

저온 초음파 추출에 의한 *Spirulina maxima* 면역활성 증진

오성호 · 한재건 · 하지혜 · 김 영 · 정명훈 · 김승섭 · 정향숙
최근표¹ · 박옥연¹ · 강도형² · 이현용^{3*}

강원대학교 BT특성화학부대학, ¹강원도립대학 식품가공제과제빵과,
²한국해양연구원, ³강원대학교 생명과학연구소

Enhancement of Immune Activity of *Spirulina maxima* by Low Temperature Ultrasonification Extraction

Sung Ho Oh, Jae Gun Han, Ji Hye Ha, Young Kim, Myoung Hoon Jeong, Seong Sub Kim, Hyang Suk Jeong,
Geun Pyo Choi¹, Uk Yeon Park¹, Do Hyung Kang², and Hyeon Yong Lee^{3*}

College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

¹Department of Food Processing & Bakery, Gangwon Provincial University

²Korea Ocean Research & Development Institute

³Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

Abstract The marine microalga *Spirulina maxima* was extracted using water or ethanol at 100 or 80°C and by ultrasonification in water at 60°C. The ultrasonification technique generated the highest yield (19.8%). To be therapeutically useful, the extraction should yield a product with low cytotoxicity and high immunity against skin infections. The cytotoxicity of all extracts (1.0 mg/mL) was below 25%. Moreover, the cytotoxicity of the extract generated by ultrasonification was 5%. Extracts prepared in the described manners could inhibit hyaluronidase activity by up to 40% compared to the control. Increased growth of human B, T and NK cells and an increase in cytokine secretion were observed, confirming the interrelationship between both human immune and skin immune activity. The extract prepared by ultrasonification increased the growth of human B, T and NK cells up to 10.3×10^4 cells/mL, 11.3×10^4 cells/mL and 19.1×10^4 cells/mL, respectively. The extract prepared by ultrasonification also greatly increased the secretion of both IL-6 and TNF- α . Moreover, it was estimated that protein, Na and leucine occupy a high ratio. Accordingly, this study has confirmed that extracts prepared as described have the potential to effectively increase skin immunity.

Key words: *Spirulina maxima*, cytotoxicity, cytokine, NK cell, hyaluronidase

서 론

*Spirulina*는 약 35억 년 전에 지구상에 나타난 조류로 주로 열대 지방의 염호에서 서식하며, 길이는 300-500 μ m, 너비 8 μ m로, 그 모양이 나선형이어서 *Spirulina*라는 이름이 붙여졌다. 현재 35종 정도가 밝혀져 있으며, 아프리카와 중남미의 열대 및 아열대 지방의 호수에서 성장한다. 그 중 산업용으로 배양 생산되고 있는 *Spirulina*는 *Arthrospira maxima*와 *Arthrospira platensis*로 특이하게 섬유소가 없는 세포막으로 인해 체내에서 소화와 흡수가 빠르고, 상대적으로 낮은 핵산을 함유하고 있으며, 단백질 55-70%, 지방 6-9%, 탄수화물 15-20%와 다량의 무기질, 비타민, 섬유질 및 색소 성분을 함유하고 있다. 이미 식품과 화장품의 천연 색소로 첨가되고 있어 새로운 기능성 연구를 통한 향상 제품으로의

응용 가능성이 매우 크다. 최근 연구를 통해 스피롤리나는 지방의 소화를 돕는 작용을 할 뿐만 아니라 항산화능을 증진시키는 청색의 피코시아닌은 물론 비타민 B12와 항산화제 역할을 하는 phenolic acid, tocopherols 등을 다량 함유하고 있다고 보고되고 있다(1,2). 또한 carotenoid 색소와 phycocyanin, novel sulfated polysaccharide 등이 잠재적인 항암 효과 및 항 노화, 색소 및 종양 전이 억제, 항산화에 대한 효과를 나타낸다는 연구도 보고되어 있다(3-6).

본 연구에 사용된 주요 종으로 *Spirulina maxima*는 기존 연구를 통해 많이 알려진 *Spirulina platensis*에 비하여(7-9), 연구되어진 바가 적음에도 불구하고 해수 대량 배양이 쉬우며, 단백질 함량이 약 10%가량 더 높고, 삼면이 바다인 우리나라로서는 *S. maxima*의 대량생산 공정을 통한 기능성 소재로의 연구조건을 충분히 갖추어 연구가 이루어질 경우 활용 면에서 가치가 높을 것으로 생각한다. 하지만 아직까지 연구가 많이 이루어져 있지 않아 유용물질 생산량 증진 및 분리 방법 등이 정립되지 않았다. 따라서 이에 대한 연구 개발을 통한 기능성 향상 소재의 개발은 학술적 연구는 물론 기술적 경제적으로 다양한 가치를 지닌다. 현재 화장품 산업에는 약품이 첨가된 기능성 화장품 혹은 약용 화장품 개념이 도입되어 세계적으로 폭넓게 이용되고 있다(3,9-11).

