

참죽의 추출방법에 따른 수용성 다당류의 생리기능성

오민희 · 황여진 · 윤경영*
영남대학교 식품영양학과

Biological activity of water-soluble polysaccharides from *Cedrela sinensis* according to extraction methods

Min Hui Oh, Yeo Jin Hwang, and Kyung Young Yoon*
Department of Food and Nutrition, Yeungnam University

Abstract The biological activity of water-soluble polysaccharide (WSP) fractions extracted from *Cedrela sinensis* was examined in this study. *Cedrela sinensis* was extracted using hot water, ultrasonication, and enzymes (Viscozyme, Shearzyme) and precipitated using ethanol to produce crude polysaccharides. The yield (3.51%) and total polysaccharide content (28.03 g/100 g) of WSP extracted using Shearzyme (WSPs) were highest compared to other extracts. The antioxidant activity of WSP extracted using hot water was highest and had the lowest IC₅₀ values in DPPH, ABTS, hydroxyl radical scavenging activity, reducing power, and superoxide dismutase-like activity. Tyrosinase inhibitory activity increased as the concentration increased. All extracts showed higher retardation effects on glucose and bile acid compared to the control; particularly, WSPs showed a similar glucose retardation effect to carboxymethyl cellulose. This study suggests that WSP from *C. sinensis* can be used as a functional food material.

Keywords: *Cedrela sinensis*, polysaccharide, antioxidant, glucose retardation effect, bile acid retardation effect

서 론

참죽(*Cedrela sinensis*)은 참죽나무 잎의 순으로 대나무처럼 순을 먹는 다하여 붙여진 이름으로, 나뭇가지와 잎의 형태로 주로 섭취되며 줄기 부분은 말려 독특한 맛을 내어 건조하여 국수나 떡국에 넣어 먹기도 한다(1). 참죽은 탄수화물, 단백질, 지방질, 무기질, 비타민 C가 많이 함유되어 있으며, 생리활성을 나타내는 폴리페놀(polyphenol), 사포닌(saponin), 알칼로이드(alkaloid) 및 플라보노이드(flavonoid) 등이 풍부하게 함유되어 있어 식품뿐만 아니라 한약재로도 이용되어 왔다(2). 특히, 참죽은 살충, 소염, 장염, 이질 등의 치료에 이용되며, 피부질환 치료에 효능이 있다고 알려져 있다(3). 참죽나무 잎의 플라보노이드 성분을 분리한 연구에서는 참죽나무 추출물이 높은 산화방지 능력을 보이며(4), 항염증 및 진통의 효과가 있음을 보였다(1).

식물에 함유되어 있는 생리기능성분은 알칼로이드, 플라보노이드, 테르페노이드(terpenoid)와 같은 저분자 물질과 다당류 및 단백질 등과 같은 고분자물질이 있다. 그 중 식물의 세포벽을 구성하고 있는 다당류의 생리활성 및 약리기능에 대한 관심이 증가하고 있다. 식물 속에 존재하는 다당류는 저장성 다당류(starch, inulin 등)를 제외하고 1차 및 2차 세포벽과 중첩층에 존재하며,

셀룰로스(cellulose), 헤미셀룰로스(hemicellulose) 및 펙틴(pectin)으로 구성되어 있다(5). 셀룰로스는 분자가 많은 수소결합에 의해 다발을 형성하고 있으며, 헤미셀룰로스는 주로 셀룰로스와 교차결합으로 이루어져 세포벽의 물리적 강도를 높이는 역할을 한다. 펙틴은 가장 복잡한 형태의 세포벽 구성다당류로 겔(gel)과 필름(film)을 형성할 수 있어 식품가공 및 식품공업에 중요한 역할을 담당한다. 식용식품, 생약재, 해조류 유래 다당류는 항응고, 혈당강하 및 항종양 활성 등의 여러 약리기능이 있어 기능성 식품 및 의약품의 개발가능성이 크다(5). 그러나 식물체에 함유된 대부분의 기능성 성분은 물에 잘 녹지 않기 때문에 식물 추출물이 모든 생리활성 및 약리효과를 나타내는 데에는 한계를 가진다. 또한 식물 추출물의 기능성 연구는 대부분 저분자 물질의 생리활성 연구에 집중되어 있어 고분자 물질의 용해성을 증가시켜 이들 기능성 성분을 추출할 수 있는 방법 모색이 필요하다.

식물 속에 함유된 생리활성 성분을 추출하기 위해 주로 용매추출법(6)과 열수추출법(7) 등이 이용되고 있다. 용매추출은 분배에 의한 것으로 얻고자 하는 성분과 용매와의 용해도, 극성 등과 안전성을 고려하여 선택하며, 추출 대상시료의 특성에 따라 용매의 선택은 달라진다. 물 외의 헥세인(hexan), 에테르(ether), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 클로로포름(chloroform), 벤젠(benzene) 등의 유기용매가 주로 추출에 사용되고 있으나 이들은 독성이 있어 안전성의 문제가 되고 있다(8). 따라서 일반적으로 식물의 생리기능성 물질을 추출하기 위해 열수추출법이 가장 많이 사용되고 있으나, 에너지 소비가 많고 높은 열에 의한 유용성분의 파괴 등의 문제점이 있다(9). 이러한 단점을 보완하고 천연 추출물의 추출 효율을 높이기 위해 효소추출, 초음파추출 등이 시도되고 있다. 초음파추출은 열에 의한 성분 파괴를 줄이고 추출 시간을 단축하며, 추출의 효율을 높이는 장점이 있다. 또한 식물

*Corresponding author: Kyung Young Yoon, Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38541, Korea
Tel: +82-53-810-2878
Fax: +82-53-810-4768
E-mail: yoonky2441@ynu.ac.kr
Received October 28, 2016; revised November 24, 2016; accepted November 25, 2016

의 세포벽을 파괴하여 식물 세포 내 수용물질들의 이동이 일어나 용매로의 전달효율을 높여 생리활성의 증가를 가져오며, 추출의 효율을 높인다(10). 효소추출은 추출과정에서 새로운 형태의 기능성 물질 생성과 비수용성 물질의 수용성 전환으로 기능성 및 추출 효율을 높이며, 용매추출에 비해 안전성이 높다는 장점을 가진다(3).

