

Aspergillus niger 효소에 의한 길경 사포닌(플라티코딘)의 전환 및 항산화 활성 비교

강주희 · 지근익 · 위혜정 · 황인경[†]
서울대학교 식품영양학과

The Transformation of Saponin *Platycodi Radix* by *Aspergillus niger* and Anti-oxidation Evaluation of the Transformed Metabolites

Ju Hui Kang, Ji Gnu Uk, Wui Hye Jung and In Kyeung Hwang[†]

Department of food Nutrition, Research Institute of Human Ecology, Seoul National University

Abstract

The principal objective of this study was to assess the possibility of transforming platycodin glycosides using various strains of probiotic bacteria and edible fungi. Among the experimental microorganisms assessed herein, *Aspergillus niger* KCTC 6909 evidenced the highest level of platycodin glycoside hydrolysis during fermentation. Particularly in cases in which the organism was incubated in the presence of rhamnose and platycodins. In order to produce the enzyme from *Aspergillus niger* effectively, various incubation conditions were assessed in order to determine the optimal conditions. The cytotoxicity on V79-4 (Chinese-hamster lung fibroblasts, normal cells) of platycodin was reduced significantly after conversion (concentration on 500 µg/mL, 1000 µg/mL); DPPH radical scavenging activity before conversion was 35.05% , and was 57.44% afterward. We noted significantly higher conversion activity inhibiting oxidative degradation. In conclusion, these results indicate that the proper combination of food microorganisms -and fermentation conditions can result in an increase in the glycoside hydrolysis of platycodin the resultant products of which reduce cytotoxicity – and increase anti-oxidant activity.

Key words: *platycodi radix*, platycodin, *Aspergillus niger*, anti-oxidation activity

1. 서론

길경(*Platycodi radix*)은 초롱과(campanulaceae)에 속하는 다년초 도라지(*Platycodon grandiflorum* A. De Candolle)의 뿌리 부분으로, 대한 약전에서는 도라지의 뿌리 부분을 물로 씻어서 가는 뿌리를 제거하고, 그대로 또는 cork피를 제거하여 말린 것을 길경으로 규정하고 있다. 도라지는 한국, 중국, 일본에 널리 이용되어 왔으며 채소로도 많이 이용되고 있다. 이외에도 진정, 해열, 진통 작용 및 항궤양, 혈압강하 작용 등에 관한 보고가 있으며 항암활성과 비만에도 효과적임이 보고되었다(이은방 1974).

호기성 생물체의 경우, 생체 내에 필요한 에너지를 생산하는 호흡 대사 과정에서 대부분의 산소는 산화적 인

산화 과정을 통해 정상적으로 환원되고 있으나, 일정량의 산소는 부분 환원되어 계속적으로 반응성이 높은 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)이라는 유해 물질을 생성하게 된다(Halliwell B와 Gutteridge JMC 1992). 활성산소종에는 hydroxyl radical(OH·), superoxide anion radical(O₂⁻), peroxy radical(RO₂)과 같은 자유기 라디칼들과 라디칼의 형태가 아닌 과산화수소(H₂O₂), singlet oxygen과 오존 등이 있는데 이러한 과정으로 생성된 ROS는 생체막 지질의 과산화를 유발하여 그 2차 산물로 결국 malondialdehyde(MDA)나 4-hydroxynonenal(4-HNE)와 같은 지질 과산화 물이 축적되도록 한다(Halliwell B 1996).

ROS는 식균 작용이나 면역체계에서도 생성되어 이물질 침입에 대한 방어기작으로 이용되고 있으나, 체내에 고농도로 존재하는 경우 높은 반응성으로 인하여 산화적 스트레스를 유발하고 DNA 변이와 노화를 촉진한다(Halliwell B 1996). 이러한 자유기에 대한 방어 기작으로 생물들은 superoxide dismutase, catalase, glutathione pero-

