

정상 동물모델에서 다시마(*Saccharina japonica*) 발효물의 기억력 개선 효과

류제광 · 조영홍¹ · 장성준¹ · 이배진^{2*}

서울대학교 인지과학연구소, ¹태경농산(주), ²주마린바이오프로세스

Memory-improving Effects of Fermented Sea Tangle *Saccharina japonica* in Normal Mice

Jehkwang Ryu, Young-Hong Jo¹, Seong-Jun Chang¹ and Bae-Jin Lee^{2*}

Institute for Cognitive Science, College of Humanities, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

¹Taekyung Food and Processing, Seoul 07057, Korea

²Marine Bioprocess Co., Ltd., Busan 46048, Korea

Marine organisms are sources of many bioactive compounds, such as essential fatty acids, essential amino acids, vitamins, and minerals, making them useful candidates for the production of safe bioactive substances. They also synthesize glutamic acid, which can be used to produce γ -aminobutyric acid (GABA), the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS), via fermentation with *Lactobacillus brevis* BJ-20. This study investigated the degree to which fermented sea tangle (FST) inhibits enzymes such as acetylcholine esterase (AChE) and prolyl endopeptidase (PEP) and affects memory of normal mice using the T-maze test. FST inhibited more than 90% of AChE at 1 mg/mL and 50% of PEP at 8 mg/mL. Oral FST (100 mg/kg) significantly improved performance of normal mice on the T-maze. Therefore, sea tangle fermented with *L. brevis* BJ20 effectively contributes to memory improvement and might be a useful functional food ingredient.

Key words: Fermented sea tangle, AChE, PEP, T-maze test, Memory

서 론

치매는 학습과 기억력의 감퇴를 특징으로 하는 대표적인 노인성 질환이다. 최근 노령인구의 증가에 따라 치매의 예방 및 치료에 관한 사회적 관심이 크게 증가하였다. 치매로 인한 기억력과 인지기능의 감퇴현상은 뇌에 amyloid β 단백질이 과도하게 축적되는 현상과 관련된 것으로 알려져 있다(Defelice and Ferreira, 2002). 최근 prolyl endopeptidase (PEP)가 amyloid β 단백질의 생성에 관여하며 PEP 저해제가 동물모델에서 건망증 개선 효과를 가지는 것이 밝혀지면서(Toide et al., 1997), 치매의 예방 및 치료를 위한 PEP 저해제의 개발이 많이 이루어지고 있다. 한편 뇌의 콜린성 기능의 저하, 즉 콜린성 체계에서 활성화되는 효소의 저하로 인해 신경학적 퇴행이 야기되는 현상

또한 치매와 관련된 주요 기전으로 주목 받고 있다. Acetylcholinesterase (AChE)는 acetylcholine (ACh)을 acetate와 choline으로 분해하는데, 이 과정에서 신경세포 손상이 발생하여 학습 능력 및 기억력 감퇴와 인지능력 저하 등의 치매증상이 발생한다(Vincenzo,2001; Buchet and Pikula, 2000). 이러한 작용 기전에 따라 치매환자의 인지기능 개선 용도로 AChE 저해제로서 많은 의약품의 개발되어 시판되고 있으나 독성과 부작용을 가지고 있어 이를 대체하기 위한 천연물 유래 치료 약제의 개발연구가 활발히 이루어지고 있다(Kim et al., 2013; Ikeya et al., 2004).

억제성 신경전달물질인 GABA (γ -aminobutyric acid)는 뇌혈류개선, 산소공급 증가, 뇌세포 대사 촉진, 스트레스 해소, 기억력 증진, 치매 예방 등에 효과가 있다고 알려져 있다(Kalueff

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0131>



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.

Korean J Fish Aquat Sci 49(2) 131-136, April 2016

Received 1 April 2016; Accepted 3 April 2016

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 722. 5453 Fax: +82. 51. 722. 0020

E-mail address: hansola82@hanmail.net

and Nutt, 1997). 최근 해조류인 다시마로부터 유산균 발효를 통해 고농도의 GABA를 추출하는 발효기술이 개발되어, 이를 활용한 건강 기능성 식품 소재의 개발 및 검증이 활발하게 진행되었다(Kang et al., 2013; Lee et al., 2010; Kang et al., 2012, Park et al., 2016).

