

멸치액젓 유래 저분자 물질의 항산화활성

최근표 · 서정길¹ · 김상무^{2*}

강원전문대학 식품생명과학과, ¹부경대학교 식품생명공학부, ²강릉대학교 해양생명공학부

Antioxidative Activity of Low Molecular Weight Biocompounds Purified from Anchovy (*Engraulis japonicus*) Sauce

Geun-Pyo CHOI, Jung-Gil SEO¹ and Sang-Moo KIM^{2*}

Department of Food and Life Science, Gangwon Provincial University, Gangneung 210-800, Korea

¹Faculty of Food and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea

Antioxidative activities of low molecular weight biocompounds purified from anchovy (*Engraulis japonicus*) sauce fermented at 15 ± 3 °C for 5 years were investigated. The fermented anchovy sauce showed 5 peaks on gel chromatography pattern. Antioxidant activity of peak 2 was 82.7% followed by 42.6% of peak 1. Main antioxidant compounds of peak 1 were glutamic acid and lysine, but those of peak 2 were not confirmed by amino acid sequence analysis.

Key words: Antioxidative activity, Anchovy sauce, Biocompound, Amino acid

서 론

산업발달, 생활의 변화, 환경오염원들은 인간에게 질병을 일으키는 원인으로 알려져 있지만, 그 중에서 대사과정 중 과다한 oxygen free radical의 생성은 세포의 지방막과 단백질 및 DNA의 산화 또는 돌연변이를 유발시키는 주 요인으로 알려져 있다 (Ames et al., 1993). 또한 oxygen free radical은 생체내에서 신호전달물질 및 면역계를 비롯한 정상적인 생명 현상에도 관여한다고 알려져 있으며 (Burdon, 1995), 이러한 oxygen free radical에는 O₂^{·-}, ·OH, RO₂[·], RO[·] 등이 있다 (Lim and Shim, 1997). 항산화제란 산화를 방지하거나 지연시키는 물질을 통칭하는 것으로 그 작용기작에 따라 자동산화의 연쇄 반응을 제어하는 free radical 소거반응제, 과산화물을 비(非)라디칼 (non-radical)로 분해하여 불활성시키는 과산화물분해제, 자동산화에 있어서 라디칼저해제와 공존시 항산화작용을 증가시키는 상승제 및 각종 활성산소계를 소거하는 singlet oxygen quencher 등으로 분류 된다 (Ahmael, 1995). 이러한 항산화제는 각종 식물의 추출물, 향료, 발효생산물 등에 대부분 flavonoid 또는 phenol계 화합물로 존재 한다 (Lee and Cheigh, 1997). 항산화제는 천연 항산화제와 합성항산화제로 대별되는데, 합성항산화제는 동물체내에서 발생과 각종 효소군 등에 영향을 주며, 특히 butylated hydroxyanisole (BHA) 및 butylated hydroxytoluence (BHT) 같은 phenol계 합성 항산화제는 기형 또는 암 발생에 관여하는 것으로 보고 되고 있다 (Doll and Pet, 1981). 또한 합성항산화제는 뛰어난 항산화제 효과에 비해 부작용으로 인해 식품위생상 안정성 문제가 제기되고 있으므로 새로운 천연 항산화제 특히, 식품 자체에 함유된 항산화물질의 탐색이 요구되고 있는 실정이다 (Yamaguch et al., 1979).

특히 아미노산 및 peptide는 대표적인 금속이온봉쇄능 (Fujimoto et al., 1984; Chen et al., 1995) 및 hydroperoxides를 imine (Zaleska, 2000)으로 전환능을 가진 항산화물질이며, 동식물성 단백질을 효소로 분해하여 얻어지는 저분자 peptide에서도 항산화활성이 있다고 알려져 있다 (Kim et al., 1996). 수산식품의 항산화연구는 어육단백질 (Kim et al., 1989), 대구 고니 (Kim et al., 2000a), 대구가공부산물 (Kim et al., 2000b), 가자미피 (Kim et al., 1996), capelin (Amarowicz and Shadihi, 1997) 등의 효소가수분해물에 국한되어 있고, 멸치액젓의 수용성획분 (Park et al., 1999)에도 항산화효과가 있다는 연구가 있으나 천연 숙성 멸치액젓의 항산화 물질 및 이의 구조분석에 관한 연구는 없다.

