

Enhancement of Anti-inflammatory Activity by Fermentation of *Sargassum siliquanstrum*

Sol-Ji Lee¹, Dong-Geun Lee¹, Mihyang Kim², Chang-Suk Kong², Ki-Hwan Yu³, Yuck-Young Kim³ and Sang-Hyeon Lee^{1*}

¹Department of Bioscience, Graduate School, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea

³ISAAC F&B Co., Marine Bio-industry Department Center, Busan 619-912, Korea

Received January 14, 2016 / Revised February 3, 2016 / Accepted February 3, 2016

This study was aimed to verify anti-inflammatory activity of fermented *Sargassum siliquanstrum* with lactic acid bacteria. Anti-inflammatory activities were compared by measuring the amount of nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages and suppressive effect on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in stably transfected RAW 264.7 cells. Inhibitory activities of NO production and iNOS expression were measured after confirmation of NO radical scavenging activities. Fermentation increased NO radical scavenging activities from 7.6% to 15.2% compared to non-fermented condition, and fermentation with *Lactobacillus* sp. SH-1 was the most efficient. Fermentation without algal debris showed better NO radical scavenging activities than that with debris. Fermentation with *Lactobacillus* sp. SH-1 also showed the highest NO production inhibitory activity (64.1%) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. LPS-induced iNOS expression was diminished to 28.6, 35.6, 49.4 and 58.5 at 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml, respectively, by fermentation with *Lactobacillus* sp. SH-1. According to MTT assay, fermented *S. siliquanstrum* did not influence the cell viability at all concentrations tested, meaning no or less cytotoxicity. These results suggest that *S. siliquanstrum* has NO radical scavenging activity and anti-inflammatory activity. Thus biological activities of *S. siliquanstrum* were upgraded by fermentation, which could be used for the development of functional foods.

Key words : Anti-inflammatory, fermentation, immunity, nitric oxide, *Sargassum siliquanstrum*

서 론

해조류는 단백질과 지방의 함량이 낮고 탄수화물의 함량이 높으며, 칼륨, 요오드, 칼슘 등의 각종 무기염류와 비타민 A, C 등의 함량이 높은 자원이며, 특히 갈조류는 alginate와 laminaran 및 fucoidan 등과 같이 인체에 유용한 다당류뿐만 아니라 여러 생리활성물질을 함유하고 있다[24, 32]. 해조류의 다양한 생리활성에 대한 연구들이 증가되고 있으며, 현재까지 알려진 생리활성은 항산화[17], 항암[5], 항염증[15], 항혈액응고[21] 및 면역조절 작용[25] 등이 있다.

해조류 중에서 갈조식물 모자반과에 속하는 파배기모자반 (*Sargassum siliquanstrum*)은 우리나라 동해안 중부 이남에서부터 남해안, 서남해안 및 제주도 일대 등에 폭넓게 자생하고 있는 해조류로서, 가지가 3릉형이고 파배기 모양으로 꼬이는

것이 특징이다[12, 14]. 최근에는 파배기모자반에 대한 유용성분 탐색이나 다양한 생리활성 검증 등의 많은 연구가 시도되고 있으며, 항균활성[23], 간보호활성[29], 세포독성 억제[28], 항산화활성[6] 등의 다양한 효능이 입증되고 있다.

파배기모자반의 생리활성에 대한 연구에서는 주로 열수 및 에탄올 등을 이용하거나 알칼리 및 산 또는 효소를 처리하는 등의 일반적인 처리 공정들을 이용하고 있으나, 이는 해조류에 포함된 비소화성 복합다당류 등의 유용성분 및 생리활성물질을 효과적으로 추출하기가 어려우며, 추출 과정에서 여러 가지 생리활성 물질이 변질 및 파괴되거나 해조류 특유의 향, 풍미, 조직감 등에 대한 문제점이 발생할 수 있다[9]. 따라서 해조류를 고부가가치 소재로 활용하기 위해서는 추출공정에서의 문제점을 해결하면서 기존의 생리활성을 증진시킬 수 있는 생산 및 가공 공정의 개발이 필요하다.

이에 대한 대안으로서 시도되고 있는 방법은 유용 미생물을 이용한 발효이다. 하지만 해조류 발효에 대한 연구는 극히 제한적으로 이루어지고 있으며, 발효 추출물에 대한 체계적인 안전성 및 기능성 평가의 보고는 미흡한 실정이다[9, 34]. 발효식품은 비발효물에 비하여 영양적, 기능적으로 우수하다[16, 18, 35, 36]. 전통적으로 다양한 발효식품에 이용되는 미생물인 유산균은 프로바이오틱스(probiotics)로서 소화 흡수를 돕

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

고, 장내부패를 억제하며, 설사 및 변비를 치료하고, 비타민 생성, 혈중 콜레스테롤 저하, 항암 효과, 면역 능력 증강 등의 다양한 기능을 가지고 있다고 보고되어 있다. 특히 발효식품에서 유산균은 맛, 풍미 등을 개선시키고, 발효산물의 특성을 결정하며, 유기산 및 박테리옌 등의 항균물질을 생성하여 식품의 저장성에도 기여한다[30, 33].

