



## 산양유 $\beta$ -Casein의 효소 가수분해 특성과 가수분해물의 Angiotensin Converting Enzyme 저해 효과

박용국 · 권일경 · 김거유\*

강원대학교 축산식품과학과

### Hydrolysis Characteristics of Goat Milk $\beta$ -Casein by Enzyme and Angiotensin Converting Enzyme Inhibition Effects of Hydrolysate

Yong-Kuk Park, Gur-Yoo Kim, and Il-Kyoung Kwon

Department of Food Science and Technology in Animal Resources, Kangwon National University

#### Abstract

This study was carried out to understand hydrolytic characteristics of  $\beta$ -casein by enzyme in goat milk and to measure the inhibition effect of the ACE of the hydrolysate. In order to conduct the experiment,  $\beta$ -casein of goat milk was separated using Mono S HR 5/5, a cation exchange column. The separated  $\beta$ -casein was treated with trypsin of animal hydrolysis enzymes, in an effort to verify the characteristics of hydrolysis. The inhibition activity of ACE was measured and the results are as follows. By analyzing the hydrolysate separated from the trypsin-processed  $\beta$ -casein of goat milk, the inhibition effect of the ACE was measured trypsin-hydrolyzed  $\beta$ -casein demonstrated a  $25.36 \pm 0.79\%$  of inhibition effect and the  $IC_{50}$  of the hydrolysate from the trypsin-processed  $\beta$ -casein reached  $308.7 \pm 2.77$  ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Key words : goat milk,  $\beta$ -casein, ACE-inhibition, hydrolysate

#### 서론

최근 국민소득의 증가와 생활수준의 향상에 따라 건강증진 욕구가 높아지면서 식품으로부터 다양한 생리활성을 나타내는 기능성 성분들에 대한 연구가 활발히 진행되어가고 있으며 그 중 우유와 대두 등의 식품단백질을 효소 가수분해시켜 얻어진 다양한 생리활성을 가지는 천연 펩타이드들은 기능성 식품의 신소재로서 뿐만 아니라 의약품 분야에까지 점차로 그 용도가 확대되고 있다.

식품 단백질에서 유래하는 대표적인 peptide로는 opioid peptide(Zioudrou *et al.*, 1979), ACE(angiotensin converting enzyme) 저해 peptide(Maruyama *et al.*, 1987), 혈소판 응집저

해 peptide(Meisel *et al.*, 1990), 면역 활성 peptide(Migliore-Samour *et al.*, 1989), 항암 peptide(Kim *et al.*, 1995) 등이 알려져 있으며 특히 우유 단백질은 아주 다양한 생리활성 peptide를 생산할 수 있는 고기능성 단백질원으로 이용되고 있다(Lee, 1998).

ACE는 1970년 경 뱀독에서 처음 발견되었으며, zinc protease의 일종으로 활성화 되기 위해서는 아연과 염소가 필요한 효소로서 혈압강화작용을 가지는 bradykinin을 분해하여 불활성화시키는 한편 불활성 상태의 angiotensin-I을 절단하여 강한 혈압상승작용을 나타내는 angiotensin-II로 활성화 시킴으로써 고혈압의 원인이 된다고 알려져 있다. Angiotensin I은 decapeptide로서 혈압 상승에 중요한 역할을 하는 angiotensin II의 전구체 역할을 한다. Angiotensin I은 폐의 내피세포에 존재하는 ACE에 의해서 octapeptide인 angiotensin II로 대부분 전환된다. 이렇게 생성된 angiotensin II는 norepinephrine, epinephrine, vasopressin 등의 호르몬과 같이 vasoconstrictor로서 작용하는 것을 Mullally 등(1997)과 Nakamura

\* Corresponding author : Gur-Yoo Kim, Dept. of Food Science and Technology in Animal Resources, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea. Tel: 82-33-250-8647, Fax: 82-33-244-2198, E-mail: gykim@kangwon.ac.kr

등(1995)에 의해 확인되었다.