따라서 본 연구에서는 인간의 면역체계와 피부면역과의 상관

*Corresponding author: Hyeon Yong Lee, College of Bioscience and Biotechnology, Division of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea
Tel: 82-33-250-6455
Fax: 82-33-253-6560
E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr
Received April 2, 2009; revised May 12, 2009;
accepted May 18, 2009

성에 대한 폭넓은 연구 자료를 바탕으로 *S. maxima*의 피부면역 활성 증진의 소재로서의 가능성을 확인하기 위해 인간 면역 체계에 중요한 역할을 하는 면역 B 세포, T 세포 및 Natural Killer(NK) 세포의 생육 측정과 IL-6와 TNF- α 와 같은 cytokine의 분비량 측정을 통한 면역 조절 기능을 확인하면서, 항염증 효과의 hyaluronidase 저해 활성 효과를 비교했다. 또한 *S. maxima*의 식품 화학적 조성과 아미노산 조성을 *S. platensis*와 비교하여 유용 성분을 분석하였다. 따라서 *S. maxima*의 새로운 항장 원료로서의 가능성을 확인함으로써 새로운 피부면역 증진이 가능한 소재 원료로써 활용하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 추출

본 실험에 사용한 시료는 해수에서 배양된 *Spirulina maxima* (UTEX, LB2495, USA) 105°C에서 3일간 건조한 분말로, 추출 방법은 100°C와 초음파 병행 60°C 물 추출물, 80°C EtOH 추출물인데, 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량에 대해 각각 10배의 용매를 이용해 3시간 추출하고, 각 추출물들은 감압 여과 및 농축 후 동결건조를 통해 분말시료로 각각의 수율을 계산하였다.

시약

실험에 사용된 세포는 미국 ATCC로부터 분양받았으며, 면역 세포 생육 증진 효과에 이용된 T cell(Jurkat (T lymphocytes: acute T cell leukemia), ATCC, Manassas, VA, USA), B cell (Raji (B lymphocytes: human burkitts lymphoma), ATCC), Natural Killer cell(NK-92MI cell, ATCC)을 사용하였다. 실험에 사용된 정상세포, 면역세포는 RPMI 1640 배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, NK-cell은 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myo-inositol, 20 mM folic acid, 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum을 첨가시켜 배양하였다. 이러한 면역세포 및 피부세포의 배양을 위한 배지로 HEPES buffer, Dulbeccos modified eagle medium(DMEM)과 RPMI1640, 혈청인 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 사로부터 구입하여 사용하였다. Gentamycin sulfate, sodium chloride, sodium bicarbonate, trypsin-EDTA는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였으며, 그 외 시약들과 추출 용매인 ethanol, 분획용매인 chloroform, hexane 등의 유기용매들은 Sigma Aldrich사의 특급 시약을 사용하였다.

이화학 성분 분석

아미노산 함량은 Association of Official Agricultural Chemists (AOAC)법에 따라 아미노산 분석기로 분석하였다(12). 즉, 시료 10 g을 냉각 아세톤으로 탈수시킨 후 60°C의 dry oven에서 여과지에 퍼서 건조시키고 마쇄하였다. 경질시험관(1.6×1.6 cm)에 마쇄시료 5 mg을 취하여 6N-HCl 5 mL 가하여 탈기한 후 밀봉하여 110°C에서 24시간 가수분해시켰다. 이를 50 mL의 원심분리관에 옮기고 용기를 0.01 N HCl용액으로 잘 씻어 원심분리관에 합치고 여기에 2 N NaOH용액 2 mL를 넣고 중화한 후 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 따로 취하여 60°C의 수욕 상에서 질소가스를 통과시키면서 농축하고 잔류물을 0.02 N HCl 20 mL에 녹이고 이를 0.45 μ m filter로 여과한 후 시험용액으로 하였다. 정량은 아미노산 혼합 표준용액과 시험용액을 아미노산 분석기인 System 6300 hyperperformance analyzer(Beckman Coulter,

Fullerton, CA, USA)에 주입하여 chromatogram의 peak 면적으로 계산했으며, 비교를 위해 대조군으로 *Spirulina platensis*를 같은 방법으로 실험하였다. 아미노산 분석에 사용된 컬럼은 Li 10 cm column No. 33805 Ion-exchange(Beckman Coulter)을 사용하였으며, 분석 조건은 150 min, buffer flow rate 20 mL/h, ninhydrin flow rate 10 mL/h, 컬럼 압력 1380 psi, 50 μ L로 주입하며, 질소 가스압은 40 psi로 유지한다.

AOAC법에 따라 분석한 일반성분 분석은 수분 함량이 105°C 상압건조법, 회분 함량은 550°C에서 직접회화법을 이용하여 분석하였다. 조단백질 함량은 micro-kjeldahl법을 이용한 단백질 자동 분석기(FOOS 1035 analyzer, Tecator, Sweden)로, 조 지방 함량은 Soxhlet 법을 이용하여 분석하였다. 소화성당질 함량은 위의 측정치를 합한 값을 100에서 뺀 값으로 하였다.

무기질(Ca, P, Mg, K, Na, Fe, Zn, Cu, Mn) 함량 분석 역시 AOAC법 의하여 분석하였다. 즉, 시료를 0.1 mg 단위까지 정확히 칭량하여 550°C에서 6시간 동안 회화시킨 다음, 20°C sand bath 상에서 5 mL의 HNO₃ 용액을 가하여 10분 동안 가온하고 방냉 후, 25 mL volumetric flask에 넣고 증류수를 가해 여과하면서 (whatman filter paper No. 41) 정용한다. 이렇게 여과된 여과액을 각 희석용액으로 적절한 농도로 희석한 후 Inductively Coupled Spectrometer(Perkin Elmer Instruments, Shelton, CT, USA)를 이용한 유도결합 Plasma 방출분석법으로 분석하였으며, 분석 조건은 nebulizer pressure 3.5 bars for meinhard type C, aerosol flow rate 0.3 L/min, sheath gas flow 0.3 L/min, cooling gas 12 L/min로 하였다.

