

김으로부터 분리한 Angiotensin-I Converting Enzyme 저해제의 정제 및 특성

최수진 · 전우진 · 유광원 · 신동훈 · 홍범식 · 조홍연[†] · 양한철

고려대학교 생명공학원

Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor from *Porphyra yezoensis*

Soo-Jin Choi, Woo-Jin Jun, Kwang-Won Yu, Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong,
Hong-Yon Cho[†] and Han-Chul Yang

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

This study focused on the purification and characterization of ACE inhibitor from *Porphyra yezoensis*. The dried *Porphyra yezoensis* was ground and hydrolyzed with 2.5 N HCl, followed by neutralization and centrifugation. Then, the subsequential purification of ACE inhibitor was carried out by Amberlite XAD 8, DEAE-Toyopearl 650C, Sephadex LH-20 column chromatography and reverse phase HPLC with C₁₈ column. The purified ACE inhibitor was peptide which consisted of glycine (24.5%), arginine (56.8%) and proline (18.8%). Also, it showed the competitive inhibition pattern to ACE. The apparent molecular mass of purified peptide was 580 dalton, and an IC₅₀ value of ACE inhibitor was 10.6 µg.

Key words: angiotensin I-converting enzyme (ACE), peptide, *Porphyra yezoensis*

서 론

현대 성인병은 심장순환기계의 질환들이 주류를 이루고 있는데 특히 고혈압은 심부전증, 신장기능 저하, 뇌졸중 등 치명적인 심장순환기계질환의 직접 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 고혈압은 그 발생 원인에 따라 여러 가지로 나눌 수 있는데 압-Na⁺노 관계(pressure-vascularities)에 변화를 초래함으로써 혈압이 상승하는 기작도 그중 한 원인으로 널리 알려져 있다(1). 여기에는 레닌-안지오텐신 시스템(renin-angiotensin system)의 활성도가 깊이 관여한다. 즉, 레닌의 작용으로 안지오텐신노젠이 안지오텐신 I으로 가수분해되며, 이는 다시 안지오텐신 전환효소(angiotensin I-converting enzyme; ACE)에 의해 강력한 혈관 수축호르몬인 안지오텐신 II로 전환된다. 이 안지오텐신 II는 동맥 혈관을 수축시켜 혈압을 상승시키는 작용과 부신에서의 aldosterone의 분비를 촉진해서 신장의 Na 및 수분의 재흡수를 증가시키는 역할을 한다. 또한 ACE는 혈액 중에서 혈관확장, 장의 운동성 증대 등의 효과를 보이는 bradykinin을 불활성화시킴으로써 고혈압의 원인이 되고 있다(2).

현재까지 captopril, enalapril과 같은 화학 합성 ACE 저해제(3)가 널리 상용되고 있지만 높은 역가에 비하여 각종 부작용(4)이 많아 안정성 측면에서 가치가 더 높은 천연물질에 대한 탐색과 개발에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. Zuhair 등(5)은 본태성 고혈압 쥐(spontaneously hypertensive rat)에 호박씨 투여시 혈압강하 효과를 보고한 바 있다. Matsubara 등(6)도 굴과피에서 분리한 플라보노이드에 대하여 천연 ACE 저해제로서의 가능성을 제시하였다.

지금까지 알려진 천연의 ACE 저해제로는 단백질 유래 펩타이드(7,8), 탄닌류(9), 플라보노이드류(10-12) 등이 있지만, 해조류 기원 제제에 대한 보고는 극히 드물다. 면역활성과 다양한 생체조절기능(13,14) 및 건강식품으로 보고되고 있는 해조류는 국내 생산양도 풍부하고 영양 성분과 정미성분이 함유된 이용가치(15)가 높은 식품중 하나이다.

따라서 본 연구에서는 70여종의 국내산 해조류에서 ACE 저해활성을 검색한 결과 활성이 가장 높았던 서천산 김으로부터 ACE 활성 저해물질을 분리, 정제하여 그 특성을 검토하였다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 건조 상태의 서천산 김은 백화점에서 구입하였다.

