

시험관내에서 멸치액젓이 Bromobenzene유발 간조직 지질과산화에 미치는 효과

박종옥 · 최종원* · 김희숙** · 류병호**
경성대학교 화학과 *경성대학교 약학과, **경성대학교 식품공학과

The Effects of Fermented Anchovy on the Bromobenzene-Induced Hepatic Lipid Peroxidation *in vitro*

Jong Ok Park, Jong Won Choi*, Hee Sook Kim** and Byung-Ho Ryu**

Department of Chemistry, Kyungshung University,

*Department of Pharmacy, Kyungshung University,

**Department of Food Science and Technology, Kyungshung University

Abstract

Fermented anchovy was used to investigate its effects on the formation of lipid peroxide and the activities of epoxide or free radical generating enzyme *in vitro* in bromobenzene-treated rats. All solvent fractions from fermented anchovy not only showed the strong antioxidative activities on linoleic acid autooxidation, but also reduced bromobenzene-induced hepatic lipid peroxidation. The activities of aniline hydroxylase and aminopyrine N-demethylase elevated by bromobenzene were recovered to the level of normal rats by adding the solvent fractions of fermented anchovy. But, xanthine oxidase and aldehyde oxidase activities were not affected by fermented anchovy. These results suggest that reduction of the bromobenzene-induced hepatic lipid peroxidation is caused by inhibition on the epoxide formation, not on free radical generation.

Key words : Fermented anchovy, aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase, bromobenzene-treated rat

서 론

식품의 저장 중 일어나는 변패 또는 산패를 방지하기 위한 방법으로 사용되었던 항산화제의 연구가 최근에는 생체세포 내에서 일어나는 여러 가지 산화반응이 노화, 동맥경화 또는 암들을 유발한다는 보고^(1,2)와 함께 독성이 없는 항산화제를 함유한 식품을 섭취하는 것이 여러 성인병 및 발암을 예방할 수 있다는 연구로 이어지고 있다. 또한 우리가 섭취해야 하는 필수지방산들은 다가불포화지방산들(PUFAs)로 세포의 막구성 등에 필요하지만 항산화물질과 함께 섭취하지 않는 경우 오히려 지질과산화에 의한 적혈구의 용혈현상, 노화 또는 빛에 의한 망막의 손상 등이 나타난다고 하였다⁽³⁻⁵⁾.

현재 알려져 있는 천연 항산화제로 tocopherol이 가장 항산화능이 높아 매우 실용적인 것으로 알려져 있으며 또한 식물로부터 얻을 수 있는 polyphenol성 물질, ascorbic acid, carotenoids, 질소화합물 등도 항산화능을 가지는 것으로 보고되고 있다^(6,7). 질소화합물인 생리활성 펩타이드들은 혈압강화작용, 혈청콜레스테롤 저하작용 및 산화방지작용 등의 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있으며 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소분해하여 얻은 저분자 펩타이드로부터 생리활성물질의 검토가 이루어지고 있다⁽⁸⁻¹⁰⁾. 발효식품에 대한 생리활성물질 연구로는, Jeong 등⁽¹¹⁾이 멸치액젓에 혈전용해효소가 존재하며 경구투여시 동물의 혈액내 혈전을 용해시키는 활성이 있다고 하였으며 김치^(12,13), 된장^(14,15), 일본의 Okara Koji⁽¹⁶⁾ 및 인도의 Tempeh⁽¹⁷⁾ 등 많은 발효식품들이 항산화물질, 아질산 소거물질, 항혈전물질 등 생리활성물질들을 함유하고 있는 것으로 보고하였고 박 등⁽¹⁸⁾은 멸치액젓에는 linoleic acid의 자동산화를 저해하는 항산화물질들이 많이 함유되어 있다고 하였다.

Corresponding author : Jong Ok Park, Department of Chemistry, Kyungshung University, 110 Daeyun-Dong Nam-Gu, Pusan 608-736, Korea
Tel : 82-51-620-4633
Fax : 82-51-622-4986
E-mail : gopark@star.kyungshung.ac.kr

