

생물전환에 의한 감태 및 곰피 추출물의 유효성분 함량 및 아토피 피부염 개선 효과

임준석^{1*} · 조근희^{1*} · 한웅호² · 문 효² · 이세정² · 오 건² · 최선일³ · 이화영⁴ · 이옥환^{1,2,3}

¹강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학전공, ²강원대학교 식품환경융합학과

³강원대학교 농업생명과학연구원, ⁴(주)에스티알 바이오텍

Assessment of Bioactive Compounds and Anti-Atopic Effect of *Ecklonia cava* and *Ecklonia stolonifera* by Bioconversion

June seok Lim^{1*}, Geun hee Cho^{1*}, Xionggao Han², Xiao Men², Se-jeong Lee²,
Geon Oh², Sun-Il Choi³, Wha Young Lee⁴, and Ok-Hwan Lee^{1,2,3}

¹Department of Food Science and Biotechnology, ²Department of Food Biotechnology and Environmental
Science, and ³Agricultural and Life Sciences Research Institute, Kangwon National University

⁴STR Biotech Co., Ltd.

ABSTRACT Atopic dermatitis is a chronic dermatitis caused by the immune imbalance of Th1 and Th2. This study evaluates and compares alleviation of the hyperimmune response due to immune imbalance of Th1 and Th2 after exposure to *Ecklonia cava* (EC), *Ecklonia stolonifera* (ES), fermented *Ecklonia cava* (FEC), and fermented *Ecklonia stolonifera* (FES). The contents of dieckol in EC, FEC, ES and FES were determined to be 8.53±0.33 mg/g, 7.51±0.21 mg/g, 1.42±0.32 mg/g, and 0.84±0.10 mg/g, respectively. The β-glucan content in EC, FEC, ES, and FES was 24.31±0.71 mg/g, 38.22±0.92 mg/g, 34.70±0.83 mg/g, and 58.35±0.46 mg/g, respectively. We also investigated the anti-atopic effect of EC, FEC, ES, and FES on TNF-α/IFN-γ-induced HaCaT cells by evaluating the production of MDC, TARC, and IL-6. Compared to EC and ES, exposure of TNF-α/IFN-γ-induced HaCaT cells to FEC and FES significantly reduced the production of IL-6, MDC, and TARC. The pre-treatment of HaCaT cells with FEC, and FES was observed to inhibit the TNF-α/IFN-γ-induced nuclear transcription factor, NF-κB, Jak1, and STAT1. These results indicate the potential of FEC and FES to be used as functional ingredients for improving atopic dermatitis.

Key words: *Ecklonia cava*, *Ecklonia stolonifera*, atopic dermatitis, β-glucan, bioconversion

서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis)은 산업이 발달하고 핵가족화가 이루어지는 서구화된 나라에서 더욱 흔하게 나타나는 질환이지만, 최근 우리나라에서도 급격한 증가추세를 보이고 있다(Yu 등, 2012). 아토피 피부염은 IgE 피부염(IgE dermatitis), 아토피 습진(atopic eczema), 습진(eczema)이라고도 불리며, 부스럼, 홍반, 삼출물, 심한 소양감과 부종을 특징으로 하는 만성 습진성 피부질환이다(Kim 등, 2009). 아토피 피부염의 주요 증상은 피부 가려움증을 동반한 심한 염증 반응인데, 그 면역학적인 특징은 피부병변에 과도한 면역세포가 침윤(infiltration)되어 인터류킨-6(interleukin-

6, IL-6), 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor-α, TNF-α)를 비롯한 염증성 cytokine의 생성을 촉진하며 CD4⁺T 세포 중에서 Th2, Th22 및 Th17 세포가 편향적으로 분화되어 수많은 염증 관련 cytokine과 chemokine을 생성해 염증 반응을 더욱 촉진하게 된다(Gittler 등, 2012; Yin 등, 2016). 염증성 cytokine의 분비가 촉진되면 피부각질 형성세포의 증식 속도를 감소시키며 진피층의 기질 형성을 방해하여 손상된 피부의 치유속도를 저하해 아토피성 피부염을 유발하게 된다(Seo 등, 2015).

현재까지 피부의 수분 유지, 면역계 염증 반응 조절을 위하여 스테로이드 등이 피부질환의 치료제로 사용되어 왔으나, 대다수 치료제는 일시적 증상 완화의 효과가 있지만 다

Received 27 February 2023; Revised 10 March 2023; Accepted 13 March 2023

Corresponding author: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, 1, Gangwondaehakgil, Chuncheon, Gangwon 24341, Korea, E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

*These authors contributed equally to this work.

© 2023 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

양한 부작용을 초래하는 것으로 알려져 있다(Yang 등, 2010). 따라서 부작용이 없고 천연물로부터 유래된 피부 염증 질환 완화제나 치료제 개발에 관한 연구가 필요한 실정이다.

감태(*Ecklonia cava*)는 식용 해조류이며 갈조식물 다시마목(*Laminariales*) 미역과(*Alariaceae*)의 식물로 주로 우리나라 남해안과 제주 연안에 서식한다(Kang과 Kim, 2009). 감태 추출물과 감태의 지표성분으로 잘 알려진 dieckol은 항염증, 피부질환 억제 및 항알레르기 효능을 갖는다고 보고된 바 있다(Kim과 Bae, 2010; Wijesinghe 등, 2013).

곰피(*Ecklonia stolonifera*)는 다년생 갈조류로 갈조식물문 갈조강 다시마목(*Laminariales*) 다시마과(*Laminariaceae*)에 속하며, 우리나라 동해안과 남해안을 따라 분포하여 우리나라에서는 다시마, 미역 등과 함께 오래전부터 식용으로 이용해오고 있는 해조류이다(Manandhar 등, 2019). 곰피의 주요 기능성 성분으로는 dieckol을 비롯한 phlorotannin류인 phloroglucinol, eckol, eckstolonol, phlorofucofuroeckol A 및 스테롤 유래의 대사물질인 fucosterol 등이 있다(Choi 등, 2015). Dieckol은 phlorotannin의 한 종류로 염증 매개체의 mRNA 발현 수준을 유의적으로 감소시키고, 세포 내 활성산소종 생성을 감소시켜 대식세포를 보호한다고 보고되었다(Sanjeewa 등, 2020).

