

## 당유자 과피 발효물의 플라보노이드 성분 변화 및 항산화 활성

현재석<sup>1</sup> · 강성명<sup>2</sup> · 한상원<sup>2</sup> · 강민철<sup>2</sup> · 오명철<sup>3</sup> · 오창경<sup>3</sup> · 김동우<sup>4</sup> · 진유진<sup>2</sup> · 김수현<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>제주산업정보대학 식품영양과, <sup>2</sup>제주대학교 해양의생명과학부  
<sup>3</sup>제주산업정보대학 관광호텔조리과, <sup>4</sup>(주)네추럴 F&P 중앙연구소  
<sup>5</sup>제주대학교 식품생명공학과

### Flavonoid Component Changes and Antioxidant Activities of Fermented *Citrus grandis* Osbeck Peel

Jae-Seok Hyon<sup>1</sup>, Sung-Myung Kang<sup>2</sup>, Sang-Won Han<sup>2</sup>, Min-Cheol Kang<sup>2</sup>, Myung-Cheol Oh<sup>3</sup>,  
Chang-Kyung Oh<sup>3</sup>, Dong-Woo Kim<sup>4</sup>, You-Jin Jeon<sup>2</sup>, and Soo-Hyun Kim<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Jeju College of Technology, Jeju 690-714, Korea  
<sup>2</sup>School of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea  
<sup>3</sup>Dept. of Tourism Hotel Culinary Art, Jeju College of Technology, Jeju 690-140, Korea  
<sup>4</sup>Central Research Center, Natural F&P Co., Ltd., Chungbuk 363-883, Korea  
<sup>5</sup>Dept. of Food Bioengineering, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

#### Abstract

In this study, we investigated the change of antioxidant activity and flavonoid contents by fermentation of *Citrus grandis* Osbeck peel (CGP) using the *Saccharomyces cerevisiae* (KCCM35053), comparing to unfermented CGP. Total flavonoid content in the fermented *Citrus grandis* Osbeck peel (FCGP) was 3,768 g/100 g sample and higher than that of CGP. The antioxidant activities of FCGP was determined by DPPH, hydroxyl, alkyl radicals, and hydrogen peroxide scavenging assays. FCGP showed higher activities than CGP in all scavenging assays. The IC<sub>50</sub> values of FCGP were 261.3 µg/mL for DPPH; 1,474 µg/mL for hydroxyl; 90.9 µg/mL for alkyl and 1,195 µg/mL for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in respective scavenging assays. Flavonoid compositions of both samples were determined by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). In the spectrum FCGP was similar to CGP in the contents of neohesperidin, naringin and an unknown No. 7 compound, but some unknown compounds (No. 1, 2, 4, 5, 6) were higher than CGP in each flavonoid contents. Therefore, the fermentation of CGP could increase the contents of unknown compound and improved antioxidant activities.

**Key words:** *Citrus grandis* Osbeck peel, antioxidant, fermentation, flavonoid, LC/MS

#### 서 론

최근 생활환경과 영양상태의 개선 및 의학의 발달과 더불어 개인의 평균 수명이 점차 증가함에 따라 건강을 유지하기 위한 다양한 방안으로 노화를 포함한 각종 성인병 발생의 원인이 되고 있는 활성산소가 주목 받고 있다. 산화적 스트레스의 직접적인 원인으로 지적되고 있는 superoxide anion, hydroxyl radical 및 hydrogen peroxide와 같은 활성 산소종이 세포와 조직의 비가역적 손상 초래, 단백질 변성, 지질과산화, DNA 산화 및 기능의 변형을 초래하여 만성질환의 원인이 되기도 한다(1-3). 따라서 생체 내 항산화 방어시스템을 증가시키거나 ROS(reactive oxygen species)를 조절할 수 있는 합성 또는 천연항산화제 개발연구의 필요성이 강조되고 있고 이에 대한 탐색이 활발히 진행되고 있다(4). 이러

한 노화 및 각종 질병을 예방하고 치료하기 위한 목적으로 초기에 사용되었던 BHT, BHA와 같은 합성 항산화제들이 갖고 있는 안전성 등의 문제를 극복하고자, 최근에 각종 생약제나 과일, 채소와 같은 천연물 유래의 항산화제를 개발, 이용하려는 연구 추세로 변화하고 있다(5).

우리나라 남해안의 제주도에서는 전체 과실 생산량의 30%에 해당하는 연간 70만톤 이상의 감귤이 생산되고 있으며 감귤 생산량 중 80~85%는 생식용으로 사용되고 있고, 나머지 15~20%는 가공용으로 소비되고 있다(6). 가공용으로 사용되는 과정에서 생산되는 막대한 양의 부산물은 자연에 방치됨으로써 부산물에 함유된 페놀화합물들은 자연환경의 오염을 유발하고 있다. 그러나 자연에 버려지는 페놀화합물의 한 종류인 플라보노이드는 심장 순환기계 질환 및 항암, 항산화, 항염증에 대한 개선 효과가 있다고 보고되고

