pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 36. No. 6, 551~560 (2023)
https://doi.org/10.9799/ksfan.2023.36.6.551

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

들깨 가식부위별 최적 추출 조건 확립을 위한 항산화 및 항염증 활성 평가

†김민영 · 김정인 · 김상우 · 김성업 · 오은영 · 이정은 · 이은수 · 안연주* · 이명희** · 김춘송**

농촌진흥청 국립식량과학원 남부작물부 밭작물개발과 농업연구사
*농촌진흥청 국립식량과학원 남부작물부 밭작물개발과 산학협동과정 박사과정생
**농촌진흥청 국립식량과학원 남부작물부 밭작물개발과 농업연구관

Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects on Optimal Extraction Conditions of Different Edible Parts of Perilla (*Perilla frutescens* L.)

†Min Young Kim, Jung In Kim, Sang Woo Kim, Sungup Kim, Eunyoung Oh, Jeongeun Lee, Eunsoo Lee, Yeon Ju An*, Myoung Hee Lee** and Choon-Song Kim**

Associate Researcher, Upland Crop Breeding Research Division, Dept. of Sourthern Area Crop Science, National Institute of Crop Science, RDA, Miryang 50424, Korea
**Doctor's Student, Upland Crop Breeding Research Division, Dept. of Sourthern Area Crop Science, National Institute of Crop Science, RDA, Miryang 50424, Korea*
***Research Officer, Upland Crop Breeding Research Division, Dept. of Sourthern Area Crop Science, National Institute of Crop Science, RDA, Miryang 50424, Korea*

Abstract

This study was performed to investigate antioxidant and anti-inflammatory activities of perilla(Perilla frutescens L.) seed, flower and leaf according to extraction condition. Perilla seed extracts(PSE), perilla flower extracts(PFE), perilla leaf extracts(PLE) was extracted by stirring extraction (STE, 25°C), shaking extraction (SHE, 80°C), and sonication assisted extraction(SAE, , 25°C) with 94% ethanol, 60% ethanol and distilled water, followed by analysis of total polyphenol and flavonoid and testing radical scavenging activities. The highest total polyphenol content (5.47, 9.36, 38.58 mg gallic acid equivalent/g), total flavonoid content(5.77, 8.62, 46.44 mg catechin equivalent/g), ABTS(10.68, 19.46, 63.56 mg trolox equivalent/g) and DPPH(6.51, 7.69, 79.73 mg trolox equivalent/g) radical scavenging activity of PSE, PFE and PLE was observed in the HWE with 60% ethanol,. Among the three extraction method, SHE provided the best results for yield, polyphenol, flavonoid content of perilla seed, flower, leaf in comparison to STE or SAE. SHE with 60% ethanol of perilla seed, flower, leaf more effectively inhibited secretion of nitric oxide(NO) and pro-inflammatory cytokine in RAW 264.7 macrophage exposed to LPS compared to other extraction solvent and method. Therefore, these extracts obtained from perilla seed, flower, leaf could be used antioxidant and anti-inflammatory ingredients in the food industry.

Key words: perilla seed, perilla leaf, perilla flower, standardization, functional ingredient

서 론

염증은 신체에 다양한 외부자극에 의해 기질의 변화를 유발하는 손상이 발생하였을 때 이에 대응하기 위한 생리적인 방어 작용이지만, 그 정도가 과도하거나 장기화되면 관절염, 천식, 만성 장염 및 위염, 피부염 등의 염증 질환을 유발하게 된다(Kim 등 2016). 일반적으로 염증 반응 시 면역세포는 다양한 염증 발현 단백질을 분비하여 손상 조직의 추가적인 감염을 막고 조직을 재생하여 정상화하려한다(Nam & Park 2019). 자극원에 의해 특정조직에 손상이 있을 때, 호중구나, 호염구, 호산구, 단핵세포 등의 세포와 IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8 등의 염증성 cytokine이 발현하여, 농양이 생성되고 통증이 완화되는 등 조직이 회복되는 과정으로 진행한다. 또한, inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclo-oxygenase-2(COX-2)같은 효소나, nitric oxide(NO), prostagladin E2(PGE2) 등의 면역관련 물질을 생성한다(Jeong 등 2014). 그러나 이러한 염증반응이

† Corresponding author: Min Young Kim, Associate Researcher, Upland Crop Breeding Research Division, Dept. of Sourthern Area Crop Science, National Institute of Crop Science, RDA, Miryang 50424, Korea. Tel: +82-55-350-1215, Fax: +82-55-350-3050, E-mail: kmyqwer@korea.kr

원인이 제거되지 않아 만성화되면 림프구나 체액성 면역 유도 cytokine과 세포성 면역유도 cytokine으로 주요 반응 물질이 지속적으로 발현될 수 있다(Feghali & Wright 1997). 본 연구에서 사용한 대식세포는 비정상인 세포, 조직, 세균 등 체내에 존재하는 이상 물질을 흡수하고 소화시켜 제거하는 식세포 작용을 하는 백혈구의 일종이다(Ovchinnikov DA 2008). 대식세포는 interferon gamma(IFN-ɣ), LPS 등에 자극되어 iNOS 같은 물질과 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 염증성 cytokine이 발현하기 때문에, 이러한 염증 매개인자들의 효율적인 억제는 식물유래 화합물의 항염증 소재 개발의 중요한 요소로 여겨진다(Mills C 2012).

