

김치에서 분리한 *Weizmannia coagulans* KK7으로 발효한 당근 잎 추출물의 항염증 활성 연구

이윤지[†] · 고보람 · 현혜진 · 오대주 · 윤원중

(재)제주테크노파크 생물종다양성연구소
(2022년 11월 30일 접수: 2022년 12월 28일 수정: 2022년 12월 29일 채택)

Anti-inflammatory activities of carrot (*Daucus carota*) leaf Fermented by *Weizmannia coagulans* KK7

Yoonji Lee[†] · Boram Ko · Hyejin Hyeon · Daeju Oh · Weon-Jong Yoon

Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark

(Received November 30, 2022; Revised December 28, 2022; Accepted December 29, 2022)

요약 : 본 연구에서는 김치로부터 분리한 유산균 *Weizmannia coagulans* KK7(KCTC19023P) 균주를 이용하여 당근(*Daucus carota* var. *sativa*) 잎 추출물의 발효를 실시하고 얻은 생산물의 항염증 활성 및 성분변화를 확인하였다. 발효에 의한 당근 잎 추출물의 성분 변화를 확인하기 위하여 고성능 액체크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과 발효 전과 비교하였을 때 발효 후에 플라보노이드의 일종인 루테올린(luteolin)의 함량이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 당근 잎 추출물과 발효 당근 잎 추출물의 항염 활성은 LPS에서 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에서 NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과로 확인하였다. 발효 당근 잎 추출물을 처리하였을 때 당근 잎 추출물 처리군에 비해 NO 생성이 상대적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 발효 당근 잎 추출물 농도가 증가함에 따라 NO 생성 억제 효과도 유의적으로 증가하였다. Western blot을 통해 염증반응에서 NO 생성성과 관련된 효소 iNOS의 발현을 확인한 결과 발효 당근 잎 추출물에서 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 실험 결과로부터 미생물 발효를 통해 당근 잎의 항염 효과가 증대된다는 것을 확인할 수 있었으며 이는 식품으로 거의 이용되지 않고 버려지는 당근 잎이 발효를 통해 새로운 식품 및 화장품 소재로 사용될 수 있음을 시사한다.

주제어 : 당근 잎, 발효, 항염, 루테올린, 플라보노이드

Abstract : In this study, the extracts of carrot (*Daucus carota* var. *sativa*) leaf fermented with *Weizmannia coagulans* KK7 strain were investigated for the anti-inflammatory activities and component changes. The KK7 strain was isolated from kimchi, a Korean fermented vegetable. The high-performance liquid chromatography was performed to analyze the changes in the components of

[†]Corresponding author
(E-mail: erylunz@gmail.com)

the carrot leaf extracts before and after fermentation. It was confirmed that the content of luteolin, a kind of flavonoid, was significantly increased after fermentation. The anti-inflammatory activities of the carrot leaf extracts and the fermented carrot leaf extracts were evaluated by the inhibition of NO (nitric oxide) production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The NO scavenging ability of the fermented carrot leaf extracts was higher than the other extracts. The protein expression of iNOS, an enzyme responsible for the NO production was significantly reduced in a concentration-dependent manner by treatment with the fermented carrot leaf extracts. In conclusion, we found that the anti-inflammatory effect of carrot leaf was increased by microbial fermentation, suggesting that carrot leaf generally discarded could be used as new food and cosmetic materials through fermentation.

Keywords : Carrot leaf, Fermentation, Anti-inflammatory activity, Luteolin, Flavonoids

1. 서론

플라보노이드(Flavonoids)는 항산화, 항염, 항암, 면역조절 등 다양한 생리적 기능을 가지고 있다고 알려진 천연 물질인 폴리페놀(polyphenol)의 일종으로 과일, 채소 등에 풍부하며 그 종류와 효능에 대해서는 다양한 연구를 통해 밝혀진 바 있다[1,2]. 플라보노이드는 그 구조에 따라 크게 플라보놀(flavonols), 플라본(Flavones), 이스플라본(isoflavones), 플라바논(flavanones), 플라바놀(flavan-3-ol) 및 안토시아닌(anthocyanins) 등 6개의 그룹으로 나눌 수 있다[2]. 이 중 플라본에 속하는 루테올린(Luteolin, 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone)은 대부분의 채소와 과일에 함유되어 있으며 항산화, 항염, 항암, 항알러지 효과가 있는 것으로 알려져 있다[3,4]. 루테올린은 염증반응, 면역체계 조절 등에 관여하는 단백질 복합체 nuclear factor kB(NF-kB)[5] 비롯해 mitogen-activated protein kinases(MAP kinase) 등 전-염증 전사인자를 억제하여 항염증 작용을 한다고 알려져 있다[6].

