Journal of Convergence for Information Technology
Vol. . No. , pp. 115-123, 2021
e-ISSN 2586-4440
DOI : https://doi.org/10.22156/CS4SMB.2021.11.09.115

산말의 항산화 및 멜라닌 생성 억제활성

남영선[1], 강상모[2*]
[1]건국대학교 생물공학과 학생, [2]건국대학교 생물공학과 교수

Characterization of Antioxidant, Melanogenic activity of Fuctions by Sanmal and D-Mannuronic Acid

Young-Sun Nam[1], Sang-Mo Kang[2*]
[1]Student, Division of Biological Engineering, Konkuk University
[2]Professor, Division of Biological Engineering, Konkuk University

요 약 본 연구는 산말 3종류 Desmarestia dudresnayi subsp. Tabacoides (담배잎산말), Desmarestia viridis (쇠꼬리산말), Desmarestia ligulate (참산말) 잎 추출물의 항산화 및 항 멜라닌 활성에 대한 기능적 연구를위해 수행하였다. 3종류의 산말 중 담배잎산말 추출물이 2.5 mg / mL의 농도에서 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성이 각각 68.0 % ± 1.9 % 및 84.6 % ± 1.7 %로 강한 항산화력을 나타냈다. 질소 (NO) 라디칼 소거 활성은 91.6 % ± 1.1 %의 높은 항산화능을 보였다 산말 추출물을 이용한 B16F10세포의 세포독성은 100 μg/mL 농도에서 3종의 산말 추출물이 모두 85% 이상의 세포 생존률을 보였고, 100 μg / mL농도에서 담배잎산말 및 쇠꼬리산말이 70% 이상의 멜라닌 억제효과를 보였다. 이러한 내용은 산말이 항산화 및 항 멜라닌 활성과 같은 천연 화장품 소재로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

주제어 : ABTS, Anti-oxidant, Anti-melanin, *Desmarestia viridis*, DPPH

Abstract This study investigated the functional study in anti-oxidant and anti-melanin activity by Desmarestia dudresnayi subsp. Tabacoides, Desmarestia viridis, Desmarestia ligulate leaf extracts. The DPPH radical scavenging activity of D. viridis extract showed a high antioxidant activity of 68.0 ± 1.9% at the concentration of 2.5 mg / mL, the ABTS and scavenging activity showed a high antioxidant activity of 84.6 ± 1.7% at the concentration of 2.5 mg / mL, and the NO radical scavenging activity was 2.5. It required a high antioxidant capacity of 91.6 ± 1.1% at mg/mL concentration. In addition, in B16F10 cells, at a concentration of 100 μg/mL, D. viridis extract is 35.0 ± 1.7% melanin among, which has the lowest amount of melanin among the three species. With these contents, it seems that there is a possibility that D. viridis could be developed as a cosmetic material. These results D. viridis considered that it can be used as a natural cosmetic material such as anti-oxidant and anti-melanin activity.

Key Words : ABTS, Anti-oxidant, Anti-melanin, *Desmarestia viridis*, DPPH

1. 서론

세포의 산화스트레스를 발생시키는 원인은 hydroxide radical (·OH), hydrogen peroxide (H_2O_2) 및 superoxide ion (O_2-)과 같은 reactive oxygen species (ROS)를 통해 발생되며, 내인성 및 외인성 항산화를 통해 ROS를 제거한다[1]. 항산화 현상은 대사 과정에서 매우 다양하게 반응하며 과도한

*Corresponding Author : Sang-Mo Kang(betty-byun@hanmail.net)
Received June 26, 2021
Revised August 28, 2021
Accepted September 20, 2021
Published September 28, 2021

ROS의 발생은 심혈관 질환, 암 및 다양한 질병에 이르기까지 신체에 유해하게 작용한다[2-4]. ROS를 비활성화시키는 항산화 메커니즘은 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase와 같은 효소 또는 bilirubin 및 albumin과 같은 비효소 화합물, Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2)와 같은 전사인자를 발현시켜 산화 스트레스를 제거한다[5].

해조류는 44종의 다양한 종이 보고되고 있으나, 실제로 가공되어 이용되는 해조류는 8종류 정도로 큰 부가가치를 창출시키지 못하는 특징을 갖는다. 해조류 중 산말은 삼척 연안해역에 구멍갈파래, 미역, 잔금분홍잎 및 괭생이모자반과 더불어 쇠꼬리산말(*Desmarestia viridis*) 이 상위 우점 5종의 피도를 갖는다. 또한, 동해안 중부의 해조류군집에서 담배잎산말 (*Desmarestia dudresnayi* subsp. tabaco- ides), 참산말 (*Desmarestia ligulata*)이 해양수산생명자원 목록에 수록되어 있으며[6,7], 산말에 대한 생리활성 연구는 효소산화억제제 개발연구, 방산선 항암치료 보호효과, Raw264.7 세포에서 NO, PGE2 저해 및 항염증 관련 싸이토카인 증가 등에 대해 보고되었다[8-10]. 또한, 선행연구를 통해 NO, IL-17, IL-4, 및 TNF-α를 조절하는 것을 확인하였고, 항염증 외 다른 기능성 연구의 필요성이 있음을 인지하였고, 산말과 같은 동해안 대표 해조류를 이용한 기능성 연구는 부족한 실정이며, 가치 창출을 위한 생리활성 연구가 필요하였다.