추출조건

시간에 따른 산·알칼리 가수분해

분쇄한 시료 1 g에 각각 2.5 N HCl과 3.0 N NaOH을 100 mL 가해 0.5, 1, 2, 3, 6, 9 시간동안 환류 추출 후 중화하여 여과시켰다. 이 여과액을 1,000 dalton(Da) 투석막(Viskase Sales Co., Japan)을 사용하여 투석한 후 내액을 농축, 동결 건조하여 ACE 활성 저해능을 비교 검토하였다.

농도에 따른 산 가수분해

분쇄한 시료 1 g에 HCl의 농도를 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 N로 달리하여 30분간 환류한 후 중화, 여과, 투석(molecular size : 1 kDa, Viskase Sales Co., Japan), 농축, 동결 건조하여 ACE 활성 저해능을 비교 검토하였다.

ACE 활성 저해물질의 추출 및 정제

김 450 g을 분쇄하고 여기에 20배 부피의 2.5 N HCl을 가해 30 분간 환류 추출, 원심분리한 후 얻은 가수분해물(PY-0)을 분자크기 3 kDa 및 5 kDa의 여과막(Milipore

Co., USA)을 사용하여 3 kDa이하의 PY-1, 3 kDa이상 5 kDa이하의 PY-2, 5 kDa이상의 PY-3을 조제하였다. 이들 중 ACE 저해활성이 가장 높았던 획분을 농축하여 증류수로 평형화된 Amberlite XAD 8 column(4×39 cm)에 주입하고 메탄올 30, 70, 100% 순으로 용출시켜 PY30, PY70, PY100으로 분리하였다. Affinity chromatography에 의하여 얻어진 활성획분을 DEAE-Toyopearl 650C column(Cl⁻ form, 3.3×36.5 cm)에 흡착시키고 증류수, 0.5, 1, 1.5, 2 M NaCl의 순서로 용출하여 ACE 저해능을 나타낸 증류수 용출획분으로부터 세가지 획분을 분리하였다. 이들 중 가장 높은 ACE 저해활성을 나타낸 획분을 증류수로 평형화된 Sephadex LH-20 column(1.5×88 cm)에 주입한 후 0.2 mL/min 유속으로 0%에서 50% 메탄올까지 linear gradient로 용출시켜 세 획분을 얻었다. 이어서 활성획분을 0.05% TFA로 평형화된 C₁₈ column(3.9×150 mm, Symmetry C₁₈)에 주입한 후 HPLC(Waters 2690, Waters Associates, USA)를 실시하여 5가지 peak으로 분리하였다. HPLC에서 분리된 peak의 순도는 high performance capillary electrophoresis(HP³⁰ CE, Hewlett-Packard Co., USA)에 의하여 확인하였다(16). Fig. 1은 김으로부터 ACE 저해활성 물질의 추출 및 정제과정을 나타낸 것이다.

