

# 와송으로부터 생리활성 물질 생산 증대를 위한 마이크로파 추출 공정 개발

김소희<sup>1</sup>, 박하영<sup>1</sup>, 강민호<sup>1</sup>, 김진우<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>선문대학교 식품과학과, <sup>2</sup>선문대학교 차세대 반도체기술연구소, <sup>3</sup>프렉스프로FlexPro Biotechnology Co. Ltd.

## Development of Microwave-Assisted Extraction Process for Enhancing Extraction of Bioactive Compounds from *Orostachys japonicus*

So Hee Kim<sup>1</sup>, Ha Young Park<sup>1</sup>, Min Ho Kang<sup>1</sup>, Jin Woo Kim<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science, Sunmoon University

<sup>2</sup>Center for Next-Generation Semiconductor Technology

<sup>3</sup>FlexPro Biotechnology Co. Ltd.

**요약** 본 연구는 와송으로부터 항산화 활성, 피부 미백 및 항주름 등의 생리활성을 증대시키기 위해 중심합성계획모델을 이용하여 마이크로파 추출 조건을 최적화하고자 하였다. 따라서 종속변수 radical scavenging activity (RSA), tyrosinase activity inhibition (TAI) 및 collagenase activity inhibition (CAI)과 독립변수 마이크로파(139.6 ~ 970.4 W), 추출 시간(26.4 ~ 93.6 초) 및 에탄올 농도(1.3 ~ 93.7 %)를 설정하여 최적화한 결과, 세 변수 중 에탄올 농도의 영향이 가장 유의하였으며, 최적 조건은 532.8 W, 61.3 초 및 47.5%에서 RSA, TAI 및 CAI가 각 22.1 %, 62.2 %, 85.2 %로 예측되었다. 검증 실험을 진행한 결과, 실험값은 각 RSA, TAI 및 CAI가 각 23.2 %, 60.5 %, 84.1 %로 확인되어 예측값과 실험값의 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 최적 추출 조건에서 와송 추출물의 함유물질은 항산화 활성, 피부 미백 및 항주름 등의 효과로 알려진 이소퀘르시트린과 헤스페레틴으로 확인되었다. 이러한 결과는 최적 추출 조건 확립을 통해 와송으로부터 항산화, 피부 미백과 항주름 등의 활성 증대가 가능함을 입증하며, 향후 복합 기능성 화장품의 원료로써 활용 가치가 높으며 상업화를 위한 효과적인 추출 조건을 확립하였다고 판단된다.

**Abstract** This study was conducted to optimize microwave-assisted conditions to enhance the extraction of bioactive compounds from *Orostachys japonicus* with antioxidant, skin-whitening, and anti-wrinkle activities. For the optimization, radical scavenging activity (RSA), tyrosinase activity inhibition (TAI), and collagenase activity inhibition (CAI) were selected as dependent variables, and microwave power (139.6 ~ 970.4 W), extraction time (26.4 ~ 93.6 sec), and ethanol concentration (1.3 ~ 93.7 %) as independent variables. The optimal conditions were 532.8 W, 61.3 sec, and 47.5%, and RSA, TAI, and CAI predictions under optimal conditions were 22.1%, 62.2%, and 85.1%, respectively. No significant difference was found between predicted and experimental values, which verified the effectiveness of predictions made using the second-order regression model. Under optimal extraction conditions, the major bioactive compounds in *O. japonicus* extract were isoquercitrin and hesperetin, which are known to have antioxidant activity, skin-whitening, and anti-wrinkle effects. These results demonstrate that the production of bioactive substances with antioxidant, skin whitening, and anti-wrinkle effects is achievable from *O. japonicus*, which makes this plant a suitable raw material in multifunctional cosmetic formulations.

**Keywords** : *Orostachys Japonicus*, Skin-Whitening, Anti-Wrinkle, Microwave-assisted Extraction, Optimization

\*Corresponding Author : Jin Woo Kim(Sunmoon Univ.)

email: kimjw1028@gmail.com

Received December 1, 2023

Revised February 2, 2024

Accepted February 6, 2024

Published February 29, 2024

## 1. 서론

자외선은 피부노화의 주요 원인으로, 피부 내 활성산소 생성을 촉진하고 활성산소에 의한 연쇄적 산화 반응을 통해 피부노화를 유발한다고 알려져 있다[1]. 자외선에 노출된 피부는 활성산소 생성이 촉진되어 지질, 핵산과 단백질 등 생체 분자의 산화적 손상이 증가하며 이때 피부는 활성산소로부터 피부를 보호하기 위해 멜라닌 매개 방어 메커니즘을 개시한다[2,3]. 멜라닌은 피부 기저층 내 멜라노사이트에 존재하는 타이로신이 타이로시네이즈에 의해 L-도파와 도파퀴논으로 순차적 변환되고 산화적 중합반응을 통해 도파크롬을 거쳐 생성되는 색소로, 자외선과 활성산소로부터 피부가 손상되는 것을 방지하지만 과도하게 생성될 경우 색소 침착을 유발하여 기미와 주근깨를 형성할 뿐 아니라 피부암을 일으킨다[4,5]. 따라서 멜라닌 생성 저해를 위해 타이로시네이즈 활성 억제제가 필수적이며 코직산과 하이드로퀴논이 미백용 소재로 널리 사용되고 있으나 피부 과민반응, 건조, 염증 및 소화기 작용 등의 부작용을 수반하여 이를 대체하기 위한 소재 개발이 필요한 실정이다[6,7].

피부노화는 자외선 노출에 의한 외인성 노화와 콜라겐 분해에 의한 내인성 노화로 구분되는데 진피층에서 콜라겐 분해과정을 통해 발생하는 내인성 노화는 피부노화, 탄력감소와 주름생성의 주요 원인이다[8]. 진피층 내 콜라겐은 기질금속단백질분해효소의 일종인 콜라게네이즈에 의해 분해되며 이때 자외선은 콜라게네이즈의 활성을 증가시켜 콜라겐 분해를 촉진시키므로 피부노화 방지를 위해서는 자외선 차단과 함께 콜라게네이즈의 활성을 저해하는 것이 필수적이다[9]. 현재 주름개선을 위한 자외선 차단 소재로는 파라아미노벤조산, 계피산과 벤조페논 등이 사용되고 있으나 알레르기, 염증 및 피부암뿐 아니라 안드로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체와 길항작용을 하여 불임을 유발한다는 연구가 보고됨에 따라 이를 대체하기 위해 콜라게네이즈 활성 저해능이 우수한 천연물 유래 주름개선 소재 개발이 필요한 실정이다[10,11].

와송(*Orostachys japonicus*)은 돌나물과(*Crassulaceae*)의 바위솔속(*Orostachys*)에 속하는 다년생 초본식물로, 한국, 일본 및 중국 등을 포함한 동아시아에 분포하고 우리나라에는 난쟁이바위솔(*O. sikokianus*), 둥근바위솔(*O. malacophyllus*) 및 좀바위솔(*O. minutus*) 등이 자생하고 있으며 전통의학에서 스트레스 완화, 면역력 강

화, 해열 작용, 해독 및 지혈 등을 위한 민간약재로 널리 활용되어 왔다[12-14]. 특히 항산화, 항당뇨, 항염 및 항암 등의 약리효과가 우수하다고 보고되는데 이는 지방산 에스테르, 플라보노이드, 트리테르페노이드 및 스테롤 등의 다양한 생리활성 물질로부터 기인된 것으로 보고되고 있다[15]. 이와 같이 다양한 생리활성 물질을 포함한 와송은 총 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 저밀도 지질 단백질 등의 수치를 감소시켜 항비만 관련 질병의 예방 및 치료에 효과가 우수하다고 알려져 있다[16].

