

교시래기 유래 Polysaccharide의 보습유지 및 피부개선효과

Moisturizing and Skin Improvement Effect of Polysaccharides from *Gracilariopsis* sp.

박은경, 김혜원, 지용현, 박상희*

Eun-Kyung Park, Hye-Won Kim, Yong-Hyun Ji, Sang-Hee Park*

주식회사 아테나, 경기도 수원시, 16226, 대한민국

Athena Co.,Ltd., Suwon-si, Gyeonggi-do 16226, Republic of Korea

(Received 11 December 2017, Revised 27 December 2017, Accepted 28 December 2017)

Abstract Polysaccharides are useful materials for keep skin moisturizing and skin improvement cosmetic materials. We have isolated polysaccharides form *Gracilariopsis* sp. The polysaccharide derived from *Gracilariopsis* sp. have various size of 300kDa, 500kDa and over 1,000kDa. The volunteers applied a cream formula with polysaccharides from *Gracilariopsis* sp. for 4 weeks. We found significant improvement of wrinkles and skin texture. We also found an effect of improving skin elasticity. When the moisture reduction rate of the skin was 2.8% lower than the 5.1% of hyaluronic acid. The polysaccharide extract from *Gracilariopsis* sp. showed stable pH and viscosity. The polysaccharides derived from *Gracilariopsis* sp. could be used as a cosmetic material.

Keywords : *Gracilariopsis*, Polysaccharide, skin Moisturizing, cosmetics

서 론

해조류에 함유되어 있는 다당류는 여러 생리적 기능뿐만 아니라 분자구조적 특성에 의한 다양한 생리 활성 물질로 주목받고 있다. 대표적인 예인 alginate, fucoidan은 다시마, 미역과 같은 갈조류에 많이 들어 있는 다당류이다. alginate는 생체 적합성 및 겔화의 용이성과 같은 물리적 특성 때문에 생의학 및 공학 분야에서 수많은 응용 분야에 이용되는 생체 적합 물질로서 알지네이트 하이드로겔은 조직의 세포 외 매트릭스와 구조적 유사성을 유지하여 상처치유, 약물 전달 및 조직공학 응용 분야에서 이용되고 있다. Fucoidan은 L-Fucose와 sulfate ester group을 함유하고

있는 polysaccharides로 갈조류에 많이 함유되어 있다. 지난 10년간 푸코이단은 항혈전제, 항바이러스제, 항암 및 면역 조절제, 항염증제, 혈중 지질 감소, 항산화제 및 항고형제제, 간장병증, 우울증 등에 대한 활성 작용으로 광범위하게 연구되어 fucoidan의 구조와 생체 활성에 대한 연구 진행이 이루어지고 있다[2].

홍조류를 구성하는 세포벽 다당류는 셀룰로오스, 자일란, 만나, 한천 그리고 카라기난이 대표적이다. 카라기난이라는 탄수화물로서 갈락토오스를 기본단위로 황산기를 갖고 있는 고분자의 필름형성능이 있는 다당류가 존재한다. 카라기난 생고분자의 젤 생성 능력은 추출방법에 큰 영향을 받아 Kappa, iota, lambda 3가지 종류로 생산될 수 있는데 필름형성능에는

* Corresponding author
Phone: +82-31-888-6410 Fax: +82-31-888-6412
E-mail: athena@athenasc.co.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

크게 차이가 없으며 식품에서 증점제, 안정제 겔화제로서 도넛, 빙과류, 음료, 어패 가공품, 잼, 햄, 소시지 등에 첨가하며, 약품이나 화장품의 안정화제 분산제로서 제한된 용도로만이 사용되고 있다. 카라기난의 생리활성에 대해 항혈액응고 작용이나 항균활성과 같은 특성의 생리활성이 밝혀진 바 있다. 한천은 카라기난보다 응고력이 강하며 보수성, 응고성(젤 형성능), 점탄성 등이 뛰어난 물성을 가지고 있어 광범위하게 이용된다. 한천은 아가로즈와 아가로펙틴으로 이루어져 있으며, 아가로즈는 의약품으로서 비만방지제로 사용되며, 지지체로서 연골, 좌약, 점조제 혼탁방지제, 캡슐, 젤리 등의 원료로도 널리 사용되고 있다. 그러나 fucoidan, alginate, carrageenan을 제외한 해조류 유래 다당류에 대한 생리활성 연구가 미비함에 본 연구는 홍조류가 함유하고 있는 다당류를 분리 정제하여 피부개선효과가 있는 다양한 사이즈의 다당류를 확보하고 피부 개선효과를 검증하고자 한다.

