

## Sodium Caseinate 가수분해물의 Angiotensin-I Converting Enzyme 저해효과에 관한 연구

이건봉\* · 신용국 · 백승천  
서울우유협동조합 중앙연구소

### Effect of Sodium Caseinate Hydrolysates on Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibition Activity

Keon Bong Lee\*, Yong Kook Shin, and Seung Chun Baick

Research and Development Center, Seoul Dairy Cooperative, Ansan 425-839, Korea

#### Abstract

This study was carried out to identify the ACE (Angiotensin converting enzyme) inhibitory activity of casein hydrolysates for development of anti-hypertensive hydrolysates. Sodium caseinate was treated with six kinds of commercial proteases such as Flavourzyme, Protamex, Neutrase 1.5, Alcalase, Protease M, and Protease S for 8 h individually, and was then treated with the enzyme combination for 4 h at 45°C. The hydrolysate which had the highest ACE inhibitory effect was then hydrolysed successively with three digestive enzymes: pepsin, trypsin, and  $\alpha$ -chymotrypsin, at 37°C for 4 h under conditions mimicking those of the gastrointestinal tract. UF (ultra filtration) treatment was applied to one of the secondary hydrolysates to determine ACE inhibitory activity. When sodium caseinate was hydrolysed by commercial proteases, the degree of hydrolysis (DH) showed 2.54 to 4.25% and after secondary hydrolysis, DH showed 4.30 to 5.22%. ACE inhibitory activity and  $IC_{50}$  values decreased, and inhibition rates increased during hydrolysis. Protamex treatment showed the lowest  $IC_{50}$  value (516  $\mu$ g/mL) and Flavourzyme hydrolysate showed the highest  $IC_{50}$  value (866  $\mu$ g/mL). As the first hydrolysate was treated with Flavourzyme, the ACE inhibitory activity increased. Neutrase hydrolysate had the highest activity with an  $IC_{50}$  value (282  $\mu$ g/mL). When Neutrase plus Flavourzyme treatment was hydrolyzed by digestive enzymes, the  $IC_{50}$  value (597  $\mu$ g/mL) was decreased statistically ( $p < 0.05$ ). As Neutrase plus Flavourzyme hydrolysate is treated by UF with MW cut-off 10,000, permeate showed 273  $\mu$ g/mL of  $IC_{50}$  value, showed no difference, but retentate which has over MW 10,000 showed statistically different  $IC_{50}$  value, 635  $\mu$ g/mL ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** angiotensin converting enzyme, sodium caseinate, hydrolysate, protease, digestive enzyme

#### 서 론

고혈압은 동맥경화증과 함께 뇌졸중이나 심근경색증과 같은 심혈관계 질환의 주요 발병 위험요인이다(Kearney *et al.*, 2005). 우리나라의 만 30세 이상 인구의 고혈압 발생률은 2007년 24.6%에 비해 2008년 26.0%로 증가하였으며 50대 35%, 60대 47.5%, 70대 56.8%로 연령이 높아질수록 발생률이 높다(Ministry of Health and Welfare, 2008).

유단백질은 다른 식품에 존재하는 단백질처럼 소화에 의해 다양한 펩타이드로 분해된다. 이들 펩타이드는 아미노

산을 공급하는 영양적 기능외에 생리활성을 나타내는 생체조절기능을 가지고 있다(McSweeney *et al.*, 1993). 최근 식품으로부터 유래한 성분들의 항암, 항노화, 또는 혈압강하 같은 생리활성 효과가 보고되고 있다, 특히 고혈압, 동맥경화 등 성인병은 식습관과 밀접한 관련이 있어 일상적으로 섭취하는 식품 성분 중 혈압강하 효과가 있는 물질을 규명하는 것은 질병 예방차원에서 매우 의미가 있다고 본다(Yun *et al.*, 2003).

Angiotensin converting enzyme(ACE)는 angiotensin I의 C-말단 di-peptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin II로 전환시켜 혈압을 상승시키고 생체 내에서 혈압강하 작용을 갖는 bradykinin을 분해한다. 따라서 이러한 ACE의 작용을 억제할 수 있다면 고혈압 치료가 가능한 것으로 보고되었다(Ariyoshi, 1993).

\*Corresponding author: Keon-Bong Lee, R&D Center, Seoul Dairy Cooperative, Ansan 425-839, Korea. Tel: 82-31-491-3867-9(ext. 557), Fax: 82-31-491-9179, E-mail: freshmen@seoulmilk.co.kr

카제인 유래 ACE 저해 펩타이드는 trypsin 분해물의 펩타이드 분획으로부터 연구되었다(Maruyama and Suzuki, 1982). Yamamoto 등(1994)은 *L. helveticus*의 단백질 분해 효소로 카제인을 가수분해하여 ACE저해 펩타이드를 분리하였으며, Yoon 등(2003)은 시약용 카제인을 소화효소인 pepsin, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin으로 분해하여 ACE 저해효과를 측정하였고, Oh 등(1997)은  $\kappa$ -casein의 pepsin, trypsin, chymosin 가수분해물에 대한 ACE 저해 효과를 탐색하였다. Kim 등(2002)은 발효유에서 분리된 펩타이드는 혈압 저하 효과가 있지만 균주를 사용하여 장기간 배양하고 ACE저해 효과가 있는 펩타이드의 생성량이 적어 이를 분리, 정제하여 산업화하기는 어렵다고 하였다.

