

오만둥이(*Styela plicata*)에서 글리코스아미노글리칸의 최적 추출조건 설정 및 주름개선 효능

네리 테리스 아리안 · 최병대*

경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소

Establishment of Optimum Extraction Conditions and Wrinkle Improvement Evaluation of Glycosaminoglycans in *Styela plicata*

Therese Ariane N. Neri and Byeong-Dae Choi*

Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

Styela plicata are naturally-occurring marine resources easily found along the coastlines that have established their niche as functional food and nutraceuticals ingredient along with their increasing consumer demand. Ascidian contain a large amount of dietary fiber but only the meat has been utilized and consumed while the rest of its parts are discarded. Also, various studies have been conducted on the meat of ascidians while studies on the functionality of the ascidian tunics, which were mostly undervalued, were scarce. In this study, we investigated and explored the glycosaminoglycans (GAGs) contents in the tunics of *S. plicata*, and their potential use as functional ingredient in pharmaceutical and nutraceutical applications. Sulfated GAGs and uronic acids contents were 8.9-10.7 g/100 g and 9.4-11.3 g/100 g, respectively. Highest GAGs content was extracted with optimum Brix at 7-9. Extraction efficiency using hot water at 121°C was 4.22% while enzyme extraction using Protamex was more efficient at 5.91%. GAGs extracted from *S. plicata* tunics exhibited collagenase inhibitory activity of 75.2% at 100 µg/mL and procollagen synthesis activity of 80.1% at 100 µg/mL.

Keywords: Collagenase inhibition, Extraction efficiency, Glycosaminoglycans, Procollagen synthesis, *Styela plicata*

서론

우리나라의 기능성 원료 개발은 최근 지역의 자원을 활용하여 고부가가치 소재를 개발하기 위한 노력으로 집중되고 있다(Kim and Byun, 2018). 이와 같은 과정을 통한 기능성 효능을 가진 원료의 개발은 주로 육상식물 자원에서 추출 및 분리되어 왔다. 육상동물물을 이용한 원료는 최근에 발생한 광우병, 조류독감, 구제역 등의 발생으로 인한 문제로 그 이용이 매우 제한적인 상황이다. 이러한 자원수급 문제를 해결하기 위해서는 해양자원을 이용한 원료개발이 매우 절실한 때이다. 육상자원에 비해 훨씬 많은 생물을 보유한 해양자원에 대한 고부가가치 소재의 개발에 관한 연구는 이제까지 상대적으로 덜 진행되어 왔으나, 육상생물자원의 고갈문제로 인한 수요한계 해결 및 이를 대

체할 수 있는 생물자원으로써 최근 많은 관심 속에 연구가 진행되고 있다(Oh and Jung, 2015). 해양에 생존하고 있는 30,000종 이상의 어류를 포함한 해양자원은 다양한 신규 생리활성물질의 탐색자원으로서 잠재적인 가치를 지니기 때문에 식품산업 뿐만 아니라 화장품 및 의약산업 분야의 자원으로서 그 중요성이 점점 높아지고 있다(Jung, 2017).

피부는 신체의 외부를 덮고 있는 하나의 막으로 여러 가지 외부의 자극, 장애, 건조 등의 환경 요소로부터 신체를 보호해주는 다양한 생리적 기능을 수행하여 내부 장기와 그 밖의 체내 기관을 보호 조절하는 역할을 한다(Lim et al., 2012). 진피층의 섬유아세포는 진피층의 섬유상 단백질인 collagen과 elastin의 발현을 담당하고 있는데, 나이가 증가함에 따라 진피층에 존재하는 섬유아세포의 작용과 그 수가 감소하여 collagen과 elastin 등

*Corresponding author: Tel: +82. 55. 772. 9142 Fax: +82. 55. 772. 9149

E-mail address: bdchoi@gnu.ac.kr



This is an Open Access article 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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0717>

Korean J Fish Aquat Sci 53(5), 717-724, October 2020

Received 6 July 2020; Revised 30 July 2020; Accepted 21 August 2020

저자 직위: 네리 테리스 아리안(대학원생), 최병대(교수)

구조 단백질의 합성이 감소되고, 피부 세포 내 수분이 손실되면 각질층의 구조가 변화된다(Jeon and Yi, 2014). Collagen은 신체 곳곳에 존재하는 대표적인 섬유상 단백질로서 14개의 type 이 존재하며 이 중 피부에는 type I collagen이 주로 존재한다. 특히 최근 화장품 연구에서 가장 중요한 기능성분 중의 하나인 항주름효과의 연구에서 항산화활성 물질이 자연노화 또는 광노화 피부의 노화를 보호하며, 이로 인해 감소할 수 있는 procollagen type I 단백질의 양을 증가시킴으로 항산화 작용으로 인한 노화피부에 효과적임을 확인할 수 있었다(Cui et al., 2019). Collagen I을 분해하는 MMP-1 (matrix metalloproteinase I, collagenase)의 효소활성을 억제하여 collagen을 보호함으로써 피부조직의 기계적 특성을 유지시켜 피부의 탄력을 증가시키고 주름 생성을 예방하는데 글리코사아미노글리칸의 역할이 중요하다고 하였다(Campo et al., 2009).

