

홍삼박으로부터 항산화 활성 산성다당체 분리 정제 및 구조 분석

하유진 · 김슬기 · 유성의 · 유선균[†]

중부대학교 식품생명과학과
(2017년 11월 8일 접수: 2017년 11월 25일 수정: 2017년 12월 5일 채택)

Separation and Purification of Antioxidant Activity Acidic Polysaccharide from Red Ginseng Marc

Yoo Jin Ha · Seul Ki Kim · Seong Eui Yoo · Sun Kyun Yoo[†]

Department of Food and Biotechnology, Joongbu University
(Received November 8, 2017; Revised November 25, 2017; Accepted December 5, 2017)

요약 : 홍삼 제조 부산물인 홍삼박은 항산화 등 생리활성을 보여 줌에 따라 건강기능식품 소재로의 가능성이 높아지고 있다. 본 연구에서는 홍삼박으로부터 조산성다당체 추출 하고 다당체중에서 항산화능을 보여주는 산성다당체를 분리 및 정제를 하였다. 계속해서 FT-IR 및 NMR을 이용하여 분자구조적 특성을 분석하였다. 산성다당체의 추출은 10%(w/v) 홍삼박 용액을 원심분리기를 이용하여 불순물을 제거하고 ethanol, methanol, propanol, acetone 및 butanol을 이용하여 최적 용매를 선정하였고, 선정된 용매 ethanol을 이용하여 홍삼박 농도별 추출을 수행하였다. 산성다당체 추출 수율(11.95%) 및 양(11.8 mg/mL) 을 비교한 결과 홍삼박 용액 농도, 10%(w/v)를 최적 농도로 선정을 하였다. 이온교환수지를 이용하여 추출된 조산성다당체로부터 가장 높은 항산화 특성을 보여주는 산성다당체는 증류수로 용출된 다당체이다. 계속해서 구조분석 결과 C-O, C-O-O-, 및 C-H 결합들과 anomeric C-6의 피크가 나타났고 C-1과 C-6의 피크들이 동일한 강도를 나타내는 것으로 보아 (1→6) glycosidic 결합이 존재함을 보여주어 전형적인 산성다당체의 특성 보여주었다.

주제어 : 홍삼박, 산성다당체, 이온교환수지, 항산화능, 건강기능식품

Abstract : The by-products of red ginseng marc showing the improvement of health has been strongly studied because of the expectation of possibility to be used as the functional foods. This research was to investigate the extraction, separation, isolation, and evaluation of crude acidic polysaccharides related to antioxidant activity, sequently chemical structure of those products was evaluated by FT-IR and NMR. Compared with other solvents such as ethanol, methanol, propanol, acetone, and butanol, ethanol was selected. The concentration of red ginseng solution for extraction was selected as 10%(w/v) related to extraction yield(11.95%) and amount(11.8 mg/ml).

[†]Corresponding author
(E-mail: skyoo@joongbu.ac.kr)

In the ion exchange chromatography, aicid polysaccharides showing the highest antioxidant activity was obtained when eluted by distilled water. As results of structural analysis by FT-IR and NMR, peaks corresponding to C-O, C-O-O-, C-H, anomeric C-6, and repeated C-1 and C-6 linkages was to be presumed to be (1→6) glycosidic linkage with the typical acidic polysaccharide.

Keywords : Red ginseng marc, acidic polysaccharide, ion exchange chromatography, antioxidant activity, functional foods

1. 서론

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 동양에서 오래전부터 약리 효능이 뛰어나 여러 질병을 예방하고 건강을 유지, 증진시키는 효과가 크다고 인정되어 한방, 민간 의약 및 식품으로 이용되어 왔다[1]. 인삼은 주요 생리활성 물질들은 ginsenoside와, polyacetylene, 다당체(polysaccharide), 인삼 단백질, 페놀성 물질 등이 알려져 왔다[2,3]. 이들 중에서 인삼 다당체들은 면역조절(immunostimulatory), 항암(antitumor), 항산화(antioxidant)등의 효능 있는 것으로 최근 발표되고 있다[4,5].

인삼 다당체들은 구조분석을 통하여 L-arabinose, D-galactose, L-rhamnose, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-galactosyl 잔기등 들이 glycosidic bond로 고분자들을 형성한다[6,7]. 고분자 다당체의 분자량은 평균 3,500 Da ~ 2,000,000 Da로 되어 있고 다양한 생리활성 특성을 지닌 것으로 보고되고 있다. 인삼 다당체들은 산성다당체와 중성다당체로 구분되고, 이들의 약리 작용 과 면역조절기능은 다당체들의 활성화에 연관된 것으로 보고되어 왔다[8]. 대부분의 인삼 다당체 구성은 전분 60%, arabinogalactans 15%, 펙틴 25%로 구성되어 있다[9].

