Vol. 32(2):157-164
DOI: 10.4217/OPR.2010.32.2.157

Ocean and Polar Research

June 2010

Article

Spirulina maxima 초고압 추출물의 피부 면역 활성 증진

오성호[1] · 강도형[2] · 최운용[1] · 서용창[1] · 허수진[2] · Affan Md Abu[2] · 정경환[3] · 이현용[1,4*]

[1]강원대학교 바이오산업공학부
(200-701) 강원도 춘천시 효자2동 192-1
[2]한국해양연구원 해양생물자원 연구부
(425-600) 경기도 안산시 안산우체국 사서함 29
[3]충주대학교 보건생명대학 식품생명공학부
(368-701) 충청북도 증평군 증평읍 대학로 61
[4]강원대학교 생명과학연구소
(200-701) 강원도 춘천시 효자2동 192-1

Enhancement of Skin Immune Activities of *Spirulina maxima* by High Pressure Extraction Process

Sung Ho Oh[1], Do Hyung Kang[2], Woon Yong Choi[1], Yong Chang Seo[1], Soo Jin Heo[2], Affan Md Abu[2], Kyung Hwan Jeong[3], and Hyeon Yong Lee[1,4*]

[1]Department of Biomaterials Engineering, College of Bioscience and Biotechnology
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
[2]Marine Living Resources Research Department, KORDI
Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea
[3]Department of Food Science & Technology, College of Health and Life Sciences
Chungju University, Chungju 380-702, Korea
[4]Institute of Bioscience and Biotechnology
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract : A marine alga, *Spirulina maxima*, was extracted under high pressure and low temperature conditions at 500 MPa and 60°C for 5 and 10 min. A high pressure of 500 MPa was applied to improve process yields because of low temperature extraction. This method resulted in highest higher extraction yield of 26.1% (w/w) in comparison to those results obtained from conventional extraction methods which produced a yield of 17.6% (w/w) from water. The extracts from this process also showed 19% of low cytotoxicity against human normal fibroblast cells in adding 1.0 mg/ml of the highest concentration. The crude extract significantly reduced the production of Prostaglandin E_2 (PGE_2) from CCD-986sk cells and increased nitric oxide production by macrophages. These higher activities of enhancing skin immune functions were found to have high antioxidant extract properties, like a 98% increase in DPPH radical scavenging activity. The extracts from the high pressure process showed a higher elution of active components than other processes and generated new compounds based on HPLC analysis. This clearly indicates that the extracts from high pressure and low temperature conditions have higher skin immune activation properties that have not been previously reported.

Key words : *Spirulina maxima*, skin immune activities, high pressure, low temperature, antioxidant

*Corresponding author. E-mail : hyeonl@kangwon.ac.kr

1. 서 론

대량의 단백질(60-70%), 지방(6-9%), 탄수화물(15-20%), 그 외 필수 아미노산, 무기질 및 비타민, 섬유질 및 색소로 이루어진 *Spirulina*는 길이 200-500 μm, 나비 8 μm로 모양이 나선형으로 현재 35종 정도가 밝혀져 있으며, 아프리카와 중남미의 열대 및 아열대 지방의 호수에서 성장하는 것으로 알려져 있다(Kay 1991). 이러한 *Spirulina*를 비롯한 사이아노박테리아와 조류(algae)는 자연 건강식품으로서 여러 가지 영양소를 골고루 포함하고 있을 뿐 만 아니라, 이용 효율도 높아 인류의 중요한 식량자원으로 이용되어 왔으며, 생리 활성을 갖는 물질들을 함유하고 있는 것으로 밝혀졌다(Kay 1991; Yang et al. 1997). 특히, *Spirulina platensis*를 이용한 연구결과가 많이 정립되어 있으며, *S. platensis*의 성분 중 carotinoid 색소와 다른 식물에는 존재하지 않는 특이 물질인 Phycocyanin 그리고 Ca-SP(Calcium spirulina), α-Tocopherol 등이 잠재적인 항암 효과 및 항 노화, 색소 및 종양 전이 억제, 항산화와 염증방지에 대한 효과 등을 제시하여 그 기능성이 높은 것으로 밝혀졌다(Diego et al. 2004; Grinstead et al. 2000; Kaji et al. 2002; Lee et al. 2003). 또한, 조류인 *Spirulina*, *Chlorella*는 헤모글로빈과 유사한 구조를 가지며 구조식 내에 있는 마그네슘의 금속치환 성질에 의한 중금속 배출능력과 자외선에 대한 생체막 보호 및 항상성 유지에 도움을 주는 엽록소 관련 화합물 및 지용성 항산화제로 널리 알려진 카로틴이 풍부하게 함유되어 있는 것으로 나타났다(강 등 2004). 이처럼 *Spirulina*는 최근 세계보건기구(WHO), 식량농업기구(FAO), 국제아동긴급기금(UNICEF) 등 국제연합(UN) 산하 국제기구들로부터 안정성을 인정받아 세계 100여 국가에서 건강보조식품 뿐만 아니라, 피부 관리 제품 등 여러 형태로 이용되며 그 활용 범위가 매우 넓다(이 등 2009). 현재 화장품 산업에는 약품이 첨가된 기능성 화장품 혹은 약용 화장품 개념이 도입되어 세계적으로 폭 넓게 이용되고 있다(Diego et al. 2004; Hernandez et al. 2002; Kaji et al. 2002).

