

효소처리에 의한 백삼 저분자 화합물의 V79-4 세포주에 대한 항산화 활성

김영찬[#] · 임주혁 · 노정해 · 조장원 · 이영경

한국식품연구원

(2007년 10월 11일 접수; 2007년 11월 19일 수리)

Antioxidant activity of white ginseng extracts prepared by enzyme treatment on V79-4 cells induced by oxidative stress

Young-Chan Kim[#], Joo Hyuk Yim, Jeonghae Rho, Chang-Won Cho and Young-Kyung Rhee

Korea Food research Institute, Seongnam, 463-746, Korea

(Received October 11, 2007; Accepted November 19, 2007)

Abstract : This study examined the extraction yields, total phenolic compounds content and the antioxidant activities on V79-4 cells of white ginseng extracts prepared by enzyme treatment. Yields of crude extract were 29.5-76%, and total phenolic compounds content showed 0.45-2.2% according to enzyme treatments. Pectinase treatment group showed the highest values of extraction yields and total phenolic compounds content. Pectinase and α -amylase treatment groups protected V79-4 cell viability (above 50%) against H_2O_2 -induced oxidative damage. In the result of antioxidant enzyme activity evaluation in cells, enzyme treatments did not show the significant difference of SOD activity ($p>0.05$). However, pectinase treatment group exhibited increased CAT and GPx activities ($p>0.05$). Also, pectinase and protease treatment group inhibited MDA formation (>50%) in the lipid peroxidation protection experiment.

Key words : Korean ginseng, enzyme treatment, antioxidant activity, V79-4

서 론

활성산소는 인체에 해가 되는 슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical, $\cdot O_2^-$), 하이드록시 라디칼 (hydroxyl radical, $\cdot OH$), 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2), 일중항산소 (singlet oxygen, 1O_2)와 같은 산소화합물을 총칭하는 것으로 체내에서 일상적인 대사과정, 즉 전자전달계, peroxisome의 지방산 대사과정, 포식세포 (phagocytic cell) 등에서 생성된다^{1,2}. 체내 활성산소의 과잉은 세포 구성성분인 지질, 단백질, 핵산, 당, DNA 등에 산화적 손상을 일으켜 세포의 정상적인 대사를 저해하기도 하며, 이로 인하여 암, 심장질환, 동맥경화, 소화기질환, 자가면역질환 등의 각종 질병과 노화를 일으키는 것으로 알려져 있다^{3,4}. 식이에 의한 천연 항산화제의 섭취는 체내의 활성산소를 효과적으로 제거할 수 있으며, 식물체의 2

차 대사산물인 polyphenol 화합물의 활성산소 소거활성이 *in vivo*와 *in vitro*에서 확인되고 있어 식품 중 항산화 물질의 존재 및 함량은 기능성과 관련하여 매우 중요한 문제가 되고 있다^{5,6}.

인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 유효성분으로는 사포닌을 비롯한, 페놀 화합물, 폴리사세칠렌, 알카로이드, 다당체 등이 알려져 있다⁷. 인삼 내 유효성분이 사포닌 성분임이 제시된 이후 사포닌의 효능에 관한 연구들이 주로 이루어졌고, 중추신경계⁸, 각종 스트레스⁹, 항당뇨 작용¹⁰, 간 기능 강화작용¹¹, 심혈관계 장애 개선작용¹² 등에 관한 약리작용이 밝혀졌다. 그러나, 사포닌 이외 인삼 속에 함유된 polyacetylene 성분들이 암세포 증식을 억제하는 것이 밝혀지면서 사포닌 이외 유효성분의 생리활성에 대한 연구가 이루어지게 되었다¹³. 또한, 인삼 사포닌은 항산화 효과가 나타나지 않거나 미약한 것으로 보고되고, 인삼의 항산화 작용은 사포닌 이외 페놀성 성분에 의한 것으로 인식되고 있다¹⁴.

