J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 34, No. 3, September 2008, 225-231

스피루리나 발효에 의한 항산화력 증진 및 항노화 효과

김 동 현 · 최 현 경 · 조 석 철* · 국 무 창* · 박 장 서†

동국대학교 화공생물공학과, *(주)바이오벤
(2008년 9월 1일 접수, 2008년 9월 16일 채택)

Enhancement of Antioxidant and Anti-aging Activities of *Spirulina* Extracts by Fermentation

Dong Hyun Kim, Hyun Kyung Choi, Seok Cheol Cho*, Moo Chang Kook*, and Chang Seo Park†

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, 3-26 Pil-dong, Chung-gu, Seoul 110-715, Korea
*Biovan Co. Ltd., R&D Center, Yonsei Engineering Reasearch Complex B120F 134, Yonsei University, Shinchon-dong, Seodeamoon-gu, Seoul 120-749, Korea
(Received September 1, 2008; Accepted September 16, 2008)

요 약: *Spirulina*는 시아노박테리아의 일종으로 피코시아닌, 베타카로틴, 비타민 E, 카로티노이드 등의 항산화물질과 양질의 단백질을 고농도로 함유하고 있어 이의 추출물은 화장품 소재로서 가치가 높다. *Spirulina*의 항산화력 증진을 위해 *Spirulina* 추출물을 *Lactobacillus plantarum* P23과 *Bacillus subtilis* TP6로 발효한 후 항산화, 항염증 및 항노화 기초 효능을 측정하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazl)법으로 측정한 항산화력은 발효 후 24.1 % (P23)와 18.6 % (TP6)로 증가되었다. *Spirulina* 추출물은 배양 중인 keratinocyte에 UV 조사 후 증가된 TNF-α와 IL-6를 정상 수준으로 줄여주었으나 발효에 의해 그 효과가 증가되지는 않았다. *Spirulina* 추출물 및 발효 추출물 모두가 UV 조사에 의한 세포사멸을 방지하였다. 특히 P23 발효 추출물의 경우 세포를 활성화시키는 효과가 관찰 되었다. UV 조사 후 관찰되는 콜라겐 생합성 감소와 MMP-2의 발현의 증가가 *Bacillus subtilis* TP6로 발효한 *Spirulina* 추출물의 경우에서만 관찰되었다. 결론적으로 *Spirulina*의 발효에 의한 물질은 기능성 화장품 소재로 가치가 기대된다.

Abstract: It is known that *Spirulina* extracts have strong antioxidant activities since it contains diverse antioxidants such as phycocyanin, β-carotene, vitamin E and other carotenoids. In order to enhance antioxidant activity of *Spirulina*, *Spirulina* extracts were fermented by *Lactobacillus plantarum* P23 and *Bacillus subtilis* TP6. The resulting fermented supernatants were analyzed for their antioxidant activities by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. The results indicated that fermentation process significantly enhanced total antioxidant activities. Increased levels of UV-induced TNF-α and IL-6 were reduced back to normal level even by treatment of all three of the *Spirulina* extracts. The result suggested that the fermentation process enhanced the anti-inflammatory activities at least ten times higher than the simple extract. Zymography is used to determine the expression of UV-induced MMP. *Spirulina* extracts fermented by *Bacillus subtilis* TP6 were found to suppressed the expression of MMPs. Also treatment with the fermented *Spirulina* extracts resulted in an increase of collagen synthesis *in vitro*. In conclusion, the fermented *Spirulina* extracts are expected to be used as anti-aging cosmeceuticals.

Keywords: *Spirulina, antioxidant, Lactobacillus plantarum, Bacillus subtilis, anti-aging*

† 주 저자 (e-mail: dgucsp@dongguk.edu)

1. 서 론

스피루리나는 식품이나 동물사료에 첨가물로 사용되는 2종의 시아노박테리아로서 아스로스피라 플라텐시스(*Arthrospira platensis*)와 아스로스피라 맥시마(*Arthrospira maxima*)가 여기에 속한다. 아스로스피라 속은 한때 스피루리나 속으로 분류되었다가 최근에 아스로스피라 속으로 통일되었으나 "스피루리나"가 일반적으로 통용되고 있다. 스피루리나는 열대 및 아열대지역의 카보네이트 함량이 높은 알칼리 수질의 호수에서 서식한다. 최근에는 사람의 건강기능성 식품 첨가물로서 상업화 되어 인공배양 되고 있다. 아스로스피라 플라텐시스는 주로 아프리카, 아시아 그리고 남미지역에서 서식하고 아스로스피라 맥시마는 중앙아메리카 지역에 서식한다.

