



Research Article

Biological activity of *Brassica oleracea* var. *capitata* fermented with *Lactobacillus plantarum*

유산균 발효 양배추의 생리활성 특성

Hyo-Jeong Lee, Se-Eun Park, Jun-Hui Choi, Ki-Man Kim*

이효정 · 박세은 · 최준희 · 김기만*

Department of Food Science and Biotechnology, Gwangju University, Gwangju 61743, Korea

광주대학교 식품생명공학과

Abstract White cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) reportedly exerts antioxidant, anti-inflammatory, and anti-gastric effects. We aimed to evaluate the biological activity of *B. oleracea* fermented with *Lactobacillus plantarum* (FBO). The plant material was fermented for 7 d. The antioxidative potentials of FBO (DPPH radical-scavenging activity, and total phenol and total flavonoid contents) and ability of FBO to inhibit digestive enzymes (α -amylase and lipase) were tested. Anti-inflammatory and anti-allergic effects were also determined by measuring the release of NO, inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-4), β -hexosaminidase and histamine. FBO contained 15.84 \pm 0.25 mg GAE/g phenols and 1.19 \pm 0.09 mg NA/g flavonoids. FBO showed DPPH radical-scavenging activity, and inhibited α -amylase and lipase. It also inhibited of NO, PGE₂ and inflammatory cytokine production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Finally, FBO inhibited degranulation and inflammatory cytokine production in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells, in a dose-dependent manner. Collectively, these observations indicate that white cabbage fermented with *L. plantarum* can be used as a functional material and edible resource in industrial setting.

Keywords *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Lactobacillus plantarum*, anti-inflammatory, anti-allergic



Citation: Lee HJ, Park SE, Choi JH, Kim KM. Biological activity of *Brassica oleracea* var. *capitata* fermented with *Lactobacillus plantarum*. Korean J Food Preserv, 29(2), 241-253 (2022)

Received: December 03, 2021
Revised: December 29, 2021
Accepted: January 04, 2022

***Corresponding author**
 Ki-Man Kim
 Tel: +82-62-670-2444
 E-mail: kmkim@gwangju.ac.kr

Copyright © 2022 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

양배추(*Brassica oleracea* var. *capitata*)는 브로콜리, 컬리플라워 등과 함께 십자화과 식물에 속하며 가장 많이 소비되는 십자화과 채소 중 하나이고, 재배 역사가 가장 오래된 작물로 장수식품 중 하나로 여겨지며, 소비가 꾸준히 증가하고 있다(Hounsoume 등, 2009). 양배추의 영양성분으로 비타민 A 및 B뿐만 아니라 비타민 C와 비타민 K, U 등을 함유하고 있으며, 리놀렌산, 라이신, 포도당이 많이 함유되어 있다(Plumb 등, 1997; Riba 등, 2018). 또한, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, ρ -coumaric acid, lutein, zeaxanthin, sulforaphan, glucosinolate, S-methylmethionine 등의 생리활성 물질을 함유하고 있다(Hayes 등, 2008;

Rice-Evans 등, 1996; Rice-Evans 등, 1997; Sim 등, 1992). 그중 isothiocyanates는 암 예방, 면역 기능 활성화, 항산화 효능 등이 있고, S-methylmethionine은 위궤양 예방 및 치료, 항염증, 통증 억제 효능 등이 있으며, sulforaphan은 항산화, 항암 효과 등이 알려져 있다 (Conaway 등, 2002; Gessler 등, 1991; Hwang과 Nhuan, 2015; Li 등, 2012). 양배추의 생리활성에 대한 다양한 연구가 진행되어 위궤양 예방 및 치료뿐만 아니라 항암, 항산화, 면역 증강, 노화 방지, 체중조절, 혈중 지질 개선, 심혈관계 질환 예방 등이 보고되었다(Hong 등, 2013; Lee 등, 1990; Maritess 등, 2005; Nilsson 등, 2006; Samec 등, 2011; Suido 등, 2002; Zhu 등, 2000).

Lactococcus, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 등을 포함하는 여러 유산균들은 발효를 통해 lactic acid와 여러 유용 대사산물을 생산하며, 장운동 촉진, 면역 증강, 장내 미생물 균총 개선 등의 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 유산균을 이용한 천연물 발효를 통해 항암, 항염, 항균, 항알러지, 피부노화, 미백 등 기능성 증진 및 기능성 소재에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 이를 활용하여 발효식품, 건강기능식품, 의약품, 화장품 등 다양한 분야에서 이용되고 있다(Ha 등, 2010; Jeon 등, 2011; Jun 등, 2014; Kang 등, 2009; Kim과 Lim, 2018; Park, 2012; Park 등, 2006).

양배추 기능성 연구는 주로 용매 추출물을 이용한 연구가 대부분을 차지하고 있으며, 유산균 발효에 의한 양배추 발효물의 기능성을 분석한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *L. plantarum*을 이용하여 양배추 발효물의 항산화 활성, 소화효소 저해활성, 항염증, 항알레르기과 같은 생리활성을 분석함으로써 기능성 식품 소재로 개발하기 위한 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 배양 및 양배추 유산균 발효물 제조

Lactobacillus plantarum ATCC14917 균주는 농업유전자원정보센터(KACC)로부터 분양을 받아 사용하였다. *L. plantarum*는 lactobacilli MRS agar 배지(KisanBio, Seoul, Korea)에 도말하여 37°C에서 48시간 배양하여 형

성된 single colony를 lactobacilli MRS broth 배지(KisanBio, Seoul, Korea)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 접종원으로 사용하였다.

양배추를 세척하고 0.5 mm로 분쇄한 후 *L. plantarum* 종균을 살균한 양배추 중량당 0.5%를 접종하여 37°C에서 7일간 정치배양하였다. 배양 종료 후 반고체 상태의 양배추 발효물과 비발효 양배추를 동결건조기(Ilshin Lab, Dongducheon, Korea)를 이용하여 분말시료를 제조하였으며 -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다.

2.2. 생균수, pH 및 산도 측정

생균수 측정은 배양액 1 mL에 멸균수 9 mL를 넣고 균질화한 다음 10배 희석법으로 희석하여 MRS agar 배지에 도말하였다. 35°C에서 72시간 배양한 다음 형성된 colony 수를 계측하고, 희석배수를 곱하여 유산균 수를 산출하였다. pH는 pH meter(Thermo scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 총 산도는 시료 1 mL를 증류수로 20배 희석한 후 1% phenolphthalein 용액을 가하고 0.1 N NaOH를 첨가하여 적정한 다음, 사용된 NaOH 용액의 양을 유기산 계수로 환산하여 총 산도를 산출하였다.

2.3. 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 분석

총폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 이용하여 측정하였다(Singleton과 Rossi, 1965). ethanol을 이용하여 1 mg/mL로 희석한 시료 100 μ L에 Folin-Denis reagent를 100 μ L를 가하여 혼합한 후 3분간 실온에서 반응시켰다. 3분 후 10% sodium carbonate solution 100 μ L를 가하여 혼합하고, 1시간 반응시킨 후 상층액을 취하여 Microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총폴리페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선을 통해 정량하였다.