인삼으로부터 ferulic acid, cinnamic acid, caffeic acid 등

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-780-9145; (팩스) 031-780-9285
(E-mail) yckim@kfri.re.kr

10여종의 페놀산이 확인되었으며, maltol은 홍삼 특이성분으로 수삼으로부터 홍삼 제조시 생성되는 것으로 강한 활성산소 소거활성을 가지는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. Han 등¹⁶⁾은 개별 사포닌 Rg₁, Re, Rb₁보다 저분자 페놀성 물질인 maltol, salicylic acid, vanillic acid의 항산화 효과가 더 높다고 보고하였다. 또한 인삼은 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase (CAT), glutathion peroxidase (GPx) 등과 같은 체내 항산화계 효소의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. Lee 등¹⁷⁾은 SD rat에 인삼 물추출물을 24일간 투여하였을 때 간조직 내 SOD, catalase, glutathion peroxidase 활성이 유의적으로 증가하였다고 보고하였으며, Jun 등¹⁸⁾도 ICR계 수컷 생쥐에게 감마선을 조사한 후 홍삼 추출물의 효과를 시험한 결과 SOD, peroxidase, catalase의 활성의 회복 속도가 빨라진다고 보고하였다. 또한 임상실험을 통해 홍삼 투여는 체내 SOD 활성을 증가시키고, 혈청내 MDA 함량을 유의적으로 감소시키는 것으로 보고되었다^{19, 20)}.

현재까지 인삼의 항산화 활성에 대한 연구는 단일 성분과 단일 추출에 의한 연구 결과가 대부분으로 다양한 추출 방법에 따른 항산화 활성 측정은 이루어지지 않고 있으며, 주로 홍삼과 사포닌에 대한 연구가 대부분이었다. 따라서 본 연구에서는 백삼을 대상으로 효소분해를 이용하여 추출한 후 저분자 페놀성 화합물의 항산화 활성을 V79-4 세포주를 이용하여 시험하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 인삼은 금산에서 2003년 9월에 수확하여 건조한 4년근 백삼을 200 mesh 이하로 분쇄하여 사용하였다. [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] (MTT), hydrogen peroxide, xanthine oxidase (grade from milk, 40 unit), t-butyl hydroperoxide, glutathione은 Sigma chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였고, 세포배양에 사용된 시약은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)에 구입하여 사용하였고, 그 외의 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

효소처리

인삼 분말 100 g에 증류수 1 L를 가하여 현탁시킨 후 가수분해 효소 (protease; EC 3.4.24.32 from *Bacillus polymyxa*, 1.0 Unit/mg, α-amylase; from *Bacillus subtilis*, 52.9 Unit/mg, cellulase; from *Aspergillus niger*, 0.45 Unit/mg, hemicellulase; EC 232-799-9 from *Aspergillus niger*, 1.5 unit/mg, pectinase; from *Aspergillus niger*, 1.8 Unit/mg)를

건물량 기준으로 0.5% 첨가하여 12시간 동안 가수분해 시켰다. 가수분해가 끝난 시료는 여과 (Whatman No. 4) 후 감압 농축하여 에틸아세테이트를 가하여 페놀성 화합물을 추출하였다.

총페놀 화합물 함량

추출 시료 100 μl에 증류수 3 ml, 0.016 M K₃Fe(CN)₆ 1 ml, 0.01M FeCl₃/0.1N HCl 1 ml를 혼합하여 강하게 진탕한 후 실온에서 15분간 방치하고, stabilizer (H₂O: 1% gum arabic: 85% phosphoric acid=3:1:1, v/v/v) 5 ml를 첨가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하고 gallic acid에 대한 당량으로 환산하였다.

세포배양 및 추출

Chinese hamster lung fibroblasts V79-4 (ATCC CCL-93)은 미국 ATCC에서 분양받아 사용하였고, 5% CO₂, 95% O₂, 37에서 72시간 배양한 후 5% fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였으며, 이때 100 μg/ml streptomycin, 100 unit/ml penicillin과 2 mM의 L-glutamine을 넣어 사용하였다. 배양 후 dish의 배지를 제거하고 DPBS로 2회 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 모은 뒤 원심분리 (1,500 rpm, 3 min)하여 cell pellet을 얻었다. 여기에 DPBS 1 ml를 가하고 얼음 상에서 한 sample당 5초씩 3번 세포를 파쇄시켜 얻은 분쇄액을 -80°C에서 냉동 보관하였다.

Cell viability

세포의 viability는 MTT assay를 이용하여 실험하였다. 96 well plate에 V79-4 cell을 1.2×10⁵ cell/ml로 나누어 배양하였고 배양 후 16시간이 지난 후 시료를 처리하고 한 시간 뒤에 1 mM의 H₂O₂를 첨가하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 100 μl의 MTT stock solution (5 mg/ml)을 첨가하였으며 다시 4시간 뒤에 10 μl isopropanol을 첨가하여 570 nm에서 ELISA reader (Bio-Rad, USA)을 이용하여 측정하였다. 대조군의 formazan의 density는 100%로 표시하였으며, 나머지 추출물의 cell viability에 미치는 영향도 대조군에 대한 viable cell의 percentage로 표시하였다.