본 연구에서는 *Spirulina*종 중, 기존 연구를 통해 많이 알려진 *Spirulina platensis*와는 달리(Diego et al. 2001; Grinstead et al. 2000; Nandeesha et al. 2001), 식품학적 연구는 많이 이루어졌으나, 향장품으로써 생리활성 효능에 관한 연구가 미흡한 *S. maxima*를 원료로 하였다. 그러나 *S. maxima*는 단백질 함량이 높으나, 해수 대량 배양이 어려워 현재까지 상용화 되지는 못했으나, 삼면이 바다인 우리나라의 대량 배양 생산 공정에 적합한 소재로 판단된다. 스피룰리나를 이용한 종래의 높은 온도의 열수추출 방법에 의한 추출은 유용 생리 활성 물질의 구조를 파괴하여 변성을 일으키며, 단백질 변성, 가용성분 위주의 추출 그리고 단순히 온도에 의한 추출은 다당류로 이루어진 물질 표면의 조직을 물러지도록 하여 유용 활성 성분 효능에 한계점을 지니고 있다. 또한, 단순 초고압 추출의 경우 고압 하에서 결합이 파괴되면, 부피가 감소하는 소수성 결합이나 이온결합은 고압 하에서 결합의 파괴가 촉진되는 한계점을 현재까지 지니고 있다.

이 연구는 향장 원료로서 *S. maxima*의 가치를 최대한 높이기 위해 저온·초고압 처리 방법(Jin et al. 2009)을 이용, 물질의 중요 구성 성분의 손실을 최소화 하고 단시간 내에 분리 가능하도록 하였는데 그 목적이 있다. 특히 고체화를 오랜 시간 유지 할 수 있고 불순물이 거의 없는 향상된 추출 수율 증가를 통해 고순도의 단일 성분을 간편하게 획득할 수 있는 방법을 제시하고 유용 활성 추출물의 증진에 의한 항산화 작용과 면역 증진의 관계를 규명을 통한 피부 면역 증진의 효과를 입증함으로써, 화장품 원료로의 이용 가치를 높이고자 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

재료 및 추출

본 실험에 사용된 *Spirulina maxima* 건조 분말은 한국해양연구원(KORDI)으로부터 지원받았다. 초고압 추출은 *S. amxima* 건조 분말 100 g을 비닐 팩에 물과 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압추출장치(Ilshin autoclave, Daejeon, Korea)를 이용하여 500 Mpa의 압력으로 각각 5분, 15분간 초고압 추출을 시행하였다. 초고압 추출이 끝난 *S. maxima*를 수직 환류냉각기가 부착된 flask에 10배의 증류수를 이용하여 60°C에서 12시간동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 추출물을 감압여과장치로 여과하여 농축 및 동결건조 한 후 실험에 사용하였다.

세포 및 시약

세포배양에 필요한 시약으로 배지는 RPMI 1640(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 사용하였고, 혈청은 fetal bovine serum(Hyclone, Logan, Utah, USA)을 이용하였다. 그 외에 세포 배양에 필요한 시약으로 Hepes buffer (Sigma), gentamycin sulfate(Sigma), trypsin-EDTA(Sigma) 등을 사용하였다.

Human skin fibroblasts(HSFs)인 CCD-986sk(KCLB, No. 21947)와 mouse 유래 대식세포인 J774.1(KCLB, No. 40067)은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)로부터 동결상태로 구입하여 각 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가해 37°C, 5% CO_2 조건하에서 배양하여 사용하였다.

세포 독성 측정

세포독성은 3-(4,5-dimethythazo-2-yl)-2,5-dipheny-tetrazolium

bromide(MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann 방법(Mosmann 1983)을 변형하였다. CCD-986sk 세포를 2×10^4 cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후, 각 well에 70-80% confluency 배양 시점에 시료를 투여하여 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액(5 μg/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리를 통해 상층액을 제거하였으며, 다시 10 μl acid-isopropanol(0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

자외선으로 인한 Prostaglandin E_2(PGE_2) 생성량 측정

일반적으로 염증 및 통증에 관여한다고 알려진 prostaglandin(PG)이 생성되는 기전은 LPS, SNP 또는 UV 자극에 의해 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), interleukin-6(IL-6) 같은 염증성 cytokine이 분비되면, phospholipase A_2(PLA_2)가 활성화 되고 PLA_2에 의해 세포막의 phospholipid에서 arachidonic acid가 분비되어 세포내 arachidonic acid가 cyclooxygenase(Cox)에 의해 PG로 변하는 과정을 통해 이루어지는 것으로 보고되었다(Bernstein and Chen 1994).

UV 조사는 cyclooxygenase enzyme의 양을 크게 변화시키며, 높은 PGE_2발현량을 나타낸다(Liou et al. 2007). 인간 fibroblast인 CCD-986sk 세포를 10% FBS와 DMEM 배지에 현탁하여 1×10^6 cells/ml로 하였다. 이 현탁액에 aspirin을 50 μM이 되도록 첨가하여 세포에 잔존하는 Cox 효소의 활성을 비가역적으로 억제시켜 동일한 PGE_2 양이 될 수 있도록 조절하였다. 다음 세포 현탁액과 시료를 96 well 세포 배양관의 각각 well에 20 μl씩 첨가하고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 2시간 동안 UV 등에 필터를 이용하여 UVA(6.3 J/cm^2)를 조사하였다. 배양 후 세포를 well 바닥에 부착시켰다. 그런 다음 부착된 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후, 표면에 남아 있는 세포를 실험에 사용하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정

