

사과씨 에탄올 추출물의 대식세포 면역 조절 활성

- 연구노트 -

변 명 우

우송대학교 외식조리영양학부

Immunomodulatory Activities of Apple Seed Extracts on Macrophage

Myung-Woo Byun

School of Culinary Nutrition, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea

ABSTRACT This study examined the immunomodulatory activities of apple seed extracts (ASE). The immunomodulatory effects were estimated through nitric oxide production, cytokine induction, protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and inhibitory kappa B α (I κ B- α) in the RAW 264.7 macrophage cell line. In the cytotoxicity assay, ASE (31 to 250 μ g/mL) did not induce cytotoxicity; thus, the optimal concentration of ASE was confirmed to be less than 250 μ g/mL. Nitric oxide (NO) and cytokines (tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6) production significantly increased in a dose-dependent manner. Similarly, the protein expression of iNOS and the phosphorylation of MAPKs and I κ B- α were also increased by ASE treatment. Overall, our results suggest that extracts from apple seeds potentially have immunomodulatory activities on macrophages.

Key words: apple seed, macrophage cells, cytotoxicity, nitric oxide production, cytokine production

서 론

현대인들은 바쁜 일상생활을 살아가면서 생체에 위해를 줄 수 있는 여러 환경적인 요인들을 접하게 되는데, 이러한 환경적 위해 요소들에 대하여 생체가 적절하게 대응하지 못하면 심혈관 질환이나 염증 등의 다양한 질환으로 발전하게 된다(1,2).

면역계는 외부 위해 항원들의 침입이나 조직 손상을 야기하는 물질들이 신체에 침입하였을 때 이들로부터 신체를 보호하는 자기 방호 수단으로써 작용하고 림프구를 포함한 여러 가지 다양한 면역세포들에 의하여 다양한 면역반응들이 일어나며(3-5), 이러한 반응들을 염증반응이라고도 일컫는다. 최근 암, 당뇨 및 뇌/심혈관질환 등의 성인병들이 생체에서 급성 및 만성 염증에 의해 발생된다고 보고됨에 따라 면역계의 조절을 통해서 이러한 질병에 대하여 치료하는 연구들이 진행되고 있으며, 특히 전 세계적으로 볼 때 현존하는 질병 중 사망률이 가장 높은 질병인 암의 경우, 암 발생 시 면역계에서 암세포를 억제시키는 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 암 발생의 억제 차원에서 면역계를 활성화시켜 줄 수 있는 다양한 후보 물질의 탐색에 대한 노력이 절실히 필요한 상황이다(6-8).

한편 사과는 식이섬유, vitamin C 및 phenolic compound

등 다양한 기능성 성분을 함유하고 있으며, 심혈관 질환 및 암 등 성인병 예방에 효과가 있는 것으로 보고되어져 있다. 현재까지 사과 추출물의 생리활성에 관한 연구로는 항산화 활성, 항암효과, 항당뇨 및 뇌/심혈관 질환의 억제 등이 있으며, 이러한 사과 추출물의 생리활성을 나타내는 주된 성분은 폴리페놀로 알려져 있고 이 성분은 주로 과피 및 씨 부분에 그 함유량이 높게 분포하는 것으로 알려져 있다(9-14). 그러나 지금까지 사과를 소재로 한 국내의 많은 연구들 중에서 사과 부산물인 사과씨를 활용하여 진행된 연구들은 미비한 실정이며, 또한 사과 추출물이 면역 활성을 유도하는 지에 관하여 연구한 연구보고들은 전무후무하다.

따라서 본 연구에서는 사과 가공 시 발생하는 폐자원인 사과씨를 활용하여 사과씨 에탄올 추출물(ASE)이 면역계를 자극시키는지에 관하여 알아보기 위하여 마우스 유래의 면역세포인 대식세포(RAW 264.7)에 ASE를 처리하여 세포 독성, 사이토카인 분비능, 및 면역반응의 대표적인 신호전달 체계인 MAPK의 인산화 및 NF- κ B의 활성화에 관하여 알아보았다.