스피루리나는 생물체가 필요로 하는 모든 영양소, 특히 단백질과 녹황색 야채가 가지고 있는 영양성분이 풍부한 고단위 천연 엽록영양소로서 인체에 필요한 5대 영양소(각종 단백질, 탄수화물, 각종미네랄, 지방, 각종 비타민)와 2 ~ 3만 가지 종류의 고른 영양소가 함축되어 있다. 비타민, 미네랄과 여러 기능성 물질 및 항산화제는 heart disease, cancer와 aging process 보호 작용을 한다. 이런 많은 활성은 산화적 손상 중 reactive oxygen species (ROS)에 의한 조정에 연관한다[1-4]. 스피루리나는 매우 높은 단백질 함량(55 ~ 77 %)을 가지고 있다. 각종 성분이 인체와 거의 같은 비로 구성되어 있어 체내 소화흡수율이 95 % 이상이며, 소화기능이 약화된 환자, 노약자, 유아 등이 섭취할 때 효과가 크며 장기간 복용하여도 영양에 불균형을 일으키지 않는 강 알카리성 완전식품이다.

여러 연구에서 스피루리나 또는 스피루리나 추출물이 사람과 동물의 암에 대한 저해 효과를 가지고 있음을 제시하였다. *In vitro* 연구에서 스피루리나의 polysaccharides는 nucleus enzyme activity와 DNA repair synthesis를 증진시키며, 체액과 세포의 면역 체계를 강화시킨다고 알려져 있다[5-8]. 최근 스피루리나의 잠재된 항산화력에 중점을 둔 여러 연구들이 진행되고 있으며, 스피루리나의 항산화능은 발암과 특정 조직 독성 저해 효과가 있다고 알려져 있다[9]. 이런 항산화능은 스피루리나의 phycocyanin에 비중을 둔 연구가 시도되고 있다[10]. 그러나 높은 항산화 성분과 비타민 A, E, C 등을 상당량 함유하고 있는 스피루리나를 이용한 항노화 화장품 소재로서의 생리활성과 피부효능을 규명한 연구 개발이 보고된 바는 아직까지 없다.

최근 발효에 의한 2차 대사산물의 생리활성물질에 대한 연구가 다양해지고 있다. 유산균(*Lactobacillus*)은 장내 유용균의 증식을 촉진하는 반면 유해균의 증식은 억제하여 장내 균총의 균형을 개선하며, 그 결과 장관 감염의 방지, 장내 부패억제, 변비 방지, 면역력 증가, 발암 억제, 비타민 B군 생산 등 여러 가지 생리적 기능을 가지는 것으로 밝혀지고 있다. 유산균 중에서도 김치에서 분리한 유산균은 전통적으로 섭취해 오던 가장 안전하고, 대표적인 식물성 유산균으로 우유 및 치즈에서 분리된 유산균과 비교하여 제한적인 환경에서도 쉽게 생육하는 특성을 나타낸다. 한편 고초균(*Bacillus subtilis*)은 다양한 단백질 분해효소를 세포 밖으로 분비하여 여러 새로운 생리활성 물질들의 활성이 증가되는 사례가 보고되고 있다. *Lactobacillus plantarum* P23과 *Bacillus subtillis* TP6 발효를 통해 *Lactobacillus*는 β-glucosidase activity에 의하여 스피루리나에 포함된 여러 당 중 lactose와 glucose의 분해를 통해 epidermal turn over에 좋은 lactic acid 등의 유기산을 생성하고, *Bacillus*는 62 %가 넘는 여러 단백질을 발효에 의해 가수분해하고 다양한 peptide와 amino acid를 생성하여 피부의 보습성을 높여주는 등의 효과가 기대 되어진다.