본 연구는 일상적으로 섭취하는 우유 유래 카제인을 상업용 단백질가수분해 효소로 처리하여 효소의 종류와 가수분해 시간에 따른 혈압강하 효과를 살펴보고, ACE 저해효과가 있는 가수분해물을 제조하여 혈압강하 효과가 있는 카제인 가수분해물을 생산하기 위한 기초 연구로서 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 공시시료

카제인염 가수분해물의 제조는 카제인나트륨(Arla foods, Denmark)을 구입하여 사용하였고, 분해에 사용한 단백질 분해 효소는 덴마크 Novo Nordisk사 제품인 *Aspergillus oryzae* 유래 Flavourzyme, *Bacillus* 유래의 Protamex, Neutrase 1.5, *Bacillus licheniformis* 유래 Alcalase와 일본 Amano사의 *Aspergillus oryzae* 유래 Protease M과 *Bacillus stearothermophilus* 유래 Protease S 제품을 구입하여 사용하였다. ACE 저해효과 측정용 시약으로는 ACE rabbit lung acetone powder(Sigma, USA)와 기질로는 Hip-His-Leu(Sigma, USA)을 구입하여 사용하였다.

### 실험설계

#### 카제인염의 가수분해

카제인염의 가수분해는 Abubakar 등(1998)의 방법을 응용하여 수행하였다. 효소처리의 pH, 온도 등 반응조건은 Table 1과 같다. 카제인염을 90°C의 증류수에 용해시켜 10%의 용액을 만들고 동일한 원추액에 용해한 각각의 가수분해효소로 가수분해하였다.

1차 가수분해시 카제인염과 효소의 비율을 1,000:1(wt/wt)로 첨가하여 뚜껑 있는 시험관에 200 mL을 취하여 shaking incubator(KMC 8480S, Yu-jin trading Co. Korea)에서 180 rpm으로 shaking 하면서 반응시간을 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h으로 나누어 가수분해하였다. 효소반응 이루어지면 95°C 물에서 10분간 시험관을 넣어 반응을 정지시켰다.

2차 가수분해는 1차 가수분해물에 exo 및 endo형 가수분해 효소인 Flavourzyme을 사용하여 기질과 효소의 비율을 500:1(wt/wt)로 하여 4시간 분해하였다. 분해 후 효소를 불활성화 한 다음, J2-21ME Centrifuge(Beckman, USA)으로 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 Freezer Dryer FD-81(EYELA, Tokyo RIKAKIKAI Co. Japan)로 동결건조 하여 실험에 사용하였다.

#### 소화효소 처리

카제인염 가수분해물을 Vermeirssen 등(2003)의 방법을 응용하여 단백질 소화효소로 분해하였다. 가수분해물을 먼저 pepsin으로 처리한 후 trypsin과  $\alpha$ -chymotrypsin으로 처리하였다. 10% 카제인염 가수분해물 용액 200 mL을 1 N HCl로 pH 2로 조정하여 pepsin을 0.0075 N HCl에 용해하였다. 이후 기질과 효소의 비율을 1,000:1(wt/wt)로 하여 소화기관인 위와 비슷한 조건을 만들어 37°C에서 2시간 분해하였다.

Pepsin을 처리한 가수분해물에  $\text{NaHCO}_3$ (5 g/L)를 첨가한 후, 1 M NaOH를 첨가하여 pH 6.5로 조정한 후, trypsin과  $\alpha$ -chymotrypsin을 각각 40 mg 첨가하여 shaking incubator(KMC 8480S, Yu-jin trading Co. Korea)를 사용해 50 rpm

Table 1. Digestive conditions of proteolytic enzymes

Enzyme	Origin	pH	Temp. (°C)	E/S ratio (wt/wt)	Manufacturer
Pepsin	Porcine gastric mucosa	2.0	37	1/1000	Sigma, USA
Trypsin	Bovine pancrease	6.5	37	1/1000	Sigma, USA
$\alpha$ -chymotrypsin	Bovine pancrease	6.5	37	1/1000	Sigma, USA
Protease M	<i>Aspergillus oryzae</i>	6.8	45	1/1000	Amano Enzyme, Japan
Protease S	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	6.8	45	1/1000	Amano Enzyme, Japan
Flavourzyme	<i>Aspergillus oryzae</i>	6.8	45	1/1000 or 1/500*	Novo Nordisk, Denmark
Protamex	<i>Bacillus</i>	6.8	45	1/1000	Novo Nordisk, Denmark
Alcalase 2.4	<i>Bacillus licheniformis</i>	6.8	45	1/1000	Novo Nordisk, Denmark
Neutrase 1.5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6.8	45	1/1000	Novo Nordisk, Denmark

\*Secondary hydrolysis Enzyme/Substrate (E/S) ratio

으로 shaking하면서 소장의 환경과 비슷한 조건인 37°C에서 2.5시간 가수분해 한 후 8,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 동결건조하여 실험에 사용하였다.

#### 가수분해도 측정

단백질 가수분해도는(DH, Degree of hydrolysis, %)는 Adler-Nissen(1979)의 TNBS 분석 방법을 기초로 하여 다음과 같이 구하였다.

$$DH(\%) = (H/H_{tot}) \times 100$$

H: 분해 중 생성된 시료의  $\alpha$ -amino group 농도 (milliequivalent/g protein)

H<sub>tot</sub>: 단백질 1 g당 총 아미노산의 농도 (milliequivalent/g milk protein: 8.3)

#### 한외여과에 의한 ACE inhibitor 분리

카제인염 가수분해물의 한외여과는 DSS Lab Unit M20(Nakskov, Denmark)을 사용하였다. Table 2에 제시된 조건으로 시스템 온도 50°C에서 cut-off 10,000 Da인 한외여과막 GR 91pp(Denmark)을 사용하여 MW 10,000 이상과 10,000 미만으로 나누어 분리한 후 동결건조하여 사용하였다.