추출물의 전자 공여 작용은 각각의 추출물에 대한 DPPH(a,a-diphenyl-picrylhy-drazyl)의 전자 공여 효과로 각 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 메탄올 1 ml, 시료 10 μl, 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.5) 990 μl를 분주한 시험관에 0.5 mM DPPH 용액(Abs. methanol soln.) 0.5 ml를 넣어 교반하고 암실에서 5분간 반응을 유도한 후, 잔존 radical의 농도를 UV spectrometer를 이용하여 517 nm에서 측정하였다(Lee and Lee 2008). 전자공여능(%)은 [(1−As/Ac)×100]으로 나타내었고, As와 Ac에 실험군과 대조군의 흡광도 값을 각각 대입하여 계산하였다. 그리고 항산화제인 butylated hydroxy anisole(BHA)의 활성을 조사하여 본 실험의 추출물과의 비교를 실시하였다.

$$\text{EDA}\ (\%) = \left(1 - \frac{As}{Ac}\right) \times 100$$

As: 추출물 첨가구의 흡광도
Ac: 추출물 무첨가구의 흡광도

Macrophage를 이용한 nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO 생성량 측정을 위해 사용된 세포주는 마우스 유래 J774.1 대식세포를 사용하였으며, 세포를 10% FBS와 RPMI 1640 배지에 배양하여 24 well plate에 4.5×10^4 cells/well의 농도로 넣은 다음, 시료를 첨가한 것과 첨가하지 않은 두 가지 군을 나누어 모두 37°C, 5% CO_2 배양기에 48시간 동안 배양한 후 LPS(lipipilysaccharide)를 200 ng/well의 농도로 처리하여 48시간 동안 세포를 배양하였다. 상등액 50 μg을 취하여 동일 부피의 Griess시약(1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihtdrochloride/2.5% h3po4)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며, 농도는 32 μM에서부터 0.25 μM까지 RPMI 1640 배지로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다(Choi et al. 2006).

HPLC 분석

*Spirulina maxima*의 유용 생리 활성 물질을 파악하기 위해, 각 추출물을 4.5 μm filter paper로 filtering 후, HPLC (Hewlett Packard HP1100, USA)에 의해 분석되었다. 컬럼은 Phenomenex(250×4.60 mm 5micron)을 사용하였으며, 전개 용매로는 HPLC용 acetonitrile과 증류수를 2:8의 비율로 혼합하여 사용하였으며, flow rate는 0.3 ml/min, wavelength는 254 nm으로 맞추어 30분간 측정하였다.

통계

본 연구에서 실험값의 통계는 SPSS package program의 paired *t*-test로 검정하였으며 모든 실험값은 평균±표준편차(Mean±standard deviation)로 나타내었다.

3. 결 과

추출 공정에 따른 추출수율

Table 1은 각 추출 조건에 따른 추출 수율을 나타낸 것으로 일반 100°C 열수 추출의 경우 17.6(%, w/w)의 수율을 보이는데 비해, 500 Mpa 이하의 초고압 추출 조건에서

Table 1. The extraction yields of *Spirulina maxima* from different extraction processes

Sample	Yields (%, w/w)
WE*	17.6±0.31
HPE5**	25.3±0.29
HPE15***	26.1±0.20

Each value were compared with control at $^{*}p<0.001$, $^{**}p<0.005$, $^{***}p<0.01$ by Student t-test. Mean values±standard deviation from triplicate separated experiments are shown.
*water extract at 100°C, control.
**holding high pressure for 5 min at 60°C with water solvent.
***holding high pressure for 15 min at 60°C with water solvent.

25(%, w/w) 이상의 높은 추출 수율을 보임을 확인 할 수 있다. 특히 초고압으로 5, 15분간 추출 시, 5분 추출 수율인 25.3(%, w/w)보다 1.0배 높은 26.1(%, w/w)로 추출 시간의 영향을 확인 할 수 있다.

세포독성 측정

인간 fibroblast에 *Spirulina maxima* 추출물을 0.2-1.0 mg/ml까지 다섯 가지 농도로 처리하고 48시간 동안 배양한 후, MTT assay로 측정한 세포 독성을 Fig. 1에 나타내었다. 그림과 같이 각 추출 조건에 따른 추출물 모두 농도 의존적으로 세포 독성이 증가하는 모습을 확인 할 수 있으며, 0.8 mg/ml의 농도에서 급격히 세포독성이 증가하는 것을 볼 수 있다. 특히, 100°C 열수 추출물의 경우 최대 농도인 1.0 mg/ml에서 18.6%의 가장 높은 세포 독성을 나타냈으며, 5, 15분 조건의 초고압 추출물의 경우 최대 농도인 1.0 mg/ml에서 각각 16.9%, 13.8%로써 낮은 세포독성을 보였다. 이와 같이 *S. maxima* 시료 모두 최고 농도에서 19% 이하로, 세포수준에서 유의할만한 세포독성을 나타내지 않아, 향장 원료로써 이용 가능성을 확인하였다.

