

## 큰실말(*Cladosiphon novae-caledoniae* Kylin) 부산물의 화장품소재 특성

김인혜·이재화<sup>†</sup>

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과  
(2016년 8월 11일 접수, 2016년 8월 31일 수정, 2016년 9월 22일 채택)

### Cosmetic Effects of Dietary Fiber from Mozuku, *Cladosiphon novae-caledoniae* Kylin

In Hae Kim and Jae Hwa Lee<sup>†</sup>

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, 140  
Baegyang-daero 700 beon-gil, Sasang-gu, Busan 46958, Korea  
(Received August 11, 2016; Revised August 31, 2016; Accepted September 22, 2016)

**요약:** 큰실말(*Cladosiphon novae-caledoniae* kylin, *C. novae-caledoniae* kylin) 부산물을 이용하여 화장품 소재로써 가능성을 조사하고자, 항산화 효과(DPPH 자유 라디칼 소거 활성), 항균(anti-microbial activity), 미백(tyrosinase inhibition assay), 주름개선(elastase inhibition assay) 및 B16F10 mouse melanoma cell (MTT assay)을 이용한 세포 생존률을 측정하였다. 큰실말 추출물 원물(MC)과 불용성(MI)은 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)와 항생제내성균주인 MRSA에 대하여 활성을 나타내었지만 항곰팡이 활성은 나타내지 않았다. 큰실말 추출물 수용성(MS)은 tyrosine에 대한 tyrosinase 저해효과가 49%로 표준물질인 arbutin 보다 미백효과가 우수하였지만 주름개선효과는 비교적 낮은 활성을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능력은 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 89%로 나타내었다. 따라서 본 연구인 큰실말 추출물은 화장품 미백소재로써 좋은 후보군임을 확인할 수 있었다.

**Abstract:** To investigate the effect of dietary fiber from mozuku, *Cladosiphon novae-caledoniae* kylin (*C. novae-caledoniae* kylin) on the skin care, we measured anti-oxidant activity, anti-microbial activities, tyrosinase activity inhibition and elastic activity. B16F10 melanoma cell (MTT assay) were used to measure cell viability. MC and MI exhibited *in vitro* antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and MRSA without antifungal activity. Mozuku extract (MS) showed excellent tyrosinase inhibition effect compared to arbutin as a positive control (to 49% for tyrosine). The wrinkle-improving effect was relatively low. However, wrinkle-improving effect was relatively low. DPPH free radical scavenging activity was 89% in concentrations at 500  $\mu\text{g/mL}$ . These results indicate that the mozuku extracts may be an effective cosmetic ingredient for skin whitening.

**Keywords:** mozuku, *Cladosiphon novae-caledoniae* kylin, methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*, DPPH, anti-wrinkle

## 1. 서 론

해조류는 독성이 낮고 육상 생물과는 전혀 다른 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있어서 예로부터 식용, 효료, 약용, 사료, 비료 등 해조 공업의 원료 등으로 이용되어 왔다[1]. 특히, 해조류에는 B1, B2, C, niacin

등의 비타민과 칼슘, 칼륨, 마그네슘, 철과 최근에는 건강 기능성 식품에서 주목 받고 있는 요오드 등의 무기질이 다량 함유되어 있으며 auran,  $\omega$ -3 지방산 등의 아미노산 지방산계 생리활성 물질과 해조류의 주성분인 구성 다당류의 독특한 구조적인 특성으로 인해 생리활성이 강한 물질로 알려져 있다[2]. 해조류 유래 기능성소재는 anti-tumor, anti-virus, anti-coagulant 및 면역력 증강 등의 활성이 보고되어 있다[3-6].

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: jhalee@silla.ac.kr)  
call: 051)999-5831

특히, 한국, 일본, 중국 및 동아시아에서 식용으로 섭취해온 갈조류에 함유된 고분자 다당체인 후코이단(fucoidan)의 여러 생리활성이 알려져 있고, 후코이단은 갈조류의 세포벽 성분인 점질 다당에 함유되어 있으며, 평균 분자량이 100 ~ 2,000 kDa으로 다양하며 세포 내 골지체에서 합성되어 세포 간 조직에 존재하는 다당류로서 L-fructose가  $\alpha$ -1,2 또는  $\alpha$ -1,3 결합으로 이루어진 골격에 mannose, glucose, xylose, gluconic acid 등이 결합된 합황 hetero형 산성 다당류로 구성되어 있다[7-9]. 후코이단은 헤파린과 유사한 구조로 항응고제 활성을 나타내는데, 그 메커니즘은 thrombin의 활성을 억제하여 혈액응고를 저해하는 것으로 알려져 있고, 헤파린을 대체할 수 있는 물질로 알려지면서 많은 연구가 진행되고 있다[10,11]. 또한, 후코이단은 음이온 전하를 띠는 고분자(polyanionic charge) 성질과 관련된 것으로 여러 약물효과들이 알려져 있으며, 구성성분 중 황산기의 함량이 높을수록 생리활성이 높다고 알려져 있다[12,13]. 후코이단에 포함된 황산기는 친수성이 강함으로 보습력이 높고 해조류가 물 밖으로 노출되었을 때 건조되는 것을 지연시키는 성분으로 보고되어 있다[14]. 후코이단의 기능성에 대한 연구로는 면역력 증감 효과[15], 항암효과[16] 및 혈행 개선[17] 등이 보고되었고, 후코이단의 항종양 활성의 메커니즘은 종양세포의 표면전하를 음전하로 띠게 하여 암세포의 전이를 억제하거나 숙주의 면역방어 기능을 활성화시켜 항암 활성을 나타낸다고 보고되어 있다[18]. 동물 실험에서는 위점막에 협착하여 위벽보호, 염증복구에 도 효과를 보여주었고[19], 항바이러스 효과로 보고된 바, herpes virus (HSV), human-immunodeficiency virus (HIV) 등의 바이러스에 효과적인 것으로 밝혀져 있다[20-23]. 그 메커니즘은 바이러스를 직접 공격하는 것이 아니라 바이러스의 세포 내 침투와 복제를 억제하는 것으로 해석되고 있고 T-cell의 증식을 촉진하는 기전으로 항바이러스 활성을 나타내는 것으로 추정하고 있다. 이 외에도 면역조절작용, 신장질환개선 등 많은 생리활성이 보고되어 있다[24].

