

Changes in Phenolic Composition, Antioxidant and Antidiabetic Properties of Jeju *Citrus sudachi* as Influenced by Maturity

Ji Eun Lee^{1†}, Ji Hye Kim^{1†} and Min Young Kim^{1,2*}

¹Toxicology Laboratory, Major in Biomaterials, College of Applied Life Science, SARI, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Received August 24, 2015 / Revised November 10, 2015 / Accepted November 17, 2015

The effects of fruit maturation on changes in the total phenolics, flavonoids, and carotenoids of methanolic extracts of *Citrus sudachi*, in addition to its antioxidant and antidiabetic activities, were determined. Generally, the concentration of these chemical constituents increased as *C. sudachi* reached maturity. *C. sudachi* contained high levels of total phenolics, flavonoids, and carotenoids at maturity, contributing 6339.5 mg of gallic acid equivalent per 100 g, 2364.2 mg of rutin equivalent per 100 g, and 678.7 mg/ml, respectively. The scavenging activities of 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), hydrogen peroxide and nitric oxide radicals and the reducing power of mature fruits were significantly higher at all data points than those of immature fruits ($p < 0.05$). In contrast, the ferrous ion chelating activity of mature and immature *C. sudachi* fruits was similar. The 50% effective concentrations (EC_{50}) of mature fruits were 4.1 ± 0.10 mg/ml for scavenging DPPH radicals, 3.1 ± 0.02 mg/ml for scavenging hydrogen peroxide, 3.9 ± 0.01 mg/ml for scavenging nitric oxide, and 3.8 ± 0.02 mg/ml for chelating ferrous ion. The antidiabetic activity of *C. sudachi* was studied *in vitro* using the α -glucosidase inhibitory method. The inhibitory activity of mature *C. sudachi* fruits on α -glucosidase was higher than that of immature fruits. These results suggest that the content of bioactive compounds and the antioxidant and antidiabetic activities of *C. sudachi* change during maturation. These findings can be further extended to exploit them for their possible application for the preservation of food products, as well as their use as health supplements and nutraceuticals.

Key words : Antioxidant, α -glucosidase, *Citrus sudachi*, harvest date, polyphenol

서 론

활성 산소란(reactive oxygen species, ROS) 세포의 대사과정 중 필연적으로 생성되는 반응성이 매우 큰 산소종으로, 세포에 손상을 가하고 DNA 변성, 지질 산화, 단백질 분해 등을 유발한다[2, 41]. 체내에는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, catalase 등의 산화 억제 효소들이 존재하여 발생된 활성 산소를 소거하지만[28] 불규칙적인 식습관, 스트레스, 환경오염 등에 노출된 현대인의 생활습관으로 산화 억제 효소들의 균형이 깨지게 되고 심질환, 당뇨, 신경 질환 등과 같은 만성 질환으로 이어지게 된다[17]. 현재 다양한 항산화제 개발이 활발하게 이루어지고 있지만 여러 합성 항산화제의 부작용이 보고되면서 천연물소재를 이용하여 활성산소를 억제하려는 시도가 활발히 진행 중이다[13].

2013년 기준 우리나라 사망원인 5위인 당뇨병은 인슐린이 제대로 작용하지 못해 체내 포도당의 대사가 정상적으로 작동하지 않아 발생하는 대사장애를 말하며 심혈관계 질환, 망막증, 족부병변 등의 합병증을 유발한다[31]. 당뇨병성 합병증의 주요 원인 중 하나는 고혈당으로 인한 산화 스트레스 현상으로, 이는 지속적인 고혈당 상태에서 포도당의 당화 과정 중 생성된 ROS로 인해 지질 과산화물 생성이 촉진되고 단백질의 당화 과정이 일어나 합병증이 발생하게 된다[39]. 따라서 효과적인 당뇨병 치료를 위해서는 혈당 유지와 더불어 ROS의 감소가 함께 이뤄져야 한다.

무농약·유기농 공법으로 생산되는 제주 영귤(*Citrus sudachi* Hort. ex Sirai)은 운향과 감귤속 후생감귤아속에 속하는 유자의 근친종이며, 우리나라에서는 제주도에 80년대 초 일부 농가가 재배하기 시작해 일본명인 스다치로 불리다 1997년에 '신선이 살만한 곳'이라는 옛 제주 명칭인 영주(瀛州)에서 영(瀛)자를 따서 영귤이라 명명되었다. 영귤의 크기는 직경 30~40 mm, 무게는 35 g 내외이며 산이 풍부해 신맛이 강하고 독특한 향을 지닌 향산성 감귤의 일종으로 과피가 녹색인 미숙과 상태에서 가장 향이 좋아 8월 말에서 9월 말이 주 수확기이며, 생식용으로는 적합하지 않아 주로 향미제와 조미료 등 가공식품으로 이용되고 있다[33]. 영귤의 성분과 생리활성에 대한 국외 연구는 영귤에서 발견된 플라보노이드인 sudachi-

†Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3349, Fax : +82-64-756-3351

E-mail : jeffmkim@jejunu.ac.kr

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.

