

열수추출 및 효소처리에 따른 감귤 과피 추출물의 기능성성분 수득에 대한 연구

노정은 · 윤성란 · 임애경 · 김혜정¹ · 허 담² · 김대익[†]

(재)대구테크노파크 바이오헬스융합센터, ¹경운대학교 임상병리학과, ²(주)옵니허브

A Study on the Yield of Functional Components of Citrus Peel Extracts using Optimized Hot Water Extraction and Enzymatic Hydrolysis

Jung-Eun Noh, Sung-Ran Yoon, Ae-Kyoung Lim, Hye-Jeong Kim¹, Dam Huh² and Dae-Ik Kim[†]

BioHealth Convergence Center, Daegu Technopark, Daegu, Korea

¹Department of Clinical Pathology, Kyungwoon University, Gyeongbuk, Korea

²Onmniherb Co., Ltd., Daegu, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the physicochemical properties of citrus peel extracts with different hot water extraction and enzymatic hydrolysis conditions. Enzymatic hydrolysis was also employed using Viscozyme L and results were compared with that of optimized hot water extract. Hot water extraction was performed under different parameters; the sample to solvent ratio(1:20, 1:15, 1:10), extraction time(2, 4 hrs), extraction temperature(85, 95°C) and enzymatic hydrolysis(0, 1%) and the subsequent extracts were used for determining their physicochemical properties, such as total yield, total phenolics, total flavonoids, and electron donating ability (EDA). With the increase in the sample to solvent ratio and extraction time, total yield, total phenolics, total flavonoids and EDA increased. But extraction temperature did not significantly affect the hot water extract. As hot water extract was hydrolyzed by the enzyme, total yield and active ingredients increased rapidly. In the result of total yield, total phenolics, total flavonoids and EDA, the activity of enzyme-treated extract was higher than those of enzyme-untreated extract. Based upon the overall hot water extraction efficiency, it was found that 20 times volume or 120 min at a time at 95°C after enzyme treatment was optimal.

Key words : citrus peel, enzymatic hydrolysis, hot water extraction

1. 서론

최근 산업의 발달과 소득 증가로 인한 생활수준의 향상으로 소비자들은 식품의 건강 기능성에 대한 관심이 증가되고 있다. 소비자의 높아진 건강에 대한 관심과 인식에 맞추어 새로운 건강 음료는 질병의 예방에 기초한 음료, 생수, 영양 강화 음료, 식사대용, 에너지 드링크 등의 개발이 크게 성장

하고 있다.

감귤류는 6대륙 100개국 이상에서 재배되는 전 세계적으로 가장 즐겨먹는 과일 중 하나이며 주요성분으로는 당, 유기산, 비타민 C, 카로티노이드, 펙틴 및 플라보노이드 등이 함유되어 있어 기능성 식품으로의 가능성을 인정받고 있다(Kim YD 2009). 감귤은 대부분 생과의 형태로 소비가 이루어지며, 일부는 착즙하여 주스가공으로 이용되어지고 있다. 감귤 가공 시 부산물로 과피가 많이 발생하여 그 처리가 문제점으로 대두되고 있으며, 또한 감귤 과피의 활용에 대한 필요성이 대두되고 있다(Kuhnan J 1976, Pierpoint WS 1986). 현재 우리나라에서는 폐과피의 일부가 사료 또는 한약재로 쓰이고 있기는 하나 대부분 폐기되고 있으므로 이를 활용하기 위한 연구들이 진행되고 있다(Chang HN 등 1977, Moon SJ 등 1982, Kim YK 등 1999). 감귤은 품종에 따라 다르나 과피가 대체로 과

[†]Corresponding author : Dae-Ik Kim, BioHealth Convergence center, Daegu Technopark, Daegu, Korea
Tel: +82-53-602-1885
Fax: +82-53-602-1898
E-mail: crs3814@daum.net

일 전체의 50% 정도 되는데 이중에는 essence oil, carotenoid 및 flavonoid, cellulose, pectin, limonoid 등 생리활성물질들이 높게 함유되어 있다(Rhyu MR 등 2002, Song EY 등 1998).

