異なる濃度のエタノールにより抽出された *Dendropanax morbifera* LEV.
葉抽出物における抗酸化能及び生理的活性の比較分析

中村 仁哉,^a 羅 鍾煥,^a 金 柱成^{*,a,b}

The Comparative Analysis of Antioxidant and Biological Activity for the
Dendropanax morbifera LEV. Leaves Extracted by Different Ethanol Concentrations

Masaya Nakamura,^a Jong-Hwan Ra,^a and Ju-Sung Kim^{*,a,b}

^aMajors in Plant Resource and Environment, College of Agriculture & Life Science, SARI, Jeju National University; 63243 Jeju, Korea; and ^bThe Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University; 63243 Jeju, Korea.

(Received January 20, 2016; Accepted April 3, 2016)

The different concentrations of ethanol (20–100%) and distilled water extract for *Dendropanax morbifera* LEV. leaves were evaluated to induce antioxidant and biological activity employed by variety of assays. The 20%, 80%, and 100% ethanol extract demonstrated the relatively higher activity, whereas distilled water, 40%, and 60% ethanol extracts exhibited the lower antioxidant and biological activity. Especially, 80% ethanol extract showed the remarkably higher radical scavenging activity, reducing power, total phenol and flavonoid content, α -glucosidase, and tyrosinase inhibitory activity, and alcohol dehydrogenases (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity. Also, 100% ethanol extract exhibited relatively greater activity, but there did not show significant radical scavenging activity. Furthermore, there were 50% and 30% promotion effect for ADH activity assay and 80% and 40% promotion effect for ALDH activity assay in 80% and 100% ethanol extract, respectively. In addition, in the minimum inhibitory concentration (MIC), all extracts except for distilled water extract inhibited *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Escherichia coli*. For *Pichia jadinii*, whole extracts effectively inhibited yeast multiplication at concentration of 125 μ g/mL for 100% ethanol extract and 250 μ g/mL for the rest of extract. These result indicated that *D. morbifera* LEV. leaves extracted by 80% ethanol would be the ideal extracting solution to maximize inherent antioxidant and biological activity agent.

Key words—*Dendropanax morbifera*; antioxidant; biological activity

緒 言

近年、生活水準が改善されるにつれ「死の四重奏」に代表される生活習慣病が問題視され、毎年多くの患者がこの生活習慣病に悩まされている。こうした生活習慣病は体内の免疫システムの一環として発生する活性酸素やフリーラジカルに起因して起こると考えられている。¹⁾ 活性酸素やフリーラジカルは本来生体外から侵入してくる病原菌に対する身体の防御対策の1つであり、基本的な細胞活動の必須化合物であるが、多量に合成されたとき、人体にとって有害になることもある。²⁾ そのため多量に合成され

た活性酸素やフリーラジカルを中和する副作用のない植物由来の抗酸化物質を食品に利用したり、又は、より強い抗酸化能を保持する植物を探索する研究がより活発化すると考えられる。

韓国原産で主に同国南部の海岸や済州島に自生するウコギ科植物の *Dendropanax morbifera* LEV. は、韓国はもちろん中国の三国時代の古文書にも紹介されるほど古い歴史を持ち³⁾ さらに様々な効能があることが知られており、日本固有種のウコギ科のカクレミノ (*D. trifidus*) と近縁種である。その葉、茎、根及び種子は昔から民間療法として偏頭痛、感染症、皮膚病などの疾病薬として用いられてきた。それと同時に、樹皮から取れる樹液は古くから“黄漆”と呼ばれ、韓国の古文書である“星湖僊説”では“六月にその樹液を採取し、器に塗り込めばその彩色は黄金のようだった”と形容されるほど昔から

^a済州大学生命資源科学大学生物産業学部植物資源環境専攻, ^b済州大学亜熱帯農業生物科学研究所

*e-mail: aha2011@jejunu.ac.kr

高貴な漆塗料として重宝されてきた。^{3,4)} 近年に入り科学的なアプローチによりその機能性を検証する実験が行われ、*D. morbifera* LEV. 葉のアルコール抽出物に酸化及びメラニン増殖を抑制する効果があることが報告されている。^{5,6)} また、*D. morbifera* LEV. から分離したルチンには血中のフィブリン凝血塊の形成を抑制し、血栓症及びパーキンソン病を予防する効果がある^{7,8)} など、その薬理効果が報告され、今後、機能性食品や薬品の素材として有望視されている。しかしながら、これらの抗酸化能や生理作用などの知見については、まだ十分とは言えない。

また、Yang ら⁹⁾により、植物体に存在するフェノールなどの化合物による抗酸化能及びその抽出効率には植物体、植物器官、用いる抽出溶液中の溶媒濃度などにより、大きな差異が認められると報告されているものの、*D. morbifera* LEV. に対する抽出液溶媒濃度毎の抗酸化物質抽出効率、あるいは、異なる溶媒濃度により抽出された抽出物毎における抗酸化能の評価に関しては、これまで十分に行われてこなかった。そこで筆者らはエタノール水溶液〔エタノール：水混合液（0：100, 20：80, 40：60, 60：80; 100：0）混合液〕を含む抽出液をもちいて、*D. morbifera* LEV. 葉から抽出した抽出物の抗酸化能と生理的活性を検定し、これらにどのような特徴と薬効があるかを分析した。

方 法

1. 試 薬 4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*NPG), α -グルコシダーゼ、没食子酸、クエルセチン、テトラサイクリン、L-tyrosine 及びアルブチンはシグマアルドリッチ社から購入した。2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), フェリシアン化カリウム、塩化鉄 (III), トリクロロ酢酸及びペルオキシ二硫酸カリウムは和光純薬工業社から購入した。その他の試薬は分析レベルの純度のものを用いた（テジョン化金及びアルファ・エーサー株式会社）。

2. *Dendropanax morbifera* LEV. 試料と調製

本研究に使用した *D. morbifera* LEV. の葉は 2015 年に済州資源植物研究所 (Jeju Resource Plant Laboratory) から購入後、漢拏山研究所金 顯哲博士に同定を依頼し *Dendropanax morbifera* LEV. と

同定した。試料の一部は済州大学親環境農業研究所の機能性作物学研究室に証拠標本 (No. JEJUA-4) として保存した。試料の葉部は室温で 10 日間完全に乾燥させた後に、ブレンダーミキサーで粉末にし、5 g ずつ秤量、各々 50 mL の 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% エタノール水溶液（蒸留水, 20% エタノール, 40% エタノール, 60% エタノール, 80% エタノール, 100% エタノール）を加えて超音波発生機（ファシン社, Power sonic 520）で 90 分間振とう抽出した。さらに、この操作を 3 回繰り返して、抽出試料を Whatman No. 2 ろ紙でろ過後、ろ液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。濃縮物はデシケーター内で 2 時間静置後、メタノールで溶解し、試料溶液として分析に供した。抽出前のサンプル重量に対する抽出物の重量比は、それぞれ 18.64% (20% エタノール抽出物), 20.62% (40% エタノール抽出物), 20.84% (60% エタノール抽出物), 17.92% (80% エタノール抽出物), 8.46% (100% エタノール抽出物), そして 17.72% (蒸留水抽出物) であった。試料は使用時まで -20°C にて保存した。

