

博士學位論文

제주산 당유자 과피 추출물의
생리활성



濟州大學校 大學院

食品工學科

玄 載 哲

2010年 2月

제주산 당유자 과피 추출물의 생리활성

指導教授 金 洙 賢

玄 載 皙

이 論文을 工學 博士學位 論文으로 提出함

2010年 2月

玄載皙의 工學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 姜 永 周 印

委 員 高 容 九 印

委 員 任 尙 彬 印

委 員 吳 昌 璟 印

委 員 金 洙 賢 印

濟州大學校 大學院

2010年 2月

Physiological Activities of Extracts from
Citrus grandis Osbeck Peels in Jeju

Jae-Seok Hyon

(Supervised by Professor Soo-Hyun Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Doctor of Engineering

2010. 2.

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Summary	1
서 론	3
I. 연 구 사	8
1. 감귤의 성분	9
2. 감귤의 플라보노이드	10
3. 감귤의 항산화성과 항균성	16
4. 감귤의 생리활성	17
II. 당유자 과피 효소 추출물의 항산화 활성	20
1. 재료 및 방법	21
1) 재료 및 시약	21
2) 당유자 과피의 추출	21
3) 추출수율	21
4) 총 폴리페놀 정량	23
5) 총 플라보노이드 정량	23
6) 항산화 활성 측정	23
(1) DPPH 라디칼 소거활성	23
(2) Hydroxyl 라디칼 소거활성	24
(3) Alkyl 라디칼 소거활성	24
(4) Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) 소거활성	24
2. 결과 및 고찰	26
1) 추출수율	26
2) 총 폴리페놀 함량	28
3) 총 플라보노이드 함량	30
4) DPPH 라디칼 소거활성	32

5) Hydroxyl 라디칼 소거활성	35
6) Alkyl 라디칼 소거활성	37
7) Hydrogen peroxide 소거활성	39
III. 당유자 과피 발효물의 항산화 활성	42
1. 재료 및 방법	43
1) 재료 및 시약	43
2) 당유자 과피 발효 및 추출	43
3) 총 플라보노이드 정량 (HPLC/MS 분석)	44
2. 결과 및 고찰	46
1) 추출수율 및 총 플라보노이드 함량	46
2) DPPH 라디칼 소거활성	48
3) Hydroxyl 라디칼 소거활성	50
4) Alkyl 라디칼 소거활성	52
5) Hydrogen peroxide 소거활성	54
6) 당유자 과피 추출물로부터 플라보노이드 화합물 분석	57
IV. 당유자 과피 추출물에 의한 HL60 세포의 Apoptosis 유도	61
1. 재료 및 방법	62
1) 재료 및 추출	62
2) 세포 배양	62
3) 암세포 증식 억제 효과 측정	62
4) MTT를 이용한 세포 독성 측정	63
5) 미토콘드리아 막 투과성 측정 (JC-1 staining)	63
6) 세포주기 분석	64
7) 염색에 의한 세포핵의 형태 관찰 (Hoechst 33342 staining)	64
8) Western blot 분석에 의한 단백질 발현의 분석	64
2. 결과 및 고찰	66

1) CGP 추출물의 암세포 증식 억제	66
2) Apoptosis에 따른 미토콘드리아 막 투과성 변화	71
3) Apoptosis에 따른 세포 형태 및 주기 변화	74
4) Apoptosis 관련 단백질의 발현 변화	77
V. 요약	81
참 고 문 헌	83



LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Hydroxyl radical scavenging activities of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels.
- Fig. 2. Alkyl radical scavenging activities of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels.
- Fig. 3. Hydrogen peroxide scavenging activities of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels.
- Fig. 4. DPPH radical scavenging activities of extract from *C. grandis* peel (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP).
- Fig. 5. Hydroxy radical scavenging activities of extract from *C. grandis* peel (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP).
- Fig. 6. Alkyl radical scavenging activities of extract from *C. grandis* peel (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP).
- Fig. 7. Hydrogen peroxide scavenging activities of extract from *C. grandis* peel (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP).
- Fig. 8. HPLC/MS chromatogram of flavonoids from CGP and FCGP extracts. A; CGP, B; FCGP.
- Fig. 9. Inhibitory effects of CGP extract against growth of the tumor cell lines (HL60, HT29, MCF-7 and B16 cells).
- Fig. 10. Inhibitory effect of CGP extract against cell growth of HL60 cells
- Fig. 11. Cytotoxicity effect of CGP extract on the cell viability of Vero cells.
- Fig. 12. Representative confocal images illustrate the increase in the green fluorescence intensity of JC-1 by membrane damage in CGP treated HL60 cells as compared to control (Original magnification $\times 200$).
- Fig. 13. Fluorescent intensity of membrane potential was detected in CGP

treated HL60 cells by flow cytometry after JC-1 staining.

Fig. 14. Apoptotic body formation was observed under a fluorescent microscope after Hoechst 33342 staining and are indicated by arrows (Original magnification $\times 400$).

Fig. 15. Apoptotic sub-G1 content was detected by flow cytometry after propidium iodide staining.

Fig. 16. Effect of CGP extract on apoptosis-related proteins in HL60 cells by western blot analysis.



LIST OF TABLES

- Table 1. Characteristics of different carbohydrases and proteases in hydrolysis process
- Table 2. Yields of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels
- Table 3. Total polyphenol contents of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels
- Table 4. Total flavonoid contents of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels
- Table 5. DPPH radical scavenging activities of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels
- Table 6. IC₅₀ of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels
- Table 7. HPLC and LC/MS conditions for the determination of flavonoids in *C. grandis* peel
- Table 8. Yields and flavonoid contents of *C. grandis* peel and fermented *C. grandis* peel extracts
- Table 9. IC₅₀ value of antioxidant activities from CGP and FCGP extracts
- Table 10. Peak assignment for the analysis of the extracts from CGP and FCGP

Summary

This study was carried out to investigate antioxidative activities of enzyme extracts from *Citrus grandis* and *C. unshiu* and 100% ethanol extracts from *C. grandis* peel and 80% ethanol extracts from *C. grandis* (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP), and anti-proliferation activity of 80% ethanol extract from *C. grandis* peel in HL60 (human promyelocytic leukemia) cells.

1. Antioxidative activities of enzyme extracts from *Citrus grandis* and *C. unshiu*

Total flavonoid content was the highest in Ultraflo extract from *C. grandis* peel as each 24.3~59.8 and 18.4~30.0 mg/100g (dry base) ranges in carbohydrases and proteases. DPPH scavenging activities were very high in extracts from *C. grandis* peel comparing to extracts from *C. unshiu*. Hydrogen peroxide scavenging activities were high in Viscozyme and Kojizyme extracts from *C. grandis* and *C. unshiu* peels. Alkyl radical scavenging activities were high in both enzyme extracts from *C. grandis* and *C. unshiu* peels. But, hydroxyl radical scavenging activities were low relatively comparing to scavenging activities of other reactive oxygen species.

2. Antioxidative activities and distribution of flavonoids of ethanol extracts from *C. grandis* (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP)

Free radical scavenging activities of *C. grandis* peel appeared more in extracts from FCGP comparing to extracts from CGP, and distribution of flavonoids appeared differently in CGP and FCGP. Therefore, *C. grandis* peel could confirm that increases physiological active components when fermented

by yeast, and accordingly free radical scavenging activities rise.

3. The anti-proliferation activity of 80% ethanol extract from *C. grandis* peel in HL60 (human promyelocytic leukemia) cells.

It was found that 80% ethanol extract from *C. grandis* could inhibit the cell growth in a dose-dependent manner (250~1,000 $\mu\text{g/mL}$), which was associated with morphological changes and apoptotic cell death such as depolarized mitochondrial membrane, formation of apoptotic bodies and increased populations of apoptotic sub- G_1 phase. The results indicate that CGP extract inhibits the growth of HL60 cancer cells by the induction of apoptosis, which may be mediated by its ability to change of the Bcl-2 family proteins, increase the activation of caspase-3 and PARP. Therefore, it is suggested that CGP has the potential to provide a remarkable natural defense against the proliferation of HL60 cells.

서론

우리나라 제주도에서는 전체 과실 생산량의 30%에 해당하는 연간 70만톤 이상의 감귤이 생산되고 있는데, 그 중 80~85%는 생과용으로 사용되고 있고, 나머지 15~20%는 가공용으로 소비되고 있다(1). 또한 제주특별자치도 농업기술원과 감귤관측조사위원회의 노지감귤 착과상황 조사결과에 따르면 2009년 제주도의 감귤 예상 생산량은 67만6천톤 내외로 전망되고 있다.

가공용으로 사용되는 감귤은 가공 과정에서 발생하는 막대한 양의 부산물이 자연에 방치됨으로써 자연환경을 오염시키고 있다. 그러나 자연에 버려지는 페놀 화합물의 한 종류인 플라보노이드는 심장 순환기계 질환 및 항암, 항산화, 항염증에 대한 개선 효과가 있다고 보고되고 있으며(2-5), 이에 따라 감귤류 과피 분말 및 과피 추출물은 기능성 식품으로 개발되어 왔다.

감귤류는 polyphenol류, vitamin류, limonoid류, synephrine 등의 다양한 화합물을 함유하고 있으며(6), rutin이나 deosmine 등의 일반적인 flavonoid류, hesperidin, naringin 등의 감귤류 특유의 flavonoid류, 채소나 과일에서는 보고되지 않는 감귤류 고유의 tangeretin, nobiletin 등의 flavonoid류가 함유되어 있다(7). 특히 감귤의 과피에는 페놀 화합물이 높은 농도로 존재하기 때문에 플라보노이드류의 풍부한 공급원이 된다(8,9). 이러한 polyphenol류는 체내의 항산화 효소체계와 함께 자유기로부터 조직을 보호해 주는 역할을 한다(10). 또한 감귤류 과피에는 carotenoid류, bioflavonoid류, pectin 및 terpene류가 풍부하게 함유되어 있으며(11-14), 혈중 LDL 콜레스테롤 함량 감소작용(5) 및 HDL 콜레스테롤을 높이며, 순환계 질환의 예방 및 개선효과(15) 등 다양한 생리적 작용이 보고되고 있다. 또한 Kim 등(16)은 감귤의 전체, 과피와 과육 부분의 세 가지 감귤 시료 중에서 flavonoids, 항산화, vitamins, 식이섬유 함량 모두 과피 분말에서 가장 높았으며, 노령 흰쥐에서 감귤 시료 중 과피 분말이 항산화능 증진과 체중감소 효과가 있었음을 보고한 바 있다.

감귤류에 함유된 대부분의 플라보노이드 화합물은 배당체의 형태로서 전체 플라보노이드의 50~60%를 차지하고 있다. 감귤의 대표적인 배당체 형태로는 naringin, hesperidin 및 neohesperidin 등이 있으며 이를 새로운 형태의 플라보노이드로 전환함으로써 기능성을 향상시키려는 연구가 보고되고 있다(17,18). 그러나 기존 방법에는 열처리를 통한 과정은 생리활성 물질을 파괴하게 만들고, 갈변현상을 초래하는 단점 등이 보고되고 있으며(19), 이런 단점을 보완하고자하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 이전 연구에서 보면 미생물과 당 분해 효소는 발효 및 자가 분해 과정을 통하여 배당체 형태의 플라보노이드가 비당체 형태로 전환되거나 또는 미생물의 2차 대사과정을 통하여 새로운 형태의 물질로 전환시켰다(20).

최근 생활환경과 영양상태의 개선 및 의학의 발달과 더불어 개인의 평균 수명이 점차 증가함에 따라 건강을 유지하기 위한 다양한 방안으로 노화를 포함한 각종 성인병 발생의 원인이 되고 있는 활성산소가 주목 받고 있다. 산화적 스트레스의 직접적인 원인으로 지적되고 있는 superoxide anion, hydroxyl radical 및 hydrogen peroxide와 같은 활성 산소종이 세포와 조직의 비가역적 손상 초래, 단백질 변성, 지질과산화, DNA 산화 및 기능의 변형을 초래하여 만성질환의 원인이 되기도 한다(21-23). 따라서 생체 내 항산화 방어시스템을 증가시키거나 ROS (reactive oxygen species)를 조절할 수 있는 합성 또는 천연항산화제 개발연구의 필요성이 강조되고 있고 이에 대한 탐색이 활발히 진행되고 있다(24). 이러한 노화 및 각종 질병을 예방하고 치료하기 위한 목적으로 초기에 사용되었던 BHT, BHA와 같은 합성 항산화제들이 갖고 있는 안전성 등의 문제를 극복하고자, 최근에 각종 생약제나 과일, 채소와 같은 천연물 유래의 항산화제 개발 이용하려는 연구 추세로 변화하고 있다(25).

암의 발생 및 암에 의한 사망률이 증가함에 따라 암을 예방하거나 암을 치료할 수 있는 동·식물 및 식품에 대해 관심이 집중 되고 있다. 암에 관한 연구는 많은 연구자들에 의해 매우 활발히 진행되고 있으며, 항암제의 개발 역시 상당히

진전되어 여러 가지 화학합성 항암제가 임상에서 사용되고 있으나, 독성 및 부작용이 제기됨에 따라 천연물로부터 항암성분을 찾는 연구가 진행되고 있다(26).