Angiotensin II는 혈관 평활근을 자극하여 소동맥의 수축이완기의 혈압을 norepinephrine보다 4~8배 증가시키며 부신피질을 자극하여 전해질의 조절에 관여하는 aldosterone의 분비를 증가시킨다. 또한 angiotensin II는 postganglionic sympathetic neuron에 직접 작용하여 norepinephrine의 분비를 촉진하여 혈압과 수분 흡수, vasopressin 및 ACTH의 분비를 증가시키기 위하여 뇌의 우회기관에 작용한다. 한편, angiotensin II의 생성에 관여하는 안지오펩신 전환효소는 강력한 vasodepressor로 알려진 kinin의 중요한 유도체인 bradykinin (nonapeptide) 및 lysylbradykinin을 불활성화하는 것으로 Tom 등(2003)에 의해 알려져 있다.

우유 단백질은 아주 다양한 생리 활성 peptide를 생산할 수 있는 고기능성 단백질원으로 이용되고 있으며 그중 ACE 활성 저해peptide는 가열조건에 안정하며 체내에서의 흡수도 용이한 비교적 저분자 물질로서 이들의 활성 저해효과는 혈압 강하제와 비교하였을 때 비교적 낮은 활성을 나타내지만 화학합성 저해제의 부작용으로 인한 피해를 줄일 수 있으며 우리가 항시 섭취하는 식품 중에 존재한다는 보편성과 안정성 면에서 그 유용성이 기대된다.

지금까지 우유단백질의 효소가수분해물에 의한 ACE 억제 효과에 대해서는 많은 연구가 이루어져 왔으나, 산양유 단백질에 대한 연구는 우유 단백질에 비하여 거의 이루어지지 않았다. 우유 케이스인에서 분리된 ACE 저해 펩타이드는 N-말단과 C-말단의 분해물이었으며, 분해물에는 소수성 아미노산이 높은 비율로 구성되어 있다(Gobbetti *et al.*, 2004).

따라서 본 시험에서는 산양유 케이스인 가운데 가장 많은 비율을 차지하고 있으며, 산양유 케이스인의 주단백질인  $\beta$ -casein을 동물성 효소인 trypsin으로 가수분해 처리를 하여  $\beta$ -casein의 trypsin에 의한 가수분해 특성을 알아보고, 케이스인 가운데 소수성이 가장 강한  $\beta$ -casein 가수분해물의 ACE 활성 저해능력을 측정하여 산양유의 기능성 식품 검색의 기초 연구로 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 산양유 산케이스인 및 $\beta$ -casein의 분리

산양유는 강원도 홍천에 위치한 조롱골 목장에서 착유한 신선한 혼합유를 사용하였으며, 산양유로부터 산케이스인의 분리는 Barrefors 등(1985)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 순수한  $\beta$ -casein의 분리는 Fast Protein Liquid Chromatography(AKTA10, Pharmacia Biotech, Sweden)를 이용하였으며, Hollar 등(1991)의 방법에 따라 실시하였다. 6 M의 urea와 0.02 M acetate가 포함된 UA완충액(pH 5.0)은 케이스인 1

mg을 0.2  $\mu$ m filter(Millipore, USA)로 여과하여 사용하였으며, UA완충액 10  $\mu$ L를 주입구에 주입하였다. 컬럼은 Mono S HR 5/5를 이용하였으며, 0~0.2 M NaCl과 0.2~1.0 M NaCl로 step gradient를 적용하여 용출시켰으며, flow rate는 1 mL/min으로 하였다. 분리된 케이스인은 fraction collector에 의해 수집되었으며, 수집된 분획물들을 동결건조하여 다음 실험에 사용하였다.

### $\beta$ -Casein의 Trypsin에 의한 가수분해

$\beta$ -casein의 trypsin(Porcine, Amersham Bioscience, UK)에 의한 가수분해는 Hernandez-Ledesma 등(2002)의 방법을 변형하여 실시하였다. 0.02 M의 Tris-HCl과 0.01 M의 CaCl<sub>2</sub>가 포함된 완충액(pH 7.8)에 10%  $\beta$ -casein 기질용액을 제조하여 효소와 기질의 비율을 1/500으로 하여 37°C에서 120분간 정치시켜 가수분해하였다. 120분간 가수분해하면서 30분 간격으로 시료를 채취하였으며, 분해는 95°C에서 15분간 열처리하여 중지시켰다.

