

홍어의 항고혈압 활성물질

임 현 수*

여수대학교 생명공학과

ACE Inhibitory Materials from *Raja kenojei*

Hyun-Soo Lim*

Dept. of Biotechnology, Yeosu National University, Yeosu 550-749, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the ACE inhibitory materials of *Raja kenojei*. *Raja kenojei* was separated to fillet and viscera, and these were extracted with hot water. Antihypertensive activity was examined by measuring angiotensin converting enzyme ACE inhibitory activity. ACE inhibitory activity of viscera at the concentration of 2% for Day 0 showed the highest value by 71.0%. But ACE inhibitory activity of fillet at 2% showed by 29%, which was lower antihypertensive activity than viscera. The protein content of visceral hot water extracts in proximate composition showed the highest. And also, there was a large amount of aromatic and branched aliphatic amino acids in viscera than those in fillet. For the purification of antihypertensive material in visceral hot water extracts, it was separated and collected by Sephadex G-25 gel chromatography. The fraction (B) of 111 to 160 showed the highest ACE inhibitory activity by 65.1% at the concentration of 0.05%. But the other fractions (A and C) showed lower activity than B. These results demonstrate that crude hot water extracts of viscera from *Raja kenojei* may be useful as functional food ingredient with antihypertensive property.

Key words – *Raja kenojei*, viscera, fillet, ACE inhibitory activity

서 론

홍어(*Skate, Raja kenojei* Muller et Henle)는 가오리과에 속하는 연골, 저서성 어류로써 우리나라의 남서해 및 일본의 중부이남해역과 동중국해에 많이 분포하고 있다. 특히, 목포, 영광, 부산 등지에서 많이 어획되고 있다. 최근 우리 연안에서 거의 잡히지 않고, 칠레나 캐나다 등지에서 수입에 의존하고 있다. 홍어의 주식은 오징어류, 젓새우류, 게

류, 갯가재류 등으로 홍어 자체의 영양성이 매우 우수하다. 또한, 홍어가 주목을 받는 이유는 목포 등지에서 전통 식품으로 홍어를 발효시켜 즐겨 애용 인구가 증가하고 있기 때문이며, 그 독특한 향과 맛으로 점차 애용인구가 증가하고 있다. 홍어는 바다 깊은 곳에서 삼투압조절을 위하여 내부에 요소 및 요소 전구체를 많이 함유하고 있기 때문에 발효가 진행됨에 따라 코를 자극하는 향과 특 쏘는 맛이 형성된다. 또한 홍어 및 발효제품에서는 유리 아미노산인 anserine, taurine, alanine, lysin 등이 다량 검출되었는데, anserine은 감칠맛을 줄뿐만 아니라 근육의 완충능[19], myrosine ATPase의 부활작용[1]과 cytochrome oxidase의

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 061-659-3306, Fax : 061-659-3306
E-mail : limbplab@yosu.ac.kr

