

B16F10 멜라닌 세포에서 약콩(*Glycine soja* Siebold et Zucc.) 분획 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

김 보 애[†]

목원대학교 테크노과학대학 생의약화장품학부
(2017년 8월 5일 접수, 2017년 9월 12일 수정, 2017년 9월 25일 채택)

Inhibitory Effects of Fractions from *Glycine soja* Siebold et Zucc. on Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells

Bo Ae Kim[†]

Division of Biomedical&Cosmetics, College of Sciences&Technology,
Mokwon University, 88 Doanbuk-ro, Daejeon 35349, Korea

(Received August 5, 2017; Revised September 12, 2017; Accepted September 25, 2017)

요약: 본 연구에서는 약콩(*Glycine soja* Siebold et Zucc.) 분획 추출물의 미백효능을 관찰하기 위해 B16F10 멜라노마 세포에서 TRP-1 (tyrosinase related protein-1), TRP-2 (tyrosinase related protein-2), 티로시나제 발현을 평가하였다. 그 결과 약콩 분획 추출물 0.125, 0.25, 0.5, 2.0 mg/mL 농도에서 82% 이상의 높은 세포생존율을 나타내었다. α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)을 처리한 B16F10 멜라노마 세포에 약콩의 EtOAc 분획 추출물을 처리한 결과 티로시나제 발현이 감소되었으며 TRP-1, TRP-2 단백질 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 약콩 분획 추출물이 멜라닌생합성과 관련된 단백질의 발현을 감소시켜 피부 미백효능을 나타내는 것으로 기대할 수 있다.

Abstract: This study was performed to cytotoxicity, tyrosinase inhibition activity, intracellular melanin contents to verify the whitening effect of fraction from *Glycine soja* Siebold et Zucc. (*G. soja*). Using western blotting, tyrosinase expression in B16F10 melanoma cells and expression levels of tyrosinase related protein-1 (TRP-1) and protein-2 (TRP-2) were examined. As a result, all of the fractions showed a high cell viability over 82% at the concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 2.0 mg/mL. When the whitening effects of fractions from *G. soja* were tested using B16F10 melanoma cells treated with the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), the EtOAc fractions inhibited tyrosinase and melanogenesis effectively. The result of protein expression measurement using western blot showed that TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression in B16F10 melanoma cells treated with extracts decreased. Therefore, it is concluded that the fractions from *G. soja* have whitening effect by inhibiting protein related melanogenesis.

Keywords: *Glycine soja* Siebold et Zucc., melanocyte, tyrosinase, tyrosinase related protein, whitening effect

1. 서 론

피부는 피하 조직, 진피, 표피의 3층 구조로 이루어져 있는 신체의 가장 바깥 부분이며, 피부의 복합적인

구조와 물리 화학적인 특징으로 외부요인에 대항하여 신체의 항상성 유지를 돕는다. 또한 피부는 신체를 보호, 체온 조절, 항원의 유입을 막아주어 면역방어 역할을 하는 등 여러 대사과정에 관여한다[1]. 세월에 따른 내인성 노화 외에 외인성 노화의 요인으로는 온도, 습도, 담배연기나 기계적인 자극이 있으며 그중 피부노화에 가장 큰 영향을 미치는 것은 자외선으로 알려져

