

멸치육 효소 가수분해물의 Angiotensin 전환효소 저해작용

이태기 · 박영범 · 박덕천 · 염동민* · 김인수** · 구연숙 · 박영호 · 김선봉
부경대학교 식품공학과*, 양산대학 식품가공과**, 경상대학교 식품과학과 · 해양산업연구소

Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity in Enzymatic Hydrolysates of Anchovy Muscle Protein

Tae-Gee LEE, Yeung-Beom PARK, Douck-Choun PARK, Dong-Min YEUM*, In-Soo KIM**
Yeun-Suk GU, Yeung-Ho PARK and Seon-Bong KIM

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Food Science and Technology, Yangsan College, Yangsan 626-040, Korea

**Department of Food Science/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

To develop functional food material with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides, muscle protein of anchovy, *Engraulis japonica* was hydrolyzed during 48 hrs by digestive proteases such as pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, and commercial proteases such as papain, bromelain, complex enzyme, Flavourzyme, Novozym, Neutrase, Protamex and Alcalase. The only 50% ethanol soluble hydrolysates were tested for inhibitory activity against ACE and yield of 50% ethanol soluble peptide-nitrogen (ESP_{N50}). ACE inhibition effects and yield of ESP_{N50} occurred as hydrolysis time increased to 8 hrs. Among those proteases tested, hydrolysates by Alcalase and α -chymotrypsin had greater ACE inhibitory activity (80 and 74%, respectively) with elevated levels of ESP_{N50} (48 and 58 mg/ml, respectively), while Protamex hydrolysates had greater ACE inhibitory activities (73%) with reduced levels of ESP_{N50} (7.2 mg/ml) than others. Amino acid compositions of 50% ethanol solubles obtained from those hydrolysates were rich in glutamic acid, aspartic acid, cysteine and leucine.

Key words: angiotensin converting enzyme (ACE), anchovy, *Engraulis japonica*, amino acid composition, enzymatic hydrolysate

서 론

식품 중에는 면역계, 신경계 및 내분비계 등의 생체조절 기능을 가진 물질이 존재하는데, 이를 검색 및 분리하는 것은 식품이 갖는 기능 특성의 해석 및 생체내에서 이들 물질의 거동 해석 등에 있어서 중요한 과제라 할 수 있다. 현대 성인병의 대표적인 질환인 고혈압증의 대부분을 차지하고 있는 본태성 고혈압증은 정상적인 혈압을 유지하는 조절기구들이 천천히 붕괴되어 진행되는 질병이다 (Frohlich, 1982). 이러한 본태성 고혈압의 원인 중에서 renin · angiotensin계가 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다 (Saxena, 1992). 즉, angiotensinogen이 renin의 분해를 받아서 angiotensin I을 생성하는데, 이는 angiotensin 전환효소 (angiotensin converting enzyme, ACE ; peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3.4.15.1)에 의하여 C 말단의 dipeptide가 절단되어 강력한 혈관수축작용을 하는 angiotensin II를 생성한다. 또한 ACE는 혈관이완작용을 가진 bradykinin을 분해하여 불활성화시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다 (Ondetti and Cushman, 1982 ; Sealey and Laragh,

1990 ; Waeber et al., 1990 ; Ohkubo, 1991).

이와 같이 혈압의 상승에는 ACE가 크게 관여하므로 혈압의 강하에는 ACE의 저해가 필수적이라 하겠다. 이와 관련하여 1970년대초 ACE 저해작용을 갖는 peptide인 tetrotide가 브라질과 일본산 독사 (*Bothrops jararaca* 와 *Agkistrodon halys blomhoffii*)의 독액으로부터 분리되었다 (Ferreira et al., 1970 ; Ondetti et al., 1971 ; Kato and Suzuki, 1971). 이 tetrotide는 고 (高) renin증 고혈압 환자에서 뿐만 아니라 정상인에서도 현저한 혈압강하작용을 갖는 것으로 밝혀짐으로써 ACE 저해제들의 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시되었으며, 1988년 미국 고혈압 합동위원회에서는 ACE 저해제를 고혈압 치료제로서 공인하게 됨으로써 고혈압 예방 및 치료에 있어서 ACE 저해제의 중요성이 부각되게 되었다 (Nishikawa, 1993).

