

연구노트

Comparison of Melanogenesis-Inhibiting Activity by Extracts of *Prunus persica* Flower and Calyx

Hyeong-U Son¹, Suk Hee Lee², Min-A Kim¹, Hee-Joon Park³, Sang-Han Lee^{1,4*}

¹Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Cheongdo Peach Experiment Station, Cheongdo 714-851, Korea

³CA Pharm Co, Ltd, Seoul 153-023, Korea

⁴Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

도화 및 도화약 추출물의 미백활성 비교

손형우¹ · 이숙희² · 김민아¹ · 박희준³ · 이상한^{1,4*}

¹경북대학교 식품공학부, ²경북농업기술원 청도복숭아시험장

³(주)씨에이팜, ⁴경북대학교 식품생물산업연구소

Abstract

The antioxidant activity and whitening effect of the distilled water (DW) and ethanol extracts of the *Prunus persica* flower and calyx were studied. In the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay for antioxidant activity measurement, it was confirmed that the flower extract was stronger than the calyx extract, and that the ethanol extract was relatively stronger than the DW extract. To define the whitening effect, an experiment was conducted involving tyrosinase inhibitory assay and measurement of the melanin content of B16F10. As a result of the use of tyrosinase, the DW extract of calyx showed 53% inhibition as the highest activity. The melanin content inhibitory rates were defined as 57% for the ethanol flower extract and 63% of the ethanol calyx extract, based on a 10 µg/mL concentration. Based on these results, mixture with the whitening effect in the extract of *P. persica* and another compounds should be researched for development as a cosmetic ingredient.

Key words : *Prunus persica*, calyx, tyrosinase, melanin, ORAC, B16F10

서 론

미백은 현재 식품의약품안전청에서 허용하는 기능성 화장품의 3가지 기능(미백, 자외선 차단, 주름 개선) 중 1가지의 기능으로서, 피부가 햇빛에 노출되면 진피의 melanocyte에서 분비되는 melanin이 표피를 보호하기 위하여 표피와 진피사이에 분비되어 표피의 색이 검게 보이는 현상이다(1). 한편, 이러한 멜라닌의 분비억제에 대한 생화학적 기전은 비교적 상세하게 알려져 있다(2). 멜라닌 생성의 첫 시발물질은 tyrosine으로부터 시작되며 melanocyte의 수적 증가에 의하여 비례하며 tyrosinase 효소 활성도의 증가에 의하여 결정된다. Tyrosinase가 L-tyrosinase를 3,4-dihydroxyphenylalanine

(L-DOPA)의 산화를 촉매시켜 DOPA quinone을 생성하게 되며(3), tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 등의 일련의 효소반응에 의하여 붉은 계열의 eumelanin과 갈색계열의 pheomelanin이 합성된다(4,5). 멜라닌 생합성에 관여하는 인자로는 tyrosinase, dopachrome conversion factor, prostaglandin (PG), interferon (IFN), melanocyte stimulating hormone (MSH), vitamin D3, histamine 등이 있다(6). 이중 tyrosinase를 저해하는 물질로서 현재 가장 잘 알려져 있는 것이 arbutin, kojic acid, hydroquinone인데 강력한 미백효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 일부 부작용으로 인하여 천연의 물질로부터 미백활성을 가지는 물질의 개발에 노력하고 있다(7).

복숭아(*Prunus persica* L. Batsch)는 장미과 벚나무속에 속하는 복숭아나무의 열매로서, 중국이 원산지로서 복사나

*Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

무라고도 부르며, 3-5 미터 정도로 자라는 작은 교목으로서 우리나라에서는 사과나무, 굴나무, 감나무, 포도나무에 이어 많이 재배하는 것으로 알려져 있다. 복숭아는 백도(*Prunus persica* for. *alba* Schneider)와 홍도(*Prunus persica* for. *rubro-plena* Schneider)로 크게 분류되며(8-10), 노화와 알츠하이머에 관여하는 cholinesterase를 저해하는 활성의 연구(11), cisplatin에 의한 간독성의 부작용 완화(12)가 대표적인 효과이다. 복숭아에는 lipid transfer protein으로 구성된 allergen 등의 allergy 유발 물질(13)을 함유하고 있는 반면, 과실의 70% 에탄올 추출물이 HMC-1 세포의 염증반응에서 NF-κB, IL-6, TNF-α, histamine 생성 등을 억제하는 항염증 효과를 보이는 것으로 보고되었다(14). 복숭아의 미백효과에 관한 연구로서는 과실, 씨, 잎 추출물의 tyrosinase 저해 효과에 대한 연구가 있으나(9,15,16), 기타 연구는 미흡한 실정이다.

