

들깨박 추출물의 항산화 및 항노화 효과

강현^{1*} · 이성규¹ · 송갑정² · 정문석³

¹단국대학교 보건과학대학 임상병리학과, ²주식회사 엔피알엘, ³메드웰

Antioxidant and Anti-aging Activities of Ethanol Extracts from Defatted *Perilla frutescens*

Hyun Kang^{1*} · Sung-Gyu Lee¹ · Gap-Jung Song² · Mon-Seok Jung³

¹Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science,
Dankook University, Cheonan 31116, Korea

²NPRL Inc., Korea

³Medwell Inc. Korea

(Received September 18, 2018 / Revised September 21, 2018 / Accepted September 21, 2018)

Abstract Purpose: This study was conducted to investigate the antioxidative, collagenase and elastase activities of defatted perilla ethanol extracts. In addition, the possibility of its use as a functional cosmetic material has been studied. **Methods:** In order to investigate the antioxidant function of the perilla extract, electron spin resonance (ESR) was measured with a spectrometer by analyzing the scavenging ability of diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals. **Results:** The antioxidant activity of DPPH free radical scavenging activity of the perilla extract was about 68% at 85 μg/ml, 85% at 20 μg/ml, 90% at 40-100 μg/ml, and showed antioxidant ability. The inhibitory activity of collagenase was increased to 4.1% at 20 mg/ml, 12% at 40 mg/ml and 26.7% at 100 mg/ml. The inhibitory activity increased in proportion to the concentration. The inhibitory activity of elastase was increased to 3.8% at 20 mg/ml, 15% at 40 mg/ml, 28% at 80 mg/ml and 35.7% at 100 mg/ml. **Conclusions:** These results suggest that the ethanol extract of perilla may inhibit the antioxidant activity and the activity of collagenase and elastase to improve the skin aging and wrinkles.

Key words: Defatted perilla, Antioxidant, Anti-oxidative, DPPH, Collagenase

초록 목적: 본 연구는 들깨 부산물의 이용가치를 높이는 방법으로 들깨박 에탄올 추출물의 항산화 작용, collagenase 와 elastase 활성의 저해작용을 통하여 항노화 활성이 있는지를 연구하였다. 그 외에 기능성 화장품 소재로서의 이용가능성을 연구도하였다. **방법:** 들깨박 추출물의 항산화 기능을 연구하기 위하여 DPPH 자유기의 소거능력을 분석하여 electron spin resonance (ESR)를 광도계로 측정하였다. **결과:** 들깨박의 에탄올 추출물의 diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) 자유기 소거의 항산화 기능은 추출물 농도 10 μg/ml에서는 약 68%, 20 μg/ml에서는 85%, 40-100 μg/ml에서는 90% 이상의 자유기의 소거 활성을 보여서 항산화능이 있음을 나타냈다. collagenase의 저해활성은 에탄올 추출물 농도 20 mg/ml에서는 4.1%, 40 mg/ml에서는 12%, 100 mg/ml에서는 26.7%로 증가하였다. 저해활성이 농도에 비례하여 증가하였다. elastase의 저해활성은 에탄올 추출물 농도 20 mg/ml에서는 3.8%, 40 mg/ml에서는 15%, 80 mg/ml에서는 28%, 100 mg/ml에서는 35.7%로 증가하였다. **결론:** 이상의 연구결과에서 들깨박의 에탄올 추출물이 항산화효과, collagenase와 elastase의 활성을 저해하여 피부의 노화와 주름의 개선효과를 나타낼 수 있다고 본다.

주제어: 들깨박, 항산화, 항산화물, DPPH, 콜라겐분해효소

*Corresponding author. Hyun Kang (Professor); Sung-Gyu Lee (Ph.D.); Gap-Jung Song (CEO); Mon-Seok Jung (CEO)
E-mail: hkang@dankook.ac.kr

서 론

피부는 크게 표피, 진피, 피하조직으로 구분된다. 진피에는 혈관, 림프시스템, 모공, 섬유아세포 등 피부의 중요한 부속기들이 있고 표피 두께의 15-40배에 해당되는 두꺼운 층으로 피부의 대부분을 차지한다(Peyrefitte, 2011). 진피조직에는 가교섬유인 콜라겐(collagen)과 탄력섬유인 엘라스틴(elastin)으로 이루어져 있는데 이들은 섬유아세포(fibroblast)에서 합성된다. 콜라겐은 긴 섬유로 몸의 지탱, 결합, 경계면을 만드는 역할을 한다. 콜라겐은 피부에 가해지는 압력이나 외부의 힘에 대해 저항하는 역할을 한다. 반면에 엘라스틴은 용수철처럼 피부의 탄력성을 유지하는 역할을 한다. 콜라겐과 엘라스틴이 그물망 구조를 형성하여 피부의 탄력성을 유지시켜 준다(Peyrefitte, 2011).