한편, 식품성분 중에서 ACE 저해효과를 나타내는 성분으로는 여러 가지 식품단백질의 효소 가수분해물로부터 얻어진 peptide류를 중심으로 주로 연구되고 있다. 즉, casein (Maruyama and Suzuki, 1982 ; Maruyama et al., 1985), gelatin (Oshima et al., 1979), 정어리육 (Ukeda

et al., 1991, 1992 ; Matsuda et al., 1992a, 1992b ; Matsui et al., 1993 ; Matsufuji et al., 1994), 가다랑어육 (Kohama et al., 1991 ; Astawan et al., 1995)과 내장 (Matsumura et al., 1993a, 1993b ; Fujii et al., 1993), 오징어육 (Suh et al., 1997) 등의 가수분해물이 ACE 저해작용을 나타낸다고 보고되고 있다.

우리나라의 경우에는 영양원으로서 수산물 단백질에 의한 의존도가 높음에도 불구하고 이들의 생리활성 특히, 고혈압의 억제와 관련이 있는 혈압강하소재의 개발에 관한 연구 및 그 이용에 관한 기술 기반이 확립되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 수산식품으로부터 ACE 저해 peptide의 특성을 해석하기 위하여 전통 수산발효식품 및 자연식품으로도 널리 이용되고 있는 멸치육을 소화효소와 식품공업용 단백질분해효소로 가수분해하여 이들 가수분해물의 ACE 저해작용에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 멸치 (*Engraulis japonica*: 체장, 11~16 cm ; 체중, 8~24 g ; 산지, 한국 동해안)는 선도 양호한 것을 구입하여 단백질 가수분해물제조용 시료로 사용하였으며, 이 때 시료 멸치의 일반성분은 수분이 69.0%, 조지방 8.7%, 단백질 17.5% 및 회분이 3.4%이었다.

Angiotensin 전환효소 (ACE)는 토끼의 허파로부터 얻은 아세톤 침전분말 (Sigma Co.) 1g에 붕산 완충액 (pH 8.3, containing 400 mM NaCl) 10 ml를 가하여 5°C에서 24시간 교반한 후 원심분리 (10,000 rpm, 30분)하여 얻은 상층액을 조효소액으로 하였으며, 기질로는 hippuryl-histidyl-leucine (Sigma Co.)을 사용하였다.

단백질 가수분해효소인 pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, papain 및 bromelain 등은 Sigma사 제품, 복합효소는 태평양화학 제품, Novozym 89, Neutrase, Protamex, Flavourzyme 및 Alcalase 0.6L 등은 Novo Nordisk사 (Denmark)의 제품을 구입하여 사용하였다. 그리고 이 외의 실험에 사용한 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

2. 실험방법

멸치육의 효소 가수분해

멸치육을 세절 마쇄하고 여기에 5배량의 chloroform/methanol (3:2, v/v) 혼합액을 가하여 어두운 곳에서 24시간 방치시킨 후, 흡인 여과한 다음 잔사를 진공동결건조하여 마쇄하고 200 mesh 체로 거른 분말을 탈지 멸치육으로 하였다. 여기에 각종 소화효소 및 식품공업용 단백질분해효소를 2% (w/w)의 농도로 첨가하여 각 효소의 최적 활성 조건으로 10배량의 완충용액을 가하여 가수분해하였다. 즉, pepsin은 hydrochloric acid 완충액 (pH 2.0)을 가하여 37°C에서, trypsin과 α -chymotrypsin은 인산완충액 (pH 7.6, pH 7.8)을, papain은 구연산완충액 (pH 6.2)을 가하여 25°C에서, bromelain은 구연산완충액 (pH 4.5)을 가하여 45°C에서, 복합효소는 인산완충액 (pH 7.0), Novozym 89는 구연산완충액 (pH 5.0), Neutrase 0.5L과 Protamex 및 Flavourzyme은 구연산완충액 (pH 6.0)을 가하여 50°C에서, Alcalase 0.6L은 인산완충액 (pH 7.0)을 가하여 60°C에서 각각 가수분해를 실시하였다. 가수분해후 배양용액 중에서 5 ml를 취하고 효소를 실험시키기 위하여 95°C 탕욕 중에서 5분간 방치한 다음 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액에 최종농도가 50%가 되게 냉 ethanol을 가하여 -40°C에서 24시간 방치한 다음 10,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 후, 그 상층액을 40°C에서 감압농축하였다. 이것을 멸치육 단백질 효소가수분해 용액으로 하였다.

Peptide-nitrogen의 정량

탈지 멸치육의 가수분해시간에 따른 시료단백질 mg당 peptide-nitrogen의 생성량의 변화는 Umemoto (1966)의 개량 biuret법에 의하여 측정하였다.

Angiotensin 전환효소 (ACE)의 활성 측정

ACE의 활성은 Cushman and Cheung (1971)의 방법을 개량한 Yamamoto et al. (1980)의 방법에 준하여 측정하였다.

