

두릅 에탄올 추출물의 Chlorogenic acid 함량 분석 및 생리활성

이정호¹, 정경옥¹, 임소연¹, 진다몬¹, 이왕로^{2*}

¹(재)순창건강장수연구소, 연구원, ²전북대학교 혁신교육개발원, 교수

Analysis of Chlorogenic Acid Content and Biological Activities of *Aralia elata* Ethanol Extract

Jeong Ho Lee¹, Kyoung Ok Jeong¹, So Yeon Im¹, Da Mon Jin¹ and Wang Ro Lee^{2*}

¹Researcher, Sunchang Research Institute of Health and Longevity, Sunchang 56015, Korea

²Professor, Faculty of Liberal Education, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

Abstract - This study was conducted to quantify chlorogenic acid content and evaluate biological activity, such as antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and digestive enzyme activity of *Aralia elata* ethanol extract (AEE). The SC₅₀ of DPPH and ABTS radical scavenging activities of AEE were 4.79±0.05 mg/mL, 5.79±0.05 mg/mL; total polyphenol and total flavonoid contents were 170.0±1.8 mgGAE/g, 105.5±4.1 mgQE/g, respectively. Nitric oxide (NO) was increased in RAW 264.7 cells and Caco-2 cells with treatment of LPS, and production of NO was inhibited by AEE in a concentration-dependent manner. Production of NO was reduced by 60.0±1.1% in RAW 264.7 cells and 50.7±2.8% in Caco-2 cells at of AEE. Similarly, the production of inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β and IL-6) was inhibited in a concentration dependent manner. Antibacterial activity increased as the dose concentration of AEE increased, and the MIC was 75 mg/mL for *L. monocytogenes*, and 100 mg/mL for *S. typhimurium* and *H. pylori*. In addition, amylase and protease enzyme activity was observed in AEE and increased enzyme activity was observed according to the concentration of the extract. AEE contained 7.06±0.01 mg/g of chlorogenic acid. As a result of the experiment, it is judged that it can be used as basic data for the development of health food using *Aralia elata*.

Key words – Antiinflammatory, Antioxidant, *Aralia elata*, Chlorogenic acid, Cytotoxicity

서 언

*Aralia elata*는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 식물로서 한국, 일본, 중국 북동부, 러시아 등에 자생하고 있으며, 민간에서 약용 또는 식용으로 섭취하고 있다. 두릅나무는 한방에서 신장병, 당뇨병, 간염, 및 위장질환 등의 치료에 사용하고 있다 (Cha *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2018; Qi *et al.*, 2018). 약리성분은 triterpenoid saponin, sitosterol, choline, 3,4-dihydroxy-benzoic acid, oleanolic acid, echinocystic acid, palmitic acid, echinocystic acid, linoleic acid, hederagenin, methyl eicosanoate, congmyanosides A, C, D, 3,4-dihydroxy-benzoic acid 등을 함유하고 있다(Ahn *et al.*, 2017; Jin *et al.*,

2017; Kwon *et al.*, 2018). 약리작용은 혈당 조절에 의한 당뇨 개선, 항산화, 항염증, 알코올 흡수저해, 피부 광노화억제, 간세포 보호 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Cha *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2018; Qi *et al.*, 2018). 두릅의 어린순과 잎은 독특한 풍미와 맛을 가지고 있어 봄철에 나물로 식용하고 있다. 두릅의 어린순과 잎에는 ascorbic acid, retinol, β-carotene, chlorogenic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid 등을 함유하고 있다(Ahn *et al.*, 2017; Cha *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013). Chlorogenic acid는 caffeic acid와 quinic acid가 ester 결합한 hydroxy cinamic acid에 속하는 폴리페놀 화합물로서 커피, 사과, 블루베리, 향신료, 채소류, 와인, 올리브오일, 고구마 등 다양한 식품소재에 함유되어 있다 (Chung *et al.*, 2011; Kim, *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018). Chlorogenic acid는 탄수화물을 분해하는 효소인 α-glucosidase

*교신저자: E-mail wrlee@jbnu.ac.kr

Tel. +82-63-270-2220

© 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

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.

를 억제시켜 탄수화물과 포도당의 흡수를 감소시킴으로써 식후 혈당 강하를 통한 항당뇨 효능과 과산화 지질 생성 억제, 콜레스테롤 생합성 억제, 혈장 및 간의 지방 감소, 항산화, 항암, 세포 보호, 혈압강하 등의 효능을 나타낸다(Chung *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2018; Oboh *et al.*, 2015).

최근 감염성 질환이 증가하고 있다. 특히 coronavirus disease 2019 (COVID-19)가 확산됨에 따라 현대인들의 식생활이 무공해 건강식품을 선호하여 신선채소에 대한 관심이 증가하고 있다. 또한 항산화 활성, 면역증진 등의 효능을 갖고, 인체 부작용이 적고 건강증진에 도움이 되는 천연자원식물에 대한 관심이 증가함에 따라 관련 연구가 증가하고 있다(Cha and Kim, 2008; Jun *et al.*, 2014). 학술적으로 천연자원식물에 대한 생리활성이 검증됨에 따라 이들을 재배하는 농가가 증가하였고, 농가의 고소득 작물로 인정받고 있다. 전북 순창지역은 지형적 특성과 기후가 두릅재배에 적합하여 전국 생산량의 약 70%를 차지하고 있으며, 지역 특산물로 각광받고 있다. 본 연구를 통해 순창에서 전북 순창에서 생산되는 두릅의 항산화, 항염, 항균, 소화효소 활성을 검증하였으며, chlorogenic acid 함량을 분석하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시료 제조

전북 순창에서 생산된 두릅을 순창군농산물직판장에서 구입하여 빛깔, 모양 등 외부형태를 확인하고 강원대학교 산림환경과학대학 최선은 교수에게 검증받은 후 실험에 사용하였으며, 표본(SCAE-2000)은 (재)순창건강장수연구소에 보관되어 있다. 시료는 수세하여 이물질을 제거하고 10 mm 두께로 자른 후 동결건조기(CLN-50C, Nihon freezer, Tokyo, Japan)를 이용하여 동결 건조시킨 후 분쇄기(HR3752/00, Philips, Amsterdam, Netherlands)로 분쇄하여 1:5 비율로 40% EtOH을 첨가하고 25°C에서 4시간 추출하였다. 추출물은 원심분리기(Super-22K, Hanil Science, Incheon, Korea)를 이용하여 10분간 3,000 × g로 원심분리하고 상등액 내 고형물의 제거를 위해 여과지(Advantec NO. 2, Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 여과시켰다. 여과액은 감압농축기(N-1000, Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 30 brix로 농축시킨 후, 동결건조기를 사용하여 완전히 건조시켜 분말(AEE, 3.16 g, 15.8%)로 제조하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