3. 試験方法

3-1. DPPH ラジカル消去活性試験 DPPH の産生量は Musa らの方法¹⁰⁾を基本として比較的安定したフリーラジカルである DPPH ラジカルを試料と反応させて試料の DPPH ラジカル捕捉効果を分析した。96 穴マイクロプレートの縦二列目に試料とメタノールを 200 μL になるように希釈し、残りの穴には 100 μL のメタノールをとり縦 1 列目をコントロールとした。そして 2 列目から 9 列目にかけて 1 試料につき 8 段階希釈した (1.56–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。その後 100 μL の DPPH 溶液 (0.4 mM) を添加して 30 分間暗所で反応させた。吸光度はマイクロプレートリーダー（パイオラッド社, モデル iMark）により波長 490 nm で測定した。測定は 2 反復行い初回と同じ濃度で実施した。ポジティブコントロールとして L-アスコルビン酸, α -トコフェロール, BHT を使用した。試料の DPPH ラジカル消去活性は消去率で表し Eq. (1) により算出した後、試料が 50% の DPPH ラジカルを消去できる最小限の量を示した RC_{50} で表した。

$$\text{DPPH ラジカル消去率 (\%)} = \left\{ \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \right\} \times 100 \quad (1)$$

ここで A_c はコントロールそして A_s は試料が消去した DPPH ラジカルの吸光度である。

3-2. ABTS ラジカル消去活性試験 ABTS ラジカル消去能は Re らの方法¹¹⁾を基本として行った。ABTS 溶液はあらかじめ 2.45 mM ペルオキシ二硫酸カリウムと 7 mM ABTS を 16 時間暗所の室温で反応させた後、分光光度計を用い 750 nm の吸光度において 1.2 から 1.3 の間になるようにリン酸緩衝液を加え調整した。96 穴マイクロプレートの縦 1 列目そして 3 列目以降に 100 μ L の蒸留水を取り、2 列目に希釈した試料溶液 40 μ L と ABTS 溶液 160 μ L を加えた。縦 2 列目から 9 列目にかけて 1 試料につき 8 段階希釈し (1.56–200 μ g/mL)、1 列目はコントロールとした。20 分間室温で反応させた後マイクロプレートリーダーを用いて 750 nm における吸光度を測定した。試料については 2 反復実施し初回と同じ濃度で、ポジティブコントロールは初回の実験結果を基に濃度を調節し 2 反復行った (0.006–0.78 μ g/mL)。

3-3. フェリシアン化カリウム還元力測定試験

3 価鉄イオンが *D. moribifera* LEV. 葉部抽出物によって還元された 2 価鉄イオン濃度を指標として Hyun らの方法¹²⁾により測定した。希釈した試料に 500 μ L のリン酸緩衝液 (0.2 M, pH 6.6) と 1% フェリシアン化カリウムを加えた後、50°C で 20 分間反応させた。20 分後に 10% トリクロロ酢酸を 2.5 mL 添加し反応を停止させ、反応させた溶液の一部 (500 μ L) をマイクロチューブにとり、蒸留水 500 μ L と 1% 塩化鉄 (III) 100 μ L を添加した。吸光度は分光光度計 (島津製作所, UV-1800 シリーズ) を使用し波長 700 nm で測定した。各試料の還元力は吸光度 (700 nm) により表した。

3-4. 総ポリフェノール及びフラボノイドの定量試験 ポリフェノールの定量には Hyun らが使用した Folin-Ciocalteu 法を用い測定した。¹²⁾ 試料を蒸留水で希釈し、50 μ L の Folin-Ciocalteu 溶液を添加し 5 分間室温で反応させた。反応させた後、20% の炭酸ナトリウム 300 μ L を加えさらに 20 分間反応させた。反応物に 1 mL の蒸留水を添加し、分光光度計で 725 nm における吸光度を測定し没食子酸を標準液としてポリフェノール含有量を算出した。ポリフェノール含有量は乾燥試料中の没食子酸相当量 (mg GAE/g of dry weight) で表記した。

フラボノイドの測定にはポリフェノール定量試験と同じく Hyun らが使用した方法に一部改良を加え測定した。¹²⁾ 任意の濃度に希釈した試料溶液 200 μ L と硝酸アルミニウム 100 μ L そして 1 M 酢酸カリウム 100 μ L をよく攪拌し 4.6 mL の 80% エタノールを添加した。40 分間室温でインキュベートした後、分光光度計で 417 nm における吸光度を測定した。フラボノイド含有量はクエルセチンを標準液として計量線を作成し、乾燥試料中のクエルセチン相当量 (mg QE/g of dry weight) を用い算出した。

3-5. α -グルコシダーゼ阻害活性試験 α -グルコシダーゼ阻害活性は Yang らの方法¹³⁾を参考にし、基質である *p*NPG が α -グルコシダーゼにより分解される過程で生成されるグルコースと *p*-ニトロフェノールのうち *p*-ニトロフェノールが試料によって生成阻害される阻害率から α -グルコシダーゼ阻害活性を評価した。試料溶液 50 μ L とリン酸水素カリウム緩衝剤 200 μ L (pH 6.8) を混合し氷上に静置した。酵素溶液として α -グルコシダーゼ 50 μ L (0.5 U/mL) を添加し 37°C, 15 分間反応させた。基質として 3 mM *p*NPG を 100 μ L 添加し 37°C で 10 分間インキュベートした。10 分間インキュベートした後、100 mM 炭酸ナトリウムを 750 μ L 加え、分光光度計で 405 nm における吸光度を測定した。得られた吸光度を α -グルコシダーゼ阻害率で表し、Eq. (2)により算出し 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求めた。

$$\alpha\text{-グルコシダーゼ阻害率 (\%)} = \{1 - (A_s/A_b)/A_c\} \times 100 \quad (2)$$

ここで上記の方法により算出した吸光度を A_s 、基質を処理しなかったものをブランク (A_b)、試料溶液を処理しなかったものをコントロール (A_c) とした。

3-6. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定試験 最小発育阻止濃度は Jeong らの方法¹⁴⁾を基本として行った。最小発育阻止濃度測定法は抗菌、抗カビ剤が細菌の発育を抑制できる最小濃度を測定する試験で消毒剤などの微生物発育抑制力の比較にもよく使われている。最小発育阻止濃度値が低いほど抗菌、抗カビ力が強いことを示し、逆に最小発育阻止濃度値が高いほど薬剤感受性が弱いことを示す。近年、植物由来の抗菌成分に対する研究が盛んに行われており、その重要性が強調されてきている。

