

오징어 간 액젓으로부터 분리된 Angiotensin Converting Enzyme 저해 Peptide의 특성

박 영 범

강원도립대학 식품가공제과제빵과

Characteristics of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Salt-fermented Squid Liver Sauce

Yeung Beom Park

Dept. of Food Processing and Bakery, Gangwon Provincial College, Gangwon 210-804, Korea

Abstract

In order to utilize squid liver by-products, which is normally discarded as industrial waste in the process of squid manufacturing, salt-fermented squid liver sauce was prepared experimentally and also tested for inhibitory activity against angiotensin converting enzyme (ACE). ACE inhibitory activity of squid liver sauce was increased with the elapse of fermentation days until 12 months, followed by a constant level of inhibitory activity thereafter. 15-month-old sauce ($IC_{50}=29.66 \mu\text{g}$) was filtered through PM-10 membrane (M.W. cut-off 10,000 Da) to obtain the peptides fractions with ACE inhibition activity. Filtered fractions were applied to a Bio-gel P-2 column and three active fractions (A, B and C) were collected. Among them, fraction B applied to a SuperQ-Toyopearl 650S column chromatography lead to the isolation of active B-1 fraction. It has the ACE inhibitory activity ($IC_{50}=5.46 \mu\text{g}$). The main composition of its amino acids is lysine, glycine and proline, which cover about 85% of the total amino acids.

Key words: angiotensin converting enzyme, squid liver, salt-fermented sauce

서 론

2008년 우리나라 주요 3대 사망원인으로는 암, 심장질환, 뇌혈관질환으로 총 사망자의 절반(48.1%)을 차지하는 것으로 알려져 있다. 이들 사망원인 중 뇌졸중, 심근경색, 동맥경화 등의 순환기계 질환의 원인인자는 고혈압과 밀접한 상관성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(1). 이와 같이 순환기계 질병의 원인이 되는 고혈압은 혈압의 조절과 항상성을 유지하는 renin-angiotensin system(RAS)의 angiotensin converting enzyme(ACE)이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(2). RAS에서 renin에 의해 angiotensinogen으로부터 생성된 angiotensin- I 은 ACE에 의해 C말단인 dipeptide (His-Leu)가 절단되어 강한 혈관수축을 유발하는 호르몬인 angiotensin- II로 변화되는데 이는 부신피질에서의 aldosterone, vasopressin의 분비를 활성화시켜 세뇨관의 Na^+ 흡수, 수분의 재흡수, 신장의 혈류량 감소 등을 유발함으로써 혈압을 상승시킨다(3). 또한 ACE는 혈관확장의 촉진, 혈소판의 흡착저해 등의 효과를 보이는 bradykinin과 kallidin (Lys-bradykinin)의 C말단(Phe-Arg)을 분해하여 혈관 이완을 억제함으로써 혈압을 상승시킨다(4). 이와 같이 ACE는 고혈압뿐만 아니라 심근경색 및 심장 관련 질병과 크게

관련이 있으므로 ACE의 저해가 필수적이며 ACE 저해제는 심근경색(5), 고혈압 및 심장관련 질환(6)의 치료를 위해 사용되고 있다.

ACE 활성을 저해하기 위해 다양한 식품단백질을 중심으로 한 연구가 진행되어, 대두(7), zein(8), casein(9), 가자미(10), 오징어(11), 참치(12), 멸치(13), 젤라틴(14) 등의 식품에서 다수의 ACE 저해 펩타이드가 보고되었다. 또한 최근 정어리단백질 유래 디펩타이드인 Valyl-tyrosine은 경중고혈압 환자에 대해 강압효과를 나타내어 우리나라 제 1호 개별 인정형 건강기능식품으로 인정받았다.

