

전통된장으로부터 Angiotensin Converting Enzyme 저해물질의 분리

김승호 · 이윤진 · 권대영
한국식품개발연구원

Isolation of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor from *Doenjang*

Seung Ho Kim, Yun-Jin Lee and Dae Young Kwon
Korea Food Research Institute

Abstract

Inhibitory compounds of angiotensin converting enzyme (ACE) were separated from *Doenjang* (traditional Korean fermented soybean paste). Water extracts from *Doenjang* which showed ACE inhibitory activity were separated with gel permeation chromatography (GPC), in which two fractions with high ACE inhibitory activities were obtained. The first fraction from GPC was further isolated by semi-preparative reverse phase preparative-HPLC (high performance liquid chromatography) and 2-dimensional electrophoresis/thin layer chromatography (TLC). The purified spot had molecular weight of 759 daltons and ninhydrin-positive non-peptide. The second fraction from GPC was also further isolated by semi-preparative reverse phase HPLC and NH_2 -column HPLC. One fraction with high ACE inhibitory activity was purified and characterized. Molecular weight of this fraction by LC-MS was 272.34 daltons. The active fraction was identified as Arg-Pro with ACE IC_{50} of 92 μM .

Key words: Soybean paste, Doenjang, peptide, ACE inhibitor, peptide sequence

서 론

안지오텐신전환효소(Angiotensin converting enzyme; ACE)는 angiotensin I의 C-말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin II로 전환시켜 혈압을 상승시키고 동시에 생체내에서 혈압 강하 작용을 갖는 bradykinin을 분해한다. 이 ACE에 의하여 생성된 angiotensin II는 혈압을 높이는 작용을 하며, 지방산의 산화를 촉진시키거나 과산화가를 증가시키므로 동맥 경화의 위험을 높이는 것으로 알려졌다^(1,2). 이러한 ACE의 작용을 저해함으로써 고혈압의 치료가 가능한 것이다.

ACE의 작용을 저해함으로써 혈압강하 활성을 갖는 물질로는 단백질 효소 분해물 유래의 peptide가 40여 종이 있다고 보고 되어 있다⁽³⁾. 특히, 젤라틴을 미생물에서 분비된 효소로 분해한 물질로부터 식품단백질 유래의 ACE 저해 peptide가 발견된⁽⁴⁾ 이후, 다른 식품 단백질에서 ACE 저해 peptide를 찾으려는 연구가 지

속적으로 진행되어 왔다^(5,6).

대표적인 식물단백 자원인 대두를 발효하여 만든 일본된장의 경우 ACE 저해효과를 비롯한 다양한 생리활성기능이 밝혀지면서⁽⁷⁾, 우리나라의 전통 된장에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 된장의 기능성에 관한 연구로는 된장의 항돌연변이 항암 효과⁽⁸⁾, 된장 유래의 항혈전 peptide 탐색⁽⁹⁾, 된장 유래의 ACE 저해 효과^(10,11) 등 여러 가지 기능이 보고되어 있다.

최근 우리나라에서도 식품으로부터 영양소 또는 비영양소 성분의 항암, 항노화, 또는 항고혈압 등 다양한 생리 활성을 나타내는 기능성 성분들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 고혈압, 동맥경화 등 성인병의 경우 대부분이 식습관과 밀접한 관련을 가지는 점을 고려할 때 일상적으로 섭취 가능한 식품 성분들 가운데 혈압강하 효과를 나타내는 물질을 검색하는 것은 질병예방 차원에서 매우 의미가 있다.

