J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
30(4), 589~593(2001)

폐자원(게껍질, 참깨박, 감귤껍질) 추출물의 항산화성 및 아질산염소거작용

김수민† · 조영석* · 성삼경*
경산대학교 생명자원공학부
*영남대학교 식품가공학과

The Antioxidant and Nitrite Scavenging Ability of Waste Resource (crab shell, sesame meal, Korean tangrin peal) Extracts

Soo-Min Kim†, Young-Suk Cho* and Sam-Kyung Sung*
Faculty of Life Resources Engineering, Kyungsan University, Kyungsan 712-240, Korea
**Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea*

Abstract

The natural sources extracted from crab shell, Korean tangrine peel, sesame meals were utilized to investigate the effects of extracts on free radical reaction, lipid oxidation and nitrite scavenging ability. The recovery percentage of extracts from waste resources (crab shell, sesame meal, dry korean tangrine peel) were chitosan 11.6%, crude sesamol 2.2% and ascorbic acid 2.8%, respectively. The antioxidants were tended to have a lower TBARS value than those of control. The nitrite scavenging and electron donating ability of crude sesamol were tended to be the most effective extract among all extracts. However, In case of chitosan, the superoxide dismutase (SOD)-like activity was the most highest, compared to other extracts.

Key words: crab shell, Korean tangrine peel, sesame meals, antioxidants, nitrite scavenging

서 론

예전에는 식품이 사람에게 위해 없이 생명유지를 위한 영양적 기능을 중시하였으나 근간에는 소득의 증가에 따른 생활의 풍요로움에 따라 미각, 후각, 시각적 효과를 갖는 기호식품을 선호하게 되었다. 그러나 최근에는 건강에 대한 관심이 증대되어 생명활동의 조절기능인 생체방어, 질병의 방지와 회복, 신체리듬의 조절, 노화억제 등의 기능을 중시한 기능성 식품을 추구하게 되었다. 이에 따라 건강 지향적인 기능성 식품 및 기호식품이 개발되어 일부 상품화되고 있다. 이러한 시점에서 인체에 무해한 천연물로부터의 항산화제 발굴과 각종 식품의 첨가제에 대한 안정성에 대한 관심이 높아지고 있다. 그 대표적인 예로 육제품이나 수산가공품 등에 발색제로 첨가되는 질산염이나 아질산염은 육색의 발색 및 안정화(1,2) 뿐만 아니라, *Clostridium botulinum*에 대한 정균작용(3), 육제품의 풍미 향상(4) 등을 개선하는데 중요한 역할을 한다. 그러나, 식품 및 생체내의 잔존 아질산염은 그 자체가 독성을 나타내며 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중에 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 메트헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으키며(5), 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 함유되어 있는 2급 및 3급 아민류와 반응하여 발암성 니트로사민을 생성하는 것으로 알려져 있다(6). 따라서, 국내의 농수산가공업체들로부터 배출되는 폐자원들 중 게껍질속의 chitosan(7)과 참깨박속의 항산화물질(8), 감귤껍질에 존재하는 ascorbic acid(9) 등의 여러 가지 기능을 이용하여 이들의 free radical 반응 및 지방산화 억제에 미치는 영향과 니트로사민 생성의 직접적인 영향인자인 아질산염에 대한 분해효과를 검토하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

감귤, 게는 경산시장내 농협에서 구입하여 껍질만을 제조방법에 따라 추출 사용하였으며, 참깨박은 경산대학교 참기름 실습실에서 참기름 제조 후 남은 박을 추출 사용하였다. 실험에 사용된 시약은 특급시약이고, trichloroacetic acid (TCA), Griess reagent(sulfanilic acid, naphthylamine) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하였고, 2-thiobarbituric acid(TBA)는 Eastern Organic Chemicals(Roochester, NY)에서 구입하였다.

