

포도껍질 추출물의 기능성 화장품 소재 특성

신은민¹, 김주연¹, 박시은¹, 김창준^{1,2,*}

¹경상국립대학교 화학공학과 및 공학연구원
52828 경상남도 진주시 진주대로 501
²경상국립대학교 나노신소재융합공학과
52828 경상남도 진주시 진주대로 501

(2021년 11월 9일 접수; 2021년 11월 22일 수정본 접수; 2021년 11월 26일 채택)

Functional Cosmetic Characteristics of Grape Skin Extract

Eun Min Shin¹, Ju Yeon Kim¹, Si Eun Park¹, and Chang-Joon Kim^{1,2,*}

¹Department of Chemical Engineering and ERI, Gyeongsang National University
501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea

²Department of Materials Engineering and Convergence Technology, Gyeongsang National University
501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea

(Received for review November 9, 2021; Revision received November 22, 2021; Accepted November 26, 2021)

요 약

포도껍질은 항산화 물질을 다량 함유한 유용자원임에도 불구하고 사람들은 포도의 과육만 섭취하고 포도껍질을 폐기하고 있다. 본 연구에서는 포도껍질 추출물을 기능성 화장품 원료로의 사용 가능성을 조사하였다. 건조된 포도껍질 분말을 증류수에 넣고 1 h 동안 교반시킨 후 고형물로부터 분리된 상등액을 추출물로 사용하였다. 추출 수율은 17.8 ~ 31.4%였고 추출물에 함유된 총 플라보노이드와 폴리페놀 함량은 각각 1.8 ~ 2.5 mg-QE g-extract⁻¹와 16.9 ~ 20.3 mg-GAE g-extract⁻¹였다. 추출물은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)와 Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTSTM) 라디칼을 효과적으로 제거하였고 소거정도는 추출물 농도에 따라 증가하였다. Collagenase의 콜라겐 가수분해 활성이 추출물에 의해 저해를 받았고 추출물 농도 증가에 따라 활성 저해율이 84.2%까지 증가하였다. 그러나 추출물에 의한 tyrosinase 활성 저해가 크지 않았다. 추출물에 편백수를 첨가함에 따라 tyrosinase 활성 저해율이 높아졌으나 DPPH 라디칼 소거활성은 오히려 감소하였다. 본 연구를 통하여 포도껍질 추출물은 항산화능과 주름개선 효능이 높은 반면 미백 효능은 낮은 것으로 확인되었다. 추출물에 편백수를 적절히 혼합함으로써 항산화능과 주름개선 효능이 우수할 뿐만 아니라 미백 효능도 향상되었다.

주제어 : 포도껍질 추출물, 항산화, 주름개선 효능, 미백 효능, 기능성 화장품

Abstract : Grape skins are a natural resource rich in antioxidants, but people only eat grape flesh and have discarded the skins. This study investigated the possibility of using grape skin extract as a raw material for functional cosmetics. The dried grape skin powder was put in distilled water and stirred for 1 h, and then the supernatant separated from the solid was used as an extract. The extract yield was 17.8 ~ 31.4%, and the total flavonoid and polyphenol contents in the extract were 1.8 ~ 2.5 mg-QE g-extract⁻¹ and 16.9 ~ 20.3 mg-GAE g-extract⁻¹, respectively. The extract effectively removed radicals of DPPH and ABTS, and the degree of scavenging increased with the concentration of the extract. The extract inhibited the collagen hydrolysis activity of collagenase, and the activity inhibition rate increased to 84.2% as the extract concentration increased. However, notable inhibition of tyrosinase by the extract was not found. As the extract of *Chamaecyparis obtusa* was added to the grape-skin extract, the tyrosinase inhibition rate increased, but the DPPH radical scavenging activity decreased. This study found that grape skin extract has a high antioxidant capacity and anti-wrinkle effect but a low whitening effect. However, by mixing the grape skin extract with the extract of *C. obtusa* in an optimal ratio, the whitening effect was improved with excellent antioxidant and anti-wrinkle effects.

Keywords : Grape skin, Antioxidant, Anti-wrinkle effect, Whitening effect, Functional cosmetics

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: cj_kim@gnu.ac.kr; Tel: +82-55-772-1787; Fax: +82-55-772-1789

doi: 10.7464/ksct.2021.27.3.306 pISSN 1598-9712 eISSN 2288-0690

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

검푸른 색상의 식물성 과일들은 항산화·항암 효과가 우수하다고 알려진 안토시아닌(anthocyanin) 계열의 생리활성 물질들을 다량 함유하고 있다[1]. 그 중 포도에는 항암·항염증 효과가 탁월하고 동맥경화와 심장병을 예방하는 천연 생리활성 물질 뿐만 아니라 각종 비타민(vitamin)과 무기질이 풍부하다[2-5]. 포도껍질에는 항산화물질인 폴리페놀(polyphenol)과 플라보노이드(flavonoid) 화합물이 다량으로 포함되어 있는데, 이들은 수산화 라디칼(hydroxy radical, OH), 과산화라디칼(peroxy radical, HO₂) 및 초과산화물 라디칼(superoxide anion radical, O₂⁻) 등의 다양한 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)들을 효과적으로 제거하는 강력한 항산화제로 작용한다[6-8]. 활성산소종들은 피부의 콜라겐(collagen)과 엘라스틴(elastin)을 분해하는 효소들의 발현을 유도한다[9,10]. 발현된 효소들은 피부골격을 구성하는 콜라겐과 엘라스틴의 분해를 촉진시키는데 이로 인해 피부 처짐, 주름 생성, 피부톤 저하 등 피부노화가 진행된다[11]. 포도껍질은 과육보다 6배 많은 폴리페놀을 함유하고 있어 피부노화를 억제하는 기능성 화장품, 식품 또는 의약품 원료로 사용될 수 있을 것으로 판단된다[12]. 그러나 안타깝게도 사람들은 포도의 과육만 섭취하고 포도껍질을 폐기하고 있다. 포도껍질을 원료로 사용하여 항산화 효과와 피부노화방지 효능이 있는 고부가가치의 기능성 물질을 생산할 수 있다면 폐기물의 유용자원화를 통해 경제적 이익을 도모할 수 있을 것으로 사료된다. 최근 들어 화학물질이 첨가되지 않은 제품을 선호하는 노케미(No-Chemi)족들이 늘어나면서, 천연물 소재 기반 화장품들이 새로운 트렌드로 급부상함에 따라 관련 시장규모도 급속히 증가하고 있다[13].

포도껍질 및 포도 부산물로부터 폴리페놀 성분을 추출하고 이들 물질들의 생화학적 특성을 알아보기 위한 연구가 활발히 진행되어왔다. Li et al. [12]은 추출조건(용매, 추출온도 및 시간)을 최적화하여 포도껍질로부터 항산화 물질의 회수율을 향상시켰을 뿐만 아니라 11개 품종의 포도를 입수하여 포도껍질과 과육에 함유된 페놀화합물의 양과 추출물의 항산화 활성을 조사하였다. Wittenauer et al. [11]은 백포도주 제조 후 잔류물로부터 얻은 추출물에서 폴리페놀 화합물을 분리하고 추출물에 의한 콜라겐 분해효소와 엘라스틴 분해효소의 활성저해를 보고하였다. 많은 연구에도 불구하고 유기용매 추출물에 대한 연구가 대부분을 차지한 반면 증류수 추출물의 생화학적 특성에 대한 보고가 거의 없다. 뿐만 아니라 포도껍질 추출물의 미백 효능에 대한 데이터는 더욱 부족한 실정이다.

