

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2019.11.2.071>

ISSN 2383-5400 (Online)

제주산 우뚝가사리 유래 한천 가수분해물의 항염 활성 효과

Agar Hydrolysates Obtained from Jeju Island Attenuates the LPS-induced Inflammation in In Vitro and In Vivo Zebrafish Embryos

김서영^{1,2}, 선현진³, 은창호³, 김길남⁴, 전유진^{5,*}

Seo-Young Kim^{1,2}, Hyeon-Jin Sun³, Chang-Ho Eun³, Kil-Nam Kim⁴, You-Jin Jeon^{5,*}

¹박사후연구원, 제주대학교 해양생명과학과, 제주특별자치도 제주시 제주대학로 102, 63243, 대한민국

²박사후연수원, 한국기초과학지원연구원 춘천센터, 강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 집현관, 24341, 대한민국

³책임연구원, 아열대원예산업연구소, 제주특별자치도 제주시 제주대학로 102, 63243, 대한민국

⁴책임연구원, 한국기초과학지원연구원 춘천센터, 강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 집현관, 24341, 대한민국

⁵교수, 제주대학교 해양생명과학과, 제주특별자치도 제주시 제주대학로 102, 63243, 대한민국

^{1,5}Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

^{2,4}Chuncheon Center, Korea Basic Science Institute (KBSI), Chuncheon 24341, Republic of Korea

³Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

(Received 21 November 2019, Revised 11 December 2019, Accepted 12 December 2019)

Abstract Previously, agar obtained from *Gelidium* sp. has a small molecular weight and has the disadvantage of inherent viscosity properties and poor functionality as a dietary fiber. In order to improve aforementioned disadvantages, agar having a fluidity that can be added to food at a higher concentration that a powder agar having a gelling property at low concentration was manufactured. In addition, the anti-inflammatory activity of agar hydrolysates was evaluated to confirm their potential as a functional material. As a result, agar hydrolysates significantly reduced NO levels secreted by LPS-activated macrophages and inhibited the expression of iNOS and COX-2, which are inflammatory mediators that regulates NO secretion in macrophages. Furthermore, in *in vivo* zebrafish embryos model results demonstrated significant reduction of LPS induced NO production after the treatment of agar hydrolysate hydrolyzed for 360 min. In addition, ROS production and cell death by stresses were also reduced in LPS-exposed embryos after the treatment of agar hydrolysis product hydrolyzed for 360 min. Taken together, agar hydrolysate hydrolyzed for 360 min can be easily added into food due to their fluidity and used as a food ingredient that inhibits inflammation due to their anti-inflammatory property.

Keywords : Agar, Agar hydrolysate, Anti-inflammatory, Macrophage, Zebrafish

서 론

한천은 소화 효소에 의해 분해되기 어려운 점질성 복합 다당류의 일종으로 우뚝가사리속(*Gelidium*), 꼬시래기속(*Gracilaria*) 등의 홍조류에 주로 포함되

어 있다 [1]. 한천은 agarose와 agaropectin으로 구성되어 있으며 agarose는 1→3 결합으로 연결된 β-D-galactopyranose와 1→4 결합으로 연결된 3,6-anhydro-α-L-galactose가 교대로 결합된 중합체이다 [2]. 또한, 한천은 수분 13~24%, 조단백질 1.5~3.0%,

* Corresponding author

Phone: +82-64-754-3475 Fax: +82-64-756-3493

E-mail: youjinj@jejunu.ac.kr, youjin2014@gmail.com

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

조섬유 0.5~0.8% 등도 포함하고 있으며, 우수한 수분흡수성, 응고성, 점탄성, 보수성 등을 지니고 있어 식품제조과정에서 안정제, 중량제, 형성제, 농후제, 건조방지제, 물성유지제 등으로 활용되고 있다 [3]. 그러나, 우뭇가사리 유래의 한천은 낮은 농도에서도 겔을 형성하며 85°C 이하에서는 녹지 않는 특성 때문에 식품개발에 있어서 그 용도와 기능이 매우 제한적이다. 따라서 한천의 용도와 기능성 향상을 목적으로 효소 또는 산을 이용한 가수분해물을 통해 한천올리고당이 생산된다. 산가수분해법으로는 무기산(염산, 황산 등), 유기산(구연산, 아세트산, 아스코르빈산 등) 고체산(양이온 교환 수지, 양이온 교환 섬유 등) 등이 사용되고 있으며 일본에서는 양이온 교환 수지를 사용하여 제조된 올리고당(중합도 10 이하) 용액을 이용하여 개발된 음료 제품이 판매되고 있다. 그러나, 산가수분해법은 무작위로 한천을 분해하므로 한천올리고당의 기능성 및 안정성이 확보되기 어렵기 때문에 [2] 이를 보완할 수 있는 방법이 필요하다. 반면, 한천분해효소를 이용한 가수분해는 결합을 분해하는 위치에 따라 α -agarase와 β -agarase에 의한 가수분해 2 종류로 구분할 수 있다 [1]. α -agarase는 α -1,3 결합을 가수분해하여 아가로올리고당(agarooligosaccharides)을 생산하는데 현재까지 알터로모나스 아가리티쿠스(*Alteromonas agarilyticus*), 슈도모나스 종(*Pseudomonas sp.*), 탈라소모나스 종(*Thalassomonas sp.*) 등에서만 보고되었으며 β -agarase에 비해 활성이 낮고 생산성도 높지 않아 산업적 활용가능성이 낮은 실정이다. 한편, β -agarase는 β -1,4 결합을 가수분해하여 네오아가로올리고당(neoagarooligosaccharides)를 생산하며 보고된 대부분의 한천분해효소는 해양 세균 유래이다 [4]. α -agarase에 의해 생성된 아가로올리고당과 β -agarase에 의해 생성된 네오아가로올리고당은 항암 효과, 면역증진 효과, 항산화 효과, prebiotic 효과, 간 보호 효과, 항균 효과, 미백 효과, 보습 효과 등의 다양한 기능성이 보고되어 있어 고부가가치 기능성 물질의 가능성이 매우 높은 것으로 알려져 있다 [4]. 이전 연구에서 우뭇가사리를 가열처리하여 한천을 추출하는 기법을 이용하여 당질을 추출함과 동시에 가열분해를 통해 특정 분자량의 크기로 올리고당화하는 기술을 개시하였으나 생산된 한천올리고당은