아미노산의 분석

아미노산의 분석은 시료 1 ml (단백질 함량, 15 mg)를 ampule에 넣고, 진한 염산 1 ml를 가하여 질소가스로 치환한 뒤 봉한 다음 110°C의 dry bath에서 24시간 가수분해하였다. 분해액을 glass filter로 여과하고 감압건고하여 염산을 완전히 제거한 다음 증류수 10 ml를 가하여 다시 감압건고한 후, 구연산완충액 (pH 2.2, Sigma Co.)으로써 25 ml로 정용하였다. 이의 일정량을 취하여 아미노산 자동분석기 (Hitachi 835)를 사용하여 정량하였다.

결과 및 고찰

1. 소화효소에 의한 멸치육 가수분해물의 ACE 저해작용

멸치는 마른 멸치로서 많이 소비되기 때문에 마른 멸치를 섭취한 후에 소화효소의 작용으로 생성되는 ACE 저해 peptide의 특성을 해석하기 위하여, 소화효소인 pepsin, trypsin 및 α -chymotrypsin을 달지 멸치육에 대하여 2% (w/w)의 농도로 첨가하여 각 효소의 최적 활성 조건으로 10배량의 완충용액을 가하여 멸치육을 가수분해시켰다.

가수분해 시간에 따른 50% ethanol 가용성 peptide-nitrogen (ESP_{N50})의 생성량과 ACE 저해효과의 경시적 변화를 Fig. 1과 2에 나타내었다. Pepsin의 경우, ESP_{N50}의 생성이 가수분해 20시간까지 증가하였으나, 그 후에는 거의 변화를 나타내지 않았다. 또한 ACE 저해효과는 가수분해 직전에도 약 20% 정도의 저해효과를 나타내었고, 12시간까지는 급격히 증가하여 약 60% 정도의 효과를 나타내었다. 그 후 24시간까지 다소 감소하는 경향을 나타내다가 가수분해 48시간까지는 거의 일정한 효과를 나타내었다.

Ukeda et al. (1991)은 소화효소에 의한 정어리육 가수분해물중 pepsin 가수분해물이 가장 높은 ACE 저해효과를 나타내고, 이를 octadecyl silica (ODS) column을 사용하여 ethanol로써 용출한 결과, 25% ethanol로 용출한 획분이 높은 저해효과 (IC₅₀=0.064 mg protein/ml)를 나타내었다고 보고하였다.

Trypsin에 의한 ESP_{N50}의 생성은 가수분해 초기 즉, 4시간까지는 급격히 증가하였으나, 8시간째에는 다소 완만한 증가를 보이다가 그 후에는 거의 변화를 나타내지 않았고, α -chymotrypsin의 경우는 반응 초기 1시간째에 급격한 증가를 보였으나, 12시간까지는 완만하게 증가하였다.

한편, ACE 저해효과는 trypsin으로 가수분해한 경우는 가수분해 초기인 1시간에 25.1% 였으나, 모든 가수분해 시간대에 걸쳐 전체적으로 다른 단백질분해효소에 비하여 비교적 낮은 저해효과를 나타내었다. 또한 α -chymotrypsin의 경우는 반응초기인 1시간의 가수분해만으로도 62.2%의 ACE 저해효과를 나타내었고, 모든 가수분해 시간대에서도 다른 두가지 소화효소 즉, pepsin이나 trypsin에 비하여 높은 ACE 저해효과를 나타내었다. 그러나 ESP_{N50}의 함량이 감소하는 16시간째에는 ACE 저해효과도 다소 감소하다가 그 후에는 거의 일정한 저해효과를 나타내었다.

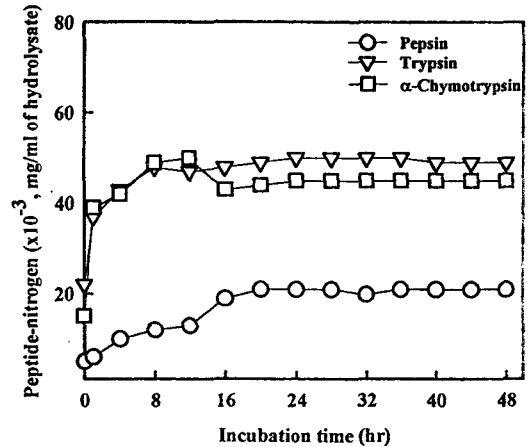


Fig. 1. Changes in levels of peptide-nitrogen of 50% ethanol solubles from anchovy muscle hydrolyzed by digestive proteases during incubation.