천연물로부터 항산화 활성, 미백 및 주름개선 등의 가능성을 갖는 생리활성 물질 추출을 최대화하기 위해 마이크로파 추출(microwave-assisted extraction, MAE), 초음파 추출과 초임계 추출 등의 다양한 추출법이 사용되고 있다[17]. 특히 낮은 에너지와 고효율을 특징으로 하는 MAE는 반응 혼합물에 존재하는 쌍극자 또는 이온과 직접적으로 결합하고 단시간 내 국소 가열을 유발하여 특정 물질의 추출 효율이 뛰어나다고 알려져 천연물의 생리활성 물질 추출을 최대화하기 위한 추출법으로 널리 사용되고 있다[18]. 따라서 본 연구의 목적은 와송 추출시 MAE를 적용하여 생리활성 물질 추출을 최대화하고 항산화 활성, 미백 및 주름개선 효과를 검증함으로써 와송의 화장품 소재로서 가능성을 평가하고 산업적 가치를 높이는 것에 있다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 실험재료

와송은 정우당(Seoul, Korea)에서 구입하여 60°C 항온 드라이오븐(DO-91, U1Tech, Suwon, Korea)에서 중량 변화가 없을 때까지 건조한 후 식품분쇄기(HMF-3000S, Hanil, Buchoen, Korea)로 분말화하여 실험에 사용하였다. 이화학 분석에 사용된 콜라게네이즈, 타이로시네이즈, 시트릭산, 코직산, L-아스코르브산 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (PzPLGPR), 알루미늄 클로라이드, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)과 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 와송 추출물의 함유물질 분석을 위해 LC-MS/MS의 이동상인 포름산, 아세트산과 아세토니트릴은 Sigma-Aldrich의 HPLC 등급을 사용하였다.

## 2.2 마이크로파 추출

(microwave-assisted extraction, MAE)

와송 추출물을 제조하기 위해 와송 분말 1 g과 농도별 에탄올 20 mL를 혼합한 후 Anton Paar microwave (Multiwave 3000, Anton Paar, Graz, Austria)를 사용하여 상온에서 60 Hz로 MAE를 진행하였다. 추출물은 원심분리기(Labogene 1236R, Gyrozen, Daejeon, Korea)를 이용하여 2,800 ×g에서 10 분 고액분리한 후 상등액을 회수하여 -21 °C에서 보관하며 분석실험에 사용하였다.

## 2.3 라디칼 소거 활성(radical scavenging activity, RSA) 측정

자유라디칼인 DPPH가 항산화 물질과 반응하여 환원되면서 흡광도가 감소하는 원리에 기반하여 Gam 등의 방법을 일부 변형하여 실험하였다[19]. 조건별로 추출한 17개의 와송 추출물 0.25 mL와 0.1 M DPPH 1.25 mL를 혼합하여 암실에서 20 분간 반응한 뒤 분광광도계 (Optizen 2120UV, Mecasys, Daejeon, Korea)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 천연 항산화제인 L-아스코르브산을 사용하였으며 RSA 결과를 아래의 식에 따라 백분율로 환산하여 나타내었다.

$$RSA = (1 - \frac{A}{B}) \times 100 \quad (1)$$

A: absorbance with *O. japonicus* extract addition,

B: absorbance with control group addition

## 2.4 타이로시네이즈 활성 저해(tyrosinase activity inhibition, TAI) 측정

멜라닌 합성의 주요 유효소인 타이로시네이즈의 활성 저해를 측정하기 위해 Kim 등의 방법을 일부 변형하여 17개의 와송 추출물의 TAI를 측정하였다[20]. 완충용액은 sodium phosphate monobasic anhydrous와 sodium phosphate dibasic anhydrous를 혼합하여 pH 6.8로 조정하였으며 완충용액 0.04 mL와 기질액 10 mM L-DOPA 0.02 mL를 혼합하고 효소 0.02 mL를 첨가하여 25 °C에서 30 분간 반응을 유도하고 475 nm에서 흡광도를 측정하고 아래의 식을 이용하여 TAI를 백분율로 표시하였다.

$$TAI = (1 - \frac{A}{B}) \times 100 \quad (2)$$

A: absorbance with *O. japonicus* extract addition,

B: absorbance with control group addition

## 2.5 콜라게네이즈 활성 저해(collagenase activity inhibition, CAI) 측정

피부 탄력을 유지하는 구조 단백질인 콜라겐을 분해하여 피부노화 및 주름생성을 유발하는 정도를 측정하고자 Hong 등의 방법을 일부 변형하여 CAI를 측정하였다[21]. 효소반응을 위한 완충용액으로는 0.1 M tris와 4 mM CaCl<sub>2</sub>를 혼합하고 1 M HCl을 첨가하여 pH 7.5로 조정한 후 기질의 단백질인 PzPLGPR (1.2 mg/mL)를 혼합하여 기질액을 제조하고 와송 추출물 또는 양성대조군 0.05 mL, 콜라게네이즈 (0.8 mg/mL)와 기질액 0.125 mL를 혼합한 후 37 °C에서 30 분간 반응하였다. 반응물은 시트릭산 0.25 mL를 첨가하여 반응을 정지시키고 아세트산에틸 1.2 mL를 첨가한 후 2,800 ×g로 10 분간 원심분리하여 상등액을 회수하였으며 회수한 상등액을 320 nm에서 흡광도를 측정하였으며 아래의 식을 이용하여 CAI를 산출하였다.

$$CAI = (1 - \frac{A}{B}) \times 100 \quad (3)$$

A: absorbance with *O. japonicus* extract addition,

B: absorbance with control group addition

## 2.6 통계학적 최적화

본 연구에서는 통계학적 최적화 기법의 하나인 중심합성계획모형(central composite design, CCD)을 이용하여 와송 추출물로부터 항산화 활성, 미백 및 주름 개선 물질 생산 최대화를 위한 최적 추출 조건을 예측하고자 하였다. 와송은 폴리페놀류와 같은 2차 대사산물의 함량이 높아 항산화를 비롯한 미백과 주름개선 효과가 높다고 알려져 있어 효능의 평가를 위해 일반적으로 RSA, TAI와 CAI의 측정이 수행된다. 또한 본 실험에서는 일변수 최적화에 비해 적은 숫자의 실험군으로 보다 효과적인 추출조건 최적화가 가능한 통계학적 최적화 기법을 사용하였다[22]. 이에 본 통계학적 최적화 실험에 적용된 추출 조건은 기존에 수행했던 일변수 실험 결과에서 주요변수로 확인된 마이크로파 출력(139.6 ~ 970.4 W,

X<sub>1</sub>), 추출시간(26.4 ~ 93.6 초, X<sub>2</sub>)과 에탄올 농도(1.30 ~ 93.7 %, X<sub>3</sub>)를 독립변수(X<sub>n</sub>)로 설정하였으며 항산화, 주름개선과 미백 평가를 위한 종속변수로는 RSA, CAI와 TAI를 설정하였다[23-25]. 독립변수의 범위는 5단계 (-1.68, -1, -0, 1, 1.68)로 부호화하여 17개의 추출 조건에 따라 실험을 진행하였으며 RSA, CAI와 TAI의 값을 측정하여 design expert software (version 8.0, Stat-Ease, MN, USA)를 이용한 통계분석 및 회귀분석에 사용하였다 (Table 1).

Table 1. Independent variables and their coded and actual values used for optimization of MAE conditions of *O. japonicus*.

