

## *Arthrospira platensis* 추출물의 항산화 및 UVB에 의해 유도된 활성산소 생성에 미치는 영향

김민승\* · 양재찬 · 김보애†

목원대학교 테크노과학대학 화학·화장품학부 화장품공학, 학생  
목원대학교 테크노과학대학 화학·화장품학부 화장품공학, 교수  
목원대학교 테크노과학대학 화학·화장품학부 화장품공학, 교수  
(2020년 1월 30일 접수: 2020년 3월 30일 수정: 2020년 4월 13일 채택)

### Antioxidant Effect of *Arthrospira platensis* Extract and Effect on UVB-induced Free Radical Production

Min Seung Kim\* · Jae-Chan Yang · Bo-Ae Kim†

Mokwon University, College of Sciences & Technology, Division of Chemistry & Cosmetics Engineering, Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon Korea  
(Received January 30, 2020; Revised March 30, 2020; Accepted April 13, 2020)

**요약** : 지구상에서 가장 오래된 해양 미세조류로 알려진 스피롤리나는 인체에 필요한 영양성분을 대부분 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 그 구성성분으로는 phycocyanin, chlorophyll,  $\beta$ -carotene 과 같은 다양한 물질을 다량 함유한다고 보고되고 있으며, 노화 및 미백효과가 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 스피롤리나 정제수 추출물의 UVB로 유도된 활성산소종 ROS (reactive oxygen species) 소거능과 항산화능을 확인하였다. 스피롤리나 정제수 추출물 0.05, 0.10, 0.50 1.0 mg/mL의 DPPH 라디칼 소거능, FRAP 환원능 및 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능을 측정하여 항산화효과를 확인하였다. 대체실험동물모델인 Zebrafish를 이용하여 스피롤리나 정제수 추출물을 0.05, 0.10, 0.50 mg/mL 농도로 처리하여 응고율, 부화율, 심장독성을 측정하였으며, 스피롤리나 추출물을 0.05, 0.10, 0.50 mg/mL 농도로 처리한 후, DCFH-DA로 염색하여 UVB로 유도된 ROS 저해효과를 확인하였다. 항산화효과 측정 결과 양성대조군인 ascorbic acid와 비교시 DPPH, Frpa, ABTS 모두 농도 의존적으로 항산화 효과가 있음을 확인하였다. 대체 실험동물인 Zebrafish를 이용하여 응고율과 부화율, 심박수를 측정한 결과 0.5 mg/mL을 제외한 0.05, 0.10 mg/mL에서는 대조군과 비교 시 독성이 없음을 확인 하였다. UVB로 유도된 Zebrafish의 ROS 소거능은 양성대조군에 비해 높은 ROS 감소 효과를 나타내었다. 본 연구의 결과는 스피롤리나 정제수 추출물이 자외선 및 피부 보호 화장품 소재로 사용가치가 있음을 시사한다.

**주제어** : 스피롤리나, 제브라피쉬, 독성, 자외선B, 활성산소종

†Corresponding author  
(E-mail: kba@mokwon.ac.kr)

**Abstract :** *Arthrospira platensis* is the oldest marine microalgae on the planet, is said to contain most of the nutrients needed by the human body. It's components are reported to contain a large amount of various substances such as phycocyanin, chlorophyll and  $\beta$ -carotene, and are known to have an aging and whitening effect. In this study, UVB-induced reactive oxygen species reduction efficacy and antioxidant activity of spirulina purified water extract were investigated. effect was confirmed by measuring DPPH radical scavenging activity, FRAP reducing power and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of 0.05, 0.10, 0.50 1.0 mg/mL of spirulina purified water extract. The coagulation rate, hatching rate and heart rate toxicity were measured by treating spirulina purified water extract with 0.05, 0.10, 0.50 mg/mL concentration using Zebrafish, an alternative experimental animal model. UVB-induced ROS measurement was treated with spirulina extract at 0.05, 0.10, 0.50 mg/mL concentration, and then stained with DCFH-DA to confirm the inhibitory effect of ROS. As a result of measuring antioxidant effect, DPPH, FRAP and ABTS<sup>+</sup> showed concentration-dependent antioxidant effects in comparison with ascorbic acid. and measuring the coagulation rate, hatching rate, and heart rate using Zebrafish, an alternative experimental animal, it was confirmed that there was no toxicity in 0.05 and 0.10 mg/mL except 0.5 mg/mL compared to the control group. The ROS scavenging activity of UVB-induced zebrafish showed higher ROS reduction than the positive control. The results of this study suggest that spirulina and purified water extracts are valuable for UV and skin protection cosmetics.

