

항고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해제를 생산하는 새로운 효모의 선별 및 저해물질 최적 생산조건

강민구¹ · 김하근^{1*} · 이성훈² · 임성일² · 이종수¹

¹배재대학교 생명유전공학과, ²한국식품연구원

Screening New Antihypertensive Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor -Producing Yeast and Optimization of Production Condition

Min-Gu Kang¹, Ha-Kun Kim^{1*}, Sung-Hun Yi², Sung-Il Lim² and Jong-Soo Lee¹

¹Department of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

²Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

(Received 8, November 2011., Accepted 14, November 2011)

ABSTRACT: Forty eight strains of yeast were cultured in potato dextrose(PD) broth at 30°C for 24 hr and centrifuged with 12,000 rpm for 20 min. After concentrated the cultures, antihypertensive angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibitory activities of its concentrates were investigated. Among them, the concentrates from *Saccharomyces cerevisiae* Y183-3 showed the highest ACE inhibitory activity of 71.8%. The ACE inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae* Y183-3 was maximally produced when *Saccharomyces cerevisiae* Y183-3 cultured in PD broth at 30°C for 36 hr.

KEYWORDS : Antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor, Potato dextrose broth, *Saccharomyces cerevisiae* Y183-3

서 론

인체 내에서의 혈압 조절 기작중의 하나인 renin-angiotensin 계에서 혈압 상승과 유지에 중요한 작용을 하는 효소가 angiotensin I-converting enzyme(ACE; peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3.4.15.1)이다(Soffer, 1976). 이 효소는 두 가지 반응을 촉매 하여 혈압 조절에 관여하는데, 먼저, 혈류 장애시 신장 사구체 세포에서 분비되는 레닌이 angiotensinogen에 작용해서 불활성 decapeptide인 angiotensin I을 생성하며 이들은 다시 ACE가 C 말단의 His-Leu를 분해시켜 octapeptide인 angiotensin II로 전환을 시킨다. 이렇게 생성된 angiotensin II는 angiotensin II 수용체와 결합하여 동맥 등을 수축시켜 직접 혈관 수축을 일으킨다. 또한, 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 분비를 촉진시키는 결과 나트륨과 수분이 조직 내 보존을 증가시켜 혈액량이 증가함으로써 혈압을 상승시키게 된다. 두 번째는 ACE가 강한 혈관 확장 작용을 가지는 bradykinin을 불활성화 시킴으로써 혈압을 상승시키는 역할을 한다고 알려져 있다(Soffer, 1976, Ganong, 1997).

고혈압 치료(예방)물질 중의 하나로 지금까지 연구, 개발된 ACE 저해제들은 각종 단백질 가수분해물(Rhyu et al.,

1996)과 무화과 유액(Maruyama et al., 1989)등의 식물추출물들, 한국 전통 민속주(김 등, 2002), 청주와 그 부산물(Saito et al., 1992, 1994) 등으로부터 ACE 저해제가 보고되었다. 특히 필자등은 최근 *Saccharomyces cerevisiae* (Kim et al., 2004)와 *Malassezia pachydermatis* G-14(Jeong et al., 2005)등의 효모와 왕송이 버섯(Lee et al., 2004), 비늘 버섯(Koo et al., 2006), 노랑느타리 버섯(Jang et al., 2011)등의 다양한 버섯에서 peptide 계통의 ACE 저해물질들을 분리하여 보고 하였다.

한편, 효모는 진핵세포를 갖고 있는 고등 미생물로서 몇 종을 제외한 대부분이 비병원성 이므로 이미 오래전부터 주류 발효 등의 식품 생산에 매우 유용하게 이용되어 오고 있다. 또한 세포 생리학적 연구가 다각적으로 자세히 진행되어 각종 대사산물의 생성 및 분비 기작이 구명되어 숙주 등의 분자생물학적 연구재료로도 이용되고 있다(Kim et al., 2004). 최근 효모로부터 생리기능성 물질의 생산에 관한 관심이 고조되고 있고 필자등도 알콜 발효균인 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 항고혈압성 ACE 저해물질(Kim et al., 2004)과 항치매성 β -Secretase 저해물질(Lee et al., 2007) 등의 생리활성 물질 생산에 관한 연구 결과를 보고한바 있다. 그러나 아직까지 항고혈압성 ACE 저해 활성이 우수하면서