따라서 본 연구에서는 연구가 많이 이뤄지지 않은 산말 3종류 담배잎산말, 쇠꼬리산말 및 참산말을 이용하여 항산화 및 항미백 기능성을 탐색하고, 화장품 원료의 기초 자료로 이용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

실험에 사용된 담배잎산말, 쇠꼬리산말 및 참산말 추출물 3종은 해양생명자원통합정보시스템 (Marine Bio Resource Information System, MBRIS)를 통해 국립해양생물자원관에서 분양 받아 100% 에탄올로 27℃에서 24시간 추출하여 사용하였다.

2.2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) 소거능 측정

각 추출물은 70% ethanol을 이용하여 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL의 농도가 되도록 희석하여 사용하였다. DPPH는 95% ethanol에 0.1 mM을 4배 희석하여 520 nm에서 흡광도가 0.5로 제조하였다. 추출물 용액 200 μL와 DPPH 용액 1.80 mL를 tube에 주입 후 혼합하여 30분간 반응시켰다. 반응물은 UV-Vis spectrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare, USA)를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였고, DPPH radical scavenging activity는 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도를 구하여 아래와 같이 백분율로 표시하였다.

Radical scavenging activity (%) = (OD520nm of blank - OD520nm of sample) / OD520nm of blank * 100

2.3 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic) acid (ABTS) radical 소거능 측정

각 추출물은 70% ethanol로 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL의 농도로 희석하여 사용하였다. ABTS는 2.5 mM 농도로 pH 7.40인 5 mM potassium phosphate buffer (PBS)에 희석한 뒤 oxidizing agent로서 manganese dioxide를 첨가하여 발색시켰다. 740 nm에서 Whatman No. 2 filter paper를 이용하여 manganese dioxide를 제거한 후 pH 7.4, 5 mM PBS으로 희석하여 흡광도가 0.5가 되도록 하였다. 추출물 용액 200 μL와 ABTS 용액 1.80 mL를 tube에 주입 후 혼합하여 30분간 반응시켰다. 반응물은 UV-Vis spectrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare, USA)를 이용하여 740 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였고, ABTS radical scavenging activity는 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도를 구하여 아래와 같이 백분율로 표시하였다.

Radical scavenging activity (%) = (OD740nm of blank - OD740nm of sample) / OD740nm of blank * 100

2.4 Nitrite radical (NO) scavenging activity 측정

각 추출물은 70% ethanol로 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL의 농도로 희석하여 사용하였다. Griess reagent는 5% phosphoric acid (TCI, Japan) 용액에 1% sulfanilamide (TCI, Japan)를 녹인 용액 A와 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (TCI, Japan) 용액을 혼합하여 제조하였다. 각 농도의 추출물 1 mL와 1 mM potassium nitrite ($NaNO_2$, Sigma, USA) 용액 1 mL를 혼합한 뒤 pH 3의 0.2 M citrate buffer (Junsei, Japan)를 제조하여 8 mL를 혼합하였다. 혼합용액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 1 mL와 2% acetic acid 용액 2 mL, Griess reagent 0.4 mL를 반응시켰다. 실온에서 15분간 반응시킨 뒤 OD520nm를 측정하였다. NO radical 소거능의 계산은 다음과 같이 계산하였다.

NO scarvenging rate(%) = (1 - (OD520nm of sample/ OD520nm of blank))*100

2.5 Total phenolic content 측정

각 추출물은 70% ethanol로 1.0 mg/mL를 제조하여 사용하였다. Sodium carbonate (NaCO3) 포화용액은 증류수에 과량의 sodium carbonate를 용해시킨 뒤, Whatman No. 2 filter paper를 이용하여 sodium carbonate를 필터링하였다. 추출물 10 μL와 Folin-Ciocâlteu reagent 0.01 mL, sodium carbonate 포화용액 60 μL를 micro tube에 주입한 뒤 15분간 반응시켰다. 그 후 증류수 0.20 mL를 주입하여 원심분리 후 상층액을 분리하였다. 반응물은 UV-Vis spectrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare, USA)를 이용하여 740 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 gallic acid를 사용하였다.

