

## 생육시기 및 부위별 고추의 항산화력 및 항암 Lunasin peptide의 동정

권기수<sup>1</sup> · 박재호 · 김대섭 · 정진부 · 심영은<sup>1</sup> · 김미숙 · 이희경 · 정규영 · 정형진\*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부, <sup>1</sup>안동시 농업기술센터

Received April 12, 2005 / Accepted June 14, 2005

**Antioxidant Activity and Identification of Lunasin Peptide as an Anticancer Peptide on Growing Period and Parts in Pepper.** Ki Soo Kwon<sup>1</sup>, Jae Ho Park, Dae Seop Kim, Jin Boo Jeong, Young Eun Sim<sup>1</sup>, Mi Suk Kim, Hee Kyung Lee, Gyu Young Chung and Hyung Jin Jeong\*. *School of Bioresources, Andong National University, Andong 760-749, Korea, <sup>1</sup>Andong Agricultural Technology and Extension Center, Andong 760-380, Korea* – The non-enzymatic anti-oxidants and lunasin peptide from the extracts of the pepper were examined in order to utilize the discovery in natural products as cancer chemopreventive agents. The DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) free radical scavenging activity on the fruit parts of the pepper was higher than that of the seed, but the difference was low. The Inhibition activity of xanthine/ xanthine oxidase in extracts of the seed was higher than that of the fruit and that of the seed on 20 days after flowering was the highest at the growing period. These were identified as fatty acids and phenolic compounds such as 1-eicosanol, palmitic acid, linoleic acid, linolenic acid and benzonitrile. The contents of fatty acids and phenolic compounds increased according to the time passing at the growing period. Peroxidase (POD) activity of the fruit at middle stage was high than that of other growing stages and that of the seed was the highest at later growing period. Though superoxide dismutase (SOD) activities in fruit were high by passage of growing stage, the activity in seed was low. Lunasin was searched from seeds of the peppers by coomassie blue staining and western blot among them and we just found lunasin peptide from extracted protein of the pepper by western blot. In addition, we observed the contents of lunasin after flowering and confirmed to appear the lunasin at 35 days after flowering. We confirmed that lunasin is complex protein of maturing seeds. 100 nM lunasin peptide in pepper showed inhibition effect on colony formation in 2~12 cells.

**Key words** – DPPH, Xanthin/xanthine oxidase, POD, SOD

국내에서는 미곡 다음으로 주요한 농산물은 건 고추로서 재배면적이 61,894 ha, 생산량이 약 154천톤에 달한다[44], 고추의 매운맛은 알칼로이드의 일종인 캡사이신(Capsaicin)이란 휘발성 물질로서 과피에는 비타민A와 비타민C가 다량 함유되어 있다[43].

인간의 노화는 free radical에 의해서 결정되어진다고 주장한 이후[19], free radical의 이론에 대한 상당한 증거가 축적되어지고 있다[5]. 노화는 세포의 손상 및 산화된 단백질의 축적이라고도 하며, 이러한 현상은 산화된 단백질을 분해시키는 효소인 proteasome 능력의 감소와[33] 산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen 및 hydrogen peroxide 등과 같은 free radical의 역할이 대두되어 이들의 제거에 대한 관심이 높아졌다[15,31]. 최근의 보고에 의하면 전자전달 회로 과정에서 발생하는 hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$  radical)은 신호전달과 면역체계 등의 정상적인 생명현상에 꼭 필요한 산물이다[3].

자기방어의 대표적인 것으로는 superoxide dismutase (SOD), catalase, 및 glutathione peroxidase 등의 효소와 tocopherol,

ascorbic acid, riboflavin, uric acid, selenium 등의 항산화 영양소 또는 항산화력을 갖는 철청단백질인 ceruloplasmin, transferrin, ferritin, lactoferrin, metallothionein 등이 초기 방어 기작으로 알려져 있다[39].

Xanthine oxidase는 생체 내 퓨린 대사과정에 관여하는 효소로 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 uric acid를 생성하여 골절에 축적되어 심한 통증을 유발하며 염증, 아테로마성 동맥경화증, 암, 노화와 같은 병리학적 과정 속에서 야기되는 생체조직의 산화적 손상에 관여하는 활성 산소 종의 중요한 생물학적 활성을 나타내는 근원적인 역할을 수행한다[11].

최근에는 각종 생약이나 식용식물의 추출물들로부터 보다 안정하고 항산화력이 강한 천연 항산화제를 개발하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 천연에서 얻을 수 있는 대부분의 항산화 물질들은 phenolic 및 flavonoid 계통의 화합물로 알려져 있고, 특히 식물계 내에는 대부분 phenolic 화합물로 보고 되어져 있다[12].

Lunasin peptide는 약 15년 전 성숙된 콩 종자로부터 처음 발견되어진 항암단백질이다[29]. 콩 종자로부터 분리된 lunasin은 세포 용해 및 염색체 분해와 같은 특정한 작용에 의해 유사분열을 저해하여 세포를 사멸시키는 예방적이고 안정적인 천연항암제로서 많이 연구되어지고 있다[17]. 고추로부터 항

### \*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5464, Fax : +82-54-820-6252

E-mail : jhj@andong.ac.kr

암단백질인 lunasin에 대한 연구 보고 된 것은 없다.