분자량이 작아 한천 고유의 보수성과 식이섬유로서의 기능성이 떨어지는 단점이 있었다. 한편, 염증은 독성물질, 상해, 감염 등의 유해한 자극으로부터 숙주를 보호하기 위한 병리학적 반응의 대표적인 특징으로 다양한 면역세포와 매개물질이 관여하는 복잡한 과정이다 [5]. 또한, 염증반응은 대식세포, 호중구 등과 같은 면역관련 세포들이 염증성 cytokines, 일산화질소(nitric oxide, NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증매개물질을 분비하여 발생한다 [6]. 특히, 만성 염증 매개물질인 NO는 nNOS, eNOS, iNOS 등 세가지 합성 효소에 의해 L-arginine과 분자 산소로부터 합성된 물질로 많은 연구를 통해 과생성된 NO가 신경계 장애뿐만 아니라 혈관 기능장애, 기타 염증과 관련된 질환을 유발하는 주요 원인으로 알려져 있으며 과생성된 NO로 인한 질환이 발생할 경우 NO는 ROS와 결합을 통해 인체 내 분자를 산화시켜 질환 발병이 가속화되므로 백혈구와 대식세포는 NO를 신속하게 제거하는 역할 수행을 통해 인체를 방어하게 된다 [7]. 이에 대식세포에서 분비되는 NO의 생성을 억제할 수 있는 새로운 물질을 연구하고 개발하는 것은 염증성 질환의 치료 및 면역 반응 연구에서 중요한 역할을 한다. 따라서 본 연구에서는 새로운 한천 가수분해물을 제조하여 이화학적 특성을 검토하고, LPS(lipopolysaccharides)로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에 대한 항염증 효과를 확인함으로써 한천의 식이섬유원으로서의 기능을 유지하면서 한천올리고당이 가진 생리활성이 기능이 부가된 한천 가수분해물을 제조하고, 이들의 염증성 질환 치료 연구에 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (P/S), phosphate buffered saline (PBS), EDTA-trypsin은 Gibco-BRL (Gibco-BRL, NY, USA)에서 구입하였으며, 제주산 우뭇가사리로부터 제조된 한천은 (주)제주씨그린(Jeju, Korea)에서 구입하였다. 이 외에 사용된 다른 화학 물질과 시약은 분석 등급을 사용하였다.

한천 가수분해물의 제조

한천은 증류수를 넣은 삼각플라스크에 첨가한 후 가열하여 한천을 용해하였다. 용해한 한천은 50°C, 150 rpm으로 설정한 진탕배양기에 넣고, 반응액의 온도가 설정 온도와 동일한 온도까지 내려가면 염산을 첨가하여 가수분해를 수행하였다. 한천의 최종 농도 2% (4 g/200 mL), 염산의 최종 농도가 50 mM이 되도록 반응액을 제조하여 반응 시간 별로 가수분해를 수행하였다. 가수분해물은 수산화나트륨을 첨가하여 중화한 후 냉장 보관하였다. 항염 활성 평가에는 동결건조한 한천 가수분해물을 사용하였다.

점도의 측정

가수분해 반응 완료 후의 시료는 중화 후 25°C에 2시간 이상 방치한 다음 VISCOMETER TVC-7 (TOKI SANGYO, Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였다.

환원당의 정량

가수분해 반응에 따라 생성되는 환원당의 함량은 DNS(dinitrosalicylic acid)법에 따라 갈락토스(galactose)를 사용한 표준검량선으로부터 정량 하였다. 가수분해 시간에 따른 한천의 분해율은 반응액의 전당(초기 한천 함량)에 대한 환원당의 비로 나타내었다. 표준물질로는 갈락토스를 0 - 20 mg/mL의 범위에서 제조하여 사용하였으며, 정량 가능 범위는 0.1 - 5 mg/mL이었다.

한천 가수분해물의 생리활성 평가

세포 배양

마우스 유래 대식세포주(murine macrophage cell line)인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 Kim 등(2014) [6]의 방법에 따라 10% 소태아혈청(Fetal bovine serum, FBS)과 1% penicillin/streptomycin(P/S)이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1 × 10⁵ cells/mL로 분주 후 confluent 상태가 될 때까지 37°C를 유지하는 CO₂ incubator에서 배양하였다.

일산화질소(NO) 생성 및 세포 생존율 평가

LPS(Lipopolysaccharide)를 처리하여 염증을 유도한 대식세포에 대한 가수분해물의 염증 보호 효능을

확인하기 위하여 대식세포로부터 분비되는 일산화질소(NO) 양과 세포생존율을 측정하였다. 먼저 NO 생성량을 측정하기 위하여 배양한 RAW264.7 세포를 10% FBS와 1% P/S가 함유된 DMEM 배지에 현탁하여 24 well plate에 각 well 당 1 × 10⁵ cells/mL로 동일하게 분주하고 16시간 동안 배양하여 부착시켰다. 그 후, 한천 가수분해물을 처리하였고, 1시간 후 LPS(1 µg/mL)를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 상등액과 Griess 시약[1% (w/v) sulfanilamid in 5% (v/v) phosphoric acid와 0.1% (w/v) aphtylethylenediamine-HCl]을 동량 (1:1, v:v) 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, 세포생존율을 측정하기 위하여 한천 가수분해물을 처리하고, LPS로 염증을 유도한 대식세포에 MTT(2 mg/mL)를 첨가하여 4시간 배양한 후 상층액을 완전히 제거하고 DMSO(dimethylsulfoxide)를 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포의 양을 측정하였다.

