

해양에서 분리한 *Bacillus* sp. RH-5에 의한 사람 Low Density Lipoprotein(LDL) 산화에 대한 항산화제의 개발

류병호[†] · 박종옥* · 김동석

경성대학교 식품공학과
*화학과

Discovery of Antioxidant on Human Low Density Lipoprotein (LDL) by *Bacillus* sp. RH-5 Isolated from Marine Origin

Beung-Ho Ryu[†], Jong-Ok Park* and Dong-Suk Kim

Department of Food Science and Biotechnology
*Department of Chemistry Kyung Sung University

Abstract

The aims of this studies were carried out to investigate the antioxidant activity on low density lipoprotein(LDL) using substances extracted from *Bacillus* sp. RH-5.

The antioxidative substances produced extracellular in the culture broth by *Bacillus* sp. RH-5 was obtained by elution of chloroform : methanol from silicagel column (80cm×100cm) chromatography. Band 4 eluted from fraction 3 by TLC was appeared at highest level of antioxidative activity using thiocyanate method. Band 4 at a concentration of 100 or 200 μ g/ml inhibited oxidation of LDL induced by the mouse transformed macrophage.

According to IR, NMR or GC/MASS, the antioxidant substance was identified as 5-hydroxyindole.

Key words : Antioxidant activity, Low density lipoprotein, Hydroxyindole

서 론

순환기계 질환은 미국과 서유럽에서 사망 원인의 제 1위를 차지할 만큼 사망의 주 요인이 된다. 우리나라도 식생활이 서구화 되면서 동맥경화, 심근경색, 심장마비 등의 뇌혈관계 질환, 뇌졸중 및 말초 혈관계 질환등 혈액 순환기계 질환이 날로 증가하고 있어 이를 예방하려면 이의 원인으로 알려진 혈관계의 LDL의 산화로 인한 cholesterol ester

로 변하는 지방층(fatty streak)의 축적을 막아야 한다. 혈액중의 LDL은 cholesterol ester의 운반체로서 그 조성은 3~5% triacyl-glyceride, 40~44% cholesteryl ester, 20~24% phospholipid, 9~10% cholesterol 및 20~26% apolipoprotein으로 구성되어 있다[21]. LDL이 산화되어 산화 LDL (Oxid LDL)이 되면 *in vivo*에서 동맥경화를 일으키며[2] 혈청중의 LDL이 산화되면 성인병이 일어난다는 것은 이미 알려진 사실이다[13]. LDL이 금속이온, macrophage