따라서 본 연구는 고추로부터 안전하고 우수한 항산화 및 항암단백질을 탐색해 보고자, 고추의 부위별, 생육시기별로 항산화 방어계를 조사하였고, 종자로부터 항암단백질인 lunasin를 탐색하였다.

### 실험 재료 및 방법

#### 재료

고추의 비효소적 항산화 방어계를 조사하기 위하여 경북 안동시 송천동에서 고추 표준 재배법으로 재배한 금탑 과육 및 종자를 2001년 6월~10월간에 생육시기별로 300개체를 채취하여 세척 후 40℃에서 열풍 건조하여 시료로 사용하였다. Lunasin 탐색을 위한 종자는 경북 영양군 소재 영양고추

시험장에서 분양을 받았고, 생육시기별 lunasin의 동정 시료는 항산화 방어계 실험과 동일한 것을 사용하였다.

#### 방법

##### 항산화 활성

###### - 추출

비효소적 항산화 방어계의 추출은 생체시료 1 kg을 80% -methanol에 3일간 침지하여 여과 추출하였다. 여과한 methanol 추출물은 각각 농축하여 Fig. 1와 같은 방법으로 분획하였다.

###### - 분획

고추의 항산화 활성물질의 분리는 80%-methanol로 추출한 ethyl acetate 분획하였다.

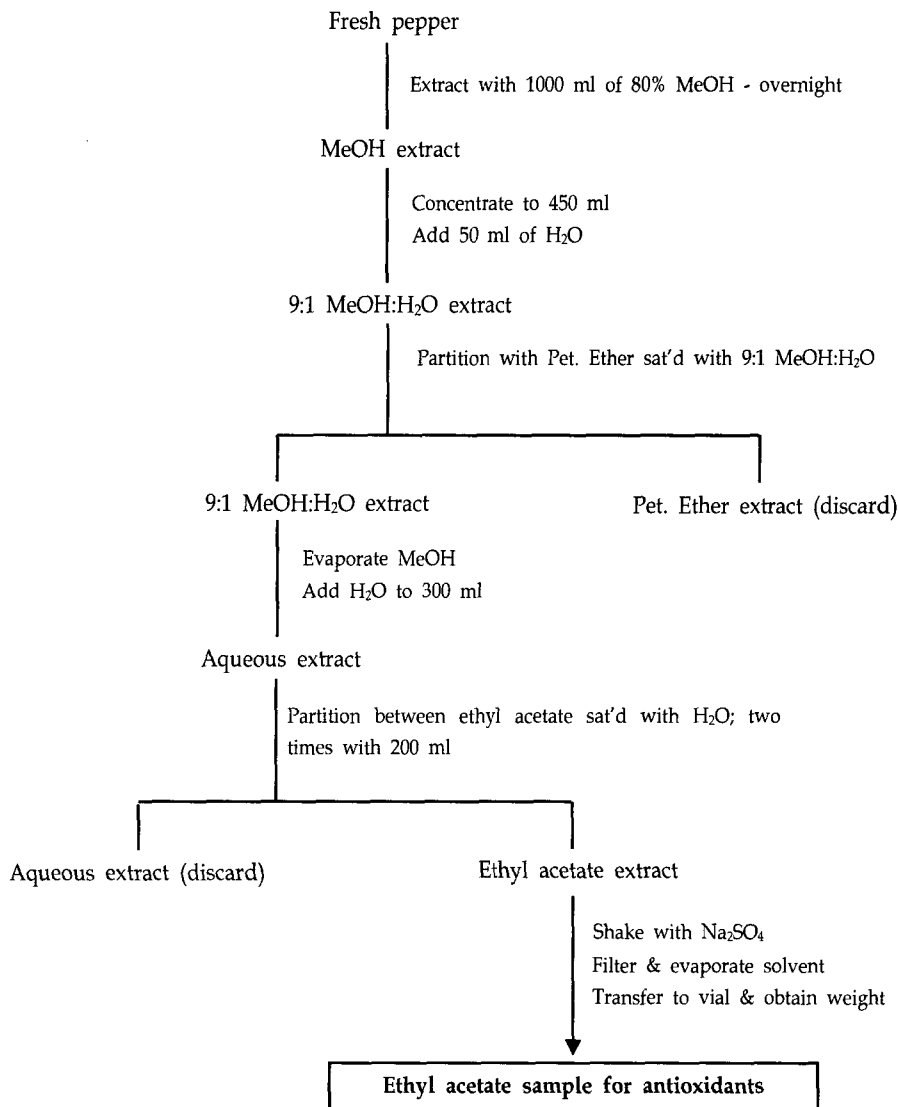


Fig. 1. Solvent fractionation of MeOH extracts on DPPH free radical scavenging activity in the pepper

- 분리 및 동정

항산화물질의 분리는 분획된 ethyl acetate층을 GC (Hewlett Packard 6890)를 사용하였고, column은 Ultra-2 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane), oven 조건은 60℃에서 시작하여 분당 2.5℃씩 230℃까지 승온하였다. 운반기체는 He 가스를, 유속은 0.8 ml/min로 분석하였다. 동정은 각 peak의 mass spectrum을 MS chemstation library (Wiley 275; Hewlett Packard)에 적용하여 얻은 결과로 분자량을 확인하였다.

