

연잎 추출물과 연잎 발효 추출물의 항산화 및 항염 효과 비교

김지은¹, 김배환^{2*}, 권수경^{1**}¹경일대학교 K뷰티화장품산업학부, ²계명대학교 자연과학대학 공중보건학과Comparison Study of Antioxidant and Anti-inflammatory Effects for Raw or Fermented Lotus (*Nelumbo nucifera*) Leaf ExtractsJieun Kim¹, Bae-Hwan Kim^{2*}, Soo Kyung Kwon^{1**}¹Department of K-Beauty and Cosmetology, Kyungil University²Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University

ABSTRACT. This study tended to identify the potential as functional natural materials for soothing of skin and scalp using lotus leaf hot water extract (*Nelumbo nucifera* hot water extract, NHWE) and fermented lotus leaf extract (fermented *nelumbo nucifera* leaf extract, FNLE).

The antioxidant evaluations such as total polyphenol and flavonoid content, DPPH electron-donating ability, and ABTS radical scavenging ability, were measured. Cell survival rate was measured in Raw 264.7 cells treated with LPS to check the toxicity, and the inhibitory rate of NO-producing and TNF- α and COX-2 protein expression were measured in Raw 264.7 cells after treatment of LPS in order to evaluate the efficacy of anti-inflammatory effect.

NHWE and FNLE showed 182.2 mg/g and 103.3 mg/g each in total polyphenol contents, and 26.8 mg/g and 49.1 mg/g each in flavonoid content. As for ABTS radical scavenging ability, high levels of antioxidants (86.6% and 93.7% in NHWE and FNLE) appeared at the concentration of 1000 μ g/mL. In DPPH electron-donating ability, NHWE and FNLE showed 66.1% and 73.3% at 1000 μ g/mL. FNLE had more antioxidant ability than NHWE.

In anti-inflammatory effects, inhibition rate of NO production by LPS increased in a concentration-dependent manner at both NHWE and FNLE, and TNF- α and COX-2 expressions were also decreased by treatment of NHWE and FNLE. In particular, 200 μ g/mL of FNLE showed the best anti-inflammatory effect.

In summary, fermented lotus leaf extract showed good efficacy in antioxidant and anti-inflammatory tests, and its potential as a functional ingredients was confirmed. It is expected that not only the soothing effect of the scalp and skin, but also the possibility of application as a functional food can be expanded, and it is considered to be suitable as a natural functional raw material.

KEY WORDS: *Nelumbo nucifera*, antioxidant, anti-inflammatory, TNF- α , COX-2

Received: 21 November 2020

Revised: 26 November 2020

Accepted: 26 November 2020

* Corresponding author: Bae-Hwan Kim
 Department of Public Health, College of Natural Sciences,
 Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
 Tel: 053-580-5933
 E-mail: kim9399@kmu.ac.kr

** Corresponding author: Soo Kyung Kwon
 Department of K-Beauty and Cosmetology,
 Kyungil University, Daegu, Korea
 Tel: 053-600-5881
 E-mail: fmaide@naver.com

Introduction

경제가 성장하고 기술이 발달하여 삶의 여유가 생기면서 많은 사람들이 외모를 가꾸고 관리하는 데 높은 관심을 보이게 되었다. 또한 점차 고령화 사회로 접어들면서 심리적으로나 외적으로 젊음을 유지하고자 하는 사회적 분위기 등의 여러 여건으로 인해 남녀 모두에게 두피·탈모 시장 규모가 확대되어 가고 있다(Kim, 2014).

천연식물에서 추출한 생리활성 물질들을 이용한 미백효과, 항노화 효과 및 피부 자극 완화 효과 등 우수한 효능 평가에 대한 연구가 지속적으로 발표되고 있으며, 제품 개발과 연관된 연구가 많아지고 있다. 최근에는 화장품의 원료로 천연물에 대한 관심이 높아져 항노화, 미백 및 자외선차단 분야의 기능성 뷰티 화장품에 각종 천연 식물 소재 사용이 많이 증가되고 있으며(Juliano and Magrini, 2018), 다양한 기능성을 위해 많이 사용되는 항산화제에 있어, 합성 항산화제는 효과나 경제성 그리고 안정성 등에는 장점이 있으나, 인체에 심각한 부작용을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Bilal et al., 2020). 따라서 안전한 대체 항산화제의 개발의 필요가 요구되고 있다. 천연항산화제로는 vitamin C, flavonoids, carotenoids, α -tocopherol, 등이 알려져 있는데, 대개 동식물에 널리 분포되어 있으나, 특히 식물유래 천연항산화제의 관심이 높다. 이러한 식물유래 성분은 free radical과 활성산소의 생성을 억제 또는 제거시켜서 산화에 의한 손상을 방지한다(Lee et al., 2017).

활성산소종에 의한 산화적 손상은 세포가 반응하는 전달체계와 항산화 효소의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 활성산소는 반응성이 매우 강하여 지질을 포함한 세포의 거대 분자를 파괴하므로, 이러한 활성산소종의 증가는 피부의 형태학적 및 화학적인 변화를 유발시켜 염증을 촉진시킨다(Zhou et al., 2003).