재료 및 방법

사과씨 추출물(ASE)의 제조

본 실험에서 사용된 사과씨는 경동시장(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 200 g의 사과씨를 수세하여 동결 건조 하고, 건조된 사과씨를 분쇄기(model FM-681, Hani,

Seoul, Korea)를 이용하여 2분 동안 분쇄하는 과정을 반복하여 완전 분쇄한 후, 2 L의 에탄올에 침지시켜 4°C 냉장고에서 24시간 동안 추출하였다. 추출여액을 Whatman No.4 filter paper(Whatman plc, Kent, UK)로 여과하여 얻은 상등액을 감압 농축기(evaporator, Sunil instrument Co., LTD, Daejeon, Korea)로 농축하여 고형의 ASE를 얻은 후, 본 실험에 사용하였다.

세포배양

마우스 유래의 대식세포인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)로부터 분양 받아 사용하였다. 세포 배양을 위한 배지의 조성은 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO, Carlsbad, CA, USA)과 100 U/mL penicillin (GIBCO), 100 µg/mL streptomycin sulfate(GIBCO)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, GIBCO) 이었고, 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator(MCO-18M, Sanyo, Tokyo, Japan)에서 배양하였다.

ASE의 세포 생존율

ASE의 면역조절 유도 활성 실험 시 대식세포에 대한 최적 처리 농도를 결정하기 위하여 RAW 264.7 세포에 대하여 ASE의 세포독성을 평가하였다. 세포배양용 96 well plate에 3×10⁴ cells/well로 RAW 264.7 cell을 동일하게 분주하고 12시간 동안 부착 및 세포의 안정화를 유도한 후, phosphate buffered saline(PBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)에 용해한 ASE를 다양한 농도(31, 62, 125, 250, 500 및 1,000 µg/mL)로 DMEM 배지에 희석하여 plate에 첨가하였다. 24시간 배양한 후, 각 well에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약(5 mg/mL)을 30 µL씩 넣고 2시간 동안 CO₂ incubator에서 반응시킨 후 배양 상등액을 제거하였다. MTT 시약의 첨가에 의해 형성된 formazan의 녹이기 위하여, 각 well에 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co.) 100 µL를 첨가하고 30분 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 실험은 3 반복하여 평균값을 나타내었으며, control(medium only)의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

ASE의 nitric oxide(NO) 유도능 평가

세포배양용 48 well plate에 1×10⁵ cells/well로 RAW 264.7 cell을 분주하고 12시간 동안 방치한 후, PBS에 용해한 ASE를 다양한 농도(31, 62, 125 및 250 µg/mL)로 DMEM 배지에 희석하여 첨가하였다. 24시간 배양한 후 배양 상등액을 분리하고, 배양 상등액 100 µL에 동량의 Griess (Sigma-Aldrich Co.) 시약을 넣어 암실에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader(Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments GmbH, Salzburg, Austria)를 이용하여 517

nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO₂, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

ASE의 cytokine 분비 유도능

세포배양용 48 well plate에 1×10⁵ cells/well로 RAW 264.7 cell을 분주한 후, PBS에 용해한 ASE를 다양한 농도(31, 62, 125, 및 250 µg/mL)로 24시간 배양한 다음 세포 배양 상등액에서 cytokine(IL-6, TNF-α)의 함량을 측정하였다. Cytokine의 함량은 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit(eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. 이때 cytokine의 농도는 kit에 포함되어 있는 IL-6 및 TNF-α의 표준 용액으로부터 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