- DPPH free radical 소거활성

DPPH free radical 소거활성 측정은 cuvette내에 농도별 시료와 300 μM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 용액을(흡광도가 1.0이 되도록 용액을 희석) 넣고 37℃에서 30분간 반응 후 515 nm (Beckman coulter, Du 650)에서 대조구와의 흡광도 차이에 의하여 측정하였다. 시료처리에 의한 억제율은 DMSO (dimethylsulfoxide)처리 대조 구와 비교하여 계산하였고, IC<sub>50</sub> (inhibitor concentration 50%)값은 50% DPPH free radical을 제어시키는 시료농도를 계산하였다.

- Xanthine /xanthine oxidase 억제 활성

Xanthine /xanthine oxidase 억제 활성 측정은 Lee (1997)의 실험방법에 의하였으나, xanthine oxidase 용액은 0.2 unit를 사용하여 측정하였다. uric acid 생성함량은 2 μl xanthine oxidase 용액(0.2 unit)이 포함된 100 μM xanthine용액(988 μl)과 10 μl DMSO를 실온에서 3분간 반응시킨 후, 295 nm에서 조사하였다.

항암 펩타이드(lunasin peptide)의 분리, 동정 및 생물학적 활성

- 단백질의 추출

분석을 위한 시료는 고추 종자 50 g을 액체 질소를 이용하여 마쇄한 후 0.1 M-phosphate buffer (pH 7.0) 100 ml을 넣고 4℃에서 24시간 추출 후, 7겹의 거즈로 불용성 물질을 제거한 다음, 상등액을 4℃, 14000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상등 액을 취하였다.

- SDS-PAGE

고추 종자의 단백질 분리는 SDS-PAGE에 의하여 수행하였다. SDS-PAGE시 resolving gel은 최종적으로 0.1%-SDS, 15%-acrylamide 농도가 되게 조제하였으며, stacking gel은 0.1%-SDS, 4%-acrylamide 농도가 되게 조제하였다.

Loading sample은 고추 종자로부터 추출한 단백질과 laemmli buffer를 1 : 2로 혼합하여 100℃에서 5분간 끓인 샘플을 사용하였고 lane 당 단백질 25 μg을 주입하였으며, 전기영동시 전압은 150 V로 1시간 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 shacking하면서 3시간 staining solution (Coomassie

brilliant blue 1 g / methanol 450 ml + acetic acid 100 ml + DH<sub>2</sub>O 450 ml)에서 염색한 후 destaining solution (methanol 100 ml + acetic acid 100 ml + DH<sub>2</sub>O 800 ml)에서 탈색하여 밴드를 확인하였다.

- Western blot

전기영동한 나머지 하나의 gel은 100 V에서 1시간 40분간 PVDF 막(Sigma, USA)으로 전이하였다. 단백질이 전이된 PVDF 막은 methanol로 행구고, Blotto A (5%-nonfat milk and 1%-tween 20 in saline)에서 1시간 30분 동안 block한 후, TBS-T solution (1%-tween 20 in tris-buffered saline)을 넣어 3회 세척하였다. 세척한 PVDF 막을 Blotto B (3%-nonfat milk and 1%-tween 20 in saline)과 1차 항체인 Zymed R1을 5000 : 1으로 희석한 용액에 1시간동안 넣어 흔들어준 다음 다시 TBS-T solution으로 3회 세척하였다. 2차 항체로서는 anti-rabbit 항체(Santacruz Biotech. SC2030)를 사용하였으며 Blotto B과 1 : 5000으로 희석하여 1시간 동안 blocking하였다. TBS-T solution으로 3회 씻어준 후, ECL시약(Amersham)을 이용하여 반응한 다음 X-ray film에 노출하였다.

생물학적 검정: 2-12 세포 콜로니 형성억제

본 실험에 사용된 세포는 종양유발 유전자인 Ha-ras oncogene (valine mutation at codon 12)을 NIH 3T3 세포로 전환하여 만들어진 2-12 세포주로 6 well plate에서 콜로니 형성억제 실험에 사용하였다. 세포배양 및 콜로니 형성억제 정도는 Jeong 등(2002)의 방법에 의하였다. 2-12 형질전환 세포주는 isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG, Sigma)의 유도에 의해 높은 Ha-ras 종양유전자와 독립 부착성을 포함한 강력한 전이특성을 나타낸다[26,27]. 세포주는 정기적으로 배양했으며 배양조건은 5%-CO<sub>2</sub>와 37℃ 수준을 유지하였다. 배양액으로 10%-calf serum이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium)을 사용하였다. 각 well당 880 μl의 배양액에 5%-agar 120 μl을 희석해서 0.6%-ase agar layer로 1 ml을 주입하고 실온에서 15분간 방치했다. upper agar layer는 0.6%-agar 550 μl, 배양액 330 μl, 1 M IPTG 20 μl와 2~12 세포 (40,000 cells/ml) 100 μl을 조합해서 well당 각 1 ml씩 주입했다. 세포는 14일간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양했으며 형성된 콜로니에 대한 관찰은 광학현미경(×40) 하에서 실시하였다. 처리시료는 고추의 수용성 단백질을 처리하였다.