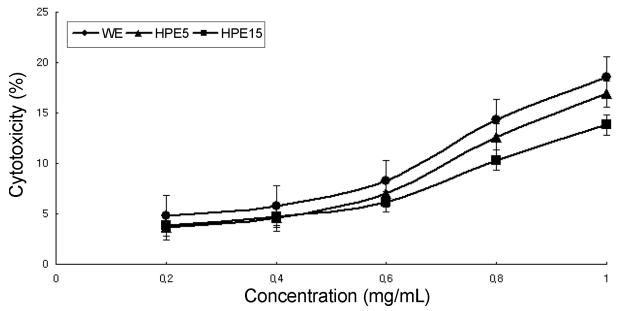

Fig. 1. Cytotoxicity of *Spirulina maxima* extraction on the normal human fibroblast, CCD-986sk. The results are expressed as the average of triplicate samples. The values represent the mean±standard deviation (WE: water extract at 100°C, control, HPE5: holding high pressure for 5 min at 60°C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 15 min at 60°C with water solvent)

자외선으로 인한 Prostaglandin E_2(PGE_2) 생성량 측정

*Spirulina maxima*의 향장 원료로서 피부 면역에 미치는 효능을 찾기 위해 UV를 이용하여 인간 fibroblast인 CCD-986sk를 자극함으로써 PGE_2 생성량을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2(a)는 UV를 조사하지 않은 세포에서의 PGE_2 발현도를 나타낸 것으로, 시료 무첨가 대조군의 경우 874 pg/ml을 나타내었다. 그러나 모든 추출물의 경우 대조군에 비해 낮은 PGE_2 발현도를 나타내었으며, 초고압 추출물(15 min)의 경우 최대농도 1.0 mg/ml에서 483 pg/ml로 가장 낮은 PGE_2 생성량을 나타내었다. 반면, Fig. 2(b)는 UV를 조사한 경우 PGE_2 생성량을 나타낸 것으로 시료 무 첨가 대조군은 2,738 pg/ml을 나타내었다. Fig. 2(a)와 같은 패턴을 보였으며, 역시 초고압 추출물(15 min)의 경우 최대 농도 1.0 mg/ml에서 1,010 pg/ml으로 가장 낮은 PGE_2 값을 나타내었다. 대조군의 자외선 조사 시 세포에서 생합성 되는 PGE_2의 양이 자외선 영향이 없는 군에 비해 약 3배 이상 증가하는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는

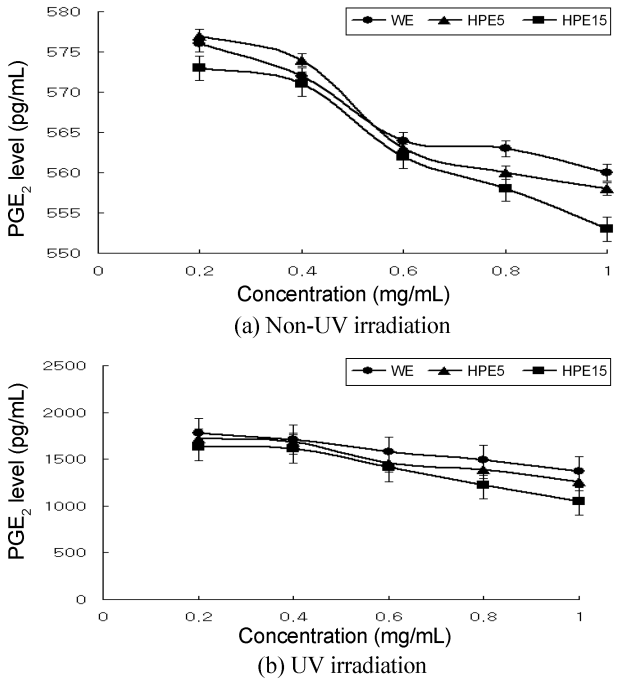

Fig. 2. Effects of *Spirulina maxima* extraction on the PGE_2 secretion of the human fibroblast, CCD-986sk, by non-UV irradiation and UV irradiation. The results are expressed as the average of triplicate samples. The values represent the mean± standard deviation (Non UV control: 874 pg/ml, UV irradiation: 2,738 pg/ml, WE: water extract at 100°C, control, HPE5: holding high pressure for 5 min at 60°C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 15 min at 60°C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 15 min at 60°C with water solvent)

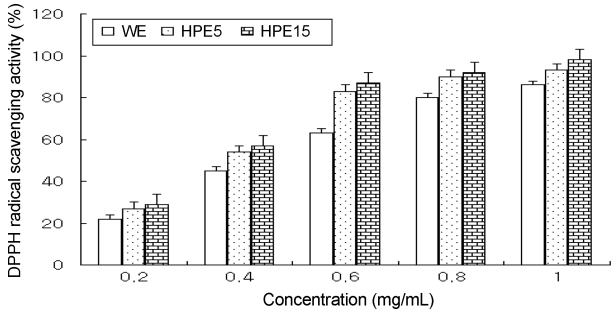

Fig. 3. Scavenging effects of *Spirulina maxima* from three different extraction processes. The results are expressed as the average of triplicate samples. The values represent the mean±standard deviation (WE: water extract at 100°C, control, HPE5: holding high pressure for 5 min at 60°C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 15 min at 60°C with water solvent)

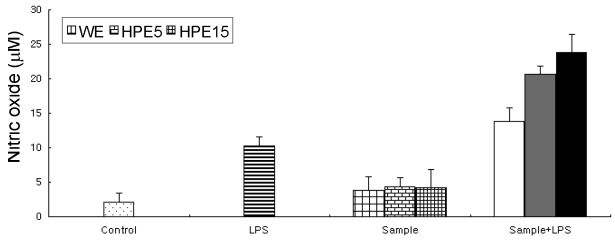

Fig. 4. Stimulation of nitric oxide production on the macrophage, J774.1, through the addition of 1.0 mg/ml of Spirulina maxima extraction from three different extraction processes. The results are expressed as the average of triplicate samples. The values represent the mean±standard deviation (WE: water extract at 100°C, control, HPE5: holding high pressure for 5 min at 60°C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 15 min at 60°C with water solvent)

UV로 인한 IL-1과 TNF와 같은 cytokine의 분비를 *S. maxima*의 유용 활성 물질이 저해함을 나타낸다.

