

효소처리한 미선나무 잎의 용매 추출 후 이화학적 품질 변화

†이경행 · 장다빈* · 이재준* · 한기정* · 배경아* · 이원종* · 권순영** · 이호진***

한국교통대학교 식품영양학 전공 교수, *한국교통대학교 식품영양학 전공 학부생,

미선나무식품화사업단 대표, *한국교통대학교 식품영양학 전공 조교수

Changes in Physicochemical Quality of the Extracts by Solvents in the Enzyme-Treated *Abeliophyllum distichum* Leaves

†Kyung-Haeng Lee, Da-Bin Jang*, Jae-Jun Lee*, Ki-Jung Han*,

Kyung-Ah Bae*, Won-Jong Lee*, Sun-Young Kwon** and Ho-Jin Lee***

Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

*Student, Dept. of Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

**CEO, Miseonnamu Products Co., Goesan 28035, Korea

***Assistant Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

To enhance the efficacy of *Abeliophyllum distichum* leaves, extracts were prepared using different solvents for hydrolytic enzyme-treated *Abeliophyllum distichum* leaves. Physicochemical quality and antioxidant activity were measured. Soluble solids, reducing sugar, ascorbic acid, flavonoids, and polyphenols contents showed the lowest values in the control without enzyme treatment. However, they showed high contents in ethanol extract. In the case of enzyme treatment, their values were higher than those of the control. In particular, verbascoside content increased about 220 times more than that of the control group when treated with enzymes and extracted with 50% ethanol. pH was lowered upon enzymatic treatment. Regarding DPPH radical scavenging activity, for enzyme-free, 25% ethanol extract showed the highest activity among extracts with different solvents. For cellulase and pectinase-treated leaves, water extract showed the highest DPPH radical scavenging activity among extracts with different solvents. For leaves treated with enzyme combination, 50% ethanol extract showed the highest DPPH radical scavenging activity among extracts with different solvents. Regarding ABTS radical scavenging activity, it was generally higher in the 50% ethanol extract than in the water extract and 25% ethanol extract. In particular, verbascoside content was increased when the extract was prepared by co-treatment with enzymes and 50% ethanol.

Key words: *Abeliophyllum distichum* leaves, enzyme treatment, physicochemical property, verbascoside, antioxidant activity

서론

미선나무(*Abeliophyllum distichum*)는 꿀풀목 물푸레나무과 (Oleaceae)에 속하는 화목관목으로 1속 1종으로 국내에서만 자생하는 특산식물이다(Hong & Han 2002; Lee 등 2014). 특히 충북 괴산 송덕리, 추점리와 영동 용도봉 3곳의 미선나무 군락지는 천연기념물 제 14호로 멸종위기 야생생물 II급 및

희귀식물로 지정되어 있으며 미선나무의 꽃은 달콤한 향을 가진 흰색의 꽃으로 관상수로도 주목받고 있다(Jeong JY 2020). 우리나라에서만 자생하는 미선나무는 세계 유일 1속 1종의 생물자원 가치가 높은 특산식물로서 생물다양성 가치 및 농업의 고부가가치 산업적 활용이 가능하다고 할 수 있다.

2010년 유전자원의 접근 및 이익 공유에 관한 나고야 의정서 발효(Park & Jung 2017)로 당사국의 유전자원이나 생물자

† Corresponding author: Kyung-Haeng Lee, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5334, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: leekh@ut.ac.kr

원을 이용하고자 할 때에는 사전 통보, 승인절차 등이 의무화되어 있다. 이처럼 생물자원 활용이 어려워진 상황에서 한 반도에서만 자생하는 천연기념물인 미선나무의 재배, 생육 등의 특성을 파악하고 이를 활용하는 적극적인 연구가 필요하다.

2016년 11월 미선나무 잎 추출물(분말)에 대하여 식품위생법 제7조 제2항 및 제5조에 따라 식품 등의 한시적 기준 및 규격이 인정되어 한시적 식품원료로 인정(식품원료 한시기준 제2016-10호)되었으며 2019년 2월에는 미선나무 줄기 추출물(액상)에 대하여 한시적 식품원료로 인정(식품원료 한시기준 제 2019-2호)되어 있지만 다른 식물소재들에 비해서는 이를 활용한 연구가 미진한 상황이다.