*Corresponding author <E-mail : hakun@pcu.ac.kr>

비교적 높은 ACE 저해물질 생산성을 가진 유용 효모의 탐색과 이들의 산업적 이용은 매우 미진한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 효모를 이용하여 비교적 가격이 저렴하고 부작용이 없으면서 약리 효능이 우수한 고혈압 예방 제품을 개발하고자 한국 식품연구원에서 발효식품에서 분리, 동정한 효모들을 대상으로 이들의 potato dextrose broth 배양 농축물들을 제조한 후 이들의 항고혈압성 ACE 저해 활성을 측정하여 우수 효모를 선정하였다. 또한 이들로부터 ACE 저해제 생산 최적 배양 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

효모, 효소 및 시약

본 실험에서 사용한 효모들은 한국 식품연구원에서 각종 발효 식품으로부터 분리, 동정한 균주들로서 시료 효모들을 PD broth에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 세포를 초음파 균체파쇄기로 파쇄하고 다시 동결건조시켜 분말로 하여 사용하였다.

ACE 저해활성 측정을 위한 안지오텐신전환효소(ACE)는 ACE rabbit lung acetone powder(Sigma Co., USA)를 인 산완충용액(pH 8.3)으로 12시간 추출하여 사용하였고, 기 질로는 hippuryl-L-histidyl-L-leucine(Hip-His-Leu, Sigma Co., USA)을 사용하였다. 기타 일반 시약들은 일급 또는 특급품을 사용하였다.

ACE 저해활성 측정

Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 일부 변형하여 다음과 같이 ACE 저해 활성을 측정하였다. 즉, 시료 50 µl에 ACE 용액 150 µl(2.8 unit)와 100 mM sodium borate buffer (pH 8.3) 100 µl를 가한 후, 37°C에서 10분간 preincubation 시켰다. 여기서 기질로서 Hip-His-Leu 용액 50 µl를 가하여 다시 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 250 µl를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 1 ml를 가하여 30초간 vortexing한 다음 3,000 ×g으로 15분 동안 원심 분리 후 상층액 0.8 ml를 취하였다. 이 상층액을 speed vac concentrator(EYELA Co., Japan)을 이용하여 완전히 건조시킨 뒤 동일건조의 sodium borate buffer 1 ml를 가하여 용해시켜 228 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같이 ACE 저해 활성을 계산하였다.

$$\text{ACE inhibitory activity(\%)} = (C - T/C - B) \times 100$$

C : 시료대신 증류수 첨가시 228 nm에서의 흡광도

T : 시료 첨가시의 흡광도

B : 반응정지 후 시료 첨가시의 흡광도

배양온도와 시간의 영향

선발균주를 PD broth에 접종하여 25°C와 30°C에서 24시간

배양하여 온도의 영향을 검토하였고 최적온도에서 48시간 배양하면서 경시적으로 생육도(A_{660})와 ACE 저해활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

각종 효모 배양 농축물들의 ACE 저해 활성

시료 효모들의 PD broth 배양 농축물들에 대한 각각의 ACE 저해활성을 측정한 결과 Table 1과 같이 *Saccharomyces*

Table 1. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of the concentrates from various yeast cultures

