

## *Lactobacillus brevis*를 이용한 다시마 발효물의 알코올 분해 활성

강영미·이배진·김진수<sup>1\*</sup>

(주) 마린바이오프로세스, <sup>1</sup>경상대학교 해양식품공학과

### Alcohol Metabolizing Activity of Fermented Sea Tangle Juice

Young-Mi Kang, Bae-Jin Lee and Jin-Soo Kim<sup>1\*</sup>

Marinebioprocess Co., Ltd., Busan 619-912, Korea

<sup>1</sup>Department of Seafood Science and Technology,  
Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

Alcohol metabolizing activity of fermented sea tangle juice (FSTJ) using *Lactobacillus brevis* BJ20 were evaluated by measuring relative alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activities. According to the results of MTT assay, the fermented sea tangle juice by *Lactobacillus brevis* BJ20 appeared safe in the cytotoxicity. The relative ADH activity of FSTJ showed 124% at 10 mg/mL, which increased with increasing concentration. The relative ALDH activity showed, however, insignificant difference ( $P>0.05$ ) between concentrations of FSTJ up to 50 mg/mL. These results suggested that fermented sea tangle juice by *L. brevis* BJ20 could be used as a potential material for metabolizing alcohol.

Key words: Sea tangle, Alcohol metabolizing activity, *Lactobacillus brevis*, Alcohol dehydrogenase, Aldehyde dehydrogenase

#### 서 론

최근 국내 주류 소비는 국내 경기의 침체와 과중한 업무 등에 의한 스트레스로 빈번히 음주함으로 인하여 증가되고 있고, 이로 인하여 알코올에 의한 생산성 상실, 인간관계 악화, 정서 및 신체 발달 장애, 여러 가지 질병 등이 야기되어 사회적으로 문제가 되기도 한다. 일반적으로 음주를 하는 경우 체내에 흡수된 알코올의 경우 분해 시 1차 대사 과정인 alcohol dehydrogenase (ADH)에 의해 생성되는 acetaldehyde가 생성된다. 하지만 이 acetaldehyde는 숙취의 주원인 물질로 추가 대사 과정을 통하여 분해되지 않고 혈액 내 잔존하는 경우 숙취 현상이 심하여지게 되고, 이러한 기능을 가진 acetaldehyde는 aldehyde dehydrogenase (ALDH)에 의하여 분해되어진다고 알려져 있다 (Lieber and Leo, 1986). 이와 같은 음주 후 숙취 현상은 알코올 자체보다는 acetaldehyde 생성 시 발생하는 과산화 반응에 의해 기인되어진다. 따라서 음주 후 효과적인 숙취 제거는 acetaldehyde와 같은 병리적 현상의 주원인 물질들의 감소를 위한 혈중 알코올 농도 저하와 피로물질의 제거 및 알코올 대사 시 생성되는 radical에 의한 세포손상을 예방하여야 한다 (Kim et al., 2000; Cho et al., 1997). 이러한 일면에서 주류 소비가 증가하고 있는 국내의 경우 음주가 건강에 미치는 영향은 물론이고, 숙취 제거에 관한 연구도 다양하게 실시되어야 할 것으로 판단된다.

