

쏙(*Upogebia major*) 효소가수분해물의 면역증강 효과

이지현 · 양지은 · 송재희¹ · 맹상현 · 김소연 · 윤나영*

국립수산물연구원 식품위생가공과, ¹서해수산연구소 갯벌연구센터

Immuno-potentiating Activities of Enzymatic Hydrolysate of Japanese Mud Shrimp *Upogebia major*

Ji-Hyun Lee, Ji-Eun Yang, Jae-Hee Song¹, Sang-Hyun Maeng, So-Yeon Kim and Na-Young Yoon*

Food Safety and Processing Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

¹Tidal Flat Research Center, National Institute of Fisheries Science, Gunsan 54014, Korea

This study investigated the immuno-potentiating activities of Japanese mud shrimp *Upogebia major*. We examined the effects of enzymatic hydrolysate from *U. major* on the production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) and on the expression of pro-inflammation cytokines including TNF- α , IL-6 and IL-1 β in RAW 264.7 cells. The treatment of six enzymatic hydrolysates of *U. major* (alcalase, α -chymotrypsin [α -Chy], trypsin, pepsin, neutrase, protamex) significantly increased the production of NO in RAW 264.7 cells, with α -Chy having the greatest effect. This hydrolysate was fractionated by two ultrafiltration membranes at 3 and 10 kDa to created three fractions (below 3 kDa, between 3 and 10 kDa, and above 10 kDa). Of these, the <3 kDa and >10 kDa fractions showed significant increases in NO production. These two fractions also induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells and showed significant increases in the expression of all cytokines studied. These results suggest that enzymatic hydrolysate from *U. major* is a potentially useful food material with immune-potentiating effects.

Key words: *Upogebia major*, Enzymatic hydrolysate, RAW 264.7 cells, Nitric Oxide, Cytokine

서론

면역은 생체 내에서 외부 인자에 대하여 방어하는 현상으로 우리 몸에서 면역을 담당하는 면역계는 외부 인자 감염으로부터 스스로를 보호하기 위한 역할을 하는 세포들과 분자들로 이루어지며, 선천 면역과 적응 면역으로 구분된다(Delves and Roitt, 2000). 선천 면역은 백혈구, 대식세포, 보체, cytokine 등으로 구성되어 있으며, T림프구와 B림프구로 이루어지는 적응 면역보다 외부 인자에 신속하게 반응한다(Parkin and Cohen, 2001). 대식세포는 면역계에서 중요한 구성 요소로 외부 인자에 반응하여 다양한 cytokine들을 방출하고 적응 면역에 관여한다(Plowden et al., 2004).

Nitric oxide (NO)는 혈관계에서는 혈소관의 응집 및 호중성구의 집합 작용, 골격근에서는 대사 조절 등 다양한 생리학적 기능을 하며 염증 반응에서 핵심적인 역할을 하는 세포 신호전달 물질로 대식세포, 백혈구, T림프구 등 면역에 관련된 많은 세포

들에 의해 합성된다(Coleman, 2001; Sharma et al., 2007). 염증 과정에서 NO는 감염 관리, 신호전달 인자와 전사 인자 조절, 혈관 반응 조절, 백혈구 이동, cytokine 생성, 세포사멸 등에 관여한다(Korhonen et al., 2005).

쏙(*Upogebia major*)은 가재와 비슷한 외형을 가진 대형 갑각류로 갯벌에 구멍을 파서 땅굴 속에서 서식하고 일본, 중국, 러시아와 우리나라 서해안과 남해안에 분포하고 있으며 식용으로 이용되고 있다(Hong, 2013). 새우, 게 등의 갑각류는 카로테노이드, 키틴, 키토산 뿐만 아니라 다양한 생리활성 물질들이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있지만 쏙 유래 생리활성 및 활성 소재에 관한 연구는 아직 이루어 지지 않았다(Galasso et al., 2017; Xia et al., 2011).

