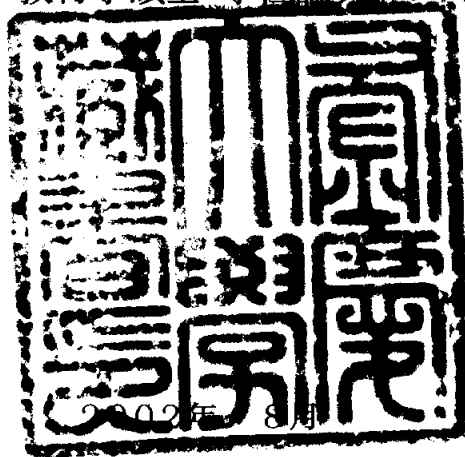


教育學碩士 學位論文

가자미 단백질의 효소적 가수분해물로부터 분리·정제된 펩티드의 항산화 특성

指導教授 金 世 權

이 論文을 教育學碩士 學位論文으로 提出함



釜慶大學校 教育大學院

化學教育專攻

全 信 映

全信映의 教育學碩士 學位論文을 認准함

2002年 6月 22日

主 審 藥學博士 孫 炳 華



委 員 理學博士 沈 鉉 館



委 員 工學博士 金 世 權



목 차

서 론	3
재료 및 방법	6
1. 재료	6
2. 방법	7
2-1. 가자미 단백질의 가수분해 조건	7
2-2. 아미노산 조성분석	9
2-3. 각 분획의 분자량 측정	9
2-4. 단백질 가수분해물의 항산화 효과	11
2-5. 항산화성 펩티드의 분리·정제	13
2-6. 순도 확인 및 분자량 측정	14
결과 및 고찰	15
1. 가자미 단백질의 가수분해도	15
2. 아미노산 조성분석	15
3. 분자량 측정	19
4. 단백질 가수분해물의 항산화 효과	19
5. 항산화성 펩티드의 분리·정제	36
6. 순도확인 및 분자량 측정	41
요 약	43
참 고 문 헌	45

Isolation and Characterization of Antioxidative Peptide from Enzymatic Hydrolysates of Yellow Fin Protein

Shin Young Jun

*Department of chemistry education,
Graduate School of education, Pukyong National University*

Abstract

In the recent, various physiological activities have been detected in the peptides derived from the proteolytic hydrolysis of many proteins. However, the research for Yellow Fin protein as functional material has not performed. In this study, the hydrolysates of Yellow Fin protein (YFP) was investigated as the antioxidant.

Yellow Fin protein was hydrolyzed with MICE (Mackerel Intestines Crude Enzyme) at first, and rehydrolyzed again with pepsin. The hydrolysate was separated into five major types, YFP I, YFP II, YFP III, YFP IV, and YFP V, according to their relative molecular weights, 30-10kDa, 10-5kDa, 5-3kDa, 3-1kDa and 1kDa respectively as determined by MWCO (molecular weight cut-off) of ultrafiltration membranes. The hydrolysates were studies for their antioxidative activity, and their activities were compared with commercial antioxidant such as a

-tocopherol. In addition, antioxidative peptides were isolated from the hydrolysates, using ion-exchange chromatography on a SP-Sephadex C-25 column, gel filtration on a Sephadex G-75 column, high performance liquid chromatography (HPLC) on an ODS column. The molecular weight of the purified hydrolysates was estimated by electrophoresis.

The antioxidative activity of YFP I was stronger than those of YFP II, YFP III, YFP IV, and YFP V, and the optimum substrate concentration for antioxidative activities of the hydrolysate was 1% (w/w) in linoleic acid water-alcohol emulsion. The synergistic effect was significantly increase in using hydrolysates with α -tocopherol. The estimated molecular weight of hydrolysates on SDS-PAGE was 13 kDa.

서 론

항산화제란 말 그대로 산화를 억제하거나 지연시키는 물질이다. 따라서 항산화제는 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새, 풍미의 변화, 유지 산패, 그리고 식품의 변색을 방지하거나 지연할 수 있는 기능을 가진 화합물을 총칭하기도 하며, 또한 자동산화방지의 측면에서는 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유 라디칼 저해제 (free radical scavenger), 과산화물을 비라디칼로 분해하여 불활성시키는 과산화물 분해제 (peroxide decomposer), 미량금속의 산화 촉진 작용을 억제하기 위한 금속 제거제 (sequestrates), 자동산화에 있어서 라디칼 저해제와 공존시 항산화 작용을 증가시키는 상승제 (synergist)로 분류된다. 인공합성품을 비롯하여 동식물체 내에도 이런 기능을 갖는 물질이 많이 알려지고 있는데 가장 널리 이용되고 있는 항산화제는 phenolic compound로서 인공 합성물인 butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), 그리고 tertiary butylhydroquinone(TBHQ) 등이 식품에서 항산화제로 널리 사용되고 있다.

생체내에서는 에너지 공급을 위하여 끊임없이 산화작용이 일어나는데 Davies (1986)는 세포계에서의 산화적인 방어기작을 primary defense system과 secondary defense system으로 나누었다. Primary defense는 지질과산화 반응의 과정에서 생성되는 자유라디칼 형태의 지질을 보다 안정한 생성물로 변환시킴으로써 지질의 연속적인 산화를 방지하는 기작으로 chain-breaking antioxidant라고도 하며, α -tocopherol, ascorbic acid, β -carotene, uric acid와 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx) 등이 여기에 속한다. 이와는 달리 secondary defense는 primary antioxidant defense를 벗어나 산화제나 자유라디칼 반응에 의해 손상을 입은 분자나 세포의 구성성분을 제거하기 위한 repair system으로 손상된 막의 인지질을 수리하는데 관여하는 효소인 phospholipase A₂와 fatty acid transferase, 손상된 단백질을 분해시키는

catalytic/multifunctional proteinase complex (Rivett, 1989) 및 산화적인 손상을 입은 DNA를 수리하는 DNA glycosylase와 DNA ligase (Halliwell 와 Gutteridge, 1989) 등이 있다. 이들은 체내 이런 제거 기작에 의하여 자유 라디칼이 대부분이 소멸되거나, 생성과 소멸의 균형이 깨어질 때 생체내에서는 각종 질환이 나타난다. 즉 류마티스성 관절염, 세균성 혹은 바이러스성 감염, 심장병, 파킨슨씨병, 알츠하이머, 암 그리고 다른 질병의 발생을 항산화성 비타민(비타민 C, 비타민 E)이 감소시킨다고 설명되고 있다.

또, 항산화제는 노화억제 및 그와 관련된 질병 사이에는 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되어 있는데, Harman (1981)은 비타민 C, α -tocopherol, glutathione, cystein 등의 항산화제가 발암방지, 면역력 증강 및 동맥경과 진행방지 등의 노화질환 예방효과를 나타낸다고 보고하였으며, Bender 등(1970)은 이들 항산화제들을 쥐에 투여하였을 때, 쥐의 평균수명이 10~20% 연장되는 효과가 있다고 보고하였다. 노화에 관련된 학설 중에서 최근 산소 라디칼설이 많은 지지를 받고 있는데, 이는 끊임없이 생성되며 반응성이 강한 활성산소 종 (reactive oxygen species) 의하여 세포가 점진적으로 손상을 받고 이 같은 손상의 축적으로 세포에 기능저하가 초래된다는 것이다.

이런 이유로 항산화 효과가 높고 천연 항산화제와 비교하여 경제적 측면에서 저렴한 인공합성 항산화제가 많이 이용되고 있으나, 이런 합성 항산화제에 대한 인체에 발암성 혹은 독성 물질로의 전환성에 대한 논란이 제기되고 있다 (Brannen, 1975). 그리고 최근 페나 위장 점막, 간의 마이크로솜 효소 분비증가로 인한 BHT의 발암성 혹은 독성 물질로의 전환에 대한 보고가 있다(Ito 등, 1982; Waternberg, 1986; Barlow, 1990). 또한 현재 미국의 FDA(Food and Drug Administration)에서는 GRAS(generally recognized as safe) 목록에서 BHA의 삭제 가능성에 대해 조사하고 있다. 또한 Ito 등 (1985)은 최근 보고에서 쥐에서 발암성을 일으키는 BHT 연구에 대해 보고한 바 있다. TBHQ 또한 유럽, 일본, 캐나다에서 식품사용에 대한 승인이 아직 나지 않았다.

이런 안전성에 대한 논란 때문에 합성 항산화제에 대한 소비자의 거부감이 날로 심해지고 있는 상황에서 인간 소비에 대해 보다 안전한 천연 항산화제인 α -tocopherol 및 tocopherol 혼합물이 가장 널리 사용되고 있다. 비록 α -tocopherol 이 안전한 천연 항산화제로 고려되고 있지만, 항상 *in vitro* 에서의 산화에 대해서는 안전성을 나타내지 않는다(Frankel, 1980). 그러므로 소비자에게 위해가 없는 대체 천연 항산화제에 대한 연구가 시급한 실정이다. 그리하여 근래에는 인간이 안전하게 오랫동안 먹어왔던 식품으로부터 항산화 효과가 있는 물질을 분리, 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다.

최근에는 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소분해하여 얻어진 펩티드에서도 여러 가지 생리 활성이 나타나는 것으로 보고되었는데, Yoshikawa (1988)는 이들 단백질을 효소분해하여 얻어진 펩티드가 혈압강하작용, 혈청콜레스테롤 저하작용 및 산화방지작용 등의 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고하였다. 또한 Suetsuna 등 (1989)은 어육단백질의 가수분해물이 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 어류 내장에서 조효소를 추출하여 수산 가공 공정에서 폐기되는 어류 잔사를 가수분해한 후 5단계 막 반응기를 이용해 추출한 가수분해물을 항산화제로서 이용가능성을 검토하였다. 이를 위하여 막 반응기를 이용하여 분자량별로 분리한 펩티드의 linoleic acid에서 항산화력을 시판 항산화제인 α -tocopherol과 비교하였으며, 최적 기질농도도 검토하였다. 아울러 각 분획별 가수분해물과 α -tocopherol과의 상승효과도 검토하였다. 또한 각 분획별에서 가장 항산화력이 뛰어난 분획만을 선택하여 분리·정제하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 가자미 육을 제거한 잔사는 (주) 대림수산에서 구입하였으며 사용 전까지 -20℃에서 냉동 보관하였다.

