

감 추출물의 항산화, 항노화 및 미백 기능 규명

홍창의^{1,†} · 유수연^{2,††}

^{*}순천대학교 약학과, 연구원

^{**}순천대학교 약학과 및 생명약학연구소, 교수

(2022년 9월 19일 접수, 2022년 9월 27일 수정, 2022년 9월 28일 채택)

Identification of Anti-oxidant, Anti-aging, and Whitening Effects of *Diospyros kaki* Extracts

Chang-Eui Hong^{1,†} and Su-Yun Lyu^{2,††}

¹College of Pharmacy, Sunchon National University, 255, Jungang-ro, Suncheon-si, Jellanam-do 57922, Korea

²College of Pharmacy and Research Institute of Life and Pharmaceutical Sciences, Sunchon National University

(Received September 19, 2022; Revised September 27, 2022; Accepted September 28, 2022)

요약: 본 연구에서는 감(*Diospyros kaki*)의 1,3-butylene glycol 추출물(DBG)과 에탄올 추출물(ET)를 이용하여 항산화, 항노화 및 미백 기능을 규명하였다. 항산화능은 DPPH와 superoxide dismutase (SOD) assay를 통해 규명하였으며, 그 결과 DBG와 ET 모두 현저한 DPPH 소거능 및 SOD-유사능을 보여주었다. 또한 elastase와 hyaluronidase 억제능 그리고 matrix metalloproteinase (MMP-1) 발현을 통해 항노화 기능을 규명하였다. DBG와 ET 모두 농도 의존적으로 elastase와 hyaluronidase를 억제하였으며, MMP-1 발현 역시 저해하였다. 마지막으로 미백 기능을 규명하기 위하여 tyrosinase 억제 및 melanin 생성 저해능을 알아보았는데, DBG 추출물만이 tyrosinase를 저해할 수 있었다. 요약하면, 감 추출물은 강한 항산화, 항노화, 미백 기능을 갖고 있으며, 추후 화장품 소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

Abstract: In this study, we prepared two extracts using 1,3-butylene glycol (DBG) and ethanol (ET), with *Diospyros kaki* and determined the anti-oxidant, anti-aging, and whitening effects *in vitro*. Anti-oxidant activity was measured by DPPH and superoxide dismutase (SOD) method, and as a result, both DBG and ET extracts confirmed their anti-oxidant properties by exhibiting significant DPPH scavenging and SOD-like activities. For anti-aging activity, we measured elastase and hyaluronidase inhibition, and the inhibition of MMP-1 expression. Both DBG and ET significantly inhibited elastase and hyaluronidase activities dose-dependently, and MMP-1 expression was also reduced in both extracts. We also measured the whitening effects with tyrosinase activity and melanin production, but only DBG showed a decrease in tyrosinase. In summary, *D. kaki* extract has strong antioxidant, anti-aging, and whitening functions, and it is believed that it can be used as a cosmetic material in the future.

Keywords: *Diospyros kaki*, anti-oxidant, anti-aging, whitening

† 주 저자 (e-mail: gruni80@naver.com)
call: 061-750-3759

†† 교신저자 (e-mail: suyun@scnu.ac.kr)
call: 061-750-3759

1. 서론

감(*Diospyros kaki*)은 매화과(Ebenaceae)에 속하며, 한국, 중국, 일본 등 동아시아를 비롯하여 전 세계에 분포한다 [1]. 열매는 생으로 먹거나 말려서 먹으며, 잎은 오래 전부터 허혈성 뇌졸중, 협심증, 고혈압, 동맥경화 등의 치료제로 사용되어 왔다[2]. 또한 감은 폴리페놀을 포함하여 폐놀 함량이 매우 높은 것으로 알려져 있으며, 강력한 항산화제로 알려져 있는 비타민 C, 카르테노이드도 다량 함유되어 있다. 항산화제는 산화적 스트레스를 일으키는 자유 라디칼로부터 생체 분자를 보호하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 항산화 효능 때문에 감의 활성 성분들은 산화적 스트레스 관련 만성 질환 등에도 효과가 좋은 것으로 알려져 있다[3].

산화적 스트레스는 세포를 손상시키고 당뇨병, 심혈관 질환, 암 및 간 손상 같은 질병을 유발할 수 있는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 생긴다[4]. 이때 항산화제는 기존의 산화제를 안정적인 분자로 전환시켜 자유 라디칼 반응을 제거하는데 중요한 역할을 한다[5]. 세포 내 항산화 수준을 높이기 위해 다양한 방법들이 제안되어 왔다. 항산화 능력이 있는 비타민이나 효소들, 예를 들어 superoxide dismutase (SOD), 글루타치온 퍼옥시다아제 등은 과도한 ROS 생산을 막을 수 있다[6]. 식품을 통한 보충 역시 비효소적 항산화제 생성을 촉진시킬 수 있다. 파이토케미컬(phytochemical)은 항산화 활성을 나타낼 수 있는데, 예를 들어 베리류에는 플라보노이드, 안토시아닌, 페놀산 같은 많은 파이토케미컬이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있으며, 이러한 식이 보충은 자유 라디칼에 대응하기 위한 추가적인 방어 수단으로 사용되어질 수 있다.

노화는 유기체의 항산화 균형이 무너지면서 나타나는 현상이다[7]. 피부에 있어서 가장 흔한 문제 중 하나는 피부 노화이다. 피부의 표피층과 진피층에서 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 분해가 일어나, 피부 표면에 여러 가지 징후가 나타나고 피부의 물리적 특성 역시 변한다[8]. 피부 노화는 내인성(시간의 흐름에 따른 노화)과 외인성(광노화) 원인들이 복합적으로 발생하여 일어나는 생물학적인 과정이다[9]. 내인성 노화는 유전적 요인, 세포 대사 및 호르몬 불균형 요인 등으로 인해 발생한다. 외인성 노화는 자외선(ultraviolet radiation, UVR), 오염, 이온화, 방사선, 화학물질 및 독성물질에 대한 만성 노출 등으로 발생한다[10]. 특히 UVR에 대한 노출은 피부의 산화적 스

트레스의 주요 원인이며, 주름, 병변, 암과 같은 피부 질환 발병의 중요한 위험 요소이기도 하다[11,12].

