

멸치액젓의 항산화효과

박종옥 · 윤미선* · 조은정** · 김희숙* · 류병호*
경성대학교 화학과, *경성대학교 식품공학과, **포항공과대학교 생명공학연구소

Antioxidant Effects of Fermented Anchovy

Jong Ok Park, Mi Sun Yoon*, Eun Jung Cho**, Hee Sook Kim* and Byung-Ho Ryu*

Department of Chemistry, Kyungshung University,

*Department of Food Science and Technology, Kyungshung University,

**Biotechnology Reserch Center, Postech.

Abstract

The antioxidative activity of Fermented Anchovy on linoleic acid autooxidation was investigated in an aqueous system at pH 7.0. All solvent fractions from Fermented Anchovy were exhibited the strong antioxidative activity. Especially, BuOH and aqueous fractions were gained large amounts with strong antioxidative activity. Ultrafiltration, dialysis, heat treatment of aqueous fraction indicated that water-soluble antioxidants of Fermented Anchovy were heat-resistant, amino acid related compounds with smaller molecular weights than 1,000. Unbound fractions from DE-52 anion exchange chromatography were exhibited antioxidative activity with or without 15 μ M Fe⁺⁺⁺ ion. We were able to purify one methionine derivative from lots of antioxidative substances in Fermented Anchovy aqueous fraction by gel filtration, anion-exchange chromatography, TLC and HPLC, successfully. These data suggest that Fermented Anchovy aqueous fraction is a mixture of fermented small molecules with strong antioxidative activities.

Key words : Fermented Anchovy, antioxidative activity, linoleic acid autooxidation

서 론

멸치젓은 우리나라의 전통발효식품의 하나로 봄과 가을에 잡히는 멸치에 소금을 뿌려 항아리에 넣고 발효숙성시켜 젓갈을 그대로 상에 놓기도 하고 찜조리 등으로 여과하여 멸치액젓을 만들며 김치를 담글 때 부재료로 사용하기도 한다. 최근 Jeong 등⁽¹⁾은 멸치액젓에 혈전용해효소가 존재하며 경구투여시 동물의 혈액내 혈전을 용해시키는 활성이 있다고 하였으며 김치^(2,3), 된장^(4,5), 일본의 *Okara Koji*⁽⁶⁾ 및 인도의 *Tempeh*⁽⁷⁾ 등 많은 발효식품들이 항산화물질, 아질산 소거물질, 항혈전물질 등 생리활성물질들을 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다.

1940년대 이후 자동산화에 대한 항산화제와 관련된 연구들이 꾸준히 이루어지고 있으며, 연구가 이루어진 이래로 지방질식품들의 가공 및 저장중에 자동산화로 생성되는 과산화물질이 식품을 변패시켜 품질의

저하를 가져오므로 산패를 방지하기 위한 수단으로 항산화물질을 첨가하기 시작하였다⁽⁸⁾. 그러나 최근에는 생체세포 내에서 일어나는 여러 가지 산화반응이 노화, 동맥경화 또는 암들을 유발한다는 보고^(9,10)와 함께 독성이 없는 항산화제를 함유한 식품을 섭취하는 것이 여러 성인병 및 발암을 예방할 수 있다고 하였다.

현재, 식품의 유지나 지방산의 산화를 억제하기 위하여 많이 사용되고 있는 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), propyl gallate (PG) 및 tert-butyl hydroquinone(TBHQ) 등 인공 합성 항산화제는 항산화력이 강한 반면, 열 안정성이 떨어지고, 유해물질을 생성하여 안정성 측면에 문제가 제기되고 있어⁽¹¹⁾ 새로운 안전한 천연 항산화제 특히, 식품속에 함유된 항산화물질의 탐색이 요구되고 있다. 현재 알려져 있는 천연 항산화제로 tocopherol이 가장 항산화능이 높아 매우 실용적인 것으로 알려져 있으며 phenolic 물질, ascorbic acid, carotenoids, 황황물질 및 질소화합물 등이 항산화능을 가지는 것으로 보고되었다^(12,13). 질소화합물인 생리활성 펩티이드는 혈압강화작용, 혈청콜레스테롤 저하작용 및 산화방지작용 등의 생

Corresponding author : Hee Sook Kim, Dept. of Food Science and Technology, Kyungshung University, 110 Daeyun-dong Namku, Pusan 608-736, Korea

리활성을 가지는 것으로 알려져 있으며 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소분해하여 얻어지는 저분자 펩타이드로부터 생리활성의 검토가 이루어지고 있다⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

우리나라 전통발효식품인 멸치액젓은 펩타이드, 지질 및 소금을 과량 함유하고 있고 오랫동안 숙성 및 저장을 거쳐야 되는 식품으로 항산화성과 같은 생리활성을 지니고 있다면 안심하고 식탁에 올릴 수 있는 영양성 및 기능성 식품이 될 수 있을 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 멸치액젓의 항산화성을 검토하기 위하여 여러 단계로 분리하고 항산화능을 측정하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 시료는 부산자갈치 시장에서 구입한 시판용 멸치액젓과 부산에 거주하는 가정에서 만든 멸치젓을 여과지(Whatman No.42)로 걸러서 얻은 여과액을 사용하였다.

