

해죽순 추출물의 미백활성 평가

김일출[†]

중부대학교 바이오화장품전공
(2022년 2월 20일 접수: 2022년 5월 24일 수정: 2022년 6월 30일 채택)

Evaluation on the Whitening Effect of *Nypa fruticans wurmb* Extracts

Il-Chool Kim[†]

Dept. of Bio-Cosmetic Science Joongbu University
(Received February 20, 2022; Revised May 24, 2022; Accepted June 30, 2022)

요 약 : 본 연구에서는 화장품 천연소재로서 해죽순 열수 추출물의 이용 가능성을 확인하였다. tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 1,000 µg/mL에서 52.0%의 활성을 나타내었다. 세포 생존율을 MTT 분석법으로 확인한 결과 멜라노마 세포(B16F10)의 농도 구간이 100 µg/mL 일 때 84.8%의 생존율을 보였다. Western blot을 통한 단백질 발현 억제 효과를 측정하기 위해 25, 50, 100 µg/mL 농도의 해죽순 열수 추출물과 β-actin을 사용하였다. 그 결과, MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현양이 100 µg/mL에서 70.7%, 83.3%, 45.7%, 45.9%로 억제됨을 확인하였다. 따라서 해죽순 열수 추출물의 미백효과가 우수함을 확인하였고, 해죽순 열수 추출물의 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

주제어 : 해죽순, 천연소재, 티로시나제, 세포생존, 미백

Abstract : The purpose of this study was to investigate the role of the *Nypa fruticans* extracts as a cosmetic additive. The tyrosinase inhibitory effects showed 52.0% at 1,000 µg/mL concentration. A cell viability test, measured on melanoma cell (B16F10) hot water extract of *nypa fruticans* showed 84.8% at 100 µg/mL concentration. The protein expression inhibitory effects of *nypa fruticans* extracts were measured by western blot at 25, 50, 100 µg/mL concentration and the β-actin. Results showed that the expression inhibition rates of the MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase protein were decreased by 70.7%, 83.3%, 45.7%, 45.9% at 100 µg/mL concentration, respectively. It was concluded that *nypa fruticans* extracts had the whitening effects and thus could be applied for cosmetics as a natural ingredient.

Keywords : *Nypa fruticans*, Natural ingredient, Tyrosinase, Cell viability, Whitening

[†]Corresponding author
(E-mail: ickim@joongbu.ac.kr)

1. 서론

소비자들의 가치관과 생활양식의 변화에 의해 화장품에 대한 소비자들의 인식과 기능 및 구매 형태는 다양하게 변화되었다. 과거에는 아름다움과 청결 등 단순한 멋의 추구하고 화장품에 대한 안정성을 고려했다면 최근 생활수준의 향상으로 피부미용 및 미백에 대한 관심뿐만 아니라 고기능성 다기능성을 지닌 미백, 항주름, 항노화 같은 기능성 화장품에 대한 관심이 늘고 있는 추세이다[2]. 특히 천연물에 함유된 유용성분들의 다양한 효능이 알려지면서 고부가 가치의 기능성 천연신소재로서 가능성을 주목하고 있으며 이러한 식물자원들은 단순히 인간의 수명연장을 넘어서 건강한 삶과 활동을 유지하려는 현대인들에게 노화를 예방하고 질병 예방, 건강 유지에 도움을 줄 수 있는 천연자원으로 인식되고 있다[3]. 외인성 피부노화의 주된 요인은 자외선에 의한 광노화이다[4]. 피부가 자외선에 노출되면 활성산소가 증가되어 하게 된다. 이로 인해 free radical이 생성되는 과정에서 세포 및 조직이 손상되며 단백질 분해가 일어나 피부의 항산화 방어 체계가 균형을 잃게 됨으로서 지질, 단백질, DNA 등의 산화가 일어나 궁극적으로 주름, 색소침착 등 피부 노화를 일으킨다[5,6]. 미백 효과를 검증하기 위해서는 keratinocyte에 있는 melanin 분포량에 따라 피부의 색소가 침착되고 피부색까지 결정되기 때문에 melanin 형성을 억제하는 것이 가장 중요하다. 현재 알려진 미백 원료로는 arbutin, kojic acid, ascorbic acid 등이 있으나 수용성 상태에서 분해되어 세포로 투과되거나 유전 독성 혹은 발암 유발 등의 문제점이 대두되고 있어 는 천연물로부터 미백 소재를 탐색하는 연구가 끊임없이 시도되고 있다[7].