들깨(*Perilla frutescens* L.)는 동아시아에 자생하는 꿀풀과에 속하는 일년생 초본 식물로(Ahmed & Tavaszi-Sarosi 2019) 목적에 따라 종자를 생산하는 종실용 들깨와 깻잎을 생산하는 잎들깨로 구분되며, 들깨의 잎, 종자, 화방 및 줄기에는 phenolic compounds, flavonoids, essential oils, carotenoids 및 fatty acids 등 다양한 기능성 화합물을 함유하고 있다고 알려져 있다(Kim 등 2022). 본 연구에서 표준화 원료로 사용한 다유 품종은 국립식량과학원에서 개발한 종실 들깨 품종으로 기름 함유율이 높아 착유량이 많으며, 일반 재래종 들깨보다 생산량이 높고 병저항성도 강한 품종으로 개발되어 현재 보급되고 있는 표준품종이다. 들깨 종자는 주로 식용 기름 및 들깨 가루 등에 이용되며, 불포화지방산 중에도 α-linoleic acid를 다량 함유하고 있어 체내에서 심혈관 질환을 예방하고 인지기능개선효과를 가지고 있다고 알려져 있다(Asif M 2011). 잎들깨는 신선채소 및 절임 등에 활용되며 apigenin, luteolin, anthocyanin 등의 플라보노이드 성분과 함께 caffeic acid, rosmarinic acid, ferulic acid 등의 페놀산과 perillaadehyde, perillaketone 등의 방향성 화합물을 다량 함유하고 있어 항산화, 항염증, 항알레르기 및 치매예방효과가 있다고 보고되었다(Kim 등 2022; Ahn 등 2023). 그 밖에 들깨 화방은 국내에서 예로부터 튀김, 자반, 부각 등의 음식으로 섭취해온 기록(Sung & Seo 2016)이 있어 식품원료로 활용이 가능하지만, 이에 대한 기능성 연구는 상대적으로 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 항염증 소재로서 가식부위별 들깨의 산업적 이용성 증대와 원료 표준화를 제시하기 위하여 동일한 품종의 종실, 화방, 잎을 수확하여 추출방법 및 용매에 따른 항산화 활성과 함께 LPS로 유도한 대식세포모델에서의 항염증 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출물 제조

본 연구에서 사용된 들깨는 2021년에 경상남도 밀양 소재의 국립식량과학원에서 생산된 다유(cv. *Dayu*) 품종을 사용하였으며, 종실, 화방, 잎을 수확한 후 동결건조 및 분쇄하여 추출물 제조에 이용하였다. 최적 추출 조건을 확립하기 위하여 종실, 화방, 잎 시료의 중량 대비 10배량의 94% 에탄올(v/v), 60% 에탄올(v/v), 증류수(v/v)를 첨가하여 각각 교반추출, 열수진탕추출, 초음파 추출을 2회 반복하여 진행하였다. 교반추출은 상온(25℃)에서 24시간동안 교반기에서 추출하였고, 열수진탕추출은 80℃ 온도의 수욕조에서 2시간 동안 추출하였으며, 초음파추출은 상온(25℃)에서 2시간 동안 추출하고, 이 추출물들을 여과, 감압농축 및 동결건조 하였다. 동결건조한 추출물은 100 mg/mL의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해한 후 증류수 및 배지(DMEM, Gibco Co.)로 희석하여 생리활성 측정용 시료로 사용하였다.

2. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Dewanto 등(2002)의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 정색으로 발색하는 것을 원리로 측정하였다. 즉, 10 mg/mL농도의 각 추출물 100 μL에 2% Na_2CO_3 용액 2 mL를 가한 후 3분 방치하여 50% Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 100 μL를 가하였다. 실온에서 30분방치 후 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였다. 표준물질로 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 5, 10, 25 및 50배로 희석하여 사용하였으며, 검량선 작성 후 총 폴리페놀 함량은 시료 1 g 중의 mg gallic acid로 나타내었다.

3. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(1999)의 방법을 변형하여 분석하였다. 플라보노이드 분석을 위한 10 mg/mL 농도의 추출물 250 μL에 증류수 1 mL와 5% $NaNO_2$ 75 μL를 가한 다음 5분 후 10% $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 150 μL를 가하여 6분간 방치하고 1 M 수산화나트륨(NaOH) 500 μL를 가하여 11분간 방치한 후, 반응액의 흡광도를 510 nm에서 측정하였다. 표준물질로 (+)-catechin hydrate(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 검량선을 작성하였다.

4. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 ABTS cation decolorization assay 방법(Choi 등 2006)에 의하여 측정하였다. 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma- Aldrich Co.)와 2.6 mM potassium persulphate를 하루 동안 암소에서 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4가 되도록 물 흡광계수($\varepsilon = 3.6 \times 10^4\ M^{-1}cm^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL

에 10 mg/mL농도의 추출액 50 μL를 가하여 흡광도의 변화를 정확히 60분 후에 측정하였으며, 표준물질로서 trolox(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다. 시료첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 mg t eq/g으로 표현하였다.

5. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Hwang 등(2011)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 10 mg/mL 농도의 추출물 0.2 mL에 0.2 mM DPPH(Sigma-Aldrich Co.) 용액 0.8 mL를 가하여 실온에서 60분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 mg trolox eqiuvalent(TE)/extract g으로 표현하였다.

6. 세포배양 및 독성 측정

본 실험에서 사용된 마우스 유래 대식세포(RAW 264.7 Macrophage cell)는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 각각의 세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, Loga, UT, USA)와 100 units/mL penicillinstreptomycin를 사용하여 37℃, 5% CO_2조건에서 배양하였으며, 세포밀도가 높아지면 계대배양을 실시하였다. 추출 조건별 들깨 종실, 화방, 잎 추출물의 세포독성은 Ishiyama 등(1996)의 방법에 따라 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하여 측정하였다. 즉, RAW 264.7 세포는 96-well plate에 1×10^5 cell/well 농도로 96 well plate에 100 μL씩 분주한 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료는 일정 농도가 되도록 DMSO로 희석하여 사용하였으며, 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지에 일정 농도로 희석된 시료를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT 시약을 well당 10 μL씩 첨가한 다음 37℃, 5% CO_2 배양기에서 4시간 후 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, DMSO 100 μL를 가한 후 상온에서 발색시키고, ELISA microplate reader(ELx 808, Bio-Tek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 세포독성은 세포생존률로 표시하였고, RAW264.7 대식세포에서 세포독성을 나타내지 않는 농도범위 내에서 산화질소 및 염증성 사이토카인 억제효과를 분석하여 항염증활성을 평가하였다.