[†] 주 저자 (e-mail: kba@mokwon.ac.kr)
call: 042)829-7569

있다[2,3]. 자외선은 멜라닌 색소 형성에 직접적으로 관련되며 파장에 따라 100-290 nm의 UVC, 290-320 nm의 UVB, 320-400 nm의 UVA로 분류되어진다. 이 중 UVC는 생물학적으로 피부에 가장 큰 영향을 미칠 수 있으나[4], 대부분 오존층에서 흡수되고, 오존층에서 흡수되지 못한 UVB는 대부분 표피에 흡수되어 표피 세포에 영향을 미친다[5]. UVA는 진피까지 침투가 가능하여 피부 섬유아세포와 상호작용을 하고 기저층의 멜라닌 세포의 활성을 촉진하여 멜라닌 형성을 통한 색소침착에 관여한다. 멜라닌 색소는 자외선 과장을 일부 흡수하게 되는데 과도한 자외선의 자극으로부터 피부 세포와 조직을 보호하는 역할을 수행한다[6]. 멜라닌은 고등 식물, 균류, 박테리아를 포함하여 모든 살아있는 유기체에서 발견되는 천연 색소이다. 멜라닌 색소는 멜라노솜을 소기관으로 갖는 멜라노사이트에 의해 합성되며 이는 주변의 케라티노사이트로 이동되고 케라티노사이트의 멜라닌캡으로서 핵을 보호한다[7]. 멜라닌 생합성 과정에서는 티로시나아제, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1)과 tyrosinase-related protein 2 (TRP-2) 등의 효소작용이 일어나며 이 중 가장 주된 효소는 티로시나아제이다[8]. 멜라닌 생합성 초기 단계에서 티로신이 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)으로, DOPA에서 DOPA quinone으로 변환되고 자동 산화과정을 거친 후에 멜라닌이 생성되는데, 티로시나아제는 이들 반응의 속도조절에 관여하고 있다[9]. 그러나 과잉 생성된 멜라닌은 피부 국소적으로 기미나 주근깨를 형성하는 등의 문제적 피부로 가속화 시킨다.

현재 미백 기능성 물질로는 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin), 아스코르브산(ascorbic acid), 하이드로퀴논(hydroquinone)과 리놀산(linoleic acid) 등이 있다. 이들은 멜라닌 생합성 과정의 촉매 물질인 티로시나아제의 활성을 억제하는 작용으로 미백 기능성을 나타낸다[10]. 미백 물질들은 식품산업, 화장품 및 의약품분야에서 상업적으로 널리 이용되고 있으나[11], 피부자극(skin stimulation), 피부 백반증(skin vitiligo) 등의 인체 안전성의 문제가 있어 보다 안전하고 효과적인 천연 미백 물질의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

본 연구에 사용된 약콩(*G. soja*)은 대두의 원종으로 흔히 돌콩이라고 불리며 동아시아, 러시아 동부, 중국 북부, 일본과 대만에 널리 분포해 있다. 한국에서는 약콩이 강기슭이나 길가, 그 밖의 여러 지역에서 자란다

고 알려져 있다[12]. 약콩의 일반성분 중 단백질 함유량은 대두와 비교하여 10% 정도 높은 것으로 보고되었으며, 약콩 전체 중량비의 45-50%에 해당한다고 알려져 있다. 반면에 지방 함유량은 대두보다 10%정도 낮아 8-10%가 함유되어 있고 탄수화물은 20% 내외이다[13]. 현재 약콩에 대한 연구는 유전적 다양성[14], 성분분석과 약콩에서 발견한 새로운 사포닌에 대한 화학적 구조 등이 있으며[15], 생리활성에 대해서는 항산화 활성[13], C57BL6 mice에 대한 탈모억제 효능, 모유두(human dermal papilas) 세포의 활성화 및 항산화에 대한 효능이 뛰어나다고 알려져 있다[16]. 반면 약콩의 멜라닌 세포에 대한 미백효능 기작에 대한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서는 약콩 분획물을 이용하여 B16F10 세포에 대한 세포독성을 측정하였으며 티로시나아제 저해활성과 멜라닌 함량 측정 및 멜라닌 생합성을 촉진하는 효소인 TRP-1, TRP-2, 티로시나아제의 단백질 발현 억제 효과를 측정함으로써 약콩 분획물의 피부 미백 원료로서의 가능성을 제시하는 바이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

약콩 열매는 전북 부안에서 자생하는 것을 구입하였고, 200 g의 약콩에 MeOH을 가하여 교반기 추출(Jisico Co., Ltd., Korea)한 후 감압 농축하여(EYELA, Japan) MeOH 추출물을 얻었다. 얻어진 추출물은 EtOAc로 분배 추출하였고, EtOAc 분획을 BuOH로 분배 추출하였다(Figure 1). BuOH 분획은 다시 H₂O로 분배 추출하였으며 각 분획층을 감압 농축하여 EtOAc 분획, BuOH 분획, H₂O 분획을 획득하였고, 수율은 각각 10.1, 8.9, 12.5%로 나타났다. 실험을 수행하는 동안 각각의 시료들을 -70 °C에 보관하면서 사용하였다.

