

발효 스쿠알렌을 함유한 마이크로솜의 제조 및 효능효과

김예진^{1,*} · 김태현² · 조희경³ · 성낙준³ · 김인영⁴ · 유광호³ · 김영호^{5,†}

^{1,*}(주)메가코스R&I CENTER, 연구원

²(주)메가코스R&I CENTER, 선임연구원

³(주)메가코스R&I CENTER, 수석연구원

⁴(주)바이오뷰텍 기업부설연구소, 연구총괄대표이사

^{5,†}(주)메가코스R&I CENTER, 연구총괄대표이사

(2020년 9월 28일 접수: 2020년 10월 29일 수정: 2020년 10월 29일 채택)

Effectiveness and Preparation of Microsome containing Fermented Squalene

Ye-Jin Kim^{1,*} · Tae-Hyun Kim² · Heui-Kyoung Cho³ · Nak-Jun Seong³
In-Young Kim⁴ · Kwang-Ho Yoo³ · Young-Ho Kim^{5,†}

^{1,2,3,5,†}*Megacos Co., Ltd., R&I CENTER, 16, Simin-daero 327Rd, Dongan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do, 14055, Republic of Korea*

⁴*Biobeautech Co., Ltd., Research and Development Center, 710, Mega-dong, SKn-TechnoPark, 124, Sagimakgol-ro, Jungwon-gu, Seongnam-City, Gyeonggi-do, 13207, Republic of Korea*
(Received September 28, 2020; Revised October 29, 2020; Accepted October 29, 2020)

요 약 : 본 연구에서는 미생물을 이용하여 개발한 발효 스쿠알렌의 안정성 향상을 위하여 마이크로솜-SQ20 (Microsome-SQ20)을 제조하고, 이에 대한 물리적 거동 및 특성과 효능효과에 대하여 연구하였다. 마이크로솜-SQ20의 외관은 투명한 액체로 고유의 냄새를 가지고 있었다. 색상은 무색이고, 비중은 0.928, pH는 5.82 (20%용액)로 화장품에 사용하는데 적합한 나노에멀전이 형성되었다. 스쿠알렌의 주성분 함량은 20.05%로 안정하게 봉입이 된 것을 확인할 수 있었다. 마이크로솜-SQ20을 0.1% 수용액화하여 측정된 입자크기는 134.8 nm로 bluish한 유화상을 얻었다. F-SQ(Fermented squalene)과 MF-SQ(Microsome squalene)의 DPPH라디칼에 의한 항산화 효과는 각각 80.72%, 81.5%로, L-ascorbic acid와 비교하여 동등한 효과를 보였다. F-SQ 및 MF-SQ은 10 ppm에서 각각 150.3%, 129.9%의 세포생존율을 나타냈다. SQ, F-SQ, MF-SQ의 elastase 저해능은 10 ppm에서 각각 8.7%, 10.33%, 8.7%의 저해능력을 가지고 있음을 알 수 있었다. MMP-1 저해능력은 SQ, F-SQ, MF-SQ 모두 10 ppm에서 각각 1.55%, 41.44%, 31.79%를 나타내 F-SQ의 collagenase 저해능이 우수한 것을 알 수 있었다.

주제어 : 발효 스쿠알렌, 마이크로솜, 안정성, 항산화효과, MMP-1 저해능

[†]Corresponding author
(E-mail: yhkim1609@megacoskorea.com)

Abstract : In this study, to improve the stability of fermented squalene developed using microorganisms, Microsome-SQ20 was prepared, and its physical behavior, properties, and efficacy were studied. The appearance of Microsome-SQ20 was a transparent liquid, no smell, and had a specific smell. The color was a transparent liquid, and the specific gravity was 0.928 and the pH was 5.82 (20% solution), forming a nano-emulsion suitable for use in cosmetics. It was confirmed that the content of the main component of squalene was 20.05%, which was stably sealed. The particle size measured by 0.1% aqueous solution of Microsome-SQ20 was 134.8 nm to obtain a bluish emulsified phase. The antioxidant effects of F-SQ and MF-SQ by DPPH radicals were 80.72% and 81.5%, respectively, showing superior effects compared to L-ascorbic acid. The cell viability of squalene (SQ), fermented squalene (F-SQ) and microsome squalene (MF-SQ) was at 10 ppm, respectively, showing 121.2%, 150.3%, and 129.9% cell viability. It was found that SQ, F-SQ, and MF-SQ had an elastase inhibitory ability of 8.7%, 10.33% and 8.7% at 10 ppm, respectively. In addition, the inhibitory ability of MMP-1 was 1.55%, 41.44%, 31.79% at 10 ppm for SQ, F-SQ, and MF-SQ, respectively, indicating that F-SQ significantly reduced the MMP-1 expression.

Keywords : Fermented squalene, microsome, stability, anti-oxidative activity, elastase reducing activity

1. 서론

스쿠알렌(squalene)은 일반적으로 상어의 간(肝)에서 얻을 수 있는 트리테르페노이드(triterpenoid)계 불포화 탄화수소이다. 스테로이드(steroid), 호파노이드(hopanoid), 트리테르펜(triterpenes) 생합성 과정의 중간체라고 할 수 있다. 스쿠알렌은 1916년에 처음으로 상어의 간유(肝油)에서 분리되었다. 하지만 스쿠알렌은 식물의 씨앗과 기름, 담수어에도 존재하며 인간도 하루에 약 1g을 생산한다고 보고되어 있다[1-3]. 일반적으로 스쿠알렌은 다양한 기능을 가지고 있어 음식, 화장품, 건강식품, 제약 산업에서 사용되고 있다[4]. 상어뿐만 아니라 종려나무의 열매와 올리브에도 스쿠알렌이 포함되어 있는데, 일반적으로 올리브는 400~450mg/100g의 스쿠알렌을 포함하며, 고품질의 올리브는 700mg/100g을 가

지고 있다. 미국을 포함한 서방국가에서 어른들의 하루 평균 섭취량은 30mg 정도이다. 고품질의 올리브를 섭취하는 지중해 지역 국가에서는 매일 400mg의 스쿠알렌을 섭취한다고 한다. 그동안 상어의 간유(肝油)와 식물 기름이 스쿠알렌의 주된 원천이었지만, 최근에는 미생물의 발효 과정을 이용하여 스쿠알렌을 생산하고 있다[5-6].

