

The Skin-Whitening Effects of *Padina Gymnospora* and Its Active Compound, Fucosterol

Hye Kyung Kim^{1,2}, Jia Bak¹, Hyunbon Kang¹, Min-Ji Kim¹, Ji-Min Kim¹, Kyungsung Min¹, Sungyun Park¹, Jae Sung Pyo¹ and Yun-Sik Choi^{1,2*}

¹College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 48434, Korea

²Convergence Research Center for Smart Healthcare, Kyungsung University, Busan 48434, Korea

Received November 29, 2019 / Revised June 6, 2020 / Accepted June 10, 2020

Padina gymnospora is a brown algae of the class Phaeophyceae. It has been established that *P. gymnospora* ameliorates amyloid- β -induced neuropathology and has an anticoagulation effect, but this study was designed to estimate its skin-whitening effect and identify its active component. The ingredients of *P. gymnospora* were extracted with ethanol and its activity was compared with arbutin. First, the *P. gymnospora* extract was observed to inhibit tyrosinase activity in a dose-dependent manner, tyrosinase being the rate-limiting enzyme of melanin synthesis. Notably, where 200 μ M of arbutin inhibited tyrosinase activity by 58.1%, *P. gymnospora* extract (0.5%) achieved 76.7%. The *P. gymnospora* extract also significantly reduced α -melanocyte-stimulating hormone-induced TRP-1 and TRP-2 mRNA expression. In addition, it significantly inhibited melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. We identified the 0.66% fucosterol content that inhibited melanin synthesis as comparable to that of arbutin. Additionally, we tested the potential cytotoxicity of *P. gymnospora* by MTT and LDH release assay and found that the extract significantly reduced LDH release in CCD-986sk cells. These results indicate that *P. gymnospora* extract could be a potential active ingredient of cosmetics with a skin-whitening effect.

Key words : Arbutin, fucosterol, *Padina gymnospora*, skin-whitening, tyrosinase

서 론

멜라닌(melanin)은 피부색을 결정하는 주요 색소이다. 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 작용이 있으나 과도하게 발현될 경우 피부에 침착하여 점이나 기미를 형성할 수 있고 피부암의 원인이 될 수도 있다. 그러므로 멜라닌의 과도한 피부 침착을 예방하기 위해서는 멜라닌 합성을 억제하는 것이 필요하다[8]. 멜라닌은 melanocyte에서 여러 단계의 화학적 반응과 효소 반응에 의해 합성되며 eumelanin과 pheomelanin의 두가지 형태로 존재한다[21]. 멜라닌 합성은 tyrosinase에 의해 L-tyrosine이 dopaquinone으로 전환되는 반응에 따라 시작되며 tyrosinase는 멜라닌 합성에 있어 가장 중요한 효소 중 하나이다[19]. 멜라닌 합성은 주로 자외선 조사에 의해 조절되며 피부가 자외선에 노출될 때 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)과 같은 멜라닌 합성 촉진 단백질이 합성된다. 생성된 α -MSH는 tyrosinase의 합성을 촉진하여 멜

라닌 합성을 촉진한다[4]. 멜라닌의 합성을 억제하는 연구는 이미 오래전부터 시작되어 1990년대에 이미 arbutin이나 kojic acid 또는 그 유도체가 개발되었다[3]. 그 외에도 vitamin C나 hydroquinone 등이 피부 미백용 화장품 원료로 개발되었다[8]. 그러나 이 물질들은 부작용이나 임상적 효능이 만족스럽지 못하여 천연물을 이용한 새로운 미백용 소재 개발의 필요성이 꾸준히 제기되고 있다[4].

아롱부챗말(*Padina gymnospora*)은 일본과 우리나라에 분포하고 있는 갈조류로, 우리나라에서는 함경도, 부산, 비진도, 거제도, 남해도, 추자도, 제주도 등지에 분포한다고 알려져 있다. 몸은 편평하고 중륵이 없고 부채꼴이다. 단조이거나 또는 노성하면 방사상으로 깨어진다. 크기는 6~7 cm, 때로는 25~30 cm이다. 하부는 갈색의 모용이 있다. 생식세포의 균은 대체로 몸의 이면, 즉 성장면이 말려 들어간 쪽의 면에 생기고 몸의 모선대와 교호로 환상으로 배열된다. 질은 두꺼운 혁질이고 건조하면 특히 하부는 나무처럼 단단하고 대지에 붙지 않는다[1]. 최근의 연구에 의하면 아롱부챗말은 다양한 약리활성을 갖고 있는 것을 알 수 있다. 예를 들어, Shanmuganathan 등 [22, 23]에 의하면 아롱부챗말과 그 활성 성분인 α -bisabolol은 amyloid- β 에 의한 신경병리학적 증상을 완화시키는 것으로 보고되었다. 또한 아롱부챗말 유래 다당류는 비특이적 면역반응은 물론 특이적 면역반응도 증강시키는 것으로 보고되었고 [20], 아롱부챗말 유래 heterofucan은 혈소판 응집 억제 작용이

*Corresponding author

Tel : +82-51-663-4890, Fax : +82-51-663-4809

E-mail : tiana@ks.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

있는 것으로 알려졌다[24]. 피부세포를 이용한 연구에서는 아롱부챗말 유래 다당류가 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아 기능 이상을 완화하여 세포 손상을 감소시키는 것으로 나타났다[25]. 그러나 아롱부챗말의 피부 미백이나 주름개선과 같은 항노화 효과는 아직까지 알려지지 않았다.

