

*Lactobacillus casei*로 발효한 톳 추출물의 항염증 활성

문옥주¹, 권명숙¹, 배민주¹, 안별님², Fatih Karadeniz^{1,3}, 김미향¹, 이상현⁴, 유기환⁵, 김육용⁵, 서영완⁶, 공창숙^{1*}

Anti-inflammatory Activity of *Hizikia fusiformis* Extracts Fermented with *Lactobacillus casei* in LPS-stimulated RAW 264.7 Macrophages

Ok-Ju Mun¹, Myeong Sook Kwon¹, Min Joo Bae¹, Byul-Nim Ahn², Fatih Karadeniz^{1,3}, Mihyang Kim¹, Sang-Hyeon Lee⁴, Ki Hwan Yu⁵, Yuck Yong Kim⁵, Youngwan Seo⁶, and Chang-Suk Kong^{1*}

Received: 29 January 2015 / Accepted: 24 February 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, we investigated the anti-inflammatory effects of fermented *Hizikia fusiformis* extracts in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages. The fermentation was performed using *Lactobacillus casei* in mixture of carbon source at 30°C for 30 days. The sample groups were prepared with/without *L. casei* group in order to demonstrate the anti-inflammatory activity of fermented

H. fusiformis in regard to lactic acid bacteria. As a result, we confirmed the inhibitory effect of *H. fusiformis* extracts on LPS-stimulated NO production and expression of TNF α , while it had no regulatory effect on the expression of iNOS, COX-2, IL-1 β and IL-6 as important inflammatory factors. However, *L. casei* fermented group significantly suppressed the expression of the above factors. In particular, the difference between the two groups in the matter of mRNA expression of iNOS, which is directly associated with NO production, indicated that the fermentation with lactic acid bacteria effectively suppressed NO production by regulating iNOS expression. Also, effective suppression of pro-inflammatory cytokines showed that the fermentation using *L. casei* may provide an increment towards extraction of active ingredients that are effective anti-inflammatory agents.

¹신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과

¹Department of Food and Nutrition, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
Tel: +82-51-999-5429, Fax: +82-51-999-5457
e-mail: cskong@silla.ac.kr

²부산대학교 공과대학 유기소재시스템공학과

²Department of Organic Material Science and Engineering, Pusan National University, Busan, Korea

³신라대학교 의생명과학대학 해양신약소재융합기술연구소

³Marine Biotechnology Center for Pharmaceuticals and Foods, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

⁴신라대학교 의생명과학대학 제약공학과

⁴Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea

⁵(주)아이에스 푸드

⁵IS Food CO., Marine Bio-industry Department Center, Busan 619-912, Korea

⁶한국해양대학교 해양생명과학부

⁶Division of Marine Bioscience, Korea Maritime and Ocean University, Busan 606-791, Korea

Keywords: *Hizikia fusiformis*, *Lactobacillus casei*, Inflammation, Fermentation

1. INTRODUCTION

염증반응이란 외부로부터의 병원균에 의한 감염, 조직의 손상 및 물리화학적으로 유해한 자극에 대항하는 생체 방어 체계로, 체내에 외부물질의 유입이 감지되었을 때 면역세포는 염증 매개 물질들을 분비하여 체내 면역반응을 일으키는 신호를 전달하게 된다 [1]. 염증반응은 우리 몸을 보호하기 위