본 연구에서는 성인병의 하나인 고혈압의 예방과 식사 요법의 면에서 일상적으로 널리 식용되고 있는 전통발효 식품인 된장을 대상으로 ACE 저해 효과가 있는 물질을 얻고자 연구하였다. 분리능이 뛰어난 분취용 high performance liquid chromatography (HPLC)

Corresponding author: Seung-Ho Kim, Division of Food Chemistry and Biotechnology, San 46-1, Baekhyon-dong, Poondang, Songnam, Kyongki, 463-420, Korea

를 이용하여⁽¹²⁾ ACE 저해 활성이 높은 peptide를 순수 분리하여 정제된 peptide의 아미노산 서열을 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

된장은 전통적 발효방법으로 담근 고은식품(순창, 전라북도)에서 1998년도에 제조한 것을 구입하여 사용하였다. Preparative HPLC 및 liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS)에 사용한 용매는 HPLC 등급을 사용하였다. ACE 저해 활성 측정시 사용한 ACE와 기질 Hippuryl-His-Leu (Hip-His-Leu)은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Gel permeation chromatography의 resin으로는 Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 사용하였다.

ACE 저해활성 측정

ACE 저해작용 측정은 Cushman과 Cheung⁽¹³⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 염으로 NaCl 0.3 M을 함유한 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3)에 녹인 기질 Hip-His-Leu (2.14 mg/mL) 200 μ L에 ACE 저해 용액 75 μ L을 첨가한 후, 37°C에서 5분간 preincubation시켰다. 여기에 증류수에 녹인 ACE 조효소액(0.2 U/mL) 20 μ L를 가하여 다시 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 250 μ L를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 다시 여기에 ethylacetate 2 mL를 가하여 15초간 교반한 후, 1,000 \times g에서 5분간 원심분리시켜 상징액 1 mL를 취하였다. 이 상징액을 120°C에서 30분간 가열하여 완전히 건조시킨 뒤 증류수 1 mL를 가하여 용해시킨 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해율을 나타내었다.

항고혈압 물질 추출

된장 500 g을 열수 500 mL에 녹인 후 95°C에서 20분간 끓인 후, Blender (Osterizer, Thomas Scientific, Mexico)로 상온에서 교반한 후 물 1 L를 첨가하였다. 이 용액을 pH 4.5로 조정한 후, 10,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 상징액만 취하였다. 이 용액을 Whatman No. 1 (Whatman Laboratory Division, Maidstone, U. K.) 여과지로 여과한 다음 다시 Whatman No. 42로 재 여과하였다. 이 여액의 냉동 건조한 분말 8 g을 20 mL의 0.1 M acetic acid buffer에 녹여 0.1 M acetic acid buffer로 평형화된 Sephadex G-25 (50 \times 950 mm)에 loading하였다. 항고혈압물질을 분리하기 위하여 0.1

M acetic acid buffer를 90 mL/h 유속으로 용출하였다.

Gel permeation chromatography에서의 앞분획 분리

Gel permeation chromatography (GPC)에서 분리된 분획들의 동결건조한 시료를 preparative HPLC로 분리하였다. Reverse phase column (Vydac C₁₈ 218TP 510; 10 \times 250 mm, Hesperia, CA, USA)을 이용하여 분리하였으며, 용매의 공급은 1.5 mL/min 속도로 수용액 (0.1% trifluoroacetic acid; TFA)을 5분간 흘려준 다음 40분 동안 acetonitrile 농도를 60%까지 상승시켰다⁽¹²⁾. 동결건조한 시료(5 mg/mL) 500 μ L을 주입하였고, ACE 저해 성분의 검출은 UV detector를 사용하여 220 nm에서 실시하였다. HPLC에서 분리된 분획을 TLC plate를 이용한 2-dimensional electrophoresis/TLC로 다시 재분리하였다. 분리된 분획을 50 mM ammonia 40 μ L에 녹여 3 μ L를 TLC plate (Silica gel 60, 10 \times 10 cm, Merck Co., Darmstadt, Germany)의 하단에서 1 cm되는 중앙에 spotting하였다. Plate의 좌우 양측에 platinum wire를 Whatman No. 1의 여과지로 감쌌다. 여기에 pyridine 완충용액(pH 6.5, 0.5% acetic acid)을 첨가하여 plate를 적신 후, 375 V에서 10분 동안 전기 영동하였다. Plate를 말린 후 TLC chamber에서 전개 용액(n-butanol : acetic acid : water=3 : 1 : 1)으로 전개한 후 0.02% ninhydrin-acetone 용액으로 발색시켰다. 각 spot를 긁어 100 μ L의 50 mM ammonia로 두번 추출한 다음 원심분리하여 상징액을 동결건조한 후 400 μ L 증류수에 녹여 ACE 저해 활성을 측정하였다.

