

<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2019.5.3.271>

JCCT 2019-8-35

아카시아 잎 추출물의 생리 활성 및 고분자 미셀과 세포투과 펩티드를 적용한 피부흡수증진 효과

Physiological Activity of *Robinia pseudo acacia* Leaf Extracts and Enhancement of Skin Permeation Using Polymer Micelles and Cell Penetrating Peptide

허수현*, 박수인*, 안규민*, 신문삼**

Soo Hyeon Heo*, Su In Park*, Gyu Min An*, Moon Sam Shin*

요약 본 연구의 목적은 아카시아 잎의 생리활성을 평가하고 고분자 미셀과 세포투과 펩티드를 이용한 피부흡수 증진에 관한 것이다. 아카시아 잎을 열수 및 에탄올 추출한 후에, 향노화, 미백, 항균 등 다양한 생리활성을 측정하였다. 총 polyphenol 함량은 열수 추출에서 56.88 mg/g, 에탄올 추출에서 47.42 mg/g이고, DPPH radical 소거능은 농도 1,000 µg/mL에서, 에탄올 추출물의 경우 44.24% 저해율을 나타냈고 이는 열수 추출물의 값(41.50%)보다 더 좋은 효능을 나타냈다. Elastase 저해능 실험결과에서 농도 의존성을 보였으며, 아카시아 잎 에탄올 추출물 500 µg/mL에서 가장 높은 54.09% 저해능, 열수 추출물은 36.95% 저해능을 보였다. SOD 유사 활성능 결과에서 농도 의존적인 결과를 보였고, 모든 농도에서 아카시아 잎 에탄올 추출물이 열수 추출물의 값보다 높았다. 500 µg/mL에서 76.41%, 같은 농도에서 아카시아 잎 에탄올 추출에서 86.31%로 더욱 높은 활성을 나타냈다. Tyrosinase 저해능 실험에서는 아카시아 잎 에탄올 추출물 농도 20 mg/mL에서 56.47% 저해율, 아카시아 잎 열수 추출물은 23.05% 저해율이 나타났다. 항균실험 결과에서는 아카시아 열수 추출물은 항균효과를 나타내지 못했지만, 아카시아 에탄올 추출물은 *Propionbacterium acnes* 균주에서 11.00 mm의 최대 clear zone을, *Bacillus subtilis* 균주에선 10.50 mm로 최대 clear zone을 제시하였다. 난용성 문제와 피부 흡수율을 증진시키기 위하여, 아카시아 에탄올 추출물과 1.0% 세포투과 펩티드(6개 알르기닌, R6)을 함유한 108.23, 126.47 nm로 약 1/10배 미세한 나노입자 크기를 갖는 PCL-PEG 고분자 미셀이 성공적으로 제조되었고, 우수한 경피흡수 증진 효과를 나타낼 수 있었다.

주요어 : 아카시아, 향노화, 고분자 미셀, 세포투과 펩티드, 피부흡수 증진

Abstract This study was conducted to evaluate physiological activity of *Robinia pseudo-acacia* leaf and its skin penetration using polymer micelles and skin penetrating peptide. After extraction with *Robinia pseudo-acacia* using the ethanol and distilled water, various physiological activities were examined. The total concentration of polyphenol compounds was determined to be 47.42 mg/g (ethanol extract), 56.88 mg/g (hydrothermal extract) and DPPH radical scavenging ability at 1,000 µg/mL was 44.24% in ethanol extract and it is higher than value(41.50%) in hydrothermal extract. The elastase inhibitory assay showed concentration dependence and elastase inhibition of *Robinia pseudo acacia* leaf ethanol extract was 54.09%, which was the highest at 500 µg/mL. In the SOD-like experiments, the concentration-dependent results were showed and the SOD-like activity of the *Robinia pseudo-acacia* leaf ethanol extract was higher than that of the *Robinia pseudo acacia* leaf hydrothermal extract at all concentrations. At a concentration of 500 µg/mL, *Robinia pseudo acacia* leaf ethanol

extract showed the highest SOD-like activity of 76.41%. The tyrosinase inhibition at 20 $\mu\text{g/mL}$ was determined to be 56.47% (ethanol extract), 23.05% (hydrothermal extract). In the antimicrobial experiments, the hydrothermal extract had no effect, but ethanol extract represented maximum clear zone of 11.00 mm in *Propionibacterium acnes* strain and maximum clear zone of 10.50 mm. in *Bacillus subtilis* strain. To solve the problem of insolubility and to improve skin penetration, PCL-PEG polymer micelles containing *Robinia pseudo-acacia* leaf ethanol extracts and 1.0% cell permeable peptide, hexa-D-arginine (R6) were successfully prepared with particle size of 108.23 and 126.47 nm and excellent skin permeation effects could be showed.

Key words : *Robinia pseudo acacia*, Polymer micelle, Cell penetrating peptide, Skin permeation

* 정회원, 을지대학교 대학원 시니어헬스케어학과 화장품약리학Received: May 13, 2019 / Revised: June 05, 2019
전공 Accepted: July 08, 2019

** 정회원, 을지대학교 대학원 시니어헬스케어학과 화장품약리학*Corresponding Author: msshin@eulji.ac.kr
전공(교신저자)

접수일: 2019년 5월 13일, 수정완료일: 2019년 6월 5일
게재확정일: 2019년 7월 8일

Department of Senior Healthcare, majored in Cosmetic
Pharmacology, Eulji University, Seongnam, Gyeonggi 13135,
Korea

1. 서 론

현대사회는 경제가 성장하고 이에 따른 생활수준이 향상함에 따라 건강과 아름다움에 대한 욕구가 증가하고 있다. 또한 고령화 사회로 접어들면서 노화에 대처하기 위한 화장품의 역할은 점점 커지고 있다.化妆품을 단순히 인체를 아름답게 하며 청결을 위한 제품에서, 이제는 피부 또는 모발을 건강하게 유지시키며 미백효과로 인한 기미제거와 피부 노화를 개선하고 지연시키기 위한 주름제거, 보습, 보호 및 피부 활성의 부분으로 접근이 이루어지고 있다. 이러한 관심이 높아짐에 따라 항산화 효과와 항균활성을 나타내는 활성성분에 관심이 집중되고 있는 반면 의약품이나 화장품 분야 등에서 많이 활용되고 있는 활성 성분은 주로 합성 물질이다. 이들은 내성, 만성독성, 변이원성, 발암물질 유발 등 많은 문제점들을 지니고 있고[1], 이를 보완하기 위해 다양한 활성성분을 함유한 식물 자원에 대한 관심이 증가되고 있다. 또한 미백, 여드름, 항균, 항산화, 항알레르기, 항노화 등에 효과가 있는 천연 물질들을 화장품, 식품첨가제나 약 등의 원료로 개발하려는 연구가 다양하게 진행 중이다[2, 3].