재료 및 시약

2,2-diphenyl-1-picryl hygrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS), pyrogallol, gallic acid, ascorbic acid, quercetin, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, minimum essential media (MEM), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), potassium persulfate ($K_2S_2O_8$), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), lipopolysaccharide (LPS), amoxicillin, sulfanilamide, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사, agar powder는 Daejung (Siheung, Korea)사, brucella broth는 Difco (Detroit, MI, USA)사, Welgene (Seoul, Korea)사, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Gibco (Grand island, NY, USA)사, penicillin-streptomycin (PS), fetal bovine serum (FBS)는 HyClone (Pittsburgh, PA, USA)사, mouse TNF ELISA kit는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)사 제품을 사용하였다.

Chlorogenic acid 분석

AEE (두릅 40% EtOH 추출물) 1 g에 MeOH (Burdick & Jackson Co., Muskegon, MI, USA) 50 mL를 넣고 30분 초음파 추출 후, 0.45 μ m syringe filter (Whatman Co., Buckinghamshire, UK)로 여과하여 분석하였다. Chlorogenic acid (Sigma Chemical Co., USA) 표준용액은 MeOH을 이용하여 1 mg/mL로 조제한 후 0.2 μ m syringe filter (Whatman Co., Buckinghamshire, UK)로 여과하여 분석하였다(Fig. 1). HPLC 시스템은 Agilent 1200 series (Agilent Technologies, CA, USA) DAD detector는 G1315D 1200 Series (Agilent Technologies, CA, USA), 컬럼은 ZORBAX Eclipse Plus C18 (5 μ m, 250 × 4.6 mm, Agilent Technologies, CA, USA)를 이용하여 25°C에서 분석하였다. 이동상은 0.1% formic acid (A)와 MeOH (B), 유속은 1.0 mL/min, 시료 20 μ L를 주입하여 검출파장 254 nm에서 분석하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다. 모든 용매는 사용 전 탈기 및 여과하여 사용하였다. Chlorogenic acid의 정량곡선은 피크 면적비와 농도 그래프를 작성하여 함량을 분석하였다(Kang *et al.*, 2016; Suh *et al.*, 2014).

항산화 활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성은 시료 40 μ L (312.5-10,000 μ g/mL)와 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L을 혼합하고 37°C에서 30분간 반

응시킨 후 microplate reader (Infinite M200 Pro, Zurich, Switzerland)를 이용하여 흡광도(515 nm)를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 아래 식을 이용하여 산출하였고, Microsoft Office Excel 2018 (Microsoft Co., Redmond, WA., USA)를 사용하여 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 농도(SC₅₀)를 계산하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다(Wang *et al.*, 2005).

DPPH radical scavenging 활성 (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{시료 무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거활성을 측정하기 위한 반응용액은 7 mM ABTS 용액에 2.4 mM의 potassium persulfate를 혼합하여 12

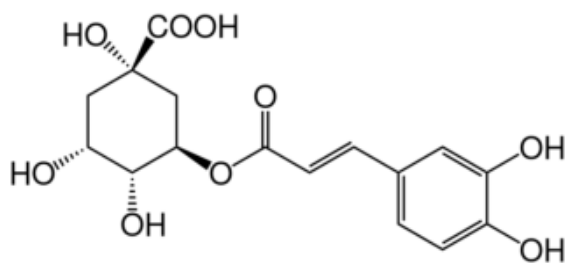


Fig. 1. The structures of standard; chlorogenic acid.

시간 동안 반응시켜 흡광도가 734 nm 파장에서 1.0이 되도록 조정하였다. 농도별로 제조된 시료 10 μL와 ABTS 반응용액 190 μL을 혼합한 후 상온에서 10분간 반응시켜 microplate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 아래 식에 대입하여 산출하였고, Microsoft Office Excel 2018를 사용하여 ABTS 라디칼을 50% 소거하는 농도(SC₅₀)를 계산하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다(Berg *et al.*, 1999).

ABTS radical scavenging 활성 (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{시료 무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 농도별로 조제한 시료 1 mL에 1 N Folin-Ciocalteu's reagent 용액 0.5 mL와 5% Na₂CO₃ 용액 1 mL를 첨가한 후 1시간 동안 암소에서 반응시킨 후 분광광도계 (Agilent 8453, Agilent, CA, USA)를 이용하여 흡광도 725 nm에서 분석하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid의 표준곡선 (25-200 μL/mL, 회귀식 y=0.0055x-0.0318, R²=0.9969)을 이용하여 측정하였으며, 총 폴리페놀 함량을 mg gallic acid equivalent(GAE)/g으로 나타내었다(Singleton and Rossi, 1965). 총 플라보노이드 함량은 농도별로 제조된 시료 0.5 mL에 1 M

Table 1. Analytical conditions of HPLC

Parameters	Conditions			
Instrument	HPLC Agilent 1200 series			
Detector	DAD detector (325nm)			
Column	ZORBAX Eclipse Plus C18 (5 μm, 250 × 4.6 mm)			
Column Temp.	25°C			
Flow rate	1.0 mL/min			
Injection volume	20 μL			
A : 0.1% formic acid in water, B : MeOH				
Mobile phase	Gradient	Time (min)	% A	% B
		0	90	10
		7	75	25
		17	65	35
		25	50	50
		30	20	80
Run time	30 min			

potassium acetate 용액 0.1 mL, 10% aluminum nitrate 용액 0.1 mL, EtOH 4.3 mL 첨가하여 40분간 실온에서 반응시킨 후 흡광도 415 nm에서 분석하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 표준곡선(20-100 $\mu\text{L/mL}$, 회귀식 $y=0.0014x+0.0011$, $R^2=0.9989$)을 이용하여 측정하였으며, 총 플라보노이드 함량을 mg quercetin(QE)/g으로 나타내었다(Moreno *et al.*, 2000).