7. 산화질소(nitric oxide) 및 염증성 사이토카인(cytokine) 분석

추출 조건 별 들깨 종실, 화방, 잎 추출물의 항염증 활성은 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서의 산화질소(nitric oxide) 및 염증성 사이토카인(cytokine) 분비 억제능을 분석하였다. 즉, 배양한 RAW 264.7 대식세포를 세포를 2×10^5 cell/well 농도로 96 well plate에 100 μL씩 분주하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 1 μg/mL LPS(Lipopolysaccharide; *E. coli* serotype 0111:B4)를 첨가한 배지에 일정 농도로 희석된 추출물을 100 μL를 첨가하여 다시 24시간 배양한다. 배양 완료 후 세포로부터 분비된 산화질소(nitric oxide)와 TNF-α, IL-6 및 Il-1β 등의 염증성 사이토카인(cytokine)을 ELSIA kit를 이용하여 분석하였다. 산화질소(nitric oxid)는 Griess reagent system(Promega)를 이용하여 정량하였으며, TNF-α, IL-6 및 Il-1β은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D System Inc.)를 이용하여 정량하였다.

8. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 가공처리 및 품종간의 차이 유무를 one-way ANOVA(analysis of variance)로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였으며($p<0.05$), 추출 조건간의 유의성은 대문자, 가식부위별 유의성은 소문자로 표기하였다. 또한 상관분석은 Metabolanalyst 프로그램을 이용하여 총 폴리페놀, 플라보노이드, ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능, 산화질소 및 사이토카인 분비량 간의 상관성을 이변량 상관계수를 이용하여 신뢰구간 $p<0.01$에서 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

추출방법 및 용매에 따른 가식부위별 들깨의 항산화 성분 변화를 측정한 결과는 Table 1 및 Table 2와 같다. 들깨 종실, 화방 및 잎들깨의 폴리페놀함량은 각각 2.71~5.74, 2.16~9.58 및 12.04~38.59 mg GAE/g 범위로 나타났으며, 플라보노이드 함량은 각각 1.09~7.75, 2.02~8.62, 3.01~46.44 mg CE/g 범위로 나타나 잎들깨가 화방 및 종실에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 들깨 종실, 잎 및 줄기 추출물의 항산화 및 라디칼 소거활성을 분석한 Lin 등(2014)의 연구에서 catechin, apigenin, luteolin, rosmarinic acid, caffeic acid 등의 페놀산과 플라보노이드 계열 화합물이 다량 함유되어있는 잎과 줄기 추출물이 종실 추출물에 비해 총 페놀 화합물 함량이 높게 나타났다는 결과와 유사하였다. 천연물에 함유된 기능성분을 용출하기 위하여 다양한 종류의 추출용매를 사용하게 되는데, 추출용매의 종류와 농도에 따라 기능성분이 용출되는 수율의 차이가 나타나며, 이는 항산화 활성 등 기타 생리활성에도 차이가 발생한다고 보고되어 있다(Tatiya 등

Table 1. Total polyphenol contents of perilla seed, flower, leaf (cv. Dayu) depending on extraction method and solvents

Extraction method	Extraction temperature	Extraction solvent	TPC (mg GAE/g)[1)]		
			Perilla seed	Perilla flower	Perilla leaf
Stirring extraction	25℃	94% EtOH	3.37±0.27^{Cb}	2.16±0.02^{Ic}	24.89±0.30^{Ea}
		60% EtOH	5.50±0.16^{Ac}	5.84±0.13^{Eb}	18.35±0.19^{Fa}
		Water	2.71±0.10^{Dc}	3.08±0.04^{Hb}	12.04±0.48^{Ha}
Shaking extraction	80℃	94% EtOH	2.64±0.06^{Dc}	4.48±0.08^{Fb}	26.94±0.66^{Da}
		60% EtOH	5.70±0.16^{Ac}	9.58±0.09^{Ab}	38.59±0.74^{Aa}
		Water	2.89±0.04^{Dc}	6.27±0.13^{Db}	28.83±0.63^{Ca}
Sonication assisted extraction	25℃	94% EtOH	2.76±0.11^{Dc}	4.17±0.03^{Gb}	27.28±0.14^{Da}
		60% EtOH	5.74±0.61^{Ac}	7.87±0.12^{Bb}	31.62±0.32^{Ba}
		Water	4.11±0.03^{Bc}	7.41±0.44^{Cb}	17.51±0.04^{Ga}

Values are mean±S.D. of three replicates.
Different capital letters ($^{A-I}$) in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among extraction methods and solvents.
Different small letters ($^{a-c}$) in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among edible parts of perilla.
[1)] Total polyphenol content (mg gallic acid equivalent/g sample).

Table 2. Total flavonoid contents of perilla seed, flower, leaf (cv. Dayu) depending on extraction method and solvents

Extraction method	Extraction temperature	Extraction solvent	TFC (mg CE/g)[1)]		
			Perilla seed	Perilla flower	perilla leaf
Stirring extraction	25℃	94% EtOH	1.09±0.15^{Fb}	2.02±0.16^{Ib}	31.39±1.00^{Da}
		60% EtOH	6.37±0.10^{Bb}	4.78±0.03^{Dc}	12.05±0.09^{Ea}
		Water	1.28±0.04^{Fc}	2.49±0.07^{Hb}	3.01±0.05^{Ga}
Shaking extraction	80℃	94% EtOH	2.62±0.33^{Dc}	4.17±0.12^{Fb}	34.79±0.79^{Ca}
		60% EtOH	5.77±0.01^{Cc}	8.62±0.32^{Ab}	46.44±0.31^{Aa}
		Water	2.55±0.07^{Dc}	3.35±0.09^{Gb}	37.14±0.58^{Ba}
Sonication assisted extraction	25℃	94% EtOH	2.56±0.09^{Dc}	4.23±0.11^{Eb}	34.47±0.82^{Ca}
		60% EtOH	7.75±0.22^{Ab}	6.51±0.11^{Cc}	34.45±0.58^{Ca}
		Water	1.71±0.05^{Ec}	7.74±0.45^{Ba}	4.77±0.10^{Fb}

Values are mean±S.D. of three replicates.
Different capital letters ($^{A-I}$) in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among extraction methods and solvents.
Different small letters ($^{a-c}$) in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among edible parts of perilla.
[1)] Total flavonoid content(mg catechin equivalent/g sample).