한편, 오징어는 한국인의 식미기호에 맞아 다른 나라에 비해 널리 이용되는 수산 자원이다. 우리나라 연근해 오징어의 생산량은 2002년 이후 최근 2008년까지 연평균 202,788톤이 어획되어 헛감과 같이 생체로 이용되거나 외투와 팔 등의 근육부분을 대상으로 한 마른오징어, 조미오징어 및 젓갈 등의 가공제품 등으로 널리 소비된다. 그러나 가공과정 중 발생하는 어체의 20~30%를 차지하는 간장, 생식기관 등을 포함한 내장 부분은 식품가공 소재로 이용되지 못하고 사료 또는 비료로 이용되거나 매립되어 환경오염의 원인이 되고 있다(15). 오징어 내장에는 일반어류에 비해 지방, 비타민 B군, 무기질 함량이 높으며 또한 단백질, 효소, 생리활성 물

질 등이 함유되어 있어 유효성분의 효율적인 이용방안이 요구되고 있다.

최근에는 오징어 내장 및 내장 유래 효소를 활용한 식품이용 및 생리활성성분에 대한 연구가 시도되고 있다. 즉, 오징어 간장 유래 조효소를 이용한 육의 물성 개선(16), 치즈(17) 및 액젓(18-20)의 발효 촉진, 쓴맛 제거 및 풍미 개선(21,22), 오징어 내장을 함유한 된장의 제조(23), 오징어 내장 가수분해물을 포함하는 국수용 장국 조성물(특허 10-0816118), 오징어 내장 분획물의 *in vitro*에서의 암세포 성장억제 효과(24) 등이 있다.

본 연구에서는 오징어 내장의 대부분을 차지하고 있는 간을 원료로 하여 제조한 액젓의 ACE 저해효과를 숙성기간에 따라 비교하고 이로부터 ACE 저해 peptide를 한외여과, 겔 크로마토그래피, 이온크로마토그래피로 분리하여 그 저해효과를 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 오징어 간은 2008년 9월 강원도 강릉시 주문진 근해에서 어획된 오징어(*Todarodes pacificus*)를 주문진 항에서 직접 구입하여 쇠빙으로 채워진 아이스박스에 담아 신선한 상태로 운반하여 실험에 사용하였다. 토끼 허파로부터의 ACE 정제효소와 기질(hippuryl-histidyl-leucine)은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

오징어 간 액젓의 제조

오징어를 적출하여 꺼낸 간을 3%(w/w)의 천일염으로 제조한 염수에 3회씩 수세와 수질을 반복한 후 2°C 이하에서 원심분리(4,000×g, 30 min)하여 지질층을 제거하였다. 지질이 제거된 오징어 간 20 kg에 대하여 25%(w/w)의 천일염을 가하고 잘 혼합하여 20 L 용량의 전통 옹기(∅×H, 20.5 cm×37.5 cm)에 담아 15~20°C의 암실에서 전통적인 방법으로 숙성 1개월부터 1주일에 2~3회씩 위, 아래로 휘저어주면서 18개월 동안 숙성하였다. 숙성 2개월부터 1~3개월 간격으로 액화된 원액을 원심분리(4,000×g, 30 min)하고 감압 여과(buchner funnel ∅110 mm; pore size 1 μm) 하여 -20°C 이하의 동결고에 보관하면서 시료로 사용하였다.

일반성분 분석

오징어 간의 일반성분은 AOAC 방법(25)에 준하여 수분정량은 105°C 상압가열 건조법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet추출법, 조회분은 550°C에서 직접 회화법으로 측정하였다.

ACE 저해능

ACE 저해능은 Lee 등(26)의 방법으로 측정하였다. 15 μL의 시료용액에 ACE 정제효소(60 mU/mL) 50 μL를 가한 후,

37°C에서 5분간 preincubation시켰다. 여기에 borate buffer (pH 8.3, 400 mM NaCl 함유)로 용해한 5 mM hippuryl-histidyl-leucine 기질 125 μL를 가하고 37°C에서 30분간 incubation 시킨 후, 10% trifluoroacetic acid(TFA) 20 μL를 가하여 반응을 정지시켰다. 이들 반응 용액 20 μL를 Zorbax 300SB C₈ column(4.6×150 mm, Agilent Tech. Inc., Santa Clara, CA, USA)이 장착된 역상 HPLC(Thermo Separation Products Inc., San Jose, CA, USA)에 주입하여 분석하였다. 분석 시 용출속도는 1 mL/min, 이동상으로는 0.1%의 TFA를 함유한 acetonitrile을 linear gradient(0~63%)하여 기질로부터 유리된 hippuric acid를 228 nm에서 검출하여, 시료 첨가 전후의 잔존 활성의 백분율로써 ACE 저해능을 나타내었다.