활성화를 위한 철이온 수송에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 taurine[4]은 홍어발효 중에 오히려 더 많이 생산되어 있는데 cholesterol 축적을 예방하는 이외에 여러 가지 생리 기능을 갖고 있다고 알려지고 있으며 차[5]등이 보고한 가오리는 같은 목에 속한 것이나 C_{25:0}는 분석되지 않았고, 홍어에서만 특이하게 분석되었다. 또한 n-3 지방산인 EPA와 DHA도 상당량 분석되었다[16]. 또한 홍어 폐기물인 간유에는 EPA (eicosapentaenoic acid)와 DHA (docosa hexaenoic acid)가 34%나 함유되어 있다. DHA와 EPA는 LDL-cholesterol을 감소시키고, HDL-cholesterol을 증가시키며, 중성지방을 저하시키는 작용이 강하여 관상동맥질환, 혈전증의 유발을 억제하는 등 성인병을 예방할 수 있는 물질이어서 주목된다[14]. 특히 DHA는 망막 및 뇌 조직의 주요성분이다[6]. 이밖에도 홍어발효식품으로 사용되지 않는 부분, 내장장기, 껍질 등은 전량 폐기되고 있는 실정이다. 그러나 이러한 조직은 많은 단백질을 함유하고 있을 뿐 아니라 발효 후 숙성에 의한 유리 아미노산이 증가하여 영양 및 소화 흡수에 유리한 조건을 제공하므로써 사료로도 사용 가능하며 또한 ACE의 작용을 억제하는 물질의 존재가 예상된다. 왜냐하면 현대 성인병의 대표적인 질환인 고혈압증의 대부분을 차지하고 있는 본태성고혈압(本態性高血壓)의 원인인 angiotensin converting enzyme (ACE)은 여러식품종의 단백질에 의해 억제되는데, 특히 casein[12]과 옥수수 단백질인 zein[14]의 가수분해물을 비롯하여 차(茶)의 polyphenol 성분, 무화과 유액[13], 간장[9] 및 청주(淸酒)와 그 부산물의 가수분해물이 ACE 저해 작용을 나타낸다고 보고되고 있다. 또한, 어육단백질인 정어리[15,20]와 고등어[21] 근육단백질 가수분해물의 ACE 저해 작용도 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 전남 특산물인 홍어발효의 과학화의 일환으로서 부산물로 생산되어 폐기되고 있는 홍어의 내장 과 가식부 열수추출물의 항고혈압활성을 평가하며, Sephadex column chromatography를 통해서 분자량별 fraction의 분리와 분리된 fraction별 항고혈압 효과를 검색하므로써 홍어 부산물의 생리기능성 규명을 통한 재활용 가능성을 탐색함이 목적이다.

재료 및 방법

시료제조

본 실험에서는 전라남도 나주시 (주)영산포 식품으로부터

터 지원 받은 홍어(*Raja kenogei*)를 냉동 보관한 상태로 실험실로 운반하여 완전해동한 후 홍어표면을 수돗물로 두 번, 증류수로 한번 세척하였다. 이를 멸균한 거즈로 표면의 물기를 제거한 다음 10℃에서 습도를 60-90%로 설정하여 10 일 동안 발효 시키면서 발효기간에 따라 가식부와 내장을 세절하여 열수추출한 후 동결 건조기(Freeze dry system/Freezone 4.5, Labconco Co, England)에서 동결 건조한 것을 시료로 사용하였다. 홍어 내장 및 가식부를 마쇄하여 환류 냉각기를 부착시킨 플라스크에 시료 1g당 30 mL의 증류수를 넣고 30분간 100℃로 3회 반복 추출한 액을 여과지(Whatman No.2)로 여과하고, 여과된 액을 다시 동결 건조하여 홍어 가식부 및 내장의 열수추출물로 하였다.

ACE (Angiotensin Converting Enzyme) 저해활성 측정
항고혈압 효과는 본태성 고혈압의 원인물질인 ACE (Angiotensin Converting Enzyme, peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3.4.15.1)의 저해활성으로 측정하였으며, Cushman과 Cheung의 방법[7]을 변형하여 측정하였다. ACE 0.38 mg을 300 mM Sodium chloride를 포함한 50 mM HEPES HCl Buffer (pH 8.3) 3 mL에 용해시켰으며, 기질인 Hippuryl-His-Leu (HHL)은 300 mM Sodium chloride를 포함한 50 mM HEPES HCl Buffer (pH 8.3)에 용해시켜 0.3%의 HHL 기질용액을 만들었다. 홍어 각 부위별 열수추출물 시료는 0.5%, 1%, 2%로 제조하여 시료 50 µL에 0.3% HHL 기질용액 200 µL을 첨가하여 37℃에서 10분간 preincubation 시켰다. 반응액에 ACE용액 50 µL첨가한 후 37℃에서 15분 반응시킨다. 반응이 끝나면 1M HCl 250 µL를 첨가하여 반응을 정지시키고 ethyl acetate 2,000 µL를 가하여 60초간 강하게 shake한 다음 3000 rpm에서 2분간 원심분리 시켜 상정액 1 mL을 취한다. 이 상정액을 140℃에서 10분간 건조 후 3 차 증류수 3 mL을 가해 용해시켜 228 nm에서 흡광도를 측정 후 계산식(Inhibitory ratio (%)) = $C-S/C-S' \times 100$ 에 따라 ACE 저해율을 나타내었다. 앞의 식에서 S는 Sample의 흡광도이고, C는 Control (sample 대신 증류수를 넣은 군)의 흡광도이며, S'는 Sample 대조군(HCl에 의한 반응 정지 후 효소를 넣은 군)의 흡광도를 나타낸 것이다.

