



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

제주산 재래감귤 과피와 종자 추출물의
항산화 활성 및 주요 플라보노이드 분포

제주대학교 대학원

식품공학과

고 영 국

2009年 8月

제주산 재래감귤 과피와 종자 추출물의 항산화 활성 및 주요 플라보노이드 분포

지도교수 김 수 현

고 영 국

이 논문을 공학 석사학위 논문으로 제출함

2009年 8月

고영국의 공학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 河 璉 桓 (印)

위 원 宋 大 鎭 (印)

위 원 金 洙 賢 (印)

제주대학교 대학원

2009年 8月

Antioxidant Activities and Distribution of
Main Flavonoid of Extracts from Jeju
Citrus Peels and Seeds

Young-Kuk Ko

(Supervised by Professor Soo-Hyun Kim)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING

2009. 8.

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND
ENGINEERING GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Summary	i
List of Tables	iii
List of Figures	iv
I. 서 론	1
II. 연구사	4
III. 재료 및 방법	9
1. 실험재료	9
1) 추출용 시료의 조제	9
2) 에탄올 추출물의 조제	9
3) 효소적 추출물의 조제	10
4) 시약	11
5) HPLC 분석 시약 및 기기	11
2. 실험방법	12
1) 일반성분 분석	12
2) 총 polyphenol 함량	12
3) 항산화 효과	12
(1) DPPH radical 소거활성 측정	12
(2) Superoxide anion radical 소거활성 측정	13
(3) Hydroxyl radical 소거활성 측정	14
(4) HPLC 정성·정량 분석	15
IV. 결과 및 고찰	16
1) 일반성분	16
2) 총 polyphenol 함량	17
3) DPPH radical 소거활성	18
4) Superoxide anion radical 소거활성	22

5) Hydroxyl radical 소거활성	26
6) HPLC를 이용한 flavonoid 정성·정량 분석	28
V. 요약	36
VI. 참고문헌	39



Summary

Water, 30, 50, 70, and 95% as well as enzymatic extracts from peel and seeds of different citrus varieties such as *Citrus sunki*, *Citrus sulcata*, *Citrus grandis* and *Citrus junos* were evaluated for their radical scavenging potential by DPPH, superoxide and hydroxyl radical scavenging assays as well as flavonoid content by HPLC.

Water extracts, 30 and 50% ethanol extracts of peel from all the citrus samples showed more than 50 % activities in DPPH radical scavenging while 70% ethanol extracts of peel from *Citrus sunki*, *Citrus sulcata* and *Citrus grandis* showed more than 50% scavenging activities in DPPH radical scavenging. Only 95% ethanol extract of peel from *Citrus junos* showed more than 50% DPPH radical scavenging activity. Among all, 50% ethanol extracts of peel from *Citrus sunki* showed the highest DPPH radical scavenging activity, and all the extracts of seed from *Citrus grandis* and *Citrus junos* showed the lowest activities in DPPH radical scavenging.

Among carbohydrase enzymes, the AMG extract of the peel from *Citrus sunki* showed the highest DPPH radical scavenging activity (60.5%) while all the extracts of seed of all citrus varieties showed lower activities (less than 50%). Among proteases enzymes, Nutrase extract of peel from *Citrus sunki* and *Citrus grandis* showed strong activities in DPPH radical scavenging (86.2 and 77.1% in *Citrus sunki* and *Citrus grandis*, respectively), while Kojizyme extract of peel from *Citrus junos* showed the third highest activities (70%). However, all the extracts of seed from all the citrus varieties showed the activities less than 50%.

All ethanolic and water extracts of peel and seed from *Citrus sunki*, *Citrus sulcata*, *Citrus grandis* and *Citrus junos* showed mild activities, and it was

less than 15%. 95% ethanolic extracts of seed from all the citrus varieties showed very low activities in superoxide anion radical scavenging.

Among carbohydrase enzymatic extracts of peel, *Citrus sunki*, *Citrus sulcata*, *Citrus grandis* and *Citrus junos*) showed the activities between 70.5–79, 65.9–83.7, 65.8–82.9 and 70.5–73.8%, respectively in superoxide radical scavenging. All the carbohydrase extracts of peel showed more than 60% activities while AMG and Ultraflo extracts of peel showed more than 70% activities. All the carbohydrase extracts of seed showed moderate activities but AMG and Ultraflo extracts of seeds showed more than 70% activities. Among proteases enzymatic extracts of peel, *Citrus sunki*, *Citrus sulcata*, *Citrus grandis*, and *Citrus junos* showed the activities between 72.1–79.3, 77–81.9, 79.5–88.8 and 49.2–80.6.%, respectively in superoxide radical scavenging. All the proteases extracts of seed showed moderate activities, but Protamex and Alcalase extracts of seeds showed more than 70% activities.

Both peel and seed water extracts from all the citrus varieties showed the activities less than 30% but 30,50,70 and 95% ethanolic extracts from peel and seed from all the citrus varieties showed moderate activities (around 50%) in hydroxyl radical scavenging.

Except water extracts of peel and seed, other extracts showed strong hydroxyl radical scavenging activities compared with the commercial antioxidant, Trolox.

All extracts of peel and seed from *Citrus sunki*, *Citrus sulcata*, *Citrus grandis* and *Citrus junos* were analyzed for their flavonoid content by HPLC, and found that Hesperidin, Hesperitin, Naringin and Rutin are available in considerable amounts. The extracts of peel from *Citrus sunki* showed 0.730 and 0.255 mg/g of hesperidin and hesperitin, respectively, while the extract of peel from *Citrus sulcata* showed 0.678 mg/g hesperidin. Further, the extract of peel from *Citrus grandis* showed 0.206, 0.865, 0.085 mg/g of hesperidin, naringin and rutin respectively while the extracts of peel from *Citrus junos*

showed 0.234, 0.182, 0.015 mg/g of hesperidin, naringin and rutin respectively. The extract of peel from *Citrus sunki* showed 0.017 mg/g quercetin, while the extracts of seed from *Citrus sunki*, *Citrus sulcata*, *Citrus grandis* and *Citrus junos* showed trace amount of caffeic acid.



List of Tables

Table 1. Scientific name of Citrus varieties	9
Table 2. Characteristics of different carbohydrases and proteases in hydrolysis process	10
Table 3. HPLC instrumental conditions for analysis	15
Table 4. Mobile phase conditions of HPLC gradient-elution	15
Table 5. Proximate composition of citrus peels used in this study	16
Table 6. Content of flavonoid and total phenol content from citrus peels and seeds	17
Table 7. DPPH radical scavenging activity of ethanolic extracts from citrus peels and seeds	19
Table 8. DPPH radical scavenging activity of enzymatic extracts from citrus peels and seeds	20
Table 9. Superoxide anion scavenging activity of ethanolic extracts from citrus peels and seeds	23
Table 10. Superoxide anion scavenging activity of enzymatic extracts from citrus peels and seeds	24
Table 11. Hydroxyl radical scavenging activity of ethanolic extracts from citrus peels and seeds	27
Table 12. Flavonoid contents of ethanolic extracts from peels of four citrus species by HPLC analysis	28
Table 13. Flavonoid contents of ethanolic extracts from seeds of four citrus species by HPLC analysis	29

List of Figures

Fig. 1. Schematic diagram of enzymatic extraction from citrus peels and seeds	10
Fig. 2. Schematic diagram of DPPH radical scavenging assay	13
Fig. 3. Schematic diagram of superoxide anion radical scavenging assay	13
Fig. 4. Schematic diagram of hydroxyl radical scavenging assay	14
Fig. 5. HPLC chromatogram of peel of <i>Citrus sunki</i> _70%	32
Fig. 6. HPLC chromatogram of peel of <i>Citrus sulcata</i> _70%	32
Fig. 7. HPLC chromatogram of peel of <i>Citrus grandis</i> _70%	33
Fig. 8. HPLC chromatogram of peel of <i>Citrus junos</i> _70%	33
Fig. 9. HPLC chromatogram of seed of <i>Citrus sunki</i> _50%	34
Fig. 10. HPLC chromatogram of seed of <i>Citrus sulcata</i> _70%	34
Fig. 11. HPLC chromatogram of seed of <i>Citrus grandis</i> _70%	35
Fig. 12. HPLC chromatogram of seed of <i>Citrus junos</i> _70%	35

I. 서론

최근 천연소재를 이용한 신물질 탐색 연구가 활발히 진행되면서 천연소재가 함유하는 생리활성물질에 대한 관심이 증대되고 있다. 이 천연소재로부터 추출 분리한 생리 활성물질은 적은 양으로도 고부가가치를 실현할 수 있는 질병에 대한 치료 및 예방제 또는 건강보조제로서 널리 이용되고 있다. 특히, 천연물로부터 제조된 생리활성 물질은 합성물질에 비해 부작용이 적고, 인체 내에서 안전성이 높은 이점이 있어 천연 소재를 활용한 응용분야에서의 적용 가능성이 높아지고 있다.

경제성장에 따른 소득 수준의 향상과 여성의 사회 활동 증가에 따라 국내화장품 산업은 2001년 기준 4조 원의 시장으로 확대되었으며, 관련 산업까지 합치면 약 10조 원 정도의 대형시장을 형성하고 있다. 화장품 산업은 보다 기능적이고, 천연물 유래 제품을 선호하는 소비자의 욕구에 부응하여 전문적이고, 고도의 기술을 요하는 첨단산업으로 점차 자리매김하고 있으며, 이에 따른 새로운 원료개발의 요구도 높아지고 있다.

제주도에서도 2000년대부터 제주 건강·뷰티 생물산업 육성 프로젝트를 전략적으로 추진하고 있으며, 이 중 뷰티프로젝트로서 향장품 산업을 부흥시키기 위하여 다방면에서 노력하고 있다. 이에 따라 2005년에 제주화장품공장을 준공하여 향장품 개발에 노력을 기울이고 있다.

최근에 인간 누구에게나 찾아오는 생체기능의 불가항력적이라고 여겨지는 노화에 대한 많은 관심을 가지게 되었다. 노화의 원인 중의 하나는 산소에 의한 것인데, 산소는 호흡을 통하여 에너지를 체내에 공급하도록 하는 등 생명 유지에 절대적으로 필요한 요소이지만 에너지 생성과정, 정상적인 신진대사 과정 및 면역 체계를 통해 끊임없이 활성산소(active oxygen)를 생성하게 된다. 즉, 활성산소는 자외선, 방사선, 화학반응, 대사 과정을 통하여 생성되어 DNA 분절, 지질 과산화, 단백질의 비활성화 등을 통하여 암, 당뇨병, 뇌졸중, 동맥경화, 심혈관 질환, 신부전, 빈혈 등 광범위한 질병의 병태 생리적 원인을 제공하고 노화를 촉진

하는 것으로 알려져 있다(1~4).

이들 활성산소는 대체 대사과정에서 생성되어 세포막 지방질을 과산화시키고 세포막 투과성의 변화를 초래하여 DNA 손상을 유발시킨다고 보고되어 있으며, 이러한 활성산소들을 소거시킬 수 있는 역할을 할 수 있는 물질로서 페놀화합물, 카로티노이드, 유기산 및 스테로이드성 알카로이드 화합물 등이 연구되어지고 있다(5~6).

천연 항산화제로는 α -tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids 등이 알려져 있는데, 이러한 항산화 효과가 있는 물질들은 동식물에 널리 분포되어 있으며, 특히 많은 연구가 식물성 소재분야에서 이루어지고 있다. 식물 유래의 2차 대사산물들은 자유유리기 (free radical)와 활성산소의 생성을 억제하거나 제거시켜서 산화에 의한 세포손상을 방지한다는 것이 생체 실험결과 밝혀졌다 (7~8). 지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 것으로서 주로 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있으며, 특히 flavonoids는 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어서 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등의 소재로 많이 활용되고 있다 (9).

감귤에는 flavonoid, limonoid 및 carotenoid 등이 함유되어 있어서 생리활성물질에 대한 연구 및 기능성식품으로서의 가치가 재조명되고 있는데, 특히 감귤류에 존재하는 flavonoid는 항알러지성, 항염성, 항바이러스성, 항암성 등의 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있고(10), 또한 감귤 유래 식이섬유도 다양한 생리조절 기능 때문에 기능성 식품소재로 이용되어 왔다(11).