아카시아(*Robinia pseudoacacia*)는 아카시 나무에서 기원된 것으로 콩아과(*Faboideae*)에 속하는 낙엽교목이다. 아카시아의 화장품 약리효과에 대한 연구로는 아카시아 꽃을 대상으로 한 연구가 일부 되어 있지만[4], 아카시아 잎을 대상으로 한 연구는 부족하며 이에 대한

화장품 약리효과를 측정하며 기능성 화장품의 천연 신소재로써 이용될 수 있는 가능성이 충분할 것이다.

천연 신소재에 존재하는 많은 생리활성물질이 난용성으로 수용액에 용해되지 않아 유기용매를 사용하여 용해시켜야 한다. 이는 피부에 자극이 될 수 있어 안전성 문제가 대두되고 피부와의 접촉면적이 적어 피부로의 흡수, 전달이 잘 되지 않는다. 이를 생분해성을 갖는 양친매성(amphiphilic) 자기 회합형 나노구조체(self-assembled nano structure)인 PCL(polycaprolactone)-PEG(polyethyleneglycol) 고분자 미셀을 이용하여 난용성 물질을 수용액에 가용화를 할 수 있다[5]. PCL-PEG는 소수성 PCL과 친수성 PEG의 공중합체(copolymer)로 양친매성을 가지므로 수용액 상에서 미셀을 형성하여 소수성의 물질을 포집할 수 있다. 이는 PCL과 PEG의 배합비율을 다양하게 조절하여 다양한 난용성 물질을 가용화시킬 수 있고, 생체적합성 고분자라는 장점을 이용해 입자크기를 나노 크기로 조절하여 수용액에 쉽게 용해되고 피부로의 흡수를 조절하며 피부와의 생체적합성을 확보해 안전성을 높일 수 있다.

이러한 효능 물질들이 화장품 원료 소재로서 효능을 제대로 발휘하기 위해서는 피부의 최외각층인 각질층을 통과하여 피부 깊숙이 흡수가 이루어져야 한다. 하지만 각질층의 지질은 세라마이드(ceramide), 콜레스테롤(cholesterol), 지방산(fatty acid)으로 이루어져 있으며 라멜라 구조를 형성하여 피부 장벽 기능으로 작용하므로 외부 물질의 투과를 방해하고 따라서 기능성 유효

성분의 경피 투과도 어렵게 된다. 이러한 문제를 해결하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 세포투과 펩티드(cell penetrating peptide, CPP)인 arginine oligomer를 이용하여 피부 투과도를 더욱 증진시킬 수 있다[6]. 세포막 투과 펩티드는 세포막을 투과하여 세포 내부로 물질을 전달할 수 있는 10~20 개 내외의 짧은 아미노산으로 구성된 펩티드로 많은 세포막 투과 펩티드들이 개발되었으며, 대표적인 CPP 중 TAT Peptide는 양이온성 아미노산인 arginine으로 인하여 세포막으로 쉽게 다가간다고 알려져 있다[7]. 세포투과 펩티드는 주로 세포막을 투과하는 연구에 집중되어 있고 피부 세포간지질을 투과하는 연구는 미미한 실정이다. 세포막과 피부 각질세포간 지질은 서로 주성분은 다르지만, 모두 지질 이중층 구조로 유사하기 때문에 세포투과 펩티드를 경피투과에 적용할 수 있고 세포투과 펩티드의 핵심 아미노산 서열인 arginine oligomer를 기능성 물질과 함께 화장품에 적용한다면 피부 흡수 증진으로 기능성 물질의 효능을 극대화 할 수 있을 것이라 기대된다.

따라서 본 연구에서는 아카시아 잎을 대상으로 열수(hot water)와 에탄올(EtOH)로 추출하고, 생리 활성을 확인하기 위해 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 항산화(총 polyphenol 함량, DPPH radical 소거능, SOD 유사 활성능), 주름 개선(elastase 활성 저해능), 미백(tyrosinase 활성 저해능) 활성을 측정하고자 하였고, (2) 난용성인 아카시아 잎 에탄올 추출물을 가용화시키기 위해 PCL-PEG 고분자 미셀을 제조하고자 하였으며, (3) 아카시아 잎 에탄올 추출물의 피부 흡수를 증진시키기 위해 세포투과 펩티드인 R6 (hexa-D-arginine)를 함께 적용하여 경피 투과도 증가를 확인하고자 하였다. 이를 통하여 아카시아 잎 에탄올 추출물의 기능성 화장품 천연 신소재로서 활용 가능성을 제시하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

항산화 실험과 미백실험, 항균시험에 사용된 polyphenol, DPPH, Elastase, Tyrosinase, SOD 등 각 실험 제조에 사용된 용액은 Sigma aldrich(USA)의 제품을 사용하였고 실험에 사용한 기기는 흡수 분광광도

계(SYNERGY HTX multi-mode reader, Bio Tek, Seoul, Korea), 원심분리기(Supra-25K, Hanil Scientific Inc., Gimpo, Korea), 향온기(ChangShin Science, Seoul, Korea)이다. PCL-PEG 고분자(Mn=2,500, Mw=2,500 ; PCL와 PEG 비율 1:1)는 Sigma aldrich (USA)에서 구매하였으며, R6(hexa-D-arginine)는 Dermafirm Co. (Seongnam, Korea)에서 구입하였다.

2. 시료추출

아카시아 잎을 열수 및 에탄올 추출공정을 이용해 각각 추출하였다. 열수 추출방법은 아카시아 잎 분말에 정제수를 가하여 80 °C 항온조에서 4시간 동안 추출하고 종이 여과지를 이용하여 감압 여과한 다음, 동결건조기(Freeze dryer, ilShin, Korea)로 동결 건조하여 분말을 얻었다. 에탄올 추출물은 아카시아 잎 분말에 85% 에탄올을 가하여 3일 동안 추출하여 종이 여과지를 이용하여 감압 여과하였다. 그 후 감압 농축기(Eyela, Japan) 농축 과정을 거쳐 동결건조기로 동결 건조하여 분말을 얻었다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀(total polyphenol content) 측정법은 시료의 항산화능력을 측정하는 방법은 아니지만, 시료에 함유되어 있는 폴리페놀 화합물의 양을 측정함으로써 항산화능력을 예측할 수 있으므로 항산화 연구에 폭넓게 이용되는 방법이다. polyphenol의 정량은 Folin-Denis의 방법에 따라 측정하였다[8]. 일정 농도로 희석한 시료 100 µL에 Folin-Denis' reagent(Sigma aldrich, USA)를 100 µL 가하여 3분간 반응시킨 후 10% Na₂CO₃를 100 µL 첨가하였다. 이 반응액을 Multi-Mode Microplate Reader(BioTek, USA)로 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid(Samchun Chemicals, Korea)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 함량은 gallic acid equivalents(mg GAE/g extract)로 나타내었다[9].