스쿠알렌(squalene)과 스쿠알란(squalane)의 분자구조를 Fig. 1에 그림으로 나타내었다.

스쿠알렌의 IUPAC명은 2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyltetracos-2, 6, 10, 14, 18, 22-hexaene이다. 탄소 30개와 수소 50개의 분자로 이루어져있다. 한편 스쿠알란(squalane)은 상어(Centrphorus) 및 기타, 주로 깊은 바다에 사는 상어류의 간유에서 얻은 탄화수소를 환원하여 얻은 포화탄화수소로 주성분은 스쿠알란(C₃₀H₆₂)이다. 곶은 사슬 탄화수소 C₂₄H₅₀의

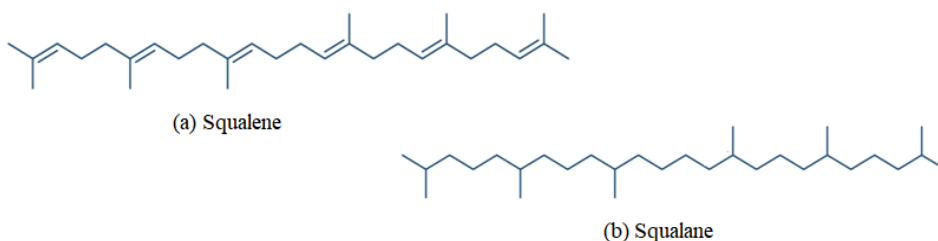


Fig. 1. Molecular structures of squalene (a) and squalane (b).

2, 6, 10, 15, 19, 23-자리에 6개의 메틸기의 결사슬이 있는 포화탄화수소 C₃₀H₆₂는 스쿠알렌의 수소화로부터 얻어진다. 분자량에 비해 어는점 (-60°C)이 낮고 부동성인 정밀 기계유. 가스 크로마토그래피의 고정상용 액체와 화장품 원료로 사용된다[7-8]. 특히 화장품 산업에서의 스쿠알렌은 피부 표면 지질의 구성 성분으로 약 13%를 차지하고 있으며, 피부 친화성이 매우 뛰어나 도포 시 잔여감 없이 깊이 흡수되는 천연 물질 중 하나이다. 상어간유, 올리브, 아마란스 씨, 쌀겨, 맥아 등에 많이 함유되어 있는 6개의 이중결합을 가진 고도의 불포화탄화수소로 환원력이 강해 활성산소와 결합하여 세포의 산화 및 손상을 예방해 주어 건강유지와 증진에 기여한다[9]. 콜레스테롤의 생합성에 아주 중요한 선구 물질로써, 상처 치유의 능력, 항산화 효능 및 콜라겐을 증가시켜 피부 노화 현상인 주름 발생을 완화해 주는 기능이 있다[10].

고령화 사회에 접어들면서 항노화(안티에이징) 트렌드가 빠르게 확산되고 관련 제품에 대한 수요가 폭발적으로 급증하고 있어 안티에이징에 탁월한 효과를 가진 스쿠알렌을 원가 절감과 동시에, 환경친화적, 생체친화적으로 생산하려는 노력이 필요하다. 그러나, 심해 상어의 간 오일에서 주로 생산되는 스쿠알렌은 동물학적 이슈(동물 소재 스쿠알렌에 대한 비판적인 움직임의 확산과 규제 강화추세, 비정부기구(NGO)들의 동물 소재 스쿠알렌 반대 활동 등)와 천연 해양 자원의 보전 문제로 인하여 지속 생산에 제약이 많으며, 구조적으로 산화에 대한 불안정성이 높아 소재 유통 및 제품 적용 개발에 대한 제약이 매우 많은 실정이다[11].

이에 본 연구에서는 성균관대학교, 한국화학연구원, 생산기술연구원이 공동연구를 통해 개발한 미생물을 이용한 발효 스쿠알렌을 제공받아 캡슐화 및 물성평가, 효능평가 연구를 수행하였다. 스쿠알렌의 안정성 향상을 위해 식물성 비이온 계면활성제를 사용하여 발효스쿠알렌 함유한 오일상 (oil phase)을 나노셀 (nano-cell)에 통과시켜 나노 입자화하였다. 투명한 형성된 마이셀 내부에 스쿠알렌을 봉입한 것을 마이크로솜(microsome)이라 명명하였다. 이를 사용하여 안정성 시험을 평가하고, 임상적 평가로써 세포독성시험, DPPH에 의한 항산화효과, 엘라스테이즈 (elastase) 저해능력 시험, MMP-1 저해능력시험, 프로콜라겐 (procollagen) 합성능력을 평가하였고, HPLC 정

량분석을 통해 스쿠알렌의 안정성을 확인하여 화장품 산업에 응용 가능하도록 연구한 결과를 보고한다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 시약

세포실험에서 사용된 Fermented Squalene (F-SQ)와 Microsome Fermented Squalene (MF-SQ)은 (주)바이오뷰텍에서 구입하여 사용하였다. Squalene (SQ), L-ascorbic acid (L-AA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), L-ascorbic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO), N-succinyl-(Ala)₃- ρ -nitroanilide (STANA), triton X-100, thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), phosphoramidon disodium salt는 Sigma-Aldrich (USA)에서, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)는 Corning에서 구입하여 사용하였다. 마이크로솜 제조를 위해 cetyl ethylhexanoate (Evonic Nutrition & Care GmbH), squalene (Sigma Aldrich), polyglyceryl-10 oleate (Biobeautech Co., Ltd), sucrose distearate (Biobeautech Co., Ltd), natural tocopheryl acetate (Biobeautech Co., Ltd) D. I. Water (Biobeautech Co., Ltd) 사용하였다.