결과 및 고찰

항산화활성

고추 ethyl acetate 추출물의 DPPH free radical scavenging 활성, xanthine/ xanthin oxidase 억제활성을 조사한 결과, 부위간의 DPPH free radical scavenging 활성은 과육은 종자

보다 높았으나, 그 차이는 높지 않았다(Fig. 2). 생육시기별로 과육과 종자추출물의 활성은 개화 후 일 수가 경과된 생육 후기가 초기에 비하여 높았다.

Xanthine oxidase 억제활성은 생육초기에는 과육에서, 생육후기는 종자에서 높았고, 개화 후 20일인 4단계가 전 생육 시기 중 가장 높았다(Fig. 3).

DPPH free radical scavenging 법은 항산화제가 안정한 free radical DPPH와 재 반응하고, 다시 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine [13,31]로 변환되는 정도를 조사하는 방법으로 많은 식물 추출물들의 항산화 활성을 bioassay-guided fractionation시에 이용되어진다[25]. Lee(1997)가 700종의 식물 추출물로부터 항산화 활성을 조사했을 시 IC<sub>50</sub>값이 200 µg/ml 이하에서 80% 이상 억제하는 것을 활성이 있는 것으로 구분하여 그 중 102종이 항산화 활성이 높았다는 보고로 미루어 보면, 개화 후 생육 기간 동안 고추 과육 및 종자 추출물이 IC<sub>50</sub>값은 22.39 및 69.67 µg/ml이하 범위로 DPPH free radical scavenging activity는 매우 높은 것으로 평가되었다.

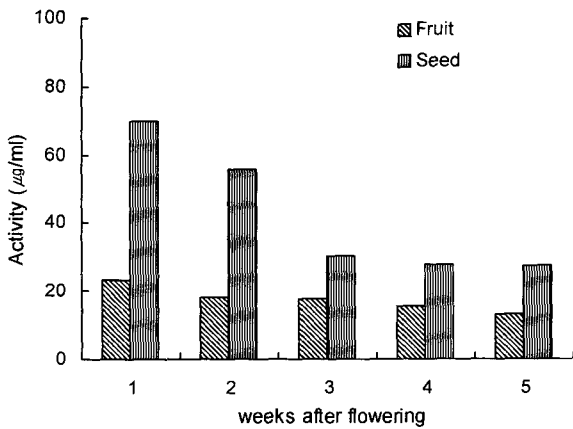


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity on different growing stage in the pepper.

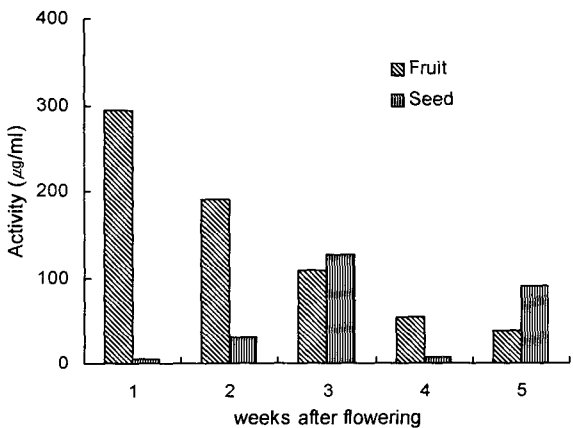


Fig. 3. Inhibition activity of xanthine oxidase on different growing stage in the pepper.

환경스트레스는 식물체내에서 존재하는 산소를 활성 산소종으로 전환시켜 생체내의 대사과정의 장애를 유발함으로써 생산성의 감소를 초래한다[1]. 이러한 활성 산소종을 측정하기 위한 방법으로 xanthine oxidase 억제활성을 조사하였다. Xanthine oxidase 억제활성은 uric acid생성의 측정에 의하여 연구되어졌고[10,11], 본 연구에서도 동일하게 uric acid의 양에 의하여 조사하는 방법을 강구하였다.

Xanthine oxidase 활성을 억제시키는 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid와 같은 페놀화합물들은 쥐의 피부의 종양형성을 억제시키는 것으로 보고 되고 있다[21]. 본 실험에서의 과육과 종자의 추출물에서 xanthine oxidase 생성을 억제활성이 높게 나타나는 것으로 미루어 보면, 고추의 과육 및 종자 내에는 강력한 항산화제와 종양억제를 억제시키는 물질이 존재하는 것으로 생각된다.