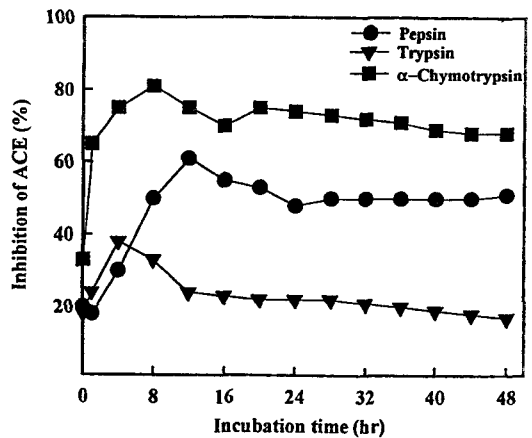


Fig. 2. Changes in ACE inhibitory activity of 50% ethanol solubles from anchovy muscle hydrolyzed by digestive proteases during incubation.

가수분해 8시간을 기준으로 하여 멸치육 가수분해물의 peptide-nitrogen 함량과 ACE 저해효과를 비교해 보면, α -chymotrypsin에 의한 경우 ACE 저해효과가 79.6%로 가장 높게 나타났으며, peptide-nitrogen 함량 역시 가장 많았다. 반면에 trypsin 가수분해물의 경우는 peptide-nitrogen 생성량은 α -chymotrypsin에 의한 가수분해물과 비슷하지만, ACE 저해효과는 가장 낮았다.

Maruyama et al. (1985)은 casein의 trypsin에 의한 가수분해물로부터 Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg의 구조를 가지는 ACE 저해 peptide를 분리하고, 우유 및 모유 β -casein을 thermolysin으로 가수분해한 것이 trypsin으로

가수분해한 것보다 강한 저해효과를 나타내었다고 하였다. 또한 이들 효소에 의한 가수분해물에 있어서 우유 β -casein 가수분해물보다 모유 β -casein 가수분해물이 더 강한 ACE 저해효과를 나타내었다고 보고하였다.

이상의 결과에서 ACE 저해작용은 가수분해 중에 생성되는 peptide와 매우 밀접한 상관관계가 있는 것으로 생각되나 pepsin 가수분해물은 사용한 소화효소 중 peptide-nitrogen 생성량이 가장 적었지만, ACE 저해효과는 비교적 높은 것으로 나타난 것으로 미루어 ACE 저해효과와 peptide-nitrogen 생성량은 반드시 상관관계가 일치하는 것은 아니며, 효소의 선택적 절단 특이성에 따라 그 저해효과가 결정되는 것으로 생각된다. 또한, 가수분해의 진행에 따라 ACE 저해작용이 다소 감소되는 것은 생성된 ACE 저해작용을 나타내는 peptide가 분해되어 peptide의 사슬길이나 아미노산 배열이 달라지기 때문인 것으로 생각된다.

Matsuda et al. (1992a)은 정어리육 단백질의 pepsin 가수분해물로부터 얻어진 ACE 저해peptide의 돼지 소장액 중의 소화효소에 의한 영향을 살펴본 결과, Leu-Lys-Leu ($IC_{50}=188 \mu M$)은 분해되지 않았고, Val-Lys-Ala-Gly-Phe ($IC_{50}=83 \mu M$)은 Val-Lys-Ala-Gly ($IC_{50}=0.93 mg/ml$)과 Gly-Phe ($IC_{50}=0.05 mg/ml$)으로, Lys-Val-Leu-Ala-Gly-Met ($IC_{50}=30 \mu M$)은 Lys-Val-Leu-Ala-Gly ($IC_{50}=0.044 mg/ml$)과 Lys-Val-Leu ($IC_{50}=0.27 mg/ml$)으로 부분분해되었다고 하였다. 또한 Saito et al. (1994)도 청주와 술지게미로부터 분리한 Tyr-Gly-Gly-Tyr과 Ile-Tyr-Pro-Arg-Tyr의 pepsin에 의한 ACE 저해활성의 안정성을 검토한 결과, pepsin 처리 후 Ile-Tyr-Pro-Arg-Tyr은 저해효과가 유지되었으나, Tyr-Gly-Gly-Tyr은 활성이 소실되었다고 보고하였다.

