

*Spirulina maxima*의 초음파 및 열수 추출 공정에 따른 항염증 효과 비교 탐색

신재빈¹ · 최운용¹ · 강도형² · 이현용³

¹강원대학교 생물소재공학과

²한국해양과학기술원

³서원대학교 식품공학과

Comparison of Anti-Inflammatory Activity of *Spirulina maxima* Extract by Ultrasonication and Water Extraction Process

Jae Bin Sin¹, Woon Yong Choi¹, Do Hyung Kang², and Hyeon Yong Lee³

¹Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University

²Korea Institute of Ocean Science & Technology (KIOST)

³Department of Food Science and Engineering, Seowon University

ABSTRACT The aim of this study was to compare the anti-inflammatory activities of *Spirulina maxima* treated with ultrasonication and water extraction process. *S. maxima* extracted via ultrasonication showed low cytotoxicity (16.90%) in a normal human cell line, CCD-986sk. Especially, *S. maxima* ultrasonication extract showed the highest DPPH radical scavenging activities (46.82%) compared to water extract (31.30%) at 100°C. In addition, ultrasonication extract showed a high amount of flavonoids (21.60 mg/g) and total phenols (8.36 µg/mL). Nitric oxide production by 1.0 mg/mL of *S. maxima* ultrasonication extract strongly inhibited (1.3770 µM), whereas water extract showed lower inhibition (1.5784 µM). TNF-α and IL-6 cytokines were effectively inhibited by 1.0 mg/mL of *S. maxima* ultrasonication extract, which shows strong antioxidant activities. Based on these results, it can be concluded that the ultrasonication process increase anti-inflammatory activity of *S. maxima* extract.

Key words: *Spirulina maxima*, antioxidant, anti-inflammatory, ultrasonication

서 론

*Spirulina*는 나선형 모양을 가진 조류로써 길이 200~500 µm, 너비 약 8 µm 정도의 크기로 존재하며, 현재 35종이 아프리카, 중앙미 등 아열대와 열대 지방의 호수에 많이 분포하고 있다고 알려져 있다(1,2). 이러한 *Spirulina*의 영양성분은 단백질 55~70%, 지방 6~9%, 탄수화물 15~20%와 무기질, 비타민 및 색소들을 많이 함유하고 있으며(3), 섬유소가 없고 세포벽이 얇아 소화 흡수가 빠르고 많은 열량을 가지고 알려져 있어 기능성 식품으로 효용이 있다고 알려져 있다.

특히 *Spirulina maxima*는 *Spirulina platensis*보다 단백질 함량이 더 높다고 알려져 있다고 알려져 있으며(4), 단백질 함량이 높기 때문에 단백질 이용률(net protein utilization, NPU)이 높고 완전단백질 식품처럼 우수한 단백질 식품으로 평가되고 있다(5). 또한 phycocyanin과 비타민

B₁₂ 및 다량의 phenolic acid와 tocopherols 등을 함유하고 있고 flavonoid와 phenol 함량이 많아 일반 천연물의 항산화능이 뛰어난 것으로 알려져 있다(1,6). 게다가 *Spirulina*에 함유된 carotenoid 색소와 phycocyanin, novel sulfated polysaccharide는 항암, 노화 방지 및 종양 전이 억제 등 많은 효과가 있다고 한다(7-9).

이러한 *Spirulina*를 기능성 식품 등으로 사용하기 위해서 보통 열수 추출이나 에탄올 추출 방법을 통해서 유용 생리활성물질을 확보한다. 하지만 열수 추출이나 에탄올 추출을 통해서 약 80~100°C의 고온에서 추출을 해야 하기 때문에 *Spirulina*에 함유되어 있는 flavonoid나 phenol의 경우 고온에서 구조가 파괴되는 단점을 가지고 있다(10,11). 따라서 고온 추출 방법의 단점을 보완하기 위한 공정을 통해서 *Spirulina*에 함유되어 있는 유용 생리활성물질을 추출해야 한다.