세포독성

대식세포주 RAW 264.7 세포와 결장직장암세포주 Caco-2 세포에 대한 독성을 측정하기 위하여 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/well의 농도로 분주하고 5% CO₂ 배양기에서 37°C, 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 농도별로 조절된 시료를 처리하고 24시간 배양한 후 0.5 mg/mL의 MTT 용액으로 4시간 동안 반응시킨 후 상등액을 제거하였다. 생성된 formazan은 DMSO 100 μL 를 첨가하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다(Alley *et al.*, 1988; Boligon *et al.*, 2014). Caco-2 세포를 96 well plate에 2.5×10^5 cells/well의 농도로 분주하고 5% CO₂ 배양기에서 37°C, 24시간 배양한 후 상기와 동일한 방법으로 측정하였다(Shon *et al.*, 2010; Walia and Chen, 2020).

NO 생성 억제

대식세포인 RAW 264.7 세포주에 농도별로 조절된 시료를 2시간 동안 전처리하고 NO 생성을 유도하기 위하여 LPS를 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후 배양액에 griess 시약(0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine : 1% sulfanilamide = 1:1)을 처리하여 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 함량은 sodium nitrate 표준곡선을 활용하여 계산하였으며, NO 생성 억제 활성은 시료를 처리하지 않은 대조군을 기준으로 백분율로 계산하였다(Green *et al.*, 1982). 인간 결장직장암 세포주인 Caco-2 세포주로부터 NO 생성을 측정하기 위하여 Caco-2 세포를 2.5×10^5 cells/mL의 농도로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 상기와 동일한 방법으로 측정하였다(Romier-Crouzet *et al.*, 2009).

염증성 사이토카인 분비 억제

상기와 같은 조건에서 24시간 배양된 RAW 264.7 세포에 농도별로 조절한 시료를 2시간 동안 전처리한 후 LPS를 처리하여 24시간 배양한 다음, 배양된 세포의 상층액을 수거하여 실험에 사용하였다. 염증성 사이토카인은 ELISA MAXTM Deluxe Set

(BioLegend, San Diego, CA, USA) ELISA kit를 이용하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성량을 manufacturer's instruction에 따라 측정하였다(Jo *et al.*, 2019, Rahbari *et al.*, 2021).

항균활성 측정

Salmonella typhimurium, *Listeria monocytogenes*와 *Helicobacter pylori*에 대한 AEE의 항균활성은 한천 확산법(agar well diffusion)과 디스크 확산법(paper disc diffusion)으로 clear zone 생성을 측정하였으며, 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC)와 최소살균농도(minimum bactericidal concentration; MBC)는 broth micro-dilution method으로 측정하였다. 시료가 농도별로 첨가된 LB broth에 negative control과 균주 처리군을 나누어 *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* 균을 균일하게 접종한 후 24시간, 37°C에서 배양하고 흡광도 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 성장 변화에 기초하여 MIC를 측정하였다. 시료에 대한 살균작용을 확인하고 항균활성의 역가를 측정하기 위하여 생균수 측정법으로 MBC를 결정하였다. 배양한 균주배양액에 시료를 MIC보다 높은 400 mg/mL까지 첨가하고 LB agar 배지에 도포한 후 24시간 배양시킨 후 생균수를 측정하여 사멸된 균수가 99.9%가 넘는 최소농도를 MBC로 결정하였다(Akbar *et al.*, 2019; Jo *et al.*, 2019; Lehrer *et al.*, 1991; Osuagwu *et al.*, 2021). 농도별로 제조된 시료가 첨가된 Brucella broth 배지를 균일하게 분주한 후 *H. pylori* 균주를 0.5×10^7 CFU/mL씩 첨가하여 10% CO₂ 배양기에서 37°C, 24시간 배양하였다. 상기와 같은 방법으로 균주의 성장 변화 및 사멸 정도를 측정하여 MIC와 MBC 농도를 결정하였다(Takarada *et al.*, 2004).

소화효소 활성 측정

α -Amylase의 효소활성은 1.0%(w/v) soluble starch solution (20 mM sodium phosphate buffer에 6.7 mM sodium chloride, pH 6.9) 250 μL 와 시료액 500 μL 를 혼합하여 30분간 37°C에서 반응시킨 후 96 mM dinitrosalicylic acid (DNS) solution을 0.5 μL 를 첨가하고 5분 동안 100°C에서 반응시킨 뒤 4°C에서 3분간 냉각시켰다. 반응 시료는 UV-spectrophotometer (Specord 200 Plus, Analytikjena Co., Konrad, Germany)를 이용하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 0.2% (w/v) maltose을 이용해 작성하였으며, 효소 활성도 (unit definition)는 상기 반응 조건(37°C, pH 6.9)에서 starch로부터 1분 동안에 생성되는 1.0 μg 의 maltose 양을 1 unit로 정의하였

다(Bernfeld, 1955). Protease 효소활성은 0.65%(w/v) casein buffer (casein 6.5 g/mL, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5) 1.25 mL를 시료액 0.5 mL를 추가 혼합하여 10분간 37°C에서 반응시킨 후 110 mM trichloroacetic acid 2.5 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응 시료는 37°C에서 30분 동안 정지시킨 뒤 잔류하는 침전물을 0.45 µm syringe filter로 여과하였다. 여과액 2 mL에 500 mM sodium carbonate solution 5 mL와 0.5 M Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 mL을 혼합한 후 30분간 37°C에서 반응시킨 뒤 UV-spectrophotometer를 이용하여 흡광도 660 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 L-tyrosine을 상기와 동일한 방법으로 분석하여 작성하였으며, 1 unit는 1분 동안 tyrosine 1 µg을 유리시키는 양을 환산하여 계산하였다 (Kim *et al.*, 2011).

통계처리

모든 실험의 통계처리는 Sigma plot (window version 10.0, USA) program을 이용하여 평균±표준편차를 산출하였으며, 두 군 간의 분석은 Student's *t*-test를 실시하였고, 3군 이상의 군간 분석은 one-way ANOVA와 사후 분석으로 Tukey's multiple comparison test를 실시하였다. *p* < 0.05를 유의성 있는 것으로 해석하였다.

