버섯균사체를 달리한 발효가시오가피 추출물의 항산화 활성 및 아질산염 소거능

김단비 · 신기해 · 이종석 · 이옥환 · 박인재^{1,*} · 조주현^{1,*}

강원대학교 식품생명공학과, ¹(주) 휴림 중앙연구소

Antioxidant and Nitrite Scavenging Activities of *Acanthopanax senticosus* Extract Fermented with Different Mushroom Mycelia

Dan-Bi Kim, Gi Hae Shin, Jong Seok Lee, Ok-Hwan Lee, In-Jae Park¹, and Ju-Hyun Cho^{1,*}

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

¹Hurum Central Research Institute

Abstract This study was designed to investigate the antioxidant activities (ORAC value, DPPH and ABTS radical scavenging activity, FRAP activity, and reducing power) and nitrite scavenging activities of *Acanthopanax senticosus* extracts fermented with the mycelia of three different mushroom species: *Ganoderma lucidum*, *Phellinus linteus*, and *Hericium erinaceus*. The highest total phenol content (42.09 GAE mg/g) and ORAC value (74,912 μ M TE/g) were observed in a hot water extract of *A. senticosus* fermented with *G. lucidum*. The highest DPPH radical and nitrite scavenging activities were observed in a 70% ethanol extract of *A. senticosus* fermented with *G. lucidum*. In addition, ABTS radical scavenging activity (8-88%), FRAP activity (0.1-0.2), and reducing power (0.3-0.7) were increased by ethanol addition in all samples in a dose-dependent manner. These results provide a basic understanding of the antioxidant and nitrite-scavenging activities of *A. senticosus* extracts fermented with different mushroom mycelia.

Keywords: ORAC, *Acanthopanax senticosus*, DPPH radical scavenging activity, total phenol content

서 론

가시오가피(*Acanthopanax senticosus*)는 두릅나무과(Araliaceae) 오갈피속(*Acanthopanax*)에 속하는 낙엽성 활엽관목으로 전 세계적으로 널리 연구되어있는 유용 식물자원 중의 하나이며, 주요성분으로 lignan 배당체인 eleutheroside B, E 및 sesamine, phenolic glycoside, chlorogenic acid, caffeic acid, β -sitosterol, friedelin 등을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(1,2). 가시오가피의 생리활성에 대한 선행연구 결과에 따르면, 혈당강하 작용(3), 면역증강 기능(4), 항염증 효능(5), 항비만 효능(6), 항산화체계 강화(7), 위궤양 치료효과(8) 등 다양한 범위에서 효능을 나타낸다고 보고되고 있다. 이에 따라 국내에서는 가시오가피를 이용한 추출액, 환, 티백차 등의 건강기능성 제품이 유통되고 있으며 가시오가피의 유효성분 및 생리활성을 증가시킨 가공방법의 개발 필요성에 대한 관심도 증대되고 있다.

최근 들어 곰팡이, 효모, 유산균 및 버섯류와 같은 유익한 미생물을 활용한 발효기술로 원료의 생리활성을 높이는 연구가 이루어지고 있다(9,10). 그 중에서도 버섯류는 수만 종으로 현재 식용으로 이용가능한 것은 약 180여 종에 이르며 크게 영양기관인

균사체(mycelia)와 번식기관인 자실체(fruiting body)로 나누어져 있다. 특히 버섯 균사체는 경제적이면서도 배양이 용이하고 강력한 섬유소 분해능을 지니고 있으며 배양물이 독성 및 부작용을 나타내지 않으며 각종 질병 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다. 그 예로 한방 및 민간에서 우수한 생약재로 이용되고 있는 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 상황버섯(*Phellinus linteus*) 및 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceus*)과 같은 버섯류에서 항종양 작용, 항염증 작용, 면역자극 및 전이억제 등의 생리활성이 보고 되어지면서 의약품 및 기능성 식품으로서 주목받고 있다(11-13).

따라서 본 연구에서는 영지버섯, 상황버섯, 노루궁뎅이버섯 균사체를 이용하여 각각의 가시오가피 버섯발효물을 제조하였고 이들 발효물의 열수와 70% 에탄올로 추출하여 pH, 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 평가하였으며, 다양한 항산화 효능과 아질산염 소거능을 비교 분석하여 검토하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 연구에서 공시균주로 사용한 영지버섯(KCTC 6729)과 상황버섯(KCTC 6719)은 생물 자원센터 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였으며, 노루궁뎅이버섯의 경우 한국교통대학교 식품공학대에서 분양받아 사용하였다. 각 균주를 접종할 기질로 사용하기 위한 가시오가피 줄기와 잎은 효광 바이오캡(Cheongju, Korea)에서 2010년 및 2011년도에 구입하여 사용하였다.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), acetic acid, griess

*Corresponding author: Ju-Hyun Cho, Hurum Central Research Institute, Cheongwon, Chungbuk 363-880, Korea
Tel: 82-43-217-1077

Fax: 82-43-217-1088

E-mail: dusvnd608@hurum.co.kr

Received September 5, 2013; revised December 10, 2013;

accepted December 16, 2013

reagent, sodium nitrite, gallic acid, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), trichloroacetic acid (TCA), potassium ferricyanide, potassium persulfate, sodium phosphate dibasic, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride (AAPH) 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, potassium phosphate monobasic, fluorescein (sodium salt)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