\*Corresponding author. E-mail: kshyun@jejunu.ac.kr  
Phone: 82-64-754-3614, Fax: 82-64-755-3601

있으며(7-10), 이에 따른 감귤류 과피 분말 및 과피 추출물은 기능성식품으로 개발되어 왔다. 이런 감귤류의 대부분의 플라보노이드 화합물은 배당체의 형태로써 전체 플라보노이드의 50~60%를 차지하며, 감귤의 대표적인 배당체 형태로는 naringin, hesperidin 및 neohesperidin 등이 있으며 이를 새로운 형태의 플라보노이드로 전환함으로써 기능성을 향상시키려는 연구가 보고되고 있다(11,12). 그러나 기존 방법에는 열처리를 통한 과정은 생리활성 물질을 파괴하게 만들고, 갈변현상을 초래하는 단점 등이 보고되고 있으며(13), 이런 단점을 보완하고자하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 이전 연구에서 보던 미생물과 당 분해 효소는 발효 및 자가 분해 과정을 통하여 배당체 형태의 플라보노이드가 비당체 형태로 전환되거나 또는 미생물의 2차 대사과정을 통하여 새로운 형태의 물질로 전환시켰다(14).

제주도 재래 감귤류의 당유자(*Citrus grandis* Osbeck)는 제주에서 왕귤 또는 탕유지라고 불리는 제주 재래 감귤로서, 분류학상 운향과, 감귤아과에 속하는 과수이며 인체에 기능성을 가지는 성분으로 limone, obacunone, nomiline, naringin, neohesperidin 등을 함유하고 있으며 최근 유자 및 당유자를 이용한 기능성식품 개발 및 생리활성에 대한 연구가 보고되고 있다(15-18).

따라서 위 연구에서는 당 성분을 에너지원으로 사용하며 알코올 발효 균주로 사용되고 있는 식품미생물인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*(KCCM 35053)를 통하여 이전 연구에서 보고되어진 대로(12,19) 소화가 용이하도록 발효 시킴과 동시에 당유자 과피에 함유하고 있는 플라보노이드 성분을 새로운 형태로 전환시킴으로써 이에 따른 생리활성 변화와 성분 변화를 보았으며, 기능성식품 및 건강보조식품 등의 식품용 신소재 개발 원료로서의 이용 가능성을 탐색하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

제주 재래 감귤인 당유자(*Citrus grandis* Osbeck)는 2009년 3월에 채집한 과피를 제주도 서귀포시 대정읍에 있는 금산건강원에서 구입하였다. 분석에 사용된 플라보노이드 표준품 중 neohesperidin, naringin은 Sigma사(St, Louis, USA)에서 구입하였고, hesperidin, nobiletin, tangeretin, 3',4',5,5',6,7-hexamethoxyflavone, 3',4',5',5',7-pentamethoxyflavone, 3',4',7,8-tetramethoxyflavone은 Extrasynthese사(Genay Cedex, France)로부터 구입하였으며, 기타 분석 및 정량 시약은 HPLC급 시약을 사용하였다.

### 당유자 발효 및 추출

당유자 과피 시료 1 kg을 증류수로 세척 후, 습식분쇄기로 분쇄하여 실험에 이용될 때까지 -20°C에서 보존하였다. 당유자 과피의 발효과정은 다음과 같다. 멸균된 삼각 플라스크

에 당유자 과피 분말 6.25%, yeast extract 1%와 glucose 1%를 각각 넣은 후 증류수를 채워서 1 L를 제조하였으며 3 N NaOH을 이용하여 전체 혼합액의 pH를 7.0으로 조절한 후, 가압멸균(121°C, 15분)하였다. 발효 균주로 사용되어진 효모, *Saccharomyces cerevisiae*(KCCM 35053)의 배양액은 YM broth 배지에서 25°C, 5일간 호기, 교반조건(120 rpm) 하에서 배양하였다. 효모의 배양액을 전체 당유자 과피 배지의 2%(v/v)가 되게 접종하였고 배양은 37°C에서 48시간 교반배양(70~80 rpm)하였으며 48시간 후 당유자 과피 발효액을 가압멸균을 함으로써 발효를 완료하였다. 배양이 완료된 당유자 과피 발효액은 -80°C에서 냉동 보관한 후 동결건조기를 이용하여 48시간 건조하였다. 건조된 발효분말 1 g을 80% 에탄올 100 mL에 넣어 상온에서 24시간 추출하였으며 추출 후 membrane filter(0.45 µm, Whatman, Maidstone, England)로 여과하여 사용하였다.

### 총 플라보노이드 정량

총 플라보노이드는 Zhuang 등의 방법(20)에 따라 당유자 과피 추출물 0.5 mL에 1.5 mL의 증류수와 0.5 mL의 5% NaNO<sub>2</sub>를 넣고 혼합한 후 6분간 반응시켰다. 그 후 10% AlCl<sub>3</sub> 0.15 mL를 넣고 다시 6분간 반응시켰다. 이어서 2 mL의 4% NaOH을 넣고 총량을 5 mL로 증류수로 맞춘 후 15분간 반응하였고 510 nm에서 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin 표준품에 의하여 작성한 검량선에 의해 계산되었다.

