

***Streptococcus thermophilus*로 발효한 한약재 발효분말의 항염증 및 미백 효과**

최 화 정 · 이 정 희 · 윤 미 영 · 이 재 숙[†]

광주여자대학교 미용과학과
(2015년 6월 10일 접수, 2015년 6월 18일 수정, 2015년 6월 24일 채택)

Anti-Inflammatory and Whitening Effect of the Lyophilized Powder of Oriental Plant Extracts Fermented with *Streptococcus thermophilus*

Hwa-Jung Choi, Jung-Hee Lee, Mi-Young Yun, and Jae-Sug Lee[†]

Department of Beauty Science, Kwangju Women's University, Gwangju 506-713, South Korea
(Received June 10, 2015; Revised June 18, 2015; Accepted June 24, 2015)

요약: 새로운 항염증 및 미백 소재를 찾기 위해서, 본 연구에서는 6가지 한약재 추출물(유자, 상백피, 오미자, 울무, 당귀, 고삼)을 *Streptococcus thermophilus*에 의해 발효한 발효분말의 미백 및 항염증 효과를 피부섬유아세포에 대한 피부독성, 산화질소 생성, tyrosinase 활성, 멜라닌 형성의 저해 효과를 측정함으로써 평가하였다. 발효물은 37 °C에서 2일 동안 *Streptococcus thermophilus*에 의해 발효한 후, 동결건조에 의해 발효분말을 제조하였다. 발효분말은 피부섬유아세포에 대해 500 µg/mL의 농도에서 cytopathic effect reduction 방법을 사용하면서 측정하였을 때 세포독성을 나타내지 않았다. 또한 발효분말은 Griess reagent system을 사용하면서 산화질소 생성에 대한 저해 효과를 나타내었다. 더욱이 발효분말은 tyrosinase 활성에 대한 저해 효과가 농도에 의존적으로 나타났다. 발효분말은 배양액으로부터 멜라닌 생성에 대해 유의적인 저해를 나타내었다($p < 0.05$). 그러므로 이러한 자료로부터 발효분말은 항염증 및 미백 효과를 갖는 것으로 나타났으며, 화장품을 위한 효과적인 성분으로써 사용가능할 것으로 사료된다.

Abstract: To identify new anti-inflammatory and whitening material, this study investigated the whitening and anti-inflammatory effects of the lyophilized powder from 6 oriental plant extracts (OPE; *Citrus junos* Tanaka, *Mori cortex Radicis*, *Schisandra chinensis* Baillon, *Coix lachrymajobi* var. mayuen, *Angelica gigas* NAKAI, and *Sophora japonica* L.) fermented with *Streptococcus thermophilus* by assessment of cytotoxicity on human dermal fibroblast, inhibitory effect of nitric oxide (NO) production, tyrosinase activity and melanin formation. The OPE was fermented with *Streptococcus thermophilus* at 37 °C for 2 days and the lyophilized powder was manufactured by freezing-dryer. OPE didn't show cytotoxicity at concentration of 500 µg/mL using a cytopathic effect reduction method. OPE also exhibited inhibitory effect on nitric oxide (NO) production by Griess reagent system. Furthermore, OPE showed inhibitory effect on tyrosinase activity with dose dependent manner, and exhibited significant inhibition of melanin formation by measurement of melanin from culture media ($p < 0.05$). From these results, 6 OPE extracts showed anti-inflammatory and whitening effect and may be used as an active ingredient for cosmetics.

Keywords: anti-inflammatory, whitening, fermented powder, *Streptococcus thermophilus*, cosmetics

[†] 주 저자 (e-mail: ljs2379@kwu.ac.kr)
call: 062)950-3697

1. 서 론

깨끗한 피부는 동서양을 막론하고 아름다움의 척도가 되고 있으며, 생활수준의 향상으로 인해 피부미용에 대한 관심이 증가하고 있으나, 환경오염 및 피부의 자외선 노출증가로 인한 피부의 광노화는 피부미백 및 보호에 대한 관심을 더욱 증가시키고 있다[1].