본 연구에서는 쏙 효소가수분해물을 이용하여 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 생성되는 NO와 cytokine 생성량을 측정하여 쏙 효소가수분해물의 면역 증진 효과 및 면역증강 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0135>



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 51(2) 135-141, April 2018

Received 6 February 2018; Revised 2 March 2018; Accepted 13 March 2018

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2652 Fax: +82. 51. 720. 2669

E-mail address: dbssud@korea.kr

재료 및 방법

재료

썩(*U. major*)은 2016년 3월에 충남 보령 갯벌에서 채집하였다. 썩은 세척한 후 전체를 동결건조한 후 분쇄하여, -20°C 에서 보관하여 사용하였다. Alcalase[®] 2.4L (Alc), α -chymotrypsin (α -Chy), trypsin (Try), pepsin (Pep), serine, α -phthalaldehyde (OPA), disodium tetraborate decahydrate, sodium dodecyl sulfate (SDS), dithiothreitol (DTT), lipopolysaccharides (LPS), griess reagent, cell proliferation reagent WST-1는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, Neutrased (Neu), Protamex (Pro)은 Novo Co. (Novozyme Laboratories, Copenhagen, Denmark)에서 구입하였다. RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아 사용하였다. fetal bovine serum (FBS), dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)은 Gibco (Gibco BRL, USA)에서 구입하였다. Penicillin-streptomycin solution은 Cellgro (Herndon, VA, USA)에서 구입하였다. PGE₂, TNF- α , IL-6, IL-1 β 측정용 kit는 R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

썩의 효소가수분해물 제조

썩을 각종 효소로 가수분해하기 위하여 Kjeldahl법을 이용하여 단백질 함량을 측정하였으며, 그 단백질 함량은 $41.39 \pm 0.69\%$ 로 나타났다. 썩 동결건조물 각 10 g씩에 6 종류의 효소(Alc, α -Chy, Try, Pep, Neu, Pro)를 처리하였으며, 효소량은 썩 단백질 함량 대비 1%를 처리하였다. 6 종류의 효소를 이용한 썩의 가수분해 조건은 Table 1에 나타난 것과 같이 각 완충용액에서 8시간 동안 가수분해 한 후, 100°C 에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화하였다. 불활성화한 시료는 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 따로 분리하였다. 상층액은 동결건조 후 사용시까지 -20°C 에서 보관하였다.

가수분해도(Degree of hydrolysis, DH)

썩의 효소가수분해물의 가수분해도는 Adler-Nissen (1979)

법을 변형하여 측정하였다. 7.62 g disodium tetraborate decahydrate와 200 mg의 SDS을 150 mL의 증류수에 녹인 용액과 160 mg OPA를 4 mL ethanol에 녹인 용액을 혼합한 후, 176 mg의 DTT를 넣고 증류수로 200 mL가 되도록 맞춰 OPA 용액을 만든다. 또한 50 mg의 serine을 증류수 500 mL에 녹여 serine 용액(0.9516 meqv/L)을 만든다. 시료와 Serine 용액을 각각 400 μL 와 OPA 용액 3 mL를 넣어 혼합하여 340 nm에서 흡광도를 측정하여, OPA가 결합된 free amino groups 값으로 환산하여 가수분해도를 나타내었다(Adler-Nissen, 1986).

$$\text{DH} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \cdot 100$$

h_{tot} 은 protein equivalent 당 총 peptide bonds 수를, h 는 가수분해된 결합수이다.

가수분해물 분획

썩의 효소가수분해물을 10 mL 증류수에 녹인 후 3 kDa와 10 kDa 두 개의 Ultrafiltration membranes (Amicon Ultra-filter devices; Millipore, Billerica, MA, USA)을 이용하여 3,000 rpm에서 20분간 반복적으로 원심분리하여 분자량별로 각 분획하였다(<3 kDa, 3-10 kDa, >10 kDa). 분자량별로 분획된 분획물은 동결건조하여 사용하였다.

총 아미노산 함량 분석

총 아미노산 함량은 시료를 6 N hydrochloric acid로 110°C 에서 24시간 동안 처리하고 농축한 후, 증류수를 넣고 감압농축을 1-2회 반복한다. 0.2 N sodium citrate buffer (pH 4.2)로 정용하여 0.2 μm membrane filter로 여과한 후, 아미노산전용분석기(S43000; Sykam, Eresing, Germany)를 이용하여 측정하였다.

