

치마버섯을 이용한 진피 발효 배양물의 항산화 및 항염 효과

송민현[†] · 배준태 · 고현주 · 장용만* · 이종대* · 이근수 · 표형배

한불화장품(주) 기술연구소, *(주)큐젠바이오텍
(2011년 10월 18일 접수, 2011년 11월 11일 수정, 2011년 11월 15일 채택)

Anti-Oxidant Effect and Anti-Inflammatory of Fermented *Citrus unshiu* Peel Extract by using *Schizophyllum commune*

Min Hyeon Song[†], Jun Tae Bae, Hyun Ju Ko, Yong Man Jang*, Jong Dae Lee*,
Geun Soo Lee, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center Hanbul Cosmetics Co. Ltd., 72-7 Yongsung-ri, Sansung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-834, Korea
*Quegen Biotech

(Received October 18, 2011; Revised November 11, 2011; Accepted November 15, 2011)

요약: 감귤은 국내 및 동남아시아 지역에서 많이 즐기는 식품 중 하나이며, 이러한 감귤류의 껍질을 건조시킨 것을 진피라고 한다. 이러한 진피는 한방에서는 이뇨작용, 비장기능을 강화하는 것으로 알려져 있으나, 천연 플라보노이드를 다량 함유하고 있어 학계에서 여러 분야로 연구가 되고 있는 실정이다. 본 연구에서는 플라보노이드 배당체를 함유한 진피 추출물을 β -glucosidase 효소를 이용하여 아글리콘(aglycone)으로 변환 할 수 있도록 치마버섯 배양을 실시하였다. 진피 발효 배양액을 HPLC를 이용하여 분석하였으며, UVA에 의한 광손상 보호능을 섬유아세포를 이용하여 측정하였다. 진피 발효 배양액은 COX-2, LOX-5와 같은 항염증 관련 대사에도 관여하여 염증완화에도 도움을 줄 수 있음을 확인하였다. 또한 각질 형성세포를 이용한 interleukin-1 α 를 측정한 결과 진피발효배양액 처리군의 저해활성이 더 높았다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 진피발효 배양액은 피부에 대한 항염 및 항산화 효과가 우수한 것으로 사료된다.

Abstract: *Citrus unshiu* (*C. unshiu*) Markovich were dried peel of mandarin orange, of which fresh fruit was one of the famous foods in Korea and Eastern Asia. In the oriental medicine, *C. unshiu* peel was known to have a diuretic effect and to strengthen spleen function. Recently, natural flavonoids of *C. unshiu* peel have been investigated. In this study, *C. unshiu* peel extract containing flavonoid-glycosides was cultured with *Schizophyllum commune* (*S. commune*) mycelia producing β -glucosidase and its biological activities were investigated. β -glucosidase of *S. commune* mycelia converted the flavonoid-glycosides (rutin and hesperidin) into aglycones (naringenin and hesperetin). Fermented *C. unshiu* peel extract compounds were analyzed by HPLC system. The photoprotective potential of fermented *C. unshiu* peel extract was tested in human dermal fibroblasts (HDFs) exposed to UVA. Fermented *C. unshiu* peel extract also showed notable *in vitro* anti-inflammatory effect on cellular systems generating cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) metabolites. Also, UVB-induced production of interleukin-1 α in human HaCaT cells was reduced in a dose-dependent manner by treatment with fermented *C. unshiu* peel extract. These results suggest that fermented *C. unshiu* peel extract may mitigate the effects of photoaging in skin by reducing UV-induced adverse skin reaction.