염증 매개 인자 단백질 발현 측정

염증 매개 인자의 단백질 발현량을 측정하기 위하여 배양한 RAW264.7 세포를 10% FBS와 1% P/S가 함유된 DMEM 배지에 현탁하여 6 well plate에 각 well에 1 × 10⁵ cells/mL로 동일하게 분주하고 16시간 동안 배양하여 부착시켰다. 그 후, 한천 가수분해물을 처리하였고, 1시간 후 LPS(1 µg/mL)를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포 내 단백질을 얻기 위하여 상등액을 제거하고 세포를 회수하여 lysis buffer[50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)]로 세포 내 단백질을 용해한 후 BCA protein assay kit(ThermoFisher Scientific, MA, USA)를 통해 단백질 정량 하였다. 동일한 단백질 양을 SDS-PAGE에 loading 하여 크기에 따라 분리한 뒤 nitrocellulose membrane으로 transfer 하여 membrane에 염증 매개 인자인 iNOS와 COX-2의 1차 항체를 반응시킨 후 2차 항체를 결합시켜 western blotting detection kit(ThermoFisher Scientific, MA, USA)를 사용한 chemiluminescence 방법을 통하여 단백질의 발현량을 가시화 하였고, FusionCapt Advance FX7 program (Vilber Lourmat, Australia)을

통하여 단백질의 발현량을 수치화 시켜 분석하였다.

***In vivo* zebrafish embryos 배양 및 한천 가수분해물 처리**

In vivo 실험 동물로 사용된 zebrafish(*Danio rerio*, wild type)는 제주월드피쉬수족관(Jeju, Korea)에서 구입하였고, Yang 등(2018) [8]의 방법에 따라 사육하였다. 성체 수컷 2마리와 암컷 1마리를 mating 하여 다음날 빛이 켜짐에 따라 자연적으로 산란하는 embryos를 획득하여 embryo media로 채운 petri dish에 보관하여 37°C incubator에서 배양하였다. 7-9 hpf (hour post-fertilization)의 embryos를 12 well plates에 각 well 당 15 embryos씩 분주한 후 한천 가수분해물을 처리하였다. Zebrafish embryos에 염증을 유도하기 위하여 한천 가수분해물을 처리하고, 1시간 후 LPS(10 µg/mL)를 처리하여 염증을 유도한 후 37°C incubator에서 배양하였다.

Zebrafish embryos 체내 NO 생성 및 생존율 평가

LPS를 처리하여 염증을 유도한 zebrafish embryos에 대한 한천 가수분해물의 zebrafish embryos 보호 효능을 평가하기 위하여 LPS 처리된 zebrafish embryos 체내에서 생산되는 NO를 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA) 형광 dye를 통해 측정하였다. 한천 가수분해물을 처리하고 1시간 후 LPS(10 µg/mL)를 처리하여 염증을 유도한 후 37°C incubator에서 배양하였다. 24시간 후 embryo media를 모두 제거한 후 새로운 embryo media를 넣어준 후 3 d pf(days post-fertilization)에 24 well plates에 각 well 당 10 embryos씩 분주하여 DAF-FM DA 형광 dye를 처리한 후 3시간 동안 암반응 시켰다. 암반응 후 새로운 embryo media로 2회 세척하고 MS-222(0.003%)로 1분 동안 마취시킨 후 CoolSNAP-Pro color digital camera가 장착된 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 형태학적으로 관찰하였고, Image J program을 통하여 형광 발현량을 수치화 시켜 분석하였다. 또한, zebrafish embryos 생존율을 측정하기 위하여 한천 가수분해물을 처리하고 24시간 후 embryo media를 모두 제거하고 새로운 embryo media를 넣어준 후 24시간 간격으로 7 dpf(days post-fertilization)까지 생존율을 측정하였다.

Zebrafish embryos 체내 ROS 생성 및 Cell death 평가

LPS 처리된 zebrafish embryos 체내에서 생성되는 ROS와 더불어 Cell death의 양에 대한 한천 가수분해물의 억제 효능을 평가하기 위하여 각각 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)와 acridine orange 형광 dye를 통해 측정하였다. 한천 가수분해물을 처리하고 1시간 후 LPS(10 µg/mL)를 처리하여 염증을 유도한 후 37°C incubator에서 배양하였다. 24시간 후 embryo media를 모두 제거하고 새로운 embryo media를 넣어준 후 3 dpf(days post-fertilization)에 24 well plates에 각 well 당 10 embryos씩 분주하여 DCFH-DA와 acridine orange 형광 dye를 각각 처리하였다. 체내 ROS 생성량을 측정하기 위하여 DCFH-DA 형광 dye를 처리한 zebrafish embryos는 1시간 동안 암반응 시켰고, Cell death를 측정하기 위하여 acridine orange 형광 dye를 처리한 zebrafish embryos는 30분 동안 암반응 시켰다. 암반응 후 새로운 embryo media로 2회 세척하고 MS-222(0.003%)로 1분 동안 마취시킨 후 형광현미경을 이용하여 형태학적으로 관찰하였고, Image J program을 통하여 형광 발현량을 수치화 시켜 분석하였다.

통계 분석

실험 결과의 통계 처리는 각각의 시료에 대한 평균 ± 표준편차로 나타내었다. SPSS 프로그램(SPSS Inc. Ver. 12.0)을 사용하여 One-way ANOVA-test를 실시하여 조사 항목들 간의 유의성 검증은 Turkey's multiple range test 로 $P < 0.05$ 및 $P < 0.01$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

가수분해 시간에 따른 한천 가수분해물의 이화학적 특성

염산의 첨가에 따른 한천 가수분해물의 환원당 함량(Figure 1A) 및 가수분해율(Figure 1B)의 변화를 살펴본 결과, 환원당 함량 및 가수분해율 모두 반응시간이 길어질수록 증가하였다. 또한, 한천 가수분해물의 가수분해 시간에 따른 점도를 측정할 결과, 15분까지는 가수분해물이 겔화하여 점도 측정이 불가 하였으나, 30분 가수분해물의 평균 점도

는 약 7,845 cps, 45분 가수분해물의 평균 점도는 약 5,060 cps, 60분 가수분해물의 평균 점도는 약 1,172 cps, 90분 가수분해물의 평균 점도는 약 203 cps로 나타났고, 120분 이상의 가수분해 시간에서는 점도가 100 cps 이하였고 이수 현상이 나타났다

(Table 1). 위 결과로부터 한천 가수분해물은 가수분해 시간이 증가할수록 점도가 감소하고 환원당의 함량이 증가함을 확인하였다. 이와 같이 제조한 한천 가수분해물을 이용하여 생리활성 평가를 수행하였다.