**Keywords :** *Spirulina*, *Zebrafish*, *toxicity*, *Ultraviolet B (UVB)*, *ROS*

## 1. 서론

최근 산업의 발전으로 사람들은 신체의 건강이나 피부미용에 대한 관심이 높아지고 있으며, 내적인 뿐만 아니라 외적인 요인에 의한 피부노화 혹은 노화개선을 위한 목적으로 화장품에 포함 다양한 분야에서 항노화 연구가 이루어지고 있다[1]. 피부의 노화는 개인의 유전적 요인에 의한 내재적 노화와 외부적인 영향인 자외선에 의한 광노화로 나눌 수 있다[2]. 자외선은 Ultraviolet-A (315~400 nm), Ultraviolet-B (280~315 nm), Ultraviolet-C (<280 nm)로 구성되어 있으며, 지표면에 도달하는 대부분의 자외선은 UV-A, UV-B로 구성되어 있다. 그러나 최근 환경적인 요인에 의하여 지표면에 도달하는 자외선의 양이 증가함에 따라 광노화에 의한 피부 손상이 늘어나고 있다 [3]. 그 중 UVB의 경우 인체의 표피층을 투과하여 진피층까지 그 영향을 미쳐 DNA 손상 및 활성산소종 ROS (reactive oxygen species)를 유발하게 된다. 활성산소종인 ROS가 증가하게 되면, 색소침착 및 피부노화 그리고 백내장 혹은 암 등의 문제점을 야기 시킨다고 알려져 있으며[4-5], 이러한 문제점

을 해결하기 최근 해양소재를 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 스피룰리나는 식품이나 동물사료에 첨가물로 사용되는 2종의 구분되어왔으나, 최근에는 “스피루리나”가 일반적으로 통용되고 있다. 스피룰리나는 열대 및 아열대지역의 알카리 수질의 호수에서 서식하며, 생물체가 필요로 하는 영양소를 포함하고 있으며, 특히 천연염색 영양소로서 인체가 필요로 하는 5대 영양소와 2~3만 가지의 고른 영양소가 함유되어 있다[6]. 또한 여러 선행 연구에 따르면 스피룰리나를 함유한 화장품의 경우 멜라닌 억제, 홍반 및 주름 개선에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다[7]. 이처럼 스피룰리나가 미백효과 및 주름개선 효과가 있는 것으로 미루어보아 UVB에 대한 보호효과가 있을 것으로 사료되며, 스피룰리나 수 추출물의 피부보호용 화장품 원료로서의 가능성을 확인하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료

본 실험에서 이용한 대체실험동물모델인

Zebrafish는 폐쇄 순환 여과 시스템을 갖춘 수조에서 사육하였으며, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 항산화 효능을 평가하기 위하여 사용된 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)에서 구입한 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl), (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), Potassium persulfate를 사용하였으며, Ascorbic acid와 Methanol은 DUKSAN (iansan, Korea)에서 구입하였다. 흡광도 측정은 Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)의 ELISA reader기를 사용하였으며. 형광값을 측정하는 형광도립 현미경(Trinocular type model TS100-F, Nikon, Japan)을 사용하였다. 수치화를 위한 프로그램으로는 Image J(Image J 1.51j8, Wayne Rasband NIH, USA) 프로그램을 사용하여 수치화하였다.

## 2.2. 재료 및 시료 추출

본 실험에서 사용한 스피롤리나 동결 건조 분말은 (주)네오엔비즈에서 공급받아 사용하였다. 시료의 제조 방법은 시료의 중량의 10배에 해당하는 정제수를 가하여 실온에서 24시간 교반한 후, 시료를 15 mL conical tube에 각각 나누어 담은 후, centrifuge (DT5-6A, Nasco, Korea)를 이용하여 4000 rpm, 20 min으로 원심분리 하였으며, 원심분리 된 내용물의 상등액만 취하여, 8 µm qualitative filter paper (Whatman/GE Healthcare, 8µm, 90mm diameter)를 이용하여 여과한 후, 농축기(EYELA, N-1000)를 이용하여 50°C에서 감압 농축하여 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

## 2.3. 대체실험동물모델 Zebrafish 사육 및 embryo 생산

Zebrafish adult는 낮 16시간, 밤 14시간을 주기로 생육온도 27-28°C의 수온을 유지하는 순환 여과 시스템을 갖춘 수조에서 사육하였다. 먹이는 brine shrimp를 부화시켜 하루 3회 급여하였다. embryo는 Zebrafish adult 암수에게 알 채취 전날 영양분을 충분하게 보충해준 후 mating cage set에 넣고 divide를 이용하여 암수를 구획화시킨 후, 다음날 divide를 제거하고 빛을 조사하여 1~2시간 이후에 egg를 채취하였다. 이후, embryo media를(sea salt solution) 이용하여 산

란한 embryo를 충분히 세척하고 100 mm petri dish에 50~100마리 정도를 분주하고 항온조 (28±0.5°C)에 사육하며, 24 시간 주기로 embryo media를 교체해주며 실험을 진행하였다.