Gel permeation chromatography에서의 뒷분획의 분리

GPC에서 ACE 저해 활성이 있는 분획을 HPLC에서 reverse column (Vydac C₁₈; 10 \times 250 mm)을 사용하여 분리하였다. 용매의 공급은 1.5 mL/min 속도로 0.1% TFA 수용액을 흘려준 다음 30분 동안 acetonitrile의 농도를 7%까지 상승시켰다. 다시 2분 동안 60%까지 acetonitrile의 농도를 직선적으로 상승시켜준 후 5분간 유지하였다. 동결건조한 시료를 0.1% TFA 수용액에 용해하여(30 mg/mL) 500 μ L을 injection 하였으며 ACE 저해 성분의 검출은 UV detector를 사용하여 220 nm에서 실시하였다. ACE 저해 활성이 높은 분획을 NH₂ column (Capcellpak, 10 \times 250 mm, Shiseido, Tokyo, Japan)상에서 재분획하였다. 용매는 70% acetonitrile을 사용하였으며 1.5 mL/min의 유속으로 흘러 분리하였다. 검출은 UV detector를 사용하여 220 nm에서 측정하였다.

분자량 측정 및 동정

분자량의 측정은 LC-electrospray mass spectrometer (Platform II, Micromass, Manchester, U.K)를 이용하여 electrospray'로 질량 spectrum을 분석하였으며, 시료는 0.2% formic acid 용액 (물: acetonitrile=1:1)에 녹였으며 elution 용매는 water:acetonitrile (1:1)이었다. Peptide의 sequencing은 Procise TM (Perkin Elmer, Protein Sequencing System, Foster, CA, USA)에 의하여 Edman degradation 법⁽¹⁴⁾에 의하여 자동분석하였다.

결과 및 고찰

GPC에 의한 활성물질 분리

된장에서 추출한 시료를 GPC에서 분리한 후, ACE 저해 활성을 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. ACE 저해 활성이 높은 분획을 두 부분에서 얻을 수 있었다. 뚜렷하게 활성이 높은 분획(앞분획)은 90% 이상의 저해 활성을 나타냈으며 바로 뒤에 약간 겹쳐 활성이 낮은 분획(뒷분획)은 70% 정도의 저해 활성을 나타내었다.

앞분획의 전기영동/TLC 및 HPLC에 의한 순수분리

GPC에서 나온 앞분획을 직접 reverse phase column-HPLC로 분리한 결과(Fig. 2), 거의 retain되지 않은 부분에 대부분의 높은 활성을 나타내었다. 이 분획을 다

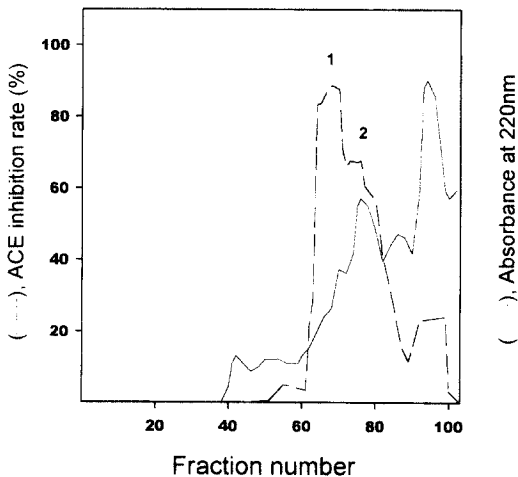


Fig. 1. Gel permeation column (GPC) chromatography of Doenjang extract on Sephadex G-25 (95×5 cm). Elution solvent, 0.1% acetic acid was eluted with 1.5 mL/min. The volume of each fraction was 10 mL. The active fractions designated by 1 and 2 were collected for further separation.