4. 항산화 실험 측정

1) DPPH radical 소거능 측정.

DPPH는 radical 상태에서 보라색을 띠고, 환원이 되면 노란색의 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H)으로 변환된다. 안정한 라디칼인 DPPH는 산화방지

물질로부터 전자 혹은 수소를 제공받으면 non-radical로 전환된다. DPPH radical scavenging을 이용한 항산화 효과의 측정에는 Blois의 방법에 따라 측정하였다[10]. 추출물 용액 100 μ L에 0.45 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 용액 120 μ L을 넣고 암실에서 30분 반응 후 Multi-Mode Microplate Reader로 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

DPPH scavenging ability (%)

$$= (1 - \text{시료 처리군 흡광도} / \text{무처리군 흡광도}) \times 100$$

2) SOD 유사활성 능력

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 반응에서 pyrogallol은 무리 존재하는 superoxide radical에 의해 자동 산화가 일어나 갈색 물질을 형성하여 이를 분광광도계로 분석하고, superoxide 포착 활성이 있는 물질이 존재 시 pyrogallol의 산화 속도가 낮아지는 원리를 이용하여 superoxide 포착활성을 간접적으로 측정할 수 있다[11, 12]. 각 아카시아 잎의 SOD 유사 활성능은 Superoxide Anion Assay Kit(Sigma aldrich, USA)를 이용하여 측정하였다. 일정 농도로 희석한 시료 20 μ L에 WST working solution을 200 μ L 가하고, enzyme working solution을 20 μ L 첨가한 후 37°C에서 20분간 반응시켰다. 이 반응액을 Multi-Mode Microplate Reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 ascorbic acid로 하였고, 소거능은 시료 첨가구와 시료 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

SOD-like activity (%)

$$= (1 - \text{시료 처리구 흡광도} / \text{무처리구 흡광도}) \times 100$$

5. Elastase 활성 저해 측정

Elastase 활성 저해능은 EnzChek elastase assay kit(ThermoFisher, USA)를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 1xReaction buffer로 희석한 시료를 50 μ L씩 분주 후 100 μ g/ml DQ elastin solution을 50 μ L 넣어준다. 그 다음 0.2 unit으로 조제한 Elastase 효소액(Sigma, 12056)을 100 μ L 씩 넣고 최종 양을 200 μ L로 만들어준 뒤 조제한 것이 잘 섞이도록 파이펫팅을 해주었다. 그 후 실온에서 30분 동안 방치하고 반응 후

microplate reader로 Excitation 485 nm, Emission 535 nm로 형광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone를 사용하였으며 음성 대조군으로 elastase 효소액 대신 100 mM 1 xReaction buffer를 50 μ L씩 분주하였다.

Inhibition of tyrosinase activity (%)

$$= [1 - (S - B) / C] \times 100$$

S : 효소액 및 시료용액 첨가 시 흡광도 변화 값

B : 효소액 대신 1xReaction buffer 첨가 시의 흡광도 변화 값

C : 시료 용액 대신 1xReaction buffer 첨가 시의 흡광도 변화 값

6. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해 활성 측정은 Kubo 등의 방법을 응용하여 측정하였다[13]. Tyrosinase 활성 억제 측정은 96 well을 사용하여 흡광도를 측정하였다. 96-well micro plate에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 220 μ L씩 분주한 후 아카시아 잎에서 추출한 시료를 20 μ L씩 넣는다. 그 후 2000U mushroom tyrosinase (Sigma, T3824) 20 μ L씩 넣고 6분 반응시킨 후 1.5 mM tyrosine (Sigma, T3754)을 40 μ L씩 첨가하고 15분 동안 암실에서 반응시켰다. 490 nm에서 흡광도를 측정하고 tyrosinase 효소 활성 억제율을 구하였다. 양성 대조군으로 kojic acid를 사용하였으며 음성 대조군으로 tyrosinase 대신 0.1 M sodium phosphate buffer를 20 μ L씩 동일하게 분주하였다.

tyrosinase 활성 저해율(%)

$$= 100 - \{(b - b') / (a - a')\} \times 100$$

*a : (-) control의 반응 후의 흡광도

*b : 시료액의 반응 후의 흡광도

*a', b' : tyrosinase 대신 PBS 로 대체하여 측정한 흡광도

6. 항균 시험

아카시아 잎 열수 및 에탄올 추출물의 항균 활성을 측정하기 위해서 disc diffusion test를 시행하였다[14]. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus*

subtilis, *Propionibacterium acnes*는 한국미생물 보존센터(KCCM)와 생물자원센터(KCTC)에서 분양받아 사용하였다. 실험에 사용된 균주인 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*는 Muller-Hinton medium을 사용하여 37 °C에서 24시간 배양 후 1회 재배양 후에 분광 광도계를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 맞추어 사용하였다. 그리고 *Propionibacterium acnes*는 Reinforced clostridial medium을 사용하였으며 가스팩을 밀폐용기에 넣어 혐기성 환경을 만들어 준 후 밀폐용기에서 72시간 배양 후 1회 재배양 후 분광광도계를 사용해 600 nm에서 흡광도를 맞추어 사용하였다. 양성 대조균으로 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*는 methyl paraben을, *Propionibacterium acnes*는 salicylic acid를 사용하였다. 배양조건은 Table 1에 나타내었다.

표 1. 항균시험에 사용된 균주와 배양 조건목록
 Table 1. List of strains and cultivation condition used for antimicrobial experiments

Strains	Media	Temperature (°C)	Time (h)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6358	MH	37	24
<i>Escherichia coli</i> ATCC23726	MH	37	24
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC19659	MH	37	24
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC6919	RC	37	72

MH; Muller-Hinton medium
 RC; Reinforced clostridial medium

7. PCL-PEG 고분자 미셀 / 세포투과 펩티드 R6 혼합 PCL-PEG 고분자 미셀 제조

PCL-PEG(Sigma aldrich, USA)는 Mn=2,500, Mw=2,500, PCL과 PEG 비율 1:1을 사용하였고, PCL-PEG 고분자 미셀의 제조 과정은 다음과 같다. 교반기로 60 °C에서 에탄올(Samchun Chemicals, Korea)에 PCL-PEG를 시료 무게 대비 5배 녹인 후, 시료를 가하여 완전히 용해시키고, 감압 농축기로 에탄올을 모두 휘발시킨 후 정제수로 최종 무게를 맞췄다. 세포투과 펩티드 hexa-D-arginine인 R6(Dermafirm Co., Korea) 혼합한 PCL-PEG 고분자 미셀은 R6를 첨가한 후 증류수로 최종 무게를 맞췄다. 입도는 Dynamic Light Scattering System(Microtrac, USA)를 이용하여 측정하였다.

