

땅콩껍질에서 항균 및 항산화활성이 있는 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid와 4-hydroxybenzoic acid의 동정

위 지 향 · 박 근 형
전남대학교 식품공학과
(접수 : 2000. 8. 11., 게재승인 : 2000. 10. 4.)

Identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzoic acid with Antioxidative and Antimicrobial Activity from *Arachis hypogaea* Shell

Ji-Hyang Wee and Keun-Hyung Park†
Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
(Received : 2000. 8. 11., Accepted : 2000. 10. 4.)

The methanol extract of *Arachis hypogaea* shell showed antioxidative and antimicrobial activity. The methanol extract was successively purified by solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and octadecylsilane column chromatography. The purified active substances were isolated by high performance liquid chromatography, and were identified as 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzoic acid by LC-MS and GC-MS. The amount of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzoic acid were 3.8 mg and 9.8 mg per kg of shell, respectively.

Key Words : *Arachis hypogaea* shell, antioxidative activity, antimicrobial activity, 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid

서 론

유해 미생물에 의한 피해를 최소화하기 위해 많은 항균제가 개발되어 왔으나 이들 대부분은 화학적 합성품으로 그 안전성이 문제되고 있다. 또한 항산화제로 널리 이용되어온 합성품인 BHA와 BHT는 생체효소의 활성을 억제하고 암을 유발한다는 보고(1)가 있어 사용규제를 받고 있다. 소비자 또한 인공 합성품의 기피현상이 두드러져 비교적 안정성이 있는 천연 기능성 물질의 개발이 요구되고 있다(2-5).

식물은 외부 자극에 대한 자기방어 수단으로 매우 다양한 유용성분을 함유하고 있으며, 이러한 유용성 물질을 식물자원으로부터 찾으려는 시도가 계속되고 있다. 솔잎(6), 왕겨(7), 치자(8), 백두옹(9) 등에서 항균활성의 본체가 규명되었으며, 인삼(10), 귀리(11), 보리(12), 생강(13), 완두콩(14) 등에서 항산화 활성물질이 보고된 바 있다.

땅콩은 일년생 초본으로, 꽃이 피어 수정되고 시들면 자방의 밑부분이 땅속으로 들어가 꼬투리가 형성되어 그 속에서 종자가 자란다(15). 이처럼 토양 속의 땅콩을 보호하며, 수확 후 저장성을 높여주는 기능을 하는 땅콩껍질은 외부의 미생물, 곤충으로부터 물리·화학적으로 종실을 보호하고 있을 뿐만 아니라, 산화에 대한 자기방어 물질을 함유하고 있을 것으로 생각되어진다.

땅콩껍질은 땅콩 중량의 35~40% 정도를 차지하여 상당한 양이 부산물로 생산되어지나 용도가 제한되어 일부가 사료로 이용되고 있을 정도이다. 땅콩껍질에는 다양한 기능성 물질이 함유되어 있을 것으로 생각되나 땅콩껍질의 methanol 추출물이 항돌연변이 효과(16)가 있다는 보고가 있을 뿐 이에 관한 연구가 빈약한 실정이다. 이에, 땅콩껍질에 함유된 항균 및 항산화 활성이 있는 물질을 탐색하여 활성 본체를 규명하여 땅콩껍질의 이용 및 기능성 해명에 도움되고자 하였다.

재료 및 실험방법

실험재료

본 실험에 사용된 땅콩(*Arachis hypogaea*)껍질은 전라북도

†Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Kwangju, 500-757 Korea.
Tel : +82-62-530-2143, Fax : +82-62-530-2149
E-mail : khpark@chonnam.chonnam.ac.kr

고창군 성송면 성송농협 팥공공장에서 종실을 제거한 다음, 실온에서 건조한 후 시료로 사용하였으며 수분함량은 4.8%이었다.

시료의 추출

팥콩깍질을 homogenizer (BM-2 Nissei bio-mixer, Nihonseiki Kaiseiki LTD, Japan)로 마쇄하면서 *n*-hexane, ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH) 등으로 순차 추출하였다. 얻어진 각 추출물은 G3 Glass filter와 여과지 (Whatman No.2)로 여과하여 얻어진 여액을 cooling aspirator (Eyela Cool Ace CA-111, Japan)가 장치된 vacuum evaporator (Eyela N-N, Japan)를 사용하여 37°C에서 감압농축하였다.