이러한 항산화 물질의 항산화 작용은 일차적으로 식품의 품질유지 및 지방질의 과산화방지에 직접 관여 할 뿐만 아니라 여러 가지 생물학적 활성 특히, 항노화, 항돌연변이성 그리고 항암성에 직접 관련이 있다고 보고 되고 있다 (Choi et al., 1998). 따라서 멸치액젓과 같은 우리나라 고유의 상용 식품이 항산화성과 같은 활성을 지니고 있다면, 멸치액젓이 갖는 영양성과 기호성에 이어 소중한 기능성 식품이 될 수 있을 것으로 생각되기 때문에 멸치액젓의 우수성과 생리적 활성을 구명할 필요가 있다. 본 연구의 목적은 천연 숙성 멸치액젓에서 생성되는 다양한 형태의 항산화물질을 분리·정제하여 항산화활성 및 구조분석을 하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 멸치액젓 (품미식품, 속초)은 멸치 20 ton에 중량당 30%의 식염을 가하여 15 ± 3 °C에서 5년간 숙성하여 제품화되고 있는 액젓을 시료로 사용하였다. 항산화물질의

*Corresponding author: smkim@kangnung.ac.kr

정제에 사용된 Bio-Rad P-2 gel은 Bio-Rad (California, USA)사에서 구입하였고, 실험에 사용된 나머지 시약은 모두 특급을 사용하였다.

항산화물질의 정제

멸치액젓으로부터 저분자 항산화물질의 정제방법은 다음과 같다. 액젓을 sulfosalicylic acid로 제단백하여 원심분리한 후, 4°C에서 PM10 (cut off, 3,000 daltons) membrane filter (Amicon, Bedford, MA)를 사용하여 한외여과 하였다. 한외여과 한 여과액을 40°C에서 감압농축한 후, Bio-Rad P-2 gel (Bio-Rad, CA)를 충전한 column (2.6 X 70 cm)에서 0.5 mL/min의 유속으로 용출하였으며, 용출액은 5 mL씩 받아 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화활성이 높은 peak는 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)로 분리·정제하였다. 즉, 제1차 분리·정제는 column Vydac C₁₈ (7.5 X 250 mm, Shiseido, Japan)로 부분·정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다. 즉, A 용매; 0.1% TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2), B 용매; 0.1% TFA를 포함하는 100% CH₃CN, B 용액의 농도 구배; 0 → 20% (40 min), 유속; 2.0 mL/min, 파장; 220 nm, 온도; 40°C로 분리하여 분획하였다. 활성을 나타낸 peak는 다시 Capcell Pak C₁₈ (7.5 X 250 mm, Shiseido, Japan) column으로 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다. 용매, 유속, 파장은 1차 정제와 동일하며, B 용액의 농도구배; 0 → 15% (45 min)로 하였다. 2차 정제에서 활성이 나타난 peak를 다시 Capcell Pak C₁₈ (4.6 X 250 mm, Shiseido, Japan) column으로 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다. 용매 및 파장은 1차 정제와 동일, B 용액의 농도구배; 0 → 10% (30 min), 유속; 1.0 mL/min으로 하였다. 정제에 사용한 HPLC는 Waters Model 486 (Waters Associates, Miliford, MA, USA)을 사용하였으며 HPLC-grade용 water와 acetonitrile은 TEDIA Co. (Ohio, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Peptide-nitrogen 함량

Peptide-nitrogen의 측정은 Umemoto의 개량 biuret법 (1966)에 의하여 측정하였다. 즉, 시료를 두 개의 시험관에 각각 0.5 mL씩 취하고 증류수 4.5 mL씩을 가한 다음, 한 시험관에는 biuret 시약 I (0.4% CuSO₄, 8% NaOH, 0.2% glycerin)을 5 mL 첨가하여 A 반응구로, 다른 시험관에는 biuret II (8% NaOH, 0.2% glycerin) 5 mL를 첨가하여 B 반응구로 하였다. Blank는 시료용액 대신 증류수 5 mL를 사용하였다. 이것을 실온에서 2시간 반응한 다음 545 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의하여 peptide-nitrogen 함량을 구하였다.

