

## Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities of Fermented Turmeric (*Curcuma longa* L.) by *Rhizopus oryzae*

Eun-Ju Kim, Bit-Na Song, Da-Som Jeong, So-Young Kim, Yong-Sik Cho and Shin-Young Park\*

Fermentated Food Science Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Korea

Received September 15, 2017 / Revised November 10, 2017 / Accepted November 16, 2017

Turmeric is a rhizomatous herbaceous perennial plant (*Curcuma longa* (CL)) of the ginger family, Zingiberaceae. A yellow-pigmented fraction isolated from the rhizomes of CL contains curcuminoids belonging to the dicinnamoyl methane group. Curcumin is an important active ingredient responsible for the biological activity of CL. However, CL is not usually used as a food source due to its bitter taste. The present study was designed to determine the effect of the CL fermented by *Rhizopus oryzae* (FCL) on pro-inflammatory factors such as nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cell line. The cell viability was determined by MTT assay. To evaluate the anti-inflammatory effect of FCL 80% EtOH extracts, IL-6 and TNF- $\alpha$  were measured by ELISA kit. Also, the amount of NO/PGE<sub>2</sub>/NF- $\kappa$ B was measured using the NO/PGE<sub>2</sub>/NF- $\kappa$ B detection kit and the iNOS/COX-2 expression was measured by Western blotting. The results showed that the FCL reduced NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS, COX-2, NF- $\kappa$ B, IL-6 and TNF- $\alpha$  production without cytotoxicity. These results suggest that FCL extracts may be a developed the functional food related to anti-inflammation due to the significant effects on inflammatory factors.

**Key words** : Anti-inflammation, anti-oxidative, lipopolysaccharide, RAW 264.7 cells, turmeric

### 서 론

염증반응은 생체 조직의 손상이나 병원균의 침입으로부터 인체를 보호하고 세포를 재생하는 중요한 방어기전이다[23]. 그러나 이러한 방어기전이 인체에서 원활하게 이루어지지 않아 염증반응이 지속될 경우 만성피부질환, 류마티스 관절염, 기관지염, 위염, 다발성 경화증, 염증성 장질환 등과 같은 다양한 질환의 원인을 제공함으로써 염증반응을 조절할 수 있는 항염증제의 개발이 중요하다[20]. 염증반응에 관여하는 주요 세포는 대식세포(Macrophage)로, 혈액 내 monocyte 형태부터 분화된 형태로 인체 모든 조직 내에 분포하고 있어, 이상 자극에 대하여 즉각적으로 반응하여 염증을 유도하고 확대시키는 과정에서 매우 중요한 역할을 담당한다. 이미 많은 연구를 통해 염증 유발물질인 lipopolysaccharid (LPS)에 의한 대식세포의 cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS), nitric oxide (NO) 생성과 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 분비가 증가된다고 알려져 있으며

그 세포내 신호전달경로도 알려져 있다[15, 42]. 따라서 천연물 제제의 효능 평가 연구에 있어서 LPS에 의해 유도된 대식세포의 염증반응을 조절하는 연구 방법이 크게 이용되고 있다[17, 23]. 한편, 생체 대사 과정 중에 필연적으로 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하여 노화, 암, 심장질환, 동맥경화, 염증 등 다양한 질병을 일으키는 물질이다[11]. 특히 산화적 스트레스는 체내 염증의 진행 과정의 원인으로 알려져 있는데, 이와 관련된 ROS와 염증성 사이토카인은 염증성 질병의 매개체로서 중요한 역할을 한다[9]. 따라서 항산화 효과가 뛰어난 성분의 섭취에 의해 산화적 스트레스가 감소되면 만성적인 염증반응이 감소된다고 보고되고 있다[3, 37].

본 연구에서 사용한 울금(*Curcuma longa* L., turmeric)은 생강목 생강과에 속하는 다년생 숙근성 초본식물로 울금의 덩이 뿌리를 그대로 또는 주피를 제거하고 썬서 말린 것을 말하며, 한약재, 향신료 및 식용으로 사용되어왔다[30]. 울금의 약리 효과로는 살균, 해독, 천식, 알레르기, 대장암, 폐암, 유방암, 위암, 간암 등이 알려져 있다[12]. 울금의 이러한 생리활성 효과는 curcuminoid의 색소 성분의 작용에 의한 것이다. Curcuminoid는 주로 curcumin, demethoxycurcumin (DMC) 및 bisdemethoxycurcumin (BMC) 등 세 가지 화합물로 구성되어 있다[4, 35, 36]. 그 중에서도 황색색소로서 각종 약리적 활성을 가지고 있는 curcumin [32, 34]에 대한 많은 효능과 작용은 오래전부터 의학, 약학, 식품학 분야 등에서 다양한 연구가 보고되었다. 그러나 울금은 여러 기능성에도 불구하고 울금

#### \*Corresponding author

Tel : +82-63-238-3625, Fax : +82-63-238-3843

E-mail : soyoenj@korea.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.

특유의 냄새와 쓴맛으로 인해 소비자의 기호에 잘 맞지 않고, 기존에 나와있는 울금 제품들은 착즙액, 분말, 환 그리고 울금에서 추출한 curcumin을 함유한 차와 음료가 대부분으로 산업적 실용화가 부족한 실정이다. 최근 이러한 연구의 일환으로 바실러스 나토균(*Bacillus natto*)을 이용하여 발효시켜 울금의 생리활성과 기호성을 향상시키기 위한 연구, 황국 균주를 이용하여 발효시켜 울금 특유의 쓴맛과 냄새를 개선과 소비자의 음용 거부반응을 해소한 연구, 유산균으로 울금을 발효하여 울금의 유효성분인 BMC와 DMC의 함량비를 증가시키고 수용액상으로 curcumin의 추출율을 높여 생체이용률을 증가시킨 연구 등과 같이 울금을 소비자가 원하는 기호로 바꾸기 위한 연구가 많이 진행되고 있다[22].

