



Angiotensin- I Converting Enzyme(ACE) 저해효과를 갖는 Sodium Caseinate 가수분해물의 기능적 특성에 관한 연구: 총설

†이건봉¹ · †백승천¹ · 천정환² · 김현숙³ · 송광영^{2*} · †서건호²

¹서울우유협동조합 중앙연구소, ²건국대학교 수의과대학 및 KU 식품안전연구소

³건국대학교 수의과대학 수의생리학전공

Functional Properties of Sodium Caseinate Hydrolysates with Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity: A Review

†Keon-Bong Lee¹, †Seung-Chun Baick¹, Jung-Whan Chon², Hyun-Sook Kim³,
Kwang-Young Song^{2*} and †Kun-Ho Seo²

¹Research and Development Center, Seoul Dairy Cooperative, Ansan 425-839, Korea

²KU Center for Food Safety and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

³Dept. of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides have functional and potential properties of casein hydrolysates that are used in the development of food ingredients and anti-hypertensive hydrolysates derived from sodium caseinate enzymatic hydrolysates. Sodium caseinate could be treated by various kinds of commercial proteases, and then could be treated with the enzyme combination. Ultrafiltration treatment can be used to generate hydrolysates that can be used to determine ACE inhibitory activity. In general, hydrolysate quality can be evaluated by changes in hydrolysis characteristics, ACE inhibitory activity, as well as functional properties such as solubility, foam capacity, cytotoxicity, free radical-scavenging effects, and sensory evaluation. In this review, we present an overview of the ACE inhibitory peptides obtained by performing enzymatic hydrolysis on various sources to identify food ingredients and functional foods that reduce hypertension.

Keywords: Hypertension, angiotensin converting enzyme, sodium caseinate, hydrolysate

식품 중에는 종래의 영양기능 및 기호성 향상 이외에 생체대사조절 기능에 관여하는 여러 가지 물질이 존재한다. 단백질은 지방, 탄수화물과 함께 인간의 생명유지와 발육에 관여하며, 체내 대다수 호르몬 및 효소의 성분으로 반응을 촉진 또는 조절하는 기능에 의해 그 중요성이 인식되어 왔다(Matsuda *et al.*, 1992; Abubakar *et al.*, 1998; Lee *et*

al., 2012). 우유단백질은 다른 식품에 존재하는 단백질과 마찬가지로 소화과정 중에서 다양한 펩타이드를 분해된다. 이들 펩타이드는 맛과 아미노산을 공급하는 영양적 기능 이외에도 용해성, 유화성 등 식품으로서의 기능과 생리활성을 나타내는 생체조절기능을 가지고 있다(Yamamoto *et al.*, 1994a; Lee *et al.*, 2012). 유단백질 분해물에서 얻어진 생리활성 펩타이드는 우유 단백질로 존재 시에는 생리적 효과가 없는 상태로 있으나, 단백질분해효소 또는 미생물에 의해 분해가 되면 독특한 생리적 특성을 갖게 된다(McSweeney *et al.*, 1993). 현재까지 우유 단백질 유래 생리활성 펩타이

* These authors contributed equally to this study.

* Corresponding author: Kwang-Young Song, KU Center for Food Safety and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: +82-2-450-4121, Fax: +82-2-3436-4128, E-mail: drkysong@gmail.com

드는 opioid 펩타이드 (Zioudrou *et al.*, 1979), 칼슘 흡수 촉진 펩타이드(Kitts and Yuan, 1992), 혈압 강하 펩타이드(Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000), 면역 증강 펩타이드(Migliore-Samour *et al.*, 1989), growth factor(Azuma *et al.*, 1989), 혈소판 응집 저해 펩타이드(Meisel and Schlimme, 1990) 등이 있다.

한국에서도 식품으로부터 영양소 또는 비영양소 성분의 항암, 항노화, 또는 혈압 강하 등 다양한 생리활성을 나타내는 기능성 성분들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 고혈압, 동맥경화 등 성인병의 경우 대부분 식습관과 밀접한 관련이 있음을 고려할 때 일상적으로 섭취 가능한 식품 성분들 가운데 혈압 강하 효과를 나타내는 물질을 검색하는 것은 질병의 예방 차원에서 매우 의미가 있다 (Yoon *et al.*, 2003).

Angiotensin converting enzyme(ACE)는 angiotensin I의 C-말단 di-peptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin II로 전환시켜 혈압을 상승시킴과 동시에 생체 내에서 혈압강하 작용을 갖는 bradykinin을 분해한다. 따라서 이러한 ACE의 작용을 억제할 수 있다면 고혈압 치료가 가능한 것으로 보고되었다(Ariyoshi, 1993). 카제인 유래 ACE 저해 펩타이드는 trypsin 분해물의 펩타이드 분획으로부터 연구되었다(Maruyama and Suzuki, 1982). Yamamoto *et al.*(1994b)은 *L. helveticus*의 단백질 분해효소로 카제인을 가수분해하여 ACE 저해 펩타이드를 분리하였으며, Yoon 등(2003b)은 시약용 카제인을 소화효소인 pepsin, trypsin, α -chymotrypsin으로 분해하여 ACE 저해효과를 측정하였다. Oh 등(1997)은 또한 κ -casein의 pepsin, trypsin, chymosin 가수분해물에 대한 ACE 저해 효과를 탐색하였다. 한편, Kuwabara 등(1995)은 다양한 유산균과 *Saccharomyces cerevisiae*로 제조한 발효유의 혈압 강하 효과를 연구하였다. 그러나 발효유에서 분리된 펩타이드는 혈압 저하 효과가 있지만, 발효유 제조에 특정 균주를 사용하여야 하고, 장기간 배양하여야 한다는 문제가 있어 단기 배양을 주로 하는 기존의 발효유 제조에는 적용하기가 곤란하고, 유산균 이외에 효모를 사용하기 때문에 저장의 어려움과 ACE 저해 효과가 있는 펩타이드는 그 생성량이 매우 적어 이를 분리, 정제하여 식품에 첨가하여 실용화하기 어렵다는 문제가 있다(Kim *et al.*, 2002). 또한 시약용 카제인 또는 κ -casein을 소화효소로 분해한 가수분해물에서 ACE 저해 효과를 갖는 펩타이드를 분리하였지만 대량 생산할 경우 카제인을 용해 시 산 및 알칼리 처리를 하는 동안 산과 알칼리에서 단백질이 분해되어 다른 결과를 나타낼 수 있으며 κ -casein을 가수분해물로 사용하는 것은 그 가격이 비싸 산업화되기 어렵다고 알려져 있다. 따라서 본 논문에서는 성인병의 하나인 고혈압의 예방과 식사요법의 면에서 일상적으로 섭취하고 있는 우유의 성분

