

## *Aspergillus oryzae* A-5로부터 Low Density Lipoprotein(LDL)의 산화에 대한 항산화 효과

류병호<sup>†</sup> · 김동석 · 조경자<sup>\*\*</sup> · 이홍수<sup>\*\*\*</sup> · 진성현<sup>\*\*\*\*</sup>

경성대학교 식품공학과, <sup>\*\*</sup>가정과  
<sup>\*\*\*</sup>사하보건소, <sup>\*\*\*\*</sup>부산시보건환경연구원

## Antioxidant Activity of *Aspergillus oryzae* A-5 on Oxidation of Low Density Lipoprotein

Beung-Ho Ryu<sup>†</sup>, Dong-Suck Kim, Kyung-Ja Cho<sup>\*\*</sup>, Hong-Su Lee<sup>\*\*\*</sup>, Sung-Hyun Jin<sup>\*\*\*\*</sup>

Department of Food Science and Biotechnology

<sup>\*\*</sup>Department of Home Management, Kyungsoong University, Pusan, 608-736, Korea

<sup>\*\*\*</sup>Saha Health Center, 604-032, Pusan, Korea

<sup>\*\*\*\*</sup>Public Health and Environment Institute of Pusan, 613-106, Korea

### Abstract

Antioxidative activity of fraction extracted from cultivation of *Aspergillus* sp. A-5 against oxidation of human low density lipoprotein(LDL) was investigated. Fractions of *Aspergillus* sp. A-5 cultivation was successively purified with ethyl acetate and silica gel column chromatography. The concentration of fraction 4 inhibited Cu<sup>2+</sup>-induced oxidation of LDL almost completely. Band 3 isolated by the further purification of fraction 4 was higher than that of same concentration of  $\alpha$ -tocopherol, BHA and BHT.

The electrophoretic mobility of oxidized LDL by addition of Band 3 was faster than that of native LDL, but slower than that of oxidized LDL. It is concluded that fraction of *Aspergillus* cultivation contained antioxidants with the capacity to inhibit oxidative modification of LDL.

**Key words** : Antioxidant, low density lipoprotein, *Aspergillus* sp. A-5

### 서 론

식품의 3대 영양소의 하나인 지방은 에너지원으로서 뿐만 아니라 식품의 맛과 품질에도 큰 구실을 하고 있다. 지방질이 많이 함유되어 있는 식품은 가공 및 저장중에 산화가 일어나 품질이 저하되고 산화가 계속 진행되면 산패가 일어나 산화가 식품위생상 문제가 발생한다. 지방의 산화를

방지하기 위하여 사용되는 인공 합성 항산화제인 BHA, BHT 등은 값이 저렴하고 항산화력도 우수하지만 열안정성이 떨어지고, 사람이 섭취할 경우 생체효소 및 지방의 변화로 암 등의 질병이 유발된다.<sup>1)</sup> 특히 혈액 내에서의 low density lipoprotein은 LDL이 산화되어 oxidized LDL(Oxidized LDL)로 전환되면 궁극적으로 cholesterol esters로 축적되어 동맥부위에 거품세포가 형성되어 동맥경화가 발병하게