2.2. 세포 배양

본 실험에 이용한 B16F10 melanoma cell은 10% fetal bovine serum (Gibco Laboratories, USA)와 1% penicillin/streptomycin 100 unit/mL (Gibco Laboratories, USA)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, USA) 배지를 이용하였으며 배양 조건은 37 °C, 5% CO₂에서 계대 배양하여 사용하였다.

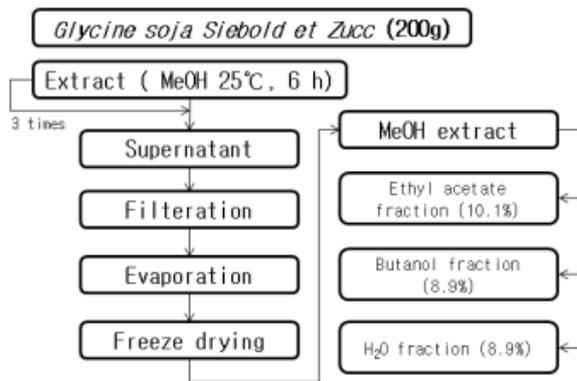


Figure 1. Flow diagram for the extraction and fractionation of *G. soja* (schematic diagram)

2.3. MTT Assay에 의한 세포생존율 측정

B16F10 세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 24 h 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 약콩의 용매별 분획물을 농도별로 처리하여 37 °C, 5% CO₂조건의 incubator에서 24 h 동안 배양한 후 시료를 제거하고 phosphate buffer saline (PBS, pH 6.8, Gibco, USA)으로 세척하였다. 세척 후 2.5 mg/mL 농도로 제조한 MTT solution (Sigma, USA)을 0.04 mL 처리하여 4 h 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 뒤 DMSO를 첨가하여 살아있는 세포에서 생성된 MTT-formazan 결정체를 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[17]. 양성 대조군으로는 kojic acid를 사용하였으며 세포를 동일한 조건으로 배양하여 실험하였다(Figure 2).

2.4. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해 활성은 B16F10세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well이 되게 분주하고 24 h 동안 배양하여 FBS와 항생제가 첨가되지 않은 배지에 10 μM alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH, Sigma, USA)과 함께 시료를 처리한 후 72 h 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1% Triton X-100 (Sigma, USA)이 함유된 PBS를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 그 후 원심 분리하여 상층액을 96-well plate에 분주하고 10 mM의 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, Sigma, USA)가 첨가된 PBS를 첨가하여 37 °C에서 1 h 동안 반응시킨 뒤 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해능은 시료용액의 첨가구와

무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.5. Melanin 함량 측정

6-well plate에 8×10^4 cells/well씩 분주하고 37 °C, 5% CO₂조건에서 24 h 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤 10 μM α -MSH를 첨가한 약콩 분획물을 2.0 mg/mL 농도로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤 trypsin-EDTA (Gibco Co., USA)로 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 원심분리 후 상층액을 제거하여 세포 pellet을 얻었다. 세포 pellet을 건조시킨 후 10% DMSO를 함유한 1 N NaOH (Duksan, Korea) 용액을 첨가하여 80 °C에서 1 h 배양하여 세포 내 멜라닌을 용해시켰다. 생성된 멜라닌은 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[18]. 멜라닌 함량은 멜라닌 표준 정량곡선을 이용하여 산출하였다.

2.6. Western Blot을 통한 단백질 발현 측정

미백인자인 TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 활성을 확인하기 위해 B16F10 melanoma cell을 100 φ culture dish에 24 h 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 분획 추출물을 처리한 배지로 교체한 후 24 h 동안 배양하였다. 다시 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하고 RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 용해하고 4 °C, 13,200 rpm에서 20 min 간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 protein assay kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였으며 단백질을 10% SDS-PAGE상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene fluo-ride fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1 h 동안 blocking (5% skim milk in TBST buffer) 하였다. TRP-1, TRP-2, tyrosinase, β -actin 1차 항체를 1:1,000으로 희석하여 4 °C에서 over night한 다음 Tris-buffered saline과 tween 20 (TBST)을 이용해 10 min 간격으로 3회 세척하고 mouse anti-goat IgG-HRP와 rabbit anti-mouse IgG-HRP 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 1 h 동안 배양하였으며 본 실험을 위한 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA)에서 구입하여 사용하였다[19,20]. 항체 반응 후 TBST로 3회 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection kit (Amersham pharmacia biotech, USA)로

