

## Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Enzymatic Hydrolysates of *Crassostrea gigas* (Oyster)

Hyung Joo Do<sup>1</sup>, Hye Jin Park<sup>1</sup>, Ok Ju Kim<sup>1</sup>, Andre Kim<sup>1</sup>, Yeung Joon Choi<sup>3</sup>, Se Young Choung<sup>4</sup> and Jong-Myung Ha<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate school, Silla University, Busan 617-736, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

<sup>3</sup>Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Jinju 650-160, Korea

<sup>4</sup>Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Received December 6, 2011 / Revised December 8, 2011 / Accepted December 9, 2011

The peptides of enzymatic hydrolysates from oyster were determined by inhibitory activity against angiotensin-converting enzyme. The ACE inhibitory activity of enzymatic oyster hydrolysates increases with hydrolysis time. Among enzymatic oyster hydrolysates, oyster hydrolysates incubated with Protamex showed the best ACE inhibitory activity after 10 h. Hydrolysates were filtered through a HiSep ultrafiltration membrane (M.W. cut-off 30 kDa, 10 kDa) to obtain the peptide fractions with ACE inhibition activity. These fractions were applied to an HPLC column (waters 120 ODS-AP 250 X 4.6 (5 μm)). Six active fractions were collected and the range of ACE inhibition was from 29.56 to 85.85%. Peptide was purified from fraction B, showing the highest ACE inhibitory activity, and its sequence was Leu-Gln-Pro. These results suggest that PEH may be beneficial for developing anti-hypertensive food and drug.

**Key words** : Angiotensin converting enzyme, *Crassostrea gigas* (oyster), hydrolysate, hypertension, Leu-Gln-Pro

### 서 론

고혈압은 성인병 비율의 15~20%를 차지할 만큼 세계적인 문제이다. 또한, 동맥 경화, 뇌졸중, 심근 경색 및 말기 심장병에 영향을 미친다. 그리고 만성질환으로 평생 동안 치료가 필요하며 사회적 경제적 손실 또한 막대하다. 고혈압의 원인은 대부분 밝혀져 있지 않지만 혈압을 상승시킬 수 있는 여러 가지 요인들 가운데 renin-angiotensin-aldosterone 고리는 생체 내에서 혈압과 체액량을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[7,19,21,22,24].

본태성 고혈압의 원인은 renin-angiotensin계가 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 여겨지고 있으며, 여기에는 angiotensin I converting enzyme이라는 효소가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다[11]. 즉, angiotensinogen이 renin의 특이적 분해를 받아서 angiotensin I을 생성하는데, 이는 다시 angiotensin 전환효소(ACE)에 의하여 혈관수축작용을 하는 angiotensin II를 생성한다. ACE는 또한 혈관이완작용을 가진 bradykinin을 분해하여 불활성화시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승하는 역할을 한다. 이와 같이 혈압의 상승에는 ACE의 관여가 크므로 혈압 강하에는 ACE의 저해가 필수적이고, 또한

ACE 저해제들이 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시되면서 고혈압 예방 및 치료에 있어서 ACE 저해제의 중요성이 부각되고 있다.

1977년 ACE의 강력한 저해제인 captopril (2-D-mercapto-propanoyl-L-proline)이 개발되었고, 이후 enalapril, benazepril 등 여러 종류의 ACE저해제가 상품화되어 고혈압 치료제로서 이용되고 있으나 마른기침, 식욕부진, 미각이상, 발진, 백혈구 감소 등 각종 부작용이 많다[15].

굴은 예로부터 타우린, 글리코젠, 셀레늄 및 아연 등을 다량 함유한 건강기능 식품 소재로 널리 알려져 있다[10,17]. 또한 심장 및 간장의 기능강화와 콜레스테롤 감소에 의한 고혈압, 동맥경화 예방효과가 있고, 셀레늄을 다량 함유하고 있어 중금속 해독기능을 갖는 등의 생리활성이 널리 알려져 있다 [9,10,20,25].

우리나라에서는 이와 같은 건강기능성 식품 소재인 굴을 다량 생산할 목적으로 청정해역인 남해안의 거제, 통영, 남해, 고성, 여수, 고흥 등을 중심으로 수하식 양식을 실시하였고, 그 결과 이들 지역을 중심으로 생산량이 급진적으로 증가하게 되었다[10,17]. 이러한 일면에서 단백질 가수분해물과 같은 건강기능성이 우수한 물질로 사용 가능하다면 항고혈압 제제로 사용되고 있는 것들보다 부작용이 없는 건강기능성이 강화되어 소비자에게 보다 유익한 건강기능식품으로 자리잡을 수 있을 것으로 기대된다.

