



## 효소가수분해 조건에 따른 우유 케이신의 Angiotensin - I 전환효소 저해효과

김현수 · 인영민 · 정석근 · 함준상 · 강국희\* · 이수원\*

축산기술연구소 · \*성균관대학교 식품 · 생명자원학과

## Angiotensin- I Converting Enzyme Inhibitory Properties of Bovine Casein Hydrolysates in Different Enzymatic Hydrolysis Conditions

Hyun-Soo Kim, Young-Min In, Seok-Geun Jeong, Jun-Sang Ham,  
Kook-Hee Kang\* and Soo-Won Lee\*

National Livestock Research Institute, RDA

\*Department of Food & Life Science, Sunkkyunkwan University

### Abstract

Angiotensin- I converting enzyme(ACE) catalyst the removal of the C-terminal dipeptide from the angiotensin-I to give the angiotensin- II, a potent peptide that causes constriction of regulation of blood pressure. Recently, ACE inhibitor peptides have been isolated from enzymatic digests of food protein. The aim of this study was to identify bovine casein hydrolysates with ACE inhibitory properties in different enzymatic hydrolysis conditions. The casein were hydrolyzed neutrase, alcalase, protamax, flavourzyme, promod 192, sumizyme MP, sumizyme LP and pascalase alone and with an enzyme combination. Promod 192 produced ACE inhibitory peptides most efficiently. In order to ACE inhibitory peptide produced enzymatic hydrolysis condition were promod 192 added to casein ratio of 1:100(w/w), and incubated at 47°C for 12hrs. Casein hydrolysate gave 50% inhibition( $IC_{50}$  value) of ACE activity at concentration with 248  $\mu$ g/ml(general method) and 265  $\mu$ g/ml(pretreatment method) respectively.

**Key words :** angiotensin- I converting enzyme, casein, hydrolysate

### 서 론

고혈압, 동맥경화 등 성인병의 경우 대부분이 식습관과 관련하여 발병하는 것을 고려할 때 일상적으로 섭취하는 식품에서 혈압강하 효과를 나타내는 물질을 검색하는 것은 이들 질병의 예방 차원에 그 의미가 있다고 생각된다.

Angiotensin- I은 Angiotensin- I converting enzyme(ACE)의 작용에 의해 C-말단의 histidine-leucine이 분해되어 강력한 혈압상승 호르몬인 angiotensin-II로 변환되며, 이것은 표적세포인 혈관 평활근, 부신 등에 작용하여 강력한 혈관수축 작용을 나타내어 혈압을 상승시킨다(Manjusri and Richard, 1975). 이와 같이 혈압상승을 억제하기 위해서는 ACE의 활

성을 억제하는 것이 중요하며, ACE 저해 펩타이드는 처음 뱀의 독에서 발견되었다. 그 후 captopril, enarapril 등 많은 ACE 저해제가 화학합성 되었고, 현재 고혈압 치료제로서 사용되고 있다(Cheung et al., 1980). 그러나 이들 ACE 저해제는 다른 세포에 작용하여 두통, 식욕부진, 미각이상 등 부작용이 있어 보다 안전하고 효과적인 천연의 ACE 저해제에 대한 탐색과 개발이 이루어지고 있다(Webster and Koch, 1996). 식품유래의 ACE 저해제는  $\alpha$ -zein(Miyoshi et al., 1991), 정어리(Matsui et al., 1993), 참치(Kohama et al., 1988), 가다랭이(Yokoyama et al., 1992) 등의 식품단백질 가수분해물 뿐만 아니라 차(茶)의 pholypheol(原征와 松本, 1995), 무화과 유액(Maruyama et al., 1989), 간장(Kinoshita et al., 1993) 등에서 보고되었다.

