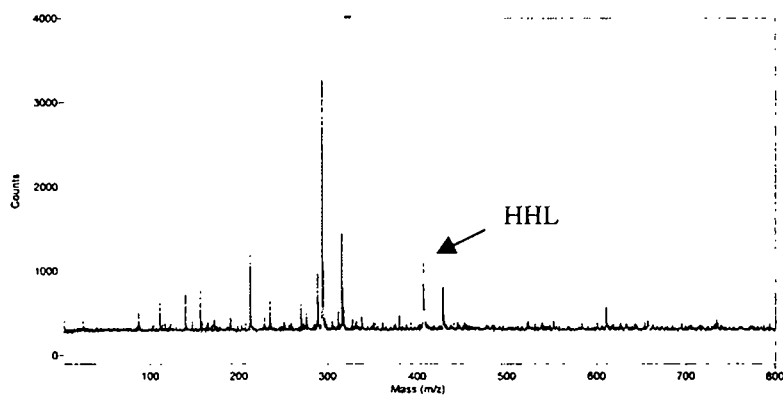
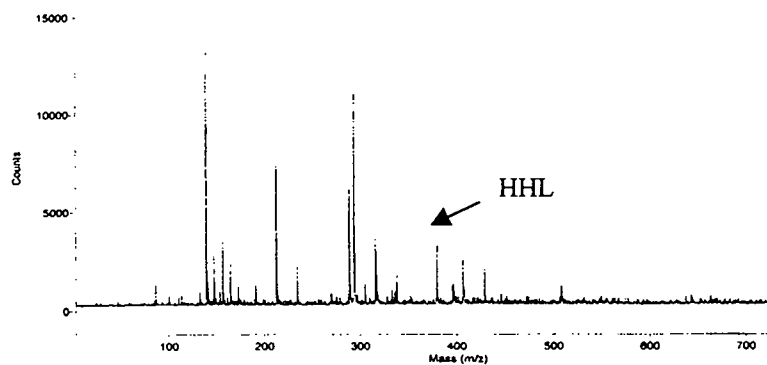


Fig. 38. MALDI mass spectroscopy analysis of HHL₉- β gal- α cleavage fraction

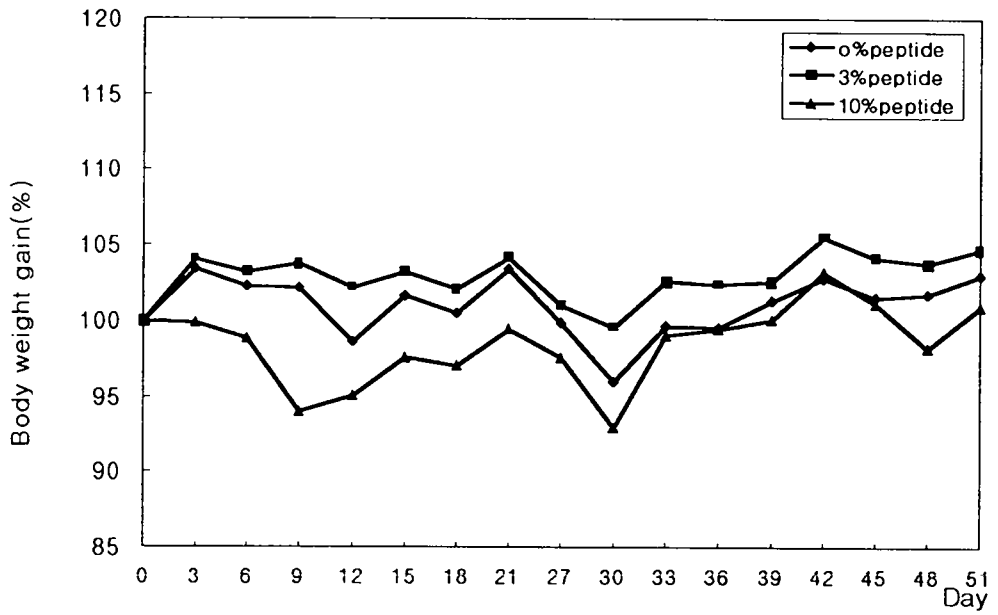


Figure 39. Effect of UF-peptide on the change of body weight gain in SHR.
SEM was less than 10% and was omitted for clarity.