추출 방법 중 초음파 공정은 낮은 온도에서도 단백질이 덜 파괴되고 생리활성물질을 보호하고 추출하기 쉽다고 알려져 있다(10,11). 이러한 초음파 공정은 초음파 에너지의 진동으로 인하여 공동현상이 생기게 되어 추출물의 생리활성물질이 효과적으로 추출이 된다고 한다(12). 이러한 기존

Received 21 August 2014; Accepted 20 October 2014

Corresponding author: Hyeon-Yong Lee, Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju, Chungbuk 361-742, Korea

E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr, Phone: +82-43-299-8471

에 연구된 초음파 추출 방법을 통해 항산화 물질로 알려진 flavonoid와 total phenol의 파괴가 최소화된다고 알려져 있으며(13), 미세조류의 두꺼운 세포벽이 초음파 공정의 공동현상으로 인하여 효과적으로 분쇄되어 추출 속도 개선 및 높은 수율을 확보할 수 있다고 알려져 있다(14,15). 따라서 본 논문에서는 *S. maxima* 추출물의 항산화능과 항염증 효능에 대해 조사함과 동시에 고온 추출에서의 단점을 보완하고자 저온 초음파 공정을 통한 효능 증대 효과를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

이 실험에서 사용된 *S. maxima* 건조 분말은 한국해양과학기술원(Ansan, Korea)에서 지원받아 사용하였다. Human dermal fibroblasts(HDF)는 CCD-986sk로 raw cell과 함께 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 동결된 상태로 구입하였다. CCD-986sk는 RPMI1640 배지에서, raw cell은 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum(Hyclone, Logan, UT, USA), 1% gentamycin을 첨가한 후 배양하여 사용하였다.

시료의 제조

시료의 제조 방법은 수직 환류 냉각기가 있는 열수추출기(TL-6Point(K), Misung Scientific Co., Yangju, Korea)를 사용하였다. 열수 추출은 60 g의 분말을 600 mL의 증류수에 첨가하여 100°C 온도로 24시간 추출하였다. 또한 초음파 추출은 60 g 분말을 600 mL의 증류수에 넣은 후 초음파 추출기(AUG-R3-900, ASIA ULTRASONIC, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 120 kHz의 조건으로 30분간 전처리 하였다. 전처리 후 60°C의 조건으로 열수 추출을 12시간 하여 최종적으로 초음파 추출물을 얻었다. 얻어진 각각의 추출물은 감압여과펌프(KNF Laboport Pressure Pump, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA)와 Whatman사(Piscataway, NJ, USA)의 20~25 µm 여과지를 이용하여 여과한 후, 여과한 추출물들을 감압회전농축기(Rotary Vacuum Evaporator N-N series, EYELA, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용해 농축한 후 동결건조기(PVTFA 10AT, ILSIN, Suwon, Korea)를 사용하여 분말로 만들어 실험을 진행하였다.

정상세포(CCD-986sk)에 대한 세포 독성 측정

세포 독성 확인은 MTT 시약을 사용하였다. 사용된 세포로는 CCD-986sk 세포를 사용하였다. 세포 독성 측정 방법은 cell을 3.0×10^5 농도로 96-well plate에 24시간 동안 배양한 후 각 샘플을 농도별로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 200 µg/mL 농도의 MTT 시약을 50 µL씩 암실에서 주입하여 3시간 동안 배양한 후 PBS buffer로 두 번

세척하고 DMSO를 각 well에 200 µL 주입하여 20분 뒤에 570 nm에서 흡광도로 측정하였다. 세포 생존율을 계산한 방법은 (시료첨가군의 O.D값/ 시료 무첨가군의 O.D값)×100 하여 %로 계산하였다.