본 연구에서는 누룩균(*Rhizopus oryzae*)을 이용한 새로운 발효방법으로 제조한 발효 울금 특유의 향과 쓴맛 개선효과, 항산화 활성 효과 그리고 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 항염 효과 등의 분석을 통해 기능성과 기호성 향상 여부를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 제조

본 연구에서 사용한 울금은 전라남도 진도군에서 재배 수확된 울금을 세척 후 동결건조기(Bondiro, Ilshin, Dongducheon, Korea)로 건조하여 사용하였다. 분쇄한 건조 울금은 10배에 해당하는 증류수(w/v)를 가하여 멸균하고, 2% *Rhizopus oryzae* (RO)를 접종하여 3일간 발효시켰다. 누룩균 발효 울금은 -80°C 초저온냉동기(deep freezer, Ilsin BioBase Co., Ltd., Korea)에서 24시간 동결시킨 후 동결건조기에서 3일 동안 건조시킨 것을 분쇄하여 시료로 사용하였다. 누룩균 발효 울금 5 g에 80% 에탄올 수용액 100 ml씩 가하여 ultrasonicator (Power Sonic 420, 50/60 HZ, 700W, Hwashin Co., Korea)로 1시간씩 2회 sonication하여 추출한 후 Whatman No. 2 (Whatman, Lawrence, KS, USA) 여과지로 여과시킨 후 200 ml로 정용하여 rotary vacuum evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 감압 농축 후 동결건조기로 건조하여 얻은 80% 에탄올 발효 울금 추출물 분말을 본 실험의 시료로 사용하였다.

### 환원당 측정과 유리당 분석

환원당은 dinitrosalicylic acid (DNS)법[31]에 따라 시료액 1 ml에 DNS reagent 1 ml를 가하여 15분간 끓인 다음, 냉각한 후 증류수 3 ml를 첨가하여 microplate reader (Biotek Synergy Mx, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 546 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이때 당의 정량은 glucose를 표준물질로 사용하여 표준곡선으로부터 환산하여 함량을 산출하였다.

유리당 분석은 HPLC (Waters 2695, waters Co., Miliford,

MA, USA)를 이용하여 분석하였다. FCL 80% 에탄올 추출물을 희석하여 0.45  $\mu$ m PVDF membrane filter를 여과한 것을 시험용액으로 하였고, column은 Prevail carbohydrate ES (5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm)을 사용하였으며, mobile phase는 acetonitrile: water 혼합액(70:30, v/v), flow rate는 1.0 ml/min, detector는 ELSD Signal (Waters 2424, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 사용하여 분석하였다.

### 맛 센서 이용한 관능검사(Taste Sensing Analysis)

발효 기간에 따른 FCL의 맛 변화를 살펴보기 위하여 맛 센서 분석기(TS-5000Z, Insent, Atsugi, Japan)를 이용하여 수행하였다. FCL 80% 에탄올 추출물을 에탄올이 20%(v/v)가 되도록 증류수에 희석한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리(Supra 25k, Hanil Co., Ltd., Incheon, Korea)한 상등액을 시료로 사용하였다. 맛 분석기에 시료를 35 ml씩 넣어 4회 맛을 측정 한 후 1회 차에 측정된 값을 제외한 나머지 값의 평균을 이용하여 나타내었다. 측정 항목으로는 쓴맛(Bitterness), 신맛(Sourness), 떫은 맛(Astringent), 떫은맛 후미(after-A), 감칠맛(Umami), 감칠맛 후미(Richness), 짠맛(Saltiness)의 값을 객관적으로 나타내었다[41].

### 성분 함량분석

FCL 80% 에탄올 추출물 성분함량분석은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Waters 2695, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 시료는 0.45  $\mu$ m PVDF membrane filter 여과하여 사용하였고, 분석조건은 다음과 같다. column은 YMC-pack pro C18 (5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm), mobile phase 조성은 solvent A water: acetic acid (99.9:0.1, v/v)와 solvent B acetonitrile: acetic acid (99.9:0.1, v/v)를 사용하였고, flow rate 및 column온도는 각각 1.0 ml/min, 30°C로 detector는 photodiode array detector (Water 2699, Waters Co.)를 사용하여 검출하였다. 표준물질은 curcumin, bisdemethoxycurcumin 그리고 demethoxycurcumin을 Sigma-Aldrich Co.로부터 구입하여 사용하였다.

### 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법[10]을 응용하여 측정하였다. FCL 80% 에탄올 추출물에 Folin-reagent 시약을 1 ml씩 차례로 가한 다음 실온에 3분간 방치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 1 ml를 혼합하고 다시 실온에 1시간 방치한 후 microplate reader (Biotek Synergy Mx, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 표준물질로 gallic acid을 이용하여 표준곡선을 작성한 후 환산하여 총 폴리페놀 함량을 계산하였다. 총 플라보노이드 함량은 Moreno방법을 이용하여 측정하였다[27]. FCL 80% 에탄올 추출물 0.5 ml에 10% aluminium nitrate 0.1 ml과 1 M potassium acetate 0.1 ml 및 추출용매 4.3 ml를

차례로 가하여 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 후 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 표준물질로 Quercetin (Sigma - Aldrich Co., Steinheim, Germany)을 이용하여 표준곡선을 작성한 후 환산하여 나타내었다.

#### DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical은 매우 안정한 활성산소(active oxygen species)로, 이 radical을 소거하는 정도로서 항산화 작용을 평가하였으며, FCL 80% 에탄올 추출물의 radical 소거활성은 Blois [6]의 방법을 이용하여 측정하였다. 1,1-di-phenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)용액 180  $\mu$ l와 FCL 80% 에탄올 추출물 20  $\mu$ l씩 혼합하여 96 well plate에 첨가하고 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 세포 배양

대식세포주 RAW 264.7 cells는 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 cells는 10% heat-inactivated FBS (Gibco BRL, Rockville, USA)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 포함하는 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, CA, USA)배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2일마다 배지를 교환하며 계대 배양하였다. 세포주를 활성화 시키기 위해 1  $\mu$ g/ml의 LPS (lipopolysaccharide, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA)를 처리하였으며 발효기간 별로 각각 농도(10, 50, 100  $\mu$ g/ml)의 FCL 80% 에탄올 추출물과 양성 대조군을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.

