

청정해역 곰피추출물의 세포생리활성 연구

황은경¹ · 조명환 · 박찬선² · 김명희³ · 박갑주*

건국대학교 생명과학부, ¹국립수산과학원 해조류연구센터,
²목포대학교 해양수산자원학과, ³공주대학교 식품영양학과

In vitro Effect of *Ecklonia stolonifera* Okamura Extract on the Cell Growth in CCD-986sk Human Fibroblast and Melanin Formation Inhibition in Clone M-3 Mouse Melanocyte Cell Line

Eun Kyoung Whang¹, Myung Hwan Cho, Chan Sun Park²,
Myung Hee Kim³ and Kap Joo Park*

Department of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

¹Sea weed Research Center, NFRDI, Jeonnam 530-831, Korea

²Department of Marine Resources, Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

³Department of Food and Nutrition, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

Abstract – In order to investigate whether or not CCD-986sk cell line can be affected by Korean *Ecklonia stolonifera* Okamura, we examined the MTT assay when we treated Korean *Ecklonia stolonifera* Okamura extract in CCD-986sk human fibroblast cell line. The sample were tested for cell proliferation activity by means of a modification of the MTT assay. *Ecklonia stolonifera* Okamura extract showed significantly strong cell proliferation activity at the range of from 6.25 mg mL⁻¹ to 1.56 mg mL⁻¹ compared with control group.

And in order to search for inhibition agents of skin melanin formation, we tested for inhibition effect of melanin pigmentation of Korean *Ecklonia stolonifera* Okamura using Clone M-3 mouse melanocyte cell lines. when we treated the extracts of *Ecklonia stolonifera* Okamura to the mouse melanocyte cell lines, the sample showed a significantly little formation of melanin pigments compared with control group at the only range of 200 mg mL⁻¹. These results suggest that extract of Korean *Ecklonia stolonifera* Okamura may represents an excellent candidate for inhibition of melanin pigmentation and for protection of human skin aging at *in vitro* level.

Key words : *Ecklonia stolonifera* Okamura, CCD-986sk human fibroblast cell line, Clone M-3 mouse melanocyte cell line, MTT assay, bioactive effect

* Corresponding author: Kap Joo Park, Tel. 02-447-5018,
Fax. 02-3436-5432, E-mail. kkupkj@konkuk.ac.kr

서 론

나이가 들어감에 따라 피부와 피부를 이루는 부속물들은 변화를 겪게된다. 즉, 피부가 거칠어지며 주름이 증가하고 탄력을 잃게되면서 피부조직이 얇아지게 된다(Lavker *et al.* 1987). 보고된 바에 의하면 피부노화는 intrinsic aging과 extrinsic aging으로 대별되는데 intrinsic aging이란 자연스러운 피부의 노화로써 피부구조와 생리학적 기능이 자연스럽게 쇠퇴하는 것을 말하며, extrinsic aging은 자외선 및 스트레스에 의해 유발되는 피부의 노화를 말한다(Lavker *et al.* 1987). 잘 알려진 바와 같이 자외선은 가장 강력한 피부노화 유발물질 중의 하나이다. 피부는 자외선에 노출되면 피부의 구성성분인 collagen과 elastin이 변성되며 연이어 horny layer가 두꺼워지고 주름이 지게된다(Braveman 1982). 또한 자외선에 노출된 피부는 pigmentary deposit이 증가하게 되고 이에 따라 피부세포 내에 melanin cell의 수가 증가하게 되어 피부가 거칠고 검게 변하는 것이다(Kim *et al.* 1988). 따라서 인간의 피부노화를 방지하기 위해 많은 과학자들이 수많은 연구들을 진행하여 왔는 바, 피부세포 활성화의 지표인 collagen을 증가, 활성화시키고, fibroblasts를 활성화시키며, extracellular matrix를 증가, 활성화시키는 물질의 개발에 연구역량을 집중하여 왔다(Han *et al.* 1987). 이러한 예로 Lee *et al.* (1997)은 L-Ascorbic 산의 fibroblast growth 및 collagen biosynthesis에 관해 보고하였고, Kang *et al.* (1996)은 retinoids와 vitamin D의 피부노화방지 효과에 대해 보고하였으며, Kim *et al.* (1989)은 Panax Ginseng과 Radix Astragali의 피부노화방지 효과, Han *et al.* (1987)은 sulfhydryl compounds와 cysteine, glutathione 등의 피부노화방지 효과 등에 대해 보고하였다.

