

흑효모를 이용한 참도박 발효 추출물의 항염 효과

부 반 빈* · 이 경 은** · 강 상 구**** †

*영남대학교 생명응용과학대학 생명공학과, 대학원생

**영남대학교 생명응용과학대학 생명공학과, 연구교수

***스텝포스(주)

****영남대학교 생명응용과학대학 생명공학과, 교수

(2021년 2월 26일 접수, 2021년 4월 14일 수정, 2021년 4월 27일 채택)

Anti-inflammatory effects of *Grateloupia elliptica* Fermenting Extracts Using *Aureobasidium pullulans*

Van Vinh Vu¹, Kyung Eun Lee^{1,2}, and Sang Gu Kang^{1,†}

¹Department of Biotechnology, College of Life and applied Sciences, Yeungnam University,
280 Daehak-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 38541, Korea

²STEMFORCE Inc., Production Technology Research Center

(Received February 26, 2021; Revised April 14, 2021; Accepted April 27, 2021)

요 약: 해양 홍조류 참도박(*Grateloupia elliptica*, *G. elliptica*)을 흑효모(*Aureobasidium pullulans*, *A. pullulans*)로 발효시킨 추출물들의 인간 피부각질세포주(HaCaT)에 대한 항염증 효과를 조사하였다. 흑효모로 발효한 참도박 추출물은 참도박 추출물에 비하여 총 폴리페놀(total polyphenol content)은 최대 2.7 배로 증가되었으며 총 플라보노이드(total flavonoid content)는 최대 2.4 배 증가되었다. 인간 피부각질세포를 lipopolysaccharide (LPS) 또는 H₂O₂로 염증을 유도 한 후 참도박 추출물과 참도박 발효 추출물을 100 µg/mL 농도로 처리 한 결과 LPS 또는 H₂O₂ 만 처리한 세포군에 비하여 약 3 ~ 10% 정도 세포생존율이 증가되었다. 또한 염증 유발과 관련된 단백질 발현 변화를 조사한 결과 참도박 발효추출물이 cyclooxygenase-2 및 70 kDa heat shock protein 의 발현을 현저히 감소시켰다. 따라서 흑효모로 발효한 참도박은 항염효과를 가진 피부수렴용 화장품 소재로 유용하다.

Abstract: In this study, we investigated the biological functions of *Grateloupia elliptica* (*G. elliptica*) fermented with *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*). Total phenolic contents (TPC) of the hot-water extract of the fermented *G. elliptica* increased 2.7 folds than that of the non-fermented *G. elliptica*. Furthermore, total flavonoid contents of both the hot-water extract and the ethanol extract increased maximum 2.4 folds amounts than non-fermented *G. elliptica* extracts. HaCaT cells were induced inflammation treated with LPS (1 µg/mL) or H₂O₂ (1mM) and examined with 100 µg/mL of *G. elliptica* extracts. The extraction of the fermented *G. elliptica* increased HaCaT cell proliferation in the maximum 10% than non-fermented *G. elliptica* extraction. Furthermore, investigating changes in protein expression associated with inflammation resulted in a significant reduction in the expression of cyclooxygenase-2 and 70 kDa heat shock protein. Conclusively, the extracts of *G. elliptica* fermented with *A. pullulans* have bioactive functions both anti-oxidant to protect environmental stresses and anti-inflammation activity. Hence, *G. elliptica* fermented with *A. pullulans* would be a good natural resource as bioactive ingredients for cosmetics. Therefore, *G. elliptica* fermented with *A. pullulans* is useful as a astringent material with anti-inflammatory skin.

Keywords: *grateloupia elliptica* (*G. elliptica*), fermentation, anti-inflammation, cyclooxygenase-2, 70 kDa heat shock protein