피부가 노화됨에 따라 주름이 나타나고, 나이가 들어감에 따라 그 수나 깊이, 범위가 증가해 간다. 노화는 내인성 및 외인성 노화로 구분되는데 내인성 노화는 나이를 먹으면서 피부의 구조와 생리적 기능이 계속적인 감퇴를 일으키는 것이다. 외적 요인에 의한 노화는 장기간에 걸친 자외선의 노출로 등이 원인으로 나타난다(Sung *et al.*, 2008).

섬유아세포에서 생성되는 elastase가 피부탄성섬유의 3차원적 뒤틀림에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있으며, elastase의 활성증가는 피부의 엘라스틴과 콜라겐을 감소시켜 피부 주름 형성에 기여한다. 자외선 조사 후 elastase의 활성이 증가하기 때문에 elastase의 활성 변화는 자외선에 의한 피부 탄성도의 감소 및 주름 생성의 주요원인으로 생각된다(Oh *et al.*, 2009). 따라서 항산화제와 elastase의 억제제 소재 개발하면 주름개선에 도움이 될 것이다.

들깨(*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara)는 식물분류학상 꿀풀과에 속하는 1년생 초본식물로 동부 아시아지역이 원산지로 한국, 일본, 중국 동북부 등의 지역에서 재배되어온 유지작물로 비옥하지 않은 토질에서도 잘 자란다. 들깨 씨의 모양은 둥글고 크기는 2.5 mm × 2.3 mm 내외이고 종류에 따라 여러 가지 색이 있으나 흑색종이 많다(Yeo *et al.*, 1998). 들깨종자는 유지의 함량이 매우 높아 유지식품으로는 물론 강장효과도 있어 식품학적, 영양학적인 의의가 크다.

들깨 지방의 중요성분은 oleic acid와 linolenic acid의 glyceride이며, 고도 불포화지방산(PUFA)의 함량이 높아 산패에 대해 불안정하다(Mo, 1975). 종실 상태에서는 상당기간 산패 없이 저장이 가능하므로 종실자체의 공기차단 효과와 함께 특수한 항산화물질이 존재하는 것이 보고되었다(Lee *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1981; Yoon *et al.*, 1993; Lee, 1993; Hong *et al.*, 1997).

따라서 본 연구에서는 들깨 부산물의 이용가치를 높이는 방법으로 들깨박 추출물에서 항산화 및 항노화 활성이 있는 지를 연구하는 것이 목적이었으며, 향후 기능성 화장품 개발 소재 가능성도 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 들깨박은 충북 음성 코메가 회사에서 생 들깨를 착유 후 남은 부산물을 수거하여 건조 후 사용하였다.

시료의 추출 및 수율측정

들깨박 추출은 들깨박을 분말상태로 만들었다. 70% ethanol을 이용하여 들깨박 분말과 용매의 비율을 1:10으로 혼합하여 상온에서 72시간 동안 추출하였다. 그 후 시료를 여과하여 감압농축 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

DPPH radical 저해활성 측정

DPPH(α - α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl)의 자유기(free radical) 거 활성은 시료인 들깨박 추출물 용액 30 μ l를 α - α -diphenyl- β -picrylhydrazyl과 메탄올에 용해한 60 μ M DPPH 용액 30 μ l를 각각 혼합하여 상온에서 2분 동안 반응시켰다. 혼합액을 미세 피펫으로 튜브에 옮긴 다음 전자회전공명(electron spin resonance: ESR)을 분광광도계(JES-PX 2300, Jeol Co., Japan)로 측정하였다. 이 때 ESR 분광광도계의 측정조건은 자기장의 경우 336.5 \pm 5 mT, 미세파동 전력(microwave power)은 5 mW, 변조주파수(modulation frequency)는 9.41 GHz이었다. 변조 항산화시료에 대한 DPPH의 자유기 저해활성(%)은 (첨가물에 함유된 ESR 신호강도(signal intensity) / 대조군의 ESR 신호강도) × 100으로 계산하였다.

