

## Immunomodulatory Effects of *Euglena gracilis* Extracts

Sun Nyoung Yu<sup>1</sup>, Bo Bae Park<sup>1</sup>, Ji Won Kim<sup>1</sup>, You Lim Hwang<sup>1</sup>, Sang Hun Kim<sup>2</sup>, Sunah Kim<sup>3</sup>,  
Taeho Lee<sup>3</sup> and Soon Cheol Ahn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 50612, Korea

<sup>2</sup>Section of Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, Department of Internal Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510, USA

<sup>3</sup>Department of Civil and Environmental Engineering, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received October 23, 2020 / Revised February 18, 2021 / Accepted February 19, 2021

*Euglena gracilis* is a microalga of great biotechnological interest that can create high levels of bioactive compounds, such as tocopherol, paramylon, and folic acid. The objective of this study was to investigate the biological activities of extracts from *E. gracilis*, especially those focused on immunological activity. *E. gracilis* biomass was extracted with hot water (HWE) and the remaining pellet was continuously extracted with methanol (HWME). First, we examined the effect of two extracts from *E. gracilis* on the production of nitric oxide (NO) and the expression of pro-inflammation cytokines, including IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  in murine macrophage RAW 264.7 cells. HWE treatment dose-dependently increased the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . On the other hand, treatment with HWME significantly decreased the generation of NO and pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophage cells. In addition, other biological activities of the extracts were further analyzed:  $\alpha$ -glucosidase inhibition, protein tyrosine phosphatase (PTP1B) inhibition, tyrosinase inhibition, xanthine oxidase (XO) inhibition, and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition. Analysis of these biological activities showed that HWE has more inhibitory effects than HWME against  $\alpha$ -glucosidase, tyrosinase, and XO agents. However, the inhibition of PTP1B and ACE with HWME were higher than with HWE. Taken together, the results suggested that *E. gracilis* possesses various biological activities—especially immunological capabilities—through regulation of cytokine production. Therefore, *E. gracilis* extract may be potentially useful for food material with immune-regulating effects.

**Key words** : Biological activity, *Euglena gracilis*, immunomodulatory activity, nitric oxide, pro-inflammatory cytokines

### 서론

최근 수년간 면역과 관련된 전염병이 심각한 문제로 대두되고 있다. 이러한 면역 관련 전염병은 사전예방적 대응책의 마련이 중요하고, 이러한 대응책으로 외부환경에 대한 생체 방어 기능인 면역력이 중요히 여겨진다. 외부자극에 가장 먼저 반응하는 비특이적 면역과 특정 병원체 침입 시 항원으로 인식하여 선별적으로 제거하는 특이적 면역으로 구분 된다[11, 17, 18].

대식세포(macrophage)는 비특이적 면역 및 특이적 면역과 모두 관련되어 있으며, 병원체에 감염된 비정상세포를 제거하거나 면역반응을 높이는 nitric oxide (NO)와 cytokine 등을

분비한다. NO는 bacteria, virus, 진균류와 같은 병원체에 반응하는 면역반응에 필수적이고 생리적 기능을 조절할 수 있으며, cytokine은 염증반응과 면역기능조절에 관련된 세포매개 성분이다[2, 5]. 염증반응이 증가함에 따라 대식세포 내 NO와 cytokine의 생성이 증가하여, NO와 cytokine의 생성을 억제하는 것 또한 염증성 질환의 발생 억제를 위해 중요하다[27, 29]. 대식세포의 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 효소 작용으로 생성되는 NO는 포식된 pathogen과 구성분자들의 변형과 Fe-S를 함유하는 효소작용을 억제함으로써 항 미생물 효과를 지닌다고 알려져 있다[31]. 또한 NO는 활성화된 대식세포나 호중구들로부터 분비되어 세포 외 병원체들을 사멸시킬 수 있으므로[3, 21], 이에 따라 NO의 증가는 면역력이 증가되었음을 의미한다. 그러나, 염증에서의 과도한 NO는 조직 손상, 유전적 변이 및 신경손상을 유발한다[25]. 염증반응에는 다양한 cytokine이 관여하며, 염증 반응에 관련된 cytokine으로는 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등이 있다.

식물, 과일, 곡물 및 미생물 등 다양한 재료들은 기능성식품의 원료로 꾸준히 활용되어 왔으며, 이 중 미생물, 특히 미세조류 유래 성분들이 최근 건강기능성 식품시장에서 두드러진 성장세를 보이고 있다. 특히 *Spirulina* sp. [9], *Dunaliella* sp.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8092, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : ahnsc@pusan.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.

[4], *Chlorella* sp. [1], *Schizochytrium* sp. [10], *Euglena* sp. [7, 19]와 같은 미생조류는 화장품, 건강기능식품, 식품 첨가제, 의약품 산업에서 항산화제의 원료가 되는 carotenoid, phycocyanin, 지질 (EPA, DHA)과 같은 고부가가치 생산물의 생산에 이용되기도 한다[23, 24, 28]. 그 중 *Euglena*는 건강기능성 식품으로 활용될 수 있는 유용물질 성분들을 다수 함유하고 있다. 비타민 E (tocopherol)와 folic acid는 건강기능성 의약품 보조제, paramylon은 면역 증진용 의약품, 불포화지방산은 기능성식품 및 사료료의 제표화가 가능하다. 특히 paramylon은 다수의 연구에서 면역기능강화, 항암 활성, 아토피성 피부염 등 피부질환의 억제, 급성 간 손상에 대한 간 보호, HIV 바이러스 억제, 상처 치유(wound healing) 등 다양한 효능이 입증된 바 있다[15, 22, 26, 30, 32].