Gel chromatography에 의한 분리

액젓을 한외여과막(PM-10, Amicon Co., Beverly, MA, USA)을 사용하여 분자량 10,000 Da 이하의 저분자물질을 회수하고 원심농축(CVE-100D, Eylea Co., Tokyo, Japan)한 것을 gel chromatography 시료액으로 사용하였다.

Bio-gel P-2(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)를 충전한 column(2.2×80 cm)을 사용하여 시료액 2 mL를 탈이온수로 용출(MP-3N, Eylea Co.; 유속 21 mL/hr, 분획량 5.25 mL/tube)시켰으며 분획한 각 용출액은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 chromatogram을 작성하였다.

Ion exchange chromatography에 의한 분리

활성회분을 탈이온수로 평형화시킨 SuperQ-Toyopearl 650S(Tosoh Co., Ltd., Tokyo, Japan) column(16×650 mm)에 주입하고 흡착시킨 다음 탈이온수로 용출하고 다시 NaCl 용액(0~1 M)을 사용하여 linear gradient(LPG1000, Eylea Co.; 유속 30.6 mL/hr, 분획량 5.1 mL/tube)로 용출, 분리하였다.

아미노산 분석

단백질 함량이 약 10 mg이 되는 시료 1 mL를 유리관에 넣고 6 N HCl 1 mL를 가하여 질소 충전시킨 후 밀봉하여 110°C, 24시간 가수분해하였다. 분해액을 감압 건조하여 HCl을 제거하고 여기에 증류수 10 mL를 가하여 다시 감압 건조한 후, 구연산나트륨 완충용액(pH 2.2)으로 정용하고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 일정량을 취하여 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

결과 및 고찰

오징어 간의 일반성분

오징어 간의 일반성분을 분석하여 수분, 조단백질, 지방, 회분함량을 Table 1에 나타내었다. 그 결과 수분함량 64.0%, 조단백질 15.9%, 조지방 17.4% 및 회분이 1.4%로 나타났다. 이와 같은 결과는 Kim 등(27)의 원양산 오징어의 내장전체

Table 1. The proximate composition of squid liver (g/100 g)

Moisture	Crude protein	Crude lipid	Ash
64.0±0.3 ¹⁾	15.9±0.4 (44.2) ²⁾	17.4±0.3 (48.3)	1.4±0.1(3.9)

¹⁾Each value presents the mean±SD of triplicate determinations.

²⁾The numbers in the parenthesis are dry weight basis.

로 한 일반성분(수분 62.9%, 조단백질 17.2%, 조지방 16.9%, 회분 1.6%)의 결과와 큰 차이를 나타내지 않았다. 한편, 건물당 단백질과 지질로는 각각 44%와 48%를 나타내어 오징어 내장의 대부분을 차지하는 간은 단백질 및 지질소재로 이용 가능하리라 생각된다.

오징어 간 액젓의 숙성에 따른 peptide-nitrogen 함량 및 ACE 저해효과

숙성기간에 따른 ACE 저해효과(Table 2)는 액젓을 담근 2개월째에 IC₅₀ 값이 67.56 µg이었으며 숙성이 진행됨에 따라 18개월까지 저해 효과가 감소됨이 없이 완만히 증가되었고, 12, 15 및 18개월째에는 IC₅₀ 값이 각각 30.46, 29.66 및 28.12 µg으로 거의 일정한 저해효과를 나타내었다.