인체의 면역체계는 외부로부터 침입하는 병원체로부터 인체를 지켜내는 중요한 역할을 하는데, 이런 면역체계를 이루는 중요한 세포들 중 하나가 대식세포(macrophage)이다. 대식세포는 염증반응에 관여하는 세포로 병원균과 같은 외부 자극에 의해 활성화되면 nitric oxide (NO) 등과 같은 염증매개물질을 분비하여 생체를 보호하는 등의 초기 염증반응에 중요한 역할을 한다[2, 13, 27]. 하지만 염증반응이 지속되면 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 등에 의해 cytokine들이 다량 분비되어 관절염, 다발성 경화증 및 천식 등의 만성 염증질환이나 당뇨병 및 심혈관 질환 등의 각종 질병을 발생시키는 것으로 보고되어 있다[31]. Nitric oxide (NO)는 매우 불안정한 자유라디칼(free radical)로서 L-arginine의 guanidinonitrogen이 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 변환되어 생성되며, 신경계, 면역계, 심장혈관계에 있어서 중요한 전달 물질로서 신경보호성과 독성의 기능을 동시에 가져 쇼크와 다른 신경 퇴행성 질병의 발생에도 관여하는 것으로 알려져 있다[3, 10]. NO는 많은 생리적 기능에 관여하고 있으나, 과도한 NO 생성은 신경 세포의 사멸을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 또한, NOS의 과다발현은 뇌출혈, 뇌성마비, 뇌졸중 등의 뇌손상이나 알츠하이머병 및 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌신경질환의 신경독성과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다[4]. 한편 파악하기 어려운 NOS 대신 reporter로 luciferase를 이용하여 적송잎 추출물의 NOS 발현저하능을 확인한 보고가 있었다 [19].

저자들은 이전 연구에서 유산균을 분리하였고 이를 이용한 파배기모자반의 최적 발효조건을 확립하였으며, 발효로 항산화활성이 증진되는 것을 검증하였다[22]. 본 연구에서는 유산균을 이용하여 발효한 파배기모자반이 NO 생성 및 lipopolysaccharide (LPS) 유도성 iNOS 발현에 미치는 영향을 검토하여 발효 파배기모자반의 항염증 및 면역 효과를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 본 연구팀에 의해 제작된 reporter system을 도입한 RAW 264.7 대식세포[19]를 립된 발효공정을 통해 증진되는 파배기모자반의 항염증 및 면역 증진효과를 검증하는데 이용하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용한 파배기모자반은 (주)파라제주(Jeju Island, Korea)에서 판매하는 것을 제공받아 초미세분쇄기 KMS-200

(Korea Medi Co., Korea)으로 분쇄한 후 실험에 이용하였다.

시료의 제조

파배기모자반의 발효는 Fig. 1과 같은 방법으로 유산균을 이용하여 진행하였다. 발효에 이용된 유산균은 4종으로 이전 보고에서 분리한 *Weissella* sp. SH-1, *Lactobacillus* sp. SH-1, *Streptococcus* sp. SH-1, *Leuconostoc* sp. SH-1 등이었다[22]. 유산균은 각각 MRS 액체배지(1 l)에 접종하여 37°C에서 정치배양한 후 원심분리(3,000× g, 15 min)를 통하여 균체를 회수하고, 증류수로 세척한 후 발효에 이용하였다. Seaweed broth는 5% 파배기모자반 분말, 3% 효모 추출물 및 1% 포도당을 포함하며, 121°C에서 1시간 동안 추출한 후 두 그룹으로 나누어 제조하였다. 해조류 침전물이 포함된 SBD군(seaweed broth with debris)과 원심분리(3,000× g, 15 min)를 통하여 해조류 침전물을 제거한 SBO군(seaweed broth without debris)으로 구분하여 제조한 후 발효에 이용하였다. 발효는 seaweed broth 1 l당 10⁵ CFU/ml의 유산균을 접종한 후 30°C에서 2일간 진행하였다. 발효가 끝난 시료는 -80°C에서 동결한 후 동결건조장치(FD8518, Ilshin BioBase, Korea)를 이용하여 동결건조하였고, 이를 통해 획득된 건조고형물로 NO 라디칼 소거능, 항염증 및 면역 효과를 검증하였다.