정상 세포(HEK293)에 대한 세포독성 측정

세포독성은 sulforhodamine B (SRB) assay 방법을 통해 인간 신장 세포인 HEK293(ATTC)을 이용하여 측정하였다. HEK293 세포를 96 well plate에 4-5×10⁴ cells/mL로 분주한 후 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)한 후, 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL로 제조한 각각의 시료를 100 μ L씩 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) trichloroacetic acid(TCA) 100 μ L를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4-5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) 아세트산에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100 μ L씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% 아세트산 용액으로 4-5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μ L를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (Thermo max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(13).

항 염증 효과의 hyaluronidase 저해 활성

피부 염증 억제효과를 평가하기 위하여 유기 용매인 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water fraction으로 순차적으로 분획 추출하여 hyaluronidase 저해활성을 측정하였다. Hyaluronidase 억제효과는 Rooster Comb에서 형성된 N-acetylglucosamine의 양을 분광광도계로 측정하여 활성을 판단하였다. 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase(7,900 unit/mL) 50 μ L에 시료의 추출물을 최종농도가 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL가 되도록 20 μ L를 가하고, 효소의 활성화를 위해 12.5 mM의 CaCl₂ 200 μ L를 혼합한 후 37°C 수욕 상에서 20분간 배양시켰다. 대조군은 DMSO 용액을 넣고 수욕 상에서 20분간 배양하였다. Ca²⁺로 활성화된 hyaluronidase 용액에 0.1 M acetate buffer(pH

3.5)에 녹인 hyaluronic acid (12 mg/5 mL) 250 μ L를 첨가하여 다시 수욕 상에서 40분간 배양하였다. 배양 후 0.4 N NaOH 용액 100 μ L와 0.4 M potassium tetraborate 100 μ L를 반응 혼합물에 첨가하여 끓는 수조에서 3분간 배양시킨 후 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 dimethyl aminobenzaldehyde 용액(*p*-dimethyl aminobenzaldehyde 4 g, 100% acetic acid 350 mL 및 10 N HCl 50 mL 혼합액) 3.28 mL를 반응 혼합물에 첨가한 후 37°C 수욕 상에서 20분간 배양한 후 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해비율은 다음과 같이 계산하고, 효소의 활성을 50% 저해하는 농도를 내삽에 의하여 구하고, 이를 IC₅₀ 값으로 한다.

$$\text{Hyaluronidase Inhibition(\%)} = \frac{(\text{ODc} - \text{ODs})}{\text{ODc}} \times 100$$

여기서 ODc는 대조군의 OD(optical density)이고, ODs는 시료 용액의 585 nm에서의 OD값이다(14).

면역세포 생육 증진 효과 및 cytokine 분비량 측정

면역 기능 증강 효과는 면역 세포인 T 세포(Jurket)와 B 세포(Raji)를 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 24 well plate에 세포를 1.0 \times 10⁴ cells/mL의 농도로 분주하여 6일 동안 배양하면서 매일매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포수를 측정하여 생육 증강도를 측정하는 방법을 사용하였다. Cytokine은 IL-6와 TNF- α 의 정량을 IL-6와 TNF- α 의 정량 kit(Chemicon, Billerica, MA, USA)을 사용하여 측정하였다. Jurkat과 Raji 세포를 24 well plate에 1-2 \times 10⁴ cells/mL 농도로 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 0.5 mg/mL의 농도의 시료를 처리하였다. 원심 분리기를 이용해 배양 배지의 상층액을 취한 다음, Sunrise(Tecan, Grodig, Austria)를 이용해 450 nm에서 microplate reader(Thermo max, Molecular Devices)를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교해 cytokine의 양을 측정하였다(13,15,16).

Natural killer(NK) cell의 면역증진 효과

NK-92MI cells을 α -MEM 배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 2-mercaptomethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)에 2 \times 10⁷ cells/mL의 농도로 희석시켜 사용하였다.

인간 B세포를 T-25 Flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식도를 관찰하면서 3-4번의 계대 배양 후 세포를 원심 분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI cell을 24 well plate에 4-5 \times 10⁴ cells/mL로 900 μ L씩 분주하고 24시간 후 B세포의 상층액을 각 plate에 100 μ L씩 투여하여 배양 48시간 후 6일 동안 NK-92MI cell의 활성도를 cell counter를 이용하여 살아있는 세포수를 측정하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정한다(17).

통계처리

실험결과는 triplicate determinations에 의한 Mean \pm SD로 표시했으며, 각 평균치 간의 차이는 ANOVA test에 의해 *p*=0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

Spirulina maxima의 일반식품 성분 분석

Spirulina maxima의 일반조성 및 무기질의 분석 결과를 Table

Table 1. Comparison of chemical composition of *S. maxima* and *S. platensis*

Component	<i>S. maxima</i> (%(w/w))	<i>S. platensis</i> (%(w/w))
Carbohydrate	14.42	16.21
Crude protein	56.59	56.14
Crude fat	0.94	0.75
Water	5.03	4.92
Ash	23.02	20.98

Table 2. Comparison of several mineral compositions of *S. maxima* and *S. platensis*

Composition	<i>S. maxima</i> (mg/100 g)	<i>S. platensis</i> (mg/100 g)
Ca	2.38	1.16
Fe	5.34	3.02
K	24.26	25.32
Mg	3.52	2.03
Mn	0.03	1.23
Na	65.80	56.32
Zn	0.01	1.32
P	13.31	10.62

1과 Table 2에 각각 나타내었다. 먼저 일반조성 분석결과 *S. maxima*는 조단백질이 55.59%로 가장 높은 비율을 차지하고 있으며, 탄수화물과 회분량이 각각 14.42, 23.02%로 비교적 높은 비율을 나타내었다. 이에 비해 *S. maxima*와 *S. platensis* 모두 조지방과 수분 함량은 비교적 낮은 결과를 보였다. 또한 무기질의 분석결과 나트륨이 65.80 mg/100 g으로 60% 이상을 차지하였다. 두 *Spirulina* 모두 나트륨과 칼륨이 대부분의 무기질을 구성하였으며, 특히 *S. maxima*의 경우는 피부 면역에 도움이 되는 성분들이 *S. platensis*에 비해 높은 비율을 차지하고 있는 것으로 나타났다.

