

능실의 항산화, 항염증 및 방부 효과 연구

장혜인[†]

세명대학교 화장품뷰티생명공학부
(2018년 7월 10일 접수: 2018년 9월 8일 수정: 2018년 9월 18일 채택)

Study on the antioxidant, anti-inflammatory and Preservative features *Water Chestnut*

Hye In Jang[†]

*School of Cosmetic Science and Beauty Biotechnology, Semyung University
65, Semyeong-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea 27136
(Received July 10, 2018; Revised September 8, 2018; Accepted September 18, 2018)*

요약 : 본 연구는 70 % 에탄올 추출물에서 추출한 *Water Chestnut*의 항산화, 항염증 및 방부 효과를 평가하고자 하였다. RAW 264.7 세포를 사용하여 조사한 마름열매 추출물의 독성은 세포 생존율의 90 % 이상을 나타내었으며 폴리페놀 추출물의 총 함량은 353.1 ± 5.6 mg / g이었고 플라보노이드 총 함량은 26.2 ± 1.4 mg / g이었다. 항산화 활성을 확인하기 위한 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 라디칼 감소는 마름 열매 추출물 농도 1 ~ 1000 (μ g / ml)범위에서 각각 17.0 ± 2.8 % ~ 88.6 ± 0.6 %의 감소효과를 보였고 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS) 라디칼의 제거 범위는 각각 2.3 ± 0.8 % ~ 93.9 ± 0.2 %였다. 활성 산소종 (ROS)에서의 효과는 1, 10, 100 (μ g / ml), 100 μ g / ml 농도에서 p <.01의 유의한 감소를 보였다. 1, 10, 100 (μ g / ml) 농도의 Nitric Oxide (NO) 생성량을 측정 한 결과, 유의한 (p <.001, p <.01)의 감소가 나타났다. 미생물 방부효과를 확인하기 위한 페이퍼 디스크를 사용하는 항 박테리아 기능과 페트리 필름을 사용하는 방부제 특성에 대해서는 유의한 효과가 나타나지 않았다.

주제어 : 능실, 수생식물, 항산화, 항염증, 방부

Abstract : The purpose of this study was to assess the antioxidant, anti-inflammatory and preservative effects of *Water Chestnut* from 70% ethanol extracts.

The toxicity of extracts from *Water Chestnut* investigated using the RAW 264.7 cell showed higher than 90% of cell survival rate. The total content of polyphenol ethanol extract was 353.1 ± 5.6 mg/g, while the total content of flavonoid was 26.2 ± 1.4 mg/g. With a concentration level of 1 ~ 1000 (μ g / ml) ethanol extract of *Water Chestnut* the range of removal of 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radicals was $17.0 \pm 2.8\%$ ~ $88.6 \pm 0.6\%$ respectively and the range of removal of 2,2'

[†]Corresponding author
(E-mail: inijjang7@naver.com)

-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radicals was also $2.3 \pm 0.8 \% \sim 93.9 \pm 0.2 \%$ respectively. There were decreases in reactive oxygen species(ROS) generations ethanol extracts of *Water Chestnut* 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) and significance decrease at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < .01$).

As a result of measuring the Nitric Oxide(NO) generation amount of *Water Chestnut* extract 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) concentration exhibited significant ($p < .001$, $p < .01$) decreases.

For the anti-bacterial features using a paper disk and the preservative features using petri film, no significance was found and therefore water chestnut extracts had not anti-bacterial or preservative features.

Keywords : *Water Chestnut, Water Plant, antioxidant, anti-inflammatory, preservative*

1. 서론

현대 사회에서는 삶의 질적 향상과 함께 웰빙에 대한 관심이 높아지면서 식품, 생활필수품, 화장품 등에 천연기능성 요구가 강해지고 있다[1]. 이러한 추세로 인해 새로운 기능성 물질을 찾으려는 연구와 노력이 활발하게 진행되고 있으며 천연물추출에 대한 안전성과 효능에 대한 많은 관심을 갖고 있다[2].

