천연 공융용매로 추출한 스피루리나 추출물의 저장 안정성

손소희¹ · 이상현^{2,*}

¹건국대학교 생물공학과, 대학원생

²건국대학교 생물공학과, 교수

Storage Stability of Spirulina Extract Extracted with Natural Eutectic Solvent

So-Hee Son¹ and Sang-Hyun Lee^{2,*}

¹Graduate Student, Department of Biological Engineering, Konkuk University

²Professor, Department of Biotechnology, Konkuk University

In this study, functional substances from Spirulina were extracted using deep eutectic solvent (DES) synthesized with cosmetic ingredients as a new natural extractant. In order to investigate the possibility of replacing water and ethanol, which are common extraction solvents, 9 kinds of DESs were synthesized. 3 DESs with low cytotoxicity were selected to extract functional substances from Spirulina. The contents of polyphenols, phycocyanin and ABTS radical scavenging ability of the Spirulina extract were measured to study the antioxidant activity. The polyphenol and phycocyanin contents of the Spirulina extract were highest when extracted with water. However, the antioxidant activity of the Spirulina extract prepared with sodium acetate: glycerol (SA: Gly) was 4 and 4.5-folds higher than those of the extract prepared with water and 70% ethanol, respectively. The ability of DESs as preservatives for functional materials of Spirulina extract was also investigated. The polyphenols and phycocyanin of all DES extracts were more stably preserved than those in 70% ethanol or water. The antioxidant activity of Spirulina extract in sodium acetate:glycerol (1:3) was maintained over 60% after 9 days storage, while only 10% of initial activity was retained in 70% ethanol. These results show the potential of DESs as both extraction solvents and preservatives for functional substances from Spirulina.

Keywords: Activity, Deep eutectic solvent, Extraction, Phycocyanin, Spirulina, Storage stability

I. 서 론

최근 식물 유래의 추출물은 생리 활성을 향상시켜 노화를 방지하고 피부 상태의 균형을 유지하는 효과를 향상시키기 위한 비건 화장품의 원료로 주목받고 있으며, 화학약품을 배제하고자 하는 화장품 산업의 트렌드와 맞물려 다양한 천연물 추출 화장품 및 추출물 원액을 이용한 제품개발이 늘어나고 있다(Kim, 2001; Ha, 2016; Kim et al., 1995). 이러한 천연물은 피부 기능성 회복에 효능이 있는 항산화 및 항염 물질을 다량 함유하고 있다(Jeon et al., 2020; Cho et al., 2008). 특히 18종의 아미노산으로 구성되어 있는 남조류인 스피루리나는 화장품 또는 식품 등으로 이용되며, 동물용 식품의 첨가제로 이용되어 왔다(Mahajan, 1995; Quoc, 1996). 이러한 스피루리나는 산화 활

성 색소 단백질인 피코시아닌을 10% 이상 함유하고 있다. 이에 스피루리나 추출물을 keratinocyte에 적용한 결과 항산화력 증진, 항노화 개선효과를 나타냈다는 연구 결과가 발표된 바 있다(Upasani, et al., 2003; Spirulina Research Society, 2005). 스피루리나는 현재 피부노화 억제, 면역증진, 각질개선, 피부트러블 개선 등을 목적으로 화장품에 사용되고 있으며, 무기질, 비타민, 색소를 제공하기 위한 식품 첨가제로 다양하게 사용되고 있다(Bartos, 2010).

식물로부터의 유용물질을 추출하기 위해서 주로 사용하는 열수추출은 다양한 수용성 물질의 추출에 유리한 장점을 가지고 있고, 추출용매의 잔류독성을 고려하지 않아도 되기 때문에 가장 많이 사용되는 방법이다. 하지만, 열수추출 방법은 비극성 물질의 추출이 어렵고(Kim et al., 2010), 실온에서는 추출효율이 낮아 약 80~100°C의 열을 가해 추출하는데 이로 인하여 폴리페놀과 같은 유용물질의 파괴가 발생할 수 있는 단점을 지니고 있다(Shin et al., 2014). 또한, 장시간 추출 시에는 미생물 번식과 같은 안정성의 문제가 발생하기도 하고, 추출물의 장기

*Corresponding author: Sang-Hyun Lee

Tel : +82-2-2049-6269

E-mail : sanghlee@konkuk.ac.kr

접수일(2021년 12월 21일)/수정일(2022년 1월 23일)/채택일(2022년 2월 10일)

보관시에는 유용물질의 변성이 유발될 수 있기 때문에 추출 이후에는 동결건조와 같은 추가적인 공정이 필요하다(Seo et al., 2015; Abbott, 2006; Pandey, 2014). 한편, 유기용매를 이용한 추출법은 비극성 물질의 추출에 있어서 열수추출 보다 장점을 지니고 있지만, 잔류 용매에 의한 세포독성과 피부 자극 등이 유발될 수 있는 한계를 지니고 있어서 추출 과정 이후에 2차적인 용매 제거 과정이 필수적이기 때문에 비용적인 측면도 고려해야 한다(Jang, 2017; Kim et al., 2020). 이러한 열수추출과 유기용매 추출 방법의 단점을 극복하기 위해서 최근 천연 공융용매(DES, deep eutectic solvent)가 친환경 대체 용매로 개발되었다(Yoo, 2020). DES는 높은 용해성, 낮은 녹는점 등의 성질을 가지며 독성이 낮고 저렴한 가격 및 쉽고 간편한 방법으로 만들 수 있다는 장점을 가진다(Sa, 2021; Smith et al., 2014). 기존의 추출방법과 비교하여 DES를 이용한 추출 방법은 유용물질의 추출 효율을 향상시키고 추출물의 안정성을 향상시킬 수 있다는 측면에서 화장품 소재의 개발을 위한 새로운 추출용매로 사용될 수 있을 것으로 기대된다(Jang, 2015). 특히, DES는 특정 물질을 선택적으로 추출할 수 있는 특징으로 인하여 추출 용매로의 활용이 많이 연구되고 있다(Yoon, 2020).

본 연구에서는 스피루리나로부터 유용물질의 추출을 위하여 세포독성이 적은 신규 DES를 합성하고 DES를 이용한 추출 효율과 추출된 유용 물질의 추출 용매 내에서의 안정성을 측정하여 스피루리나 추출물의 기능성 화장품 소재로서의 사용 가능성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

Ethyl alcohol, methyl alcohol, glycerol, sodium carbonate, hydrochloric acid, sodium chloride, potassium chloride, acetonitrile, dichloromethane, chloroform, cyclohexane, butylated hydroxytoluene은 Samchun(Korea)에서 구입하여 사용하였다. Sodium acetate anhydrous, betaine, xylitol, potassium persulfate는 Daejung(Korea)에서 구입하였다. L-ascorbic acid, gallic acid, sodium bicarbonate, ABTS는 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하여 사용하였다. 베타-카로틴 standard는 Wako사에서 구입하여 사용하였다. Folin-Ciocalteu's phenol reagent는 Junsei(Japan)에서 구입 후 사용하였다. 스피루리나는 Purebulk사(USA)의 제품을 사용하였다.