본 연구에서는 GABA를 다량 함유하고 있는 유산균 발효 다시마 추출물의 AChE 및 PEP 효소 저해활성 기능을 살펴보고, 정상 동물모델에서 학습 및 기억력 증진 효과를 검증하여 유산균 발효 다시마 추출물의 기억력 및 인지능력 개선 기능을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

다시마는 부산광역시 소재 서진기장영어조합법인에서 구입하여 사용하였고, *Lactobacillus brevis* BJ20 (*L. brevis* BJ20)은 Marinebioprocess Co., Ltd. (Busan, Korea)에서 분리 동정한 균주를 사용하였다. PEP (*Flavobacterium meningosepticum* 유래)와 기질(Z-Gly-Pro-pNA)은 일본 생화학공업사(Seikagaku Co., Japan)로부터 구입하였으며, 기타 모든 시약은 Sigma Co. (St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

다시마 발효물의 제조

다시마 발효에 사용된 *L. brevis* BJ20은 Marinebioprocess Co., Ltd. (Busan, Korea)에서 분리 동정한 균주를 사용하였다. 유산균 발효 다시마 추출물은 다시마(81.7%), 배지성분(효모농축액 2%, 함수포도당 1%)과 유산균 배양액(15.3%)을 혼합하여 발효하였다. 이때 사용된 다시마는 적당한 크기로 분쇄한 건 다시마를 사용하였고 물은 다시마의 15배(w/v)를 첨가하였다. 배지성분을 멸균(121°C, 30분) 후 균주(*L. brevis* BJ20, 15.3%)를 접종하여 발효(37°C, 48시간) 후 멸균(121°C, 30분)하고 여과 농축과정을 거쳐 건조한 분말을 실험에 사용하였다.

Acetylcholinesterase (AChE)저해활성

AChE 저해 활성 측정은 Ellman et al. (1961)의 방법을 변형하여 측정하였다. AChE와 acetylthocholine iodine (ATC)은 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)에 녹여 각각 0.25 U/mL와 75 mM을 제조하였으며, 발색시약은 39.6 mg의 DTNB [5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)]와 15 mg의 sodium bicarbonate를 100 mM phosphate buffer (pH 8.0) 10 mL에 녹여 제조하였다. 추출물 30 µL에 phosphate buffer (100 mM, pH 8.0) 2.8 mL, AChE (0.25 U/mL) 30 µL, DTNB 100 µL를 넣고 혼합한 후, 37°C에서 10분간 preincubation을 한 다음 기질 ATC 30 µL를 첨가하여 37°C에서 3분간 반응시킨 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로서는 추출물 대신 100 mM phosphate buffer (pH 8.0) 30 µL를 가하여 측정하였으며, 저해활성

의 계산식은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{AChE inhibitory activity(\%)} = [1 - (\text{CAbs} - \text{SAbs}) / (\text{CAbs} - \text{BAbs})] \times 100$$

*CAbs: 대조구 흡광도, SAbs: 시료 흡광도, BAbs: 시료 무첨가구의 흡광도

Prolyl endopeptidase (PEP) 저해활성

PEP 저해활성 측정은 Toda et al. (1992)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 200 µL와 0.25 unit/mL 효소 20 µL, 시료액 10 µL의 혼합액을 96 well plate에 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 20 mM Z-Gly-Pro-pNA 20 µL를 가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 410 mM에서 흡광도를 측정(A) 하였다. 따로 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 240 µL와 시료액 10 µL의 혼합액을 준비하여 역시 410 nm에서 흡광도 측정(B) 후 아래와 같은 식으로 저해율을 조사하였다. 이때 control은 시료액 대신 시료액을 녹인 용매를 사용하여 흡광도를 (C)를 측정하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = C - (A - B) / C \times 100$$

실험동물

유산균 발효 다시마 추출물(FST)의 기억력 증진 효과를 검증하기 위하여 6개월령 FVB/N mice를 사용하였다. 실험동물은 실험동물실에서 약 1주간 순화시키면서 예비사육을 실시하였으며, 예비사육기간 동안 모든 동물의 일반 건강상태에 대한 수의학적 검역을 실시하여 16마리를 선별하였다. 선별된 실험동물은 각 군별로 8마리씩 구성하였으며, 군분리시 균형균체중 및 균포준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다. 실험기간동안 FST (실험집단)와 증류수(통제집단)를 각각 100 mg/kg을 증류수에 희석하여 10 µL/g 씩 2주간 매일 1회 경구 투여하였다.