#### ACE 저해효과 측정

Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 응용하여 수행하였다. 12.5 mM Hip-His-Leu을 0.3 M NaCl을 함유한 350 mM 인산 칼륨(pH 8.3) 완충액에 용해한 기질 용액 100  $\mu$ L에 각각의 동결건조된 시료 100 mg을 10 mL의 증류수에 녹인 후 용해된 시료 1 mL를 10배 희석한 가수분해액 50  $\mu$ L를 가한 후 37°C에서 5분간 반응시켰다. 여기에 350 mM 인산칼륨(pH 8.3) 완충액에 용해한 ACE 조효소 150  $\mu$ L를 가하고 37°C의 항온 수조에서 60분 반응시킨 후 0.5 N HCl을 250  $\mu$ L를 가하여 반응을 정지시켰다.

반응 용액에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 vortex로 강하게 15초간 교반한 후 혼합하여 2,800 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액 0.5 mL를 취하였다. 이 상등액을 140°C의 dry 오븐에서 30분간 완전히 건조시킨 후 1 M의 NaCl 3 mL를 가한 후 228 nm에서 흡광도를 spectrophotometer(8453, Agilent, USA)로 측정하였으며 ACE 저해율은

다음과 같이 계산하였다.

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

Ec: control (HHL+D.W+ACE)

Es: sample (HHL+sample+ACE)

Eb: blank (HHL+HCl+sample)

IC<sub>50</sub>값( $\mu$ g/mL)은 정제된 시료를 일정한 농도로 희석한 후에 ACE 저해효과를 측정한 다음 이들 농도에 대한 회귀곡선을 산출하여 구하였다. 회귀곡선은 시료를 10, 30, 50, 70, 100  $\mu$ L를 가한 후 ACE 저해율을 구한 다음 직선식을 산출하여 ACE활성을 50% 저해하는데 필요한 펩타이드 양( $\mu$ g/mL)으로 나타내었다.

#### 통계분석

실험에서 얻어진 결과는 SAS system을 이용하여 Duncan의 다중 검정에 의하여 95%의 신뢰수준에서 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 효소별 카제인염의 가수분해 특성

#### 가수분해도

카제인염 10%에 6가지 효소로 1차 가수분해를 시켜 측정된 각 시료의 가수분해도는 Table 3과 같았다. 6가지 효소로 가수분해한 각 시료의 단백질 분해율은 0.61-4.25%로 나타나 상업용 단백질 분해효소로 기질 대 효소의 비율을 1,000:1로 하여 탈지분유를 40°C에서 2시간 가수분해하여 효소의 종류에 따라 각각 0.15-3.2% 정도로 가수분해 되었다고 보고한 Lee 등(2002)의 결과와 유사하였다.

8시간 가수분해한 각 시료군의 단백질 분해도는 Protamex 처리 시료가 단백질분해율이 4.25% 정도로 가장 높았으며, Flavourzyme으로 처리한 카제인염의 가수분해도가 2.54%로 가장 낮게 나타났다. Exo와 endo가수분해 특성을 갖는 Flavourzyme으로 1차 가수분해물을 2차 가수분해시킨 결과는 Table 4와 같이 4.30-5.22%로 나타났다. Protamex의 가수분해도는 5.22% 정도로 가장 높았으며 Alcalase와 Neutrase는 각각 4.97%, 5.04%의 가수분해도를 나타냈지만 유의적인 차이는 없었다( $p < 0.05$ ).

#### ACE저해 효과

카제인나트륨을 6종의 상업용 단백질 분해효소로 처리 후 ACE 활성 저해효과 결과는 Table 5 및 6과 같았다. 0.5-8시간까지 가수분해하여 측정된 ACE 저해율은 7.56-60.21%로 나타났다. 이러한 결과는 Lee 등(2002)의 탈지분유 및 유청을 상업용 단백질분해효소 7종으로 가수분해하여 약 10-70%의 저해효과가 있다고 한 보고와 유사하였다.

**Table 2. Operation conditions of ultrafiltration for sodium caseinate hydrolysate**

Module	DSS Lab Unit M 20
Inlet pressure	6 bar
Outlet pressure	2 bar
Sample	Sodium caseinate hydrolysate
Temperature	50°C
Membrane	Gr91pp

**Table 3. Hydrolysis rate changes of sodium caseinate with proteases**

(Unit: %)