本実験に使用した菌種は Korean Collection for Type Culture (KCTC) から購入した菌種を用い、グラム陽性菌として 3 種 [*Bacillus cereus* (KTCT 1012), *Staphylococcus epidermidis* (KTCT 1917), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (KTCT 1927)], グラム陰性菌として 4 種 [*Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1750), *Escherichia coli* (KTCT 1924), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (KTCT 2208), *Proteus vulgaris* (KTCT 2433)] そして酵母菌 3 種 [*Saccharomyces cerevisiae* (KTCT 7913), *Pichia jadinii* (KTCT 7293), *Candida albicans* (KTCT 7965)] に対する *D. morbifera* LEV. 葉抽出物の抗菌作用を評価した. 各菌種を 25°C から 37°C の温度で培養した. 96 穴マイクロプレートの横 1 列目に試料溶液 20 μ L と各液体培地で 100 倍に希釈した菌種 180 μ L をとり, そして残りの穴には 100 μ L を加え 1 列目から段階希釈した. その後, インキュベーター内で 20 時間培養し最小発育阻止濃度を観測した.

3-7. チロシナーゼ阻害活性試験 メラニンは動物を始めとするたくさんの生物の生体内で合成される色素であり, 真メラニンと亜メラニンの 2 種類から合成されている. メラニンの生成は複雑な過程を有し酸化還元酵素であるチロシナーゼの触媒作用を受け, アミノ酸の一種であるチロシンから L- β -(3,4-Dihydroxyphenyl) alanine (L-DOPA) そして DOPA キノンが生成される. 反応性の高い DOPA キノンは自動酸化的に反応し最終的に黒褐色の真メラニンを形成するが, 美白効果を得るためにはメラニンの生成を触媒するチロシナーゼを阻害することが重要になる.

チロシナーゼ阻害活性試験は反応生成物である DOPA キノンの吸収波長である 490 nm の吸光度を計測し生成量を測定した.¹⁵⁾ リン酸水素カリウム緩衝剤で適宜希釈した試料溶液, 1.66 mM L-tyrosine 40 μ L そして 0.1 mM のリン酸水素カリウム緩衝剤 80 μ L を混合し, チロシナーゼ懸濁液 (125 U/mL) 40 μ L を加えた. 混合液を 37°C で 20 分間静置した後, マイクロプレートリーダーで 490 nm の波長で吸光度を測定した. また L-tyrosine の代わりに L-DOPA を用い, チロシナーゼ阻害活性試験も行った. 試料, L-tyrosine (L-DOPA) とともに加えたものを (A_s), 試料を加えなかったものをコントロー

ル (A_c), L-tyrosine (L-DOPA) を加えなかったものをブランク (A_b) としチロシナーゼ阻害率を Eq. (3) に従って算出した. ポジティブコントロールとしてアルブチンを使用した.

$$\text{チロシナーゼ阻害率 (\%)} = \{1 - (A_s/A_b)/A_c\} \times 100 \quad (3)$$

3-8. アルコール脱水素酵素 (ADH) 及びアセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 活性測定試験

肝臓に運ばれたアルコールは ADH とその補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の機能によりアセトアルデヒドに分解される. アセトアルデヒドは分解前のアルコールより 10 倍以上毒性が強く二日酔いの原因になるが, ALDH の働きにより, 毒性の低い酢酸に分解される. ADH の活性が弱い人は, 摂取したアルコールにより神経が麻痺し, ほろ酔い気分が長く続き, 多量の酒を飲む傾向がある. ALDH の活性が弱い人は肝臓でアセトアルデヒドを分解できず, 強い二日酔いに襲われる. 二日酔いを防止するためには, ADH と ALDH の活性を促進させることが重要になる.

ADH 活性測定試験は Shim の方法¹⁶⁾ に改良を加え, アルコールから分解される NADH の生成量を 340 nm の吸光度で測定した. 試験管にアルコール, NAD 水溶液そして試料 100 μ L を加え, 混合した後, 0.01 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.8) を 1.8 mL になるように添加した. その後, 25°C で 10 分間反応させ, ADH (10 U/mL) を加えた後, 分光光度計を使用し 340 nm の波長で測定した. 試料を加えないものをコントロールとし, 以下の式 Eq. (4) により算出した.

ALDH 活性測定試験は Tottmar らが使用した方法¹⁷⁾ を一部改変して行った. 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.8) に 5 mM アセトアルデヒドそして 0.5 mM NAD 溶液を加え混合した. その後 200 μ L の試料溶液と 0.1 mM ALDH (1 U/mL) を添加し, 37°C で 10 分間静置した. 反応物を分光光度計で 370 nm の波長で測定した. ADH 及び ALDH 活性測定試験ともに試料を添加しなかったものをコントロール (A_c), そして試料を添加したものを (A_s) とし Eq. (4) により算出した. 加えて Eq. (4) よりコントロールの値を 100% とし相対的比較目的のため用いた.

$$\text{ADH (ALDH) 活性 (\%)} = A_s/A_c \times 100 \quad (4)$$

Table 1. Analysis of DPPH and ABTS Radical Scavenging Activity, Total Phenol and Flavonoid from *Dendropanax morbifera* LEV. Leaves with Distilled Water and Ethanolic Solution (20–100%)

Extractant ethanol concentration	DPPH scavenging ABTS scavenging		TPC (mg GAE/g) ^{#1}	TFC (mg QE/g) ^{#2}
	RC ₅₀ (μg/mL)			
0% (H ₂ O)	96.99 ± 0.16 ^{g, #3}	47.77 ± 3.74 ^e	510.61 ± 40.29 ^b	128.04 ± 4.66 ^{d, e}
20%	41.23 ± 2.17 ^{b, c}	41.71 ± 0.05 ^d	624.58 ± 13.43 ^a	169.26 ± 6.77 ^c
40%	51.03 ± 1.51 ^e	44.89 ± 2.33 ^{d, e}	501.12 ± 28.86 ^b	110.57 ± 9.50 ^e
60%	47.56 ± 0.71 ^{d, e}	21.75 ± 0.11 ^c	472.62 ± 13.43 ^b	140.14 ± 5.70 ^d
80%	45.09 ± 1.73 ^{c, d}	17.15 ± 0.03 ^b	718.20 ± 65.23 ^a	210.03 ± 1.90 ^b
100%	74.56 ± 4.10 ^f	55.31 ± 0.12 ^f	632.72 ± 51.80 ^a	244.98 ± 13.31 ^a
Positive control ^{#4}				
AsA	1.20 ± 0.08 ^a	1.06 ± 0.06 ^a		
Toco	4.05 ± 0.04 ^a	3.94 ± 0.44 ^a		
BHT	39.09 ± 1.16 ^b			

^{‡1} TPC: Total phenol content analyzed as gallic acid equivalent (GAE) mg/g of extract: values are the average of triplicate.^{‡2} TFC: Total flavonoid content analyzed as quercetin equivalent (QE) mg/g of extract: values are the average of triplicate. ^{‡3} Each value represents the mean ± S.D., and means within columns having the same superscript letters are not significant different ($p < 0.05$). ^{‡4} AsA, L-ascorbic acid; Toco, α-tocopherol; BHT, butylated hydroxytoluene.