용매분획

항균 활성을 갖는 MeOH 추출물을 EtOAc와 buffer 용액 (0.2 M glycine-0.2 M HCl, pH 3.0)으로 수상 획분과 EtOAc 가용 산성·중성 획분 (EtOAc-soluble acidic·neutral fraction)으로 분획하였다. EtOAc 가용 산성·중성 획분을 buffer 용액 (0.2 M Na₂HPO₄-0.2 M NaH₂PO₄, pH 8.0)으로 분배하여 EtOAc 가용 중성 획분 (EtOAc-soluble neutral fraction)과 수상 획분으로 분획하였고, 얻어진 수상 획분에 0.1 M HCl을 가하여 pH 3.0으로 조절한 후 EtOAc로 분배하여 EtOAc 가용 산성 획분 (EtOAc-soluble acidic fraction)과 수상획분으로 분획하였다.

Silica gel adsorption column chromatography

Silica gel (23 g, 70~230 mesh, column chromatography-용, Merck, Germany)을 EtOAc로 column (1.5×30 cm)에 충전시킨 후, EtOAc-MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50% (단계별 200 mL씩)까지 증가시키면서 step-wise 방법으로 용출 분획하였다. 또한 silica gel (15 g)을 CHCl₃으로 column (1.3×22.5 cm)에 충전시킨 후, CHCl₃-EtOAc 용매계로 EtOAc 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70% (각 단계별 200 mL)까지 증가시키면서 step-wise 방법으로 용출 분획하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography

Sephadex LH-20 (70~230 mesh, Pharmacia, Sweden)을 MeOH-CHCl₃ (4:1, v/v) 용매계로 상온에서 24시간 팽윤시킨 다음, column (1.8×90 cm; bed volume, 250 mL)에 충전하여 동 용매계로 용출 분획하였다.

Octadecylsilane (ODS) column chromatography

ODS (20 g, 70~230 mesh, YMC, Japan)를 H₂O:MeOH (3:7, v/v)로 column (1.5×23 cm)에 충전시킨 후, H₂O-MeOH 용매계의 MeOH 농도를 30%부터 10%씩 (각 단계별 40 mL) 증가시켜 용출 분획하였다.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC는 Senshu pak ODS column (0.8×25 cm, Senshu, Japan)을 이용하여 40% MeOH, 1.5 mL/min (Model 510 solvent delivery system, Waters, USA)로 용출 분획하였으며,

검출기는 UV detector (254 nm, Model 486 Tunable Absorbance Detector, Waters, USA)를 사용하였다.

Liquid chromatograph-mass spectrometry (LC-MS)

LC-MS 분석은 liquid chromatograph (Waters 2690 Separations Module, USA; Nova-pak C₁₈ column, 0.2×15 cm, Millipore, USA)를 Thermabeam mass detector (Waters Integrity system, USA)에 장착한 기기를 사용하여, 이동상은 35% MeOH (0.2 mL/min)을 이용하였으며, Waters 996 photodiode array detector로 검출하였으며, ionizing voltage는 70 eV, ion source temperature는 200°C에서 실시하였다.

Gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS)

GC-MS 분석은 gas chromatograph (Varian STAR 3400CX, USA; Rtx-1 capillary column, 0.32 mm×30 m, Varian, USA)를 mass spectrometer (Varian SATURN 4D, USA)에 장착한 기기를 사용하여, ion source temperature 200°C, ionizing voltage 70 eV 조건으로 분석하였다. GC의 injector 온도는 220°C, GC oven의 온도는 처음 2분 동안 100°C로 유지하였고 승온 속도를 5°C/min으로 하여 최종온도가 200°C가 되도록 하였다. Trimethylsilyl (TMS) 유도체화는 Park 등(17)의 방법에 의해 분리된 활성획분 10 µg에 NaOH로 건조시킨 pyridine과 N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (Fluka, Switzerland) 그리고 trimethylchlorosilane (Fluka, Switzerland)을 10:5:1 (v/v)로 섞은 시약 20 µL를 가하여 vortex mixer로 혼합 후 60°C의 heating block에서 30분 동안 반응시킨 후 GC-MS 분석용 시료로 하였다. GC-MS 분석용 표준 시약으로 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid (Sigma, USA)와 4-hydroxybenzoic acid (Junsei, Japan)를 사용하였다.

