

참가사리 분획물의 항산화 · 항균효과

정영화* · 정복미** · 강대연* · 구미정* · 신미옥* · 배송자*§

신라대학교 식품영양학과,* 여수대학교 식품영양학과,** 마린-바이오 산업화지원센터*

The Antioxidative and Antimicrobial Effects of Gloiopeltis Tenax

Jung, Young-Hwa* · Jung, Bok-Mi** · Kang, Dae-Yeon*

Ku, Mi-Jeong* · Shin, Mi-Ok* · Bae, Song-Ja*§

Department of Food and Nutrition,* Marine Biotechnology Center for Biofunctional Material Industries,
Silla University, Busan 617-736, Korea

Department of Food Science and Nutrition,** Yosu National University, Jeonnam 550-749, Korea

ABSTRACT

In this study, we investigated the antioxidative and antimicrobial activities of red algae *Gloiopeltis tenax* (GT). GT was extracted with methanol and then further fractionated it into four different types: methanol (GTMM), hexane (GTMH), butanol (GTMB) and aqueous (GTMA) soluble fractions. The antioxidant activity of the fractions from GT was investigated by measuring the scavenging activities of GT against reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Among the four fractions of GT, GTMM and GTMB showed a marked scavenging effect against ROS, but they displayed very low levels of the scavenging effect against RNS. The antimicrobial activity was increased in proportion to its concentration by the paper disc method. Among the various solvent layers, the GTMM and GTMB showed strong antimicrobial activities. (*Korean J Nutrition* 39(4): 366~371, 2006)

KEY WORDS : antioxidative activity, antimicrobial activity, gloiopeltis tenax (GT).

서론

산소는 생명유지에 절대적으로 필요한 원소이지만 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의하여 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환되면서 생체에 나쁜 영향을 미친다. Superoxide ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2) 및 hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등 활성산소(reactive oxygen species, ROS)와 peroxynitrite ($ONOO^-$), NO와 같은 활성질소 (reactive nitrogen species, RNS)는 신진대사의 부산물로서 세포내에서 계속적으로 생산되거나 환경으로부터 유입된다. 이와 같이 세포내에서 형성된 반응성 강한 물질은 세포막과 핵산의 주성분인 당질, 지질, 단백질 및 DNA와 같은 분자들을 과산화 시키며, 세포사 (apoptosis)와 같은 세포손상을 초래한다. 또한 이들에 의한 oxidative stress

는 암을 비롯하여 노화와 관련된 여러 질환의 발생 기전에 관여한다고 알려져 있다.^{1,2)} 항산화제는 oxygen free radical을 제거하며 지질 과산화반응 (peroxidation)을 억제 또는 종결시키는 기능을 한다. 또한 phase II 해독화 효소들을 활성화 시키거나 GSH 증가를 통해 친전자성 물질을 제거시키는 기능을 갖기도 한다.^{3,4)} 생체는 항산화제인 glutathione, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화 효소와 항산화물질을 이용하여 항상성을 유지하고 있으며 효율적인 항산화제는 이러한 유해한 영향을 제한하며 산화로부터 세포를 보호한다.^{5,6)} 항산화물질은 식품산업, 의약산업, 화장품산업 등 다양한 분야에서 이용될 수 있기 때문에 국가 경제 산업적 측면에서 매우 큰 파급효과를 기대할 수 있다.⁷⁾ 활성산소와 활성질소로부터의 세포 보호기전에 관한 많은 연구가 이루어지고 있는데 과거에는 BHT (butylatedhydroxytoluene) 및 BHA (butylate dhydroxanisole)와 같은 합성항산화제는 항산화 효과와 경제성이 뛰어나기 때문에 식품에 널리 사용되어 왔으나 여러 문제점으로 인하여, 최근에는 천연항산화제에 대한 관심이 점차 증대되고 있다.^{8,9)} 따라서 천연 자원으로

접수일 : 2006년 3월 2일

채택일 : 2006년 6월 9일

§ To whom correspondence should be addressed.