일반적으로 다당류는 각각 고유의 기능을 갖고 있지만 대체로 미용이나 관절염, 혈류 개선, 눈의 피로 완화, 면역력 강화 및 자양강장에 대한 효과와 관계가 있다고 알려져 있으며, 천연물 소재를 기반으로 하는 건강기능식품 및 기능성화장품 등에 대한 일반인들의 인식도 높아지고 있다(Lee and Hong, 2014). 미색류 껍질에는 여러 종류의 황산다당이 존재하고 종에 따라 그 함량 및 화학적 특성에 차이가 있다고 보고되어 있으며(Pavão et al., 1989), 관련 연구로는 껍질성분 및 색소를 이용한 양식소재개발 연구(Hong et al., 2002), 글리코사아미노글리칸의 특성(Jeong, 2003) 및 조다당의 면역활성(Park et al., 2013) 등이 진행되어 왔다. 이와 같이 수산물의 성분들이 피부의 역할을 강화하는 여러 연구들이 진행되면서 수산물에 함유된 특정성분에 대한 상호작용을 연구하는 노력이 이루어지고 있다. 해양무척추동물 유래의 추출물은 다량의 글리코사아미노글리칸 뿐만 아니라 30-50%에 달하는 펩티드와 각종 아미노산 등이 함유되어 있다. 따라서 본 실험에서는 해양무척추동물 오만둥이에 함유된 글리코사아미노글리칸의 최적 추출조건을 찾아내고 그 활성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 미색류[명게(*Halocynthia roretzi*), 미더덕(*Styela clava*), 오만둥이(*Styela plicata*)]는 2017년 3월 경남 통영시 수산시장에서 판매되는 미색류의 껍질을 실험실로 즉시 운반하여 표면의 이물질을 제거하고 깨끗이 수세한 후 표면의 물기를 털어 내고 분쇄기(CR-100, Kyungseo E&P Co. LTD., Incheon, Korea)에서 4-5 mm로 파쇄한 후 해수를 제거하기 위하여 수돗물에 하루 밤 방치한 다음 -70°C의 심온동결고(Ilshin Biobase Co. LTD., Dongducheon, Korea)에 저장하면서 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 효소로는 Protamex 1.5MG (*Bacillus protease*), Flavourzyme 500MG (*Aspergillus ory-*

zae), Papain (*Carica papaya*), Alcalase 2.4L (*Bacillus licheniformis*) 등 4종을 사용하였다. 세포 실험에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 및 fetal bovine serum (FBS) 시약은 Hyclone Co. (Thermo Scientific Inc., Logan, UT, USA)의 제품을 사용하였고, 그 외에 실험에 사용된 분석용 시약, penicillin-streptomycin 혼합용액, lipopolysaccharide (LPS) 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

가압추출과 최적 °Brix의 결정

열수추출을 위해 냉동 보관된 미색류 껍질 100 g에 탈이온수 500 mL를 넣고 121°C (15 psi)에서 3시간 가열하였다. 이 방법으로 한 번 더 추출한 다음 여액을 모아 여과하고 진공농축기에서 °Brix 5-13이 되도록 농축하였고, 1.0 N HCl로 단백질을 침전시켜 제거하고, 1.0 N NaOH로 중화한 다음 ethanol을 3배 첨가하여 글리코사아미노글리칸을 침전시킨 후 동결건조(FDU-540, Tokyo Rikakikai Co. LTD., Tokyo, Japan)하여 실험에 사용하였다.

효소 및 산처리를 이용한 추출효율 평가

냉동고에 보관된 미색류 껍질 100 g에 탈이온수 500 mL를 넣고 121°C에서 3시간 가열한 후 실온에서 일정시간 식힌 다음 각종 효소를 1% 및 2% (dry basis, w/w)의 농도로 첨가하고, 1/60 M sodium phosphate buffer 500 mL를 가한 다음 각 효소의 최적 활성조건에서 가수분해하였다. 즉, Protamex 1.5MG (*Bacillus protease*, 60°C, pH 7.0), Flavourzyme 500MG (*Aspergillus oryzae*, 50°C, pH 6.5), Papain (*Carica papaya*, 60°C, pH 5.7) 및 Alcalase 2.4L (*Bacillus licheniformis*, 60°C, pH 7.0)를 사용하여 가수분해를 실시하였고, 가수분해 후 효소를 실험시키기 위하여 90°C 탕욕 중에서 10분간 가열하였다. 산처리구는 1.0 N HCl로 pH를 4.5로 조정후 121°C에서 3시간 처리하여 미색류 껍질에 함유된 글리코사아미노글리칸을 추출하여 미색류 추출효율을 검정하였다.

가압 및 Protamex 처리에 의한 추출효율 평가

미색류 껍질 100 g을 수세한 후 증자용 추출기(DN-1001, DongNam Industrial Co. LTD., Incheon, Korea)에 넣고 121°C에서 3시간 가열하여 시료에 함유된 글리코사아미노글리칸을 추출한 다음, 여기에 1/60 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 500 mL와 Protamex를 1%가 되도록 첨가하고 60°C에서 3시간 가수분해시켰다. 효소활성을 비교하기 위하여 시료의 온도를 60°C로 설정하고 24시간 추출한 시료(No steaming구)와 여기에 Protamex 1%를 첨가하여 3시간 추출한 시료로 설정하였다. 이 시료들은 감압농축기를 사용하여 °Brix 9가 되도록 농축한 후 90°C에서 10분간 가열하여 효소의 활성을 실험시킨 다음 여과하고 ethanol을 3배 첨가하여 글리코사아미노글리칸을 침전시킨 후 동결건조하여 실험에 사용하였다.

총당, 황산기, uronic acids 및 hexosamines 함량의 측정

총당 함량은 5% phenol 1 mL와 sulfuric acid 5 mL를 시료 1 mL와 반응시킨 후 분광광도계(Spectramax M2, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며, glucose를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 계산하였다(Saha and Brewer, 1994). Sulfated glycans함량은 1,9-dimethylmemethylene blue (DMB) 용액을 1.185 g NaCl, 1.52 g glycine, 0.008 g DMB, 0.47 mL HCl을 500 mL 증류수에 녹여서 제조하였다. 제조 용액은 525 nm에서 약 0.34의 흡광도 값을 가진다. 분석방법은 각 시료 0.05 mL를 1 mL DMB 용액과 혼합한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하고, chondroitin sulfate A를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 계산하였다(Farndale et al., 1986).

