

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.2.161

JCCT 2018-5-21

해조 다당류 추출물의 항균성 및 항염증 기능성평가

The Functional Effects of Anti-microbial Activity and Anti-inflammatory of Seaweed polysaccharide Extracts

김현경*

Hyun Kyoung Kim*

요약 본 연구는 해조 다당류 추출물을 화장품 원료로 사용할 수 있는지 평가하고자 하였다. 항균 효과를 평가하기 위해 해조 다당류 추출물로 부터 *Staphylococcus aureus* (S. aureus) 균주에 대한 항균활성을 측정하였다. 또한, RAW 264.7 세포에서 항염증 효과가 확인되었으며, 해조 다당류 추출물을 Sprague-Dawley (SD) 흰쥐의 등쪽 피부에 적용하여 단회투여독성을 평가하였다. 그 결과, 해조 다당류 추출물은 피부섬유 아세포에서 최대 1,000 μ g / mL 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 또한, 1 % 해조 다당류 추출물로 처리되었을 때, 1.52 \pm 0.34 cm로 생육저해 환이 형성되어 S. aureus 균주에 대한 항균 활성을 확인하였다. 해조 다당류 추출물을 RAW 264.7 세포에 처리하면 농도 의존적으로 산화 질소 (NO)의 생성이 감소하고 인터루킨 1 베타 (IL1 β), 종양 괴사 인자 알파 (TNF α)와 같은 염증 관련 사이토카인의 생성이 증가하였으며, 프로스타글란딘 E2 (PGE2)가 감소 하였다. 해조 다당류 추출물을 여러 농도로 흰쥐에 투여했을 때 증상은 14 일 이상 변하지 않았으며 체중이나 장기 무게에는 변화가 없었다. 결론적으로 우리는 해조 다당류 추출물이 세포 독성을 나타내지 않았으며 항균 및 항염증 효과가 있음을 발견하였다. 따라서, 화장품 원료로 사용하기에 적합하다고 사료된다.

주요어 : 해조다당류, 세포독성, 항균, 항염증, 피부독성

Abstract This study aimed to evaluate seaweed polysaccharide extracts as a cosmetic material. To assess anti-microbial efficacy, *Staphylococcus aureus* (S. aureus) was treated with seaweed polysaccharide extracts and zones of inhibition were measured. In addition, the anti-inflammatory effect was confirmed in RAW 264.7 cells, and seaweed polysaccharide extracts was applied to the dorsal skin of Sprague-Dawley (SD) rats to evaluate single-dose toxicity. As a results, seaweed polysaccharide extracts did not exhibit cytotoxicity at concentrations up to 1,000 μ g/mL in skin fibroblasts. Furthermore, when S. aureus was treated with 1% seaweed polysaccharide extracts, clear zones of 1.52 \pm 0.34 cm formed, confirming sufficient anti-microbial activity. When RAW 264.7 cells were treated with seaweed polysaccharide extracts extract, nitric oxide (NO) production decreased in a concentration-dependent manner and the production of inflammation-related cytokines, such as interleukin 1 beta (IL1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF α), and prostaglandin E2 (PGE2), decreased. When seaweed polysaccharide extracts extract was applied at various concentrations to rats, symptoms did not change for more than 14 d, and there was no change in body or organ weights. In conclusion we found that seaweed polysaccharide extracts is not cytotoxic and has anti-microbial and anti-inflammatory effects. Therefore, it is suitable for use as a cosmetic material.

Key words : Seaweed-polysaccharide extracts, Cell toxicity, Anti-microbial efficacy, Anti-inflammatory effect, Dermal toxicity