9. 경피 투과도 측정

경피 투과도는 Franz Diffusion Cells and Systems(PermeGear, USA)를 이용하여 측정하였다. 인공피부 Neoderm®-E(Tegoscience, Korea)를 receptor chamber 위에 각질층이 위를 향하도록 놓고, donor chamber를 각질층 위에 올려 고정시킨 후 receptor chamber에 receptor medium인 PBS(Sigma aldrich, USA)를 8.5 mL 채워주었다. 온도는 항온수조(LabHouse, Korea)로 37°C를 유지하였고, 30분간 안정화시킨 후 시료 500 µL를 1.32665 cm² 면적의 피부에 도포하였다. 투과된 시료가 균일하게 혼합되도록 stirbar는 500 rpm을 유지하면서 4, 8, 12, 16, 20, 24시간 후에 각각 sampling port를 통해 시료가 용해되어있는 receptor medium을 500 µL 채취하고, 동량의 receptor medium을 보충하였다. 채취한 receptor medium은 HPLC를 이용하여 정량하였다[15]. 지표성분은 3,5-dihydroxy benzoic acid(Sigma aldrich, USA)로 설정하였고, 분석기기는 HPLC(Acme 9000, Youngin, Korea)이며, 컬럼은 SunfireTM C18 (3.5µm 4.6×150mm, Waters, USA)를, 펌프는 pump(SP930D, Youngin, Korea)을, 검출기는 detector(UV730D, Youngin, Korea)을 이용하였으며 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 이동상은 solvent A(water : formic acid = 99.9 : 0.1, v/v)와 solvent B(acetonitrile : formic acid = 99.92 : 0.08, v/v)를 사용하여 0.3 mL/min에서 0.5 mL/min의 유속으로 10분간 분석하였으며, 6.8 retention time에서 3,5-dihydroxy benzoic acid이 검출되었다. 자세한 분석조건은 Table 2에 제시하였다.

표 2. 아카시아 잎 분석을 위한 조건
 Table 2. HPLC operation conditions for determination of acacia leaf

Column	Sunfire TM C18 (3.5µm 4.6×150mm, Waters, U.S.A)
Mobile phase	A = water : formic acid, (99.9 : 0.1, v/v) B = acetonitrile : formic acid (99.92 : 0.08, v/v)
Detector	UV730D, Youngin, Korea
Detector wavelength	UV 280 nm
Injection volume	20 µL
Flow rate	0.3mL/min, 0.5mL/min
Column temperature	25 °C
Run time	10 min

10. 통계처리

항균 시험을 제외한 모든 실험은 각 세 번의 반복적인 실험을 통하여 결과를 얻었고, 실험에 의해 얻어진 값들의 평균±표준편차로 나타내었다. 통계분석은 SPSS 프로그램(SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용해 독립 표본 t 검정과 일원 배치 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 하였다.

III. 실험 결과 및 고찰

1. 아카시아 잎의 수율

아카시아 잎의 열수추출물, AWE(Acacia water extract)의 수율은 4.72%이고, 85% 에탄올 추출물, AEE(Acacia ethanol extract)의 수율은 0.93%이다.

2. 총 polyphenol 함량 측정

총 polyphenol의 함량을 측정하기 위해, 아카시아 잎 열수 추출, 에탄올 추출물을 각각 비교한 결과는 Table 3에 나타내었다. AWE(Acacia water extract)에서 56.88 mg/g, AEE(Acacia ethanol extract)에서 47.42 mg/g 함량을 함유하고 있으며, 열수 추출물이 약간 좋은 결과를 나타내고 있다.

표 3. 아카시아 잎으로부터의 총 polyphenol 함량

Table 3. The Contents of Total Polyphenols of Water and Ethanolic Extract from Acaia. Values represent the mean ± SD of three independent experiments. AWE : Acacia Water Extract, AEE : Acacia Ethanol Extract.

samples	Method	Total polyphenols (mg/g)
AWE	hydrothermal extraction	56.88 ± 8.93
AEE	ethanol extraction	47.42 ± 4.21

3. 아카시아 잎의 항산화 효능 측정

1) DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical은 수소 공여체의 활성을 측정하는 방법 방법의 하나이다. DPPH radical은 페놀성 화합물, 방향족 아민류 등에 의해 수소 및 전자를 받으면 보라색 빛을 띠는 라디칼로서 항산화 물질과 반응하면 노란빛으로 변하는 특징을 가지고 있다[16]. 아카시아 잎 추출물 AWE(Acacia water extract), AEE(Acacia ethanol extract)에서 측정한 실험을 진행하였고 그 결과는

Figure 1에 나타내었다. 125 ~ 1,000 µg/mL에 따라 DPPH radical 소거능 결과에서는, 아카시아 잎 에탄올, 열수 추출물에서 농도 의존적인 결과를 보였으며, 아카시아 잎 에탄올 추출물 농도 1,000 µg/mL에서 44.24% 저해율을 보였고 같은 농도에서 아카시아 잎 열수 추출물은 41.50% 저해율을 보였다. 양성 대조군인 ascorbic acid에 비해 낮은 항산화 활성이 확인되었지만, 천연물 기준으로 보았을 때 비교적 높은 항산화 활성을 나타내었다.

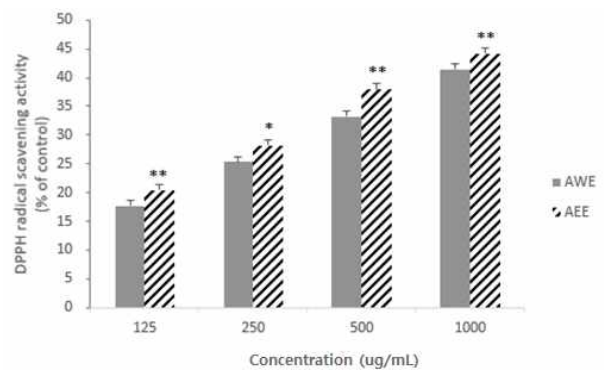


그림 1. 아카시아 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능(%)

Figure 1. DPPH radical scavenging activity of AWE, AEE.

Positive control : ascorbic acid 97.46% (radical scavenging activity) in 97.46 µg/mL. *P<0.1, **P<0.05, ***P<0.001 vs. control. AWE : Acacia Water Extract, AEE : Acacia Ethanol Extract.

