

누룩에서 분리한 *Saccharomycopsis fibuligera* 미강 발효물의 항염활성에 대한 연구

박용원^{1,2}, 이상현^{3*}

¹건국대학교 생물공학과 학생, ²경동대학교 임상병리학과 교수, ³건국대학교 생물공학과 교수

A study on anti-inflammatory activity of fermented rice bran of *Saccharomycopsis fibuligera* isolated from Nuruk

Yong-Won Park^{1,2}, Sang-Hyun Lee^{3*}

¹Student, Department of Biological Engineering, Konkuk University

²Professor, Department of Biomedical Laboratory Sciences, Kyungdong University

³Professor, Department of Biological Engineering, Konkuk University

요약 본 논문은 대체식품 및 화장품 원료로 사용되는 미강을 발효를 통해 기능성과 경쟁력을 증가시키는 것을 목표로 하였다. 미강 추출물과 누룩에서 분리된 *Saccharomycopsis fibuligera* A8로 발효된 미강 추출물을 이용해 세포독성과 항염효과를 확인하였다. 세포 독성의 경우 미강 추출물의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세포독성을 보였으나 발효 미강 추출물의 경우에는 세포독성을 보이지 않았다. 한편 nitric oxide, IL-6, TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증 지표를 통해 항염효과를 확인한 결과, 미강 추출물은 nitric oxide, TNF- α 만 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 항염효과를 보였다. 발효 미강 추출물의 경우에는 각각 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 항염효과를 보여 더 낮은 농도로 항염효과를 나타내는 것을 확인하였다. 한편 *S. fibuligera* A8 사균체의 세포독성 및 항염 효과를 실험한 결과 발효 산물에서 사균체 역시 유효하게 작용하는 것을 알 수 있었다.

주제어 : *Saccharomycopsis fibuligera*, 고체상발효, 누룩, 발효, 항염

Abstract This paper aims to increase functionality and competitiveness through fermentation of rice bran, which is used as a raw material for alternative foods and cosmetics. Cytotoxicity and anti-inflammatory effects were confirmed using rice bran extract fermented with *Saccharomycopsis fibuligera* A8 isolated from Nuruk. In the case of cytotoxicity, cytotoxicity was shown at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for rice bran extracts, but cytotoxicity was not shown for fermented rice bran extracts. Meanwhile, as a result of confirming anti-inflammatory effects through inflammatory indicators such as nitric oxide, TNF- α , IL-1 β , and IL-6, rice bran extracts showed anti-inflammatory effects at concentrations of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or higher only nitric oxide and TNF- α . And fermented rice bran extracts exhibited anti-inflammatory effects at concentrations of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, exhibiting anti-inflammatory effects in lower concentration. Meanwhile, as a result of testing the cytotoxicity and anti-inflammatory effects of heat-killed *S. fibuligera*, it was found that the heat-killed *S. fibuligera* showed anti-inflammatory effect in fermented products.

Key Words : *Saccharomycopsis fibuligera*, Solid state fermentation, Nuruk, Fermentation, Anti-inflammation

*Corresponding Author : Sang-Hyun Lee(sanghlee@konkuk.ac.kr)

Received September 30, 2021

Revised October 26, 2021

Accepted November 20, 2021

Published November 28, 2021

1. 서론

많은 의학의 발전과 삶의 질에 대한 관심이 높아지며, 신체를 건강하게 유지하는 방법에 대한 관심이 증가하고 있다. 이러한 관심은 주로, 노화를 방지하거나 지연시킬 수 있는 기능성 물질에 대한 관심도 증가하고 있다. 인체의 노화는 유전적인 요인과 함께 생활방식, 식습관, 환경조건등의 다양한 요인에 따라 나타나며 지속적으로 많은 노화의 기전들이 연구되고 밝혀지고 있다. 그 중 가장 많이 연구되는 것은 활성산소 및 자유 라디칼에 의한 노화와 그에 관련된 질병들의 기전이다[1].

활성산소는 슈퍼옥사이드 음이온, 과산화수소, 하이드록실 라디칼 및 singlet oxygen등을 말하며, 자유라디칼의 주요 공급원이며, 자유라디칼은 비공유 홀전자로 다른 물질과 반응하기 쉬워[2], 세포 내의 산화 과정에 관여 한다. 세포 내의 자유라디칼은 주로 활성 산소종과 활성 질소종으로 나누어지며, 다양한 산화 과정을 일으킨다[3]. 이러한 산화과정에는 정상적인 반응뿐만 아니라 비정상적인 반응을 동반한다[4].

자유라디칼이 세포 내에서 정상적인 반응을 하는 예로는 세포의 사멸, 자가포식작용, 면역반응 등이 있다. 이와 같이 자유라디칼은 비정상 세포, 항원 등과 같은 비정상적인 물질과 반응하여 이들을 소거하는데 사용된다. 한편 비정상적인 반응을 하는 예로는 대사성 질환, 종양, 노화 등이 있다[5]. 이러한 반응은 자유라디칼이 DNA, 단백질, 세포막 등 정상적 세포 구성물질과 반응하여 일어난다. 이러한 비정상적인 반응은 자유라디칼의 과다생산에 의해 촉진된다[6].

