

해양에서 분리한 *Streptomyces* sp. BH-405 배양액의 항산화 효과

†류 병 호 · 이 영 숙 · 양 승 택
경성대학교 식품공학과

(접수 : 2000. 3. 19., 게재승인 : 2000. 4. 21.)

Antioxidative Effects of Cultivation of *Streptomyces* sp. BH-405 Isolated from Marine Origin

Beung-Ho Ryu†, Young-Sook Lee, and Seong-Taek Yang¹

¹Department of Food Science and Biotechnology,
Kyungsoong University, Pusan, 608-736, Korea

(Received : 2000. 3. 19., Accepted : 2000. 4. 21.)

Antioxidative activity of culture of *Streptomyces* sp. BH-405 was investigated. After removal of pellets of *Streptomyces* sp. BH-405, antioxidative substances were isolated and succesively purified from culture of *Streptomyces* sp. BH-405 by thin layer chromatography (TLC) or silica gel column chromatography. The fraction 3 obtained from ethylether fractionation of the culture appeared highest level of antioxidative activity as determined by thiocyanate method. Band 2 obtained by further purification of this fraction showed higher antioxidation level than that of same concentration of *dl*- α -tocopherol, butylated hydroxy anisole (BHA). The band 2 showed higher rate of 1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl (DPPH) decolorization than *dl*- α -tocopherol. In the rat liver microsomes, band 2 rapidly inhibited lipid peroxidation which was initiated enzymatically by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) or non-enzymatically by Fenton's reagent. Band 2 inhibited on lipid peroxidation of mitochondria or the linoleic acid hydroperoxide induced peroxidation system. It is concluded that band 2 obtained by fractionation of *Streptomyces* sp. BH-405 cultivation contained antioxidants with the capacity to inhibit oxidative modification.

Key Words : *Streptomyces* sp. Antioxidative activity, thiocyanate method

서 론

해양에는 거대생물에서 미생물에 이르기까지 다종다양한 생물이 살고 있으며 해양생물은 육상과 전혀 다른 환경에서 자라나기 때문에 물질대사의 경로도 육상생물과는 다르고 그 성분도 육상생물과는 비교할 수 없을 만큼 새로운 구조를 갖는 화학물질을 생산할 수 있을 것으로 기대된다(1).

최근에는 해양 미생물 기원의 신기능성 소재를 분리 정제하여 대량생산 하므로 그 부가가치도 높고 효과도 인정받아 천연물로부터 유용물질의 탐색으로 연구방향이 전환되고 있는 실정이다. 해양에는 다양한 미생물이 존재하고 그 미생물의 대사기작 또한 특이하고 다양하므로 각종 미생물의 대사산물로부터 여러 유용한 생리 활성물질들이 발견되었고(2,3)

오늘날에는 치료제로서의 개발 가능성이 높으며 실제로 임상 치료제로 이용되는 것도 있어서 우리들의 일상 생활을 영위 하는데 많은 도움을 주고 있다(4,5,6). 지질의 과산화를 방지 하는 항산화제로는 BHT와 BHA 등이 사용되고 있으나, 이들 화학 합성품은 생체 효소의 활성을 억제하고 암을 유발한다는 보고가 있으며 대부분의 항산화제는 거의 모두 인체에 독성을 나타내어 사용규제를 받고 있다(7). 반면에 천연 항산화제로 이용되고 있는 비타민인 α -tocopherol 및 vitamin C 등은 항산화 효과가 낮고, 가격이 비싼 단점이 있다. 그러므로 항산화능이 우수하고 인체에 무해하며 가격이 저렴한 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구된다. 항산화제 연구로는 수산자원 중 미역 등 12종류에 대한 항산화성 물질을 동정한 바 있고 비식용 해양동물 및 식용 해조류를 이용한 항산화제에 대한 연구가 있을 뿐 아직은 많은 연구가 이루어지지 않고 있다(8,9).

