

초임계 및 열수 *Asparagopsis armata* 추출물의 항균, 항산화, 엘라스타아제 및 티로시나아제 저해 효과

허수현*, 이진서*, 박수인*, 이광원*, 김정화*, 민혜인*, 김정은**, 박철훈**, 김규식**, 신문삼*

*울지대학교 대학원 시니어헬스케어학과 & 미용화장품과학과, ** (주)코스온 연구소

e-mail : msshin@ulji.ac.kr

Antimicrobial, Antioxidative, Elastase and Tyrosinase Inhibitory Effect of Supercritical and Hydrothermal *Asparagopsis armata* Extract

Soo Hyeon Heo*, Jinseo Lee*, Suin Park*, Kwang Won Lee*, Jeonghwa Kim*, Hyein Min*, Jung Eun Kim**, Chul Hun Park**, Kyu Sik Kim**, Moon Sam Shin*

*Dept of Senior Health Care & Beauty and Cosmetic Science, Ulji University, **R&D Center, Coson Co.

e-mail : msshin@ulji.ac.kr

요약

본 논문에서는 해조류인 *Asparagopsis armata*를 열수, 초임계 추출 후 생리활성을 비교하였다. In vitro는 먼저, 항산화력에서 총 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거능, SOD 유사 활성, ABTS+ radical 소거능 실험에서 열수 추출물이 초임계 추출물보다 우수한 항산화력을 나타냈다. 다음 Elastase 활성 저해 측정, Tyrosinase 활성 저해 측정에서 열수 추출물보다 초임계 추출물에서 더 우수한 효능을 나타내었고, 항균 시험인 paper disc 시험법에선 열수 추출물은 항균력을 나타내지 못했고, 초임계 추출물은 4개의 균주 모두에서 항균력이 나타났다. 이를 통해 항균력에 우수하고 인체에 무해한 초임계 추출물의 기능성 화장품 천연 신소재로써 활용 가능성을 제시하고자 한다.

1. 서론

최근, 천연 유래 기능성 소재에 대한 많은 관심이 기울어지면서 항종양성[1], 면역력 증강 등의 생리기능을 가진 해조류에 유래한 기능성 소재에 대한 관심도 높아지고 있다. 하지만 천연 유래 유효성분을 산업화하기 위하여 열수추출, 알칼리, 산 또는 효소 처리 등에 의하여 추출하는 공정방법들이 대부분인데 이는 생체 활성물질의 변질 및 파괴 등을 수반하는 결과를 초래하거나 또는 효과적으로 추출해 내지 못하는 단점을 가지고 있다. 반면, 초임계 유체 추출 기술 (supercritical fluid extraction)은 어떤 물질로부터 독성 잔류 물질 없이 유효성분만을 고순도로 분리, 정제하는 기술로서 환경 친화적인 추출기술로 각광받고 있다.

따라서 본 연구에서는 해조류인 *Asparagopsis armata*를 열수, 초임계 유체로 추출하고, 다양한 생리활성을 평가하여 기능성 화장품 천연 신소재로써 활용 가능성을 제시하고자 한다.