미선나무 연구 중 Park JH(2011)은 DPPH 라디칼 소거능을 측정하고 94.72%의 높은 라디칼 소거능을 가지고 있다고 하였으며 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서도 특정 반응이 관찰되지 않았다고 하였다. 또한 미선나무 추출물의 피부주름, 피부노화 개선, 미백효과, 항염증 항암 활성 등의 연구(Kim & Lee 2015; Jang & Park 2017; Chang 등 2018)가 이루어졌으나 함유되어 있는 유효 기능성분에 대한 명확한 함유량과 질환 예방 및 치료에 관한 명확한 역학 관계에 대한 연구는 매우 부족한 편이다.

미선나무에 함유되어 있는 성분 중 verbascoside는 acteoside라고도 불리며 주로 쌍떡잎 식물에서 발견되고 있는데(He 등 2011) 그 양은 매우 소량 존재하며(Imakura 등 1985; Chang 등 2018) ACE 억제 활성능이 우수하고(Oh 등 2003) TSLP 유도 비만 세포 증식을 약화 시키는 기능이 있다고 알려져 있다(Yoo 등 2015). 또한 강력한 항산화, 항염증, 신경보호활성 및 2형당뇨 예방 등의 기능도 보고되었다(Galli 등 2020).

한편, 식품산업에서 효소처리 기술은 당의 생산량을 증가시키거나(Weinberg 등 1995; Wilkins 등 2007) 여과성 향상, 수율의 향상 또는 청징화 등의 목적으로 사용되고 있으나(Meyer 등 2001), 미선나무를 가공하기 위한 효소처리 연구는 찾아볼 수 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 미선나무잎에 cellulase와 pectinase 등의 효소를 처리한 후 여기에 물, 25% 및 50% ethanol 용매로 추출물을 제조하고 이들의 이화학적 및 항산화 활성을 분석하여 미선나무를 다양한 산업에서 활용하기 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 미선나무잎은 2022년도 9월에서 11월에 충청북도 괴산군 미선나무사업단에서 구입하여 시료로 사용하였다.

2. 미선나무잎의 효소처리 후 용매별 추출물 제조

미선나무잎에 함유되어있는 주요 성분들의 추출수율을 향상시키기 위하여 Lee 등(2015)의 방법을 참조하여 미선나무잎에 가수분해효소를 첨가하여 효소처리 미선나무잎 시료를 제조하였다. 즉 마쇄한 미선나무잎 10 g에 효소 2 mL를 첨가한 후 물 50 mL를 가하고 50°C, 80 rpm의 조건에서 2시간 동안 교반하면서 효소처리를 하였다.

효소처리 후 물(DW, distilled water) 또는 25 및 50% ethanol을 첨가한 후 30분 동안 sonicator(1875DAE, ETL Testing Laboratories Inc, NY, USA)에서 추출하였다. 그 후 4,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 여과를 3회 반복하여 정용하였으며 효소를 불활성화하기 위하여 90°C에서 30분 동안 처리하여 실험시키고 원심분리하여 추출물을 제조하였다. 이때의 처리균은 대조균, cellulase 처리균(Viscozyme, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark), pectinase 처리균(Pectinex, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) 및 cellulase와 pectinase 효소 병용처리균으로 하였다.

3. 미선나무잎 추출물의 가용성 고형분, 환원당 함량 및 pH 측정

미선나무잎의 효소처리 후 용매별 추출물의 가용성 고형분 함량은 굴절 당도계(PAL-2, ATAGO, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였고 환원당 함량은 dinitrosalicylic acid(DNS)에 의한 비색법(Chae 등 2000)에 의해, pH는 pH meter(Orion 520A, Thermo Electron Co., Waltham, MA, USA)로 측정하였다.

4. 미선나무잎 추출물의 verbascoside 함량 측정

미선나무잎 추출물의 verbascoside는 HPLC(Waters, Millipore Co-Operative, Milford, MA, USA)로 측정하였으며 이때 column은 Capcell pak C₁₈(5 μm, 250 mm×4.6 mm, Shiseido, Toyko, Japan), detector는 PDA(Photo Diode Array)로 330 nm, injection volume은 10 μL, 이동상은 A 용매(0.1% H₃PO₄), B 용매(acetonitrile)로 하여 Table 1에서와 같이 gradient하여 분석하였다. Verbasoside 표준품은 물에 용해되지 않기 때문에 70% ethanol에 용해하여 분석하였다(Xie 등 2012).

5. 미선나무잎 추출물의 항산화 성분 측정

미선나무잎 추출물에 대한 ascorbic acid, flavonoid 화합물, polyphenol 화합물 등의 항산화 성분의 함량을 다음과 같이 측정하였다.