일반성분 분석

항고혈압 효과를 나타내는 물질의 일반성분을 분석하기

위하여 수분의 정량은 일정량의 홍어내장과 가식부의 열수추출물을 채취하여 고온 건조 후 그 감량의 항량 값을 수분으로 하였으며[2], 환원당 정량은 DNS법[8]에 의하여 환원당을 정량하였다. 즉, 시료를 0.01 g/mL로 조제하고, 시료 1에 DNS 시약 3 mL을 넣고 끓는 물에서 5분간 끓였고, 흐르는 물에서 식힌 후 550 nm에서 비색정량하였다. 환원당 함량은 미리구하여둔 standard curve 로 시료의 농도를 환산하였으며, 순단백질 정량은 Biuret법에 의거하여 순단백질을 정량하였다.

원소분석

홍어의 항고혈압 효과를 나타내는 물질의 대략적인 성분을 알기 위하여 원소분석기(EA1110, CE Instruments, Italy)를 사용하여 분석하였다. 원소분석기는 pure copper를 충전한 반응관에 GC colome과 TCD(thermal conductive detector)를 사용하였다. 회화온도는 1000℃, Oven 온도는 60℃이고, 이동상은 helium gas를 사용하였으며, flow rate는 120 mL/min이었다.

유리아미노산 분석

항고혈압 효과가 높았던 홍어 내장 열수 추출물의 ACE 억제 peptide의 아미노산 조성을 알기 위하여 홍어 내장 열수 추출물을 동결건조하고, buffer는 lithium buffer, reagent는 ninhydrine, analytic time은 3 hr/L sample, injection volume은 20 µL로 아미노산 자동분석기(Biochrom 20, Pharmacia Biotech, England)로 질소화합물의 종류와 양을 분석하였다.

Sephadex G-25 column chromatography에 의한 항고혈압성 물질의 조분리 및 성분 분석

Sephadex G-25 (MWCO : 5kD) 100 g을 10배 부피의 buffer (50 mM-sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.0)에 넣고, 이를 water bath (99℃)에서 가끔씩 손으로 흔들어 주면서 1시간 동안 중탕한 후 충분히 식혀서 column (2.5×100 cm)에 충전하였다. 시료는 syringe filter (0.2 µm)로 여과하여 Sephadex G-25 column (1.25×100 cm)에 주입하고 buffer (50 mM-sodium phosphate, 0.1M sodium chloride, pH 7.0)로 0.4 mL/min의 속도로 용출하여 10분간격으로 4 mL씩 분획을 모아 280 nm에서 측정하

여 분획물(A, B, C)을 만들었다.