세포 배양 및 세포 독성

RAW 264.7 세포는 10% heat-inactivated FBS, 1% penicillin 및 streptomycin을 포함한 DMEM 배지로 37°C , 5% CO₂에서 배양하였다. RAW 264.7 세포에서 썩 효소가수분해물의 독성 여부를 확인하기 위해 WST-1 용액을 이용하여 460 nm에서 Microplate reader (BioTek, USA)로 흡광도를 측정하였다.

Table 1. The conditions of enzymatic hydrolysis and degree of hydrolysis of the enzymatic hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major*

Enzyme	Buffer	pH	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	DH (%)
Alcalase	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	50	65.17 \pm 0.84
Protamex	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	45	68.01 \pm 0.43
Trypsin	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	37	64.56 \pm 0.31
Neutrased	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	50	67.53 \pm 0.28
Pepsin	0.1M Glycine-HCl	2.0	37	68.12 \pm 1.11
α -Chymotrypsin	0.1M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	8.0	37	69.81 \pm 0.39

Enzymatic hydrolysates were obtained from 8 hour under the optical conditions. DH, degree of hydrolysis.

NO 생성 효과

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 배양하였다. 24시간 후 양성대조군으로 LPS를 1 μ g/mL 처리한 후, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 상등액 100 μ L와 동량의 Griess 시약을 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 Microplate reader기(BioTek, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준곡선의 작성은 sodium nitrite를 이용하였다.

PGE₂ 및 Cytokine 생성능

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 배양하였다. 24시간 후 양성대조군으로 LPS를 1 μ g/mL 처리한 후, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액 내 PGE₂, TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성량은 ELISA assay kit를 이용하여 Microplate reader (BioTek, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계

결과는 평균 \pm 표준편차(SD)로 나타내었으며, 두 개의 군 간의 차이의 유의성을 평가하기 위하여 Student *t*-test를 수행하였으며, 차이는 P 값이 <0.05일 때와 P 값이 <0.01일 때 유의성을

Table 2. Total amino acids composition for the molecular weight cut-off fractions of the α -chymotrypsin hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major* (g/100 g)

Amino acids	<3 kDa	3-10 kDa	>10 kDa
Asp	6.93	4.72	7.83
Thr	3.65	1.94	3.86
Ser	2.37	2.19	3.08
Glu	6.67	4.88	8.7
Pro	2.57	1.89	3.67
Gly	1.20	1.06	1.36
Ala	2.87	2.04	3.64
Cys	0.13	0.11	0.15
Val	2.93	2.37	3.09
Met	0.32	0.21	0.43
Ile	2.48	1.94	3.40
Leu	4.18	3.85	4.54
Tyr	2.91	1.38	1.82
Phe	3.24	3.03	3.28
His	3.19	3.11	3.46
Lys	3.25	2.93	3.63
Arg	3.87	2.63	2.90
Trp	2.84	2.54	3.58
Total	55.60	42.82	63.10

나타내는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

효소가수분해 및 가수분해도

동결건조 한 썩을 6 종류의 효소로 8시간 동안 처리하여 가수분해하였으며, 각각의 효소가수분해물의 가수분해도를 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 썩의 가수분해도는 α -Chy 가수분해물(69.81 \pm 0.39%)>Pep 가수분해물(68.12 \pm 1.11%)> Pro가수분해물(68.01 \pm 0.43%)>Neu 가수분해물(67.53 \pm 0.28%)>Alc 가수분해물(65.17 \pm 0.84%)>Try 가수분해물 (64.56 \pm 0.31%)의 순으로 나타났다.