피부의 멜라닌(melanin)은 사람의 피부색을 결정하는 색소(pigment)로서 피부 표피의 가장 아래층에 위치한다[2]. 이러한 멜라닌은 태양으로부터 오는 자외선을 흡수하거나, 자외선에 의해 발생하는 자유 라디칼(free radical)을 소거함으로써, 과도하게 노출된 자외선(UV)으로부터 피부를 보호하는 역할을 하고 있다[3,4]. 그러나 체내, 외적인 여러 요인에 의해 멜라닌 생성이 증가되어 다량의 멜라닌이 각질형성세포에 전달되고 피부 상피층에 축적되어 과색소 침착 현상이 나타나며 이런 멜라닌의 과잉생산은 기미, 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암의 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다[5,6].

멜라닌은 표피층 내부에 자리잡은 멜라닌형성세포(melanocyte) 내 소기관인 멜라노솜(melanosome)에서 아미노산인 tyrosine을 출발물질로 하여 생합성되며 멜라노솜 내에 있는 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1)과 dopachrome tautomerase (DCT)라고도 불리는 tyrosinase-related protein 2 (TRP2) 등의 여러 가지 효소의 복합 작용에 의해 생성된다[7,8]. 따라서 이러한 효소들은 멜라닌 합성을 조절하는 피부 미백제를 개발하기 위한 주요 타깃으로서 연구되어져 왔다[9-12].

한편 염증반응은 외부 물리적·화학적 자극과 세균 등의 감염에 대한 생체 조직의 면역체계 반응의 하나이며, 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다[13]. 신체 내 대식세포는 다양한 숙주반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응 시에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 과량 만들어지는 prostaglandin E2 (PGE2) 등과 같은 염증 촉진 인자들을 생성한다[14]. 따라서 NO, PGE2 등 염증매개체의 활성을 직접적으로 억제하는 물질들은 여드름, 아토피성 피부염 등과 같은 각종 염증 관련 질환을 억제하는 항염증제로서

개발 가능성이 높으며, 최근에는 안전하고 효과 있는 천연 유래의 여러 한약재로부터 항염증 치료제를 찾기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 예비실험 결과 효능을 나타내는 한약재인 유자, 상백피, 오미자, 울무, 당귀, 고삼을 물로 추출한 후 동결건조한 분말에 유산균인 *Streptococcus thermophilus*를 이용하여 발효한 다음 동결건조한 발효분말의 세포독성, 항염증, tyrosinase 저해효과 및 멜라닌 저해효과를 통하여 항염증 및 미백 효능을 갖는 소재를 연구하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 유자, 상백피, 오미자, 울무, 당귀, 고삼 물 추출물 제조

실험에 사용된 한약재는 금산의 한약재상에서 2013년 4월에 구입하여 사용하였다. 각 한약재 10 g씩 전체 60 g을 1 L의 물과 혼합하여 1 h씩 2회 환류 냉각 추출하여 제조하고, 제조된 추출물을 여과지를 사용하여 얻어진 여액을 동결건조하여 건조분말을 얻었다. 이 분말을 -20 °C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 동결건조분말은 필요시마다 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, St. Louis, MO, USA)에 용해시킨 후 사용하였다.

2.2. 종균 배양 및 발효

종균 단계에서는 Rogosa, and Sharpe (MRS) 배지를 121 °C에서 20 min 간 멸균한 후 *Streptococcus thermophilus*를 3×10^6 CFU/mL 되게 접종하였다. 이것을 37 °C에서 24 h 배양하여 종균을 제조하였다($OD_{600nm} = 0.6$). 본 배양에서는 서울우유 100 mL에 추출 건조분말 1.5 g과 설탕 3 g, 종균액 1 mL을 넣고 혼합한 후 37 °C에서 48 h 배양하였다. 발효가 완료되면 그 발효액을 여과지(Whatmman No. 2)로 여과하여 유산균을 제거한 후 대사산물이 함유된 여과액을 동결건조하여 각 발효분말을 얻어 냉동고에 보관하면서 필요시마다 사용하였다.