2.6 환원력(Reducing power)

각 추출물은 DMSO에 2.5, 5.0, 10.0 mg/mL의 농도로 희석하여 사용하였다. 추출물 0.05 mL와 sodium phosphate buffer (pH 6.6) 500 μL, 1% potassium ferricyanide 500 μL를 tube에 주입한 뒤 20분간 50℃에서 반응시켰다. 그 후 10% trichloroacetic acid 2 mL를 첨가하여 원심분리 후 상층액을 분리하였다. 그 후 상층액 0.10 mL와 0.1% ferric chloride 0.10 mL를 반응시킨 뒤 UV-Vis spectrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare, USA)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

2.7 세포 독성 실험

B16F10세포의 세포 독성을 평가하기 위해 Dulbecco modified eagle medium (DMEM) 445 mL, fetal bovine serum (FBS) 50 mL, penicillin-streptomycin solution 5 mL을 혼합하여 배양액을 제조하였다. 세포 배양은 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 추출물은 DMEM용액을 용매로 하여 B16F10세포에 100 μg/mL 농도로 제조하여 실험에 이용하였다.

세포독성실험은 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 각 well 당 3.0 × 10^4의 세포를 seeding하여 1일간 37℃, 5% CO_2조건에서 세포를 배양하였다. 배양 후 상층액을 회수한 뒤 DMEM 배지 180 μL와 추출물 희석액을 20 μL 주입하여 다시 2일간 배양하였다. 배양 후 추출물 희석액을 회수한 뒤 MTT solution을 5 mg/mL로 조제한 뒤 100 μL씩 처리하여 4시간 동안 결정화시켰다. 그 후 MTT solution을 다시 제거한 뒤, DMSO 100 μL를 처리하여 결정화된 MTT를 다시 용해시켜, 560 nm 흡광도를 통해 결정화된 MTT의 양을 측정하였다. MTT의 결정 생성은 NADH의 양과 비례하며, 생존한 세포수에 비례한다.

Survival rate (%) = (OD550nm of sample/ OD550nm of blank) * 100

2.8 Melanin 생성 억제능

Melanin 생성 억제능 실험에는 B16F10 cell을 사용하였다. 세포 배양에는 DMEM, FBS, penicillin-streptomycin solution을 사용하였으며, melanin 생성을 유도하기 위하여 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH, Sigma, USA)을 사

용하였다. DMEM 470 mL, FBS 25 mL, penicillin-streptomycin solution 5 mL을 혼합하여 배양액을 제조하였다. 세포 배양은 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 추출물 희석액은 DMEM용액을 용매로 하여 100 μg/mL 농도로 제조하였다. 96 well plate에 각 well 당 5.0 × 10^4 cell을 seeding하여 1일간 37℃, 5% CO_2조건에서 세포를 배양하였다. 배양 후 상층액을 회수한 뒤 α-MSH가 0.1 μg/mL 농도로 첨가된 DMEM 배지 180 μL와 추출물 희석액을 20 μL 주입하여 다시 4일간 배양하였다. 배양 후 405 nm 흡광도를 측정하였다. 405 nm 흡광도는 생성된 melanin의 양과 비례한다. Melanin 생성 억제능의 계산은 다음과 같이 계산하였다.

Melanin 생성 억제능(%) = (1 - (OD405nm of sample / OD405nm of blank)) * 100

2.9. Nitric oxide 생성 억제능

Nitric oxide 생성 억제능 실험에는 RAW 264.7 cell을 사용하였다. 세포 배양에는 DMEM, FBS, penicillin-streptomycin solution을 사용하였으며, 염증반응을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide (Sigma, USA)를 사용하였다. Nitric oxide 생성 억제능은 griess reagent를 이용하여 측정하였다. Griess reagent는 1% sulfanilamiden (TCI, Japan)를 5% phosphoric acid (Junsei, Japan)에 녹인 것과 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (TCI, Japan)수용액을 1 : 1 비율로 혼합한 것을 사용하였다. DMEM 445 mL, FBS 50 mL, antibiotics 5 mL을 혼합하여 배양액을 제조하였다. 세포 배양은 37℃, 5% CO_2조건에서 배양하였다. 추출물 희석액은 DMEM용액을 용매로 하여 12.5, 25.0, 50.0, 100 μg/mL 농도로 제조하였다.

96 well plate에 각 well 당 5.0×10^4 cell을 seeding하여 1일간 37℃, 5% CO_2조건에서 세포를 배양하였다. 배양 후 상층액을 회수한 뒤 lipopolysaccharide (LPS)가 1 μg/mL 농도로 첨가된 DMEM 배지 180 μL와 추출물 희석액을 20 μL 주입하여 다시 2일간 배양하였다. 배양 후 추출물 희석액의 상층액 100 μL을 회수한 뒤 Griess reagent을 100 μL씩 첨가하여 15분간 동안 반응시켰다. 그 후 540 nm 흡광도를 측정하였다. 540 nm 흡광도는 생성된 NO의 양과 비례한다. Nitric oxide 생성 억제능의 계산은 다음과 같이 계산하였다.