Western blot analysis

RAW 264.7 대식세포를 60 mm 세포 배양용 dish에 3×10⁵ cells/well의 농도로 분주하였고, 12시간 동안 세포를 부착시킨 후 250 µg/mL의 농도로 ASE를 처리하였다. ASE의 처리가 시간대별 면역 관련 단백질 발현 및 단백질들의 인산화에 미치는 영향에 관하여 관찰하기 위하여 ASE의 처리 시간을 10, 30 및 60분으로 각각 다르게 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 PBS로 3회 세척한 후 RIPA buffer(Cell Signaling, Danvers, MN, USA)를 첨가한 다음 14,000×g에서 25분간 원심분리 하고 cell lysate를 분리하였다. 분리된 cell lysate는 BSA를 표준물질로 하는 BCA protein detection kit(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 단백질 정량을 실시하였고, 20 µg의 cell lysate를 12% SDS-polyacrylamide gel에 각각 loading 하여 변성 분리하였다. 이 gel을 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane (Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA)으로 transfer 하였다. Transfer된 membrane은 anti-body의 비특이적 결합을 억제하기 위하여 blocking 용액(5% non-fat dry milk) 200 mL에서 1시간 동안 방치하였고, 이후 TBST(20 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였으며 iNOS, extracellular signal-regulated kinases(ERK), p-ERK, p38, p-p38, IκB-α, p-IκB-α의 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 희석하여 첨가한 후, 4°C에서 12시간 동안 over-night 하면서 반응시키고, TBST로 10분씩 5회 세척하였다. 다시 2차 항체(anti-mouse IgG, Calbiochem, San Diego, CA, USA)를 1:2,000으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후, 현상을 위하여 electro-chemiluminescence(ECL; peroxidase, substrate, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) reagent를 사용하여 인화하였다.

통계처리

모든 실험은 3번 이상 반복하여 평균값과 오차를 결과로

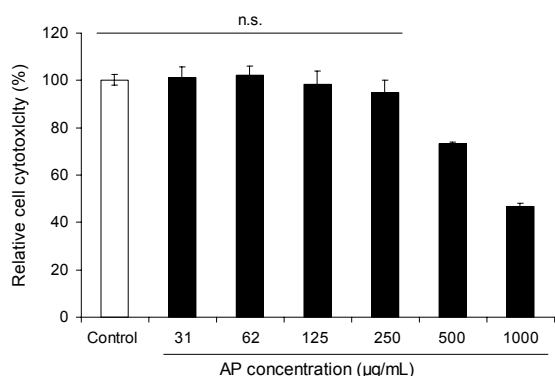


Fig. 1. Effect of apple seed extracts (ASE) on proliferation of RAW 264.7 macrophage cells. Dose-dependent effect (from 31 ~1,000 µg/mL) of ASE on proliferation was analyzed by MTT assay. The results are expressed as mean±SD (n=6). ns: no significance.

나타내었고, 이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Science(SPSS 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며, 시료간의 유의성은 Student's two tailed *t*-test로 $P \leq 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

ASE의 세포 생존율 평가

ASE가 대식세포의 면역조절에 미치는 영향을 평가하기 위한 최적 농도를 결정하기 위하여 먼저 ASE를 면역세포 (RAW 264.7)에 처리하여 ASE에 대한 면역세포의 세포 생존율을 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 1). ASE를 농도별(31, 62, 125, 250, 500, 1,000 µg/mL)로 처리하였을 때 비교적 높은 농도인 500과 1,000 µg/mL의 농도에 관해서는 각각 약 26% 및 54%로 세포 생존율을 억제시키는 것으로 관찰되었다. 그러나 250 µg/mL 이하의 농도에서는 세포 생존율의 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 ASE의 대식세포에 대한 면역조절능 평가에 대한 최적 농도를 250 µg/mL 이하로 선정하였으며, 이후 NO 및 cytokine (TNF-α, IL-6) 유도 분비능의 측정 시 250 µg/mL 이하의 농도를 사용하여 실험을 진행하였다.