총플라보노이드 함량은 Davis(1947)의 방법을 이용하여 측정하였다. ethanol을 이용하여 1 mg/mL로 희석한 시료 100 μ L에 diethylene glycol을 1 mL씩 가하여 혼합한 후, 1 N NaOH를 100 μ L 가하여 잘 혼합하고 37°C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이

용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총플라보노이드 함량은 naringin을 이용하여 작성한 표준곡선을 통해 정량하였다.

2.4. DPPH radical 소거활성 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거능은 Blois(1958)의 방법을 이용하여 측정하였다. DPPH 시약은 0.1 mM 농도가 되도록 methanol에 녹여 사용하였다. methanol로 희석한 시료 100 μ L와 DPPH 시약 0.5 mL를 넣고 20분 동안 빛을 차단한 조건에서 반응시킨 후 Microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH inhibition (\%)} \\ = [1 - (\text{시료 처리군의 흡광도} / \text{시료 무처리군의 흡광도})] \\ \times 100$$

2.5. α -Amylase 저해활성 측정

α -Amylase 저해활성은 Lim 등(2005)의 방법을 이용하여 측정하였다. 증류수로 희석한 시료에 타액 유래 α -amylase 효소액(5 unit/mL, in 50 mM potassium phosphate buffer)와 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 기질 용액인 1% starch를 넣어 교반한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 3,5-dinitrosalicylic acid 용액을 넣고 100°C에서 5분간 끓여 발색시키고 냉각하여 DW를 넣고 교반한 뒤, microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 평가하였다.

2.6. Lipase 저해활성 측정

p-Nitrophenyl butyrate(PNPB)의 substrate(10 mM)를 이용하여 lipase 저해활성을 측정하였다(Park 등, 2014). Substrate solution에 증류수로 희석한 다양한 농도의 시료를 처리한 lipase 10 mU를 가하여 60°C에서 15분 반응시킨 후 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 405 nm에서 10분간

p-nitrophenol(PNP)을 측정하여 V_{max} 또는 흡광도를 분석하였다.

2.7. 세포 배양 및 세포 독성 측정

RAW 264.7 세포, RBL-2H3 세포는 10% fetal bovine serum(FBS), 1X antibiotic-antimycotic를 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지를 사용하며, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양 flask에서 70-80% 정도로 자라게 되면 Trypsin-EDTA를 이용하여 계대배양하며 실험에 이용하였다.

세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide(MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다(Van 등, 2011). 세포를 96-well plates에 분주한 뒤 12시간 동안 배양한 후, 시료를 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지로 희석한 MTT 용액(최종농도: 0.5 mg/mL)을 각 well에 100 μ L씩 처리하고, 37°C에서 4시간 동안 배양하여 MTT를 환원시켰다. 배지를 제거하고 생성된 formazan을 녹이기 위해 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 100 μ L씩 분주하여 10분 동안 혼합한 후 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않고 배지만 처리한 세포를 대조군으로 하여 상대적인 백분율로 세포 생존율을 나타내었다.

2.8. NO 생성량 측정

Nitric oxide(NO)의 생성은 griess reagent를 이용하여 측정하였다. 세포를 24-well plate에 분주하여 12시간 배양한 후에 시료를 농도별로 처리한 다음, lipopolysaccharide(LPS) from *Escherichia coli* O55:B5(1 μ g/mL)를 처리하여 20시간 배양하였다. 세포 배양액 100 μ L와 Griess (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid와 1% α -naphthylamide in H₂O) 시약 100 μ L를 혼합하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 후, microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrate(NaNO₂)로 표준곡선을 작성하여 NO 함량을 산출하였다. 배지만 처리한 세포를 음성 대조군, LPS만 처리한 세포를 양성 대조군으로 하

여 시료 처리군과 활성을 비교하였다.

2.9. 사이토카인 및 PGE₂ 측정

배지 내에 생성된 cytokine 및 Prostaglandin E₂(PGE₂)의 농도는 enzyme-linked immunosorbent assay kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 시료와 LPS를 처리하여 배양이 끝난 후 원심분리하여 상층액을 분리하고 -70°C에 보관하였다. 제조사에서 제공한 분석방법에 따라 수행하고, ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Standard의 흡광도로 표준곡선을 구하고, 이를 이용하여 사이토카인과 PGE₂의 양을 정량하였다. 배지만 처리한 세포를 음성 대조군, LPS 또는 DNP-bovine serum albumin(DNP-BSA)만 처리한 세포를 양성 대조군하여 시료 처리군과 활성을 비교하였다.

2.10. β -Hexosaminidase 및 histamine 저해활성

탈과립은 β -hexosaminidase 측정을 이용하여 확인하였다(Matsuda, 2002). Dinitrophenyl-immunoglobulin E(DNP-IgE)를 함유한 DMEM 배지를 사용하여, 24-well plates에 세포를 분주하고 배양하였다. 각 세포들을 Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 씻어준 후, 37°C에서 동일한 buffer로 10분간 전 배양하였다. 이후 시료를 농도별로 희석시켜 세포에 처리하고 30분 동안 반응시킨 후 DNP-BSA를 가하여 2시간 동안 반응시키고, ice bath에서 10분간 배양하여 반응을 종결시켰다. 상층액 40 μ L에 substrate buffer(2 mM 4-p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide, 0.05 M sodium citrate, pH 4.5) 40 μ L를 가하고, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 각 well에 stop solution (0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 10.5) 200 μ L를 가하여 반응을 종결시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Histamine은 Shore 등(2013)의 방법을 이용하여 측정하였다. 세포 배양액 25 μ L를 넣고 0.1 N HCl 22.5 μ L, 60% HClO 42.5 μ L를 넣고 반응시킨 후 원심분리하고 상층액 40 μ L와 5 N NaOH 25 μ L, n-butanol 500 μ L, NaCl 0.06 g을 혼합하여 진탕 후 원심분리하였다. Butanol층

400 μ L와 0.1 N HCl 용액 150 μ L, n-heptane 0.5 mL를 혼합하여 진탕 후 원심분리하고, 수층 100 μ L와 1 N NaOH 용액 200 μ L, 0.1% o-phthaldialdehyde 용액 5 μ L를 혼합 후 37°C에서 3분 동안 반응시켰다. 이후 3 N HCl 10 μ L를 넣고 2분 동안 반응시킨 후 360 nm(excitation)와 450 nm(emission)에서 흡광도를 측정하였다.

배지만 처리한 세포를 음성 대조군, LPS 또는 DNP-BSA만 처리한 세포를 양성 대조군으로 하여 시료 처리군과 활성을 비교하였다.