자유라디칼, 그 중에서도 활성산소의 과다생산은 세포호흡에 관여하는 유전자 이상, 활성산소 소거에 관련된 유전자 이상, 과도한 면역 반응 등에 의해 생성된다. 염증반응이란 물리적 손상이나 세균으로 인한 감염으로 인체조직의 위해에 대한 국소적 방어보호반응으로, 세포성 면역와 체액성 면역을 유도하여 염증의 원인 인자를 제거하는 과정이다[4].

현대인은 편중된 식습관, 환경의 오염, 유해 인자 접촉 빈도의 증가 등 다양한 이유에 의해 염증의 원인 인자에 지속적으로 노출되기 쉬우며, 이러한 지속적 노출은 염증을 만성화시켜 체내의 세포 전반에 지속적인 손상을 일으킨다. 이러한 만성 염증은 아토피, 관절염, 심장병, 뇌질환, 암 등 다양한 질병의 원인이 된다. 이러한 이유로 현대인에게 염증을 억제하는 것은 건강한 삶

을 위한 조건 중 하나가 되었다[7].

미강은 이러한 요구에 적합한 기능성 원료로 각광받고 있다. 쌀은 대한민국의 대표 식량자원으로서 많은 양이 생산되고 있다. 미강은 벼의 낱알에 왕겨를 제거한 것을 현미라 하고, 이를 백미로 도정하는 과정에서 생기는 부산물이다[8]. 미강에는 항산화효과, 항암작용, 항염증작용, 항당뇨효과, 항알레르기, 미백효과, 면역촉진효과 등 다양한 연구들이 진행되었다 [9-11]. 하지만 대부분의 활성은 이들의 에탄올 추출물에 국한되어 있다. 유기용매를 이용한 추출의 경우 용매를 제거하는 과정을 거쳐야 사용이 가능하다.

이를 해결하기 위해 본 실험에서는 *Saccharomycopsis fibuligera*를 사용하였다. *S. fibuligera*는 호기성 효모의 일종으로 amylase, glucosidase, protease, cellulase 등 다양한 효소를 분비하며, 넓은 범위의 수분활성도에서도 생장이 가능하다. 본 실험에서는 이러한 장점을 살려 solid state fermentation을 적용하여, *S. fibuligera*로 미강을 발효시켜 추출물을 생성시키는 것을 목적으로 하였다.

2. 실험 방법

2.1 실험 전 준비

2.1.1 균주 선정

기존 균주와 비교하기 위해 한국생명공학연구원의 생물자원센터의 표준균주인 *S. fibuligera* KCTC 7806를 사용하였으며 누룩에서 분리된 균주 중 높은 효소 활성 및 항산화능을 기준으로 높은 발효적합성을 보인 균주를 선정하여 금정산성누룩에서 분리된 *S. fibuligera* A8을 사용하여 실험을 진행하였다.

2.1.2 미강 발효

S. fibuligera A8과 KCTC 7806 균주로 발효된 미강 추출물의 세포활성을 확인하기 위해 동물세포실험을 진행하였다. 이에 사용된 미강 발효 추출물은 다음과 같이 제조되었다.

미강은 세종시의 정미소에서 2019년 10월에 채취된 미강을 사용하였다. 기질로 사용한 미강의 이물질 제거 및 균질화를 위해 600 μm mesh를 이용하여 mesh를 통과하지 못한 미강을 이용하여 solid state fermentation을 실시하였다. 미강은 1:2(w:v)로

distilled water에 혼합하고, 30 g 을 직경 15 cm petri dish에 넣고 autoclave하여 멸균하였다. *S. fibuligera* 를 증균한 배양액을 각각 600 nm 에서의 흡광도가 2.0이 되도록 조정하고 10 mL을 멸균한 미강에 넣어 접종한다. 그 후 배양기를 이용하여 25°C 조건에서 5일간 배양하였다.

배양이 끝난 각각의 발효미강 5 g을 회수하여 1:10(w:v)로 distilled water에 첨가한 뒤 vortexing 을 통해 발효 미강 추출액을 제조하였다. 제조된 발효 미강 추출액은 원심분리를 통해 미강 및 불용성 성분을 제거하고, 상층액을 동결 건조 처리하였다. 동결 건조된 발효 미강 추출물과 동물세포간의 반응을 위해 DMSO 에 재용해 시킨 뒤 0.2 µm syringe filter를 이용해 균체 및 불용성 물질을 제거하였다.

2.1.3 사균체 제조

S. fibuligera 균체의 세포활성을 확인하기 위해 A8 의 사균체를 이용한 동물세포실험을 진행하였다. 이에 사용된 사균체는 다음과 같이 제조되었다.

YM broth (dextrose 10 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L, distilled water 1 L)를 제조하여 100 mL 진탕용 플라스크에 10 mL를 주입한 뒤 동결보존 된 *S. fibuligera* 를 접종 후 진탕 배양기를 이용하여 30 rpm, 25°C 조건에서 5일간 배양하였다. 배양을 마친 후 배양액은 원심분리를 통해 균체와 배양상층액으로 분리하였으며 배양 상층액을 제거한 뒤 동량의 FBS를 주입하여 vortexing 후 원심분리하는 방법으로 3회 washing 과정을 진행하였다. 회수된 균체는 초순수를 주입한 뒤 autoclave 하여 균을 사멸 및 파쇄하였다. 해당 용액은 동결건조를 통해 분말화하여 사용하였다.