Superoxide dismutase (SOD) 활성

Superoxide dismutase 활성의 측정은 Liu 등²¹⁾의 방법을 변형하였다. 3 mM xanthine, 0.75 mM NBT, 3 mM EDTA, BSA와 효소액이 포함된 50 mM sodium carbonate buffer

(pH 10.2)에 xanthine oxidase (0.1 mg/ml)를 첨가하여 반응을 개시하였다. 30분간 반응 후 6 mM의 copper chloride를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 반응액은 1,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 그 상층액을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 NBT를 50% 환원시 필요한 효소의 양으로 표시하였다.

Catalase (CAT) 활성

Catalase 활성의 측정은 Carrillo 등²²⁾의 방법에 따라 측정하였다. 효소액과 3% (v/v) H₂O₂ 12 µl을 50 mM의 phosphate buffer (pH 7.0)에 첨가하여 최종 부피를 1.0 ml로 정용하였다. 반응액은 37°C에서 2분간 반응시킨 후에 240 nm에서 5분 동안 시료의 흡광도 변화를 측정 하였다. 1 unit은 분당 1 µM의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양으로 표시하였다.

Glutathione peroxidase (GPx) 활성

Glutathione peroxidase 활성 측정은 Bogdanska 등²³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 1 mM EDTA, 10 mM glutathione (GSH), 1 mM NaN₃, 1 unit의 glutathione reductase가 포함되어 있는 0.1 M의 phosphate buffer (pH 7.0)에 50 µl의 NADPH와 시료를 넣은 후 30 mM *t*-butyl hydroperoxide를 가하여 10초 단위로 1분간 340 nm에서 NADPH가 산화에 의해 감소되는 흡광도의 변화를 측정하였다. NADPH의 흡광계수는 6.22⁻¹M⁻¹을 사용하였다. 1분 동안 1 µM의 NADPH를 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

Lipid peroxidation inhibitory activity

Lipid peroxidation 측정은 Ohkawa 등²⁴⁾의 방법에 따라 malonaldehyde (MDA) 생성량을 측정하여 평가하였다. 시료를 처리한 세포를 60분간 배양한 후 1 mM의 H₂O₂를 첨가하여 다시 60분간 배양하였다. 차가운 PBS로 두 번 씻어준 후 1.15% KCl로 균질화시키고 100 µl의 세포 lysates를 취하였다. 8.1% SDS 2.1 ml과 20% acetic acid (pH 3.5) 1.5 ml, 0.8% TBA 1.5 ml을 넣은 후 95°C에서 120분간 가열하여 냉각한 후 5.0 ml의 *n*-butanol/pyridine (15:1, v/v)을 첨가하여 혼합하였다. 혼합액은 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 분리한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

통계처리는 SAS/STAT TM user's guide 8.0 프로그램을 이용하여 분산분석 ANOVA analysis of variance와 Duncan's protected least significant difference test를 이용하

여 실시하였다.

결과 및 고찰

추출수율 및 총페놀 함량

인삼 저분자 화합물의 추출수율을 높이기 위하여 가수분해 효소(protease, α-amylase, hemicellulase, cellulase, pectinase)를 사용하여 건물량 기준으로 0.5% 첨가하여 12시간 동안 가수분해 시킨 후 추출수율과 페놀성 화합물의 함량을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 조추출물의 추출수율은 pectinase 처리군에서 76.0%로 가장 높았으며, hemicellulase 처리군에서 29.5%로 가장 낮은 추출수율을 보였다. 인삼 추출시 처리효소에 따라 추출수율이 2배 이상 차이가 있는 것으로 나타났으며, 추출물의 성분 조성 및 함량에 대한 분석이 필요할 것으로 생각된다. 인삼 조추출물로부터 페놀성 화합물을 추출하기 위하여 에틸아세테이트를 가하여 용매분획한 결과 에틸아세테이트 회분의 수율은 pectinase (2.68%), cellulase (2.44%), α-amylase (1.65%), protease (1.63%)의 순이었으며, hemicellulase 처리군의 수율이 0.51%로 pectinase 처리군에 비하여 20% 수준이었다. 총페놀 함량은 pectinase 처리군에서 2.21%로 가장 높았으며, cellulase 처리군에서 0.45%로 가장 낮게 나타났다. Pectinase 처리군의 경우 추출수율과 총페놀 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며, cellulase의 경우 에틸아세테이트 회분의 수율은 2.44%로 가장 높았으나 총페놀 함량은 가장 낮은 것으로 나타났다. 김 등²⁵⁾은 홍삼 엑기스에 β-amylase와 transglucosidase을 처리하여 홍삼 엑기스중의 당류의 변화와 ginsenoside 함량 변화를 보고한 바 있으며, Shin 등²⁶⁾은 인삼 잎으로부터 pectinase 처리를 통하여 rhamnoglacturonan을 분리 동정하였다.