스피루리나는 최근 스키케어제품에 보습작용과 피부수렴작용 성분으로 이용되고 있으며 항염증 효능 소재로서 활용 가능성도 예상되나 과학적 근거가 미흡한 실정이다. 또한, 높은 항산화 성분과 비타민 A, E, C 등을 상당량 함유하고 있는 스피루리나를[11] 이용한 항노화 화장품 소재로서의 생리활성과 피부효능을 규명한 연구 · 개발 보고 예는 아직까지 없다. 따라서 본 연구에서는 스피루리나 추출물에 대한 항산화 및 항노화 기능성 화장품 소재로서의 활성과 효능을 확인하고[12-14], *Lactobacillus plantarum* P23과 *Bacillus subtillis* TP6의 발효 추출물이 항산화 및 항노화 화장품 소재로서의 활성과 효능을 더욱 증가시키는지 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

UV/Vis spectrophotometer (DU730, Beckman Coulter, USA)의 제품을 사용하였다. 표준 항산화제로 6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), L-ascrobic acid를 사용하였고, free radical 소거활성측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA) 제품을 사용하였다. 배

양 세포는 normal keratinocyte와 normal hunam dermal fibroblasts를 사용하였으며 배양 배지는 GIBCO (USA) 제품을 사용하였다. Sircol assay kit는 Bio-color (USA) 제품을 사용하였으며 TNF-α, IL-6 측정을 위한 ELISA kit는 BIO-SOURCE (USA) 제품을 사용하였다.

2.2. 스피루리나 발효물의 제조

10 w/v% 스피루리나 현탁액 1 L를 37 ℃ 진탕배양기(shaking incubator)에서 24 h 동안 물추출하였다. 추출물의 상등액에 *Lactobacillus plantarum* P23과 *Bacillus subtillis* TP6를 각각 1 v/v% 접종 후 *Lactobacillus plantarum* P23은 30 ℃ incubator, *Bacillus subtillis* TP6는 37 ℃ shaking incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 멸균에 의한 항산화력의 손실을 줄이기 위해 *Lactobacillus*의 경우 무살균 발효를 진행하였다. 발효 후 원심분리 하여 cell을 제거한 발효물을 실험에 사용하였다.

2.3. 스피루리나 발효물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

유해산소 또는 활성산소(reactive oxygen species)는 성인병과 인체 노화, 특히 피부 노화의 원인 물질이다. 활성산소를 제거해주는 항산화 실험은 Molyneux[10]의 방법에 의해 측정하였다. 에탄올에 용해시킨 0.25 mM DPPH solution 0.5 mL에 여러 농도의 발효물 0.5 mL을 첨가하여 섞어주고 암실에서 20 min 동안 반응 시킨 후 UV-spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 오차를 줄이기 위하여 시료 자체의 흡광도를 측정하여 보정하였으며, 대조군으로는 기존의 항산화제로써 널리 사용되고 있는 L-ascorbic acid와 Trolox를 사용하였다.

2.3.2. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)-DPPH법을 이용한 분석

Free radical 소거활성 물질을 확인하기 위하여 Soler-Rivas *et al.*[10]의 방법에 의해 측정하였다. 점적까지의 과정은 모두 HPTLC에 의해 자동으로 진행하였다. HPTLC용 silica gel plate에 sample 5 μL씩 점적하였다. 건조 후 chamber에서 ethyl acetate : formic acid : distilled water (85 : 20 : 5, v : v) 용매로 전개하였다. Dry oven에서 20 ~ 30 min 건조 후 에탄올에 용해시킨 1 ~ 2 w/v% DPPH solution으로 발색하였다. 발색 후 30 min 건조 후 UV Spectrophotometer에서 관찰하였다.

2.4. 세포 배양(Cell Culture)

피부 조직에서 분리한 normal-keratinocyte는 DMEM과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하여 10 % FBS와 1 % AA (Anti-biotic/Anti-mycotic solution)를 첨가하여 37 ℃, 5 % CO_2 incubator에서 배양하였고, 피부조직에서 분리한 normal human dermal fibroblasts (NHDF)는 10 % FBS와 1 % AA가 포함된 DMEM media, 37 ℃, 5 % CO_2 incubator에서 배양하였다.

2.5. 자외선(UVB) 처리 및 시료의 처리

Normal-keratinocyte와 NHDF 세포를 2 × 10^5 cells/well의 농도로 접종하여 37 ℃, 5 % CO_2 배양기에서 24 h 동안 배양 후, 배양 배지를 제거하고, PBS 용액으로 1회 세척하였다. PBS 1 mL 첨가하여 자외선(312 nm, 20 mJ/cm^2) 처리 후 배양 배지를 교체하였다. 이때 시료를 각 농도별로 투여하고 37 ℃, 5 % CO_2 배양기에서 48 h 동안 배양하였다.

