

알로에 아세틸만난의 ACE (Angiotensin Converting Enzyme) 저해효과 및 동력학적 분석

류일환 · 신용서*

김정문 알로에 과학연구소, *고려대학교 생명공학원

Inhibition Effect of ACE (Angiotensin Converting Enzyme) and Kinetics of Aloe Acethylmannan

Il Whan Ryu and Yong Seo Shin*

R & D Center, Kim Jeong Moon Aloe Co., Ltd.

*The Graduate School of Biotechnology, Korea University

Abstract

This study was researched to purify and characterize variety bioactive material acethylmannan from *Aloe vera*. Purified acethylmannan was mannose (67%), acetyl group (23%) and the rest glucose, galactose that consisting of long chain polydispersed β -1,4 linked mannan polymers. The sugar and acetyl group in molecular were linked molar ration one third. IC_{50} value (i.e that concentration which exhibits 50% more enzyme inhibition than control) on angiotensin converting enzyme were 0.58 mM. This compound were found to be a competitive inhibition of Angiotensin Converting Enzyme with apparent K_i values of 0.068 mM.

Key words: *aloe vera*, acethylmannan, angiotensin converting enzyme inhibition, IC_{50} value, K_i values

서 론

알로에는 방사성에 의한 피부 상처 치료와 바이러스성 감염에 살균 작용을 갖고 있으며 소화 기관 장애에 효과 있는 유용한 식물로 알려져 왔다⁽¹⁾. 알로에의 화학적 조성은 anthraquinone 유도체와 만노오즈, 글루코오즈가 주성분인 폴리사카라이드, 각종 아미노산 (glutamic acid, arginine, asparagine), 지질(iosprenoids, alkane, n-alkyl alcohol, fatty acids, ester) 및 mineral (K, Na, Mn, Ca) 등 100 여종이 보고되어있다⁽²⁻⁴⁾. 알로에의 생리활성에 관한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으나 활성 물질의 정체는 명확히 밝혀져 있지 않다. 최근 알로에의 생리 활성 물질로서 겔내에 존재하는 다당체가 연구의 초점이 되고 있다. 이미 알로에 다당체는 Kawashima 등에 의해 소염, 방사성 치료에 효과 있는 물질로 보고 된 바 있고^(1,5) Yagi는 *Aloe Saponaria* 에서 다당체인 acemannan I, II (acethylmannan I, II)을 분리하였고⁽⁶⁾, Hart 등은 정제 다당류(MW 220,000~

320,000)가 주로 mannose를 포함하고 in vitro의 인간 pooled serum에서 Zymosan opsonization을 억제하고, 특정 항체 생성에서 adjuvant 활성을 보이는 것은 gel의 면역 증강에 의한 감염상처 치료임을 제안하였다⁽⁷⁾. Mcanally는 분자량 100,000 또는 10,000 dalton 이상의 아세틸화된 만노오즈 다당체인 Acemannan을 분리 하여 화상, 피부 와 위장관의 장애의 치유 효능을 검증 하였다. 이 물질은 조직 배양물 아섬유의 증식을 48시간내에 300%증가시키고, 아섬유 핵의 DNA 합성을 증가 시켜 치료과정의 기본 단계인 대사 활성화와 세포 증식 속도를 증가시키며 배양된 암세포에서도 저해 효능을 나타냈다. 캐나다의 AIDS 환자에게 AZT (azidotimidine)와 함께 투여시 면역 저하를 적극적으로 개선시키는 효과를 나타냈으며 미국의 FDA (Food & Drug Association)에게서 그 안전성을 인정 받았다⁽⁸⁻¹⁴⁾.