본 연구에서는 연구한 큰실말은 분류학상 갈조류(Phaeophyta)에 속하며, *Nemacystus decipiens* Kuckuck (Ito-mozuku), *Cladosiphon kamuranus* Tokida (Okinawa-mozuku), *Cladosiphon navae-caledonia* kylin (Tonga-mozuku) 등이 주로 식용으로 사용되는 해조류로써 각

종 미네랄과 영양성분이 풍부하여 기능성 건강식품, 화장품 소재뿐만 아니라 다른 해조류보다 높은 후코이단 함유로 인해 의약품 소재로도 이용가치가 높아지고 있고, 분포지역은 태평양 연안의 중, 남부, 한국, 일본 등에 분포하며 일본 내에서는 오키나와 근해에서 상업적으로 대량 배양되고 있다. 큰실말은 산업적으로 후코이단 추출에 주로 이용되고 있으며 추출 후 발생하는 부산물의 대부분을 차지하는 다당류(polysaccharides)로 이루어진 식이섬유 성분으로 구성되어 있으며 각종 생리 활성이 기대됨과 동시에 처리 비용 등 많은 문제가 발생하여 대부분 폐기 처분되는 실정이고 산업적으로 활용도가 매우 낮은 경우이다.

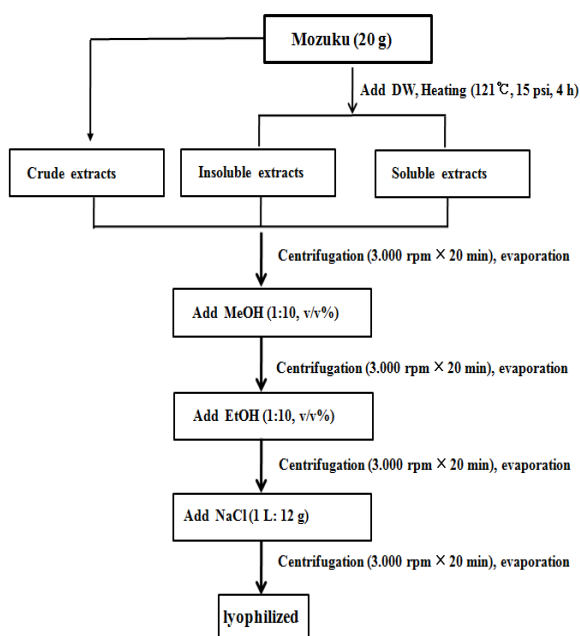
따라서 본 연구에서는 큰실말(*Cladosiphon navae-caledonia* kylin, *C. navae-caledonia* kylin) 부산물을 이용하여 화장품 소재의 가능성을 조사하고자 항균, 항산화, 미백효과 및 주름개선효과를 실시하였으며, B16F10 mouse melanoma cell에 대하여 세포 생존율을 조사하여 보고하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료 및 추출물 제조

본 실험에 사용한 큰실말은 남태평양 중부에 위치한 통가 공화국(the Kingdom of Tonga)에서 수입하였으며, 2013년 부산 서구 토성동 소재의 (주)만승수산에서 수입하여 사용하였으며, 시료는 큰실말에서 후코이단을 추출하고 남은 부산물을 큰실말 원물(mozuku crude extracts, MC), 불용성(mozuku insoluble extracts, MI) 그리고 가용성(mozuku soluble extracts, MS)으로 분리하여 추출 과정을 진행하였다[25].

동결 보관된 큰실말 부산물 각각의 시료 20 g에 5% 초산용액 2.0 L를 넣어 고압멸균기를 이용하여 121 °C 4 h 동안 고압추출 하였다. 그 시료는 원심분리(3,000 rpm × 20 min)하여 상층액을 농축하였고, 농축한 각 시료는 시료 : EtOH = 1 : 10 (v/v%)의 비율로 에탄올을 첨가하여 원심분리(3,000 rpm × 20 min)하여 침전물을 제거하였으며 이 단계를 거친 상층액은 메탄올(1 L) 및 NaCl (12 g) 비율로 첨가하여 원심분리와 농축과정을 진행하였고 농축한 상층액에 1.0 N HCl이 되도록 HCl 첨가하여 원심분리와 농축 과정을 거쳤으며 각 농축한 시료는 동결건조한 후, 본 실험에 사용하였다. 동



**Figure 1.** Summarized procedure of mozuku extracts from the *C. novae-caledoniae* kylin.

결 건조한 시료는  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관 후 실온에서 해동한 후 각 실험 단계별로 사용하였다(Figure 1).

## 2.2. 기기 및 시약

본 연구에 사용한 UV-visible spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys, Korea), ELISA multiscan reader는 Thermo Fisher Scientific Inc. (Ohio, USA) 제품을 사용하였고, fluorescence spectrophotometer는 Infinite F200 Pro. (TECAN, Austria) 제품을 사용하였다. Tryptic soy broth (TSB)와 lactose bouillon (LB), potato dextrose agar (PDA) 및 Muller Hinton broth (MHB)는 Merck & Co. Inc. (Darmstadt, Germany)의 제품을 사용하였고, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), mushroom tyrosinase, L-tyrosine 및 L-DOPA는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 그 외의 실험에 사용한 용매 및 시약(Watanabe, Japan)은 특급을 사용하였다.

