

흑효모를 이용한 참도박 발효 추출물의 항산화 효과와 티로시나제 및 콜라게나제 저해효과

부 반 빈 · 이 경 은 · 강 상 구[†]

영남대학교 생명응용과학대학 생명공학과
(2019년 11월 27일 접수, 2020년 2월 27일 수정, 2020년 3월 6일 채택)

Evaluation of Antioxidant, Tyrosinase and Collagenase Inhibitory of *Grateloupia elliptica* Extracts after *Aureobasidium pullulans* Fermentation

Van Vinh Vu, Kyung Eun Lee, and Sang Gu Kang[†]

Department of Biotechnology, College of Life and applied Sciences,
Yeungnam University, 280 Daehak-ro, Gyeongsan-si, Gyeongbuk-do 38541, Korea
(Received November 27, 2019; Revised February 27, 2020; Accepted March 6, 2020)

요 약: 연구에서는 흑효모(*Aureobasidium pullulans*)를 이용한 참도박(*Grateloupia elliptica*) 발효 열수와 에탄올 추출물 및 발효하지 않은 참도박 열수와 에탄올 추출물과 항산화, 티로시나제와 콜라게나제 저해효과, 세포독성 및 증식실험을 진행하였다. 흑효모 발효 참도박 추출물과 참도박 추출물은 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성이 높아졌으며, 발효에 관계없이 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 항산화 활성이 높게 나타났다. 또한 모든 시료 중 참도박 발효 에탄올 추출물의 항산화 활성이 가장 높게 나타났다. Tyrosinase 저해효과는 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)이 9.8%로 가장 높은 결과를 나타냈으나, 모든 추출물에서 10%이하의 낮은 tyrosinase 저해효과를 나타냈다. Collagenase 저해 효과를 조사한 결과 발효와 관계없이 열수추출물에서는 collagenase 저해 효과가 미미한 것으로 나타났으나, 에탄올 추출물의 경우 농도 의존적으로 collagenase 저해효과를 나타냈다. 또한 참도박 발효에탄올 추출물의 경우 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 50.3%의 시료 중 가장 높은 저해 효과를 나타냈다. 인간세포(HaCaT, keratinocytes)를 이용하여 세포독성 및 증식실험을 진행하였다. 참도박 및 참도박 발효추출물의 세포독성 및 증식률은 무처리 대조군과 비교한 결과 시료의 모든 농도에서 90% 이상의 결과를 나타냈다. 모든 시료 중 참도박 발효 에탄올추출물이 가장 높은 항산화 활성 및 주름개선 효과를 나타냈다. 따라서 참도박 발효추출물은 우수한 항산화 효과와 주름개선 효능을 가진 화장품의 생리활성 소재로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: In this experiment, the *Grateloupia elliptica* (*G. elliptica*) was fermented using the fungus *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*) and its extract was obtained from hot water and 70% ethanol solution. The extract was studied for their biological activities such as antioxidant effect, Collagenase and tyrosinase inhibition in comparison to the nonfermented extract in same solvents. Antioxidative activity test using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) showed that ethanol extract had higher antioxidant activity than water extract. Among all of the samples, the antioxidant activity of *G. elliptica* fermented ethanol extracts (GEFEE) was highest. Tyrosinase inhibitory activity of GEFEE was highest with 9.8% at the 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. No inhibition of collagenase from *G. elliptica* water extract (GEWE) and *G. elliptica* fermented water extract (GEFWE)

[†] 주 저자 (e-mail: kangsg@ynu.ac.kr)
call: 053-810-3025

was observed, but *G. elliptica* ethanol extracts (GEEE) and GEFEE showed increased collagenase inhibition activity with increasing concentrations of them. Collagenase inhibitory activity of GEFEE was highest with 50.3% at the 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. MTS cell proliferation assay was conducted with the GEWE, GEEE, GEFWE, GEFEE and cell viability was over 90% at the 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations for all of the samples, which suggested that the extracts were noncytotoxic. In conclusion, fermented extracts of *G. elliptica* could be developed to bioactive functional material for cosmetics with antioxidant and wrinkle improvement effects.