시료의 제조

버섯균사체의 배양에 앞서 선행연구로 버섯균사체 종류별(영지버섯, 상황버섯, 노루궁뎅이버섯) 적정 배양온도를 검토한 결과, 영지버섯 및 상황버섯 균사체는 28°C에서 최적화되었으며 노루궁뎅이버섯 균사체는 24°C로 나타났다. 따라서, 영지버섯과 상황버섯 종균 제조는 potato dextrose agar (PDA) 배지에 접종하고 28°C에서 7일간 배양한 후 cork borer (φ8 mm)로 절취하여 균주 디스크를 만들어 potato dextrose broth (PDB, Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 배지가 100 mL씩 분주되어 있는 삼각플라스크에 5-6개의 균주디스크를 접종하여 6일간 진탕배양(SI-400R, Jeitech, Seoul, Korea)한 다음 분쇄기(Waring, Winsted, CT, USA)로 균질화하여 다시 PDB 배지가 100 mL씩 분주되어 있는 삼각플라스크에 9 mL를 접종하여 5일간 배양하여 종균으로 사용하였다. 또한 노루궁뎅이버섯은 상기와 같은 방법으로 제조하되 24°C로 하였다. 마쇄한 가시오가피를 수분이 63±3%가 되도록 정제수를 투입하고 autoclave에서 121°C, 20분간 초벌 멸균한 후 배양이 진행될 배양용기에 최적 혼합비율과 배양온도에서 배양하였다. 이때 용기에 담긴 가시오가피 배지 부피가 60%가 되도록 적당한 압력으로 눌러 주고 배양 용기 뚜껑으로 밀폐시킨 후 autoclave에서 121°C, 40분간 멸균을 실시하였다. 멸균 후 온도를 25°C까지 급냉시켜 천연배지로 이용하였다. 예비실험을 통하여 가시오가피 발효물의 제조는 영지버섯 균사체의 경우, 가시오가피의 줄기와 잎의 비율이 80:20(w/w)으로 하였을 때 가장 최적의 조건을 나타낸 반면, 상황버섯 균사체 및 노루궁뎅이버섯 균사체를 사용하였을 경우에는 가시오가피의 잎과 줄기의 비율이 50:50(w/w)으로 하였을 때 최적을 나타내었다. 또한, 배양온도 및 배양기간도 영지버섯 균사체의 경우 30°C에서 14일간 배양하였을 때, 상황버섯 균사체는 30°C에서 30일간 배양하였을 때, 노루궁뎅이버섯의 경우 24.5°C에서 40일간 배양하였을 때 각각 최적의 가시오가피 버섯발효율을 얻었으며, 이들 가시오가피 버섯발효물을 이용하여 추후 실험을 실시하였다. 최적조건은 영지버섯 균사체의 경우 줄기와 잎 80:20 비율로 30°C에서 14일간 배양하였으며, 상황버섯 균사체는 50:50 비율로 30°C에서 30일간 배양하였고, 노루궁뎅이버섯의 경우 50:50 비율로 24.5°C에서 40일간 배양하여 각각의 최적조건에서 가시오가피 버섯발효물을 얻었다. 배양과정을 거쳐 얻어진 각각의 가시오가피 버섯발효물에 10배수의 증류수를 넣고 환류 추출장치에서 95°C의 온도로 6시간 동안 추출하였으며, 10배수의 70% 에탄올을 넣고 환류 추출장치에서 85°C의 온도로 6시간 동안 환류 추출하였다. 이를 filter paper (Advantec, Tokyo, Japan)로 여과한 다음 일정농도까지 농축한 후 동결건조(MCFD8508, Ilshin Lab. Co., Seoul, Korea)하여 열수추출 분말시료와 70% 에탄올 추출 분말시료를 얻었다.

pH 측정

가시오가피 버섯발효물의 pH 측정은 시료 3 g을 1 L volumetric flask에 녹여 pH meter (pH 510, EUTECH, Co., Anyang, Korea)를 이용하여 3회 반복 측정 후 평균값을 나타내었다.

총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Tawada 등(14)에 방법을 변형하여 folin-ciocalteu's phenol reagent가 페놀성 화합물에 의해 몰리브덴 청색으로 환원되는 원리로 측정하였다. 시료는 가시오가피 버섯발효 추출물 3 g을 1 L volumetric flask에 녹여 3배 희석하여 사용하였다. 각 시료 1 mL에 2% follin-ciocalteu's phenol reagent 1 mL을 첨가한 후 10% Na₂CO₃ 용액을 1 mL을 넣고 혼합하여 상온에서 1 시간 동안 방치하였다. 그 후 반응액의 흡광도를 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 이용하였으며 표준 검량곡선($y=10.555x-0.0806$, $R^2=0.9948$)으로부터 총 페놀 함량을 계산하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Kim 등(15)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료는 총 페놀함량과 동일하게 사용하였다. 각 시료 0.5 mL에 95% 에탄올 1.5 mL을 첨가한 후 10% aluminium nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL와 증류수 2.8 mL를 혼합하여 상온에서 30분간 방치하였다. 다음 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 rutin을 이용하였으며 표준 검량곡선($y=3.1713x+0.007$, $R^2=0.9999$)으로부터 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

