



상업효소를 이용한 차가버섯 추출물의 생물전환 공정을 통한 생리활성물질 생산과 항산화 활성 증진

김세빈¹ · 감다혜² · 홍지우³ · 김진우^{4,5†}

Enhancement of Production of Bioactive Compound and Antioxidant Activity in *Inonotus obliquus* by Bioconversion Process using Commercial Enzymes

Se Bin Kim¹, Da Hye Gam², Ji Woo Hong³ and Jin Woo Kim^{4,5†}

ABSTRACT

Received: 2021 December 15

1st Revised: 2022 January 6

2nd Revised: 2022 January 25

3rd Revised: 2022 February 7

Accepted: 2022 February 7

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background: *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilát is regarded as a functional food and medicinal resource due to the polyphenol content. However, the polyphenols in *I. obliquus* have a low absorption rate because they exist as a complex combined with proteins or carbohydrates. This study improves the production of free polyphenols through low molecularization in the bioconversion process using commercial enzymes including protease and carbohydrate-degrading enzymes.

Methods and Results: The total polyphenol content and radical scavenging activity of *I. obliquus* extract was significantly enhanced after bioconversion by commercial enzymes when compared to a hot-water extraction ($p < 0.05$). In addition, the *I. obliquus* extract was isolated from the bioconverted product using high performance liquid chromatography to investigate the main substances in the bioconverted products. The main substance was syringic acid at a concentration 73.6% (using Protamex) and 60.4% (using Flavourzyme) higher than the hot-water extract ($p < 0.05$).

Conclusions: The results confirm *I. obliquus* bioconverted using proteases contains a high antioxidant content when compared to the carbohydrate-degraded *I. obliquus*. Therefore, bioconverted *I. obliquus* using proteases should be developed as a high value-added raw material with excellent antioxidant potential for producing functional foods and medicines.

Key Words: *Inonotus obliquus*, Anti-oxidant, Bioconversion, Commercial Enzymes, Polyphenol

서 언

호흡을 통해 체내로 유입된 산소의 90% - 95%는 미토콘드리아에서 ATP 생성을 위해 사용되며 1% - 2%는 미토콘드리아 내막에 위치하는 전자전달계의 complex I과 III에서 초과산화물 (O_2^-), 과산화수소 (H_2O_2)와 하이드록실라디칼 ($-OH$) 등의 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)로 전환된다 (Yoo, 2013). 전환된 ROS의 홀전자 (unpaired electron)는 높은 반응성을 통해 세포의 주요 구성성분인 단백질, 지질과 DNA 등을 산화시켜 암, 심혈관계 질환, 염증과 당뇨 등의 질

병을 유발하기 때문에 최근 ROS를 제거하기 위한 항산화제 관련 연구가 활발하게 진행되는 추세이다 (Xuan *et al.*, 2016). 대표적인 항산화제로 β -carotene, selenium과 α -lipoic acid 등이 사용되고 있으나 원료의 낮은 수급, 저수율과 안정성 등의 문제가 있어 이를 보완하기 위해 천연물로부터 항산화 물질을 경제적으로 생산하는 공정개발이 요구되고 있다 (Choi, 2010).

차가버섯 (*Inonotus obliquus*)은 소나무비늘버섯과에 속한 담자균 버섯으로 β -glucan, lignin, vanillic acid, triterpene acid 와 syringic acid 등의 생리활성물질이 존재하여 암, 위염과

†Corresponding author: (Phone) +82-41-530-2226 (E-mail) kimjw1028@sunmoon.ac.kr

¹선문대학교 제약생명공학과 학사연구생 / Undergraduate student, Department of Pharmaceutical Engineering and Biotechnology, Sunmoon University, Asan 31460, Korea.

²선문대학교 식품과학과 석사 / Master's degree, Department of Food Science, Sunmoon University, Asan 31460, Korea.

³선문대학교 식품과학과 석사과정생 / Master's degree student, Department of Food Science, Sunmoon University, Asan 31460, Korea.

⁴선문대학교 식품과학과 교수 / Professor, Department of Food Science, Sunmoon University, Asan 31460, Korea.

⁵프렉스프로 대표이사 / chief executive officer, FlexPro Biotechnology, Asan 31460, Korea.