Peptide-nitrogen 함량 (mg/mL)

$$= (A \text{ 반응구의 흡광도} - B \text{ 반응구의 흡광도}) \times 0.94$$

A 반응구의 흡광도 = A 반응구의 시료 흡광도 - A 반응구의 공시험 흡광도

B 반응구의 흡광도 = B 반응구의 시료 흡광도 - B 반응구의 공시험 흡광도

NaCl 함량

시료의 NaCl 함량 측정은 Mohr 법 (AOAC International, 1995)으로 측정하였다.

항산화활성

각 시료의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 소거효과 측정은 Blois 방법 (1958)으로 측정하여 항산화능의 지표로 삼았다. 즉, methanol로 농도를 조정된 시료 4 mL를 취하고, 0.15 mM DPPH 1 mL와 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여, DPPH radical 소거활성 [Reduction of DPPH (%) = (시료 처리구의 흡광도 / 대조구의 흡광도) X 100]을 구하였다.

Amino acid 함량

아미노산 (glutamic acid 및 lysine) 함량은 표준품 (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)으로 측정된 표준곡선 (농도 vs 항산화활성)으로부터 구하였다. 항산화활성은 DPPH 소거작용 방법 (Blois, 1958)으로 측정하였다.

Peptide의 서열 결정

HPLC에서 최종 정제한 시료의 peptide 서열 결정은 protein sequencer (Shimadzu PSQ-1 Protein Sequencer, Japan)를 사용하여 아미노산 서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

항산화물질의 정제 및 특성

20 ton의 대형 숙성조 (15 ± 3°C)에서 5년 동안 숙성시킨 멸치액젓을 sulfosalicylic acid로 제단백 하고, 4°C에서 membrane filter PM10 (cut-off, 3,000 daltons)으로 한외여과하여 저분자의 물질을 얻었다. 저분자물질은 gel chromatography 상에서 5개의 peak를 나타내었다 (Fig. 1). 실험에 사용한 Bio-Rad P-2 gel은 100-1,800 daltons 사이의 분자량을 정제할 수 있는 능력을 지니고 있어 Fig. 1의 peaks들은 분자량이 상대적으로 낮은 물질일 것으로 추정되어 진다. 또한 5년 숙성한 멸치액젓의 peptide-nitrogen 함량이 너무 낮아 (270 µg/mL) 동결건조로 농축 (10,825 µg/mL)하여 실험에 사용하였으며, 정제 효율은 5.10%로 다소 낮았다 (Table 1). 전통적으로 멸치액젓은 고농도 (25-30%)의 식염을 사용하기 때문에 생리활성 측정에 소금의 영향을 최대한 제거하여야 한다. 본 실험에 사용한 Bio-Rad P-2 gel은 시료의 식염함량을 약 26%에서 0.003%로 효과적으로 낮추어 생리활성에 대한 소금의 영향은 무시하였다 (Table 1).

항산화 활성 및 분리정제

멸치액젓에서 Bio-Rad P-2 gel로 분리·정제한 분획물의 항산화활성을 DPPH radical에 대한 소거효과로 측정하여 Table 1에 나타내었다. Free radical scavenger 기능은 중요한 항산화 특성 요인의 하나이며 DPPH는 free radical로 항산화제와 반응시키므로 항산화제의 free radical scavenger 능력을 측정할