생물전환(bioconversion)이란 미생물을 이용하여 전구물질로부터 원하는 산물을 제조하는 기술이다. 기존의 발효공정은 비교적 단순한 원료에서 시작되는 반면, 생물전환공정은 미생물이나 효소의 기질 선택성을 이용하여 기존 물질의 구조적 변화를 통해 유효성분의 함량 증가 및 흡수와 같은 생물학적 변화를 유도하는 기술로 현대 제약 및 화장품 분야에서 다양한 방식으로 시행되고 있다(Lee 등, 2013). Jung 등(2016)의 연구에 의하면 표고버섯 균사체에 의해 이소플라본은 항산화 활성 등의 생리활성이 증가하였다. 또한 표고버섯 균사체 발효로 생성되는 다당류 성분이 면역증가 및 항암 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으나, 이러한 효능을 나타내는 표고버섯 균사체에 의한 해조류의 생물전환에 관한 연구는 시도된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 dieckol을 함유한 해조류인 감태와 곰피가 표고버섯 균사체에 의한 생물전환을 거치면서 생기는 유효성분과 지표성분의 함량변화를 조사하고 생물전환공정 시 아토피 피부염 억제 효능에 변화가 있는지 확인해 보고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 감태 원물(*Ecklonia cave*, EC)은 (주)태림상사에서, 곰피 원물(*Ecklonia stolonifera*, ES)은 완도맘영어조합법인에서 구매하였으며, 표고버섯 균사체(*Len-tinus edodes*)에 의해 발효된 감태 발효물(fermented *Ec-*

klonia cava, FEC)과 곰피 발효물(fermented *Ecklonia stolonifera*, FES)은 (주)에스티알바이오텍에서 제공받아 사용하였다. 표준물질 dieckol은 순도 98%로, Avention Co., Ltd.에서 구입하여 사용하였다. Formic acid, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등의 시약은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였으며, acetonitrile, 메탄올은 J.T. Baker에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco RBL Co.에서 구입하였으며, penicillin-streptomycin은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다. Western blot을 위해 사용된 모든 1차 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였으며, 모든 cytokine과 chemokine assay kit은 R&D System에서 구입하여 사용하였다.

감태 및 곰피의 생물전환

구입한 EC와 ES의 이물 및 오염물을 제거하기 위하여 세척하고 물기를 털어낸 후 동결건조하여 분말화하였다. 분말화된 EC 및 ES에 증류수를 첨가한 후 효소 처리 및 열처리 살균공정을 거쳐 배양 배지화했으며, 발효미생물로 선정된 표고버섯 균사를 10% 접종하여 배양온도는 28~30°C 및 pH 4.5~7의 조건에서 배양하였다. 이후 배양기질인 EC 및 ES와 발효배양산물인 배양균사체의 세포벽을 구성하는 유용물질을 세포벽으로부터 효율적으로 추출하기 위하여 Laminex Super 3G(Danisco)를 0.05% 첨가하고, 60°C 조건에서 1시간 동안 shaker(SI-4000R, Jeio Tech Co., Ltd.)를 이용하여 250 rpm에서 효소/기질반응을 수행하여 FEC와 FES를 생산하였고 살균 및 동결건조하여 분말화하였다.

추출물 제조

EC, FEC, ES, FES의 추출 방법은 Jung 등(2016)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 즉, 각각 1 g의 EC, FEC, ES, FES에 30% 에탄올을 10 mL 첨가하여 30분간 sonicator(JAC Ultrasonic, KODO)를 이용하여 추출하였고, 추출 후 원심분리기(416, GYROZEN Co.)를 사용하여 2,000×g로 10분간 원심분리한 다음 고형성분을 제거하여 -20°C에서 보관하며 세포 실험에 사용하였다.

지표성분 dieckol 함량 분석

Dieckol 표준물질을 25 mg 칭량 후 25 mL 부피플라스크를 이용해 DMSO로 정용하여 1 mg/mL 농도의 stock solution을 제조하였으며 working solution은 dieckol stock solution을 이용해 각각 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL가 되도록 70% 메탄올로 희석하여 검량선을 작성하였다. 시험용액은 EC, FEC, ES, FES를 각각 750 mg 취한 후 25 mL 부피플라스크를 이용해 70% 메탄올로 정용한 다음 30분 동안 sonication 처리 후, 원심분리기를 이용하여 2,000×g로 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 EC와

Table 1. HPLC analytical conditions for dieckol

Instrument	Conditions		
Column	Capcellpak C ₁₈ UG120 (5.0 im, 4.6 mm×250 mm)		
Column temp.	25°C		
	Time (min)	A ¹⁾ (%)	B ²⁾ (%)
Mobile phase (Gradient)	0	74	26
	15	74	26
	18	0	100
	20	74	26
	30	74	26
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector (234 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 µL		
Run time	30 min		

¹⁾0.1% formic acid.

²⁾Acetonitrile.

FEC의 상층액은 70% 메탄올로 희석하여 5,000 µg/mL의 농도로 제조하였으며, ES와 FES의 상층액은 70% 메탄올로 희석하여 20,000 µg/mL의 농도로 제조하였다. 제조한 시료들은 0.45 µm syringe filter(Whatman)로 여과하여 분석에 사용하였다. Dieckol의 HPLC 분석을 위해 Han 등(2022)의 분석 방법을 변형하여 최적 분석 방법 확립 후 진행하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다. 분석에 사용한 컬럼은 Capcellpak C₁₈(250×4.6 mm, 5 µm, Osaka Soda)이고, 기기는 Waters 996 Photodiode Array Detector(Waters)를 사용하였다. 이동상은 0.1% formic acid in water(A)와 acetonitrile(B)을 0~15 min: A 74%, B 26%, 15~18 min: A 0%, B 100%, 18~20 min: A 74%, B 26%, 20~30 min: A 74%, B 26%의 이동상 조건으로 분석시간은 30분으로 설정하였고 검출 파장은 232 nm, 컬럼 온도 25°C, injection volume은 10 µL, 이동상 유속은 1.0 mL/min으로 설정하였다. 또한 표준물질은 1.56~100 µg/mL, 7 point로 검량선을 그리고 시료는 EC와 FEC를 농도 5,000 µg/mL로 제조하고, ES와 FES는 농도 20,000 µg/mL로 제조하여 실험을 진행하였다.