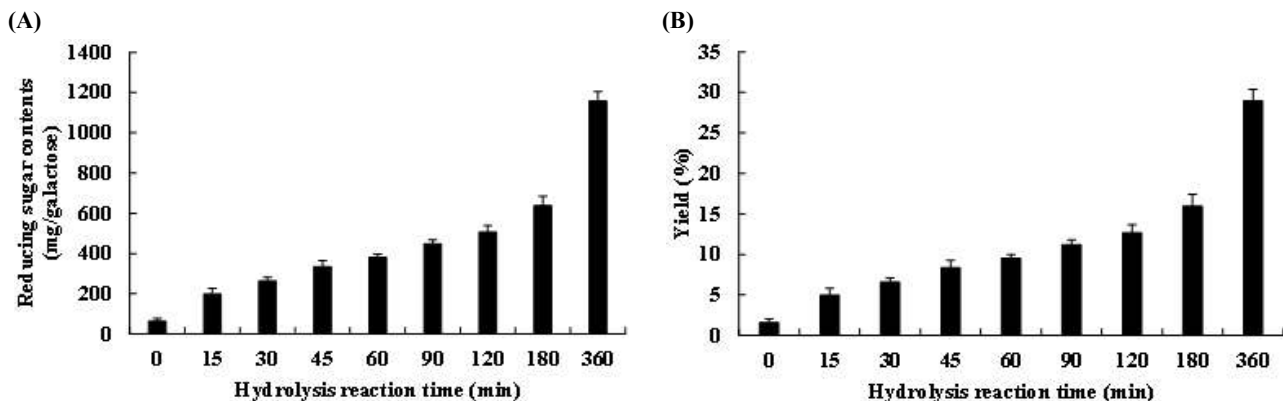


Figure 1. Reducing sugar contents (A) and yield (B) of agar hydrolysates according to reaction time.

Table 1. Viscosity of agar hydrolysates according to reaction time.

Reaction time (min)	0	15	30	45	60	90	120	180	360
Viscosity (cps)	Gelling	Gelling	7,845 ±2,973.86	5,060 ±815.61	1,172 ±382.06	203 ±66.10	≥100	≥100	≥100

한천 가수분해물에 의한 대식세포의 염증 억제 효과

대식세포(macrophages)는 외부에서 이물질이나 바이러스, 병원 미생물 등이 침입할 경우 생체 방어를 보다 효과적으로 수행하기 위해 최초로 병원체에 대응하는 면역세포로써 항원의 감시 및 이동, 식균 작용 등을 담당하는 선천면역계의 중요한 세포이다 [7]. 또한, 대식세포는 일산화질소(NO)를 포함한 cytokines과 prostaglandins 등의 다양한 염증매개물질을 방출하는 것을 통해 선천면역과 후천면역에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 염증성 질병에서 중심적인 역할을 한다 [6]. 특히, NO는 미생물의 침입이나 cytokines의 자극에 의하여 세포가 활성화되는 것으로 NO 합성 효소(inducible isoforms of NO synthase, iNOS)에 의해 L-arginine으로부터 형성되는 반응성이 강한 이원자 free radical로써 적절한 수준의 NO는 면역조절, 혈관확장, 신경전달 및 혈소판 억제 등의 기능을 수행하지만 다량 생성될 경우 염증반응을 촉진하고 기관지염, 관절염, 종양발생 및 세포의 돌연변이 등의 병적 반응을 일으키는 것으로 알려져

있다 [9]. 따라서, 대식세포에 염증반응을 유도하는 외부 자극물질로 사용되는 LPS를 이용하여 대식세포에서 생성되는 NO의 양을 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하여 가수분해 시간에 따른 한천 가수분해물의 NO 생성 억제 효능을 측정하였다. 먼저, 한천 가수분해물이 대식세포에 독성을 미치는지 확인하기 위하여 한천 가수분해물(250 μg/mL)만 처리한 결과, Figure 2A에 나타난 것처럼 독성을 나타내지 않았다. 다음으로 한천 가수분해물의 항염 효능을 확인한 결과, Figure 2B에 나타난 것처럼, LPS만 처리한 세포의 NO production을 100%로 하였을 때 아무것도 처리하지 않은 대조군(Control)의 NO production은 약 20%를 나타내었다. 이 결과로 LPS에 의해서 염증 자극이 유도된 것을 확인하였다. 또한, 가수분해 시간에 따른 한천 가수분해물을 처리한 실험군 중 360분 가수분해물을 처리한 실험군의 NO production이 약 70% 이상 감소되었다 (Figure 2B). 또한, 대조군과 LPS만 처리한 군의 세포 생존율은 약 90%로 세포 독성을 나타내지 않았다.

이를 통해 LPS가 독성을 나타내지 않으면서 NO 생성을 유도한 것을 확인하였다. 반면, LPS 처리로 염증을 유도하기 전에 시간 경과에 따른 한천 가수분해물을 전처리한 모든 실험군에서 세포 사멸을

보이지 않았다 (Figure 2C). 따라서, 360분 가수분해물(Sample F)이 대식세포에서 독성을 나타내지 않으며 LPS에 의한 NO 생성을 억제함으로써 염증 보호 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