ACE 저해활성 측정

ACE 저해활성은 Cheung과 Cushman(17)의 방법을 변

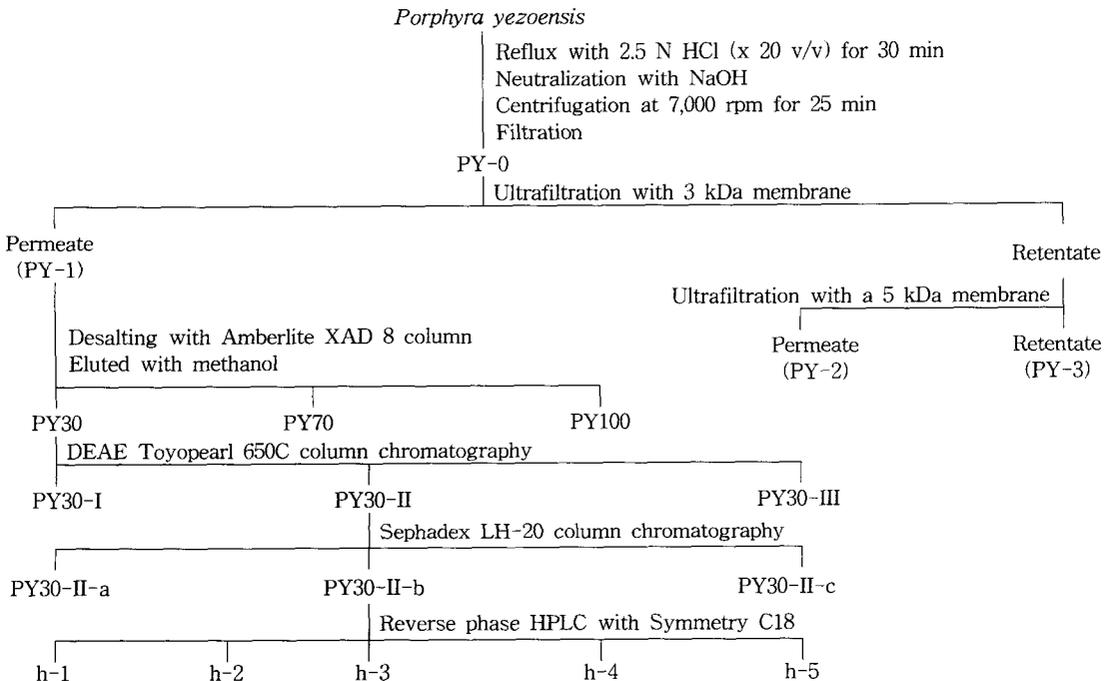


Fig. 1. Extraction and purification scheme of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors from *Porphyra yezeensis*.

형하여 측정하였다. 기질(Hip-His-Leu) 0.1 mL과 시료 0.5 mL의 혼합액을 37°C에서 5분간 반응시킨 후 ACE 효소액 0.15 mL을 첨가하여 1시간 재반응시킨 다음 0.5 N HCl(250 µL)을 사용하여 반응을 정지시켰다. 여기에 에틸아세테이트 1.5 mL을 가한 후 2,800 rpm에서 10분간 원심 분리시켜 상등액 0.5 mL을 취하였다. 이 상등액을 oil bath 140°C에서 15분간 건조하여 1 M NaCl(3 mL)로 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의해 ACE 저해율을 측정하였다. 공실험은 시료용액 대신 증류수 50 µL를 사용하였으며 대조구는 HCl을 가한 후 효소액을 가하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{E_c - E_s}{E_c - E_b} \times 100$$

E_c : 시료대신 증류수 첨가시의 흡광도

E_s : 시료첨가시의 흡광도

E_b : 반응정지 후 시료 첨가시의 흡광도

ACE에 대한 저해 양상

ACE에 대한 정제 시료의 저해 양상을 알아보기 위하여 기질의 농도를 달리하면서 시료를 10, 20 µg씩 첨가하여 ACE 저해활성을 측정하고 Lineweaver-burk plot(18)을 그려 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하였다.

분자량 측정

김으로부터 정제된 ACE 저해물질의 분자량은 HPLC(Waters 2690, Waters Associates, USA)를 이용하여 측정하였다. Column은 0.25 M NaCl을 함유한 0.02 M phosphate buffer(pH 7.2)로 평형화된 Superdex Peptide HR 10/30 column(10×300 mm, Pharmacia Biotech Co., Sweden)을 사용하였으며, ACE 저해물질을 주입한 후 동일 buffer를 0.25 mL/min의 유속으로 용출시키고 photodiode array detector(Waters Associates, USA)로 분석하였다. 표준시료는 chymotrypsin A, cytochrome c, aprotinin, bradykinin, glycine을 사용하였다.

아미노산 분석

ACE 저해물질의 아미노산조성 분석은 정제물질에 6 N HCl을 가하여 110°C에서 24시간 가수분해하여 phenylisothiocyanate(PITC) 유도체를 생성시킨 후 PICO-tag free amino acid analysis column(3.9×300 mm, Waters Associates, USA)이 장착된 HPLC(Waters 510, Waters Associates, USA)를 사용하여 실시하였다(19). 이때 column온도는 40°C로 고정하여 1.0 mL/min 유속으로 6% acetonitrile을 함유한 140 mM sodium acetate buffer에서 60% acetonitrile 용액까지 linear gradient로 용출시키고 photodiode array detector를 사용하여 254 nm에서

흡광도를 측정하여 분석하였다.