Nitric oxide 생성 억제능(%) = (1 - (OD540nm of sample/ OD540nm of blank))*100

2.10 통계분석

모든 생리활성 실험은 3회 반복 실험하여 수치화 했으며, 통계분석은 one-way 또는 two-way ANOVA로 신뢰구간 $p < 0.05$을 기준으로 검정하였다. 통계프로그램은 Graph Pad Prism 5 software (Graph Pad Software, Inc, La Jolla, CA, USA)를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 산말 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

천연물을 이용한 항산화능의 대표적인 항산화 평가법으로 분자 한 가운데의 질소 원자의 상태에 따라 라디칼 상태일 경우 보라색의 물질이며 라디칼이 사라지면 노란색으로 변한다.

DPPH 실험 결과는 Fig. 1과 같다. 담배잎산말, 쇠꼬리산말 및 참산말을 분석하였고 DPPH 소거능을 기준으로 담배잎산말, 참산말, 쇠꼬리산말 순으로 높은 항산화능을 보였다. 무처리군에서 OD값이 0.5인 반면 1.25 mg/mL의 농도에서 담배잎산말($p < 0.01$), 참산말($p < 0.001$) 및 쇠꼬리산말($p < 0.001$)에서 모두 유의미한 차이를 보였고, 산말 3종에서 모두 농도 의존적으로 항산화능력이 증가되었다. 2.5 mg/mL 의 농도에서 담배잎산말이 0.144 ± 0.014 abs (68.0 ± 1.9%)로 가장 높은 소거능을 보였으며, 산말 중 모든 농도에서 담배잎산말이 항산화 효과가 가장 높았다.

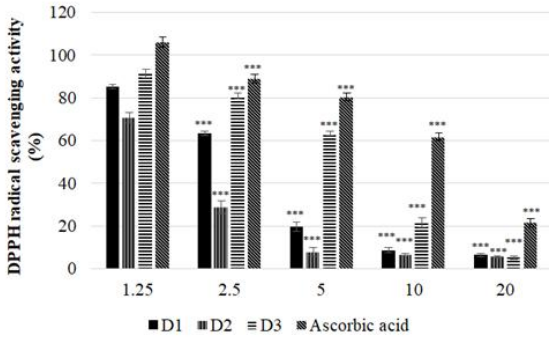

Fig. 1. Difference between antiradical parameters: DPPH radical scavenging activity.

DPPH radical scavenging activities of various concentrations of Desmarestia seaweed leaf phytochemicals extracted with solvents including ethanol. ***$p < 0.001$, compared with the control group; by Tow Way ANOVA and Bonferroni post hoc test. Data is represented as Mean ± SD, n = 3. D1; Desmarestia ligulata, D2; Desmarestia tabacoides, D3; Desmarestia viridis.

국내 자생하는 대표 10종 해조류(감태, 곰피, 대황, 매생이, 모자반, 미역, 지충이, 청각, 톳 및 파래)를 이용하여 에탄올 추출 후 DPPH 라디칼 소거능을 실험한 결과 DPPH 라디칼 소거능이 3.8 ~ 86.2%의 범위를 나타냈고[11], 이는 유사농도인 1.25 mg/mL에서 쇠꼬리산말 29.2%, 참산말 14.8%, 담배잎산말 8.6%로 매생이, 모자반, 미역, 청각, 톳 및 파래보다 우수하였다[11].

3.2 산말 추출물의 ABTS 라디칼소거능

ABTS 라디칼 소거능 분자 외곽의 질소 원자의 상태에 따라 라디칼 상태일 경우 파란색을 띄며 라디칼이 소거되면 투명해지는 원리를 이용하여 측정하는 방법으로 지용성 및 수용성 물질 모두 측정가능한 항산화 측정법이다.

ABTS 라디칼 소거능 실험 결과는 Fig. 2와 같다. 담배잎산말, 쇠꼬리산말 및 참산말을 분석하였고, ABTS 라디칼 소거능을 기준으로 담배잎산말, 참산말, 쇠꼬리산말 순으로 항산화능을 보였다. 무처리군에서 OD값이 0.5인 반면 2.5 mg/mL 농도에서 담배잎산말만 유의미한 차이를 보였고($p < 0.001$), 참산말은 5 mg/mL 농도에서 유의미한 차이를 보였으며($p < 0.001$), 쇠꼬리산말은 유의미한 차이를 보이지 않았다. 산말 3종에서 모두 농도 의존적으로 항산화능력이 증가되었으며, 산말 중 모든 농도에서 담배잎산말이 항산화 효과가 가장 높았다. 이 같은 결과는 DPPH 라디칼 소거능과 유사하였다.

DPPH 라디칼 소거능 결과에서 언급한 보고에서[11] 10종의 해조류 중 ABTS 라디칼 소거능은 모두 산말보다 높았다. 하지만, DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능은 상관관계를 갖는 것을 알 수 있었고($p < 0.01$), 쇠꼬리산말의 ABTS 라디칼 소거능은 다른 해조류에 비해 낮지만 이들 대부분이 열수추출에 의해 제조된 시료이므로 추출조건을 변경하면 항산화 효과를 증가시킬 것으로 보인다[11].