## 2.3. 항균활성

큰실말 부산물 추출물의 항균활성을 측정하기 위하여 disc method를 사용하였고 그 방법은 다음과 같다 [26]. *Escherichia coli* (*E. coli*) D31을  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 TSB에서

mid-logarithmic phase까지 배양하였다( $\text{OD}_{570} = 0.1$ ,  $5 \times 10^7$  CFU/mL). 각각의 시료를 paper disc에 흡수시켜 건조하였다. 배양한 균액  $100\text{ }\mu\text{L}$ 를 TSA 배지에 도말한 후,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 18 h 배양 후 clear zone의 크기로 활성을 측정하였다. 다음으로는 큰실말 부산물 추출물의 minimal inhibitory concentrations (MIC)를 조사하기 위해 gram-positive bacteria로는 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) PM125, *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) KCTC1056 및 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) KCTC1946을 항생제 내성 균주로는 methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) CCARM3561, CCARM3115, CCARM3089 등의 균주는 항생제내성 균주 은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, CCARM)에서 분양받아 사용하였다. Gram-negative bacteria로는 *E. coli* D31, *E. coli* KCTC1184, *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) KCTC2190, *Klebsiella pneumonia* (*K. pneumonia*) KCTC2208, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) KCTC2004, *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) KCTC1925, 그리고 어병 세균으로는 *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) KCTC2471를 사용하였다. 이 균주들은 한국미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에서 분양받아 본 연구에 사용하였다.

MIC 측정은 Broth dilution method를 사용하였다[27]. 각각의 균주는 농도를 Muller-Hinton broth에 흡광도  $1.0\text{ mL}$  ( $\text{OD}_{570} = 0.1$ ,  $5 \times 10^7$  CFU/mL)로 조절한 후 실험에 사용하였고 96-well plate에 균 배양액 Muller-Hinton broth  $100\text{ }\mu\text{L}$ 와 시료인 큰실말 추출물을 농도별로 희석한 용액  $100\text{ }\mu\text{L}$ 를 차례대로 첨가하여  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 18 h 배양 후, ELISA reader를 이용하여  $630\text{ nm}$ 에서 측정하였다. 어병 세균인 *V. parahaemolyticus* KCTC2471는  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하여 실험에 적용하였다. 표준물질로는 광범위 항생제인 ampicillin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 비교하였다.

## 2.4. 항곰팡이 활성

항곰팡이 활성 측정은 liquid growth assay method로 측정하였다[28]. *Candida albicans* (*C. albicans*) KCTC7965는 potato dextrose broth를 이용하여  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 48 h 배양하였다. 곰팡이의 농도는  $1 \times 10^6$  CFU/mL이 되도록 희석하여 96-well plate에 곰팡이 배양액과 각 시료를

혼합한 후 30 °C에서 48 h 배양 후, ELISA reader를 이용하여 630 nm에서 측정하였다.

## 2.5. 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 AOAC의 Folin-Denis법을 일부 변형하여 비색하였다[29]. 그 방법을 살펴보면 시료 100  $\mu$ L에 2% sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 2.0 mL을 혼합 후, 3 min 실온에 정치한 다음, 1.0 N Folin-Ciocalteu phenol reagent (Sigma, St. Louis, MO. USA) 2.0 mL을 첨가하여 25 °C에서 30 min 반응하였다. 그 후, ELISA reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid (Sigma, St. Louis, MO. USA)를 표준시약으로 이용하여 정량하였다.

총 플라보노이드함량 분석은 Davis법을 일부 변형하여 측정하였다[30]. 농도를 50 mg/mL으로 녹인 각각의 시료 100  $\mu$ L에 diethylene glycol 1.0 mL을 가한 후, 1.0 N NaOH 100  $\mu$ L를 첨가하여 37 °C에서 1 h 동안 반응한 후, ELISA reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 naringin (Sigma, St. Louis, MO. USA)을 표준시약으로 이용하여 정량하였다.

## 2.6. 항산화 활성(DPPH 라디칼 소거능)

가장 일반적이고 대표적인 항산화 측정 실험은 DPPH방법으로 자유 라디칼 소거활성을 측정하였다[31]. 에탄올에 용해한 0.2 mM DPPH 용액 60  $\mu$ L와 농도별로 조제한 시료용액 20  $\mu$ L를 96-well plate에 넣어 실온에서 15 min 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. 표준시료로는 Sigma (St. Louis, MO. USA)의 L-ascorbic acid를 사용하였고, 시료의 최종농도는 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.12 및 0.06 mg/mL이 되도록 제조하였다. DPPH 라디칼 소거 활성(%)는 시료 첨가군과 무 첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### Radical Scavenging (%)

$$= [1 - (\text{Exp.}-\text{Blank})/\text{control}] \times 100 \quad (1)$$

## 2.7. Tyrosinase 저해 활성 측정

L-tyrosine에 대한 tyrosinase inhibition assay는 다음과 같이 측정하였다[32]. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 200  $\mu$ L, 추출물 시료 20  $\mu$ L, tyrosinase (1,000

~ 1,500 U/mL) 20  $\mu$ L에 1.5 mM L-tyrosine 20  $\mu$ L를 혼합하여 37 °C 15 min 간 반응 시킨 후, ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase inhibition ratio는 식 (2)로부터 계산되었다. 표준물질로는 arbutin (Sigma, St. Louis, MO. USA)을 사용하였다.

### Tyrosinase Inhibition Ratio (%)

$$= [1 - (\text{Exp.}-\text{Blank})/\text{Control}] \times 100 \quad (2)$$

L-DOPA에 대한 tyrosinase inhibition assay는 다음과 같이 측정하였다, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 100  $\mu$ L, 추출물 시료 20  $\mu$ L, tyrosinase (1,000 ~ 1,500 U/mL) 20  $\mu$ L에 1.5 mM L-DOPA 20  $\mu$ L를 혼합하여 37 °C 10 min 반응 시킨 후, ELISA reader를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase inhibition ratio는 식 (2)로부터 계산되었다. 표준물질로는 Radical scavenging ratio를 사용하였다.

## 2.8. Elastase 저해 활성 측정

Elastase inhibition assay를 위하여 elastase는 porcine pancreatic elastase를 사용하였고 방법은 다음과 같다 [33]. 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)를 넣어 반응조건을 만든 다음, 각 농도별 추출물 100  $\mu$ L, porcine pancreatic elastase 20  $\mu$ L (2,500 U/mL)에 특이적인 기질인 8.8 mM STANA (*N*-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide) 20  $\mu$ L를 혼합하여 25 °C 15 min 반응 시킨 후, ELISA reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase inhibition ratio는 식 (3)로부터 계산되었다. 표준물질은 ursolic acid를 사용하였다.