인 카제인염을 단백질가수분해 효소로 처리하여 효소의 종류와 가수분해 시간에 따른 특성을 조사하여, 고혈압을 유발하는 Angiotensin-I Converting Enzyme(ACE) 저해 효과를 갖는 Sodium caseinate 가수분해물의 기능적 특성에 관한 최근 연구를 검토하여 향후 연구방향을 모색하는 것이 필요하다. 따라서 본 총설 논문에서는 Angiotensin- I Converting Enzyme(ACE) 저해효과를 갖는 Sodium caseinate 가수분해물의 기능적 특성을 알아보고자 이미 발표된 다양한 문헌 등을 정리하여 서술하였다.

펩타이드(Peptides)

펩타이드란 주로 효소로 단백질을 분해할 때 만들어지는 저분자 물질로써 분자량은 3,000~5,000 이하까지 분해되는 것이 많다. 식품 단백질 유래 펩타이드는 구조 및 활성이 다양하고 단백질 분해효소에 의해 분해되며, 유전자 조작에 의하여 생산 및 개조가 가능하며, 활성부위 전후에 효소 절단 부위가 필요한 한편, 활성이 적을 수 있으나 안전성이 높은 특징이 있다(Seki *et al.*, 1996). 생리활성 펩타이드를 소재로 한 식품의 개발을 위해서는 목적에 따른 생리활성 펩타이드의 선택, 구조 및 작용기작의 해명, 펩타이드 생성 조건의 최적화, 섭취 후 효과 확인, 안정성의 확인 등 여러 단계의 고려 사항들이 있다(Lee *et al.*, 2002).

생체조절 기능을 갖는 유단백질 유래의 펩타이드는 Fig. 1와 같이 영양기능, 맛 이외에도 유화성 등에 관여할 뿐만 아니라, 생체 내에서 진통, 마취, 장관 등의 평활근의 수축, 식욕조절 등에 관여하는 opioid peptide(Meisel, 1998), 혈압 강하작용을 나타내는 angiotensin- I converting enzyme(ACE) inhibitor, 혈소판응집 저해 펩타이드 등이 있으며, 이러한 생리활성 펩타이드를 이용한 기능성 식품의 개발이 활발히 진행되고 있다(Fiat *et al.*, 1993).

특히 혈압강하작용을 나타내는 유단백질 유래 펩타이드는 Fig. 2에서 나타나는 바와 같이 1980년대 이후부터 일반

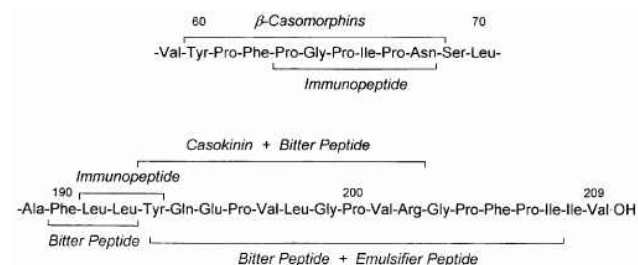


Fig. 1. Schematic representation of the multifunctional activities in milk protein-derived peptides; strategic zones in the primary structure of bovine β -casein (Meisel, 1998).

	Bioactive peptides	Protein precursor	Bioactivity
1950	Phosphopeptides	α - and β -Casein	Mineral carrier
1960			
1970	Casomorphins α -Casein exorphin	β -Casein α -Casein	Opioid agonist Opioid agonist
1980	Immunopeptides Casokinins Casoxins Lactorphins	α - and β -Casein α - and β -Casein κ -Casein α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin	Immunostimulatory ACE-inhibitory Opioid antagonist Opioid agonist
1990	Casoplatelins Lactoferricin Lactokinins	κ -Casein Lactoferrin α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin	Antithrombotic Antimicrobial ACE-inhibitory

Fig. 2. Chronological overview of identified bioactive peptides derived from milk proteins (Pihlanto-Leppälä, 2001).

카제인을 시작으로 꾸준히 연구되어 왔으며, 최근에는 유청단백질인 α -lactalbumin과 β -lactoglobulin에서 그 연구가 수행되고 있다(Pihlanto-Leppälä, 2001).

고혈압이란 세계보건기구(WTO)는 혈관벽에 미치는 혈압이 수축기 혈압이 140 mmHg, 확장기의 혈압이 90 mmHg 이상의 압력을 고혈압으로 정의하고 있다. 고혈압은 45세 이후의 성인인구의 20~30%가 가지고 있을 만큼 흔한 성인 질환으로 한국의 고혈압 환자 수는 당뇨병보다 3~4배 많은 750만 명에 달한다. 2003년 한국인의 사망원인은 Table 1과 같이 고혈압성 질환과 고혈압이 원인이 될 수 있는 뇌혈관 질환에 의해 10만 명 당 86.2명으로 암에 의한 사망자 수에 이어 두 번째로 많은 사망원인으로 보고되었다(KNSO, 2003).

Table 1. Causes and death number of Korean

Ranking	Causes of death	Death number*
1	Cancer	131.8
2	Cerebrovascular disease	75.5
3	Heart disease	35.6
4	Diabetes	25.0
5	Suicide	24.0
6	Liver disease	20.6
7	Traffic accident	19.1
8	Chronic pulmonary disease(asthma, bronchitis)	19.1
9	Hypertensive diseases	10.8
10	Falling accident	7.3

* Means the death number for 100,000 people (Korea National Statistical Office, 2003)

현대 성인병의 대표적인 질환인 고혈압은 정확한 원인이 규명되고 있지 않으나, 다음과 같은 기작에 의해 발병되는 것으로 추측되고 있다. 즉 교감신경계가 활성화되어 최근 급격히 늘어나고 있는 고혈압은 순환기계 질병의 원인인 동시에 뇌출혈, 심장병 및 신장병 등과 합병증으로 나타날 경우에는 치사율이 매우 높은 만성 퇴행성 질환으로 40대 이후의 중장년 및 노년층에서 발병률이 15~20%로 추정되고 있다(Kim *et al.*, 2002).