2.11. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였으며, 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 SPSS 20 (SPSS Inc, Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way ANOVA 분석 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 양배추 유산균 발효물의 생균수, pH 및 산도

유산균을 이용하여 발효된 양배추 발효물의 배양 시간별 생균수, pH 및 산도 변화는 Table 1에 나타내었다. 양배추의 발효 시간별 생균수는 1일 이후 7.53±0.31 log CFU/mL의 생균수를 나타내었으며, 발효 기간이 증가할수록 생균수는 증가하여 발효 7일에 생균수가 10.40±0.08 log CFU/mL로 최대값을 나타내었고, 발효 10일 후에는 9.05±0.13 log CFU/mL 감소하는 경향을 나타내었다. pH 및 산도는 무발효 시 pH 5.27 및 0.14%를 나타냈지만 발효 1일 이후 각각 pH 4.69 및 0.14%를 나타냈으며, 발효 10일 후에는 각각 pH 3.70 및 0.60으로 감소 및 증가를 나타냈다. 유산균 발효에 의한 pH의 감소 및 산도의 증가는 유산균에 의해 생성된 유기산, 젖산 및 아세트산 등에 의해 나타나는 것으로 여겨지며, 이는 Ryu 등(2018)의 연구에서 유산균 발효에 의해 pH의 감소, 산도가 증가한다는 보고와 유사한 결과를 나타냈다. 이러한 낮은 pH 및 높은 산도가 유산균 생육에 영향을 주어 생균수가 증가 후 감소하는 것으로 여겨지며, 생균수 측정 결과에 따라 최대값을 나타낸 발효 7일 후의 유산균 발효물을 이용하여 기능성을 평가하였다.

Table 1. Viable cell count, pH, and total acidity of *B. oleracea* fermentation with *L. plantarum*

	Fermentation time (day)					
	0	1	3	5	7	10
Viable cell count (log CFU/mL)	-	7.53±0.31 ¹⁾	9.19±0.15 ^f	8.48±0.15 ^a	10.40±0.08 ^b	9.05±0.13 ^b
Total acidity (%)	0.14±0.03 ^a	0.14±0.02 ^b	0.12±0.01 ^c	0.14±0.01 ^d	0.34±0.01 ^e	0.60±0.04 ^f
pH	5.27±0.01 ^d	4.69±0.01 ^c	3.97±0.01 ^e	3.83±0.02 ^c	3.77±0.01 ^a	3.70±0.01 ^a

¹⁾Mean±SD (n=3) within each column.

^{a-f}Mean within the same row followed letter are significantly different (p<0.05).

3.2. 양배추 유산균 발효물의 총페놀 및 총플라보노이드 함량

폴리페놀 화합물은 식물에 존재하는 대사산물로 다양한 분자구조를 가지며, 2개 이상의 phenolic hydroxyl(-OH)기를 가진다. 식물의 항산화 활성은 페놀화합물이 원인 물질로 알려져 있다. 항산화 외에도 항염 및 항암, 항에이즈, 충치예방 등과 같은 다양한 생리활성기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 1992). 또한, 플라보노이드는 폴리페놀계 화합물 중 하나로 항산화 활성뿐만 아니라, 다양한 생리활성 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 양배추 유산균 발효물의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량에 대한 결과는 Table 2에 나타내었다. 총폴리페놀 함량 측정 결과, 15.84±0.25 mg GAE/g으로 측정되었으며, 총플라보노이드 함량 측정 결과 1.19±0.09 mg NA/g으로 측정되었다. 양배추 유산균 발효물에 함유된 폴리페놀계 화합물로부터 여러 가지 생리활성 기능을 기대할 수 있는 것으로 사료된다.

3.3. 양배추 유산균 발효물의 DPPH radical 소거활성

DPPH는 분자 내에 free radical을 함유하고 있으며, 항산화 물질에 의해 환원되어 자색이 탈색되는 정도를 측정하여 항산화 물질의 항산화 효과를 측정할 때 이용된다(Ramrathnam 등, 1995). 양배추 유산균 발효물의 DPPH

Table 2. The contents of total contents and total flavonoid contents of *B. oleracea* fermented with *L. plantarum*

Sample	Polyphenol contents (mg GAE ¹⁾ /g)	Flavonoid contents (mg NA ²⁾ /g)
Fermented <i>B. oleracea</i>	15.84±0.25 ³⁾	1.19±0.09

¹⁾GAE, gallic acid equivalent.

²⁾NA, naringin equivalent.

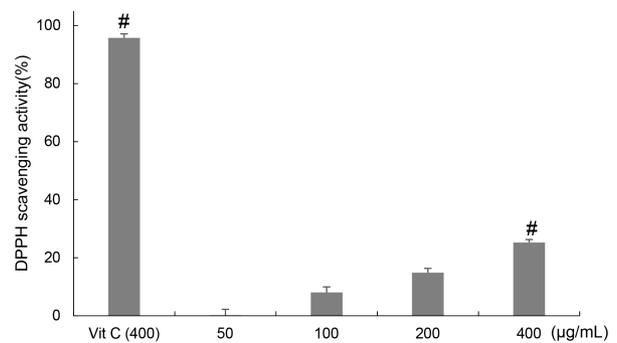
³⁾Mean±SD (n=3) within each column followed by different letters are significantly different (p<0.05).

radical 소거활성을 평가한 결과, 50, 100, 200, 400 µg/mL에서 0.20±0.06, 8.04±0.06, 14.84±0.90, 25.24±0.37% 소거활성을 나타내었다(Fig. 1). 이를 통해 양배추 유산균 발효물의 DPPH radical 소거 활성을 확인하였으며 항산화 활성을 가진 천연소재로서 활용이 가능할 것으로 사료된다.

3.4. 양배추 유산균 발효물의 소화효소 저해활성

α-Amylase는 녹말, glycogen 등을 포함하는 다당류에 작용하여 포도당과 엿당으로 분해하는 소화효소다. 탄수화물의 분해와 포도당의 농도를 조절하는 데 중요한 역할을 하며, α-amylase의 억제제는 혈당 상승을 억제하도록 돕는다(Tan 등, 2017). α-amylase 저해활성에 평가한 결과, 50, 100, 200, 400 µg/mL에서 각각 11.16±1.37, 25.82±2.68, 39.08±3.85, 45.18±3.37%의 저해율을 확인하였다(Fig. 2(A)).

Lipase는 triacylglycerol을 2-monoacylglycerol과 두 분자의 fatty acid로 분해하는 효소로 작용하며, 섭취된

**Fig. 1.** DPPH radical scavenging activity of *B. oleracea* fermented with *L. plantarum*. All values were expressed as the mean±SD of triplicate analyses. #p<0.05 vs. control group.

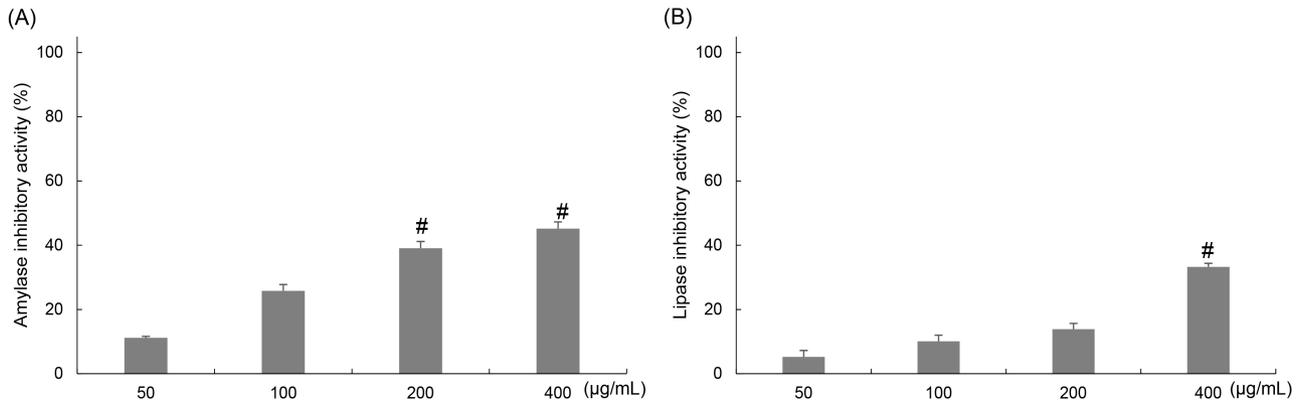


Fig. 2. Effect of *B. oleracea* fermented with *L. plantarum* on digestive enzyme activity. (A) α -amylase and (B) lipase. All values were expressed as the mean \pm SD of triplicate analyses. [#]p<0.05 vs. control group.