E-mail : sjbae@silla.ac.kr

부터 항산화제인 tocopherol,^{10,11)} carotenoids,^{12,13)} L-ascorbic acid,^{14,15)} 폴리페놀화합물^{16,17)} 등을 이용한 많은 연구가 진행되고 있다.

한편 식품의 원료나 가공, 저장, 유통 과정 중 부패 및 병원성 미생물에 의해 야기되는 문제점 해결에 대한 중요성이 증가함에 따라 보존기간의 연장이나 부패 미생물의 생육억제 등 식품 위생학적으로 안전성에 문제가 없는 항균제의 개발이 요구되고 있다. 항균활성 물질은 동물이나 식물의 구성성분으로 존재하기도 하고 외부의 자극에 의해 생체내의 대항물질로 만들어지기도 한 것으로 보고되었으며, 환경친화성 천연자원의 가치가 중요시됨에 따라 동·식물체 내에 함유된 단백질, 효소, 유기산 등의 천연 항균물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁸⁾ 본 연구에 사용된 참가사리 (*Gloiopeltis tenax*, GT)는 지누아리목 풀가사리과 홍조식물로 조간대의 바위 위나 돌 위에서 서식하며 줄기는 원주 모양을 하고 가지는 불규칙하게 차상으로 갈라져 있다. 가사리에 대한 연구로는 우무가사리¹⁹⁾의 페놀성분의 쥐의 간 보호효과와 불등가사리²⁰⁾의 암세포증식억제효과 등의 몇 연구만이 보고되어져 있다. 본 연구는 식용으로 애용되는 해조류 중 홍조류에 속하는 참가사리의 항산화 효과와 항균효과를 연구함으로써 참가사리의 생리활성 효과와 기능성 소재로서의 가능성을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 재 료

본 실험에 사용한 참가사리 (*Gloiopeltis tenax*, GT)는 2004년 5월 전남 무안군에 위치한 (주) 삼일물산에서 제공 받았다. 이 시료를 추출하고 용매별로 분획하여 항산화 및 항균효과 검색에 사용하였다.

2) 시료의 추출 및 분획물 제조

시료로 사용된 참가사리는 건조 후 메탄올을 첨가하고 37°C에서 진탕한 후 4시간 동안 3회 반복 추출하고 회진식 진공 농축기로 감압 농축시킨 후 동결 건조하여 참가사리의 methanol 추출물 (GTM)을 얻고, 이 추출물을 각 용매별로 분획하여 hexane층 (GTMH), methanol층 (GTMM), butanol층 (GTMB) 및 수층분획물 (GTMA)로 각각 분획하고 각 층을 감압 농축 후 동결 건조하여 분말로 만들어 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 항산화효과 측정

(1) Reactive oxygen species (ROS) 제거능 측정

ROS 제거능을 측정하기 위해 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA assay) 측정방법²¹⁾을 사용하였다. 99.9%의 ethanol에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/ml esterase를 -20°C에 stock solution으로 저장하고, 실험시 10 μM DCFDA와 6 U/esterase를 혼합하여 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) 용액을 22°C에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동보관 하였다. 지용성의 DCFDA는 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 시료를 10 μl 넣은 후 H₂O₂를 190 μl씩 넣고 반응시킨 후 DCFDA에 esterase를 넣어 DCFH를 형성시키고 이를 50 μl 첨가하여 25분간 생성된 형광의 변화를 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 Multi-detection microplate reader로 측정하였다.

(2) Peroxynitrite (ONOO⁻) 제거능 측정

Crow의 방법²²⁾에 의해 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다. 96-well microplate에 sample을 농도별로 취하고, 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μM diethylenetriaminepentaacetic acid와 10 μM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가한다. 그리고 10 μM ONOO⁻ 첨가한 후 형광광도를 이용하여 excitation (500 nm)과 emission (536 nm)을 측정하였다. ONOO⁻ 생성원으로는 시판되는 (Cayman Chemical Co.)를 직접 사용하거나 SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂와 NO의 반응으로 발생하는 ONOO⁻를 사용하였으며 이렇게 생성되어진 ONOO⁻의 제거 활성능을 검토하였다.