Matrix metalloproteinase (MMPs) 생산은 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로를 통해 ROS에 의해서 간접적으로 유도될 수 있다[13]. 그 중 MMP-1은 피부에서 콜라겐 type I, II 그리고 III의 분해를 시작하는 단백질이다. 진피 섬유아세포에서 UV의 의해 유도된 MMP는 콜라겐 및 기타 ECM 단백질을 분해시킨다[14]. 콜라게나아제(collagenase)는 콜라겐 분해를 포함하여 ECM을 재구성하는 일을 담당한다. 세린 단백질분해효소(serine proteinase)인 엘라스타제(elastase)는 ECM에서 엘라스틴(elastin)을 분해하는 효소이다. 콜라겐과 엘라스틴은 주로 피부의 탄탄한 구조와 탄력성을 유지하는 역할을 하기 때문에, 이들이 줄어들면 원치 않는 주름이나 노화된 피부를 가져올 수 있다[15].

멜라닌은 피부와 모발의 색을 조절하는 주요 색소이며 동식물에 널리 분포하는 고분자 화합물이다. 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하지만, 과도하게 생성되면 색소가 피부에 축적되어 기미, 주근깨를 형성하고, 이러한 병변은 피부암을 유발할 수 있다. 그러므로 과도한 피부 색소 침착을 방지하기 위해서는 멜라닌 생성을 억제하는 것이 필요하다[16]. 표피의 기저층에 위치하며 티로시나아제(tyrosinase)에 의해 조절되는 멜라닌 세포(melanocyte)는 멜라노제네시스(melanogenesis)에 의해 멜라닌을 생성하며 tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) 및 dopachrome tautomerase (DCT) 같은 효소를 함유한다[17]. 티로시나아제는 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)에서 3,4-DOPA quinone 형성을 촉진하며 자동 산화 및 효소 반응에 의해 DOPA quinone에서 멜라닌 형성을 촉진한다[18]. 티로시나아제 활성은 피부 미백 연구에서 매우 중요한 위치를 차지한다[19]. 코직산, 알부틴, 비타민 C 등 다양한 화학물질과 식물추출물이 미백 화장품에 사용된다. 그러나 착색, 냄새, 세포독성 등의 부작용으로 사용에 제한이 있다[20]. 따라서 최근에는 피부에 안전한 천연물로부터 피부 미백제를 개발하는 것에 대한 연구가 많아지고 있다[21].

본 연구에서는 감 추출물을 활용하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 자유 라디칼에 대한 소거 활성 및 pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성 측정을 통한 항산화 효능, elastase, MMP-1, hyaluronidase 활성 측정을 통한 항노화 효능, tyrosinase, melanin 활성 측정을 통한 미백 효능을 평가함으로써 화장품으로의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 시료인 감(*D. kaki*)은 청도군(Korea)에서 재배된 청도반시를 구입하였다. 감을 수세 후 70% 에탄올로 소독하고 건조한 다음 1,3-butylene glycol 추출과 에탄올 추출을 하였다. 감 1,3-butylene glycol 추출물(DBG, 수율 10.6%)은 시료 100 g에 400 g의 1,3-butylene glycol과 증류수 600 g에, 감 에탄올 추출물(DET, 수율 8.3%)은 시료 100 g에 70% 에탄올 1,000 g을 각각 넣고 7일간 상온(20 ~ 24 °C)에서 침지하였다. 이후 두 추출물을 400 mesh filter를 이용하여 1차 filter하고 0.45 µm을 이용하여 2차 filter 후 각각 사용하였다. 얻어진 여액은 감압 농축하여 동결건조 후 냉장 보관하면서 실험의 시료로 사용하였다.

2.2. 세포 배양

쥐 유래 melanocyte인 B16F10 세포는 한국세포주은행(Korea)에서 분양 받아 사용하였으며, 사람 피부 아세포인 HDF-n 세포는 Modern Tissue Technology (MITT, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포들은 10% fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, USA), 1% penicillin/streptomycin (GibcoBRL, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GibcoBRL, USA) 배지로 배양하고 Sanyo CO2 incubator (Japan, 5% CO₂, 37 °C)에서 배양하였다.

2.3. 세포독성 측정

시료에 대한 각 세포의 독성은 MIT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 사용하여 실험하였다. 96 well flat-bottomed culture plate (Nunc, Life Technologies, UK)에 세포를 1×10^4 cells/well씩 접종하고 시료를 200 µL씩 가한 후, 48 h 배양하였다. 이 후, PBS에 녹인 MIT solution(3 mg/mL)을 50 µL씩 첨가하고 CO₂ incubator에 넣어 4 h 동안 반응시켰다. 4 h 후, 상등액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO) 150 µL씩 첨가하고 595 nm (Sunrise, Tecan, Switzerland)에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. DPPH 자유 라디칼 소거 활성

자유 라디칼 소거 활성은 Ikeda[22] 등의 방법에 준하여 측정하였다. 각 시료를 일정 농도가 되도록 메탄올에 넣어 200 µL로 맞추고, 메탄올에 녹인 0.1 mM 2,2-diphenyl-

1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazin-1-yl (DPPH) solution (Sigma, USA)을 200 µL씩 가한 후, 교반하고 실온에서 30 min 동안 방치한 다음 519 nm (Sunrise, Tecan, Switzerland)에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 α-토코페롤을 사용하였으며, 소거활성능은 대조군과 비교하여 감소율로 나타내었다.

2.5. 자외선 (UVA) 조사

HDF-n 세포를 산화적으로 손상시키기 위해 100 mm culture dish에 1×10^6 cells/mL로 분주한 다음 24 h 동안 배양하였다. 자외선 조사 직전에 PBS로 1회 세척하고, PBS를 세포가 살짝 잠길 정도로 넣어 준 상태에서 plate 뚜껑을 열고 자외선을 조사하였다. 자외선 조사 즉시 다시 PBS로 1회 세척한 후, 5% FBS를 첨가한 DMEM과 농도 별 대추 추출물을 넣고 CO₂ incubator에 넣어 배양하였다. 자외선 조사 이후, 세포를 수거하여 파쇄완충용액(20 mM HEPES, pH 7.0/1 mM EDTA, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride) 300 µL를 넣고, 초음파기로 파쇄 후 4 °C, 12,000 × g에서 15 min 동안 원심분리하여 상등액을 수거하고 단백질 농도를 정량한 후, 항산화 활성 실험에 사용하였다.

2.6. Superoxide Dismutase (SOD) 유사 활성도 측정

SOD 유사 활성은 pyrogallol의 자기산화(auto-oxidation)를 저해하는 정도로 확인 하였다. 1 mM EDTA를 함유한 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.2) 970 µL에 0.2 mM pyrogallol solution을 10 µL와 세포 추출물(단백질 농도 5 mg/mL) 20 µL를 가하여 15 °C에서 10 min 반응시키고, 1 M HCl 용액을 가하여 반응을 종료시킨 후, 440 nm (Sunrise, Tecan, Switzerland)에서 흡광도를 측정하여 활성도를 산정하였다.

