

## 모자반 유산균 발효물의 비타민K 분석 및 항산화와 항염 효능

홍선미\*, 조현솔

환동해산업연구원, 산업연구부

\*,e-mail: hongsunmee@mire.re.kr

### Evaluation of Vitamin K Bioactivities from LAB-Fermented *Sargassum fulvellum*

Sun-Mee Hong \*, Hyun-Sol Jo

Dept. of Industry Research, MIRE

#### 요약

비타민K는 미량 영양소로 자연상태에서 식물 유래 비타민K1(PK)과 발효식품 유래 비타민K2(MKs)가 있으며, 이들은 혈액응고, 면역, 심혈관, 뼈건강 등의 효능에 대해 보고되었다. 본 연구에서는 식품 원료로 등록된 모자반인 팽쟁이모자반, 파베기모자반, 모자반, 알송이모자반, 지충이와 미등록된 왜모자반 모두 6종의 모자반 (*Sargassum* spp.) 및 *L. lactis* (KCCM12759P)/*L. mesenteroides* (KCCM12756P)으로 공배양한 유산균 발효물(*Sargassum\_LJLm*) 6종의 PK와 MKs를 확인하고, 그들의 항산화와 항염 효능을 분석하였다. PK와 MK4를 포함하는 6종 모자반 비타민 복합물(*Sargassum\_cVitK*)은 821.4–1,427.13 ng/g 농도 범위로 확인되었으며, 이 중 모자반(Sf, 1,427.13 ng/g)과 왜모자반(Sy, 1,405.98 ng/g)이 가장 높게 측정되었다. 또한, 모자반 발효물(*Sargassum\_LJLm\_cVitK*)은 PK와 MK4와 MK7이 확인되었고, 이 중 모자반(Sf)에서만 MK9의 생산이 확인되었다. *Sargassum\_LJLm\_cVitK*는 666.83–1,403.7 ng/g의 농도였으며, 이 중 왜모자반(*SyLJLm*, 1,403.7 ng/g)과 모자반(*SfLJLm*, 1,399.69 ng/g)이 가장 많은 것으로 확인되었다. DPPH에 의한 라디칼 소거 활성은 *Sargassum\_LJLm\_cVitK*(PK, MK4, MK7 또는 MK9)이 *Sargassum\_cVitK*(PK, MK4)보다 조금 높아지는 경향을 보였으며, 특히 파베기모자반 발효물(*SsLJLm\_cVitK*)은 73.94% 높은 활성을 보였다. LPS로 세포 손상이 유도된 Raw 264.7 대식세포의 NO 활성분석은 각 6종의 모자반(*Sargassum\_cVitK*)과 모자반발효물(*Sargassum\_LJLm\_cVitK*) 처리군 모두에서 NO 농도를 감소시켜 항염 효능이 확인되었으며, 특히 모자반 발효물(*SfLJLm\_cVitK*)과 지충이 발효물(*SiLJLm\_cVitK*)이 더 효과적인 NO 소거 활성이 있었다. 결론적으로 비타민 K1 함유 모자반과 메나퀴논 생산 기능의 *L. lactis*와 *L. mesenteroides* 공배양을 통해 긴사슬 MK7과 MK9의 생산이 가능하고, 모자반과 그 발효물의 cVitK는 항산화와 항염 효능이 있음을 제시하였다. 이 결과는 향후 해조류와 유산균 바이오공정에 의한 비타민K 생산 및 이들의 면역, 심혈관, 및 뼈건강 등에 관한 효능 연구에 도움이 될 것으로 사료된다.

#### 1. 서론(서체:KoPubWorld바탕체 Light, 크기: 12pt)

비타민은 생명유지의 기본 영양소로 호르몬, 보조효소, 항산화, 세포신호전달과 조직 성장 및 분화 등과 같은 다양한 건강과 면역 기능에 관여한다. 이들은 수용성 비타민인 비타민 C(ascorbic acid)와 B군 즉, B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B5 (pantothenic acid), B6 (pyridoxine), B7 (biotin), B9 (folic acid), B12 (cobalamin) 및 지용성 비타민인 비타민A, D, E와 K로 나누어진다. 대부분의 비타민은 체내에서 합성되지 않기 때문에 식품과 보조제 형태로 지속적인 섭취가 필요하다. 비타민은 기능성 식품(nutraceutical food)과 식이 보충제로 널리 사용되며, 화학적 합성, 천연물