결과 및 고찰

홍어 가식부, 내장 열수 추출물의 ACE 저해활성 측정

Fig. 1에 나타낸 홍어 가식부 열수 추출물의 ACE 저해 효과는 시료 2% 첨가의 경우 발효 0, 4, 8, 10일째에 각각 29.0%, 17.0%, 20.0%, 16.0%로 나타났고, 시료 1% 첨가의 경우 발효 0, 4, 8, 10일째에 각각 10.0%, 9.0%, 13.0%, 12.0%로 나타났다. 따라서 홍어 가식부 열수 추출물의 ACE 저해 효과는 시료 2% 첨가의 경우 발효 0일째에 29.0%로 가장 높게 나타났다. 홍어 가식부의 ACE 저해 작용은 다소 낮으나 상시 섭취될 수 있는 식품이란 측면에서 볼 때 그 유용성이 기대된다고 할 수 있다. 또한, 홍어 내장 열수 추출물의 ACE 저해 효과는 시료 2% 첨가의 경우 발효 0일째에 71.0%로 가장 높게 나타났고, 발효 4, 8, 10 일째에 각각 65.0%, 37.0%, 42.0%의 저해효과를 나타내었다. 시료 1% 첨가의 경우 발효 0일째에 30.0%로 시료 2% 첨가의 경우와 함께 가장 높은 ACE 저해효과를 나타내었다. 발효 4, 8, 10 일째에 각각 15.0%, 10.0%, 8.0% 저해효과를 나타내었다. 멸치 젓갈 숙성 중 시료 액의 ACE 저해 효과는 아미노 질소 함량이 최고 치에 달하는 숙성 60일에 최대 값을 나타내다가 그 후 다소 감소하는 경향을 나타내었다[11]. 그와 달리 홍어 내장 열수 추출물의 ACE 저해 효과는 시료 2% 첨가의 경우 발효 0일째에 71.0%로 가장 높게 나타났으며,

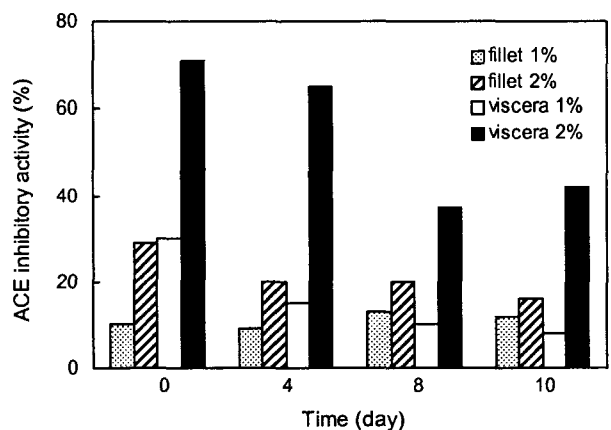


Fig. 1. ACE inhibitory activity of fillet and viscera from *Raja kenoeji* according to various fermentation period.

발효가 진행되면서 ACE 저해 효과는 감소하는 것으로 나타났다.

홍어내장 열수 추출물의 일반성분 분석

ACE 저해율이 가장 높았던 발효 0일째 홍어내장 열수 추출물의 일반성분은 Table 1과 같다. 즉, 홍어내장 열수 추출물에는 순단백질의 함량이 가장 높아서 ACE를 억제할 수 있는 물질들이 많이 있으리라 사료되며 Table 2는 원소분석 결과로서 C, H, O, N의 성분비가 당류라기 보다는 peptide계인 것으로 예상되었다. 정어리 어간장[21]의 연구에서 ACE 저해 작용을 가지는 peptide가 가열에 대하여 안정한 것으로 나타났다고 하였는데 본 연구에서도 열수 추출물이지만 ACE 저해율이 높게 나타났으며 ACE를 억제하는 peptide를 함유하리라 예상되었다.

홍어 내장 열수 추출물의 유리아미노산의 측정

ACE 억제효과가 높았던 홍어 내장 열수 추출물의 유리아미노산을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 생체 조절기능을 갖는 식품성분중 생리활성 peptide는 구조 및 활성이 다양하고, protease류에 의해 분해되며, 유전공학기술에 의해 생산 및 개조가 가능하며, 높은 안전성을 가진다[18]. 특히, gelatin의 가수 분해물로 부터 식품단백질 유래의 angiotensin converting enzyme

Table 1. The proximate composition of visceral hot water extracts from *Raja kenoeji*

Composition name	Content (%)
Moisture	14.67±0.21*
Protein	58.70±0.10
Reducing sugar	1.03±0.06

*Mean ± standard deviation.

Table 2. The composition of chemical element of visceral hot water extracts from *Raja kenoeji*

Elementary name	Content (%)
Nitrogen	7.76±0.20*
Carbon	40.87±0.06
Hydrogen	8.10±0.02
Sulfate	0.50±0.01
Oxygen	27.90±0.02

*Mean ± standard deviation.