2.7. Tyrosinase 저해 활성 및 Melanin 생성량 측정

B16F10 세포를 2×10^5 cells/well로 6 well plate에 접종한 후, 24 h 동안 배양하였다. 배지를 제거하고, 멜라닌 생합성 유도물질인 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) 50 nM와 농도 별 시료를 넣은 배지를 동시에 넣고, 48 h 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척한 후, 1%(w/v) triton X-100 함유한 100 mM sodium phosphate (pH 6.8) 100 µL를 넣고 -80 °C에서 30 min 동안 방치하면서 세포 용해과정을 거친다. 이후, 12,000 rpm으로 30 min 동안 원심분리하고 상등액을 수거하였다. Tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위해서,

단백질 정량을 통해 100 μg 에 해당하는 상등액에 100 mM sodium phosphate (pH 6.8)에 녹인 2 mg/mL L-DOPA (Sigma Chemical Co., USA) 80 μL 를 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시킨 후, 490 nm에서 tyrosinase에 의해 DOPA로부터 형성되는 DOPA chrome의 양을 측정하여 상대적 tyrosinase 활성으로 나타냈다. Melanin 생성량을 측정하기 위해서, 10% DMSO를 함유하는 1 N NaOH를 적정량 넣고 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 h 동안 방치하면서 melanin을 녹여주었다. 405 nm (Sunrise, Tecan, Switzerland)에서 용해된 melanin의 흡광도를 측정해 상대적 melanin 생성량으로 나타냈다.

2.8. Elastase 저해 활성 측정

기질로서 *N*-succinyl-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilide를 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 min 간 기질로부터 생성되는 *p*-nitroanilide의 생성량을 410 nm에서 측정하였다. 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 mL씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5 U/mL) 용액 0.5 mL를 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 *N*-succinyl-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilide(0.5 mg/mL)을 첨가하여 20 min 간 반응시켜 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타냈다.

2.9. MMP-1 저해 활성 측정

HDF-n 세포를 100 mm culture dish (Corning Life Sciences, USA)에 1×10^6 cells/mL로 분주한 다음 24 h 동안 배양하였다. 자외선 조사 직전에 PBS로 1회 세척하여 배지 내 serum을 제거한 후, PBS를 세포가 살짝 잠길 정도로 넣어준 다음 plate 뚜껑을 열고 6.3 J/cm²의 자외선 (UVA)을 UVB cross-linker (CL-508M, Vilber Lourmat, France)를 이용하여 조사하였다. UVA 조사 후 시료를 농도별로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배양한 배지를 200 μL 씩 96 well plate에 분주하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight하여 coating 하였다. PBS-T로 세척한 후 3% bovine serum albumin (BSA)/PBS로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 h 동안 blocking 하였다. PBS-T로 세척한 후, mouse monoclonal anti-MMP-1 (Sigma Chemicals Co., USA)을 1 : 3,000으로 blocking solution (3% BSA)에 희석하여 100 μL 씩 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 h 동안 반응시켰다. PBS-T로 세척한 후, anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chemicals Co.)를 1 : 3,000으로 blocking solution에 희석하여 100 μL 씩 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$

에서 2 h 동안 반응시켰다. PBS-T로 세척한 후, MTT solution 100 μL 를 첨가하여 발색시켰다. 15 min 후, 1 N HCl을 50 μL 첨가하여 반응을 중지시키고, microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(Sunrise, Tecan).

2.10. Hyaluronidase 저해 활성

20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0, 0.77 mM sodium chloride, 0.1% bovine serum albumin)에 들어있는 hyaluronidase solution (8 unit/mL)를 50 μL 의 시료와 혼합한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 h 방치하였다. 이후 300 mM sodium phosphate (pH 5.35)안에 들어있는 100 μL hyaluronic acid solution을 가한 후 다시 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45 min 간 방치하였다. 반응이 끝난 혼합물 125 μL 를 취해 acid albumin solution (24 mM sodium acetate, 79 mM acetic acid, 0.1% (w/v) BSA, pH 3.75) 625 μL 에 더하여 실온에서 10 min 간 반응시켰다. 600 nm에서 흡광도를 측정하고(Sunrise, Tecan, Switzerland), 저해활성은 대조군과 비교하여 감소율로 나타내었다.

2.11. 통계분석

각 군간의 통계처리는 GraphPad PRISM Ver. 7.04 (GraphPad Software, USA)를 사용하였으며, 유의차 검증은 student's *t*-test에 따라 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH 자유 라디칼 소거 활성

전자공여능 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl은 자체가 매우 안정한 자유 라디칼로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. 자유라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데, 폐놀성 화합물의 경우 자유라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 자유 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다[23,24]. DPPH는 알코올 등의 유기용매에 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있어 다양한 천연소재로 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다[25]. 감 추출물을 다양한 농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, Figure 1과 같이 감 에탄올 추출물인 DET가 0.3, 0.4, 그리고 0.5 mg/mL에서 각각 13.0, 21.6,

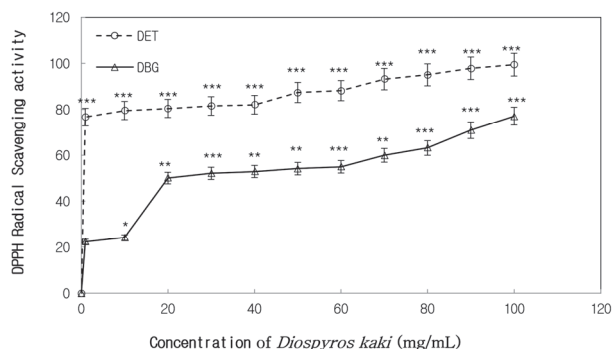


Figure 1. Free radical scavenging activity of *Diospyros kaki* extracts measured by DPPH assay. Extracts of *Diospyros kaki* were incubated with DPPH at 25 °C for 30 min and the absorbance at 519 nm was measured. Each bar represent mean ± SD (N = 3). (***) represents significant differences between control and sample-treated groups $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. DET: ethanol extract, DBG: 1,3-butylene glycol extract.