본 연구에서는 최적조건에서 배양한 *Euglena gracilis* 균체 추출물의 면역 기능성 평가를 실험하였다. Murine macrophage RAW 264.7 cell line을 대상으로 면역 증진 효과 및 과민면역반응 억제 기능성을 확인하기 위해, 식약처 건강기능식품 기능성 평가 가이드라인에서 제시한 바이오 마커 중 세포 생존율, NO 생성능, NO 생성 억제능, cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) 생성능을 분석하였다. 또한 *E. gracilis* 균체 추출물의 일반적인 생리활성 기능 평가를 위해,  $\alpha$ -glucosidase, protein tyrosine phosphatase, tyrosinase, xanthine oxidase, angiotensin converting enzyme의 억제능을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### *Euglena gracilis*의 배양 및 균체 추출물의 준비

*E. gracilis* 균체는 부산대학교 사회환경시스템공학과 이태호 교수님 연구실에서 제공받았다. *E. gracilis*를 glucose 15 g/l, monosodium glutamate 5 g/l을 첨가한 modified Hutner 배지(pH 3.5)로 27°C에서 7일간 배양한 후 *E. gracilis* 균체를 수확하였다. *E. gracilis* 배양액을 4,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 멸균수로 3회 세척하였다. 세척한 균체를 -80°C에서 24시간 냉동 후 동결건조기(Ilshin, Dongducheon, Korea)를 이용하여 동결건조시킨 후 그 분말을 distilled water (DW)와 1:4의 비율로 현탁하여 100°C, 10분간 열수 추출을 2회 반복한 후, 그 상등액을 HWE (hot water extract)로 명명하였다. 열수 추출 후 잔존한 침전물에 4 volume의 methanol (MeOH)을 넣어 추출하였고 그 상등액을 HWME (hot water extraction 후 methanol extract)라고 명명하여 실험에 사용하였다. HWE와 HWME를 Modul 4080C speed vacuum (Hanil Science Industrial Co., Gimpo, Korea)에서 건조하여 solid 양을 측정하고 최초 시료 농도를 30 mg/ml로 정량한 후 냉장보관하였다. 시료는 실험시 희석하거나 직접 사용하였고, HWE는 DW, HWME는 MeOH로 녹이거나 희석하였다.

### Nitric oxide (NO) production 측정

96-Well plate에 murine macrophage RAW 264.7 cell을  $1 \times 10^5$ /200  $\mu$ l/well로 seeding하여 24시간 후 phenol red가 첨가되지 않은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 배지로 교환하였다. 상기 시료를 30, 100, 300  $\mu$ g/ml 농도로 처리한 지 24시간 후의 상등액을 취하여, Griess 시약을 이용해 세포 배양 상등액의 nitrite 함량을 측정하였다. 동량의 Griess 시약(1% sulfanilic acid, 0.1% N-naphthyl ethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 100  $\mu$ l 배양 상등액에 첨가하고 실온에서 10분 반응시켜 540 nm에서 SpectrMax M2e (Molecular Device, Toronto, Canada)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Positive control은 시료 대신 lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 1  $\mu$ g/ml로 처리하여 얻은 상등액을 측정하였고, 측정된 OD 값은 nitrite를 이용한 표준곡선계산법으로 정량하였다.

또한, 면역억제능을 측정하기 위하여 RAW 264.7 cell을 seeding한 후 phenol red가 첨가되지 않은 DMEM 배지 교환 시 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 처리하고 동시에 *E. gracilis* 균체 추출물을 처리하여 nitric oxide 생성의 억제능을 확인하였다. 억제능은 LPS만 처리한 control을 기준으로 100%로 환산하고 이를 100에서의 차를 구하여 표시하였다.

$$\text{억제능 (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{시료처리군 OD}_{540 \text{ nm}} - \text{시료처리군 Blank OD}_{540 \text{ nm}}}{\text{대조군 OD}_{540 \text{ nm}}} \times 100 \right)$$

### 세포생존율(cell viability) 측정

NO 측정 후 부착되어 있는 murine macrophage RAW 264.7 cell에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Duchefa, Haarlem, Netherlands)를 이용하여 세포생존능을 측정하였다. MTT 시약을 0.5 mg/ml의 농도로 첨가하고 37°C에서 3시간 반응시킨 후, 상등을 제거하고 생성된 formazan complex를 DMSO로 녹여 이를 흡광도 570 nm에서 SpectrMax M2e (Molecular Device)를 이용하여 측정하였다.

### Cytokine 생성 측정

*E. gracilis* 균체 추출물을 murine macrophage RAW 264.7 cell에 처리한 후, 24시간에 배양 상등액내의 cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) 생성 및 억제능은 Ready-SET-Go!™ Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 상등액을 각 capture antibody가 coating되어 있는 96-well plate에 넣고 37°C에서 3시간 동안 반응시켰다. Tween-20이 첨가된 PBS (PBS-T)로 3회 세척한 후 detection antibody와 avidin-HRP를 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시키고, PBS-T로 3회 세척한 후 기질인 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB) solution를 첨가하여 15분 동안 암실에서 반응시켰다. 이를 1 M phosphoric acid로 반응을 정지시킨 후, 450 nm에서 SpectrMax M2e

(Molecular Device)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 결과값으로부터 calibration standard를 이용한 표준곡선으로 각 cytokine의 양을 계산하였다.

**α-Glucosidase inhibition assay**

기질인 2.5 mM pNPG (para-nitrophenyl α-D-glucopyranoside) (Sigma-Aldrich) 60 μl, 0.25 unit α-glucosidase (Sigma-Aldrich) 30 μl에 시료 6 μl를 넣고 37°C에서 30분간 반응한 후, 이를 405 nm에서 SpectrMax M2e (Molecular Device)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Positive control로는 acarbose (Sigma-Aldrich) 62.5, 250, 500 μg/ml을 이용하였으며, 이 때 억제능은 시료를 녹인 DW, MeOH을 기준으로 100% 환산하여 이를 100에서의 차를 계산하였다.

$$\text{억제능 (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{시료처리군 OD}_{504\text{ nm}} - \text{시료처리군 Blank OD}_{504\text{ nm}}}{\text{대조군 OD}_{504\text{ nm}}} \times 100 \right)$$

**Protein tyrosine phosphatase (PTP1B) inhibition assay**

기질인 100 mM p-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich) 40 μl에 PTP1B 50μl와 시료 10 μl를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 이를 405 nm에서 SpectrMax M2e (Molecular Device)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Positive control로는 ursolic acid 0.1, 0.8, 1.6 mM을 이용하였으며, 이때 억제능은 시료를 녹인 DW, MeOH을 기준으로 100% 환산하여 이를 100에서의 차를 계산하였다.

$$\text{억제능 (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{시료처리군 OD}_{504\text{ nm}} - \text{시료처리군 Blank OD}_{504\text{ nm}}}{\text{대조군 OD}_{504\text{ nm}}} \times 100 \right)$$