2.2. 기기

마이크로솜을 만들기 위하여 사용된 기기는 호모믹서 (Premix, 일본)와 디스퍼믹서 (Dispersing mixer, HY-110, 한성ENG, 한국), 고압마이크로플루다이지 (마이크로녹스, 한국)를 사용하였다. 일반적으로 유화상태를 관찰하기 위하여 올림퍼스의 광학현미경(Olympus BX-51, 일본)을 사용하였다. 입경분포를 측정하기 위하여 입자측정기 (Zeta Sizer, 영국)를 사용하였다. DPPH 법에 의한 항산화 효과측정 기기는 UV흡광도 측정기인 Optizen POP-S (K-Lab, 한국)를 사용하였다. HPLC는 diode array detector(DAD)가 장착된 Agilent 1260 Infinity series HPLC (Agilent Technologies Inc., USA)를 사용하였다. 컬럼은 C18 역상 컬럼인 CAPCELL PAK C18 (250 × 4.6 mm, 5 μ m, OSAKASODA Inc., JAPAN)을 사용하여 스쿠알렌을 정량 분석하였다.

2.3. 마이크로솜-SQ20의 제조

20%의 스쿠알렌을 함유하는 마이크로솜-SQ20 (Microsome-SQ20)을 제조하는 방법을 Table 1에 나타난 조성표를 사용하여 제조하였다. 여기에 사용된 계면활성제는 MIZOAN[®] CleanEmul-7300로 polyglyxeryl-10 oleate와 sucrose distearate가 혼합된 원료를 사용하였다. 제조방법은 (1) A상과 B상을 계량하여 60~70°C 가온 용해한다. 2) 45°C까지 냉각하여 C상을 첨가하여 교반한다. 이것은 열에 약하므로 최대한 낮은 온도(40~45°C)에서 첨가하였다. 3) D상을 첨가하여 혼합하고, 30°C까지 냉각하였다. 4) 고압분사 호모게나이저 (high pressure homogenizer)에 10,000psi, 20~30°C, 나노셀 (nano-cell)에 3~5회 통과하여 제조하였다. 5) 투명한 마이크로솜상이 되면 제조를 완료하였다. 고압으로 통과에 따른 마찰 온도의 증가를 방지하기 위하여 냉각 순환이 장착된 장비를 사용하여 제조에 적용하였다.

2.4. 실험 방법

2.4.1. 항산화능력 측정

항산화 측정에 사용된 표준 시약인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능은 Blois(1958)의 방법에 준하여 측정하였으며 [12], 이를 통해 시료 간의 항산화능력을 평가하였다. 96 well plate에 0.2 mM DPPH 용액과 시료를 첨가하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로써 L-ascorbic acid를 사용하였다. 평가하는 수식은 식(1)에 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}) \times 100 \quad \text{--- (1)식}$$

(1)식에 나타난 바와 같이 Beer Lambert 법칙에 맞도록 하기 위하여 실험군의 흡광도에 대조군의 흡광도를 나누어 얻은 값을 1로 빼 줌으로써 흡광도를 통하여 항산화 능력을 계산하였다.

2.4.2. 세포주 및 세포배양

Neonatal Human Dermal Fibroblasts (NHDF-Neo)는 Lonza (Morrisville, NC, USA)에서 분양 받아 사용하였으며 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), 1% penicillin-streptomycin (Sigma, USA)를 첨가한 Dulbecco's modification of eagle's medium (DMEM) (Corning, USA)을 배지로 하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였으며, 시료 처리 시 FBS를 제외한 무혈청배지를 사용하였다.

2.4.3. 세포 독성 측정

NHDF-Neo 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well이 되도록 분주하여 24 h 동안 배양한 후 각 시료를 농도별 (0, 2.5, 5, 10 ppm)로 첨가하였다. 24 h 배양 후 각 well에 MTT solution (5 mg/mL in PBS)을 20 μL씩 첨가한 후 37°C, 5% CO₂조건에서 3 h 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 상등액을 suction하고 DMSO를 분주하여 불용성 formazan을 용해시켰다. 이후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포 생존율(%)은 (2)식에 나타내었다[12].

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100\% \quad \text{-- (2)식}$$

Table 1. Preparing method of Microsome-SQ20 using CleanEmul-7300 of Mixed Polyglyceryl-10 Oleate and Sucrose Distearate

Phase	Ingredient Name	Wt%	Remarks
(A)	MIZOAN [®] CleanEmul-7300	42.000	Surfactant
(B)	Cetylethyl Hexanoate	35.900	Emollient
(C)	Tocopheryl acetate	0.100	Stabilizer
(D)	Squalene	20.000	Active
(E)	D. I. Water	2.000	Solvent
Total		100.000	

2.4.4. Elastase 활성 측정

스쿠알렌 (Squalene; SQ), 발효스쿠알렌 (Fermented squalene; F-SQ)과 마이크로솜화 발효스쿠알렌 (micorsome fermented squalene; MF-SQ)의 elastase 활성을 측정하기 위해 NHDF-Neo 세포를 이용하였다. 60 mm Petri dish에 세포를 분주 및 배양하여 필요한 만큼의 세포를 얻었다. 이후 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 후, 0.1% triton X-100이 포함된 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)를 가하여 단백질을 추출하였다. 이 용액을 4°C에서 3,000 rpm으로 20분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 elastase 효소액으로 하여 BCA kit (Thermo, USA)를 이용해 단백질량을 정량 하였다. Elastase 효소액을 각 well 당 100 μ g의 단백질량이 되도록 하여 96 well에 분주하고 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 50 mM STANA, 시료를 첨가하여 37°C에서 90분간 반응시켰다. 양성 대조군으로써 phosphoramidon을 사용하였고, 반응 종결 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 활성(%)은 (3)식에 의하여 나타내었다[13].

Elastase 활성(%)은 (실험군의 흡광도/대조군의 흡광도)×100 ----- (3)식

2.4.5. Procollagen type I C-peptide 생합성 측정

세포 배양액 내의 collagen 생합성량을 측정하기 위해 NHDF-Neo 세포를 12 well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 24 h 동안 배양한 후 무혈청배지에 시료를 희석한 후 첨가하였다. 24 h 반응 후, 각 well의 배양액을 수거하여 3,000 rpm에서 5 min 간 원심분리하여 얻은 상등액으로 collagen 생합성량을 측정하였다. Collagen 생합성량 측정에는 Procollagen type I C-peptide EIA kit (TaKaRa, Japan)가 사용되었다.