그리고 27.7%의 소거능을 보였으며, 0.6 mg/mL 농도에서 EC₅₀를 나타내어 높은 항산화력을 보였다. 감 1,3-butylene glycol 추출물인 DBG는 약 20 mg/mL 농도에서 EC₅₀를 나타내었다. 감 1,3-butylene glycol 추출물보다 감 에탄올 추출물이 더 우수한 활성을 나타낸 이유는 에탄올 추출물에서 항산화 능력이 있는 성분이 많이 용출되었기 때문으로 보인다. 감 에탄올 추출물의 경우 다양한 유효성분인 폴리페놀 및 플라보노이드 등이 확인되었다. 감 추출물에 포함된 폴리페놀 화합물들(ferulic acid, tannic acid, protocatechic acid, vanillic acid, epicatechin gallate, catechin gallate)은 활

Table 1. Free Radical Scavenging Activity of Alpha-Tocopherol

Concentration (μg/mL)	Free radical scavenging activity (%)
0	0
0.1	0.9
1	3.3
5	18.1
10	34.7
20	55.2

성산소종에 대한 산화스트레스에 대한 손상을 효과적으로 방어할 수 있다고 보고하고 있다[26-28]. 또한 감 추출물에는 다양한 플라보노이드(querctin, hyperin, isoquercitrin, kaempferol, glycoside, catechin) 등이 포함되어 있다고 알려져 있으며, 이러한 화합물들 또한 항산화 효과를 가진다고 보고하고 있어, 이러한 성분들이 감 에탄올 추출물의 항산화 활성에 영향을 준 것으로 생각된다[29-31]. 양성 대조군으로는 α-tocopherol을 사용하였다(Table 1).

3.2. UVA를 조사한 HDF-N 세포 내에서의 SOD 유사 활성에 미치는 영향

SOD 유사활성을 알아보기 위하여 우선 HDF-n에 UVA를 조사하여 산화적으로 손상시킨 후, 추출물에 대한 항산화 효소의 활성에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 위하여 먼저 HDF-n 세포의 생존에 대한 UVA의 영 MTT assay에 의하여 확인하였다. UVA 2 - 8 J/cm²을 조사하고 48 h 배양하여 세포의 생존율을 확인하였으며, UVA를 조사하지

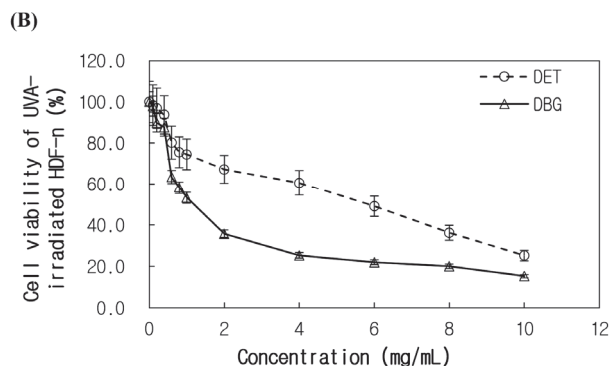
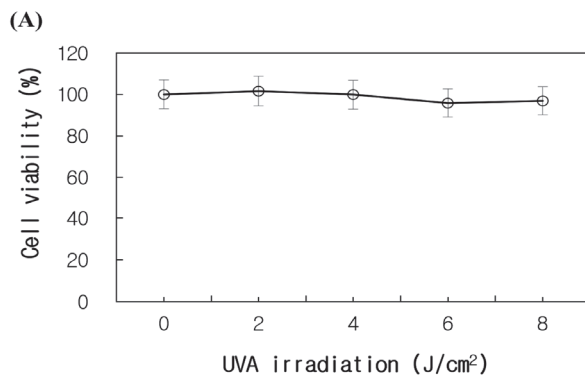


Figure 2. (A) Viability of HDF-N cells irradiated by UVA (0 ~ 8 J/cm²), and the viability of (B) UV (8 J/cm²)-irradiated HDF-n cells incubated with *Diospyros kaki* extracts. HDF-n cells and UV (8 J/cm²)-irradiated HDF-n cells were treated with extracts of *Diospyros kaki* for 48 h in the incubator at 37 °C (5% CO₂), and viability was measured by a MTT assay. DET: ethanol extract, DBG: 1,3-butylene glycol extract.

않은 세포를 대조군으로 하였다. 그 결과 조사된 UVA는 세포의 생존에 크게 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다(Figure 2A). 본 실험에서는 이 결과를 바탕으로 HDF-n 세포에 크게 영향을 미치지 않는 8 J/cm²의 UVA 세기로 설정하여 실험하였다. 또한 HDF-n에 UVA를 조사한 후, 감 추출물의 영향을 MTT assay에 의하여 확인하였다. HDF-n 세포 및 UVA가 조사된 HDF-n 세포에 추출물을 처리하고 48 h 배양하여 세포의 생존율을 확인한 결과, 0.1 mg/mL 이하의 농도에서는 두 가지 세포의 생존에 큰 영향을 끼치지 않는 것을 알 수 있었다(Figure 2B). 대표적인 항산화 효소 중 하나인 SOD는 생체에 매우 유해한 super anion radical ($\bullet\text{O}_2^-$)과 반응하여 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 생성하는 효소로, 생체 내에서 활성 산소 장애에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다[32,33]. 또한 독성이 가장 강한 hydroxyl radical의 생성을 예방하는 작용을 하여 현재 항염증 소재나 피부 노화 방지를 위한 미용 소재로 화장품 등의 첨가제로 사용되고 있다[34]. 본 실험에서는 감 추출물의 용매 별 추출물이 세포 내의 예방적 항산화제인 SOD의 활성에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, UVA에 의하여 세포 내 SOD의 활성이 감소하였으며, 감 추출물에 의하여 효소 활성이 농도의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 감 1,3-butylene glycol 추출물인 DBG의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 65.0%로 가장 높은 활성을 보였으며, 에탄올 추출물인 DET의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 52.6%

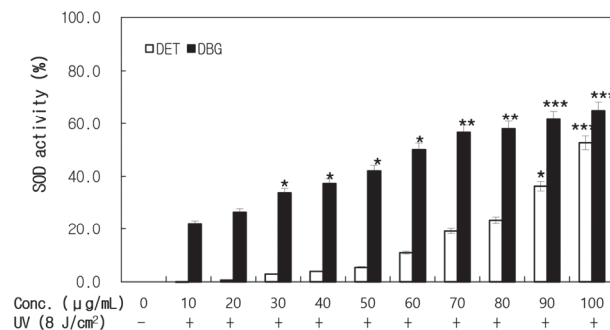


Figure 3. Effect of *Diospyros kaki* extracts on the SOD activity in UV-irradiated HDF-n cells. UV-irradiated HDF-n cells were treated with extracts of *Diospyros kaki* for 48 h. The cells in lysis buffer were broken by sonication and centrifuged. Each bar represent mean \pm SD (N = 3). (***) represents significant differences between control and sample-treated groups $p < 0.001$, (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). DET: ethanol extract, DBG: 1,3-butylene glycol extract.