백혈병은 백혈구(white blood cell)를 생산하는 조직인 골수 또는 림프관내계에서 발생한 암세포 즉 백혈병세포가 비정상적으로 증식하여 이들이 모든 장기에 침윤하여 다식 증식하는 동시에 말초혈액 중에도 나타나는 병이다. 우리나라의 백혈병은 날로 그 발생빈도가 높아지고 있으며 인구 10,000 명당 남성 4명, 여성 3명 정도로 추정되고 있다. 백혈병에는 치료제가 완벽한 것이 없으며 자가골수이식 수술을 하더라도 재발 위험이 있으며 동종골수이식은 기증자가 적으며 치료에 따른 독성이 있다. 항암 화학요법의 경우 구토, 설사, 복통, 및 탈모 등 부작용이 심하여 이에 따른 부작용이 적으면서도 치료 효과가 높은 백혈병치료제 개발이 시급한 실정이다. 이와 같이 효과적인 암의 치료와 예방에 있어서 비정상적인 세포나 암세포의 apoptosis 유도는 많은 치료제의 표적이 되고 있으며, apoptosis에 관련된 기전 연구가 많이 진행되고 있다(27-29). 세포의 사멸은 apoptosis와 necrosis로 구분되며, 이것은 세포의 형태학적 및 생화학적인 특성에 의하여 구분될 수 있다. Apoptosis는 유전적으로 보전된 관련 유전자에 의해 이루어지며, 조절이 가능한 능동적 세포 죽음과정이다. 이 과정은 형태적으로 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등과 더불어 세포내부의 물질들이 사멸체(apoptotic body)라는 포낭을 형성하고, 형성된 사멸체들은 식세포 작용에 의해 제거됨으로써 염증을 유발하지 않는다(30). 반면 괴사(necrosis)는 직접적으로 독성이 있거나 물리적 상해 등 갑작스런 외부환경의 변화에 의해 유발되는 수동적 과정으로 염색사의 불규칙한 응집과 세포질의 팽창과정을 거치게 되고 시간이 지나면 세포막이 파괴되면서 세포가 분해되고 이들은 염증을 유발하게 된다(31). 이에 apoptosis 유도에 의한 세포사멸은 종양이 항암치료에 의해 효과를 나타내는 중요한 기전으로 알려져 있다(32,33).

한편 감귤류 과피 분말 및 과피 추출물은 다양한 기능성에 영향을 주는 우수한 영양성분을 함유하고 있어서 의약품 소재 및 기능성 식품으로 가능성을 인정

받고 있으며 고부가가치 식품으로 이용될 수 있다. 최근 연구를 보면 유자 및 당유자를 이용한 기능성 식품 개발 및 생리활성에 대한 연구가 보고되고 있다(34-36). 한편, 예로부터 감귤 과피를 건조시킨 것을 진피(*Aurantii nobilis pericarpium*)라고 하여 기가 멍친 것을 풀어주고 비장 기능을 강화시켜 메스꺼움, 소화불량,泄수, 가래를 없애주며 이뇨작용의 효과가 있어서 한약재로 사용되어 왔다(37).

제주도의 재래종 감귤인 당유자(*Citrus grandis* Osbeck)는 제주에서 왕귤 또는 텃유지라고 불리는 제주 재래 감귤로서, 분류학상 운향과, 감귤아과에 속하는 과수이며 특유의 향기 성분과 기능성 성분이 다량 함유되어 있으나, 산 함량이 매우 높고 pH가 낮기 때문에 일부 당류 가공과 약용으로만 이용되고 있다(38). 또한 인체에 기능성을 가지는 성분으로 limonine, obacunone, nomiline, naringin, neohesperidin 등을 함유하고 있으며 최근 유자 및 당유자를 이용한 기능성 식품 개발 및 생리활성에 대한 연구가 보고되고 있다(34-36, 39). 감귤류의 기능성 성분 중 가장 중요한 flavonoid는 항암, 항염증, 항산화, 심혈관계 질환 예방 및 치료 등의 기능을 가지고 있는데(2-5), 당유자에는 온주밀감에서는 검출되지 않는 다양한 flavonoid류가 존재하며, 그 함량도 높은 것으로 보고되고 있다(40-43). 또한 감귤류의 항산화 작용, 활성산소 제거 및 아질산염 소거작용은 발암물질에 의한 질환의 예방 및 치료에 효과가 있다고 보고되고 있다(44).

따라서 본 연구에서는 가공 부산물로 생기는 감귤 과피의 이용성을 증대시키기 위하여 온주밀감 및 당유자의 과피를 동결건조한 후 효소를 이용하여 분해 추출한 다음 항산화 활성을 비교 검토함으로써 과피의 이용을 활성화시키는 방안을 모색하고자 하였으며, 당성분을 에너지원으로 사용하며 알코올 발효 균주로 사용되고 있는 식품미생물인 효모 *Saccharomyces cerevisiae* (KCCM 35053)를 이용하여 이전 연구에서 보고되어진 대로(18,45) 소화가 용이하도록 발효시킴과 동시에 당유자 과피에 함유하고 있는 플라보노이드 성분을 새로운 형태로 전환을 시킴으로서 이에 따른 생리활성의 변화와 성분의 변화를 살펴봄으로써 기능

성 식품 및 건강보조식품 등의 식품용 신소재 개발 원료로서의 이용 가능성을 탐색하였다. 또한 당유자 과피 추출물의 항암 활성에 관한 기전을 조사하기 위하여 다양한 암세포주를 대상으로 항암활성을 비교하였으며, 그 중 암세포 성장 억제 활성이 뛰어난 혈액암 HL60 세포를 대상으로 apoptosis 유도에 미치는 영향을 조사함으로써 당유자의 기능성 식품 소재로서 가능성을 탐색하였다.





I. 연구사

1. 감귤의 성분

감귤은 운향목 운향과(Rutaceae), 감귤나무아과(Aurantioideae) 중에서 감귤속(*Citrus*), 금감속(*Fortunella*), 탕자나무속(*Poncirus*)에 속하는 각각의 종(species) 및 이들 속(Genus)으로부터 파생된 품종을 지칭하는 것으로서, 과수용으로는 감귤속(*Citrus*)에 해당하는 귤 종류만 재배되고 있다(46).

2005년 세계 감귤 생산량은 1억 510만 톤으로 과실 중에서 생산량이 가장 많고, 지금도 그 생산량이 증가하고 있다. 우리나라의 경우, 감귤은 제주도를 중심으로 재배되고 있는데, 우리나라 총 과수 생산량 250만 톤 가운데 약 30%를 감귤이 차지하고 있어 감귤은 우리나라에서 가장 중요한 과수라 할 수 있다(47).

감귤에는 유용성분들이 다량으로 함유되어 있으며 주요 성분으로는 당, 유기산, 비타민 C, 카로티노이드, 펙틴, 리모노이드 및 플라보노이드 등이 함유되어 있어서 기능성 식품으로의 가능성을 인정받고 있다. 한국산 감귤류의 성분분석에 관한 연구로는 1967년 Yang 등(48)이 제주산 감귤 10여종에 대하여 일반성분과 무기성분 분석 및 과즙의 산과 당 함량, pH 등을 조사하여 보고한 이래, Park 등(49)이 당 및 산 함량의 시기적 변화에 대한 연구에서 과일 중량이 클수록 과피율이 큰 경향을 나타내며, 수확시기가 늦을수록 당 함량은 증가하고, 산 함량은 감소하는 경향을 보이는 것으로 보고하였으며, 또한 감귤의 유리아미노산, 당 및 펙틴 함량에 대해서 연구되었다(50,51). Kim 등(52)은 제주감귤 품종별 일반 성분, hesperidin 및 naringin 등 이화학적 성분을 비교하여 보고하였고, 제주산 감귤의 품종 및 수확시기별 품질 특성(38), 제주산 감귤류 성분과 그 특성(53), 수확시기별 조생은주밀감의 품질특성(54), 제주산 감귤류의 숙기에 따른 유리당, 유기산, 헤스페리딘, 나린진, 무기물 함량의 변화(55), 제주재래종 감귤류 미숙과의 naringin, hesperidin 및 neohesperidin 함량 분석(41), 제주산 감귤류의 영양성분 함량 비교(56) 등이 연구가 이루어져 있다.

또한, 감귤 속에 함유되어 있는 카로티노이드는 체내에 흡수되어 비타민 A로

전환되는 프로비타민 A로서의 기능 이외에 면역기능을 향진시키고, 암 발생을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있어서 천연착색제로서의 의미뿐만 아니라 하나의 기능성 성분으로 주목받고 있다(57-60). Carotenoid에 대한 연구로는 Shim 등(61)이 감귤 과피에서 총 carotenoid 분석결과, β -carotene이 가장 함량이 높은 것으로 보고하였고, Kim 등(62)은 제주산 감귤 품종별 총 carotenoid 함량이 0.47-9.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 당유자가 가장 높다고 보고하였으며, Hwang과 Yoon(63)은 제주산 감귤류 14종의 총 carotenoid 함량이 과육과 과피에서 각각 0.23~3.38 mg%와 0.82~10.64 mg%로 과피에서 함량이 높은 것으로 보고하였다. 현재 우리나라에서는 폐과피의 일부가 사료 또는 한약재로 쓰이고 있을 뿐, 대부분이 버려지고 있는 실정으로 이를 활용하기 위한 연구들이 진행되고 있다. 이 폐과피 속에는 펙틴, 헤스페리딘, 나린진, peel oil 등의 유효한 성분이 많이 함유되어 있어 미국 등 선진 외국에서는 폐과피를 이용하여 펙틴 등 유효성분을 생산하고 있는 실정이다(64). Chang 등(65) 및 Moon 등(66)은 감귤과피의 효율적 이용을 위한 펙틴의 제조방법 등을 모색하였고, 감귤과피의 정유 성분 및 밀감주스의 향기성분 연구(67,68), 감귤착즙박의 화학성분 및 플라보노이드분석(69), 건조를 통한 활용방안 등(70,71) 연구가 다양하게 진행되고 있다.

2. 감귤의 플라보노이드

감귤류는 6대륙 100개국 이상에서 재배되는 세계적으로 가장 즐겨먹는 과일 중의 하나이다. 감귤에는 포도당, 과당, 비타민 C와 E, 식이섬유소 등과 같은 영양소가 함유되어 있으며, 또한 flavonoid, carotenoid와 같은 생리활성물질도 들어 있다(1,6,10,72). 특히 감귤 과피에 많이 함유되어 있는 hesperidin이나 naringin과 같은 flavonoid 물질은 암세포의 증식을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다(74,75).

Flavonoid란 그리스어로 황색을 의미하는 flavus에서 유래되었고 과일껍질, 채소의 잎, 줄기, 뿌리, 씨앗, 꽃 등 식물에 광범위하게 존재하는 천연물질이다(76). 이는 C₆-C₃-C₆을 기본골격으로 하는 polyphenol 화합물로서 두 개의 페닐기에 이중결합의 유무와 결합위치, hydroxyl group(-OH) 및 methoxyl group(-OCH₃)의 결합수 등에 의해 flavone, flavonol, flavanone, flavanonol 및 iso-flavone 등으로 분류되며(Fig. I), 현재까지 4,000여종이 식물에 존재한다고 알려져 있고 감귤류에는 60여종이 플라보노이드가 분리되어 보고되고 있다(76,77).

이들 flavonoid 화합물의 최초 임상에서의 사용은 1936년 헝가리 Albert Szent-Gyorgyi에 의한 것으로 이들 물질이 혈관투과성 조절 및 Vitamin C 보조 활성을 보이기 때문에 Vitamin P라고 불리기도 하였으며, 인체의 평균섭취량은 약 23-1000 mg/일로 알려져 있다(78,79). 감귤류에서 유래하는 주요 flavonoid 성분으로는 naringin, hesperidin, neohesperidin, rutin, naringenin, hesperetin, narirutin, nobiletin, tangeretin, sinensetin, natsudadain, didymin, poncirin, eriocitrin, 5,7,4'-methoxyflavone, 4'-methoxyflavone 등이 보고되고 있다(Fig. II, III)(9).

