

유산균 발효에 의한 툷 (*Hizikia fusiforme*) 추출액의 항산화 및 항염증 활성 증가

송호수¹·엄성환²·강영미³·최종덕^{4,5}·김영목^{1,2*}

¹부경대학교 식품가공센터, ²부경대학교 식품공학과, ³(주)마린바이오프로세스,
⁴경상대학교 해양식품공학과, ⁵경상대학교 해양산업연구소

Enhancement of the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of *Hizikia fusiforme* Water Extract by Lactic Acid Bacteria Fermentation

Ho-Su Song¹, Sung-Hwan Eom², Young-Mi Kang³,
Jong-Duck Choi^{4,5} and Young-Mog Kim^{1,2*}

¹Food Processing Center, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²Department of Food Science and Technology, Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea

³Marine Bioprocess Co. LTD., Busan 619-912, Korea

⁴Department of Seafood Science and Technology, Gyeongsang National University,
Tongyeong 650-160, Korea

⁵Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

We previously reported that fermentation by *Lactobacillus brevis* LB-20 isolated from *Kimchi* resulted in improvement of the sensory quality of *Hizikia fusiforme* water extract. This study was conducted to evaluate the possible application of lactic acid bacteria fermentation to improve the functional qualities of *H. fusiforme* extract. *L. brevis* LB-20 was inoculated and cultivated in *H. fusiforme* extract. The antioxidant and anti-inflammatory activities of extract were then assayed both before and following fermentation for two days. Antioxidant activity was determined by assaying levels of radical scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl, superoxide, and alkyl radical. Lactic acid bacterial fermentation of *H. fusiforme* extract resulted in enhancement of antioxidant activity. The greatest enhancement of antioxidant activity was seen in the hydroxyl radical scavenging assay that incorporated 0.5 mg/mL of raw and fermented *H. fusiforme* extract. Fermented extract exhibited greater (21.95%) inhibition of nitric oxide synthesis than did raw extract (14.66%) at a concentration of 1 mg/mL. The fermented extract exerted its potent anti-inflammatory activity via attenuation of expression of inflammation-related cytokine proteins (TNF- α and iNOS).

Key words: Anti-inflammatory activity, Antioxidant activity, Fermentation *Hizikia fusiforme*, *Lactobacillus brevis* LB-20

서 론

툷 (*Hizikia fusiforme*)은 다시마와 더불어 천연 정미 성분인 아미노산 (glutamic acid 및 aspartic acid 등)과 혈액응고작용 (Kim et al., 1998), 면역증강작용 등의 기능성이 있는 것으로 알려진 중성다당류인 laminaran과 함황산성 다당류인 fucoidan이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다 (Koo et al., 1995; Koo et al., 1997; Shon et al., 2006). 툷의 생리활성에 관한 연구는 주로 툷에서 추출한 fucoidan의 화학적 특성 (Koo et al., 1995; Koo et al., 1997), 툷 추출물들에 대한 항균성에 관한 연구 (Kim, 1990; Kim et al., 1994; Lim et al., 1995) 및 툷 추출물이 지질대사 및 간 효소활성에 미치는 영향 등에 대해서 보고가 이루어지고 있으며 (Jang et al., 2007; Jung et al., 2001), 또한 생체 내 항고지혈증 (Shan et al., 1999),

항고콜레스테롤 (Abdussalam, 1990) 및 항산화 효과에 대한 연구가 이루어지고 있다 (Hruch et al., 1989; Kim et al., 1998; Kim and Lee, 2004; Park et al., 2005).

하지만 툷과 같은 해조류의 유용성분을 추출하여 이용할 때에는 해조류를 열수 추출이나 알칼리, 산 또는 효소처리 등에 의하여 추출 후 가공하는 방법들이 대부분이다 (Do et al., 1997; Kim and Bae, 2002). 그러나 이러한 추출공정은 해조류에 포함되어 있는 탄수화물의 대부분이 비소화성 복합다당류로서 산이나 알칼리에 비교적 안정하고 특수한 미생물 효소에 의하지 않고서는 분해되기가 어려워 여러 가지 생체 활성 물질의 변질 및 파괴 등을 수반하는 결과를 초래하거나 또는 효과적으로 추출해내지 못하는 단점을 가지고 있다 (Lim et al., 1995; Kim and Bae, 2002). 이에 해조류가 가지고 있는 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근 시도 되고 있는 방법이 미생물을 이용한 해조류 발효이다 (Bae and Kim, 2010; Eom

*Corresponding author: ymkim@pknu.ac.kr

et al., 2010; Song et al., 2011). 하지만 해조류가 가지는 단점을 개선하기 위한 해조류 발효에 대한 연구는 극히 제한적으로 이루어지고 있으며, 또한 이를 이용한 발효 추출물의 체계적인 안전성 평가 및 기능성 평가에 대한 보고는 미흡한 실정이다 (Song et al., 2011).

