

고려홍삼으로부터 분리한 수용성 갈변물질의 항산화 활성

이종원[#] · 박재규 · 도재호

KT&G 중앙연구원 인삼연구소
(2005년 1월 27일 접수, 2005년 2월 25일 수리)

Antioxidative Activity of the Water Soluble Browning Reaction Products from Korean Red Ginseng

Jong-Won Lee[#], Chae-Kyu Park and Jae-Ho Do

Ginseng Research Group, KT & G Central Research Institute, Taejon 305-805, Korea

(Received January 27, 2005, Accepted February 25, 2005)

Abstract : The purpose of this study was to investigate the biological activities of water soluble browning reaction products (WS-BRPs) isolated from Korean red ginseng. Antioxidative activities of WS-BRPs were examined with the various systems. Three different fractions prepared by osmolytic treatment of WS-BRP (fraction L, S-1 and S-2) were found to have an ability to donate hydrogen to DPPH and also exhibited the inhibitory activities in lipid peroxidation, consumption of oxygen and protein oxidation of mitochondrial fraction. Especially, L had the strongest activity of these three WS-BRPs in scavenging free radicals. Lipid peroxidation showed the antioxidant effect on linoleic acid oxidation inhibition ratio of 22.5%, 31.7%, 31.9% and 33.5%, respectively. And the consumption of oxygen was strongly inhibited by 49.52%, 62.44, 97.54%. But three WS-BRPs showed weak inhibitory activity on lipid peroxidation in rat hepatic microsomes.

Key words : Korean red ginseng, browning reaction, antioxidative activity, lipid peroxidation, protein oxidation

서 론

갈변반응은 식품의 가공 및 저장 중에 변색과 산패 등의 다양한 변화가 일어나고, 특히 최근에는 갈변물질의 생리활성 등에 대해서 다양한 연구가 진행되고 있다. Yamaguchi 등¹⁾은 갈변반응의 생성물질이 지질에 대한 항산화 활성이 있다고 보고한 이후로 이들을 항산화제로 이용하려는 연구가 진행되어 Franzk 등²⁾은 glucose 와 glycine 혼합용액을 가열하여 얻은 갈변반응의 생성물질이 항산화 활성에 대하여 조사하였고, Anderson 등³⁾과 Yamaguchi 등⁴⁾은 포도당과 여러 가지 아미노산을 반응시켜 얻은 갈변반응의 생성물질이 항산화 활성을 증명하였고, Kawashima 등⁵⁾은 xylose와 peptide와의 갈변반응의 생성물질에 대해서 항산화 활성을 조사한 바 있다. 그러나 이들 대부분의 연구는 갈변반응의 생성물질 자

체의 항산화기구에 대해서는 언급하지 않고 있는데 Griffith 등⁶⁾과 Yamaguchi 등¹⁾은 갈변반응의 생성물질의 항산화 활성은 reductone의 수소공여능에 의한 것이라고 추정하였고, Hwang 등⁷⁾에 의하면 Maillard 반응물질이 경시적으로 증가하지 않으므로 항산화물질은 갈변반응 초기에 형성된다고 생각하고 있는 반면에 Kirigaya 등^{8,9)}은 갈변도가 증가함에 따라 항산화 활성이 증가한다고 하여 서로 상충된 보고를 하고 있다. 최근 합성항산화제는 신장에 직접적인 해를 주거나 혈중에 cholesterol 량을 증가시키며 빈혈을 일으키는 등 부작용^{10,11)}을 나타내므로 그 사용량을 규제하거나 잠정적인 사용금지를 취하게 됨에 따라 천연항산화제의 연구 개발에 대한 관심이 높아지고 있다.