2011). 본 연구에서는 식품 산업적 적용가능성을 높이기 위해 에탄을 농도를 다르게 하여 추출용매로 사용하였는데, 가식부위별 들깨를 94% 에탄올, 60% 에탄올 및 증류수로 추출한 후 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 가식부위에 상관없이 종실, 화방 및 잎 모두 94% 에탄올과 증류수에 비해 60% 에탄올에서 가장 높은 경향을 보였다. 즉, 94% 에탄올을 추출용매로 사용하였을 때 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 2.64~27.28 mg GAE/g 및 1.09~34.79 mg CE/g 범위로 나타났지만, 60% 에탄올을 추출용매로 사용 시 5.50~38.59 mg GAE/g 및 5.77~46.44 mg CE/g으로 증가하였다. Kwon 등(2016)은 비단풀 에탄올 추출물의 플라보노이드 함량이 물추출물보다 높다고 보고하였고, Kim & Kim(2020)은 개똥쑥의 총 플라보노이드 함량은 에탄올 단일용매보다 물과 에탄올을 혼합한 용매에서 더 높다고 보고하였다. 또한, Middleton & Kandaswamin(1992)의 연구에서 플라보노이드계 물질은 화학구조에 따라 물과 에탄올에 대해 용해되는 정도가 다르다고 보고하여, 들깨 종실, 화방 및 잎 등의 시료에 함유된 물질에 따라 추출용매에 대해 용해되는 폴리페놀

및 플라보노이드 등의 항산화 성분의 함량은 다양하게 나타나는 것으로 생각된다. 또한, 식물체로부터의 특정 기능성분을 용출하기 위해서는 추출용매뿐만 아니라 추출방법 및 추출온도도 큰 영향을 미치는데, 용매와의 친화력을 이용하여 분리하는 침출법을 기본으로 특정 물질을 효과적으로 용출하기 위하여 교반추출, 온도와 압력을 조정하는 가열 추출법, 에너지 전달방식을 달리하여 용출하는 방법인 마이크로웨이브, 초임계추출법 등이 사용되기도 한다(Azmir 등 2013). 본 연구에서는 교반추출, 열수추출, 초음파 추출 방법을 이용하여 부위별 들깨의 항산화성분을 비교한 결과, 80℃의 온도에서 2시간 동안 열수추출을 하였을 때 교반 및 초음파 추출에 비해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높게 나타났다. 즉, 들깨 종실, 화방 및 잎을 60%에탄올로 교반추출하였을 때 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 5.50~18.35 mg GAE/g 및 4.78~12.05 mg CE/g이었고, 초음파 추출하였을 때 5.74~31.62 mg GAE/g 및 6.51~34.45 mg CE/g이었지만, 열수추출 시 5.70~38.59 mg GAE/g 및 5.77~46.44 mg CE/g 범위까지 증가하는 경향을 보였다. 이는 추출 수율의 결과와도 연관이 있는 것으로 판단되는데, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높았던 잎들깨의 경우 교반추출, 열수추출, 초음파 추출의 수율이 각각 10.93~17.62%, 12.62~23.17% 및 11.60~16.12% 범위로 열수추출 시 수율이 가장 우수하였다. 이러한 결과는 에탄올 농도 및 추출온도에 따른 블루베리의 항산화 성분을 분석한 Jun 등(2019)의 연구에서 추출용매에 관계없이 추출온도가 증가함에 따라 90℃까지 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 증가했다는 연구 결과와 유사하였으며, 이는 식물체 조직에 에스터 결합을 하고 있는 결합형 페놀화합물이 가열에 의해서 유리형으로 전환됨에 따라 추출용매에 용출되는 효율이 증가한 것으로 판단된다(Xu & Chang 2009). 종합적으로 들깨 종실, 화방 및 잎을 60%에 에탄올로 80℃ 온도에서 열수추출하였을 때 총 폴리페놀 함량은 5.70, 9.58 및 38.59 mg GAE/g이었고, 총 플라보노이드 함량은 5.77, 8.62 및 46.44 mg CE/g으로 가장 높게 측정되었다. 식물계에 다양하게 분포하는 2차 대사산물인 페놀 화합물과 플라보노이드 화합물은 효과적인 항산화 성분으로서 자유라디칼이 안정한 상태로 유지되는 역할을 하고, 세포 내의 활성산소종을 억제하여 항산화 활성과 함께 항암, 항균, 항염 작용 등의 생리활성을 보유하는 것으로 알려져있어(Naeimi & Alizadeh 2017), ABTS 및 DPPF 라디칼 소거능과 같은 항산화 활성과 대식세포에서의 산화질소(NO) 및 사이토카인 억제 효과와 같은 항염증 활성에 영향을 줄 것으로 판단된다.

2. 항산화 활성

식물계에 다양하게 함유되어있는 천연물의 항산화 활성은 식품 중 지방 산화를 억제하고 인체 내에서는 세포손상 및 염증 유발 등의 원인이 되는 자유라디칼에 의한 노화를 억제 시켜 질병을 예방하는 역할을 한다(Kim 등 2018). 추출방법 및 용매에 따른 가식부위별 들깨추출물의 항산화 활성은 ABTS 및 DPPH 라디칼을 이용하여 측정하였으며, 분석결과는 Table 3 및 Table 4와 같다. 두 가지의 라디칼 소거활성 측정 방법은 친수성과 친유성 물질 모두 분석이 가능하며 각각 양이온과 음이온의 라디칼을 생성하는 특징을 가지고 있

Table 3. ABTS radical scavenging activities of perilla seed, flower, leaf (cv. Dayu) depending on extraction method and solvents

Extraction method	Extraction temperature	Extraction solvent	ABTS (mg TE/g sample)[1)]		
			Perilla seed	Perilla flower	perilla leaf
Stirring extraction	25℃	94% EtOH	1.64±0.59^{Fc}	3.58±0.54^{Fb}	47.86±0.90^{Ea}
		60% EtOH	9.33±0.64^{Bc}	11.27±0.58^{Cb}	33.91±0.97^{Fa}
		Water	6.66±0.54^{Dc}	8.15±0.43^{Db}	17.52±0.06^{Ha}
Shaking extraction	80℃	94% EtOH	4.43±0.72^{Ec}	8.28±0.35^{Db}	53.10±1.14^{Da}
		60% EtOH	10.68±0.58^{Ac}	19.46±0.29^{Ab}	63.56±0.14^{Aa}
		Water	6.48±0.27^{Dc}	13.91±0.33^{Bb}	58.91±1.20^{Ba}
Sonication assisted extraction	25℃	94% EtOH	3.84±0.44^{Ec}	6.59±0.40^{Eb}	55.37±2.23^{Ca}
		60% EtOH	8.50±0.32^{Cc}	13.87±1.00^{Bb}	59.78±1.09^{Ba}
		Water	10.14±0.24^{Ac}	13.73±0.33^{Bb}	24.26±0.47^{Ga}

Values are mean±S.D. of three replicates.
Different capital letters ($^{A-H}$) in the same items indicate a significant difference (p<0.05) among extraction methods and solvents.
Different small letters ($^{a-c}$) in the same items indicate a significant difference (p<0.05) among edible parts of perilla.
[1)] ABTS radical scavenging activity (mg trolox equivalent/g sample).