이에 본 연구에서는 톳 특유의 이취를 경감시키면서 GABA와 같은 유용성분을 증대시키는 유산균주를 이용하여 발효한 톳 발효 추출액의 상업적인 적용 가능성을 검토하기 위하여 유산균 발효에 의한 톳 발효액의 항산화 활성, 세포 독성 평가 및 항염 활성 변화 등을 조사하였다.

재료 및 방법

톳 추출액의 제조

추출액 제조에 사용한 톳은 2009년 6월에 채취한 완도산을 구입하여 사용하였다. 열수 추출을 위해 수세, 탈염, 분쇄공정을 거쳐 적당한 크기로 분쇄한 톳 분쇄물에 16배의 물 (w/v)을 첨가하고 80°C에서 30분간 열수 추출하고 20 mesh 망으로 잔사를 제거한 추출액을 실험에 사용하였다 (Song et al., 2011).

발효 균주 및 배양조건

톳 추출액의 발효를 위하여 사용된 균주는 전통 발효식품 중 김치에서 분리하여 부경대학교 식품공학과 식품미생물학 연구실에서 보관 중인 유산균들 중에서 톳 특유의 이취를 경감시키면서 GABA 전환 효율이 가장 우수한 *Lactobacillus brevis* LB-20을 실험에 사용하였다 (Song et al., 2011). *L. brevis* LB-20 균주를 Lactobacilli MRS Broth (MRS; Difco, USA) 배지에 균주를 24 시간 전 배양 후, 배양액 10%를 톳 추출액에 접종하고 30°C에서 진탕 배양한 톳 발효액을 이용하여 항산화 및 항염증 활성 평가용 시료로 사용하였다.

항산화 활성 조사

DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Nanjo et al. (1996)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 30 μ L에 60 μ M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 30 μ L를 혼합 후 반응액을 100 μ L quartz capillary tube에 옮겨 2분 후 electron spin resonance (ESR) spectrometer (JES-FA, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)로 측정하였다. 실험조건은 다음과 같다 : magnetic field, 336.5 \pm 5 mT; power, 5 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1 \times 1,000; sweep time, 30 s; temperature, 298 K. DPPH radical 소거능은 H와 H₀의 상대적인 radical signal peak 높이의 차에 의하여 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{H}{H_0}\right) \times 100$$

Superoxide radical 소거능 측정

Superoxide radical은 Guo et al. (1999)에 따라 시료 10 μ L에

0.3 mM riboflavin 10 μ L, 1.6 mM EDTA 10 μ L, 800 mM DMPO 10 μ L를 첨가 후 365 nm의 UV lamp에서 1분 동안 조사하였다. 반응물을 quartz capillary tube에 옮긴 후 ESR spectrometer를 이용하여 분석하였으며 실험조건은 다음과 같다 : magnetic field, 336.5 \pm 5 mT; power, 10 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1 \times 1,000; sweep time, 30 s; temperature 298 K. Superoxide radical 소거능은 H과 H₀의 상대적인 peak를 이용하는 수식에 의해 계산되었다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{H}{H_0}\right) \times 100$$

Alkyl radical 소거능 측정

Alkyl radical (peroxyl radical)은 Hiramoto et al. (1993)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 10 μ L의 시료에 각각 10 μ L의 PBS (Phosphate buffered saline), 40 mM AAPH (2,2-azobis-(2-amidinopropane)-dihydrochloride), 40 mM POBN α - (4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron을 첨가한다. 그리고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 quartz capillary tube에 옮겨 ESR spectrometer를 이용하여 측정하였다. 실험조건은 다음과 같다: magnetic field, 336.5 \pm 5 mT; power, 10 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1 \times 1000; sweep time, 1 min; temperature 298 K. Alkyl radical 소거능은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{H}{H_0}\right) \times 100$$

Hydroxyl radical 소거능 측정

Hydroxyl radical 소거능은 Rosen et al. (1984)의 방법으로 분석하였다. 시료 20 μ L에 0.3 M DMPO 20 μ L, 10 mM FeSO₄ 20 μ L, 10 mM H₂O₂ 20 μ L을 혼합한 다음 quartz capillary tube에 옮긴 후 2.5분 후에 ESR spectrometer로 측정하였다. 실험조건은 다음과 같다: magnetic field, 336.5 \pm 5 mT; power, 1 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1 \times 200; sweep time, 4 min; temperature 298 K. Hydroxy radical 소거능은 H과 H₀의 상대적인 높이에 의해 측정하는 다음 수식에 의해 계산되었다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{H}{H_0}\right) \times 100$$

세포독성 및 항염 활성 조사

*L. brevis*를 이용한 톳 추출액과 발효액의 세포독성은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay로 항염활성은 cell based NO assay 및 western blotting analysis 방법에 의하여 측정하였다.

Cell culture

사람의 간암세포 유래 HepG2 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 분양받아 사용

하였으며 10% inactivated fetal bovine serum과 1% penicillin과 streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 와 95% air 조건에서 배양하였다.