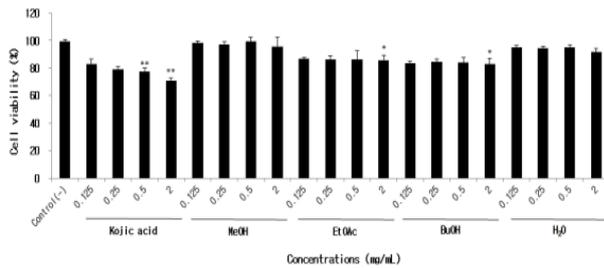


Figure 2. Cell viability of fractions from *G. soja* on B16F10 melanoma cell line. Cell viability was determined by MTT assay. Fractions were treated with 0.125, 0.25, 0.5, 2.0 mg/mL concentrations. Kojic acid was used as a positive control in concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 2.0 mg/mL. Each value is presented as mean \pm S.E. (n = 3). ** p < 0.001 compared the negative control group; * p < 0.05 compared the negative control group.

검출하여 밴드를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포생존율

약콩 분획물의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 평가하였다. 그 결과 Figure 2에서와 같이 약콩 MeOH 추출물 0.125, 0.25, 0.5, 2.0 mg/mL의 농도에서 각각 98.24, 97.44, 99.61, 95.65%의 세포생존율을 나타내었고 EtOAc 분획 추출물에서는 각각 86.72, 86.17, 86.36, 85.82%의 세포생존율을 나타내었다. BuOH 분획 추출물에서는 동일 농도에서 각각 83.38, 84.36, 83.95, 82.88%의 세포생존율을 나타내었으며 H₂O 분획물에서는 각각 94.84, 94.59, 95.08, 91.74%의 세포생존율을 나타내었다. 양성 대조군인 kojic acid를 처리한 군에서 세포생존율의 경우 지정된 농도에서 각각 83.07, 79.10, 77.63, 70.79%인 것과 비교하여 약콩 추출물을 처리한 군이 낮은 세포독성을 나타냈다. 또한 세 개의 분획 추출물중 약콩 MeOH 분획 추출물 처리군에서 가장 높은 세포생존율을 보였으며, 전체 약콩 분획물의 각 실험 농도 간 큰 차이를 보이지 않아 높은 피부세포 안전성을 나타내었다. 본 실험에 적용한 kojic acid는 1-2 mg/mL에서 약 70% 생존율을 나타내는 것으로 확인 되었기에, 독성이 나타나는 농도라고 할 수 있다[21]. 다만 본 실험에서는 동일한 농도의 kojic acid와 약콩 추출물의 안전

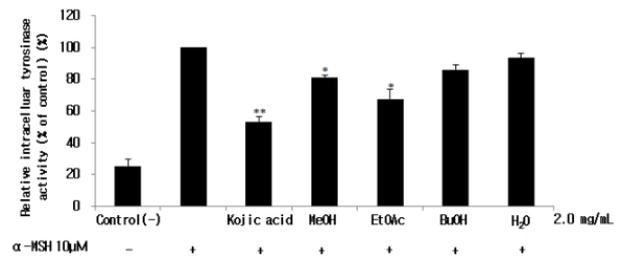


Figure 3. Effect of fractions from *G. soja* on intracellular tyrosinase in B16F10 melanoma cell line. Fractions were treated with 2.0 mg/mL, included 10 μ M α -MSH. Kojic acid was used as a positive control in concentration of 2.0 mg/mL. Each value is presented as mean \pm S.E. (n = 3). ** p < 0.001 compared the positive control group; * p < 0.05 compared the positive control group.

성을 비교하는 것을 목표로 하여 세포독성 실험을 수행하였다. 또한 본 실험에서 농도를 2.0 mg/mL 이하로 한정하는 이유는 약콩 추출물 농도 2 mg/mL 이상에서는 용해도의 제약이 있었으므로 하기와 같이 0.125, 0.25, 0.5, 2.0 mg/mL의 농도로 결정하여 실험을 수행하게 되었다.