플라보노이드의 뛰어난 생리활성으로 인하여 식품, 화장품, 의약품 등 다양한 산업 분야에서 널리 사용되고 있으며 생산성을 향상시키기 위해서 대사공학과 합성생물학을 기반으로 한 미생물을 이용한 플라보노이드의 대량생산 기술이 활발하게 개발되고 있다[7]. 생물전환(Bioconversion)은 미생물 또는 효소의 생물학적 반응을 이용하여 생리활성 물질의 구조적 변화를 유도하는 기술이다. 미생물을 이용한 플라보노이드 생물전환 연구의 경우 *Bacillus cereus*[8], *Leuconostoc mesenteroides* [9], *Lactobacillus plantarum*[10] 등 다양한 미생

물을 이용한 연구 결과가 보고된 바 있다.

염증은 조직의 손상이나 외부의 자극, 병원체 감염 등에 의하여 일어나는 정상적인 생체 내 방어 반응 중의 하나이다. 염증은 다양한 면역 세포에 의해 진행되는 복합적인 과정으로 이 때 활성산소종(reactive radical species)의 일종인 nitric oxide(NO)가 면역세포에 의해 생성되어 각종 면역 반응에서 중요한 역할을 한다[11, 12]. 염증은 다양한 세포내 염증조절인자들이 관여하는데 특히 대식세포에서 lipopolysaccharide (LPS) 자극에 의해 염증 반응의 전사 인자가 활성화되면 염증 관련 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현이 늘어나 NO와 prostaglandin E2 (PGE2)를 생성하여 염증을 일으키는 것으로 알려져 있다[12, 13]. 염증반응에서 NO의 생성은 대부분 iNOS 발현량 증가에 의한 것으로 알려져 있다[14].

당근(*Daucus carota* var. *sativa*)은 미나리과에 속하는 채소로 β -carotene, α -carotene, lutein과 같은 카로티노이드(carotenoid) 성분을 다량 함유하고 있다[15]. 당근은 뿌리 부위를 섭취하는 뿌리 채소로 당근 잎의 경우 여린 잎 부위를 제외하고 특유의 짠고 쓴 맛 때문에 수확 후 폐기되거나 동물 사료, 퇴비 등으로 사용된다. 기존의 연구에서 당근 잎 성분분석 결과 카로티노이드를 비롯하여 비타민, 미네랄 그리고 루테올린과 아피제닌(apigenin)이 풍부하다고 보고되었다[16]. 당근 잎을 포함한 당근 지상부에 대한 선행 연구로 항염 및 항균 효과를 갖는 화장품 소재로서의 개발 연구가 수행된 바 있다[17]. 당근 잎에 기능성 물질이 풍부함에도 불구하고 뿌리에 비해 많은 연구가 진행되지 않아 대부분 버려지고 있는 실정이다. 따라

서 이를 고부가가치 소재로 활용하기 위한 기술 개발이 요구되고 있다.

본 연구에서는 농업 부산물인 당근 잎의 활용 가치를 높이기 위하여 미생물 발효를 통한 기능성 소재개발에 대한 연구를 수행하였다. 김치에서 분리한 미생물 *Weizmannia coagulans*를 이용하여 당근 잎 추출물의 발효를 실시하고 생리 활성과 성분 변화를 확인하여 당근 잎의 산업적 이용 가능성에 대하여 조사하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 재료

본 실험에 사용한 당근 잎은 2020년 11월 제주 특별자치도 제주시 구좌읍에서 당근 수확 시 폐기 되는 당근 잎을 채집한 것으로 세척 후 건조한 뒤 4°C의 냉장고에 보관하여 사용하였다. 발효 미생물 확보를 위해 제주도 서귀포시 남원읍에서 제조한 김치를 사용하였다.