한편 Akira 등⁽¹⁵⁾은 *Aloe saponaria* Hwa와 *aloe aborescens* var. *natalensis*로부터 당단백을 분리하고 antibradykinase material로 보고한 이외에 aloe 다당질에 대한 구체적인 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 재배된 알로에 배라로부터 생리활성 물질인 Acethylmannan의 물리화

Corresponding author: Il Hwan Ryu, R&D Center, Kim Jeong Moon Aloe Co., Ltd, 512-4 Jangsan-ri, Susin-myeon, Cheonan-si, Chungcheongnam-do 330-880, Korea

학적 특성을 규명하고, 이물질의 Angiotensin Converting Enzyme 저해능을 탐색하고 그 동력학적 분석을 행하였다.

재료 및 방법

재료

Aloe vera 생잎은 (주)김정문 알로에의 김제 농장에서 재배한 1 kg 이상의 잎을 사용 하였으며 수확한지 12시간 이내의 것을 사용하였다.

Acethylmannan의 추출에 사용된 에탄올 및 무기염은 Junsei사 제품을 사용하였으며, protease는 Sigma사 제품을 사용하였다.

알로에 베라로부터 Acethylmannan 분리 정제

생잎 3.5 kg을 깨끗이 물로 세척하고 외피를 제거한 후 내부의 겔을 Homogenizer로 100 rpm에서 20초간 분쇄하여 발생한 기포는 4°C 냉장고에 2시간 가량 방치하여 가라 앉았다.

겔층은 8,000×g, 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 6 N HCl 용액 5~15 mL 혼합 pH 3.2로 조절한 후, 차가운 4배의 에탄올을 서서히 첨가하고 30분간 교반하여 2시간 실온에서 방치한 후 침전물을 4,000×g에서 20분간 원심 분리하여 침전물을 수득하였다.

에탄올 침전물을 동결건조하고 분말화하여 실험에 사용하였다. 동결건조 시료를 pH 7.5 sodium phosphate 완충용액에 녹이고 일정량의 protease (Sigma Co.)를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켜 내부에 존재하는 단백질을 제거하였다. 반응물은 cellulose tubing (Sigma Co.)을 사용하여 증류수로 48시간 투석을 행하였다. 투석 처리된 용액은 YM-10 ultrafilter (>10,000)을 사용한 ultrafiltration system (Satorius satocon mini & Amicon 8400)을 이용하여 분자량 10,000 dalton 이상의 분획을 모으고 동결건조하여 백색의 분말을 얻었다.

Melting point 304°C, Sugar 67%, Mannose 60%, acetyl 23%, Ash 6%, Iodine test negative, IR $v_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ (H₂O) 3435 cm⁻¹ (O-H), 1746 cm⁻¹ (C=O), 1244 cm⁻¹ (C-O-C), 895 cm⁻¹ (C1-H).

아세틸 그룹 정량

Hestrin법⁽⁶⁾에 의하여 실험 하였으며 시료 1 mL을 취하고 알칼리성 hydroxylamine시약 (2 M Hydroxylamine · HCl과 3.5 N NaOH의 1:1 혼합용액) 2 mL를 가하여 pH가 약 1.2가 되도록 조정하고 1 mL FeCl₃

용액(FeCl₃ · 6H₂O 10 g을 0.1 N HCl에 용해)을 가하고 540 nm에서 흡광도를 측정 한 후 다음의 계산식을 이용하여 acetyl group을 정량 하였다.

$$\text{acetyl content (\%)} = \frac{\text{At} \times \text{Cs} \times \text{Ma} \times 100 \times 0.91}{\text{As} \times \text{Ws} \times \text{Vs}}$$

At=시료의 흡광도 As=표준시료 (acetyl chlorine chloride)의 흡광도

Cs=표준시료의 농도 Ma=Acetyl의 분자량 Ws=시료의 무게

Vs=시료의 부피

구성성분의 정량

당정량은 phenol-sulfuric acid법⁽⁷⁾으로 비색정량 하였으며, 단백질은 Lowry 등⁽⁸⁾의 방법에 따라 측정하였다. 회분은 식품공전⁽⁹⁾에 준하여 측정하였으며, 점도는 Brookfield (DV-II 점도계를 사용하였으며, 측정 조건은 spindle은 LV 1, speed 60 rpm이며 temperature 17°C이다.