[†]Corresponding author: In Kyeung Hwang, College of Human Ecology, Seoul National University
Tel: 02-880-5708
Fax: 02-882-5708
E-mail: ikhwang@snu.ac.kr

xidase와 같은 항산화 효소체계를 가지고 있으며 그 외 항산화 물질로 비타민 A, C, E나 glutathion 등이 활성산소종을 제거할 수 있다. 효소적 방어기작에서 superoxide dismutase는 superoxide anion radical(O_2^-)을 과산화수소(H_2O_2)로 변환시키고 생성된 H_2O_2 는 catalase에 의해 물과 산소 분자로 분해된다. 생성된 H_2O_2 와 환원형 glutathione의 소비로 불포화지방산으로부터 생성된 hydroperoxide는 seleno-dependent glutathione peroxidase(GPx)에 의해 분해된다(Halliwell B 1996).

생체 내에서 일어나는 이러한 반응을 제어하기 위해 생리 활성 소재를 개발하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있는(Chung HY와 Kim HB 2000, Kim EY 등 2004) 가운데 과일과 채소의 섭취는 식도암, 대장암 등과 같은 암, 심혈관 질환, 뇌기능장애 등 퇴행성 질환의 위험성을 낮춘다고 보고되고 있다(Ames BN 1998).

이소플라본 비당체는 배당체보다 더 빨리 흡수되고 비당체가 많은 물질이 배당체가 많은 물질보다 관상동맥 심장질환과 같은 만성 질환을 예방하는데 더 효과적이라고 보고되어 있다(Xu X 등 1995). 또한 비당체를 섭취했을 때 배당체를 섭취한 것보다 혈중 농도가 더 높았다(Izumi T 등 2000). 최근, 인삼의 배당체인 ginsenoside를 경구 섭취하였을 때 장내 미생물에 의해 대사되고 그 대사 산물이 다양한 약리학적 효능을 나타낸다는 것이 밝혀져 있다(Karikura M 등 1991, Akao T와 Kobashi K. 1998). 『생약학(한대석, 1998)』을 보면, 여러 효능을 가지고 있는 길경 추출물의 주성분은 platycodin D이며 이에 결합한 당은 오탄당인 D-apiose로서 platycodins의 생리작용과 밀접한 관계에 있는 것으로 보고 있다. 이와 같이 사포닌 배당체의 완전 혹은 부분 deglycosidation은 부작용의 완화와 함께 새로운 생활성체로의 검색에 대한 접근으로 이용될 수 있다.

사람이나 동물에서의 사포닌의 deglycosidation은 완전히 가수분해된 자유 prosapogenin으로 배출되기 위해 위산이나 장내 세균의 deglycosidase에 의해 매개되어야만 한다. 화학적 가수분해와 달리 효소에 의한 배당 사슬의 부분적 가수 분해는 glycosidic bond를 분리하는데 도움을 주고 새로운 산출물을 생성할 수 있다. 이것은 천연 사포닌의 구조적 변형과 기능적 개선에 좋은 수단이 될 수 있다. 길경의 사포닌인 platycodin은 알려진 약리학적 효능에도 불구하고 특이한 아린 맛과 쓴 맛을 가지고, 복강 내로 투여 시 용혈 독성을 잃는다고 알려져 있다(Lee EB 1975). 이를 바탕으로 길경 내의 배당체를 식품 미생물을 이용하여 전환시키는 것은 중요한 약리학적 효과와 향상된 안전성, 아질산염 소거능, 관능치를 가진 특이적으로 변형된 형태의 platycodin을 산출한다고 보고되었다(위혜정 2005).

본 연구는 platycodin을 전환시켜 전환 전과 전환 후의

자유기 소거능을 측정함으로써 항산화성을 살펴보았으며, 세포주를 이용하여 세포 독성 및 산화적 스트레스에 대한 보호효과를 측정함으로써 생리 활성을 살펴보았다. 세포주의 선택에 있어서는 폐가 산화적 스트레스에 매우 민감한 기관이라고 보고되고 있는(Pryor WA 등 1998) 점을 감안하여, 산화적 스트레스에 대한 전환 전, 후의 효과를 알아보기 위해 폐 조직에서 유래된 Chinese hamster lung fibroblast(V79-4)라는 세포주를 이용하였다(Kang KA 등 2005).