대부분의 플라보노이드 화합물은 배당체의 형태로 존재하며 감귤의 대표적인 배당체 형태인 naringin과 hesperidin은 이들의 aglycone 형태인 naringenin 및 hesperetin에 비해 그 활성이 낮은 것으로 알려져 있다(Cha JY와 Cho YS 2001). 따라서 감귤 배당체 형태의 플라보노이드 화합물을 aglycone 형태로 전환시키는 방법에 관한 연구가 진행되고 있는데 최근 들어 감귤 과피, 과육 전체에 다양한 종류의 당분해 효소 (cellulase, β -glucosidase, pectinase) 등을 이용하여 감귤에 함유된 배당체 형태 flavonoid 화합물들을 aglycone 형태로 전환시키는, 가수분해를 통한 유효 생리활성 성분의 추출성을 증대시킨 연구 보고가 있다(Francisco RT 등 2001, Ahn SC 등 2005).

따라서 본 연구에서는 감귤 과피의 고부가가치 이용 방안을 마련할 목적으로 감귤 과피의 기능적 특성을 고려한 추출물을 얻고자 가용성 고형분 및 유효성분 분석을 통해 유효성분의 최적 추출조건을 설정하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 시료는 건조 감귤 과피를 2011년 7월 경북생약농업협동조합에서 유기농 재배한 것으로 구매하여 식품용 PVC 용기에 밀봉하여 -20℃ 냉동고에 보관하였으며, 실험 시 실험실용 blender(J-NCM, Jisico, Korea)를 이용하여 분쇄한 후 표준체 No. 10(10 mesh)을 통과시킨 것을 사용하였다.

2. 추출방법 및 가수분해

마쇄한 감귤 과피를 가지고 열수추출 방법을 사용하여 추출시간, 열수첨가량 및 추출온도에 따른 감귤 과피의 유용성분 함량의 변화를 살펴보았다. 추출시간은 2, 4 시간의 수욕상에서 실시하였으며 감귤 과피에 대한 물의 비율을 1:10, 1:15 및 1:20으로 변화시키면서 추출한 후 유용성분의 함량을 비교하여 선정하였다. 선정된 추출시간 및 시료에 대한 열수비를 고정하여 추출온도를 85, 95℃로 하여 추출한 후 유용성분 함량을 분석하였으며, 가수분해(Viscozyme L, 1%)한 감귤 과피 추출물과 비교분석하였다. 가수분해를 위하여 사용된 효소는 상업적으로 판매되고 있는 Viscozyme L(Novo Nordisk Co., Denmark)을 사용하였다.

3. 가용성 고형분 함량 측정

열수 추출한 감귤 과피 추출물의 가용성 고형분 함량을 측

정하기 위하여 항량을 구한 수기에 추출물 10 mL을 취하여 105℃에서 증발 건조시켜 그 무게를 측정하였으며, 추출액 조제에 사용된 원료량(건물량)에 대한 백분율로서 가용성 고형분 함량(%)을 구하였다(Kwon JH 등 2003a).

4. 총 페놀성 화합물 함량 측정

감귤 과피 추출물의 총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Denis 법(Kwon JH 등 2003b)에 따라 비색정량 하였다. 즉 감귤 과피 추출물을 10배 희석한 검액 1 mL에 2배 희석한 Folin-Ciocalteu 시약 1 mL를 가하여 혼합하고 3분 후 10% Na₂CO₃ 1 mL를 넣어 진탕하였다. 시험액을 실온에서 1시간 방치하여 발색 시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, tannic acid를 표준물질로 하여 검량곡선에 의해 정량하였다.

5. 총 플라보노이드 함량 측정

각 추출물의 총 플라보노이드 함량은 10배 희석한 추출물 1 mL에 90% diehtylene glycol 10 mL, 1N NaOH 1 mL를 가하여 혼합하고 30℃에서 60분간 방치 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다(Hong JJ와 Ahn TH 2005). 대조구는 증류수를 넣어 동일하게 처리하였으며, naringin을 표준물질로 하여 검량곡선 작성에 사용하였다.