만노오즈 정량은 Hassid법⁽²⁰⁻²¹⁾에 의하여 시료 2 mg을 100°C에서 1시간동안 6 N 황산으로 가수분해 한 후 아세트산 1.5 mL과 페닐하이드라진 1.0 mL으로 100°C에서 30분간 반응시켜 실온 방치하여 결정을 유도하였다. 유도된 결정용액을 여과하여 정제와 여액으로 나누고 각각을 60% 에탄올을 사용하여 2회 재결정하여 그 양을 결정하였다.

Gas chromatography

시료 2 mg을 2 M TFA (Trifluoroacetic acid) 1 mL에서 120°C 1시간동안 가수분해 시킨 후 NaBH₄ (in 50% Metanol) 용액 1 mL를 가하고 실온에서 1시간 환원 반응 후 pyridine 1 mL, acetic anhydride 1 mL, 120°C 20분간 재반응시켜 alditol acetate 유도체를 얻었다. 얻은 유도체를 column temperature는 250°C, Detector (HP 5890 Series 2) temperature는 300°C 그리고 flow rate 1 mL/min 의 조건에서 chromatography를 행하였다⁽²²⁾.

IR 스펙트럼

FT-IR spectrophotometer를 사용하여 4,000-200 cm⁻¹의 범위에서 KBr 가압 정제법으로 측정하였다.

구성당의 결합양상

시료 10 mg을 10 mM sodium metaperiodate 100 mL을 가하여 4°C 암실에서 7일간 산화를 행하면서 경시적으로 채취하여 과요오드 음이온(IO₃⁻) 소비량을 분광

광도법⁽²³⁾으로 구하였다. 그리고 Formic acid 생성량은 0.5% 페놀프탈레인용액을 사용하여 1 mM NaOH로 적정한 후 구한다. 환원은 0.1 g의 sodium borohydride로 12시간 반응하였으며 과량의 환원 시약은 0.1 N HCl용액으로 분해하여 2일간 투석을 행하였다.

$$\text{포름산 생성량(몰 수)} = \frac{[\text{소비된 알칼리의 양 (mL)}] \times [\text{사용한 알칼리의 농도 (N)}] \times [\text{시료전체양 (mL)}]}{[\text{채취시료의 양 (mL)}] \times (1,000)}$$

얻어진 polyol 다당을 6 N HCl로 100°C 용액에서 2시간 가수분해하고 이를 중화하여 얻은 시료 일부를 paper chromatography 하였다.

Paper chromatography는 각 시료의 산 가수분해물을 Whatman No. 1 여지로 n-BuOH:pyridine:water (6:4:3, v/v/v)의 용매계에 전개한 후 풍건하여 alkaline silver nitrate 시약으로 발색하여, 산화된 여지 부분은 5% sodium thiosulfate 용액에 담구어 제거하였다.

분자량의 측정

분자량은 gel chromatography에 의한 Cooper의 방법⁽²⁴⁾에 준하여 측정하였다.

0.4 M NaCl용액으로 평형시킨 sephadex G-200 column (2.5×80 cm)에 표준당 용액을 충전하고 0.4 M NaCl 용액으로 용출하여 용출부피로부터 표준곡선을 작성하였으며, 동일 column에 acethylmannan을 충전하고 상기 용출액으로 용출하였다. 용출물을 phenol-sulfuric acid법⁽²⁵⁾으로 당을 측정하여 elution volume를 구하였으며, 분자량은 표준당 분자량의 대수 값과 용출 부피를 도시하여 얻어지는 표준곡선으로부터 결정하였다.

ACE의 조제

Rabbit lung acetone powder (Sigma Co.)를 10배 volume의 50 mM sodium borate buffer (pH 8.3)로 현탁하고 4°C에서 homogenation하여 효소를 추출하고 이것을 40,000×g에서 40분간 원심분리하여 그 상등액을 crude ACE로 사용하였다.

