

## 포도와 오이즙액을 이용한 동충하초(*Paecilomyces japonica*) 균사체 배양액의 미백효과

이영훈<sup>1</sup> · 박상상<sup>1</sup> · 이상원<sup>1</sup> · 이성호<sup>2</sup> · 박기훈<sup>3</sup> · 최영주<sup>4</sup> · 갈상완<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>진주산업대학교 미생물공학과, <sup>2</sup>경상대학교 생물학과, <sup>3</sup>경상대학교 응용생명과학부, <sup>4</sup>신라대학교 식품영양학과

Received August 16, 2006 / Accepted August 23, 2006

**Whitening Effect of Mycelial Culture Broth of *Paecilomyces japonica* in the Mixture of Cucumber and Grape Extracts.** Young Hoon Lee<sup>1</sup>, Sang Sang Park<sup>1</sup>, Sang won Lee<sup>1</sup>, Sung Ho Lee<sup>2</sup>, Ki Hoon Park<sup>3</sup>, Young Ju Choi<sup>4</sup> and Sang Wan Gal<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, <sup>2</sup>Department of Biology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, <sup>3</sup>Department of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Department of Food and Nutrition, <sup>4</sup>Silla University, Busan 617-736, Korea. — This study was carried out to investigate the whitening effect of mycelial culture broth of *P. japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts. In the inhibition test of melanin biosynthesis of melanoma cell, B16BL6, the culture broth of *P. japonica* more than 50 µl/ml (5%) concentration inhibited the melanin biosynthesis of the cell entirely without cytotoxicity. More than 10 days incubation of *P. japonica* in the mixture was required to have the inhibition activity. *In vitro* inhibition test of melanin biosynthesis of the culture broth of *P. japonica* was investigated in the concentration dependent manner of 10% to 50%. 30% concentration of the culture broth inhibited completely tyrosinase activity. In the cytotoxicity test, cucumber and grape extract itself has a strong cytotoxicity to the melanoma cell, B16BL6. The value of IC<sub>50</sub> of the cucumber and grape extracts against the melanoma cells was 5% concentration. However, the culture broth of *P. japonica* incubated in the cucumber and grape extracts did not show the cytotoxicity up to 20% against melanoma cell, B16BL6. Therefore, we concluded that the culture broth of *P. japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts can be used as a whitening cosmetic resource.

**Key words** — *Paecilomyces japonica*, whitening, B16BL6 mouse melanoma cell, melanin biosynthesis, tyrosinase inhibitor.

### 서 론

1990년 이후 가속화된 시장개방에 따라 수입화장품의 국내시장 잠식이 가속화 되면서 화장품업체는 국제 경쟁력 향상을 위한 품질향상과 기술 개발에 시급한 과제를 안게 되었다. 그리고 첨단기술을 앞세운 선진국과 경쟁하기 위해서는 우리나라 고유의 식물이나 천연재료로부터 유용성분을 분리하여 사용한 제품의 개발로 경쟁력을 갖추는 것이 바람직한 방향이라 판단된다. 또한 환경적인 요인의 악화와 사회의 다양화에 따른 소비자들의 화장품에 대한 욕구는 기능성화장품의 세분화를 기술적으로 요구하고 있으며, 이와 같은 양상은 더욱 심화될 것으로 예측된다[1]. 화장품에 사용되는 원료로는 oil, fat의 성분유형, 계면활성제, 보습제, 향, 색소, 자외선 차단제, 산화방지제 등이 있다[23]. 화장품 원료나 재료의 개선 및 제품의 차별화를 이루려면 우선적으로 신소재를 개발해야 한다. 그래서 국외는 물론, 국내 화장품 업체는 신제품 개발에 열을 올리고 있으며 그중 가장 치열하게 경쟁을 하고 있는 부분이 기능성미백화장품으로서 피부를 하얗게

하는 화장품을 말한다. 그러나 시험관 내에서 미백효과는 뛰어나도 부작용 및 높은 수입의존도, 고가, 선진국 기업에 대한 낮은 경쟁력 때문에 실제로 화장품에 적용할 수 있는 미백 원료는 그리 흔하지 않다. 이와 같은 이유로 각 화장품 회사는 미백 효과를 가진 천연 혹은 합성물질을 개발하기 위하여 노력하고 있으나 쉽게 성공하지 못하고 있다. 현재 화장품에 사용되는 미백원료로는 피부의 멜라닌 색소 합성을 저해하는 것과 이미 생성된 멜라닌 색소를 벗겨내는 박피제가 있다[11].

