

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2021.7.4.845

JCCT 2021-11-103

## 보성녹차 감압증류추출물의 주름개선, 미백 효능과 열수추출물의 항산화, 항균효과

### Wrinkle Improvement, Whitening Effect of Boseong *Camellia sinensis* Vacuum Distilled Extract and Antioxidant, Antibacterial Efficacy of its Hydrothermal Extract

이광원\*, 홍정현\*\*, 정선화\*\*\*, 김영균\*\*\*\*, 박신성\*\*\*\*\*, 박수인\*\*\*\*\*, 신문삼\*\*\*\*\*

Kwang Won Lee\*, Jung Hyun Hong\*\*, Sun Hwa Chung\*\*\*, Young Kyun Kim\*\*\*\*\*,  
Shinsung Park\*\*\*\*\*, Su In Park\*\*\*\*\*, Moon Sam Shin\*\*\*\*\*

**요약** 본 연구는 보성에서 재배된 녹차잎을 감압증류와 열수추출법으로 추출하여 항산화, 항주름, 미백, 항균 *in vitro* 실험과 HPLC 분석을 수행하였다. 보성녹차 감압증류추출물은 주름개선(Elastase 활성 저해 실험)과, 미백(Mushroom tyrosinase 활성 저해 실험) 효능에서 우수한 결과를 나타내었으며, 열수추출물보다 낮은 농도에서 IC50 값이 측정되었다. 보성녹차 열수추출물은 항산화 시험(DPPH, ABTS+ radical 소거능, SOD 유사활성능, 총 폴리페놀 함량)에서 우수한 결과를 나타내었다. 항균 실험에서는 보성녹차 열수추출물에 의해 *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes* 균주에 대하여 Clear zone이 형성되었다. HPLC 분석 결과로, EGCG와 Caffeine이 열수추출물에서 40.29 mg/g, 9.94 mg/g 검출되었고, 감압증류추출물에서는 Caffeine이 3.4 mg/g 검출되었다. 따라서 보성녹차 감압증류추출물은 주름개선과 미백효과가 탁월하며, 보성녹차 열수추출물은 항산화, 항균효과가 우수함을 확인하였다.

**주요어** : 보성녹차, 감압증류, 주름개선, 미백, 항산화

**Abstract** In this study, *Camellia sinensis* Leaf cultivated in Boseong was extracted by vacuum distillation and hydrothermal extraction methods, and we performed *in vitro* experiments such as antioxidant, anti-wrinkle, whitening, and antibacterial activity test and HPLC analysis. Wrinkle improvement (elastase inhibition assay) and whitening effect (mushroom tyrosinase inhibition assay) of Boseong vacuum distilled extract have excellent results and IC50 values of vacuum distillation extract was measured at a lower concentration than that of the hydrothermal extract. The antioxidant activity of the Boseong hydrothermal extract was excellently measured in DPPH radical and ABTS+ radical scavenging activity, SOD-like activity, and total polyphenol content. In the antibacterial experiment, the Boseong hydrothermal extract formed a clear zone for the *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* strain. As a result of HPLC analysis, EGCG and caffeine in the hydrothermal extract were 40.29 mg/g, 9.94 mg/g respectively, and caffeine in the vacuum distilled extract was 3.40 mg/g. Therefore, we examined that Boseong *Camellia sinensis* vacuum distilled extract has excellent anti-wrinkle and whitening effect, and its hydrothermal extract has good antioxidant and antibacterial efficacy.

**Key words** : Boseong *Camellia sinensis*, Vacuum distillation, Anti-wrinkle, Whitening, Antioxidant

\*정회원, 을지대학교 시니어헬스케어학과 석사과정 (제1저자)

\*\*준회원, 스킨롬(주), 대표이사 (참여저자)

\*\*\*준회원, 티아, 대표이사 (참여저자)

\*\*\*\*준회원, (주)차연, 대표이사 (참여저자)

\*\*\*\*\*정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 석사과정 (참여저자)

\*\*\*\*\*정회원, 을지대학교 시니어헬스케어학과 박사과정 (교신저자)

\*\*\*\*\*정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 교수 (공동교신저자)

접수일: 2021년 10월 27일, 수정완료일: 2021년 10월 30일

게재확정일: 2021년 11월 4일

Received: October 27, 2021 / Revised: October 30, 2021

Accepted: November 4, 2021

\*Corresponding Author: sooo\_30@naver.com

\*Co-Corresponding Author: msshin@eulji.ac.kr

Dept. of Senior Healthcare, Eulji Univ, Korea

## I. 서 론

현대사회는 산업화가 진행되면서 풍요로운 삶을 살게 되었고 사람들의 평균수명이 늘어나게 되었다. 산업화는 우리에게 풍요로움과 편리함을 주는 반면에 산업화에 의해 부작용 또한 나타났다. 환경호르몬이나 미세먼지 등이 대표적인 산업화의 부작용이다[1, 2]. 이러한 부작용들은 인체를 보호하는 제 1차 방어막인 피부에 유해한 영향을 준다[3]. 이러한 외부요인에 의해 인체 내에는 산화물이 쌓이게 되고, 산화물과 항산화제의 평형이 무너지게 되면 지질 산화, 단백질 변성, DNA 산화 등으로 인해 결국 노화를 초래한다[4].

이러한 환경에 맞춰 화장품에도 항산화제를 첨가하게 되었는데, Butylated Hydroxy Anisole(BHA)와 Butylated Hydroxy Toluence(BHT)와 같은 합성 항산화제를 하루에 50 mg/kg 이상 투여할 경우 독성이 유발된다는 보고에 따라[5, 6] 소비자들의 최근 합성 화학물질에 대한 반감과 함께 자연에서 추출한 천연소재 이면서 항산화, 항노화, 항주름, 미백 등 다양한 생리활성 기능을 지닌 추출물들을 많이 선호하게 되었다[7]. 소비자들의 안전하면서 소량으로도 현저한 생리활성을 나타낼 수 있는 천연추출물을 선호하는 욕구에 발맞춰, 지속적인 연구와 개발이 필요하다[4].

차나무(*Camellia sinensis*)의 잎은 예로부터 인류가 즐겨왔으며[8], 선행연구에 따르면 녹차에 함유된 카테킨 화합물이 항산화, 항염, 항암, 항균, 미백효과가 있다고 보고되었고[8, 9, 10], 카테킨 화합물 중에 EGCG가 가장 강력한 효과가 있다고 알려져 있으며[9], 4월, 5월, 6월, 7월 중 채엽한 잎의 카테킨 성분을 비교한 선행연구에서는 채엽시기가 늦을수록 카테킨 화합물의 양이 증가한다고 보고되었다[10]. 카테킨 외에 녹차에 함유된 유효성분으로 알려진 Caffeine은 체지방 감소, 기억력 개선, 항산화 효과가 있다고 알려져 있다[8].