MTT assay

우선 24 well에 HepG2 세포 5 × 10⁵개를 분주하고, 4시간 뒤에 새 배지로 교체 후 일정농도 (0.5 및 1 mg/mL)의 톳 추출액 및 유산균 톳 발효액을 24시간 동안 처리하였다. 이후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (0.1 mg/mL)을 각 well에 처리하여 4 시간 배양한 후 형성된 insoluble formazan을 DMSO에 녹이고 ELISA reader (Wallac 1420, USA)를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \left(\frac{\text{반응군}}{\text{대조군}} \right) \times 100$$

Cell base NO assay

HepG2 세포를 24 well plate에 5 × 10⁵개를 분주하고, 4시간 뒤에 새 배지로 교체 후 일정농도 (0.5 및 1 mg/mL)의 톳 추출액 및 유산균 톳 발효액을 1시간 동안 전처리 후 lipopolysaccharide (LPS)를 1 µg/mL로 16 시간 동안 처리하였다. 세포배양 상층액 100 µL를 96 well에 넣어놓고 Griess 용액 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)- ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄) 100 µL를 첨가하고 5분 후 ELISA reader (Wallac 1420, USA) 를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3반복을 원칙으로 하여 평균값을 구하였다.

$$\text{Nitric oxide Inhibition (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{반응군} - \text{보조군}}{\text{대조군}} \right) \right] \times 100$$

Western blot analysis

HepG2 세포를 6well culture plates에 1 × 10⁶cells/well을 분주 후, 24시간 후에 각 well에 일정농도 (0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL)의 유산균 톳 발효액을 24시간 처리하고, 새 배지로 교체 후, 1.0 µg/mL LPS를 24시간동안 처리하였다. 처리한 세포는 PRO-PREP buffer (iNtRON, Korea)로 protein을 추출 후, Bradford법 (1976)을 이용하여 정량하였다. 추출 protein은 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였고, nitocellulose membrane로 전이시킨 후, 비특이적 결합을 줄이기 위해 5% skim milk (containing 0.1% Tween-20)를 4°C에서 16시간 처리 하였다. 실험에 사용한 primary antibody는 염증 관련 cytokine 단백질인 TNF-α 및 iNOS antibodies (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA.)를 사용하였고, secondary antibody 는 peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:2000, Santa Cruz Biotechnology)를 이용하여 chemiluminescence로 확인하였다. Band 강도는 densitometry로 정량하였고, 대조구로는 housekeeping 유전자인 β-actin을 이용하였다.

결과 및 고찰

*L. brevis*의 발효에 의한 톳 추출액의 항산화 활성 증가

DPPH radical 소거능

톳 추출액과 유산균 톳 발효액을 대상으로 ESR spectrometer를 이용하여 DPPH radical scavenging activity를 실험한 결과는 Fig. 1과 같다. Positive control인 ascorbic acid의 경우 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 각각 80.15%, 86.04%의 활성을 나타내었고, 톳 추출액의 경우에는 각각 38.96%, 49.12%로 Kim and Lee (2004)이 보고한 톳의 건조방법에 따른 DPPH radical 소거능 (36~53%)과 비슷한 결과를 얻었다. 하지만 유산균 톳 발효액은 동일 농도에서 각각 52.82%, 67.51%로 유산균 발효에 의해서 DPPH radical 소거활성이 증가하였다. 이러한 결과는, 다시마 추출액이 곰팡이와 효모의 발효에 의해 DPPH radical 소거활성이 증가하였다는 Eom et al. (2010)과 Bae and Kim (2010)의 연구 결과와도 같은 경향을 나타내고 있다. 이는 미생물의 발효에 의해 항산화 활성을 가지는 것으로 알려진 페놀 화합물이 증가하기 때문인 것으로 판단되며 Song et al. (2011)은 *L. brevis* LB-20 균주에 의한 유산균 톳 발효액이 대조구인 톳 추출액 (비발효액)에 비해 페놀성 화합물의 함량이 증가하였다고 보고하고 있다. 또한, Eom et al. (2010)과 Bae and Kim (2010)도 미생물 발효에 의한 다시마 추출액에서의 페놀성 화합물 함량 증가를 보고하였다.

유산균의 경우 효모와 곰팡이와 같은 진균류와 비해 상대적으로 단시간에 발효가 가능하고 또한, 해조류에 풍부한 glutamic acid로 부터 최근 기능성 물질로 기대되는 γ-aminobutyric acid (GABA)로의 효율적인 전환이 가능하다는 점에 있어서 향후 톳 등의 해조류의 관능성 및 기능성 향상에 있어서 유용할 것으로 기대된다 (Bae and Kim, 2010; Song et al., 2011).

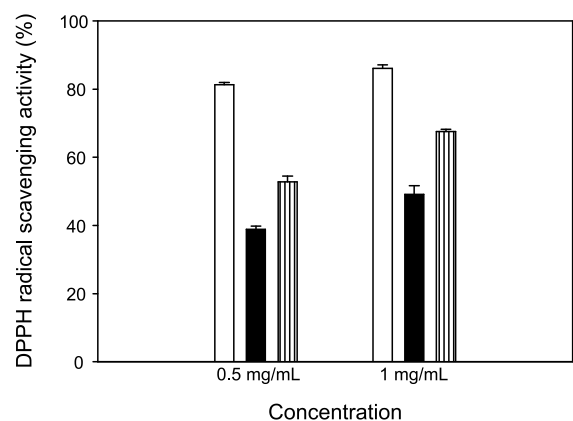


Fig. 1. Effect of lactic acid bacteria fermentation on DPPH radical scavenging activity of *Hizikia fusiforme* water extract. Result are means ±S.D. of triplicate data. □, ascorbic acid; ■, *H. fusiforme* water extract; ▤, *H. fusiforme* water extract fermented by *Lactobacillus brevis* LB-20.

