

가공용 감귤 신품종 하밀감 과피 추출물의 항산화 활성

안현주*[†] · 박경진* · 김상숙* · 현주미* · 박재호* · 박석만* · 윤수현**

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤시험장, **농촌진흥청 국립원예특작과학원 기획조정과

Antioxidative Activities of New Citrus Hybrid ‘Hamilgam’ Peel Extracts

Hyun Joo An*[†], Kyung Jin Park*, Sang Suk Kim*, Ju Mi Hyun*,
Jae Ho Park*, Suk Man Park* and Su Hyun Yun**

*Citrus Research Station, NIHHS, RDA, Jeju 699-943, Korea.

**Planning and Coordination Division, NIHHS, RDA, Suwon 440-706, Korea.

ABSTRACT : The major objective of this study was to investigate the usability as cultivar for processing of new *Citrus* hybrid ‘Hamilgam’. We investigated various antioxidant activities, such as DPPH radical, ABTS radical, Hydroxyl radical and Superoxide anion radical effect, along with total polyphenol content and total flavonoid content of *Citrus* hybrid ‘Hamilgam’, *C. unshiu*, *C. natsudaidai*. The total polyphenol content and total flavonoid content were the highest in the Hamilgam. The major flavonoids of Hamilgam and Natsudaidai were naringin and neohesperidin, and those of Unshu were narirutin and hesperidin, as determined by HPLC. Especially, the neohesperidin content of Hamilgam showed much higher (100 times over) than that of Unshu. However, the aglycone form was not found. DPPH and ABTS radical scavenging activities were the highest in Hamilgam peels. Hydroxyl radical scavenging activity was high in the order of Unshu, Hamilgam and Natsudaidai. Superoxide anion radical scavenging of 3 cultivars peels displayed low activities compared to DPPH and ABTS radical scavenging. Based on these results, Hamilgam peel extracts possess antioxidant activities and may thus serve as potential sources of functional food, cosmetic products, etc.

Key Words : Citrus, Hamilgam, Polyphenol, Antioxidant Activities, Functional Food

서 언

우리나라에서 재배되는 감귤류는 전체 과수 생산량 중 27.7%를 차지하고 있으며, 이들 감귤 생산량 중 80%는 생식용으로, 10~20%는 가공용으로 소비되고 있다. 생산 증가에 비하여 소비는 그에 미치지 못하고 대부분 생과 소비에 그치고 있으며 소득성이 낮아지면서 부가가치를 높일 수 있는 가공식품 개발이나 기능성 식품으로서의 가치를 개발하는 데 관심이 높아지고 있다.

감귤류는 가공 공정 시 과실의 과육을 이용하는 것과 더불어 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있는 과피를 이용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 감귤 품종에 따라 다르나 과피는 대체로 과일 전체의 50% 정도 되는데 다양한 phenolic 화합

물 및 flavonoid 등을 함유하고 있다. Flavonoid의 기능성 효과로는 항산화 작용, 순환기계 질환의 예방 및 개선효과, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 지질저하작용, 면역증강 작용, 모세혈관 강화작용 등 다양한 생리적 활성이 보고되고 있다 (Ahn *et al.*, 2007; Benavente-Garcia and Castillo, 2008; Frassinetti *et al.*, 2011; Balestrier *et al.*, 2011). 이러한 생리활성에 관여하는 기능성 성분들은 감귤 수확시기, 품종의 특성 및 감귤 부위에 따라 변화가 많으므로 필요한 성분이 최대로 함유된 품종과 생산시기 및 부위를 선정할 필요가 있다. 특히 감귤 과피에는 phenolic compound가 높은 농도로 존재하기 때문에 flavonoids의 풍부한 공급원이 된다 (Song *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2006). 이러한 특성을 이용하여 감귤 과피로부터 추출한 플라보노이드 성분을 활용한 비만개선음

[†]Corresponding author: (Phone) +82-64-730-4107 (E-mail) hjan67@korea.kr

Received 2014 October 14 / 1st Revised 2014 October 30 / 2nd Revised 2014 November 18 / 3rd Revised 2014 December 4 / Accepted 2014 December 5

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

료, 기능성 코팅쌀 등의 기능성 가공품이 개발되었고, 감귤박을 이용한 가축 사료, 감귤박 활성탄, 버섯배지 등에 감귤 부산물이 활용되고 있다.