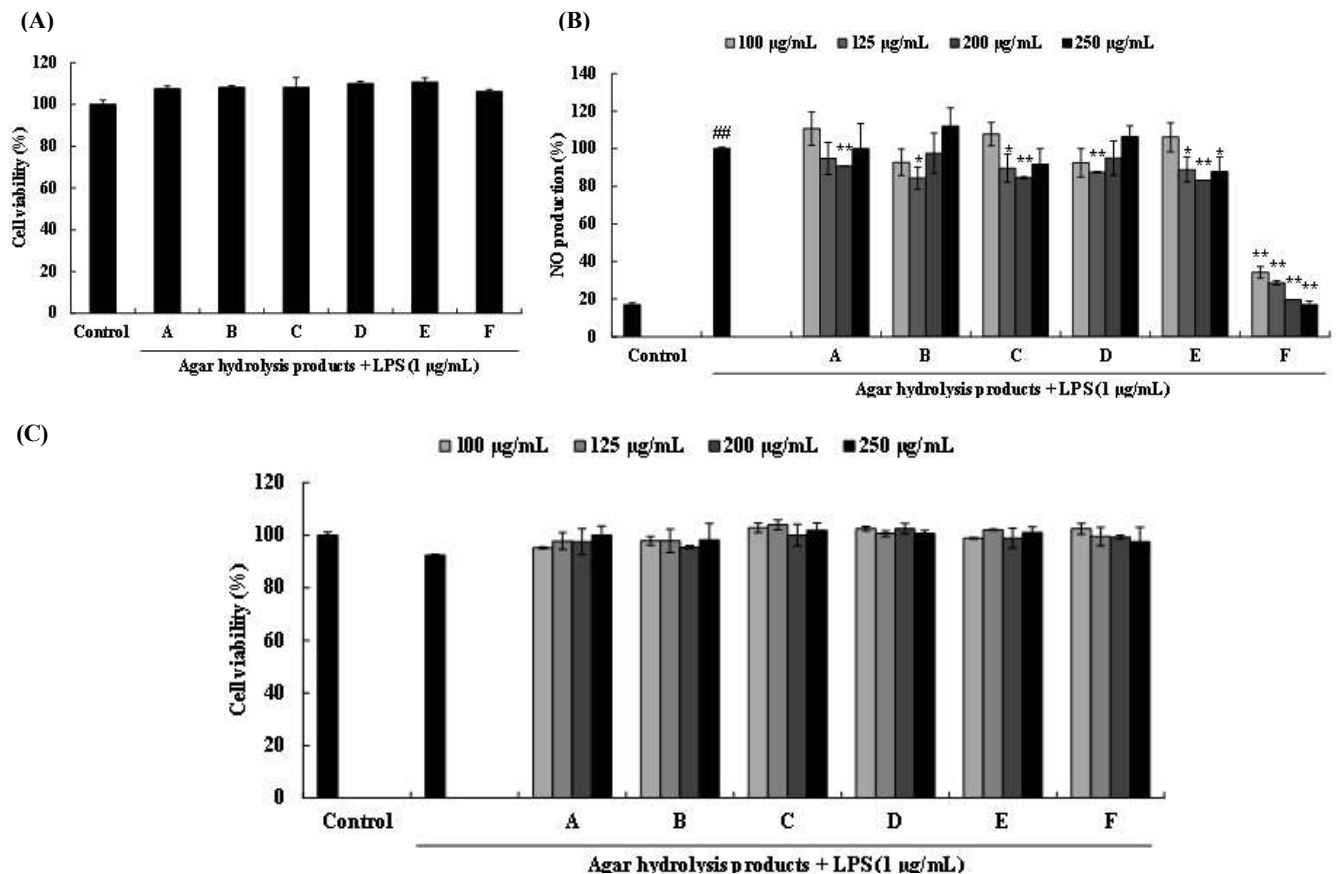


Figure 2. Anti-inflammatory activities of agar hydrolysates according to reaction time on lipopolysaccharides (LPS)-induced RAW 264.7 macrophages. (A), Cytotoxicity of agar hydrolysates; Effects of agar hydrolysates on nitric oxide (NO) production (B) and cell viability (C) in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. The agar hydrolysates used to experiments are as follow: A, reaction time is 0 min, B, reaction time is 45 min; C, reaction time is 60 min; D, reaction time is 90 min; E, reaction time is 120 min; F, reaction time is 360 min.

한천 가수분해물에 의한 염증 매개 인자 단백질 발현 감소 효과

염증성 매개체의 유도는 전사인자의 활성화에 의해 일어나게 된다. 염증 유발인자로 작용하는 LPS는 대식세포의 toll-like receptor(TLR4)라고 불리는 pattern recognition receptor를 통해 세포 내 mitogen-activated protein kinase(MAPK) family를 포함하여 여러 신호전달 경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며, 활성화된 MAPKs는 전사조절 인자인 nuclear transcription factor-kappa-B (NF-κB)를 핵 내로 translocation을 유도하며, 그 결과 iNOS 또는 COX-2와 같은 pro-inflammatory 유전자 발현을 촉진하여 염

증 반응을 일으킨다 [5]. 따라서, LPS에 의해 염증 자극이 된 대식세포에서 iNOS와 COX-2와 같은 pro-inflammatory 인자의 단백질 발현이 한천 가수분해물에 의해 어떻게 조절되는지 확인하였다. 그 결과, Figure 3에 나타난 것과 같이 β-Actin에 대하여 iNOS와 COX-2의 발현량을 비교했을 때 아무것도 처리하지 않은 대조군(Control)은 iNOS와 COX-2의 단백질이 발현하지 않은 반면, LPS만을 처리하여 염증 자극을 유도한 실험군에서는 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 상당히 증가하였다. 이를 통해, 염증 자극 유도제로 사용한 LPS에 의하여 염증이 유도되어 pro-inflammatory 인자들이 활성화 된 것을 확인하였다. 그

러나, 360분 한천 가수분해물(Sample F)을 처리하였을 때 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 유의성을 나타내며 크게 감소하였다. 특히, iNOS 단백질 발현이 360분 한천 가수분해물(Sample F)을 처리한 모든 실험군에서 감소하였다. 이를 통하여 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려진 대식세포가 LPS 자극에 의하여 활성화 되어 NO 합성 효소인 iNOS가 과발현 되었고, 360분 한천 가수분해물(Sample F)에 의하여 발현이 억제되었으며 앞서 확인한 NO 생성 역시 iNOS 발현 억제를 통한 것으로 여겨진다.

Western blot bands; (B), iNOS protein expression; (C), COX-2 protein expression. Experiments were performed in triplicate and the data were expressed as mean \pm SE; * $P < 0.05$, and ** $P < 0.01$ as compared to the untreated group.