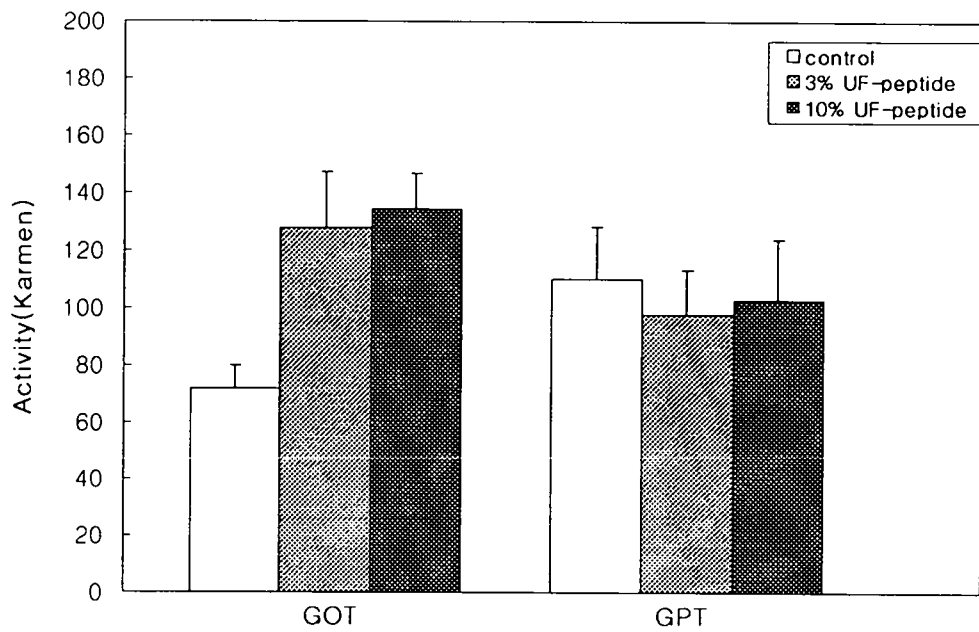


Figure 40. Effect of UF-peptide on the serum GOT and GPT activities in SHR. Data are expressed as the mean \pm SEM.

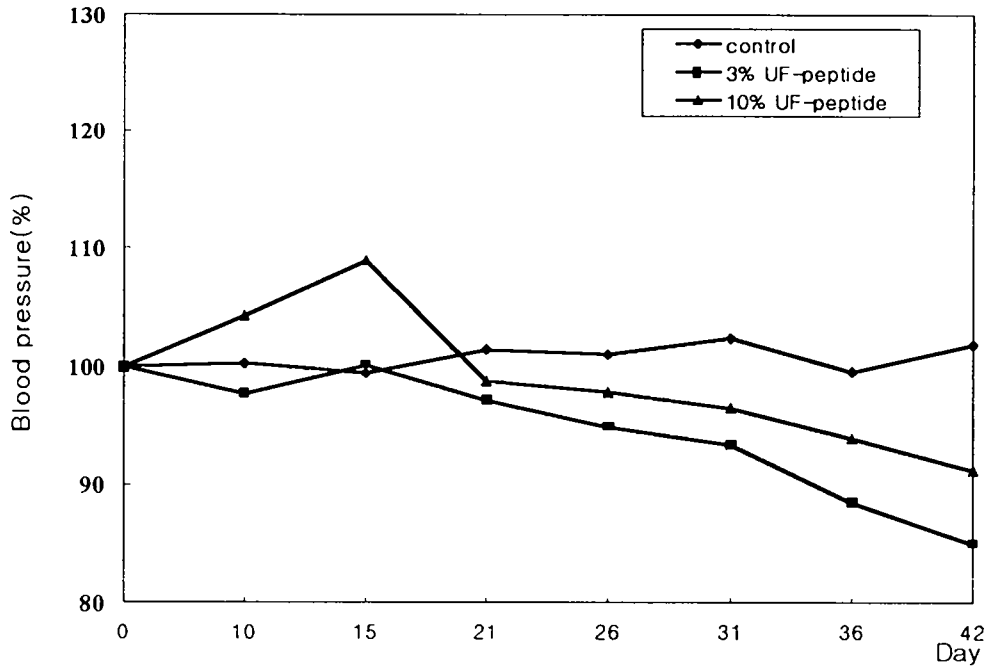


Figure 41. Effect of UF-peptide on the change of blood pressure in SHR.

* Significantly different from the control group ($p < 0.05$).

SEM was less than 10% and was omitted for clarity.