Enzyme	Hydrolysis time (h)					
	0.5	1	2	4	6	8
Flavourzyme	0.61±0.06 <sup>t</sup>	0.87±0.02 <sup>s</sup>	1.27±0.07 <sup>qr</sup>	1.61±0.15 <sup>op</sup>	2.28±0.14 <sup>jk</sup>	2.54±0.15 <sup>i</sup>
Protamex	1.46±0.02 <sup>pq</sup>	1.97±0.10 <sup>lm</sup>	2.73±0.25 <sup>h</sup>	3.58±0.19 <sup>d</sup>	4.11±0.02 <sup>ab</sup>	4.25±0.03 <sup>a</sup>
Alcalase	1.45±0.01 <sup>pq</sup>	1.67±0.18 <sup>no</sup>	2.13±0.24 <sup>kl</sup>	2.88±0.11 <sup>h</sup>	3.13±0.10 <sup>g</sup>	3.27±0.05 <sup>fg</sup>
Protease S	1.42±0.02 <sup>pq</sup>	1.61±0.04 <sup>op</sup>	2.18±0.03 <sup>jk</sup>	3.12±0.01 <sup>g</sup>	3.36±0.05 <sup>ef</sup>	3.49±0.07 <sup>de</sup>
Protease M	1.36±0.01 <sup>qr</sup>	1.63±0.08 <sup>op</sup>	2.33±0.20 <sup>j</sup>	3.24±0.03 <sup>fg</sup>	3.88±0.01 <sup>c</sup>	3.93±0.02 <sup>c</sup>
Neutrase	1.22±0.01 <sup>r</sup>	1.82±0.14 <sup>mn</sup>	2.50±0.06 <sup>i</sup>	3.90±0.04 <sup>de</sup>	3.90±0.06 <sup>c</sup>	4.00±0.12 <sup>bc</sup>

Treatment condition, Hydrolysis time at 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h.

Hydrolysis temperature at 45°C with 180 rpm in shaking incubator.

Enzyme over substrate ratio, 1:1000 (wt/wt)

<sup>a-t</sup>Means in the table with same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).**Table 4. Hydrolysis rate of sodium caseinate hydrolysates with secondary hydrolysis by Flavourzyme**

(Unit: %)

Enzyme	Hydrolysis rate
Protamex + Flavourzyme	5.22±0.15 <sup>a</sup>
Alcalase + Flavourzyme	4.97±0.15 <sup>a</sup>
Protease S + Flavourzyme	4.30±0.10 <sup>b</sup>
Protease M + Flavourzyme	4.39±0.11 <sup>b</sup>
Neutrase + Flavourzyme	5.04±0.19 <sup>a</sup>

Treatment condition, Hydrolysis time at 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h.

Hydrolysis temperature at 45°C with 180 rpm in shaking incubator.

Enzyme over substrate ratio, 1:1000 (wt/wt)

<sup>a,b</sup>Means in the column with same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

한편 가수분해 시간이 증가함에 따라 ACE저해율이 점차 증가 하였으며 Protamex로 8시간 동안 가수분해한 시료의 ACE 저해율의 경우 60.21%로 가장 높은 저해율을 보였고, Flavourzyme이 32.04%로 가장 낮게 나타났다. 특히 Flavourzyme으로 6-8시간 가수분해 한 ACE 저해율과 Protamex로 0.5-1시간 가수분해에 의한 저해율이 비슷한 것으로 나타나 Protamex의 ACE 저해율이 가장 높은 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ).

IC<sub>50</sub> 수치(μg/mL)는 가수분해 시간이 증가함에 따라 점차 감소하였으며, Protamex, Neutrase, Protease S로 8시간 가수분해한 IC<sub>50</sub> 수치(μg/mL)는 각각 516, 523, 540으로 유사 한 저해효과를 나타냈고, Flavourzyme이 866으로 저

**Table 5. ACE inhibition rate of sodium caseinate hydrolysate during hydrolysis**

(Unit: %)

Enzyme	Hydrolysis time (h)					
	0.5	1	2	4	6	8
Flavourzyme	7.56±1.91 <sup>s</sup>	12.93±1.82 <sup>qr</sup>	15.71±2.75 <sup>pq</sup>	22.22±3.48 <sup>lmn</sup>	28.39±3.48 <sup>kl</sup>	32.04±2.95 <sup>ijk</sup>
Protamex	28.81±1.79 <sup>kl</sup>	35.54±2.92 <sup>hi</sup>	46.17±2.72 <sup>de</sup>	53.87±3.21 <sup>bc</sup>	58.49±3.21 <sup>a</sup>	60.21±3.21 <sup>a</sup>
Alcalase	10.70±1.92 <sup>rs</sup>	15.10±1.91 <sup>pqr</sup>	17.47±2.74 <sup>opq</sup>	25.17±2.94 <sup>lm</sup>	31.35±2.94 <sup>ijk</sup>	36.11±2.82 <sup>ghi</sup>
Protease S	21.06±2.95 <sup>mno</sup>	32.35±1.92 <sup>ijk</sup>	39.73±1.91 <sup>fgh</sup>	44.95±3.07 <sup>ef</sup>	50.43±3.07 <sup>bcd</sup>	53.33±3.04 <sup>b</sup>
Protease M	20.99±1.90 <sup>mno</sup>	24.64±2.91 <sup>lm</sup>	35.22±2.68 <sup>hi</sup>	40.85±2.85 <sup>fg</sup>	49.55±2.85 <sup>bcd</sup>	51.69±3.00 <sup>bc</sup>
Neutrase	16.87±1.88 <sup>nop</sup>	25.71±2.82 <sup>lm</sup>	33.70±2.80 <sup>ij</sup>	39.48±3.01 <sup>fgh</sup>	47.20±3.01 <sup>cde</sup>	52.05±3.05 <sup>bc</sup>

Treatment condition, Hydrolysis time at 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h.

Hydrolysis temperature at 45°C with 180 rpm in shaking incubator.