Keywords: *Grateloupia elliptica* (*G. elliptica*), fermentation, anti-oxidant, whitening effect, anti-wrinkle

1. 서 론

피부는 시간이 지남에 따라 노화의 진행으로 피부색 변화, 피부 탄력 감소 등의 인체에서 나타나는 필연적 규칙 중 하나이다. 피부 노화를 일으키는 요인은 피부의 생리적인 기능 감소와 구조적 변화에 의해 유발되는 자연 노화 즉 내인성 노화, 피부가 자외선에 노출되면 자외선이 표피를 지나 진피층까지 침투하여 탄력 유지에 중요한 콜라겐과 엘라스틴(탄력섬유)의 손상에 의한 광노화와 피부노화를 가속화 시키는 건조 등의 외인성 노화가 있다. 또한 피부 노화의 대표적 물질 중 하나인 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 대사과정에서도 생성될 수 있으며, 지속적인 자외선 노출로 인해 피부의 광산화적 손상을 유발시키기도 한다[1,2]. 해조류는 비타민, 단백질, 아미노산, 지질, 폴리 불포화 지방산(PUFA) 등이 풍부하여 예전부터 식품, 의약품, 화장품 등의 원료로 사용되었다[3-9]. 녹조류, 갈조류, 홍조류 등 다수의 해조류는 피부 관련 생리활성 효과를 가지며 또한 자외선의 영향으로부터 피부 보호, 항염증, 미백, 및 피부 세포 재생 효과를 나타냈다. 또한 최근 해조류는 화장품의 기능성 소재로서 관심 받고 있다[10-16].

본 연구에서 사용한 참도박(*Grateloupia elliptica*)은 홍조식물문, 도박목 지누아릿과이며 모양은 여러 갈래로 갈라지며 잎 모양으로 자란다. 한국 및 일본 등지에 분포하며 제주도 해안의 바위틈에 뭉쳐있다. 참도박은 향당뇨, 항염증, 탈모방지, 항암 효과 등이 보고된 바 있다[17-20].

흑효모(*Aureobasidium pullulans*)는 *Aureobasidium*속에 속하는 균이다. 일반적으로 과실 또는 야채의 병원균으로 환경에서 쉽게 접할 수 있으며, 야생에서는 습기가 있는 장소에서 쉽게 찾아볼 수 있다. 형태는 회색 또는 흑색을

띠며, 치상 돌기에서 분생자를 형성하며 길이가 긴 기균 사로부터 불규칙하게 나누어진다. 또한 식품에 사용될 정도로 안전성이 높은 원료로서 식품 가공에도 많이 활용되고 있다[21]. 또한 다양한 효소, siderophores 및 pullulan 생산을 위해 생명 공학에서도 매우 중요하다[22].

하지만 아직까지 참도박에 대한 화장품 소재로서의 연구는 미흡한 상태이며, 또한 흑효모를 이용한 참도박 발효물에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 참도박 및 참도박 발효추출물의 항산화 활성, 미백, 주름개선, 세포 독성 및 증식률에 대한 연구를 수행하여 화장품 원료로서의 가능성을 평가하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주

한국 미생물 보존센터(<http://www.kccm.or.kr/>, Korea)에서 흑효모(*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 배양기에서 48 h 동안 발효를 시켰다[23,24].

2.2. 실험재료 추출물의 제조

본 실험에서 사용한 참도박은 (주)파라제주(Jeju, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험재료인 참도박을 흐르는 수돗물에 세척한 후 다시 1 차 증류수로 세척하였다. 수분을 제거하고 건조시킨 후 칭량하여 사용하였다. 실험재료는 열수 추출물의 경우 시료 무게의 10 배에 해당하는 멸균된 순수 정제수를 첨가하여 60 °C, 100 rpm에서 24 h 동안 중탕하였으며, 3 회 반복 추출하였다. 에탄올 추출

물의 경우 시료 무게의 10 배에 해당하는 70% 에탄올에 침지하여 상온, 100 rpm에서 24 h 동안 추출하였으며, 3 회 반복 추출하였다. 발효 추출물의 경우 건조된 참도박 을 습도가 60% 되도록 3 차 증류수를 투입하여 121 °C에서 20 min 동안 멸균하였다. 멸균된 참도박을 식힌 다음에 2×10^6 cfu/mL 흑효모 현탁액을 접종하고 혼합물을

30 °C에서 168 h 동안 발효시켰다. 발효한 후 흑효모의 균체 등을 제거하기 위하여 121 °C에서 20 min 동안 멸균시켜 발효에 사용된 미생물을 완전히 사멸시켰다. 이 참도박 발효물을 기존의 열수 및 에탄올 추출 방식과 동일하게 추출하였다. 8,000 rpm, 10 min 원심 분리(SUPRa 22K, Haniil, Korea) 후 여과지(Advantec No.2, Japan)로 여