일반적으로 화장품을 사용하는 동안 공기 중의 세균이 침입하거나 사용자의 부주의와 제조과정에서의 청결하지 못함으로 인해 미생물이 번식하여 오염되며[3] 화장품에 침입한 미생물은 대사 활동을 통해 유화수소, 아민, 암모니아 등이 발생하여 화장품 향이 바뀔 뿐만 아니라 피부의 염증 반응을 일으킬 수 있는 조건이 된다[4]. 이러한 문제점을 보완하기 위하여 화장품에는 여러 화학적 성분을 함유시킨다.

화장품의 미생물 번식으로 인해 피부의 트러블을 유발하고 건강상의 문제를 일으킬 수 있다는 단점을 보완하기 위하여 피부에 대한 자극, 알레르기 독성이 없어야 하는 안전성과 보관에 따른 변질, 변색, 변취, 산패, 미생물의 오염이 없어야 하는 안정성을 고려하여 화장품에 따른 적절한 천연물질을 사용하여야 한다[5].

화학적 부작용이 생길 수 있는 화학적 성분들을 줄이기 위해 인체에 무해하면서 보다 강한 항산화 효과를 내는 천연 항산화제와 천연 항균 소재의 화장품을 개발하고자하는 필요성을 느낀다[6-8].

기능성 화장품의 개발에 대한 요구는 생명공학 등을 이용한 기술 발전과 함께 한방약재와 천연물 원료를 이용한 한방 화장품의 관심을 증가시

키고 있는데, 한방 화장품은 화학 성분의 화장품에 비해 인체와 피부에 미치는 해가 적은 것이 큰 장점이다[9].

천연 항산화제의 대부분은 우리나라를 비롯한 동양권에서 오랜 기간 질병치료와 예방의 목적으로 사용되어온 한약재가 많으며 식품의 2차 대사산물이 가지는 생체에 대한 생리활성 효과를 이용하는 천연재료로서 경험적으로 선택·이용되어 인체에 대한 안전성은 검증된 것이라 할 수 있다[10].

능실(*Water Chestnut*)은 마름의 열매로 냉온대와 난온대 지방에서 자라며 일본, 대만, 만주, 중국, 우수리, 북반구 전역 등에 분포되어 있으며 수생식물 중 부엽식물에 속한다[11]. 약 15%가 전분이며 포도당, 단백질, 비타민 B, C 등을 함유하며 이밖에 엘라지탄닌(ellagitannin)형의 트라판이 있으면 위장이나 몸 상태를 조절하는 역할을 한다[12]. 마름 열매를 달여 먹으면 두창을 낮게 하고 술독을 풀며 눈을 밝게 할 뿐만 아니라 위암, 자궁암에 좋은 성분이 함유 되어 있다[13]. 또한 광노화 억제 효능이 있음이 선행 연구에 의해서 알려져 있다[14].

본 연구에서는 수생식물의 선행연구와 한의학에서의 효능[12] 등을 바탕으로 화장품의 미생물 번식과 합성 소재로 인한 부정적인 영향을 줄이고 천연소재가 가지고 있는 효능을 입증시켜 화장품의 소재로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 시료의 추출방법

능실은 삼흥물산(Seoul, Korea)에서 구입하여

대전에 위치한 D대학의 난치성 면역질환의 동서 생명의학연구 지역혁신센터(이하 TBRC RIC)에서 정선 후 사용하였다.

능질 30 g에 70 % 에탄올(C_2H_5OH) 500 mL 을 넣고 3시간 동안 환류 추출 후 여과액을 얻었 으며, 얻어진 여과액을 회전진공농축기 (Büchi B-480 Co., Flawil, Switzerland) 에서 감압 농축 하였다. 농축된 용액을 동결건조기 (EYELA FDU-540 Co., Tokyo, Japan)로 동결 건조하여 능질 분말 1.3g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저 온 냉동고 ($-80^{\circ}C$)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다. 이 때 70% 에탄올을 사용한 이유는 가장 보편화된 추출법으로 추출 공정이 간단하고 비용이 적게 들어 가장 널리 사용되며 수생식물의 여러 자료 에서 사용되어 안전성이 있다고 판단되어 사용하 게 되었다[15].

2.2. 균주

항균활성 및 세균 저해농도 측정에 사용한 시험균주는 *A. niger*, *C. albicans*, *E. Coli*, *S. aureus*로 한국 생명공학연구원 유전자은행에서 분양받아 사용하였으며 종류 및 배지, 각 균의 병 원성은 <Table. 1>과 같다.