Ascorbic acid의 함량은 각 추출물 시료 0.2 mL와 10% trichloroacetic acid(TCA) 0.8 mL를 첨가하고 원심분리기에서 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리시킨 후 여과하고 여액 0.5

Table 1. HPLC gradient conditions for the analysis of verbascoside in the enzyme-treated *Abeliophyllum distichum* leaves extracts

Time (min)	Mobile phase A	Mobile phase B
0	90	10
7	75	25
15	75	25
23	40	60
25	0	100
30	0	100
32	90	10

mL에 2% metaphosphoric acid와 10% phenol reagent를 혼합하여 상온에서 10분간 방치하고 UV-Vis spectrophotometer (Uvikon XL 70, Sacoman, Ales, France)로 760 nm에서 흡광도를 측정하였다(Park 등 2008).

Flavonoid 화합물의 함량은 각각의 추출물 시료 0.1 mL에 80% ethanol 0.9 mL를 가하여 이 혼합액 0.5 mL에 10% aluminium nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 80% ethanol 4.3 mL를 각각 가하고 상온에서 40분간 방치한 후 415 nm에서 흡광도 값을 측정하였으며 표준물질로는 quercetin(Sigma-Aldrich)을 사용하였다(Moreno 등 2000).

Polyphenol 화합물은 각 추출물 1 mL에 phenol reagent 0.5 mL와 10% Na₂CO₃ 1 mL, 7.5 mL의 증류수를 차례대로 혼합하여 30분 경과한 뒤 760 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준물질로는 tannic acid(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다(AOAC법 1995).

6. 미선나무잎 추출물의 *in vitro* 항산화 활성 측정

DPPH 라디칼 소거능은 각각의 추출물을 15배 희석한 시료 2 mL에 0.2 mM DPPH 2 mL 첨가 및 혼합 후 상온에서 30분 반응하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다(Blois MS 1958).

ABTS radical 소거능의 경우에는 ABTS시약(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 7.4 mM과 potassium persulfate 2.6 mM을 제조한 후 하루 동안 암소에 방치한 시약을 UV-Vis spectrophotometer에서 흡광도 값이 1.5 이하가 되도록 증류수로 희석한 후 희석된 ABTS 시약 1 mL에 추출물을 5배 희석한 시료 0.05 mL를 첨가하고 상온에서 90분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다(Re 등 1999).

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도값}}{\text{무처리구의 흡광도값}}\right) \times 100$$

7. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 측정된 후 SPSS 26.0(IBM Corporation, Armonk, NY, USA)을 이용하여 평균 및 표준편차로 나타내었으며, 실험구 간의 유의성($p < 0.05$)을 ANOVA로 분석한 후, Duncan's multiple range test에 의해 실험구 간의 차이를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 미선나무잎의 효소처리 후 용매별 추출물의 가용성 고형분, 환원당 함량 및 pH

미선나무잎을 cellulase, pectinase, 또는 cellulase와 pectinase 효소 병용처리 후 물, 25% 및 50% ethanol로 추출하여 제조한 추출물의 가용성 고형분, 환원당 함량 및 pH를 측정된 결과는 Table 2와 같다.

대조군의 경우, 물 추출물이나 ethanol 추출물 모두 0.93 °brix로 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 그러나 효소처리 후 물로 추출물을 제조하였을 때에는 cellulase 처리구는 1.53 °brix, pectinase 처리구는 1.90 °brix로 pectinase 처리 시 유의적으로 높게 나타났다. 특히 이들 효소를 병용처리하였을 때에는 2.67 °brix로 가장 높은 가용성 고형분 함량을 보이는 것으로 나타나 효소처리시 cellulose나 pectin 물질 등이 가수분해되어 가용성 고형분 함량이 높게 나타나는 것으로 판단되었다. 효소처리 후 25% 및 50% ethanol 추출물의 경우에도 물 추출물과 마찬가지로 효소처리하지 않은 대조군보다 높은 가용성 고형분의 함량을 보였다.

Youn 등(2003)은 효소처리에 의한 늙은 호박의 품질 특성 연구에서 cellulase와 pectinase 효소 병용처리군이 단독효소를 사용한 대조군에 비해 추출수율이 높게 나타나 본 연구결과와 일치하였다.