## 2.4. 스피롤리나 수 추출물의 in vivo Zebrafish 대체실험동물모델에서 배아독성 평가

산란한 zebrafish의 embryo를 24-well plate에 각각 10 마리씩 분주 후, 스피롤리나 수 추출물을 embryo media에 0.05, 0.10, 0.50 mg/mL 농도로 용해하여 각 well당 2mL씩 처리하였으며, 대조군으로는 embryo media만 첨가한 군의 경우 well당 embryo media를 2mL 분주하였다. 시료 처리 후 72 시간 동안 실체현미경(Leica, Wetzlar, Germany)으로 배아의 상태를 관찰하며 24 시간 주기로 시료를 교체하여 주었고, 응고되거나, 부화한 embryo를 확인하여 응고율(Coagulation rate, %)과 부화율(Hatching rate, %)을 측정하였다[8].

## 2.5. 스피롤리나 수 추출물의 in vivo Zebrafish 대체실험동물모델에서 심장독성 평가

산란한 Zebrafish의 embryo를 24-well plate에 5 마리씩 분주한 후 스피롤리나 수 추출물을 embryo media에 0.05, 0.10, 0.50 mg/mL 농도로 용해하여 well당 2mL씩 처리하였으며, 대조군으로는 embryo media만 첨가한 군의 경우 well당 egg water를 2mL 분주하였다. 각 시료는 24 시간 주기로 교체하여 주었으며 72 시간 때 현미경으로 larvae의 심장박동수(심박수)를 1분 동안 측정 확인하였다[9].

## 2.6. in vivo Zebrafish 대체실험동물모델에서 UV-B로 ROS 생산을 유도한 Zebrafish의 보호 효능 평가

수정 후 48HPF (hour-post-fertilization) Zebrafish의 larvae를 60 mm petri dish에 5마리씩 분주한 후, 스피롤리나 수 추출물을 embryo media에 0.05, 0.10, 0.50 mg/mL 농도로 용해하여 각 dish에 5 mL씩 처리하였다. 대조군으로는 embryo media만 첨가한 군의 경우 dish에 embryo media를 5 mL 분주하였다. 분주 후, 항온조(28±0.5°C)에 1시간 배양하였다. 배양 후 UV-B (50 mJ/cm<sup>2</sup>, UV-X000, LAB24, Korea) 장치를 사용하여 조사한 후, 24-well plate에 옮겨 DCFH-DA (20 µg/mL)로 처리하였다. Plate

는 차광하여 항온조(28±0.5°C)에 1시간 배양한 후 embryo media로 2회 세척을 진행하였고, 형광 현미경으로 관찰하였으며, Image J 프로그램을 사용하여 수치화하였다[10].

### 2.7. DPPH radical scavenging activity assay

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼에 대한 소거활성은 Blois[11]의 방법을 변형하여 항산화 효과를 측정하였다. 스피롤리나 수 추출물을 0.05, 0.10, 0.50, 1.0 mg/mL 농도로 정제수에 용해하였으며, DPPH를 0.2 mM로 methanol에 용해한 후 50 µL 시료 용액을 96-well plate에 처리하고, 150 µL working solution을 추가한 후 차광시키고 28°C 항온조에서 30분 동안 반응하여 517 nm에서 microplate reader를 통해 흡광도를 측정하였으며, 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다.

### 2.8. FRAP assay

FRAP (ferric reducing ability of plasma) 라디칼 소거능 분석은 Benzie 등[12]의 방법을 변형하여 항산화 효과를 측정하였다. FRAP 분석은 pH 3.8에서 환원력을 가지고 있는 항산화제에 의해 Ferric tripyridyltriazine (Fe<sup>3+</sup> - TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe<sup>2+</sup> - TPTZ)를 통해 환원력을 이용한 측정방법이다. 10 mM TPTZ (2,4,6-Tripyridil-s-triazine)를 40 mM HCL에서 용해하여 300 mM acetate buffer, 20 mM FeCl<sub>3</sub>를 1 : 10 : 1의 비율로 혼합하였다. 스피롤리나 수 추출물을 0.05, 0.10, 0.50 1.0 mg/mL 농도로 정제수에 용해하였으며, 50 µL 시료 용액을 96-well plate에 처리하고, 150 µL working solution을 추가한 후 차광시키고 37°C 항온조에서 10분 동안 반응하여 595 nm에서 microplate reader를 통해 흡광도를 측정하였으며, 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다.