2.4.6. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 생성량 측정

세포 배양액 내의 MMP-1 생성량을 측정하기 위해 Human total MMP-1 DuoSet (R&D Systems, USA)을 사용하였다. 먼저 NHDF-Neo 세포를 12 well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 24 h 동안 배양한 후, 배지를 제거

하여 DPBS로 세척하고 DPBS를 plate에 얇게 깔 상태에서 30 mJ/cm^2 UVB를 조사하였다. UVB 조사 후 무혈청배지에 희석한 시료와 TNF- α (10 ng/mL)를 동시 처리하여 24 h 반응시켰다. 이때, TNF- α 는 NHDF-Neo 세포에 자극을 더 주기 위하여 첨가하였다. 이후 각 well의 배양액을 수거하여 3,000 rpm에서 5 min 간 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하여 MMP-1 생성량을 측정하였다.

2.4.7. HPLC 분석방법

1) 재료 및 시료 전처리

추출 및 크로마토그래피에 사용한 아세토니트릴 및 아세톤은 HPLC급 J.T Baker사 (Phillipsburg, NJ, USA)로 사용하였으며, 스쿠알렌은 Sigma-Aldrich사(ST. Louis, Mo, USA)를 사용하였다. 시료는 적당량 채취 후 아세톤을 넣고 sonication을 이용하여 추출한 다음 검량선에 맞게 희석하여 0.2 μ m PVDF filter로 여과 후 검액으로 하였다.

2) 표준액 조제

스쿠알렌 표준용액 0.1 g을 달아 아세톤을 넣어 녹인 후 100 mL 한 액을 표준원액으로 하였다(1000 mg/L). 표준원액 0.1, 0.5, 1, 2 mL를 정확히 취하고 아세톤을 넣어 10 mL로 한 액을 검량선 작성용 표준용액으로 하였다.

3) HPLC 분석조건

HPLC는 diode array detector(DAD)가 장착된 Agilent 1260 Infinity series HPLC (Agilent Technologies Inc., USA)를 사용하였다. 컬럼은 C18 역상 컬럼인 CAPCELL PAK C18 (250 \times 4.6 mm, 5 μ m, Osakasoda Inc., Japan)을 사용하였고, 오븐온도는 30°C로 설정하였다. 이동상은 아세토니트릴:아세톤 60:40(v/v) 혼합액으로 유속은 1 mL/min, 시료주입량은 10 μ L, 검출 파장은 208 nm에서 흡광도를 측정하였다[14].

2.5. 유화 입도 평가

마이크로솜-SQ20을 1 g을 정확하게 달아서 99 g의 정제수에 넣어 1분간 교반하여 1%의 수용액으로 만들어서 입자측정기를 사용하여 입경 분포를 측정하였다.

2.4. 통계분석

효능 평가 결과는 평균±표준편차 (mean±SD)로 나타내었으며, 본 실험에서 얻은 결과는 Microsoft Excel 2016의 Paired t-test를 사용하여 유의성을 통계 분석하였다. 대조군과 실험군의 유의성 검정은 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 마이크로솜-SQ20의 물성측정 결과

Table 1의 제조방법에 따라 만들어진 발효스쿠알렌을 봉입한 투명한 나노 마이크로솜에 대하여 여러 가지 물성을 측정하였다. 그 결과를 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 보는 바와 같이 외관은 마이크로솜이 형성된 맑고 투명액체로 스쿠알렌 고유의 냄새가 있었다. 색상은 투명한 액체로 무색이었고, 비중은 0.928, pH는 5.82로 화장품에 사용하기에는 문제가 없을 것으로 생각된다. 스쿠알렌의 주성분의 함량은 20.05%로 안정하게 봉입이 된 것을 확인할 수 있었다. 스쿠알렌은 이중결합이 여러 개 있어서 효능은 우수하나 장기 안정성이 어려운 점이 거론되어 왔으나, 이번 연구를 통하여 안정하게 마이크로솜에 성공적으로 봉입함으로써 화장품 산업에 크게 활용될 것으로 기대하고 있다. 그 밖의 증급속과 미생물의 범위는 모두 화장품 규격에 적합하다는 것을 알 수 있었다.

마이크로솜-SQ20의 최종 생성물과 수용액화한 시료를 Fig. 2에 나타내었다. (A)는 마이크로솜-SQ20의 최종 생성물이고, (B)는 0.1%를 수용액

화 하여 혼합한 용액이다. (C)는 1%로 묽혀서 입자 측정이 용이하도록 하기 위한 사진이다. (A)는 투명한 마이크로에멀전으로 형성되어 안정한 상태로 존재하고 있는 사진이며, 이를 정제수에 넣어 희석할 경우에 전상이 일어나 미세한 유화형 마이셀로 전상(phase inversion)이 일어나기 때문이라고 고찰하였다. 이 시료를 가지고 입경분포 및 물성을 측정하는데 사용하였다.

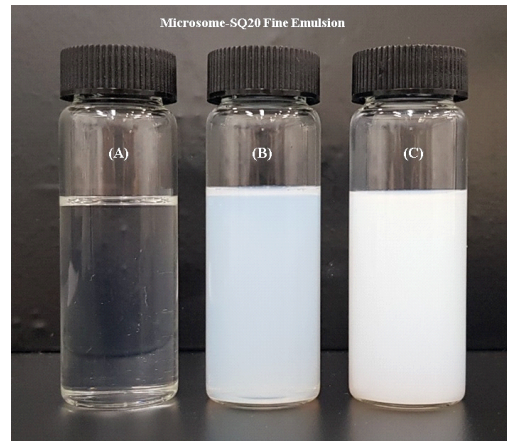


Fig. 2. Pictures of Microsome-SQ20 with fermented squalene; (A): transparent Microsome SQ-20, (B): 0.1% diluted solution in water, (C): 1% diluted solution in water.