† 교신저자 (e-mail: kangsg@ynu.ac.kr)
call: 053-810-3025

1. 서론

피부는 몸을 보호하는 보호막이다. 피부염증은 부기, 물집, 붉어짐, 가려움증을 비롯해 종종 인설, 진물, 딱지를 유발하며 피부의 바깥층에 발생한다. 알려진 원인에는 특정 물질과의 접촉, 건성 피부, 정맥류, 특정 약물, 지속적인 긁기 등이 포함된다. 급성 염증은 물리적 혹은 화학적 자극 등에 대항하는 인체의 방어 기전이며, 또한 장기나 조직의 손상을 회복시키는 기전으로 중요한 역할을 한다[1-2]. 피부를 포함한 전신의 염증(inflammation)은 신체의 면역 방어 기전으로서 세포가 자극에 반응하는 생리적 현상이다. 예를 들면, 염증유발인자로서 세균, 바이러스, 곰팡이, 독소, 화학물질 또는 외부 알레르기 유발 물질 등에 세포가 노출되면 면역체계가 작동하고 과다 할 경우 염증이 발생된다. 이러한 염증반응은 염증인자에 자극된 비만세포가 히스타민을 분비하고 또한 박테리아나 염증유발인자들을 포식한 대식세포가 사이토카인 등을 분비하면서 촉발된다[3]. 인체의 조직에서 염증이 발생하면 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 생성되며 산화방지제가 고갈된다. 염증유발 인자에 의하여 세포들은 ROS를 과잉 생산되고 조직 손상을 유발하여 염증 과정이 진행된다. 그러므로 항산화제의 활성을 증가시키면 염증 조직 내 ROS를 제거하여 염증의 진행을 중지시킬 수 있다. 즉, 효과적으로 활성산소를 제거하는 항산화제(antioxidant)는 항염증제(anti-inflammatory)의 역할을 하게 된다[4]. 피부 염증을 유발하는 환경 자극에는 접촉 알레르겐, 화학물질과 자외선이 포함된다. 이러한 다양한 염증유도 인자들은 피부의 각질 세포를 자극하여 피부 염증 반응을 유발한다[5]. 피부의 가려움이나 자외선에 의한 홍반 발생 등을 제어하기 위하여 화장품 소재의 항염증 작용은 매우 중요하다. 이러한 화장품소재의 항염증에 관한 생리활성을 연구하기 위하여 피부세포에 염증유발인자 lipopolysaccharide (LPS)를 처리 하거나 과산화수소(H₂O₂)를 처리한 후 피부세포의 생리활성 변화를 조사한다. LPS는 지질다당류로서 그람음성 세균의 세포벽 구성성분이며 병원균 감염 시 패혈증(sepsis)을 일으키는 원인물질이다 [6-8]. 그리고 H₂O₂는 활성산소종의 하나로 세포의 방어기작에중요한 요소이지만 염증으로 인한 과다 생성 시 세포에 산화적 스트레스를 유발하는 대표적인 물질이다. H₂O₂로 인한 산화적 스트레스는 HaCaT 세포에서 염증성 cytokines 및 chemokines 등의 염증 인자를 방출하여 세포 형태 파괴 및 세포사멸을 유발한다. LPS 및 H₂O₂에 의한 피부의 염

증반응은 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 70 kDa heat shock protein (Hsp70)의 상관관계를 시사하고 있다[9-10].

참도박의 종명은 *Grateloupia elliptica* (Holmes)이며 이명으로 *Pachymeniopsis elliptica* (Holmes)라고도 한다. 몸길이 25 ~ 35 cm의 넓은 원형 또는 난형이며, 쟁반 모양의 뿌리에서 편평하게 넓은 피침상으로 확대된 후, 다수의 열편으로 갈라지거나 불규칙하게 분열한다. 짙은 자홍색을 띠고 두꺼운 혁질이다. 주로 한국과 일본 연안의 우점 해조류이며, 유용물질 추출 대상 해조류로서 산업적 이용 가치가 있다. 참도박은 탈모방지과 항염증 효과 등이 보고된 바 있으나 해조류 특유의 이취로 인하여 화장품의 소재로 널리 사용되지는 않고 있다[11-14].

흑효모(*Aureobasidium pullulans*)는 *Aureobasidium*속에 속하는 검은 곰팡이다[15]. 흑효모는 균사가 없고, 운동성 및 광합성능을 가지지 않는 단세포 생물이다. 특히 습기가 찬 곳에서 쉽게 찾아볼 수 있는 사상균(filamentous fungus)이다. 흑효모는 의약품, 식품 및 화장품 산업에 사용되는 다당류 필름 및 점결제 건강음료 등의 원료인 고분자 다당류인 풀루란(pullulan)을 생산하는 균주이며, 베타-글루칸(β -glucan)을 생산하는 미생물로서 흑효모 발효물 자체만으로도 보습효과, 항산화, 진정효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 흑효모 베타-글루칸(β -glucan)은 항암, 인슐린 분비 억제 등의 생리 활성이 있는 것으로 알려져 있는 성분이 다량 함유되어 있다. 또한 흑효모를 사용한 소재의 발효는 vitamin C 함량이 증가되므로 화장품 조성에 다양하게 사용되고 있다[16-19].

본 연구에서 한국고유 유전자원인 참도박을 화장품의 소재로 개발하기 위하여 흑효모로 발효 한 후 총 polyphenol 및 총 flavonoid 양, 세포생존율 그리고 염증관련 단백질의 발현을 조사하였다.

2. 실험방법

2.1. 균주 배양

한국 미생물 보존센터(Korea)에서 흑효모(*Aureobasidium pullulans*, *A. pullulans*)를 분양받았다. 이 균체 배양을 위해 malt extract (MBcell, Korea), dextrin (Daejung chemical & metals co., ltd, Korea), soy peptone (MBcell, Korea)과 정제수를 투입하여 배지를 제조하였다. 이 배지에 흑효모 균사체를 접종한 후, 진탕 배양기(HB-201SF, HANBAEK, Korea)에서(37 °C, 48 h) 배양시켰다[20-21].

2.2. 실험재료 추출물의 제조

본 실험에서 사용한 참도박을 (주파라제주(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 시료는 흐르는 물에 세척 후 정제수로 세척하였다. 수분을 제거하고 건조시킨 후 칭량하여 사용하였다. 실험재료는 열수 추출물의 경우 시료 무게의 10 배에 해당하는 멸균된 순수정제수를 첨가하여 60 °C, 100 rpm에서 24 h 동안 증탕하였으며, 3 회 반복 추출하였다. 에탄올 추출물의 경우 시료 무게의 10 배에 해당하는 70% 에탄올에 침지하여 상온, 100 rpm에서 24 h 동안 추출하였으며, 3 회 반복 추출하였다. 발효 추출물의 경우 건조된 참도박을 습도가 60% 되도록 멸균된 순수정제수를 투입하여 121 °C에서 20 min 동안 멸균하였다. 멸균된 참도박을 식힌 다음에 2 × 10⁶ cfu/mL의 흑효모 현탁액을 접종 후 30 °C에서 168 h 동안 발효시켰다. 발효 후 흑효모 균체