한편, 다시마는 미역에 비하여 조체가 매우 강인하여 생체

로 먹기에 부적당하고, 자숙 등과 같은 가열처리에 의하여도 조체가 쉽게 부드러워지지 않아서 우리의 식생활에 부합되지 못하고 있다 (Jeong et al., 1994). 다시마는 가공하여 조미료로 이용하고자 할 때 복합 다당류인 알긴산이 많이 함유되어 있어 추출액의 여과, 농축, 또는 건조 시 많은 제약이 있는 것으로 알려져 있다 (Lee et al., 1993). 이처럼 다시마는 조체의 강인함으로 인한 세포벽 층진 물질인 세포간 다당의 유용성분을 추출하기 어려운 가공적인 문제, 추출액의 기호성 저하와 같은 기호성 문제, 그리고 많은 비용을 필요로 하는 운영 자금적인 면에서 어려움이 있어, 풍부한 자원이면서도 연안 어민에게 소득원으로 되지 못하고 있다 (Jeong et al., 1994). 그러나, 최근 다시마에 관한 다양한 연구가 이루어져 다시마가 각종 미네랄과 다양한 비타민류, 그리고, 식이섬유인 알긴산 등이 골고루 함유되어 있어 식품학적으로 상당히 의미가 있을 뿐만 아니라 최근에는 항균성, 항 바이러스성, 항 종양성, 항 돌연변이성, 항 혈액응고 및 면역력 증강 등과 같은 다양한 생리활성을 가지고 있어 소비자들로부터 상당히 각광을 받고 있는 것으로도 알려져 있으나 (Abdel-Fattah et al., 1978; Collic et al., 1991; Haroun-Bouhedja et al., 2000; Mori et al., 1982; Nishino et al., 1989; 1991; Usui et al., 1980), 아직 유산균을 이용한 다시마 발효물의 숙취제거에 대한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 유산균 발효에 의하여 제조한 다시마 발효물의 알코올 분해 및 숙취해소 제거에 대하여 ADH와 ALDH의 활성으로 살펴보았다.

\*Corresponding author: jinsukim@gnu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 재료

다시마는 2008년 10월에 부산광역시 소재 Food & Food Co., Ltd에서 구입하여 사용하였고, *L. brevis* BJ20은 Marinebioprocess Co., Ltd. (Busan, Korea)에서 분리 동정하여 사용하였다. 마우스 대식세포(RAW 264.7)는 ATCC (No. TIB-71, USA)에서 분양받았고, penicilline/streptomycine, 우태아 혈청 (fetal bovine serum) 및 DMEM은 Invitrogen (GIBCO BRL, USA)에서 구입하였으며 각 실험에 필요한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide, Lipopolysaccharide (LPS), sulfanilamide, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 다른 모든 시약은 analytical grade를 사용하였다.

### 다시마 발효물의 제조

다시마 발효물은 건다시마 6.25% (w/v), yeast extracts 3% (w/v), glucose 1%(w/v)를 각각 혼합하고, 멸균 (121°C에서 30분) 및 균주(2% *L. brevis* BJ20) 접종을 실시한 다음 발효 (37°C에서 24시간) 및 재멸균 (121°C에서 30분)하여 제조하였다.

### Cell culture

마우스 대식세포를 penicillin (100 units/mL)/ streptomycin (100 µg/mL) solution과 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator (Forma series II, Thermo, USA)에서 배양하여 사용하였다.

### HTS-MTT assay

24 well plate에 마우스 대식세포주 (5×10<sup>5</sup>)개를 분주하고, 4시간 뒤에 새로운 배지로 교체한 후 일정농도 (2.5, 5.0, 10.0 mg/mL)의 시료를 24시간 동안 처리하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide (0.1 mg/mL)를 각 well에 처리하여 4시간동안 배양한 후 형성된 insoluble formazan을 DMSO에 녹이고 ELISA reader (Wallac 1420, BMS, USA)를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

$$\text{Viability (\%)} = (\text{반응군의 흡광도}/\text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

### HTS-cell base NO assay

24 well plate에 마우스 대식세포주 5×10<sup>5</sup>개를 분주하고, 4시간 뒤에 새로운 배지로 교체한 후 일정농도(2.5, 5.0, 10.0 mg/mL)의 시료를 1시간 동안 전처리한 다음 LPS (lipopolysaccharide)를 1 µg/mL로 16시간 동안 처리하였다. 이어서 세포배양 상층액 100 µL를 96 well에 분취하고, Griess 용액 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100 µL를 첨가한 다음 5분간 반응 후 ELISA reader (Wallac 1420, BMS, USA)를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - [(\text{반응군의 흡광도} - \text{색보정군의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