II. 실험재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에서는 경동시장에서 길경 200 g을 구입한 후, methanol 1 L를 가하여 2시간씩 2회 반복 환류 추출한 후 여과하여 조추출액을 조제하였다. 조추출물을 감압 농축하여 증류수에 현탁한 후 극성에 따라 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol 순으로 용매 분획하였다. 분획한 최종 물층을 흡착수지(Diaion HP-20 resin)를 이용하여 60~80% methanol로 내려 얻은 후에 감압 농축 및 동결 건조하여 최종 조사포닌(crude platycodin, CP) 25.05 g(12.52%)을 얻었다.

2. 실험 방법

1) 세포 외 분비 효소의 추출

*A. niger*로부터 세포 외로 분비되는 효소를 추출하여 사용하였다. PDA에서 배양한 *A. niger*는 포자를 포자생리 식염수(0.005% Tween 80, 0.9% NaCl)에 풀어 수거한 후 무균 상태에서 mL 당 10^6 개에 해당하도록 potato dextrose broth(PDB)에 접종하였다. 30°C, 140 rpm에서 6일 동안 진탕배양기(SI 600R, Jeio Tech, Korea)에 배양한 후 꺼내어 원심분리(3000 * g, 40분, 4°C)로 균사체를 제거하고 여액을 모아 다음 실험에 사용하였다. 여액은 0.45 µm filter로 여과한 후 아미콘(Amicon Ultra-15, 10,000 MWCO, Millipore, U.S.A.)에 넣어 원심분리(3000 * g, 20분, 4°C)하여 분자량 10,000 이상의 미정제효소액을 얻었다. 미정제효소액은 처음 부피의 10분의 1이 되도록 phosphate buffer를 이용하여 희석하였다.

2) *A. niger*에서의 platycodin 분해 효소 생산의 최적화

Dupin 등(Dupin I 등 1992)의 방법을 응용하여 platycodin을 분해할 수 있는 효소를 얻기 위해 최소배지(% w/v): (NH_4)₂SO₄, 0.8(% w/v) ((NH_4)₂HPO₄, 0.3(% w/v) KH₂PO₄, 0.1(% w/v) MgCl₂·H₂O, 0.1(% w/v))를 사용하였다. 탄소원으로 β-D(+)-glucose(Sigma, St. Louis, U.S.A.), α-L-rhamnose(Sigma, Steinhelm, Germany), rutin(Sigma, St. Louis, U.S.A.), (+)-xylose(Sigma, St. Louis, U.S.A.), platy-

codin, L(+)-arabinose(Sigma, St. Louis, U.S.A.)를 각각 물에 녹인 후 120°C에서 15분간 멸균 후 사용하였다. 최소 배지는 100 mL 목 넓은 삼각 플라스크에 넣어 멸균 후 무균적으로 탄소원을 배합하여 첨가하고 총 부피는 20 mL로 하였다. PDA에서 배양한 *A. niger*의 포자를 포자 생리 식염수(0.005% Tween 80, 0.9% NaCl)에 풀어 수거한 후 무균 상태에서 mL 당 10⁷개에 해당하도록 접종하였다. 30°C, 140 rpm으로 6일간 배양한 후 원심분리(3000 * g, 20분, 4°C)로 균사체를 제거하고 여액을 모다 다음 실험에 사용하였다. 배지의 pH는 6으로 맞추었다.

3) 미정제효소를 이용한 platycodin의 전환

위와 같이 미생물에서 얻은 미정제효소액에 1%의 PD를 첨가하여 37°C 배양기에서 배양하여 최적의 시간을 탐색하였다. 반응을 끝낸 후에 TLC로 반응 유무를 확인하기 위하여 n-butanol로 추출한 후 butanol 층을 이용하였다. 반응 전 후의 비교 실험에 이용할 것은 여과하고 chloroform, ethyl acetate, butanol로 분획한 후 용매를 완전히 날린 후 사용하였다.