β-Glucan 함량 측정

β-Glucan 함량은 Shin 등(2014)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료는 0.5 mm sieve에 통과시켜 실험에 사용하였다. EC, FEC, ES, FES를 각각 100 mg 취해 각 tube에 넣고 가볍게 쳐서 바닥에 모이게 한 뒤, 50% 에탄올 0.2 mL와 sodium phosphate buffer(4.0 mL, 20 mM, pH 6.0)를 첨가하여 교반하였다. 그 후 tube를 boiling bath에 넣고 60초간 incubate 시킨 뒤 100°C에서 2분간 incubate 시키고 50°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 sodium acetate buffer(5.0 mL, 200 mM, pH 4.0)를 첨가하여 상온에서 5분간 안정화시킨 뒤 1,000×g에서 10분간 원심분리하

여 상등액만 0.1 mL씩 취하였다. 상등액에 β-glucosidase (0.1 mL, 2.0 U)를 첨가하고 50°C에서 20분간 반응시킨 뒤 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며 시료의 β-glucan 함량은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\beta\text{-Glucan (mg/g)} = \Delta A \times F \times \frac{FV}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180} \times D$$

ΔA Absorbance

F 50 (µg of d-glucose)/ Absorbance of 50 µg of d-glucose

FV Final volume

0.1 Volume of sample analysed

1/1000 Conversion from µg to mg

162/180 Factor to convert from free d-glucose to anhydro-d-glucose

D Dilution factor

세포배양 및 세포독성 평가

실험에 사용된 HaCaT cell은 CLS에서 구입하였다. 세포 배양을 위해 DMEM에 FBS 10%, antibiotic-antimycotic 1%를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 배양하였다. HaCaT cell에 대한 시료의 세포독성 평가는 XTT {2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt} assay kit을 Sigma-Aldrich Co.에서 구매하여 측정하였다. HaCaT cell을 96-well plate에 5×10⁴ cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양하였다. 24시간 동안 배양된 HaCaT cell에 면역과민반응을 유도하기 위한 10 ng/mL의 TNF-α/IFN-γ를 처리하였고 양성대조군인 quercetin 50 µM과 EC, FEC, ES, FES의 농도를 25, 50, 100 µg/mL로 하여 TNF-α/IFN-γ와 동시에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 XTT reagent와 PMS reagent를 첨가하고 4시간 동안 세포 배양기에서 반응시킨 후 microplate reader의 690 nm와 450 nm에서 각각 흡광도 값을 측정하였으며, 450 nm에서 측정한 흡광도 값에서 690 nm에서 측정한 흡광도 값을 빼 세포독성을 계산하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

EC, FEC, ES 그리고 FES가 cytokine 및 chemokine 생산량에 대해 미치는 영향을 확인하기 위해 HaCaT cell을 12-well plate에 2×10⁵ cells/well 농도로 분주하고 24시간 동안 배양하였으며, 이후 양성대조군인 quercetin 50 µM과 EC, FEC, ES, FES의 농도를 25, 50, 100 µg/mL로 하여 면역과민반응을 유도하기 위한 10 ng/mL의 TNF-α/IFN-γ와 동시에 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 배양배지의 상층액을 수득하여 실험에 사용하였으며, cytokine과 chemokine 생성량은 제조사의 지침에 따라 수행하여 측정하였다.

Western blot 분석

HaCaT cell을 100 Φ dish에 배양하였으며 면역과민반응을 유도하기 위해 TNF- α /IFN- γ 10 ng/mL를 처리하였다. 양성대조군인 quercetin은 50 μ M로 EC, FEC, ES, FES는 25, 100 μ g/mL 농도로 하여 TNF- α /IFN- γ 와 동시에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. Phosphate-buffered saline으로 2회 세척 후 수득된 세포를 lysis buffer를 이용하여 용해시킨 뒤, 12,000 \times g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 수득하고 분리된 단백질을 bradford protein assay kit(Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 정량하였다. 그 후 단백질(30 μ g)을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis에서 전기영동 하였으며, 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane으로 전이시켰다. 항체의 비특이적 결합을 억제하기 위해 5% skimmed milk로 1시간 동안 반응시켰으며, TBST buffer로 10분간 3회 세척하였다. 그 후 membrane은 1:1,000으로 TBST buffer에 희석된 1차 항체(Cell Signalling Technology)와 4°C에서 12시간 반응하였으며, 3회 세척 후 1:1,000으로 희석된 2차 항체(Cell Signalling Technology)와 1시간 반응하였다. 그 후 ECL detection reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc.)와 Chemi Doc image software 5.2.1(Bio-Rad Laboratories)을 활용하여 단백질 발현 정도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 진행하여 평균값과 표준편차를 구하였고, 실험의 결괏값에 대한 통계처리는 통계 소프트웨어 SPSS Statistics ver. 26.0(IBM Co.)을 이용하여 분석하였다. 또한 유의성 분석은 ANOVA 검정을 시행하여 Duncan의 다중 범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로, 유의성 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

지표성분 dieckol 함량

Han 등(2022)의 분석 방법을 일부 변형하여 EC, FEC, ES, FES의 dieckol 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. Dieckol의 함량은 EC 8.53 \pm 0.33 mg/g, FEC 7.51 \pm 0.21 mg/g, ES 1.42 \pm 0.32 mg/g 그리고 FES 0.84 \pm 0.10 mg/g으로 나타났다. 이를 통해 생물전환 진행 시 지표성분인 dieckol의 함량이 감소한다는 것이 확인되었다. Wijesinghe 등(2012)의 연구에서 EC를 발효하였을 때 dieckol에 의한 항산화 활성이 증가하지만, 발효기간이 늘어날수록 오히려 항산화 활성이 감소한다고 보고되었다. 이는 발효 후 dieckol 함량이 감소한 본 연구와 비슷한 경향을 보였다.