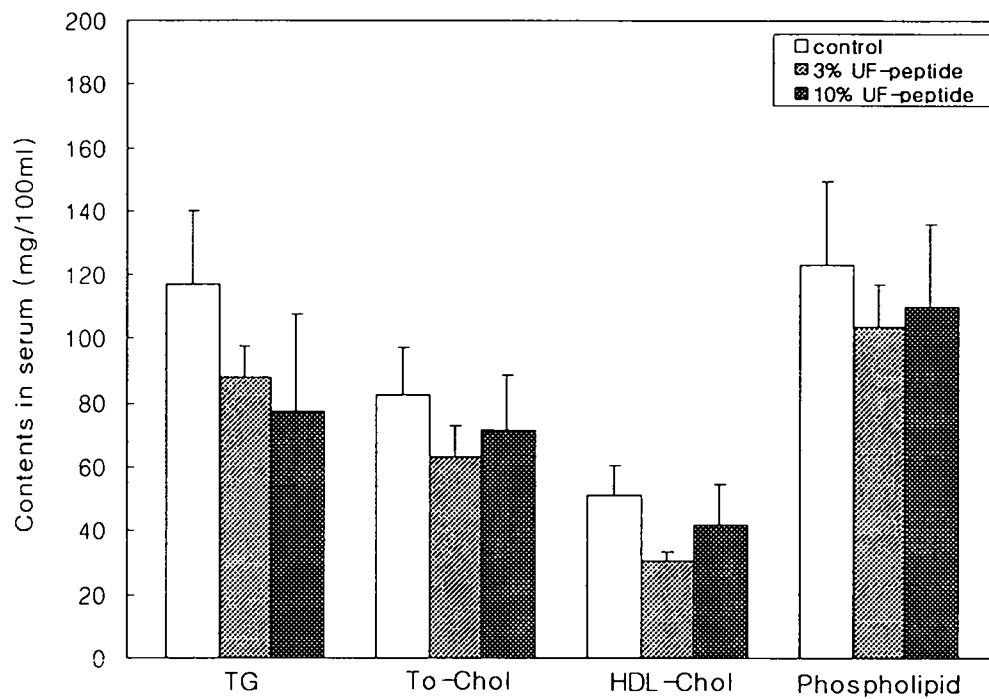


Figure 42. Effect of UF-peptide on the serum lipids level in SHR.
Data are expressed as the mean \pm SEM.

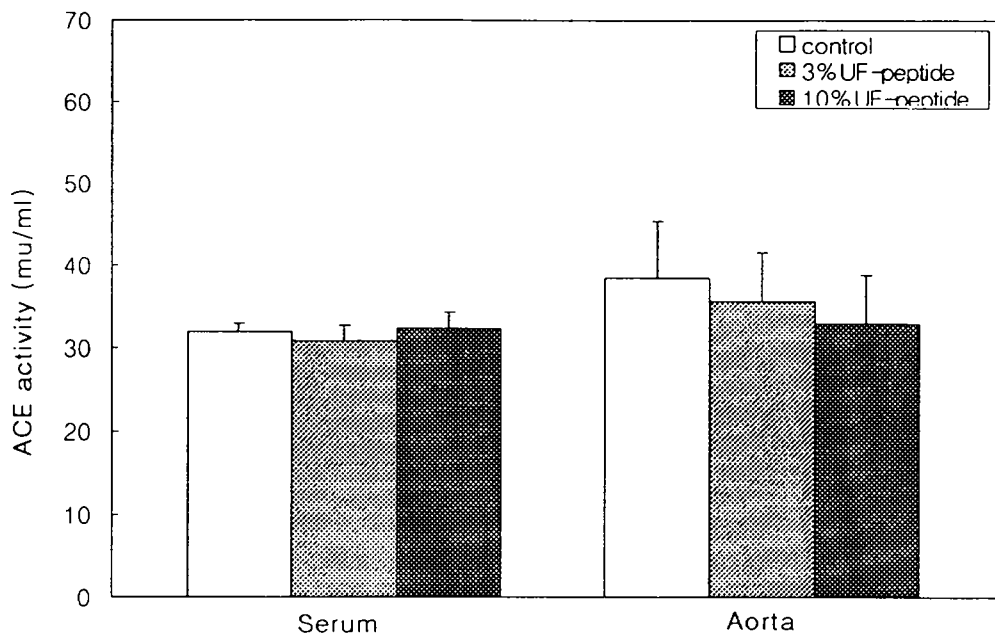


Figure 43. Effect of UF-peptide on the ACE activity in serum and aorta of SHR
Data are expressed as the mean \pm SEM.