감귤류의 과피는 온주밀감은 약 25%, 산귤은 20%, 당유자는 50%정도로 전과실의 약 20~50%를 차지하고 있다. 특히, 감귤에는 naringin, hesperidin, neohesperidin, rutin, naringenin, hesperetin, narirutin, nobiletin, tangeretin, sinensetin, natsudadain, didymin, poncirin, eriocitrin, 5,7,4'-tri-methoxylated flavone, sudachitin, 5,6,7,4'-tetra-methoxylated flavone, 5'-desmethoy nobiletin, 4'-methoxylated flavone, 3',4'-di-methoylated flavone 등과 같은 flavonoid가 다량 함유되어 있으며, 향기성분으로는 *d*-limonene 이외에 여러 가지 limonoid를 많이 함유하고 있는 것으로 보고되어지고 있다(12).

Hesperidin은 생리 및 약리 작용, naringin은 혈압강하작용 및 항산화작용(14)을 갖고 있는 것으로 보고되고 있으며, limocitrin-3- β -D-glucose, limocitrin-3- α -L-rhamnose, 3,6-di-C-glucosylapigenin 등은 혈압강하 효과(15), sinensetin, nobiletin은 항혈액응고작용, 항바이러스작용(16), nobiletin 및 tangeritin은 항돌연변이원성 효과(17), quercetin과 tangeretin은 암의 침투와 전이를 방지(18) 하는 것으로 보고되고 있다.

감귤의 종자는 주로 만감류에 존재하며, 이들 종실율은 산귤이 20.3%, 삼보감 5.0%, 당유자 3.5%, 하귤 2.5%, 금귤자 1.7%, 스타치(sudachi) 1.1%, 이에감 0.9%, 금감 2.1%로, 감귤종자에는 limonoid류와 α -tocopherol 등이 함유되어 있어 항암, 항산화 등의 여러 생리적 기능이 있는 것으로 보고되어지고 있다(20).

따라서 본 연구에서는 제주산 감귤류 종자에 대한 생리기능을 가진 물질을 탐색하기 위한 연구로 제주에서 소량 재배되고 있는 재래종 감귤 중 산귤, 삼보감, 당유자, 유자의 과피와 종자의 일반성분을 분석하고, 또한 과피와 종자 알코올 추출물에 대한 항산화성 등에 관련된 실험을 통하여 감귤의 과피와 종자가 가지고 있는 생리활성에 대한 기능성을 규명하고자 한다.

II. 연구사

1. 감귤류의 생리활성

운향과(芸香科, Rutaceae)에 속하는 감귤류의 열매는 유기산과 당분의 독특한 향미와 풍부한 과즙을 지닌 과실로 생과 및 과즙음료의 원료로서 널리 이용되고 있으며, 감귤은 독특한 향미와 다량의 비타민 C를 함유하고 있기 때문에 제주 특산과일로서 생과와 과즙음료로 널리 이용되고 있다. 또한 flavonoid, limonoid 및 carotenoid 등이 함유되어 있어서 생리활성물질에 대한 연구 및 기능성식품으로서의 가치가 재조명되고 있으며, 특히 감귤류에 존재하는 flavonoid는 항알러지성, 항염성, 항바이러스성, 항암성 등의 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있으며, 감귤 유래 식이섬유도 다양한 생리조절 기능 때문에 기능성 식품소재로 이용되고 있다(10). 감귤에는 hesperidin, rutin, narirutin, naringin, neohesperidin, nobiletin, poncirin 등과 같은 flavonoid가 다량 함유되어 있고, 향기성분으로는 d-limonene 이외에 여러 가지 limonoid를 다량 함유하고 있으며, 색소성분은 carotenoid계 물질로 알려지고 있다(12).

감귤류의 기능성에 관한 연구 중 우선 감귤 주스로 이루어진 보고를 보면, 주스의 이화학적 성상, 헤스페리딘과 나린진의 함량 등의 영향으로 감귤류 주스가 발암물질인 니트로스아민의 생성을 억제한다는 알려져 있으며, 감귤의 종자는 주로 만감류에 존재하며, 종실율은 산귤이 20.3%, 삼보감 5.0%, 당유자 3.5%, 하귤 2.5%, 금귤자 1.7%, 스타치(sudachi) 1.1%, 이예감 0.9%, 금감 2.1%로, 감귤종자에는 limonoid류와 α -tocopherol 등이 함유되어 있어 항암, 항산화 등의 여러 생리적 기능을 갖고 있다는 보고도 있다(19). 그리고 귤, 유자, 레몬 등에 함유된 정유성분의 스트레스로 인한 우울증 치료효과 등에 대한 연구보고도 알려져 있다(21).

2. 감귤 주요성분의 생리활성

감귤류에 함유되어 있는 여러 가지 신기능성 소재들 중, 고미성분인 limonoids와 색소 요소로서의 flavonoid에 대해서는 최근 이들의 생리 활성 효능에 대한 보고(22)가 있으며, limonoids가 구강암 및 피부암 억제에 역할을 하는 것으로 알려져 있어 노화 방지용 기능성 화장품(23) 및 해충을 방지하는 효과에 대한 연구 보고가 있다(24). 그리고 flavonoid의 항염증, 항세균, 항바이러스, 항알러지, 항종양활성, 항용혈활성 등에 대한 보고(25)도 있다.

Hesperidin은 식물세포뿐만 아니라 포유류 동물의 in vitro와 in vivo에서 여러 가지 생리 및 약리 작용(13), naringin은 혈압강하작용 및 항균작용, 항산화 작용, limocitrin-3- β -D-glucose, limocitrin-3- α -L-rhamnose, 3,6-di-C- glucosylapigenin 등은 혈압강하 효과(15), sinensetin, nobiletin은 항혈액응고작용, 항바이러스작용(16), nobiletin 및 tangeretin은 항돌연변이원성 효과가 높으며(17), quercetin과 tangeretin은 암의 침투와 전이를 막아주고(18), limonin, nomilin과 같은 citrus limonoid는 구강암을 억제한다고 보고하고 있다(19).

Flavonoid는 antilipoperoxidant, antitumoral, antiplatelet, anti-ischemic, anti-allergic, anti-inflammatory 활성이 있고(26), 또 lipoxygenase, cyclooxygenase, monooxygenase, xanthine oxidase, mitochondrial succinoxidase, NADH-oxidase, phospholipase A, protein kinases 등의 여러 효소활성을 저해한다고 보고되고 있다(27). 감귤 잎에서 분리된 glyceroglycolipid는 강력한 promotion 억제활성을 갖고 있으며(29), 감귤 정유성분은 항균성이 있고(30), 이중 d-limonene은 쥐의 지방암을 억제한다고 보고하고 있다(31). Flavonoid의 생물학적 영향력은 항산화성으로 유래된다고 알려졌는데 철에 대한 우수한 chelating effect 및 free radical 의 scavenging activity 보고와 세포막 과산화 손상에 대한 flavonoid의 보호효과(32) 등 다양한 생리활성을 가지는 limonoid와 flavonoid의 조성 분석법(33, 34)이 확립되어지고 있다.

3. 활성산소에 대한 연구 동향

최근에 인간 누구에게나 찾아오는 생체기능의 불가항역적이라고 여겨지는 노화에 대한 많은 관심을 가지게 되었다. 노화의 원인 중의 하나는 산소에 의한 것인데, 산소는 호흡을 통하여 에너지를 체내에 공급하도록 하는 등 생명 유지에 절대적으로 필요한 요소이지만 에너지 생성과정, 정상적인 신진대사 과정 및 면역 체계를 통해 끊임없이 활성산소(active oxygen)를 생성하게 된다. 즉, 활성산소는 자외선, 방사선, 화학반응, 대사 과정을 통하여 생성되어 DNA 분절, 지질 과산화, 단백질의 비활성화 등을 통하여 암, 당뇨병, 뇌졸중, 동맥경화, 심혈관 질환, 신부전, 빈혈 등 광범위한 질병의 병태 생리적 원인을 제공하고 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다(1~4).

이들 활성산소는 대체적으로 대사과정에서 생성되어 세포막 지방질을 과산화시키고 세포막 투과성의 변화를 초래하여 DNA 손상을 유발시킨다고 보고되어 있으며, 이러한 활성산소들을 소거시킬 수 있는 역할을 할 수 있는 물질로서 페놀화합물, 카로티노이드, 유기산 및 스테로이드성 알카로이드 화합물 등이 연구되어지고 있다(5~6).

Harman(35)는 산소로부터 유래된 활성산소 종들에 의한 끊임없는 손상의 축적이 노화와 노화관련 질병의 주요 인자라는 oxidative stress설을 처음 제안하였다. 그 이후로 활성 산소종들에 의한 oxidative stress의 증가는 세포내 성분의 산화적 손상 및 DNA 변이 등을 통하여 세포내 항상성의 파괴를 초래함으로써 여러 가지 퇴행성 질병들의 발병 및 노화현상의 촉진 등과 관련이 깊은 것으로 알려져 있는 등 oxidative stress theory에 대한 많은 연구가 진행되었다(36). 생체내에서 유발되는 대표적 활성 산소종들 중 superoxide anion radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide 등은 생물학적 중요성을 지닌 주요 물질로 평가되고 있다. 최근 산화질소들의 생물학적 역할들에 대한 연구들이 계속되면서 peroxynitrite(ONOO-) 또한 생체내 중요 활성산소 종들로 인식되고 있다. Superoxide anion radical은 세포내 기관인 mitochondria의 전자 전달계에서 자연적으로 생성되며 tryptophan dioxygenase, xanthine oxidase, flavoprotein

dehydrogenase 등의 효소 반응 및 식세포성 백혈구의 작용에서도 과잉 생성될 수 있다. 하지만 $O^{2-} \cdot$ 는 생체내 제거 효소인 superoxide dismutase(SOD)에 의해 dismutation 되어 그 농도는 낮게 유지된다(37).

Nitric oxide synthase(NOS)는 물리화학적 성질에 따라 Type I, II, II 등 3종류의 동종 효소로 분류된다. 이 중에 neuronal NOS (nNOS)와 endothelial NOS (eNOS)는 세포에 지속적으로 존재하기 때문에 지속적 NOS(constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포 등에서 lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (INF- γ) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α)등의 자극제들에 노출되는 경우에 발현되는 type II인 inducible NOS (iNOS)가 있다(38). iNOS에 의해 생산된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(39). 그리고 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 생성은 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다(40). 그러므로 NO 생성 저해제는 패혈성 쇼크, 당뇨, 동맥경화 등의 만성질환 치료제로의 가능성을 제시하고 있어, 최근에는 천연물로부터 NO생성 저해제를 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다(41).

4. 천연물의 항산화 성분에 대한 연구 동향

자연계에 천연적으로 존재, 분포되어 있는 동물이나 식물류 중에는 생체를 조절하는 기능을 가지고 성분이 함유된 식품이 많이 있다는 것이 최근 연구에 의해 밝혀짐에 따라 이에 관계된 기능성소재의 발굴 및 생리활성물질 규명에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 이러한 연구자들에 의해 각종 식물류에 항산화효과가 있음이 알려져 있으며, 천연물질 중에는 산화를 방지하는 기능을 가진 물질이 상당수 존재하는데 가장 주목받고 있는 것은 생약 중의 페놀성 물질로 그 이유는 이 페놀성 물질이 항산화성을 가진 대표적인 물질로 보고 있기 때문이다(42). 일반적으로 유지를 많이 함유한 식물종자에는 항산화 물질이 함유되어 있다고 알려져 있는데, 특히 참깨 박에는 sesamol, samolinol, sesaminol 등이 함

유되어 항산화 효과가 있음이 보고된 바 있다(43).

현재까지 알려진 천연 항산화 물질로는 아스코브르산, 토코페롤류, 플라보노이드와 그 유도체(44), 갈변반응 생성물, 아미노산 및 단백질 등이 알려져 있다(45).

Farag 등은 천연 항산화제로서 가장 많이 연구된 각종 허브류들의 정유성분을 추출하여 기본 linoleic acid에 대한 항산화효과를 시험한 결과caraway>sage>cumin>rosemary>thyme>clove순이었다고 하였으며, thyme과 clove가 면실유에 대하여 산화 억제 효과가 있다고 보고하였다(46).

왕겨의 methanol추출물에서 C-glycosylflavonoid중 isovitexin은 α -tocopherol과 같은 강도의 항산화 효과가 있고(47), 고추 과피 추출물은 마가린에 대한 항산화 효과가 있으며(48), 또한 갖과 겨자의 methanol추출물도 항산화 효과가 있음이 보고되었다(49).