Uronic acid 함량은 25 mM sodium tetraborate를 진한 황산 용액으로 제조한 후 이 용액 0.2 mL와 시료 0.05 mL를 96-well plate에 넣고 잘 섞은 후 100°C에서 10분간 가열하였다. 그 다음 상온에서 15분간 냉각 후 0.125% carbazole 0.05 mL를 가하고 다시 100°C에서 10분간 가열하였으며, 상온에서 15분 방냉한 후 ELISA reader (Asys UVM340, Biochrom, Eugendorf, Austria)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, galacturonic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 계산하였다(Cesaretti et al., 2003). Hexosamine 함량은 Blix (1948)의 방법에 준하여 시료 100 µL를 1 M hydrochloric acid 용액으로 가수분해하였고, 2.5% sodium nitrite 0.4 mL를 넣은 후 15분간 반응한 다음 12.5% ammonium sulfamate를 0.2 mL 넣고 5분 반응시켰다. 여기에 0.2 mL 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate (MBTH)를 넣고 37°C에서 30분 반응한 후 0.5% ferric chloride 0.2 mL를 넣고 5분간 방치한 다음 650 nm에서 흡광도를 측정하였으며, N-acetylglucosamine을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 계산하였다.

피부세포 독성 평가

인간 피부 섬유아세포주(CCD986sk)를 Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM) 배지로 배양하였다. 각 세포주는 배양 플레이트에 배양하여 1주일에 2-3회 계대하였으며, 배지는 10% FBS 배지를 함유한 성장배지를 이용하였다. 세포주는 95% humidity, 5% CO₂와 35°C로 조절된 항온기에서 배양하였으며, 배지는 2일에 한 번씩 교환하였다.

섬유아세포에 대한 독성 여부를 알아보기 위하여 세포를 96 well plate에 1 × 10⁴ cells/well의 농도로 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 시료는 최종 농도가 1, 10, 50 및 100 µg/mL가 되도록 배지에 녹여 세포에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포의 생존율은 CellTiter 96[®] aqueous one solution cell proliferation assay 시약(Promega Co., Madison, WI, USA)을 이용

하여 Microplate reader (Spectramax M2, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도 비를 %로 나타내었다.

Collagenase 활성 저해능의 측정

Collagenase 활성 저해능은 EnZChek Gelatinase/Collagenase Kit (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) 시약을 구입하여 사용방법에 준하여 측정하였다. 먼저 1 mg DQTM gelatin vial에 1.0 mL의 탈이온수를 가해 DQTM gelatin stock solution (1 mg/mL)을 만들었다. 그리고 10 × reaction buffer (pH 7.5) 2 mL에 탈이온수 18 mL를 가해 reaction buffer를 희석 제조하였다. 다음으로 collagenase 효소 시약을 제조하였다. Working solution으로 최종 농도가 0.2 U/mL이 되도록 reaction buffer로 희석하였다. 실험에 사용할 글리코사미노글리칸을 reaction buffer에 시료를 녹여 시료의 농도가 10, 25, 50 및 100 µg/mL가 되도록 제조하였다. 제조한 시료를 96 well plate에 90 µL씩 3회 반복실험으로 하였다. 빛을 차단한 실온에서 1시간 동안 방치한 후 형광광도 495 nm/515 nm에서 형광광도를 측정하였다. Collagenase 활성 저해능은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Collagenase inhibitory activity (\%)} = [1 - (B - B_0) / (A - A_0)] \times 100$$

A, 효소 첨가 증류수의 흡광도

A₀, 효소 무첨가 증류수의 흡광도

B, 효소 첨가 시료의 흡광도

B₀, 효소 무첨가 시료의 흡광도

Procollagen type-1 생합성 활성의 측정

인간 피부유래 진피세포인 섬유아세포를 미국세포주은행(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 48 well plate에 5 × 10⁴ cells/well 농도로 분주한 후 24시간 동안 phosphate buffered saline (PBS)로 안정화하고 배지에 시료를 녹여 세포에 처리하였다. 이렇게 배양한 다음 배양 상등액을 취해 procollagen type-1 C peptide (PIP) EIA kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)로 procollagen 함량을 측정하여 collagen의 생성 정도를 비교하였다(Park et al., 2014).

통계처리

모든 실험은 3회 반복실험을 거쳤고, 결과의 통계처리는 JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하였으며, 각각의 시료에 대해서는 평균 ± 표준편차로 나타냈다. 각 시료에 대한 유의차 검정은 One-way ANOVA test를 실시하여 분산 분석한 후, Duncan's multiple range test에 의해 유의차검정(P<0.05)을 실시하였다.

