

## 홍화자와 두충 혼합 추출물이 MG-63 조골세포의 Alkaline Phosphatase 활성에 미치는 영향

심재근<sup>1</sup> · 이재혁<sup>2</sup> · 여명구<sup>3</sup> · 박정숙<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>㈜참든마을, <sup>2</sup>남부대학교 한방제약개발학과, <sup>3</sup>남부대학교 대체의학과

### Effects of Alkaline Phosphatase Activity on the Extract of Carthami Semen and Eucommiae Cortex in Human Osteoblast-like MG-63 Cell Line

Jae-Geun Sim<sup>1</sup>, Jae-Hyeok Lee<sup>2</sup>, Myeong Gu Yeo<sup>3</sup> and Jeong-Suk Park<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Chamden Co., Gwangju 506-606, Korea

<sup>2</sup>Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Gwangju 506-606, Korea

<sup>3</sup>Department of Alternative Medicine, Nambu University, Gwangju 506-606, Korea

#### Abstract

*Carthamus tinctorius* L. and *Eucommia umoides* Oliver are often used in traditional herbal medicines for reducing damage to the liver, kidney, bone and muscle. In the present study, we investigated cell viability and alkaline phosphatase activity in the human osteoblast-like MG-63 cell line with methanol extracts of Carthami Semen (CS) and Eucommiae Cortex (EC) alone or in a mixture (CS+EC). Osteoblast cell viability was evaluated using the MTS assay and alkaline phosphatase activity assays. The cell viability and alkaline phosphatase activity significantly increased in MG-63 osteoblast cells treated with the CS+EC mixture. These findings suggest the CS+EC mixture may have beneficial effects on bone health through the proliferation of osteoblast cells.

**Key words :** Human osteoblast-like MG-63 cell line, *Carthamus tinctorius* L., *Eucommia umoides* Oliver, MTS assay, alkaline phosphatase activity.

#### 서 론

골절 골다공증 등의 골 질환 치료제로 쓰여 오고 있는 홍화자(carthami semen)는 홍화(*Carthamus tinctorius* L.)의 씨로, 주성분은 불포화지방산인 linoleic acid가 70~80%에 이르며(Kim *et al* 1998, Seo *et al* 2000), 식물성 에스트로겐 성분으로 폴리페놀화합물인 lignan류, flavonoids류와 serotonin 유도체를 다량 함유하고 있다(Jang JH 2006). 특히 linoleic acid와 같은 불포화지방산에 의한 골밀도와 골 대사에 미치는 영향이 보고되었으며(Kelly O 2003), Rhyu *et al*(1997)은 홍화자 추출물의 치주인대 섬유아세포와 조골세포의 활성도 증가를 보고하였으며, Park *et al*(2001)은 난소 적출을 통해 골다공증을 유발한 흰쥐에서 홍화자 추출물이 골밀도를 증가시키고, 골재생을 촉진시켰다는 보고를 하였다. 이러한 보고들은 홍화자의 주성분인 불포화지방산과 식물성 에스트로겐의 작용으로 이해되고 있다.

두충(Eucommiae Cortex)은 *Eucommia umoides* Oliver의 수피를 지칭하는 생약으로 한방에서는 신농본초경에 상품으로 기재되어 있고, 간과 신을 보하고 근골을 강하게 하며, 요통을 멈추게 한다고 기록되어 있다(Chung & Park 1975, Ko & Sung 1976). 또한 두충의 수피와 잎에서 각각 골 흡수 및 골 무기질의 손실 방지, 골 신생에 유의한 효과로 골다공증에 유용하다는 보고가 있으며(Oh *et al* 1995), 골다공증을 유도한 동물 모델에서 두충 조성물이 골다공증의 개선에 대한 효과가 보고되었다(Lee & Byun 2001).