2) Elastase 저해 활성 측정

피부의 진피에 존재하는 elastase는 진피 내 피부의 탄력을 유지하는 fibroectin, collagen, elastin을 포함해 다양한 단백질을 분해할 수 있는 효소로써[17], 활성이 높아 피부조직 파괴 시 직접적인 영향이 된다. 피부의 주름 개선에 효과가 있는 elastase 저해능을 확인한 시험 결과를 Figure 2에서 제시하였으며, 62.5 ~ 500 µg/mL에 따라 농도 의존적인 결과를 보였다. 모든 농도에서 에탄올 추출물이 더 좋은 효과를 나타냈었으며, 농도 500 µg/mL에서 아카시아 잎 에탄올 추출물은 54.09% 저해율을 보였고, 아카시아 잎 열수 추출물은 36.95% 저해율을 나타내었다.

3) SOD 유사활성능

SOD는 superoxide(O²⁻)를 정상 상태의 산소로 환원 시킴으로써 superoxide 즉, 활성산소가 관여하는 각종 질병이나 노화를 억제할 수 있는 효소이다. Photochemical은 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물

질로 superoxide의 반응성을 억제하고 superoxide로부터 생체를 보호하는 것으로 보고되고 있고, 이를 제거함으로써 산화적 장애를 방어하고 노화 억제의 효과를 기대할 수 있을 것으로 보고되고 있다[18]. 아카시아 잎의 SOD 유사 활성능을 측정된 결과를 Figure 3에 나타냈다. 62.5 ~ 500 µg/mL에, 따라 농도 의존적인 결과를 보이고 있고, 농도 500 µg/mL에서, 열수추출물의 SOD 활성능은 76.41%이고, 에탄올추출물의 SOD 활성능은 86.31%로 더 좋은 SOD 유사활성을 나타내었다.

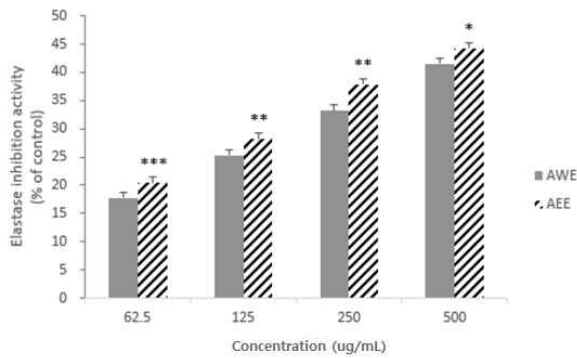


그림 2. 아카시아 잎 추출물의 Elastase 저해 활성능
 Figure 2. Inhibition of Elastase of AWE, AEE. Positive control : N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val- chloro methyl 6.84% (inhibition activity) in 10 µg/mL. *P<0.1, **P<0.05, ***P<0.001 vs. control. AWE : Acacia Water Extract, AEE : Acacia Ethanol Extract.

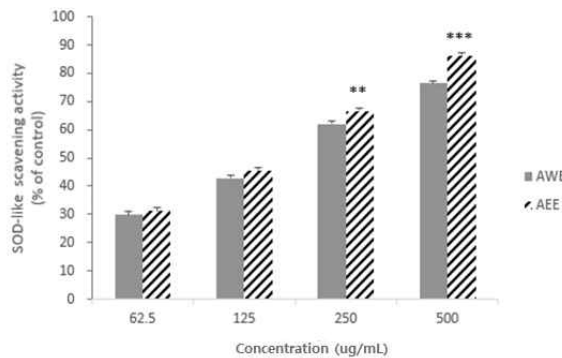


그림 3. 아카시아 잎 추출물의 SOD 유사활성능
 Figure 3. SOD-like activity scavenging of AWE, AEE. Positive control : ascorbic acid, *P<0.1, **P<0.05, ***P<0.001 vs. control. AWE : Acacia Water Extract, AEE : Acacia Ethanol Extract.

4. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase는 멜라닌 합성에 있어서 핵심적인 역할을 하는 효소이다. 이에 관한 억제 기전에 가장 많이 밝혀져 있으며, 멜라닌 합성의 출발 물질인 tyrosine을 DOPA-quinone으로 전환하기 때문에 tyrosinase의 활성

유무가 멜라닌의 양을 결정하는데 중요하다[20]. 피부의 미백 활성에 효과가 있는 Tyrosinase 저해 능 실험은 아카시아 잎 추출물 AWE(Acacia water extract), AEE(Acacia ethanol extract)에서 2.5, 5, 10, 20 mg/mL의 농도에서 실험 결과를 Figure 4에 제시하였으며, 농도 의존성을 확인하였고 모든 농도에서 아카시아 잎 에탄올 추출물이 더 우수한 효능을 나타내었다. 아카시아 잎의 Tyrosinase 저해능을 확인한 시험결과에서, 아카시아 잎 에탄올 추출물 농도 20 mg/mL에서 56.47% 저해율을 보였고 같은 농도에서 아카시아 잎 열수 추출물은 23.05% 저해율을 나타내었다.

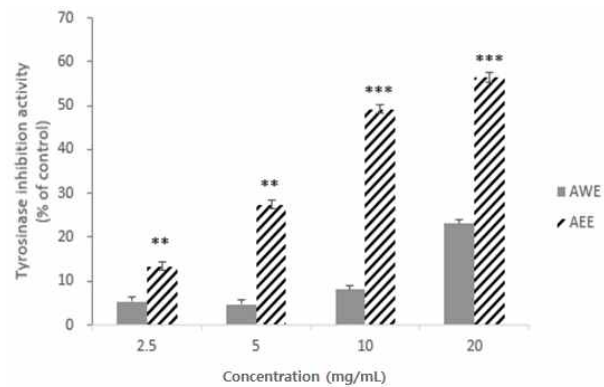


그림 4. 아카시아 잎 추출물의 Tyrosinase 저해 활성능
 Figure 4. Inhibition of mushroom tyrosinase of AWE, AEE. Positive control : kojic acid 94.38% (inhibition activity) in 0.5 mg/mL. *P<0.1, **P<0.05, ***P<0.001 vs. control. AWE : Acacia Water Extract, AEE : Acacia Ethanol Extract.

5. 항균 시험

항균시험은 4개 균주(*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*)에 대하여 paper disc 법을 이용하여 3회 실험 후 저해영역(clear zone)을 측정된 결과를 Table 4와 Table 5에 나타내었다.

아카시아 잎 열수 추출물(AWE)은 4개 균에 clear zone을 나타내지 않았으며, 에탄올 추출물(AEE)은 2개 균주(*Propionibacterium acnes*, *Bacillus subtilis*)에서 효과를 확인할 수 있었는데, *Propionibacterium acnes* 균주에서 에탄올 추출물(AEE) 10.0 mg/mL에서 11.00 mm의 clear zone으로 가장 높은 항균효능을 나타내었다(Table 4). *Bacillus subtilis* 균주에서는 에탄올 추출물(AEE) 5.0 mg/mL에서 가장 높은 항균력인 10.50 mm의 clear zone을 보였다(Table 5). 이 결과는 아카시아 잎 에탄올 추출물에서 보다 많은 항균 유효성분을

함유하는 것으로 생각된다.

