

구기자 추출물의 항노화 활성 평가

이용화^{2*} · 김나연¹ · 조일영¹ · 이용섭^{2†}

¹호서대학교 화장품과학과, 대학원생

²호서대학교 화장품생명공학부, 기초과학연구소, 교수

(2022년 2월 8일 접수: 2022년 2월 23일 수정: 2022년 2월 24일 채택)

Evaluation of Antiaging Activity on *Lycium chinense* Miller. Extracts

Yong-Hwa Lee^{2*} · Na-Yeon Kim¹ · Il-young Jo¹ · Yong-Sub Yi^{2†}

¹Department of Cosmetic science, Hoseo University

²Department of Cosmetic biotechnology, Institute of Basic Sciences, Hoseo University

(Received February 8, 2022; Revised February 23, 2022; Accepted February 24, 2022)

요약 : 본 연구는 구기자의 화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다. 에탄올을 용매로 하여 얻어진 추출물 중 총 폴리페놀 함량은 17.3 mg/mL이었으며, 추출물의 세포 독성을 확인하기 위해 MTT assay결과 1000 μ g/mL 이하의 농도에서 세포 성장에 영향을 미치지 않았다. 항산화 효능 실험으로 DPPH radical 소거 시험을 실시한 결과 1000 μ g/mL의 농도에서 84.97%의 소거능을 나타내었고, SOD 유사 활성 실험 결과 1000 μ g/mL에서 80.54%의 결과로 우수한 항산화 효능을 보였다. Elastase 저해 활성을 측정된 결과 1000 μ g/mL에서 50.93%의 저해율을 나타내어 구기자 추출물이 elastase 저해에 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구로부터 구기자 70% ethanol 추출물은 항산화와 주름 개선 효능을 확인함으로써 기능성 화장품 소재로의 활용 가능성을 확인하였다.

주제어 : 항산화, 주름개선, 기능성화장품, 천연소재, 구기자

Abstract : The purpose of this study was to investigate the functionality of *Lycium chinense* Miller. as a functional cosmetic material. The total polyphenol content in the extract was 17.3 mg/mL, and as a result of confirming cytotoxicity through MTT assay before the enzyme experiment, it was confirmed that it did not affect cell growth at all concentrations below 1000 μ g/mL. As a result of conducting DPPH radical scavenging tests as an antioxidant efficacy test, it showed 84.97% scavenging ability at a concentration of 1000 μ g/mL, and showed very excellent antioxidant efficacy in SOD-like activity test with a result of 80.54% at 1000 μ g/mL. The measured elastase inhibitory activity, the inhibition rate of 50.93% was observed at 1000 μ g/mL, indicating that the extract of *Lycium chinense* Miller. was effective in inhibiting elastase. All these findings suggested that 70% ethanol

[†]Corresponding author
(E-mail: yongsub@hoseo.edu)

extract of *Lycium chinense Miller*. was confirmed as a functional cosmetic material by confirming its antioxidant and anti-wrinkle efficacy.

Keywords : Anti-oxidation, anti-wrinkle, functional cosmetics, natural materials, *Lycium chinense Miller*

1. 서론

최근 생활 수준의 향상, 평균 수명 증가 및 여성의 사회 진출이 증가함에 따라 내외적 아름다움에 대한 관심이 커지고 있다. 이에 따라 아름다운 노후를 위한 미백, 주름개선, 항산화 효과 등을 갖는 기능성 화장품의 수요가 증가하였으며, 천연 유기농 제품을 선호하는 소비자요구에 의해 고기능성을 가진 안전한 천연소재를 이용한 화장품의 수요가 증가하고 있다. 기능성 화장품에 대한 소비자들의 요구가 가시적이고 지속적인 효과를 기대하지만, 화학적 원료의 부작용들이 보고되고 있기때문에 천연소재를 이용한 화장품의 수요가 증가하고 있다. 이러한 사회적 경향에 따라 효과를 보유한 물질을 식물 유래 천연소재에서 찾으려는 연구가 지속적으로 이루어지고 있다[1,2].