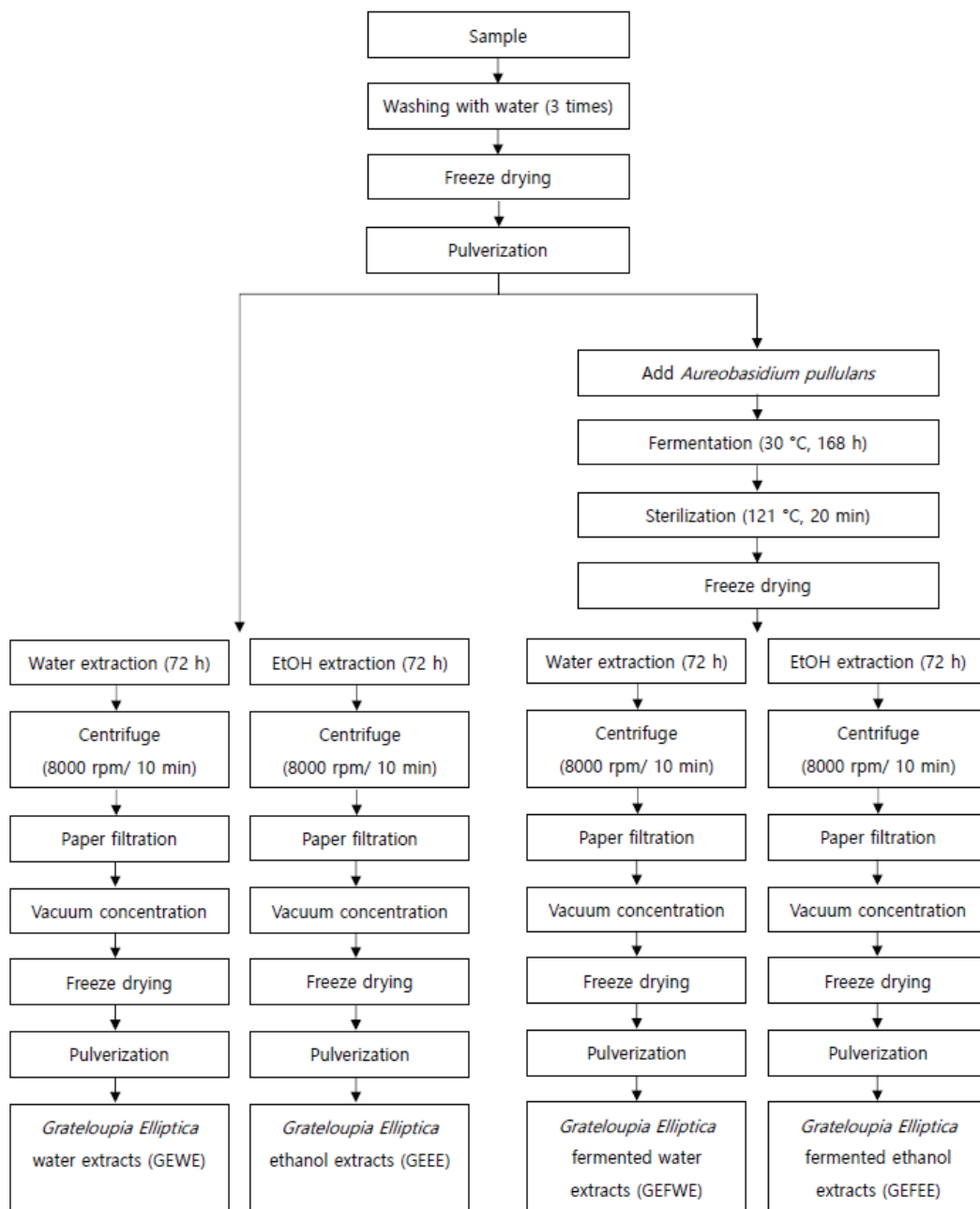


Figure 1. Diagram for preparation of algae extracts and fermented algae extracts.

과한 후 회전감압농축기(N-1000, Eyla, Japan)를 이용하여 농축하고 건조하였다. 모든 실험 재료는 사용 전까지 -20°C 에 보관하였다[25-27].

2.3. DPPH 라디칼 소거활성 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성 측정은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 분석하였다. 각 농도별로 희석된 시료 200 μL 에 에탄올로 용해시킨 0.2 mM DPPH (Sigma Aldrich, USA) 용액 100 μL 를 혼합하여 실온에서 30 min 동안 반응시킨 후 ELISA reader (Infinite™ F200, TECAN, Switzerland)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 DPPH 대신 에탄올을 처리하였다. 또한 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하였다. DPPH radical 소거 활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{DPPH scavenging activity}(\%) = 1 - \left(\frac{\text{시료 첨가군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.4. ABTS⁺ 라디칼 소거활성 측정

2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼 소거활성 측정은 Dong Hwa Park 등의 방법[28]을 변형하여 측정하였다. ABTS (Sigma Aldrich, USA)를 7 mM 농도로 증류수에 용해한 다음 2.45 mM potassium persulfate를 가하여 1 : 1의 비율로 혼합하여 실온인 암실에서 12 ~ 18 h 동안 반응 시킨 후 ABTS 라디칼을 형성 시킨 후 사용하였다. 라디칼이 형성된 ABTS 용액을 에탄올로 희석하여 734 nm에서 측정한 흡광도가 0.706 ± 0.002 가 되도록 조정하였다. 소거능은 ABTS 용액 150 μL 과 시료 150 μL 를 혼합하여 6 min 간 반응 후 ELISA reader를 이용하여 734 nm에서 각 농도별 시료와 혼합하여 사용하였다. 또한 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하였다. ABTS 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{ABTS scavenging activity}(\%) = 1 - \left(\frac{\text{시료 첨가군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.5. In Vitro Tyrosinase Inhibition Activity