한 면역체계 반응이지만 지속적인 염증반응의 진행은 세포 조직의 손상을 초래하여 암, 뇌질환, 알츠하이머병, 관절염, 천식, 염증성 장질환 및 동맥경화 등 여러 질병뿐만 아니라 노화의 직·간접적 원인이 되는 것으로 알려져 있다 [2-4]. 대식세포는 염증반응에 관여하는 주요 세포로 손상 부위의 면역세포의 이동과 Tumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β 및 IL-6 등의 pro-inflammatory cytokine 분비에 관여하는 등 매우 중요한 역할을 한다 [1,3,5-7]. 즉, 대식세포의 사이토카인에 의한 활성화는 pro-inflammatory cytokine, Prostaglandin E2 (PGE2) 및 Nitric oxide (NO) 등을 생성함으로써 염증성반응의 유발과 염증부위의 면역세포의 이동을 촉진하게 된다 [1]. 이 중 NO는 염증반응의 대표적인 지표물질로 체내에서 NO synthase (NOS) 촉매반응을 통하여 L-arginine으로부터 생성되며 [7], inducible NOS (iNOS) 및 Cyclooxygenase-2 (COX-2)가 과도하게 발현될 경우 다량의 NO를 생성하게 된다. 대식세포는 그람음성균의 세포벽을 구성하는 내독소 작용물질인 Lipopolysaccharide (LPS)의 자극에 의해 iNOS의 발현이 급격하게 증가하는 것으로 알려져 있다 [5,6]. 따라서 항염증 활성 및 염증 매개 인자들의 발현을 조절하는 물질에 대한 연구는 LPS를 자극한 대식세포를 이용하여 진행되고 있다.

해조류는 독특한 화학적 구조의 화합물을 함유하고 있으며 풍부한 영양성분을 가지고 있어 생리활성에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며 [8], 해조류의 유용성분을 추출하기 위한 방법으로 주로 열수 및 에탄올 추출법을 이용하고 있다 [9]. 그러나 해조류에 포함되어 있는 탄수화물의 대부분이 비소화성 복합다당류로서 이러한 기존 추출 방법으로는 유용성분을 다량 추출해 내는데 한계점이 있다 [10]. 이러한 단점을 극복하기 위한 방법으로 효소처리법과 유용 미생물을 이용한 발효법으로 유용성분을 추출하고자 하는 시도가 행해지고 있다 [9,11-13]. 특히, 발효는 미생물의 대사활동에 의해 유용성분의 추출 효율성을 극대화 시키는 동시에 다양한 효능을 가지는 물질을 생성할 수 있는 것으로 알려져 있다 [11]. *Lactobacillus casei*는 주로 치즈 생산에 이용되는 유산균으로 탄수화물을 분해시키는 효소인 아밀라아제 (amylase)를 생산하며 다당 성분의 처리에 의해 기능성 해조 올리고당이 생성된다고 알려져 있어 탄소원으로 포도당을 첨가하여 유용성분의 추출률을 높이는데 이용되고 있다 [9].

따라서 본 연구에서는 *L. casei*로 발효시킨 톳 추출물을 이용하여 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 대식세포에서 NO 생성 억제와 염증관련인자의 발현에 미치는 영향을 검토하여 발효 톳의 항염증 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

본 실험에 사용한 톳 (*Hizikia fusiformis*)은 2013년 파라제주

(Jeju, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 탈염된 톳 건조물을 초미세 기류식 분쇄기 (KMS-200, Korea)로 분쇄한 다음 밀봉하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

2.2. 발효균주

발효균주는 *Lactobacillus casei* ((주) 메디오젠, Jecheon, Korea)를 실험에 사용하였다. *L. casei*는 유산균 선택배지인 MRS 액체배지 (Difco, USA)에 배양하였고, 멸균된 80% glycerol (Duchefa Biochemie, Netherlands)에 배양액을 현탁하여 -80°C deep freezer (NF-140SF, HFC, Japan)에서 장기 보관하였다.

2.3. 발효균주를 이용한 톳발효액의 제조

발효균인 *L. casei*는 MRS 액체배지를 이용하여 30°C에서 정지 배양하였다. 발효액은 이전 연구방법에 따라 제조하였다 [9]. 톳 분말 10 g에 5% (w/v)로 되게 ddH₂O를 첨가한 후, 탄소원으로 1% glucose의 농도로 첨가하여 121°C의 가압 조건에서 30분간 멸균하였다. 여기에 발효균을 0.05%의 농도로 접종한 후 30°C 배양기에서 30일간 배양하여 톳 발효액을 제조하였다.

2.4. 발효톳 추출물의 제조

발효가 완료된 톳 발효액을 진공농축기 (R-200, Buchi, Switzerland)를 이용하여 농축시킨 후, 동결건조 (FD8518, Ilshin BioBae, Korea)하여 발효 톳 건조시료를 얻었다. 건조시료에 10배량 (w/v)의 70% 에탄올을 첨가한 후, 80°C에서 4시간씩 2회 추출을 수행하였으며 진공농축기를 이용하여 농축시켜 추출물을 얻었다.