상기에 언급된 바와 같이 임상적으로 유용한 피부노화 치료물질을 개발하기 위해 다양한 chemical compound에 대한 연구가 진행되어 왔고 현재도 진행 중이지만 이들 chemical compound들은 세포독성 및 부작용으로 인해 그 사용이 일정부분 제한되고 있는 실정이다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해 천연물 또는 의학용 약초를 이용하여 임상적으로 안전한 피부노화물질을 개발하기 위한 연구가 미국, 일본, 영국 등 구미 선진국을 중심으로 점차적으로 증가하고 있는 추세이다.

곰피는(*Ecklonia stolonifera* Okamura) 우리나라 동해안과 남해안에 폭넓게 분포하는 다년생 갈조류로 수심 2~10m의 조하대에 주로 서식하고 있다(Kang 1968). 이 종은 연안 역에서 중요한 1차생산자의 역할을 담당하고 있는 종이며(Druehl *et al.* 1977), 해중림의 주요 구성종

으로써 연안 생태계에 있어서 생태학적으로나 수산업상 매우 중요한 위치를 점유하고 있다. 곰피는 성게, 전복 등 유용해산동물의 먹이원으로 해중림의 주요 구성종 중의 하나이며, 경남 지역에서는 씹 채소의 하나로 오래 전부터 식용으로 이용해오고 있는 해초류이다. 특히, 곰피에는 알긴산 뿐만 아니라 순도가 높은 fucoidan이 다량 함유되어 있으며, 곰피의 fucoidan은 트롬빈 활성이 높아 헤파린의 약 1.4배에 달한다고 알려져 있고(Lee *et al.* 1995). 또한 곰피에는 피부노화방지에 효과가 있는 것으로 알려진 L-Ascorbic 산 및 collagen이 다량 함유되어 있어 피부노화방지제 개발을 위한 천연물 후보물질로서의 가능성이 충분한 것으로 본 연구팀에 의해 조사되었다. 따라서 본 연구팀은 곰피추출물의 피부노화방지 및 치료 후보물질로서의 가능성을 연구하기 위해 *in vitro* 레벨에서의 연구를 수행하였다. 즉, 곰피추출물을 CCD-986sk cell line monolayer (human fibroblast, KCBL-21947)에 투여하여 피부세포에 대한 곰피추출물의 피부세포 생리활성효과를 측정하였고, 또한 Clone M-3 mouse melanocyte cell line에 곰피추출물을 투여하여 곰피추출물의 melanin formation 저해효과를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 곰피 (*Ecklonia stolonifera* Okamura) 추출물의 제조

곰피(*Ecklonia stolonifera* Okamura)는 목포 해조류연구센터의 황은경박사로부터 2007년 5월 전라남도 보길도 앞바다에서 채취하여 응달에서 건조한 것을 분양받아 사용하였다. 건조된 곰피 50g을 취한 후 이들 시료에 500 mL의 80% methanol을 넣은 후 60°C 수조에서 18시간 침적하여 추출하였고, 추출된 methanol 용액은 8,000 ×g에서 15분간 원심 분리 한 후 여과하여 rotavapo R-200 (Buchi, Germany)를 이용하여 농축하고 동결건조 하였다. 동결건조된 시료 1g을 1 mL의 0.8% methanol (concentrated sample)에 용해한 후 0.45 μm pore size의 membranes filter (Millipore, France)로 여과하여 검액으로 사용하였다(Kang *et al.* 1997).

2. 계대세포주 및 배양액

CCD-986sk cell line (사람피부계대세포주-human skin fibroblast, KCBL-21947)은 한국 세포주 은행(KCLB: Seoul, Korea)으로부터 2007년 7월 구입하여 실험에 사용하였다. CCD-986sk cell line은 10% fetal bovine serum (FBS: Hyclone, USA), 0.22% sodium bicarbonate (Sigma,

USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: GIBCO, USA)이 배양액으로 사용된 75 cm² plastic tissue culture flasks (Nunc)에서 단층 배양하였고 그 후 이 계대세포주는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 유지시켰다.

