

유자 부산물 에탄올 추출물의 항노화 및 미백효과

김 다 슬 · 김 동 현 · 오 명 진 · 이 광 근* · 국 무 창** · 박 장 서[†]

동국대학교 화공생물공학과, *동국대학교 식품공학과, **안양대학교 해양생명공학과
(2010년 6월 10일 접수, 2010년 6월 17일 수정, 2010년 6월 20일 채택)

Antiaging and Whitening Activities of Ethanol Extract of Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) By-product

Da Sel Kim, Dong Hyun Kim, Myoung Jin Oh, Kwang Geun Lee*,
Moo Chang Kook**, and Chang Seo Park[†]

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, 3-26 Pil-dong, Chung-gu, Seoul 110-715, Korea

*Department of Food Science & Technology, Dongguk University

**Department of Marine Biotechnology, Anyang University, Incheon 417-833, Korea

(Received June 10, 2010; Revised June 17, 2010; Accepted June 20, 2010)

요약: 유자(*Citrus junos* Sieb ex TANAKA)는 북동아시아 지역에서 재배되는 감귤류 중이며, 비타민 C, 플라보이드, 리모노이드를 풍부히 함유하고 있다. 한국에서 재배되는 유자는 차나 음료식품으로 사용되고, 부산물인 씨와 과피는 전량 폐기되고 있다. 이 연구에서는 유자 부산물을 기능성 화장품 소재로서 이용 가능성을 평가하였다. 씨와 과피 에탄올 추출물에서 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성 효과는 크지 않았지만 고농도의 phenolic compounds를 함유하고 있다. 각질형성세포(HaCaT Keratinocyte)와 섬유아세포(Normal Fibroblast)에 UVB를 각각 12.5 mJ/cm², 15 mJ/cm²를 조사한 후 항염효과와 Collagen 함성량, Collagen 분해효소인 MMP-1 (matrix metalloproteinase)의 발현량을 확인하였다. 과피 추출물에서 UVB에 의해 증가된 TNF- α 를 상당량 줄여주었다. 마찬가지로 과피 추출물은 MMP-1의 발현량을 줄여주고 Collagen의 합성량도 증가시켰다. 한편 유자 추출물의 α -MSH (Melanocyte stimulating hormone) 처리에 의해 유도된 멜라닌 생합성 억제효과와 타이로시나제 발현량 감소를 확인하였다. 결론적으로 유자 부산물의 에탄올 추출물질은 항노화, 미백 기능성 화장품 소재로 가치가 기대된다.

Abstract: Yuza (*Citrus junos* Sieb ex TANAKA) is a citrus fruit that is cultivated in northeast Asia. Citron is known for containing abundant antioxidants such as vitamin C, flavonoids, for example hesperidin and hesperetin, and terpenoids such as limonin. When mature citron is processed for tea or other beverage food products in Korea, massive amounts of seeds and pericarp are remained as waste. This study aimed to exploit the processed remnant of Citron for developing functional cosmetic applications. Ethanol extracts of Yuza seed and pericarp did not show significant radical scavenging activities measured by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. But they contained significantly high phenolic compounds. Cultured human dermal fibroblasts and HaCaT keratinocytes were irradiated with 25 mJ UVB and the citron extracts were added to the medium of each culture. Cellular damages caused by UVB irradiation were prevented by the addition of the Yuza extract. In addition, the reduction of the enhanced MMP-1 expression after irradiation of UVB in human dermal fibroblasts was observed. Also the increased level of pro-inflammatory TNF- α in the UVB irradiated HaCaT cells was decreased. The collagen expression was enhanced by the extract. Yuza extract markedly inhibited melanin production from α -MSH treated B16F1 melanoma

[†] 주 저자 (e-mail: dgucsp@dongguk.edu)

cells. Melanin assay, tyrosinase zymography results indicated that Yuza extract had strong depigmenting activity. In conclusion, Yuza ethanol extracts have good anti-photoaging and strong anti-melanogenic efficacies.