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5467, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : jmha@silla.ac.kr

현재 김 가수분해물, 김[12], 다시마, 미역, 우뚝가사리, 청각, 가시파래, 툇 열수추출물[13], 쇠미역, 파래, 김, 지누아리 효소 가수분해물[14], 굴 단백질 pepsin 가수분해물[23], 바지락 단백질 Thermolysin 가수분해물, 어육 단백질로부터 분리된 항고혈압 펩타이드[5], 분리대두 단백질 가수분해[8] 등의 해산물 및 곡물을 이용한 혈압조절 건강기능성에 관한 선행연구가 이루어지고 있다. 또한 정어리단백질 유래 디펩타이드인 valyl-tyrosine은 경중고혈압 환자에 대해 강압효과를 나타내어 우리나라 제 1호 개별인정형 건강기능식품으로 인정받았다.

본 연구에서는 본태성 고혈압 쥐를 이용한 *in vivo* 실험에서 굴 효소 가수분해물이 항고혈압 활성이 나타난다는 선행연구 결과에 따라 유효지표물질을 찾고자 이에 대한 영양 및 기능 특성이 우수한 굴을 효소처리 하여 얻은 가수분해물의 ACE 저해효과를 비교하고, 이로부터 ACE저해 peptide를 한외여과하여 HPLC fraction별 저해효과를 검토하고, 활성을 가지는 peptide의 아미노산 구조를 확인하여 유효 지표물질을 찾았고, 이를 peptide 합성을 통하여 IC<sub>50</sub> 값을 구하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

굴 효소 가수분해물 제조에 사용하기 위한 참굴(*crassostrea gigas*, 각장 4.6±2.3 cm, 각중 9.9±3.2 g)은 경남 통영 연안의 양식장에서 채취하여 인근의 가공공장에서 Individual Quick Frozen (IQF)으로 가공한 제품으로서 1~2년 동안 냉동 보관된 제품을 가수분해 시료로 사용하였다.

### 효소

굴 효소 가수분해물을 제조하기 위해서 사용한 상업적 효소들 중에서 Alcalase 2.4 L (2.4 AU/g), Neutrase 0.8 L (0.8 AU/g), Protamex 1.5MG (1.5 AU/g), Flavourzyme 500MG은 Novozyme (Novozyme Co, Bagsvaerd, Denmark)에서, Pepsin은 sigma (Sigma-aldrich Co, Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 1-step 효소 가수분해물 제조

Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, Protamex, Pepsin 등 상업적 효소를 이용하여 굴 효소 가수분해물을 제조 하였다. 냉동 굴(IQF) 1 kg을 1분 동안 끓는 물에 데치고 2배 수도수를 가한 후 마쇄하여, 마쇄물을 Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, Protamex, Pepsin의 효소 반응 최적온도(각각55, 50, 40, 55, 37°C)에서 시료의 단백질 농도에 대하여 1%가 되도록 각 효소를 첨가하여 1~12시간 동안 반응 시킨 후 100°C에서 10분간 가열 하여 효소를 불활성화 시켰다[6]. 얻어진 굴 효소 가수분해물을 원심분리(Model SUPRA 21K, Hanil science Industrial,

Co., Ltd, Korea)하여 불용성 물질을 제거하고, 상층액을 진공 동결 건조하여 건조 분말을 만든 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 1). Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, Protamex, Pepsin로 가수분해한 각각의 분해 산물을 AEH, NEH, FEH, PEH, PepEH으로 명명하였다.