2. DES의 제조

천연 DES는 하나의 hydrogen bond acceptor(HBA)와 하나 또는 2개의 hydrogen bond donor(HBD)로 구성하여 Table 1의 물

Table 1. List of natural deep eutectic solvents prepared in this work(Yoon, 2020)

DESs (HBA: HBD)	Abbreviation	Molar ratio
1. Sodium Acetate : Glycerol	SA:Gly	1:3
2. Betaine : Glycerol	Bet:Gly	1:2
3. Proline : Glycerol	Pro:Gly	1:2
4. Betaine : Xylitol	Bet:Xyt	1:2
5. Proline : Lactic acid	Pro:LA	1:2
6. Betaine : Lactic acid	Bet:LA	1:2
7. Betaine : Sorbitol	Bet:Sor	1:1
8. Sodium Acetate : Xylose : 1,3-Propanediol	SA:Xyl:PD	1:1:3
9. Sodium Acetate : Xylose : 1,3-Butanediol	SA:Xyl:BD	1:1:3

비율로 혼합하고 80°C에서 투명한 액상이 될 때까지 교반하여 9종류의 DES를 제조하였다. DES 제조는 Yoon(2020) 논문의 조성을 반영하여 제조하였다.

3. DES의 세포독성 측정

B16F10 흑색종 세포주(한국세포주은행, 한국)를 사용하여 Neutral red (NR) assay로 DES에 대한 세포독성을 측정하였다. 3×10^4 세포 농도의 흑색종 세포를 96-well 플레이트의 각 well에 접종하였다. 24시간 배양 후, 세포를 DES 희석액(0.1563, 0.3125, 0.625, 1.25%)으로 처리하였다. 2일 동안 추가 배양한 후, 세포를 DMEM에 용해된 50 µg/mL NR 용액으로 처리하고 3시간 동안 37°C CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 상층액을 흡인하여 제거한 후 NR 탈착액(1% 빙초산, 49% 에탄올, 50% DW)을 이용하여 색을 추출하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 스피루리나 추출물의 제조

본 실험에서는 추출 용매에 따른 스피루리나 추출물의 특성을 분석하기 위하여 증류수(distilled water, DW), 70% 에탄올, 50% DES 1 mL에 스피루리나 10 mg을 넣고 25°C에서 120 rpm으로 교반하여 추출을 진행하였다. 추출이 완료된 액체 시료는 한일과학(대한민국), Micro 17TR를 사용하여 12,000 rpm으로 20 분간 원심분리하고 상층액을 회수하여 이후의 실험에 사용하였다.

5. 스피루리나 추출물의 특성 측정

1) Total polyphenol content(TPC) 측정

TPC는 발색반응을 통해 시료에 들어있는 폴리페놀의 양을 측정하는 실험법으로 기존의 방법(Kim et al., 2019)을 일부 변

형하여 측정하였다. 표준물질은 gallic acid(g.a)를 0.01-0.05 mg/mL 사이 농도의 수용액을 만들어 사용하였고 스피루리나 추출물은 100배 희석하였다. 각 시료 용액 100 µL에 0.2 N phenol reagent 100 µL를 가해 혼합하고 5분 동안 방치한 다음 20%(w/v) sodium carbonate 수용액을 400 µL 첨가하였다. 최종 혼합액을 상온에서 15분 동안 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료용액 대신 DW 100 µL를 첨가한 것을 대조군으로 사용하였다. 스피루리나 추출물의 항산화능은 GAE(mg/g)으로 환산하여 비교하였으며, 결과 보정식은 다음과 같다.

$$GAE(mg/g) = \frac{g.a \times D}{C} \times 1000$$

g.a는 gallic acid 농도로 환산한 스피루리나 추출물의 폴리페놀 함량(mg/mL), D는 시료의 희석배수, 그리고 C는 추출 농도(mg/mL)를 나타낸다.

2) 피코시아닌 정량 측정

스피루리나 추출물의 피코시아닌 함량 측정은 Joo et al. (2000)의 방법을 참고하였다. 스피루리나 추출물을 10배 희석한 후 spectrophotometer를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하여 아래 식을 사용하여 피코시아닌 함량을 계산하였다.

$$Phycocyanin(mg/g) = \frac{A_{620} \times D \times V}{3.39 \times m} \times 1000$$

A_{620} 는 620 nm에서의 흡광도, V는 부피, m은 시료의 무게, 3.39는 620 nm에서의 흡광계수를 나타낸다.

3) ABTS radical 소거능 측정

ABTS법은 활성산소에 의해 특정한 색을 띠는 ABTS 시약이 항산화물질과 반응했을 때 해당 물질의 전자공여능으로 ABTS 라디칼이 발색력을 잃는 원리를 활용하는 실험으로, 기존의 방법(Lee, 2012)을 일부 변경하여 측정하였다. DW 10 mL에 ABTS 36 mg을 용해시켜 만든 7 mM ABTS 수용액에 140 mM potassium persulfate 수용액 176 µL를 첨가한 뒤 20시간 동안 상온인 암실에서 반응시켰다. 반응이 끝난 ABTS 라디칼 용액은 빛을 차단해 4°C에서 보관하며, 사용 시 에탄올로 734 nm 파장에서 흡광도가 1.0 ± 0.01 이 되도록 희석하여 사용하였다. 표준물질은 ascorbic acid를 0.01-0.05 mg/mL 사이의 농도로 수용액을 제조하여 사용하였다. 스피루리나 추출물은 100배 희석하여 항산화능을 측정하였다. 각 시료 용액 50 µL와 ABTS 라디칼 용액 450 µL를 혼합, vortex mixer로 혼합하고 10분 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 DW 50 µL와 ABTS 라디칼 용액 450 µL를 혼합한 것을 대조군으로 하였다. 스피루리나 추출물의 항산화능은 표준물질로 환산해 AAE(mg/g)로 비교하였다. 결과 보정식과 표준물질 환산식은 다음과 같다.

$$AAE(mg/g) = \frac{a.a \times D}{C} \times 1000$$

a.a는 ascorbic acid의 농도로 환산한 스피루리나 추출물의 항산화능(mg/mL)을 나타내고, D는 시료의 희석배수, 그리고 C는 추출 농도(mg/mL)를 나타낸다.

6. 스피루리나 추출물의 저장 안정성 측정

스피루리나 추출물을 실온에서 3, 6, 9일간 보관한 뒤 각각의 TPC, ABTS 라디칼 소거능, 그리고 피코시아닌의 함량을 스피루리나 추출물의 분석 방법에 따라 측정한 뒤 초기값과 비교하였다.

$$Storage\ stability(\%) = \frac{C_t}{C_0} \times 100$$

C_0 와 C_t 는 각각 추출 직후의 값과 보관 후 측정한 값을 나타낸다.