세균류인 *E.Coli*와 *S.aureus*는 단일 균의 집락 1 개를 루프를 취해 TSB(trypticase soy broth)에 접종한 뒤 $37^{\circ}C$ 에서 24시간 동안 배양하여 UV-VIS Spectro photometer를 이용해 균액의 세포 수를 측정하였다.

효모 및 곰팡이류인 *A. niger*와 *C. albicans*는 $27^{\circ}C$ 에서 2-3일간 배양하여 효모는 영양세포만을 곰팡이는 포자만을 분리한 후, 현미경으로 균 액의 세포수를 측정 하였다.

2.3. 세포독성 측정

2.3.1. RAW 264.7 cell 배양

동결된 RAW 264.7 세포를 50 mL 튜브에 옮 기고 PBS (Phosphate buffer saline) 9 mL을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상청액을 제거하였다. 세포가 있는 튜브 에 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 mL을 넣어 부유시켰다. 100 mm dish에 9 mL의 배지를 넣고, 세포를 부유시켜 세포배양기 ($37^{\circ}C$, 5% CO_2)에 서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응 시켰다.

2.3.2. 세포 독성 실험

RAW 264.7 세포는 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 실험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, 능질을 1, 10, 100 ($\mu g/ml$)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl 의 water soluble tetrazolium solution을 첨가하여 세포배양기 ($37^{\circ}C$, 5% CO_2)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정 하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표 시하였다.

2.4. 항산화 활성 측정

2.4.1. 총 polyphenol 함량 측정

능질 추출물의 polyphenol 함량은 Gutfinger의 방법[16]을 응용하여 측정하였다. 추출 시료용액 1 mL에 50% Foiln-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반

Table 1. List of Microorganisms Used as Test Strains for Antimicrobial and Antimycotic Activities of Medical Herbs

Microorganism	Group	Pathogenicity	Medium
<i>A. niger</i> (KCTC 6971)	Fungi	Aspergillosis	SDA/SDB
<i>C. albicans</i> (KCTC 7270)	Yeasts	Candidiasis	SDA/SDB
<i>E. Coil</i> (KCTC 2571)	Gram(-)	Diarrgea, Enterogastritis, Poisoning	TSA/TSB
<i>S. aureus</i> (KCTC 7270)	Gram(+)	Staphylococcal scaled-skin syndrome	TSA/TSB

응용액에 Na_2CO_3 포화용액 1 ml와 7.5 ml 증류수를 차례로 혼합하여 30분간 방치시킨 뒤, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 취해 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenol 함량은 gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며 측정단위로는 GAE (Gallic acid equivalent)/g을 사용하였다

2.4.2. 총 flavonoid 함량 측정

능실 추출물의 flavonoid 함량은 Nieva Moreno[17] 등의 방법을 응용하여 측정하였다. 각 샘플 0.1 ml와 80% 에탄올 0.9 ml을 혼합한 혼합물 0.5 ml에 10% aluminium niatate와 1M potassium acetate 0.1 ml 그리고 80% 에탄올 4.3 ml을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

2.4.3. DPPH radical 소거능 측정

Free radical 소거 활성 시험은 안정한 free radical DPPH를 사용하는 방법이다. 능실 추출물은 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μl 와 능실 추출물을 각각 100 μl 씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료액의 대조군은 증류수를 넣었으며, DPPH 용액의 대조군으로써는 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH Free radical 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

소거율 (%) =

$$\left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.4.4. ABTS radical 소거능 측정

ABTS assay 방법은 기존에 보고된 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. 능실 추출물은 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온 ($\text{ABTS}^{\cdot+}$)을 형성시킨 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도

값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 용액 150 μl 와 능실 추출물을 5 μl 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

소거율 (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{(시료 첨가군의 흡광도)}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.4.5. 세포 내 ROS(reactive oxygen species) 생성 측정

RAW 264.7 세포에서 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, 능실 추출물을 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 처리하고, LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA는 10 μM 이 되도록 첨가하여 15분 동안 암소, 상온에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리 한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μl 를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