DPPH radical 소거 활성

항산화 활성 측정 방법의 하나인 DPPH radical 소거 능 측정법을 이용하여, *S. maxima* 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 Fig. 3에 나타내었다. *S. maxima*의 모든 추출물은 농도 의존적으로 증가함을 확인 할 수 있다. 대부분 높은 활성을 보인 초고압 조건의 경우 최대 투여 농도인 1.0 mg/ml에서 93%의 DPPH radical 소거 활성을 보인 5분 처리 시 보다 15분 처리 시 5% 더 높은 활성을 나타내어 초고압 처리 시, 처리 시간이 유용 물질의 용출에 미치는 영향을 확인 할 수 있었다.

Macrophage를 이용한 nitric oxide(NO) 생성량 측정

대식 세포를 이용한 NO 생성능을 통해 염증 억제 작용을 Fig. 4에 나타내었다. 대식세포의 NOS(nitric oxide synthase)는 항상 존재하는 것이 아니라, TNF-γ, TNF-α와 같은 여러 가지 cytokine이나 LPS(*E. coli* 유래 lipopolysaccharide) 등 세균내독소의 영향을 받아 NOS 유

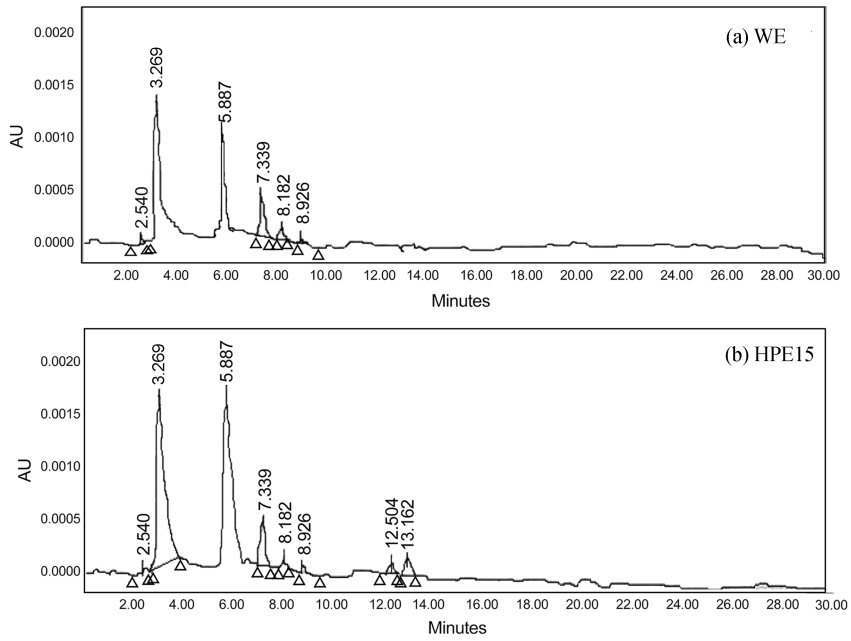

Fig. 5. Comparison of HPLC peaks of *S. maxima* (a) WE, (b) HPE15 (WE: water extract at 100°C, control, HPE15: holding high pressure for 15 min at 60°C with water solvent)

전자가 발현 유도됨으로써 나타나기 때문에 이를 확인하고자 *S. maxima* 시료와 LPS를 단독 및 병합 투여함으로써 NO의 생성능을 확인하였다. 시료를 단독 투여한 경우 4 μM 정도로 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않음을 확인 할 수 있다. 그러나 LPS와 혼합 처리 시, LPS 단독 처리 시 10.3 μM보다, 월등히 높은 NO 생성량을 보이며, 초고압 15분 동안 추출물의 경우 23.8 μM로써 가장 높은 NO 생성량을 보였다. 그러므로 PGE_2가 감소함에 따라 NO 생성능은 증가하여 면역 증진을 가져오며, 항산화 활성 역시 높아 피부 면역 증진이 높았다.

HPLC 분석

앞선 연구 결과 *S. maxima*는 향장 원료로써 가치가 매우 높음을 확인하였으며, 특히, 기존 고온 열수 추출보다 저온 초고압추출 기술에 의한 유용 생리 활성 물질의 추출물 수율 증가에 의한 면역 및 항산화 활성 증진에 따른 피부 면역 증진을 나타내었으며, 이는 Fig. 5의 HPLC를 통해 확인 할 수 있다. Fig. 5(a)는 100ºC 열수 추출물의 HPLC peak으로서 초고압 추출물의 HPLC peak (b)에 비해 물질의 용출 및 분리가 잘 이루어 지지 않았음을 나타낸다. 이러한 이유는 저온·초고압 기술을 적용할 경우, 추출이 단시간 내에 가능하며 높은 순도의 단일 성분을 쉽게 얻을 수 있기 때문이다.