이러한 오징어 간 액젓의 숙성에 따른 ACE 저해효과는 오징어 간의 자가 소화효소 및 미생물이 분비하는 단백질 분해효소에 의해 액젓 단백질로부터 유리되는 peptide에 기인하는 것으로 예상된다. 한편, 이들 숙성 기간에 따른 ACE 저해효과를 peptide-nitrogen 함량과 비교해 볼 때 숙성 8개월경의 peptide nitrogen 함량이 1,135 mg/100 mL로 최대값을 나타내었다가 함량이 감소되는 12개월(1,111 mg/100 mL), 15개월(1,035 mg/100 mL) 및 18개월(908 mg/100 mL) 개월에도 ACE 저해효과는 감소되지 않고 일정하게 유지되어 ACE 저해효과와 peptide-nitrogen 함량 사이에는 뚜렷한 상관성을 나타내지 않았다. 이와 관련하여 Kim 등(28)과 Lee 등(29)의 담수어 효소 가수분해물 및 김 가수분해물에서도 ACE 저해능과 가수분해물 및 peptide-nitrogen 함량 사

Table 2. Changes of the peptide-nitrogen and the ACE inhibitory activity of salt-fermented squid liver sauce during fermentation

Fermentation (month)	Peptide-nitrogen (mg/100 mL)	IC ₅₀ (µg protein)
2	1,008±39 ^{1)d2)}	67.56
3	1,043±14 ^{cd}	58.42
4	1,073±22 ^{bc}	52.66
5	1,096±32 ^{ab}	63.41
6	1,115±29 ^{ab}	46.86
8	1,135±24 ^a	41.34
10	1,134±10 ^a	38.07
12	1,111±33 ^{ab}	30.46
15	1,035±25 ^{cd}	29.66
18	908±40 ^e	28.12

¹⁾Each value presents the mean±SD of triplicate determinations.

²⁾Values with different superscript letters within a column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

이에는 상관성이 없는 것으로 보고하고 있어 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 숙성기간에 따른 액젓의 ACE 저해능 차이는 액젓 단백질로부터 생성된 peptide의 아미노산 조성, 사슬길이 등이 관계되는 것으로 판단된다.

오징어 간 액젓의 ACE 저해 활성획분의 분획 및 아미노산 조성

ACE 저해 peptide와 관련하여 보고되는 많은 연구에서 고분자 peptide에 비해 저분자 peptide가 ACE 저해효과가 높은 것으로 보고(10,30)되고 있어 15개월째의 액젓을 molecular weight cut-off가 10,000 Da 이하인 한외여과막을 통과한 저분자 분획물을 Biogel P-2 column에 주입하여 겔 크로마토그래피를 실시하였다. 분획 후, 각 용출획분의 280 nm에서의 흡광도 및 ACE 저해효과를 검토하여 활성획분인 A(tube No 44, 45), B(tube No 54, 55) 및 C(tube No 68, 69)를 분리하였다(Fig. 1). 이들 각 획분의 ACE 저해효과(IC₅₀)는 각각 4.51 µg, 3.23 µg 및 19.6 µg이었으며(데이터 미제시), 이들 획분 중 ACE 저해능이 우수한 B 획분을 원심농축하고 SuperQ-Toypearl 650S column을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피를 행하여 B 획분으로부터 증류수 용출 획분인 B-1(tube No, 14, 15)을 분리하였다(Fig. 2). 이와 같이 분리된 용출획분 A, B-1 및 C의 아미노산 조성을 Table 3에 나타내었다.

분리된 획분 B-1의 주요 아미노산은 lysine(72.3%), glycine(8.2%) 및 proline(4.8%)으로 이들 3종류의 아미노산이 전체아미노산의 약 85%를 차지하였으며 ACE 저해효과는 IC₅₀=5.46 µg이었다. 이와 관련하여 Guang와 Phillips(31)는 ACE 저해 peptide의 C말단에 guanidine기 또는 ε-amino기를 가지고 있어 양전하를 띠고 있는 arginine 및 lysine은 ACE 저해활성에 크게 기여하는 것으로 보고하고 있다.