Tyrosinase의 활성을 저해하는 정도를 측정하기 위하여 *in vitro* tyrosinase inhibition assay를 실시하였다. *In vitro* tyrosinase inhibition assay는 Jin 등의 방법[29]을 변형하여 측정하였다. 실험방법은 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5) 220 μL 와 각 농도별로 희석된 시료 20 μL , mushroom tyrosinase (2000 U/mL) (Sigma Aldrich, USA) 20 μL 와 1.5 mM tyrosine (Sigma Aldrich, USA) 40 μL 를 순서대로 첨가한 후 37°C 에서 10 min 동안 반응시켰다. 반응을 완료한 후 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 이때 공시료액으로 시료액 대신 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5)을 사용하였다. 또한 양성 대조군은 알부틴을 사용하였다. Tyrosinase 활성 저해율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성저해율}(\%) = \left[100 - \left(\frac{b - b'}{a - a'} \right) \right] \times 100$$

a: 공시료액의 반응 후 흡광도

b: 시료액의 반응 후 흡광도

a', b': 완충용액으로 대체하여 측정한 흡광도

2.6. In Vitro Collagenase Inhibition Activity

Collagenase 저해활성 측정은 Tamsyn 의 방법[30]을 변형하여 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl_2 를 첨가하여, 0.3 mg/mL의 4-phenyl azobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Sigma Aldrich, USA)를 녹인 기질액 250 μL 및 시료용액 100 μL 의 혼합액에 0.2 mg/mL의 collagenase (Sigma Aldrich, USA) 125 μL 를 첨가하여 실온에서 20 min 동안 방치한 후 6% citric acid 500 μL 을 넣어 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL을 첨가하여 UV/VIS spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys, Korea) 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타냈다.

$$\text{저해율}(\%) = \left[1 - \left(\frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

2.7. 세포배양

인간세포(HaCaT, keratinocytes)(ATCC, USA) 세포를 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (HyClone, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, USA)과 penicillin (100 units/mL)/streptomycin (100 µg/mL) (HyClone, USA)을 첨가하여 CO₂ 세포배양기(NU-4750G, NuAire, USA)에서 5% CO₂ 공급 하에서 배양하였으며, 2 ~ 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

2.8. 세포독성 및 증식 시험

세포독성 및 증식시험은 Terry 등의 방법[31]을 변형하여 측정하였다. 세포독성 및 증식을 측정하기 위해 배양된 인간세포(HaCaT)를 96 well plate에 1 × 10⁴ cell/well로 균일하게 분주한 다음 24 h 후 각 추출물을 10, 100, 250, 500, 1000 µg/mL 농도로 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 농도별 처리에 의한 세포의 증식에 미치는 효과는 Cell Titer 96[®]AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, USA)를 사용하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고 DMEM 배지 100 µL와 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 암상태 조건에서 3 h 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 배양액을 대조군으로 사용하였다. 세포생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

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

2.9. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였고 통계분석은 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, Student's t-test법을 이용하였으며, p-value가 0.01 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결 과

3.1. 추출방법별 참도박 추출물의 수득율

추출 방법별 참도박 추출물의 추출 수율은 Table 1과 같이 나타났다. 참도박 열수 추출물(GEWE)가 37.5%, 참도박 에탄올 추출물(GEEE)가 7.5%, 참도박 발효 열수 추

출물(GEFWE)가 30.0%, 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)가 8.0% 나타났다. 열수로 추출 방법과 에탄올로 추출방법이 비교한 결과 에탄올로 추출방법보다 열수 추출법의 수율이 약 4배 정도 높게 나타났다.

Table 1. Yields Obtained from Extraction Methods

Extraction method	Sample weight (g)	Sample extraction yield (%)
GEWE	100	37.5
GEEE	100	7.5
GEFWE	100	30.0
GEFEE	100	8.0

G. elliptica water extract (GEWE), *G. elliptica* ethanol extract (GEEE), *G. elliptica* fermentation water extract (GEFWE), *G. elliptica* fermentation ethanol extract (GEFEE)

3.2. DPPH 라디칼 소거활성 측정

생체 내에서 산화스트레스로 인해 생성되는 자유라디칼은 세포손상을 발생시키며 그에 따른 노화와 질병을 유발시킨다. 자유라디칼 화합물로서 DPPH는 자유라디칼 소거능 측정에 이용된다. 아민류인 tocopherol, 방향족 화합물, ascorbic acid 등의 환원능을 이용하여 항산화능 측정에 사용된다[32]. 참도박 추출물과 참도박 발효 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과는 다음과 같다. Figure 2에 나타난 바와 같이 모든 참도박 추