ORAC value는 Ou 등(16)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료는 총 페놀 함량과 동일한 시료를 사용하였으며 시료와 표준 물질의 농도별 희석 및 시약의 제조는 75 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하였다. 시료 25 µL과 40 nM fluorescein 150 µL를 black well plate에 첨가하고 측정 직전에 150 mM AAPH 25 µL를 첨가한 다음 fluorescence microplate reader (Spectramax GEMINI EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정 조건은 485 nm에서 전자여기를 여기한 후 535 nm에서 방출되는 조건으로 37°C에서 90분간 3분마다 fluorescence의 감소율을 측정하였다. 결과 값은 시료 첨가구와 무 첨가구의 area under curve (AUC) 차를 이용한 net AUC값을 구한 후 Trolox를 이용하여 작성한 검량선($y=1.8019x+0.5619$, $R^2=0.9979$)에 대입하여 나타내었다.

$$\text{Area under curve (AUC)}=1+f1/f0+f2/f0+f3/f0+f4/f0+...f31/f0$$

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH는 자유 라디칼에 대한 시료 내 항산화 물질의 효능을 평가하기 위하여 사용하였으며, Ozgen 등(17)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.2 mL에 에탄올에 용해시킨 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL을 첨가하여 vortex mixer로 5초간 진탕한 후 암소에서 10분 동안 반응시켰다. 다음 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음 식(1)에 의하여 백분율로 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (1)$$

ABTS 라디칼 소거능 측정

Dudonne 등(18)의 방법을 변형하여 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 암소에 24시간 방치하여 양이온(ABTS⁺)을 형성시킨 후, 750 nm에서 흡광도의 값이 1.7 이하가 되도록 에탄올을 이용하여 희석하였다. 희석된 용액 1 mL과 시료 20 µL를 30분 동안 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 다음 식(2)에 의하여 백분율로 나타내었다.

ABTS radical scavenging activity (%)

$$= \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (2)$$

FRAP 활성 측정

Jeong 등(19)의 방법을 변형하여 ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay를 통한 가시오가피 버섯발효물의 항산화 활성을 측정하였다. Sodium acetate buffer (0.3 M, pH 3.6), 10 mM의 TPTZ, 20 mM FeCl₃·6H₂O를 제조하여 실험직전에 10:1:1의 비율로 혼합하였다. 다음 혼합한 FRAP용액 1.5 mL에 시료 50 µL, 증류수 150 µL를 첨가한 후 37°C에서 4분간 incubation하고 microplate reader를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reducing power 측정

가시오가피 버섯발효물의 reducing power는 Jayaprakasha 등(20)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) 및 1% potassium ferricyanide를 각 2.5 mL씩 차례로 첨가하여 교반한 후 50°C에서 20분간 반응시켰다. 다음 10% trichloroacetic acid 용액 2.5 mL을 가하여 1,790 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액 2.5 mL에 증류수 2.5 mL과 ferric chloride 0.5 mL을 첨가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아질산염 소거능 측정

Kato 등(21)의 방법을 변형하여 아질산염 소거능을 측정하였으며 시료는 항산화 실험과 동일한 시료를 사용하였다. 각 시료 1 mL 및 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL을 혼합한 뒤 0.1 M HCl을 이용하여 pH 1.2로 보정하였다. 다음 37°C에서 1시간 반응시킨 후 반응액 1 mL에 2% acetic acid 5 mL과 Griess reagent 0.4 mL를 첨가하여 혼합한 뒤 상온에서 15분간 방치하였다. 다음 microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능은 다음 식(3)에 대입하여 값을 백분율로 나타내었다.

$$\text{Nitrite scavenging ability (\%)} = \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (3)$$

통계분석

자료의 통계분석은 SPSS (version 20 SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 2-way ANOVA ($p < 0.05$)를 이용하여 버섯균사체의 종류 및 시료의 농도 및 각 변수에 대한 두요인의 상호작용을 검정하였다. 또한 발효가시오가피의 pH, 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 항산화 활성 및 아질산염 소거능 결과 값의 통계처리는 SAS version 9.2 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. 유의성 분석은 ANOVA 검정을 실시하였으며 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다. 항산화 활성 간의 상관성은 Pearson correlation을 실행하여 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 수준에서 유의성을 검증하였고 상관계수를 구하였다.

결과 및 고찰

가시오가피 버섯발효 추출물의 pH

가시오가피 버섯발효 추출물의 pH를 측정한 결과는 Table 1과 같다. pH는 3.72-4.55 범위로 가시오가피 상황버섯발효 열수추출물(pH 4.55)에서 가장 높게 나타났으며 70% 에탄올 추출물(pH 3.72)에서 가장 낮은 값을 보였다. 가시오가피 노루궁뎅이버섯발효 추출물에서도 열수추출물(pH 4.46)이 70% 에탄올 추출물(pH 4.13)보다 높은 pH값을 나타내었다. 이와 달리 가시오가피 영지버섯발효 추출물에서는 70% 에탄올 추출물(pH 4.37)에서 열수추출물(pH 4.35) 보다 높은 pH값을 보였다.

총 페놀 및 플라보노이드함량

페놀성 화합물은 방향족화합물에 하이드록실기(-OH)가 결합한 화합물을 일컫는 것으로 활성산소에 노출 시 DNA, 세포구성 단백질 및 효소의 손상을 보호하는 항산화, 항암작용 등을 가지는 것으로 알려져 있다. 또한 총 페놀함량이 증가할수록 항산화 활성과 같은 생리활성이 증가된다고 보고되고 있다(22,23). 가시오가피 버섯발효 추출물의 총 페놀함량은 Fig. 1과 같이 가시오가피 영지버섯발효 열수추출물에서 42.09 mg GAE/g으로 가장 높게 나타났으며 다음으로 영지버섯발효 70% 에탄올 추출물에서 40.99 mg GAE/g으로 나타났으며 노루궁뎅이버섯발효 열수추출물(37.99 mg GAE/g), 상황버섯발효 열수추출물(33.00 mg GAE/g), 노루궁뎅이버섯발효 70% 에탄올 추출물(29.74 mg GAE/g), 상황버섯발효 70% 에탄올 추출물(29.46 mg GAE/g) 순으로 나타났다. 전체적으로 가시오가피 영지버섯발효 추출물에서 다른 버섯 발효 추출물에 비해 총 페놀 함량이 높게 나타났다. 이는 버섯균사체로 인삼을 배양하였을 경우 원료인삼의 조사포닌 함량보다 영지버섯, 목질진흙버섯, 노루궁뎅이버섯 순으로 영지버섯균사체 발효물에서 인삼의 유용성분인 조사포닌의 함량이 가장 크게 증가하