2.5. 세포배양 및 세포독성실험

마우스 대식세포인 RAW 264.7세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Atlas, Fort Collins, CO, USA) 및 1% penicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 포함한 phenol red-free Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cells을 1×10³ cells/well이 되도록 96-well plates에 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 농도별로 시료를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. MTT (1 mg/mL) 용액을 가하고 동일한 배양 조건에서 4시간 더 배양하였다. 이때 생성된 formazan crystal은 DMSO에 녹여서 ELISA Reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율 (%)을 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.6. Nitric oxide (NO) 생성 억제능

RAW 264.7세포를 96-well plates에 1×10^3 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 시료를 농도별로 처리하였으며 NO 생성을 유도하기 위해 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양액을 Griess reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 1:1로 혼합하여 15분 동안 실온에 방치한 후, ELISA Reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO양은 표준물질인 sodium nitrate (NaNO_2)를 표준용액으로 사용하여 계산하였다.

2.7. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

상기와 동일한 조건에서 배양한 RAW 264.7 세포를 Trizol reagent (Invitrogen Co., CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출, 정량하였다. 분리된 RNA ($2 \mu\text{g}$)는 37°C 에서 1시간 동안 역전사 반응을 실시하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6와 TNF α primer를 첨가

하였으며 internal control로 β -actin을 사용하였다 (Table 1). T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA)을 이용하여 95°C 에서 2분간 denaturation 시킨 뒤, 95°C 에서 30초간 Denaturation, 60°C 에서 45초간 Annealing, 72°C 에서 1분간 Extension 과정을 30번 반복함으로써 증폭시킨 후 마지막으로 72°C 에서 5분간 Extension한 후에 4°C 에서 종결하였다. PCR 산물은 TAE buffer (Biosesang, Korea)를 전해질로 사용한 1.5% agarose gel을 이용하여 10분간 전기영동한 후, Ethidium bromide (EtBr, AMRESCO, USA) 용액에 담귀 30분 동안 염색한 후 UV (Davinch-Chemi imagerTM, CAS-400SM, Wako Co., Osaka, Japan) 하에서 확인하였다.

2.8. 통계처리

실험결과는 평균 \times 표준편차 (Mean \times Standard deviation, SD)로 표시하였으며, SPSS⁺/WIN 12.0 (Statistical Package for Social Science, version 12.0) 통계 프로그램을 이용하여 통계적 유의성을 검토하였다. 집단간의 유의성을 검정하기 위해 일원배치 분산분석 (Oneway Analysis of Variance: ANOVA)을 통해 분석하였고, 사후검증은 Duncan's multiple range test를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

Table 1. Sequences of primers used for RT-PCR

Gene	Direction	Sequence
COX-2	Forward	5'-AGA-AGG-AAA-TGG-CTG-CAG-AA-3'
	Reverse	5'-GCT-CGG-CTT-CCA-GTA-TTG-AG-3'
iNOS	Forward	5'-TTC-CAG-AAT-CCC-TGG-ACA-AG-3'
	Reverse	5'-TGG-TCA-AAC-TCT-TGG-GGT-TC-3'
IL-1 β	Forward	5'-GGG-CCT-CAA-AGG-AAA-GAA-TC-3'
	Reverse	5'-TAC-CAG-TTG-GGG-AAC-TCT-GC-3'
IL-6	Forward	5'-AGT-TGC-CTT-CTT-GGG-ACT-GA-3'
	Reverse	5'-CAG-AAT-TGC-CAT-TGC-ACA-AC-3'
TNF α	Forward	5'-AGC-CCC-CAG-TCT-GTA-TCC-TT-3'
	Reverse	5'-CAT-TCG-AGG-CTC-CAG-TGA-AT-3'
β -actin	Forward	5'-CCA-CAG-CTG-AGA-GGG-AAA-TC-3'
	Reverse	5'-AAG-GAA-GGC-TGG-AAA-AGA-GC-3'

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 발효물 추출물의 RAW264.7 세포에 대한 독성 측정