β -Glucan 함량

Mixed-linkage beta-glucan kit을 이용해 EC, FEC,

Table 2. Dieckol and β -glucan contents of *Ecklonia cava* (EC), fermented *Ecklonia cava* (FEC), *Ecklonia stolonifera* (ES), and fermented *Ecklonia stolonifera* (FES)

Sample	Dieckol (mg/g)	β -Glucan (mg/g)
EC	8.53 \pm 0.33 ^a	24.31 \pm 0.71 ^d
FEC	7.51 \pm 0.21 ^b	38.22 \pm 0.92 ^b
ES	1.42 \pm 0.32 ^c	34.70 \pm 0.83 ^c
FES	0.84 \pm 0.10 ^d	58.35 \pm 0.46 ^a

Mean values with different letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. All data were expressed mean \pm SD.

ES, FES의 β -glucan 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. EC는 β -glucan 함량이 24.31 \pm 0.71 mg/g이고 FEC는 38.22 \pm 0.92 mg/g으로 생물전환 이후 β -glucan의 함량이 높아졌으며, ES는 34.70 \pm 0.83 mg/g이고 FES가 58.35 \pm 0.46 mg/g으로 역시 생물전환 이후 β -glucan의 함량이 높아졌다. Kim 등(2019)에 따르면 발효하지 않은 사과/배 부산물에서는 β -glucan의 함량이 정량되지 않았지만, 표고버섯 균사체에 의해 발효가 진행된 사과/배 부산물에서는 β -glucan의 함량이 정량되어, 이는 표고버섯 균사체로부터 기인한 β -glucan이라고 보고된 바 있다. 따라서 EC, ES의 발효물인 FEC와 FES의 β -glucan 함량이 높아진 이유는 표고버섯 균사체로부터 기인한 것으로 사료된다.

세포독성 평가

XTT reagent를 살아있는 세포에 처리하게 되면 세포 내 mitochondria에서 생성되는 dehydrogenase와 반응하여 tetrazolium ring 구조가 분해되고 노란색 formazan crystal을 형성하게 된다(Ali 등, 2021). TNF- α /IFN- γ 를 시료 EC, FEC, ES, FES와 동시에 처리하였을 때의 세포독성 평가에 대한 실험 결과는 Fig. 1과 같다. TNF- α /IFN- γ 10 ng/mL만 처리한 실험군과 양성대조군 quercetin 50 μ M, EC, FEC, ES, FES를 농도별로 TNF- α /IFN- γ 와 동시에 처리한 실험군 모두 흡광도 값을 대조군과 비교하였을 때 유의한 차이가 없거나 높았으며, 현미경 상에서의 morphology의 변화도 관찰되지 않아 세포독성을 나타내지 않는 것으로 판단하였다. 따라서 이후 실험들은 25, 50, 100 μ g/mL의 농도를 이용하여 실험을 진행하였다.

ELISA를 이용한 cytokine 변화

IL-6는 백혈구 이동 및 각질세포 증식을 자극하는 염증성 cytokine이다(Gurgis 등, 2015). 또한 MDC/CCL22 및 TARC/CCL17은 염증성 피부 질환에서 Th2 세포에 민감하고 Th2 림프구의 염증 부위로의 이동을 유도하는 chemokine으로 알려져 있다(Jahnz-Rozyk 등, 2005). EC, FEC, ES, FES를 농도별로 처리했을 때 IL-6, TARC 그리고 MDC 생성량의 결과는 Fig. 2와 같다. HaCaT 세포의 염증 반응을 유발하는 TNF- α 와 IFN- γ 10 ng/mL를 단독으로 처리한 실험군에서 cytokine 및 chemokine의 생성량이 증