감귤류에 특이적으로 함유되어 있는 polymethoxyflavone (PMF) 함량에 대한 연구로는 1934년 Nelson이 Florida의 Dancy tangerine (*Citrus nobilis deliciosa*)의 과피에서 tangeretin (5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone)을 분리하여 보고(80)하였으며, nobiletin (5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone)은 1938년에 Tseng이 오렌지 과피에서 처음으로 분리하여 보고하였다(81). Swift(1967)는 Florida 오렌지 과피 추출물에서 thin-layer chromatographic (TLC) system을 이용하여 tangeretin, nobiletin, sinensetin (5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone), tetra-O-methylscutellarein (5,6,7,4'-tetramethoxyflavone), 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone을 분석한 결과, 그 함량이 13~91 ppm 범위를 보고하였고(82), Veldhuis 등(1970)은 Florida 오렌지주스에서 tangeretin, nobiletin, sinensetin, tetra-O-methylscutellarein, 3,5,6,7,8, 3',4'-heptamethoxyflavone 함량이 전체적으로 2 ppm 이하

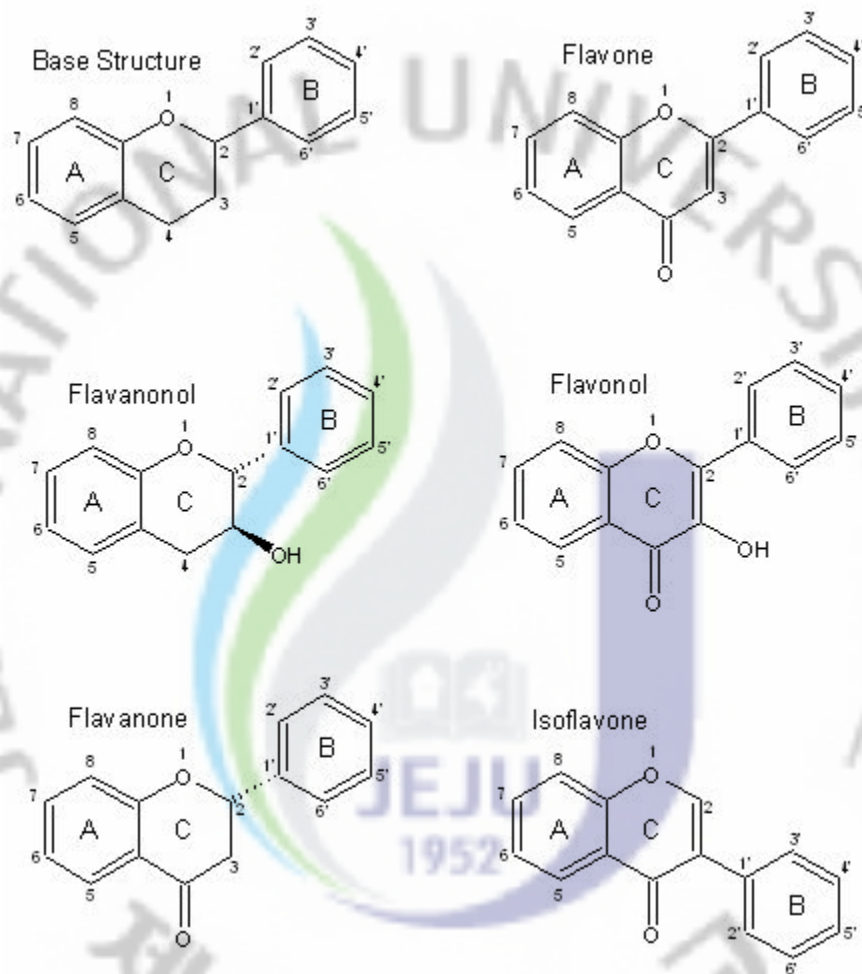
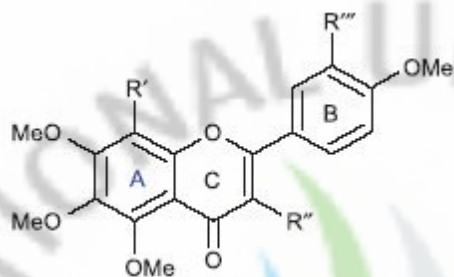
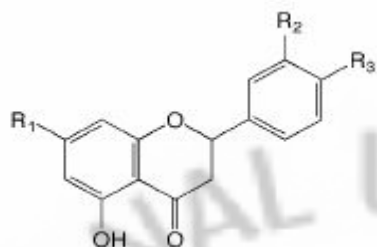


Fig. 1. Molecular structures of flavonoids.



R'	R''	R'''	Compound name
H	H	OMe(OCH ₃)	Sinensetin
H	OMe	OMe	Nobiletin
H	OMe	H	Tangeretin
OMe	OMe	OMe	3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone
H	H	H	Scutellarein tetramethylether
OH	OMe	OMe	Natsudaïdain

Fig. II. Structure of polymethoxyflavones.



R ₁	R ₂	R ₃	Compound name
<i>O</i> -Ru ^a	OH	OMe	Hesperetin 7- <i>O</i> -rutinoside (Hesperidin)
<i>O</i> -Nh ^b	H	OH	Naringenin 7- <i>O</i> -neohesperidoside (Naringin)
<i>O</i> -Ru ^a	H	OH	Naringenin 7- <i>O</i> -rutinoside (Narirutin)
<i>O</i> -Nh ^b	OH	OMe	Hesperetin 7- <i>O</i> -neohesperidoside (Neohesperidin)
<i>O</i> -Nh ^b	OH	OMe	Isosakuranetin 7- <i>O</i> -neohesperidoside (Poncirin)

Fig. III. Structure of flavanone-*O*-glycosides.

^a*O*-rutinose; ^b*O*-neohesperidose.

가 검출되었고, 과피에서 더 높은 PMF 함량을 보이는 것으로 보고하였다(83). Tatum과 Berry(84)는 Valencia orange와 Robinson tangerine peel에서 TLC법으로 13개의 flavonoid를 분리하였고, 이 중에서 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone 등 6개의 새로운 flavonoid 성분을 분리하여 보고하였다. Flavonoid 분석법으로는 Davis법, 자외선 흡광광도법(인도페놀법), 종이 및 박층크로마토그래피법(82,84), GC법, HPLC법 등이 있으나, Davis법은 간단 신속하고 비용이 저렴하여 대략적인 정량에 적합하나 비선택적인 단점이 있고, 박층크로마토그래피법은 정성 및 정량이 가능하나 시간이 많이 들고, 개개의 성분을 분리하는데 어려움이 있으며, GC법은 정밀성이 떨어지는 단점이 있다. HPLC법은 개개의 flavonoid를 신속하고 정확하게 동정 및 정량하는데 가장 적합한 것으로 알려지고 있다.

감귤류에 PMF 함량 분석을 위한 HPLC 분석은 1979년 Ting 등(85)이 Valencia orange 주스와 Dancy tangerine 주스에서 C₁₈ 칼럼에 이동상으로 acetonitrile/water(40/60, v/v)와 C₈ 칼럼에 이동상으로 tetrahydrofuran (THF)/water (25/75, v/v)를 사용하여 tangeretin, nobiletin, sinensetin, scutellarein, heptamethoxyflavone 함량을 분석할 때, C₁₈ 칼럼과 acetonitrile/water 이동상은 nobiletin과 heptamethoxyflavone, scutellarein이 분리가 잘되지 않아서, C₈ 칼럼과 tetrahydrofuran (THF)/water 이동상을 이용하여 분석하였다. Rouseff와 Ting(1979)은 냉동 농축오렌지주스에서 5개의 PMF 함량이 0.13-1.00 ppm으로 보고하였으며(86), Bianchini와 Gaydou(1980)은 tangerine과 orange peel에서 PMF의 분석은 이동상이 heptane-isopropanol(60:40)이고, 검출파장이 280 nm 일 때 가장 분리가 잘 되는 것으로 보고하였다(87). Gaydou 등(88)은 orange(*C. sinensis*)와 mandarin(*C. reticulata*) peel oil에서 tangeretin, heptamethoxyflavone 및 nobiletin이 각각 0.5-2.8, 0.2-2.7, 0.4-2.0 g/L이며, scutellarein, heptamethoxyflavone 및 sinensetin은 각각 0.0-0.6, 0.0-0.04, 0.07-0.3 g/L로 함량이 낮은 것으로 보고하였으며, tangeretin은 mandarin이 orange보다 함량이 높고, scutellarein은 orange가 mandarin보다 높다고 하였다. Kawaii 등은 일본의 감귤류 68종에

대하여 부위별로 24종의 flavonoid를 분석하였고(73), 24종의 잠감류에 대해서 23종의 flavonoid를 분석하여 보고하였다(89). 감귤 잎에 대한 PMF 연구는 지중해 만다린(90)과 일본의 감귤류 68종에 대해서 6개의 PMF을 보고(91)한 바가 있다.

국내에서의 PMF의 함량에 대한 연구로는 Baik 등(92)이 감귤류와 한국산 청피에서 sinensetin, nobiletin, tangeretin의 정량적 분포 연구와 Kim 등이 제주산 감귤류에서 nobiletin, heptamethoxyflavone, tangeretin에 대한 연구가 보고되고 있다(42,93,94).

3. 감귤의 항산화성과 항균성

최근 생활환경과 영양상태의 개선 및 의학의 발달과 더불어 개인의 평균 수명이 점차 증가함에 따라 건강을 유지하기 위한 다양한 방안으로 노화를 포함한 각종 성인병 발생의 원인이 되고 있는 활성산소가 주목 받고 있다. 산화적 스트레스의 직접적인 원인으로 지적되고 있는 인체 내에는 안정한 상태의 산소가 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학 반응과 같은 환경적 및 생화학적 요인 등에 의하여 superoxide anion, hydroxyl radical 및 hydrogen peroxide와 같은 활성 산소종이 반응성이 큰 활성산소(reactive oxygen species, ROS)로 전환된다. 이들 활성산소는 세포와 조직의 비가역적 손상 초래, 단백질 변성, 지질과산화, DNA 산화 및 기능의 변형을 초래하여 만성질환의 원인이 되기도 한다(21-23). 강한 산화력으로 류마티스 관절염, 당뇨병, 동맥경화, 암 등 각종 질병과 생체 대사과정에서 생성되어 세포막 지방질을 과산화 시키고 세포막 투과성의 변화를 초래하여 DNA 손상을 유발시킨다(21,22,95). 따라서 생체 내 항산화 방어 시스템을 증가시키거나 ROS를 조절할 수 있는 합성 또는 천연항산화제 개발연구의 필요성이 강조되고 있고 이에 대한 탐색이 활발히 진행되고 있다(24). 이러한 노화 및 각종 질병을 예방하고 치료하기 위한 목적으로 초기에 사용되었던

BHT, BHA와 같은 합성 항산화제들이 갖고 있는 안전성 등의 문제를 극복하고자, 최근에 각종 생약제나 과일, 채소와 같은 천연물 유래의 항산화제를 개발 이용하려는 연구 추세로 변화되고 있다(25). 감귤은 품종에 따라 과육과 과피의 비율 차이가 크지만, 그 동안 거의 폐기물로 버려지고 있는 과피는 대체로 과일의 50% 정도에 해당되는데 이 중에는 essence oil, carotenoid 및 flavonoid, cellulose, pectin, limonoid 등 생리활성들이 높게 함유되어 있다(41,55).

제주도 재래 감귤인 당유자(*Citrus grandis* Osbeck)는 왕귤 또는 멩우지라고 부르는 제주 재래 감귤로서, 분류학상 운향과, 감귤아과에 속하는 과수이며 인체에 기능성을 가지는 성분으로 limone, obacunone, nomiline, naringin, neo-hesperidin 등을 함유하고 있으며 최근 유자 및 당유자를 이용한 기능성 식품 개발 및 항바이러스 효과 등 생리활성에 대한 연구가 보고되고 있다(35,92,96-98).

염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질변화를 가져오는 이들의 기능성에 대한 평가로서 항산화작용, 순환계 질병의 예방, 항염증, 항 알레르기, 항바이러스, 혈중 지질 저하작용, 면역증강작용, 모세혈관 강화작용 등이 보고된 바 있으며(99,100), 감귤의 항균활성에 대한 연구로는 과피(101-103), 과즙(11)과 종자(104-106)를 대상으로 부위별로 보고한 바가 있다. 천연물에 존재하는 항균성물질을 항균소재로 이용하고자 하는 연구는 식품, 의약, 천연식물 및 생물공학산업 등에서 오래 전부터 활발하게 연구가 진행되어 왔는데, 석류(107), 삼백초(108), 오미자(109), 녹차, 오롱차 및 홍차(110), 조릿대(111), 인진쑥(112), 매실(113), 백합(114) 등이 대표적이며, 이러한 식품들은 대부분 항산화 및 항균효과를 나타내고 있으며 각 식품에 따라 특별히 좋은 효과를 보이는 것은 항균제의 재료로서 활용되고 있다.

4. 감귤의 생리활성

감귤은 독특한 향미와 다량의 비타민 C를 함유하고 있기 때문에 제주 특산과 일로서 생과와 과즙음료로 널리 이용되고 있으며, *Citrus*속 과일에 널리 분포되어 있는 flavonoid와 limonoid 그리고 carotenoid 들의 항암성을 비롯한 생리활성과 기능성식품으로서 그 가치를 재조명하고 있다(53,63).

예로부터 감귤은 신선한 과육, 그 자체로 섭취할 뿐만 아니라 위장 장애, 천식 해독, 식욕 부진 등에 효과가 있다고 알려져 약용으로도 널리 이용되어 왔다(37,115-117). 특히 감귤 과피에 많이 함유되어 있는 hesperidin이나 naringin과 같은 flavonoid 물질은 암세포의 증식을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있으며(74,75), 모세혈관의 수축을 촉진시켜 고혈압을 예방하고, 혈액내의 LDL 콜레스테롤의 양을 저하시켜 혈관의 건강을 증진시킨다(5,14,98). 그러나 이들 중요한 생리적 기능물질들을 함유하고 있는 감귤 과피는 그 일부가 한약재로 쓰이는 것 외에는 대부분 폐기되고 있는 실정이다(70).

Hesperidin은 식물세포뿐만 아니라 포유류 동물의 *in vitro*와 *in vivo*에서 여러 가지 생리 및 약리작용(118)과 혈관 청결을 향상시키고 모세혈관 침투성을 감소시키는 역할, 혈관 허약 및 침투 병 환자의 보충제로서 사용하는 것으로 보고되고 있다(78). 약리작용으로는 항염증 및 진통제 효과(119), 구강암 저해효과(120,121), 폐경기 증상에 대하여 에스트로겐 유사효과를 임상적으로 증명하여 보고하였다(122). Naringin은 콜레스테롤 저하능이 있고, 강력한 항암효과를 가지는 것으로 나타났다(5,123). 또한 naringin은 에탄올에 의한 위장장애에 대한 항궤양 효과(124)와 병리학적 과산화, 환경독소에 대한 화학요법의 보조역할을 하는 것으로 보고되고 있다(125). 감귤류 고유의 플라보노이드인 polymethoxyflavone (PMF)는 감귤 잎이나 주스보다는 과피에 더 많이 존재하고 있고(126), 최근에는 이들 화합물의 생리활성 연구가 많이 진행되고 있다. 이러한 flavonoid의 생리활성의 강도는 치환기의 수, 종류 및 결합위치에 따라 차이를 보이는데, 일반적으로 methoxy기(-OCH₃)가 많을수록, 수산기(-OH)보다 methoxy기를 가지는 화합물이 강한 활성을 보이는 것으로 보고되고 있다(127).