3.2. Tyrosinase 저해능 결과

약콩 분획물의 tyrosinase 저해능을 측정하기 위하여 B16F10 세포에 10 μ M의 α -MSH와 함께 약콩 MeOH 추출물 및 EtOAc, BuOH, H₂O 분획 추출물을 2.0 mg/mL로 처리하여 실험하였다. 약콩 분획 추출물과의 비교를 위하여 무처리군(control), α -MSH 단독 처리군, kojic acid 처리군과 함께 실험하였다. 그 결과 약콩 MeOH, EtOAc, BuOH, H₂O 분획 추출물 2.0 mg/mL 처리군에서 각각 80.88, 67.55, 85.98, 93.23%의 tyrosinase 활성을 나타내었으며 약콩 EtOAc 분획물 처리군에서 가장 낮은 tyrosinase 활성을 보였다(Figure 3). α -MSH를 단독으로 처리한 경우 99.64%의 tyrosinase 활성을 보였고, kojic acid를 처리한 경우 53.44%로 나타내어 약콩 분획 추출물이 kojic acid에 비하여 tyrosinase 활성에 비교적 낮은 감소율을 보였으나 EtOAc 분획 추출물 처리군과의 차이가 14.11%로 세포 내 tyrosinase를 효과적으로 감소시키는 것으로 평가된다.

3.3. Melanin 저해활성 결과

약콩 분획물의 melanin 저해활성을 측정하기 위하여

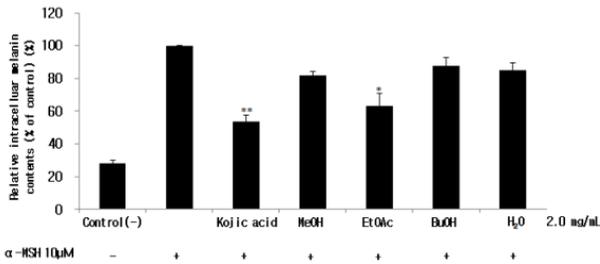


Figure 4. Effect of fractions from *G. soja* on melanin contents in B16F10 melanoma cells. Fractions were treated with 2.0 mg/mL, included 10 μ M α -MSH. Kojic acid was used as a positive control in concentration of 2.0 mg/mL. Each value is presented as mean \pm S.E. (n = 3). ***p* < 0.001 compared the positive control group; **p* < 0.05 compared the positive control group.

B16F10 세포에 10 μ M의 α -MSH가 함유된 약콩 분획물을 처리하여 melanin 함량을 측정하였다(Figure 4). α -MSH를 단독으로 처리한 양성대조군의 melanin 함량을 100%로 하여 시료처리군의 상대적인 멜라닌 함량을 확인하였다. 약콩 MeOH 추출물, EtOAc, BuOH, H₂O 분획 추출물을 2.0 mg/mL로 처리한 결과 melanin 함량이 각각 81.68, 63.26, 87.40, 84.98%로 약콩 EtOAc 분획 추출물 처리군에서 가장 낮은 melanin 함량을 보였다. 양성 대조군인 kojic acid를 처리한 경우 53.75%의 melanin 함량을 나타낸 반면 EtOAc 분획물 처리군과 9.51%의 차이를 나타내었으므로 세포 내 melanin을 효과적으로 저해한다는 것으로 평가된다.

3.4. TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 단백질 발현 억제 효과

티로시나아제, TRP-1, TRP-2 등과 같은 효소들은 멜라닌 형성을 조절하는데, 티로신의 수산화작용에 의해 DOPA로, DOPA에서 DOPA quinone으로 변하며 최종적으로 멜라닌을 형성한다[9]. 멜라닌은 피부에 긍정적인 영향을 미치지만 과도하게 생성된 멜라닌은 과색소침착을 초래 한다[22]. 미백 효능의 메커니즘은 멜라노사이트 내에서의 멜라닌 생성억제, 이미 생성된 멜라닌의 환원, 표피 내 멜라닌의 배설촉진 등이 알려져 있다. 티로시나아제는 호기성 효소이며 미생물이나 동물 및 인체 내에 광범위하게 존재하고[23], 멜라닌 합성 과정에서 그 속도를 조절한다. 본 연구에서는 약콩 분획물의 미백 관련 신호 전달 인자의 발현 억제 효과를 확인하기 위하여 western blot을 실시하여 TRP-1,