가수분해시 사용한 효소들 중 Alcalase, Neutrase는 Novo Co. (Denmark)으로부터 구입하였고, papain, pepsin, α-chymotrypsin, trypsin, pronase E는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였으며, MICE (Mackerel Intestines Crude Enzyme)는 부산시 대연동에 위치한 남천 활어센터에서 고등어내장을 구입하여 조효소를 추출하여 사용하였다. 또한, 항산화 활성 측정에 사용된 linoleic acid, thiobarbituric acid (TBA), ammonium thiocyanate, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)는 Sigma Chemical Co. (USA)제품을 사용하였다.

가자미 단백질을 가수분해시켜 분자량 별로 분획하기 위한 한외여과막장치 (Millipore Minitan™)는 Millipore Co. (USA)으로부터 구입하였고, 사용된 막의 분자량 한계범위(molecular weight cut-off, MWCO)는 각각 30kDa, 10kDa, 5kDa, 3kDa, 및 1kDa을 사용하였다. 분리·정제시 사용한 수지인 SP-Sephadex C-25와 Sephadex G-75 는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입한 것이며, 질소 농축기는 Sartorius Co. (Germany) 제품을 사용하였으며, HPLC(high liquid chromatography)는 Dionex Co. (Germany)의 ODS reverse-phase column(Ψ 10.0×250mm)을 사용하였다.

최종 순도 확인은 Bio-Rad Co. (USA)의 miniprotan II® gel electrophoresis system을 사용하였으며, SDS 전기영동용 marker protein, sodium dodecyl sulfate (SDS)는 Sigma Chemical Co. (USA)로부터 구입하였으며, 그 외 다른 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 방법

2-1. 가자미 단백질의 가수분해 조건

2-2-1. 여러 가지 효소를 이용한 가자미 단백질의 가수분해도 측정

가자미 단백질의 가수분해도를 측정하기 위해 가자미 단백질 4g을 Table 1.에 나타낸 완충용액 100ml에 분산시켜 4% 기질용액으로 만든 다음, 각 효소별 최적 온도에서 8시간 반응시켰으며 첨가된 효소량은 기질대 효소비가 50:1이 되도록 하였다. 반응종료 후 100℃에서 10분간 끓여서 효소를 실효시킨 다음, 반응 혼합물을 원심분리(9,500×g, 15분, 4℃)한 후, 상층액을 2ml 취해 여기에 20% TCA(trichloroacetic acid)를 동량 첨가하여한 후 다시 원심분리(1,520×g, 10분)를 하여 상층액을 일정량 취해 Lowry 법(1951)으로 10% TCA 가용성 질소량을 측정한 후 다음 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = \frac{10\% \text{ TCA 가용성 질소량}}{\text{총 질소량}} \times 100$$

2-2-2. 기질 농도에 대한 효과

기질에 대한 최적의 농도를 결정하기 위해서 0.1%~5%까지 기질 농도를 변화시키면서 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 50℃의 온도에서 가수분해하여 최적의 기질농도를 검토하였다.

2-2-3. 가자미 단백질 가수분해물의 추출

가자미 단백질 1kg에 0.1M sodium carbonate buffer(pH 10.0)를 5ℓ 가하고, 기질에 대하여 MICE를 50:1, 온도 50℃, 반응시간 6시간의 조건하에서 가수분해시킨 후 다시 pepsin으로 2시간 더 가수분해시켰다. 가수분해 후 원심분리

Table 1. Conditions for the hydrolysis of yellow fin protein treat with eight different proteases.

Enzyme	Buffer	pH	Temp. (°C)	Time (h)
Alcalase	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	7.0	50	8
Neutrase	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	50	8
Pronase E	0.1M Citric acid-Na ₂ HPO ₄	7.0	37	8
Pepsin	0.1M Glycine-HCl	2.0	37	8
Papain	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	6.0	37	8
α-chymotrypsin	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	37	8
Trypsin	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	37	8
MICE ¹⁾	0.1M Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃	10.0	50	8

¹⁾ Mackerel Intestines Crude Enzyme.

(7,690×g, 20분)를 하여 상층액만 회수한 다음, 한외여과막(ultrafiltration membrane system)를 이용하여 분자량 한계(molecular weight cut-off : MWCO) 범위가 각각 30kDa, 10kDa, 5kDa, 3kDa, 및 1kDa인 막을 차례로 통과시켜 분획하였다. 이 분획물을 동결건조한 다음 가자미 단백질의 가수분해물 시료로 사용하여 Scheme 1 에 따라 실험을 행하였다.

2-2. 아미노산 조성분석

가자미의 구성아미노산 분석은 동결건조한 가자미 가수분해물 10mg을 정평하여 ampoule에 넣고 6N HCl 2ml를 가하여 진공 밀봉한 다음, 24시간동안 110℃ 항온기에서 가수분해 시켰다. 이 가수분해물을 여과한 후 증류수를 가하여 감압 건조를 여러번 반복하여 HCl을 완전히 제거한 다음 sodium loading buffer (pH 2.2.)로 25ml에 정용하였다. 이 용액을 일정량 취하여 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

2-3. 분자량 측정

한외 여과막 반응기를 사용하여 분자량 한계범위가 30kDa, 10kDa, 5kDa, 3kDa 및 1kDa의 막을 통과시켜 분획한 가자미 단백질 가수분해물의 분자량은 고성능 액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)를 사용하여 측정하였다. 즉 GPC column [Zobax PSM 60 (110~10³Da), 300(3×10³~3×10⁵), 3000(10⁵~10⁷), I.D. 6.2mm, 250mm×4.6mm] 3개를 직렬로 연결하여 3차증류수로 평형화 시킨 후, 각 10mg/ml의 시료용액 100μl를 유출속도 1 ml/min로 용리시켜 UV 검출기로서 230nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 carbonic anhydrase (MW 29,000 Da), cytochrome C (MW 12,327 Da), aprotinin (MW 6,000 Da) 및 pentaphenylalanine (MW 753.9 Da)을 사용하였다

2.4. 단백질 가수분해물의 항산화 효과

한외 여과막 반응기를 사용하여 분자량 한계범위가 30kDa, 10kDa, 5kDa, 3kDa 및 1kDa의 막에 통과시켜 각각 분획한 가자미 단백질 가수분해물의 항산화력은 TBA (Ohkawa, 1978)와 ferric thiocyanate (Mitsuda, 1966)의 방법에 따른 지질과산화 및 DPPH로 RSA (radical scavenging activity)를 측정하여 비교하였다 (Hatano, 1988).

2.4-1. Linoleic acid emulsion 제조

Linoleic acid emulsion은 Osawa (1981)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, linoleic acid 0.13ml, ethanol 10ml, 50mM phosphate buffer (pH 7.0) 10ml를 혼합하고, 이 혼합물에 가수분해물을 linoleic acid에 대해 각각 1% (w/w)의 농도로 첨가하여 40±1℃로 조절된 항온기내에서 저장하면서 자동산화를 촉진시켰다.

2.4-2. TBA 방법

Thiobarbituric acid (TBA)에 대한 항산화 활성 측정은 Ohkawa 등(1978)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 40℃에서 배양시킨 linoleic acid emulsion 50μl에 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.2ml, 20% acetic acid (10N NaOH로 pH 3.5로 조절) 1.5ml 및 0.8% TBA 수용액 1.5ml를 넣고 혼합한 다음, 5℃에서 60분간 방치하고 나서 다시 95℃에서 60분간 발색시켜 spectrophotometer (Varian, USA)를 사용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

2-4-3. Ferric thiocyanate 방법

Ferric thiocyanate에 의한 항산화 활성 측정은 Mitsuda 등(1966)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 유지 혼탁액 0.1ml에 75% ethanol 4.7ml, 30% ammonium thiocyanate 0.1ml 및 2×10^{-2} M ferrous chloride/3.5% HCl 0.1ml를 가한 후 3분간 실온에서 장치한 후 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

2-4-4. Radical scavenging activity (RSA)측정

RSA는 Hatano 등(1988)의 방법에 따라 측정하였다. 각 가수분해물 5mg을 증류수 4ml에 녹이고 이를 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 1ml와 혼합한 다음 실온에서 30분동안 방치하고 517nm에서의 흡광도로 남은 DPPH의 양을 측정하여 다음 식으로 RSA값을 나타내었다.

$$\text{RSA}(\%) = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of hydrolysate}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

2-4-5. 농도에 따른 항산화력 측정

가수분해물의 농도에 따른 항산화력 측정은 TBA, ferric thiocyanate법 및 RSA값을 측정하여 구하였다. 즉, 가수분해물을 유지중량의 0.1%에서 5%까지 되게 첨가하여 구하였다.

2-4-6. 상승효과

가수분해물의 상승효과는 TBA 및 ferric thiocyanate 방법에 의해 결정하였다. 즉, 유지혼탁액에 α -tocopherol을 linoleic acid에 대해 0.1%가 되게 첨가하고, 여기에 가수분해물을 유지중량의 1%가 되게 첨가하여 $40\pm 1^\circ\text{C}$ 로 조절된 항온기 내에 저장하면서 TBA값 및 ferric thiocyanate값을 측정하여 대조구로서 가수분해물이 첨가되지 않은 α -tocopherol과 비교하였다.

2-5. 항산화성 펩티드의 분리·정제

항산화성이 우수한 펩티드만을 분리하기 위해 ion-exchange, gel filtration chromatography 및 HPLC를 이용하여 분획하였다. 각 단계별로 분획한 분획물의 항산화 효과는 TBA 값으로 7일차에 측정하였고, 가장 뛰어난 항산화력을 가진 펩티드를 다음 단계의 정제용 시료로 사용하였다. 즉, 가자미 단백질 가수분해물을 ultrafiltration membrane system으로 다섯가지로 분획하고 그 중 가장 뛰어난 항산화력을 가진 펩티드를 20mM sodium acetate buffer (pH 4.0)로 평형화시킨 SP-Sephadex C-25 column ($\phi 4\times 40\text{cm}$)에 주입하고, 동일 완충용액 1ℓ로 비흡착부분을 용출시킨 후, 완충용액 300ml와 1.0M NaCl 300ml를 사용하여 선형상 농도구배법으로 분별용출 (유속 : 60ml/hr, 분배량 : 5ml)하여 얻어진 획분을 투석(spectraper membrane tubing, Sartorius, Germany)하여 염을 제거하고 동결건조하였다. 이 동결건조물의 분획별 항산화성을 측정한 후, 가장 항산화력이 높은 획분을 50mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 평형화시킨 Sephadex G-75 column ($\phi 2.5\times 90\text{cm}$)에 주입하고, 동일 완충용액으로 용리 (유속 : 60ml/hr, 분배량 5ml)시켜 280nm에서 흡광도를 측정하여 분획하고 동결건조하여 항산화력을 측정하였다. 가장 뛰어난 항산화력을 가진 획분을 HPLC 상에서 ODS

reverse-phase column (Ψ 10.0×250mm)을 사용하여 용리하였다. 이때, 용출속도는 2.0ml/min, 이동상으로는 H₂O와 Acetonitrile (0~50%, 40 min)을 사용하여 선형상 농도구배법으로 215nm에서 흡광도를 측정하였다.