### Elastase Inhibition Ratio (%)

$$= [1 - (\text{Exp.}-\text{Blank})/\text{Control}] \times 100 \quad (3)$$

## 2.9. MTT Assay

Melanin 생성 억제 활성이 세포 자체에 미치는 독성을 확인하기 위하여 추출물의 세포에 대한 독성을 MTT assay 방법에 의하여 측정하였다[34]. 실험에 사용한 B16F10 mouse melanoma cell line은 한국 세포주 은행에서 분양받아 100 U/mL penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (Gibco Co., USA)가 함유된 DMEM 배지를 사용하였으며 배양된 B16F10 mouse

melanoma cell line을 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하여 24 h 배양하여 부착 및 안정화 시킨 후, 농도별로 희석한 시료를 처리하여 24 h 동안 배양하였다. PBS에 5 mg/mL의 농도로 용해시켜 제조한 MTT 용액을 각각의 well에 10  $\mu$ L씩 첨가하여 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 4 h 동안 반응시켜 MTT가 환원되도록 하였다. 배지를 제거한 후, 각 well에 100  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 대신 PBS를 사용한 Blank의 흡광도를 기준으로 세포의 생존율(cell viability)을 산출하였다.

### 2.10. 통계처리

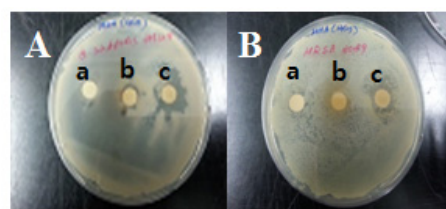
본 연구에 대한 실험결과는 3회 반복 실험에 의한 평균값으로 나타내었고, 대조군과 실험군의 통계학적 유의성 검정은 Student's *t*-test를 사용하였으며 표준편차  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 항균 및 항곰팡이 활성

큰실말의 disc method 항균 결과는 Figure 2에 나타내었다. 그 결과를 살펴보면 *B. subtilis* PM125에 대하여 MC인 경우 활성이 없었으며 MS는 2 mm 정도 약한 활성을 나타내었고, 가장 큰 활성은 MI에서 10 mm로 나타내었다(Figure 2A). 또한, MRSA CCARM3089의 경우를 보면 *B. subtilis* PM125와 같은 양상을 나타내었으며, clear zone의 크기도 MC < MS < MI의 크기로 보여주었다(Figure 2B). 반면에 gram-negative bacteria에서는 가시적인 활성은 나타내지 않았다.

다음으로 MIC를 살펴보면 gram-positive bacteria인 *B. subtilis* PM125에서는 MS가 500  $\mu$ g/mL에서 MI가 250  $\mu$ g/mL에서 약한 활성을 보였고 *S. aureus*에서는 62.5  $\mu$ g/mL의 농도에서 강한 활성을 보였고 MRSA에서는 MC과 MI 모두 낮은 농도인 62.5  $\mu$ g/mL에서 활성을 나타내었고 MS는 활성을 나타내지 않았다. gram-negative bacteria, *V. parahaemolyticus*에 대한 활성이 MC (125  $\mu$ g/mL), MS (125  $\mu$ g/mL), MI (250  $\mu$ g/mL)로 나타났으며 이러한 결과는 해조류인 큰실말이 해양의 생태 환경에서 생존하는데 많은 방어 시스템을 가지고 있는 것으로 생각되어 진다(Table 1). 큰실말의 항



**Figure 2.** Anti-microbial activities of mozuku extracts from the *C. novae-caledoniae* kylin. A 50  $\mu$ L aliquots of each extract was applied to filter paper and the paper lown placed on a *B. subtilis* PM125 (A) and MRSA CCARM3089 (B). a: MC, b: MS, c: MI. Sample concentrations were 500  $\mu$ g/mL.

균결과는 gram-negative bacteria보다 gram-positive bacteria에서 더 큰 활성을 나타내었고, 특히 *S. aureus*와 항생제 내성균주인 MRSA에 강한 활성을 나타내었다. 특히, MS보다 MI에서 강한 활성을 보여주었다. 곰팡이 균주인 *C. albicans*에 대한 활성은 나타내지 않았다.

### 3.2. 총 플라보노이드 함량 및 총 폴리페놀 함량 분석

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사물의 하나로 항산화 작용, 항혈전, 고지혈증 및 지방간 억제작용 등의 활성을 지니고 있다. 페놀의 함량은 ROS에 의한 세포수준이나 DNA 등의 손상을 억제하기 위한 방어 메커니즘을 제공한다고 알려져 있다. 큰실말 부산물의 총 플라보노이드 함량과 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과는 Table 2에 나타내었고, 각 시료의 표준물질로는 naringin과 gallic acid의 양으로 환산하여 나타내었다. 플라보노이드는 flavone을 기본 구조로 식물에만 약 6,000종 이상의 플라보노이드가 존재하며 생리 활성으로는 항암, 항균, 항바이러스 및 면역조절 활성이 보고되어 있다. 플라보노이드 함량은 항산화 효과를 알아보는 데 중요한 지표로 삼을 수 있다. MC의 경우 총 플라보노이드 함량이  $11.1 \pm 0.09$  mg naringin/g dry base, MS인 경우  $12.3 \pm 0.04$  mg naringin/g dry base로 가장 높은 수치를 나타내었고 MI은  $10.0 \pm 0.15$  mg naringin/g dry base로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 MS에서 가장 높게 나타났지만 MC과 MI와의 함량 차이는 크게 나타나지 않았다(Table 2). 플라보노이드 함량은 항산화 효과를 알아보는 데 중요한 지표로 삼을 수 있다.