X <sub>n</sub>	Independent Variables	Coded Levels				
		-1.68	-1.0	0	+1.0	+1.68
X <sub>1</sub>	Microwave power (watt)	139.6	300.0	550.0	800.0	970.4
X <sub>2</sub>	Extraction time (sec)	26.4	40.0	60.0	80.0	93.6
X <sub>3</sub>	Ethanol concentration (%)	1.30	20.0	47.5	75.0	93.7

## 2.7 함유물질 분석

통계학적 최적화를 통해 확보한 외송 최적 추출물의 함유물질은 ROC C18 컬럼(3.0 × 150 mm, Restek, SO, USA)이 장착된 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. 시료 주입량과 이동상의 유속은 각각 20.0 μL과 0.2 mL/min로 고정하여 20 분간 분석을 진행하였으며 이온화(electrospray ionization, ESI) 방법과 50 ~ 800 m/z의 전체 스캔 모드를 통해 시료의 질량 스펙트럼 정보를 수집하였다. 이동상 A (1.0% 포름산/증류수)와 이동상 B (1.0% 포름산/아세트니트릴)는 0 ~ 11 분: 95 → 0 % A, 11 ~ 14 분: 0 → 0 % A, 14 ~ 15 분: 0 → 95 % A, 15 ~ 20 분: 95 → 95 % A로 혼합비율을 변경하여 가동하였으며 외송 최적 추출물의 함유물질 분석은 분자 이온 및 단편화 패턴을 국립표준기술연구소 (National Institute of Standards and Technology, NIST)의 데이터 라이브러리와 비교하여 수행되었다.

## 2.8 통계분석

모든 실험은 3 회 반복 수행하였으며 이에 따른 결과 값은 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 통계처리는 GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA)를

이용하였으며 평가를 위한 통계적 유의성의 기준은 독립 표본 t 검정을 통해  $p < 0.05$ 로 설정되었다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 항산화 활성 평가

식물에 널리 분포하는 2차 대사산물인 폴리페놀은 항산화, 항균, 항염증과 항암 등의 다양한 생리활성 작용을 수행한다고 알려져 있다[26]. 특히 외송의 주요 폴리페놀로 알려진 프리델린, 캠퍼롤과 퀘르세틴 등은 벤젠고리에 하이드록시기 그룹을 보유하여 자유라디칼에 전자를 공여함으로써 자유라디칼 소거 및 항산화 활성을 나타낸다고 보고되었다[27].

본 연구에서 외송 추출물의 RSA를 비교한 결과, RSA는 5.5 ~ 22.5 %로 예측되었으며 마이크로파 출력 550.0 W, 추출시간 60.0 초, 에탄올 농도 47.5 %에서 RSA를 4 배 증가시키는 것으로 확인되었다(Run #17 in

Table 2. Effect of extraction conditions on radical scavenging activity, tyrosinase activity inhibition, and collagenase activity inhibition based on central composite design.

Run No.	Extraction conditions			RSA (%)	TAI (%)	CAI (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>			
1	300.0	40.0	20.0	15.4	38.7	78.3
2	800.0	40.0	20.0	11.4	42.2	75.8
3	300.0	80.0	20.0	15.1	38.3	71.5
4	800.0	80.0	20.0	13.1	46.4	73.2
5	300.0	40.0	75.0	14.5	53.4	68.7
6	800.0	40.0	75.0	12.9	56.6	65.7
7	300.0	80.0	75.0	15.4	56.3	69.7
8	800.0	80.0	75.0	15.5	61.4	64.8
9	133.3	60.0	47.5	18.4	54.2	79.6
10	966.7	60.0	47.5	16.6	58.2	75.4
11	550.0	26.0	47.5	17.5	55.5	73.1
12	550.0	94.0	47.5	20.9	60.7	68.3
13	550.0	60.0	1.7	5.5	25.1	70.1
14	550.0	60.0	93.3	11.6	50.5	60.0
15	550.0	60.0	47.5	22.2	63.0	84.9
16	550.0	60.0	47.5	21.3	62.6	88.6
17	550.0	60.0	47.5	22.5	59.3	83.5

X<sub>1</sub>: Microwave power (watt); X<sub>2</sub>: Time (sec); X<sub>3</sub>: Ethanol concentration (%)

Table 3. Polynomial equations derived using response surface methodology for optimization of extraction conditions.

Response	Regression models	R <sup>2</sup>	p
RSA (%)	$Y_{RSA} = -6.28 + 0.012X_1 + 0.28X_2 + 0.58X_3 + 9.25^{-3}X_1X_2 - 8.18^{-3}X_1X_3 + 4.77^{-4}X_2X_3 - 2.74^{-5}X_1^2 - 2.64^{-3}X_2^2 - 6.53^{-3}X_3^2$	0.9716	0.0001
TAI (%)	$Y_{TAI} = -2.78 + 0.04X_1 + 0.35X_2 + 1.36X_3 + 1.68^{-4}X_1X_2 - 6.36^{-3}X_1X_3 + 8.41^{-4}X_2X_3 - 3.38^{-5}X_1^2 - 3.42^{-3}X_2^2 - 0.01X_3^2$	0.9906	< 0.0001
CAI (%)	$Y_{CAI} = +22.72 + 0.05X_1 + 1.30X_2 + 0.72X_3 + 5.75^{-5}X_1X_2 - 1.29^{-4}X_1X_3 + 2.16^{-3}X_2X_3 - 4.40^{-5}X_1^2 - 0.01X_2^2 - 9.56^{-3}X_3^2$	0.9755	< 0.0001

X<sub>1</sub>: Microwave power (watt); X<sub>2</sub>: Time (sec); X<sub>3</sub>: Ethanol concentration (%). R<sup>2</sup>: coefficient of determination; p: probability value; p-value of < 0.05 indicates significance.

Table 2). CCD를 통해 실험값에 기반하여 2차 회귀방정식을 도출하였으며 실험값에 대한 적합성(R<sup>2</sup>)과 유의성(p)을 분석하였다. 2차 회귀방정식의 유효성 검증에 사용되는 R<sup>2</sup>은 0과 1 사이의 값을 나타내며 이 값이 1에 가까울수록 회귀방정식이 적합하다고 판정되는데 RSA의 R<sup>2</sup>이 0.9716로 확인됨에 따라 예측값과 실험값의 합치도가 높고 제안된 회귀방정식이 최적 추출 조건 예측을

Table 4. Analysis of variance of experimental results of central composite design for full quadratic model.

	RSA (%)			TAI (%)			CAI (%)		
	Sum of Squares	F value	p value	Sum of squares	F value	p value	Sum of squares	F value	p value
Model	304.77	26.56	0.0001	1746.86	82.34	<0.0001	903.36	30.95	<0.0001
X <sub>1</sub>	8.13	6.38	0.0395	52.85	22.42	0.0021	18.18	5.61	0.0498
X <sub>2</sub>	8.28	6.49	0.0382	30.62	12.99	0.0087	22.12	6.82	0.0348
X <sub>3</sub>	13.38	10.49	0.0143	801.49	340.0	<0.0001	161.12	49.68	0.0002
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1.71	1.34	0.2846	5.61	2.38	0.1668	0.66	0.20	0.6652
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2.53	1.99	0.2017	1.53	0.65	0.4468	6.30	1.94	0.2060
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.55	0.43	0.5318	1.71	0.73	0.4224	11.28	3.48	0.1044
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	32.18	25.24	0.0015	48.98	20.78	0.0026	82.71	25.51	0.0015
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	13.06	10.24	0.0151	21.97	9.32	0.0185	292.88	90.31	<0.0001
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	266.93	209.37	<0.0001	836.69	354.98	<0.0001	572.70	176.60	<0.0001

X<sub>1</sub>: Microwave power (watt); X<sub>2</sub>: Time (sec); X<sub>3</sub>: Ethanol concentration (%)

위한 모델로 적합함이 입증되었다(Table 3) [28].