### 전기영동

전기영동(Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)은 Laemmli 법(1970)에 따라 실시하였다. 각각 4%와 12.5%의 stacking gel과 separating gel을 사용하였으며, 15 mA에서 20분, 30 mA(Hoefer, EPS2A, USA)에서 60분간 전기영동을 실시하였다. 겔은 0.01% coomassie brilliant blue R-250(0.025% coomassie blue R-250, 40% methanol, 7% acetic acid)으로 2시간 염색 후 탈색액(40% methanol, 7% acetic acid)으로 6시간 동안 탈색하였다.

### $\beta$ -Casein의 Trypsin에 의한 가수분해도 측정

$\beta$ -casein의 trypsin에 의한 가수분해도는 가수분해물의 NPN 함량을 측정하였다. NPN은 Lowry 등(1951)의 방법에 준하여 측정하였다. 0.5% cupric citrate와 0.1% sodium citrate의 혼합용액인 solution A와 0.1 N NaOH 용액에 sodium carbonate 2%로 용해한 solution B를 1:50의 비율로 혼합하여 alkaline copper 시약을 제조하였다. Folin 시약은 folin-ciocalteu phenol reagent(Sigma, USA)를 10배 희석하여 사용하였다. 가수분해물 0.5 mL를 시험관에 취한 다음 alkaline copper 시약을 2.5 mL를 가하고 Voltex 한 후에 10분간 실온에서 정치한 다음 folin reagent 0.25 mL를 첨가하고 실온에서 30분간 정치하였다. 흡광도는 UV/VIS spectrophotometer(CV-530, Jasco, Japan)를 사용하여 540 nm에서 측정하였으며 bovine serum albumin(Sigma, USA)을 사용한 표준 곡선에 의해 환산하였다.

### ACE 저해활성 측정

ACE 활성 저해효과는 Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. Borate buffer는 0.2 M boric acid(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)와 0.045 M sodium borate(Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O)를 4.5:5.5의 비율(V/V)로 섞어서 pH를 8.3으로 조정 한 후, 최종 농도가 0.4 M이 되도록 NaCl 을 첨가하여 제조하였다. 시료 50 µL에 borate buffer로 5 mM이 되도록 Hippuric acid-Histidine-Leucine (Hip-His-Leu; Sigma, USA)를 첨가한 기질 용액 200 µL를 가한 후 3분 동안 예비배양한 후에 ACE(rabbit lung powder, Sigma, USA) 효소용액 20 µL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 1 N HCl 250 µL를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.7 mL를 가하고 잘 교반한 후에 30분간 방치하고 상정액을 1 mL 취하였다. 이 상정액을 80°C의 dry oven에서 완전히 건조시킨 후, 1 M NaCl을 3 mL 가하여 용해시킨 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하였으며 ACE 저해율은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = (Ec - Es) / (Ec - Eb) \times 100$$

