pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 1, pp. 29~37 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.1.29

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

노니 지표성분 6종과 발효노니의 면역활성 증진 효과

최선일[1] · 한웅호[1] · 문효[1] · 이세정[1] · 김용덕[2] · 나임정[3] · 성금수[4] · 이옥환[1]*

[1]강원대학교 식품환경융합학과
[2](주)NST바이오
[3](주)애터미오롯
[4]한국식품연구원

Enhancement of Immune Activities of Fermented *Morinda citrifolia* L. (Noni) and Six Marker Compounds

Sun-Il Choi[1], Xionggao Han[1], Xiao Men[1], Se-Jeong Lee[1], Yong Deok Kim[2], Im-Joung La[3], Geum-Su Seong[4], Ok-Hwan Lee[1]*

[1]*Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[2]*NSTBIO Co., Ltd., Incheon, Korea*
[3]*Atomy R&D Center, Gongju, Korea*
[4]*Korea Food Research Institute, Wanju, Korea*

(Received January 25, 2022/Revised February 11, 2022/Accepted February 16, 2022)

ABSTRACT - This study will evaluate the effect of fermented *Morinda citrifolia* L. extracts and its marker compounds to provide baseline data for utilizing *Morinda citrifolia* L. as functional health products. *Morinda citrifolia* L. and six marker compounds were processed on RAW 246.7 macrophage to test for XTT Cytotoxicity, measure Nitric Oxide and Cyokine formation, and analyze the expression of immune marker genes. Furthermore, LPS and fermented red ginseng extract, a common functional ingredient, are used as positive controls. Our results showed that fermented *Morinda citrifolia* L and six bioactive compounds did not have any cytotoxic effect in all treatment concentrations and groups. Among six bioactive compounds, SCP and ASE confirmed the formation of NO. In addition, the ASE treatment group showed increased formation of IL-6 and IL-1β and the expression of iNOS and TNF-α. Also, fermented *Morinda citrifolia* L extract activated the macrophage by enhancing the production of nitric oxide (NO), interleukin (IL)-6, and IL-1β, and the expression of COX2 compared to *Morinda citrifolia* L. extracts. The result of the study showed that Fermented *Morinda citrifolia* L. (Noni) and marker compound enhance the innate immunity activity and suggested that the bioactive compound could be applied as a marker compound. Thus, Fermented *Morinda citrifolia* L. (Noni) could be used as functional food material to develop immunity-enhancing products, and highly functional marker compounds can be utilized as the effective components.

Key words: *Morinda citrifolia* L., Fermentation, Bioactive compound, Immune function, Macrophage

면역 체계(immune system)는 박테리아, 곰팡이, 세균, 바이러스와 같은 외부 항원으로부터 우리 몸을 방어하는 기작 체계이며, 면역 체계의 기능저하는 다양한 질병에 노출될 수 있다[1]. 이러한 외부 항원으로 부터 신체를 보호하기 위해 즉각적인 방어를 담당하는 선천면역(innate immunity)과 외부 항원에 대한 특이적인 항체나 세포를 생성하여 기억하는 적응면역(adaptive immunity)로 나뉜다[2]. 선천면역은 피부의 상피세포와 점막층을 통해 1차적인 물리적 방어와 자연살해세포(NK cell), 대식세포, 호중구, 단핵구 및 수지상세포 등의 탐식작용으로 이루어진다[3]. 대식세포와 수지상세포는 외부 항원에 대하여 가장 빠르게

*Correspondence to: Dr. Ok-Hwan Lee, Professor, Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-6454, Fax: +82-33-259-5561
E-mail: loh99@kangwon.ac

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

탐식작용을 하는 면역반응 개시자로 케모카인 및 사이토카인을 분비하여 선천면역세포의 활성을 높이고 외부 항원을 전달하여 적응면역의 활성을 유도한다[4,5]. 자연살해세포는 과립물질(perforin, granzyme B)을 분비하여 외부 항원을 직접 제거하며, 사이토카인을 분비하여 적응면역의 활성을 유도한다[6]. 적응면역은 탐식세포들이 제시한 항원에 대하여 면역 B세포 및 T세포들의 활성화로 이루어지며, 면역세포에서 발현되는 면역 글로불린과 케모카인 및 사이토카인의 작용으로 적응면역 반응이 증폭된다[7,8]. 따라서 선천면역 반응과 적응면역 반응은 케모카인 및 사이토카인에 의해 조절되는 유기적인 상호관계를 나타낸다[9].

최근 고령화 사회로의 가속화와 더불어 코로나19(COVID-19)의 발생과 확산으로 면역기능 개선에 도움을 주는 천연물을 활용한 건강기능식품에 대한 관심이 증대되고 있다[10]. 노니(*Morinda citrifolia* L.)는 폴리네시아, 인도 및 중국에서 발견되었으며, 약 2000년 전에 폴리네시아인들은 과육뿐만 아니라 과피, 줄기, 잎, 꽃을 상처치료에 사용하였다[11]. 노니의 유용성분으로는 페놀 화합물, 알칼로이드, 리그난, 지방산 에스테르, 유기산, 비타민 및 미네랄 등이 보고되었으며[12-14], 심혈관질환, 당뇨병, 암, 항균 등에 효능이 있다고 알려져 있다[15-18]. 따라서 식품 및 제약 산업의 연구자들은 노니의 다양한 효능에 주목하고 있으며, 기능성 식품 소재로서의 가능성이 제기되었다[19].

노니를 이용한 건강기능성 식품 개발을 위해서는 노니의 효능평가와 더불어 지표성분 및 유효성분의 효능 및 분석평가를 통한 표준화가 이루어져야한다. 표준화는 천연물에 함유된 기능성 성분의 변동을 최소화하여 일관된 효능을 나타내는 제품을 생산할 수 있는 기술이다[20]. 표준화를 위해서는 원료부터 최종 제품까지 전반적인 품질관리가 필요하며, 일반적으로 지표성분 및 유효성분의 변화를 통해 확인한다[21]. 지표성분의 선정은 특이성, 대표성, 안정성, 분석 용이성 등을 고려하여 설정해야하며[22], 본 연구에서는 노니소재의 지표성분으로 노니에 함유된 주요 iridoid [deacetylasperulosidic acid (DAA), asperulosidic acid (ASP), asperuloside (ASE)]와 주요 coumarin [scopoletin (SCO), scopolin (SCP), aucubin (AUC)]을 설정하였다[23-26]. Iridoid는 식물의 자기방어(plants self-defense mechanism)에 의해 생성되는 phytochemical이며 항산화, 항암, 항균, 면역조절, 간기능 개선, 심장기능 개선 등의 효능이 보고되었다[27,28]. Coumarin은 식물의 성장과 대사조절에 중요한 역할을 하며 면역조절, 항산화, 항돌연변이, 항암 등의 효능이 보고되었다[29,30].