시약

추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였고, TLC plate는 Merck의 Kieselgel 60 F₂₅₄를, Sephadex G-50, DE-52, DPPH, BHA, L-ascorbic acid 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. Biogel P2는 Bio-Rad사 제품을 사용하였다.

Linoleic acid model을 이용한 항산화활성 측정

멸치액젓의 linoleic acid 자동산화에 대한 항산화효과의 측정은 로단철 법⁽¹⁸⁾을 사용하였다. 즉, 일정농도의 시료 200 µl와 에탄올에 용해한 5% linoleic acid 200 µl를 섞고 여기에 0.01 M 인산완충용액(pH 7.0) 400 µl와 증류수 200 µl를 넣어 잘 혼합한 다음 빛을 차단한 상태로 60°C의 항온조 내에서 보관하면서 일정 시간 경과 후 linoleic acid의 과산화정도를 측정하였다. 일정기간 반응한 linoleic acid-시료 혼합액 100 µl를 취하여 75% 에탄올 3 ml와 30% ammonium thiocyanate 100 µl를 가하고 그 혼합물에 0.02 M ferrous chloride 100 µl를 가하여 섞고 3분 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료대신 증류수를 첨가한 대조군과 비교하여 산화저해활성을 백분율로 나타내었으며 3회 반복실험으로 결과를 얻었다.

DPPH 래디칼 소거작용

Table 1. Antioxidative effects on linoleic acid system and radical scavenging effects on DPPH radical of Fermented Anchovy and its fractions

Fractions	Total volume (ml)	Inhibition of Oxidation(%) ¹⁾	Reduction of DPPH(%) ²⁾
Fermented Anchovy	800	77.8	60.3
Chloroform Fr.	10	93.2	32.3
Ethylacetate Fr.	10	90.3	44.8
Butanol Fr.	85	96.1	62.1
Aqueous Fr.	460	96.9	66.4
Control		0	0
BHA(0.01 M)		79.7	96.7

¹⁾Antioxidant activities were measured after 4 days incubation at 60°C. 100 µl of each fraction was used in total incubation volume 1 ml.

²⁾Reduction of DPPH radical was measured after 30 min incubation. 100 µl of each fraction was used in total assay volume 5 ml. Values are means of three times.

시료의 유리래디칼 소거작용의 실험은 각 시료의 DPPH 래디칼에 대한 소거효과를 측정하였다⁽¹⁸⁾. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 16 g을 10 ml의 에탄올에 용해한 후 증류수 100 ml를 혼합하여 만든 DPPH용액 5 ml와 각 용매층의 농축액을 Table 1에서와 같이 100 µl를 잘 섞어 실온에서 30분간 방치한 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 래디칼 소거활성은 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다.

Conjugated diene 생성량 측정

Linoleic acid를 멸치액젓의 분획들과 함께 위의 항산화성 시험방법과 같이 60°C에서 25시간 동안 저장하면서 5시간마다 반응액 0.1 ml를 취하여 60% 메탄올 3 ml과 무수 메탄올 1 ml를 혼합한 후 234 nm에서 흡광도를 측정하였다⁽¹⁹⁾. 대조군으로는 시료대신 증류수를 첨가하였다.

멸치액젓 수용성 핵분의 항산화물질 분리

농축한 수용액층을 MWCO 1000Å 한외여과막을 사용하여 여과액과 비여과액으로 나누고 농축하여 실험 방법에서 설명한 바와 같이 시료의 부피를 일정하게 하여 항산화활성을 측정하였다. 또한 항산화활성을 가진 수용액층에 메탄올을 같은 부피만큼 가하여 잘 혼합하고 4°C에서 저장한 후 원심분리하여 침전물과 상등액으로 분리하였다. 상등액을 농축하여 Sephadex G-50 gel filtration column chromatography (2.5×80 cm), DE-52 anion exchange column chromatography (4×17 cm), Biogel P2 column chromatography (2.5×80 cm) 및 C₁₈ reverse column (2.2×16 cm, Vydac,

USA)이 장착된 HPLC (Hewlett Packard Ti-series 1050, USA)를 행하여 활성성분을 분리하였다. 각 용매 분획물과 column chromatography에서 얻은 분획들은 각각 0.1 ml를 취하여 항산화활성을 측정하고 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각 분획마다 biuret 시험, ninhydrine 시험 및 TLC 등을 행하여 정성하였다. 항산화활성을 가진 분획들의 아미노산 조성을 측정하기 위하여 시료를 6 N HCl로 가수분해하고 PITC (phenylisothiocyanate)의 유도체를 만들어 HPLC의 Pico-tag column (3 ml volume, Waters Co. USA)으로 분리 분석하였다. HPLC에서 최종적으로 얻은 활성물질의 물질규명을 위한 수단으로 기초과학연구원 연구소의 Protein sequencer (ABI, USA)를 사용하였다.