본 연구에서는 포도껍질 추출물을 기능성 화장품 원료로의 사용 가능성을 조사하였다. 증류수를 추출용매로 사용하여 포도껍질에서 생리활성 물질을 추출하고 추출물의 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정하였다. 추출물의 농도를 변화시키며 항산화 활성, 주름개선 효능 및 미백 효능을 조사하였다. 마지막으로 포도껍질 추출물에 편백수를 첨가하여 미백 효능을 향상시켰다.

2. 실험방법

2.1. 실험재료

경북 영천시에서 재배한 머루포도(Muscat Bailey A)를 진주시 농산물 도매시장에서 구입하였다. 과실에서 분리한 포도껍질을 깨끗이 씻고 이를 건조기(WOF-155, 대한과학, 대한민국)에 넣어 80 °C에서 12 h 이상 건조시켰다. 건조된 포도껍질을 막자사발(내경 15 cm)에 넣고 곱게 갈아서 분말화한 뒤 이를 유리병에 옮겨 넣어 4 °C 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 경남 사천시 축동면에 소재한 사천편백림에서 제공받은 편백수를 냉장 보관하며 사용하였다. 편백나무 분쇄물을 증류탱크에 넣고 수증기를 공급하면 증류에 의해 정유성분이 함유된 수증기가 나오는데 이를 냉각하고 오일층을 분리하면 편백수를 얻을 수 있다[14]. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, 044150)와 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS™, 10102946001)를 각각 Alfa Aesar (MA, USA)와 Roche (Basel, Switzerland)에서 구입하였다. 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-L-alanine (L-DOPA, D0600), 3,4,5-Trihydroxybenzoic Acid Hydrate (Gallic Acid Hydrate, G0011), 5-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one (Kojic acid, K0010), Epigallocatechin Gallate Hydrate (EGCG Hydrate, E0694), 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone Hydrate (Quercetin Hydrate, P0042), L-threo-Hex-2-enono-1,4-lactone (L-Ascorbic Acid, A0537)를 TCI (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Mushroom tyrosinase (T3824), Clostridium histolyticum collagenase (C0130), 4-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg trifluoroacetate salt (89064), 및 기타 시약들을 Sigma-Aldrich사(MO, USA)에서 구입하였다.

2.2. 포도껍질 추출물 제조

포도껍질 분말(10 g)을 200 mL 비이커에 넣고 증류수를 첨가한 후 상온에서 1 h 동안 교반하였다. 이를 여과지(No. 2, ADVANTEC, Tokyo, Japan)에 통과시켜 필터에 걸러진 고형물을 제거하고 필터를 통과한 여액(filtrate)을 추출물로 사용하였다.

2.3. 분석방법

2.3.1. 회수율 측정

포도껍질 분말과 증류수 혼합비를 바꾸어가며 추출물의 회수율을 측정하였다. 추출물 5 mL를 알루미늄 접시(지름 50 mm)에 붓고 80 °C 건조기에서 12 h 동안 건조시켜 수분을 제거하였다. 건조물이 포함된 알루미늄 접시 질량에서 빈 알루미늄 접시의 질량을 빼어 건조물의 질량을 계산하였다. Equation (1)에 나타내었듯이 건조 후 잔류 건조물 함량을 투입된 포도껍질 분말의 질량으로 나눈 값의 백분율로 추출 수율을 정의하였다. 모든 분석은 3회 이상 수행되었다.

$$\text{Extraction yield (\%)} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (1)$$

A : 추출물의 건조질량

B : 포도껍질 분말의 건조질량

2.3.2. 총 플라보노이드 함량 측정

Formagio et al. [15]의 방법을 변형하여 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 에탄올(순도 $\geq 95\%$) 1500 μL , 100 g L^{-1} 염화알루미늄(AlCl_3) 100 μL , 1 M 아세트산나트륨($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) 100 μL , 증류수 2.8 mL, 및 추출물 500 μL 를 순서대로 첨가하였다. 이 혼합물을 상온에서 40 min 동안 반응시킨 후, 415 nm 파장에서 반응 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 정량을 위하여 quercetin을 표준물질로 사용하여 표준 검량곡선을 작성하였다. 총 플라보노이드 함량은 추출물 1 g 건조증량에 대한 mg quercetin equivalent (QE)로 환산하여 표시하였다. 모든 분석은 3회 이상 수행되었다.

2.3.3. 총 폴리페놀 함량 측정

Jing et al. [16]의 방법을 따라 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 본 시험법은 추출물에 존재하는 폴리페놀 화합물에 의해 Folin-Ciocalteu reagent가 환원되어 파란색으로 발색되는 원리를 이용한 것이다. 증류수로 10배 희석된 Folin-Ciocalteu reagent 1.0 mL에 추출물 100 μL 를 혼합하여 5 min 간 반응시켰다. 반응 혼합물에 탄산수소나트륨(NaHCO_3 , 75 g L^{-1}) 1.0 mL를 첨가하고 상온의 암실에서 90 min간 반응시킨 후, 725 nm 파장에서 반응 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물의 정량을 위하여 메탄올에 농도별로 용해시킨 gallic acid를 표준물질로 사용하여 표준곡선을 작성하였다. 총 폴리페놀 함량은 추출물 1 g 건조증량에 대한 mg gallic acid equivalent (GAE)로 환산하여 나타내었다. 모든 분석은 3회 이상 수행되었다.

2.3.4. 추출물의 항산화능 측정

추출물의 라디칼 소거활성을 측정함으로써 항산화능을 평가하였다. Kilani et al. [17]과 Choi et al. [18]이 제안한 DPPH법을 변형하여 추출물의 자유라디칼(free radical) 소거활성을 측정하였다. 즉, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 180 μL 에 추출물 20 μL , 그리고 에탄올에 녹인 0.2 mM DPPH 800 μL 을 혼합하여 상온의 암실에서 20 min간 반응시킨 후, UV/Vis 분광광도계(UV/Vis spectrophotometer, Mega-U600, Scinco, Seoul, Korea)를 사용하여 517 nm 파장에서 반응 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 농도별로 제조된 L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였고 모든 분석은 3회 이상 수행되었다. 측정데이터를 Equation (2)에 대입하여 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 계산하였다. 식에서 $OD_{control}$ 은 추출물을 같은 양의 100 mM Tris-HCl buffer로 대체한 반응 혼합물의 흡광도를 나타낸다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= \frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \times 100 \quad (2)$$

다음은 Pellegrini et al. [19]의 방법을 변형하여 추출물의 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 본 시험법은

항산화물질에 의한 ABTS^+ 환원정도를 측정하는 방법이다. 7.4 mM ABTS와 2.45 mM 과황산칼륨($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)으로 구성된 혼합물을 실온의 암실에서 16 h 반응시켜 측정용 시약을 제조하였고, 이를 732 nm 파장에서 흡광도가 0.70 ± 0.02 가 되도록 PBS buffer (pH 7.4)로 희석시켰다. 추출물 시료 0.1 mL와 희석된 측정시약 0.9 mL를 혼합하여 암실에서 1 min간 반응시킨 뒤, 732 nm 파장에서 반응 혼합물의 흡광도를 측정하였다. Equation (3)에 나타난 것처럼 추출물 첨가구의 흡광도(OD_{sample})와 추출물 대신 동일한 양의 100 mM Tris-HCl buffer를 첨가한 무첨가구의 흡광도($OD_{control}$, 음성대조군)를 비교하여 라디칼 소거활성을 백분율(%)로 나타내었다. 농도별로 제조된 L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하여 비교실험을 수행하였고 모든 분석은 3회 이상 수행되었다.