환원당 함량은 대조군의 경우, 물 추출 시 5.78%의 환원당 함량을 보였으나 ethanol로 추출 시에는 농도별 각각 6.05 및 5.99%로 대조군에 비하여 약간 높은 함량을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. 그러나 미선나무 잎에 cellulase를 처리한 물 추출물에서는 6.08%로 효소 무처리군에 비하여 높은 값을 보였지만 ethanol 추출물에서 환원당의 함량이 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Pectinase 처리 후의 추출물은 효소 무처리군이나 cellulase 처리군보다 높은 환원당 함량을 보였으며 특히 25% ethanol로 추출하였을 때가 가장 높은 함량을 보이는 것으로 나타났다. 한편 cellulase와 pectinase를 병

Table 2. Changes in soluble solid, reducing sugar content and pH in the enzyme-treated *Abeliophyllum distichum* leaves extracts

	Enzyme treatment	Extraction solvent		
		DW	25 % ethanol	50% ethanol
Soluble solid (°brix)	Control	0.93±0.06 ^{D1)}	0.93±0.21 ^C	0.93±0.06 ^B
	Cellulase	1.53±0.06 ^{bc}	1.70±0.10 ^{ab}	1.13±0.06 ^{cb}
	Pectinase	1.90±0.10 ^{ab}	1.93±0.21 ^{aAB}	0.97±0.23 ^{bb}
	Cellulase + Pectinase	2.67±0.06 ^{aA}	2.20±0.10 ^{ba}	1.83±0.23 ^{ca}
Reducing sugar (%)	Control	5.78±0.04 ^D	6.05±0.21 ^D	5.99±0.04 ^C
	Cellulase	6.08±0.13 ^{bc}	6.99±0.09 ^{ac}	6.28±0.16 ^{bc}
	Pectinase	8.55±0.15 ^{bb}	10.14±0.2 ^{ab}	8.97±0.39 ^{bb}
	Cellulase + Pectinase	11.95±0.01 ^{aA}	11.58±0.02 ^{ba}	11.11±0.31 ^{ca}
pH	Control	5.90±0.02 ^A	5.90±0.01 ^A	5.88±0.02 ^A
	Cellulase	5.80±0.02 ^{AB}	5.77±0.00 ^{bb}	5.77±0.01 ^{bb}
	Pectinase	5.42±0.02 ^C	5.42±0.01 ^C	5.40±0.01 ^C
	Cellulase + Pectinase	5.31±0.00 ^{AD}	5.29±0.02 ^{bd}	5.27±0.02 ^{bd}

¹⁾ Values with different superscripts within a row (^{a-c}) and a column (^{A-D}) were significantly different ($p < 0.05$).

용처리하였을 때에는 11.11~11.95%로 효소 단독 또는 효소 무처리시보다 높은 함량을 보이는 것으로 나타나 cellulase와 pectinase가 탄수화물 가수분해 효소이기에 환원당의 함량이 증가한 것으로 판단되었다.

Lee 등(2015)은 고추 추출액의 수율과 기능성을 증진시키기 위해 cellulase 또는 pectinase 단독 처리보다는 amylase를 병용처리하였을 때 효소 무처리에 비해 효소처리군이 환원당 함량이 높다고 하여 본 결과와 유사한 경향이였다.

미선나무잎 추출물의 pH는 대조군의 경우, 물 추출물에서는 5.90의 값을 보였으며 25% 및 50% ethanol 추출물은 각각 5.90 및 5.88로 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 그러나 효소처리한 경우, 효소 병용처리가 가장 많은 pH의 변화를 보였으며 다음으로는 pectinase, cellulase의 순으로 나타나 효소 처리가 조직의 연화를 통하여 유기산 등의 용출로 인해 pH의 저하를 가져오는 것으로 판단되었으며 추출 용매에 따른

차이는 크게 없는 것으로 판단되었다.

2. 미선나무잎의 효소처리 후 용매별 추출물의 verbascoside 함량 측정

미선나무잎의 효소처리 후 용매별 추출물의 verbascoside 함량은 Table 3과 같다.

