

## 항산화성 바이오 미네랄 활성수에 의한 항노화 및 미백효과

최 현 경 · 오 명 진 · 허 명 준\* · 경 경 환\* · 박 장 서†

동국대학교 화공생물공학과, \*Miba Corp.

(2009년 3월 2일 접수, 2009년 3월 5일 수정, 2009년 3월 11일 채택)

### Anti-aging and Anti-melanogenesis Efficacy by Antioxidative Mineral-bio Water

Hyun Kyung Choi, Myoung Jin Oh, Myeong Jun Her\*, Kyeong Hwan Kyeong\*, and Chang Seo Park†

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, 3-26, Pil-dong, Chung-gu, Seoul 110-715, Korea

\*Miba Corp.

(Received March 2, 2009; Revised March 5, 2009; Accepted March 11, 2009)

**요약:** 자외선에 노출된 피부는 활성산소종을 형성한다. 이는 피부의 염증 반응을 야기시키며 콜라겐 생성 억제를 통해 피부 노화를 촉진시킨다. 본 연구에서는 2종류의 항산화성 미네랄 바이오 활성수1과 2(MIBA-W1, MIBA-W2)를 이용하여 항염증 및 항노화 기초 효능과 함께 미백효능을 측정하였다. 두 종류 MIBA-W 모두가 UV에 의해 증가된 TNF- $\alpha$ 를 상당량 줄여주는 것으로 나타나 항염증 효능이 있는 것이 확인되었다. 한편 UVB에 의해 감소되는 콜라겐 합성량은 MIBA-W1에 의해 0.01 % 농도에서 대조군 수준으로 증가하였으나 MIBA-W2는 농도가 증가할수록 콜라겐 합성량이 증가하는 경향을 보였다. 한편 MIBA-W2는  $\alpha$ -MSH로 처리된 B16-F1 melanoma 세포에서의 멜라닌 합성을 억제하는 것이 관찰되었다. MIBA-W2의 경우 고형분 0.001 % (부피비 5 %)의 농도에서  $\alpha$ -MSH에 의한 멜라닌의 합성을  $\alpha$ -MSH positive control 대비 약 50 % 감소시키는 효과를 보였다. 종합하면 두 종류의 MIBA-W는 항염증 효능과 미백기능을 가지는 피부생리활성을 가지고 있는 것이 확인되었으며 따라서 기능성화장품 소재로 개발될 수 있는 가능성을 보였다.

**Abstract:** UV irradiated skin cells produce reactive oxygen species (ROS). ROS is known to be the primary cause of skin inflammation that is eventually leading to skin aging through decrease of collagen in the dermis. In this study, we evaluated basic efficacy of anti-aging, anti-inflammation and anti-melanogenesis using two antioxidative mineral-bio waters (Mineral-bio water 1 (MIBA-W1) and Mineral-bio water 2 (MIBA-W2)). Both antioxidative mineral-bio waters reduced TNF- $\alpha$  expression which was induced upon UV irradiation. MIBA-W 1 increased collagen synthesis from UVB irradiated fibroblast at 0.01 % concentration but MIBA-W2 shows slight, but linear increase. Stimulation of melanogenesis by  $\alpha$ -MSH treatment in the cultured B16-F1 melanoma was significantly reduced by the treatment of MIBA-W2 in a dose dependent manner. Taken together, antioxidative MIBA-W1 and 2 seem to have potential applications as functional cosmetic materials.

**Keywords:** antioxidative mineral-bio water, TNF- $\alpha$ , collagen synthesis, melanin, B16-F1 melanoma

## 1. 서 론

피부 노화는 나이가 들어감에 따라 피부의 구조적 변화와 생리적인 기능이 감소하는 내인성 노화(intrinsic aging)와 오랜 시간 자외선 노출로 인해 일어나는 임상적 혹은 조직학적인 피부 변화가 일어나는 광노화(photo