재료 및 방법

해조류유래 당 추출물의 제조

해조류는 2013년, 2017년 3~6월 사이 자연채집을 통해 채집된 남서해안(진도, 완도, 장흥) 홍조류 꼬시래기를 사용하였다. 꼬시래기는 사용 전 60°C 건조기에서 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 꼬시래기는 70% Ethanol에 24시간 침지하였다. Ethanol에 침지하였던 꼬시래기는 다시 60°C 건조기에서 완전 건조가 될 때 까지 건조 시킨 후 10배의 정제수를 추가하여 다양한 온도에서 열수 추출 후 원물은 제거하였다.

해조류 유래 당추출물의 당 함량

꼬시래기 추출물의 총 당 함량을 분석하기 위해 페놀황산법을 이용하였다. standard curve를 그리기 위해, D-(+)-glucose(G7021-100G, sigma)를 사용하였다.

당 사이즈 분석

당 분석은 HPLC(SHIMADZU RID-10A)로 분석하였다. 칼럼은 Shodex Ohpak column(SB-804HQ 8.0×300mm)를 사용하였고, 용매는 water, 유속은 0.7 ml/min, column과 detector의 온도는 40°C로 설정하였으며 검량곡선은 Pullulan standard set (Sigma-Aldich, Cat.96351.Mw 342~710,000)을 이용하였다. 시료는

HPLC grade water로 2배 희석한 후 0.45 μ m syringe filter(Whatman, PTFE)를 이용하여 여과하였다.

해조류유래 당의 물성적 특성

해조류 유래 당성분의 물성을 확인하기 위하여 점도계(DV-1 prime, Brookfield, USA)를 이용하여 점도를 측정하였다. 점도는 S62, 50rpm 동일한 조건에서 시료가 25°C일 때 측정하였다.

피검자 선정 및 기준

본 실험은 시험의 목적, 내용 등에 관하여 충분히 설명을 듣고 자발적으로 동의 서명하였으며 시험기간 동안 추적관찰이 가능한 피부 질환을 포함한 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 20-45세 여성을 대상으로 실시하였다. 다음의 대상은 제외로 하였다(습진성 피부질환이 있는 자, 감염성 피부질환이 있는 경우, 알레르기성 특이체질이거나 과민증이 있는 자, 화장품, 의약품, 일상적 일광 노출에 자극이나 알러지가 있는 경우, 임신 중이거나 수유 중인 경우 또는 임신 계획 중인 경우, 생명유지를 비롯하여 정신 또는 육체 활동을 하는데 필요한 에너지 및 영양소가 부족한 상태인 자, 약물이나 알콜 중독자, 시험부위에 점, 여드름, 문신, 흉터, 흉반, 모세혈관확장, 화상자국 등에 있어서 시험에 영향을 미치는 경우, 동일한 시험에 참여한 뒤 3개월이 경과되지 않은 경우, 그 외 연구책임자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 경우)또한 본 시험에 참가하였으나 다음에 해당하는 피험자는 시험을 중지시키기로 하였다(피험자가 참여 거부 의사를 제시한 경우, 다른 질환으로 인해 사용이 중단된 경우, 피험자가 정해진 사항을 준수하지 않는 경우, 기타 부득이한 사유가 있는 경우).

인체 안전성 시험

Van der Bend Chamber(Ban der Bed, Brielle, the Netherlands)를 이용하여 연구 대상자의 등에 피부접촉 시험을 실시하였다. 연구 대상자는 각 31명을 대상으로 첩포일, 첩포 제거일, 첩포 제거 후 24시간 경과 후, 48시간 경과 후 피부 자극 여부를 판정하였다.

보습 유지능 시험

피험자의 전완부(가로, 세로 3×3cm의 정사각형, 미적용 부위 포함 3부위)에 각 시험 제품 2 μ l/cm²를

시험 부위에 충분히 흡수되도록 가볍게 두드리면서 적용한다. 제품 적용 전, 제품 적용 1시간, 3시간, 6시간 경과 후 Corneometer CM825(Courage and Khzaka, Germany)를 이용하여 피부 수분측정을 하였다.