인체 내 대사활동 및 환경적 자유라디칼은 인체 내에서 존재하는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase(CAT), glutathione reductase, glutathione-Stransferase과 같은 항산화 효소들의 의하여 제어되며 균형이 파괴 될 때 세포 내 DNA, RNA, 단백질 등과 반응하여 세포 손상 및 파괴 등을 이끈다[10,11]. 이로 인한 조직의 손상은 다양한 질병과 노화를 이끌고 특히 산소의 이용률이 높은 뇌의 경우, 신경세포의 사멸로

알츠하이머병, 파킨슨병, 간질, 뇌졸중 등과 같은 질환을 유발시킨다[12,13].

따라서 본 연구는 홍삼박으로부터 최적 추출 용매를 선정하여 산성다당체를 추출하고 이온교환수지 및 투석을 이용하여 분리, 정제하고 항산화 특성을 보여주는 산성다당체를 가지고 화학 구조에 대한 분석을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료 및 시약

본 실험에서 홍삼박(red ginseng marc, RGM)은 주식회사 하농(경기도 고양 소재)에서 구입하여 사용하였다. 다당체 함량 측정에 사용한 시약으로서 butanol, ethanol, methanol, propanol, acetone(Sigma Chemical Co., Louis, MO, USA)을 사용하였다. 기타 실험에 사용된 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

2.2. 홍삼박으로부터 용매별 산성다당체 추출

홍삼박(10%, w/v)을 정제수에 현탁을 시키고 고형분을 분리하기 원심분리기(Supra R30, Hanil Scientific., Seoul, Korea)를 10,000 rpm × 10분의 조건으로 수행을 하였다. 용매별(Ethanol, methanol, propanol, acetone, butanol)로 산성다당체를 분리하기 위하여 상등액에 50% (v/v) 비율로 용매를 첨가를 하였다. 침전된 조산성다당체를 분리하기 위하여 원심분리를 수행하였다. 침전된 조산성다당체의 양을 측정하고 50 °C 의 열풍 건조기에서 건조시켰다.

2.3. 알코올을 이용한 농도별 산성다당체 추출

건조 홍삼박을 425 mesh 체 분리기를 이용하여 불순물을 제거하였다. 홍삼박 분말과 정제수를 이용하여 0.1 g , 0.5 g, 1.0 g, 1.5 g, 2.0 g 의

농도로 10 ml 용액을 제조 하였다. 산성다당체를 추출하기위해서 40 °C 와 130 rpm의 조건으로 2시간 추출 하였다. 추출 후에 고형분 제거를 위하여 원심분리(4 °C, 3000 rpm × 15분을 하였다. 원심분리 상등액에 ethanol을 1:4의 비율로 첨가를 하여 조산성 다당체를 침전시켰다. 산성다당체 회수를 위하여 원심분리(4 °C, 3,000 rpm × 15분) 수행 하였다. 계속해서 산성다당체 슬러리 용액을 65 °C 하에 24시간 건조시켜 분말화하였다. 산성다당체의 추출, 정제 및 분석의 흐름도는 Fig. 1.에서 보여준다.

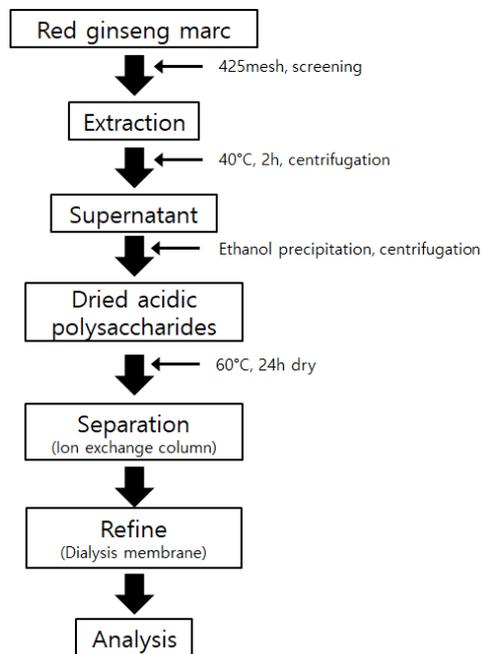


Fig. 1. Acidic polysaccharide extraction, separation and purification process.