표 4. 아카시아 잎 추출물의 *Propionbacterium acnes* 균주에 대한 항균 clear zone 효능

Table 4. The effect of AWE, AEE amount on area of clear zone against *Propionbacterium acnes*. Values represent the mean \pm SD of three independent experiments. AWE : Acacia Water Extract, AEE : Acacia Ethanol Extract.

Samples	Diameter of clear zone (mm)				
	Concentration (mg/mL)	1.25	2.5	5.0	10.0
AWE	-	-	-	-	-
AEE	9.33 \pm 0.58	9.33 \pm 0.58	9.67 \pm 0.58	11.00 \pm 0.00	

표 5. 아카시아 잎 추출물의 *Bacillus subtilis* 균주에 대한 항균 clear zone 효능

Table 5. The effect of AWE, AEE amount on area of clear zone against *Bacillus subtilis*. Values represent the mean \pm SD of three independent experiments. AWE : Acacia Water Extract, AEE : Acacia Ethanol Extract.

Samples	Diameter of clear zone (mm)				
	Concentration (mg/mL)	1.25	2.5	5.0	10.0
AWE	-	-	-	-	-
AEE	9.00 \pm 0.00	9.67 \pm 0.29	10.50 \pm 0.87	10.33 \pm 0.58	

6. PCL-PEG 고분자 미셀 / 세포투과 펩티드 R6 혼합 PCL-PEG 고분자 미셀

아카시아 잎은 항산화, 미백 활성, 항균 효과를 나타내고 있으며, 폴리페놀 함량 실험을 제외한 대부분의 실험 결과에서, 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 더 좋은 생리활성 효과를 확인하였다. 하지만 아카시아 잎 에탄올 추출물은 난용성 성분을 함유하고 있어 제형에 어려운 문제를 갖고 있으며, 피부흡수의 어려움을 지니고 있다. 이것을 해결하고자 PCL-PEG 고분자 미셀을 적용하여 수용액에 가용화하고 세포투과펩티드(R6)를 이용하여 경피투과를 증진하고자 하였다. PCL-PEG는 소수성 PCL과 친수성 PEG의 공중합체로, 양친매성을 가지므로 수용액 상에서 미셀을 형성하여 소수성의 물질을 포집할 수 있다. 이는 PCL과 PEG의 배합비를 다양하게 조절하여 다양한 난용성 물질을 가용화시킬 수 있고, 생체적합성 고분자라는 장점이 있다. 따라서 본 실험에서

는 AEE(Acacia Ethanol Extract) 1.0% 함유 PCL-PEG 고분자 미셀, 세포투과 펩티드(R6) 0.1%를 혼합한 AEE 1.0% 함유 PCL-PEG 고분자 미셀을 제조하여 난용성인 아카시아 잎 에탄올 추출물을 가용화시키는 데 성공하였다. 이를 AEE 1.0% 함유 에탄올과 증류수 1:1 혼합용매와 비교하여 입도 분석을 진행하였고 그 결과는 Table 6에 제시하였다. 고분자 미셀을 함유하지 않은 아카시아 잎 추출물(AEE)의 입자크기는 1,060.00 nm이지만, AEE 1.0% PCL-PEG 미셀, R6 0.1% 혼합 AEE 1.0% PCL-PEG 미셀의 입도는 각각 108.23, 126.47 nm로 입자크기를 1/10배로 줄일 수 있었다. 따라서 PCL-PEG 고분자 미셀을 이용해 난용성인 아카시아 잎 에탄올 추출물을 가용화에 성공하였고, 입자크기의 감소로 경피 투과도도 향상될 것으로 기대하고 경피흡수 실험을 진행하였다.

7. PCL-PEG 고분자 미셀 및 세포투과 펩티드 R6에 의한 경피 투과도 증가

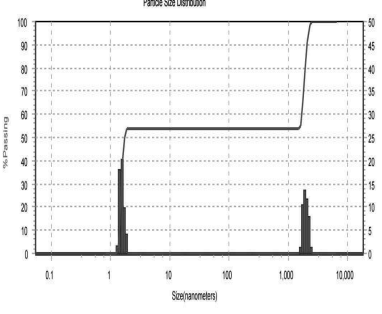
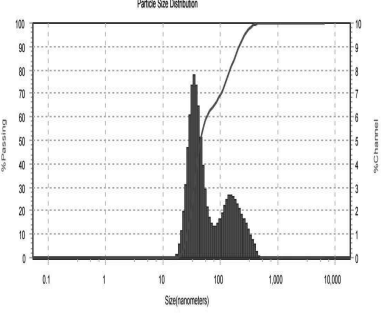
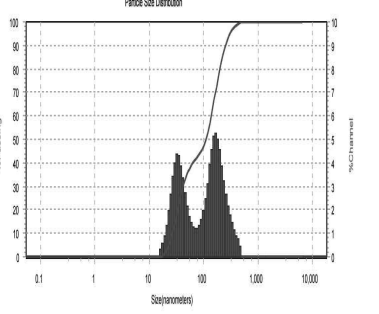
높은 생리 활성을 갖는 아카시아 잎 에탄올 추출물을 가용화했지만 표피 각질층의 피부 장벽 기능으로 경피 투과도는 여전히 낮을 것이라고 생각하여 이에 세포투과 펩티드인 R6를 이용하여 경피 투과도를 증진시키고자 하였다. 세포막 투과 펩티드(Cell Penetrating Peptide, CPP)는 양이온성 아미노산인 arginine이 높은 비율로 구성되어 있어 이는 세포 내 투과 성능을 높임을 알 수 있다. 세포막과 피부 각질 세포간 지질은 모두 지질 이중층 구조로 유사하기 때문에 세포투과 펩티드를 경피 투과에 적용할 수 있을 것이라 사료된다. 따라서 본 실험에서는 AEE(Acacia Ethanol Extract) 1.0% 함유 에탄올과 증류수 1:1 혼합 용매, AEE 1.0% 함유 PCL-PEG 고분자 미셀, 세포투과 펩티드 R6 0.1%를 혼합한 AEE 1% 함유 PCL-PEG 고분자 미셀을 대상으로 경피 투과도를 측정하였다.

그 경피투과도 실험결과는 Table 7과 Figure 5에 제시하였다. AEE, AEE 고분자 미셀, R6 혼합 AEE 고분자 미셀의 3가지 모든 경우에, 4시간에서 투과량이 급격히 상승한 후 24시간에서는 완만한 상승세를 보였다.