등을 제거하기 위하여 121 °C에서 20 min 동안 멸균시켜 발효에 사용된 미생물을 완전히 사멸시켰다. 참도박 발효물은 기존의 열수 및 에탄올 추출 방식과 동일하게 추출하였다. 8,000 rpm, 10 min 원심 분리(SUPRa 22K, Haniil, Korea) 후 여과지(Advantec No.2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)로 여과한 후 회전감압농축기(N-1000, Eyela, Japan)를 이용하여 농축하고 건조하였다(Figure 1). 모든 실험 재료는 사용 전까지 -20 °C에 보관하였다[22-24].

2.3. Total Phenolic Contents

총 페놀의 함량 측정은 Sushant 등의 방법을 변형하여 측정하였다[25]. 시료 0.1 g을 정제수 10 mL에 용해시킨 후, 1,500 rpm에서 10 min 동안 원심분리 하였다. 상층액은 여과지(Advantech No. 2)를 이용하여 필터한 후 12,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리하여 사용하였다. 추출 시료 용액 100 μL, 정제수 450 μL, 7.5% sodium carbonate (Na₂CO₃, Daejung Co., Korea) 500 μL와 50% Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, USA) 50 μL을 혼합하였다. 상온에서 30 min 동안 정치 후 UV/VIS spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys, Korea)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질은 gallic acid (Sigma Aldrich, USA)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 함량은 gallic acid equivalents (mgGAE/g extract)로 나타냈다.

2.4. Total Flavonoid Contents

총 flavonoid의 함량 측정은 Sushant 등의 방법을 변형하여 측정하였다[25]. 시료 0.1 g을 정제수 10 mL에 용해시킨 후, 1,500 rpm에서 10 min 동안 원심분리 하였다. 상층액은 여과지를 이용하여 필터한 후 12,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리하여 사용하였다. 추출 시료 용액 200 μL, 정제수 790 μL, 10% aluminum chloride hexahydrate (AlCl₃, DaejungCo., Korea) 30 μL, 1 M potassium acetate (CH₃COOK, Daejung Co., Korea)와 95% ethanol 450 μL을 혼합하였다. 상온에서 40 min 동안 정치하여, UV/VIS spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys, Korea)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin (Sigma Aldrich, USA)을 사용하여 검량선을 작성하였으며, 함량은 quercetin equivalents (mgQE/g extract)로 나타냈다.

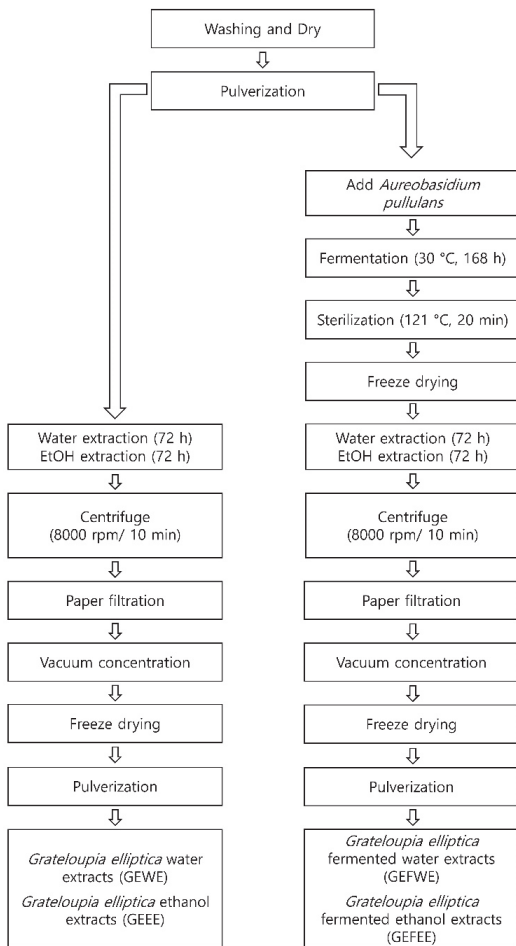


Figure 1. Diagram for preparation of algae extracts and fermented algae extracts.

2.5. 세포배양

인간피부각질세포(HaCaT, keratinocytes) (AddexBio, USA)

를 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, WELGENE, Korea) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, WELGENE, Korea)과 penicillin (100 units/mL)/streptomycin (100 µg/mL) (WELGENE, Korea)을 첨가하여 CO₂세포배양기(NU-4750G, NuAire, USA)에서 5% CO₂공급 하에서 배양하였으며, 3 일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

2.6. LPS 및 H₂O₂에 의한 세포생존율 측정

HaCaT 세포를 이용하여 LPS 및 H₂O₂ 처리에 따른 참도박 추출물과 발효추출물의 세포생존율을 측정하였다.