의 SOD 유사 활성을 나타내었다(Figure 3). 1,3-butylene glycol 및 에탄올 추출물 모두 SOD의 효소 활성이 높게 증가하였는데, 이는 이 추출물들에서 항산화 능력이 있는 성분들이 많이 용출된 것이라 생각한다. 두 추출물의 SOD 유사활성 차이는 추출물의 용매 차이인 것으로 보이며, 각 추출물에 용출된 항산화물질의 함량 차이인 것으로 추정되는 바 이에 대한 자세한 연구가 필요하다고 생각된다.

3.3. Tyrosinase 저해 활성

Tyrosine은 멜라닌 세포 내에서의 tyrosinase에 의해 DOPA 및 DOPA quinone으로 산화된다. 그 후 DOPA quinone은 DOPA chrome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone이 되고, 이어서 indole-5,6-quinone으로의 중합의 의해 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다[35]. 피부의 색조를 결정하는 중요한 인자인 melanin은 표피 기저층의 melanocyte라고 불리는 색소 세포 내의 melanosome에서 생합성 된다. 멜라닌을 합성하는데 있어서의 출발물질은 아미노산의 일종인 tyrosine이다[36]. 이렇게 피부 내에서 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있는 tyrosinase의 저해 활성을 측정함으로써 미백 효과를 알아볼 수 있다. Tyrosinase에 대한 추출물들의 직접적인 영향을 알아보기 위하여 추출물을 다양한 농도로 조제한 후, L-tyrosine을 이용하여 tyrosinase의 활성 억제율을 알아보았다. 그 결과 감 1,3-butylene glycol 추출물인 DBG 및 감 에탄올 추출물인 DET 모두 농도의존적으로 tyrosinase를 억제하였다(Figure 4).

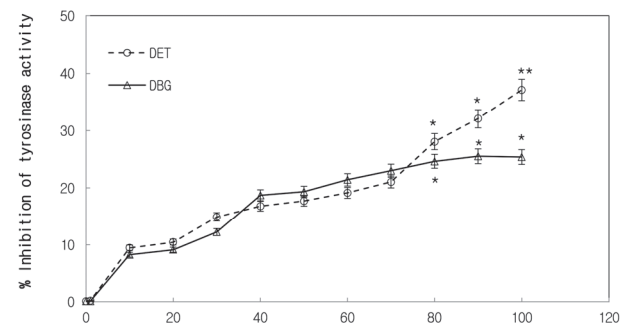


Figure 4. Inhibition of tyrosinase by *Diospyros kaki* extracts. The enzyme-reacted solution was incubated and the absorbance was measured at 490 nm. Each bar represent mean \pm SD (N = 3). (***) represents significant differences between control and sample-treated groups $p < 0.001$, (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). DET: ethanol extract, DBG: 1,3-butylene glycol extract.

3.4. B16B10 melanocyte에 대한 감 추출물의 세포 독성

Melanocyte인 B16F10 세포를 이용하여 세포 내 melanin 생성량 및 tyrosinase 활성을 측정하기 전에, 감 추출물의 세포에 대한 영향을 MTT assay에 의하여 확인하였다. B16F10 세포에 추출물을 농도 별로 처리하고 48 h 배양하여 세포의 생존율을 확인하였으며, 시료를 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하였다. 그 결과 0.1 mg/mL 농도의 추출물을 처리한 결과, DBG의 경우 99.7%의 생존율을, DET는 102.4%의 생존율을 보이는 것으로 보아 감 추출물이 이 농도들에서 세포에 거의 영향을 주지 않는 것을 확인할

수 있었다(Figure 5). 이 결과를 바탕으로 추출물의 농도를 세포의 생존율에 크게 영향을 미치지 않는 0.1 mg/mL 이하로 설정하여 실험을 수행하였다.

3.5. 세포 내 Tyrosinase 활성 및 Melanin 생성량 측정

Tyrosinase는 피부 멜라닌 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하며, melanosome에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만들고 다시 DOPA를 산화시켜 DOPA chrome을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 멜라닌 polymer를 합성하는데 있어서 중요한 역할을 한다[35,37]. 그러므로 tyrosinase 활성 억제제는 피부 내에서 멜라닌 polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있기 때문에 중간 생성단계에서 tyrosinase에 의해 생성되는 반응 산물인 DOPA chrome의 저해 정도를 확인하는 L-DOPA oxidase 방법을 채택하였다. 감 추출물이 B16F10 melanoma 세포의 tyrosinase 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 추출물을 농도별로 처리하여 배양한 후, 세포를 수거하여 tyrosinase 활성을 측정하였다. 그 결과 Figure 6A와 같이 DBG와 DET는 100 µg/mL에서 현저한 tyrosinase 저해 활성을 보였다. 사람의 피부색을 결정하는 가장 중요한 요인인 melanin은 피부의 광노화나 일광각화증을 억제할 뿐 아니라 기미, 주근깨, 검버섯 등의 부분적인 hyperpigmentation을 일으키는 역할을 하고 있다. Tyrosinase는 tyrosine을 촉매하여 결국 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다[38]. 감 추출물이 B16F10 melanoma 세

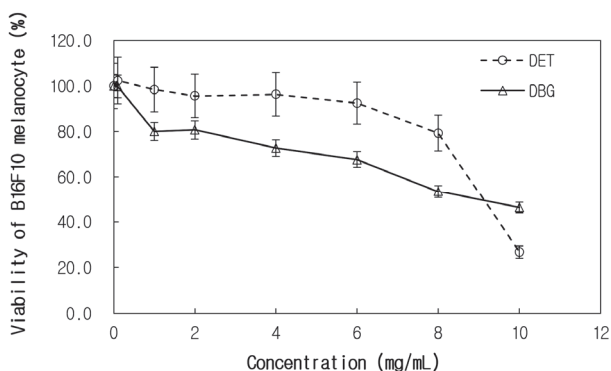


Figure 5. Viability of B16F10 cells treated with *Diospyros kaki* extracts. Cells were treated with extracts for 48 h and the viability was measured by a MTT assay. DET: ethanol extract, DBG: 1,3-butylene glycol extract.