**Tyrosinase inhibition assay**

기질인 100 mM L-tyrosine (Sigma-Aldrich) 160 μl에 시료 10 μl와 200 unit tyrosinase (Sigma-Aldrich) 30 μl를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 이를 475 nm에서 SpectrMax M2e (Molecular Device)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Positive control로는 kojic acid 6.25, 12.5, 25 μg/ml을 이용하였으며, 이 때 억제능은 시료를 녹인 DW, MeOH을 기준으로 100% 환산하여 이를 100에서 차를 계산하였다.

$$\text{억제능 (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{시료처리군 OD}_{475\text{ nm}} - \text{시료처리군 Blank OD}_{475\text{ nm}}}{\text{대조군 OD}_{475\text{ nm}}} \times 100 \right)$$

**Xanthine oxidase (XO) inhibition assay**

Black 96-well plate (SPL, Pocheon, Korea)에 기질인 0.4 M pterin 20 μl에 시료 10μl와 xanthine oxidase 10 μl를 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후, 1 N HCl 100 μl로 반응을 정지시키고 excitation 340 nm, emission 410 nm에서 SpectrMax M2e (Molecular Device)를 이용하여 형광값을 측정하였다. Positive control로는 allopurinol 0.25, 1, 4 μg/ml을 사용하였

으며, 이 때 억제능은 시료를 녹인 DW, MeOH을 기준으로 100% 환산하여 이를 100에서의 차를 계산하였다.

$$\text{억제능 (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{시료처리군 Fluorescence}_{(340-410\text{ nm})} - \text{시료처리군 Blank Fluorescence}_{(340-410\text{ nm})}}{\text{대조군 Fluorescence}_{(340-410\text{ nm})}} \times 100 \right)$$

**Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition assay**

기질인 5 mg/ml의 hippuryl-his-leu-acetate salt 20 μl, 시료 10 μl와 ACE enzyme 20 μl를 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이때 ACE enzyme은 400 mM의 boric acid (pH 8.5) 20 ml에 2 g의 rabbit lung acetone powder (Sigma-Aldrich)를 넣고 균질화 한 뒤 4°C에서 24시간 교반시키고 상등액만 -20°C에 보관하며 사용하였다. 반응 후 1 N HCl을 50 μl 넣어 반응을 정지시키고, ethylacetate 300 μl를 첨가하여 용매 추출하였다. 추출 상등액을 새로운 tube에 옮겨 speed vacuum (Hanil Science Industrial Co.)을 이용하여 건조시키고 pellet을 동량의 DW에 용해하고 이를 96-well plate에 옮긴 후, OD 280 nm에서 SpectrMax M2e (Molecular Device)를 이용하여 측정하였다. Positive control로는 captopril 1, 2, 20 μM을 사용하였으며, 이 때 억제능은 시료를 녹인 DW, MeOH을 기준으로 100% 환산하여 이를 100에서의 차를 계산하였다.

$$\text{억제능 (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{시료처리군 OD}_{228\text{ nm}} - \text{시료처리군 Blank OD}_{228\text{ nm}}}{\text{대조군 OD}_{228\text{ nm}}} \times 100 \right)$$

**통계처리**

모든 실험의 결과는 3번 반복 수행하여 얻어진 것으로, 통계 분석은 one-way ANOVA (analysis of variation)에 의해 분석하여 mean ± S.D로 표시하였고, 통계적 유의성은 \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001로 판정하였다.

**결과 및 고찰**

***Euglena gracilis* 균체 추출물의 nitric oxide (NO) 생성 및 억제능**

*E. gracilis* 균체 열수 추출물(HWE)의 면역 활성을 측정하기 위하여 murine macrophase RAW 264.7 cell에 24시간 동안 처리한 결과, positive control인 lipopolysaccharide (LPS)를 1 μg/ml 처리한 군에 비하여 NO의 생산능이 없는 것으로 나타났다(Fig. 1A). *Euglena* 균체 열수 추출 후 메탄올 추출물(HWME)을 처리한 경우에는 300 μg/ml에서 5 mM 정도의 낮은 NO 생성능을 나타냈다. 그러나, 이는 세포생존율(Fig. 1B)의 결과와 비교할 때 고농도(300 μg/ml)의 시료 처리로 인하여 발생한 세포독성(toxicity)의 결과로 보여진다. 따라서 *E. gracilis* 균체의 열수 추출물과 메탄올 추출물은 RAW 264.7 cell에서 NO의 유의적인 생성능을 나타내지 않았다.

*E. gracilis* 균체 추출물의 면역억제 기능을 측정하기 위해

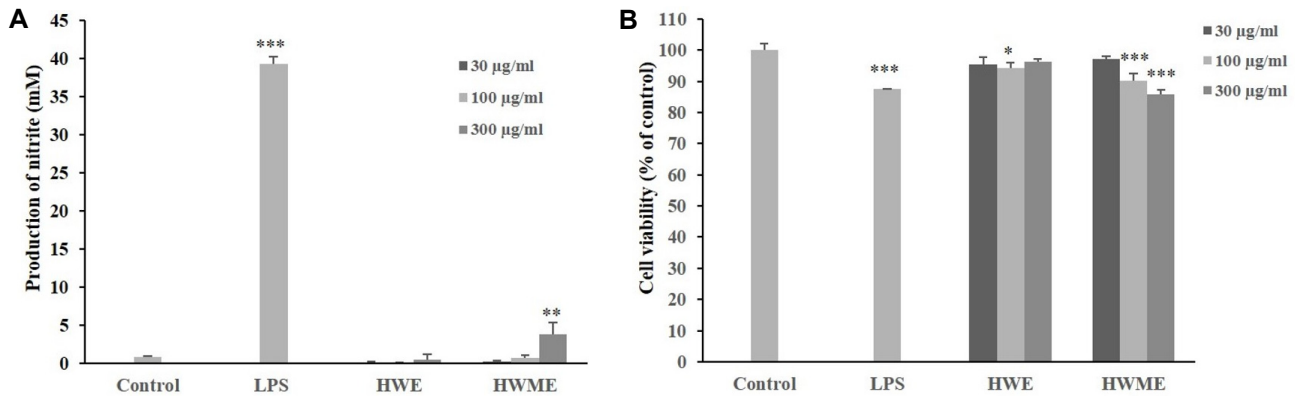


Fig. 1. Effects of the HWE and HWME from *Euglena gracilis* on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. (A) Production of NO treated with extracts for 24 hr. (B) Cell viability treated with extracts for 24 hr. LPS (1 µg/ml) was used as a positive control. All data are presented as means±SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared with control. Control, non-stimulated cells; HWE, how water extract; HWME, methanol extract after hot water extraction; LPS, lipopolysaccharide.