Iwase 등(128)은 감귤 과피에서 분리한 nobiletin과 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMT)을 이용하여, nitric oxide (NO)에 의한 발암 예방효과를 연구한 결과, HMT가 nobiletin보다 발암예방효과가 더 높은 것으로 보고하였으며, nobiletin은 세포자멸과 세포주기조절을 통해 항증식성 활성화와 위암 등 항암효과(129)와 인간의 활액 섬유아세포와 쥐 대식세포의 항염증효과(130), 유방암세포의 저해효과(131)와 C형 간염 바이러스에 대한 항간염효과를 보고하고 있다(132).

Tangeretin과 nobiletin은 암세포에 대해서 세포독성을 나타내고 강력한 항종양 촉진제로 보고되고 있고(133), 또한 tangeretin은 암세포의 침윤 및 전이방지 효과, 암세포의 세포자멸 유도효과 및 백혈병 세포의 분화 촉진 작용이 강한 것으로 보고하고 있다(134).





II. 당유자 과피 효소 추출물의
항산화 활성

1. 재료 및 방법

1) 재료 및 시약

실험에 사용된 당유자 (*Citrus grandis* Osbeck) 및 은주밀감 (*Citrus unshiu*)의 과피는 제주특별자치도 서귀포시 대정읍에 있는 금산건강원에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 Fluka (Buchs, Switzerland)나 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, USA)의 제품을 사용하였다. 실험에 사용된 효소는 탄수화물분해효소 전분분해효소인 AMG, 섬유소 분해효소인 celluclast, amylose와 amylopectin 분해효소인 termamyl과 viscozyme, 점질물질(gums)들을 분해하는 ultraflo 및 단백질분해효소인 protamex, kojizyme, neutrase, flavourzyme, alcalase로서 Novo사 (Novozyme Nordisk, Bagsvaed, Denmark)로부터 구입하여 사용하였다.

2) 당유자 과피의 추출

1,000 mL 플라스크에 감귤 동결건조 시료 각 5g과 증류수 500 mL를 가하여 pH (1M HCl/NaOH)를 고정시킨 다음 효소 0.5 mL를 첨가하여 혼합한 후 incubator에서 12시간 진탕하면서 반응시켰다. 여기에 사용되어진 효소의 최적 조건은 다음 Table 1과 같다. 그 후 80°C에서 10분간 효소를 불활성화시킨 후 pH를 7로 조정하여 Whatman 여과지로 여과하고, 급속 냉각한 후 동결 건조하였다. 한편 물 추출물은 감귤 시료 각 5g과 증류수 500 mL를 가하여 20°C의 incubator에서 24시간 동안 진탕하면서 추출한 후 Whatman 여과지로 여과하고, 급속 냉각한 후 동결 건조하였다. 이들 추출물들은 농도를 2 mg/mL로 조정하여 시료로 사용하였다.

3) 추출수율

각 효소 추출물의 추출수율은 효소 분해 방법에 따라 획득된 양을 %로 계산하였다.

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

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

4) 총 폴리페놀 정량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법(135)을 변형하여 측정하였다. 즉 시험관에 각 감귤 과피 효소 추출물 1 mL, 95% ethanol 1 mL, 증류수 5 mL, 50% Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 가하여 실온에 5분간 방치하여 반응시킨 후, 5% Na₂CO₃ 1 mL를 가하고 어두운 곳(실온)에서 1시간 반응시킨 다음 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 (+)catechin 표준액에 의하여 작성한 검량선에 따라 계산하였다.

5) 총 플라보노이드 정량

총 플라보노이드 함량은 Zhuang 등의 방법(136)에 따라 각 감귤 과피의 효소 추출물 0.5 mL에 2 mL의 증류수와 0.5 mL의 5% NaNO₂를 넣고 혼합한 후 6분간 반응시켰다. 그 후 10% AlCl₃ 0.15 mL를 넣고 다시 6분간 반응시켰다. 이어서 2 mL의 4% NaOH를 넣고 총 양을 5 mL로 증류수로 맞춘 후 15분간 반응하였고 510 nm에서 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin 표준품에 의하여 작성한 검량선에 따라 계산되었다.

6) 항산화 활성 측정

(1) DPPH 라디칼 소거활성

항산화 시료의 DPPH radical 소거활성은 Nanjo 등의 방법(137)에 의하여 측정하였다. 60 µL 시료 용액에 60 µL DPPH 용액 (60 µM)을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 electron spin resonance (ESR) spectrophotometer (JEOL Lts., Japan)로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time: 2 min, field: 337.1 ± 5mT, time constant: 0.3s, power: 1 mW, amplitude: 1×500의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 DPPH radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거활성 (%) = (ESR signal intensity for medium containing

the additives of concern / ESR signal intensity for the control medium) × 100.

(2) Hydroxyl 라디칼 소거활성

항산화 시료의 hydroxyl radical 소거활성은 Rosen 등의 방법(138)에 준하여 측정하였다. 즉, 일정한 농도의 시료 20 μL 를 e-tube에 넣은 후 여기에 0.3M 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) 20 μL , 10 mM FeSO_4 20 μL 및 10 mM H_2O_2 /0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 20 μL 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 2.5분 방치한 후 quartz capillary tube에 옮겨 ESR spectrophotometer로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time: 200s, field: $3461.3 \pm 50\text{G}$, time constant: 0.3s, power: 1 mW, amplitude: 1×200 의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 hydroxyl radical 소거활성의 계산은 위의 DPPH radical 소거활성 측정 방법과 동일하다.

(3) Alkyl 라디칼 소거활성

항산화 시료의 alkyl radical 소거활성은 Hiramoto 등의 방법(139)에 준하여 측정하였다. 항산화 시료 20 μL 에 증류수 20 μL 을 혼합한 후 40mM 2,2'-azobis(2-methylpropion-amidine)dihydrochloride (AAPH) 20 μL 를 넣고 40 mM α -(4-pyridyl N-oxide)-N-tert-butyl nitron (POBN) 20 μL 를 혼합한 다음 37°C에서 30분간 반응 후 quartz capillary tube에 옮겨 ESR spectrophotometer로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time: 200s, field: $3461.3 \pm 50\text{G}$, time constant: 0.3s, power: 1 mW, amplitude: 5×100 의 조건으로 기록하였다. 항산화 시료에 대한 alkyl radical 소거활성의 계산은 위의 DPPH radical 소거활성 측정 방법과 동일하다.

(4) Hydrogen peroxide (H_2O_2) 소거활성

Hydrogen peroxide 소거활성은 Müller의 방법(140)인 2,2-azinobis(3-ethyl-benzthiazolin)-6-sulfonic acid (ABTS) peroxidase system에서 측정하였다. 96 well plate에서 시료용액 80 μ L, 10 mM H₂O₂ 20 μ L phosphate buffer (pH 5.0, 0.1M) 100 μ L를 넣어 37°C에서 5분간 반응시켰다. 그 후 1.25 mM ABTS 30 μ L와 1 U/mL peroxidase 30 μ L를 넣고 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시키고 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Sunrise, Tecan Co. Ltd., Austria)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

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

2. 결과 및 고찰

1) 추출수율

당유자 및 온주밀감 과피의 효소 추출물들과 물 추출물의 추출수율을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 온주밀감과 당유자 과피의 효소 추출물들의 추출수율은 당유자가 온주밀감보다 높게 나타났다. 탄수화물분해효소에 의한 온주밀감 과피 추출물의 추출수율은 $34.3 \pm 1.2 \sim 51.7 \pm 1.5\%$ 범위로서 viscozyme 추출물에서 가장 높았으나, ultraflo 추출물에서 가장 낮았다. 그리고 단백질분해효소에 의한 온주밀감 과피 추출물의 추출수율은 $40.3 \pm 1.5 \sim 52.0 \pm 1.7\%$ 범위로서 kojizyme 추출물에서 가장 높았으나, flavourzyme과 alcalase에서 가장 낮았다. 탄수화물분해효소에 의한 당유자 과피 추출물의 추출수율은 $44.7 \pm 1.5 \sim 57.3 \pm 1.5\%$ 범위로서 viscozyme 추출물에서 가장 높았으나, celluclast에서 가장 낮았다. 그리고 단백질분해효소에 의한 당유자 추출물의 추출수율은 $52.7 \pm 1.5 \sim 66.0 \pm 2.0\%$ 범위로서 kojizyme 추출물에서 가장 높았으나, neutrase와 alcalase에서 가장 낮았다. 한편 온주밀감과 당유자 과피 물 추출물의 추출수율은 각각 $30.7 \pm 1.2\%$ 및 $47.7 \pm 1.5\%$ 로서 탄수화물분해효소(당유자의 AMG와 termamyl은 예외)나 단백질분해효소에 비하여 낮게 나타났다.

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

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

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

2) 총 폴리페놀 함량

당유자 및 온주밀감 과피 효소 추출물들과 물 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과는 Table 3에 나타내었다. 탄수화물분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 과피 추출물들의 총 폴리페놀 함량은 각각 $536.4 \pm 8.3 \sim 762.3 \pm 13.5$ 및 $584.7 \pm 3.1 \sim 660.3 \pm 16.1$ mg/100g 범위로서, ultaflo 추출물에서 가장 높게 나타났으나 celluclast 추출물에서 가장 낮게 나타났다. 단백질분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 과피 추출물들의 총 폴리페놀 함량은 각각 $564.3 \pm 6.7 \sim 655.3 \pm 8.2$ 및 $577.7 \pm 7.5 \sim 646.4 \pm 15.2$ mg/100g 범위로서, 각각 alcalase 및 flavourzyme 추출물에서 가장 높았으나 protamex 추출물에서 가장 낮았다. 또한 일부의 효소들(탄수화물분해효소인 celluclast, 단백질분해효소인 protamex와 kojizyme)을 제외하고는 온주밀감 추출물들이 당유자에 비하여 높은 함량을 나타내었다. 한편 온주밀감과 당유자의 물 추출물은 효소추출물들에 비하여 약간 낮거나 비슷한 함량을 나타내었다. Mahinda 등(141)은 온주밀감 부산물을 탄수화물 분해효소로 분해한 후 건조조건에 따른 총 폴리페놀 함량을 측정하여 500~700 mg/100g이라 하였는데, 본 연구 결과 이들의 결과와 잘 일치하였다. 그러나 Ahn 등(102)은 동결 건조된 온주밀감의 70% 에탄올 추출물의 총 페놀함량은 836.8 mg%라고 보고하였으며, Kim 등(142)은 수확 시기별로 진굴 생과피의 폴리페놀 함량이 126.8에서 85.2 mg%로 감소하였다고 보고하였고, Goinstein 등(143)은 감귤 건조과피의 대표적인 감귤류인 오렌지, 레몬 등의 과피에 함유된 총 폴리페놀 함량은 140~200 mg% 정도이었다고 보고하였다. 본 연구결과 이들의 결과보다 높게 나타났는데, 이러한 차이는 재료의 건조조건, 수분함량, 분해조건, 저장조건, 추출방법 등의 차이에 의한 것으로 판단된다.

Table 3. Total polyphenol contents of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels

		(mg/100g, dry base)	
	Enzymes	<i>C. grandis</i>	<i>C. unshiu</i>
Carbohydrases	Viscozyme	621.0±13.5 ^c	739.4± 4.0 ^g
	Celluclast	584.7± 3.1 ^a	536.4± 8.3 ^a
	AMG	599.6± 1.7 ^{abc}	687.2±18.0 ^f
	Termamyl	611.1±14.4 ^{bc}	656.3±16.8 ^e
	Ultraflo	660.3±16.1 ^d	762.3±13.5 ^h
Proteases	Protamex	577.7± 7.5 ^a	564.3± 6.7 ^b
	Kojizyme	581.2± 6.0 ^a	580.7± 9.9 ^{bc}
	Neutrase	578.2±17.2 ^a	597.6± 7.5 ^c
	Flavourzyme	646.4±15.2 ^d	655.3± 8.2 ^e
	Alcalase	593.6±17.3 ^{ab}	661.8± 1.5 ^c
Water extract		586.2±11.0 ^a	606.1±3.8 ^d

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

3) 총 플라보노이드 함량

당유자 및 온주밀감 과피의 효소 추출물들과 물 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Table 4에 나타내었다. 탄수화물분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 과피 추출물들의 총 플라보노이드 함량은 각각 $24.7 \pm 0.4 \sim 59.8 \pm 0.9$ 및 $24.3 \pm 0.1 \sim 36.6 \pm 1.1$ mg/100g 범위로서 ultraflo 추출물에서 가장 높았으나, 각각 viscozyme 추출물과 AMG 추출물에서 가장 낮았다. 단백질분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 과피 추출물들의 총 플라보노이드 함량은 각각 $18.4 \pm 0.5 \sim 30.0 \pm 0.5$ 및 $25.8 \pm 0.9 \sim 28.6 \pm 1.1$ mg/100g 범위로서 각각 alcalase 및 flavourzyme 추출물에서 가장 높았으나, 각각 protamex 및 neutrase 추출물에서 가장 낮았다. 특히 온주밀감 과피의 ultraflo 추출물은 59.8 ± 0.9 mg/100g으로서 가장 높은 함량을 나타내었다. 한편 온주밀감 과피의 물 추출물은 protamex를 제외하고는 효소 추출물들에 비하여 낮은 함량을 나타낸 반면, 당유자 과피의 물추출물은 termamyl과 ultraflo를 제외하고는 효소추출물들에 비하여 높은 함량을 나타내었다. Mahinda 등(141)은 온주밀감 부산물을 탄수화물 분해효소로 분해한 후 건조조건에 따른 총 플라보노이드 함량을 측정하여 그 함량이 35~85 mg/100g이라 하였으며, Kim 등(94)은 감귤류 숙성 중에 총 플라보노이드 함량 변화를 측정하여 과피의 총 플라보노이드 함량은 11.73~48.21 mg/g 범위이고 과육은 9.97~48.21 mg/g이며, 숙성 중에 약간 증가한다고 하였는데, 본 연구 결과 Mahinda 등(141)의 결과보다는 낮았으나 Kim 등(94)의 결과와 어느 정도 일치하였다. Yang 등(69)에 의하면 온주밀감 과피의 플라보노이드 함량은 약 345.3 mg% (rutin 13.6, naringin 241.8, hesperidin 285.2, neohesperidin 3.6, hesperidin 1.1 mg%)로서 과육 (199.4 mg%)보다 약 1.7배 높고 종류도 다양하게 존재한다고 보고하였다. 본 연구결과 이들의 결과보다는 낮게 나타났는데, 이러한 차이는 재료의 건조조건, 수분함량, 분해조건, 저장조건 등의 차이 등에 의한 것으로 판단된다.