Yeasts		ACE inhibitory activity (%)
<i>Clavispora lusitaniae</i>	Y263-5	55.9(± 0.3)
<i>Clavispora lusitaniae</i>	Y218-1	54.4(± 0.4)
<i>Clavispora lusitaniae</i>	Y135-7	53.9(± 0.4)
<i>Pichia anomala</i>	Y103-4	40.3(± 0.5)
<i>Pichia anomala</i>	Y94-3	65.2(± 0.2)
<i>Pichia anomala</i>	Y165-9	33.6(± 0.5)
<i>Pichia anomala</i>	Y129-1	65.5(± 0.2)
<i>Pichia burtonii</i>	Y86-5	29.6(± 0.2)
<i>Pichia burtonii</i>	Y197-9	38.9(± 0.4)
<i>Pichia burtonii</i>	Y257-7	41.7(± 0.5)
<i>Pichia caribbica</i>	Y101-4	45.8(± 0.4)
<i>Pichia caribbica</i>	Y162-8	66.4(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y16-4	61.7(± 0.7)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y54-3	56.9(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y64-3	34.7(± 0.4)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YH1-5	54.9(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y277-3	62.1(± 0.3)
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Y277-10	64.9(± 0.2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y270-12	61.4(± 0.2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y88-4	62.3(± 0.4)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y89-1-1	57.1(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y89-1-3	48.2(± 0.4)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y89-3-1	57.8(0.6)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y89-5-2	61.7(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y89-5-3	57.2(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y90-2	68.9(± 0.1)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y90-5	71.2(± 0.4)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y90-9	66.4(± 0.6)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y90-14	70.6(± 0.2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y91-2	64.1(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y91-5	49.3(± 0.4)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y98-2	63.0(± 0.3)

Table 1. Continued

Yeasts		ACE inhibitory activity (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y98-4	70.3(± 0.2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y98-5	70.6(± 0.2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y99-7	62.4(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y99-8	63.2(± 0.2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y109-3	63.8(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y111-5	64.3(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y113-4	54.6(± 0.4)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y113-8	68.2(± 0.2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y114-5	60.1(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y157-1	46.3(± 0.4)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y268-3	63.2(± 0.2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y172-8	47.0(± 0.4)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y183-2	67.5(± 0.3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y183-3	71.8(± 0.2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YH4-2	69.2(± 0.4)
Uncultured compost fungus	Y270-3	67.6(± 0.3)

cerevisiae Y183-3 배양 농축물이 71.8%로 가장 높았고 *Saccharomyces cerevisiae* Y90-5(71.0%), Y98-5(70.6%), Y98-4(70.3%) 등도 비교적 우수한 활성을 보였다. 이와 같은 ACE 저해활성은 필자등이 보고한 알콜발효 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 ACE 저해활성 42.1%(Kim *et al.*, 2004)와 자연계에서 분리, 동정한 *Malassezia pachydermatis* G-14의 48.9%(Jeong *et al.*, 2005), 비늘 버섯 ASI 24012의 66%, 잎새버섯 ASI 9021의 61% (이 등, 2003), 왕송이버섯의 61.3%(Lee *et al.*, 2004) 등 보다 높은 ACE 저해활성이었다.

ACE 저해 물질의 최적 생산 조건

ACE 저해활성이 가장 높았던 *Saccharomyces cerevisiae* Y183-3로부터 ACE 저해물질을 대량으로 얻기 위해 최적 생산 조건으로 배양온도의 영향을 조사한 결과 25°C와 30°C에서 24시간 배양했을 때, 생육은 큰 차이가 없었으나 ACE 저해 활성은 각각 59.4%와 68.8%를 보여 30°C가 더 좋았다(data not shown). 또한 30°C에서 배양시간의 영향을 검토한 결과 Fig. 1과 같이 30°C에서 36시간 배양하였을 때 가장 높은 ACE 저해 활성을 보였으며 배양시간이 길어짐에 따라 저해활성이 거의 변화가 없었다. 또한 효모용 배지로 많이 이용되고 있는 Yeast ext.-Peptone-Dextrose(YPD) 배지에 선발효모를 접종하여 24시간과 36시간 배양하였을 때 65.7%와 63.3%를 보여 PD배지에서의 배양이 더 좋은 것으로 나타났다. 따라서 ACE 저해제 생산 최적 조건은 선발 균주를 PD broth에 접종하여 30°C에서 36시간 배양하는

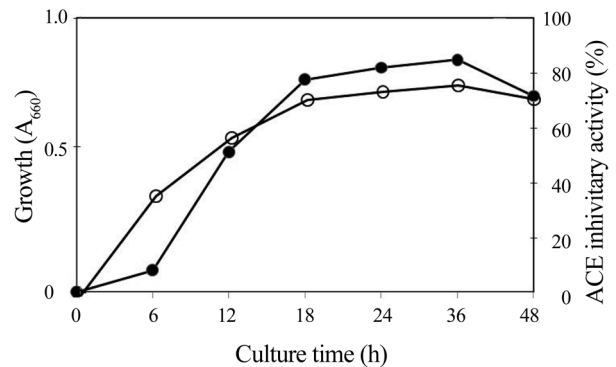


Fig. 1. Effect of cultural time on the production of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae* Y183-3 (○ : ACE inhibitory activity; ● : Cell growth).