우리나라 전통발효식품이면서 또한 김치의 부재료로 널리 쓰이고 있는 멸치액젓은 펩타이드, 지질 및 소금을 과량 함유하고 있고 오랫동안 숙성 및 저장을 거쳐야 되는 식품으로 항산화활성과 같은 생리활성을 지니고 있다면 안심하고 식탁에 올릴 수 있는 영양성 및 기능성 식품이 될 수 있을 것으로 생각되어 본인 등⁽¹⁸⁾은 멸치액젓의 linoleic acid의 자동산화에 대한 *in vitro* 항산화성을 시험하였으며 그 결과 멸치액젓의 모든 용매분획이 *in vitro*에서 항산화활성을 가지고 있었고 그 중에서도 수용액층이 가장 강한 활성을 보여주었다고 보고하였다. 이와 같이 멸치액젓의 원액 및 각 용매분획이 *in vitro*에서 linoleic acid의 자동산화를 강하게 저해하는 것으로 보아 다카볼포화지방산을 많이 함유하고 있는 멸치액젓이지만 발효숙성 및 저장되는 기간 중 산화변패는 걱정하지 않아도 될 것으로 사료된다. 본 연구에서는 이러한 항산화능을 가진 멸치액젓이 생체에서도 항산화능을 가지는지 재확인하기 위하여 멸치액젓 용매분획의 간조직 과산화지질 생성에 대한 항산화효과를 *in vitro*에서 실험하였다. 즉, 흰쥐에게 epoxide를 생성하여 간독성을 유발하는 물질로 잘 알려진 bromobenzene을 투여한 후, *in vitro*에서 간 균질액의 과산화지질 생성정도를 측정 한 결과 bromobenzene 투여에 의하여 증가했던 과산화지질의 함량이 멸치액젓에 의하여 감소하였으므로 MDA생성계에 어떠한 영향을 주는지 실험하기 위하여 먼저 산화효소계의 aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase, xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 활성을 실험하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 시료는 전보⁽¹²⁾의 실험에 사용하였던 시료로서 부산에 거주하는 가정에서 만든 멸치액젓(1997년 제조하여 1년 정도 발효 및 숙성을 거쳐)을 여과지(Whatman No. 42)로 걸러서 얻은 여과액을 사용하였다. 이 여과액의 고형분은 42.0%이었다.

멸치액젓의 용매추출물제조 및 염분함량 측정

멸치액젓 800 mL(고형분 42.0%)를 소금이 석출되지 않을 정도로 농축하고 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올의 용매극성별로 추출하였으며 각 추출물들을 농축하여 클로로포름분획(10 mL), 에틸아세테이트분획(10 mL), 부탄올분획(85 mL) 및 수용액분획(460 mL)을 얻었다. 각 용매분획의 염분함량은 Mohr의 방법⁽¹⁹⁾에

따라 AgNO₃ 표준용액으로 염소이온을 적정하여 측정하였다. 즉, 각 용매분획을 각각 원액 또는 희석액 10 mL로 하여 삼각 flask에 넣고 1 N K₂CrO₄을 지시약으로 하여 0.02 N AgNO₃ 용액으로 적정하고 염분함량을 백분율로 계산하였다.

Linoleic acid 자동산화에 대한 항산화활성 측정

멸치액젓의 linoleic acid 자동산화에 대한 항산화활성의 측정은 전보⁽¹²⁾에 서술했던 바와 같다. 즉, 고형분 10 µg 또는 20 µg에 해당하는 각 용매분획을 에탄올 100 µL에 현탁시킨 후 에탄올에 용해한 5% linoleic acid 용액 100 µL, 0.01 M 인산완충용액(pH 7.0) 200 µL 및 증류수 100 µL를 microfuge tube에 넣고 혼합하여 빛을 차단한 상태로 50°C의 항온조 내에서 보관하였다. 일정시간 경과 후 반응액 100 µL를 취하여 에탄올, 30% ammonium thiocyanate 및 0.02 M ferrous chloride를 가하고 3분 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며 6회 실험하여 결과를 얻었다.

효소원의 조제

효소원을 조제하기 위하여 대한실험동물센터(충북 음성군)로부터 분양받은 Sprague-Dawley계 숫쥐(200±50 g) 5마리를 일정한 조건(온도: 20±2°C, 습도: 50%, 명암: 12시간 light/dark cycle) 하에서 충분히 적응시킨 후 사용하였다. Bromobenzene은 1% tween 80에 460 mg/kg되게 현탁시켜 12시간 간격으로 2일간 복강주사하여 *in vitro* 실험에 사용하였다. 대조군은 동량의 생리식염수와 1% tween 80을 투여하였다. Bromobenzene을 투여한 실험동물을 탄산가스로 마취시킨 후 복부 정중선을 따라 절개하고 간을 생리식염수로 관류시켜 조직내 혈액을 제거하고 적출하여 여지로 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 평량한 다음 조직 1g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거하고 15,000×g에서 10분간 원심분리하여 침전물과 상정액을 얻었다. 이 상정액을 105,000×g에서 60분간 초원심분리하여 그 상정액(cytosol fraction)은 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 활성 측정을 위한 효소원으로 사용하였으며, 침전물(microsomal fraction)은 완충용액으로 세척한 후 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 현탁하여 aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 따로 규정이 없는 한 4°C 이하에서 행하였다.