Table 1. pH value of fermented *A. senticosus* with different mushroom mycelia and extraction conditions¹⁾

	FAGH ²⁾	FAGE ³⁾	FAPH ⁴⁾	FAPE ⁵⁾	FAHH ⁶⁾	FAHE ⁷⁾
pH	4.35±0.02 ^{c8)}	4.37±0.01 ^c	4.55±0.00 ^a	3.72±0.03 ^c	4.46±0.02 ^b	4.13±0.00 ^d

¹⁾Values are means±SD (n=3).

²⁾Hot water extract of fermented *A. senticosus* with *G. lucidum*

³⁾70% ethanol extract of fermented *A. senticosus* with *G. lucidum*

⁴⁾Hot water extract of fermented *A. senticosus* with *P. linteus*

⁵⁾70% ethanol extract of fermented *A. senticosus* with *P. linteus*

⁶⁾Hot water extract of fermented *A. senticosus* with *H. erinaceus*

⁷⁾70% ethanol extract of fermented *A. senticosus* with *H. erinaceus*

⁸⁾Means with the different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Fig. 1. Total phenol content of fermented *A. senticosus* with different mushroom mycelia and extraction conditions. FAG: fermented *A. senticosus* with *G. lucidum*, FAP: fermented *A. senticosus* with *P. linteus*, FAH: Fermented *A. senticosus* with *H. erinaceus*. Total phenolic content expressed as gallic acid equivalent (mg GAE/g). Each bar represents the mean±SD of triplicate determinations, $n=3$. ^{a-c}Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

Fig. 2. Total flavonoid content of fermented *A. senticosus* with different mushroom mycelia and extraction conditions. FAG: fermented *A. senticosus* with *G. lucidum*, FAP: fermented *A. senticosus* with *P. linteus*, FAH: Fermented *A. senticosus* with *H. erinaceus*. Total flavonoid content expressed as rutin equivalent (mg RE/g). Each bar represents the mean±SD of triplicate determinations, $n=3$. ^{a-c}Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

었던 보고(24)와 유사한 결과로 영지버섯균사체가 원료의 유용성 분 증가에 기여하는 것으로 사료된다.

플라보노이드는 폴리페놀 화합물의 일종으로 노란색 계통의 색소이며, 식물의 뿌리, 줄기, 잎, 꽃, 열매 등 대부분의 부위에 함유되어 있다. 또한 페놀성 화합물과 마찬가지로 항산화 및 항암작용 등의 효과가 보고되고 있다(25). Fig. 2와 같이 가시오가피 버섯발효물의 총 플라보노이드 함량은 15.19-23.93 mg RE/g 범위 내에서 측정되었다. 가시오가피 노루궁뎅이버섯발효 열수추출물(23.93 mg RE/g)에서 가장 높은 함량을 나타내었고 상황버섯발효

Fig. 3. ORAC value of fermented *A. senticosus* with different mushroom mycelia and extraction conditions. FAG: fermented *A. senticosus* with *G. lucidum*, FAP: fermented *A. senticosus* with *P. linteus*, FAH: fermented *A. senticosus* with *H. erinaceus*. ORAC values expressed as Trolox equivalents (μM TE/mL). Each bar represents the mean±SD of triplicate determinations, $n=3$. ^{a-c}Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

70% 에탄올 추출물(15.19 mg RE/g)이 가장 낮은 함량을 보였다. 또한 가시오가피 버섯발효물의 총 플라보노이드 함량은 열수 추출물이 에탄올 추출물에 비해 높은 함량을 함유하는 것으로 나타났다. 가시오가피 영지버섯발효 추출물의 경우 총 페놀함량은 높았으나 총 플라보노이드 함량에서는 노루궁뎅이버섯발효 추출물보다 낮은 경향을 나타내었다.

이러한 결과는 Heo 등(26)의 가시오가피 부위별 추출물의 항산화 연구와 비교하였을 때 원물에서 총 페놀 함량이 잎, 줄기, 뿌리 및 과육 부분에서 1.54, 0.69, 0.32, 0.63% 순으로 나타난 것보다 가시오가피 버섯발효 추출물에서 증가된 경향을 보였다. 또한, 총 플라보노이드 함량도 원물의 잎, 줄기, 뿌리 및 과육보다 증가된 경향을 나타내었다.