Hirosue 등은 日本藥局方に 수록된 24종의 생약에 대하여 여러 가지 용매 추출물의 항산화력을 검토한 결과 생강, 감초, 정향 및 창출 추출물들이 강한 항산화력을 가지고 있다고 보고하였다(50). 그리고 우리나라에서 재배되고 있는 생약 추출물의 항산화효과를 검토한 연구보고서에 의하면 황금, 목단과 백문동의 methylene chloride 추출물이 항산화효과를 갖고 있다는 사실도 알려져 있다(51).

패모, 어성초, 쇠비름 및 들깨박의 에탄올 추출물의 항산화 효과에 쇠비름 추출물이 돈지에 대한 산화억제 효과가 높다고 보고되었으며(52), 한국산 황기와 중국산 황기 추출물이 대두유, 팜유에 대하여 항은 저장 시나 가열시 모두, 그리고 홍화씨유에 대하여는 가열 산화 시에 BHT와 같거나 보다 우수한 항산화 효과를 보였으며 특히, 농도가 높을수록 더 좋은 항산화효과를 보였다고 보고되었다(53).

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 추출용 시료의 조제

제주도 내 과수원에서 '08년 1월경 직접 수집한 감귤류(Table 1)를 세척하고 과피를 우선 분리하여 동결건조하였고, 종자는 분리하여 24시간 수침시키고 물로 3~4회 정도 깨끗이 세척한 후, 동결건조기에서 건조시켜 분쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 하였다.

Table 1. Scientific name of Citrus varieties

Varieties	Scientific name
Sankyool(SK)	<i>Citrus sunki</i>
Sambokam(SB)	<i>Citrus sulcata</i>
Dangyooja(DY)	<i>Citrus grandis</i>
Yuja(YJ)	<i>Citrus junos</i>

2) 에탄올 추출물의 조제

감귤 종자와 과피의 분말을 각각 1g씩 채취하여 100ml의 농도별(water, 30% EtOH, 50 EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH)용매로 각각 24시간 추출하고, 다시 여과지(Whatman, England, pore size : 0.45 μ m)를 사용하여 실험에 사용할 sample을 여과하였다.

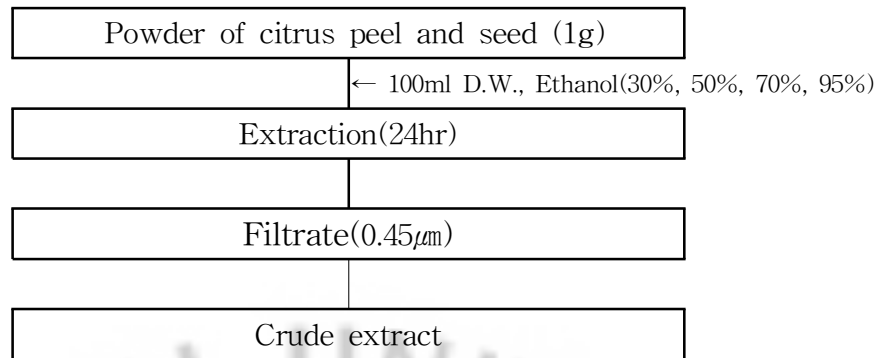


Fig. 1. Schematic diagram of enzymatic extraction from citrus peels and seeds.

3) 효소적 추출물의 조제

효소적 추출은 다음과 같은 방법으로 가수분해하였다. 즉 동결 건조한 감귤과 피와 종자를 분말화하여 시료 각 1g를 100ml의 증류수와 혼합한 후 100 μ l의 당 분해효소와 단백질분해효소를 첨가하였다. 효소적 가수분해반응물은 24시간 동안 최적 조건하에서(Table 2) 효소반응을 통해 추출한 후 각 효소 추출물을 3,000 \times g에서 20분간 원심분리하여 잔사를 제거하고 상층액을 취한 후 여과하여 농도를 4mg/ml로 맞추어 이를 효소적 추출시료로 하였다(129).

Table 2. Characteristics of different carbohydrases and proteases in hydrolysis process

Enzyme	Optimal		Characteristics	
	pH	T(°C)		
Carbohy- drases	Viscozyme	4.5	50	Ability to liberate bound materials and to grade non-starch polysaccharides
	Celluclast	4.5	60	Catalyzes the breakdown of cellulose into glucose, cellobiose and higher glucose polymer
	AMG	4.5	60	Hydrolyzes 1,4- and 1,6- linkages in liquefied starch
	Termamyl	6.0	60	Hydrolyses 1,4-glucosidic linkages in amylose and amylopectin.
	Ultraflo	7.0	60	Breakdown of α -glucans, pentosans and other gums
Proteases	Protamex	6.0	40	Production of non-bitter protein hydrolysis
	Kojizyme	6.0	40	Amino- and carboxy peptidase activities
	Nutrased	6.0	50	Endopeptidase activities
	Flavourzyme	7.0	50	Endoprotease and exopeptidase activities
	Alcalase	8.0	50	Endopeptidase activities

4) 시약

본 실험에 사용한 당분해효소(AMG, Celluclast, Termaryl, Viscozyme, Ultraflo, Pectinex)와 단백질 분해효소(Protamex, Kojizyme, Nutrase, Flavourzyme, Alcalase)는 Novo 사(Novozymes Nordisk, Bagsvaed, Denmark)에서 구입하여 사용하였으며, DPPH(Sigma D-9132), Sodium carbonate(Sigma S-7795), Sodium bicarbonate(Sigma S-5761), Xanthine (Sigma X-4002), EDTA · 2Na · 2H₂O(Sigma ED2SS), BSA(Bovine serum albumin) (Sigma A-7906), NBT(Nitrotetrazolium blue)(Sigma N-6876), Xanthine Oxidase (Sigma X-4376), Sodium phosphate monobasic(Sigma S-8282), Sodium phosphate dibasic (Sigma S-7907), 2-deoxy-D-ribose(Sigma D-5899), Iron(III) chloride hexahydrate (Daejung Chemicals), Hydrogen peroxide solution 30%(Sigma H-1009), L-Ascorbic acid(Aldrich A-92902), TCA(Trichloroacetic acid)(Sigma X-4376), TBA(4,6-Dihydroxy-2-mercaptopyrimidine)(Alfa Aesar A-12681)를 사용하였고, 그 외 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

5) HPLC 분석 시약 및 기기

HPLC 분석에 사용된 용매는 Fisher Chem. Alent Guide Co.사의 metanol(HPLC Grade)과 acetitrile(HPLC Grade)제품을 사용하였으며, buffer로는 Dae Jung Co.사의 acetic acid를 사용하였다. 분석 기기인 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph)는 Waters Co.사 제품으로 Alliance2695이며, Detector는 PDAD(Photodiode Array Detector)를 사용하였다. Column는 Waters Co.사의 Xterra® RP18 3.5µm 4.6×100mm를 사용하였다. 표준물질로 사용된 시약을 Sigma Co.사 제품으로 caffeic acid, rutin, hesperidin, naringin, quercetin, hesperetin 총 6개의 표준품을 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 일반성분 분석

감귤 과피와 종자의 일반성분은 AOAC(54)법에 따라 감귤 종자를 수분은 상압가열 건조법, 조단백질은 micro kjeldahl법(질소 계수 : 5.30), 조지방은 Soxhlet 지방추출법, 탄수화물은 Somogi-변법, 조회분은 직접회화법으로 분석하였다.

2) 총 polyphenol 함량

총 polyphenol 함량은 Folin-Denis(28)방법을 변형하여 측정하였다. 시료 5ml에 Folin시약 5ml를 가하고 3분 후 10% sodium carbonate 5ml를 넣어 30℃에서 1시간 발색시킨 다음 700 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 대조구로서는 검액 대신 물을 사용하였고 미리 (+)-catechin을 사용하여 구한 검량곡선으로부터 시료 중의 polyphenol 함량을 측정하였다.

3) 항산화 효과

(1) DPPH radical 소거활성 측정

감귤 과피와 종자의 각 추출물의 free radical 소거활성은 Blois(55)의 방법을 변형하여 측정하였다.

에탄올에 용해시킨 0.2mM DPPH 용액 100 μ l에 각 추출물 200 μ l를 넣고 혼합하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정 하였으며, DPPH free radical의 소거활성은 다음식에 의하여 계산하였다(Fig. 2).

DPPH free radical 소거활성(%)

$$= [1-(\text{대조구흡광도}-\text{시료흡광도})/\text{대조구흡광도}] \times 100$$

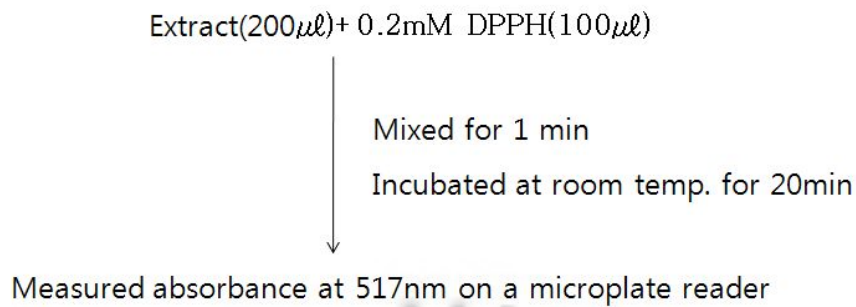


Fig. 2. Schematic diagram of DPPH radical scavenging assay.

(2) Superoxide anion radical 소거활성 측정

Superoxide anion radical 소거활성은 Nagai 등(56)의 방법에 따라 50 μ M Na₂CO₃ buffer(pH 7.8) 600 μ l에 3mM xanthine 25 μ l, 3mM EDTA 25 μ l, 0.15% bovine serum albumin 25 μ l, 0.75mM NBT 25 μ l의 혼합용액에 시료 25 μ l를 넣어 25 $^{\circ}$ C의 incubator에서 10분 반응시킨 후, 6mM의 xanthine oxidase(XOD) 25 μ l를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C의 incubator에서 20분 반응시켜, Spectrophotometer(Spectra Max, Molecular Devices, USA)로 560nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 3).

Superoxide anion radical 소거활성은 다음과 같이 계산하였다.

Superoxide anion radical 소거활성(%)

$$= [1 - (\text{대조구 흡광도} - \text{시료 흡광도}) / \text{대조구 흡광도}] \times 100$$

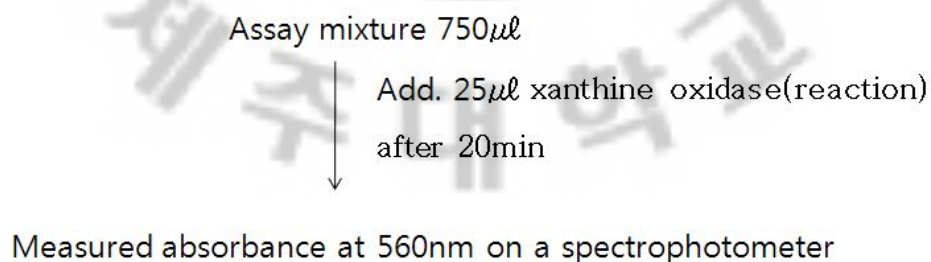


Fig. 3. Schematic diagram of superoxide anion radical scavenging assay.

(3) Hydroxyl radical 소거활성 측정

감귤 과피와 종자 각 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 Chung 등(57)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 hydroxyl radical은 iron(III)chloride의 존재하에서 Fenton 반응으로 생성시켰다. 반응용액은 0.5mM iron(III)chloride 용액, 10mM EDTA 용액, 10mM 2-deoxy-D-ribose 용액과 10mM hydrogenperoxide 을 첨가한 후 각각의 추출물 150 μ l와 0.1M phosphate buffer 용액(pH 7.4)을 넣어 혼합시킨 후 총 부피가 400 μ l가 되도록 조제하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응을 시킨 후 2.8% trichloroacetic acid와 thiobarbituric acid를 각각 0.5ml씩 첨가시키고 100 $^{\circ}$ C 끓는 물에서 15분간 발색시킨 후 얼음물에서 5분간 냉각하여 Spectrophotometer(Spectra Max, Molecular Devices, USA)로 532nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 4).

Hydrogen peroxide 소거활성은 다음과 같이 계산하였다.