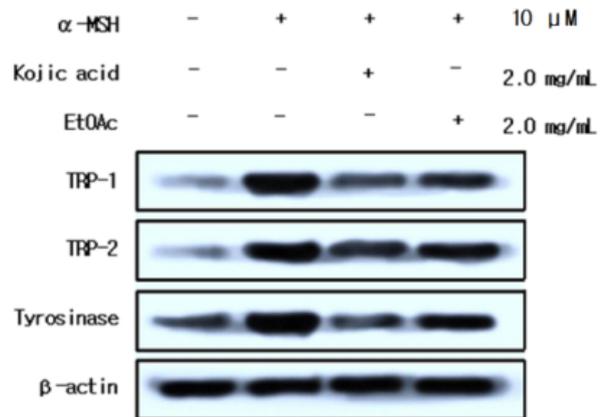


Figure 5. Inhibitory effect of fractions from *G. soja* on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2. Fractions were treated with 2.0 mg/mL, included 10 μ M α -MSH. Cell lystate were examined by western blotting analysis using TRP-1, TRP-2 and tyrosinase antibodies.

TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현 억제 효과를 확인하였다. 그 결과 Figure 4에서와 같이 10 μ M α -MSH를 처리한 B16F10에서는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 protein의 발현이 증가하였으며 약콩 EtOAc 분획 추출물을 2.0 mg/mL 농도로 처리한 경우 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 protein의 발현이 상대적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 약콩 EtOAc 분획 추출물이 멜라닌 합성 관련 단백질의 발현을 감소시키는 것으로 화장품의 미백소재로 활용 가능성이 높은 것으로 평가된다.

4. 결 론

본 연구에서는 약콩을 다양한 용매를 가하여 분획 추출물을 획득하고 B16F10 멜라노마 세포에서의 세포 생존율, 티로시나아제 활성, 멜라닌 함량, 멜라닌 생합성에 관여하는 TRP-1, TRP-2 단백질 발현을 평가하였으며 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 약콩 분획 추출물의 세포생존율을 측정할 결과 양성 대조군인 kojic acid를 처리한 군보다 높은 세포생존율을 나타내었으며 MeOH 추출물이 95% 이상으로 가장 높은 세포생존율을 보였다.
2. 약콩 분획물의 티로시나아제 저해능을 측정할 결과 EtOAc 분획 추출물을 처리한 군에서 32.45%의 티로시나아제 저해율을 보여 약콩 분획물 중 가장 높은 티로시나아제 저해능을 나타냈다.

3. 멜라닌 생성 저해능을 관찰한 결과 EtOAc 분획물에서 36.74%의 저해율을 보여 약콩 분획물 중 가장 높은 멜라닌 생성 저해능을 나타내는 것으로 확인되었다.
4. TRP-1, TRP-2 단백질 발현을 평가한 결과 약콩 EtOAc 분획 추출물을 처리한 경우 멜라닌 생합성에 관여하는 단백질발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 통해 약콩 EtOAc 분획 추출물에서 가장 우수한 피부 미백 효능을 나타내었으며 천연 미백 소재로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Reference