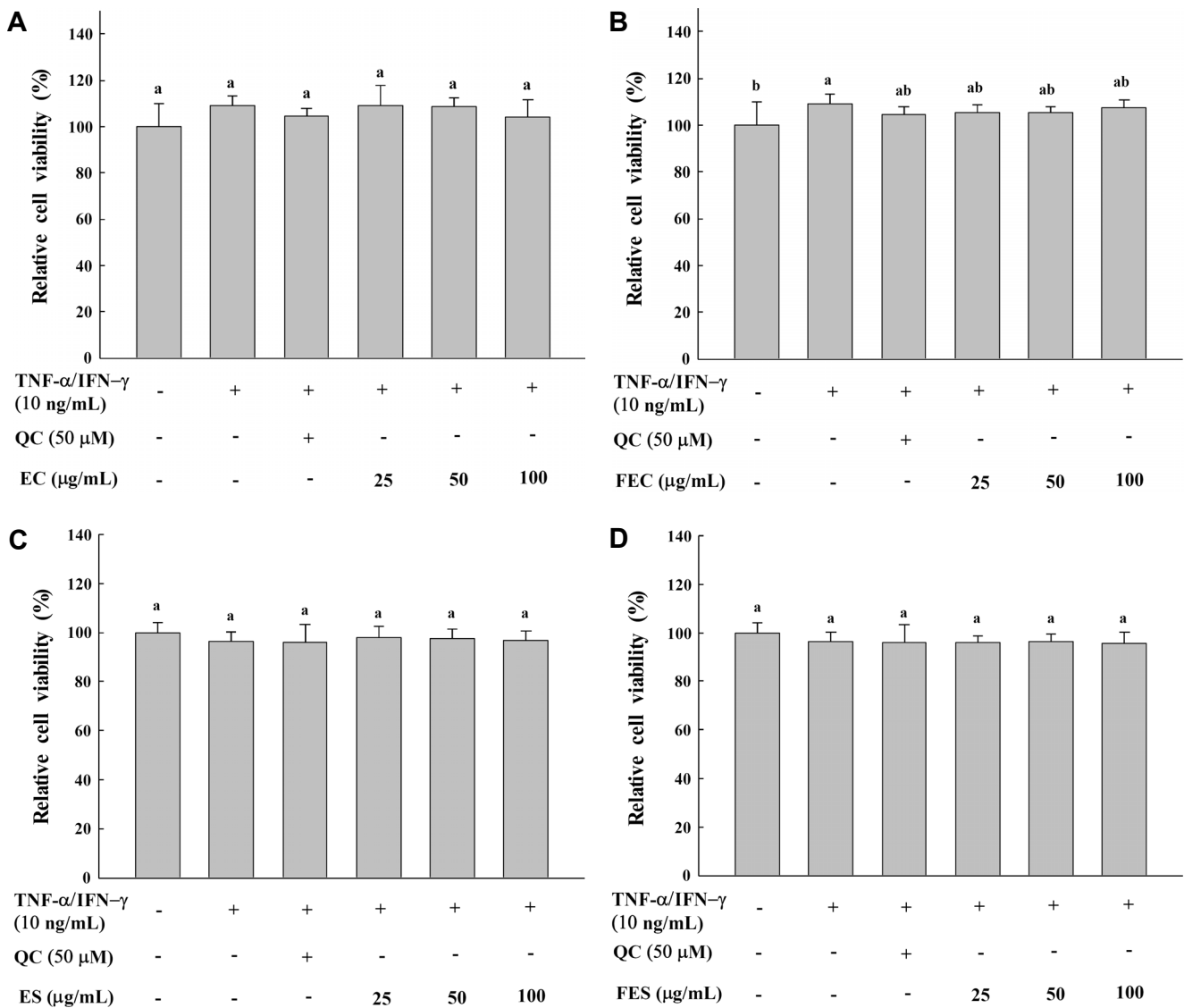


Fig. 1. Cytotoxicity of samples on cell viability (%) in HaCaT keratinocytes. A, *Ecklonia cava* (EC); B, fermented *Ecklonia cava* (FEC); C, *Ecklonia stolonifera* (ES); D, fermented *Ecklonia stolonifera* (FES). Cell viability was assessed by XTT assay. All experiments were performed in triplicates, and all values were expressed as the mean \pm SD. Different small letters indicate a significant difference between group ($P < 0.05$).

가하였지만, quercetin 50 μ M과 EC, FEC, ES, FES를 25, 50, 100 μ g/mL 농도로 동시에 처리하였을 때 IL-6, TARC, MDC는 생성량이 감소하였으며 EC, FEC, ES, FES를 처리한 실험군들에서는 모두 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 FEC와 FES는 EC와 ES에 비해 유의적으로 cytokine과 chemokine의 생성량이 감소하였다. Kang 등(2015)에 따르면 EC와 ES의 지표성분인 dieckol에 의해 MDC의 생산을 억제하여 dieckol이 항염증 효능을 가진다고 보고되었으며, Ozanne 등(2020)에 의하면 *Laminaria digitata*의 β -glucan인 Laminarin에 의해 IL-6의 생성을 억제하여 β -glucan이 항염증 효능을 가진다고 보고되었고, Choi 등(2021)에 따르면 발효도라지가 비발효도라지에 비해 IL-6, TARC, MDC 등 cytokine과 chemokine의 생성량을 유의

하게 감소시켜 발효 시 아토피 피부염 억제 효능이 향상된다고 보고된 바 있다. 따라서 EC와 ES의 발효로 생산된 FEC와 FES의 β -glucan 함량이 증가함에 따라 IL-6, TARC, MDC 생성량을 감소시켜 아토피 피부염 억제 효능이 향상되었다고 판단된다.

Western blot 분석을 통한 단백질 발현 변화

NF- κ B는 NF- κ B(I κ B) 계열 단백질의 내인성 억제제에 결합한 비활성 형태로 세포질에 일반적으로 존재하는 Rel 계열의 이형이량체 전사인자로 인산화된 NF- κ B가 핵으로 전위되어 cytokine 및 chemokine 생성 유전자 조절인자로 작용한다(Kwon 등, 2011). 관련 단백질 평가 결과는 Fig. 3B와 같다. TNF- α /IFN- γ 에 의하여 p-NF- κ B의 단백질