7. 통계처리

모든 결과는 독립된 3번의 실험 결과의 평균과 표준편차를 계산하여 나타내었다. Minitab 결과에 대한 통계는 excel 식을 통해 평균, 표준편차를 계산하고 ANOVA로 분석하고 Tukey method로 사후 검정한 실험군 간의 차이와 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. DES의 제조

본 실험에서는 DES를 스피루리나 추출물 제조를 위한 화장품 소재 추출 용매로 사용하기 위하여 화장품 성분으로 등록된 성분(sodium acetate, betaine, prolin, glycerol, xylitol, lactic acid, sorbitol, xylose, 1,3-propanediol, 그리고 1,3-butanediol)을 다양한 몰비율로 조합하여 DES로 제작하였다. 그 결과 Yoon(2020)과 같이 9종류의 DES를 제작할 수 있었다.

대부분의 DES는 투명한 무색의 약간의 점도가 있는 액체이나 DES 구성 성분에 따라 옅은 노란 빛을 띠는 것으로 나타났다. Bet:Gly, Bet:Xyt 그리고 SA:Gly은 다른 DES 대비 색상이 있는 액상으로 제조되었는데 이는 DES 제조과정에서 가해지는 열에 의해 아미노산인 proline과 당인 xylose의 변성 및 변색으로 인한 것으로 보인다. 하지만 이러한 색상의 변화는 DES의 성능과 미관에 주는 영향은 미미한 수준이다. DES의 점도는 추출공정에서 물질 전달을 방해해 DES의 추출효율을 저해할 수 있는 요인으로 작용할 수 있다. 따라서 예비실험을 통해 50%의 DES를 사용하였을 때 추출효율이 가장 높은 것을 확인

하였다. 이후의 실험에서 9종의 DES를 사용하여 세포독성을 측정해 세포독성이 없는 DES 3종을 선정하고 50% 농도의 DES를 제조하여 스피루리나 추출 실험에 사용하였다.

2. DES의 세포독성

본 실험에서는 스피루리나 추출 실험에 앞서 DES 및 DES를 추출 용매로 하여 추출된 천연 추출물을 화장품 성분으로 사용하기 위해 세포독성이 낮은 DES를 선정하고자 하였다. 세포독성의 평가는 ISO 10993-5:2009와 식품의약품안전처의 ‘의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격’에 기반하여 5가지 단계로 나눌 수 있으며, 1단계와 2단계에 해당하는 경우 세포독성이 없다고 판단할 수 있다. 이 때 2단계의 기준으로서 80% 이상의 세포 생존율을 보여야 한다. 이에 다양한 HBA와 HBD를 사용하여 제작한 9 종류의 DES를 B16F10 melanoma를 사용하여 세포독성을 측정하였다. B16F10 melanoma세포는 피부 세포종으로 정상세포에 비해 계대배양이 용이하며, 피부 독성을 평가하기에 적합한 세포라인이다(Ahn et al., 2007).

Figure 1은 본 실험에서 제작한 DES 9종의 세포독성 결과를 나타낸다. 1.25% 농도의 DES는 Bet:Gly를 제외하고는 cell viability가 80% 이하로 세포독성이 있는 것으로 나타났다. 하지만 그 농도가 0.63%로 낮아지면 SA:Gly와 Bet:Gly의 cell viability가 각각 88.7%와 115.2%로 1.25%의 농도에서보다 세포독성이 낮아진 것을 확인하였다. 또한 0.31% 이하의 농도에서는 SA:Gly, Bet:Gly, 그리고 Bet:Xyt의 cell viability가 80% 이상으로 세 종류 DES 모두 세포독성이 거의 없는 것으로 나타났다. 본 실험에서 1.25% 농도에서 세포독성이 없는 DES는 Bet:Gly 한 종류인 것으로 나타났으나 실제 화장품 제작 시 화장품 제형에 첨가되는 추출물의 함량은 0.1% 수준으로 0.31% 농도에서 세포독성이 없었던 세 종류의 DES는 화장품 원료로 사용하기에 적합할 것으로 보인다. 본 실험을 통해 세포독성이

Figure 1. Cytotoxicity of DES (black bars: control, in order from left: DES 1-9)

낮다고 판단된 DES인 SA:Gly, Bet:Gly, 그리고 Bet:Xyt를 사용하여 스피루리나로부터 유효 성분을 추출하고, 일반적으로 사용되는 추출 용매인 DW와 70% 에탄올을 사용하여 추출한 추출물과 유효성 및 저장 안정성을 비교하여 평가하였다.

3. TPC 분석

폴리페놀은 천연재료에 다양하게 포함되어 있으며, 항산화 효과를 보이는 광범위한 물질들이다. 높은 폴리페놀 함량을 포함한 물질들은 잠재적으로 천연 항산화 작용을 하면서 식품 또는 화장품 산업에 다양한 재료로 이용되었다. 특히, 추출 용매에 따라 항산화 작용은 다양하게 변화되기 때문에 용매 조건을 통한 항산화 기능의 증가는 지속적인 연구가 진행되고 있다(EI 2014, Komaikul, Mangmool et al., 2021). 스피루리나는 다양한 항산화 성분을 함유하고 있으며 추출 용매의 종류에 따라 추출되는 성분의 차이가 있을 수 있다. TPC 측정은 추출물 내의 폴리페놀의 양을 평가할 수 있는 방법으로 간접적으로 추출물의 항산화능을 추론할 수 있다(Singleton et al., 1965; Jung, 2008).

본 실험에서는 각각의 추출 용매를 사용하여 1시간부터 8시간까지 추출을 진행하였고 추출된 폴리페놀의 양은 gallic acid 양으로 환산하여 나타냈다(Figure 2).