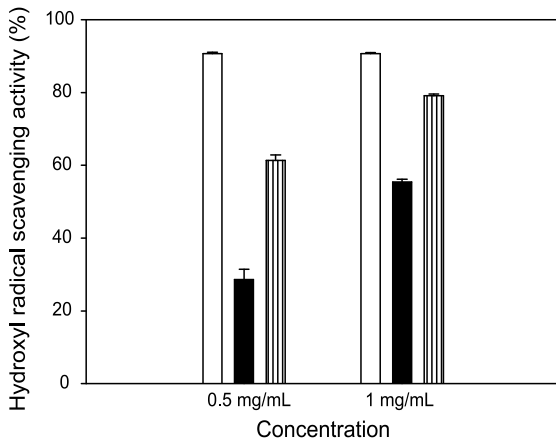


Fig. 2. Effect of lactic acid bacteria fermentation on hydroxyl radical scavenging activity of *Hizikia fusiforme* water extract. Result are means \pm S.D. of triplicate data. □, ascorbic acid; ■, *H. fusiforme* water extract; ▨, *H. fusiforme* water extract fermented by *Lactobacillus brevis* LB-20.

Hydroxyl radical 소거능

Hydroxyl radical은 노화와 관련된 원인 물질인 활성산소 중에서 반응성이 가장 강하여 생체 내 각종 조직 및 세포막 등의 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Heo and Wang, 2008). 이러한 hydroxyl radical에 대한 톳 추출액과 유산균 톳 발효액을 대상으로 hydroxyl radical의 소거활성을 실험한 결과는 Fig. 2와 같다. Positive control인 ascorbic acid의 경우 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 각각 41.27%, 44.36%의 활성을 나타내었고, 톳 추출액의 경우에는 각각 47.63%, 64.16%로 Kim and Lee (2004)가 보고한 톳의 건조 조건에 따른 hydroxyl radical 소거활성 (42~50%)과 유사하였다. 하지만, 유산균 톳 발효액은 동일 농도에서 각각 61.36%, 79.08%로 0.5 mg/mL 농도의 경우 톳 추출액 (비발효액)과 비교 시 2배 이상의 hydroxyl radical 소거 활성 증가가 나타났다. 이러한 결과는 유산균 톳 발효액이 정제된 화합물이 아닌 점을 고려한다면 유산균 톳 발효액은 상당히 뛰어난 hydroxyl radical 소거 활성을 가지고 있는 것으로 판단된다. Eom et al. (2010)도 효모 다시마 발효액의 항산화 활성의 증가에 대해 보고하고 있으나 그 활성 증가는 톳 추출액과 마찬가지로 radical의 종류에 따라 차이가 있다. 이는 해조류들 중에 존재하는 항산화 물질의 종류, 함량 및 미생물 발효에 의한 해조류 대사산물의 차이에 기인하는 것으로 생각되지만 현재 이에 대한 연구는 진행이 되어 있지 않으며 향후 연구가 필요한 것으로 판단된다.

Superoxide radical 소거능

활성산소는 체내 각종 세포들의 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되며, 자외선 및 외부환경에 의해서도 세포 내에서 발생된다. 활성산소와 지질이 반응하면 과산화 지질이 생성되어 혈관벽이나 세포막의 구조가 파괴되어 조직이 손상된다 (Masaki et al., 1995). 활성산소의 free radical에 대한 보호

효과를 측정하기 위해 xanthine oxidase가 xanthine과 반응하여 uric acid로 전환되고 (Kuppusamy and Zweier, 1989) 이때 생성되는 O_2^- (superoxide radical)를 소거하는 효과를 톳 추출액과 유산균 톳 발효액을 대상으로 평가하였다 (Fig. 3). 톳 추출액의 경우에는 각각 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 32.11%, 37.62%로 Kim and Lee (2004)가 보고한 톳의 건조 조건에 따른 superoxide radical 소거능 (33~37%)과 유사한 것으로 나타났다. 하지만, 유산균 톳 발효액은 동일 농도에서 각각 37.99%, 44.67%로 대조구인 톳 추출액 (비발효액)에 비해 소폭 증가하는 경향을 나타내었다. 특히, 1 mg/mL 농도의 유산균 톳 발효액의 경우 정제된 화합물이 아님에도 불구하고 positive control로 사용한 같은 농도의 ascorbic acid 보다 뛰어난 superoxide radical 소거 활성을 나타내고 있어 활성산소를 제어하는 천연 항산화제로서의 가치가 높은 것으로 판단된다.