본 연구에서는 아롱부챗말 추출물의 미백효과와 피부 독성을 밝히고자 하였다. 이를 위해 아롱부챗말 추출물의 tyrosinase 억제효과 및 멜라닌 합성 억제효과, 그리고 MTT assay와 LDH release assay를 이용하여 독성을 분석하였고 주 활성 성분 중 하나인 fucosterol의 함량 및 멜라닌 합성 억제효과를 측정하였다.

재료 및 방법

아롱부챗말 수급 및 추출물 제조

본 실험에서 사용된 아롱부챗말은 2019년 7월 28일에 제주에서 채취하였으며, 제주대학교 만타스마린랩 강정찬 박사에게 의뢰하여 동정한 후 사용하였다. 추출을 위하여 아롱부챗말 2.38 kg을 약 1 cm × 1 cm 크기로 분쇄하고 99% 에탄올 16 l로 실온에서 24시간 동안 침출추출을 총 2회 진행한 후 감압 농축기(A-1000S, EYELA, Japan)로 농축하고 진공동결건조기(FD5512, Ilshin, Korea)로 동결건조하여 에탄올 추출물을 얻었다. 표본은 경성대학교 약학대학 약학과(표본번호; PG-1, Korea)에 보관하였다.

지표성분 분석

지표성분인 fucosterol (F5379, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 5 mg을 메탄올 10 ml에 용해하여 stock solution으로 하고 5, 10, 50, 100 및 200 µg/ml 농도의 표준용액을 조제하였다. HPLC 분석에 사용된 용매는 HPLC급 J.T. Baker (USA) 제품을, 그 외 분석과 시료 추출을 위한 시약 및 용매는 1급 시약과 용매를 구입하여 사용하였다. 아롱부챗말 추출물 16 mg에 메탄올 40 ml를 첨가하여 30분간 초음파로 용해시킨 후 검액으로 사용하였고, 0.2 µm syringe filter (6789-1302, Whatman, USA)를 이용하여 여과한 후 HPLC 검액으로 사용하였다. HPLC는 Hitachi 사(USA)의 LaChrom Elite® HPLC 시스템을 이용하였고, Zorbax Eclipse XDB-C18 (Hewlett-Packard, 250×4.6 mm, 5 µm) column을 이용하였다. 아롱부챗말의 fucosterol 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다.

분석 방법의 검증(Validation)

HPLC 분석법의 신뢰성, 유효성을 검증하기 위해 KFDA (식품의약품안전처)의 가이드라인에 기초하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 측정하였으며, 정밀성(precision) 및 정확성(accuracy) 평가를 실시하였다.

Table 1. HPLC condition of fucosterol

HPLC condition			
Column	Zorbax Eclipse XDB-C18 column		
Column temp.	30°C		
Flow rate	1.2 ml/min		
Wave length	205 nm		
Injection volume	10 µl		
Mobile solvent	A: Acetonitrile		
	B: Mehanol		
Mobile phase	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	70	30
	30	70	30

타이로시나제(tyrosinase) 활성 저해 시험

Tyrosinase 활성 저해능은 기능성 화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인I (2015 식약처)에 따라 평가하였다. 아롱부챗말 추출물을 최종농도가 0.005, 0.05 또는 0.5%가 되도록 증류수에 녹인 용액 20 µl를 반응액(0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 220 µl, 머쉬롬 타이로시나제액(1,500 U/ml, T3824-25KU, Sigma Aldrich) 20 µl와 혼합하였다. 여기에 1.5 mM 타이로신 용액(T0550, Tokyo Chemical Industry) 20 µl를 넣고 37°C에서 15분 동안 반응시킨 후 판독기(microplate reader, AMR100, Allsheng, Hangzhou)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 200 µM arbutin (A4256-10G, Sigma Aldrich)을 이용하였다. 티로시나제(Tyrosinase) 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)

TRP-1과 TRP-2의 mRNA 발현양을 조사하기 위하여 실시간 중합효소연쇄반응(real-time Polymerase Chain Reaction, real-time PCR)을 이용하였다. 먼저, Melanoma (B16F10, ATCC) 세포에 멜라닌 생성 증폭제인 α-MSH (05-23-0751-1MG, Millipore corp., Burlington, MA)와 아롱부챗말 추출물을 0.005~0.5% 농도로 처치하고 24시간 후에 총 RNA를 kit (TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit, TaKaRa, Japan)를 사용하여 분리하였다. PCR 증폭을 위한 반응액 조성은 RNA 약 200 ng에, 정방향과 역방향 primer를 각각 0.4 µM, 2× one step TB green RT-PCR buffer, one step emzyme mix를 더하여 총 25 µl로 혼합한 후 primer의 TM 값을 고려하여 역전사(reverse transcription)는 42°C 5분, 95°C 10초, 중합반응은 95°C 5초, 57°C 30초, 72°C 30초를 조건으로 40회 반복하였다. PCR primer로 TRP-1은 정방향 5'-CAGTGCAGCGTCTTCCTGAG-3', 역방향 5'-TTCCCGTGGGAGCACTGTAA-3'을, TRP-2는 정방향 5'-GATGGCGTGCTGAACAAGGA-3', 역방향 5'-ATAAGGGCCACTCCAGGGTC-3'을, 그리고 β-actin은 정방향 5'-AGAGGGAAATCGCGGTGAC-3', 역방향 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'을 사용하였다.