Chitosan 제조 : 키틴제조는 No 등(10)의 방법을 일부 수정하여 행하였다. 탈단백질은 시료 50 g에 3.5% NaOH용액

† Corresponding author. E-mail: kimsm@kyungsan.ac.kr
Phone: 82-53-819-1427, Fax: 82-53-813-4907

을 1 : 10(w/v)의 비율로 넣어 2시간 동안 60~70°C에서 교반하면서 단백질을 제거한 후 그 잔사를 물로 반복, 수세하여 여과한 후 건조(50°C, 24 hr)시켰다. 탈단백 건조시료에 1 N HCl을 1 : 15(w/v)의 비율로 가하여 30분간 실온에서 교반하면서 회분을 제거하여 수세 및 여과한 후, 50°C의 건조기에서 건조하였다. 탈색소는 건조된 조키틴에 1 : 10(w/v)의 비율로 아세톤을 가하여 일부 색소를 추출한 후 여과하여 아세톤을 수거하고, 다시 0.315 % NaOCl을 1 : 10(w/v)의 비율로 가하여 실온에서 30분간 침지한 다음 수세, 여과 및 건조시켜 제조한 키틴을 No와 Meyers(11)의 방법에 따라 키틴에 50% NaOH 용액을 1 : 10(w/v)의 비율로 가하여 100°C에서 30분간 교반하면서 가열한 뒤 수세 및 여과한 후 50°C 의 건조기에서 건조하여 시료로 사용하였다.

Crude sesamol 제조 : Crude sesamol 제조는 김(12)의 방법으로 참깨박 100 g 을 hexane 용액에 1차 추출하고, Whatman No. 1으로 여과한 후, 다시 85% ethnaol로 진탕 추출, 여과한 후 vacuum rotary evaporator로 농축하고 열풍건조하여 시료로 사용하였다.

Crude ascorbic acid 제조 : 감귤껍질 추출물 제조는 감귤껍질(내피포함) 100 g을 깨끗이 수세한 후 air dry oven에서 80°C, 3 hr 건조 후 가정용 분쇄기(대우분쇄기 KMF-360)로 마쇄하여 20~30 mesh의 체로 거른 뒤 분말로 하여 시료로 사용하였다.

시료조제

게껍질, 참깨박, 감귤껍질에서 추출한 chitosan, crude sesamol, 감귤껍질 추출물의 분말을 0.1% 농도로 제조하여 시료로 사용하였다.

Oil emulsion 조제

Oil emulsion은 사용하기 전에 만들고 pH 6.5로 보정한 0.1 M maleic acid buffer, 8 mL를 넣은 다음 50 μL의 Tween-20과 0.5 mL 정도의 fish oil을 넣고 15분간 교반한 후 KOH 2~3조각을 넣고 교반하면서 0.1 N HCl로 pH 6.5가 되도록 제조하여 사용하였다.

수율

수율은 게껍질, 참깨박, 감귤껍질로부터 유효성분을 제조방법에 따라 획득한 다음 양을 %로 계산하였다.

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust의 방법(13)에 따라 측정하였다. 1 mL 반응 혼합물(oil emulsion 0.5 mL + 증류수 0.4 mL + 각 추출물 0.1 mL)이 채워진 시험관을 37°C water bath 에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나자마자 50 μL dibutylhydroxytoluene(BHT) 7.2%를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2 mL TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 식힌 후 2,000×g의 속도로 15분간 원심분리시켰다. 상징액에 대해 분광광도계(HITACHI UV-2001)로 531 nm에서 흡광도를 측정하였고, 공시료는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS값은 mL 반응혼합물에 대해서 μg malondialdehyde(MDA)로 표시하였다.

전자공여능 측정

전자공여능은 Blois(14)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 2 mL에 2×10^{-4} M DPPH 1.0 mL를 넣고 진탕 후 30분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 100 - [(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100]으로 나타내었다.

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund와 Marklund의 방법(15)에 따라 각 시료 0.2 mL에 pH 8.5 로 보정한 tris-HCl buffer (50 mM tris [hydroxymethyl] aminomethane + 10 mM EDTA) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 100 - [(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100]으로 나타내었다.

아질산염 소거작용 측정

아질산염 소거작용 측정은 Kato 등(16)의 방법으로 1 mM $NaNO_2$ 용액 2 mL에 각 시료 1 mL를 가하고, 0.1 N HCl(pH 1.2), 0.2 M 구연산 완충액(pH 3.0, pH 6.0)으로 각각 pH 1.2, 3.0, 6.0으로 보정한 다음 반응용액의 부피를 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액 1 mL를 취하여 2% 초산용액 2 mL와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 mL를 가한 후 진탕하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 Griess reagent 대신 증류수를 가하여 측정하였으며, 아질산염 소거능은 100 - [(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100]으로 나타내었다.