Table 4. DPPH radical scavenging activities of perilla seed, flower, leaf (cv. Dayu) depending on extraction method and solvents

Extraction method	Extraction temperature	Extraction solvent	DPPH (mg TE/g sample)[1)]		
			Perilla seed	Perilla flower	perilla leaf
Stirring extraction	25℃	94% EtOH	1.04±0.07^{Fc}	2.92±0.05^{Gb}	39.01±0.49^{Ea}
		60% EtOH	6.28±0.13^{Bb}	6.80±0.15^{Cb}	26.30±0.65^{Fa}
		Water	1.69±0.06^{Eb}	1.17±0.07^{Hb}	5.55±0.61^{Ha}
Shaking extraction	80℃	94% EtOH	2.81±0.07^{Cc}	5.52±0.14^{Eb}	42.11±0.71^{Da}
		60% EtOH	6.51±0.15^{Ab}	7.69±0.02^{Ab}	79.73±1.31^{Aa}
		Water	2.63±0.04^{Dc}	6.07±0.11^{Db}	57.56±1.17^{Ba}
Sonication assisted extraction	25℃	94% EtOH	2.84±0.07^{Cc}	5.16±0.11^{Fb}	44.67±0.84^{Ca}
		60% EtOH	6.22±0.15^{Bb}	7.54±0.02^{Bb}	57.72±1.67^{Ba}
		Water	2.82±0.03^{Cb}	2.86±0.05^{Gb}	11.38±0.90^{Ga}

Values are mean±S.D. of three replicates.
Different capital letters ($^{A-H}$) in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among extraction methods and solvents.
Different small letters ($^{a-c}$) in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among edible parts of perilla.
[1)] DPPH radical scavenging activity (mg trolox equivalent/g sample).

어 항산화 활성 분석에 가장 많이 활용되고 있다(Shin 등 2008). 들깨 종실, 화방 및 잎들깨 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 각각 1.07~7.75, 2.02~8.62 및 3.01~46.44 mg TE/g 범위로 나타났으며, DPPH 라디칼 소거능은 각각 1.04~6.51, 1.17~7.69 및 5.55~79.73 범위로 나타나 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량결과와 마찬가지로 잎들깨가 화방 및 종실에 비해 유의적으로 높게 나타났다. Lin 등(2014)의 연구에서 총 페놀화합물 함량이 종실 및 줄기에 비해 잎에서 가장 높게 측정됨에 따라 라디칼 소거능 및 환원력 또한 높게 나타난다는 연구결과와 유사하였으며, 그 밖에도 기능성분이 다량 함유되어있는 깻잎의 품종(Kim 등 2022) 및 재배조건(Hyun 등 2003) 등 다양한 원료에 대해 항산화 활성이 보고된 바 있다. 또한, 추출 방법 및 용매에 따라 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 다양하게 분포함에 따라(Table 1 및 Table 2) 항산화활성에도 영향을 줄 것으로 생각되어 동일한 추출 조건에서의 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능을 분석하였다. 그 결과, 가식부위에 상관없이 종실, 화방 및 잎 모두 94% 에탄올과 증류수에 비해 60% 에탄올에서 항산화 활성이 가장 우수한 경향을 보였고, 교반추출 및 초음파추출에 비해 열수추출방법이 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 즉, 들깨 종실, 화방 및 잎을 60% 에탄올로 80℃ 온도에서 열수추출하였을 때 ABTS 라디칼 소거능은 5.77, 8.62, 46.44 mg TE/g 이었고, DPPH 라디칼 소거능은 6.51, 7.69 및 79.73 mg TE/g 으로 항산화활성이 가장 우수하게 평가 되었다. 추출용매 및 품종별 땅콩추출물의 항산화 활성(Kim 등 2019)에 대한 등의 보고에 따르면 물 추출물보다 70% 에탄올 또는 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량이 높게 측정됨에 따라 항산화 활성 또한 높게 나타났다고 보고하였으며, Jun 등(2019)은 추출용매에 관계없이 추출온도가 증가함에 따라 블루베리 열수추출물의 항산화 활성이 증가했다고 발표하였다. 잎들깨에 함유한 주요 페놀 화합물인 로즈말린산, 루테올린, 아피제닌 등의 기능성분과 항산화 활성과의 상관성에 대해 연구한 Ahn 등(2023)의 연구결과로 미루어 볼 때, 60% 에탄올로 열수추출하였을 때 페놀화합물 함량이 높게 나타남에 따라 항산화 활성에도 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.

3. 항염증 활성

산화질소(nitric oxide, NO) 및 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1β(IL-1β) 등의 염증성 사이토카인은 주로 활성화된 대식세포에서 생성되며, 내피세포와 백혈구에 작용하여 초기 염증반응을 자극하고 조절한다. 산화질소와 사이토카인의 생성은 염증을 악화시키기 때문에 이들의 과발현을 억제하는 것은 염증치료에 중요하다고 알려져 있어, 본 연구에서는 들깨 가식 부위 및 추출 조건별 추출물의 항염증 활성 평가를 위해 LPS로 활성화된 Raw 264.7 대식세포에서의 NO 및 TNF-α, IL-6 및 Il-1β 분비 억제능을 평가하였다(Masters 등 2009). 들깨 종실, 화방 및 잎의 추출용매 및 방법에 따라 염증 대사에서 중요한 매개물질인 NO를 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. NO 억제능을 분석하기에 앞서 들깨 추출물의 농도를 설정하기 위해 MTT assay를 이용한 세포생존율을 측정한 결과, 모든 조건의 추출물 100 μg/mL의 농도에서 90% 이상의 세포생존율을 보여 세포독성이 없