발효물 첨가 배양액은 DMEM을 용매로 하여 배양액 배합 후 최종 농도가 0-1000 µg/mL 농도로 제조하였다. 사균체 첨가 배양액은 DMEM을 용매로 하여 배양액 배합 후 최종 농도가 0-10 mg/mL 농도로 제조하였다.

2.2 세포 실험

2.2.1 세포 독성 실험

세포 독성 실험에 사용한 cell line 은 RAW 264.7 (한국세포주은행, 한국)을 사용하였다. 세포 배양에 사

용된 배양액은 penicillin-streptomycin solution (Sigma, USA), fetal bovine serum(FBS, Sigma, USA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GE healthcare, USA)를 사용하였다.

penicillin-streptomycin solution 5 mL, fetal bovine serum 50 mL, Dulbecco's Modified Eagle Medium 445 mL 를 혼합하여 배양액을 제조하고 세포독성의 측정은 MTT assay를 적용 하였다. 그 과정으로는 96 Well plate에 각 well 당 3.0×10^4 cell을 seeding하여 1일간 5% CO₂, 37°C 조건으로 세포를 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 DMEM 배지 180 µL와 발효물 첨가 배양액 20 µL를 주입하여 최종 농도가 0-100 µg/mL가 되도록 한 뒤 다시 2일간 배양하였다. 배양 후 발효물 첨가 배양액을 제거한 뒤 MTT solution을 100µL씩 분주하여 4시간 동안 결정화하였다. 결정화 반응 후 MTT solution을 제거하고, DMSO 100 µL를 분주하여 결정화된 MTT를 용해시켜, 560nm 흡광도를 측정하면 결정화된 MTT의 양을 확인할 수 있다. MTT의 결정 생성은 NADH의 양과 비례하고, 생존한 세포 수에 비례한다.

사균체 활성의 경우 동일한 방법으로 최종 농도가 0-1000 µg/mL가 되도록 처리하여 실험하였다.

2.2.2 Nitric oxide 생성 억제능

Nitric oxide 생성 억제능 실험에 사용된 세포는 RAW 264.7을 사용하였다. 세포 배양조건에는 penicillin-streptomycin solution, FBS, DMEM을 사용하였으며, 염증반응 상태를 유도하기 위해 lipopolysaccharide (Sigma, USA)를 사용하였다. Nitric oxide 생성 억제능은 griess reagent를 이용하여 측정하였다. griess reagent는 5% phosphoric acid (Junsei, Japan)에 1% sulfanilamide(TCI, Japan)를 용해한 것에 0.1% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride(TCI, Japan) 수용액을 1 : 1 비율로 섞어 사용하였다. FBS 50 mL, DMEM 445 mL, antibiotics 5 mL를 혼합하여 배양액을 제조하였다. 세포 배양은 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다. 발효물 첨가 배양액은 DMEM 용액을 이용하여 1000 µg/mL 농도로 제조하였다.

96Well plate의 각 well 당 5.0×10^4 cell을 seeding 하여 1일간 5% CO₂, 37°C 조건으로 세포를 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거한 뒤 lipopolysaccharide

1 μ g/mL가 함유된 DMEM 배지 180 μ L와 발효물 첨가 배양액을 20 μ L를 주입하여 최종 농도가 0-100 μ g/mL가 되도록 한 뒤 다시 2일간 배양하였다. 배양 후 발효물 첨가 배양액의 상층액 100 μ L를 제거한 뒤 griess reagent를 100 μ L씩 분주하여 15 분간 동안 반응시켰다. 그 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 540nm에서 측정된 흡광도는 생성된 NO의 양과 비례한다.

사균체 활성의 경우 동일한 방법으로 최종 농도가 0-1000 μ g/mL가 되도록 처리하여 실험하였다.

2.2.3 염증성 cytokine 생성 억제능

염증성 cytokine 생성 억제능 실험에 사용된 세포는 RAW 264.7을 사용하였다. 세포 배양에는 penicillin-streptomycin solution, FBS, DMEM을 사용하였으며, 염증반응을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide (Sigma, USA)를 사용하였다. Inflammatory cytokine 생성 억제능은 TNF- α , IL-1 β , IL-6 ELISA kit(고마바이오텍, 한국)를 적용하여 측정하였다. FBS 50 mL, DMEM 445 mL, antibiotics 5 mL를 혼합하여 배양액을 제조하였다. 세포 배양은 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 조건에서 배양하였다. 발효물 첨가 배양액은 DMEM 용액을 이용하여 1000 μ g/mL 농도로 제조하였다.

