

산양유 Whey로부터 ACE 억제 Peptide의 분리 및 정제

이계준* · 김상범** · 류진수* · 신현수*** · 임종우*

경상대학교 농업생명과학대학 동물자원과학부, 농업생명과학연구원*,
농촌진흥청 축산연구소**, 남양유업 (주) 중앙연구소***

Separation and Purification of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides derived from Goat's Milk Whey Hydrolysates

K. J. Lee*, S. B. Kim**, J. S. Ryu*, H. S. Shin*** and J. W. Lim*

Division of Animal Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Gyeongsang National University; Institute of Agriculture & Life Sciences*,
Dairy Science Division, National Livestock Research Institute, RDA**,
Nam Yang Research & Development Center***

ABSTRACT

ACE-inhibitory peptides derived from goat's whey hydrolyzed by various proteolytic enzymes were separated and purified for antihypertension materials. The highest ACE-inhibitory activity of goat's whey hydrolysates was 85.5 % by pepsin for 72 hrs. Also the highest ACE-inhibitory activity of goat's whey hydrolysates was F-4 by pepsin for 72 hrs by Sephadex G-25 gel chromatograms. F-4e and F-4ed from F-4 by RP-HPLC to first and second purification were the highest in ACE-inhibitory activity, respectively. The most abundant amino acid was leucine(18.54 %) in F-4ed of ACE-inhibitory peptides after second purification. Amino acid sequence of F-4ed of ACE-inhibitory peptides showed Leu-Lys-Asp-Tyr-Gly-Gly-Val-Ser-Leu and Leu-Gly-Asp-Gly-Ala-Gly- Asp-Val-Ala-Phe. IC₅₀ calibrated in peptic hydrolysates(72 hrs), F-4, F-4e and F-4ed from goat's whey hydrolysates by pepsin for 72 hrs were 33.93, 28.75, 11.74 and 1.09 mg/ml, respectively. From the results of this experiment, goat's whey hydrolysate by pepsin was shown to have ACE-inhibitory activity.

(Key words : ACE-inhibitory peptide, Goat's milk whey, Proteolytic enzyme)

I. 서 론

최근 각종 성인병의 증가로 인해 식품단백질을 이용한 다양한 생리활성을 띄는 기능성 물질에 대한 관심이 고조되고 있다. Angiotensin converting enzyme inhibitors(ACE-I)는 순환기계 질병의 원인이 되는 동시에 뇌출혈, 심장병 및 신장병 등과 합병증으로 나타날 경우

치사율이 매우 높은 고혈압을 직접적으로 억제할 수 있는 물질로서 많은 연구 대상이 되어왔다.

식품내의 ACE 활성을 억제하는 인자들은 저분자 물질이다. 이는 열에 안정하며 체내에서 흡수가 용이하다. 이들의 활성 저해효과는 기존의 혈압강하제에 비해 낮은 활성을 가지고 있지만 섭취량이 대량인 측면과 식품이라는 안

Corresponding author : J. W. Lim, Division of Animal Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea. Tel : (055) 751-5415, Fax : (055) 751-5410, E-mail : limjw@nonage.gsnu.ac.kr

정적 측면에서 그 유용성이 기대된다(Shimizu, 1994). 이러한 식품내의 ACE 활성 억제 인자는 다양한 동물, 식물 및 어류의 단백질 가수분해물에 존재한다고 알려져 있다(Miyoshi 등, 1989; Kohmura 등, 1990; Miyoshi 등, 1991; Seki 등, 1993). 이들 성분은 천연성분이라는 측면에서 안정성은 높지만 ACE 저해 역가는 인공적으로 합성된 captopril 보다 낮다. 이러한 이유로 강력한 ACE 저해 능력을 가지는 천연물에 대한 탐색이 지속적으로 이루어지고 있다.

이들 천연물 중 동물의 유즙에서 유래되는 펩타이드도 ACE 저해 활성을 가진다. 특히 우유단백질을 이용한 ACE 저해 펩타이드에 관해 활발하게 연구되고 있는 실정이다(Yamamoto 등, 1994; Yasunori 등, 1995; Mullally 등, 1997; 김 등, 2002; 이 등, 2002).