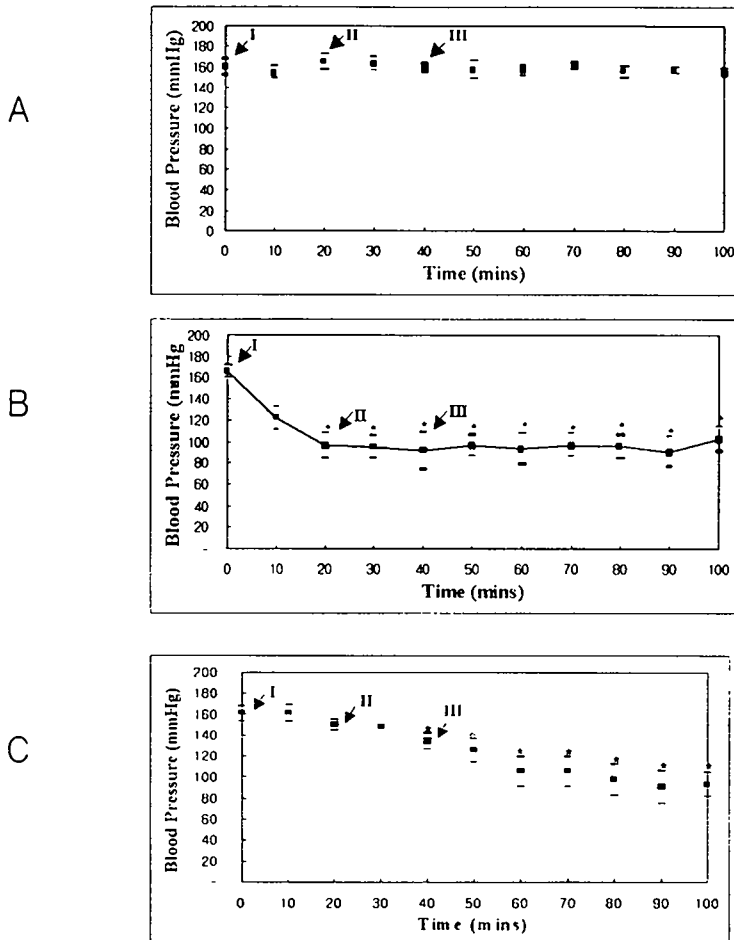


Figure 44. Effect of saline (A), captopril (B), HHL (C) on the change of blood pressure in SHR. ^I: The first injection of sample, ^{II}: The second injection of sample, ^{III}: The third injection of sample. Saline, captopril, and HHL in 0.5ml saline were intravenously injected. Data are expressed as the mean \pm SEM. * : Significantly different from control ($p < 0.01$). ** : Significantly different from control ($p < 0.05$).

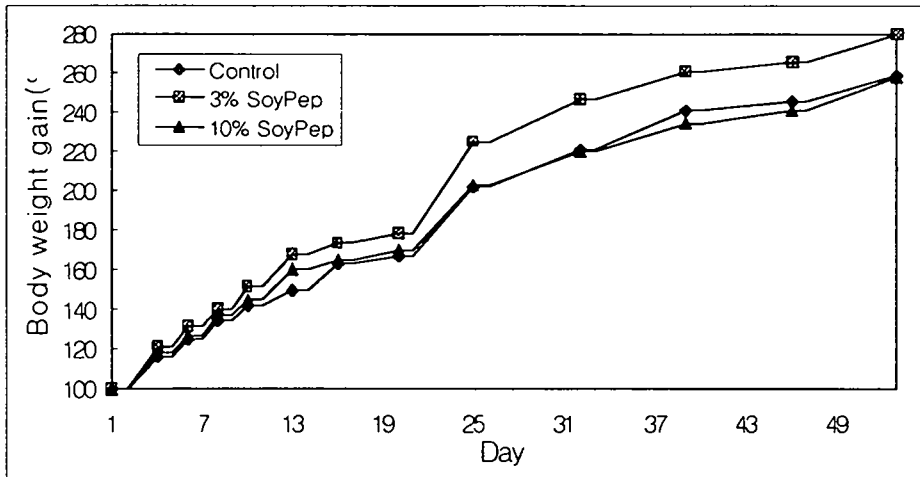


Figure 45. Effect of SoyPep279 on the change of body weight gain in young SHR
SEM was less than 10% and was omitted for clarity.

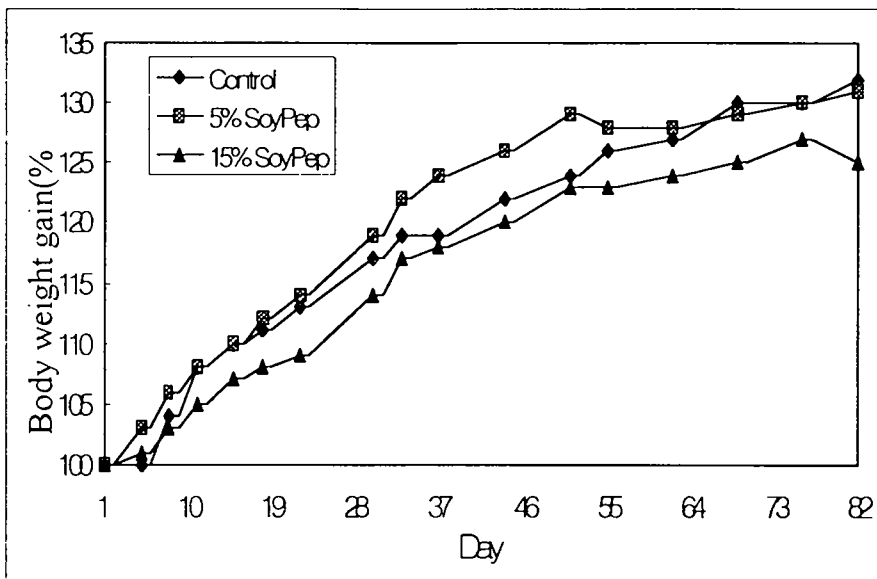


Figure 46. Effect of SoyPep279 on the change of body weight gain in adult SHR
SEM was less than 10% and was omitted for clarity.