96Well plate에 각 well 당 5.0 \times 10⁴cell을 seeding 하여 1일간 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 조건에서 세포를 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거한 뒤 lipopolysaccharide 1 μ g/mL가 함유된 DMEM 배지 180 μ L와 발효물 첨가 배양액을 20 μ L를 주입하여 최종 농도가 0-100 μ g/mL가 되도록 한 뒤 다시 2일간 배양하였다. 배양 후 발효물 첨가 배양액의 상층액 100 μ L를 회수한 뒤 ELISA kit 제조사에서 권고한 표준사용법에 맞추어 100 μ L씩 분주하여 측정하였다.

사균체 활성의 경우 동일한 방법으로 최종 농도가 0-1000 μ g/mL가 되도록 처리하여 실험하였다.

3. 실험 결과

3.1 세포 독성 측정 결과

발효 미강 추출물에 대한 세포독성 실험결과는 Table 1과 같다.

100 μ g/mL 농도에서 미발효 미강은 74.48 \pm 2.35%를 나타내었으며 KCTC 7806 발효 미강 추출물은

94.55 \pm 0.97%, A8 발효 미강 추출물은 95.30 \pm 2.07%를 나타내었다. 보편적으로 사용되는 ISO 10993-5:2009에서 세포독성의 기준으로 사용되는 80%를 기준으로 하여 세포독성을 판단하였을 때, 미발효 미강 추출물의 경우 100 μ g/mL 농도에서 독성이 나타나는데 비해, KCTC 7806 발효 미강 추출물과 A8 발효 미강 추출물의 경우 실험에 사용된 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 미강 발효과정을 통해 미강의 독성물질을 감소시키는 것이 가능하다는 것을 알 수 있다.

미강은 현미를 백미로 도정할 때 얻어지는 부산물로 쌀의 영양분 95%를 가지고 있다[12]. 미강은 양질의 단백질과 식이섬유 및 각종비타민, 미네랄을 함유하고 있으며, phytic acid, γ -oryzanol, α -tocopherol, α -tocotrienol과 같은 항산화물질 등 다양한 생리활성 물질들을 가지고 있다[13]. 그러나 일부 연구에서는 독성을 나타내며[14], 현미에 포함 되어있는 lectin이나 phytic acid 가 세포에 독성을 일으킨다는 주장이 이어지고 있다[15]. 이를 제거하는 방법으로서 발효가 대표적이다[15].

본 연구에서도 미발효 미강의 경우 독성을 나타내는데 비해, 발효미강은 독성을 나타내지 않았다. 이는 *S. fibuligera*의 효소 생성 다양성에 의한 것으로 보인다. *S. fibuligera*는 분류학상 yeast와 mold의 중간적 성질을 띠고 있으며, 이로 인해 다양한 효소를 생성한다[16]. 이러한 효소 중 glycosidase는 lectin의 작용과 연관성이 높으며, 이들의 분해에도 관여한다. 즉 *S. fibuligera*의 발효를 통해 lectin이 제거되어 세포 독성을 낮춘 것으로 보인다.

Table 1. Survival rate of Raw 264.7 with fermented rice bran extract

Concentration(μ g/mL)	Survival rate(%)		
	Cont.	KCTC 7806	A8
0	100.00 \pm 2.79	-	-
12.5	99.54 \pm 0.51	101.39 \pm 1.48	101.57 \pm 1.15
25	96.29 \pm 1.32	101.33 \pm 1.43	102.61 \pm 1.34
50	86.48 \pm 2.21	98.03 \pm 0.97	98.38 \pm 1.42
100	74.48 \pm 2.35	94.55 \pm 0.97	95.30 \pm 2.07

한편 *S. fibuligera* 사균체에 대한 세포독성 실험결과는 Table 2와 같다. *S. fibuligera* 사균체의 경우에도 실험에 사용된 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았다.

*S. fibuligera*는 주류 제조에 사용되는 균주로서, 한국에서는 전통적으로 막걸리 등의 주조과정에 사용되는 누룩에 존재하는 균종이다[17]. 이러한 이유로 *S. fibuligera*를 비롯한 많은 효모는 GRAS (Generally Recognized As Safe)로서 사용되고 있다[18]. 이러한 특성으로 효모 균체는 영양제, 화장품 원료 등으로 사용되고 있으며, 세포의 성장을 촉진시키는 효과도 보고되었다[19].

Table 2. Survival rate of Raw 264.7 with *S. fibuligera* A8

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Survival rate (%)
0	100.00 \pm 1.69
125	103.38 \pm 1.83
250	106.15 \pm 1.53
500	103.54 \pm 1.91
1000	99.91 \pm 1.35

3.2 NO 생성 측정 결과

발효 미강 추출물에 대한 nitric oxide 생성 억제능 실험결과는 Table 3과 같다.