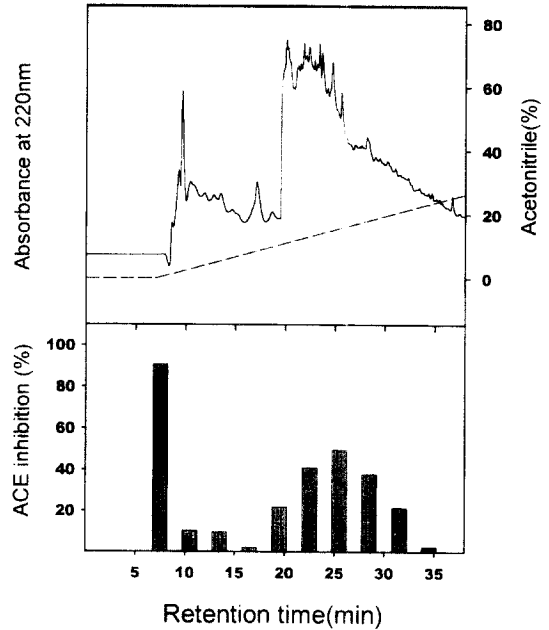


Fig. 2. Reverse phase HPLC purification of ACE inhibitors of angiotensin I converting enzyme (ACE) for the active fraction 1 from GPC in Fig. 1 using Vydac C₁₈ column. Dotted line is the percentage of acetonitrile containing 0.1% TFA for the gradient elution with water and acetonitrile.

시 분리하기 위하여 size exclusion column, hydrophilic interaction column 등 여러 column chromatography를 이용하여 재분리를 시도하였으나 분리가 깨끗하게 되지 않았다. 이 물질은 HPLC상에서 분리가 어렵다고 판단하여, 고전적인 방법인 TLC와 전기영동법을 결합한 방법인 2-dimensional electrophoresis/TLC (first dimension, electrophoresis; second dimension, TLC)에 의해 분리하였다. Gel permeation chromatography에 의해 분획한 활성 획분을 5 mg/mL (ninhydrin에 의한 아미노산 정량 결과 아미노산으로 1 mg/mL의 농도)의 농도로 500 µL씩 reverse phase column에 의해 재분리하였다. 활성 분획을 8번 분취하여 동결건조하였으며 이의 아미노산 함량은 80 µg이었다. 이를 발색용액(0.02% ninhydrin in acetone)으로 발색시킨 결과는 Fig. 3과 같다. 각 spot를 끊어 ammonia로 두번 추출, 원심분리하여 동결건조한 후 증류수에 녹여 ACE 저해 활성을 측정된 결과, 화살표한 시료만이 활성을 보였으며 85%의 저해율을 보였다. 분리한 물질의 순도를 확인하고 동시에 그 분자량을 측정하기 위하여 희석한 후 LC-electrospray MS한 결과, 분자량 759.63 dalton의 거의 순수한 물질로 밝혀졌다. 위에서 본 물

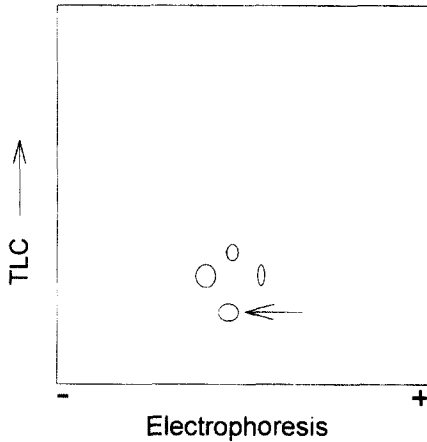


Fig. 3. Two-dimensional separation (1st, electrophoresis; 2nd, TLC) of the active fraction from HPLC on the Silica Gel plate (Fig. 2). Electrophoresis was performed in 0.5% acetic acid pyridine buffer (pH 6.5) and developed with n-butanol: acetic acid: water (3:1:1). Arrowed spot is the active fraction.