썩 효소가수분해물의 세포 독성 및 NO 생성 효과

면역 반응에 관여하는 핵심 물질인 nitric oxide (NO)의 활성화되는 능력을 확인하기 위하여 썩의 6종류의 효소가수분해물의 NO 생성능을 측정하였다(Fig. 1). 썩 효소가수분해물의 NO 생성능을 평가하기에 앞서 6 종류의 효소가수분해물의 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 측정하였다. 6 종류의 효소가수분해물은 1 mg/mL 이하의 농도에서 RAW 264.7 세포에서 90% 이상의 생존율을 나타내어 세포 독성이 나타나지 않았음을 확인하였다(데이터 제시하지 않았음). 세포독성이 나타나지 않은 6 종류의 효소가수분해물을 RAW 264.7 세포 1 mg/mL 이하의 농도로 처리한 후, LPS 무처리군(Blank)과 비교하였을 때 0.25-1 mg/mL의 농도에서 농도의존적으로 유의적인 증가를 나타내는 것으로 확인하였으며, 이들 중, α -Chy 가수분

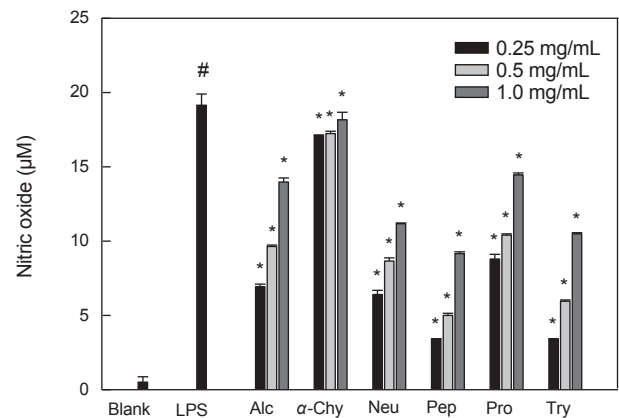


Fig. 1. Effects of the enzymatic hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major* on nitric oxide production in RAW264.7 cells. All data are presented as means \pm SD of three independent experiments. *P<0.05 compared with LPS-nontreated group. #P<0.01, compared with LPS-treatment only. LPS, lipopolysaccharide; Alc, alcalase; α -Chy, α -chymotrypsin; Neu, neutrase; Pep, pepsin; Pro, protamex; Try, trypsin.