지방의 체내 흡수에 있어 매우 중요한 역할을 한다(Park 등, 2014). 양배추 유산균 발효물의 pancreatic lipase의 억제 활성을 *in vitro*에서 확인하였다. Lipase 저해활성을 평가한 결과, 50, 100, 200, 400 µg/mL에서 각각 5.22 \pm 0.36, 10.08 \pm 0.58, 13.85 \pm 0.51, 33.28 \pm 0.63%의 저해 활성을 확인했지만, α -amylase 저해활성에 비해 낮은 활성을 나타냈다(Fig. 2(B)). 이 결과를 통해 소화효소들의 억제 활성을 확인하였으며, 이러한 효소들의 억제를 통해 각 영양소의 흡수율을 억제시킴으로써 체내에 과도하게 지방이 축적되는 것을 예방할 수 있어 비만 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

3.5. 양배추 유산균 발효물에 의한 세포 생존율 변화

양배추 유산균 발효물이 RAW 264.7 세포와 RBL-2H3 세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 이용하여 확인하였다(Fig. 3). 비발효 양배추와 양배추 유산균 발효물을 0, 100, 200, 300, 400, 500, 700, 1,000 µg/mL 농도로 24시간 동안 처리했다. RAW 264.7 세포에서는 비발효 양배추는 1,000 µg/mL, 양배추 유산균 발효물은 700 µg/mL 이상의 농도에서 세포 생존율이 감소하였다. RBL-2H3 세포에서는 비발효 양배추, 양배추 유산균 발효물 모두 1,000 µg/mL에서 세포 생존율이 감소함을 확인하였다. 따라서 항염증 및 항알러지 실험은 세포 생존율에

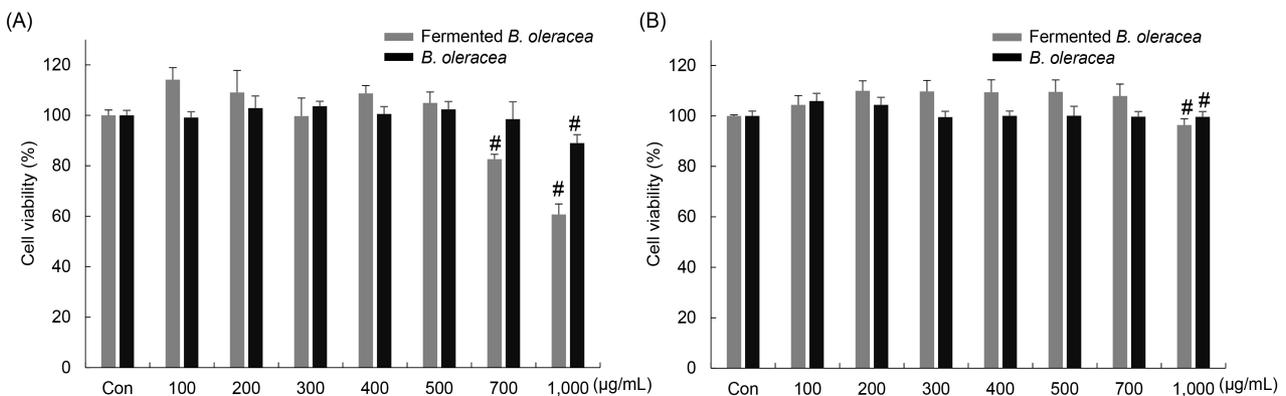


Fig. 3. Effect of *B. oleracea* fermented with *L. plantarum* and *B. oleracea* on cell viability in (A) RAW 264.7 cells and (B) RBL-2H3 cells. Cells were treated with fermented *B. oleracea* and *B. oleracea* for 24 h. After incubation, cell viability was assessed using the MTT method. Data show mean \pm SD values of three independent experiments. [#]p<0.05 vs. control group.

영향을 주지 않는 농도 범위에서 진행하였다.

3.6. 양배추 유산균 발효물의 NO 및 PGE₂ 생성 저해활성

NO는 염증 매개 물질로 L-arginine에서 NO synthase (NOS)에 의해 합성된다. 박테리아나 종양을 제거하는 역할을 하기도 하지만 거의 모든 염증 반응에 관여한다. 과도하게 생성된 NO는 독성을 나타내며, 체내 조직의 손상, 관절염, 폐혈성 쇼크 등의 염증반응과 관련된 질병을 유발하기도 한다(Jung 등, 2010). 또, 다른 염증 매개 물질인 PGE₂는 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해 합성되며, Th2 세포의 활성을 유도해 염증성 사이토카인의 생성을 유도한다. 이뿐만 아니라 종양의 세포 사멸을 억제하고 혈관 생성을 유도하여 종양 생성에 기여한다(Jang 등, 2006). 염증 반응 억제 효과를 확인하기 위해 NO와 PGE₂의 생성에 대한 양배추 유산균 발효물의 억제 효과를 측정하였다. 비발효 양배추와 양배추 유산균 발효물을 100, 200, 300 µg/mL 농도로 전처리한 후 LPS를 처리하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO 및 PGE₂ 양을 분석하였다(Fig. 4). LPS만 단독 처리한 군을 기준으로 양배추 유산균 발효물을 처리한 경우에는 14.57±0.25, 48.42±0.09, 65.26±0.18%, 비발효 양배추를 처리한 군에서는 3.24±0.31, 10.93±0.17, 23.02±0.23%의 NO 생성이 감소되었으며, 비발효 양배추에 비해 양배추 유산균 발효물의 NO 생성 억제 효과가 높은 것으로

나타났다. PGE₂의 경우, LPS만 단독 처리한 군을 기준으로 양배추 유산균 발효물을 처리한 경우에는 14.66±0.09, 31.26±0.10, 70.95±0.15%, 비발효 양배추를 처리한 군에서는 3.61±0.07, 9.39±0.11, 31.08±0.21%의 PGE₂ 생성이 감소되었으며, 비발효 양배추에 비해 양배추 유산균 발효물의 PGE₂ 생성 억제 효과가 높은 것으로 나타났다. Park 등(2018)의 연구에 의하면 *L. plantarum* 발효에 의해 층꽃나무의 항염증 능력이 향상되며, 미생물 발효가 생리활성 변화에 좋은 영향을 미치는 것으로 보고하였고, 본 연구와 유사한 경향을 나타내었다. 이 결과를 통해 유산균 발효에 의해 염증 억제 효과가 증가됨을 확인하였고, 양배추 유산균 발효물은 대식세포주에서 LPS에 의해 유발된 NO 및 PGE₂와 같은 염증 매개 물질 억제를 시킴으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