2.2. 미생물 배양 및 동정

김치로부터 유산균을 분리하기 위하여 잘게 분쇄한 시료 10 g을 멸균된 0.85% saline 90 ml에 첨가하고 vortexing 후 10^{-1} 부터 10^{-6} 까지 희석하여 현탁액을 제조하였다. MRS (Difco, Detroit, MI, USA) 고체 배지를 제조한 후 10^{-6} 현탁액 200 μ L를 도말한 후 30°C에서 48시간 이상 배양하였다. 배양 후 colony의 색깔, 모양 등 형태학적 특징에 따라 단일 colony로 순수 분리하고 사용 전 까지 glycerol stock을 만들어 -80°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 순수 분리된 미생물의 분자생물학적 동정을 위하여 MRS 고체 배지에 배양한 미생물에 대하여 솔젠트사(Solgent Co., Korea)에 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석을 의뢰하였다. 분석된 16S rRNA 염기서열에 대해서 NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (basic local alignment search tool) 검색을 통하여 동정하였다.

2.3. 당근 잎 발효물 제조

당근 잎의 발효를 위해 당근 잎 분쇄 건조물 100 g에 증류수 1,000 mL를 첨가한 뒤 고온가압 추출(AE, autoclave extraction) 방법을 통해 추출물을 제조하였다. 고온가압추출[18]의 방법을 변형하여 유리 플라스크에 분쇄시료와 증류수를 혼합

한 후 2시간 침지 후 autoclave를 이용하여 121°C에서 15분 동안 추출하였다. 추출물을 miracloth로 여과 한 후 1×10^7 cfu/mL 이상으로 배양한 *W. coagulans* KK7을 1, 3, 5%(v/v) 비율로 접종하고 37°C에서 5일간 5% CO₂배양기에서 배양하였다. 발효 과정 중 pH변화를 24시간마다 pH meter로 측정하였다. 발효가 끝난 당근 잎 추출물은 Whatman No 2 filter paper (Whatman International, Kent, UK)로 여과한 뒤 동결 건조하여 사용하였다.

2.4. HPLC 분석

당근 잎의 발효 전, 후 추출물의 성분 변화를 확인하기 위하여 고성능 액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 유효성분 스크리닝(screening)을 수행하였다. 각 시료에 당근 잎의 유효성분으로 추정되는 표준물질 neochlorogenic acid, chlorogenic acid, quercitrin, luteolin을 첨가하여 성분 변화를 확인하였다. 스크리닝을 위한 HPLC는 Shimadzu 시스템을 사용하였고 검출기는 PDA (photodiode array detector), 검출파장은 272 nm, 분석 컬럼은 Capcell Pak C18 (4.6×250 mm, 5 μ m)을 사용하였다. 0.1% 트리플루오로아세트산이 포함된 물과 아세트오니트릴을 용매에 시료 주입량은 10 μ L, 유속은 1 ml/min로 100분간 유효성분 스크리닝을 수행하였다. 스크리닝을 통해 확인된 유효물질의 정량 분석을 위해서 Waters photodiode array (PAD) detector 2998 (Waters Co. Milford, MA, USA)를 장착한 HPLC system e2695 (Waters Co. Milford, MA, USA)를 사용하였다. Zorbax SB-C18(4.6 x 250 nm, 5 μ m; Agilent, Santa Clara, CA, USA) 컬럼을 사용하였으며, 온도는 40° C로 유지하였다. 이동상은 solvent A (0.1% TFA in water) 및 solvent B (acetonitrile)를 사용하였으며, 시료 주입량은 10 μ L, 유속은 1 ml/min으로 일정하게 흘러주었다.

2.5. 세포 배양

실험에 사용된 대식세포(murine macrophage cell line) RAW 264.7 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, VA, USA)에서 분양 받아 10% FBS (fetal bovine serum)와 penicillin-streptomycin 100 units/100 μ g/ml이 함유된 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium) 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여

37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 실시하였다.

2.6. 세포독성 평가(LDH assay)

RAW 264.7 세포(1.5×10^5 cells/ml)를 DMEM 배지에 발효 전, 후의 당근 잎 추출물 시료와 LPS($1 \mu\text{g/ml}$)를 동시에 처리하여 24시간 배양 한 후 배지를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. LDH (lactate dehydrogenase) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지 50 μL 와 reconstituted substrate mix를 50 μL 를 넣고, 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 stop solution 50 μL 를 넣은 후 microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군 (LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

2.7. Nitric oxide (NO) assay

RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절하여 96 well plate에 접종하고 50% ethanol에 녹인 발효 전, 후 당근 잎 추출물 시료와 염증 반응 유도 인자인 LPS를 $1 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 griess 시약(1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid)을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO²⁻ 형태로 측정하였다. 세포 배양 상등액 100 μL 와 griess 시약 100 μL 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader (Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 생성된 NO의 양은 NaNO₂ (sodium nitrite)를 standard로 비교하였다.