생육시기 및 부위별로 DPPH 활성 및 xanthine oxidase 억제활성이 가장 높았던 분획 물을 GC/MS에 의하여 물질을 동정해 본 결과, 동정된 항산화물은 대부분이 지방산 및 페놀성 화합물이었다(Fig. 4, Table 1). 과육 및 종자가 성숙될 수록 1-eicosanol, palmitic acid, linoleic acid, linolenic acid 등의 지방산 및 benzonitrile의 함량이 증가되었다.

소나무 껍질 추출물 내에는 procyanidins B1, B3, B7, caffeic acid, ferulic, p-hydrobenzoic acid 등의 폴리페놀이 함유되어 있고, 이들의 성분들은 비타민 C 결핍, 상처치료, 피부 파괴 등의 치유효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 이들은 free radical을 감소시키는 것으로 알려져 있다[9].

페놀성 화합물은 과일이나 채소가 분해 될 때 그리고 녹차, 홍차 및 wine 등에서 주로 발견되는 화합물로서 항세균, 항알레르기에 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며[30,42], 특히, 퇴행성 질병의 발병빈도를 저하시키고[18,20], 실험적 증거에 의하여 인간의 건강증진을 위하여 천연 항산화물질로서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다[20,37,38,41].

따라서 본 결과에서 얻어진 benzonitrile 같은 페놀성 화합물들은 고추의 높은 항산화력과 밀접한 관련이 있어 extracellular와 intracellular 활성 산소종에 대한 주요 방어계로 작용할 것으로 생각된다.

### Lunasin Peptide의 동정

콩 이외의 다른 식물의 종자에서 lunasin을 찾기 위하여 고추 품종별 종자로부터 단백질을 추출하여 coomassie blue 염색 및 western blot을 한 결과(Fig. 5), coomassie blue 염색에서 4.8 kDa인 합성 lunasin과 같은 위치에 밴드를 나타내지 않았지만 western blot에서는 lunasin을 확인할 수 있었다. 고추 품종간 lunasin 함량은 차를 나타내었다.

Lunasin의 발현 시기를 조사하기 위하여 개화 후 1주 간격으로 종자를 채취한 후, 종자단백질을 coomassie blue 염색과 western blot하여 lunasin을 조사한 결과(Fig. 6), coo-

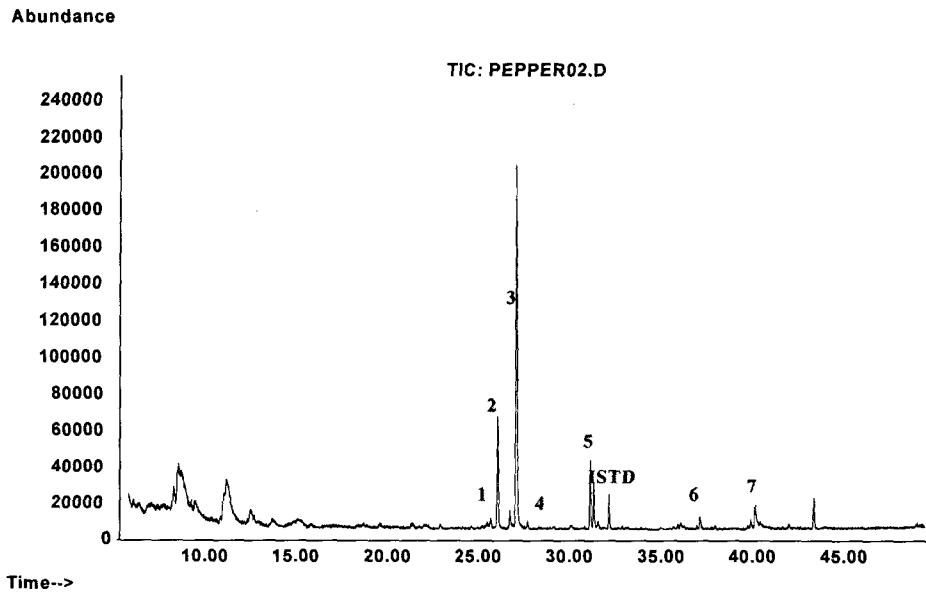
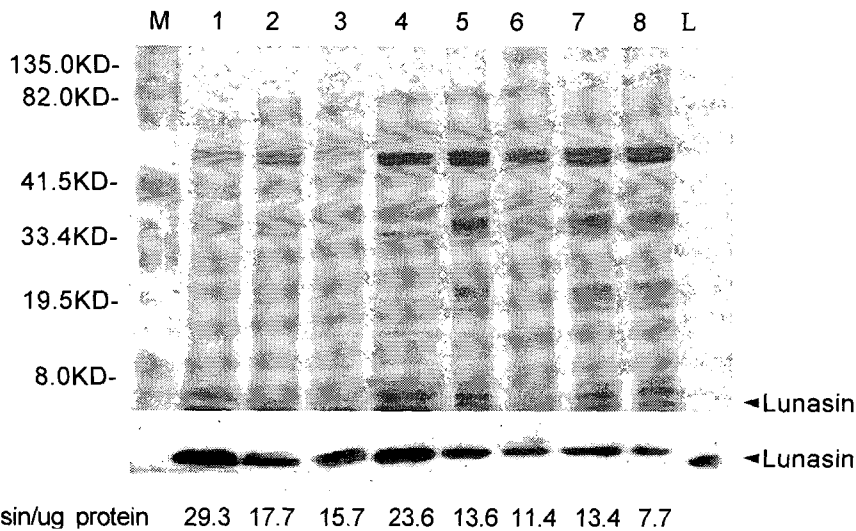


Fig. 4. Chromatogram of extracts from fruits by GC/MS.