3-9. 統計処理 本実験の各測定値は平均値 ± 標準偏差で示した。各群の統計学的分析は Statistical package for social science (SPSS, Ver. 20) を使用し、分散分析 (ANOVA) により有意な差が認められたものについて Duncan の多重比較検定法 (DMRT) により $p < 0.05$ (有意水準) を有意差ありと判定した。また、測定試験と総フェノール及びフラボノイド間の関連性を調べるため Pearson の相関分析を行った。

結 果

1. DPPH ラジカル消去活性 *Dendropanax morbifera* LEV. の各エタノール濃度別試料の DPPH ラジカル消去活性を 50% ラジカル消去濃度である RC₅₀ として Table 1 に表した。DPPH ラジカル消去活性は 20% エタノール抽出物 > 80% エタノール抽出物 > 60% エタノール抽出物 > 40% エタノール抽出物 > 100% エタノール抽出物 > 蒸留水抽出物の順であった。100% エタノール抽出物と蒸留水抽出物を除くすべてのエタノール抽出物に大きな差は認められなかったが、比較的高い DPPH ラジカル消去活性がみられた。その中でも 20% エタノール抽出物は $41.23 \pm 2.17 \mu\text{g/mL}$ と、合成抗酸化剤である BHT と遜色のない高い消去活性を示した。

2. ABTS ラジカル消去活性試験 ABTS ラジカルの 50% を消去する検定試料の量を 50% ラジカル消去濃度 (RC₅₀) とし、測定試料の RC₅₀ を Ta-

ble 1 に表した。ポジティブコントロールである L-アスコルビン酸や α-トコフェロールより低いラジカル消去活性だったが、80% エタノール抽出物 ($17.15 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$) 及び 60% エタノール抽出物 ($21.75 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$) に強い活性が認められた。ほかの抽出物にも比較的高いラジカル消去活性が観察されたが、抽出物間に有意な差はみられなかった。また 100% エタノールと蒸留水抽出物の活性が他の溶液抽出物より低かったことから、DPPH ラジカル消去活性と同様に ABTS ラジカル消去活性成分も含水エタノール水溶液により抽出され易いことが示唆された。

3. フェリシアン化カリウム還元力測定 フェリシアン化カリウムを用いた抽出物の還元力を各試料の吸光度 (700 nm) で表し、Table 2 に示した。異なるエタノール濃度の抽出物間に明瞭な還元力の差が認められ、その還元力は濃度依存的に向上した。80% エタノール抽出物の 100, 200, 300 μg/mL の値がそれぞれ 0.172 ± 0.005 , 0.341 ± 0.012 , 0.471 ± 0.002 と最も高く、ついで、100% エタノール抽出物、20% エタノール抽出物、60% エタノール抽出物、40% エタノール抽出物、蒸留水抽出物の順に高い還元力が認められた。特に、ポジティブコントロールと比較すると 80% エタノール抽出物では 100 μg/mL の濃度で L-アスコルビン酸 (0.178 ± 0.006) と同レベルの還元力が見い出された。

Table 2. Analysis of Reducing Power for *Dendropanax moribifera* LEV. Leaves with Distilled Water and Ethanolic Solution (20–100%)

Extractant ethanol concentration	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	300 $\mu\text{g/mL}$
0% (H_2O)	$0.108 \pm 0.008^{\text{e}, \#1}$	$0.207 \pm 0.004^{\text{f}}$	$0.319 \pm 0.013^{\text{f}}$
20%	$0.140 \pm 0.004^{\text{d}}$	$0.304 \pm 0.007^{\text{d}}$	$0.430 \pm 0.012^{\text{d}}$
40%	$0.127 \pm 0.004^{\text{d}}$	$0.268 \pm 0.007^{\text{e}}$	$0.392 \pm 0.014^{\text{e}}$
60%	$0.138 \pm 0.007^{\text{d}}$	$0.288 \pm 0.006^{\text{e}}$	$0.413 \pm 0.007^{\text{d}, \text{e}}$
80%	$0.172 \pm 0.005^{\text{c}}$	$0.341 \pm 0.012^{\text{d}}$	$0.471 \pm 0.002^{\text{d}}$
100%	$0.141 \pm 0.002^{\text{d}}$	$0.331 \pm 0.008^{\text{d}}$	$0.451 \pm 0.014^{\text{d}, \text{e}}$
Positive control ^{\#2}			
AsA	$0.178 \pm 0.006^{\text{c}}$	$0.399 \pm 0.009^{\text{c}}$	$0.828 \pm 0.006^{\text{c}}$
Toco	$0.677 \pm 0.008^{\text{a}}$	$1.230 \pm 0.026^{\text{a}}$	$1.868 \pm 0.057^{\text{a}}$
BHT	$0.237 \pm 0.007^{\text{b}}$	$0.635 \pm 0.028^{\text{b}}$	$1.033 \pm 0.049^{\text{b}}$

^{\#1} Values are mean value $\pm$ S.D. of duplicate determinations and expressed as absorbance at 700 nm. The means within columns having the same superscript letters are not significant different ($p < 0.05$). ^{\#2} AsA, L-ascorbic acid; Toco, α -tocopherol; BHT, butylated hydroxytoluene.

4. 総ポリフェノール及びフラボノイドの定量

測定した *D. moribifera* LEV. 葉部抽出物の総ポリフェノールとフラボノイド含有量の結果を Table 1 に表した. 全抽出溶液による抽出物からフェノールが検出され, 60%エタノールを除く各濃度エタノール及び蒸留水の抽出物に 500 mg GAE/g 以上の比較的高い含有量が認められた. 総ポリフェノール含有量は 80%エタノール, 100%エタノール, 20%エタノール, 蒸留水, 40%エタノール, 60%エタノール抽出物の順に高いフェノール含量を示した. さらに 20%から 60%エタノール濃度にかけて徐々に減少する傾向がみられ, この濃度範囲では濃度が上昇するにつれ総フェノール量が減少した.

総フラボノイド含有量を抽出液のエタノール濃度と比較すると, 100%エタノール抽出物>80%エタノール抽出物>20%エタノール抽出物>60%エタノール抽出物>蒸留水抽出物>40%エタノール抽出物となり, 40%エタノールと 100%エタノール抽出物の総フラボノイド含有量に 2 倍以上の差が認められた. また 60%エタノールからエタノール濃度が高くなるにつれフラボノイド含量も上昇する傾向が認められた.