결핵 등에 약리 효과가 있다 (Lee *et al.*, 2011; Moon and Lee, 2009). 차가버섯에 존재하는 생리활성물질 중 폴리페놀은 다른 식용 버섯보다 약 1.4 배 높게 함유되어 있지만 주로 단백질이나 탄수화물과 결합된 복합체로 존재하고 체내 소화효소를 통한 분해가 어렵기 때문에 체내 흡수율이 낮은 단점을 지닌다 (Chung *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2021). 그러나 국내에 유통되고 있는 차가버섯 음료, 분말과 캡슐 등의 제품은 methanol이나 ethanol과 같은 용매에 의한 단순한 추출공정으로부터 단백질이나 탄수화물과 같은 고분자 물질 추출을 통해 제조되기에 체내 흡수율 개선에 한계가 있어 생리활성이 증진된 기능성 고부가가치의 제품 개발을 위한 새로운 추출공정이 요구된다 (Baek *et al.*, 2012).

폴리페놀은 다가의 하이드록시기 (-OH)를 가지는 방향족 화합물로 하이드록시기에 의한 전자공여 작용을 통해 ROS를 환원시켜 항산화 효과를 나타낸다 (Hong *et al.*, 2011). 차가버섯으로부터 항산화 효과 증진을 위해서는 폴리페놀과 단백질 또는 탄수화물 간의 결합을 pH, 온도와 이온 세기와 같은 조성 변화로 분해하여 유리형 폴리페놀을 생산함으로써 항산화 활성을 가지는 하이드록시기의 노출을 증가시킬 수 있는 공정이 필요하다 (Wang *et al.*, 2021).

천연물에서 폴리페놀을 추출하기 위해 유기용매 추출과 고온 추출이 일반적으로 이용되지만, 유기용매 잔류로 인해 인체에 독성을 유발하거나 고온에 의한 유효성분의 분해 및 변성에 따른 수율 감소와 생리활성 손실이 발생하는 공정상의 단점을 가지고 있다 (Cho, 2017; Oh *et al.*, 2017). 반면 생물전환은 미생물 또는 효소를 이용하여 전구물질로부터 기능성 물질을 생산하는 기술로 결합형인 고분자 화합물의 분해를 통해 유리형의 저분자 화합물로 전환하여 추출효율을 높이는 공정으로 과정이 복잡하고 유기용매의 유해성에 대한 문제가 있는 화학적 추출공정과 달리 기질 특이성에 의해 특정 기질과 반응하기 때문에 과반응에 의한 부산물의 생산이 비교적 적게 발생하여 균일한 분해물을 생산할 수 있다 (Im *et al.*, 2016).

더불어 기질 농도, 미생물의 분해 또는 효소의 기질에 대한 특이성을 통해 기존 물질이 구조적으로 변하면 용해도, 유효 성분 함량과 흡수율이 증가함으로써 기능성 증진 및 신규 기능성 부여와 함께 체내 안전성 및 흡수율 개선이 가능하다 (Hwang *et al.*, 2021). 특히, 용매 추출에 비해 상대적으로 낮은 온도에서 공정에서 단백질이나 탄수화물과 결합된 폴리페놀의 가수분해를 통해 유리형으로 전환함으로써 부산물 생산 저감과 열분해 감소를 통한 수율 증대의 장점이 있어 천연물로부터 폴리페놀 추출에 있어 효과적인 공정으로 알려져 있다 (Lee and Kim, 2019).

본 연구는 차가버섯으로부터 폴리페놀의 생산 증대를 위해 단백질 분해효소 (Alcalase, Flavourzyme, Protamex)와 탄수화물 분해효소 (Celluclast, Pectinex, Viscozyme)로 차가버섯을

생물전환하고 폴리페놀과 항산화 활성 증대 가능성을 평가하였다. 또한, 차가버섯의 생물전환공정을 통해 함량이 증대된 지표물질을 탐색하고 항산화 활성이 우수한 식품 및 의약품 소재로의 활용을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

차가버섯 (*Inonotus obliquus*)은 한바른식품연구소 (Cheonan, Korea)에서 건조 분말형태로 구매하였고 차가버섯 추출물의 생물전환을 위해 상업효소 중 단백질 분해효소 (Alcalase; 2.4 AU-A/g, Flavourzyme; 500 LAPU/g, Protamex; 1000 BHU-2/g)와 탄수화물 분해효소 (Celluclast; 700 EGU/g, Pectinex; 3300 PGNU/g, Viscozyme; 100 FBG/g)는 Novozyme (Copenhagen, Denmark)사의 제품을 사용하였다.

분석에 사용된 시약인 gallic acid, syringic acid, 2 N Folin-ciocalteu, sodium carbonate와 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사의 일급이상 시약을 사용하였다.