일반적인 추출방법인 열수추출법과 달리 감압증류추출법은 압력을 낮추기 때문에 천연물로부터 휘발성에 따라 유효성분을 더 순수하게 추출할 수 있으며, 열수추출법보다 낮은 온도에서도 추출이 가능하여 열에 의한 유효성분의 분해 또는 산화 등을 방지할 수 있고, 특히나 입자가 작은 물질이나 지속적으로 추출용기 표면에 가해지는 열로 인한 천연물의 탄화도 방지하는 장점이 있다[11, 12].

본 연구에서는 보성녹차의 잎을 감압증류추출법과 열수추출법으로 추출한 천연소재를 4종류의 항산화 실험과 Elastase와 Mushroom tyrosinase 저해 정도를 평가하여 항주름, 미백실험을 진행하였고, 항균실험도 진행하여 다양한 생리활성능을 검증하고자 하였다. 뿐만 아니라 High-performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석을 통해 유효 성분인 Epigallocatechin Gallate(EGCG)와 Caffeine 함량을 정량적으로 측정함으로써, 천연으로부터 얻은 생리활성 복합물을 화장품에 활용할 수 있는지 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구에서는 (주)퀵템녹차로부터 차연무(茶煙霧)를 구매하여 동결건조 후 사용하였다. 전라남도 보성군에서 7월에 재배된 녹차의 잎을 영농조합법인 보성차생 산자조합에서 구매하여 열수추출하여 사용하였다. 추출하기 직전에 분쇄를 하여 추출을 진행하였으며 추출 후에 4℃로 냉장보관하여 실험에 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

L-ascorbic acid(Samchun, Korea), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Samchun, Korea), Gallic acid(Samchun, Korea)을 사용하였고, SOD 실험에서 OxiTec™ SOD Assay Kit(Biomax, Korea)를, 항주름실험에서 EnzChek™ Elastase Assay Kit(Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하였다. 그 이외 항산화, 항주름, 미백, 항균 실험은 Sigma aldrich사의 시약을 사용하였다. 항온조(Changshin science, Korea)를 사용하여 열수추출하였고, 여과를 위해 원심분리기(Hamil Scientific Inc., Korea)를 이용하였다. 열수추출물과 감압증류추출물을 동결건조기(Ilshin Bio Base, Korea)를 이용하여 건조시켰다. 감압증류추출물은 차연무(주)퀵템녹차, Korea)를 사용하였다. 항산화, 항주름, 미백실험에서 96well microplate (SPL Life Sciences Co., Korea), Multi-Mode Microplate Reader(BioTek, USA), Pipette(Eppendorf, Germany)이 사용되었다. 분석기기는 HPLC(Agilent, USA), C18 Column(Shiseido, Japan)을 사용하였다. 항균 실험에 사용된 *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes* 균주들은 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 분양받아

사용하였다.

### 3. 시료추출

감압증류추출물(*Camellia sinensis* leaf vacuum distillation extract, CSV)은 차연무를 동결건조하여 분말을 얻었다. 열수추출물(*Camellia sinensis* leaf hydrothermal extract, CSW)은 비커에 원물 3 g과 정제수 100 mL을 넣고(3%, w/v) 항온조에 정제수를 가하여 80°C를 일정하게 유지시키며 4시간 동안 추출하였다. 이 추출물을 70  $\mu$ m pore size의 매쉬 필터로 1차 여과를 하고, 원심분리기로 2차 분리를 하고, 마지막으로 5  $\mu$ m pore size 여과지로 감압 여과하였다. 이후에 동결건조하여 분말을 얻었다.

### 4. 수율 측정

감압증류추출물, 열수추출물의 수율은 다음의 식으로 수율을 산출하였다.

$$\text{감압증류추출물 수율 (\% w/v)} \\ = (\text{최종 추출물의 무게 (g)/원물의 부피 (mL)}) \times 100$$

$$\text{열수추출물 수율 (\% w/w)} \\ = (\text{최종 추출물의 무게 (g)/원물의 무게 (g)}) \times 100$$

### 5. 항산화 실험

#### 1) DPPH radical scavenging assay

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) assay는 추출물과 같은 복합물의 항산화능을 측정하는 가장 간단한 방법이다[13-15]. DPPH radical은 안정적인 free radical이며[13], 시료와 DPPH solution을 반응시킨 결과가 진한 보라색일수록 시료의 항산화능과 반비례하고[13, 16], 항산화능이 있는 추출물일수록 진한 보라색의 DPPH radical이 환원되어 옅은 노란색으로 변하게 된다.

일정 농도로 희석한 시료 10  $\mu$ L와 0.2 mM로 희석하여 제조한 DPPH solution 190  $\mu$ L를 혼합하여 20분간 암실에서 반응시켰다. 이 반응액을 Microplate Reader로 520 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였고, Positive control로 L-ascorbic acid를 이용하여 DPPH radical 소거능을 비교하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= (1 - \text{시료 첨가군 흡광도/시료 무첨가군 흡광도}) \times 100$$

#### 2) ABTS+ radical scavenging assay

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) assay는 Van den Berg의 실험방법을 응용하여 실험을 진행하였다[17]. ABTS solution 14.8 mM과 potassium persulfate 5.28 mM을 1:1 비율로 섞어 ABTS working solution을 만들었고, 암실에서 24시간 반응시켜 ABTS+ radical이 형성되도록 하였다. ABTS working solution의 흡광도를 측정하여 0.7~0.8를 맞춘 뒤 실험에 사용하였다.