Ec=시료대신 증류수 첨가 시의 흡광도

Es=시료 첨가 시의 흡광도

Eb=ACE를 첨가하지 않았을 때의 흡광도

**IC<sub>50</sub>값(µg/mL)측정**

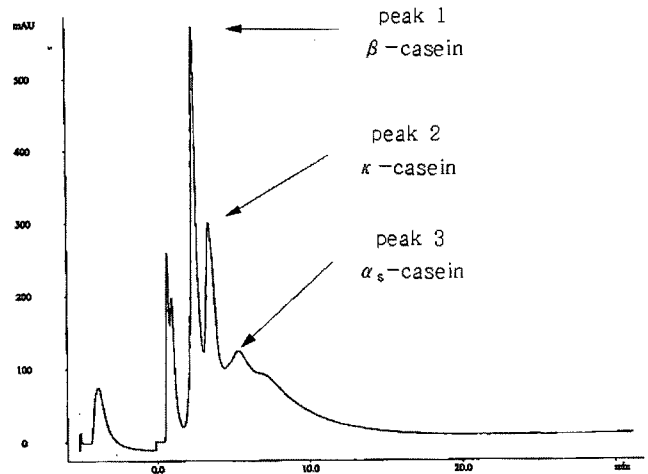
시료를 일정한 농도로 희석 한 후에 ACE 저해효과를 측정 한 다음 이들 농도에 대한 회귀곡선을 산출하여 IC<sub>50</sub>을 측정 하였다. 회귀곡선은 각각 25, 50, 100, 200 µL를 가한 후 ACE 저해율을 조사한 다음 직선식을 산출하여 ACE를 50% 저해 하는데 필요한 mL 수를 계산하여 peptide량(µg)으로 나타내 었다.

**결과 및 고찰**

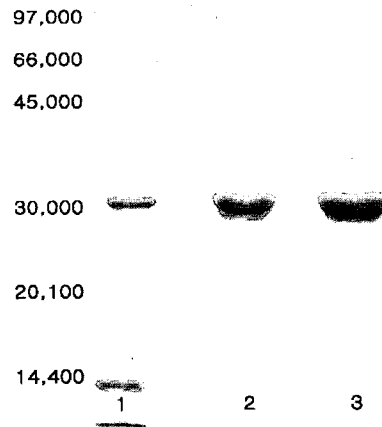
**FPLC를 이용한 산양유 β-Casein의 분리**

동결 건조된 산양유 케이신으로부터 Mono S HR 5/5컬럼 을 이용하여 순수한 β-casein의 분리를 실시하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다(Fig. 1, Fig. 2).

β-casein은 등전점이 5.35이므로 6 M의 urea와 0.02 M acetate가 포함된 pH 5.0 Urea-acetate(UA)완충액을 사용하였 다. 그 결과 산양유 casein의 경우는 3개의 peak로 분리되었 으며(Fig. 1), peak 1이 β-casein, peak 2는 κ-casein, peak 3은 α-casein으로 확인되었다. 이들 분획들을 low molecular weight maker(Amersham Bioscience, UK) 와 β-casein standard (Sigma, USA)를 이용하여 SDS-PAGE로 확인한 결과 순수한 β-casein 이 분리된 것을 확인하였다(Fig. 2).



**Fig. 1. Elution profile of whole casein from goat milk run by fast protein liquid chromatography on a Mono-s HR 5/5. A solution containing 1 mg casein in 100 uL was applied to the column and eluted at a flow rate of 1 mL/min.**



**Fig. 2. SDS-PAGE patterns on 12.5% gel for fractions obtained by cation exchange chromatography of goat caseins on a column of mono HR 5/5. Lane 1, Low molecular weight maker (phosphorylase b : 97,000, albumin : 66,000, ovalbumin : 45,000, carbonic anhydrase : 30,000, trypsin inhibitor : 20,100, α-lactalbumin : 14,400) ; Lane 2, β-casein standard ; Lane 3, peak 1.**

**Trypsin에 의한 산양유 β-Casein의 가수분해**

Fig. 3은 β-casein 가수분해물을 30분 간격으로 채취하여 전기영동을 통하여 가수분해도를 확인한 것이다. 가수분해 직후부터 β-casein 위치의 band가 희미해지기 시작하고 저분 자량의 band가 나타나기 시작하였으나 120분이 지난 후에는 저분자 band를 확인할 수 없었다. β-casein을 trypsin으로 처리하였을 때 가수분해는 30분부터 가수분해가 시작되어 120 분까지 완만하게 증가하였다. 산양유 β-casein을 trypsin으로

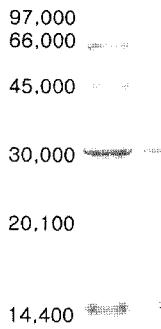


Fig. 3. SDS-PAGE patterns on 12.5% gel of heated goat  $\beta$ -casein hydrolysates by trypsin at 37°C for 0, 30, 60, 90 and 120 min. (Lane 2~6). Lane 1. Low molecular weight maker (phosphorylase b : 97,000, albumin : 66,000, ovalbumin : 45,000, carbonic anhydrase : 30,000, trypsin inhibitor : 20,100,  $\alpha$ -lactalbumin : 14,400). (E/S : 1/500).