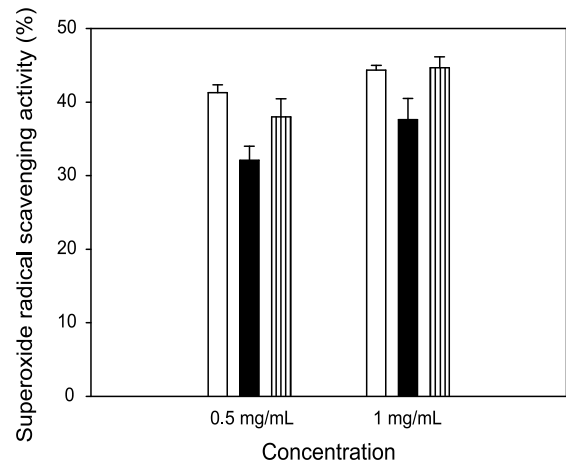


Fig. 3. Effect of lactic acid bacteria (LB-20) fermentation on superoxide radical scavenging activity of *Hizikia fusiforme* water extract. Result are means \pm S.D. of triplicate data. □, ascorbic acid; ■, *H. fusiforme* water extract; ▨, *H. fusiforme* water extract fermented by *Lactobacillus brevis* LB-20.

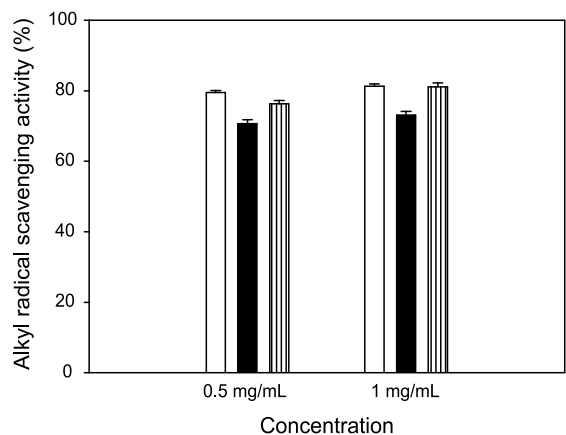


Fig. 4. Effect of lactic acid bacteria fermentation on alkyl radical scavenging activity of *Hizikia fusiforme* water extract. Result are means \pm S.D. of triplicate data. □, ascorbic acid; ■, *H. fusiforme* water extract; ▨, *H. fusiforme* water extract fermented by *Lactobacillus brevis* LB-20.

Alkyl radical 소거능

톳 추출액과 유산균 톳 발효액을 대상으로 alkyl radical 소거 활성을 실험한 결과는 Fig. 4와 같다. Positive control인 ascorbic acid의 경우 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 각각 79.51%, 81.25%의 활성을 나타내었고, 톳 추출액의 경우에는 각각 70.59%, 73.08%, 유산균 톳 발효액은 동일 농도에서 각각 76.34%, 81.07%로 유산균 발효에 의해 톳 추출액의 alkyl radical 소거 활성이 소폭 증진되는 것을 알 수 있다. 또한 천연 항산화제 중 alkyl radical 소거능이 매우 우수한 것으로 알려진 ascorbic acid와 비교 시 동일농도에서 대등한 alkyl radical 소거능을 나타내었으며 alkyl radical의 소거활성이 뛰어나다고 알려진 chitosan과도 대등한 소거활성을 나타내었다 (Lee et al., 2009; Park and Kim, 2007).

이상의 항산화 실험결과를 종합해 볼 때 톳 추출액은 DPPH radical, hydroxyl radical, superoxide radical, alkyl radical과 같은 각종 유해 radical 생성을 억제시키는 효과를 가지고 있으며 그 활성은 유산균 발효에 의해서 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 유산균 발효에 의해서 세포 독성이 생성되지 않는다면 천연 항산화제로써의 이용 가능성이 높을 것으로 판단되어 이후 MTT assay를 이용한 세포 독성에 관한 연구를 진행하였다.

*L. brevis*의 발효에 의한 톳 추출액 세포독성 평가

유산균 발효에 따른 톳 추출액의 세포 독성에 대해 조사하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포 독성에 관한 연구를 진행하였다 (Fig. 5). MTT assay에 의한 세포 독성 실험 결과, HepG2 세포 생존율은 톳 추출물의 농도가 0.5 mg/mL의 경우 112.12%, 1 mg/mL의 경우 112.44%이고 유산균 톳 발효액은 동일농도에서 각각 105.47%, 121.37%로 유산균 발효에 의한 세포 독성은 없는 것으로 나타났다. 다시마 추출액의 경우에도 효모발효 후 세포독성에 큰 변화가 없고 세포의 생존율이 다소 증가한다고 보고하고 있으며 이러한 결과는 전통 발효식