[†] Corresponding author

등에 의하여 산화되면 cholesterol ester이 증가하여 유해산소, 자유기 및 과산화물이 생성되어 동맥경화 등을 유발한다[20]. 동맥경화의 첫단계는 과산화지질 및 cholesterol이 macrophage로서 동맥의 내피 세포에 축적되어 거대 거품세포(foam cells)가 형성되며 이 과정에서 이들 일부 세포는 사멸되고, 이 거대한 거품세포가 점차 많아지면서 지방층(fatty streak)이 동맥 주위에 쌓여 동맥경화증이 일어나게 된다[10-12,17,24]. 최근에 와서 이 거품세포의 생성원인은 지방층중 Oxid LDL이 원흉물질로서 Oxid LDL은 높은 세포 독성이 있는 aldehyde 등의 지질의 과산화물이 생성되고, 세포조직에 확산되어 독성을 나타낸다[17]. Oxid LDL은 생리활성 물질을 분해하고, 내피세포에 염증을 일으켜 혈전 및 칼슘 침착으로 결국에는 동맥경화를 유발하게 된다. 따라서 동맥의 원인의 하나로 알려진 LDL의 산화를 방지하기 위하여 항산화제가 필요하다. 지질의 과산화 방지와 LDL의 산화를 방지하는 항산화제로 BHT, BHA 및 probucol 등이 많이 사용되고 있으나 화학적 합성품으로 생체효소의 활성을 억제하고 암을 유발한다는 보고가 있어 대부분의 항산화제는 거의 모두 인체에 독성을 나타내어 사용규제를 받고 있다[27]. 반면에 천연 항산화제로 이용되고 있는 비타민인 dl- α -tocopherol 및 vitamin C 등은 항산화 효과가 낮고, 가격이 상대적으로 비싼 단점이 있다[16]. 그러므로 항산화능이 우수하고 인체에 무해하고 저렴한 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구된다. 수산물로부터의 항산화제에 대한 연구로는 일본의 경우 1980년대 해안에 생육하는 21종의 해조류 등에서 항산화력이 있는 phospholipids를 분리하였고 또 36종의 해조류 중 *Rhodospira* 속과 *Polysiphonia*속에서 5-bromo 3,4-hydroxybenzaldehyde라는 활성이 뛰어난 새로운 항산화제를 분리하였다[6]. 우리나라에서는 수산자원의 항산화제 연구는 동해안에서 생산되는 톳, 다시마, 미역 등 12종류의 해조류를 채취하여 항산화성 물질을 동정한 바 있고[4] 오징어 먹즙, 불가사리, 성게 껍질, 우렁쉥이 껍질 및 비식용 해조류를 연구하였다. 또 파래, 고리메, 다시마, 넓미역, 방사무늬김 및 등우리서실 등 12종의 식용 해조류에서 천연 항산화제에 대한 연구가 있을 뿐[18], 미생물에 의한 항산화제에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 미생물의 대사산물을 대상으로 한 생리활성물질은 1940년 Chain 등이 penicillin을 발견한 이래 미생물로부터 생리활성 물질에 대한 연구가 시작

되었다[3]. 최근에는 미생물유래 의약품, 식품첨가물, 및 생리활성 물질을 분리 정제하고 그 구조를 분석하여 대량생산을 하기위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 미생물로부터 항산화제에 대한 연구는 penicillin[3,9], fungi[1], yeast [19,23], bacteria[7] 및 marine bacteria[25]등으로부터 항산화 효과가 우수한 성분이 있는 것으로 알려지고 있어 미생물로부터 항산화제의 개발은 바람직한 연구라 할 수 있다.

본 연구는 부산 인근 연안에서 항산화 활성이 우수한 균주를 분리동정 한바 있으며 항산화 활성이 강한 *Bacillus* sp. RH-5로부터 LDL에 대한 항산화 활성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 실험 방법

재료

해수에서 분리한 *Bacillus* sp. RH-5를 사용하였다[22].

용매에 의한 항산화 성분의 추출

Bacillus sp. RH-5로부터 항산화 물질을 확인하기 위하여 배양액 일정량에 ethyl ether를 넣고 세포내 함유된 물질을 추출하기 위해 1시간 가량 더 진탕시킨 후 500ml 분액 깔대기로 옮겨 추출한 후 원심분리(10,000 rpm, 15min)한 다음 증발 농축기를 이용하여 저온에서 농축하고 ethanol에 녹여 사용하였다.

Silica gel Column Chromatography에 의한 활성 성분의 분리

Bacillus sp. RH-5의 배양액의 ethylether 추출물로부터 항산화 획분을 분리하기 위하여 silica gel column chromatography을 행하고 다시 여러 개의 획분을 모은 후 각 획분에 대하여 항산화성을 비교하면서 항산화성 물질을 분리하였다. 즉 유리 column(8cm×100cm)에 활성화된 silica gel(0.063~0.100mm, 70~270mesh, 7734, Merck Co. Germany)을 chloroform 으로 slurry로 만들어 충전한 후 시료를 chloroform : methanol 비율을 100 : 0, 90 : 10, 80 : 20 및 0 : 100 등으로 구분하여 단계별로 용출하였다. 분획물들을 감압 농축하고 각 분획물에 대해 항산화 효과를 thiocyanate method로 측정하여 활성이 있는 획분을 얻었다. 즉 분리한 항산화성 물질을 농축하여 ethanol에 용해

