

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2020.12.1.020>

ISSN 2383-5400 (Online)

심바이오디니움으로부터 추출된 유효성분을 함유하는 신규 SUN BLOCK 물질에 관한 연구

A Study on Nobel SUNBLOCK Materials Containing an Active Ingredient Extracted from *Symbiodinium*

김동명^{1,*}, 정주영², 이형곤³, 박상근⁴, 권용성⁵, 양승구⁶, 한인석⁷

Dong-Myong Kim^{1,*}, Ju-Yeong Jung², Hyung-Kon Lee³, Sang-Keun Park⁴, Yong-Sung Kwon⁵, Seung-Koo Yang⁶, In-Suk Han⁷

¹수석연구원, (주)케이제이엠바이오 바이오연구소, 서울시 서초구 사임당로17, 06649, 대한민국

²선임연구원, (주)케이제이엠바이오 바이오연구소, 서울시 서초구 사임당로17, 06649, 대한민국

³책임연구원, (주)케이제이엠바이오 바이오연구소, 서울시 서초구 사임당로17, 06649, 대한민국

⁴과장, (주)케이제이엠바이오, 서울, 06649, 대한민국

⁵대표이사, (주)케이제이엠바이오, 서울, 06649, 대한민국

⁶전무이사, (주)김정문알로에, 서울, 06649, 대한민국

⁷교수, 한양대학교 화학과, 서울, 04763, 대한민국

^{1,2,3,4,5}Biotechnology Research Institute, KJM Bio Ltd, 17 Saimdang-ro, Seocho-gu, Seoul 06649, Republic of Korea

⁶R&D Center of Aloe, Kim Jung Moon Aloe Ltd, Seoul 06649, Republic of Korea

⁷Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 04763, Republic of Korea

(Received 1 April 2020, Revised 11 May 2020, Accepted 11 May 2020)

Abstract *Symbiodinium* is a dinoflagellate genus that coexists with coral reefs and is known to provide ultraviolet (UV) protection in nature through the synthesis of mycosporin-like amino acids (MAA). In order to develop a natural and ecofriendly sunblock for use in summer resorts, the possibility of using a *Symbiodinium* microbiome extract or an MAA was investigated. Two sunblocks, one containing 7% *Symbiodinium* extract and the other containing MAA were prepared to be tested on hairless mice and human skin. In this clinical study, the sun protection factor (SPF) and Protection factor of UV A (PFA) values of the sunblock containing either *Symbiodinium* extract or MAA were determined. The SPF values of the sunblock containing *Symbiodinium* extract and MAA were 10.43 and 10.83, respectively, and the PFA values were 3.42 and 3.39, respectively. Based on their PFA values of ≥ 2 , the UV A protection can be graded as PA+ (low) for both the sunblocks. In addition, the UV-blocking extract of *Symbiodinium* has a low phototoxicity and cytotoxicity, reducing the possibility of a heavy feeling to the skin or a foreign-body sensation caused by residue build-up. The low toxicity feature of the major sunblock component will also prevent side effects, such as allergic reactions. Although *Symbiodinium* extract or MAA alone do not provide effective protection against UV irradiation, their protection capacity can be complemented by the addition of inorganic UV-protecting compounds.

Keywords : *Symbiodinium*, Mycosporine-like amino acids, PFA, SPF, Sun block

1. 서 론

피부노화는 일반적으로 나이가 들면서 일어나는

* Corresponding author
Phone: 82-10-8164-4524 Fax: 82-2-405-6154
E-mail: hapyvirus@naver.com

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

내인성 노화와 환경요인에 장기간 노출되어 나타나는 광노화로 크게 나누어진다. 광노화의 환경적인 요인 중 가장 주요한 것은 UV 노출에 의한 것이다. 그렇기에 UV로부터 피부를 보호하는 것은 광노화를 막는데 중요한 역할을 한다.

UV는 인체에 필수적인 비타민 D를 만드는 장점이 있는 반면, 피부 전 층에 걸쳐 다양한 물리적 혹은 화학적 변화를 유발한다. UV A는 320-400nm의 장파장으로 피부 진피까지 도달하여 진피의 탄력섬유와 교원섬유의 변성으로 인한 피부 탄력성을 감소시키고 피부 위축현상, 주름형성, 일광탄력 섬유증을 유발 시킬 뿐만 아니라 색소침착, 홍반 및 광독성, 광알러지 반응을 일으킨다. 또한 활성산소(ROS; reactive oxygen species)를 생성하여 만성적 광노화를 발생시킨다. UV B는 280-320nm의 중파장으로 표피 기저층 또는 진피 상부까지 도달하며 홍반, 수포, DNA손상 등을 유발하는 원인으로 알려져 피부염증 악화, 피부 각화의 지속화, 세포막 손상, 효소활동 감소 등을 야기한다. UV C는 200-280nm의 단파장으로 성층권의 오존층에 의해 거의 흡수되지만 최근에 환경오염으로 인하여 오존층이 파괴되면서 지표면 및 피부까지 도달하여 피부노화의 원인이 될 수 있는 것으로 알려져 있다 [1].