세포내 tyrosinase 활성 저해 시험

Fucosterol (Sigma Aldrich)을 99% 에탄올에 녹여 최종농도가 50, 100, 200 μM이 되도록 하여 Melanoma (B16F10, ATCC) 세포에 24시간 처리한 후, 1% (v/v) Triton X-100 (X100-100 ML, Sigma Aldrich)을 포함한 0.1 M PBS (pH 6.5) 180 μl를 넣고 5분간 교반하였다. 이후 10분간 원심분리(9,400× g)하여 상층액 150 μl와 1.5 mM Tyrosine 용액(T0550, Tokyo Chemical Industry, Japan) 50 μl를 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 판독기(microplate reader)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 200 μM arbutin (Sigma Aldrich)을 이용하였다.

멜라닌 함량 측정

Melanoma (B16F10, ATCC) 세포에 멜라닌 생성 증폭제인 α-MSH (05-23-0751-1MG, Millipore corp)를 처리하고 200 μM Arbutin (Sigma Aldrich) 또는 아롱부챗말 추출물을 증류수에 녹여 최종 농도가 0.01, 0.05, 0.5%가 되도록 첨가하여 3~5일간 처리한 후, 세포를 수거하여 1 N NaOH (10% dimethyl sulfide (DMSO), Sigma Aldrich) 200 μl를 넣고 80°C에서 1시간 동안 처리한 후에 판독기(microplate reader)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 생존율 측정(MTT assay)

아롱부챗말 추출물을 증류수에 녹여 최종 농도가 0.01~0.5%가 되도록 섬유아세포(CCD-986sk, 21947, 한국세포주은행)에 첨가하여 24시간 동안 처리한 후, MTT (5 μg/ml; M2128, Sigma Aldrich) 10 μl를 넣고 37°C에서 2시간 동안 처리하였다. 이후에 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 well 당 100 μl씩 넣어 formazan을 잘 녹인 후 판독기(microplate reader)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. MTT assay는 NAD(H)-의존성 oxidoreductase 효소의 활성을 이용하여 살아 있는 세포에서 tetrazolium 색소인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium이 난용성 물질인 formazan으로 변화하는 반응을 이용한다

LDH 분비 억제 활성 측정

아롱부챗말 추출물을 증류수에 녹여 최종 농도가 0.01~0.5%가 되도록 섬유아세포(한국세포주은행)에 첨가하여 24시간 동안 처리한 후, 상층액 25 μl를 반응액(LDH cytotoxicity assay kit, Cayman, USA) 25 μl와 혼합하여 37°C에서 15분 동안 반응시킨 후 판독기(microplate reader)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

In vitro tyrosinase 활성 저해 효과

멜라닌(melanin)은 동물의 피부나 눈의 색을 결정하는 흑색 또는 갈색의 색소로 자외선, 염증반응의 외부적 자극이나 tyrosinase, TRP-1 (tyrosinase related protein 1), TRP-2 등 멜라닌 합성 효소에 의해 생성량이 결정된다. Tyrosinase는 tyrosine을 DOPA (3,4-dihydroxylphenylalanine)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성을 갖고 있고, 이 반응 단계가 멜라닌 생합성의 속도를 결정하므로 미백 활성 물질 발굴의 중요한 표적 효소이다[11]. 본 연구에서는 아롱부챗말 추출물의 미백 활성을 식약처 고시 성분으로 tyrosinase 저해제인 arbutin과 비교 평가하였다. 먼저, Fig. 1에 제시된 바와 같이 아롱부챗말 추출물은 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, arbutin (200 μM)은 대조군 대비 tyrosinase 활성을 58.1% 감소시킨 반면, 0.5% 아롱부챗말 추출 분말은 tyrosinase의 활성을 76.7% 감소시키는 것으로 나타나 tyrosinase 활성 저해능이 매우 우수함을 알 수 있다.

TRP-1, TRP-2 발현 저해 효과

Tyrosinase와 함께 멜라닌 합성에 관여하는 TRP-1과 TRP-2 mRNA 발현양을 real time PCR을 이용하여 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 TRP-1과 TRP-2는 α-MSH에 의해 통계적으로 유의하게 발현이 증가하였다. 반면, 아롱부챗말 추출물은 고농도에서 α-MSH에 의한 TRP-1과 TRP-2의 mRNA 발현 증가를 통계적으로 유의하게 억제시켰다.

In vitro melanin 합성 억제 효과

다음으로 흑색종 세포(B16F10)에서 멜라닌 합성 저해 효능을 확인하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 고시 물질인 200 μM arbutin은 멜라닌 합성을 약 35.5% 감소시켰다. 한편, 아롱부챗말 추출물은 용량 의존적으로 멜라닌의 합성을 억제하였으

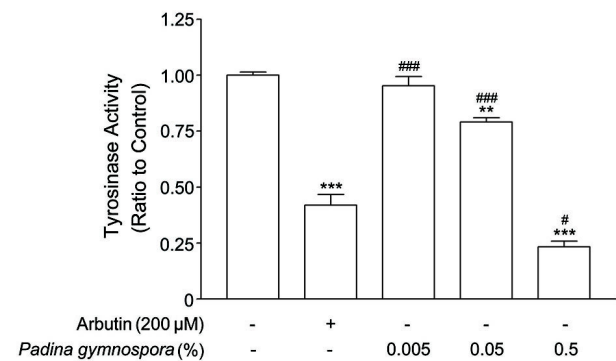


Fig. 1. Inhibition of tyrosinase activity by the extract of *Padina gymnospora*. Mushroom tyrosinase activity was measured and arbutin (200 μM) inhibited its activity by 58.1%. However, the extract of *P. gymnospora* (0.5%) inhibited its activity by 76.7%. Data are expressed as mean ± SEM. ***p*<0.01 and ****p*<0.001 compared to the control, and #*p*<0.05 and ###*p*<0.001 compared to the arbutin-treated group, respectively.

