KOREAN J. FOOD COOKERY SCI.
Vol. 26, No. 1, pp. 18～25 (2010)

온주밀감 및 당유자 진피 효소 추출물의 항산화 활성

현재석 · 강성명[1] · 마힌다[2] · 고원준[3] · 양태석[4] · 오명철[4†] · 오창경[4] · 전유진[1] · 김수현[5]
제주산업정보대학 식품영양과, [1]제주대학교 해양의생명과학부, [2]전남대학교 식품수산생명의학부
[3]제주특별자치도개발공사 연구소, [4]제주산업정보대학 관광호텔조리과, [5]제주대학교 식품생명공학과

Antioxidative Activities of Enzymatic Digests from Dried *Citrus unshiu* and *Citrus grandis* Peels

Jae-Seok Hyon, Sung-Myung Kang[1], Mahinda Senevirathne[2], Won-Joon Koh[3], Tai-Suk Yang[4], Myung-Cheol Oh[4†], Chang-Kyung Oh[4], You-Jin Jeon[1] and Soo-Hyun Kim[5]

Department of Food & Nutrition, Jeju College of Technology
[1]School of Marine Biomedicinal Sciences, Jeju National University
[2]Division of Food Science & Aqualife Medicine, Chonnam National University
[3]R&D Center, Jeju Special Self-Governing Province Development Corp.
[4]Department of Tourism Hotel Culinary Art, Jeju College of Technology
[5]Department of Food Bioengineering, Jeju National University

Abstract

This study was carried out to investigate the total polyphenol and flavonoid contents and antioxidative activities of enzymatic digests from dried *Citrus unshiu* and *C. grandis* peels. The yields of digests from dried *C. unshiu* and *C. grandis* peels were high in viscozyme (a carbohydrase) and kojizyme (a protease), and enzymatic digests from dried *C. grandis* peels appeared highly comparable to those of *C. unshiu*. Total polyphenol contents were high in ultaflo (a carbohydrase) and alcalase and flavourzyme (proteases), and the digests from dried *C. unshiu* peels appeared high in comparison to *C. grandis*. Total flavonoid contents were high in ultaflo, alcalase, and water extract. DPPH radical scavenging activities appeared very high in digests from dried *C. grandis* peels in comparison to *C. unshiu*, and was the highest in viscozyme and kojizyme. The viscozyme digest displayed particularly high activity. Hydrogen peroxide scavenging activities increased somewhat with increasing amounts of digests, but displayed very high activity, more than 91%, except kojizyme the digest from dried *C. unshiu* peel, at 2.0 mg/mL. Alkyl radical scavenging activities increased rapidly with increasing amounts of digest, and all enzyme digests from dried *C. unshiu* and *C. grandis* peels displayed very high activities at more than 0.5 mg/mL. Hydroxyl radical scavenging activities increased rapidly with increasing amounts of digests, and all enzymatic digests from dried *C. unshiu* and *C. grandis* peels displayed relatively low activities in comparison to other activated oxygen species.

Key words: *Citrus unshiu*, *Citrus grandis*, dried peels, enzymatic digests, antioxidative activities

I. 서 론

제주감귤은 우리나라 과수 생산량의 30%를 차지하고 있는 국내에서 가장 많이 생산되는 과일로서 연간 약 70만톤이 생산되어 이 중 생식용으로 80～85%가 소비되고 있고 나머지 20～25%가 가공용으로 소비되고 있다 (Lee HY 등 1987). 그러나 가공공정 중 막대한 양의 감귤과피가 부산물로 발생되어 자연에 투기 또는 방치됨으로써 환경오염 문제를 불러일으킬 우려가 높아 감귤 과피의 활용성에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

예로부터 감귤 과피를 건조시킨 것을 진피(*Aurantii nobilis pericarpium*)라고 하여 기가 뭉친 것을 풀어주고 비장 기능을 강화시켜 메스꺼움, 소화불량, 해수 및 가래를 없애주며 이뇨작용의 효과가 있어서 한약재로 사용되어 왔다(육창수 1997).

감귤 과피에는 carotenoid류, bioflavonoid류, pectin 및 terpene류가 풍부하게 함유되어 있고(Kamiya S와 Esaki S

†Corresponding author: Myung-Cheol Oh, Department of Tourism Hotel Culinary Art, Jeju College of Technology
Tel: 064-754-0360
Fax: 064-754-0360
E-mail: foodman_ca@jeju.ac.kr

1971, Jeong WS 등 1997), 특히 감귤 과피에 다량 함유되어 있는 hesperidin이나 naringin과 같은 flavonoid 물질은 암세포의 증식을 억제하며(Kim JH과 Kim MK 2003, Yoon CH과 Jwa SM 2006), 모세혈관의 수축을 촉진시켜 고혈압을 예방하고, 혈액 내의 LDL 콜레스테롤의 양을 저하시켜 혈관의 건강을 증진시킨다(Son HS 등 1992, Bok SH 등 1999, Kim HJ 등 1999). 그러나 이러한 중요한 생리적 기능물질들을 함유하고 있는 감귤 과피는 그 일부가 한약재로 쓰이는 것 외에는 대부분 폐기되고 있다.