추출 수율 향상과 유용성분의 함량 증대를 위하여 효소를 이용한 추출방법이 많이 이용되고 있다. Kim 등²⁷⁾은 황기의 유효성분인 claycosin과 formononetin의 추출 함량을 높이기 위하여 펙틴, 탄수화물, 셀룰로오스 분해 효소의 처리 효과를

Table 1. Yields and total phenolic compounds content of ginseng extract treated with enzyme (% , dry basis)

	Crude extract	EtOAc fraction	Total phenol
Protease	34.3±1.7	1.63±0.1	0.69±0.04
α-amylase	43.1±0.9	1.65±0.2	0.95±0.06
Hemicellulase	29.5±2.5	0.51±0.3	0.96±0.15
Cellulase	44.7±0.9	2.44±0.1	0.45±0.11
Pectinase	76.0±1.3	2.68±0.2	2.21±0.09

Values are mean±SE.(n=3)

Table 2. Effect on the cell proliferation of ginseng extracts induced oxidative stress by H₂O₂ in V79-4 cells

	Concentration (μg/ml)		
	50	100	200
Protease	25.8±2.3	20±3.7	29±4.1
α-amylase	49.1±1.7	45±2.9	48±2.8
Hemicellulase	19.3±3.3	36±1.6	38±3.3
Cellulase	23.3±2.9	26±1.7	25±2.9
Pectinase	40.7±1.8	50±2.0	80±3.8
Catechin	20.9±3.4	26±5.3	62±4.2

Values are mean±SE.(n=3)

시험하였으며, 이외에도 함초²⁸⁾, 표버고섯²⁹⁾, 은행잎³⁰⁾을 효소 처리한 경우 유효성분의 추출수율이 증가하고 생리활성이 향상되었다. 인삼의 경우에도 추출시 효소처리를 통하여 추출수율을 2배 이상 증가시킬 수 있으며, 추출물에서 페놀성 화합물과 같은 생리활성 물질의 함량을 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.

V79-4 cell proliferation에 미치는 인삼 추출물의 효과

활성산소는 세포내 단백질, 지질, 핵산, DNA 등의 생체성분에 대한 산화적 스트레스를 유발하여 각종 퇴행성 질환의 원인이 된다. H₂O₂에 의한 V79-4 세포주의 산화적 스트레스 방어효과를 시험한 결과는 Table 2와 같다. 배양한 세포주에 일정량의 시료를 처리한 후 1시간 후에 H₂O₂를 이용하여 산화적 스트레스를 유발시켰을 때 시료 무처리군은 10% 정도의 낮은 세포 생존율을 보였으나, 시료 첨가에 의해 20-80%의 세포 생존율을 보였다. Pectinase 처리구의 경우 50 μg/ml 처리시 40%의 세포 생존율을 보였으며, 200 μg/ml 처리시 80%의 세포 생존율을 보여 효소처리구 중에 가장 높은 세포 보호효과를 보였다. α-amylase 처리구의 경우에는 처리농도에 관계없이 50% 정도의 세포 생존율을 보였으며, 모든 효소 처리구에서 저농도 (50, 100 μg/ml)에서는 대조구인 catechin과 유사한 세포보호 활성을 보였다. Kim³¹⁾ 등은 화기삼으로 제조한 홍삼 추출물의 V79-4 세포주에 대한 보호효과를 시험하였으며, Lee 등³²⁾도 빈랑자를 비롯한 9종의 한약재에 대한 세포보호 효과를 보고하였다. 또한 Kim 등³³⁾은 감태 추출물을 효소 처리하여 분획한 추출물의 경우 효소처리하지 않은 경우보다 항산화 효과와 V79-4 세포주에 대한 보호효과가 증가됨을 보고하였다.