RAW-Blue cells (InvivoGen, San Diego, USA)은 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)를 측정하기 위한 세포로 위의 RAW 264.7 cell과 동일한 조건에서 배양하였고, 4~5회 계대 후 Zeocin (InvivoGen, San Diego, CA) 항생제를 처리 후 사용하였다.

#### 세포 생존율 측정

RAW 264.7 세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 환원 방법을 이용하여 측정하였다[16]. RAW 264.7 cells는 96-well plates에 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 분주한 뒤 12시간 동안 배양한 후, FCL 80% 에탄올 추출물을 최종농도(10, 50, 100  $\mu$ g/ml)가 되도록 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액(5 mg/ml)을 20  $\mu$ l 가하고 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 떨어지지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, CA, USA)를 200  $\mu$ l 분주하여 20분 동안 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### NF- $\kappa$ B 측정

FCL 80% 에탄올 추출물이 NF- $\kappa$ B pathway를 활성화시키는 지 확인하기 위하여 secreted alkaline phosphatase reporter gene이 안정적으로 transfection된 RAW-Blue cells (InvivoGen, San Diego, USA)을 사용하였다. NF- $\kappa$ B 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW-Blue cells을 96-well plate의 각 well당 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cell/ml가 되도록 분주하여 24시간 배양하였다. FCL을 최종농도(10, 50, 100  $\mu$ g/ml)가 되도록 세포에 처리하고 4시간 후 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하고 20시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 배양액 20  $\mu$ l와 QUANTI-Blue (InvivoGen, San Diego, USA) 200  $\mu$ l를 37°C에서 15분간 암실에서 반응시켰다. 모든 시료는 3회 반복으로 620 nm 파장에서 측정하였다[1].

#### Cytokine 생성량 측정

24-well plate에 RAW 264.7 세포를 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml이 되게 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체한 후 FCL 추출물을 10, 50, 100  $\mu$ g/ml의 농도에 LPS (1  $\mu$ g/ml) 농도로 처리하고 다시 20시간 동안 세포 배양기에서 배양하였다. 이후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 획득한 상등액으로 IL-6, TNF- $\alpha$ 를 mouse cytokine kit (Mouse IL-6, TNF- $\alpha$  ELISA Ready-SET-Go, eBioscience Co., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다.

#### Nitric oxide (NO) 함량 측정

RAW 264.7 세포를 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 24-well plate에 분주하여 24시간 배양한 후에 발효 기간별 FCL 80% 에탄올 추출물 100  $\mu$ g/ml로 처리하고 4시간 후 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하여 20시간 배양하였다. 세포 배양액 100  $\mu$ l와 Griess reagent (Promega, Madison, USA) 100  $\mu$ l를 혼합하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였고 sodium nitrate로 표준곡선을 작성하여 NO 함량을 산출하였다[21].

#### Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 측정

활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증 물질인 PGE<sub>2</sub> 생성량의 변화 측정을 위한 PGE<sub>2</sub> ELISA kit는 R&D systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. RAW 264.7 세포를 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 24-well plate에 분주하여 24시간 배양한 후에 발효 기간별 FCL 80% 에탄올 추출물 100  $\mu$ g/ml로 처리하고 4시간 후 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하여 20시간 배양하였다. 세포 배양액 내에 존재하는 PGE<sub>2</sub>의 양은 세포배양 상층액을 PGE<sub>2</sub> ELISA kit에서 제시한 방법으로 처리한 후 microplate reader를 이용하여 420 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

#### Western blot assay

염증 반응에 직접적으로 관여하는 대표적인 단백질인 COX-

2 (cyclooxygenase-2)와 iNOS (Inducible nitric oxide synthase)의 발현에 미치는 FCL 80% 에탄올 추출물의 효능을 평가하기 위해서 western blot assay를 실시하였다. Raw 264.7 세포는 100 mm dish에  $3 \times 10^5$  cell/ml로 분주한 뒤 하루 동안 배양했고, FCL은 발효기간별로 최종 농도(100 µg/ml)가 되도록 세포에 처리하고, 4시간 후 염증반응을 유도하기 위해 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 세포를 활성화시킨 후 20시간 배양하였다. 세포를 회수하기 위해 dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Gibco, USA)로 3회 세척한 후 세포를 모아 원심 분리하여 pellet에 RIPA buffer (GenDEPOT, Barker, TX, USA)를 첨가한 다음, 4°C, 13,000× g에서 10분간 원심 분리하고 상등액을 튜브에 옮겼다. 단백질 정량은 Bradford (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하였고 각각의 시료를 8% SDS polyacrylamide gel에서 영동하고 Nitrocellulose membrane (NC membrane)으로 전사하였다[7]. 전사된 NC membrane을 blocking buffer (0.5% BSA in TBS)에서 blocking한 후 1차 antibody (COX-2, iNOS, β-actin; Abcam, Cambridge, UK)를 1:200~1:1,000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 2차 antibody (Anti-mouse IgG, Anti-rabbit IgG; Abcam, Cambridge, UK)를 1:1,000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, ECL solution (GE Healthcare, Bio-Sciences Co., Piscataway, NJ, USA)을 반응시켜 단백질 발현 정도를 Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)를 사용하여 측정 후 정량하였다.