(3) Nitric oxide (NO·) 제거능 측정

특이적인 NO·의 indicator인 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO·를 포집하여, 490~495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO양에 의존한다. DAF-2가 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1 : 400배로 희석하였다. NO· 제공물질인 sodium nitroprus-

side (2 mM)와 DAF-2 (3.14 μ M)를 96well plate에 첨가하였으며, DAF-2와 NO·의 반응에 의해 방출되는 형광은 10분 후 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 Multi-detection microplate reader를 이용하여 측정하였다.²³⁾

2) 항균활성 측정

(1) 사용균주 및 배지

실험에 사용된 균주는 단백질식품 부패원인균인 *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris* 3종과 부패균인 *Bacillus subtilis*, 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus* 균이었으며 각 균의 생육 및 보존을 위해 사용한 배지는 Nutrient agar (Difco), Yeast extract, Malt extract를 사용하였다.

(2) 추출물의 용매 분획별 항균성 검색

추출, 분획물의 항균성 검색은 paper disc method²⁴⁾를 사용하였으며, 항균성 시험용 평판배지는 멸균 후 petri dish에 20 ml씩 분주하여 응고시키고 전배양한 각종 시험균을 무균적으로 첨가하여 기층용 배지위에 다시 10 ml씩 분주하여 이중의 평판배지를 만들었다. 각 용매 분획별 추출물의 농도를 500~2000 μ g/mL로 하여 멸균된 disc (직경 8 mm, Toyo Roshi Kaisha, LTD)에 흡수, 건조시켜 균주가 도달된 plate 표면에 올려놓은 후 37°C incubator에서 24시간 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경 (mm)으로부터 각 분획물의 항균활성을 측정하였으며 이 실험을 5회 반복하여 평균치를 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 참가사리의 추출 및 분획

해조류의 일종이며 식용으로 애용되고 있는 참가사리 (*Gloiopeltis tenax*, GT)를 methanol로 2회, dichloromethane 과 ethanol을 1 : 1로 섞은 용매에 2회 추출하여 추출물 (GTM)을 얻고, 이 추출물을 hexane (GTMH), methanol (GTMM), butanol (GTMB) 및 aqueous (GTMA)의 용매별로 분획하였으며, 각 시료의 용매별 수득율은 Table 1과 같다.

2. 항산화 효과 측정

1) Reactive oxygen species (ROS) 제거능

참가사리 (GT) 분획물의 활성산소 (Reactive oxygen species, ROS) 제거활성을 측정한 결과는 Table 2와 같

Table 1. Yields (%) of various solvent fractions of *Gloiopeltis tenax*

Fraction	Yields (g)	Yields (%)
Extract	15	0.75
Methanol fr.	0.2	1.33
Hexane fr.	0.45	3
Butanol fr.	1.29	8.6
Aqueous fr.	6.45	43

Table 2. ROS scavenging activity of the partition layers of *Gloiopeltis tenax*

Sample	IC ₅₀ (μ g/mL) \pm SE
GTMM	5.14 \pm 0.11
GTMH	> 40
GTMB	6.59 \pm 0.25
GTMA	> 40
Trolox	6.68 \pm 0.08

Table 3. ONOO⁻ scavenging activity of the partition layers of *Gloiopeltis tenax*

Sample	IC ₅₀ (μ g/mL) \pm SE
GTMM	39.78 \pm 0.19
GTMH	> 50
GTMB	44.85 \pm 0.37
GTMA	> 50
Penicillamine	8.75 \pm 0.03

다. GTMM층은 5.14 μ g/mL, GTMB층은 6.59 μ g/mL의 농도에서 50%의 ROS 제거활성을 나타내었다. Positive control로는 trolox를 사용하여 비교하였으며, 참가사리의 methanol 분획층에서는 control인 trolox보다 낮은 5.14 μ g/mL에서 50% ROS 제거활성을 보였으며 butanol 분획층은 IC₅₀이 6.68 μ g/mL인 trolox와 유사한 ROS 제거능이 있는 것을 나타내었다.