케이신 유래의 ACE 저해 펩타이드에 대한 연구는 주로 트립신 분해물의 분획으로부터 이루어져 왔으며(Maruyama

**Corresponding author :** Hyun-Soo Kim, National Livestock Research Institute, RDA. Suwon 441-350, Korea. E-mail: khsskku@yahoo.co.kr

et al., 1987; 1985; 1982), Yamamoto 등(Yamamoto et al., 1994)은 *Lactobacillus helveticus* 유래의 단백질분해효소로 케이신을 가수분해하여 ACE 저해 펩타이드를 분리하였다. 또한 Nakamura 등(1995)은 우유를 *Lactobacillus helveticus*와 *Saccharomyces cerevisiae*를 스타터로 발효한 산유로부터 ACE 저해 펩타이드를 분리하였다. 이와 같이 케이신은 오랫동안 ACE 저해 펩타이드 연구의 중심이 되어 왔으나 케이신의 효소분해 조건에 따른 ACE 저해효과에 대한 구체적인 연구는 많지 않은 편이다.

따라서 본 논문에서는 가수분해 조건이 케이신 가수분해물의 ACE 저해효과에 미치는 영향을 알아보고, 효소의 종류와 첨가량 및 가수분해시간을 달리하면서 ACE 저해효과가 높은 케이신 가수분해물을 제조하기 위한 가수분해조건을 설정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 단백질 가수분해 효소

단백질분해효소로서 neutrase(*Bacillus sub.*), alcalase(*Bacillus licheniformis*), protamax(*Bacillus*), flavourzyme(*Asp. oryzae*)은 Novo Nordisk사 제품을, promod 192(*Asp. oryzae*), sumizyme MP(*Asp. melleus*), sumizyme LP(*Asp. oryzae*)는 신일본화학제품을 사용하였고, pescalase(*B. licheniformis*), collupulin(파파인)은 Gist Brocades사 제품을, 트립신은 Sigma사 제품을 사용하였다.

### Endopeptidase 활성 측정

0.75% 케이신용액(pH 7.0) 1ml를 47°C 항온수조에서 5분간 방치 후 효소액 1ml를 넣고 30분간 반응시킨 다음 0.4M trichloroacetic acid(TCA, Sigma) 2ml를 넣고 25분 후에 여과하였다. 여액 1ml를 시험관에 넣고 0.4M sodium carbonate(Wako) 5ml와 2배로 희석한 Folin & Ciocalteu's(Sigma)시약 1ml와 혼합 후 50°C에서 5분간 반응시켜 발색시킨 후 660 nm(U-3300 Spectrophotometer, Hitachi)에서 흡광도를 측정하였다( $A_t$ ). 대조구로서 0.75% 케이신용액 1ml와 0.4M TCA 2ml를 넣고 혼합한 후 효소액 1ml를 넣고 위와 같은 방법으로 측정하였다( $A_0$ ). 여액 1ml 중에 tyrosine 100 μg에 상당하는 아미노산을 생성하는 효소량을 endopeptidase 활성 1단위로 하고 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Endopeptidase 활성}(U/\mu\text{g}) = (A_t - A_0) \times F \times 1/100 \times n$$

F : Tyrosine 검량선으로부터 구해진 흡광도가 1.000일 때의 tyrosine량(μg)  
n : 시료용액의 희석배수

### Exopeptidase 활성 측정

0.25mM 기질용액(Leu-Gly-Gly, 화광제약) 10ml를 넣고 47°C의 항온수조에서 5분간 방치하고, 효소액 1ml를 넣고 혼합한 후 60분간 반응시킨 다음 100°C에서 5분간 가열하였다. 냉각 후 1.1ml를 취하여 ninhydrin용액 2ml와 혼합 후 tin(II) chloride dihydrate(Junsei)용액 0.1ml를 넣고 100°C에서 20분간 가열 후 냉각하였다. 여기에 50% propylalchol(Sigma) 10 ml를 넣고 혼합한 다음 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 기질로부터 1분간 1 μM의 Leucine을 유리하는데 필요한 효소량을 exopeptidase 활성 1단위로 하여 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Exopeptidase 활성}(U/\mu\text{g}) = A_{570} \times F \times 1.1 / 0.1 \times 1/60 \times n$$

F : Leucine의 검량선으로부터 구해진 흡광도가 1.000일 때의 Leucine함량(μM)

n : 시료용액의 희석배수

### 가수분해물의 제조

케이신 가수분해물은 5% 케이신용액(Merck, pH 7.0)에 효소를 첨가하여 47°C에서 일정시간 반응시킨 후 효소를 실활시키기 위하여 85°C에서 20분간 가열한 다음 냉각 후 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 상등액을 건조하여 제조하였다.