Ascorbic acid 함량측정

Ascorbic acid 함량측정은 감귤껍질 추출물의 ascorbic acid 함량을 측정하기 위하여 Sikic 등(17)의 방법에 따라 시료를 10분 동안 10,000×g에서 원심분리시키고, 상징액 0.5 mL를 취하여 5% TCA용액 2 mL로 단백질을 침전시켰다. 다시, 4°C에서 10분 동안 15,000×g에서 원심분리시키고, 상등액 0.5 mL를 취하여 85% orthophosphoric acid 0.05 mL, 8% α, α′-dipyridyl 0.05 mL, 3% aqueous ferric chloride 0.05 mL를 가한 후, 1시간 동안 ferrous dipyridyl chromophore 물질이 생성되도록 실온에 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

통계처리는 각각의 시료에 대해 평균±표준오차로 나타내었으며, 각 군에 따른 유의차 검정은 분산분석을 한 후 $\alpha=$

0.05 수준에서 Duncan's multiple test 에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

수율

게껍질, 참깨박, 건조된 감귤껍질로부터 유효성분 즉, chitosan, crude sesamol, ascorbic acid 의 추출 수율은 Table 1과 같이 chitosan 11.6%, crude sesamol 2.2%, ascorbic acid 2.8%를 나타내었으며, 게껍질로부터 chitosan의 수율은 Chung 등(18)의 보고와 유사하였다.

지방산화에 미치는영향

지방질 식품의 산패는 주로 공기 중의 산소와 결합하여 일어나는데 이를 방지하기 위하여 독성이 없고 항산화성이 뛰어난 천연 항산화제의 개발에 관심이 집중되고 있다. 따라서, 폐자원 추출물에 존재하는 유효성분이 항산화 효과가 있는지를 알아보기 위하여 oil emulsion 상에서 대조구와 비교한 결과(Fig. 1), 대조구 0.3 MDA ppm에 비하여 chitosan 0.20 MDA ppm, crude sesamol 0.08 MDA ppm, 감귤껍질 추출물 0.16 MDA ppm으로 낮은 TBARS값을 나타내었으며, 폐자원 추출물 중 crude sesamol이 가장 낮은 TBARS값을 나타내었다($p<0.05$). 이러한 결과는 Kim과 Kim(19)의 참깨 및 들깨박 에탄올 추출물, Kim 등(20)의 감귤과피의 항산화 효과, No 등(21)의 김치의 소금절임시 키토산 첨가가 김치의 저장성을 연장시켰다는 보고와 일치하는 것이다.

Table 1. Yield of extracts from waste resources

Ingredient	Extract yield (%)[1)]
Chitosan	11.6
Crude sesamol	2.2
Ascorbic acid	2.8

[1)]Average of triplicate determinations.

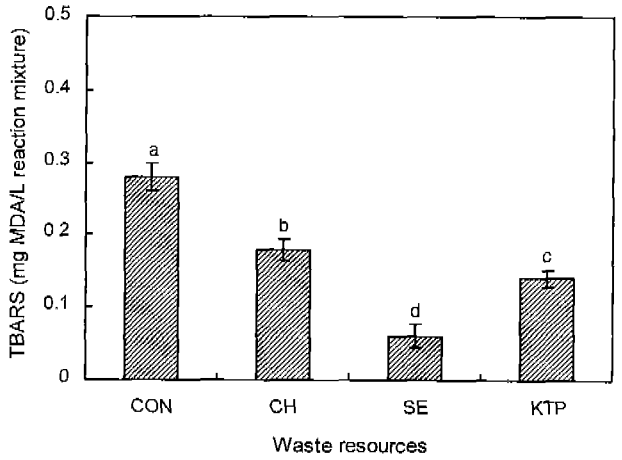

Fig. 1. Effects of the extracts from waste resources on lipid oxidation.
CON : Control, CH : Chitosan, SE : Crude sesamol, KTP : dry Korean tangrine peel extract.
Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p<0.05$.