Table 4. Total flavonoid contents of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels

(mg/100g, dry base)			
	Enzymes	<i>C. grandis</i>	<i>C. unshiu</i>
Carbohydrases	Viscozyme	28.7±0.3 ^e	24.7±0.4 ^c
	Celluclast	26.0±0.4 ^b	35.7±1.6 ^g
	AMG	24.3±0.1 ^a	28.6±1.1 ^e
	Termamyl	32.7±0.7 ^f	26.6±0.3 ^d
	Ultraflo	36.6±1.1 ^g	59.8±0.9 ^h
Proteases	Protamex	27.0±0.3 ^c	18.4±0.5 ^a
	Kojizyme	27.4±0.5 ^{cd}	21.4±0.7 ^b
	Neutrase	25.8±0.9 ^b	25.4±0.5 ^{cd}
	Flavourzyme	28.6±1.1 ^d	28.2±0.4 ^e
	Alcalase	27.9±0.1 ^d	30.0±0.5 ^f
	Water extract	29.7±0.3 ^e	22.0±0.3 ^b

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

4) DPPH 라디칼 소거활성

당유자 및 온주밀감 과피의 효소 추출물들 (2 mg/mL)의 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 5에 나타내었다. DPPH 소거활성은 AMG 추출물을 제외한 모든 효소 추출물들 및 물 추출물에서 당유자 과피 추출물이 높게 나타났다. 탄수화물분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 과피 추출물들의 DPPH radical 소거활성은 각각 $28.6 \pm 2.0 \sim 67.2 \pm 1.8$ 및 $20.2 \pm 0.5 \sim 86.4 \pm 2.5\%$ 범위로서 viscozyme 추출물에서 가장 높았으나, AMG 추출물에서 가장 낮았으며, AMG와 ultraflo 추출물을 제외하고는 당유자 추출물들이 온주밀감보다 매우 높은 활성을 나타내었다. 탄수화물분해효소에 의한 온주밀감 및 당유자 과피 추출물들의 DPPH radical 소거활성은 각각 $41.2 \pm 1.2 \sim 61.9 \pm 1.6$ 및 $57.2 \pm 4.0 \sim 74.8 \pm 2.4\%$ 범위로서 kojizyme 추출물에서 가장 높았으나, 각각 alcalase 및 flavourzyme 추출물에서 가장 낮았으며, flavouzyme 추출물을 제외하고는 당유자 추출물이 온주밀감보다 매우 높은 활성을 나타내었다. 또한 탄수화물분해효소인 viscozyme과 celluclast, 그리고 단백질분해효소인 kojizyme, neutrase 및 alcalase 추출물은 70% 이상의 활성을 나타내었으며, 특히 viscozyme 추출물은 86% 이상의 매우 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과로부터 탄수화물분해효소인 viscozyme과 단백질분해효소인 kojizyme 추출물을 선정하여 여타의 활성산소종들에 대하여 농도별로 소거활성을 검토하였다. 한편, 온주밀감 과피의 물 추출물은 효소추출물들에 비하여 매우 낮은 활성을 나타낸 반면, 당유자 과피의 물 추출물은 viscozyme을 제외한 다른 효소추출물과 비슷하거나 더 높은 활성을 나타내었다. Shin 등(144)은 숙성된 감귤류 과피의 DPPH radical 소거활성을 측정하여 *C. junos*의 에탄올 추출물 10 ppm에서 $7.67 \pm 1.29\%$, 100 ppm에서 $22.09 \pm 1.53\%$, *C. unshiu*의 에탄올 추출물 10 ppm에서 $2.03 \pm 1.87\%$, 100 ppm $15.67 \pm 2.49\%$ 라 하였다. 본 연구 결과 이들의 연구 결과와 큰 차이를 나타내었는데, 이러한 차이는 재료의 건조조건, 수분함량, 분해조건, 저장조건, 추출효소 등의 차이에 의한 것으로 판단된다. 한편 Mahinda 등(141)은 온주밀감 부산물을 AMG로 분해한 후

건조조건에 따른 DPPH radical 소거활성을 측정하여 그 함량이 $0.10 \pm 0.01 \sim 0.24 \pm 0.01$ mg/mL라 하였으며, Kim 등(145)은 여러 감귤 과육의 DPPH 소거활성을 측정하여 IC_{50} 은 $132.2 \pm 16.4 \sim 609.8 \pm 84.2$ $\mu\text{g/mL}$ 라 하였다.



Table 5. DPPH radical scavenging activities of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels

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

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

5) Hydroxyl 라디칼 소거활성

당유자 및 온주밀감 과피의 효소 추출물들의 hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 온주밀감 및 당유자 과피의 hydroxyl radical 소거활성은 추출물의 양이 증가함에 증가하였으며, 전반적으로 당유자 과피 추출물들이 온주밀감 추출물보다 약간 높은 활성을 나타내었다. 그러나 hydroxyl radical 소거활성은 당유자의 viscozyme 추출물 ($56.2 \pm 1.2\%$)을 제외하고는 50% 미만으로 매우 낮았다. 또한 모든 효소 추출물들은 다른 활성산소종들의 소거활성에 비하여 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다. 효소 추출물들의 IC_{50} 은 당유자 viscozyme > 온주밀감 kojizyme > 당유자 kojizyme > 온주밀감 viscozyme의 순서로 높은 활성을 나타내었다. Shin 등(144)은 숙성된 감귤류 과피의 hydroxyl radical 소거활성을 측정하여 *C. junos*의 에탄올 추출물 10 ppm에서 $49.01 \pm 6.97\%$, 100 ppm에서 $55.56 \pm 1.37\%$, *C. unshiu*의 에탄올 추출물 10 ppm에서 $39.70 \pm 5.63\%$, 100 ppm에서 $54.76 \pm 6.29\%$ 라 하였다. 본 연구 결과 이들의 결과와 큰 차이를 나타내었는데, 이러한 차이는 재료의 건조조건, 수분함량, 분해조건, 저장조건, 추출효소 등의 차이에 의한 것으로 판단된다. Mahinda 등(141)은 온주밀감 부산물을 AMG로 가수분해한 후 건조 조건에 따른 hydroxyl radical 소거활성의 IC_{50} 은 $0.29 \pm 0.01 \sim 0.71 \pm 0.05$ mg/mL라 하였는데, 본 연구 결과 이들의 결과와 일치하지 않았다.

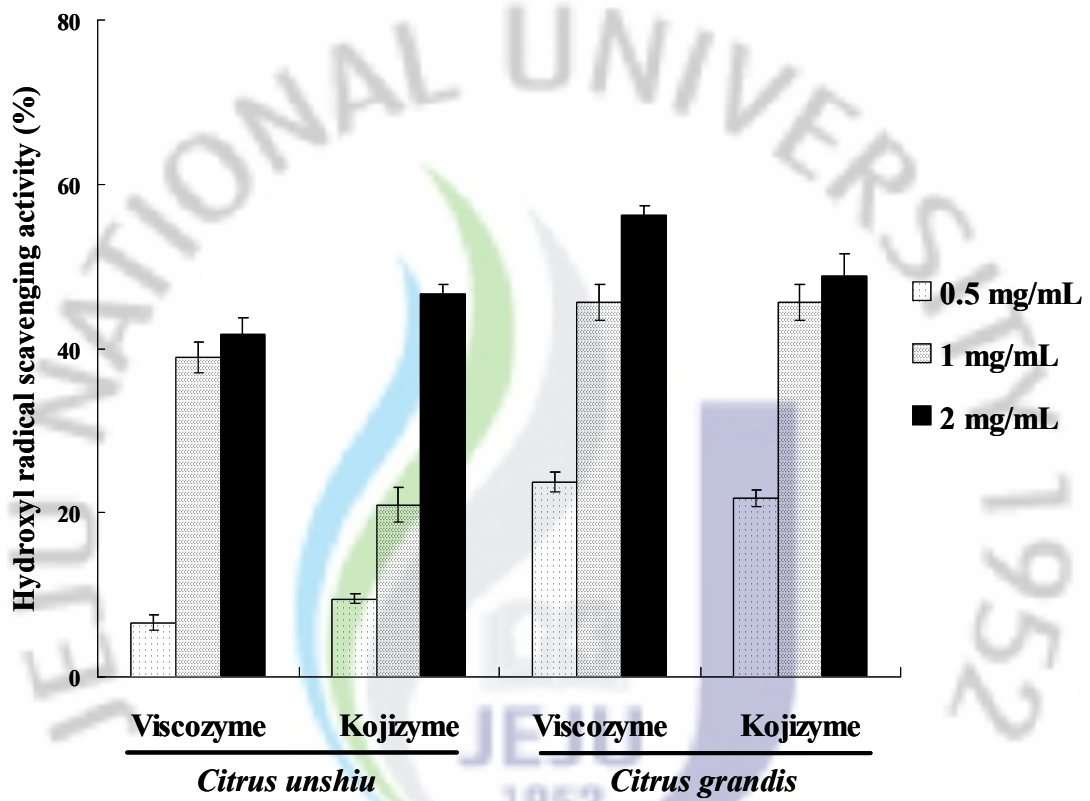


Fig. 1. Hydroxyl radical scavenging activities of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels.

6) Alkyl 라디칼 소거활성

당유자 및 온주밀감 과피의 효소 추출물들의 alkyl radical 소거활성을 측정 한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 온주밀감 및 당유자 과피의 alkyl radical 소거활성은 추출물의 양이 증가함에 급격히 증가하였으며, 모든 효소 추출물들은 0.25 mg/mL 이상에서 비타민 C보다도 높은 활성을 나타내었다. 특히 0.5 mg/mL 이상에서는 80% 전후의 높은 소거활성을 나타내었다. 효소 추출물들의 IC₅₀은 당유자 viscozyme > 온주밀감 kojizyme > 당유자 kojizyme = 온주밀감 viscozyme의 순서로 높은 활성을 나타내었다. Mahinda 등(141)은 온주밀감 부산물을 AMG로 가수분해한 후 건조조건에 따른 alkyl radical 소거활성의 IC₅₀은 0.02±0.001~0.09±0.003 mg/mL라 하였다. 본 연구 결과 이들의 결과와 큰 차이를 나타내었는데, 이러한 차이는 이들의 연구가 감귤을 가공한 후 생기는 과피와 기타의 부산물들이 혼합되어 있는 시료이며, 또한 분해효소와 추출용매 등이 서로 다르기 때문인 것으로 판단된다.