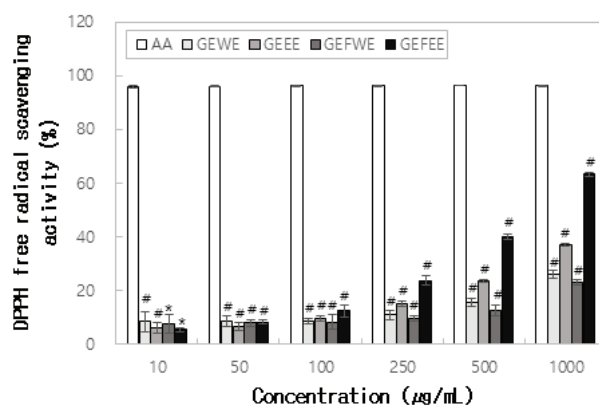


Figure 2. DPPH free radical scavenging activity of *G. elliptica* water extracts (GEWE), *G. elliptica* ethanol extracts (GEEE), *G. elliptica* fermented water extracts (GEFWE), *G. elliptica* fermented ethanol extracts (GEFEE). Results are the means ± SD, *p < 0.01, #p < 0.001 compared with ascorbic acid (AA).

출물과 참도박 발효 추출물에서 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성 증가하는 것이 보였다. 열수 추출물의 경우 참도박 추출물(GEWE)과 참도박 발효 추출물(GEFWE)이 차이가 미미하였다. 반면에 에탄올 추출물의 경우 참도박 추출물(GEEE)보다 참도박 발효 추출물(GEFEE)의 항산화 효과가 높게 나타났다. 참도박 에탄올 추출물(GEEE)은 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 23.4%, 37.1% 나타났다. 하지만 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)의 경우 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 40.0%, 63.3%의 결과를 나타냈다(Figure 2).

3.3. ABTS⁺ 라디칼 소거활성 측정

본 연구에서는 참도박 추출물들의 보다 자세한 항산화 능력을 조사하기 위하여 ABTS를 이용하여 라디칼 소거 활성을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성 측정 방법은 DPPH 방법보다 더 민감하게 항산화 능력을 알아볼 수 있는 방법으로 알려져 있다[33]. 참도박 추출물과 참도박 발효 추출물을 이용하여 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Figure 3에 나타난 바와 같이 농도의존적으로 항산화 활성이 증가하였다. 참도박 열수 추출물(GEWE), 참도박 에탄올 추출물(GEEE), 참도박 발효 열수 추출물(GEFWE), 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)은 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 48.3%, 61.7%, 68.6%, 87.1%의 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 참도박 추출물과 참도박 발효

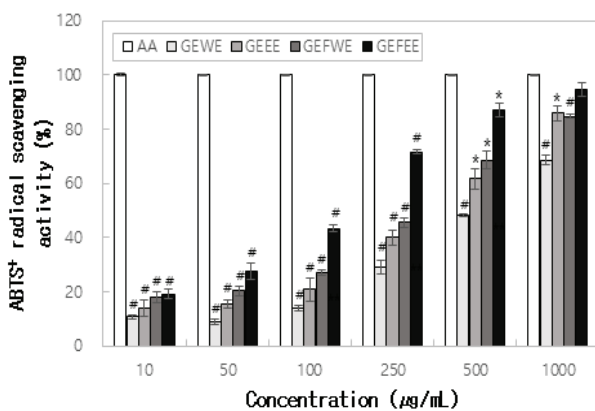


Figure 3. ABTS radical scavenging activity of *G. elliptica* water extracts (GEWE), *G. elliptica* ethanol extracts (GEEE), *G. elliptica* fermented water extracts (GEFWE), *G. elliptica* fermented ethanol extracts (GEFEE). Results are the means \pm SD, * $p < 0.01$, # $p < 0.001$ compared with ascorbic acid (AA).

추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성에 대한 결과는 참도박 추출물보다 참도박 발효 추출물의 결과가 약 15 ~ 20% 높게 나타났다. 열수 추출물과 에탄올 추출물의 비교 결과 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 뛰어난 항산화 활성을 보였으며 가장 높은 항산화 활성을 나타낸 시료는 발효 에탄올 추출물이다.