Keywords: anti-oxidant, anti-inflammatory, *Citrus unshiu* peel, *Schizophyllum commune*

1. 서 론

감귤은 가장 인기 있는 과일 중 하나로 예로부터 감귤 껍질을 건조시킨 것을 진피라고 하여 기가 멍친 것을 풀어주고 비장 기능을 강화시켜 메스꺼움, 소화불량, 해수, 가래를 없애주면 이뇨작용의 효과가 있어서 한약재로 사

[†] 주 저자 (e-mail: 207110631@hanbul.co.kr)

용되어 왔다[1]. 특히, 식물에서 진피는 천연 플라보노이드를 유발시키는 풍부한 자원으로 활용되고 있다[2]. 또한, 진피에는 카로티노이드류, 바이오플라보노이드류, 펙틴 및 테르펜류가 풍부하게 함유되어 있으며, 고혈압 예방 등의 다양한 생리활성 작용이 보고되고 있다[3-5]. 감귤류 유래 주요 플라보노이드 화합물로 naringin과 hesperidin, 그리고 이들의 비배당체 형태인 naringenin과 hesperetin 등이 있으며, 특히 naringin의 항산화, 지질과산화 예방 및 항 돌연변이 활성 등의 약리 효과가 보고되었다[6,7].

지금까지 자유 라디칼을 제거하기 위해 butylated hydroxyanisole (BHA) 및 butylated hydroxy toluene (BHT) 등의 합성 항산화제가 개발되어 식품, 화장품 등에 산화방지제로 많이 사용되어 왔으나 안전성에 논란이 있어 허용대상 식품이나 사용량이 엄격히 규제되고 있으므로 보다 안전하고 강한 산화제의 개발이 요구되어진다[8]. 피부에 햇빛으로부터 자외선이 조사되면 염증 등의 다양한 질환이 유발되며, 자외선 등의 원인 불명의 항원에 의해 세포 내 존재하는 다양한 염증유발인자들의 발현이 증가하면서 염증을 일으킨다. 대표적으로 prostaglandin (PG) 생합성을 촉매하는 COX-2는 염증반응에서 중요한 매개체로 알려져 있다. Cyclooxygenase-2 (COX-2)는 발현에 의해 tumor growth factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) 등의 다양한 growth factor들의 발현에 영향을 끼친다. PGE₂의 발현을 유도하는 또 다른 염증매개체인 5-lipoxygenase (5-LOX)는 정상적인 세포에서는 발현이 미비하지만, 염증이 유발되면 leukotrienes 물질의 증가로 인해 활성을 나타내는 것으로 보고되었다[9,10]. 이에 다양한 천연물 및 배양물의 연구가 이루어지고 있으며 다양한 생리활성을 통한 기능성 화장품 소재로서의 연구가 활발히 진행 중이다.

최근 다양한 생합성 성분을 이용하여 배당체를 비배당체로 생물 전환시켜 생리활성을 향상시키는 연구가 이루어지고 있다[11]. 비배당체로의 전환은 기존보다 향상된 생리활성을 가지는 결과가 보고되고 있다. 본 연구에서는 진피를 이용한 발효 배양물을 제조하여 항산화 효과 및 항염 효과를 측정하여 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide (MTT), nitroblue tetrazolium (NBT), BHT, phosphate buffered saline (PBS), linoleic acid, lipooxygenase (preparation type V, from soybean), nordihydroguaiaretic acid (NDGA) 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한, COX-2는 Cayman Chemical Co. (USA)에서 구입 후 사용하였다. 실험에 사용된 진피(*C. unshiu peel*)는 제주도 (주)해이래로부터 공급을 받았으며, 치마버섯(*Schizophyllum commune*)은 (주)큐젠바이오텍으로부터 분양을 받아 사용하였다. 진피추출물과 진피발효물의 활성 성분을 확인하기 위하여 Waters사의 2695 system을 이용하였으며, PDA 검출기기는 동일 제조사의 996 검출기를 이용하였다.

2.2. 진피 추출 및 발효

본 실험에서 사용된 진피는 건조된 것을 믹서에 분쇄시킨 후 사용되었다. 진피를 이용해 열수추출 시 용매로는 증류수를 이용하여 10 wt%의 농도로 80 °C에서 4 h 동안 추출한 후 여액을 여과 후 받아냈다. 진피추출물을 기질(substrate)로 하여 종균배양(seed culture)된 치마버섯 균사체를 5 wt% 농도로 접종시킨 후, 진탕배양기에서 27 °C, 150 rpm에서 5일간 배양하였다. 그 후 감압, 농축, 동결 건조한 뒤 그 분말을 사용하였다.