2. 효소처리물 제조

차가버섯은 증류수와 1 : 20 (w/v) 고액비로 혼합하여 초음파 추출기 (SD-250H, Mujigae Co., Seoul, Korea)로 60°C에서 30 분간 추출하고 원심분리기(1236R, Labogene, Daejeon, Korea)를 이용하여 13,000 rpm에서 10 분간 고액분리하였다.

효소 처리물은 Lee 등 (2014)의 효소 처리 방법을 응용하여 제조하였다. 생물전환을 위한 추출물의 상등액은 1 M NaOH와 1 M HCl를 이용하여 pH 5.5±0.1로 조정하고 2 v/v% 단백질 분해효소 (Alcalase, Flavourzyme, Protamex)와 탄수화물 분해효소 (Celluclast, Pectinex, Viscozyme)를 실험별로 가한 후 진탕배양기 (KMC-1205SW1, Vision Co., Daejeon, Korea)에서 50°C와 200 rpm으로 48 시간 생물전환을 수행하였다.

3. Total polyphenol content (TPC) 측정

차가버섯 효소처리물의 총 폴리페놀 함량 (total polyphenol content, TPC)는 Folin-Denis의 방법을 변형하여 측정하였다 (Um *et al.*, 2017).

차가버섯 효소처리물 0.14 ml와 0.2 N Folin-ciocalteu 0.7 ml를 혼합하여 실온에서 8 분간 반응시킨 후 7.5% sodium carbonate 0.56 ml를 가하여 60 분간 반응하고 분광광도계 (Optizen 2120UV, Mecasys, Daejeon, Korea)로 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 차가버섯 효소처리물의 TPC는 gallic acid를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성하여 mg·GAE (gallic acid equivalent)/g DM (dried material)로 나타내었다.

4. Radical scavenging activity (RSA) 측정

차가버섯 효소처리물의 라디칼 소거 활성 (radical scavenging activity, RSA)는 Brand-Williams의 분석법을 변형하여 측정하였다 (Kim *et al.*, 2020).

실험에 사용된 0.1 M DPPH는 517 nm에서 흡광도가 0.95 - 1.05가 되도록 메탄올로 희석하였고 차가버섯 효소처리물 0.25 ml에 1.25 ml DPPH를 가하여 암실에서 20 분간 정지반응 후 분광광도계로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 차가버섯 효소처리물의 RSA는 아래의 식을 이용해 백분율로 산출하였다 (Eq. 1).

$$RSA (\%) = \left(1 - \frac{\text{시료 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}}\right) \times 100 \quad (1)$$

5. 지표물질 탐색

차가버섯으로부터 생물전환 전후의 지표물질 분석을 위해 poroshell 120 EC-C₁₈ 컬럼 (4.6 mm × 150 mm, Agilent Technology Inc., Santa Clara, CA, USA)과 diode array detector (DAD)가 장착된 HPLC (1260 series infinity, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다.

시료는 0.01 ml 주입하고 이동상은 99.9% acetonitrile (solvent A)과 1% acetic acid (solvent B)를 사용하여 0 분 - 5 분 (0% A : 100% B), 5 분 - 50 분 (15% A : 85% B), 50 분 - 60 분 (50% A : 50% B)과 60 분 - 64 분 (100% A : 0% B)을 조건으로 혼합 비율을 변경하여 분석하였으며 유속은 0.5 ml/분이고 컬럼 온도는 30°C로 하였다. 검출물의 스펙트럼은 DAD를 이용하여 190 nm - 640 nm에서 확인하였고 머무름시간 (retention time, RT) 및 피크의 스펙트럼 특성을 비교하여 생물전환공정 전·후의 지표물질 변화를 정량 및 정성 분석하였다.

6. 통계분석

모든 통계분석은 GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad, San Diego, CA, USA)를 이용하여 분석하였으며 분석한 결과는 3 회 반복실험에 대한 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 각 실험의 통계적 유의성은 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)를 이용한 일변수 분산분석(One-way ANOVA test)에서 측정된 *p* 값을 5% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 생물전환에 의한 폴리페놀 생산 증대

차가버섯 (*Inonotus obliquus*)으로부터 생물전환공정을 통한 폴리페놀의 생산 증대를 확인하기 위해 차가버섯 효소처

리물의 TPC를 측정하였다. 차가버섯 효소처리물의 TPC는 Protamex > Flavourzyme > Alcalase > Viscozyme > Celluclast > Pectinex 순으로 나타났으며 단백질 분해효소 중 Protamex를 처리하였을 때 17.50 ± 0.29 mg·GAE/g DM으로 가장 높은 함량을 보인 반면, 탄수화물 분해효소 중 하나인 Pectinex 처리군은 14.90 ± 0.19 mg·GAE/g DM으로 단백질 분해효소 처리군에 비해 낮은 TPC를 보여 차가버섯으로부터 폴리페놀의 생산은 단백질 분해효소 처리군이 탄수화물 분해효소 처리군보다 증가한 것을 확인하였다 (Fig. 1).