결과 및 고찰

미색류에 함유된 기능성 성분의 특성

해양생물은 그 독특한 생태환경으로 인한 특유의 대사과정을 지니고 있으며, 생태학적 특이성으로 인해 선천적인 면역 및 방어 시스템을 가지고 있다. 이와 같은 특이적인 생리활성을 가지기 때문에 그 기능적 특성에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다(Lee et al., 2015). 미색류에 함유된 sulfated glycans 및 uronic acids 함량을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 우렁쟁이 (*Halocynthia roretzi*), 미더덕(*Styela clava*) 및 오만둥이(*Styela plicata*) 껍질에 함유되어 있는 sulfated glycan과 uronic acid 함량을 측정한 결과 각각 8.9 및 9.4 g/100 g, 10.2 및 10.8 g/100 g, 10.7 및 11.3 g/100 g으로 나타나 시료에 따른 차이는 크지 않은 것으로 나타났다. 그러나 Lee and Hong (2014) 등에 의하면 같은 재료를 사용하더라도 추출방법을 달리하면 추출되는 수율과 당의 함량에서도 차이가 나는 것으로 보고하고 있다. Sulfated glycans의 함량은 오만둥이 열수 추출물에서 17.71 g/100 g으로 가장 낮았고, 우렁쟁이껍질 효소추출물에서 39.72 g/100 g으로 가장 많은 함량이 나타났었다고 하였다. 산성당인 uronic acid 함량은 오만둥이 열수추출에서 3.12 g/100 g으로 가장 낮았으나, 오만둥이 효소추출에서는 10.86 g/100 g으로 가장 많이 함유되어 있었다고 하였다(Lee and Hong, 2014). 따라서 많은 연구가 이루어진 우렁쟁이와 미더덕보다 실험 결과의 발표가 적은 오만둥이를 시료로 사용하였다(Shin et al., 2014; Lee and Hong, 2015; Lee et al., 2015; Kim et al., 2016; Park and Yang, 2018).

°Brix에 따른 다당 및 아미노당 함량의 변화

글리코사미노글리칸은 세포의 점막과 점액으로 유출되기 때문에 점막 다당류라고 불리어 지기도 한다. 글리코사미노글리칸이 결합된 각 단량체의 종류, 각 단량체의 연계, 황산염의

위치, 황산화 정도에 따라 서로 구별된다. 이러한 특징을 바탕으로 글리코사미노글리칸은 크게 4가지 종류인 콘드로이틴황산/더마탄황산(chondroitin sulfate, CS/dermatan sulfate, DS), 헤파린/헤파란황산(heparin, H/heparan sulfate, HS), 히알루론산(hyaluronic acid, HA), 케라탄황산(keratan sulfate, KS)으로 분류된다(Lindahl et al., 2009). 중심 단백질에 음으로 하전된 carboxylic acid에 기인한 나뭇가지 형태의 구조로 공유 결합되어 있으며, 충격 흡수, 수분의 유지 및 전해질로서 생리학적으로 중요한 역할을 하고 있다. Sulfate-GAGs (chondroitin sulfate 등)가 80% 이상을 차지하고 있고, 강력한 항염증 작용이 있어 관절염 및 연골의 치료에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있어 이들 소재를 확보하려는 노력이 다양하게 이루어지고 있다(Lee et al., 2009).

오만둥이 시료의 °Brix에 따른 다당의 함량과 글리코사미노글리칸의 추출량을 측정하여 Table 2에 나타내었다. °Brix를 5에서 7로 증가시키면 다당 함량은 10.94%에서 16.45%로 증가되었으나, °Brix 9에서도 16.73%로 비슷하여 농축할 때 °Brix를 7-9 사이로 하면 최대의 추출효과를 가져올 것이다. °Brix를 11, 13으로 증가시키면 추출되는 당의 함량은 도리어 감소함과 동시에 포함된 글리코사미노글리칸의 함량도 4.74%, 3.13%로 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 추출용액에 함유된 글리코사미노글리칸의 농도가 일정하여 상대적으로 당의 함량이 증가하지 않았기 때문이다.

가압 및 Protamex 병행처리 후의 추출효율

오만둥이 껍질로부터 글리코사미노글리칸을 추출하기 위하여 여러 가지 방법을 응용하고 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 오만둥이 껍질에 물을 첨가한 후 가압용 추출기(121°C, 15 psi) 내에서 3시간 가열한 후 얻어진 추출액의 성상을 조사한 결

Table 1. Sulfated glycans and uronic acids contents in polysaccharides extracted from *Halocynthia roretzi*, *Styela clava* and *Styela plicata* tunic

Sources	Sulfated glycans ¹ (g/100 g)	Uronic acids ¹ (g/100 g)
<i>Halocynthia roretzi</i>	8.9±0.4 ^{b,2}	9.4±0.2 ^b
<i>Styela clava</i>	10.2±0.5 ^a	10.8±0.6 ^a
<i>Styela plicata</i>	10.7±0.6 ^a	11.3±0.4 ^a

¹Sulfated glycans content was determined by Blix method (1948), using chondroitin sulfate A as a standard; Uronic acids content was determined by carbazole assay (Cesaretti et al., 2003), using galacturonic acid as a standard. ²Values are means±standard deviation of triplicates. The same letter superscript within each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test (P<0.05).

Table 2. Optimum °Brix setting for extraction of glycosaminoglycans (GAGs) from *Styela plicata* tunics

Samples	Type ¹	Crude polysaccharides (%)	GAGs yield (%)	Mean
5 °Brix	A	10.94	3.52	3.49
	B	10.72	3.45	
7 °Brix	A	16.45	5.29	5.26
	B	16.43	5.23	
9 °Brix	A	16.36	5.19	5.28
	B	16.73	5.37	
11 °Brix	A	14.64	4.68	4.74
	B	14.81	4.80	
13 °Brix	A	10.83	3.47	3.13
	B	8.74	2.79	

¹A, 1st extracted crude polysaccharide from ascidian tunic; B, 2nd extracted crude polysaccharide from ascidian tunic.

과 pH 6.1-6.2, 염도 5-8 psi, °Brix 1.0-1.2, 수율은 4.22-5.91%로 효소를 첨가하여 추출하였을 때 수율이 약 1.4배 높아지는 것으로 나타났다. 그러나 가압없이 60°C의 온화한 조건에서 추출하였을 때는 pH 6.2, 염도 4-6 psi, °Brix 0.8-1.0, 수율은 1.19-3.72%로 추출효율이 매우 낮아져 추출온도를 높이는 것이 글리코사미노글리칸의 추출에 효과적인 것으로 나타났다.