6. 전자공여능 측정

각 추출물의 전자공여능(electron donating ability, EDA) 시험은 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH)를 사용한 방법(Blios MS 1958)으로 측정하였다. 즉, DPPH 시약 12 mg을 absolute ethanol 100 mL에 용해한 후 증류수 100 mL를 가하고 50% ethanol 용액을 blank로 하여 517 nm에서 흡광도를 약 1.0으로 조정된 후 이 용액 5 mL를 취하여 추출물 1 mL와 혼합한 후 상온에서 30초간 방치시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이 백분율(%)로 표시하여 전자공여능으로 하였다.

$$EDA(\%) = [1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{공시험의 흡광도})] \times 100$$

7. 플라보노이드 함량 분석

플라보노이드의 함량을 측정하기 위하여 HPLC(Waters 2796, Waters Co., USA) 분석조건으로는 칼럼은 xBridge™ 5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm(Waters Co., USA), 유속 1.0 mL/min, 이동상으로는 A와 B 용매를 이용하여 용리구배로 용리하였다. A용매로 1% formic acid을, B 용매로 acetonitrile을 사용하였으며 용리구배 조건은 다음과 같다(0-2 min, 100% A; 0% B; 2-10 min, 80% A; 20% B; 10-15 min, 50% A; 50%

Table 1. Effect of sample to solvent ratio and extraction time on total yield, total phenolics, total flavonoids and electron donating ability of citrus peel extract

Sample to solvent ratio	Extraction time (hrs)	Total yield (%)	Total phenolics (mg/g)	Total flavonoids (mg/g)	Electron donating ability (%)
1:20	2	4.36±0.02 ^{b1)}	35.28±0.24 ^a	16.14±0.36 ^b	72.83±0.34 ^a
	4	4.63±0.04 ^a	35.72±0.14 ^a	16.63±0.39 ^a	72.25±0.38 ^b
1:15	2	2.98±0.08 ^d	35.16±0.33 ^a	11.83±0.22 ^d	72.12±0.14 ^{bc}
	4	3.10±0.07 ^c	35.24±0.18 ^a	12.79±0.17 ^c	72.03±0.31 ^{bc}
1:10	2	2.24±0.06 ^f	29.57±0.53 ^b	9.43±0.09 ^f	71.65±0.40 ^{cd}
	4	2.43±0.08 ^e	29.74±0.36 ^b	10.37±0.08 ^e	71.44±0.26 ^d

¹⁾Values are mean S.D. of triplicate measurements and within each column followed by the same letters are not significantly different.

B; 15-20 min, 30% A: 70% B; 20-30 min, 0% A: 100% B; 30-40 min, 100% A: 0% B). 그리고 검출은 UV 검출기를 사용하였고 280 nm의 고정된 파장에서 수행하였다. 플라보노이드의 표준시료는 naringin(Sigma Co., USA), naringenin(Sigma Co., USA), hesperidin(Sigma Co., USA), hesperetin(Sigma Co., USA)을 구입하여 분석하였다(Cho SO 등 2004).

8. 결과분석

각 조건에서의 추출실험과 추출물의 분석은 3회 반복으로 측정하여 평균과 표준편차로 나타내었으며, Duncan's multiple range test(SAS 1994)를 실시하여 시료간 값의 유의차를 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 용매비 및 추출시간에 따른 추출 효율

감귤 과피의 유용성분의 효과적인 추출을 위하여 시료에 대한 용매비의 영향을 검토해 보았다. 추출 용매량은 목적성분을 충분히 용해할 수 있을 뿐 아니라 최소량으로 추출효율을 높이기 위하여 용매비에 따른 감귤 과피 추출물의 유효성분의 변화를 조사한 결과 Table 1과 같다. 가용성 고형분 함량은 1:10이었을 때 2.24%였으나, 1:15 및 1:20까지 증가함에 따라 2.98%, 4.36%로 증가하였으며, 1:10에 비해 1:20에서의 추출수율이 2배가량 증가하는 것으로 나타났다. 추출물의 총 페놀성 화합물 함량 또한 가용성 고형분 함량과 같이 1:10에 비해 1:20에서 가장 높은 값을 나타내었으며, 총 플라보노이드 함량 역시 1:20에서 가장 높은 값을 보였으나 유의적인 차이는 크게 나타나지 않았다. 전자공여능에 있어서도 시료에 대한 용매비 1:10에서 71.65%, 1:20에서 72.83%로 나타났으며 다른 유효성분과 유사한 결과를 나타내었다.