tin [8, 11], 영굴의 limonoid [30], 영굴에서 나온 새로운 flavone glucoside인 sudachiin A의 구조 및 합성[9], 영굴에서 분리된 추출 성분에서의 점액산 합성[37], 감귤류의 항돌연변이성[7], 영굴 과즙의 칼슘에 대한 생체이용률 향상[32] 등의 다양한 연구 보고가 존재한다. 감귤 대체작목 장려 정책 지원에 의해 일시적으로 1990년대 말에서 2000년대 초에 주로 가공식품의 산업화 등 응용 연구 중심으로 진행되었으나, 성분 및 생리활성에 관한 연구는 수확시기별 성분 특성[12], 항균 효과[25], 가열온도에 따른 영굴 과즙의 성분 변화[23] 등으로 그 수가 적어 영굴에 대한 기초 자료가 상대적으로 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서 제주 지역에서 재배·수확되고 있는 영굴을 수확시기별로 수거하고 기능성 성분 및 항산화, 항당뇨 활성에 관한 기초 연구 자료를 제시하여 고부가가치 천연 식·의약품 소재로서의 이용 가능성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 준비

본 연구에서 사용한 영굴은 제주녹색농원(제주특별자치도 제주시 봉개동 소재)에서 9월(미숙과)과 11월(성숙과)에 수확한 것을 제공 받아 사용하였다. 영굴 시료는 흐르는 물로 3~4회 깨끗이 세척하고 0.5 cm로 slice하여 -70℃에서 1차 동결한 후 동결건조기(PVTFD10A, 일신랩, Korea)에서 3일 동안 건조하였다. 건조된 시료는 믹서로 분말화한 후 25 g을 500 ml의 100% methanol에 shaking incubator를 이용하여 25℃에서 150 rpm으로 72시간 동안 추출하였다. 추출된 시료는 원심분리 후 상층액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 실험에 사용하였다.

좀더 자세히 예를 들어 기술하자면 준비된 영굴 추출물 원액의 농도가 50 mg/ml 이므로(5 g/100 ml의 농도로 추출하였으므로), 본 실험 결과 중 DPPH radical scavenging activity의 경우 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/ml의 시료를 만들기 위해 영굴 추출물 원액을 8 mg/ml로 희석한 뒤 duplication하여 실험을 진행하였다.

영굴의 기능성 성분 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis의 방법[3]을 변형하여 측정하였다. 96 well plate에 여과한 추출물 30 µl 을 넣고 95% ethanol 30 µl, 증류수 150 µl, 50% Folin-Ciocalteu reagent 15 µl 를 첨가해 실온에 5분 간 방치한다. 그 후, 5% Na₂CO₃ 30 µl 를 넣어 잘 혼합하여 암실에서 1시간 동안 반응시켜 microplate reader (15PA-0065, Dynex, USA)로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 함량은 gallic acid를 표준물질로 사용하여 mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g으로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량은 Zhishen의 방법[45]을 변형하여 측

정하였다. 96 well plate에 여과한 추출물 30 µl를 넣고 증류수 120 µl, 5% NaNO₂ 9 µl를 혼합해 실온에 6분 방치 후 10% AlCl₃을 넣고 다시 6분 간 방치한다. 그 다음 1 M NaOH 60 µl 와 증류수 72 µl를 첨가해 실온에 15분 간 반응시켰다. 함량은 rutin을 표준물질로 사용하여 mg rutin equivalent (RE)/100 g으로 나타내었다.

총 카로티노이드 함량은 Rainha등의 방법[36]을 이용하여 측정하였다. 추출 직후 96 well plate에 추출물 200 µl를 넣고 470, 653, 666 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{Total carotenoids (mg/l)} = (1,000 \times A_{470}) - (2.860 \times \text{Ca}) - (129.2 \times \text{Cb}/245)$$

$$\text{Chlorophyll a (Ca) (mg/l)} = (15.65 \times A_{666}) - (7.340 \times A_{653})$$

$$\text{Chlorophyll b (Cb) (mg/l)} = (27.05 \times A_{653}) - (11.21 \times A_{666})$$

A₄₇₀: absorption of 470 nm, A₆₅₃: absorption of 653 nm, A₆₆₆: absorption of 666 nm

2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Blois의 방법[1]을 변형하여 측정하였다. 시료 추출액 100 µl에 0.4 mM DPPH 용액 100 µl를 혼합하여 10분 동안 암실에서 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거능은 시료 첨가구와 무 첨가구간 흡광도 차이를 계산한 백분율과 DPPH radical을 50% 소거하는 농도(EC₅₀)로 나타내었다.

Hydrogen peroxide 소거능 측정

Hydrogen peroxide 소거능 측정은 Kim의 방법[20]을 이용하였다. 시료 추출 용액 80 µl에 10 mM hydrogen peroxide 20 µl, 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0)을 혼합하여 37℃에서 5분 간 반응시킨 후 1.25 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) 30 µl, peroxidase (1 U/ml) 30 µl 를 첨가해 37℃에서 10분 간 반응시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무 첨가구간 흡광도 차이의 백분율과 hydrogen peroxide를 50% 소거하는 농도(EC₅₀)로 나타내었다.