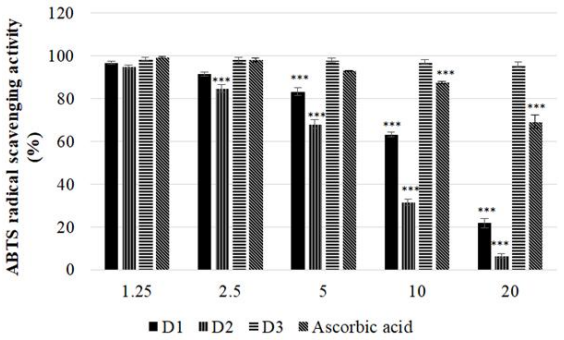

Fig. 2. Difference between antiradical parameters: ABTS radical scavenging activity.

ABTS radical scavenging activities of various concentrations of Desmarestia seaweed leaf phytochemicals extracted with solvents including ethanol. ***$p < 0.001$, compared with the control group; by Tow Way ANOVA and Bonferroni post hoc test. Data is represented as Mean ± SD, n = 3. D1; Desmarestia ligulata, D2; Desmarestia tabacoides, D3; Desmarestia viridis.

3.3 산말 추출물의 NO 라디칼소거능

NO 라디칼은 과다하게 생성되면 O_2-와 결합하여 반응성이 크고 독성이 강한 산화제인 ONOO-를 생성하는데, 이는 단백질 및 DNA와 반응하여 세포를 손상시키고 질병을 유발한다[12].

NO 라디칼 소거능 실험 결과는 Fig. 3과 같다. 담배잎산말, 쇠꼬리산말 및 참산말을 분석하였고, NO 라디칼 소거능을 기준으로 담배잎산말, 참산말, 쇠꼬리산말 순으로 항산화능을 보였다. 무처리군에서 OD값이 1.0인 반면 1.25 mg/mL의 농도에서 담배잎산말($p < 0.001$), 참산말($p < 0.001$) 및 쇠꼬리산말($p < 0.001$)에서 모두 유의미한 차이를 보였고, 산말 3종에서 모두

농도 의존적으로 항산화능력이 증가되었다. 산말 중 모든 농도에서 담배잎산말이 항산화 효과가 가장 높았고, 이 같은 결과는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능과 유사하였다.

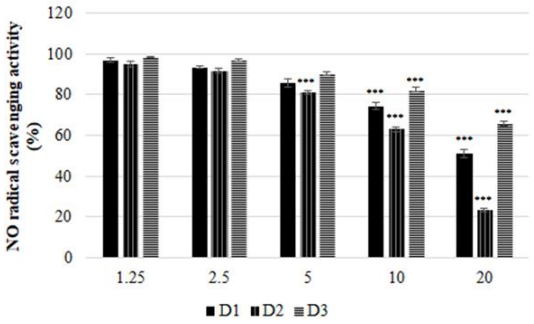

Fig. 3. Difference between antiradical parameters: NO radical scavenging activity.

NO radical scavenging activities of various concentrations of Desmarestia seaweed leaf phytochemicals extracted with solvents including ethanol. ***p 〈 0.001, compared with the control group; by Tow Way ANOVA and Bonferroni post hoc test. Data is represented as Mean ± SD, n = 3. D1; Desmarestia ligulata, D2; Desmarestia tabacoides, D3; Desmarestia viridis.

NO 라디칼 소거능은 아질산염을 소거하여 체내 핵산이나 단백질 또는 세포내의 성분을 알칼리화를 억제하여 질병 유발을 억제할 수 있는 것으로 보고되었다[13]. 노루궁뎅이 추출물을 1 mg/mL의 농도로 처리하였을 경우 55.2%의 아질산염 소거능을 보였으며, 야생 수집 버섯은 수집버섯은 23.1 ~ 49.5%의 아질산 소거능을 보였다[14]. 하지만, 고농도에서만 NO 라디칼 소거능을 보이며, 이는 아질산염 타겟을 위한 소재로는 적합하지 않은 것으로 보인다.

3.4 산말 추출물의 폴리페놀 함량

천연물 추출물에는 다양한 antioxidant가 포함되어 있으며, 천연물의 종류에 따라 차이가 있으나 phenolic content가 차지하는 비율이 높다. 이러한 이유로 phenolic content의 양을 측정하여 추출물의 항산화능을 유추할 수 있다. 폴리페놀 화합물은 flavonoids, anthocyanins, tannins, catechins, isoflavones 등을 총칭하며 폴리페놀에 존재하는 다수의 하이드록시기(-OH)는 다른 화합물과 결합하는 특성을 가지고 있어 항산화 효과가 있는 것으로 보고되었다[15].