따라서 본 연구에서는 여러 가지 추출법 즉, 열수추출, 에탄올추출, 효소추출(Viscozyme, Shearzyme) 및 초음파추출을 이용하여 수용성 다당류를 분획하고 이들의 기능적 특성을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 참죽(*Cedrela sinensis*)은 경상북도 상주시에서 재배된 것으로 15-22 cm 길이의 참죽을 상주 외서농협을 통해 구입하였다. 참죽은 이물질을 제거하고 냉동건조 후 Food Mixer (FM-681C, Hanil, Incheon, Korea)를 이용하여 마쇄한 후 45 메시(mesh) (Chung Gye Indus, MFG Co., Seoul, Korea)로 체질하였다. 그 후 추출과정을 거쳐 -40°C deep freezer (MDF, Sanyo, Tokyo, Japan)에 보관하면서 실험에 사용하였다. 효소 추출을 위해 사용된 효소는 xylanase의 활성을 가지는 Shearzyme plus (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)와 arabanase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase의 활성을 나타내는 Viscozyme L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)을 사용하였다.

참죽추출물의 수용성 다당류 추출물 제조

참죽으로부터 수용성 다당류 추출물을 제조하기 위해 열수추출, 초음파추출, 효소추출(Viscozyme, Shearzyme)을 진행하였다. 열수추출은 시료 25 g 당 20배에 해당하는 증류수 500 mL를 넣어 잘 섞은 다음, 열수 70°C에서 100 rpm으로 진탕수조(shaking water bath, BS-11, JeioTech, Seoul, Korea)에서 3시간 동안 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 추출액은 4°C, 7000 rpm에서 20분간 원심분리한 다음 거름종이(filter paper, Whatman No. 1, Maidstone, England)로 여과하여 추출액을 얻었다.

초음파추출은 초음파 수조(30x24x14.5 cm, 5510-DTH, Brason, Danbury, CT, USA)를 이용하여 초음파 수조 크기의 아크릴관에 유리병 뚜껑을 부착하여 유리병이 초음파 수조 하단에 닿지 않도록 진행하였다. 유리병에 시료 25 g의 20배에 해당하는 증류수를 넣어 물이 채워진 초음파 수조에서 495 W으로 45분간 추출하였다. 그 후 4°C, 7000 rpm에서 20분간 원심분리한 다음 거름종이(Whatman No. 1)로 여과하여 추출액을 얻었다.

Shearzyme 및 Viscozyme에 의한 효소추출은 효소의 최적 pH와 온도를 참조하여 pH 4.5, 50°C 하에서 추출하였다(11). 즉, 시료 20 g에 기질의 1% (v/w)에 해당하는 효소(Shearzyme, Viscozyme)와 0.1 N 아세트산완충용액(acetate buffer, pH 4.5) 500 mL 넣어 50°C, 100 rpm 진탕수조에서 48시간 동안 교반하였다. 그 후 100°C에서 5분 동안 효소를 불활성화 시킨 뒤 4°C, 7000 rpm에서 20분간 원심분리한 다음 거름종이로 여과하였다. 이때 얻어진 여과액은 1 M 수산화소듐(NaOH)를 사용하여 pH를 7로 조정하여 추출액으로 사용하였다.

각 방법에 따라 얻은 추출액에 추출액의 2배에 해당하는 99% 에탄올을 가하여 상온에서 1시간 동안 침지시켰다. 그 후 4°C, 7000 rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 이때 얻어진 상층액을 감압농축(R-124, Buchi, Flawil, Swizerland)한 뒤 동결건조 과정을

거쳐 수용성 다당류(water-soluble polysaccharide, WSP) 분획으로 사용하였다. 이때 열수추출, 초음파추출, Shearzyme 및 Viscozyme 효소추출에 얻어진 수용성 다당류 분획은 각각 WSP_h, WSP_u, WSP_s 및 WSP_v로 나타내었다.

수율 및 총 다당류 함량 측정

네 가지 추출방법에 의해 얻은 수용성 다당류 분획물의 수율은 동결건조 후 증량법에 따라 %로 표시하였으며, 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{수율(\%)} = \frac{\text{추출 후 분획물의 건조 중량 (g)}}{\text{추출에 사용된 참죽의 중량 (g)}} \times 100$$

각 추출물에 함유되어 있는 총 다당류의 함량은 페놀-황산(Phenol-sulfuric acid)법(12)을 변형하여 측정하였다. 즉, 일정 농도로 조제된 추출물 0.5 mL에 5% phenol 용액 0.5 mL를 가하고, 2.5 mL의 진한 황산을 넣어 20분간 실온에 방치한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

수용성 다당류 분획의 산화방지 활성 측정

수용성 다당류 분획의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 라디칼 소거능은 Im 등(13)의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 추출물을 각 시험관에 0.5 mL씩 취한 후 0.2 mM DPPH 용액 1 mL와 10초간 vortex mixing하였다. 이를 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후 분광광도계(Spectrophotometer, U-2900, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

수용성 다당류 분획의 ABTS2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼 소거활성은 Re 등(14)의 방법을 일부 수정하여 실험하였다. ABTS 7 mM 과황산포타슘(potassium persulfate) 2.45 mM을 증류수에 용해하여 12-16시간 동안 암실에 방치하여 ABTS caution radical (ABTS^{•+})을 형성한 후 이 용액을 80% 에탄올을 이용하여 734 nm에서 0.700±0.002의 흡광도를 띠도록 희석하였다. 각 추출물 50 μ L와 희석된 ABTS 용액 1 mL 잘 혼합하여 실온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

수용성 다당류 분획의 하이드록시(hydroxyl) 라디칼 소거능은 Gutteridge(15) 방법을 이용하여 측정하였다. 각 시험관에 1 mM FeSO₄/10 M EDTA 용액 2.0 mL씩 넣고 1 mM 2-데옥시리보스(2-deoxyribose) 0.2 mL와 각 시료 0.2 mL 및 0.1 M 인산완충용액(phosphate buffer, pH 7.4) 1.2 mL를 차례로 넣어 잘 혼합하였다. 이 반응액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 2.8% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid, TCA) 용액을 1.0 mL씩 가하여 95°C에서 10분 동안 가열하여 급냉시킨 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