최근 경북농업기술원 청도복숭아시험장의 새로운 품종으로 맛, 수확량, 저장성이 우수한 백향을 개발하여 이의 상품화에 많은 노력을 하고 있다. 따라서 이와 같은 백향의 부가가치를 향상시키는 연구의 일환으로서 꽃(도화, 桃花) 및 꽃받침(도화약, 桃花萼)의 열수 및 에탄올 추출물에서 미백활성을 비교하였기에 이에 보고한다.

재료 및 방법

실험재료

청도복숭아시험장의 농장에서 수확한 백향(*Baekhyang*)을 공시 재료로 사용하였으며, 꽃(도화, 桃花)과 꽃받침(도화약, 桃花萼)을 각각 분리하였다. 이 시료를 건조기(MOV-112F, Sanyo, Osaka, Japan)에서 열풍건조(60°C, 12 h) 및 동결건조(lyophilizer, 48 h, ilShinBioBase Co, Dongducheon, Korea)한 후, homogenizer (Sinil, Seoul, Korea)를 이용하여 완전히 분쇄한 다음, 각 시료에 20배(w/v)의 DW (60°C)와 10배(w/v)의 100% ethanol (45°C)을 이용하여 12시간 동안 추출하였으며, filter paper (filter paper No 1, Whatman, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 debris를 제외한 용액을 동결건조시켜 분말(100 µg/mL)로 만들어 실험에 사용하였다. 본 분말의 일부는 voucher specimen으로 보존 하였다.

항산화 활성 측정

시료의 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power), oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) assay를 이용하였다(17-19). 또한 ORAC assay로 시료 또는 양성대조군인 trolox [(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, 238813, Sigma] 20 µL를 96-well black plate (3603, Corning

Inc, Corning, NY, USA)에 넣고 200 nM fluorescein (F2456, Sigma)를 160 µL 첨가한 후 37°C에서 10분간 방치하였다. 20 mM AAPH [2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, 440914, Sigma]를 20 µL를 plate에 첨가하고 분광광도계 (Wallac Victor3 PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 490 nm excitation 파장 및 535 nm emission 파장 조건에서 5분 간격으로 70분 동안 측정하였다. 항산화능을 수치상으로 비교하기 위해 AUC (the area under the curve) 및 ORAC value를 계산하였다. 계산 방법은 시료간의 값을 비교하기 위해 1 µM trolox에서 측정된 값을 기준으로 ORAC value를 결정하였다.

$$AUC = (0.5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{n+s}/f_0) \times 5$$

$$ORAC \text{ value} = (AUC_{\text{sample}} - AUC_{\text{blank}}) / (AUC_{\text{trolox}} - AUC_{\text{blank}})$$

Tyrosinase 저해활성 측정

본 실험에 이용된 효소는 mushroom tyrosinase (T3824, Sigma)를 이용하였고, 기질은 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (D9628, Sigma)를 이용하였다. 반응액은 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.4)를 이용하였으며, sample을 제외한 효소 및 기질은 sodium phosphate buffer에 녹여서 e-tube에 반응시켰다. 실험에 이용된 모든 반응물은 실험직전에 제조하여 수조에서 37°C로 pre-incubation시킨 후 이용하였다. 각 e-tube의 총량은 200 µL로 시약의 농도는 각각 tyrosinase 5 unit/mL, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine 10 mM이었다(20). e-tube에 시료, 기질, 효소 혼합액을 만든 후 37°C에서 1시간 동안 incubation시키고 13,200 rpm 조건에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 생성물에 1N NaOH를 200 µL 첨가하여 용해시킨 용액을 분광광도계로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 군은 3회씩 반복하여 측정하였다. 양성대조군은 (N-phenylthiourea, PTU)를 이용하였으며, tyrosinase의 활성 정도는 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성(\%)} = \text{시료 첨가군의 흡광도/대조군의 흡광도} \times 100$$