ACE 저해 활성 측정

저해활성 측정은 Cushman⁽²⁵⁾과 Saito방법⁽²⁶⁾을 개량하여 사용하였다. 알로에 acethylmannan을 sodium borate buffer (pH 8.3)에 최종 농도가 0.1~1.0 mM이 되게 조절한후 기질을 넣지 않은 assay mixture와 37°C

에서 30분간 preincubation 시킨후 기질로 6.5 mM HHL (Hippuryl-His-Leu)을 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응후 1 N HCl 0.25 mL를 첨가하여 반응을 정지시키고, 이용액에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하고 10분간 hippuric acid를 추출한후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하고 ethyl acetate 층 1.0 mL를 조심스럽게 취하여 temp-block을 사용하여 90°C에서 1시간 농축하여 용매를 제거한후 50 mM sodium borate buffer (pH 8.3) 1 mL를 넣어 hippuric acid를 녹이고 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

저해율 (%) =

$$1 - \frac{\text{시료의 hippuric acid 생성량}}{\text{blank의 hippuric acid 생성량}} \times 100$$

ACE 저해제의 동력학적 분석

ACE에 대한 알로에 acethylmannan의 저해형식을 구하기 위하여 acethylmannan의 농도(0~1.0 mM)를 달리하여 기질을 넣지 않고 30분간 전반응 시킨후 기질 농도(0~6.5 mM)를 달리하여 30분간 반응시켜 효소활성을 측정하였고 Lineweaver-burk plot하여 저해양상을 조사하였다. 또한 acethylmannan의 ACE에 대한 저해상수(K_i)를 구하기 위하여 Dixon식을 이용하여 서로다른 기질 농도의 직선들의 교점인 X좌표값으로부터 저해상수를 구하였다.

결과 및 고찰

아세만난 분리 및 정제

Aloe vera 생잎 3.5 kg으로부터 일련의 정제과정(Fig. 1)을 통해 acethylmannan 건조분말 0.9 g (yield 0.025%)을 얻었다. 정제 acethylmannan의 acetyl group은 Table 1과 같이 23%였으며 63%의 당으로 구성되어 있고 3%의 단백질과 5%의 회분으로 구성되어 있었다.

이러한 결과로 *Aloe vera*로부터 분리한 acethylmannan은 당 3개의 분자당 하나의 acetyl group을 갖고있는 것으로 판단하였다. 1 mg/mL 농도에서 점도는 4.6 mPa·s이며 Hassid법에 의한 만노오즈 정량에서는 폴리사카라이드 가수분해물과 페닐하이드라진 반응에서 osazone 형성에 대한 수득율은 aloe acethylmannan의 mannosephenylhydrazone은 60%, glucosephenylhydrazone은 8%로 나타났다.

Gas chromatography

Acethylmannan의 alditol acetate 유도체의 GC측정은 retention time이 mannose는 12분, galactose는 13분,

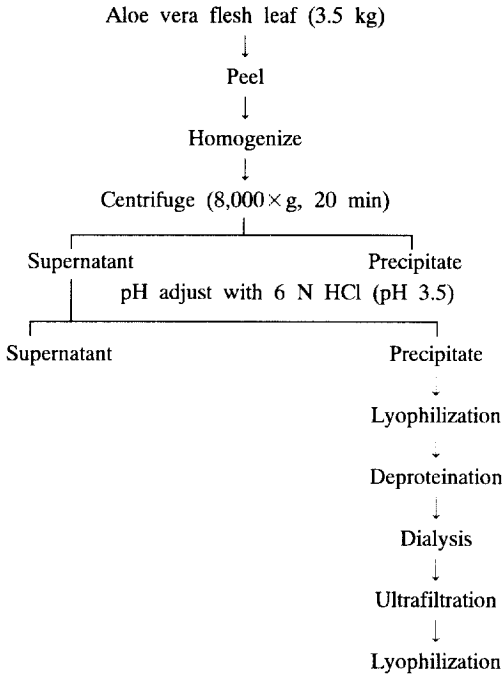


Fig. 1. Isolation diagram of Aloe acethylmannan.