2.3. 세포 독성 평가

세포 실험에 대한 시료의 적정 처리농도를 결정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 간단히 요약하면, 섬유아세포(human dermal fibroblasts, HDFs)를 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 24 h 동안 배양시킨다. 세포를 PBS로 세척 후 샘플을 세포독성 농도부터 2배씩 희석하여 처리한 후 48 h 동안 5 % CO₂ 배양기에 배양한다. 배지를 제거 후 MTT 용액을 첨가한 후 2 hr 동안 배양 후 배지를 제거한 후 isopropanol-HCl (0.04 N)을 첨가한다. 5 min 동안 shaking하여 세포를 용해시키고 microplate reader 565 nm에서 광학밀도를 측정하였다.

2.4. 항산화 효과

2.4.1. Superoxide Radical 소거 활성

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법에 의해 측정하였다[18]. 0.05 M Na₂CO₃ buffer

(pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 진피배양액을 배양시간에 따른 샘플을 가한 후 25 °C에서 10 min간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/mL xanthine oxidase를 가하고 25 °C에서 25 min 동안 반응 후 superoxide radical 소거효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4.2. 자유 라디칼 소거 활성

피부 세포 내 항산화효과를 측정하기 위해 섬유아세포를 60 ϕ plate에 분주하여 배양하고 샘플을 처리 후 4 h 뒤 자외선을 UVB 20 mJ/cm² (UVBG15T8E, Sankyo-Denki, Japan)로 조사하여 세포 내 라디칼을 생성시켰다. 프리라디칼생성 정도를 알 수 있는 형광물질(CM-DCFDA)을 처리한 후 37 °C에서 반응시키고 FACS를 이용하여 DCF fluorescence intensity (FL-1,530 nm)를 측정하였다.

2.5. 항염효과

2.5.1. Interlukin-6 생성저해효과

각질형성세포를 자외선 조사기(UVB G15T8E, Sankyo Denki, Japan)로 10 mJ/cm² 세기로 조사한 후 serum free DMEM 배지를 500 mL 첨가하고 샘플을 농도별로 첨가하였다. 24 h 동안 배양 후 배양상등액을 well plate에 4 °C에서 코팅한다. 3 % BSA로 37 °C 2 h 동안 blocking하고 primary antibody (anti-human IL-6) in PBS-T를 첨가하여 37 °C에서 90 min 동안 반응시킨다. 세척 후 secondary antibody (Goat anti-mouse IgG conjugated with peroxidase)를 첨가하고 90 min 동안 37 °C 반응시킨 후 TMBZ 기질용액을 첨가하여 발색시켜 흡광도를 측정하였다.

2.5.2. 5-Lipoxygenase (5-LOX)

활성 저해 효과 본 실험에 사용된 5-LOX 활성 저해 실험은 등의 실험방법을 변형하여 이용하였다[12]. 간단히 요약하면, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.6) 3 mL, 10,000 units/mL 5-lipoxygenase 60 μ L 및 샘플 100 μ L를 혼합한 후 실온에서 5 min간 반응시킨다. 그 후 3 mM Linoleic acid (Sigma) 100 μ L를 첨가한 후 다시 실온에서 5 min간 반응시킨다. 측정은 234 nm의 파장에서 UV spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 양성 대조군은 NDGA를 사용하였다. 측정 후 저해율(%)은 다음과 같은 식에 의해 나타내었다.

$$\text{저해율 (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도 값} - \text{샘플의 흡광도 값}}{\text{대조군의 흡광도 값}} \times 100$$