T-maze test

T자 형태의 미로의 긴 통로 쪽에 마우스를 위치하게 하고 갈림길에서 새로운 길을 찾아가는 특성을 이용하여, 이미 다녀온 통로를 순간적으로 기억(working memory)하는지를 검증하였다. 첫번째 선택한 통로와 동일한 통로를 다시 선택한다면 point 0, 새로운 통로를 선택한다면 point 1을 부여하고 개별 마우스당 하루에 2번, 이틀간 진행하였고 각 실험이 끝난 후에는 전 실험동물의 흔적을 지우기 위해 70% alcohol로 닦아 다음 실험에 영향을 주지 않도록 하였다.

통계처리

통계분석은 SPSS version 15 software (SPSS Inc., USA)를 사용하였고, 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였다. 각 그룹간 차이는 분산분석(ANOVA)을 사용하여 통계학적 유의성을 판정하였고 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 수행하였다.

결과 및 고찰

Acetylcholinesterase (AChE) 저해 효과

AChE 저해제는 알츠하이머성 치료 환자를 치료하기 위한 치료제로 잘 알려져 있다. 특히 AChE 저해제는 AChE가 ACh를 가수분해하는 것을 막음으로써 endogenous ACh의 함량을 높여주는 역할을 하며, 결과적으로 알츠하이머성 치매 환자의 뇌에서 cholinergic neurotransmission을 향상시키는 역할을 한다 (Colovic et al., 2013; Talesa, 2001; Buchet and Pikula, 2000; Mehta et al., 2012). 현재 tacrine, donepezil, rivastigmine, galanthamine, huperzine 및 대부분의 약들이 가역적인 AChE 저해제로써 치매환자의 치료제로 사용되고 있다. 그러나 몇몇 화학적으로 합성된 AChE 저해제들이 치매 환자의 치료과정에서 nausea, vomiting, bradycardia, anorexia 및 sweating 등의 부작용을 유발하여 문제가 되고 있다(Mehta et al., 2012). 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해서 오랫동안 사용하고 있는 천연물로부터 부작용이 없는 약을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

이에 기억력 및 인지기능 관련 효소 저해 활성을 평가하기 위해 다양한 생리활성 물질이 포함되어 있는 유산균 발효 다시마 추출물 농도에 따른 AChE 저해활성을 평가한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이, *L. brevis* BJ20으로 발효한 다시마추출물에서 효소저해활성이 나타났으며, 시료 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL 처리한 샘플에서 각각 8.2±0.4, 24.1±2.1, 46.3±2.4, 96.9±1.5%의 AChE 저해 활성을 보여 농도의존적으로 억제활성이 증가하는 결과를 나타내었다.

생약추출물의 AChE 저해활성에 대한 다른 연구결과로 산수유, 감초, 당귀 등이 효과가 뛰어나며, 대부분의 생약추출물이 약한 AChE 저해활성을 가지고 있고 이는 지질과산화작용

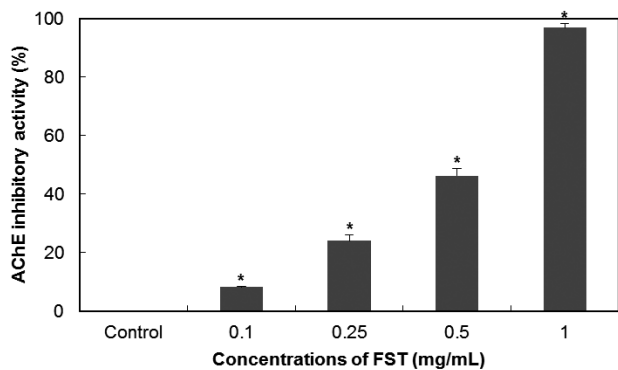


Fig. 1. Acetylcholinesterase inhibitory activity of fermented sea tangle *Saccharina japonica* (FST). Control, 100 mM phosphate buffer. Data are presented as means ± S.D. from three independent determinations. Values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