ABTS⁺ radical scavenging activity (%)

$$= \frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \times 100 \quad (3)$$

2.3.5. Collagenase 활성저해율 측정

추출물에 의한 collagenase (콜라겐 분해효소) 활성저해 정도를 측정하기 위하여 Sasagawa et al. [20]가 제시한 방법을 변형하여 사용하였다. 0.35 mM 염화칼슘(CaCl_2)를 포함하는 TES buffer (50 mM, pH 7.4)에 collagenase를 첨가한 효소용액(0.2 mg mL^{-1})을 제조하였다. Collagenase 활성 측정용 기질로 널리 사용되는 4-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg를 Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.4)에 용해시켜 0.6 mg mL^{-1} 의 기질 용액을 제조하였다. 효소용액 400 μL 를 4 mM CaCl_2 를 포함하는 Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.4) 600 μL 와 혼합한 후 혼합액을 37 °C 항온조에 15 min간 방치하였다. 전배양(preincubation)된 효소용액에 기질용액 500 μL 와 추출물 500 μL 를 동시에 넣고 37 °C 항온조에서 20 min 간 반응시켰다. 5% 시트르산 용액 1 mL을 반응액에 첨가하여 효소 반응을 중단시키고 에틸아세테이트 2 mL를 최종 반응 혼합물에 넣어 vortex한 후 10 min간 상온에 방치하였다. 혼합물은 수용액 층과 에틸아세테이트 층으로 분리되었는데 상층액인 에틸아세테이트 층을 취하여 320 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 활성저해율은 Equation (4)에 의해 계산되었다. EGCG를 양성대조군으로 사용하였고 모든 분석은 3회 이상 수행되었다.

Collagenase 활성저해율(%)

$$= 100 - \frac{OD_{Control} - (OD_{Sample} - OD_{Sample'})}{OD_{Control}} \times 100 \quad (4)$$

$OD_{control}$ = 시료를 Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.4) 용액으로 대체한 반응혼합물의 흡광도

OD_{sample} = 반응혼합물의 흡광도

$OD_{sample'}$ = 기질용액을 Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.4) 용액으로 대체한 반응혼합물의 흡광도

2.3.6. Tyrosinase 활성저해율 측정

추출물의 미백 효능을 측정하기 위하여 식품의약품안전처에서 제시한 방법을 사용하였다. 본 방법은 Ishihara et al. [21]이 제안한 것으로 tyrosinase 활성저해율을 측정하여 천연물의 미백 효능을 평가하는 시험법이다. E-tube에 sodium phosphate buffer (100 mM, pH 6.8) 500 μ L, 기질인 L-DOPA (10 mM) 200 μ L, 추출물 100 μ L, 그리고 반응 효소인 tyrosinase 용액 (100~110 U mL⁻¹) 200 μ L를 순차적으로 첨가하였다. 이 혼합물을 37 °C 항온조에서 5 min간 반응시킨 후, UV/Vis 분광광도계를 이용하여 475 nm 파장에서 반응 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 실험데이터를 Equation (5)에 대입하여 tyrosinase 활성저해율을 계산하였다. 농도별로 제작된 kojic acid를 양성대조군으로 사용하였고 모든 분석은 3회 이상 수행되었다.

$$\text{Tyrosinase 활성저해율(\%)} = 100 - \frac{b-b'}{a-a'} \times 100 \quad (5)$$

a = sample을 100 mM sodium phosphate buffer로 대체한 반응혼합물의 흡광도

a' = sample과 효소용액을 100 mM sodium phosphate buffer로 대체한 반응혼합물의 흡광도

b = 반응혼합물의 흡광도

b' = 효소용액을 100 mM sodium phosphate buffer로 대체한 반응혼합물의 흡광도

3. 결과 및 고찰

3.1. 포도껍질 분말과 증류수의 혼합 비율에 따른 추출 수율

천연물로부터 생리활성 물질의 추출에서 추출 온도·시간, 고형물과 추출 용매의 종류와 비율, 및 추출 방법에 따라 추출되는 폴리페놀과 플라보노이드화합물을 포함한 항산화 물질들의 종류와 양이 달라진다[22]. 추출 온도를 높일수록 추출 수율은 증가될 수 있으나, 온도에 민감한 천연 성분들이 파괴될 수 있다. 본 연구에서는 상온에서 건조된 포도껍질 분말을 증류수와 혼합시켜 생리활성을 갖는 유효성분들을 추출하였다.

Table 1은 증류수에 혼합되는 포도껍질 분말의 질량을 변화시키기에 따른 추출물의 수율, 추출물에 함유된 폴리페놀·플라보노이드 함량 변화를 보여준다. 증류수 단위 질량 당 포도껍질 분말의 질량이 증가할수록 추출물의 양은 증가하였으나 추출 수율(extraction yield)은 오히려 감소하였다. 추출물에 포함된 총 플라보노이드 함량도 서서히 감소하였다. 추출물의 총 폴리페놀 함량은 증류수 g 당 포도껍질 분말의 양을 0.02 g에서 0.05 g으로 증가시켰을 때 급격히 감소하였으나, 0.1 g으로 증

가시켰을 때는 더 이상 감소하지 않았다. 추출 수율은 포도껍질 분말과 증류수 비율에 따라 17.8 ~ 31.4%였고 추출물 단위 g 당 총 플라보노이드와 총 폴리페놀 함량은 각각 1.8 ~ 2.5 mg-QE와 16.9 ~ 20.3 mg-GAE였다. Li et al. [12]은 아세톤을 추출용매로 사용하여 포도껍질로부터 항산화 물질을 추출하고 총 페놀 함량을 측정하였다. 그들은 포도품종에 따라 총 페놀함량이 달랐고 그 값은 1.3 ~ 10.5 mg-GAE g-extract⁻¹라고 보고하였다. Wong et al. [22]은 60% 에탄올을 사용하여 약용 식물인 *Phyllanthus niruri*로부터 고형물과 용매의 비율을 변화시키며 항산화 물질의 추출량 및 항산화 효과를 조사하였다. 추출물 중의 총 플라보노이드와 총 페놀 함량은 각각 10 ~ 18 mg-QE g-extract⁻¹와 30 ~ 58 mg-GAE g-extract⁻¹였다. 이는 본 연구팀이 포도껍질로부터 얻은 추출물에 함유된 플라보노이드와 폴리페놀의 함량이 포도껍질 추출물 또는 타 식물체 추출물에 대한 보고치와 비슷함을 보여준다. 본 실험결과는 증류수를 추출용매로 이용하여 상온에서 포도껍질 분말로부터 항산화 물질들을 효과적으로 추출할 수 있음을 시사한다. 포도껍질 분말과 증류수 비율에 따라 항산화 물질들을 포함하는 추출물의 양, 추출물 수율, 추출물에 포함된 항산화 물질들의 함량이 크게 영향을 받는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 추출 시간에 따른 영향을 조사하지 않았다. 그러나 추출 시간도 항산화물질들의 추출 수율에 상당한 영향을 미칠 것으로 사료되는 바, 이에 대한 추가적인 연구도 필요하다.