Table 3. The free amino acid contents of viscera hot water extracts from *Raja kenoeji*

Name of free amino acid	Content (mg%)	
	Fillet	Viscera
α-Aminoadific acid	6.2	0
Valine	209.7	435.9
Isoleucine	144.3	335.1
DL-Allocystathion	19.9	32.3
Glycine	229.1	288.9
Tyrosine	277.5	798.4
Hydroxylysine	137.1	151.4
Methionine	118.2	238.2
Glutamic acid	350.3	699.8
Alanine	544.7	627.9
Hydroproline	13.1	15.6
phenylalanine	190.3	552.8
Leucine	299.8	736.3
Threonine	94.7	188.2
Lysine	403.3	612.0
Ornithine	168.9	158.9
Argine	50.4	438.7
Serine	44.9	270.0
Taurine	1167.6	1108.6
Histidine	46.8	126.2
Phosposerine	37.9	133.1
3-Methylhistidine	38.6	107.7
Aspartic acid	77.5	328.9
Total	4670.8	8384.9

저해 peptide가 발견된 이후 [10], 다른 식품단백질에서 ACE 저해 peptide를 찾으려는 연구가 지속적으로 진행되어 왔다[15]. 고혈압을 일으키는 원인물질의 하나인 ACE를 억제하는 peptide는 아미노산 중 C-말단에 Trp, Tyr, Phe 및 Pro과 같은 aromatic 아미노산이 있고, N-말단에는 Val, Ile과 같은 branched aliphatic 아미노산이 있는 경우 우수한 ACE 저해효과를 보이며 Val-Trp로 구성된 dipeptide는 IC₅₀=1.6 μM으로 가장 우수하다고 하여 ACE 저해 peptide는 C-말단을 구성하는 2-3개의 아미노산의 특성이 매우 중요한 것으로 생각되고 있다[9]. 이들 peptide들은 ACE에 대해 angiotensin-I과 경쟁적으로 결합하여 ACE의 활성을 감소시키는 것으로 추정되고 있다. 또한, N-말단에 염기성 아미노산인 histidine의 함량이 특징적으로 높은 것이 ACE 저해활성과 관계가 있

었다는 보고[17]와 같이 홍어 내장 열수 추출물의 유리아미노산 함량 중 histidine의 함량이 가식부보다 높아서 (Table 3) histidine 함량도 ACE 억제효과에 영향을 주었으리라 예상되지만 좀 더 깊이 있는 연구가 필요하리라 사료된다. 또한, 홍어 내장 열수 추출물에는 aromatic 아미노산인 Tyr, Phe이 가식부보다 많았으며 branched aliphatic 아미노산인 Val도 가식부보다 2배 이상 많아서, 홍어내장 중에 이러한 기능성 peptide가 존재하리라 예상되고 좀 더 깊이 있는 연구를 위해 구성아미노산의 분석이 필요하리라 사료된다.

G-25 column chromatography에 의한 ACE 저해활성 물질 분리

앞의 결과에서 홍어 발효 0일된 내장 열수 추출물의 ACE 저해 효과가 가장 우수하여 이들 인자를 보다 구체적으로 살펴보기 위하여 Fig. 2에 나타낸 Sephadex G-25 column chromatography에 의해 획분을 분리하여 분획물들의 ACE 저해 효과 등 기능성을 살펴보았다. 이들 획분 A(60~110), B(111~160), C(161~210)의 ACE 저해 효과는 Fig. 3과 같다. 분획물 A에서는 1% 정도로 낮았고, 분획물 C를 0.05% 첨가한 군에서 56.9%로 높은 ACE 저해 효과를 나타내었다. 그리고 분획물 B에서는 농도가 0.05, 0.1, 0.2%에서 각각 65.1, 64.1, 67.8%로 나타났으며, 분획물 중 가장 높은 ACE 저해 효과를 나타내었다. 이상의 결과로 미루어