오만둥이(*Styela plicata*)에 함유된 기능성 물질을 추출하기 위하여 methanol을 용매로 사용하였을 때 1.17 g이 추출되었으며, ethanol과 acetone을 이용한 경우에 각각 1.04 g이 추출되었고, 물을 이용한 경우에는 0.67 g으로 낮게 추출되었다고 하였다(Kim et al., 2005). 그러나 동결건조한 후 용매로 추출한 경우 methanol을 이용한 경우에는 1.64 g이 추출되어 추출효율이 47% 증가되었고, 물을 활용한 경우 0.96 g이 추출되어 절대량 및 상대량도 크게 증가되어 시료를 가공하는 방법에 따라 추출효율도 변화된다고 하였다(Kim et al., 2005). 글리코사미노글리칸의 효능에 대한 연구로는 항혈관신생, 항암작용, 항염증작용에서 글리코사미노글리칸의 발현이 이들 종양의 진행을 억제하는 중요한 작용을 한다는 연구들이 보고되었다(Kim et al., 2005; Kwak, 2014). 또한, 관절염 쥐에게 글리코사미노글리칸을 처리했을 때 치료효과가 있었으며(Campo et al., 2003), sulfated glycan은 미생물 발육을 억제하여 미생물의 인식, 부착, 침범 등의 과정을 조절하는 것으로 밝혀졌다(Wang et al., 2012). 그 외에도 글리코사미노글리칸이 지단백의 일종인 VLDL (very low density lipoprotein)의 apolipoprotein의 산화 변화와 지질 과산화에 영향을 미친다는 보고도 있었다(Albertini et al., 2000).

각종 효소 및 산 분해에 의한 각 성분의 함량변화

가압 후 효소를 처리하는 방법이 추출효율을 높였음을 Table 3의 결과로 알 수 있었으므로 어떤 효소가 더 효과적인가를 파악하기 위하여 Table 4와 같이 여러 종류의 효소를 활용하여 오만둥이 껍질에 존재하는 글리코사미노글리칸의 추출량을 조사하였다. 실험에 사용한 효소는 Alcalase, Flavourzyme, Papain, Protamex 각각 1% 및 2%였고, 이들과 비교하기 위하여 산가수분해법을 적용하여 총당, sulfated glycans, uronic acids,

Table 3. Steaming and enzyme hydrolyzation conditions of glycosaminoglycans (GAGs) extraction from *Styela plicata* tunic

Sample treatments	Components			
	pH	Salinity (psu)	°Brix	Yield (%)
Steaming (121°C)	6.1	8	1.0	4.22±0.03
Steaming (121°C)+Enzyme ¹	6.2	5	1.2	5.91±0.05
No steaming	6.2	6	0.8	1.19±0.01
No steaming+Enzyme	6.2	4	1.0	3.72±0.06

¹Protamex 1% (pH 7.0; Temp. 60°C; 3 h). Values are means±standard deviation of triplicates.

hexosamines함량을 측정하였다. 총당 함량은 효소 1%보다 2%를 사용하였을 때 약간 높았고, 가장 높은 함량을 나타낸 실험구는 Flavourzyme 및 Protamex 2% 첨가구였으며, 산가수분해의 경우 가장 낮은 값을 보여 22.7%이었다. 그 외 sulfated glycans, uronic acids, hexosamines함량을 비교하였을 때 Protamex 1% 구가 경제성이 가장 높을 것으로 추정되었다.

해조류인 불등풀가사리에 주로 함유되어 있는 다당은 자연에 널리 분포하고 있으며, 해양생물에 의해 생산되기도 하고 식물과 해조류로부터 파생되기도 한다. 이러한 다당은 sulfate 함량, 분자량, 당골격의 sulfate 위치, 당성분 및 glycosidic branching에 의존적으로 항산화 및 항암 등을 나타내고 있다고 알려져 있다(Wang et al., 2010). 해조류 다당류 중 기능성 다당인 fucoidan은 함황 산성다당으로써 조체 내에서 uronic acid와 acetyl group 및 단백질을 포함하기도 하며, 각기 다른 복잡한 구조의 fucoidan으로 존재하고 있다(Lee, 2011). 따라서 황산기를 함유한 fucose, rhamnose, xylose, glucuronic acid 등의 당분석을 통해 산성다당의 존재 및 함량을 예측할 수 있다(Jee et al., 2006). 또한 uronic acid는 단당류 분자의 말단에 있는 제1급 알콜기가 산화되어 carboxyl기가 된 것으로 6탄당에서 유도되는 uronic acid가 중요하다. Uronic acid의 경우 초고압 추출물이 5.04%로 높은 함량을 보였으며 가압가열, 열수추출물의 순으로 나타나 압력 공정을 통해 톳의 세포벽 성분 다당체 및 이의 결합을 붕괴하여 추출이 높아진 것으로 나타나 고온과 고압일수록 추출효율이 좋아지는 것으로 평가하였다(Lee and Hong, 2015).