홍삼의 갈색반응은 그 제조과정 중 100°C 부근에서 증삼하고, 일광건조하는 홍삼제조 특성상 비효소적 갈색화반응, 특히 amino-carbonyl 반응이 주된 반응이라고 보고된¹²⁾ 이후 홍삼의 갈변반응과 관련된 연구는 많이 이루어졌지만^{13, 14)} 갈변물질의 분리, 구조 등에 대해서는 연구된 바 없다. 전보에

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-866-5322; (팩스) 042-866-5419
(E-mail) jwlee@ktng.com

서^{15,16)} 이미 홍삼의 갈변반응이 초기에는 효소적 갈변반응, 증삼 후에는 비효소적 갈변반응이 관련된 복합적인 반응에 의해 이루어지며 홍삼의 갈변물질은 대부분이 수용성 물질임을 밝혔다. 또한 홍삼분말을 물로 추출한 뒤, 투석, 알콜침전, gel filtration 등의 방법에 의해 홍삼의 갈변물질은 저분자, 고분자 갈변물질이 존재하고 있음을 밝힌 바¹⁷⁾ 있다. 또한 인삼의 활성검증 및 효능연구는 주로 유기용매 추출물을 대상으로 하였으나 물 추출물의 양이 훨씬 많으며 그 중에서도 갈변물질이 상당히 많이 함유되어 있다고 생각되며, 특히 수용성 색소의 양이 대부분을 차지하고 있을 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 홍삼 중 수용성 갈변물질에 대해서 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 환원력 및 흰쥐의 미토콘드리아를 이용한 항산화 활성 중심으로 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 홍삼시료

홍삼의 수용성 갈변물질 분리용 시료로써 한국인삼공사(주)에서 판매하고 있는 홍삼(양삼 30지=38뿌리/600 g)을 분쇄한 후, (2 mm sieve로 통과)한 후 사용하였다.

2. 시료조제

홍삼 100 g에 1 L의 증류수를 가한 후 4°C에서 24시간씩 3회 추출하고, 4°C에서 원심분리(10,000×g, 20분)하여 얻은 상정액을 n-BuOH를 첨가한 후 진탕하면서 실온에서 3회 추출하여 지용성 물질과 사포닌류를 n-BuOH층으로 제거하였다. 남아있는 수용성 갈변물질 분획에 55% 에탄올을 가하여 침전물을 제거하여 투석막(Spectra, M.W. Cut-off 3,500)으로 4°C에서 1일씩 3회 투석하여 투석내액(fraction L)과 투석외액(fraction S-1, S-2)으로 구분하였다. 그리고, 투석외액의 저분자 갈변물질을 분리하기 위하여 Bio-Gel P-2로 gel chromatography상에서 분리하여 갈변물질 분획을 얻었다. Column 상에서 먼저 유출되는 갈변물질 분획을 S-1, 그 다음에 유출되는 갈변물질 분획을 S-2로 명명한 후 각 시료를 동결건조하여 사용하였다¹⁷⁾.

3. DPPH에 의한 수소공여능

수용성 갈변물질의 항산화 활성은 DPPH에 대한 수소공여능(electron donating ability, EDA)을 517 nm에서 측정하였다. 즉, 수용성 갈변물질(1%)을 0.2 ml 씩 취하고 여기에 5×10^{-4} M DPPH 수용액 3.5 ml를 가하여 10초 동안 진탕한 후 517 nm에서 10분간 흡광도의 변화를 측정하였다¹⁸⁾.

4. 흰쥐의 미토콘드리아를 이용한 항산화 효력

1) 미토콘드리아 분획의 분리

미토콘드리아 분획은 분획원심법을 이용한 Yu 등¹⁹⁾의 방법에 따라 분리하였다. 이때 완충액으로는 50 mM potassium phosphate/0.1 M KCl, pH 7.4(PBS) 용액을 사용하여 저온실에서 보관하였다. Deep freezer(-80°C)에서 보관한 흰쥐(Wistar)의 간 조직을 녹인 후 혈액, 지방성분 및 결합조직 등을 제거하고 거즈로 짜서 수분을 제거하였다. 가위로 잘게 자른 다음 무게의 10배 용량의 PBS 용액을 가하고 polytron 마쇄기로 마쇄하였다. 마쇄액을 원심분리(10,000×g, 10분)한 후 상정액을 다시 원심분리(10,000×g, 15분)하였다. 이때의 침전물은 PBS에 분산시킨 후 다시 한번 원심분리(10,000×g, 10분)하여 미토콘드리아를 분획하였다. 분획한 미토콘드리아는 PBS용액에 1:1(w/v)의 비로 분산시켜서 -80°C에 저장하면서 사용하였다.