과산화지질 함량 측정

간 조직 1 g당 9배량의 생리식염수를 가하여 마쇄하고, 이 마쇄액에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 mL, 20% acetate buffer(pH 3.5), 0.8% thiobarbituric acid 및 멀치젓 용매분획을 가한 후 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 실온에서 냉각시켜 n-부탄올/pyridine(15:1)을 첨가하고 15분간 원심분리한 후 n-부탄올/pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 흡광도를 측정한다. 다음 표준곡선에서 그 함량을 간 조직 1 g당 malondialdehyde의 nmole수로 표시하였다⁽²⁰⁾.

Aniline hydroxylase의 활성

반응액 2 mL중 10 mM MgCl₂와 150 mM KCl이 함유된 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에 기질인 1 mM aniline-HCl과 0.5 mM NADPH 및 효소액(30-400 µg의 단백질)과 멀치액젓의 용매분획들을 가하여 이 액을 37°C에서 20분간 반응시켰다. 20% TCA를 가하여 반응을 종료시킨 후 10분간 원심분리하여 얻은 상정액에 발색의 목적으로 10% Na₂CO₃와 0.2 N NaOH (2% phenol 함유)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 파장 640 nm에서 그 흡광도를 읽고 반응이 linear한 것이 확인된 표준곡선에서 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg microsomal protein이 생성한 p-aminophenol의 양을 nmole로서 표시하였다⁽²¹⁾.

Aminopyrine N-demethylase의 활성

Nashi의 방법⁽²²⁾을 약간 변경하여 사용하였다. 즉, 총 반응액 2 mL에는 0.1 M phosphate buffer(pH 7.5), 2 mM aminopyrine-HCl, 0.5 mM NADPH, 10 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1 mM semicarbazide, 멀치액젓의 분획들 및 효소액(30-400 µg의 단백질)이 함유되어 있으며 37°C에서 30분간 반응시켰다. 15% ZnSO₄와 포화 Ba(OH)₂를 가하여 반응을 정지시킨 후 5분간 방치한 다음 10분간 원심분리하여 얻은 상정액 5 mL에 발색의 목적으로 Nashi reagent를 첨가하고 60°C에서 30분간 반응시킨 후 그 상정액을 취하여 파장 415 nm에서 그 흡광도를 측정하고 linear한 표준곡선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg microsomal protein이 생성한 formaldehyde 양을 nmole로서 표시하였다.

Xanthine oxidase의 활성

Potassium phosphate buffer(pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine sodium salt 60 µM, 멀치액젓의 분획들 및 효소원을 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 20%

TCA를 가하여 단백질을 제거하고 원심분리한 후 상정액을 292 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 cytosolic protein이 생성하는 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다⁽²³⁾.

Aldehyde oxidase 활성

Potassium phosphate buffer(pH 7.5) 일정량에 기질인 n-methylnicotinamide 1.5 mM, 멀치액젓의 용매분획들 및 효소액을 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 20% TCA를 가하여 반응을 종료시켰다. 반응 종료 후 원심분리하여 얻은 상정액을 300 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 cytosolic protein이 생성한 pyridone의 양을 nmole로 나타내었다⁽²⁴⁾.

단백질 정량 및 통계처리

단백질의 정량은 Lowry 등⁽²⁵⁾의 방법에 준하였으며, bovine serum albumin(Fr. IV, Sigma Co.)을 표준품으로 하여 단백질을 정량하였다. 모든 실험에서 세 번의 독립적인 실험을 행하였으며 각 실험마다 4개씩을 한 군으로 하였다. 통계처리는 Duncan's multiple range test를 행하였고 p-value를 구하여(p<0.05) 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