결론 및 고찰

멸치액젓으로부터 항산화 활성이 있는 물질을 분리하기 위하여 극성차를 가진 용매를 이용하여 각 용매 분획을 얻었으며 각 분획물에 대한 항산화효과는 Table 1과 같았다. 각 용매 분획을 농축하여 건조하고 에탄올로 현탁시켜 실험에 사용하였을 때 모든 용매 분획에서 항산화능이 우수하였으며 농축한 용매분획 10 μl씩을 이용하여 DPPH 래디칼 소거능을 측정한 결과 모든 분획에서 소거능을 보였고, 수용액 분획과 부탄올분획이 가장 우수하였다.

멸치액젓의 수용성 분획을 한외여과막으로 분리하고 투석막을 이용하여 투석한 결과 항산화능은 Fig. 1과

같았으며 분자량 1000이하의 물질들이 분자량이 큰 물질들보다 멸치액젓의 항산화활성을 가지는 것으로 추정되었다. 또한 메탄올을 최종농도 50% 되게 하여 얻은 침전물은 항산화활성을 거의 가지지 않았지만 상층액에 항산화활성이 남아 있었고 수용액층의 색이 진한 갈색이었다. 간장숙성시 갈변반응에 의하여 생성된 melanoidin이 항산화활성을 갖는다는 보고가 있으며^(20,21), 멸치액젓의 수용액층에는 peptide 또는 아미노산이 풍부할 것으로 생각되어 먼저 증류수를 용출용매로 하여 Sephadex G-50 gel filtration column chromatography (2.5×80 cm)를 행하였으며 각 분획의 항산화 활성시험 및 아미노기 정성을 위한 ninhydrin 시험을 하였다. 갈변도 및 방향족아미노산 또는 그들의 peptide를 측정하기 위하여 420 nm 및 280 nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 2와 같았다. 활성이 있는 분획들을 모으기 위하여 silica gel이 입혀진 plate에 각 분획을 점적하고 butanol : acetic acid : H₂O(60 : 20 : 20, v/v/v)를 전개용매로 하여 혼합물을 분리하였으며 ninhydrin으로 발색시켜 같은 spot들을 가진 분획끼리 합하여 농축하였다. 항산화활성이 가장 높았던 분획 (tube no. 230-245)은 소금과 함께 흘러 나왔으나 투석한 경우 항산화활성을 거의 잃었으므로 염을 제거할 수 없었다(멸치액젓의 염분농도는 약 20%~25%이었다). Sephadex G-50 column chromatography에서 얻은 활성분획을 증류수로 많이 희석하여 DE-52 anion exchange column chromatography를 행하였으며 이에 대한 결과는 Fig. 3과 같았다. 60°C 항온조에서 linoleic

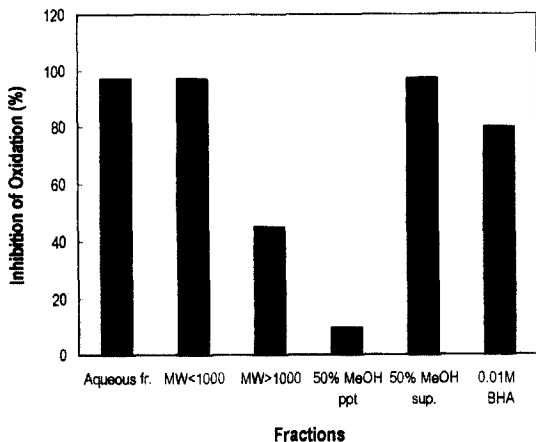


Fig. 1. Antioxidative effects of Fermented Anchovy aqueous fractions in the linoleic acid.
Antioxidant activities were measured after 4 days incubation at 60°C. Inhibition of oxidation(%) were expressed by comparing with antioxidant activity of control.

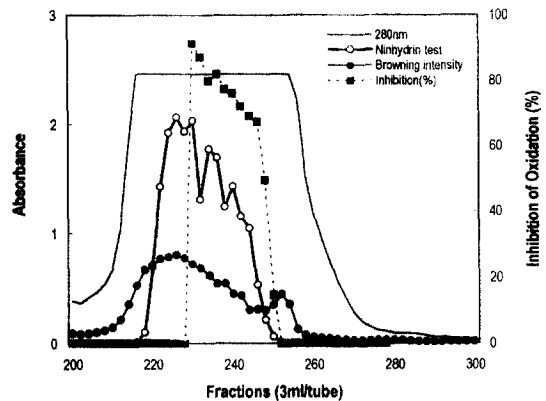


Fig. 2. Sephadex G-50 gel filtration chromatography of Fermented Anchovy aqueous small molecule fraction and inhibitory effects on the linoleic acid oxidation.
Antioxidant activity of each fraction was measured after 24h incubation at 60°C. Percent inhibition is expressed by comparing with antioxidant activity of control.