ACE 저해제로써 Pro 유도체인 captopril과, 이것의 구조를 기초로 한 enalapril 이외에 benazepril, lisinopril 등이 고혈압의 치료제로 사용되고 있다(Odenti *et al.*, 1977; Patchett *et al.*, 1980). 그러나 합성 ACE 저해제의 특징은 급격한 혈압 강하 효과를 유발하기 때문에 심박동수 증가 등의 부작용이 많고 고령자에게 투여하기 어려운 점이 있다. 뿐만 아니라 미각 이상, 가려움, 발진, 두통, 마른 기침 등의 부작용이 나타날 수 있고, 백혈구의 감소, 빈혈이나 단백뇨가 나타나기도 하며, 신기능 장애가 있는 환자에게는 신기능이 악화될 수 있는 우려가 있다(Yoo, 1990). 이러한 합성 ACE 저해제의 높은 역가에 비해 각종 부작용 때문에 안전성 측면에서 더 우수한 천연물질에 대한 검색과 개발에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다(Webster and Koch, 1996).

1. Angiotensin converting enzyme(ACE)

ACE는 peptidyl dipeptide carboxylhydrolase(CE;EC3.4.15.1)라고도 불리워지며 polypeptide 기질의 C-말단으로부터 dipeptide 잔기를 가수분해하는 효소이다(Unger *et al.*, 1980). ACE는 Zn를 가지고 있고 C-말단으로부터 peptide를 분해한다는 점에서 ACE의 효소-기질 반응기작은 carboxypeptidase A와 유사한 것으로 생각된다. Carboxypeptidase A의 활성부위는 기질의 amide 결합을 분극화시켜 분해가 쉽게 일어나도록 하는 Zn²⁺ 부위, C-말단의 방향족 아미노산에 대해 친화성이 높은 hydrophobic pocket 부위 및 C-말단의 음이온성 carboxy group과 결합하는 Arg⁺ 145부위로 구성되어 있다(Byers and Wolfenden, 1973). ACE는 carboxypeptidase A와 달리 C-말단의 방향족 아미노산에 대해 기질 특이성은 거의 보이지 않기 때문에 hydrophobic pocket 활성부위 대신에 수소결합을 통해 C-말단의 amide 결합과 반응할 수 있는 group을 가지고 있을 것으로 생각되고 있다(Odenti *et al.*, 1977). Cheung 등(1980)은 ACE 저해 효과가 있는 dipeptide는 C-말단에 Tyr, Phe 또는 Pro가 존재하며, ACE 저해효과는 Pro>Tyr>Phe 잔기 순서로 활성이 크며, dipeptide의 N-말단의 아미노산은 Val이나 Ile과 같은 가지가 있는 aliphatic 아미노산이 ACE 저해효과가 있다고 보고하였다. 한편, Suetsuna (1998)는 N 말단의 아미노산 중 Phe>Asn>Ser>Gly 잔기 순

서로 ACE 저해 효과가 크다고 하였다.

2. 혈압조절기구

혈압과 전해질 균형의 조절에는 Fig. 3에 나타난 rennin-angiotensin system과 kallikrein-kinin system이 매우 중요하다. 사람에게 존재하는 rennin은 초기에는 prorennin의 형태로 신장에서 분비되어 혈액 또는 조직에 존재하는 protease인 kallikrein에 의해 rennin으로 전환되어 간에서 생성 분비된 angiotensinogen을 angiotensin I으로 전환시킨다. Angiotensin I은 decapeptide로써 혈압 상승에 중요한 역할을 하는 angiotensin II의 전구체이며, 생리활성을 가지고 있지는 않지만 폐, 신장, 혈액 중에 존재하는 ACE의 작용에 의해 angiotensin II로 대부분 전환된다(Bakhle, 1968).

ACE에 의해 생성된 angiotensin II는 혈관을 수축하여 혈압을 상승시킨다. 한편, kallikrein은 bradykininogen을 bradykinin으로 전환시켜 혈관 확장에 의한 혈압 강하 작용을 한다(Pihlanto-Leppälä, 2001). ACE는 대부분 내피세포에 위치하며, angiotensin II의 전환은 일부 조직을 제외하고 대부분 혈액이 폐를 지날 때 일어난다. 이렇게 생성된 angiotensin II는 혈관 평활근에 작용해서 혈압을 상승시키는 강력한 혈관 수축작용을 갖는다. Angiotensin II는 혈관 평활근을 자극하여 소동맥의 수축과 이완기의 혈압을 norepinephrine보다 4~8배 이상 높으며, 부신피질을 자극하여 전해질의 조절에 관여하는 aldosterone의 분비를 증가시킨다. 그러나 angiotensin II도 angiotensinase에 의해서 oligopeptide까지 가수분해되어 활성이 없어진다(Peart, 1976).

3. 혈압 강하 활성물질

혈압 강하를 나타내는 생리활성 펩타이드 연구는 1960년대 말 *Botherops jararaca*라는 뱀독 중에 포함되어 있는

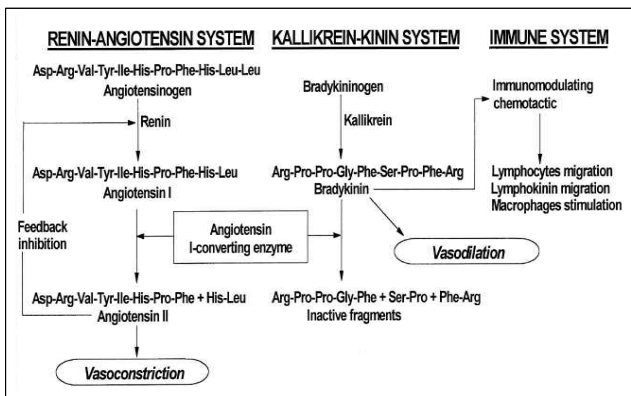


Fig. 3. The role of angiotensin I-converting enzyme in the rennin-angiotensin, kallikrein-kinin and immune system (Pihlanto-Leppälä, 2001).