3.7. 양배추 유산균 발효물의 염증성 사이토카인 분비 저해 활성

사이토카인은 면역세포의 활성, 증식 및 분화를 조절하여 염증반응을 매개하는 인자로, 대식세포와 같은 면역 관련 세포에서 사이토카인을 분비하여 다양한 염증반응을 매개하며, NO와 PGE₂ 생성을 유도한다. 사이토카인 중 tumor necrosis factor(TNF)-α, interleukin(IL)-1β는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 염증반응을 조절하는 물질로 대표적인 염

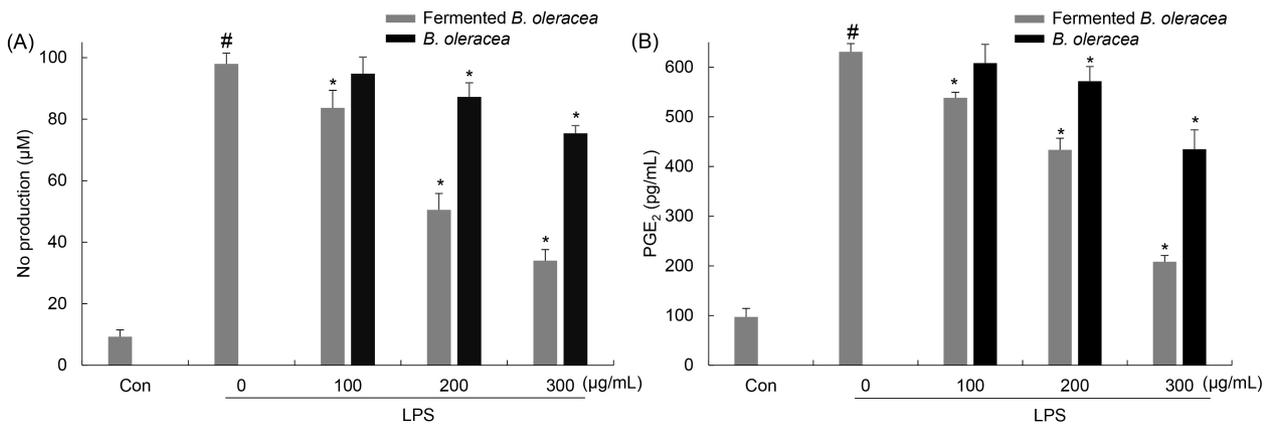


Fig. 4. Effect of *B. oleracea* fermented with *L. plantarum* and *B. oleracea* on NO and PGE₂ production in RAW 264.7 cells. The cells were pretreated with the different concentrations of fermented *B. oleracea* and *B. oleracea* for 2 h and then exposed to 1 µg/mL LPS for 20 h. The levels of NO in the supernatant was determined by griess reagent. Data show mean±SD values of three independent experiments. #p<0.05 vs. control group; *p<0.05 vs. LPS treated group.

증성 사이토카인으로 알려져 있다. TNF- α 는 세포 증식, 생존, 분화, 사멸을 조절하며, 염증반응 동안 생성이 증가하여 IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인 생성에 주도적인 역할을 하며, IL-1 β 는 면역 방어와 상처에 대한 반응에 관여한다 (Kielian 등, 2004; Levine 등, 1990). LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 세포에서 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 비발효 양배추와 양배추 유산균 발효물을 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 전처리하고, LPS를 처리한 후 ELISA를 이용하여 측정하였다(Fig. 5). IL-1 β 의 생성은 LPS만 단독 처리한 군을 기준으로 양배추 유산균 발효물을 처리한 군에서는 15.23 \pm 0.23, 30.19 \pm 1.01, 59.54 \pm 0.28%, 비발효 양배추를 처리한 군에서는 7.14 \pm 0.02, 24.93 \pm 0.27, 48.10 \pm 0.34%의 IL-1 β 생성이 감소하였으며, 유산균 발효에 의해 IL-1 β 생성 억제 효과가 증가됨을 확인하였다. TNF- α 의 경우에도 LPS만 단독 처리한 군을 기준으로 양배추 유산균 발효물을 처리한 군에서는 19.92 \pm 1.37, 45.31 \pm 0.16, 74.29 \pm 1.26%, 비발효 양배추를 처리한 군에서는 7.94 \pm 0.007, 28.35 \pm 0.33, 41.17 \pm 0.22%의 TNF- α 생성이 감소하였으며, IL-1 β 생성 억제와 유사한 양상을 나타냄을 확인하였다. Tak 등(2014)의 *L. rhamnosus*를 이용한 흑마늘 발효물의 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 IL-1 β 는 41.4%, TNF- α 는 35.4%의 억제율을 나타낸 결과와 비교했을 때, 양배추 유산균 발효물의 염증성

사이토카인 억제 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 양배추 유산균 발효물은 염증성 사이토카인의 분비 억제를 통해 염증 유도 및 관련인자를 조절하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

비만세포는 high-affinity IgE receptor(Fc ϵ RI)에 의해 다양한 사이토카인을 생성하며, 이로 인해 염증반응 유도인자들의 발현을 촉진시켜 염증성 알레르기 반응을 유발한다. 그 중, IL-4는 T림프구나 비만세포 등에서 생성되며, I형 알레르기 반응을 유발하는 IgE의 생성을 유도하고 매개성 면역반응을 조절하며, 실제 환자들에게서 IL-4의 생성이 증가되는 것이 보고되었다(Ngoc 등, 2005). 또한, TNF- α 는 체내 알레르기 반응이 시작되면 비만세포에서 탈과립되면서 히스타민 및 다른 염증 매개인자들과 함께 유출되며 또 다른 사이토카인 및 염증반응 매개인자들의 생성을 유도하여 알레르기 및 염증 반응을 더욱 악화시킨다(Chung과 Barnes, 1999). 비발효 양배추와 양배추 유산균 발효물을 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 DNP-BSA로 알레르기 반응을 유도한 RBL-2H3 세포에서 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 ELISA를 이용하여 측정하였다(Fig. 6). IL-4의 경우, DNP-BSA만 단독 처리한 군을 기준으로 양배추 유산균 발효물을 처리한 군에서는 13.37 \pm 0.22, 29.13 \pm 0.98, 47.76 \pm 1.07, 비발효 양배추를 처리한 군에서는 2.38 \pm 0.38, 14.28 \pm 0.09, 18.09 \pm