단백질 정량

단백질은 표준물질로서 bovine serum albumin(BSA)을 사용하여 bicinchoninic acid(BCA) 방법(20)에 의해 정량하였다. 즉, 1% BCA-Na₂CO₃, 0.16% Na₂-tartrate, 0.4% NaOH, 0.95% NaHCO₃로 조성된 시약 A와 4% CuSO₄ 용액인 시약 B를 50:1(v/v)로 섞어 조제된 반응시약 200 µL를 시료가 함유된 용액 800 µL에 첨가한 후 상온에서 5분간 반응시키고 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 단백질의 양을 계산하였다.

결과 및 고찰

산·알칼리 가수분해물의 ACE 저해활성

부작용과 독성이 없는 천연물로부터 ACE의 활성 저해물질을 찾기 위하여 70여종의 국내산 해조류를 예비검색한 결과 서천산 김으로부터 높은 ACE 저해능이 검출되었다(data not shown). 따라서 본 연구에서는 시료로서 김을 선정하여 산, 알칼리의 농도, 반응시간에 따른 ACE 저해활성을 비교하였다. 그 결과 2.5 N HCl으로 30분간 가수분해한 물질이 가장 높은 ACE 저해효과(53.8%)를 나타내었다(Table 1).

김(*Porphyra yezoensis*) 산가수분해물로부터 ACE 저해물질의 분리

분쇄한 김 450 g을 2.5 N HCl로 100°C에서 30분간 환류하여 가수분해를 실시한 후 효과적인 ACE 활성 저해물질의 분리를 위하여 가수분해물을 3 kDa와 5 kDa으로 한외여과를 실시하였다. 그 결과 분자량 3 kDa 이하의 물질(PY-1, 11.8 g), 분자량 3 kDa 이상, 5 kDa 이하인 물질(PY-2, 6.4 g) 및 분자량 5 kDa 이상인 물질(PY-3, 20.6 g)로 분리하였다. 이들 획분 중 PY-1이 상대적으로 높은

Table 1. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of acid or alkali hydrolyzates from *Porphyra yezoensis* in the different time periods and concentrations

Time (h)	ACE inhibitory activity (%)		Concentration (N)	ACE inhibitory activity (%)
	HCl ¹⁾	NaOH ²⁾		HCl ³⁾
0.5	49.2	6.2	0.5	13.7
1	17.6	3.2	1.0	29.4
2	12.0	1.1	1.5	34.3
3	2.4	2.4	2.0	50.0
6	1.9	4.7	2.5	54.4
9	2.4	5.1	3.0	48.8

¹⁾0.1 N HCl.

²⁾0.025 M NaOH.

³⁾Hydrolysis for 30 min.

ACE 저해 활성(56.7%)을 나타내었다(Table 2). 따라서 김 산 가수분해물로부터 분리한 ACE 활성저해물질은 분자량 3 kDa이하의 저분자물질임을 알 수 있었다.

높은 저해활성을 보인 PY-1 획분은 중화과정에서 생성된 과량의 염을 함유하고 있기 때문에 염제거와 흡착획분, 비흡착획분의 분리하고자 Amberlite XAD 8 column에 흡착시켜 30, 70, 100% 농도의 메탄올로 순차적으로 용출시킨 결과, Table 2에서와 같이 30% 메탄올 용출획분(PY30)이 83.3%의 높은 ACE 저해활성을 나타내었다. 활성과 수율이 모두 높은 PY30 획분을 증류수로 평형화된 DEAE-Toyopearl 650C column(3.3 × 36.5 cm)에 흡착시킨 후 증류수, 0.5 M, 1 M, 1.5 M, 2 M NaCl의 순서로 용출하여 투석한 후 ACE 활성 저해능을 측정된 결과 증류수에서 용출된 비흡착획분에서 높은 ACE 저해활성을 보였기 때문에 1.6 mL/min의 유속으로 증류수를 용출하여 6 mL/tube로 비흡착획분을 분획하였다. 그 결과 PY30-I, PY30-II, PY30-III의 세가지 획분을 분리하였다. 또한 각 획분의 단백질 함량을 측정된 결과 가장 활성이 높은 PY30-II 획분이 91%이상으로(data not shown) 단백질 함량도 역시 가장 높았으므로 김 산 가수분해물의 ACE 활성 저해물질은 대부분 단백질 성분임을 알 수 있었다.