### ACE 저해효과 측정

ACE 저해효과는 Cushman과 Cheung(1971)의 방법에 준하여 측정하였다. 12.5mM HHL(Hip-His-Leu, Sigma)기질 100 μl에 가수분해액 5 μl와 sodium borate buffer(pH 8.3) 45 μl를 가한 후 37°C에서 5분간 반응시켰다. 여기에 ACE 조효소액(rabbit lung acetone powder, Sigma) 150 μl 가하고 다시 37°C에서 1시간 반응시킨 후 0.5N HCl 250 μl를 사용하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl acetate(Sigma) 1.5ml를 가하여 1분간 교반 한 다음 2,800rpm에서 10분간 원심분리하여 상징액 1ml를 취하였다. 이 상징액을 건조시킨 후 1M NaCl 3ml 가해 용해시키고 228nm에서 흡광도를 측정한 후 다음 식에 의하여 ACE 저해율로 나타내었다.

$$\text{ACE 저해율}(\%) = \frac{E_c - E_s}{E_c - E_b} \times 100$$

E<sub>c</sub> : 시료대신 증류수를 넣었을 때의 흡광도

E<sub>s</sub> : 시료첨가시의 흡광도

E<sub>b</sub> : 반응 정지 후 시료 첨가한 것의 흡광도

**IC<sub>50</sub>( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 측정**

시료를 일정한 농도로 희석한 후 ACE 저해효과를 측정한 다음 ACE를 50% 저해하는데 필요한 ml수를 펩타이드 양( $\mu\text{g}$ )으로 나타내었다.

**가수분해물의 분자량 측정**

가수분해물의 분자량은 size exclusion chromatography로 측정하였다. TSKgel G3000 PWXL(7.8mm×30cm, Tosho)칼럼을 HPLC(Jasco)에 장착하고 용매는 0.1% trifluoroacetic acid(TFA, Sigma)를 함유하는 50% acetonitrile(Sigma)을 사용하였고 유량은 0.3ml/min으로, 검출은 220nm에서 측정하였다. 가수분해물 2% 용액을 0.45  $\mu\text{m}$ 로 filtering 한 후 50  $\mu\text{l}$ 를 주입하였다. 표준물질은 모두 Sigma사 제품으로서  $\beta$ -lactoglobulin(18,400Da),  $\alpha$ -lactalbumin(14,400Da), aprotinin(6,500Da), insulin B fragment(3,495Da),  $\alpha$ -MSH(1,650Da), bradykinin(1,060Da), GSH(307Da) 및 Try(181Da)를 0.1% 용액으로 하여 사용하였다.

**Table 1. Endopeptidase and exopeptidase activities in commercial proteinase**

Enzyme	Enzyme activity (U/ $\mu\text{g}$ )	
	Endopeptidase	Exopeptidase
Alcalase	368	—
Neutrase	700	—
Protamax	2,373	—
Pascalase	1,201	—
Flavourzyme	674	8,053
Promod 192	1,152	1,878
Sumizyme MP	2,703	4,394
Sumizyme LP	2,062	3,421

**통계처리**

측정값은 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었고, Duncan's multiple range test(SAS, 1996)로 유의차를 검정하였다.

**결과 및 고찰****효소활성 측정**

단백질 가수분해 효소의 활성은 Table 1에 나타내었다. Endopeptidase 활성은 sumizyme MP > protamax > sumizyme LP > pescalase > Promod 192 > neutrase > flavourzyme > alcalase 순으로 높았다. Exopeptidase 활성을 측정한 결과 alcalase, neutrase, protamax, pescalase는 활성이 없었으며, flavourzyme > sumizyme MP > sumizyme LP > Promod 192 순으로 높았다.

**가수분해물의 ACE 저해효과**

ACE 저해효과 측정은 통상법(general method)과 전처리법(pretreatment method)의 두 가지 방법을 사용하여 실시하였다.