추출, 미생물 발효 등 다양한 방식으로 생산되고 있다[1, 2]. 비타민K는 필수 식이 미량 영양소(micronutrient)로, 자연 상태에서 주로 녹색식물과 해조류에서 유래되는 비타민 K1(필라퀴논; phyloquinone; PK)과 발효 식품에서 유래되는 비타민 K2(메나퀴논; menaquinone; MKs)가 있으며, 이외에 화학적으로 합성한 비타민 K3(메나디온; menadione)가 있다[3, 4, 5]. 비타민 K는 2-methyl-1,4-naphthoquinone ring코어에 naphthoquinone ring 탄소3(C3) 사이드 사슬을 갖는 구조이다[6]. 비타민 K는 사이드 사슬의 길이에 따라 필라퀴논(PK)과 우유와 계란 등에 존재하는 짧은 메나퀴논 4(MK4)에서 미생물에 의한 청국장, 낫또, 치즈 등에서 확인되는 메나퀴논 5–13(MK5–13)이 있다[7]. 긴 사슬의 MK7과 MK9등은 짧은 사슬의 PK와 MK4보다 반감기(half-life)가 길고 생물활성도 다양하여 체내에서 흡수와 활용에 있어 유효한 것으로 알려져 있다[8, 10]. 비타민K는 정

상적인 혈액 응고(coagulation) 과정에 필요한 보조효소로 알려져 있으며, 최근 연구에서는 면역(immunity) 기능 강화, 심혈관(cardiovascular) 건강 보호, 뼈 건강(bone-health), 신경 보호(neuroprotection) 등 다양한 생리적 기능을 수행하는 것으로 보고되고 있다[11, 12]. 특히, 유산균(Lactic Acid Bacteria; LAB)은 식품 발효과정에서 비타민과 같은 유효한 포스트바이오틱스(postbiotics) 물질을 생산하는 프로바이오틱스(probiotics)로 널리 사용되며, 주요 발효 스타터 미생물로 활용되고 있다. 본 연구에서는 국내 식품원료로 등록된 5종 모자반인 팽생이 모자반, 파배기 모자반, 모자반, 알뽕이 모자반, 지충이와 미등록 종인 왜모자반의 비타민 K1(PK) 성분을 분석하였다. 또한, 이들 모자반을 프리바이오틱스로 활용하여 비타민K2 (MKs) 생산 유전자(men A-I)를 보유한 유산균인 *L. lactis* (KCCM12759P)와 *L. mesenteroides* (KCCM12756P)를 프로바이오틱스로 하여 공배양을 수행하였다. 해당 균주를 이용한 발효 과정을 통해 생성된 포스트바이오틱스인 MKs와 모자반에 함유된 PK에 대해 정량 및 정성 분석을 실시하여, 모자반 추출물(*Sargassum* spp.)과 유산균 모자반 발효물(*Sargassum\_LlLm*)의 비타민 K 함량을 비교 분석하였다. 또한, 이들 6종 모자반 추출물과 발효물의 항산화 및 항염 효과를 비교함으로써 비타민K를 포함한 모자반의 식·의약 기능성 소재로의 활용 가능성을 제시하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 재료 및 시료준비

본 실험에 사용한 팽생이 모자반, 파배기 모자반, 모자반, 왜모자반, 알뽕이 모자반, 지충이는 제주 해안에서 채취하여 건조한 분말을 Parajeju (Jeju, Korea, 2021)에서 구매하여  $-72^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하여 사용하였다.

### 2.2. 스타터 유산균 배양

모자반 발효에 사용된 균주는 환동해산업연구원(경상북도, 울진군)에서 동해안 해수에서 분리한 *L. lactis*\_TS95 (KCCM12759P; Ll)와 *L. mesenteroides*\_TS49 (KCCM12756P; Lm) 2종으로 한국미생물보존센터에 기탁한 후 실험에 사용하였다.