염증은 유해한 자극으로부터 숙주를 보호하기 위한 병리학적 반응의 대표적인 특징으로, 다양한 요인에 의해 유발될 수 있으며, 그 중 lipopolysaccharide (LPS)라 불리는 그람 음성세균의 외막 구조물은 대식세포를 자극하는 대표적인 염증 유발인자로 작용한다(Guha and Mackman, 2001). 대식세포는 TLR4라 불리는 receptor를 통해 LPS를 인식하고, 이는 여러 신호전달 경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 그 결과 iNOS 또는 COX-2와 같은 pro-inflammatory 유전자 발현으로 이어진다(Ryu et al., 2003; Woo et al., 2018).

연(*Nelumbo nucifera*)은 아시아 전역에서 재배되어 있는 다년생 수생식물이며, flavonoids, steroids, tannins, alkaloids, glycosides, polyphenols 등과 같은 다양한 phytochemicals를 함유하고 있다. 이는 항산화, 항암, 항균 등의 다양한 생리활성 기능을 갖는 다고 알려져 있다(Kim and Park, 2010; Kulkarni and Juvekar, 2008; Lee and Lee, 2011).

미생물이 효소를 이용해 유기물을 분해하는 과정을 발효라고 한다. 발효를 거치면 피부에 좋은 각종 영양분을 비롯하여 항산화물질, 유기산, 아미노산 등이 증가하여 피부대사를 촉진시키며 피부개선에 효과를 높일 수 있다. 또한 발효과정을 거치면서 생리활성효능과 tyrosinase활성 및 멜라닌 생성을 억제하여 미백제로서 더 좋은 효능을 나타낼 수 있다(Lee et al., 2012).

연잎은 세포독성이 없고 기능성 소재로서의 가능성이 있다는 연구가 일부 진행되고 있지만, 연잎을 발효한 추출물에 대한 피부개선 및 항염증효과 연구는 아직 미비하다. 따라서 본 연구에서는 기존 연잎추출물과 발효 추출물의 항산화 및 항염증 효능의 개선정도를 비교하여 기능성 소재로서 가능성을 확인하고, 더 나아가 두피 진정 소재로서의 개발 가능성도 확인하고자 하였다.

Materials and Methods

1. 시험물질 제조

1) 연잎 열수추출물

연잎추출물은 분쇄한 생 연잎 100 g과 정제수 1000 mL을 혼합하고 90°C에서 6시간동안 가열하여 열수 추출하였다. 추출물을 filter paper No.1 (Whatman, United Kingdom)으로 여과한 후, 0.2 μ m syringe filter(Sartorius, Germany)를 이용하여 여과하고 이후 추출물을 72시간 동안 동결 건조 하여 분말 형태의 연잎 열수 추출물(*Nelumbo nucifera* leaf hot water extract, NHWE)을 얻었으며 -20°C에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

2) 연잎 발효추출물

연잎 발효추출물은 분쇄한 생연잎 1400 g에 성원 DX종균을 넣고 14일간 자연발효 하였다. 생성된 발효물 약 1 kg을 5분간 6,000 rpm으로 원심분리한 후, 상등액을 0.2 μ m syringe filter(Sartorius, Germany)를 이용해 여과하고 이후 72시간 동안 동결 건조하여

분말 형태의 연잎 발효추출물(fermented *Nelumbo nucifera* leaf extract, FNLE)을 얻었으며 -20°C 에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 항산화 효과

1) Total polyphenol contents

연잎 발효추출물과 연잎 열수추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin and Denis법(1912)에 의거하여 측정하였다. 각각의 시험물질은 $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 제조하였으며, $7.5\ \text{mL}$ 의 증류수에 시험물질 $1\ \text{mL}$ 와 $0.5\ \text{mL}$ 의 Folin & Ciocalteu's phenol reagent를 혼합 후 3분간 안정화하였다. 안정화 후 $1\ \text{mL}$ 의 Na_2CO_3 을 첨가하고 1시간동안 차광상태를 유지하며 반응한다. 반응 종료 후, spectrophotometer를 이용하여 $760\ \text{nm}$ 파장으로 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 사용하여 총 폴리페놀 함량을 표준 곡선을 작성한 후 정량화하였다.

2) Total flavonoid contents

시험물질의 총 플라보노이드 함량은 Moreno법(2000)을 변형하여 측정하였다. 각각의 시험물질은 $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 제조하여 시료 용액 $0.2\ \text{mL}$ 과 10% aluminum nitrate $0.1\ \text{mL}$, 1M potassium acetate $0.1\ \text{mL}$, 80% ethanol $3\ \text{mL}$ 를 순서대로 가한 후 실온에 40분간 방치하고 spectrophotometer를 이용하여 $415\ \text{nm}$ 파장으로 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 사용하여 표준 곡선을 작성한 후 정량화 하였다.

3) DPPH radical donating ability

연잎추출물 및 연잎 발효추출물의 전자공여능(electron-donating ability)은 Blois법에 따라 측정하였다. 준비한 시료 $100\ \mu\text{L}$ 와 $0.2\ \text{mM}$ DPPH $50\ \mu\text{L}$ 를 섞어 차광 된 상태에서 30분간 방치 후 spectrophotometer로 $517\ \text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{Electron-donating ability(\%)} = [1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100$$