### Angiotensin I converting enzyme (ACE)의 저해능

동결 건조된 시료(10 mg/ml) 15 µl에 ACE 정제효소(60 mU/ml, Sigma A6778, USA) 50 µl를 가한 후 37°C에서 5분간 preincubation 하였다. 여기에 sodium borate buffer (pH 8.3, 300 mM NaCl 함유)에 용해한 5 mM의 hippuryl-histidyl-leucine 용액 125 µl를 가하여 다시 37°C에서 30분 반응시킨 후 10% trifluoroacetic acid (TFA) 20 µl를 가하여 반응을 정지시켰다. ACE 저해율은 반응용액 20 µl를 HPLC column (watchers 120 ODS-AP 250 X 4.6 (5 µm)), HPLC solvent delivery pump (Model L-2130, HITACHI), column oven (Model UV-8010, TOSOH), detector (Model Agilent 1100 series, Agilent)를 이용하여 용출속도는 1 ml/min, 이동상으로는 0.1% TFA를 함유한 CH<sub>3</sub>CN-용액(0~60%, 16.5 min)을 사용하여 선형상 농도 구배법으로 기질로부터 유리된 hippuric acid (HA)를 228 nm에서 검출하여, 시료 첨가 전후 생성량을 백분율로써 나타내었다. 이때, 시료 용액 대신 증류수를 음성 대조군으로, 고혈압에 대한 강압작용에 관여하는 주요한 성분인 valyl-tyrosine (Sigma-aldrich Co, Louis, USA)를 양성 대조군으로 사용하였다.

$$\text{ACE inhibitory activity (\%)} = \frac{\text{대조구의 HA-시료의 HA}}{\text{대조구의 HA}} \times 100$$

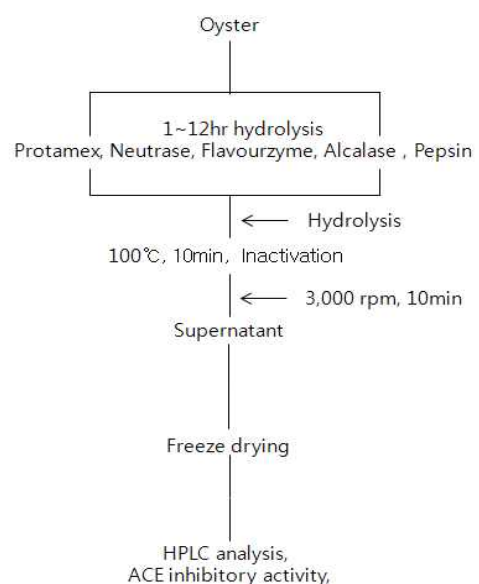


Fig. 1. Procedure for preparation of 1-step enzymatic hydrolysates.

Ultrafiltration에 의한 분리

Ultrafiltration은 굴 효소 가수분해물 시료를 molecular weight cut-off가 30 kDa, 10 kDa인 ultrafiltration (Hisep ultrafiltration membrane, SYNOPEX, Chemicore, Korea)을 사용하여 분자량 30 kDa, 10 kDa 이하의 시료를 분리하여 농축시킨 후 동결 건조하였다.

Reversed-phase HPLC system에 의한 분리

시료의 농도 100 mg/ml을 0.22 µm PVDF filter로 여과한 후 HPLC로 분리하였다. HPLC column은 watchers (120 ODS-AP 250 X 4.6 (5 µm))를 37°C로 유지하여 사용하였고, solvent delivery pump (Model L-2130, HITACHI), column oven (Model UV-8010, TOSOH), detector (Model Agilent 1100 series, Agilent)를 이용하여 228 nm에서 분리하였다. 분리 시 용출속도는 1 ml/min, 이동상으로는 CH<sub>3</sub>CN을 gradient (0-20 min 20%; 20-40 min 40%; 40-45 min 100%)로 하여, 시료는 100 µl injection하였고, 분획량은 1 ml/tube로 얻어 dry oven 60°C에서 over night 하여 시료를 건조시켰다.

Peptide 서열 분석 및 합성

건조된 분획물을 20 µl의 H<sub>2</sub>O (0.1% TFA)로 용해시킨 후, 염분을 제거하기 위하여 solvent A (50% CH<sub>3</sub>CN) 로 활성화되고 solvent B (0.1% TFA/100 ml H<sub>2</sub>O)로 처리한 ZipTip C18 (Pierce, Meridian Rd, Rockford, USA)에 loading하였다. loading이 끝난 후, solvent B로 2~3회 반복하여 세척하고 마지막으로 ZipTip C18에 결합된 peptide를 solvent C (70% ACN, 0.1% TFA)로 용출시켰다. 용출된 peptide용액을 biomembrane (AB systems Co, USA)이 전처리 되어져 있는 Micro-filter에 10 µl를 가하고 Argon gas로 건조시켰다. 건조가 끝난 filter를 cartridge에 장착하고 ABI492 automated protein sequencer의 pulsed-liquid method를 통해 peptide 서열을 Scientific Instrument Services(SIS, Seoul, Korea)에서 결정하였다. 그리고 확인된 peptide를 ㈜코스모진텍에서 합성하였다.