2-6. 순도 확인 및 분자량 측정

최종 정제된 획분의 subunit 양상 및 분자량은 Lamimli(1970)의 방법에 따라 실행하였다. 즉, SDS-PAGE (0.1% SDS를 함유하고 12.5% polyacrylamide gel) 방법을 이용하여 2% reducing buffer로 처리한 정제된 획분과 SDS-marker protein (ovalbumin ; 45 kDa, pepsin ; 34.7 kDa, trypsinogen ; 24 kDa, lysozyme ; 14.3 kDa, aprotinine ; 6.5 kDa)을 slab gel (6×8cm)에 주입하고 0.1% SDS를 함유한 0.25M Tris-0.192M glycine buffer pH 8.3 용액하에서 각 well에 100V의 전압으로 전기영동을 실행하였다. 전기영동 후 0.1% Coomassie blue R-250, 45% methanol / 10% acetic acid를 사용하여 40℃ 항온조에서 교반하면서 30분동안 염색하였다. 염색이 끝난 겔은 40% MeOH / 10% acetic acid로 탈색하여 SDS-marker protein의 전기이동도와 정제된 획분의 이동도를 비교하여 구성 subunit의 분자량 및 순도를 판정하였다. 탈색이 끝난 겔은 0.005% Coomassie blue R-250 / 6% perchloric acid 용액에 보관하였다.

결과 및 고찰

1. 가자미 단백질의 가수분해도

여러 효소에 대한 가자미의 단백질을 가수분해도를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. α -chymotrypsin으로 가수분해하였을 때 가장 높은 65% 정도의 가수분해도를 나타내었으며, MICE, trypsin으로 가수분해시켰을 때 약 58%의 가수분해도를 나타내었다. 반면 pepsin과 netrase로 가수분해 시켰을 때는 거의 가수분해가 되지 않았다.

두 가지 효소로 처리한 가자미 단백질에 대한 최적 기질농도를 검토한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 시료농도가 4%일 때 약 62%의 가수분해도를 나타내어 다른 농도에 비해 가장 효율이 높은 것으로 나타났다. 일반적으로 단백질 가수분해 반응에서 기질 농도는 1~5% 정도인데, 본 실험에서 사용한 가자미 단백질의 경우 낮은 농도에서의 가수분해는 그다지 효과적이지 않았다.

2. 아미노산 조성분석

MICE로 가수분해시킨 가자미 단백질을 한외여과막 반응기를 이용하여 MWCO 30,000~10,000 Da인 막에 의해서 분획된 가수분해물을 YFP I, MWCO 10,000~5,000 Da의 분획물을 YFP II, MWCO 5,000~3,000 Da의 분획물을 YFP III, MWCO 3,000~1,000 Da의 분획물을 YFP IV, 그리고 MWCO 1,000 Da에 모두 통과된 것을 YFP V로 표시하였으며, 이렇게 분획된 가자미 단백질 가수분해물의 아미노산 분석결과를 Table 2에 나타내었다.

각 단계별 가수분해물의 아미노산의 조성비는 거의 차이가 없었으며, aspartic acid, glutimic acid, glycine, lysine의 함량이 상대적으로 높게 나타났다.

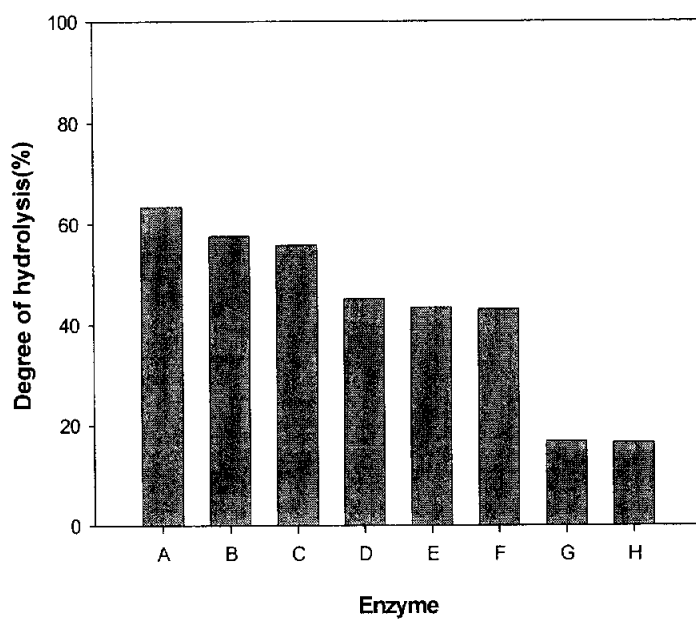


Fig. 1. Effect on the hydrolysis of Yellow fin protein by various enzymes.

Substrate conc.=4%(w/v), S/E=50(w/w), incubation time 8hrs.

A : α -chymotrypsin, B : MICE, C : Trypsin, D : Alcalase, E : Papain,
F : Pronase E, G : pepsin, H : Neutrase

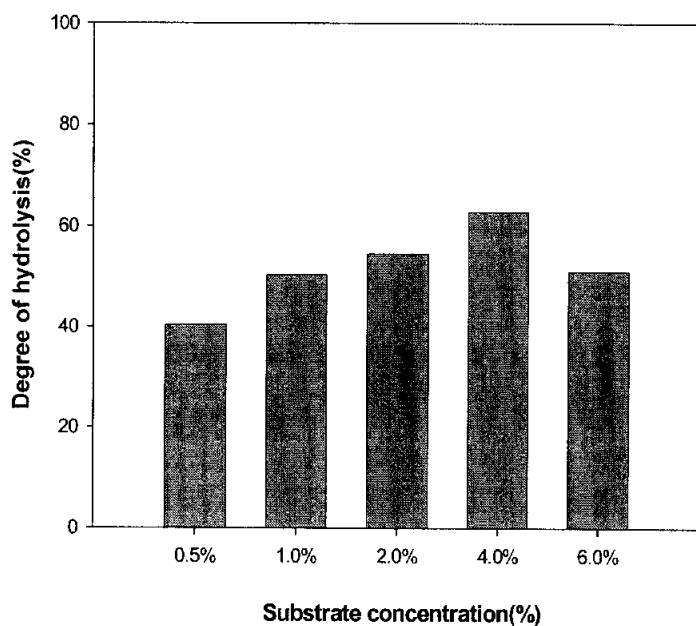


Fig. 2. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of Yellow Fin protein with two enzyme. S/E=50 (w/w), temp. 50°C, 50mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), incubation time : 6hrs (MICE)+ 2hrs (pepsin).

Table 2. Amino acid composition of Yellow Fin protein.

Amino acid	(AA/100g protein)				
	YFP I	YFP II	YFP III	YFP IV	YFP V
Aspartic acid	11.26	11.22	10.99	10.66	8.40
Threonine*	4.12	3.87	3.75	3.71	3.37
Serine	3.42	3.38	3.27	3.28	2.94
Glutamic acid	17.87	18.72	18.25	16.84	14.84
Proline	5.64	5.02	4.71	3.91	3.67
Glycine	9.53	8.90	8.03	7.35	6.49
Alanine	6.84	6.75	6.64	6.58	6.96
Cystine	0.73	0.74	0.61	0.58	1.13
Valine*	5.15	4.95	5.04	5.11	5.39
Methionine*	2.34	3.23	3.41	3.87	4.22
Isoleucine*	4.40	4.42	4.36	4.70	4.10
Leucine*	7.79	7.87	7.94	8.44	7.52
Tyrosine	1.01	1.82	2.23	2.51	2.89
Phenylalanine*	4.09	2.93	3.07	3.19	3.56
Histidine*	1.72	1.93	2.12	2.18	2.29
Lysine*	8.16	7.92	9.09	9.85	12.16
Arginine	5.94	6.35	6.47	7.22	10.07
Essential amino acid	33.36	32.69	34.44	36.37	38.51
Total amino acid	100	100	100	100	100

* Essential amino acid

3. 분자량 측정

각 단계별 막 반응기에서 분리한 가수분해물의 분자량 분포를 GPC column을 사용하여 HPLC 상에서 조사하였다. Fig. 3에서와 같이 YFP I 은 23,000~10,000 Da의 한계범위에 분포되어 있었으며, 주요 획분으로는 15,000 Da, 13,000 Da이었다. YPF II는 13,000~6,000 Da의 한계범위에 분포되어 있었으며, 주요 획분으로는 9,000 Da이었고, 7,000 Da 분자량 범위에도 분포되어 있었다. 또한 YFP III는 6,000~2,000 Da의 한계범위에 분포되어 있었으며, 주요 획분으로는 5,000 Da이었다. YFP IV는 3,000 ~900 Da의 한계범위에 분포되어 있었으며, 주요 획분으로는 2,600 Da이었고, 800 Da 분자량 범위에도 분포되어 있었다. 그리고 YFP V 에서는 분자량 범위가 900 Da ~300 Da 이었으며, 주요 획분으로는 800 Da과 500 Da 이 대부분을 차지하였다.

4. 단백질 가수분해물의 항산화 효과

4.1. 여러 가지 효소로 가수분해한 가수분해물의 항산화성

여러 가지 효소를 사용하여 가수분해한 가자미 단백질 가수분해물들의 항산화력을 $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 조절된 항온기에서 자동산화시킨 후 비교한 결과, linoleic acid에서의 항산화력은 각 가수분해물을 첨가시키지 않은 경우에 비해 TBA법에서는 4%~56% 정도 항산화력이 뛰어난 것으로 나타났다. 또한 천연 항산화제인 α -tocopherol과의 비교에서는 pepsin으로 가수분해시킨 가수분해물의 경우가 α -tocopherol과 유사한 항산화 효과를 보였으며, MICE로 분해한 가수분해물의 경우에는 가수분해물을 첨가시키지 않은 대조구보다 43%정도 높은 항산화력을 나타내었다 (Fig 4).