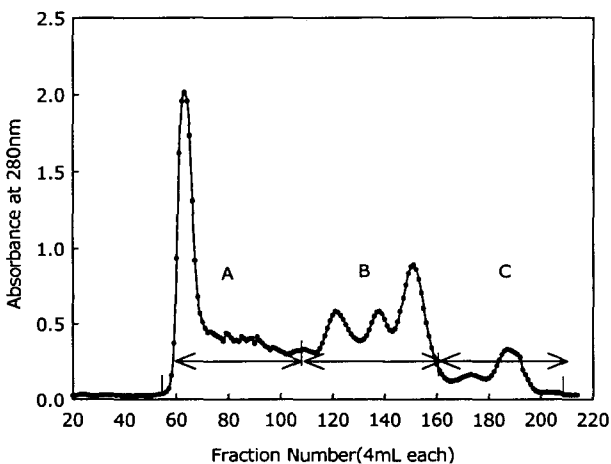


Fig. 2. Elution profile of Sephadex G-25 (5kD) gel filtration (2.5×100cm) of visceral hot water extracts from *Raja kenoeji*.

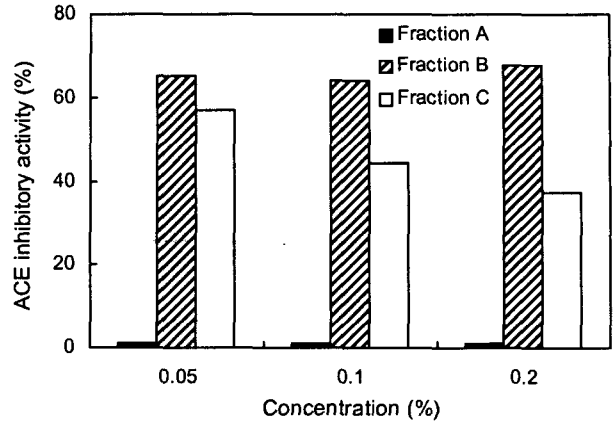


Fig. 3. ACE inhibitory activity of visceral hot water extracts fraction by Sephadex G-25 (5kD) gel filtration from *Raja kenoeji*.

보아 홍어 내장 열수 추출물의 ACE 저해인자는 가열에 대하여 안정한 비교적 저분자의 peptide와 같은 물질이라고 추정할 수 있었다. 한편, 지금까지 밝혀진 대부분의 ACE 저해 peptide는 분자량이 2000이하인 것으로 보고되었다 [3]. 따라서 본 연구에서도 홍어내장 열수 추출물의 항고혈압 물질은 저분자의 peptide 라고 사료되며, 이러한 ACE 저해 작용은 peptide 함량보다는 그 중의 peptide의 종류 즉, 아미노산의 배열순서 및 그 기질이나 구조 등에 따라서 다른 것으로 추정된다.

요 약

홍어를 발효하여 발효기간에 따른 항고혈압 효과를 조사하고 그에 따른 항고혈압성 물질을 분리하기 위해 GPC system을 사용하여 항고혈압 물질을 조 분리하였다. 항고혈압성 물질을 농축하기 위해 홍어 내장 및 가식부 열수 추출물을 대량 포집 하였다. 그리고 그에 따른 ACE 억제 효과를 검색하였다. 즉, 홍어 가식 부의 ACE 저해 작용은 2% 첨가 시 29%로, 다소 낮으나 상시 섭취될 수 있는 식품이란 측면에서 볼 때 그 유용성이 기대된다고 할 수 있으며 홍어 내장 열수 추출물의 ACE 저해 효과는 시료 2% 첨가의 경우 발효 0일째에 71.0%로 가장 높게 나타났다. 발효가 진행되면서 ACE 저해 효과는 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 ACE 억제효과를 나타내는 성분을 추정하기 위하여 홍어 내장 열수 추출물의 일반성분과 원소분석을