UV 차단제의 종류로는 화학적 UV 차단제 (Chemical sunscreen agent)와 물리적 UV 차단제 (Physical sunscreen agent)가 있는데 화학적 UV 차단제는 주로 일광의 흡수를 통해서, 물리적 UV 차단제는 반사 및 산란을 통해 일광의 침투를 막는다. 물리적 또는 화학적 UV 차단제품의 성능은 통상 UV 차단지수(Sun Protection Factor; SPF)로 표시된다. 구체적으로 UV 차단지수는 UV B에 대한 차단효과를 나타내는 지수로 UV 차단제품을 도포하지 않은 부위에 UV B를 조사하여 얻은 최소 홍반량(Minimum Erythema Dose; MED)을 UV 차단제품을 사용하여 얻은 최소 홍반량으로 나눈 상대 값이다. 최소 홍반량은 UV B를 사람의 피부에 조사하여 1,624시간 경과 후에 조사영역의 거의 대부분에 홍반이 나타나게 되는 최소한의 UV량을 말한다.

반면, UV A를 조사하여 24시간 경과 후 조사 영역의 전 영역에 기본적으로 희미한 흑화가 인식되는 최소 UV 조사량을 최소 지속형 즉시 흑화량(Minial Persistent Pigment darkening Dose; MPPD)이라 한다.

이때 제품 도포부위와 무도포부위의 MPPD비를 UV A 차단지수(Protection Factor of UV A; PFA)라하며 UV A 차단등급은 UV A 차단효과의 정도를 나타내는 지수이다 [1].

화학적 UV 차단제들은 UV를 흡수하는 성분이 한 개 이상 함유되어 있는데, UV B를 주로 막는 PABA, PABA esters(Amyl dimethyl PABA, octyl dimethyl PABA), Cinnamates (Cinoxate), Salicylate (Homomenthyl salicylate), Camphor 등과, UV A를 주로 막는 Benzophenone(Oxybenzone, Dioxybenzone, Suliso benzene), Dibenzoyl methane, Anthranilate 등이 알려져 있다. 이러한 화학적 UV 차단제들은 UV를 흡수 차단하는 효과를 얻을 수 있으나 피부나 눈에 자극이 되고 피부에 광과민성 반응하는 등의 문제점이 보고되었고 최근에는 산호의 백화현상의 원인으로 지적되어 하와이와 팔라우 등 주요 피서지에서 사용이 금지되고 있다 [2-4].

물리적 UV 차단제는 자연에 존재하는 성분들로서 피부에 침투하는 UV를 반사와 산란하여 피부를 보호한다. 이산화티탄(Titanium dioxide), 탈크(Talc; Magnesium silicate), 산화마그네슘(Magnesium oxide), 산화아연(Zinc oxide), 카올린(Kaolin) 등이 있다. 물리적 UV 차단제는 UV A와 B 모두의 UV 차단 효과를 실현할 수 있고 접촉성 피부염 같은 부작용이 없고 물에 잘 지워지지 않는 장점도 있는 반면 원하는 제형을 실현하면서 유효한 함유량을 유지하기 어렵고, 피부에 도포 시에 백탁현상 등이 나타나는 단점이 있다 [2-5].

기존의 유기 혹은 무기 UV 차단 소재들은 화장품 제형 내에서 일정량 이상 포함 시 안정성이 떨어진다거나 피부트러블이 생기는 등 다양한 문제를 안고 있으며, UV 차단제의 안정성 및 유효성 그리고 안전성은 화장품의 중요한 화두이다. 화장품의 특성상 UV로부터 피부를 보호하는 UV 차단 화장품의 경우, UV 차단 역할을 할 수 있는 소재가 자연 친화적이며, 친환경, 피부 적합도가 높고, 또한 소비자의 감성을 자극시킬 수 있는 보다 다양한 형태의 소재개발이 필요한 실정이다. UV 차단 소재의 경우도 최근 자연 친화적이면서 친환경적인 식물소재에서 찾고자하는 움직임이 활발하며, 특히 유럽에서 식물소재에서 추출된 성분들을 Eco-CERT같은 인증을 통해 소비자에게 Natural Cosmetics 혹은 Organic Cosmetics로 친근

히 다가가고자 하는 노력이 돋보인다 [2,5].

육상식물 중에 UV 조사에 대한 방어기작의 일환으로 갈릭산, 카페익산 등의 Flavonoid 계통의 색소와 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판과 퓨린 및 피리미딘 계열의 방향족 화합물 합성을 유도하는 경우가 있는데, 해양식물은 육상식물에 비해 상대적으로 UV의 직접적인 영향을 받으며, 그로 인해 해양생물은 UV 보호 관련된 물질이 많이 함유되어 있다. 특히 UV에 대한 방어를 위해 UV를 흡수시키는 마이코스포린-유사아미노산들(mycosporine-like amino acids; MAAs)이 알려져 있다 [6,7,8]. MAAs는 남조류, 균류, 미세조류 및 해조류 등에 널리 분포되어 있으며, 특히, 미세조류와 해조류에서 그 함량이 높다. UV 흡수 스펙트럼을 연구한 결과 MAAs 물질이 320-400nm 영역의 파장을 효과적으로 흡수한다는 것이 알려졌다 [9-11].