전자공여능

DPPH(α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl)에 대한 폐자원 추출물의 전자공여능을 측정한 결과, Fig. 2와 같이 chitosan 29.8%, crude sesamol 35.2%, 감귤껍질 추출물 15.8%로 나타나 crude sesamol의 전자공여능이 가장 우수하였다.

Lee 등(22)의 diethylether 로 추출한 영지버섯, 양송이버섯, 표고버섯의 전자공여능은 95.1%, 33.8%, 38.4%를 나타내어 표고버섯 추출물과 crude sesamol의 전자공여능은 유사한 값을 나타내었다. Kang 등(23)은 전자공여능은 전반적으로 농도가 상승함에 따라 증가한다고 하였으며, 1~6 mM 사이에는 농도차에 의한 효과는 크지 않았으며, 페놀성 화합물 중 hydroxybenzoic acids류에서 gallic acid, hydroxycinamic acids에서 hydrocaffeic acid, flavonoids 중에서는 (+) catechin류가 높은 전자공여능을 나타내었으며, 전자공여능은 환원력이 큰 것이 높은 값을 나타낸다고 하였다.

SOD 유사활성

항산화 효소 중의 하나인 superoxide dismutases (SOD; superoxide oxidoreductase EC 1.15.1.1)는 세포에 해로운 환원 산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매하는 효소이며, SOD에 의해 생성된 H_2O_2는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환된다. 이러한 SOD는 아니지만 superoxide anion의 활성을 억제시킬 수 있는 물질 즉, SOD 유사활성능을 측정한 결과(Fig. 3), chitosan 51.3%, crude sesamol 19.9%, 감귤껍질 추출물 8.4%로 나타나 chitosan이 가장 우수하였다 ($p<0.05$). 또한, Han과 Kim(24)은 국내에서 생산된 62종의

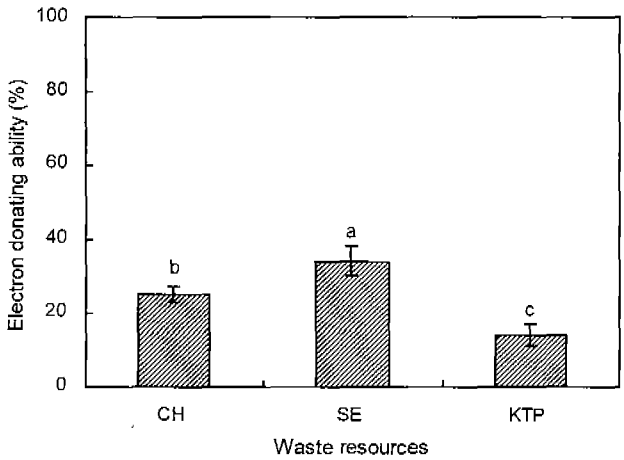

Fig. 2. Electron donating ability of the extracts from waste resources.
CH : Chitosan, SE : Crude sesamol, KTP : dry Korean tangrine peel extract.
Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p<0.05$.

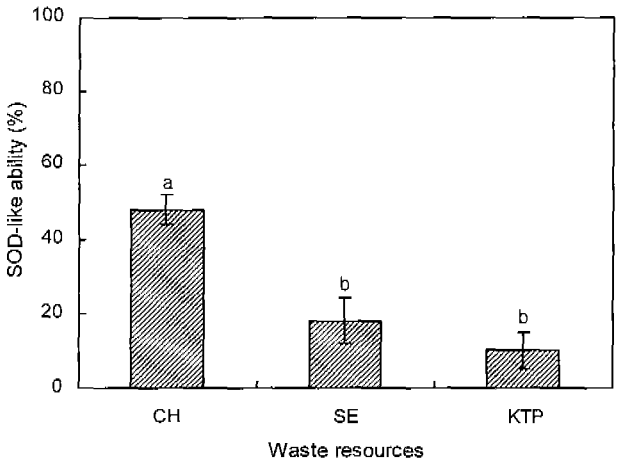

Fig. 3. Effects of the extracts from waste resources on autoxidation of pyrogallol.
CH : Chitosan, SE : Crude sesamol, KTP : dry Korean tangrine peel extract.
Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p<0.05$.