*정회원, 서원대학교 식품공학과
접수일: 2018년 3월 12일, 수정완료일: 2018년 3월 22일
게재확정일: 2018년 4월 13일

Received: March 12, 2018 / Revised: March 22, 2018

Accepted: April 13, 2018

*Corresponding Author : kimhk4@seowon.ac.kr

Dept. of Food Science and Engineering, Seowon Univ, Korea

I. 서 론

최근 국민소득 수준의 증가와 삶의 질 향상, 고령화 사회로의 진입에 따라 건강의 유지 및 증진이 무엇보다 중요하다는 사회적 트렌드가 이어지면서 후코이단 및 글리코사미노글리칸과 같은 해조 다당류 소재가 많이 포함되어 있는 해조류 껍질을 이용하여 화장품 소재로서 가능성을 알아보려고 하였다. 특히 대기오염, 핵가족화, 모유 수유의 감소, 교육 수준의 향상, 항생제 사용의 증가로 인한 항원에 대한 노출의 증가, 주거 환경 변화, 공업 발달로 인한 새로운 항원 물질들의 등장 등으로 인해 최근 피부염의 발생률이 증가하고 있다[1-5]. 또한 피부는 인체에서 가장 큰 장기로 외부의 환경으로부터 인체를 보호하여 체내 항상성을 유지하는 기능을 한다. 피부는 대사과정을 통하여 다양한 유리가 생성되는데, 이는 노화, 홍반, 부종, 피부암과 같은 다양한 염증반응의 원인이 된다. 염증 반응은 피부 내 대식세포가 lipopolysaccharide (LPS) 또는 interferon gamma (IFN γ)와 같은 자극에 의해 NO, prostaglandins (PGs)를 증가시켜, IL1 β , TNF α 와 같은 염증성 사이토카인을 발현시켜 일어난다. 또한 피부 내에서 염증성 사이토카인이 발현되면 피부각질형성세포의 증식 속도를 급격히 감소시키고 진피층의 기질형성을 억제함으로써 피부가 손상되었을 때 치유 속도를 저하시키며 아토피성 피부염, 건선과 같은 피부질환을 유발한다고 보고되어 있다[6-8]. 피부질환을 유발시키는 것으로 보고된 미생물은 여드름 균인 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)과 비듬과 모낭염의 원인균인 *Malassezia furfur* (*M. furfur*)가 대표적이며, 황색포도상구균 *S. aureus*은 피부 배양 검사 시 흔히 검출되는 균으로써, 아토피 피부염과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려졌다. *S. aureus* 균은 피부에 상재하면서 독소를 분비하는데 이 독소가 초항원으로 작용하여 피부 내 T림프구의 면역반응을 유도하며, T helper 2 (Th2) 세포에 의한 면역반응을 유발하여 아토피 피부염을 악화시킨다[10]. 해조다당류인 후코이단(fucoidan) 및 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)은 길고 가지가 없는 다당류로서 자신의 분자량보다 1000배 이상의 많은 물 분자와 결합하는 능력이 있다. 피부에는 히알루론산, 콘드로이틴 황산염, 더마탄 황산염, 헤파란 황산염, 헤파린, 케라탄 황산염의 6가지 해조다당류가 물 분자를 잡고 있어 피부의 수분을 유지

할 수 있다. 또한 진피층에서 콜라겐과 엘라스틴 사이 사이에 들어가 세포의 구조를 팽팽하게 유지해 피부표면을 주름 없이 매끄럽게 유지시키는 역할을 한다. 해조 다당류에는 콘드로이틴 황산염이 다량 존재하며, 글루탐산, 타우린, 글리신, 바나듐과 같은 많은 유용성분을 함유하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 해조 다당류 성분인 후코이단 및 글루코사미노글리칸 성분을 추출하여 세포 독성, 항염, 항균, 경피 투여 독성 효능을 실험하여 화장품 소재로서의 유효성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 추출

버려지는 해조류 껍질(명게껍질, 미더덕껍질)중 해조 다당류(후코이단 및 글루코사미노글리칸) 성분을 추출하기 위하여 해조류껍질을 세척후 건조기(HK-D0135F; HANKUK S&I, Korea)로 건조하였고 분쇄기(RT-08; Rong Tsong Precision Technoloy Co, Taiwan)를 이용하여 분쇄한 후, 분말시료 25 g에 100 mL의 acetone (Sigma-Aldrich, USA)을 가하여 실온에서 12 h 동안 방치하였다. 그 다음, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 8,000 \times g로 10 min 동안 원심분리기(1730R; LaboGene, Denmark)로 분리 후 상층액을 분리하였다. 잔사에 다시 100 mL의 acetone(Sigma-Aldrich)을 가하여 12 h 동안 방치하였다. 12h 후에, 같은 조건 (4 $^{\circ}$ C, 10 min, 8,000 \times g)에서 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 잔사에 증류수 500 mL을 가하여 40 $^{\circ}$ C에서 24 h 동안 추출하고 Buchner 여과장치(Korea material scientific, Korea)를 이용하여 여과지(Whatman@FilterPapersNo.2;GEhealthcare-LifeSciences,UK)로 여과 한 후 여과액을 rotary vacuum evaporator (JP/N-1000X; Sunileyela, Korea)를 사용하여 50 $^{\circ}$ C에서 감압 농축하였다. 잔사에 증류수 500 mL과 zinc sulfate (Sigma-Aldrich) 25 mL, 0.3 N barium hydroxide (Sigma-Aldrich) 25 mL을 가하여 60 $^{\circ}$ C에서 2 h 동안 추출하였다. 4 $^{\circ}$ C 조건에서 5,000 \times g로 10 min 동안 원심 분리하여 얻은 상층액을 rotary vacuum evaporator (JP/N-1000X; Sunileyela, Korea)로 감압 농축하여 동결 건조기(Labconco FreeZone 7740020; Labconco, USA)를 이용하여 동결 건조한 후

연은 순도 50%이상의 해조 다당류 성분 파우더를 냉장 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 세포 독성 측정

실험에 사용된 skin fibroblast 세포는 한국세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB, Korea)에서 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco™, Thermo Fisher- Scientific, USA)가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco™) 배지에서 배양하였다. 배양한 세포를 96 well microplates에 분주하여 5% CO₂ 37°C 배양기에서 24 h 배양한 후, 10-1000 µg/mL 농도의 해조 다당류 성분 추출물을 포함한 새로운 배지를 넣어주었다. 24 h 배양 후, 각 well의 상층액 0.7 mL를 제거하고 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) 용액을 5 mg/mL이 되게 분주하여 4 h 동안 배양하였다. 배양 종료 후 각 well 마다 1 mL의 isoprothiolane (Sigma-Aldrich)을 넣어 보라색 결정체가 완전히 용해될 때까지 혼합하였다. 그 후 570 nm 파장에서 UV-Vis spectrophotometer (UV1800; Shimadzu, Japan)를 사용하여 측정하였다[15].