항균 활성측정

항균 활성측정을 위해 사용한 미생물은 8종의 gram 양성 세균 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lactobacillus brevis* KCTC 3102, *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104, *Leuconostoc mesenteroidis* KCTC 3100, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* KCTC 1927, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* KCTC 3096)과 3종의 gram 음성세균 (*Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) 그리고 2종의 효모 (*Saccharomyces cerevisiae* IFO 1850, *Candida albicans* ATCC 10231)을 사용하였다.

배지는 젖산균은 *Lactobacilli* MRS 배지 (Merck, Germany), *S. pyogenes*는 Brain Heart Infusion 배지 (Difco, USA), 그 밖의 세균은 nutrient 배지 (Merck), 효모는 YM 배지 (Difco)를 사용하였다. 배양온도는 세균의 경우 37°C 또는 30°C에서 16시간, 효모는 30°C에서 16시간 동안 3회 반복하여 전 배양을 행한 후 접종균주로 사용하였다.

항균 활성의 검정은 Zaika의 paper disc (φ8 mm, Advantec, Japan)방법(18)으로 측정하였다. Davidson과 Parish의 방법(19)에 의해 45°C로 조절된 멸균 배지 20 mL에 전 배양액 0.1 mL를 무균적으로 옮겨 잘 혼합한 후 petri dish에 넣고 굳혔다. 여기에 용매에 용해시킨 시료를 적하하여 용매를

제거한 paper disc를 올린 뒤 0.85%의 식염수로 확산시켜 각 균주의 적정온도에서 12시간 배양하여 paper disc 주위의 clear zone의 크기 (mm)로 활성의 정도를 측정하였으며 대조구로 benzoic acid (Hayashi Pure Chemical Industries, Japan)를 8 mm paper disc당 0.5 mg을 사용하였다. 정제과정에서는 항균 활성 검정의 지표균으로 *S. aureus*를 사용하였다.

항산화 활성측정

항산화 활성검정은 Sakata의 방법(20)으로 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼에 대한 소거능으로 나타냈다. 즉, DPPH (Sigma, USA)를 ethanol (EtOH)에 용해하여 제조한 용액 (100 μ M, 44 mg/L) 900 μ l 와 시료용액 100 μ l 를 test tube에 넣고 vortex에서 혼합한 다음 암소에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 비교구로 α -tocopherol (Sigma, USA)을 사용하였으며, DPPH-radical 소거활성은 Sábchez-Moreno 등의 방법(21)으로 구하였다.

또한, 정제 과정에서 항산화 활성 검정은 시료를 TLC (Merck, silica gel, 0.25 mm, Germany)로 전개 (benzene:acetone:acetic acid, 90:2:8, v/v)한 다음, 200 μ M DPPH 용액을 spray하여 1분 이내에 탈색이 되면 양성으로 판정하였다.

결과 및 고찰

땅콩껍질 추출물의 항균 및 항산화 활성

땅콩껍질 (6.7 kg, 수분함량 4.8%)을 *n*-hexane, EtOAc, MeOH로 순차 추출하여 얻은 각 추출물을 땅콩껍질 5 g에 상당하는 추출물로 항균 활성을 검정한 결과, MeOH 추출물에 항균 활성을 보였으며 (Table 1), DPPH 용액에 의한 라디칼 소거능을 검정한 결과, 항산화 활성 또한 MeOH 추출물에 나타내 땅콩껍질 MeOH 추출물은 항균 및 항산화 활성물질을 함유하고 있었다.