MAAs는 cyclohexenone과 cyclohexenimine chromophore가 아미노산의 질소치환기 또는 imino alcohol과 결합되어 있는 구조이며, 아미노산과 imino alcohol기 종류에 따라 porphyra, shinorine, palythine, asterine 등 20여 종으로 나뉜다. 또한 MAAs는 색깔을 띠지 않고, 물에 잘 녹는 400Da 전후의 작은 분자량을 가지는 것으로 알려져 있다 [12-15].

피부에 무거운 느낌 또는 잔여물에 의한 이물감을 주지 않으면서 동시에 자극성 피부염, 접촉 피부염, 광 알레르기성 피부염 등의 피부 자극이나 알레르기 반응 및 독성 등과 같이 부작용이 없는 자외선 차단제용 천연 소재의 개발이 절실히 요구된다 [2,5].

본 연구에 사용한 미세조류 심바이오디니움속 (genus *Symbiodinium*)은 분류학상 Symbiodiniaceae, dinoflagellate 계열이며 endosymbiotic dinoflagellate 그룹에 속한다. 단세포 조류에 해당하며 산호초류 뿐만 아니라 말미잘, 아네모네, 해파리, 조개, 해면, 원생동물 등 광범위한 해양생물들과 공생을 하면서 광합성 무기분자 산물들을 상호 교환한다 [9-11].

*Symbiodinium*의 추출물은 유효성분으로 자외선 차단에 관여하는 MAAs를 함유하며 이는 시클로헥사논(cyclohexanone) 또는 시클로헥세니민(cyclohexenimine) 색소체 구조를 가지고 있어서 UV A (320-400nm) 영역을 잘 흡수하고 흡광계수는 인조 UV 차단제의 흡광 계수와 유사한 것으로 알려져 있다 [12-15].

따라서 최근에 하와이와 팔라우 등 주요 피서지의 해변에서 발생하는 해양환경과 생태계 파괴의 주요 요인인 UV 차단제들에 함유된 선블록(Sun Block) 원료들을 대체할 수 있는 새로운 방안으로 제시되고 있다 [2,3,13,14].

본 연구는 이러한 문제점을 해결하기 위한 연구로서, 광독성이나 세포독성 등이 없고 UV 흡수 능력이 뛰어나서 UV 차단제의 주요 성분으로 이용될 수 있는 비독성 UV 차단용 추출물을 제조하는 방법을 연구하고, 비독성 UV 차단용 추출물을 이용한 비독성 UV 차단제를 화장품제형에 적용하고자 하였다.

이러한 목적으로 UV 차단 효과가 우수하고 피부에 자극이 적어 일상생활에서의 UV 차단 방지에 탁월한 효과가 있는 미세조류의 일종인 *Symbiodinium* 추출물을 이용하여 기능성 화장품 신소재를 개발하고 고부가가치의 제품을 통하여 효용 가치를 높여 산업적으로 이용범위를 확대시키고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 *Symbiodinium*의 배양

Mycosporine-glycine의 분리 및 정제는 이전 연구를 참조하여 실시하였다. *Symbiodinium*은 초기 세포수가 5×10^4 cells/ml에서 시작하여 f/2 medium 250 ml이 포함된 500 ml Erlenmeyer flask에서 suspension 방법을 통해 배양되었으며, 빛의 광도는 $80 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 와 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도 조건에서 배양되었다. 또한 CO₂ (1%)가 함유된 공기의 공급 및 배양액 내의 pH는 8-9를 유지하였으며, 16:8시간 비율로 낮과 밤을 구별하였다. 7일간의 배양 후, MAA 분리를 위해 *Symbiodinium*을 수집하였다 [3-5].

2.2 MAAs 분리 및 정제

MAAs의 분리 정제는 20 mg dry weight (DW)의 *Symbiodinium*에 1 ml 20% aqueous methanol (v/v)을 첨가한 뒤 45°C에서 2시간 반응 후, $5,000 \times g$ 에서 1분간 원심분리 후, 700 μl 의 상층 액을 45°C vacuum (Vacuum Drying Oven 1450W, Berlin, AC, Germany) 조건으로 증발시켰다. 남아 있는 침전 층에 500 μl 증류수와 100 μl chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후, $10,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리 후, 상층액 제거를 통해 광합성에 관련된 색소를 제거하였다. 그리고 남

아 있는 침전물에 50% methanol을 첨가한 후에 HPLC (Shimadzu LC20A, Seattle, WA, USA)와 DAD-SPD M20A detector (Quantum Northwest, Seattle, WA, USA)를 이용하여 mycosporine-glycine, porphyra-334와 shi-norine을 분리하였고 효과적인 분리를 위해 Gemini 5 μ C18 110 A (5 μ m, 4.6 \times 250 nm, Phenomenex) column을 사용하였다. 분석을 위한 용매는 0.1% tri-fluoroacetic acid (TFA)를 포함한 water(용매A)와 ace-tonitrile(용매B)를 사용하였고 1 ml/min의 유속으로 332nm 파장에서 검출하였다 [15].