미발효 발효 미강 추출물의 경우 모든 농도에서 유의미한 nitric oxide 억제능이 나타나지 않았으나, KCTC 7806 발효 미강 추출물의 경우 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 nitric oxide 억제능이 나타났다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$). A8 발효 미강 추출물의 경우 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 nitric oxide 억제능이 나타났다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$). 이를 백분율로 환산하였을 때 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 미발효 미강 추출물은 94.16 \pm 3.17%를 나타내었으며 KCTC 7806 발효 미강 추출물은 78.88 \pm 2.53%, A8 발효 미강 추출물은 71.06 \pm 2.07%를 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 미강 발효과정을 통해 nitric oxide 억제능을 증가시키는 것이 가능하다는 것을 알 수 있다.

Table 3. NO production rate of Raw 264.7 with fermented rice bran extract

Concentration $\mu\text{g/mL}$	NO production rate (%)		
	Cont.	KCTC 7806	A8
0	100.00 \pm 1.23	-	-
12.5	101.99 \pm 2.16	99.25 \pm 1.73	98.26 \pm 1.68
25	98.88 \pm 2.24	97.52 \pm 1.83	93.91 \pm 1.90*
50	99.38 \pm 1.78	89.44 \pm 3.74*	86.34 \pm 2.03**
100	94.16 \pm 3.17	78.88 \pm 2.53**	71.06 \pm 2.07**

한편 *S. fibuligera* 사균체의 nitric oxide 생성 억제능 실험결과는 Table 4와 같다. *S. fibuligera* 사균체는 사용된 모든 농도범위에서 nitric oxide 억제능을 나타내었으며 1mg/mL 농도로 처리하였을 때 30.51 \pm 0.56%의 nitric oxide 억제능을 나타냈다.

Table 4. NO production rate of Raw 264.7 with *S. fibuligera* A8

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Survival rate (%)
0	100.00 \pm 0.95
125	87.33 \pm 0.31**
250	79.52 \pm 0.68***
500	56.28 \pm 1.80***
1000	30.51 \pm 0.56***

미강의 항염능은 미강에 포함된 triterpene alcohol과 sterol ferulates 가 항염능을 나타내며 nitric oxide 억제능을 보인다고 보고하였다[9]. 본 연구에서는 발효를 통해 생성된 cellulase 작용에 의한 세포벽 연화작용과 발효를 통해 생성된 alcohol에 의한 추출작용에 의해 해당 성분의 추출이 증가된 것으로 생각된다. 한편 3T3-L1 adipocyte의 염증반응에 대해 연구한 논문에서 따르면 heat-killed yeast의 β -glucan 이 항염작용을 나타낸다고 보고하였다[20]. 본 연구에서 항염능의 증가에는 미강의 추출 수율과 동시에 발효 과정에서 *S. fibuligera*의 증가도 영향을 끼쳤을 것으로 생각된다.

3.3 염증성 cytokine 생성 억제능

미강 발효물에 대한 TNF- α 억제 실험 결과, TNF- α 의 농도는 Fig. 1에 기반한 생성률은 Table 5와 같다.

미발효 미강의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 유의미한 TNF- α 억제능이 나타나는데 비해 ($p < 0.05$), KCTC 7806 발효미강의 경우 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 TNF- α 억제능이 나타났다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$). A8 발효미강의 경우 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 TNF- α 억제능이 나타났다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$). 이를 백분율로 환산하였을 때 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 미발효 미강은 95.61 \pm 0.87%를 나타내었으며 KCTC 7806 발효미강은 87.31 \pm 0.99%, A8 발효미강은 82.80 \pm 0.24%를 나타내었다. 이는 선행연구과제인 ABTS, DPPH 등의 항산화 실험에서 *S. fibuligera* A8 균주가 KCTC 7806

균주에 비해 1.12배, 1.28배 높은 항산화 수치를 나타낸 결과의 영향으로 판단된다. 아울러, 활성산소를 제거해주는 항산화제가 염증을 억제한다는 많은 연구들도 확인되었다[7].

또한 *S. fibuligera* 사균체의 TNF- α 생성 억제능 실험 결과는 Table 6과 같다. *S. fibuligera* 사균체는 사용된 모든 농도범위에서 TNF- α 억제능을 나타내었으며 1 mg/mL 농도로 처리하였을 때 78.74 \pm 0.85%의 TNF- α 억제능을 나타냈다.

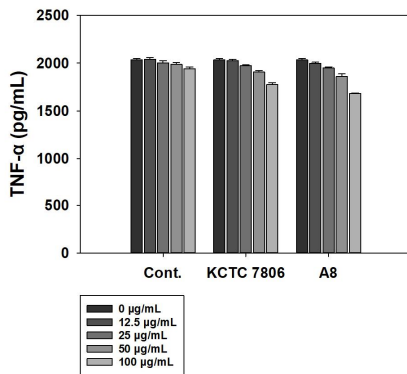


Fig. 1. TNF- α production of Raw 264.7 with fermented rice bran extract

Table 5. TNF- α production rate of Raw 264.7 with fermented rice bran extract

Concentration (μ g/mL)	Cont.	KCTC 7806	A8
0	100.00 \pm 0.75	-	-
12.5	100.43 \pm 0.79	99.66 \pm 0.57	98.33 \pm 0.56
25	98.57 \pm 1.00	97.10 \pm 0.48*	95.88 \pm 0.66*
50	97.85 \pm 0.95	93.77 \pm 0.82**	91.46 \pm 1.36**
100	95.61 \pm 0.87*	87.31 \pm 0.99**	82.80 \pm 0.24**

Table 6. TNF- α production rate of Raw 264.7 with *S. fibuligera* A8

Concentration (μ g/mL)	TNF- α production rate (%)
0	100.00 \pm 0.95
125	93.26 \pm 0.64***
250	88.64 \pm 0.62***
500	83.86 \pm 0.90***
1000	78.74 \pm 0.85***

미강 발효물에 대한 IL-1 β 억제 실험결과, IL-1 β 의 농도는 Fig. 2에 기반한 생성률은 Table 7와 같다.