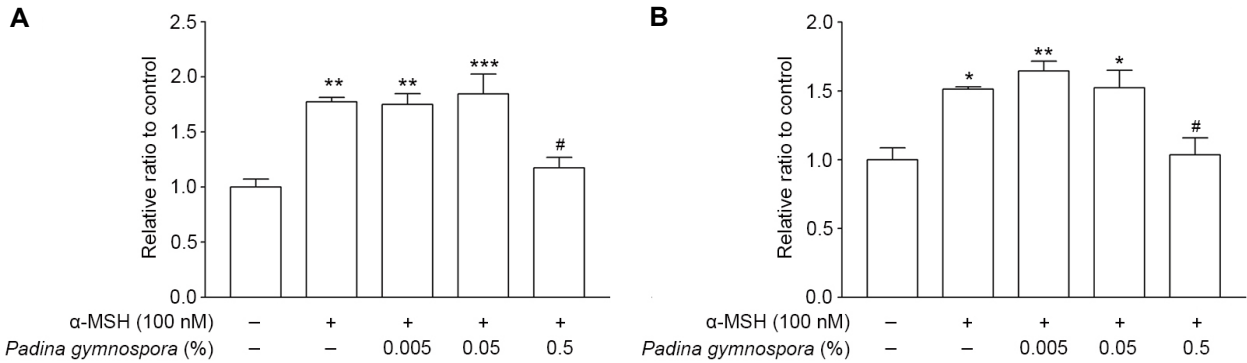


Fig. 2. The mRNA expression level of TRP-1 (A) and TRP-2 (B). High concentration of *Padina gymnospora* extract significantly reduced the mRNA expression level of both TRP-1 and TRP-2 in cultured melanoma (B16F10) cells. Data are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control, and # $p < 0.05$ compared to the α-MSH-treated group, respectively.

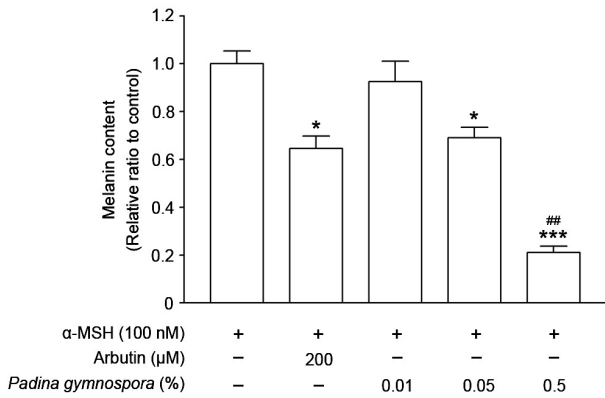


Fig. 3. Inhibition of melanin synthesis by the extract of *Padina gymnospora*. Melanin synthesis was measured in melanoma (B16F10) cells. To enhance melanin synthesis α-MSH (100 nM) was added and the activity of the extract was compared with the arbutin. The extract of *P. gymnospora* dose-dependently reduced melanin synthesis. Data are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared to the control, and ## $p < 0.01$ compared to arbutin-treated group, respectively.

며 특히, 0.5% 농도에서의 멜라닌 합성 억제 효능은 200 μM arbutin에 의한 효능보다 우수하였다. 따라서, Fig. 1과 Fig. 2의 결과를 고려할 때 아롱부챗말 추출물은 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2를 복합적으로 억제하여 멜라닌의 합성을 저해하는 것으로 생각된다.

활성 성분 분석

이전의 보고에 의하면 갈조류는 sterol로서 fucosterol을 많이 함유하는 것으로 알려져 있고, 아롱부챗말에서 fucosterol 함량 분석 결과도 보고된 바 있다[18]. 본 연구에서는 지표물질의 선정을 위해 제주산 아롱부챗말에서 fucosterol의 함량을 분석하였다. 먼저 Fig. 4에 나타난 바와 같이 아롱부챗말 추출

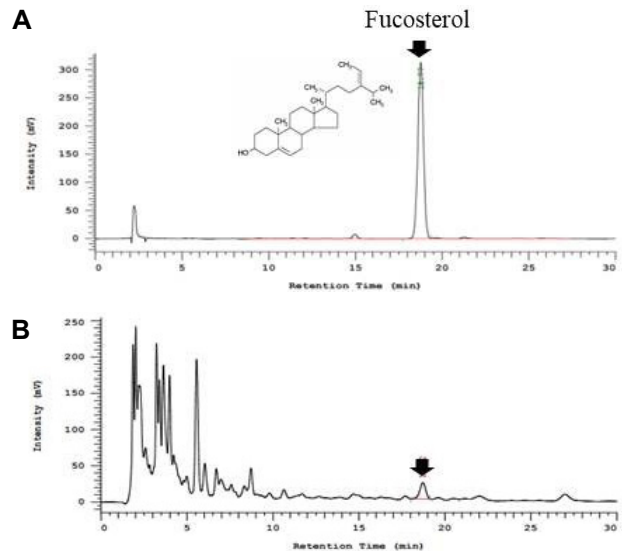


Fig. 4. HPLC chromatograms of fucosterol (A), ethanol extract from *Padina gymnospora* (B).