2.5.3. Cyclooxygenase-2 (COX-2) 저해 효과

COX-2 억제효능은 Reddy 등의 방법을 변형하여 *in vitro*에서 수행하였다[13]. 96 well plate에 40 units/mL의 COX-2를 40 μ L씩 넣고, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 90 μ L, 30 μ M EDTA 20 μ L, 150 μ M hematin 20 μ L 그리고 샘플 20 μ L를 혼합하여 25 °C에서 5 min간 반응시키고 5 mM TMPD 5 μ L와 20 mM 아라키돈산 5 μ L를 첨가하여 25 °C에서 5 min간 반응시킨 후 ELISA를 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. COX 억제율(%)은 다음과 같은 식을 이용하여 IC₅₀ 값으로 나타내었으며 양성대조군으로 EGCG를 사용하였다.

$$\text{COX 억제율 (\%)} =$$

$$\frac{\text{대조군의 흡광도 값} - \text{실험군의 흡광도 값}}{\text{대조군의 흡광도 값}} \times 100$$

2.6. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

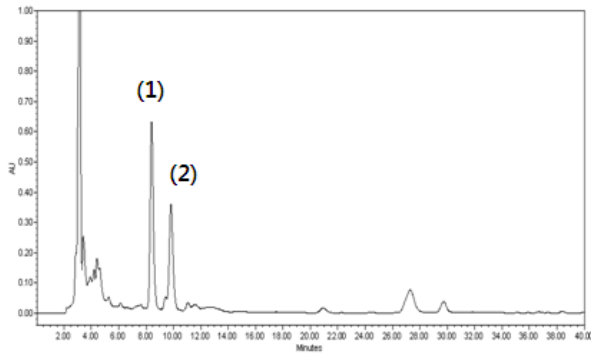
3. 결과 및 고찰

3.1. 진피추출물 및 진피발효물의 HPLC 분석 결과

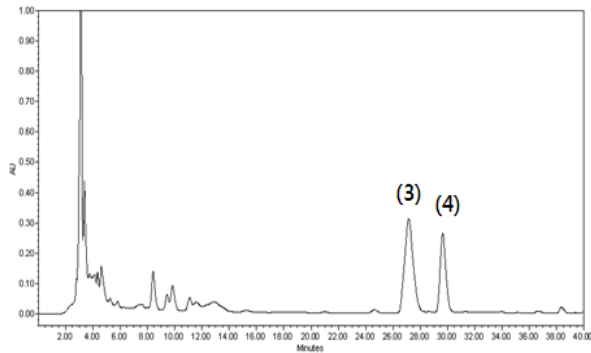
진피 추출물의 치마버섯 배양을 통한 생물전환에 대한 확인을 위하여 HPLC로 측정하였다. Figure 1a의 경우 보존 시간을 5 min과 8 min, 10 min에서 peak를 확인할 수 있었으며, 그 이외에는 다른 피크를 확인할 수 없었으나 치마버섯의 발효배양 이후에는 추출물에서 볼 수 있었던 peak들이 모두 없어지거나 혹은 그 양이 줄어든 것을 확인할 수 있었으며(Figure 1b), 오히려 추출물에 존재하지 않았던 27, 30 min의 보존 시간에서 새로운 peak가 형성됨을 확인할 수 있었다. 이는 주로 배당체 형태의 플라보노이드류가 치마버섯의 효소 작용을 통하여 당 성분이 떨어져 아글리콘 형태로 변환되었다는 것을 추측할 수 있다.

3.2. 진피발효물의 세포독성능 평가

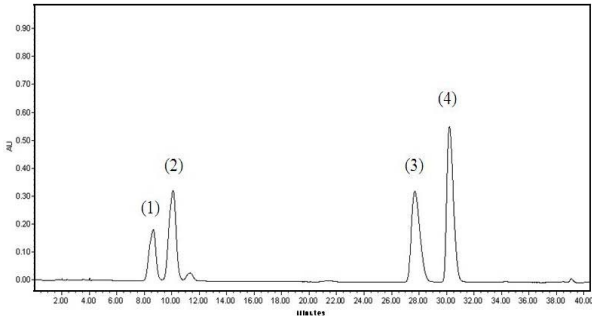
진피발효물의 농도별 세포독성을 평가해본 결과 Figure 2에서 최저 농도인 0.05 mg/mL의 경우 97 % 이상의 세포 생존률을 보이며, 최대 농도인 5 mg/mL의 경