골 조직은 교원질, 수산화인회석 등의 무기질로 구성된 세포외기질(extracellular matrix)과 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast), 골세포(osteocyte) 등 여러 종류의 세포들로 구성되어 있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로서(Stuart I 2008), 조골세포와 파골세포의 작용을 매개로 일생동안 끊임없이 형성(formation)과 흡수(resorption)를 반복하며, 골 재형성(bone remodeling)과정을 진행해 나간다(Parfitt AM 1994). 그러나 유전적 생리적 환경적 인자의 변화와 더불어 조골세포의 활성도가 약화되어 골 형성이 감소하거나, 파골세포의 활성도 강화로 골 흡수가 증가되는 경우, 또는 두 가지 요소가 동시

\* Corresponding author : Jeong-Suk Park, Tel : +82-62-970-0167, Fax : +82-62-970-0162, E-mail : pk0207@nambu.ac.kr

에 작용되는 경우에 골 대사질환이 발생하게 된다(Park JS 2000). 골다공증은 대표적인 골 대사질환으로 에스트로겐 요법으로 치료를 하고 있으나(Han IG 1993, Kim *et al* 2000), 장기간 사용 시 오심, 체중 증가, 불규칙한 자궁 출혈, 자궁 내막암 및 유방암과 같은 부작용을 유발하기도 하여 치료보다 예방의 중요성이 강조되고 있다(Rogers J 1967, Genant *et al* 1989, Murphy & Ghahary 1990). 최근에는 그 위험성을 보완하기 위해 다른 부작용 없이 골 손실을 최소화하면서 골 형성을 촉진할 수 있는 한약제(Yun *et al* 2012) 및 식품의 천연물 유래 활성 성분을 이용한 대체요법 연구가 활발히 진행되고 있다(Anderson *et al* 1999, Anderson & Garner 1998, Adlercreutz & Mazur 1997). 이에 본 연구에서는 골 형성에 효과가 있는 홍화자와 두충 단독추출물과 혼합추출물을 인간 조골세포 MG-63에 투여하여 생존력 및 골 조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발할 때, 그 활성이 증가하므로 조골세포 활성을 알아보는 biomarker로서 alkaline phosphatase (ALP) 활성을 측정하여 단독추출물과 혼합추출물에서 조골세포 활성에 미치는 영향을 분석하였다.

## 연구 방법

### 1. 실험재료

홍화자와 두충은 시중에 유통되고 있는 원료를 광주광역시 세화당에서 구입하여 감정하여 사용하였으며, 각각의 시료 100 g(혼합제제의 경우 홍화자 50 g과 두충 50 g)에 methanol로 진탕하면서 5시간씩 50°C에서 3회 추출하고, 여과 후 추출액을 회전 감압농축기(EYERA, Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Japan)로 농축하여 extract로 한 후 -80°C에 보관하였고, 이를 DMSO에 용해하여 실험에 사용하였다.

### 2. 조골세포 배양

실험에 사용한 인간의 조골세포주인 MG-63 세포는 한국 세포주은행(KCLB)에서 분양받았다. 세포배양을 위해 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco, Rocville, USA)와 1% penicillin-streptomycin(100IU-100  $\mu$ g/mL)을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, humidified atmosphere에서 배양하였다. 각각의 세포들은 2~3일간 배양 후, 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 부착된 세포를 분리시켜 원심 분리하여 얻어진 세포에 신선한 배지를 넣어 계대배양하였다.

### 3. 조골세포 생존률

각 추출물의 MG-63 조골세포에 대한 생존률은 Desai 등의 방법(Desai *et al* 2008)에 준하여 측정하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 Formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것으로 96 well plate에  $1.0 \times 10^5$  cell/well의

MG-63 조골세포를 분주하고, 18시간 동안 배양한 후 농도별(0, 10, 20, 50  $\mu$ g/mL)로 홍화자와 두충 단독 추출물 및 혼합 추출물을 첨가하여 12, 24, 48시간 동안 배양하였다. 20  $\mu$ L의 MTS solution을 첨가한 후 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 4시간 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존률을 백분율로 표시하였다.

### 4. 염기성 인산분해효소(Alkaline Phosphatase : ALP) 활성 측정

ALP 활성도 검사는 *p*-nitrophenyl phosphate의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 것을 이용하여, 가수분해 반응의 산물인 *p*-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP의 농도를 간접적으로 산출하는 것이다. 이때 세포 수의 차이가 ALP 활성도에 영향을 미칠 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여 나누어 줌으로써 단위세포 수 당 ALP 활성도를 계산한다.