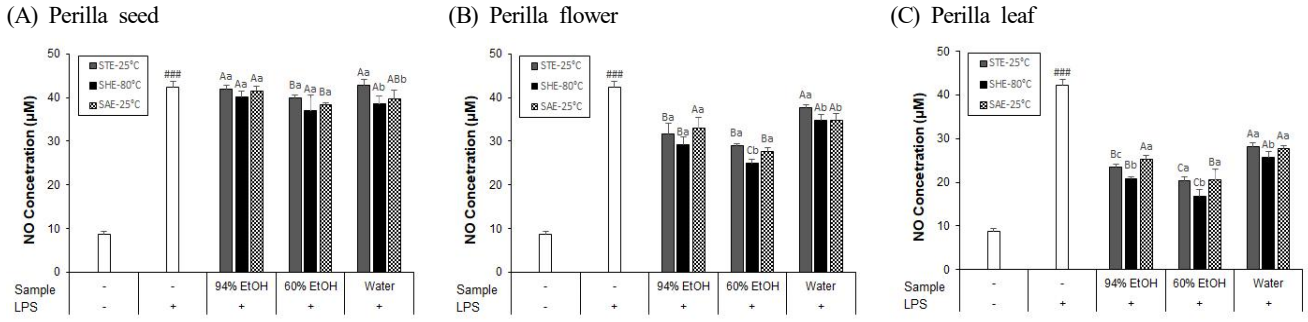


Fig. 1. Effect of perilla seed (A), flower (B), leaf (C) extracts on Nitric oxide concentration in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Values are mean±S.D. of three replicates. Different capital letters in the same items indicate a significant difference (p<0.05) among extraction methods Different small letters in the same items indicate a significant difference (p<0.05) among extraction solvents.

음을 확인하고 항염활성 검정 실험을 진행하였다. 가식부위 및 추출 조건별 들깨 추출물이 LPS로 염증을 유도한 대식세포에서 산화질소 생성을 조절하는지 확인한 결과, 정상세포(8.66 μM)와 비교하여 LPS를 처리한 RAW 264.7 대식세포에서 생성된 NO 함량이 42.25 μM 수준으로 증가하였으며, 들깨 종실, 화방 및 잎 추출물과 함께 처리된 세포에서는 추출용매 및 방법에 상관없이 NO 생성량이 모두 감소하는 것을 확인하였다. 특히 항산화 활성이 가장 우수하였던 열수추출 방법의 60% 에탄올 추출물을 처리하였을 때 RAW 264.7 대식세포가 분비하는 NO 함량이 들깨 종실, 화방 및 잎 추출물의 경우 각각 36.97 μM, 24.87 μM, 16.86 μM까지 감소하여 가장 효과적인 NO 생성 억제효과를 확인하였다. 또한 추출방법별 들깨 종실, 화방 및 잎의 60% 에탄올 추출물이 LPS로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에서 염증성 사이토카인을 조절하는지 확인하기 위해서, RAW264.7 대식세포에 추출물과 LPS(1 μg/mL)를 동시에 처리한 후 24시간동안 배양하여 TNF-α, IL-6, IL-1β 분비능을 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 정상세포에서는 TNF-α, IL-6 및 IL-1β는 20.69, 8.01 및 0.83 ng/mL 검출되었지만, LPS를 처리한 RAW 264.7 대식세포에서는 각각 521.85, 94.94 및 4.66 ng/mL 농도로 사이토카인 분비가 크게 증가하는 것을 확인하였다. 하지만, 들깨 종실, 화방 및 잎 추출물과 함께 처리된 세포에서는 모든 추출방법에서 세가지 사이토카인 모두 감소하는 경향을 보여 염증성 사이토카인 생성의 억제능을 확인하였다. 특히, 열수추출방법을 사용한 잎들깨 60% 에탄올 추출물을 처리하였을 때 TNF-α, IL-6 및 IL-1β의 농도가 각각 207.23, 12.13 및 1.36 ng/mL 까지 감소하여 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서의 사이토카인 분비를 가장 효과적으로 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. Lee & Han(2012) 연구에서 종실 들깨 추출물의 항염증 효과를 연구한 결과 LPS로 활성화된

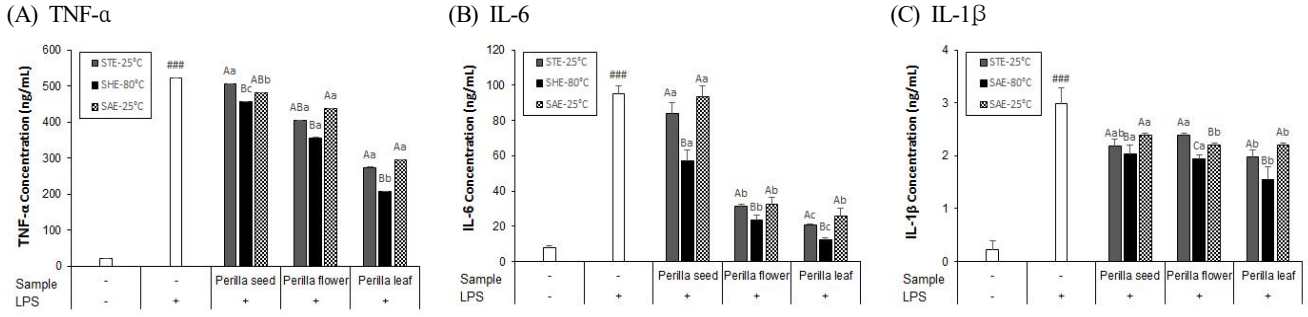


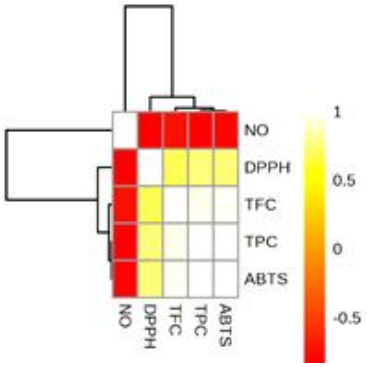
Fig. 2. Effect of Perilla seed, flower, leaf extacts with 60% ethanol according to extraction method on (A) TNF-α, (B) IL-6, (C) IL-1β concentration in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Values are mean±S.D. of three replicates. Different capital letters in the same items indicate a significant difference (p<0.05) among edible parts. Different small letters in the same items indicate a significant difference (p<0.05) among extraction method.