2) Peroxynitrite (ONOO⁻) 제거능

활성질소 (Reactive nitrogen species, RNS) 중 가장 독성이 강한 것으로 알려진 ONOO⁻에 대한 GT의 제거활성을 조사하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 GT의 ONOO⁻ 제거활성은 GTMM층과 GTMB층에서 나타났으며 IC₅₀은 각각 39.78, 44.85 μ g/mL로 positive control로 사용된 penicillamine과 비교하였을 때는 아주 미약한 효과를 보였다.

3) Nitric oxide (NO·) 제거능

Table 4는 GT의 NO· 제거활성을 측정한 결과이며 positive control인 carboxy PTIO는 7.28 μ g/mL에서 50%의 NO· 제거활성을 보인 반면 GTMM층과 GTMB층은

Table 4. NO· scavenging activity of the partition layers of *Gloiopeltis tenax*

Sample	IC ₅₀ (μg/mL) ± SE
GTMM	21.17 ± 0.08
GTMH	>50
GTMB	25.29 ± 0.55
GTMA	>50
Carboxy PTIO	7.28 ± 0.21

각각 21.17, 25.29 μg/mL에서 IC₅₀을 나타내어 그 효과는 미약하였다.

이상의 결과로 참가사리 분획물의 항산화 효과는 peroxy-nitrite (ONOO⁻)과 nitric oxide (NO·) 제거능의 질소종보다는 reactive oxygen species (ROS) 제거능의 산소종에 더 효과가 있음을 알 수 있었다. 그리고 reactive oxygen species (ROS) 제거능을 가지는 생리활성물질이 butanol 분획층에 존재할 것으로 유추해 볼 수 있었으며, 특히 해조류의 성분으로 알려져 있는 mannan, xyran, porphyrin의 생리적 효과와 최근 보고되어진 항산화물질인 pophenol의 효과도 생각해 볼 수 있었다.²⁵⁾ 앞으로 더욱 심도 있는 연구를 통해 이들 분획층의 생리활성물질들을 규명해 보고자 한다.

3. 항균활성 측정

참가사리의 각 분획물 GTMM, GTMH, GTMB, GTMA 층을 단백질 식품 부패 원인균인 *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*의 3종과 부패균인 *Bacillus subtilis*, 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus* 등 총 5가지 균종에 처리하여 항균력을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 전반적으로 GTMM층과 GTMB층이 높은 항균력을 나타냈고, 특히 단백질 식품 부패원인균인 *Serratia marcescens*에서 높은 항균력을 관찰할 수 있었다.

*Proteus mirabilis*는 모든 층에서 항균력이 나타났는데, GTMM층의 경우 농도 의존적인 효과가 있었으며 500, 1,000, 1,500 μg/mL의 시료 첨가에서는 각각 8.60, 8.90, 10.80 mm로 증가하다가 2,000 μg/mL에서는 12.60 mm의 높은 항균효과를 나타내었다. 또한 GTMH층의 경우는 500 μg/mL에서 9.6 mm의 항균력을 나타내었고, 최종농도인 2,000 μg/mL에서는 11.10 mm의 항균효과를 나타내었다.

*Serratia marcescens*의 경우 시료의 모든 분획층에서 항균력이 나타났으며, GTMB층의 경우 500 μg/mL의 농도 처리시 8.70 mm의 항균력을 보였고 농도 의존적으로 그 효과가 증가하여 최종농도인 2,000 μg/mL에서 12.00 mm의 높은 항균효과를 관찰 할 수 있었다. GTMM층과 GTMA층 또한 농도가 증가할수록 항균력이 증가하여 2,000 μg/mL

Table 5. Antimicrobial activity of the partition layers of *Gloiopeltis tenax*

Stains	Fractions μg/ml	Clear zone on plate (mm) ¹⁾			
		GTMM	GTMH	GTMB	GTMA
<i>Proteus mirabilis</i> (KCTC 2566)	500	+	+	+	-
	1000	+	+	+	-
	1500	++	++	+	-
	2000	+++	++	+	+
<i>Serratia marcescens</i> (KCTC 2356)	500	+	+	+	+
	1000	+	+	+	+
	1500	+	+	++	+
	2000	++	+	+++	++
<i>Proteus vulgaris</i> (IFO 3851)	500	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-
	1500	-	-	++	+
	2000	++	+	+++	+
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	500	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-
	1500	+	+	+	-
	2000	+	+	++	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (KCTC 1621)	500	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-
	1500	-	+	-	+
	2000	++	++	++	+