DPPH 자유라디칼 소거 활성 및 flavonoid 함량 측정

DPPH 자유라디칼 소거 활성 확인을 위하여 Dietz 등(16)의 방법을 변형하여 실험을 실시하였다. 각 샘플들과 positive control(ascorbic acid 0.2 mg/mL)을 각각 80 µL와 0.1 mM DPPH 200 µL를 혼합하여 25°C에서 20분간 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과값은 DPPH 라디칼 소거능(%)으로 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: absorbance value of *S. maxima* extract

B: absorbance value of control

Flavonoid 및 total phenol 함량 측정

Flavonoid 함량 방법은 Kong 등(17)의 방법을 변형하여 실시하였다. 각 시료의 농도를 1.0 mg/mL로 넣어 준 다음 1 N NaOH 1 mL를 첨가한 뒤 1시간 방치 후 420 nm의 흡광도에서 측정을 하였으며, 대조군으로는 루틴을 사용하였다. Total phenol 함량 측정 방법은 Gutfinger(18)의 방법을 참고하여 각 시료의 농도를 0.5 mg/mL로 100 µL와 Na₂CO₃ 20 µL를 첨가하여 3분간 반응 후 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 µL를 첨가하여 30분간 반응시킨다. 반응 후 750 nm 흡광도로 값을 측정하고 standard로는 galic acid를 사용하였다.

NO 생성 반응

Nirtic oxide 생성량 측정 방법은 Green 등(19)의 방법을 변형하여 실시하였다. Raw cell을 3.0×10^5 정도로 키운 후 96-well plate에 200 µL 넣고 24시간 배양한 후 배지를 식선한 후 LPS 무처리군과 처리군으로 나누어 10 µg/mL의 농도로 주입하였다. 또한 샘플 처리군과 미처리군도 나누어 24시간 동안 배양하였으며, 이때 plate에는 각각 총 200 µL가 되도록 배지를 채워주었고, 샘플 처리군에는 100 µL의 LPS와 100 µL의 배지를 채워주었다. 24시간 배양 후 상층액 50 µL를 취하여 새로운 96-well plate에 옮기고 Griess 시약 50 µL를 주입한 후 10분간 방치하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IL-6 및 TNF-α 측정

IL-6 측정 방법은 Quantikine ELISA Mouse IL-6 kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다. 96-well plate에 raw 264.7 세포를 3.0×10^5 cells/mL만큼 24시간 동안 배양한 뒤 *S. maxima*의 열수 추출물과 초음파 공정을 거친 추출물을 각 농도에 맞게 처리하고 LPS 0.2

µg/mL의 농도로 넣어준 뒤 대기하였다. 24시간 후 kit 순서에 맞춰서 assay diluent 50 µL를 처리하고 흔들어진 다음, standard와 샘플을 넣고 섞은 뒤 2시간 동안 대기하였다. 그 후 plate를 wash buffer로 씻고 IL-6 conjugate를 넣고 다시 2시간 동안 실온에 방치한 뒤 다시 한 번 wash buffer로 씻고 substrate solution을 100 µL만큼 넣은 후 빛을 차단하고 30분 동안 실온에 방치하였다. Stop solution을 넣고 microplate reader기(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 한 뒤 정량 방법은 standard 선을 이용하여 정량을 하였다.

TNF-α 정량 방법은 Quantikine ELISA Mouse TNF-α kit(R&D Systems)를 사용하였다. 처음 부분은 IL-6 방법과 동일하게 raw cell과 LPS를 넣어준 뒤 50 µL의 assay diluent RD1-63를 각각의 well에 처리한다. 그 뒤 standard와 control 그리고 샘플을 50 µL 넣어주었다. 2시간 후 wash buffer로 세척한 후 TNF-α conjugate 100 µL를 첨가한 뒤 2시간 동안 실온에 방치하였다. Wash buffer로 세척하여 substrate solution 100 µL를 넣고 암실에 30분 동안 방치하였다. 그 후 stop solution 100 µL를 첨가하여 microplate reader기(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 450 nm 파장으로 흡광도를 측정 한 뒤 standard 선을 이용하여 TNF-α를 정량하였다.

통계처리

실험은 총 3회 반복으로 실시하였으며, 모든 실험의 데이터 통계처리는 실험값의 SAS(Statistical Analysis System, ver 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 통하여 two-way ANOVA 방법으로 처리하였다. 처리구 간의 유의수준의 차는 $P < 0.05$ 로 통계처리 하였다.