AEC 저해 펩타이드로부터 시작되었다(Feria, 1965). ACE 활성 발현에 Zn^{2+} 이 필요하며, C-말단의 Pro 잔기가 ACE 저해에 중요하다는 사실 등을 감안하여 뱀독 유래 펩타이드를 모델로 하여 Pro 아미노산 succinyl 유도체를 합성하여 고혈압 치료제 실용화에 성공하였으며, 이것이 captopril이다(Odentii *et al.*, 1977; Apenten, 1998).

Captopril은 종래의 혈압강하제로는 치료되지 못하던 중증의 고혈압 증에도 좋은 효과를 보이고 있으며, 중추신경 또는 교감신경에 작용하는 종래의 혈압강하제에서 문제가 되는 여러 가지 부작용들이 발견되지 않았다. 그러나 단백뇨증(proteinuria)이나 무과립증(agranulocytosis) 등의 새로운 부작용이 문제점으로 대두되었으며, 이러한 부작용들은 captopril의 sulfhydryl기에 기인하는 것으로 추정되어 sulfhydryl기를 갖지 않는 enalapril이라는 새로운 ACE 저해 물질을 개발하였으며, captopril보다 ACE 저해력이 약 10배 크다고 보고하였다(Patchett *et al.*, 1980; Owusu-Apenten and Chee, 2004).

ACE의 작용을 저해함으로써 혈압 강하 활성을 갖는 물질로서는 크게 단백질 분해물 유래의 펩타이드와 폴리페놀과 같은 비단백질성 물질로 나눌 수 있다. 녹차 성분의 ACE 저해 작용을 조사한 결과, 차의 폴리페놀 성분인 catechin, epicatechin, gallic acid, gallocatechin, gallocatechin gallate, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, free theaflavin, theaflavin monogallate 및 theaflavin digallate가 ACE 저해 작용을 나타낸다고 하였다(Vermeirssen *et al.*, 1987; Rhee and Choi, 2001; Weber *et al.*, 2003). 또한 녹차의 열수 추출물을 쥐의 정맥에 투여 시 혈압의 지속적인 저하가 관찰되었으며, 자발성 고혈압 쥐에 녹차의 catechin을 경구투여하였을 때 15주령에서 비투여군의 혈압이 210 mmHg 이하로 혈압 강하 효과가 확인되었다(Hodgson *et al.*, 1999). Doh 등(1993)은 결명자, 들깨, 대추, 모과, 오미자, 생강 등 기호음료의 수용성 분획의 ACE 저해 활성을 조사하였으며, 생강, 오미자, 들깨, 결명자, 모과, 대추의 순으로 저해 작용이 높았다고 보고하였다.

4. 식품단백질 유래 ACE 저해 펩타이드

1) 유단백질

우유단백질로부터 ACE 저해 펩타이드의 제조는 크게 2가지 방법으로 접근할 수 있다. 첫째, 단백질 분해효소를 사용하는 방법으로 단백질 분해효소가 펩타이드 결합을 특이적 또는 비특이적으로 분해함으로써 ACE 저해 효과를 가진 펩타이드를 제조할 수 있다. 둘째, 발효유나 치즈 등 발효유 제품의 제조 시 발효과정 중 미생물이 생성하는 단

백질 분해효소에 의해 제조할 수 있다(Fox, 1989). 특히 첨가한 단백질을 분해효소와 미생물에 의한 효소에 의해 단백질을 분해를 가속화 하여 새로운 펩타이드를 제조하기도 한다(Law, 2001).

(1) 효소에 의한 ACE 저해 펩타이드

단백질을 펩타이드로 분해하는 방법으로 효소에 의한 가수분해가 가장 선호되고 있다. 산 또는 알칼리에 의한 가수분해는 이취 발생, 중화에 의한 염의 생성 등으로 맛의 변화와 탈색, 탈취 등의 정제 과정이 복잡하고 강한 조건에서 가수분해를 함으로써 영양분의 파괴가 일어나는 단점이 있으나, 효소에 의한 가수분해는 온화한 조건에서 진행되므로 영양성분의 파괴가 거의 일어나지 않는다(Sohn and Lee, 1988).

카제인으로부터 유래된 ACE 저해 펩타이드는 trypsin 가수 분해물에서 α_{s1} -casein 유래의 Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys의 펩타이드가 분리되었으며(Maruyama and Suzuki, 1982), 이 펩타이드를 Pro에 대한 특이적 endopeptidase (EC,3.4.21.26)로 처리하였을 때 활성이 강해진 Phe-Phe-Val-Ala-Pro이 생성되었다. 활성이 강한 펩타이드를 모체로 하여 Val-Ala-Pro, Phe-Val-Ala-Pro, Phe-Ala-Pro를 합성하였는

데, 이들 펩타이드의 ACE 저해 효과는 모체인 pentapeptide와 동일한 수준이었다고 보고된다(Maruyama *et al.*, 1987).

β -Casein에서도 Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg(IC₅₀=15 μ M)의 펩타이드가 분리되었다. 카제인을 특정효소로 처리하여 얻어진 가수분해물이 *in vitro* 에서 ACE 저해 작용을 나타냈으며, 자발성 고혈압 쥐에게 경구 투여했을 때 약 12%의 혈압강하 효과를 확인하였다(Maruyama *et al.*, 1985). 카제인으로부터 ACE 저해 펩타이드가 주로 분리되었으나, 최근에는 유청단백질 유래 ACE 저해 펩타이드가 보고되었으며, 이를 Table 2에 나타내었다.

Mullally(1997)는 α -lactalbumin, β -lactoglobulin의 trypsin 분해물에서 ACE 저해 효과를 보고하였다. 또한 α -lactalbumin의 trypsin 분해물인 Try-Gly-Leu(f50~52)가 ACE 저해활성을 나타내었고, β -lactoglobulin의 trypsin 분해물에서도 Leu-Ala-Met-Ala(f22~25), Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg(f32~40) 및 Val-Phe-Lys(f81~83)이 분리되었다(Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000).