3.2. 마이크로솜-SQ20의 입경분포 측정결과

입경분포의 측정은 마이크로솜-SQ20을 0.1% 용액과 1% 용액을 가지고 입경 분포를 측정한다

Table 2. Physical Properties of Microsome-SQ20 with 20% Fermented Squalene

Terms	Specification Level	Result	Remarks
Appearance	Transparent Liquid	Passed	Standard
Odor	Odorless or specific odor	Passed	Standard
Color	No color	Passed	Standard
Sepecific Gravity	0.900 ~ 1.10	0.928	Gravity method
pH	5.0 ~ 7.50	5.82	10% sol. pH meter
Major Ingredient	Squalene 18~21%	20.05	HPLC method
Heavy metal level	Pb 20ppm max. As 2 ppm max	N/D N/D	KCID KCID
Microbiological test	1000 CFU/mL	Passed	KCID

결과를 Fig.3에 나타내었다. (a)는 마이크로솜-SQ20을 0.1% 농도로 희석한 시료이고, (b)는 1%로 희석한 시료를 입자측정기로 측정된 결과이다. Fig.3의 그래프에서 보는 바와 같이 (a)의 평균입경분포는 134.8 nm이었으며, 표준편차는 33.60이었다. (b)의 평균입경분포는 131.2 nm이었으며, 표준편차는 39.70이었다. 외관상으로는 (a)가 (b)보다 더 푸른빛을 가지는데 이것으로 농도가 더 묽어서 나타나는 현상이라고 생각된다. 이 마이크로솜-SQ20의 안정성은 30일 경과 후에도 안정하였으며, 그의 입경분포의 그래프가 좁은 피크로 나타났고, 균일한 입자가 형성되어 유의차 없는 범위 내에서 안정한 나노에멀전상을 나타낸 것으로 판단하였다.

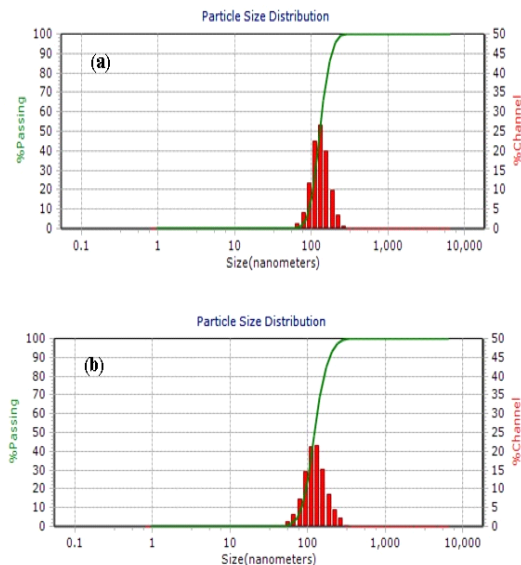


Fig. 3. Pictures of particle size of Microsome-SQ20 with fermented squalene; (a): 0.1% diluted solution in water, (b): 1% diluted solution in water.

3.3. 항산화능력 활성평가

효모의 대사경로를 통제하여 얻은 F-SQ과 이를 마이크로솜으로 캡슐화한 MF-SQ에 대한 항산화능력을 평가하기 위해 DPPH radical 소거능을 측정하였다. Free radical은 인체 내의 지질, 단백질 등과 결합하여 노화를 유발한다[15]. 따라서 F-SQ와 MF-SQ를 DPPH radical로 반응시켰을 때 free radical을 소거시키는 능력을 측정함으로써 이들이 가지는 항산화능을 비교할 수

있었다. SQ은 용해도가 좋지 않아 다른 시료와 동일한 농도에서 비교가 불가능하여 용해가 되는 최고농도에서 비교하였다. 그 결과, F-SQ와 MF-SQ는 250 ppm에서 각각 80.72%, 81.5%로, 93.05%를 나타낸 L-ascorbic acid와 동등한 수준으로 높은 항산화능을 보였다. 이는 용해도가 낮은 SQ의 단점을 발효 및 마이크로솜 공정을 해결하여 생성된 F-SQ와 MF-SQ의 항산화능이 동등한 수준으로 높은 효과를 가지는 것으로 확인되었다는 점에서 큰 의미가 있다고 생각된다.

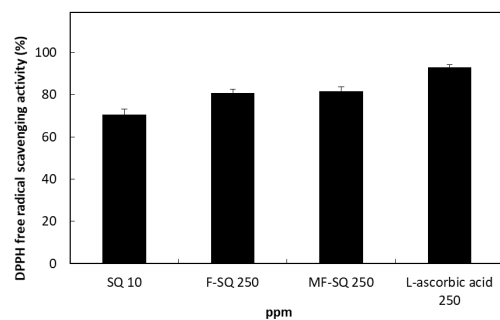


Fig. 4. Effect of fermented squalene (F-SQ) and microsome fermented squalene (MF-SQ) measured by DPPH radical scavenging assay.

3.4. 세포독성 평가

효능 평가를 진행하기에 앞서 SQ, F-SQ, MF-SQ의 세포에 대한 독성 평가를 실시하였다. NHDF-Neo 세포에 세 시료를 농도별 (2.5, 5, 10 ppm)로 처리했을 때, 전 구간에서 독성이 나타나지 않았으며 F-SQ의 경우 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하였다 (Fig. 5 A). SQ, F-SQ, MF-SQ 모두 10 ppm에서 각각 121.2%, 150.3%, 129.9%의 세포생존율을 나타내, 117.5%의 세포생존율을 나타낸 L-ascorbic acid보다 세포생존율이 높은 것을 확인하였다. 특히 F-SQ의 경우, 발효 전의 SQ과 비교했을 때 농도가 증가함에 따라 섬유아세포의 생존율이 약 10~30% 이상 증가하는 것으로 보아 스쿠알렌의 발효공정이 섬유아세포의 성장을 향상시키는 것으로 해석하였다. 위 결과를 토대로, 이후 효능 평가의 실험 농도를 세포독성이 나타나지 않은 최고 농도인 10 ppm으로 설정하여 해당 농도에서 elastase 활성, procollagen 생합성, MMP-1 저해 활성을 측정하였다. (Fig. 5 B).