수용성 다당류 분획의 환원력은 Mau 등(16)의 방법으로 측정하였다. 각 추출물을 농도별로 증류에 녹인 후 e-tube에 250 μ L씩 취하였다. 그 후 0.2 M 인산소듐완충용액(sodium phosphate buffer, pH 6.6)와 1% 페로사이안화 포타슘(potassium ferricyanide, KFe(CN)₆)를 각각 250 μ L씩 첨가하여 잘 혼합한 후 50°C에서 20분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid (CCl₃COOH) 250 μ L를 첨가하였다. 위 반응액을 25°C, 1000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 상층액 500 μ L와 0.1% 염화철(III) (ferric chloride, FeCl₃·6H₂O) 100 μ L를 혼합하였다. 그 후 700 nm에서 microplate reader (EPOCH, BioTek Instrument Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

수용성 다당류 분획물의 superoxide dismutase (SOD) 유사활성

측정은 Bradford(17)의 방법에 준하여 측정하였다. 각 분획물 0.2 mL와 pH 8.5로 보정된 tris-HCl buffer (50 mM tris(hydroxymethyl) amino-methane+10 mM EDTA) 3 mL, 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 혼합한다. 다음 25°C에서 10분간 방치 후 1 N 염산(HCl) 0.1 mL로 반응을 정지하는 과정을 거쳐 420 nm에서 활성을 측정하여 SOD 유사활성을 산출하였다.

항미백 활성 측정

수용성 다당류 분획의 항미백 활성은 tyrosinase 저해활성으로 측정하였으며, tyrosinase 저해활성은 L-DOPA를 기질로 사용하여 DOPACHROME의 형성을 확인하여 결과를 나타내었다(18). 50 mM 인산소듐완충용액(pH 6.8) 25 µL에 1.5 mM L-DOPA(3,4-dihydroxy-L-phenylalanine) 25 µL, 분획물 20 µL, tyrosinase (500 unit/mL) 30 µL와 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 반응액 중 생성된 DOPA chrom을 475 nm에서 흡광도를 측정하여, tyrosinase 억제활성을 산출하였다.

포도당(glucose) 및 bile acid 흡수지연 효과 측정

수용성 다당류 분획물의 장관 내 포도당 흡수지연 효과를 알아보기 위해 포도당이 투석막에 투석되는 원리를 이용하여 측정하였다(11). 유리상태의 포도당은 투석막을 쉽게 통과하지만 고분자 물질과 결합한 포도당은 투석막을 통과하기 어려울 것이라는 가정 하에 투석 외액을 취하여 측정하였다. 투석막은 장막의 투과조건과 유사한 분자량 한계가 비교적 낮은 투석막(Sigma D7884: M.W. cut-off<1,200, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 투석막을 10 cm 길이로 잘라 0.1% sodium azide 용액에 24시간 담귀 사용하였다. 그 후 투석막 한쪽 끝을 묶어 투석막 내부에 다당류 분획물 0.2 g을 넣고 36 mg을 넣은 0.1% sodium azide (Junsei, Tokyo, Japan) 용액 6 mL를 넣어 나머지 투석막 끝을 묶어 250 mL 용기에 넣어 14시간 수화시켰다. 이때 시료를 제외하고 포도당을 녹인 sodium azide 용액 6 mL만을 넣은 것을 대조구로 하였다. 또한 CMC (carboxymethyl cellulose, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 비교 표준시료로 사용하였다. 14시간 수화가 끝나면 용기에 0.1% sodium azide 용액 100 mL를 첨가하여 37°C 진탕수조에서 100 rpm으로 12시간동안 교반하며 일정 시간 간격으로 투석 외액을 1 mL씩 취하여 dinitrosalicylic acid(19)법을 이용하여 포도당 함량을 측정하였다.

수용성 다당류 분획의 bile acid 흡수지연 효과는 포도당과 마찬가지로 유리상태의 bile acid가 투석막을 투과하는 원리를 이용하여 측정하였다(11). 투석막을 10 cm 길이로 잘라 0.1% sodium azide 용액에 24시간 담귀 후 사용하였다. 투석막의 한쪽 끝을 단단히 묶은 후 투석막 내부에 다당류 분획물 0.2 g과 0.1% sodium azide가 용해된 50 mM 인산완충용액(pH 7.0) 1 L에 15 mmole taurocholic acid를 녹인 용액 6 mL를 넣어 투석막의 끝을 묶어 밀봉시켰다. 그 후 250 mL 용기에 넣어 14시간 동안 수화시켰다. 대조구는 시료를 제외한 taurocholic acid 용액만 넣었으며 포도당 흡수지연 효과와 동일하게 CMC를 표준시료로 사용하였다. 14시간의 수화가 끝난 뒤, 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 용해된 0.1% sodium azide 용액 100 mL를 첨가하여 37°C 진탕수조에서 100 rpm으로 15시간 동안 교반하였다. 투석일정 시간 간격으로 투석 외액을 취하였으며, 투석 외액의 taurocholic acid의 함량을 Boyd 등(20)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 1 mL 투석 외액에 70% 황산용액을 넣고 5분 동안 반응시킨 후 0.25% furfural 용액 1 mL를 넣어 상온에서 60분 동안 최대로 발색한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 1. Yields and total polysaccharide contents of water-soluble polysaccharide fractions extracted from *C. sinensis* according to extraction methods

Sample	Yield (%)	Total polysaccharide content (g/100g)
WSPh	3.23±0.70 ^{a 1)}	21.18±0.06 ^c
WSPu	2.58±0.61 ^{ab}	21.10±0.12 ^c
WSPs	3.51±0.43 ^a	28.03±0.17 ^a
WSPv	2.00±0.11 ^b	27.15±0.20 ^b

WSPh, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using hot water; WSPu, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Ultrasonic; WSPs, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Shearzyme; WSPv, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Viscozyme.

¹⁾Mean±SD (n=3).

^{a-c}Values with different letters in the same column are significantly different (*p*<0.05).