2.3. 세포주 및 세포배양

Cambrex (UK)로부터 피부섬유아세포(Human dermal fibroblast)를 구입하였다. 세포 배양용 배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM)/F12 (3 : 1)를 사용하였으며, 배지에 10% Fetal bovine serum (FBS),

1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포는 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하여 사용하였다.

2.4. 세포독성 측정

2×10^4 cells/well의 세포를 96-well plate에 넣은 후 37 °C 세포배양기에서 24 h 동안 배양하였다. 배양액을 배지흡입기를 이용하여 제거한 후 각 발효분말을 10, 50, 100, 500 μ g/mL의 농도로 처리하여 24 h 동안 37 °C 세포배양기에서 배양하였다. 각 발효분말의 세포독성은 전에 보고된 sulforhodamine B (SRB) 분석법으로 측정하였다[15].

2.5. 항염증 효과 측정

발효분말의 피부염증 완화 효과를 평가하기 위해, Raw 264.7 세포를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에 10% FBS, 100 units/mL 페니실린 (penicillin)과 100 μ g/mL 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가하여 배양하였다. 세포가 100 mm dish 바닥의 80% 정도까지 자랐을 때 세포의 염증 반응을 유도하기 위하여 1% FBS가 함유된 DMEM 배양액에 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여, 활성화를 유도한 다음, 각 발효분말의 양(6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL)을 각각 다르게 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배양액 중의 함유된 산화질소(nitric oxide; NO)의 양은 Griess reagent system을 이용하여 측정하였다[16].

2.6. Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase는 Sigma사에서 구입하여 사용하였고, 기질인 L-티로신(Sigma)은 0.05 M 인산나트륨 완충용액 (pH 6.8)에 용해하여 0.1 mg/mL 용액으로 만들어 사용하였다. 발효분말은 0.05 M 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 적당한 농도로 조절하여 용해한 후 사용하였다. L-티로신 용액 0.5 mL를 시험관에 넣고 여기에 발효분말 0.5 mL를 가하고 37 °C 항온기에서 10 min 간 방치하였다. 그 후, 시료액에 200 unit/mL tyrosinase 0.5 mL를 첨가하고 37 °C에서 10 min 간 반응시켰다. 이 반응액이 든 시험관을 얼음 위에 놓아 급냉시켜 반응을 중지시킨 후, 분광광도계로 파장 475 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로는 상기 시료 대신 완충용액 0.5 mL를 넣은 것을 사용하였고 양성대조군으로는 미백제로 잘 알려진 알부틴을 사용하였다.

상기 각 시료의 tyrosinase 활성 저해율은 다음 식에 따라 계산하였다.

Tyrosinase 활성 저해율(%) =

$$100 - [(\text{실험군 흡광도}/\text{대조군 흡광도}) \times 100]$$

2.7. 멜라닌 함량 측정

Melanocyte line, Melan-a는 D.C. Bennett (St George's Hospital Medical School, London, UK)에서 분양받았다. 24 well plate (Falcon)에 melanocyte를 2×10^4 cells/well이 되도록 분주한 후 배양기에서 24 h 동안 배양하였다. 다음 날 각 well에 발효분말을 농도별로(10, 50, 100, 500 μ g/mL) 처리한 후 37 °C의 배양기에서 72 h 동안 배양하였다. 72 h 간 배양한 후 phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2)로 1회 세척 후 trypsin-EDTA로 plate 바닥에 붙어 있는 세포를 모아 PBS로 2회 세척한 후 1200 rpm에서 20 min 간 원심 분리하여 세포를 수집하고 0.85 N KOH 250 μ L를 첨가하여 90 °C 항온수조 (water bath)에서 10 min 멜라닌을 용해시킨 후 반응을 정지시키고 spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, 멜라닌 생성 저해율은 다음과 같다.