Melanin 생합성 저해

B16F10 melanoma 세포(ATCC, CRL-6475, mouse melanoma cell)를 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, I5879, Sigma)을 1 mM로 첨가한 배지와 함께 6-well plate (SPL Lifesciences Co., Ltd, Pocheon, Korea)에 2×10^5 cells/well의 농도로 분주하여 48시간 배양시킨 후 세포가 약 80% 정도 자랐을 때, 각 well에 시료를 1, 3 및 10 µg/mL가 되도록 처리하였다(22). 72 시간 배양 후 배지를 제거하고 인산완충액(PBS)로 세척한 후 부착된 세포를 e-tube에 옮기고 원심분리하여 pellet을 얻었다. 침전된 B16F10 세포의

형상을 촬영하고, RGB (red-green-blue)를 측정된 값을 각각 합산하여 relative intensity로 하였다.

통계처리

모든 분석치는 평균치와 표준편차로 나타내었으며 SAS 통계 소프트웨어(Statistical Analysis System, NC, USA)에 의하여 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

복숭아 꽃잎과 꽃받침의 물 추출물(DW)과 에탄올 추출물(EtOH)의 항산화 활성을 측정된 결과, 농도 의존적으로 환원력을 나타내는 것을 확인하였다(data not shown). Ascorbic acid의 표준곡선을 이용하여 FRAP 활성을 측정된 결과 $y = 0.176x + 0.084$ (y : 흡광도, x : ascorbic acid $\mu\text{g/mL}$)의 1차 방정식을 얻었으며, 이 결과로 흡광도가 증가하는 것을 확인하였다. 시료의 항산화 효과를 수치적으로 비교하기 위해 각 시료의 흡광도를 ascorbic acid의 표준곡선에 대입하여 활성 정도를 비교하였다. 시료 100 mg/mL 농도를 기준으로 하여 표준곡선 식에서 흡광도 y 값을 대입하여 비율을 계산한 결과, 복숭아 꽃잎(도화)의 에탄올 추출물(Pf-EtOH) 8.43%, 복숭아 꽃받침(도화약)의 에탄올 추출물(Pc-EtOH) 4.67%, 복숭아 꽃잎(도화)의 물 추출물(Pf-DW) 3.63%, 복숭아 꽃받침(도화약)의 에탄올 추출물(Pc-DW) 0.34%의 순서로 나타났다. 복숭아꽃 추출물이 받침에 비해 상대적으로 활성이 높았으며, 에탄올 추출물이 DW 추출물보다 활성이 높았다. 이 data로부터 다시 ORAC (Oxygen radical antioxidant capacity) 활성을 측정하였다. ORAC assay는 항산화 활성을 측정하는 표준화된 방법으로 fluorescence를 측정하는 방법이다(19). 양성대조군인 trolox를 1 μM 에서 측정된 값을 기준으로 시료에 대한 값과 비교한 결과, 추출물의 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도 기준에서의 값은 Pf-DW: 5.074, Pf-EtOH: 8.849, Pc-DW: 1.217, Pc-EtOH: 5.723로 나타났다(Fig. 1). 가장 높은 활성을 가지는 시료는 Pf-EtOH이었으며, 상대적으로 에탄올 추출물이 DW 추출물보다, 꽃 추출물이 꽃받침 추출물보다 높은 활성을 나타냈다.

한편, 항산화 활성의 결과가 미백 활성과 연관성이 있는지의 여부를 확인해 보았다. L-DOPA를 기질로 하여 mushroom tyrosinase에 의한 L-dopaquinone이 생성되는 정도를 분광광도계를 이용하여 측정된 결과, 양성대조군인 PTU는 농도별로 3 mM: 84%, 1 mM: 31%, 0.3 mM: 40%, 0.1 mM: 24%의 저해율을 나타내었다. 시료에 의한 tyrosinase 저해 활성은 시료의 10 mg/mL 농도를 기준으로

Pf-DW: 40%, Pf-EtOH: 32%, Pc-DW: 53%, Pc-EtOH: 43%의 저해율을 각각 나타내었다. 결과적으로 Pc-DW에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 에탄올 추출물보다 DW 추출물에서 억제활성이 강하였고 꽃보다 꽃받침에서 더 강한 활성이 확인되었다(Fig. 3).