본 연구에서는 포도와 오이를 화장품 주원료로 사용하는 데, 포도는 프로안토시아닌이란 축합형 탄닌이 함유되어 있다[15,16,20]. 이 탄닌은 떫거나 쓴맛을 나타내며, 가공처리 과정에서 혼탁의 유발이나 단백질 성분과 반응하여 침전을 일으키는 원인 물질로 작용하지만 생체 내에서 산소 유리 라디칼 포착기능에 의한 항산화 작용을 하여 노화 방지에 효과적이며, 피부의 유연성과 탄력성을 부여하는 역할도 한다[5,12,13,19]. 오이는 칼륨의 함량이 높아 체내의 노폐물 배출을 도와주며 또한 비타민 C가 다량 함유되어 있어 항산화 효과 및 피부 미용 등에 탁월한 효과를 나타내고 있다[6,14,17,24].

천연 재료인 포도와 오이즙액을 배지로 이용하여 동충하

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3393, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sangal@jinju.ac.kr

초 균사체를 배양한 후, 배양 상등액 자체의 멜라닌 생성 억제 효과를 B16BL6 mouse melanoma cell에서 확인하고 특히 멜라닌생성의 주 효소인 tyrosinase의 활성을 억제시킴으로서 미백 효과를 나타냄을 확인하고, 또한 세포 독성을 확인하여 피부자극이 적고 미백효과가 있는 기능성 화장품원료로서의 이용 가능성을 조사 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 기기

본 실험에 사용한 버섯 균사체는 경남농업기술원으로부터 분양받은 눈꽃동충하초(*Paecilomyces japonica*) 균사체를 사용하였으며, 포도와 오이는 경상남도 진주시 인근 재래시장에서 구입하여 사용하였다. 세포주인 B16BL6 mouse melanoma cell (No. 80006)은 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 사용하였으며, 우태아혈청(Fetal Bovain serum, FBS)은 Gibco사의 것을, 배양용 배지(Minimum Essential Medium, MEM)는 Sigma사의 것을 사용하였다.

UV-Vis spectrophotometer는 Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotec, Swiss)을 사용하여 475와 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, melanin 생합성 측정에 있어서는 ELISA reader (Synergy<sup>TM</sup> HT, Bio-tek, USA)를 사용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 기타 활성 측정 및 분석에 사용된 시약은 특급품을 사용하였다.

### 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양액의 제조

시료의 제조에 있어서 동충하초 균사체 액체배양을 위한 균사체는 potato dextrose agar (PDA, Difco, USA) 배지에 눈꽃 동충하초 균사체를 접종하여 7일간 25°C에서 정치 배양한 것을 사용하였다. 본 배양은 천연재료인 포도와 오이즙액을 각각 47.5%씩 되게 한 후, 감자 5%를 첨가한 액체배지에 전 배양된 동충하초 균사체 1%(W/V)를 접종하여 25°C, 120 rpm의 조건으로 5, 10, 15, 20, 25일씩 각각 진탕 배양하였다. 배양이 완료된 각각의 배양액을 회수하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 0.2 µm syringe filter (Sartorius, Germany)로 여과하여 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 세포 배양 및 수확

B16BL6 mouse melanoma cell (No. 80006)은 CO<sub>2</sub> 세포배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum (Gibco, Co.)이 포함된 MEM 배지를 사용하여 배양하였다. 여기에 penicillin-streptomycin (Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U.-100 µg/ml를 첨가하였으며, 약 24시간 주기로 MEM 배지를 교체하였다. 세포 수확에 있어서는 trypsin-EDTA (Gibco, Co.)를 cell이 부착되어 있는 dish에 5분간 처리한 후

trypsin-EDTA를 완전히 제거하고, MEM 배지를 이용하여 수확하는 방법을 사용하였다[18,21].