2.6. 염증성 사이토카인의 측정(ELISA법)

자외선 처리 후 새로운 배양 배지에 시료를 투여하여 48 h 배양이 끝난 normal keratinocyte의 배양 상등액을 회수하였다. 이를 이용하여 배양액으로 분비된 TNF-α와 IL-6를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

2.7. 자외선에 의한 세포 손상 회복 효과

자외선 처리 후 새로운 배양 배지에 시료를 각각 농도별로 투여한 후 48 h 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 0.33 g/L 인 MTT 용액을 각 2 mL/well씩 넣어 90 min 동안 배양한 후 MTT 용액을 제거하고 isopropanol 1 mL을 이용해 20 min 동안 실온에서 shaking 한 후 상등액을 회수하여 12,000 rpm에서 5 min 동안 원심분리 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 세포 생존률을 비교하였다.

2.8. 신생 콜라겐 정량

배양이 끝난 NHDF의 배지를 제거하고 cell lysis 용액 500 μL/well 씩 첨가하여 cell을 회수한 후 하루 동안 상온에서 유지하였다. 용해된 cell 추출액으로부터 신생 콜라겐을 정량하기 위해 Sircol collagen assay kit를 이용하였다. Dye reagent와 cell을 반응시킨 후 15,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리하여 상등액을 제거한 후 형성된 펠렛을 알칼리 reagent를 넣어 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 신생 콜라겐을 정량 하였다.

Table 1. 50 % Radical Scavenging Activity Mass Content of Antioxidants & *Spirulina* Extracts, Fermented Sample by the DPPH Colormetry Method***

Antioxidant	Scavenging activity (FSC_{50}**)
	Concentration (μg/mL)*
L-Ascorbic acid	27.2 ± 1.3
Trolox	33.5 ± 1.8
Spirulina Extracts	83.3 ± 12.4
Spirulina E. (P23)	138.8 ± 6.5
Spirulina E. (TP6)	150.2 ± 9.2

* Each value is the mean ± S.D. of 3 replicate assays.
** FSC_{50} is the mean 50 % free radical scavenging activity.
*** Use 250 μM DPPH solution for DPPH Colormetry method.
(*Spirulina* E. (P23): Fermented with *Lactobacillus plantarum* P23, *Spirulina* E. (TP6): Fermented with *Bacillus subtilis* TP6)

2.9. Zymography

자외선 처리 후 새로운 배양 배지에 시료를 투여하여 48 h 배양이 끝난 normal-keratinocyte의 배양 상등액을 회수하였다. MMPs (matrix metalloproteases) 중 type IV 과 type VII collagen을 분해하는 MMP-2 (gelatinase A)와 MMP-9 (gelatinase B)의 발현을 조사하기 위해 1 % gelatin이 포함된 10 % SDS-PAGE gel에 회수한 배양액과 zymogram sample buffer와 1 : 1의 비율로 전기영동 하였다. SDS를 제거하기 위해 2.5 % Triton-X-100에 30 min 세척한 후 incubation buffer를 이용하여 over night incubation 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 스피루리나 발효물의 항산화력

10 w/v% 스피루리나 현탁액 1 L를 37 ℃ 진탕배양기 (shaking incubator)에서 24 h 동안 물추출하였다. 추출물의 상등액에 *Lactobacillus plantarum* P23과 *Bacillus subtillis* TP6를 각각 1 v/v% 접종 후 *Lactobacillus plantarum* P23은 30 ℃ incubator, *Bacillus subtillis* TP6는 37 ℃ shaking incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 이때 수득율은 29.9 %였다.

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. α-Tocopherol 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소주개(hyderogen donor)로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이때 hydrogen donor로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 자유 라디칼인

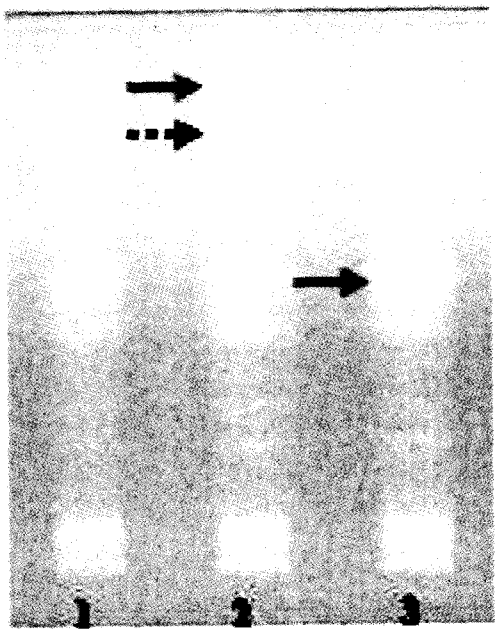

Figure 1. Fermentation of *Spirulina* slurry increase the antioxidant compounds by high performance thin layer chromatography. 1: *Spirulina* extracts, 2: *Spirulina* E. (P23), 3: *Spirulina* E. (TP6).