발효는 미생물에 의해 유기물을 분해하는 과정으로, 발효의 목적은 생리 활성 물질의 구조적 변화를 유도하여 유효성분 함량을 높이고 흡수율을 향상시키며 새로운 기능성 성분의 생성을 유도하는 것이다[31]. 따라서 발효는 소재의 기능성 향상을 위한 방법으로 사용되고 있다. 노니의 다양한 효능에도 불구하고 노니 열매의 특유한 냄새 때문에 식품으로서의 가치가 낮았지만 최근 연구에서는 발효를 통해 노니 열매의 냄새를 개선하는 연구가 발표되었다[32,33]. 하지만 발효에 따른 노니의 기능성 개선과 지표성분 설정을 위한 효능평가 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 발효노니를 건강기능식품 소재의 원재료 표준화를 위한 기초자료를 제공하고자 하였으며, *Lactobacillus brevis*를 이용하여 발효한 노니 및 지표성분 6종의 면역활성 증진 효능은 식품의약품안전처에서 제공하는 건강기능식품 가이드라인 '면역기능 개선에 도움을 줄 수 있음'편에서 제시된 바이오마커 측정을 통하여 평가하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

Penicillin/streptomycin (P/S), trypsin-EDTA, fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS) 및 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Gibco Co. (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하였으며, Sodium nitrite 및 Sulfanilamide는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. N-(1-naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride는 Wako Co. (Tokyo, Japan)로부터 구입하였으며, 발효노니의 지표성분성분 6종(DAA, ASP, ASE, SCO, SCP, AUC)은 ChemFaces Co. (Wuhan, Hubei, China)에서 구입하여 사용하였다.

본 연구에 사용된 발효노니 추출물 및 발효홍삼 추출물은 (주)NST Bio (Incheon, Korea)로부터 제공받아 사용하였다. 프랑스령 폴리네시아에서 수확된 노니 100 g을 500 mL의 distilled water 및 2% (8×10^{11} CFU/g) *Lactobacillus brevis* (NST707)와 함께 30°C에서 72시간 동안 발효시켰다. 그 후 여과와 동결건조를 하여 발효노니 추출물(FME)를 수득하였으며, *Lactobacillus brevis* 처리를 제외한 동일한 방법을 통해 노니 추출물(MCE)를 수득하였다. 또한 양성 대조군으로 사용된 발효홍삼 추출물은 홍삼농축액 100 g을 1 L의 distilled water 및 2% *Lactobacillus plantarum*과 함께 37°C에서 24시간 발효시켰으며, 여과와 동결건조를 하여 발효홍삼 추출물(FRE)를 수득하였다. 모든 시료는 증류수에 넣고 10분간 초음파처리 후 0.22 μm PVDF filter (Millex-HV, Millipore, Bedford, MA, USA)로 여과하여 사용하였다.

RAW 264.7 대식세포 배양

RAW 264.7 대식세포는 American Type Culture Collection (ATCC, TIB-71 , Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO_2 incubator (MCO-20, SANYO, Osaka, Japan)에서 1% P/S, 10% FBS 및 sodium

bicarbonate 3.7 g/L가 함유된 high glucose DMEM media로 배양되었으며, 실험 목적에 따라 96-well plate, 6-well plate, 100Φ dish에 1×10^5 cell 농도로 분주되어 각 실험에 사용하였다.

XTT assay를 이용한 세포 독성 평가

RAW 264.7 대식세포에 대한 발효노니 추출물 및 지표성분 6종의 세포 독성 평가는 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2Htetrazolium-5-carboxanilide innersalt (XTT) assay kit (WelGene, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 대식세포를 96-well plate에 seeding하고 24시간 동안 배양하였으며 각각의 지표성분 6종(20, 80 μM)은 24시간, 농도별 발효노니 추출물(100, 200 μg/mL)은 72시간 동안 배양하였다. 그 후 XTT와 N-methylphenazonium methyl sulfate (PMS) regent를 50:1의 비율로 혼합한 XTT working solution을 각 well 40 μL 씩 분주하여 4시간 동안 배양하여 반응을 유도하였다. 세포배양 상등액을 microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm 및 690 nm의 흡광도값을 뺀 결과 값을 대조군과 비교하여 세포독성을 나타내었다.

Nitric Oxide (NO) 생성 측정

RAW 264.7 대식세포에서 발효노니 추출물 및 지표성분 6종의 NO 생성능 평가는 griess assay를 이용하여 측정하였다. XTT assay와 동일한 방법으로 RAW 264.7 대식세포를 배양하였으며, 0.1% N-(1-naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride (in distilled water)와 0.1% Sulfanilamide (in 5% H_3PO_4)를 1:1의 비율로 혼합하여 griess reagents solution을 준비하였다. 세포배양 상등액(100 μL)과 griess reagents solution (100 μL)을 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에 흡광도를 측정하였으며, Sodium nitrite ($NaNO_2$)로 표준곡선을 그려 계산에 사용하였다.

Cyokine 생성 측정

RAW 264.7 대식세포에서 발효노니 추출물 및 지표성분 6종의 Cyokine 생성능 평가는 ELISA (Enzyme linked immuno solvent assay) assay kit (R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 대식세포를 6-well plate에 배양하였으며 각각의 지표성분 6종(20, 80 μM)은 24시간, 농도별 발효노니 추출물(200 μg/mL)은 72시간 동안 배양하였다. 그 후 세포배양 상등액을 취하여 cytokine 분석을 위한 시료로 사용하였으며, interleukin (IL)-1β (cat. MLB00C) 및 interleukin (IL)-6 (cat. M6000B) ELISA kit에서 제공하는 manufacturer's instruction에 따라 실험을 진행하였다.