PY30-II 획분을 정제하기 위해 size exclusion, partition, adsorption 등의 분리 원리를 가지는 Sephadex LH-20 column을 선택하였다. 50% 메탄올로 평형화된 column에 PY30-II를 흡착시킨 후 0에서 50%까지 메탄올의 농도를 증가시키며 용출하였다. Fig. 2에서 보여주듯이 280 nm에서 PY30-II-a, PY30-II-b, PY30-II-c의 3가지 획분으로 분리하였다. 이 획분들의 ACE 활성 저해율은 각각 81.4, 87.1, 74.2%였다(Table 2). 기존에 보고된 ACE

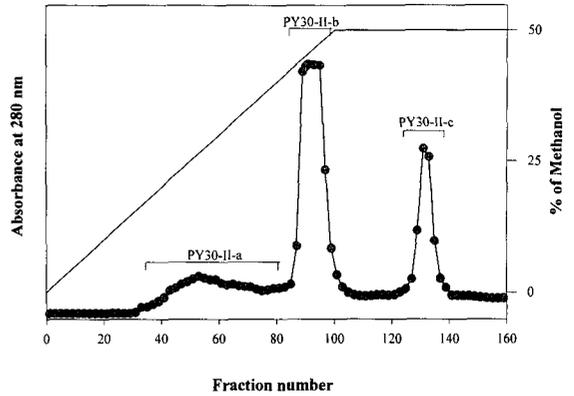


Fig. 2. Purification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor from *Porphyra yezoensis* by Sephadex LH-20.

The column (1.5×88 cm) was eluted by a linear gradient of 0~50% methanol. The flow rate of column was 0.2 mL/min and fractions of 2 mL was collected. Fractions were checked at 280 nm.

저해제들은 펩타이드의 C말단 부분에 phenylalanine, tryptophane, tyrosine와 같은 방향족 아미노산과 proline이 존재할 때 특이적으로 강한 저해능을 나타낸다는 보고(21)가 있기 때문에 방향족 아미노산의 흡수파장인 280 nm에서 가장 높은 흡광도를 갖고 활성도 가장 높은 PY30-II-b 획분을 모아 농축 동결건조하였다.

PY-30-II-b획분을 reverse phase HPLC column인 symmetry C₁₈으로 acetonitrile-0.05% TFA gradient를 사용하여 정제하였다. 그 결과 h1, h2, h3, h4, h5의 5개의 peak들로 분리되었다(Fig. 3A). 이들의 ACE 저해활성을 측정된 결과 h-5의 활성이 가장 높음을 알 수 있었다. 이 PY30-II-b-h5의 순도를 확인하기 위해 HPCE를 수행한 결과, 220 nm에서 20~30 mAU의 높은 흡광도를 보이며 단일한 peak으로 확인되었다(Fig. 3B). 또한 펩타이드는 보통 5분 이내에 용출되는데(22) PY30-II-b-h5도 1.706분에 용출되었으므로 정제된 물질이 순수한 펩타이드임을 확인할 수 있었다.

최종적으로 정제된 ACE 저해 펩타이드의 ACE 활성을 50% 저해하는데 필요한 저해제 양은 초기 가수분해물의 44.32 µg/mL에서 10.6 µg/mL로 약 4배의 정제도를 나타내었다(Table 3). 이 양은 기존의 보고된 enalapril (0.024 µg/mL), bradykinin(6.54 µg/mL)보다는 많았지만, EGCG(182 µg/mL)보다는 훨씬 적었다(23).

분자량 확인

HPLC system을 이용하여 0.25 M NaCl을 함유한 0.02 M phosphate buffer(pH 7.2)로 평형화된 Superdex Peptide HR 10/30 column(10×300 mm)에 정제 시료를 용출한 결과, PY30-II-b-h5는 약 580 dalton으로 아미노산 5~6개로 이루어진 저분자 펩타이드임을 알 수 있었다(Fig. 4).