DPPH와의 반응을 통하여 알아 볼 수 있다. Free radical 소거활성에서 스피루리나 추출물과 발효물은 표준물질로 사용한 L-ascorbic acid와 Trolox에 비해 활성이 낮지만 천연추출물로서 상대적으로 free radical 소거능력을 지닌 물질로 판단된다. 또한, 발효물은 추출물(183.3 ± 12.4 μg/mL)에 비해 유산균(P23) 발효 시 약 24.1 % (138.8 ± 6.5 μg/mL), 고초균(TP6) 발효 시 18.6 % (150.2 ± 9.2 μg/mL) 정도의 항산화력 증진효과를 나타내었다(Table 1).

3.2. 스피루리나 발효물의 HPTLC 분석

스피루리나 발효물의 HPTLC 크로마토그램은 Figure 1에 나타내었다. Figure 1에서 1은 스피루리나 추출물, 2는 스피루리나 *Lactobacillus plantarum* P23 발효물, 3은 스피루리나 *Bacillus subtillis* TP6 발효물을 나타내었다. 각각의 노란색 band는 항산화력을 가지는 물질을 나타낸다. HPTLC 결과 추출물에 비해 *Lactobacillus plantarum* P23 발효물은 Figure 1에서 solid arrow band가 48 % 늘어나고 dotted arrow band가 소멸되는 것을 보였다. *Bacillus subtillis* TP6 발효물은 solid arrow band가 새로 생성되는 것을 확인하였다. 이와 같은 변화가 각각의 발효물의 항산화력 증가와 구체적으로 어떤 연관성이 있는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

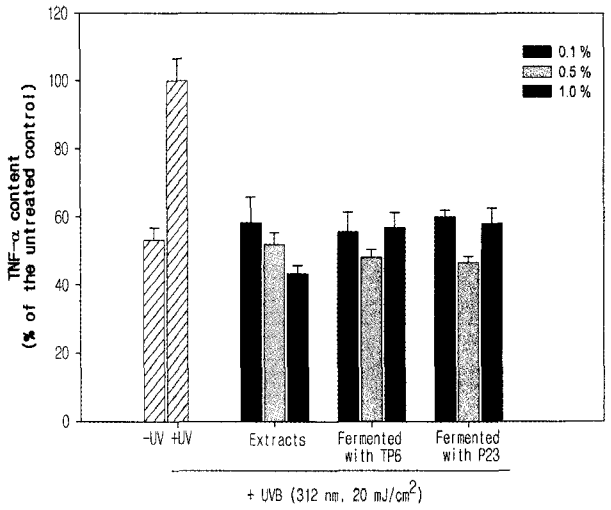

Figure 2. Anti-inflammatory activity against UV-induced TNF-α.

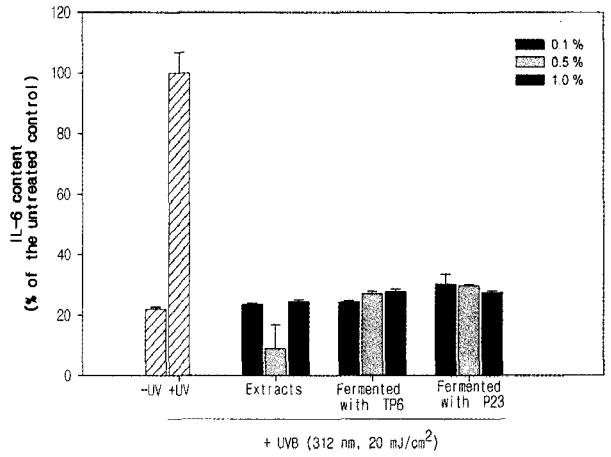

Figure 3. Anti-inflammatory activity against UV-induced IL-6.