### 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양기간에 따른 멜라닌 억제

포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양기간에 따른 멜라닌 생성 억제를 측정하기 위하여, B16BL6 mouse melanoma cell을 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml의 세포수로 각각 5 ml씩 분주하여 배양하였다. 24시간 배양후 5% FBS가 첨가된 MEM 배지로 교환한 후 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체를 5일 간격으로 25일간 배양한 배양 상등액을 각각 5%의 농도로 처리하였다. 처리된 세포를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 5일간 배양한 후 생성된 멜라닌 색소를 육안으로 1차 평가하였고, 배양 상등액 1 ml을 취하여 원심분리 후 pellet을 제거한 상등액을 UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 475 nm 파장에서 흡광도를 통해 멜라닌 생성량을 측정하였다. 멜라닌 생성량은 시료를 처리하지 않은 melanoma cell을 대조군으로 그 상대적인 양을 측정하여, 가장 활성이 우수한 배양기간의 균사체 배양액을 본 실험에 이용하였다.

### 균사체 배양액의 농도별 멜라닌 생성 억제

멜라닌 생성 억제 효능을 평가하기 위하여 B16BL6 mouse melanoma cell을 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml의 세포를 각각 5 ml씩 넣고 24시간 배양하였다. 배양 후 5% FBS가 첨가된 MEM 배지로 교환한 후 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체를 15일 배양한 배양 상등액을 0, 10, 20, 30, 40, 50 µl/ml의 농도로 처리하였다. 처리된 세포를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건에서 5일간 배양 후 생성된 멜라닌 색소를 육안으로 1차 평가하였고, 배양 상등액 1 ml을 취하여 원심분리 후 pellet을 제거한 상등액을 UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 475 nm 파장에서 흡광도에 의해 멜라닌 생성량을 측정하였다[2,9,18].

### 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양액의 세포독성

포도, 오이즙액과 이 즙액에 동충하초 균사체 배양액의 세포 생존에 미치는 영향을 측정하기 위하여 crystal violet assay 방법[2,3,8]을 응용하였다. 6 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/ml의 세포를 각각 5 ml씩 넣고 24시간 배양 후 1% FBS가 첨가된 MEM 배지로 교환하여 준 후, 포도, 오이즙액과 그 즙액에 동충하초 균사체를 15일 동안 배양한 배양 상등액을 각각 0, 1, 3, 5, 7, 9, 10, 20% 농도로 각각 처리하여 24시간동안 배양하여 배양 상등액을 제거하고, PBS (pH 7.2)로 세척한 후 0.1% crystal violet (10% ethanol)을 이용하여 5분 동안 상온에서 염색 하였다. 그 후 crystal violet을 완전히 제거한 후 PBS (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 염색된 세포로부터 crystal violet을 추출하기 위하여 95% ethanol을 1시간동안 상온에서 처리하였으며, 추출액을 UV-Vis spectrophotometer를

이용하여 540 nm 파장에서 흡광도로 세포의 생존율을 측정하였다.

**Tyrosinase 활성억제**

포도와 오이혼합액에 동충하초 균사체 배양액의 *in vitro* tyrosinase 활성 억제율을 측정하기 위하여, 96 well plate (Falcon, USA)에 L-tyrosine (10 mM) 25 µl에 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양액을 각각 0, 5, 10, 20, 30%씩 첨가하고, mushroom tyrosinase (2,500 unit, Sigma Chemical Co., USA)를 3 µl씩 넣은 후 50 mM 인산완충용액으로 최종 200 µl가 되게 조절하였다. 그 후 30°C에서 1시간 동안 ELISA reader 를 통해 멜라닌 생성량을 490 nm에서 흡광도로 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**배양기간에 따른 멜라닌 생성 억제**

포도와 오이즙액에 동충하초 균사체를 기간별로 배양하여 각각의 배양액이 가지는 멜라닌 생성억제 효과를 측정한 결과 배양일수가 증가할수록 억제율이 높았으며, 15일을 기점으로 멜라닌 생성억제 활성이 최대치에 도달하였다(Fig. 1). 이 결과에서 동충하초가 생성하는 멜라닌 생성 억제체가 15일을 기점으로 최대로 만들어지며, 그 이후에는 억제활성이 증가하지 않는 점을 볼 때 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체를 배양할 때 재료 및 방법에서 설명한 조건하에서는 약 15일 정도의 배양이 미백화장품 원료로서 최적임을 확인하였다.