3. 항균력 효능 측정

해조 다당류 성분의 항균 효과를 평가하기 위하여 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Korea)에서 분양 받은 *S. aureus* (KCTC 1621)를 계대 배양하여 사용하였으며 항균력 측정은 paper disc법을 사용하였다. 평판 배지에 배양된 각 균주를 1 백금이를 취해서 액체 배지 10 mL에서 18-24 h 배양하여 활성화시켰다. 액체 배지 10 mL에 균액을 0.1 mL씩 접종하여 3-6 h 배양한 후 평판 배지 1개당 균액을 약 10⁷cells되게 접종하여 멸균 면봉으로 균일하게 도말하였다. 멸균된 filter paper disc (8 mm; Advantec, Japan)를 고체 평판배지에 올려놓은 다음 각각 45 µL/disc가 되도록 시료를 농도별로 흡수시켰고 35°C에서 18-24 h 배양하여 disc 주위의 clear zone 즉 균 성장억제 영역의 직경(mm)을 측정하여 항균력을 평가하였다[9].

4. 항염증 효능 측정

4-1. NO 농도 측정

해조 다당류 성분 추출물의 항염증 반응을 평가하기 위하여 RAW 264.7 세포를 한국세포주은행에서 구입하여 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640 (Gibco™)배지에 10% fetal bovine serum (FBS)를 포함하여 배양하였다. 24 well plates에 세포는 2×10⁵ cells/mL의 밀도로 현탁 하였고, 50-400 µg/mL 농도로 해조 다당류 추출물을 처리하였다. 염증반응을 유발하기 위하여 1 µg/mL lipopolysaccharides (LPS; Sigma-Aldrich)로 자극한 후 24 h 동안 배양하였고 세포 상층액을 취해 96 well microplates에 분주하였다. 그 후 100 µL의 그리스 시약 (Griess reagent; 0.5% sulphanilamide (Sigma-Aldrich), 2.5% phosphoric acid (Sigma-Aldrich) 및 0.5% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEDHC; Sigma-Aldrich)을 첨가하였으며 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고 NO의 농도는 아질산염의 표준 곡선으로부터 계산하였다[12].

4-2. 염증 관련 cytokine 측정

RAW 264.7 세포를 6 well microplates에 3×10⁵cells/mL가 되도록 분주하고, 24 h 동안 배양한 후, LPS를 500 µg/mL 농도로 처리하여 염증반응을 유발하였다. 세포에 해조 다당류 추출물 성분을 50, 100, 200, 400 µg/mL로 처리하고, 24 h 동안 배양한 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL1β, TNFα는 Milliplex map cytokine kit (Millipore, USA)을 이용하여 측정하고, PGE₂는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Calbiochem, USA)을 이용하여 측정하였다[7].

4-3. 단회 경피 투여 독성 평가

5주령 SD 흰쥐 암·수컷 50 마리를 (주)코아텍(COATECH, Korea)으로부터 공급받아 1주일간의 실험실 적응 과정을 거친 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실 환경은 온도 23±2 °C, 상대습도 55±10%, 환기횟수 12 회/hr, 조명주기 12 h (07:00 - 19:00), 조도 150-300 lux로 조절되었다. 사료는 고형 사료로 (주)다물사이언스(Korea)에서 공급하였고 멸균 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 적응 기간 종료 후 이상이 없는 실험 동물을 선별하여 수컷과 암컷 흰 쥐를 각 군당 10 마리씩

평균체중이 일정하게 되도록 무작위로 배치하였다. 실험군은 대조군(vehicle), 해조 다당류 성분추출물 1% 처치군 (seaweed polysaccharide extract 1%), 해조 다당류 성분추출물5% 처치군 (seaweed polysaccharide extract 5%), 해조 다당류 성분추출물 10% 처치군 (seaweed polysaccharide extract 10%)으로 각 10마리씩 나누어서 사용하였다. 실험 동물의 등 부위를 약 5×2.5 cm²를 미리 제모한 후 해조 다당류 성분 추출물을 30% 에탄올에 적정 처치 용량으로 용해하여 제모한 부위에 1 mL를 고르게 도포하였다. 처치 후 14 일간 매일 관찰하여 일반증상을 기록하였고, 처치 당일의 절식체중과 익일을 포함하여 3 일 간격으로 체중, 음수 및 사료 섭취량을 각각 측정하였다. 또 실험물질투여 후 14 일이 되는 시점에 절식시킨 후 15 일째에 부검하여 주요 장기의 중량을 측정하였고 절식체중에 대한 상대 장기 중량으로 산출하여 비교하였으며, 부검 시 육안적 병리소견 및 이상 병변이 관찰된 장기 및 조직에 대한 조직병리학적으로 분석하였다. 그 결과로부터 개략의 치사량(10% 치사량)을 산출하였다.