가정에서 제조한 멀치액젓으로부터 극성차이를 가진 용매로 추출, 농축하여 각 용매분획을 얻었으며 10 µg 또는 20 µg의 각 용매분획들이 linoleic acid의 자동산화에 미치는 항산화효과를 관찰하였다(Fig. 1). 멀치액젓의 모든 용매분획에서 항산화효과가 우수하였으며 클로로포름분획과 에틸아세테이트분획은 염분을 함유하지 않았으나 부탄올분획과 수용액분획의 경우 염분을 각각 12.2% 및 21.1% 함유한 상태였으므로 부탄올분획과 수용액분획을 사용한 실험에서는 염분을 포함한 상태로 실험에 사용하였으며 별도의 실험에서 염분을 20% 함유한 증류수가 linoleic acid의 자동산화에 대하여는 항산화능을 보이지 않는 것을 확인하였다. 또한 전보에서 실험한 결과에서 C18 column이 부착된 HPLC를 이용하여 수용액층으로부터 항산화물질을 분리하였을 때 염분을 함유하지 않은 상태에서 오히려 항산화활성이 오랜동안 유지되었음이 관찰되었으며 염분을 제거하기 위하여 투석막을 이용한 투석이나 gel filtration chromatography 방법을 사용하였으나 부탄올

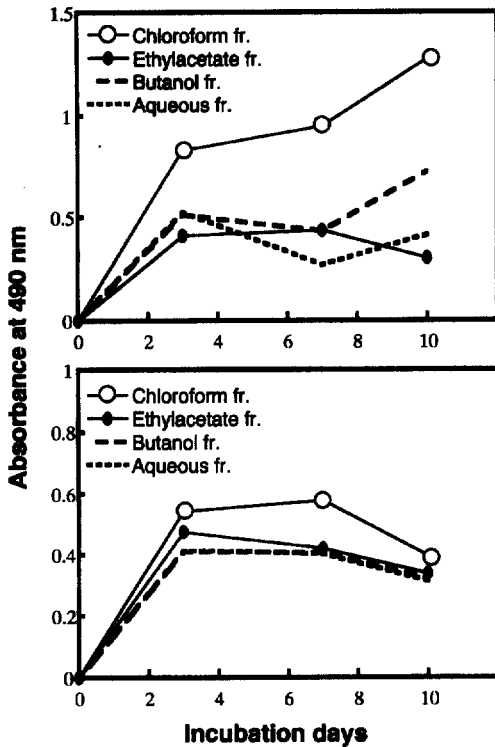


Fig. 1. Antioxidative effects of fermented anchovy fractions on the linoleic acid oxidation.
Antioxidant activity was measured after indicated incubation periods at 50°C. Peroxidation of linoleic acid were measured at 490 nm. 10 µg(panel A) and 20 µg(panel B) of each fraction of fermented anchovy were used against 5 mg linoleic acid oxidation.

분획과 수용액분획의 항산화활성 물질은 분자량이 적어 투석(MWCO 1000) 또는 Bio-gel P2 gel filtration chromatography와 같은 방법으로 분리할 수 없었으며 HPLC의 C18 column으로는 미량밖에 얻을 수 없었으므로 본 실험에서는 염분을 함유한 상태로 bromobenzene으로 유도된 간조직의 과산화지질에 대한 *in vitro* 실험을 행할 수 밖에 없었다. 그러나 과량의 염분에 의한 과산화지질생성에 대한 영향을 배제하기 위하여 먼저 NaCl용액 3 mg/mL 및 1 mg/mL 농도에서 실험을 한 결과 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났으므로 멸치액젓의 용매분획들을 염분제거하지 않은 상태에서 실험에 사용하였다. 생리식염수 및 bromobenzene으로 간장독성을 유발한 흰쥐의 간 균질액에서 지질 과산화물생성에 대한 멸치액젓의 효과를 관찰한 결과는 Table 1과 같았다. 멸치액젓의 모든 용매분획이 모든 농도에서 과산화지질의 생성을 유의적으로 감소시켰으며 에틸아세테이트분획과 부탄

Table 1. The effects of fermented anchovy fractions on the hepatic lipid peroxide content in bromobenzene-treated rats *in vitro*