당유자(Citrus grandis Osbeck)는 제주에서 왕귤 또는 뎅유지라고 불리는 제주 재래 감귤로서, 분류학상 운향과, 감귤아과에 속하는 과수로써 과피가 두껍고 산 함량이 매우 높고 pH가 낮아 특유의 쓴맛이 강하며 저장성이 좋지 않아 생과로 섭취하기 보다는 대부분 고농도의 설탕에 절인 당유자청으로 가공되거나 약용으로만 이용되고 있다(Song EY 등 1997). 이러한 당유자에는 온주밀감에서는 검출되지 않는 다양한 flavonoid류가 존재하며, 그 함량도 높은 것으로 보고되고 있다(Lee CH와 Kang YJ 1997, Rhyu MR 등 1997, Satoru K 등 1999, Kim YC 등 2001). 또한 당유자에는 특유의 기능성 성분인 limonine, obacunone, nomiline, naringin, neohesperidin 등을 함유하고 있어 최근 당유자를 이용한 기능성 식품 개발 및 생리활성 등에 대한 연구가 진행되고 있다(Kim YJ 등 2007, Lee HJ 등 2006, Lim HK 등 2006, Lim HK 등 2009).

감귤류의 기능성 성분 중 가장 중요한 플라보노이드는 항산화, 항암, 항염증, 심혈관계 질환 예방 및 치료 등의 기능을 가지고 있는데, 대부분의 플라보노이드 화합물은 배당체의 형태로서 전체 플라보노이드의 50~60%를 차지하고 있다(Cha JY 등 1999). 감귤의 대표적인 배당체 형태의 플라보이드 화합물로 naringin, hesperidin 및 neohesperidin 등은 이들의 배당체 형태인 naringenin 및 hesperetin에 비하여 생리활성이 떨어짐에 따라(Cha JY와 Cho YS 2001), 감귤 배당체 형태의 플라보노이드를 aglycon 형태의 플라보노이드로 전환함으로써 기능성을 향상됨을 기대할 수 있는데, Ahn SC 등(2005)은 감귤에 여러 종류의 당분해효소를 이용하여 감귤에 함유된 배당체 형태인 플라보노이드 화합물들을 aglycone 형태의 플라보노이드로 전환과 세포벽 구성성분의 가수분해를 통하여 유효 생리활성 성분의 추출성을 증대시킨다고 하였으며, 감귤과피를 효소(viscozyme L)를 처리할 경우 생리활성인 강한 aglycone 형태의 hesperetin 및 naringenin의 함량을 증가시킨다고 하였다(Lee MH 등 2007).

따라서 본 연구에서는 가공 부산물로 생기는 감귤 과피의 이용성을 증대시키기 위하여 온주밀감 및 당유자의 진피를 동결건조한 후 단백질분해효소와 탄수화물분해효소로 가수분해시켜 항산화 활성을 비교 검토함으로써 기능성 식품소재로서의 가능성을 탐색하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

실험에 사용된 온주밀감(*Citrus unchiu*) 및 당유자(*Citrus grandis*)의 진피는 제주특별자치도 서귀포시 대정읍에 있는 금산건강원에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 Fluka나 Sigma-Aldrich사(St. Luois, USA)의 제품을 사용하였다. 실험에 사용된 탄수화물분해효소로서 전분분해효소 AMG, 섬유소 분해효소 celluclast, amylose와 amylopectin 분해효소 termamyl과 viscozyme, 점질물질(gums)들을 분해하는 ultraflo 등을, 단백질분해효소로서 protamax, kojizyme, neutrase, flavourzyme, alcalase 등을 Novo사(Novoeyme Nordisk, Bagsvaed, Denmark)로부터 구입하여 사용하였다. 모든 효소는 Table 1과 같이 최적의 반응 온도와 pH를 조절하여 사용하였다.

Table 1. Characteristics of different carbohydrases and proteases in hydrolysis process

Enzyme	Characteristics	Optimal	
		pH	Temp(℃)
AMG	Hydrolyzes 1,4- and 1,6-α-linkages in liquefied starch	4.5	60
Celluclast	Catalyzes the breakdown of cellulose into glucose, cellobiose and higher glucose ploymer	4.5	60
Termamyl	Hydrolyses 1,4-α-glucosidic linkages in amylose and amylopectin	6.0	60
Ultraflo	Breakdown of α-glucans, pentosans and other gums	7.0	60
Viscozyme	Ability to liberate bound materials and to degrade non-starch polysaccharides	4.5	50
Protamex	Production of non-bitter protein hydroysis	6.0	40
Kojizyme	Amino- and carboxypeptidase activities	6.0	40
Neutrase	Endopeptidase activities	6.0	50
Flavourzyme	Endopeptidase and exopeptidase activities	7.0	50
Alcalase	Endopeptidase activities	8.0	50

2. 진피의 추출

1,000 mL 플라스크에 감귤 동결건조 시료 각 5 g과 증류수 500 mL를 가하여 pH(1 M HCl/NaOH)를 고정시킨 다음 효소 0.5 mL를 첨가하여 혼합한 후 incubator에서 12시간 진탕하면서 반응시켰다. 그 후 80℃에서 10분간 효소를 불활성화시킨 후 pH를 7로 조정하여 Whatman 여과지로 여과하고, 급속 냉각한 후 동결 건조하였다. 한편 물 추출물은 감귤 시료 각 5 g과 증류수 500 mL를 가하여 20℃의 incubator에서 24시간 동안 진탕하면서 추출한 후 Whatman 여과지로 여과하고, 급속 냉각한 후 동결 건조하였다. 이들 추출물들은 농도를 2 mg/mL로 조정하여 시료로 사용하였다. 각 효소 추출물의 추출수율은 효소 추출 방법에 따라 획득된 양을 %로 계산하였다.