4) 항산화 활성 측정

DPPH 자유기 소거 활성 측정

Blois(Blois MS 1958)의 방법을 응용하여 시료 0.5 mL에 0.3 mM DPPH(1,1-Diphenyl-s-picrylhydrazyl, Sigma Chemical Co., USA)용액 2 mL를 넣고 37°C에서 30분간 방치한 후, 분광광도계(DU 650 spectrophotometer, Beckman, USA)로 517 nm에서 흡광도 감소를 통하여 DPPH의 잔존량을 측정하였고, 다음 식에 의하여 항산화성을 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

세포 생존률 측정

Chinese Hamster lung fibroblasts인 V79-4 세포(ATCC, CCL-93)는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양 받아 10% fetal bovine serum(FBS ; Gibco™ Invitrogen, USA)과 100 unit/mL의 penicillin 및 100 µg/mL의 streptomycin(Gibco™ Invitrogen, USA)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium ; Gibco™, Invitrogen, USA)을 사용하여 배양하였다. 2일 간격으로 배지 교환 및 계대 배양을 하였다.

Platycodin의 세포 생존률 실험은 Nara(Nara E 등 2001)의 방법에 따라 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 tetrazolium salt의 cleavage로 형성된 보라색 formazan의 정도를 측정함으로써 상대적인 세포의

생존률을 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT : Sigma Chemical Co., USA)시약을 사용하여 측정하였다. 즉, V79-4세포를 5×10⁵ cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주한 후 37°C, 5% CO₂(Sanyo, Japan)에서 24시간 배양한 후, 배양에 사용된 배지를 제거하고 각각의 세포를 배양하는 배지에 녹인 여러 가지 농도(1000, 500, 100, 10, 1 µg/mL)의 시료를 분주하였다. 다시 72시간 배양한 후, 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 well 당 10 µL씩 분주하였다. 추가로 4시간 배양 후, 2-propanol에 녹인 0.04 N HCl을 100 µL 넣은 후 ELISA microplate reader(Bio-rad, Benchmark, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Lipid peroxidation 억제능 측정

Ohkawa의 방법(Ohkawa H 등 1997)에 따라 생성된 malondialdehyde(MDA)의 양을 측정함으로써 lipid peroxidation을 측정하였다. V79-4세포에 배지를 녹인 시료들을 1시간 동안 처리한 후 1 mM hydrogen peroxide를 가해주고 다시 1시간 동안 배양하였다. PBS로 헹구고 1.15% KCl과 함께 세포를 떼어낸 후 sonicator(VCX 400, Sonic & Materials Inc, USA)로 파쇄시켰다. Cell lysate 100 µL에 8.1% SDS 200 µL, 20% acetate acid 1.5 mL 증류수 700 µL를 가하고 95°C에서 120분간 가열하였다. 상온까지 식힌 후에 n-butanol이 pyridine을 15:1(v/v)로 섞인 혼합물을 5 mL씩 가하고 vortex를 이용하여 잘 섞어주었다. 1500 rpm에서 10분 동안 원심 분리 후에 상층액의 흡광도를 532 nm에서 분광 광도계(DU 530 spectrometer, Beckman, USA)를 이용하여 측정하였다.

5. 통계 분석

통계 처리는 SAS 프로그램을 이용하여 분산 분석(analysis of variance) 및 Duncan의 다중 범위 시험법(Duncan's multiple range test)과 Student's *t*-test를 적용하여 실시하였으며 probability values는 *p*<0.05, *p*<0.01, *p*<0.001 수준에서 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 추출 수율

길경을 메탄올로 추출하여 얻은 조추출물의 수율은 29.19±3.41%였으며, 메탄올 추출물을 순차적으로 용매 분획하여 농축했을 때 각 분획물의 수율은 핵산층 0.5±0.15%, 클로로포름층 1.4±0.32%, 에틸아세테이트층 0.4±0.07%, 부탄올층 3.7±1.45%, 물층이 21.94±7.13%였다. 분획한 최종 물층을 흡착수지를 이용하여 정제한 후에 감압 농축 및 동결 건조하여 최종 조 사포닌 12.52±1.89%을 얻었다(Fig. 1).