4. 토 의

색소 단백 계열 물질을 지닌 스피룰리나는 아미노산의 사슬 사이의 여러 비 공유결합에 의한 수소결합, 반데르발스 힘, 이온결합, 소수성결합에 의하여 입체구조를 형성한다. 이러한 구조로 인하여 종종 유용 물질의 침투를 제한하기도 하여 유용 생리 활성 물질의 용출이 어려웠다. 이번 연구에서 추출 공정에 따른 추출수율은 Table 1에서 볼 수 있듯이 500 Mpa 이하의 초고압 추출 조건에서 가장 높은 추출 수율 뿐만이 아니라 추출 시간도 단축됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *S. maxima*의 최적 수율을 보인 저온·초음파 열수 추출 시, 20.1(%, w/w)의 추출 수율을 보인 결과와 비교하여 월등히 높으며(Kim et al. 2009), 다른 추출 원료를 이용한 연구결과에서는 초고압 추출 시 수율이 3~4% 가량 증진된 연구 결과를 보여주어 유용 물질의 용출이 증대됨을 확인 할 수 있었다(Jin et al. 2009). 이번 연구로 기존의 열수 추출 방법으로는 용출되어지지 않았던 성분들이 초고압 처리에 의해 조직과 세포막의 변형으로 용매 침투가 쉬워짐으로써 단시간 내에 용출량이 증가한 것으로 판단된다. 그러므로 저온·고압 추출을 통해 이러한 결합들이 분리되어 신물질의 용출이 가능한 것으로 보인다.

이러한 추출기법의 연구결과 중, *S. maxima*로부터 용출된 물질의 활성 정도의 증거로서 세포독성, 자외선으로 인한 Prostaglandin E_2(PGE_2) 생성량 측정, DPPH radical 소거 활성, Macrophage를 이용한 nitric oxide (NO) 생성량 측정 등을 통해 *S. maxima*의 향장 원료로서 매우 높은 가치를 결과로서 입증하였다. 또한 기존의 추출방법보다 향상된 유용 생리활성물질의 추출물 수율 증가 등을 HPLC 분석법 등을 통해 증명하였다.

인간 fibroblast에 *Spirulina maxima* 추출물을 처리하고 세포 독성 측정한 결과를 보면 각 추출 조건에 따라 전체 추출물이 농도 의존적으로 세포 독성이 증가하는 모습을 확인 할 수 있었다. 반면 100ºC와 같은 고온 열수 추출 시, 조직의 물러짐과 동시에 독성을 나타내는 물질 또한 용출되어 추출물의 독성이 상승되었다. 특히 100ºC 열수 추출물에 비해 초고압 추출물의 경우에는 10.2-24.3% 낮은 세포독성을 보였다. 이와 같이 *S. maxima* 시료 모두 최고 농도에서 19% 이하로, 세포수준에서 유의할만한 세포독성을 나타내지 않아, 향장 원료로써 이용 가능성을 확인했다.

Prostaglandin E_2(PGE_2)는 arachidonic acid의 cyclo-oxygenase에 의한 대사산물 중의 하나로서 세포막 지질에서 유래되어 prostaglandin synthetase에 의해 합성되며, 일종의 호르몬으로서 염증반응의 중요한 매개체 역할을 하며 각종 질환의 염증반응을 비롯한 여러병적현상에 관여한다. 뿐만 아니라 섬유아세포에 의해서도 합성 분비되어 주변 세포와 염증 세포의 성장 및 단백질 합성, 콜라겐 합성에 영향을 주기도 한다. 그러나 아직 세포내 어떤 경로를 통해 증식이 억제되는지 알려진 바가 없다. 이번 연구에서 *S. maxima*의 향장 원료로서 피부 면역에 미치는 효능은 시료 무첨가 대조군에 비해 낮은 PGE_2 발현도를 나타내었으며, 이 중 초고압 추출물의 경우에 최대농도에서 가장 낮은 PGE_2 생성량을 나타내었다. 또한 UV를 조사한 경우에도 시료 무 첨가 대조군에 비해 상대적으로 낮은 PGE_2 생성량을 나타냈으며, 초고압 추출물에서 가장 낮은 PGE_2 값을 나타내었다. 무첨가 대조군의 세포에서 3배 이상 증가하여 생합성되는 PGE_2의 비교 양은 UV로 인한 IL-1과 TNF와 같은 cytokine의 분비를 *S. maxima*의 유용 활성 물질이 저해함을 역설적으로 나타낸다. 또한, 불가사리 유래 콜라겐 펩타이드를 이용한 연구에서는 UV를 조사하지 않은 경우와 한 경우 각각 553 pg/ml, 1100 pg/ml으로써, 상대적으로 낮은 PGE_2를 나타낸 *S. maxima* 저온 초고압 추출에 의해 피부 면역 증진이 높아 가치있는 향장원료로 평가된다(Jeong et al. 2008).

이번 연구에서 DPPH radical 소거능 측정에 의한 항산화 활성 측정 결과를 보면 *S. maxima*의 모든 추출물은 농도 의존적으로 증가함을 확인 할 수 있었고, 대부분 높은

