

## Probiotics를 이용하여 발효시킨 감귤 가공부산물 발효물의 특성

문영건 · 이경준 · 김기영 · 송춘복 · 전유진 · 허문수\*  
제주대학교 해양과학부

**Characteristics of Citrus By-Product Ferment Using Probiotics as Starter.** Moon, Young Gun, Kyeong-Jun Lee, Ki-Young Kim, Choon-Bok Song, You-Jin Jeon, and Moon-Soo Heo\*. Faculty of Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea – In this study, we investigated the biological activity of antioxidant and antibacterial activity of citrus by-product ferment. Among the six probiotic bacteria, *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae* had the highest antioxidant activity. Hot water extracts from citrus by-product of ferment were screened for antibacterial activity fish pathogenic bacteria by paper disc method. Among the various hot water extracts, the *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* showed relatively strong antibacterial activities in the order. The reducing activity on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and  $O_2^-$  and  $\cdot OH$  radical scavenging potential were sequentially screened, in search for antioxidant activities of citrus by-product ferment.

**Key words:** Citrus by-product ferment, six probiotics, antioxidant activity, antibacterial activity

제주도에서는 전체 과일 생산량의 30%에 해당하는 연간 60만톤 이상의 감귤이 생산되며 그 중 감귤 생산량 중 80~85%는 생식용으로, 20~25%는 가공용으로 소비되고 있다[11]. 이러한 감귤과즙 제조공정에 있어 생산되는 막대한 양의 감귤 과피 및 펄프와 같은 부산물(이하 착즙박)은 수분 함량이 높아 부패되기 쉽고 또한 부산물에 대한 특별한 처리 방안이 없어 일부를 제외하고는 자연 그대로 방치되고 있는데 특히, 식물소재의 가공 부산물 중에는 높은 수준의 페놀 화합물을 함유하고 있어 자연환경 오염의 원인이 되고 있다. 그러나 이러한 천연 페놀화합물에는 항암 효과뿐만 아니라 항알러지, 항바이러스, 항염증 등 다양한 생리 기능들이 있는 것으로 밝혀지면서 이에 대한 관심이 증가하고 있다[3, 12, 18]. 감귤 과피에는 carotenoids, bioflavonoids, pectin 및 terpenes 등이 풍부하게 함유되어 있고[7, 8, 13], 감귤류 과피의 주성분 중 하나인 flavonoids는 심장 순환기계 질환 및 항암, 항산화, 항염증에 대한 개선 효과[2, 4-6] 등 다양한 생리적 작용이 보고되고 있으며, 이에 따른 감귤류 과피 분말 및 과피 추출물은 기능성 식품으로서 개발되어 왔다. 그러나 가공공정에서 발생하는 감귤 착즙박 같은 경우는 효과적인 이용 방법이 없어 대부분이 방치되고 있다. 그러므로 이러한 감귤 착즙박의 효과적인 처리는 폐자원의 재활용뿐만 아니라 식품, 동물사료 및 유용물질 생산에 기여할 수 있을 것이다. 특히 감귤과즙 제조공정에서 생산되

는 부산물은 sucrose, glucose와 같은 다량의 수용성 탄수화물과 조단백질 등을 함유하고 있어 미생물의 발효기질로서 적합하다고 볼 수 있다. 그 예로 Sakamoto 등[16]은 감귤 착즙액이나 과피 가수분해물을 feed yeast, vinegar, butylene glycol, citric acid, lactic acid 등의 발효생산을 위한 탄소원으로 이용할 수 있음을 보여 주었다. 또한 여러 연구자들[19]에 의해 감귤 과피에 대한 동물사료로서의 이용가능성도 광범위하게 연구가 이루어져 왔다.

따라서 본 연구에서는 최근 들어 제주 환경에 있어 주요한 환경 오염원으로 부각되고 있는 감귤 가공부산물에 대해 Probiotics를 이용하여 발효를 실시하였고, 그 발효산물의 특성을 파악하여 감귤 착즙박을 활용한 기능성 소재로서의 가능성을 찾고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

본 실험에 사용된 감귤 착즙박 시료는 2004년 10월~2005년 2월에 제주도에서 생산되어 (주)일해(제주도 조천읍 와흘리)에서 쥬스 착즙 후 배출되는 감귤 가공부산물을 제공받아 -20°C에서 보관하면서 실험 재료로 사용하였다.

#### 감귤 가공부산물 발효에 이용되는 미생물

감귤 가공부산물을 발효시키기 위한 발효 미생물은 한국중균협회(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에서 분양받아 실험에 이용하였다(Table 1).

\*Corresponding author  
Tel: 82-64-754-3473, Fax: 82-64-756-3493  
E-mail: msheo@cheju.ac.kr

**Table 1. List of probiotic bacteria used for fermentation.**

Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM <sup>1</sup> 35053
	<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM 40820
	<i>Enterococcus faecium</i>	KCCM 12118
Bacteria	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	KCCM 32826
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCCM 11542
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KCCM 40464

<sup>1</sup>Korean Culture Center of Microorganisms.