5. α -グルコシダーゼ阻害活性 *Dendropanax moribifera* LEV. 葉抽出物の α -グルコシダーゼ活性の 50%抑制濃度 (IC_{50}) を Table 3 に表した. 80%エタノール抽出物に最も高い α -グルコシダーゼ阻害活性が認められた. ついで 100%エタノール, 60%エタノール, 40%エタノール, 20%エタノール,

Table 3. Analysis of α -Glucosidase Inhibitory Activity from *Dendropanax moribifera* LEV. Leaves with Distilled Water and Ethanolic Solution (20–100%)

Extractant ethanol concentration	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^{\#1}
0% (H_2O)	$120.30 \pm 1.29^{\text{f}, \#2}$
20%	$104.91 \pm 2.10^{\text{e}}$
40%	$101.55 \pm 1.92^{\text{e}}$
60%	$88.29 \pm 3.42^{\text{e}}$
80%	$60.21 \pm 0.31^{\text{a}}$
100%	$66.43 \pm 3.34^{\text{b}}$
Positive control	
Acarbose	$94.13 \pm 2.81^{\text{d}}$

^{\#1} IC_{50} : The concentration requires to reduce 50% of α -glucosidase ($\mu\text{g/mL}$). ^{\#2} Values are mean value $\pm$ S.D. of duplicate determinations and means within columns having the same superscript letters are not significant different ($p < 0.05$).

蒸留水抽出物の順に強い α -グルコシダーゼ阻害作用が確認され, 高含水エタノール抽出物に比較的低い活性が認められた. 80%, 100%, 60%エタノール抽出物の α -グルコシダーゼ阻害剤は, acarbose ($94.13 \pm 2.81 \mu\text{g/mL}$) より強い阻害活性を示した. 蒸留水から 80%までエタノール濃度が上昇するほど阻害活性が強くなる傾向が確認された.

6. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定 グラム陽性菌, グラム陰性菌, 酵母菌に対する *D. moribifera* LEV. 葉の最小発育阻止濃度を Table 4 にまとめた. グラム陽性菌では *Bacillus cereus* にそれぞれ 20%, 60%, 80%, 100%エタノール抽出物に 500 $\mu\text{g/mL}$, 40%エタノール抽出物に 1000 $\mu\text{g/mL}$ の阻害作

Table 4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *Dendropanax moribifera* LEV. Leaves with Distilled Water and Ethanolic Solution (20–100%)

		Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) ^{#1}					
		0% (H ₂ O)	20%	40%	60%	80%	100%
Gram positive bacteria	B.c ^{#2}	—	500	1000	500	500	500
	S.e ^{#2}	—	—	—	—	—	—
	S.a ^{#2}	—	1000	—	1000	1000	500
Gram negative bacteria	P.a ^{#2}	—	—	—	—	—	—
	E.c ^{#2}	—	1000	1000	1000	1000	1000
	K.p ^{#2}	—	—	—	—	—	—
	P.v ^{#2}	—	—	—	—	—	—
Yeast	S.c ^{#2}	—	—	—	—	—	—
	P.j ^{#2}	250	250	250	250	250	125
	C.a ^{#2}	—	—	—	—	—	—

^{#1} The MIC value against bacteria was determined by the serial two-fold dilution method. The growth of the bacteria were evaluated by the degree of turbidity of the culture with the naked eye in 20 h. ^{#2} B.c: *Bacillus cereus* (KCTC 1012), S.e: *Staphylococcus epidermidis* (KCTC 1917), S.a: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (KCTC 1927), P.a: *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1750), E.c: *Escherichia coli* (KCTC 1924), K.p: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (KCTC 2208), P.v: *Proteus vulgaris* (KCTC 2433), S.c: *Saccharomyces cerevisiae* (KCTC 7913), P.i: *Pichia jadinii* (KCTC 7293), C.a: *Candida albicans* (KCTC 7965). —: no inhibitory activity.

Fig. 1. The Activity of Tyrosinase Inhibition in *Dendropanax moribifera* LEV. Leaves with Distilled Water and Ethanolic Solution (20–100%) Analyzed by L-tyrosine and L-DOPA as Substrate

H₂O, distilled water extract; 20E, 20% ethanolic extract; 40E, 40% ethanolic extract; 60E, 60% ethanolic extract; 80E, 80% ethanolic extract; 100E, 100% ethanolic extract. The values with different letters were significantly different as calculated using paired Duncan's test at $p < 0.05$.

用が認められた。また *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* に対して、100%エタノール抽出物に 500 $\mu\text{g/mL}$ 又 20%, 60%, 80%エタノール抽出物に 1000 $\mu\text{g/mL}$ の発育阻害作用がみられた。グラム陰性菌では *Escherichia coli* に蒸留水を除く抽出物に 1000 $\mu\text{g/mL}$ の発育阻止作用が確認された。酵母菌である *Pichia jadinii* ではすべての抽出物に、より高い発育阻止作用がみられ、特に 100%エタノール抽出物に 125 $\mu\text{g/mL}$ と最も高い発育阻害作用が認められた。

7. チロシナーゼ阻害活性 L-Tyrosine と L-

DOPA を基質として使用したチロシナーゼ阻害活性の結果を Fig. 1 に示した。L-Tyrosine と L-DOPA のどちらを基質にした場合においても活性が濃度依存的に上昇する傾向がみられた。L-Tyrosine の場合には 80%エタノール抽出物に最も高い阻害活性が確認され、メラニン合成阻害剤であるアルブチンより強い活性を示した。逆に蒸留水では最も低い活性が認められた。80%エタノール抽出物について 100%, 20%, 60%, 40%エタノール抽出物に高いチロシナーゼ阻害活性がみられた。L-DOPA を基質にした場合、アルブチンより低い活性が認められ、

Fig. 2. The Activity of Alcohol Dehydrogenase (ADH) and Acetaldehyde Dehydrogenase (ALDH) in *Dendropanax moribifera* LEV. Leaves with Distilled Water and Ethanolic Solution (20–100%)

H₂O, distilled water extract; 20E, 20% ethanolic extract; 40E, 40% ethanolic extract; 60E, 60% ethanolic extract; 80E, 80% ethanolic extract; 100%, ethanolic extract. The values with different letters were significantly different as calculated using paired Duncan's test at $p < 0.05$.