### Relative ADH activity

Relative ADH activity는 Bostian et. al. (1978)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 시험구의 반응액은 증류수 1.4 mL, 1.0 M tris-HCl buffer (pH 8.8) 0.75 mL, 20 mM NAD<sup>+</sup> 0.3 mL, ethanol 0.3 mL 및 다시마 발효액 0.1 mL의 혼합액과 효소원 0.15 mL로 하고 이를, 그리고 대조구의 반응액은 시험구 반응액의 조성액과 같이 하되 다시마 발효액 대신에 증류수 0.1 mL를 첨가하고 이를, cuvette에 각각 넣어 총 3 mL가 되도록 조절한 다음 30°C에서 5분간 pre-incubation 한 후, 5분간 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 이 때 relative ADH activity는 대조구에 대한 상대활성 (%)으로 나타내었다.

$$\text{Relative ADH activity (\%)} = [(\text{시료 흡광도} - \text{blank 흡광도}) / (\text{대조군 흡광도} - \text{blank 흡광도})] \times 100$$

### Relative ALDH activity

Relative ALDH activity는 Blandino et al. (1978)의 방법을 약간 변형하여 측정하였고, 흡광도 340 nm에서 NADH의 생성 속도를 지표로 사용하였다. 시험구의 반응액은 증류수 2.1 mL, 1.0 M tris-HCl buffer (pH 8.8) 0.3 mL, 20 mM NAD<sup>+</sup> 0.1 mL, 1.0 M acetaldehyde 0.1 mL, 3.0 M KCl 0.1 mL, 0.33 M 2-mercaptoethanol 0.1 mL 및 다시마 발효액 0.1 mL의 혼합액과 효소원 0.1 mL로 하고 이를, 그리고 대조구의 반응액은 시험구 반응액의 조성액과 같이 하되 다시마 발효액 대신에 증류수 0.1 mL를 첨가하고 이를 cuvette에 각각 넣어 총 3 mL가 되도록 조절하여 30°C에서 5분간 pre-incubation한 후, 5분간 340 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하였다. 시료의 relative ALDH activity는 대조구에 대한 상대활성 (%)으로 나타내었다.

$$\text{Relative ALDH activity (\%)} = [(\text{시료 흡광도} - \text{blank 흡광도}) / (\text{대조군 흡광도} - \text{blank 흡광도})] \times 100$$

### 통계처리

통계분석은 SPSS version 11 software (SPAA Inc., USA)를 사용하였고, P-value<0.05로 유의성 검정을 하였다.

## 결과 및 고찰

### 세포독성 및 항염증 활성

MIT assay로 측정된 다시마 발효물의 세포독성은 Fig. 1과 같다. 세포 생존률은 다시마 발효물의 농도가 12.5 µg/mL의 경우 105.4%, 25 µg/mL의 경우 108.1%, 50 µg/mL의 경우 102% 및 100 µg/mL의 경우 109.2%로 농도에 관계없이 거의 일정하여 다시마 발효물은 세포 독성이 없는 것으로 나타났다.

다시마 발효물의 세포보호 효과 (cell protective effect)를

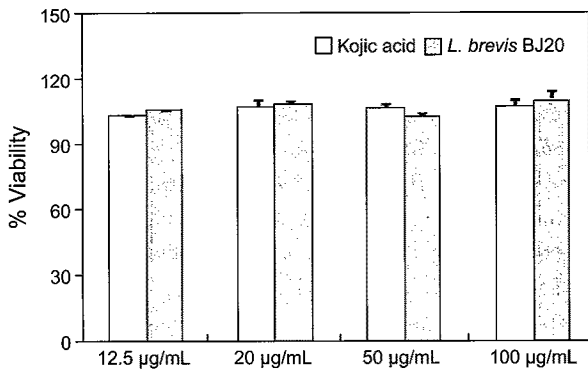


Fig. 1. Cell cytotoxicity of fermented sea tangle juice by *Lactobacillus brevis* BJ20 as affected by concentration. The *P* value was determined by a *t*-test.