Keywords: yuza by-product, anti-photoaging, collagen, MMP-1, Whitening, melanin assay, tyrosinase zymography, cosmetic

1. 서 론

피부 노화현상은 내인성 노화(intrinsic aging)와 광노화라고도 불리는 외인성 노화(photo-aging) 두 가지로 나눌 수 있다. 내인성 노화는 나이가 들어감에 따라 피부의 표피와 진피 사이의 결합이 약해지고, 피부각질형성세포의 분열 능력이 저하되며 지질형성능력이 떨어지게 된다. 오랜 시간 자외선 노출로 인해 일어나는 외인성 노화는 자외선이 표피를 투과해 진피층까지 깊이 침투함으로써 탄력을 유지시키는 진피 내의 collagen과 엘라스틴(탄력 섬유)을 손상시켜 나타난다[1,2]. 자외선 작용으로 인해 피부는 superoxide anion, peroxide 등을 포함하는 유해한 활성산소종(ROS, Reactive Oxygen Species)을 과잉 생성한다. 증가된 ROS는 DNA에 damage를 주고 형질변환 signal을 증가시켜 궁극적으로 AP-1 (Activator protein 1) transcription factor를 증가 시킨다. UV는 직접적으로 DNA mutagenesis에 관여하며 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 증가 시키고 TGF- β 를 감소시킨다[3-5]. 이러한 기작들은 collagen의 합성과 분해, 또한 inflammatory cytokine 생성에도 영향을 미친다. 자외선에 의해 세포 사이를 채우는 성분인 collagen과 elastin의 합성이 감소하여 다양한 기질 단백질 분해 효소의 발현이 촉진된다. 이러한 기질 단백질의 결핍은 광노화에 있어서 가장 중요한 인자라고 할 수 있다[6-8].

피부, 머리카락, 눈동자의 색을 결정하는 멜라닌은 색소 세포인 melanocyte에서 생성되며 melanocyte에서 melanin이 형성되는 총체적인 과정을 melanogenesis라 하며 melanocyte는 피부 표피의 가장 아래층에 위치한다[9]. 피부의 색소 세포인 melanocyto로부터 합성되는 멜라닌은 물에 녹지 않는 흑갈색 색소와 금속 단백질로 구성되어 있으며 각질형성 세포인 keratinocyte를 통해 표피로 이동하여 피부 착색이 나타나게 된다. 이러한 멜라닌 합성은 과도한 자외선 조사, 질병 또는 유전적인 원인에 의해 주로 전구체인 tyrosinase 효소의 산화 작용에 의해 나타나게 된다. Tyrosinase는 phenylalanine의 한 종류인 tyrosine을 DOPA-quinone과 DOPA-chrome으로 산화시켜 각각 멜라닌의 종류인 eumelanin, pheomelanin으로 합성을 활성화

화 시키는 효소이다[10]. Tyrosinase와 같은 멜라닌 합성 관련 효소의 활성이 감소하여 멜라닌의 합성이 억제되는 것을 미백작용이라 하고 이러한 효능을 나타내는 물질로는 kojic acid, arbutin 등이 잘 알려져 있다[11]. 이러한 작용기전 외에 melanocyte에서 합성된 melanin이 melanosome의 파립형 입자로 keratinocyte를 통해 피부 표면으로 이동하는 과정에서 melanocyte와 keratinocyte 간의 melanosome transfer를 차단하는 작용 역시 미백효과를 나타낼 수 있다[12].

유자(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA)는 뛰어난 향과 특유의 산미를 지니므로 주로 과육 및 과피를 사용하여 유자청으로 제조되어 유자차로 소비되고 있으며[13,14] 유자 부산물은 유자 과실의 약 10 ~ 15 % 정도 차지하는데[15] 이는 유자청 및 유자 착즙액의 제조 후 대부분이 연간 1,800톤 폐기되어진다. 북아시아 지역에서 주로 재배되고 있는 유자는 vitamin C와 헤스페리딘, 헤스페레틴, 리모닌과 같은 플라보노이드 성분이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 플라보노이드 성분들은 항염증, antioxidant 그리고 radical scavenging activity가 뛰어나다고 알려져 있다. Citrus 중에서 추출된 플라보노이드 성분, 특히 헤스페리딘, 헤스페리틴, 노빌레틴, 리모닌과 같은 물질들은 tumor necrosis factor- α , interleukin-1, interleukin-6와 같은 inflammatory cytokine 물질들을 줄여주는 것으로 보고되었다[16,17]. 따라서 본 연구에서는 폐기되어지는 유자의 부산물을 이용하여 이의 항염증 효과, collagen 생성 및 미백효능 등을 평가하여 항노화와 미백 효능을 갖는 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