또한 Table 3을 통해 *S. maxima*와 *S. platensis*의 19종의 아미노산 조성을 나타내었다. Glutamic acid의 함량이 15.08%로 구성 아미노산중 많은 부분을 차지하고 있었으며, *S. platensis*와 비교하여 필수 아미노산 7종 중 하나인 leucine과 tyrosine의 함량이 각각 9.83, 4.57%로 월등히 많이 함유되어 있었다. Leucine은 뼈, 피부, 근육조직의 성장과 재생, 헤모글로빈의 중요한 구성성분의 아미노산으로 *S. maxima*의 경우 인체에 필요한 필수 아미노산의 함량이 상대적으로 풍부하여 기능성 식품으로서의 가치 뿐만 아니라 이를 이용하여 인간의 인체에 직접적으로 작용하는 화장품 원료로써 이용하여 피부 면역 증진에 기여할 것으로 사료된다.

정상 세포(HEK293)에 대한 세포독성 측정

S. maxima 추출물의 인간 신장 정상 세포에 대한 세포독성을 sulforhodamine B assay를 사용하여 측정된 결과 모든 추출물에서 세포독성은 0.2-1.0 mg/mL로 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 최고 농도 투여 농도인 1.0 mg/mL에서 80°C EtOH 추출물이 24.5%의 가장 높은 독성을 보였으며, 100°C 물 추출물에서 21.3%, 60°C 초음파 병행 물 추출물에서 18.5%의 효과를 나타내어 정상 세포에 대한 세포독성이 비교적 낮은 것으로 나타났다(Fig. 1).

이 결과를 바탕으로 연구되어진 *S. platensis*와 비교하여 최고 농도인 1.0 mg/mL에서 대부분 26% 이하의 세포독성을 나타내는 것으로 알려진 것에 비해(18) 낮은 세포 독성을 나타내었다. 앞선 연구와 추출 조건이 달라 더 낮은 세포독성을 나타내었을 것으로 사료되며 이와 동시에 본 연구 과정에서 더 효과적인 추출

Table 3. Comparison of essential amino acids of *S. maxima* and *S. platensis*

Composition	<i>S. maxima</i>	<i>S. platensis</i>
	Content (%)	Content (%)
Aspartic Acid	9.83	10.42
Threonine	5.26	5.92
Serine	5.03	4.79
Glutamic Acid	15.08	14.93
Proline	3.43	4.51
Glycine	5.48	5.07
Alanine	8.23	7.61
Cystine	0.27	0.56
Valine	6.63	6.76
Methionine	1.37	3.10
Isoleucine	5.94	6.76
Leucine	9.83	0.85
Tyrosine	4.57	0.56
Phenylalanine	5.03	6.76
Lysine	5.26	7.04
Ammonia	0.27	1.41
Histidine	1.60	2.54
Tryptophan	0.07	0.00
Arginine	6.86	10.42
	100.00	100.00

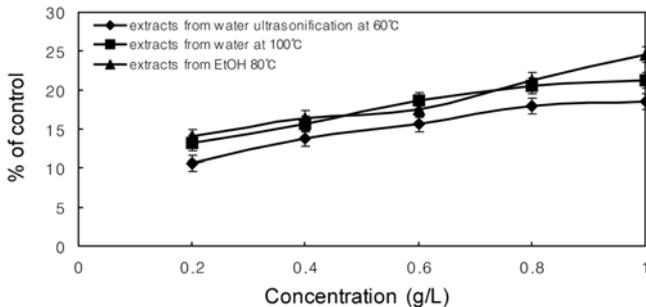


Fig. 1. Cytotoxicity of *S. maxima* extracts on human embryonic kidney (HEK293) cells. Results are expressed as mean±SD of data obtained from three independent experiments.

조건을 정립한 것으로 생각된다. 따라서 *S. maxima*는 인체에 큰 독성을 나타내지 않았으며, *S. maxima*의 색소 단백질 물질은 60°C에서 변성이 일어나지 않고, 초음파를 이용한 증류수 추출 방법에서 가장 많이 추출되는 것으로 사료되므로, 앞으로 향장 원료로써 사용이 가능하다.