3.2. 포도껍질 추출물 농도에 따른 항산화 효과

일반적으로 플라보노이드와 폴리페놀 함유량이 높을수록 천연물의 항산화활성이 높다고 알려졌다[23]. 플라보노이드와 폴리페놀 함량이 높은 것으로 보아 포도껍질 추출물의 우수한 항산화활성을 기대할 수 있었다. 이러한 추론을 검증하기 위하여 다음 실험에서 추출물의 농도를 변화시키며 항산화 활성을 측정하였다.

항산화능을 평가하기 위하여 천연물 시료에 의한 DPPH 또는 ABTS의 라디칼 소거 정도를 측정하는 *in vitro* 에세이(assay)법이 널리 사용된다[24]. 두 방법 모두 전자 이동에 기반한 것으로서 항산화제가 산화제를 환원시키는 능력을 측정하는 에세이법이다. DPPH 방법은 소수성(hydrophobic) 혼합물에 적합한 반면 ABTS 방법은 친수성(hydrophilic)과 친유성(lipophilic) 혼합물에 잘 적용된다[25]. 일반적으로 단일 방법보다는 몇 가지 방법으로 테스트한 후 천연물의 항산화 능력을 종합적으로 평가한다[26]. 본 연구에서는 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성을 측정하여 포도껍질 추출물의 항산화 능력을 평가하였다. DPPH는 짙은 보라색을 나타내는 자유라디칼(free radical)로서 항산화

Table 1. The total phenolic and flavonoid content, and extraction yield of grape skin extract.

Solid to solvent ratio	Extract weight (mg)	Yield (%)	Total flavonoid (mg-QE g-extract ⁻¹)	Total phenol (mg-GAE g-extract ⁻¹)
0.02:1	8.0 ± 0.7	31.4 ± 3.6	2.5 ± 0.1	20.3 ± 0.0
0.05:1	22.9 ± 0.0	23.9 ± 1.1	2.2 ± 0.1	16.3 ± 0.0
0.1:1	45.7 ± 0.5	17.8 ± 0.9	1.8 ± 0.1	16.9 ± 0.0

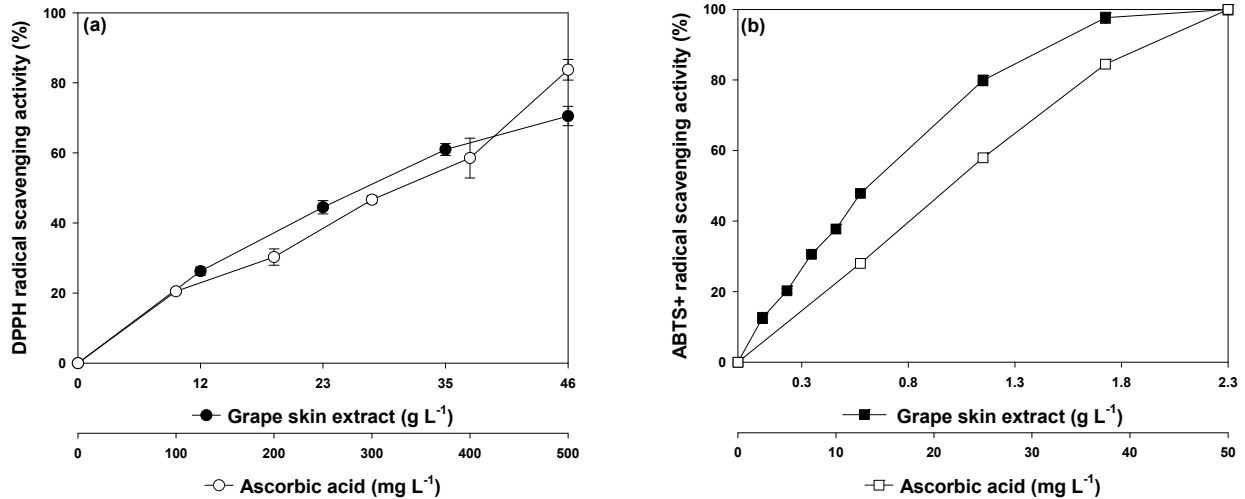


Figure 1. Antioxidant capacity of grape skin extract and ascorbic acid. (a) DPPH and (b) ABTS radical scavenging activity.

활성이 있는 물질과 만나면 수소 라디칼의 전자를 받아들여 환원되면서 고유의 보라색을 잃고 노란색으로 탈색되는 특성이 있다. 탈색정도가 크면 시료의 DPPH 라디칼 소거능이 큰 것을 의미한다. 보라색을 띠는 DPPH 용액은 517 nm에서 높은 흡광도 값을 나타내는데 탈색됨에 따라 흡광도 값은 점차 감소한다[27]. 포도껍질 추출물(46 g-extract L⁻¹)을 증류수로 희석시켜 농도별로 제조된 추출물과 L-ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였고 그 결과를 Figure 1(a)에 나타내었다. 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거 활성은 거의 선형적으로 증가하였는데, 11.5 g L⁻¹와 46 g L⁻¹의 추출물에서 DPPH 라디칼 소거 활성은 각각 26%와 71%였다. L-ascorbic acid 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거 활성도 증가하였는데 500 mg L⁻¹의 L-ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거 활성은 83%였다. 측정결과를 바탕으로 계산된 L-ascorbic acid의 EC₅₀ 값은 328 mg L⁻¹였다. L-ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거에 대한 EC₅₀값이 3 ~ 30 mg L⁻¹으로 보고되었다[15,16,23]. 본 실험에서 얻은 L-ascorbic acid의 EC₅₀값이 기존 보고된 값의 10 배 이상인데, 이는 에세이 방법의 차이에 기인한 것으로 사료된다. 즉, 본 실험에서는 기존 에세이에서 보다 10배 적은양의 시료가 첨가되었다. 한편, 포도껍질 추출물의 EC₅₀값은 30 g L⁻¹였다. 천연물 추출물의 EC₅₀값이 대략 수백 mg L⁻¹[23]인 것을 감안하고 첨가되는 시료량이 적은 것을 고려하더라도, 본 실험에서 얻은 추출물의 EC₅₀값이 기존에 보고된 천연물 시료의 EC₅₀값보다 다소 높았다. 향후 이를 규명하고 향상된 결과를 얻기 위한 추가적인 연구가 필요하다.