<sup>†</sup> Corresponding author

된다.<sup>2~8)</sup>

LDL은 macrophages<sup>9)</sup>, 동물의 내피세포<sup>10)</sup>, 평활근 세포<sup>11)</sup> 및 금속이온의 존재하에서도 Oxid LDL로 유도된다.<sup>12,13)</sup> Oxid LDL은 세포에 대해 독성이 강한 aldehyde 등 지질의 과산화물을 함유하고 있고, 세포조직에 확산되어 독성을 나타낼뿐만 아니라 내피세포에 염증을 일으키고 결국에는 동맥경화를 유발하게 된다.<sup>8,14)</sup> 따라서 동맥경화의 원인을 예방하기 위해서는 LDL의 산화를 방지하는 것이 보다 효과적인 방법으로 지적되고 있다. 천연 항산화제로서는 지금까지 많은 보고가 있으나 인체의 독성이나 경제적인 이유로 실용하기 어려운 실정이다. 토코페롤은 내열성이 강하나 합성 항산화제에 비하여 고가이고 항산화 활성이 약하며 식물성 기름에는 효과가 약한 것으로 지적되고 있어 값이 저렴하고 항산화 효과가 강한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다. 이와같이 LDL의 산화를 억제하는 천연 항산화제로는 비타민 E<sup>15~18)</sup>, carotenoids<sup>18)</sup>, catechin<sup>19)</sup>, flavonoid<sup>20~23)</sup> 및 그 유도체 등이 알려져 있으나 미생물에 의한 항산화제에 대한 연구는 미비한 실정이다. 미생물의 대사산물을 대상으로 한 생리활성물질은 1940년 Chain 등<sup>27)</sup>이 penicillin을 발견한 이래 미생물로부터 생리활성 물질에 대한 연구가 시작되었다. 최근에는 미생물 유래 의약품, 식품첨가물 및 생리활성 물질을 분리 정제하고 그 구조를 분석하여 대량생산을 하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 미생물로부터 항산화제에 대한 연구는 penicillin<sup>24,25)</sup>, fungi<sup>26,27)</sup>, yeast<sup>28)</sup>, bacteria<sup>29)</sup> 및 marine bacteria<sup>30)</sup> 등으로부터 항산화 효과가 우수한 성분이 있는 것으로 알려지고 있어 미생물로부터 항산화제의 개발은 바람직한 연구라 할 수 있다.

본 연구는 *Aspergillus* sp. A-5로부터 항산화제를 탐색하고 항산화 효과에 대하여 실험한 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 실험방법

### 미생물

*Aspergillus awamori* ATCC 22342, *Aspergillus niger* ATCC 22343, IFO 6342, *Aspergillus oryzae* KCTC 1227, 1229, 1235 및 *Aspergillus oryzae* ATCC 42149, *Aspergillus usami* KCTC 1291, 1994, 1297, *Aspergillus fumigatus* KCTC 1234, *Aspergillus* sp. A-1(from soil), *Aspergillus* sp. A-5(from soybean paste)를 사용하였고,

이들 배지는 potato dextrose agar배지로 배양하였으며 slant배지에서 4℃에서 보관하였다.

### 배지와 배양조건

배지는 0.3% sucrose, 0.3% NaNO<sub>3</sub>, 0.05% KCl, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.001% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 및 3% sucrose를 증류수 1ℓ에 녹혀 pH는 6.0으로 조절한 후 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

항산화제의 생성조건은 *Aspergillus* sp. 의 균체를 1ℓ삼각 flask의 200ml배지에 접종하여 30℃에서 5일간 배양하였다.

### *Aspergillus* sp. 의 배양액으로부터 DPPH법에 의한 항산화활성의 검색

각종 fungi의 배양액을 초음파 분쇄(sonicator) 시킨후 ethylacetate로서 추출하고 ethylacetate 층을 분취하여 증발 농축하였다. 농축한 일정액을 여과지에 점적한 후 1,1-diphenyl 2-picryl hydrazyl(DPPH)(100μM/ml)의 에탄올 용액으로 분무하여 30분 동안 반응시켜 자주색에서 탈색되는 균주를 선발하였다.<sup>31)</sup>

### 항산화 활성의 측정(thiocyanate 법)

항산화 효과를 측정하기 위하여 linoleic acid(25mg/ml ethanol용액), NH<sub>4</sub>SCN(0.39g/ml 수용액), ferrous chloride(2.5mg/ml 3.5% 염산용액)을 인산완충용액(5×10<sup>-2</sup> M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 및 5×10<sup>-2</sup> M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O)에 혼합하여 pH 7.0으로 조절하였다. 각 시료 (200μl in EtOH)를 시험관(1.5×4.3cm)에 넣고 linoleic acid용액(200μl), 인산 완충용액(200μl)을 넣고 어두운 곳에서 40℃에서 방치한 다음 500nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>32)</sup>

### 항산화 성분의 분리 및 동정

#### 용매에 의한 성분의 추출

시료 1ℓ를 분액깔대기에 넣고 700ml ethyl acetate를 가한 후 항산화 물질을 추출하기 위해 진탕시켜 용매층을 분리한 후 여과한 다음 50℃에서 감압농축하고 에탄올에 녹여 사용하였다.