1시간 동안 추출을 진행한 경우 DW로 추출한 경우 3.24 ± 0.12 mg/g, 70% EtOH로 추출한 경우 1.57 ± 0.12 mg/g, SA:Gly로 추출한 경우 3.12 ± 0.12 mg/g, Bet: Gly로 추출한 경우 1.93 ± 0.24 mg/g, Bet:Xyt로 추출한 경우 1.57 ± 0.12 mg/g으로 나타났으며, 이를 ANOVA로 분석하고 Tukey method로 사후 검정한 결과, Figure 2a와 같다. Tukey method로 사후 검정한 결과, DW, SA:Gly가 A 그룹, 70% EtOH, Bet:Gly, Bet:Xyt가 B그룹으로, SA:Gly이 DW와 동일한 수준의 높은 추출 효율을 보였다. 즉 다시 말하면 물 또는 SA:Gly를 추출 용매로 사용하였을 때 추출된 폴리페놀의 양이 각각 gallic acid로서 3.2 mg/g, 3.1 mg/g으로 사용된 추출 용매 중 가장 많은 양의 폴리페놀이 추출된 것으로 나타났다. 8시간 추출 후 추출된 폴리페놀의 양이 gallic acid로서 6.5 mg/g으로 물을 용매로 사용한 추출 방법 대비 73.7%의 추출 효율을 나타냈다. Bet:Gly를 사용한 추출 방법에서는 1시간 추출에서는 낮은 추출 효율을 나타냈으나 추출 용매별로 8시간 동안 DES 및 물, 70% EtOH로 추출한 스피루리나 추출물의 TPC 농도는 Figure 2b와 같다. DW로 추출한 경우 8.77 ± 0.41 mg/g, 70% EtOH로 추출한 경우 5.27 ± 0.12 mg/g, SA:Gly로 추출한 경우 6.46 ± 0.19 mg/g, Bet:Gly로 추출한 경우 5.755 ± 0.22 mg/g, Bet:Xyt로 추출한 경우 5.99 ± 0.394 mg/g로 나타났으며, DW가 A 그룹, SA:Gly가 B 그룹, Bet:Gly, Bet:Xyt가 BC그룹으로, 70% EtOH이 C그룹으로, 물이 가장 높은 수준의 추출 효율을 보였으며 SA:Gly로 추출하였을 때 가장 높은 수준의 추출 효율을 보였다($p < 0.05$). 폴리페놀의 양을 ANOVA로

Figure 2. ANOVA analysis of TPC of Spirulina extract according to the extraction solvent. The efficiency of extraction for 1 hour (a) and extraction for 8 hours (b) was confirmed. Significant differences were confirmed by cross-comparison with controls (70% ethanol, distilled water)

분석하고 Tukey method로 사후 검정한 결과($p < 0.001$), 물을 이용한 추출방법이 가장 추출효율이 높았으며 세 종류의 DES는 추출 효율이 거의 유사하고 70% 에탄올을 사용한 방법이 폴리페놀 추출 효율이 가장 낮은 것으로 나타났다. 공융용매를 이용한 식물을 분리 또는 추출하는 연구(Choi et al., 2021)에서 3종의 공융용매별 리그닌 추출률은 페놀류 기반의 공융용매, 카복실산 기반의 공융용매, 알칼리 기반의 공융용매 순으로 각 공융용매의 전기전도도 특성에 비례하는 결과를 나타냈으며 이러한 결과로 보아 각 공융용매의 전기전도도 특성이 리그닌 추출에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 총 폴리페놀 함량에서 DW로 추출한 추출물이 높은 수준으로 나타나는 것은 스피루리나 내의 폴리페놀은 물에 대한 용해도가 높기 때문인 것으로 보여진다. 또한, 스피루리나에 포함된 수용성 카로티노이드, 피코시아닌 및 클로로필 등의 물질이 항산화능을 보이는 것으로 판단된다. DES의 경우에는 추출 시간이 1시간 일때는 물보다 좋거나 유사한 정도의 폴리페놀을 추출할 수 있었다. 이는

50% SA:Gly 추출조건이 70% 에탄올 대비 높은 추출효율을 나타내 에탄올을 대체할 수 있는 추출 용매로 사용할 수 있을 것으로 보여진다. 추출시간에 따른 폴리페놀의 함량이 달라지는 것은 극성물질 이외에도 약한 비극성 물질이 같이 함유되어 있는 것으로 보이며, 시간이 지남에 따라 극성 물질의 용출이 많이 되어 발생하는 현상으로 보인다.

4. 피코시아닌 함량 분석

피코시아닌은 수용성 단백질 색소로 강력한 항산화능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Kim, 2021). 본 실험에서는 스피루리나에 다량 함유되어있는 피코시아닌을 추출 용매를 달리하여 추출하고 추출된 피코시아닌의 함량을 광학적 방법으로 측정하였다(Figure 3). 1시간 추출에서 DES 및 DW, 70% EtOH로 추출한 스피루리나 추출물의 phycocyanin 농도는 다음과 같다. DW로 추출한 경우 69 ± 0.7 mg/g, 70% EtOH로 추출한 경우

Figure 3. ANOVA analysis of phycocyanin content of Spirulina extract according to the extraction solvent. The efficiency of extraction for 1 hour (a) and 8 hours (b) for extraction was confirmed. Significant differences were confirmed by cross-comparison with controls (70% ethanol, distilled water)

25.4±0.2 mg/g, SA:Gly로 추출한 경우 69±0.1 mg/g, Bet:Gly로 추출한 경우 26.4±0.4 mg/g, Bet:Xyt로 추출한 경우 36±0.1 mg/g로 나타났다. 이를 ANOVA로 분석하고 Tukey method로 사후 검정한 결과, DW와 SA:Gly이 A 그룹, Bet: Xyt이 B그룹으로, Bet:Gly와 70% EtOH이 C 그룹으로 DW와 SA:Gly로 추출하였을 때 가장 높은 수준의 추출 효율을 보였다(Figure 3a). 8시간 추출에서는 DES 및 물, 70% EtOH로 추출한 *Spirulina* 추출물의 피코시아닌 농도는 다음과 같다. DW로 추출한 경우 166.2±5.8 mg/g, 70% EtOH로 추출한 경우 55.3±0.4 mg/g, SA:Gly로 추출한 경우 96±0.4 mg/g, Bet:Gly로 추출한 경우 70.2±1.8 mg/g, Bet:Xyt로 추출한 경우 50.0±2.2 mg/g로 나타났으며, 이를 ANOVA로 분석하고 Tukey method로 사후 검정한 결과, DW이 A 그룹, SA:Gly이 B 그룹, Bet:Xyt이 C 그룹으로, Bet:Gly와 70% EtOH이 D 그룹으로, A그룹이 가장 높은 수준의 추출 효율을 보였으며, 다음은 SA:Gly로 추출하였을 때 가장 높은 수준의 추출 효율을 보였다(Figure 3b, $p<0.05$). 따라서 1시간 추출에서는 SA:Gly로 추출된 추출물의 피코시아닌 함량이 69.2 mg/g으로 물을 용매로 사용한 추출로 추출된 추출물의 피코시아닌의 함량과 유사한 것으로 나타났다. 하지만 추출 시간이 길어질수록 추출된 피코시아닌 함량의 차이는 커져 물을 용매로 사용한 추출 방법으로 추출된 추출물의 피코시아닌의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 피코시아닌이 수용성 단백질로 에탄올보다 물에 대한 용해도가 높기 때문으로 보여진다. 그 결과 모든 추출 시간에서 SA:Gly로 추출한 추출물의 피코시아닌의 함량이 70% 에탄올로 추출한 피코시아닌 함량보다 최대 2.7배 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 폴리페놀 추출과 마찬가지로 DES가 피코시아닌의 추출에서도 70% 에탄올 보다 효율적이라는 것을 의미한다. 특히, SA:Gly가 폴리페놀과 피코시아닌 추출에 가장 적합한 DES이었다. 피코시아닌은 수용성 색소의 한 종류로 시아노박테리아

의 세포벽 성분이라 추출이 어려운 것으로 보고되어 있으나 (Chittapun et al., 2020), DES는 피코시아닌의 추출에도 활용이 가능할 것으로 보인다.