¹⁾ GTMM: Methanol partition layer of methanol extracts *Gloiopeltis tenax* (GTM)

GTMH: Hexane partition layer of GTM

GTMB: Butanol partition layer of GTM

GTMA: Aqueous layer of GTM

²⁾ Treated sample was adsorbed into paper disc (8 mm, diameter) and the diameter (mm) of clear zone was confirmed around the colony.

Growth inhibition size of clear zone: +++, larger than 12 mm; ++, 10-12 mm; +, smaller than 10 mm; -, not detected

에서 각각 10.20 mm와 10.50 mm의 항균효과를 나타내었다.

*Proteus vulgaris*의 경우 GTMB층은 500, 1,000 μg/mL의 저농도에서는 효과가 없었으나 1,500 μg/mL에서는 10.60 mm, 최종농도인 2,000 μg/mL에서 12.70 mm의 높은 항균력을 관찰 할 수 있었고, GTMM층의 경우 2,000 μg/mL 농도에서 10.60 mm의 항균효과를 보였다.

*Bacillus subtilis*의 경우는 GTMB 층에서 최종농도인 2,000 μg/mL에서 다른 균주들에 비해 10.40 mm의 다소 낮은 항균효과를 나타내었고, 나머지 GTMM, GTMH 층의 경우에는 1,500, 2,000 μg/mL 농도에서 비로소 활성이 나타남을 관찰 할 수 있었다.

*Staphylococcus aureus*는 GTMM과 GTMB 층이 최종농도 2,000 μg/mL에서 10.20 mm의 동일한 항균력을 보였으며, GTMH 층의 경우는 1,500 μg/mL의 농도에서부터 항균력을 나타내어 2,000 μg/mL에서 10.10 mm의 결과

를 보였다.

본 실험의 결과로 참가사리는 각 균주에 따라 항균력이 다르게 나타나나 전체적으로 볼 때 GTMB층과 GTMM층에서 높은 항균력을 나타내었다. 이러한 결과는 박²⁶⁾ 등의 미역귀 분획물의 항균결과와 같은 결과로써 극성물질의 용매층인 GTMB 층과 GTMM 층에 항균활성물질이 존재함을 유추해 볼 수 있었다. 그리고 해조류 중에 포함되어 있는 점액성 다당류의 분자 극성도를 고려해 볼 때, 이층에서의 fucoidan과 alginic acid과 같은 극성물질의 활성효과도 생각해 볼 수 있었다. fucoidan과 alginic acid는 항종양, 항고혈압, 항균, 알러지 예방 등의 생리활성이 이미 보고되어 있다.²⁷⁾ 그러므로 이 두 층의 항균물질 구조 분석 등 항균활성 물질규명은 더욱더 연구해야 할 과제라고 생각된다. 또한 다른 균주에 비해 단백질 식품 부패 원인균인 *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*에서 다소 큰 활성을 보였으므로 앞으로 이러한 활성성분을 이용한 천연 항균 식품 보존제로서의 산업화 이용도 기대되어진다.

요 약

참가사리의 항산화효과를 측정하기 위해 ROS와 RNS 제거활성을 측정하였다. ROS 제거활성 측정결과 GTMM 층과 GTMB층이 positive control로 사용한 trolox와 유사한 높은 제거능을 보였고, ONOO⁻ 제거능은 그 효과가 미약하였으나 GTMM 층에서 나타났으며 NO[·] 제거활성 역시 GTMM층과 GTMB층에서 약한 효과가 관찰되었다. 따라서 본 실험의 결과 GTMM 층에서 ROS 제거활성의 효과가 높았으며 다음으로 GTMB층에서 효과를 보여 GTMM 층과 GTMB층에 활성산소 제거효과를 가지는 물질이 있는 것으로 사료되어진다.