4) ABTS⁺ radical scavenging activity

연잎추출물 및 연잎 발효추출물을 이용한 ABTS⁺ cation decolorization assay는 Re 등의 방법에 따라

측정하였다. ABTS solution은 2,2-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) $7\ \text{mM}$ 과 potassium persulfate $2.45\ \text{mM}$ 을 동량 혼합한 후 차광하여 실온에서 12시간동안 반응시켜 ABTS⁺ free radical을 생성시켰다. 반응 후 ABTS solution은 에탄올로 희석하여 $734\ \text{nm}$ 에서 흡광도 측정하였다. 농도별로 희석한 시료($100\ \mu\text{L}$)에 ABTS solution($100\ \mu\text{L}$)을 혼합하여 암실에서 7분간 반응시킨 후 spectrophotometer로 $734\ \text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다. ABTS⁺ free radical 소거능은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Scavenging activity(\%)} = [1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100$$

3. RAW 264.7 cell을 이용한 NHEW 와 FNLE의 항염증효과

1) Cell culture

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell은 한국 세포주은행(KCLB, 40071, Seoul, Korea)에서 분양 받아 배양하였으며 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% P/S(penicillin-streptomycin)을 첨가하여 사용하였다. 세포는 37°C , 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

2) Cell viability in RAW 264.7

시료에 대한 RAW 264.7 cell의 생존 및 증식에 관한 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 사용하였다. 세포는 DMEM에 10% FBS, 1% P/S가 함유된 배지를 사용하였고 37°C , 5%, CO_2 조건에서 72시간 배양하여 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. 안정화된 RAW 264.7 cell을 96-well plate에 1×10^6 cells/well로 분주하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 후 시료 추출물을 농도별로 희석하여 $100\ \mu\text{L}$ 씩 처리하고 같은 조건에서 24시간 배양하였다. 이후 상층액을 제거한 후 RAW 264.7 cell을 PBS로 1회 washing 하고 $0.5\ \text{mg}/\text{mL}$ 의 MTT 용액을 $100\ \mu\text{L}$ 씩 넣은 후 37°C , 5% CO_2 incubator에서 3시간 동안 반응시켰다. 상층액을 제거한 다음 DMSO를 $100\ \mu\text{L}$ 씩 넣어 실온에서 20분간 cell을 녹인 후 spectrophotometer를 이용하여 $570\ \text{nm}$ 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Cell viability(\%)} = (\text{Absorbance}_{\text{sample}} / \text{Absorbance}_{\text{Normal}}) \times 100$$

3) Cell viability of LPS in RAW 264.7 cell

RAW 264.7 cell은 10% FBS, 1% P/S가 함유된 DMEM 배지에 37°C, 5%, CO₂조건에서 72시간 배양하여 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. 안정화된 RAW 264.7 cell을 96-well plate에 1×10⁶ cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂incubator에서 24시간 배양한 후 시료를 농도별로 LPS(0.1 µg/mL)를 넣은 DMEM 배지에 희석하여 200 µL씩 처리하고 같은 조건에서 24시간 배양하였다. 이후 상층액을 제거한 후 RAW 264.7 cell을 PBS로 1회 washing 하고 0.5 mg/mL의 MTT 용액을 100 µL씩 넣은 후 37°C, 5% CO₂incubator에서 3시간 동안 반응하였다. MTT용액을 제거한 다음 DMSO를 100 µL씩 넣어 상온에서 20분간 반응 시킨 후 spectrophotometer로 540 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Cell viability(\%)} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{Normal}}} \times 100$$

4) Nitric Oxide inhibitory rate in RAW 264.7

대식세포 계열 세포(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지로 96 well plate에 1×10⁵ cells/mL로 계산하여 분주한 후, 먼저 NHWE, FNLE의 세포독성을 측정하여 처리 용량을 선정하였다. 이후 RAW 264.7 세포 분주 후(1×10⁵ cells/mL), 시료와 LPS(1 µg/mL)가 함유된 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하여 생성된 NO 양을 측정하였다. 생성된 NO 양 측정을 위해, 세포배양 상층액 100 µL와 동량의 Griess reagent을 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{NO inhibitory rate(\%)} = [1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100$$

5) Western blotting in RAW 264.7

RAW 264.7 cell은 6-well plate에서 1×10⁶ cells/mL로 분주 하였다. 24시간 뒤 PBS로 2번 세척 후 RIPA buffer 200 µL/well 씩 처리하였으며 scraper를 이용하여 세포를 떨어뜨린 후 1.75 mL tube로 옮겨 10분간 원심분리 하였다. Lowry 등(1951)의 방법에 의거하여 단백질 농도를 정량분석 하였다. 정량분석 후 시료는 LSB와 lysis buffer를 첨가하여 15분간 가열 한 후 사용하였다. 추출된 단백질은 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 한 후 membrane에 transfer 하였다. 이후 5% nonfat dry milk로 1시간 blocking 하고, TBST(TBS + 0.1% Tween-20, pH 5)를 사용하여 세척한 다음 primary antibody를 16시간 교반 반응 시켰다. COX-2, TNF-α에 반응하는 항원을 검출하기 위해 immunoblotting을 진행한 후 TBST로 세척하고 secondary antibody를 가하여 1시간 교반 반응 한 후 TBST로 3회 세척하였다. Band의 시각화는 ECL(Amersham)을 이용하였고 X-ray film에 가시화 하였다.

4. 통계처리

실험 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타냈다. Windows 용 SPSS 21.0을 사용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고 각 그룹 평균 간의 차이를 검정하기 위해 Duncan's multiple range test를 통해 사후분석을 실시하였다. 연구의 통계학적 유의성 검증 수준은 p<0.05, p<0.01, p<0.001로 하였다.