활성을 보인 초고압 조건의 경우 5분 처리 시 보다 15분 처리 시 5% 더 높은 활성을 나타내어 처리 시간이 유용 물질의 용출에 미치는 영향을 확인 할 수 있었다. *S. maxima*는 Jung et al. (2004)이 보고한 일반 식물의 활성 연구 중 녹차(64.6%), 작약(57.1%), 생강(48.3%)보다 높은 활성을 나타낸다. 항산화 활성은 노화억제와 독소제거, 면역증강의 기능성을 갖고 있고, 씀바귀의 항산화 기능이 세포의 항상성을 유지하게 하는 면역력을 증가시킨다고 결론을 내리고 있다(Chung et al. 1996; Jeong et al. 2002). 특히 Jin et al. (2009)이 보고한 약용 식물의 항산화 활성 연구에서 최고 투여 농도 1.0 mg/ml 농도의 오가피, 음약꽉 및 산수유 추출물이 약 70-77%의 라디칼 소거 능을 나타낸 것과 비교했을 때, 비교적 높은 항산화 활성을 나타냈다. 이는 초고압 공정 처리 시, *S. maxima*의 수소결합, 전기적 결합, 반데르발스 결합의 약화로 높은 항산화 물질이 용출이 가능하였음을 확인 할 수 있는 것이다. 앞선 PGE_2의 생성 억제 패턴과 반대로 활성 산소를 제거하는 항산화 활성은 증가하는 반비례 관계를 확인 할 수 있었다. 이는 항산화 기능이 세포의 항상성을 유지하게 하는 면역력이 증가됨을 입증하는 결과(Chung et al. 1996; Jeong et al. 2002)로서 *S. maxima*의 항산화 반응은 노화억제와 면역 증강의 기능을 갖는 것으로 판단되며, 향장 원료로서의 가치 평가를 위해 중요한 연구 결과였다. 그러므로 DPPH free radical 소거 활성 실험 역시 면역증진과 깊은 관계가 있을 것으로 기대되며, 향장 원료로써의 가치 평가를 위해 상당히 중요한 연구 결과였다.

대식세포를 이용한 NO 생성이 염증 억제 작용을 일으키는 것을 확인하기 위해 *S. maxima* 시료와 LPS를 단독 및 병합 투여한 처리군의 결과를 보면 시료를 단독 투여한 경우 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. LPS와 혼합 처리 시에는 LPS 단독 처리보다 월등히 높은 NO 생성량을 보였으며, 초고압 15분 동안 추출물의 경우 가장 높은 NO 생성량을 보였다. 이런 결과는 불가사리 유래 콜라겐 펩타이드를 이용한 연구의 NO 생성능 확인한 연구결과 20.6 μM으로써(Jeong et al. 2008), 이와 비교하여 *S. maxima*가 면역 체계 촉진에 영향을 끼치는 성분을 다량 함유하여 LPS 등 세포내 독소와의 혼합작용을 통해 높은 상승효과가 발생함을 확인 할 수 있었다. LPS에 의한 PGE_2와 NO 생성능의 상관관계를 복분자 딸기를 이용한 항염증 영향을 살펴본 연구에서 잘 보여주고 있다(Park et al. 2006; Jeong et al. 2008). 또한 Jeong et al. (2002)은 씀바귀가 대식세포를 활성화하여 NO를 생성시켜 면역세포 활성에 의한 면역증강 작용으로 강한 효과를 나타내며, 항산화 작용과의 관련성을 잘 나타냈다고 보고하였다. 본 연구 결과 역시 PGE_2이 감소함에 따라 NO 생성능은 증가하여 면역 증진을 가져오며, 항산화 활성 역시 높아 피부 면역 증진이 높았다. 이는 저온·고압 처리 방법 하에서 단백질의 변성, 세포막의 비가역적 분해 등으로 막 투과성이 증가되어 물질 이동이 용이해 용매가 세포 안으로 들어가 수율 증진과 함께 보다 많은 유용 성분이 세포 밖으로 쉽게 용출되어 나오기 때문으로 판단된다.

특히, 기존 고온 열수 추출보다 저온 초고압추출 기술에 의한 유용 생리 활성 물질의 추출물 수율 증가에 의한 면역 및 항산화 활성 증진에 따른 피부 면역 증진을 나타내었다. 높은 항상화 활성의 선행 연구(Jeong et al. 2009; Jeong et al. 2009; Jin et al. 2009)에서 볼 수 있듯이 이번 연구의 저온 초고압 기술은 추출이 단시간 내에 가능하며, 불순물이 거의 없고 높은 순도의 단일 성분을 쉽게 얻을 수 있기 때문이며, 유용 성분이 용출 조건을 용이하게 만들어 피부면역 및 항산화 활성이 높게 측정되어 *S. maxima*는 향장 원료로써 가치가 매우 높음을 확인하였다.

5. 결 론

향장 원료로써 가치 평가가 미흡한 *Spirulina maxima*는 종래 고온 열수 추출에 의한 수율이 낮아 활성 물질의 활용 극대화가 어렵고 에너지 소비가 많으며, 열로 인해 많은 유용 성분의 파괴, 단백질 변성, 가용성분 위주의 추출과 열에 대한 불안정성 등의 어려움이 있었다. 그러나 본 논문의 목적은 이러한 단점을 극복하고자 함에 있다. 향장 원료로서 *Spirulina maxima*의 가치를 최대한 높이기 위해 저온·초고압 처리를 통해 물질의 중요 구성 성분의 손실을 최대한 줄이고 단시간 내에 분리 가능하였다. 특히 고체화를 오랜 시간 유지 할 수 있고 불순물이 거의 없는 향상된 추출 수율 증가를 통해 고순도의 단일 성분을 간편하게 획득할 수 있었다. 그러므로 본 연구는 유용 활성 추출물의 증진에 의한 항산화 작용과 면역 증진의 관계를 규명하였다는데 그 의의가 있으며, 이는 높은 향장 활성의 유지가 피부 면역 증진의 작용을 높게 일으키는 결과로 나타났다. 따라서 저온·초고압 처리 시, 높은 순도의 단일 구성 성분의 추출이 단시간 내에 가능하고 세포막이 비가역적으로 분해되어 막 투과성이 증가되어 용매가 세포 안으로 들어가 보다 많은 종류의 유용 활성 성분이 용출되어 이의 활성에 의한 항산화 및 면역 증강 효과를 가져와 피부 면역 증진이 이루어졌다. 이러한 *S. maxima* 향장 활성 증진에 관한 연구 결과는 최초로 상당히 가치 있는 학술적, 산업적 기초연구 자료가 될 것이다.