Table 1. Gene specific primer used for RT-PCR

Gene	Primer sequences (5'-3')
iNOS	F: CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C
	R: GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G
TNF-α	F: TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG
	R: CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC
GAPDH	F: CAC TCA CGG CAA ATT CAA CGG CAC
	R: GAC TCC ACG ACA TAC TCA GCA C

Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

RAW 264.7 대식세포를 100Φ dish에 배양하였으며 지표성분 6종(80 μM)은 24시간, 농도별 발효노니 추출물(200 μg/mL)은 72시간 동안 배양하였다. 세포 배양액을 제거 후 PBS로 2회 세척하였으며 TRIzol reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) 1 mL을 첨가하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA (1 μg)를 Maxime RT premix kit (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea)를 사용하여 RT-PCR system (c1000 thermal cycler; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 45°C, 60분간 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA와 각각의 primer, Taq MasterMix (MGMED, Seoul, Korea) 혼합한 후 RT-PCR system을 증폭시켰다. 그 후 PCR 결과물은 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gels에서 전기영동하였으며 UV에서 증폭된 DNA band는 분석 프로그램 (care stream MISE; Carestream Health, Rochester, NY, USA)을 이용하여 유전자의 발현 정도를 측정하였다. 실험에 사용된 primer sequence는 Table 1과 같다.

Western blot 분석

RAW 264.7 대식세포 배양 및 시료처리는 RT-PCR 분석과 동일하게 진행되었으며, PBS로세척 후 수득된 세포를 lysis buffer를 이용하여 용해시켰다. 12,000 × g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 수득한 뒤, 분리된 단백질을 Bradford protein assay kit (Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 정량하였다. 그 후 단백질(30 μg)을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전기영동하였으며, 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 전이시켰다. 항체의 비특이적 결합을 억제하기 위해 5% skimmed milk로 1시간 동안 반응시켰으며, TBST buffer로 10분간 3회 세척하였다. 그 후 membrane은 1:1000으로 TBST buffer에 희석된 1차 항체(Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA)와 4°C에서 12시간 반응하였으며, 3회 세척 후 1:2000으로 희석된 2차 항체(Cell Signalling Technology)와 1시간 반응하였다. 그 후 ECL detection

reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)와 Chemi Doc image software 5.2.1 (Bio-Rad Laboratories)를 활용하여 단백질 발현 정도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 수행하였으며 평균±표준편차(means±SD)로 나타내었다. 그룹간의 유의성평가는 SAS version 9.4 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 one-way ANOVA, Duncan의 다중범위 사후검정법(Duncan's multiple range test)으로 검정하여 P-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

Results and Discussion

지표성분 6종 및 발효노니의 세포독성 평가

살아있는 세포에 XTT reagent를 처리하면 세포 내 mitochondria에서 생성되는 dehydrogenase와 반응하여 tetrazolium ring 구조가 분해되고 노란색 formazan crystal을 형성하게 된다[34]. 노란색의 흡광도를 측정하여 세포생존율을 측정하는 방법으로 RAW 264.7 대식세포에 대한 각각의 지표성분 6종(20, 80 μM)과 발효노니 추출물(100, 200 μg/mL)의 세포독성 평가하였으며, Fig. 1과 같다. 20 및 80 μM의 지표성분 6종 처리군에서 흡광도 값이 모두 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 100 및 200 μg/mL의 노니, 발효노니 및 발효홍삼 처리군 또한 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 뿐만 아니라 현미경 상에서의 morphology의 변화도 관찰되지 않아, 독성을 나타내지 않는 것으로 판단하였다. 따라서 지표성분 및 발효노니 추출물의 면역활성 증진 효능평가는 20 및 80 μM의 지표성분과 100 및 200 μg/mL의 발효노니 추출물을 이용하여 실험을 진행하였다.

지표성분 6종 및 발효노니의 NO 생성능 평가

Griess assay는 nitrite (NO_2^-)가 sulfonilaminde와 결합을 통해 diazonium salt를 형성하고 N-(1-naphthyl)ethylenediamine와 결합하여 분홍색의 azo dye를 형성하는 원리이다[35]. 분홍색의 흡광도를 측정하여 NO 생성능을 측정하는 방법으로 RAW 264.7 대식세포에 대한 각각의 지표성분 6종(20, 80 μM)과 발효노니 추출물(100, 200 μg/mL)의 NO 생성능을 평가하였다. 아무것도 처리하지 않고 배양한 대조군과 비교하여 나타내었으며, 양성대조군으로는 lipopolysaccharide (LPS)를 사용하였다. 지표성분 6종의 NO 생성능을 평가한 결과, 80 μM의 SCP와 ASE를 처리한 군에서 각각 131%와 169%로 NO 생성능이 증가하였다(Fig. 2A). 또한 100 및 200 μg/mL의 발효노니 추출물을 처리한 실험군에서는 131%와 169%로 NO 생성능이 증가하였다(Fig. 2B). 특히 양성대조군으로 사용한 발효홍삼 추출을 처리한 실험군보다 높은 NO 생성능이 나타났다. NO는 대식세포에서 주로 생성되며, 외부에서 침입된 병원체의 포식된 병원체의 구성분자 변형과 Fe-S를 함유하는 효소의 작용을 억제시켜 탐식작용 활성을 가진다[36]. 과량의 NO는 자가면역 반응 중에 정상세포를 공격하여 조직 손상과 염증을 유도하는 염증 질환의 매개인자로 알려져 있지만, 세포내 및 세포간 면역신호전달자 역할과 자가면역조절 등의 역할