폴리페놀 함량 실험 결과는 Fig. 4와 같다. 폴리페놀 함량은 담배잎산말은 2 mg/mL에서 2.0 ± 0.0 mg/mL, 참산말은 2 mg/mL에서 1.3 ± 0.0 mg/mL, 쇠꼬리산말은 2 mg/mL에서 1.8 ± 0.0 mg/mL의 total phenolic content를 보였다. 이를 환산하면 각각, 0.13 g gallic acid/g extract, 0.08 g gallic acid/g extract, 0.11 g gallic acid/g extract로 나타났다. 폴리페놀의 함량은 낮지만 이중 담배잎산말이 3 종류의 산말 중 가장 높은 수치를 보였다. 이 수치는 식용가능한 6종(미역, 톳, 다시마, 김, 시래기 및 파래)의 해조류의 폴리페놀 함유량이 0.02~0.05 mg/mg으로, 산말의 폴리페놀 함량은 다른 해조류보다 높은 것을 확인하였다(김소정 등., 2013).

양파는 폴리페놀 함량은 187.67 mg/g으로 높지만 DPPH 라디칼 소거능은 15.3%로 낮은 항산화 효과를 보였고[15], 폴리페놀, 플라보노이드와 DPPH 라디칼 소거능과 같은 항산화능에 대해 일관된 상관관계를 찾기 어렵다고 보고된 바 있다. 이러한 결과는 폴리페놀 화합물 종류에 따라 DPPH 라디칼 소거능의 차이가 있을 것으로 보이며, 다양한 폴리페놀 화합물 중 특정 성분에 기인하는 것으로 보인다[15].

본 연구에서 확인 항산화 측정은 모두 담배잎산말, 참산말, 쇠꼬리 산말 순의 항산화를 보였고, 이는 잎의 면적이 넓은 범위 일수록 항산화가 높아지는 것을 알 수 있었다. 이 같은 원인은 다양한 항산화 물질이 포함되어 있겠지만, 특히 잎의 넓은 면적은 알긴산과 같은 물질의 함량 및 폴리페놀 화합물의 함량이 다르게 분포할 것이라 추측된다. 다만, 본 연구에서 갈릭산을 이용한 폴리페놀 함량이 육지식물과 비교했을 때 매우 낮은 함량이기 때문에 항산화를 타겟으로 부가가치 창출은 어려울 것이라 판단된다. 하지만, 폴리페놀 함량 측정 시 스탠다드의 변화 또는 플라보노이드와 같은 항산화를 조절하는 물질에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

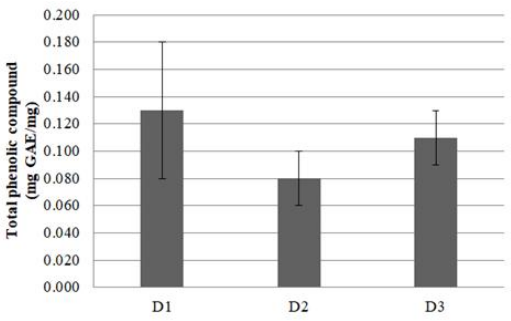

Fig. 4. Difference contents between of phenolic compound.

Phenolic compound content of 1.0mg/mL concentrations of Desmarestia seaweed leaf phytochemicals extracted with solvents including ethanol. Compared with the control group; by One Way ANOVA and Bonferroni post hoc test. Data is represented as Mean ± SD, n = 3. D1; Desmarestia ligulata, D2; Desmarestia tabacoides, D3; Desmarestia viridis.

3.5 산말 추출물의 B16F10 세포에서 세포독성 및 멜라닌 함량 조절

멜라닌은 동물에 흑색을 보이는 색소로 일정량 이상의 자외선을 차단하는 기능이 있어서 피부의 체온을 유지시켜주고 자외선으로 피부를 보호하지만 과다한 멜라닌 생성은 피부의 반점을 생성하여 미관상 문제를 일으킨다.

산말 추출물을 이용한 B16F10세포의 세포독성 및 멜라닌 함량은 Fig. 5와 같다. 50 μg/mL의 농도에서 3종의 산말 추출물이 모두 85% 이상의 세포생존률을 보였고, 멜라닌양을 측정한 결과 100 μg/mL에서 담배잎산말은 33.0 ± 1.0%를 보였고, 쇠꼬리산말은 31.5 ± 2.1%의 멜라닌양을 보였다. 참산말을 처리시 15% 미만의 세포독성을 보였기 때문에 세포생존률로 보정하여 각각 참산말은 105.6 ± 2.9%로 멜라닌을 전혀 억제하지 못했으며, 담배잎산말은 34.2 ± 0.6%를 쇠꼬리산말은 35.0 ± 1.7%를 보여 쇠꼬리산말이 멜라닌양이 제일 낮았다. 산말 추출물의 항산화 결과는 담배잎산말에서 높았으며, 멜라닌 억제 결과에서도 쇠꼬리산말 및 담배잎산말에서 멜라닌 억제효과가 높은 것을 알 수 있었다. 하지만 산말의 항산화 효과와 멜라닌 억제 효과는 동일하다고 보기 어려우며 각 추출물에 따라 양상이 약간 다른 것을 알 수 있었다. 이 같은 결과는 항산화와 항멜라닌 성분을 갖는 물질이 동일하지 않는다는 것으로 생각할 수 있다. 다만, 이에 대한 추가연구가 필요할 것으로 보인다.