NO radical 소거능

Nitric oxide (NO) free radical 소거활성은 Marccoci의 방법 [26]을 응용하여 측정하였다. 20 mM phosphate buffer (pH

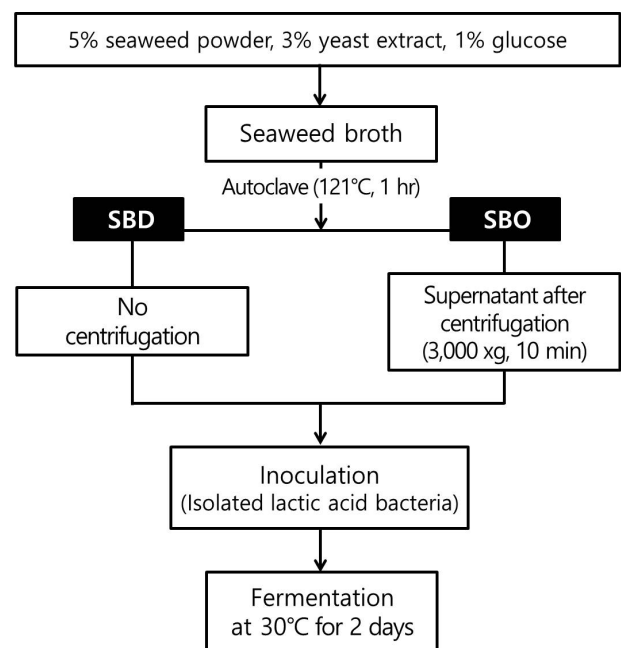


Fig. 1. Procedure of fermentation of *S. silvianstrum* (SBD, seaweed broth with debris; SBO, seaweed broth without debris).

7.4)에 녹인 시료 500 μ l에 10 mM sodium nitroprusside 용액 500 μ l를 첨가하여 25°C에서 150분간 반응한 후 원심분리 (12,000 \times g, 10 min)하여 상등액을 취했다. 대조군은 시료 대신에 20 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하였다. 분리한 상등액에 Griess 용액 1 ml를 넣어 혼합한 후 25°C에서 10분간 반응시켰고, 96 well plate에 200 μ l씩 분주한 후 Multiplate Reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 사용하여 542 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였으며, 다음과 같은 식으로 NO 소거활성을 계산하였다.

$$\text{NO free radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (S - C)\} \times 100$$

S : Sample (sample added with Griess solution)
C : Control (buffer added with Griess solution)

MTT assay를 이용한 세포독성 측정

RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (Corning, USA) 및 penicillin-streptomycin (100 units/ml, Corning)을 포함하는 DMEM (Corning, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다.

RAW 264.7 세포의 생존율은 Chung 등이 사용한 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) 환원 방법을 이용하여 측정하였다[7]. 10% FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지를 이용하여 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 well당 1.0 \times 10⁴개로 접종하고, 하룻동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양한 후 시료 10 μ l를 첨가하여 24시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 MTT 용액(5 mg/ml) 10 μ l 및 DMEM 배지 90 μ l를 첨가하여 동일한 배양 조건으로 4시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 각 well 당 10% DMSO 200 μ l를 첨가하여 570 nm에서 흡광도를 Multiplate Reader를 이용하여 측정하였다.

NO 생성 억제능

배양된 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.0 \times 10⁴개로 분주하고, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 하룻동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 새로운 배지로 교체한 후 NO 생성을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide (LPS, 최종 농도 1.0 μ g/ml)를 첨가하여 1시간 동안 전처리한 후 시료를 발효추출물의 농도별로 처리하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 상등액과 Griess reagent (Sigma, USA)를 1:1로 혼합하여 15분간 실온에 방치한 후 Multiplate Reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 생성된 NO의 양을 계산하여 항염증 효과를 검증하였다.

iNOS 발현 억제

본 연구진에 의해 제작된 iNOS 발현 억제 검증용 세포주 RAW 264.7/pGL2-Neo-miNOS_pro11 [19]를 10% FBS를 포

함하는 DMEM 배지를 이용하여 하룻동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다.

배양된 세포가 60 mm dish에서 약 90%의 세포밀도(confluence)가 되었을 때 PBS 2 ml로 1회 세척한 후 새로운 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지로 교환하였다. 여기에 LPS (최종농도 1.0 μ g/ml)를 첨가한 후 시료를 농도별로 각각 5 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 48시간 동안 배양하였으며, 표준물질로는 동일한 농도의 saponin (Sigma, USA)을 사용했다. 그 후 세포를 수확하고 1X PBS로 2회 세정한 후, 원심분리(4°C, 1,700 \times g, 5분)하여 상등액을 제거하였다. 이후 세포 침전물에 1 \times lysis buffer 250 μ l를 첨가하여 세포를 용해시키고 실온에서 30분간 방치한 후, 각 세포추출물 20 μ l의 luciferase 활성을 측정하였다. Luciferase 활성은 luciferase assay kit (Promega, WI, USA)를 사용하여 제조사의 manual을 토대로 수행하였으며, TD-20/20 Luminometer (Turner Design, Sunnyvale, USA)를 이용하여 측정하였다. 결과값은 BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)로 측정된 세포 추출물의 단백질 함량으로 표준화하였다.