이후, 30-60 μ l의 침전물에 100% HPLC-grade methanol을 첨가하여 0.5 ml을 만들고, 이를 rotary evaporator를 이용하여 증발시켰다. 그리고 600 μ l 증류수에 희석된(1:10) pH 3.0의 액상에 0.2% trifluoro-acetic acid와 ammonium hydroxide를 첨가하였다. Whatman 100 kDa filter를 이용하여 12,000 g에서 20분간 원심분리를 통해 큰 분자와 비수용성 물질을 제거한 후, HPLC를 이용하여 10 μ l 샘플을 1 ml/min flow rate로 분리하였다 [16].

2.3 *Symbiodinium* 추출물의 안정성 및 안전성시험

Symbiodinium 추출물에 대하여 실온, 40°C, 50°C, 냉장 조건으로 각각 보관하면서 외관성상의 변화를 관찰하면서 안정성 시험을 실시하였다.

또한 *Symbiodinium* 추출물에 대한 안전성을 1차적으로 피부에 점검하기 위해 첩포시험(patch test)을 실시하였다. 본 실험은 20명을 대상으로 24시간동안 첩포하였으며, 판정기준은 Draize의 P.I.I법을 기준으로 판정하였고, 판정방법은 patch 제거 후 1일 후에 3차 판정, patch 제거 후 3일 후에 4차 판정을 하였으며, 테스트 위치는 왼팔 안쪽부위에 patch를 감싸는 방식으로 하여 시행하였다.

2.4 *Symbiodinium* 추출물의 미생물 검사 및 중금속 분석

Symbiodinium 추출물의 방부처리 후 원료 내 미생물 검출을 위해 식품의약품안전처 미생물 한도기준 및 시험방법 가이드라인에 준해 시험을 실시하였다.

또한 *Symbiodinium* 추출물 내의 중금속을 분석하기 위해 식품의약품안전처 기준 및 시험방법대로 실시하였다 [17].

2.5 *Symbiodinium* 추출물의 광독성 실험

조추출물과 정제추출물에 대해 인체 광독성 결과와 양호한 일치를 보인다고 알려진 OECD의 화학물질 평가법인 3T3 NRU 광독성 시험법(The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test, 3T3 NRU PT)과 산소의존적 세포막 손상을 효과적으로 검색하는 방법으로 알려진 광용혈 시험법(Photohemolysis Test)을 적용하여 광독성을 평가하였다. 3T3 NRU 광독성 시험법에는 마우스 유래의 섬유아세포(NIH/3T3)가 사용되었고 광용혈 시험법에는 인간 적혈구(Human Erythrocyte)가 사용되었다.

3T3 NRU 광독성 시험법은 화장품의 광독성 평가에 대한 대체시험법으로 2004년 4월 OECD 독성시험 기준으로 채택되었으며, 마우스 유래의 섬유아세포인 3T3 cell을 이용하여 광조사한 것과 광조사하지 않은 세포와의 세포독성을 NRU 시험을 이용하여 그 정도를 비교하여 그 차이(PIF; photo irritation factor)가 5배 이상이 되면 광독성 물질로 분류하는 평가방법이다.

2.6 *Symbiodinium* 추출물의 세포독성 실험

조추출물과 정제추출물에 대해 사람의 각질세포(keratinocyte)인 HaCaT에 대한 세포독성 시험(cytotoxicity test)을 수행하였다. 세포독성의 평가는 neutral red assay를 이용하였다 [3].

2.7 *Symbiodinium* 추출물의 UV유도성 세포손상 보호능 측정 시험

HaCaT을 24well plate에 1 \times 10⁵개의 세포를 분주하여 배양하였다. 24시간 후 FBS를 포함하지 않는 배지로 교체하고 24시간동안 starvation하고, 시료를 농도별로 처리하였다. 그후 UV A (320-400nm)를 조사(10 mJ/cm²)하여 24시간동안 배양하였다. 배지를 제거한 뒤 5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma) 시약을 각 well당 40 μ l씩 처리 후 4시간 동안 추가 배양하였다. 4시간 뒤 배지를 제거하고, dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco)를 1 ml씩 넣고 10분간 흔들어 준 다음 200 μ l씩 90well에 취하여 spectrophotometer (Thermo)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다 [16,17].

2.8 *Symbiodinium* 추출물의 UV 차단능 실험

*Symbiodinium*을 이용한 수용성 추출물을 이용한

여 UV 노출에 따른 UV 차단능을 확인하였다 [16,17]. *Symbiodinium* 수용성 추출물은 UV B 파장 (280-320nm)에서 UV 흡수능을 나타내어 hairless mouse를 이용한 동물실험을 수행하였고 본 실험을 위하여 한양대학교 의과대학 동물윤리위원회의 승인을 득하였다(KJAEC-2018207).

2.9 *Symbiodinium* 추출물의 UV 차단지수(SPF), UV A 차단지수(PFA) 평가

Symbiodinium 추출물이 15% 함유된 UV 차단크림에 대하여 인체적용시험을 실시하였다.