식품단백질 유래의 ACE 저해 펩타이드는 *in vitro*에서의 ACE 저해효과와 *in vivo*에서의 혈압강하작용이 반드시 일치하지 않는는데, 이것은 일반적인 ACE 저해 펩타이드의 스크리닝(통상법)에서는 ACE 저해 펩타이드 뿐만 아니라 ACE 기질도 ACE 저해물질로써 검출되어 *in vivo*에서 혈압강하작용을 나타내지 않기 때문이며, ACE 저해효과를 나타내는 펩타이드가 기질 또는 저해물질 중 어느 것인지 확인하기 위해서는 ACE 저해효과 측정에 앞서 ACE와 펩타이드를 전 반응을 하여 IC<sub>50</sub>값이 변하는지를 보면 알 수 있다(上野, 1996). 그러나 펩타이드를 ACE와 반응시킨 후 기질을 첨가하는 방법(전처리법)은 ACE의 순도에 따라서는 섞여 있는 펩티다제

**Table 2. ACE inhibitory properties of casein hydrolysates**

Enzyme	General method		Pretreatment method	
	Inhibition rate (%)	IC <sub>50</sub> value <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Inhibition rate (%)	IC <sub>50</sub> value ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Sumizyme LP	47.02±3.61	266.63±20.45	45.09±4.42	278.57±27.35
Promod 192	49.15±1.57	254.45± 4.35	49.22±5.74	255.70±29.83
Sumizyme MP	41.30±0.16	302.67± 1.14	23.74±2.40	529.35±53.46
Flavourzyme	39.98±1.27	312.85± 9.91	40.26±0.79	310.54± 6.11
Neutrase	25.17±1.05	495.19±20.65	13.33±1.08	941.19±76.42
Alcalase	41.52±1.57	309.56±12.03	25.88±3.12	486.43±58.60
Pascalase	38.39±3.21	326.75±27.32	29.45±1.40	423.93±20.20
Protamax	56.32±1.94	221.98± 7.66	31.05±4.36	406.58±57.04
Trypsin	51.03±1.83	245.14± 8.80	13.70±4.72	970.07±34.46

Hydrolysis were performed for 24 hrs. with commercial proteinase at 47°C.

Enzyme : substrate ratio = 1:100(w/w).

<sup>1)</sup> Amounts of inhibitors needed for 50% inhibition ACE activity.

의 영향으로 ACE 저해 펩타이드가 분해되는 경우가 있으므로, ACE 저해효과를 가지는 펩타이드의 스크리닝 시에 통상법과 전처리법을 동시에 실시하는 것이 바람직하다(川岸, 1997).

Table 2에 나타낸 바와 같이 케이신 가수분해물의  $IC_{50}$ 값은 통상법에서 220~495  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 전처리법에서 256~970  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위로서 대부분의 효소 가수분해물이 전처리법에서 ACE 저해효과가 낮았다. 그러나 promod 192 가수분해물은 통상법과 전처리법에서  $IC_{50}$ 값이 각각 254.45과 255.70  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 차이가 없었다. 이 값은 Hyun과 Shin(2000)이 보고한  $IC_{50}$ 값이 1,560  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 케이신의 alcalase 분해물 보다 ACE 저해효과가 높은 것이었다. 따라서 ACE 저해효과가 높은 케이신 가수분해물을 제조하기 위한 단백질 분해효소로서 promod 192를 사용하는 것이 바람직하고 사료되었다.

#### 가수분해물의 분자량 측정

여러 가지 효소를 사용하여 제조한 케이신 가수분해물의 분자량 분포를 Table 3에 나타내었다. ACE 저해효과가 높은

**Table 3. The molecular weight distribution of casein hydrolysates**

Enzymes	Molecular weight distribution <sup>1)</sup> (Da) (%)			Average molecular weight (Da)
	$\geq 1,000$	1,000~500	$\leq 500$	
Sumizyme LP	34.56	36.20	29.25	1,051
Promod 192	21.0	34.91	44.09	773
Sumizyme MP	21.0	34.91	44.09	750
Flavourzyme	29.56	30.30	40.14	920
Neutrase	63.88	15.64	20.47	2,340
Alcalase	37.30	31.13	31.57	1,109
Protamax	50.32	27.36	22.31	1,528
Pescalase	37.56	35.79	26.65	1,189