### 김굴 가공부산물 시료의 전처리

김굴 가공부산물 시료 6 kg을 증류수로 세척한 후, 습식 분쇄기를 사용하여 분쇄한 후 실험에 사용하였다. 먼저 분쇄된 김굴 가공부산물 시료 각 1 kg에 멸균증류수 1 L를 첨가한 후 당분(설탕 5%, w/w)을 첨가 혼합한다. 그 후 3 N NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조절하였으며, 고압 멸균기를 이용하여 121°C에서 10분간 멸균하여 김굴배지를 제조하였다.

대조구로 사용될 김굴 가공부산물은 김굴배지 제조과정에서 당분을 첨가하지 않은 것을 사용하며, 제조된 김굴배지는 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 김굴 가공부산물의 발효 및 추출

각 균주의 전배양 조건을 보면 *Saccharomyces cerevisiae* 배양은 YM(Yeast extract malt extract, Difco, U.S.A.) broth 배지를 사용하여 25°C에서 2~3일간 호기 교반 배양하였다. *Lactobacillus plantarum* 배양은 Lactobacill MRS broth(Difco, U.S.A.) 배지를 사용하여 30°C에서 2~3일간 혐기 정지 배양하였고, *L. rhamnosus* 배양은 BHI(Brain heart infusion, Difco, U.S.A.) broth 배지를 사용하여 37°C에서 2~3일간 혐기 정지 배양하였으며, *Enterococcus faecium* 배양은 BHI broth 배지를 사용하여 37°C에서 2~3일간 혐기 정지 배양하였다. 그리고 *Pediococcus pentosaceus* 배양은 Lactobacill MRS broth(Difco, U.S.A.) 배지를 사용하여 30°C에서 2~3일간 혐기 정지 배양하였다. 또한 *Bacillus subtilis* 배양은 Nutrient broth(Difco, U.S.A.) 배지를 사용하여 30°C에서 2~3일간 호기 교반 배양하였다. 전배양된 발효 미생물은 다시 한 번 MRS broth에 각 균주를  $1.0 \times 10^6$  cells/ml로 접종하여 각 배양조건에 맞게 배양하였다. 이렇게 하여 배양된 배양균은 제조되어져 있던 김굴배지에 접종되는데 *S. cerevisiae*는 균수가  $1.0 \times 10^6$  cells/ml이 되게 희석하여 김굴배지에 접종하는데 접종량은 김굴배지의 2.5%가 되게 접종하여 shaking incubator를 이용하여 호기적인 조건 하에서 3일간 발효를 실시하였다. 그 외에 *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *E. faecium*, *P. pentosaceus*, *B. subtilis*는 균수가  $1.0 \times 10^6$  cells/ml이 되게 희석하여 김굴배지에 2.5%가 되게 접종하여 각 발효미생물에 최적 생육온도에 맞춰 3일간 혐기적 조건하에서 정지배양을 하며 발효를 실시하였다. 발

효는 시중에 유통되고 있는 3 L 용량에 밀폐 유리병을 사용하였으며 3일 동안 발효하였다. 발효된 시료는 -70°C 냉동고에서 24시간 냉동시킨 후 동결건조기를 이용하여 24시간 동안 동결건조 하고, 동결건조 된 시료는 GM-MM3900분쇄기(지엠 월드텍, 한국)를 사용하여 분쇄하였다.

분쇄된 시료는 각각 50 g씩 멸균 증류수 250 ml가 들어 있는 1,000 ml 삼각플라스크에 첨가하여 혼합한 후 45°C에서 24시간 동안 추출과정을 거친 후 여과지(Whatman No.1, England)를 이용하여 여과 시킨 후 Rotary Evaporator HS-2001N(Hahn Shin, Korea)을 사용하여 10배로 감압 농축하였다.

### 어류 질병 세균에 대한 항균실험

본 실험에 사용된 균주는 어류 질병 원인균으로서 한국유전자은행인 KCTC(Korean Collection For Type Culture)에서 그람 음성균 8종과 그람 양성균 1종을 분양받아(Table 2) 실험에 사용하였다. 분양 받은 세균은 배양조건에 맞게 전배양 하였으며, 항균 활성 실험은 McFarland No 0.5로 희석된 각각의 세균 현탁액을 멸균된 면봉을 사용하여 준비되어진 Muller Hinton agar(MHA, Difco) plate에 골고루 도말하고, 건조 후 멸균된 paper disc(직경 6 mm, Advantec, Japan)에 5%, 10%, 15%, 20% 농도로 조절된 추출액을 50  $\mu$ l씩 적하하여 풍건 한 후 MHA plate에 얹어서 각 배양 온도에 맞춰 24시간 배양하여 clear zone을 caliper로 측정하였다. Caliper로 측정된 clear zone은 paper disc의 직경도 포함 하였다.