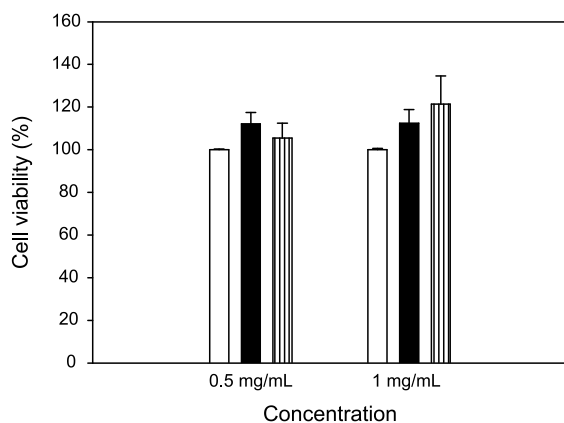


Fig. 5. Effect of lactic acid bacteria fermentation on cell cytotoxicity (Raw 264.7 cells) of *Hizikia fusiforme* water extract. Result are means \pm S.D. of triplicate data. □, Kojic acid; ■, *H. fusiforme* water extract; ▨, *H. fusiforme* water extract fermented by *Lactobacillus brevis* LB-20.

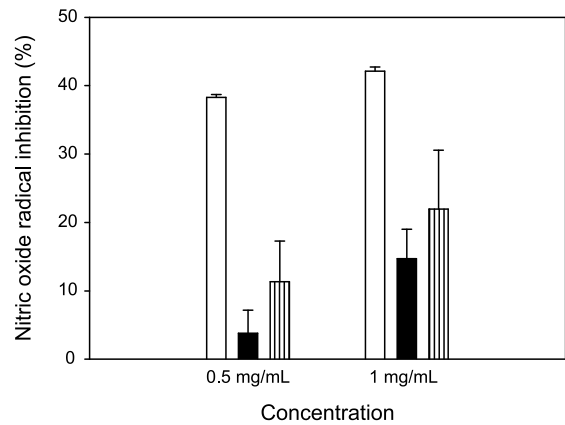


Fig. 6. Effect of lactic acid bacteria fermentation on cell (HepG2 cell) based nitric oxide assay of *Hizikia fusiforme* water extract. Result are means \pm S.D. of triplicate data. □, Kojic acid; ■, *H. fusiforme* water extract; ▨, *H. fusiforme* water extract fermented by *Lactobacillus brevis* LB-20.

품에서 분리한 유산균 및 효모 등의 발효미생물이 해조류의 발효 중에 인체에 유해한 독성물질을 생산하지 않는다는 것을 의미한다 (Eom et al., 2010; Kang et al. 2010). 이러한 연구 결과는 향후 전통 발효식품에서 분리된 미생물을 이용한 다양한 해조류 가공 기술 개발에 연결될 것으로 기대된다.

*L. brevis*의 발효에 의한 톳 추출액 항염증 활성 증가

톳 추출액은 항산화 활성 외에도 항염증에 대한 활성 등이 보고되고 있으며 (Ryu and Kim, 2006), 항염증 실험을 진행하기 위하여 MTT assay에서 세포 독성을 나타내지 않는 농도인 0.5 및 1.0 mg/mL에서 톳 추출액과 유산균 톳 발효액의 항염증 활성을 조사하였다.

NO 생성에 대한 효과

유산균 톳 발효액의 세포보호효과 (cell protective effect)를 항염증 활성의 지표로 측정되어지는 세포 내 NO (nitric oxide)는 세포 내 독소인 1 μ g/mL LPS 처리로 생성을 유도하였다. 톳 추출액의 경우 0.5 mg/mL 농도에서는 3.80%, 1 mg/mL의 경우에는 14.69%의 NO 생성 억제 효과를 나타냈으며 유산균 톳 발효액에서는 각각 11.34% 및 21.95%로 유산균 발효에 의해 억제 활성이 증가하였으며 농도 의존적인 경향을 나타내었다 (Fig. 6). 톳 발효 추출액은 positive control인 kojic acid (79.4%, 80.53%) 보다는 NO 생성정도의 억제율은 떨어지는 것으로 나타났지만, 발효액이 정제된 화합물이 아닌 점을 고려한다면 상당한 억제능을 가진 것으로 판단된다. 또한 이러한 결과는 다른 해조류 추출액의 미생물 발효에 의해 항염 활성이 증가하였다는 보고와도 같은 경향을 보여주고 있다 (Eom et al., 2010; Kang et al., 2010).

염증관련 Cytokine 단백질 (TNF- α 및 iNOS) 발현 측정 자극에 유도된 TNF- α 와 iNOS는 오랜 기간 동안 다량의 NO를 생성하는 염증 관련 cytokine 단백질로 이들에 의해 생성된 NO는 guanylyl cyclase의 활성과 동시에 주위 조직에