한 다음 micro tube에 200 μ l 넣고 여기에 phosphate buffer(400 μ l), distilled water(200 μ l), linoleic acid solution(200 μ l)를 각각 넣어 섞은 다음 어두운 곳에서 50 $^{\circ}$ C를 유지하며 반응시켰다. 시간별로 반응액(100 μ l)을 NH₄SCN solution(100 μ l), ferrous chloride reagent(100 μ l)와 함께 75% ethanol(3ml)에 섞고 3 분 뒤 490nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 나타내었다.

TLC에 의한 활성성분의 분리

Silica gel column chromatography를 행하여 항산화능이 있는 비극성 분획물을 TLC로 분리하여 항산화성 물질을 검색하였다. 즉, 항산화성이 확인된 분획물들을 capillary tube로 silica gel TLC (5554, Merck Co.)위에 점적한 후 전개시켰다. 이때 전개용매는 CHCl₃:MeOH = 9:1을 사용하였고, TLC plate는 DPPH 발색 시약을 분무하여 자주색에서 무색으로 되는 항산화성 물질들을 확인하였다.

사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 분리

건강한 남자의 혈액 50ml을 1mg/ml EDTA를 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4 $^{\circ}$ C에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma는 상온에서 20분 동안 원심분리(2,000 \times g)한 다음 gentamycin sulfate (1mg/25ml)을 첨가하였다. LDL (d. 1.019~1.063g/ml)은 초고속 원심분리기(46,000 \times g)로 24시간 동안 분리하여 얻었다. 분리된 LDL은 0.15M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01M phosphate buffer, pH 7.4로서 16~20시간 투석하였다[8].

Macrophage의 분리와 배양

Female ICR mice을 CO₂로 질식사시켜 절개한 복부 부위에 차게 만든 Ca²⁺, Mg²⁺이 없는 Dulbecco's phosphate buffered saline을 넣어 세척하여 macrophage을 포집한 후 원심분리 한 다음 혈액을 제거하고 세포만 분리하였다. 이 세포는 10% 불활성시킨 fetal bovine serum과 2 mmol/l L-glutamine, 100 units/ml penicillin 및 0.17 mmol/l streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)배지에서 5% CO₂/air 존재하에서 배양하였다. 배양 24시간 후에 신선한 배지로 교환시킨 다음 5% lipoprotein-deficient serum(LPDS), L-glutamine 함유 DMEM배지에 LDL 또는 산화 LDL의 적당한 농도를 첨가하여 실험하였다[5].

Copper mediated LDL 산화에 대한 항산화 효과

LDL(100 μ g/ml)을 1~5 μ M CuSO₄를 함유한 phosphate buffer saline(PBS)에 시료를 적당한 농도로 첨가하여 5% CO₂ 존재하에서 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여 LDL의 산화를 측정하였다. 별도로 대조군은 이 배양액에 시료를 첨가하지 않은 조건에서 배양하였다.

Macrophage-mediated LDL에 대한 항산화 효과

LDL(100 μ g/ml, protein)함유 macrophage 배양액에 *Bacillus* sp. RH-5의 획분을 일정 농도별로 첨가한 후 5% CO₂ 존재하에서 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양한 후 LDL의 산화의 정도를 실험하였다.

Thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)의 측정

Human LDL의 산화는 TBARS의 형성으로서 평가하였다. 100 μ g, protein/ml, LDL이 함유된 배양 혼합액 0.5ml에 20% TCA 1.5ml를 가한 다음 여기에 0.05M NaOH에 0.67% TBA 1.5ml를 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90 $^{\circ}$ C 수욕상에서 45분간 가열하였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000 \times g)한 다음 상등액의 형광을 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Model 650-10S)로서 510 및 553 nm에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malonaldehyde (MDA)로서 만들어진 MDA의 표준곡선으로 부터 MDA의 nmole로서 나타내었다[26].