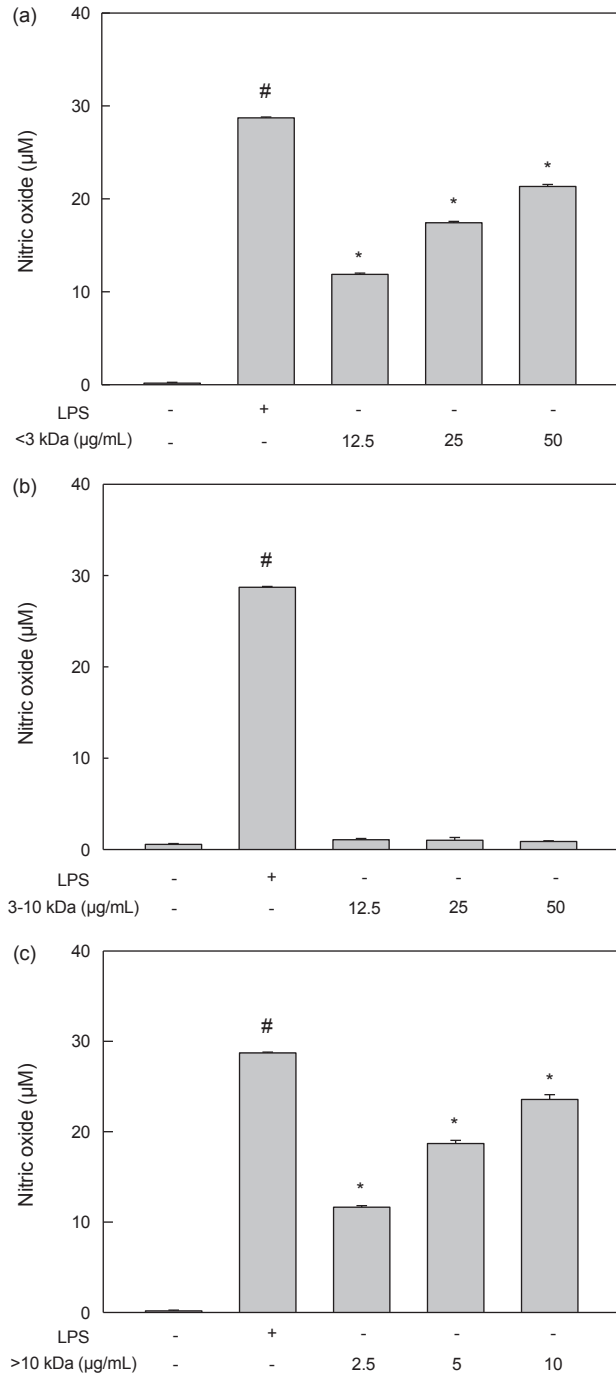


Fig. 2. Effects of the molecular weight cut-off fractions of the α -chymotrypsin hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major* on nitric oxide production in RAW264.7 cells. Cells were treated with various concentration of <3 kDa (a), 3-10 kDa (b), and >10 kDa (c) fractions of the α -Chymotrypsin hydrolysates of *U. major*. All data are presented as means \pm SD of three independent experiments. *P<0.05 compared with LPS-nontreated group. #P<0.01, compared with LPS-treatment only. LPS, lipopolysaccharide.

해물은 면역에 관여하는 NO의 생성을 가장 많이 유도하는 것으로 나타났다.

총 아미노산 함량

면역 증강 효능 검증 및 활성 소재를 발굴하기 위하여 쪽 α -Chy 가수분해물로부터 3 kDa과 10 kDa의 membrane filter를 이용하여 분획을 하였으며, 각각의 분획물 (<3 kDa 분획물, 3-10 kDa 분획물, >10 kDa 분획물)을 구성하고 있는 아미노산의 함량을 확인하고자 총 아미노산 함량을 분석하였다(Table 2). 쪽의 α -Chy 가수분해물의 분자량별 분획물의 총 아미노산 함량은 >10 kDa 분획물(62.42 g/100 g), <3 kDa 분획물(55.60 g/100 g), 3-10 kDa 분획물(42.82 g/100 g) 순으로 나타났다. 일

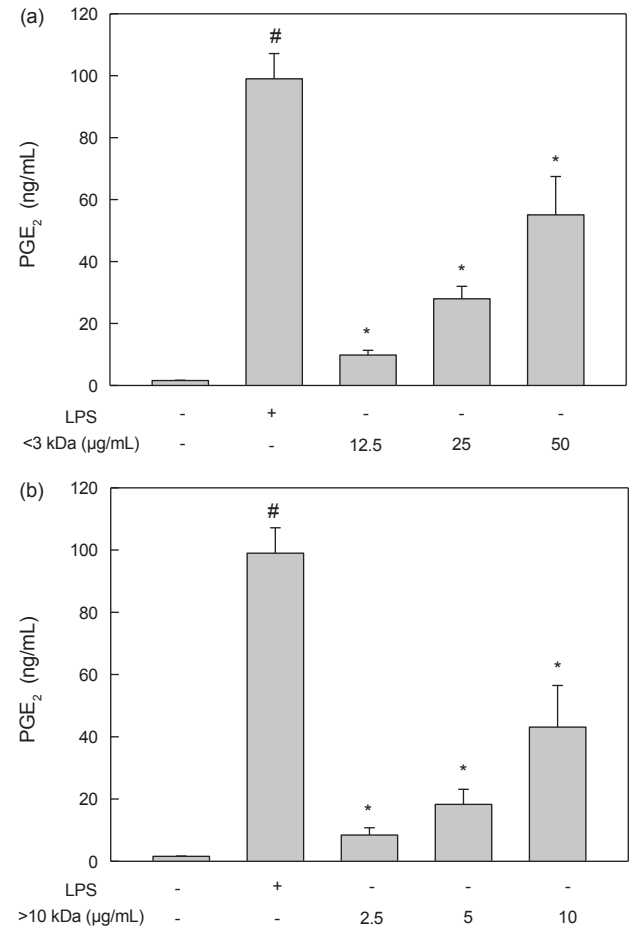


Fig. 3. Effects of the molecular weight cut-off fractions of the α -chymotrypsin hydrolysates of Japanese mud shrimp *Upogebia major* on prostaglandin E₂ (PGE₂) release in RAW264.7 cells. Cells were treated with various concentration of <3 kDa (a) and >10 kDa (b) fractions of the α -Chymotrypsin hydrolysates of *U. major*. All data are presented as means \pm SD of three independent experiments. *P<0.05 compared with LPS-nontreated group. #P<0.01, compared with LPS-treatment only. LPS, lipopolysaccharide.