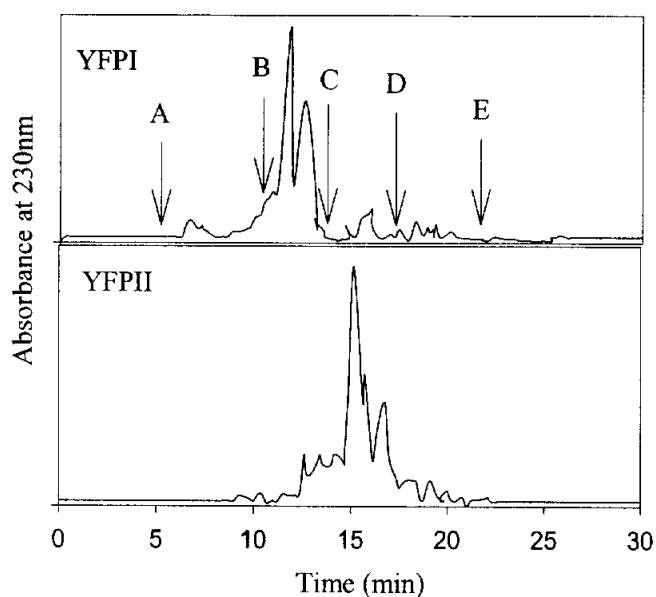
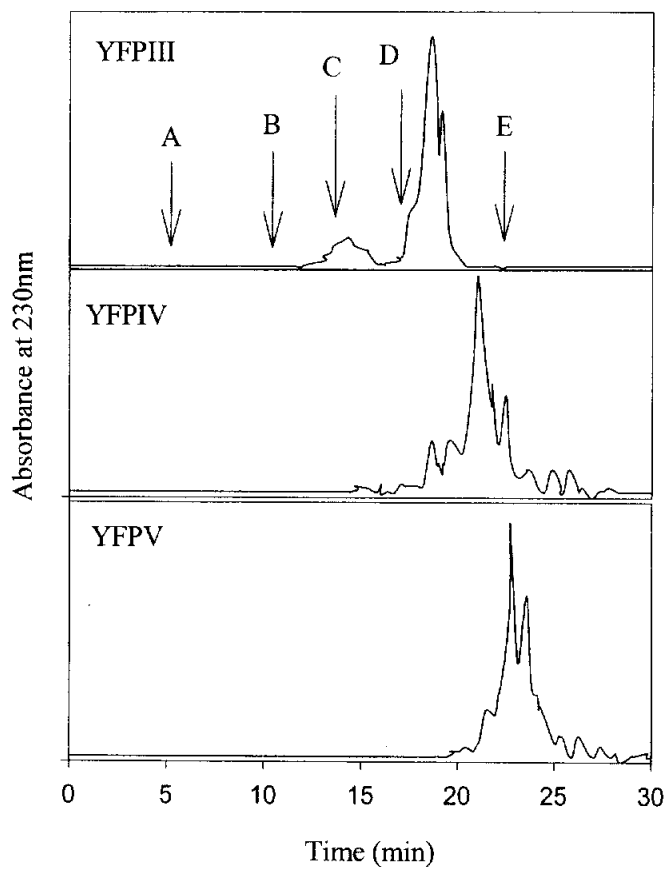


Fig. 3. Molecular weight distribution profiles of YFP I, II, III, IV and V on HPLC with GPC column.

HPLC operation was carried out with deionized water as mobile phase at flow rate of 1ml/min. A : Albumin (MW 66,000Da), B : Carbonic anhydrase (MW 29,000 Da), C : Cytochrome C (MW 12,327Da), D : Aprotinin (MW 6,000Da), E : Pentaphenylalane (MW 753.9 Da). YFP I : MWCO 30~10kDa, YFP II : MWCO 10~5kDa, YFP III : MWCO 5~3kDa, YFP IV : MWCO 3~1kDa. YFP V : below MWCO 1kDa



continued

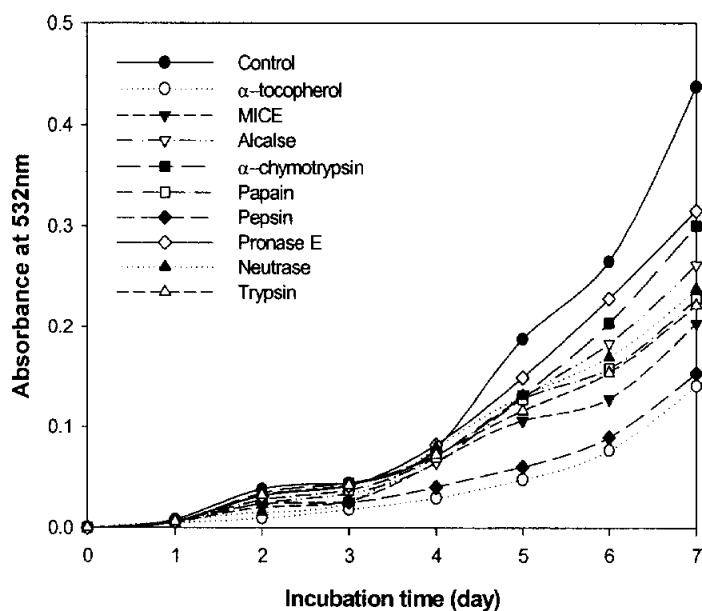


Fig 4. Effects of antioxidative activity of hydrolysates of various enzyme from Yellow Fin protein in linoleic acid autoxidation system measured by the TBA method.

Ferric thiocyanate 법에 의해 검토한 결과는 가수분해물을 첨가하지 않은 대조구보다 13~50%정도 뛰어난 항산화력 효과를 나타내었고, 역시 pepsin으로 분해한 가수분해물의 첨가군이 천연 항산화제인 α -tocopherol과 유사한 항산화 효과를 나타내었다 (Fig. 5). Radical scavenging activity (RSA)는 20~58% 정도의 활성을 나타내었지만, α -tocopherol에 비해 낮은 항산화력을 나타내었다 (Fig. 6).

4-2. 가자미 단백질 가수분해물의 항산화성

가자미 단백질 가수분해물들의 항산화력을 $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 조절된 항온기에서 자동산화시켜 비교한 결과, linoleic acid에서의 항산화력은 각 가수분해물을 첨가시키지 않은 경우에 비해 TBA법에서는 30~50% 증가된 항산화 효과를 나타내었으며 (Fig. 7), ferric thiocyanate법에서는 30~70% 정도 항산화력이 증가하였고 (Fig. 8), radical scavenging activity (RSA)는 α -tocopherol 보다 낮은 항산화 효과를 나타내었다 (Fig. 9).

YFP II 과 YFP III, YFP IV, YFP V 의 TBA법에 의한 항산화력 측정은 시판 항산화제인 α -tocopherol에 비교하였을때 37%정도 낮은 항산화력을 나타내었으나, YFP I 의 경우에는 α -tocopherol과 유사한 항산화효과를 나타내었다. Ferric thiocyanate 법에서는 YFP III, YFP IV, YFP V 모두 α -tocopherol 보다는 낮은 항산화력을 보였고 YFP I 의 경우에는 α -tocopherol보다 낮은 항산화력을 나타내었다. RSA에서의 항산화성 측정은 대부분의 분획이 α -tocopherol보다 낮은, 63~38% 정도의 radical scavenging activity를 보였다.

이상의 결과에서, 각단계별 가수분해물 중에서는 YFP I 가 가장 좋은 항산화 효과를 나타내었다. Bishov 등 (1972)은 AYP (autolyzed yeast protein)과 HVP (hydrolyzed vegetable protein)이 농도에 의존하는 primary antioxidant 라고 보고하였으며, Yee 등 (1980)은 대두 단백질의 pepsin 가수분해물의 항산화성 측정에서 대조구와 비교하여 80% 정도 향상된 항산화효과를 보였다. Yamaguchi 등

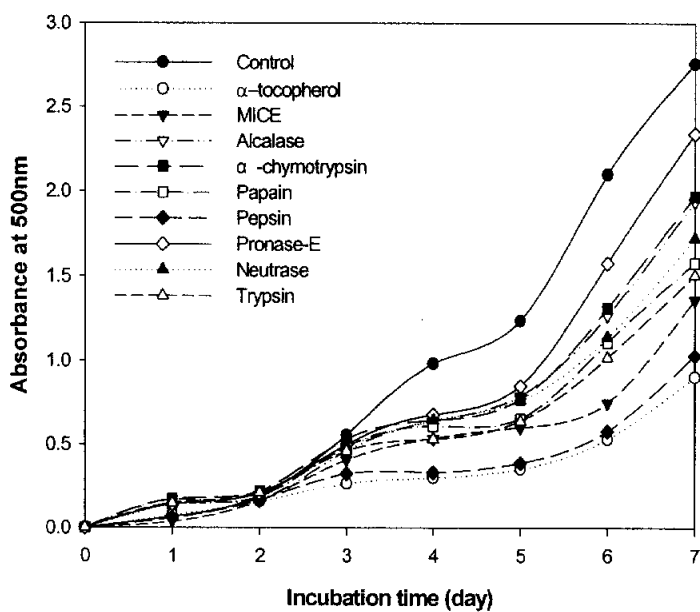


Fig. 5. Effects of antioxidative activity of hydrolysates of various enzyme from Yellow Fin protein in linoleic acid autoxidation system measured by the ferric thiocyanate method.