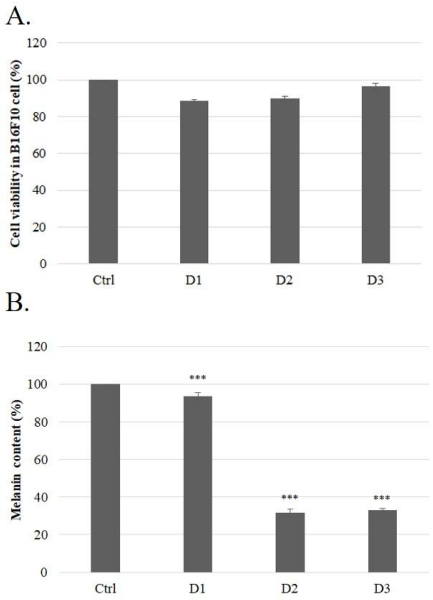

Fig. 5. Comparison of melanin release inhibition parameters: anti-melanin activity.

(A) B16F10 cell viability. (B) Melanin content. Melanin content of 1mg of Desmarestia seaweed leaf phytochemicals extracted with solvents including ethanol. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, compared with the control group; by One Way ANOVA and Bonferroni post hoc test. Data is represented as Mean ± SD, n = 3. D1; Desmarestia ligulata, D2; Desmarestia tabacoides, D3; Desmarestia viridis.

L-tyrosine은 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), dopaquinone, dopachrome, 5,6- dihydroxyindole (DHI), 5,6-dihydroxyindole-2- carboxylic acid (DHICA)를 생성하고 중합반응을 통해 멜라닌을 형성하는데 초기 멜라닌 생성단계에 tyrosinase가 tyrosinehydroxylase와 DOPA oxidase로 핵심적인 작용을 한다. 이때 산말추출물이 DOPA oxidase 및 tyrosinase를 억제시켜 항멜라닌 기전을 작용시키는 것으로 추측된다. 다만, 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

이 수치는 백합뿌리를 이용한 멜라닌 실험에서 에탄을 추출물 100 μg/mL의 동일 농도에서 12%의 억제율을 보인 반면, 쇠꼬리산말 및 담배잎산말에서 멜라닌

억제효과는 백합뿌리 대비 70%가량의 억제율을 보이는 것을 알 수 있었다. 육지 식물 이외 해양 식물(해조류)를 통한 멜라닌 억제능에 대한 좀 더 심도 있는 연구를 통해 화장품 소재 등으로 이용될 수 있을 것으로 보이며, 이 같은 내용을 토대로 에탄올 추출한 담배잎산말이 화장품 원료로 개발할 수 있는 가능성이 있는 것으로 보이며, 항산화 증대를 위한 추출용매에 따른 효율에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 쇠꼬리산말을 이용한 항산화 및 항멜라닌 해조류 화장품 소재의 개발은 산말의 부가가치를 창출할 수 있을 것이다.

4. 결론

최근 해조류를 이용한 다양한 기능성 원료를 찾고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다. 본 연구는 항산화 실험 및 멜라닌 억제능을 토대로 해조류인 3종류의 산말 중 담배잎산말이 DPPH 라디칼 소거능은 2.5 mg/mL의 농도에서 68.0 ± 1.9%의 높은 항산화능을 보였고, ABTS 라디칼 소거능은 2.5 mg/mL 농도에서 84.6 ± 1.7%의 높은 항산화능을 보였고, NO 라디칼 소거능은 2.5 mg/mL의 농도에서 91.6 ± 1.1%의 높은 항산화능을 보였다. 또한, B16F10세포에서 100 μg/mL 농도에서 담배잎산말은 35.0 ± 1.7%로 3종의 산말 중 제일 낮은 멜라닌양을 보였다. 위 결과는 3종류의 산말이 갖는 항산화 및 항멜라닌 기능성이 서로 다른 것을 알 수 있었으며, 담배잎산말은 항산화 활성을 갖고, 담배잎산말 및 쇠꼬리산말은 항멜라닌 활성을 갖는다. 산말을 이용한 광범위한 산화 반응을 억제하고 적절한 용량을 찾는다면 항산화 또는 항멜라닌 화장품 재료로 사용될 수 있을 것이다. 또한, 육지식물 외 해조류를 이용한 기능성 개발에 대한 가능성을 제시하고자 하였다.

REFERENCES

[1] N. F. Santos-Sánchez, R. Salas-Coronado, C. Villanueva-Cañongo & B. Hernández-Carlos. (2019). *Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism, in Antioxidants*. IntechOpen.