질이 ninhydrin에 의해 발색한 점으로 미루어 아미노기를 가진 물질이므로, peptide일 가능성이 높을 것으로 생각되어 아미노산 분석과 peptide sequencing을 수행하였으나 어떠한 아미노산 peak도 나타나지 않았고 펩타이드 서열도 분석할 수 없었다. 이러한 것으로 미루어 peptide가 아닌 아미노기를 갖는 물질로 추정할 수 있었다. 이 물질에 대하여는 지속적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

뒷분획의 순수분리

된장 추출물을 GPC로 분리하였을 때 두 번째로 높은 혈압강화 활성을 보이는 뒷분획(Fig. 1)에 대한 분리를 HPLC (reverse phase column)로 순수분리를 시도하였다. 우선 보통 쓰이는 linear gradient로 분리하여 혈압강화 활성을 측정하여(data not shown) 높은 활성을 보이는 획분들이 자세히 분리되도록 shallow gradient를 사용하여 분리하였다(Fig. 4). 각 획분의 ACE 저해 활성을 측정한 결과 50%의 활성을 보이는 분획과 47%의 저해 활성을 보이는 분획을 얻을 수 있었다. Chromatogram 상에서 이 두 분획이 순수해 보이지 않았으므로 냉동 건조하여 다음 재분리 단계를 이행하였다. 상기 reverse phase column-HPLC에 의해 분리한 두 분획을 NH₂ column-HPLC로 acetonitrile 농도를 변화시켜 분리한 결과 70% acetonitrile에서 가장 잘 분리되었다. Reverse phase column chromatography에 의하여 분리한 첫 번째 획분은 아직도 활성이 있는 획분

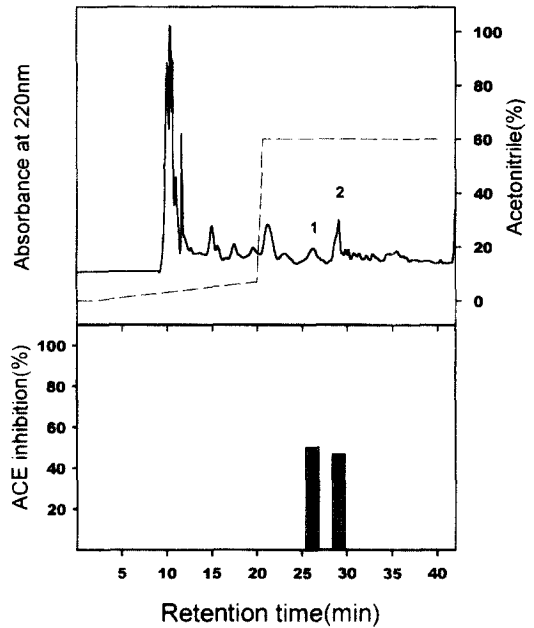


Fig. 4. HPLC purification of the ACE inhibitors for the fraction 2 from the GPC in Fig. 1. The legends were the same in Fig. 2.

들이 분리가 잘 되지 않아, 두 번째 분획을 우선 대상으로 삼았으며 그 결과는 Fig. 5와 같다. 각각의 분획들은 비슷한 ACE 저해 활성(각각 60, 58, 70%)을 가지고 있었다. 이들 분획을 LC-MS를 이용하여 순수도를 측정된 결과 peak 1은 HPLC 상에서 나타난 바와 같이 복합물질로 나타났고, peak 2도 역시 단일물질이 아닌 것으로 나타났다. 따라서 LC-MS 상 단일물질로 판명된 분획은 peak 3 뿐이었다(Fig. 6). 이 분획물은 50%의 저해활성을 나타내는 IC₅₀이 92 μM인 것으로 나타났다.

NH₂-column HPLC에서 단일물질로 분리정제된 분획 (peak 3)을 LC-electrospray MS로 분석한 결과(Fig. 6), 이 물질의 분자량은 272.34 dalton으로 나타났다. 이 물질이 peptide라면 아미노산 2개로 구성된 것으로 추정되었다. 따라서 LC-MS에 의해 확인된 활성 물질의 아미노산 배열순서는 Edman degradation method를 이용하여 분석한 결과⁽¹⁴⁾, N-말단으로부터 Arg-Pro의 아미노산 서열을 가지는 단일 dipeptide임을 확인하였다. 이 peptide의 분자량을 계산한 합이 271.33 dalton인 것은 LC-MS 측정으로 얻어진 분자량(272.34 dalton)과 1 dalton 정도로 차이가 남에 따라 LC-MS결과와 peptide sequenator에서 분석한 결과가 정확하게 일치하였다. 따라서 분리한 ACE 저해물질이 Arg-Pro로 된