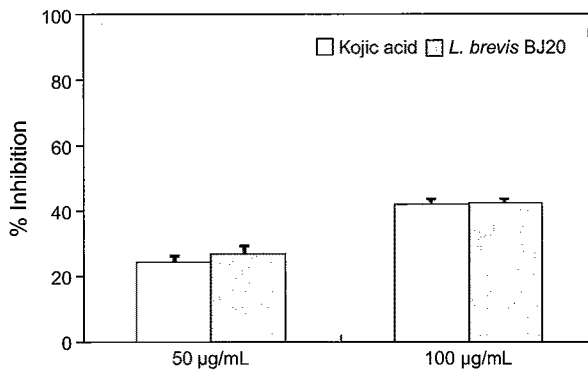


Fig. 2. Inhibition of cell base NO level by fermented sea tangle juice by *Lactobacillus brevis* BJ20. The *P* value was determined by a *t*-test.

합염증 활성의 지표로서 측정되어지는 세포내 NO 생성정도로 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 다시마 발효물의 LPS에 의해 유도된 NO의 생성정도의 억제율은 50 µg/mL의 경우 27.8%, 100 µg/mL의 경우 43.1%로 다시마 발효물의 농도에 따라 증가하는 경향은 나타내었으나 그 비율이 그다지 높지 않은 것으로 나타났다.

이상의 다시마 발효물의 세포독성과 세포내 NO의 생성 억제율의 결과로 미루어 보아 다시마 발효물은 세포에 대한 독성이 없을 뿐만 아니라, 외부물질에 의해 생성된 염증 약화시키는 능력이 있는 것으로 사료된다. 따라서 현재 식용으로 이용되고 있는 다시마의 무해성은 이미 널리 알려져 있지만, 유산균 발효에 의해 생성된 발효물의 경우도 역시 세포 독성이 없어 식품으로 이용 가능성이 확인되었다.

#### 알코올분해 효과

다시마 발효물의 알코올 분해에 대한 작용 기작의 분석을 위하여 다시마 발효물의 농도에 따른 체내 알코올 대사의 1차 관여 효소인 ADH activity 변화를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. ADH activity는 다시마 발효물을 첨가하지 않을 경우를 기준으로 10 mg/mL인 경우 124%, 50 mg/mL인 경우 138

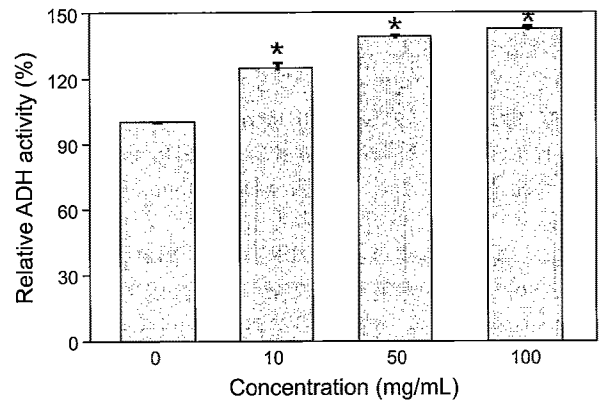


Fig. 3. Relative alcohol dehydrogenase (ADH) activity of fermented sea tangle juice by *Lactobacillus brevis* BJ20 as affected by concentration.

Each experiment was conducted in triplicate and the results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. The *P* value was determined by a *t*-test. \*: *P*>0.05.

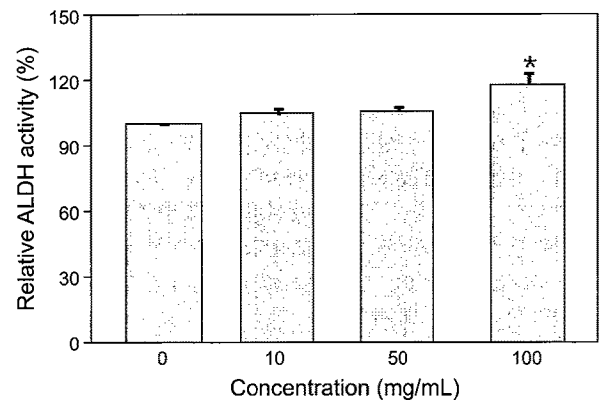


Fig. 4. Relative Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity of fermented sea tangle juice by *Lactobacillus brevis* BJ20 as affected by concentration.

Each experiment was conducted in triplicate and the results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. The *P* value was determined by a *t*-test. \*: *P*>0.05.

