

당분해효소를 이용한 물푸레나무 효소처리물의 항염 및 항산화 효능 연구

이혜원[†] · 김유아 · 박병준 · 한상근^{††}

한국콜마(주) 피부천연물연구소
(2023년 8월 14일 접수, 2023년 9월 11일 수정, 2023년 9월 21일 채택)

A Study on Anti-inflammatory and Antioxidant Effect of *Fraxinus rhynchophylla* Using Carbohydrate-Hydrolyzing Enzymes

Hye Won Lee[†], You Ah Kim, Byoung Jun Park, and Sang Keun Han^{††}

Skin & Natural Products Lab., Kolmar Korea Co., Ltd., 61,
Heolleung-ro 8-gil, Seocho-gu, Seoul 06800, Korea

(Received August 14, 2023; Revised September 11, 2023; Accepted September 21, 2023)

요약: 물푸레나무(*Fraxinus rhynchophylla* Hance, *F. rhynchophylla*)는 동아시아에서 널리 사용되어 온 전통적인 약용 식물로, 만성 기관지염, 세균성 이질과 시력 개선 등을 위해 사용돼 왔다. 물푸레나무에는 esculin, esculletin, fraxin 및 fraxetin과 같은 다양한 형태의 쿠마린 이 존재하며, esculletin은 항산화, 항염, 항균, 항암 및 아토피성 피부 염증 완화 등의 효과를 가지고 있다. 지금까지 물푸레나무 내 유효 성분을 증가시키는 공정 개발에 관한 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구의 목적은 물푸레나무 내 esculletin 함량을 증가시키고, 항염 및 항산화 효능을 증대시키기 위한 물푸레나무 생물전환 공정을 개발하는 것이다. 당분해효소 viscozyme L을 이용하여 물푸레나무에 처리한 결과 물푸레나무 효소처리물(FRE-VL)은 물푸레나무 추출물(FRE) 대비 esculletin 함량이 3.1배 증가하였으며, 항염 활성 증대와 DPPH 라디칼 소거 활성의 효과를 나타내었다. 본 연구를 통해 화장품 분야에서 생물전환 기술을 적용한 물푸레나무 효소처리물의 신규 화장품 기능성 소재로의 활용 가능성을 확인하였다.

Abstract: *Fraxinus rhynchophylla* Hance (*F. rhynchophylla*) is a traditional medicinal plant that has been widely used in East Asia and has been used for chronic bronchitis, bacterial dysentery and improved eyesight. *F. rhynchophylla* contains various type of coumarins such as esculin, esculletin, fraxin and fraxetin. Esculetin possesses versatile activities including antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer properties and improvement of atopic dermatitis. However, there is no research on the process of increasing active components in *F. rhynchophylla*. The objectives of the present study were to apply biotransformation technology to *F. rhynchophylla* for increasing the content of esculletin, and enhancing anti-inflammatory and antioxidant activities. *F. rhynchophylla* extract (FRE) treated with viscozyme L (FRE-VL) showed 3.1 times higher content of esculletin than FRE, and exhibited effects such as increased anti-inflammatory activity and DPPH radical scavenging activity. Based on the these results, it is concluded that biotransformed FRE-VL could be potentially applicable as a new active ingredient in the cosmetic field.

Keywords: *Fraxinus rhynchophylla*, esculletin, viscozyme L, anti-inflammatory, antioxidant

[†]주 저자 (e-mail: hw0101@kolmar.co.kr)
call: 02-3459-5769

^{††}교신저자 (e-mail: sang@kolmar.co.kr)
call: 02-3459-5501

1. 서론

물푸레나무(*Fraxinus rhynchophylla* Hance)는 물푸레나무과(Oleaceae)의 물푸레나무속(*Fraxinus*)에 속하는 낙엽 활엽 교목으로 중국 및 한국에 주로 분포하며, 만성 기관지염, 세균성 이질의 치료와 시력 개선 등을 위한 약재로 사용돼 왔다. 한방에서 물푸레나무의 껍질을 진피라고 하며, 장염, 기관염, 급성 결막염, 이질 및 건선의 치료를 위한 항염증제로 사용되고 있다[1,2].