결과 및 고찰

효소 반응 시간별 가수분해율

효소의 종류 및 가수분해 시간에 따른 굴 효소 가수분해물의 변화는 Fig. 2에 나타내었다. 시간별 가수분해율은 효소처리하지 않은 대조구의 경우 8.8% 이었다. 5종의 상업적 효소를 이용하여 가수분해한 결과, protamex를 처리한 가수분해물은 1~2시간까지는 가수분해 시간이 경과함에 따라 급격히 증가하여 12~20.7%의 범위였고, 그 이상의 가수분해 시간에서는 6시간까지 25.42%, 12시간까지 30.66%로 완만한 증가를 하였으며, 그 외의 효소 가수분해물의 경우 약간의 증가 또는 감소

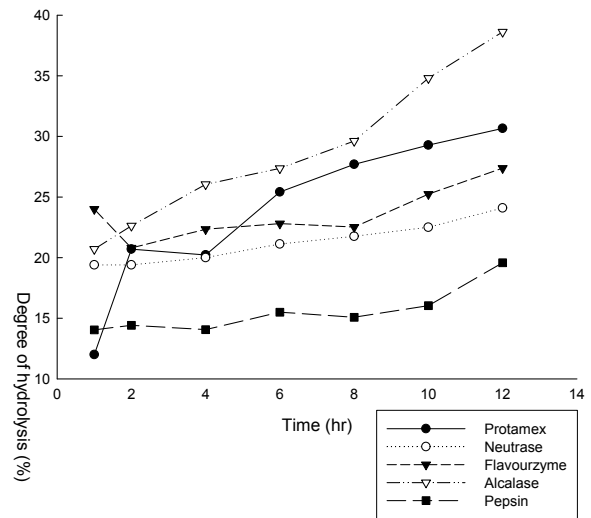


Fig. 2. Hydrolysis pattern of *Crassostrea gigas* (Oyster) protein isolate by five different proteases (E=1%).

하는 경향을 나타내었다. Flavourzyme, Neutrase, Pepsin의 경우 1~12시간까지 가수분해율은 각각 24%~27.38%, 19.4%~24.1%, 14.04%~19.58%로 증가하였다. Alcalase의 경우 1~12시간 까지 가수분해율은 20.7~38.62%로 약 18% 증가하였다. 본 연구의 각 효소의 가수분해율은 Chung 등[3]에서 보고한 바와 같이 endoprotease가 주로 함유된 alcalase 및 protamex가 endo- 및 exoprotease의 혼합형태인 neutrase와 flavourzyme보다 우수하였고, neutrase와 flavourzyme은 기질특이성이 높은 pepsin과 같은 소화효소에 비해 우수한 경향이 나타났다.

1-step 효소 반응 시간별, 저분자 분획별 ACE 저해활성

Angiotensin 전환효소(ACE)는 불활성형인 angiotensin-I의 말단 dipeptide (His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin-II로 전환시킴으로서 혈압을 상승시키는 것으로 알려져 있다. 효소 가수분해물의 수율과 peptide-nitrogen 함량은 Park [18]과 Chung 등[3]에서 상업적 효소의 종류에 관계없이 가수분해율에 따른 의존성은 없다고 판단된다고 보고되어 있어 수율과 peptide-nitrogen 함량은 배제하고 측정된 결과 반응시간별 효소가수분해물의 ACE 저해 활성은 Table 1에서 보여지는 것과 같이 1-step 효소 1~12시간별 가수분해물의 ACE 저해활성은 PEH (protamex enzymatic hydrolysate) 75.80±1.59% ~ 83.32±0.59%, NEH (neutrase enzymatic hydrolysate) 76.57±2.23% ~ 79.77±1.67%, FEH (flavourzyme enzymatic hydrolysate) 3.45±1.27% ~ 15.72±1.55%, AEH (alcalase enzymatic hydrolysate) 39.62±0.54% ~ 43.24±0.41% PepEH (pepsin enzymatic hydrolysate) 46.85±2.02% ~ 61.37±1.52%로 나타났다. 각 효소 가수분해물의 시간별 ACE 저해효과가 가장 높은 PEH는 가수분해 1~8시간 까지는 ACE 저해 활성의 시간별 유의성이 나타나지 않았다. 10, 12시간의 ACE 저해활성은 높았으나 유의성