SOD, GPx, CAT 활성

효소 처리하여 추출한 인삼 저분자 화합물 처리가 V79-4 세포주의 항산화 관련 효소계에 미치는 효과를 조사한 결과

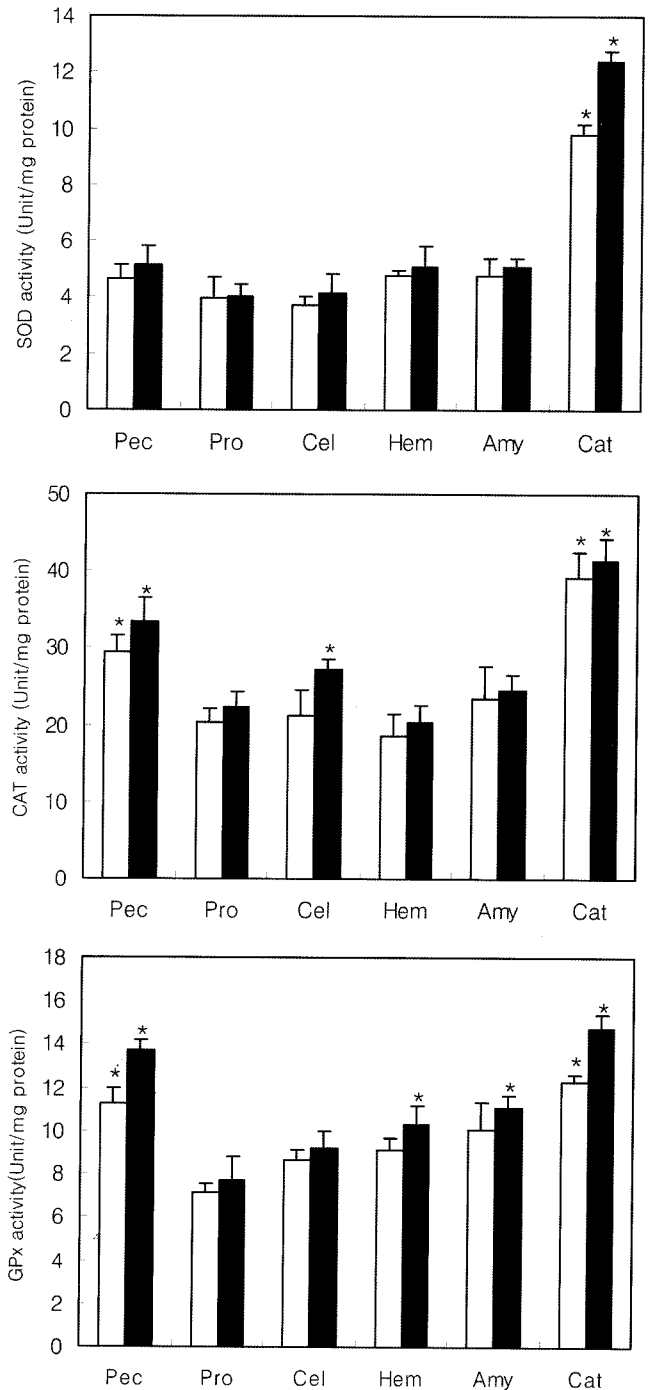


Fig. 1. Effect of ginseng extract on SOD, CAT and GPx activities induced oxidative stress by H₂O₂ in V79-4 cells. Pec; pectinase, Pro; protease, Cel; cellulase, Hem; hemicellulase, Amy; α-amylase, Cat; catechin, □; 50 μg/ml, ■; 100 μg/ml, *indicates significant difference at p<0.01.

는 Fig. 1과 같다. SOD 활성은 시료 50 μg/ml 처리시 3.7-4.78 unit/mg protein으로 동일 농도의 catechin (9.78 unit/mg protein)에 비하여 다소 낮게 나타났으며, 100 μg/ml 처리

시에도 4.0-5.1 unit/mg protein으로 농도별 활성 차이는 없었다. 또한 처리한 효소의 종류에 따라서도 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. GPx 활성은 50 µg/ml 농도에서는 7.1-11.2 unit/mg protein이었으며, 100 µg/ml 처리시에는 7.6-13.7 unit/mg protein으로 나타났다. Pectinase 처리군의 경우 가장 높은 GPx 활성을 보였으며, catechin과 비교했을 때 거의 동일한 활성을 가진 것으로 조사되었다. CAT 활성은 50 µg/ml 농도에서는 18.6-29.3 unit/mg protein이었으며, 100 µg/ml 처리시에는 22.3-33.4 unit/mg protein으로 나타났다.

