

스피루리나(*Spirulina platensis*)로부터 미백과 주름개선 생리활성 물질 분리를 위한 초음파 추출공정 개발

김소희 · 전성진 · 김준희 · 염서희 · 김진우*

선문대학교 자연과학대학 식품과학과

Ultrasound-assisted Extraction for Development of Skin Whitening and Anti-wrinkling Cosmetic Materials from *Spirulina platensis*

So Hee Kim, Seong Jin Jeon, Jun Hee Kim, Suh Hee Yeom and Jin Woo Kim*

Department of Food Science, Sun Moon University, Asan 31460, Korea

Ultrasound-assisted extraction (UAE) conditions, including extraction time, extraction temperature, and ethanol concentration, were optimized to increase the total flavonoid content (TFC), tyrosinase inhibitory activity (TIA), and collagenase inhibitory activity (CIA) of *Spirulina platensis* through central composite design (CCD). For the optimization of the three dependent variables, a quadratic regression model was derived from 17 experimental sets for the simultaneous maximization of TFC, TIA, and CIA. The predicted optimal UAE conditions were 44.0 min of extraction time, 82.8°C of extraction temperature, and 96.0% of ethanol concentration. Under these conditions, 0.93 mg QE/g DM of TFC, 81.9% of CIA, and 92.1% of TIA were predicted. The CCD-based UAE optimization enabled an increase in TFC, CIA, and TIA, thereby confirming that the *S. platensis* extract can be used in the development of a cosmetic material with skin whitening and anti-wrinkle effects.

Keywords: Ultrasound-assisted extraction, Skin whitening, Anti-wrinkle, Optimization, *Spirulina platensis*

서론

인체의 산화적 대사과정에서 생산되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 화학적으로 반응성이 높은 분자로 강력한 산화반응을 통해 생체조직을 공격하고 세포를 손상시킨다(Kitagawa et al., 2004). 이에 세포는 대표적 ROS인 O²⁻ (superoxide anion), HO· (hydroxyl radical), H₂O₂ (hydrogen peroxide)와 HOCl (hypochlorous acid)로부터의 산화적 손상을 방어하기 위해 다양한 항산화 효소(catalase, super oxide dismutase)를 생산하며 활성산소의 균형상태를 유지한다(Kim et al., 2018). 하지만 ROS 소거속도에 비해 생산속도가 높으면 잉여 ROS가 잔류하게 되며, 이는 콜라겐결합을 분해하거나 비정상적인 교차결합을 유발해 주름생성을 촉진하고 Matrix Metalloproteinases-1 (MMP-1)의 활성을 증가시켜 노화를 가속시킨다(Rhee, 1999; Wang et al., 1999; Torres and Forman, 2003). 따라서 ROS의 생성을 저해하여 생체를 보호하는 추가

적인 항산화 작용이 필요로 되는데, 대표적으로 페놀성 화합물이 이러한 ROS 소거 활성과 항산화 작용을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Rittié and Fisher, 2002). 특히 페놀성 화합물 중 플라보노이드계 성분들은 항산화 및 미백활성을 갖는 것으로 알려져 식품의약품 안전처에서 미백활성 고시 원료로 지정하고 있으며 미백활성과 주름개선 등의 기능성 화장품 원료로 다양하게 사용되고 있다(Jeong et al., 2011). 한국화장품미용학회의 연구결과에 따르면 2019년에 천연 기능성 화장품의 수요가 전년대비 42% 증가한 것으로 확인되었으며 천연 기능성 화장품의 향후 지속적인 성장이 예상된다(Kang and Kim, 2020). 이러한 소비 증가는 미용 목적을 넘어 기능성을 강조하는 소비자의 구매 트렌드의 변화에서 기인하는 것으로 천연 소재를 이용한 화장품의 미백, 주름개선, 항산화와 노화억제 등의 효능이 과학적으로 증명됨에 따라 천연물 유래 성분의 화장품 소재화에 대한 관심은 더욱 커질 것으로 예상된다(Kang and Lee, 2017). 미세조류(microalgae)로부터 생산되는 카로티노이드, 플라보

*Corresponding author: Tel: +82. 41. 530. 2226 Fax: +82. §

E-mail address: kimjw1028@sunmoon.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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0271>

Korean J Fish Aquat Sci 54(3), 271-279, June 2021

Received 19 February 2021; Revised 16 March 2021; Accepted 4 June 2021

저자 직위: 김소희(대학생), 전성진(대학생), 김준희(대학원생), 염서희(대학생), 김진우(교수)

노이드, 지방산 등은 항산화, 항염증, 항균, 항암, 면역증진 등의 생리활성기능을 가진다고 보고되고 있으며 기능성 식품 분야에서 광범위하게 이용되면서 인체에 대한 안전성과 효능이 입증되었다(Lynch and Dianne, 2007). 그 중 *Spirulina platensis*는 배양이 용이하고 단위 면적당 바이오매스 생산량이 높아 기능성 식품으로 널리 이용되고 있는 미세조류 중 하나이다(Gwak et al., 2013; Jung et al., 2017).

하지만 기존의 *S. platensis*를 이용한 생리활성 물질 생산 연구는 페놀산, 토코페롤, 카로틴과 프로스타글라딘을 중심으로 항산화, 항염증, 항알러지 및 항혈소판 응집 효과에 집중되어 미백과 주름방지를 포함한 화장품 소재로서의 기능성에 관한 연구는 미흡한 실정이다(Kay and Barton, 1991; Yang et al., 1997). 이에 본 연구에서는 *S. platensis*로부터 기능성 소재 물질을 추출하여 피부 미백과 주름개선용 소재를 생산하고자 초음파 추출법을 진행하였다. 또한 효과물질의 생산 증대를 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용한 추출 주요변수의 최적화를 진행하여 추출효율을 높일 수 있는 공정개발을 수행하여 *S. platensis*의 상업적 가치를 높이고자 하였다(Godbout et al., 1992; Bezerra et al., 2008; Said and Amin, 2015).