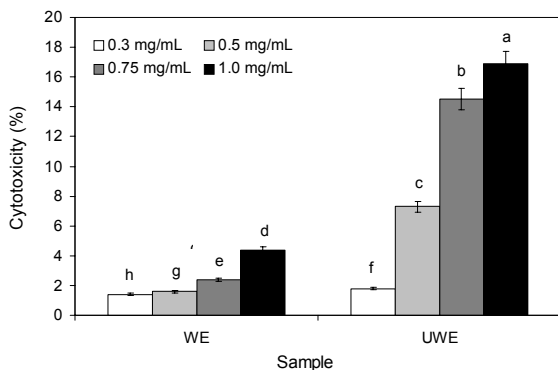


Fig. 1. Cytotoxicity of the *Spirulina maxima* extract from WE and UWE against human fibroblast cells (CCD-986sk). WE, water extract at 100°C; UWE, extracts from water ultrasonication at 60°C. Values are mean±SD (n=3). Means with different letters above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

결과 및 고찰

정상세포(CCD-986sk)에 대한 세포 독성 측정

S. maxima 추출물에 대한 세포 독성을 확인하기 위하여 인간 피부 섬유아세포 CCD-986sk를 이용하였고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. *S. maxima* 열수 추출물의 경우 농도 의존적으로 *S. maxima* 추출물의 농도가 0.3~1.0 mg/mL로 높아질수록 세포 독성이 높아지는 것을 확인하였다. 특히 가장 농도가 높은 1.0 mg/mL의 농도에서 4.4%의 세포 독성을 보이는 것을 확인하였으며, 가장 낮은 농도인 0.3 mg/mL에서 1.4%의 세포 독성을 보여 단지 약 3% 차이를 보이는 낮은 세포 독성을 보이는 것을 확인하였다. 반면 초음파 열수 추출물의 경우 농도 의존적으로 세포 독성이 높아지는 것이 확인되는데 가장 높은 농도인 1.0 mg/mL의 농도에서 약 16.90%의 비교적 높은 세포 독성을 나타내었으며, 가장 낮은 농도인 0.3 mg/mL의 경우 약 1.8%의 낮은 세포 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 상기의 결과처럼 초음파 열수 추출물의 경우 일반 열수 추출보다 높은 세포 독성을 보이는 것은 초음파 열수 추출물이 저온으로 추출을 진행함으로써 유효성분 물질의 보호 및 용출이 더 잘 되어 세포 독성이 더 높게 나온 것으로 사료된다(10,11). 또한 상기의 결과는 기존에 보고된 *S. maxima* 추출물의 세포 독성 실험에서 1.0 mg/mL에서 24.5%의 독성을 보인 거에 비해 낮은 세포 독성을 보인 것으로 판단된다. 또한 기타 식용으로 쓰이고 있는 천연물인 복분자의 세포 독성과 비교했을 때 현저히 낮은 독성을 보여주고 있으며, 복분자의 가장 낮은 세포 독성의 결과는 약 21.6%를 나타내고 있다(20). 이러한 결과를 바탕으로 비록 초음파 열수 추출물이 고농도에서 비교적 높은 세포 독성을 보이거나 일반적으로 다른 미세조류나 천연물의 세포 독성보다 낮은 것을 확인할 수 있었다.

S. maxima 초음파 추출물의 항산화 활성 측정

S. maxima 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위하여

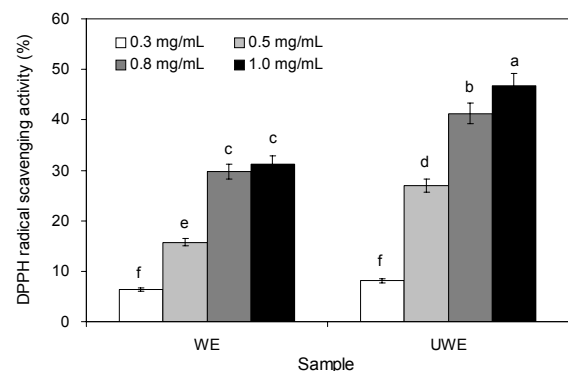


Fig. 2. DPPH radical scavenging ability of *Spirulina maxima* extract. WE, water extract at 100°C; UWE, extracts from water ultrasonication at 60°C. Values are mean±SD (n=3). Means with different letters above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