인체의 기관에서 가장 큰 면적을 차지하고 있는 피부의 가장 큰 기능은 피부 장벽으로서의 역할 [2]이지만, 각종 오염 물질, 스트레스, 자외선 등 외부 환경 등에 의해 가장 먼저 노출되는 기관이다. 피부노화의 원인으로는 자외선(ultraviolet radiation, UV)과 비정상적으로 생성량이 증가되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 피부 노화가 있다.

활성산소에 의하여 발생한 노화는 생체 내 활성산소의 생성을 억제 또는 제거할 수 있는 항산화제의 개발을 통해 예방할 수 있다. 일반적으로 phenol성 화합물, flavone 유도체, glutathione, ascorbic acid 등의 천연 항산화제와 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), propylgallate (PG) 등의 합성 항산화제가 널리 알려져 있다. 합성 항산화제에 대한 안정성 및 안전성 문제에 따라 천연식물을 이용한 항산화제 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[4].

콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin) 등이 피부의 단백질을 구성하고 있으며[5], 이 중 엘라스틴은 피부 결합 조직 내에서 탄성력이 높아 피부의

탄력을 유지하는 단백질이다. 자외선은 특히 엘라스틴 섬유조직의 축적 저해, 콜라겐 붕괴 등을 유발하여 피부 탄력저하와 주름 생성의 원인이 된다. 또한 피부에서 콜라겐과 엘라스틴 분해효소인 collagenase와 elastase는 각각의 단백질의 분해를 촉진하고 합성을 저해하여 피부의 탄력을 감소시키고 주름 생성을 촉진시킨다. 따라서 피부 주름 개선에 있어 collagenase와 elastase의 작용 억제제는 중요하다고 할 수 있다[6].

구기자나무(*Lycium chinensis Miller*)의 열매인 구기자(*Lycii fructus*)의 주요 성분으로는 betaine, kukoamine, ρ -coumaric acid, rutin, cerebroside, carotenoid, β -sitosterol, vitamin B₁, vitamin B₂, zeaxanthin, choline 등 다양한 기능성 성분 및 다당류와 플라보노이드를 함유하고 있어 항산화 효과, 항균효과 등의 효능을 나타낸다[7]. 또한 구기자 함유 기능성 다류 및 양갱에 관한 연구[8,9], 구기자 추출액을 첨가한 요구르트의 생리활성에 관한 연구[10] 등을 통해 기능성 식품으로의 기능성과 항산화에 대한 연구가 진행되었지만, 화장품 소재로서의 활용이 부족하여 개발이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 국내 청양 구기자를 이용하여 추출물을 획득하고 생리활성을 확인하기 위해 세포독성, 항산화, elastase 저해 활성 실험을 통해 추출물의 항노화 화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

시료의 추출 및 활성 실험을 위해 freeze dryer (Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Germany), rotary evaporator (JEIO TECH, Co., Ltd.), microplate reader (TECAN, Switzerland), pH meter (Xylem Analytics Inc.)를 사용하였으며, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-

azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)는 Hoffmann-La Roche, Ltd. (Mannheim, Germany)에서, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), ascorbic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. 세포 독성 실험을 진행하기 위해 B16F10 cell을 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양받았고, dulbecco's modified eagle medium (DMEM), penicillin-streptomycin, phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone Laboratories, Inc에서 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)시약 및 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)와 Daejung (Korea)에서 구매하여 실험에 사용하였다.

2.2. 시료 추출

본 실험에 사용된 구기자(*Lycii fructus*)는 약재 시장에서 건조된 국내산 구기자 열매를 구매하여 완전히 분쇄 후 추출하였다. 시료의 추출은 중량 대비 10배의 70% 에탄올을 사용하여 24시간 동안 추출한 후 상등액을 Whatman No.1 여과지로 여과하였으며, 여과액은 감압농축기를 이용하여 용매를 제거한 후 -80°C로 동결시킨 다음 동결건조기에서 건조하여 -4°C에 보관하며 실험에 이용하였다.