Table 1. The antioxidative compounds in extracts of parts and growing stage identified by GC/MS  
(Compound peak area / I.S.T.D peak area)

Compounds	Growing stage (weeks after flowering)									
	1		2		3		4		5	
	Fruit	Seed	Fruit	Seed	Fruit	Seed	Fruit	Seed	Fruit	Seed
1-Eicosanol	0	0.019	0	0.030	0.047	0.106	0.065	0.163	0.067	0.174
Palmitic acid	0.054	0.077	0.216	0.242	0.221	2.008	0.301	0.519	0.861	0.644
Linoleic acid	0.093	0.038	0.105	0.173	0.215	1.999	0.308	0.517	1.380	0.690
Linolenic acid	0.070	0.028	0.094	0.134	0.113	0.213	0.144	0.367	0.363	0.370
Methyl stearate	0.271	0.020	0.105	0.052	0.048	0.353	0.062	0.113	0.154	0.052
Cyclododecanone	0.000	0.008	0.058	0.000	0.016	0.000	0.000	0.055	0.041	0.000
Benzonitrile,m-phenthyl	0.034	0.020	0.034	0.027	0.049	0.238	0.065	0.343	0.102	0.365



g lunasin/ug protein 29.3 17.7 15.7 23.6 13.6 11.4 13.4 7.7

Fig. 5. Identification of lunasin on coomassie blue staining and western blot of crude protein from different peppers.

M: Marker, 1: *C. baccatum*, 2: *C. chacoense*, 3: *C. chinense*, 4: *C. frutescens*, 5: Haedogi, 6: Chammaeun, 7: Pocheongch, 8: Gumcho, each lane was loaded with 25 µg of protein. L: synthetic lunasin (200 ng).

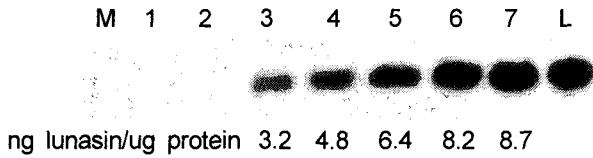


Fig. 6. Western blot according to growing stage after flowering in Red pepper. Numbers correspond to week after flowering. each lane was loaded with 25 µg of protein. L: Synthetic lunasin 200 ng.

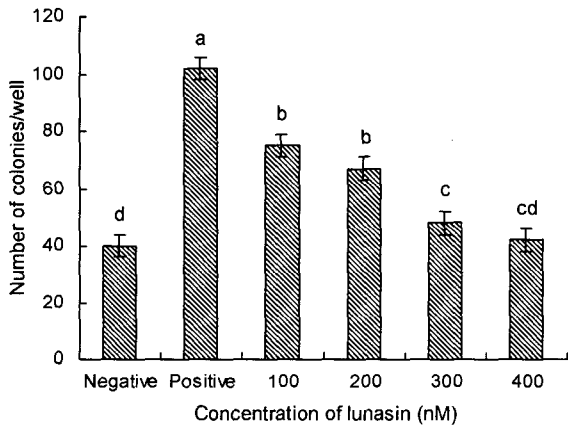


Fig. 7. Inhibitory effect of protein extracted by pepper seed on colony formation in IPTG-induced *ras* stably transformed 2-12cells. Treatment means (+ standard errors) with similiar letters are not significantly different from each other as analyzed by One Way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range Test.

massie blue 염색에서는 개화 후 고추 종자의 단백질 pattern 은 시기별 큰 차이가 없었으나, western blot 결과에서 lunasin이 개화 후 5주 이후부터 생합성되고, 생육이 경과됨에 따라 함량이 증가되었다. 따라서 lunasin은 종자가 성숙되면서 합성되는 단백질로 사료된다. Lunasin은 지금까지 콩(*Glycine max*)에 존재하며 lunasin을 포함하는 Gm2S-1 유전자는 개화 후 3주 후에 나타나며, 다른 부위 즉 잎, 줄기 및 뿌리에서는 나타나지 않고 단지 종자의 배유에서만 발견된다[34]. Lunasin은 43개의 아미노산으로 구성되어 있고, 분자량은 4.8 kDa이다[17]. 또한 hydrophilic하고 acidic하며 구조적으로는 RGD motif 뒤의 9개의 aspartic acid를 가지고 helix한 특징이 있어 tumor cell에 쉽게 결합 될 수 있다. 이러한 구조적 특징들을 가짐으로써 lunasin이 항암 단백질로서의 작용을 나타낸다고 알려져 있다[35].