**시료의 농도에 따른 멜라닌 생성 억제**

포도와 오이즙액에 동충하초 균사체를 15일간 배양한 배양액을 B16BL6 mouse melanoma cell에 처리 하였을 때, 무처리 세포에 비하여 멜라닌 생성이 억제됨을 Fig. 2A와 같이

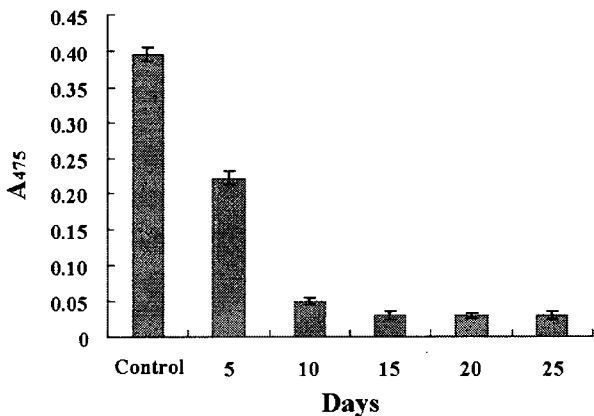


Fig. 1. Inhibition of melanogenesis of B16BL6 mouse melanoma cells treated with the time-course cultured supernatant (2.5%) of *P. japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts. Each bar is the mean values ± standard error (P<0.05)

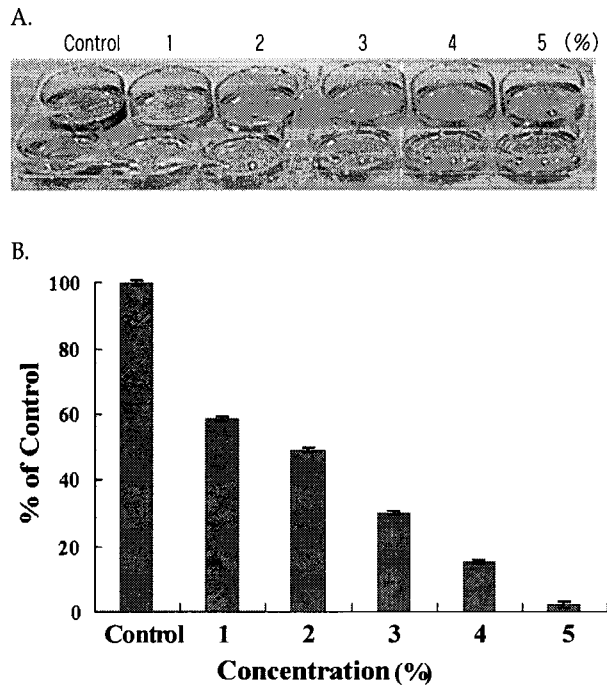


Fig. 2. Inhibition of melanogenesis of melanoma cells treated with the culture supernatant of *P. japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts. A : photograph of B16BL6 mouse melanoma cell treated with the culture supernatant, B : absorbance of the culture supernatant of B16BL6 mouse melanoma cell. Each bar is the mean values ± standard error (P<0.05).

육안으로 확인하였고, 억제율은 Fig. 2B와 같이 흡광도를 이용하여 확인 한 결과 2% 첨가 시 50%, 5% 첨가 시 100% 멜라닌 생성이 억제됨을 확인하였다. 이와 같은 결과에서 볼 때 포도와 오이 즙액에 동충하초 균사체를 배양한 배양액을 멜라닌 생성세포에 처리 시 농도 의존적으로 멜라닌 생성억제 효과가 나타남을 확인 할 수 있었다.

**포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양액의 세포독성**

포도와 오이즙액 및 이 즙액에 동충하초 균사체를 배양한 배양액의 멜라닌 생성세포에 처리로 인한 세포독성조사 결과, Fig. 3B와 같이 포도와 오이즙액은 5% 첨가 시 50%의 세포가 사멸하는 것을 보였으며, 9% 이상 첨가에서는 세포가 모두 사멸됨을 확인하였다. 포도와 오이 즙액에 동충하초 균사체 배양액은 20%의 농도까지 첨가하였을 때, 세포독성이 없는 것을 관찰하였다(Fig. 3A). 이 결과에서 볼 때 포도와 오이 즙액 자체의 세포독성을 동충하초 균사체를 배양함으로써 제거되었을 것으로 판단된다. 그리고 세포에 대한 독성이 없는 것으로 볼 때 피부에 대한 자극적인 부작용이 없는 것으로 판단되며, 이 배양액의 피부자극실험은 이 등[10]이 앞서 보고 한 바 있다.