Results

1. NHWE와 FNLE의 항산화 효과

1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

NHWE와 FNLE의 총 폴리페놀함량과 총 플라보노

Table 1. Total contents of polyphenol and flavonoid in NHWE and FNLE

		Total contents(mg/g)				
		1	2	3	Mean	SD
Polyphenol	NHWE	183.2	182.2	181.2	182.2	1.0
	FNLE	103.2	103.6	103.2	103.3	0.2
Flavonoid	NHWE	28.0	24.6	28.0	26.8	1.92
	FNLE	51.3	48.0	48.0	49.1	1.9

Values represent the mean ± SD of 3 independent measurements. NHWE: *Nelumbo nucifera* leaf hot water extract. FNLE: fermented *Nelumbo nucifera* leaf extract.

이드함량을 분석한 결과, NHWE는 총 폴리페놀 함량은 182.2 mg/g이며, FNLE는 103.3 mg/g으로 약 80 mg/g의 폴리페놀 함량의 차이가 났고, 플라보노이드의 함량은 NHWE는 26.8 mg/g, FNLE는 49.1 mg/g으로 약 23 mg/g의 함량 차이를 확인하였다(Table 1).

2) ABTS⁺ 라디칼 소거활성

ABTS radical 소거활성 결과는 최고농도인 1000 µg/mL 농도에서 NHWE는 86.6%, FNLE는 93.7%로 발효했을 시 항산화능이 높았으며 FNLE는 최고농도에서 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid와 유사한 정도의 항산화능을 보여주었다(Fig. 1).

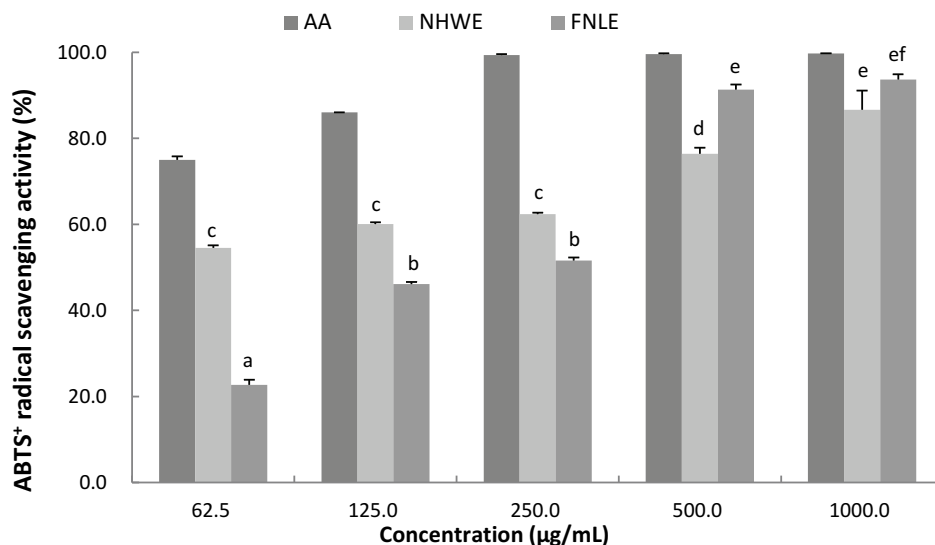


Fig 1. ABTS⁺ radical scavenging ability of NHWE and FNLE. Values represent the mean ± SD of 3 independent measurements. AA: ascorbic acid, NHWE: *Nelumbo nucifera* leaf hot water extract, FNLE: fermented *Nelumbo nucifera* leaf extract

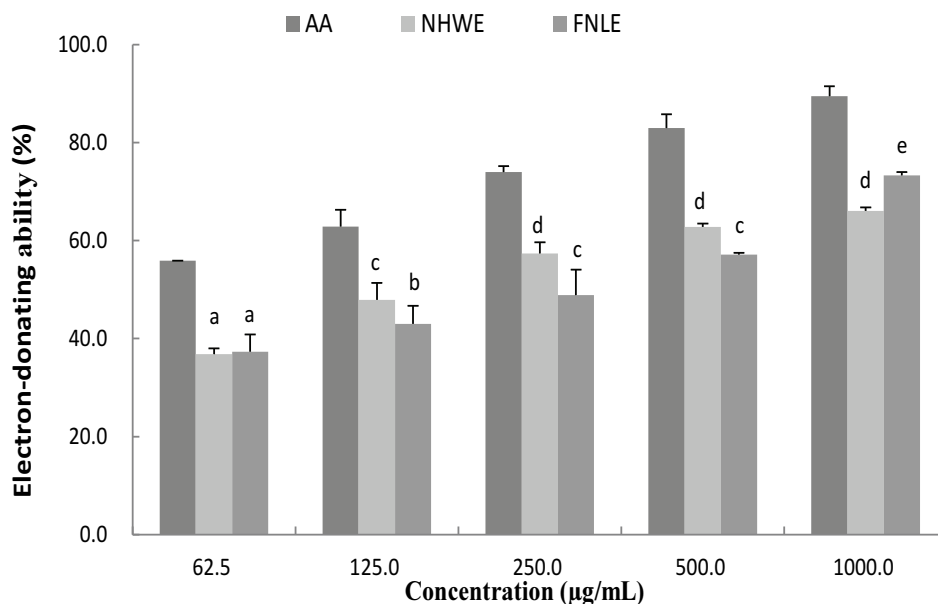


Fig 2. Electron-donating ability of NHWE and FNLE. Values represent the mean ± SD of 3 independent measurements. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). AA: ascorbic acid, NHWE: *Nelumbo nucifera* leaf hot water extract, FNLE: fermented *Nelumbo nucifera* leaf extract

3) DPPH 전자공여능

DPPH는 전자공여능은 결과는 최고농도인 1000 µg/mL에서 NHWE는 66.1%의 전자공여능을 띄웠고, FNLE의 경우에는 73.3%로 ABTS결과와 동일하게 발효했을 시 항산화능이 더욱 높았다(Fig. 2).