2.8 Western blot assay

24시간 동안 배양한 RAW 264.7 cell을 cold PBS (phosphate-buffered saline)로 wash하고 lysis buffer로 세포를 용해하였다. 원심분리기(15000 rpm, 30 min)를 이용하여 상층액을 얻은 다음 단백질 농도를 측정하고, SDS-PAGE로 분리한 후 gel을 0.2 μm nitrocellulose membrane으로 옮겨 Primary antibody 및 secondary antibody에 배양

하였다. ECL (enhanced chemiluminescent) 기질 (iNtRON biotechnology, SungNam, Korea)과 반응시킨 다음 Vilber Western blot imaging system 을 이용해 확인하였다.

2.9. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균±표준편차로 나타내었다. 통계학적 분석은 student's t-test를 시행하여 신뢰수준 95%(p<0.05)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유산균 분리 및 동정

당근 잎 추출물의 발효를 위하여 사용된 미생물은 제주도에서 제조된 김치로부터 분리되었으며 16s rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 99.4%의 상동성으로 *Weizmannia coagulans*로 동정되었다. *W. coagulans*는 lactic acid를 생산하는 *Lactobacillus* 속 특성뿐만 아니라 포자를 형성하는 *Bacillus* 속의 특성을 가지고 있어 유산균의 생존율 및 유통기한 측면에서 장점을 가지고 있어 식이보조제 뿐만 아니라 다양한 농업용, 축산용 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 기존에 *Lactobacillus sporogenes*, *Bacillus coagulans*로 명명되었으나 최근의 연구[19]에서 학명이 변경되었다. 최종 동정 된 미생물은 *W. coagulans* KK7 균주로 명명하였다. KK7 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 특허 기탁하였다(기탁번호 KCTC19023P).

3.2. 당근 잎 추출물의 발효 조건 확립

당근 잎 추출물의 발효 과정에서 적정 미생물 접종량과 최소 발효 시간을 확인하기 위하여 미생물 접종 비율(1, 3, 5% v/v)을 달리하며 시간 별로 pH 변화를 측정하였다. 미생물 접종 비율과 시간에 따른 pH 값의 변화는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 접종 비율에 관계없이 발효 시작 후 24시간이 지나면 pH가 급격하게 감소하기 시작하며 접종 48시간 이후부터 pH 감소가 둔화되어 72시간 이후 pH변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 미생물을 접종하지 않은 무처리구(당근 잎 추출물)의 경우 pH값의 변화가 없는 것으로 보아 이는 젖산을 생산하는 *W. coagulans* KK7의 생리활성에 의한

것으로 판단된다. 이러한 pH값의 변화 양상은 death phase를 제외한 일반적인 미생물의 성장곡선(lag phase, exponential phase, stationary phase)과 유사하며 이를 통해 간접적으로 미생물 발효가 진행되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 유산균 접종 비율 1%에서도 24시간이 지나면 pH 값이 5%와 유사하게 감소하는 것으로 보아 최종 실험에서는 당근 잎 추출물에 1% v/v로 유산균을 접종하여 실험하였으며 72시간 이후 pH 변화가 없으므로 발효가 충분히 진행되었다고 판단하여 최종 발효시간은 접종 후 72시간으로 결정하였다. 유산균 접종 비율과 접종 시간은 향후 소재개발을 위한 대량생산 공정 개발에 중요한 데이터로 활용될 수 있다.

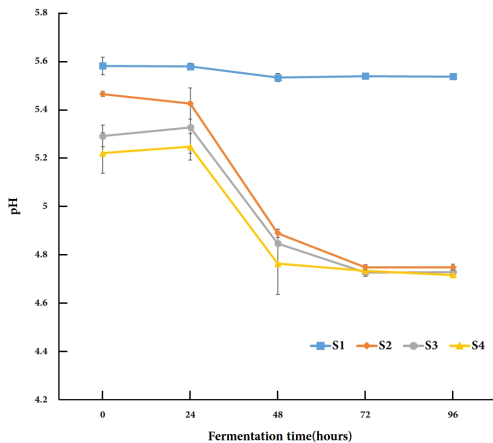


Fig. 1. The change of pH value during the fermentation with different concentration of KK7 strains.