미생물로부터 항산화제에 관한 연구로는 어유에 대한 효모의 항산화 효과(10), fungi로부터 분리한 curvulic acid 및 citrinin의 과산화 억제효과(11), 생선 및 패류 부착 세균이 생산하는 항산화제(12), *Aspergillus sojae* K가 생산하는 pept-

†Corresponding Author : Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsoong University, Pusan, 608-736, Korea
Tel : 051-620-4712, Fax : 051-622-4986
E-mail : bhryu@star.kyungsoong.ac.kr

ides 성분의 항산화제(13), *Bacillus natto*에 의한 soybean paste로부터 항산화제의 분리에 대한 연구(14) 및 *Penicillium roquefortii* IFO 5956으로부터 분리한 항산화제 등(15)이 있을 뿐 새로운 기능을 가진 항산화제에 관련된 연구는 찾아 볼 수 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 해양에서 분리한 항산화제를 생산하는 균주를 분리한 후(16), 균주의 배양액에서 지질과산화에 대한 항산화 물질을 분리 정제하고 항산화제로서 개발 가능성을 보고하고자 한다.

재료 및 실험방법

미생물

해수를 1997년 2월 부산 연안에서 채수하여 분리 동정한 항산화제 생산균주인 *Streptomyces* sp. BH-405를 사용하였다(16).

항산화 활성 측정

Streptomyces sp. BH-405를 marine broth 2216(DIFCO) 배지 1L를 배양하였다. 배양액 1L를 원심분리하여 상등액을 모두 취하고 ethylether로 500mL씩 3회 추출한 후 전 용매층을 모아 농축하였다. 농축한 항산화성 물질 10mg를 ethanol 1mL에 용해시킨 후 그 중 200 μ l를 effendorf tube에 넣고 phosphate buffer 400 μ l, distilled water 200 μ l, linoleic acid solution 200 μ l과 함께 넣어 섞은 다음 어두운 곳에서 50 $^{\circ}$ C를 유지하며 일정시간 동안 반응시켰다. 이 반응액 100 μ l를 취하고 여기에 NH₄SCN solution(100 μ l), ferrous chloride 시액(100 μ l) 및 75% ethanol을 가한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 상대 활성으로 나타내었다(17).

수소공여능의 측정

시료에 대한 수소공여능(hydrogen donating ability, HDA)을 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)의 환원성을 이용하여 517 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer (Beckman DU-65, USA)로 측정하였다. 즉, 시료용액(1 mg/ethanol mL) 1mL를 시험관에 넣고 DPPH (8 mg/ethanol mL) 3mL 가하고 10초 동안 vortex mixer로 섞은 후 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후, 5분 후에 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 흡광도의 감소 비율로서 수소 공여능을 나타내었다(18).

항산화 성분의 분리

용매에 의한 성분의 추출

배양액 1.5L는 Jar fermentor(1L)에 *Streptomyces* sp. BH-405 배양액 10mL를 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 72시간 배양시킨 후 원심분리(3,000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)하고 상등액을 모아 500mL ethylether로 3회 추출한 다음 이를 진공 농축하고 증발 건조한 후 시료로 사용하였다.

Silica gel column chromatography에 의한 활성 성분의 분리

Ethylether 추출물을 silica gel column chromatography을 행하였다. 즉 유리 column(길이, 100cm \times 직경, 10cm)에 활성화

된 silica gel(0.063~0.100 mm, 70~270 mesh, 734, Merck Co., Germany)을 ethylether로 slurry를 만들어 충전한 후 시료를 넣고 ethylether : methanol용액을 100 : 0 (500 mL), 90 : 10 (500 mL), 80 : 20 (500 mL), 50 : 50 (500 mL), 그리고 0 : 100 (500 mL)의 비율로 혼합하여 단계별로 각각 용출하였다. 이때 얻은 각 분획물들을 감압 농축한 후 이들 시료를 각각 200 μ l씩을 취하여 항산화 효과를 측정하여 활성이 있는 subfraction을 얻었다.