Hydroxyl radical 소거활성(%)

$$= [1 - (\text{대조구 흡광도} - \text{시료 흡광도}) / \text{대조구 흡광도}] \times 100$$

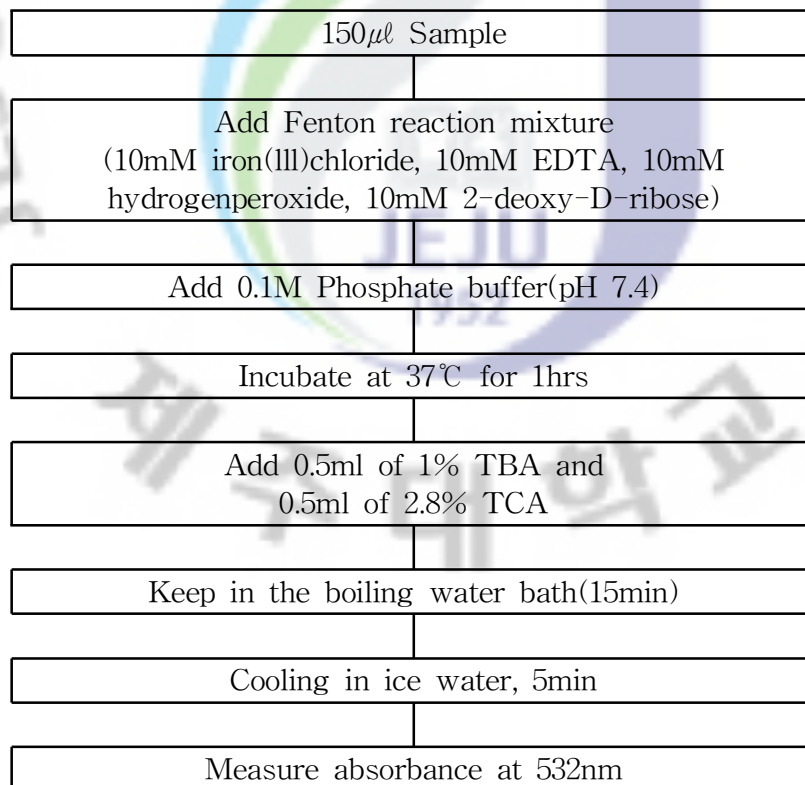


Fig. 4. Schematic diagram of hydroxyl radical scavenging assay.

(4) HPLC 정성·정량 분석

HPLC 분석에서 용리액은 acetonitrile 1,000ml에 acetic acid 5ml를 혼합한 용액과 3차 증류수 1,000ml에 acetic acid 5ml를 혼합한 용액을 기울기 용리법으로 분석하였다. 이때 HPLC 기기조건을 Table 3에 나타내었고, 이동상의 기울기 용리 조건을 Table 4에 수록하였다.

Table 3. HPLC instrumental conditions for analysis

HPLC	Waters Alliance System (Waters 2695)
Column	Xterra® RP18 3.5µm 4.6×100mm
Detector	Photodiode Array Detector
Flow Rate	1.0ml/min
Injection Volume	10µL
Column Temperature	25°C
Sample Temperature	25°C

Table 4. Mobile phase conditions of HPLC gradient-elution

Program order	Time	Flow	H ₂ O	Acetonitrile	Curve
1		1.00	95.0	5.0	
2	5.00	1.00	95.0	5.0	6
3	10.00	1.00	90.0	10.0	6
4	30.00	1.00	80.0	20.0	6
5	40.00	1.00	80.0	20.0	6
6	50.00	1.00	70.0	30.0	6
7	60.00	1.00	70.0	30.0	6
8	70.00	1.00	50.0	50.0	6
9	80.00	1.00	50.0	50.0	6
10	81.00	1.00	0.0	100.0	6
11	90.00	1.00	0.0	100.0	6
12	91.00	1.00	95.0	5.0	6
13	100.00	1.00	95.0	5.0	6

IV. 결과 및 고찰

1. 일반성분

동결건조한 감귤 과피와 종자들을 건식분쇄기로 분쇄시킨 추출용 시료의 일반성분을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 동결건조된 감귤 과피와 종자들의 수분함량은 4.2~5.8%로 대부분 6%이하의 수분함량을 보였으며, 조단백질 함량은 과피 0.4~0.6%, 종자는 11.2~15.0%, 조지방 함량은 과피 3.8~6.2%, 종자 34.1~44.2%, 탄수화물함량은 과피 87.2~91.4, 종자 33.3~47.1%이었고, 회분함량은 과피 0.2~0.5%, 종자 2.8~4.4%를 나타내었다.

Table 5. Proximate composition of citrus peels used in this study (unit : %)

component	SK		SB		DY		YJ	
	peel	seed	peel	seed	peel	seed	peel	seed
Moisture	4.2	4.7	5.0	4.2	5.5	4.8	5.8	5.3
Crude protein	0.4	15.0	0.6	14.8	0.6	11.2	0.5	13.2
Crude lipid	3.8	41.4	4.6	44.2	6.2	34.1	5.1	38.6
Carbohydrate	91.4	34.8	89.4	33.3	87.2	47.1	88.2	38.5
Ash	0.2	4.1	0.4	3.5	0.5	2.8	0.4	4.4

2. 총 polyphenol 함량

동결건조된 감귤 과피와 종자의 총 polyphenol 함량은 Table 6과 같이, 과피 288.4~867.2mg/100g, 종자 365.9~384.5mg/100g를 나타내었으며, 과피의 경우 산귤이 867.2mg/100g 높은 함량을 나타내었는데 이는 과피의 형태에 따른 것으로 사료되며, 종자의 경우도 산귤이 상대적으로 높은 함량을 나타내고 있다.

감귤류인 오렌지, 레몬 등의 생과피에 함유된 총 폴리페놀 함량이 140~200mg/100g 정도라는 보고(58)도 있지만, 본 실험에서는 동결건조 시킨 것을 사용하였기 때문에 차이를 보이는 것으로 생각 된다.

Table 6. Content of flavonoid and total phenol content from citrus peels and seeds

Sample	Polyphenol contents(mg/100g)	
	Peels	Seeds
SK	867.2	367.2
SB	343.1	373.1
DY	288.4	384.5
YJ	315.9	365.9

3. DPPH radical 소거활성

감귤 과피와 종자의 에탄올 농도에 따른 추출물별 DPPH free radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 7에 나타내었다. 감귤 과피와 종자 각추출물의 DPPH 소거활성은 산귤 추출물의 경우 과피 32.9~82.1%, 종자 10.1~31.3%로 50% 에탄올 추출물에서 상대적으로 높은 활성을 보였으며, 삼보감 추출물은 과피 43.8~63.7%, 종자 12.0~44.7%, 당유자 추출물은 과피 44.0~70.3% 종자 -0.7~14.3%, 그리고 유자 추출물은 과피 41.6~73.3%, 3.1~14.4%의 활성을 나타내었는데, 과피가 종자에 비해서 매우 높은 활성을 보였다.

감귤 과피와 종자의 효소별 추출물의 DPPH free radical 소거활성은 Table 8에 나타내었다. 탄수화물분해효소추출물에서는 산귤과피 46.1~60.5%, 삼보감과피 40.3~50.0%, 당유자과피 42.9~53.5%, 유자과피 39.3~47.2%로 감귤류 과피의 DPPH free radical 소거활성은 대체 60%이하로 낮았으나, 산귤과피의 AMG 추출물만은 60.5%로 다소 높은 소거활성을 보였다. 산귤종자 36.2~51.9%, 삼보감종자 31.5~44.7%, 당유자종자 26.0~38.4%, 유자종자 22.8~31.0%로 감귤종자의 경우 대체적으로 50%이하의 낮은 소거활성을 보였다. 단백질분해효소추출물들에선 산귤과피 48.6~86.2%, 삼보감과피 38.9~62.8%, 당유자과피 34.0~77.1%, 유자과피 33.3~70.0%의 소거활성을 보였다. 단백질분해효소들에서 nutrase 추출물의 소거활성이 대체로 높게 나타났는데, 특히 산귤과피 86.2%, 당유자과피 77.1%의 소거활성을 보였으며, 유자과피의 kojizyme 추출물에선 70.0%의 소거활성을 나타내었다. 종자에서는 산귤종자 23.4~42.4%, 삼보감종자 29.6~42.2%, 당유자종자 27.3~41.9%, 유자종자 27.0~45.7%로 50%이하의 낮은 소거활성을 나타냈다.

피자두의 아세톤추출물 100 μ g/ml 농도에서 완속과의 DPPH radical 소거활성은 47.2~61.3%를 갖는 반면, 미속과는 89.88~98.88%로 완속과에 비해 상대적으로 높은 소거활성을 갖는다고 보고되었다(59). 또한 오디 60% 에탄올 추출물에서 81%(60), 비파 물추출물에서 70% 소거활성이(61) 갖는다고 보고되고 있으며, 구기자 50% 에탄올 추출물에서 66.97%의 소거활성을 갖는다고 보고되었다(62).

지방의 산화과정에서 생성되는 free radical들은 체세포의 노화촉진, 체세포의 방어기전 저하 등의 세포활성을 저해하기 때문에 이들 free radical들을 전자공여로 안정화시킴으로서 체세포를 보호하게 된다. 이러한 전자공여작용은 활성라디칼에 전자를 공여하여 연쇄반응을 중단시키고 식품내 지질산화억제나 인체 내에서 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용되기도 한다(63).

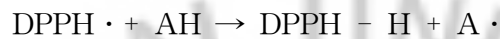
Table 7. DPPH radical scavenging activity of ethanolic extracts from citrus peels and seeds

Sample	DPPH scavenging activity(%)		
	Peels	Seeds	
SK	Water	58.5	28.7
	30% EtOH	69.8	31.3
	50% EtOH	82.1	29.2
	70% EtOH	61.3	27.5
	95% EtOH	32.9	10.1
SB	Water	63.7	31.5
	30% EtOH	61.3	31.7
	50% EtOH	62.7	36.1
	70% EtOH	60.1	44.7
	95% EtOH	43.8	12.0
DY	Water	70.3	14.3
	30% EtOH	62.7	10.9
	50% EtOH	62.9	11.8
	70% EtOH	59.4	7.8
	95% EtOH	44.0	-0.7
YJ	Water	53.0	14.4
	30% EtOH	58.5	13.4
	50% EtOH	53.5	11.6
	70% EtOH	41.6	5.6
	95% EtOH	73.3	3.1
Ascorbic acid (10 μ g/ml)	95.5		

Table 8. DPPH radical scavenging activity of enzymatic extracts from citrus peels and seeds

Sample	DPPH Scavenging Activity(%)								
	Peels				Seeds				
	SK	SB	DY	YJ	SK	SB	DY	YJ	
Carbohydrases	Viscozyme	58.5	45.8	48.6	44.3	51.9	44.7	38.4	29.5
	Celluclast	56.4	42.9	42.9	39.3	46.3	42.6	30.7	31.0
	AMG	60.5	50.0	53.5	47.2	42.1	42.7	34.2	27.0
	Termamyl	46.1	40.2	43.8	42.6	34.5	31.5	28.0	26.3
	Ultraflo	55.4	42.5	45.8	39.8	36.2	32.0	26.0	22.8
Proteases	Protamex	49.1	38.9	55.1	35.2	29.7	39.4	32.3	29.4
	Kojizyme	52.5	45.1	58.2	70.0	23.4	37.9	41.9	32.8
	Nutrase	86.2	62.8	77.1	65.8	42.4	42.2	39.9	45.7
	Flavourzyme	65.1	51.4	43.1	39.9	35.5	29.6	27.3	27.0
	Alcalase	48.6	39.6	34.0	33.3	34.6	32.7	31.3	27.0
Trolox(ug/ml)					95.3				

비교적 안정한 free radical인 DPPH는 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물 등에 의해 환원되어 짙은 보라색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는데, 이러한 DPPH는 전자 또는 수소를 받아들이는 안정한 반자성분자(diamagnetic molecule)로 항산화제(AH) 존재시 항산화 활성을 지닌 물질로부터 수소를 받아 DPPH는 다음과 같이 환원된다(64).



이러한 전자공여능은 유지의 자동산화 과정에서 생성되는 ROO·, R·, RO· 등에 수소 또는 전자를 주는 것으로 환원력이 중요한 작용을 하지만 항산화제의 일반적인 작용을 전자 공여능만으로 설명할 수 없다고 하였으며 항산화물질의 전자공여능을 측정할때는 DPPH법이 편리하다고 하였다(65).

DPPH radical 소거활성(전자공여능)은 phenolic acid, flavonoid 및 기타 phenol 성 물질에 대한 항산화작용의 지표라 하였으며 이러한 물질은 환원력이 큰 것일 수록 전자공여능이 높다고 하였다(66).