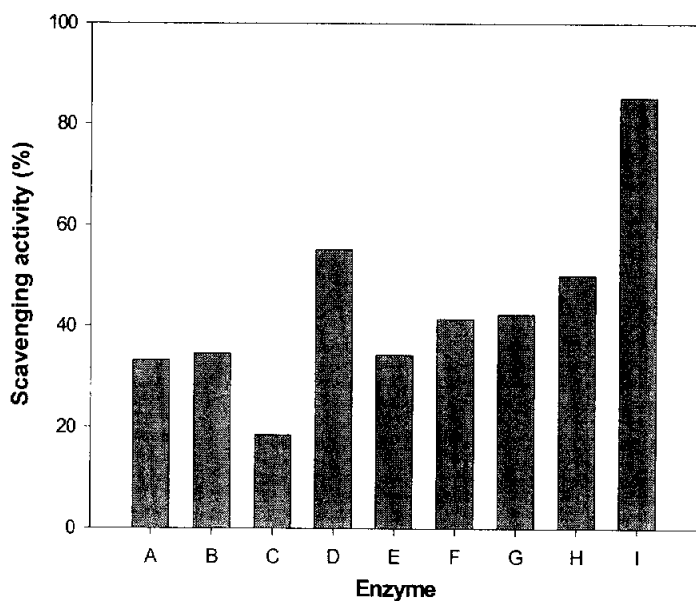


Fig. 6. Radical scavenging activity of α -tocopherol and hydrolysates of various enzymes from Yellow Fin on DPPH radical.

A : Alcalase, B : Neutrase, C : Pronase E, D : Pepsin, E : Papain,
F : α -chymotrypsin, G : Trypsin, H : MICE, I : α -tocopherol

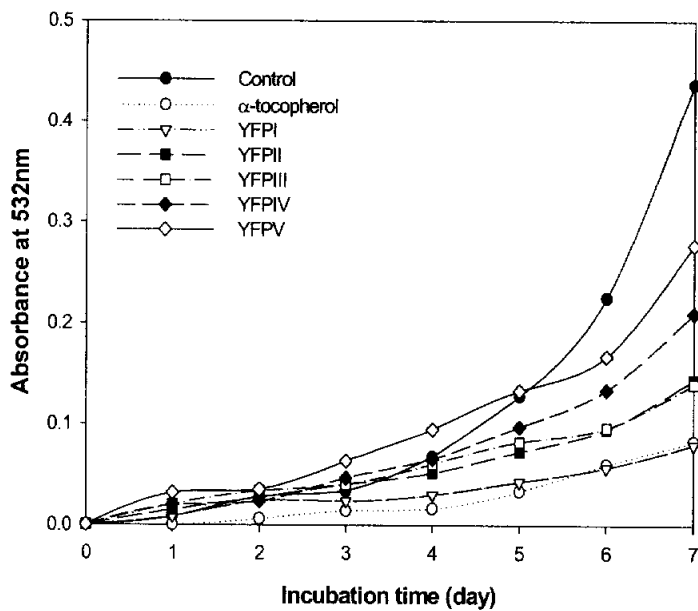


Fig. 7. Antioxidative activity of hydrolysates of MICE + pepsin from Yellow Fin protein in linoleic acid autoxidation system measured by the TBA method.

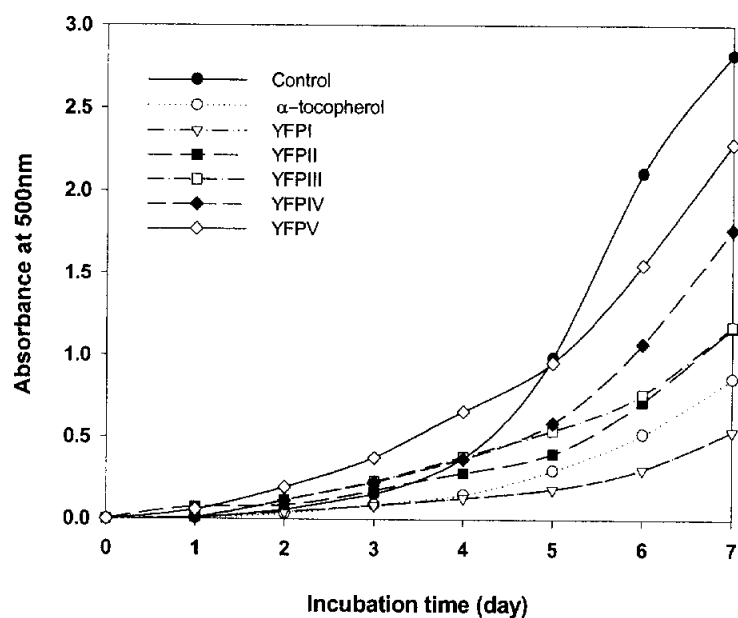


Fig. 8. Antioxidative activity of hydrolysates of MICE + pepsin from Yellow Fin protein in linoleic acid autoxidation system measured by the ferric thiocyanate method.

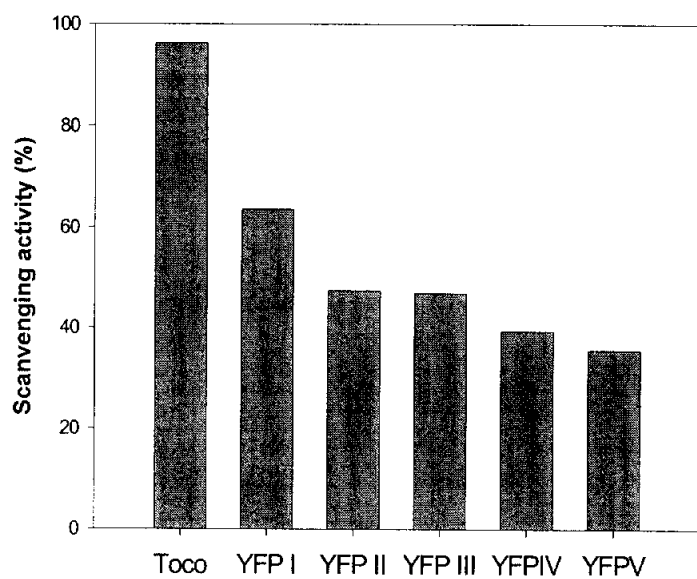


Fig. 9. Radical scavenging activity of hydrolysates of MICE + pepsin enzyme from Yellow Fin protein on DPPH radical.

(1975)은 일반적으로 항산화력이 높다고 알려진 아미노산 중에서 Met, His은 C 말단에 위치할 때 높은 항산화력을 나타낸다고 하였고, Krogull 등 (1987)은 질소 화합물인 단백질, 펩티드, 아미노산은 자체적으로 산화를 일으키며, pH, 온도, 수분활성 및 산화촉매제나 저해제의 존재 여부에 따라 차이가 있다고 보고한 바 있다.

이상의 보고와 실험결과를 종합하면 가수분해물의 항산화력은 아미노산 단계에서는 각각의 아미노산 즉, radical scavenger로서 작용하여 과산화물 생성을 억제하는 항산화성이 높은 아미노산들에 의해 영향을 받고, 펩티드에서는 그 구성 아미노산의 성분과 위치에 의해 항산화성이 결정되어지는 것으로 생각되나 가수분해물의 항산화력을 RSA 만으로 설명하기는 미흡하다고 판단된다.

4-3. 가자미 단백질 가수분해물의 농도에 대한 항산화성

항산화력이 가장 높은 2차 가수분해물 (YFP I)의 첨가 농도에 따른 항산화력을 측정한 결과, TBA법에 의한 측정에서 가수분해물의 첨가농도가 linoleic acid에 대해 0.1%, 0.5%에서는 뚜렷한 항산화력을 나타내지 못했으며, 1%에서 α -tocopherol과 유사한 항산화효과를 나타내었다 (Fig. 10). Ferric thiocyanate법에 의한 측정에서도 1%에서 높은 항산화효과를 나타내는 결과를 나타내었다 (Fig. 11). RSA에서는 가수분해물의 첨가농도가 1%일 때 다른 농도에 비해 가장 높은 항산화력을 보였다 (Fig. 12). 이러한 결과는 펩티드의 첨가농도가 낮을 경우에는 펩티드 자체의 산화정도가 펩티드의 항산화력에 크게 영향을 미치지 않지만, 펩티드를 1%이상 첨가하였을 때 펩티드의 산화정도가 항산화 효과에 영향을 미치는 중요한 하나의 요소로서 작용하기 때문이라고 생각되며, 본 연구에서 가수분해물의 항산화성에 대한 최적농도는 1% 이상임을 알 수 있었다.

Bishov 등 (1972)은 대두 단백질 가수분해물의 농도에 따른 항산화력을 검토한 결과, 0.01M ~0.2M 농도범위에서 펩티드가 농도의 증가에 따라 항산화력이

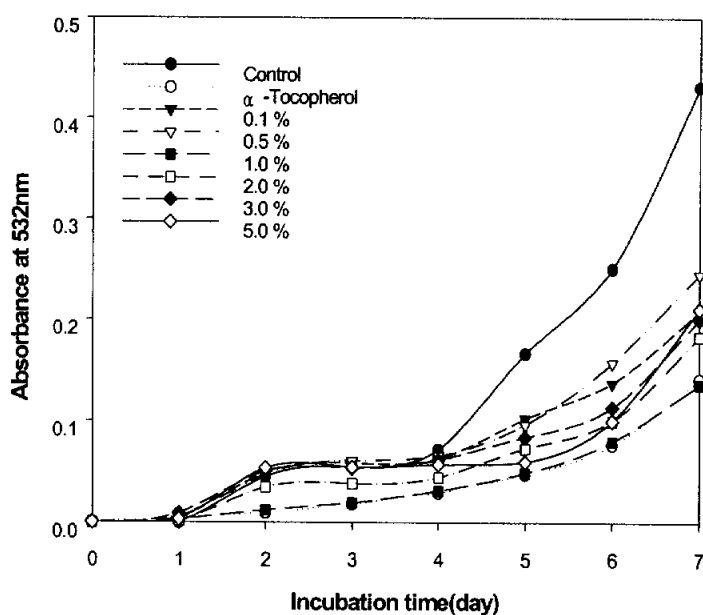


Fig. 10. Antioxidative activity of YFP I at various concentration in linoleic acid autoxidation system measured by the TBA method.