결과 및 고찰

Chlorogenic acid 함량

Chlorogenic acid는 과일, 채소, 커피, 올리브오일, 블루베

리, 와인, 고구마 등의 식품에 함유되어 있으며, quinic acid와 caffeic acid가 결합된 폴리페놀 화합물로서 항산화, 항당뇨, 항암, 세포보호, 혈압강하, 콜레스테롤 생합성 억제 등의 활성을 가지고 있다(Kwon *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018; Olthof *et al.*, 2001). AEE에 함유된 chlorogenic acid 함량을 HPLC를 이용하여 Table 1의 조건으로 분석하였다. Chlorogenic acid 표준용액은 HPLC용 MeOH을 이용하여 1 mg/mL로 조제하였으며, AEE 1 g을 HPLC용 MeOH 50 mL을 넣고 초음파기를 이용하여 30분간 추출한 후 0.45 µm syringe filter로 여과시켰다. HPLC 분석기기는 Agilent 1200 series, ZORBAX Eclipse Plus C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm), DAD detector 325 nm에서 분석하였다. 분석 조건은 유속 1.0 mL/min, 시료 20 µL를 주입하여 column 온도는 25°C, 0.1% formic acid in water/MeOH (A/B, v/v)를 B; 0분: 10%, B; 7분: 25%, B; 17분: 35%, B; 25분: 50%, B; 30분: 80%의 조건으로 분석하였다. Chlorogenic acid 표준용액 검량선의 상관계수(R^2)=0.9997 이상의 직선성을 얻었으며, retention time 13.01분대에서 main peak가 관찰되었다. AEE의 HPLC 분석결과 chlorogenic acid 표준용액에서와 같이 13.00분대에 peak가 관찰하였다(Fig. 2). AEE에 함유된 chlorogenic acid 함량을 분석한 결과 7.06±0.01 mg/g 함유되어 있었다.

항산화 활성

인체 질병의 약 90%는 활성산소와 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 인체 대사과정에서 생성된 활성산소는 산화물과 잘 반응하여 생체조직에서 전자를 얻어 안정한 화학구조를 이루지만 전자를 잃은 생체조직과 세포는 radical로 변화에 인체에 악영

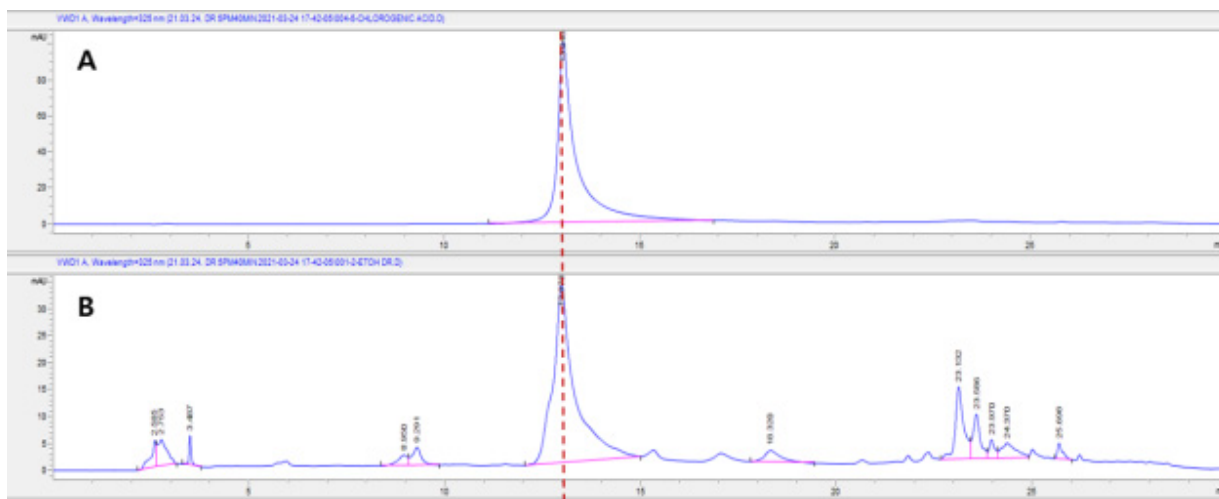


Fig. 2. HPLC chromatogram of (A) chlorogenic acid standard and (B) *Aralia elata* ethanol extract.

Table 2. SC₅₀ values of *Aralia elata* ethanol extract

Sample	DPPH radical		ABTS radical	
	SC ₅₀ ^z (mg/mL)	Relative activity(%) ^y	SC ₅₀ ^z (mg/mL)	Relative activity(%) ^y
AEE ^x	4.79±0.05	3.97	5.79±0.05	1.73
AA ^w	0.19±0.00	100.00	0.11±0.00	100.00

^zSC₅₀: 50% scavenging concentration of free radical.

^yRelative activity: a ratio (%) of SC₅₀ value of sample compared to that of positive control ascorbic acid.

^xAEE; *Aralia elata* 40% EtOH extract, ^wAA; L-Ascorbic acid, L-Ascorbic acid was used as a positive control.

All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

향을 일으킨다. 따라서 항산화 활성 물질은 radical의 전자 공여를 낮추는 것이라 할 수 있다. Radical이 체내에서 생성되면 세포내 지방질과 단백질, DNA를 손상시켜 암을 유발시키며, 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색증 등의 질병을 일으킨다. 따라서 체내에 생성된 radical의 제거는 인체 질병을 예방하는 것으로 항산화 활성 물질은 radical 전자의 공여를 낮추는 것이라 할 수 있다 (Chang *et al.*, 2001; Kim, 2020; Suh *et al.*, 2020). DPPH는 ascorbic acid, butylated hydroxyanisole (BHA), tocopherol 등에 의하여 환원되어 짙은 자색으로 변하는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정한다. ABTS는 청록색의 인위적인 radical로 Potassium persulfate에 의하여 생성되는 ABTS free radical이 항산화 물질에 의하여 제거되어 연녹색으로 탈색되는 원리를 이용하여 측정한다(Cha *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2014). AEE의 DPPH 라디칼 소거활성과 ABTS 라디칼 소거활성을 312.5–10,000 µg/mL 농도 범위로 측정하였으며, 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다(Table 2). DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼을 50% 소거하는 농도인 SC₅₀은 일반적으로 측정값이 낮을수록 활성이 높은 것을 의미한다. DPPH 라디칼 소거활성(SC₅₀)은 4.79±0.05 mg/mL, 양성대조군인 L-ascorbic acid는 0.19±0.00 mg/mL, 상대활성(relative activity)은 3.97%로 측정되었다. ABTS 라디칼 소거활성(SC₅₀)은 5.79±0.05 mg/mL, 양성대조군인 L-ascorbic acid는 0.11±0.00 mg/mL, relative activity은 1.73%로 측정되었다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

천연자원에 함유된 페놀성 화합물은 식물의 2차 대사산물로서 phenolic hydroxyl기가 있어 거대분자인 단백질 등과 쉽게 결합한다. 폴리페놀 화합물은 과일과 채소에 함유된 천연 항산화 활성물질로서 다양한 화학구조와 분자량을 가지고 있으며, flavonoid, catechin, tannin류로 구분되며, 콜레스테롤 저하,

Table 3. Total polyphenol and flavonoid content of *Aralia elata* ethanol extract

Total polyphenol (mgGAE ^z /g)	Total flavonoid (mgQE ^y /g)
170.0±1.8 ^x	105.5±4.1 ^x

^zGallic acid equivalent, ^yQuercetin equivalent.