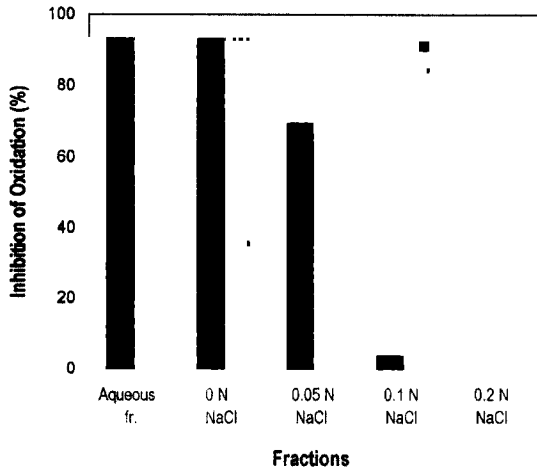


Fig. 3. Inhibition effects on the linoleic acid oxidation by the fractions of DE-52 anion exchange column chromatography.

Antioxidant activity was measured after the mixtures were incubated with or without 15 μ M FeCl₃ for 4 days at 60°C.

acid의 자동산화시 FeCl₃를 첨가하지 않은 항산화시험에서는 DE-52 수지에 결합하지 않고 용출된 획분(0 N NaCl) 및 0.05 N NaCl 용액에서 용출된 획분의 항산화활성이 높았으나 FeCl₃를 첨가한 실험에서는 0 N NaCl 용출분획은 항산화활성이 유지되었으나 0.05 N NaCl 용출분획의 항산화활성이 소멸되었다. 또한, 0 N NaCl 용출분획은 농축시 용액이 불투명하고 온도를 높이면 완전히 녹는 것을 보아 소수성 물질이 많이 함유되어 있음을 예측할 수 있었으며 100°C에서도 끓여도 항산화활성은 유지되었다.

DE-52 anion exchange chromatography로부터 얻은 0 N NaCl 용출분획의 항산화활성이 우수하였으므로 Biogel P2 gel filtration chromatography (2.5×80 cm)를 행하고 증류수로 용출하여 각 획분마다 280 nm에서의 흡광도, ninhydrin 시험, biuret 시험 및 항산화시험 등을 측정된 결과는 Fig. 4와 같았다. 각 획분을 TLC를 행하고 ninhydrin용액을 분무하여 spot이 비슷한 획분들을 모아 농축하여 7개의 분획을 얻었으며 그들의 항산화활성을 시험한 결과는 Fig. 4에서와 같이 3번 및 5번 획분에서 우수하였고 각 획분을 TLC에 점적하고 butanol : acetic acid : H₂O (60 : 20 : 20, v/v/v)의 혼합용매계로 전개한 후 ninhydrin용액으로 발색시켰을 때 나타난 spot들의 경향은 Fig. 5와 같았다. Biogel P2 gel filtration chromatography에서 5번 분획과 6번 분획이 용출될 때 소금이 함께 용출되었다. 멸치액젓 분획중 항산화활성이 우수하였던 분획들의 conjugated

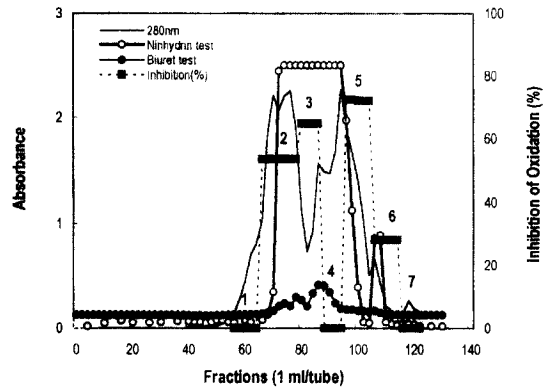


Fig. 4. Biogel P2 gel filtration chromatography of DE-52 unbound fraction and inhibitory effects of the linoleic acid oxidation.

The fractions which had similar trends of spots on TLC were pooled and numbered. Antioxidant activity of each numbered fraction was measured after 4 days incubation at 60°C.

Fig. 5. Separation of Biogel P2 and DE-52 unbound fractions on silica gel TLC.

The TLC plate was developed with BuOH : HOAc : H₂O (60 : 20 : 20, v/v/v) and sprayed with ninhydrin solution.

diene 형성정도를 측정된 결과는 Fig. 6과 같이 시료를 첨가하지 않았던 대조군보다 conjugated diene 형성이 저해되는 것을 볼 수 있었다.