TLC에 의한 항산화 활성 성분의 분리

Silica gel column chromatography를 행하여 얻은 항산화능이 있는 분획물을 TLC로 분리하여 항산화성 물질을 검색하였다. 즉, 항산화 활성이 가장 강한 분획물(10 mg/mL)을 capillary tube로 silica gel TLC (5554 Merck)상에 점적한 후 전개시켰다. 이때 전개용매는 butanol : methanol (90 : 10)을 사용하였고, TLC plate는 DPPH 발색 시액을 분무하여 항산화성 물질들을 확인하였다.

분리 확인된 항산화 활성이 높은 분획을 실험실에서 만든 silica gel plate(두께 0.4~0.5 mm)상에 preparative TLC로 점적한 후 butanol : methanol(90 : 10) 용매로 전개하였다. 반복 실험한 후 이를 긁어 모아(150 mg~200 mg정도) ethylether 1 mL에 녹인 후 잔존하는 silica gel을 제거한 후 시료로 사용하였다.

분획물의 항산화력 측정

분획물 10mg을 ethanol 1mL에 녹인 후 그 중 30 μ l를 취하여 ethanol 1 mL에 다시 녹인 후 linoleic acid 5 g을 넣어 잘 혼합한 다음 차광된 63 $^{\circ}$ C의 oven에서 24시간 동안 보관하면서 경시적으로 일정량을 채취하여 과산화물가(POV)를 측정하였다. 이때 대조군으로 BHA를 같은 농도로 ethanol에 녹여 1mL로 한 후 30 μ l를 취해 동일한 방법으로 측정하였으며 대조시험은 분획물을 첨가하지 않은 조건에서 측정하였다.

동물실험에 의한 간지질의 과산화 억제효과

Rat liver로부터 mitochondria 및 microsomes의 제조 Mitochondria 및 microsomes은 Wistar male rats (100~150 g)의 간(liver)으로부터 적출하여 분리하였다. 쥐의 간을 적출하여 0.25 M sucrose, 0.1 mM EDTA 함유하는 3 mM Tris · HCl buffer(pH6.5)에 넣어 0 $^{\circ}$ C로 유지한 후 적출한 간을 균질화하였다. Mitochondria는 7,000 \times g로 원심분리하여 분리하고 이때 microsomal pellet은 0.15 M KCl로 sucrose를 제거하여 사용한다. Submitochondrial particle은 sonicator를 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 1분동안 균질화하였다. 이를 -80 $^{\circ}$ C에서 동결하여 두고 사용하였다(19).

Microsomes의 지질의 과산화 억제효과

Fenton reaction은 microsomal suspension(0.5 mg, protein/mL)을 3 mM ADP로서 배양시킨 후 각종 농도의 시료를 첨가한 다음 1 mM H₂O₂와 0.15 mM FeSO₄을 첨가하였다. 85 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후, 이때 생성된 과산화 지질은 thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)의 흡광도(532nm)로서 나타내었다(20).

Mitochondria의 지질의 과산화 억제효과

Mitochondria의 지질 과산화는 쥐 간에서 분리한 submitochondrial particles(0.3 mg, protein/mL)를 50 mM HEPS, pH 7.0, 2 mM ADP, 0.1 mM FeCl₃, 0.1 mM NADPH의 반응 혼합액 1mL에 각종 농도의 추출물을 첨가하여 5분간 반응시킨 후 microsome의 과산화 억제효과와 같은 방법으로 측정하였다(19).

결과 및 고찰

Streptomyces sp. BH-405 배양액의 항산화력의 비교

Streptomyces sp. BH-405의 배양액의 ethylether 추출물이 예비실험에서 각종 유기용매 추출물보다 항산화 활성이 높았다. Figure 1에 나타난 바와 같이 Streptomyces sp. BH-405 배양액의 ethylether 추출물의 항산화력을 비교하기 위하여 linoleic acid의 에탄올 용액 1mL에 ethylether 추출물 10mg을 첨가한 후 항산화력을 측정하였다. 이때 대조군으로 ascorbic acid, dl- α -tocopherol, BHA와 비교한 결과 ethylether 추출물이 ascorbic acid와 dl- α -tocopherol 보다는 항산화력이 강했으나 BHA보다는 낮았다.