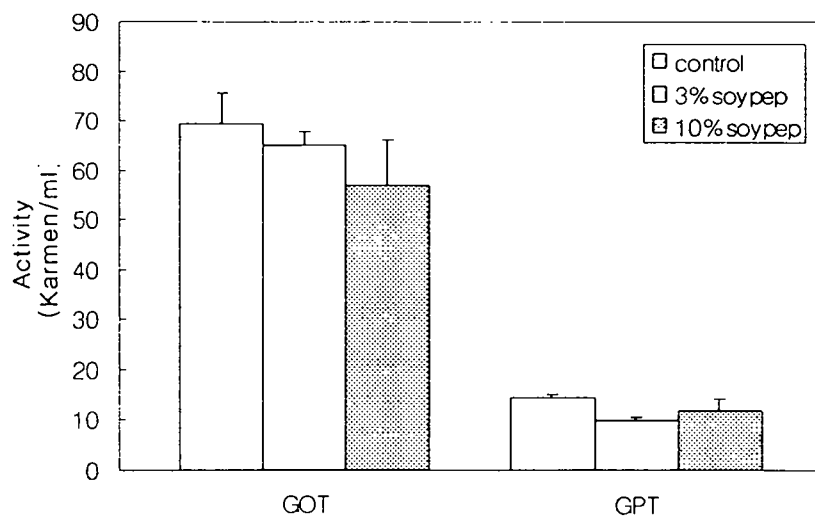


Figure 47. Effect of SoyPep279 diet on the plasma GOT and GPT activities in SHR in young age. Values are mean \pm SEM.

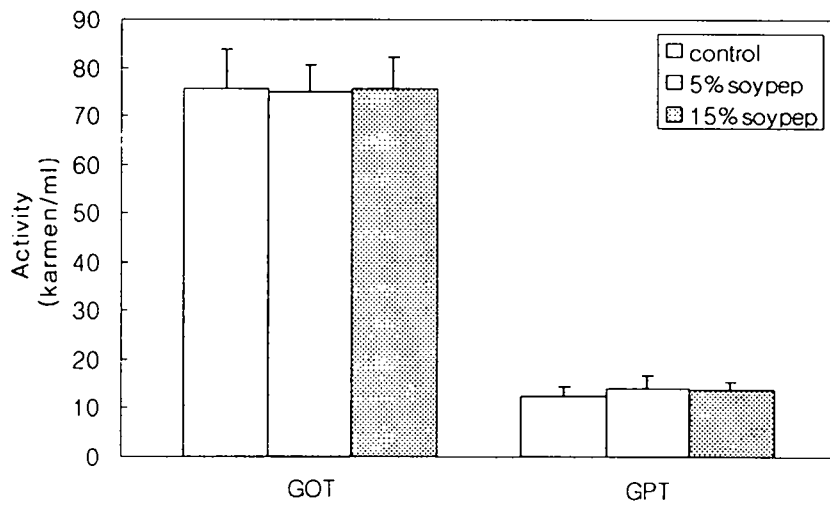


Figure 48. Effect of SoyPep279-diet on the plasma GOT and GPT activities in old SHR. Values are mean \pm SEM.

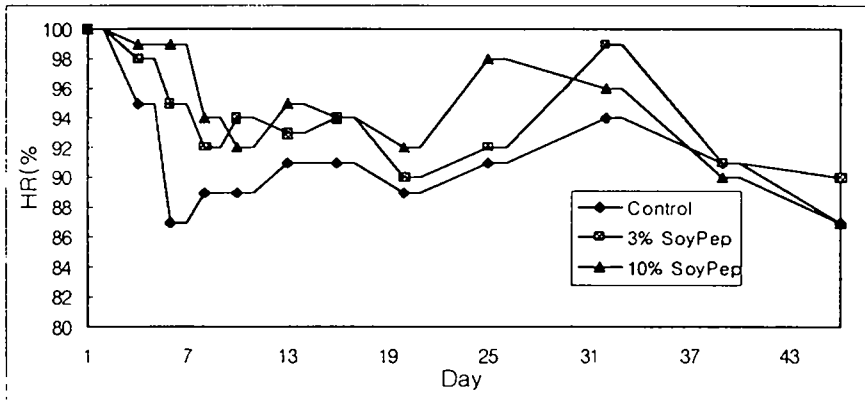
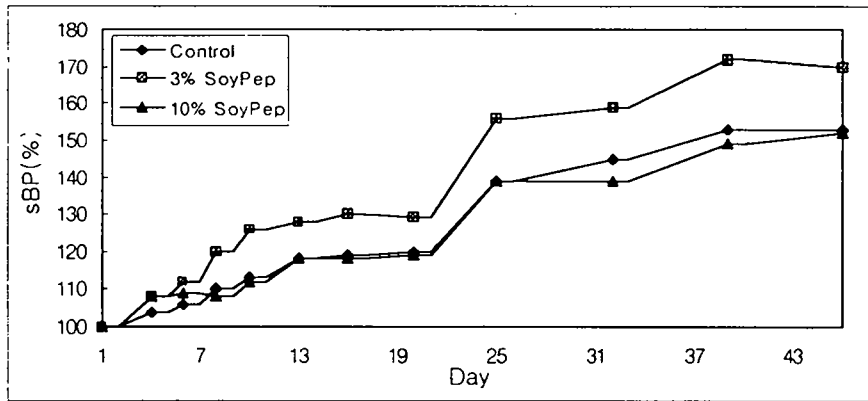


Figure 49. Effect of SoyPep279 on the change of systolic blood pressure and heart rate in young SHR. SEM was less than 10% and was omitted for clarity.