2. 식품공업용 단백질분해 효소에 의한 멸치육 가수분해물의 ACE 저해작용

멸치육을 이용한 기능성 조미 소재의 제조 조건을 살펴보기 위하여 식품공업용 단백질 분해효소인 papain, bromelain, 복합효소, Flavourzyme, Novozym, Neutrase, Protamex 및 Alcalase을 사용하여 각 효소의 최적 가수분해조건에서 시간에 따른 ESPN₅₀의 생성량과 ACE 저해효과를 살펴보아 Fig. 3과 4에 각각 나타내었다.

ESPN₅₀의 생성에 있어서 Alcalase에 의한 경우가 가장 많은 것으로 나타났으며, papain, bromelain, Neutrase 순이었으나 Novozym, Protamex, 복합효소 및 Flavourzyme의 경우는 적은 것으로 나타났다.

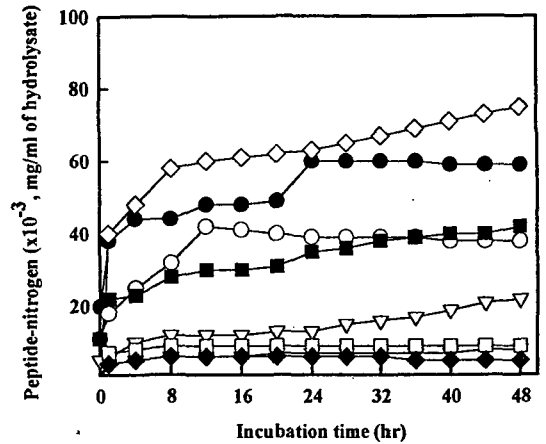


Fig. 3. Changes in levels of peptide-nitrogen of 50% ethanol solubles from anchovy muscle hydrolyzed by various proteases during incubation. ● : Papain, ▼ : Complex enzyme, ■ : Neutrase, ◆ : Flavourzyme, ○ : Bromelain, ▽ : Novozym, □ : Protamex, ◇ : Alcalase

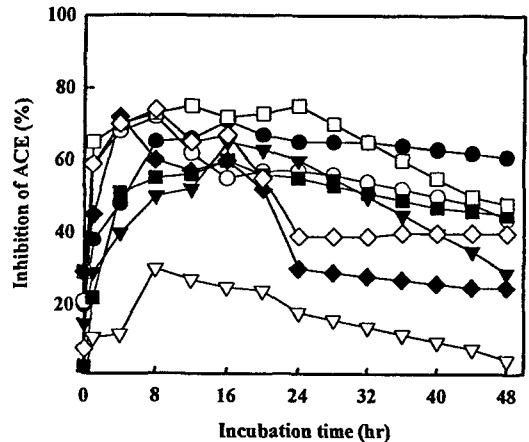


Fig. 4. Changes in ACE inhibitory activity of 50% ethanol solubles from anchovy muscle hydrolyzed by various proteases during incubation. ● : Papain, ▼ : Complex enzyme, ■ : Neutrase, ◆ : Flavourzyme, ○ : Bromelain, ▽ : Novozym, □ : Protamex, ◇ : Alcalase

ACE 저해효과는 Protamex에 의한 가수분해물의 경우가 가장 높은 것으로 나타났으며, Novozym의 경우가 가장 낮은 것으로 나타났다.

이들 ACE 저해효과와 ESPN₅₀의 생성량과 비교해 볼 때 Protamex로 가수분해한 경우, ESPN₅₀의 생성량은

적었지만, ACE 저해효과는 다른 것에 비하여 우수하여 가수분해 1시간째에도 65.0%의 저해효과를 나타내었으며, 이후 반응 24시간까지 70%~75% 정도의 높은 저해효과를 나타내었다. ESPN₅₀의 생성량이 가장 많은 Alcalase의 경우에는 반응 1시간째에 58.5%를 나타내어 반응 8시간까지는 73.9%까지 증가하였으나, Protamex와는 달리 그 이후 급격히 떨어져 24시간이후에는 40% 정도의 저해효과를 나타내었다.

또한, papain으로 가수분해한 경우에는 ACE 저해효과가 가수분해 초기인 반응 1시간에서 37.0%, 반응 4시간째에는 65.1%의 저해효과를 나타내었으며, 이후 48시간까지 약 60%~70% 정도의 높은 저해효과를 유지하였다. bromelain으로 가수분해한 경우도 반응 1시간째에 약 58.3%의 높은 저해효과를 나타내었고, 8시간까지는 Alcalase나 Protamex와 같이 계속 증가하였으나 그 이후는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

복합효소로 가수분해한 경우에는 ESPN₅₀의 생성량은 적었지만, 반응 1시간에서 28.0%, 반응 16시간에서는 65.9%의 높은 저해효과를 나타내다가 그 이후에는 오히려 감소하는 경향을 나타내어 반응 48시간째에는 28.4%의 저해효과를 나타내었다. 또한 Flavourzyme의 경우는 반응 4시간째에 Protamex와 Alcalase에 의한 가수분해물의 저해효과와 비슷한 71.4%를 나타내다가 그 이후 급격히 감소하여 반응 48시간째에는 가수분해전보다도 낮은 25.6%의 저해효과를 나타내었다.