본 실험에서는 MG-63 조골세포를 24 well plate에  $1 \times 10^4$  cell/well 농도로 분주하고 배양한 다음, 10% FBS, 1% antibiotics와 홍화자와 두충 단독추출물 및 혼합추출물을 적정 농도별(0, 10, 20, 50  $\mu$ g/mL)로 첨가한 후, 48시간 동안 배양하였다. 이후 각각의 well에서 배양액을 제거하고, 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 분리한 다음, 세포 부유액을 4°C, 4,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 FBS로 세척한 후, 분리한 세포를 얼음에 옮겨 0.5% Triton X-100을 첨가하고, 1시간 동안 방치하여 세포를 lysis 시켰다. 4°C, 10,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 모아 StemTAG ALP kit(Cell Biolabs, USA)를 사용하여 ALP 활성을 측정하였다.

단백질 농도는 표준 시료로서 소의 혈청 알부민(bovine serum albumin: BSA)을 이용한 Bradford 법을 사용하여 측정하였다. 각 실험에서 얻어진 ALP활성도는 단백질 양으로 보정하여 대조군의 ALP 활성에 대한 시료첨가군의 ALP비를 %로 계산하였다.

### 5. 통계처리

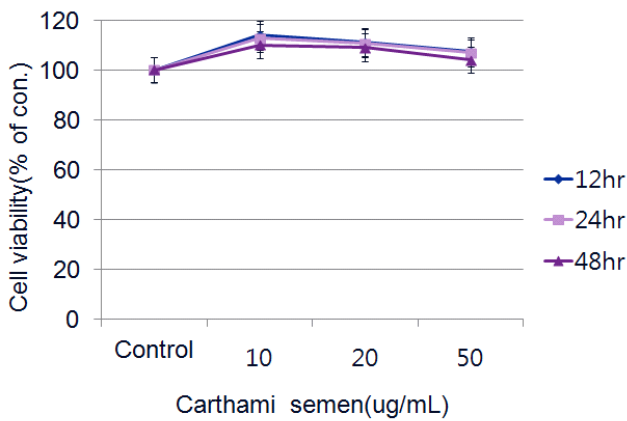
실험결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 대조군과 추출물 사이의 유의성은 paired Students' *t*-test를 이용하여  $p < 0.05$  일 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 조골세포 생존률

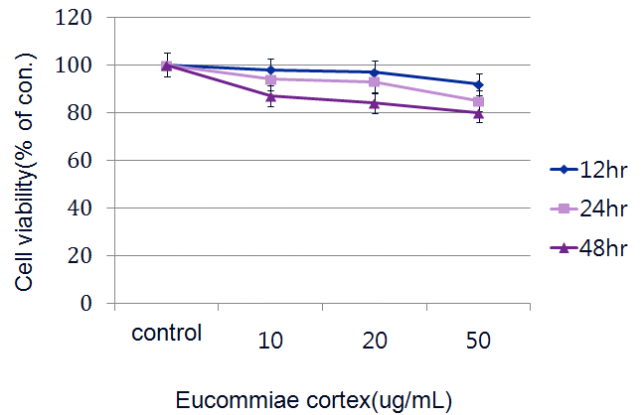
MG-63 조골세포에 추출물의 세포 독성을 보기 위하여 10~100  $\mu$ g/mL 농도 의존적으로 처리한 후, MTS assay를 실시하여 cell viability를 측정한 결과, 50  $\mu$ g/mL 농도까지는 독성이

나타나지 않았다(Lee *et al* 2011). 따라서 세포 생존률에 영향을 주지 않는 0, 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 에 처리하여 12, 24, 48시간 배양한 후, 세포 생존률을 관찰하였다. 홍화자 처리군의 경우, 12시간 처리군에서는 세포 생존률이 0, 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군과 비교 시 113.8%, 111.1%, 107.4%를 나타냈으며, 24, 48시간 처리군의 경우에는 모두 대조군보다 높은 생존률을 보였다(Fig. 1). 홍화자는 골 재생 효과가 있는 약재로 알려져 있으며, 민간에서는 골다공증 등에 사용되고 있다(Lee HK 1998). Shin *et al*(1988)은 마우스 조골세포인 MC3T3-E1에 홍화자 추출물을 5~20  $\mu\text{g/mL}$  처리한 후, 80~120% 생존률을 보고하였다. 또한 두충 처리군의 경우, 12시간 처리군에서는 세포 생존률이 0, 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군과 비교 시 98.2%, 97.8%, 92.5%를 나타냈으며, 24, 48시간 처리군의 경우에는 시간과 농도에 의존적으로 감소를 보였으나, 80% 내외의 생존률을 보였다(Fig. 2). 두충의 수피와 잎 추출물이 골 흡수 및 골무기질의 손상 방지, 골 형성에 유의한 효과로 골다공증 억제에 보고되었으며, 줄기 추출물은 마우스 조골세포를 120%까지 생존시켰다는 보고가 있다(Oh *et al* 1995). 또한 두충 에탄올 추출물을 인간조골세포 MG-63에 처리 시 25~100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 60~80% 생존율을 나타내었다(Lee *et al* 2011). 반면에 홍화자와 두충 혼합제제군의 경우, 12시간 처리군에서는 세포 생존률이 0, 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군과 비교 시 118.5%, 115.2%, 117.7%를 나타냈으며, 24, 48시간 처리군의 경우에도 대조군에 비하여 유의성 있는 생존률을 나타내었다(Fig. 3). 이는 홍화자와 두충 혼합제제군의 활성 물질 간의 상호작용으로 사료되며, 특히 식물성 에스트로겐 성분이 많이 함유된 약콩과 대두에서 현저한 조골세포의 증식