Group	Conc.(mg/mL)	Activity
		MDA nmole/g of tissue
Negative control		14.6 ± 2.36 ^(1,2)
Positive control(BB)		28.9 ± 3.17 ^a
Fermented anchovy	3	18.5 ± 1.36 ^{c,f,g,h}
	1	23.5 ± 2.13 ^{b,c,d}
	3 × 10 ⁻¹	28.0 ± 1.76 ^a
Chloroform fr.	3 × 10 ⁻²	27.7 ± 1.49 ^a
	3	16.4 ± 1.47 ^{h,i}
	1	18.0 ± 2.10 ^{g,h,i}
Ethylacetate fr.	3 × 10 ⁻¹	24.5 ± 1.42 ^{b,c,d}
	3 × 10 ⁻²	24.3 ± 2.13 ^{b,c,d}
	3	20.9 ± 1.34 ^{b,c,d,e,f,g}
Butanol fr.	1	21.0 ± 2.13 ^{b,c,d,e,f,g}
	3 × 10 ⁻¹	23.4 ± 1.86 ^{b,c,d}
	3 × 10 ⁻²	22.8 ± 2.00 ^{b,c,d}
Aqueous fr.	3	20.3 ± 2.61 ^{c,d,e,f,g}
	1	19.6 ± 1.89 ^{d,e,f,g}
	3 × 10 ⁻¹	21.2 ± 2.11 ^{b,c,d,e,f,g}
Aqueous fr.	3 × 10 ⁻²	22.7 ± 1.74 ^{b,c,d}
	3	19.3 ± 2.19 ^{d,e,f,g,h}
	1	18.6 ± 1.47 ^{c,f,g,h}
Aqueous fr.	3 × 10 ⁻¹	18.2 ± 1.96 ^{f,g,h,i}
	3 × 10 ⁻²	22.2 ± 2.00 ^{b,c,d}

¹⁾The values above show mean ± S.D. of three independent experiment with four replications.

²⁾Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other by Duncan's multiple range test(p>0.05).

올분획에서는 농도간에 유의적인 차이는 보이지 않았으나 클로로포름분획에서는 1 mg/mL 농도에서, 수용액분획의 경우 0.3 mg/mL 농도에서도 과산화지질의 생성을 강하게 감소시키는 것을 볼 수 있었다. 식물인 경우 polyphenol을 주로 함유하고 있는 에틸아세테이트분획이 항산화활성을 강하게 나타내는 것으로 보고되고 있으며^(26,27) 동물성식품인 경우에는 지질성분인 인지질⁽²⁸⁾ 또는 수용액성분인 저분자단백질 및 단백질 가수분해물들로부터 항산화활성물질을 분리한 연구들이 보고되어 있다^(29,30).

Epoxide 독성 유발물질로서 bromobenzene을 흔히 사용하는데 bromobenzene은 cytochrome P-450 dependent monooxygenase에 의하여 독성이 강한 bromobenzene-3,4-oxide로 전환되며 epoxide hydrolase에 의하여 무독의 bromobenzene-3,4-dihydrodiol이 생성되거나 glutathione S-transferase에 의하여 bromobenzene glutathione이 생성되어 배설된다. 본 연구에서는 먼저 epoxide 생성단계에 관여하는 microsomal 분획의 aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase 활

Table 2. The effects of fermented anchovy on the hepatic aniline hydroxylase activity in bromobenzene-treated rats *in vitro*

Group	Conc.(mg/mL)	Activity
		<i>p</i> -aminophenol nmole/ mg protein/min
Negative control		0.59 ± 0.01 ^{g,1),2)}
Positive control(BB)		1.36 ± 0.12 ^{a,b}
Chloroform fr.	3	0.77 ± 0.03 ^{e,f}
	1	0.85 ± 0.05 ^e
	3 × 10 ⁻¹	1.25 ± 0.05 ^{b,c}
	3 × 10 ⁻²	1.36 ± 0.10 ^{a,b}
Ethylacetate fr.	3	0.86 ± 0.06 ^e
	1	1.18 ± 0.08 ^c
	3 × 10 ⁻¹	1.36 ± 0.12 ^{a,b}
	3 × 10 ⁻²	1.45 ± 0.07 ^a
Butanol fr.	3	0.72 ± 0.05 ^f
	1	0.85 ± 0.02 ^e
	3 × 10 ⁻¹	1.06 ± 0.05 ^d
	3 × 10 ⁻²	1.45 ± 0.07 ^a
Aqueous fr.	3	0.51 ± 0.07 ^h
	1	0.67 ± 0.08 ^{e,g}
	3 × 10 ⁻¹	1.18 ± 0.09 ^c
	3 × 10 ⁻²	1.36 ± 0.12 ^{a,b}

¹⁾The values above show mean ± S.D. of three independent experiment with four replications.

²⁾Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other by Duncan's multiple range test(p>0.05).