2) 지질과산화의 측정

미토콘드리아 분획의 지질과산화에 대한 수용성 갈변물질의 항산화 효과를 알아보기 위해 일정량의 peroxy 유리기를 2,2'-azobid(2-amideinopropane) dihydrochloride(AAPH)를 이용하여 지질을 과산화시켰다. 50 mM PBS 완충액(pH 7.4)에 1.0 mg/ml 단백질량의 미토콘드리아 분획과 농도별로 수용성 갈변물질을 넣고 10 mM AAPH 존재하에 37°C에서 1시간 동안 진탕, 반응시킨 후 2.0 mM EDTA를 첨가하여 급냉시켜 반응을 중지시켰다. 지질과산화 정도는 Buege와 Aust²⁰⁾의 thiobarbituric acid(TBA) 법에 따라 측정하였다. 즉, 지질과산화 반응이 완료된 시료 1.0 ml를 2.0 ml의 0.375%(w/v) TBA 15%(w/v) TCA, 0.25 N HCl과 잘 혼합한 다음 시험관을 유리 구슬로 막고 끓는 물에서 15분간 가열한 후 냉각시켰다. 이를 원심분리(1,000×g, 10분)하고, 그 상정액의 흡광도를 535 nm에서 측정하였다. 지질과산화는 malondialdehyde(MDA)의 양으로 표시하였으며 이때 분자흡광계수는 $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이었다.

3) 산소 소모율의 측정

수용성 갈변물질의 항산화 활성은 AAPH에 의해 미토콘드리아 분획이 산화되는 과정에서 발생하는 산소 소모와 이의 억제효과를 Yellow Spring Instrument社의 Clark type oxygen electrode를 이용하여 측정하였다. 즉, 50 mM potassium phosphate(pH 7.4) 완충액 2.0 ml에 0.5 mg/ml 단백질량의 미토콘드리아 분획을 넣고 산소 소모도를 측정하면서 20 mM AAPH를 첨가한 후 농도별 수용성 갈변물질을 넣어 산소 소모량을 분석하였다. 각 시료의 항산화능은 미토

콘드리아와 AAPH에 의한 산소 소모율에 하여 시료를 첨가한 후의 산소 소모율을 백분율로 표시하였다.

4) 단백질 산화의 측정

단백질의 산화는 DNPH를 이용한 Levine 등²¹⁾의 방법에 따라 산화된 단백질의 carbonyl기를 측정하여 분석하였다. 즉, 지질과산화 실험과 같이 조직을 ascorbate-Fe²⁺계로 처리하여 유발된 단백질산화 뿐만 아니라 ascorbate-Fe²⁺계를 처리하지 않고 *in vivo* 상태에서 이미 만들어진 단백질 산화물의 basal level을 측정하였다. 단백질산화를 유발시킨 경우에는 조직을 ascorbate-Fe²⁺계로 37°C에서 1시간 동안 산화시킨 후 이때 생성된 carbonyl기의 양을 360 nm와 370 nm사이의 파장에서 분자흡광계수(E=22,000)를 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

1. DPPH에 의한 수소공여능

항산화물질의 가장 특징적인 역할인 oxidative free radical 반응을 이용한 후 환원성물질의 분석시약인 DPPH 방법에 따라 시간 경과에 따른 수용성 갈변물질의 수소공여능을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 수소공여능 조사에서 S-1과 S-2 분획은 반응시간이 경과함에 따라 완만하게 감소하였고, L 분획은 S-1, S-2 분획보다 감소폭이 증가하였다. L 분획의 반응초기에는 O.D가 0.675에서 반응후기에는 0.352로 감소하였고, S-2 분획은 반응초기에는 O.D가 0.775에서 반응후기에는 0.625로 그리고 S-1 분획은 0.840에서 0.641로 약하게 감소하였다. 中林 등²²⁾은 인삼갈변물질의 항산화 활성에 대하여 model system에서 glucose와 glycine을 수용액 중에서 가열