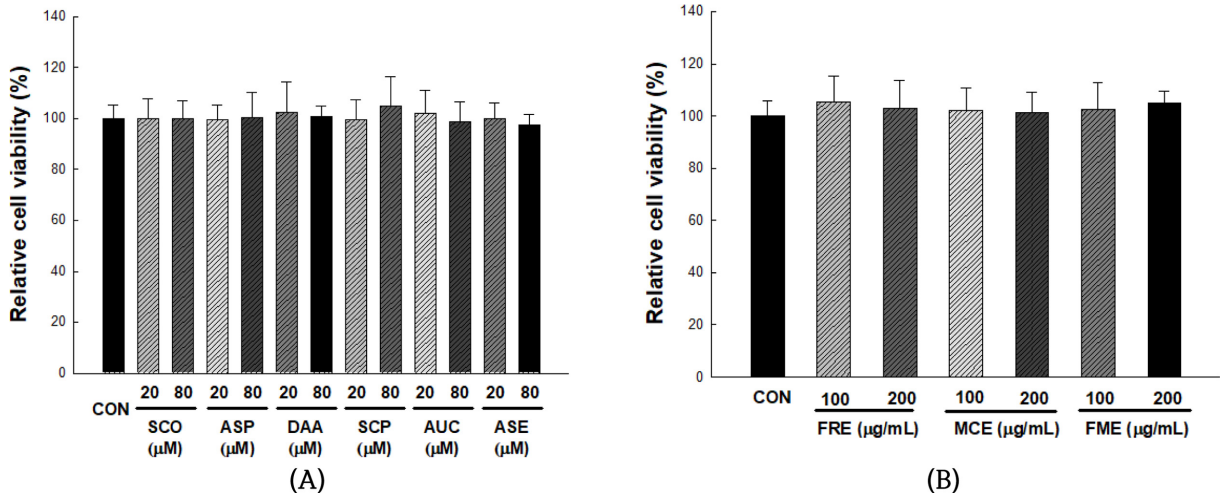

Fig. 1. Effect of six marker compounds (A) and FME (B) on cell viability of RAW 264.7 macrophage. Six marker compounds (20 and 80 μM) and FME (100 and 200 μg/mL) were cultured for 24 h and 72 h, respectively and cell viability was determined using XTT assay. Each value is expressed the mean±SD of the results from six different plates (n=6). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA and Duncan's post-hoc test were used to compare multiple groups (P<0.05). SCO, scopoletin; ASP, asperulosidic acid; DAA, deacetylasperulosidic acid; SCP, scopolin; AUC, aucubin; ASE, asperuloside; FRE, fermented red gingseng extracts; MCE, *Morinda citrifolia* L. extracts; FME, fermented *Morinda citrifolia* L. extracts.

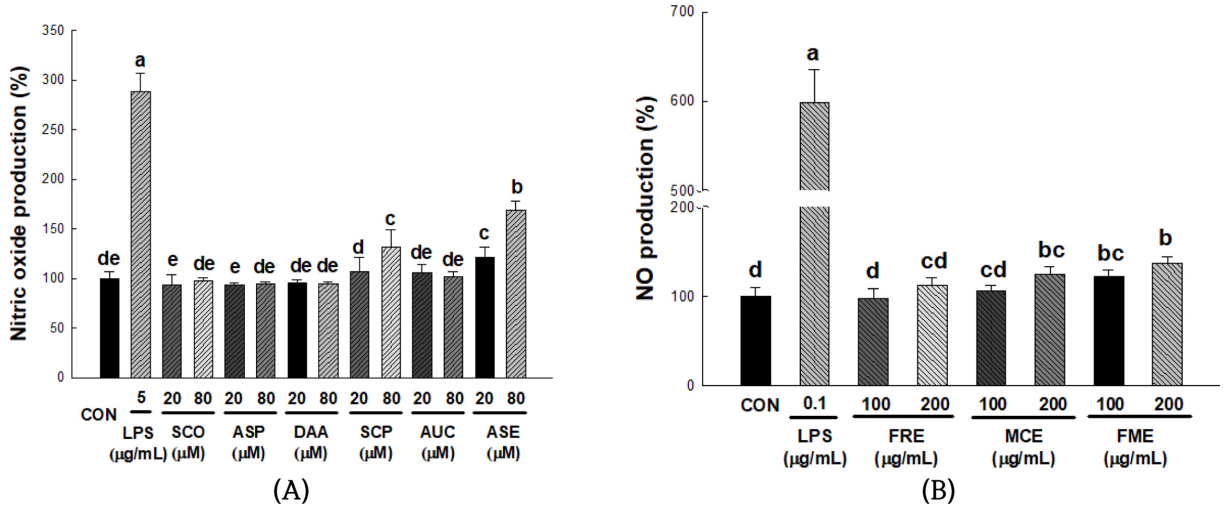

Fig. 2. Effect of six marker compounds (A) and FME (B) on NO production in RAW 264.7 macrophage. Six marker compounds (20 and 80 μM) and FME (100 and 200 μg/mL) were cultured for 24 h and 72 h, respectively and NO production was determined using griess assay. Each value is expressed the mean±SD of the results from six different plates (n=6). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA and Duncan's post-hoc test were used to compare multiple groups (P<0.05). LPS, lipopolysaccharide; SCO, scopoletin; ASP, asperulosidic acid; DAA, deacetylasperulosidic acid; SCP, scopolin; AUC, aucubin; ASE, asperuloside; FRE, fermented red gingseng extracts; MCE, *Morinda citrifolia* L. extracts; FME, fermented *Morinda citrifolia* L. extracts.

이 보고되어 면역활성 평가의 marker로 사용되고 있다[37]. 따라서 발효노니 추출물과 지표성분 중 SCP와 ASE는 NO 생성 증가를 통하여 면역기능을 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

지표성분 6종 및 발효노니의 cytokine 분비능 평가

Cytokine은 면역세포에서 분비되는 단백질로서 선천면역과 적응면역 등의 여러 기능을 조절한다[38]. 이들은 면역세포의 분화와 활성화를 자극하거나 세포를 이동시키는 강력한 신호전달분자이다[39]. ELISA kit는 항원-항체반응을 이용하여 항원 단백질의 양을 정량 하는 방법으로, RAW 264.7 대식세포에 대한 각각의 지표성분 6종(20, 80 μM)과 발효노니 추출물(200 μg/mL)의 cytokine 분비능 평가에 사용되었다. 지표성분 6종의 cytokine 분비능을 평가한 결과, IL-6은 아무것도 처리하지 않고 배양한 대조군(6.96±0.10 pg/mL)과 비교하여 모든 지표성분에서 농도 유의적으로 증가되는 경향을 나타냈다(Fig. 3A). 특히 80 μM의 ASP와 ASE를 처리한 군에서 각각 7.99±0.57와 7.91±0.26 pg/mL로 IL-6 생성량이 증가하였다. 뿐만 아니라 IL-1β 생성량 평가에서도 지표성분 6종에 의한 생성량 증가가 확인되었다(Fig. 3B). 특히 ASE 처리군에서는 IL-1β 생성량이 아무것도 처리하지 않고 배양한 대조군(4.62±0.10 pg/mL)과 비교하여 5.26±0.10 pg/mL으로 유의적인 증가가 확인되었다. 발효노니 추출물(200 μg/mL)을 처리한 실험군에서는 발효 전 노니 추출물과 비교하였을 때 IL-6 생성량이 12.80±0.91 pg/mL에서 17.50±2.21 pg/mL로 유의적인 증가가 확인되었다(Fig. 3C). 또한 IL-1β 생성량은 1.86±0.68 pg/mL에서 3.80±0.32 pg/mL으로 증가되었지만 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3D). 본 연구에서 측정한 cytokine은 대식세포, 호중구 등의 선천면역을 담당하는 세포에서 생산되는 cytokine으로 NO에 의하여 유도되는 것으로 보고되었다[40,41]. IL-6와 IL-1β는 면역 및 탐식세포의 분화 및 활성화와 병원체 침입에 대한 세포이동을 유도한다[42]. 또한 immunoglobulin (Ig)을 분비하는 B세포의 증식을 유도하며 T세포를 조절한다[43]. 따라서 발효노니 추출물과 지표성분 6종은 대식세포의 cytokine 생산 증가를 통하여 면역 및 탐식세포의 활성화와 적응면역을 조절하는 신호전달분자를 증가시켜 면역기능을 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