5. 통계처리

실험결과는 () Version 22.0 (IBM, USA)의 unpaired Student's t-test를 이용하여 통계처리 하였으며, 그 값은 평균±표준편차(mean±standard deviation)로 표기하였다. 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 판단하였다.

III. 실험결과

1. 세포 독성

해조류 껍질중 해조 다당류 성분추출물을 10-1,000 µg/mL 농도로 skin fibroblast 세포에 처리한 군과 아무것도 처리하지 않은 대조군의 세포 생존율을 비교하였을 때 생존율은 각각 100.0±0.9%, 98.3±2.3%, 96.6±3.4%, 94.3±2.9%, 91.1±3.3%, 90.2±4.7% 그리고 87.3±3.5%로 모든 농도에서 유의적인 세포독성을 나타내지 않았다(Figure 1).

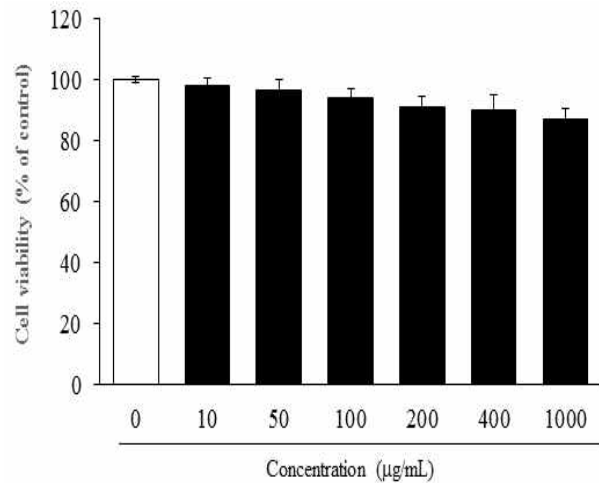


그림 1. 해조 다당류 추출물의 skin fibroblast 세포 생존률에 미치는 효과

Figure 1. Effects of seaweed polysaccharide extract on skin fibroblast cell viability.

Skin fibroblast cells were incubated with various concentrations of seaweed polysaccharide extract for 24h. seaweed polysaccharide extract did not exhibit cytotoxicity at concentrations up to 1,000 µg/mL.

2. 항균력 평가

S. aureus균은 대표적인 피부 상재균으로서 단독으로 염증을 일으키지는 않지만 피부의 염증이 발생하였을 경우 2차 감염을 일으켜 염증을 악화시키고 여드름에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 해조 다당류 성분 추출물의 항균효과를 알아보기 위해, S. aureus균 배양 후 해조 다당류 성분추출물을 0, 0.01%, 0.1%, 1% 농도로 처리하여 48 h 후에 항균활성을 살펴보았다. 실험 결과, Figure 2에서 나타난 바와 같이 해조 다당류 성분추출물을 처리한 부분에서 생육 저해환이 형성되었으며, 0.01%, 0.1%, 1%의 농도로 처리하였을 때 각각 1.32±0.54 cm, 1.44±0.68 cm, 1.52±0.34 cm의 생육 저해환이 형성되어 추출물의 농도에 비례하여 효능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Table 1).

표 1. 해조류 다당류 추출물의 S. aureus 균주에 대한 항균력 평가

Table 1. Anti-microbial activity of Seaweed polysaccharide extracts on Staphylococcus aureus.

Materials	Concentration (%)	Inhibition zone diameter (cm)
Seaweed polysaccharide extracts	1	1.52 ± 0.34
	0.1	1.44 ± 0.68
	0.01	1.32 ± 0.54
	0	-

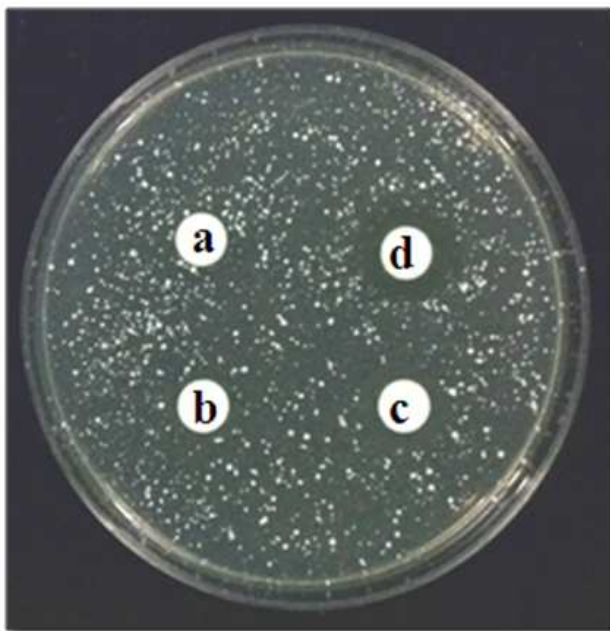


그림 1. 해조 다당류 추출물의 S. aureus 균주에 대한 생육 억제 효과. S.aureus, Staphylococcus aureus. 0 % (a), 0.01 % (b), 0.1 % (c) 및 1 % (d)의 해조류 다당류 추출물 처리군.