발효물 에탄올 추출물의 RAW 264.7세포에 대한 세포독성은 MTT assay를 통하여 확인하였다 (Fig. 1(a)). RAW 264.7세포에 발효물 에탄올 추출물을 농도별 (10, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 결과, *L. casei* 접종군 및 *L. casei* 무접종군 모두 90% 이상의 생존율을 보여 RAW 264.7세포에 대한 독성이 나타나지 않음을 확인하였으며, 이 농도에서 발효물 추출물의 염

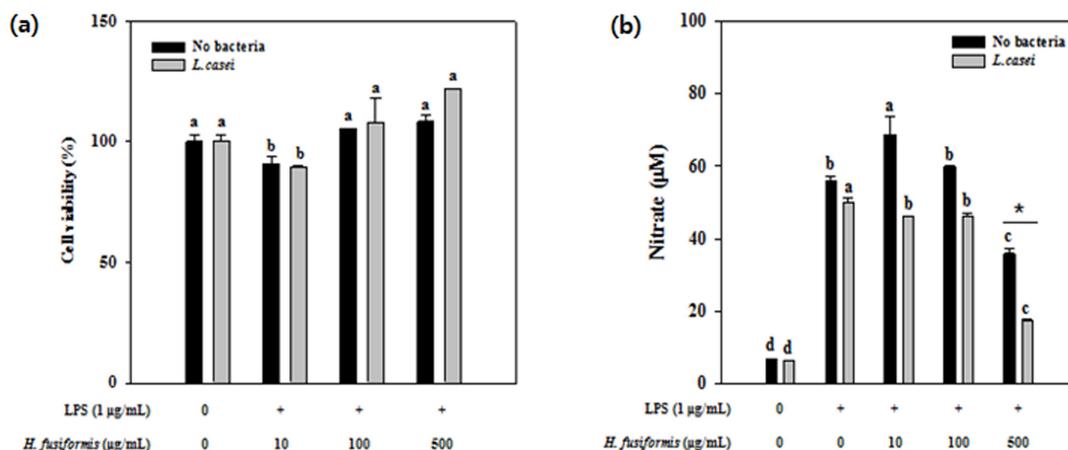


Fig. 1. Effect of ethanol extracts from fermented *H. fusiformis* with/without *L. casei* on cell viability (a) and NO level (b) in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. The cells were pretreated with fermented *H. fusiformis* for 1 h and following by treating with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24 h. The nitrite content of culture media was analyzed. ^{a-d}Means with the different letters in the each sample are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. * $p < 0.01$.

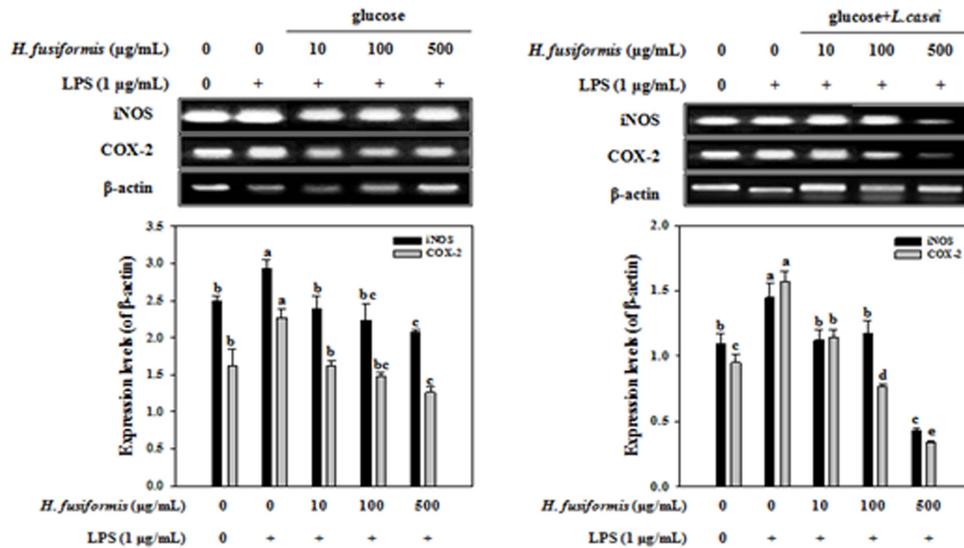


Fig. 2. Effect of ethanol extracts from fermented *H. fusiformis* with/without *L. casei* on COX-2 and iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. The cells were pre-treated with different concentration of the fermented *H. fusiformis* for 1 h followed by stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different in each gene ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

증 억제 활성을 확인하기 위한 실험을 진행하였다.