눈가 주름 및 피부결 개선 시험

연구 대상자는 본 인체적용 시험기간 중 시료 적용 전, 적용 2주 후, 적용 4주 후 총 3회 측정을 시행하였다. 인체적용 시험 시작 1주 전부터 평과 결과에 영향을 미칠 수 있는 피부 개선을 목적으로 하는 치료제, 화장품 및 의약외품 등의 사용과 의학적 처치, 마사지 등의 시술을 금지하였다.

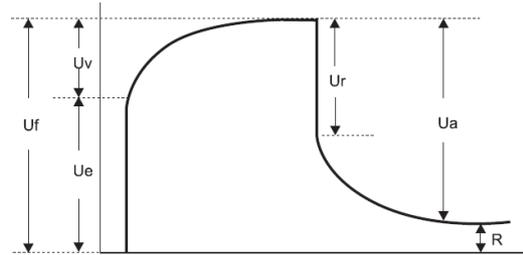
모든 연구 대상자는 기존에 사용하던 기초 화장품을 사용하면서 시험 시료를 4주간 1일 2회 지정된 얼굴 부위에 도포 후 두드려 충분히 흡수시켜 적용하였다. 시험시료를 꼬시래기 유래 다당류 추출물이 함유되어 있는 크림으로 시행하였다. 인체적용 시험은 공기의 이동이 없고 직사광선이 없는 항온항습 (20 ~ 24℃, 40 ~ 60% RH) 조건에서 시행하였으며, 세안한 후 30분간 항온항습 조건에서 안정을 취하고 시험을 진행하였다. 측정은 PRIMOS High Resolution(Phaseshift Rapid In vivo Measurement Of Skin high resolution, GF Messtechnik GmbH, Germany)을 이용하여 눈가주름, 볼 부위의 피부결 평가를 진행하였다. 통계분석은 95% 신뢰구간에서 시료 사용 전/후 간 군간의 유의성 여부를 Wilcoxon signed-rank test를 이용하여 분석하였다. 통계 분석 프로그램은 IBM SPSS statistics version 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 을 이용하였다.

피부 탄력 평가 시험

연구 대상자는 기존에 사용하던 기초 화장품을 사용하면서 시험 시료를 4주간 1일 2회 지정된 얼굴 부위에 도포 후 두드려 충분히 흡수시켜 적용하였다. 시험시료를 꼬시래기 유래 다당류 추출물이 함유되어 있는 크림으로 시행하였다. 인체적용 시험은 공기의 이동이 없고 직사광선이 없는 항온항습 (20 ~ 24℃, 40 ~ 60% RH) 조건에서 시행하였으며, 세안한 후 30분간 항온항습 조건에서 안정을 취하고 시험을 진행하였다. 측정은 Cutometer MPA580(Courage and Khazaka, Germany)를 이용하여 볼 부위의 피부

탄력 평가를 진행하였다.

피부탄력과 관련된 parameter는 R2, R5, R7이며, parameter의 설명과 증가율은 아래와 같다.



- R2: U_a / U_f (gross elasticity)
- R5: U_r / U_e (net elasticity)
- R7: U_r / U_f (biological elasticity)

결과 및 고찰

해조류 유래 당추출물의 총당 함량

D-(+)-glucose(G7021-100G, sigma)를 사용하여 Standard curve를 그려 R score 값 0.9933을 얻었다. 하였다. 해조류의 종류에 따른 당추출물에 대한 총당 함량 변화를 확인한 결과, 꼬시래기 추출물의 총당 함량이 다른 해조류에 비해 높았으며 총당함량 39.0 mg/ml이 확인되었다. 당추출물의 당 함량에 대한 차이는 지역별 차이가 나타나지는 않았다(Fig1).