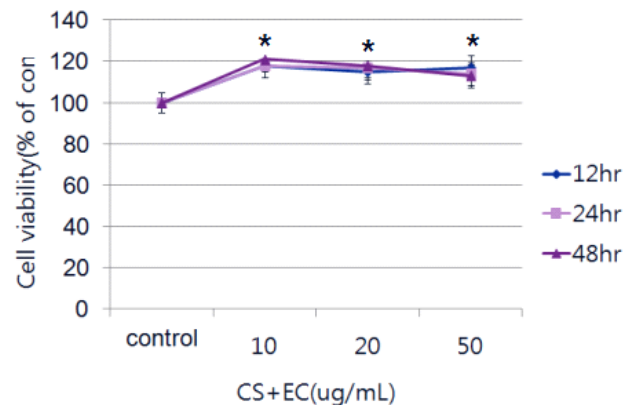
**Fig. 1. Effects of Carthami semen on the cell viability of MG-63.**

MG-63 cells were plated in 96 well plates and treated with various concentrations of Carthami semen for 12, 24, 48 hr. Data are mean±S.D. of triplicate per treatment.



**Fig. 2. Effects of Eucommiae cortex on the cell viability of MG-63.**

MG-63 cells were plated in 96 well plates and treated with various concentrations of Eucommiae cortex for 12, 24, 48 hr. Data are mean±S.D. of triplicate per treatment.



**Fig. 3. Effects of mixture of Carthami semen and Eucommiae cortex on the cell viability of MG-63.**

MG-63 cells were plated in 96 well plates and treated with various concentrations of mixture of Carthami semen and Eucommiae cortex for 12, 24, 48 hr.

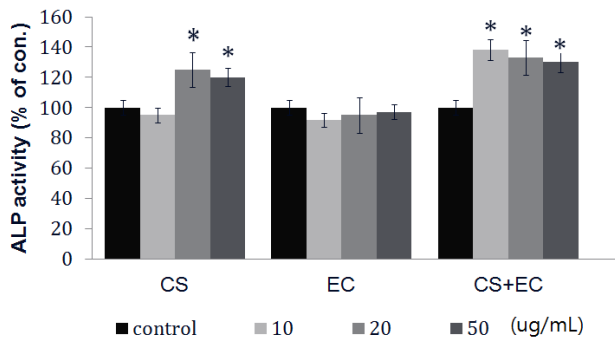
Data are mean±S.D. of triplicate per treatment.

\*  $p < 0.05$ , significantly different from the control group.

(Setchell & Cassidy 1999)을 보인 것처럼 홍화자의 불포화지방산과 식물성 에스트로겐 성분인 lignan 류, flavonoids 류와 serotonin 유도체에 의한 시너지효과로 사료된다(Jang JH 2006).

## 2. 염기성 인산분해효소(Alkaline Phosphatase : ALP) 활성 측정

ALP는 모든 조직에 존재하며, 특히 골 조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발할 때 그 활성이 증가하므로 조골세포 활성을 알아보는 biomarker로서 사용이 된다. 본 논문에서는



**Fig. 4. Effects of CS, EC and CS+EC on the alkaline phosphatase activity of MG-63.**

MG-63 cells were plated in 24 well plates and treated with various concentrations of CS, EC and CS + EC for 48 hr.