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용된 *S. platensis*는 (주)푸른산(Seoul, Korea)에서 구매 후 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 추출용매는 1차 증류수와 에탄올 99.5% (Samchun, Seoul, Korea)를 이용하였고 미백과 주름개선 효능 평가를 위한 시약은 aluminum chloride, potassium acetate, 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), tyrosinase from mushroom, 4-phenylazobenzyloxy-carbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg와 collagenase from *Clostridium histolyticum*을 사용하였다. 타이로시네이즈와 콜라게네이즈 저해능 측정으로 kojic acid와 L-ascorbic acid를 각각 양성대조군으로 사용하였으며, 플라보노이드 함량 측정을 위한 표준물질로는 quercetin을 이용하여 검량선을 작성하였다. 분석에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 순도 99.5% 이상을 구입하여 사용하였다.

Table 1. Independent variables and their coded and actual levels for central composited design

X_i	Independent variable	Level				
		-1.68	-1	0	+1	+1.68
X_1	Extraction time (min)	5.0	15.0	30.0	45.0	55.0
X_2	Extraction temperature (°C)	26.0	40.0	60.0	80.0	94.0
X_3	Ethanol concentration (%)	0.0	20.0	50.0	80.0	99.5

통계학적 최적화

본 연구에서는 *S. platensis*로부터 항산화 활성 및 생리활성 물질 최적 추출조건을 예측하고자 RSM 중 중심합성계획모델(central composite design, CCD)을 이용하였다. 독립변수는 추출공정에서 중요변수로 고려되는 추출시간(X_1), 추출온도(X_2), 추출용매(X_3)로 지정하였고 선행연구에 따라 각 인자들의 범위를 설정하였으며, 추출조건은 추출시간(5.0-55.0분, X_1), 추출온도(26.0-94.0°C, X_2), 에탄올농도(0.0-99.5%, X_3)를 -1.68, -1, -0, 1, 1.68의 5단계로 부호화하여 CCD에 따라 17개의 추출조건으로 추출 후 실험을 진행하였다(Table 1). 통계 분석 및 처리는 Design-Expert software (Version 8; Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하였으며, 아래 식과 같은 2차 회귀방정식을 도출하였다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

여기서 Y 는 종속변수, β_0 는 상수, $\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ 는 회귀계수, X_i 와 X_j 는 독립변수를 각각 의미한다.

Table 2. Central composite design (CCD) matrix for independent variables with experimental values of total flavonoid content (TFC), collagenase inhibition activity (CIA), and tyrosinase inhibition activity (TIA)

Run No	Extraction condition			TFC (mg QE/g DM)	CIA (%)	TIA (%)
	X_1	X_2	X_3			
1	15.0	40.0	20.0	0.20	12.7	22.5
2	45.0	40.0	20.0	0.27	20.6	29.8
3	15.0	80.0	20.0	0.28	22.1	24.3
4	45.0	80.0	20.0	0.32	11.8	0.42
5	15.0	40.0	80.0	0.83	83.8	0.61
6	45.0	40.0	80.0	0.91	88.7	68.6
7	15.0	80.0	80.0	0.79	78.8	71.8
8	45.0	80.0	80.0	0.99	88.9	81.9
9	5.0	60.0	50.0	0.49	65.2	55.7
10	55.0	60.0	50.0	0.62	56.0	59.6
11	30.0	26.0	50.0	0.42	74.4	60.0
12	30.0	94.0	50.0	0.60	63.5	61.4
13	30.0	60.0	0.0	0.28	0.14	0.08
14	30.0	60.0	99.5	0.94	85.0	100.0
15	30.0	60.0	50.0	0.55	65.1	58.8
16	30.0	60.0	50.0	0.48	69.1	58.0
17	30.0	60.0	50.0	0.61	53.8	58.2

List of experiments planned in CCD for model optimization, X_1 , extraction time (min); X_2 , extraction temperature (°C); X_3 , ethanol concentration (%).

초음파 추출

초음파 추출을 위해 압력용기에 건조 분말 1.0 g과 농도 별 에탄올을 20 mL씩 혼합하고 초음파 발생장치(SD-D250H; Mujigae, Seoul, Korea)는 40 kHz, 200 W로 고정하고 독립변수를 변화시켜 추출을 진행하였다. 추출 후, 냉각수에 침지하여 추출 반응을 종료하였으며 원심분리기(Lobogene 1236R; Gyrozen, Daejeon, Korea)를 이용하여 4°C, 10,000 rpm으로 10분간 상등액을 분리 후 냉장 보관하여 사용하였다.

총 플라보노이드(Total flavonoid content, TFC) 측정

TFC 측정은 Zhishen et al. (1999)의 방법을 일부 수정하여 사용했다. 각각의 시료 0.1 mL에 증류수 0.56 mL와 에탄올 0.3 mL을 교반한 후 aluminum chloride 0.02 mL와 potassium acetate 0.02 mL를 가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 분리한 상등액은 분광광도계(Optizen 2120UV, KLab, Daejeon, Korea)를 이용하여 415 nm에서 측정하였으며 측정치는 mg quercetin equivalent (QE)/g dry matter (DM)로 표현하였다.

콜라게네이즈 저해능(Collagenase inhibitory activity, CIA) 측정

주름개선능을 평가하기 위한 CIA는 Kim et al. (2004)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 완충용액은 0.1 M tris와 4 mM CaCl₂ 혼합액에 1 M HCl을 첨가하여 pH 7.5로 조정하였으며, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (1.2 mg/mL)를 녹여 기질액을 제조하였다. 시료 및 양성대조군 0.05 mL에 효소 0.08 mg/mL와 제조한 기질액 0.125 mL를 가하여 37°C에서 30분간 반응을 진행하였고 citric acid 0.25 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 용액에 1.2 mL ethyl acetate를 첨가하여 상등액을 분리 후 320 nm에서 흡광도를 측정하였으며 측정된 CIA는 아래의 계산식을 이용하여 백분율로 표시하였다.

$$CIA (\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A, 시료의 흡광도; B, 대조군의 흡광도

Table 3. Second-order regression models developed by central composite design for the optimization of UAE process variabls of *Spirulina platensis*