한편, 반응 초기에 ESPN₅₀의 생성량이 많았던 Neutrase에 의한 가수분해물의 ACE 저해효과는 반응 4시간부터 24시간까지 50%~60% 정도의 높은 저해효과를 나타내었고, 반응 48시간까지도 47.5% 정도의 저해효과를 유지하였다. 그러나 Novozym에 의한 가수분해물은 다른 단백질 분해효소에 의한 가수분해물에 비하여 가장 낮은 ACE 저해효과를 나타내었다.

이상에서와 같이, papain, bromelain, 복합효소, Novozym, Neutrase, Protamex, Flavourzyme, Alcalase 등의 효소에 의한 멸치육 효소 가수분해물의 가수분해시간에 따른 ESPN₅₀의 생성량은 가수분해 8시간을 전후로 하여 거의 일정 수준에 도달하였고, ACE 저해효과 역시 이 때 높은 것으로 확인되었다.

또한, 가수분해 8시간째의 멸치육 가수분해물의 peptide-nitrogen 함량과 ACE 저해효과를 비교해 볼 때, Alcalase와 papain으로 처리한 것이 peptide-nitrogen 생성량이 많았고, ACE 저해효과도 높게 나타났다. 반면에, Protamex, 복합효소 및 Flavourzyme에 의한 것은 peptide-nitrogen의 생성량은 적었지만, ACE 저해효과는

높게 나타나, 가수분해시간에 따른 peptide-nitrogen의 생성량과 ACE 저해효과는 반드시 일치하지는 않음을 확인할 수 있었다. 또한, Novozym을 제외한 모든 효소가수분해물이 반응초기에도 높은 ACE 저해효과를 나타내는 것으로 미루어, 탈지 멸치육 단백질 중에는 유리되기 쉬운 형태의 ACE 저해물질이 존재하는 것으로 추정되었다.

Matsuda et al. (1992b)은 정어리육을 식품공업용 단백질분해효소인 denazyme AP로 가수분해하고 ODS column을 통해 ethanol을 이용한 순차 농도구배법 (10, 25, 50, 99.5%)으로 용출한 결과, ethanol 농도를 10% 및 25%로 하여 용출한 획분의 IC₅₀ (ACE활성을 50% 저해하는데 필요한 저해제의 농도)값이 각각 0.25 mg protein/ml, 0.35 mg protein/ml로 가장 높은 ACE 저해활성을 가지는 것으로 나타났다고 하였다.

3. 멸치육 효소 가수분해물의 아미노산 조성

소화효소 및 식품공업용 단백질 분해효소에 의한 탈지 멸치육 단백질 가수분해물의 50% ethanol 가용성 획분에 있어서 각 효소에 대한 ACE 저해효과가 가장 우수한 시간별 획분의 아미노산 조성을 Table 1에 나타내었다. 그 결과, 모든 획분에 있어서 glutamic acid의 함량이 가장 많은 것으로 나타났으며, 그 다음으로 aspartic acid, cysteine 및 leucine의 함량이 많은 것으로 나타났다.

이와 관련하여 Yeum et al. (1993)은 탈지대두박, egg albumin 및 casein 등의 식품단백질 효소가수분해물의 ACE 저해효과를 갖는 획분의 분자량은 1,400 부근으로 이들의 아미노산 조성은 glutamic acid의 함량이 특히 많았다고 보고하였다. 또한 정어리육을 *Bacillus licheniformis* 유래 alkaline protease를 사용하여 얻은 가수분해물로부터 분리한 ACE 저해 peptide는 산성 아미노산인 aspartic acid와 glutamic acid의 함량이 많았으며, 소수성 아미노산인 valine, leucine 및 tryptophan의 함량은 적었다는 등의 보고 (Matsui et al., 1993)로 미루어 보아 이들 아미노산의 조성도 ACE 저해효과에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

요 약

것갈 및 자건품으로 소비량이 많은 멸치의 기능특성 해석 및 기능성 조미 소재 제조의 일환으로 단백질 분해 효소에 의한 멸치 육단백질 가수분해물의 peptide-nitrogen 생성량과 ACE 저해작용을 검토하였다. 소화