2.4 이온교환수지를 이용한 항산화 활성 산성 다당체 분리 및 정제

조산성다당체로부터 항산화 활성 산성다당체를 분리하기 위하여 이온 교환수지를 이용하였다. 이온교환수지 Dowex® 1×2, 200수지를 column (2.5 × 100 cm)에 평형화 시켰으며, 평형화 된 수지에 10 %의 산성다당체 1 mL을 주입시켰다. 샘플의 용출 순서는 1차로 증류수 100 mL로 용출 후 0.1 M NaCl, 0.5 M NaCl 마지막으로 1.0 M NaCl 순서로 수행하였다. 분획 샘플은 자

동분획기 Retriever 500(Teledyne ISCO, USA)를 사용하였으며, 시험관에 용출액은 5 mL 씩 수집 하였다. 각각의 용출액의 다당체를 측정하고 항산화 활성을 측정 하였다. Column 하여 모은 용액 중 4 ~ 14번(증류수), 17 ~27번(0.1 M NaCl), 40 ~ 50번(0.5 M NaCl)을 100 mL 등근바닥플라스크에 모아 주었다. 용출액 10개, 즉 50 mL 를 3개로 각각 모아 rotary evaporator로 용매를 날려준 후 증류수 5 mL를 넣고 잘 녹여준 후 dialysis membrane에 넣고 6시간 정도 교반하여 투석(dialysis)해 주었다. 투석한 용액을 -50 °C에 얼린 후 동결건조기로 동결 건조하였다.

2.5. 산성다당체의 DPPH 라디칼 소거능 측정

조산성다당체로부터 분리 및 정제한 것을 사용하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 측정하였다. 즉 0.1 mM DPPH 용액을 제조하여, 투석해서 얻은 용액을 사용하여 0.5 mL와 증류수 0.5mL, 0.1 M NaCl 0.5 mL, 0.5 M NaCl 0.5 mL 각 농도의 시액을 DPPH 용액과 동일한 양으로 혼합한 후 암실에서 30분간 반응 시키고 517 nm에서 UV-1601 spectrophotometer(Shimadzu Co., Australia)를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, 증류수를 동일하게 처리하여 대조구의 흡광도를 동일한 조건에서 측정하였다. 비교구로 ascorbic acid를 이용하여 위와 동일한 방법으로 전자공여능을 측정하여 시료군 과 비교하였고, 각 시험은 3회 반복하여 수행하였다. 전자공여능은 아래의 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \frac{B-A}{B} \times 100$$

A : 시료 첨가시의 흡광도

B : 시료 무 첨가시의 흡광도

2.6 산성다당체 구조 분석

FT-IR은 표면반사 적외선 분광기를 사용했다. 샘플 준비는 KBr 150 mg에 시료 1.5 mg(100:1)로 섞어 막자사발에 갈아 준 후 KBr 펠렛(pellet)을 만들고 ATR 장치 위에 올려 고정하여 주었다. VERTEX 80v FT-IR(Bruker, USA)로 흡광도를 측정하였다. NMR은 ¹H NMR(400 MHz)과 ¹³C NMR 스펙트럼(100 MHz) 두가

지를 측정했다. 샘플 준비는 30 mg 시료를 CDCl_3 용매를 0.6 mL에 녹여 준 후 sample tube에 넣어 준비했다. JNM-AL400 NMR spectrometer(Jeol, Japan) 로 ^1H NMR (400MHz)과 ^{13}C NMR 스펙트럼(100MHz)을 측정하였다.

2.7. 산성다당체 정량 분석

홍삼알코올 추출물에 함유되어있는 산성다당체는 pectin 정량에 상용되는 carbazole sulfuric acid 방법으로 측정하였으며 대조구에는 carbazole을 사용하였다. 건조된 파우더에 증류수 10 mL 첨가하여 잘 용해하였다. 20 mL 팔콘 튜브에 용해된 용액 1 mL를 취하고 증류수 9 mL 넣었다. 희석한 용액 0.5 mL 와 carbazole 0.25 mL를 넣고 혼합해준 후 sulfuric acid 3 mL를 가해주었다. 용해된 용액을 85 °C 수조(water bath)에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝나고 실온에서 15분간 식혀주었다. spectrophotometer를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다

3. 결과 및 고찰

3.1. 홍삼박으로부터 용매별 산성다당체 추출

홍삼박으로부터 용매 종류에 따른 산성다당체의 추출량을 정량하기 위하여 펙틴을 대표물질로 하여 표준 곡선을 정하고 다당체의 양에 따른 흡

광도를 측정하여 평가를 하였다[14,15]. 표준곡선식에 따라 평가된 산성다당체 추출은 Fig. 2에서 나타내었고 alcohol를 용매로 사용 하였을 때 평균 16.64% 로 가장 높았다. 용매 methanol 과 propanol에 의한 수율은 약 10 ~ 12%로 유사하였고 acetone과 butanol의 경우에는 용매의 층 분리 및 다당체의 침전이 일어나지 않은 것으로 나타났다.