한천 가수분해물에 의한 zebrafish embryos 체내 NO 생성량 변화

열대성 담수어인 zebrafish(*Danio rerio*)는 포유류와 생리적 유사성 때문에 분자유전학, 발생학, 약물 및 독성학에 관한 연구에서 널리 이용되는 실험 동물모델로서 공간의 제약을 받지 않는 작은 크기와 대량으로 쉽게 수정란을 확보할 수 있고, 더불어 조직 및 장기가 하루 만에 형성되는 빠른 발생과정 등의 장점을 가지고 있다 [8]. 따라서, 한천 가수분해물을 zebrafish 배아(embryos)에 처리하여 배아 내 염증 반응을 관찰하였다. 먼저, zebrafish embryos에 염증을 유도하기에 앞서 한천 가수분해물이 zebrafish에 미치는 영향을 알아보기 위해 시간 경과에 따른 한천 가수분해물 중 세포 수준에서 가장 뛰어난 항염 효능을 나타내었던 360분 한천 가수분해물(Sample F)을 처리하여 7일까지 생존율 변화를 확인하였다. 그 결과, Figure 4A에 나타난 것처럼 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 이상에서 생존율이 약 80% 이상 감소하였다. 이후, 독성을 나타내지 않는 한천 가수분해물이 LPS로 염증이 유도된 zebrafish embryos 체내 NO 생성을 억제하는지 확인하였다. 먼저, LPS가 zebrafish 배아 체내 NO 생성을 유도하는지 확인하기 위하여 아무것도 처리하지 않은 대조군(Control)과 LPS만을 처리한 실험군의 NO 생성량을 형광 현미경으로 관찰한 후 가시화하여 비교했을 때 LPS만을 처리한 실험군의 zebrafish embryos 체내 NO 생성량이 유의적으로 증가하였다. 반면, 360분 한천 가수분해물(Sample F)을 처리하였을 때 zebrafish embryos 체내 NO 생성량이 유의적으로 감소하였다 (Figure 4C). 또한, 고농도(15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 360분 한천 가수분해물(Sample F)을 처리하였을 때 zebrafish embryos의 생존율이 LPS만을 처리한 실험군과 비교하여 아무것도 처리하지 않은 대조군(Control)과 유사하게 나타났다 (Figure 4B).

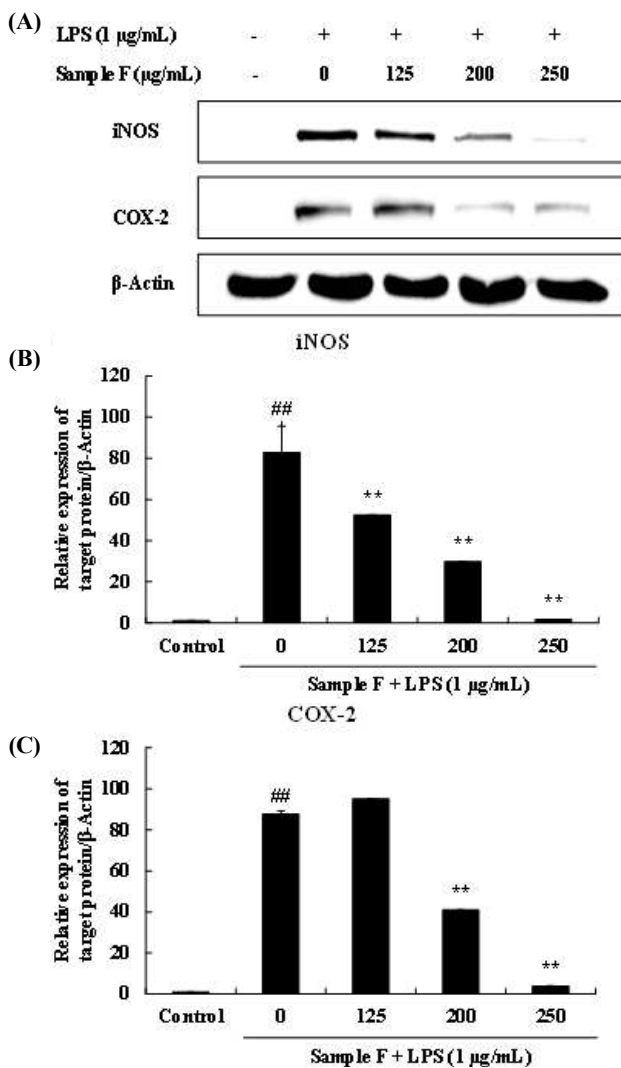


Figure 3. Down-regulation of iNOS and COX-2 proteins by the treatment of agar hydrolysate hydrolyzed for 360 min (Sample F) in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. (A),