지표성분 6종 및 발효노니의 immune marker genes 발현분석

역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)은 특정 표적 유전물질의 증폭을 통해 발현량을 확인하는 방법으로 RAW 264.7 대식세포에 대한 지표성분 6종(80 μM)의 immune marker genes 발현 평가에 사용되었다. 지표성분 6종 처리군의 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 tumor necrosis factor-α (TNF-α)의 발현량은 아무것도 처리하지 않고 배양한 대조군과 비교하였으며, iNOS 발현량은 1 ng/mL의 LPS처리군에서 2.98±0.75배 증가된 것으로 나타났다. 또한 ASE 처리군에서 1.64±0.45배 증가 된 것으로 나타났지만 다른 지표성분 처리군에서는 iNOS의 발현이 증가되지 않았다(Fig. 4A). TNF-α의 발현량은 1 ng/mL의 LPS처리군에서 1.50±0.23

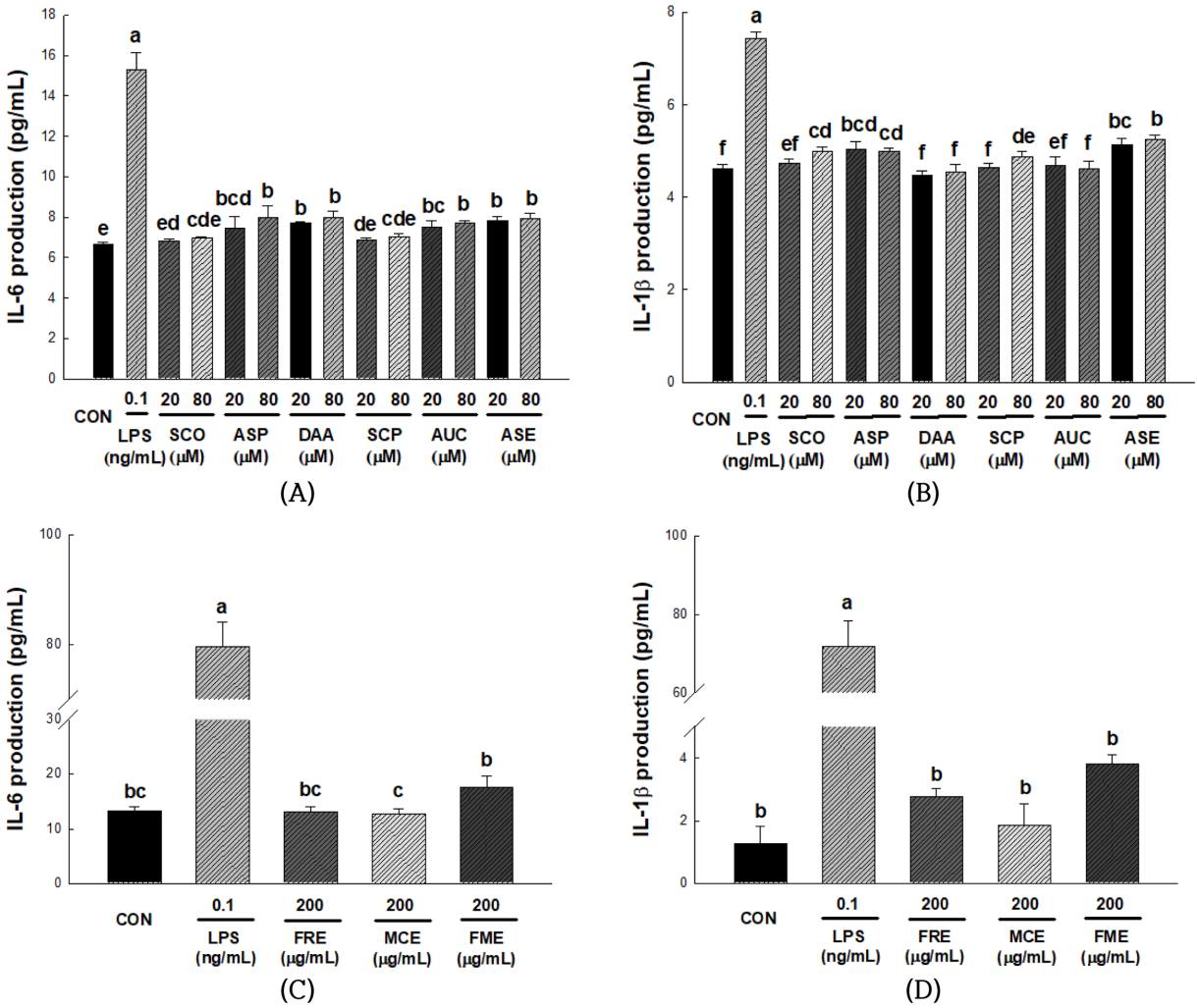

Fig. 3. Effect of six marker compounds (A and B) and FME (C and D) on cytokine production in RAW 264.7 macrophage. Six marker compounds (20 and 80 μM) and FME (100 and 200 μg/mL) were cultured for 24 h and 72 h, respectively and cytokine production was determined using ELISA kit. Each value is expressed the mean±SD of the results from six different plates (n=6). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA and Duncan's post-hoc test were used to compare multiple groups (P<0.05). LPS, lipopolysaccharide; SCO, scopoletin; ASP, asperulosidic acid; DAA, deacetylasperulosidic acid; SCP, scopolin; AUC, aucubin; ASE, asperuloside; FRE, fermented red gingseng extracts; MCE, *Morinda citrifolia* L. extracts; FME, fermented *Morinda citrifolia* L. extracts.