3.2. 홍삼박으로부터 농도별 산성다당체 추출

용매 별 산성다당체 추출 수율을 비교하여 alcohol를 최적 용매로 선택을 하였다. 본 실험은 홍삼박 농도를 달리하여 조산성다당체 추출 수율 및 추출 양을 비교하였다. 결과는 Fig. 3에서 보여 준다. 산성다당체의 수율은 홍삼박 농도가 증가함에 따라서 추출된 산성다당체의 양은 증가하였으나 수율은 감소하였다. 홍삼박 샘플양이 1 ~ 20% 까지 증가하였을 때 산성다당체의 양은 8.49 mg/mL에서 1,405 mg/mL까지 점차적으로 증가하였고 수율은 84.95%에서 7.03%까지 감소하였다. 본 연구결과는 농도에 따라서 추출 수율이 다르게 결정되는 것은 홍삼박의 농도가 높아 감에 따라 홍삼박에 결합되어 있는 다당체 성분들과 용매와의 반응 kinetics가 다르기 때문이라 사료된다[16]. 따라서 홍삼박의 양을 증가시킬 때 다당체의 추출횟수를 늘리는 것이 필요하다고 시료된다.

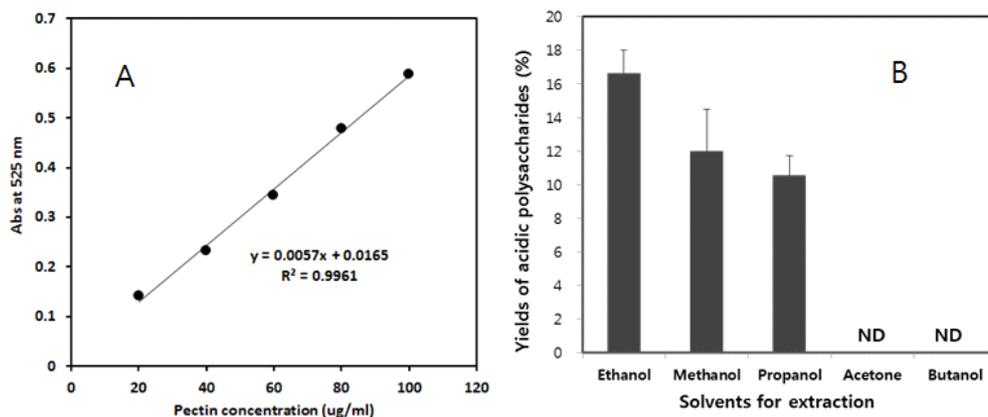


Fig. 2. Standard curve of the amount of pectin (A) and yield of acidic polysaccharides (B). The amount of acidic polysaccharides was designated as the amount of pectin.

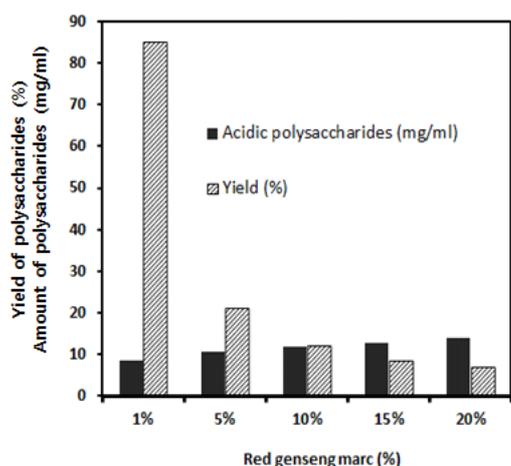


Fig. 3. Yields and amount of acidic polysaccharides extracted by different alcohol concentration from the red ginseng marc.