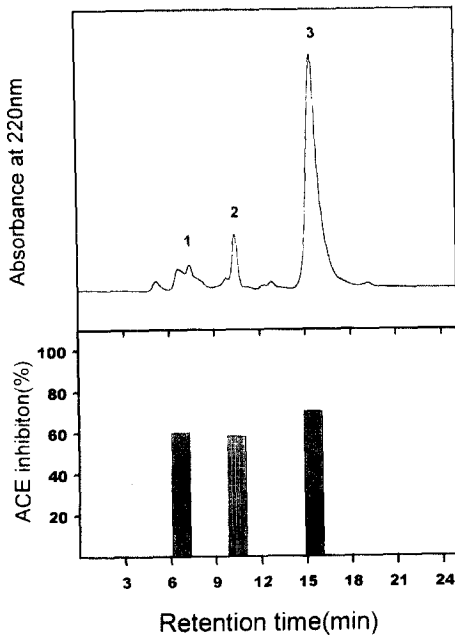


Fig. 5. Purification of fraction 2 from Fig. 4 by HPLC. Acetonitrile in water (70%) was loaded on a NH_2 column (Shiseido, $10 \times 250\text{mm}$) and eluted with 1.5 mL/min in the same solvent.

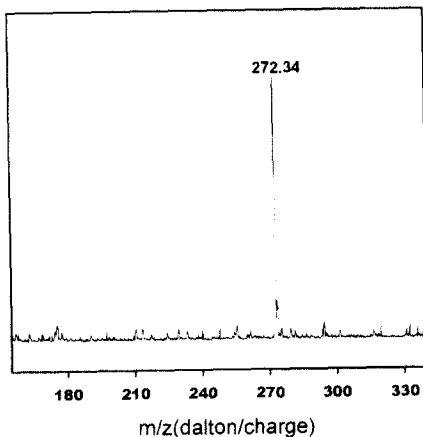


Fig. 6. Electrospray mass spectrum of the fraction 3 collected from the NH_2 -column HPLC (Fig. 4).

dipeptide라고 결론 지었다.

ACE 저해물질이 펩타이드라는 것은 많은 연구결과에서 밝혀졌고, 외국에서는 아미노산 배열순서도 많이 밝혀지고 있다. Matsumura 등⁽¹⁵⁾은 가다랭이 내장으로 부터 ACE 저해 작용을 나타내는 peptide를 분리하여 아미노산 배열 순서를 밝혔다. 그 결과 이들 중 특히 강한 ACE 저해작용을 나타내는 4종류의 tripeptide들