LPS (Sigma Aldrich, USA) 및 H₂O₂ (Duksan, Korea)에 의한 참도박 추출물과 발효추출물의 세포생존율 측정하기 위해 HaCaT 세포를 96 well plate에 1 × 10⁴ cell/well로 균일하게 분주한 다음 24 h 후 LPS (1 µg/mL), H₂O₂ (1 mM) 농도로 각각 처리하여 24 h 동안 배양한 다음 PBS로 세척 후 각 추출물을 100 µg/mL 농도로 72 h 동안 처리하였다. LPS, H₂O₂ 및 각 추출물을 100 µg/mL 농도로 처리 후 세포생존율에 미치는 효과는 Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, USA)를 사용하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고 DMEM 배지 100 µL 외 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) solution 20 µL를 첨가하여 5% CO₂, 37 °C 압상태 조건에서 3 h 동안 반응시킨 후 microplate reader (Infinite™ F200, Tecan, Switzerland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 배양액을 대조군으로 사용하였다. 세포생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Cell proliferation (\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.7. Western Blotting을 위한 단백질 정제

HaCaT 세포를 100 mm dish에 5 × 10⁵ cell/well로 균일하게 분주한 다음 24 h 후 LPS (1 µg/mL), H₂O₂ (1 mM) 농도로 각각 처리하여 24 h 동안 배양한 다음 PBS로 세척 후 각 추출물을 100 µg/mL 농도로 72 h 동안 처리하였다.

시료를 처리한 HaCaT 세포를 수거한 후, Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (Thermo Scientific, USA)와 M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, USA)를 첨가하여 단백질을 추출하였다. BCA[™] Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA)를 사용하여 단백질 농도를 측정하였다.

2.8. Western Blot Analysis

분리된 단백질 30 µg을 7.5% SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하여 polyvinylidene fluoride (PVDF membrane)에 transfer한 다음 TBS-T (100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.05% Tween20)로 blocking한 후 Hsp70 (MyBioSource, USA), COX-2 (GeneTex, USA) 및 β-actin (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1 차 항체는 각각 1 : 10,000, 1 : 1,500, 1 : 500 비율로 사용하였고 1 차 항체에 대한 Goat anti-rabbit IgG antibody (HRP, GeneTex, USA) 및 m-IgGκ BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology, USA) 2 차 항체를 표지하였다. 2 차 항체 반응을 마친 후 Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA) 용액을 PVDF membrane (Sigma Aldrich, USA) 위에 적용시킨 후 암실에서 필름에 감광 후 현상하였다. MyImager (SLB, Korea)와 LabWorks software (Ultra-Violet Products Ltd., USA)를 이용하여 특정 단백질 밴드의 상대적 강도를 정량하였다.

2.9. 통계처리

모든 실험은 3 회 반복 실시하였고 통계분석은 평균 ± 표준편차를 나타냈으며, student's *t*-test법을 이용하여, *p* value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Total Phenolic Contents

참도박 추출물 및 발효추출물의 총 polyphenol 양을 gallic

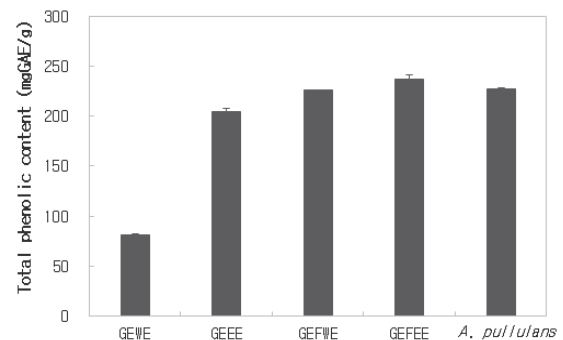


Figure 2. The total phenolic content of *G. elliptica* water extract (GEWE), *G. elliptica* ethanol extract (GEEE), *G. elliptica* fermentation water extract (GEFWE), *G. elliptica* fermentation ethanol extract (GEFEE), *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*).

acid의 양으로 환산하여 정량한 결과, 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)에서 236.59 ± 4.71 mgGAE/g으로 가장 높았으며, 참도박 발효 열수 추출물(GEFWE)에서 225.89 ± 0.30 mgGAE/g, 참도박 에탄올 추출물(GEEE)에서 204.66 ± 2.51 mgGAE/g, 참도박 열수 추출물(GEWE)에서 81.68 ± 0.61 mgGAE/g 순으로 나타났다. 발효 유무에 따라 비교한 결과, GEFWE는 GEWE의 약 2.7 배 증가하였으며 GEFEE는 GEEE의 약 1.1 배 증가하였다. *A. pullulans*는 227.46 ± 0.38 mgGAE/g을 나타냈다(Figure 2).

3.2. Total Flavonoid Contents

참도박 추출물 및 발효추출물의 총 flavonoid 함량을 측정하였다(Figure 3). 추출물에 함유된 flavonoid 양을 quercetin의 양으로 환산하여 정량한 결과, 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)에서 39.15 ± 0.46 mgQE/g으로 가장 높았으며, 참도박 발효 열수 추출물(GEFWE)에서 34.53 ± 1.19 mgQE/g, 참도박 에탄올 추출물(GEEE)에서 17.46 ± 0.60 mgQE/g, 참도박 열수 추출물(GEWE)에서 14.88 ± 0.80 mgQE/g 순으로 나타났다. 발효 유무에 따라 비교한 결과, GEFWE는 GEWE의 약 2.4 배 증가하였으며 GEFEE는 GEEE의 약 2.2 배 증가하였다. *A. pullulans*는 16.69 ± 0.61 mgQE/g을 나타냈다.