한편, 산양유 단백질은 우유 단백질보다 소화력이 우수하고 알러지나 설사 등의 부작용이 없는 것으로 알려져 있어 식품적인 가치가 부각되고 있으며, 산양유를 기질로 사용한 ACE 저해 펩타이드에 관한 연구는 Hernandez-Ledesma 등(2002)이 발표한 caprine whey에서 분리한 β -lactoglobulin 가수분해물의 펩타이드 fragments에서 ACE 저해 효과를 알아 본 연구가 있으나 산양유의 whey에서 유래된 가수분해물의 ACE 저해 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 산양유 whey 가수분해물로부터 ACE 저해 펩타이드를 분리하고 그 특성을 알아보기 위해 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료 및 처리

본 실험의 시료는 한국메디알(주)에서 판매하는 신선한 산양(Sannen 종) 유를 4 °C, 4,000 × g에서 25 분간 원심분리하여 지방을 제거한 후 사용하였다.

가수분해 효소로는 Novo社 (Denmark)의 pancreas trypsin과 *Bacillus subtilis* 유래의 Neutrase

0.8, Amano社(Japan)의 *Carica papaya* 유래의 Papain W-40과 *Bacillus stearothermophilus* 유래의 Protease S 및 porcine 유래의 pepsin(1:10,000; Junsei, Japan)을 사용하였다.

2. 산양유 whey의 분리 및 가수분해물의 제조

산양유 whey의 분리는 Sofia와 Malcata(2000)의 방법에 따라 실시하였다. 산양유 whey 가수분해물의 제조는 Adamson과 Reynolds(1996)의 방법을 변형하여 산양유 whey를 50 °C로 조절한 다음 Enzyme:Substrate(E:S)의 비를 1:100 (wt/wt; 단백질 기준)으로 가수분해 효소를 각각 첨가하였다. 가수분해 시간은 비효소 처리군은 0 시간, 효소 처리군으로는 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 60 및 72 시간으로 하였으며, 각 시간대별 가수분해물은 90 °C에서 5 분간 열처리에 의해 불활성화 시켰다. 효소와 반응된 각 가수분해물은 원심분리(12,000 × g)에 의해 상등액만을 취하여 다음 분석 전까지 -20 °C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 가수분해도 및 단백질 정량

효소의 반응시간에 따른 산양유 whey의 가수분해도는 TNBS 법(Adler-Nissen, 1986)에 의해 측정되었다. 또한 가수분해물과 분획의 단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 측정하였다.

4. ACE 저해능 및 IC₅₀의 측정

ACE 저해능의 측정은 Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 변형하여 실시하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 5 mM HHL(Hip-Hip-Leu)을 녹인 기질 200 μ l에 가수분해액 10 μ l를 가한 후 37 °C에서 5 분간 반응시켰다. 여기에 ACE 효소액(Sigma Co., A6778, rabbit lung acetone powder) 20 μ l를 가하고 다시 37 °C에서 90분 동안 반응시킨 후 1 N HCl 250 μ l를 사용하여 반응을 정지시켰다. 반응용액에 ethyl ace-

tate 2 ml를 가하여 15 초간 교반 한 다음 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상징액 1.8 ml를 취하였다. 이 상징액을 speed vacuum concentration(MAXI-DRY PLUS, Heto-Holten A/S., Denmark)으로 완전히 건조시킨 후, 증류수를 0.5 ml를 가하여 용해시킨 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하며 다음 식에 의하여 ACE 저해율을 계산하였다.

ACE 저해율 (%) =

$$\frac{\{(Ec - Ecb) - (Es - Esb)\}}{(Ec - Ecb)} \times 100$$

Ec = 시료대신 증류수 첨가시의 흡광도

Ecb = 반응정지 후 증류수 첨가시의 흡광도

Es = 시료 첨가 시의 흡광도

Esb = 반응정지 후 시료 첨가 시의 흡광도

ACE 저해능이 가장 높은 가수분해물과 분획의 IC₅₀(μg/ml) 측정은 Fuglsang 등(2002)의 방법에 의하여 실시하였다. 즉, 시료를 일정한 농도로 희석한 후에 ACE 저해율을 측정한 다음 ACE 활성을 50% 저해하는데 필요한 ml 수를 펩타이드 양(μg)으로 나타내었다. 펩타이드 양(μg)은 Lowry 등(1951)의 방법에 준하여 측정하였다.