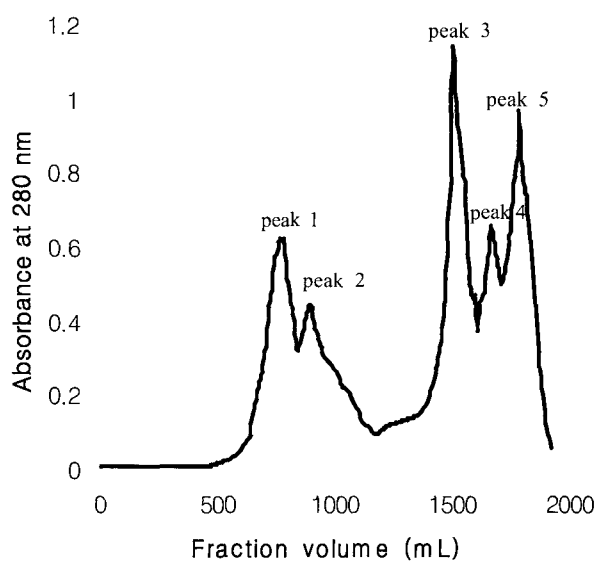


Fig. 1. Gel permeation chromatography pattern of biocompounds purified from anchovy sauce fermented at $15 \pm 3^\circ\text{C}$ for 5 years.

수 있다. DPPH는 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족아민류 등의 항산화물질에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색이 됨으로 편리한 방법으로 알려져 있다 (Blois, 1958). Peak 1-5까지의 총항산화활성은 185.3%이었으며 peak 2 (84.7%), peak 1 (42.6%), peak 3 (26.2%), peak 4 (13.8%), peak 5 (12.1%) 순으로 항산화효과를 나타내었다. 한편 단위질량당 비활성 (specific activity)으로 환산한 결과 peak 2가 1,283%·mL/mg로 peak 1 (380.4%·mL/mg) 및 peak 4 (328.6%·mL/mg) 보다 아주 높은 값을 나타내어, 항산화활성은 peak 2가 가장 우수한 것으로 나타났다. 이상의 결과와 Table 1의 peptide-nitrogen 생성량과 비교해 볼 때 멸치액젓 유래 저분자물질의 항산화능과 peptide-nitrogen의 생성량과는 반드시 상관관계가 일치하는 것은 아니며 발효과정 중 효소의 단백질에 대한 선택적 절단특이성에 따라 항산화효과가 결정되는 것으로

생각되며, Yeum et al. (1997)의 멸치육 단백질의 효소가수분해물의 항산화성 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 한편 Yamaguchi et al. (1980)은 대두단백질을 효소로 가수분해시킨 분해물 중에서의 항산화활성은 분자량 2.5-3 kDa 사이의 peptide가 가장 뛰어났다고 보고 하였으며, Kim et al. (1996)은 가자미 gelatin을 10, 5 및 1 kDa의 한외여과막을 차례로 통과시켜 얻은 가수분해물 중에서 분자량 5-10 kDa의 가수분해물이 α -tocopherol보다 항산화력이 10% 정도 더 높았다고 보고하였다. 또한 대두단백질, 우유 casein 및 난백 albumin 효소가수분해물의 항산화활성은 vitamin B12 (MW 1,350 Da) 보다 약간 큰 분자량을 가진 획분에서 가장 높았으며 (Yamaguchi et al., 1980), gelatin 가수분해물의 경우는 그보다 더 큰 분자량 획분에서 항산화활성이 높았다고 한다 (Kim et al., 1996). Park et al. (1998)은 보라우무 (*Symphycladia latiuscula*)의 추출물에 대한 항산화 활성에 대한 연구에서 추출물의 IC_{50} 은 3.14-15.44 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 특히 천연항산화제 L-ascorbic acid의 IC_{50} 은 1.22 $\mu\text{g/mL}$, α -tocopherol의 IC_{50} 은 1.28 $\mu\text{g/mL}$, 합성항산화제 BHA의 IC_{50} 은 1.06 $\mu\text{g/mL}$, BHT의 IC_{50} 은 3.21 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었다고 보고하였다. 본 연구의 멸치액젓 유래 biocompound에서 가장 높은 항산화활성을 나타낸 peak 2의 IC_{50} 은 66 $\mu\text{g/mL}$ 로 천연 항산화제 및 합성항산화제에 비해서는 낮은 활성을 나타내었지만, 시료 자체가 100% 완전 정제물질이 아니기 때문에 완전 정제된 물질은 이보다 훨씬 높은 IC_{50} 값을 가질 것으로 추정된다. 약 10,000 daltons 분자량의 대구 frame 효소가수분해물은 α -tocopherol과 비슷한 항산화활성을 가지고 있으나 (Jeon et al., 1999), 대구고니 효소가수분해물인 경우 1,000 daltons 이하의 분자량에서 항산화활성이 높았다고 한다 (Kim et al., 2000a). 멸치액젓의 BuOH 및 수용액층 모두 항산화활성이 우수하고 항산화물질은 분자량 1,000 daltons 이하의 peptide 일 것으로 추정하였지만 (Iwamoto et al., 1997), 이 논문에서는 식염의 영향을 고려하지 않은 약점이 있다. 어육단백질은 금속이온봉쇄능에 의하여 항산화활성을 가지나, 금속이온봉쇄능은 금속이온의 종류에 따라 차이가 난다 (Yamaguchi et al.,