### 2.3. 추출물과 발효물 제조 및 비타민 K 추출

비타민K 정량·정성을 위한 시료로 팽생이모자반, 파배기모자반, 모자반, 왜모자반, 알뽕이 모자반, 지충이 건조 분말 각 10 g을 3차 증류수 200 ml (5%; w/v)로 제조한 후,  $121^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 멸균하여 모자반 추출물(*Sargassum*)로 준비하였다. 각 멸균된 모자반 추출물 200 ml (5%; w/v)에 Ll와 Ll

가 1:1 비율로 혼합된 배양액을 1%(v/v) 접종한 후  $26^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간동안 진탕 배양하여 6종 모자반 발효물(*Sargassum\_LlLm*)을 제조하였다

### 2.4. 비타민K정량을 위한 HPLC분석 조건

6종의 모자반 추출물과 발효물에서 분리한 cVitK는 정량·정성 분석을 위해 Kinetex C18 column ( $2.1 \times 50$  mm,  $2.6 \mu\text{m}$ ; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) 컬럼이 장착된 HPLC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 사용하였다.

### 2.5. 항산화 분석

모자반 추출물과 발효물의 cVitK의 항산화 효능을 분석을 위해 자유 라디칼의 하나인 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA)에 대한 radical 소거능을 DPPH의 환원력을 이용하여 측정하였다[20]. 6종의 모자반 추출물과 발효물에서 얻어진 12종의 cVitK 시료 20  $\mu\text{l}$ 와 0.3 mM DPPH 용액 180  $\mu\text{l}$ 를 혼합한 다음 빛이 차단된 상온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용해서 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.6. 세포내 산화질소 생성 저해 활성 분석

모자반 추출물과 발효물의 cVitK의 처리에 따른 대식세포 Raw 264.7 세포의 산화질소(Nitric Oxide; NO) 생성 저해 활성 분석은 Griess 시약 반응법을 이용한 nitric oxide kit (DoGenBio Co.)를 이용하여 측정하였다.

### 2.6. 통계처리

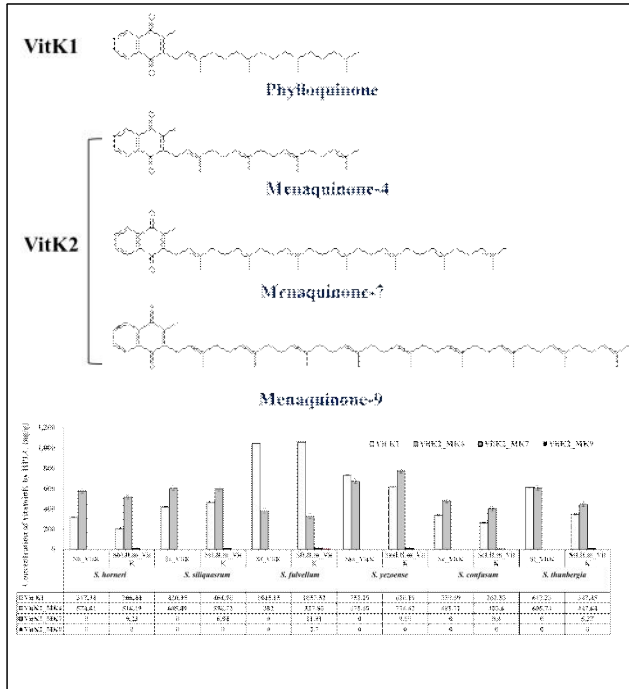
측정값은 평균값  $\pm$  표준오차평균(mean $\pm$ SEM)로 표시하였고, 실험의 통계학적 분석은 IBM SPSS Statistics 프로그램을 이용하여 일원분산분석법을 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 6종 모자반과 모자반 유산균 발효물의 비타민K 분석

모자반 추출물과 발효물에서 추출한 비타민K 복합물(cVitK; PK, MKs) 정량 분석은 HPLC기반의 질량 분석법(mass spectrometry)을 이용하여 수행하였다(Fig 2). 유산균을 활용한 비타민K2 생산 바이오프로세스(bioconversion)에서 모자반(Sf)의 프리바이오틱스로서의 활용은 PK를 유지하는 동시에 MK7과 MK9와 같은 메나퀴논의 생산에 유효한 것으로 확인되었다. 반면, 모자반(Sf)의 MK4 함량이 실험에 사용한 모자

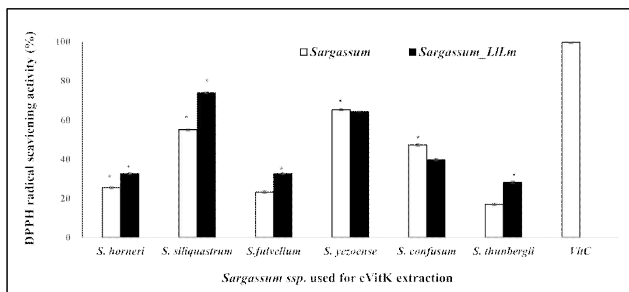
반 중에서 가장 낮은 측정된 것은 동일한 LILm 유산균을 사용하였음에도 불구하고 모자반의 종류에 따라 비타민K2 함성에 차이가 있는 것으로 사료된다.