배 증가된 것으로 나타났으며, 모든 지표성분에서 발현량이 증가되는 경향을 나타냈다(Fig. 4B). 특히 ASE 처리군에서 1.34±0.25배로 유의적인 증가를 보였다. Western blot은 특정 단백질의 발현량을 확인하는 방법으로, 발효노니 추출물(200 μg/mL)의 cyclooxygenasse-2 (COX) 발현량 평가에 사용되었다(Fig. 4C). COX2 발현량은 1 ng/mL의 LPS 처리군에서 2.56±0.10배 증가된 것으로 나타났으며, 발효노니 추출물 처리군에서는 1.25±0.16배 증가되었다.

뿐만 아니라 발효노니 추출물 처리군에서 발효 전 노니 추출물(1.00±0.06) 보다 높은 COX2 발현량이 확인되었다. iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 한번 발현되면 오랜시간 동안 다량의 NO를 생성하여 면역신호전달자 역할과 자가면역조절 등의 면역관련 지표로 사용된다[44]. TNF-α는 활성화된 대식세포 및 다른 면역세포에서 분비되는 cytokine으로 과량의 분비는 염증반응을 유도하지만 면역반응을 일으키는 주요 매개체이다[45]. COX2는 지방산인 아리키돈산을 prostagladin E2 (PGE2)로 전환 시키는 효소이며, 발열, 혈관 확장 등을 통해 물질을 제거하고 동시에 적응면역로 넘어가는 매개체로써 선천 면역에 중요한 역할을 한다[46,47]. 이와 같은 결과는 발효노니 추출물 및 지표성분이 RAW 264.7 대식세포의 활성화를 통해 면역관련 cytokine들의 생산을 증가시키며 immune marker genes 발현을 유도하는 것으로 나타나 면역증진 기능성식품 소재로서의 가능성을 나타낸다. 하지만 본 연구팀의 선행연구에서는 노니 발효과정을 통해 DAA 및 SCO의 함량 증가를 확인하였다[48]. 이러한 결과는 면역활성에 직접

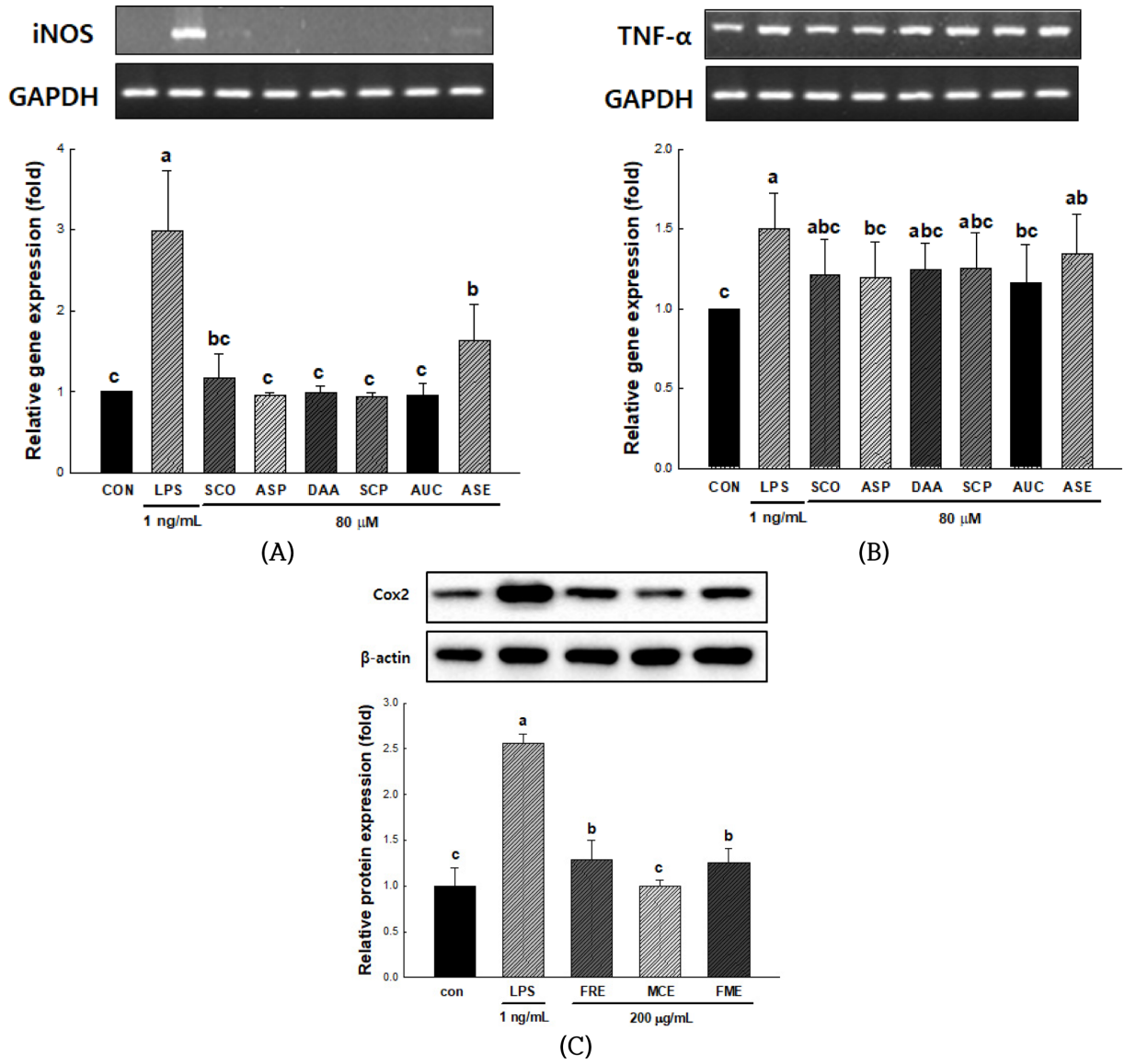

Fig. 4. Effect of six marker compounds and FME on expression of immune marker genes in RAW 264.7 macrophage. Six marker compounds (80 μM) and FME (100 and 200 μg/mL) were cultured for 24 h and 72 h, respectively and immune marker genes were determined using RT-PCR (A and B) and western blot (C). Each value is expressed the mean±SD of the results from six different plates (n=3). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA and Duncan's post-hoc test were used to compare multiple groups (P<0.05). LPS, lipopolysaccharide; SCO, scopoletin; ASP, asperulosidic acid; DAA, deacetylasperulosidic acid; SCP, scopolin; AUC, aucubin; ASE, asperuloside; FRE, fermented red gingseng extracts; MCE, *Morinda citrifolia* L. extracts; FME, fermented *Morinda citrifolia* L. extracts.