감귤류의 항산화 활성에 대한 연구는 주로 온주밀감과 하귤에 대한 것이 대부분이며 (Hyon *et al.*, 2010), 그 외 재배품종으로는 세토카, 청견, 부지화 (Hwang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013), 제주재래종 감귤에 대한 연구로는 당유자, 사두감, 홍귤, 동정귤, 지각, 진귤, 빈귤, 인창귤 등에 관한 보고가 있으나 (Kim *et al.*, 2009a, 2009b), 국내에서 육성된 신품종에 대한 연구 결과는 전무한 상황이다. 본 연구에 사용된 온주밀감은 제주도에서 생산하는 감귤의 90%를 차지하고 있는 대표적인 품종으로 생과용뿐만 아니라 가공용으로 소비되고 있고, 하귤은 4월 이후에 성숙하는 감귤로 기능성 품종으로 주목받고 있으나 씨가 많은 특성이 있어 가공적성 측면에서의 경제적 재배가 어렵다. 하밀감은 감귤의 기능성 성분의 산업화를 위한 원료 품종 개발을 위해 1992년 감귤시험장에서 청도온주와 하귤을 교배하여 육성한 품종으로 성숙기가 3월이며 씨가 없고 껍질두께가 온주밀감보다 두껍고 신맛과 쓴맛이 상당히 오래가는 특성이 있다.

따라서 기능성 성분이 강화된 가공용 감귤 신품종 하밀감의 과피 추출물을 대상으로 건강 기능성 식품, 천연 항산화제, 기능성 향장품 등 다양한 가공품 개발 소재로서의 활용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고, 그 이용성을 증대시키고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 감귤 품종은 온주밀감 (*Citrus unshiu*), 하귤 (*C. natsudaidai*), 하밀감 (*C. unshiu* × *C. natsudaidai*)으로 온주밀감과 하귤은 제주도 서귀포 감귤시험장 포장에서 과실을 채취하였고, 하밀감은 제주도 제주시 농가에 식재된 나무에서 수확하였다. 수확 시기는 2012년 11월부터 2013년 2월까지 각 품종별로 완숙된 과실을 수확하였다. 수확한 과실을 선별 및 세척 후 과피와 과육을 분리하고, 과피는 60°C 건조기에서 12~48시간 건조시킨 후 분쇄하여 사용하였다. 과육은 압착기를 이용하여 착즙한 후 사용하였으며 모든 시료는 냉동 보관하였다.

2. 과피 추출물의 제조

각 품종별 과피 추출물은 건조 과피 2g에 70% 메탄올 40 mL를 가하여 초음파 추출기로 1시간 동안 추출하였다. 상층액을 0.45 µm syringe filter로 여과한 후 감압 농축하고 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

3. 유리당 및 유기산 함량 분석

유리당과 유기산 분석은 Dionex Application Note 82법 (Dionex, 1992)을 이용하여 착즙한 과즙을 0.45 µm filter로 여과 후, 1,000배 희석하여 Ion chromatography (ICS3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)로 분석하였다. 유리당은 CarboPac™ PA1 column과 INT Amperometry detector로 분석하였으며, 이동상 용매는 100 mM NaOH (Merck, Darmstadt, Germany)으로 표준 용액은 glucose, fructose, sucrose (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하였다. 유기산은 IonPac® ICE-AS6 column과 conductivity detector로 분석하였으며, 이동상 용매는 0.4 mM Heptafluorobutric (Merck, Darmstadt, Germany)으로, 표준 용액은 oxalic acid, malic acid, citric acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

4. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법 (Gutfinger, 1981)을 이용하여 비색 정량하였다. 추출물 100 µL에 증류수 900 µL를 넣어 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-ciocalteus' phenol reagent 100 µL를 첨가하여 실온에서 약 3분간 반응시키고, Na₂CO₃ 용액 (7%, w/v) 200 µL를 가하여 혼합한 후 증류수 700 µL를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. UV-Spectrophotometer (Molecular devices, SpectraMax M2, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 720 nm에서 흡광도 측정을 통해 분석되었으며, 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 작성한 표준검정곡선을 통해 추출물의 총 폴리페놀 함량을 나타내었다.

5. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법 (Moreno *et al.*, 2000)을 이용하여 비색 정량하였다. 추출물 15 µL에 diethylene glycol 150 µL, 1N NaOH 15 µL를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 1시간 반응시키고 UV-Spectrophotometer (Molecular devices, SpectraMax M2, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 하여 작성한 표준검정곡선을 통해 추출물의 총 플라보노이드 함량을 나타내었다.

6. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석

과피 추출물의 성분분석은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 통해 확인하였으며 (Park *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014), 모든 시약은 HPLC grade를 사용하였다. 이동상 용매인 acetonitrile과

acetic acid는 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 분석에 사용된 표준물질은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. HPLC 분석은 Waters 2489 UV visible detector, Waters e2695 Separations module (Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였으며, 분석 column은 YMC Pro C₁₈ RS (250 × 4.6 mm; YMC Co., Kyoto, Japan)을 사용하였다. Column 온도는 40°C, 유속은 1 mL/min으로 유지하였고 UV 280 nm에서 검출하였으며, 이동상 용매는 0.1% acetic acid를 포함하는 증류수 (A)와 acetonitrile (B)를 이용하였다. 이동상 용매 조건은 초기 20% B로 시작하여, 0~5 min 10~25% B, 5~30 min 25~40% B, 30~35 min 40~100% B, 35~43 min 100~10% B로 유지하는 조건으로 분석하였다. 분석 S/W는 Waters의 Empower system을 사용하였다.

7. DPPH free radical 소거활성 측정

항산화 활성은 변형된 Blois 등의 방법 (Blois *et al.*, 1958)을 이용하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical에 대한 전자공여능 (Electron donating ability, EDA)을 측정하였다. 추출물의 전자공여능 측정을 위해, 시료 20 µL에 0.2 mM DPPH 용액 180 µL를 넣고 10분간 반응시킨 후 UV-Spectrophotometer를 사용하여 잔존하는 DPPH free radical을 517 nm에서 측정하였다. DPPH radical을 50% 소거하는 시료의 농도 (IC₅₀)를 확인하였으며, 대조군으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = 1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

A_{control}: DPPH 용액의 흡광도

A_{sample}: DPPH 용액과 시료 반응액의 흡광도

A_{blank}: 시료 자체의 흡광도

8. ABTS radical 소거활성 측정

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거활성은 Pellegrini 등의 방법 (Pellegrini *et al.*, 1999)에 따라 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합 후 실온 암소에서 15시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02가 되도록 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 180 µL에 추출물 20 µL를 가하여 실온에서 15분 동안 방치한 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

9. Hydroxyl radical 소거활성 측정

Hydroxyl radical 소거활성은 Halliwell 등의 방법 (Halliwell

et al., 1987)에 따라 측정하였다. 희석한 시료 50 µL에 2.5 mM 2-deoxy-D-ribose를 함유한 10 mM PBS 용액 345 µL를 혼합한 다음, 1 mM FeCl₃와 1.04 mM EDTA 용액 50 µL, 1 mM ascorbate 50 µL 및 0.1M H₂O₂ 5 µL를 각각 첨가하였다. 37°C에서 10분간 배양한 후, 2.8% trichloroacetic acid 500 µL와 1% 2-thiobarbituric acid 250 µL를 첨가하고 95°C에서 8분간 가열하였다. 반응물을 냉각시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, hydroxyl radical 소거활성은 [(흡광도_{시료무첨가}-흡광도_{시료})/흡광도_{시료무첨가}] × 100 공식으로 계산하였다.

10. Superoxide anion radical 소거활성 측정

Superoxide anion radical 소거활성 측정은 Liu 등의 방법 (Liu *et al.*, 1997)에 따라 측정하였다. 희석한 시료 20 µL에 0.5 mM nitro blue tetrazolium (NBT) 20 µL와 0.5 mM β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 40 µL, 30 mM Tris-HCl 용액 (pH 8.0) 100 µL를 혼합한 다음 0.12 mM phenazine methosulfate (PMS) 20 µL를 각각 첨가하였다. 즉, 비효소적으로 PMS/NADH로 유발된 superoxide radical은 NBT를 자주색의 formazan으로 환원시키며, 생성된 formazan을 측정하기 위해 560 nm에서 10분 동안 반응물의 흡광도를 측정하였다. 시료의 superoxide radical 소거활성은 [(흡광도_{시료무첨가}-흡광도_{시료}) / 흡광도_{시료무첨가}] × 100 공식으로 계산하였다.

11. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복하여 이루어졌으며, 실험결과는 SAS package (version 9.2, Cary, NC, USA)를 사용하여 평균과 표준편차를 구하고, 분산분석 (ANOVA)을 실시하여 유의적 차이가 있는 항목은 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)에 의하여 *p* < 0.05 수준에서 통계적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 유리당 및 유기산 함량 분석

가공용 품종인 하밀감을 포함한 온주밀감, 하귤의 유리당 및 유기산 함량을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 하밀감 품종에서는 glucose 1.04%, fructose 1.12%, sucrose 2.47%를 함유하고 있었고, 온주밀감은 glucose 1.22%, fructose 1.47%, sucrose 5.19%, 하귤의 경우는 glucose 1.19%, fructose 1.25%, sucrose 4.56%를 함유하고 있었다. 유리당의 경우 세 품종 모두 sucrose가 다른 성분에 비해 비교적 많이 함유되어 있었으며, 하밀감과 나머지 두 품종간의 통계적 유의차 (*p* < 0.05)가 있음을 알 수 있었다. 유기산의 경우 온주밀감을 제외한 하밀감과 하귤에서 citric acid의 함량이 비교적 높고 다음으로 malic

Table 1. Free sugars and organic acid content of citrus cultivars.

Cultivar	Free sugar conc.				Organic acid conc.			
	Total	Glucose	Fructose	Sucrose	Total	Oxalic acid	Citric acid	Malic acid
Unshu	7.88 ± 0.67a	1.22 ± 0.16a	1.47 ± 0.14a	5.19 ± 0.44a	0.64 ± 0.02b	0.06 ± 0.01a	0.53 ± 0.02b	0.05 ± 0.01b*
Natsudaikai	6.99 ± 1.64a	1.19 ± 0.1a	1.25 ± 0.17ab	4.56 ± 1.39a	2.76 ± 0.2a	0.04 ± 0.01b	2.59 ± 0.19a	0.13 ± 0.01a
Hamilgam	4.64 ± 0.17b	1.04 ± 0.04a	1.12 ± 0.1b	2.47 ± 0.22b	3.04 ± 0.32a	0.03 ± 0.01b	2.87 ± 0.3a	0.13 ± 0.03a

*Each value is expressed as mean ± SD (n = 3). Values followed by the same letter are not significantly different (p < 0.05).

Table 2. Total polyphenol and total flavonoid contents of methanol extract from citrus peels.

Cultivar	Total polyphenol (mg/g GAE**)	Total flavonoid (mg/g QE)
Unshu	250.6 ± 2.3c	43.3 ± 1.3c*
Natsudaikai	291.0 ± 4.6b	47.7 ± 0.2b
Hamilgam	312.8 ± 4.6a	50.1 ± 0.1a

*Each value is expressed as mean ± SD (n = 3). Values followed by the same letter are not significantly different (p < 0.05).

**GAE; gallic acid equivalent, QE; quercetin equivalent.

acid의 함량이 높았다. 온주밀감과 하귤의 교배에 의해 육성된 하밀감은 두 교배모본 품종에 비해 유리당의 함량은 낮은 반면 유기산의 함량이 높은 특성을 보였다.

2. 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정

Citrus류의 과피나 종자에는 페놀산과 flavonoids와 같은 페놀화합물들이 많이 함유되어 있으며, 종자나 과육보다 과피에 더 많이 함유되어 있음이 보고되었다 (Kim *et al.*, 2006; Yusof *et al.*, 1990). 대부분의 식물체에 존재하는 페놀성 화합물들은 분자 내에 phenolic hydroxyl기를 가지고 있는 방향족 화합물로서 플라보노이드는 페놀성 화합물 중에서 자연적으로 생성되는 가장 큰 그룹 중의 하나이다 (Chung and Jeon, 2011). 이들은 수산기를 통한 수소공여와 페놀 고리구조의 공명 안정화 (Shahidi and Wanasundara, 1992), 단백질 및 거대 분자들과 결합하는 성질에 따른 reducing agent, singlet oxygen quencher, hydrogen donor로 작용함으로써 항산화 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Kwak *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008a; Kang *et al.*, 2002).

각 품종별 메탄올 과피 추출물의 추출수율은 온주밀감 13.9%, 하귤 22.2%, 하밀감 16.3%였다. 각 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 총 폴리페놀 함량은 하밀감이 312.8 mg/g으로 가장 높았으며 하귤 291.0 mg/g, 온주밀감 250.6 mg/g 순으로 높았다. 이러한 하밀감의 총 폴리페놀 함량은 아보카도 과피 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량 223.45 µg/mg (Lee *et al.*, 2008b), 오이 장죽청장 품종 추출물의 함량 105.1 µg/mL (Yang and Boo, 2013) 보다 월등히 높음을 알 수 있었다. 총 플라보노이드 함량에서도 하밀감 50.1 mg/g, 하귤 47.7 mg/g, 온주밀감 43.3 mg/g 순으로 높았다. 총 페놀 함량뿐만 아니라 총 플라보노이드 함량에 있어서도 하밀감이 두 모본 품종에 비해 더 많은 것으로 나타났으나, 총 페놀 함량에 대한 총 플라보노이드가 차지하는 비율은 하밀감 16.0%, 온주밀감 16.4%, 하귤 17.3%로 각 품종의 총 페놀에 대한 총 플라보노이드 함량은 거의 비슷하게 나타났다.

