

## 청국장으로부터 Angiotensin I 전환효소 저해 Peptide의 분리

松井利郎<sup>1</sup> · 유형재 · 황재성 · 이동석<sup>2</sup> · 김한복\*

호서대학교 자연과학부 생명과학전공, <sup>1</sup>日本九州大學院 農學研究院, <sup>2</sup>인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과

한국의 전통 대두 발효식품 청국장이 정장, 혈액순환 개선 등의 기능성식품으로 부각되고 있다. 청국장은 발효가 되면서 미생물, 효소, 다양한 생리활성물질이 크게 증가하며, 그 중에는 peptide류도 포함된다. 청국장 peptide류의 형성은 SDS-PAGE분석을 통해 확인할 수 있었다. 청국장의 수용성 아미노산 중, Tyr, Gln-Lys, Trp, Gln, Lys-Pro 등이 주요성분으로 발견되었고, Lys-Pro (0.083 mg/100 g 시료)가 HPLC에 의해 분리되었다. Lys-Pro는 angiotensin I-converting enzyme (ACE) 저해효과 (IC<sub>50</sub>=32.1 μM)를 지니고 있었다. 고혈압군이 분말청국장 20 g을 복용하고 2시간 지났을 때, 수축기 혈압은 15 mmHg, 이완기 혈압은 8 mmHg 떨어지는 강하효과가 있었다. 청국장은 ACE 저해제와 혈압강하효과를 갖고 있기 때문에 혈액순환 개선에 상당한 도움을 주는 기능성 식품으로 개발될 수 있을 것이다.

**Key words** □ angiotensin I-converting enzyme, blood pressure, Chungkookjang, peptide, HPLC

식품에는 영양분을 제공하는 측면도 있지만, 질병을 예방, 치료할 수 있는 기능성도 있다. 요즘 한국의 전통발효식품인 청국장이 혈액순환개선, 정장 등의 기능성 식품으로 크게 부각되고 있다. 청국장에서는 genistein, daidzein, glycitein 등의 isoflavone류에 의한 항산화(3), 항암효과(5, 13), 단백질 분해효소에 의한 혈전용해 효과(2, 3, 16, 17, 20), 면역증강효과(1, 2) 등이 보고되고 있다.

다른 장류식품과는 달리 청국장은 소금을 사용하지 않고 제조할 수 있다. 과도한 정제소금의 섭취가, 한국인의 높은 위암, 고혈압, 뇌졸중 등의 발생률과 관련성이 높다는 견해가 많다. 이런 점에서 청국장의 섭취는 소금의 과잉섭취를 막는다는 점에서 바람직하다.

대두가 *Bacillus* 균주에 의해 발효되면서, 청국장에는 대두에 없었던 미생물, 효소, 다양한 생리활성물질이 만들어진다(2). 대두 발효는 대부분 *B. subtilis*나 *B. licheniformis*에 의해 이루어진다(2, 14). 생리활성물질에는 단백질이 분해된 다양한 peptide류도 포함된다(6). Angiotensin I-converting enzyme (ACE)은 angiotensin II를 형성함으로써, 혈압을 높인다(10). 반면에 몇몇 peptide는 ACE 저해제로 작용하여 혈압을 떨어뜨릴 수 있다(10, 11). 본 연구에서는 청국장에서 ACE 저해제 역할을 할 수 있는 peptide를 분리하였다. 아울러 청국장을 섭취함으로써, 혈압강하 효과를 얻을 수 있는지 여부도 결정하였다.

### 재료 및 방법

#### 청국장 발효

*B. licheniformis* B1을 LB media에서 37°C에서 18시간 동안

배양한 액을 starter로 이용하였다(2). 정선된 백태를 18시간 동안 수지하고, 120°C에서 30분간 autoclave한 원료대두 500 g에다 상기균주 배양액이 1%가 되도록 접종하였다. 접종 후 40°C incubator에서 발효시켰다.