Table 2. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of inhibitor extracted from *Porphyra yezoensis* by purification step

Fraction	ACE inhibitory activity (%)
Ultrafiltration	
PY-1 (< 3 kDa)	56.7
PY-2 (5 kDa > > 3 kDa)	19.1
PY-3 (> 5 kDa)	14.1
Amberlite XAD 8	
PY30	83.3
PY70	79.0
PY100	13.0
DEAE Toyopearl 650C	
PY30-I	76.3
PY30-II	87.3
PY30-III	66.1
Sephadex LH-20	
PY30-II-a	81.4
PY30-II-b	87.1
PY30-II-c	74.2

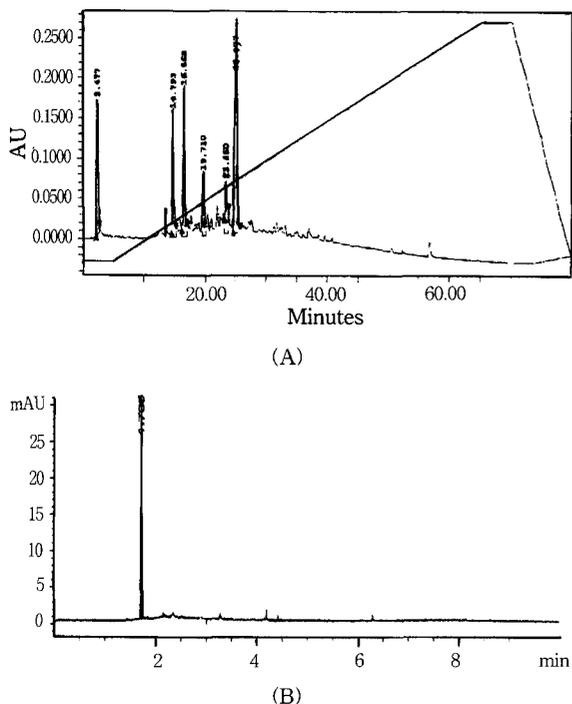


Fig. 3. HPLC profile (A) and electrophoretogram (B) of purified angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor from *Porphyra yezoensis*.

The HPLC analysis was carried out on a Waters 2690 instrument, using a PDA detector and a column (3.9 × 150 mm) of symmetry C₁₈ by gradient elution of 20% acetonitrile solvent. The high performance capillary electrophoresis (HPCE) conditions were: capillary length, 40 cm; injection, 40 mbar × 10 sec; detection, 220 nm; running, pH 8.6 of 20 mM borate buffer.

Table 3. Inhibition tendency of Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors extracted from *Porphyra yezoensis* by purification steps

Purification step	IC ₅₀ ¹⁾ (μg/mL)
Acid hydrolysis	44.32
Ultrafiltration	42.68
Amberlite XAD 8	16.75
DEAE-Toyopearl	11.89
Sephadex LH-20	10.78
HPLC	10.60

¹⁾IC₅₀ was defined as the concentration which inhibits 50% of angiotensin-I converting enzyme activity.

저해양상

정제된 시료가 ACE를 저해하는 양상을 알기 위해 기질의 농도와 시료의 농도를 달리하면서 Lineweaver-burk plot하여 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교한 결과 기질과 저해제가 효소와 같은 부위에 경쟁적으로 결합함으로써 효소의 활성부위에 요구되는 기질의 양을 증가시키는 경향을 나타내었다(Fig. 5). 이 결과로부터 김 산가수 분해물로부터 정제된 ACE 저해제는 효소를 경쟁적으로

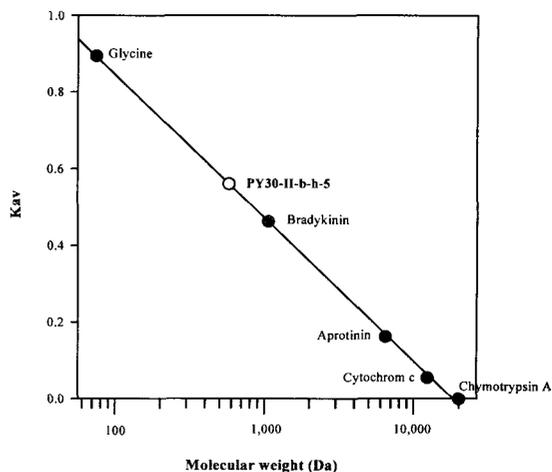


Fig. 4. Molecular mass determination of purified angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor from *Porphyra yezoensis*.