진피의 주요 성분으로는 coumarin 유도체를 비롯하여 secoiridoids, phenylethanoids, flavonoids, lignan 및 triterpenes 등이 있다. 진피로부터 분리된 coumarin유도체로는 esculetin, esculin, scopoletin, fraxetin, fraxin, fraxidin 및 fraxisecoside 등이 있다[3,4]. 진피의 주요 활성 성분인 esculetin은 항산화, 항염, 항균, 항암 및 아토피성 피부 염증 완화 등의 효과가 보고되어 있다[5,6].

생물전환은 미생물이 효소를 이용한 이화작용을 통해 유기물을 분해하고, 저분자화, 비배당체화 및 생리활성물질 생산 등을 수행하여 인간에게 유용한 물질을 만드는 과정이다[7,8]. 생물전환 공정은 화학적 공정에 비해 환경 친화적인 공정, 저렴한 비용과 안전성 등의 장점을 보유하고 있어 화장품 및 식품 분야에서 널리 활용되고 있다. 특히 당분해효소를 통한 글루코시드 결합의 가수분해는 유효성분의 저분자화 및 구조적 변화를 일으키며, 생리 활성 및 생체 이용률에 긍정적인 영향을 주는 연구 사례가 보고되어 있다[9,10].

물푸레나무 추출물의 효능이 보고되어 있으나, 물푸레나무가 지닌 유효 성분과 효능을 향상시키는 방법에 관한 연구가 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 생물전환 기술을 이용하여 물푸레나무가 갖는 유효 성분의 함량을 증가시키고, 항염 및 항산화 효과가 우수한 화장품 소재로의 활용을 위한 가능성을 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 물푸레나무 껍질은 서울시 동대문구에 소재한 삼흥건재약업(Korea)에서 구입하였으며, 표준품인 esculetin은 Chendu Biopurify Phytochemicals Ltd. (China)로부터 구입하여 사용하였다. 당분해효소 처리를 위하여 상업적으로 판매되어 사용되고 있는 celluclast 1.5L (Novozymes

A/S, Denmark), pluszyme 2000P (Bision biochem, Korea), viscozyme L (Novozymes A/S, Denmark)를 사용하였다. 물푸레나무 효소처리물의 활성 평가를 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma, USA), L-ascorbic acid (Sigma, USA), Griess reagent system Kit (Promega, USA), LPS (MILLIPORE, USA), Celecoxib (Sigma, USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 대식세포 주인 RAW264.7 cell (ATCC TIB-71)은 ATCC (USA)에서 구입한 것을 사용하였다.

2.2. 물푸레나무의 추출물 제조 및 효소처리

물푸레나무 껍질 중량의 4배에 해당하는 70% 에탄올 (Sigma, USA)을 가해서 상온에서 72 h 씩 3 회 반복하여 추출한 후, 0.45 μ m membrane filter (Pall Corporation, USA)로 여과하고 회전공농축기(EYELA CCA 1110, Eyela Co. Ltd, Japan)를 이용하여 45 °C에서 농축하였다. 이 농축물을 동결건조기(LP10, Il Shin Bio Base, Korea)를 이용하여 -80 °C에서 72 h 동안 건조하여 물푸레나무 추출물을 얻었다.

이 추출물을 1% 농도로 pH 5의 citrate phosphate buffer에 다시 용해시키고, 당분해효소 1%를 혼합한 후 진탕배양기(JSSI-300C, JSR, Korea)에 24 h 동안 진탕하면서 반응시켰다. 모든 효소는 Table 1과 같이 최적의 반응 온도와 pH를 조절하여 사용하였다. 효소 반응이 끝나면 90 °C에서 10 min 동안 효소를 불활성화 시키고, 원심 분리하여 상등액을 획득한 후 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 물푸레나무 효소처리물을 얻었다. 이를 동결 건조한 물푸레나무 효소처리물 파우더를 효능 평가에 사용하였다.

2.3. 물푸레나무의 효소처리 pH 조건 최적화

효소처리 pH 조건을 최적화하기 위하여 서로 다른 pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0)의 citrate phosphate buffer를 사용하여

Table 1. Properties of the Commercial Carbohydrate-Hydrolyzing Enzymes Used in this Study

Commercial enzyme	Reaction conditions		Enzyme composition
	pH	Temperature (°C)	
Celluclast 1.5L	5.0	50	Cellulase
Pluszyme 2000P	5.0	60	β -Glucosidase
Viscozyme L	5.0	35	Arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase

효소처리를 진행한 후 esculetin 함량을 비교하였다.