Table 1. Amino acid composition of 50% ethanol solubles obtained from anchovy muscle hydrolyzed by various proteases (% to total amino acids)

Amino acid	Protein hydrolysates										
	Pep (12)*	Try (4)	Chy (8)	Pap (12)	Bro (8)	Com (16)	Nov (8)	Neu (16)	Pro (12)	Fla (4)	Alc (8)
Aspartic acid	8.6	10.8	10.2	10.3	8.6	8.8	8.5	8.4	8.3	6.6	10.3
Threonine	4.9	5.2	5.5	5.1	5.2	5.6	5.0	4.9	5.2	4.9	5.6
Serine	3.7	4.1	4.4	4.1	3.8	2.4	3.4	3.5	3.5	3.0	4.3
Glutamic acid	14.1	15.1	14.0	14.3	13.9	12.9	14.7	12.2	12.5	12.2	15.1
Glycine	7.4	5.1	4.8	5.4	6.0	8.7	7.3	5.3	4.8	4.6	5.1
Alanine	10.3	7.3	7.3	7.5	8.3	4.6	10.3	3.9	7.2	7.7	8.0
Cysteine	2.3	7.9	10.2	10.2	10.5	9.9	10.1	13.6	8.8	8.7	8.9
Valine	5.6	4.8	3.1	3.3	3.1	6.5	4.3	8.1	5.8	6.8	4.5
Methionine	4.1	1.5	2.1	2.5	1.6	5.3	0.4	0.6	3.6	4.2	0.8
Isoleucine	3.9	4.6	4.8	4.5	4.8	4.7	4.2	4.4	5.7	6.1	4.9
Leucine	9.4	9.1	9.8	8.9	10.9	7.7	11.0	11.1	11.1	12.1	10.2
Tyrosine	2.0	3.1	4.0	3.4	3.5	4.0	2.0	2.9	3.9	3.9	3.2
Phenylalanine	3.5	3.5	4.4	3.5	3.7	4.3	3.5	3.7	4.5	4.6	3.9
Lysine	8.5	5.9	4.9	5.5	3.3	5.0	4.5	3.9	4.0	2.6	4.7
Histidine	0.6	1.2	1.0	1.1	0.7	2.3	0.9	0.8	2.5	1.5	0.9
Arginine	5.3	6.4	5.1	5.6	3.3	1.5	4.2	4.3	3.8	2.8	5.0
Proline	5.8	4.4	4.4	4.8	8.8	5.8	5.7	8.4	4.8	7.7	4.6
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

*Numbers in parenthesis indicate values of the hydrolysis time. Pep : pepsin; Try : trypsin; Chy : α -chymotrypsin; Pap : papain; Bro : bromelain; Com : Complex enzyme; Nov;Novozym; Neu : Neutrase; Pro : Protamax; Fla : Flavourzyme; Alc : Alcalase.

효소와 식품공업용 단백질분해효소를 이용한 달지 멸치 육 가수분해물의 50% ethanol 가용성 peptide-nitrogen 생성량은 반응 8시간을 전후로 하여 거의 일정수준에 도달하였고, ACE 저해효과 역시 높게 나타났다. 따라서, 가수분해 8시간간의 각 효소 가수분해물의 peptide-nitrogen의 함량과 ACE 저해효과를 검토한 결과, 소화효소의 경우, α -chymotrypsin으로 가수분해시켰을 때, 50% ethanol 가용성 peptide-nitrogen의 생성량과 ACE 저해효과가 높은 것으로 나타났다. 또한, 식품공업용 단백질분해 효소를 사용한 경우는 Alcalase 0.6L를 사용하였을 때가 50% ethanol 가용성 peptide-nitrogen의 생성량 및 ACE 저해효과가 가장 우수하였고, Protamax에 의해서는 50% ethanol 가용성 peptide-nitrogen의 생성량은 적었지만, ACE 저해효과는 높게 나타났다. ACE 저해효과가 우수한 멸치육 효소 가수분해물의 50% ethanol 가용성 핵분의 아미노산 조성은 대부분의 가수분해물에서 glutamic acid의 함량이 가장 많았고, 그 다음으로 aspartic acid, cysteine 및 leucine의 순이었다.

참 고 문 헌

Astawan, M., M. Wahyuni, T. Yasuhara, K. Yamada, T.