Nitric oxide소거능 측정

Nitric oxide 소거능 역시 Kim의 방법[20]으로 측정하였는데, 추출액 50 µl에 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.0)에 녹인 10 mM sodium nitroprusside 50 µl를 첨가 후 25℃에서 3시간 반응시킨다. 그 다음 Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% N-1-naphthylethylene diamine dihydrochloride in 2.5% polyphosphoric acid) 100 µl를 잘 혼합해 실온에 15분 간 방치하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거능은 시료 첨가구와 무첨가구 간 흡광도 차이의 백분율과 nitric oxide를

50% 소거하는 농도(EC₅₀)로 나타내었다.

금속 결합력 측정

금속 결합력은 Kim의 방법[19]을 이용하여 측정하였다. 시료액 250 µl에 2 mM ferrous chloride 5 µl를 섞은 후 5 mM ferrozine solution 10 µl를 넣은 후 실온에서 10분 동안 방치한 다음 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

환원력 측정

환원력은 Oyaizu의 방법[34]을 변형하여 측정하였다. 시료 용액 400 µl와 1% potassium ferricyanide가 포함된 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.6) 400 µl를 e-tube에 혼합하여 50°C에서 20분 동안 반응시킨다. 10% (w/v) trichloroacetic acid 400 µl를 넣어 반응을 멈추게 한 후 상층액 100 µl를 96 well plate에 분주한 후 증류수 100 µl와 0.1% (w/v) ferric chloride 20 µl를 넣어 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

α-Glucosidase 저해 활성 측정

2 U/ml α-glucosidase 50 µl에 추출물 또는 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) 10 µl를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 5 mM p-nitrophenol- α-glucopyranoside (PNPG) 50 µl를 첨가하여 실온에 5분 간 방치하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과는 3회 반복 측정 후 평균값 ± 표준편차로 나타내었고 SPSS program (18.0)의 independent sample t-test를 실시하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

영굴의 기능성 성분 함량 측정

영굴 미숙과와 성숙과의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 Table 1과 같이 성숙과의 폴리페놀 함량이 6339.5 mg GAE/100 g로 미성숙과의 폴리페놀 함량 5191.4 mg GAE/100 g보다 유의적으로 높은 것으로 나타났다(p<0.05). Lee 등은 영굴 착즙액의 총 폴리페놀 함량을 28.4 mg GAE/100 ml라고

보고하여[27] 본 연구의 함량이 높게 측정되었는데 이는 Lee의 연구에서는 껍질을 제거해 가식부만을 착즙하고 별도의 추출 과정이 없었던 반면 본 연구에서는 과실 전체를 사용하고 100% methanol에서 추출하여 methanol에 용해된 다양한 폴리페놀 성분이 포함되었기 때문이라 사료된다. 일반적으로 Kim 등의 보고와 같이 대부분의 감귤류는 수확시기가 늦어질수록 총 폴리페놀 함량이 감소하는 경향을 보이나[22] Yoo 등의 연구에서 유자(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA)의 경우에는 성숙할수록 과피와 과육의 폴리페놀 함량이 높아진다고 보고하였는데[43] 이는 본 연구의 경향과 일치한다.

영굴 미숙과와 성숙과의 총 플라보노이드 함량은 Table 1과 같이 성숙과가 2833.3 mg RE/100 g으로 미숙과의 함량 2364.2 mg RE/100 g 보다 높은 것을 확인할 수 있었다(table 1). Hyon 등의 연구에서 진굴과 온주밀감 진과의 플라보노이드 함량은 50.7~63.9 mg/100 g로 본 연구보다 낮게 측정되었는데[11] 이는 추출 농도 및 시간 차이와 본 연구에서는 과실 전체를 사용한 반면 Hyon 등은 과피만을 사용한 점에서 차이가 발생한 것으로 사료된다. Kim 등은 제주 재래종 감귤 착즙액의 플라보노이드 함량이 대부분 성숙할수록 감소하는 경향을 보이나 품종에 따라 함량이 증가하는 경우도 있다고 보고하여[22] 본 연구 결과의 경우도 예외적으로 성숙과의 플라보노이드의 함량이 높아진 것으로 생각된다.

영굴 미숙과와 성숙과의 총 카로티노이드 함량을 측정한 결과 성숙과가 678.7 mg/ml로 미숙과의 함량 447.2 mg/ml보다 유의적으로 높았다. 이는 성숙 과정 중에 클로로필이 분해되면서 카로티노이드가 급속히 합성된 것에 기인하는 것으로 사료된다[15].

DPPH 라디칼 소거능

DPPH 소거법은 항산화능 측정에 널리 쓰이는 방법으로 DPPH radical이 항산화 활성을 가진 물질과 만나면 전자를 받아들이고 환원되어 진한 보라색이 노란색으로 탈색되는데 이 변화 정도를 측정하여 소거능을 계산한다[18].

영굴 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 미성숙과와 성숙과의 라디칼 50% 소거 농도(EC₅₀)를 비교한 결과 성숙과가 4.1 mg/ml로 미성숙과의 6.1 mg/ml보다 낮아 DPPH 라디칼 소거능이 유의적으로 높은 것으로

Table 1. Total phenolic, flavonoid and carotenoids content of *Citrus sudachi*

Harvesting time	Content		
	Total phenolic (mg GAE/100 g) ¹⁾	Total flavonoid (mg RE/100 g) ²⁾	Total carotenoids (mg/ml)
Immature	5191.4±385.5	2364.2±46.6	447.2±1.5
Mature	6339.5±244.5*	2833.3±121.4*	678.7±0.6*

¹⁾Total phenolic content, expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per 100 g of dried weight; ²⁾Total flavonoid content, expressed as mg rutin equivalent (RE) per 100 g of dried weight. Values are means ± SD of three separated experiments. Data were statistically analyzed by independent sample t-test. *Values are significantly different from immature (p<0.05).