### 2.9. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity assay

ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 분석은 Re 등[13]의 방법을 변형하여 산화 효과를 측정하였다. 7 mM ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하였다. 차광된 실온에서 24시간 동안 방치하고 프리라디칼 생성을 유도하였다. ABTS 용액이 734 nm에서 흡광도 OD 값이 0.7±0.05가 되도록 에탄올에 희석하였다.

스피롤리나 수 추출물은 0.05, 0.10, 0.50, 1.0 mg/mL 농도로 정제수에 용해하였으며, 50 µL 시료 용액을 96-well plate에 처리하고, 150 µL working solution을 추가한 후 차광시키고 실온에서 20분 동안 반응하여 734 nm에서 microplate reader를 통해 흡광도를 측정하였으며, 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다.

### 3.0. 통계 처리

본 연구의 실험은 개별적으로 3회를 실시한 후, 평균값으로 나타내었다. 또한 실험 결과는 각 항목에 따라 Student's t-test를 이용하여 p < 0.05 유의수준에서 검증하였다.

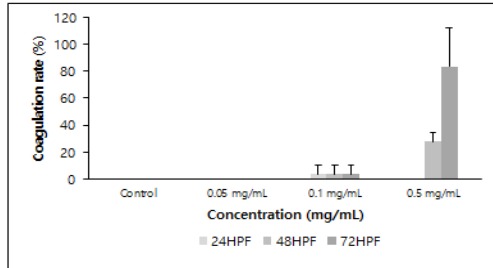
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 스피롤리나 수 추출물의 *in vivo* Zebrafish 대체실험동물모델에서 배아독성 평가

스피롤리나 수 추출물을 처리한 배아에서는 24시간 후 응고율은 각 농도에서 0.00, 3.70, 0.00%로 나타났다. 48시간 후 응고율은 각 농도에서 0.00, 3.70, 27.78%로 나타났으며, 72시간 후 응고율은 각 농도에서 0.00, 3.70, 83.33%의 응고율을 나타내었다(Fig. 1A). 최고 농도인(0.5 mg/mL)에서 시간이 지날수록 응고율이 증가되었으며, 0.05 mg/mL과 0.1 mg/mL에서는 응고율이 변화가 없었다. 최고 농도인 0.5 mg/mL 농도는 대조군보다 응고율이 높은 것으로 나타났고 독성이 있는 것으로 확인되었다. 부화율에서는 48시간 후 0.05 mg/mL은 93.33% 부화가 되었고, 0.1 mg/mL에서는 57.78%부화 되었으며, 72시간 후 0.05 mg/mL은 100.00% 부화가 되었고, 0.1 mg/mL에서는 96.30% 부화가 되었으며, 부화지연은 일어나지 않았다(Fig. 1B). 따라서, 스피롤리나 수 추출물은 0.5 mg/mL 미만의 농도에서 응고율과 부화율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 또한 선행 연구된 S. J. Zhang 등[18]의 결과와 비교 시, 스피롤리나 에탄올 추출물 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL에서 독성이 발생하지 않음을 확인할 수 있으나, 0.5 mg/mL 이상의 농도에서는 부화지연이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 실험결과에서 확인할 수 있듯이 0.5 mg/mL이상의 농도에서는 스피롤리나 수 추출물이 배아독성에 영향을 주는 것을 파악할 수

있다.

(A)



(B)

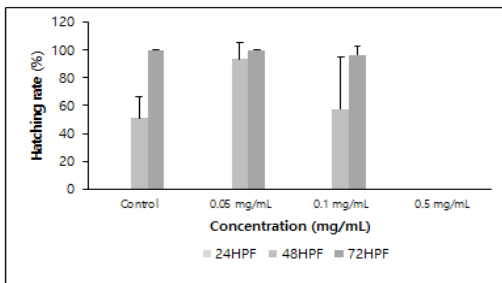


Fig. 1. Coagulation rate (A), Hatching rate (B) were measured by Zebrafish toxicity. Embryos were seeded at 24-well plate and were measure various concentrations Spirulina water extract of toxicity. The coagulation rate, hatching rate individual Zebrafish were quantified, and values represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments performed in duplicate.

### 3.2. 스피롤리나 수 추출물의 *in vivo* Zebrafish 동물모델에서 심장독성 평가

스피롤리나 수 추출물을 처리한 배아에서는 72 시간 후 심박수를 측정된 결과 0.5 mg/mL의 농도에서는 부화가 이루어지지 않아 심박수를 측정하지 못하였으며, 0.05 mg/mL에서는 165.66회/60s', 0.1 mg/mL에서는 167.66회/60s' 로 확인되었다(Fig. 2). 이는 대조군인 embryo media: 163.33회/60s' 와 비교 시, 큰 차이를 보이지 않음을 확인할 수 있었으며, 이는 S. J. Zhang 등 [18]의 연구 결과와 비교 시, 스피롤리나 에탄올 추출물 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL에서 대조군의 비

해 심박수의 변화가 크지 않았고, 0.5 mg/mL 이상의 농도에서는 대조군의 비해 심박수가 느려짐을 확인하였다고 보고 하였는데 이는 본 연구의 결과와 유사하게 0.05, 0.10 mg/mL에서는 독성이 낮은 것을 확인할 수 있었다.