(2) 미생물 발효에 의한 ACE 저해 펩타이드

유제품 발효에 일반적으로 사용되는 유산균으로 제조한

Table 2. Summary of casein derived peptides which are inhibitors of angiotensin converting enzyme

Sequence	Source	Treatment	IC ₅₀ *value(μ M)	Reference
FFVAPEPEVFGK	α_{s1} -casein	Trypsin	77	Maruyama <i>et al.</i> (1982)
FFVAP	α_{s1} -casein	Trypsin and peptidase	6	Maruyama <i>et al.</i> (1985)
AVPYPQR	β -casein	Trypsin	15	Maruyama <i>et al.</i> (1987)
TTMPLW	α_{s1} -casein	Trypsin and peptidase	16	
VAP	α_{s1} -casein	Synthesis	2	
FVAP	α_{s1} -casein	Synthesis	10	
AYFYPE	α_{s1} -casein	Proteinase	16	Yamamoto <i>et al.</i> (1994b)
SKVLPVPQ	β -casein	Proteinase		
VPP	β -casein	Fermentation	9	Nakamura <i>et al.</i> (1985)
IPP	β -casein	Fermentation	5	
YGL	α -lactalbumin	Pepsin then trypsin and chymotrypsin	409	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)
VGINYWLAHK	α -lactalbumin	Trypsin	327	
WLAHK	α -lactalbumin	Trypsin	77	
LAMA	β -lactoglobulin	Trypsin	1,062	
LDAQSAPLR	β -lactoglobulin	Trypsin	635	
ALPMHIR	β -lactoglobulin	Pepsin then trypsin and chymotrypsin	43	Mullally <i>et al.</i> (1997)
LAHKAL	α -lactalbumin	Pepsin then trypsin	621	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (1998)
GLDIQK	β -lactoglobulin		580	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (1998)
IPA	β -lactoglobulin	Proteinase K	141	Abubakar <i>et al.</i> (1998)

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

발효유의 ACE 저해활성을 조사한 결과, *L. helveticus*를 균주로 제조한 발효유만이 혈압 강하 효과가 있었고, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 및 *L. lactis* subsp. *cremoris*는 효과가 없었다(Yamamoto *et al.*, 1994a). Kuwabara 등(1995)은 유산균인 *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *diactylactis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Leuconostoc cremoris*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*와 *Saccaromyces cerevisiae*로 Kefir를 제조하여 자발성 고혈압 쥐에게 급여하여 혈압 강하 효과를 확인하였다. Yamamoto 등(1994b)은 *L. helveticus* 유래 단백질 분해효소로 α_{s1} -casein과 β -casein을 가수분해한 가수분해물로부터 ACE 저해 펩타이드를 얻었고, 이들 펩타이드를 자발성 고혈압 쥐에 경구 투여한 결과, 혈압 강하 활성을 확인하였다. *L. helveticus*와 *Saccaromyces cerevisiae*를 스타터로 한 Calpis sour milk의 발효과정 중에 ACE 저해활성이 증가하였으며, 2종류의 ACE 저해 펩타이드로 Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro가 분리되었다. 또한 숙성된 치즈에서도 혈압 강하 펩타이드가 보고되었는데, Gouda cheese 추출물 중 저분자 펩타이드에서 ACE 저해활성이 보고되었다(Meisel *et al.*, 1997).

2) 어류단백질의 ACE 저해 펩타이드

Kohama 등(1988)은 참치 근육의 acid 추출물을 고압멸균한 후, 몇 단계의 chromatography를 통하여 Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-gly-Asp 펩타이드를 분리하였다. 척추동물의 근육 중의 glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)에 이 펩타이드와 아주 유사한 부위가 있음이 밝혀졌고, 돼지 유래의 ACE 저해 펩타이드인 Pro-Ala-Asn-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp도 돼지 근육의 GAPDH의 79~86잔기와 동일한 것으로 밝혀졌다(Hazato and Kase, 1986). 이러한 사실들은 Pro-Thr-his-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp가 참치의 고압 살균 과정 중 산 분해에 의해서 생성되었을 가능성을 나타낸다. 한편, 이 펩타이드는 토끼 허파의 ACE에 대하여 비경쟁적으로 저해 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(Kohama, 1989). 가다랭이의 몇 가지 효소분해물 중 thermotrypsin 효소분해물의 ACE 저해 활성이 상대적으로 높았으며, 이로부터 Ile-Lys-Pro-Leu-Asn-Tyr이 분리되었고, 이것을 효소분해하여 활성이 높은 Ile-Lys-Pro를 분리하여, ACE 저해활성이 있는 펩타이드를 더 작은 분자량의 펩타이드로 효소분해할 경우, 일반적으로 분해 전보다 높은 ACE 활성을 갖는다고 보고하였다(Seki *et al.*, 1996). Matsuda 등(1992)은 정어리의 pepsin 효소분해물로부터 Leu-Lys-Leu 등 5종의 ACE 저해 펩타이드를

분리하였다. 글 단백질은 *Aspergillus oryzae* 유래 denazyme AP로 효소분해하였을 때 Leu-Phe의 ACE 저해 펩타이드가 동정되기도 했다(Matsumoto *et al.*, 1994).

3) 식물단백질의 ACE 저해 펩타이드

무화과 유액으로부터 Ala-Val-Asp-Pro-Ile-Arg 등 3종의 ACE 저해 펩타이드가 보고되었다. 그러나 이들이 자연적으로 존재하던 펩타이드 인지 전처리 과정 중 열처리에 의해 생성되었는지는 분명치 않다(Maruyama *et al.*, 1989). Choi 등(2000)은 김(*Porphyra yezoensis*)을 염산으로 가수분해하여 ACE 저해물질을 분리하였다. 분리된 저해물질은 분자량이 3,000 Da 미만의 저분자 물질이며, Gly, Arg, Pro 조성의 5개 아미노산으로 구성된 펩타이드라고 추정하였다.