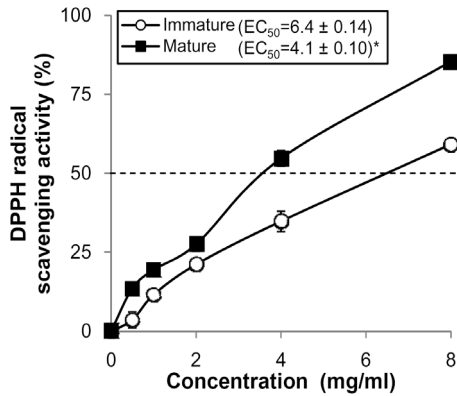


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity and 50% effective concentration (EC₅₀) of *Citrus sudachi*. Values are means ± SD of three separated experiments. Data were statistically analyzed by independent sample *t*-test. *Values are significantly different from immature fruit (*p*<0.05).

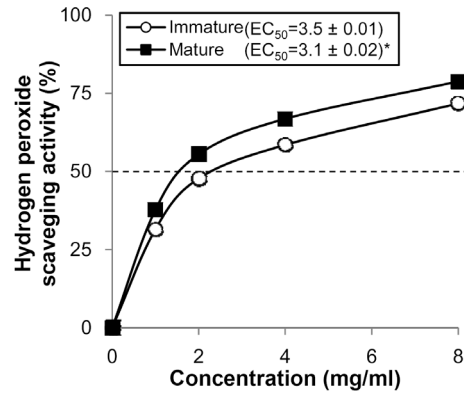


Fig. 2. Hydrogen peroxide scavenging activity and 50% effective concentration (EC₅₀) of *Citrus sudachi*. Values are means ± SD of three separated experiments. Data were statistically analyzed by independent sample *t*-test. *Values are significantly different from immature fruit (*p*<0.05).

나타났다(*p*<0.05). 이는 폴리페놀 함량과 자유 라디칼 소거능이 상관 관계를 가지는 경향으로 미루어보아[35] 성숙과의 폴리페놀 함량이 높기 때문에 성숙과의 DPPH 라디칼 소거능이 미성숙과보다 뛰어난 것으로 사료된다. Kim의 연구에서도 영귤 과피의 라디칼 소거능이 8월보다 11월이 높게 측정되어 본 연구와 경향과 일치하였다[21]. 수확시기별 유자(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) 추출물[43]과 산지별 유자의 수확시기에 따른 라디칼 소거능을 측정 한 실험[29]에서도 수확시기가 늦을수록 소거능이 증가하였다는 보고가 있다.

Hydrogen peroxide 소거능 측정

Hydrogen peroxide는 DNA 및 단백질을 손상시키거나 과산화 지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며 그 결과 노화 및 성인병 등을 초래한다고 보고되고 있다[11].

Hydrogen peroxide 소거능을 측정한 결과는 Fig. 2와 같이 농도의존적으로 소거능이 증가하는 경향을 보였으며 성숙과의 EC₅₀이 3.1 mg/ml로 미숙과의 EC₅₀ 3.5 mg/ml와 비교하여 유의적으로 차이가 있는 것으로 나타나 성숙과의 hydrogen peroxide 소거능이 더 뛰어남을 알 수 있었다(*p*<0.05). Kim 등은 제주 감귤 재래종 감귤 과피의 수확시기별 hydrogen peroxide 소거활성을 조사한 결과 대부분 소거능이 감소한다고 하였으나 지각과 진귤은 9월 수확분보다 11월 수확분이 더 높은 활성을 나타내었다고 보고하여 본 실험과 유사한 경향을 보였다[22]. Kim의 연구에서 hydrogen peroxide 소거활성의 IC₅₀이 0.72~1.03 mg/ml에 비해[20] 본 연구의 EC₅₀의 수치가 높는데 이는 감귤 품종 및 재배 환경의 차이 등에 의한 것으로 판단된다.

Nitric oxide소거능 측정

Nitric oxide synthase (NOS)에서 생성되는 nitric oxide는

평활근 이완을 통한 혈관 등의 이완, 혈소판 응집억제, 신경전달, 면역조절, 세포독성 등의 중요한 기능을 한다[42]. 그러나 nitric oxide가 superoxide (O₂)와 반응하여 peroxynitrite (ONOO)를 생성하며 세포독성을 발생시키며 과량의 염증반응을 일으키고 면역 체계에 이상을 일으키며 종양을 발생시킬 수 있다.