적인 효능을 나타내는 유효성분보다는 발효노니의 품질을 관리하는 지표성분으로 활용 가능성을 나타낸다. 따라서 발효공정에서 지표성분 변화를 통한 원료 및 공정 표준화가 필요하며, NK cell 및 B세포, T세포 등의 적응면역세포와의 유기적인 면역활성 관계연구가 필요하다.

감사의 글

본 논문은 2020년도 중소벤처기업부의 중소기업기술개발사업 지원(S2840161)과 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2021R1A6A1A03044242) 및 4단계 두뇌한국21 사업(4299990913942)으로 지원된 연구로 이에 감사드립니다.

요 약

본 연구에서는 발효노니를 건강기능식품 소재로 활용 시 기초자료로 제공하고자 발효노니 추출물 및 지표성분의

면역활성 증진 효과를 평가하였다. RAW 264.7 대식세포에서 발효노니 추출물 및 지표성분 6종을 처리하여 XTT 세포독성평가, Nitric Oxide 생성 측정, Cyokine 생성 측정, immune marker genes 발현분석 수행하였다. 뿐만 아니라 양성대조군으로 LPS와 기능성 원료로 사용되고 있는 발효홍삼 추출물을 사용하였다. 그 결과 모든 처리 농도 및 처리군에서 세포독성이 관찰되지 않았으며, 지표성분 6종 중 SCP 및 ASE에서 NO 생성이 증가됨을 확인하였다. 뿐만 아니라 ASE 처리군에서는 IL-6 및 IL-1β의 생성이 증가되었으며, iNOS 및 TNF-α의 immune marker genes 발현이 증가됨을 확인하였다. 발효노니 추출물 효능평가에서는 발효시 NO 생성 및 IL-6, IL-1β의 생성, COX2의 발현이 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과는 발효노니 추출물 및 지표성분의 선천면역 활성증가를 타나내며 노니 및 발효노니 표준화 연구에서 지표성분으로 사용 가능성을 제시한다. 따라서 발효노니는 면역증진 활성을 갖는 제품 개발에 있어서 유용한 기능성 식품소재로써 사용될 수 있으며, 우수한 효능을 나타내는 지표성분은 유용성분으로 이용이 가능할 것으로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Sun-Il Choi	https://orcid.org/0000-0001-7400-6286
Xionggao Han	https://orcid.org/0000-0002-5057-7401
Xiao Men	https://orcid.org/0000-0003-1101-5796
Se-Jeong Lee	https://orcid.org/0000-0001-8738-7559
Yong Deok Kim	https://orcid.org/0000-0003-0670-6103
Im-Joung La	https://orcid.org/0000-0003-3222-6349
Geum-Su Seong	https://orcid.org/0000-0001-9346-4098
Ok-Hwan Lee	https://orcid.org/0000-0001-6855-3136

References

1. Howell, M., Shepherd, M., The immune system. *Anaesth. Intensive Care Med*., **19**, 575-578 (2018).
2. Wluka, A., Olszewski, W.L., Innate and adaptive processes in the spleen. *Ann. Transplant*., **11**, 22-29 (2006).
3. Cruvinel, W.D.M., Mesquita Júnior, D., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., Souza, A.W.S.D., Silva, N.P.D., Andrade, L.E.C., Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev. Bras. Reumatol*., **50**, 434-447 (2010).
4. Zhang, W., Ma, W., Zhang, J., Song, X., Sun, W., Fan, Y., The immunoregulatory activities of astragalus polysaccharide liposome on macrophages and dendritic cells. *Int. J. Biol. Macromol*., **105**, 852-861 (2017).
5. Luster, A.D., The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol*., **14**, 129-135 (2002).
6. Moretta, A., Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G., Moretta, L., NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ*., **15**, 226-233 (2008).
7. Vaziri, N.D., Pahl, M.V., Crum, A., Norris, K., Effect of uremia on structure and function of immune system. *J. Ren. Nutr*., **22**, 149-156 (2012).
8. Esche, C., Stellato, C., Beck, L.A., Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol*., **125**, 615-628 (2005).
9. Getz, G.S., Bridging the innate and adaptive immune systems. *J. Lipid Res*., **46**, 619-622 (2005).
10. Choi, S.I., Han, X., Men, X., Lee, S,J., Park, M.H., Lee, O.H., Yang, J.M., Choi, Y.E., Cho, J.H., Development and validation of an analytical method for 2-furoic acid in *Benincasa hispida* extracts (HR1901-W). *J. Agri. Life Environ. Sci*., **33**, 311-320 (2021).
11. Wang, M.Y., West, B.J., Jensen, C.J., Nowicki, D., Su, C., Palu, A.K., Anderson, G., *Morinda citrifolia* (noni): A literature review and recent advances in noni research. *Acta Pharmacol. Sin*., **23**, 1127-1141 (2002).
12. Furusawa, E., Hirazumi, A., Story, S., Jenson, J., Antitumor potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) on sarcoma 180 ascites tumour in mice. *Phytother. Res*., **17**, 1158-1164 (2003).
13. Su, B.N., Pawlus, A.D., Jung, H.A., Keller, W.J., McLaughlin, J.L., Kinghorn, A.D., Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni) and their antioxidante activity. *J. Nat. Prod*., **68**, 592-595 (2005).
14. Wang, M.Y., Su, C., Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Ann. N. Y. Acad. Sci*., **952**, 161-168 (2001).
15. Motshakeri, M., Ghazali, H.M., Nutritional, phytochemical and commercial quality of noni fruit: A multi-beneficial gift from nature. *Trends Food Sci. Technol*., **45**, 118-129 (2015).
16. García-Vilas, J.A., Quesada, A.R., Medina, M.A., Damnacanthal, a noni anthraquinone, inhibits c-Met and is a potent antitumor compound against HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Sci. Rep*., **5**, 1-9 (2015).
17. Murata, K., Abe, Y., Futamura-Masuda, M., Uwaya, A., Isami, F., Deng, S., Matsuda, H., Effect of *Morinda citrifolia* fruit extract and its iridoid glycosides on blood fluidity. *J. Nat. Med*., **68**, 498–504 (2014).
18. Ahmad, A.N., Daud, Z.A.M., Ismail, A., Review on potential therapeutic effect of *Morinda citrifolia* L. *Curr. Opin. Food Sci*., **8**, 62-67 (2016).
19. Almeida, É.S., de Oliveira, D., Hotza, D., Properties and applications of *Morinda citrifolia* (noni): A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*., **18**, 883-909 (2019).
20. Yadav, N.P., Dixit, V.K., Recent approaches in herbal drug standardization. *Int. J. Integr. Biol*., **2**, 195-203 (2008).
21. Ong, E.S., Extraction methods and chemical standardization