3. DPPH free radical 소거활성 측정

항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 DPPH radical 소거활성은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 항산화 측정법이다. DPPH는 radical 중 비교적 안정한 화합물로 에탄올 용액에서 보라색으로 발색된다. 황 함유 아미노산, ascorbic acid, 페놀성 화합물 등의 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 DPPH-H로 환원되면서 짙은 보라색이 노란색으로 탈색되며 흡광도가 감소된다 (Park and Kim, 2013). 하밀감, 온주밀감 및 하귤 과피 추출물의 DPPH radical 소거능을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 3 품종 모두 농도 의존적으로 소거능이 증가하였으며, 하밀감, 하귤, 온주

Table 3. DPPH radical scavenging activity (%) of methanol extract from citrus peels.

Cultivar	Extracts (µg/mL)				IC ₅₀ (µg/mL)
	62.5	125	250	500	
Unshu	20.7 ± 0.9b	29.2 ± 1.4b	44.3 ± 2.1c	69.1 ± 3.4b*	292
Natsudaikai	22.9 ± 1.6ab	32.8 ± 2.1b	50.2 ± 2.9b	69.5 ± 3.8b	254
Hamilgam	25.5 ± 1.5a	37.7 ± 1.7a	57.8 ± 3.1a	88.7 ± 4.6a	189

*Each value is expressed as mean ± SD (n = 3). Values followed by the same letter are not significantly different (p < 0.05).

밀감 순으로 높은 소거활성을 보였다. 가장 높은 소거활성을 보인 하밀감의 경우 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 88.7%에 이르는 활성을 보였다. IC_{50} 은 하밀감 189 $\mu\text{g/mL}$, 하귤 254 $\mu\text{g/mL}$, 온주밀감 292 $\mu\text{g/mL}$ 순서로서, 하밀감은 두 품종 대비 상대적으로 적은 양으로도 50%의 소거활성을 나타내었다. 이는 총 폴리페놀 함량이 높으면 자유라디칼 소거능도 우수한 경향이 있다고 보고되고 있는데 (Anagnostopoulou *et al.*, 2006) 본 결과에서도 총 페놀 함량과 플라보노이드 함량이 높은 하밀감 과피 추출물에서 DPPH radical 소거능이 높게 나타난 것을 알 수 있었다.

4. Hydroxyl radical 소거활성 측정

Hydroxyl radical은 DNA의 핵산과 결합함으로써 손상을 일으켜 발암성, 돌연변이 및 세포독성을 유발하게 되며, 지질과산화 과정에서 빠른 개시제로 작용하게 되는데 Hydroxyl radical 소거활성은 지질과산화 과정의 진행을 직접적으로 방해하거나 활성화된 산소종을 소거함으로써 연쇄반응을 저해하기 때문이라고 보고되고 있다 (Kim *et al.*, 2009a). 하밀감, 온주밀감, 하귤 과피 추출물의 Hydroxyl radical 소거능을 측정 한 결과는 Table 4와 같다. Hydroxyl radical 소거능은 다른 종과 마찬가지로 3품종 모두 농도 의존적으로 소거활성이 증가하였고, 하밀감 과피 추출물보다는 온주밀감 과피 추출물의 활성산소 소거능이 농도에 상관없이 높은 활성을 보였다. 그러나 온주밀감 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 49%의 낮은 소거활성을 보였는데, 이러한 결과는 Hyon 등 (Hyon *et al.*, 2010)의 연구에서 진귤, 온주밀감 및 하귤 과피의

Table 4. Hydroxyl radical scavenging activity (%) of methanol extract from citrus peels.

Cultivar	Extracts ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Unshu	37.0 \pm 0.2a	47.6 \pm 0.3a	49.0 \pm 0.6a*
Natsudaiddai	28.9 \pm 0.7c	40.3 \pm 2.5b	47.8 \pm 0.6a
Hamilgam	31.0 \pm 0.9b	39.7 \pm 0.9b	45.7 \pm 0.8b

*Each value is expressed as mean \pm SD (n = 3). Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

Table 5. ABTS radical scavenging activity (%) of methanol extract from citrus peels.