<sup>1)</sup> Value are areas within a defined molecular mass distribution, expressed as % total area of chromatogram at 220nm.

promod 192 가수분해물의 평균 분자량은 773Da였고, 79% 이상이 분자량 1,000Da 이하이었다. 반면 ACE 저해효과가 낮은 neutrase와 alcalase 가수분해물은 평균 분자량이 2,340과 1,109Da으로서 promod 192 가수분해물 보다 큰 펩타이드 이었다. 이와 같이 가수분해물의 분자량은 ACE 저해효과와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료되었다. 이에 대하여 Ariyoshi(1995)는 식품 단백질의 ACE 저해효과가 높은 펩타이드는 주로 분자량 1,000 Da이하이었다고 하였으며, 오 등(1997)도  $\kappa$ -케이신을 트립신으로 가수분해한 결과 분자량 1,000 Da 이하 분획의  $IC_{50}$ 값은 115  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으나 3,500 Da 인 분획은 238  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 ACE 저해효과가 높은 분획은 분자량 1,000 Da 이하였다고 보고한 바 있다. 따라서 가수분해 조건을 조절하여 적당한 길이의 펩타이드를 생산하는 것이 ACE 저해효과에 중요하다고 생각되며, 계속해서 효소의 복합사용과 첨가량 및 가수분해 시간을 달리하면서 ACE 저해효과에 미치는 영향을 알아보았다.

#### 효소의 복합사용이 가수분해물의 ACE 저해효과에 미치는 영향

효소를 어떻게 선택하느냐에 따라 다양한 펩타이드가 생기므로 endo형 효소와 exo형 효소를 복합사용하여 가수분해물의 ACE 저해효과에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 0.5%의 neutrase, collupulin, alcalase 및 pascalase의 endopeptidase와 먼저 반응시킨 후 promod 192 1%를 첨가하여 가수분해물의 ACE 저해효과를 측정하였다. Table 4에 나타낸 바와 같이 효소 복합사용에 의한 ACE 저해효과에 유의적인 차이가 없거나 오히려 다소 낮아 효소를 복합 사용하여 대부분 케이신을 펩신, bromelanin 및 alcalase로 분해하였을 때 ACE 저해효과가 높았다고(염 등, 1993) 한 보고와 다른 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 promod 192가 endo형 활성과 exo형 활성을 모두 가지고 있기 때문에 endopeptidase의 복합사용이 ACE 저해효과에 영향을 주지 못하였다고 생각

**Table 4. Effects of enzyme combinations on the ACE inhibitory properties of casein hydrolysates**

Enzymes	General Method		Pretreatment Method	
	Inhibition rate(%)	$IC_{50}$ value <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Inhibition rate(%)	$IC_{50}$ value ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Promod 192 <sup>1)</sup>	$49.15 \pm 1.57$	$254.45 \pm 8.13^b$	$49.22 \pm 5.74$	$255.70 \pm 29.83^b$
Neutrase → Promod 192	$53.18 \pm 1.44$	$235.14 \pm 6.38^b$	$55.05 \pm 1.37$	$226.70 \pm 26.02^b$
Collupulin → Promod 192	$52.36 \pm 2.21$	$238.94 \pm 10.07^b$	$55.01 \pm 1.46$	$228.81 \pm 26.88^b$
Alcalase → Promod 192	$42.94 \pm 2.81$	$291.73 \pm 19.12^a$	$33.18 \pm 0.44$	$376.73 \pm 9.86^a$
Pascalase → Promod 192	$48.30 \pm 3.51$	$258.83 \pm 18.88^{ab}$	$53.36 \pm 0.99$	$234.30 \pm 4.35^b$

<sup>1)</sup> Hydrolysis of casein with promod 192 was performed at 47°C and pH 7.0 for 24 hrs.

<sup>2)</sup> Amounts of inhibitors needed for 50% inhibition ACE activity.

<sup>a~d</sup> Within same rows, means with different superscripts are significantly different( $P < 0.05$ ).