추출물 농도에 따른 세포독성

오만둥이 가압 열수 추출물의 피부세포에 대한 주름개선효능을 확인하기 위하여 먼저 인간 피부 섬유아세포인 CCD986sk를 통해 독성시험을 실시하였다(Table 5). 먼저 세포를 2×10^3

Table 4. Composition of glycosaminoglycans (GAGs) from *Styela plicata* tunics by enzyme hydrolysis and acidic extraction

Enzyme		Components (%)			
		Total sugars	Sulfated glycans	Uronic acids	Hexosamines
Alcalase	1%	33.5±0.1 ^a	11.6±0.1 ^a	11.3±0.2 ^a	8.8±0.1 ^a
	2%	34.7±0.3 ^a	11.9±0.1 ^a	11.5±0.4 ^a	9.3±0.1 ^a
Flavourzyme	1%	34.2±0.4 ^a	11.0±0.1 ^a	11.1±0.2 ^a	9.1±0.1 ^a
	2%	35.2±0.5 ^a	10.8±0.2 ^a	11.8±0.1 ^a	9.5±0.1 ^a
Papain	1%	33.4±0.3 ^a	10.5±0.3 ^a	12.1±0.2 ^a	8.3±0.2 ^a
	2%	34.9±0.4 ^a	10.9±0.3 ^a	12.5±0.2 ^a	8.8±0.1 ^a
Protamex	1%	34.1±0.3 ^a	12.3±0.2 ^a	12.2±0.1 ^a	9.3±0.3 ^a
	2%	35.6±0.2 ^a	12.8±0.3 ^a	12.6±0.3 ^a	9.6±0.2 ^a
Acidic extraction		22.7±1.6 ^b	9.4±0.8 ^b	9.6±0.6 ^b	7.3±0.4 ^b

Values are means±standard deviation of triplicates. The same letter superscript within each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test (P<0.05).

cells/well 농도로 96 well plate에 분주하고, 24시간 동안 안정화한 후 오만둥이 열수 추출물은 최종농도가 각각 1, 10, 50 및 100 µg/mL의 농도가 되도록 배지에 혼합하여 배양하였다. 세포의 생존율은 무처리군에 대비한 시료 처리군의 흡광도의 비를 %로 표시한 결과, 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았다.

Collagenase 활성저해

Collagen의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화의 유도 등이 알려져 있다(Perlish et al., 1988). 피부의 진피는 주로 collagen으로 이루어져 있으며, 자외선이나 노화 현상에 의해 collagen을 분해하는 효소인 collagenase에 의해 피부의 주름이 형성되고, 피부의 탄력이 떨어진다고 한다(Wlaschek et al., 2001). 오만둥이 글리코사미노글리칸의 농도를 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 하여 collagenase 저해활성을 측정하여 Table 6에 나타내었다. 그 결과 레티닐 아세테이트는 10 µg/mL의 농도에서 약 42.0%의 저해활성을 보여주었고, 오만둥이

Table 5. Cell proliferation activity of glycosaminoglycans (GAGs) extracts from *Styela plicata* tunics

Samples (µg/mL)	Cell proliferation (%)
Control	100.0±4.6
Glycosaminoglycans	
1	109.8±6.7 ^b
10	106.5±6.7 ^b
50	112.3±5.5 ^a
100	115.1±3.7 ^a

Values are means±standard deviation of triplicates. The same letter superscript within each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Table 6. Collagenase inhibition activity of glycosaminoglycans (GAGs) extracts from *Styela plicata* tunics on fibroblast cell (CCD986sk)

Samples (µg/mL)	Collagenase inhibition activity (%)
Control	100.0±5.7
Retinyl acetate	
1	29.6±3.2 ^d
10	42.0±1.4 ^c
Glycosaminoglycans	
10	44.9±2.6 ^c
25	59.9±1.9 ^b
50	71.1±0.4 ^a
100	75.2±5.9 ^a

Values are means±standard deviation of triplicates. The same letter superscript within each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

글리코사미노글리칸 추출물도 10 µg/mL에서 44.9%, 고 농도인 100 µg/mL에서는 75.2%의 높은 활성 저해능을 보여 주었다.

불가사리 유래의 저분자 collagen 펩타이드(24-116 kDa)의 collagenase-1 저해활성 값이 40-60%이었으며, 홍어 껍질에서 유래된 pepsin 가수분해물의 저해활성 값과 유사하였다(Kwon et al., 2007). 단백질 가수분해물 및 저분자 펩타이드는 체내의 흡수율이 높으며, 추출물에 비해 독성이 낮으므로 단백질 가수분해물 및 저분자의 펩타이드가 collagenase-1 저해물질로 활용 가능성이 높다고 하였다(Park et al., 2011). Collagen은 피부 전체 건조중량의 약 70-80%를 차지하며, 피부 진피 교원질 중 주 단백질이다. 이러한 진피 층의 collagen은 활성산소 등으로 인한 광노화에 의해 감소하여 주름과 탄력저하의 원인이 된다(El-Domyati et al., 2002). 잔가시 모자반 추출물의 collagenase 저해활성을 측정한 결과 에탄올 추출물이 물 추출물보다 높아 에탄올 추출물 1 mg/mL 농도에서 80% 이상으로 높은 효소 저해능을 보였다(Pak et al., 2016). 또한 Kim et al. (2010)은 헛개 나무 열매 열수 추출물 및 뿌리 에탄올 추출물의 경우 0.25 mg/mL에서 68.1% 및 68.3%의 collagenase 저해활성을 가진다고 보고하였다.

Procollagen type-1 생합성 활성

글리코사미노글리칸의 다양한 노화방지 효과는 화장품 및 의약품의 소재로 광범위하게 활용되도록 하는 데 기여했다(Lee et al., 2016). 히알루론산, 콘드로이틴황산, 디마탄황산, 케라탄 황산 등 글리코사미노글리칸은 세포 외 구조를 구성하는 성분이며 진피와 표피세포의 성장, 이동, 분화, 접착, 지질 합성을 포함한 많은 생물학적 과정을 조절한다(Anderegg et al., 2014). 베르시칸, 데코린, 비글리칸을 갖는 프로테오글리칸을 포함한 글리코사미노글리칸도 collagen과 elastin의 합성 및 유지에 중요한 역할을 한다(Carrino et al., 2000). Collagen이 부착된 글리코사미노글리칸의 제거는 카텝신 K를 통한 collagen 분해에 영향을 미친다는 것이 입증되었다(Panwar et al., 2017).