또한 분산분석을 기반으로 RSA를 최대화하는 MAE 조건을 예측하기 위해 독립변수 변화에 따른 종속변수의 변량을 확인한 결과, 에탄올 농도(p = 0.0143)가 증가함에 따라 RSA가 유의하게 증가한 반면 마이크로파 출력(p = 0.0395)과 추출시간(p = 0.0382)에 따른 RSA의 변량은 에탄올 농도의 영향에 비해 미미한 것을 확인하였다(Table 4, Fig. 1A). 이는 분산분석과 일치하는 결과로 RSA 증가에 대해 마이크로파 출력과 추출시간 대비 에탄올 농도의 영향이 가장 유의한 것을 재확인하였으며 증류수 또는 에탄올을 단일용매로 사용하지 않고 에탄올 농도가 47.5 %인 혼합용매를 사용하여 RSA를 최대화할 수 있음을 확인하였다.

외송으로부터 생리활성 물질 추출시 독립변수간 상호작용이 RSA에 미치는 영향을 평가하기 위해 한 개의 독립변수를 중간값에 고정하고 두 개의 독립변수를 변화시켰을 때 나타나는 RSA 결과를 3차원 반응표면곡선으로 시각화하였다(Fig. 2). 에탄올 농도를 중간값인 47.5 %에 고정하고 마이크로파 출력과 추출시간이 RSA에 미치는 영향을 평가하였을 때 마이크로파 출력과 추출시간이 증가함에 따라 RSA가 비례하여 증가하다 최대값인 22.5 %에 도달한 후 감소하는 것을 확인하였으며 이를 통해 외송으로부터 생리활성 물질 추출시 추출시간과 마이크로파 출력 대비 유의한 영향을 주는 에탄올 농도의 최적화가 우선적으로 고려되어야 할 것으로 판단되었다. 마이크로파를 이용한 천연물 추출에서 추출 성분의 유전상수는 높고 추출 용매의 유전상수가 낮을수록 마이크로파가 효과적으로 추출 물질에 도달하여 생리활성 물질의 추출 효율을 증가된다는 연구에 기반할 때 본 실험에 사용된 증류수와 에탄올은 유전상수가 각 78 ~ 80 및 24 ~ 25로, 에탄올 농도 증가에 따라 유전상수가 감소하여 추출 물질에 에너지가 효과적으로 전달되었을 뿐 아니라 벤젠고리를 포함한 폴리페놀 등 생리활성 물질의 분자운동이 활성화되어 추출 효율이 증가됨에 따라 항산화 활성이 증가한 것으로 사료된다[29-31]. 따라서 본 연구 결과를 통해 추출 용매의 종류와 혼합비에 따른 유전상수가 생리활성 물질의 추출 효율에 유의한 영향을 미치므로 혼합비의 최적화를 수행하여 외송으로부터 생리활성 물질 추출 및 항산화 활성을 최대화할 수 있음을 확인하였다.

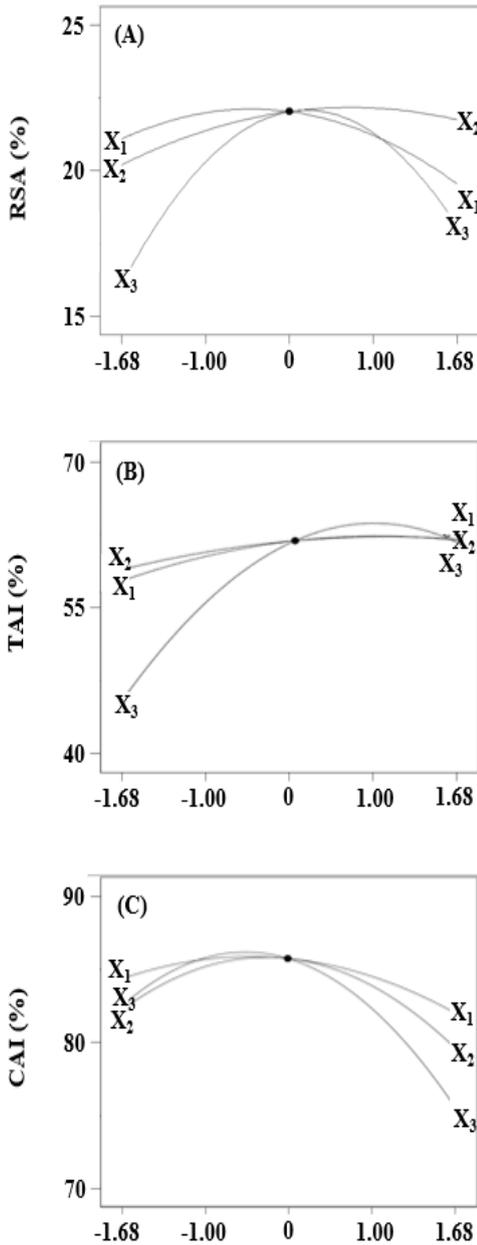


Fig. 1. Perturbation plots for evaluation of effect of three independent variables, including microwave power (X<sub>1</sub>), time (X<sub>2</sub>), and ethanol concentration (X<sub>3</sub>) on (A) RSA (B) TAI (C) CAI of *O. japonicus*.

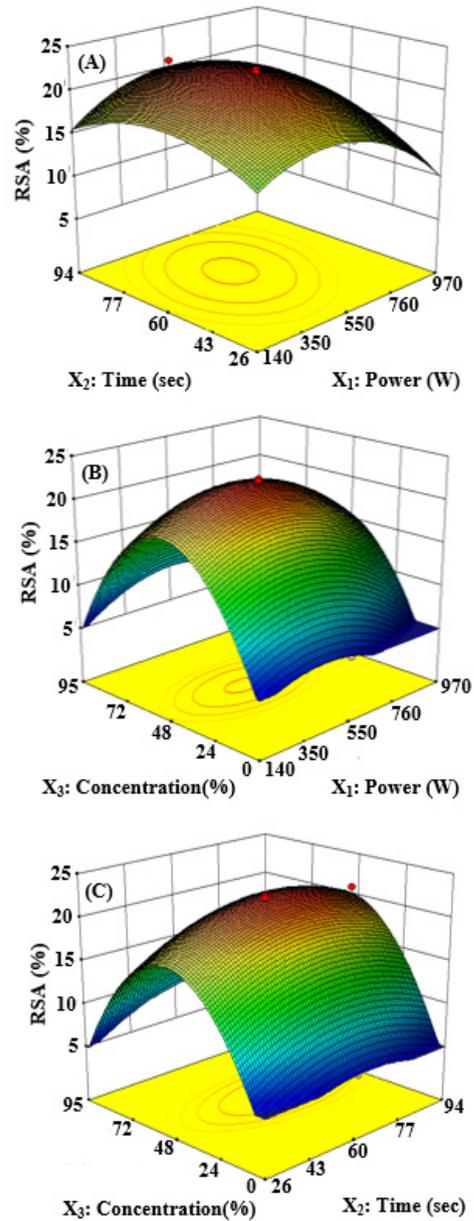


Fig. 2. Response surfaces plots represent effect of two variables on RSA. RSA as function of (A) microwave power and time (B) microwave power and ethanol concentration (C) time and ethanol concentration.