Nitric oxide 소거능은 Fig. 3과 같이 농도가 증가할수록 영귤 추출물의 소거능이 증가하였으며 성숙과의 EC₅₀값은 3.9 mg/ml로 미숙과의 4.3 mg/ml 보다 낮게 나와 nitric oxide 소거능 또한 성숙과가 높았으며(*p*<0.05), Kim 등이 보고한 IC₅₀ 값(0.66~3.08 mg/ml)보다는 높게 측정되었다[20]. Kim 등은 대부분의 감귤종이 성숙할수록 nitric oxide 소거능이 증가하는 추세를 보였으나 변화폭은 낮다고 보고하였다[24]. Hwang 등이 감귤 과피의 nitric oxide 생성 저해능을 측정 한

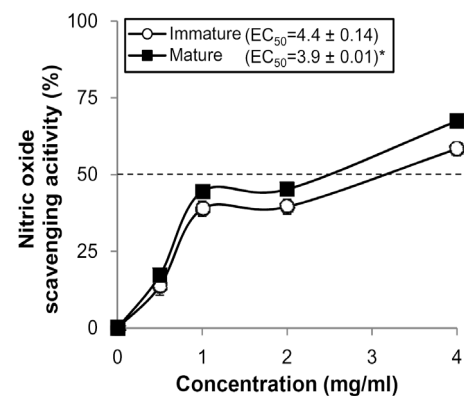


Fig. 3. Nitric oxide scavenging activity and 50% effective concentration (EC₅₀) of *Citrus sudachi*. Values are means ± SD of three separated experiments. Data were statistically analyzed by independent sample *t*-test. *Values are significantly different from immature fruit (*p*<0.05).

결과 감귤류 7종 중 영귤이 두번째로 활성이 높은 것으로 보고하였고[10] Yuasa 등은 영귤에서 발견되는 polymethoxy-flavone인 sudachitin이 LPS로 유도된 RAW264 세포주에서 항염증 효과를 보였다고 보고하였다[44]. 이를 종합하여 볼 때 영귤이 nitric oxide 소거뿐만 아니라 생성 또한 효과적으로 저해하므로 nitric oxide로 유발된 질병 예방에 효과적일 것이라 사료된다.

금속 결합력 측정

Fe, Cu 등과 같은 산화 환원이 용이한 금속은 지질 산화 과정에서 촉매로 작용하며 O₂, H₂O₂, RO·, ROO· 등의 2차 라디칼을 생성시켜 산화를 촉진시킨다. 따라서 이들 금속을 결합시키면 간접적으로 항산화 활성을 나타낼 수 있다[4].

영귤 추출물의 금속 결합력 측정 결과는 Fig. 4와 같다. 농도의존적으로 결합력이 증가함을 보였으나 EC₅₀ 값이 3.76 mg/ml로 미성숙과와 성숙과간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 금속 결합력과 ROS소거는 작용 기전이 달라 폴리페놀, 플라보노이드 함량과의 상관관계가 ROS 소거능보다 낮기 때문에[5] 미성숙과와 성숙과에서 큰 차이를 보이지 않은 것으로 판단된다. Kim은 온주밀감의 야생형 및 돌연변이형의 금속 결합력의 IC₅₀을 1.35~7.59 mg/ml 로 보고하였다[19]. 영귤이 금속 결합 활성을 보이는 것으로 보아 폴리페놀, 플라보노이드 외의 유용 물질들이 존재해 금속 이온을 제거하는 기능을 하는 것으로 추측되며 이에 대한 추가적인 분석이 필요하다고 생각된다. 본 실험에서 실시한 *in vitro* 실험뿐만 아니라 *in vivo* 실험에서 노령흰쥐에게 감귤전체, 감귤과피, 감귤과육을 섭취하게 한 후 지질 과산화의 척도가 되는 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 값을 측정된 결과 감귤전체와 감귤과피에서 대조군에 비해 유의적으로 감소했다는 보고가 있다[16]. 이와 마찬가지로 감귤류에 속하는 영귤도 *in vivo* 실험

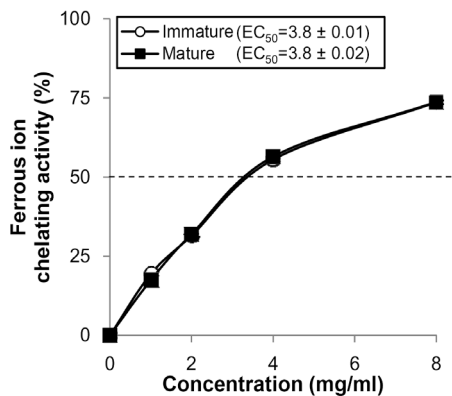


Fig. 4. Ferrous ion chelating activity and 50% effective concentration (EC₅₀) of *Citrus sudachi*. Values are means ± SD of three separated experiments. Data were statistically analyzed by independent sample *t*-test. *Values are significantly different from immature fruit (*p*<0.05).

험을 실시한다면 지질과산화 방지 효과가 있을 것으로 사료된다.

환원력 측정

환원력은 ferric ion/ferricyanide복합체를 환원시켜 Perl's Prussian blue complex를 700 nm의 흡광도로 측정하여 나온 OD 값으로 항산화 활성을 나타낸다. 환원력이 클수록 녹색에 가까게 발색되어 높은 흡광도 값을 가지는 물질일수록 항산화 활성이 뛰어나다[18].