L-tyrosine を基質にした場合と順位は同じであった。

8. アルコール脱水素酵素 (ADH) 及びアセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 活性測定

Dendropanax moribifera LEV. 葉抽出物に対する ADH と ALDH の酵素活性を Fig. 2 に表した。ADH 及び ALDH ともに濃度依存的に活性が認められた。ADH 活性測定試験では 20% と 60% エタノール抽出物に 300 µg/mL で 90% を超え、ほぼ同程度の活性が認められ、80% 及び 100% エタノール抽出物について高い活性がみられた。しかしコントロールに比べて若干低い活性が見受けられ、40% エタノール抽出物と蒸留水抽出物に至ってはそれぞれコントロールより低い活性がみられた。

ALDH 活性測定試験では ADH 活性測定試験に比べ 100 µg/mL と 200 µg/mL で増加する傾向がみられた。ADH 活性測定試験と同じく 80% エタノール抽出物に最も強い ALDH 促進効果が認められ、すべての濃度でコントロールより高い活性がみられた。ついで 100%, 20%, 60%, 40% エタノール、蒸留水の順に高い活性が認められた。

考 察

Dendropanax moribifera LEV. 葉部のエタノール及び蒸留水抽出物の DPPH ラジカル消去能を考察した結果 (Table 1), 20–80% エタノール抽出物に大きな差は認められず、含水エタノールに比較的高い DPPH ラジカル消去活性がみられたことから、活

性成分は含水エタノールによってより抽出され、同程度に消去活性を示すと推察された。また、これまでの研究でもフェノール含量がラジカル消去活性に高く相関することは報告されているが¹⁸⁾ 本研究では、DPPH ラジカル消去活性の順位と総フェノール含有量の順位が一部一致せず、総フェノール含量が最も低い値だった 60% エタノール抽出物に高いラジカル消去作用が確認され、逆に高いフェノール含有量が見出された 100% エタノール抽出物に低い DPPH ラジカル消去活性が確認された。しかし、最も高い総フェノール量が認められた 80% エタノール抽出物でも強いラジカル消去活性が認められ、フェノール化合物は消去活性に大きく関連するとも考えられるが、各測定試験とフェノール及びフラボノイドの関連性を示した Table 5 より有意な相関関係は認められず ($r = -0.224$) フェノール化合物以外のラジカル消去能を有する存在が大きく影響している可能性が明らかになった。山田ら¹⁹⁾ は、同じウコギ科のウコギは脂溶性であるビタミン E の含有量が少なく、高い DPPH ラジカル消去活性が確認され、比較検討のため用いた高脂溶性の β -カロチンを多く含む人参に比較的低い DPPH ラジカル消去能が認められたことから、DPPH ラジカル消去活性試験は水溶性の抗酸化物質がより関与することを見出ししている。さらに非フェノール化合物であるビタミン E と同じ程度の脂溶性成分の抗酸化成分の評価が可能だとし、溶媒や濃度によって抽

Table 5. Analysis of Correlation between Each Assays and Total Phenol and Flavonoid Contents

	DPPH	ABTS	α -Glu ^{#1}	RP ^{#2}	ADH	ALDH	L-Tyrosine	L-DOPA
Phenol	-0.224	-0.132	-0.614*,#3	0.734**	0.629*	0.839***	0.729**	0.738**
Flavonoid	-0.017	0.036	-0.795**	0.631*	0.801**	0.848***	0.703*	0.632*

^{#1} α -Glu: The value of α -glucosidase inhibitory assay. ^{#2} RP: The value of reducing power. ^{#3} *: Significance $p < 0.05$, **: Significance $p < 0.01$, ***: Significance $p < 0.001$.

出される量や分子種が異なると報告されている。^{20,21)} このことから、水とエタノールを混合することにより、より広い抽出の範囲を得た含水エタノールに高い DPPH ラジカル消去活性が確認され、含水エタノール抽出物においても異なる濃度の含水エタノールにより抽出された抗酸化物の量や分子種の違いにより、ラジカル消去能のレベルに差が生じたと考えられる。

Table 1 に ABTS ラジカル消去活性の結果を示した。80%エタノール抽出物に最も高い ABTS ラジカル消去活性が認められ、60%、20%、40%エタノール、蒸留水、100%エタノール抽出物の順に高い活性が見い出された。Table 5 より相関関係は認められなかったが ($r = -0.132$)、総ポリフェノール及びフラボノイドの定量試験でも 80%エタノール抽出物に高い値が観測され、80%エタノール抽出物においてフェノール化合物が ABTS ラジカル消去活性に大きく寄与していることが示唆された。全体的にフェノール量が高い濃度に高い ABTS ラジカル消去活性が確認されたが、60%エタノール抽出物と 100%エタノール抽出物に対するフェノール含有量と ABTS ラジカル消去活性の関連性は DPPH ラジカル消去活性試験にみられたのと同様の傾向が確認され、高いフェノール含量が確認された 100%エタノール抽出物に最も低い ABTS ラジカル消去活性がみられた。これより 100%エタノール抽出物ではフェノール化合物はラジカル消去活性にあまり関与しない、あるいは活性の低い成分であることが確認された。ABTS ラジカル消去活性試験と DPPH ラジカル消去活性試験では、フリーラジカルの不対電子に電子ないし水素イオンを引き渡し、ラジカルを安定化させるが、両試験のメカニズムは類似しており高い相関性を表すとされている。^{22,23)} 水溶性成分の選択性が比較的高い DPPH ラジカル消去活性試験とは異なり、水溶性及び脂溶性成分の評価が可能な ABTS ラジカル消去活性試験におい

てもフェノール含有量が最も低かった 60%エタノール抽出物に高いラジカル消去活性が認められたことから、水溶性成分のみならず脂溶性成分の抗酸化成分も寄与していると考えられる。

Table 2 よりフェリシアン化カリウム還元力において濃度依存的な活性が得られ、80%エタノール抽出物に他の抽出物に比べ最も高い還元力がみられた。Table 1 及び 2 より総フェノール量が多いと還元力も高くなる傾向が確認され、フェノール含有量が還元力に大きく影響することが判明した ($r = 0.734$, $p < 0.01$)。さらに Kim ら²⁴⁾ により *D. morbifera* LEV. 葉に多量のビタミン C が含まれてることが明らかにされており、ビタミン C はエジオール基による強い還元力を持つことから、本実験において強い還元力を示した 80%エタノール抽出物にはフェノール化合物とともにビタミン C などの働きによる可能性があるものと推測される。

Dendropanax morbifera LEV. 葉のエタノール、蒸留水抽出物によるフェノール及びフラボノイド含有量は Table 1 に示した通りである。フェノール及びフラボノイドともに 80%あるいは 100%エタノール抽出物に最も高いフェノール及びフラボノイド含量が認められた。*D. morbifera* LEV. の葉部にはコーヒーなどに多大に含まれるクロロゲン酸、ビタミン C の働きを助け強い抗酸化を有するルチン、そして、主にシソ科植物に含まれるロスマリン酸などが同定されている。²⁵⁾ *D. morbifera* LEV. 葉の 20%、80%、100%エタノール抽出物などの高いフェノール及びフラボノイド含量は記述の成分などに由来すると推察される。しかし、総フェノール含量測定試験は消去活性にあまり関与しない非ポリフェノールすなわちクエン酸や D-グルコースなどにも反応すること、各フェノール化合物が異なる発色度を示すことが報告されている。^{26,27)} このような非ポリフェノール成分の存在も生理的活性や抗酸化活性に影響した可能性があると考えられる。