### 통계분석

본 실험의 결과는 3회 반복 실험을 실시한 뒤 mean ± SEM으로 나타내었으며, 각 군 간의 유의성의 검증은 SPSS 18.0 version (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Student t-test 및 ANOVA 법으로 검증하여 *p*값이 0.05 미만을 유의한 것으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

### 환원당과 유리당 함량분석

발효기간에 따른 환원당과 유리당의 변화는 Table 1에 나타내었다. 비 발효 울금에서 환원당 함량은 142.32 mg/100 g을 나타냈으며, 발효 1일차에 172.28 mg/100 g으로 가장 높음

환원당 함량을 나타냈었다. 그 이후 발효가 진행 될수록 환원당 함량이 낮아지는 경향을 보였다. 원료 중의 전분질은 당화 amylase 작용 하에 당분으로 분해됨과 동시에 효모의 영양원이나 발효 기질로 이용되므로 발효가 진행됨에 따라 환원당의 함량은 감소하게 된다[18]. 울금에 함유된 주요 유리당은 fructose, glucose와 sucrose 3개의 당이 확인되었고, 비 발효 울금의 유리당 함량은 fructose 158.87 mg/100 g, glucose 191.21 mg/100 g 그리고 sucrose 205.30 mg/100 g를 나타냈으며, fructose는 발효 1일차에 유리당 함량이 감소하였다가 발효 2일차에 174.07 mg/100 g으로 가장 높았고, glucose는 발효 1일차부터 증가하여 발효 2일차에 1192.70 mg/100 g으로 최대값을 나타내었다. Sucrose는 발효 1일차부터 유리당 함량이 감소하다가 발효 3일차에 273.31 mg/100 g으로 가장 높았다.

### 맛 분석

FCL의 발효 기간별 맛의 차이를 객관적으로 측정하기 위하여 맛 분석기(taste sensing system)를 사용하였다. 누룩균(RO)를 이용해 발효 기간 3일 동안의 FCL의 맛을 비교하여 분석한 결과(interpolation difference)는 Fig. 1과 같았다. Fig. 1 (A)는 발효 기간에 따른 80% 에탄올 FCL 추출물의 맛 분석의 절대값을 나타내었고, (B)는 비 발효군 대비 발효 기간별 값을 나타내었다. 비 발효 군에 비해 발효 1일차부터 쓴맛이 감소하는 경향을 보였고 3일차에 가장 크게 감소하였다, 신맛의 경우는 발효 1일차부터 증가하였고 발효 3일차에 최대값을 나타냈다. 쓴맛의 감소로 인하여 울금의 기호도가 향상 될 가능성이 있을 것으로 기대되었다.

### 성분 함량분석

발효 기간별 FCL의 curcuminoid 함량을 비교한 결과는 Table 2와 같다. HPLC를 이용한 정량분석 결과 비 발효 울금 80% 에탄올 추출물은 Curcumin이 315.91 mg%, BMC가 18.08 mg%, DMC 75.21 mg%의 함량을 나타냈다. 군 발효에 의해 울금의 Curcumin과 BMC의 함량의 발효 1일차에 감소하는 경향을 보였지만 발효 2일차에 418.99 mg%, 22.31 mg%로 가장 증가하였고, DMC 함량은 발효 1일차에 감소하였다가 3일차에 102.56 mg%로 발효 기간에 따라 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 1. Reducing sugar and free sugar contents of *Curcuma longa* fermented by *Rhizopus oryzae* (FCL)

Fermentation period (days)	Reducing sugar (mg/100g)	80% EtOH ext. (mg/100g)		
		Fructose	Glucose	Sucrose
NC	142.32±0.00 <sup>c</sup>	158.87	191.21	250.30
1	172.28±0.00 <sup>d</sup>	132.20	539.18	191.11
2	120.41±0.01 <sup>b</sup>	174.07	1192.70	157.82
3	78.99±0.01 <sup>a</sup>	114.38	390.68	273.31

<sup>a-d</sup>Means (n=3) in the same column not sharing a common letter are significantly different (*p*<0.05) by Duncan's multiple test.

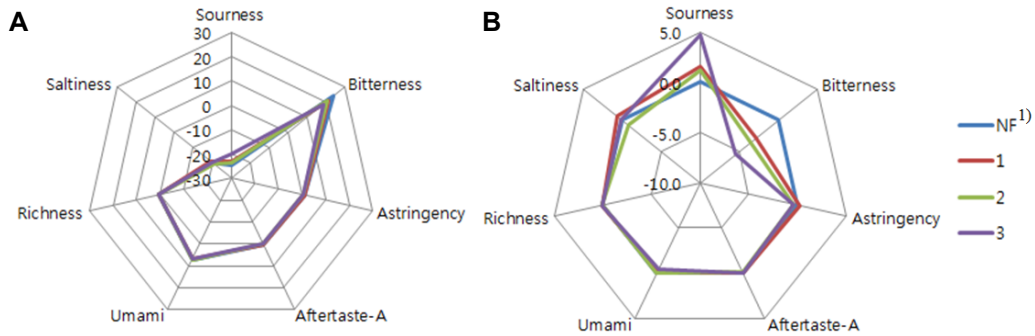


Fig. 1. Taste sensing analysis results of *Curcuma longa* fermented by *Rhizopus oryzae* (FCL). (A) each signal intensity (B) comparison with a NF. <sup>1)</sup>Fermentation period (days), NF; non-fermentation.

Table 2. Content of curcuminoid in *Curcuma longa* fermented by *Rhizopus oryzae* (FCL) with HPLC

Fermentation period (days)	80% EtOH ext. (mg%)		
	BMC <sup>1)</sup>	DMC	curcumin
NF	18.08	75.21	315.91
1	16.85	69.97	287.31
2	22.31	101.01	418.99
3	19.27	102.56	399.00

<sup>1)</sup>BMC; bisdemethoxycurcumin, DMC; demethoxycurcumin.

**DPPH free radical 소거 활성**

발효 기간별 FCL 80% 에탄올 추출물의 항산화 활성은 DPPH free radical 소거능으로 조사하였으며, 그 결과 Table 3에서 보는 바와 같다. 비 발효 울금의 전자공여능은 87.23%를 높은 항산화성을 보였고, 발효 1일차 FCL의 전자공여능이 92.47%로 가장 높은 항산화능을 보였다. DPPH는 화학적으로 안정된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물 등에 의해 환원되어 노란색으로 탈색되며[2], 식물 또는 식품에서 추출물 또는 특정 혼합물의 free radical 소거능의 평가에 DPPH 시험이 널리 이용되고 있다[3, 8]. 따라서 DPPH radical을 소거하는 능력에 따라 항산화 활성 효과가 있다고 말할 수 있다[25].