#### 시료준비

20 mg의 발효대두 시료를 1 ml의 증류수에 녹인 후 5분간 실온에서 충분히 vortexing을 해 주었다. 실온에서 10,000 × g에서 10분간 원심분리를 하고, 상층액 중 0.5 ml (3.98 mg의 수용성 단백질 포함)을 취해 진공 동결건조하였다. 이를 HPLC용 증류수에 녹였다.

#### SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Laemmli 방법 (9)에 의해 12% gel을 이용하여 수행하였다. 단백질 Band는 Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma, MO, USA)로 확인하였다.

#### 발효대두로부터의 peptide 성분 분석

발효분말 sample의 peptide 성분을 분석하기 위해 reverse HPLC (Shimadzu LC-10A instrument, Kyoto, Japan)을 이용하여 분석하였다. Column은 Cosmosil 5C18-ARII (4.6φ × 250 mm, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)를 이용하였다. Elution은 CH<sub>3</sub>CN용액의 농도를 gradient program을 이용하여 2에서 35%로 증가시키면서 수행하였고, 유속은 0.4 ml/min으로 조절하였다. 용출된 시료는 220 nm에서 흡광도를 측정하였다. 첫 번째 HPLC에서 분리한 peak를 건조하였고, 첫 번째와 같은 조건에서 2번째 HPLC를 수행하여 단일 peak여부를 최종 확인하였다. 아미노산 배열은 Shimadzu PPSQ-21 protein sequencer를 이용하여 자동 Edman

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 041-540-5624, Fax: 041-548-6231  
E-mail: hbkim@office.hoseo.ac.kr

분해법으로 결정하였다.

### ACE 저해 활성 결정

Lys-Pro (Sigma, MO, USA) (179  $\mu$ M) 50  $\mu$ l와 ACE (Sigma, MO, USA) (25 mU/ml) 100  $\mu$ l를 섞어 주었다. 여기에 Hip-His-Leu (Peptide Institute, Osaka, Japan) 100  $\mu$ l (borate buffer pH8.3)를 넣어주고 37°C에서 1 시간 반응시켰다(10). EDTA 250  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 멈추었다. Ethyl acetate 1.5 ml를 넣어주고 15초 동안 vortexing해 주고 15000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하였다. Ethyl acetate층 500  $\mu$ l를 건조시킨 후, 1 M NaCl 3 ml를 첨가하여 섞어주었다. Hippuric acid의 농도를 228 nm에서 Shimadzu UV-1200 spectrophotometer (Kyoto, Japan)를 이용하여 결정하였다.

### 혈압측정

혈압은 자동혈압계 (Omron R4 model, Omron Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 20 g의 분말청국장을 5명에게 복용하게 한 후 각각 개인당 3회 측정하여 평균값을 취하였다.

## 결과 및 고찰

### SDS-PAGE분석

청국장 발효가 진행되면, 대두 단백질이 *Bacillus protease*에 의해 분해되면서 아미노산이나 peptide류를 생성하게 된다. 발효가 진행됨에 따라 발효대두 단백질 성분의 변화를 알아보기 위해 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 증자된 대두에서는 lane 전체가 단백질로 덮일 정도였으나 그런 중에서도 대두의 주요 단백질 band가 뚜렷하게 보였다(Fig. 1). 발효가 시작된 후, 6, 12, 18, 24 시간이 지나면서 분자량이 큰 단백질이 사라지면서 작은 분자량의 것들이 증가하는 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 발효 시작 후 6시간이 지난 상태에서도, 상당량의 단백질이 분해된 것

으로 보아, 본 실험에서 사용한 균주의 단백질 분해효소 활성이 상당히 강함을 알 수 있었다. 이들 분해된 작은 분자량의 단백질에는, 다양한 생리활성을 지니는 peptide가 존재할 것으로 추정된다.