The standards were glycine (75 dalton), bradykinin (1,060 dalton), aprotinin (6,500 dalton), cytochrome c (12,400 dalton) and chymotrypsin A (25,000 dalton). The apparent molecular mass of PY30-II-b-h5 was 580 dalton.

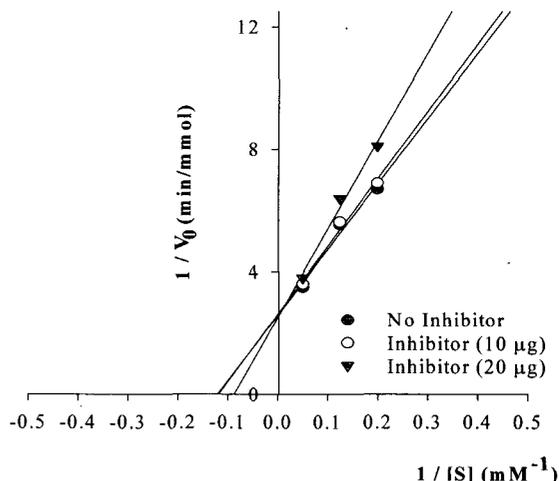


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for the inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE) by the purified inhibitor from *Porphyra yezoensis*.

저해함을 알 수 있었다. 또한 대부분 펩타이드성 저해제가 ACE에 대해 경쟁적 저해(24)를, phenolic 저해제가 비경쟁적 저해(11)를 하는 것으로 보고된 바와 일치하는 결과였다.

아미노산 조성

아미노산 조성을 분석한 결과 glycine 24.5%, arginine 56.8%, proline 18.8% 인 것으로 나타났다(Table 4). 분자량으로 계산한 결과 김의 산 가수분해물로부터 정제된 저해제는 glycine, arginine, proline이 각각 2, 2, 1개씩 약

Table 4. Amino acid composition of purified angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor from *Porphyra yezoensis*

	Amino acid	Content (%)
PY30-II-b-h5	Glycine	24.5
	Arginine	56.8
	Proline	18.8

5개의 아미노산으로 구성된 oligo펩타이드로 추정되었다. 이것은 정어리의 단백질 가수분해물에서 보고된 glycine-arginine-proline과 구성 아미노산이 일치하며, Cheung 등(25)의 C말단 잔기로서는 tryptophan, phenylalanine, tyrosine 및 proline을, N말단 잔기로는 valine과 isoleucine을 가지는 dipeptide가 높은 ACE 저해활성을 가진다는 보고에 의하면 저해제의 C말단이 proline일 가능성이 높았다.

요 약

본 연구는 70 여종의 국내산 해조류중 가장 높은 ACE 저해 활성을 보였던 김(*Porphyra yezoensis*, 서천)의 산 가수분해물로부터 ACE 활성 저해 펩타이드를 분리하여 그 특성을 조사하였다. ACE 저해물질의 분획은 균일하게 파쇄한 김을 2.5 N HCl로 산 가수분해한 후 중화하여 환의역과로 분자크기 3 kDa이하의 물질로 분리하였다. 분자크기 3 kDa이하의 물질에 대하여 column chromatography(Amberlite XAD 8, DEAE-Toyopearl, Sephadex LH-20)와 reverse phase HPLC(C₁₈)를 순차적으로 수행하여 ACE 저해제인 PY30-II-b-h5물질을 분리하였다. PY30-II-b-h5는 분자크기는 약 580 dalton으로 glycine(24.5%), arginine(56.8%), proline(18.8%)의 아미노산 조성을 갖는 저분자 펩타이드였으며, ACE의 저해양상은 경쟁적 저해작용을 하였고, IC₅₀ 값은 10.6 µg/mL이었다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 해양수산부 수산특정연구개발사업의 연구비지원에 의한 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y.: Inhibition of angiotensin-I converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 922-925 (1993)
- Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. and Ondetti, M.A.: Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme carboxyalkanoyl and mer-

- captoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, **16**, 5484-5491 (1977)
- Ondetti, M.A., Rubin, B. and Cushman, D.W.: Design of specific inhibitors of angiotensin. *Science*, **196**, 441-444 (1977)
- Webster, J. and Koch, H.F.: Aspects of tolerability of centrally acting antihypertensive drugs. *J. Cardiovascular Pharmacol.*, **27**, 549-554 (1996)
- Zuhair, H.A., Abd El-Fattah, A.A. and El-Sayed, M.: Pumpkin-seed oil modulates the effect of felodipine and captopril in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Res.*, **41**, 555-563 (2000)
- Matsubara, Y., Kumamoto, H., Iizuka, Y., Murakami, T., Okamoto, K., Miyake, H. and Yokoi, K.: Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in *Citrus unshiu* peelings. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 909-914 (1985)
- Yamamoto, Y.: Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopoly.*, **43**, 129-134 (1997)
- Emiko, K., Jun, Y. and Mamoru, K.: Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sause. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1107-1110 (1993)
- Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T.: Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea compound. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **61**, 803-808 (1987)
- Inoruchi, J., Okabe, H., Yamauchi, T. and Nagamaisu, A.: Inhibitors on angiotensin converting enzyme in crude drugs I. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3615-3619 (1984)
- Inoruchi, J., Okabe, H., Yamauchi, T., Nagamaisu, A., Nonaka, G.I. and Nishioka, I.: Inhibitors on angiotensin converting enzyme in crude drugs II. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 264-269 (1985)
- Kameda, K., Takaku, T., Okuda, H. and Kimura, Y.: Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin converting enzyme activity. *J. Natural Products*, **50**, 680-683 (1987)
- Noro, S., Sato, N., Sakurada, N., Fujita, N., Ishizaki, T., Kamimura, N., Yoshida, Y., Ono, T., Ohtomo, N. and Matsuda, Y.: Preliminary screening for antiviral AIDS drugs. II. Report on fiscal year 1989. *Eisei Shikenjo Hokoku*, **109**, 107-110 (1991)
- Collic, S., Fisher, A.M., Tapon-Brethaudiere, J., Boisson, C., Durant, P. and Jozefonvicz, J.: Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thromb. Res.*, **64**, 143-154 (1991)
- Tashiro, T.: Analysis of nucleic acid related substances dried purple laver. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 1121-1125 (1983)
- Fujii, T., Kawabe, S., Horike, T., Masana, T. and Ogata, T.: Simultaneous determination of the urinary metabolites of toluene, xylene and styrene using high-performance capillary electrophoresis - Comparison with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, **730**, 41-47 (1999)
- Cheung, H.S. and Chshman, D.W.: Spectrometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637-1648 (1971)
- Bush, K., Henry, P.R. and Slusarchyk, D.S.: Muraceins-muramyl peptides produced by *Nocardia orientalis* as angiotensin converting enzyme inhibitors. *J. Antibiotics*, **37**, 330-335 (1984)
- Lui, T.Y. and Chan, Y.H.: Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. *J. Biol. Chem.*, **246**, 2842-2848

- (1971)
20. Smith, P.K., Krphn, R.L., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85 (1985)
 21. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. : Structures and activity of angiotensin converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1313-1318 (1991)
 22. Piccoli, G., Fiorani, M., Biagiarelli, B., Palma, F., Vallorani, L., Bellis, R.D. and Stocchi, V. : High-performance capillary electrophoretic separation of proteins and peptides using a bonded hydrophilic phase capillary. *Electrophoresis*, **16**, 626-629 (1995)
 23. Ryuk, J.S. : Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Sinapis alba* L. *M.S. Thesis*, Korea University, Seoul (1998)
 24. Cho, S.J. : The inhibitory effect of squid hydrozate on angiotensin converting enzyme. *M.S. Thesis*, Korea University, Seoul (1994)
 25. Cheung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F. and Cushman, D.W. : Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **255**, 401-407 (1980)

(2000년 4월 27일 접수)