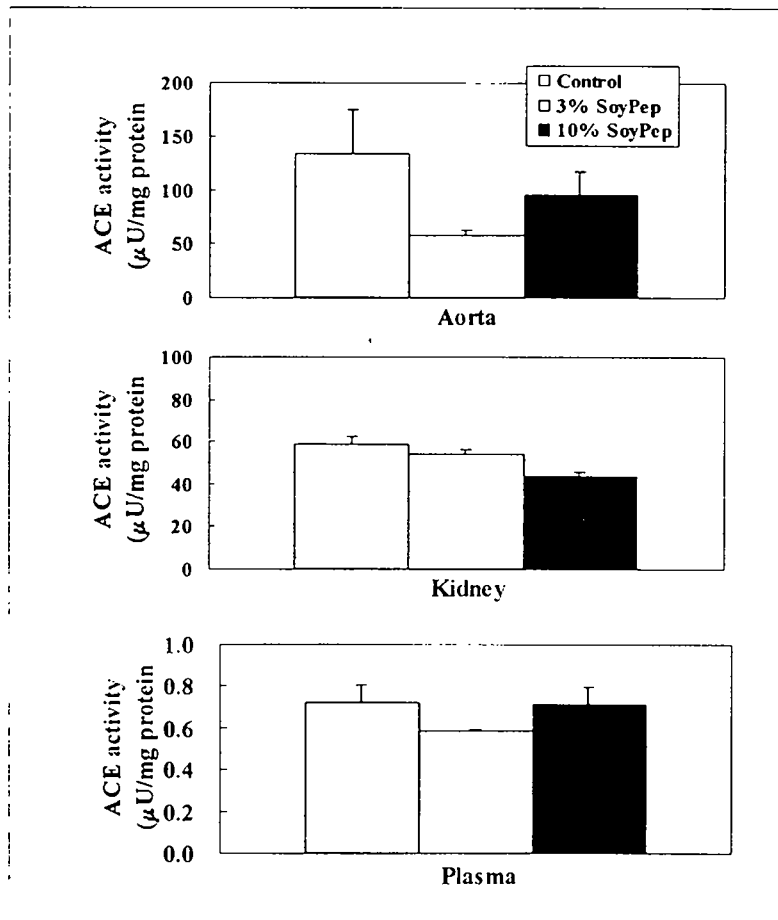


Figure 50. Effect of SoyPep279 on the ACE activity in aorta, kidney, and plasma of SHR in young age. Data are expressed as the mean \pm SEM.

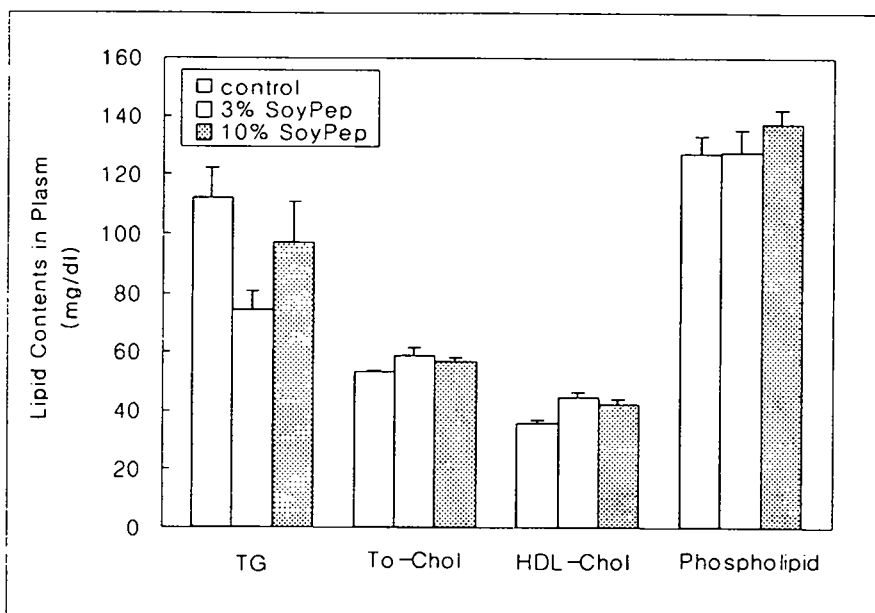


Figure 51. Effect of SoyPep279 on the plasma lipid levels in young SHR.
 Values are mean \pm SEM.