3.3. 세포생존율 측정

3.3.1. LPS에 의한 참도박 추출물과 발효 추출물의 세포 생존율 측정

LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 처리 후 각 추출물 $100 \mu\text{g/mL}$ 농도 처리에 따른 세포생존율에 미치는 효과는 Figure 4와 같이 나

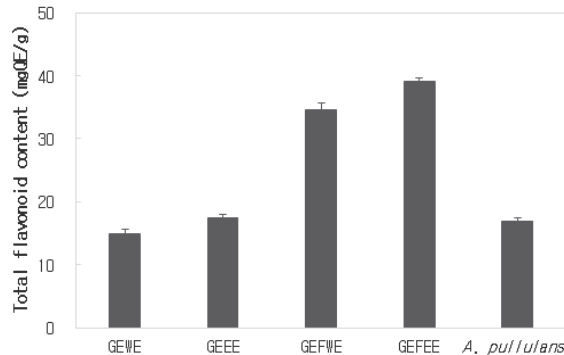


Figure 3. The total flavonoid content of *G. elliptica* water extract (GEWE), *G. elliptica* ethanol extract (GEEE), *G. elliptica* fermentation water extract (GEFWE), *G. elliptica* fermentation ethanol extract (GEFEE), *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*).

타났다. 참도박 열수 추출물(GEWE)는 98.4%, 참도박 에탄올 추출물(GEEE)는 100.6%, 참도박 발효 열수 추출물(GEFWE)는 99.2%, 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)는 96.2%로 나타났다. 그리고 LPS($1 \mu\text{g/mL}$) 처리 후 각 추출물을 처리 한 세포 생존율은 LPS만 처리한 대조군보다 9 ~ 14% 높은 결과를 나타냈다. 따라서 LPS 처리 후 GEWE,

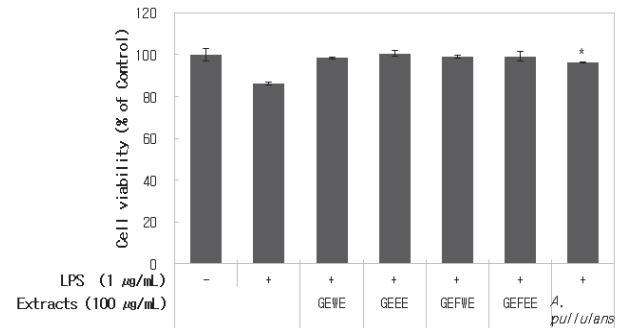


Figure 4. Cell viability and proliferation in HaCaT keratinocyte cells treated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) for 24 h and $100 \mu\text{g/mL}$ of *G. elliptica* water extract (GEWE), *G. elliptica* ethanol extract (GEEE), *G. elliptica* fermentation water extract (GEFWE), *G. elliptica* fermentation ethanol extract (GEFEE), *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*) for 72 h. Statistical significance was determined with respect to the control. Control was not treated with any materials (* $p < 0.05$ vs control).

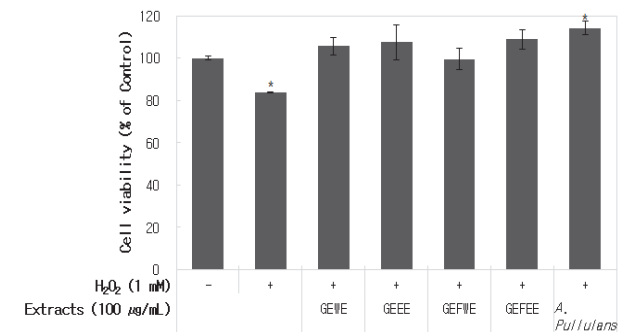


Figure 5. Cell viability and proliferation in HaCaT keratinocyte cells treated with H_2O_2 (1 mM) for 24 h and $100 \mu\text{g/mL}$ of *G. elliptica* water extract (GEWE), *G. elliptica* ethanol extract (GEEE), *G. elliptica* fermentation water extract (GEFWE), *G. elliptica* fermentation ethanol extract (GEFEE), *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*) for 72 h. Statistical significance was determined with respect to the control. Control was not treated with any materials (* $p < 0.05$ vs control).

GEEE, GEFWE, GEFEE를 처리한 결과 세포생존율의 증가를 확인할 수 있었다. *A. pullulans*는 96.2%의 세포생존율을 나타냈다.

3.3.2. H₂O₂에 의한 참도박 추출물과 발효 추출물의 세포생존율 측정

H₂O₂ (1mM)로 처리 후 각 추출물 100 µg/mL 농도로 농도 처리에 따른 세포생존율에 미치는 효과는 Figure 5와 같이 나타났다. 참도박 열수 추출물(GEWE)은 105.6%, 참도박 에탄올 추출물(GEEE)은 107.5%, 참도박 발효 열수 추출물(GEFWE)은 99.4%, 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)은 108.9%로 나타났다. 또한 H₂O₂ 후 각 추출물을 처리 한 세포생존율은 H₂O₂만 처리한 대조군보다 15 ~ 30% 높은 결과를 나타냈다. 따라서 H₂O₂ 처리 후 GEWE, GEEE, GEFWE, GEFEE를 처리한 결과 세포생존율의 증가를 확인할 수 있었다. *A. pullulans*는 114.2%의 세포생존율을 나타냈다.