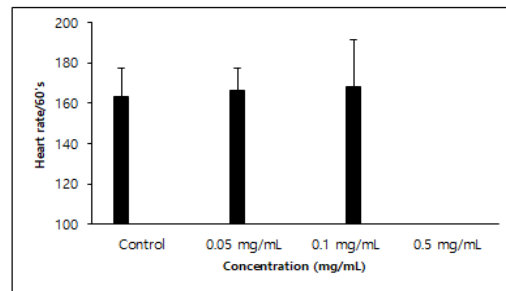


Fig. 2. Arrhythmia test of spirulina water extract Zebrafish larvae. Counting the heartbeat of Zebrafish larvae for 1min. the heart rate is individual Zebrafish were quantified, and values represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments performed in duplicate.

### 3.3. *in vivo* Zebrafish 동물모델에서 UV-B로 ROS 생성을 유도한 Zebrafish의 보호 효능 평가

스피롤리나 수 추출물을 처리하여 UV-B로 유도된 Zebrafish에서 ROS 생성량을 측정된 결과 스피롤리나 수 추출물의 0.05, 0.10, 0.50 mg/mL 농도에서 각각 85.60%, 75.61%, 59.66%로 확인되었다(Fig. 3A). 이는 UV-B만 조사한 대조군(219.86%)에 비교하면 스피롤리나 수 추출물을 처리한 Zebrafish에서 농도 의존적으로 높은 ROS 생성을 억제하는 것을 보였으며, 형광 강도가 감소하는 것을 확인하였다. 이는 선행 연구된 D. Y. Jang 등[19]의 연구결과에서 확인된 바와 같은 유사경향을 나타내었다. D. Y. Jang 등[19]의 스피롤리나 에탄올 추출물에서는 1 mg/mL의 농도에서 음성대조군과 유사한 형광 밝기를 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 본 연구에서 사용한 스피롤리나 수 추출물의 경우 0.5 mg/mL에서 음성대조군과 유사한 형광 밝기를 보이는 것을 확인하였다. 또한 F. Yogianti 등 [20]의 연구결과에서 보고된 바와 같이, 스피롤리나 추출물을 처리하지 않은 군에 비해 스피롤리나