항산화 활성

ORAC 지수는 퍼옥시 라디칼 생성제인 AAPH에 의해 유도된 산화반응에 시료의 항산화 물질이 수소를 기여하면서 발생하는 형광물질의 감소를 확인하는 실험으로 hydrogen atom transfer (HAT)반응을 기본 원리로 한다(27). 가시오가피 버섯발효 추출물의 ORAC 지수를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 가시오가피 영지버섯발효 열수추출물에서 74,912 μM TE/g으로 가장 높게 나타났으며 그 다음으로 영지버섯발효 70% 에탄올추출물(67,705 μM TE/g), 노루궁뎅이버섯발효 열수추출물(61,937 μM TE/g), 상황버섯발효 열수추출물(58,879 μM TE/g), 노루궁뎅이버섯발효 70% 에탄올추출물(54,463 μM TE/g), 상황버섯발효 70% 에탄올추출물(43,188 μM TE/g) 순으로 나타났다. 이는 총 페놀함량의 결과와 유사한 것으로 Prior 등(28)의 보고에서도 ORAC 지수가 총 페놀 함량에 비례하여 활성이 증가한다고($R_y=0.845$) 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능은 자유 라디칼인 DPPH 시약을 이용하여 시료의 항산화 능력을 측정하는 실험으로 시료 내의 항산화 물질과 반응 시 라디칼이 소거되면서 자색에서 노란색으로 탈색되는 원리를 이용한다(29). 가시오가피 버섯발효 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 2와 같이 고농도 시료(5,

Table 2. Antioxidant activities of fermented *A. senticosus* with different mushroom mycelia and extraction conditions¹⁾

	Concentration (mg/mL)	FAGH ²⁾	FAGE ³⁾	FAPH ⁴⁾	FAPE ⁵⁾	FAHH ⁶⁾	FAHE ⁷⁾
DPPH ⁸⁾	3	49.49±0.71 ^{a12)}	50.08±0.76 ^a	41.32±0.76 ^{bc}	39.60±0.42 ^d	42.84±0.49 ^b	41.00±1.40 ^e
ABTS ⁹⁾	5	29.91±0.63 ^{a,C13)}	27.89±1.36 ^{a,C}	15.97±2.00 ^{b,C}	7.73±2.85 ^{c,C}	26.53±3.04 ^{a,C}	16.52±3.62 ^{b,C}
	10	52.65±1.19 ^{a,B}	51.74±3.07 ^{a,B}	37.65±1.29 ^{c,B}	20.92±0.81 ^{e,B}	41.74±1.53 ^{b,B}	28.60±0.54 ^{d,B}
	20	88.07±1.15 ^{a,A}	81.20±0.57 ^{b,A}	59.68±1.01 ^{d,A}	43.46±1.67 ^{f,A}	69.1±2.54 ^{c,A}	53.01±1.34 ^{e,A}
FRAP ¹⁰⁾	5	0.12±0.00 ^{a,C}	0.12±0.00 ^{b,C}	0.11±0.01 ^{d,C}	0.10±0.00 ^{f,C}	0.12±0.00 ^{c,C}	0.11±0.00 ^{e,C}
	10	0.15±0.00 ^{a,B}	0.15±0.01 ^{b,B}	0.15±0.00 ^{c,B}	0.11±0.00 ^{e,B}	0.14±0.01 ^{c,B}	0.12±0.00 ^{d,B}
	20	0.21±0.01 ^{a,A}	0.22±0.01 ^{a,A}	0.22±0.01 ^{b,A}	0.13±0.01 ^{c,A}	0.21±0.00 ^{b,A}	0.17±0.01 ^{b,A}
RP ¹¹⁾	5	0.37±0.01 ^{a,C}	0.35±0.00 ^{a,C}	0.33±0.00 ^{a,C}	0.29±0.00 ^{c,B}	0.34±0.00 ^{a,C}	0.30±0.00 ^{b,C}
	10	0.52±0.01 ^{a,B}	0.49±0.01 ^{a,B}	0.46±0.01 ^{ab,B}	0.39±0.01 ^{d,B}	0.46±0.01 ^{b,B}	0.43±0.01 ^{c,B}
	20	0.70±0.01 ^{a,A}	0.69±0.01 ^{a,A}	0.64±0.04 ^{a,A}	0.51±0.01 ^{c,A}	0.60±0.02 ^{a,A}	0.60±0.03 ^{b,A}

¹⁾Values are means±SD (n=3).²⁾Hot water extract of fermented *A. senticosus* with *G. lucidum*³⁾70% ethanol extract of fermented *A. senticosus* with *G. lucidum*⁴⁾Hot water extract of fermented *A. senticosus* with *P. linteus*⁵⁾70% ethanol extract of fermented *A. senticosus* with *P. linteus*⁶⁾Hot water extract of fermented *A. senticosus* with *H. erinaceus*⁷⁾70% ethanol extract of fermented *A. senticosus* with *H. erinaceus*⁸⁾DPPH radical scavenging activity⁹⁾ABTS radical scavenging activity¹⁰⁾FRAP activity¹¹⁾Reducing power¹²⁾Means with different superscripts in the row are significantly different ($p<0.05$).¹³⁾Means with different superscripts in the column are significantly different ($p<0.05$).

10, 20 mg/mL)에서는 결과 값이 유사하여 시료 간의 항산화능 차이가 나타나지 않았다(data not shown). 따라서, 본 실험에서는 3 mg/mL의 농도에서 측정하였다. 측정 결과는 39.60-50.08% 범위로 나타났으며 가시오가피 영지버섯발효 70% 에탄올추출물(50.08%)에서 가장 높은 소거능을 보였고 상황버섯 70% 에탄올추출물(39.60%)에서 가장 낮은 값을 나타내었다. 또한 Kim 등(30)의 보고에서도 영지버섯 및 상황버섯 동결 건조물의 DPPH 라디칼 소거능이 각각 30분 반응 시 74, 36%로 본 연구와 유사한 경향을 보였다.