### 3.2 타이로시네이즈 활성 저해 평가

타이로시네이즈는 피부 표피층에 존재하는 멜라노솜에서 타이로신을 산화시켜 멜라닌으로 생성하는 주요 효소로 미백 효과를 증대시키기 위해서는 타이로시네이즈 활성 저해가 필수적이다[32].

본 연구에서는 타이로시네이즈를 효과적으로 저해하는 외송의 추출 조건을 예측하기 위해 마이크로파 출력( $X_1$ ), 추출시간( $X_2$ )과 에탄올 농도( $X_3$ )를 주요 공정 변수로 설정하여 17개의 추출 조건에서 최적화 실험을 수행한 결과, 외송 추출물의 TAI는 25.1 ~ 63.0 %을 보였으며 마이크로파 출력 550.0 W, 추출시간 60.0 초와 에탄올 농도 47.5 %가 TAI를 최대화하는 조건으로 예측되었다(Run #16 in Table 2). 또한 결과값을 바탕으로 도출된 2차 회귀 방정식의 적절성을 평가하였을 때  $R^2$ 은 0.9906로 1에 근접한 값을 나타내어 도출된 2차 회귀 방정식이 최적 추출 조건 예측을 위해 적합한 모델임을 확인하였다(Table 3).

외송으로부터 TAI를 최대화하는 추출 조건을 예측하기 위해 TAI의 변량을 시각화하여 단일 독립변수가 TAI에 미치는 영향을 확인한 결과 에탄올 농도( $p < 0.0001$ ), 마이크로파 출력( $p = 0.021$ )과 추출시간( $p = 0.087$ ) 모두 TAI에 유의한 영향을 미치는 것으로 확인되었으며 외송의 추출 공정 설계시 가장 유의한 것으로 확인된 에탄올 농도의 최적화가 선행되어야 함을 입증하였다(Table 4, Fig. 1B). 독립변수의 상호작용을 통한 TAI의 변화를 확인하고자 한 개의 독립변수를 중간값에 고정하고 두 개의 독립변수를 변화시켜 3차원 반응표면곡선으로 시각화하였다(Fig. 3). 에탄올 농도를 중간값인 47.5 %에 고정하고 마이크로파 출력과 추출시간의 영향을 나타내었을 때 두 변수가 증가함에 따라 최댓값인 62.8 %에 도달 후 다시 감소하는 경향을 보였다. 이는 TAI에 영향을 주는 폴리페놀이 마이크로파 출력과 추출시간이 증가함에 따라 열분해가 촉진되어 TAI가 감소한 것으로 사료된다. 이는 기존 연구사례에서 사과와 복숭아 부산물로부터 폴리페놀 추출시 추출온도와 추출시간이 증가함에 따라 총 폴리페놀의 함량이 각 0.502와 0.250 mg GAE/g에서 각 0.097과 0.077 mg GAE/g로 감소했다는 Adil 등의 연구 결과에 기반할 때 외송 추출시 한계 온도와 시간 이상에서 폴리페놀의 열분해가 급속도로 발생함을 유추할 수 있다[33]. 따라서 외송으로부터 생리활성 물질 추출시 미백 기능을 최대화하기 위해서는 에탄올 농도를 기반으로 추출 조건을 최적화가 진행되어야 함을 확인하였다.

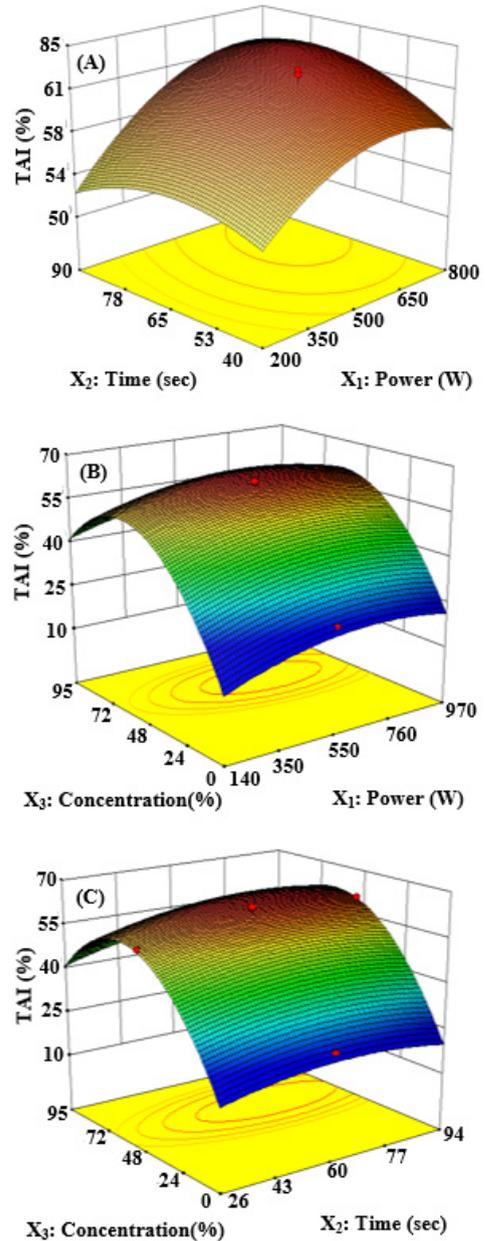


Fig. 3. Response surface plots represent effect of two variables on TAI. (A) TAI as function of microwave power and time (B) microwave power and ethanol concentration (C) time and ethanol concentration.

### 3.3 콜라게네이즈 활성 저해 평가

콜라겐은 세포 외 기질에서 피부 조직의 유지를 위해 필수적인 구조단백질로 다당류와 결합하여 세포의 다양한 생화학적 작용을 조절할 뿐 아니라 피부 손상

회복 및 피부 조직 재생 등의 역할을 수행한다[34]. 하지만 자외선, 외상과 노화 등에 의해 콜라겐을 분해하는 효소인 콜라게네이스의 활성이 촉진되면 피부 조직의 두께와 탄력 감소를 수반하여 주름 생성을 촉진하므로 이를 억제하기 위해서는 콜라게네이스의 활성 저해를 통해 콜라겐 분해를 감소시키는 것이 필수적이다[35].

와송으로부터 MAE를 적용하여 CAI를 최대화하기 위해 17개 추출 조건에 따른 와송 추출물의 CAI는 60.0 ~ 88.6 %로, 마이크로파 출력 550.0 W, 추출시간 60.0 초와 에탄올 농도 47.5 %에서 TAI를 최대화하는 추출 조건을 확보하였다(Run #15 in Table 2). 결과값을 기반으로 2차 회귀방정식을 도출한 결과, 2차 회귀방정식에 의한 예측값과 실험값의 합치도가  $R^2 = 0.9755$ 로 확인되어 2차 회귀방정식이 최적 추출 조건 확립을 위한 모델로 적합함이 입증되었다(Table 3). 또한 분산분석을 통해 마이크로파 출력( $p = 0.0498$ ), 추출시간( $p = 0.0348$ ) 대비 CAI에 가장 유의한 영향을 주는 에탄올 농도( $p = 0.0002$ )의 최적화가 우선적으로 고려되어야 함을 확인하였다(Table 4, Fig. 1C).