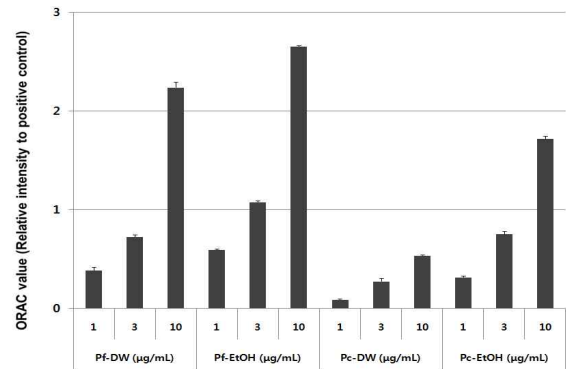


Fig. 1. Antioxidant activities of *Prunus persica* extracts on ORAC (Oxygen radical antioxidant capacity) value.

The ORAC value was adjusted as value from trolox treatment group. Con: control (not treated sample group), Pf: *P. persica* flower, Pc: *P. persica* calyx, DW: aqueous fraction, EtOH: ethanolic fraction.

All values are mean \pm S.D. of triplicate determinations.

Fig. 3의 결과를 확인하기 위하여, B16F10 세포에서의 멜라닌 생합성 억제 정도를 비교하였다. 세포 내에서 생성된 melanin은 Fig. 2-B에서 보는 바와 같이 검정색 침전물로 육안으로 쉽게 구별이 가능하다. IBMX에 의해 melanin 생성이 유도된 군에서의 값을 1, 유도되지 않은 군(IBMX 무첨가군)에서의 값을 0으로 기준하여 멜라닌이 생성된 정도를 Fig. 2-B와 같이 relative intensity로 나타내었다. 그 결과, Pf와 Pc의 DW 추출물에서는 세포수준에서 멜라닌 억제 효과가 나타나지 않았으나, 에탄올 추출물에서는 높은 억제 활성을 나타내었다. 에탄올 추출물(Pf-EtOH)의 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 60%, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 82%의 억제 효과를 보인 반면, 복숭아 꽃받침 에탄올 추출물(Pc-EtOH)의 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 63%, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 100 세포 생존율을 측정 시 50%의 세포성장 억제가 관찰되어 (data not shown) 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 저해효과는 이에 기인한 것으로 판단된다(Fig. 2-B).

Kim 등(9)은 복숭아 유과 메탄올 추출물의 0.1 mg/mL 농도에서 tyrosinase 저해활성이 홍백, 천중도백도, 장택백봉, 몽부사, 용택골드, 마도카의 품종의 순서대로 각각 8.58, 8.26, 7.81, 6.88, 5.75, 4.65%로 나타났음을 확인하였다. 또한 Kim 등(15)은 복숭아 씨의 80% 메탄올 추출물 20 mg/mL 농도에서 용택골드, 천중도백도, 마도카, 몽부사, 장택백봉, 홍백 품종별 순서대로 각각 29.23, 29.17, 24.11, 18.30, 17.18, 9.31%의 tyrosinase 저해활성을 비교하였다. Hideaki 등(16)은 복숭아 잎의 50% 메탄올 추출물이 0.5 mg/mL 농도에서 42% 저해 활성을 보고하였다. 이와 같은

타 연구 결과와 비교하였을 때 복숭아나무의 열매 및 다른 부위의 추출물에서 공통적으로 미백활성이 존재하는 것으로 판단되며, 추출 용매에 따른 저해율의 차이가 있을 수 있으나 잎과 유과 추출물에서 상대적으로 높은 활성을 가지는 것으로 판단된다. 반면에, 복숭아의 미백활성에 대한 구체적인 연구가 많이 부족하므로 복숭아 추출물 내에 활성을 가지는 성분의 분리 동정 및 부위별 함량 등의 연구가 필요하다.