ABTS 라디칼 소거능은 potassium persulfate와 ABTS 시약의 반응에 의해 생성된 ABTS 자유 라디칼이 시료 내의 항산화 성분에 의해 소거되면서 청록색이 탈색되는 원리를 이용하였다(31). 가시오가피 버섯발효 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 5-20 mg/mL의 농도범위에서 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Table 2). 중간 범위의 농도인 10 mg/mL에서 결과를 비교하였을 때, 가시오가피 영지버섯발효 열수 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었고 상황버섯발효 70% 에탄올 추출물에서 가장 낮은 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 DPPH 라디칼 소거능과는 다소 다른 결과로 DPPH는 자유 라디칼을 이용하는 반면, ABTS는 양이온 라디칼의 소거능을 평가하는 것으로서 라디칼에 따라 결합하는 페놀물질이 다르기 때문인 것으로 사료된다(32).

FRAP 활성은 colored ferrous TPTZ 복합체를 이용하는 것으로서 낮은 pH에서 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) 혼합물이 수소를 공여하여 자유 라디칼이 안정화되면서 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} TPTZ)로 전환되는 환원력을 측정하는 방법이다. 가시오가피 버섯발효 추출물의 FRAP활성은 5-20 mg/mL의 농도 유의적으로 증가하는 결과를 나타내었으며, 10 mg/mL 농도에서 비교하였을 때 가시오가피 영지버섯발효 열수추출물에서 가장 높은 환원력을 보였고 상황버섯발효 70% 에탄올 추출물에서 가장 낮

은 환원력을 나타내었다.

마찬가지로 reducing power도 Fe^{3+} 에서 Fe^{2+} 로 환원되는 환원력을 측정하는 방법으로 5-20 mg/mL의 범위에서 농도 유의적으로 증가하는 결과를 나타내었고, 중간범위인 10 mg/mL의 농도에서는 가시오가피 영지버섯발효 열수추출물에서 가장 높은 환원력을 보였으며 상황버섯발효 70% 에탄올 추출물에서 가장 낮은 환원력을 나타내었다. 또한 FRAP 활성과 reducing power에서 5 mg/mL의 농도에서는 가시오가피 상황버섯 열수추출물이 노루궁뎅이버섯 열수추출물보다 낮은 경향을 나타내었으나 20 mg/mL에서는 높아지는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Bolling 등(33)이 항산화 실험에서 희석배율 및 표준곡선은 매우 중요한 요소로 작용하며 농도에 따라 항산화 성분 간의 상승작용 혹은 상쇄작용이 일어날 수 있다는 보고와 유사한 것으로 다양한 농도범위에서 다양한 항산화 실험의 필요성을 확인할 수 있었다.

아질산염 소거능

아질산염은 식품제품 및 수산물의 가공, 저장과정 중에 독소생성억제, 발색 및 산패방지를 위하여 첨가되는 것으로 과량 섭취시 독성을 나타내어 methemoglobin증과 같은 각종 중독증상을 유발한다(34). 가시오가피 버섯발효 추출물의 아질산염 소거능을 측정한 결과, Fig. 4와 같이 가시오가피 영지버섯발효 70% 에탄올 추출물 > 영지버섯발효 열수 추출물 > 노루궁뎅이버섯발효 열수추출물 > 상황버섯발효 70% 에탄올 추출물 > 상황버섯발효 열수추출물 > 노루궁뎅이버섯발효 70% 에탄올추출물 순으로 나타났다. 이는 총 페놀 함량이 높았던 가시오가피 영지버섯발효 추출물, 노루궁뎅이버섯발효 열수추출물이 높은 아질산염 소거능을 나타낸 것으로 보아 페놀성 물질이 아질산염의 니트로화 반응을 억제한다는 Cooney 등(35)의 연구 결과와 일치하였다. 이상의 결과로 볼 때, 시료에 함유된 항산화 물질이 항산화 실험 및 아질산염 소거능의 측정원리 및 반응 메커니즘에 따라 다르게 나타나

Fig. 4. Nitrite scavenging activity of fermented *A. senticosus* with different mushroom mycelia and extraction conditions. FAG: fermented *A. senticosus* with *G. lucidum*, FAP: fermented *A. senticosus* with *P. linteus*, FAH: Fermented *A. senticosus* with *H. erinaceus*. Each bar represents the mean $\pm$ SD of triplicate determinations, $n=3$. ^{a-d}Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

기 때문에 항산화 성분, 항산화 활성 및 아질산염 소거능 간의 상관관계 분석이 요구되어 진다.

버섯균사체의 종류 및 농도에 따른 상호작용

ABTS 라디칼 소거능, FRAP 활성 및 reducing power에 영향을 미치는 버섯균사체의 종류 및 농도의 효과가 독립적인 효과인지를 검증하기 위하여 상호작용을 분석한 결과 가시오가피 버섯발효물의 항산화능은 버섯균사체의 종류 및 농도사이의 상호작용이 있는 것으로 나타났다($p<0.001$).