2.4. High-performance Liquid Chromatography

(HPLC)를 이용한 Esculetin 정량 분석

물푸레나무 효소처리물과 물푸레나무 추출물의 유효성분을 고속액체크로마토그래피(Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다. 당분해효소 5 종의 효과를 비교하기 위하여, 액상의 효소처리물을 50%로 희석된 에탄올에 50% (v/v) 농도로 희석하고, 0.2 μm syringe filter (Whatman, England)로 여과하여 분석하였다. 물푸레나무 효소처리물 파우더는 50%로 희석된 에탄올에 1% (w/w) 농도로 희석하고 여과한 후 분석하였다. HPLC 분석 조건은 Table 2에 나타내었다.

2.5. 물푸레나무 효소처리물의 항염 및 항산화 효과

2.5.1. Nitric Oxide Production Assay

RAW264.7 세포주를 96 well cell culture plate에 5×10^5 cells/mL로 100 μL/well 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터 조건 하에 24 h 배양하였다. 배양된 세포에 nitric oxide (NO)의 생성을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide (LPS) 1 μg/mL이 포함된 배지로 교환한 후, 세포 배지를 사용하여 파우더 형태의 물푸레나무 효소처리물과 물푸레나무 추출물을 농도별로 희석하고 세포에 처리 후 24 h 재배양하였다. 생성된 NO의 양은 세포배양 상등액 100 μL와 Griess 시약 100 μL를 혼합하여 96 well cell culture plate에서 10 min 반응시킨 후 ELISA reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 질산나트륨(NaNO₂)의 표준곡선과 비교하여 산출하였고, 아래 식을 이용하여 항염 효과를 도출하였다. 상기 실험에서

celecoxib (10 μg/mL)을 양성대조군으로 설정하였으며, 총 3 회 독립적으로 시행하여 통계분석하였다.

$$\text{NO inhibition(\%)} =$$

$$100 - \left[\frac{\{\text{NO conc.}(\mu\text{M})_{\text{Positive control or Experimental}}\}}{\{\text{NO conc.}(\mu\text{M})_{\text{Vehicle group}}\}} \times 100 \right]$$

2.5.2. DPPH Radical Scavenging Assay

증류수와 ascorbic acid (100 μg/mL)를 비교군으로 설정하고, 파우더 형태의 물푸레나무 효소처리물과 물푸레나무 추출물의 항산화 효과를 확인하였다. 각 시료는 증류수에 농도별로 희석하여 사용하였다. 준비된 시료를 100 μL/well 만큼 96 well plate에 분주하고, 시료와 동일한 부피의 DPPH solution (0.56 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)을 처리하였다. 시료 자체의 흡광도를 제거하기 위하여 준비된 시료를 100 μL/well 만큼 96 well plate에 분주하여 DPPH solution 대신 시료와 동일한 부피의 99.9% 에탄올을 각 well에 분주하였다. 그 후, 차광 25 °C 조건에서 30 min 반응시키고 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 상기 실험은 총 3 회 독립적으로 시행하여 통계분석하였다. 항산화 효과는 아래 식에 의하여 도출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging effect(\%)} =$$

$$100 - \left[\frac{\{\text{시료별 (OD}_{\text{DPPH}} - \text{OD}_{\text{Ethyl alcohol}})\}}{\{\text{dH}_2\text{O (OD}_{\text{DPPH}} - \text{OD}_{\text{Ethyl alcohol}})\}} \times 100 \right]$$

2.5.3. 통계처리

본 실험의 통계처리는 SPSS 12.0 (Chicago, USA)을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준 편차로 나타내었으며, 실험값과 대조값 사이의 통계적 유의한 차이는 2-표본 *t* 검정을 사용하여 분석하였고, 통계적 유의한 판단 수준은 95% (**p* < 0.05), 99% (***p* < 0.01)와 99.9% (***)*p* < 0.001)의 세 가지 수준을 사용하였다.