성에 대한 멸치액젓의 효과를 관찰하였다(Table 2 및 Table 3). 정상쥐 간의 aniline hydroxylase 활성에 비하여 bromobenzene을 처리한 간조직 균질액의 aniline hydroxylase의 활성이 0.59에서 1.36 nmole/mg microsomal protein으로 증가하였으며, 멸치액젓의 용매분획을 가하였을 때 모든 분획의 0.3 mg/mL 농도에서 aniline hydroxylase 활성이 유의적으로 감소하였으며 물분획의 경우 1 mg/mL 농도에서 다른 용매분획보다 aniline hydroxylase 활성을 저해시키는 효과가 좋았으나 0.03 mg/mL 농도에서는 모든 용매분획에서 효과가 없는 것으로 나타났다. Aminopyrine N-demethylase 활성에 대한 멸치액젓의 효과를 보면, 모든 용매분획의 0.03 mg/mL 농도에서도 유의적인 저해효과를 보였으나 클로로포름분획이 가장 강한 저해효과를 보여 3 mg/mL에서 정상쥐간의 효소활성에 가깝게 나타났으며 모든 분획에서 농도가 증가할수록 aminopyrine N-demethylase 활성에 대한 저해효과도 증가하였다.

한편, linoleic acid 자동산화에 대한 항산화실험 및 bromobenzene에 의해 유도된 쥐간의 과산화지질생성에 대한 실험에서 멸치액젓의 각 용매분획이 항산화 및 과산화지질 생성저해의 효과를 나타내었으므로, free

Table 3. The effects of fermented anchovy on the hepatic aminopyrine N-demethylase activity in bromobenzene-treated rats *in vit*

Group	Conc.(mg/mL)	Activity
		Formaldehyde nmole/mg protein/min
Negative control		5.19 ± 0.24 ^{g,1),2)}
Positive control(BB)		10.35 ± 1.08 ^a
Chloroform fr.	3	5.76 ± 0.38 ^a
	1	6.96 ± 0.16 ^{e,f}
	3 × 10 ⁻¹	8.12 ± 0.13 ^{c,d}
	3 × 10 ⁻²	9.56 ± 0.25 ^b
Ethylacetate fr.	3	8.21 ± 0.34 ^c
	1	8.56 ± 0.16 ^b
	3 × 10 ⁻¹	9.24 ± 0.10 ^b
	3 × 10 ⁻²	9.76 ± 0.25 ^b
Butanol fr.	3	7.18 ± 0.10 ^{e,f}
	1	7.56 ± 0.19 ^{d,e}
	3 × 10 ⁻¹	8.23 ± 0.64 ^c
	3 × 10 ⁻²	9.48 ± 0.09 ^b
Aqueous fr.	3	6.71 ± 0.17 ^f
	1	7.46 ± 0.07 ^c
	3 × 10 ⁻¹	8.56 ± 0.11 ^b
	3 × 10 ⁻²	9.24 ± 0.25 ^b

¹⁾The values are mean ± S.D. of three independent experiments with four replications.

²⁾Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other by Duncan's multiple range test(p>0.05).

radical의 생성에 관여하는 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 활성에 대한 영향을 관찰하였다(Table 4). Xanthine oxidase와 aldehyde oxidase는 cytosol 분획에 존재하는 molybden 함유 산화효소로서 생화학적 반응을 촉매하는 과정에서 반응액 중의 산소분자를 전자수용체로 활용하고 있으므로 superoxide anion, hydrogen peroxide 및 최종적으로 hydroxyl radical을 생성한다. 그러나 실험결과 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 활성에 대한 멸치액젓의 효과는 없는 것으로 나타났다. 그러므로 멸치액젓이 bromobenzene 투여로 인한 과산화지질의 생성을 저해하는 현상은 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 활성에 의한 free radical의 생성과는 상관이 없는 것으로 생각된다. 위와 같은 실험결과들로 볼 때, 멸치액젓의 모든 용매분획들은 bromobenzene으로 유도된 간세포의 과산화지질의 생성을 저해하였으나 이는 free radical의 생성을 저해해서가 아니라 마이크로솜분획의 aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase의 활성을 저해하여 epoxide생성을 억제하므로써 나타난 결과라고 할 수 있다. 이미 생성된 epoxide를 무독화하여 배설케 하는 epoxide hydrolase 및 glutathione S-

Table 4. The effects of fermented anchovy on the hepatic cytosolic aldehyde oxidase and xanthine oxidase activity in bromobenzene-treated rats *in vitro*