항염증 효과의 hyaluronidase 저해 활성 효과

*S. maxima*의 피부 면역 및 항염증 효과 여부를 확인하기 위해 각 추출물의 hyaluronidase 활성 저해 효과를 측정 하였다. Hyaluronidase는 고분자 hyaluronic acid의 분해 효소인데, 이 효소의 저해는 항염증 효과를 기대할 수 있다. 각 분획물의 농도별로 결과를 Fig. 2에 나타내었는데, 각 분획물의 5가지 농도를 준비해서 각 농도에 따른 저해율을 구하였다. 60°C 초음파 병행 물 추출물과 100°C 물 추출물의 경우 1.0mg/mL 농도일 때 각각 62.4, 60.2%의 저해 활성을 나타내었으며, 80°C 에탄올 추출물의 경우 상대적으로 낮은 57.2%의 저해 활성을 나타내었다. 실험결과 60°C

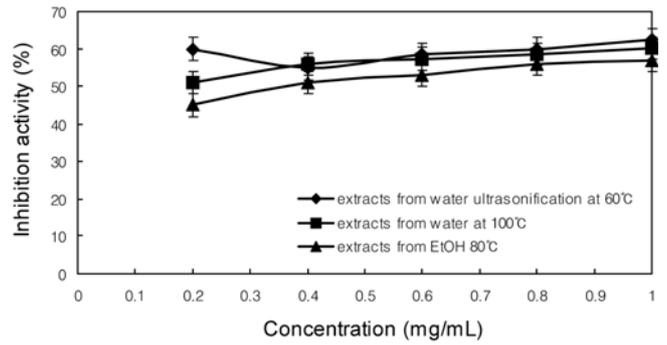


Fig. 2. Hyaluronidase inhibition activity of *S. maxima* under different extraction conditions. Results are expressed as mean±SD of data obtained from three independent experiments.

초음파 병행 물 추출물이 가장 높은 hyaluronidase의 저해를 보임으로써 항염증 효과를 기대할 수 있으며, 모든 추출물이 40% 이상의 저해 활성을 나타내어 *S. maxima*의 피부 면역 및 항염증 효과를 기대할 수 있다.

*S. platensis*의 hyaluronidase 활성 저해 효과에 대해 알려진 연구가 없으므로, 복분자를 이용한 연구 자료에서는 증류수 분획층이 가장 높은 세포 분화 활성도를 보이며, 초음파 병행 추출물에 비해 최고 20% 이상의 분화 활성도를 나타내었다(19). 이것은 분획으로 인해 초음파를 병행한 추출물들보다 분화유도 물질의 증가와 이로 인한 세포의 신호 전달 체계가 신속하게 이루어져 분화도가 증가한 것으로 사료된다. 이와 비교하여, *S. maxima* 추출물은 높은 면역 활성을 나타내는 유용 성분을 함유하고 있어 증류수층으로 추출을 통해 면역 활성의 증진이 가능함을 확인하였다. 따라서 향후 여러 조성을 통한 분획 후, 분리 및 구조 규명을 통해 향장 원료로서의 가능성을 증가시키고자 한다.

면역세포 생육 증진 효과 및 cytokine 분비량 증진

인간의 면역 체계에 중요한 역할을 하는 면역 세포인 T세포, B세포의 면역 증진 효과를 확인하기 위하여 면역 B세포와 T세포의 생육 촉진 효과를 생육도와 생육도에 따른 cytokine의 분비량 측정을 통해 확인하였다(Table 4, Fig. 3-4). T 세포의 생육도의 경우 보면 대조군과 실험군이 모두 측정 1일부터 6일까지 계속적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 최대 생육도를 나타낸 6일째 100°C 물 추출물, 80°C 에탄올 추출물은 각각 11.3%, 11.0%의 생육도를 나타내었으며, 60°C 초음파 병행 물 추출물의 경우 12.8×10^4 cells/mL로 가장 높은 생육도를 나타내 무첨가 대조군의 10.3×10^4 cells/mL와 비교하여 생육을 유의적으로 증가시켰음을 확인할 수 있었다(Table 4). B 세포의 생육도의 경우도 T 세포의 생육도와 유사한 결과를 보여주었다. 최대 생육도를 나타낸 6일째 60°C 초음파 병행 물 추출물의 경우 11.3×10^4 cells/mL로 무첨가 대조군의 9.0×10^4 cells/mL보다 B 세포의 생육 도를 증가시킨 것으로 나타났다. 따라서 *S. maxima*의 B 세포와 T 세포의 생육을 증가시키는 경향을 확인할 수 있었다. 이를 통해 6일째 배양에서 생육 증진이 높아지는 것으로 보아 가시적인 면역증강 효과를 나타낼 것이 기대되며 낮은 세포독성을 가지는 것으로 고려하면 인간의 면역 증진 측면에서 효과적으로 작용할 수 있음을 알 수 있다.

또한 면역 세포들이 분비하는 cytokine(IL-6, TNF- α)의 분비량을 나타내었는데, T 세포의 생육에서 측정된 결과에서 각 추출 시료 첨가를 통한 세포 당 cytokine의 분비를 살펴보면, 최대 생

Table 4. The growth of human immune T, B cell in adding 0.5 mg/mL of *S. maxima* extracted from various extraction conditions

Extraction condition of sample		Cultivation time (day)	1	2	3	4	5	6
T cell	Viable cell density ($\times 10^4$ cells/mL)	Extracts from water ultrasonification at 60°C	3.3±0.02	4.3±0.04 ^a	6.2±0.05 ^b	8.3±0.06 ^c	10.8±0.07 ^a	12.8±0.08 ^b
		Extracts from water at 100°C	3.1±0.08	4.0±0.07 ^a	5.5±0.11 ^a	7.3±0.13 ^a	9.5±0.16 ^b	11.3±0.18 ^c
		Extracts from EtOH 80°C	2.8±0.06	3.5±0.09 ^a	5.8±0.07 ^a	7.3±0.08 ^a	9.1±0.10 ^c	11±0.09 ^b
		Control	2.8±0.10	3.5±0.13	4.8±0.09 ^a	6.3±0.07 ^c	8.5±0.11 ^c	10.3±0.16
B cell	Viable cell density ($\times 10^4$ cells/mL)	Extracts from water ultrasonification at 60°C	3.1±0.06	4.3±0.03 ^a	6.3±0.08 ^c	8.4±0.10 ^a	9.8±0.11 ^b	11.3±0.09 ^a
		Extracts from water at 100°C	2.8±0.09	3.8±0.10 ^c	6.2±0.11 ^a	7.8±0.13 ^a	9.3±0.10 ^c	10.8±0.7 ^c
		Extracts from EtOH 80°C	2.8±0.07	3.3±0.09 ^b	4.8±0.07 ^a	6.3±0.06 ^c	8.4±0.08 ^c	9.3±0.09 ^a
		Control	2.5±0.07	3.1±0.08 ^b	4.5±0.12 ^a	5.8±0.08 ^a	7.5±0.09 ^c	9.2±0.08