Clone M-3 cell line (mouse melanocyte, KCBL-10053.1) 역시 한국 세포주 은행 (KCLB: Seoul, Korea)으로부터 2007년 7월 구입하여 실험에 사용하였다. Clone M-3 cell line은 0.22% sodium bicarbonat (Sigma, USA) 및 10% fetal bovine serum (FBS: Hyclone, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: GIBCO, USA)이 배양액으로 사용된 75 cm² plastic tissue culture flasks (Nunc, USA)에서 단층배양하였고 이 계대세포주 역시 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

3. MTT assay를 이용한 피부세포 생리활성도 측정 실험

96 well plate에 1×10^5 CCD-986sk fibroblast cell line well⁻¹을 접종하고 0.8% methanol에 용해한 곰피추출물 시료 (200 μ L, 곰피추출물 시료 1,000 mg mL⁻¹을 함유)를 0.8% methanol 이용하여 2배 계단희석한 후 각 well에 첨가하고 이 culture plates를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4일간 배양한다 (Kang *et al.* 1997). 이때 일반 0.8% methanol을 2배 계단희석하여 각 well에 첨가하고 이를 normal control로 사용하였다. 그 후 각 well의 상태를 현미경으로 관찰하여 세포상태를 관찰, 체크하면서, culture plate의 각 well에 0.1 mg (50 μ L of 2 mg mL⁻¹)의 MTT를 가해주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 한다. 배양 종료시 각 well의 배지를 제거하고 100 μ L의 solubilization solution (DMSO)을 첨가하여 기형성된 짙은 청색의 결정체인 formazan을 완전히 녹인 후에 ELISA plate reader (Molecular devices, USA)로 흡광도 (test wavelength 540 nm, reference wavelength of > 650 nm)를 측정하였다. 시료의 CCD-986sk fibroblast cell에 대한 생리활성 정도의 평가는 대조군과 시료투여군의 흡광도를 기준으로 피부세포 생리활성 정도를 측

정한 후 결정하였다. 실험의 정확성을 기하기 위해 상기의 실험을 4회 반복한 후 4회 실험 결과 수치를 평균하여 통계처리한 후 피부세포 생리활성도를 판단하였다.

4. Melanin pigmentation 저해 활성도 측정

1.2×10^6 Clone M-3 mouse melanocyte cells well⁻¹을 함유한 6-well culture plates (Nunc, USA)에 곰피추출물 시료 (200 μ L, 곰피추출물 시료 1,000 mg mL⁻¹을 함유)를 각각 0.8% methanol 이용하여 2배 계단희석한 후 각 well에 첨가하였다. 이때 일반 0.8% methanol 역시 2배 계단희석하여 각 well에 첨가하였다 (normal control). 그 후 culture plates를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4일간 배양한 후 500 μ L의 trypsin-EDTA (GIBCO, USA)를 각 well에 첨가하고 각 well의 cell을 모아 1 mL의 3차 증류수를 첨가한다. 그 후 상온에서 2시간 방치한 후, 1 mL의 1 N NaOH solution을 각각의 샘플에 첨가하고 24시간 배양한 후 melanin pigments의 양을 475 nm wavelength에서 Spectrophotometer (Molecular devices, USA)를 이용하여 측정하였다. 실험의 정확성을 기하기 위해 상기의 실험을 4회 반복하였으며 이 4회의 실험 결과를 평균하여 통계처리한 후 melanin 저해 활성도를 판단하였다.

5. Statistical analysis

모든 결과는 mean \pm standard deviation로 나타내었고, student t-test를 이용하여 각 군 간의 차이점을 비교하여 통계처리하였다.

결 과

1. 곰피추출물 시료가 CCD-986sk cell line (사람피부 계대세포주-human skin fibroblast)의 생리활성에 미치는 영향

곰피추출물의 CCD-986sk cell line에 대한 세포생리활

Table 1. Effects of *Ecklonia stolonifera* Okamura extract on the fibroblast cell growth measured by MTT assay.