2.5. Nitric Oxide(NO) 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitric oxide 농도를 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 능실 추출물을 각각 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도와 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. N_1 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하여 10분간 상온에서 반응 한 후, N_2 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하고 10분간 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

2.6. 항균활성 측정

2.6.1. Paper disk를 이용한 항균활성 실험

능질 추출물의 항균 활성은 Davison 등의 paper disk 방법[18]에 따라 다음과 같이 검색하였다. 세균류는 TSA를 멸균하여 50°C로 냉각한 뒤 배지에 1×10^6 CFU/ml이 포함되도록 균액을 접종하여 현탁 시켰다. 직경 90 mm인 petri dish에 20 ml씩 분주하여 굳힌 뒤 각 균의 배지마다 각각의 추출물을 500 μ l씩 점적한 직경 8 mm의 paper disk를 올려놓았다. 37°C 항온기에서 24시간 동안 배양하였다.

효모 및 곰팡이류는 멸균하여 50°C에서 냉각한 SDA 배지에 1×10^6 CFU/ml이 포함되도록 접종해 현탁 시켰다. 균을 접종한 SDA 배지를 직경 90 mm인 petri dish에 20 ml씩 분주하여 굳힌 뒤 각 균의 배지마다 각 균의 배지마다 각각의 추출물을 500 μ l씩 점적한 직경 8 mm의 paper disk를 올려놓았다. 27°C 항온기에서 48시간 동안 배양하였다. paper disk 주위에 생긴 저해환의 유무로 생약 추출물의 항균활성을 확인하였다.

2.6.2. Petri film을 이용한 방부력 측정

능질 추출물의 제형 내 방부력을 시험하기 위해 식품의약품안전청(2004)의 공인을 받아[19], 식품미생물검사에 사용되고 있는 3M사의 건조배지 필름을 이용하였다[20]. 각 제제를 1 ml씩 취하여 9 ml의 멸균 희석수에 용해한 뒤 *E. Coli*와 *S. aureus*는 세균용 petri film에, *A. niger*와 *C. albicans*는 효모 및 곰팡이류 petri film에 각각 점적하여 눌러 고정시킨 후 세균배지는 35°C incubator에서 48시간 배양하고, 효모 및 곰팡이 배지는 25°C incubator에서 120시간 배양 한 다음 균의 발현 유무와 균수를 확인하였다.

2.7 통계처리

모든 통계처리는 Student' t-test를 이용하여 유의 수준 0.05, 0.01, 0.001 ($p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$) 수준에서 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. RAW 264.7 세포에 대한 독성 검사

능질의 70% 에탄올 추출물의 독성에 대해 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 능질 추출물을 여러

농도로 처리하여 24시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 DMSO를 처리한 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타냈을 때 능질 추출물은 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 $100.9 \pm 1.0\%$, $94.0 \pm 7.7\%$, $92.3 \pm 8.9\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 능질 추출물은 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.(Fig. 1)

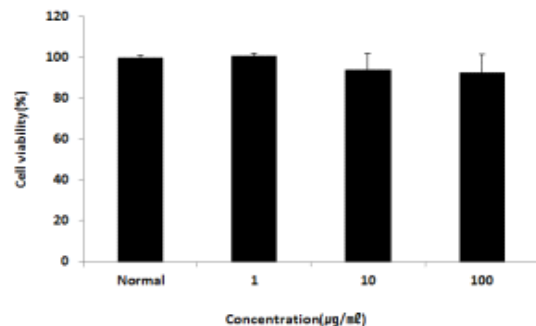


Fig. 1. Cell viability of WC extract in RAW 264.7 cells.

Each cell was treated with 1, 10 and 100 (μ g/ml) of WC extract for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

3.2 항산화 활성에 미치는 영향

3.2.1. 총 polyphenol 함량

능질 추출물에 존재하는 총 polyphenol 함량은 3회에 거쳐 실험한 후 나온 값의 평균값과 표준 편차값을 계산하였고 gallic acid를 표준물질로 하여 측정된 결과, <Table 2>와 같이 능질 추출물은 353.1 ± 5.6 mg/g으로 나타났다. 이는 같은 방법으로 실험한 한약재인 고본 추출물 90.48 mg/g, 진범 추출물 90.20 mg/g, 사상자 추출물 88.55 mg/g, 승마 추출물이 88.10 mg/g보다 매우 높은 함량을 나타내었다[21].