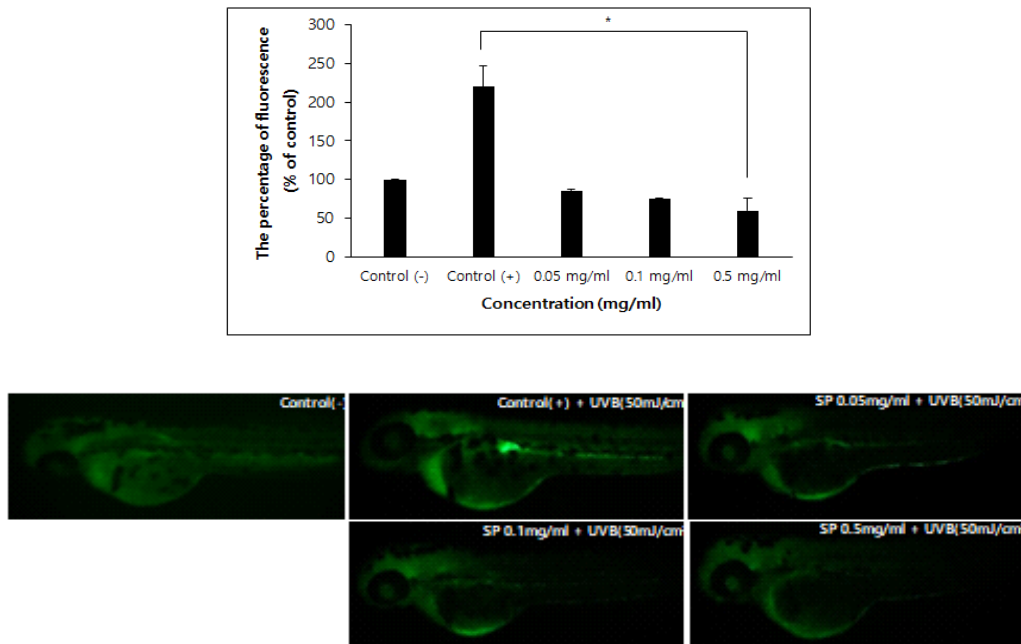


Fig. 3. Protective effect of spirulina water extract under various cultivation against UVB-induced ROS generation in Zebrafish larvae. Zebrafish ROS levels generated by UVB radiation were detected using a fluorometer microscope after staining with DCFH-DA. Control (embryo media), SP (Spirulina water extract). A (Control-), B (Control+UVB (50mJ/cm<sup>2</sup>)), C (SP 0.05 mg/mL+UVB (50mJ/cm<sup>2</sup>)), D (SP 0.1 mg/mL+UVB (50mJ/cm<sup>2</sup>)), E (SP 0.5 mg/mL+UVB (50mJ/cm<sup>2</sup>)). \* :  $p < 0.05$ .

추출물을 처리한 군에서는 UVB에 의해 유도된 ROS가 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 D. Y. Jang [19]의 스피룰리나 에탄올 추출물보다 스피룰리나 수 추출물이 UVB에 의한 ROS생성을 보다 효과적으로 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

### 3.4. DPPH radical scavenging activity assay 평가

스피룰리나 수 추출물을 0.05, 0.10, 0.50, 1.0 mg/mL 농도로 용해하여 실험한 결과 스피룰리나 수 추출물의 0.05 mg/mL에서는 0.12%의 radical 소거능이 보였으며, 0.10 mg/mL에서는 1.23%, 0.5 mg/mL에서는 13.56%, 1.0 mg/mL에서는 19.91%의 radical 소거능을 확인하였다 (Fig. 4). 이는 양성 대조군인 ascorbic acid (89.13%)와 radical 소거능을 비교하였을 때, 낮은 활성을 나타낸 것으로 확인되었지만, 이는 대

표적인 해조류에 속하는 미역 파래와 녹조 식물 군에 속하는 매생이와 비교하였을 때 [14-15], 비슷한 DPPH radical 소거능을 확인할 수 있다. 결과적으로 스피룰리나 수 추출물은 농도 의존적으로 DPPH radical 소거능이 증가함을 확인할 수 있었다.

### 3.5. FRAP 활성

스피룰리나 수 추출물을 0.05, 0.10, 0.50, 1.0 mg/mL 농도로 실험한 결과 스피룰리나 수 추출물의 0.05 mg/mL에서는 0.0802의 활성을 보였으며, 0.10 mg/mL에서는 0.0862, 0.5 mg/mL에서는 0.1498, 1 mg/mL에서는 0.2250의 활성을 확인하였다 (Fig. 5). 이는 양성 대조군인 ascorbic acid와 비교하였을 때, 낮은 활성을 나타낸 것으로 확인되었지만, 시료의 농도 의존적으로 Frap 활성이 증가함을 확인할 수 있었다. H. K. Madhyastha 등 [16]의 선행 연구 결과 농도가 증

가함에 따라 Frap활성이 증가하였으며, R. Agreganm 등[21]의 연구결과에서 확인할 수 있듯 DPPH assay와 FRAP assay의 radical 소거능이 유사한 것을 파악할 수 있었다.

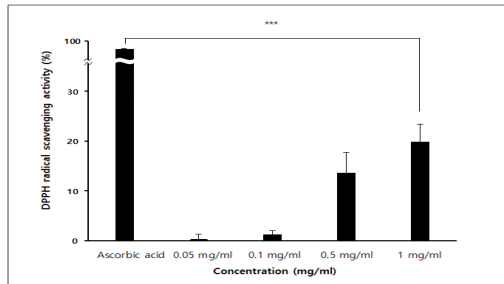


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity(%) of SP (Spirulina water extract) under various cutivation, and values represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments performed in duplicate. \*\*\* :  $P < 0.0001$ .

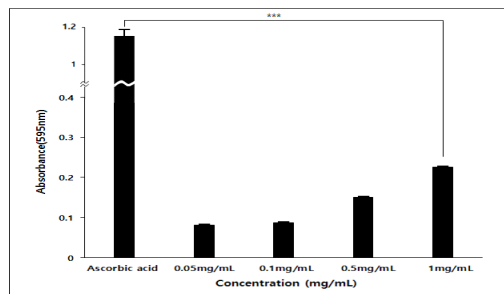


Fig. 5. FRAP assay(O.D 595nm) of SP (spirulina water extract) under various cutivation, and values represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments performed in duplicate. \*\*\* :  $P < 0.0001$ .