3.2. 발효톳 추출물이 LPS에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 영향

NO는 L-arginine을 기질로 하여 NOS에 의해서 합성되며 NO가 과량으로 생성되면 염증 반응을 촉진시키고 조직 및 신경을 손상시키는 것으로 알려져 있다 [14]. 발효톳 추출물의 NO 생성억제 활성을 알아보기 위해 RAW 264.7세포에서 LPS로 자극을 유도하고 시료를 농도별 (10, 100, 500 µg/mL)로 처리하여 24시간 후 NO 생성량을 측정하였다 (Fig. 1(b)). LPS 단독 처리군에 비하여 *L. casei* 접종군과 *L. casei* 무접종군 모두 NO 생성을 저해하였다. 특히, *L. casei* 접종군은 *L. casei* 무접종군에 비해 10, 100, 500 µg/mL의 처리 농도에서 각각 1.4배, 1.3배, 2.1배의 NO 생성 저해 효과를 보였다.

3.3. 발효톳 추출물의 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향

iNOS와 COX-2는 염증 유발에 관여하는 유전자로 대식세포에서 LPS 자극에 의해 유도된 염증이 NO를 포함한 다량의 염증매개체를 생성하는 것으로 알려져 있다. 세 종류의 NOS에서 neuronla NOS (nNOS)와 endothelial NOS (eNOS)는 세포 내에서 항상 발현이 유지되지만 iNOS는 LPS와 pro-inflammatory cytokine에 의해 발현이 증가한다. iNOS에 의해 NO가 과량 증가되어 염증성 질환을 유발한다. COX는 염증 매개 물질인 prostaglandins 분비를 자극하는 효소이다. COX-1은 정상적인 생체기능에 적용되어 인체에 유익한 prostaglandins 형성에 관여하는 효소인 반면, COX-2는 염증 유발 자극인자들에 의해 활성화되어 통증과 염증을 유발시키는 prostaglandins의 분비에 작용한다 [14-16]. 발효톳 에탄올 추출물의 NO 생성 억제 효과가 염증 관련 유전자의 발현

조절과 관련이 있는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다 (Fig. 2). 유전자 발현에 큰 변화를 보이지 않은 *L. casei* 무접종군에 비하여 *L. casei* 접종군은 COX-2의 발현을 농도의존적으로 저해하였으며, 특히 500 µg/mL의 농도에서 iNOS와 COX-2의 발현을 현저히 억제하였다.

3.4. 발효톳 추출물이 pro-inflammatory cytokine 발현에 미치는 영향

TNF α , IL-1 β 및 IL-6는 대표적인 염증성 cytokine으로 LPS로 유도된 대식세포에서 과도하게 생성되어 발열, 조직을 손상시키고 염증반응을 촉진한다 [17]. 이들 중 TNF α 는 endotoxin shock에 관련된 중요한 인자로 과발현되면 치명적인 독성을 유발하여 패혈증의 원인이 되는 것으로 알려지고 있다 [18]. 발효톳 에탄올 추출물이 pro-inflammatory cytokine의 유전자 발현에 미치는 효과를 RT-PCR을 통하여 확인하였다 (Fig. 3). *L. casei* 무접종군은 IL-1 β 와 IL-6 발현은 억제하지 못하였지만 TNF α 발현은 유의적으로 감소시켰다. 반면, *L. casei* 접종군은 TNF α , IL-1 β 와 IL-6 발현 모두 농도 의존적으로 저해하였으며, 500 µg/mL 농도에서는 *L. casei* 무접종군에 비해 *L. casei* 접종군의 TNF α , IL-1 β 와 IL-6 발현이 현저히 억제되어 발효톳 에탄올 추출물이 pro-inflammatory cytokine 생성을 저해하는 것을 확인하였다.