억제를 통한 신경세포 보호효과에 따른 것이란 보고가 있었다 (Kwon et al., 2014; Kwak et al., 2009; Yuk et al., 2007). Jung et al. (2012)에 의하면 10가지 식용식물추출물에서 AChE 저해 활성을 측정한 결과 오미자, 헛개나무, 측백엽, 가시오가피 추출물 1 mg/mL에서 각각 33.0, 26.6, 20.7, 17.8%로 비교적 높은 억제활성을 나타내었다고 보고하였다. 이와 비교하였을 때 유산균 발효 다시마 추출물의 경우 1 mg/mL에서 96.9±1.5%의 AChE 저해 효과를 보여 상대적으로 저해활성이 높은 것으로 확인되었으며 이에 기억력 개선 효과가 우수한 기능성 식품소재로 이용가능할 것으로 기대된다.

Prolyl endopeptidase (PEP) 저해 효과

Prolyl endopeptidase (PEP)는 carboxyl 말단 prolyl 잔기에 작용하여 peptide 결합을 분해하기 때문에 proline을 함유한 학습, 기억과 관계된 neuropeptide의 분해에 중추적인 역할을 담당하는 효소로 알려져 있다. 특히 인간 대뇌 피질층에서 그 활성이 높아 이부분에서 PEP가 중요한 기능을 담당하는 것으로 추정되고 있다. 다시말해 PEP는 중추신경계의 neurotransmitter 또는 neuromodulator로서 중요한 기능을 담당하는 neuropeptide들을 분해할 수 있으며 이러한 neuropeptide들의 결핍은 다양한 행동적 장애나 인지력의 감소와 연관되는 것으로 알려져 있다(Mannisto et al., 2007; Schneider et al., 2002; Shinoda et al., 1997). 따라서 PEP를 억제하는 저해제의 개발은 치매의 예방 및 치료를 위한 의약품 개발에 중요한 target이 된다(Toide et al., 1997). 따라서 유산균 발효 다시마 추출물 농도별(1, 2, 4, 8 mg/mL) PEP 저해활성을 분석하였다. 그 결과 유산균 발효 다시마 추출물 4와 8 mg/mL 처리시 각각 28.2±1.2, 57.5±1.9%의 저해활성을 나타내었고, Fig. 2에서 보는 바와 같이 PEP 저해활성 또한 AChE와 마찬가지로 높게 나타났으며 농도 의존적으로 저해활성이 증가함을 확인하였다.

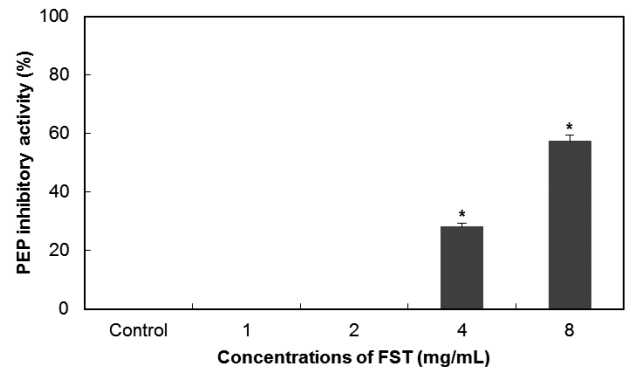


Fig. 2. Prolyl endopeptidase inhibitory activity of fermented sea tangle *Saccharina japonica* (FST). Control, distilled water. Data are presented as means ± SD from three independent determinations. Values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