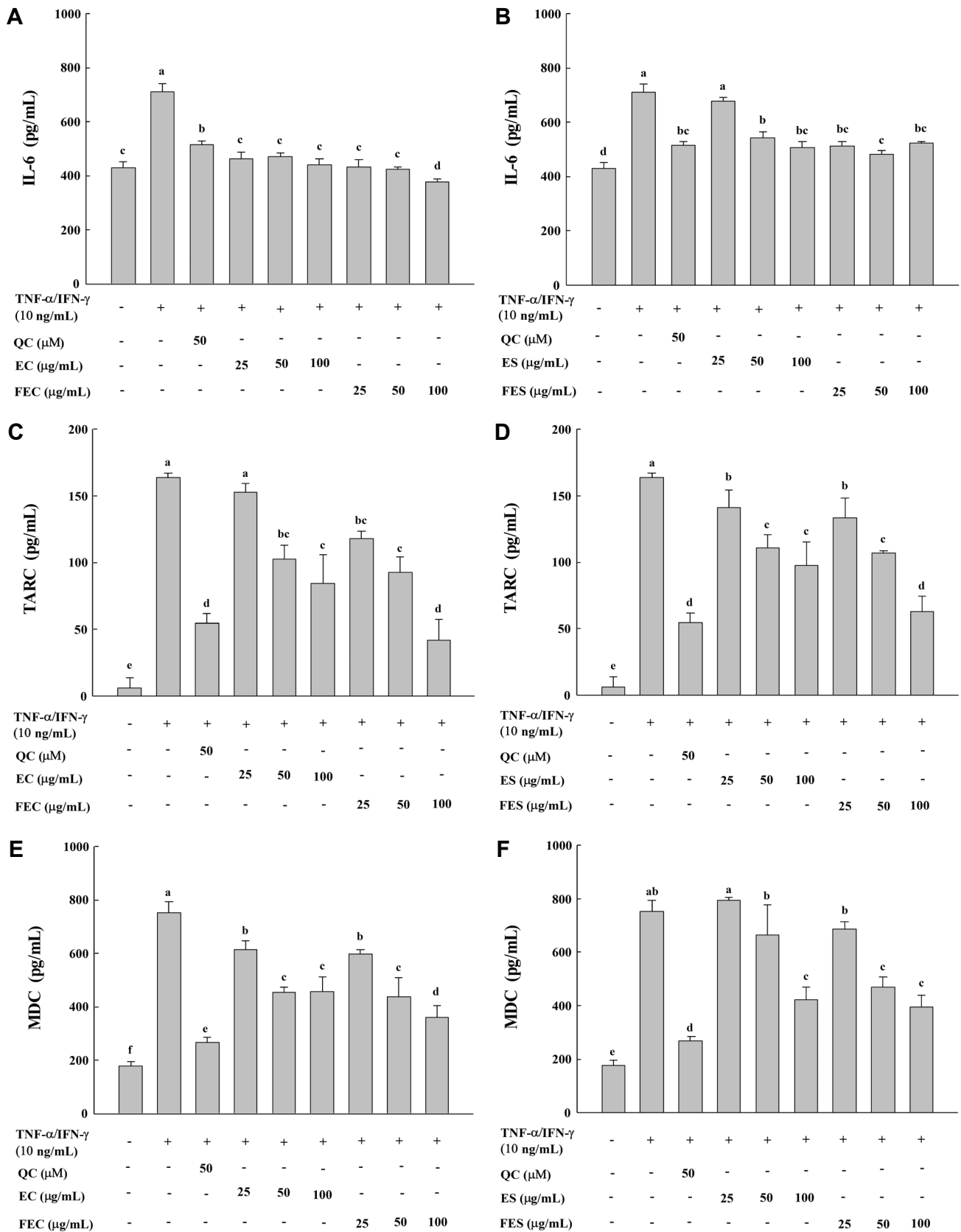


Fig. 2. Effects of EC, FEC, ES, and FES on the TNF-α/IFN-γ-induced TARC, MDC, and IL-6 production in HaCaT cells. The production of (A, B) IL-6, (B, C) TARC, and (E, F) MDC protein measured by ELISA. Experiments were performed in triplicates, and all values were expressed as the mean±SD. Different small letters indicate a significant difference between group ($P<0.05$).

발현량이 증가하였으며, 양성대조군인 quercetin 처리 시 p-NF- κ B가 감소하는 것으로 나타났다. EC와 FEC의 경우 100 μ g/mL 처리 시 TNF- α /IFN- γ 처리군에 비하여 p-NF- κ B가 감소하는 것으로 나타났으나 EC와 FEC 사이에 유의미한 차이는 없었다. 이와 달리 ES에서는 p-NF- κ B 발

현량이 TNF- α /IFN- γ 처리군과 유의미한 차이가 없었으나, FES에서는 농도 의존적으로 p-NF- κ B 발현량이 감소하였다.