3. 총 폴리페놀 정량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법(AOAC 1980)을 변형하여 측정하였다. 즉 시험관에 각 감귤 진피 효소 추출물 1 mL, 95% ethanol 1 mL, 증류수 5 mL, 50% Foiln-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 가하여 실온에 5분간 방치하여 반응시킨 후, 5% Na_2CO_3 1 mL를 가하고 어두운 곳(실온)에서 1시간 반응시킨 다음 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 (+)catechin 표준액에 의하여 작성한 검량선에 따라 계산하였다.

4. 총 플라보노이드 정량

총 플라보노이드 함량은 Zhuang 등의 방법(1992)에 따라 각 감귤 진피의 효소 추출물 0.5 mL에 2 mL의 증류수와 0.5 mL의 5% $NaNO_2$를 넣고 혼합한 후 6분간 반응시켰다. 그 후 10% $AlCl_3$ 0.15 mL를 넣고 다시 6분간 반응시켰다. 이어서 2 mL의 4% NaOH를 넣고 총 양을 5 mL로 증류수로 맞춘 후 15분간 반응하였고 510 nm에서 측정하였다 총 플라보노이드 함량은 quercetin 표준품에 의하여 작성한 검량선에 따라 계산되었다.

5. 항산화 활성 측정

1) DPPH 라디칼 소거활성

진귤 및 온주밀감 진피의 효소 추출물의 DPPH(α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl) radical 소거활성은 Nanjo 등의 방법(1996)에 의하여 측정하였다. 60 μL 시료 용액에 60 μL DPPH 용액(60 μM)을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 electron spin resonance(ESR) spectrophotometer(JEOL Lts., Japan)로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time: 2 min, field: 337.1±5 mT, time constant: 0.3 s, power: 1 mW, amplitude: 1×500의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 DPPH radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Activity}(\%) = \frac{\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern}}{\text{ESR signal intensity for the control medium}} \times 100$$

2) Hydroxyl 라디칼 소거활성

온주밀감 및 당유자 진피의 효소 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 Rosen GM와 Rauckman EJ의 방법(1980)에 준하여 측정하였다. 즉, 일정한 농도의 시료 20 μL를 e-tube에 놓은 후 여기에 0.3 M 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO) 20 μL, 10 mM $FeSO_4$ 20 μL 및 10 mM H_2O_2/0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 20 μL 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 2.5분 방치한 후 quartz capillary tube에 옮겨 ESR spectrophotometer로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time: 200 s, field: 3461.3±50 G, time constant: 0.3 s, power: 1 mW, amplitude: 1×200의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 hydroxyl radical 소거활성의 계산은 위의 DPPH radical 소거활성 측정 방법과 동일하다.

3) Alkyl 라디칼 소거활성

온주밀감 및 당유자 진피의 효소 추출물의 alkyl radical 소거활성은 Hiramoto 등의 방법(1993)에 준하여 측정하였다. 항산화 시료 20 μL에 증류수 20 μL을 혼합한 후 40 mM 2,2'-azobis(2-methylpropion-amidine)dihydrochloride(AAPH) 20 μL를 넣고 40 mM α-(4-pyridyl N-oxide)-N-tert-butylnitrone(POBN) 20 μL를 혼합한 다음 37℃에서 30분간 반응 후 quartz capillary tube에 옮겨 ESR spectrophotometer로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time: 200 s, field: 3461.3±50 G, time constant: 0.3 s, power: 1 mW, amplitude: 5×100의 조건으로 기록하였다. 항산화 시료에 대한 alkyl radical 소거활성의 계산은 위의 DPPH radical 소거활성 측정 방법과 동일하다.

4) Hydrogen peroxide(H_2O_2) 소거활성

온주밀감 및 당유자 진피의 효소 추출물의 hydrogen peroxide 소거활성은 Müller의 방법(1995)인 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonic acid(ABTS) peroxidase system에서 측정하였다. 96 well plate에서 시료용액 80 μL, 10 mM H_2O_2 20 μL phosphate buffer(pH 5.0, 0.1 M) 100 μL를 넣어 37℃에서 5분간 반응시켰다. 그 후 1.25 mM ABTS 30 μL와 1 U/mL peroxidase 30 μL를 넣고 혼합한 후 37℃에서 10분간 반응시키고 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader(Sunrise, Tecan Co. Ltd., Austria)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 3회 반복 측정한 후 평균과 표준편차를 나타내었으며, SPSS 11.1을 이용하여 실험군 간의 유의차를 ANOVA로 검증한 후 $p<0.05$ 수준에서 상호 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 추출수율

온주밀감 및 당유자 진피의 효소 추출물들의 추출수율을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 온주밀감과 당유자 진피의 효소 추출물들의 추출수율은 당유자가 온주밀감보다 높게 나타났다. 탄수화물분해효소 추출물들의 추출수율은 온주밀감 진피의 경우 34.3±1.2～51.7±1.5% 범위로서 viscozyme 추출물에서, 그리고 당유자 진피의 경우 40.3±1.5～52.0±1.7% 범위로서 viscozyme, celluclast 및 ultraflo 추출물에서 50% 이상으로 높았다. 단백질분해효소 추출물들의 추출수율은 온주밀감 진피의 경우 44.7±1.5～57.3±1.5% 범위로서 kojizyme 추출물에서, 그리고 당유자의 경우 52.7±1.5～66.0±2.0% 범위로서 모든 효소 추출물에서 50% 이상으로 높았다. 한편 온주밀감과 당유자 진피 추출물의 추출수율은 각각 30.7±1.2% 및 47.7±1.5%로서 탄수화물분해효소(당유자의 AMG와 termamyl은 예외)나 단백질 분해효소에 비하여 낮게 나타났다. 이와 같이 당유자의 효소 추출물이 온주밀감 추출물(특히 단백질분해효소 추출물)보다 추출수율이 높은 것으로 보아 이들 단백질 분해효소들은 당유자 진피 추출에 유용할 것으로 생각된다. Lee MH 등(2007)은 당분해효소 처리에 따른 감귤 과피의 가용성 고형분 함량을 측정한 결과 가용성 고형분 함량의 경우 건조만 한 진피의 경우 48.49%, 효소처리를 하였을 경우 63.03～72.97%로 가용성 고형분 함량이 높은 것으로 나타났다고 보고하였다. 본 연구 결과 이들의 결과보다 낮게 나타났는데, 이러한 결과는 이들보다 효소농도가 낮고, 가수분해조건이 다른 것에 기인하는 것으로 판단된다.