멜라닌 생성 저해율(%) =

$$[(\text{대조군 흡광도}/\text{실험군 흡광도})/\text{대조군 흡광도}] \times 100$$

2.8. 통계처리

결과값은 3번의 독립적인 실험을 통한 평균과 표준편차로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Tukey test를 사용하면서 ANOVA검정을 적용하였으며, $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성

발효분말을 10, 50, 100, 500 μ g/mL 농도로 세포에 처리하여 배양했을 때 세포독성을 측정된 결과는 Figure 1과 같다. 발효분말은 전 처리농도에서 피부섬유아세포(Human dermal fibroblast)에 대해 약 100%의 세포생존율을 나타내었다. 따라서 발효분말은 피부세

Table 1. Inhibitory Effects of the Fermented Powder on NO Production in LPS-stimulated RAW264.7 Cells

Concentration of fermented power ($\mu\text{g/mL}$)	Control	6.25	12.5	25	50	100
NO secretion (%)	100 \pm 0.0	82 \pm 0.9*	75 \pm 1.2*	64 \pm 1.0*	58 \pm 1.3*	35 \pm 0.8*

Each value is the result of mean \pm S. D. of three independent experiments. *Significantly different from control ($p < 0.05$).

Table 2. Inhibitory Activities of the 6 Oriental Plant Extracts, Its Mixtures and Fermented Powder in Tyrosinase Activity

Concentration of fermented power ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition of tyrosinase activity (%)
Control	-
20	39 \pm 1.2
100	48 \pm 0.9
500	57 \pm 1.4
Arbutin (200 $\mu\text{g/mL}$)	58 \pm 0.6

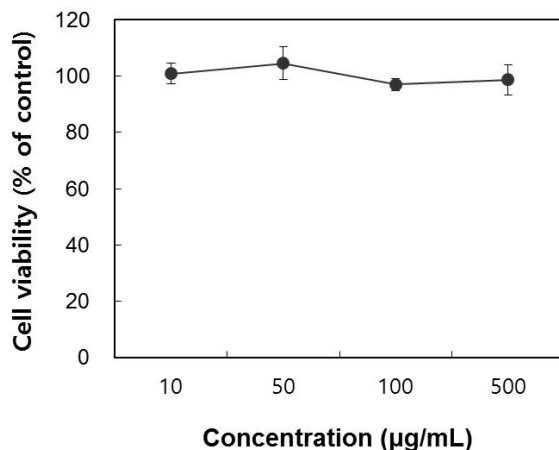


Figure 1. Cell viability of human dermal fibroblast treated with fermented power. Fermented power was added at human dermal fibroblast cells. After 1 day, cell viability was evaluated by SRB method. Each value is the result of mean \pm S. D. of three independent experiments.

포에 독성이 없게 나타났으므로 미용소재로써 사용가능할 것으로 생각된다.

3.2. 함염증 효과

발효분말의 항염증 효과를 평가하기 위해 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서의 NO 생성억제 효과를 측정 한 결과는 Table 1과 같다. 발효분말을 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 LPS에 의해 증가된 NO의 생성을 82%로 감소시켰으며, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로

각각 처리한 경우 NO의 생성을 각각 75, 64, 58, 35%로 유의성 있게 감소시켰다($p < 0.05$). NO와 같은 염증촉진 매개물은 피부염을 더욱 악화시키는 것으로 알려져 있다[17]. 또한 NO에 의해 생체 내의 항산화효소가 고갈되면서 피부염증반응이 심화되는 것으로 알려졌다 [18]. 본 연구에서 발효분말의 처리농도가 증가할수록 NO의 생성은 농도의존적으로 감소함을 알 수 있었다. 따라서 발효분말은 피부염증에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

3.3. Tyrosinase 저해활성

Tyrosinase는 Melanogenesis의 주요 단백질로서 색소 조절 과정 연구에 중요한 지표로 여겨지는 단백질이다[19]. 본 연구에서 발효분말의 tyrosinase 저해 활성을 나타낸 결과는 Table 2와 같다. 각 한약재 추출물(유자, 상백피, 오미자, 울무, 당귀, 고삼) 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 24, 21, 27, 25, 26, 23%의 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다. 또한 6 가지 혼합물을 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 tyrosinase 저해 활성은 30%를 나타내었다.