세포독성을 나타낸다 (Kim et al., 2010). 본 연구를 통해 세포내 NO 생성 정도를 측정한 결과 유산균 톳 발효액에 의해 NO 생성이 최고 21.95% 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 6). 이에 유산균 톳 발효액의 염증관련 cytokine 단백질에 대한 저해 효과를 확인하기 위해 HepG2 cell에 *L. brevis* LB-20으로 2일째 까지 발효시킨 유산균 톳 발효액과 톳 추출액을 각각 0.5 mg/mL와 1 mg/mL로 처리한 후 24시간 배양한 후 LPS (1 µg/mL)를 처리하고 24시간 뒤 염증 관련 cytokine 단백질 발현 변화를 western blotting으로 확인 하였다. 실험결과 positive control인 LPS 단독처리에 의한 염증 관련 cytokine 단백질인 TNF-α와 iNOS의 발현이 증가하였다 (Fig. 7, lane 2). 반면, 톳 추출액과 유산균 톳 발효액을 첨가한 경우에는 염증 관련 cytokine 단백질의 발현이 감소하는 결과를 나타내었으며 특히 0.5 mg/mL 유산균 톳 발효액을 첨가한 경우 가장 우수한 결과를 나타내었다 (Fig. 7, lane 3~6). HepG2 cell에서 LPS에 의해 유도되어진 염증 관련 cytokine 단백질인 TNF-α와 iNOS의 발현 억제 효과는 결론적으로 유산균 톳 발효액에 의한 NO 생성 억제로 연결되고 이를 통한 항염증 효과가 기대된다.

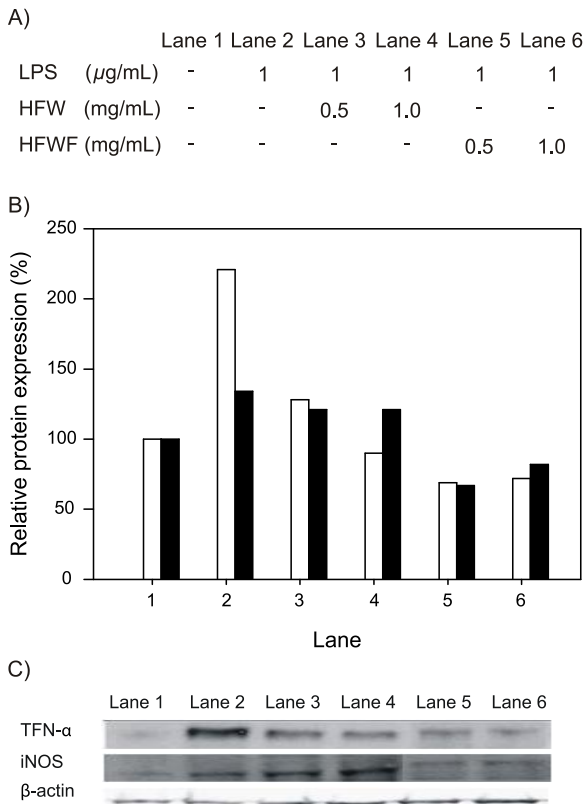


Fig. 7. TNF-α and iNOS protein expression rate of *Hizikia fusiforme* water extract (HFW) and *H. fusiforme* water extract fermented by *Lactobacillus brevis* LB-20 (HFWF). A, Treatment conditions of lipopolysaccharide (LPS), HFW and HFWF. B, TNF-α (□) and iNOS (■) expression. C, Western blotting profiles.

이상의 결과를 종합해 보면 톳 추출액의 유산균 발효는 독성에는 영향을 미치지 않으면서 톳 추출액의 항산화 활성뿐만 아니라 항염 활성도 증가시키는 것으로 나타났으며 이를 바탕으로 향후 톳의 관능성 및 기능성을 개선시킨 유산균 톳 발효액의 다양한 식품 소재로서의 응용 가능성에 대한 연구를 지속적으로 실시할 예정이다. 또한, 본 연구결과는 특유의 이취와 이미 때문에 원료 자체의 우수성에도 불구하고 다양한 식품소재로서 적용에 한계가 있는 다른 해조류에 대한 미생물 발효공정의 도입 및 이를 응용한 다양한 제품개발에 연결될 것으로 기대된다.

사 사

본 연구과제는 2010년 부산테크노파크에서 시행한 지역기반육성기술개발사업 연구비 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다 (과제번호: 2010-3001).

참고문헌

Abdussalam S. 1990. Drugs from seaweeds. *Med Hypotheses* 32, 33-35.

Bae HN and Kim YM. 2010. Improvement of the functional qualities of sea tangle extract through fermentation by *Aspergillus oryzae*. *Korean J Fish Aquat Sci* 13, 12-17.

Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Do JR, Kim EM, Koo JG and Jo KS. 1997. Dietary fiber contents of marine algae and extraction condition of the fiber, *Korean J Fish Aquat Sci* 30, 291-296.

Eom SH, Lee BJ and Kim YM. 2010. Effect of yeast fermentation on the antioxidant and anti-inflammatory activity of sea tangle water extract. *Korean J Fish Aquat Sci* 43, 117-124.

Guo Q, Zhao B, Shen S, Hou J, Hu J and Xin W. 1999. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *BBA* 1427, 13-23.

Heo SI and Wang MH. 2008. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of extracts from *Taraxacum mongolicum* H. *Kor J Pharmacogn* 39, 255-259.

Hiramoto K, Kato T and Kikugawa K. 1993. Generation of DNA-breaking activity in the Maillard reaction of glucose-amino acid mixtures in a solid system. *Mutat Res* 285, 191-198.