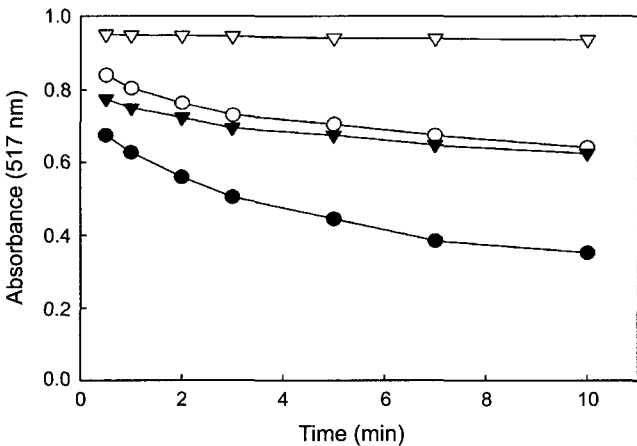


Fig. 1. Change of absorbance by the hydrogen donor properties of red ginseng WS-BRPs. ▽; Control, ●; L, ○; S-1, ▼; S-2

하여 생성된 melanoidin 분자 중에는 비교적 안정한 유리기가 존재하며, 산화방지제의 항산화 활성은 이러한 유리기와 항산화 활성과의 관계가 있다고 보고 되고 있다. Melanoidins의 항산화작용 메카니즘에 대한 많은 의문점이 있음에도 불구하고 일정 수준의 항산화 활성이 인정되고 있다.⁹⁾ 홍삼의 수용성 갈변물질의 반응시간이 증가함에 따라 환원이 증가되는 경향은 인삼추출물의 갈색반응이 촉진될수록 환원성이 증가되었다는 보고와 백삼에 비하여 마이야르형 갈색반응이 촉진된 홍삼에서 그 작용이 현저하게 증가되었다는 연구결과²³⁾와 본 실험과는 유사한 경향이였다.

2. 흰쥐의 미토콘드리아를 이용한 항산화 효력

1) 지질과산화도의 변화

미토콘드리아 분획의 지질과산화에 대한 수용성 갈변물질의 항산화 활성을 조사하기 위해 일정량의 peroxy 유리기를 AAPH를 이용하여 시료를 농도별로 첨가시킨 결과는 Fig. 2와 같다. WS-BRPs 농도별로 첨가하였을 때, 첨가농도가 높을 수록 지질과산화 억제율은 높았다. L은 저농도에서 지질과산화 활성이 높았으나 S-2 분획은 고농도에서 지질과산화 활성이 있었다. 이런 결과로부터 투석내액(L 분획)의 수용성갈변물질이 투석외액(S-1, S-2 분획)의 갈변물질보다 지질과산화 억제율이 높은 것을 알 수 있었다.

2) 산소 소모율의 변화

수용성 갈변물질의 항산화 활성을 조사하기 위한 방법으로

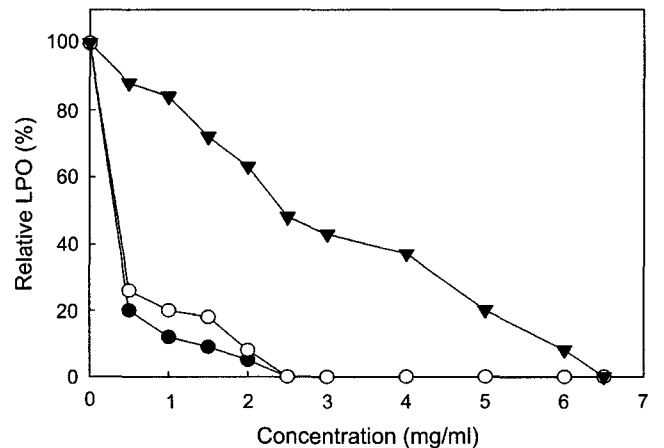


Fig. 2. Inhibition of lipid peroxidation of mitochondrial fraction induced by ascorbate and Fe(II). The reaction mixtures contained 50 mM K-phosphate/0.15 M KCl buffer, (pH 7.4), 0.5 mg protein of mitochondrial fraction, 0.1 mM ascorbate, 0.05 mM Fe₂SO₄ and adequate amount of red ginseng WS-BRPs and the mixtures was incubated at 37°C for 1hr with shaking. ●; L, ○; S-1, ▼; S-2