% 및 100 mg/mL인 경우 142%로 농도 의존적으로 증가하였다. 이와 같은 다시마 발효물의 처리농도에 따른 ADH의 활성 변화의 결과로 미루어 보아 다시마 발효물은 ADH의 활성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 확인되어 알코올의 분해에 기여할 것이라 사료되었다.

일반적으로 숙취의 주요 원인 물질인 acetaldehyde는 ADH 작용에 의해 생성되는 부산물로 널리 알려져 있다 (Lieber and Leo, 1986). 다시마 발효물이 단순히 ADH만 활성화시키면 혈중 알콜 농도는 신속히 감소시킬 수가 있으나 혈액에 잔존하는 acetaldehyde는 계속 축적이 되어 보다 심한 숙취를 일으킬 가능성이 있다. 따라서 이와 같은 가능성을 확인하기 위하여 다시마 발효물의 농도에 따른 acetaldehyde의 분해에 직접적인 영향을 미치는 효소인 ALDH activity를 비교한 결과는

Fig. 4와 같다. ALDH activity는 다시마 발효물을 첨가하지 않은 것을 기준으로 10 mg/mL인 경우 104%, 그리고, 50 mg/mL인 경우 107%로 2종의 농도 간에는 차이가 없었으나, 다시마 발효물의 농도가 100 mg/mL인 경우 117%로 0-50 mg/mL인 경우에 비하여 5% 유의수준에서 차이가 있었다.

알코올 분해 효소의 활성은 ADH activity의 경우 다시마 발효물의 농도에 따라 비례적으로 증가하였으나, ALDH activity의 경우 저농도에서는 거의 확인이 되지 않았고 고농도에서 만이 확인되었다. 이와 같은 사실로 미루어 보아 ADH 및 ALDH와 같은 두 효소의 활성은 생체 내에서 균형을 이루며 반응하면서 알코올을 분해하는 것으로 추정되었다. 따라서 다시마 발효물은 알코올 분해 속도의 경우 빠르게 증진시켰으나, 숙취에 관련이 깊은 ALDH activity를 다소 저하시켰다. 이와 같이, 다시마 발효물은 ALDH activity를 다소 저하시키는 하였으나 acetaldehyde를 acetic acid로 분해시켜 숙취 해소에도 상당한 도움을 줄 것이라 사료된다. 이와 같은 다시마의 알코올 분해 효과는 다시마 내에 존재하는 주요 아미노산 성분인 aspartic acid, glutamic acid 및 alanine 등의 효과에서 기인된 것이라 사료된다 (Bunsel and Lehmann, 1980; Takabe and Itokawa, 1983; Han et al., 1985).

일반적으로 항산화 활성과 알코올 분해 간에는 상당히 관련성이 있다고 알려져 있고 (Kim et al., 2000; An et al., 1999), 다시마의 경우 특히 항산화 활성이 높다고 널리 알려져 있다. 이러한 일면에서 Lee et al. (2006)과 Heo et al. (2003)은 다시마의 줄기와 잎을 효소 또는 메탄올로 추출하고 항산화성을 살펴본 결과 항산화 활성이 높았다고 보고한 바 있고, Bunsel and Lehmann (1980), Takabe and Itokawa (1983) 및 Han et al. (1985)은 다시마에 다량 함유되어 있는 aspartic acid, glutamic acid, glycine 및 alanine 등과 같은 아미노산이 항산화 작용에 많이 관여한다고 보고한 바 있다. 또한, Cho et al. (1997)은 북어 엑기스가 항산화 활성뿐 아니라, 알코올 섭취 후 유도되는 간기능 저하에 따른 피로 상태와 acetaldehyde에 의해 형성되는 radical에 의한 간조직 손상을 보호해 준다는 것을 동물실험을 통해 확인하고 보고한 바 있다.

이상의 결과로 미루어 보아, 다시마 발효물은 알코올 분해에 도움을 줄 수 있는 식품 소재로서의 판단되었으나, 이의 사업화를 위하여는 반드시 *in vivo* 상의 실험결과가 보완되어야 할 것으로 판단되었다.