효소를 처리하지 않은 대조군의 경우, 물 추출물은 11.03 µg/mL이었으며 25% 및 50% ethanol 추출물은 각각 743.51 및 1,273.02 µg/mL로, 물 추출에 비해 ethanol 추출에서 높은 verbascoside 함량을 보였다. 효소처리의 경우, 물 추출물은 대조군, cellulase, pectinase 및 효소 병용처리 순으로 그 함량이 증가하였으며 효소처리를 하지 않은 대조군에 비해 효소 병용처리군이 약 98배 정도 높은 함량을 보여 효소처리를 함으로써 verbascoside 함량이 매우 증가함을 알 수 있었다. 25% 및 50% ethanol 추출물에서도 효소 병용처리가 가장 많

Table 3. Changes in verbascoside content in the enzyme-treated *Abeliophyllum distichum* leaves extracts

(unit: µg/mL)

Enzyme treatment	Extraction solvent		
	DW	25% ethanol	50% ethanol
Control	11.03±4.82 ^{cd}	743.51±17.40 ^{bd}	1,273.02±15.32 ^{ac}
Cellulase	147.01±5.73 ^c	1,573.11±23.67 ^{ab}	1,540.39±6.76 ^{bbc}
Pectinase	309.71±29.91 ^{cb}	1,211.45±2.45 ^{bc}	1,744.00±414.67 ^{ab}
Cellulase+Pectinase	1,079.20±36.93 ^a	1,630.77±35.39 ^{ba}	2,466.23±42.77 ^a

¹⁾ Values with different superscripts within a row (^{a-c}) and a column (^{A-D}) were significantly different ($p < 0.05$).

은 함량을 나타내었으며 물 추출물인 대조군에 비해 효소 병용처리 후 50% ethanol 추출물의 함량은 약 220배 이상 증가하였다. 따라서 항비만, 항산화, 항염증, 신경보호활성 및 2형당뇨 예방효과 등을 나타내는 verbascoside의 함량 향상을 위해서는 cellulase와 pectinase 등의 효소처리와 50% 정도의 ethanol로 추출함이 바람직할 것으로 판단되었다. Verbascoside는 물에 용해가 잘 안되고 alcohol류에 잘 용해되고(Jeong JY 2020) 효소처리에 의해 조직이 연화되었기 때문인 것으로 판단되었다.

3. 미선나무잎의 효소처리 후 용매별 추출물의 항산화 성분 측정

미선나무잎의 효소처리 후 용매별로 추출한 추출물의 ascorbic acid, flavonoid 화합물 및 polyphenol 화합물의 함량을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

Ascorbic acid의 경우, 대조군의 물 추출물은 9.16 mg%로 가장 낮은 함량을 보였고 25% 및 50% ethanol 추출물에서는 그 함량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타나 물 보다는 ethanol로 추출 시 ascorbic acid의 함량이 증가함을 알 수 있었다. Cellulase, pectinase 및 효소 병용처리의 경우에도 물 추출물 보다는 ethanol 추출물에서 대체적으로 ascorbic acid의 함량이 높았으며 특히 pectinase를 처리하고 50% ethanol로 추출하였을 때 16.13 mg%로 가장 높은 함량을 보였다.

Flavonoid 화합물의 함량에서는 대조군의 물 추출물에서는 9.96 mg%였으나 25% 및 50% ethanol 추출물에서는 각각 18.22, 21.16 mg%로 ethanol의 농도가 높을수록 함량이 증가

하는 것으로 나타났다. Cellulase 및 pectinase를 각각 효소처리한 경우에는 효소처리하지 않은 대조군과 비교할 때 추출용매 모두 그 함량이 높은 것으로 확인되었다. 특히 50% ethanol 추출물의 경우 가장 많은 함량을 보였지만 효소 병용처리한 경우에는 다른 처리군과는 달리 물 추출시에 더 많은 함량을 보였다.

Polyphenol 화합물은 대조군의 물 추출물의 경우 52.32 mg%였으나 ethanol 추출물에서는 각각 70.28 및 89.61 mg%로 물 보다는 ethanol로 추출하였을 때 그 함량이 증가함을 알 수 있었다. 미선나무잎에 cellulase 또는 pectinase 처리시에는 ascorbic acid 및 flavonoid 화합물과는 달리 25% ethanol 추출물에서 가장 높은 함량을 보였고 다음으로는 50% ethanol, 물 추출물 순이었다. 효소 병용처리군에서도 25% ethanol 추출물이 polyphenol 화합물의 함량이 가장 많은 것으로 나타났다.