-aging)로 나눌 수 있다[1,2]. 자외선의 작용으로 인해 피부는 superoxide anion, peroxide, singlet oxygen 등을 포함하는 유해한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 과잉 생성한다. 자외선으로 생성된 활성산소종은 피부의 효소 및 비효소적 항산화 방어체계를 손상시키며 산화적 스트레스는 지질과산화, 단백질산화, 간질성분을 파괴시키는 단백질 분해효소의 활성화, 탄력섬유인 콜라겐과 엘라스틴의 파괴, 세포 성분의 손상을 야기

† 주 저자 (e-mail: dgucsp@dongguk.edu)

시키고 광노화를 촉진시킨다. 뿐만 아니라 활성산소종은 피부의 염증 반응을 유발시키고, 피부면역기능을 억제시킨다[3-6]. 즉, 만성적으로 자외선에 노출되면 pro-inflammatory cytokine에 의해 동통, 홍반, 염증 등의 부작용이 일어난다. Pro-inflammatory cytokines는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-6, IL-8 등을 포함하며 각질형성 세포에서는 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  등이 자외선에 의해 증가된다[7-9]. 자외선에 의해 세포 사이를 채우는 성분인 교원질(collagen)과 탄력질(elastin)의 합성이 감소하여 다양한 기질 단백질 분해 효소의 발현이 촉진된다. 이러한 기질 단백질의 결핍은 광노화에 있어서 가장 중요한 인자라고 할 수 있다[4,10,11]. 피부의 색소 세포인 melanocyte로부터 합성되는 멜라닌은 물에 녹지 않는 흑갈색 색소와 금속 단백질로 구성되어 있으며 각질형성 세포인 keratinocyte를 통해 표피로 이동하여 피부 착색을 나타나게 된다. 이러한 멜라닌의 합성은 과도한 자외선 조사, 질병 또는 유전적인 원인에 의해 주로 전구체인 tyrosinase 효소의 산화 작용에 의해 나타나게 된다[12]. Tyrosinase는 phenylalanine의 한 종류인 tyrosine을 DOPAquinone과 DOPAchrome으로 산화시켜 각각 멜라닌의 종류인 eumelanin, pheomelanin으로의 합성을 활성화 시키는 효소이다[13]. Tyrosinase와 같은 멜라닌 합성 관련 효소의 활성이 감소하여 멜라닌의 합성이 억제되는 것을 미백 작용이라 하고 이러한 효능을 나타내는 물질로는 kojic acid, arbutin 등이 잘 알려져 있다[14]. 이러한 작용기전 외에 melanocyte에서 합성된 melanin이 melanosome의 과립형 입자로 keratinocyte를 통해 피부 표면으로 이동하는 과정에서 melanocyte와 keratinocyte 간의 melanosome transfer를 차단하는 작용 역시 미백효과를 나타낼 수 있다[15]. 미백은 항산화, 항노화 효능과 함께 기능성 화장품의 대부분을 차지하고 있으며 이러한 미백효능을 갖는 화장품 소재로서 최근에는 천연물을 이용한 소재가 부각되고 있다[16]. 본 연구에서는 2종의 MIBA-W를 이용하여 이의 콜라겐 생성 및 항염증 효과 미백효능 등을 평가하여 항노화 및 미백 효능을 갖는 기능성 화장품 소재로서의 사용 가능성을 알아보고자 하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

Normal human dermal fibroblast는 circumcised neonatal foreskin으로부터 분리하여 세포 배양하였다. HaCaT

keratinocyte는 동국대학교 박정극 교수님 연구실에서 분양받아 사용하였다. 세포주인 B16-F1 melanoma는 KCLB (Korea)로부터 구입하여 배양하였다. 세포 배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotics (Welgene, Korea)를 사용하였다.  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), ascorbic acid, dexamethason, kojic acid는 Sigma (USA)로부터 구입하였다. Sircol assay kit는 Bio-color (USA) 제품을 사용하였으며 TNF- $\alpha$  측정을 위한 ELISA kit는 BIO-SOURCE (USA) 제품을 사용하였다.