추출물에 의한 ABTS 라디칼 소거활성을 측정하였다. ABTS와 과황산칼륨을 혼합하여 암소에 두면 ABTS가 산화되면서 청록색을 띠는 ABTS 양이온 라디칼(ABTS⁺)이 생성된다. 이 양이온 라디칼은 734 nm의 파장에서 최대 흡광도를 나타내는데 추출물에 존재하는 항산화 물질에 의해 환원되면 양이온 특유의 청록색이 탈색된다[28,29]. 이러한 색상 변화를 흡광도 값의 변화로 측정하였다. 여러 농도로 제조된 추출물과 L-ascorbic acid의 ABTS⁺ 라디칼 소거능력을 Figure 1(b)에 나타내었다.

추출물 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거활성도 증가하였다. 즉, ABTS 라디칼 소거활성은 0.12 g L⁻¹의 추출물에서 12.5%였고 2.0 g L⁻¹ 추출물에서는 100%였다. L-ascorbic acid 농도 증가에 따라 ABTS 라디칼 소거활성이 선형적으로 증가하여 50 mg L⁻¹의 L-ascorbic acid는 100% 라디칼 소거 활성을 보였다. 측정결과를 바탕으로 계산된 L-ascorbic acid의 EC₅₀값은 21.7 mg L⁻¹였다. 이는 기존에 보고된 값(18 mg L⁻¹)과 비슷한 수치이다[16]. 포도껍질 추출물의 EC₅₀값은 0.6 g L⁻¹였다. 본 실험 결과는 포도껍질 추출물의 항산화능이 높다는 것을 시사한다.

3.3. 포도껍질 추출물 농도에 따른 collagenase 활성저해

Collagenase는 콜라겐을 가수분해하는 효소이다. 콜라겐은 피부조직을 구성하는 주요 구조 단백질들(structural proteins) 중 하나로, 세포의 구조유지 및 강도 부여 등 세포를 보호하는 역할을 수행한다[30,31]. 피부 내 진피층의 대부분을 차지하는 콜라겐이 분해되면 피부의 탄력이 저하되어 주름과 모공이 생기는 등의 피부노화가 촉진된다[32,33]. 우수한 주름개선 효능을 나타내는 물질은 collagenase의 콜라겐 분해반응을 저해하여 피부노화의 진행을 억제한다. Collagenase는 4-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg를 색깔을 띠는 4-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-OH와 무색의 Gly-Pro-D-Arg-OH로 절단한다. Orange-yellow 색깔의 아실펩타이드(acyl peptide)는 에틸아세테이트에 잘 용해되기 때문에 에틸아세테이트를 사용하여 산성화된 혼합물로부터 4-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-OH를 추출하고 분광광도계로 이를 정량할 수 있다. 포도껍질 추출물의 주름개선능을 평가하기 위하여 collagenase 활성저해율을 측정하였고 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. Collagenase 활성저해율은 추출물의 농도가 11.5 g L⁻¹일 때 16.9%였고 추출물 농도가 증가함에 따라 증가하여 46.0 g L⁻¹ 추출물의 활성저해율은 84.2%였다. EGCG의 농도에 따른 영향을 조사하기 위한 실험에서, 저농도의 EGCG에서 콜라겐 분해효소의 활성이 저해를 받았고 25 mg L⁻¹에서 효소 활성저해율은 71.9%였다. 기존 연

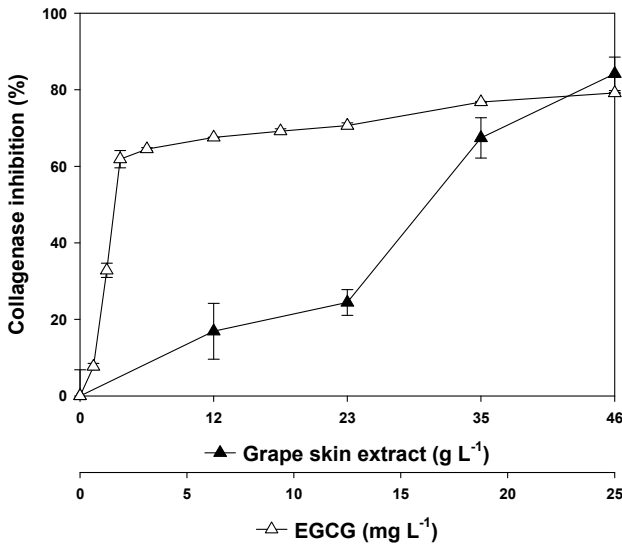


Figure 2. Collagenase inhibition by grape skin extract and epigallocatechin gallate (EGCG).

구자들은 EGCG (114 mg L⁻¹) 첨가 시 콜라겐 분해효소의 활성 저해율이 74.9% 또는 49.5%라고 보고하였다[34,35]. 본 실험 결과로부터 포도껍질 추출물은 주름개선능이 뛰어난 물질로서 주름개선 화장품 원료로 사용 가능성이 높다고 할 수 있다.

3.4. 포도껍질 추출물과 편백나무 추출물로 구성된 혼합물의 tyrosinase 활성저해

표피층에 존재하는 멜라닌(melanin)은 인간의 피부색을 결정 짓는 가장 중요한 역할을 한다. 그러나 야외 활동으로 자외선에 노출 시 과도한 멜라닌 생성으로 인하여 얼굴이 검게 변한다[36]. 뽀얀피부를 원하는 사람들을 대상으로 개발된 미백 화장품은 멜라닌 생합성을 저해하는 성분을 포함한다. 멜라닌 생합성은 타이로신(C₉H₁₁NO₃)의 산화반응에서 시작한다. Tyrosinase는 타이로신을 기질로 사용하여 L-DOPA (C₉H₁₁NO₄)의 생성과 L-DOPA를 L-DOPA quinone (C₉H₉NO₄)으로 전환시키는 두개 반응을 촉매한다. L-DOPA quinone은 여러 단계를 거쳐서 적갈색에서 황색을 나타내는 페오멜라닌(pheomelanin)과 흑갈색에서 갈색을 나타내는 유멜라닌(eumelanin)으로 나뉜다[36,37]. 일반적으로 미백 기능을 갖는 생리활성 물질들은 멜라닌 생합성의 출발 효소인 tyrosinase의 활성을 저해한다고 알려졌다[38]. Tyrosinase 활성을 측정하기 위하여 타이로신 또는 L-DOPA를 기질로 사용할 수 있다. 본 연구에서는 L-DOPA가 L-DOPA quinone으로 전환되는 속도를 측정함으로써 tyrosinase 활성을 결정하였다. 포도껍질 추출물의 농도에 따른 tyrosinase 활성 저해율 측정결과를 Figure 3에 나타내었다. 추출물 농도가 증가함에도 불구하고 활성 저해율은 소폭으로 증가하는데 그쳤다. 즉, 46 g L⁻¹ 추출물의 활성 저해율은 21%였다. 다양한 농도로 제조된 kojic acid 용액의 tyrosinase 활성 저해율을 측정하였다. Kojic acid 농도 증가에 따라 활성 저해율이 증가하였는데, 활성 저해율은 25 mg L⁻¹에서 30.5%였고 100 mg L⁻¹에서 94.9%였다. 이로부터 산출된 kojic acid의 IC₅₀은 53.7 mg L⁻¹로 기