물의 HPLC 분석에서 fucosterol이 존재함을 확인하였다. 특히 표준용액과 아롱부챗말 추출물의 크로마토그램을 비교하여 fucosterol의 피크를 분석한 결과 다른 물질의 간섭없이 분리가 가능함을 확인하였다. Fucosterol 표준용액을 이용하여 농도를 증가시키며 분석한 결과 5~200 μg/ml의 범위에서는 검량선의 상관계수(R^2)가 1.000으로 매우 높은 직선성을 보였다 (Table 2). 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 분석법이 fucosterol 분석을 위한 특이성과 직선성(Linearity)을 충족함을 나타낸다. 특이성이란 추출물 등의 혼재 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말하는 것으로, 지표성분이 아롱부챗말 추출물 내의 다른 물질의 간섭 없이 분리가 되는지를 표준용액과 아롱부챗말 추출물의 chromatogram을 비교하여 peak들의 retention time을 검토하여 확인한다. 반면, 직선성이란 검체 중 분석대상물질의 농도에

Table 2. Linear ranges, LOQ and LOD of fucosterol

Compounds	Linear range (µg/ml)	Response slope (a)	Response factor (b)	Correlation coefficient (R ²)	LOQ (µg/ml)	LOD (µg/ml)
Fucosterol	5~200	8,121.9	34,343	1.000	0.272	0.082

Table 3. Precision and accuracy of fucosterol

Compounds	Conc. (µg/ml)	Accuracy (bias,%)		Precision (**c.v.,%)	
		*Intra-day	**Inter-day	*Intra-day	**Inter-day
Fucosterol	5	101.26	101.63	1.11	0.85
	100	98.44	98.50	1.95	1.93
	200	99.96	100.16	1.06	1.41

*Intra-day: three times per day, **Inter-day: three times analysis of standards per day for three days, **c.v.: co-efficient of variation.

비례하여 일정 범위 내에서 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말한다.

다음으로, Table 3에 나타난 바와 같이 이 실험에서 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 각각 0.082 µg/ml와 0.272 µg/ml 수준으로 확인되었고, fucosterol 분석의 정확성은 99.64~104.20, 정밀성은 0.28~1.94%로 나타났다(Table 3). 검출한계란 시료분석과정에서 배경 노이즈와 확실하게 구분되어지는 분석물질의 최저농도를 의미하고, 정량한계는 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 실측될 수 있는 시료 내 분석물질의 최소량을 말한다. 검출한계와 정량한계의 계산은 검량선의 기울기와 회귀직선에서 잔차의 표준편차를 이용하였다.

또한 본 실험에서 정밀성은 모두 2% 이하였으며, 정확성은 99.64~104.20% 사이의 범위에 있어 정밀성 및 정확성이 높은 분석 방법임을 확인하였다. 정밀성과 정확성 평가를 위해, fucosterol 5, 100 및 200 µg/ml의 범위에서 각 시료 농도당 3일간 반복성 시험과 일 내 3회 반복 시험을 수행하였다. 정확성은 표준값과 측정값 사이의 근접성을 계산하여 확인하였으며, 정밀성은 반복 실험하였을 때 측정값들 사이의 근접성, 즉 분산 정도를 계산하여 확인하였다.

이러한 분석 기법을 이용하여 아롱부챗말 추출 분말의 fucosterol 함량을 분석한 결과 0.66%로 확인되었다(Table 4).

Fucosterol의 미백 활성

Fig. 5에 제시된 바와 같이 fucosterol은 고시 성분인 arbutin과 같은 농도에서 유사한 멜라닌 합성 억제 효능이 있음을 처음으로 확인하였다. 이상의 결과는 아롱부챗말이 tyrosinase와 TRP-1과 TRP-2를 억제하여 멜라닌의 합성을 억제하며 지

Table 4. Contents of fucosterol from extracts of *Padina gymnospora*

Samples	Contents of fucosterol (%)
<i>Padina gymnospora</i> ethanol extract	0.66%

표물질로 활용 가능한 fucosterol이 주요 활성 성분 중 하나임을 알 수 있다.

아롱부챗말의 세포독성 평가

마지막으로 아롱부챗말의 세포독성을 평가하였다. 먼저 MTT assay에서는 아롱부챗말 추출물 0.01%에서 멜라닌 생성을 뚜렷하게 억제하는 0.5% 농도에 이르기까지 거의 차이가 없었다(Fig. 6A). 반면, 배양액으로 분비된 LDH의 활성은 아롱부챗말 추출물 농도가 증가함에 따라 유의하게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6B). 이러한 두 실험 결과를 볼 때 아롱부챗말 추출물은 멜라닌 합성을 현저히 억제하는 농도에서도 세포독성을 유발하지 않으며 오히려 세포를 배양하며 나타나는 세포 손상을 억제함을 제시한다.

고 찰

미백은 주름개선과 함께 가장 대표적인 기능성 화장품 개발

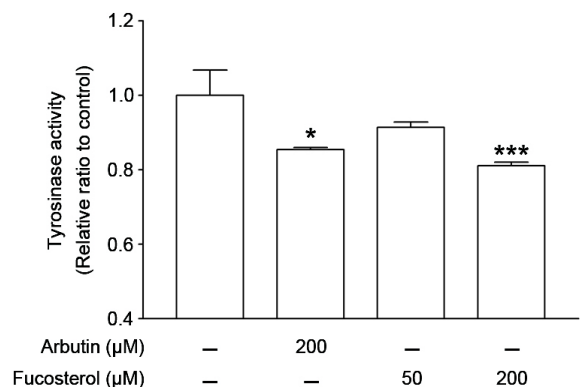


Fig. 5. Inhibition of melanin synthesis by fucosterol. In melanoma (B16F10) cells arbutin (200 µM) reduced melanin synthesis by 14.6% and fucosterol (200 µM) reduced melanin synthesis by 17.2%. Data are expressed as mean ± SEM. *p<0.05 and ***p<0.001 compared to the control, respectively.