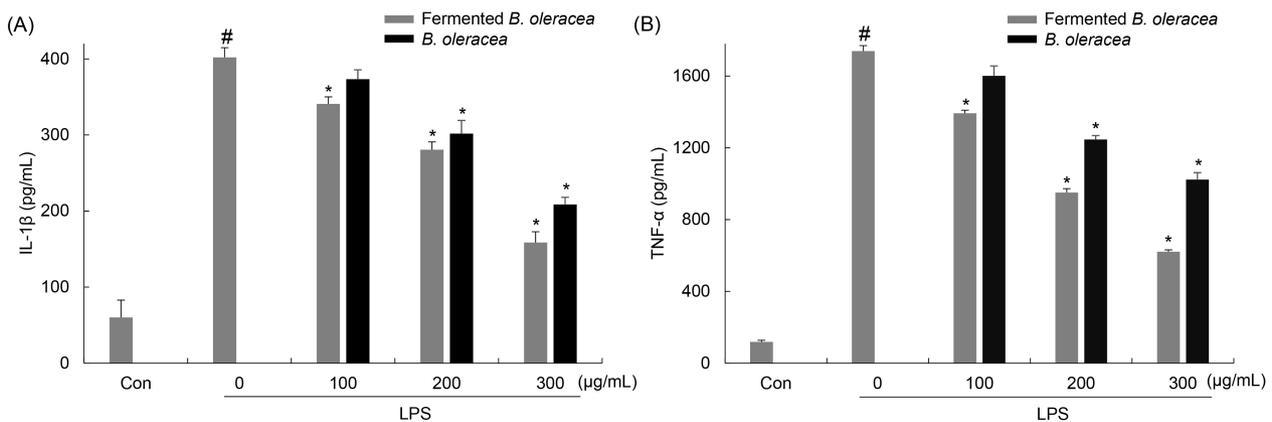


Fig. 5. Effect of *B. oleracea* fermented with *L. plantarum* and *B. oleracea* on inflammatory cytokine in RAW 264.7 cells. The cells were pretreated with the different concentrations of fermented *B. oleracea* and *B. oleracea* for 2 h and then exposed to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS for 20 h. Cytokines were determined by ELISA. The data presented are the means \pm SD of three independent experiments. # p <0.05 vs. control group; * p <0.05 vs. LPS treated group.

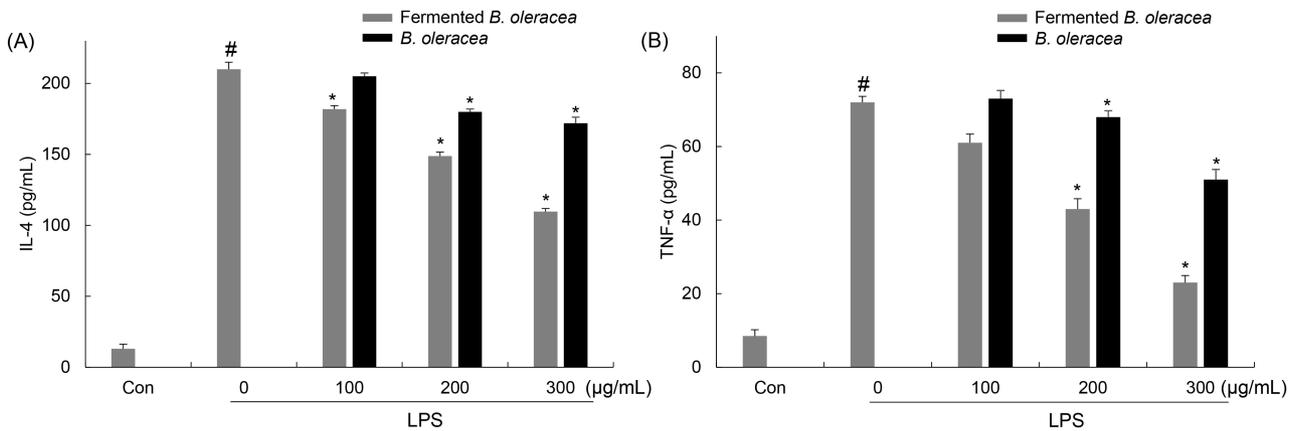


Fig. 6. Effect of *B. oleracea* fermented with *L. plantarum* and *B. oleracea* on inflammatory cytokine in RBL-2H3 cells. Cells were sensitized with anti-DNP IgE for 24 h and stimulated by DNP-BSA. Fermented *B. oleracea* and *B. oleracea* were pretreated for 1 h prior to DNP-BSA stimulation for 2 h. Cytokines were determined by ELISA. The data presented are the means \pm SD of three independent experiments. [#] p <0.05 vs. control group; ^{*} p <0.05 vs. DNP-BSA treated group.

0.05%를 감소하였다(Fig. 6). TNF- α 의 경우에도 DNP-BSA만 단독 처리한 군을 기준으로 양배추 유산균 발효물을 처리한 군에서는 15.27 ± 0.09 , 40.27 ± 2.17 , $72.22\pm 1.95\%$, 비발효 양배추를 처리한 군에서는 1.02 ± 0.02 , 5.28 ± 0.09 , $29.16\pm 1.12\%$ 로 감소하였다(Fig. 6). 이 결과를 통해서 DNP-BSA 단독 처리군에 비해 양배추 유산균 발효물에 의해서 IL-4와 TNF- α 생성이 감소한 것을 나타냈으며, 유산균 발효에 의해 IL-4와 TNF- α 생성 억제 효과가 증가하였음을 확인하였다. Park 등(2018)의 연구에서 *B. breve*를 이용한 썬바귀와 썬바귀 발효물은 $50\ \mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 IL-4는 37%와 41.4%, TNF- α 는 13%와 35.4%의 억제율을 나타냈으며, 발효에 의해 사이토카인의 생성 억제 효과가 증가됨이 보고되어 양배추 본 연구와 유사한 결과를 보여주었다. 따라서 양배추 유산균 발효물이 DNP-BSA로 자극한 RBL-2H3 세포에서 전염증성 사이토카인 IL-4와 TNF- α 의 생성을 억제하여 염증성 알레르기를 억제하는 효능을 가지고 있는 것으로 사료된다.

3.8. 양배추 유산균 발효물의 β -hexosaminidase 및 histamine 분비 저해활성

Histamine은 알레르기 반응 전에도 존재하고 있으며, 알레르기 유발 자극을 받으면 외부로 유리된다(Schwartz와 Huff, 1998). β -Hexosaminidase은 비만세포의 분비 과립

안에 저장되어 있으며, 알레르기 반응에 의해 histamine을 세포 밖으로 분비하므로 비만세포 탈과립의 지표인자로 이용된다(Galli 등, 2005). 비발효 양배추와 양배추 유산균 발효물을 100, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 RBL-2H3 세포 배양액 중에 존재하는 β -hexosaminidase 활성과 histamine 분비량을 분석하였다(Fig. 7). 탈과립에 의해 분비된 β -hexosaminidase 활성을 측정된 결과, 배지만 처리한 군에 비해 DNP-BSA만 단독 처리한 군에서는 β -hexosaminidase 생성이 195%로 증가하였고, 양배추 유산균 발효물을 처리한 군에서는 180, 163, 121%, 비발효 양배추를 처리한 군에서는 192, 188, 173%로 생성이 감소하였다. 이를 통해서 유산균 발효에 의해 β -hexosaminidase 생성 억제 효과가 증가함을 확인하였다. Kang과 Kim(2011)의 연구에서 유산균 발효에 의한 발효 한약이 RBL-2H3 세포 내 β -hexosaminidase의 방출을 억제하는 것을 통해 알레르기 저해 효과를 나타내었으며, 이는 비발효 한약보다 높은 저해 효과를 나타낸다고 보고되어 본 연구와 유사한 결과를 보여주었다.