Collagenase 저해활성 측정

피부노화억제 효과를 확인하기 위한 collagenase 저해활성 측정은 Kim *et al.*(2004)의 방법으로 측정하였다. 반응용액은 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여 준비하였다. 녹인 기질액 0.25 ml에 0.3 mg/ml의 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg 용액과 시료용액 0.1 ml를 혼합액한 후에 collagenase(0.2 mg/ml) 0.15 ml를 첨가하여 실온에서 20분간 방치하였다. 다시 6% citric acid 0.5 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 ethylacetate 1.5 ml를 첨가하여 상등액을 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Elastase 저해활성 측정

피부주름 개선효과를 확인하기 위한 porcine, pancreas, elastase저해활성은 Cannell *et al.*(1998)의 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 피부 주름 개선효과를 확인하기 위하여 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 30분간 p-nitroanilide의 생성량을 측정함으로써 elastase 저해 활성을 조사하였다. 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.1 ml씩 시험관에 취하고 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 elastase, pancreatic solution (Type I : porcine

pancreas 유래, 0.6 units/ml 용액 0.05 ml을 가한 후 기질 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)³-p-nitroanilide(1 mg/ml)을 0.1 ml를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 그리고 microplate reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

결과 및 고찰

들깨박 추출물의 항산화력

들깨박 추출물의 항산화력을 DPPH 자유기의 저해능은 ESR을 통하여 분광광도계로 측정하여 백분율로 표시값이 Fig. 1에 제시되었다. 들깨박을 에탄올로 추출물한 원액의 농도는 각각 10, 20, 40, 80, 100 µg/ml로 나누었다. 그 다음에 실험에서는 각각의 DPPH 자유기 소거능은 10 µg/ml에서 약 68%로 나타났으며, 20 µg/ml 이상의 농도에서부터는 80% 이상의 높은 DPPH 자유기의 소거하는 활성을 보였다. 독활 에탄올 추출물의 항산화능은 10 µg/ml에서는 3.16%, 50 µg/ml에서는 20.53%를 나타냈고 보고하였다(Lee *et al.*, 2015). 흑메밀 에탄올 추출물의 항산화능은 추출물 10 µg/ml에서 15%, 50 µg/ml에서는 68%라 보고하였다(Lee *et al.*, 2016a). 모시 에탄올 추출물의 항산화능은 추출물 50 µg/ml에서는 62%, 100 µg/ml에서는 70%의 DPPH 자유기의 소거능을 나타내었다(Lee *et al.*, 2016b). Choi & Lee(2016)은 운지버섯 자실체의 열수추출물(HE)과 메탄올 추출물(ME)의 DPPH의 자유기 소거활성은 에탄올 추출액은 1 mg/ml에 비해서 3 mg/ml에서는 41.03%가, ME 1 mg/ml에 비해서 3 mg/ml에서는 16.36%로 더 높게 나타나서 두 종류의 추출물은 항산화 및 생리활성기능을 나타내어 피부의 주름의 완화제로서 유용하다고 판단되었다. 본 연구에서 들깨박의 추출물은 항산화능이 독활, 흑메밀, 모시의 에탄올 추출물의 항산화능보다 높게 나타나서 효율성이 높다고 판단한다.

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는

것으로 유리기의 소거 작용은 활성라디칼에 전자를 공여하여 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 이용되고 있다(Ahn *et al.*, 2007). DPPH는 hydrazyl의 질소원자가 불안정한 상태로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있어 항산화성 물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로서 자체적으로 가지고 있는 정색성을 잃게 되는 성질을 이용하여 항산화능의 정도를 측정할 수 있다. DPPH 자유기 소거방법은 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 가늠하게 한다고 하였다(Kim, 2004). 본 연구의 결과에서는 소거능력이 기존의 연구들보다 높았다고 판단한다.