Test groups	Optical densities at 560 nm at the following concentration (mg mL ⁻¹) of the extracts							
	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56
Methanol	0.064 \pm 0.003	0.064 \pm 0.003	0.064 \pm 0.003	0.064 \pm 0.003	0.064 \pm 0.003	0.064 \pm 0.003	0.064 \pm 0.003	0.064 \pm 0.003
<i>Ecklonia stolonifera</i> Okamura	0.052 \pm 0.004	0.054 \pm 0.005	0.080 \pm 0.008	0.088 \pm 0.011	0.089 \pm 0.023	0.121 \pm 0.017*	0.123 \pm 0.022	0.129 \pm 0.031*

All values are mean \pm standard deviation. “*” values are significantly different from the control at P < 0.1 as determined by student t-test. Methanol (0.8%) is control group.

Table 2. Summary of Table 1

Test groups	Optical densities at 560 nm at the following concentration (mg mL ⁻¹) of the extracts							
	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ecklonia stolonifera</i> Okamura	-	-	-	-	-	+	-	+

“-” letter represents not significant difference. “+” letter represents significant difference from the control at P<0.1 as determined by student t-test. Methanol (0.8%) is control group.

성 효과를 MTT 검색법 (Tetrazolium-based colorimetric assay)을 이용하여 측정하였다. MTT검색법은 투여된 시료가 피부세포의 활성화에 효과가 있을 경우 피부세포의 생존율이 증가하게 되는데 이때 오직 생존 세포들만이 세포내의 효소작용에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)의 환원으로 formazan crystal을 생산하게 된다. 이 formazan crystal의 양을 흡광도로 측정하여 피부세포가 얼마나 활성화 되었는가를 측정하는 방법으로 즉, 흡광도의 증가는 생존 피부세포의 증가를 의미하며 생존 피부세포의 증가는 피부세포의 활성화를 의미하고 이는 피부재생효과 및 주름살제거 효과의 척도가 되는 것이다. MTT검색법 수행 시 96 well plate를 이용하면 실험조작의 자동화가 가능하고 실험 결과의 재현성과 객관성도 우수하여 대량검색이나 1차 검색에 적합한 스크리닝 방법이다.

본 실험에서는 0.8% methanol에 용해한 곰피추출물 시료 (200 µL, 곰피추출물 시료 1,000 mg mL⁻¹을 함유)를 0.8% methanol을 이용하여 연속적으로 2배 계단희석한 후 각 well에 투여한 곰피추출물 시료투여군을 시험군으로 하였고, 아무시료도 첨가되지 않은 일반 0.8% methanol을 연속적으로 2배 계단희석하여 각 well에 첨가한 군을 대조군으로 사용하였으며 이에 관한 실험결과를 Table 1 및 2에 나타내었다. 즉, 대조군은 560 nm에서 전 구간에서 걸쳐 0.064±0.0032의 흡광도를 나타낸 반면 시험군인 곰피추출물 투여군은 6.25~1.56 mg mL⁻¹ 구간에서 0.121±0.017, 0.123±0.022, 0.129±0.031의 흡광도 (Optical Density)를 나타내어 대조군에 비해 강한 세포생리활성 효과를 나타내어 유의성 있는 실험결과를 보여주었다. 이러한 결과는 곰피추출물을 투여한 시험군에서 대조군에 비해 CCD-986sk 사람피부계대세포의 수효가 약 200 퍼센트 더 증가한 것을 나타내는 것으로 이는 곰피추출물의 CCD-986sk 계대세포주에 대한 강한 세포생리 활성효과를 보여주는 결과로 사료된다.

Table 3. Estimation of melanin pigmentation on the melanocyte treated with *Ecklonia stolonifera* Okamura extract

Test groups (200 mg mL ⁻¹)	O.D. at 475 nm
Methanol	0.187±0.006
<i>Ecklonia stolonifera</i> Okamura	0.127±0.007*

All values are mean±standard deviation. *values are significantly different from the control at P<0.1 as determined by student t-test. Methanol (0.8%) is control group.