Table 2. HPLC Conditions for Esculetin Analysis of *F. rhynchophylla*

Parameter	Condition
HPLC	Shimadzu LC-20A HPLC system
Mobile phase	A: 0.1% acetic acid in water, B: Acetonitrile
Column	C ₁₈ (Luna 5u C ₁₈ (2) 100A New Column, 5 μm, 4.6 × 250 mm)
Wavelength	342 nm
Injection volume	10 μL
Oven temperature	35 °C
Flow rate	1 mL/min

3. 결과 및 고찰

3.1. 물푸레나무의 최적 당분해효소 선정

Esculetin은 가장 기본적인 구조를 가진 coumarin 유도체 중 하나로, 6 번과 7 번 탄소에 하이드록실기를 가지고 있으며, esculin은 esculetin의 6 번 탄소 위치의 하이드록실기에 glucose가 결합된 배당체이다. Esculetin은 esculin 대비

항산화력, 지방 세포 분화 억제력, 미백 효과와 생체 흡수율이 우수하며, 이는 coumarin 기본 골격에 존재하는 유리 하이드록실기가 생리 활성을 발휘하는 데 중요한 역할을

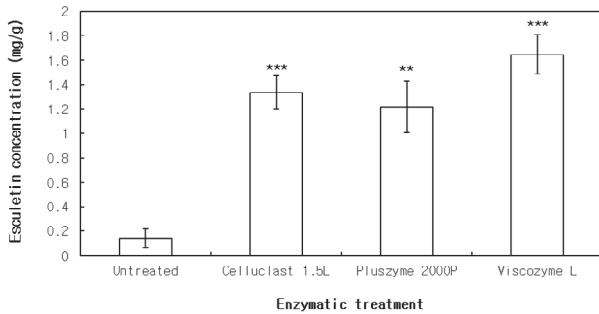


Figure 1. The concentration of esculetin of *F. rhynchophylla* extract treated with commercial carbohydrate-hydrolyzing enzymes. Data are means \pm SD, N = 3, * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared with untreated group.

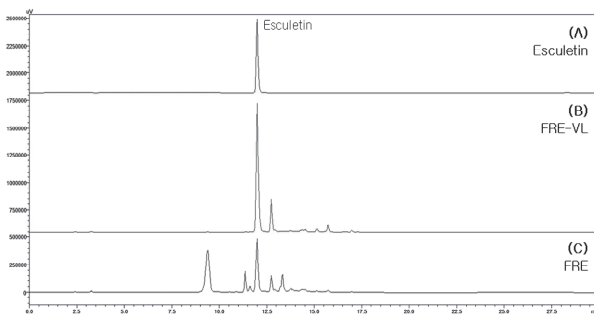


Figure 2. HPLC chromatogram of (A) Standard esculetin, (B) FRE-VL) *F. rhynchophylla* extract treated with viscozyme L, (C) FRE) *F. rhynchophylla* extract at 342 nm.

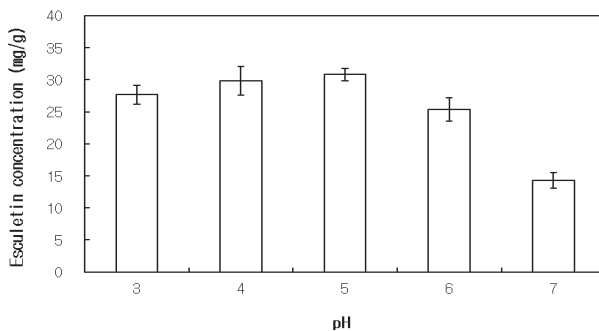


Figure 3. Effect of pH on the concentration of esculetin produced in *F. rhynchophylla* extract treated with viscozyme L. Data are means \pm SD, N = 3.

수행하고 glucose의 결합이 활성을 감소시킴을 시사하고 있다[11-15]. 따라서 물푸레나무 추출물에 당분해효소를 처리하여 esculetin 배당체를 esculetin으로 전환시킴으로써 물푸레나무 추출물의 생리 활성 및 생체 이용률을 높이고자 하였다.

물푸레나무 추출물에 적용 가능한 최적의 당분해효소를 결정하고자 하였으며, 물푸레나무의 효소별 지표성분 함량은 Figure 1에 나타내었다. 그 결과 물푸레나무의 주요 coumarin인 esculetin의 함량이 당분해효소처리 시 증가함을 확인하였다. 물푸레나무 추출물 내 esculetin 배당체 성분을 esculetin으로 전환시키는 활성은 viscozyme L > celluclast 1.5L > pluszyme 2000P 순으로 우수한 것을 확인하였다. 특히, 효소를 처리하지 않은 물푸레나무 추출물의 esculetin 함량이 0.15 mg/g으로 낮은 것에 비하여, viscozyme L을 처리한 물푸레나무 효소처리물의 esculetin 함량은 1.64 mg/g으로 높게 증가하였음을 확인하였다. 동결 건조한 시료를 분석한 결과, 물푸레나무 추출물 파우더(FRE)의 esculetin 함량은 11.12 mg/g, 물푸레나무 효소처리물 파우더(FRE-VL)의 esculetin 함량은 34.22 mg/g으로 효소처리 후 3.08 배 증가하였음을 확인하였다(Figure 2).