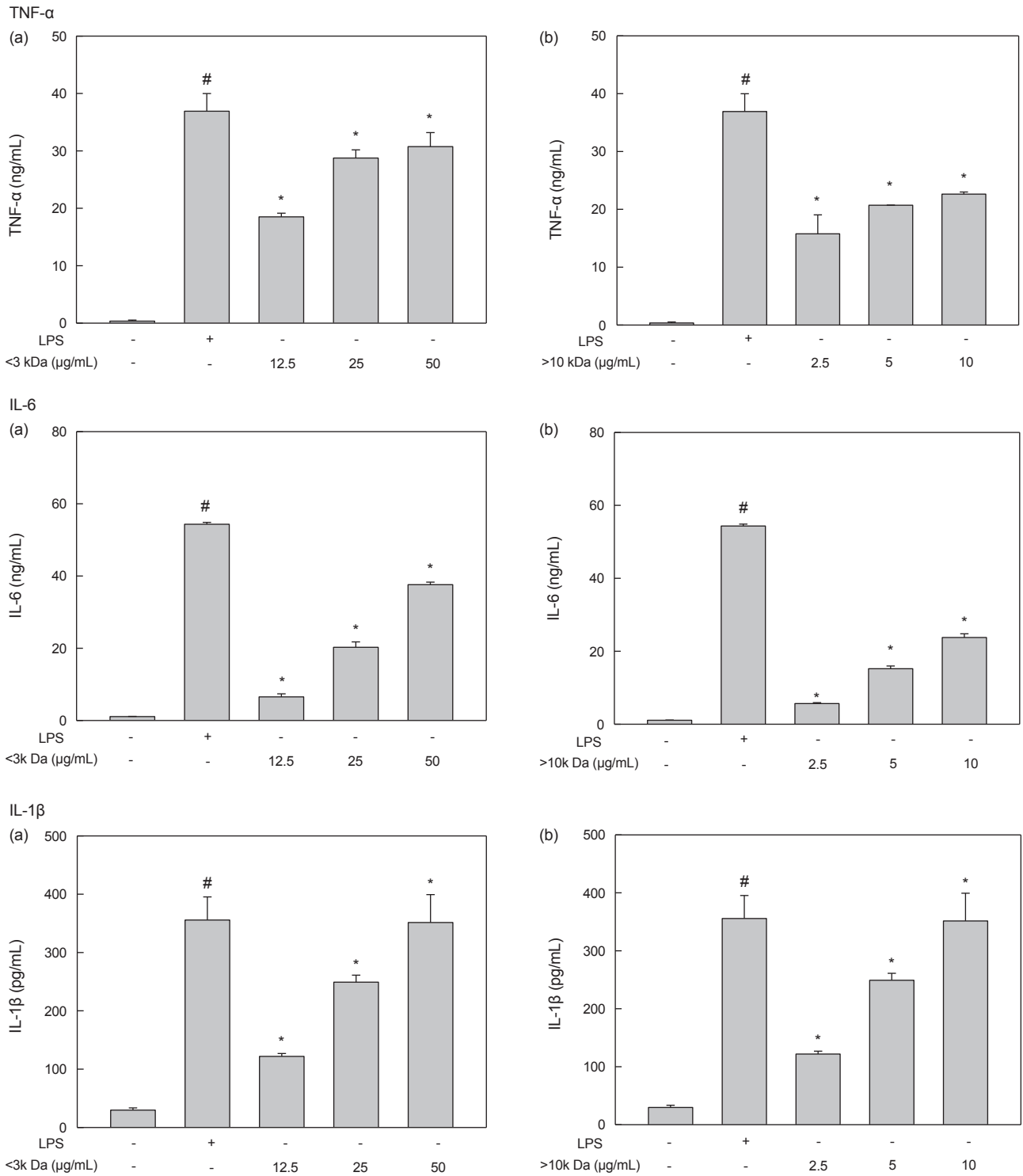


Fig. 4. Effects of cut-off fractions of Japanese mud shrimp the α -chymotrypsin hydrolysates of *Upogebia major* on the production of pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) in RAW264.7 cells. Cells were treated with various concentration of <3 kDa (a) and >10 kDa (b) fractions of the α -chymotrypsin hydrolysates of *U. major*. All data are presented as means \pm SD of three independent experiments. * $P<0.05$ compared with LPS-nontreated group. # $P<0.01$, compared with LPS-treatment only. TNF- α , tumor necrosis factor α ; IL-6, interleukin 6; IL-1 β , interleukin 1 β ; LPS, lipopolysaccharide.