결과적으로 감귤 과피와 종자 추출물 DPPH 소거의 목적으로 한 산업적 활용을 고려 해볼 때 50%~70% 에탄올 추출을 통한 산업적 이용이 가능할 것으로 사료되고, 특히 nutrase 단백질분해효소를 이용한 감귤과피의 DPPH 소거활성은 우수하여 기존의 용매추출을 대체할 수 있을 것이라 생각되며, 따라서 BHT 등과 같은 합성 산화제들의 유해성 논란이 커지고 천연물 유래의 것 및 인체 안전성 높은 첨가물에 대한 선호도가 더욱 고조되는 시점에서, 이들 추출물을 대용량 추출장치를 활용한 DPPH 소거의 목적의 제품개발도 고려해볼만 하다고 생각된다.

4. Superoxide anion radical 소거활성

감귤 과피와 종자의 각 에탄올 농도에 따른 추출물들의 superoxide anion radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 9에 나타내었다. Superoxide anion radical 소거활성은 산귤은 과피 1.1~10.1%, 종자 -6.2~5.0%, 삼보감은 과피 3.2~8.7%, 종자 -2.2~13.6%, 당유자는 과피 2.4~7.9%, 종자 -10.3~14.2%, 그리고 유자는 과피 3.4~7.1%, 종자 -9.3~6.3으로 매우 낮은 소거활성을 보였다.

감귤 과피와 종자의 효소별 추출물의 superoxide anion radical 소거활성은 Table 10에 나타내었다. 탄수화물분해효소추출물에서는 산귤과피 70.5~79.0%, 삼보감과과피 65.9~83.7%, 당유자와과피 65.8~82.9%, 유자와과피 70.5~73.8%로 감귤류 과피의 superoxide anion radical 소거활성은 대체적으로 60%이상으로 높았다. 특히 탄수화물분해효소 중 AMG, ultraflo를 이용한 추출물에서는 70%이상의 높은 소거활성을 나타내었으며, 산귤종자 -31.6~65.9%, 삼보감종자 -5.5~70.3%, 당유자종자 -15.8~67.1%, 유자종자 -40.8~75.5로 감귤종자의 경우 대체적으로 낮은 소거활성을 보였으나 감귤과피의 결과와 마찬가지로 탄수화물분해효소 중 AMG, Ultraflo를 이용한 추출물에서는 소거활성이 높았다. 단백질분해효소추출물의 소거활성은 산귤과피 72.1~79.3%, 삼보감과과피 77.0~81.9%, 당유자와과피 79.5~88.8%, 유자와과피 49.2~80.6.0%로 대체적으로 70%이상의 높은 소거활성을 보여주고 있다. 또 산귤종자 -26.3~59.8%, 삼보감종자 29.6~75.8%, 당유자종자 -34.9~70.9%, 유자종자 58.6~73.2%의 소거활성을 보였으며, 특히 단백질분해효소 중 Protamex, Alcalase의 감귤종자추출물에서 70%이상의 높은 소거활성을 나타내고 있다.

약용식물을 물로 추출한 후 superoxide anion 소거활성을 조사한 결과 5mg/ml 농도에서 음양곽 42%, 오가피, 해동피, 파고지 토사자, 속단에서 20% 이상의 활성을 갖고 있다고 보고되었으며(67), 현미 및 발아현미 추출물(500 μ g/ml)에서 66.2% 및 53.52%(68), 딸보리수 열매의 메탄올 추출물(1mg/ml)에서 52.91%(69), 녹차 열수추출물(2mg/ml)에서 10~26%의 소거활성을 보인다고 하였는데(70), 본 실험의 결과는 이들에 비하여 꽤 높은 소거활성을 보이고 있다.

Table 9. Superoxide anion scavenging activity of ethanolic extracts from citrus peels and seeds

Sample	superoxide anion scavenging activity(%)		
	Peel	Seed	
SK	Water	1.8	2.3
	30% EtOH	3.0	5.0
	50% EtOH	10.1	2.8
	70% EtOH	5.9	-0.2
	95% EtOH	1.1	-6.2
SB	Water	7.5	-0.2
	30% EtOH	8.7	13.6
	50% EtOH	5.5	8.7
	70% EtOH	3.2	3.6
	95% EtOH	4.1	-2.2
DY	Water	2.4	-4.5
	30% EtOH	7.9	14.2
	50% EtOH	2.9	6.6
	70% EtOH	5.5	6.9
	95% EtOH	7.4	-10.3
YJ	Water	7.4	-0.3
	30% EtOH	6.2	6.5
	50% EtOH	5.9	0.3
	70% EtOH	7.1	-0.3
	95% EtOH	3.4	-9.3
Trolox(ug/ml)		85.9	

Table 10. Superoxide anion scavenging activity of enzymatic extracts from citrus peels and seeds

Sample		superoxide anion scavenging Activity(%)							
		Peels				Seeds			
		SK	SB	DY	YJ	SK	SB	DY	YJ
Carbohydrases	Viscozyme	77.1	65.9	77.1	73.5	-31.6	-5.5	-15.8	-40.8
	Celluclast	79.0	76.5	81.2	75.6	-1.2	71.8	52.6	75.3
	AMG	70.5	82.6	82.1	71.1	65.0	70.3	60.4	75.5
	Termamyl	76.7	78.3	65.8	70.5	49.3	53.8	52.5	54.3
	Ultraflo	77.7	83.7	82.9	73.8	65.9	63.3	67.1	52.2
Proteases	Protamex	75.0	81.4	88.8	58.7	52.4	75.8	70.8	73.2
	Kojizyme	76.3	81.9	84.0	80.6	-26.3	61.4	72.8	58.6
	Nutrase	72.1	77.0	81.9	79.4	-8.8	67.3	-34.9	74.1
	Flavourzyme	79.3	75.6	84.7	49.2	41.4	29.6	68.1	60.4
	Alcalase	74.6	81.0	79.5	76.2	59.8	70.7	70.9	62.3
Allopurinol($\mu\text{g}/\text{ml}$)						97.6			

Superoxide anion radical은 전자 환원에 의한 반응성이 매우 강하여 세포 독성을 일으켜 암을 유발시키거나 피부의 노화 등을 일으킬 수 있다. 이런 활성산소는 과식, 스트레스, 흡연, 지나친 운동으로 인한 과호흡 등에 의해 그 양이 증가하는데(71), 인체 내에서는 superoxide anion radical을 제거하기 위하여 superoxide dismutase(SOD)가 분비되어 세포에 유해한 superoxide anion radical을 과산화수소(H_2O_2)와 정상상태의 산소로 전환시켜주는 반응($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 하는 것으로 알려져 있으며, SOD에 의해 생성된 H_2O_2 는 생체 조직을 산화시키기도 하고 peroxidase나 catalase에 의하여 자신은 분해하여 물분자와 산소분자로 전환되기도 한다. SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemicals에 속하는 것으로 보고되고 있다(72).

이상의 결과로부터 감귤 과피와 종자 추출물들에서 알코올 용매의 경우는 위약용식물이나 녹차 보다 낮은 활성을 보였으나, 효소추출물의 경우 대체적으로 높은 활성을 보여주고 있다. 산업적 활용면에서 탄수화물분해효소 중 AMG, Ultraflo와 단백질분해효소 Protamex, Alcalase의 경우는 대조군으로 사용한 항산화제인 Allopurinol보다는 낮았으나 70%이상의 높은 소거활성을 나타내고 있어 천연물 유래의 기능성물질 및 인체 안전성 높은 첨가물에 대한 선호도가 더욱 고조되는 시점에서, 이들 추출물을 대용량 추출장치를 활용한 제품개발도 고려해볼만 하다고 생각된다.

5. Hydroxyl radical 소거활성

Hydroxyl radical 소거능은 과산화수소(H_2O_2)와 철이온($FeCl_3$ -EDTA)과의 반응, 즉 Fenton 반응에 의해 생성되는 hydroxyl radical에 의해 반응계의 기질로 사용된 deoxyribose가 산화되면서 생성되는 과산화물인 malondialdehyde(MDA)를 측정함으로써 평가된다. 따라서 감귤 과피와 종자 각추출물의 hydroxyl radical 소거활성을 BHT와 α -tocopherol 항산화제와 비교하여 Table 11에 나타내었다.

Hydroxyl radical 소거활성에 대한 감귤 과피와 종자의 각 에탄올 농도별 추출물들의 소거활성은 산귤 과피 9.5~63.4%, 종자 19.5~53.0%, 삼보감 과피 20.2~50.9%, 종자 5.1~49.4%, 당유자 과피 30.5~59.7%, 종자 3.1~59.1%, 유자 과피 16.4~63.5%, 종자 5.1~55.4%로 물 추출물을 제외한 에탄올 추출물에서 항산화제인 trolox와 비교해서도 높은 소거활성을 보였다.

현미 및 발아현미추출물은 0.5mg/mL 농도에서 각각 26.15% 및 44.15%의 hydroxyl radical 소거활성을 갖고 있으며(73), 유색미인 경우 70% 에탄올 추출물 2mg/ml농도에서 13개 품종이 51~124%, 녹차추출물은 3mg/ml 농도에서 60%의 소거활성이 있다고 보고되었다(74). 또한 제천산 약용식물 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 열수추출물 오가피 80.45%, 독활 69.75%, 당귀와 황기는 각각 12.95 및 2.1%라 하였으며(75), 충청지역 민속주의 hydroxyl radical 소거활성은 17~53%, 식용백합 잎, 꽃 및 뿌리 에탄올 추출물에서도 80.9~81.8%의 높은 소거활성을 갖고 있다고 보고되었다(76).

생체에서 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에서 가장 강력한 활성산소로 알려진 hydroxyl radical의 생성량은 반응성 산화대사물에 의해 deoxyribose가 파괴되어 aldehyde가 생성되어 DNA 손상에 의한 돌연변이, 암 등의 발생과 밀접한 관계가 있다(158). 따라서 hydroxyl radical 소거능을 가지는 물질은 deoxyribose와 반응할 수 있는 hydroxyl radical을 제거하여 MDA의 생성을 감소시킬 수 있다(80).

이상의 결과로 부터 본 연구에서는 감귤 과피와 종자의 추출물들은 hydroxyl

radical의 소거 목적으로 활용성은 높아 앞으로 보다 깊은 연구로, 인체 무해한 천연항산화제의 개발 소재로 활용성도 기대해볼만 하다 사료된다.

Table 11. Hydroxyl radical scavenging activity of ethanolic extracts from citrus peels and seeds

Sample	Hydroxyl radical scavenging activity(%)		
	Peel	Seed	
SK	Water	9.5	19.5
	30% EtOH	63.4	46.6
	50% EtOH	49.6	53.0
	70% EtOH	47.5	47.1
	95% EtOH	48.0	43.8
SB	Water	20.2	5.1
	30% EtOH	46.8	44.3
	50% EtOH	50.9	48.8
	70% EtOH	52.0	47.9
	95% EtOH	52.3	49.4
DY	Water	30.5	3.1
	30% EtOH	59.5	55.7
	50% EtOH	58.0	55.4
	70% EtOH	59.7	59.1
	95% EtOH	59.6	54.7
YJ	Water	16.4	5.1
	30% EtOH	58.2	48.7
	50% EtOH	54.8	51.0
	70% EtOH	63.5	50.2
	95% EtOH	54.3	55.4
Trolox(ug/ml)		52.5	

6. HPLC를 이용한 Flavonoid 정성·정량 분석

감귤에 비교적 다량으로 함유되어 있다고 보고된 플라보노이드 성분들 중 caffeic acid, rutin, hesperidin, naringin, quercetin, hesperetin 등 총 6개를 중심으로 HPLC 함량분석을 하였고, 감귤 껍질 및 씨 또한 추출액의 에탄올 %에 따른 플라보노이드 함량 결과를 Table 12.~13.에 요약하였다. 또한 각각의 chromatogram을 Fig. 5. ~ Fig. 12.에 나타내었다.