총 폴리페놀 함량을 조사한 결과는 MC인 경우  $51.3 \pm 0.17$  mg gallic acid/g으로 가장 높은 함량을 나타내었

**Table 1.** Anti-microbial Activities of Mozuku Extracts from the *C. novae-caledoniae* Kylin

Microorganisms	Minimal inhibitory concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	MC	MS	MI	Ampicillin
<i>Gram-positive bacteria</i>				
<i>B. subtilis</i> PM125	NA*	NA	NA	1.96
<i>M. luteus</i> KCTC1056	NA	NA	NA	62.5
<i>S. aureus</i> KCTC1916	62.5	62.5	62.5	31.2
MRSA** CCARM3089	62.5	NA	62.5	7.8
MRSA CCARM3115	62.5	NA	62.5	1.9
MRSA CCARM3561	62.5	NA	62.5	15.6
<i>Gram-negative bacteria</i>				
<i>E. coli</i> D31	250	250	250	62.5
<i>E. coli</i> KCTC1184	500	500	500	15.6
<i>E. areogense</i> KCTC2190	500	500	500	125
<i>K. pneumonia</i> KCTC2208	500	500	500	250
<i>P. areoginosa</i> KCTC2004	500	500	500	1.96
<i>S. typhimurium</i> KCTC1925	500	500	500	125
<i>V. parahaemolyticus</i> KCTC2471	125	125	250	7.8
<i>Fungus</i>				
<i>C. albicans</i> KCTC7965	NA	NA	NA	7.8

\*NA: not activity

\*\*MRSA: methicilline resistance *S. aureus***Table 2.** The Total Polyphenol and Flavonoid Contents of Mozuku Extracts from the *C. novae-caledoniae* Kylin

	Total flavonoid (Naringin $\text{mg/g}^*$ )	Total polyphenol (Gallic acid $\text{mg/g}^*$ )
MC	11.1 $\pm$ 0.09	51.3 $\pm$ 0.17
MS	12.3 $\pm$ 0.04	27.4 $\pm$ 0.02
MI	10.0 $\pm$ 0.15	24.5 $\pm$ 0.05

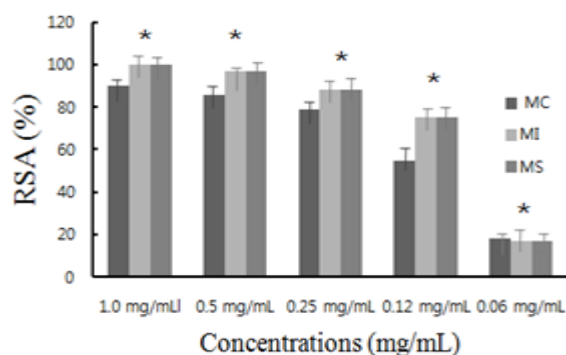
\*mg/g, base on dry weight. Each value is expressed a means  $\pm$  S.D. of triplicate determinations (\* $p < 0.05$ ).

고, MS인 경우는  $27.4 \pm 0.02$  mg gallic acid/g, MI도 MS와 거의 비슷한 함량으로  $24.5 \pm 0.05$  mg gallic acid/g으로 나타내었다. 큰실말의 경우 아주 높은 총 폴리페놀 함량을 나타내므로 이러한 물질이 항산화 효과뿐만 아니라 항균 효과와 화장품 소재로서의 미백, 보습능력으로 많은 생리 활성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

### 3.3. 항산화 활성과 미백 활성

DPPH 라디칼의 소거 능력에 대하여 큰실말의 효과

를 조사하였으며, 그 결과를 Figure 3에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거법은 항산화 물질에 의한 DPPH 라디칼의 탈색 정도를 지표로 하여 산화 억제 정도를 예측할 수 있다. MC보다는 MS와 MI가 DPPH 라디칼 소거능이 더 뛰어났다. 시료의 농도가  $500 \mu\text{g/mL}$ 일 때 MC가 86.3%, MI가 97.8%이고 MS가 87.1%의 소거능을 보여주었다. MS와 MC의 경우 비슷한 라디칼 소거능을 보여주었다. 활성산소종이 생체내의 여러 소기관인 소포체, 미토콘드리아와 세포질 내의 각종 산화 기작을 통해 생산되는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 함께 DNA, 단백질, 지질

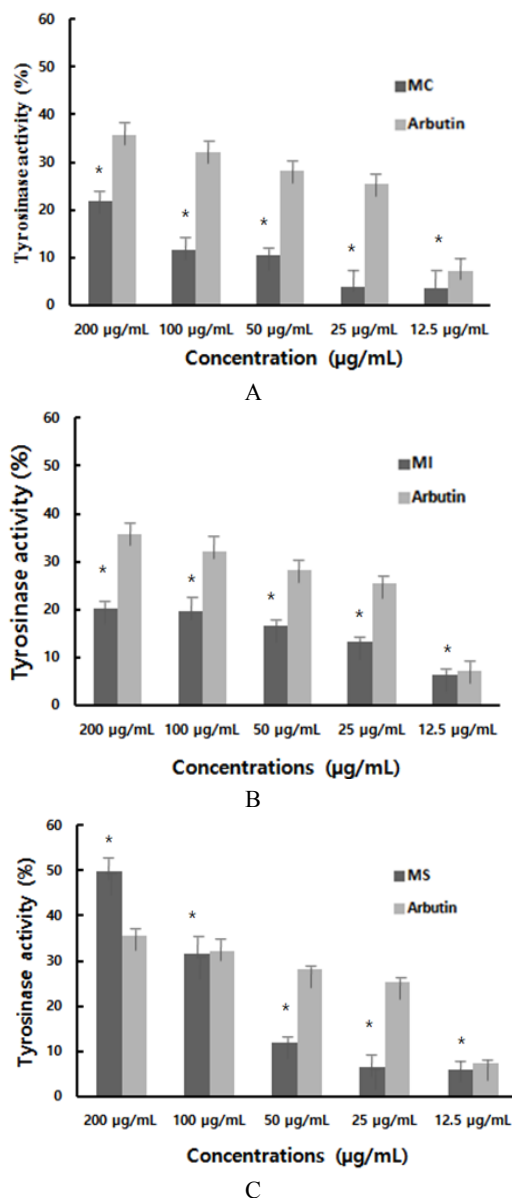


**Figure 3.** Anti-oxidant activity of mozuku extracts from the *C. novae-caledoniae* kylin. Each value is expressed a means  $\pm$  S.D. of triplicate determinations (\* $p < 0.05$ ).

등을 손상시킴으로써 노화와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 큰실말 추출물이 라디칼 소거 능력이 크다는 것은 활성산소를 제거하고 세포의 노화를 지연시키는 핵심이 되며 anti-aging의 좋은 원료로 제시할 수 있다.