2. NHWE와 FNLE의 항염증 효과

1) LPS 처리한 RAW 264.7 cell에서 NHWE 와 FNLE의 세포생존율

RAW 264.7 cells에서 실험물질의 생존 및 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay 측정 결

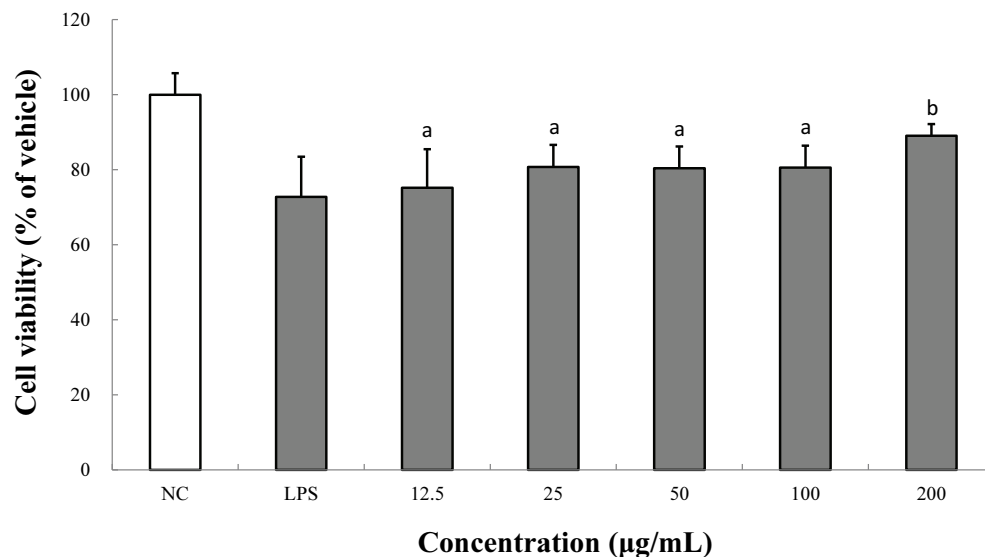


Fig 3. Cell viability of LPS and NHWE in RAW 264.7 cell. The values represent mean ± SD of 3 independent experiments. Cells viability expressed as a percentage of NC. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). NC : vehicle-treatment control, NHWE: *Nelumbo nucifera* leaf hot water extract

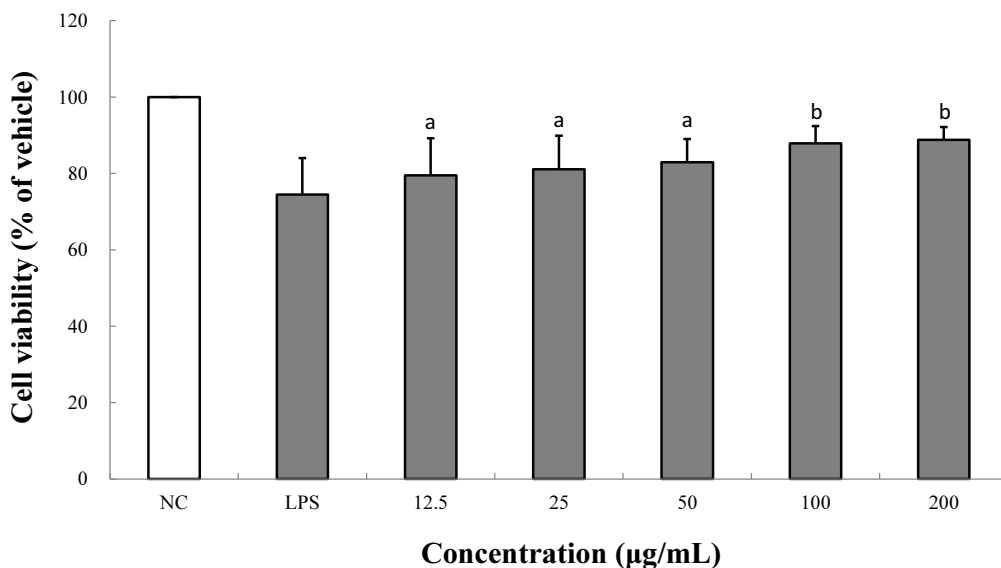


Fig 4. Cell viability of LPS and FNLE in RAW 264.7 cell. The values represent mean ± SD of 3 independent experiments. Cells viability expressed as a percentage of NC. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). NC : vehicle-treatment control, FNLE: fermented *Nelumbo nucifera* leaf extract