Response	Second order polynomials	*R ²	P-value
TFC (mg QE/g DM)	$Y_{TFC} = 0.010 - 3.27 \times 10^{-3} X_1 + 4.29 \times 10^{-3} X_2 + 5.66 \times 10^{-3} X_3 + 3.81 \times 10^{-5} X_1 X_2 + 4.80 \times 10^{-5} X_1 X_3 - 1.96 \times 10^{-5} X_2 X_3 + 2.50 \times 10^{-5} X_1^2 - 2.24 \times 10^{-5} X_2^2 + 2.76 \times 10^{-5} X_3^2$	0.9466	0.0011
CIA (%)	$Y_{CIA} = -12.5 + 0.62 X_1 - 0.13 X_2 + 1.90 X_3 - 5.44 \times 10^{-3} X_1 X_2 + 4.84 \times 10^{-3} X_1 X_3 - 1.11 \times 10^{-3} X_2 X_3 - 9.16 \times 10^{-3} X_1^2 + 2.24 \times 10^{-3} X_2^2 - 9.63 \times 10^{-3} X_3^2$	0.9558	0.0006
TIA (%)	$Y_{TIA} = -25.27868 + 2.41 X_1 + 1.13 X_2 - 0.64 X_3 - 0.037 X_1 X_2 + 0.026 X_1 X_3 + 0.023 X_2 X_3 - 0.019 X_1^2 - 0.112 \times 10^{-3} X_2^2 - 7.98 \times 10^{-3} X_3^2$	0.8637	0.0236

TFC, total flavonoid content; CIA, collagenase inhibition activity; TIA, tyrosinase inhibition activity.

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) of second-order regression models on UAE of *Spirulina platensis*

Model	TFC (mg QE/g DM)			CIA (%)			TIA (%)		
	Sum of Squares	F-value	P-value	Sum of squares	F-value	P-value	Sum of squares	F-value	P-value
Model	0.99	13.78	0.0011	13753.15	16.83	0.0006	12220.94	4.93	0.0236
X ₁	0.026	3.30	0.1121	0.60	6.581E×10 ⁻³	0.9376	340.35	1.23	0.3032
X ₂	0.017	2.12	0.1884	37.78	0.42	0.5395	259.17	0.94	0.3645
X ₃	0.93	116.41	<0.0001	12728.14	140.18	<0.0001	7245.83	26.29	0.0014
X ₁ X ₂	1.047E×10 ⁻³	0.13	0.7274	21.31	0.23	0.6428	1013.90	3.68	0.0966
X ₁ X ₃	3.744E×10 ⁻³	0.47	0.5146	38.00	0.42	0.5383	1147.40	4.16	0.0807
X ₂ X ₃	1.117E×10 ⁻³	0.14	0.7188	3.58	0.039	0.8482	1606.14	5.83	0.0465
X ₁ ²	3.585E×10 ⁻⁴	0.045	0.8379	47.96	0.53	0.4909	212.88	0.77	0.4086
X ₂ ²	9.089E×10 ⁻⁴	0.11	0.7451	9.12	0.10	0.7605	118.84	0.43	0.5324
X ₃ ²	6.903E×10 ⁻³	0.87	0.3824	836.56	9.21	0.0190	573.59	2.08	0.1923

Model summary statistics for X₁, extraction time; X₂, extraction temperature; X₃, ethanol concentration; TFC, total flavonoid content; CIA, collagenase inhibitor activity; TIA, tyrosinase inhibitor activity.

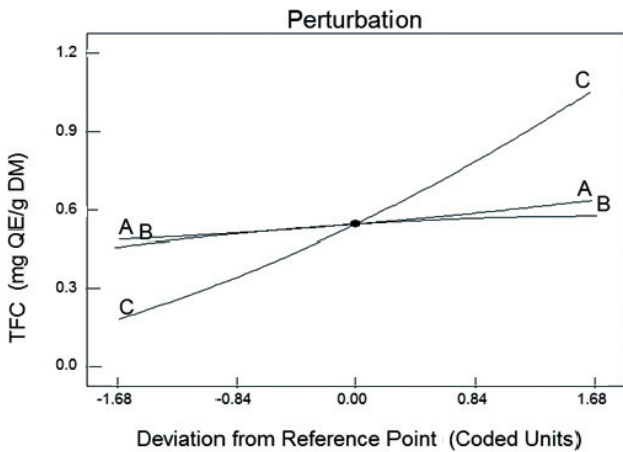


Fig. 1. Perturbation plot representing effects of UAE process variables on TFC. TFC, total flavonoid content.

타이로시네이즈 저해능(Tyrosinase inhibitory activity, TIA) 측정

TIA는 Flurkey (1991)의 방법을 변형하여 실험하였다. 완충용액은 sodium phosphate monobasic anhydrous와 sodium phosphate dibasic anhydrous를 혼합하여 pH 6.8로 제조하였으며, 이를 이용해 10 mM L-DOPA (2 mg/mL)의 기질액을 제조하였다. 완충용액 0.04 mL에 기질액 0.02 mL와 시료 및 양성대조군 0.02 mL을 혼합한 뒤 효소 0.02 mL를 첨가하여 교반하였다. 혼합액은 25°C에서 30분 반응을 진행하여 475 nm로 측정된 흡광도를 아래의 계산식을 이용하여 백분율로 표시하였다.

$$TIA (\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A, 시료의 흡광도; B, 대조군의 흡광도

결과 및 고찰

TFC 추출 최적조건 탐색

플라보노이드는 식물에 함유된 노란 색소로 ROS의 직접 소거 또는 산화효소 작용 저해를 통한 항산화 효능이 확인되어 플라보노이드가 다량 함유되어 있는 식물의 추출물은 항산화 및 항균효과가 높아 피부에 대한 보호효과를 보인다(Kim et al., 2010; Hong et al., 2012; Kim et al., 2013). 이에 본 연구에서 *S. platensis*로부터 피부 보호효과를 갖는 플라보노이드의 최적 추출조건을 탐색하였을 때, TFC는 0.20-0.99 mg QE/g DM으로 추출조건에 따른 차이를 나타냈고(Table 2), 최대값은 추출시간 45.0분, 추출온도 80.0°C, 에탄올 80.0%에서 0.99 mg QE/g DM로 확인되었다. 이를 기반으로 도출한 2차 회귀방정식을 Table 3에 나타냈으며 ANOVA를 통해 유의성과 적합성