항산화제의 구조 확인

Bacillus sp. RH-5의 배양액을 Fraction 한 후 TLC에서 끊어 모아 HPLC(model No. HP1050, Hewlett Paekrd Co. Waldbronn, Germany)에 의하여 정제한 후 GC/MASS, IR 및 NMR로 확인하였다.

단백질의 정량

LDL의 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법[15]에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

Chromatography와 TLC에 의한 항산화성 물질의 분리

액체 배양액을 ethyl ether로 추출 농축한 액을 silica gel

column chromatography를 행하였다. Chloroform : methanol의 비율이 Fraction 1 (100 : 0), Fraction 2 (80 : 20) Fraction 3 (50 : 50), Fraction 4 (20 : 80) 및 Fraction 5 (0 : 100)인 각 분획물을 얻어 이에 대해 thiocyanate method를 이용하여 항산화성을 측정된 결과 Fig. 1에서 보는바와 같이 Fraction 3이 활성이 있는 분획물임을 알 수 있었다. Fraction 3을 silica gel column chromatography와 TLC법으로 분리하여 TLC로 얻은 band 1, 2, 3 및 4를 얻었다 (Fig. 2). 이를 Vit. E(10^2 mol)와 BHA(10^2 mol)와 비교했을 때 band 4는 기존 항산화제 보다 활성이 높은 결과를 나타내었다(Fig. 3).

Bacillus sp. RH-5 배양액의 LDL의 수식에 대한 항산화 효과

Bacillus sp RH-405의 배양액을 ethyl ether로 추출한 다음 여과하여 농축한 후 silica gel column chromatography 및 TLC에 의하여 얻은 Fraction 3에서 황산화 활성이 가장 높은 band 4를 LDL의 산화에 대한 항산화 효과를 실험한 결과 Fig. 4에 나타내었다.

Fraction 4의 농도별 항산화 효과를 알아보기 위하여

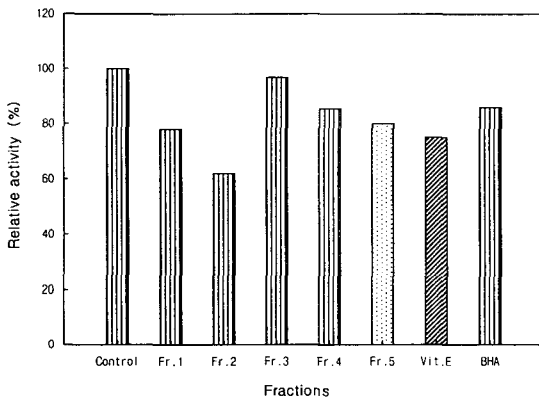


Fig. 1. Antioxidative activity of various fractions by silica gel column(8cm×100cm)chromatography with mixtures of CHCl₃ and methanol.

Fr.1, CHCl₃ : MeOH(100 : 0), Fr. 2, CHCl₃ : MeOH (90 : 10), Fr. 3, CHCl₃ : MeOH(80 : 20), Fr. 4, CHCl₃ : MeOH(50 : 50), Fr. 5, CHCl₃ : MeOH(0 : 100), Vit. E, BHA(10^2 mol)

All fractions are eluted with 1000ml mixtures of CHCl₃ and methanol.

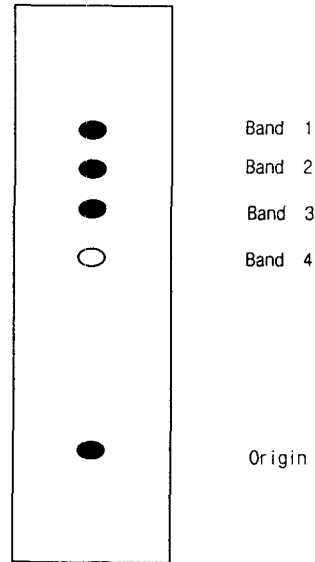


Fig. 2. Thin layer chromatogram of antioxidative fraction developed with mixtures of Ethyl acetate : Methanol = 90 : 10.