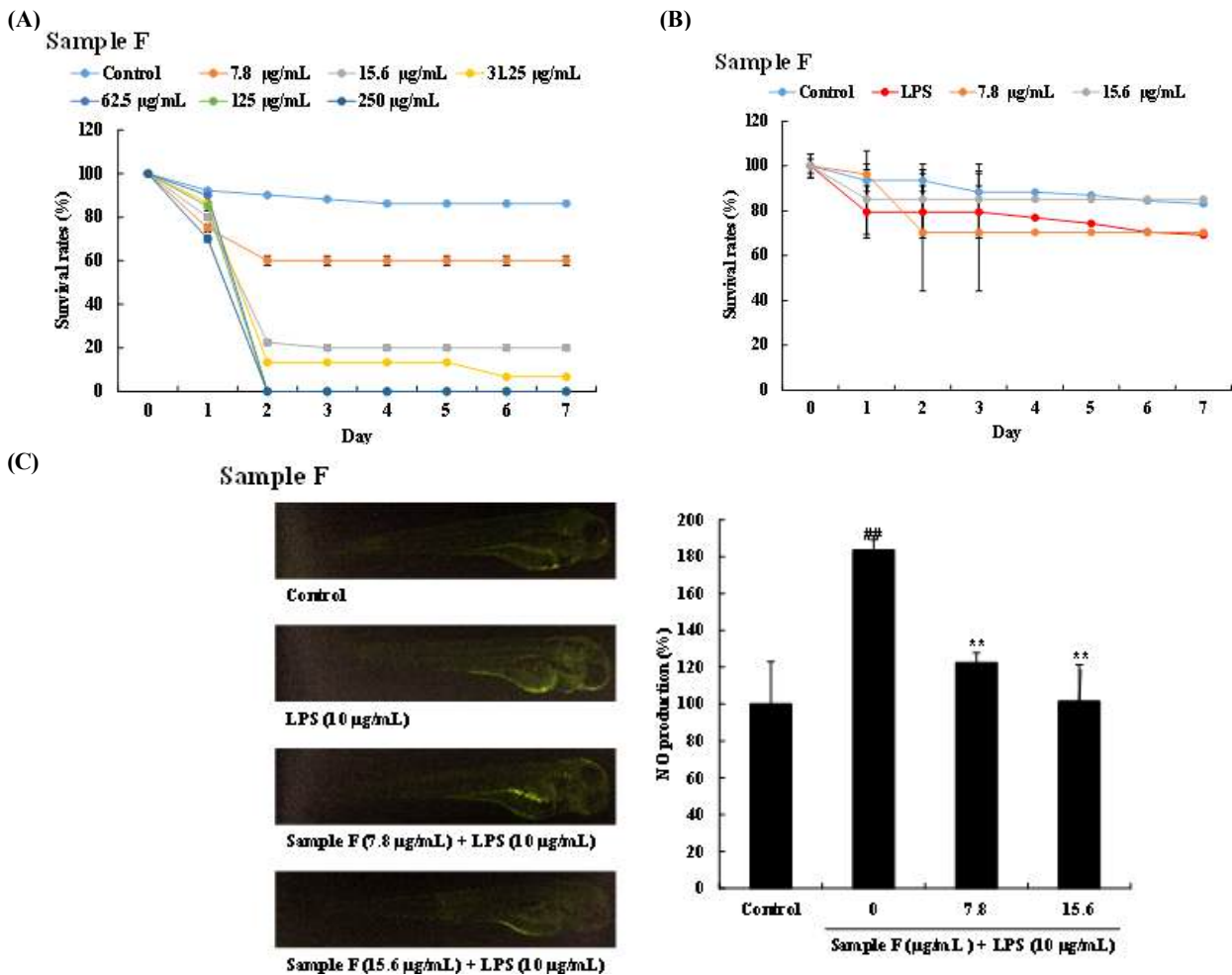


Figure 4. Changes in survival rates of zebrafish embryos after treating with the hydrolysate hydrolyzed for 24 hours (Sample F) (A) and with Sample F and LPS (B). Nitric oxide (NO) production in LPS exposed zebrafish embryos after treating with the hydrolysis product hydrolyzed for 24 hours (Sample F) (C). Experiments were performed in triplicate and the data were expressed as mean ± SE; * P < 0.05, and ** P < 0.01 as compared to the untreated group.

한천 가수분해물에 의한 zebrafish 체내 ROS 생성량 및 Cell death 변화

NO는 대식세포의 활성화로 인한 산물로 oxygen radical과 더불어 강력한 항 미생물 작용을 하며 NO가 생성될 때 Ca²⁺ 농도의 증가로 인해 superoxide anion (O₂⁻)과 H₂O₂가 함께 생성되면 산화력이 강한 OH·로의 연쇄 반응을 일으켜 세포 조직에 영향을 주어 직간접적으로 조직의 산화를 초래한다 [10]. 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 인체 세포를 공격하여 과산화지질을 형성하고, DNA와 RNA 파괴뿐만 아니라 세포 사멸과 괴사 발생 및 다양한 효소 기능을 억제하여 다양한 질병을 유발하는 주요 원인이 된다 [9]. 따라서, 각각의 형광 dye 염색을 통해 zebrafish embryos 체내 ROS 생성

량과 cell death를 관찰하였다. 그 결과, Figure 5A에서 확인할 수 있듯이 zebrafish embryos 체내 ROS 생성량이 LPS에 의해 증가하였고, 360분 한천 가수분해물(Sample F)을 처리하였을 때 zebrafish embryos 체내 ROS 생성량이 감소하는 경향을 보였다. 또한, 아무것도 처리하지 않은 대조군(Control)과 비교하여 LPS만을 처리한 zebrafish embryos의 cell death가 증가하였다. 반면, 360분 한천 가수분해물(Sample F)을 처리한 실험군 중 고농도(15.6 µg/ml)에서 cell death가 유의적으로 감소하였다 (Figure 5B). 이는 LPS에 의해 지질과산화 및 DNA/RNA 손상이 일어나 체내 ROS가 증가하며 세포사멸이 일어났으며, 360분 한천 가수분해물(Sample F)에 의해 체내 ROS 생성과 Cell death가 감소된 것으로 여겨진다.