**Table 5. Effects of enzyme concentrations on the ACE inhibitory properties of casein hydrolysates**

Amount of enzymes (%)	General method		Pretreatment method	
	Inhibition rate (%)	IC <sub>50</sub> value <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Inhibition rate (%)	IC <sub>50</sub> value ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
0.01	6.56±0.13	1905.49±20.54 <sup>a</sup>	9.14±0.05	1368.38±7.41 <sup>a</sup>
0.1	36.83±3.63	341.10±33.60 <sup>b</sup>	22.47±2.79	538.10±76.38 <sup>b</sup>
0.3	44.89±0.73	278.53±4.52 <sup>c</sup>	27.62±2.18	460.66±86.33 <sup>bc</sup>
0.5	43.95±2.16	284.79±13.98 <sup>c</sup>	32.35±3.25	386.36±39.05 <sup>bc</sup>
0.7	44.83±3.29	279.61±20.51 <sup>c</sup>	40.21±2.36	310.82±17.41 <sup>bc</sup>
1.0	47.73±0.31	256.63±23.67 <sup>c</sup>	47.00±2.69	266.42±15.27 <sup>c</sup>
1.5	46.73±1.93	267.73±11.08 <sup>c</sup>	52.89±9.72	240.41±44.18 <sup>c</sup>
2.0	49.60±1.98	252.20±10.01 <sup>c</sup>	59.71±3.96	209.82±13.92 <sup>c</sup>

Hydrolysis of casein with promod 192 were performed at 47°C and pH 7.0 for 24hrs.

<sup>1)</sup> Amounts of inhibitors needed for 50% inhibition ACE activity.

<sup>a~d</sup> Within same rows, means with different superscripts are significantly different( $P<0.05$ ).

되며, alcalase를 복합사용한 가수분해물에서 ACE 저해효과가 다소 낮아진 것은 가수분해가 많이 진행되면서 ACE 저해효과를 가지는 펩타이드의 말단이 분해되어 ACE 저해효과를 상실하였기 때문으로 사료되었다.

#### 효소 첨가량과 가수분해시간이 가수분해물의 ACE 저해효과에 미치는 영향

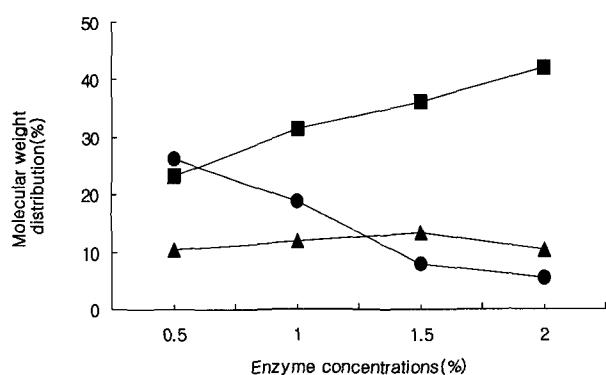
효소 첨가량이 케이신 가수분해물의 ACE 저해효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 promod 192 첨가량을 0.01~2.0%로 달리하면서 케이신 가수분해물의 ACE 저해효과를 측정하고 그 결과를 Table 5에 나타내었다.

효소첨가량이 증가함에 따라 ACE 저해효과 또한 급격히 증가하여 통상법에서 효소 0.3% 첨가까지는 IC<sub>50</sub>값이 1,905.49  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 278.53  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 ACE 저해효과가 증가하였다. 그러나 그 이상 효소 첨가에서는 유의적인 차이가 없었다. 전처리법에서는 효소 첨가량을 1.0%까지 증가시킬 수록 ACE 저해효과 또한 증가하였고, 그 이상의 효소 첨가

는 ACE 저해효과에 영향을 주지 않았다.

효소 첨가량에 따른 가수분해물의 분자량 분포를 알아보았다. Fig. 1에서와 같이 효소 첨가량이 많을수록 1,000 Da 이상의 펩타이드 함량은 감소하였고, 1,000 Da 이하의 펩타이드함량은 증가함을 알 수 있었다. 이와 같이 단백질 효소 분해물 내에 저분자 펩타이드 증가 현상은 ACE 저해효과의 증가에 직접적인 요인이 되는 것을 알 수 있었다. 따라서 ACE 저해효과가 높은 케이신 가수분해물을 제조하기 위한 효소 첨가량은 케이신에 대하여 1%로 하는 것이 적당하였다.