[2] K. Iwata. (2016). Differential roles of NOX1/NADPH oxidase derived ROS in car*diovascular disease. Nihon Yakurigaku Zasshi, 147,* 12-7.
DOI : 10.1161/ATVBAHA.116. 307308

[3] C. D. Ochoa, R. F. Wu ,L. S. Terada. (2018). ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 63, 18-29.
DOI : 10.1016/j.mam.2018.03.002

[4] S. Shen et al. (2020). Characterization of ROS Metabolic Equilibrium Reclassifies Pan-Cancer Samples and Guides Pathway Targeting Therapy. *Front Oncology, 10,* 581197.
DOI : 10.3389/fonc. 2020.581197

[5] N. Robledinos-Antón, R. Fernández-Ginés, G. Manda & A. Cuadrado. (2019). Activators and inhibitors of NRF2: a review of their potential for clinical development. *Oxidative medicine cellular longevity*, 2019,
DOI : 10.1155/2019/9372182

[6] C. G. Choi, S. N. Kwak & C. H. Sohn. (2006). Community Structure of Subtitdal Marine Algae at Uljin on theEast Coast of Korea. *Algae*, 21, 463-470.
DOI : 10.4490/algae.2006.21.4.463

[7] S. R. Lee & E. Y. Lee. (2018). *Desmarestia japonica* subsp. angustifolia (Desmarestiales, Phaeop- hyceae), a new subspecies from Korea. *Phytotaxa, 365,* 89-95.
DOI : 10.11646/ phytotaxa.365.1.4

[8] M. J. Kim, K. W. Yang, W. J. Lee, S. S. Kim, N. H. Lee & C. G. Hyun. (2013). Inhibitory effect of Ulva fasciata and Desmarestia viridis on the production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3,* 1.
DOI : 10.7324/JAPS.2013.3901

[9] S. B. Lee, J. Y. Lee, D. G. Song, C. H. Pan, C. W. Nho, M. C. Kim, E. H. Lee, S. H. Jung, H. S. Kim & Y. S. Kim. (2008). Cancer chemopreventive effects of Korean seaweed extracts. *Food Science Biotechnology, 17,* 613-622.

[10] E. O'Connell, C. Piggott & M. Tuohy. (2011). Purification of exo-1, 3-beta-glucanase, a new extracellular glucanolytic enzyme from Talaromyces emersonii. *Applied microbiology biotechnology, 89,* 685-696.
DOI : 10.1007/ s00253-010-2883-x

[11] J. H. Kim, H. M. Gang, S. H. Lee, J. Y. Lee & N. Y. Pakr. (2015). Antioxidant and α-glucosidase inhibition activity of seaweed extracts. *Korean Journal of Food Preservation, 22(2),* 290-296.
DOI : 10.11002/kjfp.2015.22.2.290

[12] Y. Wu et al. (2020). Mini review on the roles of nitrate/nitrite in advanced oxidation processes: Radicals transformation and products formation.

Journal of Cleaner Production, 273, 123065.
DOI : 10.1016/j.jclepro.2020.123065

[13] H. O. Boo, S. J. Hwang, C. S. Bae, S. H. Park & W. S. Song. (2011). Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigments. *Korean Journal of Plant Resources, 24,* 105-112.
DOI : 10.7732/kjpr.2011.24.1.105.

[14] G. H. An, J. G. Han & J. H. Jo. (2019). Antioxidant activities and β-glucan contents of wild mushrooms in Korea. *Journal of mushrooms, 17(3),* 144-151.
DOI : 10.14480/JM.2019.17. 3.144

[15] E. J. Kim, J. Y. Choi, M. R. Yu, M. Y. Kim, S. H. Lee & B. H. Lee. (2012). Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants, *Korean journal of food science and technology, 44(3),* 337-342.
DOI : 10.9721/KJFST.2012.44.3.337

[16] S. J. Kim, G. S. Lee, S. H. Moo, J. B. Park. C. K. Auh, Y. J. Chung, T. K. Ryu & T. K. Lee. (2013). Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Six Edible Seaweeds, *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society, 14(6),* 3081-3088.
DOI : 10.5762/KAIS.2013.14.6.3081

남 영 선(Young-Sun Nam) [정회원]

· 2012년 1월 ~ 2014년 01월 : ㈜ GSI KOREA (교육팀/ 과장)
· 2014년 2월 ~ 2018년 12월 : (유)하이코스 (교육팀/ 과장)
· 2021년 8월 : 건국대학교 생물공학과 (이학박사) 졸업예정
· 2019년 3월 ~ 현재 : 신경대학교 뷰티디자인학과 (겸임교수)
· 관심분야 : 뷰티, 화장품
· E-Mail : golf4484@naver.com

강 상 모(Sang-Mo Kang) [정회원]

· 1975년 2월 : 건국대학교 미생물공학과 졸업
· 1987년 3월 : 오오사카대학 석사
· 1990년 3월 : 오오사카대학 박사
· 1990년 9월 ~ 현재 : 건국대학교 생물공학과 교수
· 관심분야 : 생물공학
· E-Mail : kangsm@konkuk.ac.kr