분산분석에서 확인된 독립변수들의 상호영향을 평가하기 위해 하나의 독립변수를 중간값에 고정하고 두 개의 독립변수에 따른 종속변수의 변화를 시각화하였다(Fig. 4). 추출시간과 에탄올 농도가 CAI에 미치는 영향을 평가하기 위해 마이크로파 출력을 550 W에 고정하고 두 변수의 상호영향을 평가한 결과, 앞선 RSA와 TAI의 경향과 유사하게 추출시간과 에탄올 농도가 증가함에 따라 CAI가 증가하였으나 최댓값 이후 급격히 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 블랙커런트 추출물의 폴리페놀이 추출온도가 증가함에 따라 70 %에서 54 % 까지 감소했다는 기반할 때 추출시간 증가가 온도 증가를 유발하고 열 민감성이 높은 폴리페놀이 분해되어 감소됨에 따라 콜라게네이스와 상호작용을 통한 효소 활성 저해 효과가 감소된 것으로 예측된다[36-38]. 따라서 에탄올 농도를 기반으로 추출 조건을 최적화하는 것이 와송으로부터 주름개선 가능성을 갖는 생리활성 물질의 추출을 최대화시키는 가장 효과적인 방법이 될 것으로 사료된다.

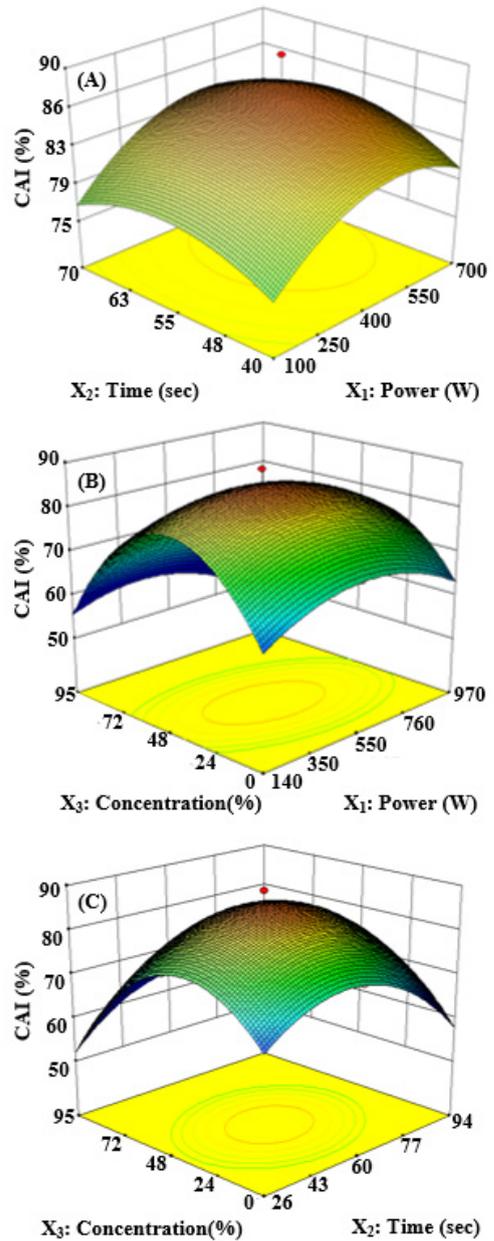


Fig. 4. Response surface plots represent effect of two variables on CAI. (A) CAI as function of microwave power and time (B) microwave power and ethanol concentration (C) time and ethanol concentration.

### 3.4 최적 추출 조건 예측 및 검증

앞선 단계에서 진행한 단일 변수 최적화를 기반으로 RSA, TAI와 CAI의 최적화 결과를 중첩하여 세 가지 종속변수를 공통으로 최적화하는 조건을 도출하기 위해 중

첩 최적화(superimposing optimization)를 진행하였다. 또한 CCD를 통해 예측된 최적 추출 조건을 적용하여 와송 추출물의 RSA, TAI와 CAI를 분석하였으며 이를 기반으로 CCD를 통한 최적 조건 확립 모델의 신뢰성을 검증하고자 하였다.

본 연구에서 예측된 최적 추출 조건은 마이크로파 출력 532.8 W, 추출시간 61.3 초와 에탄올 농도 47.5 %에서 RSA 22.1 %, TAI 62.2 %와 CAI 85.2 %로 예측되었다. 동일한 최적 조건에서 실시한 검증 실험값은 RSA 23.2 ± 0.8 %, TAI 60.5 ± 2.4 %와 CAI 84.1 ± 1.8 %로 확인되었으며 이는 CCD를 통해 예측된 값이 실제 실험값과 높은 합치도를 나타내어 CCD에 근거해 도출된 최적 추출 조건과 2차 회귀방정식의 유효성이 입증되었다(Fig. 5). 또한 반응표면분석법을 이용한 마이크로파 추출 조건이 기존 추출법 대비 추출시간과 비용을 절감하고 생리활성 물질의 생산성을 최대화함으로써 생리활성 물질 추출에 효과적이며 향후 천연물 유래 기능성 소재의 추출 효율 증대를 위한 주요 지표로 활용될 것으로 판단되었다.

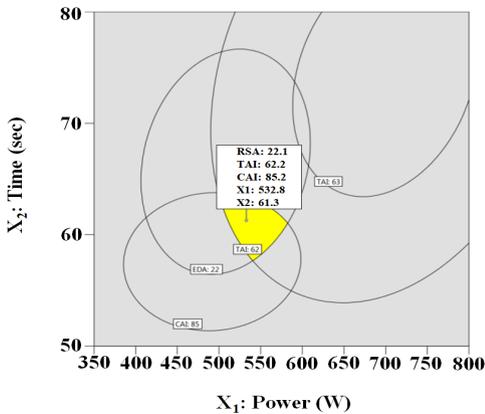


Fig. 5. Superimposing contour map for prediction of optimized conditions of TAI, CAI, and RSA from three independent variables, including microwave power, time, and ethanol concentration. X<sub>1</sub>; microwave power, X<sub>2</sub>; time.

### 3.5 함유물질 분석

통계학적 최적화를 통해 와송 추출물로부터 생리활성 물질 추출을 위한 최적 추출 조건을 확립하였으며 최적 추출 조건으로 추출을 진행한 와송 추출물의 함유물질을 확인하기 위해 LC-MS/MS를 이용하여 분자량 분포에 기반하여 함유물질을 분석하였다. 그 결과 이소퀘르시트

린과 헤스페레틴이 m/z 463.0과 301.0에서 [M-H]<sup>-</sup> 형태의 분자이온 피크로 확인되었다(Fig. 6). 분석된 이소퀘르시트린은 폴리페놀의 일종인 퀘르세틴에 하나의 포도당이 결합하여 존재하는 배당체로, 활성산소를 직접적으로 소거하여 항산화 활성을 나타낼 뿐 아니라 타이로시나제의 활성을 저해시켜 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 알려져 있다[39,40]. 또한 헤스페레틴은 헤스페리딘의 아글리콘 형태로, 엘라스타제, 히알루루니다제 및 콜라가네이즈의 활성을 억제하고 염증성 인테루킨과 기질 금속단백질분해효소의 발현을 저해시켜 항주름 활성을 지닐 뿐 아니라 항산화 메커니즘에서 nuclear factor erythroid-2-related factor-2와 heme oxygenase-1의 발현을 상향 조절함으로써 활성산소 소거에 관여하여 우수한 항산화 활성을 갖는다고 보고되었다[41,42]. 따라서 본 연구에서 확인한 와송 추출물의 항산화 활성과 미백 및 주름개선 효과는 LC-MS/MS를 통해 분석된 이소퀘르시트린과 헤스페레틴에서 비롯된 것으로 추측되며 이를 통해 향후 와송 추출물의 고부가가치 소재로서의 활용 가능성이 입증되었다.