2. 총 폴리페놀 함량

온주밀감 및 당유자 진피 효소 추출물들과 물 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. 탄수화물분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 진피 추출물들의 총 폴리페놀 함량은 각각 536.4±8.3～762.3±13.5 및 584.7±3.1～660.3±16.1 mg/100 g 범위로서, ultaflo 추출물에서 가장 높았으며, 또한 celluclast를 제외하고는 온주밀감 진피 추출물이 당유자 진피 추출물보다 높게 나타났다. 단백질분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 진피 추출물들의 총 폴리페놀 함량은 각각 564.3±6.7～655.3±8.2 및 577.7±7.5～646.4±15.2 mg/100 g 범위로서, 각각 alcalase 및 flavourzyme 추출물에서 가장 높았으며, alcalase를 제외하고는 온주밀감과 당유자 진피 추출물이 비슷한 함량을 나타내었다. Mahinda S 등(2008)은 온주밀감 부산물을 탄수화물 분해효소로 분해한 후 건조조건에 따른 총 폴리페놀 함량을 측정하여 500～700 mg/100 g이라 하였는데, 본 연구 결과 이들의 결과와 잘 일치하였다. 그러나 Ahn MS 등(2007)은 동결 건조된 온주밀감의 70% 에탄올 추출물의 총 페놀함량은 836.8 mg%라고 보고하였으며, Kim YD 등(2009)은 수확 시기별로 진귤 생과피의 총 폴리페놀 함량을 측정하여 126.8에서 85.2 mg%로 감소하였다고 보고하였고, Goinstein S 등(2001)은 감귤 건조과피의 대표적인 감귤류인 오렌지, 레몬 등의 과피에 함유된 총 폴리페놀 함량은 140～200 mg% 정도이었다고 보고하였다. 본 연구결과 이들의 결과보다 높게 나타났는데, 이러한 차이는 본 연구에서는

Table 2. Yields of enzyme digests from dried *C. unshiu* and *C. grandis* peels (%)

	Enzymes	*C. unshiu*	*C. grandis*
Carbohydrases	Viscozyme	51.7±1.5^{e}	57.3±1.5^{d}
	Celluclast	34.3±1.2^{b}	57.0±1.0^{d}
	AMG	41.7±0.6^{c}	44.7±1.5^{a}
	Termamyl	42.3±1.2^{c}	45.3±1.2^{a}
	Ultraflo	36.7±1.5^{b}	50.0±1.7^{c}
Proteases	Protamex	48.0±2.0^{d}	61.7±1.5^{e}
	Kojizyme	52.0±1.7^{e}	66.0±2.0^{f}
	Neutrase	41.3±1.5^{c}	52.7±1.5^{c}
	Flavourzyme	40.3±1.5^{c}	56.7±1.5^{d}
	Alcalase	40.3±1.5^{c}	52.7±1.5^{c}
Water extract		30.7±1.2^{a}	47.7±1.5^{b}

Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Total polyphenol contents of enzyme digests from dried *C. unshiu* and *C. grandis* peels (mg/100g)

	Enzymes	*C. unshiu*	*C. grandis*
Carbohydrases	Viscozyme	739.4± 4.0^{g}	621.0±13.5^{c}
	Celluclast	536.4± 8.3^{a}	584.7± 3.1^{a}
	AMG	687.2±18.0^{f}	599.6± 1.7^{abc}
	Termamyl	656.3±16.8^{e}	611.1±14.4^{bc}
	Ultraflo	762.3±13.5^{h}	660.3±16.1^{d}
Proteases	Protamex	564.3± 6.7^{b}	577.7± 7.5^{a}
	Kojizyme	580.7± 9.9^{bc}	581.2± 6.0^{a}
	Neutrase	597.6± 7.5^{c}	578.2±17.2^{a}
	Flavourzyme	655.3± 8.2^{e}	646.4±15.2^{d}
	Alcalase	661.8± 1.5^{e}	593.6±17.3^{ab}
Water extract		606.1± 3.8^{d}	586.2±11.0^{a}

Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

건조 과피인 진피를 재료로 한 반면, 이들은 생과피를 사용한데서 오는 차이로 판단된다.