한편 Matsumura 등(32)도 ACE 저해효과를 나타내는 가다랑어 내장 peptide를 분리하고 이를 바탕으로 한 peptide를 합성한 결과, 저해활성이 강한 peptide들은 공통적으로 N말

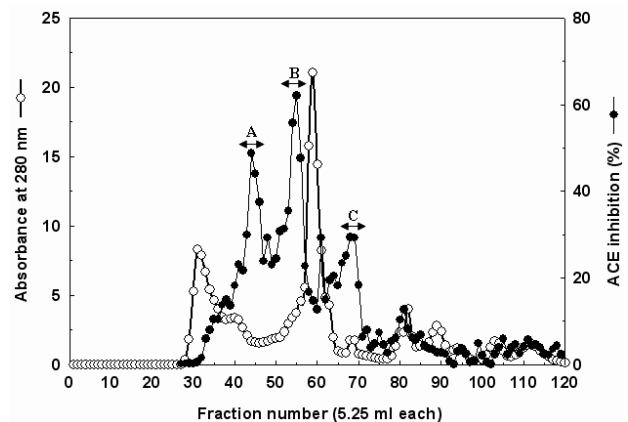


Fig. 1. Gel chromatogram on a Bio-gel P-2 column of salt-fermented squid liver sauce filtered with PM-10 membrane. Arrow lines were collected separately.

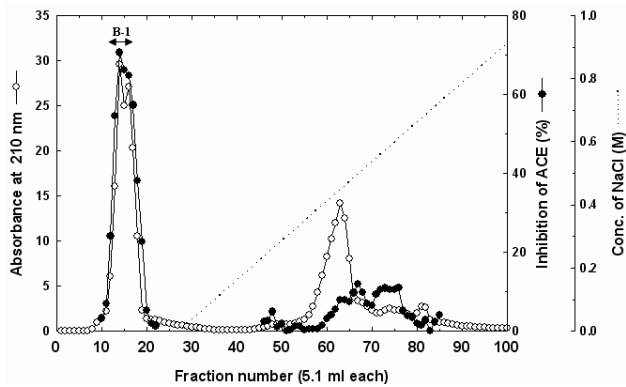


Fig. 2. Ion chromatogram on a SuperQ-Toyopearl 650S column of the active fraction B eluted from Bio-gel P-2 column. Arrow lines were collected separately.

Table 3. Amino acid composition of each active fractions eluted from Bio-gel P-2 and SuperQ-Toyopearl 650S column (% to total amino acids)

Amino acids	A	B-1	C
Aspartic acid	19.1	2.1	0.5
Threonine	4.9	2.1	0.3
Serine	3.0	1.6	0.5
Glutamic acid	20.9	1.6	0.2
Glycine	13.5	8.2	1.2
Alanine	4.2	0.4	0.1
Valine	4.1	1.0	0.1
Cysteine	8.7	0.6	0.3
Methionine	0.5	0.3	0.1
Isoleucine	2.2	0.4	0.1
Leucine	2.9	0.4	0.1
Tyrosine	1.3	ND	0.1
Phenylalanine	1.0	0.1	0.2
Lysine	4.3	72.3	1.5
Histidine	2.9	2.2	32.9
Arginine	1.9	1.9	61.6
Proline	4.6	4.8	0.2

ND: not detected.

단 아미노산잔기에는 valine, isoleucine 및 leucine과 같은 소수성 아미노산이, 중앙에는 arginine 및 lysine과 같은 염기성 아미노산이, C말단의 아미노산잔기는 proline으로 구성되었다고 보고하였다. 특히 이들 합성 peptide C말단의 아미노산잔기인 proline은 ACE 활성부위와의 결합에 중요한 역할을 하여 강력한 ACE 저해제로 작용한다고 보고하였으며 본 실험에서의 B-1획분의 proline 함량은 4.8%로 나타났다.

Cheung 등(33)은 dipeptide의 C말단 및 N말단 아미노산의 잔기의 영향에 대하여 검토하였으며 이들 dipeptide 중에서 lysine, glycine 및 proline을 함유한 ACE 저해 dipeptide로는 Gly-Pro($IC_{50}=450 \mu M$), Gly-Lys($IC_{50}=5400 \mu M$), Gly-Gly($IC_{50}=7200 \mu M$), Lys-Gly($IC_{50}=3200 \mu M$), Pro-Gly($IC_{50}=17,000 \mu M$)을 보고하고 있다.