### 2.2. 항산화성 바이오 미네랄 활성수 제조

항산화성 바이오 미네랄 활성수(MIBA-W)는 토양에 존재하는 유용 미생물이 가지는 자연정화기능과 물질 전환활성을 이용하는 자연발효과정을 통해 분해된 유기물과 이로부터 생성되는 생리활성물질이 포함된 발효수를 지칭한다. MIBA-W의 생산공정은 다음과 같다. 원료혼합시설, 연료저장시설, 제 1 숙성시설, 제 2 숙성시설, 1차 정밀여과시설, 미생물 활성화시설, 활성 촉진화시설, 제 2차 정밀여과시설, 완제품저장시설 및 각 시설로의 이송 및 반송장치로 구성된 제조설비에서 항산화성 바이오 미네랄 활성수를 제조하였다. MIBA-W1에 사용된 원료는 자연수 79.8 ~ 95.1 wt%, 물엿 2.9 ~ 11.9 wt%, 알코올 0.9 ~ 4.0 wt%와 각각 50 mesh로 분쇄된 현미입자 0.9 ~ 4.0 wt%, 쌀겨 0.05 ~ 0.15 wt%, 죽엽 0.05 ~ 0.15 wt%이며, MIBA-W2는 여기에 상황버섯분말을 0.5 wt% 첨가한 것이다. 이들 원료는 배합비율대로 제조된 후 저장탱크에 저장되어 일정량씩 미생물발효과정인 제 1 숙성시설로 연속균등 주입된다. 정량주입단계에서 연속 균등 투입된 원료를 배양원으로 유용 미생물에 의한 원료 분해와 질산염의 탈질이 제 1 숙성단계에서 이루어지며 제 2 숙성단계에서는 제 1 숙성단계에서 1차 숙성된 고농도 유용미생물이 2차 대사과정을 거친 후 0.4  $\mu$ m 제균 필터를 이용하여 유용미생물과 그 미생물에 의하여 분비된 1차, 2차 대사산물을 분리한 후 여과액을 첫 번째 숙성조로 다시 순환시켜 동일한 과정으로 2차 발효를 시킨다. 발효숙성이 종료된 후 2차 정밀여과단계에서 0.4  $\mu$ m인 제균 필터로 미생물과 불용성물질을 제거한 후 그 여액인 농축된 항산화성 바이오 미네랄 활성수만을 분리하게 된다(Figure 1).