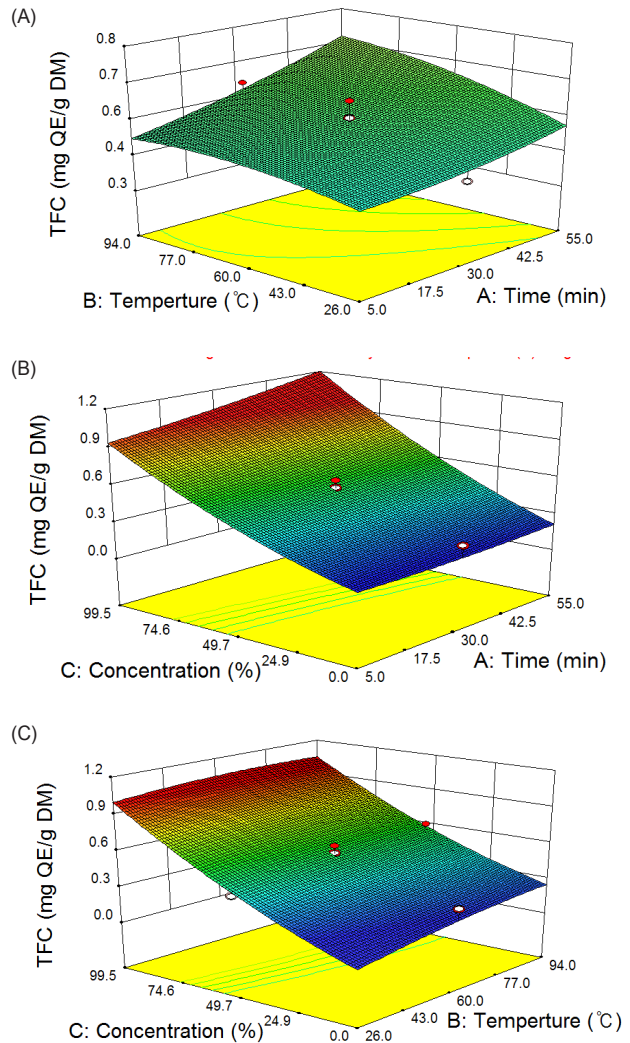


Fig. 2. Response surface plots showing the effect of the extraction time (A), extraction temperature (B), and ethanol concentration (C) on TFC concentration. TFC, total flavonoid content.

을 평가하였다. 결정계수(R²)는 실험설계의 적합성을 나타내는 통계적 지표이며, 유의확률(P-value)은 0.05 이하에서 통계적인 유의성을 나타낸다(Shishir et al., 2016). 본 실험의 결정계수(R²)는 0.9466, P-value는 0.0011로 유의수준인 0.05 이하의 값을 나타내었으며 특히 에탄올농도는 TFC 수율에 가장 유의적인 영향을 주는 독립변수로 확인되었다(Table 4). 두 독립변수를 중앙값에 고정하고 하나의 독립변수를 변화시켜 TFC의 변화를 시각화한 일변수곡선을 Fig. 1에 나타내었다. 추출시간과 추출온도에 따른 변화는 미미한 반면, 에탄올농도 증가에 따라 TFC 수율이 급격하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 앞선 ANOVA에서 독립변수 중 에탄올농도에 유의성이 나타난다는 결과와 일치하였으며 ANOVA에서 확인된 각 독립 변수들

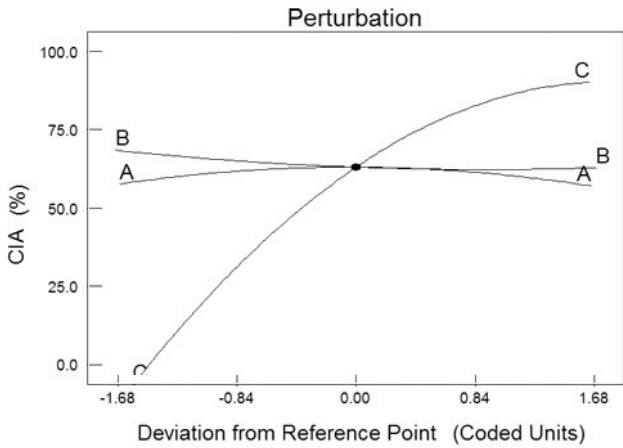


Fig. 3. Perturbation plot representing effects of UAE process variables on CIA. CIA, collagenase inhibition activity.

의 상호 작용을 분석하고자 독립변수 하나를 중앙값에 고정하고 두 개의 독립변수를 동시에 변화시켜 TFC의 변화를 3차원 반응표면곡선으로 도식화하여 Fig. 2에 나타내었다. 추출시간과 추출온도의 상호작용을 나타낸 Fig. 2A는 두 독립변수에 따른 TFC 수율의 변화가 미미한 것을 확인한 반면 Fig. 2B와 Fig. 2C에서는 에탄올농도의 변화에 따른 TFC의 변화량이 큰 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 에탄올 농도가 추출시간과 추출온도에 비해 TFC에 보다 유의한 영향을 미치는 인자임을 확인하였고 이러한 양상은 Kim and Hong (2012)의 야관문(*Lespedeza cuneata*) 에탄올 추출 시 에탄올 농도 증가(10.0-90.0%)에 따라 TFC가 증가하는 것으로 확인되었으며 이는 보고된 결과와 유사함을 확인할 수 있었다(Kim and Hong, 2012). 본 실험의 17개 추출조건을 기준으로 확인된 *S. platensis*의 최적 추출공정은 추출시간 45.0분, 추출온도 80.0°C, 에탄올 80.0%의 추출조건(Run #8)이며, 이 조건에서의 TFC는 0.99 mg QE/g DM으로 확인되었다. 식물의 세포벽에 존재하는 페놀성 화합물은 용매의 극성에 따라 추출수율이 달라진다고 보고된 바 있어 에탄올농도 증가가 *S. platensis*로부터 플라보노이드 추출을 증대시켜 TFC 수율에 영향을 미친 것으로 보여지며, 이에 *S. platensis*의 TFC 추출 최적화는 에탄올농도의 설정을 우선적으로 진행되어야 할 것으로 예측된다(Kim et al., 1995; Cha et al., 2006).