^xAll values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

항암, 항미생물, 비만억제, 심혈관 질환 예방 및 항산화 작용 등 다양한 항산화 생리활성 기능을 가지고 있다(Cha *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2000). 폴리페놀 화합물은 하이드록실기(-OH)가 가지고 있어 여러 화합물과 쉽게 결합한다. 폴린-시오칼토 시약에 의해 환원되어 몰리브데넘 청색으로 발색하는 원리를 이용하여 폴리페놀의 함량을 측정한다(Kwon *et al.*, 2018; Middleton *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2021). 플라보노이드는 과일, 채소 등 다양한 식물에 존재하는 물질로서 flavones, flavonones, flavonols, catechins, anthocyanidins 등으로 항산화, 항암, 항염증, 항노화, 항부종, 관상 동맥 심장 질환 예방 등의 생리활성을 가지고 있다(Hertog *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2018). AEE에 함유된 총 폴리페놀 함량은 gallic acid, 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 기준물질로 설정하여 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 170.0±1.8 mgGAE/g, 총 플라보노이드 함량은 105.5±4.1 mgQE/g으로 분석되었다(Table 3). Kwon *et al.* (2018)의 연구에서 두릅 에탄올 추출물을 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate로 분획한 분획물의 폴리페놀 함량을 측정된 결과 *n*-hexane층은 13.42±0.52 mg GAE/g, chloroform층은 16.33±1.18 mg GAE/g, ethyl acetate층은 258.92±0.52 mg GAE/g, 증류수층은 69.58±0.38 mgGAE/g으로 분석되었다고 보고되었다. 본 연구에서는 AEE에서 170.0±1.8 mg GAE/g으로 폴리페놀 함량이 높게 측정되어 두릅은 항산화 활

성이 우수한 것으로 판단된다.

RAW 264.7 세포의 항염 활성

RAW 264.7 세포에 대한 AEE에 대한 세포독성을 MTT assay 실험법으로 측정하였다. AEE을 농도별(25-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리한 결과 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도까지 100% 이상의 세포생존이 측정되어 세포독성이 나타나지 않았다(Table 4). 따라서 독성이 나타나지 않는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 NO 생성 억제를 측정하였다(Table 5). LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 세포에 AEE을 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 후 NO 생성 억제를 측정한 결과 각각 79.3 ± 1.7 , 73.9 ± 0.9 , 65.5 ± 0.3 , $60.0 \pm 1.1\%$ 로 NO 생성이 농도 의존적으로 억제되었다. Jin *et al.* (2017)의 선천성 고혈압 흰쥐에서 두릅 에탄올 추출물의 항고혈압 효과 연구에서 두릅나무 에탄올 추출물에 대한 혈장 NO생성량을 측정한 결과 10 mg/kg 투여군에서 $17.51 \pm 3.84 \mu\text{M}$, 50 mg/kg 투여군에서

$47.69 \pm 2.94 \mu\text{M}$ 으로 측정되었다고 보고되었다. 이와 같이 AEE는 NO 생성을 억제하는 것으로 나타남에 따라 순창산 두릅은 다양한 염증인자를 억제하는 것으로 사료된다.

RAW264.7 세포가 활성화되면 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등을 분비한다. 일반적으로 cytokine은 염증과정과 면역반응 등을 관여하는 세포의 작용을 조절한다. T림프구의 성장과 활성을 조절하는 TNF- α 는 암세포를 사멸시킨다. 하지만 과량 분비되면 염증 및 면역반응의 이상을 초래하여 혈관 확장, 혈압강하 등을 일으킨다. 염증과 면역반응, 조혈작용을 조절하는 cytokine인 IL-6은 plasma cell의 분화를 유도하고 면역글로블린을 합성하는 등의 작용을 한다. IL-1 β 는 T세포를 활성화시키고, T세포에서 분비되는 cytokine을 활성화시킨다(Cha *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2012). LPS를 이용하여 RAW 264.7 세포에 염증을 유발시키고, AEE에 대한 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성을 측정하였다(Table 6). LPS를 RAW 264.7 세포에

Table 4. Effect of *Aralia elata* extract on cell viability of RAW 264.7 cell

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
25	50	75	100	125	150
105.3 ± 0.7^z	105.1 ± 1.5^z	101.2 ± 3.5^z	99.5 ± 1.7^z	102.5 ± 0.4^z	101.2 ± 3.7^z

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

^zindicate significant differences each other at $p < 0.05$ by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Table 5. Inhibitory effects of *Aralia elata* ethanol extract on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cell

Control	LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)			
		25	50	75	100
1.9 ± 0.3^z	100.0 ± 0.0^z	79.3 ± 1.7^z	73.9 ± 0.9^z	65.5 ± 0.3^z	60.0 ± 1.1^z

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

^zindicate significant differences each other at $p < 0.05$ by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Table 6. Effect of *Aralia elata* ethanol extract on the production (%) of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in RAW 264.7 cells

	Control	LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)			
			25	50	75	100
TNF- α (ng/mL)	2.5 ± 0.0^z	11.9 ± 0.3^z	11.4 ± 0.1^z	10.4 ± 0.3^z	9.3 ± 0.3^z	8.9 ± 0.1^z
IL-6 (ng/mL)	0.4 ± 0.0	24.0 ± 0.2	18.2 ± 0.1	16.8 ± 0.2	15.2 ± 0.2	15.2 ± 0.8
IL-1 β (pg/mL)	24.9 ± 3.5	75.5 ± 4.7	36.9 ± 2.9	36.4 ± 0.7	35.5 ± 1.0	30.9 ± 0.9

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

^zindicate significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

처리함에 따라 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성이 증가하였으며, AEE의 처리 농도가 증가함에 따라 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성이 농도 의존적으로 억제되었다. AEE 100 μ g/mL 농도에서 TNF- α 생성은 8.9 \pm 0.1 ng/mL로 LPS 처리군 대비 74.7 \pm 0.8% 억제되었으며, IL-6 생성은 15.2 \pm 0.8 ng/mL로 63.3 \pm 0.3%, IL-1 β 생성은 30.9 \pm 0.9 pg/mL로 40.9 \pm 1.1%로 억제되어 순창산 두릅은 염증성 cytokine의 생성을 억제하여 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.