Streptomyces sp. BH-405 배양액의 ethylether 추출물의 항산화 효과를 높이기 위하여 silica gel column chromatography로 정제하였다. Ethylether : methanol의 비율을 달리하여 fraction 1 (100 : 0), fraction 2 (80 : 20, v/v), fraction 3 (50 : 50, v/v), fraction 4 (20 : 80, v/v) 및 fraction 5 (0 : 100, v/v)인 각 분획물을 얻어 비교하였다. Figure 2에서 나타난 바와 같이 column(100cm \times 10cm) chromatography를 실시하여 얻은 5개의 fraction을 농축한 후 과산화물가(peroxide value, POV)를 측정하였다. Linoleic acid에 각각 5개의 fraction을 에탄올 용액(10mg/mL)에 녹인 후 63 $^{\circ}$ C에서 저장하면서 저장시간에 따른 각종 유기용매 추출물의 POV를 측정한 결과 항산화 활성은 fraction 3 > fraction 4 > fraction 5 > fraction 1 > fraction 2의 순이었다.

Streptomyces sp. BH-405 배양액의 ethylether의 fraction 3이 linoleic acid에 대하여 우수한 항산화 효과를 나타내는 것은 linoleic acid와 같은 불포화 지방산을 함유한 지질에 대하여 산화억제 작용을 보여주는 것으로 천연 항산화제로서 가능성을 보여주고 있다.

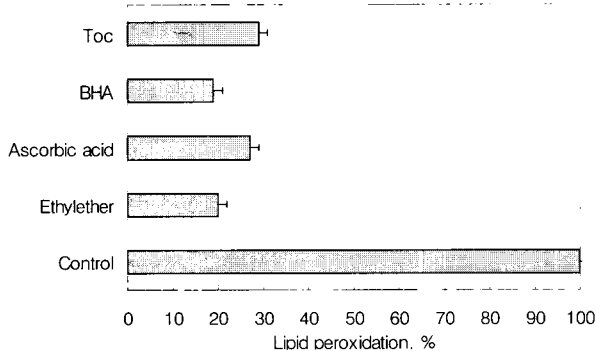


Figure 1. Inhibition on oxidation of linoleic acid by various antioxidants measured by ferric thiocyanate method. Toc, tocopherol; BHA, ethylether-extracts from BH405 culture.

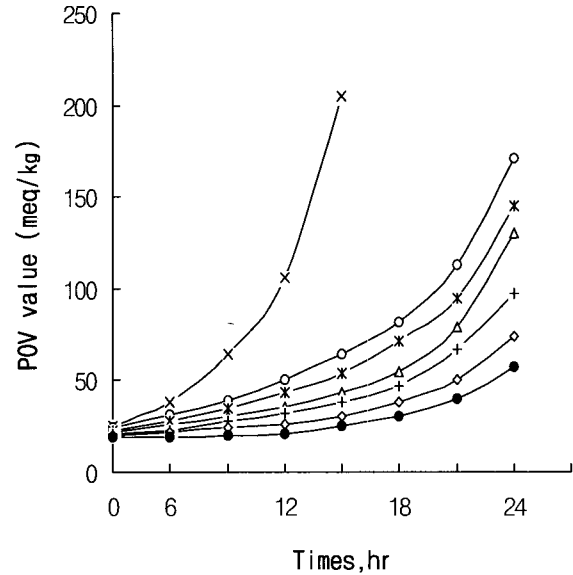


Figure 2. Peroxide values of each fraction eluted from cultivation of Streptomyces sp. BH-405. Control, x-x; Fraction 1, *-*; Fraction 2, o-o; Fraction 3, o-o; Fraction 4, +-+; Fraction 5, Δ-Δ; BHA, ●-●.