4. CONCLUSION

톳의 분해성을 높여 유용성분의 활성을 증진시키고자 유산균 *L. casei*을 이용한 발효 공정을 도입하여 유산균 발효에 따른 항염증 활성을 *L. casei* 접종군과 *L. casei* 무접종군으로 나

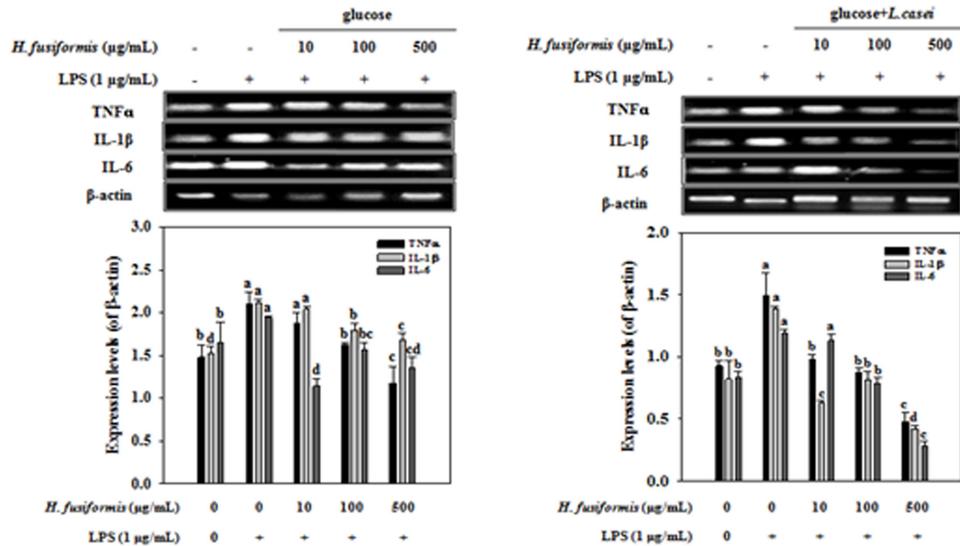


Fig. 3. Effect of ethanol extracts from fermented *H. fusiformis* with/without *L. casei* on TNF α , IL-1 β and IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. The cells were pre-treated with different concentration of the fermented *H. fusiformis* for 1 h followed by stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different in each gene ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

누어 비교하였다. 그 결과, *L. casei* 무접종군은 LPS에 의해 유도된 NO생성과 TNF α 의 발현을 억제하여 톳 발효 추출물 그 자체로도 염증 억제 효과를 보임을 확인하였다. 하지만 중요한 염증유발 인자인 iNOS와 COX-2 및 IL-1 β , IL-6의 발현 조절에는 효과가 없었던 반면, *L. casei* 접종군은 위 인자들의 발현을 유의적으로 저해시켰다. 특히, NO 생성과 직접적으로 연관된 iNOS의 발현이 두 그룹간 큰 차이를 보인 점은 유산균 발효가 전사수준에서 iNOS 유전자를 조절하여 NO 생성을 효과적으로 억제한다는 것을 시사한다. 또한, pro-inflammatory cytokine에 보인 뛰어난 억제효과는 *L. casei*를 이용한 발효가 염증 억제에 효과가 있는 유효 성분의 추출물을 높여줄 수 있음을 보여준다. 본 연구를 바탕으로 향후 개선된 발효 조건을 확립하여 항염증 활성 물질 개발 연구에 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 기대되며, 톳 발효 추출물을 기능성 소재로 개발하기 위해서 항염증 억제 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 교육과학기술부와 한국연구재단의 지역혁신인력 양성사업으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다 (No. NRF-2013H1B8A2032201).

REFERENCES

- Kim, Y. S., S. J. Lee, J. W. Hwang, E. H. Kim, P. J. Park, and J. H. Jeong (2012) Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW 264.7 macrophages. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1205-1210.