### DPPH 라디칼 소거활성

항산화시료의 DPPH radical 소거활성은 Nanjo 등의 방법(21)을 변형하여 측정하였다. 60 µL 시료 용액에 60 µL DPPH 용액(60 µM)을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합 용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 electron spin resonance(ESR) spectrometer(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time: 2 min, field: 337.1±5 mT, time constant: 0.3 sec, power: 1 mW, amplitude: 1×500의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 DPPH radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성(\%)} = (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium}) \times 100$$

### Hydroxyl 라디칼 소거활성

항산화시료의 hydroxyl radical 소거활성은 Rosen과 Rauckman의 방법(22)에 준하여 측정하였다. 즉, 일정한 농도의 시료 20 µL를 e-tube에 넣은 후 여기에 0.3 M 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO) 20 µL, 10 mM FeSO<sub>4</sub> 20 µL 및 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 20 µL 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 2.5분 방치한 후 quartz capillary tube에 옮겨 ESR spectrophotometer로 측

정하였다. 스펙트럼은 scan time: 200 sec, field:  $3461.3 \pm 50$  G, time constant: 0.3 sec, power: 1 mW, amplitude:  $1 \times 200$ 의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 hydroxyl radical의 소거활성 계산은 위의 DPPH radical 소거 측정 방법과 동일하다.

#### Alkyl 라디칼 소거활성

항산화 시료의 alkyl radical 소거활성은 Hiramoto 등의 방법(23)에 준하여 측정하였다. 항산화 시료 20  $\mu$ L에 증류수 20  $\mu$ L을 혼합한 후 40 mM 2,2'-azobis(2-methylpropion-amidine) dihydrochloride(AAPH) 20  $\mu$ L을 넣고 40 mM  $\alpha$ -(4-pyridyl N-oxide)-N-tert-butyl nitron(POBN) 20  $\mu$ L을 혼합한 다음 37°C에서 30분간 반응 후 quartz capillary tube에 옮겨 ESR spectrophotometer로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time: 200 sec, field:  $3461.3 \pm 50$  G, time constant: 0.3 sec, power: 1 mW, amplitude:  $5 \times 100$ 의 조건으로 기록하였다. 항산화 시료에 대한 alkyl radical의 소거활성 계산은 위의 DPPH radical 소거 측정 방법과 동일하다.

#### Hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ) 소거활성

Hydrogen peroxide 소거활성은 Müller(24)의 방법인 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonic acid(ABTS)-peroxidase system에서  $H_2O_2$  소거활성을 측정하였다. 96 well plate에서 시료용액 80  $\mu$ L, 10 mM  $H_2O_2$  20  $\mu$ L, phosphate buffer(pH 5.0, 0.1 M) 100  $\mu$ L를 넣어 37°C에서 5분간 반응시켰다. 그 후에 1.25 mM ABTS 30  $\mu$ L와 1 U/mL peroxidase 30  $\mu$ L를 넣고 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시키고 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader(Sunrise, Tecan Co. Ltd., Salzburg, Austria)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### HPLC/MS 분석

분석에 사용된 HPLC/MS는 ThermoFisher Scientific사의 LXQ(San Jose, USA) 모델을 사용하였다. 본 실험에서는 당유자 과피에 많이 함유되어 있다고 보고되어진 neohesperidin, naringin, nobiletin 등 여러 종류의 플라보노이드 표준품을 같은 조건에서 동시에 분석하였으며 이때 HPLC의 column은 YMC C18 column(5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  250 mm)을 사용하였고, 이동상은 A: 메탄올, B: 물을 사용하였다. 이동상구배는 메탄올/물을 10/90의 비율로 시작하여 40분에 100/0의 비율로 분석하였다. 이동상 유속은 0.8 mL/min으로 하였고 시료 주입량은 20  $\mu$ L를 사용하였다. HPLC 조건과 LC/MS에 대한 분석조건은 다음 Table 1과 같다.

### 결과 및 고찰

#### 추출수율 및 플라보노이드 함량

당유자 과피(*Citrus grandis* Osbeck peel, CGP)와 당유자

**Table 1. HPLC and LC/MS conditions for the determination of flavonoids in *C. grandis* peel**

A. Condition of HPLC				
Company	ThermoFisher Scientific			
Column	YMC C18 (5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm)			
Mobile phase	A: methanol, B: water			
	Time	A%	B%	Flow
Gradient	0 min	10	90	0.8 mL/min
	40 min	100	0	0.8 mL/min
	50 min	100	0	0.8 mL/min
	52 min	10	90	0.8 mL/min
	60 min	10	90	0.8 mL/min
B. Condition of LC/MS				
Company	ThermoFisher Scientific			
Ion source	ESI source			
Polarity	Positive (+), Negative (-)			
Mass range	100~1,000 m/z			
Sheath gas	50			
Scan type	Full scan			
Capillary temp.	350°C			