ABTS working solution 190  $\mu$ L와 일정 농도로 희석한 시료 10  $\mu$ L을 혼합 후 실온과 암실 조건에서 20분간 반응시켰다. 이 반응액을 Microplate Reader로 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control로 L-ascorbic acid를 이용하여 ABTS+ radical 소거능을 비교하였다.

$$\text{ABTS+ radical scavenging activity (\%)} \\ = (1 - \text{시료 첨가군 흡광도/시료 무첨가군 흡광도}) \times 100$$

#### 3) SOD assay

Superoxide dismutase(SOD) assay는 Marklund와 Marklund의 방법을 응용한 OxiTec™ SOD Assay Kit의 방법을 변형하여 실험을 진행하였다[18, 19]. SOD 유사활성능 평가는 SOD와 유사한 역할을 하는 분자가 추출물에 함유되어 있는지 확인하는 방법이다. 450 nm에서 측정된 흡광도가 낮을수록 SOD 유사활성능이 뛰어난 것을 의미한다[20]. 일정한 농도 별로 희석한 시료 10  $\mu$ L에 WST working solution 172  $\mu$ L를 넣고, Enzyme working solution 18  $\mu$ L를 혼합시킨 뒤 37°C Incubator에서 20분간 반응시켰다. 이 반응액을 Microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control로 L-ascorbic acid를 이용하여 SOD-like activity를 비교하였다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} \\ = (1 - \text{시료 첨가군 흡광도/시료 무첨가군 흡광도}) \times 100 \\ [20]$$

#### 4) Total polyphenol content assay(TPC assay)

일정한 농도로 시료를 희석하여 각 Well에 시료 10  $\mu$ L와 Folin ciocalteu's reagent를 40  $\mu$ L 혼합한 뒤에 3 분 동안 반응시켰다. 그 후 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  150  $\mu$ L를 첨가하여 알칼리 조건으로 반응액을 만들어주었다. 이 반응액을 Microplate Reader를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 Gallic acid를 사용하여 Gallic acid standard curve를 작성하였으며, 폴리페놀의 함량은 mg Gallic acid equivalents(GAE)/g extract로 나타내었다.

#### 6. Elastase inhibition assay

EnzChek™ Elastase Assay Kit의 방법을 응용하였다. Elastase와 DQ elastin과 서로 반응을 하여 DQ elastin에 표지된 형광물질의 단편화에 의해 나타나는 형광정도를 측정하는 방법을 이용하였다[21]. 일정 농도로 희석한 시료를 10  $\mu$ L를 넣고, 0.1 M reaction buffer에 희석시킨 DQ elastin과 Elastase를 각각 50  $\mu$ L, 140  $\mu$ L씩 첨가하여 반응시켰다. 실온에서 30분간 반응시킨 뒤에 Microplate reader로 Emission 535 nm, Excitation 485 nm로 형광도를 측정하였다. Positive control로 N-Methoxysuccinyl-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-chloro methyl ketone 10  $\mu$ g/mL를 이용하여 Elastase 저해도를 비교하였다.

Elastase inhibition activity (%)

$$= (1 - \text{시료 첨가군 형광도} / \text{시료 무첨가군 형광도}) \times 100$$

#### 7. Mushroom tyrosinase inhibition assay

0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 제조하여 사용하였다. 일정한 농도별로 희석한 시료를 10  $\mu$ L씩 넣고, buffer 용액과 L-tyrosine 5 mM을 각각 160  $\mu$ L, 20  $\mu$ L 첨가한 후에 6분 동안 37°C Incubator에서 반응시키고, Mushroom tyrosinase 2500 U/mL를 10  $\mu$ L씩 추가로 혼합시킨 후에 10분간 반응시켰다. 이 반응액을 Microplate Reader로 흡광도를 490 nm 파장에서 측정하였다. Positive control으로 Kojic acid 10  $\mu$ g/mL를 사용하여 Tyrosinase 활성 저해도를 비교하였다.

Mushroom tyrosinase inhibition activity (%)

$$= (1 - \text{시료 첨가군 흡광도} / \text{시료 무첨가군 흡광도}) \times 100$$

#### 8. 항균 실험

녹차잎의 감압증류추출물과 열수추출물의 항균력을 평가하기 위해 Disc diffusion method를 시행하였다 [22]. Muller-Hinton medium을 사용하여 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*) 균주를 Shaking incubator(37°C, 500 rpm)에서 24시간 배양 후에 1회 계대배양하고 Spectrophotometer로 600 nm에서 Optical density(OD) 값을 0.5로 맞춘 뒤 실험을 진행하였다. 이 현탁액을 150  $\mu$ L씩 한천 평판배지에 접종 후 Spreader로 도말하였다. Reinforced Clostridial medium에 *Cutibacterium acnes*(*C. acnes*) 균주를 접종하였고, AnaeroGen™ 2.5 L Sachet(Thermo Scientific, USA)을 사용하여 혐기성 조건을 형성한 상태로, 37°C에서 72시간 배양 후에 1회 계대배양하여 Spectrophotometer로 600 nm에서 OD값을 0.5로 맞춘 뒤 실험을 진행하였다. 이 현탁액을 200  $\mu$ L씩 한천 평판배지에 접종 후 Spreader로 도말하였다. Positive control로 *S. aureus* 균주의 실험에서는 40 mg/mL의 Methyl paraben을, *C. acnes* 균주의 실험에서는 40 mg/mL의 Salicylic acid를 사용하였다.

#### 9. HPLC analysis

녹차의 유효 성분 중 EGCG, Caffeine을 분석하기 위해 HPLC 분석기를 통해 EGCG, Caffeine 동시 분석을 진행하였다. HPLC 기기는 Agilent사의 1100 series를 사용하였고, Shiseido사의 C18 Column(5  $\mu$ m, 4.6 (I.D.) $\times$ 250 mm)을 사용하였다. 각 시료당 20  $\mu$ L씩, 이동상의 유속을 1.5 mL/min으로 주입하였다. 이동상은 정제수/Acetonitrile (87:13 v/v)와 0.05% Trifluoroacetic acid(TFA)를 실험에 이용하였다. 30°C 온도조건에서 210 nm 파장으로, 각 시료 당 15분 동안 분석하였다[23].

##### 1) EGCG 함량 분석

유효 성분인 EGCG(Sigma aldrich, USA)를 0, 2500, 5000, 10000, 20000  $\mu$ g/mL 농도로 희석하여 표준곡선을 얻었으며, 감압증류추출물과 열수추출물을 각각 5 mg/mL로 정제수에 용해시킨 뒤에 0.2  $\mu$ m nylon filter를 사용하여 여과 후 분석에 사용하였다.

##### 2) Caffeine 함량 분석

유효 성분인 Caffeine(Sigma aldrich, USA)을 0, 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도로 희석하여 표준곡선을 얻었으며,

감압증류추출물과 열수추출물을 각각 500 µg/mL 농도로 정제수에 용해시킨 뒤에 0.2 µm nylon filter로 여과 후 분석에 사용하였다.

### 10. 통계처리

모든 실험은 각 세 번의 실험을 하였고, 실험에 의해 얻어진 세 번의 결과 값들을 Mean ± SD로 나타내었다. 항균실험 외에 SPSS 프로그램 18.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)으로 t-test를 실시하였고, p값이 0.05 미만일 때 값이 유의한 것으로 판단하였다.