2.3. 실험 방법

2.3.1. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 화합물 함량은 Singleton과 Rossi의 Folin-Denis 방법에 따라 측정하였다. 추출물을 25 mg/mL의 농도로 제조한 후, 이 시료 용액 200 μ L에 증류수 400 μ L를 첨가하고, Folin & Ciocalteu's phenol reagent 50 μ L를 혼합 후 37°C에서 방치하였다. 반응이 완료된 용액에 Na₂CO₃ 용액 100 μ L를 넣어 실온에서 1시간 반응시킨 후 752 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannin acid로 하여 농도별 결과로 작성된 검량선을 이용하여 정량하였다.

2.3.2. 세포주 및 세포배양

Mouse melanoma cell line인 B16F10 cell은 1% penicillin-streptomycin과 5% fetal bovine

serum (FBS)을 첨가한 dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 세포는 바닥 면적의 75% 까지 자란 상태에서 계대 배양 하였다.

2.3.3. 세포독성(MTT assay)

96 well plate에 B16F10 cell을 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 농도별로 제조한 시료를 처리한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료되면 배지를 제거한 후 5 mg/mL 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 용액과 배지를 일정 비율로 혼합한 시약을 200 μ L씩 분주하여 CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 자주색의 MTT formazan 결정은 570 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

2.3.4. 전자공여능 측정

전자공여능(electron donating ability)은 Blois의 DPPH assay 방법[11]을 변형하여 측정하였다.

농도별 시료 용액 10 μ L에 0.25 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 90 μ L와 methanol을 첨가 후 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율로 나타내었다.

전자공여능(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.3.5. Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정

Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성은 Marklund 등의 방법[12]에 따라 진행하였으며, 농도별 시료 용액 20 μ L와 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3) 130 μ L, 7.2 mM pyrogallol 30 μ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 1N HCl을 이용하여 반응을 정지시켰다.

반응이 완료된 시험 용액은 420nm에서 흡광도

를 측정하여 산화된 pyrogallol의 양을 측정하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가구의 흡광도와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

SOD 유사활성도(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.3.6. Elastase 저해 활성 측정

Elastase 저해 활성은 Cannell 등[13]의 방법에 따라 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide를 기질로, porcine pancreas elastasem를 효소원으로 하여 효소 저해 활성을 측정하였다. 농도별 시료 용액 20 μL씩 취하고 기질 1.6 mM N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 100 μL와 0.4 U/mL porcine pancreas elastasem 20 μL, 10 mM tris-HCl buffer (pH 8.6) 60 μL를 차례로 첨가하여 5분간 실온에서 반응시켰다. 혼합 용액의 반응에 따라 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 410 nm에서 측정하였다. Elastase 저해 활성은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Elastase inhibition(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법에 따라 phosphomolybdate와 phosphotungstate의 혼합물인 Folin & Ciocalteu's phenol reagent와 polyphenol antioxidant이 phosphotugstomolybic acid를 생성하고 생성된 산이 알칼리에서 tannic-like compound에 의해 환원되어 푸른색을 발색하는 원리를 이용한 실험법을 이용하여 측정하였다. 표준물질 Tannin acid를 기반으로 작성된 검량선을 이용하여 구기자 추출물 25 mg/mL에 대한 총 폴리페놀 함량을 정량하였다. 그 결과 구기자 추출물의 총 폴리페놀 함량은 17.3 mg/mL로 나타났다.