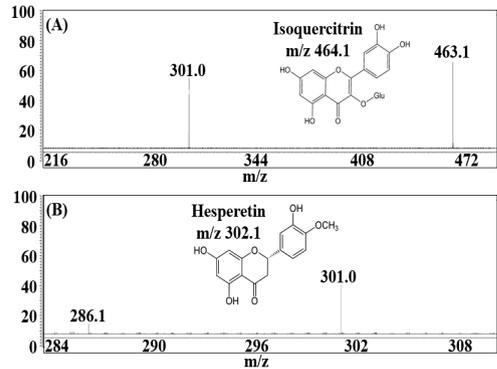


Fig. 6. LC-MS/MS spectra for analysis of main compounds in *O. japonicus*. (A) isoquercitrin (B) hesperetin

## 4. 결론

본 연구에서는 와송 추출시 항산화 활성, 미백과 주름 개선 기능성을 갖는 생리활성 물질을 보다 효과적으로 생산하기 위해 CCD를 이용하여 MAE 조건을 최적화하였다. 마이크로파 출력, 추출시간과 에탄올 농도를 독립 변수로 설정하였을 때 항산화 지표인 RSA, 미백 지표인 TAI와 항주름 지표인 CAI를 동시에 최대화하는 조건으로는 마이크로파 출력 532.8 W, 추출시간 61.3 초와 에

탄을 농도 47.5 %가 예측되었다. 예측된 조건에서 외송 추출물의 RSA, TAI와 CAI는 각 23.2 %, 60.5 %와 84.1 %로 도출되었으며 추출 조건별 RSA, TAI와 CAI에 대한 2차 회귀방정식의 R<sup>2</sup>값은 0.9708 ~ 0.9757로 예측값과 실험값의 유사한 값을 나타내어 회귀방정식이 신뢰할 수 있음을 확인하였다. 이는 MAE를 적용한 외송 추출시 통계학적 최적화를 이용하여 효과적으로 생리활성 물질의 추출을 증대시킬 수 있으며 외송 추출물의 항산화 활성, 미백과 주름개선 가능성이 우수함을 확인함으로써 외송이 기능성 화장품용 소재로서 활용성이 높음을 보여주는 결과이다. 이후 최적 조건으로 외송 추출물의 함유물질을 분석한 결과, 이소퀘르시트린과 헤스페레틴이 확인됨에 따라 외송으로부터 MAE를 활용하여 생리활성 물질을 효율적으로 추출할 수 있음이 확인되었다. 이로써 항산화 활성, 미백과 주름개선 가능성을 갖는 화장품 소재를 생산함에 있어 원료 공급 비용 절감과 효율적인 추출 공정의 확보가 가능한 추출 공정 수립을 위한 기초자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## References

- [1] E. R. Gonzaga, "Role of UV light in photodamage, skin aging, and skin cancer: importance of photoprotection," *Am. J. Clin. Dermatol.*, vol. 10, pp. 19-24, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2165/0128071-200910001-00004>
- [2] Y. C. Boo, "Emerging strategies to protect the skin from ultraviolet rays using plant-derived materials," *Antioxidants*, vol. 9, no. 7, p. 637, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9070637>
- [3] K. Paria, D. Paul, T. Chowdhury, S. Pyne, R. Chakraborty, and S. M. Mandal, "Synergy of melanin and vitamin-D may play a fundamental role in preventing SARS-CoV-2 infections and halt COVID-19 by inactivating furin protease," *Transl. Med. Commun.*, vol. 5, no. 1, pp. 1-14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41231-020-00073-y>
- [4] H. K. Lee, J. W. Ha, Y. J. Hwang, and Y. C. Boo, "Identification of L-cysteinamide as a potent inhibitor of tyrosinase-mediated dopachrome formation and eumelanin synthesis," *Antioxidants*, vol. 10, no. 8, p. 1202, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10081202>
- [5] A. Y. Lee, "Skin pigmentation abnormalities and their possible relationship with skin aging," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 7, p. 3727, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22073727>
- [6] J. T. E. Lim, Frcpi, and Fams, "Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid," *Dermatologic Surg.*, vol. 25, no. 4, pp. 282-284, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1524-4725.1999.08236.x>
- [7] W. Westerhof and T. J. Kooyers, "Hydroquinone and its analogues in dermatology—a potential health risk," *J. Cosmet. Dermatol.*, vol. 4, no. 2, pp. 55-59, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2005.40202.x>
- [8] C. C. Zouboulis, R. Ganceviciene, A. I. Liakou, A. Theodoridis, R. Elewa, and E. Makrantonaki, "Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment," *Clin. Dermatol.*, vol. 37, no. 4, pp. 365-372, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinidermatol.2019.04.002>
- [9] P. Panwar, G. S. Butler, A. Jamroz, P. Azizi, C. M. Overall, and D. Brömme, "Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases," *Matrix Biol.*, vol. 65, pp. 30-44, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.06.004>
- [10] B. Pomierny, W. Krzyżanowska, Ż. Broniowska, B. Strach, B. Bystrowska, B. Starek-Świechowicz, A. Maciejaska, A. Skórkowska, J. Wesolowska, M. Walczak, and B. Budziszewska, "Benzophenone-3 passes through the blood-brain barrier, increases the level of extracellular glutamate, and induces apoptotic processes in the hippocampus and frontal cortex of rats," *Toxicol. Sci.*, vol. 171, no. 2, pp. 485-500, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz160>
- [11] N. A. Elmarzugi, E. I. Keleb, A. T. Mohamed, Y. S. Issa, A. M. Hamza, A. A. Layla, M. Salama, and A. M. Bentaleb, "The relation between sunscreen and skin pathochanges mini review," *Int. J. Pharm. Sci. Invent.*, vol. 2, no. 7, pp. 43-52, 2013.
- [12] Y. Il Kim, S. W. Park, I. H. Choi, J. H. Lee, H. J. Woo, and Y. Kim, "Effect of *Orostachys japonicus* on cell growth and apoptosis in human hepatic stellate cell line LX2," *Am. J. Chin. Med.*, vol. 39, no. 03, pp. 601-613, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1142/s0192415x11009068>
- [13] J. Min, C. Seo, H. J. Park, Y. B. Kim, H. S. Lee, M. Ji, S. B. Choi, S. J. Oh, K. W. Park, and M. J. Paik, "Flavonoid Profiling Analysis by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 40, no. 12, pp. 1162-1166, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/bkcs.11885>
- [14] S. Hur, E. Jang, and J. H. Lee, "Beneficial actions of *Orostachys japonica* and its compounds against tumors via MAPK signaling pathways," *Nutrients*, vol. 13, no. 2, p. 555, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13020555>
- [15] S. M. Lim, H. J. Park, and Y. J. Cho, "Antioxidative and biological activity of extracts from *Orostachys japonicus*," *J. Appl. Biol. Chem.*, vol. 60, no. 4, pp. 293-300, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3839/jabc.2017.046>
- [16] L. K. Sun and L. H. Seon, "Anti-obesity Effects of the Water Extract from *Orostachys japonicus* in High-fat