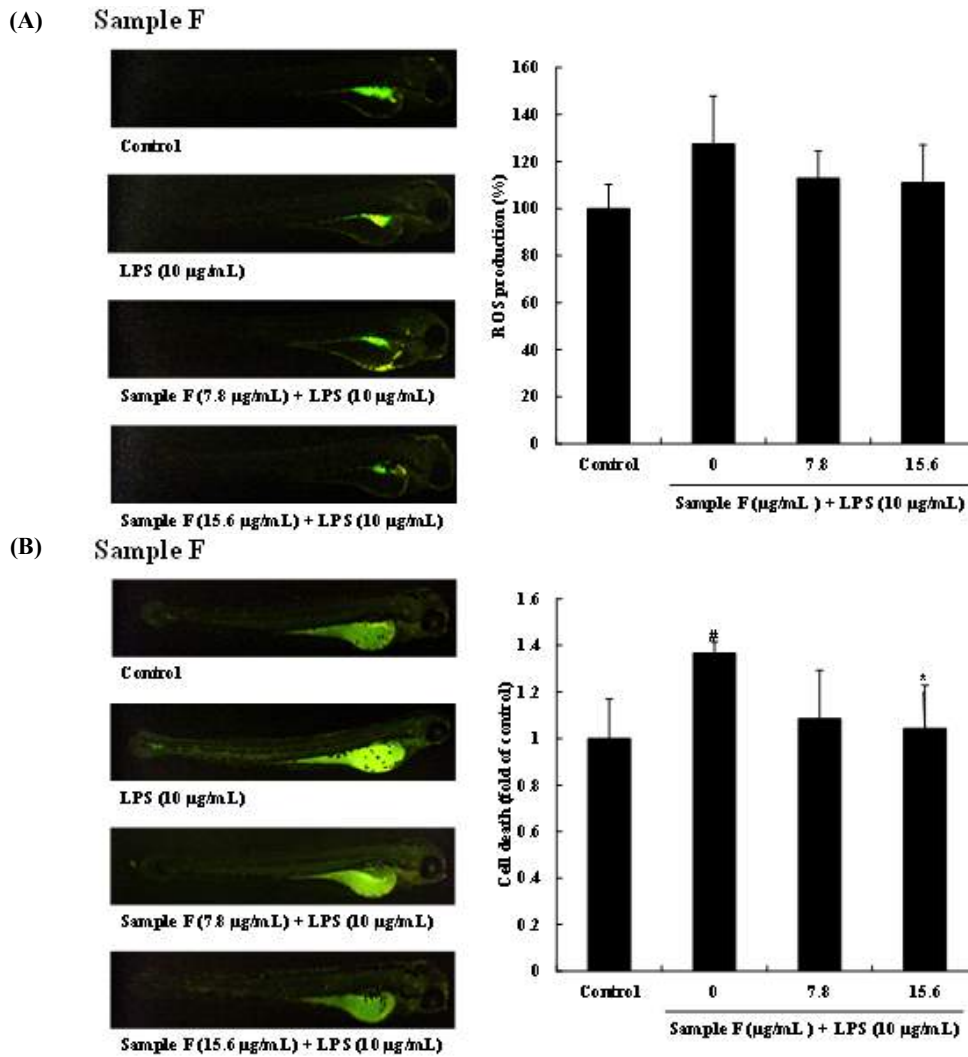


Figure 5. Reactive oxygen species (ROS) production (A) and cell death (B) in LPS exposed zebrafish embryos after treating with the hydrolysate hydrolyzed for 24 hours (Sample F). Experiments were performed in triplicate and the data were expressed as mean ± SE; * P < 0.05, and ** P < 0.01 as compared to the untreated group.

결론

이전 우뭇가사리 유래 한천은 분자량이 작고 한천 고유의 보수성과 식이섬유로의 기능성이 떨어지는 단점이 있어 이를 보완하여 낮은 농도에서도 겔화되는 특성을 가진 분말 한천보다 고농도로 식품에 첨가될 수 있는 한천 가수분해물을 제조하였다. 또한, 이들의 항염 효능을 측정된 결과, 360분 이상 한천 가수분해물이 LPS로 염증 자극된 대식세포에서 분비되는 NO 분비량을 억제하였고, NO 분비를 조절하는 염증매개인자인 iNOS뿐만 아니라 COX-2의 단백질 발현을 감소시켰다. 게다가, 360분 이상 한천 가수분해물은 *in vivo* zebrafish 동물모델에서 LPS 염증 자극에 의하여 zebrafish 체내 NO 생성량뿐만 아

니라 ROS 생성량과 cell death를 크게 감소시켰다. 결과들을 종합하면 한천 가수분해물(360분 가수분해물, Sample F)은 페이스트상(현탁액)이므로 식품 내에 균일하게 혼합될 수 있을 뿐만 아니라 항염 효능을 가지고 있어 염증 억제 또는 개선 식품의 제조에 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성(R&D) 기술개발사업(과제번호: R0003888)으로 수행된 연구결과입니다.

References

1. Kim S. W., Hong C.H., Yun N.K. and Shin H.J. 2016. Production and Application of Recombinant Agarase. *J. Mar. Biosci. Biotechnol.* **8(1)**, 1-9.
2. Lee C., Lee S., Lee D. and Lee S. 2016. 신규 한천분해세균 *Maribacter* sp. SH-1의 분리 및 효소 특성조사. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44(2)**, 156-162.
3. Park J.J., Kim J.E., Yun W.B., Lee M.L., Choi J.Y., Song B.R., Kim D.S., Lee C.Y., Lee H.S., Lim Y., Jung M.W. and Hwang D.Y. 2017. Hypolipidemic and Hypoinsulinemic Effects of Dietary Fiber from Agar in C57BL/6N Mice Fed a High-fat Diet. *J. Life Sci.* **26(8)**, 937-944.
4. Lee D.G. and Lee S.H. 2012. The Classification, Origin, Collection, Determination of Activity, Purification, Production, and Application of Agarases. *J. Life Sci.* **22(2)**, 266-280.
5. Lee E.J., Seo Y.M., Kim Y.H., Chung C., Sung H.J., Sohn H.Y., Park J.Y. and Kim J.S. 2019. Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts from Leaf, Seed, and Seedpod of *Nelumbo nucifera*. *J. Life Sci.* **29(4)**, 436-441.
6. Kim J., Lakmkal H.H.C., Lee J.H., Lee W.W. and Jeon Y.J. 2014. Anti-inflammatory and Anti-cancer Effects of Sterol-rich Fraction from *Nannochloropsis oculata* by using Saponification. *Korean J Fish Aquat Sci.* **47(6)**, 770-775.
7. Sim B.Y., Park J.H., Kim S.K. and Ji J.G. 2019. Effects of anti-inflammatory on *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray. *KASAT.* **36(2)**, 488-497.
8. Yang H.W., Kim E.A., Kim S.Y. and Jeon Y.J. 2018. Acute Toxicity Assessment in Zebrafish *Danio rerio* of Arsenic-rich Extracts from Three Species of Seaweeds. *Korean J Fish Aquat Sci.* **51(1)**, 31-41.
9. Jung K.I., Kim B.K., Kang J.H., Oh G.H., Kim I.K. and Kim M. 2019. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Water and the Fermentation Liquid of Sea Tangle (*Saccharina japonica*). *J. Life Sci.* **29(5)**, 596-606.
10. Kim D.G., Kang M.J. and Shin J.H. Hepatoprotective Effects of Sumaeyaksuk (*Artemisia argyi* H.) Extract on LPS-mediated Inflammatory Response. *J. Life Sci.* **26(11)**, 1282-1288.