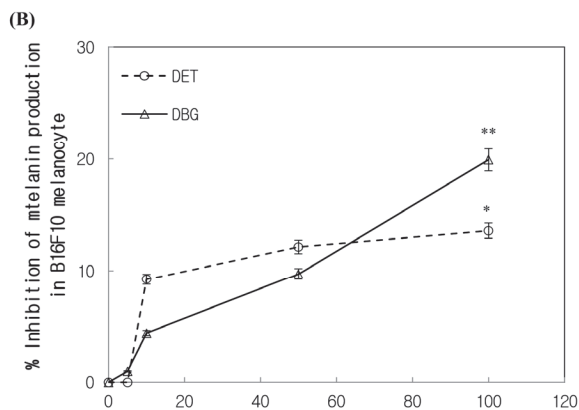
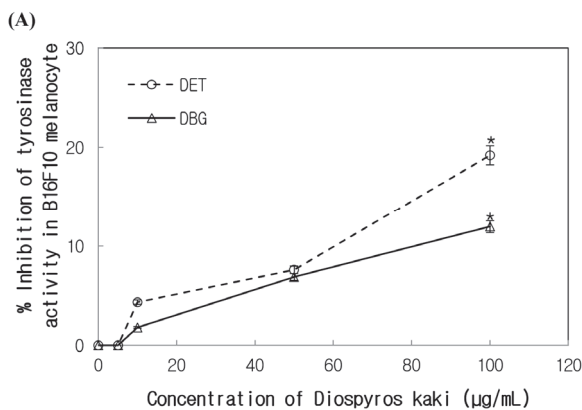


Figure 6. Effect of *Diospyros kaki* extracts on (A) tyrosinase and activity (B) melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. Cells were seeded at 2×10^5 cells/well and incubated for 24 h. Cells were treated with various concentrations of *Diospyros kaki* extracts and incubated for a further 48 h. Tyrosinase activity was measured at 490 nm and melanin contents were measured at 405 nm. Each bar represent mean \pm SD (N = 3). (***) represents significant differences between control and sample-treated groups $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). DET: ethanol extract, DBG: 1,3-butylene glycol extract.

포의 신호전달경로를 통하여 간접적으로 tyrosinase 활성에 관여하는지를 확인하기 위하여 멜라닌 합성에 대한 대하여 감 추출물이 억제 작용을 나타내는지 알아보았다. Tyrosinase 활성 결과와 유사하게 DBG와 DET 모두 melanin 생성량이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 DBG는 19.90%, DET는 13.59%의 멜라닌 생성 억제율을 나타내어 멜라닌 생산이 현저하게 감소하였다 (Figure 6B). Tyrosine은 tyrosinase에 의해 L-DOPA로 전환되어 DOPA quinone이 되고, DOPA quinone은 산화와 효소 반응에 의해 dopachrome으로 전환되어 최종적으로 melanin 색소를 형성한다[38]. 그러므로 DBG 및 DET 추출물이 B16F10 melanocyte 내에서 tyrosinase 활성을 저해함으로써 melanin 생성을 억제했다고 볼 수 있다.

3.6. Elastase 저해 활성 측정

감 추출물의 elastase 저해 활성을 조사한 결과 전반적으로 농도가 증가함에 따라 저해 활성이 증가한 것을 볼 수 있었다(Figure 7). 특히 DBG 100 mg/mL 및 DEG 100 mg/mL에서 elastase 저해 활성이 각각 52.99%와 45.8%로 높게 나타났으며, DBG는 IC_{50} 가 89 mg/mL, DET는 IC_{50} 가 111 mg/mL에서 나타났다. Elastase는 진피 내 피부 탄력을 유지하는 기질 단백질인 elastin의 분해에 관여하며 collagen을 분해할 수 있는 비 특이적 가수분해 효소이다. 또한 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중 하나로 이상조직에서는 활성이 높아져 조직 파괴의 직접적인 원인이 되며, 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발한다[39]. 따라

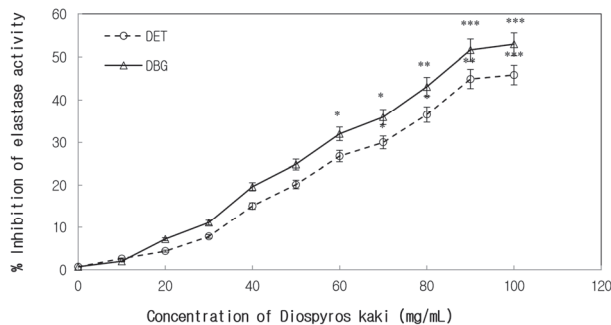


Figure 7. Inhibition of elastase activity by *Diospyros kaki* extracts. The enzyme-reacted solution was incubated and the absorbance was measured at 410 nm. Each bar represent mean \pm SD (N = 3). (***) represents significant differences between control and sample-treated groups $p < 0.001$, (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). DET: ethanol extract, DBG: 1,3-butylene glycol extract.

서 감 추출물처럼 elastase의 활성을 저해할 수 있는 물질은 피부의 주름을 개선하는 효과가 있다고 말할 수 있다.

3.7. MMP-1 저해 효과 측정

피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 activator protein-1 (AP-1)의 활성도가 증가되는 신호전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다[40]. 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 감 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 섬유아세포(HDF-n)에 6.3 J/cm² UVA를 조사하고 추출물을 첨가하여 24 h 동안 배양한 후 MMP-1 발현 저해 효과를 ELISA를 통해 알아보았다. 그 결과 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 DBG는 24.87%의 뛰어난 MMP-1 발현 저해 효과를 나타내었으며, DET는 10 $\mu\text{g/mL}$ 는 18.78%의 저해 활성을 나타내었다(Figure 8). MMP-1은 UV로 인한 피부 손상과 조기 노화의 주요 매개체 역할을 하므로 MMP-1 억제는 광노화를 예방하는 좋은 전략이 될 수 있다[41]. MMP-1에 대한 효과를 기반으로 감 추출물은 강력한 콜라겐 분해 억제제로 작용할 수 있다고 할 수 있다.