Symbiodinium 추출물 함유 UV 차단제의 인체적용 시험은 피엔케이 피부임상연구센터에 의뢰하여 실시하였다(PNK-16D12-E1R). 시험자 모집, 최소 홍반량 측정, 제품의 UV 차단효과 평가, 데이터 분석 및 결과보고서 작성 순서로 진행하였으며, 2018년 10월 25일에 시작하여 11월 7일에 종료하였다. 피시험자는 만 20~50세 성인 남·여 10명을 대상으로 실시하였으며, 20대 2명, 30대 4명 및 40대 4명으로 구성하였다. 시험자는 피부질환, 내분비 이상 및 간기능 이상 등이 없는 자를 대상으로 하였으며, 스테로이드 등 의용제를 도포하고 있거나, 화장품, 의약품 및 일상적인 광노출에 반응이 심하거나 알러지가 있는 자 또는 임부나 수유부도 제외하였다. 그 외의 시험방법은 UV 차단 효과 측정방법 및 기준(식품의약품안전처 고시 제2013-50호)에 따라 수행되었다 [18,19].

2.9.1 UV 차단지수(SPF) 평가

평가방법은 광적용부위의 흑화상태를 판정하는 기법을 사용하였다. UV 차단지수 평가를 위해서 UV 조사 16-24시간 뒤 시험부위의 최소 홍반량을 숙련자 2인이 홍반 상태 판정기준표(Table 1)에 따라 판정하고 이 판정 값을 이용하여 UV 차단지수를 계산하였다.

Table 1. Criteria table of standard evaluation on erythema status

Evaluation	Criteria
0	No change on the skin
±	Visible erythema but partially (< 50%)
+	Visible erythema nearly whole (> 50%)
++	Erythema+edema
+++	Erythema+edema+blistering

2.9.2 UV A 차단지수(PFA) 평가

UV A 차단지수 평가를 위해서는 UV 조사 2~4시간 후 시험부위의 최소 흑화부위를 숙련자 2인이 Table 1에 따라 판정하고, 그 판정 값을 이용하여 UV A 차단지수를 계산하였다. 2인의 결과 값이 서로 다를 경우 판정결과가 낮은 최소지속형 즉시 흑화량으로 채택하였다.

2.10 *Symbiodinium* 추출물 도포 전후 UV 감지 카메라 활용

Symbiodinium 추출물이 15% 함유된 UV 차단크림에 대하여 인체적용시험을 실시하였다 [2,5].

3. 결과 및 고찰

3.1 *Symbiodinium* 추출물의 안정도 시험

Symbiodinium 추출물을 각 온도에 따라 보관한 후에 외관을 관찰했다. 그 결과는 Table 2에서 제시하였다. 일반적으로 화장품 원료의 경우(미용성분)에는 실온(1-30℃) 또는 상온(15-25℃)에서 1년간 외관 정상 등에 변화가 없이 유지되어야 하며, 실온이나 상온의 안정도가 떨어지는 경우라도 냉장의 조건에서 최소 6개월에서 1년간 유지가 되어야 원료로서의 상품성이 있으나, *Symbiodinium* 추출물의 경우, 안정도에 크게 문제가 없는 것으로 보인다.

Table 2. Stability test result according to the temperature of the *Symbiodinium* extract(NC; no change)

Days	1	2	3	4	5	6	7	10	13	15	20	23	25	30
Room temp.	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
40	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
50	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Cold storage	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Table 3. Phototoxicity test results on 3T3 NRU

Type of extract	Average concentration of IC ₅₀ (UV-, mg/ml)	Average concentration of IC ₅₀ (UV+, mg/ml)	PIF* [IC ₅₀ (UV-)/IC ₅₀ (UV+)]
Crude extract	932.5	215.0	4.34
Purified extract	> 1000	> 1000	1

*PIF; photo irritation factor

3.2 *Symbiodinium* 추출물의 안전성 시험

인체 피부적합성 테스트 결과, 추출물을 2회에 걸쳐 시험하였으며 20명 전원 자극 없음을 확인하였다.

3.3 *Symbiodinium* 추출물의 미생물 검사

미생물 검사 결과 모든 추출물에서 총생균수 100 cfu/g 이하이며 대장균 및 병원균은 불검출 되었다.

3.4 *Symbiodinium* 추출물의 중금속 분석

중금속 분석 결과 모든 추출물에서 분석시 불검출 로 확인되었다.

3.5 *Symbiodinium* 추출물의 광독성 실험

Table 3은 3T3 NRU 광독성 시험법에 의한 조추출물과 정제추출물의 광독성 결과를 나타낸 것이다. Table 3에서 나타나는 바와 같이 정제 추출물은 평균 반수 치사량(IC₅₀, 일반적으로 독성이 예상되는 물질 일정량을 동물에 투여해 실험에 사용된 동물의 수가 반수 이상 죽는 양을 말한다.) 농도가 UV 조사 여부와 관계없이 1000 mg/ml를 초과하고, PIF 값이 1을 나타내어 비광독성 물질(non-photo toxic substance)로 판정되었다. 또한, 조추출물의 경우 평균 반수 치사량의 농도가 정제추출물보다 낮게 나타나 상대적으로 독성 정도가 높았으나, PIF 값이 5 미만으로 나타나 비광독성 물질로 판정되었다.