과피 발효물(Fermented *Citrus grandis* Osbeck peel, FCGP)의 80% 에탄올 추출물 수율 및 플라보노이드 화합물의 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 추출수율은 CGP 추출물이 좀 더 높은 22%로 FCGP 추출물 17%보다 높게 나타났다. 총 플라보노이드 함량은 FCGP가 3.768 g/100 g으로 CGP 3.395 g/100 g보다 약간 높은 함량을 함유하고 있었다. 추출수율에 따른 플라보노이드 함량을 비교해 본 결과 FCGP 추출물이 22.02%로 CGP 추출물 16.43%보다 약 6% 정도의 높은 플라보노이드 함유 함량을 확인할 수 있었다. 이와 같은 폴리페놀 화합물은 식물체에 널리 분포하는 2차 대사산물로서 수산기를 가지는 방향성 화합물을 총칭하는 것으로, hydroxycinnamic acid를 비롯한 대부분의 폴리페놀 화합물은 세포벽, 다당류, 리그닌 등과 에스테르 결합되어 있거나 중합체로 존재하며, 수산기를 통한 수소공여와 페놀 고리구조의 공명안정화에 의해 항산화 능력을 나타낸다고 보고되었다(25,26). 따라서 폴리페놀류의 하나인 플라보노이드 함량의 증가는 항산화력에 영향을 미치는 주된 인자라고 보이며 이 실험에서도 FCGP의 플라보노이드 함량의 증가는 항산화 능력에 영향을 미치는 주된 요인이 될 것으로 생각된다.

**Table 2. Contents of *C. grandis* peel and fermented *C. grandis* peel extracts**

Amounts (g/100 g)	<i>C. grandis</i> peel (CGP)	Fermented <i>C. grandis</i> peel (FCGP)
80% EtOH extract <sup>1)</sup>	20.66	17.11
Flavonoid <sup>2)</sup>	$3.395 \pm 0.08$ (16.43% <sup>3)</sup> )	$3.768 \pm 0.07$ (22.02%)

<sup>1)</sup>Solid extract (g)/ 100 g of raw material (dry weight).

<sup>2)</sup>Flavonoid content (g)/ 100 g of raw material (dry weight).

<sup>3)</sup>{Flavonoid (g)/ 80% EtOH extract (g)}  $\times$  100 (%).

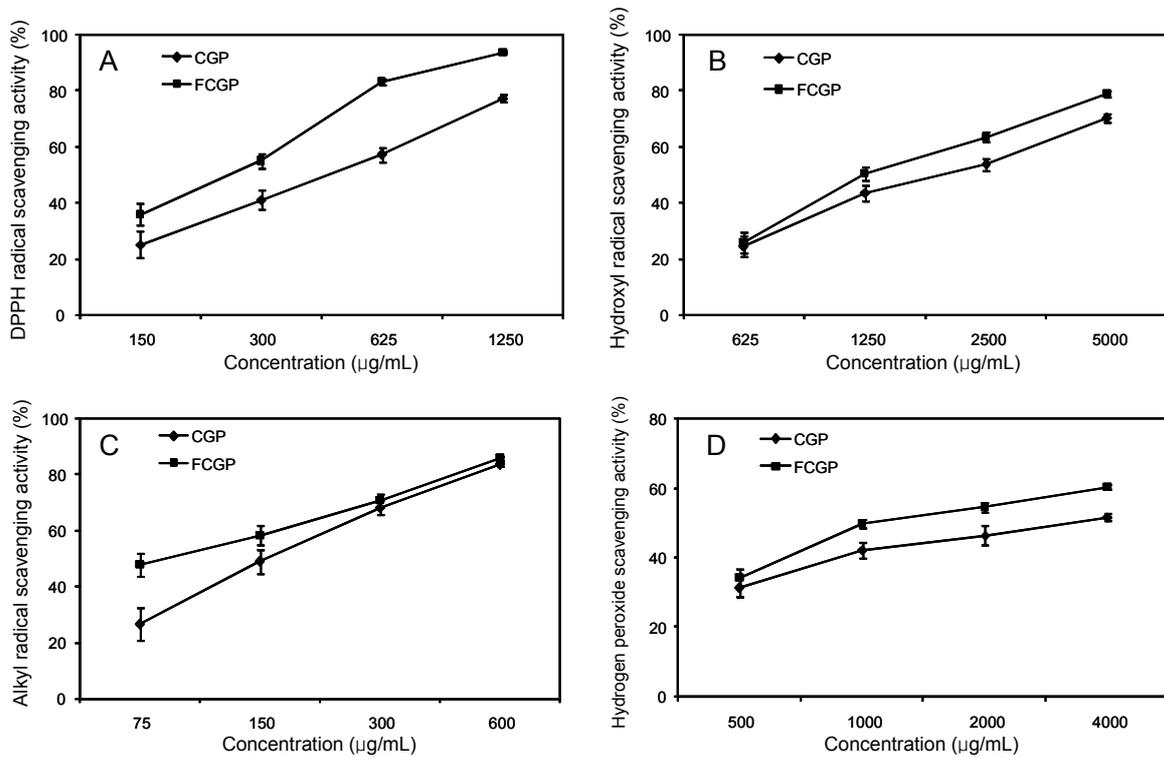


Fig. 1. Antioxidant activities of *C. grandis* peel (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP) extracts. A, DPPH radical; B, hydroxyl radical; C, alkyl radical; D, hydrogen peroxide.