Caco-2 세포의 항염 활성

Caco-2 세포에 대한 AEE의 세포독성을 MTT assay 실험법으로 측정하였다. AEE를 50-250 μ g/mL 농도로 처리한 결과 250 μ g/mL 농도까지 100% 생존율이 측정되어 처리한 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았음을 확인하였다(Table 7). 이에 따라 독성이 나타나지 않는 농도를 100 μ g/mL 이하의 농도로 설정한 후 NO 생성 측정하였다. AEE 25, 50, 75, 100, μ g/mL의 농도에서 63.9 \pm 1.3, 59.7 \pm 0.3, 56.4 \pm 1.7, 50.7 \pm 2.8%로 NO 생성이 농도 의존적으로 억제하였다(Table 8). 이를 통해 AEE가 결장직장 세포 내 염증을 효과적으로 감소시킬 수 있는 것으로 사료된다.

항균활성

S. typhimurium, *L. monocytogenes*, *H. pylori*에 대한 AEE의 항균활성은 agar well diffusion과 paper disc diffusion 분석

법으로 측정하였다(Table 9). AEE 3 mg/disc 농도에서 *S. Typhimurium*의 agar well diffusion은 0.64 mm, paper disc diffusion에서 0.57 mm, *L. monocytogenes*의 agar well diffusion은 3.99 mm, paper disc diffusion에서 2.17 mm, *H. pylori*의 agar well diffusion은 6.10 mm, paper disc diffusion은 7.14 mm의 clean zone이 나타났다. AEE의 *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *H. pylori*의 생육을 억제시키는 최소성장억제농도(MIC)와 최소살균농도(MBC)를 측정하였다(Table 9). *S. typhimurium*와 *H. pylori*의 MIC는 100 mg/mL, MBC는 350 mg/mL, *L. monocytogenes*의 MIC는 75 mg/mL, MBC는 275 mg/mL로 측정되었다.

소화효소활성

α -Amylase는 포도당, 말토오스 등의 α -D-(1,4)-glucan 결합을 가수분해하는 촉매 효소이며, protease는 단백질의 아미노산 peptide 결합을 가수분해 효소로서 단백질의 소화와 분해, 세포의 불필요한 단백질을 제거한다(Kang *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015). AEE의 α -amylase 효소 활성은 고농도인 25 mg/mL 농도에서 1.46 \pm 0.01 unit/mL으로 저농도인 5 mg/mL (0.81 \pm 0.08 unit/mL) 보다 약 1.8배 높게 측정되었다(Table 10). 식물에 함유된 anthocyanin, proanthocyanidins 등의 phenolic 화합물을 다량 함유하고 있는 물질은 α -amylase 활성을 저해한다(Kim *et al.*, 2007). α -Amylase 효소 활성이 높게 측정된 것은 AEE에 함유된 phenolic 화합물에 기인한 것으로 판단된다. Protease 효소활성은 100 mg/mL 농도에서

Table 7. Cell viability on Caco-2 cell culture incubated for 24 h with *Aralia elata* ethanol extract

Caco-2 Cell viability (%)				
Concentration (μ g/mL)				
50	100	150	200	250
101.5 \pm 1.0 ^z	103.9 \pm 1.3 ^z	103.9 \pm 2.9 ^z	101.6 \pm 1.5 ^z	102.0 \pm 2.4 ^z

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

^zindicate significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

Table 8. Nitric oxide production activity (%) on LPS-stimulated Caco-2 cell culture incubated for 24 h with *Aralia elata* ethanol extract

Control	LPS (1 μ g/mL)	Concentration (μ g/mL) + LPS (1 μ g/mL)			
		25	50	75	100
0.9 \pm 0.1 ^z	100.0 \pm 0.0 ^z	63.9 \pm 1.3 ^z	59.7 \pm 0.3 ^w	56.4 \pm 1.7 ^z	50.7 \pm 2.8 ^z

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

^zindicate significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

Table 9. Antibacterial activity against *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* and *H. pylori* of *Aralia elata* ethanol extract

Bacteria	Diffusion Assay	Diameter of clean zone (mm)		
		Concentration (mg/disc)		
		1	2	3
<i>S. Typhimurium</i>	Agar well	N.D.	N.D.	0.64
	Paper disc	0.01 ^z	0.02 ^z	0.57 ^z
<i>L. monocytogenes</i>	Agar well	1.32	1.86	3.99
	Paper disc	N.D.	2.10	2.17
<i>H. pylori</i>	Agar well	1.56	4.46	6.10
	Paper disc	2.49	6.67	7.14

N.D.: Not detected.

All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

^zindicate significant differences each other at *p* < 0.05 by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Table 10. α-Amylase activity of *Aralia elata* ethanol extract

α-Amylase activity (Unit/mL)				
Concentration (mg/mL)				
5	10	15	20	25
0.81±0.08 ^z	1.30±0.00 ^z	1.64±0.05 ^z	2.11±0.05 ^z	1.46±0.01 ^z

All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

^zindicate significant differences each other at *p* < 0.05 by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Table 11. Protease activity of *Aralia elata* ethanol extract

Protease activity (Unit/mL)				
Concentration (mg/mL)				
20	40	60	80	100
0.34±0.01 ^z	0.54±0.02 ^z	0.74±0.00 ^z	0.91±0.00 ^z	1.24±0.02 ^z

All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

^zindicate significant differences each other at *p* < 0.05 by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

1.24±0.02 unit/mL로 분석되었으며, 저농도인 20 mg/mL (0.34±0.01 unit/mL) 보다 약 3.7배 높게 측정되었다(Table 11). AEE의 처리 농도가 증가함에 따라 α-amylase 효소와 protease 효소 활성이 증가하였다.