(E/S : 1/500) 가수분해하여 NPN 생성량을 측정한 결과 가수분해 직후 63  $\mu$ g이었으나 120분이 경과한 후에는 94  $\mu$ g으로 증가하는 것을 확인하였다. 1000 Da 이하의 펩타이드가 증가함에 따라 ACE 저해효과도 증가한다(Oh *et al.*, 1997)는 보고에서와 같이 NPN 생성량이 증가할수록 ACE 저해율이 높아지며, 효소 첨가량이 증가할수록 ACE 저해효과가 급격히 증가하나 효소 첨가량을 1.0% 이상 첨가시에는 ACE 저해효과가 증가하지 않는다고 하였다(Kim *et al.*, 2002).

**$\beta$ -Casein 가수분해물의 ACE 저해활성의 측정**

산양유에서 분리된  $\beta$ -casein을 trypsin으로 처리하여(E/S : 1:500) 120분 경과 후 그 가수분해물을 이용하여 ACE 저해효과를 측정하였다. 그 결과 가수분해하지 않은  $\beta$ -casein은 1.80 $\pm$ 1.21%의 ACE 저해활성을 보였으나 trypsin으로 가수분해 하여 ACE 저해 활성을 측정하였을 때 25.36 $\pm$ 0.79%의 저해 활성을 나타내었다. 이러한 결과는  $\beta$ -casein의 trypsin에 의한 가수분해의 결과로 생성된 저분자 형태의 펩타이드가 저해율을 증가시킨 것으로 볼 수 있다(Fig. 4). Trypsin에 의한  $\beta$ -casein 가수분해물의 IC<sub>50</sub>을 측정한 결과 308.7 $\pm$ 2.77  $\mu$ g/mL로 나타났다(Table 1). 우유 전케이스인을 trypsin으로 37°C에서 가수분해하여 ACE 저해 활성을 전처리법으로 측정한 결과 13.7%의 ACE 저해활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub>은 970.07  $\mu$ g/mL를 나타내었다는 kim 등(2002)의 보고와 비교할 때 산양유의  $\beta$ -casein 가수분해물은 ACE 저해활성이 우유 전케이

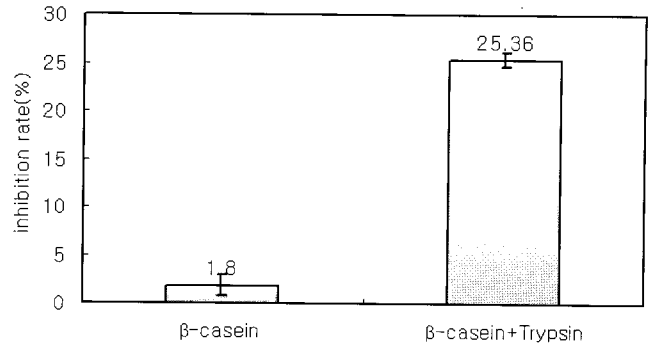


Fig. 4. ACE inhibition rate of  $\beta$ -casein hydrolysate by trypsin.

Table 1. ACE inhibitory activity of  $\beta$ -casein hydrolysate

Protease	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) <sup>1)</sup>
Trypsin	308.7 $\pm$ 2.77

<sup>1)</sup> IC<sub>50</sub>, the concentration  $\beta$ -casein hydrolysate which inhibits 50% of the angiotensin- I converting enzyme activity.