3.2. 세포독성(MTT assay)

추출물이 세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 진행하여 측정하였다. Tetrazolium-based colorimetric 시험법은 대사 과정이 온전한 세포의 미토콘드리아 내의 탈수소효소가 노란색 수용성 tetrazoliumsalt[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT)를 비수용성의 짙은 자주색 MTT formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용한 실험법이다.[14]

구기자 추출물 10, 50, 125, 500, 1000 μg/mL 농도 범위에서 B16F10 cell에 대한 독성을 확인한 결과, 모든 범위에서 세포 성장에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. (Fig. 1)

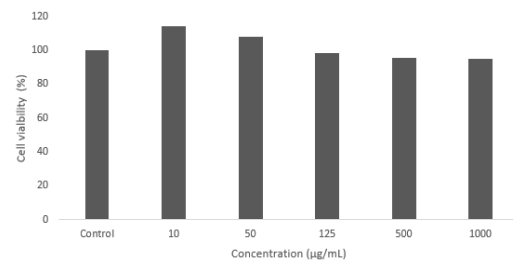


Fig. 1. Cytotoxic effect of *Lycii fructus* extract on melanoma cell (B16F10). All of cells were incubated for 24h in DMEM containing 5% FBS at 37°C, were treated with *Lycii fructus* extract. Results are the mean ± S.D. from three independent experiments. Control : in cells untreated with extract.

3.3. 전자공여능 측정

전자공여능 측정에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 용액은 짙은 보라색을 나타내며, 517 nm에서 강한 흡수를 보이거나 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 매우 빠르게 hydrogen radical의 전자를 받아들이면서 환원되어 안정한 화합물인 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine으로 비가역적으로 전환되며 탈색된다[15,16]. 시료가 free radical에 전자를 공여하는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 인체 내의 활성산소를 비롯한 다른 radical에 대한 소거활성을 기대할 수 있고 이는 노화를 억제하는 척도로 이용될 수 있다[16]. 구기자 추출물 10, 50, 125, 500, 1000 μg/mL의 농도에서 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 것을 확

인할 수 있었으며, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 84.97%의 radical 소거 활성을 나타내었다(Fig. 2).

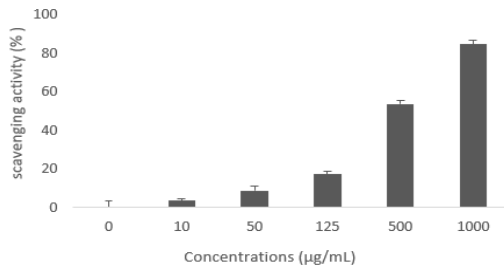


Fig. 2. Effect of *Lycii fructus*, extract on the DPPH radical scavenging activity.

3.4. Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성

항산화 효소 중 하나인 SOD는 자유 라디칼을 근본적으로 제거하는 효소로서 다른 종류의 항산화제보다 우수한 효과를 나타내며, SOD의 항산화 작용으로 생성된 성분들은 인체에 무해한 물 분자와 산소분자로 전환되어 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다[17]. SOD 유사 활성은 pyrogallol을 이용하여 superoxide와 반응한 pyrogallol의 자동산화 반응 정도를 측정하는 것이다[11]. 구기자 추출물의 SOD 유사 활성을 측정할 결과, 구기자 추출물의 농도가 증가함에 따라 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 80.54%의 저해활성을 나타내었다(Fig. 3).

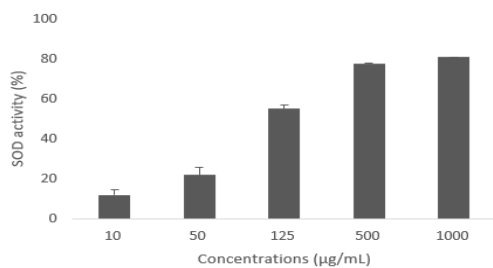


Fig. 3. Effect of *Lycii fructus*, extract on xanthine inhibition.