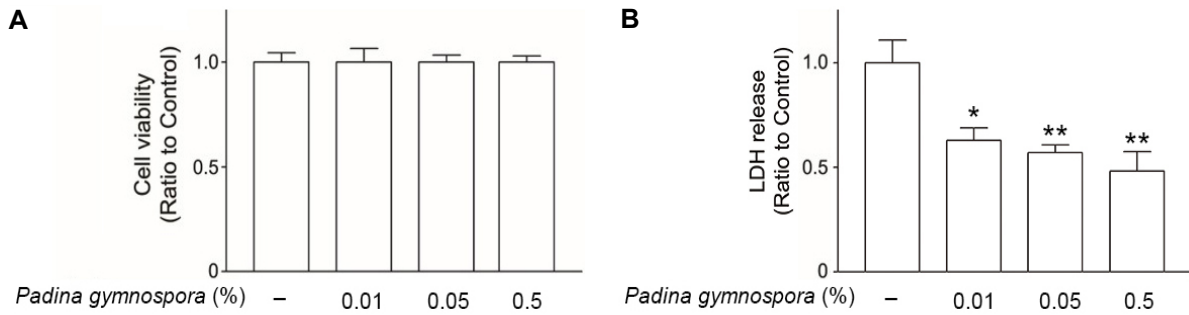


Fig. 6. Cytotoxicity of the extract from *Padina gymnospora*. (A) Cytotoxicity was measured by MTT assay and cell viability was not decreased up to 0.5% of the extract. (B) Cytotoxicity was measured by LDH release assay and the enzymatic activity of LDH in the media was dose-dependently and significantly reduced. Data are expressed as mean \pm SEM. * p <0.05 and ** p <0.01 compared to the control, respectively.

분야이다. 특히 미백은 멜라닌 합성 경로가 밝혀짐에 따라 tyrosinase를 억제하는 많은 활성성분들이 소개되었다. 이 중 arbutin, kojic acid 또는 α -bisabolol 등은 현재 많은 화장품의 원료로 이용되고 있다[3, 13]. 그러나 이러한 물질들은 부작용이 발견되거나 임상적 효능이 만족스럽지 못하여 천연 성분을 함유하는 새로운 미백 화장품 개발이 활발히 진행되고 있다[4]. 이러한 노력의 결과 최근에는 톱풀(*Achillea alpine* L.), 목단(*Paeonia suffruticosa* Andrews), 가래나무(*Juglans mandshurica*), 매듭풀(*Kummerowia striata*) 등의 미백효과를 갖는 다양한 천연물이 보고되고 있다[10, 12, 14, 16].

최근에는 tyrosinase를 억제하는 활성 성분 뿐만 아니라 멜라닌 합성 경로의 후기 단계에서 dopachrome을 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 전환하는 TRP-2와 DHICA를 indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone (ICAQ)으로 전환하는 TRP-1을 저해하는 성분도 보고되고 있다[11, 14]. 이에 따라 본 연구에서도 B16F10 세포를 이용하여 아롱부챗말 추출물에 의한 TRP-1과 TRP-2의 발현에 미치는 영향을 조사하였고 고농도에서 통계적으로 유의하게 α -MSH에 의한 TRP-1과 TRP-2의 mRNA 발현 증가를 억제하는 것을 확인하였다. 흥미롭게도, 미백 고시성분인 arbutin은 tyrosinase를 억제하여 멜라닌 합성을 낮추는 반면, TRP-1과 TRP-2의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다[2]. 반면, 기니피그의 등 피부세포에 자외선을 조사할 때 TRP-1은 변화가 없으나 tyrosinase와 TRP-2는 발현이 증가하는데 이러한 발현 증가를 arbutin이 억제하는 것으로 보고되었다[15]. 본 연구에서는 아롱부챗말 추출물의 중등 농도(0.05%)에서 tyrosinase 활성과 melanin 생성을 통계적으로 유의하게 억제하였으나, TRP-1과 TRP-2의 발현에는 영향이 없는 것으로 나타났다. 반면, 고농도(0.5%)에서는 α -MSH에 의해 유도된 TRP-1과 TRP-2의 발현을 유의하게 저해하였다. 따라서 이러한 연구 결과를 고려할 때 아롱부챗말의 미백 효능은 기전적으로 arbutin 보다 복잡적이며 효능 면에서도 매우 우수함을 알 수 있다.

천연 추출물을 이용하여 기능성 제품을 개발할 때 지표성분

을 확보하는 것이 매우 중요하다. 지표성분은 정성 및 정량분석이 가능해야 하고 해당 천연물의 기능성을 나타내는 활성성분일 경우 제품에 대한 신뢰성이 보다 높아진다. 본 실험에서는 아롱부챗말 추출물의 활성을 확인한 후, 지표성분으로 활용이 가능한 활성성분을 확인하고자 하였다. 이를 위하여, 이전의 연구 논문들을 검토한 결과 아롱부챗말은 fucosterol을 비롯하여 hentriacontane, phytol 등 여러 성분들이 보고된 바 있음을 확인하였다[18]. 이에 따라 본 연구진은 아롱부챗말의 알려진 구성성분들에 대해 연구하였고, 그 결과 fucosterol의 정성·정량분석 조건을 확립함과 동시에 미백 효과에 대해 처음으로 제시하였다. Fucosterol은 sterol의 일종으로 아롱부챗말과 같은 갈조류에 풍부한 것으로 알려져 있다. 최근의 연구 결과에 따르면 fucosterol은 amyloid β 에 의한 신경세포 보호와 concanabalin A에 의한 급성 간독성 저해 작용, 그리고 항우울, 항경련 작용이 있음이 보고되었다[6, 17, 26]. 피부유래세포를 이용한 연구에서는 fucosterol이 미세먼지와 자외선 조사로부터 피부를 보호하는 것으로 보고되었다[5, 7]. 작용 기전으로는 자외선 조사에 의한 활성산소 생성을 억제하고, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase의 발현을 증가시키는 항산화 작용과 c-Jun, c-Fos, NF- κ B의 발현 억제 등이 보고되었다[5, 7]. 이러한 결과를 볼 때 아롱부챗말의 주성분인 fucosterol은 미백 효과는 물론 자외선과 미세먼지로부터 피부를 보호하는 항노화 효능이 우수한 것으로 볼 수 있다.