3.4. Western Blot Analysis

3.4.1. LPS에 의한 참도박 추출물과 발효 추출물의 단백질

LPS에 의한 참도박 추출물과 발효추출물의 HaCaT 세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 단백질 발현 정도를 분석하였다. 배양된 HaCaT 세포에 LPS를 1 µg/mL 농도로 처리하여 각 추출물을 100 µg/mL 농도로 처리 후 cyclooxygenase-2 (COX-2) 및 70 kDa heat shock protein (Hsp70) 단백질 발현 변화를 확인하였다(Figure 6).

LPS에 의해 염증반응이 유도된 HaCaT 세포 통한 염증 매개 사이토카인 COX-2의 발현이 LPS만 처리한 대조군과 비교한 결과 모두 낮은 COX-2 발현 결과를 나타냈다. 그리고 피부세포가 스트레스를 받거나 피부 노화, 주름 형성 등에 관여하는 Hsp70의 발현이 감소한 것을 확인하였다. 따라서 참도박 발효추출물은 참도박 열수, 에탄올추출물보다 COX-2 및 Hsp70 발현이 감소되었다. 이는 흑효모 발효에 의한 참도박 추출물이 피부세포에 염증을 제어하는 항염증 기능의 생리활성이 있음을 시사한다. 본 연구결과 한국고유 유전자원인 참도박을 흑효모로 발효시킨 추출물은 화장품의 수렴제로서 적합하다.

3.4.2 H₂O₂에 의한 참도박 추출물과 발효 추출물의 단백질 발현

H₂O₂에 의한 참도박 추출물과 참도박 발효 추출물이 HaCaT 세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 단백질 발현

정도를 분석하였다. 배양된 HaCaT 세포에 H₂O₂을 1 mM 농도로 처리한 다음 각 추출물을 100 µg/mL 농도로 처리하여 COX-2 및 Hsp70 단백질 발현을 확인하였다(Figure 7).

H₂O₂에 의해 산화적 스트레스가 유도된 HaCaT 세포에서 H₂O₂만 처리한 대조군과 비교하였을 때 참도박 발효 열수 및 에탄올 추출물들은 COX-2와 Hsp70 발현을 현저히 억제시켰다(Figure 7). 이는 참도박 발효 추출물이 피부세포의 염증을 완화시키는 항염증 생리 활성이 있음을 시사한다.

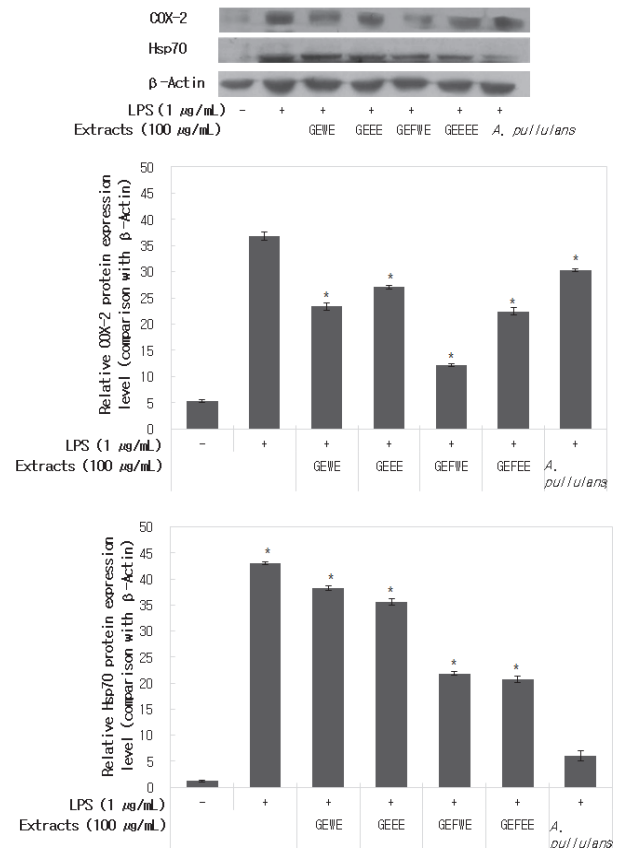


Figure 6. Western blot measurements of COX-2, Hsp70 expression in HaCaT keratinocyte cells treated with LPS (1 µg/mL) for 24 h and 100 µg/mL of *G. elliptica* water extract (GEWE), *G. elliptica* ethanol extract (GEEE), *G. elliptica* fermentation water extract (GEFWE), *G. elliptica* fermentation ethanol extract (GEFEE), *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*) for 72 h. Statistical significance was determined with respect to the control. Control was not treated with any materials ($p < 0.05$ vs control). The presented western blot figure was selected from three times repeated blotting experiments.