DPPH radical 소거활성

생물학 체계에서 항산화제의 보호능력은 주로 항산화제의 free radical 소거능, 금속축매 chelating 능력, 항산화 효소의 활성, 산화 효소의 억제 작용으로 판단한다. 그 중에서도 DPPH radical 소거능에 이용되는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical은 화학적으로 유도되는 비교적 안정한 radical로서, 어떠한 반응계에서 전자를 공여 받으면 고유의 자색이 없어진다. 이 방법은 lipoxigenase에 의한 지방산화 반응계에서의 항산화 활성 측정결과와도 잘 부합하며 간편하면서도 신뢰성이 높은 장점을 가지고 있다(27). 본 연구에서 CGP와 FCGP에 대한 DPPH radical 소거능 측정 결과는 Fig. 1A로 나타내었다. 결과에 따르면 CGP와 FCGP 모두 150 µg/mL에서 1,250 µg/mL까지 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 특히, FCGP 소거활성은 35%에서 83%까지 높은 DPPH radical 소거활성을 보였다. 또한 당유자 과피 추출물에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 보았을 때에도 FCGP가 261.3 µg/mL로 CGP 485.3 µg/mL보다 강력한 DPPH radical 소거활성을 보였다(Table 3).

Hydroxyl radical 소거활성

Hydroxyl radical은 활성산소 라디칼 중에서 화학적으로 가장 반응성이 크며, 지질산화를 개시하고 DNA 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있고, 생체의 대사 과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 과산화수소가 Fe<sup>2+</sup>

Table 3. IC<sub>50</sub> value of antioxidant activities from CGP and FCGP extracts

IC <sub>50</sub> value (µg/mL)	DPPH	Hydroxyl	Alkyl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
CGP	485.3±4.5	2361.3±26.1	159.3±12.4	4355±29.4
FCGP	261.3±2.1	1474±14.5	90.9±8.5	1195±12.8

나 Cu<sup>2+</sup>이온의 존재 하에서 생성되며 가장 독성이 강한 free radical이다(28). Hydroxyl radical 에 대한 CGP와 FCGP의 소거능 측정결과는 Fig. 1B로 나타내었다. CGP와 FCGP 모두 625 µg/mL에서 5,000 µg/mL까지 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었으나 다른 라디칼 소거활성에 비해 다소 약한 소거능을 보였다. IC<sub>50</sub> 값을 보면 FCGP가 1,474 µg/mL로 CGP 2,361.3 µg/mL보다는 강한 hydroxyl radical 소거활성을 보였다(Table 3).

Alkyl radical 소거활성

Alkyl radical은 hydrocarbon reaction에서 초기 반응 생성물로 많이 형성된다. 이는 불포화지방산이 산소에 노출되면 지질과산화가 일어나며 이는 free radical에 의해 불포화지방산의 methylene(-CH<sub>2</sub>-)기로부터 수소원자가 탈취함에 따라 개시된다. 이로 인해 peroxy radical과 과산화물로 전환되며 이렇게 형성된 지질과산화물로 인하여 지질분자의 구조적 변화가 넓은 범위에 걸쳐 발생하면 생체막 fluidity의 감소, membrane potential의 감소, 이온투과성의 증가, 세포

소기관 내용물의 누출 등이 예상되고 결국은 세포기능의 저하와 세포의 죽음을 초래할 수 있다. 지질과산화물과 그것의 분해산물 중에는 생체에 유해한 성분들이 있으며 대식세포 기능의 억제, 단백질 합성 억제, thrombin 과다생산 등과 같은 유해 작용들이 보고되어 왔다. 이에 따라 지질과산화의 시발점이라 할 수 있는 alkyl radical의 소거활성을 통해 그 생리활성물질로서 가능성을 확인하고자 하였다. Fig. 1C를 보면 대체적으로 다른 라디칼과  $H_2O_2$ 보다는 낮은 농도에서도 높은 활성이 나타나는 것을 볼 수 있으며 특히 FCGP는 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 60% 이상의 alkyl radical 소거활성을 보여줬다. CGP와 FCGP 모두 300, 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 서 비슷한 활성을 보여줬으나 Table 3을 보면 FCGP가 90.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 CGP 159.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 높은  $IC_{50}$  값을 확인할 수 있었다. 당유자 과피 추출물보다는 발효를 통한 추출물이 강력한 alkyl radical 소거활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

#### Hydrogen peroxide 소거활성

생체에서 생성된 hydroxyl radical 같은 활성 산소종은 반응성이 대단히 높다. 생체내의 superoxide dismutase (SOD)가 superoxide를 hydrogen peroxide로 변화시키고, catalase는 hydrogen peroxide를 제거하며, 한편 glutathione transferase와 glutathione peroxidase들은 친전자성 이물을 포함하여 해독하며 SOD에 의해 생성된 peroxide를 제거한다. 그러나 생체 내에서 완화된 oxidase stress가 일어나면 세포들은 이러한 항산화기전을 가동하여 반응하지만