#### Silicagel column chromatography에 의한 활성 성분의 분리

Ethyl acetate 추출물로부터 항산화성분을 추출할 목적으

로 silicagel column chromatography을 행하고 다시 여러 개의 subfraction으로 나눈 후 각 subfraction에 대하여 항산화성을 비교하면서 항산화성 물질을 분리하였다. 즉 유리 column(5cm×100cm)에 활성화된 silicagel(0.063~0.100mm, 15101, 70~270mesh, 7734, Merck Co. Germany)을 chloroform으로 slurry로 만들어 충전한 후 시료를 chloroform : methanol을 1 : 0 (200ml), 99 : 1 (200ml), 90 : 10 (200ml), 그리고 0 : 1 (200ml) 등의 단계 별로 용리하였다. 이때 얻은 각 분획물들을 감압 농축하고 각 분획물에 대해 항산화 효과를 thiocyanate method를 이용하여 측정하여 활성이 있는 subfraction을 얻었다.

#### TLC에 의한 활성성분의 분리

Silicagel column chromatography를 행하여 항산화능이 있는 분획물을 TLC로 분리하여 항산화성 물질을 검색하였다. 즉, 항산화성이 확인된 분획물들을 capillary tube로 silicagel TLC (5554 Merck)상에 점적한 후 전개시켰다. 이때 전개용매는 CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 10 : 1을 사용하였고, TLC plate는 DPPH 발색시약을 분무하여 항산화성 물질들을 확인하였다.

#### LDL 수식에 대한 산화억제 효과

사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 분리  
건강한 남자의 혈액 50ml을 1mg/ml EDTA를 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4°C에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma는 상온에서 20분동안 원심분리(2000×g)한 다음 gentamycin sulfate (1mg/25ml)을 첨가하였다. LDL (d. 1.019~1.063g/ml)은 초고속 원심분리기(46,000×g)로 24시간 동안 분리하여 얻었다. 분리된 LDL은 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01M phosphate buffer, pH 7.4 로서 16~20시간 투석하였다.<sup>33)</sup>

#### LDL의 Cu<sup>2+</sup>에 의한 산화

##### Copper mediated 산화

LDL(100µg/ml)를 5µM CuSO<sub>4</sub>를 함유한 phosphate buffer saline(PBS)에 적당한 농도의 *Aspergillus* sp. A-5의 추출물을 첨가하여 37°C에서 24시간 배양하여 LDL의 산화를 측정하였다.<sup>34)</sup> 별도로 대조군은 이 배양액에 시료를 첨가하지 않은 조건에서 배양하였다.

Thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)의 측정  
LDL의 산화는 TBARS의 형성으로서 평가하였다. 100µg protein/ml LDL이 함유된 배양 혼합액 0.5ml에 20% TCA 1.5ml를 가한 다음 여기에 0.05M NaOH에 0.67% TBA 1.5ml를 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90°C 수욕 상에서 45분간 끓였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000×g)한 다음 상등액의 형광을 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Model 650-10S)로서 510 및 553 nm에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malonaldehyde (MDA)로서 만들어진 MDA의 표준곡선으로부터 MDA의 nmole로서 나타내었다.<sup>35)</sup>

#### LDL의 gel electrophoresis

LDL의 전기영동은 Nile red를 혼합한 LDL를 barbital buffer, pH 8.6으로 만든 agarose gel에 loading하여 75 V에서 20 분동안 전개하였다. 이를 UV lamp로서 확인하였다.<sup>36)</sup>

#### 단백질의 정량

LDL의 단백질의 정량은 Lowry등의 방법<sup>37)</sup>에 따라 측정하였다.