Cultivar	Extracts ($\mu\text{g/mL}$)			
	125	250	500	1000
Unshu	36.7 \pm 1.0b	51.9 \pm 0.9b	70.7 \pm 0.9b	87.7 \pm 0.4b*
Natsudaiddai	37.5 \pm 1.3b	50.7 \pm 0.9b	69.6 \pm 0.5b	86.6 \pm 0.6c
Hamilgam	52.4 \pm 0.1a	67.5 \pm 0.9a	79.7 \pm 0.2a	88.9 \pm 0.2a

*Each value is expressed as mean \pm SD (n = 3). Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

Hydroxyl radical 소거활성이 다른 활성산소종 소거활성에 비하여 상대적으로 낮다고 보고한 내용과 일치하였다.

5. ABTS radical 소거활성 측정

항산화 효능 측정에서 DPPH radical 소거측정과 더불어 많이 사용되는 ABTS radical 소거측정은 ABTS와 potassium persulfate와의 반응으로 특유의 청록색을 띠게 되며 항산화제를 첨가함에 따라 연한 녹색으로 탈색되는 정량법으로 ABTS radical 양이온 탈색 정량법이라고 한다 (Park and Lee, 2013). 하밀감, 온주밀감, 하귤 과피 추출물의 ABTS radical 소거능 측정 결과 Table 5에 나타난 바와 같이 추출물의 농도 증가에 따라 소거능은 증가하였으며, 하밀감의 경우 125 $\mu\text{g/mL}$, 온주밀감과 하귤은 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 추출물 농도에서도 50% 이상의 ABTS radical이 소거됨을 알 수 있었다. 이는 감귤 과피 추출물이 DPPH radical 소거능이나 Hydroxyl radical 소거능보다 ABTS radical 소거능에 높은 활성이 있는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 여주 품종별로 폴리페놀 함량이 높을수록 ABTS 양이온 소거활성도가 높게 나타났다는 Boo 등 (Boo *et al.*, 2009)의 연구결과와 일치하는 경향을 보였다.

6. Superoxide anion radical 소거활성 측정

하밀감, 온주밀감, 하귤 추출물의 Superoxide anion radical 소거능 측정 결과는 Table 6과 같다. 추출물 125 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서만 품종 간에 Superoxide anion radical 소거능에 차이를 보였고 농도 증가에 따른 품종 간 유의차를 볼 수 없었으며, 소거활성 정도도 다른 활성산소종 소거활성에 비해 상대적으로 매우 낮았다. 본 실험의 결과와는 달리 Kim 등 (Kim *et al.*, 2009a)은 높은 총 폴리페놀 함량을 보인 홍귤과 지각에서 가장 높은 superoxide 소거활성을 보여 총 폴리페놀 함량과 superoxide 소거활성의 상관관계가 높다고 보고하였다. 그러나 Bocco 등 (Bocco *et al.*, 1998)은 항산화능과 glycosylated flavanone 농도와의 상관관계가 불분명하다고 보고하였으며, Rouseff (Rouseff, 1998)는 각 flavonoid 유도체들은 서로 다른 생리적인 활성을 가지고 있다고 보고하였다. 따라서 품종

Table 6. Superoxide anion radical scavenging activity (%) of methanol extract from citrus peels.

Cultivar	Extracts ($\mu\text{g/mL}$)			
	125	250	500	1000
Unshu	15.5 \pm 2.4a*	19.7 \pm 1.8	27.2 \pm 1.7	29.4 \pm 2.3
Natsudaiddai	10.7 \pm 1.7b	19.9 \pm 1.2	27.1 \pm 1.1	32.9 \pm 2.8
Hamilgam	3.6 \pm 0.9c	18.4 \pm 2.7	24.9 \pm 2.7	30.9 \pm 2.2

*Each value is expressed as mean \pm SD (n = 3). Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

Table 7. Flavonoids contents ($\mu\text{g/g}$) of citrus peel extract identified by HPLC.

Cultivar	Rutin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Naringenin	Hesperetin
Unshu	279.4 \pm 91.6a	1,548.2 \pm 379.0a	96.0 \pm 14.9c	753.0 \pm 84.8a	12.8 \pm 2.3c**	n.d*	n.d
Natsudaidai	48.0 \pm 5.6b	127.9 \pm 16.3c	1,174.2 \pm 143.2b	45.7 \pm 14.7c	479.1 \pm 73.6b	n.d	n.d
Hamilgam	50.6 \pm 5.6b	324.0 \pm 43.8b	1,871.4 \pm 118.8a	93.4 \pm 15.0b	1,350.8 \pm 167.7a	n.d	n.d

*n.d; not detected.