Figure. 2. Anti-microbial activity of seaweed polysaccharide extracts on S. aureus. S. aureus, Staphylococcus aureus. seaweed polysaccharide extract at 0% (a), 0.01% (b), 0.1% (c), and 1% (d).

S.aureus. was treated with varying concentration of seaweed polysaccharide extract, and the diameter of the zone of inhibition was measured. The zone of inhibition of S.aureus. treated with 1% seaweed polysaccharide extract was 1.52±0.34cm, confirming that seaweed polysaccharide extracts have sufficient anti-microbial activity.

3. 항염증 효능 평가

1) NO 생성량 측정

L-arginine은 L-citrulline과 NO로 변하는데, 생성된

NO는 빠른 반응을 통하여 안정된 nitrogen dioxide (이산화질소, NO₂), nitrite(아질산염, NO₂⁻)으로 변한다.

그리스 시약은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 NO 생성량을 측정할 수 있다. 해조 다당류 성분추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 항염증 효능을 평가한 결과, 1 µg/mL 농도의 LPS로 염증반응을 유발시킨 배양액 내 NO의 함량은 11.7±1.1 µM로 정상군 (3.0±1.0)에 비해 증가되었다. 그러나, 해조 다당류 성분추출물을 50, 100, 200, 400 µg/mL로 처리한 실험군의 배양액 내 NO의 함량은 각각 11.6±1.5, 11.7±1.1, 10.7±1.9, 9.5±1.7 µM로 나타났고, 특히 해조 다당류 성분추출물 농도 400 µg/mL로 처리한 실험군은 LPS를 단독 처리한 대조군에 비해 유의하게 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 3).

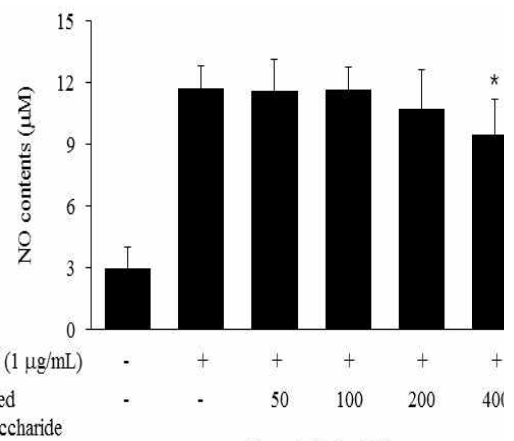


그림 3. 해조 다당류 추출물의 LPS에 의한 Raw 264.7 세포에 대한 항염증 효능 평가.

Figure 3. Effects of seaweed polysaccharide extract on LPS-induced No production in Raw 264.7 cells.

No, nitric oxide, LPS, lipopolysaccharide. RAW 264.7 cells were treated with 50-400 µg/mL Effects of seaweed polysaccharide

extract and LPS(1 µg/mL) for 24h. No production decreased in a Concentration dependent manner. Significance; * $P < 0.05$ compared with LPs treated RAW 264.7 cells without seaweed polysaccharide.No, nitric Oxide, LPS, lipopolysaccharide.

2) 염증성 cytokine 측정

외부의 자극에 의하여 피부는 홍반, 염증, 동통 등의 반응이 일어나고 이는 proinflammatory cytokine인 TNF α , IL1 β , monocyte chemoattractant protein1 (MCP1) 등에 의해 매개된다. 해조 다당류 성분추출물이 RAW 264.7세포에 대한 항염증 효능을 평가한 결과, 1 µg/mL 농도의 LPS로 염증반응을 유발시킨 배양액 내 IL1b의 함량은 173.3±23.9 pg/mL로 정상군에 비해 유의하게 증가되었다. 그리고 해조 다당류 성분추출물을 400 µg/mL로 처리한 실험군의 배양액 내 IL1 β 의 함량은 136.8±13.2 pg/mL으로 나타나 LPS를 단독 처리한 대조군에 비해 감소되었으나, 유의성은 보이지 않았다 (Figure 4A).