**총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정**

폴리페놀은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차대사 산물로

서 다양한 구조와 분자량을 가지고 있으며 항산화, 항암 및 항염증 등의 생리활성 기능을 갖는 것으로 알려져 있고 폴리페놀 함량이 높을수록 전자공여능이 높은 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다[13, 14]. 발효 기간별 FCL 80% 에탄올 추출물에 존재하는 총 폴리페놀의 함량은 gallic acid를 표준물질로, 플라보노이드 함량은 quercetin을 기준물질로 하여 각각 측정된 결과는 Table 3과 같다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량의 측정 결과, 비 발효 울금의 함량은 각각 27.05 mg/g, 7.47 mg/g을 나타내었고, 발효 1일차에는 폴리페놀 함량이 42.91 mg/g 플라보노이드 함량이 10.33 mg/g으로 가장 높았으며, DPPH radical 소거능과도 유사한 결과를 보였다. 연구에서는 Curcumin의 함량이 높을수록 총 폴리페놀 함량도 높게 나타나며, 그에 따른 항산화 활성도 높다고 보고되었다[19].

**세포 증식에 미치는 영향**

RAW 264.7 cell line에 대한 시료의 독성을 알아보기 위하여 FCL 80% 에탄올 추출물의 최종 농도는 10, 50, 100 µg/ml로 처리하였다, FCL은 세포에 대한 독성은 보이지 않았으며, 오히려 발효 2일차까지는 대식세포가 활성화되어 세포 증식률이 증가하는 결과를 나타내었다(Fig. 2). MTT에 의한 세포 성장률의 측정은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium이 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide]으로

Table 3. Total polyphenol, and total flavonoid contents, and DPPH radical scavenging activity of 80% ethanol extracts of *Curcuma longa* fermented by *Rhizopus oryzae* (FCL)

Fermentation period (days)	80% EtOH ext.		
	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)	DPPH (%)
NF	27.05±0.38 <sup>c</sup>	7.47±0.57 <sup>c</sup>	87.23±1.14 <sup>c</sup>
1	42.91±0.47 <sup>a</sup>	10.33±0.01 <sup>a</sup>	92.47±0.24 <sup>a</sup>
2	23.25±0.16 <sup>d</sup>	6.47±0.36 <sup>d</sup>	89.48±1.64 <sup>b</sup>
3	33.14±0.19 <sup>b</sup>	8.40±0.08 <sup>b</sup>	91.97±0.58 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup>Means (n=3) in the same column not sharing a common letter are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple test.

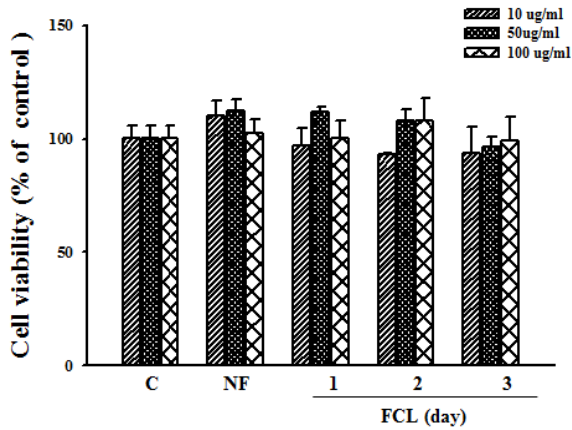


Fig. 2. Effect of *Curcuma longa* fermented by *Rhizopus oryzae* (FCL) on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^6$ ) in 96-well plates were incubated with and without indicated various concentrations (10, 50, 100 µg/ml) of FCL extracts for 24 hr. Cell viability was estimated by the MTT assay. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0.05$ , versus a media alone-treated group.

환원되는 정도를 측정하는 검사법으로, 이 과정에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다 [28]. 본 실험에서는 FCL 80% 에탄올 추출물의 농도가 세포 독성이 나타나지 않아, 시료 농도 10, 50, 100 µg/ml로 실험에 이용하였다.

**NF-κB, IL-6 및 TNF-α 분비에 미치는 영향**

Cytokine중에서 TNF-α, IL-6는 대표적인 염증성 cytokine 으로 대식세포는 LPS로 자극시키면 다양한 염증인자들이 증가되는데 그 중 림프구나 대식세포 등에서 생성되는데, 염증 반응에 관여하는 것으로 알려진 전사인자 NF-κB, TNF-α와 IL-6의 생성 억제 활성을 측정하였다(Fig. 6). LPS로 인해 발현된 NF-κB, TNF-α와 IL-6의 생성을 비 발효, 발효 올균 80% 에탄올 추출물을 처리한 결과 발현 감소를 보였다. NF-κB 경우 농도 의존적 감소를 보였지만 비 발효군과 발효군 사이의 유의적 차이는 없었고, 발효 1일차 시료 100 µg/ml 농도에서 비 발효군에 비해 감소하는 경향을 보였다. IL-6 또한 발효 1일차 시료 100 µg/ml 농도에서 비 발효군에 비해 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 결과 시료 농도 100 µg/ml 농도에서 비 발효군에 비해 FCL 에탄올 추출물의 cytokine 발현을 억제 효능의 증가를 확인할 수 있었다.

**NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향**

활성산소의 일종으로 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO [39]는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NOS (nitric oxide synthase)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는데, 특히 iNOS (inducible NOS)가 염증 반응에 관여하며, TNF-α, LPS와 같은 염증성 사이토카인의 자극이 있을 때 발현