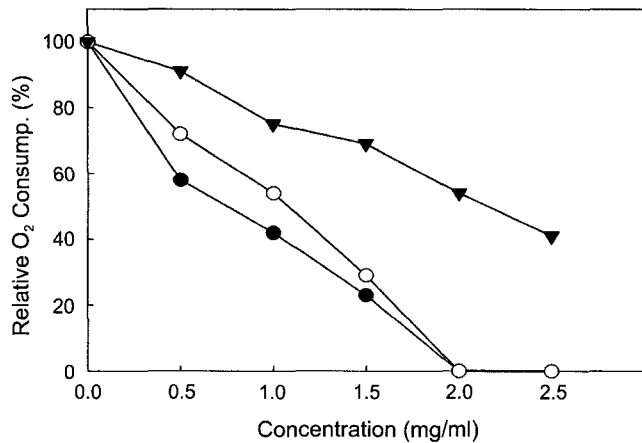


Fig. 3. Inhibition of O₂ consumption of mitochondrial fraction induced by ascorbate and Fe(II). The reaction mixtures contained 50 mM K-phosphate/0.15 M KCl buffer, (pH 7.4), 0.5 mg protein of mitochondrial fraction, 0.1 mM ascorbate, 0.05 mM Fe₂SO₄ and adequate amount of red ginseng WS-BRPs and the mixtures was incubated at 37°C for 1hr with shaking.
●; L, ○; S-1, ▼; S-2

AAPH에 의한 미토콘드리아 분획이 산화되는 과정에서 발생하는 산소소모와 이의 억제 효과를 Clark type oxygen electrode를 이용하여 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉, WS-BRPs의 산소소모 억제율은 농도의존적으로 증가되었다. WS-BRPs의 산소 소모 억제율은 L, S-1 및 S-2 분획 순으로 나타났다.

Hashiba 등²⁴⁾도 간장의 갈변을 일으키는 성분이 강한 환원력을 가지며 산소 흡수능력을 가지고 있다고 하여 간장의 색소성분이 환원력과 산소제거제로 작용함을 알 수 있다고 보고하였는데 본 실험결과와 일치하는 경향이였다.

3) 단백질 산화의 변화

단백질의 산화정도를 단백질의 carbonyl기로 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 수용성 갈변물질을 농도별로 각각 첨가했을시 L 분획에서 반응초기에 약간 급속히 진행되는 것으로 보이나, S-1 과 S-2 분획에서는 비교적 농도 의존적으로 나타났으며, S-2 분획은 S-1, L 분획보다 억제율이 현저히 낮았다. WS-BRPs의 단백질 산화억제율도 산소 소모율과 지질과산화 조사결과와 유사한 경향이였다. 세포를 사용하는(미토콘드리아) 방법을 이용한 지질과산화 억제율, 산소소모 억제율 및 단백질 산화 억제율의 항산화 활성은 WS-BRPs의 농도가 높을 수록 억제율이 높았으며 그 순서는 고분자 갈변물질이 저분자 갈변물질보다 높게 나타났다. 도 등²⁵⁾의 보고에 의하면 홍삼물액 기스를 농도별로 첨가하여 지질과산화 억제율, 단백질산화 억제율, 산소소모 억제율 시험에서 첨가농도가 높을 수록 억제