사 사

본 연구는 한국해양연구원의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다(PM55470).

참고문헌

강민숙, 심상준, 채희정 (2004) 기능성 생물 소재로서의 클로렐라. 한국생물공학회지 **19**(1):1-11

이윤진, 손찬욱, 김혜정, 이진하, 김미리 (2009) 스피루리나 첨가한 생면과 조리면의 저장 중 품질특성. 한국식품저장유통학회지 **16**(1):23-32

Bernstein EF, Chen YQ (1994) Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. J Invest Dermatol **103**(2):182-186

Choi SY, Hwang JS, Kim S, Kim SY (2006) Synthesis, discovery and mechanism of 2,6-dimethoxy-N-(4-methoxyphenyl)benzamide as potent depigmenting agent in the skin. Biochem Bioph Res Co **349**(1):39-49

Chung TY, Kim MA, Jones AD (1996) Antioxidative activity of flavonoids isolated from jindalrae flower. Plant Physiol Bioch **39**(4):320-326

Diego JM, Gomez C, Ibanez E, Ruperez FJ, Barbas C (2004) Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. J Chromatogr A **1054**(1/2):227-233

Grinstead GS, Tokach SS, Goodband RD, Nelssen JL (2000) Effects of *Spifulina Platensis* in growth performance of weanling pigs. Anim Feed Sci Tech **83**(3-4):237-247

Hernandez AC, Nieves I, Meckes M, Chamorro G, Barron BL (2002) Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. Antivir Res **56**(3):297-285

Jeong DM, Kim HM, Kim JM (2002) Antioxidative treatment method by lxeris dentata for conquer cancer and stress. J Korean Soc Jungshin Sci, **6**(1):69-82

Jeong HS, Kwon MC, Han JG, Ha JH, Jin L, Kim JC, Kwak HG, Hwang BY, Lee HY (2008) Enhancement of skin immune activation effect of collagen peptides isolated from *Asterias amurensis*. Korean J Food Sci Ttecnol **40**(5):522-527

Jeong MH, Kim SS, Ha JH, Jin L, Lee HJ, Kang HY, Park SJ, Lee HY (2009) Enhancement of anticancer activity of acer mono by high pressure extraction process. J Korean Soc Food Sci Nutr **38**(9):1243-1252

Jeong MH, Ha JH, Oh SH, Kim SS, Lee HJ, Kang HY, Lee HY (2009) Comparison of biological activities of *Acer mono* and *A. okamotoanum* extracts by water extraction and low temperature high pressure extraction. Korean J Med Crop Sci **7**(6):407-414

Jin L, Ha JH, Jeong MH, Chung EK, Chung AR, Kim JC, Ahn JH, Lee HY (2009) Enhancement of the antioxidant and anticancer activities of *Berberis koreana* bark by using a low temperature and high-pressure extraction process. Korean J Food Sci Technol **41**(3):284-291

Jose C, Pierre VA, Lenka T, Gabriela O, Doris V, Karim ZB, Michel V, Jean N (2010) Free radical-scavenging, antioxidant and immunostimulating effects of a licorice infusion. Food Chem. 122(3):508-517. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.060

Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J Korean Soc Appl Biol Chem **47**(1):135-140

Kaji T, Fujiwara Y, Inomata Y, Hamada C, Yamamoto C, Shimada S, Lee JB, Hayashi T (2002) Repair of wounded monolayers of cultured bovine aortic endothelial cells is inhibited by calcium spirulan, a novel sulfated polysaccharide isolated form *Spirulina platensis*. Life Sci **70**(16):1841-1848

Kay RA (1991) Microalgae as food and supplement. Crit Rev Food Sci **30**(6):555-573

Oh SH, Jeoung MH, Kim SS, Ahn JH, Kang DH, Lee HY (2010) The effect of ultrasonificated extracts of *Spirulina maxima* on the anticancer activity. Mar Biotechnol. doi: 10.1007/s10126-010-9282-2

Lee HH, Lee SY (2008) Cytotoxic and antioxidant effects of *Taraxacum coreanum* Nakai and T. officinale WEB. extracts. Korean J Med Crop Sci **16**(2):79-85

Lee HS, Lee SH, Mun HC, Lee HY (2003) Screening of the immuno-stimulatory activity of the marine alga Chlorella capsulate. Kor J Biotechnol Bioeng **18**(1):19-24

Liou JY, Ellent DP, Lee S, Goldsby J, Ko BS, Matijevic N, Huang JC, Wu KK (2007) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin e2 protects mouse embryonic stem cells from apoptosis. Stem Cells **25**(5):1096-1103

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. J Immunol Methods **65**(1/2):55-63

Nandeesha MC, Gangadhara B, Manissery KK, Venkataraman LV (2001) Growth performance of two indian major carps, catla fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. Bioresour Technol **80**(2):117-120

Park JH, Oh SM, Lim SS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Choe NH, Park JHY, Kim JK (2006) Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of Rubus coreanus in murine macrophages. Biochem Biophys Res Commun **351**(1): 146-152

Yang HN, Lee EH, Kim HM (1997) *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reactin. Life Sci **61**(13):1237-1244

Received Apr. 26, 2010
Revised May 24, 2010
Accepted Jun. 15, 2010