3.3. 발효에 의한 당근 잎 추출물의 성분변화

HPLC를 이용하여 당근 잎 추출물의 발효 전, 후의 성분 변화를 스크리닝 한 결과 Fig. 2와 같이 루테올린 함량이 발효에 의해 증가하는 것을 알 수 있었다. 정량 분석을 위하여 표준품의 피크 면적비를 가지고 표준 검량선을 작성한 결과, $y=33368x-34416$ 의 회귀식이 산출되었으며 결정 계수(coefficient of determination, R^2) 값은 0.9996로 확인되었다(Fig. 3). 발효 전 당근 잎 추출물의 루테올린 함량은 2.76 ± 0.08 mg/g이며

발효 후의 루테올린 함량은 5.72 ± 0.15 mg/g로 발효에 의해 당근 잎 추출물의 루테올린 함량이 약 200% 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). One-way ANOVA로 조사한 결과, p -value <0.0001로 통계적으로 유의한 차이가 있음을 확인하였다. 기존의 연구에서 미생물을 이용한 식물의 발효과정에서 총 플라보노이드 함량이 증가되는 것이 보고된 바 있다[20, 21]. 이러한 결과를 통해 KK7 균주를 이용한 당근 잎 발효 과정이 루테올린 생합성에 영향을 준다는 것을 확인하였으며 정확한 메커니즘에 대해서는 추가 연구가 필요한 것으로 판단된다.

3.4. 발효에 의한 항염증 증진 효과

루테올린이 염증반응, 면역체계 조절 등에 관여하는 전-염증 전사인자를 조절하여 항염증 작용을 한다고 알려져 있기[6] 때문에 발효 당근 잎 추출물의 항염증 활성을 확인하였다. RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 준 뒤 발효 전, 후 당근 잎 추출물을 농도별로 처리하였다. LPS에 의해 생성된 NO의 소거 값을 통하여 당근 잎 및 발효 당근 잎 추출물의 항염증 효능을 확인한 결과(Fig. 4) 발효 전, 후 당근 잎 추출물 처리 시 NO의 생성이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 같은 농도로 처리하였을 때 NO 생성 억제능이 발효 시료에서 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 각 시료를 $200\mu\text{g}$ 처리하였을 때 NO 생성 억제능을 비교하면 당근 잎 추출물 처리 시 약 75%, 발효 당근 잎 추출물 처리 시 약 59%로 상대적으로 발효 후에 NO 생성 억제능이 1.2배 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과를 통해 KK7 발효 시 당근 잎 추출물의 항염증 효과가 증대되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 발효 과정에서 루테올린 함량이 증가한다는 점에서 루테올린에 의한 항염증 증진 효과로 판단된다.

실험에 사용된 당근 잎 추출물의 세포독성을 알아보기 LDH assay를 실시한 결과 모든 시료에서 경우 90% 이상의 생존율을 보여 $200\mu\text{g/ml}$ 농도에서도 세포독성이 없는 것을 알 수 있었다. 이를 통하여 발효 전, 후 당근 잎 추출물의 NO 생성억제가 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