Enzyme over substrate ratio, 1:1000 (wt/wt)

<sup>a-s</sup>Means in the table with same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).**Table 6. IC<sub>50</sub> value of sodium caseinate hydrolysate during hydrolysis**

(Unit: μg/mL)

Enzyme	Hydrolysis time (h)					
	0.5	1	2	4	6	8
Flavourzyme	3,147±153 <sup>a</sup>	2,079±105 <sup>e</sup>	1,375±196 <sup>hi</sup>	1,122±63 <sup>jk</sup>	950±53 <sup>lm</sup>	866±63 <sup>lmn</sup>
Protamex	2,155±93 <sup>de</sup>	1,388±82 <sup>hi</sup>	787±40 <sup>mno</sup>	612±40 <sup>qr</sup>	533±26 <sup>r</sup>	516±33 <sup>r</sup>
Alcalase	2,829±140 <sup>b</sup>	1,889±112 <sup>f</sup>	1,262±64 <sup>ij</sup>	928±63 <sup>lm</sup>	831±59 <sup>lmno</sup>	737±43 <sup>nopq</sup>
Protease S	2,282±156 <sup>d</sup>	1,545±103 <sup>e</sup>	987±59 <sup>kl</sup>	663±43 <sup>opqr</sup>	547±33 <sup>r</sup>	540±33 <sup>r</sup>
Protease M	2,447±140 <sup>c</sup>	1,552±93 <sup>e</sup>	961±45 <sup>l</sup>	724±45 <sup>nopq</sup>	645±73 <sup>pqr</sup>	605±63 <sup>qr</sup>
Neutrase	2,555±99 <sup>c</sup>	1,501±92 <sup>gh</sup>	927±61 <sup>lm</sup>	721±45 <sup>nopq</sup>	597±31 <sup>qr</sup>	523±36 <sup>r</sup>

Treatment condition, Hydrolysis time at 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h.

Hydrolysis temperature at 45°C with 180 rpm in shaking incubator.

Enzyme over substrate ratio, 1:1000 (wt/wt)

<sup>a-r</sup>Means in the table with same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

해효과가 가장 작은 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ).

가수분해시간에 따른 ACE 저해율과  $IC_{50}$  수치( $\mu\text{g/mL}$ )의 관계는 Fig. 1-6과 같았다. 6가지 단백질분해효소로 처리한 모든 시료가 가수분해가 진행되는 동안 ACE 저해율은 증가하고  $IC_{50}$  수치( $\mu\text{g/mL}$ )는 감소하였다. 특히 가수분해 시작 후 2시간까지 가수 분해도가 급격히 증가하였으며 이에 따라 ACE 저해효과가 급격히 증가한 후 그 후 완만하게 증가하는 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 Shin(1996)이 탈지대두박을 여러 종류의 단백질 가수분해 효소로 처리한 결과 각 효소분해물은 효소 종류에 따라 다소 차이는 있었으나 가수분해도의 증가에 따라 ACE 저해 활성이 급격히 증가하는 경향이 있었다는 보고와 유사하였다.

복합효소로 제조한 가수분해물의 ACE저해 활성 ACE 활성이 높은 가수분해물을 얻기 위해 ACE 저해율

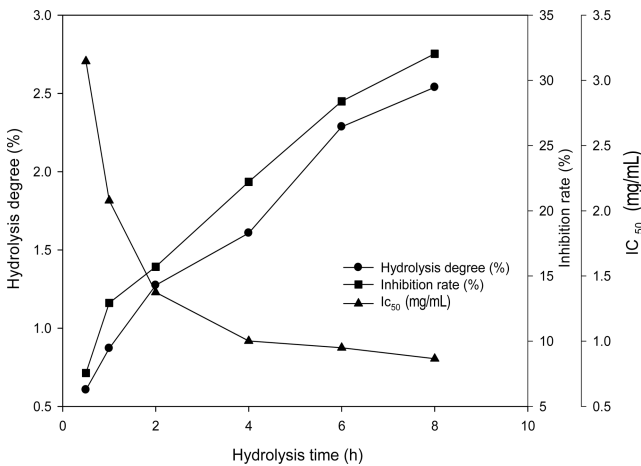


Fig. 1. Changes of hydrolysis degree, ACE inhibition activity, and  $IC_{50}$  (mg/mL) of sodium caseinate hydrolysate with Flavourzyme.

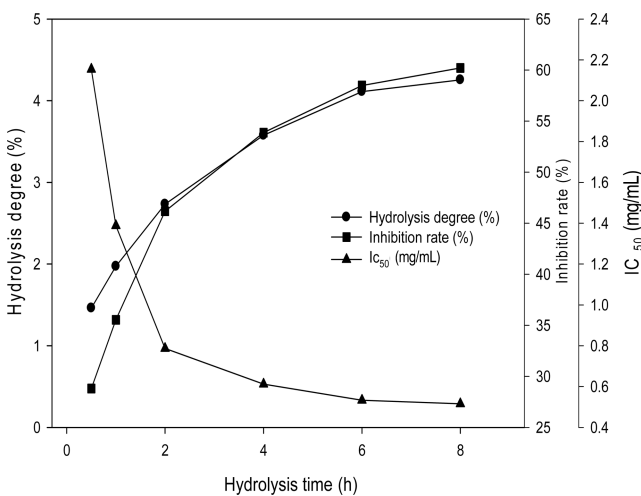


Fig. 2. Changes of hydrolysis degree, ACE inhibition activity, and  $IC_{50}$  (mg/mL) of sodium caseinate hydrolysate with Protamex.