1. M. Boguniewicz, D. Y. M. Leung, Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation, *Immunology Review*, **242**(1), 233 (2011).
2. D. H. Yoo, D. H. Joo, S. Y. Lee, and J. Y. Lee, Antioxidant effect of *Nelumbo nucifera* G. leaf extract and inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expression in a B16F10 melanoma cell line, *J. Life Sci.*, **25**(10), 1115 (2015).
3. M. Kim and H. J. Park, Molecular mechanisms of skin aging and rejuvenation, *biochemistry, Genet. Mol. Biol.* (2016).
4. Y. A. Jang and J. T. Lee, The evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and anti-aging of extract solvent and *Poria cocos* by parts, *Korean J. Aesthet. Cosmetol.*, **13**(3), 377 (2015).
5. A. Svobodova, D. Walterova, and J. Vostalova, Ultraviolet light induced alteration to the skin, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, **150**(1), 25 (2006).
6. M. Berneburg, H. Plettengerg, and J. Krutmann, Photoaging of human skin, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **16**(6), 239 (2000).
7. H. Ando, Y. Niki, M. Ito, K. Akiyama, M. S. Matsui, D. B. Yarosh, and M. Ichihashi, Melanosomes are transferred from melanocytes to feratinocytes through the processes of packaging, release, uptake and dispersion, *J. Invest. Dermatol.*, **132**(4), 1222 (2012).
8. S. Y. Choi, N. N. Kim, Y. E. Kim, Y. M. Lee, S. J. Kim, and J. H. Kim, Inhibitory effects of cultured *Tricholoma matsutake Mycelia* on melanin biosynthesis, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **43**(2), 240 (2011).
9. T. N. Zahra, M. Akaberi, M. Vatani, and S. A. Emami, Evaluation of antioxidant and anti-melanogenic activities of different extracts from aerial parts of *Nepeta binaludensis Jamzad* in murine melanoma B16F10 cells, *Iran. J. Basic Med. Sci.*, **19**(6), 662 (2016).
10. E. J. Seo, E. S. Hong, M. H. Choi, K. S. Kim, and S. J. Lee, The antioxidant and skin whitening effect of *Artemisia iwayomogi* extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**(1), 89 (2012).
11. E. J. Cho, H. M. Ju, C. H. Jeong, S. H. Eom, H. J. Heo, and D. O. Kim, Effect of phenolic extract of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don on antioxidant capacity and tyrosinase inhibition, *Korean J. Hortic. Sci.*, **29**(4), 34 (2011).
12. S. D. Chung, H. W. Huh, and M. G. Chung, Genetic diversity in korean populations of *glycine soja* (*Fabaceae*), *J. Plant. Biol.*, **38**(1), 39 (1995).
13. B. C. Cha, H. J. Park, E. Lee, M. Y. Choi, and T. J. Rhim, Comparison of antioxidant activity and composition in *Glycine max Merr.* and *Glycine soja Siebold et Zucc.*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **27**(3), 190 (1996).
14. D. L. Hyten, Q. J. Son, Y. L. Zhu, I. K. Choi, R. L. Nelson, J. M. Costa, J. E. Specht, R. C. Shoemaker, and P. B. Cregan. Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity, *PNAS*, **103**(45), 16666 (2006).
15. M. J. Kim, K. S. Kim, Functional and chemical composition of Hwanggumkong, Yakong and Huktae, *Korean J. Food Cookery SCI.*, **21**(6), 844 (2005).
16. J. C. Yang and B. A. Kim, *In vivo* and *in vitro* hair growth promotion effects of extract from *Glycine soja Siebold et Zucc.*, *J. Appl. Biol. Chem.*, **59**(2), 137 (2016).
17. M. B. Hansen, S. E. Nielsen, and K. Berg, Re-exami-

- nation and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods*, **119**, 203 (1989).
18. J. Hosoi, E. Abe, T. Suda, and T. Kuroki, Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1R,25-dihydroxy vitamin D3 and retinoic acid, *Cancer Res.*, **45**, 1474 (1985).
 19. K. J. Kwon, S. H. Bae, K. R. Kim, I. S. An, K. J. Ahn, S. K. An, and H. J. Cha, Asiaticoside, a component of *Centella asiatica*, inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma, *Mol. Med. Rep.*, **10**(1), 503 (2014).
 20. D. H. Kim, B. J. An, and J. Y. Lee, Whitening activities of the *Agrimonia pilosa* L. extracts, *J. App. Biol. Chem.*, **54**(4), 284 (2011).
 21. F. B. L. Ahmad, H. Muhajir, S. Ahmad, and A. B. Ariff, Lipase-catalyzed synthesis of kojic acid derivative in bioreactors and the analysis of its depigmenting and antioxidant activities, *Cosmetics*, **4**(3), 12 (2017).
 22. H. S. Yoon, K. W. Yang, J. E. Kim, J. M. Kim, N. H. Lee, and C. G. Hyun, Hypopigmenting effects of extracts from bulbs of *Lilium* Oriental hybrid 'Siberia' in murine B16/F10 melanoma cells, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **43**(5), 705 (2014).
 23. C. I. Wang and W. Liu, Recent advances in tyrosinase research as an industrial enzyme, *KSSB Journal*, **29**(1), 1 (2014).