최근 화장품은 천연 화장품, 유기농 화장품 등 천연 원료에 대한 관심과 선호도가 증가하는 경향이고 이러한 현상에 따른 천연식물의 여러 생리 활성과 더불어 항산화 활성이 있어서 anti-aging 성분을 첨가함으로써 천연 화장품의 주요 성분으로 각광받고 있다. 최근 시판되고 있는 천연 화장품의 주요 성분들은 실제로 섭취가 가능한 것들이 많으며 큰실말 또한 해조류로서 섭취가 가능하고, 화장품 제조 시 사용하는 오일 성분이 산화하는 것을 방지할 뿐만 아니라 노화방지에 효과적이며 기능성 화장품 및 천연 화장품의 좋은 원료를 확인할 수 있었다.

멜라닌은 피부의 색소 물질로 자외선 같은 자극에 피부가 노출되었을 때 tyrosinase 같은 효소 등에 의해 멜라닌이 형성된다. 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 중요한 기능도 있지만 색소를 과도하게 생성되면 기미, 주근깨 등 과색소 침착이 나타난다. 멜라닌의 형성이 억제되면 미백효과를 기대할 수 있다[35]. 큰실말 추출물이 멜라닌 합성에 관여하는 tyrosinase 활성을 알아보기 위해 L-tyrosine과 L-DOPA를 기질로 사용하였으며 대조군으로는 arbutin을 사용하였다. 측정 결과 농도 의존적으로 활성을 억제하는 경향을 나타내었다. 먼저 L-tyrosine을 기질로 사용한 결과는 arbutin 200  $\mu$ g/mL에서 35.7% 효소활성 억제하였으며 MC에서



**Figure 4.** Effect of mozuku extracts from the *C. novae-caledoniae* kylin on L-tyrosine induced tyrosinase activity. Arbutin was used as a positive control. Each value is expressed a means  $\pm$  S.D. of triplicate determinations (\* $p < 0.05$ ).

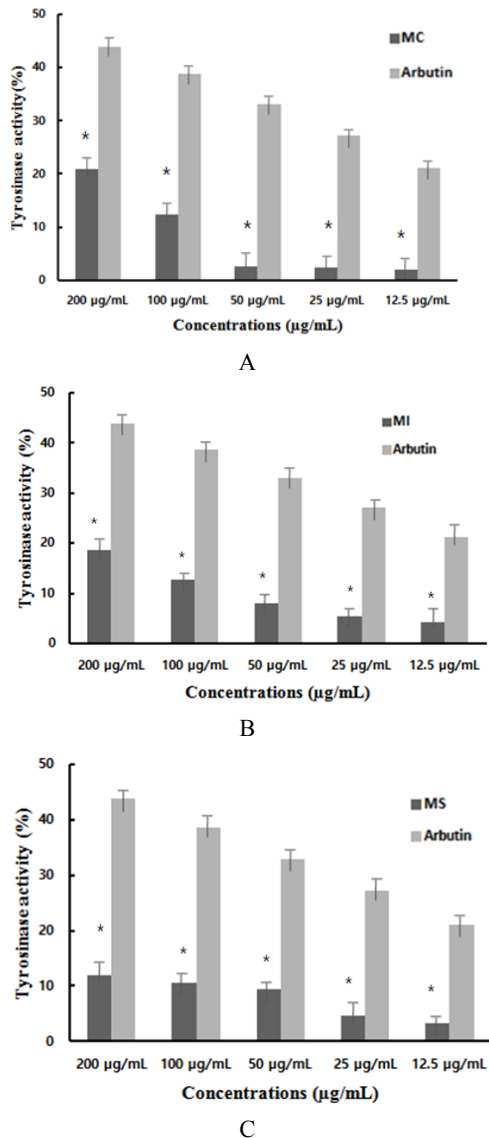
는 20.9%, MS에서는 49.8%, MI에서는 20.3%라는 효소 활성 억제 효과를 나타내었다. MS에서는 대조군인 arbutin보다 더 큰 활성을 나타내었고 멜라닌 합성에 관여하는 tyrosinase 활성 억제 반응에서 멜라닌 합성을 억제하는 경향을 나타내었다(Figure 4). L-DOPA 기질을 보면 200  $\mu$ g/mL에서 MC가 20.9%, MS가 12.0% 및



**Table 3.** Elastase Inhibitory Effects of Mozuku Extracts from the *C. novae-caledoniae* Kylin

Sample name	Elastase inhibition (%)
MC	17.1 ± 1.05*
MS	17.6 ± 2.07*
MI	18.8 ± 0.92*
Ursolic acid	56.5 ± 0.70*

\*Sample concentrations were 200 µg/mL and ursolic acid was 50 µg/mL. Each value is expressed a means ± S.D. of triplicate determinations (\**p* < 0.05).



**Figure 5.** Effect of mozuku extracts from the *C. novae-caledoniae* kylin on L-DOPA induced tyrosinase activity. Arbutin was used as a positive control. Each value is expressed a means ± S.D. of triplicate determinations (\**p* < 0.05).

MI가 17.6%로 나타내었고 농도의존적인 경향을 나타내었다. 기질은 L-DOPA 보다 L-tyrosine을 사용한 활성이 억제 능력을 더 크게 보여주었다. 큰실말 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 관찰한 결과 농도의존적으로 tyrosinase inhibitor 활성을 나타내었고 대조군인 arbutin보다 미백 효능이 우수한 것으로 나타났다. 큰실말 추출물의 두 미백효과를 종합하여 보면 미백효과는 매우 우수함을 알 수 있었고 화장품 소재로서의 좋은 재료임을 확인할 수 있었다.