**Each value is expressed as mean \pm SD (n = 3). Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

별로 함유하고 있는 각각의 플라보노이드 성분에 따라 항산화 능 발현 효과가 다른 것으로 판단되었다.

7. 플라보노이드 성분별 함량 분석

하밀감, 온주밀감, 하귤 과피 추출물의 플라보노이드 성분에 대한 HPLC 분석 결과는 Table 7과 같다. 감귤 과피의 주 페놀화합물 구성성분은 flavanone과 flavone glycoside로 보고되고 있다. 하밀감과 하귤의 주요 성분은 naringin과 neohesperidin이며, naringin의 경우 온주밀감은 96 $\mu\text{g/g}$ 인데 비해 하밀감과 하귤은 각각 1,871 $\mu\text{g/g}$, 1,174 $\mu\text{g/g}$ 으로 12 ~ 19배 함량이 높았으며, neohesperidin의 경우는 하밀감이 온주밀감보다 100배 이상의 함량을 보였다. 반면 온주밀감은 narirutin과 hesperidin의 함량이 높았으며, 특히 하귤에 비해 narirutin은 12배, hesperidin은 16배 이상의 함량을 보였다. Naringenin, hesperetin 과 같은 aglycon 형태의 성분은 확인 되지 않았다. Jeong 등 (Jeong *et al.*, 1997)은 온주밀감 메탄올 추출물의 narirutin이 Hydroxyl radical 소거에 강한 활성을 보였다고 보고하였다. Shin 등 (Shin *et al.*, 2006)의 연구에 따르면 유자와 온주밀감 과피 추출물의 플라보노이드 성분 분석 결과 유자에는 naringin과 neohesperidin이 주요 구성성분이었으며, 온주밀감은 narirutin과 hesperidin의 함량이 높았고, free radical scavenging, ROS scavenging 활성 결과 유자 과피 추출물이 온주밀감에 비해 보다 효과적이었다고 보고하였다. 이러한 결과는 narirutin의 함량이 높은 온주밀감의 경우 Hydroxyl radical 소거능은 높았으나 그 이외의 항산화 효능에서는 naringin과 neohesperidin을 많이 함유하고 있는 하밀감과 하귤 추출물이 높은 활성을 보인 본 연구결과와 일치함을 알 수 있었다. 총 폴리페놀 함량이 기존 품종 대비 상당히 높고, 항산화 활성 효과가 있음이 확인된 하밀감은 향후 기능성 식품, 화장품 개발 등에 있어서 새로운 소재로서 활용 가능성이 있음이 시사되었다.

REFERENCES

Ahn MS, Kim HJ and Seo MS. (2007). A study on the antioxidative and antimicrobial activities of the *Citrus unshiu* peel extracts. Journal of the Korean Society of Food Culture. 22:454-461.

Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN and Boskou D. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel(*Citrus sinensis*). Food Chemistry. 94:19-25.

Balestrieri E, Pizzimenti F, Ferlazzo A, Giofre SV, Iannazzo D, Piperno A, Romeo R, Chiacchio MA, Mastino A and Macchi B. (2011). Antiviral activity of seed extract from *Citrus bergamia* towards human retroviruses. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 19:2084-2089.

Benavente-Garcia O and Castillo J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular and anti-inflammatory activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56:6185-6205.

Blois MS. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 181:1199-1200.

Bocco A, Marie EC, Hubert R and Claudette B. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46:2123-2129.

Boo HO, Lee HH, Lee JW, Nwang SJ and Park SU. (2009). Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:15-20.

Chung HJ and Jeon IS. (2011). Antioxidative activities of methanol extracts from different parts of *Chrysanthemum zawadskii*. Korean Journal of Food Preservation. 18:739-745.

Dionex Co. (1992). Analysis of fruit juice adulterated with medium invert sugar from beets. Dionex Application Note 82. Dionex. Sunnyvale, CA, USA. p.1-4.

Frassinetti S, Caltavuturo L, Cini M, Della Croce CM and Maserti BE. (2011). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from *Citrus* spp. Journal of Essential Oil Research. 17:375-379.

Gutfinger T. (1981). Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemists' Society. 58:966-968.