CIA 추출 최적조건 탐색

피부의 진피층에는 콜라겐, 엘라스틴, 피브로넥틴 및 히알루론산 등의 extracellular matrix (ECM) 단백질들이 상호적으로 가교결합을 형성하면서 피부 탄력과 진피의 지지층을 구성하는데 피부의 탄력을 제공하는 콜라겐은 콜라게네이즈에 의해 분해가 진행되면서 진피층의 지지층 감소로 인해 주름이 발생하게 된다. 일반적으로 ECM 단백질의 대부분이 콜라겐으로 구성

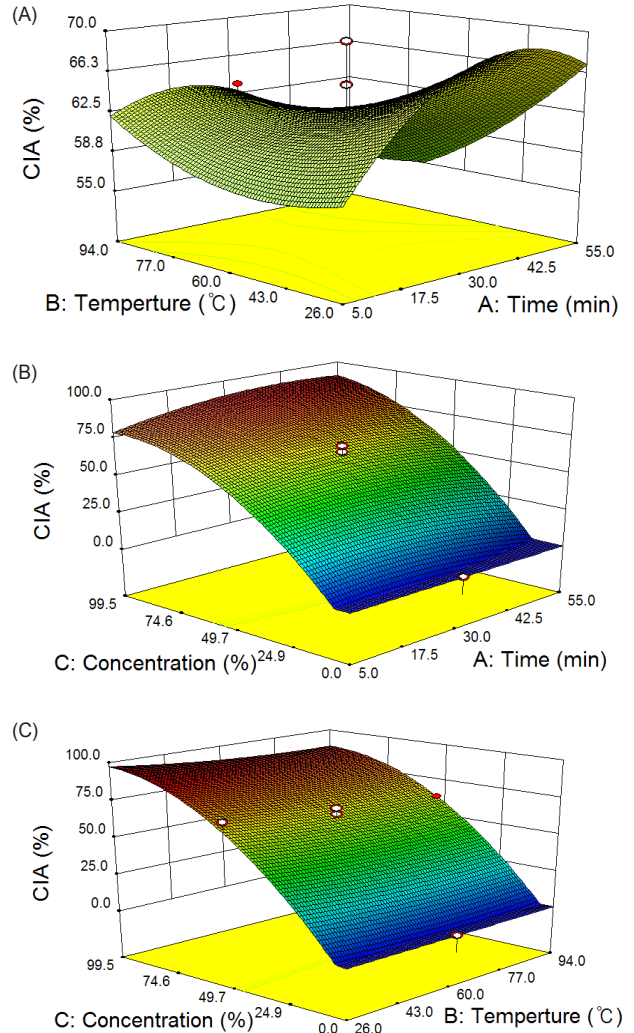


Fig. 4. Response surface plots showing the effect of the extraction time (A), extraction temperature (B), and ethanol concentration (C) on CIA. CIA, collagenase inhibition activity.

되어 있어 콜라겐의 분해가 주름생성에 가장 큰 영향을 미치므로 주름생성 억제를 위해서는 콜라게네이즈의 활성을 저해하는 저해제의 개발이 필요하다(Yang et al., 2016). 이에 본 연구에서는 *S. platensis*의 콜라게네이즈 저해 활성을 확인하기 위해 17개의 추출조건을 확립하여 가장 효율적인 추출 최적조건을 도출하고자 하였다. 최적화 결과에 있어 CIA는 0.1-88.9%로 나타났으며 추출시간 45.0 분, 추출온도 80.0°C과 에탄올 80.0%에서 CIA 88.9%로 최대활성을 나타냈다(Run #8). 도출된 결정계수(R²)는 0.9558로, 2차 회귀방정식이 UAE (ultrasound-assisted extraction) 최적조건 예측을 위한 모델로 적합하다는 것이 입증되었으며 ANOVA를 확인한 결과 P-value는 0.0006으로 2차 회귀방정식이 결과값을 예측하는데 적합하다

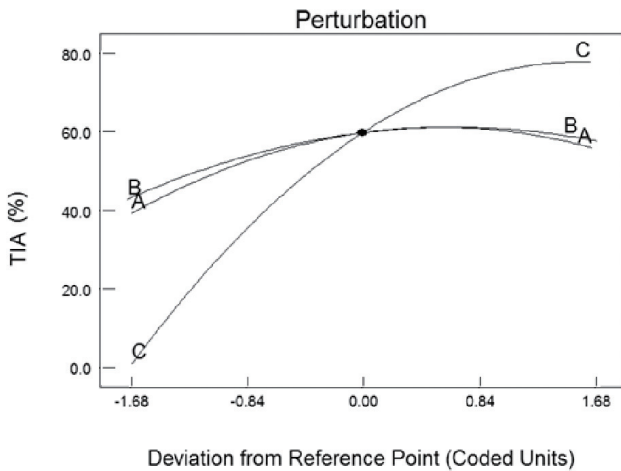


Fig. 5. Perturbation plot representing effects of UAE process variables on TIA. TIA, tyrosinase inhibition activity.