가수분해시간을 4시간에서 48시간까지 증가시키면서 가수분해물의 ACE 저해효과를 알아보았다. 그 결과 Table 6에 나타낸 바와 같이 통상법에서는 효소 가수분해시간이 증가함에 따라 반응 초기에는 ACE 저해효과 또한 증가하였으나 8시간 이후에는 차이가 없었으며, 전처리법에서는 12시간까지 IC<sub>50</sub>값이 265.84  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 ACE 저해효과가 증가하였으나 그 이상에서는 ACE 저해효과에 차이가 없었고, 48시간에는 IC<sub>50</sub>값이 303.32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 낮아졌다. 따라서 ACE 저해효과가 높은 케이신 가수분해물을 제조하기 위해서는 충분한 가수분해 시간이 필요하나 너무 많은 가수분해시간은 오히려 ACE 저해효과를 감소시키므로 12시간이 적당하다고 사료되었다. 탈지 대두박, 계란 알부민 및 케이신을 가수분해한 결과 8시간까지는 ACE 저해효과가 급격히 증가하였으나, 그 이후에는 오히려 감소하는 경향을 나타내었고(염 등, 1993), 염 등(1992)도 고등어 분해물의 ACE 저해효과를 살펴 본 결과, 단백질 가수분해 시간에 따른 ACE 저해작용은 가수분해 초기에는 낮다가 8시간에는 급격히 증가하는 경향을 나타내었다고 하였다. Matsui 등(1993)은 정어리 단백질에 효소첨가량과 가수분해시간이 증가할 수록 ACE 저해효과 또한 증가하였다고 하였으며, 유산균 스타터와 *Asp. oryzae*



**Fig. 1. Effects of promod 192 concentrations on the molecular weight distribution of casein hydrolysates.** 1,000Da over(●), 1,000 Da below(■), 180 Da below(▲)

**Table 6. Effects of hydrolysis times on the ACE inhibitory properties of casein hydrolysates**

Hydrolysis time (hrs.)	General method		Pretreatment method	
	Inhibition rate (%)	IC <sub>50</sub> value* (μg/ml)	Inhibition rate (%)	IC <sub>50</sub> value (μg/ml)
4	45.70±2.74	274.02±16.45 <sup>a</sup>	20.77±0.13	601.99± 3.89 <sup>a</sup>
8	49.78±2.20	251.38±11.11 <sup>ab</sup>	33.92±1.29	368.84±14.07 <sup>b</sup>
12	50.27±0.78	248.71± 3.88 <sup>b</sup>	47.02±3.34	265.84±26.20 <sup>c</sup>
24	52.21±0.39	239.45± 1.78 <sup>b</sup>	50.55±4.06	248.11±19.96 <sup>c</sup>
48	51.04±0.06	244.93± 0.31 <sup>b</sup>	51.21±2.36	303.32± 8.94 <sup>b</sup>

Hydrolysis of casein with promod 192 were performed at 47°C and pH 7.0.

<sup>1)</sup> Amounts of inhibitors needed for 50% inhibition ACE activity.

<sup>a~d</sup> Within same rows, means with different superscripts are significantly different( $P<0.05$ ).

유래 단백질분해효소로 ACE 저해효과가 있는 발효유 제조 시에도 배양 6시간까지 ACE 저해효과가 급격히 증가하였다 (이 등, 2000). 가수분해시간이 경과함에 따라 ACE 저해효과가 감소하는 것은 ACE 저해효과를 가지는 펩타이드가 효소 가수분해의 진행에 따라 다시 분해되어 펩타이드의 길이나 아미노산 조성이 달라지기 때문으로 사료되었다.