Table 1. ACE inhibitory activity of *Crassostrea gigas* (Oyster) 1-step enzyme hydrolysates by various enzymes and time

Enzyme hydrolysate	Hydrolysis time (hr)						
	1	2	4	6	8	10	12
PEH	77.53±0.46	79.11±1.02	75.80±1.59	78.16±1.25	77.70±1.54	82.59±0.52	83.32±0.59
NEH	77.79±1.69	76.78±1.69	76.57±2.23	78.26±1.10	78.53±1.50	79.77±1.67	78.76±1.65
FEH	9.93±0.9	11.74±1.28	15.72±1.55	3.45±1.27	6.01±1.72	3.50±1.5	7.93±1.67
AEH	39.62±0.54	40.38±2.27	40.28±1.55	43.24±0.41	41.03±1.76	41.76±2.4	39.78±0.7
PepEH	46.85±2.02	47.86±1.79	53.66±1.52	58.64±1.52	54.41±4.06	61.37±1.52	57.77±1.36

mean±SD.

Obtained from three experiments.

Table 2. ACE inhibitory activity (%) of each active fractions from *Crassostrea gigas* (Oyster) enzymatic hydrolysates

Enzyme hydrolysate	Ultrafiltration of hydrolysate	
	30 kDa	10 kDa
PEH	69.18±0.75	83.71±1.12
NEH	55.49±1.79	70.23±1.36
FEH	-	-
AEH	50.45±0.51	55.47±1.36
PepEH	51.02±0.97	57.74±1.10

mean±SD.

Obtained from three experiments.

은 나타나지 않았다. NEH는 10시간, FEH는 4시간, AEH는 6시간, PepEH는 10시간 동안 각 효소 가수분해 시간 별로 비교해 본 결과 PEH는 83.32±0.59%, NEH는 79.77±1.67%, PepEH는 61.37±1.52%, AEH는 43.24±0.41%, FEH는 15.72±1.55% 순으로 높은 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 효소의 복합적인 분해에 의해 생성되는 서로 다른 구조나 사슬길이 및 아미노산 배열 순서를 갖는 여러 종류의 peptide가 ACE 저해활성을 나타내는 것으로 추정 되어진다[18]. 그리하여 단백질 효소 가수분해물은 각 효소의 단백질 가수분해의 시간과 기질의 특이성에 따라 ACE 저해활성의 차이를 보이게 된다고 판단된다. 이들 가수분해물을 한외여과를 이용하여 가수분해물을 molecular weight cut-off가 30, 10 kDa이하인 분획물을 얻었고, 분획물별 ACE 저해활성을 확인한 결과를 Table 2에 나타내었다. PEH의 30 kDa, 10 kDa분획물은 각각 69.18±0.75%, 83.71±1.12%, NEH의 30 kDa, 10 kDa분획물은 각각 55.49±1.79%, 70.23±1.36%, AEH의 30 kDa, 10 kDa분획물은 각각 50.45±0.51%, 55.47±1.36%, PepEH의 30 kDa, 10 kDa분획물은 각각 51.02±0.97%, 57.74±1.10%의 ACE 저해 결과를 나타냈으며 FEH는 활성이 나타나지 않았다. 30 kDa 여과액보다 10 kDa 여과액의 ACE 저해 효과가 높았으며, 그 중 PEH의 10 kDa 분획물이 가장 높은 활성을 나타냈다.