Table 12. Flavonoid contents of ethanolic extracts from peels of four citrus species by HPLC analysis

code	Flavonoid contents(mg/g, 254nm)					
	CA	HD	NG	RT	QC	HT
1B_30%	ND	0.097	ND	ND	0.001	0.035
1B_50%	ND	0.139	ND	ND	0.002	0.042
1B_70%	ND	0.500	ND	ND	0.003	0.052
1B_95%	ND	0.730	ND	ND	0.017	0.255
2B_30%	ND	0.243	ND	ND	ND	ND
2B_50%	ND	0.678	ND	ND	ND	ND
2B_70%	ND	0.365	ND	ND	ND	ND
2B_95%	ND	0.533	ND	ND	ND	ND
3B_30%	ND	0.206	0.626	0.060	ND	ND
3B_50%	ND	0.107	0.561	0.054	ND	ND
3B_70%	ND	0.111	0.595	0.057	ND	ND
3B_95%	ND	0.143	0.865	0.085	ND	ND
4B_30%	ND	0.104	0.123	0.09	ND	ND
4B_50%	TR	0.189	0.151	0.011	ND	ND
4B_70%	TR	0.205	0.164	0.012	ND	ND
4B_95%	ND	0.234	0.182	0.015	ND	ND

* CA : Caffeic acid, HD : Hesperidin, NG : Naringin, RT : Rutin hydrate,
QC : Quercetin, HT : Hesperetin TR : Trace, ND : None detect

* * 1B(Sankyool peel, *Cirtus sunki*), 2B(Sambokam peel, *Cirtus sulcata*)
3B(Dangyooja peel, *Cirtus grandis*), 4B(Yuja peel, *Cirtus junos*)

Table 13. Flavonoid contents of ethanolic extracts from seeds of four citrus species by HPLC analysis

Flavonoid contents(mg/g, 254nm)						
code	CA	HD	NG	RT	QC	HT
1A_30%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1A_50%	TR	ND	ND	ND	ND	ND
1A_70%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1A_95%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2A_30%	TR	0.011	ND	ND	ND	ND
2A_50%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2A_70%	TR	0.019	ND	ND	ND	ND
2A_95%	ND	0.024	ND	ND	ND	ND
3A_30%	TR	0.009	TR	TR	TR	ND
3A_50%	TR	ND	ND	ND	TR	ND
3A_70%	TR	0.007	0.003	ND	ND	ND
3A_95%	ND	0.009	ND	ND	ND	ND
4A_30%	TR	0.025	TR	ND	ND	ND
4A_50%	TR	0.025	TR	ND	TR	ND
4A_70%	TR	0.017	TR	ND	TR	ND
4A_95%	ND	0.012	ND	ND	ND	ND

* CA : Caffeic acid, HD : Hesperidin, NG : Naringin, RT : Rutin hydrate, QC : Quercetin, HT : Hesperetin, TR : Trace , ND : None detect

* * 1A : SK(Sankyool seed, *Cirtus sunki*), 2A : SB(Sambokam seed, *Cirtus sulcata*)
3A : DY(Dangyooja seed, *Cirtus grandis*), 4A : YJ(Yuja seed, *Cirtus junos*)

위 분석결과에 의하면 종자(seed)에는 목표로 하는 플라보노이드 성분들이 혼적량 내지는 미량으로 나타난 반면, 감귤과피(peel)에서 플라보노이드 성분들이 많음을 확인할 수 있었다. 또한 과피(peel)를 추출방법에 따라 비교 했을때 에탄올의 비율이 30%, 50% 70%, 95% 증가함에 따라 플라보노이드 성분들이 많이 추출됨을 확인할 수 있었다.

감귤류에는 다양한 flavonoid가 존재하며 현재까지 약 60여종 이상의 구조가 밝혀져 있고, 최근 hesperidin의 혈관투과성에 미치는 영향, naringin의 항산화, 지질과산화예방 등의 약리 효능이 보고되고 있으며, 밀감과 오렌지의 주성분은 narirutin, hesperidin이었고 특히, 과육과 과피에 narirutin, hesperidin이라는 두종류의 플라보노이드가 존재하고 있는 것으로 분석되었으며, 과육부의 나린진과 헤스페리딘 함량은 각각 100g 당 2.95mg, 6.53mg이었으며, 과피에서는 과육부보다 함량이 높아 10.77mg, 38.90mg이라고 보고되고 있다.(81, 82)

본 실험의 감귤 과피에서 추출한 조추출물 중의 플라보노이드 함량 중 hesperidin은 산귤과피 50% 에탄올 추출물에서는 0.139mg/g, 삼보감과피 50% 에탄올 추출물에서는 0.678mg/g, 재래당유자과피 50% 에탄올 추출물에서는 0.107mg/g, 재래유자과피 50% 에탄올 추출물에서는 0.189mg/g으로 삼보감과피 50% 에탄올 추출물에서가 hesperidin을 가장 많이 함유하고 있음을 확인하였고, 4종의 껍질에 모두 함유하고 있음도 확인하였다. Naringin은 재래당유자과피와 재래유자의 과피에서 검출되었는데 재래당유자과피 30% 에탄올 추출물에서는 0.626mg/g, 50% 에탄올 추출물에서는 0.561mg/g, 70% 에탄올 추출물에서는 0.595mg/g, 95% 에탄올 추출물에서는 0.865mg/g이며, 재래유자 과피 30% 에탄올 추출물에서는 0.123mg/g, 50% 에탄올 추출물에서는 0.151mg/g, 70% 에탄올 추출물에서는 0.164mg/g, 95% 에탄올 추출물에서는 0.182mg/g로 재래당유자과피 95%에서 naringin을 가장 많이 함유하고 있음을 확인하였고, 2종의 껍질에 함유하고 있음도 확인하였다. 또한 rutin hydrate의 함량을 보면 재래당유자과피 30% 에탄올 추출물에서 0.060mg/g, 50% 에탄올 추출물에서 0.054mg/g, 70% 에탄올 추출물에서 0.057mg/g, 95% 에탄올 추출물에서 0.085mg/g이며, 재래유자과피 30% 에탄올 추출물에서는 0.09mg/g, 50% 에탄올 추출물에서는 0.011mg/g, 70% 에탄올 추출물에서는 0.012mg/g, 95% 에탄올 추출물에서는 0.015mg/g 로

재래당유자과피 95% 에탄올 추출물에서 rutin hydrate을 가장 많이 함유하고 있음을 확인하였다. 그리고 hesperetin은 산귤과피에서만 확인되었는데 산귤과피 30% 에탄올 추출물에서는 0.035mg/g, 50% 에탄올 추출물에서는 0.042mg/g, 70% 에탄올 추출물에서는 0.052mg/g, 95% 에탄올 추출물에서는 0.255mg/g로 에탄올의 비율이 30%, 50% 70%, 95% 증가함에 따라 성분 함량이 높아지는 것을 확인 할 수 있었다. 반면에 caffeic acid와 quercetin인 경우 모든 감귤류에서 검출한계 이하의 농도를 보였다.



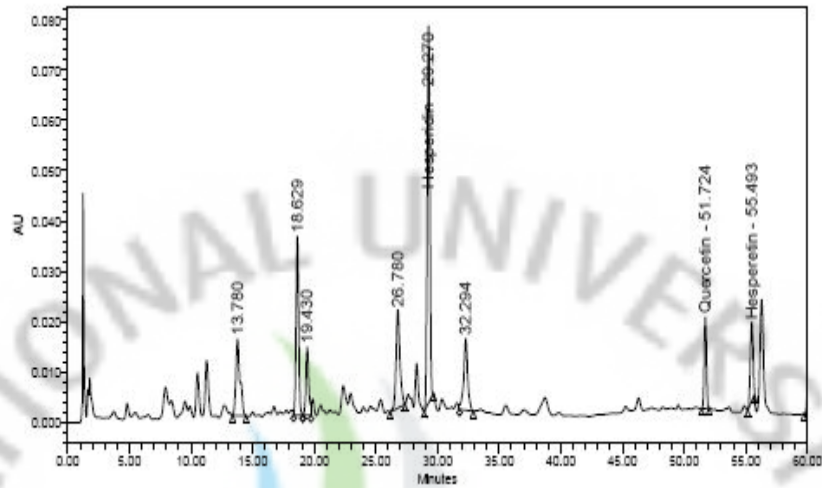


Fig. 5. HPLC chromatogram of peel of *Citrus sunki*_70%.

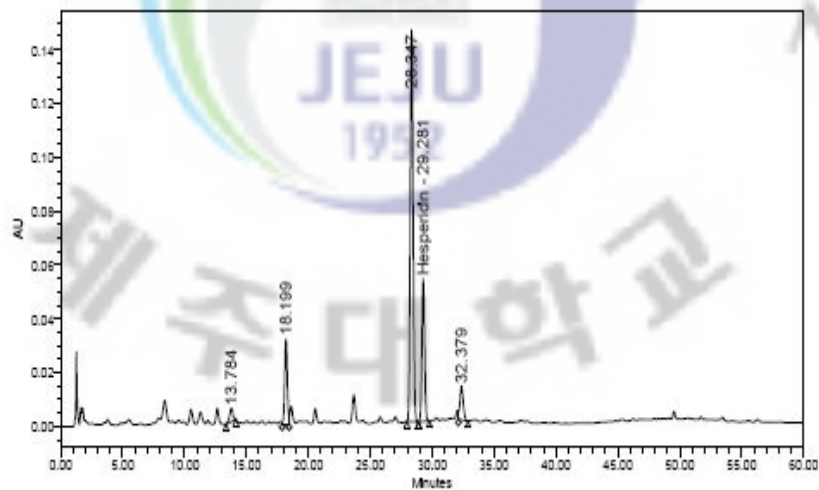


Fig. 6. HPLC chromatogram of peel of *Citrus sulcata*_70%.

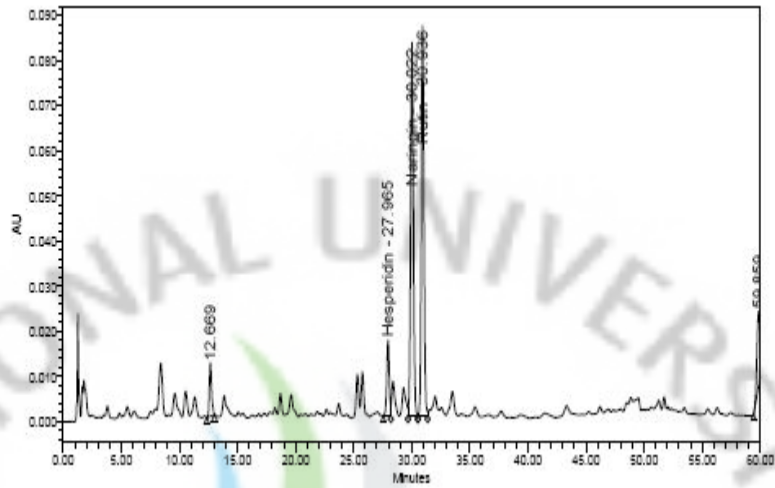


Fig. 7. HPLC chromatogram of peel of *Citrus grandis*_70%.

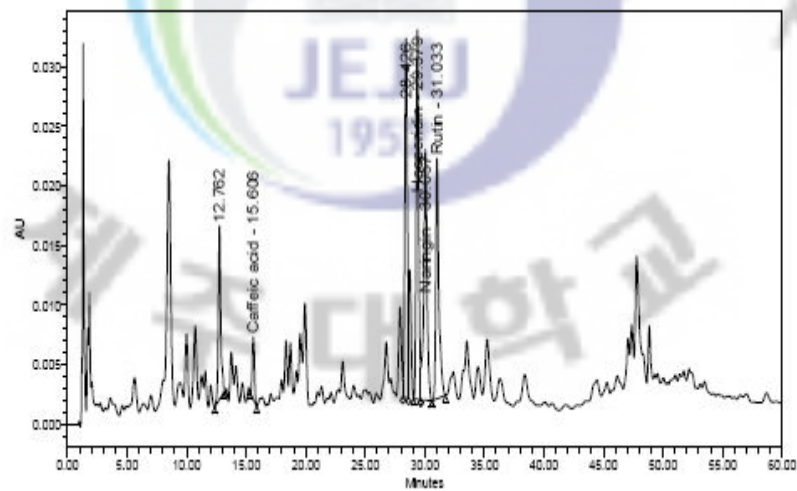


Fig. 8. HPLC chromatogram of peel of *Citrus junos*_70%.