들깨박 추출물에서의 collagenase 저해활성

들깨박 추출물 농도에 따른 collagenase 저해활성의 결과는 Fig. 2에 제시하였다. 추출물 농도가 20, 40, 80, 100 mg/ml로 증가할 경우 collagenase 저해 활성은 20 mg/ml에서는 4.1%, 40 mg/ml에서는 12%, 100 mg/ml에서는 26.7%로 증가하였다. Collagenase 저해 활성은 들깨박 추출물 농도증가에 따라서 증가하는 경향을 보였다. 따라서 들깨박 추출물이 항노화 기능성 주름개선 원료로서 사용가능성을 확인하였다. Choi & Lee(2016)는 운지버섯 자실체의 열수추출물(HE)과 메탄올 추출물(ME)의 collagenase저해활성은 HE 1 mg/ml에 비해서 3 mg/ml에서는 5.44%가, ME에서는 4.07%로 더 높았다. 상기 효소활성은 모두 추출액농도증가에 비례하여 활성이 증가하였다. 결론적으로 상기의 두 종류의 추출물은 항산화 및 생리활성기능을 나타내어 피부의 주름의 완화제로서 유용하다고 하였다.

자연 노화와 계절에 따른 세포 활성의 감소와 같은 내적 요인에 의해 콜라겐의 생합성이 감소되고, 여러 가지 유해 환경에 의한 스트레스의 증가 및 자외선에 의한 활성산소종의 증가와 같은 외적요인에 의해 분해가 가속화되어 피부 기질이 파괴되면서 주름이 생성된다(Kim *et al.*, 2002; Year *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1996). 들깨박, 메밀 및 흑메밀 등의 추출물의 활용으로 이러한 피부환경을 극복할 수 있다고 생각한다.

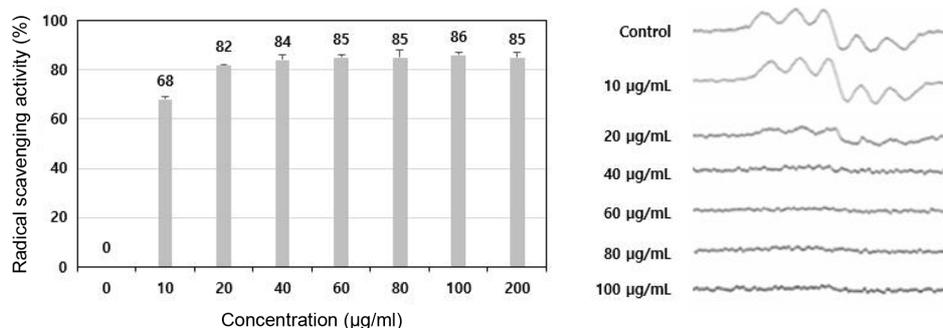


Fig. 1. Effect of the defatted Perilla ethanol extracts on DPPH radical scavenging activity. The capacity to scavenge DPPH free radical by different concentrations defatted Perilla ethanol extract and ESR spectra was measured. The scavenging activity of each sample on DPPH radical was measured using a JES-FA ESR spectrometer. A spin adduct was measured on an ESR spectrometer exactly 2 min later.

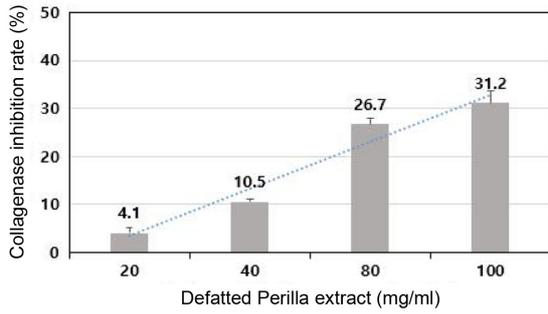


Fig. 2. Inhibitory activity of collagenase of defatted Perilla ethanol extract.

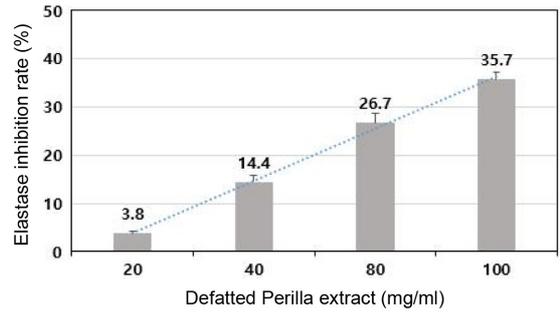


Fig. 3. Inhibitory activity of elastase of defatted Perilla ethanol extract.