그림 4. 해조 다당류 추출물의 LPS로 유발된 Raw 264.7 세포에서 염증성 사이토카인 측정

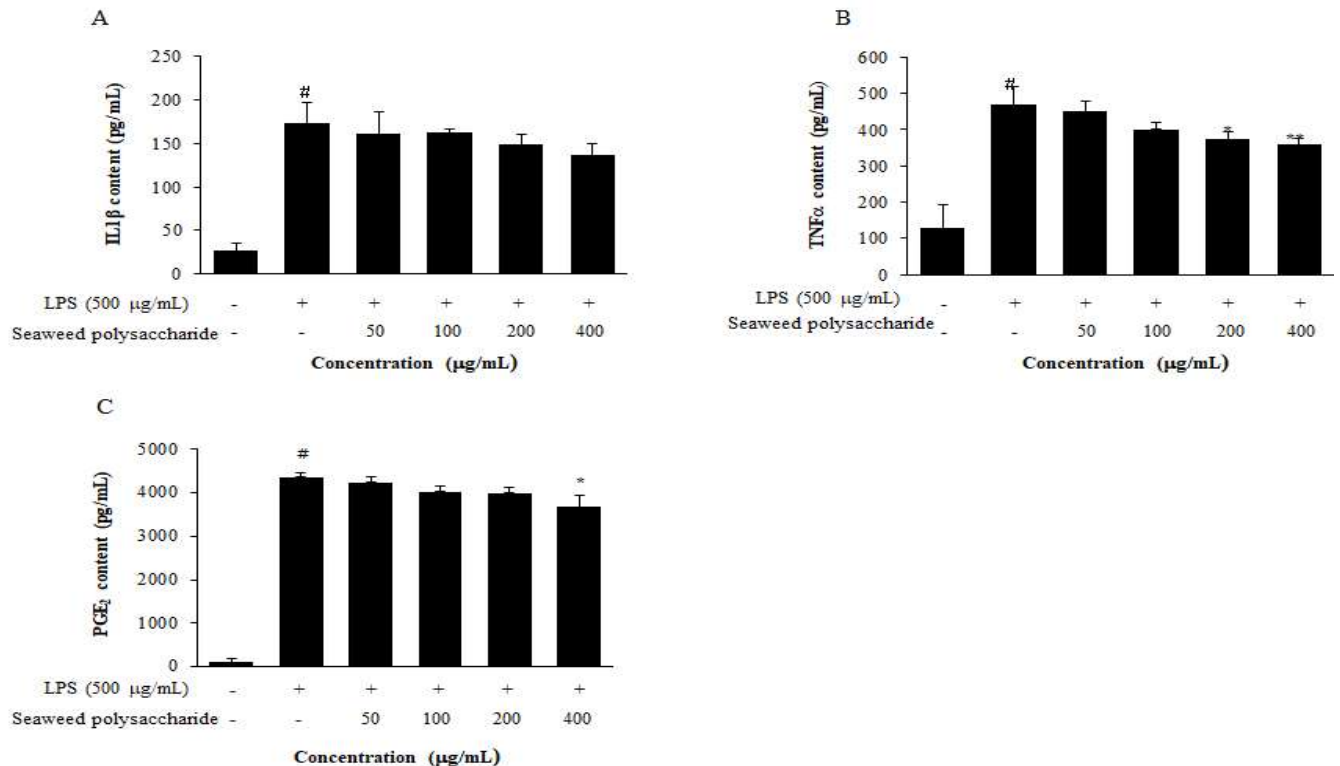


Fig. 4. Effects of seaweed polysaccharide extract on LPS-induced inflammatory cytokine production in Raw 264.7 cells.

IL 1 β , interleukin 1 beta; TNF α , tumor necrosis factor alpha; PGE $_2$, prostaglandin E $_2$; LPS, lipopolysaccharide.

RAW 264.7 cells were treated with 50-400 µg/mL of seaweed polysaccharide extracts and LPS (500 µg/mL) for 24 h, and IL 1 β (A), TNF α (B), and PGE $_2$ (C) were determined. Inflammation-related cytokines, such as IL 1 β , TNF α and PGE $_2$ were significantly decreased, Significance: * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with LPS treated RAW 264.7 cells in the absence of seaweed polysaccharide; * $P < 0.05$ compared with LPS non-treated RAW 264.7 cells in the absence of seaweed polysaccharide.

LPS로 염증반응을 유발시킨 배양액 내 TNF α 의 함량은 469.4±49.4 pg/mL로 정상군에 비해 증가되었고, 해조 다당류 성분추출물을 200, 400 µg/mL로 처리한 실험군은 LPS를 단독 처리한 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났다(Figure 4B).

PGE $_2$ 는 비만세포나 대식세포에 의하여 분비되며 염증 부위의 부종, 통증, 감각 과민을 일으키는 histamine, NO 등과 함께 혈관 투과성을 증가시켜 백혈구의 염증부위로의 주화성을 증가시킨다. PGE $_2$ 의 함량은 대조군(4363.8±102.3 pg/mL)에 비해 해조 다

당류 성분추출물을 50, 100, 200, 400 µg/mL로 하였을 때, 각각 4243.6±136.7 pg/mL, 4018.6±119.8 pg/mL, 3993.4±140.6 pg/mL, 3677.6±257.8 pg/mL으로 LPS를 단독 처리한 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소되었으며, 특히 해조 다당류 성분추출물 농도가 400 µg/mL로 처리한 실험군은 유의한 감소를 나타내었다(Figure 4C).

3) 단회 경피 투여 독성 평가

① 체중증가, 사료 섭취량 및 음수량 평가

해조류겉질 추출물중 해조 다당류 성분추출물을 흰 쥐의 등에 도포한 후 14 일 동안 관찰한 결과, 모든 동물에서 이상 증상은 보이지 않았으며 체중변화에 있어 수컷 흰쥐의 경우 약 153 g에서 시작하여 실험 종료 14 일에 268 g으로 꾸준히 증가되었고 암컷 흰쥐의 경우도 약 138 g에서 시작하여 실험 종료 14 일에 242 g으로 증가되었다.