Paper disc method를 이용한 항균활성 효과 실험결과, *Serratia marcescens*가 모든 층에서 높은 항균력을 보였으며 *Proteus mirabilis*에서도 GTMA층을 제외한 모든 층에서 항균효과를 보였다. 사용한 모든 균주에서 각각 항균력의 차이는 있으나 전체적으로 GTMB 층과 GTMM 층에서 높은 항균활성을 관찰할 수 있었다.

이 연구결과를 토대로 참가사리의 항산화 및 항균활성물질에 대한 단계적인 분리 동정이 이루어져 GTMM층과 GTMB층의 생리활성물질 개발이 기대되는 바이다.

■ 감사의 글

본 실험에 사용된 참가사리는 전남 무안군에 위치한 (주) 삼일물산에서 제공된 것으로 (주) 삼일물산 사장님께 감사드립니다.

Literature cited

- 1) Bauer G. Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Res* 20: 4115-4139, 2000
- 2) Brune B, Zhou J, Von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. *Kidney Int Suppl* 84: 22-24, 2003
- 3) Kim TH, Jo YJ, Ha YM, Shon YH, Bae BJ. Effect of chitosan oligosaccharide on enzymes for cancer chemoprevention. *J Korean Cancer Assoc* 33(1): 64-70, 2001
- 4) Halliwell B. Drug antioxidant effects. *Drugs* 42: 569-605, 2001
- 5) Corfran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. WB Saunders, Philadelphia, pp.1, 1989
- 6) Halliwell B, Gutteridge J. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of toxicity. In: Free radicals in biology and medicine. 2nd, Clarendon press, Oxford, pp.187, 1989
- 7) Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29: 273-300, 1990
- 8) Kim HK, Kwon YJ, Kim YE, Nahmgang B. Changes of total polyphenol content and antioxidant activity of Aster scaber thub extracts with different microwave assisted extraction conditions. *Korean J Food Preservation* 11(1): 88-93, 2004
- 9) Huong DTL, Dat NT, Cai XF, Shen GH, Bae KH, Kim YH. Phenolic components from the leaves and twigs of *Rhamnus taquetii*. *Korean J Pharmacogn* 35(2): 139-142, 2004
- 10) Shim SM, Kim GH. Identification of carotenoid oxidation products in pigment extracts from Stur Ruby Grapefruit pulp at different temperatures with exposure to litht. *J Food Sci Nutr* 6(1): 1-5, 2001
- 11) Hong SP, Kim MH, Hwang JK. Biological functions and production technology of carotenoids. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27(6): 1297-1306, 1998
- 12) Kim TK, Shin Hd, Lee YH. Stabilization of polyphenolic antioxidants using inclusion complexation with cyclodextrin and their utilization as the fresh-food preservative. *Korean J Food Sci Technol* 35(2): 266-271, 2003
- 13) Park KY, Kang CS, Lee YS, Lee YH, Lee YS. Tocotrienol and tocopherol content in various plant seeds. *Korea J Crop Sci* 49(3): 207-210, 2003
- 14) Chung HJ. Effects of basil and majoram essential oils with or without ascorbic acid on color and oxidative and microbial stability of beef patties. *J Food Sci Nutr* 9: 1-6, 2004
- 15) Lee KH. Effects of ascorbic acid in skim milk during light storage. *Food Engineering Progress* 6(3): 256-262, 2002
- 16) Kim YK, Lee HY, Oh DH. Changes in antioxidative activity and total polyphenols of crude and defatted grape seed extract by extraction condition and storage. *Korean J Food Preservation* 11(4): 455-460, 2004
- 17) Jeong SM, Son MH, Lee SC. A survey on contents of phenolic compounds of market fruit and vegetables juices. *J Basic Sci* 18: 117-123, 2003
- 18) Cho JY, Kim HK Ma SJ, Moon H, Park KH. Isolation and identification of azelaic acid and 3,4-dihydroxy benzoic acid from buckwheat hull as antimicrobial substances. *Food Sci. Biotechnol*