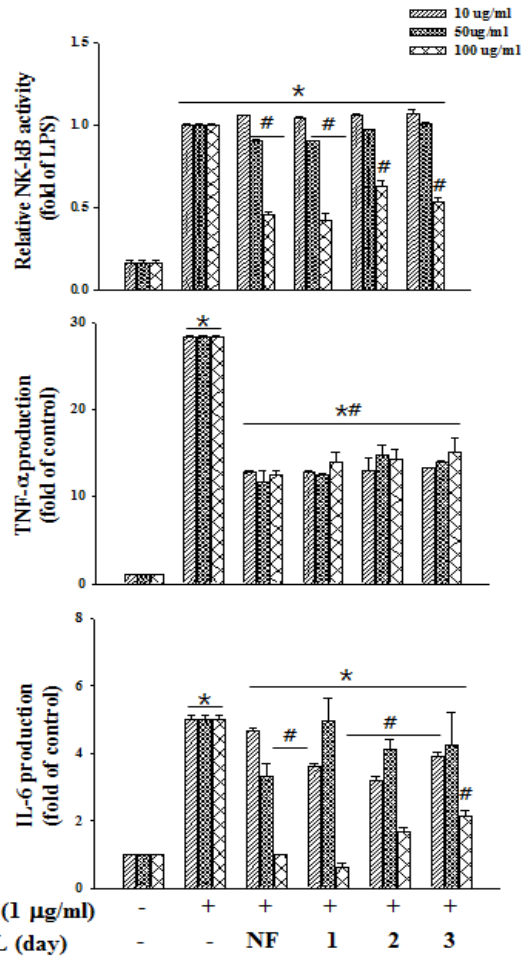


Fig. 3. Effects of *Curcuma longa* fermented by *Rhizopus oryzae* (FCL) on the production of TNF-α, IL-6 and NF-κB in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cell. Raw 264.7 cells were treated with extracts and LPS (1 µg/ml) for 24 hr. TNF-α, IL-6 and NF-κB were carried out as described in Materials and Methods. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$  VS. control, #  $p < 0.05$  VS. LPS.

된다[26]. 염증 유발물질로 사용되는 LPS를 이용하여 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 측정된 결과(Fig. 4), RAW 264.7 세포에 LPS 처리로 인해 증가된 NO 생성량이 발효 기간에 따른 FCL 100 µg/ml 을 처리한 실험군에서 NO 생성에 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 비 발효군에 비해 발효 1일차에 NO생성 억제를 보였다. iNOS는 세포내에 존재하지 않으나 일단 자극에 의해 유도가 되면 NO를 생성하며 생성된 NO는 혈관확장, 세포독성, 조직 손상과 같은 작용을 하며 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[33]. 또한 염증반응과 관련된 조직 손상에서 NO와 iNOS의 발현이 증가함이 보고되고 있다[24]. LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 NO의 합성 효소인 iNOS의 유전자 발현에 대한 FCL 효과를 조사하기 위하여

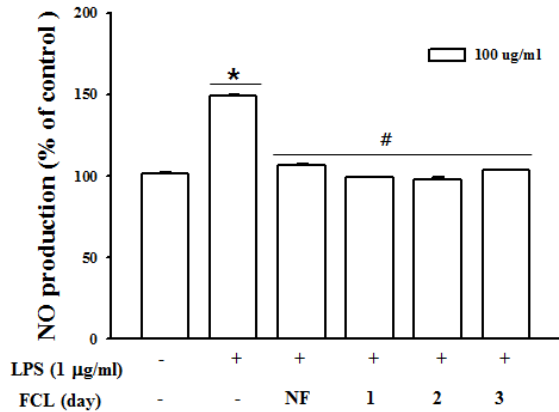


Fig. 4. Effects of *Curcuma longa* fermented by *Rhizopus oryzae* (FCL) on lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were plated in 24-well plates at  $1 \times 10^6$  cells/well. After 24 hr, cells were treated with concentrations (100 µg/ml) of FCL in the absence or presence of 1 µg/ml LPS. The media were conditioned and collected at 20 hr after FCL treatment. NO in the conditioned media were measured using the NO Griess reagent system. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0.05$  VS. control, #  $p < 0.05$  VS. LPS.

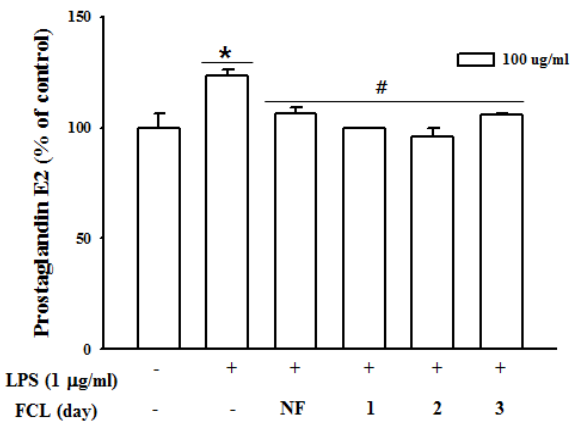


Fig. 5. Effect of *Curcuma longa* fermented by *Rhizopus oryzae* (FCL) on lipopolysaccharide (LPS)-induced Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in RAW 264.7 cells. Raw264.7 cells were plated in 24-well plates at  $1 \times 10^6$  cells/well. After 24 hr, cells were treated with concentrations (100 µg/ml) of FCL in the absence or presence of 1 µg/ml LPS. The media were conditioned and collected at 20 hr after FCL treatment. PGE<sub>2</sub> in the conditioned media were measured using the R&D system PGE<sub>2</sub> kit. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0.05$  VS. control, #  $p < 0.05$  VS. LPS.

Western blot을 수행하였다. 그 결과(Fig. 6), RAW 264.7 세포만 배양한 대조군에 비하여 LPS를 처리한 군에서는 iNOS의 발현이 현저히 증가하였다. RAW 264.7 세포에 발효 기간별 FCL 추출물을 100 µg/ml의 농도로 처리한 경우 iNOS의 발현

이 감소함을 보였고, 비 발효군에 비해 발효 1, 3일차에 iNOS의 발현이 감소함을 보였다. 결과는 발효를 통해 증가된 올금의 생리활성 물질들이 LPS에 의해 유도되는 염증인 이란 자 iNOS 유전자의 발현을 효과적으로 억제시켜 NO의 생성을 억제시킨 것으로 사료된다.

### PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현에 미치는 영향

Arachidonic acid에서 생성되는 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)는 염증유발인자로 염증, 부종, 통증 및 혈관을 확장시키고 대식세포 등 면역세포를 염증 부위로의 이동(movement)등에 관여하는 것으로 알려져 있다[29, 38, 40]. RAW 264.7 cells에 LPS로 유도된 PGE<sub>2</sub> 생성량을 측정하였다. LPS에 의해 증가된 PGE<sub>2</sub> 생성량이 발효 기간별 FCL 추출물 100 µg/ml 농도로 처리한 결과 억제 효능을 확인하였다(Fig. 5). 비 발효군에 비해 발효 1, 2일차에 PGE<sub>2</sub> 생성량이 감소하는 경향을 보였다. LPS로 염증이 유발된 RAW 264.7 cell에서 염증 유발에 관여하는 단백질 COX-2의 발현에 미치는 효과를 Western blot을 통하여 확인하였다. LPS에 의해 유도된 COX-2 단백질 발현은 올금에탄올 추출물을 처리했을 때, 유의적인 감소효과를 확인하였

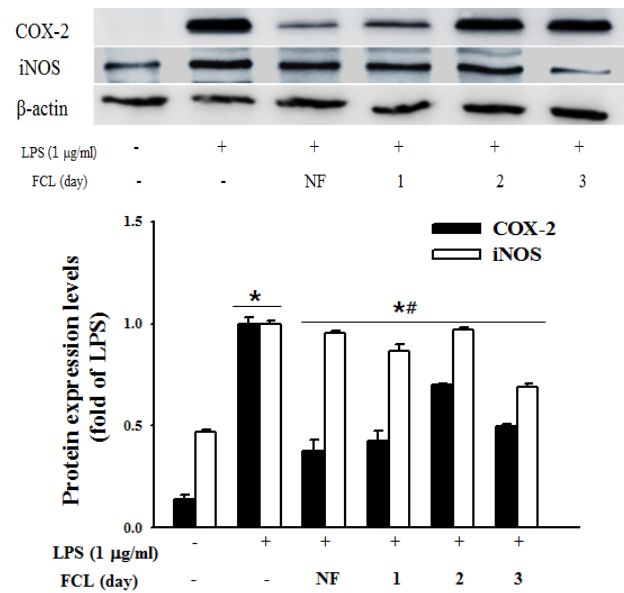


Fig. 6. Effects of *Curcuma longa* fermented by *Rhizopus oryzae* (FCL) on the protein expression levels of iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cell. Raw264.7 cells ( $3 \times 10^5$  cells) in 100 mm dishes were preincubated with and without the indicated concentrations (100 µg/ml) of FCL for 4 hr and then incubated with LPS (1 µg/ml) for 20 hr. Untreated represents the negative control without LPS treatment. Levels of protein expression were determined by western blot analysis.  $\beta$ -actin was used as an internal control. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with three separate experiments. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0.05$  VS. control, #  $p < 0.05$  VS. LPS.

지만 비 발효균에 비해 발효에 의한 유의적 감소 경향은 보이지 않았다(Fig. 6). 따라서 울금 추출물이 우수한 항산화 및 항염증 활성을 가지고 있는 것으로 판단되었다. 다만, 발효 기간에 따라 유의적으로 감소시키지 못한 부분과 물 추출물 등 다른 용매 추출물과 관련 된 항산화 및 항염증 생리활성 물질에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구사업(과제번호: PJ01084501)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

### References

- Ahn, S. B., Park, H. E., Lee, S. M., Kim, S. Y., Shon, M. Y. and Lee, W. K. 2013. Characteristics and immuno-modulatory effects of Weissella cibaria JW15 isolated from Kimchi, Korea traditional fermented food, for probiotic use. *J. Biomed. Res.* **14**, 206-211.
- Al-sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M. and Sen, P. 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn) and its therapeutic potentials. *Indian. J. Exp. Biol.* **37**, 124-130.
- Ammara, R. B., Wissem, B., Mohamed, B. S., Jihed, B., Ines, S., Aicha, N. and Ines, B., Bouhl, S. B., Anne-Marie, M., Chekir-Ghedira, L., Marie-Genevieve, D. F. and Kamel, G. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L (Rhamnaceae): a structure-activity relationship. *J. Food Chem.* **116**, 258-264.
- Anand, P., Thomas, S. G., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Sung, B., Tharakan, S. T., Misra, K., Priyadarsini, I. K., Rajasekharan, K. N. and Aggarwal, B. B. 2008. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharm.* **76**, 1590-1611.
- Bak, M. J., Jeong, J. H., Kang, H. S., Jin, K. S., Seon, O. K. and Jeong, W. S. 2009. *Cedrela sinensis* leaves suppress oxidative stress and expressions of iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathways in RAW 264.7 cells. *J. Food Sci. Nutr.* **14**, 269-276.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Choi, C. H., Song, E. S., Kim, J. S. and Kang, M. H. 2003. Antioxidative activities of castanea crenataflos methanol extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 1216-1220.
- Chung, E. K., Seo, E. H., Park, J. H., Shim, H. R., Kim, K. H. and Lee, B. R. 2011. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of extracts from organic soybean. *Kor. J. Org. Agric.* **19**, 245-253.
- Folin, O. and Denis, W. 1912. Phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-249.
- Fukuzawa, K. and Takaoshi, Y. 1990. Antioxidants. *J. Act. Oxyg. Free. Rad.* **1**, 55-70.
- Goel, A., Kunnumakkara, A. B. and Aggarwal, B. B. 2008. Curcumin as 'Curecumin': From kitchen to clinic. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 787-809.
- Harborne, J. B. and Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B. and Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**, 1007-1011.
- Hinz, B. and Brune, K. 2002. Cyclooxygenase-2-10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 367-375.
- Je, J. Y., Park, P. J., Kim, E. K. and Ahn, C. B. 2009. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of *Bambusae caulis* in liquamen. *J. Food Chem.* **113**, 932-935.
- Jeong, J. B., Hong, S. C., Jeong, H. J. and Koo, J. S. 2012. Antiinflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 Cells. *Kor. J. Plant Res.* **25**, 299-307.
- Jin, T. Y., Wang, M. H., Yin, Y. and Eun, J. B. 2008. Effect of *Citrus junos* peel on the quality and antioxidant activity of traditional rice wine, jinyangju. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 76-82.
- Jung, Y. S., Park, S. J., Park, J. H., Jhee, K. H., Lee, I. S. and Yang, S. A. 2012. Effects of ethanol extracts from *Zingiber officinale* Rosc., *Curcuma longa* L., and *Curcuma aromatic* Salisb. on acetylcholinesterase and antioxidant activities as well as GABA contents. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1395-1401.
- Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A. and Farnarier, C. 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* **24**, 25-29.
- Kim, K. H., Kim, H. J., Byun, M. W. and Yook, H. S. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from six vegetables containing different sulfur compounds. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 57-583.
- Kim, S. Beom., Kang, B. H., Kwon, H. S. and Kang, J. H. 2011. Antiinflammatory and antiallergic activity of fermented turmeric by *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 266-273.
- Lawrence, T., Willoughby, D. A. and Gilroy, D. W. 2002. Antiinflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 787-795.
- McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**, 749-754.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.
- Moncada, S. and Higgs, A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**, 2002-2012.
- Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampietro, A. R. and Vattuone,