4시간에서 AEE, AEE 고분자 미셀, R6 혼합 AEE 고분자 미셀의 투과량은 각각 14.85, 20.99, 29.97 μ g/cm²으로 AEE에 비해, 고분자 미셀은 약 1.43배, R6 혼합 고분자 미셀은 약 2.02배 많은 양이 투과되었다.

표 6. 아카시아 잎 에탄올 추출물과 1.0%의 PCL-PEG 고분자 미셀 함유, 그리고 세포투과 펩티드 R6 혼합 PCL-PEG 고분자 미셀 함유시 각각의 입도 크기

Table 6. Particle size of AEE 1.0% water and ethanol (1:1) solution, AEE 1.0% PCL-PEG polymer micelle and AEE 1.0% PCL-PEG polymer micelle containing cell penetrating peptide R6. Values represent the mean \pm SD of three independent experiments. AEE:Acacia Ethanol Extract.

Sample		
AEE 1.0% in Water and Ethanol (1:1)	AEE 1.0% in PCL-PEG	AEE 1.0% and R6 0.1% in PCL-PEG
1,060.00 \pm 662.26 nm	108.23 \pm 18.78 nm	126.47 \pm 2.31 nm
		

또한 24시간에서 AEE, AEE 고분자 미셀, R6 혼합 AEE 고분자 미셀의 누적 투과량은 각각 35.72, 46.58, 55.65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 AEE에 비해, 고분자 미셀은 약 1.19배, R6 혼합 고분자 미셀은 약 1.56배 많은 양이 투과되었다. 그러므로 PCL-PEG 고분자

미셀로 가용화시키면 입도의 감소로 경피 투과도가 증가하고, 여기에 세포투과 펩티드인 R6를 함께 적용하면 경피 투과도가 상당량 증가하는 것을 알 수 있었다.

표 7. 아카시아 잎 에탄올 추출물과 고분자 미셀, 세포투과 펩티드 혼합 고분자 미셀의 누적된 침투 함유량

Table 7. Cumulative amount permeated of Acacia Ethanol Extract., its polymer micelle and its polymer micelle containing cell penetrating peptide, R6 . Values represent the mean \pm SD of three independent experiments. AEE : Acacia Ethanol Extract.

Time (h)			0	4	8	12	16	20	24
Cumulative amount permeated ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	AEE 1.0% in Water and Ethanol (1:1)	mean	0	14.85	19.23	24.89	28.74	31.96	35.72
		SD	0	1.41	1.09	1.09	1.21	1.74	1.61
	AEE 1.0% in PCL-PEG	mean	0	20.99	25.23	31.55	39.08	43.06	46.58
		SD	0	1.73	1.92	2.25	1.47	2.01	0.93
	AEE 1.0% and R6 0.1% in PCL-PEG	mean	0	29.97	39.51	46.37	51.42	54.59	55.65
		SD	0	1.97	2.06	1.73	1.15	1.61	1.72
one-way ANOVA			-	.000	.000	.000	.000	.000	.000

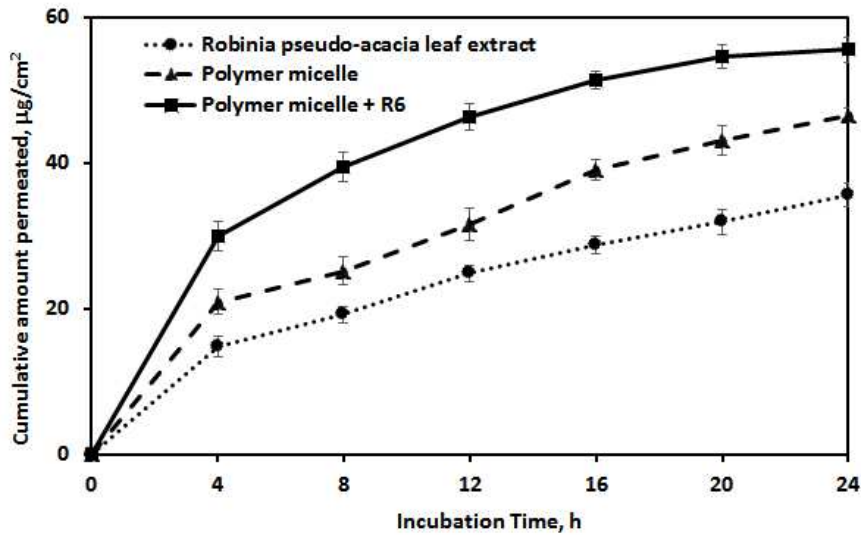


그림 5. 아카시아 잎 에탄올 추출물과 고분자 미셀, 세포투과 펩티드 혼합 고분자 미셀의 누적된 침투 함유량
 Figure 5. Cumulative amount permeated of Acacia Ethanol Extract, its polymer micelle and its polymer micelle containing cell penetrating peptide.

V. 결론

본 연구에서는 아카시아 잎 열수 및 에탄올 추출물에 대한 생리활성을 평가하였고, 고분자 미셀과 세포투과 펩티드를 이용하여 난용성 약물의 가용화, 안정화, 나노 입자수준으로 입자크기 감소 및 피부흡수의 증가효과를 확인하였다.

총 polyphenol 함량은 열수 추출에서 56.88 mg/g, 에탄올 추출에서 47.42 mg/g으로 분석되었고 열수 추출에서 더 많은 polyphenol 함량을 나타냈다. DPPH radical 소거능 실험에서는 아카시아 잎 에탄올 추출물 농도 1,000 µg/mL에서 44.24% 저해율을 보였고 같은 농도에서 아카시아 잎 열수 추출물은 41.50% 저해율을 나타냈다. 주름개선에 효과를 나타내는 elastase 저해능 결과에서는 아카시아 잎 에탄올 추출물 농도 500 µg/mL에서 54.09% 저해율을 보였고 같은 농도에서 아카시아 잎 열수 추출물은 36.95% 저해율을 확인하였다. SOD 유사활성능 결과에서는 아카시아 잎 열수 추출물 농도 500 µg/mL에서 76.41%, 같은 농도에서 아카시아 잎 에탄올 추출에서 86.31% 로 더욱 높은 활성을 나타냈다. 미백 기능에 효과를 나타내는 Tyrosinase 실험에서는 아카시

아 잎 에탄올 추출물 농도 20 µg/mL에서 56.47% 저해율을 보였고 같은 농도에서 아카시아 잎 열수 추출물은 23.05% 저해율이 나타났다. 항균 시험의 경우 아카시아 잎 열수 추출은 4개 모든 균주에서 clear zone을 확인할 수 없었지만, 에탄올 추출물은 *Propionibacterium acnes* 균주에서 11.00 mm의 최대 clear zone을, *Bacillus subtilis* 균주에선 10.50 mm의 최대 clear zone을 나타내었다.