### 전자공여능에 의한 항산화 활성 측정

전자공여능은  $4.0 \times 10^{-4}$  M DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)용액 2 ml와 발효산물 농축액을 농도별로 희석한 액을 각각 1 ml씩 혼합한 후, spectrophotometer(Hanson OPRON-3000, Korea)로 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 합성 항산화제인 BHT(butylated hydroxytoluene)와 BHA(butylated hydroxyanisole)를 0.05%(w/v)의 농도로 제조한 후 제조된 DPPH 용액 2 ml와 대조구역 1 ml를 혼합

**Table 2. List of strains used for antimicrobial activity.**

Bacteria name	Strain No.
<i>Edwardsiella tarda</i>	<sup>1</sup> KCTC 12267
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 1916
<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCTC 2928
<i>Vibrio anguillarum</i>	KCTC 2711
<i>Vibrio cholerae</i>	KCTC 2715
<i>Vibrio harvey</i>	KCTC 2717
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	KCTC 40870
<i>Vibrio salmonicida</i>	KCTC 2726
<i>Vibrio tubiashii</i>	KCTC 2728

Korean Collection For Type Culture.

한 것과 발효 미생물에 의해 발효되지 않은 감귤 착즙박을 시험구와 같은 농도로 희석액을 제조한 후 제조된 DPPH 용액 2 ml와 대조구액 1 ml씩을 혼합한 후 30분간 상온에서 반응시킨 후 흡광도를 측정 하였다.

전자 공여능(Electron donating ability, EDA(%))은 발효 미생물 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{EDA}(\%) = (1 - \text{발효 미생물 첨가구의 흡광도} / \text{무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

#### SOD(Superoxide Dismutase) 유사활성 측정

Superoxide dismutase 유사활성능은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund[14]의 방법에 따라 측정하였다.

본 실험에서 사용된 시료는 각 균주별로 발효된 후 농축액을 농도별로 희석하여 실험하였다. 표준값으로 50 mM phosphate buffer 2.61 ml에 3 mM pyrogallol 90  $\mu$ l를 첨가하여 20초 간격으로 3분간 측정하였으며, 본 시료의 측정은 50 mM phosphate buffer(pH 8.24) 2.61 ml에 시료 50  $\mu$ l와 3 mM pyrogallol 90  $\mu$ l를 첨가하여 325 nm에서 20초 간격으로 6분간 측정하였다. 측정된 값은 다음과 같은 식에 의해서 Superoxide dismutase 유사활성능을 계산하였다.

$$\text{Superoxide dismutase scavenging activity}(\%) = (a-b)/a \times 100$$

a = standard의 반응전과 반응후의 흡광도 차이

b = sample의 반응전과 반응후의 흡광도 차이

#### Hydroxyl radical 소거활성(HSA) 측정

농도별로 희석된 농축액의 hydroxyl radical(OH·) 소거활성능을 조사하기 위해 2-deoxyribose oxidation method 방법[9]을 변형하여 측정하였다.

시험관에 10 mM FeSO<sub>4</sub>/EDTA 용액 0.2 ml, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 ml, 농축액 0.2 ml와 0.1 mM phosphate buffer(pH 7.4) 1ml, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 ml를 가하고 37°C에서 4시간 동안 반응 시킨 후, 2.8% TCA(trichloroacetic acid)용액 1 ml를 가하여 반응을 중지 시켰다. 그 후, 1.0% TBA(thiobarbituric acid)용액 1 ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 시료에 대한 기준시료는 발효되지 않은 농축액을 가지고 측정하였다. OH· 소거활성은 HSA(hydroxyl radical scavenging ability)로 표기하였으며 다음과 같은 식으로 계산 하였다.

$$\text{HSA}(\%) = 1 - [(\text{absorbance of sample at 532 nm}) / (\text{absorbance of control at 532 nm})] \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 발효 후 Probiotics 수의 변화

Probiotics는 유산 발효를 하여 식품의 부패를 방지하고 bacteriocin과 같은 항균물질을 분비하여 식중독균을 억제하고 사람의 장내 pH를 낮추어 장내 부패세균의 증식을 억제하는 등 인체에 기능성을 부여하는 미생물이다. 본 연구에서는 감귤 가공부산물을 발효시키기 위해 6종의 미생물(Table 1)을 선택하여 3일 동안의 발효과정을 거쳤다. 발효 직후에 발효된 산물에 pH를 측정한 결과 pH가 3~3.5로 나타났으며 균수의 변화는 각 균주의 증균 배지를 이용하여 측정된 결과 *S. cerevisiae*는  $3.0 \times 10^8$  cells/ml, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *E. faecium*, *P. pentosaceus*는  $4.3 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^9$  cells/ml, *B. subtilis*는  $1.5 \times 10^9$  cells/ml로 나타나 증식이 이루어진 것을 확인할 수가 있었다.