MeOH 추출물 (145.2 g/땅콩껍질 6.7 kg)을 용매분획하여 얻어진 EtOAc 가용 산성 획분, EtOAc 가용 중성 획분을 대

상으로 항균 활성을 검정한 결과, EtOAc 가용 산성 획분과 EtOAc 가용 중성 획분 모두 미생물 생육억제 현상을 보였다 (Table 1). 또한, 이들 획분을 대상으로 DPPH 자유라디칼 소거능을 검정한 결과, EtOAc 가용 산성 획분에 활성을 보였다. 땅콩껍질 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성 획분에서 항균 및 항산화 활성이 모두 나타나 우선 이 획분에 함유된 활성 본체의 단리를 시도하였다.

활성물질의 정제

항균 및 항산화 활성을 갖는 EtOAc 가용 산성 획분 (2.3 g/땅콩껍질 6,020 g)을 EtOAc-MeOH 용매계의 silica gel adsorption column chromatography로 용출 분획한 결과, 100% EtOAc 용출 획분에서 항산화 및 항균 활성이 나타났다. 이 활성 획분 (1.5 g/땅콩껍질 6,004 g)을 CHCl₃-EtOAc 용매계의 silica gel adsorption column chromatography로 용출 분획한 결과, CHCl₃-EtOAc (80:20, v/v) 용출 획분 (156 mg)과 CHCl₃-EtOAc (70:30, v/v) 용출 획분 (177 mg)은 항산화 및 항균 활성을 나타냈다. 보다 극성이 낮은 활성 획분 (156 mg/땅콩껍질 5,965 g)을 Sephadex LH-20 column chromatography (bed volume, 250 mL)로 분리한 결과, Ve/Vt (elution volume/bed volume) 0.92~1.04의 위치에 용출된 획분에 항산화 및 항균 활성을 보였다. 이 활성 획분 (89.6 mg/땅콩껍질 5,914 g)을 ODS column chromatography를 이용하여 MeOH-H₂O의 용매계로 용출 분획한 결과, 40% MeOH 용출 획분 (80.1 mg/땅콩껍질 5,844 g)은 항산화 및 항균 활성을 나타냈다.

이 획분을 Senshu pak ODS column을 탑재한 HPLC (40% MeOH)로 분석하였더니 retention time (*t_R*) 5.10분에 minor peak 그리고 *t_R* 6.27분에 main peak를 갖는 두 물질의 혼합물로 존재하였다. 두 물질 모두 항균 활성을 나타내었으나, 항산화 활성은 main peak에서 관측되었다.

활성물질의 구조확인

분리된 두 활성물질의 규명을 위해 LC-MS를 실시하였다.

Table 1. Antimicrobial activity of MeOH extract and solvent fractionated fractions against various microorganisms

Microorganisms	Inhibition (Clear zone, mm)			
	MeOH extract**	EtOAc-soluble acidic fr.**	EtOAc-soluble neutral fr.**	Benzoic acid 0.5 mg
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927	16.3±0.35	16.5±0.70	17.8±0.35	13.8±0.35
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	14.3±0.35	13.8±0.35	16.5±0.70	9.8±0.35
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	12.5±0.70	11.5±0.70	13.3±0.35	12.3±0.35
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	14.8±1.06	13.8±0.35	15.8±0.35	14.3±0.35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	12.8±0.35	12.8±0.35	15.5±0.70	11.5±0.70
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	17.3±0.35	16.5±0.70	18.3±0.35	11.8±0.35
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	18.8±0.35	18.8±0.35	18.5±0.70	13.8±0.35
<i>Streptococcus pyogenes</i> KCTC 3096	9.3±0.35	9.3±0.35	9.5±0.70	8.8±0.35
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3102	12.8±0.35	12.8±0.35	13.8±0.35	10.8±0.35
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	12.3±1.06	13.3±0.35	13.5±0.70	10.5±0.70
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	12.8±0.35	13.5±0.70	12.8±0.35	9.3±0.35
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	15.8±1.06	15.5±0.70	10.8±0.35	15.5±0.70
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1850	12.8±0.35	12.5±0.70	14.8±0.35	15.8±0.35

*: data are shown as the mean±S.D. (n=2)