통계처리

본 실험의 결과는 3반복으로 수행된 평균값과 표준편차로 나타내었으며, 각 실험 결과에 대한 통계분석은 SPSS (Ver. 21, Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 *p*<0.05 수준에서 일원배치 분산분석법으로 실시하였으며, 실험의 평균치간의 유의적 차이는 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)으로 검증하였다.

결과 및 고찰

수용성 다당류 분획의 수율 및 총 다당류 함량

참죽으로부터 추출된 다당류의 수율은 Table 1과 같다. WSPs가 3.51%으로 가장 높은 수율을 보였으며, 그 다음으로 WSPh (3.23%), WSPu (2.58%), WSPv (2.00%) 순으로 높은 수율을 보였으나, WSPv를 제외한 세 가지 추출법간의 유의적인 차이는 없었다. 이는 메틸겝질을 효소분해 하여 얻은 세포벽 다당류 유래 수용성 식이섬유소의 수율(0.86-1.29%)에 비해 매우 높은 수준이었다(13). Park과 Yoon(11)은 배추부산물로부터 Viscozyme L 효소분해 및 에탄올 침전하여 얻은 수용성 식이섬유소의 수율은 0.37-4.70%로 보고하여, 본 연구결과와 유사하였다. 또한 Kozarskim 등(21)은 다양한 버섯으로 부터 열수추출 후 에탄올 침전하여 얻은 다당류 분획의 수율이 1.6-4.6%라고 보고하여, 본 연구의 추출수율과 유사한 값을 나타내었다. 본 연구에서 Shearzyme 효소에 의한 분해 시 Viscozyme 효소에 의한 분해에 비해 유의적으로 높은 수율을 보였는데, 이는 cellulase 및 xylanase 작용력이 큰 Shearzyme의 세포벽 분해를 통해 다당류의 추출수율이 증가된 것으로 판단된다.

각 추출법에 의해 얻은 수용성 다당류 분획물에 함유된 총 다당류의 함량을 측정된 결과, WSPs에 함유된 총당의 함량이 28.03 g/100 g으로 유의적으로 가장 높은 함량을 보였다. WSPv는 27.15 g/100 g으로 두 번째로 높은 함량을 보였는데 이는 WSPh (21.18 g/100 g), WSPu (21.10 g/100 g)에 비해 유의적으로 높았다. 이와 같이 Shearzyme과 Viscozyme을 이용하여 효소추출한 경우 다른 추출물에 비해 높은 총 다당류 함량을 보였는데, 이는 식물 세포벽과 결합되어 있던 불용성의 다당류가 효소의 작용에 의해 수용성의 다당류로 전환되어 그 함량이 높아진 것으로 판단된다.

다당류 분획의 산화방지 활성

참죽으로부터 추출된 다당류의 산화방지를 측정하기 위해

Table 2. Antioxidant activity of water-soluble polysaccharide fractions extracted from *C. sinensis* according to extraction methods

Sample	IC ₅₀ value				
	DPPH radical scavenging ability (μg/mL)	ABTS radical scavenging ability (mg/mL)	Hydroxyl radical scavenging ability (mg/mL)	Reducing power (mg/mL)	SOD-like activity (mg/mL)
WSPh	248.03±5.59 ^{a 1)}	3.27±0.09 ^a	0.72±0.12 ^a	3.82±0.06 ^a	4.44±0.43 ^a
WSPu	607.02±36.27 ^b	4.84±0.05 ^c	1.40±0.12 ^b	4.58±0.12 ^c	6.44±0.18 ^d
WSPs	923.95±21.31 ^c	4.41±0.01 ^b	0.90±0.03 ^a	4.51±0.09 ^c	5.39±0.26 ^{ab}
WSPv	996.88±13.53 ^d	5.40±0.05 ^d	1.56±0.08 ^b	4.13±0.07 ^b	6.31±0.89 ^{cd}

WSPh, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using hot water; WSPu, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Ultrasonic; WSPs, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Shearzyme; WSPv, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Viscozyme.

¹⁾Mean±SD (n=3).

^{a-c}Values with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, 하이드록시 라디칼 소거능, 환원력 및 SOD 유사활성을 측정하였으며, 이에 대한 IC₅₀ 값을 Table 2에 나타내었다.

생리활성 물질의 기능적 특성 중 하나인 DPPH 라디칼 소거능은 산화방지 물질의 능력을 측정하기 위한 수단으로 알려져 있다(22). 이는 보라색을 띠는 DPPH 라디칼이 비교적 안정한 유리 라디칼로서 산화방지제 및 방향족 아민류와 같은 물질에 의해 환원되어 색이 탈색되는 원리는 바탕으로 산화방지 능력을 검증한다(23). DPPH 라디칼 소거능의 IC₅₀ 값은 WSPh가 248.0 μg/mL로 유의적으로 가장 낮은 값을 보였으며, WSPu, WSPs 그리고 WSPv의 IC₅₀ 값은 각각 607.0, 923.9 및 996.9 μg/mL로 나타났다. Fu 등(22)의 연구에서 차가버섯균 열수추출물 다당류의 라디칼 소거능이 초음파추출보다 높은 소거능을 보여 본 연구와 비슷한 경향을 보였다. 또한 Lee와 Hong(24)의 연구에서 오만동이 열수추출 유래 다당류의 DPPH 라디칼 소거능이 500 μg/mL에서 21.35%를 보여, 참죽의 열수추출 다당류 분획이 오만동이 열수추출 유래 다당류보다 높은 소거능을 보임을 알 수 있었다.