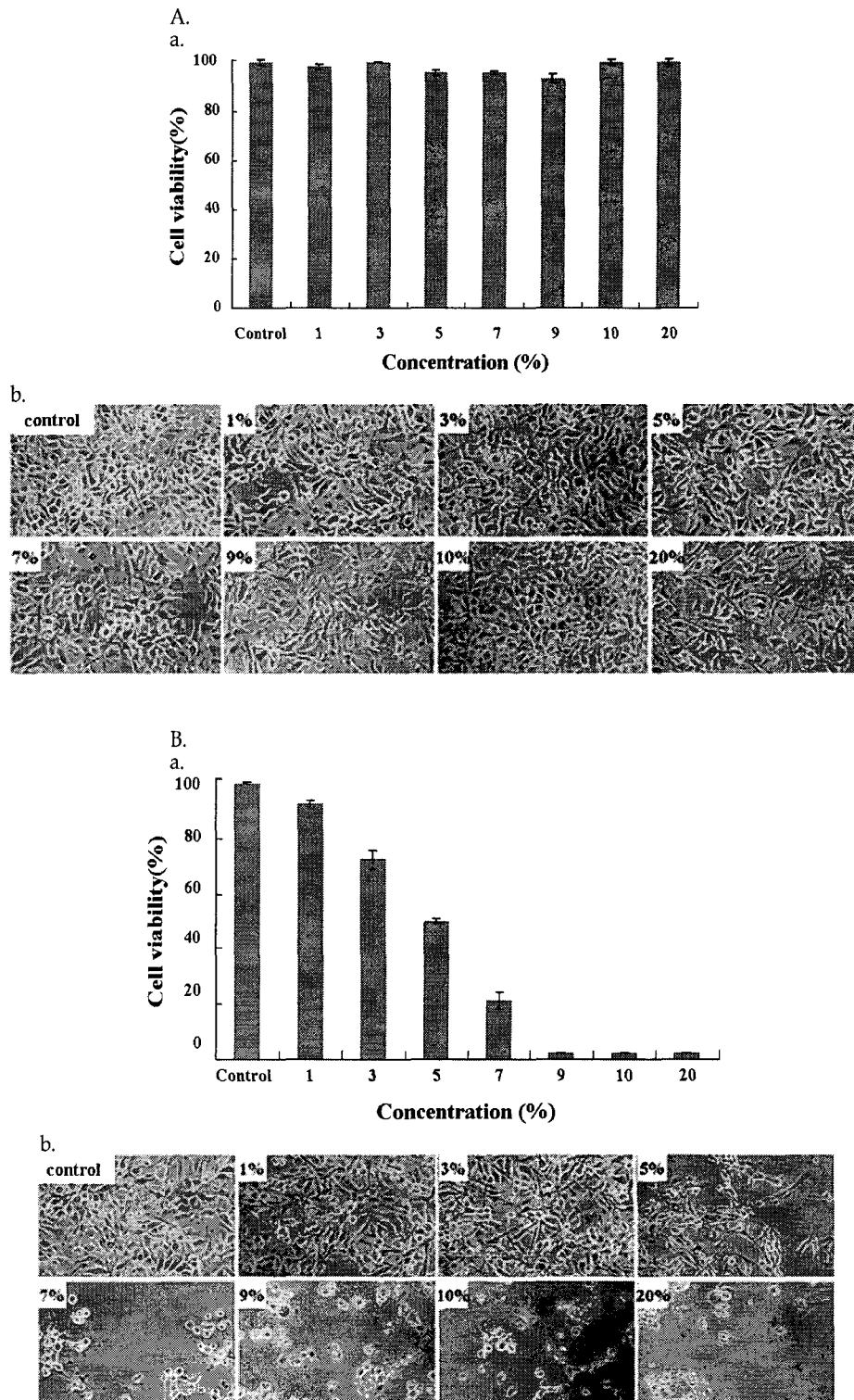


Fig. 3. Effect of cucumber and grape extract and the culture supernatant of *P. japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts on the cytotoxicity against B16BL6 mouse melanoma cells. A : treated with the culture supernatant of *P. japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts, B : treated with cucumber and grape extracts, a : graphs of cell viability, b : microscopic views of B16BL6 mouse melanoma cells. Each bar is the mean values  $\pm$  standard error ( $P < 0.05$ )