ASE의 iNOS관련 NO 및 cytokine 유도능

ASE의 대식세포 면역조절능에 관하여 알아보기 위하여 대식세포인 RAW 264.7 세포에 ASE를 처리한 후, 세포 배양 상등액에서 NO 및 cytokine의 생성에 관하여 알아보았다. Fig. 2는 RAW 264.7 세포에 앞선 세포 생존율 실험에서 세포를 죽이지 않는 농도인 31, 62, 125, 250 µg/mL의 농도로 ASE를 처리하였을 때, NO의 분비능을 나타낸다. ASE를 대식세포에 처리하였을 때 iNOS의 활성뿐만 아니라 NO의 분비능은 농도 의존적으로 유의적($P \leq 0.05$)으로 증가하는 양상을 나타내었고, 최고 농도인 250 µg/mL에서 가장 높게

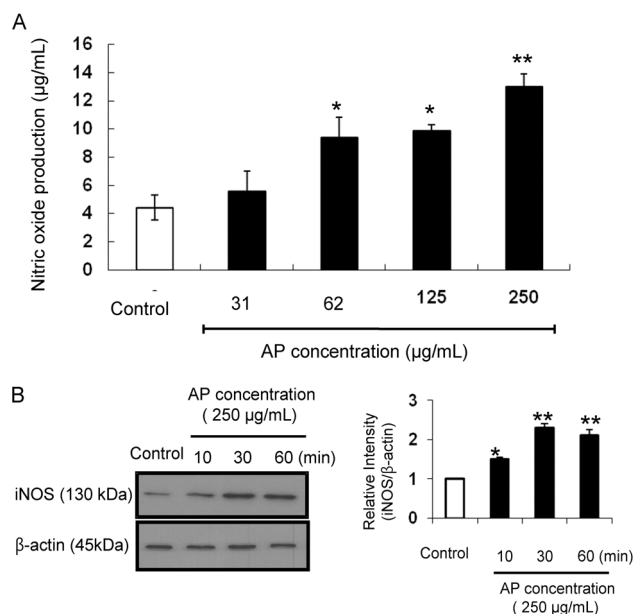


Fig. 2. Effect of apple seed extracts (ASE) on iNOS-mediated NO production of RAW 264.7 macrophage cells. (A) Dose-dependent effect of ASE (31~250 µg/mL) on NO production was analyzed by a Griess reagent assay. (B) Time-dependent effect of ASE (250 µg/mL) on iNOS release by western blotting. Relative band intensity of each protein was expressed. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group by unpaired Student's *t*-test.

증가되는 것으로 관찰되었다. 대식세포는 초기 면역 반응에서 중요한 역할을 수행한다. 비특이적(non-specific)인 항원이 생체에 침입하게 되면 대식세포가 이를 포식하고, 포식된 항원에 대한 정보를 면역 T cell에 제공하게 되어 세포성 면역 반응 일어난다. 따라서 대식세포의 활성화는 외부 병원성 미생물의 침입에 대한 초기면역 반응의 상승을 의미하므로 다양한 면역증강 후보물질들의 면역 활성 검색에서 대식세포의 활성화 여부를 주로 평가한다(15). 대식세포 활성화 지표 중의 하나인 NO는 cytokine이나 미생물의 영향을 받아 대식세포에서 생성되는 반응질소 중간체로서 nitric-oxide synthase(NOS)와 산소와 결합하여 L-알지닌을 산화시켜 NO가 생성된다. 생성된 NO는 세포 내 감염을 일으키는 미생물과 암세포를 제어하는 것으로 보고되어지고(16), NO가 필요 이상 생성되면 혈관확장, 염증반응에 의한 조직 손상, 돌연변이, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체 내 유해한 작용을 나타내는 것으로도 알려져 있다(17-19). 이렇듯 NO는 이중적 성질을 가지고 있어 대식세포의 면역반응 조절연구에 많이 이용되고 있다(20-22). 따라서 약물처리 시 세포독성을 유발하지 않는 농도에서 NO 생성을 촉진하면 면역기능을 증가시키는 것으로 판단할 수 있다. 본 연구에서도 ASE를 처리 최고 농도인 250 µg/mL로 처리하였을 때 세포독성이 나타나지 않았고, NO 분비능이 증가되는 것으로 관찰되어 ASE는 대식세포에 대하여 면역기능을 증가시킨 것으로 사료된다.