평균적으로 한 마리 당 0.16 g/g으로 유지되었다. 물 섭취량 또한 특이점이 보이지 않았으며, 평균적으로 한 마리 당 0.24 mL/g으로 유지되었다(Table 2).

해조류겉질 추출물중 해조 다당류 성분추출물 도포 14 일 후 실험 동물을 부검한 결과, 모든 동물에서 장기의 특이적인 이상 소견이 관찰되지 않았다. 간, 신장, 비장, 폐, 심장을 포함한 장기 무게는 수컷과 암컷 모두 대조군과 비교하였을 때 차이를 보이고 있지 않았고 결과적으로 해조 다당류 성분 추출물이 신체 내부에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다.

이상의 결과로 사망 동물은 물론 일반 증상, 체중변화, 부검 및 육안소견 그리고 장기의 무게에 있어서 어떠한 이상 소견도 발견되지 않음으로써 개략의 치사량을 산출할 수 없었으며, 흰 쥐에서 해조류겉질 추출물중 해조 다당류 성분추출물의 단회

표 2. Sprague-Dawley 랫드의 체중증가, 식이섭취량 및 음수량 섭취 평가
 Table 2. Evaluation of body weight and food and water intake in SD-rats

Day		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Body weight (g)	M	153	165	172	184	192	199	207	214	222	231	238	243	253	260	268
	F	138	142	150	157	163	170	180	186	195	203	210	219	228	236	242
Food intake (g/g)	M	0.17	0.16	0.17	0.15	0.18	0.16	0.16	0.18	0.17	0.16	0.15	0.16	0.17	0.17	0.16
	F	0.15	0.14	0.16	0.16	0.18	0.17	0.16	0.16	0.16	0.18	0.17	0.16	0.14	0.16	0.16
Water intake (mL/g)	M	0.22	0.24	0.26	0.25	0.25	0.24	0.23	0.23	0.24	0.25	0.23	0.24	0.24	0.25	0.24
	F	0.24	0.25	0.24	0.23	0.24	0.22	0.24	0.26	0.25	0.26	0.25	0.25	0.24	0.23	0.23

M, male; F, female; SD, Sprague - Dawley.

표 3. 해조류 다당류 추출물을 단회투여 독성 평가에 의한 각 장기무게 측정

Table 3. Rat organ weights after single transdermal treatment with seaweed polysaccharide extract (Unit: g)

Organ	Vehicle		Seaweed polysaccadide Extracts, 1%		Seaweed polysaccadide, Extracts 5%		Seaweed polysaccadide, Extracts 10%	
	M	F	M	F	M	F	M	F
	Liver	8.58 ± 0.43	6.42 ± 0.33	8.48 ± 0.38	6.35 ± 0.48	8.51 ± 0.45	6.44 ± 0.35	8.53 ± 0.32
Kidney	1.04 ± 0.10	0.71 ± 0.10	0.98 ± 0.08	0.68 ± 0.10	0.99 ± 0.11	0.69 ± 0.08	0.96 ± 0.08	0.72 ± 0.12
Spleen	0.72 ± 0.05	0.48 ± 0.03	0.69 ± 0.08	0.50 ± 0.08	0.73 ± 0.10	0.47 ± 0.04	0.70 ± 0.06	0.49 ± 0.06
Lung	1.62 ± 0.11	1.12 ± 0.11	1.59 ± 0.08	1.09 ± 0.13	1.60 ± 0.10	1.06 ± 0.08	1.64 ± 0.13	1.10 ± 0.10
Heart	1.01 ± 0.07	0.68 ± 0.07	0.98 ± 0.08	0.66 ± 0.09	1.03 ± 0.12	0.69 ± 0.08	0.97 ± 0.10	0.70 ± 0.10

M, male; F, female.

해조 다당류 성분추출물의 단위 경피 처치는 10% 농도까지 특이적인 부작용이 없는 것으로 사료된다 (Table 3).