심한 oxidase stress는 세포상해를 일으키며 necrosis와 apoptosis로 발전된다고 보고되었다(29). Hydrogen peroxide에 대한 CGP와 FCGP의 소거능 측정결과는 Fig. 1D로 나타내었다. CGP와 FCGP 모두 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 4,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 농도별로 활성이 크게 증가하진 않았지만 농도의존적으로 증가하였고  $IC_{50}$  값을 보면 FCGP가 1,195  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 CGP 4,355  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 명확히 hydrogen peroxide 소거활성이 높다는 것을 알 수 있었다(Table 3).

위의 결과를 보면 효모를 이용하여 당유자 과피를 발효하였을 때, 당유자 과피 본래의 생리활성 성분보다는 효모 발효를 통하여 생리활성 성분이 증가 및 전환되었으리라 보며 이를 확인하기 위하여 DPPH, hydroxyl, alkyl radical 및 hydrogen peroxide에 대한 항산화능을 측정된 결과, 모든 항산화실험에서 발효 추출물인 FCGP가 높은 활성을 보이는 것을 확인하였다. 그리고 FCGP의 생리활성 성분의 변화 및 증가를 알아보기 위하여 LC/MS를 이용하여 성분 분석을 하였다.

#### 당유자 과피 추출물로부터 플라보노이드 화합물 분석

Fig. 2에 당유자 과피 CGP와 발효물인 FCGP의 HPLC에 의한 분석크로마토그램을 나타내었다. CGP보다 FCGP에서 많은 peak들이 나타났으며 몇 가지 플라보노이드 성분이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그 내용은 다음과 같다.

Table 4를 보면 분석크로마토그램에서 나타난 크고 작은 50여종의 물질 중에 retention-time의 순으로 13종에 대한

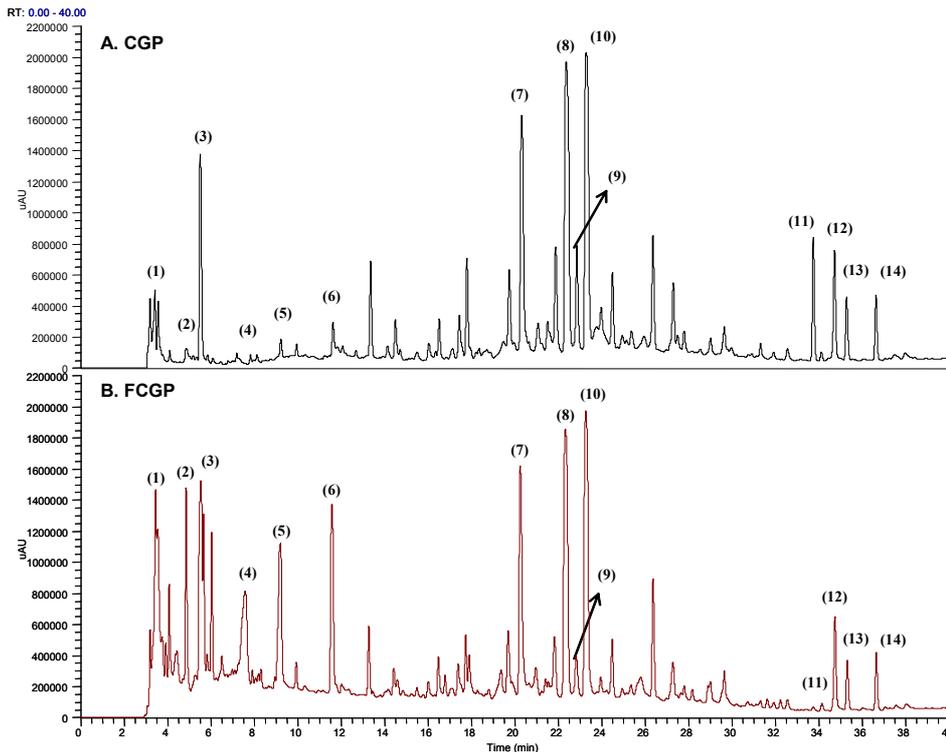


Fig. 2. HPLC/MS chromatogram of flavonoids from CGP and FCGP extracts. A, CGP; B, FCGP.