Table 1. Antioxidative activity of low molecular weight biocompounds purified from anchovy sauce fermented at $15 \pm 3^\circ\text{C}$ for 5 years

Biocompound	Peptide concentration (mg/mL)	Yield (%)	NaCl concentration (%)	Antioxidative activity (%)	Specific antioxidative activity (%·mL/mg)
Raw	10.825(0.270)*	100.00	26.200		
Peak 1	0.112	1.03	0.003	42.6	380.4
Peak 2	0.066	0.61	0.003	84.7	1283.3
Peak 3	0.172	1.59	0.003	26.2	152.3
Peak 4	0.042	0.39	0.003	13.8	328.6
Peak 5	0.160	1.48	0.003	12.1	75.6
Total		5.10		185.3	

* The value in the parenthesis is peptide-nitrogen concentration of raw (not concentrated) anchovy sauce

1980). Capelin의 효소가수분해물에서 정제한 4개의 peptide 획분 중에서 한개의 획분에서 높은 항산화활성을 나타내었고, 2개의 획분에서는 아주 약한 항산화활성을 나타내었으며, 나머지 1개의 획분에서는 prooxidant 활성을 나타내었다고 하였는데 (Amarowicz and Shahidi., 1997), 본 실험에서도 이와 유사하게 분획물에 따라 항산화활성은 서로 다른 값을 나타내었다.

멸치액젓에 존재하는 항산화물질의 구조를 분석하기 위하여 Bio-Rad P-2 gel로 분획한 획분 중 항산화활성이 가장 높은 peak 1 및 2를 HPLC로 단계별로 정제하였으며, 그 중 대표적인 2차 HPLC 정제 분석 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 본 논문에서는 나타내지 않았지만 1차 HPLC 정제에서 peak 1은 5개 (peak 1-A-E), peak 2는 9개 (2-A-J)의 세부 분획을 나타내었다. 그 중 항산화활성이 높은 1-A 분획을 HPLC로 2차 정제하여 11개의 분획 (I-XI)을 얻었으며, 2-B는 9개의 분획 (I-IX)을 나타내었다 (Fig. 2). 이중 항산화활성이 높은 1-A-II분획은 HPLC로 3차 정제하여 4개의 peak (1-A-II-a-d)를 얻었으며, 그 중 1-A-II-d 분획의 항산화활성은 9%를 나타내었다. 또한 1-A-III 분획은 64%를 나타내었다. 2-B-VI-b 및 e는 각각 3 및 82%, 2-B-VIII-d 및 2-B-IX

분획은 각각 23 및 5%의 항산화활성을 나타내었다. 천연 속성 멸치액젓 분획 중 항산화 활성이 높은 1-A-II-d와 1-A-III를 sequence analyzer로 분석한 결과 각각 glutamic acid 및 lysine의 단일 아미노산으로 나타났다. HPLC로부터 정제한 시료의 양은 극미량이어서 아미노산 함량측정은 현실적으로 불가능하다. 그러므로 관례적으로 구조분석을 한 다음 해당 표준품으로 측정된 표준곡선으로부터 아미노산의 함량을 측정하고 있다. 아미노산 함량에 따른 항산화활성의 표준곡선은 glutamic acid인 경우 $y = 0.18x + 101.1$ ($R^2 = 0.8526$) 이었으며, lysine인 경우 $y = 4.9x + 5$ ($R^2 = 0.9471$) 이었다. 표준곡선에서 항산화활성 9 및 64%에 해당하는 glutamic acid 및 lysine의 함량은 6.11 및 1.20 g/mL 이었다 (Table 2). 한편 Park et al. (1999)은 멸치액젓 수용액층에서 항산화물질을 분리·정제하여 methionine 유도체로 추정하였으며, Yamaguchi et al. (1975)은 유리아미노산도 항산화능이 있으나 유리아미노산이나 tripeptide보다 dipeptide가 더 우수하다고 하였으며 N-말단의 구성아미노산에 따라 항산화능이 달라진다고 하였다. 그러나 peak 2는 정제되지 않아 sequence analyzer로 구조분석이 되지 않았는데, 이는