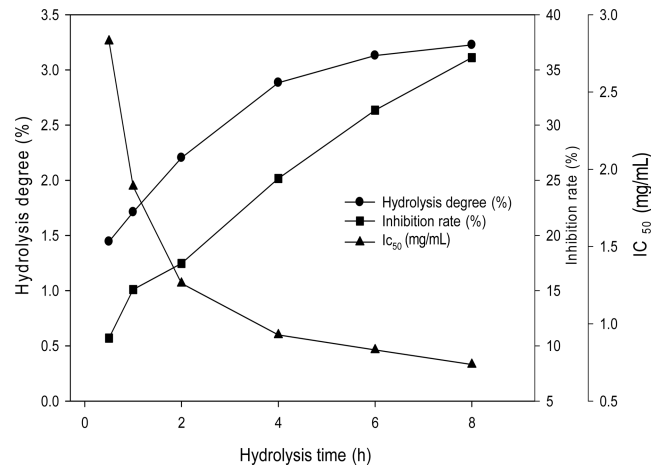


Fig. 3. Changes of hydrolysis degree, ACE inhibition activity, and  $IC_{50}$  (mg/mL) of sodium caseinate hydrolysate with Alcalase.

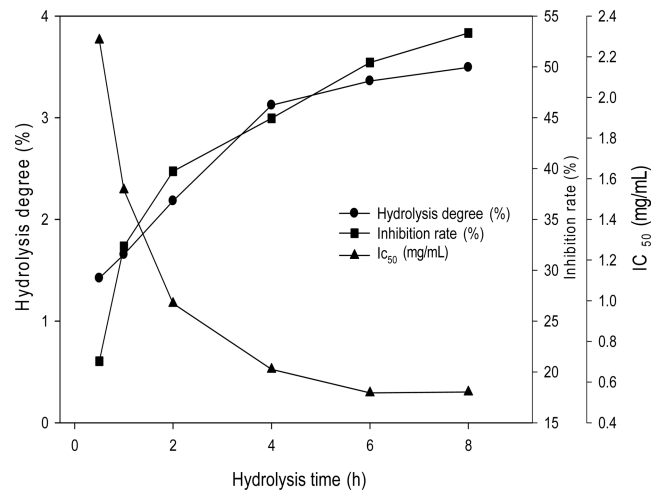


Fig. 4. Changes of hydrolysis degree, ACE inhibition activity, and  $IC_{50}$  (mg/mL) of sodium caseinate hydrolysate with Protease S.

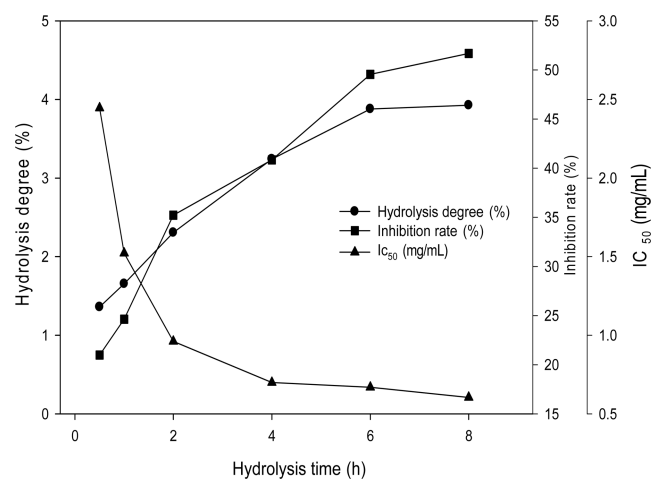


Fig. 5. Changes of hydrolysis degree, ACE inhibition activity, and  $IC_{50}$  (mg/mL) of sodium caseinate hydrolysate with Protease M.

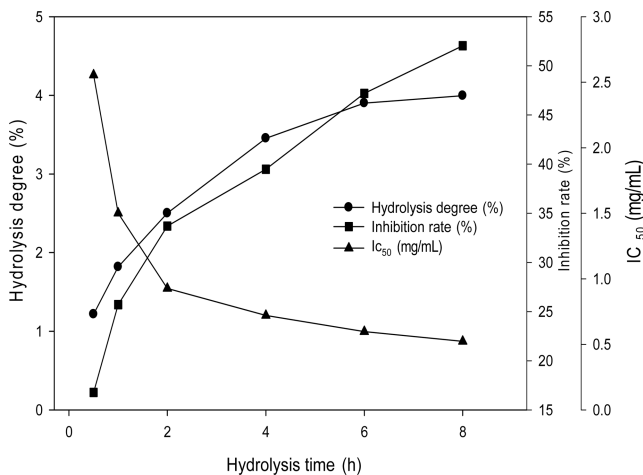


Fig. 6. Changes of hydrolysis degree, ACE inhibition activity, and IC<sub>50</sub> (mg/mL) of sodium caseinate hydrolysate with Neutrased.

이 가장 낮은 Flavourzyme을 제외한 5가지 가수 분해효소로 카제인염을 1차 가수분해 한 후, exo와 endo의 특성을 갖는 Flavourzyme으로 2차 가수분해를 하여 측정된 ACE 저해율과 IC<sub>50</sub>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )수치는 Table 7과 같았다. 2차 가수분해물의 ACE저해율은 Neutrased가 74.06%로 가장 높은 저해율을 보였고, Protease M이 55.88%로 가장 낮은 저해율을 보였다( $p < 0.05$ ).