## III. 실험 결과 및 고찰

### 1. 추출법에 따른 수율 측정

보성녹차 잎의 감압증류추출물과 열수추출물의 수율을 다음의 Table 1에 나타내었다.

표 1. 보성녹차 추출물의 수율  
 Table 1. Yield of CSV, CSW

Sample	Yield(%)
CSV	0.032
CSW	17.57

CSV: *Camellia sinensis* leaf vacuum distillation extract,  
 CSW: *Camellia sinensis* leaf hydrothermal extract.

### 2. 보성녹차추출물의 항산화 실험 결과

#### 1) DPPH radical scavenging assay

보편적으로 DPPH radical은 free radical과 반응력이 큰 물질일수록 쉽게 소거된다고 알려져있다[24]. 또한 알코올 용매에 안정적으로 용해되며 항산화 기작 중에 보라색의 DPPH radical이 전자를 받아 노란색으로 탈색되기 때문에 육안으로 항산화능을 짐작할 수 있다[25, 26]. 두 추출물 모두 농도의존적으로 radical 소거능이 증가함을 확인했으며, 감압증류추출물 500 µg/mL 농도에서 20.41 ± 0.24%, 열수추출물 50 µg/mL 농도에서 94.72 ± 0.05%로 가장 높은 소거능이 측정되었다(Figure 1).

#### 2) ABTS+ radical scavenging assay

청록색을 띠는 ABTS+ radical의 색이 없어지는 정도 측정하는 방법이다[27].

두 추출물 모두 농도의존적으로 ABTS+ radical 소거능이 증가하는 결과를 보였으며, 감압증류추출물의

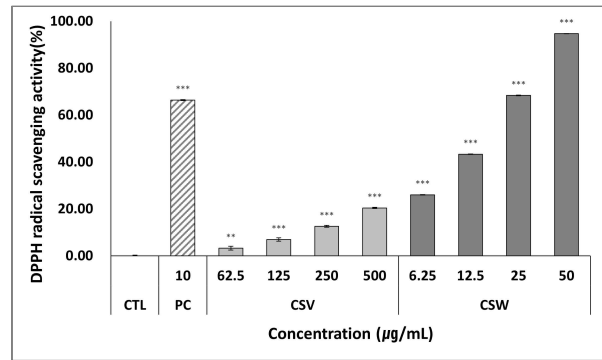


그림 1. 보성녹차 추출물의 DPPH radical 소거능(%)

Figure 1. DPPH radical scavenging activity of CSV, CSW Positive control: L-ascorbic acid 66.40 ± 0.21% (radical scavenging activity) at a concentration of 10 µg/mL, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs control, CTL: control, sample untreated group, PC: Positive control, CSV: *Camellia sinensis* leaf vacuum distillation extract, CSW: *Camellia sinensis* leaf hydrothermal extract.

250~500 µg/mL 농도에서 43.25 ± 0.24 ~ 69.18 ± 0.36% 소거능이 나타났다. 열수추출물의 5 µg/mL 농도에서 81.74 ± 0.29% 소거능이 확인되었다. 감압증류추출물과 열수추출물의 Inhibitory concentrations(IC) 50은 각각 326.35 µg/mL, 2.70 µg/mL로 나타났다(Figure 2). Jeong 등은 녹차 열수추출물 250 µg/mL 농도에서 92.09%의 radical 소거능이 나타났고, 15 µg/mL 농도에서 20% 이하의 radical 소거능이 나타났다고 보고하였다[28]. 이는 기존의 하동녹차 열수추출물 연구와 본 연구의 실험결과를 비교해볼 때, 보성에서 재배한 녹차 열수추출물 또한 천연 항산화제로 화장품에 이용되기에 충분함을 시사한다.

#### 3) SOD assay

체내에 활성산소가 쌓이게 되면 세포에 산화스트레스를 주어 세포손상을 유발한다[29]. SOD는 활성산소 중 하나인 Superoxide를 반응성이 낮은 O<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 바꾸어주는 촉매 역할을 하는 효소이다[20]. 농도의존적으로 SOD 유사활성능이 증가하였으며, 감압증류추출물의 160 µg/mL 농도에서 16.21 ± 2.17% SOD 유사활성능이 나타났고, 열수추출물의 40 µg/mL 농도에서 88.17 ± 1.20%로 SOD 유사활성능이 가장 높게 나타났다(Figure 3). Kim 등이 한 연구에서, 상황버섯 열수추출물과 에탄올추출물의 100 ~ 500 µg/mL 농도에서 각각 14.36 ± 2.38 ~ 17.19 ± 2.40%, 17.27 ± 1.58 ~ 18.87 ± 3.21%의 유사활성능을 보인 바가 있다. 감압증류추

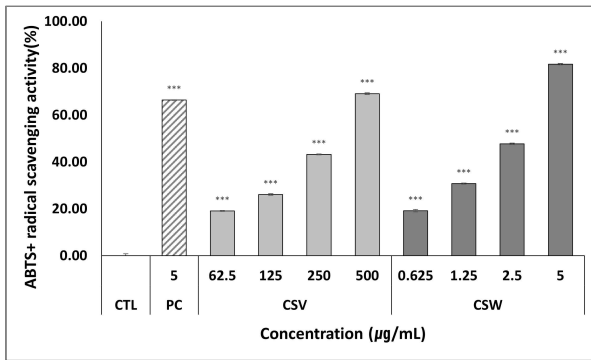


그림 2. 보성녹차 추출물의 ABTS+ radical 소거능(%)  
Figure 2. ABTS+ radical scavenging activity of CSV, CSW. Positive control: L-ascorbic acid  $66.45 \pm 0.16\%$  (radical scavenging activity) at a concentration of  $10 \mu\text{g/mL}$ ,  $***P < 0.001$  vs control, CTL: Control, sample untreated group, PC: Positive control, CSV: *Camellia sinensis* leaf vacuum distillation extract, CSW: *Camellia sinensis* leaf hydrothermal extract.