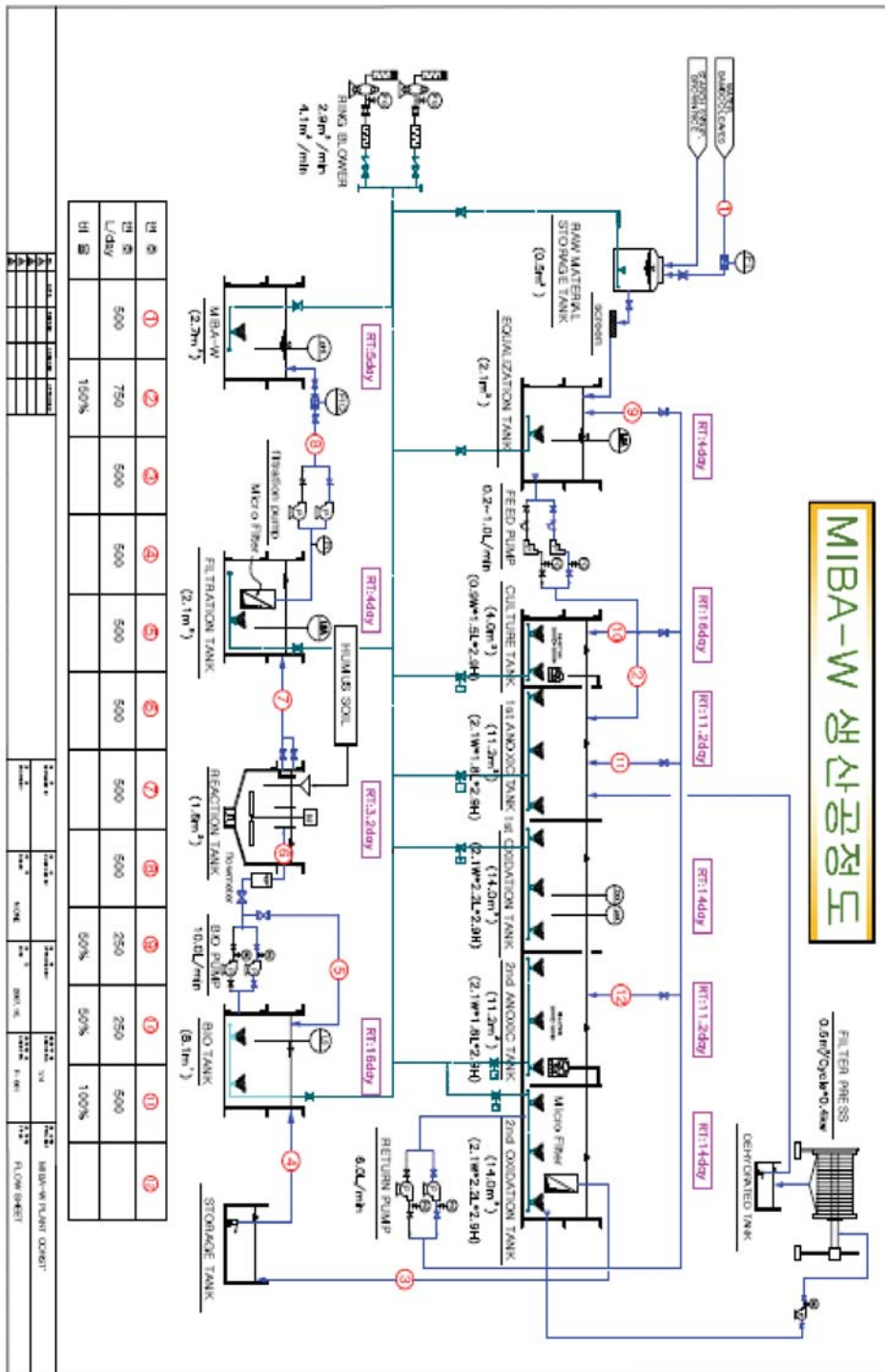


Figure 1. Process chart of MIBA-W.

2.3. 자외선(UVB) 처리 및 시료의 처리  
12-well plates에  $1 \times 10^5$  cells/well의 HaCaT kerati-

nocytes를 접종 후 DMEM 배지를 이용하여 24 h 동안 배양한 후 SX-312 research radiometer (Uvitec, USA)

를 이용하여 312 nm, 25 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 조사하였다. UVB 조사 직후 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지에 항산화성 바이오 미네랄 활성수를 각 농도별로 처리하여 24 h 동안 추가 배양하였다. Normal fibroblasts를 6-well plates에  $2 \times 10^5$  cells/well로 접종하여 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 h 동안 배양 후 FBS가 첨가되지 않은 DMEM을 배양하여 24 h 동안 starvation 하였다. 그 다음으로 UVB를 52 mJ/cm<sup>2</sup> 처리 후 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지에 항산화성 바이오 미네랄 활성수를 각 농도별로 처리하여 48 h 동안 추가 배양하였다.

#### 2.4. $\alpha$ -MSH 처리 및 시료의 처리

B16-F1 melanoma 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well에 접종하여 24 h 동안 배양한 후 멜라닌 합성을 유도시키기 위한 의도로 5 nM의  $\alpha$ -MSH와 함께 항산화성 바이오 미네랄 활성수를 배지에 농도별로 처리하여 48 h 동안 배양하였다.  $\alpha$ -MSH를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우를 각각 negative control과 positive control로 사용하였고 멜라닌 합성을 억제시키는 효과를 나타내는 것으로 잘 알려진 kojic acid를 400  $\mu$ M 처리하여 결과와 비교하였다.

#### 2.5. MTT Assay

항산화성 바이오 미네랄 활성수를 처리한 뒤 일정시간 배양한 세포의 배양 배지를 제거하고 0.33 g/L인 MTT 용액을 배양 배지와 같은 양(2 mL/6-well)으로 넣어 90 min 동안 배양하였다. 다음으로, MTT 용액을 제거하고 배양 배지와 같은 양의 isopropanol 을 이용해 20 min 동안 실온에서 shaking 한 후 상등액을 회수하여 12,000 rpm에서 5 min 동안 원심분리 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 세포 생존율을 비교하였다.