DPPH 자유라디칼 소거 활성을 실험하였다. 그 결과를 Fig. 2에 나타내었으며, *S. maxima*의 초음파 및 열수 추출물의 농도가 1 mg/mL에서 가장 높은 약 46.82%의 DPPH 자유라디칼 소거 활성을 보였으며, 가장 낮은 농도인 0.3 mg/mL에서 약 8.14%의 DPPH 자유라디칼 소거 활성을 보이는 것을 확인하였다. 반면 열수 추출물의 경우 고농도인 1.0 mg/mL의 농도에서 약 31.30%의 자유라디칼 소거능을 확인하였으며, 상기의 결과는 초음파 및 열수 추출물의 농도가 0.5 mg/mL일 때 약 26.97%의 DPPH 자유라디칼 소거 활성과 크게 차이가 나지 않은 것을 확인할 수 있었다. 상기의 DPPH 자유라디칼 소거능 결과는 기존에 알려진 *Chlorella ellipsoidea* C020 추출물의 DPPH 자유라디칼 소거능 결과와 비교하였을 때, *Chlorella ellipsoidea* C020 추출물이 가장 높은 농도인 1 mg/mL에서 약 39%, 그리고 가장 낮은 농도인 0.25 mg/mL일 때 약 10%의 DPPH 자유라디칼 소거 활성을 보이는 것과 비교하여 *S. maxima*의 초음파 및 열수 추출물이 보다 더 높은 활성을 가지는 것으로 확인되었다(21). 이러한 결과는 *S. maxima*에 항산화능에 가장 큰 영향을 준다고 알려진 비타민 성분과 더불어 베타카로틴, phycocyanin과 phenolic acid 그리고 tocopherols를 많이 함유하고 있어 항산화능이 높은 것으로 예상된다(7,8). *S. maxima* 추출물의 flavonoid 함량과 total phenol 함량을 측정된 결과인 Table 1을 확인한 결과, flavonoid 함량에서 열수 추출물의 경우 약 19.60 mg/g의 양이 측정된 반면, 초음파 전처리된 추출물의 경우 약 21.60 mg/g의 flavonoid를 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 이 수치는 항산화능이 좋다고 알려진 흑마늘의 flavonoid 양보다 10배 이상 많은 수치이며 *S. maxima*의 항산화능이 뛰어난 것을 증명하고 있다(22). 또한 total phenol 함량에서는 열수 추출물에서 8.19 µg/mL, 초음파 및 열수 추출물에서는 8.36 µg/mL 함유하고 있는 것을 확인하였다. 흑마늘의 수치인 0.81 mg/100 g과 비슷한 수치를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 상기의 결과 모두 초음파 공정을 적용하였을 경우 보다 많은 양의 flavonoid와 total phenol이 용출된 것을 확인할 수 있었고, 이는 초음파 공정을 통해 진동 에너지의 공동현상으로 인하여 추출물의 생리활성물질이 더 추출된 것으로 사료되며(12), 초음파로 인해 물 분자 집단의 크기인 클러스트가 일반 증류수의 크기인 118 Hz보다 적어지기 때문에 *S. max-*

*ima*의 세포벽에 물 분자가 빠른 흡수를 일으켜 높은 용해력을 가지는 것으로 사료된다(23). 또한 저온에서의 초음파 추출로 인해 flavonoid와 total phenol의 파괴가 최소화되어 높은 함량을 보인 것으로 사료된다(24). 특히 *S. maxima*의 열수 추출물과 초음파 추출물의 추출 수율을 비교한 결과 열수 추출의 경우 약 9.31%(w/w) 그리고 초음파 추출의 경우 약 10.87%(w/w)의 수율을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과를 통해서 초음파로 인한 추출이 효과적으로 이루어진다는 것을 다시 확인할 수 있었다. 따라서 초음파 공정을 거칠 경우 항산화능에 관련된 생리활성물질의 추출이 용이해지기 때문에 항산화능이 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