3. 총 플라보노이드 함량

온주밀감 및 당유자 진피의 효소 추출물들과 물 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 4에 나타내었다. 탄수화물분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 진피 추출물들의 총 플라보노이드 함량은 각각 24.7±0.4～59.8±0.9 및 24.3±0.1～36.6±1.1 mg/100 g 범위로서 ultaflo 추출물에서 가장 높게 나타났다. 단백질분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 진피 추출물들의 총 플라보노이드 함량은 각각 18.4±0.5～30.0±0.5% 및 25.8±0.9～28.6±1.1 mg/100 g 범위로서 각각 alcalase 및 flavourzyme 추출물에서 가장 높았다. 특히 온주밀감 진피의 ultraflo 추출물은 59.8±0.9 mg/100 g으로서 가장 높은 함량을 나타내었다. 한편 온주밀감 진피의 물 추출물은 protamex를 제외하고는 효소 추출물들에 비하여 낮은 함량을 나타낸 반면, 당유자 진피의 물추출물은 termamyl과 ultraflo를 제외하고는 효소추출물들에 비하여 높은 함량을 나타내었다. Mahinda S 등(2008)은 온주밀감 부산물을 탄수화물 분해효소로 분해한 후 건조조건에 따른 총 플라보노이드 함량을 측정하여 그 함량이 35～85 mg/100 g이라 하였으며, Kim YC 등(2002)은 감귤류 숙성 중에 총 플라보노이드 함량 변화를 측정하여 진피의 총 플라보노이드 함량은 11.73～48.21 mg/g 범위이고 과육은 9.97～48.21 mg/g이며, 숙성 중에 약간 증가한다고 하였는데, 본 연구 결과 이들의 결과 Mahinda 등의 결과보다는 낮았으나 Kim 등의 결과와 어느 정도 일치하였다. Yang YT 등(2008)에 의하면 온주밀감 진피의 플라보노이드 함량은 약 345.3 mg%(rutin 13.6, naringin 241.8, hesperidin 285.2, neohesperidin 3.6, hesperidin 1.1 mg%)로서 과육(199.4 mg%)보다 약 1.7배 높고 종류도 다양하게 존재한다고 보고하였다.

Table 4. Total flavonoid contents of enzyme digests from dried *C. unshiu* and *C. grandis* peels (mg/100g)

	Enzymes	*C. unshiu*	*C. grandis*
Carbohydrases	Viscozyme	24.7±0.4^{c}	28.7±0.3^{e}
	Celluclast	35.7±1.6^{g}	26.0±0.4^{b}
	AMG	28.6±1.1^{e}	24.3±0.1^{a}
	Termamyl	26.6±0.3^{d}	32.7±0.7^{f}
	Ultraflo	59.8±0.9^{h}	36.6±1.1^{g}
Proteases	Protamex	18.4±0.5^{a}	27.0±0.3^{c}
	Kojizyme	21.4±0.7^{b}	27.4±0.5^{cd}
	Neutrase	25.4±0.5^{cd}	25.8±0.9^{b}
	Flavourzyme	28.2±0.4^{e}	28.6±1.1^{d}
	Alcalase	30.0±0.5^{f}	27.9±0.1^{d}
Water extract		22.0±0.3^{b}	29.7±0.3^{e}

Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

4. 항산화 활성

1) DPPH radical 소거활성

온주밀감 및 당유자 진피의 효소 추출물들(2 mg/mL)의 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 5에 나타내었다. DPPH 소거활성은 AMG 추출물을 제외한 모든 효소 추출물들 및 물 추출물에서 당유자 진피 추출물이 높게 나타났다. 탄수화물분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 진피 추출물들의 DPPH radical 소거활성은 각각 28.6±2.0～67.2±1.8 및 20.2±0.5～86.4±2.5% 범위로서 viscozyme 추출물에서 가장 높게 나타났으며, AMG와 ultraflo 추출물을 제외하고는 당유자 추출물들이 온주밀감보다 높을 활성을 나타내었다. 특히 당유자의 viscozyme과 celluclast 추출물들은 80% 전후의 높은 활성을 나타내었다. 단백질분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 진피 추출물들의 DPPH radical 소거활성은 각각 41.2±1.2～61.9±1.6 및 57.2±4.0～74.8±2.4% 범위로서 kojizyme 추출물에서 가장 높게 나타났다. 특히 당유자 진피 추출물들은 flavouzyme 추출물을 제외하고는 70% 전후로써 온주밀감보다 매우 높은 활성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 당유자 진피의 효소 추출물은 온주밀감 진피 추출물보다 더 효과적인 항산화능을 갖는 것으로 판단된다. 한편 Shin DB 등(2006)은 숙성된 감귤류 진피의 DPPH radical 소거활성을 측정하여 *C. unshiu*의 에탄올 추출물 10 ppm에서 2.03±1.87%, 100 ppm 15.67±2.49%라 하였다. 본 연구 결과 이들의 연구 결과와 큰 차이를 나타내었는데, 이러한 차이는 이들은 시험에 사용된 양이 낮은

Table 5. DPPH radical scavenging activities of enzyme digests and water extract from dried *C. unshiu* and *C. grandis* peels (%)

	Enzymes	*C. unshiu*	*C. grandis*
Carbohydrases	Viscozyme	67.2±1.8^{i}	86.4±2.5^{h}
	Celluclast	55.6±1.2^{g}	79.3±0.5^{g}
	AMG	28.6±2.0^{b}	20.2±0.5^{a}
	Termamyl	50.9±0.5^{f}	66.7±3.0^{d}
	Ultraflo	28.9±2.6^{b}	38.6±2.1^{b}
Proteases	Protamex	47.8±0.9^{e}	68.2±1.2^{d}
	Kojizyme	61.9±1.6^{h}	74.8±2.4^{f}
	Neutrase	44.2±1.5^{d}	70.3±0.5^{de}
	Flavourzyme	55.6±3.0^{g}	57.2±4.0^{c}
	Alcalase	41.2±1.2^{c}	73.2±2.7^{ef}
Water extract		23.4±1.2^{a}	72.2±2.4^{ef}
Vitamin C		96.0±0.6^{j}	96.0±0.6^{i}

Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 6. Hydroxyl radical scavenging activities(%) and IC_{50} (mg/mL) of methanol extracts from dried *C. unshiu* and *C. grandis* peels

Digest (mg/mL)	*C. unshiu*		*C. grandis*		Vitamin C
	Viscozyme	Kojizyme	Viscozyme	Kojizyme	
0.5	6.6±0.9[a]	9.5±0.6[b]	23.7±1.2[d]	21.7±1.0[c]	32.5±0.3[e]
1.0	38.9±1.8[b]	20.9±2.1[a]	45.7±2.2[c]	45.6±2.2[c]	63.0±0.7[d]
2.0	41.8±2.0[a]	46.7±1.1[b]	56.2±1.2[c]	48.9±2.7[b]	91.1±1.5[d]
IC_{50}	>3.0	2.12±0.09[b]	1.41±0.15[a]	2.29±0.16[c]	

Values with different superscripts within the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

반면, 본 연구에서는 이들의 사용한 양보다 많은 양을 사용한데서 오는 것이라 판단된다. 한편 Mahinda S 등(2008)은 온주밀감 부산물을 AMG로 분해한 후 건조조건에 따른 DPPH radical 소거활성을 측정하여 IC_{50}이 0.10±0.01～0.24±0.01 mg/mL라 하였으며, Kim HS 등(2007)은 여러 감귤 과육의 DPPH 소거활성을 측정하여 IC_{50}이 132.2±16.4～609.8±84.2 μg/mL라 하였는데, 본 연구에서는 농도별로 측정하지 않아서 IC_{50}을 비교할 수는 없었다.

이상의 결과(Table 4)와 Table 2의 추출수율, Table 3의 총 폴리페놀 함량 등을 종합적으로 고려하여 탄수화물분해효소인 viscozyme과 단백질분해효소인 kojizyme 추출물을 선정하여 여타의 활성산소종들에 대하여 농도별로 소거활성을 검토하였다.

2) Hydroyl radical 소거활성

온주밀감 및 당유자 진피의 효소 추출물들의 hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 6에 나타내었다. 온주밀감 및 당유자 진피의 hydroxyl radical 소거활성은 추출물의 양이 증가함에 증가하였으며, 전반적으로 당유자 진피 추출물들이 온주밀감 추출물보다 약간 높은 활성을 나타내었다. 그러나 hydroxy radical 소거활성은 당유자의 viscozyme 추출물(56.2±1.2%)을 제외하고는 50% 미만으로 매우 낮았다. 또한 모든 효소 추출물들은 다른 활성산소종들의 소거활성에 비하여 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다. 효소 추출물들의 IC_{50}은 당유자의 viscozyme, 당유자 kojizyme, 온주밀감 kojizyme, 온주밀감 viscozyme 추출물의 순서로 나타났다. 이상의 결과로부터 당유자와 온주밀감의 효소 추출물들은 다른 활성산소종 소거활성보다는 상대적으로 낮음을 알 수 있었다. Shin DB 등(2006)은 숙성된 감귤류 진피의 hydroxy radical 소거활성을 측정하여 *C. junos*의 에탄올 추출물 10 ppm에서 49.01±6.97%, 100 ppm에서 55.56±1.37%, *C. unshiu*의 에탄올 추출물 10 ppm에서 39.70±5.63%, 100 ppm에서 54.76±6.29%라 하였다. 본 연구 결과 이들의 사용한 추출물의 양보다 약 20배 더 높은 농도에서 비슷한 효과를 나타내었는데, 이러한 차이는 이들의 연구는 에탄올로 추출한 반면, 본 연구에서는 효소로 추출한데서 기인한 것으로 판단된다. 한편 Mahinda S 등(2008)은 온주밀감 부산물을 AMG로 가수분해한 후 건조조건에 따른 hydroxyl radical 소거활성을 측정하여 그 함량이 0.29±0.01～0.71±0.05 mg/mL라 하였는데, 본 연구 결과 이들의 결과보다는 매우 높은 농도에서 활성이 나타났는데, 이러한 차이는 이들의 연구는 감귤을 가공한 후 생기는 과피와 기타의 부산물들이 혼합되어 있는 시료인 반면, 본 연구에서는 진피를 사용했기 때문인 것으로 판단된다.

3) Alkyl radical 소거활성

온주밀감 및 당유자 진피의 효소 추출물들의 alkyl radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 7에 나타내었다. 온주밀감 및 당유자 진피의 alkyl radical 소거활성은 추출물의 양이 증가함에 급격히 증가하였으며, 모든 효소 추출물들은 0.25 mg/mL 이상에서 비타민 C보다도 높은 활성을 나타내었다. 특히 0.5 mg/mL 이상에서는 80% 전후의 높은 소거활성을 나타내었다. 효소 추출물들의 IC_{50}은 당유자 viscozyme, 온주밀감 kojizyme, 온주밀감 viscozyme, 당유자 kojizyme 추출물의 순서로 높았다. 이상

Table 7. Alkyl radical scavenging activities(%) and IC_{50} (mg/mL) of enzyme digests from dried *C. unshiu* and *C. grandis* peels