## 결과 및 고찰

#### *Aspergillus oryzae* A-5로부터 항산화활성이 있는 균주의 검색

*Aspergillus* sp.의 배양액으로부터 항산화활성을 검색하기 위하여 DPPH법에 따라 실험하였다. *Aspergillus* sp.의 배양액의 항산화 활성을 검색한 결과 *Aspergillus oryzae* KCTC 1229, KCTC 1235 및 *Aspergillus usarii* KCTC 1994는 항산화활성을 약하게 나타내었다. 그러나 토양에서 분리한 *Aspergillus* sp. A-1 및 된장에서 분리한 *Aspergillus* sp. A-5와 *Aspergillus oryzae* R-11는 항산화활성을 나타내었으며 그중에서도 *Aspergillus oryzae* A-5가 가장 항산화 활성이 높았다.(Table 1)

이들 *Aspergillus* sp.중 항산화 활성이 가장 우수한 *Aspergillus oryzae* A-5를 대량 배양하여 항산화활성에 대한 실험을 하였다. 한편 *Aspergillus oryzae* A-5의 배양액을 ethyl

Table 1. Origins and antioxidative activity from *Aspergillus* sp.

<i>Aspergillus</i> sp.	ATCC / KCTC / IFO	Antioxidative Activity (DPPH method)
<i>Aspergillus awomorii</i>	ATCC 22342	+
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 22343	-
	IFO 6342	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	KCTC 1227	-
	KCTC 1229	++
	KCTC 1235	++
	ATCC 42149	-
<i>Aspergillus usamii</i>	KCTC 1291	-
	KCTC 1994	+
	KCTC 1297	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KCTC 1234	-
<i>Aspergillus oryzae</i> A-5(from soybean paste)		+++
<i>Aspergillus</i> sp. A-1(from soil)		++
<i>Aspergillus</i> sp. A-5(from soybean paste)		++
<i>Aspergillus oryzae</i> R-11(from soybean paste)		++

+ : positive, - : negative

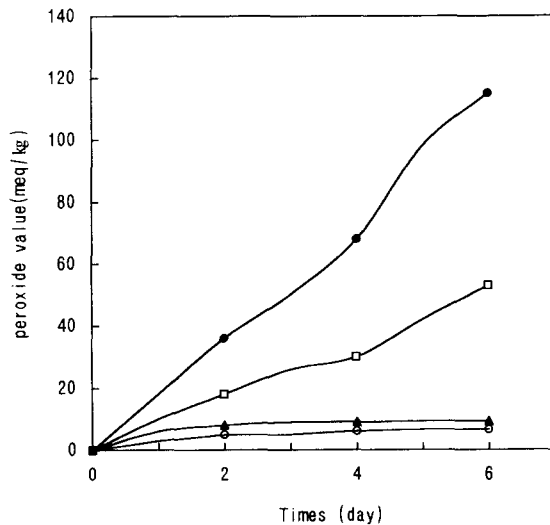


Fig. 1. Antioxidant activity of different solvent fraction extracted from *Aspergillus oryzae* A-5  
 ●-● ; Control, ○-○ ; ethylacetate extract  
 ▲-▲ ; water extract, □-□ ; methanol extract

acetate 및 methanol에 이행시켜 감압농축하여 항산화 활성을 측정된 결과 ethyl acetate가 항산화 활성이 높았으므로 이후의 실험은 ethyl acetate로서 추출하여 농축한 후 실험하였다.(Fig. 1)

***Aspergillus oryzae* A-5로부터 항산화 활성물질의 분획**

*Aspergillus* sp. A-5를 Czapek's medium으로 37°C에서 5일간 배양시킨 후 여과한 배양액 3ℓ에 동량의 ethylacetate를 가하여 5시간 동안 교반한 후 2회 추출하고 ethylacetate층을 모아 감압농축하였다. 농축액을 silicagel column chromatography를 실시하였다. Ethylacetate 추출물을 분획하기 위하여 column(φ8cm×100cm)에 silicagel을 충전한 다음 ethylacetate 추출물을 methanol에 약간 녹인 후 chloroform : methanol의 비율이 100 : 0, 95 : 5, 90 : 10 및 10 : 99의 비율로 분획하여, 획분인 Fraction 1, 2, 3, 4 및 5를 각각 얻었다.