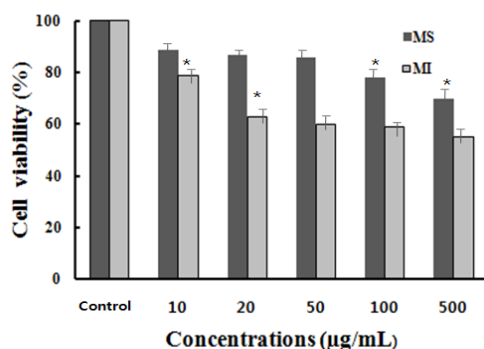
### 3.4. Elastase 저해 활성

피부는 주름 증가와 탄력감소, 색소침착 등이 노화의 형태로 나타나며 주름이 가장 대표적인 노화 현상이다. Elastase는 진피 내 피부 탄력을 유지하는 elastin을 분해함으로써 피부의 탄력성 저하와 주름 형성과 거칠어짐이 발생하여 노화를 촉진한다[36, 37]. Elastase 저해제는 주름 개선 기능으로 노화를 지연시키는 효과가 있으며, 큰실말의 elastase 저해효과는 표준시료인 ursolic acid와 함께 200 µg/mL의 농도에서 진행하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 먼저 MC의 경우 17.1 ± 1.05%, MS는 17.6 ± 2.07% 그리고 MI는 18.8 ± 0.92%로 표준시료인 ursolic acid 56.5 ± 0.78에 비하여 비교적 낮은 결과를 나타내었다.

### 3.5. 세포 생존율 분석

MTT를 이용하여 mouse melanoma cell에 대한 큰실말 추출물의 세포독성 효과를 Figure 6에 나타내었다. 큰실말 추출물을 처리하지 않은 세포, 즉 시료대신 PBS를 처리한 세포를 100%로 대조군으로 정의하여 시료군과 비교하였다. 큰실말 추출물 10, 20, 50, 100, 500 µg/mL 농도로 처리한 결과, 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포의 활성이 감소하였으며 MI가 MS보다





**Figure 6.** Cell viability of B16F10 mouse melanoma cell for concentration of mozuku extracts from the *C. novae-caledoniae* kylin. Cells viability was measured using the MTT assay. The viability of untreated control cells was defined as 100%. Each value is expressed a means ± S.D. of triplicate determinations (\* $p < 0.05$ ).

는 비교적 우수한 세포활성을 보여주었다(Figure 6). MS의 경우 50 µg/mL의 농도일 때 80%, 100 µg/mL의 농도에서는 78%의 세포활성을 나타내었고, MI는 50 µg/mL의 농도일 때 60%, 100 µg/mL의 농도에서는 59%의 세포활성을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 큰실말 추출물은 화장품 소재로서 비교적 우수한 안정성을 나타내었다.

#### 4. 결 론

큰실말 부산물을 이용하여 화장품 소재로써 가능성을 조사하고자, 항산화 효과(DPPH 자유 라디칼 소거 활성), 항균(anti-microbial activity), 미백(tyrosinase inhibition assay), 주름개선(elastase inhibition assay) 및 안전성 시험(MTT assay)를 수행하였다. B16F10 mouse melanoma cell을 이용하여 세포독성을 실시하였다. 먼저 항균 결과를 살펴보면 MC와 MI는 *S. aureus*와 항생제내성균주인 MRSA에 대하여 62.5 µg/mL의 농도에서 높은 활성을 나타내었지만 MS의 경우는 활성을 나타내지 않았다. 큰실말 추출물의 경우, MC, MS 및 MI 모두 항곰팡이 활성은 나타내지 않았다. 미백효과를 살펴보면 MS의 경우 200 µg/mL의 농도에서 L-tyrosine에 대한 tyrosinase 저해효과가 49%로 표준물질인 arbutin 보다 미백효과가 우수하였지만, 주름개선효과는 200 µg/mL의 농도에서 비교적 낮은 활성을 나타내었다. 항산화 효과인 DPPH 라디칼 소거능은 500 µg/mL의 농

도에서 MC가 86%, MI가 98%, MS가 88%로 우수한 효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 큰실말 추출물이 화장품 소재로써 좋은 후보군임과 더불어 기능성 식품 및 식의약품의 좋은 후보군임을 알 수 있었다.

#### Acknowledgment

본 연구는 2015년도 부산광역시의 재원으로 지원을 받아 수행된 Brain Busan 21 (BB21, 과제번호 2016-04-002) 사업의 연구비로 진행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

#### Reference

1. S. J. Lee, W. H. Ha, H. J. Choi, S. Y. Cho, and J. W. Choi, Separation and purification of anti-hypertensive substances from edible seaweeds, *Kor. J. Fish Aquat. Sci.*, **43**(5), 421 (2010).
2. D. S. Kim, D. S. Lee, D. M. Cho, H. R. Kim, and J. H. Pyeon, Trace components and functional saccharides in marine algae, *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, **28**(3), 270 (1995).
3. A. Fortun, A. Khalil, D. Gagne, N. Douziech, C. Kuntz, and D. Dupuis, Monocytes influence the fate of T cells challenged with oxidised low density lipoproteins towards apoptosis or MHC-restricted proliferation, *Atherosclerosis*, **156**(1), 11 (2001).
4. S. Mauray, E. Raucourt, J. C. Talbot, J. Dachary-Prigent, M. Jozefowicz, and A. M. Fisher, Mechanism of factor IXa inhibition by antithrombin in the presence of unfractionated and low molecular weight heparins and fucoidan, *Biochim. Biophys. Acta*, **1387**(1), 184 (1998).
5. A. Saito, M. Yoneda, S. Yokohama, M. Okada, M. Haneda, and K. Nakamura, Fucoidan prevents concanavalin A-induced liver injury through induction of endogenous IL-10 in mice, *Hepatol. Res.*, **35**(3), 190 (2006).
6. K. H. Park, E. H. Cho, N. C. Kim, and H. J. Chae, Production of fucoidan using marine algae, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **25**(3), 223 (2010).