[그림 1] The chemical structures of vitamin K. Vitamin K2 represents a group of molecules with a varying number of isoprene units. Quantitative analysis of vitamin K from Sargassum and the Sargassum\_LILm.

### 3.2 모자반 유래 비타민K의 항산화 효능

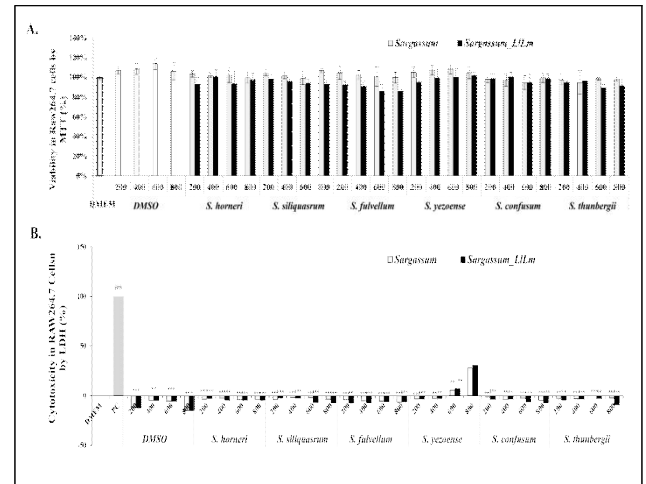
6종의 모자반 추출물과 발효물의 DPPH 라디칼 소거 활성(DPPH radical scavenging activity)을 분석한 결과, 각각의 모자반에서 라디칼 소거능의 차이가 확인되었다(Fig 3). 본 연구에서 비타민K 함량과 종류가 DPPH 라디칼 소거능에 미치는 명확한 상관관계는 확인되지 않았으나, 유산균 발효 과정에서 생성된 생리활성 물질이 항산화 활성에 기여하는 가능성을 보여주었다. 또한, 이소프로판올로 추출한 모자반과 그 발효물 내의 cVitK와 기타 활성 물질이 DPPH 라디칼 소거 효능에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.



[그림 2] Fig 3 Antioxidant effects of cVitK produced from Sargassum ssp. and Sargassum\_LILm by DPPH assay.

### 3.3 세포 생존율, 독성 및 산화질소 저해 효능

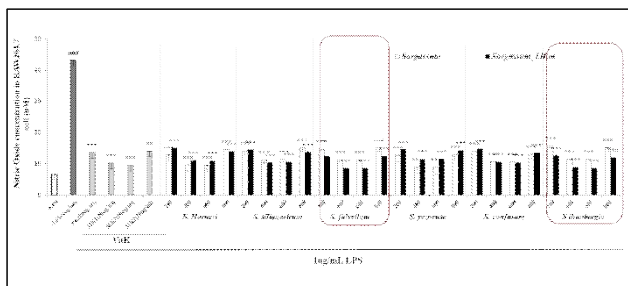
모자반 추출물과 발효물에서의 cVitK에 대한 세포 생존율은 대식세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 MTT assay를 측정하였다(Fig 4A). 모자반 추출물의 cVitK를 200, 400, 600, 및 800 µl/ml로 처리한 결과, 대조군 대비 95–108% 생존율을 나타내었으며, 모자반 발효물의 cVitK는 86–102%의 생존율을 보였다. 이어서, 모자반 추출물과 발효물에서의 cVitK에 대한 세포 독성은 세포 손상 시 방출되는 LDH 활성을 통해 측정하였다(Fig 4B). LDH 분석 결과, 대부분의 조건에서 0% 이하로 세포 손상이 관찰되지 않았으나, 왜모자반(Sy)의 cVitK 농도가 600과 800 µg/ml 일 때 5.71–30.68%의 LDH 활성이 나타났다. 하지만, 해당 농도에서 세포 생존율이 101–108%로 유지되어 세포 손상은 미미한 수준임을 시사한다.