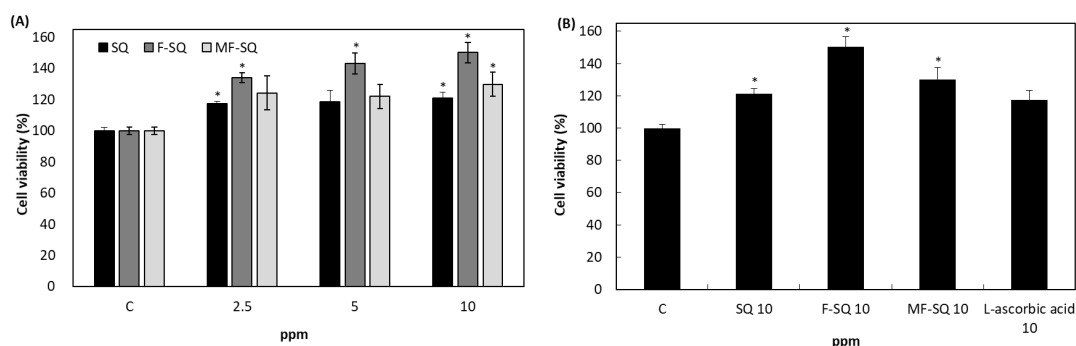


Fig. 5. Cell viability effect of fermented squalene (F-SQ) and microsome fermented squalene (MF-SQ) on cell viability in human dermal fibroblast. The results were presented as means of triplicates \pm standard deviation (SD). * $p < 0.05$ vs control.

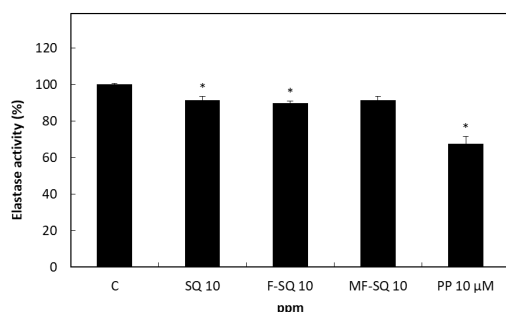


Fig. 6. Effect of fermented squalene (F-SQ) and microsome fermented squalene (MF-SQ) on elastase activity in human dermal fibroblasts. Cultured cells were harvested and used for the detection of elastase activity. Phosphoramidon was used as positive control. The results were presented as means of triplicates \pm standard deviation (SD). * $p < 0.05$ vs control.

3.5. Elastase 활성 평가결과

Elastin은 진피층의 3-4%를 차지하는 탄력섬유로, 세포외기질 (extracellular matrix; ECM)에 풍부하게 존재하며 피부 탄력에 중요한 역할을 한다[16-17]. 이런 elastin을 분해하는 효소인 elastase의 저해 활성을 측정하여 주름개선 후보 물질을 탐색하였다. 이 결과를 Fig. 6에 나타내었다. SQ, F-SQ, MF-SQ을 NHDF-Neo 세포에서 추출한 elastase 효소액과 반응시켰을 때, 세 가지 시료 모두 10 ppm에서 각각 8.7%, 10.33%, 8.7%의 저해율을 나타내었으며 이 중 F-SQ의 elastase 활성 저해율이 10% 이상으로 가장 높게 나타났으며, FM-SQ10도 활성이 유의차가 있다는 것을 확인하였다.

3.6. Procollagen type I C-peptide 생합성 측정결과

Type I procollagen은 세포외기질의 대부분을 구성하는 type I collagen을 합성하는 주재료로, procollagen의 증가는 피부의 결합력과 탄력성에 관여함으로써 주름 개선에 영향을 미친다 [18-19]. 이 방법으로 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. SQ, F-SQ, MF-SQ에 대한 procollagen type I의 생합성능을 측정한 결과, 10 ppm에서 각각 5%, 6.7%, 3.5%를 나타내며 F-SQ 생합성능이 가장 높게 나타났지만 그 수준이 매우 미비하여 세 시료 모두 collagen 생성에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

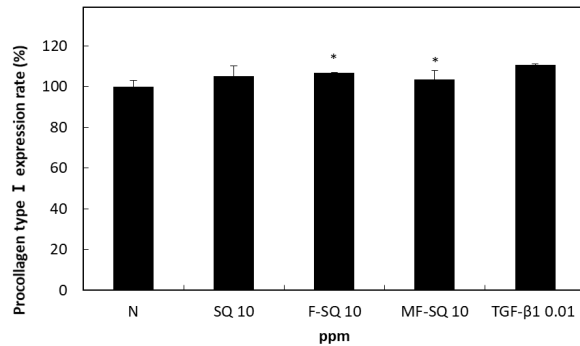


Fig. 7. Effect of fermented squalene (F-SQ) and microsome fermented squalene (MF-SQ) on a type I procollagen biosynthesis in human dermal fibroblasts. Human dermal fibroblasts were pre-treated with SQ, F-SQ and MF-SQ for 24 h in serum-free media, then type I procollagen was measured from the supernatant. TGF-β1 was used as positive control. The results were presented as means of triplicates ± standard deviation (SD). **p*<0.05 vs control.

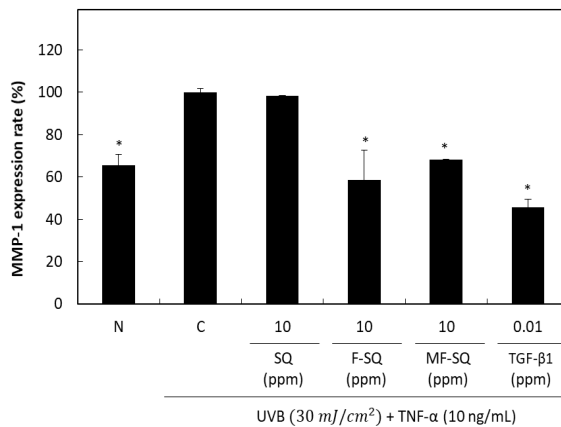


Fig. 8. Inhibitory effect of fermented squalene (F-SQ) and microsome fermented squalene (MF-SQ) on a MMP-1 activity. Human dermal fibroblasts were pre-treated with SQ, F-SQ and MF-SQ for 24 h in serum-free media, and after UVB (30 mJ/cm²) irradiation and TNF-α (10 ng/mL) treatment, MMP-1 was measured from the supernatant. TGF-β1 was used as positive control. The results were presented as means of triplicates ± standard deviation (SD). **p*<0.05 vs control.