Values are expressed as mean±SM of data obtained from three independent experiments.

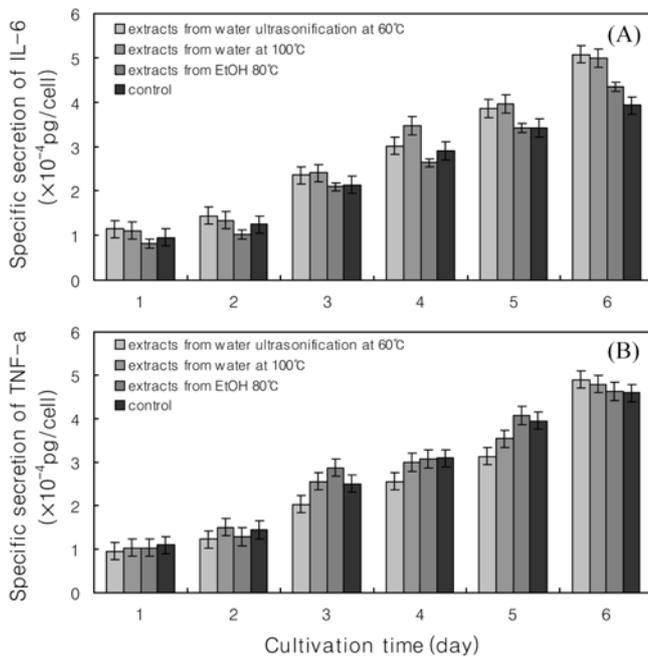


Fig. 3. Secretion of IL-6 and TNF- α from human immune T cells in adding 0.5 mg/mL of the extracts. Results are expressed as mean±SD of data obtained from three independent experiments. (A) IL-6 (B) TNF- α

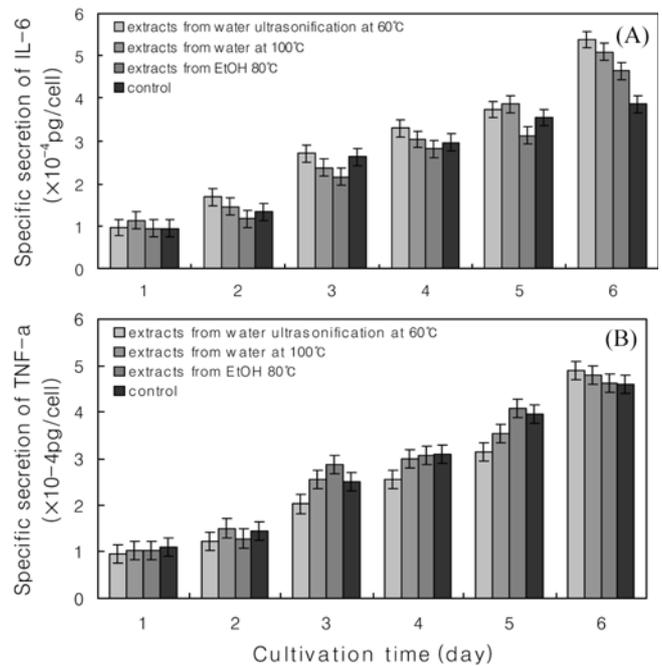


Fig. 4. Secretion of IL-6 and TNF- α from human immune B cells in adding 0.5 mg/mL of the extracts. Results are expressed as mean±SD of data obtained from three independent experiments. (A) IL-6 (B) TNF- α

육을 나타낸 6일째 IL-6와 TNF- α 를 가장 많이 분비하는 60°C 초음파 병행 물 추출물에서 각각 5.08×10^{-4} pg/cell, 4.90×10^{-4} pg/cell을 분비하며, 각각 3.93×10^{-4} pg/cell, 4.6×10^{-4} pg/cell을 분비하는 대조군에 비해 증가된 분비량을 나타낸 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 마찬가지로 B 세포의 생육을 통해 분비되는 cytokine 양을 측정된 결과에서도 각 추출물에 대한 세포 당 IL-6와 TNF- α 의 분비량에서 60°C 초음파 병행 물 추출물에서 추출한 IL-6와 TNF- α 를 각각 5.38×10^{-4} pg/cell, 5.89×10^{-4} pg/cell로 각각 3.87×10^{-4} pg/cell, 4.67×10^{-4} pg/cell을 분비하는 대조군에 비해 높은 유의적 증가를 보였다(Fig. 4).