미발효 미강의 경우 100 μ g/mL 농도에서도 유의미

한 IL-1 β 억제능이 나타나지 않았으며, KCTC 7806 발효미강의 경우 100 μ g/mL 농도에서 IL-1 β 억제능이 나타났다(p<0.05). A8 발효미강의 경우 50 μ g/mL, 100 μ g/mL 농도에서 IL-1 β 억제능이 나타났다(p<0.05, p<0.01). 이를 백분율로 환산하였을 때 100 μ g/mL 농도에서 미발효 미강은 98.35 \pm 2.90%를 나타내었으며 KCTC 7806 발효미강은 89.42 \pm 1.73%, A8 발효미강은 76.30 \pm 2.15%를 나타내었다. 한편 *S. fibuligera* 사균체의 IL-1 β 생성 억제능 실험결과는 Table 8과 같다. *S. fibuligera* 사균체는 사용된 모든 농도범위에서 IL-1 β 억제능을 나타내었으며 1 mg/mL 농도로 처리하였을 때 63.85 \pm 1.21%의 IL-1 β 억제능을 나타냈다.

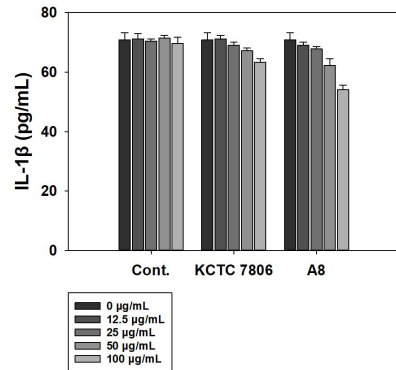


Fig. 2. IL-1 β production of Raw 264.7 with fermented rice bran extract

Table 7. IL-1 β production rate of Raw 264.7 with fermented rice bran extract

Concentration (μ g/mL)	Cont.	KCTC 7806	A8
0	100.00 \pm 3.39	-	-
12.5	100.47 \pm 2.46	100.47 \pm 1.70	97.37 \pm 1.49
25	99.29 \pm 1.15	97.37 \pm 1.49	95.67 \pm 1.09
50	100.66 \pm 1.34	94.73 \pm 1.31	87.92 \pm 3.25*
100	98.35 \pm 2.90	89.42 \pm 1.73*	76.30 \pm 2.15**

Table 8. IL-1 β production rate of Raw 264.7 with *S. fibuligera* A8

Concentration (μ g/mL)	IL-1 β production rate (%)
0	100.00 \pm 1.25
125	92.74 \pm 1.41**
250	82.46 \pm 0.88***
500	68.41 \pm 1.20***
1000	63.85 \pm 1.21***

미강 발효물에 대한 IL-6 억제 실험결과, IL-6의 농도는 Fig. 3에 기반한 생성률은 Table 9와 같다.

미발효 미강의 경우 유의미한 IL-6 억제능이 나타나지 않았으며, KCTC 7806 발효미강의 경우 50 μ g/mL, 100 μ g/mL 농도에서 IL-6 억제능이 나타났다 ($p < 0.01$, $p < 0.001$). A8 발효미강의 경우 50 μ g/mL, 100 μ g/mL 농도에서 IL-6 억제능이 나타났다 ($p < 0.01$, $p < 0.001$). 이를 백분율로 환산하였을 때 100 μ g/mL 농도에서 미발효 미강은 98.89 \pm 1.07%를 나타내었으며 KCTC 7806 발효미강은 77.07 \pm 1.07%, A8 발효미강은 74.37 \pm 1.37%를 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 미강 발효과정을 통해 미강의 항염능을 증가시키는 것이 가능하다는 것을 알 수 있다. 한편 *S. fibuligera* 사균체의 IL-6 생성 억제능 실험결과는 Table 10과 같다. *S. fibuligera* 사균체는 사용된 모든 농도범위에서 IL-6 억제능을 나타내었으며 1 mg/mL 농도로 처리하였을 때 50.27 \pm 1.56%의 IL-6 억제능을 나타냈다.

Inflammatory cytokine의 농도 측정을 통해 *S. fibuligera* A8를 이용한 발효 미강 추출물의 항염능을 확인할 수 있었다. *S. fibuligera*는 다양한 효소를 생성하며[16], 이러한 효소는 발효의 효과를 증가시키는 동시에 독성을 감소시킬 수 있다. 그 예로 *S. fibuligera* 발효 블랙커런트 추출물은 발효 전에 비해 세포독성이 감소된 동시에 항산화, 항염증 효과가 증진되었다[21]. 이와 같이 발효를 통한 물질 개선에 *S. fibuligera*가 사용될 수 있음을 보였다.