Esculetin은 β -glucosidase 처리 시 가수분해되어 esculetin으로 전환됨이 알려져 있다[16]. 하지만 상업용 효소인 viscozyme L을 이용한 esculetin으로의 생물전환과 물푸레나무 추출물에 당분해효소를 처리하여 유효 성분과 생리 활성을 증가시키는 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 상업용 당분해효소를 이용하여 물푸레나무 내 비배당체 유효 성분인 esculetin 함량을 증가시킴으로써 화장품 소재로서 물푸레나무의 부가가치를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

3.2. 물푸레나무의 효소처리 pH 조건 최적화

각 pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0)의 citrate phosphate buffer에서 viscozyme L을 이용한 효소 처리를 수행한 결과, pH가 3.0에서 5.0으로 증가할수록 esculetin 함량이 높아지며 pH가 5.0에서 7.0으로 증가할수록 esculetin 함량이 다시 감소하였다. pH 7에서 esculetin 함량이 14.32 mg/g로 가장 낮게 확인되었으며, pH 5에서 esculetin 함량이 30.81 mg/g로 가장 높음을 확인하였다(Figure 3).

3.3. 물푸레나무 효소처리물의 항염 및 항산화 효과

3.3.1. 항염 효과 확인

염증은 외부 자극으로부터 인체를 보호하며, 피부 손상

에 대응하고 회복하기 위한 일종의 면역 반응이다. 대식세포(macrophage)는 항상성 유지를 위한 면역 반응에 관여하는 중요한 세포 중 하나이다. 대식세포가 lipopolysaccharide (LPS), 자외선 손상, 미생물 감염 등과 같은 자극원을 인식하게 되면 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 염증 매개 물질의 생성이 증가한다[17,18]. NO는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 만들어지는 대표적인 염증 매개 물질로, 세포 내 항상성 유지, 멜라닌 합성 조절, 혈관 확장 등에 관여하는 신호전달자이지만 과량 존재할 경우 질병과 장애 발생을 유발하게 된다[19,20].

본 연구에서는 염증반응을 유도하는 내독소(endotoxin)인 LPS를 RAW264.7 세포에 처리하여 과량의 NO 분비를

유도하고 동시에 물푸레나무 효소처리물(FRE-VL)을 처리함으로써 LPS에 의한 NO 발생 억제 활성을 확인하였다. 물푸레나무 효소처리물(FRE-VL)은 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 91%의 NO 생성 저해율을 나타내었으며, 물푸레나무 추출물(FRE)은 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 81%의 NO 생성 저해율을 나타내었다. 물푸레나무 효소처리물(FRE-VL)은 물푸레나무 추출물(FRE) 대비 농도 의존적으로 높은 NO 발생 억제 활성을 나타내었다. 이를 통하여 물푸레나무 추출물에 viscozyme L을 처리하게 되면 항염 활성이 증가함을 알 수 있었다(Figure 4).

3.3.2. 항산화 효과 확인

피부 노화는 내인적 또는 외인적 요인에 의하여 진행된다. 내인적 노화는 유전적인 영향과 시간의 흐름을 반영하며, 부분적으로는 세포의 산화적 대사에 의해 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 지속적인 생성으로 인한 내재적 손상을 통해 일어난다. 외인적 노화는 자외선 노출, 대기 오염, 매연, 영양 부족 및 알코올 남용 등과 같은 환경적 요인에 의해 유발되며, UVA와 같은 자외선 노출은 ROS을 발생시켜 지질 과산화와 DNA 손상을 유발한다. 피부 노화의 주요 원인을 제공하는 ROS로 인한 산화적 스트레스에 대항하기 위하여, 피부는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase와 같은 효소적 방어 시스템과 비타민, 글루타치온 등을 이용한 비효소적 방어 시스템을 보유하고 있다. 하지만 지속적인 ROS의 공격은 피부 방어 체계를 붕괴시키고, 지질, 단백질, DNA와 같은 세포 구성 성분들을 손상시켜 피부 노화를 가속화시킨다 [21-23]. 화장품 소재로서 피부의 항산화력을 보강하기 위한 항산화제가 꾸준한 관심을 받고 있다. 합성 항산화제는 세포 변이 및 독성으로 인해 인체에 암을 유발할 수 있기에, 안전하고 활성이 높은 천연 항산화제의 연구는 높은 관심을 받고 있다[24-26]. 더 나아가 천연 항산화제의 유효 성분과 효능을 향상시키기 위하여 효소나 유익 미생물을 이용한 생물전환 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 DPPH radical을 활용하여 물푸레나무 효소처리물(FRE-VL)의 항산화 효과를 측정하였다. 물푸레나무 효소처리물(FRE-VL)의 경우 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 89.5%의 라디칼 소거 활성을 나타내며, 물푸레나무 추출물(FRE)은 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 88.6%의 라디칼 소거 활성을 나타냄을 확인하여 두 시료 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이는 물푸레나무 고유한 DPPH 라디