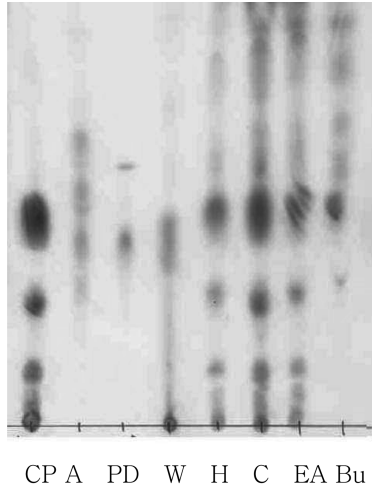


Fig. 1. The TLC profile of platycodin transformed by extracellular enzyme from *A. niger*.

CP : crude platycodin, A : crude platycodin transformed by crude enzyme from *A. niger* PD : platycodin D, W: water layer, H : Hexane layer, C: chloroform layer, EA: ethyl acetate layer, Bu: buthanol layer

2. 항산화 활성

1) 전환된 Platycodin의 세포 생존률

Platycodin의 세포 생존률 실험은 정상 세포인 Chinese hamster lugh fibroblast를 이용하여 세포가 사멸하는 정도를 알아보았다. Fig. 2를 보면, 전환 전의 CP는 농도에 의존적으로 모든 농도(1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL)에서 세포독성이 나타나는 것을 알 수 있다(92.23%, 84.67%, 81.18%, 67.56%, 44.98%). 전환 후의 CP 대사체는 역시 농도에 의존적으로 모든 농도(1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL)에서 세포 독성이 나타났다(96.88%, 89.92%, 84.94%, 73.64%, 59.09%). 전환 전과 전환 전후의 차이는 500 µg/mL, 1000 µg/mL 농도에서 유의적으로 나타났으며, 그 외의 농도에서도 전환 후의 viability가 높게 나타났다(Fig. 2).

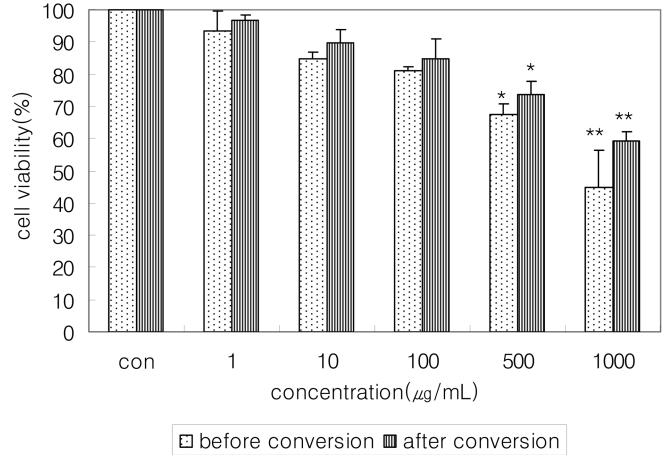


Fig. 2. The cell viability of crude platycodin and the transformed metabolites.

¹⁾ Control group treated only medium without platycodin. All mean value are triplicate determinations.

*significant at p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

이는 CP가 미생물을 이용하여 전환되고 당 부분이 일부 혹은 전부 떨어져 나가면 세포에 대한 독성이 크게 감소하여 안전성이 더 커졌다고 말해주는 결과이다.

2) DPPH 자유기 소거 활성

Platycodin의 항산화 활성을 알아보기 위하여 DPPH 자유기 소거능을 측정하였고, 그 결과는 Table 1과 같다. Platycodin의 DPPH자유기 소거능은 35.05%에서 57.44% 정도의 억제 활성을 보였으며 전환 후 4000 µg/mL platycodin에서 가장 큰 높은 억제 활성을 보였고, 전환 전보다 전환 후의 억제 활성이 모든 농도에서 높게 나타났다. 전환 전, 후의 차이는 모든 농도에서 유의적 이었으며, 특히 500 µg/mL, 2000 µg/mL, 4000 µg/mL에서는 p<0.001 수준에서 유의적으로 나타났다. 이는 CP가 미생물을 이용하여 전환되고 당 부분이 일부 혹은 전부 떨어져 나가면서 항산화 활성에 긍정적인 영향을 미치는 것이라 보이는 결과이다(Table 1).