3.3. 염증성 사이토카인 억제 효과

Normal-keratinocyte에 자외선을 조사한 후 시료를 농도별로 처리하고 48 h 동안 배양 후 배양 상등액을 회수하여 염증성 사이토카인을 측정한 결과 세 가지 시료의 모든 농도에서 자외선 처리 하지 않은 상태보다 TNF-α 생성을 50 % 이상 억제함을 볼 수 있다(Figure 2). 자외선 처리 후 처리 전보다 3배 이상 IL-6 분비량을 증가시켰고, 자외선 처리 후 시료를 각 농도별로 처리한 경우 각 시료의 최소농도에서 이미 최대의 항염증 효능을 나타내고 있어 우수한 항염증 효능을 가지고 있다고 판단된다(Figure 3). 즉, 스피루리나 추출물과 발효 추출물이 자외선에 의해 증가된 염증유발 사이토카인인 TNF-α와 IL-6를 모두 자외선 무처리 대조군 수준 이하로 낮추는 효능이 있음을 확인하였으나 발효 과정에 의해 추가적인 항염증 효능의 증가는 관찰되지 않았다.

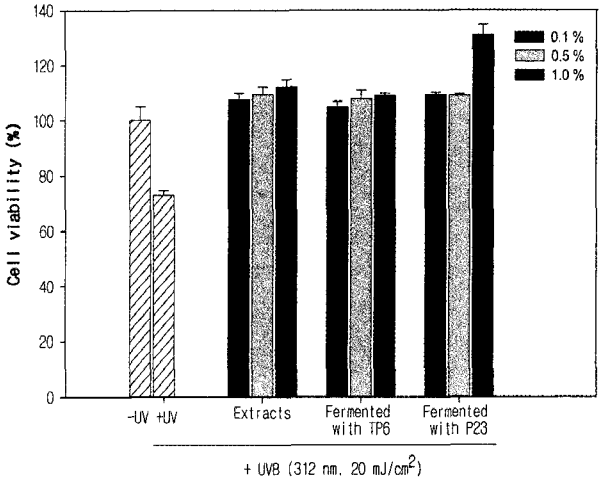

Figure 4. Protection effects of the fermented *spirulina* extracts on cell damage induced by UVB (MTT assay).

3.4. 자외선에 의한 세포 손상 회복 효과

자외선에 의한 세포 손상 회복 효과를 알아보기 위해 자외선 조사 후 세포 생존율을 측정하였다. 스피루리나 추출물 및 발효 추출물 모두가 UV 조사에 의한 세포사멸을 방지하였다. 스피루리나 시료를 처리한 경우 처리하지 않은 대조군보다 대략 40 % 이상의 생존율을 증가시켜 강한 세포 손상 회복 효과가 있음을 보였다. 특히 *Lactobacillus plantarum* P23으로 발효한 경우 고농도(1 %)에서 세포 생존율이 대조군에 의해 1.7배 증가되어 오히려 UV 무처리군보다도 높은 세포성장 촉진 효과를 나타내었다. 따라서 *Lactobacillus plantarum* P23 발효물의 경우 세포사멸의 방지뿐 아니라 세포활성을 증가시키는 효능이 있는 것으로 사료된다(Figure 4).

3.5. 신생 콜라겐 합성 효과

신생 콜라겐 생합성을 알아보기 위해 NHDF에 자외선을 조사한 시료를 각 농도별로 투여한 후 48 h 동안 배양하여 콜라겐 생합성량을 측정하였다. 실험결과 자외선 처리 후 세 가지 시료는 각 농도별로 투여한 모든 범위에서 자외선 처리로 감소한 콜라겐 합성량을 자외선 처리 전 수준으로 회복시킬 뿐만 아니라 최대 3배 이상의 신생 콜라겐 합성량을 증가시키는 것을 확인하였다. 스피루리나 추출물과 *Lactobacillus plantarum* P23으로 발효한 경우 신생 콜라겐 합성량이 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였지만 *Bacillus subtillis* TP6를 이용한

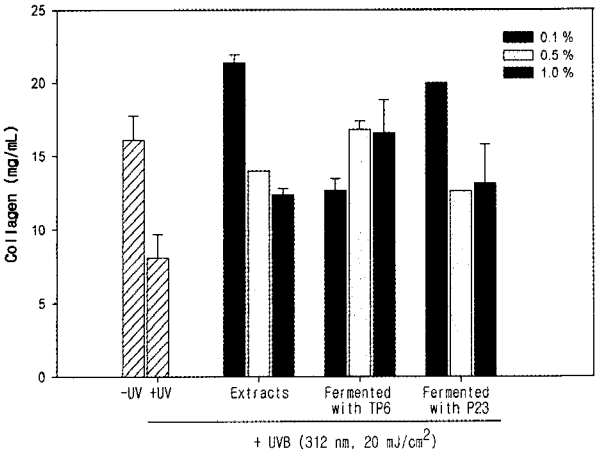

Figure 5. Collagen assay of human dermal fibroblasts treated with fermented *Spirulina* extracts (*in vitro*).