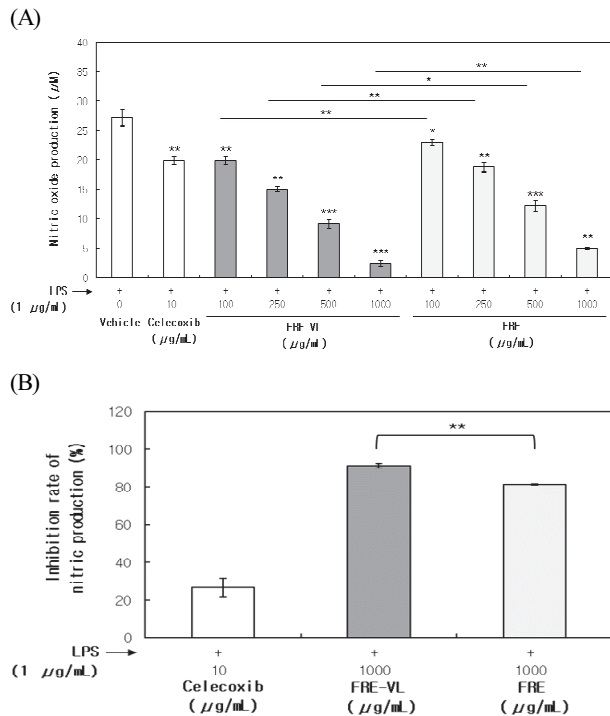


Figure 4. Inhibitory effect of FRE-VL and FRE on nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells. (A) Nitric oxide production (B) Inhibition rate of nitric oxide production compared by control or vehicle groups. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of FRP-VL or FRP. Positive control used celecoxib (10 $\mu\text{g/mL}$). Data are means \pm SD, N = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the control or vehicle groups. FRE-VL : *F. rhynchophylla* extract treated with viscozyme L, FRE : *F. rhynchophylla* extract.

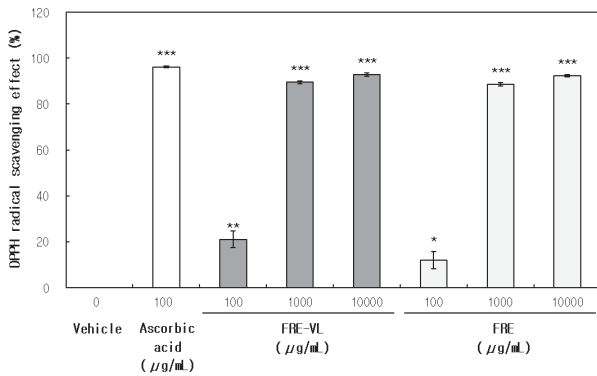


Figure 5. DPPH radical scavenging activity of FRE-VL and FRE. Positive control used L-ascorbic acid (100 µg/mL). Data are means ± SD, N = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the vehicle group. FRE-VL : *F. rhynchophylla* extract treated with viscozyme L, FRE : *F. rhynchophylla* extract.