Table 1. DPPH radical scavenging activity of platycodin.

µg/mL/Treatment	100	500	1000	2000	4000	Concentration effect ²⁾	F Value
before conversion	3.42±2.18 ^{1)a}	11.05±3.22 ^b	18.09±7.51 ^c	25.43±2.47 ^d	35.05±6.45 ^e	***	38.05
After conversion	10.12±4.91 ^a	27.25±6.94 ^b	30.57±2.93 ^c	44.93±4.23 ^c	57.44±1.94 ^d	***	94.89
conversion effect ³⁾	**	***	*	***	***		
t Value	-3.14	-6.98	-3.77	-8.2	-7.08		

All mean value are triplicate determinations.

¹⁾ Means±standard deviation

²⁾ Different superscripts within concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05

³⁾ Different superscripts within conversion are significantly different by Paired t-test at p<0.05

N.S: Not significant, * significant at p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Table 2. Malondialdehyde(MDA) concentration of crude platycodin and the transformed

µg/mL/Treatment	100	200	concentration effect ²⁾	F Value
before conversion	25.90±3.77 ^{1)a}	24.30±1.56 ^a	N.S.	0.47
after conversion	12.09±1.61 ^a	9.29±0.90 ^a	**	6.92
conversion effect ³⁾	N.S.	**		
t Value	9.37	10.57		

All mean value are triplicate determinations.

¹⁾ Means±standard deviation

²⁾ Different superscripts within concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05

³⁾ Different superscripts within conversion are significantly different by Paired t-test at p<0.05

N.S: Not significant, * significant at p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

3) Lipid peroxidation 억제능

전환 전과 후의 platycodin의 lipid peroxidation 억제능을 알아보기 위하여 malondialdehyde(MDA) 양을 측정하였고, 그 결과는 Table 2와 같다. 전환 전 Platycodin과 전환 후 platycodin의 malondialdehyde(MDA)은 전환 후의 MDA의 양이 100 µg/mL, 200 µg/mL 농도에서 각각 12.09 mM, 9.29 mM 생성되었다. 이는 전환 전 Platycodin 100 µg/mL, 200 µg/mL 농도에서 생성된 25.90 mM, 24.30 mM 보다 46.7%, 38.23%씩 감소된 것이다. 특히 200 µg/mL 농도에서는 전환 전과 전환 후의 차이가 p<0.001 수준으로 유의적으로 나타났다. DPPH 자유기 소거능에서 보여준 결과와 마찬가지로 전환 체의 항산화 활성이 높음을 알 수 있고 이것으로 미루어 항암이나 항염 연구를 계속한다면 비슷한 결과가 나올 것이라 예상된다. 또한 배당체의 전환 연구에 대한 기초자료로서 가치가 있다고 판단되어진다(Table 2).

IV. 요약

본 연구에서는 길경을 추출, 농축, 정제하여 crude platycodin을 얻은 후, 식품 미생물을 이용하여 길경의 배당체인 platycodin의 당 사슬 부분을 일부 가수분해하여 전환할 수 있는 방법을 모색하였다. 그리고 platycodin의 전환 전과 전환 후의 세포주를 이용한 세포 독성, 항산화 활성 및 항산화 효소 활성에 대해 비교하여 보았다. Chinese Hamster lung fibroblast인 V79-4 세포 독성실험 결과, 전환 전에 비교하여 전환 후에 더 나은 세포 생존률을 보였다. 후에 진행된 DPPH 자유기 소거능을 측정실험과 lipid peroxidation 억제능을 알아보기 위하여 malondialdehyde(MDA) 양을 측정한 결과 전환 후에서 더 높은 항산화 활성이 나타나는 결과를 보였다.