식물의 세포벽에 존재하는 폴리페놀은 다당류인 셀룰로오스 또는 헤미셀룰로오스와 결합한 형태로 존재하는데, 식물체의 20% - 40%를 차지하는 셀룰로오스는 β-1,4 글리코사이드 결합을 통해 섬유 간 긴밀한 결합으로 결정성이 강한 고분자 물질을 형성하여 물리, 화학 및 생물학적 분해에 매우 강한 저항성을 가진다 (Kim *et al.*, 2017). 이러한 구조는 셀룰로오스 주변의 수소결합과 van der waals 결합으로 인해 더욱 강화되어 효소분해에 강한 저항성을 가지고 더불어 셀룰로오스는 오탄당의 함량이 높은 헤미셀룰로오스 구조체로부터 보호를 받는 구조적 특징을 지닌다 (Lee *et al.*, 2010). 이와 관련하여 Kim (2010)는 셀룰로오스의 강건한 구조로 인해 셀룰레이스를 통한 효소분해가 저해된다고 보고하였는데, 본 연구에서도 차가버섯 내 헤미셀룰로오스에 의한 보호 효과로부터 셀룰레이스 계열인 Celluclast, Pectinex와 Viscozyme을 통한 효소분해가 저해되어 생물전환 효율이 낮아짐에 따라 탄수화물 분해 효소 처리군이 단백질 분해효소에 비해 폴리페놀 생산에 유의한 증가가 없는 것으로 판단된다.

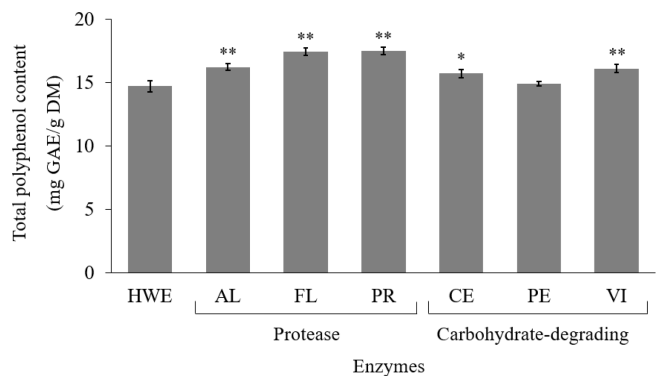


Fig. 1. The values of total polyphenol content in *I. obliquus* by bioconversion process using commercial enzymes. HWE; hot-water extract of *I. obliquus*, AL; Alcalase, FL; Flavourzyme, PR; Protamex, CL; Celluclast, PE; Pectinex, VI; Viscozyme. There was no effect of pH on RSA because the final pH of bioconverted *I. obliquus* extract was adjusted equally. All values are means in triplicate measurement. All data of TPC were statistically different from the value of the hot-water extract using the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, **p* < 0.05, ***p* < 0.01).

즉, 차가버섯으로부터 폴리페놀의 생산에 있어 단백질 분해 효소를 통한 생물전환은 탄수화물 분해효소보다 효율적인 것으로 판단되며 생산된 폴리페놀은 차가버섯 내 단백질과 관련이 있을 것으로 사료된다.

2. 생물전환에 의한 RSA 증대

차가버섯으로부터 생물전환공정으로 인한 항산화 활성의 변화는 RSA 측정을 통해 확인하였다 (Fig. 2). 모든 효소 처리군의 RSA는 열수추출물 (28.10 ± 2.25%)과 비교하였을 때 증가하였으며 특히 Protamex 처리군에서 28.40% 증가하였고 Flavourzyme 처리군에서 24.20% 증가하여 다른 효소 처리군에 비해 높은 RSA를 확인하였다 ($p < 0.01$). 또한, Protamex와 Flavourzyme 처리군은 탄수화물 분해효소 중 가장 높은 RSA가 측정된 Viscozyme 처리군에 비해 RSA가 높게 측정되었다 ($p < 0.01$).