과실, 채소, 버섯의 SOD 유사활성을 측정한 결과, 과실에는 감과 키위가 식물과 버섯류에는 딸기, 마늘, 미나리, 상추, 브로콜리의 활성도가 높았으며, 수용성 화합물 중에서는 ascorbic acid, ascorbic acid-6-palmitate, glutathione(reduced)의 활성이 높다고 하였다.

아질산염 소거작용

폐자원 추출물의 nitrite 소거작용을 검토하기 위하여 각 pH별 nitrite 소거작용을 측정한 결과(Fig. 4), pH의 감소에 따라 nitrite 소거작용이 높게 나타났다. 폐자원 추출물은 pH 1.2에서 chitosan 17.4%, crude sesamol 56.4%, 감귤껍질 추출물 19.0%로 나타났으며, sesamol이 pH 1.2와 pH 3.0에서 각각 56.4%, 55.4%의 높은 소거작용을 나타내었다. 이는 Lee 등(25)의 영지버섯 diethylether 추출물과 표고버섯 부탄올 추출물의 경우 68.3%, 68.2%보다는 낮으나, 영지 및 양송이 부탄올 추출물의 아질산염 소거작용 44.4%, 43.4%보다는 높은 수치를 나타내었다. 니트로사민의 전구물질인 아질산염과 아민이 식품내에 존재하고 있으므로 이들을 함유하고 있는 식품을 동시에 섭취하였을 때 니트로사민의 생성가능성은 매우 높다. 그러므로, 아질산염의 소거능이 우수한 crude sesamol을 아질산염과 아민이 존재할 수 있는 생체식품 및 가공식품과 함께 섭취하도록 함으로써 니트로사민에 의한 암의 발생을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

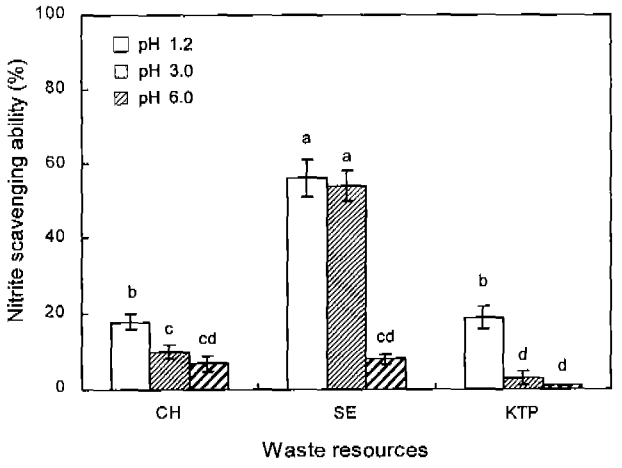

Fig. 4. Nitrite scavenging ability of the extracts from waste resources.
Control, CH : Chitosan, SE : Crude sesamol, KTP : dry Korean tangrine peel extract.
Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p<0.05$.

요 약

폐자원으로 얻어지는 게껍질, 감귤껍질, 참깨박이 free radical 반응 및 지방산화 억제에 미치는 영향과 nitrosamine 생성의 직접적인 영향인자인 아질산염에 대한 폐자원의 분해효과를 검토하였다. 폐자원(게껍질, 참깨박, 감귤껍질)으로부터 유효성분인 chitosan, crude sesamol, ascorbic acid는 각각 11.6%, 2.2%, 2.8%로 나타났으며, TBARS값은 대조구에 비하여 낮은 값을 나타내어 항산화성이 인정되었다. 또한, 전자공여능은 chitosan 29.8%, crude sesamol 35.2%, 감귤껍질 추출물 15.8%로 나타났으며, SOD 유사활성능은 전반적으로 SOD 유사활성이 8% 이상으로 나타났으며, chitosan 51.3%, crude sesamol 19.9%, 감귤껍질 추출물 8.4%로 나타났다. 폐자원 추출물의 nitrite 소거작용은 pH 1.2에서 chitosan 17.4%, crude sesamol 56.4%, 감귤껍질 추출물 19.0%로 나타났으며, crude sesamol이 pH 1.2와 pH 3.0에서 각각 56.4%, 55.4%의 높은 소거작용을 나타내었다.