### Peptide 및 아미노산 성분 분석

Angiotension I-converting enzyme (ACE)는 angiotension I을 angiotension II로 전환시키며, angiotension II가 혈압을 높이는 것으로 알려져 있다(11). 따라서 ACE 저해제를 복용하면 혈압강하효과를 기대할 수 있으며 이러한 원리로 captopril과 같은 고혈압 치료제가 개발되어 있다. Ile-Phe-Leu, Trp-Leu, His-Leu-Leu, Ser-Tyr 등이 발효대두에서, Val-Tyr은 정어리 근육단백질의 가수분해물에서, Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro 등은 발효유에서 ACE 저해제로 보고되고 있다(8, 10, 15, 18, 19). 본 균주에 의해 제조된 분말청국장에서도 peptide성 ACE 저해제가 존재하는지 여부를 결정하였다.

분말청국장의 peptide성분을 분석하기 위해 2차례에 걸쳐 HPLC를 수행하였다. Peak 1-4, 8은 2번째 HPLC에서는 다시 발견되지 않았다. Peak 5는 Tyr (3.50  $\mu$ mol/g sample), peak 6 중, peak 6-1은 Gln-Lys (4.32 nmol/g sample), peak 6-2는 Trp (0.48  $\mu$ mol/g sample), peak 7은 Lys-Pro (3.43 nmol/g sample), peak 9-1은 Gln (0.22 nmol/g sample)으로 판명되었다(Fig. 2A, B, C). Peak7은 2번째 HPLC를 수행하여 peak7-1을 얻었고, 이의 아미노산배열을 결정하여 Lys-Pro임을 확인하였다(Fig. 2C). 이상에서 본 분말청국장에서는 Tyr, Trp가 Gln-Lys, Lys-Pro에 비해 1000 배 이상 존재하고, Gln은 Gln-Lys, Lys-Pro와 유사한 수준으로 존재함을 확인할 수 있었다.

Katsuobushi oligopeptide 중 Ile-Lys-Pro, Leu-Lys-Pro은 ACE 저해제라고 알려져 있다(19). 또한 N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro은 ACE의 기질로 알려져 있다(12). 이상의 예로 보아 본 청국장에서 발견된 Lys-Pro도 ACE 저해제로서 가능성이 있다고 보아, 화학적으로 합성된 Lys-Pro를 이용하여 ACE 저해 활성을 결정하였다. 실험결과 IC<sub>50</sub>은 32.1  $\mu$ M으로 결정되어, Lys-Pro이 ACE 저해제임을 밝힐 수 있었다. 처음에 발효대두에서, ACE 저해제로 잘 알려져 있는 Val-Tyr을 분리하려 했으나, 발견되지 않았다. NCBI Blast 검색결과,  $\beta$ -conglycinin의  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  subunit에서 Lys-Pro이 각각 발견되어, 청국장 속의 Lys-Pro성분이  $\beta$ -conglycinin 단백질로부터 유래함을 확인할 수 있었다.

ACE 저해제의 C-terminal에서는 통상 Phe, Tyr, Trp이 발견되나(10), 본 연구에서 확인된 Lys-Pro, Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro의 예와 같이 Pro를 갖고 있는 것도 적지 않게 있다(18). 아미노산보다 dipeptide 혹은 tripeptide류의 장내 흡수가 더 효율적이라고 알려져 있다(4, 11). Lys-Pro-like diacid인 non-esterified CGS 16617가 장내에서 흡수되며 대두 oil, glycerin과 같이 처리해 주면 흡수율이 더욱 증가되는 것으로 알려져 있다(7). 따라서 본 청국장의 Lys-Pro peptide도 장내흡수가 실제로 가능할 것이며, 청국장 속의 풍부한 지질류가 이의 흡수를 촉진시키는 역할도 기대할 수 있을 것이다.