Chromatography와 TLC에 의한 항산화성 물질의 분리

Streptomyces sp. BH-405의 배양액의 ethylether 추출물 중 항산화 활성이 높은 fraction 3을 농축한 후 TLC로 분리 정제하였다. 항산화력이 가장 우수한 fraction 3의 활성 부위를 다시 분리 정제하기 위하여 Figure 3에서 보는바와 같이 TLC상에서 전개시킨 결과 band 1 및 2를 얻었다. 이를 preparative TLC로 다시 전개시켜 나타난 band 1 및 2를 TLC상에서 긁어 모아 ethylether로 녹인 후 여과하고 농축하여 band 1 및 Band 2 시료로 하였다. Figure 4는 preparative TLC로 분리한 band 1 및 band 2의 항산화력을 비교하기 위하여 POV를 측정한 결과 dl- α -tocopherol, BHA 및 BHT와 비교한 실험 결과이다. Band 2의 항산화 활성은 BHA보다는 약간 낮았으나, BHT와는 비슷하였고 dl- α -tocopherol보다 높았다.

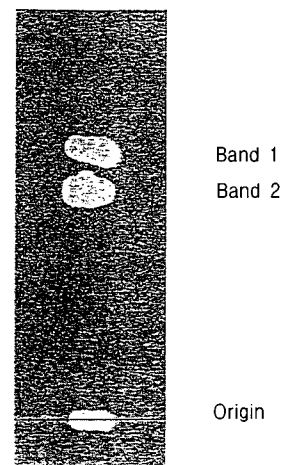


Figure 3. Thin layer chromatogram showing antioxidative effect of Fraction 3 eluted from cultivation of Streptomyces sp. BH-405

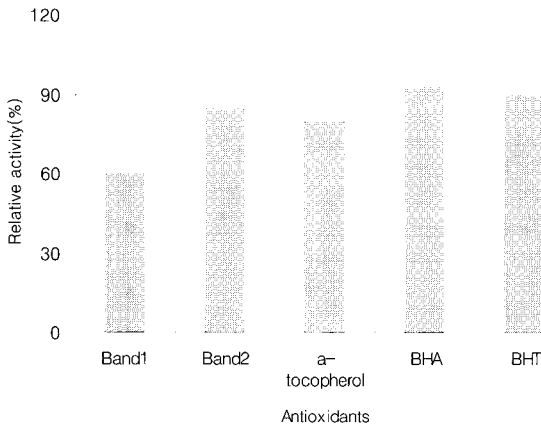


Figure 4. Comparative analysis of antioxidative activity of band 1 and 2 extracted from fraction 3 of *Streptomyces* sp. BH-405 culture.

Streptomyces sp. BH-405 배양액 추출물의 수소 공여능

Streptomyces sp. BH-405의 배양액을 ethylether을 추출하고 fraction한 후 fraction 3을 preparative TLC를 실시하여 얻은 band 2를 수소전자 공여 효과에 대하여 dl-α-tocopherol 및 BHA와 비교실험 하였다. Figure 5에 나타낸 바와 같이 band 2를 각각 100 및 200µg의 농도를 첨가한 시료와 100µg/mL dl-α-tocopherol 과 비교 실험한 결과 200µg을 첨가한 경우 DPPH에 의한 전자 공여 효과가 높았으나 band 2를 100µg 첨가한 경우 dl-α-tocopherol보다 낮았다. 이러한 결과는 band 2의 용량 의존형 항산화 효과가 있을 것으로 보여 주고 있다.

쥐 간의 microsomes에서 지질 과산화에 대한 항산화 효과

Microsomes은 세포 원형질의 망상조직에서 용이하게 지질의 산화가 일어날 수 있고 각 조직이 쉽게 과산화물을 운반시키게 된다. *Streptomyces* sp. BH-405에서 분리 정제한 항산화 활성이 강한 band 2에 대한 지질 과산화의 억제효과를 알아보기 위하여 쥐의 간에서 microsomes을 분리하여 항산화 효과를 검토하였다. Figure 6에서 보는 바와 같이 microsome 현탁액에 NADPH와 Fe³⁺을 첨가한 다음 산화 억제효과를 조사한 band 2를 100 및 200 µg/mL 씩 넣고 실험한 TBARS의 생성이 현저히 억제되었다. 이를 항산화 효과가 이미 알려져 있는 dl-α-tocopherol과 비교 실험한 결과 band 2와 동일 농도에서의 tocopherol의 항산화 효과는 약간 낮은 결과를 나타내었다. NADPH 및 Fe³⁺ 유도지질의 과산화는 NADPH 의존 cytochrome p-450 reductase의 활성에 의하여 잘 일어나므로 본 실험에 사용된 band 2는 효소작용에 의한 산화를 억제하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