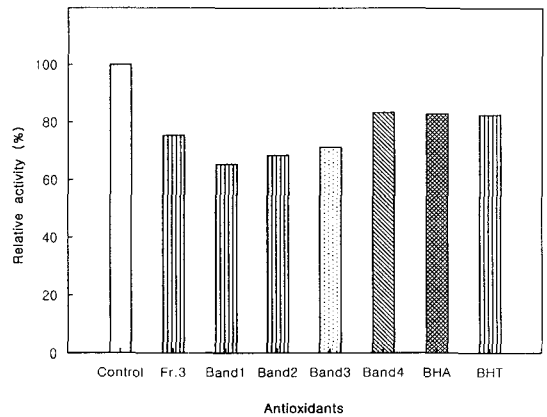


Fig. 3. Antioxidative activity of band 1, 2, 3 and 4 obtained from Fraction 3 by TLC and its comparison with BHA and BHT.

LDL($100\mu\text{l}/\text{ml}$)에 band 4을 $100\mu\text{l}$ 및 $200\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도로 조절하여 $5\mu\text{M}$ CuSO₄의 존재하에서 37°C에서 18시간 동안 배양한 결과 band 4의 $100\mu\text{l}$ 및 $200\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도에서 항산화 효과를 나타내었다. LDL의 산화를 인위적으로 시키기 위하여 LDL에 $5\mu\text{M}$ CuSO₄을 첨가하여 37°C에서

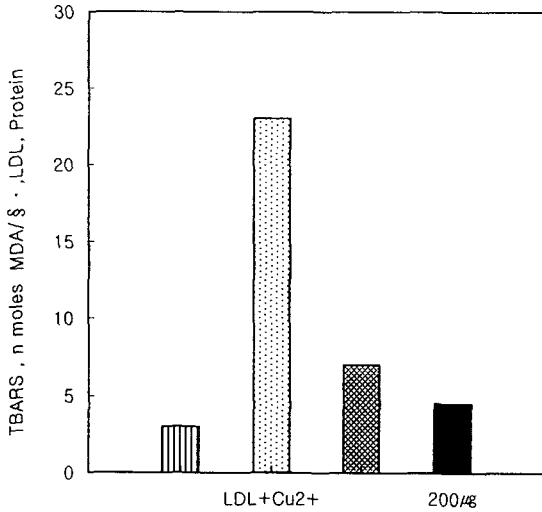


Fig. 4. Antioxidant effect of Fraction 3(band 4) obtained from *Bacillus* sp. RH-5 cultivation on the oxidation of LDL by $5\mu\text{M}$ CuSO_4 . LDL(100µg, protein/ml) was incubated for 18h at 37°C in the presence of 100µg or 200µg/ml band 4 of Fraction 3 by the addition of $5\mu\text{M}$ CuSO_4 .

18시간동안 배양한 후 TBARS를 측정한 결과 native LDL에서 2.45 ± 0.23 nmole MDA/mg LDL, protein이었으나 $5\mu\text{M}$ CuSO_4 로 산화시킨 대조군의 경우 23.30 ± 1.42 nmole MDA/mg LDL, protein이었고 LDL에 $\pm 5\mu\text{M}$ CuSO_4 를 첨가하고 여기에 band 4를 각각 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 첨가한 경우 TBARS의 수치는 각각 5.14 ± 0.20 및 4.80 ± 0.17 nmol MDA/mg LDL, protein으로 LDL의 산화억제 효과가 좋았다.