#### 2.6. TNF- $\alpha$ 의 측정 (ELISA법)

항산화성 바이오 미네랄 활성수를 처리 한 후 24 h 추가 배양이 끝난 HaCaT keratinocytes의 배양 상등액을 회수하였다. 이를 이용하여 배양액으로 분비된 TNF- $\alpha$ 를 ELISA kit (BIO-SOURCE, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 2.7. 신생 콜라겐 정량

배양이 끝난 normal fibroblasts의 배지를 제거하고 cell 용해 용액을 300  $\mu$ L/well 씩 첨가하여 cell을 용해하였다. 용해된 cell 추출액으로부터 신생 콜라겐을 정량하기 위

해 Sircol collagen assay kit (Bio-color, Belfast, Northern Ireland)를 이용하여 정량하였다. Sircol dye reagent와 용해된 cell을 30 min 동안 반응시킨 후 15,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리 하여 상등액을 완전히 제거하였다. 이 때 형성된 펠렛 sircol 알칼리 시약을 넣어 모두 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다

#### 2.8. Melanin Assay

세포 배양이 끝난 후 배지를 회수하여 10,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리 한 후 상등액을 96-well plates에 옮겨 405 nm에서 microplate reader (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

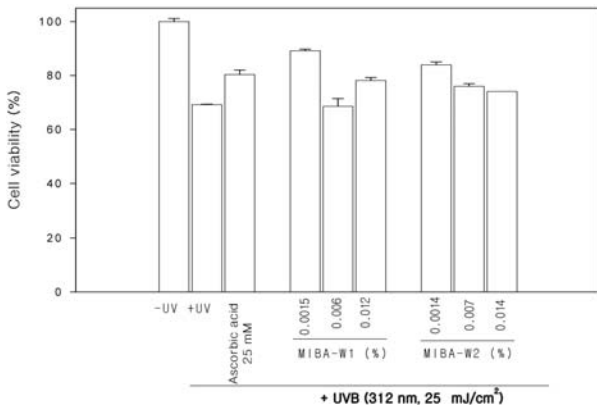
### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. UVB에 의한 세포 손상 회복 효과

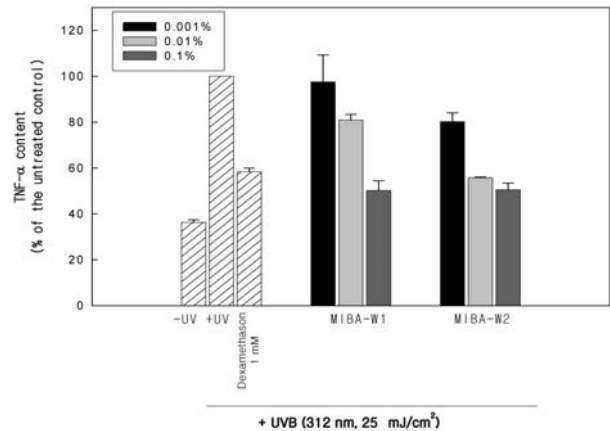
UVB에 의한 세포 손상 완화 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. 자외선을 25 mJ/cm<sup>2</sup> 조사한 후 항산화성 바이오 미네랄 활성수를 농도별로 처리하여 자외선 조사 후 시료를 처리하지 않은 대조군과 세포 생존율을 비교하였다. 양성 대조군으로 ascorbic acid 25  $\mu$ M을 처리하였다. 두 종류의 MIBA-W는 자외선에 의해 줄어든 HaCaT keratinocyte 세포의 cell viability를 20 % 내외 수준으로 크게 향상시키지는 않았다(Figure 2). 즉, 0.0014 ~ 0.014 % 농도에서 세포 독성이 존재하지 않으며 자외선에 의한 세포 손상을 악화시키지는 않았다. 그러나 사멸한 세포의 활성을 증가시키는 효능은 15 % 내외임을 확인하였다.