세포막의 지질의 산화는 고도 불포화 지방산의 함량에 영향을 받고 있을 뿐 아니라 효소적 또는 비효소적으로 유리가 생성되어 세포막에 자극을 주어 일어난다. Microsome에서의 NADPH 의존 지질의 과산화는 peroxidation system으로 제시된 Fe²⁺에서 Fe³⁺는 cytochrome p-450 reductase의 NADPH 의존 활성에 의하여 효소적으로 일어나거나 ascorbic acid와 같은 환원제의 첨가에 의하여 비효소적으로 일어난다.

본 연구에 사용된 band 2는 여러 가지 요인에 의하여 지질 과산화가 일어나는 동안 linoleic acid의 측쇄반응에 효과가

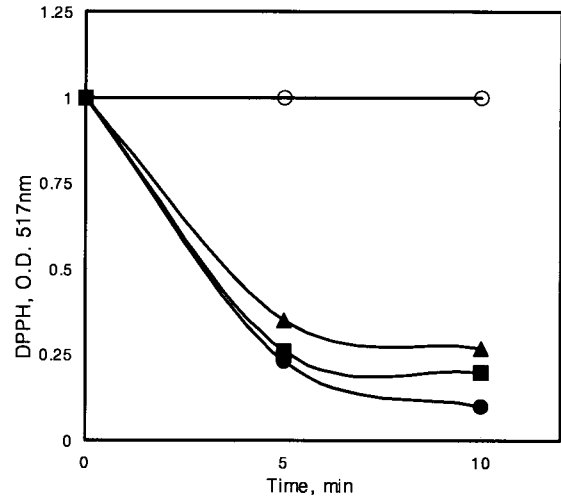


Figure 5. Time courses of DPPH decolorization by extracts from cultivation of *Streptomyces* sp. BH-405. Control, ○-○; 100µg/mL band 2, △-△; 200µg/mL band 2, ●-●; 100µg/mL dl-α-tocopherol, ■-■.

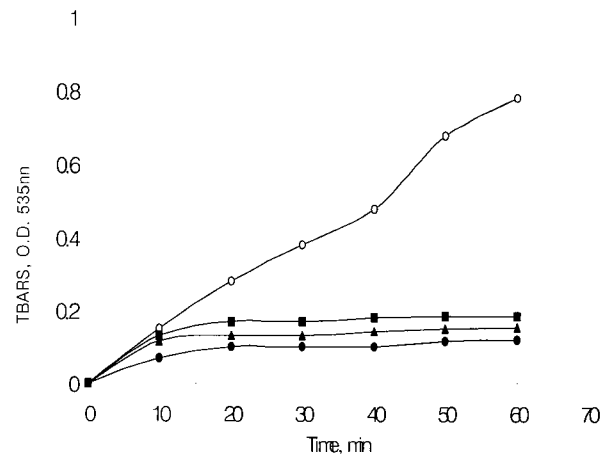


Figure 6. Antioxidative effect of band 2 isolated from *Streptomyces* sp. BH-405 on the lipid peroxidation initiated by NADPH and FeCl₃ in rat liver microsomes as described in methods. The amount of peroxidated products is expressed as the change in absorbance of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) at 535nm, Control, ○-○; 100µg/mL dl-α-tocopherol, ■-■; 100µg/mL band 2, △-△; 200µg/mL band 2, ●-●.

있는 것으로 생각된다.