ABTS assay는 다양한 식품의 복합화합물 또는 단일화합물의 총 산화방지능력을 측정할 때 쓰인다. ABTS 라디칼 소거능은 특정 734 nm에서 유기용제, 수성용제 모두의 산화방지능을 측정할 수 있다(25). 이를 바탕으로 참죽으로부터 추출된 수용성 다당류 분획물의 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능의 IC₅₀ 값은 WSPh가 3.27 mg/mL로 유의적으로 가장 낮은 산화방지 활성을 보인 반면, WSPv는 가장 높은 IC₅₀ 값(5.40 mg/mL)을 나타내어 가장 낮은 산화방지 활성을 보였다. 이러한 결과는 열수추출이 ABTS 소거능이 높은 저분자 물질의 추출을 증가시킨 것으로 추측된다(26). 참죽으로부터 추출한 다당류에서는 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능은 농도에 따른 증가 양상은 비슷하나 ABTS 라디칼의 소거능이 현저히 낮음을 알 수 있다. 이는 많은 페놀성 물질은 효과적으로 라디칼을 제거하나, 페놀물질의 종류에 따라 라디칼을 선택적으로 제거하는 것으로 보고되어(27) DPPH 라디칼보다 낮은 소거능을 보인 것으로 판단된다.

H₂O₂는 Fe, Cu 등과 같은 금속과 만나 반응하여 분해 과정을 거쳐 하이드록시(hydroxyl) 라디칼을 생성한다. 하이드록시 라디칼은 전자와의 친화성이 높으며 열과의 반응성이 높아 DNA 가닥을 절단하여 DNA에 염의 변형을 가져오며, DNA 구성당을 분해하는 등 유전물질의 손상을 가져오는 발암유발의 원인물질로 알려져 있다. 금속이온과 반응하여 생성되는 하이드록시 라디칼은 2-deoxyribose를 산화시켜 MDA (malondialdehyde)로 분해시킨다(28). 이때 생성된 MDA를 523 nm에서 흡광도를 측정하여 참

죽으로부터 추출된 수용성 다당류 분획의 하이드록시 라디칼 소거활성을 측정하였다. 하이드록시 라디칼 소거능의 IC₅₀ 값은 WSPh, WSPu, WSPs 그리고 WSPv 각각 0.72, 1.40, 0.90 및 1.56 mg/mL로 측정되어 WSPh가 가장 높은 산화방지 활성을, WSPv가 가장 낮은 산화방지 활성을 나타내었다. 화살나무열 열수추출물의 하이드록시 라디칼 소거능이 3 mg/mL 농도에서 35%를 보였으며(29), 외송 열수추출물은 1000 μg/mL에서 34.6%의 소거능을 보여(30) 본 연구에서 참죽으로부터 추출된 다당류 분획의 하이드록시 라디칼의 소거능이 매우 높음을 확인할 수 있었다. 따라서 참죽 수용성 다당류 분획물은 생체내에서 유해한 산화적 손상을 일으키는 하이드록시 라디칼의 반응을 억제할 수 있는 산화방지제로서의 이용 가능성이 클 것으로 판단된다.

환원력은 환원성을 가지는 물질이 내어주는 수소원자가 유리 라디칼을 분해하며, 흡광도 값 자체가 시료 환원력의 지표를 나타낸다. 흡광도의 수치가 높을수록 높은 환원력을 띤다. 이 측정법은 potassium ferricyanide reduction법을 사용하여 금속 이온을 환원시키는 원리로 지질과산화 시 과산화물질에 수소원자를 제공하여 유리 라디칼의 연쇄반응을 변환시켜 과산화 물질의 생성을 저해함으로써 산화방지 활성을 정도를 알 수 있다(31). 참죽으로부터 추출된 수용성 다당류 분획물의 환원력을 측정된 결과, WSPh의 IC₅₀ 값이 3.82 mg/mL로 가장 높은 환원력을 보였으며, WSPv가 4.13 mg/mL로 두 번째로 높은 환원력을 나타내었다. WSPu와 WSPs는 각각 4.58 및 4.51 mg/mL의 IC₅₀ 값으로 유사한 환원력을 나타내었다. Mau 등(32)의 연구에서 *G. frondosa* 메탄올 추출물의 환원력을 측정된 결과, 5 mg/mL 농도에서 환원력은 0.37로 본 실험의 참죽 수용성 다당류 추출물에 비해 낮은 값을 보였다. 또한 *Gynura bicolor* 잎으로부터 추출된 다당류의 환원력을 측정된 결과(33), 4.31 mg/mL의 IC₅₀을 보여 본 연구결과와 유사하였다. 환원력은 reductone과 관련된 hydroxide group이 전자공여체의 역할을 함으로써 라디칼 연쇄반응을 종료시켜 활성 산소와의 반응을 저해하는 것으로 알려져 있다(34). 따라서 참죽으로부터 여러 가지 방법에 의해 추출된 수용성 다당류 분획은 높은 환원력을 나타내어 참죽 다당류 또한 hydroxide group이 많을 것으로 판단된다.

본 연구의 참죽으로부터 추출된 다당류 분획의 SOD 유사활성을 측정된 결과, 다른 산화방지 활성과 마찬가지로 WSPh가 가장 낮은 IC₅₀ 값(4.44 mg/mL)을 보였으며, 그 다음 WSPs (5.39 mg/mL), WSPv (6.31 mg/mL), WSPu (6.44 mg/mL) 순으로 나타났다. 체내 대사과정에 생성되는 superoxide 라디칼(O²⁻)은 인체 내 세포와 조직에 독성을 일으키며 암을 유발하여 종양의 생성을 촉진하고 피부의 노화를 일으킨다. Superoxide dismutase

Table 3. Tyrosinase inhibitory activity of water-soluble polysaccharide fractions extracted from *C. sinensis* according to extraction methods

Sample	Sample concentration (mg/mL)			
	2.0	2.5	3.0	4.0
WSPh	48.77±2.26 ^{a, 1)}	51.23±1.48 ^a	51.72±2.26 ^b	53.69±3.72 ^b
WSPu	29.56±1.71 ^b	43.84±2.56 ^b	56.16±2.26 ^a	61.58±2.96 ^a
WSPs	17.73±0.85 ^c	41.87±2.26 ^b	50.25±0.85 ^b	56.65±1.71 ^b
WSPv	5.42±1.48 ^d	36.95±3.08 ^c	44.83±0.85 ^c	46.80±1.48 ^c

WSPh, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using hot water; WSPu, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Ultrasonic; WSPs, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Shearzyme; WSPv, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Viscozyme.

¹⁾Mean±SD (n=3).