#### 3.2. TNF- $\alpha$ ELISA Assay

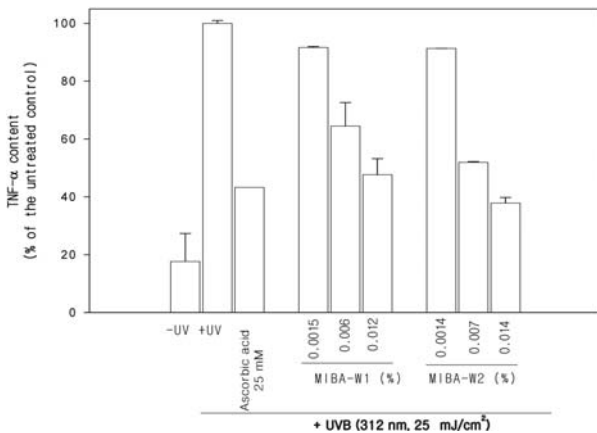
TNF- $\alpha$ 는 염증의 변인, 림프구 세포의 활성화, apoptosis에 중요한 역할을 하는 다기능 cytokine으로 알려져 있다. 항염증 효능을 평가하기 위해 UVB로 TNF- $\alpha$ 의 발현을 유도시킨 후 항산화성 바이오 미네랄 활성수가 TNF- $\alpha$  분비 억제 효능을 갖는지 평가하였으며 양성 대조군으로 dexamethason 1  $\mu$ M을 사용하였다. 배양 상등액을 회수하여 배양액으로 분비되는 TNF- $\alpha$ 를 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 두 종류의 MIBA-W 모두에서 TNF- $\alpha$ 의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Figure 3, 4). 양성 대조군으로 사용된 dexamethason 1  $\mu$ M 처리 시 TNF- $\alpha$  58.34 % 분비와 비교하였을 경우, 0.1 % MIBA-W1과 MIBA-W2의 처리는 TNF- $\alpha$  분비를 각각 50.20 %, 50.52 %로 감소시켜주었



**Figure 2.** Protection effects of the HaCaT keratinocyte cell damage induced by UVB.



**Figure 4.** Anti-inflammatory activity MIBA-W1 and 2 against UVB-induced TNF- $\alpha$ .



**Figure 3.** Anti-inflammatory activity of MIBA-W1 and 2 against UVB-induced TNF- $\alpha$ .

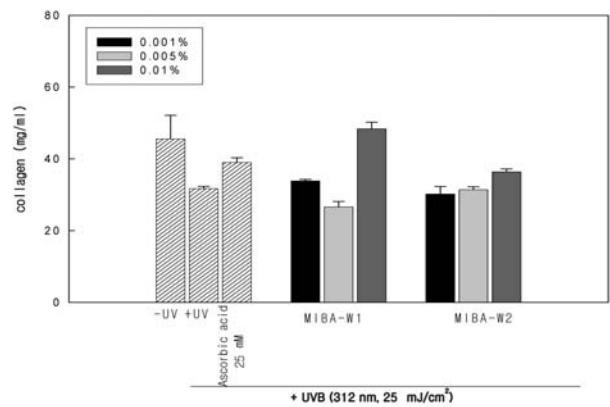
다(Figure 4). 이를 통해 항산화성 바이오 미네랄 활성수가 항염증 효능을 갖고 있음을 확인하였다.

### 3.3. 신생 Collagen 합성

콜라겐은 진피를 구성하는 단백질의 70 %를 차지하며 결합조직의 탄력을 나타낸다. 신생 콜라겐 생합성을 알아보기 위해 sircol collagen assay를 수행하였다. 노화된 피부에서 주름 생성과 깊은 관계가 있는 콜라겐의 합성량을 측정된 결과, MIBA-W1의 경우 0.01 % 농도에서 콜라겐 생합성량이 뚜렷이 증가하는 것이 관찰되었으나 MIBA-W2 처리군에서는 농도가 증가할수록 콜라겐 합성량이 증가하는 경향을 보였다(Figure 5).