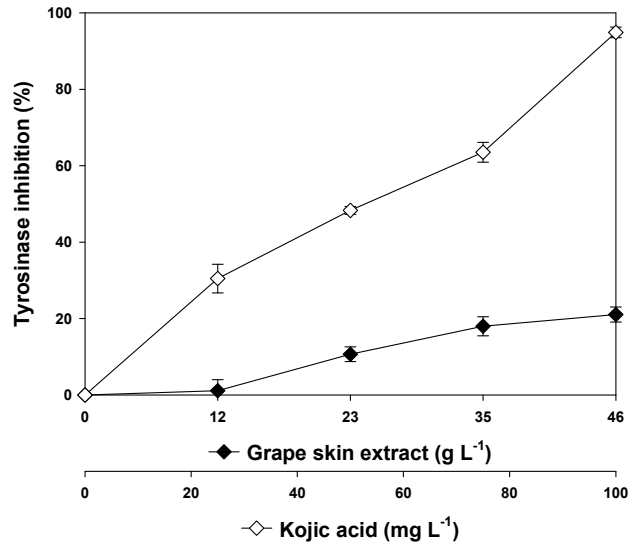


Figure 3. Tyrosinase inhibition by grape skin extract and kojic acid.

존에 보고된 값들보다 다소 낮았다. L-DOPA를 기질로 사용한 tyrosinase 에세이에서 kojic acid의 IC₅₀은 0.03272 mM (524 mg L⁻¹)로 알려진 반면[39], Pillaiyar et al. [37]은 200 mg L⁻¹에서 tyrosinase의 저해도가 97%라고 보고하였다. 기존 연구 데이터와 비교하여 본 실험에서 얻은 포도껍질 추출물의 미백 효능이 현저히 낮다는 것을 확인하였다. Hsu et al. [40]은 포도껍질과 포도씨 추출물의 tyrosinase 활성 저해도를 측정하였다. 이들은 포도씨 추출물이 높은 효소 활성저해율을 나타낸 반면, 포도껍질 추출물의 효소 활성저해율은 낮다고 보고하였는데, 이는 본 실험 데이터와 일치하는 결과이다. 추출물이 기능성 화장품 원료로 사용되기 위해서는 주름개선과 미백 효능이 있어야 한다. 포도껍질 추출물은 우수한 항산화 활성과 주름개선 효능을 나타내었으나 미백 효능이 낮아 기능성 화장품 소재로 사용되기 위해서는 이에 대한 보완이 필요하였다.

편백나무 추출물은 항균·항염증 기능이 있고, 여러 종류의 테르펜(terpene)계 물질로 구성된 피톤치드(phytoncide)를 함유하고 있다[41]. 편백나무 잎 아세톤 추출물 또는 정유, 편백나무 에탄올 추출물의 미백효능이 보고되었다[42,43]. 그러나 편백나무 정유(essential oil)로부터 분리된 편백수의 미백 효능에 대한 연구 결과가 아직까지 보고된 바 없다. 사천편백림에서 시판하는 편백수를 구입하고 이를 증류수로 희석하여 다양한 농도로 제조한 후 tyrosinase 활성저해율을 측정하였고 그 결과를 Figure 4(a)에 나타내었다. 편백수의 농도 증가에 따라 tyrosinase 활성 저해율은 급격히 증가하였다. 즉, 편백수 농도를 2.5%에서 10% (v/v)로 증가시키기에 따라 tyrosinase 활성 저해율은 36.4%에서 69.1%로 급격히 증가하였고 편백수 농도가 20%에서 84.4%를 나타내었다. 이는 편백나무 정유로부터 분리된 편백수가 뛰어난 미백 효능을 갖는 물질임을 시사한다. 본 결과는 편백나무 정유에서 분리한 편백수의 우수한 미백 효능에 대한 최초의 보고이다.

본 실험 결과를 바탕으로 편백수를 포도껍질 추출물과 혼합하여 그 영향을 조사하였다. Figure 4(b)에 나타내었듯이, 편백

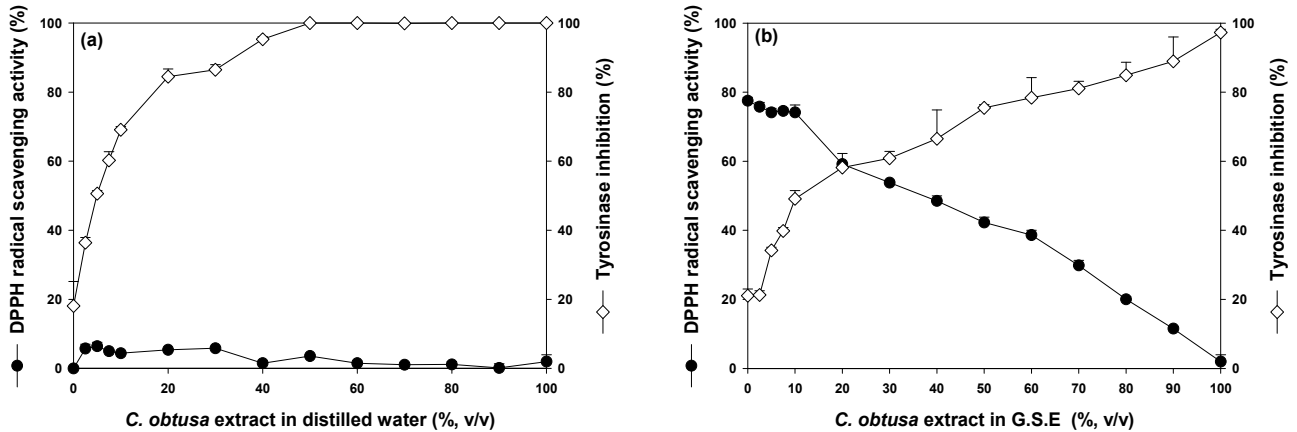


Figure 4. DPPH radical scavenging and tyrosinase inhibitory activity of (a) *Chamaecyparis obtusa* (*C. obtusa*) extract in distilled water and (b) *Chamaecyparis obtusa* extract in grape skin extract (G.S.E).