위의 결과를 통해 *S. maxima* 각각의 추출물은 면역세포의 생육을 증진하는 성분을 가지고 있으며, 추출 조건에 따라 생육 증진 활성이 높아지며, cytokine의 분비량도 많아지는 것으로 사료된다. 따라서 *S. maxima*의 추출물 첨가를 통한 면역 세포의 생

육 증진 및 cytokine의 분비량 증가를 통해 면역 증진 소재로 활용 가능성이 있다는 것을 확인했으며, 이를 바탕으로 항장 실험 중 하나인 hyaluronidase 활성 저해 결과와의 연관성을 통해 피부의 면역증진 효과를 바탕으로 면역증진 화장품 소재로의 활용 가능성이 기대된다.

또한 다른 연구 결과에 따르면, *S. platensis*의 추출물을 농도별로 투여했을 때 T cell의 생육도를 알아 보았는데 수층 분획물은 면역 기능을 강화시킨다는 사실은 이미 널리 알려져 있는 것처럼 대조군과 별다른 차이가 없었지만, 핵산 분획물을 투여한 H9의 경우 최고 48.2%의 생육 증가율을 보였는데 이는 포함된 지질 성분이 활성 성분으로 작용하여 면역 기능을 강화시킨 것으로 사료된다는 결과를 보였다. 본 실험에서는 이와 달리 세 조건에서의 추출물을 통해 면역 활성의 연구를 진행하였으며, 최적의 추출조건을 비교할 수 있었다. 이와 같은 종인 본 실험의 *S.*

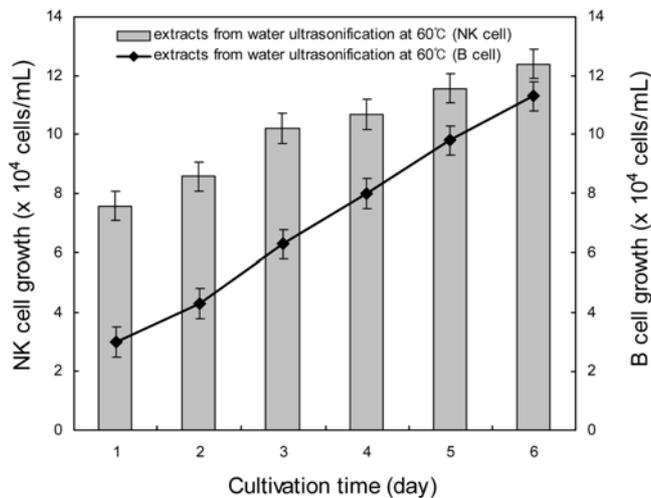


Fig. 5 Effects of *S. maxima* extracts on the enhancement of NK cell growth by adding the supernatant of human B cells. Results are expressed as mean±SD of data obtained from three independent experiments

*maxima*의 경우도 다른 논문의 연구와 같이 비슷한 지질 성분을 포함하고 있을 것으로 생각되어 추가 분리를 통한 다른 물질에 대한 실험을 한다면 좀 더 높은 면역 증진 효과의 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

Natural killer(NK) 세포의 생육증진 효과

NK 세포의 면역증진 효과 실험은 앞의 실험인 면역 B세포의 생육 촉진 효과를 생육도와 생육도에 따른 cytokine의 분비량 측정을 통해 확인한 결과 가장 높은 활성을 나타낸 60°C 초음파 병행 물 추출물을 사용해 측정하였다. NK 세포의 활성 측정은 B 세포 추출물을 첨가한 후 그 배양액을 NK 세포에 첨가함에 따른 생육도의 변화를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 활성을 측정하였다. Fig. 5는 B 세포에 각 시료를 첨가하여 배양 후 그 배양액을 NK 세포에 첨가하였을 때, NK 세포의 활성도를 나타낸 그림이다. 6일 동안 생육도를 관찰하였는데 시료에 대한 생육도가 배양 시간에 따라 유의적으로 증가하는 것을 나타내었고, 가장 높은 생육도를 나타낸 6일째 12.40×10⁴ cells/mL를 나타내어 11.49×10⁴ cells/mL를 나타낸 대조군에 비해 조금 높은 활성을 나타내었으며, 이로써 활성 물질을 포함하고 있음을 알 수 있다.

또한 NK 세포의 활성 측정은 시료를 첨가한 면역 B cell의 배양액을 NK 세포에 첨가하여 실험하였는데, 6일 동안 생육도를 관찰한 결과 6일째에 톡 유래 저분자 푸코이단이 14.5×10⁴ cells/mL의 생육을 나타내며, *S. maxima*에 비해 높은 생육 활성을 나타내었다. 또한 cytokine의 분비량 역시 생육도와 유사한 증가율을 보이며, *S. maxima*에 비해 좀 더 높은 면역 증진 효과를 나타내었지만, *S. maxima*가 거대조류가 아닌 미세조류인 것을 고려한다면 높은 활성을 나타내었다.

요 약

본 실험은 해수에서 배양된 *Spirulina maxima*를 100°C와 초음파 병행 60°C 물 추출물, 80°C EtOH 추출물을 이용하여 실험을 수행하였다. AOAC법에 의한 일반 조성 및 무기질, 아미노산 조성 분석결과 조 단백질과 무기질 중 나트륨이 각각 56, 60%의 비교적 높은 비율을 차지했으며, 다양한 균주의 필수 아미노산을