들깨박 추출물에서의 elastase 저해활성

들깨박 추출물이 elastase 저해활성에 미치는 영향을 조사하였다. 들깨박 추출물 농도에 대한 elastase 저해활성은 Fig. 3에 제시하였다. 들깨박 추출물 농도가 20에서 100 mg/ml이 증가할 경우 elastase저해활성은 3.8%에서 35.7%로 증가되는 것을 확인하였다. Choi & Lee(2016)는 운지버섯 자실체의 열수추출물(HE)과 메탄올 추출물(ME)의 elastase 저해활성은 HE 1 mg/ml에 비해서 3 mg/ml에서는 3.12%, ME에서는 21.53%가 더 높았다고 보고하였다. 상기 효소활성은 모두 추출액 농도증가에 비례하여 활성이 증가하였고, 두 종류의 추출물은 항산화 및 생리활성기능을 나타내어 피부의 주름의 완화제로서 유용하다고 판단되었다.

Elastase는 단백질인 elastin을 분해하는 효소로 다른 중요한 기질 단백질인 collagen을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 피부의 진피조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있다. elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부의 그물망 구조 결합이 끊어짐으로써 elastase가 주름생성의 주원인 효소로 알려져 있다. Elastase저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타내고, ursolic acid 등이 elastase저해제로 보고되어 있다(Tsujii *et al.*, 2001).

이상의 결과는 들깨박의 에탄올 추출물이 피부의 주름 등의 개선에 관여하는 효소들의 억제제로 작용하는 것을 발견하였다. 이의 활용연구가 더욱 발전하기를 기대하여 본다.

결 론

본 연구에서는 들깨 부산물의 이용가치를 높이는 방법으로 들깨박 추출물에서 항산화 및 항노화 활성이 있는지를 연구하여 기능성 화장품 소재로서의 이용가능성을 연구하는 것이 목적이었다. 방법으로 들깨박 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH자유기1 저해능력을 분석하여 ESR 광도계로 측정하였다.

추출물의 항산화력

들깨박을 에탄올로 추출물의 농도는 각각 10, 20, 40, 80,

100 µg/ml으로 나누어서 측정하였다. 각각의 DPPH 자유기 소거능은 10 µg/ml에서 약 68%로 나타났으며, 20 µg/ml 이상의 농도에서부터는 80% 이상의 강력한 DPPH 자유기의 소거하는 활성을 보였다.

collagenase 저해활성

들깨박 추출물 농도가 20, 40, 80, 100 mg/ml로 증가할 경우 collagenase 저해 활성은 20 mg/ml에서는 4.1%, 40 mg/ml에서는 12%, 100 mg/ml에서는 26.7%로 증가하였다.

elastase 저해활성

들깨박 추출물 농도가 20에서 100 mg/ml이 증가할 경우 elastase저해활성은 3.8%에서 35.7%로 증가되는 것을 확인하였다.

결론적으로 이상의 연구결과에서 들깨박의 에탄올 추출물이 항산화효과, collagenase와 elastase의 활성을 저해하여 피부의 노화와 주름의 개선효과를 나타낼 수 있다고 본다.

감사의 말

본 연구는 중소벤처기업부의 창업성장기술개발사업의 일환으로 수행하였음(S2539864, 국내 다우들깨 부산물로부터 광노화 소재 발굴 및 스킨디펜스 화장품개발).

References

Ahn, S.I., B.J., Heung, and J.Y., Son. 2007. Antioxidative activity and nitrite scavenging abilities of some phenolic compounds. *Kor. J. Food Cook. Sci.* 23(1): 19-24.
 Cannell, R.J., S.J. Kellam, and A.M. Owsiansk. 1998. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta. Med.* 54(1): 10-14.
 Choi, B.Y. and H.H. Lee. 2016. Antioxidant and physiological activities of *Coriolus versicolor* fruit body crude extracts. *J. Kor. Acad.-Indus. coop. Soc.* 17(8): 415-422.
 Hong, E.Y., H.J. Kang, C.S. Kwon, Y.J. Nam, M.J. Suh, and J.S.