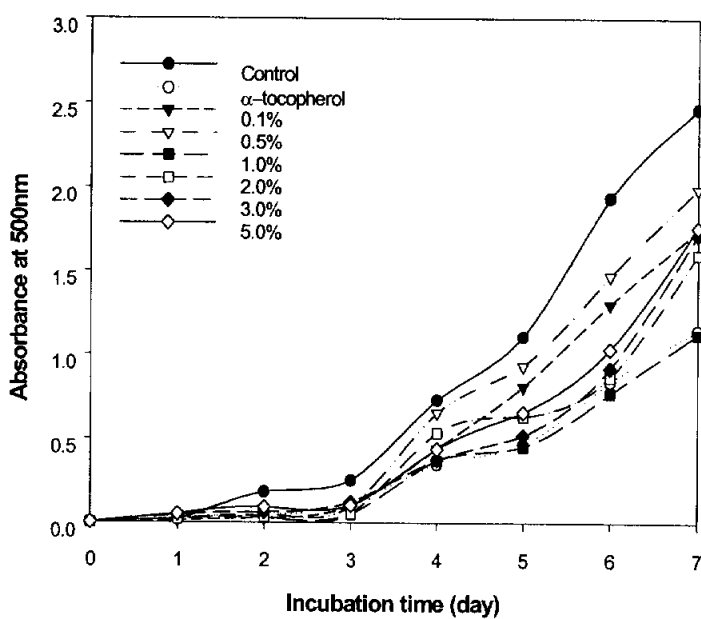


Fig. 11. Antioxidative activity of YFP I at various concentration in linoleic acid autoxidation system measured by the ferric thiocyanate method.

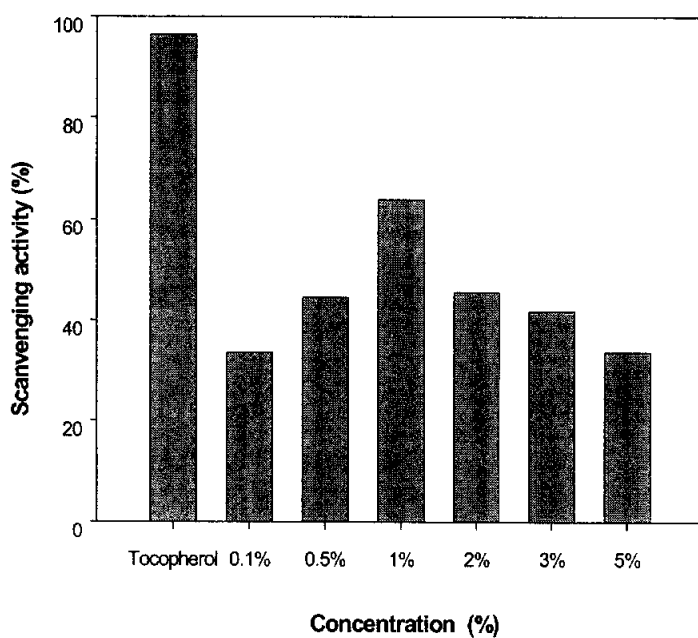


Fig. 12. Radical scavenging activity of YFP I at various concentration on DPPH radical.

증가한다고 보고하였고, 김 등 (1996)은 가자미피 젤라틴 가수분해물의 첨가농도에 따른 항산화성 측정에서 유지중량에 대해 1.0% 첨가한 농도에서 최대 항산화효과를 나타낸다고 보고한 바 있다. 또한 박 (2001)등 은 역시 계란 노른자에서 추출한 가수분해물의 농도가 1%, 2%일 때 둘 다 최대 항산화효과를 나타내었다고 보고하였다. 이러한 보고는 각 가수분해물의 원료는 다르지만 최적농도는 비슷한 농도에서 나타남을 보여준다.

4.4. 상승효과

가수분해물의 상승효과를 검토하기 위해 천연 항산화제인 α -tocopherol과 병용 사용시 TBA법과 ferric thiocyanate법에 의한 항산화력을 측정한 결과, linoleic acid에 α -tocopherol과 가수분해물을 함께 첨가한 경우, α -tocopherol만을 첨가한 대조구보다 TBA법에서는 모든 가수분해물이 α -tocopherol 보다 높은 항산화 상승효과를 나타내었다 (Fig. 13). Ferric thiocyanate 법에서도 모든 가수분해물에서 80% 이상의 높은 항산화효과를 나타내었다 (Fig. 14). 이상의 결과에서 가자미 단백질 가수분해물은 시판 천연항산화제인 α -tocopherol과 병용시 아주 높은 상승효과를 나타냄을 알 수 있었다.

Bishov 등(1972)은 자가분해 효모단백질 (AYPE)의 가수분해물을 BHA와 병용 사용하여 상승효과를 검토한 결과, 0.005% BHA에 0.25%의 AYPE 첨가시에 0.02% BHA 농도보다 2배의 항산화효과를 보였다고 보고하였고, Yamaguchi 등(1979)은 α -tocopherol과 가수분해물 10% 이상의 대두단백질 가수분해물의 상승작용이 높음을 보고하였다. 또한 Yamaguchi (1989)는 대두단백질, 우유카제인, 젤라틴, 알부민 등이 가수분해물과 α -tocopherol 과의 상승효과를 검토한 결과, 모든 가수분해물이 비교적 높은 상승효과를 나타낸다고 보고하였으며, Bishov 등 (1975)은 식물단백질 가수분해물 (HVP)과 자가분해 효모 단백질 (AYPE)을 BHT, BHA와 함께 사용했을 경우, 3%이상의 농도에서 50%이상의 상승효과를 보였다고 보고

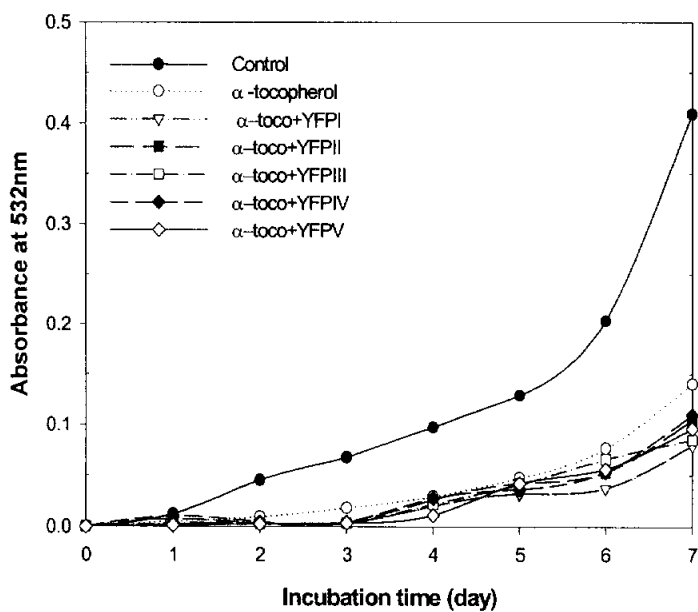


Fig. 13. Synergistic effects of α -tocopherol and hydrolysates of MICE + pepsin from Yellow Fin protein in linoleic acid autoxidation system measured by the TBA method.

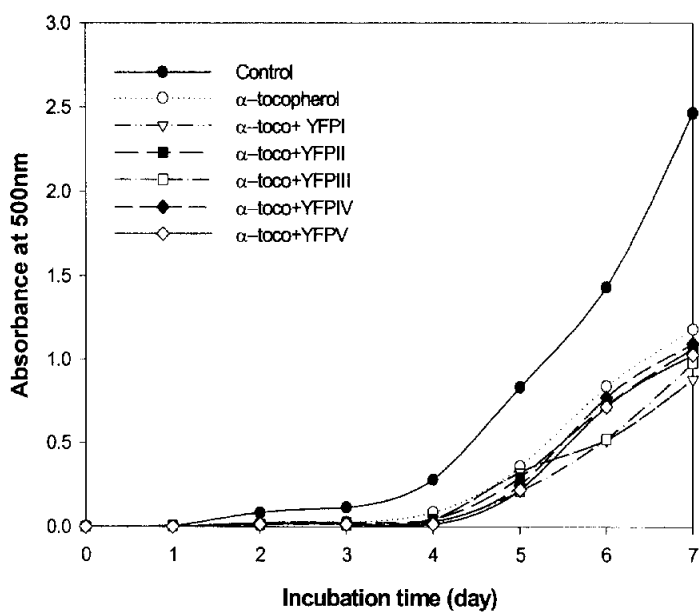


Fig. 14. Synergistic effects of α -tocopherol and hydrolysates of MICE + pepsin from Yellow Fin protein in linoleic acid autoxidation system measured by the ferric thiocyanate method.

하였다. 이러한 단백질 가수분해물과 페놀계 항산화제와의 상승효과는 단백질 가수분해물이 페놀계 항산화제가 항산화력을 나타내는 적정농도의 유지, 즉 산화된 항산화제를 재생시킴으로써 나타나는 것으로 판단된다.

5. 항산화성 펩티드의 분리·정제

각 단계별 막 반응기에서 분리한 가수분해물들 중에서 항산화력이 높은 가수분해물에서 가장 강한 항산화력을 나타내는 단일 펩티드만을 분리하게 위해 ion-exchange chromatography, gel chromatography 및 HPLC를 이용하여 분리하였다. 먼저 SP-Sephadex C-25 수지를 충전시킨 column ($\phi 4 \times 40$ cm)에 시료용액 5ml를 용리하여 분획한 분획별 항산화성을 측정한 결과를 Fig. 15에 나타내었다. 양이온 교환수지가 충전된 칼럼에 20mM sodium acetate buffer (pH 4.0) 1ℓ를 용리하고 1.0M NaCl용액 300ml와 동일한 완충용액 300ml를 사용하여 선형상 농도구배법으로 분리를 행한 결과, 3개의 획분으로 분리하였다. 각 획분을 동결건조한 후, TBA 법에 의한 항산화성을 측정한 결과, 획분 III (130~160)가 가장 뛰어난 항산화효과를 나타내었다.

양이온 크로마토그래피의 획분물 중에서 항산화성이 뛰어난 펩티드가 함유되어 있는 획분 III의 동결건조물을 buffer에 녹인 후, 분리범위가 분자량 3,000~80,000Da인 Sephadex G-75 수지를 충전시킨 column (2.5×90cm)에 50mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 평형화시킨 다음 GradFrac System (Pharmacia Biotech., Sweden)을 사용하여 한 개의 획분 (III-1)을 분리하였으며, 이 획분의 항산화성을 측정한 결과 이 획분에서 양이온 크로마토그래피의 획분 III에서보다 높은 항산화력을 나타내었다(Fig. 16).