또한 Ichimura 등(13)은 멸치 액젓으로부터 Ala-Pro($IC_{50}=29 \mu M$), Gly-Pro($IC_{50}=360 \mu M$), Lys-Pro($IC_{50}=22 \mu M$) 등을

분리하고 이들 중 Lys-Pro이 강력한 ACE 저해효과를 나타냄을 보고하고 있으며 이와 유사한 Leu-Lys-Pro은 일본에서 혈압강하용 특정 보건용 식품으로 상품화 되어 있다. 따라서 ACE 저해활성이 우수한 B-1의 주요 아미노산인 lysine, glycine, 및 proline이 ACE 저해활성과 관계가 있을 것으로 추정된다.

A획분의 경우에는 산성아미노산인 glutamic acid(20.9%), aspartic acid(19.1%)와 glycine(13.5%)이 전체 아미노산의 약 50% 이상을 차지하였으며 이들 외에 cysteine이 8.7%, valine, leucine 및 isoleucine이 약 9%로 나타났다. 이들 결과와 관련하여 Yeum 등(34)은 복합효소와 bromelain에 의한 ACE 저해활성을 갖는 고등어 단백질 가수분해물은 glutamic acid, aspartic acid, lysine, alanine, valine 및 leucine 등이 대체적으로 많은 것으로 보고하여 본 실험의 A획분의 아미노산 조성과 다소 유사하였다.

C획분의 주요 아미노산은 histidine(32.9%)과 arginine(61.7%)으로 이들 두 종류의 염기성 아미노산이 전체 아미노산의 94.6%를 차지하였으며 그 외의 아미노산은 5.4%에 불과하였다. 그 저해활성은 $IC_{50}=19.6 \mu g$ 으로 획분 A 및 B-1에 비하여 낮았다. Lee 등(35)은 rotifer(*Brachionus calyciflonus*)의 효소 가수분해물로부터 ACE 저해 peptide인 Ala-Gln-Gly-Glu-Arg-His-Arg을 분리하고 그 저해활성은 $IC_{50}=40.01 \mu g/mL$ 로 보고하였다. 이와 관련하여 C획분의 주요 아미노산인 histidine과 arginine의 함량비가 약 2:1임을 고려해 볼 때 C획분 중에 존재하는 peptide도 Lee 등(35)이 보고한 peptide C말단의 tripeptide(-Arg-His-Arg) 배열과 유사한 peptide로 예측된다. 한편 Shin 등(36)은 된장으로부터 저해활성이 우수한 His-His-Leu($IC_{50}=2.22 \mu g/mL$)을 분리하고 높은 저해활성은 ACE 기질인 angiotensin I의 C말단 잔기(-His-Leu)와의 유사성에 기인할 것으로 추정하고 있다. 이외에도 angiotensin I의 C말단 잔기(-His-Leu)와 유사한 저해 peptide로는 His-His-Thr($IC_{50}=800 \mu M$), Gly-Val-His-His-Ala($IC_{50}=71.8 \mu M$) 등이 보고되어 있다(37,38).

Andrews 등(39)과 Hernández-Ledesma 등(40)은 ACE 저해효과를 가지는 peptide에 있어서 C말단의 tripeptide 잔기가 경쟁적 저해활성에 중요한 역할을 하며, tripeptide로 구성된 ACE 저해 peptide의 경우, C말단의 잔기는 tryptophan, tyrosine phenylalanine과 같은 방향족 아미노산 및 valine, leucine, isoleucine과 같은 가지달린 아미노산 또는 소수성 아미노산이 ACE 저해활성에 더욱 효과적이며 친수성 아미노산의 경우 약한 저해활성을 나타내는 것으로 보고(31,41)하고 있다.

따라서 C획분의 낮은 저해활성($IC_{50}=19.6 \mu g$)과 아미노산 조성을 고려해 볼 때 C획분에 존재하는 peptide는 주로 histidine과 arginine으로 구성되어 있을 것으로 예측된다.