LPS와 함께 두 종류의 추출물을 24시간 동안 murine macrophage RAW 264.7 cell에 각각 처리한 결과, 고농도의 HWME (300 µg/ml)에서 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성이 42.08% 억제되는 것을 확인하였고 이때 세포생존율도 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2B). 이는 고농도의 HWME 처리로 세포생존율에 영향을 주어 NO 생성에 대한 억제능이 나타난 것으로 사료되었으나 NO 저해능이 농도의존적으로 현저히 높게 나타나므로 유의한 결과로 확인되었다. 그러나 HWE 처리군에서는 NO 저해 활성이 뚜렷하게 나타나지는 않았으며(Fig. 2A) 세포생존율 또한 동일 농도의 HWME에서 보다 감소되는 것이 확인되었다(Fig. 2B).

***Euglena gracilis* 균체 추출물의 cytokine 생성 및 억제능**

IL-1β, IL-6, TNF-α와 같은 염증성 cytokine은 세포 내 신호 전달에 관여하여 염증 반응을 조절한다[8, 26]. IL-6는 선천 면

역과 적응 면역에서 모두 작용 가능한 cytokine으로서 세포 매개 면역반응을 촉진하는 기능이 있다. TNF-α는 LPS 반응의 주요 매개체로 선천 면역반응에서 중요한 역할을 하며, 만성 염증과 관련되어 있다. 선천 면역을 매개하고 조절하는 cytokine인 IL-1β는 TNF-α와 유사한 작용을 수행하며, 감염 및 기타 자극에 대해 염증반응 매개 물질로 작용한다[13].

*E. gracilis* 균체 추출물의 murine macrophage RAW 264.7 cell에서의 cytokine 생성능을 측정하기 위하여 HWE와 HWME를 처리한 결과, IL-1β와 TNF-α의 생성이 농도의존적으로 증가하였고(Fig. 3), HWME를 처리한 군보다 HWE를 처리한 군에서 생성량이 더 높은 것을 확인하였다. IL-1β의 경우, LPS를 처리한 군에서 151.57 pg/ml의 생성량을 나타냈으며, HWE와 HWME 처리한 군 모두 농도의존적으로 증가하였으며 300 µg/ml에서 각각 77.92 pg/ml와 74.28 pg/ml의 생성량을 나타냈다. TNF-α는 HWME를 처리한 군(122.88 pg/ml)에 비교하

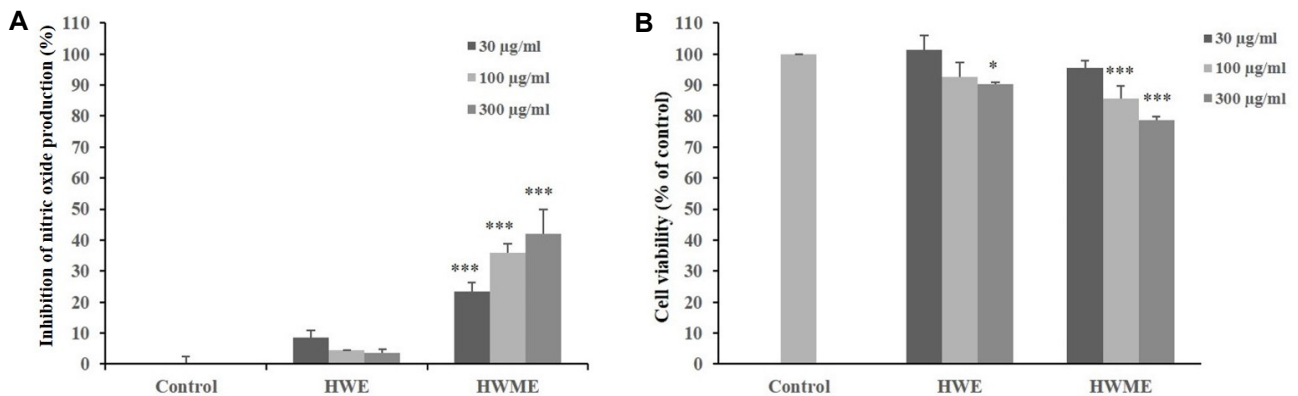


Fig. 2. Inhibition effects of the HWE and HWME from *Euglena gracilis* on nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) Inhibition effects of NO treated with extracts for 24 hr. (B) Cell viability treated with extracts for 24 hr. All data are presented as means ± SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared with control. Control, LPS-stimulated cells; HWE, how water extract; HWME, methanol extract after hot water extraction; LPS, lipopolysaccharide.

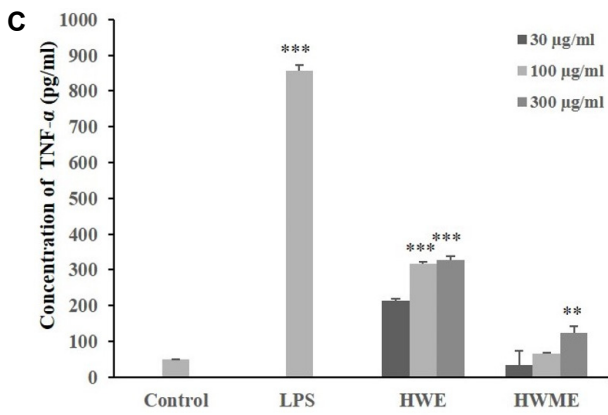
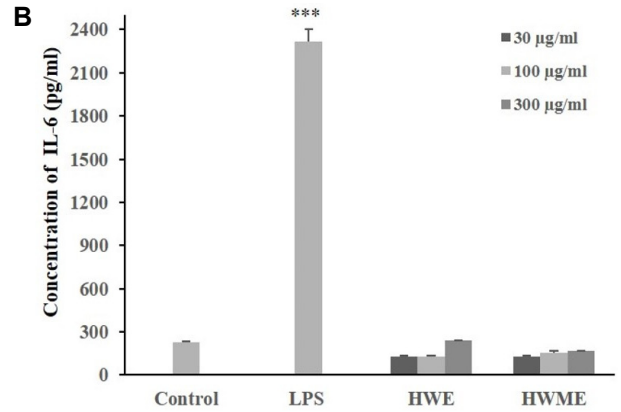
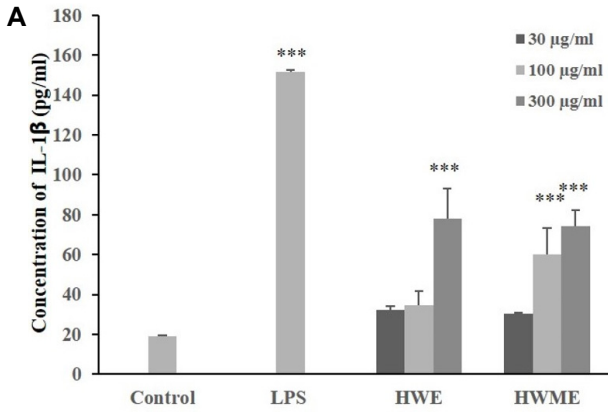