문 헌

1. Fox, J.B., Jr. and Thomson, J.S. : Formation of bovine nitrosylmyoglobin. I. pH 5.4~5.6. *Biochemistry*, **2**, 465-470 (1963)
2. Fox, J.B., Jr. and Ackerman, S.A. : Formation of nitric oxide myoglobin. Mechanism of the reaction with various reductants. *J. Food Sci.*, **33**, 264-265 (1968)
3. Simon, S., Ellis, D.E., MacDonald, B.D., Miller, D.G., Waldman, R.C. and Westerberg, D.O. : Influence of nitrite and nitrate curing ingredients on quality of packaged frankfurters. *J. Food Sci.*, **38**, 919-923 (1973)
4. Cho, I.C. and Bratzler, L.J. : Effect of sodium nitrite on flavor of cured pork. *J. Food Sci.*, **35**, 668-670 (1970)
5. Wolff, I.A. and Wasserman, A.E. : Nitrates, nitrites, and nitrosamine. *Science*, **177**, 15-19 (1972)
6. Shank, R.C. : Toxicology of N-nitroso compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **31**, 361-368 (1975)
7. Chang, H.J., Jeon, D.W. and Lee, S.R. : *In vitro* study on the functionality in digestive tract of chitin and chitosan from crab shell. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 348-354 (1994)
8. Ryu, S.R., Lee, J.I., Choi, C.Y. and Kang, S.S. : Relationships among antioxidantive substances, major chemical components

and seed characteristics in sesame seed. *Korean J. Breed.*, **24**, 303-307 (1993)
9. Koh, J.S. and Kim, S.H. : Physicochemical properties and chemical compositions of citrus fruits produced in Cheju. *Kor. J. Agric. Chem. Biotech.*, **38**, 541-545 (1995)
10. No, H.K., Meyers, S.P. and Lee, K.S. : Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 575-579 (1989)
11. No, H.K. and Meyers, S.P. : Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 580-586 (1989)
12. 김동태 : 참깨유와 참깨박으로부터 세사미놀 성분을 분리 및 정제하는 방법. 특허출원, 특1999-004067 (1997)
13. Buege, J.A. and Aust, S.D. : Microsomal lipid peroxidation. *Method in Enzymol.*, **52**, 302-310 (1978)
14. Blois, M.S. : Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**, 1199-1200 (1958)
15. Marklund, S. and Marklund, G. : Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismmutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469-474 (1974)
16. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F. : Inhibition of nitrosamine formmation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol.Chem.*, **51**, 1333-1338 (1987)
17. Sikic, B.I., Mimnaugh, E.G., Litterst, C.L. and Gram, T.E. : The effects of ascorbic acid deficiency and repletion on pulmonary, renal and hepatic drug metabolism in the guinea pig. *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**, 663-671 (1977)
18. Chung, G.H., Kim, B.S., Hur, J.W. and No, H.K. : Physicochemical properties of chitin and chitosan prepared from lobster shrimp shell. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 870-876 (1996)
19. Kim, E.H. and Kim, D.J. : Antioxidant activity of ethanol-extracts of defatted soybean, sesame and perilla flours in a soybean oil-water emulsion system. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **13**, 283-288 (1981)
20. Kim, H.J., Bae, K.H., Lee, H.J., Eun, J.B. and Kim, M.K. : Effect of hesperidin extracted from tangerine peel on Cd and lipid metabolism, and antioxidative capacity in rats. *Korean Nutr. Soc.*, **32**, 137-149 (1999)
21. No, H.K., Park, I.K. and Kim, S.D. : Extension of shelf-life of *kimchi* by addition of chitosan during salting. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 932-936 (1995)
22. Lee, G.D., Chang, H.G. and Kim, H.K. : Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 432-436 (1997)
23. Kang, Y.H., Park, Y.K. and Lee, G.D. : The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 232-239 (1996)
24. Han, D.S. and Kim, S.J. : Development of SOD-like activity products and functional food. *Korean Bull. Food Technol.*, **7**, 41-49 (1994)
25. Lee, G.D., Chang, H.G. and Kim, H.K. : Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 432-436 (1997)

(2001년 3월 9일 접수)