a) *C. unshiu* peel extract



b) fermented *C. unshiu* peel extract



c) standard material

Figure 1. The changes in (1) narirutin, (2) hesperidin, (3) naringenin (4) hesperetin during fermentation of *C. unshiu* peel extract with *S. commune* for 5 days. HPLC profile with PDA detector at 285 nm. Extra column and gradient condition methanol : H₂O = 7 : 3 in zero to methanol : H₂O = 3 : 7 in 40 min. Standards were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

우에도 80 % 이상의 세포 생존률을 보인 것을 확인할 수 있었으며, 이는 진피발효물의 안전성을 확인할 수 있는 결과이다.

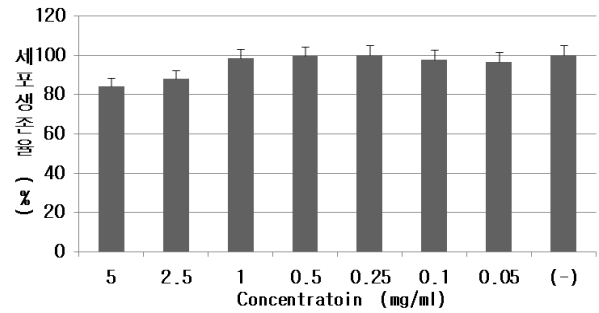


Figure 2. Toxicity in the cell of fermented *C. unshiu* peel.

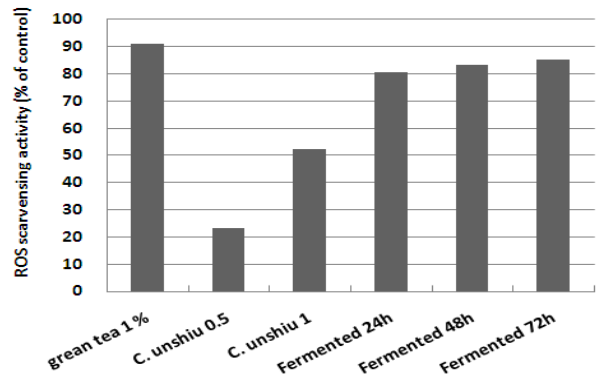


Figure 3. NBT assay of *C. unshiu* peel and fermented *C. unshiu* peel.

3.3. 진피발효물의 항산화력 측정

진피추출물과 진피발효물의 NBT assay를 측정해본 결과, 양성 대조군인 녹차 추출물의 경우 1 mg/mL의 농도에서 91 %의 활성산소 제거능을 나타내었으며, 녹차추출물의 경우에는 그 활성이 매우 낮아 20 %를 약간 넘는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3). 그에 반해 치마버섯을 이용한 진피 발효추출물 10 wt%의 경우 배양 시간에 비례하여 활성산소 제거능이 점점 증가함을 확인할 수 있으며, 배양 48 h 이후에서는 80 % 이상의 우수한 활성산소 제거능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 진피발효물의 높은 항산화력을 확인할 수 있었다.

진피발효물의 피부 세포 내 항산화효과를 측정하기 위해 섬유아세포를 분주하여 배양하고 샘플을 처리 후 4 h 뒤 자외선을 UVB 20 mJ/cm²로 조사하여 세포 내 라디칼을 생성한 뒤 형광 강도를 측정된 결과, 진피발효물은 대조군에 비해 매우 낮은 값을 확인할 수 있었으며, 농도의존적으로 항산화 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4).