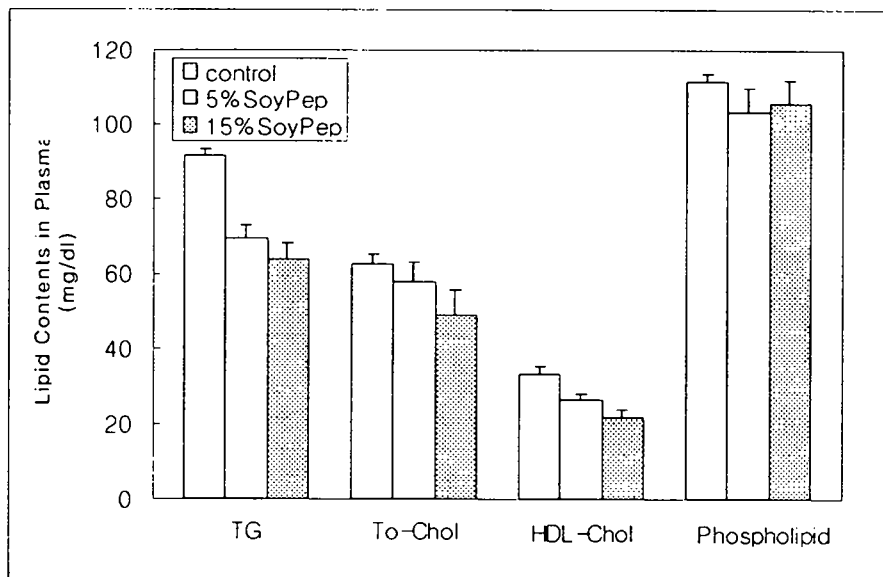


Figure 52. Effect of SoyPep279 on the plasma lipid levels in old SHR.

Values are mean \pm SEM.

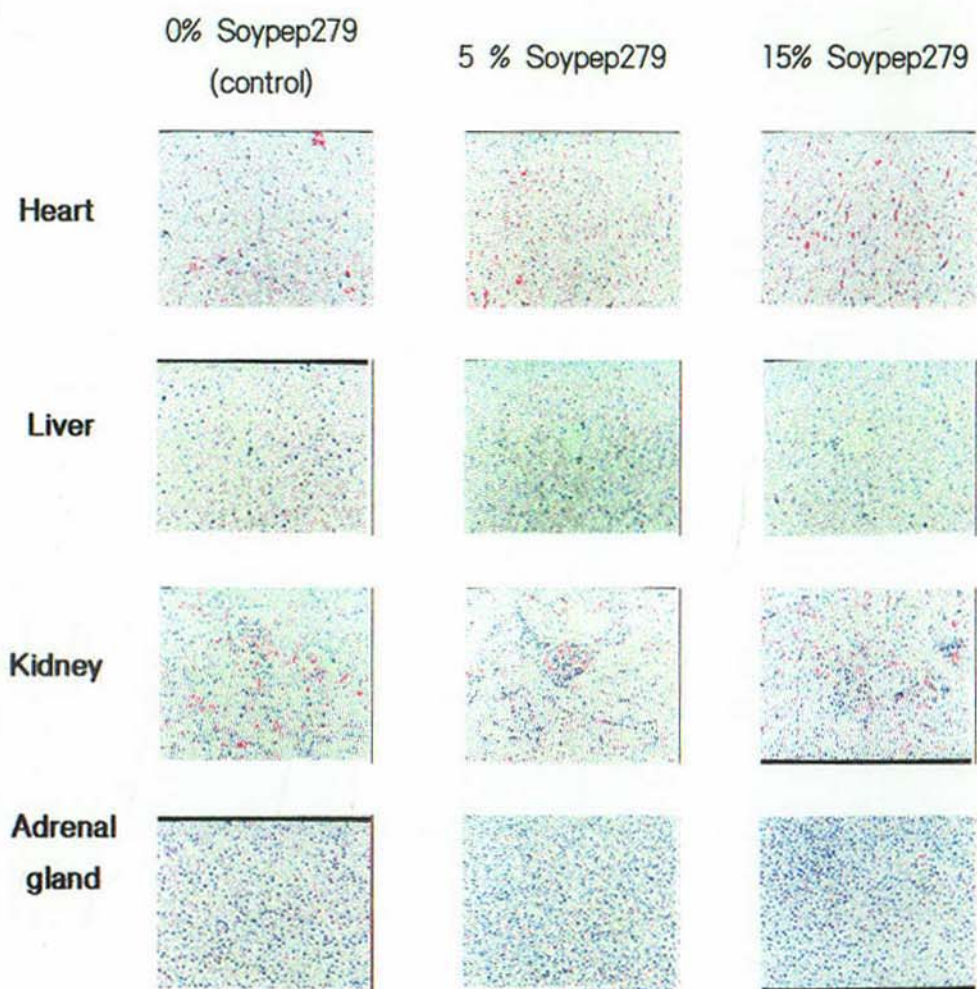


Figure 53. Histological change of various organs in young SHR.