한편 2차 가수분해시 증가된 저해율을 살펴보면 1차 가수분해 한 ACE저해율보다 Flavourzyme으로 2차 가수분해한 저해율이 4.19-33.61%가 증가하였으며, Alcalase의 경우 36.11%에서 2차 분해시 69.72%로 증가하여 2차 가수분해에 의한 ACE 저해 증가율이 가장 높았다. Neutrased 처리 가수분해물은 1차 가수분해시 52.05%에서 2차 분해시 74.06%로 ACE 저해율이 증가하여 2차 가수분해에 의한 ACE 저해율이 가장 높았다( $p < 0.05$ ).

IC<sub>50</sub>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )수치 또한 Protamex와 Protease S, Protease M은 34-37  $\mu\text{g}/\text{mL}$  정도 낮아져 활성이 조금 증가하였으나 Alcalase와 Neutrased의 경우에는 428과 241  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 활성 증가율이 높아, 효소의 종류에 따라 Flavourzyme의 2차 가

Table 7. ACE inhibition rate and IC<sub>50</sub> value of hydrolysates after secondary hydrolysis

Enzyme	IC <sub>50</sub> value ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*	Inhibition rate (%)
Protamex	479.00±27.17 <sup>b</sup>	70.59±2.64 <sup>a</sup>
Alcalase	309.22±14.60 <sup>c</sup>	69.72±3.14 <sup>a</sup>
Protease S	506.52±27.59 <sup>b</sup>	61.77±2.90 <sup>b</sup>
Protease M	570.51±36.68 <sup>a</sup>	55.88±2.91 <sup>c</sup>
Neutrased	282.32±10.17 <sup>c</sup>	74.06±1.62 <sup>a</sup>

Each treatment has secondary hydrolysis with Flavourzyme.

\*Values are concentrations needed to 50% inhibition of ACE activity, expressed as peptide contents.

<sup>a-c</sup>Means in the column with same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

수분해에 의한 ACE 저해율과 IC<sub>50</sub>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 미치는 영향이 상이한 것으로 나타났다. IC<sub>50</sub>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )수치는 Alcalase와 Neutrased가 각각 282.32와 309.22로 우수하였고 Protease M이 570.51로 가장 적은 활성을 나타냈다( $p < 0.05$ ).

#### 가수분해물의 소화효소 처리

2차 가수분해된 가수분해물 중 가장 효과가 좋은 Neutrased 분해물을 소화효소에 의한 ACE 저해효과는 Table 8과 같다.

소화효소 처리에 의해 IC<sub>50</sub>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )은 282.32에서 597.81로 증가되었고 저해율도 74.06%에서 62.92%로 낮아졌다. 이는 Kim 등(2002)이 5% 카제인 용액(Merck, pH 7.0)을 *Asp. oryzae* 유래 단백질 분해효소로 1차 분해 후 pepsin, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin으로 처리하였을 때 가수분해물의 ACE저해 효과의 차이가 없었다는 보고와 상이한 결과이다. 이는 가수분해물에 Seki 등(1996)이 보고하는 MW 315 Da의 펩타이드 함량이 적거나 또는 소화효소에 의해 저해물질이 분해되어 활성이 감소되었다고 생각한다.

#### UF처리 가수분해물의 저해효과

MW cut-off 10,000의 UF로 분자량 크기로 분리한 결과 연황색의 10,000 미만 permeate와 황색의 10,000 이상의 retentate를 얻었다. 10,000 미만 permeate의 경우 동결건조시 수분흡수도가 높은 분말형태로 존재하며 이는 가수분해물의 분자량이 적어 극성기가 많이 노출됨으로써 수분흡수력이 증가하여 일어나는 현상으로 생각된다.

가수분해물 UF의 ACE저해 효과는 Table 8과 같이 permeate의 ACE 저해효과 IC<sub>50</sub>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )은 UF처리하기 전 282.32와 비교해서 273.87로 저해효과가 증가하지 않았다. 그러나 MW 10,000 이상의 retentate의 경우 저해효과가 635.56으로 감소하는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 이 결과는 Oh 등(1997)의 정제된  $\kappa$ -casein을 소화효소인  $\alpha$ -chymotrypsin, pepsin 및 trypsin으로 가수분해하여 ACE 저해효과가 있는 분획중 MW cut-off가 증가할수록 IC<sub>50</sub>가 감소하였다는 결과와 유사한 것으로 나타났다.

Table 8. ACE inhibitory activity by ultrafiltration and digestive enzyme of sodium casein hydrolysate

Sample	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*	ACE Inhibition rate (%)
Hydrolysate (Neutrased → Flavourzyme)	282.32±10.17 <sup>c</sup>	74.06±1.62 <sup>b</sup>
Digestive enzyme hydrolysate	597.81± 8.18 <sup>b</sup>	62.92±0.69 <sup>c</sup>
Ultrafiltration		
10,000 MW below	273.87±3.46 <sup>c</sup>	98.14±0.77 <sup>a</sup>
10,000 MW above	635.56±9.24 <sup>ab</sup>	58.38±4.89 <sup>d</sup>

\*Values are concentrations needed to 50% inhibition of ACE activity, expressed as peptide contents.