Figure 1은 인간 적혈구 세포를 이용한 광용혈 시험법에 따른 *Symbiodinium*으로부터 추출된 비독성 UV 차단용 조추출물과 2차 정제 추출물의 광독성 결과를 나타낸 그래프이다. 또한, Figure 2는 *Symbiodinium*으로부터 추출된 비독성 UV 차단용 조추출물의 농도가 500 µg/ml일 때의 인간 적혈구 세포를 이용한 광용혈 시험법에 따른 광독성 결과를 나타낸 사진이고, Figure 3은 *Symbiodinium*으로부터 추출된 비독성 UV 차단용 2차 정제 추출물의 농도가 250 µg/ml일 때의 인간 적혈구 세포를 이용한 광

용혈 시험법에 따른 광독성 결과를 나타낸 사진이다. Figure 2와 Figure 3에 나타난 광용혈 시험에서 사용된 UV A 조사량은 15 J/cm² 이었다.

인간 적혈구를 이용한 광용혈 시험법에 의한 광독성 결과는 3T3 NRU 광독성 시험법에 의한 광독성 시험 결과와 거의 동일하였다.

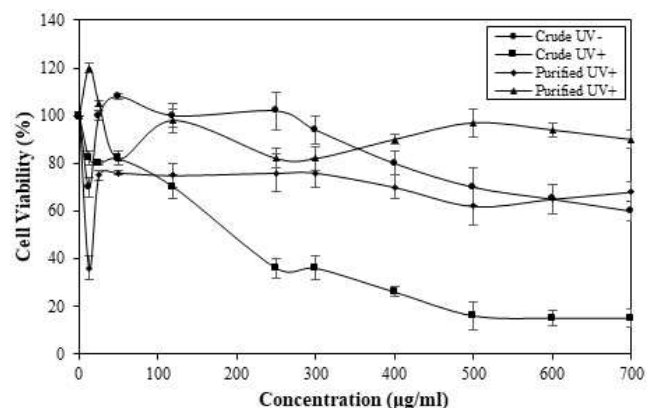


Figure 1. Graph of phototoxicity test results of crude extracts and purified extracts according to the photohemolysis test method using human red blood cells

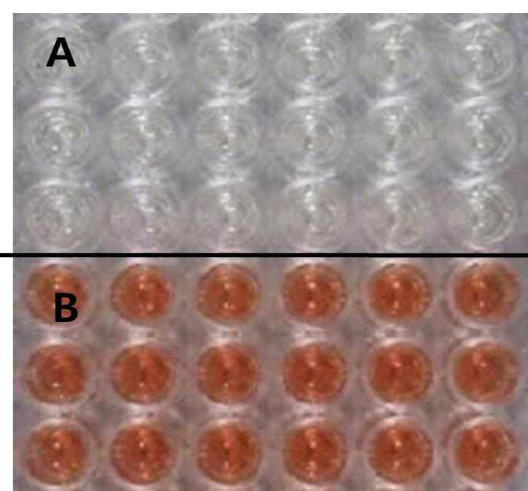


Figure 2. Phototoxicity results according to the photohemolysis test method using human red blood cells when the concentration of crude extract for sun protection is 500 µg/ml (A; UV-, B; UV+)

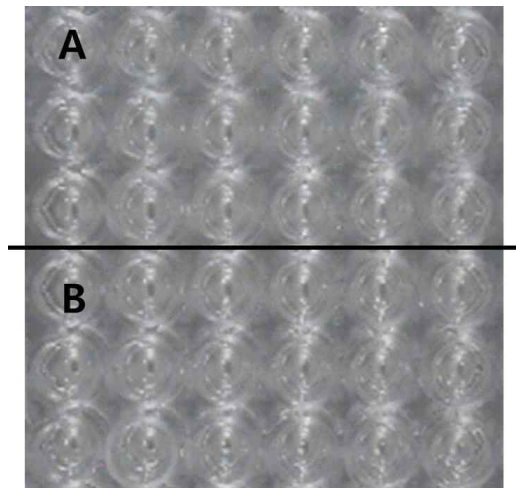


Figure 3. Phototoxicity results according to the photo-hemolysis test method using human red blood cells when the concentration of the secondary tablet extract for UV protection is 250 µg/ml (A; UV-, B; UV+)

3.6 Symbiodinium 추출물의 세포독성 실험

Table 4는 *Symbiodinium*으로부터 제조된 조추출물과 정제추출물의 사람의 각질세포인 HaCaT에 대한 세포독성 시험결과를 나타낸 것이다. Table 3에서 나타나는 바와 같이 조추출물과 정제추출물의 HaCaT에 대한 반수 치사량 농도가 모두 5 mg/ml 이상으로 나타나 비세포 독성 물질(non-cytotoxic substance)로 사료된다.