셀룰레이즈를 이용한 생물전환에 있어 Kellock 등 (2017)은 가문비나무 내 lignin이 효소 활성 부위와 소수성 결합을 형성하여 기질과 경쟁적으로 작용하기 때문에 효소분해 효율을 감소시키는 것으로 보고하였는데, 본 연구에서 차가버섯 내 lignin으로 인해 효소분해 효율이 감소하여 RSA 관련 화합물이 분해되지 않은 것으로 사료된다.

반면, 단백질은 내부에 소수성 아미노산과 표면에 친수성 아미노산을 가지는 3차원 구조를 이루며 아미노산의 극성과 분자량에 따라 폴리페놀과 다양한 결합을 형성한다고 보고된다 (Lee et al., 2009). 특히 류신, 이소류신, 글리신, 메티오닌, 알라닌과 페닐알라닌과 같은 소수성 아미노산 잔기는 폴리페

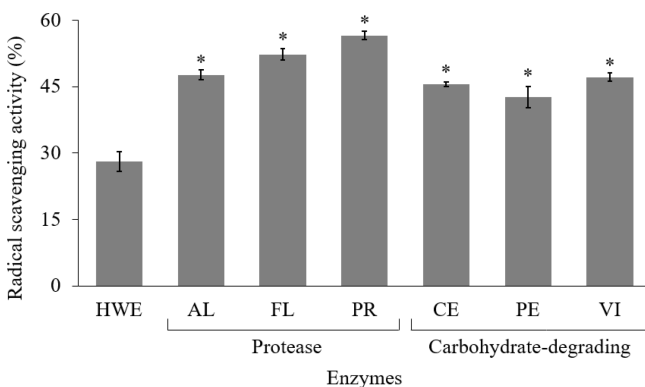


Fig. 2. The values of radical scavenging activity (RSA) in *I. obliquus* by bioconversion process using commercial enzymes. HWE; hot-water extract of *I. obliquus*, AL; Alcalase, FL; Flavourzyme, PR; Protamex, CL; Celluclast, PE; Pectinex, VI; Viscozyme. Bioconverted *I. obliquus* extracts were measured on the same pH (5.5 ± 0.1). All values are means in triplicate measurement. All data of RSA were statistically different from the value of the hot-water extract using the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, * $p < 0.01$).

놀의 비극성 방향족 고리와 소수성 결합이나 수소결합을 통해 복합체를 형성한다고 알려져 있다 (Hong and Jung, 2012). 따라서 단백질 분해효소는 차가버섯 내 단백질의 구조에서 소수성 아미노산과 결합된 폴리페놀을 유리화하였고 그 결과 RSA가 높아진 것으로 판단된다. 이는 Hyon 등 (2010)이 당유자 효소분해물의 RSA를 측정한 결과 단백질 분해효소 처리군에서 탄수화물 분해효소 처리군보다 높았다고 보고한 것과 동일하다. 또한, 단백질과 폴리페놀 간의 결합은 셀룰로오스와 폴리페놀 간의 결합에 비해 생물전환을 통한 유리형 폴리페놀 생산에 유리하다고 알려져 있다 (Brudzynski and Maldonado-Alvarez, 2015; An et al., 2020).

이에 본 연구 결과는 Protamex와 Flavourzyme를 이용한 생물전환공정을 통해 차가버섯 단백질 내부의 소수성 아미노산과 폴리페놀 간의 결합이 분해되어 유리형 폴리페놀 생산이 증가됨으로써 RSA가 높게 측정된 것으로 사료된다. 따라서 단백질 분해효소를 이용한 생물전환공정은 차가버섯 내의 소수성 아미노산을 특이적으로 분해하여 폴리페놀 생산을 증대함으로써 차가버섯의 항산화 활성을 높이는 데 효과적인 것으로 판단된다.

3. 지표물질의 생산 증대

앞선 결과를 기반으로 TPC와 RSA가 가장 높게 측정되었던 단백질 분해효소 중 Protamex와 Flavourzyme 처리군에서 증가된 폴리페놀을 탐색하기 위해 HPLC를 이용하여 정량 및 정성 분석하였다 (Table 1 and Fig. 3).

Protamex와 Flavourzyme로 생물전환된 차가버섯 효소처리물의 주요 피크는 머무름시간이 13.7 분으로 나타나, syringic acid 표준품과 일치하였고 DAD 기반 280 nm에서의 스펙트럼이 동일함에 따라 차가버섯 효소처리물의 주요 지표물질이 syringic acid임을 확인하였다. 차가버섯 효소처리물에서 syringic acid를 주요 지표물질로 확인한 결과는 Im 등 (2017)이 차가버섯 ethyl acetate 분획물에서 syringic acid를 주요물질로 검출한 연구 결과와 일치하였다.