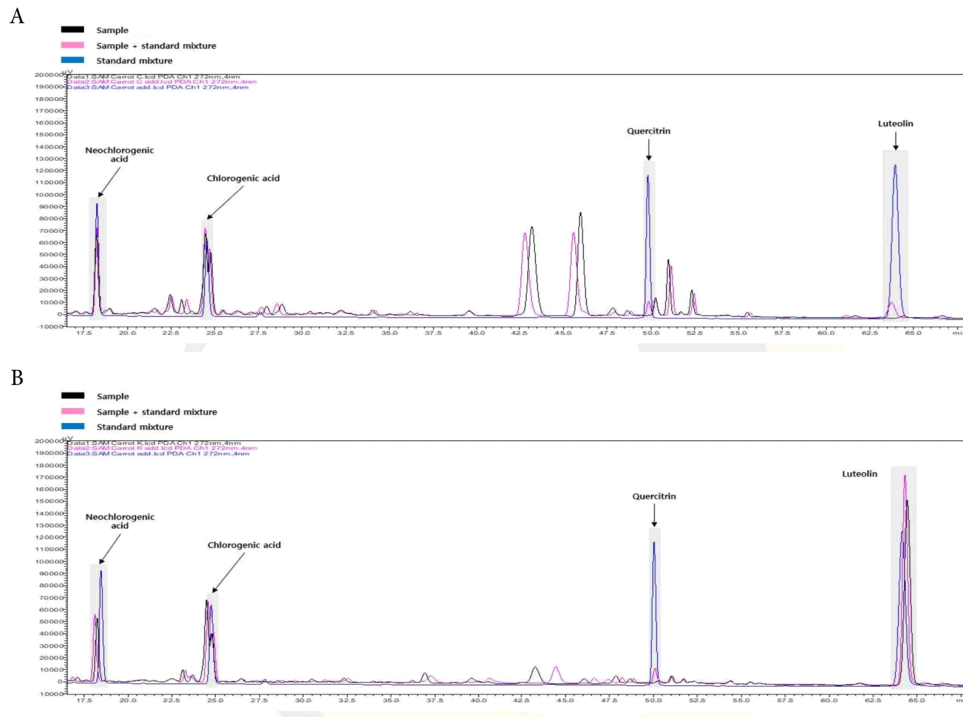


Fig. 2. HPLC chromatograms of the carrot leaf extracts (A) and fermented carrot leaf extracts (B). The x axis represents retention time and y axis represents absorbance units.

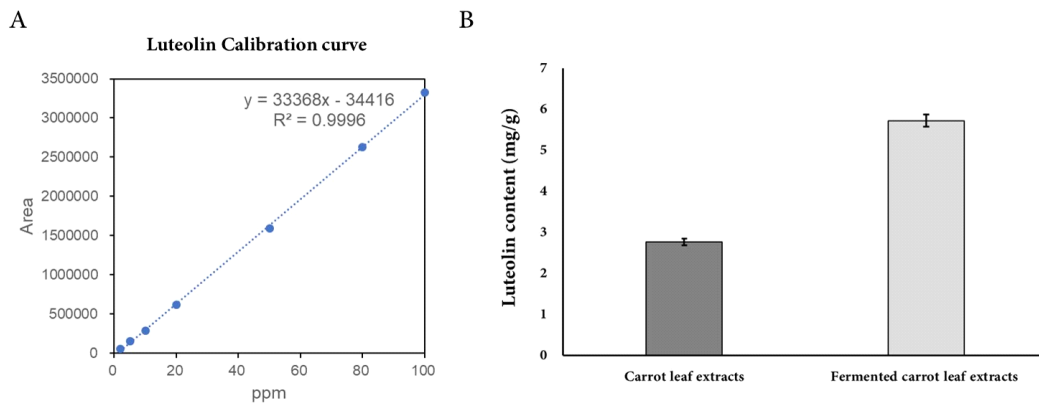


Fig. 3. Changes in luteolin content of carrot leaf extracts by fermentation, (A) luteolin calibration curve and (B) Luteoiln content of each extract.

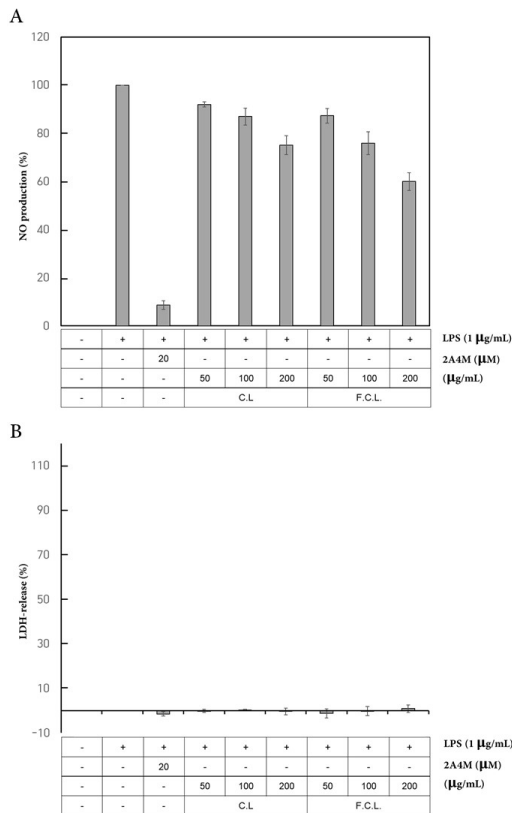


Fig. 4. Effects of the carrot leaf extracts and the fermented carrot leaf extracts on the cell viability. (A) NO production and (B) the cell viability.