Digest (mg/mL)	*C. unshiu*		*C. grandis*		Vitamin C
	Viscozyme	Kojizyme	Viscozyme	Kojizyme	
0.125	28.8±1.5[a]	43.5±1.5[c]	55.8±1.3[d]	35.0±1.3[b]	52.6±0.7[e]
0.25	70.8±2.9[bc]	67.2±1.4[b]	70.6±2.4[bc]	66.3±2.1[b]	55.5±1.0[a]
0.5	83.1±2.6[b]	82.4±2.2[b]	78.8±2.5[b]	82.1±2.6[b]	66.2±1.0[a]
1.0	86.9±2.8[b]	87.6±2.4[bc]	87.8±1.8[bc]	83.0±3.3[b]	69.2±1.1[a]
IC_{50}	0.19±0.01[c]	0.16±0.01[b]	0.08±0.01[a]	0.19±0.01[c]	

Values with different superscripts within the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 8. Hydrogen peroxide scavenging activities(%) and IC_{50} (mg/mL) of enzyme digests from dried *C. unshiu* and *C. grandis* peels

Digest (mg/mL)	*C. unshiu*		*C. grandis*		Vitamin C
	Viscozyme	Kojizyme	Viscozyme	Kojizyme	
0.25	18.6±1.0[b]	16.0±0.5[a]	16.5±0.6[a]	16.2±0.8[a]	73.4±1.6[c]
0.5	30.9±0.7[c]	26.3±0.7[ab]	26.9±0.5[b]	25.7±0.4[a]	82.8±0.3[d]
1.0	44.5±0.8[d]	42.9±0.6[c]	41.0±0.9[b]	38.1±1.0[a]	91.8±0.3[e]
2.0	92.9±0.4[b]	56.5±1.8[a]	91.6±0.9[b]	91.1±1.1[b]	96.0±0.6[c]
IC_{50}	0.48±0.01[a]	0.84±0.08[c]	0.52±0.01[b]	0.53±0.02[b]	

Values with different superscripts within the same row are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

의 결과로부터 당유자와 온주밀감 진피의 항산화능이 매우 높은 것으로 판단된다. 한편 Mahinda S 등(2008)은 온주밀감 부산물을 AMG로 가수분해한 후 건조조건에 따른 alkyl radical 소거활성을 측정하여 그 함량이 0.02±0.002～0.09±0.004 mg/mL라 하였다. 본 연구 결과 이들의 결과와 큰 차이를 나타내었는데, 이러한 차이는 이들의 연구가 감귤을 가공한 후 생기는 진피와 기타의 부산물들이 혼합되어 있는 시료이며, 또한 분해효소와 추출용매 등이 서로 다르기 때문인 것으로 판단된다.

4) Hydrogen peroxide 소거활성

온주밀감 및 당유자 진피의 효소 추출물들의 hydrogen peroxide 소거활성을 측정한 결과는 Table 8에 나타내었다. 온주밀감 및 당유자 진피의 hydrogen peroxide 소거활성은 추출물의 농도가 증가됨에 따라 약간씩 증가하였으며, 1.0 mg/mL 이하에서는 50% 미만으로 낮았으나 2.0 mg/mL에서는 온주밀감 진피의 kojizyme 추출물(56.5±1.8%)을 제외하고는 91% 이상으로 매우 높았다. 효소 추출물들의 IC_{50}은 온주밀감 viscozyme, 당유자 kojizyme, 당유자 viscozyme, 온주밀감 kojizyme 추출물의 순서로 높았다. 이상의 결과로부터 당유자와 온주밀감 진피의 항산화능은 다량을 사용하였을 때 높게 나타남을 알 수 있었다. Shin DB 등(2006)은 숙성된 감귤류 진피의 hydrogen peroxide 소거활성을 측정하여 *C. unshiu*의 에탄올 추출물 10 ppm에서 13.15±5.35%, 100 ppm 23.61±3.53%라 하였다. 본 연구 결과 이들의 연구 결과와 큰 차이를 나타내었는데, 이는 이들의 연구에 사용된 추출물의 양이 적은 것은 물론 추출에 사용된 용매가 다르기 때문인 것이라 판단된다. Mahinda S 등(2008)은 온주밀감 부산물을 AMG로 분해한 후 건조조건에 따른 hydrogen peroxide 소거활성을 측정하여 IC_{50}은 0.65±0.03～0.99±0.05 mg/mL라 하였는데, 본 연구 결과 이들의 결과와 거의 일치하였다.

IV. 요 약

온주밀감 및 당유자 진피 추출물의 추출수율은 탄수화물분해효소인 viscozyme 추출물과 단백질분해효소인 kojizyme 추출물에서 높았으며, 당유자의 효소 추출물들이 온주밀감에 비하여 높게 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 탄수화물분해효소인 ultaflo와 단백질분해효소인 alcalase 및 flavourzyme에서 높았으며, 온주밀감 추출물들이 당유자에 비하여 높게 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 탄수화물분해효소인 ultaflo와 단백질분해효소인 alcalase 및 물 추출물에서 높았다. DPPH radical 소거활성은 온주밀감에 비하여 당유자의 효소 추출물에서 매우 높게 나타났으며, 탄수화물분해효소인 viscozyme과 단백질분해효소인 kojizyme에서 가장 높았다. 특히 viscozyme 추출물은 86% 이상의 매우 높은 활성을 나타내었다. Hydrogen peroxide 소거활성은 추출물의 농도가 증가됨에 따라 약간씩 증가하였으나, 2.0 mg/mL에서는 온주밀감 진피의 kojizyme 추출물을 제외하고는 91% 이상의 매우 높은 활성을 나타내었다. Alkyl radical 소거활성은 추출물의 농도가 증가됨에 따라 급격히 증가하였으며, 모든 효소 추출물들은 0.5 mg/mL 이상에서 매우 높은 활성을 나타내었다. Hydroxyl radical 소거활성은 추출물의 농도가 증가됨에 따라 급격히 증가하였으며, 모든 효소 추출물들은 다른 활성산소종들의 활성에 비하여 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다.