열수추출을 이용한 감귤 과피 유용성분의 추출실험에서 추출시간에 따른 추출특성을 비교한 결과 추출시간이 길어질수록 높은 수율을 보여주었으며 총 페놀성 화합물 함량 및 총 플라보노이드 함량에 있어서는 추출시간이 길어질수록 다소 높은 값을 보였으나 그 영향은 크지 않은 것으로 나타났다. 한편 추출물의 전자공여능에 있어서는 추출시간과의 상관관계가 거의 없는 것으로 나타났다. 이 같은 경향은 반응표면 분석을 이용한 송이버섯 열수추출(Kang BH 등 2010)과 진피 열수추출물(Min SH 등 2002) 등의 연구와 유사한 경향을 나타내는 것으로 시료에 대한 용매비가 증가할수록 유용성분의 함량도 증가하는 것으로 나타났으며 또한 추출시간이 증가할수록 유용성분의 함량도 증가하였으나 용매비에 비해 그 영향이 크지 않은 것으로 나타났다.

2. 추출온도에 대한 추출효율

감귤 과피의 열수추출물의 추출공정에서 추출온도에 따른 추출효율을 확인하기 위해서 시료에 대한 용매비를 1:20으로 고정하고 추출시간을 2시간으로 하고, 추출온도는 열수 추출로 많이 사용되어 지는 85℃ 및 95℃로 추출하여 비교하였다. 추출 온도에 따른 추출효율을 비교한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 가용성 고형분 함량은 추출온도 85℃일 때 3.96% 및 95℃일 때 4.02%로 나타났으나, 통계적으로 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 또한 총 페놀성 화합물 함량 및 총 플라보노이드 함량에서도 차이가 없는 것으로 나타났다. 이에 따른 전자공여능에서도 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 녹차 침출조건 예측(Chang MJ 등 2006)과 유사한 경향으로 용매비 및 추출시간에 비해 추출온도에 따른 고형분 및 유효성분 함량에 그다지 크지 않은 것으로 나타났다.

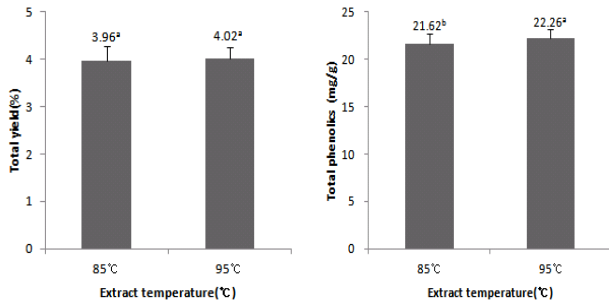


Fig. 1. Effect of temperature(85, 95°C) on total yield(left) and total phenolics(right) of citrus peel hot water extract.

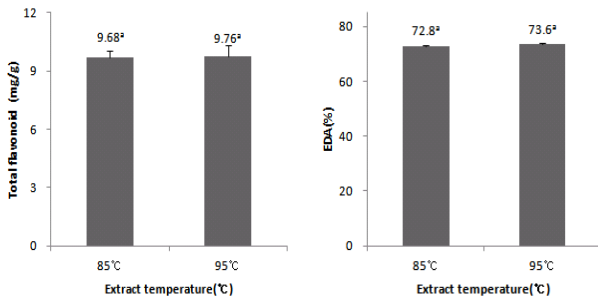


Fig. 2. Effect of temperature(85, 95°C) on total flavonoids(left) and electron donating ability(right) of citrus peel hot water extract.