스피루리나 발효물은 농도 의존적으로 콜라겐 생합성량을 증가시킴을 확인 하였다(Figure 5).

3.6. MMP 발현 억제 효과

피부의 basement membrane (BM)과 dermal epidermal junction (DEJ)에서 type IV과 type VII collagen을 분해하는 MMP-2 (gelatinase A)와 MMP-9 (gelatinase B)의 발현을 알아보기 위해 normal-keratinocyte에 자외선을 조사한 후 시료를 농도별로 처리하고 48 h 배양 후 배양 상등액을 회수하여 zymography를 실행하였다. 스피루리나 추출물과 *Lactobacillus plantarum* P23을 이용하여 발효한 시료에서는 MMPs의 발현이 크게 줄어들지 않았으나, *Bacillus subtillis* TP6를 이용하여 발효한 시료의 경우 농도 의존적으로 MMPs의 발현이 현저히 감소하였다. 즉 발효를 통하여 MMPs의 발현이 감소함을 확인하였다(Figure 6). 이와 같은 결과는 콜라겐 생합성 측정의 결과와도 일치하는 것으로 노화현상에서 나타나는 콜라겐을 비롯한 dermal matrix 구성성분의 감소를 억제하는 효능이 *Bacillus subtillis* TP6를 이용한 스피루리나 발효 추출물에 존재하는 것으로 보인다. 향후의 연구는 어느 특정성분이 이러한 효능과 관련이 있는지를 규명하는데 초점을 맞추어 수행하고자 한다.

4. 결 론

본 연구는 스피루리나 추출물이 항산화 및 항노화 화장품 소재로서의 활성과 효능을 갖는지 알아보고, *Lactobacillus plantarum* P23과 *Bacillus subtillis* TP6의

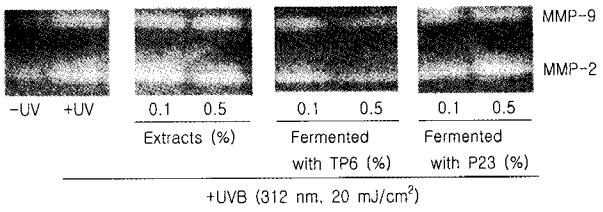

Figure 6. Treatment with fermented *Spirulina* extract resulted in reduced the expression of UV-induced MMP-2 and MMP-9 in human normal keratinocytes.

발효 추출물이 항산화 및 항노화 화장품 소재로서의 활성과 효능을 더욱 증가시키는지 알아보기 위하여 항산화(free radical 소거활성), 항염(TNF-α, IL-6 생성 억제), MTT (자외선에 의한 세포 손상에 회복), 신생 콜라겐합성, MMPs 발현 억제 효과에 대해 알아보고자 진행되었다. 항산화 효과를 측정하기 위한 free radical 소거활성에서 스피루리나 추출물은 FSC_{50}에서 183.3 ± 12.4 μg/mL의 radical 소거 활성을 보였으며 *Lactobacillus plantarum* P23 발효 시 24.1 %, *Bacillus subtillis* TP6 발효 시 18.6 %의 항산화활성의 증진효과를 나타내었다. HPTLC 분석 결과 *Lactobacillus plantarum* P23 발효의 경우 스피루리나의 항산화 물질 활성을 증가시켰고, *Bacillus subtillis* TP6의 경우 새로운 항산화 물질을 생성하는 결과를 보였다. 균마다 다른 enzyme activity에 의해 항산화 활성 및 피부생리활성 물질의 생성과 증진이 예상된다. 각 물질에 대한 정성, 정량 분석은 추후 실험으로 확인할 예정이다. 항염 효과 측정에서 스피루리나 추출물 및 발효 추출물은 UV-induced pro-inflammatory cytokines인 TNF-α는 50 % 이상 줄여주었고, IL-6의 경우는 70 % 이상 줄여 주어 항염증에 효능이 있음을 보였다. 스피루리나 추출물 및 발효물은 자외선에 의한 세포 손상에 대해 강력한 회복 효과가 있음을 보였다. 특히 *Lactobacillus plantarum* P23으로 발효한 경우 세포 생존율이 대조군에 의해 1.7배 증가됨을 통해 발효를 통한 스피루리나 추출물이 세포 손상 회복 효과를 증가시키는 것을 확인하였다. 또한, 각 농도별로 투여한 모든 범위에서 자외선 처리로 감소한 콜라겐 합성량을 자외선 처리 전 수준으로 회복시키고 최대 3배 이상의 신생 콜라겐 합성량을 증가시켰으며 MMPs의 발현을 감소시켰다. 특히, *Bacillus subtillis* TP6를 이용한 발효물은 신생콜라겐 합성량을 농도 의존적으로 증가 시킬 뿐 아니라 MMPs의 발현을 현저히 줄여 주었고 발효를 통해 그 효능이 증가됨을 확인하였다.