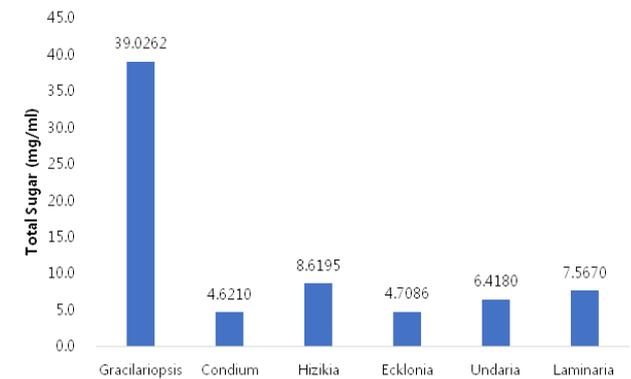
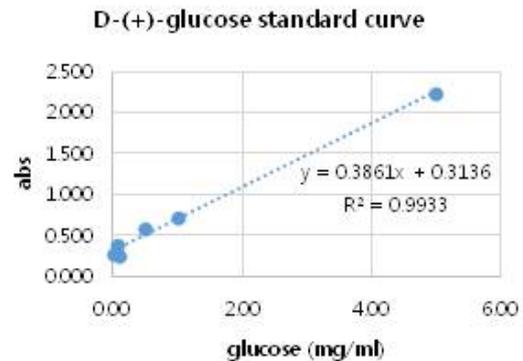


Figure 1. Total sugar of water extraction from Seaweed.

당의 분자량 분석

다양한 온도와 시간 조건의 열수 추출한 추출용액

은 300kDa, 500kDa, 1,000kDa이상의 추출조건별 다양한 분자량으로 추출되었다(Fig2).

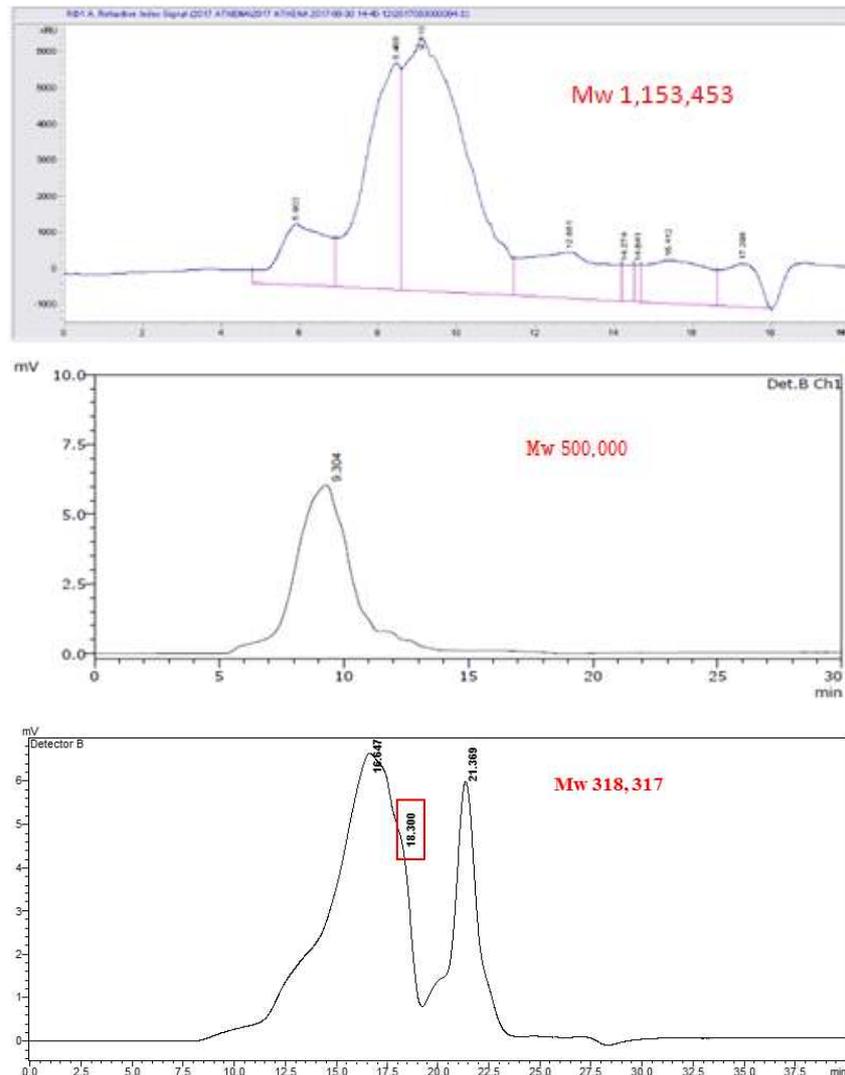


Figure 2. Molecular weight of water extraction from *Gracilariopsis* sp.