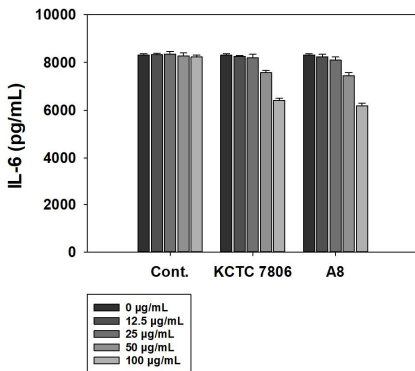


Fig. 3. IL-6 production of Raw 264.7 with fermented rice bran extract

Table 9. IL-6 production rate of Raw 264.7 with fermented rice bran extract

Concentration μ g/mL	IL-6 production rate (%)		
	Cont.	KCTC 7806	A8
0	100.00 \pm 0.61	-	-
12.5	100.10 \pm 0.80	99.13 \pm 0.55	98.99 \pm 1.29
25	100.30 \pm 1.47	98.60 \pm 1.64	97.40 \pm 1.49
50	99.53 \pm 1.40	91.05 \pm 1.21**	89.45 \pm 1.62**
100	98.89 \pm 1.07	77.07 \pm 1.07***	74.37 \pm 1.37***

Table 10. IL-6 production rate of Raw 264.7 with *S. fibuligera* A8

Concentration (μ g/mL)	IL-6 production rate (%)
0	100.00 \pm 1.36
125	91.33 \pm 1.31**
250	75.27 \pm 1.46***
500	56.42 \pm 2.00***
1000	50.27 \pm 1.56***

4. 결론

최근 대체 식품, 화장품 원료 등 여러 방면으로 기능성이 입증되어 신소재로 사용되고 있는 미강의 기능성과 원료 대비 가격경쟁성을 증가시키기 위해 *S. fibuligera* 발효를 이용하였다. 선행연구를 통해 미강 발효에 적합한 균주를 분리하였으며, 이를 통해 미강 발효 추출물의 세포 독성 및 항염효과를 확인하였다. 또 균주 자체의 세포 독성 및 항염효과를 확인하였다.

세포 독성의 경우 100 μ g/mL 농도 이상에서 세포 생존율이 80% 이하로 떨어져 독성을 보인 미강 추출물과는 달리 발효 미강 추출물은 동일 농도에서 KCTC 7806, A8 모두 각각 94.55 \pm 0.97%, 95.30 \pm 2.07%의 세포 생존율을 보여 독성이 없음을 확인하였다.

NO 생성 억제능의 경우 100 μ g/mL 농도에서 통계적으로 유의미한 감소를 보이지 못한 미강 추출물과는 달리 발효 미강 추출물은 동일 농도에서 KCTC 7806, A8 모두 각각 78.88 \pm 2.53%, 71.06 \pm 2.07%의 NO 생성율을 보여 항염능이 있음을 확인하였다.

TNF- α 의 경우 미강 추출물은 100 μ g/mL에서 통계적으로 유의미한 감소를 보였으나, 발효 미강 추출물은 두 균주 모두 25 μ g/mL에서 통계적으로 유의미한 감소를 보였다.

IL-1 β 의 경우 미강 추출물은 모든 농도에서 통계적으로 유의미한 감소를 보이지 못했으나, 발효 미강 추

출물은 KCTC 7806은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A8은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 통계적으로 유의미한 감소를 보였다.

IL-6의 경우 미강 추출물은 모든 농도에서 통계적으로 유의미한 감소를 보이지 못했으나, 발효 미강 추출물은 KCTC 7806은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A8은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 통계적으로 유의미한 감소를 보였다.

이를 통해 발효가 미강 추출물의 단점인 독성을 감소시키는 동시에 기능성 역시 증가시킬 수 있으며, 특히 *S. fibuligera* A8 균주가 발효에 적합함을 확인하였다.