3.3. 산성다당체의 분리, 정제 및 항산화능

조산성다당체로부터 항산화능을 보여주는 다당체를 분리 및 정제를 하기 위해서 양이온 교환수지를 사용하였다. 계속해서 유사한 위치에서 용출되는 샘플들은 합하여 투석을 수행하였다. 투석을 하여 염이 제거된 샘플들은 동결 건조를 하여 후속 실험에 사용을 하였다. 용출에 대한 크로마토그램은 Fig. 4에서 보여준다. 화학적으로 유사한 다당체의 피크들은 세 가지 패턴으로 나타났는데 A 피크는 증류수, B 피크는 0.1 M NaCl, C 피크는 0.5 M NaCl로 용출된 크로마토그램을 나타낸다. 다른 연구결과를 보면 미국 인삼에서 항산화 기능 가진 다당체의 분리 실험에서는 두가지의 피크를 나타내었다 [17,18]. 본 연구에서는 세가지의 패턴으로 나타난 피크를 가지고 DPPH 라디칼 소거능을 계산하였다. DPPH 라디칼 소거능은 phenolic acids, 플라보노이드 및 기타 페놀성 화합물에 의한 항산화 작용이며, 이런 물질의 환원력이 클수록 DPPH 라디칼 소거활성이 크다고 하였다[19]. 3개의 분획물의 DPPH 라디칼 소거능을 비교 분석한 결과, 증류수(A)에서 67.70%, 0.1 M NaCl(B)에서 19.48%, 0.5 M NaCl(C)에서 32.29%가 나타난 것을 Fig. 5에서 보여준다. 본 연구에서는 라디칼 소거능의 범위는 19.48 ~ 67.70%이고, 세 개의 피크 중 용출된 다당체 최대 예측 DPPH 라디칼 소거능이 67.70%로 증류수(A)에서 항산화능이 가장 높게

측정되었다. 본 실험 결과로부터 용출액을 증류수로 사용하여 분리한 A가 DPPH의 활성이 가장 높게 나타나서 산성다당체 구조분석 시료를 A로 사용하여 측정하였다.

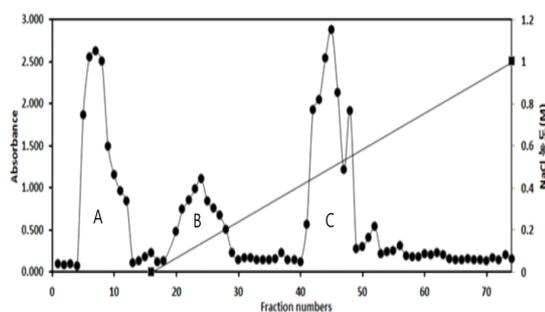


Fig. 4. The purification and separation of acidic polysaccharides showing the antioxidant activity by ion exchange chromatography. A, B, and C represent three large different fractions. The highest antioxidant activity was appeared at peak A.

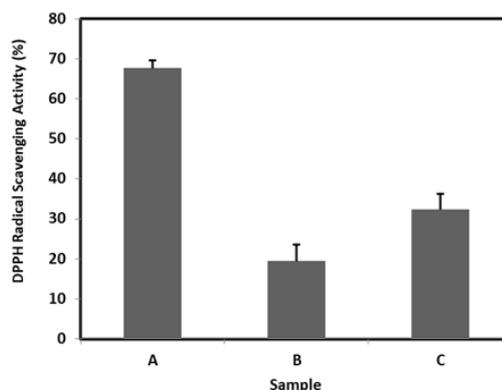


Fig. 5. DPPH antioxidant activity of the pooled fractionation separated by ion exchange chromatogram. A, B, and C were eluted by water, 0.1 M NaCl and 0.5 M NaCl, respectively.

3.5. 산성다당체 구조 분석

가장 항산화 활성이 높은 피크에 해당하는 용출량을 합하여 동결 건조한 샘플을 산성 다당체를 구성하는 당의 특정 작용기를 분석하기 위해서 FT-IR를 이용하였다. 분석한 결과 크로마토