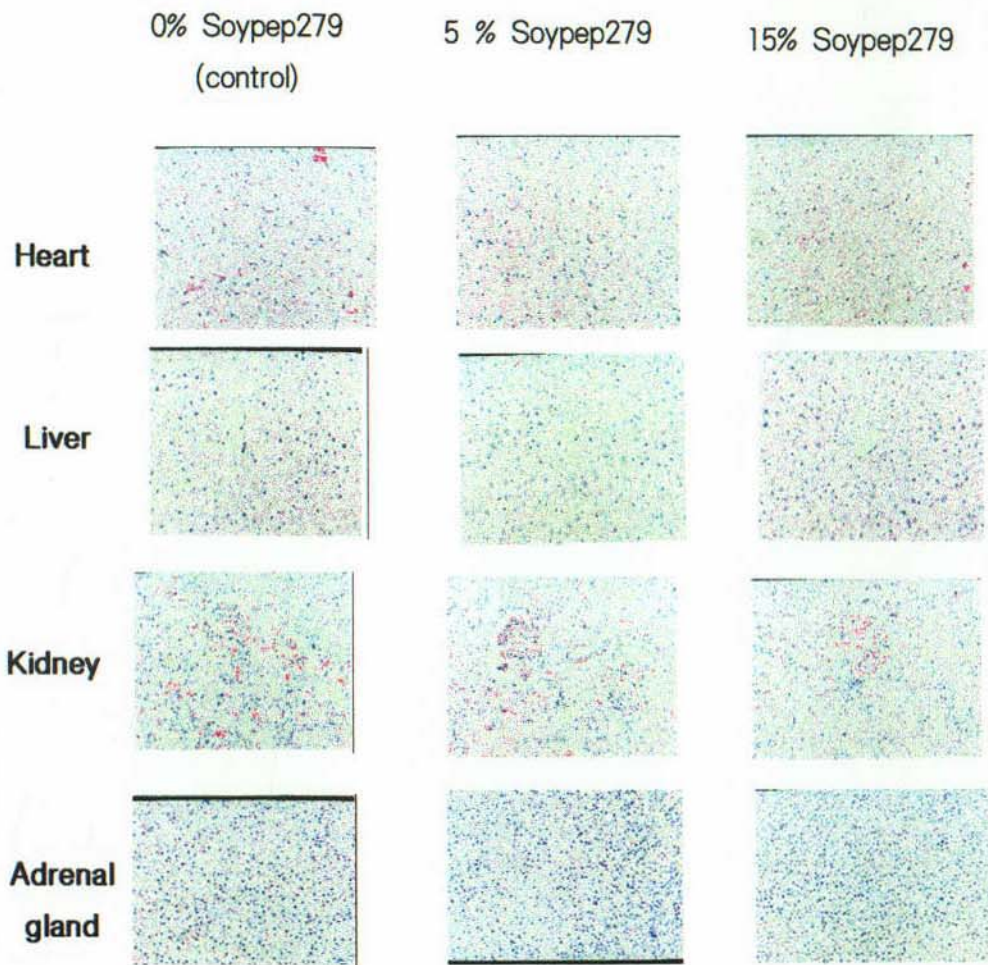


Figure 54. Histological change of various organs in old SHR.

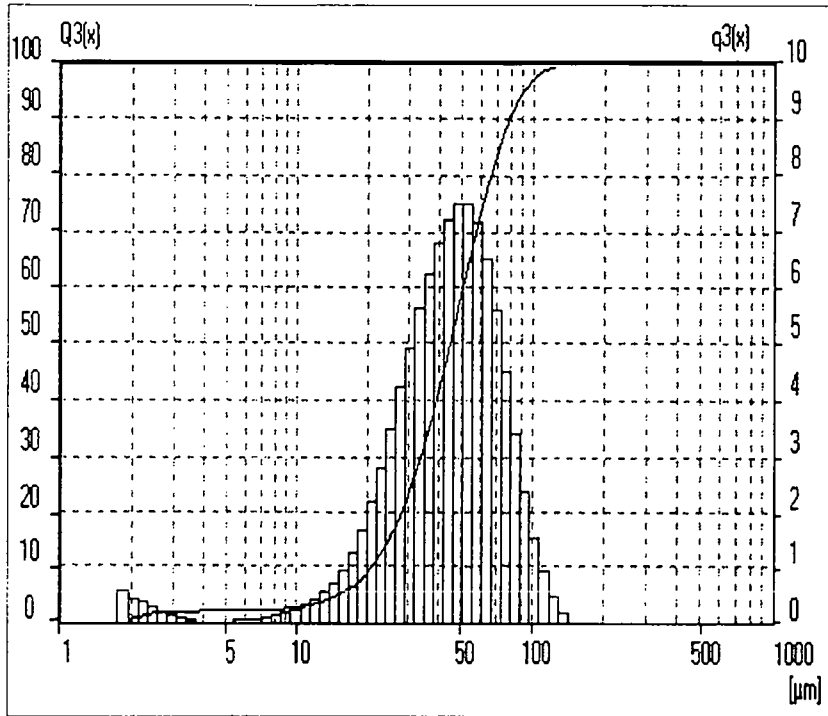


Fig. 55. Particle size distribution of SoyPep279