SOD, GPx, CAT 등과 같은 효소는 체내 활성산소 소거와 관련된 항산화계 효소로 알려져 있다. 이들 항산화 효소는 서로 작용을 받고 있으며 세포내의 free radical의 소거와 생성에 깊은 관련을 가지고 있다. 특히 SOD는 산소대사의 유해작용에 대한 가장 중요한 방어효소의 하나로서 대사과정 중 생성되는 superoxide radical을 제거하기 때문에 생체 내에서 SOD의 방어 기구는 중요한 역할을 한다. Kim과 Park³⁴⁾은 8명의 남성에게 인삼 추출물 6g을 8주간 섭취하였을 때 항산화 관련 효소인 SOD와 CAT 활성이 각각 31%와 24% 증가하였다고 보고하였다. 또한 홍삼 추출물이 산화적 스트레스에 대해 SOD, peroxidase, catalase와 같은 항산화 효소계의 활성이 증가되고¹⁸⁾, 혈청내 MDA 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 보고되었다^{19, 20)}.

지질과산화 억제 활성

인삼 저분자 추출물의 지질과산화 억제활성을 알아보기 위해 H₂O₂ 처리에 의해 생성되는 V79-4 세포주 내의 MDA

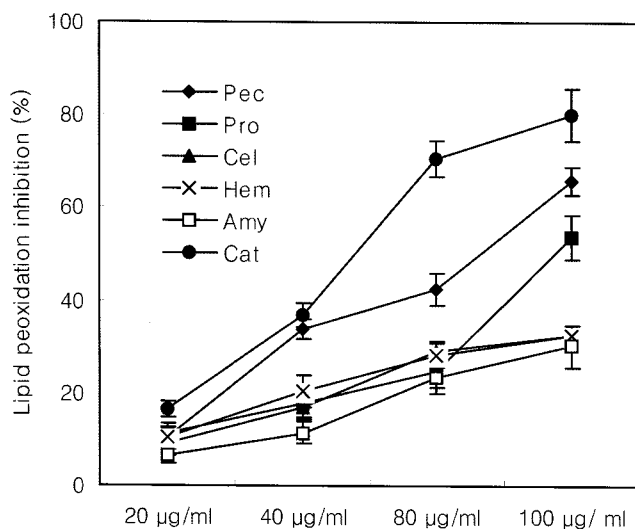


Fig. 2. Lipid peroxidation inhibitory activity of ginseng extract induced oxidative stress by H₂O₂ in V79-4 cells. The abbreviation is same as Fig. 1.

생성량을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 각 효소 처리구는 농도 의존적으로 지질과산화를 억제하였으며, 시료를 100 µg/ml로 처리하였을 때 pectinase 처리구가 65.8%, protease 처리구가 53.7%의 저해활성을 보였으며, catechin의 경우 80%의 저해활성을 보였다. 각 추출물들은 MDA 생성 저해활성의 차이는 있지만 농도 의존적으로 저해 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 이들의 IC₅₀치를 구한 결과 protease 처리구가 96.4 µg/ml, pectinase 처리구가 82.1 µg/ml, catechin이 53.8 µg/ml이었다.

Kim 등²⁸⁾은 효소 처리한 함초 물추출물을 급여한 흰쥐에서 지질대사 개선효과를 보고하였는데, 이는 효소처리에 의하여 페놀성 화합물의 함량 증가와 연관이 있는 것으로 보고하였다. 일반적으로 식물체 내의 페놀성 화합물의 함량과 항산화 활성간에는 높은 상관관계를 보인다고 알려져 있다^{35, 36)}. 이러한 페놀성 화합물의 높은 항산화 활성은 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 산화적 스트레스에 대한 방어효과 항산화 효소계의 활성 증가를 가져온다고 보고되고 있다^{37, 38)}.