아롱부챗말은 주로 우리나라와 일본 근해에 자생하는 갈조류이다. 본 연구를 통해 0.1% 아롱부챗말은 고시 성분인 arbutin (200 μ M) 대비 월등한 tyrosinase 억제 효능이 있는 것을 처음으로 확인하였다. 또한, 아롱부챗말의 주요 성분 중 하나인 fucosterol은 본 연구에서 사용한 분석법으로 특이성과 직선성이 확인되었고, 아롱부챗말 추출물을 이용한 HPLC 분석에서 다른 성분들과 겹치지 않고 정성 및 정량분석이 가능함을 밝혀, 아롱부챗말의 지표 성분으로 활용이 가능함을 처음으로 확인하였다. 게다가 fucosterol의 미백 효능은 아직까지 보고된 바 없으며 아롱부챗말은 MTT assay와 LDH release

assay를 통해 세포 독성이 없음을 확인하였다. 이러한 결과를 종합할 때 아롱부챗말 추출물은 기존 고시성분 대비 우수한 미백 효과와 안전성을 갖고 있어 새로운 기능성 화장품 원료로 활용이 가능함을 알 수 있다.

감사의 글

본 연구는 부산산업과학혁신원의 지역특화 기술개발·확산 개방형연구실 운영사업(B0080509000470)의 일환으로 수행된 결과입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Boo, S. M. and Kim, H. S. 2010. Algal flora of Korea. Marine brown algae I : heterokontophyta: phaeophyceae: ectocarpales. *National Institute of Biological Resources, Ministry of Environment* **2**, 46-48.
- Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., Komoto, M. and Ichihashi, M. 1998. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **11**, 206-212.
- Chen, J. S., Wei, C. and Marshall, M. R. 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897-1901.
- Choi, S. Y. and Kim, Y. C. 2011. Whitening effect of black tea water extract on brown Guinea pig skin. *Toxicol. Res.* **27**, 153-160.
- Fernando, I. P. S., Jayawardena, T. U., Kim, H. S., Vaas, A. P. J. P., De Silva, H. I. C., Nanayakkara, C. M., Abeytunga, D. T. U., Lee, W., Ahn, G., Lee, D. S., Yeo, I. K. and Jeon, Y. J. 2019. A keratinocyte and integrated fibroblast culture model for studying particulate matter-induced skin lesions and therapeutic intervention of fucosterol. *Life Sci.* **233**, 116714.
- Gan, S. Y., Wong, L. Z., Wong, J. W. and Tan, E. L. 2019. Fucosterol exerts protection against amyloid β -induced neurotoxicity, reduces intracellular levels of amyloid β and enhances the mRNA expression of neuroglobin in amyloid β -induced SH-SY5Y cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **121**, 207-213.
- Hwang, E., Park, S. Y., Sun, Z. W., Shin, H. S., Lee, D. G. and Yi, T. H. 2014. The protective effects of fucosterol against skin damage in UVB-irradiated human dermal fibroblasts. *Mar. Biotechnol.* **16**, 361-370.
- Kang, S. H., Jeon, Y. D., Cha, J. Y., Hwang, S. W., Lee, H. Y., Park, M., Lee, B. R., Shin, M. K., Kim, S. J., Shin, S. M., Kim, D. K., Jin, J. S. and Lee, Y. M. 2018. Antioxidant and skin-whitening effects of aerial part of *Euphorbia supina* Raf. Extract. *BMC Complement. Altern. Med.* **18**, 256.
- Kim, J. H., Yun, E. J., Yu, S., Kim, K. H. and Kang, N. J. 2017. Different levels of skin whitening activity among 3,6-anhydro-l-galactose, agarooligosaccharides, and neogargarooligosaccharides. *Mar. Drugs* **15**, E321.
- Kim, J. Y., Lee, E. J., Ahn, Y., Park, S., Kim, S. H. and Oh, S. H. 2019. A chemical compound from fruit extract of *Juglans mandshurica* inhibits melanogenesis through p-ERK-associated MITF degradation. *Phytomedicine* **57**, 57-64.
- Kim, S. S., Kim, M. J., Choi, Y. H., Kim, B. K., Kim, K. S., Park, K. J., Park, S. M., Lee, N. H. and Hyun, C. G. 2013. Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **3**, 617-622.
- Lee, H. J., Sim, M. O., Woo, K. W., Jeong, D. E., Jung, H. K., An, B. and Cho, H. W. 2019. Antioxidant and anti-melanogenic activities of compounds isolated from the aerial parts of *Achillea alpina* L. *Chem. Biodivers.* **16**, e1900033.
- Lee, J., Jun, H., Jung, E., Ha, J. and Park, D. 2010. Whitening effect of alpha-bisabolol in Asian women subjects. *Int. J. Cosmet. Sci.* **32**, 299-303.
- Lee, J. Y., Cho, Y. R., Park, J. H., Ahn, E. K., Jeong, W., Shin, H. S., Kim, M. S., Yang, S. H. and Oh, J. S. 2018. Anti-melanogenic and anti-oxidant activities of ethanol extract of *Kummerowia striata*: *Kummerowia striata* regulate anti-melanogenic activity through down-regulation of TRP-1, TRP-2 and MITF expression. *Toxicol. Rep.* **6**, 10-17.
- Lee, T. H., Seo, J. O., Do, M. H., Ji, E., Baek, S. H. and Kim, S. Y. 2014. Resveratrol-enriched rice down-regulates melanin synthesis in UVB-Induced guinea pigs epidermal skin tissue. *Biomol. Ther.* **22**, 431-437.
- Lin, D., Wang, S. H., Song, T. Y., Hsieh, C. W. and Tsai, M. S. 2019. Safety and efficacy of tyrosinase inhibition of *Paeonia suffruticosa* Andrews extracts on human melanoma cells. *J. Cosmet. Dermatol.* **18**, 1921-1929.
- Mo, W., Wang, C., Li, J., Chen, K., Xia, Y., Li, S., Xu, L., Lu, X., Wang, W. and Guo, C. 2018. Fucosterol protects against concanavalin A-induced acute liver injury: Focus on p38 MAPK/NF- κ B pathway activity. *Gastroenterol Res. Pract.* **2018**, 2824139.
- Murugan, K. and Iyer, V. V. 2014. Antioxidant activity and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of extracts of the Marine Algae, *Caulerpa peltata* and *Padina Gymnospora*. *Indian. J. Pharm. Sci.* **76**, 548-552.
- Pillaiyar, T., Manickam, M. and Namasivayam, V. J. 2017. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32**, 403-425.
- Rajendran, P., Subramani, P. A. and Michael, D. 2016. Polysaccharides from marine macroalga, *Padina gymnospora* improve the nonspecific and specific immune responses of *Cyprinus carpio* and protect it from different pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* **58**, 220-228.
- Schiaffino, M. V. 2010. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1094-1104.
- Shanmuganathan, B., Sathya, S., Balasubramaniam, B., Balamurugan, K. and Devi, K. P. 2019. Amyloid- β induced neuropathological actions are suppressed by *Padina gymno-*