포함하고 있었다. 그중 피부와 관련된 leucine의 함량이 9.83%로 상대적으로 풍부하여 *S. maxima* 피부면역 활성 증진에 효율적인 소재의 가능성을 확인했다. 본 연구에서는 피부 면역과 인체 면역과의 밀접한 상관성이 있으므로 본 연구에서는 T 세포와 B 세포의 생육증진 및 cytokine의 분비량 측정과 NK 세포의 활성 및 항염증 효과인 hyaluronidase 저해 활성 효과를 측정하였다. 먼저 정상세포(HEK293)에 대한 세포독성 결과 인체에 큰 독성을 나타내지 않는 것으로 나타난 *S. maxima*를 추출조건에 따른 면역 증진 효과를 비교한 결과 60°C 초음파 병행 물 추출물이 면역 B 세포와 T세포에서 각각 11.3×10⁴ cells/mL, 12.8×10⁴ cells/mL로 6일째 가장 높은 생육도를 보였다, 이러한 면역 세포들이 분비하는 cytokine(IL-6, TNF-α)의 분비량은 가장 높은 생육도를 보인 60°C 초음파 병행 물 추출물을 첨가한 B세포, T세포의 경우 IL-6와 TNF-α는 유의적으로 증가된 분비량을 보이며, 면역 및 기능성 소재로서의 활성이 뛰어난 것으로 나타났다. B세포에 각 시료를 첨가하여 배양 후 그 배양액을 NK 세포에 첨가하였을 때, 6일 동안 생육도를 관찰하였는데 시료에 대한 생육도가 증가하며, 6일째 12.40×10⁴ cells/mL를 나타내어 11.49×10⁴ cells/mL를 나타낸 대조군에 비해 높은 활성을 나타내었으며, 이로써 활성 물질을 포함하고 있음을 알 수 있다. 또한 항염증 효과의 hyaluronidase 저해 활성 효과에서 60°C 초음파 병행 물 추출물이 1.0 mg/mL 농도일 때 62.4%의 저해 활성을 보여 100°C 이상의 고온 추출에서 야기되는 단백질이나 미립자 활성 물질의 파괴가 최소화되고 저온 초음파 추출 시 유용성분들의 용출량 증가와 새로운 물질들의 생산 혹은 활성변형에 의한 추출을 통해 인체면역과 피부면역 활성 증진에 활용이 가능한 효율적인 소재화가 가능한 것을 확인했다. 이로써, 본 연구 논문은 *S. maxima*의 물질 분리보다 피부면역관련 활성을 통한 소재로서의 탐색이 주목적 이므로 향후 이 추출물의 분리, 동정을 통해 피부 면역 활성도에 따라 물질의 구조 분석에 관한 연구를 보이코자 한다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 한국 해양 수산 연구원의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다(PM54740).

문 헌

1. Kay RA. Microalgae as food and supplement. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 30: 555-573 (1991)
2. Yang HN, Lee EH, Kim HM. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. Life Sci. 61: 1237-1244 (1997)
3. Hernandez AC, Nieves I, Meckes M, Chamorro G, Barron BL. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against Herpes simplex virus type 2. Antivir. Res. 56: 297-285 (2002)
4. Jeong SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. Korean J. Food. Sci. Technol. 27: 891-896 (1995)
5. Kim IS, Cho ZS. Modulation of human fibroblast proliferation and collagen production by prostaglandin E2. Korean Biochem. J. 26: 40-52 (1993)
6. Cho JH, Lee KM, Kim NS, Kang WH. The effects of whitening components on human melanocytes *in vitro*. Korean Cosmet. Sci. 23: 115-121 (1997)
7. Grinstead GS, Tokach SS, Goodband RD, Nelssen JL. Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weaning pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 83: 237-247 (2000)
8. Nandeesh MC, Gangadhara B, Manissery KK, Venkataraman LV. Growth performance of two Indian Major carps, catla (catla catla) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*.

- Bioresour. Technol. 80: 117-120 (2001)
9. Diego JM, Gomez C, Ibanez E, Ruperez FJ, Barbas C. Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. J. Chromatogr. A 1054: 227-233 (2004)
 10. Kaji T, Fujiwara Y, Inomata Y, Hamada C, Yamamoto C, Shimada S, Lee JB, Hayashi T. Repair of wounded monolayers of cultured bovine aortic endothelial cells is inhibited by calcium spirulan, a novel sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*. Life Sci. 70: 1841-1848 (2002)
 11. Lee HS, Lee SH, Mun HC, Lee HY. Screening of the Immunostimulatory activity of the marine alga *Chlorella capsulate*. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 18: 19-24 (2003)
 12. Thompson RH, Merola GV. A simplified alternative to the AOAC official method for cholesterol in multicomponent foods. AOAC Int. 76: 1057-1068 (1993)
 13. Lee MK, Choi GP, Ryu LH, Lee GY, Yu CY, Lee HY. Enhanced immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. extracts against human cell lines. Korean J. Med. Crop Sci. 12: 36-42 (2004)
 14. Kim YS, Noh YK, Lee GI, Kim YK. Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. Korean J. Pharm. 26: 265-272 (1995)
 15. Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baik KU. Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. Yakhak Hoeji 42: 296-301 (1988)
 16. Kwon SY, Lee HS, Lee SH, Im GI, Kim SN, Kim HS, Hwang SW, Hwang SY. Analgesic effect and inhibition of prostaglandin E2 Activity and pro-inflammatory cytokines production by ethyl alcohol extract from new herbal formula. Korean J. Pharmacogn. 37: 136-142 (2006)
 17. Limdbolum CK. IL-2 receptor signaling through the Shb adapter protein in T and NK cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 296: 929-936 (2002)
 18. Kim HS, Kim CH, Kim JH, Kwon MC, Cho JH, Gwak HG, Hwang BY, Kim JC, Lee HY. Comparison of anticancer activities from the culture and extraction conditions of the *Spirulina platensis*. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 34: 143-149 (2006)
 19. Choi SI, Lee YM, Heo TR. Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 18: 282-288 (2003)