S. maxima 초음파 추출물의 항염증 활성 측정

S. maxima 초음파 추출물의 항염증 활성을 측정하기 위해 NO 생성량을 측정하였다. 그 결과를 Fig. 3에 나타내었으며, LPS만 첨가하여 측정된 값을 기준으로 LPS와 함께 시료를 넣어준 값들을 비교 분석하였다. 그 결과 *S. maxima*의 추출물에 LPS를 넣어준 군과 넣지 않은 군을 비교하여 LPS를 넣지 않은 군의 NO 생성이 22~23% 가량 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 열수 추출물과 초음파 및 열수 추출물을 비교하면 초음파 및 열수 추출물이 NO를 약 12% 정도 덜 생성하는 것으로 보아 초음파 공정을 거친 *S. maxima* 추출물의 항염증 효능이 좋다는 것을 확인할 수 있었다. 항염증 관련 cytokine인 IL-6 및 TNF-α의 생성량을 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. IL-6 생성량 비교 결과 열수 추출물의 경우 농도에 따라 각각 785.0, 699.0 및 596.0 pg/mL의 농도를 생성하였으며, 초음파 및 열수 추출물의 경우 각각 718.5, 516.5 및 533.0 pg/mL의 IL-6를 생성하는 것을 확인하였다. TNF-α의 경우 열수 추출물은 농도에 따라 각각 1,311.4, 1,303.1 및 1,284.5 pg/mL가 생성되었으며, 초음파 및 열수 추출물의 경우 각각 1,307.9, 1,292.8 및 1,279.0 pg/mL의 IL-6가 생성하는 것을 확인하였다. 상기

Table 1. Flavonoid, total phenol contents, and extraction yields in *Spirulina maxima*

Antioxidant activity	WE	UWE
Flavonoid (mg/g)	19.60±1.372 ^{b1)2)}	21.60±1.015 ^a
Total phenol content (µg/mL)	8.19±0.294 ^a	8.36±0.351 ^a
Extraction yields (% , w/w)	9.31±1.195 ^b	10.87±1.322 ^a

WE: water extract at 100°C, UWE: extracts from water ultrasonication at 60°C.

¹⁾Mean±SD (n=3).

²⁾Means with different letters in a row are significantly different (P<0.005).

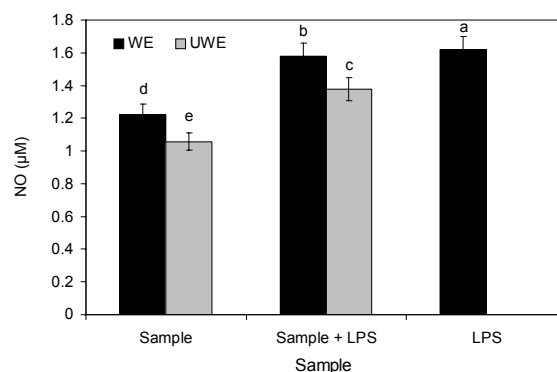


Fig. 3. Nitric oxide content of *Spirulina maxima* extract on the macrophage through the addition of 1.0 mg/mL from two different extraction processes. WE, water extract at 100°C; UWE, extracts from water ultrasonication at 60°C. Values are mean±SD (n=3). Means with different letters above the bars are significantly different (P<0.05).

Table 2. Estimation of IL-6 and TNF- α secretion of the extracts obtained from different extraction processes

Cytokine	Sample			
	WE		UWE	
	mg/mL	pg/mL	mg/mL	pg/mL
IL-6	0.3	785.0 \pm 3.6 ^{Aa1)2)3)}	0.3	718.5 \pm 13.5 ^{Ab}
	0.6	699.0 \pm 8.5 ^{Ba}	0.6	561.5 \pm 5.6 ^{Bb}
	1.0	596.0 \pm 5.1 ^{Ca}	1.0	533.0 \pm 10.7 ^{Ca}
TNF- α	0.3	1,311.4 \pm 50.1 ^{Aa4)5)}	0.3	1,307.9 \pm 34.7 ^{Ab}
	0.6	1,303.1 \pm 37.5 ^{Aa}	0.6	1,292.8 \pm 26.0 ^{Bb}
	1.0	1,284.5 \pm 20.4 ^{Ba}	1.0	1,279.0 \pm 22.9 ^{Ca}

WE: water extract at 100°C, UWE: extracts from water ultrasonication at 60°C.