그림(Fig. 6)은 탄수화물의 전형적인 O-H 신축 진동은 $3,294\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타나고 포화된 C-H 는 $2,932\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타났고 $1,018\text{ cm}^{-1}$ 에서 상대적으로 강한 C=O의 흡수피크가 나타나는데, $1,149\text{ cm}^{-1}$ 에서 C-O-C 결합과 glycosidic 결합이 전형적인 다당류의 흡수 패턴을 보여주었다[20,21]. 2개의 강한 흡수 $1,149, 932\text{ cm}^{-1}$ 가 피라노시드 피크에 대해 나타났고, $1,100 \sim 1,010\text{ cm}^{-1}$ 범위의 푸라노시드에 대한 2개의 피크는 $1,636\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 피크로 나타났다. 또한, FT-IR 스펙트럼에서 약 $1,636\text{ cm}^{-1}$ (비대칭 COO⁻ 신축 진동) 및 $1,343\text{ cm}^{-1}$ (대칭 COO⁻ 신축 진동)에서의 카르복실기의 흡수 밴드가 가장 두드러졌다. 따라서 본 연구결과 항산화 기능 보유 샘플은 전형적인 산성 다당체의 구성들인 L-arabinise, D-galactose, L-rhamnose, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-galactosyl 등 잔기들이 glycosidic bond로 고분자들로 구성 되었다는 전 연구결과들과 일치한다[22]. 계속해서 샘플 산성 다당체의 화학결합 구조를 분석하기 위해서 NMR를 사용하였다. NMR 데이터는 산성다당체를 분리할 때 용리액으로서 증류수를 사용하여 dialysis한 것을 측정된 것을 Fig. 7에 나타내었다. 산성다당체의 ^1H NMR의 공명스펙트럼은 8.46-10.45 ppm 영역에서 관찰되었다. 8.46 ~ 9.34 ppm에서 H-2, H-3, H-4, H-5 및 H-6

과 hemiacetal의 H-1이 multiplato로 관찰되었다. 그리고 9.83ppm에서는 전형적인 (1→6) chain-extending anomeric peak임을 알 수 있었다. (1→3) 으로 연결된 결합은 10.45 ppm에서 나타났다. 산성다당체의 ^{13}C NMR의 스펙트럼은 94.84-134.00 ppm에서 관찰되었다(Fig. 8). 105 ~ 110 ppm 부근에서 C-2, C-3, C-4 및 C-5의 피크가 나타났고 94.84 ppm에서 anomeric C-6의 피크가 나타났다. C-1과 C-6의 피크는 대략 동일한 강도를 나타내는 것으로 보아 (1→6) glycosidic 결합이 존재함을 보여주었다.

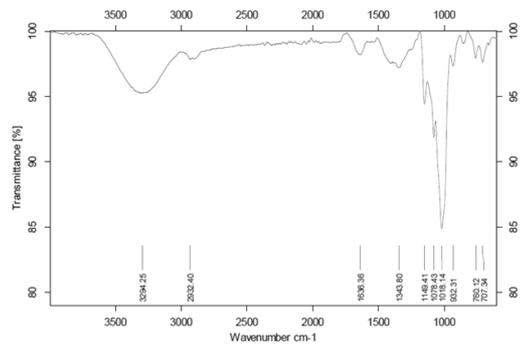


Fig. 6. Acidic polysaccharide FT-IR.

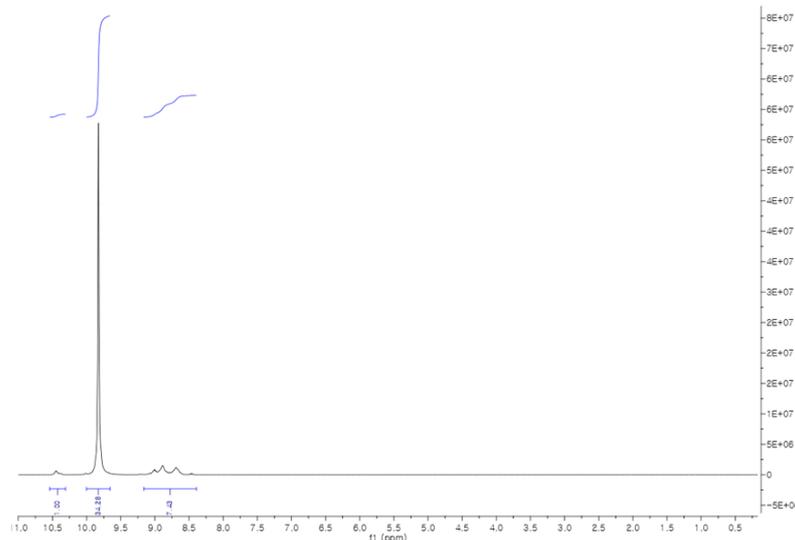
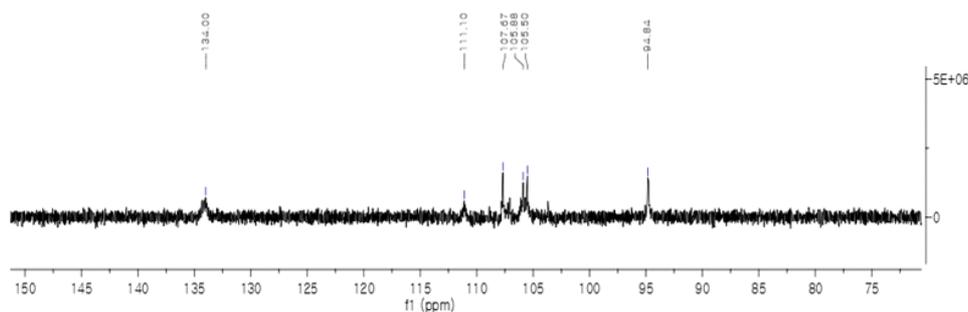