Fig. 3은 ASE의 대식세포에 대한 cytokine 분비 유도능

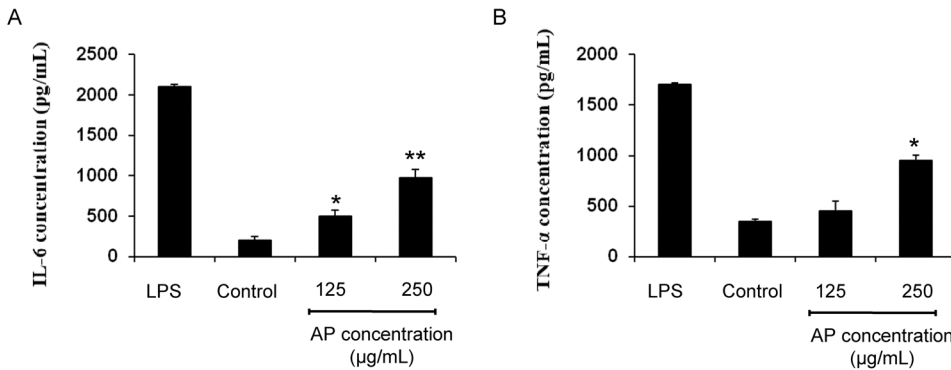


Fig. 3. Effect of apple seed extracts (ASE) on cytokine release (A, IL-6; B, TNF-α) of RAW 264.7 macrophage cells. The results are expressed as mean±SD (n=4). *P<0.05, **P<0.01 vs. control group by unpaired Student's *t*-test.

에 관하여 나타낸다. ASE를 125 및 250 μg/mL의 농도로 처리하여 대식세포의 배양 상등액에서 cytokine(IL-6, TNF-α)의 함량을 측정된 결과, 처리 농도 의존적으로 cytokine의 분비능이 증가하는 것으로 관찰되었다. 대식세포는 면역반응에 있어서 중추적인 역할을 수행한다. 일반적으로 활성화되지 않은 대식세포는 생체 내 미생물 및 바이러스에 감염된 세포를 제거하는데 효과적이지 않다(23). 그러나 대식세포의 활성화가 일어나면 미생물 및 바이러스에 감염된 세포를 제거하는 능력이 크게 증가하게 된다(24). 여기에서 대식세포의 활성화를 일으키는 신호전달을 매개하는 물질이 cytokine이다. 따라서 대식세포가 분비하는 cytokine의 함량을 측정하여 대식세포의 활성화 정도를 예측할 수 있다. 본 연구에서도 ASE를 대식세포에 처리하였을 때 IL-6 및 TNF-α의 함량이 증가하는 것으로 보아 ASE의 처리는 대식세포의 활성화를 유도하는 능력을 갖는 것으로 사료된다.

ASE의 처리가 MAPKs 및 IκB의 인산화에 미치는 영향

상기 실험 결과에서 ASE의 처리는 대식세포를 활성화 시

켜서 NO 및 cytokine(TNF-α, IL-6)의 함량을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 대식 세포의 활성화가 어떠한 면역 기전을 통하여 일어나는 가를 알아보기 위하여 면역 및 염증 시 주로 활성화되는 신호 전달 체계인 MAPK 및 IκB-α의 인산화에 대하여 알아보았다(Fig. 4). 그 결과, 대식세포에 ASE를 250 μg/mL로 처리하고 시간대(10, 30 및 60 min)별 MAPKs(ERK, p38) 및 IκB-α의 인산화 정도를 관찰한 결과, ASE의 처리는 MAPKs(ERK, p38) 및 IκB-α의 인산화를 증가시키는 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