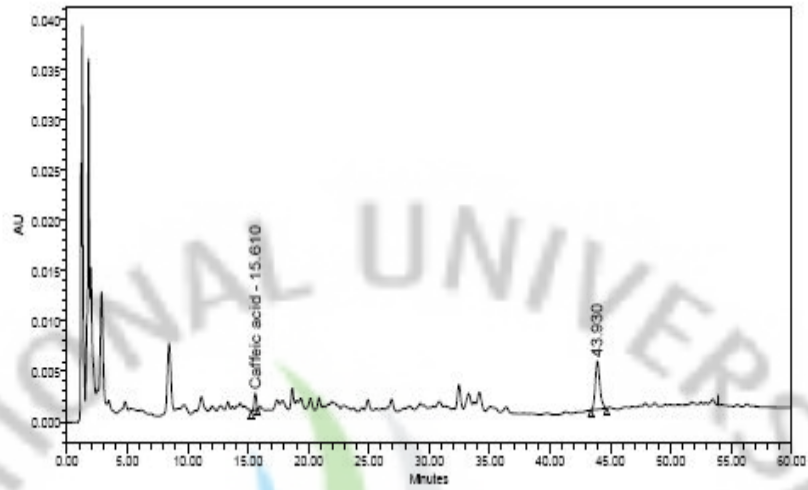


Fig. 9. HPLC chromatogram of seed of *Citrus sunki*_50%.

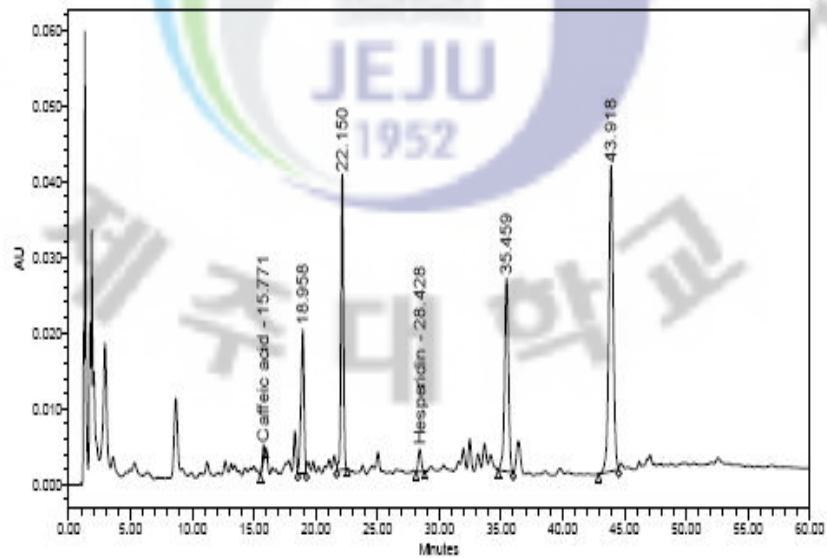


Fig. 10. HPLC chromatogram of seed of *Citrus sulcata*_70%.

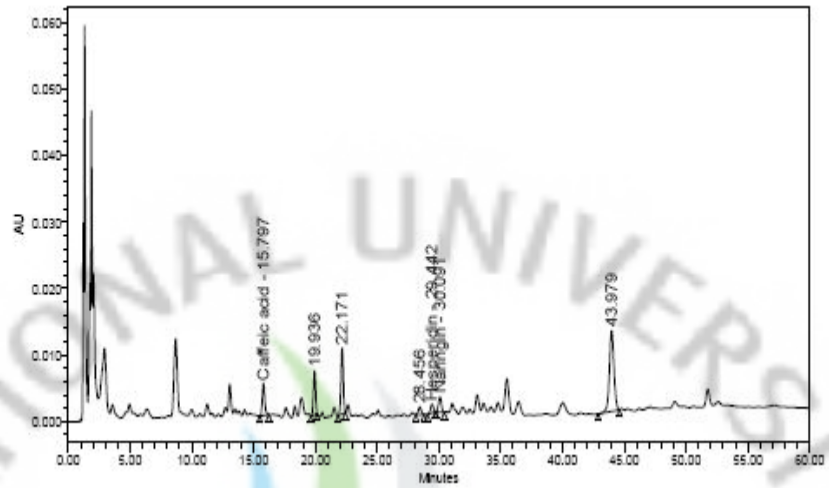


Fig. 11. HPLC chromatogram of seed of *Citrus grandis*_70%.

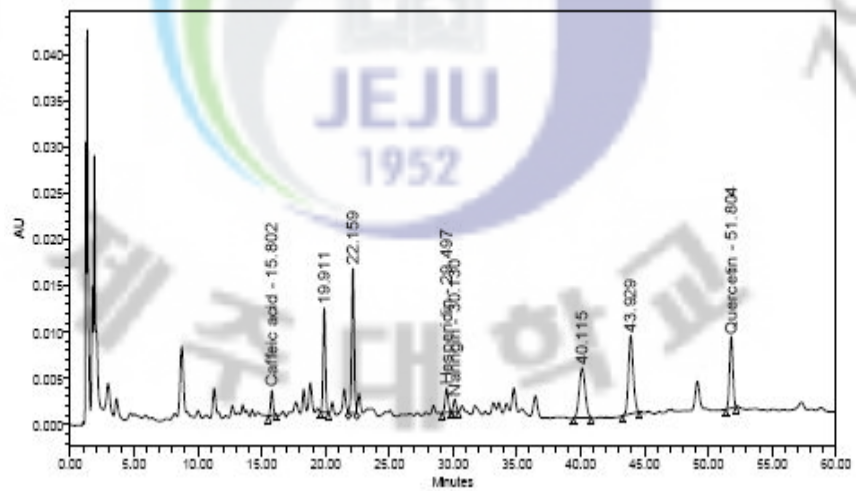


Fig. 12. HPLC chromatogram of seed of *Citrus junos*_70%.

V. 요약

감귤 과피와 종자의 생리활성능을 검토하기 위하여, 물, 30%, 50%, 70%, 95%의 에탄올 및 효소 추출물들의 DPPH radical, superoxide anion radical, hydroxyl radical 소거활성을 실험하였고, HPLC을 이용하여 flavonoid 성분 함량을 분석하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. DPPH scavenging activity

제조된 8가지의 sample에 대하여 DPPH소거능을 농도별로 측정한 결과 모든 감귤 과피의 water 추출물과 30% EtOH 추출물 및 50% EtOH 추출물에서 50% 이상의 DPPH소거능이 확인 되었고, 70% EtOH 추출물에서는 산귤, 삼보감, 당유자 과피에서 50% 이상의 DPPH소거능이 확인 되었다. 그리고 95% EtOH 추출물에서는 유자과피에서만 50% 이상의 DPPH소거능이 확인 되었다.

또한 산귤 과피의 50% EtOH 추출물에서 가장 높은 소거활성을 확인하였고 당유자와 유자 종자에서 전체적으로 낮은 소거활성을 확인할 수 있었다.

감귤 과피와 종자의 효소별 추출물의 DPPH free radical 소거활성은 탄수화물 분해효소추출물에서는 산귤과피 AMG 추출물이 60.5% 소거활성을 나타내었으며, 감귤종자의 경우 대체적으로 50%이하의 낮은 소거활성을 보였다. 단백질분해효소추출물 중 nutrase 추출물의 소거활성이 대체적으로 높게 나타났으며, 특히 산귤과피 86.2%, 당유자과피 77.1%의 높은 소거활성을 보였고, Kojizyme 유자과피 추출물은 70.0%의 소거활성을 나타내었으며, 감귤종자추출물은 50%이하의 낮은 소거활성을 보였다.

2. Superoxide anion radical scavenging activity

제조된 8가지의 sample의 superoxide anion radical 소거능을 농도별로 측정한 결과 모든 추출물에서 15% 이하의 소거능 활성을 나타내었다. 삼보감, 당유자 종자의 30% EtOH 추출물은 이들 중 상대적으로 높은 소거활성이 나타났으며 감귤 종자의 95% EtOH 추출물에서는 저조한 소거활성을 확인하였다.

감귤 과피와 종자 추출물의 superoxide anion radical 소거능을 농도별로 측정한 결과 전체적으로 15% 미만의 superoxide anion radical 소거능을 확인하였고, 그 중 감귤종자 95% EtOH 추출물에서는 낮은 활성을 확인하였다.

감귤 과피와 종자의 효소별 추출물의 superoxide anion radical 소거활성은 탄수화물분해효소추출물에서는 산귤과피 70.0~79.0%, 삼보감과피 65.9~83.7%, 당유자와피 65.8~82.9%, 유자와피 70.5~73.8%로 감귤류 과피의 superoxide anion radical 소거활성은 60%이상으로 대체적으로 높았으며, 특히 탄수화물분해효소 중 AMG, ultaraflo을 이용한 추출물에서 70%이상의 높은 소거활성을 나타내었다. 감귤종자의 경우 대체적으로 낮은 소거활성을 보였으나 감귤과피의 결과와 마찬가지로 탄수화물분해효소 중 AMG, ultaraflo을 이용한 추출물에서 70%이상의 높은 소거활성을 보여주고 있다. 단백질분해효소추출물에서는 산귤과피 72.1~79.3%, 삼보감과피 77.0~81.9%, 당유자와피 79.5~88.8%, 유자와피 49.2~80.6.0%의 소거활성을 보였으며, 단백질분해효소를 이용한 감귤추출물의 소거활성이 대체적으로 높았다.

3. Hydroxyl radical scavenging activity

감귤 과피와 종자 추출물의 hydroxyl radical 소거능을 농도별로 측정한 결과 water 추출물은 30% 이하의 hydroxyl radical 소거능이 확인되었고, 30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH 와 95% EtOH 추출물에서는 50% 근처의 소거활성을 나타내었다.

감귤 과피와 종자의 hydroxyl radical 소거능을 농도별로 측정한 결과 water 추출물을 제외한 감귤 과피와 종자 모두에서 hydroxyl radical 소거능이 우수하게 확인되었다.

4. Flavonoid 함량 분석

4종의 감귤 과피 및 종자 중의 flavonoid 함량을 분석한 결과, 산귤과피에서는 hesperidin 0.730mg/g, hesperetin 0.255mg/g, 삼보감과피에서는 hesperidin 0.678mg/g, 재래당유자과피에서는 hesperidin 0.206mg/g, naringin 0.865mg/g, rutin hydrate 0.085mg/g의 함량을 보였으며, 재래유자과피에서는 hesperidin 0.234mg/g, naringin 0.182mg/g, rutin hydrate 0.015mg/g의 함량을 보였다. quercetin은 산귤과피에서 0.017mg/g, caffeic acid은 산귤, 삼보감, 재래당유자, 재래유자에서 소량의 흔적량을 나타내었다.

VI. 참고문헌

- 1) Antolovich M. Prenzler PD. Patsalides E. McDonald S. and Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127 : 183-198 (2003)
- 2) Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science*. 221 : 1256-1264 (1983)
- 3) Chance B. Sies H and Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59 : 27-605 (1979)
- 4) Fridorich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biophys*. 247 : 1-11 (1986)
- 5) Kim YK. Antioxidants. Ryo Moon Gak P. Vo. Seoul, Korea. pp. 5-95 (2004)
- 6) Lee SO. Lee HJ, Yu MH. Im HG. Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetable produced in Ullung island. *Kor. J. Food Soc. Sci. Nutr.* 37 : 233-240 (2005)
- 7) Jeong SJ. Lee JH. Song HN. Seong NS. Lee SE. Baeg NI. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J. Kor. Soc. Appl Biol Chem.* 47 : 135-140 (2004)
- 8) Kang IH. Cha JH. Han JH. Lee SW. Kim HJ. Kwon SH. Han IH. Hwang BS. Whang WK. Isolation of anti-oxidant from domestic *Crataegus pinnatifida* Bunge leaves. *Kor. J. Pharmacogn.* 36 : 121-128 (2005)
- 9) Kim EC. Ahn SY. Hong ES. Li GH, Kim EK, Row KH, Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* 16 : 348-353 (2005)
- 10) Whang HJ. Yoon KR. Carotenoid Pigment of Citrus Fruits Cultivated in Korea. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 27(6) : 950-957 (1995)
- 11) Eun JB. Jung YM. Woo GJ. Identification and Determination of Dietary