Fig. 3. Effects of the HWE and HWME from *Euglena gracilis* on the production of pro-inflammatory cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in RAW 264.7 cells. Cells were treated with various concentration of HWE and HWME from *Euglena gracilis* (A) Production of IL-1 $\beta$  treated with extracts for 24 hr. (B) Production of IL-6 treated with extracts for 24hr. (C) Production of TNF- $\alpha$  treated with extracts for 24hr. LPS (1  $\mu$ g/ml) was used as a positive control. All data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001 compared with control. Control, non-stimulated cells; HWE, how water extract; HWME, methanol extract after hot water extraction; LPS, lipopolysaccharide; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; IL-6, interleukin 6; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$ .

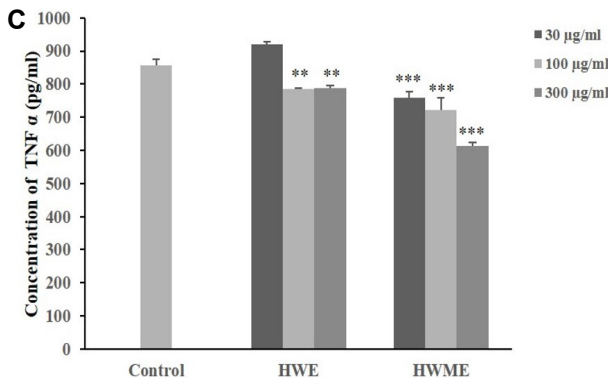
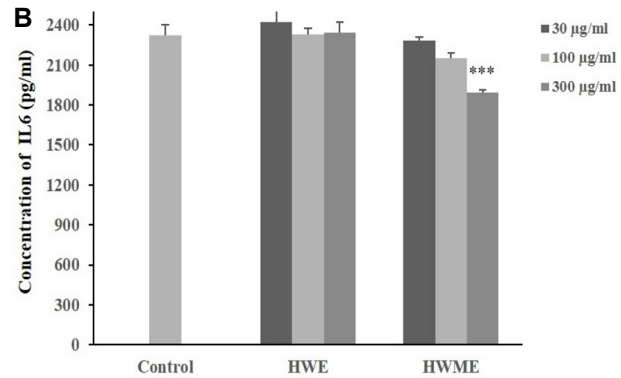
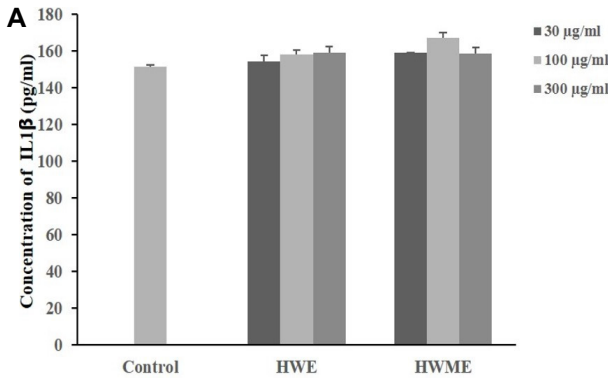


Fig. 4. Inhibition effects of the HWE and HWME from *Euglena gracilis* of pro-inflammatory cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with various concentration of HWE and HWME from *Euglena gracilis* (A) Inhibition effects of IL-1 $\beta$  treated with extracts for 24 hr. (B) Inhibition effects of IL-6 treated with extracts for 24 hr. (C) Inhibition effects of TNF- $\alpha$  treated with extracts for 24 hr. All data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001 compared with control. Control, LPS-stimulated cells; HWE, how water extract; HWME, methanol extract after hot water extraction; LPS, lipopolysaccharide.