유자는 전라남도 고흥 지방의 유자를 이용한 유자청 가공 부산물을 한성식품(전남 고흥)으로부터 제공받아 사용하였다. UV/Vis spectrometer (DU730, Beckman Coulter, USA)의 제품을 사용하였고, 추출 용매인 Hexane, Ethanol은 DaeJung (Korea) 제품을 사용하였다. 배양 세

포는 normal keratinocyte와 normal human dermal fibroblasts, B16F1 melanoma를 사용하였으며 배양 배지는 GIBCO (USA) 제품을 사용하였다. TNF- α 측정을 위한 ELISA kit는 BIO-SOURCE (USA) 제품을 사용하였다.

2.2. 유자 추출물의 제조

고흥산 유자청 제조 후 냉동 상태의 부산물을 녹여 과피와 씨로 분류하였다. 부위별로 동결 건조하여 건조 분말상태로 각 부위별로 -20 °C에 보관하였다. 각 분말은 60 °C에서 추출을 시행하였다. 추출물은 10배 농축하여 시료 제조하여 -70 °C 초저온 냉동고에 보관하였다. 피부 효능 평가 과정 시 세포에 대한 유기용매의 제한이 있어 동결건조 후 다이메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide)에 녹여 실험하였다.

2.3. 총 페놀 함량 측정

총 페놀함량은 천연물 등의 원료 내 추출 성분 중 생리 활성 물질을 지닌 phenolic compounds의 함량을 분석한다. Folin-Denis법[18]에 따라 1 N Folin-ciocalteau solution, 탄산나트륨 solution, 유자 분획물을 각각 1 : 1 : 1로 50 min 반응시키고 원심분리 후 상등액을 분광광도계 760 nm에서 측정한다. 지표 물질은 갈릭산(gallic acid)을 사용하였다.

2.4. 세포 손상 회복효과

배양이 끝난 후 plate에서 배지를 제거하고 MTT solution (0.33 g/L)을 배양배지와 같은 양 만큼 넣어주고 배양한다. 90 min 후 MTT solution을 제거하고 1 mL의 Isopropanol을 이용해 20 min 동안 실온에서 shaking한 후 상등액을 회수하여 13,000 rpm에서 5 min 동안 원심분리 한다. 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 대조군과 세포 생존율을 비교하였다.

2.5. 염증성 사이토카인 억제 효과(ELISA)

12well plate에 well당 1×10^5 cells의 HaCaT Keratinocytes를 접종한 후 10 % FBS와 1 % 항생제가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 24 h 동안 배양한 후 312 nm, 12.5 mJ/cm²의 UVB를 조사하였다. 조사 후 FBS가 첨가되지 않은 DMEM에 유자 추출물을 농도별로 첨가하여 24 h 동안 추가 배양하였다. HaCaT Keratinocyte의 배양이 끝나고 회수한 배양액을 이용하여 ELISA kit (Bio-Source, USA)를 이용하여 배양액으로 분비된 TNF- α 의 양을 측정하였다.

2.6. 단백질 발현 조사(Western blot)

Normal fibroblasts를 6 well plate에 well 당 2×10^5 cells을 접종하고 FBS가 첨가된 DMEM 배지로 24 h 동안 배양하고 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 24 h 동안 starvation 시켰다. 그 후 15 mJ/cm²의 UVB를 조사하고 FBS와 phenol red가 포함되지 않은 DMEM 배지에 각 농도별 유자추출물을 첨가하고 72 h 동안 추가 배양하였다. Normal Fibroblast의 배양이 끝난 후 배양액을 회수하여 bradford assay 방법에 따라 단백질량을 정량한 후 SDS-PAGE를 진행하였다. 전기영동 후 단백질을 gel에서 PVDF membrane으로 transfer한 뒤 1차 antibody와 2차 antibody를 이용하여 단백질을 표지하고 X-ray 필름에 감광하여 단백질 발현 정도를 분석하였다.