통계처리

실험 결과는 모두 평균치와 표준편차로 나타내었으며, IBM SPSS Statistics Ver. 20 (IBM, NY, USA)을 이용하여 one-way ANOVA로 통계적 유의성을 검증하였고, 사후검정으로는 Duncan's post-hoc test 및 t-test를 실시하였다. 모든 통계적 유의성은 $p < 0.001$ 이상의 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

Nitric oxide (NO) radical 소거활성

Nitric oxide (NO)는 산화질소인 아르기닌(C₆H₁₄N₄O₂)으로부터 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase)에 의하여 생성되는 산화물질로서, NO의 소거활성 측정을 통해 항산화 효과를 검증할 수 있다[8]. 발효 파쇄기모자반의 NO radical 소거활성을 측정된 결과, 전반적으로 시료의 농도가 증가할수록 소거활성이 증가하였으며, 24.86~81.48%의 소거활성을 보였다(Table 1). 또한 비발효균에 비해 발효균의 NO radical 소거활성이 유의적으로 높게 나타났으며, 전반적으로 SBD균에 비해 SBO균의 활성이 높았다. 특히 발효균 중 *Lactobacillus* sp. SH-1 접종균의 경우에는 SBD와 SBO 모두 1,000, 500 μ g/ml 농도에서 그리고 SBO는 100, 50 μ g/ml 농도에서도 양성대조군인 ascorbic acid의 활성보다 약 10% 더 높게 나타났다.

Eom 등[9]의 다시마에 대한 연구에 따르면 50, 100 μ g/ml 농도에서 각각 12.3%, 29.6%의 NO 소거활성을 나타낸 다시마 추출액에 비해 다시마 발효액의 NO 소거활성은 29.9%와 57.9%로 발효과정을 통해 항산화 활성이 증가하였다. Ahn 등 [1]은 다양한 해조류 추출물의 NO 소거활성을 조사하였는데

Table 1. NO radical scavenging activities (%) of fermented SBD and SBO

Sample concentrations (µg/ml)		1,000	500	100	50
P-CON	Ascorbic acid	81.48±4.03 ^a	68.74±2.33 ^{d,e}	50.86±0.84 ⁿ	43.63±3.22 ^o
Fermented SBD	No seeding	51.83±1.93 ^{m,n}	39.05±0.42 ^{q,r}	28.10±1.61 ^s	24.86±0.79 ^s
	<i>Weissella</i> sp. SH-1	68.43±0.34 ^{d,e}	60.73±0.34 ^{g,h,i}	53.53±0.48 ^{l,m,n}	42.39±1.03 ^{o,p,q}
	<i>Lactobacillus</i> sp. SH-1	74.41±0.33 ^b	67.88±0.72 ^e	57.85±0.85 ^{ij,k}	54.34±0.12 ^{k,l,m,n}
	<i>Streptococcus</i> sp. SH-1	59.97±0.72 ^{g,h,i}	53.16±1.35 ^{m,n}	43.49±1.55 ^o	37.52±0.64 ^r
	<i>Leuconostoc</i> sp. SH-1	66.21±1.58 ^{e,f}	62.51±0.95 ^{f,g,h}	50.79±0.76 ⁿ	44.80±4.51 ^o
Fermented SBO	No seeding	59.35±2.55 ^{h,i,j}	44.27±2.43 ^o	39.55±0.69 ^{p,q,r}	35.79±1.66 ^r
	<i>Weissella</i> sp. SH-1	72.85±1.11 ^{b,c}	62.52±0.55 ^{f,g,h}	55.70±0.13 ^{jk,l,m}	44.86±1.04 ^o
	<i>Lactobacillus</i> sp. SH-1	74.53±0.47 ^b	69.42±1.39 ^{c,d,e}	62.07±0.14 ^{g,h}	57.77±0.32 ^{ij,k}
	<i>Streptococcus</i> sp. SH-1	61.11±1.37 ^{g,h,i}	58.47±0.92 ^{h,i,j}	55.68±0.51 ^{jk,l,m}	43.37±0.58 ^{o,p}
	<i>Leuconostoc</i> sp. SH-1	72.34±0.62 ^{b,c,d}	67.91±0.79 ^e	59.72±0.97 ^{g,h,i,j}	43.55±0.83 ^o

Mean±SEM for three tests are shown as NO radical scavenging activity (%). ANOVA with Duncan's post-hoc test ($p < 0.001$) compared with no seeding. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

그 중 모자반 속은 약 40 µg/ml의 농도에서 50%의 NO 소거활성을 나타냈다. 따라서 파배기모자반은 높은 NO radical 소거활성을 나타내어 뛰어난 항산화효과를 가지는 것으로 사료되었으며, 발효를 통해 NO radical 소거활성을 증진시킬 수 있다고 판단되었다.

RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향

세포 내 생리활성 측정에는 전반적으로 NO radical 소거활성능이 높은 SBO균을 이용하여 수행하였다. 먼저 대식세포인 RAW 264.7 세포에 대해 SBO와 발효 SBO가 독성을 나타내는지의 여부를 조사하기 위하여 시료를 50, 100, 500, 1,000 µg/ml 등의 다양한 농도로 24시간 동안 세포에 처리하고, MTT법으로 세포의 생존율을 조사하였다. 모든 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었으며, 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교한 결과, 모든 시료에서 통계적으로 유의하지 않은 결과를 도출하였으므로(자료미제시), SBO와 발효 SBO는 세포 독성을 가지지 않는다고 판단되었다.