3.2.2. 총 flavonoid 함량

능질 추출물에 존재하는 총 플라보노이드 함량은 3회에 거쳐 실험한 후 나온 값의 평균값과 표준 편차값을 계산하였고 quercetin을 표준물질로 하여 측정된 결과, <Table 3>과 같이 능질 추출물은 26.2 ± 1.4 mg/g으로 대청엽 에탄올 추출

Table 2. Total polyphenol contents of WC extracts

Sample	1	2	3	Total polyphenolics (mg/g ext.)
Water Chestnut	350.4	361.4	342.5	353.1±5.6

Table 3. Total flavonoid contents of WC extracts

Sample	1	2	3	Total flavonoid (mg/g ext.)
Water Chestnut	26.2	23.9	24.2	26.2±1.4

물의 플라보노이드 함량 33.37 mg/g과[22] 유사한 함량을 나타내었다.

3.2.3. DPPH radical 소거능

능실 추출물의 DPPH 소거율을 측정된 결과, 능실 추출물은 1, 10, 100, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $17.0 \pm 2.8\%$, $54.9 \pm 4.8\%$, $85.6 \pm 1.4\%$, $88.6 \pm 0.6\%$ 로 10 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 저농도에서도 50%이상의 라디칼 소거능을 보였고 농도 의존적으로 소거능이 증가하였다. 국화류에 해당하는 선복화, 홍화, 감국 에탄올 추출물의 100~1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 DPPH 라디칼 소거능 실험결과 선복화 80.56~92.68%, 홍화 32.62~77.56%, 감국 59.53~85.99%로[23] 유사한 소거능을 확인하였다. (Fig. 2)

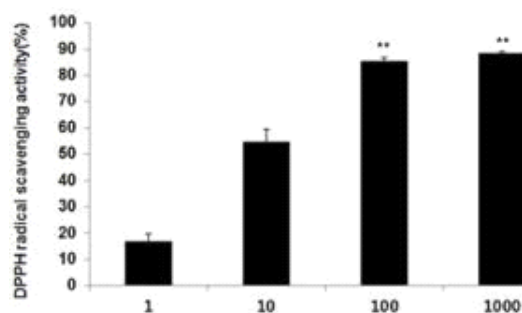


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity of WC extract at various concentration. Extract was incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. (Significance of results, ** : $p < .01$, * : $p < .05$).

3.2.4. ABTS radical 소거능

능실 추출물의 ABTS 소거율을 측정된 결과, 능실 추출물은 1, 10, 100, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $2.3 \pm 0.8\%$, $30.2 \pm 6.5\%$, $92.2 \pm 2.0\%$, $93.9 \pm 0.2\%$ 로 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가함을 확인하였고 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 이상에서는 90%가 넘는 우수한 소거능을 보임을 알 수 있었다. (Fig. 3)

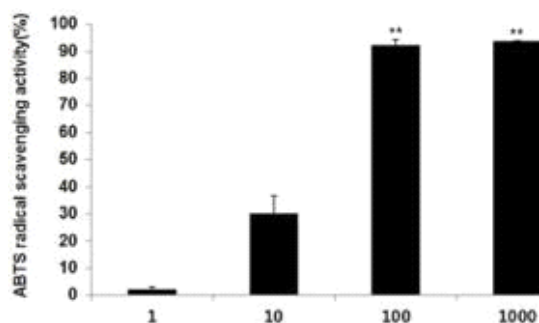


Fig. 3. ABTS cation radical scavenging activity of WC extract at various concentration. Extract was incubated with ABTS solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 734 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. (Significance of results, ** : $p < .01$, * : $p < .05$).