Jak1은 IFN- γ 가 수용체 결합에 의해 활성화되어 cytokine 수용체 및 다른 Jak의 티로신 잔기를 인산화하여 도킹

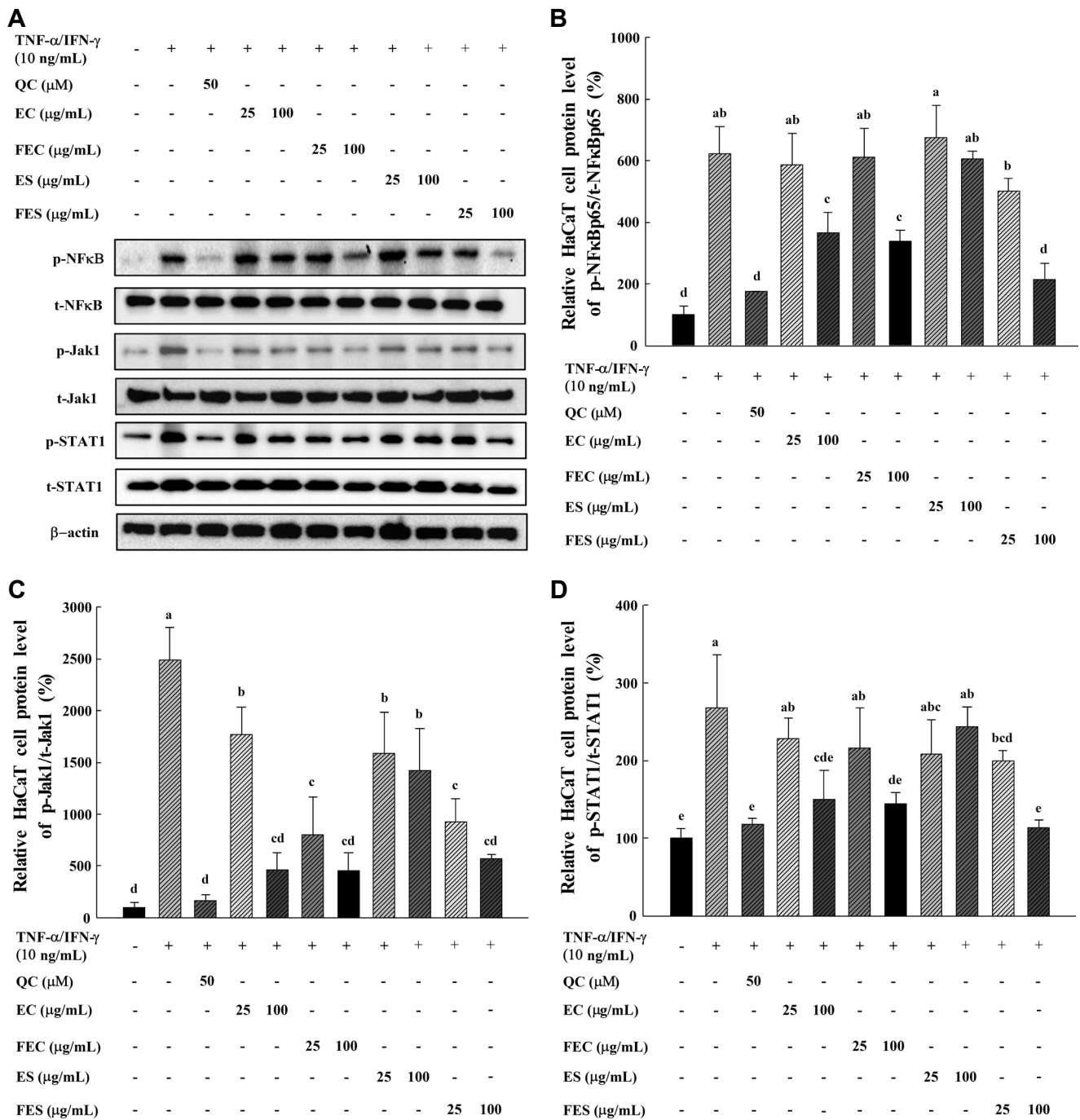


Fig. 3. Effects of EC, FEC, ES, and FES on TNF- α /IFN- γ induced NF- κ B, Jak1, and STAT1 protein expression in HaCaT cells. The cells were incubated with EC, FEC, ES, FES, and/or TNF- α /IFN- γ (10 ng/mL) for 24 h and harvested. (A) The protein expression of NF- κ B, Jak1, and STAT1 was determined by immunoblotting. The relative protein levels of (B) p-NF- κ B, (C) p-Jak1, and (D) p-STAT1 were densitometrically quantified with β -actin. All values are expressed as the mean \pm SD. Different small letters indicate a significant difference between group ($P < 0.05$).

사이트를 생성할 수 있으며, 이로써 STAT1을 모집 및 인산화한다(Darnell 등, 1994). 관련 단백질 평가 결과는 Fig. 3C와 같다. TNF- α /IFN- γ 에 의하여 p-Jak1의 발현량이 증가하였으며, 양성대조군인 quercetin 처리 시 p-Jak1의 발현량이 감소하였다. EC와 FEC의 경우 두 시료 모두 농도 의존적으로 p-Jak1의 발현량이 감소하였고, FEC가 EC에 비해 p-Jak1의 발현량을 유의적으로 감소시켰다. ES와 FES 역시 농도 의존적으로 p-Jak1의 발현량이 감소하였으며, FES가 ES에 비해 p-Jak1의 발현량을 유의적으로 감소시켰다.

STAT1은 Jak에 의해서 활성화되고, 활성화된 STAT1은 다른 STAT1과 이량체를 형성하며 핵으로 이동해 DNA에 결합하여 cytokine 및 chemokine 생성 유전자 전사를 조절한다(Ju 등, 2009). 관련 단백질 평가 결과는 Fig. 3D와 같다. TNF- α /IFN- γ 에 의하여 p-STAT1의 단백질 발현량이 증가하였으며, 양성대조군인 quercetin 처리 시 p-STAT1의 발현량이 감소하였다. EC와 FEC의 경우 100 μ g/mL에서 TNF- α /IFN- γ 처리군에 비하여 p-STAT1이 감소하는 것으로 나타났고, EC와 FEC의 p-STAT1의 발현량 감소는 유의미한 차이가 없었다. ES에서는 TNF- α /IFN- γ 처리군에 비하여 p-STAT1의 발현량에 유의미한 차이를 보이지 않았으나, FES에서 STAT1의 발현량이 농도 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다.

이상의 결과들은 EC가 p-NF- κ B, p-Jak1, p-STAT1의 단백질 발현을 억제함으로써 아토피 피부염 억제 효능을 가질 수 있다는 것을 보여주며, FEC는 p-Jak1의 단백질 발현을 EC보다 유의적으로 억제함으로써 발효를 통해 아토피 피부염 억제 효능을 향상시킬 수 있다는 것을 보여준다. ES의 경우 p-Jak1의 단백질 발현을 억제함으로써 아토피 피부염 억제 효능을 가질 수 있다는 것을 보여주며, FES는 p-NF- κ B, p-Jak1, p-STAT1의 단백질 발현을 ES보다 유의적으로 억제함으로써 발효를 통해 아토피 피부염 억제 효능을 향상시킬 수 있다는 것을 보여준다.

요 약

본 연구에서는 표고버섯 균사체에 의해 발효된 FEC, FES의 아토피 피부염 개선효과를 EC, ES와 비교하였다. Dieckol 함량의 경우 EC 8.53 \pm 0.33 mg/g, FEC 7.51 \pm 0.21 mg/g, ES 1.42 \pm 0.32 mg/g, FES 0.84 \pm 0.10 mg/g으로 생물전환 과정을 거친 후에 dieckol 함량이 줄어드는 것을 확인하였다. 유효성분인 β -glucan의 함량은 EC 24.31 \pm 0.71 mg/g, FEC 38.22 \pm 0.92 mg/g, ES 34.70 \pm 0.83 mg/g, FES 58.35 \pm 0.46 mg/g으로 측정되었다. 이를 통해 생물전환 후의 FEC와 FES에서 유의미하게 β -glucan의 함량이 증가하였음을 확인하였다. HaCaT cell을 이용한 세포독성 실험에서는 EC, FEC, ES 그리고 FES가 25~100 μ g/mL 농도에서 세포독성을 보이지 않았다. TNF- α /IFN- γ 로 증가한 p-