Nitric oxide (NO) 생성 억제능

발효 파배기모자반에 대한 항염증 활성을 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 세포 내 NO 생성을 유도한 후 시료를 처리하여 NO 생성 억제능을 측정하였다(Fig. 2). 전반적으로 시료의 농도가 증가할수록 NO 생성 억제능이 증가하였으며 파배기모자반의 SBO와 발효 SBO는 항염증 효과를 가지는 것으로 사료되었다. 또한, 1,000 µg/ml의 농도에서 발효균의 NO 생성 억제능이 비발효균에 비해 통계적으로 유의하게 증가하는 것으로 보아, 발효를 통해 파배기모자반의 항염증 활성을 증진시킬 수 있다는 것을 검증하였다. 특히, *Lactobacillus* sp. SH-1 접종균의 경우는 1,000 µg/ml의 농도에서 64.1%로 가장 높은 NO 생성 억제능을 보였으므로, *Lactobacillus* sp. SH-1이 가장 효과적인 발효 유산균이라고 판

단되었다.

Kwon 등[20]의 연구에서는 50, 100, 500 µg/ml의 농도에서 33.3~74.8 µM의 NO 생성 정도를 나타낸 톱 추출물에 비해 톱 발효물은 13.7~56.2 µM의 NO 생성 정도를 나타내어 발효를 통해 항염증 활성이 증가한다고 보고하였다. 또한, NO 생성 억제에 대한 다시마 추출액 및 그 발효액의 효과를 측정할 결과, 100 µg/ml 농도에서 NO 생성 억제능이 다시마 추출액

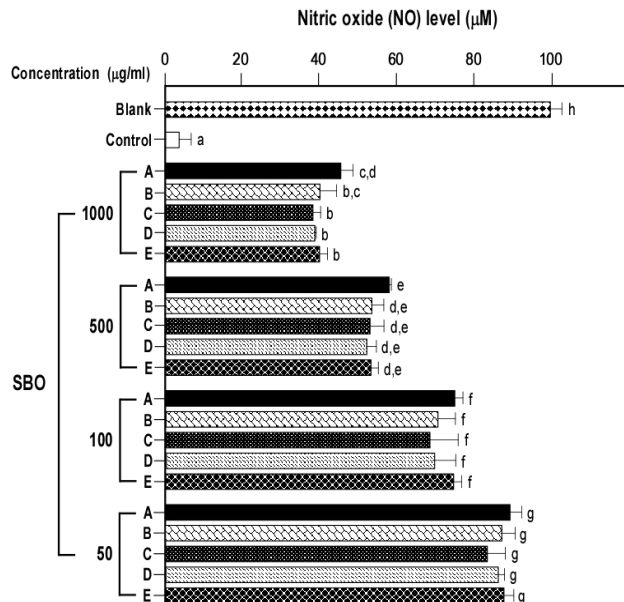


Fig. 2. NO level (µM) of fermented SBO in LPS-stimulated RAW 264.7 cells (A, no seeding ■; B, *Weissella* sp. SH-1 ▨; C, *Lactobacillus* sp. SH-1 ▩; D, *Streptococcus* sp. SH-1 ▪; E, *Leuconostoc* sp. SH-1 ▫). Mean±SEM for three tests are shown as NO level (µM). ANOVA with Duncan's post-hoc test ($p < 0.001$) compared with blank (LPS alone). This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

은 21.8%이며, 다시마 효모발효액은 34.2%로 NO 생성 억제능이 약 12% 증가되어 효모 발효를 통해 항염증 활성이 증가되었다고 보고하였다[9]. 항염증 활성이 증진된 발효 해조류의 NO 생성 억제능을 비교하였을 때, 본 연구에서 사용한 발효 파베기모자반은 100 µg/ml의 농도는 발효 파베기모자반이 0.2 mg/ml의 농도로 포함된 추출물로 31.3%의 저해능을 나타내었으며, Eom 등[9]은 발효 다시마가 0.27 mg/ml의 농도로 포함된 추출물은 34.2%의 저해능을 보였으며, Kwon 등[20]은 발효 토티 0.24 mg/ml의 농도로 포함된 추출물은 35.7%의 저해능을 나타낸다고 보고하였는데 발효 파베기모자반은 비교적 높은 항염증 활성을 보였다.

따라서, 파베기모자반은 뛰어난 항염증효과를 나타내며, 발효를 통해 더 증진된 효과를 얻을 수 있다고 판단되었다

LPS 유도 iNOS 발현 저해효과

Nitric oxide (NO)는 많은 생리적 기능에 관여하고 있지만 과도하게 생성될 경우 세포가 사멸되는 것으로 알려져 있다. Nitric oxide synthase (NOS)는 NO 합성효소로서 항상 발현되는 constitutive 형(cNOS)과 면역반응에 의해 발현되는 inducible 형(iNOS)으로 구분된다. iNOS는 활성화된 세포에서 유도되어 병리생태학적으로 중요한 역할을 한다. NOS의 과다 발현은 뇌손상(뇌출혈, 뇌성마비, 뇌졸중 등) 및 퇴행성 뇌 신경질환(알츠하이머병, 파킨슨병 등)의 신경독성과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다[11].