- Fibers and Flavonoids in Pulp and Peel of Korean Tangerine(*Citrus aurantium* var.) Kor. J. Food Sci. Technol. 28(2) : 371-377 (1996)
- 12) Johnson PL. Htoon AK and Shaw KJ. Detection of orange pell extract in orange juice. Food Australia. 47 : 426-432 (1995)
 - 13) Kim CJ and Chung JM. Pharmacological Activities of Flavonoids(I). Yakhak Hoeji. 34 : 348-364 (1990)
 - 14) Tanizawa H. Ohkawa Y. Takino Y. Miyase T. Ueno A. Kageyama Y. and Hara S. Studies on natural antioxidants in citrus species. I. Determination of antioxidative activities of citrus fruits. Chem. Pharm. Bull. 40 : 1940-1942 (1992)
 - 15) Matsubara Y. Kumamota H. Lizuka Y. Murakami T. Okamoto K. Miyake H. and Yokoi K. Structure and hypotensive effects of flavonoid glycosides in *Citrus unshiu* peeling. Agric. Biolchem. 49 : 909-914 (1985)
 - 16) Veckenstedt A. and Horn M. Testing of antiviral compounds against mengo virus infection of mice : A-2 step porcedure of *in vivo* screening Z. Allg. Microbiol. 19 : 57-60 (1976)
 - 17) Calomme M. Pieters L. Vlietinck and Berghe DV. Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. Planta Med. 62 : 222-226 (1996)
 - 18) Jie C. Antonio MM. and Wilbur WW. Two new polymethoxylated flavones, a class of compounds with potential anticancer activity isolated from cold pressed Dancy tangerine peel oil solids. J. Agric. Food Chem. 45 : 364-368 (1997)
 - 19) Yumiko Achiwa. Tsuneo Kada. Kazuko Namiki. Inhibition of N-nitrosomorpholine formation by lemon juice. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 38(9) : 826-830 (1991)
 - 20) Vincent PM. Hasengwa S. Bennett RD. Echols CL. Limonin and Limonoids : Chemistry, Biochemistry and Juice Bitterness. Citrus Nutrition and Quality. Based on a Symposium Sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry at the 179th Meeting of the

- American Chemical Society. Houston. Texas. March 26 : 63-821 (1980)
- 21) Song HS. Studies on aroma and functional properties of citrus essential oils. Ehime University (2000)
 - 22) Mark AB. Chi HF. Ong HT. and Hasegawa K. Limonoid and flavonoid composition in varieties of papeda and papedocitrus. Biochemical systematics and ecology. 24(3) : 237-242 (1996)
 - 23) Edvard GM. Andrea PGS. Anne MC. William HB. Hasegawa S. Lam LKT. Citrus limonoids as inhibitors of oral carcinogenesis. Food technol. 110-114 (1994)
 - 24) Tada K. Takido M. Kitatanaka S. Limonoid from fruit of *Melia toosendan* and their cytotoxic activity. Phytochem. 51 : 787-791 (1999)
 - 25) Suarez J. Herrea MD. Marhuenda E. *In vitro* scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. Phytomed. 5(6) : 469-473 (1998)
 - 26) Terao J. Protective effect of epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. Arch. Biochem. Biophys. 308, 278 (1994)
 - 27) Gil B. Effects of flavonoids on *Naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. Life Sci. 54 : 333 (1994)
 - 28) Cotelle, N. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. Free Radic. Biol. Med. 20 : 35 (1996)
 - 29) Akira M. Yoshimasa N. Koichi K. and Hijime O. Glyceroglycolipids from citrus hystrix. A traditional herb in Thailand, potently inhibit the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse skin. J. Agric. Food Chem. 43 : 2779-2783 (1995)
 - 30) Nobuyuki K. Makoto M. Ryuichiro K. and Yoshimasa T. Antifungal activity of components of essential oils. Agric. Biol. Chem. 45(4) : 945-952 (1981)

- 31) Jill DH. Mary JL. and Michael NG. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Cancer Res.* 52 : 4021-4026 (1992)
- 32) Middleton E. Kandaswami Jr. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol.* 115-120 (1994)
- 33) Harmut M. Liebich I. Glass capillary chromatography in clinical medicine and pharmacology. *J. Chromatography.* 419, 440 (1985)
- 34) Pierre M. Emile M. Gay DT. Jacques E. Column liquid chromatographic determination of flavonoid glycosides in citrus. *J. Chromatography.* 634 : 129-134 (1993)
- 35) Harman D. Aging : A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11 : 298-300 (1956)
- 36) Halliwell B. Free radicals reactive oxygen species and human disease : A critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British J. Exp. Pathol.* 70, 737 (1989)
- 37) Misra H.P. Generation of superoxide free radical during autooxidation of thiol. *J. Bio. Chem.* 249, 2151 (1974)
- 38) Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6 : 3051-3064 (1992)
- 39) Lee HJ. Jeong YS. Ryu SY. and Ryu JH. Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthine in activated RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji.* 42(5) : 540-543 (1998)
- 40) Cerutti PA. Oxy-radicals and cancer. *Lancet.* 344(8926) : 862-863 (1994)
- 41) Knowles RG. and Mocada S. Nitric oxide as signal in blood vessels. *TIBS,* 17 : 399-402 (1992)
- 42) Avena SL and Hinoay LV., Ferulic acid and other phenolics in oat seeds. *J. Food Sci.* 42 : 551-556 (1977)
- 43) Park HS. Ahn B. and Yang CB. Studies on the Functional Properties of Sesame and Perilla Protein Isolate. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22(3) : 350-356 (1990)

- 44) Naohiko Y. Antioxidant preparations from nonsalted soybean Miso. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 31, 278 (1984)
- 45) Beckel, RW. Antioxidative arginine-xylose maillard reaction products. *J. Food Sci.* 48, 996 (1983)
- 46) Farag RS. Badei AZMA. and Baroty GSA. Influence of thyme and clove essential oils in cotton seed oil oxidation. *JAOCS*. 66 : 800-806 (1989)
- 47) Ramarathnam N. Osawa T. Namiki M and Kawakiski S. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 1. Isolation, fractionation and partial characterization. *J. Agric. Food Chem.* 36 : 732-735 (1988)
- 48) Yu JH. Cho CM. Oh DH and Pyun YR. Antioxidant properties of red-pepper peel extracts on margarine. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 9(1) : 21-27 (1981)
- 49) Han YB. Kim MR. Han BH and Han YN. Studies on anti-oxident component of mustard leaf and seed. *Kor. J. Pharmacogn.* 18(1) : 41-49(1987)
- 50) Hirose T, Kawi H and Hosegai Y. On the antioxidative activities of crude drugs, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 25 : 691-694 (1978)
- 51) Kim HK. Kim YE. Do JR, Lee YC. Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medical plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 27 : 232-239 (1995)
- 52) Lee YJ. Shin DH. Chang YS and Shin JI. Antioxidative effect of some edible plant solvent extracts with various synergists. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 25(6) : 683-688(1993)
- 53) Seo MS. Antioxidant activity of astragalus membranaceus extracts. *Sungshin Women's University* (2000)
- 54) AOAC. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of official analytical chemists. Virginia. USA (1990)
- 55) Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical.

- Nature. 181 : 1199-1120 (1985)
- 56) Nagai T. Sakai M. Inoue R. Inoue H and Suzuki N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. Food Chem. 75 : 237-240 (2001)
 - 57) Chung SK. Osawa T and Kawakishi S. Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). Biosci. Biotech. Biochem. 61 : 118-123 (1997)
 - 58) Goinstein S. Martin-Belloso O. Park YS. Haruenkit R. Lojek A. Ciz M. Caspi A. Libman I. Trakhtenberg S. Composition of some biochemical characteristic of different citrus fruit. Food Chem. 74 : 309-315.(2001)
 - 59) Yu MH. Lee S. Im HG. Kim HJ. Lee IS. Antioxidant activities of *Prunus salicina* Lindl. cv. *Soldam*(Plum) at different growth stages. Kor. J. Food Preserv. 11(3) : 358-363 (2004)
 - 60) Cha WS. Shin HR. Park JH. Oh SL. Antioxidant activity of phenol compounds from mulberry fruit. Kor. J. Food Preserv. 11(3) : 383-387 (2004)
 - 61) Bae YI. Chung YC. Shim KW. Antimicrobial and antioxidant activities of variuos solvent extract from different parts of Loquat(*Eriobotrya japonica*, Lindl.). Kor. J. Food Preserv. 9(1) : 97-101 (2002)
 - 62) Kim HK. Na GM. Ye SH. Han HS. Extraction characteristics and antioxidative activity of *Lycium chinenes* extracts. Kor. J. Food Preserv. 11(3) : 352-357 (2004)
 - 63) Jeong SJ. Lee JH. Song HN. Seong NS. Baeg NI. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem. 47 : 135-140 (2004)
 - 64) Lee HK. Choi YM. and Suh HJ. Antioxidant activities of traditional wine and liquor produced in chungcheong-do. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 33(8) : 1257-1261 (2004)
 - 65) Mahoney JR and Graf E. Role of alpha-tocopherol, ascorbic acid, citric

- acid and EDTA as antioxidants in model system. J. Food Sci. 51 : 1293-1296 (1986)
- 66) Oki T. Masuda M. Furuta S. Nishibia Y. Terahara N. and Suda I. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. J. Food Chem. Toxicol. 67 : 1752-1756 (2002)
- 67) Kim EY. Baik IH. Kim JH. Kim SR. Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Kor. J. Food Sic. Technol. 36(2) : 333-338 (2004)
- 68) Kang MY. Kim S. Ko HJ. Chin JH. Nam SH. Antioxidative activity of germinated specialty rices. Kor. J. Food Sci. Technol. 36(4) : 624-630 (2004)
- 69) Hong JY. Nam HS. Lee YS. Yoon KY. Kim NW. Shin SR. Study on the antioxidant activity of extracts from the fruit of *Elaeagnus multiflora* Thunb. Kor. J. Food Preserv. 13(3) : 413-419 (2006)
- 70) Shon MY. Kim SH. Nam SH. Park SK, Sung NJ. Anitoxidant activity of Korean green and fermented tea extracts. J. Life Sci. 14(6) : 920-924 (2004)
- 71) Devy C. and Gautier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutase. Biochem. Pharmacol. 39 : 399-405 (1990)
- 72) Halliwell B. Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 219 : 1-4 (1984)
- 73) Kang MY. Kim S. Ko HJ. Chin JH. Nam SH.,Antioxidative activity of germinated specialty rices. Kor. J. Food Sci. Technol. 36(4) : 624-630 (2004)
- 74) Nam SH. Chang SM. Kang MY. Varietal difference in antioxidative activity of ethanolic extracts from colored rice bran. J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem. 46(1) : 16-22 (2003)

- 75) Min SH. and Lee BR. Antioxidant activity of medicinal plant extracts cultivated in Jechon. Kor. J. Food Culture. 22(3) : 336-341 (2007)
- 76) Lee HK. Choi YM. and Suh HJ. Antioxidant activities of traditional wine and liquor produced in Chungcheong-do. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 33(8) : 1257-1261 (2004)
- 80) Lee SO. Lee HJ. Yu MH. Im HG. Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetable produced in Ullung island. Kor. J. Food Soc. Sci. Nutr. 37 : 233-24 (2005)
- 81) Horowitz R. and Gentili B. Flavonoids constituents of citrus. In Citrus Science and Technology. Nagy S. Shaw PE. and Vedhuis, M.K(Eds). pp. 397-426 AVI Publishing : Westport. CT (1977)
- 82) Guengerich, FP. and Kim DM. *In vitro* inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. Carcinogenesis. 11 : 2275-2279 (1990)

감사의 글

대학원을 시작하고 처음 학교를 들어갔을 때 새로운 것을 접한다는 생각에 가슴이 뛰었던 생각이 납니다. 새로운 것을 배운다는 생각에 처음에는 무엇이든지 열심히 할 수 있을 거라고 다짐을 하면서 시작을 했습니다. 하지만 처음의 다짐과 달리 열정적으로 하지 못한게 후회가 되기도 합니다. 그러나 정신적으로 마음적으로 모두들 도와주시고 이끌어 주셔서 이렇게 졸업을 하게 되었습니다. 감사합니다.

부족한게 많은 저를 항상 걱정해 주신 김수현 교수님 정말 감사드립니다. 그리고 실험방 식구들....용석이형, 마인다 등 잘해주지도 못하고 챙겨주지도 못했지만 실험방 식구들이 있어서 많은 힘이 되었습니다. 그리고 대학원을 다니면서 항상 옆에서 조언을 아껴주신 하진환교수님, 송대진교수님, 카리스마의 지존 강영주교수님, 웃는게 멋있으신 임상빈교수님, 과묵하시면서도 따뜻하신 고영환교수님 모두 감사합니다. 그리고 항상 따듯이 대해 주었던 식품공학과 조교 선생님들 정말 감사합니다.

마지막으로 힘들지만 항상 제 옆에 계시는 부모님...

힘들 때 항상 이겨낼 수 있도록 지켜봐 주신거 알고 있습니다.. 사랑합니다.

나이만 먹었지 항상 철이 없는 저를 지금껏 키워주시고 이끌어 주셔서 정말 감사합니다. 그리고 누나들...항상 정신적으로 도와줘서 정말 고마워....

모두들 감사하고 사랑합니다.