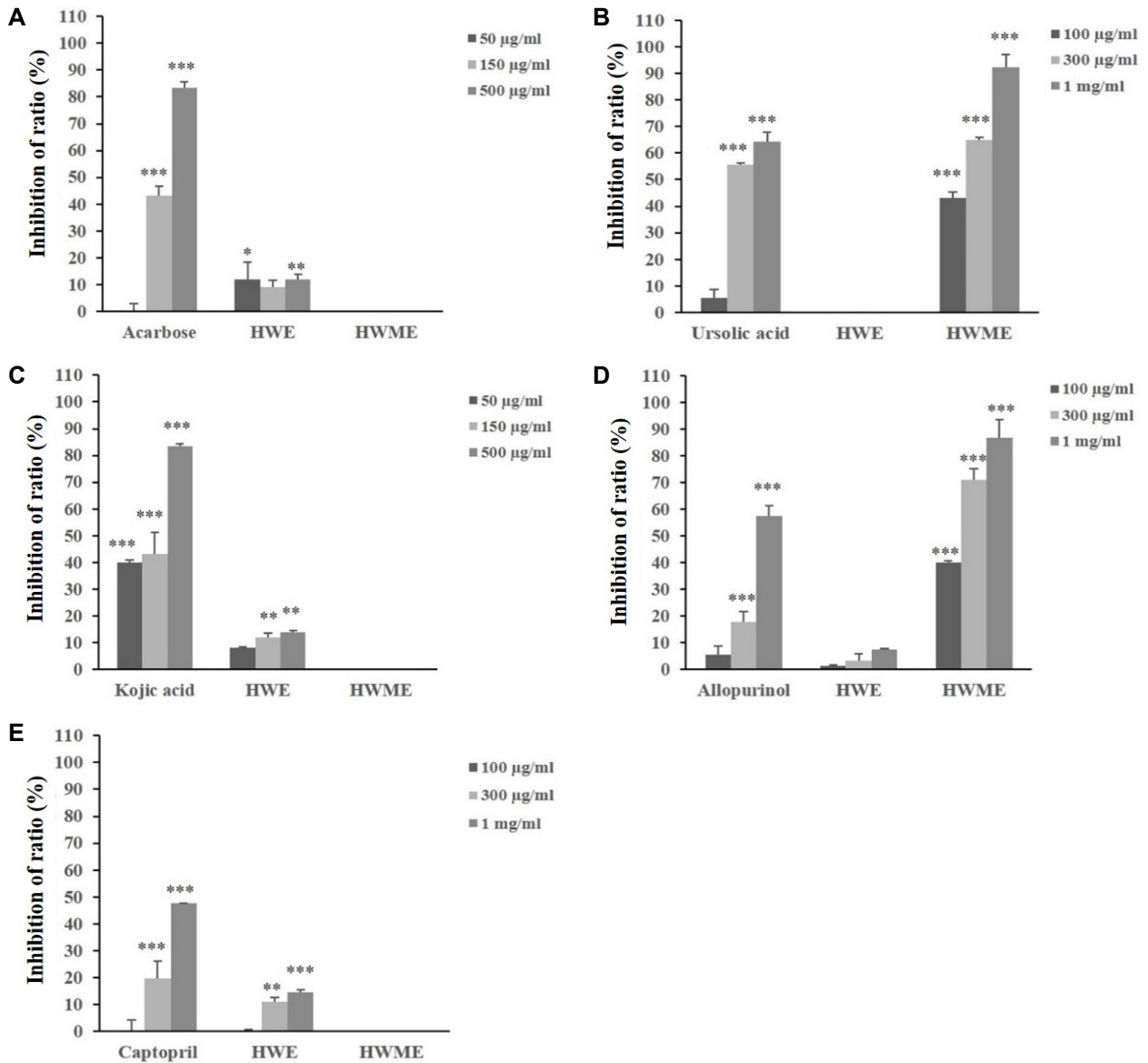


Fig. 5. Various biological activities of HWE and HWME from *Euglena gracilis*. (A) Inhibitory activity of the HWE and HWME on  $\alpha$ -glucosidase assay. Acarbose (62.5, 250 and 500  $\mu\text{g/ml}$ ) was used as a positive control. (B) Inhibitory activity of the HWE and HWME on PTP1B assay. Ursolic acid (0.1, 0.8 and 1.6 mM) was used as a positive control. (C) Inhibitory activity of the HWE and HWME on tyrosinase assay. Kojic acid (6.25, 12.5 and 25  $\mu\text{g/ml}$ ) was used as a positive control. (D) Inhibitory activity of the HWE and HWME on XO assay. Allopurinol (0.25, 1 and 4  $\mu\text{g/ml}$ ) was used as a positive control. (E) Inhibitory activity of the HWE and HWME on ACE assay. Captopril (1, 2 and 20  $\mu\text{M}$ ) was used as a positive control. All data are presented as means $\pm$ SD of three independent experiments. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001 compared with control. Control, DW or methanol; HWE, how water extract; HWME, methanol extract after hot water extraction; PTP1B, protein tyrosine phosphatase; XO, xanthine oxidase; ACE, angiotensin converting enzyme.

여 HWE를 처리한 군(326.5 pg/ml)에서 현저하게 높은 생성량을 보였으며, 이는 LPS를 처리한 군(856.5 pg/ml)의 38.12%에 해당한다. 반면 IL-6는 LPS를 처리한 실험군에서 2319.75 pg/ml의 생성량을 나타냈으나, 2 종류의 *E. gracilis* 추출물 처리군은 대조군에 비해 유의한 생성량의 증가를 보이지 않았다.

LPS에 의해 유도되는 cytokine 생성에 대한 *E. gracilis* 균체

추출물의 억제능을 측정하기 위해 murine macrophage RAW 264.7 cell에 LPS와 *E. gracilis* 균체 추출물을 동시에 처리한 후, 상등액을 이용하여 IL-1 $\beta$ , IL-6와 TNF- $\alpha$ 를 측정하였다 (Fig. 4). LPS 처리군에서는 2319.75와 856.5 pg/ml의 IL-6와 TNF- $\alpha$  생성능을 나타내었다. LPS에 의해 유도되는 IL-6에 대한 *E. gracilis* HWME의 억제능을 측정한 결과, 30, 100, 300

µg/ml을 처리하였을 때, 각각 34(1.47%), 168.13(7.25%), 423.75(18.27%) pg/ml의 생성 억제능을 나타냈으며 TNF-α의 경우, 각각 98.88(11.54%), 135(15.76%), 243.5(28.43%) pg/ml의 생성 억제능을 나타냈다. 그러나 HWE를 처리한 군에서는 IL-6와 TNF-α의 생성 억제능을 나타내지 않았다. 또한, LPS에 의해 유도된 IL-1β의 생성에 대한 *E. gracilis* 추출물의 억제능을 확인할 수 없었다.

결론적으로 *E. gracilis* 균체 추출물은 열수 추출 시 cytokine 생성 유도를 통한 면역강화기능을 나타내었으며, 열수 추출 후 메탄올 추출 시 약한 면역억제 기능을 나타내었다. 이들 결과로부터 *E. gracilis* 추출물은 murine macrophage RAW 264.7 cell에서 면역반응에 작용하는 cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β)을 조절하는 면역 활성 인자로 작용하며 *E. gracilis*의 추출법에 따라 면역 증진과 면역 조절 소재로 활용할 수 있을 것으로 사료된다

#### *Euglena gracilis* 균체 추출물의 일반 생리활성

*E. gracilis* 균체 추출물의 다양한 생리활성을 확인하기 위하여 α-glucosidase, protein tyrosine phosphatase (PTP1B), tyrosinase, xanthine oxidase (XO), angiotensin converting enzyme (ACE)에 대한 저해활성을 측정하였다.

α-Glucosidase 효소의 활성 억제는 당질 가수분해 및 흡수를 지연시켜 식후 혈당 농도 상승을 억제하는 것으로 알려져 있으며[33], 이 효소의 비정상적인 활성은 당뇨병 등의 질병을 야기할 수 있다. α-Glucosidase 저해활성을 측정한 결과, HWE에서 11.74% (50 µg/ml), 8.92% (150 µg/ml), 11.98% (500 µg/ml)로 낮은 저해능을 보였으며, 농도 의존적인 변화는 나타나지 않았다(Fig. 5A). 이러한 결과는 *E. gracilis*와 같은 미세조류인 *Chlorella*에서 α-glucosidase 저해활성이 보고된 결과와는 대조적이었다[14].