차가버섯 열수 추출물의 수율은 15.8%로 확인되었으며, syringic acid의 함량에 있어서 차가버섯 효소처리물을 대조군인 열수 추출물과 비교하였을 때 Protamex와 Flavourzyme 처리군에서 syringic acid의 함량이 0.92 mg/g DM과 0.85

Table 1. The values of syringic acid in bioconverted *I. obliquus* for HPLC.

Syringic acid (mg/g DM)	Enzymes		
	Hot-water extract	Flavourzyme	Protamex
	0.53	0.92**	0.85*

All values of syringic acid were statistically different from the value of the hot-water extract using the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

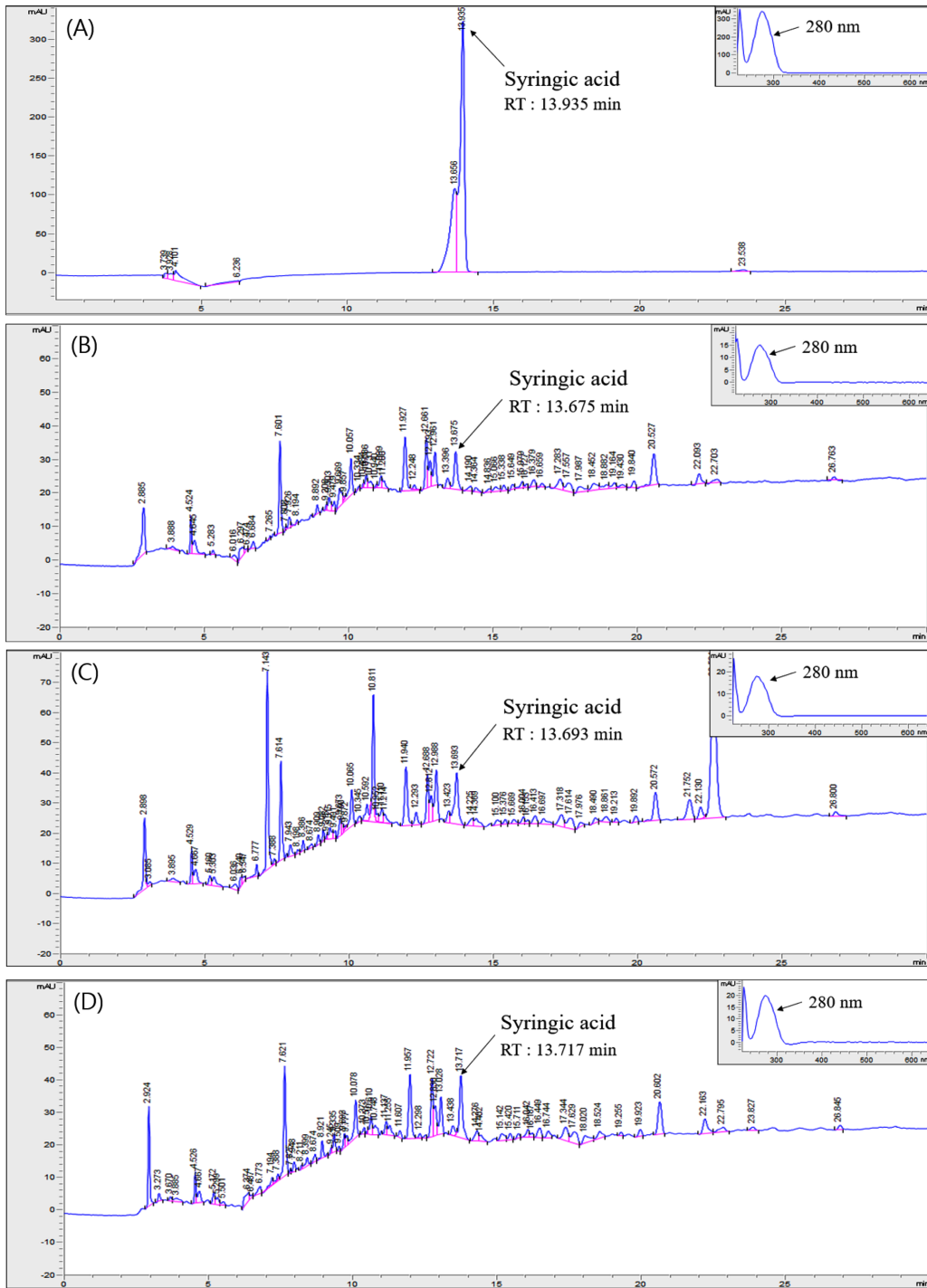


Fig. 3. HPLC chromatograms and DAD spectrums at 280 nm for syringic acid identification in bioconverted *I. obliquus*. (A); syringic acid of the standard material, (B); hot-water extract on *I. obliquus*, (C); Flavourzyme treatment group, (D); Protamex treatment group.