V. 결 론

본 연구에서는 해조류껍질 추출물중 해조 다당류 성분추출물의 화장품 소재로서의 유효성을 알아보기 위하여 세포독성, 항균, 항염증 효능을 평가하였다. Skin fibroblast 세포에 해조류껍질중 해조 다당류 성분추출물을 농도별로 처리한 결과 1,000 µg/mL까지 세포독성이 나타나지 않았으며 *S. aureus* 균 배양 후 해조 다당류 성분추출물을 0.01%, 0.1%, 1%의 농도로 처리한 결과, 농도의존적인 항균활성을 나타내었다. 또한 RAW 264.7 세포에 LPS를 가하여 염증반응을 유발한 후 NO 생성량 및 IL1 β , TNF α , PGE2와 같은 염증성 사이토카인 생성량을 살펴본 결과, LPS를 처리하였을 때 11.7 \pm 1.1 µM로 증가한 NO 생성량이 해조류껍질중 해조 다당류 성분추출물 400 µg/mL 농도 처리군에서 9.5 \pm 1.7 µM로 유의하게 감소함을 확인하였다. 그리고 IL1 β 생성량은 해조 다당류 성분으로 처리하였을 때 감소하는 경향을 나타내었고, TNF α 생성량은 해조 다당류 추출물 200, 400 µg/mL 농도 처리군에서 유의한 감소를 나타내었다. PGE2 생성량 또한 해조 다당류 성분추출물 400 µg/mL 농도 처리군에서 유의하게 감소하여 해조 다당류 성분추출물의 뛰어난 항염증 효능을 확인할 수 있었다. 그리고 해조 다당류 성분추출물을 흰 쥐의 등에 도포한 후 14 일 동안 관찰한 결과, 모든 동물에서 이상 증상은 보이지 않았으며 체중 및 장기 변화에서도 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 본 실험에서 해조류껍질중 해조 다당류 성분추출물은 세포독성 및 경피 투여 독성을 나타내지 않았고 *S. aureus* 균을 효과적으로 억제하였으며 NO 및 염증성 사이토카인의 생성량을 감소시켜 항균 및 항염증 화장품으로서의 활용가능성이 높다고 사료된다. 그러나 염증 차단 기전을 분명히 하기 위하여 cyclooxygenase 2 (COX2) 발현 억제 효능, iNOS 발현 억제 효능 등을 살펴 보지 못한 점, *P. acnes*, *M. furfur* 등 다양한 균에 대한 항균실험을 하지 못한 점은 본 연구의 한계점으로 남는다. 따라서 향후 연구에서는 다양한 균을 대상으로 한 해조류껍질중 해조 다당류 성분추출물의 항균실험과 염증 기

전에 따른 실험뿐 아니라 동물 실험을 통한 심도 깊은 연구를 진행하고자 한다.

References

- [1] Kim DB, Ahn EY, and Kim EJ, "Improvement of insulin resistance by curcumin in high fat diet fed mice, The Journal of the Convergence on Culture Technology, Vol. 4(1), pp. 315-323, 2018.
- [2] Bae GC, and Bae DY, "The anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Allium Hookeri* cultivated in South Korea," The Korea Journal of Herbolgy, Vol. 27, pp. 55-61, 2012.
- [3] Cha SH, Lee JS, Kim YS, Kim D, Moon JC, and Park K, "Properties of fucoidan as raw materials of water-holding cream and cosmetics," Korean Chemical Engineering Research, Vol. 48, pp. 27-32, 2010.
- [4] Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Kim CM, and Koo JG, "Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) extract and fucoidan components on lipid metabolism of stressed mouse," Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Vol. 33, pp. 124-128, 2000.
- [5] Choi YH, Kim SE, Huh J, Han YH, and Lee MJ, "Antibacterial and antioxidative activity of roasted coffee and red ginseng mixture extracts," Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, Vol. 41, pp. 320-326, 2012.
- [6] Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kim WT, and Park KK, "Antimicrobial property of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom against *Propionibacterium acnes* and aerobic skin flora," Korean Journal of Pharmacognosy, Vol. 40, pp. 173-177, 2009.
- [7] Jung HK, Kang BM, Jang JH, Ahn BK, Yeo JH, Jung WS, Cho JH, Kuk YI, Hyun KH, and Cho HW, "Inhibitory effect of *Alopecurus aequalis* sobol ethanol extracts on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 Cells," Korean Journal of Medicinal Crop Science, Vol. 22, pp. 98-104, 2014.
- [8] Kang N, Han EJ, Park SY, Jee Y, Jeon YJ, Ahn CB, and Ahn G, "Inhibitory effects of *Ecklonia cava* ethanol extracts against TNF- α /IFN- γ -induced inflammation in human keratinocytes," Journal of Chitin and Chitosan, Vol. 22, pp. 82-88, 2017.
- [9] Kim HH, Park GH, Park KS, Lee JY, Kim TH,

- and An BJ, "The effect of *Aster glehni* Fr. Schm. extracts on whitening and anti-wrinkle," *Journal of Life Science*, Vol. 20, pp. 1034-1040, 2010.
- [10] Kim MR, Woo SE, Shin SO, Hong SM, and Yang SY, "IA study on the distribution of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis," *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. 32, pp. 93-97, 2006.
- [11] Kim SN, Lee SH, Choi GH, Chang IS, and Lee BG, "Effects of parsley extract on skin anti-aging and anti-irritation," *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. 30, pp. 79-83, 2004.
- [12] Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, and Jeong JH, "Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages," *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 41, pp. 1205-1210, 2012.
- [13] Lee AR, Roh SS, Lee ES, and Min YH, "Anti-oxidant and anti-melanogenic activity of the methanol extract of pine cone," *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol. 14, pp. 301-308, 2016.
- [14] Lee SS, Imm JY, and Han YS. "The improvement effect of lotus leaf extracts on acne skin. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*," Vol. 10, pp. 405-413, 2012.
- [15] Lee S, Han HS, An IS, and Ahn KJ, "Effects of amentoflavone on anti-inflammation and cytoprotection," *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol. 14, pp. 201-211, 2016.