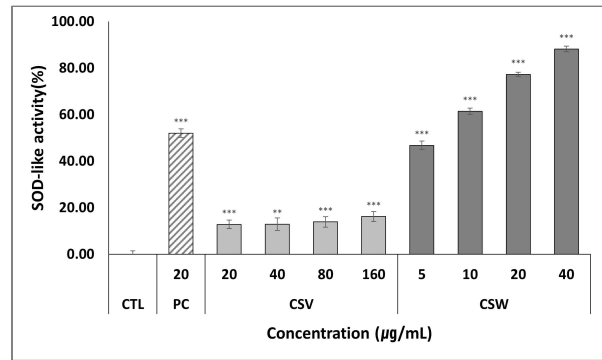


그림 3. 보성녹차 추출물의 SOD 유사활성능(%)  
Figure 3. SOD-like activity of CSV, CSW. Positive control: L-ascorbic acid  $52.03 \pm 1.80\%$  (SOD-like activity) at a concentration of  $20 \mu\text{g/mL}$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs control, CTL: Control, sample untreated group, PC: Positive control, CSV: *Camellia sinensis* leaf vacuum distillation extract, CSW: *Camellia sinensis* leaf hydrothermal extract.

출물은 기존 연구 추출물과 비슷한 유사활성능을 보였다. 상항버섯 열수추출물과 에탄올추출물의 IC50 값은 각각  $10000 \mu\text{g/mL}$  이상,  $3,829.13 \mu\text{g/mL}$ 으로 보고되었다. 녹차 열수추출물은 IC50 값이  $6.10 \mu\text{g/mL}$ 으로 산출되었고, 이는 기존의 보고된 추출물보다 낮은 농도에서 높은 SOD 유사활성능을 확인할 수 있었다. 이를 통해 감압증류추출물과 열수추출물 모두 화장품 천연소재로 사용할 수 있음을 시사한다[30].

#### 4) Total polyphenol content assay

폴리페놀 구조에는 다량의 히드록실기(-OH)를 포함하고 있어 쉽게 여러 화합물과 결합하는 특성을 지니기 때문에 항산화, 항염, 항암 효과를 발휘한다고 보고된다[29]. 즉, 직접적인 항산화능을 평가하는 실험이라기보다는 폴리페놀 함량을 정량함으로써 간접적으로 항산화능을 평가할 수 있는 방법이다[24]. 추출법에 따른 추출물의 총 폴리페놀 함량 결과는 다음의 Table 2에 나타내었다. 감압증류추출물에서  $8.92 \pm 0.10 \text{ mg GAE/g extract}$ , 열수추출물에서  $390.67 \pm 5.95 \text{ mg GAE/g extract}$ 이 함유되어 있었다(Table 2). Jeong 등이 실행한 국내 시판된 녹차 열수추출물의 선행연구에 의하면, 동일하게 Gallic acid로 표준곡선을 이용한 연구에서  $85.62 \pm 0.32 \text{ mg GAE/g extract}$ 로 측정되었다고 보고된다[28]. 이는 하동에서 재배된 녹차 열수추출물(5% v/w, 2시간)과 보성에서 재배된 녹차 열수추출물(3% v/w, 4시간)의 추출 방법에서, 원물의 양이 보성녹차가 적음에도 불구하고 ABTS+ radical scavenging

assay 결과와 총 폴리페놀 함량이 뛰어난 것을 미루어, 재배지와 추출 시간이 추출물의 항산화제 함량에 영향을 주었을 것으로 추측된다.

표 2. 보성녹차 감압증류추출물, 열수추출물에 함유된 총 폴리페놀 함량

Table 2. Total polyphenols of vacuum distillation and hydrothermal extracts from *Camellia sinensis* leaf

Sample	Total polyphenol content (mg GAE/g extract)
CSV	$8.92 \pm 0.10$
CSW	$390.67 \pm 5.95$

Values represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. CSV: *Camellia sinensis* leaf vacuum distillation extract, CSW: *Camellia sinensis* leaf hydrothermal extract.

#### 3. Elastase inhibition assay

Elastin은 진피 내 피부 탄성을 부여하는 기질 단백질이다. Matrix-metalloproteinases(MMPs)는 진피 내에 존재하는 피부노화를 촉진하는 단백질분해 효소이며, Collagenase, Gelatinase, Elastase 등으로 구성된다. 이 중 Elastase는 Elastin의 가수분해를 촉매하는 역할을 한다. 따라서 피부의 노화를 방지하기 위해 Elastase의 활성을 저해하는 것은 필수적이다[31]. 두 추출물 모두 농도의존적으로 Elastase의 활성 저해를 증가시키는 결과가 도출되었고, 감압증류추출물과 열수추출물의  $1000 \mu\text{g/mL}$  농도에서 Elastase 활성 저해능이 각각  $58.44 \pm 3.46\%$ ,  $52.37 \pm 3.13\%$ 로 가장 높게 나타났다(Figure 4). 감압증류추출물의 IC50 값은  $307.50 \mu\text{g/mL}$ , 열수추출물의 IC50 값은  $492.65 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다,

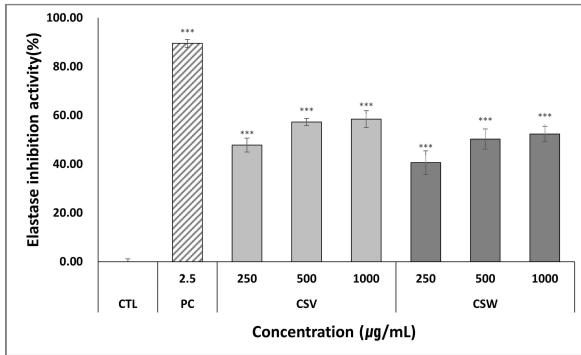


그림 4. 보성녹차 추출물의 Elastase 활성 저해능(%)  
 Figure 4. Elastase inhibitory activity of CSV, CSW  
 Positive control: *N*-Methoxysuccinyl-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-chloromethyl ketone 89.56 ± 1.64% (elastase inhibitory activity) at a concentration of 10 µg/mL, \*\*\*P<0.001 vs control, CTL: Control, sample untreated group, PC: Positive control, CSV: *Camellia sinensis* leaf vacuum distillation extract, CSW: *Camellia sinensis* leaf hydrothermal extract.

감압증류추출물이 더 낮은 농도에서 Elastase의 활성을 저해시키는 것으로 측정되었다. Kim 등은 상항버섯 열수추출물과 에탄올추출물의 Elastase 활성을 저해하는 IC<sub>50</sub> 값이 각각 8,861.52 µg/mL, 3,387.05 µg/mL로 보고하였다[30]. 이를 통해 녹차의 감압증류추출물과 열수추출물 기준에 보고된 천연추출물보다 뛰어난 주름 개선 기능성 소재로 사용할 수 있음을 시사한다.