3.4. In Vitro Tyrosinase Inhibition Activity

멜라닌 색소는 자체 방어기전으로 자외선으로부터 피부를 보호를 위해 만들어 진다. 피부의 기저층에 있는 멜라노사이트(melanocyte)가 자외선의 자극으로 활성화되면 티로시나아제(tyrosinase)라는 효소의 작용으로 멜라닌 색소가 생성된 후 피부 표면으로 올라온다. 주로 각질이 되어 떨어져 나가는데, 과도하게 합성이 되거나 진피에 머무르게 되는 부분에 기미 및 색소 침착이 나타난다[34]. 참도박 추출물과 참도박 발효 추출물을 이용하여 tyrosinase 저해효과를 측정한 결과는 Figure 4와 같다. 대표적인 미백효과 물질인 arbutin을 대조군으로 하여 tyrosinase 저해효과를 나타냈다. 모든 시료 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 참도박 열수 추출물(GEWE)은 4.0%, 참도박 에탄올 추출물(GEEE)은 8.3%, 참도박 발효 열수 추출물(GEFWE)은 7.6%, 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)은 9.8%의 결과를 나타냈다.

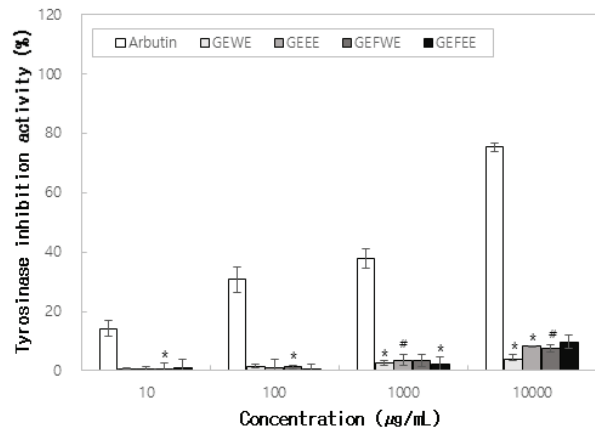


Figure 4. Tyrosinase inhibition activity of *G. elliptica* water extracts (GEWE), *G. elliptica* ethanol extracts (GEEE), *G. elliptica* fermented water extracts (GEFWE), *G. elliptica* fermented ethanol extracts (GEFEE). Results are the means \pm SD, * $p < 0.01$, # $p < 0.001$ compared with Arbutin.

3.5. *In Vitro* Collagenase Inhibition Activity

Collagen을 분해하는 효소는 종류가 매우 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것 중 하나가 matrix metalloproteinase I (MMP-1, collagenase)이며, 이는 콜라겐 type I을 분해한다. 피부노화에 있어 MMP-1의 저해는 중요한 요인으로 평가되고 있다[35]. 참도박 추출물과 참도박 발효추출물을 이용하여 collagenase inhibition activity 측정한 결과는 Figure 5와 같이 나타났다. 각 추출물 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 참도박 열수 추출물(GEWE)은 9.0%, 참도박 발효 열수 추출물(GEFWE)은 8.4% 나타났다. 반면에 참도박 에탄올 추출물(GEEE)은 31.0%, 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)은 50.3%의 collagenase 저해효과를 나타냈다. Collagenase 저해 효과는 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)를 대조군으로 비교한 결과 참도박 발효 에탄올 추출물이 가장 높은 저해효과를 나타냈다.

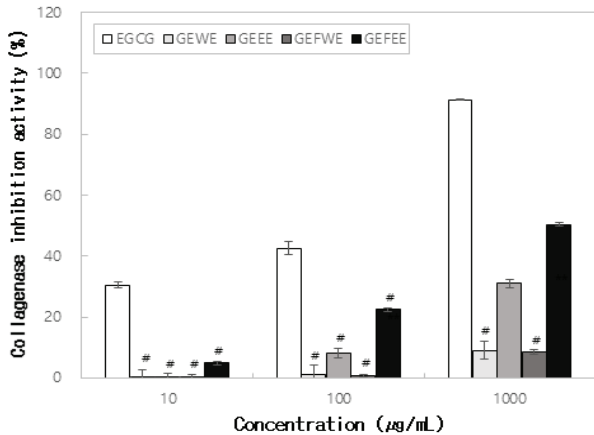


Figure 5. Collagenase inhibition activity of *G. elliptica* water extracts (GEWE), *G. elliptica* ethanol extracts (GEEE), *G. elliptica* fermented water extracts (GEFWE), *G. elliptica* fermented ethanol extracts (GEFEE). Results are the means \pm SD, * $p < 0.01$, # $p < 0.001$ compared with epigallocatechin gallate (EGCG).

3.6. 세포독성 및 증식률

참도박 추출물과 참도박 발효추출물이 인간의 피부에서 유래한 인간세포(HaCaT, keratinocytes)에 세포독성 및 증식에 대한 영향을 조사하기 위해 세포 배양액에 다양한 농도의 참도박 추출물과 참도박 발효추출물을 첨가하여 48 h 배양한 후 세포 독성 및 증식시험을 실시하고 그 결과를 나타냈다(Figure 6). 참도박 추출물과 참도박 발효

추출물을 48 h 처리한 결과, 추출물을 처리한 모든 농도에서 무처리 대조군과 유사한 결과를 나타냈다. 각 시료별 가장 세포증식이 높은 농도 및 증식률은 다음과 같다. 참도박 열수 추출물(GEWE)가 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 99.8%, 참도박 에탄올 추출물(GEEE)가 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 99.8%, 참도박 발효 열수 추출물(GEFWE)가 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 98.8%, 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)가 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 99.2% 나타났다. 그리고 시료처리 모든 농도에서 세포 독성 및 증식률이 대조군과 비교한 결과 90% 이상의 결과를 나타냈다.