### 어병 세균에 대한 항균실험

항균 실험에 대한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 감귤 착즙박의 추출액에서는 20%에 농도에서 *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. ichthyoenteri*, *Staphylococcus aureus*에 대해 다소 높은 항균 활성을 나타내고 있다. 반면 각각의 Probiotics를 첨가하여 발효시킨 감귤 가공부산물 산물의 추출액에서는 감귤 가공부산물 자체보다 모든 농도에서 높은 항균 활성을 나타내고 있다. 이러한 결과는 발효시키기 위해 첨가시킨 Probiotics에 의해서 감귤 가공부산물이 함유하고 있던 항균성 물질들이 발효과정이라는 미생물 대사과정에서 그 성분들의 효능이 증가하여 어류 질병 미생물에 대한 저해 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 특히 넓치 자어에 장관 백탁증을 일으키는 병원성 세균인 *V. ichthyoenteri*와 콜레라 원인균인 *V. cholerae*, 연조직에 주로 감염되어 많은 피해를 일으키는 *V. alginolyticus*에 대해서는 *B. subtilis*를 첨가하여 발효시킨 산물과 *S. cerevisiae*를 첨가하여 발효시킨 산물에서 아주 높은 항균 활성을 나타냈다.

### 전자공여능에 의한 항산화 활성 측정

일반적으로 특정 물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그 중에서 DPPH radical 소거활성법은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 방법으로 흔히 이용되고 있다. 항산화 물질은 free radical에 전자나 수소를 공여하여 복합체를 만들고, DPPH는 항산화 물질로부터 전자와 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여, 전자공여능(EDA(%))으로부터 항산화 활성을 측정할 수가 있다. 전자공여 작용은 활성 radical에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제 시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 활성 radical에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로도 이용되고 있다. DPPH법은 항산화 활성

**Table 3. Antimicrobial activities of hot water extracts from citrus by-products and fermented products.**

Concentration (%)	Fish pathogenic bacteria (clear zone on plate (mm))									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
CBP <sup>1</sup>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	6.5	-
	15	-	-	-	-	6	-	-	10	-
	20	-	-	6.5	10	11	11	-	11.5	-
CBP + <i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	7	-
	10	-	-	-	-	-	10	8	12	-
	15	-	-	6.5	10	9	13	11	14.5	-
	20	-	7	8	12	11	16	14	17.5	8
CBP + <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	7	-
	10	-	-	-	8	7.5	11	9.5	11	-
	15	-	6	7	11	9	12.5	11.5	14	-
	20	-	7	8	13.5	11.5	15.5	13	17.5	9
CBP + <i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	6.5	10	11	10	-
	15	-	5	-	8	9	12	14	15.5	-
	20	-	7	7	10.5	11	13.5	14	17.5	8.5
CBP + <i>Pediococcus</i> <i>pentosaccus</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	7	-
	10	-	-	-	8	7.5	10	9.5	10	-
	15	-	6	7	11	10.5	12.5	11.5	14	-
	20	-	7.5	8	13.5	11.5	15.5	13	17.5	9.5
CBP + <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	5	-	-	6	-	7	9.5	6	10	7
	10	-	-	9.5	11	12	13	14.5	14	9.5
	15	7	8	12	14.5	16	17	17.5	18	14
	20	14	12.5	13	17.5	18	18.5	20	23.5	15.5
CBP + <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	5	-	-	6	-	6.5	10	7.5	10	6
	10	-	-	10	10.5	11	12	9	15.5	10
	15	6	7	11.5	12	15.5	16.5	14	16.5	12
	20	12.5	11.5	16	16.5	17	17.5	17.5	18.5	15.5

<sup>1</sup>CBP : Citrus by-product.

1. KCTC 2728 *Vibrio tubiashii*, 2. KCTC 2717 *Vibrio harvey*, 3. KCTC 12267 *Edwardsiella tarda*, 4. KCTC 2711 *Vibrio anguillarum*, 5. KCTC 1916 *Staphylococcus aureus*, 6. KCTC 2928 *Vibrio alginolyticus*, 7. KCTC 2715 *Vibrio cholerae*, 8. KCTC 40870 *Vibrio ichthyoenteri*, 9. KCTC 2726 *Vibrio salmonicida*.

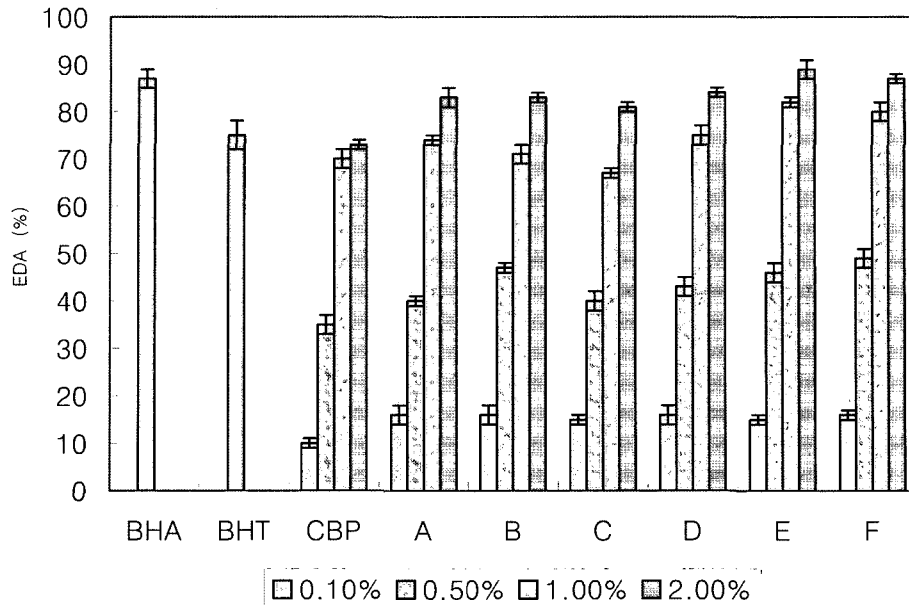
을 나타내는 생리활성 물질의 의해 환원됨으로써 짙은 자색이 탈색되는 정도에 따라 항산화 효과를 전자공여능으로 측정하는 방법이다. 각각의 발효 미생물에 의해 발효되어진 감귤착즙박과 발효되지 않은 감귤 가공부산물을 열수추출법으로 물질을 추출하여 감압농축한 후 농축액을 0.1%, 0.5%, 1%, 2%로 희석하여 DPPH에 의한 항산화 활성을 측정하였다(Fig. 1).