3.7. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 저해능 측정결과

MMP는 zinc-dependent endopeptidase로, elastin, collagen 등의 세포외기질 단백질의 감소에 관여하는 효소로, UVB나 TNF-α와 같은 외부 자극에 의해 발현이 조절된다. 그 중에서도 MMP-1은 광노화에 중요한 역할을 하며, collagen 1, 2, 3, 5형을 분해함으로써 피부 노화에 영향을 미친다[20-21]. 따라서 외부 자극으로

인해 손상된 NHDF-Neo 세포에 SQ, F-SQ, MF-SQ 처리했을 때 MMP-1의 발현이 줄어드는 정도를 측정함으로써 시료가 가지는 주름 개선 효과를 알 수 있다. NHDF-Neo 세포에 UVB (30 mJ/cm²) 조사 및 TNF-α (10 ng/mL) 처리했을 때 MMP-1의 생성량이 34.4% 증가하였고 SQ, F-SQ, MF-SQ를 처리하였을 때 각각 1.55%, 41.44%, 31.79% 감소하였다(Fig. 8). 본 연구 결과로부터 F-SQ이 UVB 등의 외부 자극에

의해 증가한 MMP-1을 절반가량 감소시키는 것을 확인하였으며, SQ는 거의 감소하지 않았으며, MF-SQ는 유의차 있는 MMP-1 저해 효능을 나타내는 것을 알 수 있었다.

3.8. HPLC를 이용한 캡슐 내 스쿠알렌의 장기 안정성 평가 결과

스쿠알렌은 6개의 이중결합을 가진 고도의 불포화탄화수소로 환원력이 강력한 물질로서 생리학적인 활성은 높지만 안정성은 매우 좋지 않고 제형내에서 안정성이 좋지 않다. 이에 스쿠알렌을 함유한 마이크로솜과 마이크로솜을 적용한 에센스 제형에서 스쿠알렌의 HPLC 분석을 통해 장기안정도(6개월)를 확인하였다. 캡슐화 하지 않은 스쿠알렌은 25°C, 50°C 조건에서 25주차에 70% 잔류하였으며(Fig.9(c)), 마이크로솜화 한 경우 26

주차에 80% 이상 함량이 유지됨을 확인하였다. (Fig.9(a)), 마이크로솜을 적용한 제형의 경우(Fig. 9(b)), 4°C, 25°C, 50°C 모두 12주 경과 후에도 80%이상 정량분석되어, 마이크로솜이 스쿠알렌을 안정화 하는데 유의미하게 기여하는 것으로 고찰할 수 있었다.

이러한 결과를 바탕으로 폴리글리세릴계와 수크로오스계의 식물성 혼합계면활성제(MIZOAN® CleanEmul-7300)를 사용하여 스쿠알렌 20%가 함유된 투명한 마이크로솜-SQ20을 안정하게 개발하였다. 이에 대한 항산화활성, 세포독성, 프로콜라겐합성능, MMP-1저해능, 엘라스틴합성능에 대한 성능분석을 통하여 효능효과를 검증한 결과를 이용하여 화장품 산업에서 다양한 퍼플리케이션 개발에 응용이 가능할 것으로 기대한다.

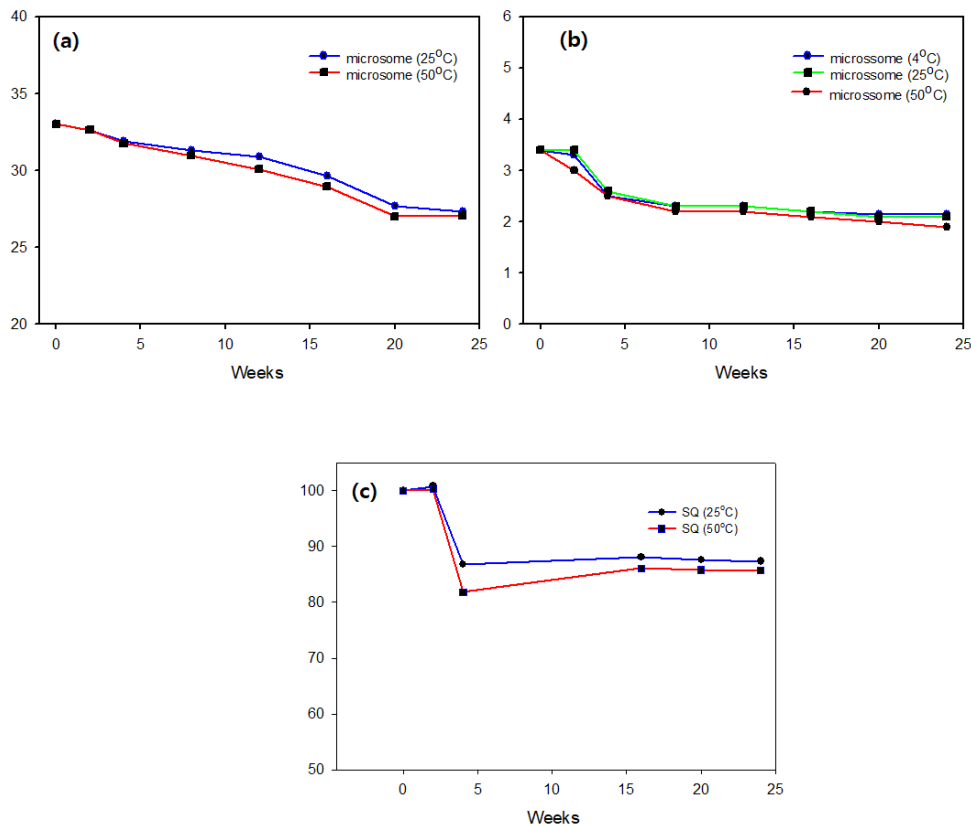


Fig. 9. Determination results of Microsome-SQ20 containing squalene in essence formulation measured by HPLC analysis; (a) stability of microsome-SQ20 for 25 weeks, (b) stability of squalene in essence application using 5% Microsome-SQ20 (c) stability of aldrich-squalene.

4. 결론

본 연구에서는 미생물을 이용하여 개발한 발효 스쿠알렌의 안정성 향상을 위하여 마이크로솜-SQ20을 제조하고, 이에 대한 물리적 거동의 특성과 효능효과에 대한 연구 결과를 하기와 같이 요약하였다.