최근 뇌 내의 β -amyloid protein이 병의 발생에 중요한 원인으로 주목을 받고 있고, 이 단백질의 생성에 PEP가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. Aoyagi et al. (1991)에 의하면 노인성치매 환자 뇌 및 혈청에서 정상인보다 PEP의 활성이 높다고 보고한 바 있어, PEP 저해활성을 가지는 다양한 천연물 연구가 진행되고 있다. 녹차를 포함한 가지, 호박, 생강, 당근 등 약 52종의 천연 추출물이 약 50%미만의 PEP저해활성을 보인다는 연구결과가 보고된 바 있다(Lee et al., 1997; Lee et al., 1999; Kim et al., 2001). Lee et al. (2003)에 의하면 건다시마의 경우 약 11.3%의 PEP저해활성을 보고하였고, 해조류 중 모자반류 및 감태, 패, 툇의 메탄올추출물에서 90%이상으로 PEP 활성이 저해됨을 확인한 바 있다.

정상 동물모델에서 유산균발효추출물의 기억력 개선 효과

기억력이란 뇌속에 주어진 정보를 받아들여 저장했다가 필요한 시기에 꺼내어 사용하는 능력을 말한다. 이러한 기억력은 크게 정보가 감각기관을 통하여 저장되는 감각기억(sensory memory), 현재의 정보들을 처리하는 짧은 기간 동안의 단기 기억(short term memory), 나중에 재생되도록 비교적 영구히 저장되는 장기기억(long term memory)으로 구별되어 진다(Choi et al., 2012). 본 연구에서 수행된 T-maze test는 기억에 관한 연구 목적으로 많이 사용되는 실험으로 다양한 형태로 응용이 가능하며, T-maze test를 통해 작업기억(working memory)을 검증할 수 있다(Deacon and Rawlins, 2006; Shoji et al., 2012). 작업 기억은 장기 기억이 아니라 단기 기억의 일종으로 본 연구에서는 행동실험을 통해 control 군과 시험군의 비교 분석을 통해 단기기억력 개선 정도를 검증하고자 하였다.

T-maze test를 통하여 유산균 발효 다시마 추출물이 마우스의 기억력에 미치는 영향을 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

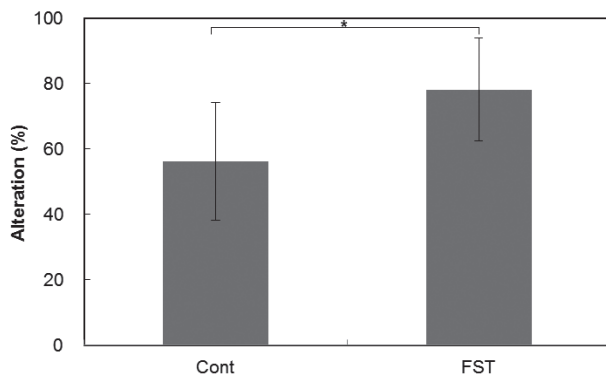


Fig. 3. Effect of the fermented sea tangle *Saccharina japonica* (FST) on memory of normal mice in T-maze test. Control, water injection; FST, FST injection (100 mg/kg b.w.). Data are expressed as the mean \pm SD (n=8). $P < 0.05$, significantly different from the control group

T-maze test에서 나타난 alteration (%)은 단기 공간인지 기억력 회복의 지표로 사용되며, 분석 결과 Control 그룹에서 56%의 alteration을 보였고, 유산균 발효 다시마 추출물에서 78%로 Control 그룹보다 alteration이 증가하는 결과를 확인할 수 있었으며, one-way ANOVA 검증 결과 통계적으로 유의한 차이를 확인하였다($P < 0.05$).

기억력 저하의 주요한 원인 중 하나는 뇌조직의 콜린계 활성의 감소이다. 뇌조직의 신경세포에서 choline과 acetyl CoA는 acetyltransferase에 의해 ACh으로 전환되고 ACh은 AChE에 의해 acetate와 choline으로 분해되는 과정에서 지속적인 AChE의 작용으로 인해 ACh의 양이 감소 시 기억력 저하가 일어난다(Choi et al., 2012).