3. 감귤 과피의 효소처리에 따른 추출효율

감귤 과피 부분은 분해하기 어려운 pectin, cellulose, hemicellulose, β -1,4-glucan 등과 같은 성분들로 구성되어 있으며, 대부분의 생리활성을 나타내는 물질들은 이들 내부에 존재한다(Lee MH 등 2007). 당분해 효소처리에 따른 감귤 과피의 가용성 고형분 함량 측정 결과는 Fig. 3과 같으며 일반 열수추출의 경우 3.84%였으나 효소처리 후 열수추출 한 경우는 5.14%로 나타나, 열수처리 전 효소처리를 하는 것이 가용성 고형분 함량이 높은 것으로 나타났다(Fig. 3). 총 페놀성 화합물 함량은 효소처리 유무에 따라 효소처리 후 열수추출할 경우에 45.51 mg/g로 높게 나타남을 볼 수 있었다(Fig. 3). 또한 총 플라보노이드 함량에서는 효소처리 후 열수추출한 감귤 과피 추출물이 12.74 mg/g으로 높은 것을 볼 수 있었으며(Fig. 4), 이러한 총 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드가 높게 추출되어진 효소처리 후 열수추출한 감귤 과피의 추출물에서 전자공여능이 높게 나타남을 볼 수 있었다(Fig. 4). 효소처리에 따른 플라보노이드 함량에서는 Table 2와 같이 열수추출만 한 감귤 과피 추출물에서는 hesperidin만 검출되었으나, 효소처리 후 열수추출한 감귤 과피 추출물에서는 naringenin 및 hesperetin이 검출되었는데, 이것은 Lee MH 등 (2007)의 논문에서와 같이 비처리구에서는 hesperidin만이 검

출되었으며 효소 처리함에 따라 hesperidin은 감소하는 반면에 naringenin 및 hesperetin 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 본 연구에서도 효소처리에 따라 flavonoid 배당체가 aglycone의 형태로 전환되는 것을 알 수 있었다. Cha JY와 Cho YS(2001)의 연구에서는 aglycone 플라보노이드인 hesperetin 및 naringenin이 기능적 특성에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서도 효소처리 후 열수추출로 인하여 기능적 성분들이 다량 추출되어지는 것도 있지만 플라보노이드의 경우 aglycone 형태의 플라보노이드로 전환됨에 따라 기능적 특성에 영향을 주는 것으로 사료된다.

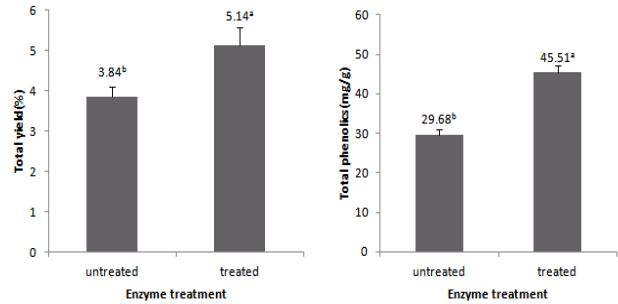


Fig. 3. Effect of enzyme treatment on total yield and total phenolics of citrus peel hot water extract.

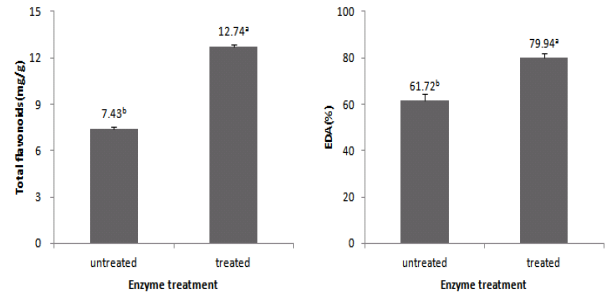


Fig. 4. Effect of enzyme treatment on total flavonoids and electron donating ability of citrus peel hot water extract.

Table 2. Effect of enzyme treatment on flavonoids content from enzyme-untreated and enzyme-treated citrus peel extract

Enzyme treatment	Flavonoids(μ g/g)			
	Naringin	hesperidin	naringenin	hesperetin
Untreated	- ¹⁾	393.60 \pm 1.36	-	-
Treated	-	-	628.63 \pm 2.09	387.47 \pm 1.75

¹⁾ Not detected.