따라서 본 실험에서도 성숙된 종자를 제외한 다른 부위에서는 lunasin이 나타나지 않았으며 종자가 성숙되면서 합성되는 종자단백질임을 확인할 수 있었다.

**Lunasin peptide의 생물학적 검정**

콜로니 assay는 세포배양 내에서의 부착 성장하는 종양세

포의 성장분석을 위한 단순하고 신속한 양적 도구로 이용된다. 고추 종자단백질을 종양유발 유전자가 전이된 2~12 세포에 처리하여 콜로니 형성정도를 비교한 결과(Fig. 7), IPTG를 넣지 않은 negative control 처리 구의 콜로니 형성은 매우 낮게 나타났으나, 고추 종자 추출단백질로부터 분리된 lunasin 전 농도(100 nM-400 nM)에서 2~12 세포의 콜로니 형성을 억제시켰다. 또한, 추출물을 넣지 않고 IPTG로 유도된 positive control 처리 구는 콜로니 형성이 높게 나타났다. 실험결과에 대한 Duncan's multiple range tests에서 콜로니 형성이 positive 처리 구와 모든 처리 농도 간에 유의차를 나타내었고, 처리 농도 간에는 100 nM과 300 nM이상 농도 간에 유의차를 나타내었다. 그러나 이들 물질이 암 세포의 chromatin binding 여부 및 더욱 정제된 순수 화합물에 대한 낮은 농도에서의 암세포증식억제에 대한 연구는 추후 연구되어야 할 부분이다.

보리, 콩으로부터 추출 및 정제된 lunasin 항암 단백질을 2~12세포에 100 nM 이상농도 처리 시 세포증식이 억제되고 in vivo에서도 이들 물질이 항암성이 높았다는 결과[23]로 미루어 보면, 고추종자내의 lunasin은 콩과 보리의 lunasin과 유사한 항암 활성을 나타내었다.

**요 약**

부위간의 DPPH free radical scavenging 활성은 과육은 종자 보다 높았고 생육시기간에는 후기가 초기에 비하여 높았고, Xanthine oxidase 억제활성은 종자와 과육에 비하여 매우 높았고 동정된 항 산화물은 대부분이 지방산 및 폐놀성 화합물로, 과육 및 종자가 성숙 될수록 1-eicosanol, palmitic acid, linoleic acid, linolenic acid 등의 지방산 및 benzonitrile의 함량이 증가되었다. 시료 채취 시간간의 POD활성은 과육은 성숙증기에 높았으나, 종자는 성숙이 경과될수록 낮았다. SOD 활성은 과육은 생육이 경과 할수록 증가하였으나, 종자는 성숙 할수록 낮아졌다. 고추종자 단백질은 western blot에 의하여 lunasin이 동정되었고, 개화 후 5주부터 lunasin 생합성되었다. 고추 종자내의 100 nM lunasin 펩타이드는 종양유발 유전자가 전이된 2~12 세포의 콜로니 형성을 억제시켰으며, 결과적으로 고추 종자내에는 암 예방적 특성을 갖는 lunasin peptide가 존재한다.

**감사의 글**

본 연구는 2005년도 과학기술부 국제공동연구사업(과제번호: 2005-00637)연구비 지원에 의하여 이루어진 결과의 일부이며 이에 감사 드립니다.