Lee 등(2021)은 병풀을 효소처리하였을 때 ascorbic acid, flavonoid 및 polyphenol 화합물의 함량을 측정한 결과 효소처리시 병풀의 조직이 연화되어 추출율이 높아져 증가하였다고 하여 본 결과와 유사한 경향을 보였다. 또한 효소처리 후 ethanol 추출시 그 추출 수율이 높아짐을 확인할 수 있었다. 한편, Jeong JY(2020)는 50% 및 100%의 ethanol과 methanol로 미선나무잎을 추출한 후 polyphenol 화합물과 flavonoid 화합물의 함량을 측정한 결과, polyphenol 화합물은 100% methanol에서, flavonoid 화합물에서는 100% ethanol에서 그 함량이 높은 편이었다고 하여 본 결과와 마찬가지로 추출용매에 따라 항산화 성분의 추출 정도 등이 달라짐을 확인할 수 있었다.

Table 4. Changes in ascorbic acid, flavonoids and polyphenols contents in the enzyme-treated *Abeliophyllum distichum* leaves extracts (unit: mg%)

	Enzyme treatment	DW	25% ethanol	50% ethanol
Ascorbic acid	Control	9.16±0.14 ^{cB1)}	10.23±0.00 ^{bB}	14.33±0.51 ^{aA}
	Cellulase	5.97±0.28 ^{cC}	10.80±0.38 ^{bB}	14.16±1.92 ^{aA}
	Pectinase	10.23±0.65 ^{cA}	12.93±0.89 ^{bA}	16.13±0.43 ^{aA}
	Cellulase+Pectinase	10.48±0.25 ^{bA}	12.53±0.28 ^{aA}	10.07±0.14 ^{bB}
Flavonoid	Control	9.96±3.08 ^{bB}	18.22±1.64 ^{abA}	21.16±8.06 ^{aBC}
	Cellulase	12.13±3.97 ^{bB}	19.09±5.23 ^{bA}	35.81±10.15 ^{aA}
	Pectinase	13.44±1.30 ^{bB}	17.13±4.34 ^{bA}	35.12±6.72 ^{aAB}
	Cellulase+Pectinase	29.96±11.00 ^{aA}	21.04±4.44 ^{bA}	19.95±2.85 ^{aA}
Polyphenols	Control	52.32±0.51 ^{cC}	70.28±1.44 ^{bB}	89.61±1.43 ^{aA}
	Cellulase	38.37±1.24 ^{cD}	102.08±4.05 ^{aA}	89.20±1.20 ^{bA}
	Pectinase	68.47±2.89 ^{bB}	101.14±2.85 ^{aA}	85.90±2.12 ^{bA}
	Cellulase+Pectinase	87.31±5.71 ^{bA}	107.94±7.41 ^{aA}	67.21±4.10 ^{cB}

¹⁾ Values with different superscripts within a row (^{a-c}) and were a column (^{A-D}) significantly different ($p < 0.05$).

4. 미선나무잎의 효소처리 후 용매별 추출물의 항산화 활성 측정

미선나무잎에 cellulase와 pectinase 등의 효소를 처리하고 여기에 물, 25% 및 50% ethanol의 농도가 되도록 각각 용매를 첨가하여 제조한 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정된 결과는 Table 5와 같다. 우선 미선나무 잎 추출물들에 대한 항산화 활성을 예비실험한 결과, 활성이 매우 우수하여 DPPH 라디칼 소거능은 시료의 225배 희석한 추출물을, ABTS 라디칼 소거능은 75배 희석한 추출물을 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거능의 경우, 효소 무처리한 25% ethanol 추출물이 98.04%로 가장 높은 활성을 나타내었고 cellulase 및 pectinase 처리한 물 추출물에서 각각 96.30 및 102.25%로 활성이 높았으며 효소 병용처리군에서는 50% ethanol 추출물에서 가장 높은 활성을 보여 효소와 용매간 항산화 활성이 각기 다른 것으로 나타났지만 희석배수 등을 고려하면 미선나무잎의 추출물은 항산화 활성이 우수한 것으로 판단되었다.

ABTS 라디칼 소거능의 경우, 물과 25% ethanol 추출물보다는 50% 추출물에서의 활성이 대체적으로 높았으며 특히 pectinase 및 cellulase를 각각 처리하고 50% ethanol로 추출하였을 때가 가장 높은 활성을 나타내었다.