3.8. Hyaluronidase 저해 활성 측정

Hyaluronidase는 mucopolysaccharide를 가수분해하는 효소로서 hyaluronic acid를 분해하는 작용 이외에 모세혈관 투과성에 관여하며 급성 부종을 야기하는 기염제로도 알려

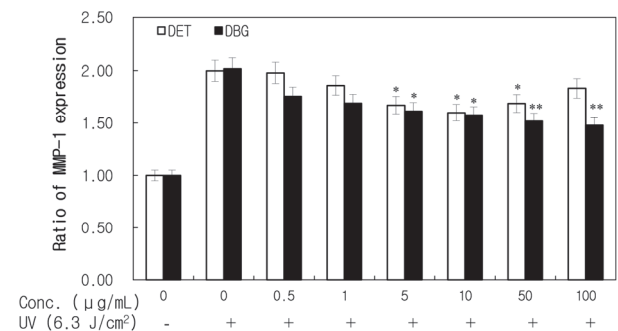


Figure 8. Effects of *Diospyros kaki* extracts on the production of MMP-1. Cells were irradiated with UVA and the ratio of MMP-1 expression was determined. Each bar represent mean \pm SD (N = 3). (***) represents significant differences between control and sample-treated groups $p < 0.001$, (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). DET: ethanol extract, DBG: 1,3-butylene glycol extract.

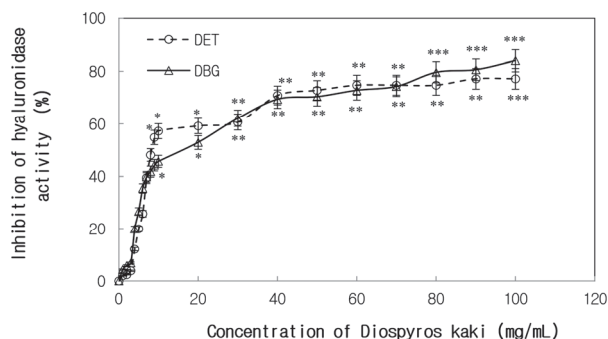


Figure 9. Inhibition of hyaluronidase activity by *Diospyros kaki* extracts. Hyaluronidase solution (5 unit/mL) was preincubated with extracts of *Diospyros kaki* for 60 min at 37°C, and the mixture was added to hyaluronic acid (0.03%) for 45 min at 37°C. Each bar represent mean ± SD (N = 3). (***) represents significant differences between control and sample-treated groups $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. DET: ethanol extract, DBG: 1,3-butylene glycol extract.

져 있다[42,43]. 본 연구에서는 감 추출물의 hyaluronidase 저해 효과를 조사하였고, 그 결과 감 추출물들의 농도가 증가함에 따라 의존적으로 hyaluronidase 활성이 저해되었다. DET의 IC₅₀는 8.8 mg/mL, DBG의 IC₅₀는 15 mg/mL으로 측정되었다. DET는 100 mg/mL에서 77.18%의 hyaluronidase 저해 활성을 보였으며 DBG의 경우 100 mg/mL에서 83.98%의 hyaluronidase 저해 활성을 보였다(Figure 9). 따라서 이렇게 hyaluronidase의 활성을 저해할 수 있는 감 추출물은 보습 및 항알러지 작용을 가지는 것으로 생각되며, 항염증 및 피부 보습 기능을 갖는 기능성 화장품 재료의 원료로도 사용되어질 수 있을 것이라 사료된다.

4. 결 론

감 추출물을 다양한 농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 감 에탄올 추출물인 DET와 감 1,3-butylene glycol 추출물인 DBG 모두 높은 항산화력을 보였으며, SOD 유사 활성을 측정한 결과 역시 두 추출물의 농도가 증가할수록 활성도 증가하였다. 미백 효과를 알아보기 위하여 B16F10 melanocyte에 감 추출물을 처리했을 때, 두 추출물 모두 tyrosinase 억제 활성 및 melanin 생성 감소를 나타내었다. 마지막으로 감 추출물의 항노화 효과는 elastase 저해 및 hyaluronidase 저해 활성을 통해 알아보았다. 그 결

과 DET와 DBG 모두 우수한 elastase 및 hyaluronidase 저해 효과를 나타내었다.

Acknowledgement

이 논문은 순천대학교 교연비 사업에 의하여 연구되었음.

References

1. N. M. Alfarafisa, K. Kitaguchi, and T. Yabe, *Diospyros kaki* extract protects myoblasts from oxidative stress-induced cytotoxicity via secretions derived from intestinal epithelium, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **85**(2), 430 (2021).
2. C. Xie, Z. Xie, X. Xu, and D. Yang, Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties, *J. Ethnopharmacol.*, **163**, 229 (2015).
3. R. Direito, J. Rocha, B. Sepodes, and M. Eduardo-Figueira, From *Diospyros kaki* L. (Persimmon) phytochemical profile and health impact to new product perspectives and waste valorization, *Nutrients*, **13**(9), 3283 (2021).
4. S. Bilal, A. L. Khan, M. Waqas, R. Shahzad, I. D. Kim, I. J. Lee, and D. H. Shin, Biochemical constituents and *in vitro* antioxidant and anticholinesterase potential of seeds from native Korean persimmon genotypes, *Molecules*, **21**(7), 893 (2016).
5. H. Zhao, Z. Wang, F. Ma, X. Yang, C. Cheng, and L. Yao, Protective effect of anthocyanin from *Lonicera caerulea* var. *Edulis* on radiation-induced damage in mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**(9), 11773 (2012).
6. T. Brioche and S. Lemoine-Morel, Oxidative stress, sarcopenia, antioxidant strategies and exercise: molecular aspects, *Curr. Pharm. Des.*, **22**(18), 2664 (2016).
7. F. Petersen, R. Rodrigo, M. Richter, and S. Kostin, The effects of polyunsaturated fatty acids and antioxidant vitamins on atrial oxidative stress, nitrotyrosine residues, and connexins following extracorporeal circulation in patients undergoing cardiac surgery, *Mol. Cell. Biochem.*, **433**(1-2), 27 (2017).
8. A. Szajdek and E. J. Borowska, Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review,