3.2.5. ROS (reactive oxygen species)

생성량에 미치는 영향

능실 추출물의 ROS 생성 저해 활성을 측정된 결과, 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타냈을 때 능실 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 103.8

± 2.2%, 94.1 ± 3.7%, 60.0 ± 2.0%로 나타나, 100 µg/ml 농도에서 유의성 있는 ($p < .01$) 감소를 나타내었다. (Fig. 4)

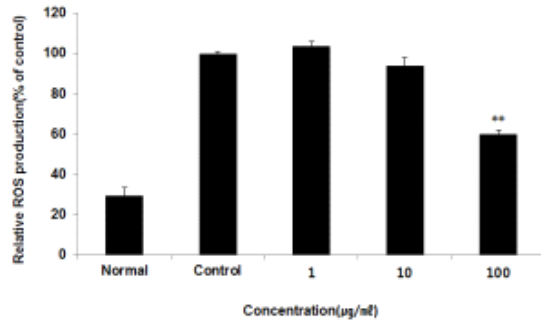


Fig. 4. Effect of WC extract on ROS production in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 1, 10 and 100 (µg/ml) of WC extract and LPS (1 µg/ml) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < .01$).

3.3 항염증 효능에 미치는 영향

3.3.1. Nitric oxide (NO)의 생성량에 미치는 영향

농실 추출물의 항염증 작용을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에서 LPS 자극에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 농실 추출물을 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도와 1 µg/ml의 농도를 처리하여 배양하였다. 대조군을 100.0 ± 1.0%로 나타냈을 때 농실 추출물은 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 73.8 ± 4.1%, 78.0 ± 5.6%, 61.2 ± 3.6%로 나타나, 각각의 농도에서 유의성 있는 ($p < .001$, $p < .01$) 감소를 나타내었다. (Fig. 5)

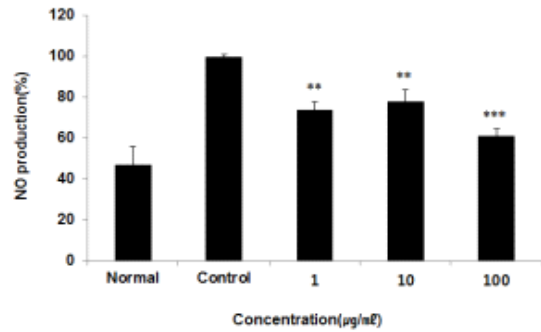


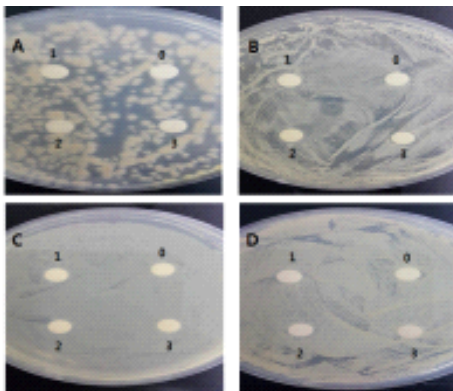
Fig. 5. Effect of WC extract on LPS-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 (µg/ml) of WC extract and LPS(1µg/ml) for 24hr. The amount of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < .001$, ** : $p < .01$).

3.4 항균 활성 측정

3.4.1. Paper Disk를 이용한 항균활성 실험

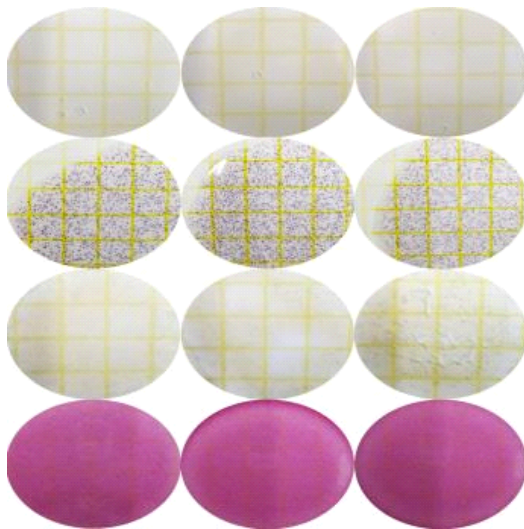
농실 추출물의 항균활성을 측정한 결과, 추출물은 곰팡이균인 *A. niger*에서 1, 10, 100 (µg/ml)농도는 각각 0.3 ± 0.2 mm, 0.7 ± 0.4 mm, 0.9 ± 0.3 mm의 항균활성을 보였고 효모류인 *C. albicans*에서 1, 10, 100 (µg/ml) 농도는 각각 0.8 ± 0.5 mm, 1.1 ± 0.6 mm, 1.2 ± 0.4 mm의 항균활성을 나타내었다. 또한, 세균류인 *E. coli*에서 1, 10, 100 (µg/ml) 농도는 0.6 ± 0.2 mm, 0.9 ± 0.4 mm, 1.2 ± 0.5 mm의 항균활성을 보였고 *S. aureus*에서 1, 10, 100 (µg/ml)농도는 1.0 ± 0.3 mm, 1.4 ± 0.7 mm, 1.6 ± 0.6 mm의 항균활성을 보였다. (Picture. 1)