반적으로 생리 활성 peptide는 친수성 아미노산 잔기와 소수성 아미노산 잔기를 모두 포함하는 것으로 알려져 있다(Santiago-Lopez et al., 2016). 본 연구 결과 세 개의 분획물을 구성하고 있는 아미노산 중 Asp, Glu, Leu, Phe, His의 함량은 높은 반면, Cys, Met의 함량은 낮은 것으로 나타났다.

썩 α -Chy 가수분해물 분획물의 세포 독성 및 NO 생성 효과

썩의 α -Chy 가수분해물의 3개의 분획물의 RAW 264.7 세포에서 세포 독성을 한 결과, <3 kDa 분획물과 3-10 kDa 분획물은 0-50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었으며, >10 kDa 분획물은 0-10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다(데이터는 나타내지 않음).

NO는 활성화된 대식세포에서 생성되며 염증성 cytokine의 생성을 조절하고 염증 반응을 매개한다(Yu et al., 2012). 본 연구에서는 RAW 264.7 세포에 썩의 α -Chy 가수분해물의 3개의 분획물을 세포독성이 나타나지 않은 농도 범위로 처리한 결과, <3 kDa 분획물 처리군은 LPS 무처리군(Blank)과 비교하였을 때 12.5-50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 NO의 생성이 농도의존적으로 유의적인 증가를 나타내는 것으로 확인하였으며, >10 kDa 분획물은 2.5-10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 농도의존적으로 NO의 생성을 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 그러나 3-10 kDa 분획물은 농도의존적으로 유의적인 NO 생성을 유도하지 않았다.

PGE₂ 생성 효과

NO 뿐만 아니라 PGE₂ 또한 염증 매개물질 중 하나로 알려져 있으며, 염증성 cytokine의 생성 조절에 관여한다(Harris et al., 2002; Williams and Shacter, 1997). 본 연구에서는 썩의 α -Chy 가수분해물의 3개의 분획물 중 NO 생성능을 나타낸 <3 kDa 분획물과 >10 kDa 분획물의 RAW 264.7 세포에서 PGE₂ 생성에 대한 효과를 측정하였다(Fig. 3). <3 kDa 분획물 처리군은 LPS 무처리군(Blank)과 비교하였을 때 12.5-50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 PGE₂의 생성은 농도증가에 따라 유의적으로 증가하였으며, >10 kDa 분획물 또한 2.5-10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 PGE₂의 생성이 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가되는 것으로 나타났다. <3 kDa 분획물과 >10 kDa 분획물의 RAW 264.7 세포에서 PGE₂ 생성에 대한 효과는 NO 생성능과 유사한 것으로 나타났다.

Cytokine 생성능

TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 염증성 cytokine은 세포 내 신호전달에 관여하여 염증 반응을 진행시킨다(Hanada and Yoshimura, 2002). 해양 생물 유래 peptide의 대식세포 활성 증가 효과에 대한 보고가 있으며, 새우, 게 등의 갑각류 유래 소재가 면역반응시 증가되는 염증성 cytokine의 분비량을 증가시킨다는 보고가 있다(Cheung et al., 2015; Wu et al., 2015).

본 연구에서는 썩의 α -Chy 가수분해물의 <3 kDa 분획물과 >10 kDa 분획물의 cytokine 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성량을 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

썩의 α -Chy 가수분해물 분획물로 RAW 264.7 세포에서 유도된 TNF- α 양은 <3 kDa 분획물 처리군은 LPS 무처리군과 비교하였을 때 12.5-50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 TNF- α 의 생성은 농도증가에 따라 유의적으로 증가하였으며, >10 kDa 분획물은 2.5-10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 TNF- α 의 생성이 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가되는 것으로 나타났다.