상관관계 분석

가시오가피 버섯발효 추출물 6종의 pH, 총 페놀함량, 총 플라보노이드 함량, ORAC 지수, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, FRAP 활성, reducing power 및 아질산염 소거능에 대

한 상관관계를 분석한 결과는 Table 3과 같다. ABTS 라디칼 소거능과 reducing power 간의 상관성이 0.977로 유의적($p<0.01$)으로 가장 높은 상관관계를 나타내었으며 다음으로 ORAC 지수와 ABTS 라디칼 소거능의 상관성(0.972), 총 페놀함량과 ABTS 라디칼 소거능의 상관성(0.966) 순으로 나타났다. 이는 Awika 등(36)이 사탕수수과 사탕수수제품을 이용하여 ORAC 지수 및 ABTS 라디칼 소거능의 상관관계를 분석하였을 때 상관계수가 0.99로 높은 결과를 나타낸 것과 유사한 경향을 보였다. 반면에 총 페놀함량과 총 플라보노이드 함량 간의 상관성은 0.028로 매우 낮게 나타났다. ABTS 라디칼 소거능에 비플라보노이드성 페놀 화합물이 작용했을 것으로 생각된다. 또한 총 페놀함량이 FRAP 활성 및 reducing power와 같은 환원력을 측정하는 항산화 실험보다 ORAC 지수, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능 실험에서 더 높은 상관성을 나타내어 가시오가피 버섯발효 추출물의 페놀성 물질이 라디칼을 직접적으로 소거하는 항산화실험에서 높은 항산화력을 나타내내는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 가시오가피 버섯발효 추출물의 항산화 성분 함량, 다양한 항산화 활성 및 아질산염 소거능에서 효능을 나타내고 있으며 특히 가시오가피 영지버섯발효 추출물에서 높은 기능성을 나타내어 기능성 원료로서의 활용 가능성이 기대된다.

향후, 항산화활성이 가장 높게 나타난 가시오가피 영지버섯발효물의 추출용매, 추출온도, 추출시간 등의 최적추출조건을 설정하고 이들 추출조건에 따른 *in vitro* 및 *in vivo* 효능평가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 가시오가피 영지버섯발효 추출물, 상황버섯발효 추출물 및 노루궁뎅이버섯발효 추출물의 pH, 항산화 성분함량(총 페놀 및 플라보노이드 함량), 항산화 활성(ORAC 지수, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, FRAP 활성 및 reducing power), 아질산염 소거능을 측정하였다. pH는 가시오가피 상황버섯발효 열수추출물이 4.55로 가장 높았고 상황버섯발효 70% 에탄올추출물이 3.72로 가장 낮았다. 총 페놀 함량은 가시오가피 영지버섯발효 열수 추출물이 42.09 mg GAE/g으로 가장 많았으며, 상황버섯발효 70% 에탄올추출물이 29.46 mg GAE/g으로 가장 적

Table 3. Correlation coefficient (R) between total phenolic content, total flavonoid, antioxidant activities and nitrite scavenging activity

	TPC ¹⁾	TFC ²⁾	ORAC ³⁾	DPPH ⁴⁾	ABTS ⁵⁾	FRAP ⁶⁾	RP ⁷⁾	NSA ⁸⁾
pH	0.593	0.555	0.731	0.425	0.734	0.888*	0.734	0.149
TPC	-	0.028	0.922**	0.921**	0.966**	0.825*	0.915**	0.790
TFC	-	-	0.181	0.241	0.084	0.170	0.120	0.290
ORAC	-	-	-	0.881*	0.972**	0.908*	0.996**	0.499
DPPH	-	-	-	-	0.918**	0.768	0.895*	0.681
ABTS	-	-	-	-	-	0.935**	0.977**	0.630
FRAP	-	-	-	-	-	-	0.930**	0.419
RP	-	-	-	-	-	-	-	0.495

¹⁾Total phenolic content

²⁾Total flavonoid content

³⁾Oxygen radical absorbance capacity

⁴⁾DPPH radical scavenging activity

⁵⁾ABTS radical scavenging activity

⁶⁾FRAP activity

⁷⁾Reducing power

⁸⁾Nitrite scavenging activity

⁹⁾* $p<0.05$, ** $p<0.01$

었다. 반면에 총 플라보노이드의 경우 가시오가피 노루궁뎅이버섯발효 열수추출물(23.93 mg RE/g)에서 가장 높았고, 상황버섯발효 70% 에탄올추출물(15.19 mg RE/g)으로 가장 낮았다. 항산화 활성의 경우 ORAC 지수는 총 페놀함량과 같은 경향을 나타내었으며 DPPH 라디칼 소거능은 34.29-50.08% 범위에서 측정되었다. 또한 ABTS 라디칼 소거능(7.73-88.07%), FRAP활성(0.10-0.22) 및 reducing power (0.29-0.70)은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 가시오가피 영지버섯발효 추출물에서 우수한 항산화활성을 나타내었다. 아질산염 소거능의 경우 16.89-22.69%의 결과를 나타내었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 버섯균사체를 이용한 발효가시오가피 추출물들은 다양한 항산화 모델에서 효능을 나타내어 기능성 식품원료로서의 활용도가 매우 넓을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가가치식품 기술개발사업(과제번호: 110128) 및 산학연공동기술개발 국제사업(과제번호: C1008942-01-01) 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