[그림 3] . Cytotoxicity analysis of cVitK produced from Sargassum ssp. and Sargassum\_LILm in Raw 264.7 cells.

모자반 추출물과 발효물의 cVitK이 염증 반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 염증 반응의 지표 인자인 Nitric oxide의 생성량을 분석하였다(Fig 5). 먼저 마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 그람음성균의 세포막에 존재하는 내독소인 LPS를 처리하여 염증을 유도한 후, 시료를 처리하여 이에 대한 NO 생성 억제 효과를 평가하였다. LPS를 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, LPS를 단독으로 처리한 세포군에서 NO 함량이 46.10 µM으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ). 결과는 모자반 추출물과 발효물의 cVitK가 600 µl/ml 농도에서 항염 효과를 나타냄을 제시한다(Fig 5). 특히, 6종의 모자반 발효물 중 모자반 발효물(SfLILm;  $p < 0.001$ )과 지충이 발효물(StLILm;  $p < 0.001$ )의 cVitK에서 NO 저해 활성이 더 높게 관찰되었으며, 모자반 발효물(SfLILm)의 cVitK는 PK, MK4, MK7, MK9을 모두 포함하고, 상대적으로 높은 함량을 나타내어 이들 성분의 상호작용이 항염 효과에 기여할 가능

성을 시사한다. 지충이 발효물(StLILm) 또한 PK와 MK4, MK7이 주요 성분으로 포함되어 있어 이들의 항염 작용이 확인되었으며, 추가적인 연구를 통해 각 성분의 항염 작용에 대한 기여도를 평가할 필요가 있을 것으로 판단된다. 결론적으로, 모자반 유래 cVitK(PK, MK4)와 발효물 cVitK(PK, MK4, MK7, MK9)의 NO 소거 효능은 비타민K의 항염 효과를 뒷받침하는 결과로 확인되었다[9, 19]. 본 연구 결과는 모자반 유산균 발효에 의해 생산된 MK7과 MK9이 생체 내 항염 효능을 나타내며, 염증 반응과 관련된 사이토카인(cytokines) 생성을 억제할 수 있음을 시사한다. 또한, 모자반 유래 cVitK가 면역, 심혈관 및 골 건강에 미치는 긍정적인 영향을 평가하는 후속 연구에 중요한 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.



[그림 3] .Nitric oxide inhibition effects of cVitK produced from *Sargassum* ssp. and *Sargassum\_LILm* in LPS-stimulated Raw 264.7 cells by Griess reaction assay.

### 참고문헌

- [1] Arora, N. and Philippidis, G. P. 2023. The prospects of algae-derived vitamins and their precursors for sustainable cosmeceuticals. *Processes* 11, 587–603.
- [2] Basset, G. J., Latimer, S., Fatihi, A., Soubeyrand, E. and Block, A. 2017. Phylloquinone (vitamin K1): occurrence, biosynthesis and functions. *Mini Rev. Med. Chem.* 17, 1028–1038.
- [3] Bentley, R. and Meganathan, R. 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev.* 46, 241–280.
- [4] Bus, K. and Sztark, A. 2021. Relationship between structure and biological activity of various vitamin K forms. *Foods*. 10, 3136.
- [5] Chollet, M., Guggisberg, D., Portmann, R., Risse, M. -C. and Walther, B. 2017. Determination of menaquinone production by *Lactococcus* spp. and propionibacteria in cheese. *Int. Dairy J.* 75, 1–9.
- [6] Debbarma, J., Rao, M. B., Murthy, L. N., Mathew, S., Venkateshwarlu, G. and Ravishankar C. N. 2016.

Nutritional profiling of the edible seaweeds *Gracilaria edulis*, *Ulva lactuca* and *Sargassum* sp.. *Indian J. Fish.* 63, 81–87.

- [7] Fusaro, M., Mereu, M. C., Aghi, A., Iervasi, G. and Gallieni, M. J. 2017. Vitamin K and bone. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 14, 200–206.
- [8] Gu, Y. R., Kim, S. W., Son, Y. W. and Hong, J. H. 2017. Antioxidant activities of solvent extracts from different *Glehnia Radix* parts and their inhibitory effect against nitric oxide production in Raw 264.7 cell. *Korean J. Food Preserv.* 24, 116–124.