α -Zein의 thermolysin 효소분해물로부터 Leu-Arg-Pro 등 3종의 ACE 저해 펩타이드가 보고되었으며, 이들의 합성 펩타이드를 자발성 고혈압 쥐에 정맥 주사 시 혈압 강하 활성을 확인할 수 있었다(Miyoshi *et al.*, 1991). Suetsuna(1998)는 마늘의 한 종류인 *Allium sativum* L.로부터 Ser-Tyr, Gly-Tyr, Phe-Tyr, Asn-Tyr, Ser-Phe, Gly-Phe, Asn-Phe의 펩타이드를 분리한 후 ACE 저해 효과가 높은 dipeptide는 Phe-Tyr 이라고 보고하였다. Oh 등(2003)은 옥수수 글루텐을 Flavourzyme, Pescalase, Thermolysine으로 가수분해 후 UF를 사용하여 분리하여 IC₅₀이 1.3~7.6 mg/mL의 분획을 얻었으며, 이를 다시 ODS column chromatography, gel filtration chromatography, reverse phase chromatography 등을 순차적으로 사용하여 LPF(IC₅₀=40 μ M), GPP(IC₅₀=17.6 μ M), PNPY(IC₅₀=30.7 μ M), SPPPFYL(IC₅₀=63 μ M) 및 SQPP(IC₅₀=17.2 μ M)의 펩타이드를 정제하였다.

5. 효소분해에 의한 ACE 저해 펩타이드의 생성

Yeum 등(1993)은 탈지대두박, 계란 알부민 및 카제인의 효소 분해물의 ACE 저해활성을 측정하였다. 효소분해에 따른 ACE 저해능은 효소분해 8시간까지는 급격히 증가하였으나, 그 후 완만히 증가하였다. 특히 복합효소, bromelain 및 pepsin 등에 의해 우수하게 나타났다. 그러나 trypsin 및 α -chymotrypsin에 의한 계란 알부민 및 카제인의 효소 분해시는 8시간 이후에 오히려 감소하는 경향을 나타냈다고 보고하였다.

6. ACE 저해 펩타이드의 분리 및 정제

ACE 저해 펩타이드의 경우, 분리 및 정제방법은 일반적인 펩타이드의 정제방법과 동일하나, 그 원료에 따라 전처리 방법에서 약간의 차이를 보인다. 또한 기존의 보고된 펩타이드들의 일반적인 극성 정도나 ionic strength 정도를 고

려하여 펩타이드의 분리, 정제조건을 수행하는 실험들이 진행되었다. 식품단백질 유래의 ACE 저해 펩타이드를 최초로 보고한 Oshima 등(1979)은 펩타이드의 ionic strength를 감안하여 Amberlite CG-50 약 양이온 칼럼을 사용하여 0.01 N sodium acetate buffer로 등전점 pH 4.5에서 용출시켰다. 용출액은 Sephadex G-25컬럼을 사용한 gel permeation chromatography(GPC)를 통하여 ACE 저해 활성 부위만을 분자량에 따라 분획하고, 이를 다시 Dowex 50-X2 컬럼을 사용하여 양이온 교환컬럼을 수행하였다. 이를 다시 GPC를 통하여 활성부위만을 분획하고, paper liquid chromatography를 통하여 단일물질로 정제하였다. Hazato과 Kase(1986)는 자연상태로 존재하는 ACE 저해 펩타이드를 처음으로 돼지 혈장으로부터 다음과 같이 분리하였다. 돼지의 혈액을 원심분리하여 혈장을 모으고, 다시 Amberlite XAD-4 컬럼에 흡착시킨 후 충분한 양의 0.01N HCl, 10% MeOH로 순차적으로 세척한 후, 80% MeOH로 용출시켜 상대적으로 비극성인 펩타이드만을 농축시켰다. 이것을 다시 Dowex 50W-X8 약 양이온 교환컬럼과 0.05M pyridine acetate buffer(pH 2.7 to 4.7)를 사용하여 pH gradient에 따라 용출되는 펩타이드를 분취하여, ACE 저해 활성부분 만을 모은 후 한 번 더 약 양이온 칼럼으로 정제하였다. 이를 GPC에 의해 분자량별로 분취하고 그 중 활성 분획을 HPLC를 사용하여 정제하였다. 사용한 칼럼은 ODS column인 μ -Bondapak C-18을 사용하였으며, 10% acetonitril을 isocratic하게 흘려 극성 정도에 따라 분리한 후, 활성 peak만을 HPLC로 재 분리하여 단일물질로 정제하였다.

7. 한외여과에 의한 ACE inhibitor의 분리

생리활성 펩타이드를 생산하는 방법은 일반적으로 분해, 정제, 건조로 완성된다. 간단하게는 단백질 분해효소로 단백질을 처리한 후, 분해 정도가 요구되는 수준에 도달하면 처리를 중단하고 제품을 직접 분무 건조할 수 있다. 이 경우, 미분해 산물과 유리 아미노산 등 전체 크기의 펩타이드가 최종 제품에 함께 존재하게 된다. 그러므로 분해물을 분해한 후 펩타이드를 미리 설정한 크기의 것으로 분리하는 경우가 대부분이다. 이러한 분리는 한외여과 처리 같은 초여과기술에 의한 것인데, 미리 설정한 크기 이상 또는 이하의 분자를 제거하며, 여과하여 최적의 활성을 갖는 펩타이드를 얻는다(Lee *et al.*, 2013). 막분리기술이 식품에 사용된 것은 1964년 미국 농무성 서부 연구소에서 역삼투압을 이용한 과즙 농축이 처음이었다(Madison, 1977). 식품산업 환경관련 산업, 정수산업 등에 널리 이용되고 있는 막의 대부분은 artificial membrane으로서 다양한 합성 고분자물질을 재료로 하고 있다(Gutman, 1987). 막분리 기술이 비교적 빠

르게 식품에 적용된 것은 다음과 같은 몇 가지 이유가 중요하게 작용되었다. 첫째, 기존의 여과법에 비해 단시간에 대량의 식품을 처리할 수 있어 작업의 난이도와 노동력을 경감하여 비용을 절감할 수 있다는 점이다. 둘째, 식품 중에는 비타민, 당, 단백질 등 열에 변성되거나 활성을 잃기 쉬운 영양성분과 향 등 휘발성 성분 등이 많이 있다(Lee, 2005). 막기술은 비가열처리로서 고품질의 식품처리가 가능한 장점이 있다. 셋째, 식품의 안전성 측면이다. 이물질이나 미생물오염 문제에 대해 안전성이 높은 기술이라는 것이 큰 장점이다. 이외에도 활성탄과 같은 여과제를 사용할 때와 비교하여 환경문제를 일으키지 않는다는 장점이 있다. 기능과 역할에 있어서 가장 중요한 1차적 기능은 막의 선택적 투과성에 있다. 한외여과에 의해 분리되는 분자량의 범위는 1,000~1,000,000 Da이며, 막에 적용되는 transmembrane pressure는 역삼투압에 비하여 상대적으로 낮은 압력인 1,000 kPa이 적용된다(Lee 2005; Lee *et al.*, 2013).