Table 1. Composition of Aloe acethylmannan

Content of Acemannan (%)					
Sugar	Mannose	Glucose	Acetyl group	Protein	Ash
VAM-1 67±0.5	60±0.5	8±0.5	23±0.5	3±0.5	6±0.5

glucose는 15분으로 나타났다. mannose와 galactose의 면적 ratio는 34, mannose와 glucose 면적 ratio는 16이였다.

IR spectrum: IR spectrometer 측정에서는 3435 cm⁻¹ 주위에서 O-H stretching에 기인한 강한 흡수를 나타내었다. 카보닐 및 아세틸 그룹의 C-O-C stretching은 각각 1746 cm⁻¹, 1244 cm⁻¹,에서 관찰되었으며, 895 cm⁻¹의 peak에 의해 C₁-H이 존재함을 알수 있어 아세만난이 β-glycoside bond를 갖고있는 D-mannose임을 확인하였다.

구성당의 결합양상

과요오드산 이온은 히드록시기, 카르보닐기, 일차 아미노기들은 두 개가 인접한 탄소원자들 사이에 결합되어 있을 때 두 탄소 원자들 사이를 특이하게 산화시킨다. 산화물이 1,3 glucan이고 1,6 분지일 경우에는 IO₄ 소비량과 HCOOH의 생성량의 몰 비가 2:1이다.

크로마토그래피 후 검출되는 글루코오스는 과요오

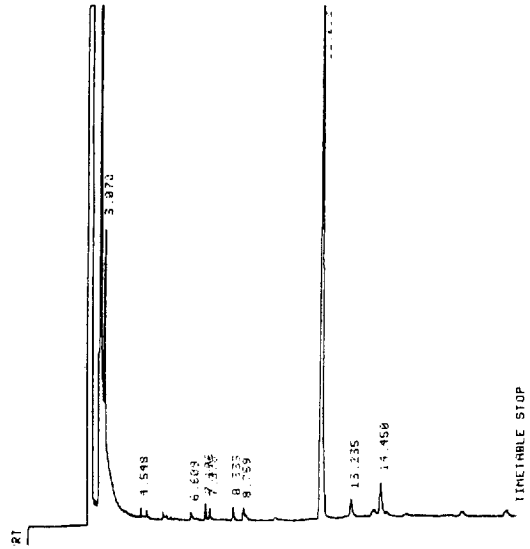


Fig. 2. Gas chromatogram of the alditol of Aloe acethylmannan.

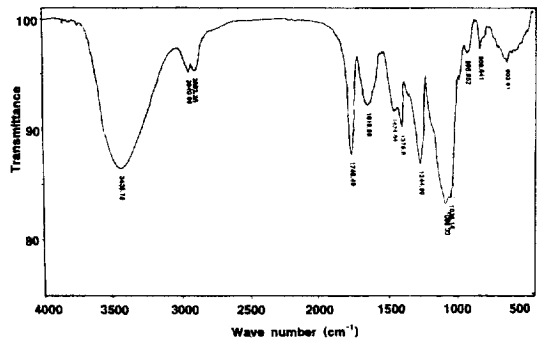


Fig. 3. FT-IR spectra of the Aloe acethylmannan.

드산화시 산화되지 않은 1,3 글루칸에서 온 것이며, glycerol은 환원말단, 비 환원 말단 및 1,6 분지로부터 생성된 것이다. 1,4 글루칸인 경우에는 환원 말단과 비 환원 말단이 산화하여 IO₄ 소비량과 동시에 HCOOH을 생성 하지만 backbone은 산화되어 IO₄ 소비되거나 HCOOH는 생성되지 않는다. 비환원말단 에서는 2 M의 IO₄를 소비하고 1 M의 HCOOH를 생성한다. 환원 말단에서는 3 M의 IO₄를 소비하고 2 M의 HCOOH를 생성한다. 1,6 잔기를 가진 1,4 glucan의 경우도 산화되어 IO₄를 소비하지만 HCOOH는 생성하지 않는다. 분리된 acethylmannan은 과요오드산 음이온(IO₄⁻)의 소비량과 포름산(HCOOH) 몰 비가 7:1로 큰 차이를 보였다(Fig. 4). 또한 비환원 말단과 환원말단에서 생성되는 glycerol과 1,4 결합의 경우 생성되는 erythritol이 검출되어 분리된 acethylmannan은 1, 4결합으로 이루어