미선나무잎의 효소처리 후 용매 추출물은 색을 진하게 띠고 있어 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 측정 시 색의 간섭이 많았고 미선나무잎 자체의 항산화 활성이 뛰어나 이를 희석하는 과정에서의 실험오차 등으로 활성의 차이를 보이는 것으로 판단되며 차후 실험 결과들에서의 시료 양 및 희석 농도 등을 고려하여 보다 정확한 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

이상의 결과로 보아 미선나무잎에 가수분해 효소를 처리하는 것이 다양한 생리적 기능성 성분들의 함량을 증진시킬

수 있으며, 특히 효소처리 후 물 보다는 25% 또는 50%의 ethanol을 활용하여 추출하는 것이 바람직할 것으로 사료되었다. 또한 항비만, 항산화, 항염증, 신경보호활성 및 항당뇨 등의 효과가 있다고 알려져 있는 verbascoside 성분은 cellulase와 pectinase를 처리하고 여기에 50% ethanol의 농도가 되도록 하여 추출물을 제조할 경우 효소 무처리 및 물 추출물과는 그 함량이 220배 이상의 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

요약 및 결론

미선나무잎에 cellulase와 pectinase 등의 효소를 처리하고 여기에 물, 25% 및 50% ethanol로 추출물을 제조하고 이들 추출물의 이화학적 품질변화 및 항산화 성분 및 활성 변화를 측정하였다. 가용성 고형분과 환원당 함량은 효소처리를 하지 않은 대조군에서 가장 낮은 값을 나타내었고 추출용매별로는 물보다는 ethanol 추출에서 그 함량이 더 높게 나타났다. 추출물의 pH는 효소처리 시 낮아지는 것으로 나타났다. Verbascoside는 효소 병용처리 후 50% ethanol 추출물에서 그 함량이 대조군보다 약 220배 이상 증가하였다. Ascorbic acid는 ethanol 추출물에서 그 함량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며 효소처리의 경우에서도 ascorbic acid의 함량이 높았으며 특히 pectinase를 처리 후 50% ethanol로 추출하였을 때 가장 높은 함량을 보였다. Flavonoid 화합물은 대조군의 물 추출물보다 ethanol의 농도가 높을수록 함량이 증가하였으며 cellulase 및 pectinase를 각각 효소처리한 경우에는 대조군과 비교할 때 그 함량이 모두 높게 나타났다. Polyphenol 화합물도 물 보다는 ethanol로 추출하였을 때 그 함량이 증가하였고 25% ethanol 추출물에서 가장 높은 함량을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능의 경우, 효소 무처리한 25% ethanol 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었고 cellulase

Table 5. Changes in *in vitro* antioxidant activities in the enzyme-treated *Abeliophyllum distichum* leaves extracts

(unit: %)

Enzyme treatment		DW	25 % ethanol	50% ethanol
DPPH radical scavenging activity	Control	95.26±0.73 ^{bb1)}	98.04±0.20 ^{aA}	91.87±1.40 ^{cB}
	Cellulase	96.30±1.96 ^{ab}	80.33±1.97 ^{cC}	87.53±1.31 ^{bb}
	Pectinase	102.25±1.45 ^{aa}	95.17±1.66 ^{ba}	90.92±0.91 ^{cB}
	Cellulase+Pectinase	93.99±5.67 ^{bb}	89.03±2.12 ^{bb}	103.09±4.24 ^{aA}
ABTS radical scavenging activity	Control	42.23±1.20 ^{cC}	58.81±1.38 ^{bc}	68.38±2.73 ^{ac}
	Cellulase	28.74±0.26 ^{cd}	45.66±1.37 ^{bd}	94.50±1.35 ^{ab}
	Pectinase	55.67±1.18 ^{bb}	77.71±1.69 ^{bb}	98.75±0.86 ^{aA}
	Cellulase+Pectinase	60.69±1.63 ^{ba}	82.77±2.84 ^{aA}	61.90±2.87 ^{bd}

¹⁾ Values with different superscripts within a row (^{a-c}) and were a column (^{A-D}) significantly different ($p < 0.05$).

및 pectinase 처리한 물 추출물에서 활성이 높았으며 효소 병용처리군에서는 50% ethanol 추출물에서 가장 높은 활성을 보였다. ABTS 라디칼 소거능의 경우, 물과 25% ethanol 추출물보다는 50% 추출물에서의 활성이 대체적으로 높았으며 특히 pectinase 및 cellulase를 각각 처리하고 50% ethanol로 추출하였을 때가 가장 높은 활성을 나타내었다. 특히 기능성 물질인 verbascoside는 효소 병용처리 후 50% ethanol의 농도가 되도록 하여 추출물을 제조할 경우 그 함량을 증가시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 과제는 2022년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다(과제 관리번호: 2021RIS-001).