것이며 이때 ACE 저해활성이 74.5%이었다.

이상의 결과들을 종합했을 때 본 연구에서 최종 선발된 *Saccharomyces cerevisiae* Y183-3이 현재 막걸리 가양주 제조시 이용되고 있는 K누룩에서 분리, 동정된 균으로 안전하고 항고혈압활성이 71.8%로 다른 효모나 버섯류보다 높은점 등으로 볼 때 앞으로 항고혈압성 건강소재를 생산하는 효모자원으로 매우 유용할 것으로 사료된다.

적요

항고혈압 효능이 우수하며 부작용이 없는 새로운 고혈압 예방 소재를 개발하고자 한국 식품연구원에서 분리, 동정한 48종의 효모들의 PD broth 배양 농축물들을 대상으로 angiotensin 전환효소(ACE) 저해활성을 조사하여 활성이 우수한 효모들을 선정한 다음 ACE 저해물질의 생산 최적 조건을 검토하였다. ACE 저해활성은 *Saccharomyces cerevisiae* Y183-3 균주의 PD broth 배양 농축물이 71.8%의 가장 높은 ACE 저해활성을 보여 최종 우수 균주로 선발하였다. 그리고 이 Y183-3 효모를 30°C에서 36시간 PD broth에 배양했을 때 ACE 저해물질이 가장 많이 생산되었다.

감사의 글

이 연구는 2011년 한국 식품연구원의 연구비지원에 의하여 진행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 이대형, 김재호, 정종천, 공원식, 유영복, 박정식, 유창현, 이종수. 2003. 각종 버섯류로부터 안지오텐신 전환효소 저해제의 탐색. 한국균학회지. 31:148-154
- 김재호, 이대형, 최신양, 이종수. 2002. 전통민속주의 생리기능성 탐색. 한국식품과학회지. 34:118-122.
- Cushman D. W. and Cheung H.S. 1971. Spectrophotometric assay

- and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20:1637-1648
- Ganong, W. F. 1997. Review of medical physiology. *Appleton and Lange* (New jersey, USA) pp. 425-460
- Jang, J. H., Jeong, S. C., Kim, J. H., Lee, Y. H. Ju, Y. C. and Lee, J. S. 2011. Characterization of new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Pleurotus cornucopiae*. *Food Chemistry* 127:412-418
- Jeong, S. C., Kim, J. H., Kim, N. M. and Lee, J. S. 2005. Production of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Malassezia pachydermatis* G-14. *Mycobiol.* 33:142-146.
- Koo, K. C., Lee, D. H., Kim, J. H., Yu, H. E., Park, J. S. and Lee, J. S. 2006. Production and characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Pholiota adiposa*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:757-763.
- Kim, J. H., Lee, D. H., Jeong, S. C., Chung, K. S. and Lee, J. S. 2004. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:1318-1323.
- Lee, D. H., Lee D. H. and Lee, J. S. 2007. Characterization of new antidementia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbiol Technol.* 42:83-88.
- Lee, D. H., Kim, J. H., Park, J. S., Choi, Y. J. and Lee, J. S. 2004. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 25:621-627.
- Maruyama, S., Miyoshi, S. and Tanaka, H. 1989. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from *Ficus carica*. *Agric. Biol. Chem.* 53:2763-2769.
- Rhyu, M. R., Nam, Y. I. and Lee, H. Y. 1996. Screening of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in cereals and legumes. *Food & Biotechnol.* 5:334-337
- Saito Y., Wanezaki, K., Kawato, A. and Imayasu, S. 1994. Structure and activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58:1767-1771.
- Satio, Y., Nakamura, K., Kawato, A. and Imayasu, S. 1992. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in sake and its by products. *Nippon Nogeikagakuikaishi* 66:1081-1087.
- Soffer, R. L., 1976. Angiotensin I-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 45:73-94.