PTP1B는 비만과 당뇨병환자를 포함하여 인슐린 저항성이 높은 경우에 과발현이 관찰된 바 있으며, 억제시 인슐린 저항성을 낮추고 비만과 제2형 당뇨가 개선되는 결과가 보고되었다[16]. Insulin receptor signaling을 조절하는 효소로 알려진 PTP1B의 활성 억제능을 확인한 결과, HWME의 100, 300, 1,000 µg/ml 농도에서 각각 43.21, 64.91, 92.33%로 뛰어난 저해능을 보였으며, 이는 기존 PTP1B의 저해제로 알려진 ursolic acid (positive control) 보다 유의적인 저해활성을 나타냈다(Fig. 5B). 결과적으로, *E. gracilis* 추출물은 제 2형 당뇨를 예방하기 위한 기능성 식품 소재로의 가능성이 있고, 특히 열수 추출 후 메탄올 추출물에서 현저하게 높았다.

Melain 합성의 주요 기질로 사용하는 L-tyrosine과 melanin 생성조절 효소인 tyrosinase를 이용하여 미백능을 확인하였다(Fig. 5C) [31]. 그 결과, HWE를 50, 150, 500 µg/ml 처리했을 때 각각 8.11, 11.82, 13.72%의 낮은 저해능을 보였으나, HWME에서는 저해능이 나타나지 않았다.

XO는 체내 hypoxanthine을 uric acid로 만드는 효소이며, uric acid의 혈액 내 축적으로 관절의 윤활막 및 연골에 침착하여 염증과 통증을 유발하게 되므로 최근 XO를 억제하는 천연물의 탐색 연구가 활발하다[6]. *Euglena* 추출물로 XO 억제 활성을 확인한 결과, HWME에서 유의적인 저해능을 나타냈다(Fig. 5D). 100, 300, 1000 µg/ml에서 각각 40.06, 70.94, 86.56%의 저해능을 보였으며, 이는 positive control로 사용한 allopurinol 보다 높은 저해능을 나타냈다.

ACE는 세포의 oxidative stress와 관련이 있어 reactive oxygen species와 4-peroxynitrite의 생성을 증가시키고 혈관 내에 혈소판의 응집과 흡착으로 인해 혈전증 발생을 높인다. 따라서 ACE의 대사를 조절할 수 있는 저해제는 고혈압과 다른 심혈관, 신장 질환 등을 예방할 수 있을 것으로 보여진다[20]. HWE를 100, 300, 1,000 µg/ml으로 처리했을 때 각각 0.03, 10.78, 14.43%의 낮은 저해능을 보였으며, HWME에서는 저해능이 나타나지 않았다(Fig. 5E).

이러한 결과를 종합해보면, *E. gracilis* 균체 추출물이 추출 방법에 따라 열수 추출물(HWE)에서는 α-glucosidase, tyrosinase, ACE에 대한 낮은 억제 활성을 확인하였고, 열수 추출 후 메탄올 추출물(HWME)에서는 PTP1B, XO에 대해 농도의존적으로 우수한 억제활성을 나타내었다. 따라서, *E. gracilis* 균체 추출물의 다양한 생리활성 연구를 통해 건강기능성 식품 및 치료제로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

#### 감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

#### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

#### References

1. An, H. J., Rim, H. K., Jeong, H. J., Hong, S. H., Um, J. Y. and Kim, H. M. 2010. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* improve immune function in protein-deficient weanling mice and immune cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **32**, 585-592.
2. Bogdan, C. 2015. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* **36**, 161-178.
3. Bohlen, H. J. 2015. Nitric oxide and the cardiovascular system. *Compr. Physiol.* **5**, 808-823.
4. Caroprese, M., Albenzio, M., Ciliberti, M. G., Francavilla, M. and Sevi, A. 2012. A mixture of phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* affects proliferation of peripheral blood mononuclear cells and cytokine production in sheep.