DE 52 anion exchange column chromatography 및 Biogel P2 gel filtration chromatography를 행하여 얻은

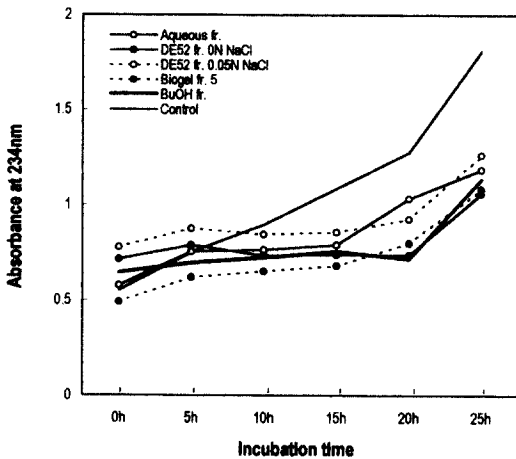


Fig. 6. Conjugated diene formation of Fermented Anchovy antioxidant fractions in the linoleic acid. Reaction mixtures were incubated for 25 hours at 60°C.

항산화활성획분들을 6 N HCl로 가수분해하여 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 2와 같았다. DE52 chromatography의 0N NaCl 용출분획은 0.05 N NaCl 용출분획에 비하여 소수성 아미노산이 풍부하였고 Biogel P2 gel filtration chromatography의 3번 및 5번 분획들 역시 다른 분획에 비하여 소수성 아미노산이 풍부하였고 6번 분획은 다른 분획들에 비하여 아미노산 농도가 아주 낮은 것으로 보아 아미노산이 아닌 다른 물질들이 함유되어 있는 것으로 사료된다. Biogel P2 chromatography에서 얻은 5번 분획을 1 mm silica

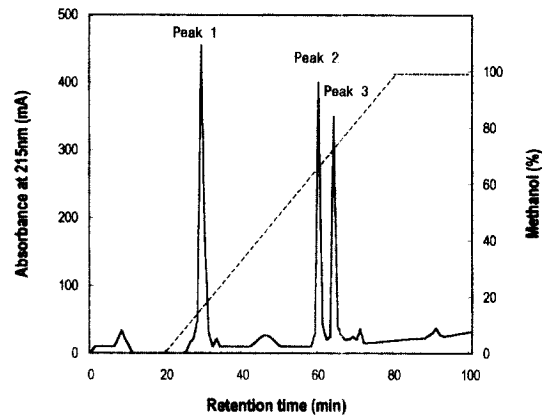


Fig. 7. HPLC profile of the antioxidant fraction of Biogel P2 gel filtration chromatography. The sample was analyzed on C₁₈ reverse column. The peaks were detected at 215 nm. Elution was done by using a linear gradient of methanol in H₂O from 0% to 99% in 100 min, at a flow rate of 2 ml/min.

겔이 입혀진 TLC plate에 길게 점적하고 위와 같은 전개용매로 두 번 반복하여 전개한 다음 254 nm 및 365 nm의 UV등 위에서 나타나는 형광과, 전개된 plate의 가장자리를 ninhydrin으로 발색시켜 나타난 spot들의 위치를 참조하여 각각의 band를 긁어모았다. Methanol (100%), methanol/H₂O (50%) 및 H₂O을 단계별로 이용하여 silica gel 분말로부터 물질을 추출하고 그 여과액을 농축한 다음 항산화활성을 측정하였다. 항산화능이 가장 우수한 band를 C₁₈ reverse column이 장착된 HPLC로 분리하였을 때 얻은

Table 2. Amino acid composition of Fermented Anchovy antioxidant fractions of DE-52 anion exchange chromatography and Biogel P2 gel filtration chromatography

	DE52 fr.		Biogel P2 fr.					
	0N NaCl	0.05N NaCl	1	2	3	4	5	6
Asp/Asn	6.9 ¹⁾	27.7	-	0.9	-	-	7.0	-
Glu/Gln	11.8	45.3	7.9	1.7	-	-	-	-
Ser	2.1	1.3	2.6	-	-	-	5.6	3.0
Gly	13.8	9.4	18.4	1.0	2.2	10.2	11.3	12.2
Arg	2.7	3.1	-	-	2.8	50.8	12.7	-
Thr	3.1	1.7	3.7	-	-	-	-	-
Ala	18.8	2.1	13.1	53.2	54.5	14.3	32.4	3.0
Pro	6.1	4.5	23.2	7.9	7.1	4.5	12.7	2.7
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	12.2
Val	9.9	1.5	4.9	18.5	19.1	4.1	4.2	-
Met	2.3	1.3	9.4	1.6	1.5	14.3	4.2	6.1
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	4.3	-	-	2.8	6.6	-	2.8	-
Leu	5.2	-	-	2.0	5.0	-	2.8	-
Phe	1.5	1.3	-	-	-	-	-	48.6
Lys	11.5	1.0	16.9	10.3	1.2	1.6	4.2	12.2
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

¹⁾The fractions were hydrolyzed with 6N HCl and derivatized with phenylisothiocyanate.