Table 3 に α -グルコシダーゼ阻害活性試験において *D. morbifera* LEV. 葉のエタノール及び蒸留水抽出物の抑制作用をまとめた。80%エタノール抽出物に $60.21 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$ と最も高い α -グルコシダーゼ阻害活性が認められた。ついで 100%エタノール、60%エタノール抽出物にも高い α -グルコシダーゼ阻害活性が確認され、80%からエタノール濃度が下降するほど、その含水エタノール抽出の阻害活性が低下する傾向がみられた。このことから、 α -グルコシダーゼ阻害活性物質抽出には高濃度エタノール溶液がより効果的であることが示唆された。*D. morbifera* LEV. 葉メタノール抽出物からトリテルペン化合物であるデンドロパノキシド、アミリン、グルチノールそして植物ステロールである β -シトステロールが分離されている。²⁸⁾ これら脂溶性を示す物質に高い血糖値上昇抑制活性、すなわち α -グルコシダーゼ阻害活性が見い出されており、²⁹⁻³²⁾ 本研究でもこれらの阻害物質が関与している可能性が推測された。またフェノール酸であるクロロゲン酸は既報によりメタノール抽出物から同定されていることから、少なくとも疎水性を示す可能性があり、²⁵⁾ 強い α -グルコシダーゼ抑制作用も報告されている。³³⁾ 80%そして 100%エタノール抽出物に高いフェノール含有量及び α -グルコシダーゼ阻害活性がみられ、比較的高い相関が見い出されたことから ($r = -0.614$, $p < 0.05$) 本研究の抽出物にクロロゲン酸様のフェノール化合物が他の抽出物よりも多く含有され、かつ、 α -グルコシダーゼ阻害活性にも寄与していると示唆された。

Dendropanax morbifera LEV. 葉の抗菌作用を最小発育阻止濃度 (MIC) で Table 4 に示した。グラム陽性菌 3 種、グラム陰性菌 4 種そして酵母菌 3 種に対する発育阻害作用を検定した結果、グラム陽性菌では *Bacillus cereus* と *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* に、グラム陰性菌では *Escherichia coli* に、酵母菌では *Pichia jadinii* に効果が確認された。蒸留水抽出物にはグラム陽性菌、陰性菌ともに発育阻害作用が確認されず、酵母菌 2 種に対しても効果がみられなかった。このことから、蒸留水抽出物には発育阻害効果が乏しいことが明らかになった。20-100%エタノール抽出物に発育阻害効果が認められ 100%エタノール抽出物には、他の抽出物より若干強い活性がみられたが、全体的に顕著な差は

確認できなかった。既報ではフェノール化合物が抗菌作用を表すと報告されているが、³⁴⁾ 本実験の結果からは、葉抽出物の菌・酵母の発育阻害活性はフェノール化合物及び濃度に関係なく検出されることが確認された。特に *P. jadinii* に特異的に有効な発育阻害効果が認められた。この効果は単に抽出された阻害物質の量によるものなのか、抽出された阻害物質の分子種によるものなのかは明らかではないが、他の菌種において *P. jadinii* と同様の強い阻害活性が認められなかったこと、全抽出物に強い活性が見い出されたことより、分子種の違いが重要であると示唆され、*P. jadinii* に対する特異性のある物質の存在が推察された。

L-Tyrosine と L-DOPA を基質として分析したチロシナーゼ阻害活性の結果を Fig. 1 に示した。その結果、L-tyrosine 及び L-DOPA とともに 80%エタノール抽出物に最も高い阻害活性が認められた。ついで 100%エタノール抽出物に強い阻害活性がみられ 20%, 60%, 40%, 蒸留水の順に高い活性が認められた。Moon らは、³⁵⁾ 済州島に自生する 263 種の植物のうち最も高いフェノール含量が認められた 5 種 (*Toxicodendron succedaneum*, *Cornus walteri*, *Aesculus turbinata*, *Cornus controversa*, *Distylium racemosum*) に最も高いチロシナーゼ阻害活性が見い出されたと報告している。他の報告においてもシラカバやメグスリノキに多く含まれるタンニンの一種であるロドデンドロールそして柑橘類に多くみられるケンペロールやクエルセチンといったフラボノイドに強いチロシナーゼ阻害活性があることが明らかになっている。^{36,37)} 本研究でも高フェノール含量が認められた 80%及び 100%エタノール抽出物に高いチロシナーゼ阻害作用が認められ、高い相関 (L-tyrosine: $r = 0.729$, $p < 0.01$, L-DOPA: $r = 0.738$, $p < 0.01$) が確認された。このことよりフェノール含有量がチロシナーゼ阻害活性に寄与していると予測された。また抽出物の阻害活性は、L-DOPA より L-tyrosine を基質に使用した場合に、より強い阻害活性が確認される傾向があった。このことから L-DOPA より L-tyrosine をより強く阻害する活性物質が含まれていることが推察された。

Dendropanax morbifera LEV. 葉エタノール及び蒸留水抽出物の ADH 及び ALDH 賦活作用を Fig. 2 に表した。ADH 及び ALDH とともに 80%, 100%

エタノール抽出物に高い活性が確認され、20%エタノール抽出物は ALDH にのみ促進活性が認められた。蒸留水、40%、60%エタノール抽出物は ADH 及び ALDH とともにコントロールより低い値を示し促進活性がみられなかった。このことから蒸留水、40%、60%エタノール抽出物には ADH 及び ALDH の活性を増進する効果が薄いと考えられる。逆に、顕著な活性作用を示した 80%、100%エタノール抽出物にはそれらの活性を著しく促進する物質の存在が示唆された。さらに ALDH 活性測定試験では ADH 活性測定試験と比較すると全体的に増進効果が認められ、ADH の働きを促進する成分より ALDH の活性を促進する成分をより多く含有していると推察される。また、ADH と ALDH に総フェノール量との相関関係が強く見い出され (ADH: $r=0.629$, $p<0.05$, ALDH: $r=0.839$, $p<0.001$), フェノール化合物が何かしらの形で ADH 並びに ALDH 促進活性に関与している可能性が強く示唆された。しかし、低濃度 (100 $\mu\text{g/mL}$) において ALDH 活性測定試験における 80%エタノール抽出物を除いてすべての抽出物に効果が認められず、ある程度の濃度により初めて効果が期待できることが明らかになった。また、ADH と ALDH 活性にアミノ酸がどのように影響するか報告した Cha ら³⁸⁾は、ある程度の添加濃度を基準に活性が減少することを見い出している。本試験においても濃度が高くなるほど抽出物によって伸び率が上昇又は減少する傾向が確認され、特に 80%エタノール抽出物における添加濃度による最大化が今後の研究課題の 1 つだと考えられる。