수와 포도껍질 추출물로 구성된 복합물에서도 편백수의 농도 증가에 따라 tyrosinase 활성 저해율이 증가하였다. 그러나 동일한 편백수 농도에서 편백수와 포도껍질 추출물로 구성된 복합물이 편백수와 증류수로 구성된 혼합물에서 보다 낮은 효소 활성저해율을 나타내었다. 이는 포도껍질 추출물에 존재하는 성분이 편백수의 미백 효능을 나타내는 성분과 상호작용을 하기 때문인 것으로 여겨진다. 이를 규명하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다. 편백수 또는 편백나무 잎 추출물이 항산화 효과가 우수한 것으로 알려졌다[44]. 따라서 편백수의 항산화 효능을 알아보기 위하여 농도별로 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 그러나 본 연구에서 사용한 편백수에서는 항산화 효능이 거의 관찰되지 않았다. 항산화능이 높은 포도껍질 추출물과 혼합하였을 때, 복합물에서 편백수의 상대 함량의 증가는 복합물의 DPPH 라디칼 소거활성을 감소시켰다. 이는 편백수의 첨가로 복합물에 존재하는 항산화 물질의 농도가 희석된다는 것을 의미한다. 본 연구결과는 포도껍질 추출물과 편백수가 적절히 혼합된 복합물을 항산화능과 미백 효능이 우수한 화장품 소재로 사용할 수 있음을 시사한다.

포도껍질에 존재하는 항산화 성분들의 함량은 원산지, 기후 환경에 따라 달라진다. 원료의 성장 변화에 따라 공정의 운전 조건(추출 용매, 추출 온도, 추출 시간)을 최적화하여 포도껍질 추출물을 생산하고, 추출물을 적정 농도로 희석하는 공정을 통해 생산된 추출물 함량이나 물성을 일정하게 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 결론

포도껍질 분말과 증류수의 혼합비율에 따라 추출 수율은 17.8 ~ 31.4%였고 추출물 g당 총 플라보노이드와 총 폴리페놀 함량은 각각 1.8 ~ 2.5 mg-QE와 16.9 ~ 20.3 mg-GAE였다. 포도껍질 추출물은 DPPH와 ABTS의 라디칼을 효과적으로 제거하는 항산화능이 우수하였고 collagenase 활성을 저해함으로써 주름개선 능력이 뛰어난 물질로 확인되었다. 포도껍질 추출물에 의한 tyrosinase 활성저해는 낮았으나 편백수를 첨가함에 따

라 tyrosinase 활성 저해율이 증가하였다. 본 연구팀은 폐기되는 포도껍질이 고부가가치 기능성 화장품 개발을 위한 유용자원으로 사용가능하다고 예상된다.

감사

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2020R1F1A1054433).

References

1. Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., and Lim, S. M., "Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and The Potential Health Benefits," *Food Nutr. Res.*, **61**, 1361779 (2017).
2. Saito, M., Hosoyama, H., Ariga, T., Kataoka, S., and Yamaji, N., "Antiulcer Activity of Grape Seed Extract and Procyanidins," *J. Agric. Food Chem.*, **46**(4), 1460-1464 (1998).
3. Hudson, T. S., Hartle, D. K., Hursting, S. D., Nunez, N. P., Wang, T. T., Young, H. A., Arany, P., and Green, J. E., "Inhibition of Prostate Cancer Growth by Muscadine Grape Skin Extract and Resveratrol Through Distinct Mechanisms," *Cancer Res.*, **67**(17), 8396-8405 (2007).
4. Udenigwe, C. C., Ramprasath, V. R., Aluko, R. E., and Jones, P. J., "Potential of Resveratrol in Anticancer and Anti-inflammatory Therapy," *Nutr. Rev.*, **66**(8), 445-454 (2008).
5. Yun, J. W., Lee, W. S., Kim, M. J., Lu, J. N., Kang, M. H., Kim, H. G., Kim, D. C., Choi, E. J., Choi, J. Y., Kim, H. G., Lee, Y. K., Ryu, C. H., Kim, G., Choi, Y. H., Park, O. J., and Shin, S. C., "Characterization of A Profile of The Anthocyanins Isolated from *Vitis coignetiae Pulliat* and Their Anti-invasive Activity on HT-29 Human Colon Cancer Cells," *Food Chem. Toxicol.*, **48**(3), 903-909 (2010).
6. Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., and Sakariah, K. K., "Antioxidant Activity of Grape Seed (*Vitis vinifera*) Extracts

- on Peroxidation Models *in Vitro*,” *Food Chem.*, **73**(3), 285-290 (2001).
7. Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Rizelio, V. M., Gonçalves, A. E. D. S. S., Genovese, M. I., and Fett, R., “Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Seed and Skin Extracts of Red Grape (*Vitis Vinifera* and *Vitis labrusca*) Pomace from Brazilian Winemaking,” *Food Res. Int.*, **44**(4), 897-901 (2011).
 8. Li, X., Li, J., Dong, S., Li, Y., Wei, L., Zhao, C., Li, J., Liu, X., and Wang, Y., “Effects of Germination on Tocopherol, Secoisolaricresinol Diglucoside, Cyanogenic Glycosides and Antioxidant Activities in Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.),” *Int. J. Food Sci. Technol.*, **54**(7), 2346-2354 (2019).
 9. Pientaweeratch, S., Panapisal, V., and Tansirikongkol, A., “Antioxidant, Anti-collagenase and Anti-elastase Activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and Silymarin: An *In Vitro* Comparative Study for Anti-aging Applications,” *Pharm. Biol.*, **54**(9), 1865-1872 (2016).
 10. Ghimeray, A. K., Jung, U. S., Lee, H. Y., Kim, Y. H., Ryu, E. K., and Chang, M. S., “*In Vitro* Antioxidant, Collagenase Inhibition, and *in Vivo* Anti-wrinkle Effects of Combined Formulation Containing *Punica Granatum*, *Ginkgo Biloba*, *Ficus Carica*, and *Morus Alba* Fruits Extract,” *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, **8**, 389-396 (2015).
 11. Wittenauer, J., Mäckle, S., Sußmann, D., Weisz, U. S., and Carle, R., “Inhibitory Effects of Polyphenols from Grape Pomace Extract on Collagenase and Elastase Activity,” *Fitoterapia*, **101**, 179-187 (2015).
 12. Li, F., Li, F., Yang, Y., Yin, R., and Ming, J., “Comparison of Phenolic Profiles and Antioxidant Activities in Skins and Pulps of Eleven Grape Cultivars (*Vitis Vinifera* L.),” *J. Integr. Agric.*, **18**(5), 1148-1158 (2019).
 13. Oh, D. G., and Kim, C. J., “Analysis of Consumer Type According to Eco-friendly Consciousness and The Development of Eco-friendly Cosmetics Package Design,” *J. Korean Soc. Costume.*, **71**(1), 86-102 (2021).
 14. Park, S. H., “Extracting Apparatus and An Extracting Method using that A *Chamaecyparis Obtusa* Oil,” KR Patent No. 102,105,797 (2020).
 15. Formagio, A. S. N., Volobuff, C. R. F., Santiago, M., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. D. C., and Pereira, Z. V., “Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in *Psychotria* Leaf Extracts,” *Antioxidants.*, **3**(4), 745-757 (2014).
 16. Jing, L., Ma, H., Fan, P., Gao, R., and Jia, Z., “Antioxidant Potential, Total Phenolic and Total Flavonoid Contents of *Rhododendron Anthopogonoides* and Its Protective Effect on Hypoxia-induced Injury in PC12 Cells,” *BMC Complement. Altern. Med.*, **15**, 287-298 (2015).
 17. Kilani, S., Ammar, R. B., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L., “Investigation of Extracts from (Tunisian) *Cyperus Rotundus* as Antimutagens and Radical Scavengers,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **20**(3), 478-484 (2005).
 18. Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H., and Kim, S. K., “Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging Capacity Between Korean Medicinal Plants and Flavonoids by Assay-guided Comparison,” *Plant Sci.*, **163**(6), 1161-1168 (2002).
 19. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C., “Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay,” *Free Radic. Biol. Med.*, **26**(9-10), 1231-1237 (1999).
 20. Sasagawa, Y., Kamio, Y., Matsubara, Y., Matsubara, Y., Suzuki, K., Kojima, H., and Izaki, K., “Purification and Properties of Collagenase from *Cytophaga sp.* L43-1 Strain,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**(11), 1894-1898 (1993).
 21. Ishihara, Y., Oka, M., Tsunakawa, M., Tomita, K., Hatori, M., Yamamoto, H., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M., and Oki, T., “Melanostatin, A New Melanin Synthesis Inhibitor: Production, Isolation, Chemical Properties, Structure and Biological Activity,” *J. Antibiot.*, **44**(1), 25-32 (1991).
 22. Wong, B. Y., Tan, C. P., and Ho, C. W., “Effect of Solid-to-solvent Ratio on Phenolic Content and Antioxidant Capacities of “*Dukung Anak*” (*Phyllanthus niruri*),” *Int. Food Res. J.*, **20**(1), 325-330 (2013).
 23. Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., and Koirala, N., “Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal,” *Plants.*, **8**(4), 96-107 (2019).
 24. Granados-Guzmán, G., Salazar-Aranda, R., Garza-Tapia, M., Castro-Ríos, R., and Waksman de Torres, N., “Optimization and Validation of Two High-throughput Methods Indicating Antiradical Activity,” *Curr. Anal. Chem.*, **13**(6), 499-507 (2017).
 25. Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., and Mérillon, J. M., “Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays,” *J. Agric. Food Chem.*, **57**(5), 1768-1774 (2009).
 26. Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., and Chun, O. K., “Comparison of ABTS/DPPH Assays to Measure Antioxidant Capacity in Popular Antioxidant-rich US Foods,” *J. Food Compos. Anal.*, **24**(7), 1043-1048 (2011).
 27. Chung, H. J., “Comparative Study of Antioxidant Activity of Imported Tropical and Subtropical Fruits,” *Korean J. Food Preserv.*, **22**(4), 577-584 (2015).
 28. Lee, H. H., and Moon, Y. S., “Assessment of The Important Factors Influencing Consistent and Accurate ABTS Assay,” *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.*, **48**(3), 390-393 (2019).
 29. Dong, J. W., Cai, L., Xing, Y., Yu, J., and Ding, Z. T., “Re-evaluation of ABTS^{•+} Assay for Total Antioxidant