5. ABTS 라디칼 소거능

본 실험에서는 앞선 스피루리나 추출물의 스펙트럼 측정 결과를 바탕으로 추출된 물질의 항산화능을 측정하기 위해 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 항산화 물질의 활성 -OH(hydroxyl group)에 의해 환원되어 자유 라디칼(free radical) 고유의 색인 청록색이 연한 녹색이 되며 안정화되는 원리를 적용한 측정 방법이다(Chung et al., 1999; Stanier, 1977; Shin, 2021; Kim et al., 2015). 이러한 자유 라디칼(free radical)에 대한 높은 소거능은 물질의 높은 항산화능을 나타내는 것으로 화장품소재로서의 활용가능성을 평가하는 지표 중 하나이다(Uhm et al., 2015; Park et al., 2009). 본 실험에서는 각각의 추출 용매를 사용하여 스피루리나로부터 유용 물질을 추출하였다. 추출 시간은 1시간, 8시간에 진행하였으며 추출된 추출물은 희석하여 ABTS 라디칼과 반응시켜 추출물의 항산화능을 측정하였다(Figure 4). Figure 4은 추출 용매에 따른 스피루리나 추출물의 항산화능을 ascorbic acid 양으로 환산한 것으로 물을 용매로 사용한 추출 방법과 에탄올 추출 방법을 비교하였을 때 초기 1시간 추출은 큰 차이를 보이지 않았으나 8시간 추출 후에는 물을 용매로 사용한 추출물의 항산화능이 에탄올 추출물의 항산화능 대비 1.6배 더 높은 것으로 나타났다. 본 실험에 사용된 DES 중에서는 SA:Gly를 사용하여 추출하였을 때 추출물의 항산화능이 1시간 추출 시 ascorbic acid로서 40.6 mg/g으로 본 실험에서 사용된 추출 용매 중 추출물의 항산화능이 가장 높았고 8시간 추출에서도 ascorbic acid로서 49.6 mg/g으로 물을 용매로 사용한 추출 및 에탄올 추출 방법

Figure 4. ANOVA analysis of antioxidant activity of *Spirulina* extract according to the extraction solvent. The efficiency of extraction for 1 hour (a) and 8 hours (b) for extraction was confirmed. A significant difference was confirmed by mutual comparison with the control group (70% ethanol, distilled water)

대비 각각 1.1배, 1.8배 더 높은 것으로 나타났다. SA:Gly를 제외한 나머지 두 종류의 DES를 사용한 추출물은 에탄올 추출물과 비교하였을 때 유사한 수준이었다. ANOVA 분석을 통해서 통계적으로도 확인할 수 있었다. 1시간 추출 시 DW로 추출한 경우 10.19 ± 1.21 mg/g, 70% EtOH로 추출한 경우 8.98 ± 0.17 mg/g, SA:Gly로 추출한 경우 40.59 ± 1.88 mg/g, Bet:Gly로 추출한 경우 6.39 ± 1.73 mg/g, Bet:Xyt로 추출한 경우 8.29 ± 0.17 mg/g로 나타났으며, SA:Gly이 A그룹, DW가 B그룹, 70% EtOH, Bet:Gly, Bet:Xyt가 C그룹으로, SA:Gly이 가장 높은 수준의 추출 효율을 보였다(Figure 4a). 8시간 추출에서는 DW로 추출한 경우 44.57 ± 0.86 mg/g, 70% EtOH로 추출한 경우 27.29 ± 0.17 mg/g, SA:Gly로 추출한 경우 49.58 ± 0.69 mg/g, Bet:Gly로 추출한 경우 31.84 ± 1.27 mg/g, Bet:Xyt로 추출한 경우 23.32 ± 1.04 mg/g로 나타났으며, 이를 ANOVA로 분석한 결과는 SA:Gly이 A그룹, DW이 B그룹, Bet:Gly이 C그룹으로, 70% EtOH이 D그룹으로, Bet:Xyt가 E그룹으로, SA:Gly가 가장 높은 수준의 추출 효율을 보였으며, 다음으로 DW로 추출하였을 때 가장 높은 수준의 추출 효율을 보였다(Figure 4b).

이러한 결과는 DES의 추출 용매로서의 가능성을 보여준다. 추출물의 항산화능은 특정 물질에 의해서만 나타나는 것이 아니라 항산화능을 가지는 물질이 얼마나 많이 추출되었는지와 추출된 물질의 항산화능이 얼마나 유지되면서 추출되었는지가 복합적으로 작용한다. 앞선 실험 결과에서 DES를 사용한 스피루리나 추출물의 폴리페놀, 피코시아닌의 항산화물질의 함량은 물 추출물 보다 낮은 것으로 나타났다. 하지만 이렇게 추출된 항산화 물질들의 실제 항산화능은 본 실험에 사용된 DES 중 SA:Gly로 추출된 추출물이 가장 높은 것으로 나타났다 ($p < 0.05$).

SA:Gly는 폴리페놀과 피코시아닌의 추출에 있어서는 물 보다 효율이 다소 낮았다. 하지만, ABTS 라디칼 소거능으로 측정한 항산화능은 DW나 70% EtOH로 추출한 것 보다 높게 나왔다. 이는 SA: Gly가 항산화능을 가지는 친수성 물질과 소수성 물질을 고르게 추출할 수 있었기 때문으로 판단된다. 또한, SA:Gly로 추출된 스피루리나 추출물의 각각의 항산화 물질의 함량은 낮지만 추출된 항산화 물질의 항산화능이 잘 보존되어 다른 추출 용매로 추출된 추출물보다 항산화 물질의 비활성 (specific activity)이 높았던 것으로 판단된다. 에탄올 추출물의 경우 추출되는 항산화 물질의 함량은 높으나 색소-단백질 복합체인 피코시아닌 등이 에탄올에 의해 변성되어 항산화능이 떨어졌기 때문으로 생각된다. 그러므로, 에탄올 추출물의 장기 보관을 위해서는 추가공정으로 에탄올을 제거해야 할 것으로 생각된다. 공융용매의 특징분석 및 천연물을 이용한 추출원리 및 방법탐색의 선행연구(Chang, 2017)에서는 DES를 이용하여 다시마로부터 후코이단을 추출시 황산화기 함량과 항산화 활성이 더 높은 것으로 확인하였다. 특히 DES는 항산화 물질을

추출하는 과정에서의 변성을 억제하여 후처리 공정 없이도 천연물 추출 제조에 활용이 가능할 것이다. 하지만 DES 추출물의 항산화능은 DES의 종류에 따라 그 차이가 많이 나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 DES를 이용하여 스피루리나에서 화장품 소재용 천연물 추출 용매로 사용하기 위해서는 보다 많은 후보군의 발굴과 screening 단계가 필요할 것으로 보여진다.