LDL의 인위적인 산화는 Cu^{2+} 를 촉매로 이용하여 산화시키면서 항산화제에 의한 효과를 측정한다[5]. LDL의 산화를 시키기 위하여 Cu^{2+} 의 농도를 $5\mu\text{M}$ 로 조절하는 것이 가장 타당하다는 보고[14]에 따라 본 실험에서도 CuSO_4 를 $5\mu\text{M}$ 농도로 조절하여 사용하였다.

항산화 물질의 HPLC에 의한 분리

TLC에 의해 Band 4의 주성분과 미향 성분이 확인되었으나 더욱 정확하게 하기 위해 chloroform : methanol(9:1)용매계를 이용한 reverse phase column(Hypersil ODS C18)의 HPLC를 실시하여 분리를 시도하였다. 그 결과 retention

time은 7.20과 7.5분 그리고 8.4분에 peak를 나타내 분리(baseline separation)가 이루어 졌으며, 이들 3 성분은 항산화 활성을 나타내었다. 이 중 retention time 7.20 분의 peak의 확분을 진공 농축한 후 증발 건조하여 냉장고에 보관하여 두고 사용하였다.

Hydroxyindole의 구조규명

5-Hydroxyindole의 구조에서 aromatic 고리에서 나타나는 피크는 대부분 7.29-6.42 ppm 사이에서 나타났다. 이 중 6.44-6.42 ppm에서 나타나는 피크는 90MHz NMR 을 사용하여 분해능이 떨어지기는 하나 Ha 에 해당하는 피크로 그림에서 보는 바와 같이 이중피크로 나타나고 있음을 확인할 수 있다. 또한 Hb 에 해당하는 피크는 6.74-6.72ppm에서 확실히 이중피크로 분리되고 있음을 나타낸다. Hc 피크들은 모두 7.29-7.04 ppm 사이에서 multiplet 으로 나타났으며 Ha:Hb:Hc의 ratio는 대략 3:1:1로 나타나는 것으로 보아 indole의 골격을 가지고 있음을 알수 있다. 더불어서 indole 내에 붙어 있는 질소-수소 한개의 독특한 broad 한 피크가 8.0 ppm 근처에 나타났고 OH 기의 수소 역시 4.47 ppm에서 거의 1개의 수소 비율로 integration 이 나타났으므로 indole 구조에 탄소-수소이외의 두개의 수소 즉 N-H 및 O-H 를 확인할수 있었다(Fig. 5).

Mass Spectrum을 살펴보면 분자이온에 해당하는 M^+133 (m/z, rel. intensity)피크가 강하게 나타나고 기타 104, 78, 66, 51 의 aromatic 에 해당하는 질량 패턴이 정확하게 나

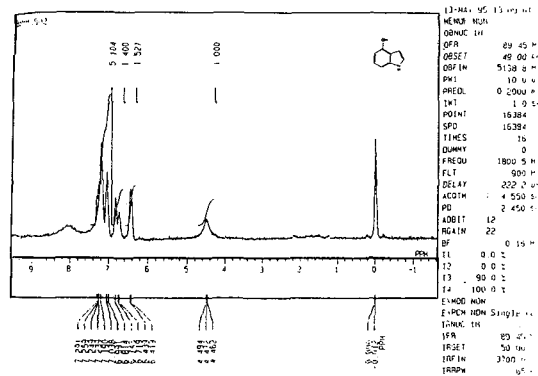


Fig. 5. NMR spectrum of 5-hydroxyindole isolated from *Bacillus* sp. RH-5.