Halliwell B, Gutteridge JMC and Aruoma OI. (1987). The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Analytical Biochemistry. 165:215-219.

Hwang JH, Park KY, Oh YS and Lim SB. (2013). Phenolic compound content and antioxidant activity of citrus peels. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 42:153-160.

Hyon JS, Kang SM, Mahinda S, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ and Kim SH. (2010). Antioxidative activities of dried and fresh citrus peels in Jeju. Korean Journal

- of Food Cookery Science. 26:88-94.
- Jeong WS, Park SW and Chung SK.** (1997). The antioxidative activity of Korean *Citrus unshiu* peels. Food Biotechnology. 6:292-296.
- Kang MH, Cho CS, Kim ZS, Chung HK, Min KS, Par CG and Park HW.** (2002). Antioxidative activities of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of *Crotalaria sessiflora* L. Korean Journal of Food Science and Technology. 34:1098-1102.
- Kim JH, Kwon SH, Kim JK and Kim MK.** (2006). Effects of different mandarin formulation on antioxidative capacity and oxidative DNA damage in fifteen-month aged rats. Korean Journal of Nutrition. 39:610-616.
- Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ and Kim SH.** (2009a). Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 38:462-469.
- Kim YD, Ko WJ, Koh KS, Jeon YJ and Kim SH.** (2009b). Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation. Korean Journal of Nutrition. 42:278-290.
- Kim SS, Hyun JM, Kim KS, Park KJ, Park SM and Choi YH.** (2013). Influence of essential oil in ‘Shiranuhi’ immature fruit on antioxidant and antimicrobial activities. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 21:493-497.
- Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH and Heo HJ.** (2010). Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. Journal of Agricultural Life Science. 44:57-66.
- Lee SY, Shin YJ, Park JH, Kim SM and Park CS.** (2008a). An analysis of the Gyungokgo’s ingredients and a comparison study on anti-oxidation effects according to the kinds of extract. The Korea journal of Herbology. 23:123-136.
- Lee SG, Yu MH, Lee SP and Lee IS.** (2008b). Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 37:269-275.
- Liu F, Ooi VEC and Chang ST.** (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. Life Sciences. 60:763-771.
- Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR and Vattuone MA.** (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of Ethnopharmacology. 71:109-114.
- Park HS, Oh JH, Lee JH and Lee YJ.** (2010). Minor effects of the citrus flavonoids naringin, naringenin and quercetin, on the pharmacokinetics of doxorubicin in rats. Die Pharmazie. 66:424-429.
- Park MJ and Kim GH.** (2013). The Antioxidative and antibrowning effects of citrus peel extracts on fresh-cut apples. Korean Journal of Food Science and Technology. 45:598-604.
- Park HJ and Lee KY.** (2013). Evaluation on antioxidant effect of methanol extract from immature cotton boll. Korean Journal of Plant Resources. 26:426-432.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 26:1231-1237.
- Rouseff RL.** (1998). Differentiating citrus juices using flavanone glycoside concentration profile. In Nagy S. et al. (eds.). Adulteration of fruit juice beverages. Marcel Dekker. New York, NY, USA. p.49-50.
- Sasaki K, Mito K, Ohara K, Yamamoto H and Yazaki K.** (2008). Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophera flavescens*. Plant Physiology. 146:1075-1084.
- Shahidi F and Wanasundara PK.** (1992). Phenolic antioxidant. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 32:67-103.
- Shin DB, Lee DW, Yang R and Kim JA.** (2006). Antioxidative properties and flavonoids contents of matured citrus peel extracts. Food Science and Biotechnology. 15:357-362.
- Song EY, Choi YH, Kang KH and Koh JS.** (1998). Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of cheju citrus fruits according to harvest date. Korean Journal of Food Science and Technology. 30:306-312.
- Yang SY and Boo HO.** (2013). Phenolic compounds, Antimicrobial effects and tyrosinase inhibition activities of cucumber grown greenhouse according to cultivars and growth stages. Korean Journal of Plant Resources. 26:645-651.
- Yusof S, Ghazali HM and King GS.** (1990). Naringin content in local citrus fruits. Food Chemistry. 37:113-121.
- Zhang J, Chu CJ, Li XL, Yao S, Yan B, Ren HL, Xu NY, Liang ZT and Zhao ZZ.** (2014). Isolation and identification of antioxidant compounds in *Vaccinium bracteatum* Thunb. by UHPLC-Q-TOF LC/MS and their kidney damage protection. Journal of Functional Foods. 2:62-70.