신보다는 높게 나타났다. Minervini 등(2003)은 *L. helveticus* PR4로부터 부분 정제한 proteinase를 이용하여 산양유, 인간, 염소, 돼지, 물소 등의 유즙으로부터 조제한 Na-카제인의 조 가수분해물에 대한 ACE 억제활성을 조사한 결과 종에 따라 2~43% 범위의 ACE 억제율을 나타내었다고 하였다. 또한 이들은 산양유 가수분해물을 RP-FPLC를 이용하여 펩타이드를 순수 분리하여 ACE 억제효과를 측정한 결과 크로마토그래피 분획3에는 산양유  $\beta$ -casein의 일부 아미노산 서열(f 58-65)과 일치하는 펩타이드가 함유되어 있으며, 이들의 IC<sub>50</sub>은 147.3  $\mu$ g/mL를 나타내었다고 하였다.

반면 우유  $\beta$ -케이스인의 일부 아미노산과 일치하는(f 58-76) 펩타이드를 함유하는 우유 단백질 가수분해물의 IC<sub>50</sub>은 크로마토그래피의 분획에 따라 16.2에서 57.2  $\mu$ g/mL를 나타내었다고 하였다. Maruyama 등(1985)은 우유의  $\beta$ -casein을 trypsin으로 가수분해한 가수분해물의 IC<sub>50</sub>은 15 $\mu$ M/L이었다고 보고하였다 위의 결과에서와 같이 유단백질 가수분해물의 IC<sub>50</sub>에 대한 결과는 동물의 유즙과 펩타이드를 구성하고 있는 아미노산 잔기 수에 따라 차이를 나타내고 있다.

본 실험에서는 산양유  $\beta$ -케이스인의 trypsin에 의한 조가수분해물의 IC<sub>50</sub>은 산양유 Na-카제인으로부터 생성된  $\beta$ -케이스인 유래 저분자량 펩타이드에 비하여 높은 수치를 나타내고 있으나, 순수하게 정제한 산양유  $\beta$ -케이스인의 가수분해물로부터 생성되는 펩타이드는 보다 더 높은 ACE 저해활성을 나타낼 가능성은 매우 크다고 하겠다.

각 연구자들의 유단백질에 대한 효소 가수분해물의 ACE 저해효과가 상이한 결과를 나타내는 것은 효소 가수분해물의 결과로 생성된 펩타이드의 구성 아미노산의 종류, 가수분

해물의 아미노산 잔기 수, 케이션의 순도, 가수분해 조건, 효소의 종류 등이 원인으로 생각할 수 있다. 그러나 ACE 저해 활성을 나타내는 펩타이드들의 공통적인 특징 중의 하나는 대부분의 peptide가 10개 미만의 아미노산 잔기로 이루어져 있으며, 이들 펩타이드는 주로 C-말단의 소수성 아미노산 잔기들로 구성되어 있다(Gobbetti *et al.*, 2004; Marco *et al.*, 2004)는 것이다. 따라서 산양유의 주단백질이며 소수성이 가장 강한  $\beta$ -케이션으로부터 각종 효소에 의해 생성되는 펩타이드의 ACE 저해 효과에 대하여 보다 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

산양유  $\beta$ -casein의 효소에 의한 가수분해 특성과 가수분해물의 ACE 저해 효과를 측정하고자 산양유의  $\beta$ -casein을 양이온 교환 컬럼인 Mono S HR 5/5를 이용하여 분리하였으며 분리된  $\beta$ -casein을 동물성 분해효소인 trypsin으로 처리하여 가수분해 특성을 확인하였고 가수분해물의 ACE 저해 활성을 측정하였다. Mono S HR 5/5 양이온 교환 컬럼을 이용한 산양유 산 케이션으로부터 순수한  $\beta$ -casein의 분리는 SDS-PAGE를 이용하여 확인한 결과 순수한  $\beta$ -casein의 분리가 이루어졌음을 확인할 수 있었다.  $\beta$ -casein을 37°C에서 trypsin으로 처리하여 전기영동으로 확인한 결과 가수분해 직후부터  $\beta$ -casein 위치의 band가 희미해지기 시작하고 저분자량의 band가 나타나기 시작하였으나 120분이 지난 후에는 모든 band가 가수분해되어 사라졌고 산양유에서 분리된  $\beta$ -casein을 trypsin으로 처리하여 120분 경과 후 그 가수분해물을 이용하여 ACE 저해효과를 측정한 결과 가수분해하지 않은  $\beta$ -casein은  $1.80 \pm 1.21\%$ 의 ACE 저해 활성을 보였으나 trypsin으로 가수분해하여 ACE 저해 활성을 측정하였을 때  $25.36 \pm 0.79\%$ 의 저해 활성을 나타내었으며, trypsin에 의한  $\beta$ -casein 가수분해물의  $IC_{50}$ 를 측정한 결과  $308.7 \pm 2.77(\mu\text{g/mL})$ 로 나타났다.