#### 4. Mushroom tyrosinase inhibition assay

Cu<sup>2+</sup>를 포함한 Oxygenase 중 하나인 Tyrosinase는 멜라닌세포에서 멜라닌 합성 과정의 초기 단계를 촉매하는 효소이다[32]. Tyrosinase는 monophenols의 히드록실기(-OH)를 생성하고 o-diphenols을 o-quinones 구조로 산화시키는 역할을 한다[33]. 따라서 기미, 주근깨, 과색소침착을 방지하기 위해 Tyrosinase의 활성을 저해하는 것은 중요하다[21, 32].

농도의존적으로 Tyrosinase 활성 저해를 증가시켰으며, 감압증류추출물이 300 µg/mL 농도에서 활성 저해능이 78.66 ± 0.11%, 열수추출물이 300 µg/mL 농도에서 활성 저해능이 46.76 ± 0.11%로 가장 높게 나타났다(Figure 5). 감압증류추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 116.49 µg/mL으로 나타났으며, 열수추출물은 IC<sub>50</sub> 값이 300 µg/mL이상으로 나타났다. Korkmaz 등의 메탄올로 다양한 찻잎을 추출한 선행연구에 의하면 백차, 홍차 각각의 IC<sub>50</sub> 값이 181.97 µg/mL, 1000 µg/mL로 나타났다. 이는 녹차 감압증류추출물이 발효를 많이 시킨 백차추출물과

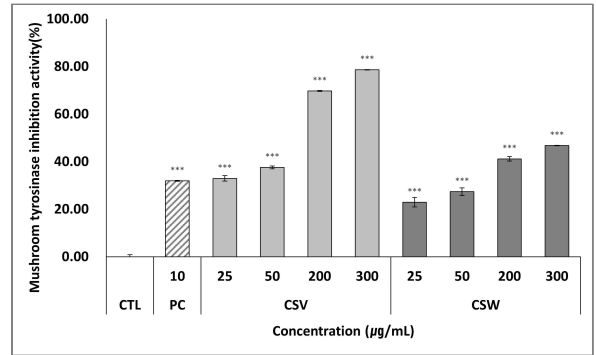


그림 5. 보성녹차 추출물의 Tyrosinase 활성 저해능(%)  
 Figure 5. Tyrosinase inhibitory activity of CSV, CSW.  
 Positive control: Kojic acid 31.91 ± 0.19% (tyrosinase inhibitory activity) at a concentration of 10 µg/mL, \*\*\*P<0.001 vs control, CTL: Control, sample untreated group, PC: Positive control, CSV: *Camellia sinensis* leaf vacuum distillation extract, CSW: *Camellia sinensis* leaf hydrothermal extract.

홍차추출물보다 더 높은 Tyrosinase 활성 저해를 보이며, 미백 기능성 유효성분으로 활용 가능성을 확인했다[34].

#### 5. 항균 실험 결과

Disc diffusion method는 항균 활성이 있는 추출물이 Disc 주변 한천 평판배지로 확산되면서 그 확산된 부위에 균이 자라지 못하는 저해영역의 지름을 측정하는 방법이다. 상대적으로 쉽게 다양한 균을 실험할 수 있으며, 하나의 균 단독으로 항균 활성을 측정할 수 있는 실험방법이다[35]. *S. aureus* 와 *C. acnes* 균주의 Disc diffusion method 실험 결과를 다음의 Table 3에 나타내었다. *S. aureus* 균주를 한천 평판배지에 접종하고 시료를 적신 Paper disc를 한천 평판배지에 올린 후 24시간 배양한 실험 결과, Methyl paraben 40 mg/mL 농도에서 9.67 ± 1.15 mm로 나타나고 열수추출물에서 Clear zone이 나타났다. 마찬가지로 *C. acnes* 균주를 한천 평판배지에 접종 후 시료를 적신 Paper disc를 한천 평판배지에 올린 후 72시간 배양한 실험 결과, Salicylic acid 40 mg/mL 농도에서 10.00 ± 1.00 mm로 나타났으며 열수추출물에서 Clear zone이 나타났다. 열수추출물 시료에서 농도의존적으로 Clear zone의 지름이 커지는 것도 확인할 수 있었다.

#### 6. HPLC analysis

녹차 추출물의 유효 성분인 EGCG와 Caffeine을 분석한 결과는 다음의 Table 4에 나타내었다.

열수추출물은 추출물 1g 당 약 4.02% EGCG를 함유하였고, 약 0.99% Caffeine을 함유하였다. 감압증류추출물은 추출물 1g 당 약 0.34%의 Caffeine을 함유하는 것으로 분석되었다. 항산화 효과를 나타낸다고 알려진 EGCG와 Caffeine 함량이 더 많이 함유된 열수추출물에서 감압증류추출물에 대비해서 항산화 실험 결과가 우수하게 나타나는 경향이 나타났다.

표 3. 보성녹차 추출물의 clear zone 지름 측정 결과  
Table 3. The result of clear zone diameter of CSV, CSW

Strain	Conc (mg/mL)	Clear zone(mm)			
		CTL	PC	CSV	CSW
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	-	-	-	9.67 ± 0.57
	40	-	9.67 ± 1.15 <sup>a</sup>	-	10.33 ± 0.57
<i>Cutibacterium acnes</i>	20	-	-	-	11.33 ± 1.15
	40	-	10.00 ± 1.00 <sup>b</sup>	-	13.00 ± 2.64

Values represent the mean ± SD of three independent experiments, Conc: Concentration(mg/mL), CTL: Control, sample untreated group, PC: Positive control, a: Methyl paraben, b: Salicylic acid, CSV: *Camellia sinensis* leaf vacuum distillation extract, CSW: *Camellia sinensis* leaf hydrothermal extract.

표 4. 보성녹차의 추출법 따른 EGCG, Caffeine 분석 결과  
Table 4. The analysis result of the contents of EGCG, caffeine containing *Camellia sinensis* leaf extracts from Boseong according to extraction method

	EGCG(mg/g)	Caffeine(mg/g)
CSV	0.00	3.40
CSW	40.29	9.94

#### IV. 결 론

본 연구에서는 보성녹차의 감압증류추출물과 열수추출물의 항산화, 항주름, 미백, 항균 실험을 진행하여 다양한 생리활성능이 있는지 확인하였다. 또한 HPLC 분석을 통해 녹차의 유효 성분인 EGCG와 Caffeine을 정량적으로 분석하였다.