**TLC로 분리된 band의 항산화 효과**

각 획분인 Fraction. 1. 2. 3. 4 및 5를 각각 농축한 다음

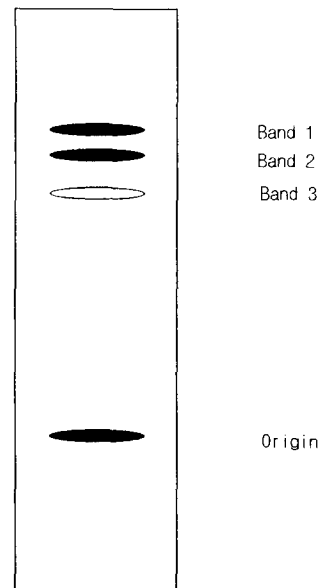


Fig. 2. Thin layer chromatograms of antioxidative effect of fraction with Ethylacetate : Methanol=90 : 10

thiocyanate법으로 항산화활성을 측정된 결과 Fraction 4가 활성이 가장 높았으며 Fraction 4을 preparative TLC 에 전개하였던바 3개의 band로 분리되었다.(Fig. 2) Fraction 4를 TLC로 분리하여 얻은 band 1, 2 및 3의 항산화력을 비교하기 위하여 비타민 E, BHT 및 BHA와 비교한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 이들 중 Band 1 및 2는 비타민 E와는 항산화 활성이 비슷하였으나 BHA 및 BHT보다 항산화 활성이 다소 낮았고 band 3은 비타민 E, BHT 및 BHA보다 다소 높은 항산화 활성을 나타내었다.(Fig. 3)

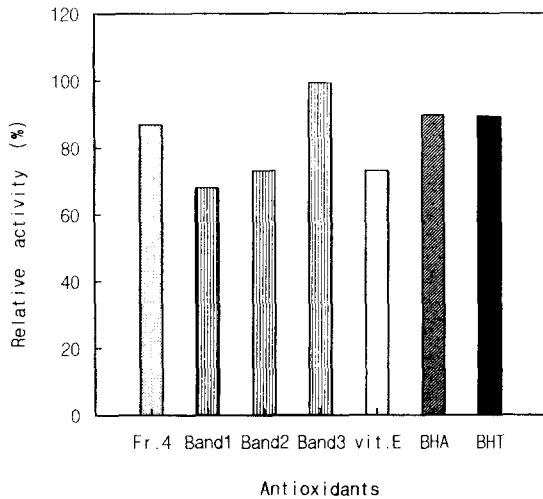


Fig. 3. Antioxidative activity of band 1, 2, and 3 obtained from Fraction 4 by TLC and its comparison with vitamin E, BHA and BHT.

*Aspergillus oryzae* A-5 배양액의 LDL에 대한 항산화효과  
*Aspergillus oryzae* A-5을 37°C에서 5일간 배양한 후 ethylacetate로 추출하고 TLC 및 silica gel column chromatography에 의하여 분리 정제한획분을 진공농축하여 LDL의  $Cu^{2+}$  유도 산화에 대한 항산화 효과를 실험하였다.

본 실험에서는 LDL에 5 $\mu$ M  $CuSO_4$ 를 첨가하여  $Cu^{2+}$ 로 유도 산화시키고 한편으로 여기에 band 3을 각각 100 및 200 $\mu$ g/ml 첨가하여 항산화 활성을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 항산화 활성이 있는 band 3를 100 $\mu$ g/ml 첨가하였을 때는 대조구보다는 항산화 활성이 높았으며 200 $\mu$ g/ml를 첨가한 결과 Native LDL 보다는 TBARS값이 약간 높았으므로 강력한 항산화 효과가 있는 것으로 나타내었다.