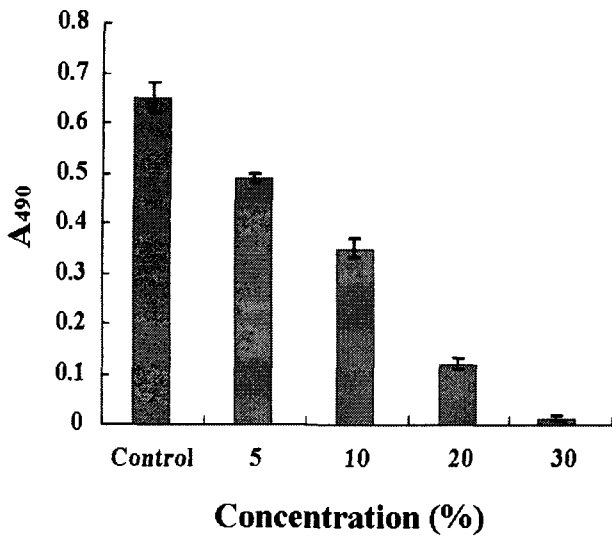


Fig. 4. *In vitro* tyrosinase inhibition activity according to the concentration of the culture supernatant of *P. japonica*. Each bar is the mean values ± standard error ( $P < 0.05$ )

**Tyrosinase 활성억제 측정**

포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양액의 *in vitro* tyrosinase 활성억제조사에서는 시료의 처리 농도가 높아질수록 멜라닌 생성 억제율이 증가하는 것을 관찰하였다. Fig. 4와 같이 배양액을 10% 첨가 시 50%의 멜라닌 생성 억제율을 보였으며, 최종 30% 농도에서는 tyrosinase 활성을 100% 억제시키는 것을 관찰할 수 있었다. 피부는 자외선에 노출되면서 tyrosinase의 작용으로 melanosome에서 멜라닌이 합성되어 피부노화가 촉진되며[21], 이때 생성된 자유라디칼은 지질, 단백질, 당 및 핵산을 손상시키고 세포막의 파괴에 관여함으로써 돌연변이 유발, 피부암의 발암, 성인병 및 노화등을 촉진시키는 원인요소로 알려져 있다[7]. 따라서 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양액은 tyrosinase 활성을 억제시킴으로서 피부 흑화나 색소침착 등을 방어할 수 있는 기능성 미백화장품 소재로 이용 가능하리라 생각된다.

**요 약**

포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양액의 미백화장품 원료로서의 이용가능성을 조사하였다. B16BL6 mouse melanoma cell에 동충하초 균사체 배양액을 배양기간 및 농도별로 처리했을 때, 15일 동안의 배양조건과 50 µl/ml (5%)의 농도로 처리하였을 때 멜라닌 생성억제 효과가 가장 높은 것을 확인하였다. *In vitro* tyrosinase 활성억제효과에서는 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양액을 10% 농도로 첨가 시 50%의 멜라닌 생성 억제율을 보였으며, 30% 농도에서는 100% 억제를 확인하였다. 결과적으로 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체 배양액은 멜라닌 생성의 주 효소인 tyrosinase

의 작용을 억제함으로써 미백 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 세포독성실험에서 포도, 오이즙액과 그 즙액에 동충하초 균사체 배양액을 각각의 농도로 B16BL6 mouse melanoma cell에 처리 한 결과 포도, 오이즙액의 5% 처리 시에는 50% 사멸, 9% 이상에서는 100% 세포가 사멸하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 포도, 오이즙액에 동충하초 균사체를 배양한 배양액은 20% 까지 처리 시에도 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인 하였다. 따라서 포도와 오이즙액에 동충하초 균사체를 배양한 배양액은 세포 독성이 없으며, 미백 효과가 뛰어난 것으로 미백화장품 원료로서 사용가능함을 확인하였다.