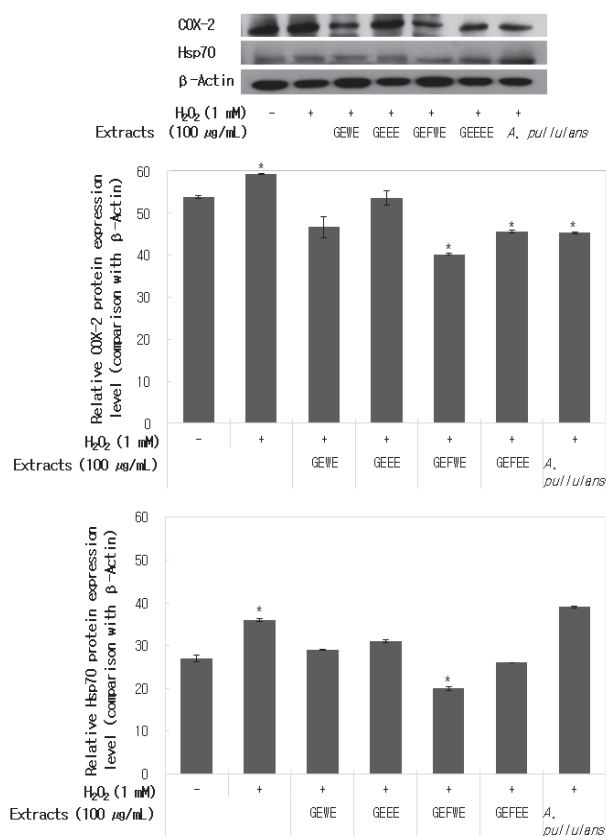


Figure 7. Western blot measurements of COX-2, Hsp70 expression on in HaCaT keratinocyte cells treated with H₂O₂ (1 mM) for 24 h and 100 μg/mL of *G. elliptica* water extract (GEWE), *G. elliptica* ethanol extract (GEEE), *G. elliptica* fermentation water extract (GEFWE), *G. elliptica* fermentation ethanol extract (GEFEE), *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*) for 72 h. Statistical significance was determined with respect to the control. Control was not treated with any materials ($p < 0.05$ vs control). The presented western blot figure was selected from three times repeated blotting experiments.

4. 결 론

본 연구는 참도박을 흑효모로 발효 한 후 총 polyphenol 및 총 flavonoid 양적 변화를 조사하였으며 인간피부각질 세포주(HaCaT)에 대한 세포생존을 그리고 염증관련 단백질의 발현정도를 조사하였다.

참도박 추출물들의 총 polyphenol 함량을 분석한 결과, 참도박 발효 열수 추출물(GEFWE)의 총 polyphenol 함량은 참도박 열수 추출물(GEWE)보다 약 2.7배 증가하였으며 참

도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)의 총 polyphenol 함량은 참도박 에탄올 추출물(GEEE)보다 약 1.1배 증가하였다. 참도박 추출물들의 총 flavonoid 함량을 측정한 결과, 참도박 발효 열수 추출물(GEFWE)의 flavonoid 함량은 참도박 열수 추출물(GEWE)보다 약 2.4배 증가하였으며 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)의 flavonoid 함량은 참도박 에탄올 추출물(GEEE)보다 약 2.2배 증가하였다. 따라서 참도박을 흑효모로 발효 한 결과 총 polyphenol과 총 flavonoid 함량이 증가되었음을 확인하였다.

선행연구에서 확인한 바 DPPH 라디칼 소거활성 및 ABTS 양이온 소거활성 시험을 실시 한 결과 흑효모로 발효한 추출물이 일반 참도박 추출물에 비하여 활성산소(ROS) 제거능이 월등히 높았다[26]. 이는 본 연구에서 확인 한 바와 같이 흑효모로 발효한 추출물의 총 polyphenol과 총 flavonoid 함량이 상대적으로 증가되었기 때문인 것으로 추정된다. 또한 일반적으로 흑효모의 발효과정에서 vitamin C 함량이 증가되므로 추출물의 활성산소(ROS) 제거능은 더욱 증가 될 수 있을 것이다[19]. 따라서 참도박 발효 추출물의 총 polyphenol과 총 flavonoid 함량 증가로 인하여 발효하지 않은 추출물에 비해 높은 항산화능력이 증가된 것으로 사료된다.

흑효모 발효 참도박 추출물은 일반 참도박 추출물에 비하여 LPS 및 H₂O₂ 로 염증이 유도된 피부각질세포의 세포 생존율을 현저히 증가시켰다. 또한 흑효모 발효 참도박 추출물은 COX-2 및 Hsp70 단백질 발현을 감소시켰다. 이는 참도박 발효 추출물이 일반 참도박 추출물에 비해 항산화 능력이 증가하여 활성산소종을 효과적으로 제거하였으므로 활성산소종에 의하여 유도 발현되는 COX-2 및 Hsp70 단백질 발현을 감소시켰을 것이다. 그러므로 참도박 발효 추출물은 피부세포의 염증을 낮추고 제어하는 항염증 생리활성 기능이 향상되었음을 시사한다. 본 연구결과 흑효모 발효 참도박은 해조류의 이취가 제거된 항산화 및 항염증 기능성 해양식물소재로써 화장품 원료로 사용이 가능하다.