- Vet. Immunol. Immunopathol.* **150**, 27-35.
5. Chaplin, D. D. 2010. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S3-23.
  6. Do, J., Gwak, J., Rho, J. J., Lee, K. and Ki, D. C. 2019. Inhibitory effect of medicinal plant extracts on xanthine oxidase activity. *J. Appl. Biol. Chem.* **62**, 275-280.
  7. Evans, M., Falcone, P. H., Crowley, D. C., Sulley, A. M., Campbell, M., Zakaria, N., Lasrado, J. A., Fritz, E. P. and Herrlinger, K. A. 2019. Effect of a *Euglena gracilis* fermentate on immune function in healthy, active adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients* **11**, 2926.
  8. Feghali, C. A. and Wright, T. M. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.* **2**, d12-26.
  9. Finamore, F., Palmery, M., Bensehaila, S. and Peluso, I. 2017. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly spirulina. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, 3247528.
  10. Habte-Tsion, H., Kolimadu, G. D., Rossi Jr, W. and Filer, K. 2020. Effects of *Schizochytrium* and micro-minerals on immune, antioxidant, inflammatory and lipid-metabolism status of *Micropterus salmoides* fed high- and low-fishmeal diets. *Sci. Rep.* **10**, 7457.
  11. Iwasaki, A. and Medzhitov, R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343-353.
  12. Jung, S. H. and Park, J. K. 2014. Isolation and characterization of bioactive substances from microalgae. *J. Chitin. Chitosan* **19**, 100-106.
  13. Kany, S., Vollrath, J. T. and Relja, B. 2019. Cytokines in inflammatory disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 6008.
  14. Kim, H. M., Oh, H., Jeong, J. H., Lee, S. C., Moon, H. J. and Jeong, Y. S. 2017. Functional evaluation of marine micro-algae *Amphidinium carterae* extract. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 673-679.
  15. Koizumi, N., Sakagami, H., Utsumi, A., Fujinaga, S., Takeda, M., Asano, K., Sugawara, I., Ichikawa, S., Kondo, H. and Mori, S. 1993. Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon. *Antiviral Res.* **21**, 1-14.
  16. Lee, W. S., Choi, A., Ahn, C. Y., Oh, H., Ahn, J. S. and Oh, H. M. 2004. Screening of bioactive materials from freshwater microalgae. *Algae* **9**, 271-276.
  17. McComb, S., Thiriot, A., Akache, B., Krishnan, L. and Stark, F. 2019. Introduction to the immune system. *Methods Mol. Biol.* **2024**, 1-24.
  18. Palm, N. W., de Zoete, M. R. and Flavell, R. A. 2015. Immune-microbiota interactions in health and disease. *Clin. Immunol.* **159**, 122-127.
  19. Phillips, F. C., Jensen, G. S., Showman, L., Tonda, R., Horst, G. and Levine, R. 2019. Particulate and solubilized  $\beta$ -glucan and non- $\beta$ -glucan fractions of *Euglena gracilis* induce pro- and anti-inflammatory innate immune cell responses and exhibit antioxidant properties. *J. Inflamm. Res.* **12**, 49-64.
  20. Pujiastuti, D. Y., Amin, M. N. G., Alamsjah, M. A. and Hsu, J. L. 2019. Marine organisms as potential sources of bioactive peptides that inhibit the activity of angiotensin I-converting enzyme: a review. *Molecules* **24**, 2541.
  21. Radak, Z., Naito, H. and Taylor, A. W. 2012. Is it the cause of muscle soreness? *Nitric Oxide* **26**, 89-94.
  22. Russo, R., Barsanti, L., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Longo, V., Pucci, L., Penno, G. and Gualtieri, P. 2016. *Euglena gracilis* paramylon activates human lymphocytes by upregulating pro-inflammatory factors. *Food Sci. Nutr.* **5**, 205-214.
  23. Silva, S. C., Ferreira, I. C. F. R., Dias, M. M. and Barreiro, F. 2020. Microalgae-derived pigments: a 10-year bibliometric review and industry and market trend analysis. *Molecules* **25**, 3406.
  24. Soares, A. T., de Costa, D. C., Vieira, A. A. H. and Filho, N. R. A. 2019. Analysis of major carotenoids and fatty acid composition of freshwater microalgae. *Heliyon* **5**, e01529.
  25. Stefano, G. B. and Kream, R. M. 2011. Reciprocal regulation of cellular nitric oxide formation by nitric oxide synthase and nitrite reductases. *Med. Sci. Monit.* **17**, RA221-6.
  26. Sugiyama, A., Suzuki, K., Mitra, S., Arashida, R., Yoshida, E., Nakano, R., Yabuta, Y. and Takeuchi, T. 2009. Hepatoprotective effects of paramylon, a beta-1, 3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z, on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *J. Vet. Med. Sci.* **71**, 885-890.
  27. Suh, S. S., Hong, J. M., Kim, E. J., Jung, S. W., Kim, S. M., Kim, J. E., Kim, I. C. and Kim, S. 2018. Anti-inflammation and anti-cancer activity of ethanol extract of antarctic freshwater microalga, *Micractinium* sp. *Int. J. Med. Sci.* **15**, 929-936.
  28. Tossavainen, M., Ilyass, U., Ollilainen, V., Valkonen, K., Ojala, A. and Romantschuk, M. 2019. Influence of long term nitrogen limitation on lipid, protein and pigment production of *Euglena gracilis* in photoheterotrophic cultures. *PeerJ.* **7**, e6624.
  29. Wang, X., Wang, H., Pierre, J. F., Wang, S., Huang, H., Zhang, J., Liang, S., Zeng, O., Zhang, C., Huang, M., Ruan, C., Lin, J. and Li, H. 2018. Marine microalgae bioengineered *Schizochytrium* sp. meal hydrolysates inhibits acute inflammation. *Sci. Rep.* **8**, 9848.
  30. Watanabe, T., Shimada, R., Matsuyama, A., Yuasa, M., Sawamura, H., Yoshida, E. and Suzuki, K. 2013. Antitumor activity of the  $\beta$ -glucan paramylon from *Euglena* against preneoplastic colonic aberrant crypt foci in mice. *Food Funct.* **4**, 1685-1690.
  31. Weigert, A., von Knethen, A., Fuhrmann, D., Dehne, N. and Brüne, B. 2018. Redox-signals and macrophage biology. *Mol. Aspects Med.* **63**, 70-87.
  32. Yasuda, K., Ogushi, M., Nakashima, A., Nakano, Y. and Suzuki, K. 2018. Accelerated wound healing on the skin using a film dressing with  $\beta$ -glucan paramylon. *In Vivo* **32**, 799-805.
  33. Zaharudin, N., Staerk, D. and Dragsted, L. O. 2019. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity by selected edible seaweeds and fucoxanthin. *Food Chem.* **270**, 481-486.



**초록 : *Euglena gracilis* 추출물의 면역조절 및 생리활성 분석**유선녕<sup>1</sup> · 박보배<sup>1</sup> · 김지원<sup>1</sup> · 황유림<sup>1</sup> · 김상현<sup>2</sup> · 김선아<sup>3</sup> · 이태호<sup>3</sup> · 안순철<sup>1\*</sup>( <sup>1</sup>부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실, <sup>2</sup>에일대학교 호흡기내과, <sup>3</sup>부산대학교 사회환경시스템공학과)

본 연구에서는 다양한 생리활성을 나타내는 compound를 함유하고 있는 것으로 알려진 *Euglena gracilis*를 hot water로 추출하고(HWE), 그 잔존물을 methanol로 추출(HWME)한 후, murine macrophage RAW 264.7 cell에 처리하여 면역활성을 측정하였다. Murine macrophage RAW 264.7 cell에서 HWE 처리로 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 가 농도의존적으로 증가되었고, lipopolysaccharide에 의해 유도되는 IL-6와 TNF- $\alpha$  생성이 HWME 처리에 의해 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다. 또한  $\alpha$ -glucosidase, protein tyrosine phosphatase (PTP1B), tyrosinase, xanthine oxidase (XO), angiotensin converting enzyme (ACE) 등에 대한 저해활성을 조사하였다. 그 결과, *E. gracilis* HWE 추출물에서는  $\alpha$ -glucosidase, tyrosinase, ACE에서 약한 억제 활성을 보였으나, HWME 추출물에서는 PTP1B와 XO에서 유의적인 억제활성을 나타냈다. 따라서 본 연구를 통하여 *E. gracilis* 추출물의 면역조절 활성 뿐 만 아니라 당뇨와 심혈관 질환에 대한 유의적인 억제활성을 통해 다양한 건강기능성 식품의 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.