Picture 1. Effect of WC on antimicrobial activity against *A. niger*, *C. albicans*, *E. coli* and *S. aureus*.
A ; *A. niger*, B ; *C. albicans*, C ; *E. coli*, D ; *S. aureus*, concentration test : 0 ; Nomal, 1 ; 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 ; 10 $\mu\text{g/mL}$, 3 ; 100 $\mu\text{g/mL}$

3.4.2. Petri Film을 이용한 방부력 실험

Petri film을 이용한 능실 추출물의 방부력을 확인한 결과, 능실 추출물은 곰팡이균인 *A. niger*, 효모류인 *C. albicans*, 세균류인 *E. coli*와 *S. aureus* 등의 1, 10, 100 ($\mu\text{g/mL}$) 농도에서 방부력에 대한 효능은 확인할 수 없었다. <Picture. 2>



Picture 2. Effect of WC on preservative activity against *A. niger*, *C. albicans*, *E. coli* and *S. aureus*

4.결론

능실 추출물의 항산화 및 항염증과 방부(항균)에 미치는 영향을 객관적으로 검증하기 위하여 연구를 진행한 결과 다음과 같은 연구결과를 얻었다.

1. 능실 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성은 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 확인되었다.
2. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 $353.1 \pm 5.6 \text{ mg/g}$ 와 $26.2 \pm 1.4 \text{ mg/g}$ 로 폴리페놀 함량이 매우 높게 측정되었다.
3. 항산화 측정결과는 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 농도 의존적으로 증가시켰으며, ROS 생성량을 측정한 결과, 능실 추출물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.
특히 DPPH 소거능은 10 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 저농도에서도 50%이상의 라디칼 소거능을 보였고 ABTS 소거능의 경우엔 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 이상에서는 90%가 넘는 우수한 소거능을 확인하였다. ROS 생성 저해 활성의 경우엔 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $60.0 \pm 2.0\%$ 로 유의성 있는 ($p < .01$) 감소를 나타내었다.
4. 항염증 측정결과, NO 생성량을 능실 추출물은 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $73.8 \pm 4.1\%$, $78.0 \pm 5.6\%$, $61.2 \pm 3.6\%$ 로 유의성 있는 ($p < .001$, $p < .01$) 감소를 나타내었다.
5. 능실 추출물은 paper disk를 이용한 항균활성 측정결과, 곰팡이균인 *A. niger*와 효모류인 *C. albicans*, 세균류인 *E. coli*와 *S. aureus*에서 강한 항균활성을 보이지는 않은 것으로 보아 방부 효능을 나타내지 않았다.

또한, 항산화 측정을 통한 추출물에 대한 효능을 객관적으로 증명하였으나 항균실험에서는 미생물을 소거하는 기능이 없는 것으로 나타났다.

아울러 염증 및 항균, 방부력에 대한 결과는 화장품 및 피부질환에 관련된 천연 소재로써의 활용성을 제고함과 동시에 향후 보다 효과적인 기초적 자료를 제공하고자 다양한 용매에 대한 효능에 대해 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임