해죽순은 바다에서 자라는 죽순이라 뜻으로 새순의 모양이 우리나라 죽순과 비슷하여 붙여진 이름으로 해안갯벌이나 맹그로브 지대 등의 습지에서 자라는 야자나무과 식물로 학명은 니파야자 (*Nypa fruticans* Wurm)이다[8,9]. 예로부터 해죽순의 잎, 줄기, 뿌리는 천식, 나병, 결핵, 간질환의 치료제, 진정제, 치아 염증 치료 등에 이용되어 왔다[10]. 최근 연구에 따르면 해죽순에는 Chlorogenic acid, protocatechuic acid, kaempferol과 같은 다량의 페놀산과 플라보노이

드를 함유하고 있고 그에 따라 항산화 효과 및 콜레스테롤 억제 효과가 뛰어나 의학적 목적 뿐만 아니라 식재료로도 이용되고 있다[11-13].

최근 국내에서도 해죽순의 생리활성 효능이 주목 받기 시작하면서 이를 이용한 다양한 기능성 화장품의 개발이 시도되고 있어 제품화에 응용할 수 있는 기초 연구 자료가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 화장품의 기능성 측면에서 매우 중요하다고 판단되는 해죽순의 미백활성 효능 검증을 통해 각종 기능성 화장품 개발의 기초자료로 제시하고자 한다.

2. 실험

2.1. 공시재료

본 실험에서 사용된 해죽순(*Nypa fruticans wurmb*)은 보성허브(Bosengherb Co., Ltd, Seoul, Korea)에서 구입하여 이물질들을 전부 제거 및 건조 후에 실험재료로 사용하였다. 건조 해죽순 100 g에 증류수 2,000 mL를 가하여 10 0°C에서 4시간 냉각순환 추출해 얻은 액을 흡입 여과한 후 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 해죽순 추출물 25.4 g을 냉동보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2.2. Tyrosinase 저해활성 측정

해죽순 추출물의 미백 활성을 검토하기 위해 분석한 tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등[14]의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 ml 10 mM L-DOPA(Sigma, U.S.A) 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (Sigma, U.S.A) 100 U/ mL을 첨가하여 37°C에서 2 min간 반응시켜서 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm파장에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

저해율(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무 첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.3. 세포 배양

본 실험에 이용한 melanoma cell인 B16F10는 ATCC (USA)에서 구입하여 사용하였다. 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

2.4. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

MTT assays는 Carmichael의 방법[15]에 따라 실시하였다. 멜라노마 세포(B16F10) 96 cell plate에 1×10⁵ cells/well을 180 μL씩 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 20 μL 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 2.5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 40 μL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 100 μL를 가하여 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

세포 생존율(%)=

$$\left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{무 첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.5. Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase, ERK, p-ERK, CREB, p-CREB 미백 관련 인자들의 활성을 알아보기 위해 cell line B16F10을 100 mm tissue culture dish에 cell seeding 후 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24~48시간 배양한 후 PBS로 2회 세척해 주었다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 mL에 complete mini 1 tab를 가한 100 μL로 용해한 후 4°C 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하였으며, 20 μL의 단백질을 10% SDS-PAGE 상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane에 옮겨 blocking buffer (5% skim milk TBST)을 제조한 후 실온에서 1시간 blocking을 실시하였

다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night 후 다시 10분 간격으로 tris-buffered saline and tween 20(TBST)으로 3회 세척하고 2차 항체를 1:1,000로 희석하여 실온에서 2시간 반응하였다. 3회 세척한 후 Davinch-ChemiTM Imager CAS-400SM 기기를 사용하여 밴드 확인을 하였다.