2.7. 멜라닌 함량 조사(Secreted Melanin assay)

멜라닌 형성 세포주의 하나인 B16F1 melanoma를 1 % penicillin-streptomycin과 10 % Fetal bovine serum을 포함한 Dulbecco's modified essential medium을 이용하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 5 nM의 α -MSH (Melanocyte stimulating hormone)와 함께 시료를 배지에 농도별로 처리하여 48 h 동안 추가 배양하였다. Secreted melanin assay는 Bhatnagar, V., *et al.*의 방법을 변경하여 참고하였다[19]. 추출물을 처리하고 48 h 동안의 배양이 끝난 후 배지를 회수하여 10,000 rpm에서 10 min간 원심분리 한 후 상등액을 96well plate에 옮겨 microplate reader (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. 타이로시나제 발현량 조사(Zymography)

Tyrosinase zymography 는 Kim, K.S., *et al.*의 방법을 변형하여 참고하였다[20]. 추출물을 처리하고 48 h 동안의 배양 후 RIPA buffer를 이용하여 cell을 lysis 하였다. Bradford assay를 통해 β -mercaptoethanol을 첨가하지 않은 laemmli sample buffer를 이용해 단백질량을 모두 동일하게 보정하였다. 단백질을 가열하는 과정을 생략하고 8 % SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)를 한 후에 gel을 0.1 M SPB (Sodium phosphate buffer, pH 6.8)로 30 min 동안 shaking 하면서 equilibration 하였다. 한 번의 equilibration을 추가로 반복한 후에 staining은 5 mM L-DOPA를 SPB에 녹여 37 °C에서 약 1 h 동안 발색이 나타날 때까지 반응시켰다.

Table 1. Total Polyphenol of the Etanol Extract from Yuza By-product

	Total polyphenol (mg G.A equivalents/g d.w)
Seed EtOH extract	10.91 ± 0.12
Pericarp EtOH extract	34.53 ± 0.37

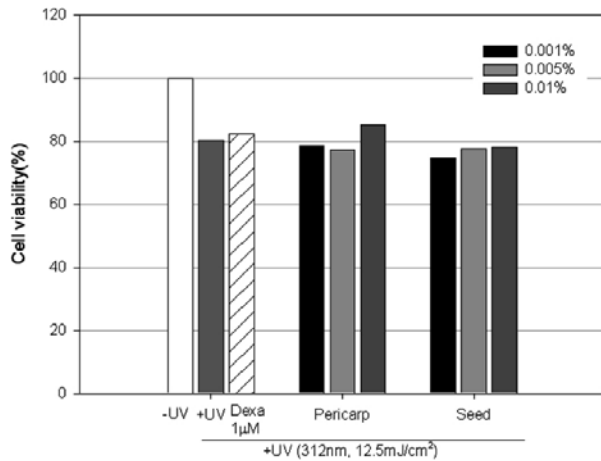


Figure 1. Protection effects of the citron extracts on cell damage induced by UVB (MTT assay).

3. 결과 및 고찰

3.1. 추출 총 페놀 함량

유자 부산물의 phenolic compounds의 총 함량은 Table 1과 같다. 씨 부분보다는 과피 부분에서 phenolic compounds 구조의 성분이 다량 추출되었다. DPPH assay에 의한 실험 결과에서 자유라디칼 소거활성은 뛰어나지 않으나 체내에서 생리활성을 가지는 phenol 구조의 성분의 양을 측정할 Total phenol assay에서는 효과가 있음을 알 수 있다.

3.2. 자외선(UVB)에 의한 세포 손상 회복효과

자외선에 의한 세포 손상 회복 효과를 알아보기 위해 자외선 조사 후 세포 생존율을 측정하였다. 유자 부산물 추출물 모두가 0.001 ~ 0.01 % 농도에서 자외선에 의한 세포 사멸을 방지하였다. 과피 추출물의 경우 0.01 % 농도에서 대략 15 %의 세포 손상 회복 효과가 있음을 보였다. 따라서 두 추출물의 경우 세포사멸의 방지시키는 효능이 있으며, 과피 추출물의 경우 미세한 세포 손상 효능이 있는 것으로 사료된다(Figure 1).

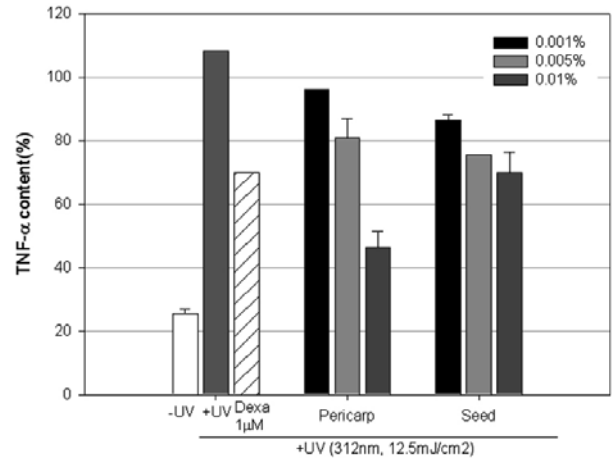


Figure 2. Anti-inflammatory activity of citron extracts on UVB-induced TNF- α .