5. Gel filtration chromatography

ACE 억제 peptide의 분리는 Maruyama 등(1985)의 방법에 따라 분리하였다. 효소별 산양유 whey 가수분해물 중 ACE 저해효과가 가장 높은 가수분해물을 동결 건조하여 농축한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하였고, 농축된 가수분해물 5 ml를 증류수로 평형화시킨 Sephadex G-25 column(2.5 × 50 cm)에 0.2 ml/min의 유속으로 증류수를 이용하여 용출시켜 2 ml씩 각각 분취하였다. 각 분획은 280 nm에서 흡광도를 측정하였고 분획 각각에 대한 ACE 저해능을 측정하였다.

6. RP-HPLC

RP-HPLC에 의한 정제는 Pihlanto-Leppälä 등

(2002)의 방법으로 실시하였다. 시료를 0.2 μm syringe filter(Advantec MFS, Inc., Japan)로 여과한 후 5% acetonitrile로 평형화 시킨 C18 column(4.6 × 250 mm)과 autosampler가 장착된 RP-HPLC(ASI 100, Dionex Co., USA)에 의해 분취하였다. 이동상으론 5~45%의 acetonitrile을 사용하여 5분 동안 0%, 10분 동안 10% 다시 10분 동안 25%, 마지막 20분 동안 60%의 step-wise gradient로 45분간 분취한 다음 분취된 분획의 ACE 저해능을 측정하였다.

7. 아미노산 조성 및 아미노산 염기 서열

ACE 저해 peptide의 아미노산 조성은 Moore 등(1958)의 방법에 따라분석하였다. 시료 0.1~0.2 mg 정도에 6N HCl을 가하고 진공 밀봉하여 110 °C에 24 시간 가수분해하였다. 가수분해 후 시료를 speed vacuum concentration(MAXI-DRY PLUS, Heto-Holten A/S., Denmark)으로 감압, 농축하여 HCl을 제거하고, pH 2.2의 sodium citrate loading buffer로 희석한 후 0.2 μm syringe filter(Advantec MFS, Inc., Japan)로 여과한 다음 amino acid analyzer(Biochrom 20, Pharmacia, Sweden)를 이용하여 분석하였다. 정제된 ACE 저해 peptide의 아미노산 염기서열 분석은 자동화 된 protein sequencer(962592A, Perkin-Elmer, USA)로 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 가수분해율

상업적 효소에 의한 산양유 whey의 가수분해율은 Fig. 1에서 나타내었다. 산양유 whey 가수분해물은 각 효소의 기질 특이성에 따라 16.7~34.3%로 다양한 가수분해율을 보였다. 모든 효소의 가수분해율은 가수분해 시작 후 8시간 동안 급격하게 증가한 다음 종료 때까지 점차적으로 증가하였다. 모든 효소 가수분해물에 있어서 72 시간 가수분해한 결과 trypsin이 가장 높게 나타난 반면 papain W-40이 가장 낮은 가수분해율을 나타내었다. 본 실험의 결과 동

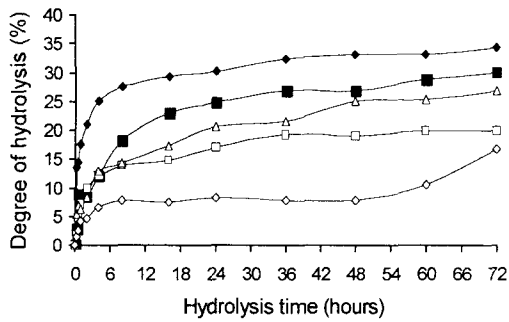


Fig. 1. Degree of hydrolysis of goat's whey by commercial proteases.