Table 4. Peak assignment for the analysis of the extracts from CGP and FCGP

Peak	RT (min)	Identification	Polarity	m/z
1	3.58	Unknown	[M-H] <sup>-</sup>	191
2	4.86	Unknown	[M+H] <sup>+</sup>	260
3	5.54	Unknown	[M-H] <sup>-</sup>	180
4	7.57	Unknown	[M-H] <sup>-</sup>	447
5	9.38	Unknown	[M-H] <sup>-</sup>	165
6	11.78	Unknown	[M-H] <sup>-</sup>	203
7	20.48	Unknown	[M-H] <sup>-</sup>	595
8	22.35	Naringin	[M-H] <sup>-</sup>	579
9	22.78	Hesperidin	[M-H] <sup>-</sup>	609
10	23.28	Neohesperidin	[M-H] <sup>-</sup>	609
11	33.73	3',4',5',5,7-Pentamethoxyflavone	[M+H] <sup>+</sup>	373
12	34.71	Nobiletin	[M+H] <sup>+</sup>	403
13	35.25	3',4',5,5',6,7-Hexamethoxyflavone	[M+H] <sup>+</sup>	403
14	36.63	Tangeretin	[M+H] <sup>+</sup>	373

LC/MS 분석 정보를 나타내었다. 14중에서 7종은 현재 보유하고 있는 플라보노이드 표준품(naringin: 580 m/z, hesperidin: 610 m/z, neohesperidin: 610 m/z, 3',4',5',5,7-pentamethoxyflavone: 372 m/z, nobiletin: 402 m/z, 3',4',5,5',6,7-hexamethoxyflavone: 402 m/z, tangeretin: 372 m/z)의 LC/MS 값과 MS<sup>2</sup>을 통하여 비교하여 확인하였다. 당유자 과피에 함유된 플라보노이드 성분중에서 naringin과 neohesperidin은 이전 연구 보고(28)에서와 같이 가장 많은 양을 함유하고 있었다. 당유자 과피의 플라보노이드 분석은 표준품의 분석크로마토그램 상에 RT와 LC/MS를 통하여 확인하였으며 CGP와 FCGP 모두에서 neohesperidin, hesperidin 및 naringin은 유사한 함량이 함유되어 있는 것을 알 수 있었다. 하지만 9, 11, 12, 13, 14의 성분들은 발효과정 중에 함량의 일부가 감소하고 있는 것을 알 수 있으며, 그중에 11번째 성분인 3',4',5',5,7-pentamethoxyflavone은 FCGP에서 그 성분을 확인할 수 없을 만큼의 적은 양만이 측정되었다. 한편 FCGP에서는 3번을 제외한 1, 2, 4, 5, 6번 화합물들의 함량이 수배에서 수십 배까지 크게 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 1~7번까지의 성분은 감귤유래 플라보노이드 표준품들과의 MS 및 MS<sup>2</sup>를 이용하여 비교하였으나 다른 값을 가지고 있어 확인할 수 없었다. 이로서 당유자 과피를 효모를 통하여 발효하였을 때 당유자 과피에 함유된 플라보노이드 일부 성분이 감소되었으며 효모의 발효과정을 통하여 다른 형태의 화합물로 전환되었다는 것을 알 수 있었고 이 화합물은 비당체 형태의 naringenin과 hesperetin이 아닌 새로운 형태의 화합물로 전환되어진 것을 알 수 있었다. 이 화합물들의 특성을 크로마토그램에서 보면 전환되어진 성분들이 다른 플라보노이드보다 먼저 측정된 것을 확인할 수 있었다. 칼럼의 특성상 친수성 부분이 많이 함유되어진 물질이 빨리 용출되므로 이 화합물에는 친수성인자인 하이드록실기(-OH)가 다른 플라보노이드에 비해 많이 함유되어 있으리라 생각되어진다. 하이드록실기는 항산화 활성에 영향을 미치는 인자로서 전환되어진 성분들이 생리활성을 증가

시키리라 보인다.

이와 유사한 연구 사례를 보면, 감귤류의 과피 부분은 분해하기 어려운 pectin, cellulose, hemicellulose, β-1,4-glu-can 등과 같은 성분들로 구성되어져 있으며, 대부분의 생리활성을 나타내는 물질들은 이들 내부에 존재한다고 보고되었다. 생리활성 성분으로는 naringin, neohesperidin 및 hesperidin 등의 플라보노이드 성분이 있으며, 이런 성분들이 발효를 통하여 다른 형태의 화합물로 전환되었고 이렇게 전환되어진 성분들로 인하여 항균, 항염 및 생리 활성을 증가한 사례가 보고되었다(10,12).

따라서 당유자 과피에 함유된 플라보노이드가 효모의 발효과정을 통하여 일부의 플라보노이드가 감소하여 다른 형태의 새로운 화합물로 전환되어진 것을 LC/MS를 통하여 확인할 수 있었고 이렇게 전환된 성분들은 항산화 활성을 증가시키는데 기여한 것으로 판단된다. 본 연구결과에서 보면 당유자 과피를 식품미생물인 효모를 이용하여 발효한 경우 항산화 활성들이 증가되는 사실을 알 수 있어 기능성 증대가 가능한 것으로 판단된다.