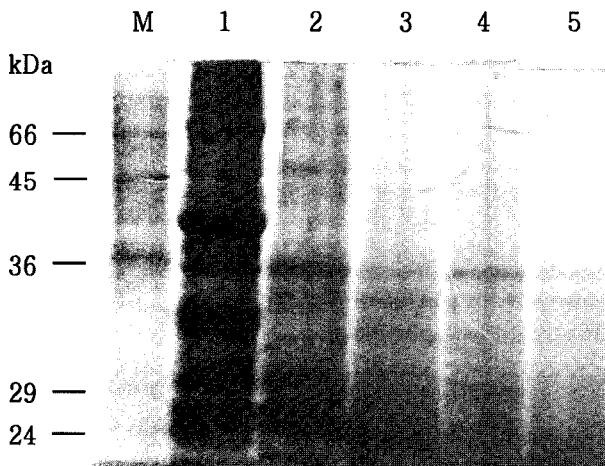
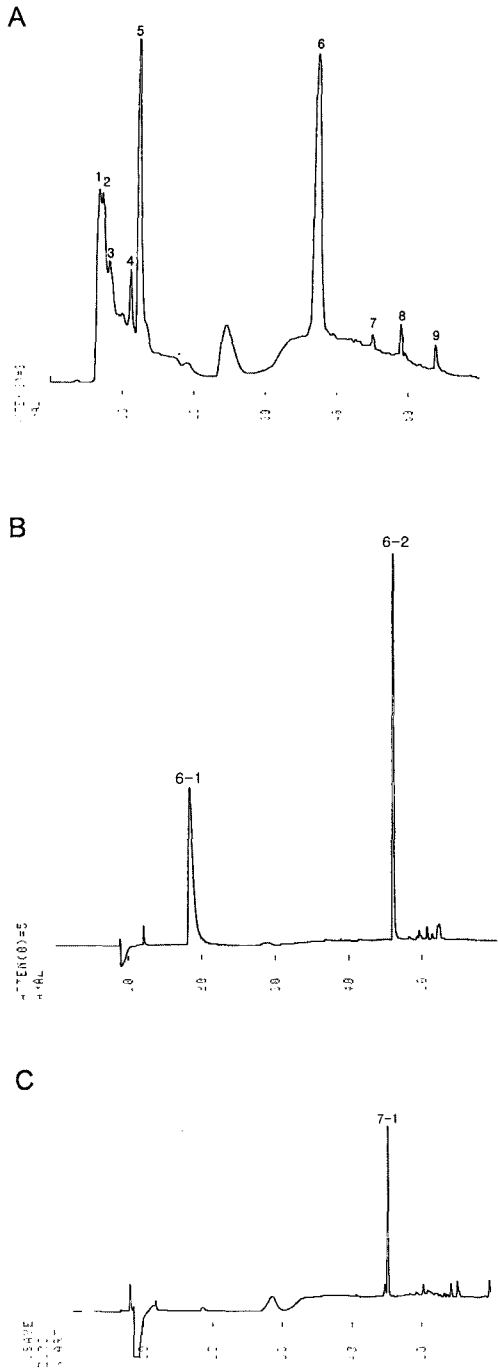


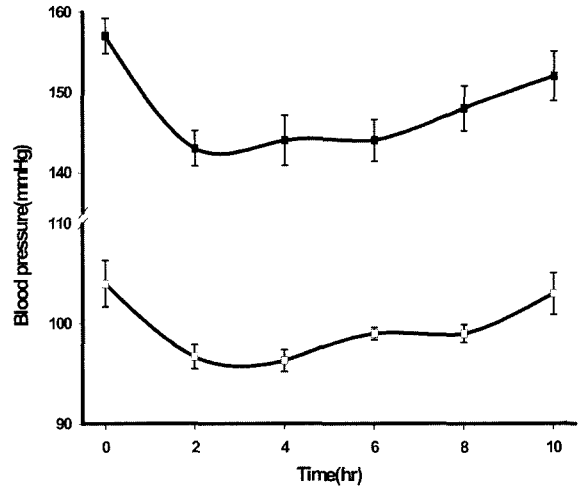
Fig. 1. SDS-PAGE of fermented soybean. Autoclaved soybeans (50  $\mu$ g of protein) were fermented for 0 (lane 1), 6 (lane 2), 12 (lane 3), 18 (lane 4), and 24 hr (lane 5) with *Bacillus licheniformis* B1. Size markers are shown in lane M.