해조류유래 당의 물성적 특성

해조류 유래 대표 당성분인 Agar(덕산화학), κ-Carrageenan(MSC), Na-Alginate(와 물성 차이를 확인하고자 각 시료별 0.5% 액제에 대하여 점도계를 이용하여 점도를 측정하여 꼬시래기 유래 다당류의 물성을 비교하였다.

Table 1과 같이 동일한 건조잔량 0.5% 액제에 대해 Agar, Na-Alginate과 본 연구의 꼬시래기 유래 다당류의 점도에 대해 물성적 차이를 나타내었다. κ-Carrageenan의 경우는 건조잔량 0.5% 액제의 경우 완전한 겔화가 되어 겔화가 되지 않는 점도 측정 가

능 농도인 0.2%와 물성 비교를 함으로 꼬시래기 유래 다당류와의 물성적 차이를 확인하였다. 따라서 종래에 알려진 홍조류 유래 다당류와는 물성적 차이를 나타내는 다당류로 판단된다.

인체 안전성 시험

다양한 분자량 분포의 다당류에 대해 화장품 원료로서의 안전성을 확인하고자 인체 첩포 시험을 시행하였다. 연구대상자 30명에 대해 꼬시래기 유래 다당류에 대한 무자극 판정으로 인체적용시 안전성을 확인하였다. 이에 본 연구를 통해 개발된 꼬

Table 1. Viscosity of polysaccharide.

Sample	concentration (%)	Viscosity (cP)
polysaccharide of Gracilariopsis(454Kda)	0.5	5.4
polysaccharide of Gracilariopsis(764Kda)	0.5	51.6
polysaccharide of Gracilariopsis(1,122Kda)	0.5	108.0
κ-Carrageenan	0.5	18.6
Agar	0.2	30.0
Na-Alginate	0.5	10.2

Table 2. Reduction rate of measurement by individual eye wrinkle roughness variable(%).

	Cream containing polysaccharide (sample A)		Cream without polysaccharide (Sample B)	
	2weeks	4weeks	2weeks	4weeks
Ra	2.618	9.028	-1.499	-0.315
Rmax	1.871	8.078	3.106	4.725

*Ra : Average roughness

*Rmax : Maximum roughness depth

시래기 유래 다당류의 화장품 원료로서 안전성을 확보하였다.

보습 유지 효과

보습활성 시험에 참여한 피험자 수는 총 20명으로 20명 모두에게 특이적인 이상반응은 발견되지 않았다. 전완부 가로, 세로 3×3cm에 해조류 유래 당 함유 추출물을 적용하여 Corneometer로 수분함유량을 측정하였다. 그 결과 해조류 유래 당함유 액제(건조잔량 0.5%)는 미적용부위 대비 적용 1시간 후 109%, 3시간 후 106%의 피부 수분 유지능을 나타내었다. 이는 당 업계에 가장 널리 사용되고 있는 건조잔량 1% hyaluronic acid 액제가 적용 1시간 후 115%, 3시간 후 109%로 hyaluronic acid의 5.1% 수분 감소율 대비 꼬시래기 유래 다당류 추출물은 1시간후 109%에서 3시간후 106%로 2.8%의 낮은 수분 감소율이 보습 유지효과를 나타내었다(Fig.3).

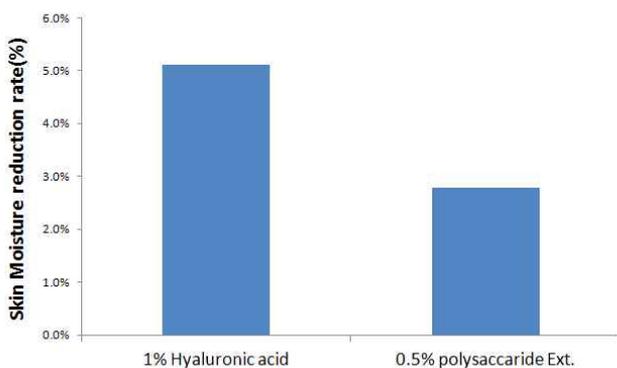


Figure 3. Effect of Algae polysaccharide on the skin moisture reduction rate of 20~45 aged female.

눈가 주름 및 피부결 개선 시험

PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 부위의 Roughness 변수 별 측정값을 분석한 결과, 꼬시래기 유래 다당류 함유 크림(시료 A) 적용 부위의 Ra값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 4주 후 9.028% 감소하였다(Table 2). 따라서, 꼬시래기 유래 다당류 추출물은 적용 4주 후 눈가주름 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.