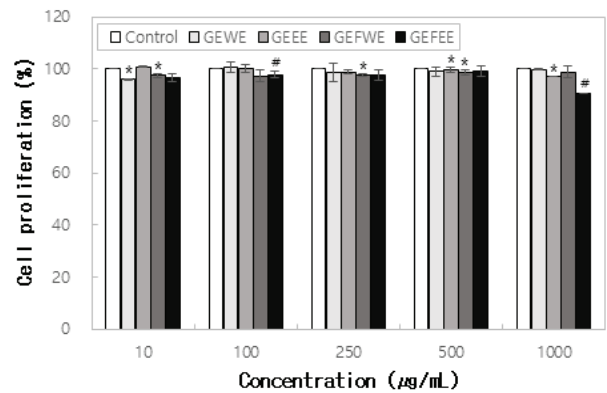


Figure 6. Cell viability of *G. elliptica* water extracts (GEWE), *G. elliptica* ethanol extracts (GEEE), *G. elliptica* fermented water extracts (GEFWE), *G. elliptica* fermented ethanol extracts (GEFEE). Results are the means \pm SD, * $p < 0.01$, # $p < 0.001$ compared with control. Control is no-treatment.

4. 고찰

본 연구에서는 화장품 기능성 소재로 개발하기 위해 참도박 추출물과 참도박 발효 추출물에 대한 항산화, 미백, 주름개선, 세포독성 및 증식 효과를 검증하고자 하였다. 항산화 실험인 DPPH radical 소거 활성에 대한 측정 결과는 추출물을 각각 처리하였을 때 농도 의존적으로 증가하였으나 열수 추출물의 경우 발효 전후 항산화 활성은 유사한 결과를 나타냈다. 하지만 에탄올 추출물의 경우 발효 후 항산화 활성이 모든 시료 중 가장 높게 나타났다. ABTS radical 소거활성능 또한 농도 의존적으로 항산화능이 증가하였으며, 측정 결과 참도박 에탄올 추출물(GEEE), 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE) 경우 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 85.8%, 94.6%로 매우 우수한 항산화 활

성을 나타냈다. 특히 참도박 발효 에탄올 추출물(GEFEE)의 경우 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상에서 85.0% 이상으로 가장 우수한 항산화 활성을 나타냈다. 또한 열수 추출물보다 에탄올 추출물의 항산화 활성이 우수한 결과를 나타냈다. Arbutin을 대조군으로 tyrosinase 저해효과를 측정결과와 비교해 보았을 때 참도박 열수 추출물, 참도박 발효 열수 추출물, 참도박 에탄올 추출물, 참도박 발효 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해활성은 10% 이하의 미미한 결과를 나타냈다. Collagenase 저해효과는 발효에 관계없이 열수 추출물보다 에탄올 추출물의 collagenase 저해활성을 높은 것을 확인하였다. 또한 에탄올 추출물 중에서 참도박 발효 추출물이 collagenase 저해활성을 50.3%로 가장 높게 나타냈다. 세포독성 및 증식률은 모든 시료 처리군에서 무처리 대조군과 비교하였을 때 90.0% 이상의 결과 나타났다. 따라서 참도박 발효 에탄올 추출물의 경우 가장 높은 항산화 효과와 주름개선 효과를 나타냈다. 종합하면 참도박 발효추출물은 우수한 항산화 효과와 주름개선 효능을 가진 화장품의 생리활성 소재로 개발될 수 있는 가능성을 확인하였다.