- Chang SY, Ryu KS, Lee DH, Seo YK. Program the annaul convention of the Korean society of pharmacognosy: studies on the lignan group from *Acanthopanax sessiliflorum*. Korean J. Pharmacogn. 7: 255-255 (1976)
- Kim CW, Lee HY. Studies on the constituents of seeds of *Acanthopanax senticosus* for inermis Harms. Korean J. Pharmacogn. 21: 235-238 (1990)
- Ko SK, Kim JS, Choi YE, Lee SJ, Park KS, Chung SH. Anti-diabetic effects of mixed water extract from Ginseng radix rubra, *Acanthopanax cortex*, and Cordyceps. Korean J. Pharmacogn. 33: 337-342 (2002)
- Lim SD, Seong KS, Kim KS, Han DU. Effects of fermented milk with hot water extract from *Acanthopanax senticosus* and codonopsis lanceolata on the immune status of mouse. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 323-329 (2007)
- Jung HJ, Park HJ, Kim RG, Shin KM, Ha J, Choi JW, Kim HJ, Lee YS, Lee KT. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects of liriodendrin isolated from the stem bark of *Acanthopanax senticosus*. Planta. Med. 69: 610-616 (2003)
- Cha YS, Rhee SJ, Heo YR. *Acanthopanax senticosus* extract prepared from cultured cells decreases adiposity and obesity indices in C57BL/6J mice fed a high fat diet. J. Med. Food 7: 422-429 (2004)
- Lin QY, Jin LJ, Cao ZH, Lu YN, Xue HY, Xu YP. *Acanthopanax senticosus* suppresses reactive oxygen species production by mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo*. Phytother. Res. 22: 740-745 (2008)
- Fujikawa T, Yamaguchi A, Morita I, Takeda H, Nishibe S. Protective effects of *Acanthopanax senticosus* harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. Biol. Pharm. Bull. 19: 1227 (1996)
- Kim H, Yoon HS, Jeong JH, Jeong HS, Hwang JH, Yu KW. Enhancement of immunostimulation by fractionation of active polysaccharide from fermented ginseng with *Phellinus linteus* Mycelium in solid culture. Korean J. Food Sci. 42: 223-232 (2010)
- Lee TS, Han EH. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using *Rhizopus japonicus nuruks*. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 691-698 (2000)
- Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Lee SS, Shiao MS, Ho CK. The antitumor effect of *Ganoderma Lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. Int. J. Cancer Suppl. 70: 699-705 (1997)
- Kim SH, Song YS, Kim SK, Kim BC, Lim CJ, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. J. Ethnopharmacol. 93: 141-146 (2004)
- Kim H, Jeong JH, Hwang JH, Jeong HS, Lee HY, Yu KW. Enhancement of immunostimulation and anti-metastasis in submerged culture of bearded tooth mushroom (*Hericium erinaceum*) Mycelia by addition of ginseng extract. Food Sci. Biotechnol. 19: 1259-1266 (2010)
- Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elmat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chem. 104: 1372-1378 (2007)
- Kim IS, Yang MR, Lee OH, Kang SN. Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. Int. J. Mol. Sci. 12: 4120-4131 (2011)
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J. Agr. Food Chem. 49: 4619-4626 (2001)
- Ozen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. J. Agr. Food Chem. 54: 1151-1157 (2006)
- Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. J. Agr. Food Chem. 57: 1768-1774 (2009)
- Jeong JW, Lee YC, Jung SW, Lee KM. Flavor components of citron juice as affected by the extraction method. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 709-712 (1994)
- Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. Food Chem. 73: 285-290 (2001)
- Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. Agr. Biol. Chem. Tokyo 51: 1333-1338 (1987)
- Kaur C, Kapoor HC. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. Int. J. Food Sci. Tech. 37: 153-161 (2002)
- Machowetz A, Poulsen HE, Gruendel S, Weimann A, FitM, Marugut J, de la Torre R, Salonen JT, Nyyssnen K, Mursu J, Nascenti S, Gaddi A, Kiesewetter H, Bumler H, Selmi H, Kaikkonen J, Zunft HJ, Covas MI, Koebnick C. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. FASEB J. 21: 45-52 (2007)
- Joung EM, Hwang IG, Lee HY, Jeong JH, Yu KW, Jeong HS. Changes of saponin and β -glucan content on the cultured ginseng with mushroom mycelia. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 1084-1089 (2009)
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem. 13: 572-584 (2002)
- Heo SJ, Ahn HY, Kang MJ, Lee JH, Chaz JY, Cho YS. Antioxidative Activity and Chemical Characteristics of Leaves, Roots, Stems and Fruits Extracts from *Acanthopanax senticosus*. J. Life Sci. 21: 1052-1059 (2011)
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. J. Agr. Food Chem. 50: 3122-3128 (2002)
- Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Mainland CM. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. J. Agr. Food Chem. 46: 2686-2693 (1998)
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. LWT-Food Sci. Technol. 30: 609-615 (1997)
- Kim MY, Seguin P, Ahn JK, Kim JJ, Chun SC, Kim EH, Seo

- SH, Kang EY, Kim SL, Park YJ, Ro HM, Chung IM. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *J. Agr. Food Chem.* 56: 7265-7270 (2008)
31. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
32. Wang MF, Shao Y, Li JG, Rngarajan M, Lavoie EJ, Huang TC, Ho CT. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agr. Food Chem.* 46: 4869-4873 (1998)
33. Bolling BW, Chen YY, Kamil AG, Oliver Chen CY. Assay dilution factors confound measures of total antioxidant capacity in polyphenolrich juices. *J. Food Sci.* 77: H69-H75 (2012)
34. Jin Q, Park JR, Kim JB, Cha MH. Physiological activity of *zizyphus jujaba* leaf extracts. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 593-598 (1999)
35. Cooney RV, Ross PD, Bartolini GL. *N*-nitrosation and *N*-nitration of morpholine by nitrogen dioxide: Inhibition by ascorbate, glutathione and α -tocopherol. *Cancer Lett.* 32: 83-90 (1986)
36. Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agr. Food Chem.* 51: 6657-6662 (2003)