2.6. Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포의 cell seeding은 100 mm culture dish에 1×10⁶ cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거 후 trizol lysis buffer를 well에 1 mL씩 분주하였고, 세포를 lysis한 후 chloroform 200 μL를 분주하여 20초간 반응시켰다. 그 후 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 μL과 1:1 튜브에 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water를 각 튜브에 1 mL씩 분주하여 13,200 rpm에서 2분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여 실온에서 건조시켰다. Diethylpyrocarbonate water(DEPC water) 50 μL로 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 μL와 멸균수 195 μL를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA 양을 측정하였다. 추출한 RNA 2 μg, Oligo(dT) 15 primer (500 μg/mL) 1 μL, nuclease free water로 10 μL를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 후 5× reaction buffer, MgCl₂, reverse transcriptase, nuclease free water, PCR nucleotide mix, recombinant rnasinribonuclease inhibitor를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

2.7. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

MITF(Microphthalmia-associated transcription factor), TRP-1(Tyrosinase-related protein 1), TRP-2(Tyrosinase-related protein 2), tyrosinase의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 polymerase chain reaction(PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 Go Flexi DNA polymerase, primer, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후

PCR을 실행하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 94°C에서 30초, 55°C에서 45초, 72°C에서 45초(35 cycles), tyrosinase는 94°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C 45초(40 cycles), TRP-1, TRP-2, MITF는 94°C에서 30초, 58°C에서 45초, 72°C에서 45초(40 cycles)을 하였으며, PCR로 합성 시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 40분간 전기영동 후 UV transilluminator를 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

2.8. 통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS10.0 (Evanston, IL, USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(analysis of variance ANOVA)을 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Tyrosinase 저해활성 측정 결과

Tyrosinase는 melanin 생성 초기에 관여하는 산화 효소로 L-tyrosine을 L-DOPA로 전환하고 DOPA quinone으로 산화시켜 melanin을 생성한다[16]. 따라서 tyrosinase의 DOPA 산화반응에 대한 활성 저해를 측정하여 미백 효과를 확인할 수 있으며 tyrosinase 억제제를 찾는 방향으로 미백에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 해죽순

추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 해죽순 추출물의 경우 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 52.0% 이상의 저해 효과를 나타내었다. 이는 제주산 식물인 자리공열매뿌리, 비파, 녹나무의 Et-AC분획물이 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 14.47%, 7.04%, 3.39%의 저해활성을 나타 낸 것[17]과 은행나무 종자 에탄올 추출물이 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 가죽나무 뿌리, 줄기, 잎의 물 추출물이 2 mg/mL의 농도에서 39.5%의 효과를 나타내었다는 연구결과[18]와 비교하였을 때 해죽순 추출물의 tyrosinase 저해활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

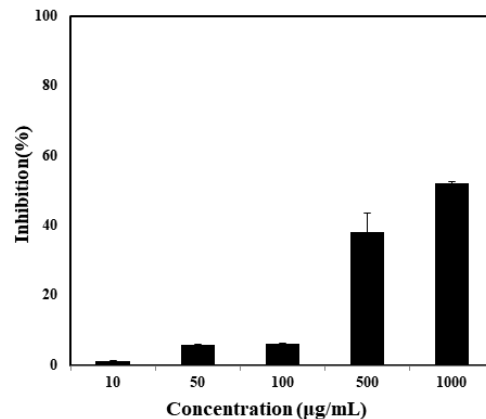


Fig. 1. Inhibition rate of *Nypa fruticans* wurbm extracts on tyrosinase.

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR

Gene	Prime	Sequence(5' → 3')
MITF	Forward	AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG
	Reverse	TAG CTC CTT AAT GCG GTC GT
TRP-1	Forward	ACT TCA CTC AAG CCA ACT GC
	Reverse	AGC TTC CCA TCA GAT GTC GT
TRP-2	Forward	GCT CCA AGT GGC TGT AGA CC
	Reverse	AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC
GAPDH	sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC

3.2. MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정에 많이 이용되고 있는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석은 살아있는 세포에서 대사가 활발한 미토콘드리아의 탈수소효소 능력을 이용하는 방법으로 cell proliferation과 viability의 in vitro 분석에 매우 유용하게 사용되고 있는 방법 중 하나이다. 노란색을 띠는 수용성 기질의 MTT가 미토콘드리아의 탈수소효소 작용으로 환원되면 파란색의 비수용성 formazan을 형성하는데 이때 형성된 파란색 formazan의 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정 가능하다[19]. 해죽순 추출물의 세포 생존율을 측정한 결과 Fig. 2에 나타낸 결과와 같이 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였음을 확인할 수 있었다. 따라서 멜라노마 세포 (B16F10)에서의 미백 관련 인자측정은 세포의 농도를 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 하여 실험을 실시하였다.