### 3.4. B16-F1 Melanoma 세포 생존율 검사

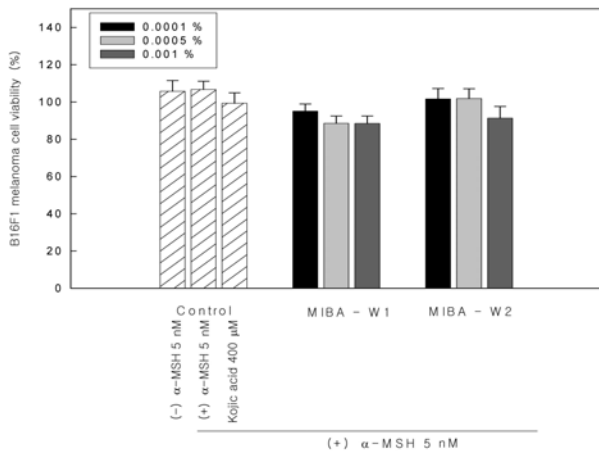
MTT assay를 이용하여 B16-F1 melanoma 세포 성장



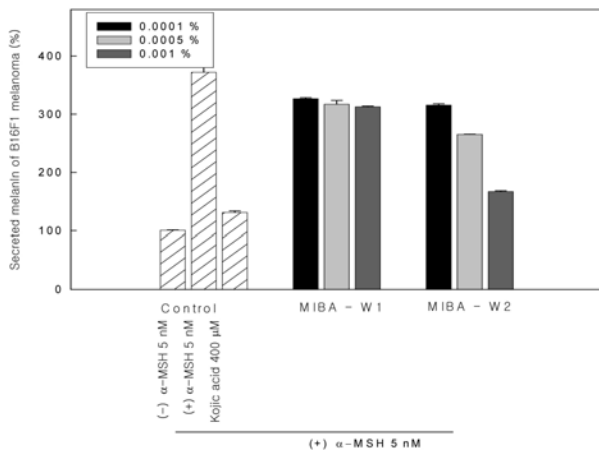
**Figure 5.** Collagen assay of human dermal fibroblasts treated with MIBA-W1 and 2.

에 미치는 영향을 알아본 결과 MIBA-W1, MIBA-W2 샘플의 경우 고형분 기준으로 0.0001, 0.0005, 0.001 % (부피비 각각 0.5 %, 2.5 %, 5 %)의 모든 농도에서 세포 생존율이 90 % 이상으로 나타났으므로 MIBA-W1, MIBA-W2 샘플이 세포 성장에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인하였다(Figure 6).

세포주가 암세포인지 아닌지 여부와 관계없이 정상 상태의 세포, 즉 (-)  $\alpha$ -MSH control과의 세포 생존율을 비교하여 MIBA-W1, 2가 세포 성장에 어떤 영향을 주는지를 MTT assay로 확인했다. (-)  $\alpha$ -MSH control과 (+)  $\alpha$ -MSH control의 세포 생존율 결과를 비교해 보면 거의 차이가 없다고 할 수 있으므로  $\alpha$ -MSH가 세포 성장에 주는 영향은 거의 없다고 할 수 있다. 하지만 MIBA-W1, 2의 세포 생존율 결과를 보면 (+)  $\alpha$ -MSH control의 결과에 비해 눈에 띄게 감소한 것을 알 수 있는데, 이 결과로부터



**Figure 6.** Cell viability of B16-F1 melanoma with MIBA-W1 and 2.



**Figure 7.** Melanin assay of B16-F1 melanoma with MIBA-W1 and 2.

MIBA-W1, 2가 세포 성장에 영향을 주었다고 사료된다.