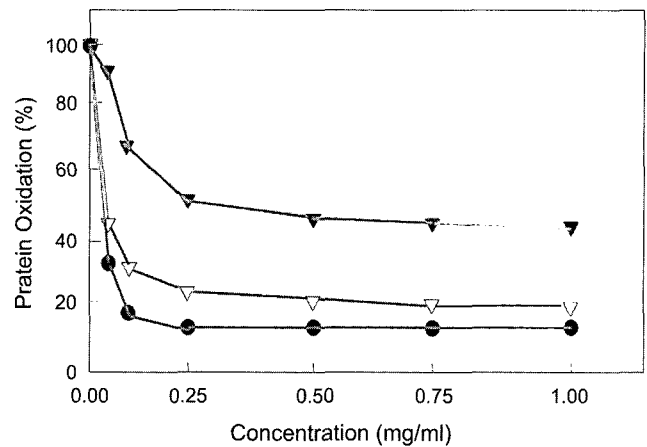


Fig. 4. Inhibition of protein oxidation of mitochondrial fraction induced by ascorbate and Fe(II). The reaction mixtures contained 50 mM K-phosphate/0.15 M KCl buffer, pH (7.4), 0.5 mg protein of mitochondrial fraction, 0.1 mM ascorbate, 0.05 mM Fe₂SO₄ and adequate amount of red ginseng WS-BRPs and the mixtures was incubated at 37°C for 1hr with shaking.
●; L, ▽; S-1, ▼; S-2

율이 증가하는 것은 본 실험과 비슷하였다. 이 등²⁶⁾도 메주 및 된장으로부터 수용성물질에 대해서 항산화 활성을 조사한 결과 수용성 물질을 투석 내액과 외액을 구분했을시 투석 내액물질에 극성이 높은 물질이 많이 함유하고 있었고, 외액물질보다 내액물질에서 항산화 활성이 강하게 나타났으며, Yamaguchi²⁷⁾ 등은 D-xylose-glycine 갈변반응 생성물에 대한 연구결과에서도 분자량이 큰 분획일수록 착색도가 높고, 환원력이 강하게 나타난 것은 본 실험 결과와 유사한 경향이였다.

요 약

홍삼에서 분리한 수용성 갈변물질의 항산화 활성을 DPPH 수소공여능 및 미토콘드리아 분획을 이용한 지질과산화, 산소소모율 및 단백질 산화율을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. DPPH 수소공여능을 조사한 결과 수용성 갈변물질 S-1, S-2 분획은 반응시간이 경과함에 따라 완만하게 DPPH가 감소하였고, L 분획은 S-1, S-2 분획보다 시간이 경과함에 따라 감소폭이 증가하였다. 미토콘드리아 분획을 이용한 지질과산화 및 산소 소모율의 변화에서 첨가 농도가 높을 수록 억제율이 높았으며, 특히, L 분획이 S-1 및 S-2 분획보다 높은 활성을 보였다. 또한 수용성 갈변물질을 농도별로 각각 첨가했을시 단백질 산화에서 L 분획에서 반응초기에 약간 급속히 진행되는 것으로 보이나, S-1 과 S-2 분획에서는 비교적 농도 의존적으로 나타났으며, S-2 분획은 S-1 및 L 분획보다 억제율이 현저히 낮았다.