이상에서 살펴본 바와 같이 오징어 간 액젓에 존재하는 ACE 저해 peptide는 그 구성아미노산의 조성, 함량에도 영향을 미칠 것으로 예측되나 그 외에도 peptide의 아미노산 배열순서, 길이 등이 더 크게 저해활성에 영향요인이 될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

오징어 가공 부산물인 오징어 간의 효율적 이용을 위하여 오징어 간을 이용하여 액젓을 제조하고 이들 액젓의 ACE 저해효과를 살펴보았다. 액젓의 ACE 저해활성은 12개월까지는 점차적으로 증가하였으나 그 이후에는 저해활성이 둔화되어 거의 일정한 저해활성을 유지하였다. 숙성 액젓 중 15개월째 액젓(IC₅₀=29.66 µg)을 한외여과막으로 통과시켜 회수한 분자량 10,000 Da 이하의 저분자물질을 Bio-gel P-2 gel chromatography를 행하여 ACE 저해효과를 가지는 3개획분을 분취하였다. 이들 획분 중에서 ACE 저해효과가 가장 높은 B 획분을 SuperQ-Toyopearl 650S column을 이용한 음이온 교환크로마토그래피에 의해 B-1의 활성획분을 분리하였다. 획분 B-1의 아미노산 조성은 lysine, glycine 및 proline의 함량이 가장 많아 전체의 약 85%를 차지하였으며 IC₅₀은 5.46 µg으로 나타났다.

문 헌

- Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA, Godwin J, Qizilbash N, Taylor JO, Hennekens CH. 1990. Blood pressure, stroke and coronary heart disease: Part 2, short-term reduction in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 335: 827-838.
- Esther CR, Marino Jr EM, Bernstein KE. 1997. The role of angiotensin-converting enzyme in blood pressure control, renal function and male fertility. *Trends Endocrinol Metab* 8: 181-186.
- Unger T. 2002. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 89: 3A-10A.
- Witherow FN, Helmy A, Webb DJ, Fox KAA, Newby DE. 2001. Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure. *Circulation* 104: 2177-2181.
- Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moye L, Braunwald E. 2000. Longterm ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. *Lancet* 355: 1575-1581.
- Pahor M, Pasty BM, Alderman MH, Applegate WB, Williamson JD, Furberg CD. 2000. Therapeutic benefits of ACE inhibitors and other antihypertensive drug in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23: 888-892.
- Wu J, Ding X. 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 49: 501-506.
- Yano S, Suzuki K, Gunatsu G. 1996. Isolation from α-zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci Biotech Biochem* 60: 661-663.
- Tauzin J, Miclo L, Gaillard JL. 2002. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α₂-casein. *FEBS Lett* 531: 369-374.
- Jung WK, Mendis E, Park PJ, Son BW, Kim HC, Choi YK, Kim SK. 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem* 94: 26-32.
- Suh HJ, Cho SJ, Whang JH, Lee H, Yang HC. 1997. Characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from squid hydrolysate. *Food and Biotechnol* 6: 122-124.
- Kohama Y, Matsumoto S, Oka H, Teramoto T, Okabe M, Mimura T. 1988. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biosci Biophys Res Commun* 155: 332-337.
- Ichimura T, Hu J, Aita DQ, Maruyama S. 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and insulin secretion stimulative activity of fermented fish sauce. *J Biosci Bioeng* 96: 496-499.
- Oshima G, Shimabukuro H, Nagasawa K. 1979. Peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim Biophys Acta* 566: 128-137.
- Lee KS, Kim YB, Park KY, Yoo BJ, Jeon JK, Jeong IH. 1998. Effect of Diet supplemented with squid intestine on growth and body composition of the catfish (*Parasilurus asotus*). *J Korean Fish Soc* 31: 31-36.
- Kolodziejska I, Pacana J, Sikorski ZE. 1992. Effect of squid liver extract on proteins and on the texture of cooked squid mantle. *J Food Biochem* 16: 141-150.
- Raksakulthai R, Rosenberg M, Haard NF. 2002. Accelerated cheddar cheese ripening with an aminopeptidase fraction from squid hepatopancreas. *J Food Sci* 67: 923-929.
- Kim WJ, Kim SM. 2003. The chemical and microbial characteristics of northern sand lance, *Ammodytes personatus*, sauce manufactured with fermentation accelerating agents. *Korean J Food Sci Technol* 35: 447-454.
- Xu W, Yu G, Xue C, Xue Y, Ren Y. 2008. Biochemical changes associated with fast fermentation of squid processing by-products for low salt fish sauce. *Food Chem* 107: 1597-1604.
- Choi YJ, Kim IS, Cho TJ, Seo DH, Lee TG, Park YB, Park JW. 1999. Peptide properties of rapid salted and fermented anchovy sauce using various proteases 2. Characterization of hydrolytic peptides from anchovy sauce and actomyosin. *J Korea Fish Soc* 32: 488-494.
- Komai T, Kawabata C, Tojo H, Gocho S, Ichishima E. 2007. Purification of serine carboxypeptidase from the hepatopancreas of Japanese common squid *Todarodes pacificus* and its application for elimination of bitterness from bitter peptides. *Fish Sci* 73: 404-411.
- Raksakulthai R, Haard NF. 2001. Purification and characterization of a carboxypeptidase from squid hepatopancreas (*Illex illecebrosus*). *J Agric Food Chem* 49: 5019-5030.
- Seo JH, Jeong YJ. 2001. Quality characteristics for Doenjang using squid internal organs. *Korean J Food Sci Technol* 31: 89-93.
- Shin MO, Bae SJ. 2009. Growth inhibitory and quinone reductase activity stimulating effects of internal organs of fractions on human cancer cell lines *in vitro*. *J Life Sci* 19: 1251-1257.
- AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Associa-