6. 스피루리나 추출물의 추출 안정성 분석

앞선 실험을 통해 DES가 스피루리나로부터의 유용물질을 효율적으로 추출할 수 있다는 것을 확인하였다. 특히, DES는 DES를 제작할 때 사용된 HBA와 HBD의 성분에 따라 용매 특성이 달라짐을 확인할 수 있었다. 추출물 내 수용성 물질인 폴리페놀, 피코시아닌의 함량 측정을 통해 SA:Gly와 Bet:Gly은 물보다는 에탄올에 가까운 극성을 나타내며 Bet:Xyt은 물에 가까운 특성을 나타냄을 확인하였다.

물과 에탄올은 각각 수용성 또는 지용성 물질을 추출하는 데는 매우 효과적인 추출 용매이나 추출 용매에 추출물을 장기간 보관하기 위해서는 부패를 막기 위해 방부제를 첨가하거나 유용 물질의 활성을 보존하기 위해 용매를 제거하는 공정을 필요로 한다. 따라서 본 연구에서는 이러한 추출 용매의 단점을 개선하고자 DES의 스피루리나 추출 용매로서의 능력과 함께 보존용매로서의 가능성을 확인하는 실험을 진행하였다. 용매의 유효 성분 보존능은 각 용매로 스피루리나로부터 항산화 물질을 추출한 뒤 추출한 용매에서 그대로 9일간 보관하여 용매의 추출 안정성을 평가하였다. 또한, 추출물의 ABTS 라디칼 소거능도 함께 측정하여 실제 화장품 소재에서 기대하는 항산화능의 유지도 함께 평가하였다.

1) 폴리페놀

천연DES를 이용한 spirulina 추출물의 TPC 보존능력을 측정한 결과는 Figure 5와 같다. 9일이 지난 후의 TPC는 DW $52.41 \pm 1.24\%$, 70% EtOH $40.48 \pm 2.01\%$, SA:Gly $86.27 \pm 1.11\%$, Bet:Gly $72.30 \pm 0.93\%$, Bet:Xyt $81.74 \pm 2.24\%$ 로 나타났다. 앞선 스피루리나의 폴리페놀 추출 실험에서는 DW가 가장 높은 추출 수율을 나타냈고, 다음으로 SA:Gly, 그 다음으로 Bet:Gly와 Bet:Xyt, 70% EtOH 순서로 나타났다(Figure 2). 하지만 Figure 5에서 보이는 바와 같이 추출된 폴리페놀의 보존능은 추출능과는 그 경향이 다른 것으로 나타났다. 물과 에탄올로 추출한 스피루리나 추출물의 폴리페놀은 보관 기간이 길어질수록 그 함량이 전차 줄어들어 에탄올 추출물의 경우에는 약 5일간 보관하였을 때 50% 이하로 줄어들었고 물 추출물은 9일간 보관하였을 때 폴리페놀의 함량이 52.4%로 절반가량 줄어든 것으로 나타났다. 하지만 DES를 사용하여 추출한 추출물의 경우에는 추출된 폴리페놀의 양이 70% 에탄올을 사용하여 추출한 추출

Figure 5. TPC retention capacity of Spirulina extract according to the extraction solvent

(●: DW, ○: 70% ethanol, ▼: 50% SA:Gly, △: 50% Bet:Gly, ■: Bet:Xyt)

물의 폴리페놀의 양과 유사하거나 살짝 높은 정도였으나 추출 안정성은 향상되어 추출 후 9일간 보관하여도 추출물내의 폴리페놀의 함량이 초기 대비 70% 이상이었으며 SA:Gly와 Bet:Xyt을 사용하여 추출한 추출물의 경우에는 9일간 보관하여도 80% 이상의 폴리페놀이 산화되거나 변성되지 않고 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 DES의 스피루리나 추출 시 보존 용매로서의 가능성을 보여주는 것으로 천연물로부터 유용 물질을 추출한 뒤 추가 공정이나 기타 첨가제 없이 추출물의 성분을 장기간 보존할 수 있을 용매로 개발할 것으로 기대된다.

2) 피코시아닌

천연DES를 이용한 spirulina 추출물의 피코시아닌의 보존능력을 측정된 결과는 Figure 6과 같다. 9일이 지난 후의 피코시아닌 잔존 함량은 DW 79.36±4.26%, 70% EtOH 44.61±1.95%, SA:Gly 84.63±4.21%, Bet:Gly 88.25±4.96%, Bet:Xyt 84.60±4.23%로 나타났다. 피코시아닌은 수용성 색소 단백질로 앞선 실험에서 물을 사용하여 추출하였을 때 가장 높은 추출 효율을 보였고 DES 중에서는 SA:Gly를 사용하여 추출한 추출물의 피코시아닌 함량이 높은 것을 확인하였다. 70% 에탄올을 사용한 추출물은 Bet:Xyt과 함께 피코시아닌 함량이 가장 낮은 것을 확인하였다. 하지만 피코시아닌의 추출 안정성 실험에서는 70% 에탄올을 사용한 스피루리나 추출물을 제외하고는 모두 물과 같은 보존능을 가지는 것으로 나타났다. 스피루리나로부터 각 용매를 사용하여 추출한 뒤 6일이 지난 후에도 피코시아닌 함량이 초기 대비 90% 이상 유지되었고 9일이 지난 후에도 80% 이상인 것을 확인하였다. 반면 70% 에탄올로 추출한 추출물의 피코시아닌 함량은 약 8일 이후에는 50% 이하로 감소하였고 9일 보관하였을 때는 44.6%로 감소하였다. 이는 친수성

Figure 6. Phycocyanin retention capacity of Spirulina extract according to the extraction solvent

용매인 에탄올에 의한 색소-단백질 복합체인 피코시아닌의 변성에 의한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 폴리페놀의 추출 안정성 결과와 마찬가지로 DES의 스피루리나 추출 시 보존 용매로서의 가능성을 보여주는 것으로 에탄올보다 효과적으로 천연물로부터 유효 성분을 추출 및 보관할 수 있는 용매로 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

3) ABTS 라디칼 소거능

앞선 ABTS 라디칼 소거능 측정 실험을 통해 천연물 추출물의 항산화능은 추출된 항산화 물질의 함량뿐만 아니라 추출과정 중 항산화 물질의 활성 유지도 중요하게 작용함을 확인하였다. 본 실험에서는 추출 용매 내에서의 추출된 항산화 물질의 보존성을 ABTS 라디칼 소거능을 통해 확인한 결과 9일 후 잔