발효분말을 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 경우 tyrosinase 저해활성은 39%를 나타내었으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 경우 tyrosinase 저해활성은 48%를 나타내었다. 또한 발효분말을 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 경우 tyrosinase 저해활성은 57%를 나타내었고 양성대조군인 arbutin의 경우는 200 $\mu\text{g/mL}$ 의

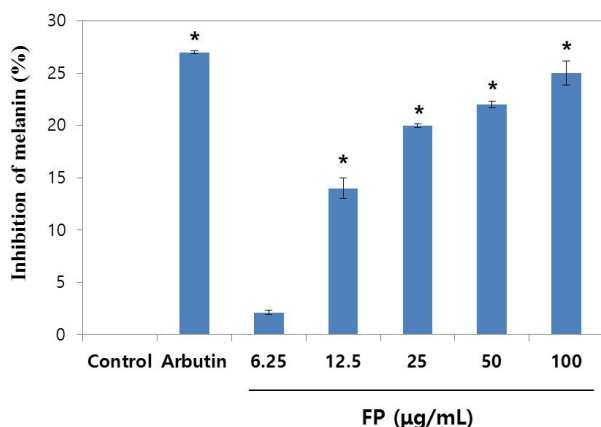


Figure 4. Inhibitory effect of melanin formation in melanomacryte by fermented powder. Each value is the result of mean \pm S. D. of three independent experiments. Arbutin 200 μ g/mL. FP, Powder by freezing dryer of 6 medicinal plant extracts fermented with *Streptococcus thermophilus*. *Significantly different from control ($p < 0.5$).

농도로 처리하였을 경우 tyrosinase 저해활성은 58%를 나타내었다. 많은 연구에서 한약재 추출물들은 tyrosinase 저해활성을 나타낸다고 보고하였다[7,8,20]. 본 연구에서도 발효분말을 처리하였을 때 농도의존적으로 tyrosinase 저해활성이 높아지는 것을 알 수 있었다.

3.4. 멜라닌 함량 측정

발효분말의 멜라닌 생성에 대한 저해 효과는 Figure 2과 같다. 양성대조군인 arbutin을 200 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때 멜라닌 생성은 27%로 나타났다. 발효분말을 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 증가하면서 처리하였을 때 멜라닌 생성의 저해율은 각각 2.1, 14, 20, 22, 25%로 저해율이 유의적으로 증가함을 알 수 있었다($p < 0.05$). 전의 연구에서 엉경귀 추출물 실리마린은 멜라닌 생성을 억제하면서 피부 미백효과가 있다고 보고하였다[21]. 또한 천연한방소재인 연교 추출물은 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 저해할 뿐만 아니라 연교추출물 3% 함유한 크림의 경우도 임상 대상자들에 대해 미백 효과를 나타낸다고 보고하였다[22]. 따라서 6가지 한약재 물 추출물을 유산균으로 발효하여 동결건조한 발효분말의 경우도 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 보아 미백크림 등에 응용가능함을 시사한다.

4. 결 론

유자, 상백피, 오미자, 울무, 당귀, 고삼의 물 추출물을 *Streptococcus thermophilus*으로 발효하여 동결건조한 발효분말은 피부섬유아세포에 대해서 세포독성을 나타내지 않았다. 또한 이러한 발효분말은 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 증가된 NO의 생성을 유의적으로 억제하였다($p < 0.05$). 더욱이 발효분말은 tyrosinase 활성을 처리농도에 비례하여 억제하였으며, melanin생성도 유의적으로 억제하였다($p < 0.05$). 따라서 발효분말은 세포독성이 없으면서 피부미백효과를 기대할 수 있을 것으로 생각되며, 이를 응용하여 화장품소재로서의 개발 가능성을 시사한다.

Acknowledgement

본 논문은 2015학년도 광주여자대학교 교내연구비 지원(KWU15-95)에 의하여 연구되었습니다.