## 요 약

최근 고혈압을 예방하기 위한 ACE 저해 펩타이드에 대한 연구는 주로 여러 가지 식품 단백질의 효소 가수분해물로부터 얻어진 펩타이드를 중심으로 이루어지고 있다. 본 연구에서는 케이신을 여러 가지 상업용 단백질분해 효소를 사용하여 ACE 저해 효과가 높은 가수분해물 제조 시 가수분해 조건이 ACE 저해효과에 미치는 영향을 알아보자 하였으며 적정 가수분해 조건을 설정하고자 하였다. ACE 저해효과를 가지는 케이신 가수분해물을 제조하기 위한 효소 종류, 첨가량 및 가수분해시간은 효소는 *Aspergillus oryzae* 유래의 promod 192를 사용하고, 효소의 첨가량은 케이신에 대하여 1%, 반응시간은 47°C에서 12시간으로 하는 것이 적당하였다. 이 때 케이신 가수분해물의 IC<sub>50</sub>값은 248.71 μg/ml(통상법), 265.84 μg/ml(전처리법)로서 ACE 저해효과가 높았다.

## 참고문현

- Ariyoshi, Y. (1993) Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, **4**, 139-144.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. and Cushman, D. W. (1980) Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *The J. of Biol. Chem.* **255**, 401-407.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharm.* **20**, 1637-1648.
- Hyun, C. K. and Shin, H. K. (2000) Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochem.* **36**, 65-71.
- Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kiluchi, M. (1993) Purification and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1107-1081.
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M. and Mimura, T. (1988) Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **155**, 332-337.
- Manjusri, D. and Richard, L. S. (1975) Pulmonary angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **250**, 6762-6768.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N. and Suzuki, H. (1987) Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1581-1586.
- Maruyama, S., Miyoshi, S. and Tanaka, H. (1989) Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2763-2767.
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H. (1985) Angiotensin-I converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1405-1409.
- Maruyama, S. and Suzuki, H. (1982) A peptide inhibitor of angiotensin converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1393-1394.
- Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y. (1993) Inhibition of angiotensin I converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 922-925.
- Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. (1991) Structures and activity of angiotensin converting enzyme inhibitors in an α-zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1313-1318.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. and Takano, T. (1995) Purification and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitor from sour milk. *J. of Dairy Sci.* **78**, 777-783.

15. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. and Takano, T. (1995) Antihypertensive effect of sour milk and peptide isolated from it that are inhibitors to angiotensin- I converting enzyme. *J. of Dairy Sci.* **78**, 1253-1257.
16. SAS (1996) SAS/STAT Software for PC. Releasw 6.11, *SAS Institute*, Cary, Nc, U.S.A.
17. Webster, J. and Koch, H. F. (1996) Aspects of tolerability of centrally acting antihypertensive drugs. *J. of Cardiovascular Pharm.* **27**, S49-54.
18. Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. (1994) Antihypertensive effect of the peptide derived from casein by on extracellular proteinase from *Lactobacillus heveticus* CP790. *J. of Dairy Sci.* **77**, 917-922.
19. Yokoyama, K., Chiba, H. and Yoshikawa, M. (1992) Peptide inhibitors for angiotensin- I converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotech. and Biochem.* **56**, 1541-1545.
20. 上野川修一 (1996) 乳の科學. 朝書店, pp. 11
21. 이은선, 이정희, 박민홍, 허철성, 백영진 (2000) 안지오텐신 전환효소 효과가 있는 발효유의 제조방법. 대한민국공개특허 2000-0020202.
22. 오세종, 김세현, 김상교, 백영진, 조경현 (1997)  $\kappa$ -Casein의 chymosin, pepsin 및 trypsin 가수분해물에 대한 안지오텐신 변환효소저해효과 탐색. *한국식품과학회지*, **29**, 1316-1318.
23. 염동민, 노승배, 이태기, 김선봉, 박영호 (1993) 식품단백질 효소 가수분해물의 Angiotensin I 전환효소 저해작용. *한국영양식량학회지*, **22**, 226-232.
24. 염동민, 이태기, 변한석, 김선봉, 박영호 (1992) 효소에 의한 고등어 근육단백질 가수분해물의 Angiotensin- I 전환효소 저해작용. *한국수산학회지*, **25**, 229-235
25. 原征産, 松本 (1995) 茶の血壓上昇抑制作用. *食品工業*, **38**, 78
26. 川岸瞬朗 (1997) 생체기능조절물질 연구법. 한림원, pp. 121

(2002년 2월 8일)