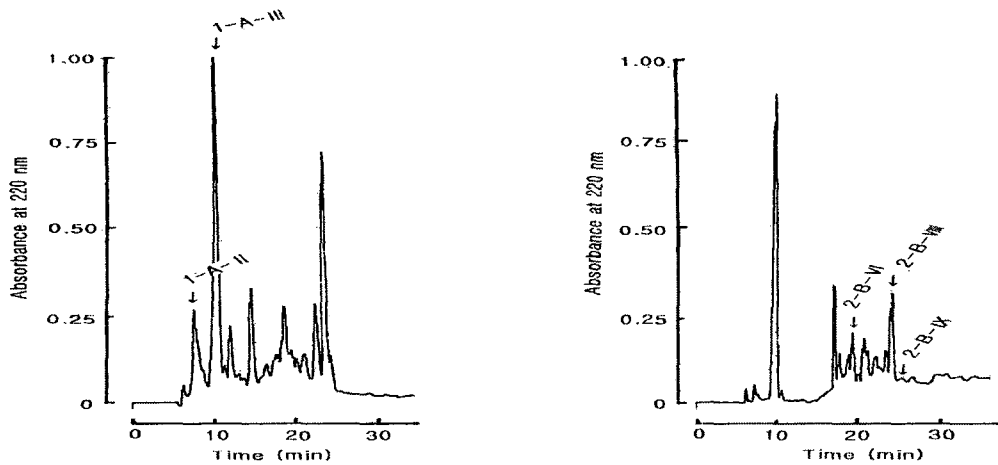


Fig. 2. 2nd HPLC pattern of biocompounds purified from anchovy sauce fermented at $15 \pm 3^\circ\text{C}$ for 5 years. A and B, Peak 1 and 2; Column, Capcell Pak C_{18} (4.6×250 mm); Flow rate, 2.0 mL/min.

Table 2. Antioxidative activity of low molecular weight biocompounds purified from anchovy sauces fermented at 15°C for 5 years

Biocompound	1st HPLC	2nd HPLC	3rd HPLC	Antioxidative activity (%)	Amino acid	Concentration (g/mL)
Peak 1	1 -A	1-A- II	1-A-III-d	9	Glutamic acid	6.11
		1-A-III		64	Lysine	1.20
Peak 2	2-B	2-B-VI	2-B-VI-b	3	NA*	
			2-B-VI-e	82	NA	
		2-B-VIII	2-B-VIII-d	23	NA	
		2-B-IX		5	NA	