참고문헌

1. Yamaguchi, N., Tokoo, Y. and Koyama, Y. : Studies on the browning reaction product yielded by reducing sugar and amino acid. Part 1. Effect of browning reaction products on the stability of fats contained in biscuits and cookies. *J. Food Sci. & Technol. Japan*, **11**, 184-189 (1964).
2. Franzk, Cl. and Iwainsky, H. : Deut. Lebensm. Rundschau, **50**, 252-257 (1954).
3. Anderson, R. H., Moran, D. H. Huntly, T. E. and Holahan, J.L. : Responses of cereals to antioxidants. *Food Technol.* **17**, 1587-1590 (1963).
4. Yamaguchi, N. and Koyama, Y. : Studies on the browning reaction products yielded by reducing sugar and amino acid. Part 1. Effect of the substance extracted from biscuits and cookies by several organic solvents on the stability of fat. *J. Food Sci. & Technol.* **14**, 106-112 (1967a).
5. Kawashima, K. H. Itoh and Chibata, I. : Antioxidant effect of peptidein combination with sugar on autoxidant of edible oils. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 987-992 (1981).
6. Griffith, T. and Johnson, J. A. : Relation of the browning reaction to storage stability of sugar cookies. *Cereal Chem.* **34**, 159-169 (1957).
7. Hwang, C. I. and Kim, D. H. : The antioxidant oxidants. *Wld. Hlth. Org. Techn. Rept. Ser.* 228-233 (1973).
8. Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M. : Studies on antioxidant of nonenzymatic browning products. part 1, Relations of color intensity and reductones with antioxidant activity of browning reaction products. *J. Agric. Chem. Soc.* **32**, 289-290 (1968).
9. Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M. : Studies on antioxidant activity of nonenzymatic browning reaction products. Part 2. Antioxidant activity of nondialyzyble browning reaction product. *J. Agric. Chem. Soc.* **43**, 484-491 (1969).
10. Hathway, D. E. : Metabolic fat in animals of hindered phenolic antioxidants in relation to their safety evaluation and antioxidant function in food research. *Academic press*, New York, **15**, 1-6 (1966).
11. Branen, A. L. : Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 59-62 (1975).
12. Kim, D. Y. : Studies on the Browning of Red Ginseng. *Korean Agricultural Chemical Society*, **16**, 60-77 (1973).
13. Kim, S. D., Do, J. H. and Oh, H. I. : Antioxidant Activity of Panax Ginseng Browning Products. *J. Korean Agricultural Chemical Society*, **24**, 161-166 (1981).
14. Choi, K. J. and Kim, D. H. : The Characteristics and Antioxidant Activity of Non-enzymatic Browning Products from Fresh Ginseng Extracts and Those with Arginine or Glucose. *Korean J. Ginseng Sci.*, **5**, 8-14 (1981).
15. Lee, J. W., Lee, S. K., Do, J. H. and Shim, K. H. : Water Soluble Browning Reaction Pigments of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng* C.A Meyer). *Korean J. Ginseng Sci.*, **19**, 244-248 (1995).
16. Lee, J. W., Lee, S. K., Do, J. H. and Shim, K. H. : Browning Reaction of Fresh Ginseng(*Panax ginseng* C.A Meyer) as Affected by Heating Temperature. *Korean J. Ginseng Sci.*, **19**, 249-253 (1995).
17. Lee, J. W., Ko, H. R. and Shim, K. H. : Structural Characteristics of the water Soluble Browning Reaction Products Isolated from Korean Red Ginseng. *Korean J. Food & Nutr.* **11**, 499-505 (1998).
18. Blois, M. S. : Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. **1981**, 1199-1202 (1958).
19. Yu, B. P., Masoro, E. J. and Murata, Bertrand, I. : Life span study of SPF fischer 344 male rats fed libitum or restricted diets, Longevity, growth, lean body mass and disease. *J. Gerontol.*, **37**, 130-135 (1982).
20. Buege, J. A. and Aust, S. D. : Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.*, **52**, 302-308 (1978).
21. Levine, R. L, Willias, J. A., Stadtman, E. R. and Shacter, E. C. : Assays for determination oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, **233**, 346-350 (1994).
22. 中林敏郎, 木村進 : 食品と變色とその化學. 光琳書院, 東京, 日本, 223-289 (1967).
23. Do, J. H., Kim, K. H., Jang, J. G., Yang, J. W. and Lee. K.S. : Changes in Color Intensity and Components during Browning Reaction of White Ginseng Water Extract. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **21**, 480-483 (1989).
24. Hashiba, H., Okuhara, A. and Iguchi, N. : Maillard reaction in food. Chemical Phy. and tech. Aspect (Oxford : Pergamon Press) 93-113 (1981).
25. Do, J. H., Lee, J. W., Lee, S. K. and Sung, H. S. : Development of New Red Ginseng product of Anti-aging Function. Ginseng study report (new development part), (1995).
26. Lee, J. H., Kim, M. H., Im, S. S., Kim, S. H. and Kim. G. E. : Antioxidative Materials in Domestic Meju and Doenjang Separation of Hydrophilic Brown Pigment and Their Antioxidant Activity. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 604-613 (1994).
27. Yamaguchi, N. and Fujimaki, M. : Studies on browning reaction production from reducing sugars and amino acids. *J. Food Sci. Technol.*, **20**, 507-512 (1973).