따라서, 발효 파베기모자반의 LPS 유도성 iNOS 발현에 대한 저해효과를 확인하였다(Fig. 3). 시료를 처리하였을 때, LPS 유도성 iNOS 발현에 대하여 reporter 단백질인 luciferase의 활성이 낮게 측정되었을 때 iNOS 발현저해 활성이 높다고 판단하였다[19]. 전반적으로 모든 시료는 농도 의존적으로 iNOS 발현을 저해하였으므로, 파베기모자반의 SBO균과 발효SBO균은 iNOS 발현저해 활성을 나타낸다고 사료되었다. 또한 1,000 µg/ml의 농도에서 모든 발효균은 비발효균에 비해 약 5~10% 높은 iNOS 발현 저해효과를 나타내었으며, 통계적으로 유의하였다. 특히 *Lactobacillus* sp. SH-1 점종균의 경우에는 50, 100, 500, 1,000 µg/ml의 농도에서 각각 28.6, 35.6, 49.4, 58.5%로 가장 높은 iNOS 발현 저해효과를 나타내었다. 따라서, 파베기모자반은 항염증 효과와 함께 iNOS 발현저해 활성을 가지며, 발효를 통해 효과를 증진시킬 수 있다는 것을 검증하였다.

본 연구에서 사용한 파베기모자반과 같이 해조류를 사용하여 iNOS 발현저해 활성을 확인한 보고는 Jeon 등[11]의 토티 에탄올 추출물 및 수층 분획물로 연구한 사례가 있다. 또한 적송잎 열수 추출물의 경우 50, 500 µg/ml의 농도에서 iNOS 발현이 각각 88, 92% 저해되어 양성대조군인 saponin과 동일 농도에서 비슷한 iNOS 발현저해활성을 나타내었다[19]. 본 연구에서 사용한 해조류 파베기모자반과 타 연구에서 사용한

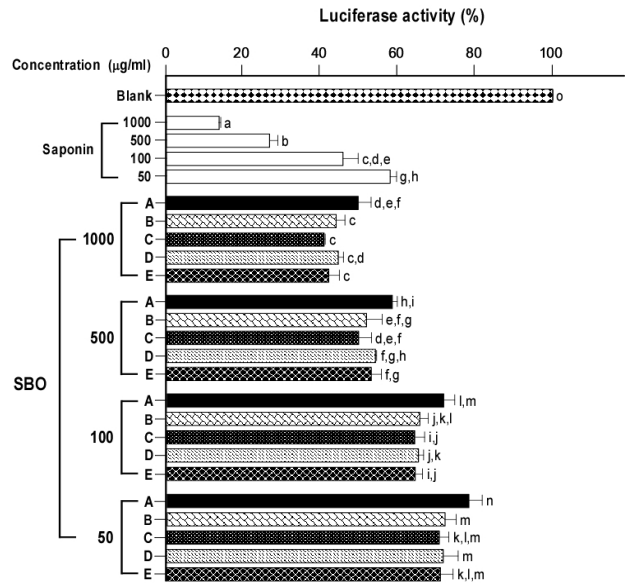


Fig. 3. Verification of suppressive effect of fermented SBO on LPS-induced iNOS expression using the *in vitro* detection system (A, no seeding ■; B, *Weissella* sp. SH-1 ▨; C, *Lactobacillus* sp. SH-1 ▩; D, *Streptococcus* sp. SH-1 ▪; E, *Leuconostoc* sp. SH-1 ▫). Mean±SEM for three tests are shown as NO level (µM). ANOVA with Duncan's post-hoc test ($p<0.001$) compared with blank (LPS alone). This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

톯 추출물의 iNOS 발현저해효과를[11] 유사한 농도에서 살펴 보았을 때, 파베기모자반 추출물의 경우 1 mg/ml의 농도로 사용하였을 때 58.5%의 iNOS 발현저해활성을 나타내었으며, 토티 추출물의 경우 0.5 mg/ml를 사용하였을 때 60%의 저해활성을 나타냈다. 하지만 추출원료로 사용한 파베기모자반은 50 g이고 토티는 500 g이었다. 따라서 파베기모자반의 발효추출물이 더 우수한 것으로 사료되었다. 파베기모자반의 NO 생성억제(Fig. 2)는 iNOS 발현의 억제와 연관이 있다는 것을 유추할 수 있었다. 따라서 발효 파베기모자반은 뛰어난 NO 생성억제능을 가지고 있으며, 발효를 통해 NO 생성억제능을 더 증진시킬 수 있을 것이라고 판단되었다. 발효 파베기모자반이 뛰어난 항산화[22] 및 항염증(Table 1, Fig. 3) 활성을 나타내므로 이를 이용한 기능성 소재 등의 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