유산균 발효 다시마 추출물을 치매유도 동물모델(TMT-induced rat)에서 Morris water-maze test를 이용하여 공간 기억력을 연구한 결과 인지 및 기억력 손상에 대한 보호 효능을 나타내었고, 이러한 유산균 발효 다시마 추출물의 효과는 신경돌기 세포 성장 및 ACh를 합성하는 효소인 choline acetyltransferase (ChAT) 발현 증가를 통해 매개되었다(Park et al., 2016). 기억력 향상효과는 콜린신경계 세포에서 ACh의 합성, 분해, 분비 및 ACh 수용체와 관련하여 그 기전을 추측해 볼 수 있다. 알츠하이머병에서의 콜린성신경계의 손상에 의한 기억력 장애는 잘 알려진 사실이다. ACh을 합성하는 효소인 ChAT의 활성은 기본적인 뇌기능을 수행하는데 있어 콜린신경계의 신경발달 및 활동과 관련하여 대단히 중요한 역할을 한다(Jegal et al., 2010). 콜린성 신경계 결손에서 ChAT의 활성 감소는 여러 연구를 통해 확인되었고 이러한 활성저하는 특히 해마에서 최대로 나타나며 최대 95% 수준까지 활성이 감소하는 것으로 보고되고 있다(Kasa et al., 1997; Jegal et al., 2010).

정상마우스의 행동실험에서 나타난 유산균 발효 다시마 추출물의 기억력 향상효과는 뇌신경세포에서 ChAT 증가에 의한 ACh 활성 증가, AChE 억제에 의한 시냅스 연결에서 ACh 작용의 연장효과에 의한 것으로 추측된다. 이외에도 유산균 발효 다시마 추출물의 기억력 개선효과의 기전은 신경영양인자(neurotrophic factor)의 발현 증가와 상위 전사인자 조절에 의한 측면에서도 생각해 볼 수 있다. Murray et al. (1994)에 따르면 brain derived neurotrophic factor (BDNF)는 중추신경계 특히 해마에서 높은 수준으로 발현되는 뇌신경조절인자로 신경세포의 성장과 생존을 조절하는 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며 알츠하이머 환자의 경우 해마 형성체에 BDNF mRNA의 발현이 현저히 감소된다고 보고하였다. BDNF는 해마와 전뇌기저부(basal forebrain)의 콜린성 뉴런의 생존과 분화를 촉진시키며 ACh의 합성과 관련된 효소의 활성을 증가시키고(Alderson et al., 1990), 시냅스 가소성을 향상시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다(McAllister et al., 1999; Jegal et al., 2010). 이러한 연구결과로 보아 BDNF의 부족이나 결핍이 기억력 장애를 초래할 것으로 추측할 수 있다. 이전 연구에서 행동

실험을 마친 실험동물의 해마에서 단백질을 분리하여 BDNF의 발현을 측정할 결과 유산균 발효 다시마 추출물을 투여한 실험군에서 그 양이 유의적으로 증가됨을 확인 할 수 있었다(Park et al., 2016). 따라서 유산균 발효 다시마 추출물의 투여가 AChE 저해, PEP 저해 등 다양한 기전을 통해 기억력 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 추측할 수 있다.

사 사

본 연구는 산업통상자원부 및 한국산업기술평가관리원의 산업핵심기술개발사업의 일환으로 수행하였음. [과제번호 10048025, 글로벌 시장 진출용 고령친화용 뇌건강 기능성식품 개발]