10 kDa PEH로 부터 ACE 저해 peptide 분리 고분자의 polypeptide를 제거하고 저분자 peptide를 얻기

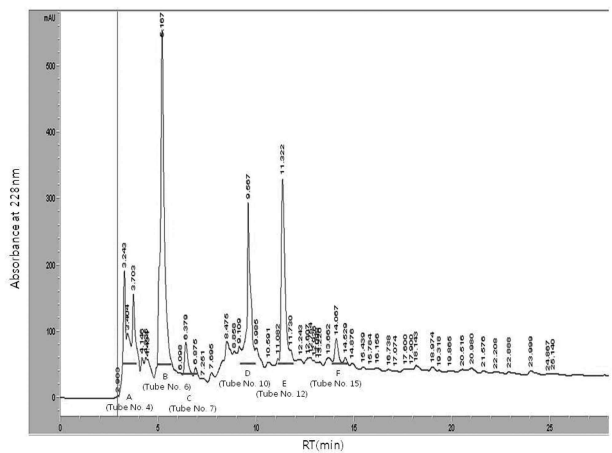


Fig. 3. Chromatogram of 12 hr PEH (10 kDa filtrate) with reversed-phase HPLC system on a watchers 120 ODS-AP 250 X 4.6 (5 um) column.

위해 ACE저해 활성이 가장 높게 나타난 10시간 이상 반응시킨 PEH를 10 kDa이하인 한외여과 막을 통과한 저분자 분획물들을 HPLC를 이용하여 분리하였다(Fig. 3). 총 33개의 분획물을 분취하였고, 각각의 분획물은 건조하여 ACE 저해 활성을 비교 하였는데, 그 결과 ACE 저해 활성을 나타내는 분획물은 15분 이내에 모두 용출되었으며, 그 중 ACE 저해활성을 가장 많이 나타내는 것으로 판단되는 분획인 A (No. 4), B (No. 6), C (No. 7), D (No. 10), E (No. 12), F (No. 15)의 분획물을 건조시켜 ACE 저해활성을 확인한 결과를 table 3에 나타내었다. 각각의 ACE 저해활성은 85.78%, 85.85%, 29.56%, 81.72%, 77.37%, 52.53%로 나타났다. 그 중 높은 활성을 나타내는 fraction A, B peak에서 높은 함량을 가지는 fraction B를 선정하여 HPLC를 이용하여 확인한 결과, PEH의 fraction B의 peak인 것을 확인하였다(Fig. 4). Fraction B의 아미노산들의 분자량은 600 Da 이하였고, N말단에는 소수성 아미노산인 Leucine, 중앙에는 염기성 아미노산 Glutamine, C말단의 아미노산 잔기 Proline을 가진 Leu-Gln-Pro 인 것을 확인하였다. 이를 peptide 합성하여 ACE 저해활성을 확인한 결과, 저해활성 농도(IC<sub>50</sub>)가 1.18 uM임을 확인하였다.

Daisuke 등[4] 도 ACE 저해효과를 나타내는 참깨 가수분해

Table 3. ACE inhibitory activity of each active fractions

Fractions	ACE inhibitory activity (%)
A (No. 4)	85.78
B (No. 6)	85.85
C (No. 7)	29.56
D (No. 10)	81.72
E (No. 12)	77.37
F (No. 15)	52.83

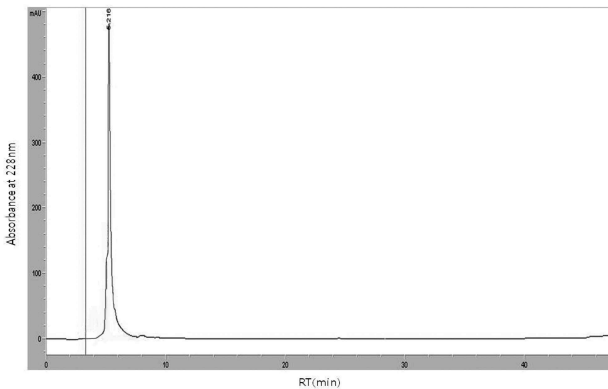


Fig. 4. Chromatogram of purified fraction B from 12 hr PEH (10 kDa filtrate) with watchers 120 ODS-AP 250 X 4.6 (5 um) column.

물에서 peptide를 분리하고 peptide를 합성한 결과 Leu-Lys-Tyr, Leu-Gln-Pro의 IC<sub>50</sub>값이 각각 0.78 μM, 1.04 μM로 높은 활성을 가지는 것으로 보고하였다. 또한 Leu-Val-Tyr의 저해 활성 역시 1.80 μM로 높은 활성을 나타났다고 보고하였다. 여기서 저해 활성이 강한 peptide들은 공통적으로 N말단 아미노산 잔기에는 Leu와 같은 소수성 아미노산으로 구성되어 있는 것으로 보고하였는데, 본 연구에서도 ACE 저해효과를 보인 fraction B의 아미노산 조성을 확인한 바 유사한 결과를 얻었다고 판단된다.