- spora (Phaeophyceae) and its active constituent α -bisabolol in Neuro2a cells and transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's model. *Nitric Oxide* **91**, 52-66.
23. Shanmuganathan, B., Sheeja Malar, D., Sathya, S. and Pandima Devi, K. 2015. Antiaggregation potential of *Padina gymnospora* against the toxic Alzheimer's beta-amyloid peptide 25-35 and cholinesterase inhibitory property of its bioactive compounds. *PLoS One* **10**, e0141708.
24. Silva, T. M., Alves, L. G., de Queiroz, K. C., Santos, M. G., Marques, C. T., Chavante, S. F., Rocha, H. A. and Leite, E. L. 2005. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 523-533.
25. Vasantharaja, R., Stanley Abraham, L., Gopinath, V., Hariharan, D. and Smita, K. M. 2019. Attenuation of oxidative stress induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in fibroblast cells by sulfated polysaccharide from *Padina gymnospora*. *Int. J. Biol. Macromol.* **124**, 50-59.
26. Zhen, X. H., Quan, Y. C., Jiang, H. Y., Wen, Z. S., Qu, Y. L. and Guan, L. P. 2015. Fucosterol, a sterol extracted from *Sargassum fusiforme*, shows antidepressant and anticonvulsant effects. *Eur. J. Pharmacol.* **768**, 131-138.

초록 : 아롱부챗말과 그의 활성성분인 fucosterol의 미백 효과

김혜경^{1,2} · 박지아¹ · 강현본¹ · 김민지¹ · 김지민¹ · 민경성¹ · 박성연¹ · 표재성¹ · 최윤식^{1,2*}

(¹경성대학교 약학과, ²경성대학교 스마트헬스케어융복합연구센터)

아롱부챗말은 갈조강에 속하는 갈조류의 일종이다. 이전의 보고에 의하면 아롱부챗말은 amyloid- β 에 의한 신경병증을 완화하고 혈소판 응집도 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 아롱부챗말의 피부미백 효과를 평가하고 활성 성분을 확인하도록 고안되었다. 이러한 연구를 위하여 아롱부챗말 99% 에틸알코올을 이용하여 추출하였고 활성은 arbutin을 양성 대조군으로 하여 비교하였다. 먼저, 아롱부챗말 추출물은 멜라닌 생성의 속도조절효소인 tyrosinase의 활성을 용량 의존적으로 억제함을 확인하였다. 주목할만한 점으로, 200 μ M arbutin은 tyrosinase의 활성을 58.1% 억제한 반면, 0.5% 아롱부챗말 추출물은 76.7% 억제하였다. 아롱부챗말 추출물은 α -melanocyte-stimulating hormone에 의한 TRP-1과 TRP-2 mRNA 발현 증가도 저해하였다. 게다가, 아롱부챗말 추출물은 흑색종 세포인 B16F10 세포에서 멜라닌의 합성을 유의하게 감소시켰다. 아롱부챗말의 활성성분으로는 fucosterol이 확인되었고 함량분석에서 0.66%로 확인되었다. Fucosterol은 흑색종 세포에서 멜라닌 합성 억제 효과가 고시 성분인 arbutin과 유사하였다. 마지막으로, 아롱부챗말의 세포독성을 MTT assay와 LDH release assay를 이용하여 분석하였다. 이 실험에서 아롱부챗말 추출물은 LDH 유출을 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다. 종합하면, 본 연구에서는 아롱부챗말 추출물이 피부 미백용 화장품의 활성성분으로 사용되기에 충분한 가능성을 갖고 있는 것으로 확인하였다.