DPPH법에 의한 전자공여능을 측정한 결과, 기존 합성항산화제인 BHA는 87% BHT는 75%에서 DPPH radical 소거활성을 보였다. 반면 발효하기 전 감귤착즙박과 발효 감귤 가공부산물의 경우 공통적으로 0.1%에서 DPPH radical 소거활성이 아주 낮게 나타나고 있다. 그러나 발효 감귤 가공부산물은 0.5%에서 항산화도가 40% 이상 나타나기 시작하였고, 1.0% 농도에서는 *L. rhamnosus*를 이용하여 발효시킨 감귤 가공부산물을 제외한 나머지는 70% 이상의

DPPH radical 소거활성이 측정되었고, *B. subtilis*와 *S. cerevisiae*를 첨가한 시료에서는 합성 산화제인 BHT보다 높은 82%와 80%의 DPPH radical 소거활성이 측정되었다. 그리고 2.0%(20 mg/ml)농도에서는 *B. subtilis*와 *S. cerevisiae*를 이용하여 발효시킨 시료에서는 기존 합성 항산화제인 BHA의 항산화 활성값인 90%에 가까운 항산화도를 나타내었다. 본 연구에서는 *L. rhamnosus*를 제외한 나머지 발효 미생물들이 첨가된 감귤 가공부산물 발효 산물 1.0%에서부터 합성 항산화제와 거의 유사한 값에 DPPH radical 소거활성을 나타내고 있다.

#### Superoxide Dismutase 유사활성 측정

Superoxide dismutase(SOD)는 산패로 인하여 형성된 세포에 해로운 환원산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )를 촉매하고, catalase는 SOD



**Fig. 1. Radical scavenging activity of the hot water extracts obtained Citrus by-product Ferment.** The antioxidant activity was tested by DPPH method. BHA: Butylated hydroxyanisole, BHT: Butylated hydroxytoluene, CBP: Citrus by-product, A: *Lactobacillus plantarum*, B: *Enterococcus faecium*, C: *Lactobacillus rhamnosus*, D: *Pediococcus pentosaceus*, E: *Bacillus subtilis*, F: *Saccharomyces cerevisiae*.

에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 무해한 물분자와 산소 분자로 전환시키는 역할을 하는 효소이다. 생체 내 활성 산소종은 산소에서 유래된 것들로 안정한 분자 상태인 triplet oxygen이 자외선, 대사과정, 화학반응을 통하여 생성된다[17].

이러한 활성 산소 종류에는 자유 라디칼 형태인 superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radical(OH·), peroxy radical(HO<sub>2</sub>·)들과 singlet oxygen(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), 오존(O<sub>3</sub>), 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등과 같은 라디칼 형태가 아닌 것으로 구분된다 [1]. 이러한 활성 산소에 의해 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 여러 체내 과산화물도 세포에 대한 산화적 파괴로 인한 각종 장애를 일으키며 [15], 활성 산소가 정상적으로 제거되지 않았을 때에는 잔존하고 있는 자유라디칼에 의해 산화적 스트레스를 받게 됨으로써 다른 질병의 원인이 되기도 한다.

이에 본 실험에서는 생체내의 항산화 방어기구 중 효소적 방어체계의 하나로서 superoxide radical을 환원시켜 산소독으로부터 생체를 보호하는 superoxide radical 소거활성을 pyrogallol 자동산화로 생성되는 superoxide anion radical 소거 여부로 확인하였다(Fig. 2). 기존 합성 항산화제인 BHT (butylated hydroxytoluene)와 BHA(butylated hydroxyanisole)를 대조구로 사용하였고, 감귤 가공부산물(미생물 미첨가구)과 발효 감귤 가공부산물(미생물 첨가구)을 0.1%, 0.5%, 1%, 2% 농도로 희석하여 SOD 유사활성을 측정하였다.