Legend : Trypsin (◆), Papain W-40 (◇), Protease S (■), Neutrase 0.8 (□) and Pepsin (△).

물성 효소인 trypsin에서 가수분해율이 높게 나타났는데 이는 trypsin이 단백질의 lysine과 arginine의 carboxyl group을 연결하는 펩타이드 결합에 아주 강한 기질 특이성이 있어 가수분해가 잘 일어난다는 Otte 등(1997)과 Monti와 Jost (1978)의 보고와 거의 유사한 경향을 나타내었다.

2. ACE 억제 활성

Fig. 2는 효소 가수분해에 따른 산양유 whey 가수분해물의 ACE 저해능력을 나타낸 것이다. Pepsin에 의해 72 시간 동안 가수분해된 가수분해물이 85.5%로 가장 높게 측정되었고 trypsin은 72 시간에 66.3%, neutrase 0.8은 60 시간에 65.6%, protease S는 72 시간에 64.5% 그리고 papain W-40은 48 시간대에 32.8%의 순으로 나타났다. 전체적인 ACE 저해율 패턴을 살펴보면, 가수분해 전의 산양유 whey는 저해율을 나타내지 않았고 trypsin과 papain W-40은 대체적으로 가수분해 초기 (0.25 시간)에 ACE 저해율이 급격히 증가한 후 2~4 시간 이후에는 시간이 경과하여도 유기적인 변화를 나타내지 않았으나 pepsin, neutrase 0.8은 가수분해도와 마찬가지로 서서히 증가되는 경향을 나타내었다. Neutrase 0.8에 의해 가수분해된 가수분해물의 경우 처리

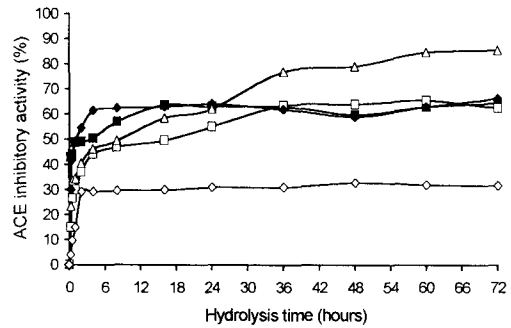


Fig. 2. ACE-inhibitory activities of goat's whey hydrolysates by commercial proteases.

Legend : Trypsin (◆), Papain W-40 (◇), Protease S (■), Neutrase 0.8 (□) and Pepsin (△).

60 시간 이후에는 저해율이 감소하는 경향을 나타내었다. 본 실험의 결과 가수분해율과 ACE 저해 능력의 관계는 반드시 가수분해율이 증가함에 따라 ACE 저해능력이 증가하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 ACE 저해에는 ACE 저해 능력을 가진 특이한 서열의 ACE 저해 펩타이드가 있으며 그 이상으로 가수분해 되었을 때에는 저해능력을 소실하는 것으로 생각된다.

3. ACE 억제 peptide의 분리 및 정제

Pepsin 가수분해물(72 시간)은 gel filtration에 의해 5개의 분획이 나타났다. F-4 분획에서 90.4%로 ACE 저해율이 가장 높았다(Fig. 3). Fig. 4는 gel filtration에 의해 분취된 F-4의 분획 내 ACE 저해 펩타이드를 분리, 확인하기 위해 C18 column이 장착된 RP-HPLC를 사용하여 linear gradient로 정제한 결과이다. 모두 6개의 분획으로 나누어 각 분획의 ACE 저해 효과를 측정한 결과 F-4e(90.1%)에서 저해능이 가장 높게 나타났다. 그 다음 purity를 높이기 위해 F-4e를 다시 정제하기 위해 동일한 C18 column 하에서 RP-HPLC에 의해 정제한 결과 Fig. 5의 chromatogram과 같이 나타났으며 각 분획별로 ACE 저해 효과를 측정한 결과 F-4ed에서 93.3%로 저해능력이 가장 높게 나타났다.