Figure 7. Stability of antioxidant activity of Spirulina extract according to extraction solvent (●: DW, ○: 70% ethanol, ▼: 50% SA:Gly, △: 50% Bet:Gly, ■: Bet:Xyt)

존환성이 DW $20.85 \pm 0.71\%$, 70% EtOH $12.46 \pm 0.73\%$, SA:Gly $63.98 \pm 1.29\%$, Bet:Gly $23.87 \pm 1.85\%$, Bet:Xyt $27.90 \pm 1.80\%$ 로 나타났다(Figure 7). SA:Gly의 보존능력이 가장 높은 것으로 나타났고, 70% EtOH의 보존능력이 가장 낮은 것으로 나타났다. Figure 7에서 보이는 바와 같이 스피루리나 추출물의 항산화능은 폴리페놀과 피코시아닌 함량보다 반감기가 더 짧은 것으로 나타났다. 70% 에탄올 추출물과 Bet:Gly 추출물은 각각 약 2일 이후에 항산화능이 초기 대비 50% 이하로 떨어졌고 Bet:Xyt 추출물은 3일, 물 추출물은 4일 이후인 것으로 나타났다. 하지만 DES인 SA:Gly를 이용한 추출물의 항산화능은 9일 간 보관하여도 항산화능이 초기대비 64.0%로 가장 높은 것으로 나타났으며 6일 이후에는 항산화능이 유지되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 DES의 우수한 항산화 물질 보존능을 보여주는 것으로 일반적으로 사용되는 추출 용매인 물과 에탄올을 대체하여 쉽게 산화되는 항산화 물질의 보호에 사용이 가능할 것으로 기대된다. 하지만 DES의 종류에 따라 스피루리나 내에 함유된 물질의 보존능이 다르므로 항산화 물질의 항산화능 보존에 적합한 SA:Gly의 항산화능이 높은 DES의 단일물질에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 보인다.

IV. 결 론

다양한 특성의 천연물을 화장품 소재로 사용하기 위하여 추출 용매를 이용한 추출 방법이 이용되고 있다. 하지만 일반적으로 사용되는 용매는 추출 후 보관을 위해 방부제를 첨가하거나 용매 자체의 자극성 또는 유용 물질의 파괴 등으로 후처리 공정이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 화장품 소재로 사용되는 성분을 사용하여 9종의 DES를 제작하고 이를 스피루리나 천연물 추출 및 보존 용매로 사용하고자 하였다. 스피루리나는 단백질을 다량 함유하는 조류로 단백질 외에도 피코시아닌, 항산화 물질을 함유하고 있으며, 피부의 건강 및 항산화에 도움을 주는 건강기능 식품 원료이다. 따라서 본 연구에서는 DES와 일반적으로 사용되는 추출 용매인 물과 70% 에탄올을 추출 용매로 하여 스피루리나로부터 유용 물질을 추출하였다. 총 9종의 DES를 제조하고 B16F10 melanoma를 사용한 세포독성 실험을 통하여 화장품 원료로 사용되는 범위에서 세포독성이 없는 세 종류의 DES(SA:Gly, Bet:Gly, Bet:Xyt)를 선정하였다. DES는 종류에 따라 추출 특성이 다른 것으로 나타났다. DES 중 SA:Gly를 사용하여 추출한 스피루리나 추출물은 다른 DES 대비 폴리페놀, 피코시아닌의 함량이 높았으며 추출된 항산화 물질의 항산화능 역시 높은 것으로 나타났다. 특히, SA:Gly로 추출한 스피루리나 추출물은 물이나 70% 에탄올로 추출한 경우 보다 높은 ABTS 라디칼 소거능을 나타냈다.

본 연구에서는 각 조건에 따른 적합한 DES는 폴리페놀일 경우 SA:Gly로 추출이 적합하며 피코시아닌 SA:Gly로 추출이 적

합하다. ABTS 라디칼 소거능에는 SA:Gly로 추출이 적합한 것으로 나타났다. 물 또는 70% 에탄올 추출조건에서 DES는 폴리페놀 1시간 조건에는 SA:Gly가 물 또는 70% 에탄올 추출 대비 우수 하였으며 피코시아닌은 1시간 조건에는 SA:Gly가 물 또는 70% 에탄올 추출 대비 우수하여 폴리페놀과 비슷한 경향을 보였다. ABTS 라디칼 소거능에는 SA:Gly로 추출이 우수한 것으로 나타났다. 따라서 추출 안정성은 모든 DES 추출에서 총폴리페놀 및 피코시아닌 보존 안정성이 우수하였으며 DES에서 중 SA:Gly가 가장 높은 보존 안정성을 보였다. 이에 실험에 이용된 DES 중 SA:Gly, Bet:Gly, Bet:Xyt 추출 시 세포독성이 낮고 SA:Gly, Bet:Gly, Bet: Xyt를 이용한 추출 시 보관 안정성이 우수하다. 또한 각 DES의 조성에 따라 DES를 선택적으로 이용하면 높은 추출 효율을 통한 추출함량을 조절 할 수 있다. 이에 추출물을 동결건조와 같은 후처리 공정 없이 그대로 추출 용매에 보관하였을 때 유효 물질의 안정성을 측정 한 결과, 9일간의 보관시 SA:Gly이 유효 물질 추출뿐만 아니라 스피루리나로부터 추출된 폴리페놀 및 피코시아닌의 보존에 효과적 이었으며 항산화능의 유지에 탁월함을 확인하였다. SA:Gly가 전반적으로 좋은 효과를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과들은 DES의 추출 용매로서의 가능성 뿐만 아니라 보존용매로서의 가능성 역시 보여주는 것으로 기존의 추출 용매를 대체할 수 있는 차세대 추출 및 보존용매로 DES가 다방면으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 다만 천연 DES를 이용한 스피루리나 추출물을 이용한 유효성 단일물질의 탐색, 기능성 화장품으로의 개발 및 장시간 보존 안정성에 대한 부분은 추가 연구가 필요 할 것으로 보인다.

DES 시장의 확대로 DES를 통한 추출법추출 효율을 증대하고 화장품 소재의 안전성이 중요시되는 현시점에서 천연 스피루리아의 화장품 소재는 천연 DES를 이용하여 자극을 받아 예민해진 피부의 개선을 도와줄 수 있는 돌파구가 될 수 있을 것이다. 또한 본 연구에 사용된 DES는 실제 합성할 수 있는 DES 중 일부로 후속 연구를 통해 화장품에 사용될 수 있는 다양한 DES 후보군을 개발하고 DES의 특성을 보다 체계적으로 분석 및 데이터화하여 다양한 천연물에 적용할 수 있는 시스템을 개발한다면 DES가 스피루리나 추출 시 이용할 수 있는 용매로서 화장품 산업뿐만 아니라 생물, 의약품, 식품 등의 다양한 분야에서의 활용 가능할 것으로 생각된다.