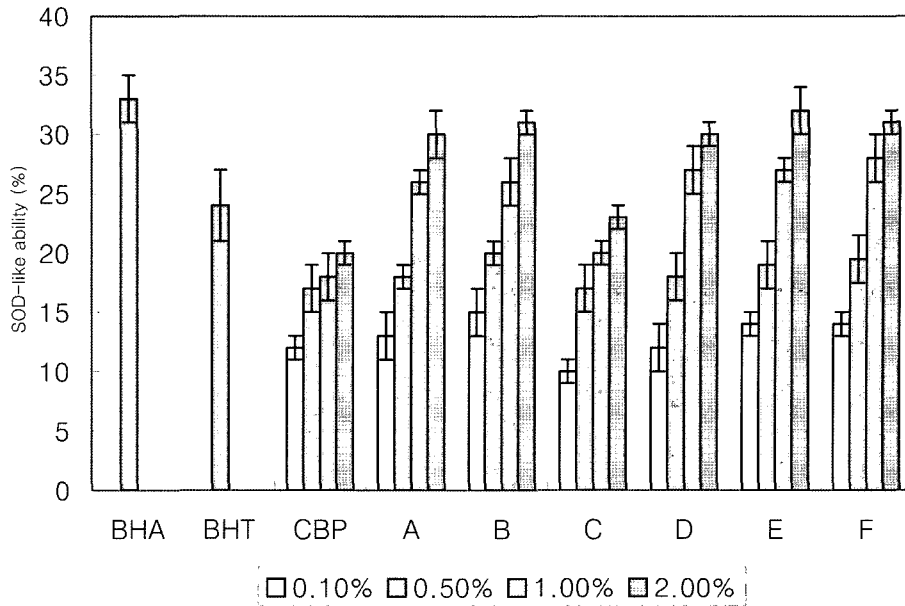
Fig. 2에서 처럼 기존 합성 항산화제인 BHA는 33%, BHT는 24%로 측정이 되었고, 0.1%의 농도에서는 CBP(감귤 가공부산물)나 미생물을 첨가하여 발효한 감귤 가공부산물에서 SOD 유사 활성 활성능이 10% 정도로 나타나 그리

큰 활성은 나타내고 있지 않다. 그러나 미생물 첨가구에서는 약간의 유의한 차이를 보이고 있는데, 0.5%에 농도에서 (미생물 첨가구) 점점 그 활성이 증가하였고, 1% 농도에서는 감귤 가공부산물(미생물 미첨가구)과 *L. rhamnosus*를 첨가구만을 제외 한 발효 감귤 가공부산물에서 합성 항산화제인 BHT(24%) 보다 높은 활성을 나타내기 시작하였다. 2%에 농도에서는 감귤 가공부산물(미생물 미첨가구)은 BHA나 BHT 보다 낮은 20%, *L. rhamnosus*를 첨가 시킨 시료에서는 23%, *L. plantarum*과 *P. pentosaceus*를 첨가한 시료에서는 30%, *E. faecium*와 *S. cerevisiae*를 첨가시킨 시료에서는 31%, *B. subtilis*를 첨가 시킨 시료에서는 32%로 실험구에서는 가장 높은 SOD 유사활성을 나타내고 있다. *L. rhamnosus*를 첨가 시켜 발효시킨 시료에서 가장 낮은 SOD 유사 활성능이 나타났지만 그 외 시료에서는 30% 이상으로 기존 합성 항산화제인 BHT보다 높고 BHA와는 거의 유사한 활성을 가지고 있는 것으로 조사 되었다.

**Hydroxyl radical 소거활성(HSA) 측정**

Free radical이란 제일 바깥쪽 전자각에 짝지어지지 않은 전자(unpaired electron)를 포함하는 화학종으로 대체로 강한 반응성을 나타낸다. 이들은 탐식작용, prostaglandin 합성과 같은 생리적 과정에서 뿐만 아니라 많은 효소촉매반응의 중간물질로서 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 강한 반응성 때문에 인접한 세포성분들을 무차별 공격하여 손상을 일으킬 수 있다.