또한, 탈과립 후 유리되는 histamine 양을 측정된 결과, DNP-BSA만 단독 처리한 군을 기준으로 비발효 양배추를 처리한 군에서는 24.87 ± 1.75 , 43.39 ± 2.01 , $70.93\pm 1.99\%$, 양배추 유산균 발효물을 처리한 군에서는 10.87 ± 0.08 , 16.62 ± 1.31 , $39.62\pm 1.74\%$ 로 histamine 생성이 감소하

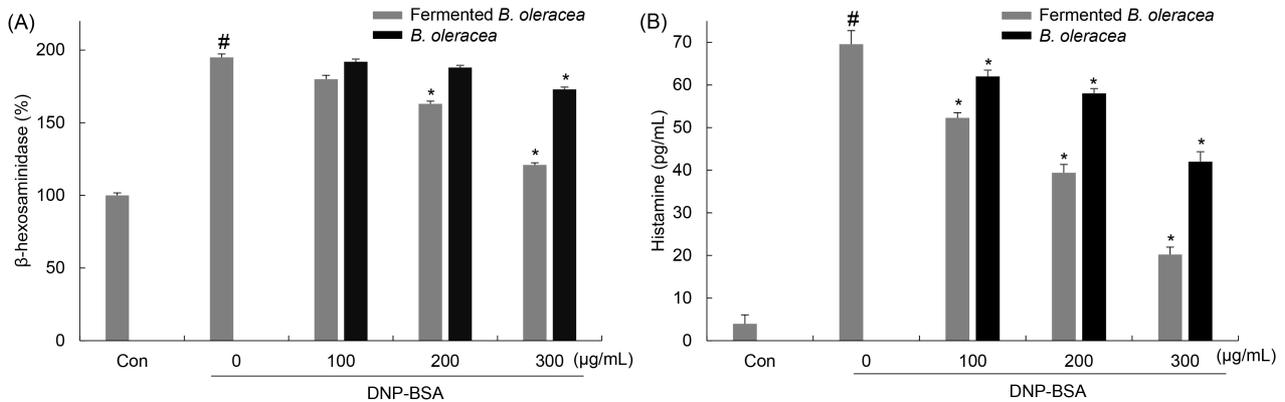


Fig. 7. Effect of *B. oleracea* fermented with *L. plantarum* and *B. oleracea* on degranulation of (A) β -hexosaminidase and (B) histamine release in RBL-2H3 cell. Cells were sensitized with anti-DNP IgE for 24 h and stimulated by DNP-BSA. Fermented *B. oleracea* and *B. oleracea* were pretreated for 1 h prior to DNP-BSA stimulation for 2 h. (A) β -Hexosaminidase was measured at 405 nm with a microplate reader. (B) Histamine was measured with excitation at 360 nm and emission at 450 nm with a fluorometer. The data presented are the means \pm SD of three independent experiments. [#] $p < 0.05$ vs. control group; ^{*} $p < 0.05$ vs. DNP-BSA treated group.

였으며, β -hexosaminidase와 유사한 경향을 나타냈다 (Fig. 7). 이러한 결과를 통해서 양배추 유산균 발효물은 활성화된 비만세포에서 β -hexosaminidase와 histamine 분비를 억제함으로써 알레르기 증상 개선에 효과가 있을 것으로 사료된다.

4. 요약

본 연구에서는 다양한 생리활성을 가지고 있는 양배추의 기능성 식품 소재로의 활용 가능성을 확인하고자 유산균인 *L. plantarum*을 이용한 양배추 발효물을 제조하여 발효물의 생리활성을 분석하였다. 양배추 유산균 발효물의 페놀 함량과 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거 활성을 통해서 항산화 활성을 확인하였으며 소화효소인 α -amylase, lipase에 대한 저해활성을 갖고 있는 것으로 확인되었다. 또한, RAW 264.7에 LPS 처리에 의한 염증 반응 억제 효과를 확인한 결과, 양배추 유산균 발효물을 처리한 군에서는 NO의 생성이 감소하였으며, 염증반응을 유발하는 염증성 사이토카인 IL-1 β , TNF- α 및 PGE₂의 생성이 모두 발효물을 처리에 의해 감소됨을 확인하였다. DNP-IgE와 DNP-BSA로 자극시킨 RBL-2H3 세포를 이용하여 알레르기 억제 효과를 확인한 결과, 양배추 유산균 발효물을 처리하지 않은 군에서는 β -hexosaminidase와 histamine의 분비가

증가하였지만, 발효물을 처리한 군에서는 분비량이 감소되었고, IL-4와 TNF- α 생성도 발효물을 처리한 군에서 감소됨을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 양배추 유산균 발효물은 항산화, 소화효소 저해, 항염증 및 항알레르기 활성을 가지고 있는 것을 확인하였으며, 향후 다양한 분야에서 기능성 소재로의 활용이 가능할 것으로 생각된다.

하지만 유효 물질에 대한 분리, 정제에 대한 연구와 생리활성에 대한 작용 기전 연구 등에 대한 심층적이고 체계적인 추후 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부에서 시행한 2020년도 사회적 혁신성장사업(R&D)(과제번호: P0013016)의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Park SE. Data curation: Park SE. Formal analysis: Park SE. Methodology: Lee HJ. Validation: Choi JH. Writing - original draft: Lee HJ.

Writing - review & editing: Lee HJ, Park SE, Kim KM.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Hyo-Jeong Lee (First author)