3.5. Elastase 저해 활성 측정

피부 세포외기질 (Extracellular matrix, ECM)을 구성하는 기질 단백질인 elastin은 collagen과 함께 그물망 구조로 결합된 상태로 존재하며, 피부 탄력성에 관여하는 성분이다. Elastase는 진피 내의 그물망 구조 결합을 끊어지게 함으로써 주름을 유발하는 효소로서 UV 노출로 발생하는 노화 과정과

주름 형성 작용에 관여한다. 따라서 추출물의 elastase 저해능은 피부 주름을 개선하는 작용이 있는 것으로 평가할 수 있다[18,19]. 구기자 추출물 10, 50, 125, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서의 elastase 저해활성을 측정할 결과, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 50.93%의 활성 저해 효과를 나타내었다(Fig. 4). 본 연구의 결과 구기자 추출물에 의하여 elastase의 저해 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었으며, 피부 주름 개선을 위한 기능성 천연 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

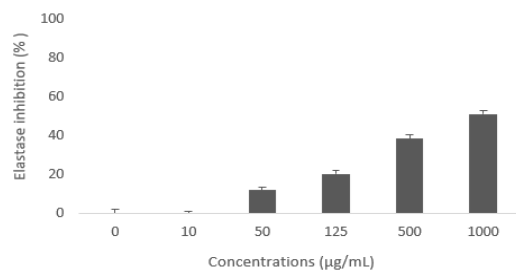


Fig. 4. Effect of anti-aging of elastase inhibition activity of *Lycii fructus*, extract.

4. 결론

본 연구는 국내산 구기자의 열매 70% ethanol 추출물의 항산화 및 주름개선 효과를 확인하여 항노화 화장품 천연소재로서의 이용 가능성을 확인하였다. DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거능과 SOD 유사 활성, elastase 저해 활성을 측정하였으며, 실험 전 추출물의 세포 안정성을 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 B16F10 cell에 대한 세포독성을 측정하였다. 실험결과 1000 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 세포 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 이후 실험은 독성이 없는 1000 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도 구간을 설정하여 실험을 진행하였다. DPPH 라디칼 소거능과 SOD 유사 활성을 측정할 결과 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 85%, 80%의 활성이 나타났다. Elastase 저해 활성 측정 결과 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 51%의 저해율이 나타났다.

이상의 결과를 볼 때, 70% ethanol로 추출한 구기자 추출물이 항산화 및 elastase 저해 활성을 가지는 천연소재임을 확인할 수 있었으며, 이 같은 결과를 토대로 구기자 추출물이 항노화 기능성 화장품 원료로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