고 판정되었다(Table 3). 각 독립변수에 대한 일차항의 유의성을 나타내는 값은 추출시간($P=0.9376$)과 추출온도($P=0.5395$)에 비해 에탄올농도($P<0.0001$)가 보다 유의한 것으로 확인되었다(Table 4). 두 독립변수를 중앙값에 고정하고 하나의 독립변수의 변량을 시각화한 일변수곡선(Fig. 3)에서 추출시간과 추출온도에 따른 CIA의 변화폭은 작으나 에탄올농도에 따른 CIA의 변화폭은 크게 나타났으며 이는 앞선 ANOVA에서 에탄올농도가 다른 두 독립변수에 비해 CIA에 미치는 영향력이 크다는 결과와 일치하였다. 두 독립변수의 상호작용에 따른 CIA를 확인하고자 3차원 반응표면곡선으로 도식화하여 Fig. 4에 나타내었다. 추출시간과 추출온도의 영향을 평가하였을 때 두 독립변수에 따른 CIA의 영향은 미미한 반면(Fig. 4A), 에탄올농도가 포함된 Fig. 4B와 Fig. 4C에서는 CIA에 유의한 영향을 보여 에탄올 농도가 결과에 큰 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 캄보디안 상항버섯 추출물의 주름개선 효과 연구를 확인한 결과에서 에탄올농도의 영향이 가장 크다는 보고와 유사하였다(Cheon et al., 2008). 본 실험의 추출공정 최적화는 추출시간 30.0분, 추출온도 58.0°C, 에탄올 96.0%에서 CIA는 90.0%로 확인되었다. 피부 내 콜라겐의 80%를 차지하는 type-I 콜라겐은 콜라게네이즈를 포함한 단백질 분해효소 MMP-1에 의해 분해되는데, 폐놀성 화합물은 방향족 고리의 OH기는 활성산소를 제거하는 동시에 MMP-1의 발현을 억제하여 콜라겐분해 및 주름형성을 저하시킨다고 보고된 바 있다. 이에 *S. platensis* 추출물이 기능성 화장품의 원료로 활용 가능성이 확인되어, 추가실험을 통해 에탄올농도에 따른 폐놀성 화합물과 CIA를 동시에 증가시키는 최적화 수행이 필요하다고 사료되는 바이다(Kim et al., 2005; Davias and Saunder, 2006; Greenlee et al., 2007; Kang et al., 2007; Jung et al., 2014; Lee and Lee, 2016).

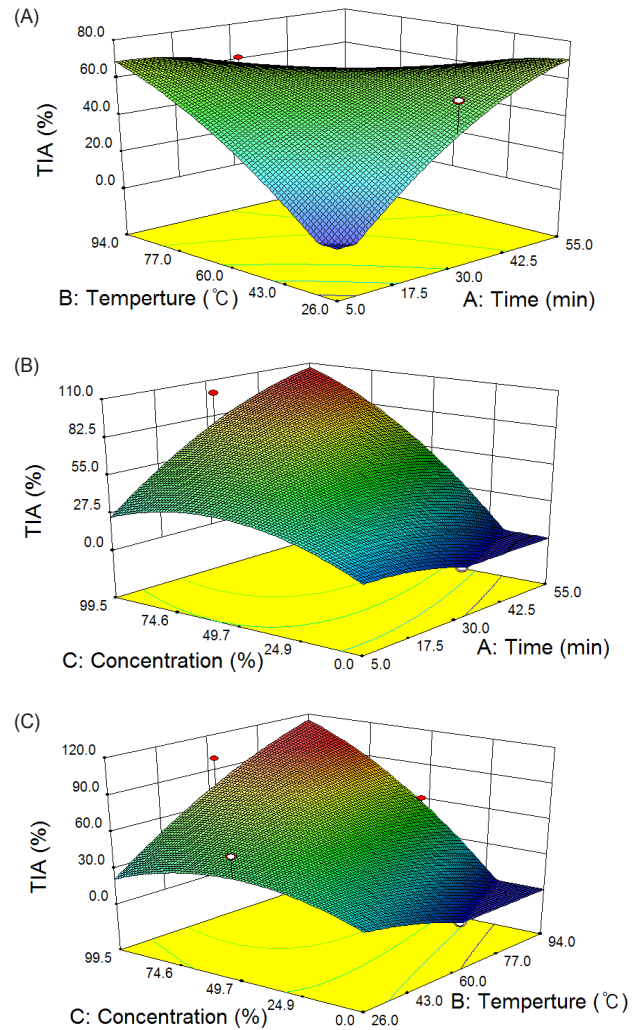


Fig. 6. Response surface (3-D) showing the effect of the extraction time (A), extraction temperature (B) and ethanol concentration (C) on TIA. TIA, tyrosinase inhibition activity.

TIA 추출 최적조건 탐색

피부 표피 기저층에서의 멜라닌 과잉 생성은 기미, 점 및 검버섯 등의 색소침착과 노화 및 피부 손상을 유발하는데, 이는 멜라닌 생성의 주요 효소인 타이로시네이즈를 억제함에 따라 완화되며 이를 통해 미백효과 증진이 가능하다(Imokawa and Mishima, 1980; Laskin and Piccinini, 1986). 본 연구에서는 타이로시네이즈 억제를 최대화하고자 CCD를 기반으로 하여 2차 회귀방정식을 도출해 UAE 공정의 최적조건 예측을 진행하였다(Table 2). 17개 추출조건에 따른 결과값을 비교했을 때, 추출시간 30.0분, 추출온도 60.0°C와 에탄올 99.5%에서 최댓값 100%의 결과를 확인할 수 있었다(Run #14). 실험 결과에 기반하여 도출된 2차 회귀방정식을 Table 3에 나타내고 ANOVA를

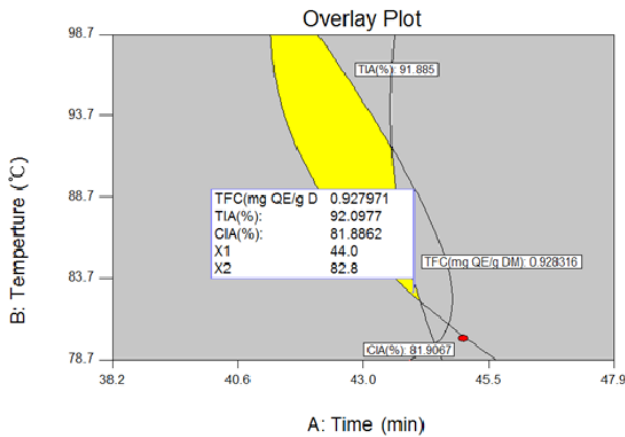


Fig. 7. Superimposed contour plots showing the optimized condition of extraction time, extraction temperature, and ethanol concentration for the maximization of TFC, CIA and TIA simultaneously. TFC, total flavonoid content; CIA, collagenase inhibition activity; TIA, tyrosinase inhibition activity.