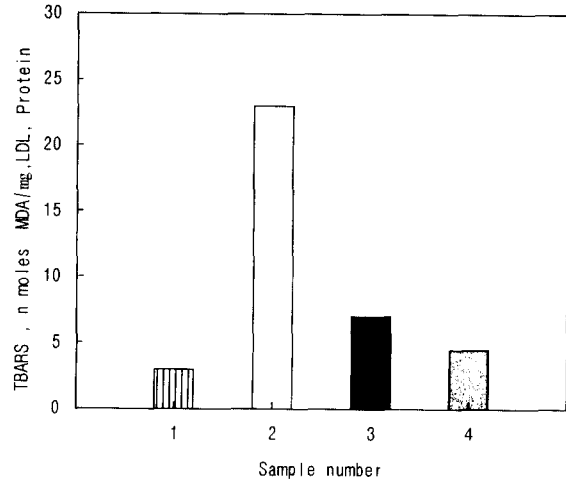


Fig. 4. Antioxidant effect of Fraction 4(band 3) obtained from *Aspergillus oryzae* A-5 cultivation on the oxidation of LDL by 5 M  $CuSO_4$ . LDL (100  $\mu$ g, protein/ml) was incubated for 18h at 37°C in the presence of 100 $\mu$ g or 200 $\mu$ g/ml band 3 of Fraction 4 by the addition of 5 M  $CuSO_4$ . 1 lane ; Native LDL, 2 lane ; LDL+5 M  $CuSO_4$ , 3 lane ; LDL+5 M  $CuSO_4$ +100 $\mu$ g (Band 3), 4 lane ; LDL +5 M  $CuSO_4$ +200 $\mu$ g(Band 3)

일반적으로 LDL의 금속이온에 의한 산화 유도는  $CuSO_4$ 인 경우 1~5 $\mu$ M까지 산화시킬 수 있으나 5 $\mu$ M  $CuSO_4$ 에서 일정하게 산화되므로 본 실험에서도 5 $\mu$ M  $CuSO_4$ 를 사용하였다.<sup>34)</sup>

본 실험에서 LDL을 *Aspergillus* sp. A-5의 추출물의 band 3를 첨가후 18시간 배양한 후 LDL의 산화 억제효과에 관한 실험에서는 산화 억제력이 좋았으나 첨가농도가 낮은 경우에는 산화 억제효과가 낮아 용량에 따른 차이가 있었다. Jialal 및 Scaccini는<sup>36)</sup>  $Cu^{2+}$ 의 존재하에서 LDL의 산화를 2~3시간동안 단시간 배양한 후 TBARS를 측정하여 산화정도를 측정하였으나 본 실험에서는 2~3시간보다 4, 5배 많은 배양시간으로 실험하였다. 이것은 개체에 따라 다르지만 사람의 혈장에서 채취하여 얻은 LDL이 자체에 존재하는 항산화제에 약간의 양항을 받기 때문이다.<sup>39)</sup> 비타민 A 및 E 와 같은 항산화제가 LDL의 획득에 미량함유되어 있을 경우 항산화력이 있으며 반대로 담배를 피우는

사람은 혈액에서 산화가 쉽게 일어날 수 있기 때문에<sup>13)</sup> 산화에 필요한 18시간동안 배양하였다. 이와 같이 LDL의 산화는 LDL자체에 항산화제가 극미량들어 있어도 산화가 쉽게 일어나지 않는다. 한편 LDL의 산화는 LDL의 농도가 증가하면 산화가 쉽게 일어날 가능성이 많아 본 실험에서는 LDL을 100mg/ml로 조절하여 실험하였다. 이는 LDL이 저장동안에 LDL의 산화를 최소화 하기 위하여 희석용액도 높은 농도에서 저장해야 한다는 것을 암시하고 있다.

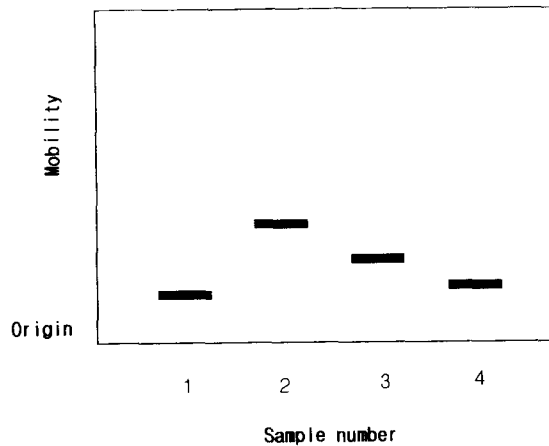


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of native LDL, Oxid LDL and LDL in addition of band 3 in Fraction 4 obtained from *Aspergillus oryzae* A-5.

LDL(100 µg protein/ml) was incubated in the absence and presence of 100µg/ml or 200µg/ml for 18h at 37°C.