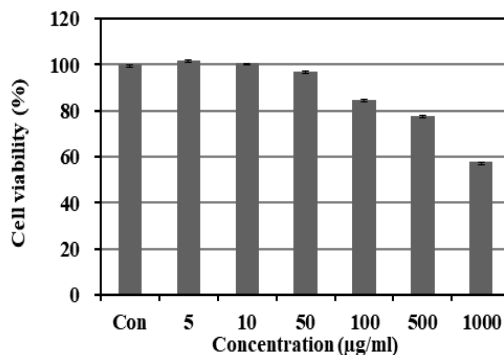


Fig. 2. Cell viability of *Nypa fruticans* wurb extracts on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^5 cells) were started in serum free medium for 1h the cells were treated with 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of *Nypa fruticans* wurb extracts for 24 h. Results are means \pm S.D. of triplicate data.

3.3. MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향 측정

Tyrosinase 효소는 melanin 생합성과 관련된 효소이면서 melanin 생합성 경로를 조절하는 중요한 역할을 한다. 따라서 피부의 melanin 색소를 생성하는 효소인 tyrosinase의 저해 활성을 측

정함으로써 다양한 잠재적 미백 소재의 발굴이 가능하다. 이에 단백질 발현과 연관성이 있는지 보기위해 미백관련 전사인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase를 이용한 Western blot을 통해 관련 단백질 발현량의 변화를 확인하였다 (Fig. 3). B16F10 mouse melanoma cell에 추출물을 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 처리한 후 control은 α -MSH를 처리하여 멜라닌을 과발현시켰으며, normal은 α -MSH를 처리하지 않는 구간으로 설정하였다. 이때 단백질 발현량을 비교하기 위하여 세포의 여러 종류나 조건에서도 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β -actin을 positive control로 사용하였다. 그 결과, 해죽순 추출물을 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 처리한 B16F10군에서 α -MSH에 의해 증가된 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현량이 해죽순 추출물을 처리하지 않은 군 보다 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 한편 멜라닌합성 주 효소인 tyrosinase 내 Cu^{2+} 와 착염을 형성함으로써 멜라닌 생합성을 저해하거나, DOPA chrome tautomerase와 DHICA oxidase에 간섭하여 멜라닌 형성을 억제한다고 알려져 화장품 미백제로 많이 사용되어지는 kojic acid[20]와 비교하였을 때 tyrosinase의 단백질 발현양에서 특히 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

3.4. MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase mRNA 발현에 미치는 영향 측정

RT-PCR을 통해 혼합 추출물이 melanin 합성에 관계된 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase에 미치는 mRNA 발현 억제 효과를 알아보기 위하여 mouse melanoma cell (B16F10)에 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 추출물을 농도별로 처리한 후 24시간 뒤에 mRNA 발현량을 측정하여 그 결과를 Fig. 4와 같이 나타내었다. Control은 α -MSH를 처리하여 멜라닌을 과발현시키고, normal은 α -MSH를 처리하지 않는 구간으로 설정하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. 그 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 열수 추출물을 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 B16F10에서 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 mRNA 발현이 추출물의 농도가 증가함에 따라서 억제됨을 확인하였으며 대조군인 kojic acid와 비교했을 때 특히 TRP-1와 tyrosinase에서 우수한