Fig. 7. Acid polysaccharide ^1H NMR

Fig. 8. Acidic polysaccharide ^{13}C NMR.

4. 결론

본 실험에서는 홍삼 추출의 부산물인 홍삼박을 이용하여 산성다당체의 추출과 분리 그리고 정제를 통해 항산화 활성 및 구조를 분석하는 연구를 진행하였다. 다양한 용매로부터 산성다당체를 추출하였을 때 ethanol 이 각각의 용매들 중 선택성과 수율이 높았고 식품공정에서의 안정함에 따라 침전용매로 사용하였다. ethanol을 침전용매로 농도에 따라 산성다당체를 추출하였을 때 10%의 농도가 가장 적합하다 판단되어 분리 및 항산화 활성을 통해 구조 특성을 진행하였다. 이온교환수지 컬럼을 사용하여 산성다당체를 분리하였을 때 3가지 피크가 나타났고, 각각의 피크에 나온 용액을 모아 dialysis membrane을 사용하여 정제하였다. 정제 후 산성다당체의 항산화능을 측정하였을 때, 증류수에서 67.70%, 0.1 M NaCl에서 19.48%, 0.5 M NaCl에서 32.29%가 나타났다. 본 연구에서의 라디칼 소거능 범위가 19.48 ~ 67.70%이고, 세 개의 피크 중 용출된 다당체 최대 예측 DPPH 라디칼 소거능이 67.70%로 증류수에서의 항산화능이 가장 높게 측정되었다. 이로써 정제된 파우더를 가지고 FT-IR과 NMR을 측정하여 산성다당체의 화학결합에 의한 특정 작용기와 glycosidic 결합이 존재함을 확인하였다.

감사의 글

본 연구논문은 중소기업청의 첫걸음기술개발사업(C0454023)의 일환으로 수행하였으며, 일부는 농림축산식품부 고부가 식품기술개발사업

(314040-30-1-HD030)의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

1. J. Watanabe, K. W. Oh, H. S. Kim, M. Takahashi, H. Kaneto, "Anon-opioid mechanism in the inhibitory effect of ginseng saponins on electrically evoked contractions of guinea pig ileum and mouse vas deferens," *J. Pharmacobodyn.* Vol.11, pp. 453-458, (1988).
2. T. Namba, "The encyclopedia of wakan-yaku(Traditional sino-Japanese medicines) with color pictures," *Hoikusha*, Vol.1, pp. 50-51, (1993).
3. S. Shibata, O. Tanaka, K. Soma, Y. Iita, Y. Ando, H. Nakamura, "Studies on saponins and sapogenins of ginseng, the structure of panaxatriol," *Tetrahedron Lett.* Vol.3, pp. 207-213, (1965).
4. S. Shibata, "Some chemical studies on ginseng," *Proceedings of Intern Ginseng Sympo*, Vol.1, pp. 69-76, (1974).
5. C. Konno, K. Sugiyama, M. Kano, M. Takahashi, H. Hikino, "Isolation and hypoglycaemic activity of Panaxans A, B, C, D and E, Glycans of Panax ginseng Roots1." *Planta Medica* Vol.50, pp. 434, (1984).