Sephadex G-75에서 분리한 획분 중에서 항산화성이 가장 우수한 획분을 동결건조한 후, ODS column이 장착된 HPLC를 이용하여 H₂O와 acetonitrile 용액으로 선형상 농도구배법 (0~50%, 40min)으로 용출시켜 (2ml/min) 분리한 결과를

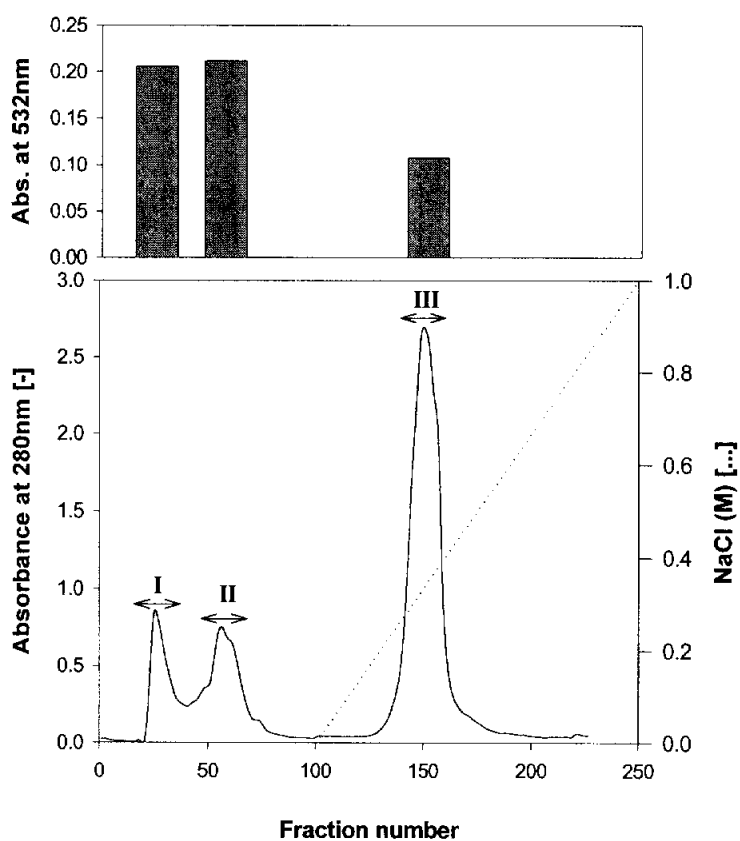


Fig. 15. Separation of YFP I by SP-Sephadex C-25 column chromatography (lower panel) and antioxidative activities (upper panel) of the fractions (I, II and III). Elution was performed at 1ml/min of flow rate with a linear NaCl gradient (0~1M) in 20mM sodium acetate buffer, pH 4.0.

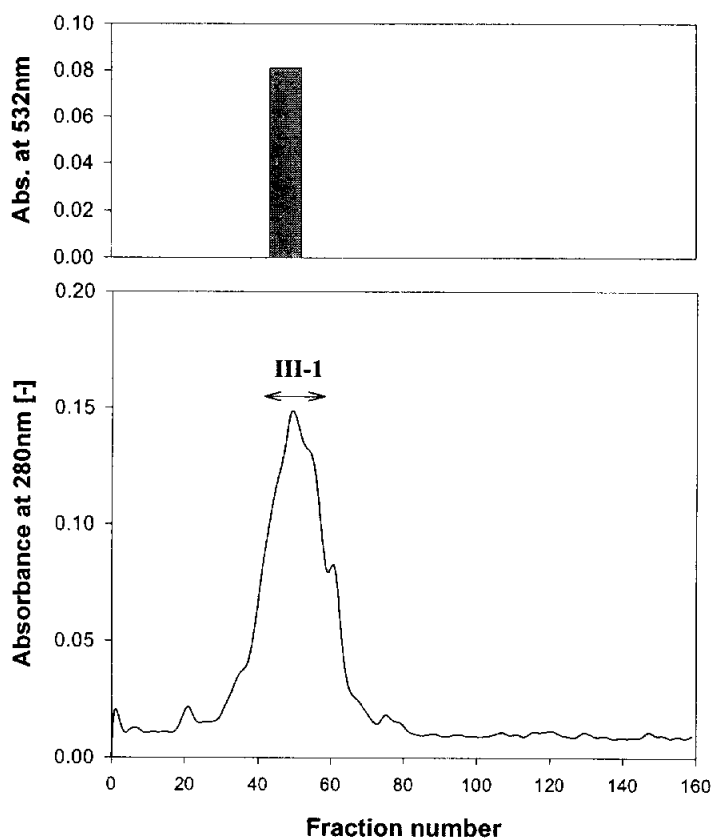


Fig. 16. Re-chromatography of fraction III on Sephadex G-75 gel chromatography (lower panel) and antioxidative activities(upper panel) of the fractions (III-1). Elution was done 1ml/min of flow rate in 50mM sodium phosphate buffer, pH 7.0.

Fig. 17에 나타내었다. 4개로 분획된 획분의 항산화성을 측정한 결과 III-1-1이 가장 뛰어난 항산화력을 보였고, 이 획분을 다시 HPLC를 이용하여 재 분리하여 획분 2개를 얻었다(Fig. 18). 이중 획분 III-1-a가 더 높은 항산화력을 나타내었다.

Bishov 등 (1972)은 식물 및 효소단백질 가수분해물에서 Sephadex G-10과 G-15를 이용하여 분리한 항산화성 획분이 1.5kDa 이상임을 보고하였고, Yamaguchi 등 (1979)은 대두단백질을 가수분해하여 Sephadex G-25 column상에서 겔여과하여 항산화성을 측정한 결과 가장 항산화성이 높은 분획은 vitamin B₁₂ 보다 약간 큰 분자량의 펩티드에서 나타났으며, 우유단백질, egg white albumin에서도 vitamin B₁₂보다 큰 분자량에서 항산화성이 높은 펩티드가 강한 항산화력을 가진다고 보고하였으며, Yamaguchi (1989)는 대두단백질을 효소로 가수분해 시킨 가수분해물 중에서 가장 항산화성이 우수한 6시간 효소처리한 가수분해물을 Sephadex G-25 column상에서 분획, 항산화성을 측정한 결과, 2.5~3.0kDa의 분자량에서 강한 항산화성이 나타났다고 보고하였다.

이러한 분획별 항산화성 측정의 결과에서 대부분의 단백질 가수분해물은 vitamin B₁₂보다 약간 고 분자량에서 높은 항산화효과를 나타내며, 젤라틴 가수분해물의 경우 다른 단백질 가수분해물에 비해 더 큰 분자량 상태일 때 강한 항산화효과를 나타낸다. 본 실험에서도 사용한 YFP I 도 분자량 분포에서 15,000~13,000 Da 사이의 분자량을 가진 펩티드를 다량 함유하고 있었으며, 이 펩티드들이 강한 항산화효과를 나타내는 것으로 보여진다.

6. 순도확인 및 분자량 측정

최종 정제된 분획의 순도 측정은 12.5% SDS-PAGE법으로 실행하고 그 결과를 Fig 19에 나타내었다. 염색후 관찰한 결과 한 개의 band만 나타나 순수한 물질임을 알 수 있었으며, maker protein인 ovalbumin (45 kDa), pepsin (34.7 kDa), trypsinogen (24 kDa), lysozyme (14.3 kDa) 그리고 aprotinine (6.5 kDa)을 사용하여 이때 측정된 최종 정제 획분의 분자량은 13 kDa로 나타났다.

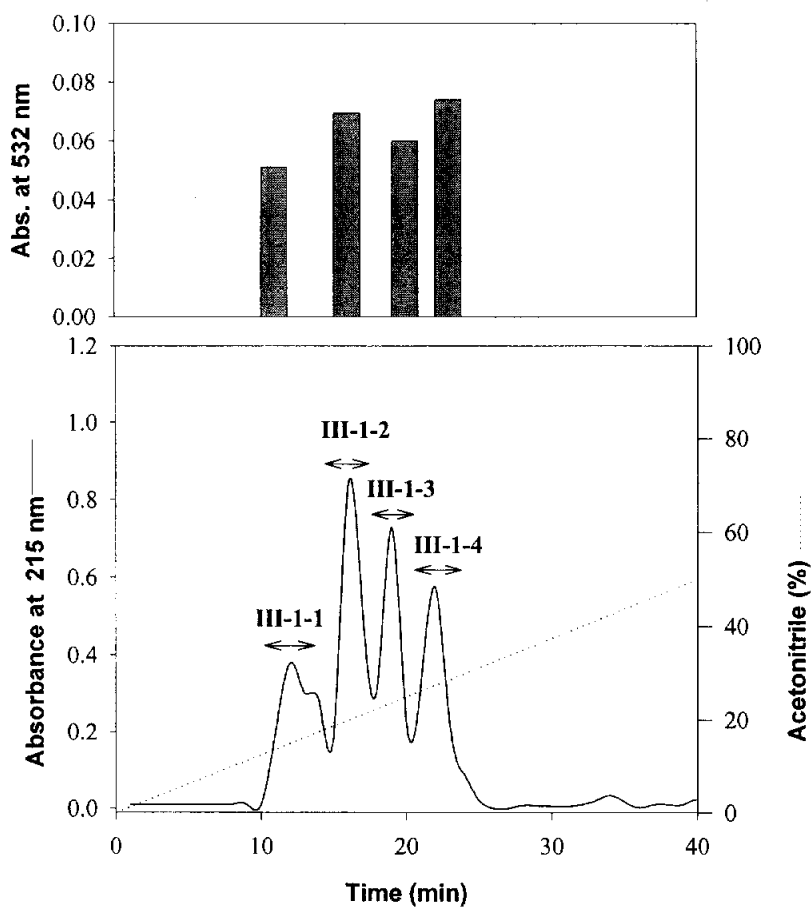


Fig. 17. Reverse-phase HPLC pattern on a Primary 10 C-18 column of active fraction III eluted on the Sephadex G-75 gel chromatography (lower panel) and antioxidative activities (upper panel) of the fractions (III-1-1, III-1-2, III-1-3, III-1-4). HPLC operation was carried out with 50% acetonitrile as mobile phase at 2ml/min of a flow rate using UV detector as 215nm.