감사의 글

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

References

1. Ahn, S. M., Hong, Y. K., Kwon, G. S. and Sohn, H. Y. 2011. Evaluation of antioxidant and nitrite scavenging activity of seaweed extracts. *J. Life Sci.* **21**, 576-583.
2. Andreaskos, E., Foxwell, B. and Feldmann, M. 2004. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? *Immunol. Rev.* **202**, 250-265.
3. Bredt, D. S. and Snyder, S. H. 1994. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* **13**, 301-313.
4. Chabrier, P. E. and Auguest, M. 1999. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 1029-1035.
5. Cho, K. J., Lee, Y. S. and Ryu, B. H. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Kor. Fish. Soc.* **23**, 345-352.
6. Cho, S. H., Kang, S. E., Cho, J. Y., Kim, A. R., Park, S. M., Hong, Y. K. and Ahn, D. H. 2007. The antioxidant properties of brown seaweed (*Sargassum siliquastrum*) extracts. *J. Med. Food* **10**, 479-485.
7. Chung, M. J., Walker, P. A., Brown, R. W. and Hogstrand, C. 2005. Zinc-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **205**, 225-236.
8. Clark, D., Durner, J., Navarre, D. A. and Klessig, D. F. 2000. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *MPMI* **13**, 1380-1384.
9. Eom, S. H., Lee, B. J. and Kim, Y. M. 2010. Effect of yeast fermentation on the antioxidant and anti-inflammatory activity of sea tangle water extract. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **43**, 117-124.
10. Jaffrey, S. R. and Snyder, S. H. 1995. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 417-440.
11. Jeon, M. J., Kim, M. H., Jang, H. J., Lee, S. W., Kim, J. H., Kim, H. S. and Lee, S. H. 2012. Whitening effect of *Hizikia fusiformis* ethanol extract and its fractions. *J. Life Sci.* **22**, 889-896.
12. Kim, A. R. 2008. Antioxidant abilities of extracts from *Sargassum siliquastrum* treated with heat, pH and γ -irradiation. M.S. Thesis. Pukyong National University, Busan, Korea.
13. Kim, C. M. and Park, Y. M. 2009. The effects of different extracts of *Ostericum koreanum* on the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology* **24**, 169-178.
14. Kim, E. K. 2012. Studies on the bioactive compounds from *Sargassum siliquastrum*. M.S. Thesis. Hanbat National University, Daejeon, Korea.
15. Kim, J. Y., Kim, K. H., Suh, H. S. and Choi, W. C. 1997. Antiinflammatory effects of new chemical compounds, HS-1580 series (HS-1580, HS-1581, HS-1582). *J. Life Sci.* **16**, 1181-1187.
16. Kim, M. J. and Kim, G. R. 2006. *In vitro* evaluation of cholesterol reduction by lactic acid bacteria extracted from kimchi. *Kor. J. Culinary Res.* **12**, 259-268.
17. Kim, M. J., Song, E. J., Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Kim, S. J., Lee, S. J., Yoon, S. Y., Kim, A. R., Jeon, Y. J., Park, J. G., Choi, J. I., Lee, J. W., Byun, M. W. and Ahn, D. H. 2008. Effects of γ -irradiation on antioxidant and physicochemical properties of *Ishige okamurai* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1485-1490.
18. Kim, M. K., Kim, M. Y., Youn, E. K. and Kim, S. D. 2002. Extraction of citrus bioflavonoid with vinegars and effect on blood pressure. *Kor. J. Food Preserv.* **9**, 411-417.
19. Kim, N. Y., Jang, H. J., Lee, D. G., Jang, M. K., Lee, S. W., Jeon, M. J., Kim, M. H., Kim, S. G. and Lee, S. H. 2011. Establishment of *in vitro* detection system for iNOS expression and the verification of suppressive effect by pine needle extract. *KSBB J.* **26**, 172-176.
20. Kwon, M. S., Mun, O. J., Bae, M. J., Lee, S. G., Kim, M. H., Lee, S. H., Yu, K. H., Kim, Y. Y. and Kong, C. S. 2015. Anti-inflammatory activity of ethanol extracts from *Hizikia fusiformis* fermented with lactic acid bacteria in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 1450-1457.
21. Lee, H. J., Kim, J. H., Lee, C. H., Kim, J. S., Kwak, S. T., Lee, K. B., Song, K. S., Choi, B. W. and Lee, B. H. 1999. Inhibition activities of sea weeds on prolyl endopeptidase, tyrosinase and coagulation. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**, 231-237.
22. Lee, S. J., Lee, D. G., Park, S. H., Kim, M. H., Kong, C. S., Kim, Y. Y. and Lee, S. H. 2015. Comparison of biological activities in *Sargassum siliquastrum* fermented by isolated lactic acid bacteria. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **20**, 341-348.
23. Lee, S. Y., Kim, J. H., Kim, K. B. W. R., Song, E. J., Kim, A. R., Park, S. M., Han, C. S. and Ahn, D. H. 2007. Antimicrobial activities of medicinal herbs and seaweeds extracts against microorganisms isolated from the rice warehouses. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 476-480.
24. Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Song, E. J., Kim, J. H., Kim, A. R., Kim, M. J., Moon, J. H., Kang, H. M., Lee, H. D., Hong, Y. K. and Ahn, D. H. 2008. Effect of extracts from *Sargassum siliquastrum* on shelf-life and quality of bread. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 490-496.
25. Liu, J. N., Yoshida, Y., Wang, M. Q., Okai, Y. and Yamashita, U. 1997. B cell stimulating activity of seaweed extracts. *Int. J. Immunopharmacol.* **19**, 135-142.
26. Marcocci, L., Packer, L., Dory-Lefaix, M. T., Sakaki, A. and Gardes-Albert, M. 1994. Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract Egb 76. *Methods Enzymol.* **234**, 462-475.
27. Moncada, S. 1999. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J. R. Soc. Med.* **92**, 164-169.
28. Numata, A., Kanbara, S., Takahashi, C., Fujiki, R., Yoneda, M., Usami, Y. and Fujita, E. 1992. A cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile* and structures of chromenes. *Phytochemistry* **31**, 1209-1213.
29. Park, J. C., Choi, J. S., Song, S. H., Choi, M. R., Kim, K. Y. and Choi, J. W. 1997. Hapatoprotective effect of extracts and phenolic compound from marine algae in bromobenzene-treated rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **28**, 239-246.
30. Park, M. J. and Han, J. S. 2006. Radical scavenging and anti-