은 공통적으로 N-말단 아미노산 잔기로서는 valine, isoleucine 및 leucine과 같은 side chain을 소수성 아미노산으로 가지고, 중앙에는 arginine, lysine과 같은 side chain을 염기성 아미노산으로, C-말단 아미노산 잔기로서는 proline을 함유하고 있다고 보고 하고 있다. 또한 여러 가지 dipeptide를 합성하여 ACE 저해 효과에 미치는 C-말단과 N-말단 아미노산 잔기의 영향에 대하여 검토한 결과⁽¹⁶⁾, C-말단 아미노산 잔기로서는 tryptophan, phenylalanine, tyrosine, proline을, N-말단 아미노산 잔기로서는 aliphatic 아미노산과 염기성 아미노산을 가지는 dipeptide가 ACE에 대하여 경쟁적으로 저해함으로써 활성을 나타낼 것이라고 추정하고 있다. 이중 Val-Trp, Ile-Trp 등 Trp으로 끝나는 dipeptide가 가장 좋은 ACE 저해효과를 나타내었고 (각각의 IC_{50} 이 1.6 μM 과 2.0 μM), Pro으로 끝나는 dipeptide는 상대적으로 작은 활성을 나타내었다(Arg-Pro, IC_{50} =180 μM ; Val-Pro, IC_{50} =420 μM). 반면 Kohmura 등⁽¹⁷⁾은 C-말단에 proline을 갖고 있는 합성한 여러 peptide들의 ACE 저해효과를 확인하였다. Proline으로 끝나는 tripeptide 중에서 N-말단의 아미노산이 달라짐에 따라 ACE 저해활성이 달라짐을 보고하였는데, 가장 좋은 저해 효과를 보이는 것은 Val-Arg-Pro (IC_{50} =2.2 μM)이었다. 이 peptide에 더 많은 아미노산을 합성하면 ACE 저해 활성은 감소되었다. 한편 Miyoshi 등⁽¹⁸⁾은 Arg-Pro 앞에 Leu를 붙여서 합성한 tripeptide인 Leu-Arg-Pro가 가장 높은 IC_{50} (=0.27 μM)을 보여 주고 있었다. 본 실험에서 동정한 dipeptide은 C-말단에 proline을 N-말단에 염기성 아미노산인 arginine을 가지므로 Kohmura 등⁽¹⁷⁾과 Miyoshi 등⁽¹⁸⁾이 밝혀낸 Val-Arg-Pro과 Leu-Arg-Pro의 tripeptide의 N-말단에서 Val이나 Leu이 없어도 ACE 저해효과가 비교적 강하게 나타내고 있음을 보여주고 있다. 본 연구 결과는 우리나라 전통된장에서 ACE 저해활성이 강한 dipetide, Arg-Pro를 생산할 수가 있음을 보여주고 있다.

우리나라에서는 많은 연구자가 단백질에서 ACE 저해기능이 있다고 보고하고 있지만 그 펩타이드의 아미노산 배열 등 구조를 밝힌 연구는 그다지 많이 보고되고 있지 않다. 이 측면에서 본 연구의 결과는 아미노산 서열까지 밝혀냈으므로 그 의미가 크다. 동시에 많은 ACE 저해 펩타이드가 아미노산 3개내지 길게는 7개의 펩타이드로 구성되었다고 보고되고 있다. 실제로 식품에서 분리한 ACE 저해 peptide들은 모두 tripeptide이거나 그 이상의 peptide로 구성되어 있다. 따라서 본 실험에서 분리된 dipeptide 저해제는 기존 합성에 의한 dipeptide 저해제와는 달리 우리나라 전

통된장에서도 분리생산 할 수 있다.

이상의 결과를 종합하면 된장에서 분리한 물질의 저해 작용은 그 구성 아미노산의 조성이나 함량보다는 그 구성 peptide의 종류나 아미노산의 배열에 더 큰 영향을 받고 있음을 확인하였다. 즉 전통장류인 된장에서 분리한 물질이 나타내는 ACE 저해 작용은 저분자 peptide의 길이나 구조 및 아미노산의 종류, 배열순서 등의 복합적인 작용에 의하여 angiotensin I 전환효소에 대하여 저해작용이 있는 것으로 추정된다. 본 실험에서 분리한 ACE 저해 dipeptide, Arg-Pro는 된장 제조 과정에서, 콩의 발효과정 중에 protease에 의하여 분해된 펩타이드로 추정된다. 이 dipeptide가 다른 단백질원 즉 우유단백질이나 근육 단백질의 분해물에서도 생성될 수 펩타이드인지는 밝혀지지 않고 있으나 다른 단백질에서는 더욱 강한 다른 아미노산 배열 순서의 펩타이드가 있음을 현재 확인 중이다. 또한 된장에는 펩타이드가 아닌 다른 아미노계 수용성물질이 있어서 ACE 저해 작용을 하고 있음을 보여주고 있다. 이에 대하여 더욱 깊고 체계적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