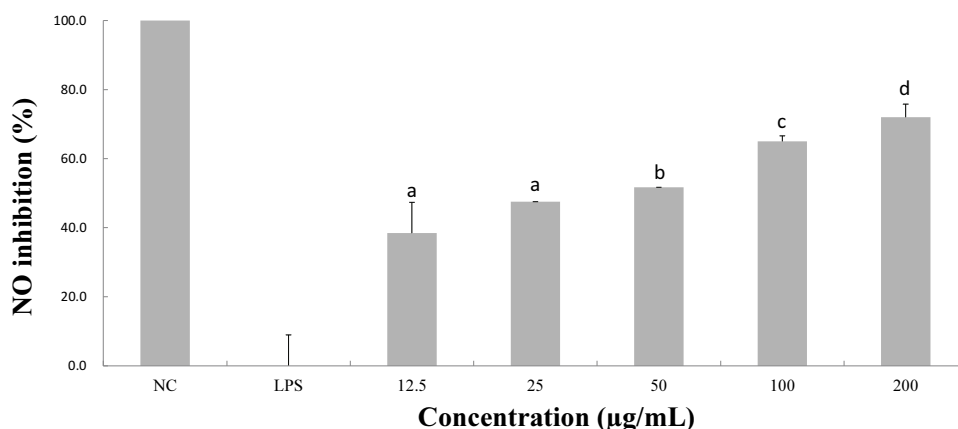


Fig 5. Inhibition rate of nitric oxide secretion by NHWE in RAW 264.7 cell. The values represent mean \pm SD of 3 independent experiments. NO inhibition(%) is expressed as a percentage of NC. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). NC: vehicle-treatment control, NHWE: *Nelumbo nucifera* leaf hot water extract

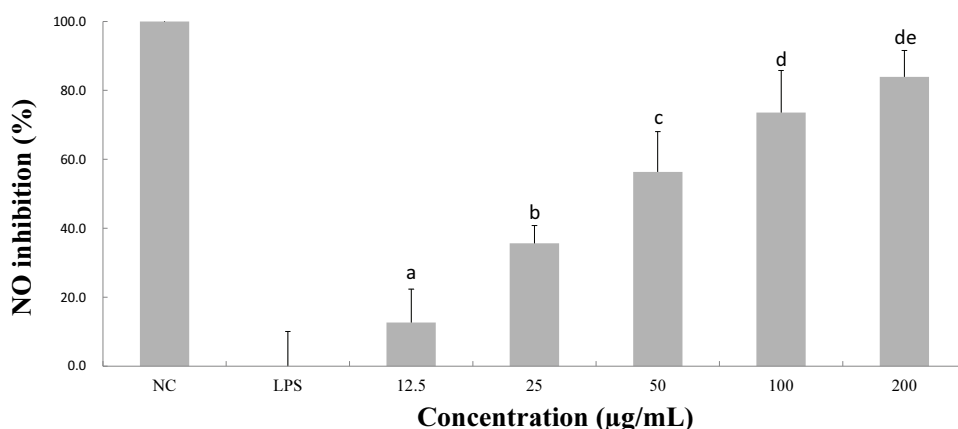


Fig 6. Inhibition rate of nitric oxide secretion by FNLE in RAW 264.7 cell. The values represent mean \pm SD of 3 independent experiments. NO inhibition(%) is expressed as a percentage of NC. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). NC: vehicle-treatment control, FNLE: fermented *Nelumbo nucifera* leaf extract

과, NHWE는 12.5~200 µg/mL에서 모두 70% 이상의 높은 세포 생존율을 나타냈으며 최고 농도인 200 µg/mL에서 77.7%를 나타내었다(Fig. 3). FNLE는 12.5~200 µg/mL에서 모두 70% 이상의 높은 세포 생존율을 나타냈으며 최고 농도인 200 µg/mL에서 79.1%를 나타내었다(Fig. 4). 따라서 No assay 실험에 세포 생존 및 증식에 영향을 미치지 않는 농도범위인 200 µg/mL 이하 농도에서 수행하였다.

2) NO 생성저해율

RAW 264.7 cells에서의 NO 생성저해율을 측정된 결과는 Fig. 5, 6와 같다. NHWE와 FNLE의 농도가 높아질수록 NO 생성저해율은 농도 의존적으로 증가하

는 양상을 나타냈으며 높은 저해율을 나타냈다. NHWE와 FNLE는 최고 농도인 200 µg/mL에서 각각 72%, 83.9%의 NO 저해율을 보였다.

3) RAW 264.7 세포에서 NHWE와 FNLE의 TNF- α , COX-2 발현 억제

LPS에 의한 TNF- α , COX-2의 발현량에 대한 NHWE와 FNLE의 억제 효과 결과는 Figs. 7, 8과 같다. NHWE와 FNLE를 처리한 모든 RAW 264.7 cell에 LPS군에 비해 TNF- α , COX-2가 감소하였으며 특히 200 µg/mL의 농도에서 FNLE를 처리한 군은 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