¹⁾Mean \pm SD (n=3).

²⁾Means with different capital letters in a column are significantly different ($P<0.05$) at IL-6.

³⁾Means with different small letters in a row are significantly different ($P<0.05$) at IL-6.

⁴⁾Means with different capital letters in a column are significantly different ($P<0.005$) at TNF- α .

⁵⁾Means with different small letters in a row are significantly different ($P<0.005$) at TNF- α .

의 결과를 바탕으로 초음파 열수 추출물의 경우 일반 열수 추출물보다 적은 양의 cytokine을 생성하는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 기존에 알려진 천연물 중 쉼 추출물의 TNF- α 의 측정량인 1,337 mg/mL와 비교하면 낮은 수치를 보이기 때문에 *S. maxima*가 항염증 효능이 좋다는 것을 추측할 수 있었다(24). 또한 기존에 연구된 천연물인 달맞이순 추출물의 IL-6 생성량이 25.0 μ g/mL에서 약 400 pg/mL가 생성되었기 때문에 일반 천연물에 비해 항염증 효과가 우수한 결과를 얻을 수 있었다(25). 이러한 *S. maxima* 초음파 추출물의 항염증 활성이 높아지는 결과는 열수 추출의 경우 고온으로 인한 성분 파괴나 변성 등이 일어나 원하고자 하는 효능들이 떨어져 활성이 감소한 것에 비해, 초음파 열수 추출물은 60°C에서 추출을 진행하여 열 변성에 대해 적게 반응하고 초음파 에너지를 이용하여 항산화 활성에 관련된 생리활성물질을 용이하게 추출하였을 것이라고 사료된다. 기존에 연구된 염증 반응을 유발한다고 알려진 활성 산소는 대식세포에서 활성화되는 IL-6, TNF- α 와 같은 각종 cytokine 및 NO(nitric oxide)를 유발한다고 알려져 있다(26). 따라서 초음파 전처리 공정을 통한 *S. maxima* 추출물은 활성 산소를 소거하는 항산화 활성이 증진됨에 따라 항염증 효과가 증진되었다고 사료된다.

요 약

본 실험은 초음파 전처리를 통한 *Spirulina maxima* 추출물이 기존의 열수 추출 공정과 비교하여 항산화, 항염증 효과가 증진되는지에 대한 연구를 하였다. 낮은 세포 독성을 통해 안정성을 확보하였으며, 항염증성 효과를 증진시키기 위한 항산화 효능에서는 DPPH의 경우 약 50% 정도 이상의

효능을 보였다. Flavonoid 함량에서는 열수 추출물보다 초음파 공정을 거친 추출물은 10% 정도의 함량 증가를 보였으며, total phenol에서도 함량의 증가를 확인하였다. 또한 이 결과로 일반 천연물보다 항산화능이 좋을 뿐 아니라 독성도 낮은 결과를 얻어 *S. maxima*의 뛰어난 효능을 입증하였다. 항염증 효과의 경우 NO, TNF- α 및 IL-6 생성량을 확인한 결과 3가지 생성량 모두 열수 추출물보다 초음파 공정을 통하여 항염증 효능의 증대를 보이는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 초음파 공정을 이용해 낮은 온도에서 활성 물질들의 파괴가 없을뿐더러 초음파의 높은 에너지로 인하여 더 많은 활성물질들을 추출하여 효능들의 증대로 보이며, 초음파 공정 전처리를 통하여 *S. maxima*의 두꺼운 세포벽을 효과적으로 파쇄하여 생리활성 물질의 추출이 효과적으로 진행되어 항산화능이 증가하게 되고, 항산화능의 증가로 항염증 효능에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이 실험 결과들을 바탕으로 *S. maxima*의 활성 증진 및 기능성 식품로의 개발에 적용될 것이라고 사료된다.