- Tadokoro and A. Maekawa. 1995. Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 425~429.
- Cushman, D.W. and H.S. Cheung. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637~1648.
- Ferreira, S.H., D.C. Bartelt and L.J. Greene. 1970. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, 9, 2583~2593.
- Frohlich, E.D. 1982. Hemodynamic factors in the pathogenesis and maintenance of hypertension. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 41, 2400~2408.
- Fujii, M., N. Matsumura, K. Mito, T. Shimizu, M. Kuwahara, S. Sugano and H. Karaki. 1993. Antihypertensive effects of peptides in autolysate of bonoto bowels on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 2186~2188.
- Kato, H. and T. Suzuki. 1971. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Isolation of five bradykinin potentiators and the amino acid sequences of two of them, potentiators B and C. *Biochemistry*, 10, 972~980.
- Kohama, Y., H. Oka, Y. Kayamori, K. Tsujikawa, T. Mimura, Y. Nagase and M. Satake. 1991. Potent synthetic

- analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2169~2170.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- Maruyama, S. and H. Suzuki. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1393~1394.
- Maruyama, S., K. Nakagomi, N. Tomizuka and H. Suzuki. 1985. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1405~1409.
- Matsuda, H., T. Ishizaki, H. Morita, T. Nagaoka, K. Osajima and Y. Osajima. 1992a. Digestion of peptides from sardine muscle that inhibit angiotensin I converting enzyme by intestinal enzymes of pigs. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, 66, 1645~1647 (in Japanese).
- Matsuda, H., T. Nagaoka, H. Morita, K. Osajima and Y. Osajima. 1992b. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides generated from sardine muscle by protease for food industry. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39, 678~683 (in Japanese).
- Matsufuji H., T. Matsui, E. Seki, K. Osajima, M. Nakashima, and Y. Osajima. 1994. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 2244~2245.
- Matsui T., H. Matsufuji, E. Seki, K. Osajima M. Nakashima, and Y. Osajima. 1993. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 922~925.
- Matsumura, N., M. Fujii, Y. Takeda and T. Shimizu. 1993a. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1743~1744.
- Matsumura, N., M. Fujii, Y. Takeda K. Sugita and T. Shimizu. 1993b. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 695~697.
- Nishikawa, K. 1993. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, 38, 239~246 (in Japanese).
- Ohkubo, H. 1991. Molecular studies of blood pressure control. *Japan. Biochem., Soc.*, 63, 1419~1440.
- Ondetti, M.A. and D.W. Cushman. 1982. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 283~308.
- Ondetti, M.A., N.J. Williams, E.F. Sabo, J. Pluscec, E.R. Weaver and O. Kocy. 1971. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry*, 10, 4033~4039.
- Oshima, G., H. Shimabukuro and K. Nagasawa. 1979. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 566, 128~137.
- Saito Y., K. Wanezaki (Nakamura), A. Kawato, and S. Imayasu. 1994. Structure and activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1767~1771.
- Saxena, P.R. 1992. Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 19, S80~S88.
- Sealey, J.E. and J.H. Laragh. 1990. Hypertension : Pathophysiology, diagnosis and management (Edited by Laragh, J. H. and B. M. Brenner). The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. pp. 1287~1317, Raven Press, LTD., New York.
- Suh, H.J., S.J. Cho, J.H. Whang, H. Lee and H.C. Yang. 1997. Characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from squid hydrolysate. *Foods and Biotechnology*, 2, 122~124.
- Ukeda, H., H. Matsuda, H. Kuroda, K. Osajima, H. Matsufuji and Y. Osajima. 1991. Preparation and separation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Nippon N geikagaku Kaishi*, 65, 1223~1228 (in Japanese).
- Ukeda, H., H. Matsuda, K. Osajoma, H. Matsufuji, T. Matsui and Y. Osajima. 1992. Peptides from peptic hydrolyzate of heated sardine meat that inhibit angiotensin I-converting enzyme. *Nippon N geikagaku Kaishi*, 66, 25~29 (in Japanese).
- Umamoto, S. 1966. A modified method for estimation of fish muscle protein by biuret method. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 32, 427~435 (in Japanese).
- Waeber, B., J. Nussberger and H.R. Brunner. 1990. Hypertension : Pathophysiology, diagnosis and management (Edited by Laragh, J. H. and B. M. Brenner). Angiotensin-converting-enzyme inhibitors in hypertension. pp. 2209~2232, Raven Press, LTD., New York.
- Yamamoto, S., I. Toida and K. Iwai. 1980. Re-examination of the spectrophotometric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Japan. J. of Thoracic Diseases*, 18, 297~303 (in Japanese).
- Yeum, D.M., S.B. Roh, T.G. Lee, S.B. Kim and Y.H. Park. 1993. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of food protein. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22, 226~233 (in Korean).