<sup>a,b</sup>Means in the column with same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

## 요 약

본 연구는 유단백질 유래 카제인염을 상업용 단백질가수분해 효소로 처리하여 효소의 종류와 가수분해 시간에 따른 ACE 저해효과를 살펴보고 주요 성인병인 고혈압의 예방을 위한 혈압강하 효과가 높은 가수분해물을 제조하고자 수행하였다. 카제인염을 6종의 단백질 분해효소로 기질대 효소비 1000:1로 첨가하여 8시간 가수분해했을 때 가수분해도는 2.54-4.25%로 나타났고, 다시 가수분해물을 기질대 효소비 500:1로 처리하여 4시간 동안 2차 가수분해하였을 때 4.30-5.22%의 가수분해가 일어났다. 효소별 가수분해물의 ACE 저해효과는 가수분해가 진행됨에 따라 IC<sub>50</sub>의 수치는 감소하였고 저해율을 증가하였다. 1차 가수분해시 8시간 가수분해한 가수분해물의 IC<sub>50</sub> 수치는 Protamex 처리군이 516 µg/mL로 가장 낮았고 Flavourzyme이 866 µg/mL로 가장 높았다. 1차 가수분해물을 Flavourzyme로 4시간 2차 가수분해를 하였을 때 1차 가수분해물 보다 IC<sub>50</sub> 수치가 감소되어 ACE저해 효과가 증가하였으며 Neutrase로 처리하였을 때 282 µg/mL로 가장 낮았고 Protease M이 570 µg/mL로 가장 효과가 적었다. 가장 효과가 좋은 Neutrase 2차 가수분해물을 소화효소인 pepsin, trypsin, α-chymotrypsin으로 가수분해 하였을 경우 IC<sub>50</sub> 수치는 597 µg/mL로 1차 가수분해물보다 저해효과가 유의적으로 감소되었다( $p < 0.05$ ). Neutrase 2차 가수분해물을 MW 10,000로 한외여과하였을 때 MW 10,000 미만 permeate의 IC<sub>50</sub> 수치는 273 µg/mL로 저해효과는 유의차가 없었으나, 10,000 이상의 retentate는 IC<sub>50</sub> 수치가 635 µg/mL로 유의적 수준에서 저해효과가 감소하였다( $p < 0.05$ ). 이에 효소의 종류와 가수분해 시간의 조합에 의한 ACE 저해활성을 측정하고 분리공정을 최적화하기 위한 추가 연구를 수행한다면 주요 유단백질인 카제인 유래 기능성 식품의 산업적 대량생산이 가능할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., and Itoh, T. (1998) Structure analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J. Dairy Sci.* **81**, 3131-3138.
- Adler-Nissen, J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 1256-1262.
- Ariyoshi, Y. (1993) Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Technol.* **4**, 139-144.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637-1648.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., and He, J. (2005) Global burden of hypertension: Analysis of worldwide data. *Lancet* **365**, 217-223.
- Kim, D. W., In, Y. M., Jeong, S. G., Ham, H. S., Kim, H. S., Choe, H. S., Ahn, C. N., Kim, Y. K., and Youn, S. K. (2002) Angiotensin-1 converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk protein. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* **20**, 9-17.
- Lee, J. H., Oh, S. J., Lim, K. S., Shin, J. G., Huh, C. S., and Baek, Y. J., (2002) Chromatographic pattern and functionalities of partially hydrolyzed milk proteins by commercial proteases. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* **20**, 110-115.
- Maruyama, S. and Suzuki, H. (1982) A peptide inhibitor of angiotensin converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agri. Biol. Chem.* **46**, 1393-1394.
- McSweeney, P. L. H., Olson, N. F., Fox, P. F., Healy, A., and Hojrup, P. (1993) Proteolytic specificity of bovine αs1-casein. *Food Biotechnol.* **7**, 143-158.
- Ministry of Health and Welfare (2008) KHANES IV 2<sup>nd</sup> year report. pp. 50.
- Oh, S. J., Kim, S. H., Kim, S. K., Baek, Y. J., and Cho, K. H., (1997) Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of the κ-casein fragments hydrolysed by chymosin, pepsin, and trypsin. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 1316-1318.
- Seki, E., Osajima, K., Matsufuji, H., Matsui T., and Osajima, T. (1996) Resistance to gastrointestinal proteases of the short chain peptide having reductive effect in blood pressure. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* **43**, 520-525.
- Shin, J. I. (1996) Characteristics and process optimization of anti-hypertensive peptides derived from soybean foods. Ph. D. thesis, Seoul Univ., Seoul, Korea.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Devos, L., and Verstraete, W. (2003) Release of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) inhibitory activity during *in vitro* gastrointestinal digestion: from batch experiment to semi continuous model, *J. Agric. Food. Chem.* **51**, 5680-5687.
- Yamamoto, N., Akino, A., and Takano, T. (1994) Anti-hypertensive effects of peptide derived from casein by extra cellular protease from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* **77**, 917-922.
- Yoon, J. H., Yoon, J. O., and Hong, K. W., (2003) Research Notes Fractionation of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Casein Hydrolysates by Proteases. *Food Eng. Progress.* **7**, 116-120.
- Yun, J. S., Jeong, B. H., Kim, N. Y., Seong, N. S., Lee, H. Y., Lee, J. H., and Kim, J. D. (2003) Screening of 94 Plant Species Showing ACE Inhibitory Activity. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **11**, 246-251.

(Received 2011.12.7/Revised 2012.7.6/Accepted 2012.9.13)