### 3.6. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity assay

스피룰리나 수 추출물을 0.05, 0.10, 0.50 1.0 mg/mL 농도로 실험한 결과 스피룰리나 수 추출물의 0.05 mg/mL에서는 9.20%의 radical 소거능이 보였으며, 0.10 mg/mL에서는 19.97%, 0.5 mg/mL에서는 56.26%, 1.0 mg/mL에서는 87.30%의 소거능을 확인하였다(Fig. 6). 이는 양성 대조군인 ascorbic acid 와 radical 소거능을

비교하였을 때, 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 radical 소거능이 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 L. C. Wu 등[17]의 연구결과에서 알 수 있듯, 농도 의존적으로 radical 소거능을 확인할 수 있었으며, 또한 R. Agreganm 등[21]의 연구결과에서 확인할 수 있듯 ABTS<sup>+</sup> assay는 DPPH assay와 FRAP assay에서 보이는 radical 소거능 보다 높은 radical 소거능을 확인할 수 있었으며, 본 연구에서도 R. Agreganm 등[21]의 연구와 유사한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능을 확인할 수 있었다.

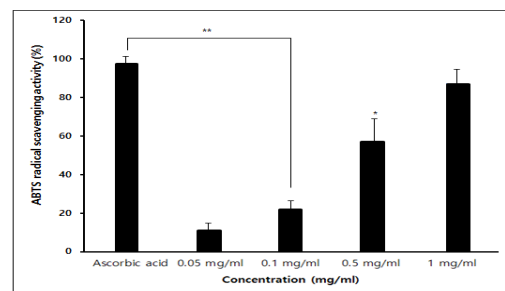


Fig. 6. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity(%) of spirulina water extract under various cutivation, and values represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments performed in duplicate. \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ .

## 4. 결론

본 연구에서는 해양 미세 조류인 스피룰리나를 사용하여 항산화효과 및 독성평가 그리고 자외선에 의해 발생하는 ROS (reactive oxygen species) 소거능에 대한 연구를 진행하였다. 항산화 효과에 대한 실험의 결과 DPPH, FRAP, ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity에서 스피룰리나 수 추출물은 농도 의존적으로 활성산소를 감소시키는 것으로 확인 되었다. 또한 대체실험동물 모델인 zebrafish를 이용하여 실험한 결과 수 추출물은 응고율과 부화율 및 박동 수 실험에서 0.05, 0.10 mg/mL의 농도에서는 독성이 발생하지 않았지만 0.5 mg/mL에서는 독성이 확인되었다. 이는 선행 연구에서 보고된 바와 같이 0.5 mg/mL 농도 이상에서는 zebrafish의 배아 및 심장에 독성을 유발하는 것으로 파악 된다. 스피룰

리나 수 추출물의 UVB로 유도된 ROS 소거능을 확인한 결과 Zebrafish에 다양한 농도(0.05, 0.10, 0.50 mg/mL)의 스피롤리나 수 추출물을 사용하였을 때, 대조군에 비해 농도 의존적으로 ROS를 억제함을 확인할 수 있었다. 이는 선행 연구에서 보고된 결과와 비교하였을 때, 동일 농도에서 스피롤리나 수 추출물이 음성대조군과 유사한 형광 세기를 나타내었다. 이는 스피롤리나 수 추출물이 UVB에 의해 유도된 ROS 생성을 보다 효과적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 스피롤리나 수 추출물이 항산화 및 자외선 방어효과가 기존의 연구된 스피롤리나 에탄올 추출물에 비해 농도 의존적으로 효과적인 것으로 파악되며, 이를 통해 스피롤리나 수 추출물이 피부 보호용 화장품 및 원료로서[22] 사용하기에 적합하다고 사료 된다.

### 감사의 글

본 연구는 2019년도 중소벤처기업부의 기술개발사업 지원에 의한 연구임 [S2660304]