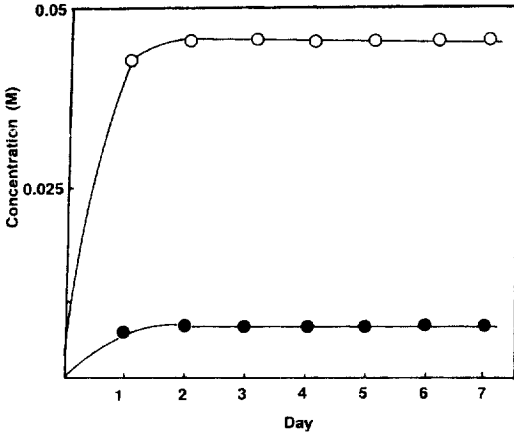


Fig. 4. The result of periodate oxidation. ○—○: formic acid production, ●—●: Consumption IO_4^- .

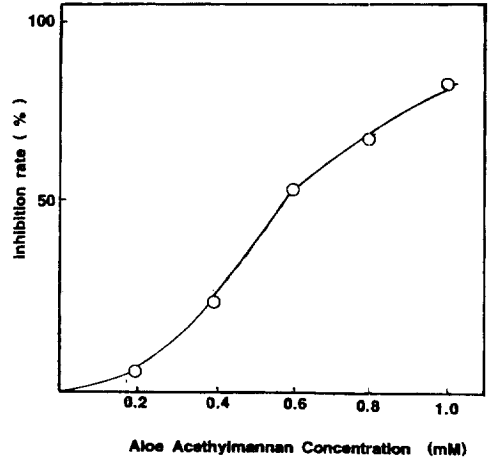


Fig. 6. Inhibition of ACE by Aloe acethylmannan.

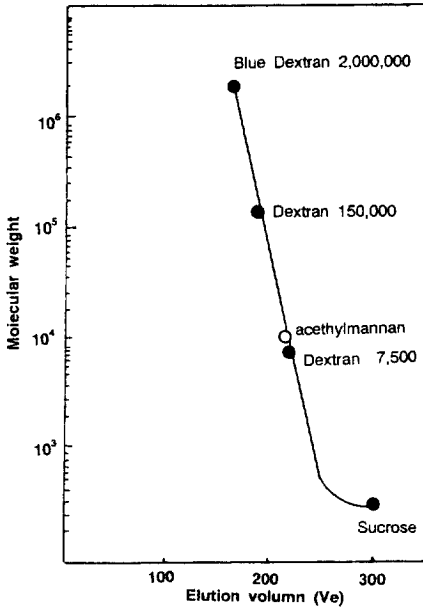


Fig. 5. Determination of molecular weight of Aloe acethylmannan by gel chromatography.

어져 있는 다당체임을 확인하였다.

분자량의 결정

표준당 분자량의 대수 값과 용출부피를 도시하여 얻어지는 표준곡선으로부터 aloe acethylmanann의 분자량을 결정한 결과 elution volumn 220~230 mL 사이에서 용출되어 10,000정도의 분자량으로 구성되어 있는 것으로 판단하였다.