Table 7. Procollagen synthesis activity of glycosaminoglycans (GAGs) extracts from *Styela plicata* tunics on fibroblast cell (CCD986sk)

Samples (µg/mL)	Procollagen synthesis activity (%)
Control	100.0±5.7
Glycosaminoglycans	
10	60.4±1.5 ^c
25	63.2±2.6 ^c
50	75.3±4.1 ^b
100	80.1±3.9 ^a

Values are means±standard deviation of triplicates. The same letter superscript within each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

그러나 피부에 미치는 노화방지 효과의 기초가 되는 글리코스아미노글리칸의 분자 메커니즘을 보고한 연구는 거의 없다. 오만둥이 글리코스아미노글리칸의 농도를 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 하여 procollagen 생합성 활성을 측정하여 Table 7에 나타내었다. 오만둥이 글리코스아미노글리칸 추출물도 10, 25, 50 및 100 µg/mL에서 각각 60.4%, 63.2%, 75.3% 및 80.1%의 높은 생합성 활성을 보여주었다.

글리코스아미노글리칸이 포함된 크림이 임상실험에서 주름, 피부탄력, 피부밀도, 피부조절 등을 긍정적으로 조절하는 것으로 나타났으며, 각종 염증성 사이토카인/케모카인의 발현이 현저하게 증가하고, 고령의 피부진피에서 I형 collagen의 발현이 감소하는 것을 볼 때, 글리코스아미노글리칸은 피부를 위한 항염증제 및 항노화제로 사용할 수 있다고 제안하고 있다(Kim et al., 2015). 글리코스아미노글리칸은 TNF- α 의 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 인산화를 촉진시켜 MMP-1 발현을 억제시키는 것으로 나타났다. 이는 MMP-1이 억제되면 I형 collagen의 분비를 촉진시키고 동시에 TNF- α 에 기인된 HDFs를 억제함으로써 세포사멸을 억제하여 피부노화를 억제할 수 있다고 하였다(Na et al., 2018).

References

- Albertini R, Passi A, Abuja PM and De Luca G. 2000. The effect of glycosaminoglycans and proteoglycans on lipid peroxidation. *Int J Mol Med* 6, 129-136. <https://doi.org/10.3892/ijmm.6.2.129>.
- Anderegg U, Simon JC and Averbek M. 2014. More than just a filler-the role of hyaluronan for skin homeostasis. *Exp Dermatol* 23, 295-303. <https://doi.org/10.1111/exd.12370>.
- Blix G. 1948. The determination of hexosamines according to Elson and Morgan. *Acta Chem Scand* 2, 467-473. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.02-0467>.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Samà D and Calatroni A. 2009. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. *J Cell Biochem* 106, 83-92. <http://doi.org/10.1002/jcb.21981>.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM, Altavilla D and Calatroni A. 2003. Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther* 5, R122-R131. <https://doi.org/10.1186/ar748>.
- Carrino DA, Sorrell JM and Caplan AI. 2000. Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys* 373, 91-101. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1545>.
- Cesaretti M, Luppi E, Maccari F and Volpi N. 2003. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydr Polym* 54, 59-61. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00144-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00144-9).
- Cui YR, Kim HS, Je JG, Wang L, Oh JY, Jia L and Jeon YJ. 2019. Protective effects of antioxidant active fractions derived from the edible seaweed *Hizikia fusiformis* in oxidatively stressed human dermal fibroblasts. *Korean J Fish Aquat Sci* 52, 35-42. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0035>.
- El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H and Uitto J. 2002. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol* 11, 398-405. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2002.110502.x>.
- Farndale RW, Buttle DJ and Barrett AJ. 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *BBA Gen Subjects* 883, 173-177. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90306-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90306-5).
- Hong BI, Jung BC, Jung WJ, Ruck JH, Choi BD, Lee KH. 2002. Utilization of pigments and tunic components of ascidian as an improved feed aids for aquaculture: 3. Functional properties of sulfated polysaccharides from ascidian *Halocynthia roretzi* tunic. *J Korean Fish Soc* 35, 671-675.
- Jee HK, Cho YJ, Kim CT, Jang YS and Kim CJ. 2006. Increase of solubility of Ginseng radix by extrusion cooking. *Korean J Food Sci Technol* 38, 361-368.
- Jeon SH and Yi DH. 2014. Effects of alliin on cellular protection, up-regulation of collagen and down-regulation of MMP1 in human dermal fibroblasts. *Korean J Aesthet Cosmetol* 12, 249-258.
- Jeong SH. 2003. Characterization of glycosaminoglycans from the ascidian tunic. MS thesis, Gyeongsang National University, Jinju, Korea, 1-46.
- Jung JH. 2017. Anti-cancer effect of marine resources against human colorectal cancer cells. *J Food Hyg Saf* 32, 70-74. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.1.70>.
- Kim BJ, No YA, Lee Y, Kim MN, Hong CK, Yoo KH, Kim YM, Hwang JH and Kong SY. 2015. Use of cream containing mucus secreted by snails has an anti-aging effect on skin. *Korean J Dermatol* 53, 430-436.
- Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR and Lee SC. 2005. Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34, 937-941. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2005.34.7.937>.
- Kim MJ, Kim WB, Hwang JH, Kim SA, Kim BR, Koo KY, Son HJ, Hwang DY, Jung YJ and Lee HS. 2016. Characterization of *Styela clava* tunic after alkaline treatment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45, 690-695. <http://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.5.690>.
- Kim SH, Jun DH, Jang MJ, Lee JT, Lee CE, Han JG, Kim JC and Lee DH. 2010. Study of cosmeceutical activities of *Hovenia dulcis* var. *koreana* nakai extracts. *J Korean For Soc* 99, 836-842.
- Kim SK and Byun HG. 2018. Production and biological applications for marine proteins and peptides- An overview. *Food Sci Indus* 51, 278-301.
- Kwak JY. 2014. Fucoidan as a marine anticancer agent in pre-clinical development. *Mar Drugs* 12, 851-870. <https://doi.org/10.3390/md12020851>.