^{a-c}Values with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

(SOD)는 체내에서 유해한 활성산소종을 과산화수소로 전환시키는 $2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ 와 같은 반응을 촉매하는 산화방지 효소이다. 또한 SOD의 작용으로 인해 생성된 과산화수소(H_2O_2)는 카탈레이스(catalase)에 의해 물 분자와 산소분자로 바뀌어 활성산소종에 의해 유발되는 독성으로부터 생체를 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 매생이 열수 및 에탄올 추출물은 5 mg/mL 농도에서 각각 6.8, 12.8% 활성을 보인다고 보고되어(35), 본 연구의 참죽으로부터 추출된 다당류의 활성이 더 높아 참죽 다당류 분획물이 인체 내 superoxide를 제거하고 산화적 노화를 억제할 수 있을 것으로 판단된다. 이상의 결과, 참죽으로부터 추출된 다당류는 우수한 산화방지 활성을 보였으며, 특히, 참죽의 열수추출물이 다른 추출군에 비해 뛰어난 산화방지 효과를 보였는데, 이는 열수에 의해 산화방지 물질의 용출이 증가한 것으로 판단된다.

Tyrosinase 저해활성

참죽으로부터 추출된 다당류 분획물의 tyrosinase 저해활성은 Table 3에 나타내었다. Tyrosinase 저해활성은 측정 농도가 증가할수록 모든 추출군에서 증가함을 보였다. 2.5 mg/mL 농도에서는 WSPh가 51.23%로 유의적으로 높은 활성을 보였으며 WSPu 43.84%, WSPs 41.87%, WSPv 36.95% 순으로 높은 활성을 보였다. 4.0 mg/mL 농도에서는 WSPu 61.58%, WSPs 56.65%, WSPh 53.69%, WSPv 46.80% 순으로 높은 활성을 보였다.

Tyrosinase는 멜라닌 합성과정에서 중요한 역할을 하는 효소이다. Tyrosinase는 멜라닌(melanin) 합성 초기단계에서 L-tyrosine에서 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA)를 거쳐 L-dopaquinon으로 전환되어 멜라닌을 생성하는데 관여하는 효소이다. 멜라닌의 과도한 생성은 기미, 검버섯, 피부노화, 피부암 등을 유발하는 부작용이 있다(36). 열수추출 오만동이 유래 다당류는 5.0 mg/mL 농도에서 20.50%를 보였으며 가압 및 효소추출에서는 25.18%, 28.56%를 보였다(24). 또한 효소 처리된 매생이는 2.0 mg/mL 농도에서 28%의 저해활성을 보여(37), 본 연구에서 추출된 참죽 다당류 분획물의 tyrosinase 저해활성이 높음을 알 수 있었다.

포도당 흡수지연 효과

In vitro 법에 의해 참죽 다당류 분획의 포도당 흡수지연 효과를 측정하였으며, 12시간 동안 투석되는 포도당 양을 측정하여 대조군과 비교한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 본 연구의 모든 추

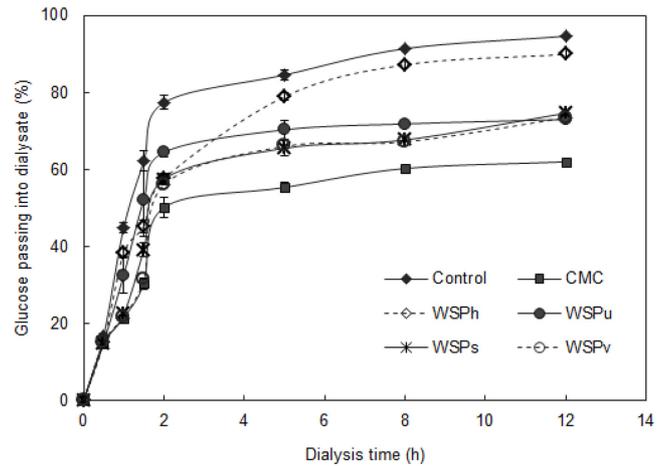


Fig. 1. Passive transport of glucose in the presence of water-soluble polysaccharide fractions extracted from *C. sinensis*. WSPh, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using hot water; WSPu, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Ultrasonic; WSPs, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Shearzyme; WSPv, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Viscozyme; CMC, Carboxymethyl cellulose.

출군은 대조군과 비교하여 포도당 흡수지연 효과를 보였으며, 또한 투석 30분 후에는 참죽으로부터 추출된 모든 다당류 분획은 CMC와 유사한 포도당 투과율을 보였다. 투석 1시간 경과 후 CMC의 포도당 투과율은 21.5%로 가장 낮았으며, WSPs와 WSPv는 각각 22.53, 21.81%를 보여 CMC와 유사한 투과율을 보였다. 투석 시간이 경과할수록 포도당의 투과율은 급속히 증가하여 투석 1시간 30분 후 대조군의 포도당 투과율은 62.17%를 나타내었다. 이에 반해 CMC의 포도당 투과율은 30.42%로 가장 낮은 값을 보였으며 WSPv가 31.56%로 CMC와 유사한 포도당 흡수지연 효과를 보였다. 또한 WSPh가 45.26%로 높은 투과율을 보였으나 대조군에 비해서는 낮은 값을 보여 참죽 추출물로부터 얻은 수용성 다당류는 포도당 흡수지연 효과가 있음을 알 수 있었다. 투석 2시간 후에는 모든 시료의 포도당 투과율이 50% 이상을 보였으며, 투석시간이 증가함에 따라 포도당 투과율은 증가하여 12시간이 경과 후 대조군 94.67%, CMC 62.06%, WSPh 89.95%, WSPu 73.06%, WSPs 74.67%, WSPv 73.47%의 값을 나타내었다. 이와 같이 참죽으로부터 추출된 모든 추출물은 대조군에 비해 포도당 투과 저해를 보였으며, 특히 WSPh를 제외한 모든 추출물은 70% 대의 낮은 투과율을 나타내었다. 투석 초기의 포도당 흡수 지연 지수는 포도당 흡수의 지연효과를 판별할 수 있는 지표이며, 특히 불용성 식이섬유보다도 보수력과 점성이 높은 수용성 식이섬유의 포도당 흡수 지연 효과가 더 높다고 알려져 있다(38). 본 연구의 참죽으로부터 추출된 다당류 또한 수용성 식이섬유의 형태로 보여지며, 다른 추출군에 비해 WSPs와 WSPv가 투석 초기 CMC의 흡수지연 효과와 비슷한 값을 보였다. 따라서 추후 단일화합물 정제 연구를 통해 더욱 높은 포도당 흡수지연 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