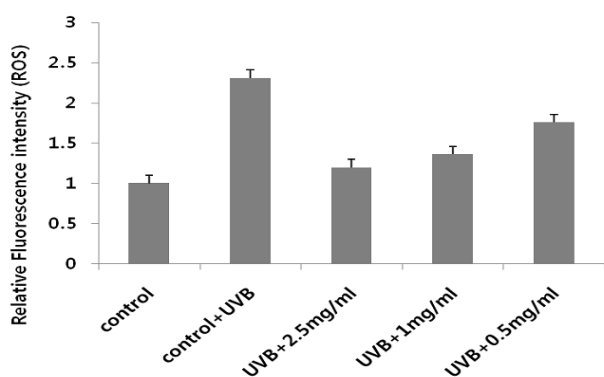


Figure 4. ROS activity of fermented *C. unshiu* peel in cells.

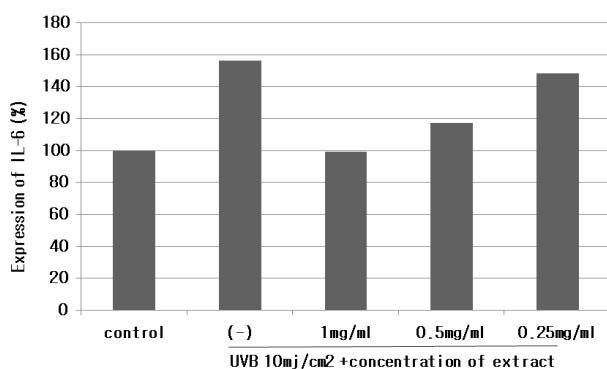


Figure 5. Anti-inflammatory effect of fermented *C. unshiu* peel.

3.4. 진피발효물의 항염 효과 측정

염증성 사이토카인 생성 억제 효과를 측정하기 위하여 각질형성세포를 자외선 조사기로 10 mJ/cm² 세기로 조사한 후 serum free DMEM 배지를 500 μL 첨가하여 IL-6의 분비량을 측정하여 염증성 사이토카인인 IL-6에 대한 억제율을 측정하여 염증 기전에 대한 효과를 측정하였다(Figure 5). 그 결과 진피발효물의 농도의존적으로 IL-6의 발현량이 감소함을 확인할 수 있었으며 1 mg/mL의 농도로 시료를 처리하여 측정하였을 때는 대조군과 유사한 IL-6 발현량을 나타내어 염증 발현을 감소시킬 수 있는 소재로 충분히 가능성이 있을 것으로 사료된다.

진피발효물의 5-LOX 저해율을 측정한 결과, 양성 대조군인 NDGA의 IC₅₀ 값은 21.3 mg/mL이었으며, 진피추출물의 경우에는 NDGA에 비해서는 다소 낮으나 5-lipoxygenase 저해 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 진피 발효 배양액의 배양 시간별 5-LOX 측정 결과 배양 시간이 지날수록 저해효과가 증가하는 것을 확

Table 1. Inhibitory Effects of 5-LOX and COX-2 in *C. unshiu* Peel and Fermented *C. unshiu* Peel

	IC ₅₀ (μg/mL)	
	5-lipoxygenase	Cyclooxygenase-2
Control	NDGA*	21.3 ± 2.15
	EGCG*	71.8 ± 0.72
Extract <i>C. unshiu</i> peel		105.8 ± 3.3 / 277.2 ± 5.2
Fermented <i>C. unshiu</i> peel	24 h	89.23 ± 2.21 / 211.99 ± 4.21
	48 h	85.11 ± 3.91 / 189.18 ± 6.19
	72 h	56.97 ± 3.19 / 144.96 ± 4.01
	96 h	52.09 ± 4.24 / 141.32 ± 3.44

NDGA : Nor-dihydroguareatic acid (standard control of 5-LOX)
EGCG : Epigallocatechin gallate (standard control of COX-2)

인할 수 있으며, 배양 72 h 이후부터는 저해 효과가 유사한 것으로 나타났다. 이는 배양 시간이 증가함에 따라 생물전환되어 아글리콘이 생성되어 5-LOX 저해에 영향을 주는 물질을 생성하는 것으로 사료된다.