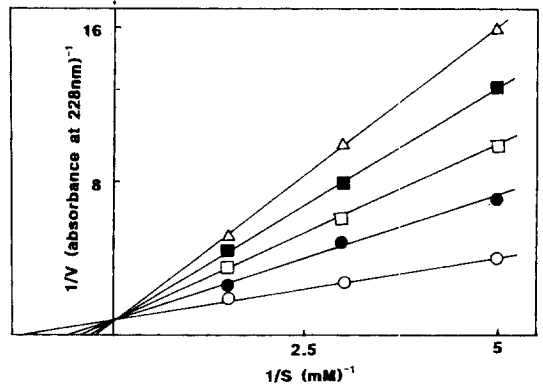


Fig. 7. Lineweaver-burk plot of inhibition on ACE by Aloe acethylmannan. Aloe acethylmannan concentration: ○—○: 0.2 mM, ●—●: 0.4 mM, ◇—◇: 0.6 mM, ◆—◆: 0.8 mM, △—△: 1.0 mM.

ACE저해 활성 측정 및 동력학적분석

분리한 Aloe acethylmanann의 ACE 저해효과를 측정 한 결과는 Fig. 6에서와 같이 비교적 우수한 저해활성을 나타내었다. 즉 저해제 농도 0.8 mM에서 75%의 저해효과를 나타내었으며, 1 mM 농도에서 87%의 저해효과를 나타내었으며 IC_{50} 값은 0.58 mM이었다. 또한 Lineweaver-burk의 double reciprocal의 방법에 따라 Aloe acethylmanann의 ACE에 대한 저해제 친화성을 보다 실제적으로 비교하기 위하여 ACE inhibition의 동력학적 분석을 행하고 Lineweaver-burk plot 및 Dixon plot을 행한 결과 Fig. 7과 8에서 보는 바와 같이 competitive inhibition형식을 보였으며 K_i 값은 0.068 mM이었다.

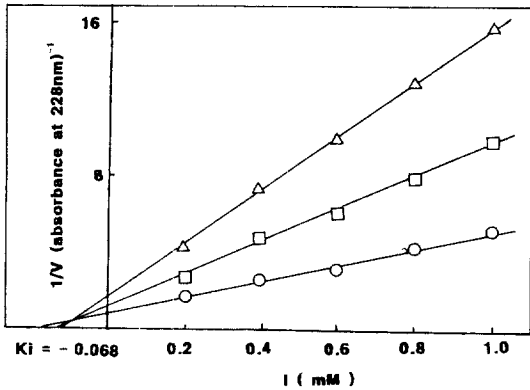


Fig. 8. Dixon plot of inhibition on ACE by Aloe acetylmannan. HHL concentration, ○—○: 6.5 mM, ◇—◇: 3.0 mM, △—△: 2.0 mM.

요 약

국내에서 재배된 *Aloe vera*에서 생리활성 물질인 a-cetylmannan을 분리 하고 그 제반의 특성을 규명하고 ACE저해효과 및 동력학적분석을 행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 알로에 베라 3.5 Kg으로 부터 에탄올에 불용성 다당체를 수득, 백색의 분말형태인 0.9 g의 acetylmannan을 얻었다. 분리한 acetylmannan은 탄수화물 67%를 함유하고 있으며 만노오즈는 60% 소량의 글루코오즈와 갈락토오즈로 이루어져 있고 아세틸기는 23%를 함유하고 있으며 acetyl group은 IR 스펙트럼에서 1746 cm⁻¹, 1244 cm⁻¹ peak으로서 확인하였다. 과요오드 산화법에서 과요오드 음이온 소비량이 포름산 생성량에 비해 많고, 1, 4 글리코사이드 결합으로 이루어져 있음을 확인하였다. 또한 ACE에 대한 IC₅₀ 값은 0.58 mM 이였으며, competitive 저해형식을 나타내었고, Ki 값은 0.068 mM 이였다.