### 3.5. Melanin Assay

세포로부터 분비된 멜라닌의 합성량을 측정된 결과 MIBA-W2 샘플의 경우에 고형분 0.001 % (부피비 5 %)의 농도에서  $\alpha$ -MSH에 의한 멜라닌의 합성을  $\alpha$ -MSH positive control 대비 50 %로 감소시켰다. 이는 MIBA-W2의 농도에 의존적으로 감소하였고 미백 효능을 갖는 화합물인 kojic acid 400  $\mu$ M을 처리한 결과와 비슷한 수치였다(Figure 7). Kojic acid와의 결과를 비교하여 볼 때 MIBA-W2가  $\alpha$ -MSH에 의한 멜라닌의 합성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

## 4. 결 론

2종류의 항산화성 바이오 미네랄 활성수를 처리하여 항노화 및 미백효능을 관찰하였다. 항산화성 바이오 미네랄 활성수는 UVB에 의해 증가된 TNF- $\alpha$ 의 발현을 농도 의존적으로 감소시켜 우수한 항염증 효과를 나타내었다. 한편 MIBA-W1에서는 0.01 %의 농도에서 콜라겐 생합성량의 뚜렷한 증가, MIBA-W2에서는 미약하나마 농도가 증가할수록 콜라겐 합성량이 증가하는 경향을 보였다. 따라서 보다 높은 농도에서는 콜라겐 합성을 더욱 증가시키는지 확인할 필요가 있겠다. 또한  $\alpha$ -MSH에 의한 멜라닌 합성 억제 활성을 분석해 본 결과 MIBA-W2의 경우 고형분 기준 0.001 % (부피비 5 %)의 농도에서  $\alpha$ -MSH에 의한 멜라닌의 합성량을  $\alpha$ -MSH (positive control)에 비해 약 50 % 감소시키는 결과를 나타내었다. 이를 통해 항산화성 바이오 미네랄 활성수의 항노화 및 미백 화장품 소재로의 사용 가능성이 충분함을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

1. J. Y. Seo, Skin aging from phenotype to mechanism, *Korean J. Invest. Dermatol.*, **8**(4), 187 (2001).
2. J. H. Chung, V. N. Hanft, and S. Kang, Aging and photoaging, *J. American Acad. Dermatol.*, **49**(4), 69 (2003).
3. L. Rittie and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **1**(4), 705 (2002).
4. M. H. Shin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **125**(2), 221 (2005).
5. S. L. Camhi, P. Lee, and A. M. Choi, The oxidative stress response, *New Horiz.*, **3**(2), 170 (1995).
6. F. Cimino, M. Cristani, A. Saija, F. P. Bonina, and F. Virgili, Protective effects of a red orange extract on UVB-induced damage in human keratinocytes, *Biofactors*, **30**(2), 129 (2007).
7. T. Ishida and I. Sakaguchi, Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of *Lithospermum erythrorhizon*, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(5), 928 (2007).
8. M. M. Bashir, M. R. Sharma, and V. P. Werth,

- TNF-alpha production in the skin, *Arch. Dermatol. Res.*, (2008).
9. A. Grone, Keratinocytes and cytokines, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **88**(1-2), 1 (2002).
  10. G. J. Fisher and J. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce AP-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin *in vivo*, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **3**(1), 61 (1998).
  11. G. J. Fisher, Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees, Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *N. Engl. J. Med.*, **337**(20), 1419 (1997).
  12. M. Yoshimura, Y. Watanabe, K. Kasai, J. Yamakoshi, and T. Koga, Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **69**(12), 2368 (2005).
  13. L. D. P. Uyen, D. H. Nguyen, and E. K. Kim, Mechanism of skin pigmentation, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **13**(4), 383 (2008).
  14. Y. Aoki, T. Tanigawa, H. Abe, and Y. Fujiwara, Melanogenesis inhibition by an oolong tea extract in B16 mouse melanoma cells and UV-induced skin pigmentation in brownish guinea pigs, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **71**(8), 1879 (2007).
  15. M. Seiberg, C. Paine, E. Sharlow, P. Andrade-Gordon, M. Costanzo, and M. Eisinger, Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening, *J. Invest. Dermatol.*, **115**(2), 162 (2000).
  16. D. H. Nguyen, D. T. M. Nguyen, L. H. La, S. H. Yang, H. B. Lee, R. J. Kim, J. H. Shin, D. M. Kim, and E. K. Kim, Depigmenting effect of *Cinnamomum cassia* Presl in B16F10 melanoma cells, *Korean J. Chem. Eng.*, **24**(5), 827 (2007).