### References

1. K. J. Park, S. H. Park, J. K. Kim, "Anti-wrinkle activity of *Acanthopanax senticosus* extract in ultraviolet B (UVB)-induced photoaging", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.39, No.1 pp. 42-46, (2010).
2. H. S. Joen. "Experimental studies on the inhibitory effects of *Yukmijiwangtang* on photoaging skin induced by UVB irradiation in SKH-1 mice", *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, Vol.11, No.2 pp. 239-252, (2013).
3. J. Kim, S. S. Park, N. Y. Cho, W. G. Kim, H. K. Cho, "Recent variations of UV irradiance at seoul 2004-2010", *Korean Meteorological Society*, Vol.21, No.4 pp. 429-438, (2011).
4. J. Jang, B.R. Ye, S. J. Heo, C. Oh, D. H. Kang, J. H. Kim, A. Affan, K. T. Yoon, Y. U. Choi, S. C. Park, S. Han, W. K. Jung, I. W. Choi, "Photo-oxidative stress by ultraviolet-B radiation and antioxidative defense of *eckstonol* in human keratinocytes", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol.34, No.3 pp. 926-934, (2012).
5. S. Y. Kim, D. K. Ahn, S. K. Park, J. Y. Lee, W. G. Kim, Y. C. Sim, S. J. Lee, "Protective effects of *jaummi-dan* (*Ciyinmei-dan*) against skin photoaging in hairless mouse model and UVB-induced damage in human fibroblasts", *Journal of Korean Oriental Medicine*, Vol.23, No.3 pp. 43-53, (2002).
6. D. Y. Kim, Choi. H. K, Cho. S. C, Kook. M. C, Park. C. S, "Enhancement of antioxidant and anti-aging activities of *Spirulina* extracts by fermentation", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.34, No.3 pp. 225-231, (2008).
7. S. J. Jung, H. J. Lee, S. H. Li, "A study on the effect of *Spirulina*-containing cosmetics using micro-needle", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.18, No.6 pp. 269-276, (2017).
8. F. Busquet, R. Strecker, J. M. Rawlings, S. E. Belanger, T. Braunbeck, G. J. Carr, P. Cenijn, P. Fochtman, A. Gourmelon, N. Hubler, A. Kleensang, M. Knobel, C. Kussatz, J. legler, F. Martinez-Jeronimo, C. Polleichtner, H. Rzodeczko, E. Salinas, KE. Schneider, S. Scholz, E.J. van den Brandhof, LTM. van der Ven, S. Walter-Rohde, H. Witters, S. Weigt, M. Halder, "OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the *Zebrafish* embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol.69, No.3 pp. 496-511, (2014).
9. K. S. Warren, K. Baker, M. C. Fishman, "The slow mutation reduces pacemaker current and heart rate in adult zebrafish", *The American Journal of physiology- Heart and Circulatory Physiology*, Vol.50, No.4 pp. 1711-1719, (2001).
10. G. Maria, F. Virginia, A. B. Lidia, R. M.



- Ivan, S. Gonzalez, "In vivo UVB photoprotective activity of extracts from commercial marine macroalgae", *Food and Chemical Toxicology*, Vol.50, No.3-4 pp. 1109-1117, (2012).
11. M. S. Blois "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol.181, pp. 1199-1200, (1958).
  12. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP Assay", *Analytical Biochemistry*, Vol.239, No.1 pp. 70-76, (1996).
  13. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.26, No.9-10 pp. 1231-1237, (1999).
  14. H. jang, "Study of the physiological functions and improve of *Spirulina platensis* in soothing facial redness and sensitive skin", (2015).
  15. A. A. Zaid, D. M. Hammad, E. M. Sharaf, "Antioxidant and anticancer activity of *Spirulina platensis* water extracts", *International Journal of Pharmacology*, Vol.11, No.7 pp. 846-851, (2015).
  16. H. K. Madhyastha, S. Sivashankari, T. M. Vatsala, "*C-phycoyanin* from *Spirulina fusiformis* exposed to blue light demonstrates higher efficacy of in vitro antioxidant activity", *Biochemical Engineering Journal*, Vol.43, No.2 pp. 221-224, (2012).
  17. L. C. Wu, J. A. Ho, M. C. Shieh, I. W. Lu, "Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.53, No.10 pp. 4207-4212, (2005).
  18. S. J. Zhang, "A study on the inflammatory response induced by LPS of the *Arthrospira platensis* ethanol extract", *The Korean Society of Applied Science and Technology*, Vol.36, No.3 pp. 966-974, (2019).
  19. D. Y. Jang, Y. S. Han, J. C. Yang, B. A. Kim, "Anti-oxidative and protective effects of *arthrospira platensis* ethanol extracts on zebrafish ROS Induced by UVB Induction", *The Korean Society of Applied Science and Technology*, Vol.35, No.2 pp. 423-432, (2018).
  20. F. Yogianti, M. Kunisada, E. Nakano, R. Ono, K. Sakumi, S. Oka, Y. Nakabeppu, C. Nishigori, "Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB-Induced skin inflammatory responses and carcinogenesis", *Journal of Investigative Dermatology*, Vol.134, No.10 pp. 2610-2619, (2014).
  21. R. Agreganm, P. E. S. MuneKata, D. Franco, J. Carballo, F. J. Barba, J. M. Lorenzo, "Antioxidant potential of extracts obtained from macro (*Ascophyllum nodosum*, *fucus vesiculosus* and *bifurcaria bifurcata*) and micro-algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) assisted by ultrasound", *Medicines Basel*, Vol.5, No.2 pp. 33, (2018).
  22. J. Heo, D. H. Cho, H. S. Kim, "Culture optimization of Indigenous microalgal strain, *arthrospira* sp. for cosmetic ingredients screening", *Asian journal of Beauty & Cosmetology*, Vol.13, No.4 pp. 527-532, (2015).