Hurch FC, Meade JB, Treanor RE and Whinna HC. 1989. Antithrombotic activity of fucoidan with heparin co-factor II, antithrombin III and thrombin. *J Biol*

- Chem 6, 361-375.
- Jang SE and Chyun KH. 2007. Effects of dietary calcium level and *Hizikia fusiforme* supplementation on bone indices and serum lipid levels in ovariectomized rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 40, 419-427.
- Jung BM, Ahn CB, Kang SJ, Park JH and Chung DH. 2001. Effects of *Hizikia fusiforme* extracts on lipid metabolism and liver antioxidative enzyme activities in triton-induced hyperlipidemic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 30, 1184-1189.
- Kang YM, Lee BJ and Kim JS. 2010. Alcohol metabolizing activity of fermented sea tangle juice. Korean J Fish Aquat Sci 43, 1-5.
- Kim HH, Park GH, Park KS, Lee JY and An BJ. 2010. Antioxidant and anti-inflammation activity of fractions from *Aster glehni* Fr. Schm. Kor J Micorobial Biothchnol 38, 434-441.
- Kim HS and Bae TJ. 2002. Studies on the hydrolysis of seaweed using microorganism and its application. Korean J Food Nutri 15, 257-266.
- Kim JA and Lee JM. 2004. The change of biologically functional compounds and antioxidant activities in *Hizikia fusiformis* with drying methods. Korean J Food Culture 19, 200-208.
- Kim KI, Seo HD, Lee HS, Jo HY and Yang HC, 1998. Studies on the blood anticogulant polysaccharide isolated from hot water extracts on *Hizikia fusiforme*. J Korean Soc Food Sci Nutr 27, 1204-1210.
- Kim SH. 1990. Antitumor effect of water-soluble extracts of plants-herbs, seaweeds, and mushrooms in cheju island. M.S. thesis, Cheju National University, Cheju, Korea,
- Kim SH, Lim SB, Ko YH, Oh CK, Oh MC and Park JS. 1994. Extraction yields of *Hizikia fusiforme*. by solvents and their antimicrobial effects. Korean J Fish Aquat Sci 27, 462-468.
- Koo JG, Jo JS, Do JR, Park JH and Yang CB. 1995. Chemical properties of fucoidans from *Hizikia fusiformis* and *Sargassum fulvellum*. Korean J Fish Aquat Sci 28, 659-666.
- Koo JG, Jo KS and Park JH. 1997. Rheological properties of fucoidans from *Laminaria religiosa*, sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme* and *Sagassum fulvellum* in Korea. J Korean Fish Soc 30, 329-333.
- Kuppusamy P and Zweier JL. 1989. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. J Biol Chem 264, 9880-9884.
- Lim SB, Kim SH, Ko YH, Oh CK, Oh MC, Ko YG and Park CS. 1995. Extraction yields of *Hizikia fusiforme* and *Aloe vera* Linne by supercritical carbon dioxide and antimicrobial activity of their extracts. Korean J Food Sci Technol 27, 68-73.
- Lee SJ, Kim EK, Hwang JW, Oh HJ, Yang SI, Lee SJ, Jeon BT, Kim SK and Park PJ. 2009. Free radical scavenging activity of β -chitooligosaccharides. J Chitin Chitosan 14, 24-28.
- Masaki H, Sakaki S, Atsumi T and Sakurai H. 1995. Active oxygen scavenging activity of plant extracts. Biol Pharm Bull 18, 162-166.
- Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M and Hara Y. 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl radical. Free Radical Biol Med 21, 895-902.
- Park KE, Jang MS, Kim CW, Kim YK, Seo YW and Park HY. 2005. Antioxidant activity on ethanol extract from boiled-water of *Hizikia fusiformis*. J Korean Soc Appl Biol Chem 48, 435-439.
- Park PJ and Kim SK. 2007. Alkyl radical scavenging activity of sulfated chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry. J Chitin Chitisan 12, 6-10.
- Rosen GM and Rauckman EJ. 1984. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. Methods Enzymol 105, 198-209.
- Ryu HS and Kim HS. 2006. Effect of Zingiber officinale and *Hizikia fusiforme* water extracts on no production in macrophage of mice. Korean J Food Nutr 19, 327-331.
- Shan BE, Yoshida Y, Kuroda E and Yamashira U. 1999. Immunomodulating acitivity of seaweed extract on hu-man lymphocytes *in vitro*. Int J Immunopharmacol 21, 59-70.
- Shon JH, Kang DY, Oh HC, Jung BM, Kim MH, Shin MO and Bae SJ. 2006. The effects of antimicrobial and cytotoxicity of *Hizikia fusiformis* fraction. Korean J Nutr 39, 444-450.
- Song HS, Kim HK, Min HO, Choi JD and Kim YM. 2011. Change of physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiformis* water extract by the fermentation of lactic acid bacteria. Korean J Fish Aquat Sci 44, 104-110.

2011년 3월 10일 접수

2011년 3월 18일 수정

2011년 4월 5일 수리