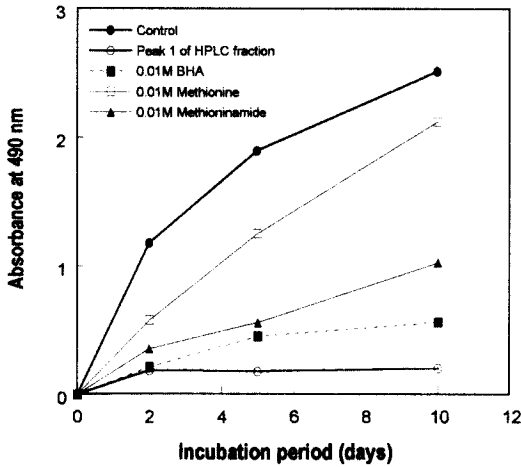


Fig. 8. Antioxidative effects of HPLC peak 1 in the linoleic acid.

Antioxidant activity was measured after various incubation period at 60°C. Peroxidation of linoleic acid were measured at 490 nm.

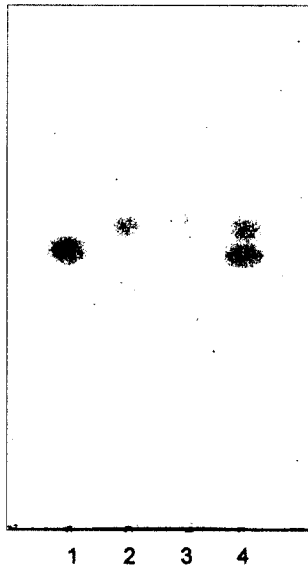


Fig. 9. Comparing peak 1 of HPLC fractions to methionine relative compounds on silica gel TLC.

The TLC plate was developed with BuOH:HOAc:H₂O(60:20:20, v/v/v) and sprayed with 1% ninhydrin solution. Lane 1; methionine, lane 2; peak 1 of HPLC fractions, lane 3; methioninamide, lane 4; methionine + methioninamide + peak 1.

chromatogram은 Fig. 7과 같았으며 29분에 용출된 peak 1의 항산화활성이 가장 우수하여 60°C에서 10일 이상 항산화능이 유지되었고(Fig. 8), 아미노산 조성분석에서는 methionine만이 나타났으며 methionine 및

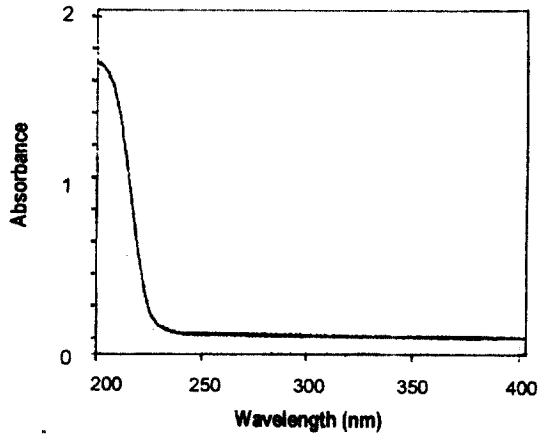


Fig. 10. UV-Vis spectrum of Peak 1 purified on HPLC. Sample was dried by speed-vac and redissolved with distilled water.

methioninamide를 표준품으로 하여 HPLC나 TLC로 확인 결과 유리 methionine의 위치와는 달랐으므로(Fig. 9) methionine의 유도체로 생각되었다. 분리된 물질의 UV-Vis spectrum은 Fig. 10과 같았으며 기초과학지원 연구소의 protein sequencer를 이용하여 아미노산배열을 5 cycle 행한 결과 methionine이 첫 cycle에서 나타나고 두 번째 cycle에서는 다른 peak들이 나타나지 않아 methionine이 N-terminal에 있으며 peptide가 아닌 methionine의 유도체일 것으로 해석되었으나 NMR 및 mass실험이 병행되지 않아 정확한 물질규명에는 부족하였다. 위의 실험결과들을 보면 멸치액젓 수용액층의 항산화활성은 발효숙성 중 생성된 여러 아미노산의 유도체들이 oligopeptide들과 어울려 상승효과를 나타내는 것으로 설명할 수 있을 것이다.