한편, Byun 등[2]은 아미노산의 잔기의 영향에 대하여 검토한 결과 N말단의 Leu와 C말단의 Pro의 잔기가 있는 tripeptide가 ACE저해 활성이 높음을 보고하였으며, 이들 tripeptide 중에서 ACE 저해 활성을 높게 가지는 peptide는 Leu-Gly-Pro (IC<sub>50</sub>=0.72 mM), Gly-Leu-Pro (IC<sub>50</sub>=1.62 mM) 및 Gly-Pro-Leu (IC<sub>50</sub>=2.65 mM)이라고 보고 하였다. 또한, Matsumura 등[16]의 보고에 따르면 ACE 저해효과를 나타내는 가다랑어 내장 peptide를 분리한 결과, 저해활성이 강한 peptide들은 공통적으로 N말단 아미노산 잔기에는 valine, isoleucine 및 leucine과 같은 염기성 아미노산이, C 말단의 아미노산 잔기는 proline으로 구성되었다고 보고 하였다. 이들 peptide 합성물의 C말단의 아미노산 잔기인 proline은 ACE 활성 부위와의 결합에 중요한 역할을 하여 강력한 ACE 저해제로 작용한다고 보고하였지만, 본 연구에서의 fraction B의 아미노산 조성을 확인해 보았을 때, Leu-Gln-Pro의 단백질에서의 proline은 극히

낮은 함량을 포함하고 있었다.

이와 같이 본 실험과 연구 보고를 살펴본 결과 굴 효소가수분해물의 ACE 저해 peptide는 아미노산의 조성과 길이에 따라 ACE 저해 활성과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 2011년도 기술사업화 지원사업에 의해 이루어진 것입니다. 이에 감사드립니다.

### References

- Ariyoshi, Y. 1993. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Tech* **4**, 139-144.
- Byun, H. G. 2002. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from alaskan pollack skin. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 239-243.
- Chung, I. K., H. S. Kim, K. T. Kang, Y. J. Choi, J. D. Choi, J. S. Kim, and M. S. Heu. 2006. Preparation and functional properties of enzymatic oyster hydrolysates. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 919-925.
- Do, J. R., I. D. Heo, J. H. Jo, S. H. Kim, H. K. Kim, S. S. Kim, and C. K. Han. 2006. Effect of antihypertensive peptides originated from various marine proteins on ACE inhibitory activity and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**, 567-570.
- Guerard, F., N. Decourcelle, C. Sabourin, C. Floch-laizet, L. Le grel, P. Le floch, F. Gourlay, R. Le delezir, P. Jaouen, and P. Bourseau. 2010. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. *J. Sci. Hal. Aquat.* **2**, 21-27.
- Hong, J. H., B. S. Son, B. K. Kim, H. Y. Chee, K. S. Song, B. H. Lee, H. C. Shin, and K. B. Lee. 2006. Antihypertensive effect of *Ecklonia cava* extract. *Korean J. Pharmacogn.* **37**, 200-205.
- Jang, Y. B. 2007. Application in foodstuffs and functional characteristics of oyster hydrolysates. Ph. D. thesis, Pukyong University, Busan, Korea.
- Jeong, B. Y., B. D. Choi, and J. S. Lee. 1998. Proximate composition cholesterol and α-tocopherol content in 72 species of Korean fish. *J. Korean Fish Sci. Technol.* **1**, 129-146.
- Kim, C. Y., J. H. Pyeun, and J. N. Nam. 1981. Decomposition of glycogen and protein in pickled oyster during fermentation with salt. *J. Korean Fish Soc.* **14**, 66-71.
- Kim, T. J., H. D. Yoon, D. S. Lee, Y. S. Jang, S. B. Suh, and D. M. Yeum. 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.
- Lee, H. O., D. S. Kim, J. R. Do, and D. Y. Kwan. 2001. Separation and purification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from Laver hydrolysate. *J. Korean*