- Park, S. H., J. I. Kim, Y. K. Jeong, and Y. H. Choi (2011) Extracts of *Allium fistulosum* attenuate pro-inflammatory action in the lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia cells. *Korean J. Life Sci.* 21: 796-804.
- Kim, Y. J. (2011) *Anti-inflammatory effect and mechanism of an extract from Anethum graveolens flowers*. MS Thesis. Yon-Sei University, Seoul, South Korea.
- Jin, K. S., J. Y. Lee, H. J. Kwon, and B. W. Kim (2014) Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Ardisia arborescens* ethanol extract. *Korean J. Life Sci.* 24: 713-720.
- Cho, W. I. (2010) *Anti-inflammatory effect of Houttuynia cordata extract in lipopolysaccharide-induced Raw 264.7 Cells*. MS Thesis. Chung-Ang University, Seoul, South Korea
- Jung, Y. S., C. S. Eun, Y. T. Jung, H. J. Kim, and M. H. Yu (2013) Anti-inflammatory effects of *Picrasma quassioides* (D.DON) BENN leaves extracts. *Korean J. Life Sci.* 23: 629-636.
- Kang, C. H., S. H. Han, and J. S. So (2013) Anti-inflammatory effect of chloroform extract from *Potentilla chinensis*. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* 28: 13-17.
- Jeon, M. R. and S. H. Choi (2012) Quality characteristics of pork patties added with seaweed powder. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 32: 77-83.
- Park, S. H., S. J. Lee, M. J. Jeon, S. Y. Kim, O. J. Mun, M. H. Kim, C. S. Kong, D. G. Lee, K. H. Yu, Y. Y. Kim, and S. H. Lee (2014) Evaluation of biological activities of fermented *Hizikia fusiformis* extracts. *Korean J. Life Sci.* 24: 304-310.
- Song, H. S., H. K. Kim, H. O. Min, J. D. Choi, and Y. M. Kim (2011) Changes in physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiforme* water extract by fermentation of lactic acid bacteria. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* 44: 104-110.

11. Choi, W. S., H. S. Kwon, R. H. No, G. P. Choi, and H. Y. Lee (2013) Enhancement of anti-inflammatory activities of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 39: 303-311.
12. Moon, Y. G., K. J. Lee, K. Y. Kim, C. B. Song, Y. J. Jeon, and M. S. Heo (2006) Characteristics of by-product ferment using probiotics as starter. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 158-165.
13. Hyon, J. S., S. M. Kang, S. W. Han, M. C. Kang, M. C. Oh, C. K. Oh, D. W. Kim, Y. J. Jeon, and S. H. Kim (2009) Flavonoid component changes and antioxidant activities of fermented *Citrus grandis* peel. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 1310-1316.
14. Kim, D. H., E. Y. Hwang, and J. H. Son (2013) Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorious* seed extract in Raw 264.7 cells. *Korean J. Life Sci.* 23: 55-62.
15. Lee, S. Y., J. M. Hyun, S. S. Kim, S. M. Park, K. J. Park, Y. H. Choi, S. H. Kim, S. N. Yu, and S. C. Ahn (2014) Anti-inflammatory effect of *Citrus unshiu* peels fermented with *Aspergillus niger*. *Korean J. Life Sci.* 24: 750-756.
16. Kong, C. S. (2014) Anti-inflammatory activity of the solvent-partitioned fractions from *Spergularia marina* in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Prev. Nutr. Food Sci.* 19: 261-267.
17. Han, M. H., M. H. Lee, S. H. Hong, Y. H. Choi, J. S. Moon, M. K. Song, M. J. Kim, S. J. Shin, and H. J. Hwang (2014) Comparison of anti-inflammatory activities among ethanol extracts of *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Dictamnus dasycarpus*, and their mixtures in RAW 264.7 murine macrophages. *Korean J. Life Sci.* 24: 329-335.
18. Bae, G. S., B. Y. Jo, M. S. Kim, K. C. Park, B. S. Koo, S. W. Seo, S. G. Kim, S. W. Yun, W. S. Jung, Y. W. Ham, H. J. Song, M. J. Youn, H. S. Jeon, K. B. Kwon, J. H. Kim, and S. J. Park (2009) Anti-inflammatory effects of *Sophora japonica* aqueous extract. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* 23: 1392-1398.