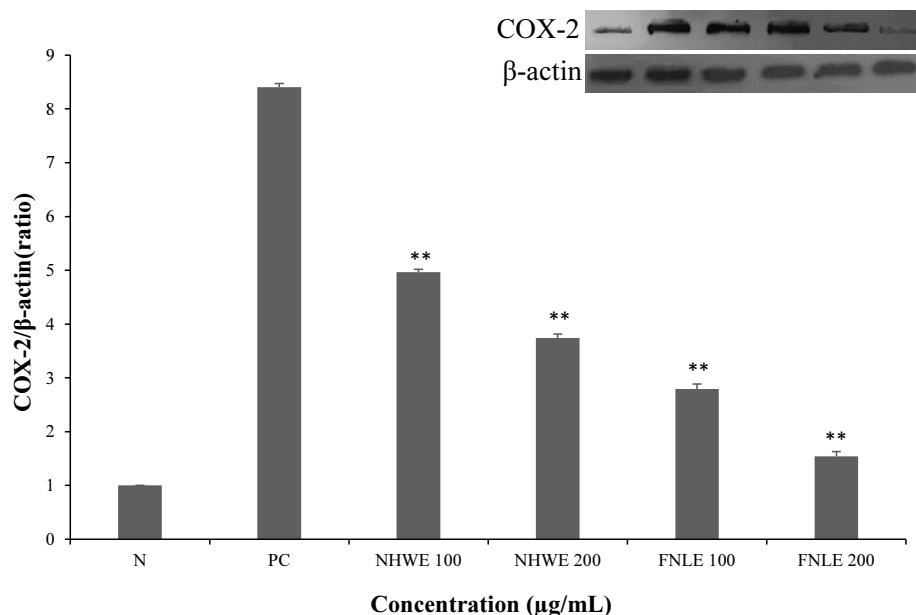


Fig 7. Effect of NHWE and FNLE treatment on the COX-2 levels of inflammation in RAW 264.7 cells. Values are relative to the vehicle-treatment control and is expressed mean ± SD of 3 independent measurements. Asterisk indicates a significant difference from the Vehicle treatment (** $p < 0.001$). N : Vehicle, PC: LPS, NHWE: *Nelumbo nucifera* leaf hot water extract, FNLE: fermented *Nelumbo nucifera* leaf extract

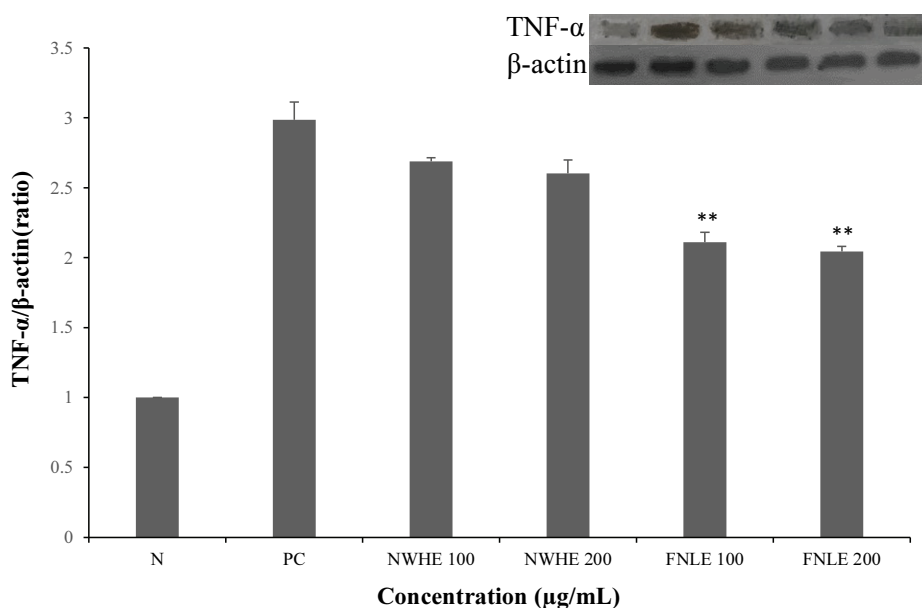


Fig 8. Effect of NHWE and FNLE treatment on the TNF-α levels of inflammation in RAW 264.7 cells. Values are relative to the Vehicle-treatment control and is expressed mean ± SD of 3 independent measurements. Asterisk indicates a significant difference from the Vehicle treatment (** $p < 0.001$). N : Vehicle, PC: LPS, NHWE: *Nelumbo nucifera* leaf hot water extract, FNLE: fermented *Nelumbo nucifera* leaf extract

Discussion

본 연구는 연잎 열수 추출물(*Nelumbo nucifera* leaf hot water extract, NHWE) 및 연잎 발효 추출물(fermented *Nelumbo nucifera* leaf extract, FNLE)의 항산화 및 항염 효능을 평가하여 피부 및 두피의 진정 등의 기능성 천연 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

먼저 시료의 항산화능 평가를 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정 결과 NHWE는 총 폴리페놀 함량은 182.2 mg/g이며, FNLE는 103.3 mg/g으로 약 80 mg/g의 폴리페놀 함량의 차이가 났고, 플라보노이드의 함량은 NHWE는 26.8 mg/g, FNLE는 49.1 mg/g으로 약 23 mg/g의 함량 차이를 확인하였다. ABTS radical 소거활성 결과 최고농도인 1000 µg/mL 농도에서 NHWE는 86.6%, FNLE는 93.7%로 발효했을 시 항산화능이 높게 나타났다. DPPH 전자공여능은 결과는 최고농도인 1000 µg/mL에서 NHWE는 66.1%의 전자공여능을 나타내었고, FNLE의 경우에는 73.3%의 전자공여능을 나타냈다. Wu 등(2003)의 연구에서 연잎 메탄올 추출물을 이용하여 좋은 항산화 효과를 보였다는 결과를 제시했는데, 본 시험의 실험 결과도 유사한 양상으로 보였다. 특히, 발효를 시킨 연잎의 항산화는 더 높게 나타나, 발효과정이 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량이 증가시켜 radical 소거활성, 전자공여능 등 항산화 활성에 기여 한 것으로 사료된다.