References

- Abbott, A. P. (2005). Model for the Conductivity of Ionic Liquids Based on an Infinite Dilution of Holes. *ChemPhysChem*. 6, 2502.
- An, I. S., Kim, J. H., Yu, H. S., Jang, R., Kang, S. M., Choi, T. B., Kwon, T. J., An, S. K., & Kim, K. Y. (2007). The Inhibition Effect of L-cysteine on Melanogenesis in B16F10 Mouse Mela-

- noma Cells. *Kor J Aesthet Cosmetol*, 5(2), 239-246.
- Badarinath, A. V., Rao, K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. (2010). A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *International Journal of Pharm Tech Research*, 2(2), 1276-1285.
- Bartosz, G. (2010). Non-enzymatic antioxidant capacity assays: limitations of use in biomedicine. *Free Radical Research*, 44(7), 711-720.
- Chung, W. J., Wang, M. S., Choi, S. I., Kim, J. K., and Jeong, B. C. (1999). High cell density cultures of micro-algal *Dunaliella bardawil*. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 14, 160-166.
- Choi, K. H., Lee, Ch. W., Lee, K. S., & Ryu, J. Y. (2021). Exploring Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Lignocellulosic Materials (II) – Extraction Tests for Lignin- and Cellulose-based Standard Materials. *Journal of Korea TAPPI*, 53(3), 29-35.
- El, B. (2014). Natural Antioxidant Ingredient from by-Products of Fruit. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 9(3), 311-320.
- Ha, B. J. (2001). Functional Cosmetics. Shinkwang Pub. 3-45.
- Jeon, Y. H., Cho, Y. J., & Kang, S. M. (2020). Cellular Activities of *Abelmoschus manihot* Jinhuakui Extracts Extracted from Water based Alkaline Solvent. *Journal of The Korean Society of cosmetology*, 26(4), 752-759.
- Jo, Y. J., Joo, I. S., Cheon, S. S., An, B. J., Kim, J. H., Kim, M. W., & Kwon, O. J. (2008). Screening of Biological Activities of Extracts from *Rhododendron mucronulatum* Tur cz. Flowers. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, 37(3), 276-281.
- Jang, K. J. (2017). Extract fucoidan from brown algae using Deep eutectic solvent and electrospun nanofiber containing fucoidan. Master's Thesis. Hannam University.
- Joo, D. S., & Cho, S. Y. (2000). Stability of phycocyanin and spectral characteristic of phycobilins from *Spirulina platensis*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33(5), 482-488.
- Jeong, J. K. (2008). (The) study for antioxidation activity and polyphenol contents of Korean sweet potatoes. Ph. D. Thesis, Uiduk University. 3-9.
- Kim, Y. J., & Kim, K. Y. (1995). Cosmetology. chung ku Publisher. 3-65.
- Kim, M. Y., Kim, J. S., Sa, Y. J., Jeong, H. J., Chun, W. J., Kwon, Y. S., Kim, T. Y., Choi, H. S., Yu, Ch. Y., & Kim, M. J. (2010). Screening of Extraction Solvent Condition of Fermented *Rhus verniciflua* Stem Bark by Antioxidant Activities. *The Korean Society of Medicinal Corp Science*, 18(4), 217-223.
- Kim, J. H., Kang, H. M., Lee, S. H., Lee, J. Y., & Park, N. Y. (2015). Antioxidant and α -glucosidase inhibition activity of seaweed extracts. *Korean Society of Food Preservation*, 22(2), 290-296.
- Kim, H. S., Park, H. Y., Kwon, H. S., Lee, S. H., Ha, J., Lee, S. W., & Cho, S. J. (2019). Variations in antioxidant activity in *Protaetia brevitarsis* larvae depending on the feeding source. *Journal of Mushroom*, 17(4), 261-267.
- Kim, M. S. (2021). A study on improvement of itchiness of C-phycocyanin, pharmacological efficacy of skin and application of cosmetic material. Master's Thesis. Mokwon University.
- Komaikul, J., Mangmool, S., Putalun, W., & Kitisripanya, T. (2021). Preparation of Readily-to-Use Stilbenoids Extract from *Morus Alba* Callus Using a Natural Deep Eutectic Solvent. *Cosmetics*, 8(3), 91.
- Kim, S. L. (2001). (A) study on the development of cosmetics industry after economic crisis in Korea. Master's thesis. Yonsei University.
- Lee, J. S. (2012). Antioxidant and Skin-Whitening Activities of Mushrooms and Seaweeds Extracts. Master's Thesis. Incheon University. 3-16.
- Mahajan, G., & Kamat, M. (1995). γ -linolenic acid production from *Spirulina platensis*. *Appl Microbio and Biotechnology*, 43, 466-469.
- Park, M. K., & Kim, C. H. (2009). Extraction of polyphenols from apple peel using cellulase and pectinase and estimation of antioxidant activity. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 38(5), 535-540.
- Pandey, A., Rai, R., Pal, M., & Pandey, S. (2014). How polar are choline chloride-based deep eutectic solvents?. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16(4), 1559-1568.
- Quoc, K. P., & Pascaud, M. (1996). Effect of dietary gamma-linolenic acid on the tissue phospholipid fatty acid composition and the synthesis of eicosanoids in rats. *Ann Nutr & Metabolism*, 40(2), 99-108.
- Spirulina Research Society. (2005). Complete Food Spirulina. Hangeam Seowon.
- Seo, H. S., & Park, B. H. (2015). Properties of Deep Eutectic Solvents (DESS) and Their Applications. *Journal of Institute of Convergence Technology*, 5(2), 43-48.
- Shin, J. B., Choi, W. Y., Kang, D. H., & Lee, H. Y. (2014). Comparison of Anti-Inflammatory Activity of *Spirulina maxima* Extract by Ultrasonication and Water Extraction Process. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 43(12), 1852-1857.
- Shin, S. H. (2021). Antioxidant Effect and Cell Bioactivity of Non-edible Brown Algae Extract. Ph. D. Thesis, Konkuk University. 7-33.
- Singleton, V. L., & Rossi, Joseph A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*. 16(1), 144-158.
- Um, S. H., Choi, I. H., Lee, J. H., & Lee, S. H. (2015). Anti-neuroinflammatory Effects of Glycolytic Enzyme Extract of Microalgae Residues in LPS-stimulated BV-2 Microglia. *J. Chitin Chitosan*, 20(1), 10-19.
- Upasani, C. D., & Balaraman, R. (2003). Protective effect of Spirulina on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. *Phytotherapy Research*, 17(4).
- Yoon, J. C. (2020). Effect of deep eutectic solvents on activity and stability of laccase. Master's Thesis. Konkuk University. 1-6.
- Yoo, E. J. (2020). Characterization and Application of Lignin Extracted using Deep Eutectic Solvents. Master's Thesis. Konkuk University. 4.