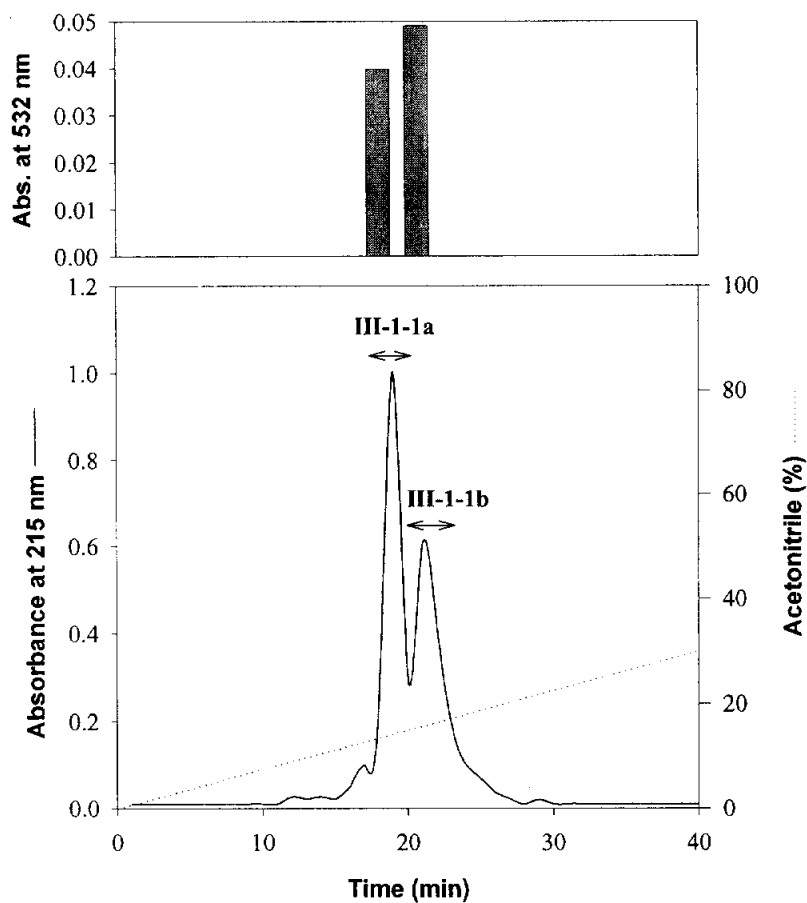


Fig. 18. Reverse-phase HPLC pattern on a Primary 10 C-18 column of active fraction III-1-1 eluted on the HPLC (lower panel) and antioxidative activities (upper panel) of the fractions (III-1-1a, III-1-1b). HPLC operation was carried out with 30% acetonitrile as mobile phase at 2 ml/min of a flow rate using UV detector as 215nm.

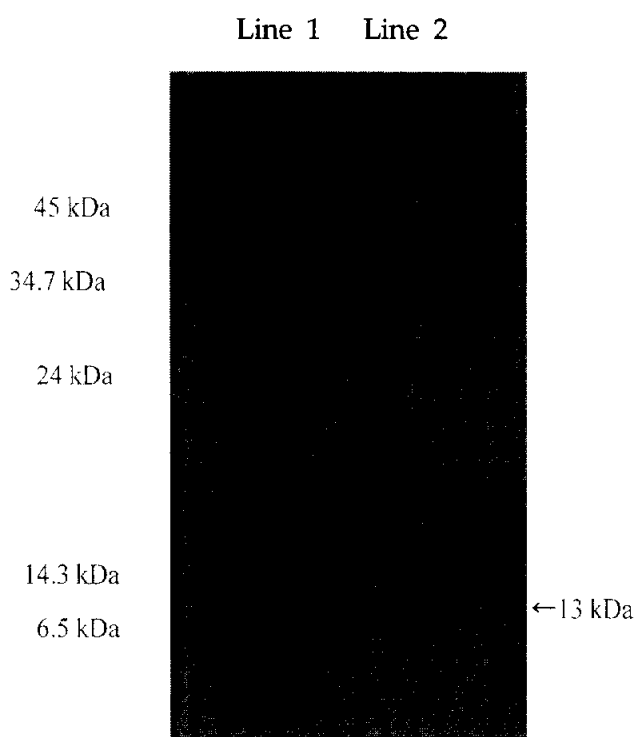


Fig. 19. SDS-PAGE of the purified enzymatic hydrolysates of Yellow Fin protein on 12.5% gels under denaturing condition. Line 1 : ovalbumin (45 kDa), pepsin (34.7 kDa), trypsinogen (24 kDa), lysozyme (14.3 kDa), aprotinine (6.5 kDa). Line 2 : enzymatic hydrolysates of Yellow Fin protein.

요 약

가자미 단백질을 효소적으로 가수분해시킨 후, 6단계 막 반응기를 이용한 각 가수분해 분획물을 항산화제로서의 이용 가능성에 대해 검토하였다. 이를 위하여 분자량 별로 분리한 펩티드를 linolein acid 내에서 항산화력을 측정하여 시판 항산화제인 α -tocopherol과 비교하였으며, 아울러 이들과의 상승효과도 검토하였다. 또한 여러 단계의 분리과정을 거쳐 가장 항산화력이 뛰어난 펩티드만을 분리·정제하여 그 아미노산 서열을 분석하였다.

1. 5단계 막 반응기를 통해 가수분해시킨 각 단계별 가자미 단백질의 분자량 분포는 1단계 막반응기로 분리된 가수분해물의 경우 23~10 kDa, 2단계 막반응기로 분리된 가수분해물의 경우 13~6 kDa, 3단계 막반응기로 분리된 가수분해물의 경우 5 kDa, 4단계 막반응기로 분리된 가수분해물의 경우 2.6 kDa, 마지막 5단계 막반응기로 분리된 가수분해물의 경우 0.8 kDa의 분자량이 주종을 이루었다.
2. 각 단계별 막반응기로부터 분리한 가수분해물의 항산화성을 측정한 결과, 1단계 막 반응기를 통과한 가수분해물의 항산화력이 가장 높았으며, 천연 항산화제인 α -tocopherol보다 30% 정도 높은 항산화효과를 나타내었다.

3. 각 단계별 분획된 펩티디중 항산화력이 가장 우수한 1단계 막반응기를 통과한 가수분해물로부터 펩티드 농도에 따른 항산화 효과를 측정한 결과, 펩티드의 농도가 유지중량의 1.0%일 때 가장 높은 항산화력을 보였다.
4. 천연 항산화제인 α -tocopherol과 병용 사용하여 상승효과를 측정한 결과, 각 분획 모두 α -tocopherol을 단독 사용한 경우보다 항산화력이 높게 나타났다.
5. 이온교환크로마토 그래피, 겔 여과 및 HPLC를 사용하여 항산화성이 가장 뛰어난 획분을 분리하여, SDS-PAGE로 순도 및 분자량을 측정한 결과 13 kDa으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Bender, A. D., G. G. Kormends and P. Powell (1970) Pharmacological control of aging, *Exp. Gerontol.*, **5**, 97-
- Bishov, S. J. AND A. S. Henick (1972) Antioxidant effect of protein hydrolysates in a freeze-dried model system, *J. Food Sci.* **37**, 873-875
- Brannen, A. C. (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **52**, 59-63.
- Choe, S. Y., K. H. Yang (1982) Toxicological Studies of Antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J. Food Sci Technol.* **14**(3), 283-288.
- Davies, K. J. A. (1986) Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses : a hydrolythesis, *J. Free Rad. Biol. Med.*, **2**, 155-173
- Frankel, E. N. (1980) Lipid oxidation, A review. *Progress in Lipid Research* **19**, 1-22.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge (1989) Free radicals in biology and medicine, Clarendon Press, Oxford.

- Halliwell B., R. Aeschbach, J. Löliger, O. I. Aruoma (1995) The characterization of antioxidants. *Fd Chem. Toxic.* **33**(7), 601-617.
- Harman, D. (1981) The aging process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7124-
- Hara, S., N. Oakada, H. Hibino and Y. Totani (1992). Antioxidative behavior of phospholipids for polyunsaturated fatty acids of fish oil, *Yukagaku*, **41**, 130-135.
- Ito, N., Hagiwara, A., Shibata, M., Ogiso, T and Fukushima, S. (1982) Induction of squamous cell carcinoma in the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole. *Japaness Journal of Cancer Research* **73**, 332-334.
- Kim, S.K., Y.T. Kim, H.G. Byun, K.S. Nam, D.S. Joo and F. Shahidi (2001). Isolation and Characterization of Antioxidative Peptides from Gelatin Hydrolysate of Alaska Pollack Skin, *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1984-1989.
- Kim, S.K., H.C. Lee, H.G. Byun, and Y.J. Jeon (1996). Isolation and drolysates of Yellowfin Sole Skin Gelatine, *J. Korean Fish. Soc.* **2**, 246-255.
- Krogull, M. K. and R. F. Burk(1976) Oxidation of tryptophan in the presence of oxidizing methyl linoleate, *J. Agric. Food Chem*, **35**, 66-70
- Liebler, D.C., D.S. Kling and D.J. Reed (1986). Antioxidant protection of phospholipid bilayer α -tocopherol : Control of α -tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12114-12119.

- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Bio. Chem.*, **193**, 265-275.
- Ohkawa, H., N. Ohisi and K. Yagi (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbityric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- Park, J.P., W.K. Jung, Y.R. Choi, and S.K. Kim (2000). Antioxidative Effect of Enzymatic Protein Hydrolysate from Lecithine-Free Egg Yolk, *Korean J. Life Sci*, **10**, 34-41.
- Park, J.P., W.K. Jung, K.S. Nam, F. Shahidi, and S.K. Kim (2001). Purification and Chracterization of Antioxidative Peptides from Protein Hydrolysate of Lecithine-Free Egg Yolk, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78**(6), 651-656.
- Suetsuna, K. and K. Osajima (1989) Blood prossures reductim and vasolilatory effects in vivo of peprides originating from sardine mucle, *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, **42**(1), 47-54.
- Wanasundara, U. N. and Shahidi, F. (1998) Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, **63**(3), 335-342.
- Yamaguchi, N., Y. Tokoo and M. Fujimaki (1979) Antioxidative activited of protein hydrolysates, *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaish*, **26**(2), 65-70.
- Yamaguchi, M. (1989) *New Food Industry*, **31**, 18-
- Yee, J. J., W. F. Shipe and J. E. Kinsella (1980) Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper-catalyzed methyl linoleate oxidation, *J. Food Sci.* **45**, 1082-1083