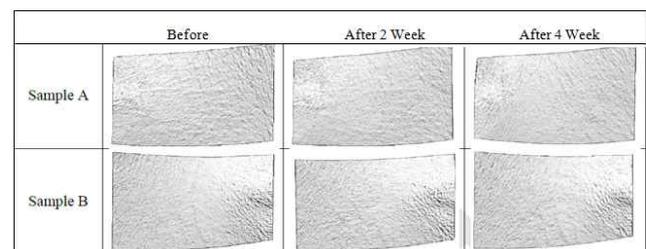


Figure 4. Effect of Eye wrinkle improvement.

PRIMOS High Resolution을 이용한 볼 부위의 Ra 측정값을 분석한 결과, 꼬시래기 유래 다당류 함유 크림(시료 A) 적용 부위는 꼬시래기 유래 다당류 미함유 크림(시료 B) 적용 부위에 비하여 적용 2주 후 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)의 감소를 나타내었다(Table 3).

피부 탄력 평가 시험

Cutometer를 이용한 볼 부위의 피부탄력 변수 별 측정값을 분석한 결과, 꼬시래기 유래 다당류 함유

Table 3. Reduction rate of R measured value of individual cheek area(%).

	Cream containing polysaccharide (sample A)		Cream without polysaccharide (Sample B)	
	2weeks	4weeks	2weeks	4weeks
Ra	4.607	5.371	-1.624	-0.660

Table 4. Reduction rate of R measured value of individual cheek area(%).

	Cream containing polysaccharide (Sample A)		Cream without polysaccharide (Sample B)	
	2weeks	4weeks	2weeks	4weeks
R2	2.399	3,355	0.415	1.013
R5	7.968	16,269	1.678	0.708
R7	9.131	15.333	3.758	0.980

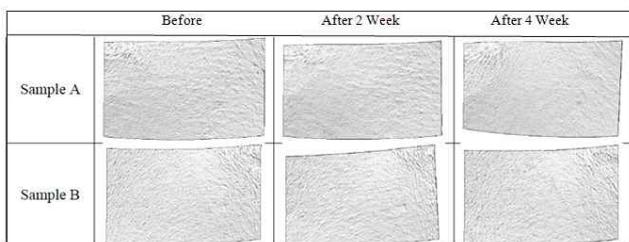


Figure 5. Effect of skin texture improvement.

크림(시료 A) 적용 부위의 R2, R5, R7값은 Table 4와 같이 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p < 0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 증가하였다(Table 4).

따라서, 꼬시래기 유래 다당류 추출물이 함유된 크림은 적용 2주 후, 적용 4주 후 피부탄력 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.

추출용액의 안정성

당제품은 발효되거나 고온에서 고분자가 저분자화 되면서 pH가 낮아질 수 있다. 꼬시래기 유래 다당류 추출물에 대해 다양한 온도에서도 4주간 저장에서 안정된 pH와 점도를 보였다(Fig 6).

결론

홍조류를 구성하는 세포벽 다당류는 Carrageenan, Agar가 대표적이다. 본 연구는 홍조류의 대표적 다당류인 Carrageenan, Agar와는 물성적 차별성을 가지는 다당류를 제조하여 300kDa, 500kDa, 1,000kDa의 분자량을 확인하였다. 다양한 사이즈의 꼬시래기 유래 다당류는 인체적용 안전성 시험에 무자극의 안전성을 확인하였으며 안정성을 측정된 결과 다양한

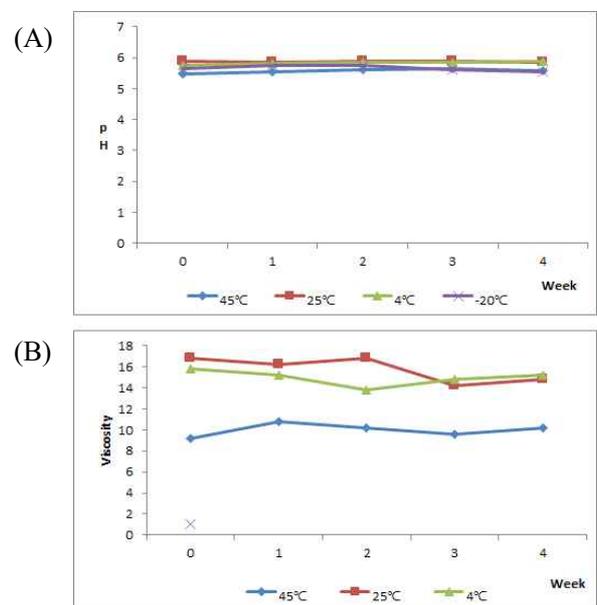


Figure 6. Viscosity and pH of extraction solution during storage. (A): pH, (B): Viscosity.