감사의 글

이 연구는 한국해양과학기술원의 연구비(PE99213) 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Kay RA. 1991. Microalgae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci* 30: 555-573.
- Son MH, Park KH, Choi AR, Yoo G, In MJ, Kim DH, Chae HJ. 2009. Investigation of biological activities of enzymatic hydrolysate of *Spirulina*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 136-141.
- Romano I, Bellitti MR, Nicolaus B, Lama L, Manca MC, Pagnotta E, Gambacorta A. 2000. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. *Phytochemistry* 54: 289-294.
- Saeid A, Chojnacka K, Korczyński M, Korniewicz D, Dobrzański Z. 2013. Biomass of *Spirulina maxima* enriched by biosorption process as a new feed supplement for swine. *J Appl Phycol* 25: 667-675.
- Zao X, Yang YH, Cho YS, Chun HK, Song KB, Kim MR. 2005. Quality characteristics of *Spirulina*-added salad dressing. *J East Asian Soc Diet Life* 15: 292-299.
- Yang HN, Lee EH, Kim HM. 1997. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Life Sci* 61: 1237-1244.
- Hernández-Corona A, Nieves I, Meckes M, Chamorro G, Barron BL. 2002. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Res* 56: 297-285.
- Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han D. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 891-896.
- Kim IS, Cho ZS. 1993. Modulation of human fibroblast proliferation and collagen production by prostaglandin E2. *Korean Biochem J* 23: 40-52.
- Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ. 2001. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during

- solvent extraction. *Ultrason Sonochem* 8: 137-142.
11. Vinatoru M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem* 8: 303-313.
 12. Chung KW, Kim WI, Hong IK, Park KA. 2000. Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. *Appl Chem* 4: 149-152.
 13. Yu SH, Chong MS, Kim HJ, Lee KN. 2007. Studies on the extraction method and polysaccharide of *Tricholoma matsutake* using the supersonic wave and microwave. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 21: 1431-1436.
 14. Lee SB, Lee SM, Hong IK. 2003. Energy density analysis in ultrasound assisted solvent extraction process. *J Korean Ind Eng Chem* 14: 989-993.
 15. Oh SH, Ahn J, Kang DH, Lee HY. 2011. The effect of ultrasonicated extracts of *Spirulina maxima* on the anti-cancer activity. *Mar Biotechnol* 13: 205-214.
 16. Dietz BM, Kang YH, Liu G, Eggler AL, Yao P, Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR, Mesecar AD, van Breemen RB, Bolton JL. 2005. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem Res Toxicol* 18: 1296-1305.
 17. Kong SH, Choi YM, Lee SM, Lee JS. 2008. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the methanolic extracts from milling fractions of black rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 815-819.
 18. Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-998.
 19. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
 20. Kwon MC, Kim CH, Na CS, Kwak HG, Kim JC, Lee HY. 2007. Comparison of Immuno-modulatory regulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel by ultra high pressure extracts process. *Korea J Medicinal Crop Sci* 15: 398-404.
 21. Kim HJ, Kim IH, Lee JH. 2008. Biological activities of ethanol extract from the seawater algae, *Chlorella ellipsoidea* C020. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 125-130.
 22. Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Sung NJ. 2008. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 965-971.
 23. Tataka PA, Pandit AB. 2002. Modelling and experimental investigation into cavity dynamics and cavitation yield: influence of dual frequency ultrasound sources. *Chem Eng Sci* 57: 4987-4995.
 24. Kim AK, Cho SJ, Kwak JE, Kum JY, Kim IY, Kim JH, Chae YZ. 2012. Heavy metal contents and safety evaluation of commercial salts in Seoul. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 129-135.
 25. Kwak CS, Lee JH. 2014. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from sprout of evening primrose (*Oenothera laciniata*) and gooseberry (*Actinidia arguta*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 207-215.
 26. Lee YJ, Wok SC, Kim HJ, Lee JH, Kim MR. 2009. Quality characteristics of raw and cooked *Spirulina* added noodles during storage. *Korean J Food Preserv* 16: 23-32.