Kim 등(23)은 복숭아꽃 추출물이 케라틴세포, 섬유아세포에서 UV에 의해 일어나는 광독성을 보호하는 효과와 기니픽에서 UVB에 의해 유도되는 홍반 생성을 완화하는 효과를 보고하였는데, 이는 자외선 차단제의 이용 가능성을 보여주는 결과이며 미백효과를 더불어 복숭아 추출물의 항산화소재로서의 가치가 기대된다. 또한 향후 추출물에 대한 고체발효나 이미 알려진 aglycone을 생화학적으로 절단하여 활성을 측정하는 등 다각적인 접근을 한다면 더욱 활성이 우수한 소재 확보가 가능하리라 판단된다.

요 약

복숭아꽃(도화)과 꽃받침(도화약)의 DW 및 에탄올 추출물로부터 미백활성을 측정하였다. ORAC assay에서 공통적으로 복숭아꽃 추출물이 꽃받침에 비해 높은 활성을, 에탄올 추출물이 DW 추출물 보다 상대적으로 활성이 높은 것을 확인하였다. Tyrosinase에 의한 미백활성을 비교하여 본 결과 10 mg/mL 농도를 기준으로 복숭아꽃 DW 추출물: 40%, 에탄올 추출물: 32%, 복숭아꽃받침 DW 추출물: 53%, 에탄올 추출물: 43%의 저해율로 복숭아꽃받침 DW 추출물에서 가장 높은 활성을 나타내었다. B16F10 세포에서 melanin 생합성 억제제를 측정 한 결과, 복숭아 꽃 에탄올 추출물의 10 µg/mL에서 57%, 100 µg/mL에서 76%의 억제 효과를, 복숭아 꽃받침 에탄올 추출물의 10 µg/mL에서 63%의 억제 효과를 확인하였다. 이 결과를 토대로 복숭아꽃 및 꽃받침의 물 또는 에탄올 추출물은 다른 천연성분과 적절히 혼합 사용 시 우수한 시너지효과를 나타낼 수 있는 소재임을 확인하였다.

참고문헌

1. Website of Korea Food & Drug Administration, <http://www.kfda.go.kr/>
2. Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ (2007) The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem*, 282, 27557-27561
3. Park HJ, Park KK, Hwang JK, Chung WY, Lee SK (2011) Inhibitory effect of *Prunus persica* flesh extract (PPFE) on melanogenesis through the microphthalmia-associated transcription factor (MITF)-mediated pathway. *Natural Product Sci*, 17, 26-32
4. Olivares C, Solano F (2009) New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Res*, 22, 750-760
5. Rodríguez-López JN, Tudela J, Varón R, García-Carmona F, García-Cánovas F (1992) Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J Biol Chem*, 267, 3801-3810
6. Imokawa G, Mishima Y (1982) Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res*, 42, 1994-2002
7. Gholamhoseinian A, Razmi Z (2012) Screening the methanolic extracts of some plants for tyrosinase inhibitory activity. *Toxicol Environ Chem*, 94, 310-318
8. Park JD, Hong SI, Park HW, Kim DM (1999) Modified

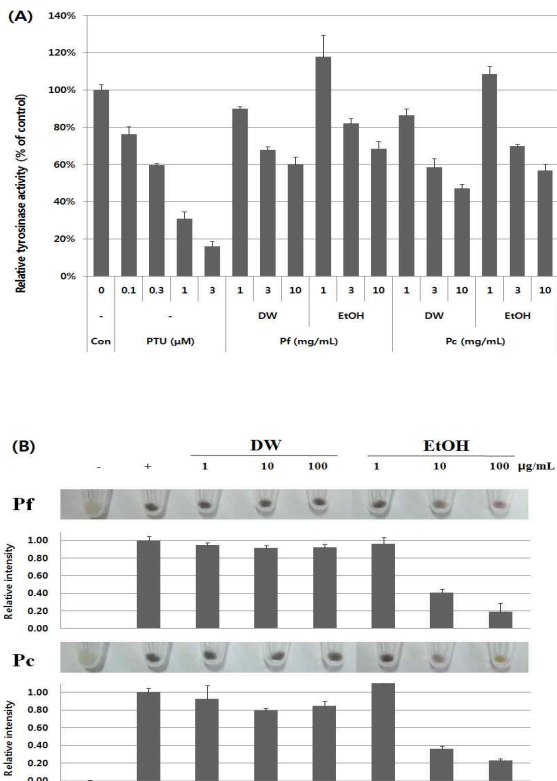


Fig. 2. Tyrosinase inhibitory activity (A) and melanin contents (B) of *P. persica* extracts.