mg/g DM으로 나타나 각각 73.6%와 60.4% 증가하였다 ($p < 0.05$). 차가버섯에서 Protamex와 Flavourzyme 처리는 Viscozyme (0.66 mg/g DM), Pectinex (0.64 mg/g DM)와 Alcalase (0.76 mg/g DM) 처리보다 syringic acid의 함량이

높은 것으로 보아 차가버섯 내 단백질과 폴리페놀 간의 결합이 생물전환공정을 통해 syringic acid 생산이 증대한 것으로 사료된다.

폴리페놀인 syringic acid는 벤젠 고리에 산소와 수산기 및

메틸기가 결합된 형태로 특히 2 개의 하이드록시기를 가지고 있어 강력한 항염, 항산화와 항암 효과를 가짐이 보고된 바 있다 (Han *et al.*, 2003). 또한, 신령버섯균사체 액체배양물의 항산화 활성에 대한 Ha 등 (2018)의 연구, 어성초와 야관문의 항산화 활성에 대한 Park 등 (2020)의 연구 그리고 옥수수 가루의 항산화 활성에 대한 Cho 등 (2018)의 연구에 따르면 syringic acid가 항산화 활성을 나타내는 표준물질로 확인하였다.

따라서 앞서 진행한 실험 결과에서 차가버섯 효소처리물의 TPC 및 RSA가 열수 추출물에 비해 높게 측정된 결과는 단백질이나 탄수화물과 syringic acid 간의 결합이 생물전환공정을 통해 유리형으로 전환됨에 따라 syringic acid가 증대한 것으로 판단된다.

본 연구에서는 단백질 분해효소 중 Protamex와 Flavourzyme을 이용한 생물전환공정이 차가버섯으로부터 폴리페놀의 증대와 함께 항산화 활성을 높이는데 효과적인 방법임을 확인하였으며 차가버섯을 대상으로 상업효소를 적용한 생물전환공정을 통해 부산물 생산을 감소하고 기존 물질의 구조를 변화시켜 항산화 성분이 증진된 소재로 개발함으로써 고부가가치의 가능성을 가진 식품 및 의약품 소재로써 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- An GH, Cho JH and Han JG. (2020). Examination of the biological activities of wild mushrooms extracts in Korea. *Journal of Mushrooms*. 18:151-163.
- Baek GH, Jeong HS, Kim H, Yoon TJ, Suh HJ and Yu KW. (2012). Pharmacological activity of chaga mushroom on extraction conditions and immunostimulating polysaccharide. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 41:1378-1387.
- Brudzynski K and Maldonado-Alvarez L. (2015). Polyphenol-protein complexes and their consequences for the redox activity, structure and function of honey. A current view and new hypothesis-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 65:71-80.
- Cho DH, Kim MJ, Sim EY, Jeon YH, Lee CK and Woo KS. (2018). Effect of carbohydrase treatments on phenolics content and antioxidant activity of maize flour. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 50:132-137.
- Cho YT. (2017). Development of a high performance extractor for the effective ingredient of propolis. *Journal of the Korean Society of Manufacturing Process Engineers*. 16:107-112.
- Choi JS. (2010). Oxidative stress and antioxidant therapy. *Korean Journal of Family Medicine*. 31:329-333.
- Chung BH, Seo HS, Kim HS, Woo SH and Cho YG. (2010). Antioxidant and anticancer effects of fermentation vinegars with *Phellinus linteus*, *Inonotus obliquus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:113-117.
- Ha YL, Moon YG, Kim NH, Heo JD, Cho MJ, Kim YR, Kim YS and Kim JO. (2018). *Agaricus blazei* mycelial liquid culture extract containing eritadenine improves benign prostatic hyperplasia-related biochemical markers in RWPE-1 cells through anti-inflammatory and anti-oxidative actions. *Journal of Life Science*. 28:1147-1155.
- Han DS, Oh SK and Oh ES. (2003). Selective cytotoxicities of phenolic acids in cancer cells. *Official Journal of Korean Society of Toxicology*. 19:45-50.
- Hong JI, Kim HJ and Kim JY. (2011). Factors affecting reactivity of various phenolic compounds with the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 40:205-213.
- Hong YH and Jung EY. (2012). Biotransformation of green tea with tannase as a functional material. *Food Industry and Nutrition*. 17:11-19.
- Hwang YJ, Kim JM and Yoon KY. (2021). Antioxidant activity of water-soluble polysaccharide extracts produced from perilla seed cake by enzymatic hydrolysis. *Korean Journal of Food Preservation*. 28:190-198.
- Hyon JS, Kang SM, Senevirathne M, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ and Kim SH. (2010). Antioxidative Activities of enzymatic digests from dried *Citrus unshiu* and *Citrus grandis* Peels. *Korean Journal of Food Cookery Science*. 26:18-25.
- Im DY and Lee KI. (2017). Antioxidative activity and tyrosinase inhibition effect of fractions from the extract of *Inonotus obliquus*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 48:46-50.
- Im HJ, Park BY and Yoon KY. (2016). Production of soluble dietary fiber of buckwheat hulls by enzymatic depolymerization and its characteristics. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 48:97-103.
- Kellock M, Rahikainen J, Marjamaa K and Kruus K. (2017). Lignin-derived inhibition of monocomponent cellulases and a xylanase in the hydrolysis of lignocellulosics. *Bioresource Technology*. 232:183-191.
- Kim CH, Seong ES, Yoo JH, Lee JG and Yu CY. (2020). Ginsenoside analysis of *Panax ginseng* C. A. Meyer culture broth in a bioreactor and its application in inducing biological changes in leafy vegetables. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 28:119-127.
- Kim MY, Jang GY, Oh NS, Baek SY, Kim KH, Kim KM, Kim HS, Lee JS and Jeong HS. (2017). Changes in free and bound forms of bioactive compound profiles of adzuki bean with germination. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 46:937-943.
- Kim YS. (2010). A research trend of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: A literature review. *Journal of Forest and Environmental Science*. 26:137-148.
- Lee GH, Kim MK, Oh HJ, Lee JY, Lee JY and Lee KH. (2009). Enzymatic hydrolysis of silk sericin and its anti-oxidative effect. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 35:135-141.
- Lee KH and Kim SO. (2019). Optimal enzymatic hydrolysis conditions for increased production of L-arginine and GABA in *Dendropanax moribifera* Lev. leaves. *Korean Journal of Food Preservation*. 26:289-299.