본 실험에서 영귤 미숙과와 성숙과의 환원력을 측정한 결과는 Fig. 5처럼 0.5~4 mg/ml에서 미성숙과는 0.16~0.86, 성숙과는 0.21~1.19로 성숙과의 흡광도가 미성숙과보다 높게 측정되었다(*p*<0.05). 유자 과피 열수 추출물의 환원력은 500~10,000 µg/ml에서 0.03~0.97로 본 연구의 흡광도가 더 높았다[38]. Park 등은 감귤 4종류의 항산화 효과를 비교한 결과 총 폴리페놀의 함량과 환원력의 연관성이 0.946으로 상관관계가 높다고 보고하여[35] 본 실험에서도 총 폴리페놀 함량이 많은 성숙과의 환원력이 미숙과보다 높게 나타난 것으로 판단된다.

α-Gucosidase 저해 활성 측정

α-Gucosidase는 소장 점막의 미세용모막에서 존재하는 효소로 다당류를 단당류로 분해하는 효소이다. Acarbose와 같은 경구혈당강하제는 α-gucosidase저해를 통해 다당류의 분해를 방해해 소장에서 glucose의 흡수를 지연시켜주어 식후 혈당의 급격한 상승을 방지해주는데 이들 저해제는 복부팽만감, 구토, 설사 등 다수의 부작용이 보고되어[6] 천연 소재를 이용한 저해제 개발 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 또한 포도당 대사 과정에서 발생하는 ROS에 의해 조직 손상이 나타나기 때문에 ROS를 소거하는 항산화 활성과 α-gucosidase 저해 활성이 동시에 작용할 때 더욱 효율적으로 당뇨병을 관리할 수 있다[14].

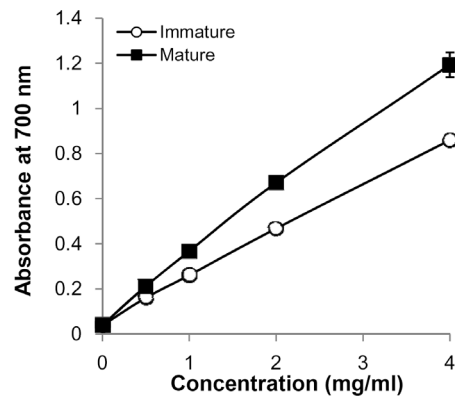


Fig. 5. Reducing power of *Citrus sudachi*. Values are means ± SD of three separated experiments. Data were statistically analyzed by independent sample *t*-test. *Values are significantly different from immature fruit (*p*<0.05).

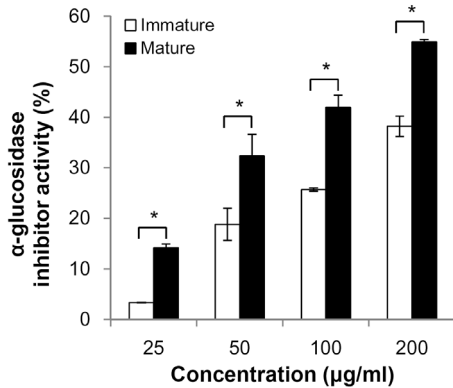


Fig. 6. α-Glucosidase inhibitor activity of *Citrus sudachi*. Values are means ± SD of three separated experiments. Data were statistically analyzed by independent sample *t*-test. *Values are significantly different from immature fruit ($p < 0.05$).

영굴 추출물의 α-glucosidase 저해 활성을 확인한 결과 Fig. 6와 같이 25, 50, 100, 200 µg/ml에서 미숙과와 성숙과의 저해 활성이 각각 5.5, 18.8, 25.7, 38.2% ($EC_{50} = 212.3 \pm 5.67$ µg/ml)와 14.2, 32.3, 41.9, 54.9% ($EC_{50} = 212.7 \pm 17.82$ µg/ml)로 성숙과의 저해도가 유의적으로 높은 것을 알 수 있었다($p < 0.05$). Lee 등은 주요 감귤성분을 대사정결환 마우스에게 주요 감귤성분을 경구투여한 결과 공복혈당이 감소함을 보였고 Akt의 인산화가 크게 증가하여 당뇨 관련 세포결손을 억제시킬 수 있다고 하였다[26]. Tsutsumi 등은 영굴 과피에 있는 플라보노이드 중 하나인 sudachitin을 고지방식으로 비만이 유발된 C57BL/6 J마우스와 당뇨질환모델 db/db마우스에게 12주 동안 구강투여한 결과 sudachitin이 에너지대사를 향상시켜 이상지질혈증과 대사증후군을 개선시켜주고 대사장애를 막아 미토콘드리아 생합성을 유도하여 에너지 소모를 늘리고 체중이 늘어나는 것을 막아준다고 보고하였다[40]. 본 실험과 위 보고들을 종합하여 볼 때 영굴의 항당뇨 효과가 기대되며 항산화 효과를 통해 효율적인 당뇨병의 관리 또한 가능할 것으로 생각되어 향후 천연 소재를 이용한 의약품 및 건강기능식품 개발 소재로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