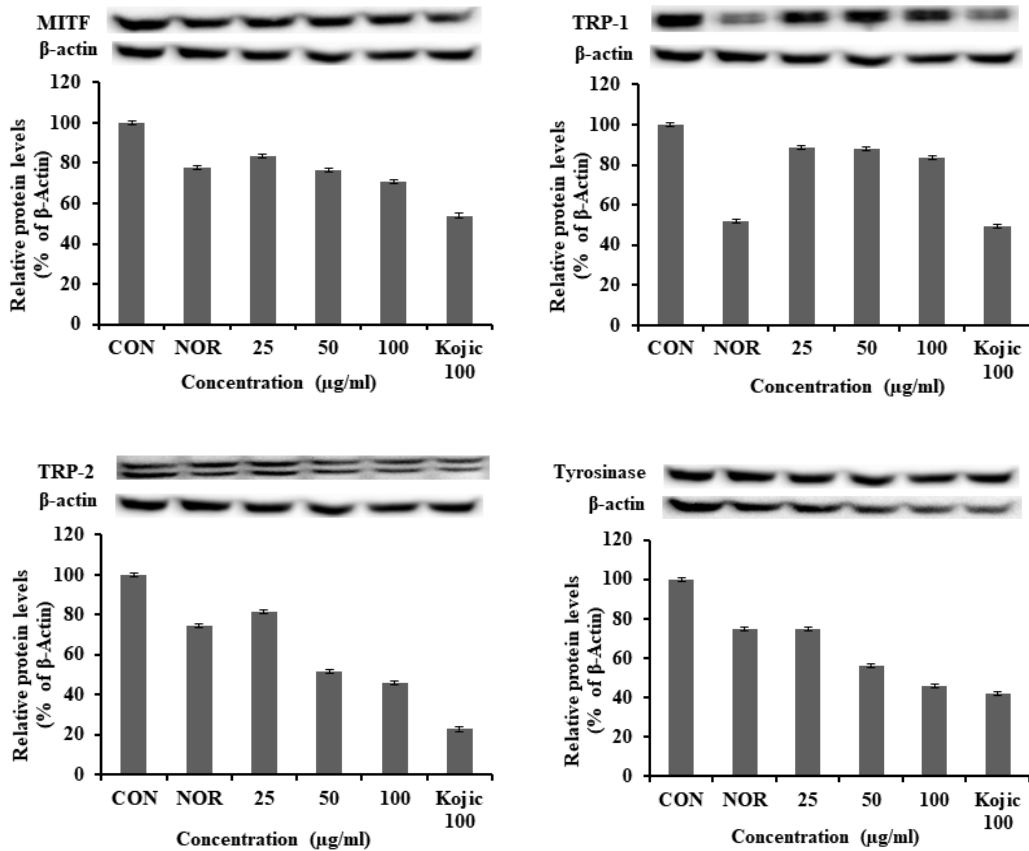


Fig. 3. MITF, tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 mRNA expression rate of *Nypa fruticans* wurbm extracts on melanoma cell(B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1h the cells were treated with 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of *Nypa fruticans* wurbm extracts for 48 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

억제능을 확인할 수 있었다. 이는 MITF의 발현이 억제됨에 따라 tyrosinase, TRP-1의 단백질 발현이 감소되어 멜라닌 생성 억제로 이어지는 것이라고 판단할 수 있다[21]. 따라서 해죽순 열수추출물을 이용하여 미백 관련 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 활성을 조절하고, MITF의 발현을 억제할 수 있는 연구 결과를 통해 미백 소재로서의 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

4. 결론

본 연구에서는 해죽순 추출물의 미백 효능 소재로서의 가능성을 평가하기 위해 해죽순 열수추출물을 이용하여 tyrosinase 저해활성 특징, B16F10 mouse melanoma 세포에 대한 미백효과를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