## 참고 문헌

- Allen, R. D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* **107**, 1049-1054.
- Alscher, R. G and J. L. Hess. 1993. Antioxidants in higher plants. *CRC Press, Boca Raton.* 1-17.
- Barry, R. H. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biol. & Medi.* **18**, 775-794.
- Beauchamp, C and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase : Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* **44**, 276-287.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547- 581.
- Benthath, A., S. Rusznyak and A. Szent-Gyorgyi. 1936. Vitamin nature of flavones. *Nature* **138**, 798.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cerutti, P. A., and B. F. Trump. 1991. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer cell*, **3**, 1-7.
- Chandler, F. R., L. Freeman and S. N. Hooper. 1979. Herbal remedies of the maritime indians. *J. Ethnopharmacol.* **1**, 49-68.
- Chan, W. S., P. C. Wen and H. C. Chiang. 1995. Structure activity relationship of caffeic acid analogues on xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Res.* **15**, 703-708.
- Chang, W. S., Y. H. Chang, F. J. Lu, and H. C. Chiang. 1994. Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* **14**, 501-506.
- Choe, S. Y. and K. H. Yang. 1982. Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and buthy-lated hydroxyanisole (BHA)(in Korean). *Korean J. Food Sci, Technol.*, **14**, 283-288.
- Cotelle, N., J. L. Bernier, J. P. Cateau, J. Pommery, J. C. Wallet and E. M. Gaydou. 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 35-43.
- Tally, F. P., H. R. Godin, N. V. Jacobus and S. L. Gorbach. 1977. *Infect. Immun.* **16**, 20.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1-11.
- Fukuta, Y., T. Osawa, M. Namiki and Ozaki T. 1985. Studies on antioxidative substances in sesame seed. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 301-306.
- Galvez, A.F., and B.O. de Lumen. 1999. A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits of mammalian cells. *Nat. Biotech.* **17**, 495-500.
- Goldbohm, R. A., M. G. Hertog, H. A. Brant, G. Van Poppel and P. A. Van der Brandt. 1996. Consumption of black tea and cancer risk : a prospective cohort study. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 93-100.
- Harman, D. 1956. Aging: A thory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298-300.
- Hertog, M. G. 1996. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 385-397.
- Hassan, H. M. 1984. In *Free Radicals in Molecular Biology, Aging, and Disease* (Armstrong, D., R. S. Sohal, R. G. Cutler and T. F. Slater, eds.), *Raven Press, New York*, 77-84.
- Huang, M. T., R. C. Smart, C. Q. Wong and A. H. Conney. 1988. Inhibitory effect of curcumin, Chlorogenetic acid, caffeic acid and Ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Cancer Res.* **48**, 5941-5946.
- Jeong, H.J, Lam, Yi and B.O. de Lumen. 2002. Barley Lunasin suppress  $\gamma$ s-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5903-5908.
- Kang, T. B and N. C. Liang. 1997. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 Leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 1013-1018.
- Lee, S. K. 1997. Evaluation of cancer chemopreventive activity mediated by antioxidants and modulators of tumor promotion. Phd thesis of university of illinois at Chicago. 52-54.
- Liu, H. S.; Scoble, H.; Villaret, D. B.; Lieberman, M. A. 1992. Stambrook, P. J. *Cancer Res*, **52**, 983-989.
- Liu, H. S.; Chen, C. Y.; Lee, C. H.; Chou, Y. I. 1998. *Br J Cancer*, **77**, 1777-17786
- McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
- Odani, S., Koide, T. and T. Ono. 1987. Amino acid sequence of a soybean (*Glycine max*) seed polypeptide having a poly (L-aspartic acid) structure. *J. Bio. Chem* **262**, 10502-5.
- Ohmori, Y., M. Ito, M. Kishi, H. Mizutani, T. Katada and H. Konishi. 1995. Antiallergic constituents from oolong tea stem. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 683-686.
- Omaye, S.T., Reddy K.A. and C.E. Cross. 1977. Effect of butylated hydroxytoluene and antioxidantson mouse lung metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health* **3**, 829-836.
- Pitcher, L. H and B. A. Zilinskas, 1996. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiol.* **110**, 583-588.
- Rivett, A.J. 1985. Purification of a liver alkaline protease which degrades oxidatively modified glutamine synthase. Characterization a high molecular weight cysteine proteinase. *J. Biol. Chem.* **260**, 12600-12606.
- Revilleza, M.J., Galvez, A.F., Krenz, D.C. and de B.O. Lumen. 1996. An 8 kDa methionine-rich protein from soybean (*Glycine max*) cotyledon : Identification, purification and N-terminal sequence. *J. Agric. Food. Chem.* **44**, 2930-2935.
- Ruoslahti, E.K. and M.D. Pierschbacher. 1986. Arg-Gly-Asp : a versatile cell recognition signal. *Cell* **44**, 517-518.
- Ryu, S. N and B. H. Lee. 1998. Antitumor activity of crude sesaminol in sesame seed. *Korean J. Crop. Sci.* **43**, 168-171.
- Sadzuka, Y., A. Sugiyama, Y. Nozawa and S. Hirota. 1996. The effects of theanine, as a novel biochemical modulator, on the antitumor activity of adriamycin. *Cancer Lett.* **105**, 203-209.
- Serafini, M., A. Ghiselli and A. Ferro-Luzz. 1996. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J.*

- Clin. Nutr.* **50**, 28-32.
39. Shigenaga, M., T. M Hagen and B. N. Ames. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 10771-10778.
40. Smith, R. C., J. C. Reeves, R. C. Dage and R. A. Schettler. 1987. Antioxidant properties of 2- imidazolones and 2-imidazolthiones. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 1457-1460.
41. Stoner, G. D. and H. Mykhtar. 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell. Bio. Chem.* **22**, 169-180.
42. Vijaya, K., S. Ananthan and R. Nalini. 1995. Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia Sinensis*) and euphorbia hirta on shigella spp. *J. Ethnopharmacol.* **49**, 115-118.
43. Yun, H. K, Kim, K. Y., Kim, Y. C., Seo, T. C., Kim, S., Y., Keun C. 2002. Changes of color and fruit component by temperature treatment after harvest of unripened fruit in hot pepper. *Journal of the Korean society for horticulture science.* **43(3)**, 289-292.
44. 국립농산물품질관리원. 2004. 농업통계정보. [www.naqs.go.kr/statisticsInfo/statisticsInfo](http://www.naqs.go.kr/statisticsInfo/statisticsInfo)