References

1. K. S. Ko, "A Study on the Antioxidant Activity and Cytotoxicity of *Scutellaria baicalensis* Extracts", *Journal of The Korea Soc. Beauty & Art*, Vol.14, No.2 pp. 233-243, (2013).
2. T. H. Youm, H. B. Lim, Antimicrobial Activities of Organic Extracts from Fruit of *Thuja orientalis* L., *Korean J. Medicinal Crop Sci.* Vol.18, No.5 pp. 315 - 322 (2010)
3. Y. R. Kim, J. S. Han, "A Study of Antimicrobial and Anti-oxidative Activities on Skin Inflammation-causing Microbes of Supercritical Green Tea Extract", *Journal of The Korea Soc. Beauty & Art*, Vol.15, No.2 pp. 71- 80, (2014).
4. J. W. Hwang, *Cosmetics*, Hyunmoon Publishers, 219-235 (1995).
5. J. D. Kim, *New Cosmetics*, Dongwha Publishers, 185-235 (2008).
6. M. H. Choi, E. M. Ruy, D. S. Oh, H. J. Shin, "Improvement of Acne Condition in Skin Care Using *Camellia japonica* L. extracts", *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*, Vol.10, No.3 pp. 661-672 (2012).
7. K. H. Cheseman and T.F. Slater. Free radicals in medicine, *British Medical Bulletin*, 309(6955) 678 (1994).
8. Y. J. Ahn, S. Y. Kim, J. H. Ok, H. Wang, C. H. Park, S. H. Kim, Y. S. Heo, Y. H. Jeon, and S. N. Park, Antioxidant Activity of *Persicaria perfoliata* Extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, Vol. 35, No. 3, pp 235-241 (2009).
9. K. S. Kim, "A Differences in Interests by Usage and Purchasing Behavior of Korean Herbal Cosmetics" *Journal of The Korean Society Cosmetology*, Vol.16, No.4, pp 991-1003 (2010).
10. J. K. Kim, Y. M. Kang, K. S. Eum, Y. M. Ko, T. Y. Kim, Antioxidative Activity and Antimicrobial Activity of Extracts from medicinal plants(*Akebia quinata* Decaisn, *Scirpusfluvialis* A. Gray, *Gardenia jasminoides* for. *grandiflora* Makino), *J. Agriculture & Life Sciences*, Vol. 37, No. 4, pp 69-75 (2003).
11. T. D. Cho, *Encyclopedia Korean Herbs*, Dawon Publishers, 79-81 (2011).
12. K. S. Lee, M. K. Shin, D. K. Ahn, *Encyclopedia of Chinese Medical Herbs*, Hakjisa Medical Publishers, No. 2, 123-130 (1999).
13. H. G. Joo, J. H. Hong. *Encyclopedia of Anticancer Herbs*, Yugang Publishes. 154-160 (2001).
14. J. J. Mam, K. E. Lee, J. E. Park, S. J. Moon, J. K. Youm, Inhibitory Effect of Fractionated *Trapa Japonica* Extracts on UVB-induced Skin Photoaging, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, Vol. 40, No. 4, pp 321-330 (2014).
15. D. H. Yoo, D. H. Joo, S. Y. Lee, 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, *Journal of Life Science*, Vol.25, No.10, pp 1115-1123 (2015)
16. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, Vol. 58, No.11, pp. 966-968 (1981).

17. Nieva M, Mar í'a I, Antonio R, Marta A, Vattuone. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of ethnopharmacology*. Vol.71, No.1, pp 109 (2000).
18. Davidson PM, Parish ME. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food technology*. 43(1), 48 (1989).
19. Ministry of Food and Drug Safety, Revised Standards and Regulations of Foods, 81. (2004).
20. S. Y. Hong, "Research on Validity Verification on Rapid Assay kit of Food Sanitary Indicative Bacteria", Koshin University, Koshin University, Master Thesis. (2008).
21. Y. H. Shin, H. I. Jang, "A Study on the Effect of Whitening and Wrinkle Enhancement of *Torilis japonica* (Houtt.) DC. (*Sasangja*), *Angelica tenuissima* Nakai (*Gobon*), *Cimicifuga heracleifolia* Kom. (*Seungma*), *Aconitum pseudolaeve* Nakai (*Jinbeom*) Ethanol Extracts", *Journal of The Korea Soc. Beauty & Art*, Vol.17, No.3, pp 107-118 (2016).
22. H. D. Lee, "Isolation of components from *Isatidis Folium* and their Cosmeceutical activities", Youngnam University, Doctorial Thesis. (2013).
23. M. R. Han, N. W. Kim, Y. S. Lee, "Anti-wrinkle and Antioxidative Effects of Ethanolic Extracts of *Inula Flos*, *Chrysanthemi Flos* and *Carthami Flos*", *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol.9, No.4, pp 361-370 (2013).