RAW 264.7 대식세포모델에서 들깨 추출물을 처리하였을 때 염증 매개물질인 NO와 TNF-α, IL-6 및 IL-1β 등의 사이토카인을 조절하는 NF-κB, iNOS, CO-2 단백질의 발현을 억제함으로써 항염증 효과가 있다고 보고하였다. 또한, 본 연구에서 항산화 및 항염증 효과가 가장 우수하게 나타난 잎들깨 추출물의 경우, 9가지의 잎들깨 품종별 항염증 효과를 비교한 Kim 등(2022)의 연구에서 염증 유도물질인 LPS를 처리한 시험군에서는 IL-6의 농도가 증가하였으나 잎들깨 추출물을 함께 처리하였을 때 모든 품종에서 전반적으로 감소하는 경향을 보였고, 특히 '늘보라' 품종의 추출은 약 40% 이상 감소하여 항염증 효과를 확인하였다고 보고하였다. 그 밖에도 탈지들깨박 추출물의 *in vitro* 및 *in vivo* 항염증 효과(Chumphukam 등 2018), 깻잎으로부터 추출한 루레올린 분획의 항염증 및 효과(Jeon 등 2014), 깻잎 추출물의 경구투여에 따른 *in vivo* 항산화 및 알러지 개선효과(Ueda) 연구 등 종실들깨와 잎들깨의 *in vitro* 및 *in vivo* 항염증 활성과 효능의 작용기작 등은 다양하게 보고되었지만, 들깨 화방의 항염증 활성에 대해서는 보고된 바가 없고 부위별 들깨의 추출 조건별 항염증 활성에 대한 연구는 부족하다. 따라서 들깨 종실, 화방, 잎의 추출방법과 용매에 따른 항염증 활성 결과는 들깨를 항염증 소재로서의 산업적 이용성을 증대시키기 위한 기초자료로 활용이 가능할 것으로 생각된다.

4. 상관관계분석

가식부위별 추출용매 및 방법에 따른 들깨 추출물의 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드함량, ABTS 라디칼 소거능, DPPH 라디칼 소거능, LPS로 유도한 RAW264.7 세포에서의 산화질소 농도 간의 상관관계를 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. 총 폴리페놀 함량은 ABTS 라디칼 소거능(0.99**), DPPH 라디칼 소거능(0.75**)과 높은 양의 상관관계를 나타내었으며, 대식세포가 분비하는 산화질소의 농도(−0.83**)와는 높은 음의 상관관계를 보였다. 총 폴리페놀 함량과 마찬가지로 총 플라보노이드 함량은 ABTS 라디칼 소거능(0.97**), DPPH 라디칼 소거능(0.69**)과 높은 양의 상관관계를 나타내었으며, 세포가 분비하는 산화질소의 농도(−0.74**)와는 높은 음의 상관관계를 보였다. 즉, 항산화성분인 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높을수록 항산화 활성의 지표인 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능은 높게 나타났으며, 산화질소의 농도는 낮게 나타나 항염증활성이 우수하게 평가되는 것을 확인 할 수 있었다.

(A) Correlation heatmap



(B) Correlation table

	NO	DPPH	TFC	TPC	ABTS
NO	1	−0.83**	−0.74**	−0.83**	−0.81**
DPPH		1	0.69**	0.75**	0.74**
TFC			1	0.95**	0.97**
TPC				1	0.99**
ABTS					1

$^{**}p$<0.01.

(C) Hierarchical clustering heatmap

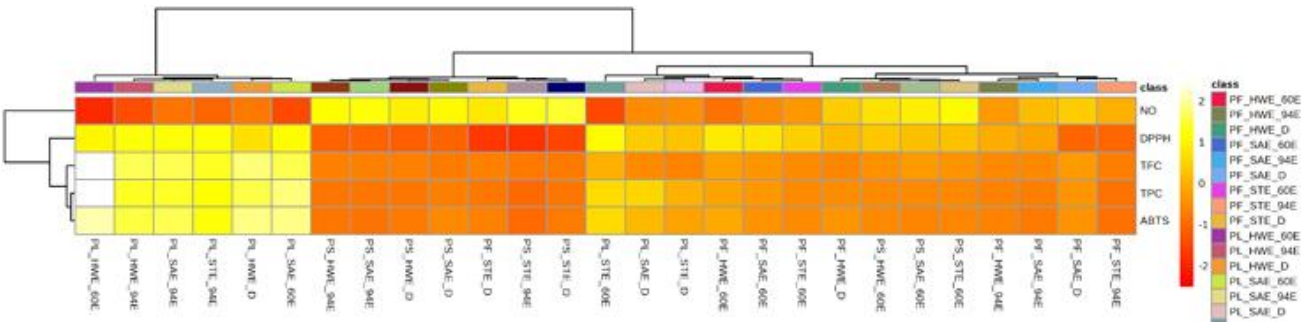


Fig. 3. Correlation coefficients among total polyphenol (TPC), flavonoid contents (TFC), ABTS and DPPH radical scavenging activity, nitric oxide (NO) concentration of perilla depending on edible parts and extraction condition.

요약 및 결론

본 연구에서는 가식부위별 들깨의 식품 산업적 이용성 증대와 원료표준화를 제시하기 위하여 추출 조건에 따른 항상화 성분과 *in vitro* 항산화 활성 및 항염증 활성을 분석하였다. 품종은 다유(cv. Dayu)를 사용하였으며, 종실, 화방, 잎을 수확한 후 동결건조한 시료에 94% 에탄올(v/v), 60% 에탄올(v/v), 증류수(v/v)를 첨가하여 각각 교반추출, 열수진탕추출, 초음파 추출한 후, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능과 함께 LPS로 활성화시킨 RAW 264.7 대식세포모델에서의 산화질소와 염증성 사이토카인의 분비 억제능을 분석하여 항염증 활성을 평가하였다. 가식 부위에 따른 들깨의 기능성에 대해 분석한 결과, 들깨 종실 및 화방에 비해 잎들깨의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높게 측정됨에 따라 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능과 같은 항산화 활성과 NO 및 염증성 사이토카인 억제효과가 우수하게 나타나는 경향을 보였다. 또한 추출 조건 최적화를 위하여 추출 용매 및 방법에 따른 항산화 및 항염증 활성을 분석한 결과, 종합적으로 들깨 종실, 화방 및 잎을 60% 에탄올로 80℃온도에서 열수 추출하였을 때 항산화 성분인 총 폴리페놀 및 플라보노이드가 효과적으로 용출될 뿐만아니라 자유라디칼의 일종인 ABTS와 DPPH 라디칼을 효과적으로 소거하였고, LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서 염증 매개물질인 NO와 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6 및 IL-1β의 분비를 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 따라서 이상의 결과를 바탕으로 식용기름, 들깨 가루, 신선채소 등으로 섭취하던 들깨의 다양한 가식부위를 활용하여 항염증 소재를 비롯한 건강기능식품 소재로 개발하기 위한 기초자료로 이용이 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ01678501) 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