항산화 실험 결과, DPPH radical, ABTS+ radical 소거능 실험과 SOD 유사활성능 평가에서 열수추출물이 전반적으로 뛰어난 radical 소거능과 SOD 유사활성능을 보였으며, 총 폴리페놀 함량 또한 열수추출물이 감압증류추출물에 비해 많이 함유되었다. HPLC 분석 결과, 열수추출물에 EGCG와 Caffeine 함량이 더 많이 함유된 것으로 분석되었다. 이는 항산화 효과를 나타낸다고 알려진 EGCG와 Caffeine을 더 많이 함유한 열수추출물에서 항산화 효과가 높게 나타나는 경향성을 보였다.

주름개선 실험 결과, 감압증류추출물과 열수추출물의 IC50 값은 각각 307.50 µg/mL, 492.65 µg/mL로 나타났다. 즉, 감압증류추출물이 더 낮은 농도로 나타났다. 즉, 감압증류추출물이 Elastase 활성을 더 낮은 농도에서 저해시킬 수 있었다. 미백 실험 결과, 감압증류추출물의 IC50 값이 116.49 µg/mL로 평가되었고, 열수추출물은 IC50 값이 300 µg/mL 이상으로 나타났다. 기존에 연구된 천연물과 비교 시, 높은 Elastase와 Tyrosinase 활성 저해도를 보였다.

보성녹차 감압증류추출물은 주름개선, 미백 효능에서 탁월한 결과를 나타내었으며, 보성녹차 열수추출물은 항산화능과 항균효과에서 우수한 결과를 나타내었다. 따라서 화장품에 기능성 천연소재를 사용자가 원하는 기능성에 따라 추출법을 선택하여 다양한 기능성 제품에 적용시킬 수 있을 것으로 사료된다.

#### References

- [1] M. G. Kim, S. I. Park, G. M. An, S. H. Heo, and M. S. Shin, "Physiological Activity of Supercritical *Poria cocos* back Extract and Its Skin Delivery Application using Epidermal Penetrating Peptide," *Journal of the Korean Applied Science and Technology(KOCS)*, Vol. 36, No. 3, pp. 766-778, September 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2019.36.3.766>
- [2] Y. Yoo, "Air pollution and childhood allergic disease," *Allergy Asthma Respir Dis(AARD)*, Vol. 4, No. 4, pp. 248-256, July 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.4168/aard.2016.4.4.248>
- [3] H. S. Byun, Y. S. Um, I. H. Hur, S. Y. Sim, and K. J. Kim, "The Quality of Life of Skin Disease Patients, Particularly Acne Patients," *Journal of Korean Medicine Ophthalmology and*



- Otolaryngology and Dermatology(JKOOD), Vol. 19, No. 1, pp. 65–75, April 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.6114/jkood.2014.27.3.026>
- [4] B. G. Lee, J. H. Kim, S. G. Ham, and C. E. Lee, “Study on Biological Activities of Extracts for Cosmeceutical Development from Lagerstroemia indica L. Branch,” Korean Journal of Plant Resources(KJPR), Vol. 27, No. 1, pp. 029–034, February 2014. DOI: <https://doi.org/10.7732/kjpr.2014.27.1.029>
- [5] K. H. Shim, H. S. Young, T. W. Lee, and J. S. Choi, “Studies on the Chemical Components and Antioxidative Effect of Solanum lyratum Thunb,” Korean Journal of Pharmacognosy(KSP), Vol. 26, No. 2, pp. 130–138, June 1995.
- [6] H. J. Lee, and S. N. Park, “Antioxidative Effect and Active Component Analysis of Quercus salicina Blume Extracts,” Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea(SCSK), Vol. 37, No. 2, pp. 143–152, June 2011. DOI: <https://doi.org/10.15230/SCSK.2011.37.2.143>
- [7] S. I. Park, G. M. An, M. G. Kim, S. H. Heo, and M. S. Shin, “Physiological Activity of Magnolia kobus A. P. DC. Leaf Extracts and Enhancement of Skin Permeation Using PCL-PEG Polymer Micelle and Cell Penetrating Peptide,” Journal of Investigative Cosmetology (KSIC), Vol. 15, No. 3, pp. 255–262, September 2019. DOI: <https://doi.org/10.15810/jic.2019.15.3.004>
- [8] B. S. Hwang, Y. S. Jeong, S. M. Oh, G. C. Kim, Y. S. Cho, and I. G. Hwang, “Catechin Contents of Green Tea Produced in Korea”, The Korean Society of Food Science and Nutrition(JKSFSN), Vol. 47, No. 8, pp. 857–862, August 2018. DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2018.47.8.857>
- [9] J. H. Kang, Y. K. Park, S. T. Chung, and K. H. Row, “Extraction and Purification of EGCG(Epigallocatechin Gallate) from Green Tea,” The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering(KSBB), Vol. 14, No. 5, pp. 517–522, October 1999.
- [10] S. H. Kim, D. S. H, and J. D. Park, “Changes of Some Chemical Compounds of Korean (Posong) Green Tea according to Harvest Periods,” Korean Journal of Food Science and Technology(KJFST), Vol. 36, No. 4, pp. 542–546, August 2004.
- [11] Z. Wu, L. Xie, Y. Li, Y. Wang, X. Wang, N. Wan, X. Huang, X. Zhang, and M. Yang, “A novel application of the vacuum distillation technology in extracting Origanum vulgare L. essential oils,” Industrial Crops & Products(Ind. Crops. Prod.), Vol. 139, No. 32, pp. 1–8, November 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111516>
- [12] M. A. Falcao, A. L. B. Fianco, A. M. Lucas, M. A. A. Pereira, F. C. Torres, R. M. F. Vargas, and E. Cassel, “Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of lemongrass essential oil,” Phytochemistry reviews(Phytochem. Rev.), Vol. 11, No. 4, pp. 405–412, September 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9255-3>
- [13] K. H. Musa, A. Abdullah, B. Kuswandi, and M. A. Hidayat, “A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity,” Food Chemistry(Food Chem.), Vol. 141, No. 4, pp. 4102–4106, December 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.112>
- [14] O. P. Sharma, and T. K. Bhat, “DPPH antioxidant assay revisited,” Food Chemistry (Food Chem.), Vol. 113, No. 4, pp. 1202–1205, April 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- [15] S. B. Kedare, and R. P. Singh, “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay,” Association of Food Scientists & Technologists (India)(AFST(I)), Vol. 48, No. 4, pp. 412–422, July - August 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- [16] K. Sirivibulkovit, S. Nouanthavong, and Y. Sameenoi, “Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis,” The Japan Society for Analytical Chemistry(JSAC), Vol. 34, No. 7, pp. 795–800, July 2018. DOI: <https://doi.org/10.2116/analsci.18P014>
- [17] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Riceevans C. “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,” Free Radical Biology & Medicine(FRBM), Vol. 26, No. 9/10, pp. 1231–1237, May 1999.
- [18] S. MARKLUND, and G. MARKLUND, “Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase,” European Journal of Biochemistry(EJB), Vol. 47, No. 3, pp. 469–474, September 1974. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- [19] A. R. Kim, “Applied study of functional cosmetics