- Fish. Soc.* **34**, 164-172.
12. Lee, H. O., D. S. Kim, J. R. Do, and Y. S. Ko. 1999. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. *J. Korean Fish. Soc.* **32**, 427-431.
  13. Lee, J. M., S. G. You, and S. M. Kim. 2005. Functional activities of low molecular weight peptides purified from enzymatic hydrolysate of seaweeds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1124-1129.
  14. Lim, S. D., K. S. Kim, and J. R. Do. 2008. Physiological characteristics and ACE inhibitory activity of *Lactobacillus zeae* RMK354 isolated from raw milk. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **28**, 587-595.
  15. Matsumuta, N., M. Gujii, Y. Takeda, and T. Shimizu. 1993. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1743-1744.
  16. Nakano, D., K. Ogura, M. Miyakoshi, F. Ishii, H. Kawanishi, D. Kurumazuka, C. J. Kwak, K. Ikemura, M. Takaoka, S. Moriguchi, T. Iino, A. Kusumoto, S. Asami, H. Shibata, Y. Kiso, Y. Matsumura. 2006. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1118-1126.
  17. National Fisheries Research and Development Agency. 1995. Supplemented chemical composition of marine products in Korea. pp. 139-143, Yemoo Publishing Co., Seoul.
  18. Park, Y. B. 2009. Characteristics of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from Aroase AP10 hydrolysate of octopus. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 177-181.
  19. Richard, N. and M. D. Re. 2002. The clinical implication of tissue rennin angiotension system. *Curr. Opin. Cardiol.* **16**, 317-327.
  20. Soudant, P. and F. L. Chu. 2001. Lipid class and fatty acid composition of the protozoan parasite of oysters, *Perkinsus marinus* cultivated in two different media. *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**, 309-319.
  21. Ursula, C., M. D. Brewster, A. Mark, and M. D. Perazella. 2004. The rennin-angiotensin-aldosterone system and the kidney disease. *Am. J. Med.* **116**, 263-272.
  22. Walmor, C., A. H. De Mell, and Jan Danser. 2002. Angiotensin II and the heart on the intracrine renin-angiotension system. *Hypertension* **35**, 1183-1188.
  23. Wang, J., J. Hu, J. Cui, X. Bai, Y. Du, Y. Miyaguchi, and B. Lin. 2008. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* **111**, 302-308.
  24. Weiss, D., J. J. Kools, and W. R. Taylor. 2001. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* **103**, 448-454.
  25. Yoon, H. D., H. S. Byun, S. J. Chun, S. B. Kim, and T. H. Park. 1986. Lipid composition of oyster, arkshell and sea-mussel. *J. Korean Fish. Soc.* **19**, 321-326.

#### 초록 : 굴 효소 가수분해물의 angiotensin converting enzyme 저해작용

도형주<sup>1</sup> · 박혜진<sup>1</sup> · 김옥주<sup>1</sup> · 김안드레<sup>2</sup> · 최영준<sup>3</sup> · 정세영<sup>4</sup> · 하종명<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>신라대학교 대학원 생명공학과, <sup>2</sup>신라대학교 제약공학과, <sup>3</sup>경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소, <sup>4</sup>경희대학교 약학대학 위생약학 및 독성학실)

굴 효소 가수분해물은 굴을 alcalase, protamex, neutrase, flavourzyme, pepsin으로 각각 처리하였고, 이들의 ACE 저해활성을 측정하였다. ACE 저해활성은 가수분해 시간에 따라 증가 또는 감소하였으며, 그 중 10시간 이상 가수분해 처리한 PEH에서 가장 높은 ACE 저해활성을 나타내었다. PEH 가수분해물을 한외여과(30, 10 kDa) 하여 낮은 분자량의 분획물을 얻었다. 30 kDa와 10 kDa 이하 분자량 별 ACE 저해활성은 각각 69.18±0.75, 83.71±1.12의 활성을 나타내었다. 이 결과 10 kDa 이하의 시료로부터 HPLC column (waters 120 ODS-AP 250 X 4.6 (5 µm))을 이용하여 각각의 활성 분획을 분취하여 얻은 6분획의 ACE 저해 활성은 29.56~85.85% 로 나타났다. 그 중 저해활성이 가장 높게 나타나는 B fraction의 아미노산 서열을 확인한 결과 Leu-Gln-Pro임을 확인하였고, peptide합성하여 얻은 저해활성 농도(IC<sub>50</sub>)가 1.18 µM임을 확인하였다. 이러한 결과는 PEH를 이용하여 건강 기능성 식품의 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.