A: Tyrosinase activities were calculated according to relative percentage of control group (100%). B: Melanin contents from B16F10 cells with IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) treatment. Relative intensity means melanin content compared to control group. Data show a classical observation of three independent measurements. Con: control (not treated sample group), PTU: N-phenylthiourea, Pf: *P. persica* flower, Pc: *P. persica* calyx, DW: aqueous fraction, EtOH: ethanolic fraction. (▽) : A data, only 100% of ethanolic fraction, showed 50% B16F10 cell death on an MTT assay. All values are mean±S.D. of triplicate determinations. Different values indicate significance at $p < 0.05$.

- atmosphere packaging of peaches (*Prunus persica* L. Batsh) for distribution at ambient temperature. Korean J Food Sci Technol, 31, 1227-1234
9. Kim KH, Kim DM, Yu S, Yook HS (2012) Antioxidant and whitening activities of various cultivars of Korean unripe peaches (*Prunus persica* L. Batsch). J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 156-160
 10. Park YJ, Park YS, Jang HG, Heo BG (2005) Utilization of pruning branch of peach tree as a natural dyeing material. Korean J Plant Res, 18, 216-222
 11. Suh SJ, Koo BS, Jin UH, Hwang MJ, Lee IS, Kim CH (2006) Pharmacological characterization of orally active cholinesterase inhibitory activity of *Prunus persica* L. Batsch in rats. J Mol Neurosci, 29, 101-107
 12. Lee CK, Park KK, Hwang JK, Lee SK, Chung WY (2009) Extract of *Prunus persica* flesh (PPFE) improves chemotherapeutic efficacy and protects against nephrotoxicity in cisplatin-treated mice. Phytother Res, 22, 223-227
 13. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, Baroglio C, Scibola E, Ansaloni R, Incorvaia C, Conti A (1999) The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. J Allergy Clin Immunol, 103, 520-526
 14. Shin TY, Park SB, Yoo JS, Kim IK, Lee HS, Kwon TK, Kim MK, Kim JC, Kim SH (2010) Anti-allergic inflammatory activity of the fruit of *Prunus persica*: role of calcium and NF-kappaB. Food Chem Toxicol, 48, 2797-2802
 15. Kim DM, Kim KH, Kim YS, Koh JH, Lee KH, Yook HS (2012) A study on the development of cosmetic materials using unripe peaches seed extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 110-115
 16. Matsuda H, Nakamura S, Kubo M (1994) Studies of cuticle drugs from natural sources. II. Inhibitory effects of *Prunus* plants on melanin biosynthesis. Biol Pharm Bull, 17, 1417-1420
 17. Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": FRAP assay. Anal Biochem, 230, 70-79
 18. Zulueta A, Esteve MJ, Frigola A (2009) ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chem, 114, 310-316
 19. Yang YJ, Kim HJ, Kang SH, Kang SC (2011) Screening of natural herb resources for anti-oxidative effects in Korea. Korean J Plant Res, 24, 1-9
 20. Ye Y, Chou GX, Mu DD, Wang H, Chu JH, Leung AK, Fong WF, Yu ZL (2010) Screening of Chinese herbal medicines for antityrosinase activity in a cell free system and B16 cells. J Ethnopharmacol, 129, 387-390
 21. Yu J, Kim AK (2009) Effect of taurine on antioxidant enzyme system in B16F10 melanoma cells. Adv Exp Med Biol, 643, 491-499
 22. Yoon NY, Eom TK, Kim MM, Kim SK (2009) Inhibitory effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on mushroom tyrosinase activity and melanin formation in mouse B16F10 melanoma cells. J Agric Food Chem, 57, 4124-4129
 23. Kim YH, Yang HE, Kim JH, Heo MY, Kim HP (2000) Protection of the flowers of *Prunus persica* extract from ultraviolet B-induced damage of normal human keratinocytes. Arch Pharm Res, 23, 396-400

(접수 2012년 9월 6일 수정 2012년 11월 28일 채택 2012년 12월 5일)