3.3. 염증성 사이토카인 억제 효과

HaCaT-keratinocyte에 자외선을 조사한 후 시료를 농도별로 처리하고 24 h 동안 배양 후 배양 상등액을 회수하여 염증성 사이토카인을 측정할 결과 씨 추출물의 경우 TNF- α 생성을 약 30 %정도 줄여주는 것을 볼 수 있다. 과피 추출물의 경우는 농도 dependant하게 46 %까지 줄어들어 dexamethson보다 더 좋은 효능을 보였다(Figure 2). 따라서 유자 부산물 추출물 0.001, 0.005, 0.01 % 농도에서 자외선에 의해 분비가 증가되는 염증 유발 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)인 TNF- α 의 분비를 줄여주는 효과가 있음을 알 수 있다.

3.4. Collagen합성 관련 단백질 발현

MMPs는 matrix components 분해에 중요한 역할을 한다. 특히 MMP-1은 collagenase-1이라고도 하며 collagen 분해의 주요 원인으로 알려져 있다. 그러므로 유자의 추출물이 MMP-1의 발현량을 줄여주는지 확인했다. Normal Fibroblast를 6 well plate에 24 h 배양하고 FBS가 포함되지 않은 DMEM으로 24 h starvation을 주고 UVB를 15 mJ/cm² 조사하였다. 72 h 추가 배양한 뒤 배지를 회수하여 western blot 방법을 이용해 MMP-1의 발현량을 확인한 결과 유자에 다량 포함되어 있다고 알려진 헤스페레틴과 리모닌이 5 µM과 10 µM에서 MMP-1의 발현량이 줄어드는 것을 볼 수 있고, 특히 헤스페레틴은 Ascorbic acid보다 뛰어난 효과를 보였다. 마찬가지로 유자의 씨, 과피 추출물 0.0025 %, 0.005 %의 농도에서도 MMP-1의 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있으며 특히 과피 추출물에서 뛰어난 효과를 보였다

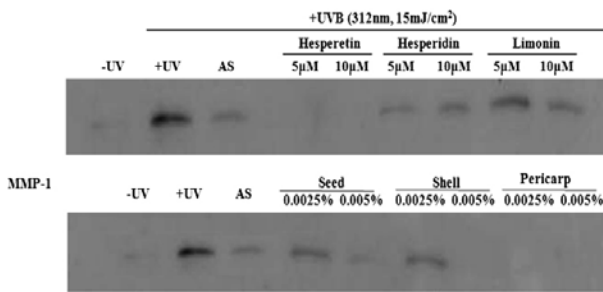


Figure 3. Effect of citron extracts on the production of MMP-1. AS : Ascorbic acid 25 µM.

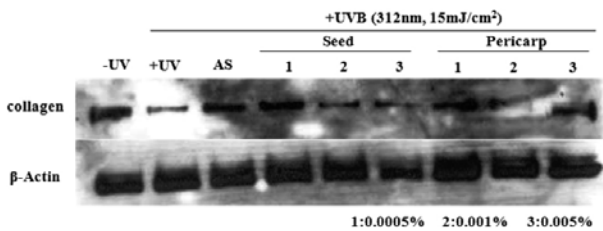


Figure 4. Collagen synthesis effect by citron extracts after UVB irradiation. AS : Ascorbic acid 25 µM.

(Figure 3). 같은 방법으로 collagen 합성량을 확인했다. MMP-1 발현량의 경우 씨와 과피에서 모두 효과를 보였으나 collagen 합성량의 경우 씨의 추출물에서 시료의 loading량의 차이에 의해 정확한 결과를 논의하기 어려우나 과피의 경우에는 농도가 증가함에 따라 collagen의 합성량도 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

3.5. 분비된 멜라닌 함량 측정

B16F1 melanoma cell에 α-MSH와 함께 시료를 배지에 농도 별로 처리하여 48 h 동안 추가 배양하여 분비된 멜라닌 함량을 측정된 결과 유자 분획물 0.01 0.02 % 농도에서 α-MSH에 의한 세포 내 분비된 양이 과피와 씨에서 감소함을 알 수 있다. 특히, 0.02 %의 농도에서 표준물질인 kojic acid보다 좋은 활성을 나타내었다. 따라서 유자 부산물 중 과피와 씨의 추출물은 멜라닌 분비를 억제하는 강력한 미백활성이 있는 것으로 사료된다(Figure 5).