** : extracts of *Arachis hypogaea* shell (5 g eq./8 mm paper disc)

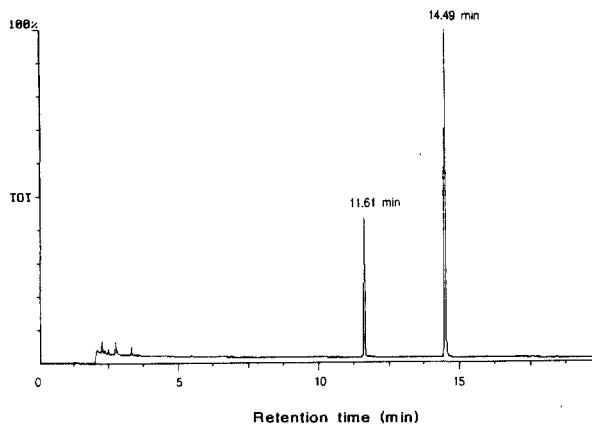


Figure 1. GC chromatogram of the trimethylsilylated active substances obtained from the HPLC active fraction.

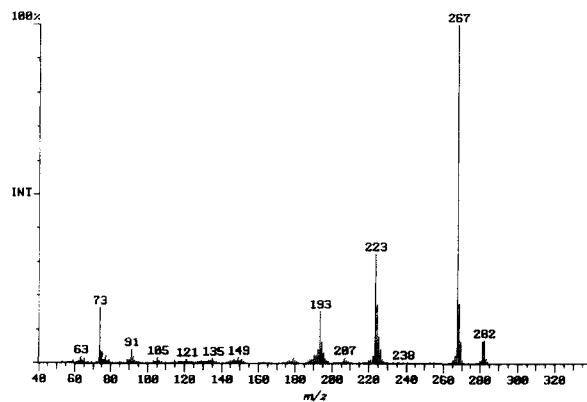


Figure 2. EI-MS spectrum of the trimethylsilylated active substance (t_R 11.6 min of GC).

35% MeOH을 이동상으로한 column (Nova-pak C₁₈)에 의해 두 종의 활성물질은 t_R 2.5분과 4.8분에 peak를 나타냈다. 이를 EI-MS 분석 결과, t_R 2.5분의 활성물질은 M^+ 이 138에 관찰되었으며, fragment ion으로 m/z 121(base peak), 93(27%), 65(38%)에 이온이 관측되어 C₇H₆O₃의 분자식을 갖는 4-hydroxybenzoic acid의 EI-MS spectrum (NIST library, NIST No. 3581)과 일치하였다. 또한 t_R 4.8분의 활성물질은 M^+ 이 base peak로서 m/z 168에 관찰되었으며, fragment ion으로 m/z 153(63%), 125(22%), 108(5%), 97(30%)에 이온이 관측되었다. 이는 C₈H₆O₄의 분자식을 갖는 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid의 EI-MS spectrum (NIST library, NIST No. 6514)과 일치하였다.

이를 확인하고자, ODS-HPLC에서 두 물질의 혼합물질로 분리된 t_R 4.7~6.5 분의 활성분획의 일부를 TMS유도체로 만든 다음, GC-MS에 의해 분석한 결과, t_R 11.61분과 t_R 14.49분에 peak를 나타내는 두 물질만이 존재하는 GC chromatogram이 관측되었으며 두 물질은 29:71의 존재비를 나타냈다 (Figure 1).

t_R 11.61분에 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum (Figure 2)은 M^+ 이 282(6%)에 그리고 fragment ion이 m/z 267(base peak), 223(32%), 193(15%)에 나타나, 4-hydroxybenzoic acid의

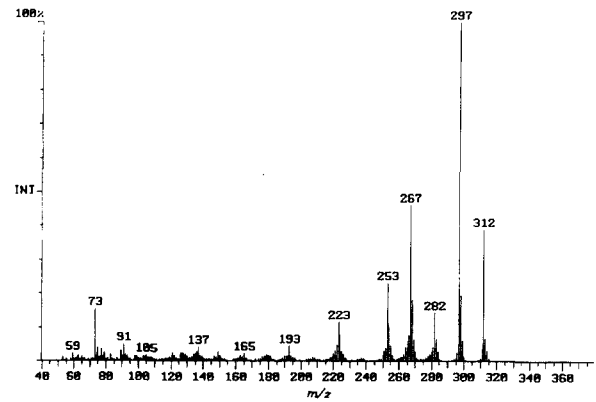


Figure 3. EI-MS spectrum of the trimethylsilylated active substance (t_R 14.49 min of GC).