한편, Kim 등⁽²²⁾은 가자미피의 젤라틴을 가수분해하여 분자량 1800정도의 펩타이드가 항산화활성이 우수하다고 하였으며 Tsuge 등⁽¹⁴⁾은 ovoalbumin의 효소분해물 중 tripeptide인 Ala-His-Lys가, Muramoto⁽²³⁾는 콩 펩타이드 중 histidine을 가진 tripeptide 또는 tetrapeptide들이 금속이온 킬레이트 효과가 커서 항산화능을 갖는다고 하였고 Babizhayev 등⁽²⁴⁾은 근육세포에 존재하는 dipeptide인 carnosine 또는 carmine이 hydroxyl 래디칼을 소거하며 이는 histidine의 금속이온 킬레이트 효과 때문이라고 하였다. Liu와 Mori⁽²⁵⁾는 뇌세포의 산화적 손상을 norepinephrine, dopamine 및 serotonin 등 monoamine이 방어해 준다고 하였으며, Yen과 Hsieh⁽²⁶⁾은 tyrosine의 유도체 중 tyramine 및 dopamine만이 유리래디칼 소거반응이 있고 tyrosine이나 norepinephrine은 유리래디칼 소거활성보다는 과산화

물 생성을 저해하는 항산화능이 우수하다고 하였다. Yamaguchi 등⁽²⁷⁾은 유리아미노산도 항산화능이 있으나 유리아미노산이나 tripeptide보다 dipeptide가 더 우수하며 그 중에서도 Met-AspNH₂가 가장 우수하다고 하였고 N-말단의 구성아미노산에 따라 항산화능이 달라진다고 하였다. Kojima와 Suetsugu⁽²⁸⁾는 cysteine이나 methionine의 methylester가 같은 농도의 BHA보다도 항산화능이 우수하다고 하였으며 Nagaro 등⁽²⁹⁾은 몇몇 *Streptomyces* 균주가 배양액에 methionine과 함께 축적하는 methionine의 환상유도체인 3-methylthiopropylamine이 BHA정도의 항산화능을 가지면서도 rat에 대하여 2배 이상의 안정성을 가진다고 하였다.

단백질의 가수분해물질인 oligopeptide들의 항산화성에 대하여는 많은 연구들이 진행되고 있으나 발효식품에서의 oligopeptide 또는 아미노산 관련물질의 항산화성에 대하여는 미지의 발효물질이기 때문에 규명하기가 어렵고 특히 젓갈같은 발효식품은 소금함량이 많고 항산화성 물질이 항상 소금과 함께 용출되는 관계로 정제하기가 어려운 점이 있으나 우수한 생리활성 물질을 많이 가지고 있으므로 좀 더 깊은 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

멸치액젓으로부터 항산화활성을 가지는 물질을 분리하기 위하여 용매추출 및 chromatography를 행하였다. 모든 용매분획들에 항산화활성이 있었으며 그 중 BuOH 층과 수용액층이 소금을 함유하고 있었으나 항산화활성이 우수하였다. 수용액층을 투석막(MWCO 1000)으로 증류수에 대하여 투석하였을 때 투석막 내역의 항산화활성이 소실되었으므로 멸치액젓의 항산화성 물질은 분자량 1000이하의 분자량을 가진 것으로 추정하였다. Sephadex G-50 gel filtration chromatography에서 얻은 항산화물질 분획(tube No. 230-245)으로 DE-52 anion exchange chromatography를 행한 결과 column에 결합하지 않고 흘러나온 분획(0 N NaCl용액) 및 0.05 N NaCl용액으로 용출된 분획에서 항산화활성이 있었으나 15 μM의 Fe⁺⁺⁺ ion의 존재하에서 0 N NaCl 분획만 항산화활성이 유지되었다. Biogel P2 chromatography를 행한 결과 3번과 5번 분획의 항산화활성이 특히 우수하였으며 TLC확인결과 아미노기가 풍부한 분자들임을 알 수 있었고 아미노산 조성을 분석하였을 때 다른 분획들보다 3번과 5번 분획에 소수성 아미노산이 많이 함유되어 있었다. TLC로 분리하여 항산화활성이 우수한 하나의 band를 HPLC의 C18