칼 소거 활성이 우수하며, 당분해효소를 통해 생물전환될 때 물푸레나무의 항산화 활성은 유지되는 것으로 판단된다(Figure 5). Esculetin은 esculetin의 배당체인 esculin 대비 항산화 효과가 우수하다고 보고된 바 있으나, 본 연구의 물푸레나무 내 esculetin 배당체의 esculetin으로의 전환은 물푸레나무 효소처리물(FRE-VL)의 항산화 효과 변화에 유의미한 영향을 주지 않았다. 이는 물푸레나무 내 다양한 유효 성분들이 존재하며, 효소 처리 과정에서 물푸레나무 내 여러 성분들의 당 분해 및 산화 등을 통한 기능적 변화가 물푸레나무 효소처리물(FRE-VL)의 항산화 효과에 영향을 주었을 것으로 예상된다.

4. 결 론

본 연구에서는 예로부터 한방 소재로 이용되었으나 화장품 원료로는 크게 주목받지 못한 물푸레나무의 부가가치를 향상시키기 위하여 효소를 이용한 생물 전환 기술을 적용하였다. 물푸레나무 내 비배당체 유효 성분인 esculetin의 함량을 증가시키기 위한 최적 당분해효소로 viscozyme L을 선정하였고, 최적 pH 조건을 확립하였다. 물푸레나무 효소처리물(FRE-VL)은 물푸레나무 추출물(FRE) 대비 3.1 배 높은 esculetin을 함유하는 것을 확인하였다.

물푸레나무 효소처리물(FRE-VL)은 물푸레나무 추출물(FRE) 대비 농도 의존적으로 높은 항염 효과를 나타내는 것을 nitric oxide production assay를 통하여 확인할 수 있었

다. 항산화 효과의 경우 1,000 µg/mL의 농도에서 효소처리 전후 시료 모두 약 90%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내어 통계적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 이를 통해 당분해효소를 물푸레나무에 처리하더라도 동등한 항산화 효과가 유지됨을 확인하였다.

물푸레나무 효소 처리를 통한 esculetin 함량 증가 폭 대비 항염 효과의 증가 폭은 낮게 확인되었으며, 항산화 효과는 동등한 수준으로 유지되었다. 이는 효소 처리를 통해 esculetin 배당체뿐만 아니라 물푸레나무 내 다른 배당체 성분들도 당이 분해되었을 가능성이 높으며, 여러 성분들의 구조적 및 기능적 변화에 의한 복합적인 결과로 판단된다. 다만, esculetin 배당체가 esculetin으로 전환될 때 수소성이 증가하고 저분자화됨으로써 피부 친화도가 증가하고 임상적 효과가 개선될 가능성이 있을 것으로 예상된다. 추후 esculetin의 세포 수준 및 임상적 효과에 대한 연구를 통해 esculetin 단일 성분의 기능을 밝힐 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구를 통해서 당분해효소를 이용한 생물전환 기술을 적용하여 유효 성분 esculetin 함량이 증가한 물푸레나무 효소처리물 개발 공정을 확립할 수 있었으며, 항염 및 항산화 효과를 기대할 수 있어 천연 추출물 기반의 생물전환 신소재로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. N. Y. Kim, H. O. Pae, Y. S. Ko, J. C. Yoo, B. M. Choi, C. D. Jun, H. T. Chung, M. Inagaki, R. Higuchi, and Y. C. Kim, *In vitro* inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituents from *Fraxinus rhynchophylla*, *Planta Med.*, **65**(07), 656 (1999).
2. K. Xiao, Q. H. Song, S. W. Zhang, and L. J. Xuan, Water-soluble constituents of the root barks of *Fraxinus rhynchophylla* (Chinese drug Qinpi). *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **10**(2), 205 (2008).
3. Z. B. Wu, Y. Liu, S. S. Tian, and C. Wen, Chemical constituents of the stem bark of *Fraxinus rhynchophylla*, *Chem. Nat. Compd.*, **49**, 1162 (2014).
4. C. L. Si, Y. Zhang, Z. Y. Zhu, J. Xu, J. K. Kim, and Y. S. Bae, Isolation and structure elucidation of secoiridoid glucosides from *Fraxinus rhynchophylla* leaves, *Chem. Nat. Compd.*, **45**, 814 (2009).
5. B. R. Kim, J. S. Lee, D. Y. Kim, B. K. Kim, H. S. Lee,