이상의 결과들은 스피루리나 추출물의 효과와 더불어 발효에 의한 항산화 및 항노화 효과의 증진을 확인하였다. 또한, *Lactobacillus plantarum* P23, *Bacillus subtillis* TP6 enzyme activity에 의한 콜라겐 합성증가, MMPs 발현감소, antioxidant activity의 증가 등 발효에 의한 생리활성이 증가하는 것을 보았다. 그러므로 스피루리나 발효물은 항산화, 항노화 효과를 가진 화장품 기능성 소재로써 응용가능성이 기대된다. 본 연구결과에서도 나타났듯이 *Lactobacillus plantarum* P23과 *Bacillus subtillis* TP6 발효 후 스피루리나 항산화 성분의 변화 양상이 다르게 관찰되었으며, 콜라겐 및 MMP-2에 대한 영향도 차이가 있었다. 또한 자외선 조사 후 나타나는 세포손상 회복 정도에서도 뚜렷한 차이가 관찰되었다. 향후의 연구에서는 이러한 차이가 어느 특정성분의 변화에서 기인하는지를 규명하고자 한다.

참 고 문 헌

1. O. I. Aruoma, Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants, *Food Chem. Toxicol.*, **32**, 671 (1994).
2. I. Fridovich, Oxygen toxicity: a radical explanation, *J. Exp. Biol.*, **201**, 1203 (1998).
3. J. A. Imlay and S. Linn, DNA damage and oxygen radical toxicity, *Science*, **240**, 1302 (1998).
4. T. M. Buttke and P. A. Sandstrom, Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes, *Free Radical Res.*, **22**, 389 (1995).
5. Q. S. Pang, B. J. Guo, and J. H. Ruan, Enhancement of endonuclease activity and repair DNA synthesis by polysaccharide of *Spirulina platensis*, *I Chuan Hsuch Pao*, **15**, 374 (1998).
6. M. A. Qureshi, M. T. Kidd, and R. A. Ali, *Spirulina platensis* extract enhances chicken macrophage functions after *in vitro* exposure, *J. Nutritional Immunol.*, **3**, 35 (1995).
7. M. A. Qureshi, J. D. Garlich, and M. T. Kidd, Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **18**, 465 (1996).
8. M. A. Qureshi and R. A. Ali, *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **18**, 457 (1996).
9. C. D. Upasani and R. Balaraman, Protective effect of *Spirulina* on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats, *Phytother Res.*, **17**, 330 (2003).
10. H. Takashi, T. Mikiya, O. Masaki, T. Teppei, and S. Morihiko, Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*, *J. Appl. Phycol.*, **12**, 435 (2000).
11. J. E. Pinero Estrada, P. Bermejo Bescos, and A. M. Villar, Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract, *Farmaco*, **56**, 497 (2001).
12. G. J. Fisher and J. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce AP-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, **3**, 61 (1998).
13. G. Jenkis, Molecular mechanisms of skin ageing, *Mech. Aging Dev.*, **123**, 801 (2002).
14. S. Amanoa, N. Akutsua, Y. Matsunagaa, K. Kadoya, T. Nishiyamaa, M. F. Champliaudb, R. E. Burgesonb, and E. Adachi, Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation, *Experimental Cell Res.*, **271**, 249 (2001).