References

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed. Association of Official Analytical Chemist
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Chang SJ, Jeon NB, Park JW, Jang TW, Jeong JB, Park JH. 2018. Antioxidant activities and anti-inflammatory effects of fresh and air-dried *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves. *Korean J Food Preserv* 25:27-35
- Chae SK, Kang KS, Ma SJ, Bang GW, Oh MH, Oh SH. 2000. Standard Food Analysis. pp.299-301, 403-404. JiguMunhwasa
- Galli A, Marciani P, Marku A, Ghislanzoni S, Bertuzzi F, Rossi R, Di Giancamillo A, Castagna M, Perego C. 2020. Verbascoside protects pancreatic β -cells against ER-stress. *Biomedicines* 8:582
- He J, Hu XP, Zeng Y, Li Y, Wu HQ, Qiu RZ, Ma WJ, Li T, Li CY, He ZD. 2011. Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. *J Asian Nat Prod Res* 13: 449-464
- Hong SP, Han MJ. 2002. The floral dimorphism in the rare endemic plant, *Abeliophyllum distichum* Nakai (Oleaceae). *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 197:317-325
- Imakura Y, Kobayash S, Mima A. 1985. Bitter phenyl propanoid glycosides from *Campsis chinensis*. *Phytochemistry* 24:139-146
- Jang TW, Park JH. 2017. Antioxidative activities and whitening effects of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum*. *J Life Sci* 27:536-544
- Jeong JY. 2020. Analysis of inorganic elements and indicator compound form *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves. Master's Thesis, Chosun Univ. Gwangju. Korea
- Kim NY, Lee HY. 2015. Enhancement of anti-wrinkle activities of *Abeliophyllum distichum* Nakai through low temperature extraction process. *Korean J Med Crop Sci* 23:231-236
- Lee JY, Choi GH, Lee KH. 2015. Physicochemical and sensory properties of red pepper extract treated with enzyme complex. *Korean J Food Nutr* 28:628-634
- Lee KH, Joo KY, Kim CY, Han KJ, Jang DB, Yun JH, Yu KW, Bae YJ. 2021. Physicochemical quality change of enzyme-treated *Centella asiatica* and preparation of jam using enzyme-treated *Centella asiatica*. *Korean J Food Nutr* 34: 612-620
- Lee NN, Choi YE, Moon HK. 2014. Effect of leds on shoot multiplication and rooting of rare plant *Abeliophyllum distichum* Nakai. *J Plant Biotechnol* 41:94-99
- Meyer AS, Köser C, Adler-Nissen J. 2001. Efficiency of enzymatic and other alternative clarification and fining treatments on turbidity and haze in cherry juice. *J Agric Food Chem* 49:3644-3650
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71:109-114
- Oh H, Kang DG, Kwon TO, Jang KK, Chai KY, Yun YG, Chung HT, Lee HS. 2003. Four glycosides from the leaves of *Abeliophyllum distichum* with inhibitory effects on angiotensin converting enzyme. *Phytother Res* 17:811-813
- Park H, Jung B. 2017. Optimal contract under the Nagoya protocol for the benefit sharing. *Environ Resour Econ Rev* 26:85-101
- Park JH. 2011. Antioxidant activities and inhibitory effect on oxidative DNA damage of extracts from *Abeliophylli distichi* Folium. *Korean J Herbol* 26:95-99
- Park YK, Kim SH, Choi SH, Han JG, Chung HG. 2008. Changes of antioxidant capacity, total phenolics, and vitamin C contents during *Rubus coreanus* fruit ripening. *Food Sci Biotechnol* 17:251-256
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26:1231-1237

- Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Azrieli A. 1995. The effect of cellulase and hemicellulase plus pectinase on the aerobic stability and fibre analysis of peas and wheat silages. *Anim Feed Sci Technol* 55:287-293
- Wilkins MR, Widmer WW, Grohmann K, Cameron RG. 2007. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresour Technol* 98:1596-1601
- Xie J, Tan F, Zhu J, Yue C, Le Q. 2012. Separation, purification and quantification of verbascoside from *Penstemon barbatus* (Cav.) Roth. *Food Chem* 135:2536-2541
- Yoou MS, Kim HM, Jeong HJ. 2015. Acteoside attenuates TSLP-induced mast cell proliferation via down-regulating MDM2. *Int Immunopharmacol* 26:23-29
- Youn SJ, Kim GE, Jeong YJ. 2003. Extract characteristics of old pumpkin on enzyme treatment. *Korean J Food Preserv* 10:302-307

Received 9 January, 2023
Revised 16 January, 2023
Accepted 31 January, 2023