쥐의 microsomes을 이용하여 cytochrome P-450 환원효소와 연관이 있는 ascorbic acid와 Fe³⁺의 첨가에 의하여 유도되는 과산화물은 band 2에 의하여 현저히 억제됨을 알 수 있었다.

이러한 실험결과로 보아 band 2는 microsomes에서 효소적(NADPH) 및 비효소적(ascorbic acid 및 Fenton reaction)시스템으로 유발되는 과산화물의 억제하는 우수한 항산화 효과가 있는 것으로 판단된다.

Mitochondria의 과산화에 의한 항산화 효과

Mitochondria에서 흔히 일어날 수 있는 반응으로 mitochondria가 산화적 스트레스를 꾸준히 받는다. Mitochondrial electron transport system에서 양쪽의 전기가 흘러나오면 유리되어 나오는 O₂가 방출되어 유리 산소로서 반응하고 결과적

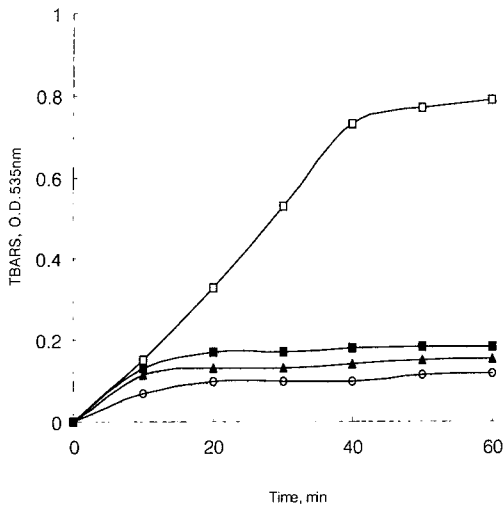


Figure 7. Antioxidative effect of band 2 isolated from *Streptomyces* sp. BH-405 on lipid oxidation in rat liver mitochondria. Control, □ - □; 100 µg/mL *dl*-α-tocopherol, ■ - ■; 100 µg/mL band 2, ▲ - ▲; 200 µg/mL band 2, ○ - ○.

으로 H_2O_2 을 생성하게 된다. 생성되는 지질 과산화물은 mitochondria 기능에 영향을 받아 H_2O_2 로 부터 유도된 hydroxyl 기($\cdot OH$)에 의하여 생성된다. Figure 7에서 보는 바와 같이 band 2를 100 및 200 µg/mL씩 첨가한 실험에서 mitochondria의 지질 과산화물의 생성을 억제하였으며 항산화제로 사용된 *dl*-α-tocopherol과 거의 비슷한 억제효과를 나타내었다. Mitochondria의 일부분의 지질 과산화는 ADP와 Fe^{3+} 의 존재 하에서 NADH와 NADPH에 의하여 일어나게 된다. Microsome의 과산화 지질에 있어서 band 2는 역시 ADP와 ascorbic acid에 의하여 유도되는 mitochondria의 지질 과산화를 억제한다고 생각된다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 교육부의 생물화학공학 학술연구 조성비에 의해 수행하였으므로 이에 감사드립니다.

요 약

본 연구는 *Streptomyces* sp. BH-405의 배양액으로부터 유용매로 추출하여 지질과 산화에 대한 항산화 효과를 실험하였다. *Streptomyces* sp. BH-405의 배양액을 ethylether로 추출한 후 silica gel column(100×10 cm) chromatography로 분획한 획분을 POV로 측정된 결과 fraction 3에서 항산화 활성이 가장 높았다.

항산화 활성이 높은 fraction 3 획분을 다시 preparative TLC와 column chromatography로 더욱 정제하여 band 2를 얻었다. Band 2의 항산화 효과를 알아보기 위해 기존의 항산화제와 비교한 결과 *dl*-α-tocopherol, BHA보다 산화억제 효과가 높았으며 DPPH에 의한 수소 공여능은 실험결과가 우수하였다. 한편 band 2는 쥐 간의 microsome에 있어서 유리기의 소거기능이 있었고 NADPH 및 Fenton 시액에 의한 효소

적 과산화 지질의 생성을 억제하였다. 그리고 mitochondria와 리놀산의 과산화 유도계에서도 지질의 과산화 과정에 생성하는 유리기의 형성을 차단하였다. 결론적으로 *Streptomyces* sp. BH-405의 배양액에서 얻은 획분인 band 2는 산화를 억제하는 활성이 있었다.