요 약

당유자 과피를 식품미생물인 효모를 이용하여 발효 후 80% 에탄올로 추출하여 발효 전과 후의 플라보노이드 함량 및 성분 변화와 항산화 활성의 차이를 비교 분석하였다. LC/MS를 통한 플라보노이드 분석 결과, 발효 후 추출물에서 neohesperidin과 naringin의 함량 변화는 큰 차이가 없었으나, hesperidin과 일부 플라보노이드 성분은 감소하였으며, 특히 3',4',5',5,7-pentamethoxyflavone은 발효 후에 그 함량이 크게 감소하였다. 이에 반하여 친수성 unknown 화합물들이 크게 증가하는 것을 LC/MS를 통하여 확인할 수 있었다. 이는 효모를 통한 발효과정 중에 플라보노이드 성분이 다른 형태로 전환되었으며, 이렇게 전환되어진 성분들을 함유한 FCGP는 CGP보다 DPPH, hydroxyl, alkyl 및 hydrogen peroxide 소거활성 등과 같은 항산화 활성을 크게 증가시켰다. 결론적으로 효모를 이용하여 당유자 과피를 발효시킴으로써 생리활성 성분의 일부를 전환시킴으로써 항산화 활성 등과 같은 기능성을 향상시킬 수 있어, 향후 당유자 과피의 발효에 의한 다양한 건강기능식품으로서의 개발이 가능한 것으로 사료된다.

문 헌

1. Aruoma OI. 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *JAOCS* 75: 199-212.
2. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Tesler J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
3. Kim HJ, Jin CB, Lee YS. 2007. Antioxidative activities of

- phenolic compound isolated from *Inonotus obliquus*. *Kor J Pharmacogn* 38: 1-16.
4. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.
  5. Masaki H, Skai S, Atsumi T, Sakurai H. 1995. Active oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol Pharm Bull* 18: 162-166.
  6. Lee HY, Seog HM, Nam YJ, Chung DH. 1987. Physico-chemical properties of Korean mandarin (*Citrus reticula*) orange juice. *Kor J Food Sci Technol* 19: 338-345.
  7. Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Jeong TS, Choi MS. 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.
  8. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. 1990. Flavonoids as superoxide scavenger and antioxidants. *Free Rad Biol Med* 9: 19-21.
  9. Cook NC, Samman S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7: 66-76.
  10. Damon P, Flandre O, Michel F, Perdrix L, Lavrid C, Crastes de Paulet A. 1987. Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. *Arzneimittelforschung* 37: 1149-1153.
  11. Yoshio S Bacterial. 1963. paramedicidal and spermatocidal actions of some flavonoids. *Gifu Ika Daigaku Kiyo* 10: 123-130.
  12. Ahn SC, Kim MS, Lee SY, Kang JH, Kim BH, Oh WK, Kim BY, Ahn JS. 2005. Increase of bioactive flavonoid aglycone extractable from Korean citrus peel by carbohydrate-hydrolysing enzymes. *Kor J Microbiol Biotechnol* 33: 288-294.
  13. Puri M, Banerjee UC. 2000. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnol Adv* 18: 207-217.
  14. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 436: 71-75.
  15. Kim YJ, Moon JY, Kim JH, Kim HG, Kim JH, Cho SK. 2007. Effects of mixing method and storage period of *Dangyuja*-sugar mixture on customer preferences for *Dangyuja*-tea. *Kor J Food Preserv* 14: 160-164.
  16. Lee HJ, Kang GJ, Yoon WJ, Kang HK, Kim YS, Kim SM, Yoo ES. 2006. Anti-inflammatory effect of unripe fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW264.7 and HaCat cells. *Kor J Pharmacogn* 37: 74-80.
  17. Lim HK, Yoo ES, Moon JY, Jeon YJ, Cho SK. 2006. Antioxidant activity of extracts from *Dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) fruits produced in Jeju island. *Food Sci Biotechnol* 15: 312-316.
  18. Lim HK, Moon JY, Kim HN, Cho MJ, Cho SK. 2009. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by the hexane fraction of an extract of immature *Citrus grandis* Osbeck fruits. *Food Chem* 114: 1245-1250.
  19. Moon SW, Kang SH, Jin YJ, Park JG, Lee YD, Lee YK, Park DB, Kim SJ. 2004. Physiological activity/nutrition: fermentation of *Citrus unshiu* Marc. and functional characteristics of the fermented products. *Kor J Food Sci Technol* 36: 669-676.
  20. Zhuang XP, Lu YY, Yang GS. 1992. Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. *Chinese Herbe Med* 23: 122-124.
  21. Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki H, Sakai M, Hara Y. 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med* 21: 885-902.
  22. Rosen GM, Rauckman EJ. 1980. Spin trapping of the primary radical involved in the activation of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene by cumene hydroperoxide hematin. *Mol Pharmacol* 17: 233-238.
  23. Hiramoto K, Johkoh H, Sako H, Kikugawa K. 1993. DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free Radic Res Commun* 19: 323-332.
  24. Müller HE. 1995. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 259: 151-158.
  25. Yusof S, Ghazali HM, King GS. 1990. Naringin content in local citrus fruits. *Food Chem* 37: 113-121.
  26. Hermann K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxyl-benzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28: 315-347.
  27. Xu XM, Jun JY, Jeong IH. 2007. A study on the antioxidant activity of Hae-songi mushroom (*Hypsizigus marmoreus*) hot water extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1351-1357.
  28. Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. 2009. Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 462-469.
  29. Chance S, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.

(2009년 8월 31일 접수; 2009년 9월 10일 채택)