- Diet-Fed Mice," *Microbiology and Biotechnology Letters*, vol. 45, no. 4, pp. 284-290, 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.4014/mbl.1707.07001>
- [17] D. H. Gam, S. Y. Kim, and J. W. Kim, "Optimization of ultrasound-assisted extraction condition for phenolic compounds, antioxidant activity, and epigallocatechin gallate in lipid-extracted microalgae," *Molecules*, vol. 25, no. 3, p. 454, 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25030454>
- [18] A. H. Nour, A. R. Oluwaseun, A. H. Nour, M. S. Omer, and N. Ahmed, "Microwave-assisted extraction of bioactive compounds," *Microw. heating. Electromagn. fields causing Therm. non-thermal Eff.*, pp. 1-31, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.96092>
- [19] D. H. Gam, J. H. Park, J. W. Hong, S. J. Jeon, J. H. Kim, and J. W. Kim, "Effects of Sargassum thunbergii extract on skin whitening and anti-wrinkling through inhibition of TRP-1 and MMPs," *Molecules*, vol. 26, no. 23, p. 7381, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26237381>
- [20] J. H. Kim, Y. S. Hwang, M. H. Kang, S. H. Yeom, J. H. Park, and J. W. Kim, "Enhancement of the Skin-Whitening and UV-Absorption Effects of Angelica gigas Extract by Lactiplantibacillus plantarum Fermentation," vol. 51, no. 5, pp. 412-418, 2022.  
DOI: <https://doi.org/10.3746/ikfn.2022.51.5.412>
- [21] J. W. Hong, H. Y. Park, J. H. Kim, S. H. Yeom, and J. W. Kim, "Antioxidation and anti-photoaging effects of white Taraxacum coreanum extract by Lactobacillus plantarum," *J. Korea Acad. Coop. Soc.*, vol. 22, no. 4, pp. 554-562, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2021.22.4.554>
- [22] O. Soufi, L. Medouni-Haroune, M. Bachirbey, S. Medouni-Adrar, F. Idir, T. Heddad, L. Ouldsaadi, C. Romero, K. Madani, L. Makhlof-Boulekbache, Statistical optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from olive pomace. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 36, pp. 101260. 2023.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/i.scp.2023.101260>
- [23] D. H. Gam, J. W. Hong, J. H. Kim, and J. W. Kim, Skin-whitening and anti-wrinkle effects of bioactive compounds isolated from peanut shell using ultrasound-assisted extraction. *Molecules*, vol. 26, no. 5, pp. 1231, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26051231>
- [24] F. Dahmoune, B. Nayak, K. Moussi, H. Remini, and K. Madani, Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food chemistry*, vol. 166, pp. 585-595, 2015.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/i.foodchem.2014.06.066>
- [25] E. K. Im, and J. C. Yang, A Study on the Antioxidative Effect of Orostachys Japonicus A. Berger Ethyl Acetate Fraction. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, vol. 38, no. 1, pp. 118-125, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.12925/jkocs.2021.38.1.118>
- [26] H. Tijjani, M. H. Zangoma, Z. S. Mohammed, S. M. Obidola, C. Egbuna, and S. I. Abdulai, "Polyphenols: Classifications, biosynthesis and bioactivities," *Funct. foods nutraceuticals Bioact. components, Formul. Innov.*, pp. 389-414, 2020.  
DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-42319-3\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-030-42319-3_19)
- [27] G. E. N. H. Kumar, D. K. Maurya, B. Viswanath, and M. Balaji, "Role of phytoconstituents and their mechanism in attenuation of radiation effects: an update," in *Recent developments in applied microbiology and biochemistry*, vol. 2, pp. 55-76, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821406-0.00007-2>
- [28] L. J. Saunders, R. A. Russell, and D. P. Crabb, "The coefficient of determination: what determines a useful R2 statistic?," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 53, no. 11, pp. 6830-6832, 2012.  
DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10598>
- [29] M. De la Guardia and S. Armenta, "Chapter 5—Greening Sample Treatments," *Compr. Anal. Chem. Guard. MDL, Armen. S., Eds*, vol. 57, pp. 87-120, 2011.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53709-6.00005-7>
- [30] S. Machmudah, H. Kanda, and M. Goto, "Hydrolysis of biopolymers in near-critical and subcritical water," in *Water extraction of bioactive compounds*, pp. 69-107, 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809380-1.00003-6>
- [31] J. Wyman, "The dielectric constant of mixtures of ethyl alcohol and water from-5 to 40," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 53, no. 9, pp. 3292-3301, 1931.  
DOI: <https://doi.org/10.1021/ja01360a012>
- [32] G. M. Casanola-Martin, H. Le-Thi-Thu, Y. Marrero-Ponce, J. A. Castillo-Garit, F. Torrens, A. Rescigno, C. Abad, and M. T. H. Khan. "Tyrosinase enzyme: 1. An overview on a pharmacological target," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 14, no. 12, pp. 1494-1501, 2014.  
DOI: <https://doi.org/10.2174/1568026614666140523121427>
- [33] I. H. Adil, H. I. Cetin, M. E. Yener, and A. Bayındırlı, "Subcritical (carbon dioxide+ ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 43, no. 1, pp. 55-63, 2007.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.04.012>
- [34] J. Caldeira, A. Sousa, D. M. Sousa, and D. Barros, "Extracellular matrix constitution and function for tissue regeneration and repair," in *Peptides and proteins as biomaterials for tissue regeneration and repair*, pp. 29-72, 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100803-4.00002-4>
- [35] S. Inomata, K. Takada, M. Tsunenaga, M. Fukuda, Y. Matsunaga, S. Amano, K. Kobayashi, T. Nishiyama, and Y. Kohno. "Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 120, no. 1, pp. 128-134, 2003.

DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12021.x>

- [36] A. Antony and M. Farid, "Effect of temperatures on polyphenols during extraction," *Appl. Sci.*, vol. 12, no. 4, p. 2107, 2022.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/app12042107>
- [37] J. E. Cacace and G. Mazza, "Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol," *J. Food Sci.*, vol. 68, no. 1, pp. 240-248, 2003.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14146.x>
- [38] J. Wittenauer, S. Mäckle, D. Sußmann, U. Schweiggert-Weisz, and R. Carle, "Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity," *Fitoterapia*, vol. 101, pp. 179-187, 2015.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/i.fitote.2015.01.005>
- [39] S. B. Lee and D. W. Chung, "Study on the synthesis of isoquercitrin by enzymatic partial hydrolysis," *Appl. Chem. Eng.*, vol. 25, no. 2, pp. 152-156, 2014.  
DOI: <https://doi.org/10.14478/ace.2013.1119>
- [40] K. Valentová, J. Vrba, M. Bancířová, J. Ulrichová, and V. Křen, "Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 68, pp. 267-282, 2014.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/i.fct.2014.03.018>
- [41] R. Novotná, D. Škařupová, J. Hanyk, J. Ulrichová, V. Křen, P. Bojarová, K. Brodsky, J. Vostálová, and J. Franková, "Hesperidin, Hesperetin, Rutinose, and Rhamnose Act as Skin Anti-Aging Agents," *Molecules*, vol. 28, no. 4, p. 1728, 2023.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28041728>
- [42] A. Khan, M. Ikram, J. R. Hahm, and M. O. Kim, "Antioxidant and anti-inflammatory effects of citrus flavonoid hesperetin: Special focus on neurological disorders," *Antioxidants*, vol. 9, no. 7, p. 609, 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9070609>

김 소 희(So-Hee Kim)

[준회원]



- 2022년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 응용생물과학과 식품과학전공 석사과정

<관심분야>

바이오, 항암, 유전

박 하 영(Ha-Young Park)

[준회원]



- 2022년 9월 ~ 현재 : 선문대학교 응용생물과학과 식품과학전공 석사과정

<관심분야>

바이오, 생물, 식품

강 민 호(Min-Ho Kang)

[준회원]



- 2023년 9월 ~ 현재 : 선문대학교 응용생물과학과 식품과학전공 석사과정

<관심분야>

바이오, 생물, 식품

김 진 우(Jin-Woo Kim)

[정회원]



- 1997년 2월 : 인하대학교 생물공학과 (공학석사)
- 2000년 5월 : Colorado State Univ.(美) 화학공학 (공학석사)
- 2004년 10월 : McGill Univ. (캐) Biosystems Engineering (박사)
- 2015년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 식품과학과 교수

<관심분야>

생물, 바이오