- regarding anti-oxidants, the anti-wrinkles and the anti-bacterial effect of coffee grounds extract,” Master’s Thesis Dissertation, Eulji University, Jung-gu, Daejeon, Republic of Korea, 2016.
- [20]M. J. Kim, and E. J. Park, “Feature Analysis of Different In Vitro Antioxidant Capacity Assays and Their Application to Fruit and Vegetable Sample,” *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition (JKSFSN)*, Vol. 40, No. 7, pp. 1053–1062, July 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.7.1053>
- [21]O. VALLISUTA, V. NUKOOLKARN, A. MITREVEJ, N. SARISUTA, P. LEELAPORNPI SID, A. PHRUTIVORAPONGKUL, and N. SIN CHAIPANID, “In vitro studies on the cytotoxicity, and elastase and tyrosinase inhibitory activities of marigold (*Tagetes erecta* L.) flower extracts,” *Experimental and Therapeutic Medicine(Exp. Ther. Med.)*, Vol. 7, No. 1, pp. 246–250, October 2014. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1373>
- [22]M. O. Ko, H. J. Kang, J. H. Hwang, and K. W. Yang. “Screening of the antibacterial effects by ethanol extracts from natural plant in Jeju against *Propionibacterium acnes*,” *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea(SCSK)*, Vol. 44, No. 1, pp. 59–66. March 2018. DOI: <https://doi.org/10.15230/SCSK.2018.44.1.59>
- [23]T. Theppakorn, and S. Wongsakul, “Optimization and Validation of the HPLC-Based Method for the Analysis of Gallic acid, Caffeine and 5 Catechins in Green Tea,” *Naresuan University Journal(NUJST)*, Vol. 20, No. 2, pp. 1–11, May–August 2012.
- [24]G. M. An, “Epidermal Permeation Experiment and Cosmetic Material Development using Polymer Micelle (PCL-PEG) Formulation of Red pinus densiflora and *Petroselinum crispum* extract,” Master’s Thesis Dissertation, Eulji University, Jung-gu, Daejeon, Republic of Korea, 2020.
- [25]C. I. Park, and G. H. Park, “Antioxidant and Anti-wrinkling Effects of Extracts from *Nelumbo nucifera* leaves,” *The Korea journal of herbology(Kor. J. Herbol.)*, Vol. 31, No. 4, pp. 53–60, July 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2016.31.4.53>.
- [26]M. G. Kim, “A Study on physiological activity and percutaneous permeability Enhancement of Supercritical *Centella asiatica* Extract obtained by optimal temperature process,” Master’s Thesis Dissertation, Eulji University, Jung-gu, Daejeon, Republic of Korea, 2020.
- [27]I. Jasprica, M. Bojic, A. Mornar, E. Besic, K. Bucan, and M. Medic-Saric, “Evaluation of Antioxidative Activity of Croatian Propoli Samples Using DPPH· and ABTS·+ Stable Free Radical Assays,” *Molecules(Mol.)*, Vol. 12, No. 5, pp. 1006–1021, May 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/12051006>
- [28]C. H. Jeong, S. T. Kang, O. S. Joo, S. C. Lee, Y. H. Shin, K. H. Shim, S. H. Cho, S. G. Choi, and H. J. Heo, “Phenolic Content, Antioxidant Effect and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Korean Commercial Green, Puer, Oolong, and Black Teas,” *The Korean Society of Food Preservation((KoSFoP)*, Vol. 18, No. 2, pp. 230–237, April 2009.
- [29]E. J. Kim, J. Y. Choi, M. R. Yu, M. Y. Kim, S. H. Lee, and B. H. Lee, “Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants,” *Korean Journal of Food Science and Technology(KJFST)*, Vol. 44, No. 3, pp. 337–342, June 2012. DOI: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2012.44.3.337>
- [30]J. O. Kim, M. J. Jung, H. J. Choi, J. T. Lee, A. K. Lim, J. H. Hong, and D. I. Kim, “Antioxidative and Biological Activity of Hot Water and Ethanol Extracts from *Phellinus linteus*,” *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition(JKSFSN)*, Vol. 37, No. 6, pp. 684–690, June 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.6.684>
- [31]H. J. Lee, and S. N. Park, “Antioxidative Effect and Active Component Analysis of *Quercus salicina* Blume Extracts,” *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea(SCSK)*, Vol. 37, No. 2, pp. 143–152, June 2011. DOI: <https://doi.org/10.15230/SCSK.2011.37.2.143>
- [32]A. Adhikari, H. P. Devkota, A. Takano, K. Masuda, T. Nakane, P. Basnet, and N. Skalko-Basnet, “Screening of Nepalese crude drugs traditionally used to treat hyperpigmentation: in vitro tyrosinase inhibition,” *International Journal of Cosmetic Science(IJSC)*, Vol. 30, No. 5, pp. 353–360, October 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00463.x>
- [33]L. P. Xie, Q. X. Chen, H. Huang, H. Z. Wang, and R. Q. Zhang, “Inhibitory Effects of Some Flavonoids on the Activity of Mushroom Tyrosinase,”

- Biochemistry(Moscow)(Biochem. (Mosc.)), Vol. 68, No. 4, pp. 487-491, April 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1023620501702>
- [34]N. Korkmaz, S. O. Sener, S. Akkaya, M. Badem, R. Aliyazicioglu, M. Abudayyak, E. Oztas, and U. Ozgen, "Investigation of antioxidant, cytotoxic, tyrosinase inhibitory activities, and phenolic profiles of green, white, and black teas," Turkish Journal of Biochemistry(TJB), Vol. 44, No. 33, pp. 278-288, July 2019. DOI: <https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0345>
- [35]J. J. BIEMER, "Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method," Annals of Clinical and Laboratory Science(ACLS), Vol. 3, No. 2, pp. 135-140, March-April 1973.

※ 본 연구는 2017년도 과기정통부의 재원으로  
한국연구재단 바이오·의료기기개발사업의 지  
원을 받아 수행되었음 (No. 2017M3A9D80  
48416).