* NA: Not analyzed

색소들이 결합된 갈변물질일 것으로 추정되어진다. 왜냐하면 어류는 고도불포화지방을 많이 함유하고 있기 때문에 어유의 산화를 방지하는 물질 역시 많이 존재하며, 또한 액젓의 숙성 중에 생겨나는 갈변물질 또한 항산화활성을 가지고 있기 때문인 것으로 보여진다. 일반적으로 아미노산은 amine 반응 및 sulphur group들이 hydroperoxide와 반응하여 imines, sulphides, thiosulphinates, sulphoxides를 형성하여 항산화활성을 가지고 있다 (Zaleska, 2000). 그러므로 본 실험에서 정제된 glutamic acid 및 lysine은 imine을 형성하여 항산화활성을 가지는 아미노산이라고 본다. 청어 기름으로부터 정제한 11개 아미노산의 항산화활성을 측정하였을 때, 10개의 아미노산이 항산화활성을 나타내었으며, 그 중 histidine, tryptophan, lysine이 강한 활성을 가지고 있는데 반해 glutamic acid 및 alanine 등은 다소 약한 항산화활성을 나타내었다 (Marcusk, 1960). 이들 아미노산은 산화촉진물질과 결합하든지 아니면 산화된 1차 항산화물질을 재생함으로써 항산화활성을 나타낸다고 한다 (Marcusk, 1960). 특히 histidine을 함유하고 있는 peptide는 금속뿐만 아니라 histidine의 imidazole ring이 지방 radical의 봉쇄 (Murase et al., 1993), 또는 hydroxyl radical 및 singlet oxygen을 봉쇄 (Wade and Turker, 1998)하여 항산화활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 어육단백질 가수분해물은 항산화물질 및 산화촉진제를 동시에 함유하고 있으나 (Shahidi and Amarowicz, 1996), 대두 및 우유단백질 가수분해물보다 뛰어난 항산화활성을 가지고 있다고 한다 (Kim et al., 1989). 한편 Cheigh et al. (1993)은 양조간장의 항산화성은 melanoidin related products (MRPs)가 free radical scavenger 기능, 항산화 효력 상승제의 기능과 금속 킬레이트로서의 기능, lipoxigenase 활성 저해능을 가진다고 하였는데 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 비효소적갈변반응 (Maillard reaction) 물질들은 항산화활성을 가지고 있으나 아직 상업용으로는 개발되지 못하고 있는데 (Dworschak and Szoabo, 1986a; Dworschak et al., 1986b), 그 이유는 갈변으로 인하여 식품첨가시 변색이 되기 때문이다 (Yamauchi, 1991).

위의 실험결과를 보면 멸치액젓의 항산화 활성은 발효과정 중 생성된 여러 가지 아미노산 및 아미노산의 유도체 그리고 발효과정 중 형성된 갈변물질들 등이 oligopeptide들과 어울려 상승효과를 나타내는 것으로 생각된다. 최근 김치, 간장, 액젓 등 우리나라 전통발효 식품에 우수한 생리활성 물질을 많이 가지고 있음이 확인 (Cheigh et al., 1998; Cheigh et al., 1993) 되고 있으므로 좀 더 깊은 연구가 필요하다고 생각 된다.

사 사

본 연구논문은 2001년도 한국과학재단 지역협력연구센터사업 (한림대 실버생물산업기술연구센터 R12-2001-047-03004-0)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Ahmael, S. 1995. Oxidative Dstress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman and Hall. New York, pp. 25-42.
- Amarowicz, R. and F. Shahidi. 1997. Antioxidant activity of peptide fraction of capelin protein hydrolysate. Food Chem., 58, 355-359.
- Ames, B.N., M.K. Shigenaga and T.M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7915-7917.
- AOAC International. 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1119-2000.
- Burdon, R.H. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. Free Rad. Biol. Medi., 18, 775-779.
- Chen, H.M., K. Muramoto and F. Yamauchi. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta- conglycinin. J. Agric. Food Chem., 43, 574-578.
- Cheigh, H.S, J.S Lee, G.S Moon and K.Y. Park. 1993. Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented Soybean sauce. J. Kor. Soc. Nutr., 22(5), 565-569.
- Cheigh, H.S, Y.O Lee and Y.S Choi. 1998. Antioxidative activity of Kimchi and Kimchi sub-ingredient. Food Ind. Nutr., 3(2), 47-54.
- Doll, K. and R. Pet. 1981. The causes of cancer, quantitative estimates of avoidable risks of cancer in United States. J. Natl. Cancer Inst., 66, 1192-1308.
- Dworschak, E. and L. Szoabo. 1986. Formation of antioxidative materials in the preparation of meals. Dev. Food Sci., 13, 311-319.
- Dworschak, E., V. Tarjan and S. Turos. 1986. Characteristics of some new flavoring materials produced by the Maillard reaction. AOCS Symp. Ser., 215, 159-168.
- Fujimoto, K., W.E. Neff and E.N. Frankel. 1984. The reaction of DNA with lipid oxidation products, metal reducing agent. Biochim. Biophys. Acta, 795, 100-107.
- Iwamoto, T., S. Watanabe, M. Nishimura, R. Onda, M. Iwamoto, H. Kurata, A. Matsumoto, H. Itakura and K. Kondo. 1997. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by fish protein (mackerel peptide). 11th International Symposium on Atherosclerosis. October 8, Paris, pp. 223.
- Jeon, Y.J., H.G. Byun, and S.K. Kim. 1999. Improvement