- Plant Foods Hum. Nutr.*, **63**(4), 147 (2008).
9. H. Pratsinis and D. Kletsas, Special Issue Anti-aging properties of natural compounds, *Cosmetics*, **6**(4), 67 (2019).
 10. P. K. Mukherjee, N. Maity, N. K. Nema, and B. K. Sarkar, Bioactive compounds from natural resources against skin aging, *Phytomedicine*, **19**(1), 64 (2011).
 11. R. Ganceviciene, A. I. Liakou, A. Theodoridis, E. Makrantonaki, and C. C. Zouboulis, Skin anti-aging strategies, *Dermatoendocrinol.*, **4**(3), 308 (2012).
 12. S. Jadoon, S. Karim, M. H. Bin Asad, M. R. Akram, A. K. Khan, A. Malik, C. Chen, and G. Murtaza, Anti-aging potential of phytoextract loaded-pharmaceutical creams for human skin cell longevity, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 709628 (2015).
 13. S. Pientaweeratch, V. Panapisal, and A. Tansirikongkol, 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 (2016).
 14. E. Hwang, D. G. Lee, S. H. Park, M. S. Oh, and S. Y. Kim, Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type I and MMP-1 expression, *J. Med. Food*, **17**(9), 985 (2014).
 15. S. H. Kang, Y. D. Jeon, J. Y. Cha, S. W. Hwang, H. Y. Lee, M. Park, B. R. Lee, M. K. Shin, S. J. Kim, S. M. Shin, D. K. Kim, J. S. Jin, and Y. M. Lee, Antioxidant and skin-whitening effects of aerial part of *Euphorbia supina* Raf. Extract, *BMC Complement. Altern. Med.*, **18**(1), 256 (2018).
 16. M. Iwata, T. Corn, S. Iwata, M. A. Everett, and B. B. Fuller, The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins, *J. Invest. Dermatol.*, **95**(1), 9 (1990).
 17. J. Cabanes, S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona, Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**(12), 982 (1994).
 18. Y. J. Kim and H. Uyama, Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**(15), 1707 (2005).
 19. C. Jimenez-Cervantes, J. C. Garcia-Borron, P. Valverde, F. Solano, and J. A. Lozano, Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes. I. Biochemical characterization of two melanosomal tyrosinases from B16 mouse melanoma, *Eur. J. Biochem.*, **217**(2), 549 (1993).
 20. Y. Ye, G. X. Chou, H. Wang, J. H. Chu, and Z. L. Yu, Flavonoids, apigenin and icariin exert potent melanogenic activities in murine B16 melanoma cells, *Phytomedicine*, **18**(1), 32 (2010).
 21. J. Yamakoshi, F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi, and Y. Kubota, Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, *Pigment Cell Res.*, **16**(6), 629 (2003).
 22. N. Ikeda and K. Fukuzumi, Synergistic antioxidant effect of nucleic acids and tocopherols, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**(9), 360 (1977).
 23. H. Aoshima, H. Tsunoue, H. Koda, and Y. Kiso, Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity, *J. Agric. Food Chem.*, **52**(16), 5240 (2004).
 24. S. 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.*, **47**(3), 469 (1974).
 25. E. Song, H. Chung, E. Shim, J. K. Jeong, B. K. Han, H. J. Choi, and J. Hwang, *Gastrodia elata* Blume extract modulates antioxidant activity and ultraviolet A-irradiated skin aging in human dermal fibroblast cells, *J. Med. Food*, **19**(11), 1057 (2016).
 26. R. Fu, Y. Zhang, T. Peng, Y. Guo, and F. Chen, Phenolic composition and effects on allergic contact dermatitis of phenolic extracts *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. leaves, *J. Ethnopharmacol.*, **162**, 176 (2015).
 27. B. Zhao, Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease, *Neurochem. Res.*, **34**(4), 630 (2009).
 28. J. H. Lee, Y. B. Lee, W. D. Seo, S. T. Kang, J. W. Lim, and K. M. Cho, Comparative studies of antioxidant

- activities and nutritional constituents of persimmon juice (*Diospyros kaki* L. cv. Gajubaekmok), *Prev. Nutr. Food Sci.*, **17**(2), 141 (2012).
29. K. Ohguchi, C. Nakajima, M. Oyama, M. Iinuma, T. Itoh, Y. Akao, Y. Nozawa, and M. Ito, Inhibitory effects of flavonoid glycosides isolated from the peel of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* 'Fuyu') on melanin biosynthesis, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**(1), 122 (2010).
 30. L. Sun, J. Zhang, K. Fang, Y. Ding, L. Zhang, and Y. Zhang, Flavonoids from persimmon (*Diospyros kaki*) leaves (FPL) attenuate H₂O₂-induced apoptosis in MC3T3-E1 cells via the NF- κ B pathway, *Food Funct.*, **5**(3), 471 (2014).
 31. L. Sun, J. Zhang, X. Lu, L. Zhang, and Y. Zhang, Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves, *Food Chem. Toxicol.*, **49**(10), 2689 (2011).
 32. W. A. Pryor, Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions, *Annu. Rev. Physiol.*, **48**, 657 (1986).
 33. C. L. Greenstock, Radiation and aging: free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention, *Med. Hypotheses*, **41**(5), 473 (1993).
 34. T. Grasbon, E. M. Grasbon-Frodl, B. Juliusson, C. Epstein, P. Brundin, A. Kampik, and B. Ehinger, CuZn superoxide dismutase transgenic retinal transplants, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **237**(4), 336 (1999).
 35. G. Prota, Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, *J. Invest. Dermatol.*, **75**(1), 122 (1980).
 36. S. Pavel and F. A. Muskiet, Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma: a preliminary report, *Cancer Detect. Prev.*, **6**(1-2), 311 (1983).
 37. G. Cardinali, G. Bolasco, N. Aspite, G. Lucania, L. V. Lotti, M. R. Torrisi, and M. Picardo, Melanosome transfer promoted by keratinocyte growth factor in light and dark skin-derived keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **128**(3), 558 (2008).
 38. W. Liu, M. Wang, S. Xu, C. Gao, and J. Liu, Inhibitory effects of shell of *Camellia oleifera* Abel extract on mushroom tyrosinase and human skin melanin, *J. Cosmet. Dermatol.*, **18**(6), 1955 (2019).
 39. N. Y. Kim, H. S. Kwon, and H. Y. Lee, Effect of inhibition on tyrosinase and melanogenesis of *Agastache rugosa* Kuntze by lactic acid bacteria fermentation, *J. Cosmet. Dermatol.*, **16**(3), 407 (2017).
 40. N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa, The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity, *Photochem. Photobiol.*, **74**(2), 283 (2001).
 41. Y. L. He, Z. Xiao, S. Yang, C. Zhou, S. Sun, P. Hong, and Z. J. Qian, A phlorotannin, 6,6'-bieckol from *Ecklonia cava*, against photoaging by inhibiting MMP-1, -3 and -9 expression on UVB-induced HaCaT keratinocytes, *Photochem. Photobiol.*, 1131 (2021).
 42. C. H. Kang, S. J. Rhie, and Y. C. Kim, Antioxidant and skin anti-aging effects of marigold methanol extract, *Toxicol. Res.*, **34**(1), 31 (2018).
 43. J. H. Lee, S. H. Moon, Y. Hong, D. U. Ahn, and H. D. Paik, Anti-elastase and anti-hyaluronidase activity of phosvitin isolated from hen egg yolk, *Br. Poult. Sci.*, **61**(1), 17 (2020).