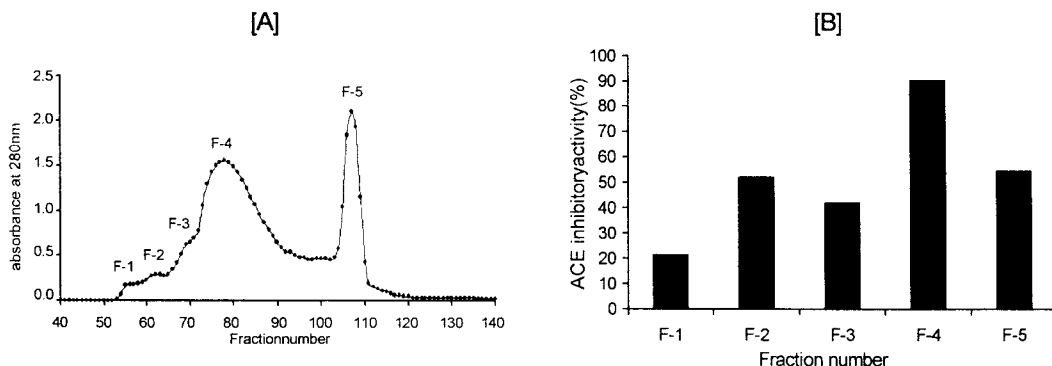


Fig. 3. Sephadex G-25 gel chromatograms of the goat's whey hydrolysates at 72 hrs by pepsin [A] and ACE-inhibitory activities of the collected fractions from the Sephadex G-25 gel chromatograms [B].

Legend : F-1 (tube no. 51-58), F-2 (tube no. 59-65), F-3 (tube no. 66-70), F-4 (tube no. 71-97) and F-5 (tube no. 98-120).

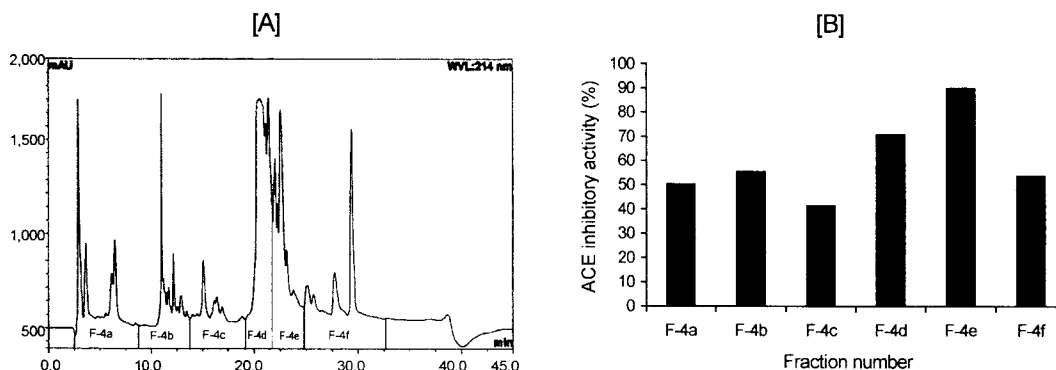


Fig. 4. The first fractionation by RP-HPLC of the most active fraction (F-4) obtained by Sephadex G-25 gel chromatography from goat's whey hydrolysates by pepsin at 72 hrs [A] and ACE-inhibitory activities of the collected fractions by the first fractionation [B]. Fractions were termed with F-4a to F-4f followed by a number, respectively.