Maruyama 등(1989)은 식물단백질 유래의 펩타이드를 다음과 같이 분리하였다. 무화과 나무의 유액을 100°C에서 15분간 열처리한 후 여과하여 상등액을 다시 PM-10 UF 막을 사용하여 MW 10,000 이상의 고분자 물질을 제거한 투과액을 농축하였다. 이러한 방법은 ACE 저해 물질이 MW 2,000 미만의 저분자 물질임을 고려한 것이다. 이것을 GPC 등으로 활성부위 만을 분취한 후, preparative HPLC(pre-HPLC, TM prep-10 ODS column, 3.5 to 67% MeCN)로 극성 정도에 따라 분리하였다. 이 중 활성부위 peak를 HPLC로 재분리하여 단일물질로 정제하였다. Jung과 Song(2001)은 *Cucurbita moschata* Duch를 95°C에서 2시간 가열한 열수 추출물을 PM-10과 YM-1 UF 막을 사용하여 분리한 후, Shephadex G-15 컬럼과 HPLC μ -Bondapak C-18를 사용하여 정제한 후, 최종적으로 mass spectrophotometer을 사용 ACE 저해효과가 있는 물질이 MW 222와 273을 갖는 혼합물임을 보고하였다.

요 약

최근 성인병 중에서 가장 높은 빈도로 발병하는 것이 고혈압인데, 이 고혈압의 예방하기 위해서 가장 손쉽게 일상적으로 섭취할 수 있는 것이 바로 우유의 성분인 카제인염이다. 일반적으로 우유 펩타이드는 혈압조절자인 ACE를 방해함으로써 혈압을 줄여주는 항고혈압 효과와 관련이 있으며, 또한 혈액의 혈소판 응집을 저해해 심근경색이나 뇌경색의 원인인 혈전을 방지한다라고 알려져 있다. 따라서 이러한 기능을 가지고 있는 우유의 카제인염을 다양한 단백질가수분해 효소로 처리하여 가수분해 시간에 따른 특성 그리고 ACE 저해효과가 높은 가수분해물을 제조하기 위해서

대표적인 막여과 방법인 한외여과법이 이용되고 있는 것을 살펴보았다. 향후 가수분해물들의 (1) 항산화 효과, 세포독성 및 용해성, 기포성 등이 더 향상될 수 있도록 효소선발과 효소처리에 대한 폭 넓은 조사와 연구, (2) 고품질 대량 생산법 확립, 그리고 (3) 건강기능성식품으로의 산업화 이용이 가능하도록 지속적인 기초 연구가 신속히 진행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 수출전략기술개발사업 (no. 313010-3)에 의해 이루어졌습니다. 또한 한국연구재단 일반연구자지원사업 (2012R1A13A-2012009237)의 연구비 지원을 받았습니다.