After the incubation period, lipoprotein were stained with Nile red, and subjected to electrophoresis. 1 lane ; native LDL, 2 lane ; LDL+5 M CuSO<sub>4</sub>, 3 lane ; LDL+5 M CuSO<sub>4</sub>+100µg/ml band 3, 4 lane ; LDL+5 M CuSO<sub>4</sub>+200µg/ml, band 3.

#### LDL 및 Oxid LDL의 gel electrophoresis

Fig. 5는 사람의 혈액에서 LDL을 분리한 다음 native LDL, CuSO<sub>4</sub> 및 *Aspergillus sp.* A-5의 배양액 추출물 Fraction 4의 band 3을 첨가하였을때 agarose gel electrophoresis을 실시하여 LDL의 이동거리를 비교하였다. Native

LDL을 대조군으로 하고 LDL에 5nM CuSO<sub>4</sub>를 가하여 산화시킨 Oxid LDL 및 LDL에 5µM CuSO<sub>4</sub>와 *Aspergillus sp.* A-5의 항산화물질인 band 3을 첨가하여 비교한 결과 native LDL의 이동거리는 적었으며 CuSO<sub>4</sub>로 산화시킨 Oxid LDL의 이동거리는 높았고 *Aspergillus sp.* A-5 로 부터 얻은 추출물인 band 3을 100 및 200µg/ml을 첨가한 경우 Oxid LDL 보다 이동거리가 낮았으므로 항산화효과가 있는 것으로 판단된다.

## 요 약

본 연구는 *Aspergillus oryzae sp.* A-5의 배양액으로부터 사람의 low density lipoprotein(LDL) 의 산화에 대한 항산화효과를 조사하였다. *Aspergillus oryzae sp.* A-5의 배양액을 ethylacetate로 추출한 후 silica gel column chromatography로획분중 Fraction 4가 항산화 활성이 높았다. Fraction 4를 다시 TLC로 분리정제한 결과 band 3가 활성이 가장 높았다. LDL의 5µM CuSO<sub>4</sub>의 유도산화에 대한 band 3의 추출물은 100µg/ml 및 200µg/ml에서 LDL의 산화억제 효과가 높았으며 용량 의존형의 항산화 효과가 있었다. 이때 같은 농도의 band 3 추출물을 산화 LDL의 전기영동의 이동거리는 native LDL 보다는 약간 높았으나 Oxid LDL의 대조군보다는 이동거리가 낮았다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1996년도 산학협동재단과 신광식품의 연구비 지원에 의하여 이루어 졌으므로 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Yagi. K. : Lipid peroxides and human diseases, *Chemistry and physics of lipid*, 45, 337(1987).
2. Fujimoto, K. and Kaneda, T. : Screening test for antioxygenic compounds from marine algae and fractionation from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida* Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 46, 1125(1980).
3. Steinberg, D., Parthasarathy, S. : Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L. Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity, *New Engl. J. Med.*, 320, 915(1989).