이를 바탕으로 총 polyphenol 함량 실험을 제외한 대부분 항산화, 미백, 항균실험에서 아카시아 잎 에탄올 추출이 열수 추출보다 우수함을 확인하였다. 아카시아 잎 에탄올 추출물의 난용성과 경피흡수의 어려움을 해결하기 위해 PCL-PEG 고분자 미셀과 세포투과펩티드(R6)를 적용한 PCL-PEG 고분자 미셀을 제조하여 아카시아 잎 에탄올 추출물을 100 nm 내외로 가용화시키는 데 성공하였고 입자크기도 각각 108.23, 126.47 nm로 약 1/10배 미세한 나노입자 크기를 얻을 수 있었다. 또한, 아카시아 잎 에탄올 추출물, PCL-PEG 고분자 미셀 적용, 세포투과펩티드(R6)를 함유한 PCL-PEG 고분자 미셀의 24시간 최종 누적 투과량은 각각 35.72 µg/cm², 46.58 µg/cm², 55.65 µg/cm²으로 증가된 경피흡수 결과를 확인하였다. 즉, PCL-PEG 고분자 미셀로 가용화시

키면, 입자크기 감소로 경피 투과도가 증가하고, 여기에 세포투과 펩티드인 R6를 함께 적용하면, 경피 투과도가 훨씬 더 증가하는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서는 아카시아 잎 에탄올 추출물을 대상으로 polyphenol 화합물의 함량 및 항노화, 미백, 항균 등 다양한 생리 활성을 확인할 수 있었고, 생분해성을 갖는 양친매성 PCL-PEG를 사용하여 제형 안정성을 높이고, 효능을 극대화하기 위해 세포투과 펩티드(R6)를 이용하여 피부 투과도를 증가시켰다. 아카시아 잎 에탄올 추출물의 천연 기능성 화장품 소재로서 가능성을 확인하였고, 이를 활용한 기능성 화장품의 제조·활용 및 이 분야 연구의 기초 자료로 활용하는 데 있어 매우 유용한 천연소재로서 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

References

- [1] Thayer DW, Boyd G, Kim A, Fox JB, Farrel HM, "Fate of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* during refrigerated storage on raw of cooked turkey breast meat", *Journal of Food Protection*, Vol. 61(8), pp. 979-987, 1998.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.8.979>
- [2] Kreydiyyeh SI, Usta J, "Diuretic effect and mechanism of action of parsley", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 79(3), pp. 353-357, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00408-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00408-1)
- [3] Kim CS, Ahn KS, Perk KC, Jeon BS, Lee JT, Park JW, "Isolation of antioxidative compound from *Scutellaria baicalensis*", *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, Vol. 14(4), pp. 212-216, 2006.
- [4] Kim YG, Pham DN, Lee YH, Jo JJ, Choe EY, Lee YH, Kim SB, Kim CJ "Whitening and antioxidant activities of fermentation broth of acacia flower (*Robinia pseudoacacia*)", *Clean technology*, Vol. 23(4), pp. 401-407, 2017.
<https://doi.org/10.7464/ksct.2017.23.4.401>
- [5] Hyun H, Kim MS, Khang GS, Rhee JM, Lee HB, "Synthesis and characterization of linear and branched copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(ϵ -caprolactone)", *Polymer*, Vol. 30(2), pp. 146-151, 2006.
- [6] Lundberg P, Langel U, "A brief introduction to cell-penetrating peptides", *Journal of Molecular Recognition*, Vol. 16, pp. 227-233, 2003.
<https://doi.org/10.1002/jmr.630>
- [7] Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB, "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 97, pp. 13003-13008, 2000.
- [8] Folin O, Denis W, "On phosphotungstic - phosphomolybdic compounds as color reagents", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 12 pp. 239-243, 1912.
- [9] Lee SH, Lee SO, "Polyphenol contents and antioxidant activities of lentil extracts from different cultivars", *Journal of Korean Society of Food Science Nutrition*, Vol. 45(7), pp. 973-979, 2016.
<http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.7.973>
- [10] Blois MS, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", *Journal of Nature*, Vol. 181, pp. 1199-1200, 1958.
<http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>
- [11] Bae RN, Lee SK, "Factors affecting Browning and its control methods in chopped garlic", *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, Vol. 31, pp. 213 - 218, 1990.
- [12] Jo KS, Kim HK, Ha JH, Park MH, Shin HS, "Flavor compounds and storage stability of essential oil from garlic distillation", *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol. 22(7), pp. 840 - 845, 1990.
- [13] Kubo I, Kinoshita H, Yokokawa Y, "Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits", *Journal of Natural Products*, Vol. 57, pp. 545-551, 1994.
<https://doi.org/10.1021/np50106a021>
- [14] Ko MO, Kang HJ, Hwang JH, Yang KW, "Screening of the antibacterial effects by ethanol extracts from natural plant in Jeju against *Propionibacterium acnes*", *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. 44(1), pp. 59-66, 2018.
<http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2018.44.1.59>
- [15] Park JS, "The antioxidative, antimicrobial Activity and tyrosinase activity inhibitory effect of extracts from parts of *Robinia pseudoacacia*", *Master Thesis*, Soongsil University, 2008.
- [16] Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cineros-Zevallos L, "Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum

- (*Sorghum bicolor*) and sorghum products”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, pp. 6657-6662, 2003.
<https://doi.org/10.1021/jf034790i>
- [17] Papa ND., Tatjana S, Alain C, “Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin - rich fractions”, *Food Chemistry*, Vol. 113, pp. 897-902 (2009).
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.016>
- [18] Kwak YJ, Kim JS, “Changes of chlorophyll and sod-like activities of chinese chives dehydrated at different heat treatments : anti-aging and anti-wrinkle effects”, *Journal of Korean Society of Food Science Nutrition*, Vol. 38, pp. 879-884, 2009.
<https://doi.org/10.3746/jkfn.2009.38.7.879>
- [19] Kligman D, “Cosmeceuticals”, *Dermatologic Clinics*, Vol. 18(4), pp. 609-615, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(05\)70211-4](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(05)70211-4)
- [20] Lee YS, Choi JB, Joo EY, Kim NW, “Antioxidative activities and tyrosinase inhibition of water extracts from *Ailanthus altissima*.”, *Journal of Korean Society of Food Science Nutrition*, Vol. 36, pp. 1113-1119, 2007.

※ 본 연구는 2017년도 과기정통부의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기기개발사업의 지원을 받아 수행되었음 (No. 2017M3A9D8048416).