따라서, 식품이나 생약 소재 배당체의 구조를 식품 미

생물을 통해 안전하게 전환시키면 그에 따라 독성, 활성 등이 변화해 새로운 성질을 가진 유도체를 만들어 낼 수 있고, 이러한 전환체는 상대적으로 높은 생리활성을 가지는 것을 알 수 있었다. 따라서 이상의 결과를 종합하여 보면, 식품이나 생약 소재 배당체의 구조를 식품 미생물을 통해 안전하게 비당체로 전환시키면 그에 따라 독성, 활성 등이 변화해 새로운 성질을 가진 유도체를 만들어 낼 수 있다.

본 연구에서 살펴본 platycodin의 전환 전과 전환 후의 항산화 생리활성은 대부분이 전환 후의 platycodin 활성이 높게 나타났으며, 이는 전환체가 새로운 식품 소재로서의 가능성을 시사한다고 판단된다.

V. 감사의 글

본 연구는 과학기술부 국가지정연구실(NRL)사업의 지원으로 수행되는 프로바이오틱스 기반 기능성 식품소재 설계 및 평가 사업(과제 번호M10300000321-06J0000-32110)의 일환으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 위혜정. 2005. 아스퍼질러스 나이거의 효소에 의한 길경 사포닌(플라티코딘)의 전환 및 전환체의 특성연구. 석사학위논문. 서울대학교. pp 32-57
- 이은방. 1974. 길경의 약리학적 연구. 생약학회지. 5(1):49
- Akao T, Kobashi K. 1998. Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb1 by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration measurement of compound K by immunoassay. Biol Pharm Bull 21(3):245-249
- Ames BN. 1998. Micronutrients prevent cancer and delay aging. Toxicology Letters 102(1):5-18
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radicals. Nature 181:1199-1201
- Chung HY, Kim HB. 2000. In vitro Studies on the superoxide scavenging activities, the cytotoxic and the immunomodulating effects of thirteen kinds of herbal extracts. Korean J Food Sci Technol 32(3):699-705
- Dupin I, Ziya G, Jean C S, Claude B, Oubadjim. M, Claude T. 1992. Production of β-apiosidase by *Asperillus niger* : Partial purification, properties, and effect on terpenyl apisyglucosides from grape. J Agric Food Chem 40(10):1886-1891
- Halliwell B, Gutteride JMC. 1992. Free radical, antioxidants and human disease : where are we now?. J Labora Clini Med 119(3):598-620
- Halliwell B. 1996. Andioxidants in human health and disease. Annual Review of nutrition 16:33-50
- Izumi T, Mariusz K P, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than

- their glucosides in Humans. *J Nutr* 130:1695-1699
- Nara E, Hayashi H, Kotake M, Miyashita K, Nagao, 2001. Acyclic carotenoids and their oxidation mixtures inhibit the growth of HL-60 human promyelocytic cells. *Nutrition and cancer* 39:273-283
- Kang KA, Lee KH, Chae SW, Zhang R, Jung MS, Lee YK, Kim SY, Kim HS, Joo HG, Park JW, Ham YM, Lee NH, Hyun JW. 2005. Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS letters* 579(12):6295-6304
- Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, Takino Y. 1991. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of metabolism of ginseng saponins VII. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside- Rb 1 and -Rb 2 in the digestive tract of rats. *Chem Pharm Bull* 39(9):2357-2361
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidants activity of some medicinal plant. *Korean J Food Sci Technol* 36(2):333-338
- Lee EB. 1975. Pharmacological activities of crude platycodin: Terpenoid Symposium proceedings Natural Products Research Institute Seoul. Seoul National University. pp 52-64
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1997. Assay for lipid peroxide in animal tissues by hiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2):351-358
- Pryor WA , Stone K, Zang LY, Bermudez E. 1998. Fractionation of aqueous cigarette tar radical cause DNA damage. *Chemical Research in Toxicology* 11(3):441-448
- Xu X, Harris K, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S. 1995. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr* 125(9):2307-2315

2007년 6월 4일 접수; 2008년 8월 11일 심사(수정); 2008년 8월 11일 채택