실시한 결과 일반성분 중 순단백질이 58.7%로 가장 높게 나타났으며, 원소분석 결과 C, H, O, N의 성분비가 당류라기 보다는 peptide계인 것으로 나타났다. 또한, 질소화합물의 분석결과 ACE를 억제하는 기능성 peptide의 성분인 Tyr, Phe, Val, His 등이 가식부 보다 많아서 ACE를 억제하는 peptide를 함유하리라 예상되었다. ACE억제 물질을 조 분리하기 위하여 Sephadex G-25 column chromatography에 의해 분자량별로 분획한 결과, 분획물들의 ACE 저해 효과는 분획물 B(111-160)의 농도 0.2%에서 67.8%로 가장 높은 ACE 저해 효과를 나타내었다. 이상의 결과로 미루어 보아 홍어 내장 열수 추출물의 ACE 저해인자는 가열에 대하여 안정한 비교적 저분자의 peptide와 같은 물질이라고 추정할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2002년 한국과학재단의 지역대학우수과학자 육성지원 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Aneva, R. M. and W. J. Brown. 1969. Effects of carosine and anserine on muscle adenosine triphosphates. *J. Biol. Chem.* **244**, 1600-1604.
2. A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis. pp. 382-383. 16th eds, Assoc. Off. Anal. Chem., Washington D.C.
3. Ariyoshi, Y. 1993. Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trend in food science & technol.* **May**, 139.
4. Brown C. E. 1981. Interaction among carosine, anserine, ophidine and copper inbiochemical adaptation. *J. Biol. Chem.* **88**, 245-256.
5. Cha, Y. J., C. B. Ahn, T. H. Lee, Y. H. Chung, Y. H. Lee and S. K. Kim. 1985. Flavor component in sun-dried ray. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **14**, 370-375.
6. Connor W. E., M. Meuringer and S. Reisbick. 1992. Essential fatty acids in the retina and brain. *Mutr. Rev.* **50**, 21-24.
7. 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.
8. Gali, L. M. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-427.
9. Kinoshita, E., J. Yamakoshi and M. Kikuchi. 1993. Purification and identification of an angiotensin-I converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1107-1110.
10. 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**, 128-130.
11. Hong, S. P., M. H. Kim and S. W. Oh. 1998. The characteristics and material of Angiotensin converting enzyme. *Food science and industry.* **31**, 86-91.
12. Maruyama, S. and H. Suzuki. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1393-1394.
13. Maruyama, S., S. Miyoshi and H. Tanaka. 1989. Angiotensin I converting enzyme by Bacillus licheniformis Alkaline Protease Hydrolysates Derived from Sardine Muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 922-925.
14. Miyoshi, S., H. Ishikawa, T. Kaneko, F. Fukui, H. Tanaka and S. Maruyama. 1991. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1313-1318.
15. 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.
16. Nam, H. K. and M. K. Lee. 1995. Studies on the fatty acids and cholesterol of Raja skate. *J. Kor. Oil Chemist's Soc.* **12**, 55-58.
17. Saito, Y., K. Nakamura, A. Kawato and S. Imayasu. 1992. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in Sake and its by-product. *Nippon Noeikagaku Kaishi.* **66**, 1081-1083.
18. Shin, Z. I., C. W. Ahn, H. S. Nam, H. J. Lee, H. J. Lee and T. H. Moon. 1995. Fraction of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 230-234.
19. Suyama, M. and T. Shimizu. 1982. Buffering capacity

- and taste of carosine and its methylated compounds. *Bull. Jan. Soc. Sci. Fish.* **48**, 89-95.
20. Yeom, D. M., T. G. Lee, H. S. Byun, S. B. Kim, and Y. H. Park. 1992. Angiotensin- I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrlysates of Mackered muscle protein. *J. Korean Fish. Soc.* **25**, 3-5.
21. Yeom, D. M., T. G. Lee, J. R. Do, W. K. Kim, Y. B. Park, S. B. Kim and Y. H. Park. 1993. Characteristics of Angiotensin- I converting enzyme derived from fermented fish product 2. Characteristics of Angiotensin- I converting enzyme inhibitors of fish sauce prepared from sardine, *sardinops melanosticta*. *J. Korean Fish. Soc.* **26**, 416-423.

(Received June 26, 2003; Accepted October 10, 2003)