2. 본론

2.1. *Asparagopsis armata* 추출법

Asparagopsis armata 분말에 정제수를 가하여 80 °C

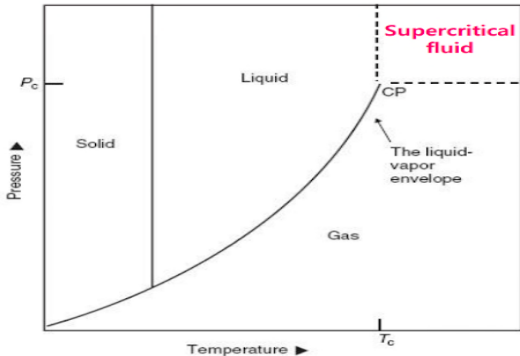
항온조에서 4시간 동안 추출하고 종이 여과지를 이용하여 감압 여과한 다음, 동결건조기(Freeze dryer, ilShin, Korea)로 동결 건조하여 분말을 얻었다. 초임계 유체는 임계 온도(T_c)와 압력(P_c)이상에서 단일상으로 존재하는 유체를 의미한다 (그림1). 액체와 기체의 특성을 동시에 가져 액체처럼 용해력이 크고, 기체처럼 빠르고 침투력이 좋아 용매로 활용할 수 있다. 초임계 유체로는 이산화탄소를 사용하였고, 이는 임계 온도가 상온에 가깝고 임계 압력이 낮으며($T_c=31^\circ\text{C}$), 값이 싸고, 독성이 없어 기존 유기용매를 대처할 유용한 용매이다. 초임계 추출공정은 추출단계와 분리단계로 이루어지고와 추출조의 압력을 최대압력인 350bar, 60°C로 설정하고, 분리조의 압력을 50bar, 25°C로 설정하여 150min 동안 추출하였다.

2.2 항산화 활성 측정

2.2.1 총 폴리페놀 함량 측정

Polyphenol의 정량은 Folin-denis의 방법에 따라 측정하였다[2]. 일정 농도로 희석한 시료 100 μL 에 Folin-Denis' reagent(Sigma aldrich, USA)를 100 μL 가하여 3분간 반응시킨 후 10% Na_2CO_3 를 100 μL 첨가하였다. 이 반응액을 Multi- Mode Microplate Reader(BioTek, USA)로 760 nm에

서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid(Samchun Chemicals, Korea)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 함량은 gallic acid equivalents(mg GAE/g extract)로 나타내었다 [3].



[그림 1] 기압 및 온도에 따른 상전도

2.2.2 DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical scavenging을 이용한 항산화 효과의 측정은 Blois의 방법에 따라 측정하였다[4]. 추출물 용액 100 μ L에 0.4 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 용액 100 μ L을 넣고 암실에서 30분 반응 후 Multi-Mode Microplate Reader로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

2.2.3 SOD 유사활성 능력

Superoxide Anion Assay Kit(Sigma aldrich, USA)를 이용하여 측정하였다. 일정 농도로 희석한 시료 20 μ L에 WST working solution을 200 μ L 가하고, enzyme 추출물 항산화 working solution을 20 μ L 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 이 반응액을 Multi-Mode Microplate Reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 ascorbic acid로 하였고, 소거능은 시료 첨가구와 시료 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

2.2.4 ABTS+ 라디칼 소거활성 측정법

ABTS+ 라디칼 소거능 측정은 7.4 mM ABTS (Sigma-Aldrich) 와 2.4 mM potassium persulfate (K2S2O8; Sigma-Aldrich)를 1:1 로 혼합하여 암실 및 실온에서 24 h 동안 반응시킨 후, 사용 전에 ABTS 용액을 에탄올에 희석하여 745 nm에서 흡광도 값이 0.700 \pm 0.001이 되게 하여 사용하였다. 양성대조군은 ascorbic acid로 하였고, 소거능은 시료 첨가구와 시료 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

2.3 Elastase 활성 저해 측정

Elastase 활성 저해능은 EnzChek elastase assay kit(ThermoFisher, USA)를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 1xReaction buffer로 희석한 시료를 50 μ L씩 분주 후 100 μ g/ml DQ elastin solution을 50 μ L 넣어준다. 그 다음 0.2

unit으로 조제한 Elastase 효소액(Sigma, 12056)을 100 μ L 씩 넣고 최종 양을 200 μ L로 만들어준 뒤 조제한 것이 잘 섞이도록 파이펫팅을 해주었다. 그 후 실온에서 30분 동안 방치하고 반응 후 microplate reader로 Excitation 485 nm, Emission 535 nm로 형광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone 를 사용하였으며 음성 대조군으로 elastase 효소액 대신 100 mM 1 xReaction buffer를 50 μ L씩 분주하였다.