References

1. R. Lee, H. Kim, J. M. Yu, Y. H. Cho, D. I. Kim, Y. Shin, Y. Cho, O. J. Kwon, and B. An, Anti-inflammatory effect of *Polygonum multiflorum* extraction in activated RAW 264.7 cells with lipopolysaccharide, *Korean J.*

- Food Preserv.*, **21**(5), 740 (2014).
2. K. E. Lee, J. J. Nam, S. M. Kim, H. K. Kim, S. J. Moon, and J. K. Youm, Anti-inflammatory effects of the mixture of *Sorbus commixta*, *Urtica dioica*, *Phyllostachys nigra*, and *Rhus semialata* gall extracts on LPS-induced inflammation in HaCaT cells, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **40**(1), 45 (2014).
 3. L. Ferrero-Miliani, O. H. Nielsen, P. S. Andersen, and S. E. Girardin, Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation, *Clin Exp Immunol*, **147**(2), 227 (2007).
 4. N. Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, and C. Matar, The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols, *Nutrients*, **10**(11), 1618 (2018).
 5. J. N. Barker, R. S. Mitra, C. E. Griffiths, V. M. Dixit, and B. J. Nickoloff, Keratinocytes as initiators of inflammation, *Lancet.*, **337**(8735), 211 (1991).
 6. B. Zhao, R. Li, F. Yang, F. Yu, N. Xu, F. Zhang, X. Ge and J. Du, LPS-induced vitamin D receptor decrease in oral keratinocytes is associated with oral lichen planus, *Sci Rep.*, **8**(1), 763 (2018).
 7. Y. He, B. G. Kim, H. E. Kim, Q. Chu, S. Shi, G. Ma, Y. Kim, O. S. Kim, and O. J. Kim, The protective role of feruloylserotonin in LPS-induced HaCaT cells, *Molecules*, **24**(17), 3064 (2019).
 8. B. Bertani and N. Ruiz, Function and biogenesis of lipopolysaccharides, *EcoSal Plus*, **8**(1), 10 (2018).
 9. J. Radons, The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?, *Cell Stress Chaperones*, **21**(3), 379 (2016).
 10. T. J. Borges, L. Wieten, M. J. C. V. Herwijnen, F. Broere, R. V. D. Zee, C. Bonorino, and W. V. Eden, The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70, *Front Immunol*, **3**, 95 (2012).
 11. N. Y. Bae, M. J. Kim, K. B. W. R. Kim, N. K. Ahn, Y. U. Choi, J. H. Park, S. H. Park, and D. H. Ahn, Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Grateloupia elliptica* holmes on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells and mice ears, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **44**(8), 1128 (2015).
 12. K. Y. Kim, K. A. Nam, H. Kurihara, and S. M. Kim, Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*, *Phytochemistry*, **69**(16), 2820 (2008).
 13. J. Kang, S. C. Kim, S. C. Han, H. J. Hong, Y. J. Jeon, B. Kim, Y. S. Koh, E. S. Yoo, and H. K. Kang, Hair-loss preventing effect of *Grateloupia elliptica*, *Biomol. Ther (Seoul)*, **20**(1), 118 (2012).
 14. M. L. Cho, G. M. Park, S. N. Kim, T. Amna, S. Lee, and W. S. Shin, Glioblastoma-specific anticancer activity of pheophorbide a from the edible red seaweed *Grateloupia elliptica*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**(3), 346 (2014).
 15. Z. Chi, F. Wang, Z. Chi, L. Yue, G. Liu, and T. Zang, Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**(5), 793 (2009).
 16. H. Y. Choi, J. D. Kim, and M. Y. Park, A 4 week Randomized, Double-blind human trial to compare the efficacy and safety of *Aureobasidium pullulans* cultured solution and placebo on improvement of immune in subjects, *Korean Journal of Oriental Medicine.*, **15**(3), 83 (2009).
 17. E. K. Park, S. M. Kang, and M. H. Leem, A study on the variation of skin moisture, oil(sebum), melanin and erythema index after application of β -glucan, *Kor J Aesthet Cosmetol.*, **1**(3), 83 (2003)
 18. Y. E. Kim, M. A. Yeo, J. H. Han, J. M. Lee, S. K. Jung, H. A. Jeong, S. H. Kim, and J. E. Lee, *Aureobasidium pullulans* ferment of black tea for anti-oxidation, whitening and anti-wrinkle effects, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **43**(3), 265 (2017).
 19. Korea Patent 10-0138716 (2016).
 20. C. Cheng, Y. Zhou, M. Lin, P. Wei, and S. T. Yang, Polymalic acid fermentation by *Aureobasidium pullulans* for malic acid production from soybean hull and soy molasses: Fermentation kinetics and economic analysis, *Bioresour. Technol.*, **223**, 166 (2017).
 21. C. An, S. J. Ma, F. Chang, and W. J. Xue, Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose, *Braz. J. Microbiol.*, **48**(1), 180 (2017).
 22. S. Suraiya, Y. B. Choi, H. D. Park, W. J. Jang, H. H. Lee, and I. S. Kong, *Saccharina japonica* fermented by *Monascus spp.* inhibit adipogenic differentiation and gene

- expression analyzed by real-time PCR (Q-PCR) in 3T3-L1 cell, *J. Funct. Foods*, **55**, 371 (2019).
23. Korea Patent 10-1647049 (2016).
 24. Korea Patent 10-0893350 (2009).
 25. A. Sushant, B. K. Manoj, D. Krisha, K. Puspa, G. Roshani, and K. Niranjana, Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western nepal, *Plants (Basel)*, **8**(4), 96 (2019).
 26. V. V. Vu, K. E. Lee, and S. G. Kang, Evaluation of antioxidant, tyrosinase and collagenase inhibitory of *Grateloupia elliptica* extracts after *Aureobasidium pullulans* fermentation, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **46**(1), 1 (2020).