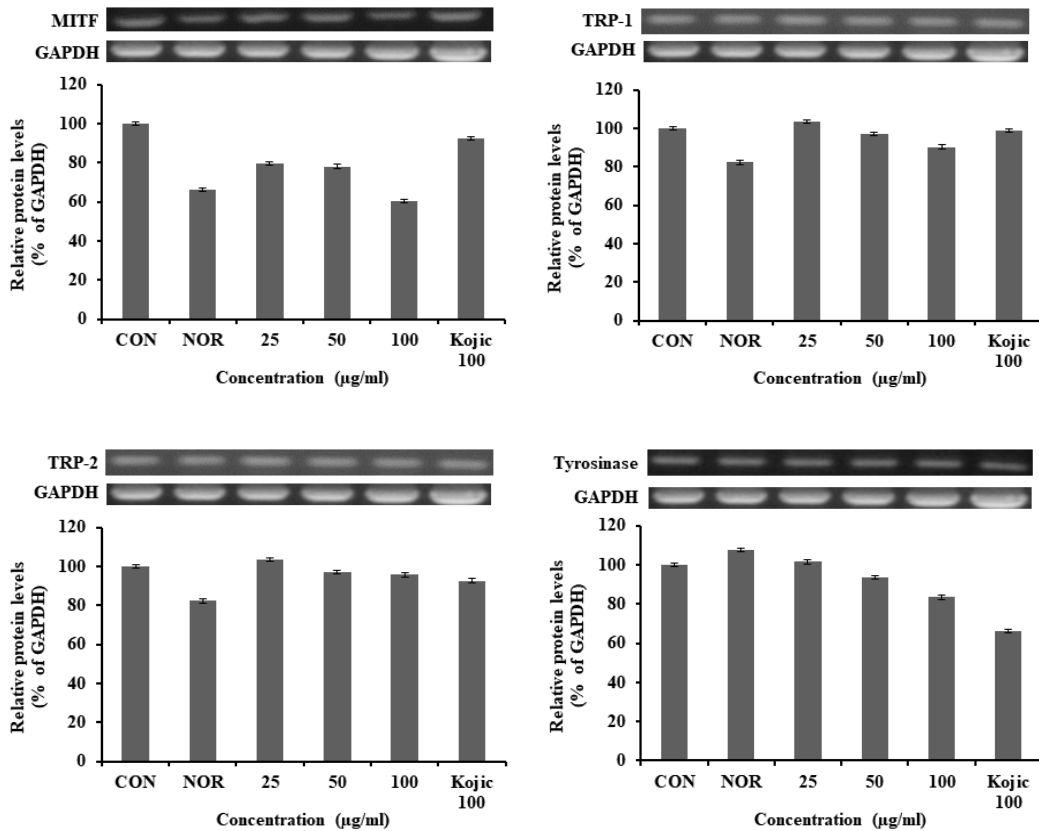


Fig. 4. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase mRNA expression rate of *Nypa fruticans* wurmb extracts on melanoma cell(B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1h the cells were treated with 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of *Nypa fruticans* wurmb extracts for 48 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

1. 해죽순 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정할 결과 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가하는 것을 확인하였고 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 52.0%의 효과를 나타내어 해죽순 추출물의 tyrosinase 저해활성이 우수한 것으로 확인할 수 있었다. .

2. 세포 생존율을 MTT 분석법을 통해 확인한 결과 농도 구간이 100 $\mu\text{g/mL}$ 일때 84.78%의 생존율을 보였으며, 따라서 관련 실험을 세포생존율이 80% 이상인 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 진행

하였다. B16F10 세포에 해죽순 추출물을 처리한 결과 MITF, TRP-2의 단백질 발현양이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, TRP-1과 tyrosinase 발현양이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

3. 해죽순 추출물을 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 처리하였으며 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현 측정 결과 농도가 증가함에 따라서 mRNA 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 항산화 및 멜라닌 생합성에 관여하는 그 하위 유전자 및 상위 유전자의

발현을 저해하여 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 추측된다.

4. 상기 결과는 해죽순 추출물의 미백효능의 기초자료로 활용될 수 있으며 향후 기능성 천연 미백소재로써 이용 가능성을 제시할 수 있을 것으로 판단 된다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 중부대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임