References

- Alderson RF, Alterman AL, Barde YA and Lindsay RM. 1990. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 5, 297-306. [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90166-D](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(90)90166-D).
- Aoyagi T, Nagai M, Ogawa K, Kojima F, Okada M, Ikeda T, Hamada M and Takeuchi T. 1991. Poststatin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase, produced by *Streptomyces viridochromogenes* MH534-30F3. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot* 44, 949-955. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.44.949>.
- Ellman GL, Countney KD, Andress V and Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination acetylcholine esterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88-95. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Buchet R and Pikula S. 2000. Alzheimer's disease: Its origin at the membrane, evidence and questions. *Acta Biochimica Polonica* 47, 725-733.
- Choi MR, Lee MY, Hong JE, Lee JY, Chun JW, Kim TH, Shin HK and Kim EJ. 2012. The aqueous extract of *Rubus coreanus* Miquel improves scopolamine-induced memory impairment in ICR Mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41, 192-196. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.2.192>.
- Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM and Vasic VM. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacol* 11, 315-335. <http://dx.doi.org/10.2174/1570159X11311030006>.
- Deacon RMJ and Rawlins JNP. 2006. T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols* 1, 7-12. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.2>.
- Defelice FG and Ferreira ST. 2002. Physiopathological modulators and amyloid aggregation and novel pharmacological approaches in Alzheimer's disease. *An Acad Bras Ciênc* 74, 265-284. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652002000200006>.
- Ikeya Y, Takeda S, Tunakawa M, Karakida H, Toda K, Yamaguchi T and Aburada M. 2004. Cognitive improving and cerebral protective effects of acylated oligosaccharides in *Polygala tenuifolia*. *Biol Pharm Bull* 27, 1081-1085. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.27.1081>.
- Jegal KH, Park SJ, Kim CY, Lee C, Park JH and Jang JH. 2010. Effect of *Poria cocos* on the scopolamine-induced memory impairment and its underlying molecular mechanism. *Korean J Orient Physiol Pathol* 24, 228-235.
- Jung YS, Park SJ, Kim JE, Yang SA, Park JH, Kim JH, Jhee KH, Lee SP and Lee IS. 2012. A comparative study of GABA, glutamate contents, acetylcholinesterase inhibition and antiradical activity of the methanolic extracts from 10 edible plants. *Korean J Food Sci Technol* 44, 447-451.
- Kalueff A. and Nutt DJ. 1997. Role of GABA in memory and anxiety. *Depression Anxiety* 4, 100-110.
- Kang YM, Lee BJ, Kim JI, Nam BH, Cha JY, Kim YM, Ahn CB, Choi JS, Choi IS and Je JY. 2012. Antioxidant effects of fermented sea tangle (*Laminaria japonica*) by *Lactobacillus brevis* BJ20 in individuals with high level of γ -GT: a randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical study. *Food Chem Toxicol* 50, 1166-1169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.026>.
- Kang YM, Woo NS and Seo YB. 2013. Effects of *Lactobacillus brevis* BJ20 Fermentation on the antioxidant and antiinflammatory activities of sea tangle *Saccharina japonica* and oyster *Crassostrea gigas*. *Korean J Fish Aquat Sci* 46, 359-364. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2013.0359>.
- Kim JH, Kim SI and Song KS. 2001. Prolyl endopeptidase inhibitors from green tea. *Arch Pharm Res* 24, 292-296. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02975094>.
- Um MY, Ha TY, Seong KS and Kim YS. 2013. In vitro screening of the acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity, and neuronal cell protective effect of medicinal plant extracts. *Korean J Food Preserve* 20, 840-845. <http://dx.doi.org/10.11002/kjfp.2013.20.6.840>.
- Kook MC, Seo MJ, Cheigh CI, Pyun YR, Cho SC and Park H. 2010. Enhanced production of γ -aminobutyric acid using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16. *J Microbiol Biotechnol* 20, 763-766. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.0911.11016>.
- Kasa P, Rakonczay Z and Gulya K. 1997. The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 52, 511-535. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00028-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00028-2).
- Kwak JH, Jeong CH, Kim JH, Choi GN, Shin YH, Lee SC, Cho SH, Choi SG and Heo HJ. 2009. Acetylcholinesterase inhibitory effect of green tea extracts according to storage condition. *Korean J Food Sci Technol* 41, 435-440.
- Kwon YR, Cho SM, Hwang SP, Kwon GM, Kim JW and Youn KS. 2014. Antioxidant, physiological activities, and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Portulaca oleracea*.