References

1. B. H. Park, H. H. Yang, and H. S. Cho. "Quality Characteristics and Antioxidative Effect of *Yukwa* Prepared with *Lycii fructus* Powder". *Korean Journal Soc Food Sci Nutr*. Vol.41, No.6, pp. 745-751 (2012).
2. B. A. Kim. "A Study on the Possibility of Produced by Supercritical Fluid Extraction from *Lycii Fructus* Seed for Cosmetic Ingredients". *Journal of Oil & Applied Science*. Vol.34, No.3, pp. 623-630 (2017).
3. I. M. Chung, K. H. Kim, J. K. Ahn. "Screening of Korean Medicinal and Food Plants with Antioxidant Activity". *Korean Journal Medicinal Crop Sci*. Vol.6, No.4, pp. 311-322 (1998).
4. S. W. Shin, J. H. Lee, and B. K. Soo. "Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Xanthium sibiricum*". *Korean Journal Plant Res*. Vol.25, No.4, pp. 372-378 (2012).
5. J. N. Um, J. W. Min, K. S. Joo, and H. C. Kang. "Antioxidant, Anti-wrinkle and Whitening Effect of Fermented Extracts of Hwangryunhaedoktang". *Korea Journal Soc. Cosmet Sci*. Vol.43, No.1, pp. 69-78 (2017).
6. J. H. Lee, J. I. Kim, H. J. Choi, and J. H. Lee. "Anti-Wrinkle Effect of *Schizandra chinensis* Baillon Fermented with *Lactobacillus plantarum*". *Korea Journal Soc. Cosmet. Sci*. Vol.40, No.4, pp. 365-371 (2014).
7. B. H. Park, H. H. Yang, and H. S. Cho. "Quality Characteristics and Antioxidative Effect of *Yukwa* Prepared with *Lycii fructus* Powder". *Korean Journal Soc Food Sci Nutr*. Vol.41, No.6, pp. 745-751 (2012).
8. Y. S. Lee, E. J. Seo, S. Y. Jeon, A. and J. Kim, J. O. Rho. "Quality Characteristics and Antioxidative Effects of *Dasik* added with *Lycii Fructus* Extract". *Korean Journal Human Ecology*. Vol.23, No.6, pp. 1217-1229 (2014).
9. E. J. Seo, A. J. Kim, and J. O. Rho. "Antioxidant Effects and Storage Stability of *Yanggaeng* Supplemented with *Lycii Fructus* Extract". *Korean Journal Human Ecology*. Vol.25, No.3, pp. 375 (2016).
10. H. C. Bae, I. S. Cho, and M. S. Nam. "Effects of the Biological Function of Yogurt Added with *Lycium chinense* Miller Extract". *Korea. Journal Anim. Sci. & Technol*. Vol.47, No.6, pp. 1051-1058 (2005).
11. M. S. Bolis. "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical". *Nature*. Vol.181, pp. 1199-1200 (1958).
12. S. F. Marklund, and G. Marklund. "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase". *Eur J Biochem*. vol.47, pp. 469-474 (1974).
13. R. J. Cannell, S. J. Kellanm, A. M. Owsiansk, and J. M. Malker. "Reasult of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors". *Planta Med*. pp. 10-14 (1988).
14. Y. M. Lim, D. Y. Kwom, H. m. Kim, J. T. Kwon, P. J. Kim, K. G. Choi, "Biomarker study for toxicity evaluation", *National Institute of Environmental Research*. pp8. 2015
15. M. J. Kim, and E. J. Park. "Feature Analysis of Different In Vitro Antioxidant Capacity Assays and Their Application to Fruit and Vegetable Samples". *Journal Korean. Soc. Food. Sci. Nutr*. Vol.40, No.7, pp. 1053-1062 (2011).
16. J. S. Kim, Y. J. Lee, J. F. Yang, Y. J. Sa, M. O. Kim, J. H. Park, D. S. Park, C. Y. Yu, and M. J. Kim. "Biological Activity of *Sorghum bicolor* M. cv. Bulgeunjangmoksusu Extracts". *Korean Journal Plant Res*. Vol.26, No.1, pp. 111-118 (2013).

17. H. Y. Kim, S. I. Yeo, and J. T. Lee, "Antioxidant Effects of Solvent Fraction from *Sanguisorbae officinalis* L. with Acetone", *Journal Appl. Biol. Chem*, Vol.54, No.2, pp. 89-93, (2011).
18. J. G. Hwang, J. K. Yun, S. K. Kim, S. H. Lee, and K. H. Han, "Mass Production of Chaff-winegar and Its Effect of Anti-Aging and Whitening", *Korean. Journal Microbiol. Biotechnol*, Vol.40, No.3, pp. 208-214, (2012).
19. I. C. lee, B. K. Park, J. M. Kim, J. Y. Moon, and D. Y. Kim, "In vitro Evaluation of Biological Activities of Jeju Island Plants Mixture", *Journal Invest Cosmetol*, Vol.14, No.1, pp. 39-45. (2018).
20. N. R. Jo, M. A. Park, S. H. Jeon, and S. N. Park, "Nano-emulsion Containing Parthenocissus tric uspidata Stem Extracts for Enhanced Skin Pemeation and the Anti-bacterial Activity of the Extracts", *Journal Microbiol. Biotechnol*, Vol.41, No.3, pp. 320-326, (2013).