Bile acid 흡수지연 효과

참죽으로부터 추출된 수용성 다당류 분획물의 bile acid 흡수지연 효과를 확인하기 위하여 *in vitro*법에 의해 투석막을 이용하여 투석되는 bile acid의 양을 측정된 결과는 Fig. 2와 같았다. 투석

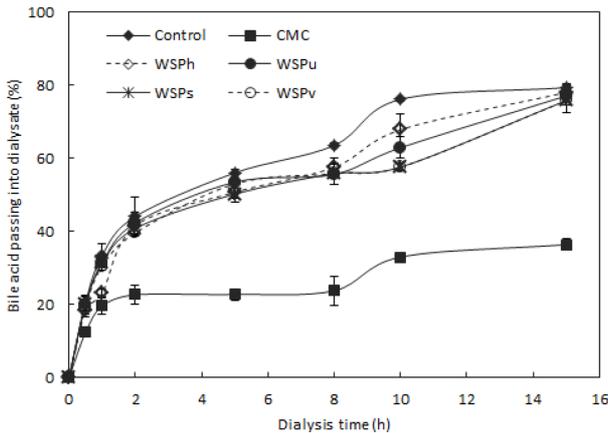


Fig. 2. Passive transport of bile acid in the presence of water-soluble polysaccharide fractions extracted from *C. sinensis*. WSPh, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using hot water; WSPu, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Ultrasonic; WSPs, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Shearzyme; WSPv, water-soluble polysaccharide extracted from *C. sinensis* using Viscozyme; CMC, Carboxymethyl cellulose.

30분에는 CMC의 bile acid 투과율은 12.37%로 가장 낮았으며, 대조구가 20.52%를 보여 가장 높은 값을 나타내었다. 또한 WSPh가 18.23%로 대조구에 비해 다소 낮은 투과율을 보였으나 WSPu, WSPs, WSPv 각각 20.19, 19.92, 19.41%를 나타내어 대조구와 유사한 투과율을 나타내었다. 투석 1시간 경과 후에는 참죽으로부터 추출된 모든 추출물의 bile acid 투과율이 대조구에 비해 낮게 측정되었으나 positive control로 사용된 CMC에 비해서는 매우 높은 투과율을 보였다. 또한 투석 10시간 후에는 대조구 76.11%, CMC 32.96%, WSPh 67.80%, WSPu 62.86%, WSPs 57.56%, WSPv 57.56%의 투과율을 나타내어 CMC에 비해서는 높은 투과율을 보였으나 대조구에 비해서는 낮은 투과율을 보였다. 식이섬유와 bile acid의 흡착은 생리학적으로 중요한 의미를 지니며 소장 내에서 식이섬유와 bile acid가 결합함에 따라 체내의 유리된 bile acid의 함량을 낮춰 콜레스테롤(cholesterol) 합성을 저하시킨다. 또한 식이섬유가 대장 내에서 발효되어 짧은사슬지방산(short chain fatty acid)이 콜레스테롤 합성을 저하시키고(39), 당흡수와 관련하여 인슐린 및 글루카곤 호르몬 분비가 감소함에 따라 콜레스테롤 및 지방산 합성을 저하시킨다(40). 본 연구의 참죽으로부터 추출된 다당류 분획은 식이섬유 단일 분획물이 아니며 식이섬유 외 비당류 물질을 함유하고 있어 bile acid 흡수지연 효과가 다소 낮은 것으로 판단된다. 그러나 WSPs와 WSPv는 투석 중반 이후 대조구에 비해 투과율의 저하가 뚜렷함을 보여 추후 이들 다당류 분획과 bile acid 흡착 능력에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

다양한 영양성분을 함유할 뿐만 아니라 생리활성이 우수한 참죽으로부터 수용성 다당류를 추출하고 이들의 생리기능성을 측정하였다. 이를 위해 참죽을 열수, 초음파 및 효소(Viscozyme, Shearzyme)를 이용하여 수용성 다당류를 추출하고, 추출법에 따른 수용성 다당류의 기능성을 비교하였다. Shearzyme 효소로 추출하여 얻은 수용성 다당류 분획의 수율과 총당 함량이 가장 높았

다. 참죽으로부터 추출된 수용성 다당류 분획의 산화방지 활성을 측정된 결과, 열수추출에 의해 얻은 수용성 다당류 분획물의 IC₅₀ 값이 가장 낮게 나타나 가장 높은 산화방지 활성을 보였다. Tyrosinase 저해활성은 측정 농도가 증가할수록 모든 추출군의 활성이 증가하였다. 포도당 흡수지연 효과를 확인한 결과, 모든 추출군은 포도당 흡수 지연 효과를 보였으며, 특히, WSPs는 대조구인 CMC의 포도당 흡수지연 효과와 유사한 값을 나타내었다. Bile acid 흡수지연 효과를 측정된 결과, bile acid의 투과율이 CMC에 비해 높아 흡수지연 효과가 낮은 것으로 나타났다. 이상의 연구 결과, 열수에 의해 추출된 수용성 다당류분획이 뛰어난 산화방지 및 미백활성을 보였으며, Shearzyme 효소추출물이 우수한 포도당 흡수지연 효과를 보였다. 이를 통해 참죽으로부터 추출된 수용성 다당류는 향후 기능성 식품 소재로서의 개발 가능성이 높을 것으로 판단된다.