적 요

순창군에서 생산된 두릅을 40% EtOH을 이용하여 추출한 후 chlorogenic acid 함량, 항산화, 항균, 항염 및 소화효소 활성을 측정하였다. HPLC를 이용하여 chlorogenic acid 함량을 측정 한 결과 7.06±0.01 mg/g 함유되어 있었다. DPPH 라디칼 소거

활성(SC₅₀)은 4.79±0.05 mg/mL, ABTS 라디칼 소거활성(SC₅₀)은 5.79±0.05 mg/mL, 총 폴리페놀 함량은 170.0±1.8 mgGAE/g, 총 플라보노이드 함량은 105.5±4.1 mgQE/g으로 분석되었다. RAW 264.7 세포, Caco-2 세포에서 세포독성이 나타나지 않았 으며, 농도 의존적으로 NO 생성이 억제되었다. RAW 264.7 세 포에서 염증성 cytokine인 TNF-α 생성은 8.9±0.1 ng/mL, IL-6 생성은 15.2±0.8 ng/mL, IL-1β 생성은 30.9±0.9 pg/ mL으로 억제되었으며, AEE의 처리 농도가 증가함에 따라 TNF-α, IL-1β, IL-6 생성이 농도 의존적으로 억제되었다. *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *H. pylori*에 대한 항균활성이 우수하게 나타났으며, 두릅을 EtOH 추출물의 처리농도가 증가

함에 따라 효소 활성인 α -amylase와 protease 효소활성도 증가하였다. 순창군에서 생산된 두릅은 chlorogenic acid를 다량 함유하고 있으며, 항산화, 항염, 항균, 소화효소 활성이 우수하게 나타나 향후 건강기능성 소재로 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahn, E.M., S.A. Choi and J.Y. Choi. 2017. HPLC analytical method validation of *Aralia elata* extract as a functional ingredients. Korean J. Food Preserv. 24(6):795-801 (in Korean).
- Akbar, A., M.B. Sadiq, I. Ali, N. Muhammad, Z. Rehman, M.N. Khan, J. Muhammad, S.A. Khan, F.U. Rehman and A.K. Anal. 2019. Synthesis and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. Biocatal. Agric Biotechnol. 17:36-42.
- Alley, M.C., D.A. Scudiero, A. Monks, M.L. Hursey, M.J. Czerwinski, D.L. Fine, B.J. Abbott, J.G. Mayo, R.H. Shoemaker and M.R. Boyd. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Res. 48(3):589-601.
- Berg, R., G. Haenen, H. Berg and A. Bast. 1999. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem. 66(4):511-517.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β methods in enzymology, Methods Enzymol. 1:149-158.
- Boligon, A.A., M.M. Machado and M.L. Athaydem. 2014. Technical evaluation of antioxidant activity. Med Chem. 4(7):517-522.
- Cha, J.H., Y.S. Kim and E.M. Lee. 2010. Effects of *Prunellae Spica* water extract on immune response in macrophage cells. J. Orien Obstet Gynecol. 23(3):91-100 (in Korean).
- Cha, J.Y., H.Y. Ahn, K.E. Eom, B.K. Park, B.S. Jun and Y.S. Cho. 2009. Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts. J. Life Sci. 19(5):652-658.
- Cha, M.H and Y.K. Kim. 2008. Analysis of consumption values of a seaweed functional food. J. Korean Soc Food Cult. 23(4):462-468 (in Korean).
- Chang, S.T., J.H. Wu, S.Y. Wang, P.L. Kang, N.S. Yang and L.F. Shyur. 2001. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. J. Agric. Food Chem. 49(7):3420-3424.
- Chung, D.M., Y.C. Chung and H.K. Chun. 2011. Spectrophotometric assay for determination of chlorogenic acid using green pigment formation and quantitative analysis of chlorogenic acid in Blueberry Leaf. J. Life Sci. 21(4): 610-612.
- Green, L.C., D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok and S.R. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 126(1):131-139.
- Hertog, M.G.L., P.C.H. Hollman and D.P. Venema. 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anti-carcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. J. Agric Food Chem. 40(9):1591-1598.
- Jin, J.Y., E.H. Park, Y.A. Jeon and Y.J. Lee. 2017. Antihypertensive effect of ethanol extracts of *Aralia elata* in spontaneously hypertensive rats. Korean J. Vet Res. 57(3):181-187 (in Korean).
- Jo, S.H., M.E. Kim, J.H. Cho, Y.J. Lee, J.W. Lee, Y.D. Park and J.S. Lee. 2019. Hesperetin inhibits neuroinflammation on microglia by suppressing inflammatory cytokines and MAPK pathways. Arch Pharm Res. 42(8):695-703.
- Jun, H.I., Y.A. Kim and Y.S. Kim. 2014. Antioxidant activities of *Rubus coreanus* Miquel and *Morus alba* L. fruits. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43(3):381-388 (in Korean).
- Kang, J.E., S.K. Park, T.J. Guo, J.Y. Kang, D.S. Lee, J.M. Kim, O.J. Kwon, U. Lee and H.J. Heo. 2016. Antioxidant activity and comparative analysis of major functional compounds in liqueur using coffee and coffee-ground. Korean J. Food Preserv. 23(4):560-567 (in Korean).
- Kang, J.R., M.J. Kang, J.H. Shin, J.H. Park and D.I. Kim. 2017. Antioxidant and antidiabetic activities of various solvent extracts from *Stachys sieboldii* Miq. Korean J. Food Preserv. 24(5):615-622 (in Korean).
- Kim, H.J., J.Y. Cha, M.L. Choi and Y.S. Cho. 2000. Antioxidative activities by water-soluble extracts of morus alba and *Cudrania tricuspidata*. J. Korean Soc Agric Chem Biotechnol. 43(2):148-152 (in Korean).
- Kim, J.H. 2020. Identification and characterization of fibriolytic compound from *Cornus officinalis* S. et Z. Korean J. Plant Res. 33(4):237-244 (in Korean).
- Kim, J.H., M.U. Kim and Y.J. Cho. 2007. Isolation and identi-