NF- κ B, p-Jak1, p-STAT1의 단백질 발현량은 EC, FEC, ES, FES의 처리에 의해 감소하였으며, 특히 FEC는 p-Jak1의 단백질 발현량을 EC보다 유의적으로 감소시켰으며, FES는 p-NF- κ B, p-Jak1, p-STAT1의 단백질 발현량을 ES보다 유의적으로 감소시켰다. 또한 EC, FEC, ES, FES에 의한 IL-6, MDC, TARC의 생성량은 농도 의존적으로 감소하였으며, FEC와 FES는 EC와 ES보다 유의적으로 IL-6, TARC, MDC의 생성량을 감소시켰다. 이상의 결과들을 종합해볼 때, FEC와 FES는 EC와 ES에 비해 지표성분인 dieckol 함량이 감소하였지만, β -glucan 함량이 유의적으로 증가하였고 FEC는 p-Jak1의 단백질 발현량을 EC보다 유의하게 억제하고, FES는 p-NF- κ B, p-Jak1, p-STAT1의 단백질 발현량을 ES보다 유의하게 억제하여 피부면역과민 반응에 주요한 cytokine과 chemokine의 생성량을 감소시켰다. 이는 FEC와 FES가 EC와 ES에 비해 아토피 피부염 개선 효과가 높음을 시사한다. 따라서 생물전환을 거친 해조류, 특히 감태와 곰피는 기능성이 향상된 소재로서 이용 가치가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 정부(과학기술정보통신부), 교육부와 한국연구재단의 재원으로 교육부 및 한국연구재단을 통한 4단계 두뇌한국21 사업(4단계 BK21 사업)(4299990913942), 기초연구사업(2021R1A6A1A03044242) 그리고 한국연구재단(NRF-2017RID1A3B06028469)으로부터 지원을 받아 수행된 사회맞춤형 산학협력 선도대학(LINC+)육성사업(No. 202210780001)의 연구로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ali S, Sudha KG, Karunakaran G, et al. Green synthesis of stable antioxidant, anticancer and photocatalytic activity of zinc oxide nanorods from *Leea asiatica* leaf. J Biotechnol. 2021. 329:65-79.
- Choi JS, Han YR, Byeon JS, et al. Protective effect of fucosterol isolated from the edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*, on tert-butyl hydroperoxide- and tacrine-induced HepG2 cell injury. J Pharm Pharmacol. 2015. 67: 1170-1178.
- Choi SI, Choi YE, Han X, et al. Fermented *Platycodon grandiflorum* extract alleviates TNF- α /IFN- γ -induced inflammatory response in HaCaT cells and modulates immune balance on 1-chloro-2,4-dinitrobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. J Funct Foods 2021. 85:104617. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104617>
- Darnell Jr JE, Kerr LM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science. 1994. 264:1415-1421.
- Gittler JK, Shemer A, Suárez-Fariñas M, et al. Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2012. 130:1344-1354.
- Gurgis FMS, Yeung YT, Tang MXM, et al. The p38-MK2-HuR

- pathway potentiates EGFRvIII-IL-1 β -driven IL-6 secretion in glioblastoma cells. *Oncogene*. 2015. 34:2934-2942.
- Han X, Choi SI, Men X, et al. Modification and validation of an analytical method for dieckol in *Ecklonia Stolonifera* extract. *J Food Hyg Saf*. 2022. 37:143-148.
- Jahnz-Rozyk K, Targowski T, Paluchowska E, et al. Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis. *Allergy*. 2005. 60:685-688.
- Ju SM, Song HY, Lee SJ, et al. Suppression of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose via blockade of NF- κ B and STAT1 activation in the HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. 387:115-120.
- Jung TD, Shin GH, Kim JM, et al. Assessment of validation method for bioactive contents of fermented soybean extracts by bioconversion and their antioxidant activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2016. 45:680-689.
- Kang NJ, Koo DH, Kang GJ, et al. Dieckol, a component of *Ecklonia cava*, suppresses the production of MDC/CCL22 via down-regulating STAT1 pathway in interferon- γ stimulated HaCaT human keratinocytes. *Biomol Ther (Seoul)*. 2015. 23: 238-244.
- Kang SR, Kim M. The effect of *Ecklonia cava* extracts on bone turnover markers in ovariectomized rats. *J Life Sci*. 2009. 19: 1841-1846.
- Kim EH, Lee BW, Kim EH. A literal study of the main symptoms of atopic dermatitis. *J Korean Med Classics*. 2009. 22: 207-228.
- Kim JK, Jo SW, Kim EJ, et al. Development of an apple/pear pomace fermented with *Lentinus edodes* mycelia. *Korean J Food Sci Technol*. 2019. 51:286-294.
- Kim TH, Bae JS. *Ecklonia cava* extracts inhibit lipopolysaccharide induced inflammatory responses in human endothelial cells. *Food Chem Toxicol*. 2010. 48:1682-1687.
- Kwon DJ, Bae YS, Ju SM, et al. Casuarinin suppresses TNF- α -induced ICAM-1 expression via blockade of NF- κ B activation in HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011. 409:780-785.
- Lee KJ, Gu MJ, Roh JH, et al. Quantitative analysis of bioconversion constituents of insampeadock-san using various fermented bacteria. *Yakhak Hoeji*. 2013. 57:167-172.
- Manandhar B, Wagle A, Seong SH, et al. Phlorotannins with potential anti-tyrosinase and antioxidant activity isolated from the marine seaweed *Ecklonia stolonifera*. *Antioxidants*. 2019. 8:240. <https://doi.org/10.3390/antiox8080240>
- Ozanne H, Toumi H, Roubinet B, et al. Laminarin effects, a β -(1,3)-glucan, on skin cell inflammation and oxidation. *Cosmetics*. 2020. 7:66. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7030066>
- Rincón M, Anguita J, Nakamura T, et al. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *J Exp Med*. 1997. 185:461-470.
- Sanjeewa KKA, Fernando IP, Kim HS, et al. Dieckol: an algal polyphenol attenuates urban fine dust-induced inflammation in RAW 264.7 cells via the activation of anti-inflammatory and antioxidant signaling pathways. *J Appl Phycol*. 2020. 32: 2387-2396.
- Seo WY, Youn GS, Choi SY, et al. Butein, a tetrahydroxy-chalcone, suppresses pro-inflammatory responses in HaCaT keratinocytes. *BMB Rep*. 2015. 48:495-500.
- Shin SH, Kim KH, Kang CS, et al. Analysis of grain and malting quality during storage period of 2-row barley. *J Agric Life Sci*. 2014. 45(1):1-5.
- Wijesinghe WJJP, Ahn G, Lee WW, et al. Anti-inflammatory activity of phlorotannin-rich fermented *Ecklonia cava* processing by-product extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Appl Phycol*. 2013. 25:1207-1213.
- Wijesinghe WJJP, Lee WW, Kim YM, et al. Value-added fermentation of *Ecklonia cava* processing by-product and its antioxidant effect. *J Appl Phycol*. 2012. 24:201-209.
- Yang HJ, Park KW, Kim HS, et al. Effect of anti-atopic allergic reaction in response to oriental herb extracts. *Korean J Food Sci Technol*. 2010. 42:109-114.
- Yin HH, Cho BO, Lee HS, et al. Synergistic effects of grape branch and *Pleurotus eryngii* extract combination against inflammation on activated mast cells and atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Korean J Food Sci Technol*. 2016. 48: 582-589.
- Yu JS, Lee CJ, Lee HS, et al. Prevalence of atopic dermatitis in Korea: Analysis by using national statistics. *J Korean Med Sci*. 2012. 27:681-685.