- M. A. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **71**,109-114.
28. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
29. Nakayama, T., Mutsuga, M., Yao, L. and Tosato, G. 2006. Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 95-104.
30. Oh, H. I., Park, H. B., Ju, M. S., Jung, S. Y. and Oh, M. S. 2010. Comparative study of anti-oxidant and anti-inflammatory activities between *Curcuma longae* Radix and *Curcuma longae* Rhizoma. *Kor. J. Herbology* **25**, 83-91.
31. Park, C. S. and Lee, T. S. 2002. Quality characteristics of Takju prepared by wheat flour Nuruks. *Kor. J. food Sci. Technol.* **34**, 296-302.
32. Priyadarsini, K. I., Maity, D. K., Naik, G. H., Kumar, M. S., Unnikrishnan, M. K., Satav, J. G. and Mohan, H. 2003. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 475-484.
33. Ryu, J. H., Ahn, H., Kim, J. Y. and Kim, Y. K. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother. Res.* **17**, 485-489.
34. Sandur, S. K., Ichikawa, H., Pandey, M. K., Kunnumakkara, A. B., Sung, B., Sethi, G. and Aggarwal, B. B. 2007. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 568-580.
35. Soudamini, K. K. and Kuttan, R. 1988. Cytotoxic and tumour reducing properties of curcumin. *Indian. J. Pharmacol.* **20**, 95-101.
36. Srivastava, R. M., Singh, S., Dubey, S. K., Misra, K. and Khar, A. 2011. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 331-341.
37. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. and Mahajan, R. T. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* **7**, 65-74.
38. Wang, X. S. and Lau, H. Y. 2006. Prostaglandin E potentiates the immunologically stimulated histamine release from human peripheral blood-derived mast cells through EP1/EP3 receptors. *Allergy* **61**, 503-506.
39. Weisz, A., Ciacatiello, I. and Esumi, H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* **316**, 209-215.
40. Weller, C. L., Collington, S. J., Hartnell, A., Conroy, D. M., Kaise, T., Barker, J. E., Wilson, M. S., Taylor, G. W., Jose, P. J. and Williams, T. J. 2007. Chemotactic action of prostaglandin E2 on mouse mast cells acting via the PGE2 receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 11712-11717.
41. Yang, S. W., Kim, B. R., Lee, G. W., Lee, C. and Moon, B. G. 2014. Quality characteristics of cream soup with hericium erinaceus powder. *J. East Asian Soc. Diet. Life* **24**, 631-640.
42. Yi, H. S., Heo, S. K., Yun, H. J., Choi, J. W., Jung, J. H. and Park, S. D. 2008. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Draconis Resina* in mouse macrophage cells. *Kor. J. Herbology* **23**, 179-192.

## 초록 : *Rhizopus oryzae*으로 발효한 울금의 항산화 및 항염효과

김은주 · 송빛나 · 정다솜 · 김소영 · 조용식 · 박신영\*  
(농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과)

본 연구의 목적은 울금의 발효를 통해 쓴맛의 관능적 기호도를 향상시키면서, 발효 울금의 항산화 및 항염효능 검증을 위한 것으로, 발효 울금의 관능적 기호도 확인을 위해 맛센서 분석과 항산화 평가를 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 및 DPPH radical 소거능, 지표성분 검출을 위해 HPLC분석을 진행하였고, 항염증평가는 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증인자인 NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS, COX-2, NF-κB, IL-6와 TNF-α에 대한 감소효과를 측정하였다. 실험결과 *Rhizopus oryzae*로 울금의 발효가 진행 될수록 쓴맛이 감소함을 보였다. 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량과 DPPH radical 소거능은 비 발효 울금보다 울금 발효 1, 3일차에 증가함을 보였다. 발효 기간별 발효 울금은 10, 50, 100 µg/ml 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. RAW 264.7 세포에 LPS로 유도된 염증인자인 NF-κB, IL-6와 TNF-α 생성량이 발효 기간별 발효 울금의 염증인자 생성억제를 평가한 결과 NF-κB와 IL-6에서 발효 울금 100 µg/ml 에서 현저히 생성량이 억제되었다. LPS로 유도된 cytokines 억제효과를 보인 발효 기간별 발효 울금(100 µg/ml)의 NO, PGE<sub>2</sub> 생성억제를 평가한 결과, 대조군과 비교해 LPS를 처리한 군에서 NO, PGE<sub>2</sub>의 생성이 현저히 증가되었고, 울금 에탄올 추출물에 의해 유의성 있는 생성억제효과를 보였고 비 발효에 비해 발효 울금의 생성억제 효과를 보였다. 또한 COX-2와 iNOS의 단백질 발현 억제효과를 확인한 결과, 대조군과 비교해 LPS에 의해 증가 된 COX-2와 iNOS의 단백질발현이 발효 울금에 의해 감소됨을 확인하였다. 위 결과 발효 울금은 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성억제, iNOS와 COX-2의 발현을 억제시켰으며, NF-κB, IL-6와 TNF-α의 분비량도 억제시켰다. 이는 발효 울금의 항산화와 항염증성을 입증하기 위한 기초자료로 활용이 가능하다고 사료된다.