- of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. Proc. Biochem., 35, 471-478. (in Korean)
- Kim, S.B., D.M. Yeam, S.G. Ji, Y.W. Lee and Y.H. Park. 1989. Antioxidative effects of food protein hydrolysates by protease. Kor. J. Food Sci. Technol., 21, 492-497. (in Korean)
- Kim, S.K., H.C. Lee, H.K. Byun and Y.J. Jeon. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. J. Kor. Fish. Soc., 29(2), 246-255. (in Korean)
- Kim, S.K., Y.R. Choi, P.J. Park, J.H. Choi and S.H. Moon. 2000a. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolyzate of cod teiset protein. J. Kor. Fish. Soc., 33(2), 198-204. (in Korean)
- Kim, S.K., Y.R. Choi, P.J. Park, J.H. Choi and S.H. Moon. 2000b. Screening of biofunctional peptides from cod processing wastes. J. Kor. Soc. Agri. Chem. Biotechnol., 43, 225-227. (in Korean)
- Lee, J.S. and H.S. Cheigh. 1997. Composition and antioxidative characteristics of phenolic fraction isolated from soybean fermented food. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr., 26(3), 383-389. (in Korean)
- Lim, K.T. and J.H. Shim. 1997. Antioxidative effect of ethanol extract from *Rhus Verniciflua* Stoke on mouse whole brain cell. Kor. J. Food Sci. Technol., 29(6), 1248-1254. (in Korean)
- Marcusk, R. 1960. Antioxidative effect of amino acids. Nature, 185, 886-887.
- Murase, H., A. Nagao and J. Terao. 1993. Antioxidant and emulsifying action of N-(long-chain-acyl)histidine and N-(long-chain-acyl) carnosine. J. Agric. Food Chem., 41, 1601-1604.
- Park, H.J., J.S. Choi and H.Y. Chung. 1998. The antioxidant activity in extract of *Symphycladia lactiuscula*. J. Kor. Fish. Soc., 31(6), 927-932. (in Korean)
- Park, J.O., M.S. Yoon, E.J. Cho, H.S. Kim and B.H. Ryu. 1999. Antioxidant effects of fermented anchovy. Kor. J. Food Sci. Technol., 31(5), 1378-1385. (in Korean)
- Shahidi F. and R. Amarowicz. 1996. Antioxidant activity of protein hydrolyzates from aquatic species. J. Am. Oil Chem. Soc., 73, 1197-1199.
- Umamoto, S. 1966. A modification method for estimation of muscle protein by biuret method. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 32, 427-435. (in Japanese)
- Wade, A.M. and H.N. Turcker. 1998. Antioxidant characteristics of L-histidine. J. Nutr. Biochem., 9, 308-315.
- Yamaguch, N., Y. Yokoo and M. Fujimaki. 1979. Antioxidative activity of protein hydrolyzates. Nippon Shokuin Kogyo Gakkaishi, 26(2), 65-70. (in Japanese)
- Yamaguchi, N., S. Naito, Y. Yokoo and M. Fujimaki. 1980. Application of protein hydrolyzate to biscuit as antioxidant. J. Jap. Soc. Food Sci. Technol., 27, 56-59.
- Yamauchi, N. 1991. Antioxidant properties of decolorized melanoidin. New Food Ind., 33, 76-80. (in Japanese)
- Yeum, D.M., T.G. Lee, Y.H. Park and S.B. Kim. 1997. Antioxidative activity of enzymatic hydrolysates derived from Anchovy muscle protein. Kor. J. Food Sci. Technol., 30(5), 842-849. (in Korean)
- Zaleska, F.J. 2000. Antioxidant properties of α -tocopherol, methionine and selenomethionine in olive oils. Riv. Ita. Sostanze Grasse, 77, 543-547.

2003년 3월 25일 접수

2003년 7월 12일 수리