- cea* extracts with different extraction methods. J Korean Soc Food Sci Nutr 43, 389-396. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.3.389>
- Lee BJ, Kim JS, Kang YM, Lim JH, Kim YM, Lee MS, Jeong MH, Ahn CB and Je JY. 2010. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods. Food Chemistry 122, 271-276. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.071>.
- Lee HJ, Kim JH, Lee JH, Kim JS, Kwak ST, Lee KB, Song KS, Choi BW and Lee BH. 1999. Inhibitory activities of seaweeds on prolyl endopeptidase, tyrosinase and coagulation. Korean J Pharmacogn 30, 231-237
- Lee KH, Lee HJ and Park HI. 1997. Screening of prolyl endopeptidase inhibitors from natural products. Yakhak Hoeji 41, 153-160.
- Lee SH, Park HJ, Cho YS, Chung IK and Song KS. 2003. Screening of prolyl endopeptidase inhibition from Korean natural foods. J Korean Soc Food Sci Nutr 32, 971-975. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2003.32.7.971>.
- Mannisto PT, Venalainen J, Jakanen A and Garcia-Horsman JA. 2007. Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders. Drug New Perspect 20, 293-305. <http://dx.doi.org/10.1358/dnp.2007.20.5.1120216>.
- McAllister AK, Katz LC and Lo DC. 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. Annu Rev Neurosci. 22, 295-318. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.295>
- Mehta M, Adem A and Sabbagh M. 2012. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Int J Alzheimers Dis 2012, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/728983>.
- Murray KD, Gall CM, Jones EG and Isackson PJ. 1994. Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase messenger RNA expression in Alzheimer's disease. Neuroscience 60, 37-48. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90202-X](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(94)90202-X).
- Park HJ, Lee MS, Shim HS, Lee GR, Chung SY, Kang YM, Lee BJ, Seo YB, Kim KS and Shim I. 2016. Fermented *Saccharina japonica* (Phaeophyta) improves neurotogenic activity and TMT-induced cognitive deficits in rats. Algae 31, 1-12. <http://dx.doi.org/10.4490/algae.2016.31.11.10>.
- Schneider JS, Giardiniere M and Morain P. 2002. Effects of the prolyl endopeptidase inhibitor S 17092 on cognitive deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys. Neuropsychopharmacology 26, 176-182. [http://dx.doi.org/10.1038/S0893-133X\(01\)00307-4](http://dx.doi.org/10.1038/S0893-133X(01)00307-4).
- Shinoda M, Toide K, Ohsawa I and Kohsaka S. 1997. Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid beta protein in NG 108-15 cells. Biochem Biophys Res Commun 27, 641-645. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1997.6730>.
- Shoji H, Hagihara H, Takao K, Hattori S and Miyakawa T. 2012. T-maze forced alternation and left-right discrimination tasks for assessing working and reference memory in mice. J Vis Exp 60, e3300. 10.3791/3300.
- Toda S, Obi Y, Numata K, Hamagishi Y, Tomita K, Komiyama N, Kotake C, Furumai T and Oki T. 1992. Eurystatins A and B, new prolyl endopeptidase inhibitors, I. Taxonomy, production, isolation and biological activities. J Antibiot 45, 1573-1579. <http://doi.org/10.7164/antibiotics.45.1573>.
- Talesa VN. 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev 122, 1961-1969. [http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00309-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00309-8).
- Toide K, Shinoda M, Fujiwara T and Iwamoto Y. 1997. Effect of novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. Pharmacol Biochem Behav 56, 427-434. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057\(96\)00238-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057(96)00238-9).
- Yuk DY, Kim TI, Park SG, Park HK, Yoon YK and Hong JT. 2007. Improvement of memory impairment by L-theanine through inhibition of acetylcholinesterase activity in mice. Yakhak Hoeji 51, 409-414.
- Toda S, Obi Y, Numata K, Hamagishi Y, Tomita K, Komiyama N, Kotake C, Furumai T and Oki T. 1992. Eurystatins A and B, new prolyl endopeptidase inhibitors, I. Taxonomy, production, isolation and biological activities. J Antibiot 45, 1573-1579. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.45.1573>.
- Talesa VN. 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev 122, 1961-1969. [http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00309-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00309-8).
- Toide K, Shinoda M, Fujiwara T and Iwamoto Y. 1997. Effect of novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. Pharmacol Biochem Behav 56, 427-434. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057\(96\)00238-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057(96)00238-9).
- Yuk DY, Kim TI, Park SG, Park HK, Yoon YK and Hong JT. 2007. Improvement of memory impairment by L-theanine through inhibition of acetylcholinesterase activity in mice. Yakhak Hoeji 51, 409-414.