2.4 Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 활성 억제 측정은 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 50 μ L와 정제수 40 μ L, 20U mushroom tyrosinase (Sigma, T3824) 5 μ L를 미리 제조하여 총 95 μ L씩 분주한 후 추출물 용액을 5 μ L씩 넣었다. 0.03% L-tyrosine 을 500 μ L씩 첨가하고 10분 동안 incubation에서 반응시켰다. 475 nm에서 흡광도를 측정하고 tyrosinase 효소 활성 억제율을 구하였다. 양성 대조군으로 kojic acid를 사용하였으며 음성 대조군으로 L-tyrosine 대신 정제수를 50 μ L씩 동일하게 분주하였다.

2.5 항균 시험

2.5.1 사용균주 및 균주 배양

항균활성에 사용된 미생물 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC/BRC, Jeongeup, Korea), 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)로부터 분양받았다. 실험에 사용한 각 미생물 균주의 균종과 번호를 표 1에 정리하였다.

[표 1]항균시험에 사용된 균주와 배양 조건목록

Strains	Culture collection	Media	Temp	Time
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6358	MH	37 $^{\circ}$ C	24h
<i>Escherichia coli</i>	ATCC23726	MH	37 $^{\circ}$ C	24h
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC19659	MH	37 $^{\circ}$ C	24h
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC6919	RC	37 $^{\circ}$ C	72h

MH: Muller-Hinton medium

RC: Reinforced clostridial medium

2.5.2 Paper disc에 의한 항균력 분석

항균력 측정은 paper disc법을 사용하였다[5]. 배양된 균주는 1.0 \times 10⁶ CFU/mL으로 조절한 후 본 실험에 사용하였다. 평판배지에 배양된 각 균주를 100 μ L씩 도말하여 준비하였고, 추출물을 각각 2.5~20 mg/mL 농도로 50 μ L 씩 paper disc (diameter 8 mm, Roshi kaisha. Ltd.,Tokyo, Japan)에 천천히 흡수시킨 뒤 다음 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다. 대조군으로 균주에 따라 Triclosan, salicylic acid, Methyl

paraben을 다양하게 사용하였으며, 배양 후 disc 주변에 생성된 저해환 (clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

3. 결론

본 논문에서는 해조류인 *Asparagopsis armata*를 열수, 초임계 추출 후 생리활성을 비교하였다. In vitro는 먼저, 항산화력에서 총 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거능, SOD 유사활성, ABTS+ radical 소거능 실험에서 열수 추출물이 초임계 추출물보다 우수한 항산화력을 나타냈다. 다음 효소 실험인 Elastase 활성 저해 측정, Tyrosinase 활성 저해 측정에서 열수 추출물보다 초임계 추출물에서 더 우수한 효능을 나타내었고, 항균 시험인 paper disc 시험법에선 열수 추출물은 항균력을 나타내지 못했고, 초임계 추출물은 4개의 균주 모두에서 항균력이 나타났다. 이를 통해 항균력에 우수하고 인체에 무해한 초임계 추출물의 기능성 화장품 천연 신소재로써 활용 가능성을 제시하고자 한다.

참고문헌

- [1] Lee, YS., Kim DS., Ryu BH. and Lee SH., "Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward sarcoma-180 cell". J. Kor. Soc. Food Nutr. 21, 544550, 1992
- [2] Folin O. and Denis W., "On phosphotungstic - phosphomolybdic compounds as color reagents". J. Biol. Chem. 12, 239, 1912.
- [3] Lee SH. and Lee SO., "Polyphenol contents and antioxidant activities of lentil extracts from different cultivars". J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr. 45, 973, 2016.
- [4] Blois MS., "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical". J. Pharm. Pharmacol. 181, 1199, 1958.
- [5] Ko MO., Kang HJ., Hwang JH., Yang KW., "Screening of the antibacterial effects by ethanol extracts from natural plant in Jeju against *Propionibacterium acnes*". J. Soc. Cosmet. Sci. Korea. 44, 59, 2018.