- Kim. 1997. Modulation of cellular quinone reductase inducibility by roasting treatment and acid hydrolysis of Perilla. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 26(2): 186-192.
- Kim, E.H. and D.H. Kim. 1981. Antioxidant activity of ethanol-extracts of defatted soybean, and Perilla flours in a soybean oil-water emulsion system. Kor. J. Food Sci. Technol. 13(4): 283-288.
- Kim, M.J., J.Y. Kim, and S.W. Choi. 2004. Anti-wrinkle effect of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract. J. Soc. Cosmet. Scient. 30(1): 15.
- Kim, S.J. 2004. DPPH radical scavenging and ACE inhibitory effects of the aerial parts of *Fagopyrum esculentum*, and isolation of flavonoids. Sunchon National University Master's thesis, Suncheon, Korea. p.10.
- Kim, S.N., S.H. Lee, and B.K. Lee. 2002. A compositions containing *Anthriscus sylvestris* Hoffmann extract or *Petroselinum stivum* Miller extract for external application having effects of improving skin wrinkle. Kor. Inst. Patent Inf. 10: 0079594.
- Lee, K.Y. 1993. Antioxidant effects of phenolic compounds isolated from defatted Perilla seed flour. Kor. J. Food Sci. Technol. 25(1): 9-14.
- Lee, Y.J., D.H. Shin, Y.S. Chang, and J.I. Shin. 1993. Antioxidative effect of some edible plant solvent extracts with various synergists. Kor. J. Food Sci. Technol. 25(6): 683-688.
- Lee, S.G., D.J. Jo, H.J. Chang, and H. Kang. 2015. Antioxidants and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from *Aralia continentalis* Kitagawa. J. Naturopathy 4(1&2): 10-14.
- Lee, S.G., S.Y. Park, I.C. Hwang, and H. Kang. 2016a. Antioxidants and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from *Fagopyrum tataricum*. J. Naturopathy 5(1): 9-14.
- Lee, S.G., J.H. Lee, M.S. Chung and H. Kang. 2016b. Antioxidants and anti-neuroinflammatory from *Boehmera nivea* L. Gaudich. J. Naturopathy 5(1): 33-37.
- Li, J.J., Z. Dong, M.I. Dawson, and N.H. Colburn. 1996. Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids the transrepress AP-1 without transactivation retinoic acid response element. Cancer Res. 56(3): 483-489.
- Mo, S. 1975. Fatty acid composition of varying seed oils of Korean origin. Kor. J. Nut. 8(2): 19-26.
- OH, M.H., J.E. Lee, S.Y. Kim, K.C. Park, H.Y. Yun, K.J. Baek, N.S. Kwon, and D.S. Kim. 2009. Screening system establishment for potentia anti-wrinkle agent using human fibroblast elastase. Soc. Cosm. Sci. Kor. 35(1): 19-25.
- Peyrefitte, G. (Y.S. Han *et al.*, trans). 2011. Biologie de la peau. 3rd edition, Cheongdam Pub., Seoul. pp. 15-30.
- Sung, H.C., H.D. Jung, K.D. Park, W.J. Lee, S.J. Lee, D.W. Kim, J.T. Jeon, and Y.J. Kim. 2008. Original article: A clinical study on the efficacy of cosmetics containing the ascidian tunic in reducing wrinkles. Kor. J. Dermatol. 46(7): 896-892.
- Tsuji, N., S. Moriwaki, and Y. Suzuki. 2001. The role of elastase secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. Photochem. Photobiol. 74(2): 283-290.
- Yeo, K.M. and H.S. Choi. 1998. Review: Nutritional characteristics and industrial application of Perilla oil. Food Industry and Nutrition published by Kor. So. Nut. 3(1): 36-37.
- Year, M. and B.A. Gilchrest. 1998. Aging versus photo aging: Postulated mechanisms and effectors. J. Investing Dermatol. Symp. Proc. 3(1): 47-51.
- Yoon, S.K., J.H. Kim, and Z.U. Ki. 1993. Studies on antioxidant activity of ethanol extracts from defatted Perilla flour. Kor. J. Food Sci. Technol. 25(2): 160-164.