References

1. M. A. Jang, J. M. Lee, "Research on domestic and international industrial trends of functional cosmetics", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.38, No.2, pp.618-627, (2021).
2. J. S. Kim, J. S. Kim, "A bibliometric analysis of research trends in the cosmetics industry -focusing on domestic graduate thesis-" *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol.11, No.3, pp. 249-257, (2015).
3. M. Y. Yu, S. H. Lee, "Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Grateloupia filicina* extract", *Journal of Convergence for Information Technology*, Vol.12, No.1, pp. 119-126, (2022).
4. J. M. Kim, S. W. Jeon, W. G. Lee, H. J. Nam, Y. B. Kim, "Study of preventing methods for skin aging and wrinkles", *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*, Vol.24, No.4, pp. 533-542, (2010).
5. J. W. Kong, R. Park, J. W. Park, J. Y. Lee, Y. J. Choi, S. H. Moon, H. J. Kim, B. G. Jeon, "Comparative analysis on antioxidant activity in various human skin fibroblasts and mesenchymal stem cells", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.36, No.2, pp. 394-406, (2019).
6. J. K. Hong, "A study on skin aging caused by free-radical and on efficacy of antioxidant vitamins", *Asian Journal of Beauty Cosmetology*, Vol.7, No.2, pp. 51-62, (2009).
7. P. H. Lu, J. Y. Wang, L. Y. Chiu, Y. T. Huang, C. F. Hung, N. L. Wu, "Spleen tyrosine kinase regulates keratinocyte inflammasome activation and skin inflammation induced by UVB irradiation", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 180, No.20, pp. 121-133, (2022).
8. Md. F. Hossain, Md. A. Islam, "Utilization of mangrove forest plant: Nipa palm (*nypa fruticans* Wurmb.)", *Journal of Agriculture and Forestry*, Vol.3, No.4, pp. 156-160, (2015).
9. K. Sugai, S. Watanabe, T. Kuishi, S. Imura, K. Ishigaki, M. Yokota, S. Yanagawa, Y. Suyama, "Extremely low genetic diversity of the northern limit populations of *nypa fruticans* (Arecaceae) on iriomote island Japan", *Conservation Genetics*, Vol.17, No.4, pp. 221-228, (2016).
10. W. Saengkrajang, M. Chaijan, W. Panpipat, "Physicochemical properties and nutritional compositions of nipa palm (*Nypa fruticans* Wurmb) syrup", *NFS Journal*, Vol.23, pp. 58-65, (2021).
11. G. S. Bae, S. J. Park, "The anti-inflammatory effect of *nypa fruticans* wurmb. fruit on lipopolysaccharide-induced inflammatory response on RAW 264.7 cells", *The Korea Journal of Herbology*, Vol.31, No.5, pp. 79-84, (2016).
12. N. A. Yosoff, M. Ahmad, B. A. Hindi, T. Widyawati, M. F. Yam, R. Mahmud, "Aqueous extract of *nypa fruticans* wurmb. vinegar alleviates postprandial hyperglycemia in normoglycemic rats", *Nutrients*, Vol.7, No.8, pp. 7012-7026, (2015).
13. Y. J. Oh, E. S. Hwang, "Quality properties and antioxidant activity of cream soup with wheat flour replaced by Nipa palm (*Nypa fruticans*) powder"

- Korean Society of Food & Cookery Science*, Vol.33, No.4, pp. 435-442, (2017).
14. A. Yagi, T. Kanbara, M. Naoko, "Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract", *Planta Medica*, Vol.53, No.6, pp. 515-517, (1987).
 15. J. Carmichael, WG. DeGraff, AF, Gazdar, JD. Minna, JB. Mitchell, "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing", *Cancer Research*, Vol.47, No.4, pp. 943-946, (1987).
 16. S. Zolghadri, A. Bahrami, THK. Mahmud, J. Munoz-Munoz, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, AA. Saboury, "A comprehensive review on tyrosinase inhibitors", *Journal of enzyme inhibition and medicinal*, Vol.34, No.1, pp. 279-309, (2019).
 17. N. H. Lee, H. C. Yang, H. J. Bu, D. S. Jung, S. J. Lee, K. Z. Riu, "Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju", *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.32, No.126, pp. 175-180, (2001).
 18. E. Y. Choi, Y. A. Jang, "The analysis of whitening effects on extracts from Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) seed", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.38, No.5, pp. 1229-1240, (2021).
 19. S. K. Seo, C. S. Ku, B. m. Son, S. G. Lee, E. M. Kang, M. O. Kim, J. H. Hong, S. H. Kim, M. S. Shin, "Anti-pollution capacity of mixtures of anemarrhena asphodeloides root extract, β -glucan and poly- γ -glutamic acid from stimulation with particulate matter", *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol.12, No.4, pp. 313-322, (2016).
 20. M. E. Winkler, K. Lerch, E. I. Solomon, "Competitive inhibitor binding to the binuclear copper active in tyrosinase", *Journal of America Chemistry Society*, Vol. 103, No.23, pp. 7001-7003, (1981).
 21. B. Y. Kim, S. H. Park, B. J. Park, J. J. Kim, "Whitening effect of *Androsace umbellata* extract", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.41, No.1, pp. 21-26, (2015).