6. R. Srivastava. "Bioactive polysaccharides from plants." *Phytochemistry*, Vol.28, pp. 2877-2883, (1989).
7. Y. Oshima, C. Konno, H. Hikino, "Isolation and hypoglycemic activity of panaxans I, J, K and L, glycans of Panax ginseng roots." *J. Ethanopharmacology* Vol.14, pp. 255, (1985).
8. M. Wang, L. J. Guilbert, J. Li, Y. Wu, P. Pang, T. K. Basu, J. J. Shan. "A proprietary extract from North American ginseng (*Panax quinquefolium*) enhances IL-2 and IFN γ productions in murine spleen cells induced by Con-A." *Int Immunopharmacol*, Vol.4, pp. 311-315, (2004).
9. X. Zhang, L. Yu, H. Bi, X. Li, W. Ni, H. Han, N. Li, B. Wang, Y. Zhou, G. Tai, "Total fractionation and characterization of the water-soluble polysaccharides isolated from Panax ginseng C. A. Meyer," *Carbohydrate Polymers*, Vol.77, No. 3, pp. 544-552, (2009).
10. L. Chen, J. U. Hu, S. Q. Wang, "The role of antioxidants in photoprotection: A critical review" *J. Am. Acad. Dermatol*, Vol.67, pp. 1013-1024, (2012).
11. R. G. Aischer, J. L. Hess, "Antioxidants in higher plants," *CRC Press Boca Raton*, pp. 1-17, (1993).
12. T. S. Yu, H. H. Kim, C. G. Yoon, "Hepatic oxygen free radical metabolizing enzyme activities and serum lipid profile in rats fed diet supplemented with Monascus pigment," *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.32, pp. 244-249, (2003).
13. S. E. Lee, N. S. Seong, T. Y. Chung, M. Y. Choi, E. K. Yun, Y. J. Jeung, "The effect of powdered herb of Aster scaber Thunb. on antioxidant system in ethanol-treated rats." *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.30, pp. 1215-1219, (2001).
14. Bitter, Tet, M. M. Heien, "A modified uronic acid carbazole reaction." *Analytical biochemistry*, Vol.4, No.4, pp. 330-334, (1962).
15. J. H. Do, H. O. Lee, S. K. Lee, J. K. Jang, S. D. Lee, H.S. Sung, "Colorimetric Determination of Acidic Polysaccharide from Panax ginseng, its Extraction Condition and Stability" *Journal of Ginseng Research*, Vol.17, No. 2, pp. 139-144, (1993).
16. J. H. Do, J. W Lee, S. K. Lee, H.S. Sung, "Preparation of red ginseng extract rich in acidic polysaccharide from red tail ginseng marc produced after extraction with 70% ethyl alcohol." *Korea J Ginseng Sci*. Vol.20, pp. 60-64, (1996).
17. X. Yu, X. Yang, B. Cui, L. Wang, G. Ren, "Antioxidant and immunoregulatory activity of alkali-extractable polysaccharides from North American ginseng" *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol.65, pp. 357-361, (2014).
18. K. Ohtani, K. Okai, U. Yamashita, I. Yuasa, A. Misaki, "Characterization of an Acidic Polysaccharide Isolated from the Leaves of Corchorus olitorius (Moroheiya)," *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol.59, No. 3, pp. 378-381, (1995).
19. S. C. Blois, P. H. Laing, Y. Chang, L. C. Yu, H. W. Sung, "A Natural Compound (Ginsenoside Re) Isolated from Panax ginseng as a Novel Angiogenic Agent for Tissue Regeneration." *Pharmaceutical Res*, Vol.22, pp. 636-645, (2005).
20. F. He, Y. Yang, G. Yang, L. Yu, "Components and Antioxidant Activity of the Polysaccharide from Streptomyces virginia H03" *Polysaccharide from Streptomyces virginia*, Vol.63, pp. 181-188, (2008).
21. D. Hua, D. Zhang, B. Huang, P. Yi, C. Yan, "Structural characterization and DPPH· radical scavenging activity of apolysaccharide from Guara fruits" *Carbohydrate Polymers*, Vol.103, pp. 143-147, (2014).

22. J. F. Kennedy and C. A. White Ellis Horwood, "Bioactive Carbohydrates in Chemistry, Biochemistry and Biology." *FEBS Letters*, Vol.162, No. 1, pp. 204, (1983).
23. K. Tark, K. Cho, K. H. Park, S. M. Son, H. J. Chae, "Optimization of Extraction Conditions for Polysaccharide using Red Ginseng Marc" *Journal of Ginseng Research*, Vol.33, No. 4, pp. 337-342, (2009).
24. J. W. Lee, J. H. Do, "Extraction Condition of Acidic Polysaccharide from Korean Red Ginseng Marc" *Journal of Ginseng Research*, Vol.26, No. 4, pp. 202-205, (2002).
25. J. H. Choi, S. J. Hwang, S. N. Jeong, Y. K. Lee, M. H. Jin, S. G. Park, K. Lee, "Anti-aging effect on skin with 9 repetitive steaming and fermenting process herbal composition extract." *The Korea Journal of Herbology*, Vol.24, No. 4, pp. 101-106, (2009).