면역(염증)반응이 시작되면 세포 내 신호전달에 관여하는 MAPKs(ERK, p38)의 활성화가 일어나고, 핵 안으로 이동하여 핵 내의 다른 면역 활성인자를 인산화 시키고, cytokine 생성에 관여한다(23). 현재까지 잘 알려진 MAPK로는 ERK 1/2, p38, JNK이 있다(25,26). NF-κB는 염증 반응, 면역 반응 등에 다양한 유전자 발현에 관여하는 전사 인자이다. 정상적으로는 NF-κB는 세포질에서 inhibitory kappaB (IκB) 단백질과 결합되어 있다. NF-κB가 면역 활성인자에 의해 자극을 받게 되면 IκB-α가 인산화 되고, NF-κB와

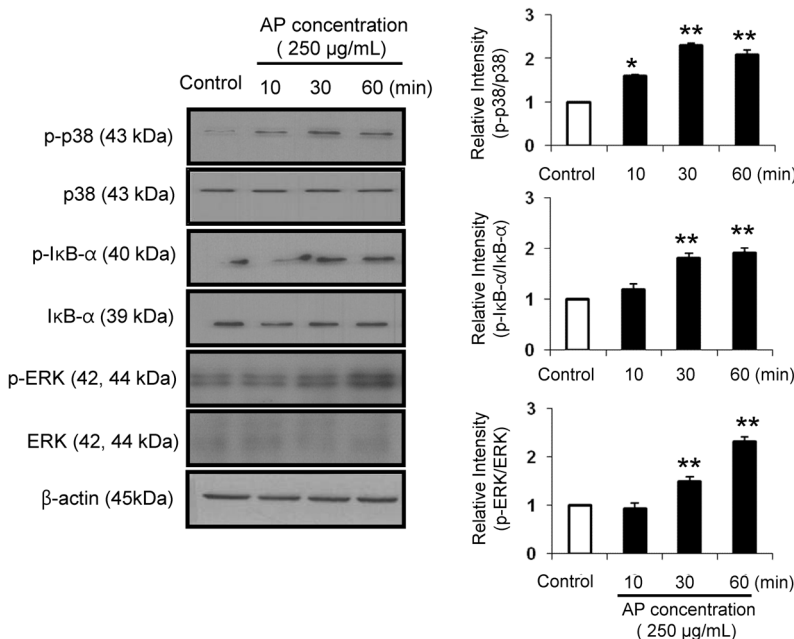


Fig. 4. Effect of apple seed extracts (ASE) on NF-κB and MAPK signaling. Immunoblot analysis was performed using specific antibodies to phospho-p38 (p-p38), p38, phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), ERK1/2, phospho-IκB-α (p-IκB-α), and IκB-α. The results shown are representative of 3 experiments conducted under each condition. The data are shown as mean±SD (n=3) values. Relative band intensity of each protein was expressed. Statistical significance (*P<0.05, **P<0.01) was indicated for ASE versus control group.

분해가 되면서 NF- κ B는 핵 내로 이동하여 iNOS, cytokine 등 여러 면역(염증)성 매개체의 유전자 발현을 유도한다(27). 그리하여 NF- κ B 활성화는 I κ B- α 의 분해를 통해 알 수가 있는 것이다. 본 연구에서 ASE의 처리는 MAPKs의 인산화 증가시키고, NF- κ B의 활성을 유도하는 전 단계인 I κ B- α 의 인산화 또한 증가시키는 경향을 나타냈으며(Fig. 3), 이를 통하여 cytokine 생성 및 iNOS의 발현을 통한 NO의 생성을 유도한 것으로 사료된다. 따라서 이러한 결과로 미루어 보아 ASE에 의한 대식세포의 활성화 유도는 MAPKs의 pathway를 경유하고, I κ B- α 의 pathway를 통하여 이루어지는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 사과씨로부터 추출한 사과씨 에탄올 추출물이 1차 면역세포인 대식세포의 면역기능에 관하여 면역기능을 증가시켜 줄 수 있는지에 관한 여부를 알아보기 위하여 수행되었다. 사과씨 추출물을 마우스 유래의 대식세포인 RAW 264.7 세포에 처리하였을 때, 대식세포의 활성화 관련 지표인 nitric oxide와 cytokine(IL-6, TNF- α)의 생성이 증가되었다. 이러한 결과는 사과씨 추출물이 대식세포의 활성화에 크게 영향을 줄 수 있다는 가능성을 제시하고, 이러한 사과씨 추출물이 대식세포의 면역 활성을 유도하는 신호전달 과정에 관하여 연구해 본 결과, 사과씨 추출물의 처리는 대식세포 내 MAPKs(ERK, p38) 및 I κ B- α 의 인산화를 증가시키는 신호전달 과정을 경유하는 것으로 관찰되었다.