시료의 독성을 확인하기 위해 LPS 처치한 Raw 264.7 세포에서 세포생존율을 측정한 결과 NHWE와 FNLE의 세포생존율의 결과는 200 µg/mL에서 77.7% 79.1%로 나타났다. 모든 시료처리농도에서 70%이상의 세포생존율을 나타내었으며 이후 실험에서 최고농도를 200 µg/mL로 진행하였다.

NHWE와 FNLE의 항염증 효능을 평가하기 위해서 Raw 264.7 세포에서 NO 생성 저해율과 LPS에 의한 TNF- α , COX-2 단백질 발현 억제율을 측정하였다. NO 생성 저해율은 NHWE와 FNLE의 농도가 높아질수록 농도 의존적으로 증가하는 양상을 나타냈으며, LPS에 의한 TNF- α , COX-2 단백질 발현 억제율은 NHWE와 FNLE 를 처치한 모든 RAW 264.7 cell에 LPS군에 비해 TNF- α , COX-2가 감소하였으며 특히 200 µg/mL의 농도에서 FNLE를 처치한 군은 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. Kaewkroek 등(2010)은 강황 추출물과 함유 성분들이 항염증 활성을 가지며, iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 것으로 보고

한 바 있으며, Lee 등(2019)의 결과에서도 연잎 에탄올 추출물을 이용한 항염효과를 보고한 바 있는데, 본 연구의 결과에서도 유사하게 좋은 항염효과를 결과를 보였다고 생각되며, 특히 발효된 연잎의 항염 효과가 더 높게 보인 점은 좋은 성과라 판단된다.

이상의 결과를 볼 때, 발효된 연잎 추출물은 항산화 및 항염증 실험에서 좋은 효능을 보여주었기 때문에, 다양한 기능성원료로서의 가능성이 확인되었다고 생각된다. 본 시험 결과에서 보여준 효능을 바탕으로 기능성 화장품, 식품 등의 원료로서의 활용가능성으로 확대될 수 있을 것으로 보이며, 특히 두피 및 피부의 진정효과를 타겟으로 한 식물 유래 천연 기능성 원료로도 충분히 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

References

- Bilal M, Mehmood S, and Iqbal HMN. (2020) The Beast of Beauty: Environmental and Health Concerns of Toxic Components in Cosmetics. *Cosmetics* 7(1), 13; <https://doi.org/10.3390/cosmetics7010013>
- Blois MS. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Folin O, Denis W. (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
- Guha M, and Mackman N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signal* 13: 85-94.
- Juliano C, and Magrini GA. (2018) Cosmetic Functional Ingredients from Botanical Sources for Anti-Pollution Skincare Products. *Cosmetics* 5(1): 19; <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010019>
- Kaewkroek K, Wattanapiromsakul C, and Tewtrakul S. (2010). Anti-inflammatory Mechanisms of Compounds from Curcuma Mangga Rhizomes using RAW264.7 Macrophage Cells. *Nat Prod Commun.* 5(10):1547-50.
- Kim KS. (2014). Research Trends Relevant with Hair Growth Promotion and Scalp Condition Improvement by Applying Natural Extracts. *Kor J Aesthet Cosmetol* 12(1): 17-24.
- Kim DW, and Park JH. (2010). Protective effect of leaf extracts from *Nelumbo nucifera* on DNA damage against oxidative stress. *J Appl Oriental Medicine* 10(2): 33-40
- Kulkarni M, and Juvekar A. (2008). Attenuation of acute and chronic restraint stress-induced perturbations in experimental animals by *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Indian J Pharm Sci* 70(3): 327-332.
- Lee CE, Jeong HH, Cho JA, and Ly SY. (2017). In vitro and in vivo anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Acer tegmentosum* Maxim extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46: 1-9.
- Lee KS, and Lee KY. (2011). Effect of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf extract on serum and liver lipid levels of

- rats fed a high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(11): 1544-1547.
- Lee HS, Kim MR, Park YH, Park HJ, Chang UJ, Kim SY, and Suh HJ. (2012). Fermenting Red Ginseng Enhances Its Safety and Efficacy as a Novel Skin Care Anti-Aging Ingredient: In Vitro and Animal Study. *J Med Food* 15(11); <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2187>
- Lee EJ, Seo YM, Kim YH, Chung CW, Sung HJ, Sohn HY, Park JY, and Kim JS. (2019). Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts from Leaf, Seed, and Seedpod of *Nelumbo nucifera*. *J Life Sci.* 29: 436-441.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry* 193: 265-275.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, and Vattuone MA. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharm* 71: 109-114.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Ryu JH, Ahn H, Kim JY, and Kim YK. (2003). Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytother Res* 17: 485-489.
- Woo HS, Lee SM, Heo JD, Lee MS, Kim YS, and Kim DW. (2018). Anti-inflammatory activity of extracts of *Hovenia dulcis* on lipopolysaccharides-stimulated RAW264.7 cells. *Korean J Plant Res* 31: 466-477.
- Wu MJ, Wang L, Weng CY, and Yen JH. (2003). Antioxidant Activity of Methanol Extract of the Lotus Leaf (*Nelumbo nucifera* Gertn.). *Am J Chin Med.* 31(05): 687-698.
- Zhou Y, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, and Huang P. (2003). Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood* 101(10): 4098-4104.