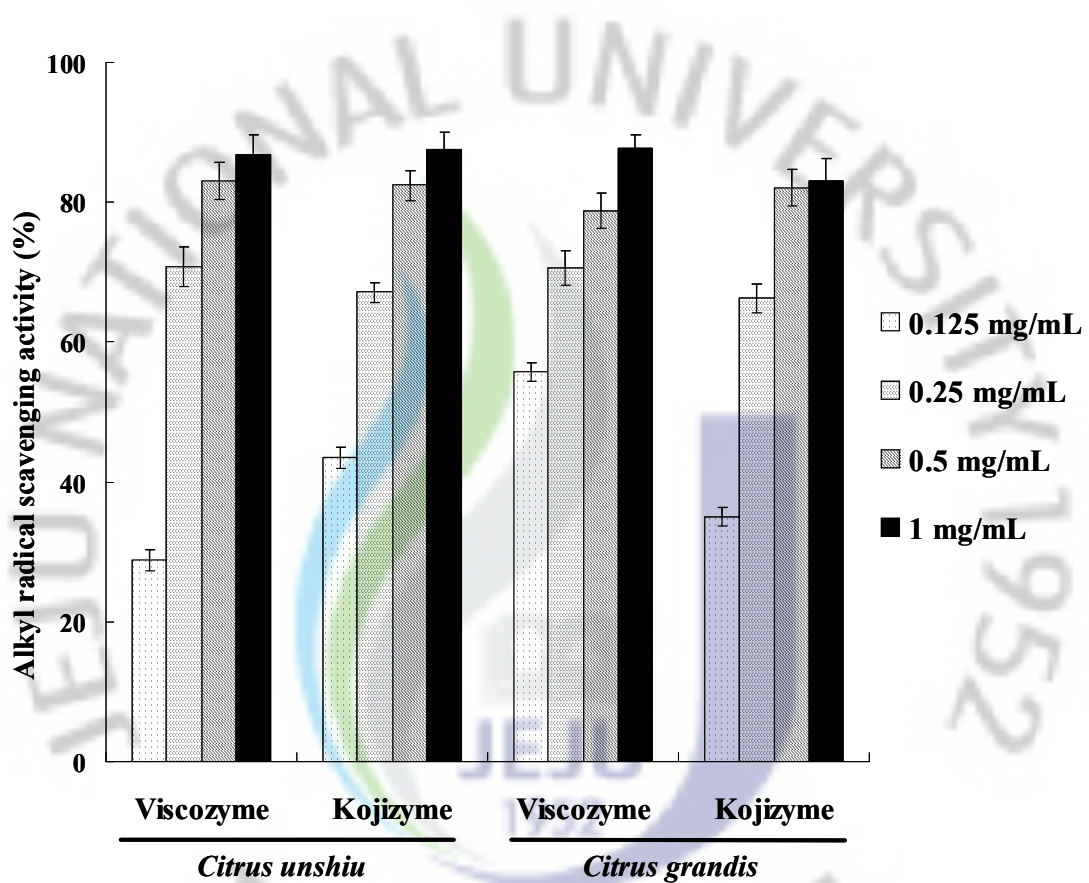


Fig. 2. Alkyl radical scavenging activities of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels.

7) Hydrogen peroxide 소거활성

당유자 및 온주밀감 과피의 효소 추출물들의 hydrogen peroxide 소거활성을 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 온주밀감 및 당유자 과피의 hydrogen peroxide 소거활성은 추출물의 농도가 증가됨에 따라 약간씩 증가하였으며, 1.0 mg/mL 이하에서는 50% 미만의 낮은 소거활성을 나타내었으나 2.0 mg/mL에서는 온주밀감 과피의 kojizyme 추출물 ($56.5 \pm 1.8\%$)을 제외하고는 91% 이상의 매우 높은 소거활성을 나타내었다. 효소 추출물들의 IC_{50} 은 온주밀감 viscozyme > 당유자 viscozyme = 당유자 kojizyme > 온주밀감 kojizyme의 순서로 높은 활성을 나타내었다. Shin 등(144)은 숙성된 감귤류 과피의 hydrogen peroxide 소거활성을 측정하여 *C. junos*의 에탄올 추출물 10 ppm에서 $11.83 \pm 4.68\%$, 100 ppm에서 $25.76 \pm 1.44\%$, *C. unshiu*의 에탄올 추출물 10 ppm에서 $13.15 \pm 5.35\%$, 100 ppm에서 $23.61 \pm 3.53\%$ 라 하였다. 본 연구 결과 이들의 연구 결과와 큰 차이를 나타내었는데, 이는 이들의 연구에 사용된 추출물의 양이 낮기 때문에 낮은 활성을 보인 것이라 판단된다. Mahinda 등(141)은 온주밀감 부산물을 AMG로 분해한 후 건조 조건에 따른 hydrogen peroxide 소거활성의 IC_{50} 은 $0.65 \pm 0.03 \sim 0.99 \pm 0.05$ mg/mL라 하였는데, 본 연구 결과 이들의 결과와 거의 일치하였다. 효소 추출물들의 IC_{50} 은 당유자에서 조금 높거나 온주밀감과 비슷한 항산화 활성을 보였다(Table 6).

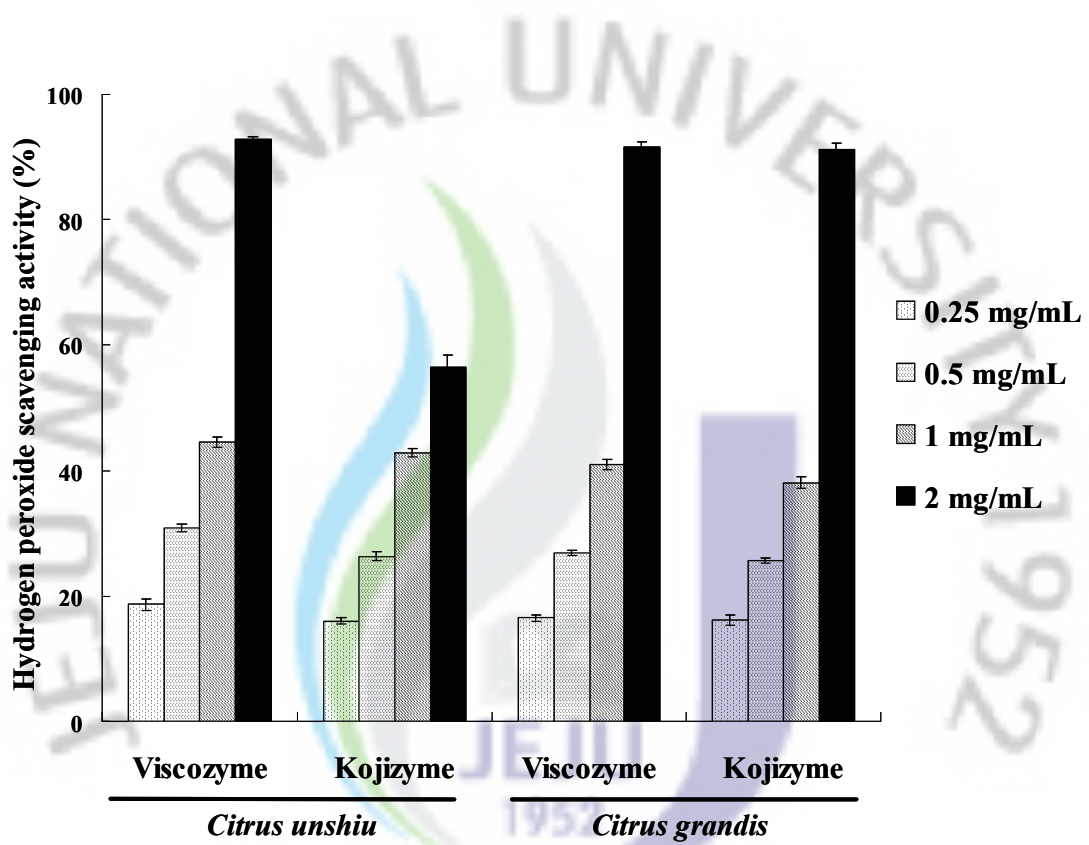


Fig. 3. Hydrogen peroxide scavenging activities of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels.

Table 6. IC₅₀ of enzyme digests from dried *C. grandis* and *C. unshiu* peels

Reactive oxygen species	(mg/mL)			
	<i>C. grandis</i>		<i>C. unshiu</i>	
	Viscozyme	Kojizyme	Viscozyme	Kojizyme
Hydroxyl radical	1.41±0.15 ^a	2.29±0.16 ^c	>3.0 ^d	2.12±0.09 ^b
Alkyl radical	0.08±0.01 ^a	0.19±0.01 ^c	0.19±0.01 ^c	0.16±0.01 ^b
Hydrogen peroxide	0.52±0.01 ^b	0.53±0.02 ^b	0.48±0.01 ^a	0.84±0.08 ^c

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



Ⅲ. 당유자 과피 발효물의 향산화 활성

1. 재료 및 방법

1) 재료 및 시약

제주 재래 감귤인 당유자 (*Citrus grandis* Osbeck)는 2009년 3월에 채집한 과피를 제주도 서귀포시 대정읍에 있는 금산건강원에서 구입하였다. 분석에 사용된 플라보노이드 표준품 중 neohesperidin, naringin은 Sigma사 (St, Louis, USA)로부터, 그리고 hesperidin, nobiletin, tangeretin, 3',4',5,5',6,7-hexamethoxyflavone, 3',4',5',5,7-pentamethoxyflavone, 3',4',7,8-tetramethoxyflavone은 Extrasynthese사 (GENAY, France)로부터 구입하였으며, 기타 분석 및 정량 시약은 HPLC급 시약을 사용하였다.

2) 당유자 과피 발효 및 추출

당유자 과피 시료 1 kg을 증류수로 세척 후, 습식분쇄기로 분쇄하여 실험에 이용될 때까지 -20℃에서 보존하였다. 당유자 과피의 발효과정은 다음과 같다. 멸균된 삼각 플라스크에 당유자 과피 분말 6.25%, yeast extract 1%와 glucose 1%를 각각 넣은 후 증류수를 채워서 1 L를 제조하였으며 3 N NaOH을 이용하여 전체 혼합액의 pH를 7.0으로 조절한 후, 가압멸균(121℃, 15분)하였다. 발효 균주로 사용되어진 효모, *Saccharomyces cerevisiae* (KCCM 35053)의 전배양은 YM broth 배지에서 25℃, 5일간 호기, 교반조건(120 rpm) 하에서 배양하였다. 효모의 배양액을 전체 당유자 과피 배지의 2% (v/v)가 되게 접종하였고 배양은 37℃에서 48시간 교반배양 (70~80 rpm) 하였으며 48시간 후 당유자 과피 발효액을 가압멸균 함으로써 발효를 완료하였다. 배양이 완료된 당유자 과피 발효액은 -80℃에서 냉동 보관한 후 동결건조기를 이용하여 48시간 건조하였다. 건조된 발효분말 1 g을 80% 에탄올 100 mL에 넣어 상온에서 24시간 추출하였으며 추출 후 membrane filter (0.45 μm, Whatman, USA)로 여과하여 사용하였다.

3) 총 플라보노이드 정량 (HPLC/MS 분석)

분석에 사용된 HPLC/MS는 Thermo Fisher Scientific 사의 LXQ (San Jose, USA)를 사용하였다. 본 실험에서는 당유자 과피에 많이 함유되어졌다고 보고되어진 neohesperidin, naringin, nobiletin 등 여러 종류의 플라보노이드 표준품을 같은 조건에서 동시에 분석하였으며 HPLC 조건과 LC/MS에 대한 분석조건은 다음 Table 7과 같다. HPLC의 column은 YMC C₁₈ column (5 µm, 4.6 mm × 250 mm)을 사용하였고, 이동상은 A는 메탄올, B는 물을 사용하였다. 이동상구배는 메탄올/물을 10/90의 비율로 시작하여 40분에 100/0의 비율로 분석하였다. 이동상 유속은 0.8 mL/min으로 하였고 시료 주입량은 20 µL를 사용하였다.



Table 7. HPLC and LC/MS conditions for the determination of flavonoids in *C. grandis* peel

A. HPLC				
Company	ThermoFisher Scientific			
Column	YMC C ₁₈ (5 μm, 4.6×250 mm)			
Mobile phase	A : Methanol, B : Water			
	Time (min)	A (%)	B (%)	Flow (mL/min)
	0	10	90	0.8
Gradient	40	100	0	0.8
	50	100	0	0.8
	52	10	90	0.8
	60	10	90	0.8
B. LC/MS				
Company	ThermoFisher Scientific			
Ion source	ESI source			
Polarity	Negative(-)			
Mass range	100-1,000 m/z			
Sheath gas	50			
Scan type	Full scan			
Capillary temp	350°C			

2. 결과 및 고찰

1) 추출수율 및 총 플라보노이드 함량

당유자 과피 (*Citrus grandis* Osbeck peel, CGP)와 당유자 과피 발효물 (Fermented *Citrus grandis* Osbeck peel, FCGP)의 80% 에탄올 추출물 수율 및 플라보노이드 화합물의 함량을 분석한 결과는 Table 8과 같다. 추출 수율은 CGP 추출물이 좀 더 높은 22%로 FCGP 추출물 17% 보다 높게 나타났다. 총 플라보노이드 함량은 FCGP가 3.768g/100g으로 CGP 3.395g/100g보다 약간 높은 함량을 나타내었다. 추출 수율에 따른 플라보노이드 함량을 비교해 본 결과 FCGP 추출물이 22.02%로 CGP 추출물 16.43% 보다 약 6% 정도의 높은 함량을 보였다. 이와 같은 폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포하는 2차 대사산물로서 수산기를 가지는 방향성 화합물을 총칭하는 것으로, hydroxycinnamic acid를 비롯한 대부분의 폴리페놀 화합물은 세포벽, 다당류, 리그닌 등과 에스테르 결합되어 있거나 중합체로 존재하며, 수산기를 통한 수소공여와 페놀 고리구조의 공명 안정화 의해 항산화 능력을 나타낸다고 보고되었다(146,147). 따라서 폴리 페놀류의 하나인 플라보노이드 함량의 증가는 항산화력에 영향을 미치는 주된 인자라 인 것으로 보여 지며 이 실험에서도 FCGP의 플라보노이드 함량의 증가는 항산화 능력에 영향을 미치는 주된 요인이 될 것으로 생각된다.

Table 8. Yields and flavonoid contents of *C. grandis* peel and fermented *C. grandis* peel extracts

	(g/100g, dry base)	
	<i>C. grandis</i> peel (CGP)	Fermented <i>C. grandis</i> peel (FCGP)
80% EtOH extract ¹⁾	20.66	17.11
Flavonoid ²⁾	16.43 ³⁾ (3.395±0.08)	22.02 (3.768±0.07)

¹⁾Solid extract (g)/ 100g of raw material (dry weight).