**Fig. 2.** A. Elution profile of hydrolysate of fermented soybean. HPLC was performed to purify peptides from Chungkookjang powder. B. Purification of peak 6-1 and 6-2. The fraction containing peak 6 in Fig. 2A was rechromatographed. C. Final purification of Lys-Pro. The fraction containing peak 7 in Fig. 2A was analysed again by 2nd HPLC.

**혈압강하효과**

ACE 저해제가 포함되어 있는 본 발효대두가 실제로 인간에게서 혈압강하효과가 있는지 여부를 결정하였다. 고혈압군에게 분말청국장 20g을 섭취하게 한 후, 2시간 간격으로 10시간까지 혈



**Fig. 3.** Change in blood pressure. Systolic (■) and diastolic (□) blood pressure of the five volunteers were determined every 2 hr after the administration of 20 g of fermented soybeans. Data are the mean± SEM.

압변화를 측정하였다. 이 때 분말청국장은 소금을 전혀 포함하지 않은 것이다. 수축기 혈압은 2시간 지났을 때 15 mmHg 떨어졌고, 이완기 혈압은 2시간 지나 8 mmHg 떨어지는 양상을 보였으며, 10시간이 지나면 원래의 혈압상태로 되돌아 오는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 2시간 만에 수축기 혈압이 15 mmHg 떨어진 것은 상당한 효과라고 볼 수 있다. 또한 별도로 7명의 고혈압군을 대상으로 매일 분말청국장 20g을 한달간 복용하게 한 후 혈압을 측정해 보면, 수축기 혈압은 17 mmHg, 이완기 혈압은 6 mmHg 떨어짐을 확인할 수 있었다(자료미제시). Lys-Pro를 포함한 다양한 peptide류가 ACE의 활성을 저해함으로써 혈압을 떨어뜨렸을 가능성이 충분히 있다.

2003년도 통계청 자료에 의한 뇌졸중 사망자는 36,495명이며 심장병 사망자는 11,866명이다. 뇌졸중과 심장병 사망자 수를 합치면 연간 혈관관련 사망자 수가 암 사망자 수와 비슷하게 된다. 혈관질환 예방용 건강기능식품의 개발이 국내외적으로 시도되고 있다. 일본에서는 ACE 저해제 중 Val-Pro-Pro, Leu-Lys-Pro, Val-Try 등이 이미 혈압강하용 특정보건용식품 (FOSHU)으로 상품화되어 있다. 본 연구에서 발견된 Lys-Pro도 광범위한 임상실험을 거쳐 혈압강하용 건강기능식품으로 개발되기를 기대해 본다.

**감사의 말**

이 논문은 2004년도 호서대학교 학술연구구성비와, 과학기술부 한국과학재단 지정 지역협력연구센터인 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