Ahmed HM, Tavaszi-Sarosi S. 2019. Identification and quantification of essential oil content and composition, total polyphenols and antioxidant capacity of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Food Chem* 275:730-738

Ahn YJ, Kim JI, Kim S, Kim S, Oh E, Lee J, Lee E, Yoo E, Sung JS, Lee MH, Kim CS, Kim MY. 2023. Functional components and antioxidant activities of perilla leaf genetic resource. *Korean J Food Nutr* 36:379-386

Asif M. 2011. Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: *Perilla frutescens* is a good example of plant oils. *Orient Pharm Exp Med* 11:51-59

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* 117:426-436

Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99:381-387

Chumphukam O, Pintha K, Khanaree C, Chewonarin T, Chaiwangyen W, Tantipaiboonwong P, Suttajit M, Khantamat O. 2018. Potential anti-mutagenicity, antioxidant, and anti-inflammatory capacities of the extract from perilla seed meal. *J Food Biochem* 42:e12556

Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50:3010-3014

Feghali CA, Wright TM. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2:12-26

Hwang CR, Hwang IG, Kim HY, Kang TS, Kim YB, Joo SS, Lee J, Jeong HS. 2011. Antioxidant component and activity of dropwort (*Oenanthe javanica*) ethanol extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:316-320

Hyun KW, Kim JH, Song KJ, Lee JB, Jang JH, Kim YS, Lee JS. 2003. Physiological functionality in Geumsan perilla leaves from greenhouse and field cultivation. *Korean J Food Sci Technol* 35:975-979

Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno KA. 1996. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19:1518-1520

Jeon IH, Kim HS, Kang HJ, Lee HS, Jeong SI, Kim SJ, Jang SI. 2014. Anti-inflammatory and antipruritic effects of luteolin from perilla (*P. frutescens* L.) leaves. *Molecules* 19:6941-6951

Jeong DH, Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory activity of *Sargassum micracanthum* water extract. *J Appl Biol Chem* 57:227-234

Jun HI, Jang SW, Oh HH, Jeong DY, Song GS. 2019.

Antioxindant activity and anthocyanin analysis of blueberry with different extraction conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48:1223-1232

Kim HY, Lee HG, Seo HY, Seo WD, Lee MJ, Song SY, Kim JI, Choi JY. 2022. Antioxidant activities of Korean perilla leaves (*Perilla frutescens*) by various cultivars. *Korean J Food Nutr* 35:453-463

Kim JH, Kim HY, Kang SY, Kim JB, Kim YH, Jin CH. 2018. Chemical constituents from *Apios americana* and their inhibitory activity on tyrosinase. *Molecules* 23:232

Kim KC, Kim JS. 2020. Effect of varying ethanol concentrations on the extraction properties and physiological activity of *Artemisia annua* L. *Korean J Food Sci Technol* 52:130-137

Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Choi JS, Ahn DH. 2016. Anti-inflammatory effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract on LPS-induced RAW 264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45:181-187

Kim MY, Kim HJ, Kim MH, Lee JY, Lee YY, Lee BK, Lee BW. 2019. Changes in the physiological activities of peanut and defatted peanut extracts according to cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48:847-855

Kwon YR, Lee HR, Hwang SH, Kwon OJ, Youn KS. 2016. Antioxidant activities and physiological properties of *Euphorbia humifusa* extracts prepared using different solvents. *Korean J Food Preserv* 23:252-258

Lee HA, Han JS. 2012. Anti-inflammatory effect of *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *frutescens* extract in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Prev Nutr Food Sci* 17:109-115

Lin ES, Li CC, Chou HJ. 2014. Evaluation of the antioxidant and antiradical activities of perilla seed, leaf and stalk extracts. *J Med Plants Res* 8:109-115

Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. 2009. *Horror autoinflammaticus*: The molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 27:621-668

Middleton E Jr, Kandaswami C. 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol* 43:1167-1179

Mills C. 2012. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol* 32:463-488

Naeimi AF, Alizadeh M. 2017. Antioxidant properties of the flavonoid fisetin: An updated review of *in vivo* and *in vitro* studies. *Trends Food Sci Technol* 70:34-44

Nam JH, Park SJ. 2019. Inhibitory effects of ethanol extract from *Vicia amoena* on LPS (Lipopolysaccharide) indeed nitric oxide and prostaglandin E2 production in RAW 264.7 macrophage cell. *Asia-pac J Multimedia Serv Convergent Art Humanit Sociol* 9:443-450

Ovchinnikov DA. 2008. Macrophages in the embryo and beyond: Much more than just giant phagocytes. *Genesis* 46:447-462

Shin JH, Lee SJ, Seo JK, Cheon EW, Sung NJ. 2008. Antioxidant activity of hot-water extract from yuza (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) peel. *J Life Sci* 18:1745-1751

Sung Y, Seo SY. 2016. Awareness of temples food for popularizing traditional temple food preference and food research. *Korean J Tour Res* 31:311-330

Tatiya AU, Tapadiya GG, Kotecha S, Surana SJ. 2011. Effect of solvents on total phenolics, antioxidant and antimicrobial properties of *Bridelia retusa* Spreng. stem bark. *Indian J Nat Prod Resour* 2:442-447

Xu B, Chang SKC. 2009. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and anti-oxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *J Agric Food Chem* 57:4754-4764

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64:555-559

Received 13 November, 2023
Revised 05 December, 2023
Accepted 07 December, 2023