²⁾Flavonoid content (g)/ 100g of raw material (dry weight).

³⁾{Flavonoid (g)/ 80% EtOH extract (g)} × 100 (%).

2) DPPH 라디칼 소거활성

생물학 체계에서 항산화제의 보호능력은 주로 항산화제의 free radical 소거능, 금속축매 chelating 능력, 항산화 효소의 활성화, 산화 효소의 억제 작용으로 판단한다. 그 중에서도 DPPH radical 소거능에 이용되는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical은 화학적으로 유도되는 비교적 안정한 radical로서, 어떠한 반응계에서 전자를 공여 받으면 고유의 자색이 없어진다. 이 방법은 lip-oxygenase에 의한 지방산화 반응계에서의 항산화 활성 측정결과와도 잘 부합하며 간편하면서도 신뢰성이 높은 장점을 가지고 있다(148). 본 연구에서 CGP와 FCGP에 대한 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. DPPH radical 소거활성은 CGP와 FCGP 모두 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 1,250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 특히, FCGP 소거활성은 35%에서 83%까지 높은 DPPH radical 소거활성을 보였다. 또한 당유자 과피 추출물에 대한 IC_{50} 값을 보았을 때에도 FCGP가 261.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 CGP 485.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 높은 DPPH radical 소거 활성을 보였다.

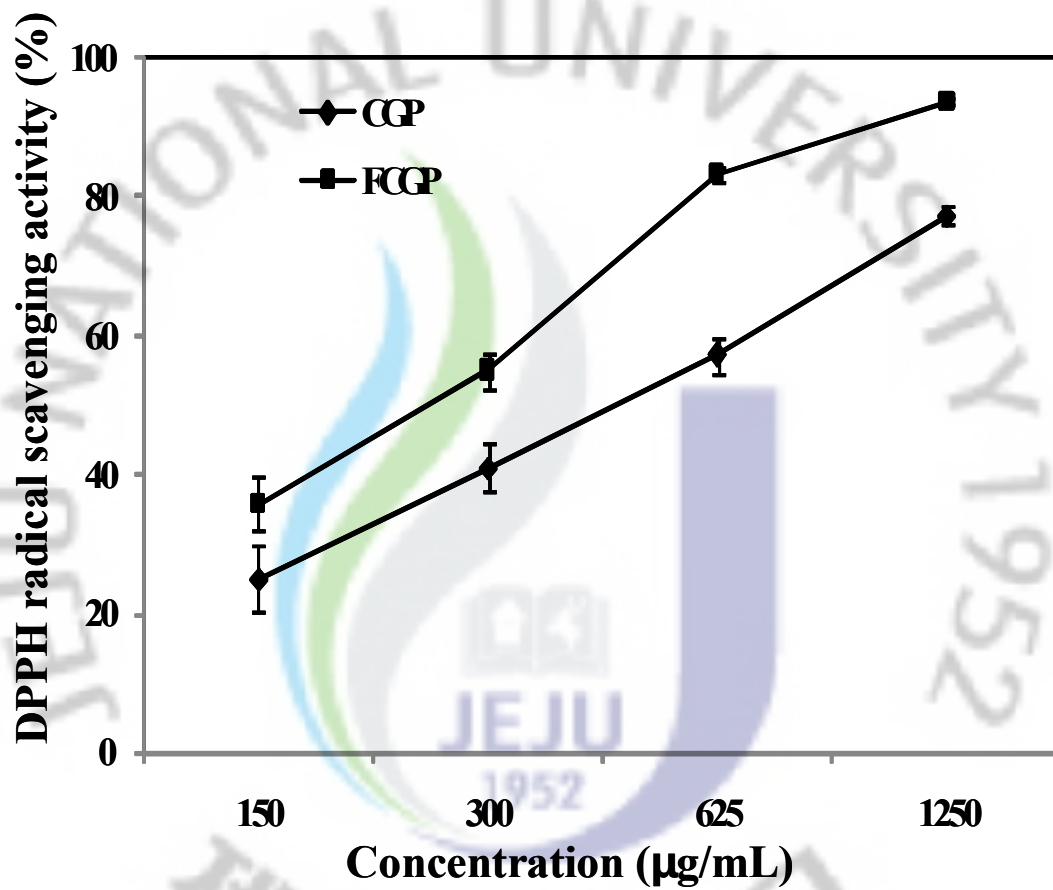


Fig. 4. DPPH radical scavenging activities of extracts from *C. grandis* peel (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP).

3) Hydroxyl 라디칼 소거활성

Hydroxyl radical은 활성산소 라디칼 중에서 화학적으로 가장 반응성이 크며, 지질산화를 개시하고 DNA 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있고, 생체의 대사 과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 과산화수소가 Fe^{2+} 나 Cu^{2+} 이온의 존재 하에서 생성되며 가장 독성이 강한 free radical이다(149). Hydroxyl radical에 대한 CGP와 FCGP의 소거능을 측정한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. Hydroxyl radical은 활성산소는 CGP와 FCGP 모두 625 $\mu\text{g/mL}$ 에서 5,000 $\mu\text{g/mL}$ 까지 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었으나, 다른 라디칼 소거활성에 비하여 다소 약한 소거능을 보였다. IC_{50} 값을 보면 FCGP가 1,474 $\mu\text{g/mL}$ 로 CGP 2,361.3 $\mu\text{g/mL}$ 보다는 높은 hydroxyl radical 소거 활성을 보였다.



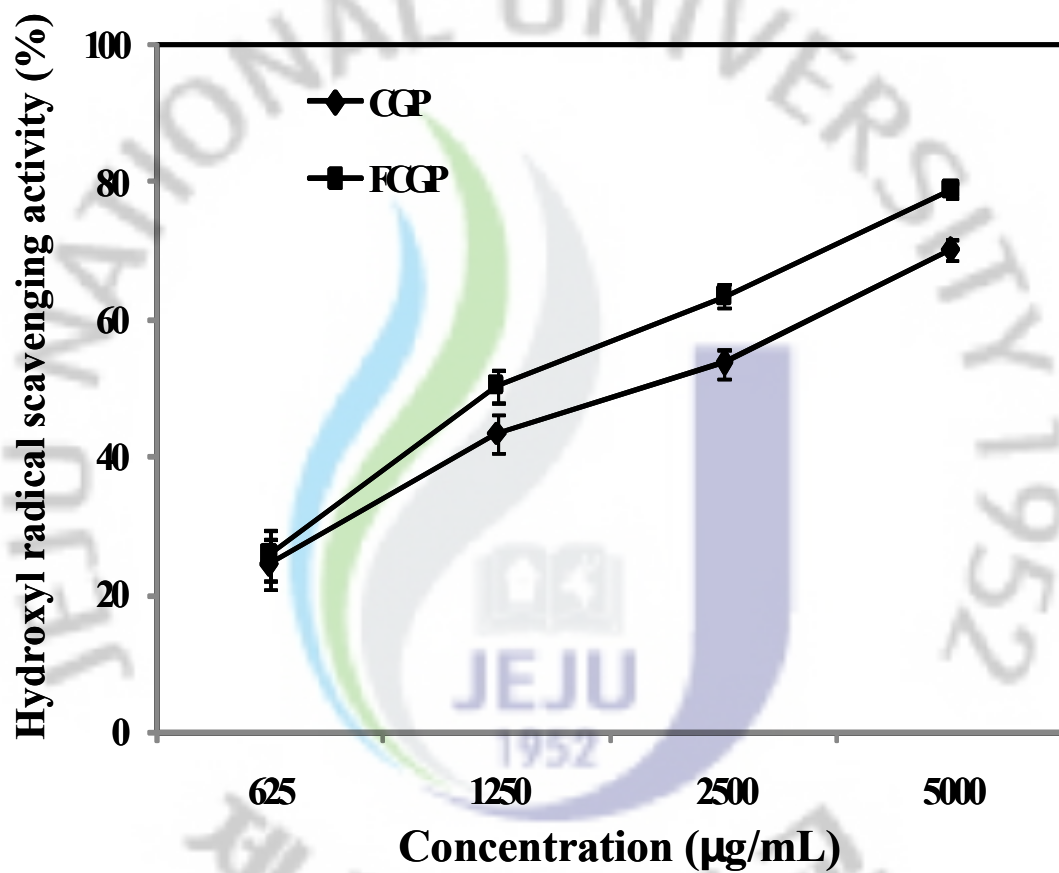


Fig. 5. Hydroxy radical scavenging activities of extracts from *C. grandis* peel (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP).

4) Alkyl 라디칼 소거활성

Alkyl radical은 hydrocarbon reaction에서 초기 반응 생성물로 많이 형성된다. 이는 불포화지방산이 산소에 노출되면 지질과산화이 일어나며 이는 free radical에 의해 불포화지방산의 methylene (-CH₂-)기로부터 수소원자가 탈취함에 따라 개시된다. 이로 인해 peroxy radical과 과산화물로 전환되며 이렇게 형성된 지질과산화물로 인하여 지질분자의 구조적 변화가 넓은 범위에 걸쳐 발생하면 생체막 fluidity의 감소, membrane potential의 감소, 이온투과성의 증가, 세포소기관 내용물의 누출 등이 예상되고 결국은 세포기능의 저하와 세포의 죽음을 초래할 수 있다. 지질과산화물과 그것의 분해산물 중에는 생체에 유해한 성분들이 있으며 대식세포 기능의 억제, 단백질합성 억제, thrombin 과다생산등과 같은 유해 작용들이 보고되어 왔다. 이에 따라 지질과산화의 시발점이라 할 수 있는 alkyl radical의 소거활성을 통해 그 생리활성물질로서 가능성을 확인 하고자 하였다. Fig. 6을 보면 대체적으로 다른 라디칼과 H₂O₂ 보다는 낮은 농도에서도 높은 활성이 나타나는 것을 볼 수 있으며, 특히 FCGP는 150 µg/mL에서도 60% 이상의 alkyl radical 소거활성을 보였다. 또한 CGP와 FCGP 모두 300, 600 µg/mL서 비슷한 활성을 보였으나, IC₅₀ 값은 FCGP가 90.9 µg/mL로 CGP 159.3 µg/mL 보다 높은 값을 나타내었다. 이로부터 당유자 과피의 발효 추출물이 당유자 과피 추출물보다는 높은 alkyl radical 소거활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

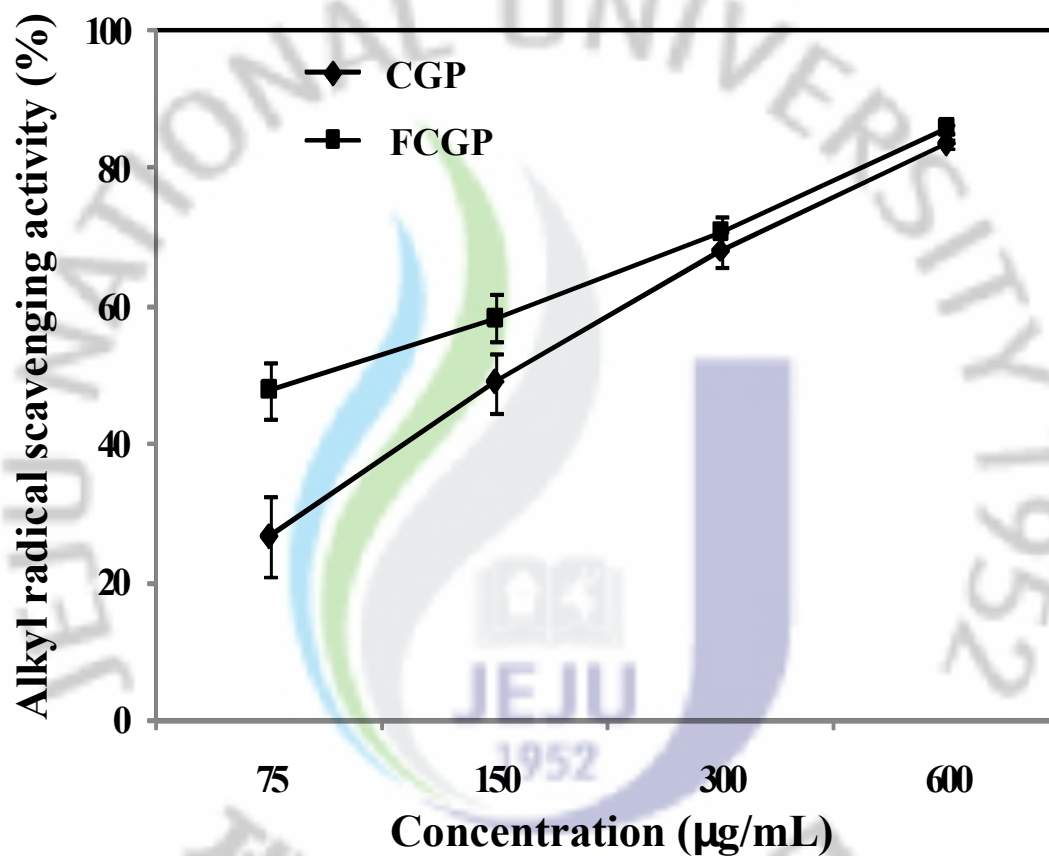


Fig. 6. Alkyl radical scavenging activities of extracts from *C. grandis* peel (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP).