Table 4. Cytotoxicity test result of *Symbiodinium* extract

Type of extract	IC ₅₀ concentration (mg/ml)
Crude extract	> 5
Purified extract	> 5

3.7 Symbiodinium 추출물의 UV 유도성 세포손상 보호능 측정 시험

시험결과는 Figure 4의 그래프와 같으며, cell viability는 아래의 공식대로 계산했다. 그 결과 48%였던 값이 추출물 0.1 mg/ml를 첨가했을 때 64%로 증가하는 효과를 보였다.

$$\text{Cell 100 x viability (\%)} = (\text{시험군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100 (\%)$$

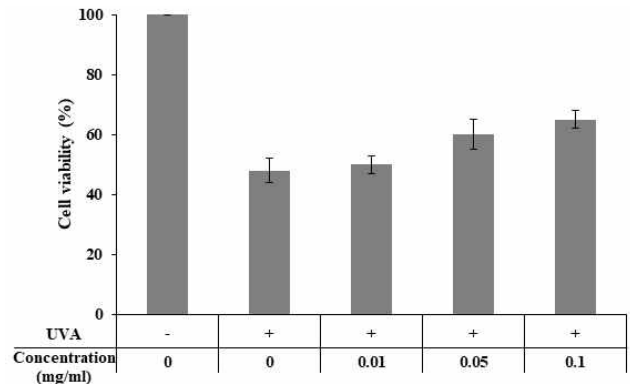


Figure 4. Cell viability of UV induced cell damage protection of *Symbiodinium* extract

3.8 Symbiodinium 추출물의 UV 차단능 실험

등 부위에 시험물질을 도포한 다음 UV 노출선을 노출한 후 24시간 뒤 홍반유무를 확인한 결과 *Symbiodinium*의 추출물을 도포한 부위에서 모두 홍반이 관찰되지 않았다. 따라서 *Symbiodinium* 수용성 추출물은 UV 차단능을 가지는 유용성분을 함유하고 있는 것으로 예상된다 (Fig. 5).

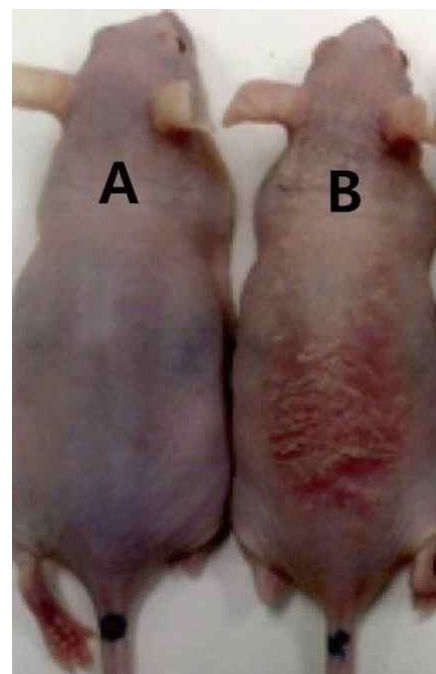


Figure 5. UV protection effects using hairless mouse on *Symbiodinium* extract (A; application, B; non-application)

3.9 UV 차단지수(SPF) 평가

시험에 사용된 낮은 UV 차단지수 표준시료의 UV

차단지수(SPF)와 UV A 차단지수(PFA)의 측정결과 각각 평균값이 4.46과 4.08로 식품의약품안전처 고시 제2013-50호의 UV 차단효과 측정방법 및 기준에서 제시한 낮은 UV 차단지수의 표준시료 기준인 4.47 ± 1.28 와 UV A 차단지수의 낮은 표준시료 기준인 4.4 ± 0.6 이상에 각각 존재하였으며 95% 신뢰구간이 표준제품의 UV 차단지수 평균값의 $\pm 20\%$ 와 $\pm 10\%$ 구간 안에 포함되어 시험의 신뢰성 검증에서도 적합한 것으로 나타났다 (Table 5, 6).

Symbiodinium 추출물 함유 UV 차단크림의 UV와 UV A의 차단지수의 측정결과 평균값은 각각 14.39 ± 1.62 과 3.5 ± 0.43 으로 나타났으며, 95% 신뢰구간이 차단지수 평균값의 $\pm 20\%$ 와 $\pm 10\%$ 구간 안에 포함되어 시험의 신뢰성 검증에서도 적합한 것으로 나타났다 (Table 5, 6).

Table 5. Measurement result of UV blocking index of *Symbiodinium* extract

Products	SPF value	95% CI
Low SPF standard sample	4.47 ± 1.28	0.49
<i>Symbiodinium</i> extract containing sun block	14.39 ± 1.62	1.28

Table 6. Measurement result of UV A blocking index of *Symbiodinium* extract

Products	PFA value	95% CI
Low SPF standard sample	4.4 ± 0.6	0.42
<i>Symbiodinium</i> extract containing sun block	3.5 ± 0.43	0.25

3.10 *Symbiodinium* 추출물 도포 전후 UV 감지 카메라 활용

UV 감지 카메라로 촬영한 결과 UV 차단크림 도포 전에는 흰색으로 나타났으며 도포 후에는 검은색으로 나타나는 것으로 보아 Figure 6의 *Symbiodinium* 수용성 추출물은 UV 차단능을 가지는 유용성분을 함유하고 있는 것으로 예상된다. [2,5,19,20].