## 사 사

본 연구는 2008년도 수산 중소·벤처 기업 기술 개발 지원 사업의 지원에 의해 이루어졌으며, 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Abdel-Fattah A, Hussein FMD and Fuad ST. 1978. Carbohydrates of the brown seaweed *Dictyota dichothoma*. *Phytochemistry* 17, 741-743.
- An SW, Kim YG, Kim MH, Lee BI, Lee SH, Kwon IH, Hwang B and Lee HY. 1999. Comparison of hepatic detoxification activity and reducing serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* THUNB and *Alnus Japonica* Steud. *Korean J Med Crop Sci* 7, 263-268.
- Bostian KA and Betts GF. 1978. Kinetics and reaction mechanism of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J Molecular aspects* 173, 773-786.
- Bunsel RG and Lehmann AG. 1980. Antagonistic effect of sodium ascorbate on ethanol-induced changes in swimming of mice. *Behav Brain Res* 1, 351.
- Cho JY, Kim AR, Yeon JD, Lim SW, Lee JH, Yoo ES, Yu YH and Park MH. 1997. Effects of combined preparation (DWP715) containing Alaska pollack extract, maltol, ascorbic acid and nicotinamide on decreasing of blood alcohol concentration, anti-fatigue and anti-oxidation. *Korea J Food Sci Technol* 29, 167-172.
- Collic S, Fischer AM, Tapon-Brethaudiere H, Boisson C, Durand P and Jozefonvicz J. 1991. Anticoagulant of a fucoidan fraction. *Thrombosis Res* 64, 143-147.
- Han BH, Park MB and Han YN. 1985. Studies on the antioxidant components of Korean ginseng (V): The mechanism of antioxidant activity of maltol and phenolic acid. *Kor Biochem J* 18, 337.
- Haroun-Bouhedja F, Ellouali M, Siquin C and Boisson-Vidal C. 2000. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thrombosis Res* 100, 453-459.
- Heo SJ, Lee KW, Song CB and Jeon YJ. 2003. Antioxidant activity of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Algae* 18, 71-81.
- Jeong IH, Lee SS and Lee KH. 1994. The effect of additives to the texture of kelp blade. *Bull Korean Fish Soc* 27, 149-154.
- Kim MH, Chung YT, Lee JH, Park YS, Shin MK, Kim HS, Kim DH and Lee HY. 2000. Hepatic detoxification activity and reduction of serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* THUNB from Korea and China. *Korean J Med Crop Sci* 8, 225-233.
- Lee JK, Choi HS, Yoon SK, and Kim WJ. 1993. Effect of extraction temperature on some quality of sea tangle extract. *J Korean Soc Food Nutr* 22, 771-776
- Lee SE, Han HS, Bang JK, Kim GS and Seong

- NS. 2006. Alcohol metabolizing and antioxidant activities of mixed extract from *Acanthopanax senticosus* and *Rubus coreanus* in alcohol-treated rats. Korean Soc Crop Sci 1, 430-431.
- Liber CS and Leo MA. 1986. Inprogress in Liver Diseases. Popper, H. and Schaffner, F. (Ed.), Grune and Stration, New York, 253.
- Mori H, Kwame H, Nishide HK and Nisizawa M. 1982. Sugar constituents of some sulfated polysaccharides from the sporophylls of wakkame (*Undaria pinnatifide*) and their biological activities. Proc 10th Intern, Seaweed Symp 109.
- Nishino T, Aizu Y and Nagumo T. 1991. The relation between the molecular weight and the anticoagulant of fucan sulfates from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. Agric Biol Chem 55, 791-797
- Takabe M and Itokawa Y. 1983. Thiamine depletion after ethanol and acetaldehyde administration to rabbits. J Nutr Sci Vitamin 29, 509.
- Usui T, Asari K and Mizuno T. 1980. Isolation of highly fucoidan from *Eisenia bicycles* and anticoagulant and antitumor activities. Agric Biol Chem 44, 1965-1970.

---

2009년 11월 20일 접수

2009년 12월 21일 수정

2010년 2월 19일 수리