COX-2 저해율을 측정한 결과에서도 5-LOX와 유사한 경향을 나타내었으며, 양성 대조군인 EGCG보다는 다소 낮으나 이 역시 COX-2를 저해하는 물질이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 배양 시간별로 보았을 경우에도 배양 시간이 증가함에 따라 저해율이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 진피발효물을 통한 생물전환이 진피 추출물 내부의 활성물질을 변화시킬 수 있다는 것을 간접적으로 유추할 수 있다.

4. 결 론

국내 및 동남아시아에 서식하는 감귤 과육의 경우 식품 혹은 그 가공품으로 많은 이용이 되고 있다. 그러나 그 껍질인 진피의 경우 다른 산업으로의 이용이 매우 미비한 실정임으로 매년 폐기되는 진피를 추출 및 발효를 이용하여 산업적 이용이 필요한 실정이다.

본 실험에서는 담자균류인 치마버섯 균사체를 이용하여 발효 배양한 결과 배양 시간이 지남에 따라 진피추출물 내 플라보노이드 배당체가 아글리콘 화합물로 생물전환되어, 진피추출물의 미비한 항산화 및 항염증 효과를 증대시킬 수 있음을 확인하였다. 이러한 진피를 한방 혹은 민간요법, 식용으로 뿐만 아니라 발효 배양을 이용하여 그 효과가 증대되므로 이를 의약이나 화장품 분야에

서도 이용가능성을 높일 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부에서 시행한 “지역전략기획기술 개발사업(과제번호 : 70007145)”의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. S. H. Kang, Y. J. Lee, C. H. Lee, S. J. Kim, D. H. Lee, Y. K. Lee, and D. B. Park, Physiological activities of peel of Jeju-indigenous *Citrus sunki* Hort, Tanaka, *Kor. Food Sci. Technol.*, **37**, 983 (2005).
2. X. Yang, S. M. Kang, B. T. Jeon, Y. D. Kim, J. H. Ha, Y. T. Kim, and Y. J. Jeon, Isolation and identification of an antioxidant flavonoid compound from citrus-processing by-product, *J. Sci. Food Agric.*, **91**, 1925 (2011).
3. M. Moresi, F. Clementi, J. Rossi, R. Medici, and L. Vinti, Production of biomass untreated orange peel by *Fusarium avenaceum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 37 (1987).
4. S. Kamiya and S. Esaki, Recent advances in the chemistry of the citrus flavonoids, *Nippon. Shokuhin. Kogyo Gakkaishi*, **18**, 38 (1971).
5. M. T. Monforte, A. Trovato, S. Kirgavanien, A. M. Forestieri, E. M. I. Galati, and R. B. Curto, Biological effects on hesperidin a citrus flavonoid hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat, *Famco.*, **50**, 595 (1995).
6. P. P. M. Mouly, C. G. Arzouyan, E. M. Gaydou, and J. M. Estienne, Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 70 (1994).
7. E. P. Guengerich and D. M. Kim, *In vitro* inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids, *Carcinogenesis*, **11**, 2275 (1990).
8. S. Y. Choe and K. H. Yang, Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA), *Korean J. Hood Sci. Technol.*, **12**, 283 (1982).
9. J. M. Jeong, Antioxidative and antiallergic effects of aronia (*Aronia melanocarpa*) extract, *Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**, 1109 (2008).
10. M. J. Kim, J. R. Im, and K. S. Yoon, Anti-inflammatory effects of prescription extracts containing *Forsythia viridissima* L., *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**, 277 (2009).
11. J. H. Kim, J. T. bae, M. H. Song, G. S. Lee, S. Y. Choe, and H. B. Pyo, Biological activities of *Fructus Arctii* fermented with the *Bacidiomycete Grifola frondosa*, *Arch. Pharm. Res.*, **33**, 1943 (2010).
12. Y. Frum and A. M. Viljoen, *In vitro* 5-Lipoxygenase of south african medicinal plants commonly used topically for skin diseases, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **19**, 329 (2006).
13. C. M. Reddy, V. B. Bhat, G. Kiranmai, N. M. Reddy, P. Reddanna, and K. M. Madyastha, Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277**, 599 (2000).