<https://orcid.org/0000-0002-9494-9369>

Se-Eun Park

<https://orcid.org/0000-0001-6644-3080>

Jun-Hui Choi

<https://orcid.org/0000-0001-6725-381X>

Ki-Man Kim (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0002-2325-077X>

References

- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200 (1958)
- Chung KF, Barnes PJ. Cytokine in asthma. *Thorax*, 54, 825-857 (1999)
- Conaway CC, Yang YM, Chung FI. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: Their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Curr Drug Metab*, 3, 233-255 (2002)
- Davis WB. Determination of flavonones in citrus fruits. *Anal Chem*, 19, 476-478 (1947)
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 6, 135-142 (2005)
- Gessler NN, Bezzubov AA, Podlepa EM, Bykhovski VY. S-methylmethionine (vitamin U) metabolism in plants. *Appl Biochem Microbiol*, 27, 275-280 (1991)
- Ha JH, Seo YC, Choi WY, Kim JS, Kim HH, Ahn JH, Lee HY. Enhancement of antioxidant activities of bark of *Berberis koreana* palibin by lactic acid fermentation. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 18, 421-428 (2010)
- Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston IM. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Euro J Nutr*, 47, 73-88 (2008)
- Hong YJ, Kim SY, Han J, Lim YI, Park KY. Inhibitory effects of cabbage juice and cabbage-mixed juice on the growth of AGS human gastric cancer cells and on HCl-ethanol induced gastritis in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 42, 682-689 (2013)
- Hounscome N, Hounscome B, Tomos D, Edwards-Jones G. Changes in antioxidant compounds in white cabbage during winter storage. *Postharvest Biol Technol*, 52, 173-179 (2009)
- Hwang ES, Nhuan DT. Impact of cooking method on bioactive compound content and antioxidant capacity of cabbage. *Korean J Food Sci Technol*, 47, 184-190 (2015)
- Jang SI, Jun CS, Kwak KC, Bae MS, Lee JH, Kim KY, Yun YG, Chai GY. Evaluation of Korean phytomedicinal plants on inhibition of prostaglandin E₂ (PGE₂) production and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated U937 cells. *J Physiol & Pathol Korean Med*, 20, 455-459 (2006)
- Jeon JM, Choi SK, Kim YJ, Jang SJ, Cheon JW, Lee HS. Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria. *J Soc Cosmet Sci Korea*, 37, 75-81 (2011)
- Jun DH, Cho WA, Lee JB, Jang MJ, You MS, Park JY, Kim SH, Lee JT. Antioxidant activity of chestnut (*Castanea crenata* S. et Z.) bur fermented by *Lactobacillus casei*. *J Life Sci*, 24, 1193-1199 (2014)
- Jung JY, Lee JR, Byun SH, Jung JW, Kim YH, Kim SC. Inhibitory effect of *Dioscorea bulbifera* MeOH extract on pro-inflammatory mediator *in vitro* and *in vivo*. *J Physiol & Pathol Korean Med*, 24, 310-318 (2010)
- Kang DH, Kim HS. Functionality analysis of korean medicine fermented by *Lactobacillus* strains.

- Korean J Microbiol Biotechnol, 39, 259-265 (2011)
- Kang MS, Oh HJ, Lee HC, Oh JS. Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. J Bacteriol Virol, 39, 11-19 (2009)
- Kielian T, Bearden ED, Baldwin AC, Esen N. IL-1 and TNF-alpha play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced experimental brain abscess. J Neuropathol Exp Neurol, 63, 381-396 (2004)
- Kim KY, Nam KA, Kurihara H, Kim SM. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. Phytochemistry, 69, 2820-2825 (2008)
- Kim SK, Lim SD. Functionality and research trend of probiotics. Food Ind Nutr, 23, 18-24 (2018)
- Lee GD, Kim JS, Bae JO, Yoon HS. Antioxidative effectiveness of water extract and ether in wormwood (*Artemisia montana* Pampan). J Korean Soc Food Nutr, 21, 17-22 (1992)
- Lee YS, Jang WS, Eui MJ, Lee SJ, Jang JJ. Inhibitory effect of Chinese cabbage extract on diethylnitrosamine-induced hepatic foci in Sprague-Dawley rats. J Korean Cancer Assoc, 22, 355-359 (1990)
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. N Engl J Med, 323, 236-241 (1990)
- Li Z, Liu Y, Fang Z, Yang L, Zhuang M, Zhang Y, Sun P. Development and verification of sulforaphane extraction method in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italic* Planch.). J Med Plants Res, 6, 4796-4803 (2012)
- Lim CS, Li CY, Kim YM, Lee WY, Rhee HI. The inhibitory effect of *Cornus walteri* extract against α -amylase. J Korean Soc Appl Biol Chem, 48, 103-108 (2005)
- Maritess C, Small S, Waltz-Hill M. Alternative nutrition therapies in cancer patients. Semin Oncol Nurs, 21, 173-176 (2005)
- Matsuda H, Morikawa T, Sakamoto Y, Toguchida I, Yoshikawa M. Labdane-type diterpenes with inhibitory effects on increase in vascular permeability and nitric oxide production from *Hedychium coronarium*. Bioorg Med Chem, 10, 2527-2534 (2002)
- Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedon JC. Cytokine, allergy, and asthma. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 5, 161-166 (2005)
- Nilsson J, Olsson K, Engqvist G, Ekvall J, Olsson M, Nyman M, Åkesson B. Variation in the content of glucosinolates, hydroxycinnamic acids, carotenoids, total antioxidant capacity and low-molecularweight carbohydrates in *Brassica* vegetables. J Sci Food Agric, 86, 528-538 (2006)
- Park EK, Sung JH, Trinh HT, Bae EA, Yun HK, Hong SS, Kim DH. Lactic acid bacterial fermentation increases the antiallergic effects of *Ixeri dentate*. J Microbiol Biotechnol, 18, 308-313 (2008)
- Park JA, Jin KS, Lee JY, Kwon HJ, Kim BW. Antioxidative and anti-obesity effects of *Amomum cardamomum* L. extract. Kor J Microbiol Biotechnol, 42, 249-257 (2014)
- Park KY. Increased health functional of fermented foods. J Korean Soc Food Sci Nutr, 17, 1-8 (2012)
- Park MJ, Park HJ, Lee EH, Jung HY, Cho YJ. Anti-inflammatory effect potentials of ethanol extracts from fermentated *Caryopteris incana* by *Lactobacillus plantarum* on induced to LPS with Raw 264.7 cell. J Appl Biol Chem, 61, 141-150 (2018)
- Plumb GW, Chambers SJ, Lambert N, Wanigatunga S, Williamson G. Influence of fruit and vegetable extracts on lipid peroxidation in microsomes containing specific cytochrome P450s. Food Chem, 60, 161-164 (1997)
- Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S.

- The contribution of plant food antioxidants to human health. *Food Sci Technol*, 6, 75-82 (1995)
- Riba D, Hasan A, Swaroop N, Thomas T, David AA, Rao S. Effects of organic and inorganic source of nutrients on physio-chemical properties of soil and yield of cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Int J Chem Stud*, 6, 2196-2200 (2018)
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med*, 20, 933-956 (1996)
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, 2, 152-159 (1997)
- Schwartz LB, Huff TF. Biology of mast cells. In: Allergy, Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkins NF, Yunginger JW, Busse WW (Editors), 5th ed, Principles and Practice, St. Louis, MO, USA, p 261-276 (1998)
- Shim KH, Sung NK, Kang KS, Ahn CW, Seo KI. Analysis of glucosinolates and the change of contents during processing and storage in *Cruciferous* vegetables. *J Korean Soc Food Nutr*, 21, 43-48 (1992)
- Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther*, 127, 182-186 (1959)
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16, 144-158 (1965)
- Suido H, Tanaka T, Tabei T, Takeuchi A, Okita M, Kishimoto T, Kasayama S, Higashino K. A mixed green vegetable and fruit beverage decreased the serum level of low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic patients. *J Agric Food Chem*, 50, 3346-3350 (2002)
- Tak HM, Kang MJ, Kim KM, Kang DW, Han S, Shin JH. Anti-inflammatory activities of fermented black garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 43, 1527-1534 (2014)
- Tan Y, Chang SK, Zhang Y. Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food Chem*, 214, 259-268 (2017)
- Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, NY, USA, p 237-245, 731 (2011)
- Zhu C, Poulsen HE, Loft S. Inhibition of oxidative DNA damage *in vitro* by extracts of brussels sprouts. *Free Rad Res*, 33, 187-196 (2000)