**참고문헌**

1. 이봉기, 장운수, 이숙이, 정건섭, 최신양 1997. 된장 추출

- 물의 면역조절 기능과 그 작용기전. *Kor. J. Immunol.* 19, 559-569.
2. 이재중, 이동석, 김한복. 1999. *Bacillus licheniformis* B1에 의한 청국장 및 간장발효. *미생물학회지* 35, 296-301.
  3. 유형재, 이동석, 김한복. 2004. 보리, 쑥, 다시마, 대두 혼합물의 청국장 발효. *미생물학회지* 40, 49-53.
  4. Chun, H., M. Sasaki, Y. Fujiyama, and T. Bamba. 1996. Effect of peptide chain length on absorption and intact transport of hydrolyzed soybean peptide in rat intestinal everted sac. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 21, 131-140.
  5. Hirota, A., S. Taki, S. Kawaii, M. Yano, and N. Abe. 2000. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso toward the cancer lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1038-1040.
  6. Kiers, J.L., A.E.A. van Laeken, F.M. Rombouts, and M.J.R. Nout. 2000. *In vitro* digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 163-169.
  7. Kim, J.S., R.L. Oberle, D.A. Krummel, J.B. Dressman, and D. Fleisher. 1994. Absorption of ACE-inhibitors from small intestine and colon. *J. Pharm. Sci.* 83, 1350-1356.
  8. Kuba, M., K. Tanaka, S. Tawata, Y. Takeda, and M. Yusuda. 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1278-1283.
  9. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
  10. Matsui, T., C.H. Li, and Y. Osajima. 1999. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J. Peptide Sci.* 5, 289-297.
  11. Matsui, T., K. Tamaya, E. Seki, K. Osajima, K. Matsumoto, and T. Kawasaki. 2002. Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 29, 204-208.
  12. Rhaleb, N.E., H. Peng, X.P. Yang, Y.H. Liu, D. Mehta, E. Ezzan, and O.A. Carretero. 2001. Long-term effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on left ventricular collagen deposition in rats with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Circulation* 103, 3136-3141.
  13. Sarkar, F.H. and Y. Li. 2002. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev.* 21, 265-280.
  14. Sarkar, P.K., B. Hasenack, and M.J.R. Nout. 2002. Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (Indian Kinema) and locust beans (African Soumbala). *Int. J. Food Microbiol.* 77, 175-186.
  15. Shin, Z.I., R. Yu, S.A. Park, D.K. Chung, C.W. Ahn, H.S. Nam, K.S. Kim, and H.J. Lee. 2001. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3004-3009.
  16. Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi, and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* 84, 139-143.
  17. Suzuki, Y., K. Kondo, Y. Matsumoto, B. Zhao, K. Otsuguro, T. Maeda, Y. Tsukamoto, T. Urano, and K. Umemura. 2003. Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. *Life Sci.* 73, 1289-1298.
  18. Yamamoto, N., A. Akino, and T. Takano. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy. Sci.* 77, 917-922.
  19. Yokoyama, K., H. Chiba, and M. Yoshikawa. 1992. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1541-1545.
  20. Urano, T., H. Ihara, K. Umemura, Y. Suzuki, M. Oike, S. Akita, Y. Tsukamoto, I. Suzuki, and A. Takada. 2001. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type I. *J. Biol. Chem.* 276, 24690-24696.

(Received November 5, 2004/Accepted November 24, 2004)

**ABSTRACT : Isolation of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Chungkookjang Toshiro Matsui<sup>1</sup>, Hyung Jae Yoo, Jae Sung Hwang, Dong Seok Lee<sup>2</sup>, and Han Bok Kim\***  
(Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795 Korea, <sup>1</sup>Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan, <sup>2</sup>Department of Medical Laboratory Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea)

Chungkookjang, Korean traditional fermented soybean food emerges as a functional food to improve intestinal function and blood circulation. During Chungkookjang fermentation, microorganisms, enzymes, and diverse bioactive compounds increase sharply. Chungkookjang contains diverse oligo-peptides. Formation of peptides was confirmed by SDS-PAGE. Soluble fermented soybean in our sample contained Tyr, Gln-Lys, Trp, Gln, and Lys-Pro as major components. Lys-Pro (0.083 mg/100 g sample) was purified by HPLC analysis. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) causes hypertension by converting angiotensin I to angiotensin II. ACE inhibitory activity of Lys-Pro was determined to be  $IC_{50}=32.1 \mu M$ . Whether or not eating Chungkookjang can lower blood pressure was also determined. Systolic blood pressure dropped by 15 mmHg, and diastolic blood pressure by 8 mmHg 2 hr after a single administration of 20 g of fermented soybean. Chungkookjang might be helpful in improving blood circulation since it has ACE inhibitor and antihypertensive effect.