References

- Park JC, You YB, Lee JH, Kim NJ. Anti-inflammatory and analgesic effects of the components from some edible plants. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 23: 671-674 (1994)
- Kim MH, Park SY, Jeong YJ, Yoon KY. Sensory properties of *Kalopanax pictus* and *Cedrela sinensis* shoots under different blanching conditions and with different thawing methods. *Korean J. Food Preserv.* 19: 201-208 (2012)
- Oh MH, Jang HL, Lim YJ, Yoon KY. Antioxidant activities of *Cedrela sinensis* hydrolysates prepared using various enzymes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 413-418 (2015)
- Park JC, Kim SW. Seasonal variation of flavonoid contents in the leaves of *Cedrela sinensis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 24: 578-581 (1995)
- Shin KS. Immunostimulating plant polysaccharides: Macrophage immunomodulation and its possible mechanism. *Food Sci. Ind.* 45: 12-22 (2012)
- Im HJ, Jang HR, Jeong YJ, Yoon KY. Chemical properties and antioxidant activities of the sprouts of *Kalopanax pictus*, *Cedrela sinensis*, *Acanthopanax cortex* at different plucking times. *Korean J. Food Preserv.* 20: 356-364 (2013)
- Shin, HJ, Jeon YJ, Shin HJ. Physiological activities of extracts of *Cedrela sinensis* leaves. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.* 23: 164-168 (2008)
- Ko SC, Kang SM, Ahn G, Yang HP, Kim KN, Jeon YJ. Antioxidant activity of enzymatic extracts from *Sargassum coreanum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 494-499 (2010)
- Shin SL, Lee CH. Antioxidant activities of ostrich fern by different extraction methods and solvents. *J. Life Sci.* 21: 56-61 (2011)
- Melecchi MIS, Pres VF, Dariva C, Zini CA, Abad FC, Martinez MM, Caramo EB. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers. *Ultrason. Sonochem.* 13: 242-250 (2006)
- Park SY, Yoon KY. Enzymatic production of a soluble fiber hydrolysate from Chinese cabbage waste and its health-related properties. *J. Food Biochem.* 39: 274-280 (2015)
- DuBois RN, Tsujii M, Bishop P, Awad JA, Makita K, Lanahan A. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 266: 822-827 (1994)
- Im HJ, Park BY, Yoon KY. Production of soluble dietary fiber of buckwheat hulls by enzymatic depolymerization and its characteristics. *Korean J. Food Sci. Technol.* 48: 97-103 (2016)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Gutteridge J. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *J. Biochem.* 224: 761-767 (1984)

16. Mau JL, Lin HC, Song SF. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res. Int.* 35: 519-526 (2002)
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
18. Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DH. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 891-896 (1995)
19. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428 (1959)
20. Boyd GS, Eastwood MA, MacLean N. Bile acids in the rat: studies in experimental occlusion of the bile duct. *J. Lipid Res.* 7: 83-94 (1966)
21. Kozarski M, Klaus A, Niki M, Vrvic MM, Todorovi N, Jakovljevi D, Griensven LJLD. Antioxidant activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *J. Food Compos. Anal.* 26: 144-153 (2012)
22. Fu L, Chen H, Dong P, Zhang X, Zhang M. Effects of ultrasonic treatment on the physicochemical properties and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from mushroom *Inonotus obliquus*. *J. Food Sci.* 75: 322-327 (2010)
23. Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt P, Testa B, Bre F, Zini R, Tillement J, Labidalle S, Guyot D, Chauvet-Monges A. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 25: 113-120 (1998)
24. Lee DH, Hong JH. Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Styela plicata* by extraction conditions. *J. Chitin Chitosan* 19: 130-137 (2014)
25. Hassas-Roudsari M, Chang PR, Pegg RB, Tyler RT. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chem.* 114: 717-726 (2009)
26. Baek GH, Jeong, HS, Kim H, Yoon TJ, Suh HJ, Yu KW. Pharmacological activity of Chaga mushroom on extraction conditions and immunostimulating polysaccharide. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1378-1387 (2012)
27. Goycoolea FM, Crdenas A. Pectins from *Opuntia* spp.: a short review. *J. Prof. Assoc. Cactus* 5: 17-29 (2003)
28. Aruoma OI, Cuppett SL. Antioxidant methodology: *in vivo* and *in vitro* concepts: The American Oil Chemists Society. Urbana, IL, USA. p.14 (1997)
29. Kwon GJ, Choi DS, Wang MH. Biological activities of hot water extracts from *Euonymus alatus* leaf. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 569-574 (2007)
30. Lee SJ, Seo JK, Shin JH, Lee HJ, Sung NJ. Antioxidant activity of wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) according to drying methods. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 605-611 (2008)
31. Wettasinghe M, Shahidi F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chem.* 67: 399-414 (1999)
32. Mau JL, Chang CN, Huang SJ, Chen CC. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta*, and *Termitomyces albuminosusmycelia*. *Food Chem.* 87: 111-118 (2004)
33. Yan F, Yang X, Liu C, Fu C. Extraction optimization of antioxidant polysaccharide from leaves of *Gynura bicolor* (Roxb. & Wild) DC. *Food Sci. Technol.* 34: 402-407 (2014)
34. Zha XQ, Wang JH, Yang XF, Liang H, Zhao LL, Bao SH, Luo JP, Xu YY, Zhou BB. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran. *Carbohydr. Polym.* 78: 570-575 (2009)
35. Park SJ, Song SW, Seong DH, Park DS, Kim SS, Gou JY, Ahn JH, Yoon WB, Lee HY. Biological activities in the extract of fermented *Codonopsis lanceolata*. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 983-988 (2009)
36. Chen JS, Wei CI, Marshall MR. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agr. Food Chem.* 39: 1897-1901 (1991)
37. Bae JM, Cho EK, Kim HY, Kang SH, Choi YJ. Biological analysis of enzymatic extracts from *Capsosiphon fulvescens* using the microbulbifer sp. AJ-3 marine bacterium. *J. Life Sci.* 22: 627-633 (2012)
38. Schneeman BO. Soluble vs insoluble fiber: different physiological responses. *Food Technol.* 41: 81-82 (1987)
39. Vahouny GV, Tombes R, Cassidy MM, Kritchevsky D, Gallo LL. Dietary fibers: V. Binding of bile salts, phospholipids and cholesterol from mixed micelles by bile acid sequestrants and dietary fibers. *Lipids* 15: 1012-1018 (1980)
40. Chen WJ, Anderson JW, Jennings D. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Exp. Biol. Med.* 175: 215-218 (1984)