참고문헌

육창수. 1997. 아세아 생약도감. 도서출판 경원, 서울. p 273-274

Ahn MS, Kim HJ, Seo MS. 2007. A study on the antioxidative and antimicrobial activities of the *Citrus unshiu* peel extracts. Kor J Food Cul 22: 454-461

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. Korean J Microbiol Biotechnol 33: 288-294

AOAC. 1980. Official methods of analysis, 13th ed, Association of Official Analysis Chemists, Washington, DC, USA. Method 914-915

Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroyl-3-methylglutaryl CoA reductase and

acyl CoA: Cholesterol transferase are lower in rat fed Citrus peel extract on a mature of citrus bioflavonoids. J Mutr 129:1182-1185

Cha JY, Kim SY, Jeong SJ, Cho YS. 1999. Effects of hesperetin and naringenin on lipid concetration in orotic acid treated mice. Korean J Life Sci 9:389-394

Cha JY, Cho YS. 2001. Biofuctional activities of citrus flavonoids. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 44:122-128

Hiromato K, Johkoh H, Sako, Kikugawa K. 1993. DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride(AAPH). Free Radical Res Commu 19:323-332

Jeong WS, Park SW, Park SW, Chung SK, 1997. The antioxidative activity of Korean *Citrus Unshiu* peels. Food Biotechnol, 6:292-296

Kamiya S, Esaki S. 1971. Recent adnaces in the chemistry of the citrus flavonoids. Nippn Shokuhin Kogyo Gakkaishi 18: 38-48

Kim HJ, Bae KH, Lee HJ, Eun JB, Kim MK. 1999. Effects of hesperidin extracted from tangerine peel on Cd and lipid metabolism, and antioxidative capacity in rats. Korean Nutr Soc 32:137-149

Kim HS, Lee CW, Kim DH, Kim GO, Kim SJ, Chang IS. 2007. The study on the whitening effects and antioxidant activity of various citrus fruits. J Soc Cosmat Korea 33:69-77

Kim JH, Kim MK. 2003. Effect of different part of mandarin intake on antioxidative capacity in 15-month-old rats. Korean J Nutr 36:559-569

Kim YC, Koh KS, Koh JS. 2001. Changes of flavonoids in peel of Jeju native citrus fruits during maturation. Food Sci Biotechnol 10:483-487

Kim YC, Koh KS, Koh JS. 2002. Changes of some flavonoids in the peel of late maturing citrus during maturation. J Food Sci Nutr 7:1-4

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 38: 462-469

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. Korean J Food Preserv 14:160-164

Lee CH, Kang YJ. 1997. HPLC analysis of some flavonoids in citrus fruites. Korean J Postharv Sci Technol 4:181-187

Lee HJ, Kang GJ, Yoon WJ, Kang HK, Kim YS, Kim SM, Yoo ES. 2006. Antiinflammatory effect of unripe fruit of Citrus grandis Osbeck in RAW 264.7 and HaCat cells. Korean J Pharmacogn 37:74-80

Lee HY, Seog HM, Nam YJ, Chung DH. 1987. Physico-chemical properties of Korean mandarin (*Citrus reticula*) orange juice. Korean J Food Sci Technol 19:338-345

Lee MH, Huh D, Jo DJ, Lee GD, Yoon SR. 2007. Flavonoids compounds and fuctional properties of citrus peel hydrolysate. J Korean Soc Food Sci Nur 36(11):1358-1364

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

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

Mahinda S, Jeon YJ, Kim SH. 2008. Effect of far-infrared radiation for drying citrus by-products and their radical scavenging activities and protective effects against H_2O_2-induced DNA damage. J Food Sci Nutr 13:313-320

Müller HE. 1995. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS peroxidase medium. Zentralbl Bakterio. Mikrobio Hyg 259:151-158

Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki H, Sakai M, Hara Y. 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphnyl-2-picrylhydrazyl radical. Free Radical Biol Med 21:885-902

Rhyu MR, Kim EY, Bae IY, Park YK. 1997. Contents of neohesperidin, naringin and hesperidin in premature Korean citrus fruits. Korean J Food Sci Technol 34:132-135

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. Molec Phamacol 17:233-238

Satoru K, Yasuhiko T, Eriko K, Kazunori O, Masamichi Y. 1999. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruit. J Agric Food Chem 47:3565-3571

Shin DB, Lee DW, Yang R, Kim JA. 2006. Antioxidative properties and flavonoids contents of matured Citrus peel extracts. Food Sci Biotechnol 15:357-362

Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS. 1992. Isolation, purification and hypotensive effects of bioflavonoids in *Citrtus sinensis*. J Korean Soc Food Nutr 21:136-142

Song EY, Choi YH, Kang KH, Koh JS. 1997. Quality characteristics of citrus fruits according to the harvest date and variety. Agric Chem Biotechnol 40:416-421

Yoon CH, Jwa SM. 2006. Isolation of anti-tumor promoters from citrus peels. J Korean Soc Appl Biol Chem 49:25-29

Yang YT, Kim MS, Hyun KH, Kim YC, Koh JS. 2008. Chemical constituents and flavonoids in Citrus passed cake. Korean J Food Preserv 15:94-98

Zhuang XP, Lu YY, Yang GS. 1992. Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. Chineese Herbe Med 23:122-124

2009년 9월 30일 접수; 2010년 1월 22일 심사(수정); 2010년 1월 22일 채택