요 약

본 연구는 효소분해를 통하여 인삼의 저분자 화합물을 추출하고 추출수율, 총페놀 함량, V79-4 세포주를 이용한 항산화 활성을 시험하였다. 조추출물의 추출 수율은 29.5-76%였으며, 총페놀 함량은 0.45-2.21%로 처리 효소에 따라 차이를 보였으며, pectinase 처리구가 추출 수율과 총페놀 함량이 가장 높았다. V79-4 세포주에 대해서는 pectinase 처리구와 α-amylase 처리구에서 50% 이상의 세포 보호효과를 나타내었다. 세포내 항산화 관련 효소계의 활성을 시험한 결과 SOD 활성은 처리 효소에 따른 유의적인 차이가 없었으나, CAT와 GPx 활성은 pectinase 처리구에서 유의적으로 높은 활성을 보였다. 또한 지질과산화 활성을 시험한 결과에서도 pectinase 처리구와 protease 처리구에서 50% 이상의 MDA 생성 억제를 보였다.

인용문헌

1. Proctor, P. H. : Free radicals and human disease. In Miquel, J. A. T. Quintannilha. H. Weber(ed.) Handbook of free radicals and antioxidants in medicine. Vol. , CRC Press Boca Raton. Florida. p. 17 (1992).
2. Zwart, L. L.; Meerman, J. H. N., Commandeur, N. M. and Verneulen, N. P. E. : Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Biol. & Med.* **26**, 202-226 (1999).

3. Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M. and Dolara, P. : Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food and Chem. Toxicol.* **39**, 1205-1210 (2001).
4. Gackowski, D., Kruszewski, M., Jawien, A., Ciecierski, M. and Olinski, R. : Further evidence that oxidative stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. *Free Rad. Biol. & Med.* **31**, 542-547 (2001).
5. Wang, S. Y. and Jiao, H. : Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5677-5684 (2000).
6. Burda, S. and Oleszaw, W. : Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2774-2779 (2001).
7. Attele, A. S., Wu, J. A. and Yuan, C. S. : Ginseng pharmacology, multiple constituents and multiple actions. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1685-1693 (1999).
8. Benishin, C. G., Lee, R. I., Wang, L. C. and Liu, H. J. : Effect of ginsenoside Rb₁ on central cholinergic metabolism. *Pharmacol.* **42**, 223-229 (1991).
9. Kim, N. D., Han, B. H., Lee, E. B. and Kang, J. Y. : Studies on ginseng on antistress effects. *Korean J. Pharmacogn.* **10**, 61-67 (1979).
10. Elma, Z. T., Ilian, E. Z. and Christina, I. H. : Effect of ginsenoside Rg₁ on insulin binding in mice liver and brain membrane. *Phytother Res.* **5**, 46-48 (1991).
11. Joo, C. N. : The preventive effect on the saponin fraction of *Panax ginseng* C.A. Meyer against ethanol intoxication of rat liver. *Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp.* 63-74 (1984).
12. Kang, S. Y., Kim, S. H., Schini, V. B. and Kim, N. D. : Dietary ginsenosides endothelium dependent relaxation in the thoracic aorta of hypercholesterolemic rabbit. *Gen. Pharmacol.* **26**, 483-487 (1995).
13. Hwang, W. I. and Oh, S. K. : Effects of petroleum extract of ginseng root on some enzyme activity in human colon cancer cell. *Korean J. Ginseng Sci.* **10**, 27-35 (1996).
14. Liu, Z. Q., Luo, X. Y., Sun, Y. X., Chen, Y. P. and Wang, Z. C. : Can ginsenosides protect human erythrocytes against free radical-induced hemolysis? *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 58-66 (2002).
15. Shin, J. G., Park, J. W., Pyo, J. K., Kim, M. S. and Chung, M. H. : Protective effects of a ginseng component, maltol(2-methyl-3-hydroxy-4-pyrone) against tissue damages induced by oxygen radicals. *Korean J. Ginseng Sci.* **14**, 187-190 (1990).
16. Han, B. H., Park, M. H., Han, Y. N. and Shin, S. C. : Studies on the antioxidant components of Korean ginseng(IV) Antifatigue active components. *Yakhak Hoeji* **28**, 231-235 (1984).
17. Lee, D. W., Shon, H. O., Lim, H. B. and Lee, Y. G. : Antioxidant action of ginseng: An hypothesis. *Korean J. Ginseng Sci.* **19**, 31-38 (1995).
18. Jun, C. and Chang, C. C. : The effect of red ginseng extracts on the superoxide dismutase, peroxidase and catalase activities in the liver of gamma ray irradiated mice. *Korean J. Ginseng Sci.* **17**, 29-34 (1993).
19. Choi, D. S., Kim, Y. K., Park, S. H., Kim, S. J., Choi, K. M. and Choi, J. S. : Effects of red ginseng on the lipid peroxidation of erythrocyte and antioxidant superoxide dismutase (SOD) activity in NIDDM patients. *Korean J. Ginseng Sci.* **21**, 153-159 (1997).
20. Choi, J. H., Lee, K. M., Kim, C. B. and Kim, H. J. : The effects of red-ginseng intaking on free radical produced during aerobic exercise in the elderly. *The 7th. Fall Congress. J. Kor. Exercise Nutrition.* 21-40 (1999).
21. Liu, F., Ooi, V. E. and Chang, S. T. : Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* **60**, 763-771 (1997).
22. Carrillo, M. C., Kanai, S., Nokubo, M. and Kitani, K. : (-) Deprenyl induces activities of both superoxide-dismutase and catalase but not of glutathion peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sci.* **48**, 517-521 (1991).
23. Bogdanska, J. J., Korneti, P. and Todorova, B. : Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in healthy male subjects in Republic of Macedonia. *Bratisl. Lek. Listy* **104**, 108-114 (2003).
24. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358 (1979).
25. Kim, N. M., Lee, J. S. and Lee, B. H. : Effects of β -amylase and trans glucosidase on the qualities of red ginseng extract. *J. Ginseng Res.* **23**, 93-98 (1999).
26. Shin, K. S., Kiyohara, H., Matsumoto, T. and Yamada, H. : Rhamnogalacturonan from the leaves of panax ginseng C.A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. *Carbohydr. Res.* **300**, 239-249 (1997).
27. Kim, M. J., Lim, K. R., Jung, T. K. and Yoon, K. S. : Anti-aging effects of *Astragalus membranaceus* root extract. *J. Soc. Cosmet. Sci.* **33**, 33-40 (2007).
28. Kim, K. R., Jang, M. J., Choi, S. W., Woo, M. H. and Choi, J. H. : Effects of water extract from enzymic-treated hamcho(*Salicornia herbacea*) on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 55-60 (2006).
29. Park, N. Y. and Jeong, Y. J. : Quality properties of oak mushroom(*Lentinus edodes*) based on extraction condition and enzyme treatment. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 1273-1279 (2006).