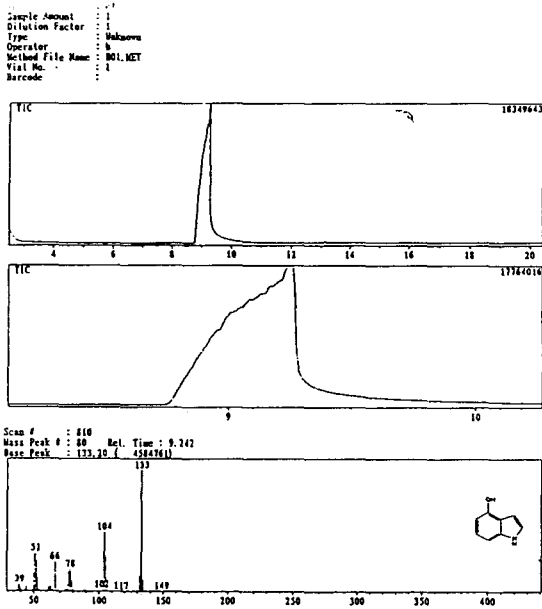


Fig. 6. GC/MS chromatogram of 5-hydroxyindole isolated from *Bacillus* sp. RH-5.

타나고 있다(Fig. 6).

IR 스펙트럼은 KBr pallet 을 만들어 확인하여 본 결과 3398 cm^{-1} 을 중심으로 OH 기에 해당하는 강하고 broad 한 피크가 나타났으며 1623 cm^{-1} 에 방향족 고리내의 이중 결합에 의한 피크가 있음이 확인이 되었다. 기타 나타나는 피크는 $1591, 1487, 1458, 1208\text{ cm}^{-1}$ 가 비교적 강한 피크로 나타났다(Fig. 7).

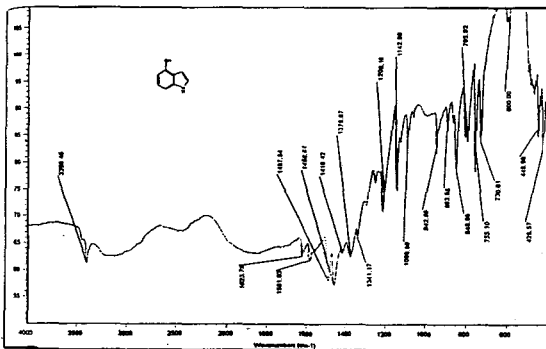


Fig. 7. IR spectrum of 5-hydroxyindole isolated from *Bacillus* sp. RH-5.

감사의 말씀

이 논문은 1996년도 한국 학술진흥 재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

요 약

Bacillus sp. RH-5로 배양한 배양액을 silica gel column ($8.0\text{cm} \times 100\text{cm}$) chromatography를 행하여 chloroform : methanol = 90 : 10인 항산화 분획층을 얻어 TLC 법에 의해 활성이 있는 물질을 분리하여 thiocyanate method로 활성을 측정하여 본 결과 Vit. E(10^{-2}mol)보다 좋았으며 BHA, BHT와는 비슷한 결과를 나타내었다. 한편 $5\text{ }\mu\text{M}$ CuSO_4 촉매 사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 산화에 항산화 활성이 알려진 Fraction 3의 band 4를 각각 100 및 $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ 농도로 37°C 에서 18시간 배양한 결과 LDL의 산화에 대한 억제효과가 좋았다. Fraction 3의 band 4를 HPLC로 정제한 후 IR, NMR 및 GC/MASS로 확인한 결과 5-hydroxyindole로 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Aoyama, T., Nakakita, Y., Nakagawa, M., and Sakai, H. 1992. Screening for antioxidant of microbial origin, *Agric. Biol. Chem.*, **46**(9), 2369-2371.
2. Bruckdorfer K. R. 1990. Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1**, 529-535.
3. Chain, E. B., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jerrings. N. A., Orr-Ewing, J. and Sandets, A. G. 1940. Penicillin as a chemotherapeutic agent, *Lancet*, ii, 226-228.
4. Cho, S. Y., You, B. J., Chang, M. H., Lee, S. J. Sung, N. J. and Lee, E. H. and Eung-Ho Lee. 1994. Screening for the antioxidants in unused marine resources by the olarographic method. *Korean. J. Food SCI. TECHNOL.* **26**(4), 417-421.
5. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M. 1989. Continous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commun.* **6**, 67-75.
6. Fujimoto, K. and Kaneda, T. 1984. Separation of antioxidant compounds from marine algae, *Hydro-*