Free radical 중에 생체 내에서 가장 빈번히 출현하고 따라서 중요하게 취급되는 것이 산소radical이다. 주요 산소

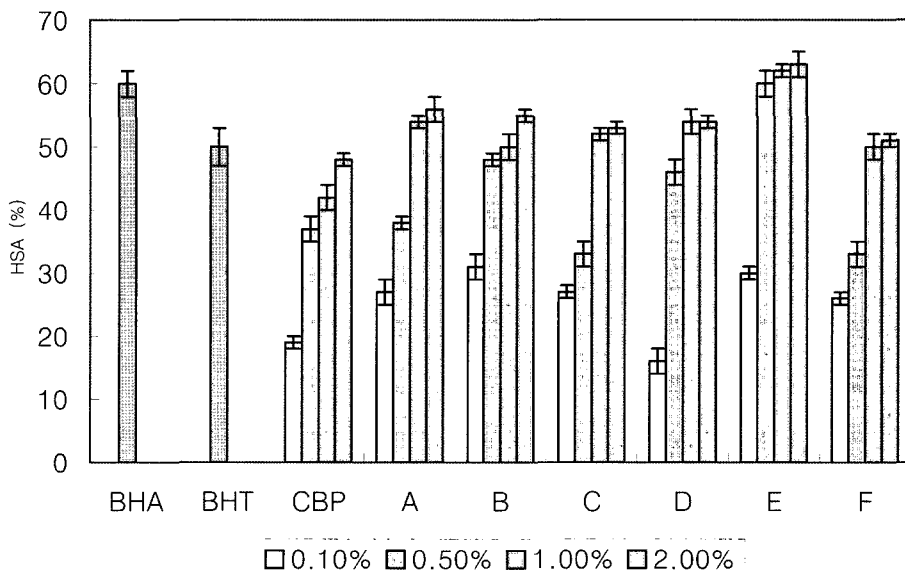


**Fig. 2. SOD-like ability of the hot water extracts obtained citrus by-product ferment.** BHA: Butylated hydroxyanisole, BHT: Butylated hydroxytoluene, CBP: Citrus by-product, A: *Lactobacillus plantarum*, B: *Enterococcus faecium*, C: *Lactobacillus rhamnosus*, D: *Pediococcus pentosaceus*, E: *Bacillus subtilis*, F: *Saccharomyces cerevisiae*.

radical로는 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl(OH<sup>·</sup>), perhydroxyl(HO<sub>2</sub><sup>·</sup>), alkoxy(RO<sup>·</sup>), peroxy(ROO<sup>·</sup>) radical 등이 있다. 그 외 radical은 아니지만 반응성이 강한 산소 종류로 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 singlet oxygen이 있다. Singlet oxygen은 분자 산소와는 달이 외각의 전자 2개의 spin방향이 서로 반대로 되어 있어 불안정하다. 이상에서 열거한 여러 형태의 산소를 가리켜 흔히 reactive oxygen species(활성 산소)라 부르는데 그 중에서도 hydroxyl radical과 singlet oxygen이 수용

액 중에서 가장 강한 반응성을 나타내어 지질산화를 개시하고 DNA에 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있고, 생체의 대사과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 Fe<sup>2+</sup>나 Cu<sup>2+</sup> 이온의 존재 하에서 생산되며 가장 독성이 강한 free radical이므로 이 라디칼을 소거하는 정도를 측정 한다[9, 15].

이에 대한 본 연구 결과를 보면(Fig. 3) 기존에 항산화제로 사용되어지는 BHA는 hydroxyl radical 소거활성능이



**Fig. 3. Hydroxyl radical scavenging activity of the hot water extracts obtained citrus by-product ferment.** BHA: Butylated hydroxyanisole, BHT: Butylated hydroxytoluene, CBP: Citrus by-product, A: *Lactobacillus plantarum*, B: *Enterococcus faecium*, C: *Lactobacillus rhamnosus*, D: *Pediococcus pentosaceus*, E: *Bacillus subtilis*, F: *Saccharomyces cerevisiae*.

60%로 나타났고, BHT는 50%로 나타났다. 발효미생물이 첨가되지 않은 감귤 가공부산물은 0.1% 농도에서 19%의 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었지만 *P. pentosaceus*를 첨가하여 발효시킨 시료를 제외하고는 모든 시료에서 25% 이상의 Hydroxyl radical 소거활성을 나타내었으며, 발효 감귤 가공부산물에서는 0.1%~0.5%에서 급격하게 hydroxyl radical 소거활성이 증가하는 결과를 보여주고 있다. 그리고 1%에 농도에서는 모든 실험구가 기존 합성항산화제인 BHT 보다 높거나 유사한 활성을 보여주고 있는데, 특히, *E. faecium*를 첨가하여 발효시킨 시료에서는 0.5%에서 BHT와 유사한 활성을 보이거나 1% 농도에서는 같은 활성을 보이고 있다. 또한 *B. subtilis*를 첨가시킨 시료에서는 0.5%에서는 BHA와 같은 60%의 hydroxyl radical 소거활성을 보이고 1%와 2%의 농도에서는 62%와 63%에 Hydroxyl radical 소거활성을 나타내고 있어 *B. subtilis*를 이용하여 발효를 시킬 경우 가장 좋은 활성을 얻을 수 있을 것으로 보인다.

## 요 약

감귤 과피 뿐만 아니라 가공부산물 내에는 carotenoid, bioflavonoids, pectin 등의 풍부하게 함유되어 있으며, 특히 flavonoids는 항산화 또는 금속이온과 착염을 형성하여 free radical이나 electrophiles 및 과산화 지질의 생성을 막아 세포, 조직, 기관이 손상을 억제 해주며, 노화방지, 순환계 질환을 예방 해주며 항암 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다.

이에 본 연구에서는 미생물을 첨가하여 발효시킨 감귤 가공부산물의 열수 추출액과 감귤 가공부산물의 열수 추출액을 가지고 어류 질병 세균에 대한 항균활성과 항산화활성을 측정하였는데, 어류 질병 세균에 대한 항균 실험에 있어서는 미생물을 첨가하여 발효시킨 감귤 가공부산물 추출액에서 저해 효과가 뚜렷하게 나타났다(Table 3). 반면 항산화활성 측정에서는 감귤 가공부산물 자체도 항산화 활성이 높다는 것을 알 수가 있다.