본 연구에서는 제주산 영굴의 수확시기별 항산화 및 항당뇨 효과를 분석하였다. 영굴 미성숙과와 성숙과의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 카로티노이드 함량을 분석한 결과 성숙과의 함량이 각 6339.5 mg GAE/100 g, 2833.3 mg RE/100 g, 678.7 mg/ml로 미성숙과보다 기능성 물질의 함량이 높았다. 항산화 활성을 비교한 결과 DPPH radical, hydrogen peroxide, nitric oxide 등의 ROS소거능과 환원력에서 성숙과의 활성이 유의적으로 높았으나 금속 결합능에서는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 영굴 미성숙과와 성숙과의 α-glucosidase 저해 활성을 분석한 결과 성숙과의 저해 활성이 유의적으로 우수한 것을 알 수 있었다. 결론적으로 성숙과의

생리활성이 미성숙과보다 뛰어나 수확시기를 놓쳐 상품 가치가 떨어진 성숙 영굴도 활용 가능성이 있다고 사료된다. 본 연구를 통해 영굴의 항산화 및 항당뇨 효과를 확인하였으며 수확시기가 제한되어 있다는 한계를 보완할 수 있어 영굴의 부가가치 상승 및 활용을 극대화 할 수 있을 것으로 판단된다. 영굴이 기능성 식품 및 의약품 소재로 폭넓게 사용되기 위해서는 항산화와 항당뇨 이외의 다른 생리활성에 대한 추가적인 *in vitro* 및 *in vivo* 실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 교육부의 지방대학특성화 사업(CK-I)에 의해 이루어진 것입니다.

References

- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
- Folin, O. and Denis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239- 243.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1-11.
- Graf, E. and Eaton, J. W. 1990. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **8**, 61-69.
- Hanefeld, M. 1998. The role of acarbose in the treatment of non - insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Diabetes Complications* **12**, 228-237.
- Higashimoto, M., Yamato, H., Kinouchi, T. and Ohnishi, Y. 1998. Inhibitory effects of citrus fruits on the mutagenicity of 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of ethanol. *Mutat. Res.* **415**, 219-226.
- Horie, T., Masumura, M. and Okumura, F. S. 1961. Sudachitin, a new flavone pigment of sudachi. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **34**, 1547-1548.
- Horie, T., Tsukayama, M. and Nakayama, M. 1982. The structure and synthesis of sudachiin A, a new flavone glucoside from citrus sudachi. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **55**, 2928-2932.
- Hwang, J. H., Park, K. Y., Oh, Y. S. and Lim, S. B. 2013. Phenolic compound content and antioxidant activity of citrus peels. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 153-160.
- Hyon, J. S., Kang, S. M., Senevirathne, M., Koh, W. J., Yang, T. S., Oh, M. C., Oh, C. K., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2010. Antioxidative activities of extracts from dried citrus sunki and C. unshiu peels. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1-7.
- Jeong, S. W., Lee, K. M., Jeong, J. W., Lee, Y. C., Lee, M. S. and Um, S. S. 1999. Physicochemical properties of korean citrus sudachi fruit by harvesting time and region. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 1503-1510.
- Joo, S. Y. 2013. Antioxidant activities of medicinal plant

- extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 512-519.
14. Kang, J. R., Hwang, C. R., Sim, H. J., Kang, M. J., Kang, S. T. and Shin, J. H. 2015. Biological activities of yellow garlic extract. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 983-992.
 15. Kim, B. S., Kim, H. S., Koh, J. S., J. and Kang, Y. 1996. carotenoid, color value, uv spectrum, organic acid and free sugar contents of citrus varieties produced in Cheju. *Kor. J. Post-Harvest Sci. Technol. Agri. Products* **3**, 23-32.
 16. Kim, J. H. and Kim, M. S. 2003. Effect of different part of mandarin intake on antioxidative capacity in 15-month-old rats. *Kor. J. Nutr.* **36**, 559-569.
 17. Kim, M. J., Hong, C. O., Nam, M. H. and Lee, K. W. 2011. Antioxidant effects and physiological activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) extract from different aerial parts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **43**, 195-199.
 18. Kim, M. J. and Park, E. J. 2011. Feature analysis of different in vitro antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 1053-1062.
 19. Kim, M. Y. 2013. Free radical scavenging and ferrous ion chelating activities of citrus fruits derived from induced mutations with gamma irradiation. *Life Sci.* **10**, 9s.
 20. Kim, M. Y., Kim, I. J., Lee, H. Y., Lee, D. S., Im, S. J., Kim, J. H., Byun, J. H., Kim, J. Y., Lee, Y. J. and Jeong, S. R. 2012. Characterization of the antioxidant properties of citrus mutants induced by Gamma-rays. *Life Sci.* **9**, 1495-1500.
 21. Kim, Y. D. 2009. Study on the composition of flavonoids and biological activities from jeju citrus fruits. *Jeju National University Graduate School*.
 22. Kim, Y. D., Ko, W. J., Koh, K. S., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2009. Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation. *Kor. J. Nutr.* **42**, 278-290.
 23. Kim, Y. D., Lee, Y. C., Oh, Y. J. and Kang, Y. J. 2001. Changes of components of citrus sudachi juice heated at various temperatures. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **33**, 238-244.
 24. Kim, Y. D., Mahinda, S., Koh, K. S., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2009. Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 462-469.
 25. Kim, Y. J., Kim, Y. D., Oh, S. W., Kang, Y. J. and Lee, Y. C. 1999. Antimicrobial activities of solvent extracts from citrus sudachi juice and peel. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 1613-1618.
 26. Lee, Y. J., Choi, Y. H., Lee, S. Y., Park, K. J., Park, S. M., Hong, H. J. and Han, C. H. 2010. A study on the treat cause of diabetes due to dry citrus flavonoids. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 105-106.
 27. Lee, Y. J., Kim, D. B., Cho, J. H., Bail, O. H. and Lee, O. H. 2013. Physicochemical characteristics and antioxidant activities of bioresource juices from Jeju. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45**, 293-298.
 28. Lee, Y. M., Bae, J. H., Jung, H. Y., Kim, J. H. and Park, D. S. 2011. Antioxidant activity in water and methanol extracts from korean edible wild plants. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 29-36.
 29. Moon, S. H., Assefa, A. D., Ko, E. Y. and Park, S. W. 2015. Comparison of flavonoid contents and antioxidant activity of yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) based on harvest time. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **33**, 283-291.
 30. Nakagawa, H., Duan, H. and Takaishi, Y. 2001. Limonoids from citrus sudachi. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **49**, 649-651.
 31. Nam, S. M., Kang, I. J. and Shin, M. H. 2015. Anti-diabetic and anti-oxidative activities of extracts from crataegus pinnatifida. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **25**, 270-277.
 32. Nii, Y., Fukuta, K., Sakai, K. and Yamamoto, S. 2004. Japanese citrus fruit (sudachi) juice is associated with increased bioavailability of calcium from whole small fish and suppressed bone resorption in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **50**, 177-183.
 33. Oh, H. S. 2009. Cooking potentiality for japanese dishes using domestic citrus sudachi. *Kor. J. Culin. Res.* **15**, 18-27.
 34. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutri.* **44**, 307-315.
 35. Park, G. H., Lee, S. H., Kim, H. Y., Jeong, H. S., Kim, E. Y., Yun, Y. W., Nam, S. Y. and Lee, B. J. 2011. Comparison in antioxidant effects of four citrus fruits. *J. Ed Hyg. Saafety* **26**, 355-360.
 36. Rainha, N., Lima, E., Baptista, J. and Rodrigues, C. 2011. Antioxidant properties, total phenolic, total carotenoid and chlorophyll content of anatomical parts of *Hypericum foliosum*. *J. Med. Plan. Res.* **5**, 1930-1940.
 37. Sengoku, T., Murata, Y., Mitamura, H., Takahashi, M. and Yoda, H. 2012. Synthesis of novel mucic acid 1,4-lactone methyl ester 3-O-ferulate related to an extractive component isolated from the peels of citrus sudachi. *Tetrahed. Lett.* **53**, 435-437.
 38. Shin, J. H., Lee, S. J., Seo, J. K., Chen, E. W. and Sung, N. J. 2008. Antioxidant activity of hot-water extract from yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) peel. *J. Life Sci.* **18**, 1745-1751.
 39. Shin, K. N., Lee, H. S. and Kwon, C. S. 2011. Effects of nutrition education in type 2 diabetes mellitus on diabetes control and blood antioxidant status. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 689-695.
 40. Tsutsumi, R., Yoshida, T., Nii, Y., Okahisa, N., Iwata, S., Tsukayama, M., Hashimoto, R., Taniguchi, Y., Sakaue, H. and Hosaka, T. 2014. Sudachitin, a polymethoxylated flavone, improves glucose and lipid metabolism by increasing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Nutr. Metab.* **11**, 1-14.
 41. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44-84.
 42. Yim, C. Y. 2010. Nitric oxide and cancer. *Kor. J. Med.* **78**, 430-436.
 43. Yoo, K. M. and Hwang, I. K. 2004. *In vitro* effect of yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Kor J. Food Sci. Technol.* **36**, 339-344.

44. Yuasa, K., Tada, K., Harita, G., Fujimoto, T., Tsukayama, M. and Tsuji, A. 2012. Sudachitin, a polymethoxyflavone from citrus sudachi, suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mouse macrophage-like RAW264 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 598-600.
45. Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.

초록 : 수확시기별 제주산 영굴의 항산화 및 항당뇨 활성 비교

이지은^{1†} · 김지혜^{1†} · 김민영^{1,2*}

(¹제주대학교 생명자원과학대학 바이오소재전공 독성학 실험실, ²제주대학교 아열대농업생명과학연구소)

본 연구는 9월과 11월에 수확한 영굴 미성숙과와 성숙과의 항산화 및 항당뇨 활성을 비교하였다. 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 카로티노이드 함량을 분석한 결과 모두 성숙과의 함량이 높았다. 항산화 활성을 DPPH radical, hydrogen peroxide, nitric oxide 소거능, 금속 결합능 및 환원력으로 평가하고 이를 EC₅₀으로 나타낸 결과 금속 결합능을 제외하고 성숙과의 활성이 유의적으로 높았다. α-Glucosidase 저해 활성을 통해 항당뇨 활성을 확인한 결과 성숙과가 높은 저해도를 나타내었다. 이를 통해 출하 시기를 놓친 영굴 성숙과도 건강기능식품 및 의약품 소재로 개발 가능성이 있다고 판단되며 이를 활용하기 위한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.