## 참고문헌

- Barrefors, P., Ekstrand, B., Fagersam, L., Larsson-Ranznikiewicz, M., Schaar, J., and Steffner, P. (1985) Fast protein liquid chromatography (FPLC) of bovine caseins. *Milchwissenschaft* **40**, 257-265.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971) Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637-1647.
- Gobbetti, M., Minervini, F., and Rizzello, C. G. (2004) Angiotensin - I converting enzyme inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* **57**, 173-188.
- Hernandez-Ledesma, B., Receio, I., Romas, M., and Amigo, L. (2002) Preparation of ovine and caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.* **12**, 805-812.
- Hollar, C. M., Low, A. J. R., Dalglish, D. G., and Brown, R. J. (1991) Separation of major casein fractions using cation-exchange fast protein liquid chromatography. *J. Dairy Sci.* **74**, 2403-2411.
- Kim, H. D., Lee, H. J., Shin, Z. I., Nam, H. S., and Woo, H. J. (1995) Anticancer effects of hydrophobic peptides from a cheese slurry. *Foods Biotechnol.* **4**, 268-273.
- Kim, H. S., In, Y. M., Jeong, S. G., Ham, J. S., Kang, K. H., and Lee, S. W. (2002) Angiotensin- I converting enzyme inhibitory properties of bovine casein hydrolysates in different enzymatic hydrolysis conditions. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **22**, 87-93.
- Laemmil, U. K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage. *Nature* **227**, 680-691.
- Lee, H. J. (1998) Health functional peptides from milk products. *Kor. Dairy Technol.* **16**, 98-105.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Marco, G., Fabio, M., and Carlo, G. (2004) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* **57**, 173-188.
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N., and Suzuki, H. (1985) Angiotensin - I converting enzyme inhibitor derived from enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1405-1410.
- Meisel, H. and Schlimme, E. (1990) Milk proteins : Precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Sci. & Technol.* **1**, 41-49.
- Migliore-Samour, D., Floc'h, F., and Jolles, P. (1989) Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J. Dairy Research* **56**, 357-366.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., and Gobbetti, M. (2003) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antibacterial peptides from

- Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *J. Applied & Environm Micro.* **69**, 5297-5305.
16. Mullally, M., Meisel, M. H., and FitzGerald, R. J. (1997) Identification of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine beta-lactoglobulin. *FEBS Lett.* **402**, 99-101.
17. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakia, K., Okubo, A., Yamazaki, S., and Takano, T. (1995) Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy. Sci.* **78**, 777-783.
18. Oh, S. J., Kim, S. K., Kim, S. K., Baek, Y. J., and Cho, K. H. (1997) Angiotensin- I converting enzyme inhibitory activity of the  $\kappa$ -casein fragments hydrolysed by chymosin, pepsin, and trypsin. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 1316-1318.
19. Tom, B., Dendorfer, A., and Danser, A. H. J. (2003) Bradykinin, angiotensin(1-7), and ACE inhibitors : how do they interact. *Int. J. Biochemistry & Cell Biology* **35**, 792-801.
20. Zioudrou, C., Streaty, R. A., and Klee, W. A. (1979) Opioid peptide derived from food protein. *J. Biochemical Biochemistry* **254**, 2446-2453.
- 
- (2004. 12. 13. 접수 ; 2005. 5. 2. 채택)