REFERENCES

- Rimm EB, Ascherio A, Giovannucci E, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. 1996. Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *JAMA* 275: 447-451.
- WHO. 2009. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. Fact sheet N 317.
- Liu YJ. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106: 259-262.
- Salazar-Mather TP, Hokeness KL. 2003. Calling in the troops: regulation of inflammatory cell trafficking through innate cytokine/chemokine networks. *Viral Immuno* 16: 291-306.
- Belardelli F. 1995. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Apmis* 103: 161-179.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287-306.
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. 2003. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 42: 1149-1160.
- Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. 2000. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* 13: 49-54.
- Wolfe K, Wu X, Liu RH. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 51: 609-614.
- Akiyama H, Sakushima J, Taniuchi S, Kanda T, Yanagida A, Kojima T, Teshima R, Kobayashi Y, Goda Y, Toyoda M. 2000. Antiallergic effect of apple polyphenols on the allergic model mouse. *Biol Pharm Bull* 23: 1370-1373.
- Kojima T, Akiyama H, Sasai M, Taniuchi S, Goda Y, Toyoda M, Kobayashi Y. 2000. Anti-allergic effect of apple polyphenol on patients with atopic dermatitis: A pilot study. *Allergol Int* 49: 69-73.
- Miura D, Miura Y, Yagasaki K. 2007. Effect of apple polyphenol extract on hepatoma proliferation and invasion in culture and on tumor growth, metastasis, and abnormal lipoprotein profiles in hepatoma-bearing rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2743-2750.
- Pearson DA, Tan CH, German JB, Davis PA, Gershwin ME. 1999. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sci* 64: 1913-1920.
- Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y. 2007. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J Agric Food Chem* 55: 4604-4609.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 230: 70-76.
- Gao X, Bjork L, Trajkovski V, Uggla M. 2000. Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J Sci Food Agric* 80: 2021-2027.
- Flurkey WH. 1991. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J Food Sci* 56: 93-95.
- Jung DW, Park SI. 2005. Effect of green tea powder on the growth inhibition of oral bacteria in yoghurt. *Korean J Food Sci Ani Resour* 25: 500-506.
- Jung, SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 135-140.
- Moon GS, Ryu BM, Lee MJ. 2003. Components and antioxidative activities of *buchu* (Chinese chives) harvested at different times. *Korean J Food Sci Technol* 35: 493-498.
- Osawa T. 1994. Novel natural antioxidant for utilization in food and biological system. In *Postharvest Biochemistry of Plant Food Material in the Tropics*. Uritani I, Garcia VV, Mendoza EM, eds. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan. p 241-251.
- Brewer MS, Ikins WG, Harbers CAAZ. 1992. TBA values, sensory characteristics, and volatiles in ground pork during long-term frozen storage: Effects of packaging. *J Food Sci* 57: 558-563.
- Lee BM, Kim HI. 1996. Stevioside, a natural sweetener: Is it safe? *J Food Hyg Safety* 11: 323-327.
- Shin SE, Kim MK. 2004. Effect of dried powders or ethanol extracts of garlic flesh and peel on antioxidative capacity in 16-month-old rats. *Korean J Nutr* 37: 633-644.
- Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
- Kim NY, Kim YK, Bae KJ, Choi JH, Moon JH, Park GH, Oh DH. 2005. Free radical scavenging effect and extraction condition of ethanol extracts and fractions of wild grape seed (*Vitis coignetia*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 755-758.