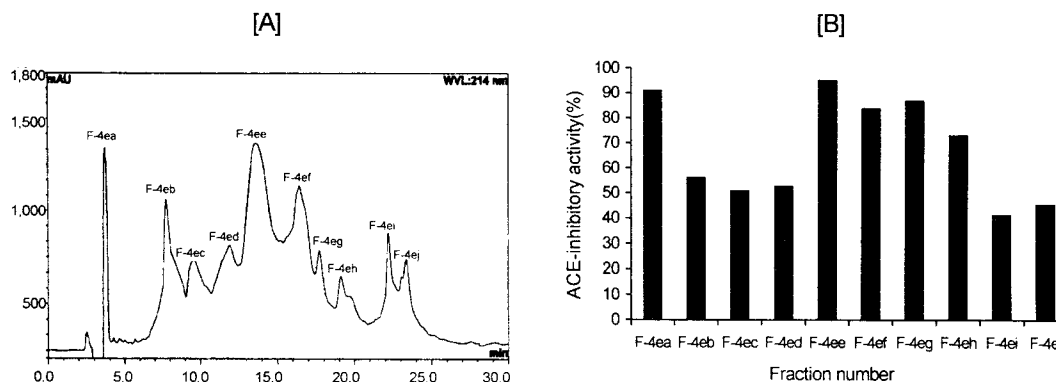


Fig. 5. The second fractionation by RP-HPLC of the most active fraction (F-4e) obtained by the first RP-HPLC from goat's whey hydrolysates by pepsin at 72 hrs [A] and ACE-inhibitory activities of the collected fractions by the second fractionation [B]. Fractions were termed with F-4ea to F-4ej followed by a number, respectively.

4. 아미노산 조성 및 아미노산 염기 서열

Table 1은 산양유 whey의 pepsin 가수분해물에서 유래된 ACE 저해능력이 우수한 분획인 F-4ed의 아미노산 조성을 나타내었다. 아미노산 분석 결과 leucine이 약 18.58%로써 가장 많이 함유되어 있으며, ACE 저해 활성에 관여하는 아미노산 잔기로 알려진 Leu, Asp, Glu, Cys 및 Lys 등이 전체 아미노산의 약 76.59%를 차지하였다. 본 실험의 결과 F-4ed에는 ACE 저해 활성에 관여하는 잔기가 풍부하게 포함되어 있는 것으로 나타났다.

F-4ed의 아미노산 염기 서열을 측정된 결과 Leu-Lys-Asp-Tyr-Gly-Gly-Val-Ser-Leu 및 Leu-Gly-Asp-Gly-Ala-Gly-Asp-Val-Ala-Phe가 나타났는데 이는 α -lactalbumin과 lactoferrin에서 유래된 것으로 보인다. Pihlanto-Leppälä 등 (2002)은 bovine α -lactalbumin의 trypsin 가수분해물인 Try-Gly-

Table 1. Amino acid composition of ACE-inhibitory peptides derived from goat's whey hydrolysates by pepsin

Amino acids	ACE-inhibitory peptides
Asp	13.68
Thr	2.56
Ser	1.72
Glu	13.94
Pro	1.10
Gly	0.88
Ala	2.50
Cys	14.97
Val	2.37
Met	0.50
Ile	3.20
Leu	18.58
Tyr	3.70
Phe	4.54
His	0.23
Lys	15.42
Arg	0.11
Total Mol. Ratio (%)	100.00

Ala가 ACE 저해 활성을 나타내며, bovine β -lactoglobulin의 trypsin 가수분해물에서도 Leu-Ala-Met-Ala, Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg 및 Val-Phe-Lys가 ACE 저해 활성을 나타낸다고 보고하였다. 뿐만 아니라 α -lactalbumin에 trypsin 처리 후 pepsin 처리에 의해 획득한 Leu-Ala-His-Lys-Ala-Leu도 ACE 저해 활성을 나타낸다고 보고 하였다(Pihlanto-Leppälä 등, 1998).

5. IC₅₀

산양유 whey 가수분해물로부터 ACE 저해 peptide의 분리 및 정제에 있어 각 단계별 IC₅₀은 72 시간 pepsin으로 가수분해한 가수분해물, F-4, F-4e 및 F-4ed은 각각 33.93, 28.35, 11.74 및 1.09 μ g/ml로 나타났다. 본 실험의 결과 pepsin 가수분해물과 F-4에 비해 F-4e와 F-4ed에서 상당히 높은 IC₅₀을 나타내었는데 이는 가수분해물의 정제과정을 통해 ACE 저해 물질을 생산할 수 있을 것으로 생각된다.