2. 곰피추출물 시료의 melanin pigmentation 저해 활성 효과

Clone M-3 mouse melanocyte cell에 대한 곰피추출물의 melanin pigment 저해활성을 측정하였고 그 결과를 Table 3에 나타내었다. Clone M-3 cell line을 배양하기 위해 0.22% sodium bicarbonate (Sigma, USA) 및 10% fetal bovine serum (FBS: Hyclone, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: GIBCO, USA)을 배양액으로 사용하였고 이 배양액이 첨가된 75 cm² plastic tissue culture flasks (Nunc, USA)에 Clone M-3 cell line을 분주하여 단층배양하였고 이 계대세포주를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

즉, Clone M-3 mouse melanocyte cell이 well 당 1.2×10⁶ cells 함유된 6-well culture plates (Nunc, USA)에 곰피추출물 시료 (200 µL, 곰피추출물 시료 1,000 mg mL⁻¹을 함유)를 0.8% methanol을 이용하여 2배 계단희석하여 각 well에 처리하고, culture plates를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4일간 배양하였으며 각 well의 cell을 모아 buffer 및 1 N NaOH solution을 처리하고 24시간 배양한 후 475 nm wavelength에서 Spectrophotometer (Molecular devices, USA)를 이용하여 melanin pigments의 양을 측정하고 그 결과를 대조군과 비교하였다.

실험결과 오직 200 mg mL⁻¹ 구간에서만 유의성 있는 실험결과를 나타내었는데, 이 구간에서 대조군의 흡광도는 0.187±0.006으로 측정되었고 시험군인 곰피추출물 투여군의 흡광도는 0.127±0.007로 측정되어 곰피추출물 투여군이 대조군에 비해 200 mg mL⁻¹ 구간에서 melanin pigment 생합성을 유의성 있게 감소시키는 것으로 실험결과가 나타났다.

적 요

곰피추출물의 CCD-986sk cell line monolayer (human fibroblast, KCBL-21947)에 대한 피부세포 생리활성효과를 측정하고, 또한 곰피추출물의 Clone M-3 mouse melano-

cyte cell line에 대한 melanin formation 저해효과를 측정하기 위해 *in vitro*레벨에서 실험을 실시하였다.

곰피는 다년생 갈조류의 일종으로 이 종은 한국 연안 해역에서 중요한 1차생산자의 역할을 담당하고 있는 종이며 연안 생태계에 있어서 생태학적으로나 수산업상 매우 중요한 위치를 점유하고 있다. 최근 이러한 대형 갈조류에 관한 연구는 주로 생태학적인 관점에서 이루어져 왔으며 (Notoya and Aruga 1990), 유주자의 발아와 핵분열 (Yabu and Notoya 1985) 등에 관한 연구가 주로 일본의 연구자들에 의하여 보고된 바 있고, 국내에서는 Park *et al.* (1994)이 부산만 인근해역 곰피의 성장과 연령 조성에 관한 연구를 수행하였고, 순간접착제를 이용한 곰피의 이식 등에 관한 연구(최 등 2002)가 보고된 바 있다. 그러나 지금까지 곰피의 식품 또는 약품제제로서의 가능성을 밝히는 연구는 아직 미미한 실정으로서 이에 대한 체계적인 연구가 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 곰피추출물에 풍부하게 함유된 fuco-dan, L-Ascorbic 산 및 collagen 등에 주목하여 곰피의 피부노화방지제로서의 가능성을 체계적으로 연구하기 위한 일환으로 우선 곰피추출물이 피부재생, 주름살제거 및 피부미백작용에 효과를 나타내는지 확인하기 위해 CCD-986sk cell line 및 Clone M-3 mouse melanocyte cell line을 이용하여 *in vitro* 수준에서 피부세포 생리활성 효과와 melanin formation 저해효과를 측정하였다.

그 결과 CCD-986sk cell line에 대한 세포생리활성 효과 실험에서 시험군인 곰피추출물 투여군은 대조군에 비해 강한 세포생리활성 효과를 나타내어 유의성 있는 실험결과를 보여주었고, Clone M-3 mouse melanocyte cell에 대한 melanin pigment 저해활성 효과 실험에서도 곰피추출물은 대조군에 비해 melanin pigment 생합성을 유의성 있게 감소시키는 실험결과를 나타내어 매우 흥미로운 결과를 보여주었다.