COOH기와 OH기에 TMS가 도입된 TMS ester TMS ether 구조 (C₁₃H₂₂O₃Si₂, M^+ 282)로 관측될 뿐만 아니라 GC의 t_R (11.61분) 또한 표준품의 t_R 과 일치하여 활성물질 구조가 4-hydroxybenzoic acid임이 재확인되었다.

t_R 14.49분에 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum (Figure 3)은 M^+ 이 312(40%)에 그리고 fragment ion이 m/z 297(base peak), 282(13%), 267(46%), 253(16%), 223(18%)에 나타나, 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid의 COOH기와 OH기에 TMS가 도입된 TMS ester TMS ether 구조 (C₁₄H₂₄O₄Si₂, M^+ 312)로 관측될 뿐만 아니라 GC의 t_R (14.49분) 또한 표준품의 t_R 과 일치하여 main 활성물질의 구조가 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid임이 재확인되었다.

이상의 LC-MS, GC-MS분석에 의해 땅콩껍질의 MeOH 추출물로부터 항균 및 항산화 활성물질로 분리된 활성물질은 4-hydroxybenzoic acid와 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid로 동정되었다.

4-hydroxybenzoic acid는 왕겨에 존재하는 항균물질로 단리(7)된 바 있으나, 땅콩껍질에서 기능성물질로 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid와 4-hydroxybenzoic acid가 분리·동정된 것은 처음으로 사료된다. 땅콩껍질의 MeOH 추출물에서 분리된 4-hydroxybenzoic acid와 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid는 땅콩껍질 kg 당 각각 3.96 mg, 9.73 mg 이었으나, 분리과정에서의 유실 등을 고려한다면, 땅콩껍질에 함유된 두 물질의 함량은 이보다 더 높은 수준일 것으로 사료된다.

두 활성물질의 항균 및 항산화 활성

땅콩껍질로부터 단리된 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid와 4-hydroxybenzoic acid를 200~500 μ g 수준에서 paper disc법으로 항균 spectrum을 조사한 결과, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. mesenteroides* 등의 gram 양성세균, *E. coli*, *S. typhi* 등의 gram 음성세균, *C. albicans* 등의 효모에 항균 활성을 보였으며, 4-hydroxybenzoic acid는 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid보다 더 강한 항균 활성을 보였는데, 이는 Cho 등(7)의 결과와 유사하였다.

땅콩껍질에서 얻어진 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid와 4-hydroxybenzoic acid를 DPPH 자유라디칼 소거능으로 나타낸 항산화 활성을 검정한 결과, 두 물질은 α -tocopherol보다

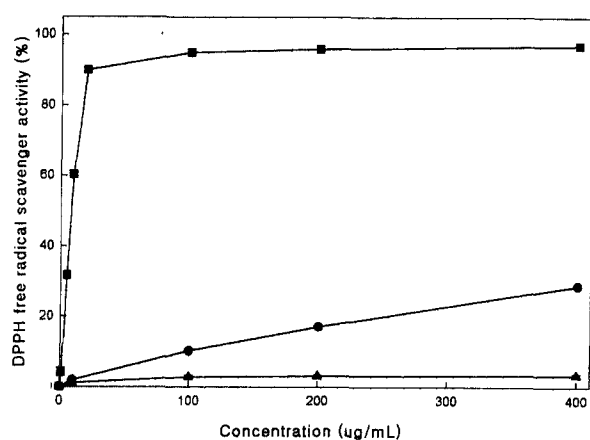


Figure 4. DPPH free radical scavenger activity of the 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzoic acid. α -tocopherol was used as a reference compound. (■-■: α -tocopherol, ●-●: 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid, ▲-▲: 4-hydroxybenzoic acid).

낮은 활성을 보였다. 즉, 4-hydroxybenzoic acid는 200~400 $\mu\text{g/mL}$ 수준에서 거의 항산화 활성을 나타내지 않았으나, 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid는 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 10% 정도의 라디칼 소거활성을 갖는 항산화 활성을 보였다(Figure 4).