Reference

1. J. N. Young, H. J. Choi, and S. H. Baek, *In vitro* the whitening effect of *Zanthoxylum schinifolium* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **2**(1), 9 (2006).
2. D. S. Kim, D. H. Kim, M. J. Oh, K. G. Lee, M. C. Kook, and C. S. Park, Antiaging and whitening activities of ethanol extract of Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) by-product, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **36**(2), 137 (2010).
3. B. A. Gilchrest and M. S. Eller, DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**(1), 35 (1999).
4. S. C. Taylor, Skin of color : biology, structure, function, and implications for dermatologic disease, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **46**(2), S41 (2002).
5. G. C. Romero, E. Aberdam, M. Clement, J. P. Ortonne, and R. Ballotti, Nitric oxide produced by ultraviolet irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis, *J. Clin. Invest.*, **99**(4), 635 (1997).

6. A. Yagi, T. Kanbara, and N. Morinobu, The effect of tyrosinase inhibition for aloe, *Planta med.*, **244**, 3855 (1986).
7. H. Y. Lee, Y. H. Kim, S. Y. Um, U. S. Jung, M. S. Chang, and N. H. Lee, Melanogenesis inhibition effects of *Nemopilema nomurai* hydrolyzed extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **40**(4), 341 (2014).
8. Y. H. Chang, J. H. Choo, S. Y. Lee, T. Y. Kim, M. H. Jin, M. Y. Chang, S. H. Lee, C. K. Lee, and S. G. Park, Inhibition of melanogenesis by Cucurbitacin B from *Cucumis sativus* L., *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **40**(4), 403 (2014).
9. I. Aksan and C. R. Goding, Targeting the microphthalmia basic helix-loop- helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Cell. Biol.*, **18**(12), 6930 (1998).
10. C. Levy, M. Khaled, and D. E. Fisher, MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene, *Trends Mol. Med.*, **12**(9), 406 (2006).
11. K. Yasumoto, K. Yokoyama, K. Takahashi, Y. Tomita, and S. Shibahara, Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes, *J. Biol. Chem.*, **272**(1), 503 (1997).
12. U. Yavuzer, E. Keenan, P. Lowings, J. Vachtenheim, G. Currie, and C. R. Goding, The microphthalmia gene product interacts with the retinoblastoma protein *in vitro* and is a target for deregulation of melanocyte-specific transcription, *Oncogene*, **10**(1), 123 (1995).
13. R. Zamora, Y. Vodovtz, and T. R. Billiar, Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases, *Mol. Med.*, **6**(5), 347 (2000).
14. M. Higuchi, N. Higashi, H. Taki, and T. Osawa, Cytolytic mechanism of activated macrophages. tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages, *J. Immunol.*, **144**(4), 1425 (1990).
15. Z. X. Lin, J. R. S. Hoult, and A. Raman, Sulforhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo, *J. Ethnopharmacol.*, **66**(2), 141 (1999).
16. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, **126**(1), 131 (1982).
17. D. Bruch-Gerharz, T. Ruzicka, and V. Kolb-Bachofen, Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease-a review, *Arch. Dermatol. Res.*, **290**(12), 643 (1998).
18. J. Zhao, M. Lahiri-Chatterjee, Y. Sharma, and R. Agarwal, Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin, *Carcinogenesis*, **21**(4), 811 (2000).
19. R. Han, H. P. Baden, J. L. Brissette, and L. Weiner, Redefining the skin's pigmentary system with a novel tyrosinase assay, *Pigment Cell Res.*, **15**(4), 290 (2002).
20. Y. J. No, H. J. Choi, and S. H. Baek, *In vitro* the whitening effect of *Zanthoxylum schinifolium* extract, *Soc. Cosmet. Public Health*, **2**(1), 9 (2006).
21. S. J. Choo, I. J. Ryoo, Y. H. Kim, G. H. Xu, K. H. Kim, C. S. Han, S. J. Kim, J. W. Kim, E. D. Son, and I. D. Yoo, Hypopigmentary effect of milk thistle extract silymarin, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 151 (2009).
22. J. N. Lee, J. H. Park, S. W. Kim, Y. K. Yoo, G. T. Lee, and K. K. Lee, A study on the whitening effect of the oriental medicinal herb *Forsythia suspensa* fruit as a cosmetic ingredient, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(2), 79 (2007).