- Capacity of Natural Products,” *Nat. Prod. Commun.*, **10**(12), 2169-2172 (2015).
30. Subhan, F., Ikram, M., Shehzad, A., and Ghafoor, A., “Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical Applications,” *J. Food Sci. Technol.*, **52**(8), 4703-4707 (2015).
 31. Silva, T. H., Moreira-Silva, J., Marques, A. L. P., Domingues, A., Bayon, Y., and Reis, R. L., “Marine Origin Collagens and Its Potential Applications,” *Mar. Drugs.*, **12**(12), 5881-5901 (2014).
 32. Varani, J., Warner, R. L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S. H., Kang, S., Chung, J. H., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Fisher, G. J., and Voorhees, J. J., “Vitamin A Antagonizes Decreased Cell Growth and Elevated Collagen-degrading Matrix Metalloproteinases and Stimulates Collagen Accumulation in Naturally Aged Human Skin,” *J. Invest. Dermatol.*, **114**(3), 480-486 (2000).
 33. Shin, J. W., Kwon, S. H., Choi, J. Y., Na, J. I., Huh, C. H., Choi, H. R., and Park, K. C., “Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches,” *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(9), 2126-2141 (2019).
 34. Acikara, Ö. B., Ilhan, M., Kurtul, E., Šmejkal, K., and Akkol, E. K., “Inhibitory Activity of *Podospermum Canum* and its Active Components on Collagenase, Elastase and Hyaluronidase Enzymes,” *Bioorg. Chem.*, **93**, 103330 (2019).
 35. Shirzad, M., Hamed, J., Motevaseli, E., and Modarressi, M. H., “Anti-elastase and Anti-Collagenase Potential of Lactobacilli Exopolysaccharides on Human Fibroblast,” *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, **46**(1), 1051-1061 (2018).
 36. Masum, M. N., Yamauchi, K., and Mitsunaga, T., “Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources as Skin-lightening Agents,” *Rev. Agric. Sci.*, **7**, 41-58 (2019).
 37. Pillaiyar, T., Manickam, M., and Namasivayam, V., “Skin Whitening Agents: Medicinal Chemistry Perspective of Tyrosinase Inhibitors,” *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **32**(1), 403-425 (2017).
 38. Del Marmol, V., Ito, S., Jackson, I., Vachtenheim, J., Berr, P., Ghanem, G., Morandini, R., Wakamatsu, K., and Huez, G., “TRP-1 Expression Correlates with Eumelanogenesis in Human Pigment Cells in Culture,” *FEBS Lett.*, **327**(3), 307-310 (1993).
 39. Zhang, C., Lu, Y., Tao, L., Tao, X., Su, X., and Wei, D., “Tyrosinase Inhibitory Effects and Inhibition Mechanisms of Nobiletin and Hesperidin from Citrus Peel Crude Extracts,” *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **22**(1), 83-90 (2007).
 40. Hsu, C. K., Chou, S. T., Huang, P. J., Mong, P. J., Wang, C. K., Hsueh, Y. P., and Jhan, J. K., “Crude Ethanol Extracts from Grape Seeds and Peels Exhibit Anti-tyrosinase Activity,” *J. Cosmet. Sci.*, **63**(4), 225-232 (2012).
 41. Ekundayo, O., “Monoterpene Composition of The Needle Oils of *Pinus* Species,” *J. Chromatogr. Sci.*, **16**(7), 294-295 (1978).
 42. Kim, S. H., Lee, S. Y., Hong, C. Y., Gwak, K. S., Yeo, H. M., Lee, J. J., and Choi, I. G., “Whitening and Antioxidant Activities of Essential Oils from *Cryptomeria Japonica* and *Chamaecyparis Obtusa*,” *J. Korean Wood Sci. Technol.*, **39**(4), 291-302 (2011).
 43. Joung, Y. W., Kim, Y. M., and Jang, Y. A., “Studies on The Antioxidant and Whitening Effects of *Chamaecyparis Obtusa* Extract,” *J. Korean Appl. Sci. Technol.*, **37**(6), 1496-1506 (2020).
 44. Kim, J. H., Lee, S. O., Do, K. B., Ji, W. D., Kim, S. G., Back, Y. D., and Kim, K. J., “Analysis of The Component and Immunological Efficacy of *Chamaecyparis Obtusa* Leaf Extract,” *Korean J. Clin. Lab. Sci.*, **50**(1), 37-43 (2018).