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.
- Apenten, R. K. O. 1998. Protein stability function relations: β -lactoglobulin-A sulfhydryl group reactivity and its relation to protein unfolding stability. *Intl. J. Biological Macromolecules* 23:19-25.
- Ariyoshi, Y. 1993. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends in Food Science & Technology* 4:139-144.
- Azuma, N., Nagaune, S. I., Ishino, Y., Mori, H., Kamigogawa, S. and Yamauchi, K. 1989. DNA-synthesis stimulating peptides from human β -casein. *Agric. Biol. Chem.* 53(10): 2631-2634.
- Bakhle, Y. S. 1968. Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung. *Nature* 220:919-920.
- Byers, L. D. and Wolfenden, R. 1973. Binding of the byproduct anology benzylsuccinic acid by carboxypeptidase A. *Biochemistry* 12:2070-2078.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Odentti, M. A., Sabo, E. F. and Cushman, D. W. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 255:401-407.
- Choi, S. J., Jun, W. J., Yu, K. W., Shin, D. H., Hong, B. H., Cho, H. Y. and Yang, H. C. 2000. Purification and characterization of antiangiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Prophyra yezoensis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29:719-725.
- Doh, J. R., Kim, S. B., Park, Y. H. and Kim, D. S. 1993. Angiotensin- I converting enzyme inhibitory activity by the component of traditional tea materials Korean J. Food Sci. Technol. 25:456-460.
- Feria, S. H. 1965. A bradykinin potentiating factor (BPF) present in venom of *Borthtops jararaca*. *Brit. J. Pharmacol.* 24:163-165.
- Fiat, A. M., Migliore-Samour, D., Jolles, P., Drouet, L., Sollier, C. B. D. and Cean, J. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.* 76:301-310.
- Fox, P. F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72:1379-1400.
- Gutman, R. G. 1987. Membrane filtration: The technology of pressure-driven crossflow processes. Adam Hilger. England.
- Hazato, T. and Kase, R. 1986. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from porcine plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139:52-55.
- Hodgson, J. M., Puddey, I. B., Burke, V., Beilin, L. J., Jordan, N. 1999. Effects on blood pressure of drinking green and black tea. *J. Hypertens.* 17:457-463.
- Jung, H. Y. and Song, B. S. 2001. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitors from ripe *Cucurbita moschata* Duch. *J. Food Sci.* 6:244.
- 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-I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk protein *J. Korean Dairy Technol. Sci.* 20:9-17.
- Kitts, D. D. and Yuan, Y. V. 1992. Caseinophosphates calcium bioavailability. *Trends in Food & Technology* 3:31-35.
- Kohama, Y., Oka, H., Matsumono, S., Nalagawa, T., Miyamoto, T., Mimura, T., Nagase, Y., Satake, M., Takane, T. and Fujita, T. 1989. Biological properties of angiotensin converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. *J. Pharmacobio. Dyn.* 12:566-571.
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M. and Mimura, T. 1988. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun. 155:332-337.
21. Korea National Statistical Office (KNSO), 2003. The cause of death and mortality of Korean. Available: <http://kostat.go.kr/attach/journal/10-2-2.pdf>
 22. Kuwabara, Y., Nagai, S., Yoshimitsu, N., Nakagawa, I., Watanabe, Y. and Tamai, Y. 1995. Antihypertensive effect of the milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast. *J. Fermentation and Bioengineering* 80:294-295.
 23. Law, B. A. 2001. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *Int. Dairy J.* 11:383-398.
 24. 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.
 25. Lee, K. B., Shin, Y. K. and Baick, S. C. 2012. Effect of sodium caseinate hydrolysates on angiotensin-I converting enzyme inhibition activity. *Korean J. Food Sci. An.* 32:652-658.
 26. Lee, S. H., Song, K. Y., Seo, K. H. and Yoon, Y. C. 2013. Production of Mozzarella cheese analogue by ultrafiltration. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* 31:21-33.
 27. Madison, R. F. 1977. *Hyperfiltration and ultrafiltration in plate and frame system.* Elsevier Scientific. New York.
 28. 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.
 29. 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. *Agri. Biol. Chem.* 51:1581-1586.
 30. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N., and Suzuki, H. 1985. Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from casein II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agri. Biol. Chem.* 49:1405-1409.
 31. Maruyama, S., Miyoshi, S., and Tanaka, H. 1989. Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agri. Biol. Chem.* 53:2763-2767.
 32. Matsuda, H., Ishizaki, T., Moritani, H., Nagaoka, T., Osajima, K. and Osajima, N. 1992. Digestion of peptides from sardine muscle that inhibit angiotensin-I converting enzyme by intestinal enzyme of pigs. *Nippon Nogeigaku Kaishi.* 66:1645-1647.
 33. Matsumoto, K., Ogikubo, A., Yoshino, T., Matsui, T. and Osajima, Y. 1994. Separation and purification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in peptic hydrolysate of oyster. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 41:589.
 34. McSweeney, P. L. H., Olson, N. F., Fox, P. F., Healy, A. and Hojrup, P. 1993. Proteolytic specificity of bovine α S1-casein. *Food Biotechnology* 7:143-158.
 35. Meisel, H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy Journal* 8:363-373.
 36. Meisel, H. and Schlimme, E. 1990. Milk proteins: Precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Sci. and Tech.* 1:41-43.
 37. Meisel, H., Goepfert, A. and Günther, S. 1997. ACE inhibitory activities in milk product. *Milchwissenschaft.* 52:307-311.
 38. Migliore-Samour, D., Floc'h, F. and Jollès, P. 1989. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J. Dairy Research* 56:357-362.
 39. Miyoshi, S., Kaneko, T., Ishizawa, Y., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. 1991. Hypertensive activity of enzymatic α -zein hydrolysates. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1407-1408.
 40. Mullally, M. M., Meisel, H. and FitzGerald, R. J. 1997. Identification of novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide corresponding to tryptic fragment of bovine β -lactoglobuline. *FEBS Letter* 402:99-101.
 41. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. and Takano, T. 1985. Purification and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* 78:777-783.
 42. Odentti, M., Rubin, A. B. and Cushman, D. W. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: New class orally active antihypertensive agents. *Science* 196:441-444.
 43. Oh, K. S., Lee, D. G., Hong, J. U. and Sung, H. C. 2003. Peptide inhibitors for angiotensin I converting enzyme from corn gluten digests. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31:51-56.
 44. 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.
45. Oshima, G., Shimabukuro, H. and Nagasawa, K. 1979. Peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme in digests of gelatin by bacteria collagenase. Biochem. Biophys. Acta. 556:128-137.
46. Owusu-Apenten, R. and Chee, C. 2004. Sulfhydryl group activation for β -lactoglobulin measured using κ -casein 2-thio, 5-nitrobenzoic acid. Int. Dairy J. 14:195-200.
47. Patchett, A., Harris, E., Tristram, E. W., Wyvratt, M. J., Wu, M. T., Taub, E., Peterson, E. R. and Ikeler, T. J. 1980. A new class of angiotensin converting enzyme inhibitor. Nature 288:280-283.
48. Peart, W. S. 1976. The renin-angiotensin system: peptide hormones. The Macmillan Press Ltd pp. 179-194.
49. Pihlanto-Leppälä, A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. Trends in Food Science & Technology 11:347-356.
50. Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. and Korhonen, H. 2000. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. J. Dairy Research 67:53-64.
51. Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. and Korhonen, H. 1998. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. Int. Dairy J. 8:325-331.
52. Rhee, S. J. and Choi, J. H. 2001. Effects of green tea catechin on the superoxide dismutase, glutathione peroxidase and xanthine oxidase activities of kidney in diabetic rats. Kor. Nutr. Soc. 34:734-740.
53. 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.
54. Sohn, K. H. and Lee, H. J. 1988. Bitter peptide derived from α - and β -casein digested with alkaline protease from *Bacillus subtilis*, Korean J. Food Sci. Texhnol. 20:659.
55. Suetsuna, K. 1998. Isolation and characterization of Angiotensin I converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (gallic). J. Nutr. Biochem. 9:415.
56. Unger, T., Schüll, B., Speck, G. and Ganten, D. 1980. Peptidyl-dipeptid carboxyhydrolase (converting enzyme) inhibitor: Pharmacology and mechanism of action. Enzyme Inhibitors. Verlag. Chemie. pp. 223-241.
57. 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.
58. Weber, J. M., Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L. and Sircar, S. 2003. Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. Antiviral Research. 58:167-173.
59. Webster, J. and Koch, H. F. 1996. Aspects of tolerability of centrally acting antihypertensive drugs. J. Cardiovascular Pharmacology 27(Suppl.3):S49-S54.
60. Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. 1994a. Anti-hypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. Biosci. Biotech. Biochem. 57(4):776-778.
61. Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. 1994b. Anti-hypertensive effects of peptide derived from casein by extra cellular protease from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Dairy Sci. 77:917-922.
62. Yeum, D. M., Roh, S. B., Lee, T. G., Kim, S. B. and Park, Y. H. 1993. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolyzates of food protein. J. Korean Soc. Food Nutr. 22:226-232.
63. Yoo, E. H. 1990. The complications of hypertention. Medicine Report 2:74-79.
64. 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.
65. Zioudrou, C., Streaty, R. A. and Klee, W. A. 1979. Opioid peptide derived from food protein. J. Biochemical Biochemistry 254:2446-2449.

(Received: 24 January 2014 / Accepted: 15 April 2014)