4. Jurgens, G., Hoff, H. F., Chisolm, G. M., and Esterbauer, H. : Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation. Characterization and path- ophysiological implications, *Chem. Phys. Lipids*. **45**, 315(1987).
5. Ross. R. : The pathogenesis of atherosclerosis. perspective for the 1990s, *Nature.*, **362**, 801, 1993.2), *Steinbergm, D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo, J. C., Witztum, J. L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity, N. Engl. J. Med.*, **320**, 915(1989).
6. Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., Striegel, G. : Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 77(1990).
7. Chisolm, G. M. : Cytotoxicity of oxidized lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.*, **2**, 311(1991).
8. Carpenter, K. L. H., Brabbs, C. E., Mitchinson, M. J. : Oxygen radicals and atherosclerosis, *Klin Wochenschr.*, **69**, 1039(1991).
9. Henriksen, T., Mahoney, E., Steinberg, D. : Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells. Recognition by the receptor for acetylated low density lipoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 6499 (1981).
10. Henriksen, T., Mahoney, E. M., Steinberg, D. : Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein, *Arteriosclerosis*, **3**, 149 (1983).
11. Morel, D. W., Docorleto, P. E., Chisolm, G. M. : Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation, *Arteriosclerosis* **4**, 357(1984).
12. Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Fong, LG., Steinberg D. : Oxidatively modified low density lipoproteins. A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **84**, 2995(1987).
13. Steinbrecher, U., Parthasarathy, S., Leake, D. S., Witztum, J. L., Steinberg D. : Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**, 3883(1984).
14. Bruckdorfer, K. R. : Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.*, **1**, 529(1990).
15. Esterbauer, H., Puhl H., Dieber-Rotheneder, M., Striegel, G., Waeg, G. : Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein, *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 314S(1991).
16. Tappel, A. L. : Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **203**, 12(1972).
17. Dugan, L. R., Jr. and Kraybill, H. R. : Tocopherols as carry-through antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **33**, 527(1956).
18. Esterbauer, H., Streigel, G., Puhl, H., Oberreither, S. : Rotherneder, M., El-Saadani, M., Urgens, G., The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **570**, 254(1989).
19. Mangiapane, H., Thomson, J., Salter, A., Brown, S., Bell, G. D., and White, D. A. : The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 445(1992).
20. De Whalley, C. V., Rankin, S. M., Hoult, J. R. S., Jessup, W., and Leake, D. S. : Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages, *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1743(1990).
21. Lea, C. H. and Swoboda, P. A. T. : Antioxidative activity of flavonols gossypetin and querceetin, *Chem. Ind.*, 1406(1956).
22. Schuler, P. : Natural-antioxians exploited commercially, In "Food antioxidants", Hudson, B. J. F.(ed.), Elsevier, p. 99(1990)
23. Torel, J. and Cillard, P. : Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical, *Phycochemistry*, **25**, 383(1986).
24. Chain, E. B., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jerrings. N. A., Orr-Ewing, J. and Sanders, A. G. : Penicillin as a chemotherapeutic agent, *Lancet*, **ii**, p. 226-228(1940).
25. Hayashi, K., Suzuki, K., Kawaguchi, M., Nakajima, T., Suzuki, T., Numata, M., and nakamura, T. : Isolation of antioxidant from *penicillium roquefortii* IFO 5956, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**(2), 312-320 (1995).
26. Aoyama, T., Nakakita, Y., Nakagawa, M., and Sakai, H. : Screening for antioxians of microbial origin, *Agric. Bio. Chem.*, **46**(9), 2369-2371.
27. Rashid, H., Kato, F., Murata, A. and Kando, M. : Purification and charaterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus sojae* K., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(6), 935-939(1993).
28. 류병호, 김혜성, 정종문, 이상훈, 지영애 : 魚油에 대한

- 효모의 항산화효과, 한국식품위생학회지, 2(1), 15-20(1987).
29. Hattori, T., Ohishi, H., Yokota, T., Ohoami, H. and Watnanbe, K. : Antioxidative effect of crude antioxidant preparation from soybean fermented by *Bacillus natto*, *Lebensm-Wiss. Technol.*, 28, 135-138 (1995).
  30. Takao, T., Kitatani, F., Watanade, N., Yagi, A., and Sakata, K. : A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shefish. *Biosci, Biotech, Biochem.*, 58(10), 1780-1783(1994).
  31. Fridovich, I. : Xanthin oxidase, in Handbook of Method for oxygen radical research. (Green wald, R.A., ed.) 51, CRC Press, Boca Raton FL(1985).
  32. Fukuda, Y., Osawa, M., Namiki, M. and Osaki, T. : Thiocyanate method, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 301 (1985).
  33. Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H. : The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, *J. clin. Invest.* 34, 1345(1995).
  34. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M. : Continous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein, *Free Rad. Res. Commun.* 6, 67(1989).
  35. Yaki, K. : A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma, *Biochem. Med.*, 15, 212(1976).
  36. Greenspan, P. and Gutman, R. L. : Detection by nile red of agarose gel electrophoresed native and modified low density lipoprotein, *Electrophoresis*, 14, 65 (1993).
  37. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randell, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951).
  38. Jialal, I. and Scaccini, C. : Antioxidants and atherosclerosis. *Current Pin. Lipidologie*, 3, 324(1992).
  39. Parthasarathy, S., Young, S. G., Witztum, J. L., Pittman. R. C. and Steinberg, D. : Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.*, 77, 641(1986).