Data are mean±S.D. of triplicate per treatment.

\*  $p < 0.05$ , significantly different from the control group.

MG-63 조골세포에서 ALP 활성을 측정함으로써 홍화자와 두충 단독추출물 및 혼합추출물의 조골세포 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 아무런 시료를 처리하지 않은 배양액만 넣어준 대조군에 대한 비율로 나타내었으며, 결과는 다음과 같다(Fig. 4).

홍화자 처리군을 농도별(0, 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리한 결과, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 125.7%, 120.4%로 ALP 활성을 유의성 있게 증가시켰다. 홍화자 추출물은 다양한 농도에서 조골세포, 조골모 유사세포, 치주인대세포 등의 ALP 활성을 유의성 있게 증가시켰다는 보고가 있으며(Park *et al* 2001, Yoon *et al* 1998), 두충 처리군은 농도별(0, 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리한 결과, ALP 활성을 증가시키지 않았다. Im *et al*(2010)에 의하면 두충 추출물을 50  $\mu\text{g/mL}$ 보다 낮은 농도에서는 대조군과 비교 시 ALP 활성이 105.2% 정도였으나, 50~100  $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 후, 대조군과 비교 시 ALP 활성이 150.7%로 유의성 있는 증가를 보였다. 두충 추출물은 고농도에서 ALP 활성을 증가시키는 것으로 사료된다. 그러나 홍화자와 두충 혼합제제군을 농도별(0, 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리한 결과, 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 138.7%, 133.4%, 130.7%로 ALP 활성을 유의성 있게 증가시켰다. 이러한 상승작용은 홍화자와 두충 혼합제제군의 상호작용으로 사료되며, 최근에 홍화자의 골형성에 미치는 ALP 활성에 대한 영향은 홍화자의 불포화지방산 성분 중 linoleic acid의 작용으로 이해되고 있다(Kim *et al* 2002).

## 결론

본 연구에서는 홍화자와 두충 단독 추출물 및 혼합추출물이 MG-63 조골세포의 생존력에 미치는 영향은 MTS assay

를 실시하였고, ALP 활성에 미치는 영향을 분석하여 골다공증 예방 소재로 이용 가능성을 규명하고자 하였다.

연구 결과, MG-63 조골세포의 생존력에 미치는 영향은 홍화자와 두충 혼합제제군이 홍화자 처리군과 두충 처리군에 비하여 MG-63 조골세포의 생존을 유의적으로 증가시켰다. 또한 ALP 활성에 미치는 영향은 홍화자 처리군은 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 125.7%, 120.4%로 ALP 활성을 유의성 있게 증가시켰다. 두충 처리군은 ALP 활성을 증가시키는 효과를 나타내지 않았다. 그러나 홍화자와 두충 혼합제제군을 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 138.7%, 133.4%, 130.7%로 ALP 활성을 유의성 있게 증가시켰다. 이러한 결과로 홍화자나 두충 단독 처리군보다 홍화자와 두충 혼합제제군이 골다공증 관련 예방 소재로 이용 가능성이 있다고 사료된다. 그러나 홍화자와 두충 혼합추출물의 골 관련 질환 예방 소재 개발을 위해서는 다양한 농도와 혼합비율 등 다양한 변수가 있을 거라 사료되며, 혼합물 내의 생리 활성 물질 분리와 같은 심도 있는 연구가 수행되어야 할 것이다.

## 문헌

- Adlercreutz H, Mazur W (1997) Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann Med* 29: 95-120.
- Anderson JJ, Anthony MS, Cline JM, Washburn SA, Garner SC (1999) Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nut* 2: 489-504.
- Anderson JJ, Garner SC (1998) Phytoestrogen and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12: 543-557.
- Chung MH, Park CW (1975) Studies on the development of antihypertensive agents from Korean crude drug. *Kor J Pharmacog* 6: 29-35.
- Desai A, Vyas T, Amiji M (2008) Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci* 97: 2745-2756.
- Genant HK, Baylink DJ, Gallagher JC (1989) Estrogens in the prevention of osteoporosis in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 161: 1842-1846.
- Han IG (1993) Osteoporosis diagnosis and medicinal remedy. *J Korean Acad Fam Med* 14: 348-355.
- Im NK, Kim HJ, Kim MJ, Lee EJ, Kim HI, Lee IS (2010) Effects of medicinal herb extracts on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Korean J Food Sci Technol* 42: 637-642.
- Jang JH (2006) The changes in lipid and bone metabolism and the effects of safflower tea supplementation on bone