**참 고 문 헌**

1. Cho, W. G. 1998. Cosmeceuticals in skin care. *J. Soc. Cosm. Sci. Korea*. 24, 40-79.
2. Curto, E. V., C. Kwong, H. Hermersdorfer, H. Glatt, C. Santis, V. Virador, V. J. Hearing and T. P. Dooley. 1999. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *In vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 57, 663-672.
3. Dooley, T. P., R. C. Gadwood, K. Kilgore and L. M. Thomasco. 1994. Development of an *in vitro* primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agents. *Skin Pharmacol.* 7(4), 188-200.
4. Hosoi, J., E. Abe, T. Suda and T. Kuroki. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α, 25-dihydroxy vitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 45, 1474-1478.
5. Kanner, J., E. N. Frankel, R. Granit, B. German and J. E. Kinsella. 1994. Natural antioxidant in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* 42, 64-69.
6. Kawahara, K., S. Suzuki, T. Dakurai and A. Nakahara. 1985. Characterization of cucumber ascorbate oxidase and its reaction with hexacyanoferrate (II). *Arch. Biochem. Biophys.* 241(1), 179-186.
7. Kaufman, R. J. 1990. Vectors used for expression in mammalian cells. *Method Enzymol.* 185, 487-511.
8. Kim, D. S., S. H. Park, S. B. Kwon, S. W. Youn and K. C. Park. 2004. Effects of lysophosphatidic acid on melanogenesis. *Chem. Phys. Lipids* 127, 199-206.
9. Kim, Y. J. and H. Uyama. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *CMLS* 62, 1707-1723.
10. Lee, Y. H., U. S. Choi, K. H. Park, Y. J. Choi and S. W. Gal. 2006. Anti-wrinkle effect of mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts. *Korean J. Life Science*, 16(3), 516-521.
11. Maeda, K and M. Fukuda. 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 42, 361-368.
12. Mayer, A. S., O. S. Yi, D. A. Perason, A. L. Waterhouse and F. N. Franke. 1997. Inhibition of human LDL oxida-

- tion in relation to composition of phenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1683-1643.
13. Momboisse, J. C, P. Braquet, A. Randoux and J. P. Borel. 1983. Non-enzymatic degradation of acid soluble calf skin collagen by superoxide ion; Proactive effect of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 53-58.
  14. Park, J. S. 1978. Studies of mineral contents in Korean daily food. *Thesis collection of Duksung Women's Univ.* **7**, 299-317.
  15. Prieur, C., J. Rigaud, V. Cheynier and M. Moutounet. 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape. *Phytochemistry* **36**, 781-784.
  16. Ricardo, D., J. M. Silva, N. Darmon, Y. Fernandez and S. Mitjavila. 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1549-1552.
  17. Sakurai, T., S. Sawada, S. Suzuki and A. Nakahara. 1985. Oxidation of reduced cucumber ascorbate oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131(2)**, 647-652.
  18. Tajima S., A. Ura-Ishiko and A. Hayashi. 1996. Melanogenesis, biosynthetic phenotype of fibronectin and collagen and migrating activity in cloned B16 mouse melanoma cells. *J. Dermatological Science* **12(1)**, 24-30.
  19. Teissedre, P. L., E. N. Frankel, A. L. Waterhouse and E. N. Franke. 1997. Inhibition of *in vivo* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* **70**, 55-61.
  20. Teresa, E. B., G. F. Yolanda, C. R. Julian and S. B. Celestino. 1992. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1794-1799.
  21. Tomohiro, I. and F. Yukio. 2005. Hot-water extracts from Adzuki Beans(*Vigna angularis*) stimulate not only melanogenesis in cultured mouse B16 melanoma cells but also pigmentation of hair color in C3H mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 873-882.
  22. Yang, M. J., M. G. Kim, H. S. Ann and R. M. Ahn. 1999. Inhibitory effects of water-acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji.* **43**, 269-275.
  23. Kim, K. J., K. S. Ryu. 2005. *Skin Care and Cosmetic Ingredients Dictionary*. pp. 1-229. Jung Dam Co. Seoul.
  24. Shin, H. S. 1996. *Food Analysis*. pp. 612. Hakmun Publishing Co. Seoul.