IV. 결론

감귤 과피 유용성분을 효과적으로 추출하고자 열수 추출시 고려되는 인자는 용매비, 추출시간 및 추출온도, 효소처리여부에 따른 기능성분의 추출특성을 평가하였다. 이 때 추출조건의 설정을 위하여 시료에 대한 용매비(1:10, 1:15, 1:20), 추출시간(2, 4 hr), 추출온도(85, 95°C), 효소처리 여부로 구분하여 추출하였으며, 추출물의 총 수율, 총 페놀성 화합물 함량, 총 플라보노이드 함량, 전자공여능 등의 항산화 성분을 측정하여 추출효율을 알아보았다. 시료에 대한 용매비에서는 용매비가 높을수록 추출 효율이 높은 것으로 나타났으며, 추출시간에 있어서도 추출시간이 길어질수록 추출효율이 좋은 것으로 나타났다. 추출온도에 따라서는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 효소 처리여부에 따른 추출효율에 있어서는 효소 처리한 감귤과피 열수추출물이 가용성 고형분 및 항산화성분의 함량이 현저히 증가되는 결과를 나타내었다. 전반적인 추출효율을 고려한다면 감귤 과피 유용성분의 추출은 시료에 대한 용매비 1:20, 효소처리후 추출온도 95°C 및 추출시간 2시간으로 추출하는 것이 적합한 것으로 나타났다.

참고문헌

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* 33:288-29

Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 4617:1198-1199

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

Chang HN, Nam KE, Hur JW. 1977. Studies on the utilization of Korean citrus peel waste ;2. Contents of pectin, hesperidin and naringin. *Korean J. Food Sci Technol* 9:251-254

Chang MJ, Ha HJ, Yoon SR, Noh JE, Kwon JH. 2006. Prediction of optimal leaching conditions for green tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35(6):747-753

Cho SO, Hong SP, Choi HY, Choi HS, Lee JH. 2004. Determination methods of *Citrus unshiu* percarpium by HPLC. *Korean J Herbology* 19(4):61-66

Francisco RT, Isabel PA, Augustin LM. 2001. Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. *J Agric Food Chem* 49:5207-5209

Hong JJ, Ahn TH. 2005. Changes in total flavonoid and total polyphenol contents of leafy vegetables (spinach, chard and

whorled mallow) by blanching time. *Korean J Food Cookery Sci* 21:190-194

Kang BH, Lee JM, Kim YK. 2010. Optimization of hot water extraction conditions for *Tricholoma matsutake* by response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39(8):1206-1212

Kim YD. 2009. Study on the composition of flavonoids and biological activities from Jeju citrus fruits. Jeju National University of Korea. pp 6-57

Kim YK, Hyun SW, Ko YH. 1999. Analysis of essential oils from the peel of mandarine (*Citrus unshiu* Marc.var.Okitsu). *Korean J Food Sci Technol* 31:1178-1183

Kuhnan J. 1976. In the flavonoids: A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24:117-191

Kwon JH, Belanger JMR, Pare JRJ, Yaylayan VA. 2003. Application of microwave-assisted process (MAP) to the fast extraction of ginseng saponins. *Food Res Int* 36:491-498

Kwon JH, Belanger JMR, Pare JRJ. 2003. Optimization of microwave-assisted extraction (MAP) for ginseng components by response surface methodology. *J Agric Food Chem* 51:1807-1810

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

Min SH, Park HO, Oh HS. 2002. A study on the properties of hot water extracts of Korean dried tangerine peel and development of beverage by using it. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 18(1):51-56

Moon SJ, Sohn KH, Lee MH, Lee MH. 1982. The content and chemical and physical properties of the pectin in tangerine peel. *Korean J Food Sci Technol* 14:63-66

Pierpoint WS. 1986. Flavonoids in the human diet. In plant flavonoids in biology and medicine, biochemical, pharmacological and structure-activity relationship. Liss, Alan R, New York, USA. pp 125-140

Rhyu MR, Kim EY, Bae Y, Park YK. 2002. Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits. *Korean J Food Sci Technol* 34:132-135

SAS. 1994. User's guide version 6. 4th ed. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA

Song EY, Choi YH, Kang KH, Koh JS. 1998. Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of Cheju citrus fruits according to harvest date. *Korean J Food Sci Technol* 30:306-312