- status in postmenopausal women. *Ph.D Dissertation* Catholic University, Daegu. pp 33-37.
- Kelly O (2003) The effect of polyunsaturated fatty acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young growing rats. *Br J Nutr* 90: 743-750.
- Kim HJ, Bae YC, Park RW, Choi SW, Cho SH, Choi YS, Lee WJ (2002) Bone protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 71: 88-94.
- Kim JH, Jeon SM, An MY, Ku SK, Lee JH, Choi MS, Moon KD (1998) Effects of diet of Korean safflower(*Carthamus tinctorius* L.) seed powder on bone tissue in rats during the recovery of rib fracture. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 27: 698-704.
- Kim KS, Min BK, Lee SP, Kim IS, Kim HY, Sim JR (2000) Evaluation of biochemical markers of bone turnover in postmenopausal osteoporotic women to alendronate treatment. *J Korean Soc Menopause* 6: 36-42.
- Ko YO, Sung HG (1976) A study on the cutting of *Eucommia ulmoides* Oliv. *Kor J Pharmacog* 7: 59-86.
- Lee DS, Byun SY (2001) Effects of the dietary mixture of *Eucommia ulmoides* Oliver on osteoporosis. *Kor J Bioechnol Bioeng* 16: 614-619.
- Lee HK (1998) Effect of black bean and samryung bak chul san on ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. *Ph.D Dissertation* Kyung Hee University, Seoul. pp 25-31.
- Lee SY, Jang ES, Jin SC, Piao ZG, Park SH, Kim SG (2011) The effect of medicinal plants extracts on the cell growth in the MG-63 human osteoblast cell. *Oral Bio Res* 35: 41-46.
- Murphy LJ, Ghahary A (1990) Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen induced uterine proliferation. *Endocrine Rev* 11: 443-453.
- Oh HS, Kim HC, Lee SI, Ahn DK (1995) Effect of eucommiae cortex and folium on the ovariectomized rat as model of postmenopausal osteoporosis. *J Herbology* 10: 59-68.
- Parfitt AM (1994) Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55: 273-286.
- Park CH, Um JO, Yoo SK, Kim CW, Kim JH, Cho HB (2001) Effects of Carthami Semen on the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Oriental Gynecol* 14: 73-87.
- Park JS (2000) Physiological effect of isoflavone(II): osteoporosis and post menopausal symptom. *Natl Nutr* 215: 25-31.
- Rhyu IC, Lee YM, Ku Y, Bae KW, Chung CP (1997) The biologic effects of safflower(*Carthamus tinctorius* L.) extract and dipsasi radix extract on periodontal ligament cells and osteoblastic cells. *J Kor Acad Periodontol* 27: 867-882.
- Rogers J (1967) Estrogens in the menopause and postmenopause. *N Eng J Med* 280: 364-367.
- Seo HJ, Kim JH, Kwak DY, Jeon SM, Ku SK, Lee JH, Moon KD, Choi MS (2000) The effects of safflower seed powder and its fraction on bone tissue in rib-fractured rats during the recovery. *Kor J Nutr* 33: 411-420.
- Setchell KD, Cassidy A (1999) Dietary isoflavones, biological effect and relevance to human health. *J Nutr* 129: 758-767.
- Shin SY, Lee YM, Ku Young, Bae KH, Chung CP (1998) The biologic effects of magnoliae cortex and safflower seed extract mixture on PLL cells and osteoblasts. *J Periodontal Implant Science* 28: 545-559.
- Stuart I Fox (2008) Bonedeposition and resorption In. Human physiology 9th ed., McGraw-Hill Inc., New York. pp 652-657.
- Yoon DH, Lee SC, Kim ME, Kim EC, You HK, Kim YC, Shin HS (1998) Effects of safflower seed extract on the osteoblastic activity and bone regeneration. *J Kor Acad Periodontol* 28: 769-784.
- Yun JH, Hwang ES, Kim GH (2012) Effect of *Chrysanthemum* L. extract on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells under oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Korean J Food Sci Technol* 44: 82-88.

---

접 수: 2012년 11월 23일  
 최종수정: 2013년 1월 25일  
 채 택: 2013년 2월 21일