- tion of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
26. Lee TG, Yeum DM, Kim YS, Yeo SG, Lee YW, Kim JS, Kim IS, Kim SB. 2005. Peptide inhibitor for angiotensin-converting enzyme from thermolysin hydrolysate of manila clam proteins. *J Fish Sci Technol* 8: 109-112.
 27. Kim HS, Heu MS, Kim JS. 2007. Distribution and extraction condition of endoprotease and exopeptidase viscera of *Illex argentinus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 308-315.
 28. Kim TJ, Yoon HD, Lee YS. 1996. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hot-water extract and enzymatic hydrolysate of fresh water fish. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 871-877.
 29. Lee HO, Kim DS, Do JR, Kwan DY. 2001. Separation and purification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from laver hydrolysate. *J Korean Fish Soc* 34: 164-172.
 30. Zhao Y, Li B, Dong S, Liu Z, Zhao Xang J, Zeng MA. 2009. Novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *peptides* 30: 1028-1033.
 31. Guang C, Phillips R. 2009. Plant food-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *J Agric Food Chem* 57: 5113-5120.
 32. Matsumura N, Fujii M, Takeda Y, Shimizu T. 1993. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1743-1744.
 33. Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo FF, Cushman DW. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-I converting enzyme, importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J Biol Chem* 255: 401-407.
 34. Yeum DM, Lee TG, Byun HS, Kim SB, Park YH. 1992. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Bull Korean Fish Soc* 25: 229-235.
 35. Lee JK, Lee MS, Park HG, Kim SK, Byun HG. 2010. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide extracted from freshwater zooplankton. *J Med Food* 13: 357-363.
 36. Shin ZI, Yu R, Park SA, Chung DK, Ahn CW, Nam HS, Kim KS, Lee HJ. 2001. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *J Agric Food Chem* 49: 3004-3009.
 37. Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M. 1992. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci Biotech Biochem* 56: 1541-1545.
 38. Balti R, Nedjar-Arroume N, Adje EY, Guillochon D, Nasri M. 2010. Analysis of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins. *J Agric Food Chem* 58: 3840-3846.
 39. Andrews PR, Carson JM, Caselli A, Spark MJ, Woods R. 1985. Angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Med Chem* 28: 393-399.
 40. Hernández-Ledesma B, Amigo L, Ramos M, Recio I. 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem* 52: 1504-1510.
 41. Qian ZJ, Je JY, Kim SK. 2007. Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *J Agric Food Chem* 55: 8398-8403.

(2010년 7월 19일 접수; 2010년 10월 5일 채택)