IV. 요약

본 연구는 산양유 whey에 다양한 가수분해 효소를 처리한 가수분해물에서 ACE 억제 능력을 가진 peptide를 분리하기 위해 실시하였다. Pepsin 가수분해물(72 시간)에서 ACE 억제 능력이 가장 우수하였다(85.5%). Pepsin 가수분해물(72 시간)을 gel filtration과 RP-HPLC에 의해 분리하여 ACE 억제 능력을 측정된 결과 ACE 능력이 가장 우수한 최종 분획(F-4ed)에서 leucine(18.54%)이 가장 풍부하게 존재해 있었으며 아미노산 염기서열은 Leu-Lys-Asp-Tyr-Gly-Gly-Val-Ser-Leu과 Leu-Gly-Asp-Gly-Ala-Gly-Asp-Val-Ala-Phe의 염기서열인 것을 확인하였다. 따라서 본 실험의 결과 pepsin 처리한 산양유 whey 가수분해물에서 ACE 억제 능력이 우수하였으며, 향후 본 실험에서 분리된 ACE 저해 활성을 갖는 펩타이드를 대량 합성한 다음 *in vivo* test를 실시하여

산업화 방안을 강구하여야 할 것으로 생각된다.

V. 인 용 문 헌

1. Adamson, N. J. and Reynolds, E. C. 1996. Characterization of casein phosphopeptides prepared using *alcalase*: Determination of enzyme specificity. *Enzyme Microb. Tech.* 19:202.
2. Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, New York, USA.
3. Cushman, D. W. and Cheung, H. S. 1971. Spectrophotometric assay and of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20:1637.
4. Fuglsang, A., Nilsson, D. and Nyborg, N. C. B. 2002. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Appl. Environ. Microb.* 68:3566.
5. Hernandez-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M. and Amigo, L. 2002. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.* 12:805.
6. Kohmura, M., Nio, N. N. and Ariyoshi, Y. 1990. Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptide fragment of human k-casein. *Agric. Biol. Chem.* 54:835.
7. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
8. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H. 1985. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49:1405.
9. Miyoshi, S., Ishikawa, H. and Tanaka, H. 1989. Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from ficus carica. *Agric. Biol. Chem.* 53:276.
10. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. 1991. Structure and activity of angiotensin converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 55:1313.
11. Monti, J. C. and Jost, R. 1978. Enzymatic solubilization of heat-denatured cheese whey protein. *J. Dairy Sci.* 61:1233.
12. Moore, S., Spackman, D. H. and Stein, W. H. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed. Proc.* 17:1107.
13. Mullally, M. M., Meisel, H. and FitzGerald, R. J. 1997. Identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide corresponding to fragment of bovine beta lactoglobulin. *FEBS Lett.* 402:99.
14. Otte, J., Zakora, M., Qvist, K. B., Olsen, C. E. and Barkholt, V. 1997. Hydrolysis of bovine β -lactoglobulin by various protease and identification of selected peptides. *Int. Dairy J.* 7:835.
15. Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. and Korhonen, H. 2002. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *J. Dairy Res.* 67:53.
16. 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.
17. Seki, E., Osajima, K., Matsui, T. and Osajima, Y. 1993. Separation and purification of angiotensin converting enzyme inhibitors peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 40:783.
18. Shimizu, M. 1994. Bioactive peptides from bovine milk proteins. *Paperat Animal Secretions in 24th International Dairy Congress.* Melbourne Sept. p. 18.
19. Sofia, V. S. and Malcata, X. 2000. Comparative catalytic activity of two proteinases upon caprine caseins in solution. *Food Chem.* 71:207.
20. Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77:917.
21. Yasunori, N., Yamamoto, N., Sakai, K. and Takano, T. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to

- Angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.* 78:1253.
22. 김동운, 인명민, 정석근, 함준상, 김현수, 채현석, 안종남, 김용곤, 윤상기. 2002. 우유단백질 유래의 Angiotensin-I converting enzyme 저해 펩타이드. *한국유가공기술과학회지.* 20:9.
23. 이정희, 오세종, 임광세, 신정걸, 허철성, 백영진. 2002. 상업용 단백질 분해 효소로 부분 가수분해된 유단백질의 특성. *한국유가공기술과학회지.* 20:110. (접수일자 : 2004. 12. 10. / 채택일자 : 2005. 1. 18.)