- oxidant activities of fermented *Laminaria japonica* extracts. *J. Food Sci. Nutr.* **11**, 10-16.
31. Park, S. H., Kim, J. I., Jeong, Y. K. and Choi, Y. H. 2011. Extracts of lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia cells. *J. Life Sci.* **21**, 796-804.
32. Schwartzmann, G., Rocha, A. B., Berlinck, G. S. and Jimeno, J. 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncol.* **2**, 221-225.
33. Shobharani, P., Halani, P. M. and Sachindra, N. M. 2012. Potential of marine lactic acid bacteria to ferment *Sargassum* sp. for enhances anticoagulant and antioxidant properties. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 96-107.
34. Song, H. S., Kim, H. K., Min, H. O., Choi, J. D. and Kim, Y. M. 2011. Change of physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiformis* water extract by the fermentation of lactic acid bacteria. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **44**, 104-110.
35. Yang, J. O., Yoo, C. J., Kim, J. O. and Che, M. E. 1999. Utilization fermented tea-fungus beverage for the sports drink. *Kor. J. Phys. Edu.* **38**, 277-293.
36. Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Lee, K. H., Kwak, J. H., Baek, Y. J., Huh, C. S. and Kim, J. B. 1999. Fermented extracts of Korean mistletoe with *Lactobacillus* (FKM-110) stimulate macrophage and inhibit tumor metastasis. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 838-847.

초록 : 파배기모자반의 발효를 통한 항염증 활성의 증진

이솔지¹ · 이등근¹ · 김미향² · 공창숙² · 유기환³ · 김육용³ · 이상현^{1*}

(¹신라대학교 일반대학원 바이오과학과, ²신라대학교 식품영양학과, ³주이삭에프엔비)

본 연구에서는 유산균으로 발효한 파배기모자반의 항염증 및 iNOS 발현저해 활성에 대하여 검증하였다. 항염증 활성은 lipopolysaccharide (LPS)로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 nitric oxide (NO)가 생성되는 양을 비교하여 나타내었으며, iNOS 발현저해 활성은 stable transfection시킨 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현에 대한 저해효과를 reporter인 luciferase의 활성을 확인하여 나타내었다. NO 생성 억제능과 iNOS 발현에 대한 실험은 NO radical 소거 활성을 확인한 후 수행하였다. NO radical 소거 활성은 발효균이 비발효균에 비해 7.6~15.2% 증가되었으며, *Lactobacillus* sp. SH-1으로 접종한 균이 가장 높은 활성을 나타내었다. 그리고 해조류 침전물을 포함하여 발효한 균보다는 해조류 침전물을 포함하지 않고 발효한 균이 더 높은 NO radical 소거 활성을 나타내었다. *Lactobacillus* sp. SH-1을 접종하여 발효한 균은 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 억제능이 가장 높게 나타났다(64.1%). 또한 *Lactobacillus* sp. SH-1 접종균은 50, 100, 500, 1,000 µg/ml의 농도에서 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현을 각각 28.6, 35.6, 49.4, 58.5% 감소시켰다. MTT법에 따르면, 발효 파배기모자반은 모든 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으므로, 세포독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다. 본 연구에서는 NO radical 소거 활성, 항염증 및 iNOS 발현저해 활성 등의 파배기모자반이 가지는 생리활성을 확인하였다. 따라서 발효에 의해 생리활성이 개선된 파배기모자반을 이용하여 기능성 식품을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.