- Lee PH, Park SY, Jang TH, Yim SH, Nam SH, In MJ, Kim DC and Chae HJ.** (2014). Effects of complex carbohydrase treatment on physiological activities of pear peel and core. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 43:404-410.
- Lee SH, Lee HL, Youn HJ and Xiang ZH.** (2010). Adsorption of cationic birchwood xylan on Hw-BKP and its effect on paper properties. *Journal of Korea Technical Association of The Pulp and Paper Industry*. 42:1-11.
- Lee SH, Park SH, Lee KH, Park SJ and Kim HY.** (2011). Effect of *Inonotus obliquus* extract on the expression MMPs and HAS-2. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 37:237-245.
- Moon BH and Lee WC.** (2009). Studies on the anti-cancer activity of chaga mushroom extract. *Journal of Korean Medicine*. 30:1-12.
- Oh MH, Hwang YJ and Yoon KY.** (2017). Biological activity of water-soluble polysaccharides from *Cedrelela sinensis* according to extraction methods. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 49:215-221.
- Park DH, Hwang JH and Jeong YJ.** (2021). Functional constituents and quality stability according to storage conditions of chaga mushroom extract. *Korean Journal of Food Preservation*. 28:23-31.
- Park SI, Sohn HY, Lee CI, Hwang HY, Park SW and Kim JS.** (2020). Functional chemical components and their biological activities of *Houttuymia cordata* and *Lespedeza cuneata*. *Journal of Life Science*. 30:169-177.
- Um M, Kang SY, Lee JW and Lee OR.** (2017). Effect of gamma ray on germination, growth and antioxidant activity of *Senna tora*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 25:290-295.
- Wang Z, Tang C, Xiao G, Dai F, Lin S, Li Z and Luo G.** (2021). Comparison of free and bound phenolic compositions and antioxidant activities of leaves from different mulberry varieties. *BMC Chemistry*. 15:21. <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13065-021-00747-0> (cited by 2021 Dec 1).
- Xuan SH, Kim AR, Jeong YJ, Lee NH and Park SN.** (2016). Antioxidant and cellular protective effects of *Moringa oleifera* leaves extract. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 42:217-226.
- Yoo YD.** (2013). Mitochondrial reactive oxygen species production mediated by rom1 expression. *Hanyang Medical Reviews*. 33:90-96.