Group	Conc.(mg/mL)	Activity	
		Aldehyde oxidase	Xanthine oxidase
Positive(BB)		1.24 ± 0.13 ^{ns,1),2)}	2.40 ± 0.11 ^{ns}
Chloroform fr.	3	1.22 ± 0.06	2.41 ± 0.03
	1	1.22 ± 0.04	2.43 ± 0.05
	3 × 10 ⁻¹	1.25 ± 0.06	2.43 ± 0.07
	3 × 10 ⁻²	1.20 ± 0.07	2.47 ± 0.06
Ethylacetate fr.	3	1.23 ± 0.02	2.47 ± 0.07
	1	1.23 ± 0.03	2.31 ± 0.06
	3 × 10 ⁻¹	1.22 ± 0.02	2.63 ± 0.25
	3 × 10 ⁻²	1.22 ± 0.05	2.48 ± 0.07
Butanol fr.	3	1.29 ± 0.07	2.43 ± 0.12
	1	1.18 ± 0.02	2.44 ± 0.11
	3 × 10 ⁻¹	1.22 ± 0.03	2.43 ± 0.04
	3 × 10 ⁻²	1.28 ± 0.08	2.44 ± 0.07
Aqueous fr.	3	1.22 ± 0.06	2.45 ± 0.05
	1	1.25 ± 0.02	2.44 ± 0.05
	3 × 10 ⁻¹	1.25 ± 0.05	2.44 ± 0.03
	3 × 10 ⁻²	1.26 ± 0.02	2.43 ± 0.06

¹⁾The values above show mean ± S.D. of three independent experiment with four replications.

²⁾ns; not significant.

transferase의 활성에 대한 멸치액젓의 효과는 아직 밝혀지지 못했으며 앞으로 실험할 예정이다.

박 등⁽³¹⁾이 보고한 해조류 추출물의 효과를 보면 납작과래, 우뚝가사리 등 6종의 메탄올추출물 1 mg/mL가 bromobenzene-유도 쥐간의 과산화지질생성을 26~79% 정도 저해하였으며 이와 함께 세포질분획의 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 활성을 저해하였기 때문에 free radical의 생성을 방해함으로써 지질과산화가 억제되었다고 설명하였다. 또한 해조류 *Ecklonia stolonifera*에서 분리된 페놀성 화합물 phlologlucinol의 경우, 마이크로솜분획인 aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase 및 세포질분획인 glutathione S-transferase의 활성에는 영향이 없었으나 epoxide hydrolase 활성만이 대조군의 76%까지 회복되었다고 하였다. 그러나 본 연구는 *in vitro*에서 멸치액젓이 bromobenzene으로 유도된 쥐의 간균질액의 효소활성에 미치는 영향을 본 것이므로 여러 독성물질들에 의한 간조직의 지질과산화를 억제할 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있으나 앞으로 superoxide dismutase, glutathione S-transferase 등 유해산소 대사효소들에 대한 *in vivo* 연구들이 필요하다고 사료된다.

요 약

멸치액젓의 용매분획을 50°C에서 10일동안 항온실험한 경우 각 용매분획의 건조중량 10 µg 또는 20 µg

이 5 mg의 linoleic acid의 자동산화를 저해하는 것으로 나타났으며, 용매분획 중 부탄올분획 및 수용액분획이 염분을 함유하고 있었고 염분의 함량은 각각 12.2% 및 21.1%이었다. 흰쥐에게 간장독성을 유발시킨다고 알려진 bromobenzene을 주사하고 간조직을 분리하여 *in vitro*에서 멸치액젓이 간균질액의 지질과산화물 생성에 미치는 효과를 관찰한 결과, 모든 용매분획들이 3 mg/mL 또는 1 mg/mL 농도에서 지질과산화물 생성을 강하게 감소시켰으며 수용액분획의 경우 0.3 mg/mL 농도에서도 활성을 가지는 것으로 나타났다. 간조직의 지질과산화반응에 관여하는 것으로 알려진 효소들 중 aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase, xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 활성에 대한 멸치액젓의 효과를 관찰한 결과, 간세포 마이크로솜 분획에 존재하는 aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase의 활성을 모든 용매분획이 저해하였다. 즉, 3 mg/mL 농도에서는 거의 정상쥐의 효소활성 수준까지 회복시켰고, 0.3 mg/mL의 농도에서도 유의적인 효과가 나타났으나 세포질 효소인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase의 활성에 대하여는 저해 효과가 나타나지 않았다. 이와 같은 결과로부터, bromobenzene-유도 간지질의 과산화물 생성과정에 있어서 멸치액젓의 항산화물질들은 free radical을 포획하여 지질과산화물 생성을 억제하는 것이 아니라 epoxide 생성단계를 저해하여 과산화지질 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 글