以上の結果から *D. morbifera* LEV. 葉部から高い抗酸化能及び生理的作用が 80%エタノール抽出物から得られ、本研究の結果から今後機能性食品や薬品開発素材としてより貢献することを期待する。本研究では各濃度別の有効成分の特定には至らなかったが、有効成分の構造決定及び生理作用の調査が今後の重要研究課題であると考えられる。

謝辞 本研究は韓国中小企業庁が助成する 2015 年度産学連協力技術開発事業 [産学連協力技術開発事業 (研究村), 認可番号: C0297060] の研究成果の 1 つとして実施したものである。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Roberts C. K., Sindhu K. K., *Life Sci.*, **84**, 705–712 (2009).
- 2) Padmanabhan P., Jangle S. V., *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **4**, 143–146 (2012).
- 3) Sun B. H., MA. Dissertation, Jeju National University, 2015.
- 4) Terada A., *Baiko Gakuin University Repository*, **27**, 42–52 (1994).
- 5) Park S. A., Lee H. M., Ha J. H., Jeon S. H., Park S., *Korean J. Chem. Eng.*, **25**, 468–473 (2014).
- 6) Park S. A., Park J., Park C. L., Jie Y. J., Hwang Y. C., Kim Y. H., Jeon S. H., Lee H. M., Ha J. H., Kim K. J., Park S. N., *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 407–415 (2013).
- 7) Choi J. H., Kim D. W., Park S. E., Lee H. J., Kim K. M., Kim K. J., Kim M. K., Kim S. J., Kim S., *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 181–186 (2015).
- 8) Park S. E., Saptkota K., Choi J. H., Kim M. K., Kim Y. H., Kim K. M., Kim K. J., Oh H. N., Kim S. J., Kim S., *Neurochem. Res.*, **39**, 707–718 (2014).
- 9) Yang J., Kim J. S., Jeong H. J., Kang H. K., Cho J. C., Yeom H. M., Kim M. J., *Afr. J. Biotechnol.*, **10**, 19197–19202 (2011).
- 10) Musa K. H., Abdullah A., Kuswandi B., Hidayat M. A., *Food Chem.*, **141**, 4102–4106 (2013).
- 11) Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evan C., *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1231–1237 (1999).
- 12) Hyun T. K., Kim H. C., Kim J. S., *Ind. Crop Prod.*, **52**, 611–616 (2014).
- 13) Yang J., Kim J. S., Sa Y. J., Kim M. O., Jeong H. J., Yu C. Y., Kim M. J., *Afr. J. Biotechnol.*, **10**, 9438–9444 (2011).
- 14) Jeong J. H., Lee J. W., Kim K. S., Kim J. S., Han S. N., Yu C. Y., Lee J. K., Kwon Y. S., Kim M. J., *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **53**, 33–38 (2010).
- 15) Jin Y., Ahn S. Y., Hong E. S., Li G. H., Kim E. K., Row K. H., *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **16**, 348–353 (2005).

- 16) Shim K. B., Lee H. J., Lee S. J., Cho H. A., Yoon N. Y., Lim C. W., *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.*, **45**, 594–599 (2012).
- 17) Tottmar S. O. C., Petterson H., Kiessling K. H., *Biochem. J.*, **135**, 577–586 (1973).
- 18) Urabe K., Sakai K., Nadamoto T., *Journal of Home Economics of Japan*, **59**, 929–934 (2008).
- 19) Yamada N., Tamura A., Tabuchi M., *Bull. Yamagata Prefect. Yonezawa Women Jr. Coll.*, **38**, 1–6 (2003).
- 20) Nagai S., Oki T., Yoshinaga M., Suda I., *Kyushu Agricultural Research*, **67**, 39 (2005).
- 21) Shinmoto H., Rungchang S., Takano-Ishikawa Y., *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **54**, 459–461 (2007).
- 22) Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K. M., Özyürek M., Güçlü K., *Pure Appl. Chem.*, **85**, 957–998 (2013).
- 23) Rubalya V. S., Neelamegam P., *Int. Food Res. J.*, **22**, 289–294 (2015).
- 24) Kim H. R., Chung H. J., *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **43**, 63–66 (2000).
- 25) Hyun T. K., Kim M. O., Lee H., Kim Y., Kim E., Kim J. S., *Food Chem.*, **141**, 1947–1955 (2013).
- 26) Terpinc P., Čeh B., Ulrih N. P., Abramovič H., *Ind. Crop Prod.*, **39**, 210–217 (2012).
- 27) Yu L., Perret J., Davy B., Wilson J., Melby C. L., *J. Food Sci.*, **67**, 2600–2603 (2002).
- 28) Park B. Y., Min B. S., Oh S. R., Kim J. H., Kim T. J., Kim D. H., Bae K. H., Lee H. K., *J. Ethnopharmacol.*, **90**, 403–408 (2004).
- 29) Moon H. I., *Hum. Exp. Toxicol.*, **30**, 870–875 (2011).
- 30) Santos F. A., Frota J. T., Arruda B. R., de Melo T. S., da Silva A. A., Brito G. A., Chaves M. H., Rao V. S., *Lipids Health Dis.*, **11**, 98 (2012).
- 31) Sharma K. R., Adhikari A., Hafizur R. M., Hameed A., Raza S. A., Kalaunin S. K., Miyazaki J., Choudhary M. I., *Phytother. Res.*, **29**, 1672–1675 (2015).
- 32) Nkobole N., Houghton P. J., Hussein A., Lell N., *Nat. Prod. Commun.*, **6**, 1585–1588 (2011).
- 33) Meng S., Cao J., Feng Q., Peng J., Hu Y., *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 1–11 (2013).
- 34) Gutiérrez-Larraínzar M., Rúa J., Castro I., de Castro C., de Arriaga D., García-armestro M. R., del Valle P., *Food Control*, **26**, 555–563 (2012).
- 35) Moon J. Y., Yim E. Y., Song G., Lee N. H., Hyun C. G., *EurAsia J. Biosci.*, **4**, 41–53 (2010).
- 36) Iwadate T., Nihei K. I., *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 6650–6658 (2015).
- 37) Ding H. Y., Lin H. C., Chang T. S., *J. Cosmet. Sci.*, **60**, 347–352 (2009).
- 38) Cha J. Y., Jung H. J., Jeong J. J., Yang H. J., Kim Y. T., Lee Y. S., *J. Life Sci.*, **19**, 1321–1327 (2009).