Figure 6. Photos before and after applying the sun block cream containing the *Symbiodinium* extract taken with the UV detection camera (A; before application, B; after application)

결론

*Symbiodinium*으로부터 UV 흡수능을 지닌 추출 분획물을 분리 및 정제하여 UV 차단효과 및 비독성 여부를 연구하였다. 그 결과 해당 물질은 UV 차단효과 신뢰성 면에서도 적합성을 가지며 비독성을 떠나는 사실도 확인하였다. 이러한 해양미세조류 자원에서 추출한 MAAs를 활용하여 UV 흡수능을 지닌 자연친화적이고 친환경적이며 비독성을 지닌 신소재 개발을 통해 다양한 UV 차단 제품 보급에 기여할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 중소벤처기업부와 서울특별시의 재원으로 기술개발 지원사업의 지원을 받아 수행된 연구임 (과제번호: S2594138).

References

1. Souza, C., Campos, P. M., Schanzer, S., Albrecht, S., Lohan, S. B., Lademann, J., Darvin, M. E. and Meinke, M. C. 2017. Radical-Scavenging Activity of a Sunscreen

- Enriched by Antioxidants Providing Protection in the Whole Solar Spectral Range. *Skin Pharmacol. and Physiol.* **30**, 81-89.
2. Yun, J. S. and Kim, D. M. 2018. *Korea Patent*. 10-2018-0103402.
 3. Hughes, T. P., Keer, J. T., Alvarez-Noriega, M., Alvarez-Romero, J. G., Anderson, K. D., Baird, A. H., Cantin, N. E., Dalton, S. J., Sommer, B., Torrida, G., Wachenfeld, D. R., Willis, B. L. and Wilson, S. K. 2017. Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature.* **543**, 373-377.
 4. Dan, T., Maxim, Y. G., Colombari, D. V., Swati, N. Y., Allen, J. M., Max, H. and Paul G. F. 2004. Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 13531-13535.
 5. Kim, D. M., Yun, J. S. and Han, I. S. 2019. *Korea Patent*. 10-2019-0115490.
 6. Carreto, J. I. and Carignan, M. O. 2011. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Mar. Drugs.* **9**, 387-446.
 7. Dunlap, W. C. and Shick, J. M. 1998. Ultraviolet radiation absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* **34**, 418-430.
 8. Oren, A. and Gunde-Cimerman, N. 2007. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol. Lett.* **269**, 1-10.
 9. Coffroth, M. A. and Santhos, S. R. 2005. Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist.* **156**, 19-34.
 10. Barker, A. C. 2003. Flexibility and specificity in coral algal symbiosis: Diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Ann. Rev. Ecol., Evol. and Systematics.* **34**, 661-689.
 11. Balskus E. P., Case, R. J. and Walsh, C. T. 2011. The biosynthesis of cyanobacterial sunscreen scytonemin in intertidal microbial mat communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**, 322-332.
 12. Pope, M. A., Spence, E., Seralvo, V., Gacesa, R., Heidelberger, S., Weston, A. J., Dunlap, W. C., Shick, J. M. and Long, P. F. 2015. O-Methyltransferase is shared between the pentose phosphate and shikimate pathways and is essential for mycosporine-like amino acid biosynthesis in *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Chembiochem.* **16**, 320-327.
 13. Hu, C., Völler, G., Süßmuth, R., Dittmann, E. and Kehr, J. C. 2015. Functional assessment of mycosporine-like amino acids in *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806. *Environ. Microbiol.* **17**, 1548-1559.
 14. Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., Sopun, W., Tanaka, Y. and Takabe, T. 2014. Identification and upregulation of biosynthetic genes required for accumulation of mycosporine-2-glycine under salt stress conditions in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1763-1769.
 15. Banaszak, A. T., Santos, M. G., LaJeunesse, T. C. and Lesser, M. P. 2006. The distribution of mycosporine-like amino acids(MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **337**, 131-146.
 16. Chung, M. H., Cho, W. S., Lee, K. A., Kim, K. Y., Jung, K. J., Choi, Y. J. and Back J. Y. 2011. *Korea Patent*. 10-2011-0044494.
 17. Moon, J. C., Jung, H. S., Song, M. Y., Seo, H. H., Kulkarni, A., Suh, S. S., Lee, T. K. and Moh, S. H. 2014. Effect of sun screen utilizing Porphyra-334 derived from Ocean. algae of skin protection. *J. Korea Acade. Indus. Cooper. Soc.* **15**, 4272-4278.
 18. Kim, D. M., Yun, J. S. and Han, I. S. 2018. *Korea Patent*. 10-2018-0170393.
 19. Yun, J. S., Kim, D. M. and Han, I. S. 2018. *International Patent*. PCT/KR 201801163.
 20. Kim D. M., Yun, J. S., Kim, S. J., Choi, H. S. and Han, I. S. 2019. A Novel transdermal delivery system based on a bile acid conjugated nanoparticle model for cosmetics. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **17**, 81-91.