요 약

땅콩(*Arachis hypogaea*)껍질의 MeOH 추출물은 항균 및 항산화 활성을 보여 땅콩껍질에 함유된 활성물질의 탐색을 시도하였다. MeOH 추출물을 solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, ODS column chromatography 등으로 정제하고 HPLC에 의해 활성물질을 분리하였다. 분리된 두 활성물질은 LC-MS, GC-MS분석에 의해 4-hydroxybenzoic acid와 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid로 동정되었으며 두 물질은 땅콩껍질에 각각 3.96 mg/kg, 9.73 mg/kg 정도 함유되어 있었다.

감 사

이 연구는 1999년도 전남대학교 학술연구비와 목포대학교 식품산업연구센터 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Brane, A. L. (1975), Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 59-63.
- Friedman, M. (1997), Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, *J. Agric. Sci. Food* **45**, 1523-1540.
- Middleton, E. (1996), Biological properties of plant flavonoids: An overview, *Int. J. Pharmacognosy* **34**, 344-348.
- Schmid, M. K. (1992), Medical foods, *Food Technology* **46**, 87-96.
- Caragy, A. B. (1992), Cancer-preventive foods and ingredients, *Food Technology* **46**, 65-68.
- Kuk, J. H., S. J. Ma, and K. H. Park (1997), Isolation of characterization of benzoic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 204-210.
- Cho, J. Y., J. H. Moon, K. Y. Seong, and K. H. Park (1998), Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and *trans* 4-hydroxycinnamic acid isolate and identified from rice hull, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2273-2276.
- Yim, C. K., J. H. Moon, and K. H. Park (1999), Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid, which exhibits antimicrobial activity from fruits of *Gardenia jasminoides*, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 1386-1392.
- Moon, J. H., S. J. Ma, H. H. Lee, N. Watanabe, A. Yagi, K. Sakata, and K. H. Park (2000), Isolation and structural determination of a novel antimicrobial compound from the root of *Pulsatilla koreana*, *Natural Product Letters* **14**, 311-317.
- Wee, J. J. (1988), Isolation and identification of constituents from antioxidant and hematopoietic fractions of *Panax ginseng* C.A. meyer, Ph. D. Dissertation, Seoul National University, Seoul.
- Xing, Y. M., and P. J. White (1997), Identification and function of antioxidants from oat groats and hulls, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 303-307.
- Maillard, N. M., and C. Berset (1995), Evolution of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt, *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1789-1793.
- Jitoe, A., T. Masuda, I. G. P. Tengah, D. N. Suprpta, I. W. Gara, and N. Nakaatani (1992), Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids, *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1337-1341.
- Tsuda, T., T. Osawa, T. Nakayama, S. Kawakishi, and K. Ohshina (1993), Antioxidant activity of pea bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extract, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 9-12.
- Ensminger, A. H., M. E. Ensminger, J. E. Konlande, and J. R. K. Robson (1983), Foods and nutrition encyclopedia vol. 2, 1st ed., p1727, Pegus press, California.
- Yen, G. C., and P. D. Duh (1996), Antimutagenic effect of methanolic extracts from peanut hulls, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1698-1700.
- Park, K. H., J. D. Park, K. H. Hyun, M. Nakayama, and T. Yokota (1994), Brassinosteroids and monoglycerides with brassinosteroid-like activity in immature seeds of *Oryza sativa* and *Perilla frutescena* and in cultured cells of *Nicotiana tabacum*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 2241-2243.
- Zaika, L. L. (1988), Their antimicrobial activity and its determination, *J. Food Safety* **9**, 97-118.
- Davidson, P. M., and M. E. Parish (1989), Methods for testing the efficacy of food antimicrobials, *J. Food Technology* **43**, 148-155.
- Takao, T., F. Kitatani, N. Watanabe, A. Yagi, and K. Sakata (1994), A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1780-1783.
- Sábchez-Moreno, C., J. A. Larrauri, and F. Saúa-calixto (1998), A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agric.* **76**, 270-276.