- S. W. Lee, H. J. Kwon, Antioxidant and antibacterial activities of the bark of *Fraxinus rhynchophylla* Hance, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **13**(3), 339 (2015).
6. N. H. Jeong, E. J. Yang, M. Jin, J. Y. Lee, Y. A. Choi, P. H. Park, S. R. Lee, S. U. Kim, T. Y. Shin, T. K. Kwon, Y. H. Jang, K. S. Song, and S. H. Kim, Esculetin from *Fraxinus rhynchophylla* attenuates atopic skin inflammation by inhibiting the expression of inflammatory cytokines, *Int. Immunopharmacol.*, **59**, 209 (2018).
 7. H. J. Kang, J. W. Lee, T. W. Park, H. Y. Park, and J. Park, Biotransformation of ginsenoside Rd from red ginseng saponin using commercial β -glucanase, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **46**(4), 349 (2020).
 8. S. H. Yeom, M. H. Kang, J. H. Park, S. H. Kim, and J. W. Kim, A study on antioxidant, skin-whitening and UV absorption effect of *Beta vulgaris* using *Lactiplantibacillus plantarum* SM4, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **48**(3), 225 (2022).
 9. S. C. Ahn, M. S. Kim, S. H. Lee, J. H. Kang, B. H. Kim, W. K. Oh, B. Y. Kim, and J. S. Ahn, Increase of bioactive flavonoid aglycone extractable from Korean citrus peel by carbohydrate-hydrolysing enzymes, *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, **33**(4), 288 (2005).
 10. J. S. Hyon, S. M. Kang, M. Senevirathne, W. J. Koh, T. S. Yang, M. C. Oh, C. K. Oh, Y. J. Jeon, and S. H. Kim, Antioxidative activities of enzymatic digests from dried *Citrus unshiu* and *Citrus grandis* peels, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**(1), 18 (2010).
 11. E. Shin, K. M. Choi, H. S. Yoo, C. K. Lee, B. Y. Hwang, and M. K. Lee, Inhibitory effects of coumarins from the stem barks of *Fraxinus rhynchophylla* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**(9), 1610 (2010).
 12. Y. D. Hong, M. H. Nam, C. S. Lee, S. S. Shin, and Y. H. Park, Depigmenting effects of esculetin and esculin isolated from *Fraxinus rhynchophylla* Hance, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **40**(1), 89 (2014).
 13. P. T. Thuong, T. M. Hung, T. M. Ngoc, D. T. Ha, B. S. Min, S. J. Kwack, T. S. Kang, J. S. Choi, and K. H. Bae, Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships, *Phytother. Res.*, **24**(1), 101 (2010).
 14. J. H. Kwak, Y. Kim, C. E. Staatz, and I. Baek, Oral bioavailability and pharmacokinetics of esculetin following intravenous and oral administration in rats, *Xenobiotica*, **51**(7), 811 (2021).
 15. S. S. Garg, J. Gupta, D. Sahu, and C. J. Liu, Pharmacological and therapeutic applications of esculetin, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(20), 12643 (2022).
 16. V. Veena, P. Poomima, R. Parvatham, and K. Kalaiselvi, Isolation and characterization of β -glucosidase producing bacteria from different sources, *Afr. J. Biotechnol.*, **10**(66), 14891 (2011).
 17. D. C. LeBert, A. Huttenlocher, Inflammation and wound repair, *Semin. Immunol.*, **26**(4), 315 (2014).
 18. D. A. Yanez, R. K. Lacher, A. Vidyarthi, and O. R. Colegio, The role of macrophages in skin homeostasis, *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.*, **469**(3-4), 455 (2017).
 19. J. MacMicking, Q. Xie, and C. Nathan, Nitric oxide and macrophage function, *Annu. Rev. Immunol.*, **15**(1), 323 (1997).
 20. D. Bruch-Gerharz, T. Ruzicka, and V. Kolb-Bachofen, Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease-a review, *Arch. Dermatol. Res.*, **290**(12), 643 (1998).
 21. N. Puizina-Ivic, Skin aging, *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.*, **17**(2), 47 (2008).
 22. L. Packer, Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants, *New Compr. Biochem.*, **28**, 239 (1994).
 23. T. Briocche and S. Lemoine-Morel, Oxidative stress, sarcopenia, antioxidant strategies and exercise: molecular aspects, *Curr. Pharm. Des.*, **22**(18), 2664 (2016).
 24. G. M. Williams, C. X. Wang, and M. J. Iatropoulos, Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies, *Food Chem. Toxicol.*, **28**(12), 799 (1990).
 25. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Active-oxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**(1), 162 (1995).
 26. R. Kahl, Synthetic antioxidants: biochemical actions and interference with radiation, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogens, *Toxicology*, **33**(3-4), 185 (1984).