RAW 264.7 세포에서 썩의 α -Chy 가수분해물의 <3 kDa 분획물과 >10 kDa 분획물의 처리로 발현된 IL-6은 <3 kDa 분획물 처리군은 LPS 무처리군과 비교하였을 때 12.5-50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서, >10 kDa 분획물은 2.5-10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 농도증가에 따라 유의적으로 증가되는 것으로 나타났다.

썩의 α -Chy 가수분해물의 <3 kDa 분획물과 >10 kDa 분획물의 처리로 RAW 264.7 세포에서 생성된 IL-1 β 은 <3 kDa 분획물 처리군은 LPS 무처리군과 비교하였을 때 12.5-50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 농도의존적으로 유의적인 증가를 나타내었다. 또한, >10 kDa 분획물은 5-10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의적인 증가를 나타내었다.

이들 결과로부터 썩의 α -Chy 가수분해물과 분획물은 RAW 264.7 세포에서 면역증강에 중요한 역할을 하는 NO와 PGE₂와 면역반응에 작용하는 cytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β)를 자극하여 활성화시키는 면역 활성 인자로 작용하는 것으로 나타나 썩 효소가수분해물은 면역 증진에 도움이 되는 소재로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원 수산시험연구사업의 지원으로 수행되었습니다(R2018060).

References

- Adler-Nissen J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* 27, 1256-1262. <http://dx.doi.org/10.1021/jf60226a042>.
- Adler-Nissen J. 1986. *Enzyme hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Sciences Publisher, New York, Barking, Essex, U.K., 110-169.
- Cheung RCF, Ng TB and Wong JH. 2015. Marine peptides: Bioactivities and applications. *Mar Drugs* 13, 4006-4043. <https://doi.org/10.3390/md13074006>
- Coleman JW. 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 1, 1397-1406. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00086-8).

- Delves PJ and Roitt IM. 2000. The immune system. *N Engl J Med* 343,37-49. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107>.
- Galasso C, Corinaldesi C and Sansone C. 2017. Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. *Antioxidants (Basel)* 6, 96. <https://doi.org/10.3390/antiox6040096>.
- Hanada T and Yoshimura A. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 413-421. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00026-6).
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D and Phipps RP. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23, 144-150. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02154-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02154-8).
- Hong JS. 2013. Biology of the mud shrimp *Upogebia major* (de Haan, 1841), with particular reference to pest management for shrimp control in manila clam bed in the west coast of Korea. *Ocean Polar Res* 35, 323-349. <http://dx.doi.org/10.4217/OPR.2013.35.4.323>.
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H and Moilanen E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 471-479.
- Parkin J and Cohen B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet* 357, 1777-1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7).
- Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J and Sambhara S. 2004. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging cell* 3, 161-167. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00102.x>.
- Santiago-Lopez L, Hernandez-Mendoza A, Vallejo-Cordoba B, Mata-Haro V and Gonzalez-Cordova AF. 2016. Food-derived immunomodulatory peptides. *J Sci Food Agric* 96, 3631-3641. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7697>.
- Sharma JN, Al-Omran A and Parvathy SS. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15, 252-259. <https://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>
- Williams JA and Shacter E. 1997. Regulation of Macrophage Cytokine Production by Prostaglandin E₂ Distinct roles of cyclooxygenase-1 and-2. *J Biol Chem* 272, 25693-25699. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25693>.
- Wu N, Wen ZS, Xiang XW, Huang YN, Gao Y and Qu YL. 2015. Immunostimulative activity of low molecular weight chitosans in RAW264.7 macrophages. *Mar Drugs* 13, 6210-6225. <https://doi.org/10.3390/md13106210>.
- Xia W, Liu P, Zhang J and Chen J. 2011. Biological activities of chitosan and chitoooligosaccharides. *Food Hydrocoll* 25, 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.003>.
- Yu A, Park HY, Choi IW, Park YK, Hong HD and Choi HD. 2012. Immune enhancing effect of medicinal herb extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41, 1521-1527. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.11.1521>.