column으로 분석하였을 때 3개의 peak 중 항산화활성을 갖은 물질은 methionine의 유도체이었으며 이는 멸치젓 수용액층의 많은 항산화물질 중 하나로 여러 아미노산 또는 oligopeptide의 유도체들의 상승효과가 멸치액젓의 항산화성을 유지하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 과학재단 특정기초연구과제(과제번호 96-0402-12-01-3) 사업비의 지원으로 수행된 연구결과에 일부로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Jeong, Y.K., Yang, W.S., and Kim, B.K. Effect of oral administration of fibrinolytic enzyme from a fermented anchovy, Myulchi Jeot-Gal. Korean J. Life Sci. 8, 737-740 (1998)
2. Cheigh, H.S., Lee, Y.O., Choi, Y.S. Antioxidative activity of *Kimchi* and *Kimchi* sub-ingredient. Food Ind. and Nutr. 3, 47-54 (1998)
3. Kim, K.H., Kim, S.H., Rhee, S.H. and Park, K.Y. : Effects of *Kimchi* extracts on Interleukin-2 production and natural killer cell activity in mice. J. Food Sci. Nutr. 3, 282-286 (1998)
4. Choe, G.S., Lim, S.Y. and Choi, J.S. : Antioxidant and nitrite scavenging effect of soybean, meju and Doenjang. Korean J. Life Sci., 8, 473-478 (1998)
5. Kurech, T., Kikugawa, K., Fukuda, S. and Hasunuma, M.: Inhibition of N-nitrosamine formation by soya products. *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 425-428 (1981)
6. Matsuo, M. : *in vivo* Antioxidant activity of *Okara Koji*, a fermented *Okara*, by *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1968-1972 (1997)
7. Matsuo, M. , Nakamura, N., Shidoji, Y., Muto, Y. and Osawa, T.: Antioxidant mechanism and apoptosis induction by 3-hydroxyanthranilic acid, an antioxidant in Indonesian food, *Tempeh*, in the human hepatoma-derived cell line, HuH-7. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 43, 249-259 (1997)
8. Matano, K. : Toxicity of oxidized and heated fats. *J. Japan. Oil. Chem. Soc.*, 19, 197 (1970)
9. Ames, B.N. Endogeneous oxidative damage, aging and cancer. *Free Rad. Comms.*, 7, 121-128 (1989)
10. Steinberg, D. : Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.*, 272(34), 20963-20966 (1997)
11. Branen, A.L. : Toxicology and biochemistry of butyrate hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59-63 (1975)
12. Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B. and Kanner, J. Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.*, April, 85-88 (1993)
13. Burton, G.W.: Antioxidant activity of carotenoids. *J.*

- Nutr., 119, 109-111 (1989)
14. Tsuge, N., Eikawa, Y., Nomura, Y., Yamamoto, M. and Sugisawa, K.: Antioxidative activity of peptide prepared by Enzymatic hydrolysis of egg-white albumin. Nippon Nogeikakaku Kaishi(in Japanese), 65, 1635-1641 (1991)
 15. Suetsuna, K. and Osajima, K. : Blood pressure reduction and vasolatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine muscle, Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi, 42, 47-54 (1989)
 16. Rhee, K.S., Ziprin, Y.A. and Rhee, K.C. : Water-soluble antioxidant activity of oilseed protein derivatives in model lipid peroxidation system of meat. J. Food Sci., 44, 1132-1135 (1979)
 17. Ariyoshi, Y. : Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. Trends Food Sci. Technol., 4, 139-144 (1993)
 18. Misuda, H., Yasumoto, K. and Iwaki, K. : Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. J. Japan. Soc. of Food Nutr., 19, 210-214 (1966)
 19. Lingnert, H., Vallentin, K., and Eriksson, C.E. Measurement of antioxidative effect in model system. J. Food process preserv., 3, 87(1979)[in Korean J. Food Sci. Technol., 29, 1045-1051 (1997)]
 20. Cheigh, H.S., Lee, J.S., Moon, G.S., and Park, K.Y. : Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. J. Korean Soc. Food Nutr., 22, 565-569 (1993)
 21. Cheigh, H.S., Lee, J.S., and Lee, C.Y. : Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. J. Korean Soc. Food Nutr., 22, 570-575 (1993)
 22. Kim, S.K., Lee, H.C., Byun, H.K., and Jeon, Y.J. : Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. Korean J. Fish. Soc., 29, 246-256 (1996)
 23. Muramoto, K. : Functional properties of proteolytic hydrolysates of soybean proteins : Antioxidative activity against the peroxidation of linoleic acid and inhibitory activity on the crystallization of calcium chloride, Paper presented at 30th Ann. International Symposium on Soybean peptides and human health, Seoul, Korea (1998)
 24. Babizhayev, M.A., Seguin, M.C., Gueyne, J., Evstigneva, R.P., Ageyeva, E.A., and Zheltukhina, G.A.L.: Carosine and carinine act as natural antioxidants with hydroxyl-radical scavenging and lipid peroxidase activities. Biochem. J., 304, 509-516 (1994)
 25. Liu, J. and Mori, A. : Monoamine metabolism provides an antioxidant defense in the brain against oxidant-aid free radical-induced damage. Arch. Biochem. Biophys., 302, 118-127 (1993)
 26. Yen, G.C. and Hsieh, C.L. : Antioxidant effects of dopamine and related compounds. Biosci. Biotech. Biochem., 61, 1646-1649 (1997)
 27. Yamaguchi, M., Yoshio, Y., and Fufimaki, M. : Studies on antioxidative activity of amino compounds on fats and oils. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi(in Japanese), 22, 425-430 (1975)
 28. Kojima, M. and Suetsugu, R. : Studies on the antioxidant activities of the derivatives of sulfur containing amino acids on oils. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi(in Japanese), 21, 32-37 (1974)
 29. Nagano, Y., Samejima, H., and Kinoshita, S. : Antioxidant activity of 3-methylthiopropylamine hydrochloride. Agr. Biol. Chem., 32, 846-850 (1968)

(1999년 4월 20일 접수)