-20°C, 4°C, 25°C, 45°C에서 4주간 보관 중에도 pH 변화가 없었으며, 4°C, 25°C, 45°C에서 4주간 보관 중에 점도의 변화가 없는 화장품 원료로서 안정성을 확보하였다

PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 부위와 볼부위의 피부개선의 Roughness 변수 별 측정값을 분석한 결과, 꼬시래기 유래 다당류를 함유하는 크림의 적용 부위의 Ra값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p < 0.05$)으로 적용 4주 후 감소함으로 꼬시래기 유래 다당류가 눈가주름 개선 및 피부결 개선에 도움을 주는 것으로 확인하였다.

Cutometer를 이용한 볼 부위의 피부탄력 변수 별 측정값을 분석한 결과, 꼬시래기 유래 다당류를 함

유하는 크림 적용 부위는 대조군 적용 부위에 비하여 적용 2주 후 통계적으로 유의한 수준 ($p < 0.05$)으로 R2, R5, R7값의 증가를 나타냄으로 꼬시래기 유래 다당류를 함유하는 크림은 적용 2주 후, 적용 4주 후 피부탄력 개선에 도움을 주는 것으로 확인하였다.

당업계에서 가장 대표적인 보습원료인 1% hyaluronic acid 액제 대비 인체 적용 보습효과에서 3시간까지 수분유지능에서 1% hyaluronic acid의 5.2% 감소율 대비 본 연구개발에서 추출된 다당류의 건조잔량은 0.5%임에도 불구하고 2.7%의 낮은 수분 감소율을 나타냄으로 본 연구의 꼬시래기 유래 다당류는 눈가주름 개선, 피부결 개선 및 보습 유지력을 갖는 화장품 원료로서 효능을 검증하였다.

이상의 연구결과로 꼬시래기 유래 다당류는 피부 보습유지 및 피부개선 소재로서의 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부에서 지원하는 2017년 벤처형소재부품기술개발사업(10067312)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

1. Bondu Stephanie, Deslandes Eric, Fabre Marie Sophie, Berthou Christian, Guangli Yu. Carrageenan from *Solieria chordalis*(Gigartinales):Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. Vol **81**, Issue 2, 11 June 2010, Pages 448-460
2. Bo Li, Fei Lu, Xijun Wei and Ruixiang Zihao. Fucoidan:Structure and Bioactivity. *Molecules* 2008, 13(8),1671-1696.
3. Dubois, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analysis Chem.*28, 350(1956)
4. J.Necas, L.Bartoskova, Carrageenan:a review, *Veterinari Medicina*, **58**, 2013(4):187-205
5. Kuen Yong Lee, David J.Mooney. 2011. Alinate:Properties and biomedical application. *Progress In Polymer Science*. Volume **37**, Issue1, January 2012, page 106-126.
6. Ronald D. Villanueva, Jumelita B. Romero, Anita Linda R. Ragasa, Marco Nemisio E. Montano, Agar from the red seaweed, *Laurencia flexilis*(Ceramiales, Rhodophyta) from northern Philippines, Volume **58**, Issue 2, April 2010 pages 151-156
7. Seong Han Cha, Myeong Won Ahn, Jung Shik Lee, Young Suk Kim, Dong-uk Kim, Tae Gang Byun and Kwon pil Park. The Effect of Fucoidan Molecular Weight on Cosmetic Function. *Korea Chem. Eng. Res.* Vol.**50**, No. 4, August, 2012, pp 604-609
8. Tatiana, N. Z., Nataliya, M. S., Irina, B. P., Vladimir, V. L.,Andrey, S. S., Elena, V. S. and Lyudmila A. E., A New Procedure for the Separation of Water soluble Polysaccharides from Brown Seaweeds, *Carbohydr. Res.*, **322**, 32-39(1999)
9. Usov Al. Polysaccharides of the red algae. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2011;**65**:115-217