3.5. 발효에 의한 iNOS 발현량 변화

염증반응에서 NO 생성은 염증반응에 관여하는 효소인 iNOS에 의해 조절된다. iNOS는 대표적인 염증자극에 반응하여 유도되는 단백질이며, iNOS 발현 증가를 억제함으로써 항염증 반응에 관여할 수 있다는 것은 이미 잘 알려져 있다. 본 연구에서 확인한 당근 잎 발효물의 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 억제 조절 효과가 iNOS 효소의 발현 조절에 의한 것인지 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 그 결과 발효 당근 잎 추출물 처리 시 농도 의존적으로 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현을 감소시키는 것을 알 수 있었다 (Fig 5). 발효하지 않은 당근 잎 추출물 처리 시 iNOS 발현 저해가 거의 없는 것을 확인할 수 있었다. 한편 염증에 관여하는 또 다른 효소인 COX-2의 경우 염증반응 유발인자인 PGE2를 생

성하는데 관여한다고 알려져 있는데 당근 잎 발효물의 경우 LPS에 의해 증가된 COX-2 발현을 억제 조절하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 KK7 균주 발효에 의한 당근 잎의 항염증 증진 효과가 루테올린 함량 증가와 더불어 iNOS-NO 경로 조절에 의한 염증과정에서의 NO 생성 억제로 인한 것을 의미한다.

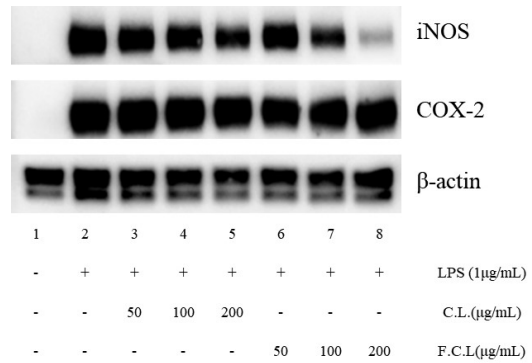


Fig. 5. Effects of iNOS and COX-2 expressions in LPS-induced RAW 264.7 cells. iNOS and COX-2 expression was determined by western blot assay.

4. 결론

본 연구에서는 김치에서 분리한 유산균 *W. coagulans* KK7을 활용하여 당근 잎 추출물을 발효하고 그에 따른 당근 잎의 항염증 활성 및 성분 변화에 대하여 조사하였다. KK7 균주로 당근 잎 추출물을 발효하는 과정에서 항염 효과가 있다고 알려진 루테올린의 함량이 증가하는 것을 정량적으로 확인할 수 있었다. 그에 따라 발효 전, 후의 당근 잎 추출물의 항염 활성에도 영향이 있을 것이라 판단하여 RAW 264.7 세포를 LPS로 자극한 후 NO 생성 억제능과 NO 생성과 관련된 효소 iNOS 발현에 대하여 알아보았다. 그 결과 발효 당근 잎 추출물 처리 시 iNOS 발현이 억제되고 그에 따라 NO 생성이 저해되어 발효 전과 비교하였을 때 항염증 효과가 증진되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 수확 후 버려지는 당근 잎을 활용한 기능성 소재 개발 시 유용한 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 천연 물질인 루테올린의 생성이 증가한다는 점에서 추가 연구를 통해 그 생물 전환 메커니즘이 명확히 밝혀진다면 미생

물을 이용한 루테올린의 대량생산 공정을 개발하여 화장품, 식품, 의학 분야 등 다양한 산업분야에 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성+(R&D, S3084302)”사업의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다.