3.6. 타이로시나아제 발현량 측정

SDS-PAGE를 통해 gel 상에서 세포 내의 tyrosinase가 L-DOPA와 반응하여 staining 되어 나타나는 tyrosinase zymography 결과, 유자 부산물을 처리한 경우 tyrosinase의 발현이 큰 폭으로 억제되었다. 따라서 유자 부산물은 자체적인 tyrosinase의 발현을 억제시키는 효과가 있음을 알 수 있다(Figure 6).

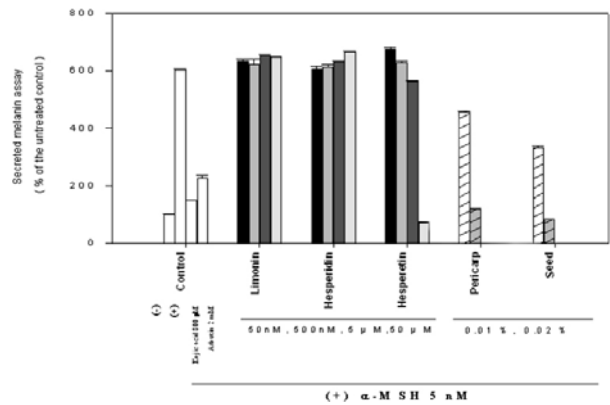


Figure 5. The Down-regulation of secreted melanin by citron extracts.

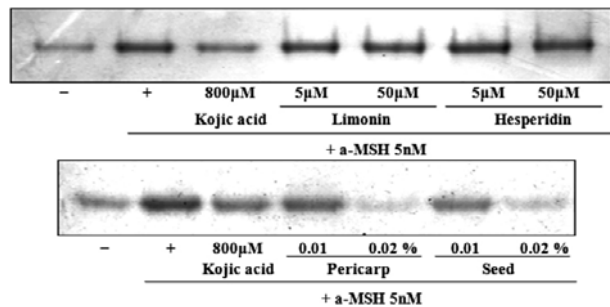


Figure 6. Staining of tyrosinase on electrophoresis by L-DOPA.

4. 결 론

본 연구는 유자청 제조 시 폐기되는 부산물이 항산화, 항노화 및 미백 화장품 소재로서의 활성과 효능을 갖는지 알아보기 위하여 total phenol assay, MTT (자외선에 의한 세포 손상 회복), 항염(TNF-α), 신생 collagen 합성, MMPs 발현 억제 효과, 분비된 멜라닌 억제 및 타이로시나아제 저해 효과에 대해 알아보려고 진행되었다. 지표 물질로 설정한 hesperidin, hesperetin, limonin의 효과는 미미하였지만, 부산물의 추출물에 의한 효과는 우수하였다. 이는 유자 부산물 내 다른 성분 활성에 의한 것으로 예측할 수 있으며, 향후 지표물질에 대한 분석 및 효능 실험이 진행 중이다. 항산화 효과를 측정하기 위한 total phenolic assay에서 유자 부산물 중 과피 추출물은 30.53 ± 0.37 (mg G.A equivalents/g d.w)의 높은 phenolic compound 함유량을 나타내었다. 항염 효과 측정에서 부산물 모두 UV-induced pro-inflammatory cytokines인 TNF-α를 40 % 이상 줄여주어 항염증에 효능이 있음을 보였으며, 자외선에 의한 세포 손상에 대해 강력한

회복 효과가 있음을 보였다. 과피 추출물은 각 농도별로 투여한 모든 범위에서 자외선 처리로 감소한 Collagen 합성량을 증가시켜주고, MMPs의 발현을 감소시켜주어 항노화 효과가 증가됨을 확인하였다. 또한, 과피 및 씨 추출물은 세포 내에서 분비되는 melanin의 양과 tyrosinase의 양을 줄여주는 효과를 보였다.