요 약

전통된장으로부터 안지오텐신전환효소(angiotensin converting enzyme; ACE)를 저해하는 물질을 추출하여 그 구조를 밝혀냈다. ACE 저해물질을 열수추출한 다음 gel permeation chromatography (GPC)를 통하여 ACE 저해작용이 큰 두 개의 큰 회분을 받았다. 앞회분은 90%와 70%의 ACE 저해효과를 나타내었으나 단일물질로 분리되지 않아 계속하여 역상 HPLC를 통하여 순수 분리를 하였다. 그러나 앞회분은 순수분리되지 않아 결국 2차원 전기영동/TLC를 통하여 분리한 결과 분자량이 759.63인 아미노기를 갖고 있는 비펩타이드 물질임이 밝혀졌다. 뒷회분은 다른 조건의 HPLC (reverse column과 NH₂ column)를 이용하여 순수분리에 성공하였다. 이 중 ACE 저해효과가 큰 물질은 분자량 271.33인 dipeptide인 arginine-proline임을 밝혀냈다. 이 물질의 ACE IC₅₀은 92 µM이었다. 본 연구 결과는 대부분 ACE 저해물질이 3개 내지 7개 등의 긴 펩타이드임을 감안할 때, 짧은 dipeptide로 ACE 저해펩타이드가 한국의 전통된장에서 생산할 수 있음을 보여주고 있다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 수행한 농림수산물기술개발사

업(과제관리번호 295179-3)의 지원으로 수행한 결과의 일부로서 이에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

1. Manjusri, D. and Richard, L.S.: Pulmonary angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **250**, 6762-6768 (1975)
2. Gavras, I.: Braykinin-mediated effects of ACE inhibition. *Kidney International*, **42**, 1020-1029 (1992)
3. Ariyoshi, Y.: Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trend Food Science Technol.*, **4**, 139-144 (1993)
4. Oshima, G., Shimabukuro, H. and Nagasawa, K.: Peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochem. Biophys. Acta*, **566**, 128-137 (1979)
5. Maruyama, S., Miyoshi, S. and Tanaka, H.: Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from *Ficus Carica*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2763-2767 (1989)
6. Kim, S.B., Lee, T.G., Park, Y.B., Yeum, D.M., Kim, E. K., Do, J.R. and Park, Y.H.: Angiotensin -I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolyzate of anchovy protein (in Korean). *Bull. Korean Fish. Soc.*, **27**, 1-6 (1994)
7. Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kikuchi, M.: Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1107-1110 (1993)
8. Park, K.Y., Moon, S.H., Baik, H.S. and Cheigh, H.S.: Antimutagenic effect of *Doenjang* toward aflatoxin (in Korean). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **19**, 156-162 (1990)
9. Shon, D.H., Lee, K.A., Kim, S.H., Ahn, C.W., Nam, H. S., Lee, H.J. and Shin, Z.I.: Screening of antithrombotic peptides from soybean paste by microplate method (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 684-688 (1996)
10. Suh, H.J., Suh, D.B., Chung, S.H., Whang, J.H., Sung, H.J., and Yang, H.C.: Purification of ACE inhibitor from soybean paste (in Korean). *Agric. Chem. Biotechnol.*, **37**, 441-446 (1994)
11. Shin, Z.I., Ahn, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J., Lee, H.J. and Moon, T.H.: Fraction of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste (Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 230-234 (1995)
12. Kwon D.Y.: Effects of negative charges of a model for bovine pancreatic trypsin inhibitor folding intermediate on the peptide folding. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 400-405 (1994)
13. Cushman, D.W. and Cheung, H.S.: Spectrometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharm.*, **20**, 1637-1647 (1971)
14. Siuzdak, G.: Mass Spectrometry for Biotechnology, Academic Press, pp. 133-136 San Diego, CA, USA (1996)
15. Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K. and

- Shimizu, T.: Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 695-673 (1993)
16. Cheung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F. and Cushman, D.W.: Binding of peptide substrates and inhibitor of angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **225**, 401-407 (1977)
17. Kohmura, M., Nio, N. and Ariyoshi, Y.: Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptide fragments of human κ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 835-836 (1990)
18. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S.: Structures and activity of angiotensin-I converting enzyme inhibitore in an α -zein hydrolyzate: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1313-1318 (1991)
-
- (1999년 1월 22일 접수)