30. Kim, B. Y., Lee, C. G., Whang, W. K. and Huh, J. D. : Studies on the extraction of active components in Ginkgo biloba leaves by enzyme treatments. *Korean J. Pharmacogn.* **20**, 43-47 (1989).
31. Kim, K. T., Yoo, K. M., Lee, J. W., Eom, S. H., Hwang, I. K. and Lee, C. Y. : Protective effect of steamed American ginseng(*Panax quinquefolius* L.) on V79-4 cells induced by oxidative stress. *J. Ethnopharmacol.* **111**, 443-450 (2007).
32. Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J. S., Jeong, H. S. and Kim, J. H. : Screening of medical plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci.* **73**, 167-179 (2003).
33. Kim, K. N., Heo, S. J., Song, C. B., Lee, J. H., Heo, M. S., Yeo, I. K., Kang, K. A., Hyun, J. W. and Jeon, Y. J. : Protective effect of *Ecklonia cava* enzymatic extracts on hydrogen peroxide-induced cell damage. *Proc. Biochem.* **41**, 2393-2401 (2006).
34. Kim, S. H. and Park, K. S. : Effects of *Panax ginseng* extract on lipid metabolism in Humans. *Pharmacol. Res.* **48**, 511-513 (2003).
35. Verzelloni, E., Tagliazucchi, D. and Conte, A. : Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chem.* **105**, 564-571 (2007).
36. Campanella, L., Bonanni, A. and Tomassetti, M. : Determination of the antioxidant capacity of samples of different types of tea, or of beverages based on tea or other products, using a superoxide dismutase biosensor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 725-736 (2003).
37. Silvina, B. and Lotito, B. F. : Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Rad. Biol. & Med.* **41**, 1727-1746 (2006).
38. Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Bauchart, D. and Durand, D. : Plant extracts rich in polyphenols(PERP) are efficient antioxidants to prevent lipoperoxidation in plasma lipids from animals fed *n*-3 PUFA supplemented diets. *Animal Feed Sci. Technol.* **136**, 281-296 (2007).