문 헌

1. Mcanally, B.H.: 알로에 추출물 및 이의 제조 방법. 한국 특허공고, 93-1062 (1993)
2. Anon.: *Aloe vera* L. and Its Products Applications and Nomenclature, *Cosme. & Toilet*, **98**, 99 (1983)
3. Hennessee, O.M. and Cook, B.R.: *Aloe Myth Magic Medicine*, 1st ed. Universal Graphics London, p.66-72 (1989)
4. Gage, D.: *Aloe vera Healing Arts*. Press Rocheste, Vermont, p.80-83 (1988)
5. Suga, T. and Hirata, T.: The efficiency of the aloe plants chemical constituents and biological activity, *Cosme. & Toilet*, **98**, 105 (1983)
6. Yaki, A., Hamada, K., Mihashi, K., Harada, N. and

- Nishioka, I.: Structure determination of Polysaccharides in *Aloe saponaria* (Hill.) Haw.(Liliaceae). *J. Pharm. Sci.*, **73**, 62 (1984)
7. Hart, L.A., Nibbering, P.H., van den Barselaar, M.T., van den Berg, A.J. and Ladadie, R.P.: Effect of low molecular constituents from Aloe vera gel on oxidative metabolism and cytotoxic and bactericidal activities of human neutrophils. *Int. J. Immu.*, **12**, 427 (1990)
8. Kahlon, J.B., Kemp, M.C., Tawei, N., Carpenter, R.H. and Shannon, W.M.: *In vitro* evaluation of the synergistic antiviral effects of acemannan inhibition with azidothymidine and acyclovir. *Mol. Biother.*, **3**, 214 (1991)
9. Kahlon, J.B., Kemp, M.C., Carpenter, R.H., McAnally, B.H., Medaniel, H.R. and Shannon, W.M.: Inhibition of AIDS virus replication by acemannan *In vitro*. *Mol. Biother.*, **3**, 127 (1991)
10. Mcanally, B.H.: Acemannan (Carrisin[®]) for injection AIDS. report, p.1 (1993)
11. Mcanally, B.H. and Tex, G.P.: Processes for preparation of aloe products, products produced thereby and compositions thereof. *U.S. Patent* 4,959,214 (1990)
12. 서화중 : *Aloe vera*의 생리 효과에 대한 고찰, 한국영양식량학회지, **24**, 1026 (1995)
13. Gowda, D.C., Neelisiddaiah, B. and Aniancyaih, Y.V.: Structural studies of Polysaccharides from *Aloe vera*. *Carbohydr. Res.*, **72**, 201 (1979)
14. Mcanally, B.H.: Process for preparation aloe products, *U.S. Patent* 4,957,907 (1990)
15. Yaki, A. and Nishioka, I.: キタチアロエのフラテイキニン分解 糖蛋白 について. 和漢醫藥會誌, **2**, 518 (1985)
16. Hestrin, S.: The Reaction of Acetylcholine and Other Carboxylic acid Derivatives with Hydroxylamine, and its analytical Application *J. Biochem.*, **180**, 249 (1949)
17. Chapline, M.F. and Kennedy, J.F.: *Carbohydrate Analysis*. Oxford, IRL Press, p.3 (1986)
18. Bollag, D.M. and Edelman, S.J.: *Protein Method*. Wiley-liss Press, p.56 (1991)
19. 한국식품공업협회: 식품공전(II), 642-643 (1995)
20. Roboz, E. and Haagen-smit, A.J.: A Mucilage from *Aloe vera*. *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3248 (1948)
21. Hassid, W.Z. and McCread, R.M.: Identification of sugars. *Ind. Chem. Analytical Edition*, **14**, 683 (1942)
22. Stephan, A.M.: *Food Polysaccharides*. Mar. Dek. Inc., p.586 (1995)
23. Whistler, R.L.: *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York, Academic Press, V, p.357 (1960)
24. Cooper, T.G.: *The Tools of Biochemistry*. new york, John wiley and Son, p.171 (1991)
25. Cushman, D.W. and Cheung, H.S.: Inhibition of Homogeneous Angiotensin-converting Enzyme of Rabbit Lung by Synthetic Venom Peptides of *Bothrops Jararaka*, *BBA*, **293**, 453 (1973)
26. Saito, Y., Nakamura, K., Kawato, A. and Imayasy, S.: Angiotensin I converting Enzyme Inhibitors in sake and its by-production. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **66**(7), 1082 (1992)