Reference

1. K. Y. Kim and N. K. Lee, Herbal extracts research trend that have effects on melanin production and control, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **12**(4), 453 (2014).
2. J. Y. Kim, J. Y. Kim, C. H. Choi, J. H. Lim, M. J. Choo, S. H. Moon, and S. J. Chang, Development of pre-assessment indicator for skin aging and anti-aging effect of inner skin by the cream product containing *Gynostemma pentaphyllum* gypenoside fraction, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **42**(3), 303 (2016).
3. A. R. Ganesan, U. Tiwari, and G. Rajauria, Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention, *Food Sci. Hum. Wellness*, **8**(3), 252 (2019).
4. J. Parada, J. R. Pérez-Correa, and J. Pérez-Jimenez, Design of low glycemic response foods using polyphenols from seaweed, *J. Funct. Foods*, **56**, 33 (2019).
5. M. M. Monagail, E. Cummins, R. Bermejo, E. Daly, D. Costello, and L. Morrison, Quantification and feed to food transfer of total and inorganic arsenic from a commercial seaweed feed, *Environ. Int.*, **118**, 314 (2018).
6. A. N. Aryee, D. Agyei, and T. O. Akanbi, Recovery and utilization of seaweed pigments in food processing, *Curr. Opin. Food Sci.*, **19**, 113 (2018).
7. N. M. Nurilmala, T. Hidayat, and F. Sudirdjo, Characteristics of seaweed as raw materials for cosmetics, *Aquat. Procedia*, **7**, 177 (2016).
8. J. Fleurence and I. Levine, Seaweed in health and disease prevention, eds. J. Fleurence and I. Levine, 423, Elsevier Science Publishing Co Inc, San Diego, United States. (2016).
9. Y. Qin, Bioactive seaweeds for food applications: Natural ingredients for healthy diets, ed. Y. Qin, 111, Elsevier Science Publishing Co Inc, San Diego, United States. (2018).
10. H. Dominguez, Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals, ed. H. Dominguez, 694, Elsevier's Science and Technology, Cambridge, United Kingdom. (2013).
11. J. Y. Berthon, R. N. Kappes, M. Bey, J. P. Cadoret, I. Renimel, and E. Filaire, Marine algae as attractive source to skin care, *Free Radic. Res.*, **51**(6), 555 (2017).
12. S. Joshi, R. Kumari, and V. N. Upasani, Applications of algae in cosmetics: An overview, *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.*, **7**(2), 1269 (2018).
13. J. K. Lim, A review of the usability of fucoidan extracted from brown seaweed as a functional ingredient of cosmetics, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **12**(4), 447 (2014).
14. I. P. S. Fernando, K. N. Kim, D. Kim, and Y. J. Jeon, Algal polysaccharides: potential bioactive substances for cosmeceutical applications, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **39**(1), 99 (2018).
15. F. A. Gomez, N. Korbee, V. C. Arrojo, R. T. A. Diaz, and F. L. Figueroa, UV photoprotection, cytotoxicity and immunology capacity of red algae extracts, *Molecules*, **24**(2), 341 (2019).
16. Y. Ding, S. H. Kim, J. J. Lee, J. T. Hong, E. A. Kim, D. H. Kang, S. J. Heo, and S. H. Lee, Anti-melanogenesis activity of *Ecklonia cava* extract cultured in tanks with magma seawater of jeju island, *Algae*, **34**(2), 177 (2019).
17. 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).
18. 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).
19. 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.*, **20**(1), 118 (2012).
20. 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).
21. J. S. Kim, M. Lee, M. Y. Song, S. W. Kwon, S. J. Kim, S. B. Hong, B. Y. Park, and B. S. Yun, Isolation and identification of *Aureobasidium spp.* from flowers of the jeolla-do province in Korea, *Korean J. Mycol.*, **46**(4), 415 (2018).
22. 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).
23. 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).
24. 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).
25. 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).
26. Korea Patent 10-1647049 (2016).
27. Korea Patent 10-0893350 (2009).
28. D. H. Park, S. T. Lee, D. Y. Jun, J. Y. Lee, M. H. Woo, K. Y. Kim, M. C. Seo, J. Y. Ko, K. S. Woo, T. W. Jung, D. Y. Kwak, M. H. Nam, and Y. H. Kim, Comparative evaluation of antioxidant activities of ethanol extracts and their solvent fractions obtained from selected miscellaneous cereal grain, *Life Sci.*, **24**(1), 26 (2014).
29. J. K. Suk, J. Y. Lee, H. J. Kwon, and B. W. Kim, Anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-melanogenic activities of *Endlicheria Anomala* Extract, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **41**(4), 433 (2013).
30. T. S. Thring, P. Hili, and D. P. Naughton, Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants, *BMC Complement Altern Med.*, **9**, 27 (2019).
31. T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, and L. Minor, Cell viability assays, *Assay Guidance Manual* (2013).
32. C. C. Wei, C. W. Yu, P. L. Yen, H. Y. Lin, S. T. Chang, F. L. Hsu, and V. H. Liao, Antioxidant activity, delayed aging, and reduced amyloid- β toxicity of methanol extracts of tea seed pomace from *Camellia tenuifolia*, *J. Agric. Food Chem.*, **62**(44), 10701(2014).
33. A. Floegel, D. O. Kim, S. J. Chung, S. I. Koo, and O. K. Chun, Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, *J. Food Compos. Anal.*, **24**(7), 1043 (2011).
34. H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Mitchell, Melanin: a two edged sword?, *Pigment Cell Res.*, **10**(3), 158 (1997).
35. J. H. Chung, S. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, **115**(2), 117 (2000).