7. D. J. Kwon, S. T. Lim, Y. J. Chung, S. H. Park, and D. K. Kweon, Comprehension and practical use of fucoidan extracted from brown seaweeds, *Food Sci. Ind.*, **39**(1), 73 (2006).
8. L. Chevlot, A. Foucault, F. Chaubet, N. Kervarec, C. Siquin, A. M. Fisher, and C. Boisson-vidal, Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity, *Carbohydr. Res.*, **319**(4), 154 (1999).
9. A. O. Chizhov, A. Della, H. R. Morris, S. M. Haslam, R. A. McDowell, A. S. Shashkov, N. E. Nifant'ev, E. A. Khatuntseva, and A. I. Usov, A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*, *Carbohydr. Res.*, **320**(1), 108 (1999).
10. K. Dobashi, T. Nishino, M. Fufihara, and T. Nagumo, Isolation and preliminary characterization of fucose containing sulfated polysaccharide with blood anticoagulant activity from the brown seaweed, *Carbohydr. Res.*, **194**(1), 315 (1989).
11. M. Pereira, B. Mulloy, and P. Mourao, Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans, *J. Biol. Chem.*, **274**(12), 7656 (1999).
12. T. Nishino, Y. Aizu, and T. Nagumo, The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the brown seaweed *Ecklonia kurome*, *Agri. Biol. Chem.*, **55**(3), 791 (1991).
13. J. G. Koo, Structural characterization of purified fucoidan from *Laminaria religiosa*, sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea, *Kor. J. Fish Soc.*, **30**(1), 128 (1997).
14. S. H. Cha, J. K. Lee, Y. S. Kim, D. G. Kim, J. C. Moon, and K. P. Park, Properties of fucoidan as raw materials of water-holding cream and cosmetics, *Korean Chem. Eng. Res.*, **48**(1), 27 (2010).
15. H. Maruyama, H. Tamauchi, M. Hashimoto, and T. Nakano, Suppression of Th2 immune responses by mekabu fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **137**(4), 289 (2005).
16. E. Furusawa and S. Furusawa, Anticancer potential of viva-natural, a dietary seaweed extract, on lewis lung carcinoma in comparison with chemical immunomodulators and on cyclosporine-accelerated AKR leukemia, *Oncology*, **46**(5), 343 (1989).
17. H. Itoh, H. Noda, H. Amano, C. Zhuang, T. Mizuno, and H. Ito, Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharide, especially fucoidan prepared from *Sargassum thunbergii* of phaeophyceae, *Anticancer Res.*, **13**(6A), 2045 (1993).
18. S. Koyanagi, N. Tanigawa, H. Nakagawa, S. Soeda, and H. Shimeno, Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities, *Biochem. Pharmacol.*, **65**(2), 173 (2003).
19. A. Cumashi, N. Ushakova, M. Preobrazhenskaya, A. D'Incecco, A. Piccoli, L. Totani, N. Tinari, G. Morozovich, A. Berman, M. Bilan, A. I. Usov, N. Ustyuzhanina, A. Grachev, C. Sanderson, M. Kelly, G. Rabinovich, S. Iacobelli, and N. E. Nifantiev, A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds, *Glycobiol.*, **17**(5), 541 (2007).
20. R. Cooper, C. Dragar, K. Elliot, J. Fitton, J. Godwin, and K. Thompson, GFS, a preparation of Tasmanian *Undaria pinnatifida* associated with healing and inhibition of reactivation of Herpes, *BMC Complement. Altern. Med.*, **2**(1), 1 (2002).
21. M. Baba, R. Snoeck, R. Pauwels, and E. D. Clercq, Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**(11), 1742 (1988).
22. N. Ponce, C. Pujol, E. Damonte, M. Flores, and C. Stortz, Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies, *Carbohydr. Res.*, **338**(2), 153 (2003).
23. S. reeprame, K. Hayashi, J. B. Lee, U. Sankawa, and T. Hayashi, A novel antivirally active fucan

- sulfate derived from an edible brown alga *Sargassum horneri*, *Chem. Pharm. Bull.*, **149**(4), 484 (2001).
24. Q. Zhang, Z. Lee, X. Niu, and Z. Hong, Effects of fucoidan on chronic renal failure in rats, *Planta Med.*, **69**(6), 537 (2003).
  25. H. S. Jeong and J. H. Lee, Effects of dietary fiber from mosuku (*Cladosiphon novae-caledoniae* kylin) residue on antioxidant activity and anticancer in HT-29 human colon cancer cells according to extraction condition, *Appl. Chem. Eng.*, **25**(4), 363 (2014).
  26. I. H. Kim, D. G. Lee, S. H. Lee, J. M. Ha, B. J. Ha, S. G. Kim, and J. H. Lee, Antibacterial activity of *Ulva lactuca* against methicilline-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **12**(1), 579 (2007).
  27. D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, R. Kapur, and H. G. Boman, Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae*, *Eur. J. Biochem.*, **127**(1), 207 (1982).
  28. R. I. Lehrer, M. Roseman, S. Harwig, R. Jackson, and P. Eisenhauer, Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides, *J. Immunol. Methods*, **137**(2), 67 (1991).
  29. V. L. Singleton and J. A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdenic-phosphotungstic acid reagents, *J. Enol. Viticult.*, **16**(1), 144 (1965).
  30. C. C. Chang, M. H. Yang, H. M. Wen, and J. C. Chen, Estimation of total flavonoids contents in propolis by two complementary colorimetric methods, *J. Food Drug Anal.*, **10**(3), 178 (2002).
  31. K. Ishihara, T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondon, S. Nishiyama, K. Urabe, and J. Hearing, Pigment production in murine melanoma cell is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPA chrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor, *J. Invest. Dermatol.*, **100**(3), 126 (1993).
  32. T. S. Chang, An updated review of tyrosinase inhibitor, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**(6), 2440 (2009).
  33. J. Bieth, B. Spiess, and C. Wermuth, The synthesis and analytical use of a high sensitive and convenient substrate of elastase, *Biochem. Med.*, **11**(4), 350 (1974).
  34. D. Gerlier and N. Thomasset, Use of MTT colorimeter assay to measure cell activation, *J. Immunol. Methods*, **94**(2), 57 (1986).
  35. R. Busca and R. Ballotti, Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigment Cell Res.*, **13**(2), 60 (2000).
  36. N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa, The role of elastase secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity, *Photochem. Photobiol. J.*, **74**(2), 283 (2001).
  37. D. L. Dewitt, T. E. Rollins, J. S. Day, J. A. Gauge, and W. L. Smith, Orientation of the active site, and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, **256**(20), 10375 (1981).