- fication of inhibitory compound from *Crataegi Fructus* on α -amylase and α -glucosidase. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 50(3):204-209 (in Korean).
- Kim, M.H., J.H. Rho and M.J. Kim. 2011. Stabilizing and optimizing properties of crude protease extracted from Korean figs. Korean J. Food Cookery Sci. 27(3):29-37 (in Korean).
- Kim, S.H., M.S. Kim, J.G. Han, H.S. Kim and H.K. Moon. 2013. Morphological characteristics and classification of 25 selected clones of *Aralia elata* Seem. Korean J. Plant Res. 26(1):36-43 (in Korean).
- Kim, Y.J., H.W. Kim, M.K. Lee, S.H. Lee, G. Asamenew, S. Lee, S.H. Lee, Y.S. Cha and J.B. Kim. 2018. Comparison of phenolic acid from shoots of *Aralia elata* and *Kalopanax pictus* cultivated in Korea using UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS. Korean J. Environ Agric. 37(4):260-267 (in Korean).
- Kwon, B.S., S.K. Park, J.M. Kim, J.Y. Kang, S.H. Park, J.E. Kang, C.J. Lee, S.B. Park, S.K. Yoo U. Lee and H.J. Heo. 2018. Antioxidant capacity and hepatoprotective effect of ethyl acetate fraction from shoot of *Aralia elata* on alcohol-induced cytotoxicity. Korean J. Food Sci Technol. 50(2): 216-224 (in Korean).
- Lee, B.B., S.T. Park, C.S. Han, D.Y. Han, E.J. Park, H.T. Park and S.C. Lee. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. J. Korean Soc Food Sc Nutr. 37(4):405-409 (in Korean).
- Lee, R.H., S.J. Yang, T.Y. Hwang, S.K. Chung and J.H. Hong. 2015. α -Glucosidase inhibitory activity and protease characteristics produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. Korean J. Food Preserv. 22(5):727-734 (in Korean).
- Lee, S.Y., J.H. Kim, J.M. Park, I.C. Lee and J.Y. Lee. 2014. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Smilax China* L.. Korean J. Food Preserv. 21(2):254-263 (in Korean).
- Lee, T.G., S.W. Hyun, I.S. Lee, B.K. Park, J.S. Kim and C.S. Kim. 2018. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of the extracts of *Aster koraiensis* Leaves. Korean J. Medicinal Crop Sci. 26(5):382-390 (in Korean).
- Lehrer, R.I., M. Rosenman, S.S.S.L. Harwig, R. Jackson and P. Eisenhauer. 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. J. Immunol Methods. 137(2): 167-173.
- Middleton, E., C. Kandaswami and T.C. Theoharides. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol. Rev. 52(4):673-751.
- Moreno, M., M. Isla, A.R. Sampietro and M.A. Vattuone. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71(1-2):109-114.
- Oboh, G., O.M. Agunloye, S.A. Adefegha, A.J. Akinyemi and A.O. Ademiluyi. 2015. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes(in vitro): A comparative study. J. Basic Clin Physiol Pharmacol. 26(2):165-170.
- Olthof, M.R., P.C. Hollman and M.B. Katan. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. J. Nutr. 131(1) 66-71.
- Osuagwu, S.O., Smart, I.T., Oluma, H.O.A. and O. Adibe. 2021. Antibacterial activity and phytochemical properties of selected medicinal plants against *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A, B and C*, clinical isolates in Lafia, Nigeria. Am. Sci. Res. J. Eng. Technol. Sci 81(1):203-221.
- Park, Y.C., Y.T. Yang, J.Y. Kim, C.H. Lee, S.H. Kang and J.H. Kang. 2021. Characteristics of flavonoids in juice and cluster analysis of satsuma mandarin germplasm. Korean J. Plant Res. 34(1):37-43 (in Korean).
- Qi, M., X. Hua, X. Peng, X. Yan and J. Lin. 2018. Comparison of chemical composition in the buds of *Aralia elata* from different geographical origins of China. R Soc Open Sci. 5(8):180676.
- Rahbari, K.M., J.C. Chang and M.J. Federle. 2021. A *Streptococcus* quorum sensing system enables suppression of innate immunity. Am Soc Microbiol. 12(3):e03400-20.
- Romier-Crouzet, B., J. Van De Walle, A. During, A. Joly, C. Rousseau, O. Henry, Y. Larondelle and Y.J. Schneider. 2009. Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells. Food Chem Toxicol. 47(6):1221-1230.
- Shon, D.H., M.H. Kim, Y.C. Kim and S.S. Kim. 2010. Effect of Korean red ginseng on the stability of the tight junction of intestinal epithelial cells. Korean J. Food Sci Technol. 42(3): 335-342 (in Korean).
- Singleton, V.L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16:144-158.
- Suh, J.T., K.D. Kim, H.B. Sohn, S.J. Kim, S.Y. Hong and Y.H. Kim. 2020. Comparative study of antioxidant activities at different cultivation area and harvest date of the Gomchwi 'Sammany' variety. Korean J. Plant Res. 33(4):245-254 (in

- Korean).
- Suh, Y.S., S.H. Lee, Y. Shang, J.R. Yoon and W.J. Lee. 2014. Changes in antioxidant activities and flavor patterns of *Coffea arabica* beans during roasting. Korean J. Food Preserv. 21(2):224-230 (in Korean).
- Takarada, K., R. Kimizuka, N. Takahashi, K. Honma, K. Okuda and T. Kato. 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol. Immunol. 19(1):61-65.
- Walia, N. and L. Chen. 2020. Pea protein based vitamin D nanoemulsions: Fabrication, stability and in vitro study using Caco-2 cells. Food Chem. 305:125475.
- Wang, K.J., Y.J. Zhang and C.R. Yang. 2005. Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of *Polygonum paleaceum*. J. Ethnopharmacol. 96(3):483-490.
- Woo, Y.M., O.J. Kim, E.S. Jo, M.Y. Jo, M.Y. Ahn, S.H. Lee, J.M. Ha and A. Kim. 2018. Enhancement of the anti-inflammatory activities of *Aralia continentalis* kitagawa extracts fermented by *Lactobacillus plantarum*. J. Life Sci. 28(12):1438-1447.
- Yu, A.R., H.Y. Park, I.W. Choi, Y.K. Park, H.D. Hong and H.D. Choi. 2012. Immune enhancing effect of medicinal herb extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 41(11):1521-1527 (in Korean).

(Received 27 July 2022 ; Revised 8 September 2022 ; Accepted 15 September 2022)