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

문헌

- Ames, B.N. Endogeneous oxidative damage, aging and cancer. *Free Rad. Comms.* 7: 121-128 (1989)
- Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272: 20963-20966 (1997)
- Takahata, K., Monobe, K., Tada, M. and Weber, P.C. The benefits and risks of n-3 polyunsaturated fatty acid. *Biosci. Biochnol. Biochem.* 62: 2079-2085 (1998)
- Oski, F.A. and Barness, L.A. Vitamin E deficiency: a previously unrecognized cause of hemolytic anemia in the premature infant. *J. Pediatr.* 70: 211-220 (1967)
- Buch, R.A., Reme, C.A. and Malnoe, A. Light damage in the rat retina: the effect of dietary deprivation of n-3 fatty acids on acute structural alterations. *Exp. Eyeres.* 53: 399-404 (1989)
- 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)
- Burton, G.W. Antioxidant activity of carotenoids. *J. Nutr.* 119: 109-111 (1989)
- 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.* 65: 1635-1641 (1991)
- Suetsuna, K. and Osajima, K. Blood pressure reduction and vasolatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine muscle. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkai-shi.* 42: 47-54 (1989)
- Ariyosh, Y. Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 4: 139-144 (1993)
- 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)
- Cheigh, H.S., Lee, Y.-O. and Choi, Y.-S. Antioxidative activity of *kimchi* and *kimchi* sub-ingredient. *Food Ind. Nutr.* 3: 47-54 (1998)
- 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)
- 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)
- Kurech, T., Kikugawa, K., Fukuda, S. and Hasunuma, M. Inhibition of N-nitrosamine formation by soya products. *Fd Cosmet. Toxicol.* 19: 425-428 (1981)
- Matsuo, M. *in vivo* Antioxidant activity of *Okara Koji*, a fermented Okara, by *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 1968-1972 (1997)
- Matsuo, M., Nakamura, N., Shidoji, Y. Muto, Y. and Osawa, T. Antioxidative 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)
- Park, J.O., Yoon, M.S., Cho, E.J. Kim, H.S. and Ryu, B.-H. Antioxidant effects of fermented anchovy. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 31: 1378-1385 (1999)
- The Society of Korean Food Chemistry. The quantitation of chloride, The technology of food processing, Ji-Gu publishing Co., Seoul, pp. 339-341 (1998)
- Ohkawa, H. Ohishi, N. and Yaki, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 265-275 (1979)
- Bidlack, W. R. and Lowry, G. L. Multiple drug metabolism: *p*-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* 31: 311-317 (1982)
- Nashi, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the henrisch reaction. *J. Biol. Chem.* 55: 412-416 (1953)
- Stripe, F. and Della Corte, E. The reaction of rat liver xanthine oxidase: conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase(Type D) to oxidase(Type O). *J. Biol. Chem.* 244: 3855-3863 (1969)
- Rajagopalan, K.V., Fridovich, I. and Handler, P. Hepatic aldehyde oxidase: I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 237: 922-928 (1962)
- Lowry, O.H., Rodebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
- Lee, Y.-J., Shin, D.-H., Chang, Y.-S. and Shin, J.-I. Antioxidative effect of some edible plant solvent extracts with various synergists. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 683-688 (1993)
- Hudson, B.J.F. and Lewis, J.I. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids as synergists. *Food Chem.* 10: 111-120 (1983)
- King, M.F., Boyd, L.C. and Sheldon, B.W. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69: 545-548 (1992)
- Colbert, L.B. and Decker, E.A.: Antioxidant activity of an ultrafiltration permeate from acid whey. *J. Food Sci.* 56: 1248-1250 (1991)
- Kim, S.K., Lee, H.C., Byun, H.K. and Jeon, Y.J. Isolation and characterization of antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *Korean J. Fish. Soc.* 29: 246-256 (1996)
- Park, J.-C., Choi, J.-S., Song, S.-H., Choi, M.-R., Kim, K.-Y. and Choi, J.-W. Hepatoprotective effect of extracts and phenolic compound from marine algae in bromobenzene-treated rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 28: 239-246 (1997)