그러나 *E. faecium*, *P. pentosaceus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*를 각각 첨가하여 발효시킨 감귤 가공부산물을 기존 합성 항산화제인 BHT와 BHA와 비교하여 보았을 때 전자공여능을 이용한 항산화 활성 측정에서는 전체적으로 높은 항산화 활성 효과를 가지고 있는 것으로 나타났고, 특히 *B. subtilis*, *S. cerevisiae*를 이용하여 발효시킨 실험구에서는 합성 항산화제인 BHA보다 높은 89%와 같은 값인 87%에 활성을 나타내고 있다. SOD 유사활성 측정에 대한 결과는 Fig. 2에서처럼 *L. rhamnosus*를 첨가하여 발효시킨 실험구를 제외하고 나머지 5개의 실험구에서는 기존 합성항산화제인 BHT와 BHA보다 높거나 유사한 활성을 나타내었다. 그리고 hydroxyl radical 소거활성 측정에서는 미생물을 첨가하여 발효시킨 산물에 추출액의 활성이 높게 나타났으며, 1%에 농도에서는 합성 항산화제보다도 좋은

활성을 나타내는 것으로 조사 되었는데, 특히 *B. subtilis*를 첨가하여 발효시킨 실험구에서는 가장 높은 활성을 나타내고 있다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 미생물을 첨가하여 발효과정을 거친 감귤 가공부산물의 어류 질병 세균에 대한 항균 활성이나 항산화활성에 있어서 그 효과가 탁월하다는 것을 알 수가 있다. 그리고 발효과정에 있어 첨가되어진 미생물 중에서는 *B. subtilis*와 *S. cerevisiae*가 발효 미생물로서 적합하다는 것을 알 수가 있었고, 본 연구에서 *Bacillus subtilis* 같은 경우는 가장 높은 항균활성과 항산화활성을 나타내고 있어 최적 발효 미생물로 말할 수가 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 2005년도 제주지역환경기술센터 산학협력연구 사업비에 의해 수행 되었으며, 연구에 협조해 주신 김영수 산에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Aruoma, O. I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **32**: 671-683.
2. Bok, S. H., S. H. Lee, Y. B. Park, K. H. Bae, T. S. Jeong, and M. S. Choi. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nitr.* **29**: 1182-1185.
3. Carrol, K. K., F. M. Kurowska, and N. Guthrie. 1999. Use of citrus limonoids and flavonoids as well as tocotrienols for the treatment of cancer. International patent WO 9916167.
4. Chen, Y. T., R. L. Zheng, Z. J. Jia, and Y. Ju. 1990. Flavonoids as superoxide scavenger and antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* **9**: 19-21.
5. Cook, N. C. and S. Samman. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* **7**: 66-76.
6. Damon, P., O. Flandre, F. Michel, L. Perdrix, C. Lavrid, and A. Crastes de Paulet. 1987. Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. *Arzneimittel Forschung.* **37**: 1449-1153.
7. Kim, Y. D., Y. J. Kim, S. W. Oh, Y. J. Kang, and Y. C. Lee. 1999. Antimicrobial activity of solvent extracts from *Citrus sudachi* juice and peel. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**: 1613-1618.
8. Kamiya, S. and S. Esaki. 1971. Recent advances in the chemistry of the citrus flavonoids. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **18**: 38-48.
9. Kawagan, S. 1996. Protocol for control of body functional material in food, pp. 8-15. *Kakuen press center*, Japan.
10. KoguKuchi, N. 1999. *Protocol for free radical experimant*,

- pp. 40-45. suiyoonsa. Japan.
11. Lee, H. Y., H. M. Seog, Y. J. Nam, and D. H. Chung. 1987. Physico-chemical properties of Korean mandarin (*Citrus reticula*) orange juice. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **19**: 338-345.
  12. Mayer, A., O. Yi, D. Pearson, A. L. Waterhouse, and E. Frankel. 1997. Inhibition of human low-density lipoproteins oxidation in relation to phenolic antioxidants in grapes. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1838-1643.
  13. Moresi, M., F. Clementi, J. Rossi, R. Medici, and L. Vinti. 1987. Production of biomass from untreated orange peel by *Fusarium avenaceum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 37-45.
  14. Marklud, S. and G. Marklud. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 469-474.
  15. Miquel, J., A. T. Quintanilha, and H. Weber. 1989. In *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. CRC press, I pp. 223.
  16. Sakamoto, S., I. Shooro, and M. Arai. 1982. Reduced cellulose as a substrate of cellulases. *J. Ferment. Technol.* **60**: 327.
  17. Trush, M. A., E. G. Mimnaugh, and T. E. Gram, 1982. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **31**: 3335-3346.
  18. Williams, R. L. and M. S. Elliot. 1997. Antioxidants in grapes and wines: Chemistry and health effects. In Shahidi F., *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Application*, Illinois, AOCS Press. 150-173.
  19. Walker, S. S. 1971. The utilization of cull citrus fruit in Florida. *Fla. Agr. Exp. Sta. Bull.* **135**: 131.

(Received Jan 28, 2006/Accepted June 6, 2006)