REFERENCES

- Miyachi, S., and Matsunaga, T., (1988), Perspective of marine Biotechnology, *Chemical Industry*, 41(7), 604-6165.
- Kobayashi, J. and Ishibashi, M., (1993), Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganism, *Chem. Ind.* 93, 1753-1769.
- Garson, M. J. (1993), The biosynthesis of marine natural products, *Chem. Rev.* 93, 1699-1733.
- Barrow, K. D. (1983), In marine natural products; Chemical and Biological perspective; Scheuer, P.J., Eds; Academic Press, New York, 5, 51-86.
- Okami, Y. (1988), Message to medicine from marine organisms, *Chemical and Industry*, 41(7). 620-623.
- Chain, E. B., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jerrings, M. A., Our-Ewing, J., and Sanders, A. G. (1940), Penicillin as a chemotherapeutic agent, *Lancet* ii., 226-228.
- Branen. A.L. (1975), Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59.
- Park, J. H., Kang, K. C., Baek, S. B., Lee, Y. H. and Rhee, K. S., Separation of antioxidant compounds from edible marine algae, (1991), Korea, *J. Food Sci. Technol.* 23(3), 256-261.
- Cho, S. Y., You, B. H., Chang, M. H. and Lee, E. H., (1994), *Korea J. Food Sci. Technol.*, 26(4), 417-421.
- Ryu, B.H., Kim, H. S., Jeong, J. S., Lee, S. H., (1987), Effects of antioxidative activity of yeast against fish oil, *Korea J. Food Hyg.*, 1987, 2, 15-20.
- Aoyama, T., Nakakita, Y., Nakagawa, M., and Sakai, H. (1992), Screening for antioxidant of microbial origin, *Agric. Biol. Chem.*, 46(9), 369-2371.
- Takao, T., Kitatani, F., Watanabe. N., Yagi, A, and Sakata, K. (1994), A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58(10), 1780-1783.
- Harun-Or-Rachid, Ma., Kato, Murata, A. and Kondok, M. (1993), Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus sojae* K, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(6), 935-937.
- Hattori, T., Ohishi, H., Yokota, T., Ohoami, H. and Watanabe, K. (1995), Antioxidative effect of crude antioxidant preparation from soybean fermented by *Bacillus natto.*, *Lebensm-Wiss. Technol.*, 28, 135-138.
- Hayashi, K., Suzaki, K., Kawaguchi, M., Nakajima, T., Suzaki, T., Numata, M. and Nakamura, T., (1995) Isolation of an antioxidant from *Penicillium roquefortii* IFO 5956, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(2), 319-320.
- Lee, Y. S., (1999), Antioxidative activity of 2,6, dimethoxyphenol and its derivative produced from *Bacillus* sp. ks-96. Ph.D Thesis, p.p. 82.
- Fukan, Y., Osawa, M., Namiki, M. and Osaki, T. (1985), Thiocyanate method, *Agric. Biol. Chem.* 49. 301-303.
- Blois, M.S. (1958), Antioxidant determinations by the use

- of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199.
19. Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978), Microsomal lipid peroxidation, *Method in Enzymology*, **30**, 301-310.
20. Rechnagel, R. O., Glende, E. A., Waller, R. L. and Lowrey, K. (1982), Lipid peroxidation : biochemistry. measurement and significance in liver cell injury, in PLAA, G. and Hewitt, W. R.(Eds.), Toxicology of the liver, Raven R. Press, New York, pp 218-232.
21. Yaki, K. A. (1976), Simple fluometric assay for lipoperoxide in blood plasma, *Biochem. Med.*, **15**, 212-216.