- biologia*, **116**, 184-190.
7. Hattori, T., Ohishi, H., Yokota, T., Ohoami, H. and Watnanbe, K. 1955. Antioxidative effect of crude antioxidant preparation from soybean fermented by *Bacillus natto*, *Ledensm-Wiss. Technol.*, **28**, 135-138.
 8. Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H. 1995. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. clin. Invest.*, **34**, 1345-1352.
 9. Hayashi, K., Suzuki, K., Kawaguchi, M., Nakajina, T., Suzuki, T., Numata, M., and Nakamura, T. 1955. Isolation of an antioxidant from *Penicillium roquefortii* IFO, 5956, *Biosci. Biochem.*, **59**(2) 319-320.
 10. Heinecke, J. W., Rosen, H., Chait, A. 1984. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J. Clin. Invest.*, **74**, 1890-1894.
 11. Henriksen, T., Mahoney, E. and Steinberg, D. 1981. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: Recognition by the receptor for acetylated low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 6499-6503.
 12. Henriksen T., Mafoney E. M., and Steinberg D. 1983. Enhanced macrophage degradation of biological modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, **3**, 149-159.
 13. Jessup, W., Dean, R. T., de Whallpt, C. V. 1970. The role of oxidative modification and antioxidants in LDL metabolism and atherosclerosis, IN: Emerit, L., Parker, L., Auclair, C., eds. *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*, New York, plenum, 139.
 14. Jialal, L. and Scaccini, C. 1992. Antioxidants and atherosclerosis, *Current Pin. Lipidologie*, **3**, 324.
 15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randell, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 16. Mao, S. J. T., Yates, M., T. 1989. Antioxidant activity of probucol and vitamin E(α -tocopherol) in plasma. *Artherosclerosis* **9**, 751 a, (abstract).
 17. Morel, D. W., Docorleto, P. E. and Chisolm, G. M. 1984. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Artherosclerosis*, **4**, 357-364.
 18. Park, J. H., Kang, K. C., Baek, S. B., Lee, Y. H. and Rhee, K. S. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae, *Korean. J. Food Sci. TECHNOL.* **23**(3), 256-2651.
 19. Rashid, H., Kato, F, Murata, A. and Kando, M. 1993. Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus sojae* K., *Biosci Biotech. Biochem.*, **57**(6), 935-939.
 20. Roma P., Catapano A. L., Bertulli, S. M., Varesi L., Fumagalli R. and Bernini F. 1990. Oxidized LDL increase free cholesterol and fail to stimulate cholesterol esterification in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res.*, **171**, 123-131.
 21. Ross. R. 1993. The Pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 1990S, *Nature*. **362**. 801-809.
 22. Ryu, B. H., Jeung, J. W., Kim, D. S. and Park, J. O. 1998. Antioxidative activity against oxidation of human low density lipoprotein(LDL) by *Bacillus* sp. RH-5 isolated from marine origin. *J. Fd. Hyg. Safety*. **13**, 6-13.
 23. Ryu, B. H., Kim, H. S., Jung, J. S., Lee, S. H. and Ji, Y. A. 1987. Screening for antioxidative activities of yeasts on fish oil. *Kor. J. Food Hygiene*, **2**(1), 15-20.
 24. Steinbrecher, U., Parthasarathy S., Leake D. S., Witztum J. L. and Steinberg D. 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**, 3883-3887.
 25. Takao, T., Kitatani, F., Watanade, N., Yagi, A., and Sakata, K. A. 1994. simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and sheefish. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **589**(10), 1780-1783.
 26. Yagi, K. A. 1976. Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212~216.
 27. Yagi. K. 1987. Lipid peroxides and human diseases, *Chemistry and Phycsics of Lipid*, **45**, 337.