통해 통계적 지표를 확인하였을 때, 결정계수(R^2)는 0.8637, P-value는 0.0236으로 유의성이 인정되어 최적조건 예측에 적합한 모델로 확인되었다. 각 독립변수가 종속변수에 미치는 유의성을 시각화하여 일변수곡선으로 나타내었을 때(Fig. 5), 에탄올농도($P=0.0014$), 추출시간($P=3032$), 추출온도($P=0.3645$)의 순으로 결과에 유의한 영향을 주었다. 두 독립변수의 상관관계를 Fig. 6에 3차원 반응표면곡선으로 확인하였을 때, Fig. 6A에서 추출시간과 추출온도가 증가함에 따라 TIA가 일정 수준까지 증가하다 점차 감소하는 경향을 보였으나 에탄올농도의 증가에 따라 TIA가 계속 증가되는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 6B, 6C). 이는 왕호장근 뿌리로부터 에탄올(10.0-100.0%)을 이용한 추출에 있어 에탄올농도가 증가함에 따라 TIA수율이 증가된다는 연구결과와 일치하였다(Lee et al., 2016). 이러한 결과의 해석은 페놀성 화합물이 타이로신의 기질유사체로 작용하여 타이로시네이즈 활성을 저해시키고 타이로시네이즈에 의해 발생하는 가역적 산화반응 물질들을 환원시켜 멜라닌 생합성반응을 억제한다는 것에서 찾을 수 있다(Boissy and Manga, 2004; Kim and Uyama, 2005). 따라서 *S. platensis* 추출물에 존재하는 플라보노이드와 같은 페놀성 화합물이 타이로시네이즈 활성을 저해시키며 TIA 효율을 높이기 위해서는 에탄올농도를 우선적으로 설정하여 최적화가 진행되어야 함을 확인하였다(Sugumaran, 2002).

최적조건 탐색

본 연구는 *S. platensis*의 항산화 활성, 미백 및 주름개선 효과를 증진을 위한 추출공정개발을 위해 3개 종속변수를 동시에 최대화하는 것을 제한조건으로 하여 각각의 반응표면을 중첩(superimposing)하여 최적점을 예측하였다(Fig. 7). 각 종속변

수에서 유의한 결과를 나타낸 에탄올 농도를 96.0%로 고정된 상태로 추출시간 5.0-55.0분, 추출온도 26.0-94.0°C의 범위에서 최적점을 구했을 때 추출시간 44.0분, 추출온도 82.8°C와 에탄올 96.0%로 예측되었다. 본 조건에서의 예측값은 TFC 0.93 mg QE/g DM, CIA 81.9%와 TIA 92.1%이었고, 검증 실험을 진행한 결과 TFC 0.99 mg QE/g DM, CIA 88.9%와 TIA 81.9%로 확인되었으며 예측값과 실험값이 유사한 결과를 나타내어 CCD를 기반으로 한 UAE 공정의 효과적인 최적화가 수행되었음을 입증하였다. 본 연구의 결과로 *S. platensis* 추출물의 미백과 주름개선 효과를 확인하였고 초음파 추출법을 이용하여 *S. platensis*로부터 보다 효과적인 생리활성물질 추출을 조건을 도출하였으며 향후, 이를 활용하여 *S. platensis* 추출물의 화장품 소재화와 추출공정 표준화에 있어 유용한 정보를 제공할 것으로 기대된다.

References

Boissy RE and Manga P. 2004. On the etiology of contact/occupational vitiligo. *Pigment Cell Res* 17, 208-214. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>.

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS and Escalera LA. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 16, 965-977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>.

Cha JY, Jeong JJ, Kim YT, Seo WS, Yang HJ, Kim JS and Lee YS. 2006. Detection of chemical characteristics in Hamcho (*Salicornia herbacea L.*) according to harvest periods. *Korean J Life Sci* 16, 683-690. <https://doi.org/10.5352/JLS.2006.16.4.683>.

Cheon SJ, Jang MJ, Jang YA, Choi EY, Jun DH, Kim YH and Choi KI. 2008. Anti-wrinkle effect of *Cambodian Phellinus linteus* extracts. *Korean J Life Sci* 18, 1718-1721. <https://doi.org/10.5352/JLS.2008.18.12.1718>.

Davias GE and Saunder WB. 2006. Molecular balance of capillary tube formation versus regression in wound repair: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J Invest Dermatol Symp Proc* 11, 44-56. <https://doi.org/10.1038/sj.jidsymp.5650008>.

Flurkey WH. 1991. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J Food Sci* 56, 93-95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb07983.x>.

Godbout N, Salahub DR, Andzelm J and Wimmer E. 1992. Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I: Boron through neon, optimization technique and validation. *Can J Chem* 70, 560-571. <https://doi.org/10.1139/v92-079>.

Greenlee KJ, Werb Z and Kheradmand F. 2007. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physio Rev* 87, 69-98. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2006>.