첫째, 스쿠알렌의 함량이 20.05% 함유된 마이크로솜에 봉입하여 안정한 나노에멀전을 만들 수 있었다.

둘째, 마이크로솜-SQ20의 외관은 투명한 액체로 고유의 냄새를 가지고 있었다. 색상은 투명한 액체이었고, 비중은 0.928, pH는 5.82로 화장품에 사용하는데 적합한 나노 에멀전이 형성되었다.

셋째, 나노입자화된 마이크로솜-SQ20을 0.1% 수용액화하여 측정된 입자크기는 134.8 nm로 bluish한 유화상을 얻었다.

넷째, F-SQ과 MF-SQ의 DPPH라디칼에 의한 항산화 효과는 각각 80.72, 81.5%로, L-ascorbic acid와 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다.

다섯째, 발효스쿠알렌 (Fermented squalene; F-SQ) 및 마이크로솜화 스쿠알렌(microsome squalene;MF-SQ)의 세포생존율은 10 ppm에서 121.2%, 150.3%로 129.9%의 세포생존율을 나타내 117.5%의 세포생존율을 나타낸 L-ascorbic acid 보다 세포생존율이 높은 것을 확인하였다.

여섯째, SQ, F-SQ, MF-SQ은 10 ppm에서 각각 8.7%, 10.33%, 8.7%의 저해율을 나타내어 elastase 저해능이 있다는 것을 알 수 있었다.

일곱째, Procollagen type I의 생합성능은, SQ, F-SQ, MF-SQ 모두 10 ppm에서 각각 5%, 6.7%, 3.5%를 나타내 콜라겐 생성에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부의 바이오 산업핵심 기술개발사업 (No. 20000679)의 지원을 받아 수행한 연구과제입니다.

References

1. L. Harivardhan Reddy, Patrick Couvreur, "Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 61, pp. 1412-1426, (2009).
2. M. Tsujimoto, "A highly unsaturated hydrocarbon in shark liver oil." *Industrial & Engineering Chemistry*, Vo. 8, No. 10, pp. 889-896, (1916).
3. Z. KopiCoVa, S. VaVreiNoVa, "Occurrence of squalene and cholesterol in various species of Czech freshwater fish", *Czech journal of food sciences*, Vol. 25 No. 4, pp. 195-201, (2007).
4. R. Anandan, R. Rajesh, S. Vimaladevi, R. Navneethan, R. Jayarani, D.K. Vijayan, S. Mathew, *Nutraceutical and biomedical application of squalene*, p.177-134, ICAR-Central Institute of Fisheries Technology, Cochin, (2016).
5. G. Beltrán, M.E. Bucheli, M.P. Aguilera, A. Belaj, A. Jimenez, "Squalene in virgin olive oil: screening of variability in olive cultivars", *European Journal of Lipid Science and Technology*, Vol. 118 No. 8, pp. 1250-1253, (2016).
6. H.L. Newmark, "Squalene, olive oil, and cancer risk: review and hypothesis", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 889, No. 1, pp. 193-203, (1999).
7. S. K. Kim, F. Karadeniz, "Biological importance and applications of squalene and squalane". *Advances in food and nutrition research*, Vol. 65, pp. 223-233, Academic Press, (2012).
8. M. Kayama, *Science of processing marine food products*, pp. 157-172, Japan International Cooperation Agency Press, (1990).

9. S. Passi, O. De Pità, P. Puddu, G.P. Littarru, "Lipophilic antioxidants in human sebum and aging", *Free radical research*, Vol. 36 No. 4, pp. 471-477, (2002).
10. Z.R. Huang, Y.K. Lin, J.Y. Fang, "Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology", *Molecules*, Vol. 14 No. 1, pp. 540-554, (2009).
11. J.M. Lou-Bonafonte, R. Martínez-Beamonte, T Sanclemente, J.C. Surra, L.V. Herrera-Marcos, J. Sanchez-Marco, J. Osada, "Current insights into the biological action of squalene". *Molecular nutrition & food research*, Vol. 62 No. 15, pp. 1-59, (2018).
12. M.S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol. 181, No.4617, pp. 1199-1200, (1958).
13. N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, G. Imokawa, "The Role of Elastases Secreted by Fibroblasts in Wrinkle Formation: Implication Through Selective Inhibition of Elastase Activity", *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 74, No.2, pp. 283-290, (2001).
14. N. Nenadis, M. Tsimidou, "Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 79 No.3, pp. 257-259, (2002).
15. H. K. Kim, Y. E. Kim, J. R. Do, Y. C., Lee, B. Y. Lee, "Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants", *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol. 27, No. 1, pp. 80-85, (1995).
16. J. Uitto, J. L. Paul, K. Brockley, R. H. Pearce, J. G. Clark, "Elastic fibers in human skin: Quantitation of elastic fibers by computerized digital image analyses and determination of elastin by radioimmunoassay of desmosine. Laboratory investigation", *a journal of technical methods and pathology*, Vol. 49, No. 4, pp. 499-505, (1983).
17. L. Debelle, A.M. Tamburro, "Elastin: molecular description and function", *The international journal of biochemistry & cell biology*, Vol. 31, No.2, pp. 261-272, (1999).
18. A. M. Parfitt, L.S. Simon, A. R. Villanueva, S. M. Krane, "Procollagen type carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase", *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 2, No.5, pp. 427-436, (1987).
19. E. Jung, J. Lee, J. Baek, K. Jung, J. Lee, S. Huh, D. Park, "Effect of Camellia japonica oil on human type I procollagen production and skin barrier function", *Journal of ethnopharmacology*, Vol. 112, No.1. pp. 127-131, (2007).
20. D. Fagot, D. Asselineau, F. Bernerd, "Direct role of human dermal fibroblasts and indirect participation of epidermal keratinocytes in MMP-1 production after UV-B irradiation", *Archives of dermatological research*, Vol. 293, No. 11, pp. 576-583, (2002).
21. S. Fayad, P. Morin, R. Nehmé, "Use of chromatographic and electrophoretic tools for assaying elastase, collagenase, hyaluronidase, and tyrosinase activity", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1529, pp. 1-28, (2017).