이상의 결과들은 유자청 가공 부산물의 항산화, 항노화 및 미백 효과를 확인하였다. 특히, 유자 부산물 중 과피 추출물은 항산화, 항노화 및 미백 효과 모두 활성이 우수한 것으로 판단되며 부산물을 이용한 기능성 화장품 소재로서의 사용 가치가 기대 된다. 향후의 연구에서는 유자 부산물 내 기능성 활성을 보이는 물질에 대한 분석과 유자 내 풍부한 flavonoid glycoside를 생물전환기술을 통해 aglycon 형태로 변환하여 활성증가 가능성을 규명하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 기술개발연구사업의 연구비 지원(S-2009-A0214-00005)을 받아 수행된 연구 결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, and J.J Voorhees, Molecular Mechanism of Photoaging in Human Skin *In Vivo* and Their Prevention by All-Trans Retinoic Acid.
- J. S. Shim, Y. Y. Kwon, and J. K. Hwang, The Effects of Panduratin A Isolated from *Kaempferia Pandurata* on the Expression of Matrix Metalloproteinase-1 and Type-1 Procollagen in Human Skin Fibroblasts.
- J. H. Rabe, A. J. Mamelak, P. J. S. W. L. Morison, and D. N. Sauder, Photoaging : Mechanisms and repair, *J. Am Acad Dermatol*, **55**, 1 (2006).
- T. Ishida and I. Sakaguchi, Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of *Lithospermum erythrorhizon*, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(5), 928 (2007).
- M. M. Basher, M. R. Sharma, and V. P. Werth, TNF-alpha production in the skin, *Arch. Dermatol. Res.* (2008).
- M. H. Shin, H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin *in vivo*, *J Invest. Dermatol.*, **125**(2), 221 (2005).
- G. J. Fisher and J. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid : ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that AP-1 regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin *in vivo*, *J. Incestig. Dermatol. Symp. Proc.*, **3**(1), 61 (1998).
- G. J. Fisher, Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees, Photophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *N. Engl. J. Med.*, **337**(20), 1419 (1997).
- T. Yokota, *et al.*, The inhibitory effect of glabridin from licorice extraction melanogenesis and inflammation, *Pigment Cell Research*, **11**(6), 355 (1998).
- L. D. P. Uyen, D. H. Nguyen, and E. K. Kim, Mechanisms of skin pigmentation, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **13**(4), 383 (2008).
- Y. Aoki, T. Tanigawa, H. Abe, and Y. Fujiwara, Melanogenesis inhibition by an oolong tea extract in B16 mouse melanoma cells and UV-induced skin pigmentation in brownish guinea pigs, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **71**(8), 1879 (2007).
- M. Seiberg, *et al.*, Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening, *Journal of Investigative Dermatology*, **115**(2), 162 (2000).
- Y. T. Kim, Main composition analysis of citron (*Citrus junos* Sieb.) and production of their juice and vinegar. MS Thesis. Gyeongsang National University (1997).
- H. W. Nam and Y. H. Hyun, Drying of citron juice from by-product of citron tea manufacturing, *Korean J Food Nutr*, **16**, 334 (2003).
- H. Y. Lee, Y. M. Kim, D. H. Shin, and B. K. Sun, Aroma components in Korean citron (*Citrus medica*), *Korean J Food Sci Technol*, **19**, 361 (1987).
- N. Lin, T. Sato, Y. Takayama, Y. Mimaki, Y. Sashida, M. Yano, and A. Ito, Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages, *Biochemical Pharmacology*, **65**, 2065 (2003).

17. S. Tanaka, T. Sato, N. Akimoto, M. Yano, and A. Ito, Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobilletin, in human keratinocytes *in vivo* and *in vitro*, *Biochemical Pharmacology*, **68**, 433 (2004).
18. T. Gutfinger, Polyphenols in olive oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 966 (1958).
19. V. Bhatnagar, A. Srirangam, and R. Abburi, *In vitro* modulation of proliferation and melanization of melanoma cells by citrate *Molecular and Cellular Biochemistry*, **187**(1-2), 57 (1998).
20. K. S. Kim, *et al.*, Inhibitory effect of *piperlongumine* on melanin production in melanoma B16 cell-line by downregulation of tyrosinase expression. *Pigment Cell Research*, **19**(1), 90 (2006)