of botanicals and herbal preparations. *J. Chromatogr. B*, **812**, 23-33 (2004).
22. Lee, K.H., Na, H.J., Song, C.K., Kang, S.Y., Kim, S., Quercetin quantification in a Jeju *Dendropanax morbifera* Lev. extract by varying different parts, harvest times, and extraction solvents. *Korean J. Food Preserv.*, **25**, 344-350 (2018).
23. Deng, S., West, B.J., Palu, A.K., Jensen, C.J., Determination and comparative analysis of major iridoids in different parts and cultivation sources of *Morinda citrifolia*. *Phytochem. Anal.*, **22**, 26-30 (2011).
24. Abou Assi, R., Darwis, Y., Abdulbaqi, I.M., Khan, A.A., Vuanghao, L., Laghari, M.H., *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. *Arab. J. Chem.*, **10**, 691-707 (2017).
25. Ikeda, R., Wada, M., Nishigaki, N., Nakashima, K., Quantification of coumarin derivatives in Noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species. *Food Chem.*, **113**, 1169-1172 (2009).
26. Lewis Luján, L.M., Assanga, I., Bernard, S., Rivera-Castaneda, E.G., Gil-Salido, A.A., Acosta-Silva, A.L., Meza-Cueto, C.Y., Rubio-Pino, J.L., Nutritional and phenolic composition of *Morinda citrifolia* L.(Noni) fruit at different ripeness stages and seasonal patterns harvested in Nayarit, Mexico. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **3**, 421-429 (2014).
27. Ilc, T., Parage, C., Boachon, B., Navrot, N., Werck-Reichhart, D., Monoterpenol oxidative metabolism: role in plant adaptation and potential applications. *Front. Plant Sci.*, **7**, 509 (2016).
28. Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., Statti, G.A., Menichini, F., Biological and pharmacological activities of iridoids: Recent developments. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **8**, 399-420 (2008).
29. Robe, K., Izquierdo, E., Vignols, F., Rouached, H., Dubos, C., The coumarins: secondary metabolites playing a primary role in plant nutrition and health. *Trends Plant Sci.*, **26**, 248-259 (2021).
30. Bai, Y., Li, D., Zhou, T., Qin, N., Li, Z., Yu, Z., Hua, H., Coumarins from the roots of *Angelica dahurica* with antioxidant and antiproliferative activities. *J. Funct. Foods*, **20**, 453-462 (2016).
31. Rein, M.J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S.K., da Silva Pinto, M., Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **75**, 588-602 (2013).
32. Cheng, Y., Li, P., Hu, B., Xu, L., Liu, S., Yu, H., Guo, Y., Xie, Y., Yao, W., Qian, H., Correlation analysis reveals the intensified fermentation via Lactobacillus plantarum improved the flavor of fermented noni juice. *Food Biosci.*, **43**, 101234 (2021).
33. Wang, Z., Dou, R., Yang, R., Cai, K., Li, C., Li, W., Changes in phenols, polysaccharides and volatile profiles of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice during fermentation. *Molecules*, **26**, 2604 (2021).
34. Ali, S., Sudha, K.G., Karunakaran, G., Kowsalya, M., Kolesnikov, E., Rajeshkumar, M.P., Green synthesis of stable antioxidant, anticancer and photocatalytic activity of zinc oxide nanorods from *Leea asiatica* leaf. *J. Biotechnol.*, **329**, 65-79 (2021).
35. Charbaji, A., Heidari-Bafroui, H., Anagnostopoulos, C., Faghri, M., A new paper-mased microfluidic device for improved detection of nitrate in water. *Sensors*, **21**, 102 (2021).
36. Piacenza, L., Trujillo, M., Radi, R., Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *J. Exp. Med.*, **216**, 501-516 (2019).
37. Ahmad, R., Hussain, A., Ahsan, H., Peroxynitrite: cellular pathology and implications in autoimmunity. *J. Immunoassay Immunochem.*, **40**, 123-138 (2019).
38. Striz, I., Brabcova, E., Kolesar, L., Sekerkova, A., Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin. Sci.*, **126**, 593-612 (2014).
39. Borish, L.C., Steinke, J.W., 2. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111**, S460-S475 (2003).
40. Lee, H.J., Kang, G.J., Yoon, W.J., Kang, H.K., Kim, Y.S., Kim, S.M., Yoo, E.S., Anti-inflammatory effect of unripe fruit of citrus grandis osbeck in RAW 264.7 and HaCaT Cells. *Kor. J. Pharmacogn.*, **37**, 74-80 (2006).
41. Chang, L.P., Lai, Y.S., Wu, C.J., Chou, T.C., Liquid perfluorochemical inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide formation in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. *J. Phaarmacol.*, **111**, 147-154 (2009).
42. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., Sahebkar, A., Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.*, **233**, 6425-6440 (2018).
43. Oh, M.Y., Infection and Innate Immunity. *Korean J. Pediatr.*, **48**, 1153-1161 (2005).
44. Kwon, H.Y., Choi, S.I., Cho, B.Y., Choi, S.H., Sim, W.S., Xionggao, H., Jang, G.W., Lee, O.H., Nitrite scavenging activity and anti-inflammatory effects of standardized Cirsium setidens extract. *Korean J. Food Preserv.*, **26**, 343-349 (2019).
45. Fujiwara, N., Kobayashi, K., Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, **4**, 281-286 (2005).
46. Preshaw, P.M., Taylor, J.J., How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis?. *J. Clin. Periodontol.*, **38**, 60-84 (2011).
47. Harizi, H., The immunobiology of prostanoid receptor signaling in connecting innate and adaptive immunity. *BioMed Res. Int.*, 683405 (2013).
48. Choi, S.I., Kwon, H.Y., La, I.J., Jo, Y.H., Han, X., Men, X., Lee, S.J., Kim, Y.D., Seong, G.S., Lee, O.H., Development and validation of an analytical method for deacetylasperulosidic acid, asperulosidic acid, scopolin, asperuloside and scopoletin in fermented *Morinda citrifolia* L.(Noni). *Separations*, **8**, 80 (2021).