동시에 *S. fibuligera* A8의 사균체가 세포 성장에 도움을 주는 동시에 NO 생성 억제능, 염증성 cytokine의 억제능을 지니고 있어, 미강 발효 추출물의 효과 중 일부가 *S. fibuligera* A8의 균체로부터 유래된 것을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- [1] S. I. Liochev. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 1-4.
DOI : 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011
- [2] J. Lee, N. Koo & D. B. Min. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.
DOI : 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x
- [3] B. Drew & C. Leeuwenburgh. (2002). Aging and the role of reactive nitrogen species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959(1), 66-81.
DOI : 10.3390/nul1081806
- [4] S. W. Kang. (2013). Role of Reactive Oxygen Species in Cell Death Pathways. *Hanyang Medical Reviews*, 33(2), 77-82.
DOI : 10.7599/hmr.2013.33.2.77
- [5] A. A. Alfadda & R. M. Sallam. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
DOI : 10.1155/2012/936486
- [6] J. Yoo, J. Yun, K. Seol, M. Oh. & J. Ham. (2020). Oxidative Stress and Alzheimer's Disease. *Journal of Dairy Science and Biotechnology*, 38(3), 134-141.
DOI : 10.22424/jdsb.2020.38.3.134
- [7] A. El-Kenawi & B. Ruffell. (2017). Inflammation, ROS, and mutagenesis. *Cancer cell*, 32(6), 727-729.
DOI : 10.1016/j.ccell.2017.11.015
- [8] Y. J. Kim et al. (2012). Quantification of γ -Oryzanol Components and Comparison Its Biological Activity in Brown Rice. *The Korean Journal of Food and Nutrition*, 25(3), 499-504.
DOI : 10.9799/ksfan.2012.25.3.499
- [9] T. Akihisa et al. (2000). Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2313-2319.
DOI : 10.1021/jf000135o
- [10] G. Y. Chae, R. H. Kwon, M. W. Jang, M. J. Kim & B. J. Ha. (2011). Whitening and antioxidative effect of rice bran fermented by *Bacillus subtilis*. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 37(2), 153-159.
DOI : 10.15230/SCSK.2011.37.2.153
- [11] Y. Yu, J. Zhang, J. Wang & B. Sun. (2019). The anti-cancer activity and potential clinical application of rice bran extracts and fermentation products. *RSC advances*, 9(31), 18060-18069.
DOI : 10.1039/C9RA02439E
- [12] S. B. Jeon, J. A. Jeon & B. G. Jeong. (2010). Anti-oxidative Activities and Tyrosinase Inhibition Ability of Rice Bran Ethanol Extract. *Journal of The Korean Society of cosmetology*, 16(2), 602-606.
- [13] S. M. Bae et al. (2002). Effect of γ -Irradiation on the Antioxidant Activity of Rice Hull, Rice Bran and Barley Bran. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 31(2), 246-250.
DOI : 10.3746/jkfn.2002.31.2.246
- [14] J. S. Choi et al. (2013). Cytotoxicity and single-dose oral toxicity testing for rice bran supercritical CO₂ extract. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 5(4), 215-220.
DOI : 10.1007/s13530-013-0175-4
- [15] N. R. Reddy & M. D. Pierson. (1994). Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. *Food Research International*, 27(3), 281-290.
DOI : 10.1016/0963-9969(94)90096-5
- [16] Z. Chi, Z. Chi, G. Liu, F. Wang, L. Ju & T. Zhang. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnology advances*, 27(4), 423-431.
DOI : 10.1016/j.biotechadv.2009.03.003
- [17] E. Y. Son, S. M., Lee, M. Kim, J. A. Seo & Y. S. Kim. (2018). Comparison of volatile and non-volatile metabolites in rice wine fermented by *Koji* inoculated with *Saccharomycopsis*

fibuligera and *Aspergillus oryzae*. *Food Research International*, 109, 596-605.

DOI : 10.1016/j.foodres.2018.05.008

- [18] D. H. Choi, E. H. Park & M. D. Kim. (2014). Characterization of Starch-Utilizing Yeast *Saccharomycopsis fibuligera* Isolated from Nuruk. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 42(4), 407-412.
DOI : 10.4014/kjmb.1409.09006
- [19] M. J. Crowe, R. B. McNeill, D. J. Schlemm, D. G. Greenhalgh & S. J. Keller. (1999). Topical application of yeast extract accelerates the wound healing of diabetic mice. *Journal of Burn Care and Rehabilitation*, 20(2), 155-163.
- [20] C. Jakkawanpitak, N. Hutadilok-Towatana & D. Sermwittayawong. (2020). Fungal-like particles and macrophage-conditioned medium are inflammatory elicitors for 3T3-L1 adipocytes. *Scientific reports*, 10(1), 1-16.
DOI : 10.1038/s41598-020-66283-4
- [21] J. H. Jang, H. G. Lee, J. T. Bae, J. S. Lee & B. Y. Hwang. (2020). Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Fermented Blackcurrant Fruit Extracts with *Saccharomycopsis fibuligera*. *Journal of the society of cosmetic scientists of Korea*, 46(4), 403-413.
DOI : 10.15230/SCSK.2020.46.4.403

박 용 원 (Yong-Won Park)

[정회원]



- 2002년 2월 : 한국방송통신대학교 환경보건학과 (보건학사)
- 2006년 8월 : 건국대학교 생물공학과 (공학석사)
- 2021년 8월 : 건국대학교 생물공학과 (공학박사수료)

- 2020년 2월 ~ 현재 : 경동대학교 임상병리학과 교수
- 관심분야 : 임상병리, 항산화
- E-Mail : stronghead @hanmail.net

이 상 현(Sang-Hyun Lee)

[정회원]



- 2005년 8월 : POSTECH 화학공학과 공학박사
- 2009년 3월 ~ 현재: 건국대학교 생물공학과 교수
- 관심분야 : 화장품, 헤어
- E-mail : sanghlee@konkuk.ac.kr