여러 가지 보고에 의하면 그동안 미국, 영국, 일본 등 구미 선진국의 과학자들은 intrinsic problems (피부구조 및 생리기능의 노쇠)과 extrinsic problems (자외선노출 및 스트레스)을 skin aging의 근본원인으로 규정짓고 피부 콜라겐과 엘라스틴을 재생시켜 피부 horny layer의 주름을 제거시키는 수 많은 종류의 chemical drugs를 개발하였고 현재도 개발 중에 있다 (Lavker *et al.* 1987; Choi and Oh 1997; Han *et al.* 1998). 그러나 이런 chemical에 비해 생체에 대한 부작용이나 세포독성이 상대적으로 적은 천연물을 이용하여 anti-skin aging drug을 개발하는 연구는 그 동안 부족했던 것이 현실이다. 한국은 오랜 역사를 통하여 화합물질이 아닌 다수의 천연물들을 임상에 적용하여온 역사를 가지고 있고 따라서 본 연구팀

은 우리 남해안의 청정해역에서 자라는 곰피의 항피부노화방지제로서의 개발 가능성에 주목하여 본 연구를 진행하였다. 연구 결과, 곰피추출물은 피부노화 및 skin-darkness에 대한 대체치료물질 (alternative therapeutic agent)로서의 충분한 가능성을 보여주었다.

사 사

본 연구는 2007년도 농림기술개발사업 및 해양수산기술훈원의 수산특정연구과제 (F10600206A210000100) 연구비 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

- 최창근, 김형근, 손철현. 2002. 순간접착제를 이용한 곰피 (*Ecklonia stolonifera* Okamura)의 이식효과. 한국수산학회지. 35:608-613.
- Braverman, Irwin M and F Eileen. 1982. Studies in cutaneous aging. Soc. Invest. Dermatol. 78:444-448.
- Choi HC and CH Oh. 1997. Evaluation of skin furrows in the aging process using an image analysis system. Kor. J. Dermatol. 35: 292-302.
- Druehl LP, W Roland and T Tuominen. 1977. Food chains originating from *Macrocystis integrifolia*. J. Phycol. 3:19.
- Han KW, KB Myung, JH Hahm and HI Kook. 1987. The effect of sulfhydryl compounds on melanosomal morphology of epidermal melanocytes in UV-irradiated black mice. Kor. J. Dermatol. 25:553-561.
- Han KH, KH Cho, DY Noh, HC Eun and JI Youn. 1998. Histological changes in the skin with innate aging. Kor. J. Dermatol. 36:971-980.
- Kang JW. 1968. Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea. Marine Algae. 8:465.
- Kang S, X-Y Li and John J Voorhees. 1996. Pharmacology and molecular action of retinoids and vitamin D in skin. Soc. Invest. Dermatol. 1:15-21.
- Kang BJ, KS Yang, MH Kim and KJ Park. 1997. Screening of antiviral activities of Korean medicinal herbs and traditional prescriptions against *Herpes simplex virus type-1*. J. Kor. Soc. Virology. 27:227-236.
- Kim YK, YK Park and HJ Kim. 1988. The effect of UV-B radiation on epidermal melanocytes of C57BL Mouse. Kor. J. Dermatol. 26:139-144.
- Kim YH, KS Ahn, D-K Song and MB Wie. 1989. Effects of Panax Ginseng and Radix Astragali on age-related physiological alterations in rats. J. K.O.M.S. 10:26-46.
- Lavker RM, P Zheng and G Dong. 1987. Aged skin: A study

- by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. Soc. Invest. Dermatol. 88:44-51.
- Lee OS, KW Lee, JE Hong, YK Cho and YS Lee. 1997. Studies on the synthesis of L-Ascorbic acid-3-aminopropane phosphoric acid diester and its applications. J. Soc. Cos. Sci. Kor. 23:97-109.
- Notoya M and Y Aruga. 1990. Relation between size and age of holdfasts of *Ecklonia stolonifera* Okamura (Laminariales, Phaeophyta) in northern Honshu, Japan. Hydrobiologia 204/205:241-246.
- Park CS, EK Hwang, SJ Lee, KW Rho and CH Sohn. 1994. Age and growth of *Ecklonia stolonifera* Okamura in Pusan Bay, Korea. Bull. Korean Fish. Soc. 27:390-396.
- Yabu H and M Notoya. 1985. Nuclear divisions in the young sporophytes of *Ecklonia stolonifera* Okam. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 36:83-86.

Manuscript Received: December 11, 2007

Revision Accepted: February 13, 2008

Responsible Editor: Jae Seok Lee