References

1. G. L. Hostetler, R. A. Ralston, S. J. Schwartz, "Flavones: food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity", *Advances in Nutrition*, Vol.8, No.3 pp. 423-435, (2017).
2. M. C. Dias, D. C. Pinto, A. M. Silva, "Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity", *Molecules*, Vol.26, No.17 pp. 5377, (2021).
3. A. Xagorari, A. Papapetropoulos, A. Mauromatis, M. Economou, T. Fotsis, C. Roussos, "Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol.296, No.1 pp. 181-187, (2001).
4. A. Kotanidou, A. Xagorari, E. Bagli, P. Kitsanta, T. Fotsis, a. Papapetropoulos, C. Roussos, "Luteolin reduces lipopolysaccharide-induced lethal toxicity and expression of proinflammatory molecules in mice", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol.165, No.6 pp. 818-823, (2002).
5. S. W. Chae, "Function and Activation of NF- κ B in Immune System", *Korean Journal of Otolaryngology*, Vol.48, pp. 284-288, (2005).
6. B. I. Jang, "Effect of the Flavonoid Luteolin for Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis in NF-kappa BEGFP Transgenic Mice", *Yeungnam University Journal of Medicine*, Vol.23, No.1 pp. 26-35, (2006).
7. S. Kumar, A. K. Pandey, "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview", *The scientific world journal*, Vol.2013, pp. 1-16, (2013).
8. K. V. Rao, N. T. Weisner, "Microbial transformation of quercetin by *Bacillus cereus*", *Applied and environmental microbiology*, Vol.42, No.3 pp. 450-452, (1981).
9. A. Bertrand, S. Morel, F. Lefoulon, Y. Rolland, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, "Leuconostoc mesenteroides glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents", *Carbohydrate research*, Vol.341, No.7 pp. 855-863, (2006).
10. J. M. Landete, L. Plaza-Vinuesa, C. Montenegro, L. Santamaría, I. Reverón, B. de Las Rivas, R. Muñoz, "The use of *Lactobacillus plantarum* esterase genes: A biotechnological strategy to increase the bioavailability of dietary phenolic compounds in lactic acid bacteria", *International journal of food sciences and nutrition*, Vol.72, No.8 pp. 1035-1045, (2021).
11. C. F. Nathan, J. B. Hibbs Jr, "Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity", *Current opinion in immunology*, Vol.3, No.1 pp. 65-70, (1991).
12. B. G. Lee, S. H. Kim, O. P. Zee, K. R. Lee, H. Y. Lee, J. W. Han, H. W. Lee, "Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two β -carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*", *European journal of pharmacology*, Vol.406, No.3 pp. 301-309, (2000).
13. H. Kawamata, H. Ochiai, N. Mantani, K. Terasawa, "Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line", *The American journal of Chinese medicine*,

- Vol.28, No.2 pp. 217-226, (2000).
14. Y. C. Huang, J. H. Guh, Z. J. Cheng, Y. L. Chang, T. L. Hwang, C. H. Liao, C. C. Tzeng, C. M. Teng, "Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives: involvement of IkappaB-alpha stabilization", *European Journal of Pharmacology*, Vol.418, No.1-2 pp. 133-139, (2001).
 15. J. K. Yoo, J. H. Lee, H. Y. Cho, J. G. Kim, "Change of Antioxidant Activities in Carrots (*Daucus carota* var. *sativa*) with Enzyme Treatment", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.42, No.2 pp. 262-267, (2013).
 16. R. Song, M. Ismail, S. Baroutian, M. Farid, "Effect of subcritical water on the extraction of bioactive compounds from carrot leaves", *Food and Bioprocess Technology*, Vol.11, No.10 pp. 1895-1903, (2018).
 17. J. E. Kim, Y. J. Jo, N. H. Lee, "Anti-inflammatory and Anti-bacterial Constituents from the Extracts of *Daucus carota* var. *sativa* Aerial Parts", *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.44, No.4 pp. 427-436, (2018).
 18. K. M. Kang, S. H. Lee, "Effects of Extraction Methods on the Antioxidative Activity of *Artemisia* sp.", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.42, No.8 pp. 1249-1254, (2013).
 19. R. S. Gupta, S. Patel, N. Saini, S. Chen, "Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species", *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Vol.70, No.11, pp. 5753-5798, (2020).
 20. B. H. Kim, J. O. Jang, J. H. Lee, Y. Park, J. G. Kim, Y. C. Yoon, S. J. Jeong, G. S. Kwon, J. B. Lee, "Increased anti-oxidative activity and whitening effects of a *Saposhnikovia* extract following bioconversion fermentation using *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33", *Journal of Life Science*, Vol.29, No.11, 1208-1217, (2019).
 21. M. Kim, J. I. Kim, K. H. Jung, K. W. Yu, G. S. Moon, H. Y. Lee, "Biosynthesis of Compound K, a biologically active saponin of ginseng(*Panax ginseng*) by bioconversion", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.38, No.5 pp. 1335-1344, (2021).