- Kwon MC, Kim HC, Kim SH, Syed AQ, Hwang BY and Lee HY. 2007. Anti-wrinkle activity of low molecular weight peptides derived from the collagen isolated from *Asterias amurensis*. Korean J Food Sci Technol 39, 625-629.
- Lee CH, Shin SL, Kim NR, Yoon SE, Kim SI, Baek SH and Hwang JK. 2009. Changes of antioxidant effects according to greening period of astragalus membranaceus var. membranaceus, senna occidentalis, dianthus longicalyx, and plantago asiatica sprout vegetables. Korean J Plant Re 22, 349-358.
- Lee DH and Hong JH. 2014. Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Styela plicata* by extraction conditions. J Chitin Chitosan 19, 130-137.
- Lee DH and Hong JH. 2015. Immune-enhancing effects of polysaccharides isolated from ascidian *Halocynthia roretzi* tunic. J Korean Soc Food Sci Nutr 44, 673-680. <http://doi.org/10.3746/jkfn.2015.44.5.673>.
- Lee DH, Oh JH and Chung JH. 2016. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. J Dermatol Sci 83, 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.05.016>.
- Lee SH. 2011. Current status and prospect of nutraceuticals from marine algae. Bull Food Technol 24, 165-175.
- Lee SM, Lee YR, Cho KS, Cho YN, Lee HA, Hwang DY, Jung YJ and Son HJ. 2015. Stalked sea squirt *Styela clava* tunic waste as a valuable bioresource: Cosmetic and antioxidant activities. Process Biochem 50, 1977-1984. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.018>.
- Lim MS, Han SB, Kwon SS, Park MA and Park SN. 2012. Elastic liposome formulation for transdermal delivery of rutin. J Soc Cosmet Sci Korea 38, 147-154. <https://doi.org/10.15230/SCSK.2012.38.2.147>.
- Lindahl U, Couchman J, Kimata, K and Esko JD. 2009. Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. In: Essentials of Glycobiology 2nd ed. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, U.S.A., 229-248.
- Na JT, Bak DH, Im SI, Choi HT, Hwang JH, Kong SY, No YA, Lee YH and Kim BJ. 2018. Anti-apoptotic effects of glycosaminoglycans via inhibition of ERK/AP-1 signaling in TNF- α -stimulated human dermal fibroblasts. Inter J Mol Med 41, 3090-3098. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3483>.
- Oh GW and Jung WK. 2015. Biomedical materials for regenerating bone tissue utilizing marine invertebrate. Korean J Fish Aquat Sci 48, 1-15. <http://doi.org/10.5657/KFAS.2015.0001>.
- Pak WM, Kim KBWR, Kim MJ, Park JH, Bae NY, Park SH and Ahn DH. 2016. Anti-melanogenesis and anti-wrinkle effects of *Sargassum micracanthum* extracts. Microbiol Biotechnol Lett 44, 19-25. <https://doi.org/10.4014/mbl.1510.10002>.
- Panwar P, Butler GS, Jamroz A, Azizi P, Overall CM and Brömme D. 2017. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases. Matrix Biol 65, 30-44. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.06.004>.
- Park EK, Ahn SR, Kim DH, Lee EW, Kwon HJ, Kim BW and Kim TH. 2014. Effects of unripe apple polyphenols on the expression of matrix metalloproteinase-1 and type-1 procollagen in ultraviolet irradiated human skin fibroblasts. J Korean Soc Appl Biol Chem 57, 449-455. <https://doi.org/10.1007/s13765-014-4128-7>.
- Park SH, Jeong SB and Choi BD. 2013. Immuno- and anti-cancer activities of *Halocynthia roretzi* tunic extracts on cells. J Agric Life Sci 47, 163-170.
- Park SH, Lee JK, Jeon JK and Byun HG. 2011. Characterization of a collagenase-1 inhibitory peptide purified from skate *Dipturus chilensis* skin. Korean J Fish Aquat Sci 44, 456-463. <http://doi.org/10.5657/KFAS.2011.0456>.
- Park SH and Yang JC. 2018. Studies on the stability of natural pigment extracted from Ascidian shell. J Oil Appl Sci 35, 292-298. <http://doi.org/10.12925/jkocs.2018.35.1.292>.
- Pavão MS, Albano RM, Lawson AM and Mourão PA. 1989. Structural heterogeneity among unique sulfated-L-galactans from different species of ascidians (tunicate). J Biol Chem 264, 9972-9979.
- Perlish JS, Lemlich G and Fleischmajer R. 1988. Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. J Invest Dermatol 90, 48-54. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12462561>.
- Saha AK and Brewer CF. 1994. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. Carbohydr Res 254, 157-167. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84249-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84249-3).
- Shin YK, Park JJ, Park MS, Myeong JI and Hur YB. 2014. Effect of temperature and dissolved oxygen on the survival rate and physiological response of the warty sea squirt *Styela clava*. Korean J Environ Biol 32, 216-224. <http://doi.org/10.11626/KJEB.2014.32.3.216>.
- Wang X, Wang J, Zhang J, Zhao B, Yao J and Wang Y. 2010. Structure-antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. Int J Biol Macromol 46, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.10.004>.
- Wang W, Wang SX and Guan HS. 2012. The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: An overview. Mar Drugs 10, 2795-2816. <https://doi.org/10.3390/md10122795>.
- Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J and Scharffetter-Kochanek K. 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. J Photochem Photobiol B 63, 41-51. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00201-9](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00201-9).