Gwak GD, Kim MS and Kwak DH. 2013. Particle separation

- characteristics and harvesting efficiency of *Spirulina platensis* using micro-bubble. *J Korean Soc Water Wastewater* 27, 621-629. <https://doi.org/10.11001/jksww.2013.27.5.621>.
- Hong MS, Yoon YM, An SW, An IS and Byun BH. 2012. Protective effects of the natural ingredient quercetin in human dermal fibroblasts. *Kor J Aesthet Cosmetol* 10, 571-579.
- Imokawa G and Mishima Y. 1980. Isolation and characterization of tyrosinase inhibitors and their differential action on melanogenic subcellular compartments in amelanotic and melanotic melanomas. *Br J Dermatol* 103, 625-634. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1980.tb01684.x>.
- Jeong HR, Jo YN, Jeong JH, Jin DE, Song BG and Heo HJ. 2011. Whitening and anti-wrinkle effects of apple extracts. *Korean J Food Preserv* 18, 597-603. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2011.18.4.597>.
- Jung HK, Choi MO, Kim BJ, Jo SK and Jeong YS. 2014. Improving the efficacy of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on ultraviolet-induced photoaging. *Korean J Food Preserv* 21, 264-275. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2014.21.2.264>.
- Jung S, Lee H and Li S. 2017. A Study on the effect of *Spirulina*-containing cosmetics using micro-needle. *J Korean Acad Industr Coop Soc* 18, 269-276. <https://doi.org/10.5762/KAIS.2017.18.6.269>.
- Kang KS, Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Oh SH, Kim MA, Jung HJ, Kang HY and Ha BJ. 2007. The evaluation of anti-wrinkle effects in oriental herb extract. *Korean J Life Sci* 17, 1147-1151. <https://doi.org/10.5352/JLS.2007.17.8.1147>.
- Kay RA and Barton LL. 1991. Microalgae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci Nutr* 30, 555-573. <https://doi.org/10.1080/10408399109527556>.
- Kim DI and Hong JH. 2012. Optimization of ethanol extraction conditions for functional components from *Lespedeza cuneata* using response surface methodology. *Korean J Life Sci* 28, 275-283. <https://doi.org/10.9724/kfcs.2012.28.3.275>.
- Kim DJ, Oh SK, Yoon MR, Chun AR, Hong HC, Lee JS and Kim YK. 2010. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the 70% ethanol extracts from brown and milled rice by cultivar. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39, 467-473. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.3.467>.
- Kim HH, Lee MJ, Lee SR, Kim KH, Cho KH, Eun HC and Chung JH. 2005. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech Ageing Dev* 126, 1170-1177. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.06.003>.
- Kim JY, Maeng YS and Lee KY. 1995. Antioxidative effects of soybean extracts by using various solvents. *Korean J Food Sci Technol* 2, 635-639.
- Kim SC, Ryu HM, Jung SM, Lee YH, Kim HS, Kim JO, Cho YU and Cho SJ. 2013. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of *Hypsizygus marmoreus* (brown cultivar) methanol extracts. *J Mushroom* 11, 254-260. <https://doi.org/10.14480/JM.2013.11.4.254>.
- Kang MJ and Kim JH. 2020. A study on the differences between aging and consciousness of consumption according to the actual condition of medical cosmetics by women in their 20s and 40s. *J Korean Soc Cosmet Cosmet* 10, 215-234.
- Kang YN and Lee IH. 2017. The effect of hospital workers cosmetic cosmetics product selection on marketing communications. *J Korean Acad Industr Coop Soc* 18, 88-98. <https://doi.org/10.5762/KAIS.2017.18.8.88>.
- Kim YJ and Uyama H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 62, 1707-1723. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y>.
- Kim MJ, Kim JY and Choi SW. 2004. Anti-wrinkle effect of safflower (*Carthamus tinctorius L.*) seed extract. *J Soc Cosmet Sci Korea* 30, 449-456.
- Kim YS, Hwang JW, Shin WB and Park JS. 2018. Antioxidant activity and protective effect of extracts from *Vitis vinifera* root on t-BHP induced oxidative stress in chang cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47, 136-142. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2018.47.2.136>.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A and Watanabe T. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62, 1186-1197. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.011>.
- Laskin JD and Piccinini LA. 1986. Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J Biol Chem* 261, 16626-16635. [https://doi.org/10.1016/50021-9258\(18\)66613-X](https://doi.org/10.1016/50021-9258(18)66613-X).
- Lee DH, Ha HY and Lee PJ. 2016. Antioxidant activity and tyrosinase inhibitory effects of *Fallopia sachalinensis* rhizome ethanol extract. *J Invest Cosmetol* 12, 15-20. <https://doi.org/10.15810/jic.2016.12.1.003>.
- Lee SH and Lee SO. 2016. Polyphenol contents and antioxidant activities of lentil extracts from different cultivars. *J Korean Soc Nutr* 45, 973-979. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.7.973>.
- Lynch N and Dianne B. 2007. Differences in perceived risks and benefits of herbal, over-the-counter conventional, and prescribed conventional, medicines, and the implications of this for the safe and effective use of herbal products. *Complement Ther Med* 15, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2006.06.007>.
- Rhee SG. 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 31, 53-59. <https://doi.org/10.1038/emmm.1999.9>.
- Rittié L and Fisher GJ. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 1, 705-720. [https://doi.org/10.1016/S1568-1637\(02\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S1568-1637(02)00024-7).
- Said KAM and Amin MAM. 2015. Overview on the response surface methodogly (RSM) in extraction processes. *J Appl*

- Sci Process Eng 2, 8-17. <https://doi.org/10.33736/jaspe.161.2015>.
- Shishir MRI, Taip FS, Aziz NA, Talib RA and Sarker MSH. 2016. Optimization of spray drying parameters for pink guava powder using RSM. Food Sci Biotechnol 25, 461-468. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0064-0>.
- Sugumaran M. 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. Pigment Cell Res 15, 2-9. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.00056.x>
- Torres M and Forman JH. 2003. Redox signaling and the MAP kinase pathways. Biofactors 17, 287-296. <https://doi.org/10.1002/biof.5520170128>.
- Wang Y, Johnson AR, Ye QZ and Dyer RD. 1999. Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. J Bio Chem 274, 33043-33049. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.33043>.
- Yang HN, Lee EH and Kim HM. 1997. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. Life Sci 61, 1237-1244. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)00668-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)00668-1).
- Yang WT, Kim KS, Kwon YS, Kim DH and Kim DH. 2016. Whitening and anti-aging effects of *Cistanche deserticola* extract. J Plant Biotechnol 43, 492-499. <https://doi.org/10.5010/JPB.2016.43.4.492>.
- Zhishen J, Mengcheng T and Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 64, 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).