5) Hydrogen peroxide 소거활성

생체에서 생성된 hydroxyl radical 같은 활성 산소종은 반응성이 대단히 높다. 생체내의 superoxide dismutase (SOD)가 superoxide를 hydrogen peroxide로 변화시키고, catalase는 hydrogen peroxide를 제거하며, 한편 glutathione transferase와 glutathione peroxidase들은 친전자성 이물을 포함하여 해독하며 SOD에 의해 생성된 peroxide를 제거한다. 그러나 생체 내에서 완화된 oxidase stress가 일어나면 세포들은 이러한 항산화기전을 가동하여 반응하지만 심한 oxidase stress는 세포상해를 일으키며 necrosis와 apoptosis로 발전된다고 보고되었다 (150). Hydrogen peroxide에 대한 CGP와 FCGP의 소거능을 측정한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. Hydrogen peroxide 소거활성은 CGP와 FCGP 모두 500 µg/mL에서 4,000 µg/mL까지 농도별로 활성이 크게 증가하진 않았지만 농도 의존적으로 증가하였고 IC₅₀ 값을 보면 FCGP가 1,195 µg/mL로 CGP 4,355 µg/mL 보다 명확히 hydrogen peroxide 소거활성이 높다는 것을 알 수 있었다.

위의 결과를 보면 당유자 과피의 항산화 활성은 당유자 과피 본래의 성분보다는 효모를 이용한 발효를 통하여 본래의 성분이 활성 성분으로 전환되면서 활성이 증가하는 것으로 판단되며, 이를 확인하기 위하여 DPPH, hydroxyl, alkyl radical 및 hydrogen peroxide에 대한 항산화능을 측정한 결과, 모든 항산화실험에서 발효 추출물인 FCGP가 높은 활성을 보이는 것을 확인하였다(Table 9).

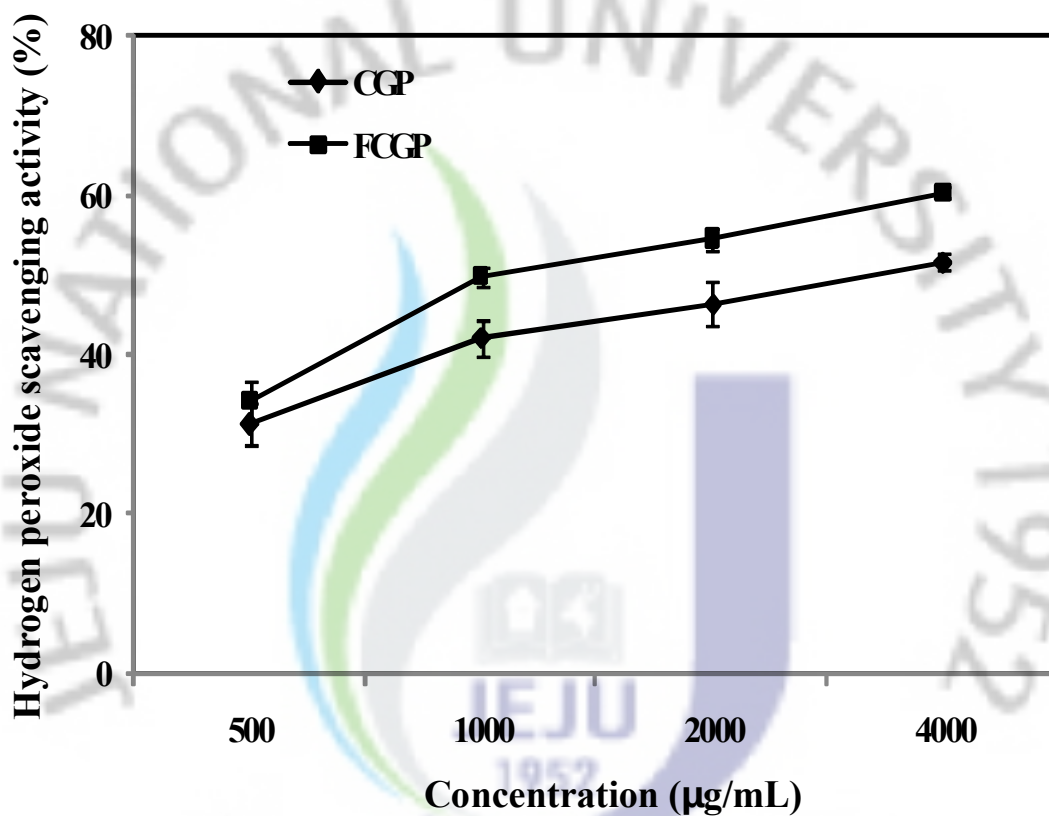


Fig. 7. Hydrogen peroxide scavenging activities of extracts from *C. grandis* peel (CGP) and fermented *C. grandis* peel (FCGP).

Table 9. IC₅₀ value of antioxidant activities from CGP and FCGP extracts

Extracts	(μg/mL)			
	DPPH	Hydroxyl	Alkyl	H ₂ O ₂
CGP	485.3±4.5	2361.3±26.1	159.3±12.4	4355±29.4
FCGP	261.3±2.1	1474±14.5	90.9±8.5	1195±12.8

CGP : *C. grandis* peels; FCGP : fermented *C. grandis* peels.

6) 당유자 과피 추출물로부터 플라보노이드 화합물 분석

Table 9의 결과로부터 당유자 과피의 발효 추출물이 생리활성 성분의 변화 및 증가를 알아보기 위하여 당유자 과피 CGP와 발효물인 FCGP의 HPLC/MS에 의한 분석크로마토그램을 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 8의 크로마토그램에서 보면 CGP보다 FCGP에서 많은 peak들이 나타났으며, 몇 가지 플라보노이드 성분이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그 내용은 Table 10과 같다. Table 10을 보면 분석크로마토그램에서 나타난 크고 작은 50여종의 물질 중에 retention time의 순으로 13종에 대한 LC/MS 분석 정보를 나타내었다. 14중에서 7종은 현재 보유하고 있는 플라보노이드 표준품 (Naringin; 580 m/z, Hesperidin; 610 m/z, Neohesperidin; 610 m/z, 3',4',5',5,7-Pentamethoxyflavone; 372 m/z, Nobiletin; 402 m/z, 3',4',5',5,6,7-Hexamethoxyflavone; 402 m/z, Tangeretin; 372 m/z)의 LC/MS 값과 MS²를 통하여 비교하여 확인하였다. 당유자 과피에 함유된 플라보노이드 성분 중에서 naringin과 neohesperidin은 이전 연구 보고(149)에서와 같이 가장 많은 양을 함유하고 있었다. 당유자 과피의 플라보노이드 분석은 표준품의 분석크로마토그램 상에 RT와 LC/MS를 통하여 확인하였으며 CGP와 FCGP 모두에서 neohesperidin, hesperidin 및 naringin은 유사한 함량을 함유 되어 있는 것을 알 수 있었다. 하지만 9, 11, 12, 13, 14의 성분들은 발효 과정 중에 함량의 일부가 감소하고 있는 것을 알 수 있으며, 그중에 11번째 성분인 3',4',5',5,7-Pentamethoxyflavone은 FCGP에서 그 성분을 확인할 수 없을 만큼의 적은 양만이 측정되었다. 한편 FCGP에서는 3번을 제외한 1, 2, 4, 5, 6번 화합물들의 함량이 수배에서 수십 배까지 크게 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 1~7번까지의 성분은 감귤유래 플라보노이드 표준품들과의 MS 및 MS²를 이용하여 비교하였으나 다른 값을 가지고 있어 확인할 수 없었다.

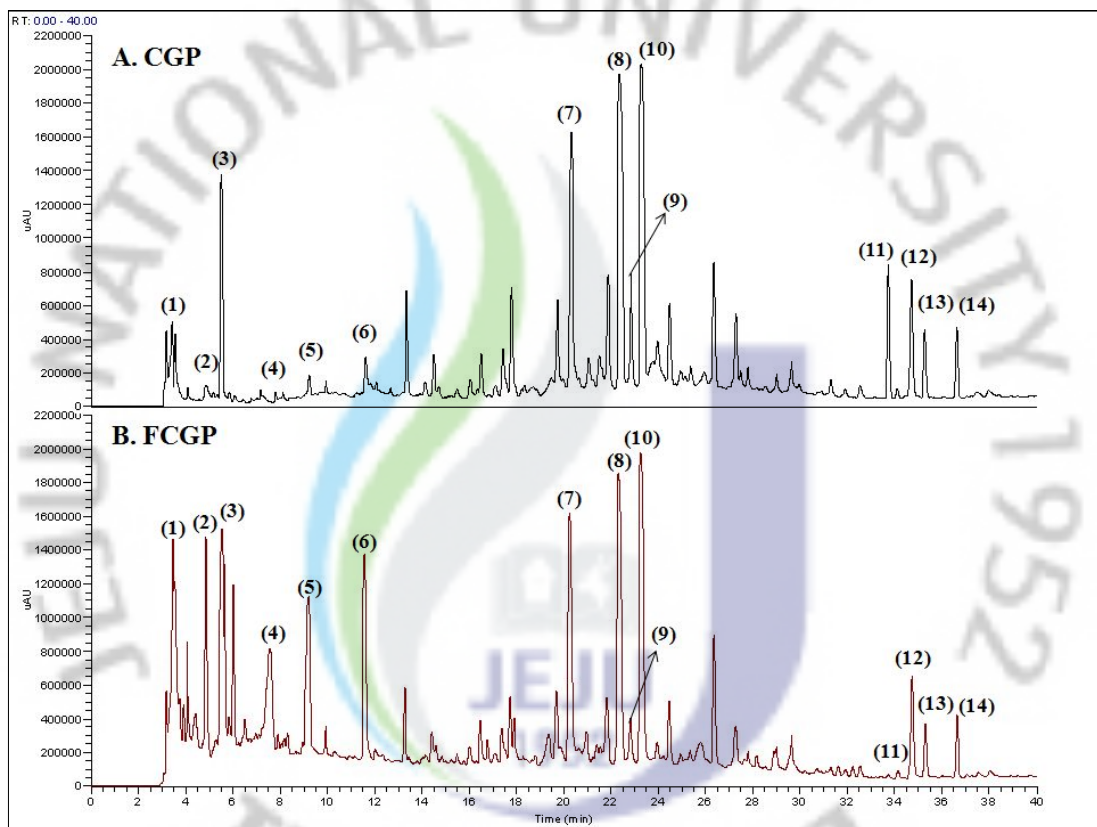


Fig. 8. HPLC/MS chromatogram of flavonoids from CGP and FCGP extracts. A; CGP, B; FCGP.

Table 10. Peak assignment for the analysis of the extracts from CGP and FCGP

Peak	RT(min)	Identification	polarity	m/z
1	3.58	Unknown	[M-H] ⁻	191
2	4.86	Unknown	[M+H] ⁺	260
3	5.54	Unknown	[M-H] ⁻	180
4	7.57	Unknown	[M-H] ⁻	447
5	9.38	Unknown	[M-H] ⁻	165
6	11.78	Unknown	[M-H] ⁻	203
7	20.48	Unknown	[M-H] ⁻	595
8	22.35	Naringin	[M-H] ⁻	579
9	22.78	Hesperidin	[M-H] ⁻	609
10	23.28	Neohesperidin	[M-H] ⁻	609
11	33.73	3',4',5',5,7-Pentamethoxyflavone	[M+H] ⁺	373
12	34.71	Nobiletin	[M+H] ⁺	403
13	35.25	3',4',5,5',6,7-Hexamethoxyflavone	[M+H] ⁺	403
14	36.63	Tangeretin	[M+H] ⁺	373

이로부터 당유자 과피를 효모를 이용하여 발효하였을 때 당유자 과피에 함유된 플라보노이드의 일부 성분이 감소되었으며, 효모의 발효과정을 통하여 다른 형태의 화합물로 전환되었다는 것을 알 수 있었고, 이 화합물들은 비당체 형태의 naringenin과 hesperetin이 아닌 새로운 형태의 화합물로 전환되어진 것을 알 수 있었다. 이 화합물들의 특성을 크로마토그램에서 보면 전환되어진 성분들이 다른 플라보노이드보다 먼저 측정된 것을 확인할 수 있었다. 컬럼의 특성상 친수성 부분이 많이 함유되어진 물질이 빨리 용출되므로 이 화합물에는 친수성인자인 하이드록실기 (-OH)가 다른 플라보노이드에 비하여 많이 함유되어 있으리라 생각되어진다. 하이드록실기는 항산화 활성에 영향을 미치는 인자로서, 전환되어진 이들 성분들이 생리활성을 증가시키리라 생각된다.

이와 유사한 연구 사례를 보면, 감귤류의 과피 부분은 분해하기 어려운 pectin, cellulose, hemicellulose, β -1,4-glucan 등과 같은 성분들로 구성되어져 있으며, 대부분의 생리활성을 나타내는 물질들은 이들 내부에 존재한다고 보고되었다. 생리활성 성분으로는 naringin, neohesperidin 및 hesperidin 등의 플라보노이드 성분이 있으며, 이런 성분들이 발효를 통하여 다른 형태의 화합물로 전환되었고 이렇게 전환되어진 성분들로 인하여 항균, 항염 및 생리 활성을 증가한 사례가 보고되었다(4,18).

따라서 당유자 과피에 함유된 플라보노이드가 효모의 발효과정을 통하여 일부의 플라보노이드가 감소하여 다른 형태의 새로운 화합물로 전환되어진 것을 LC/MS를 통하여 확인할 수 있었으며, 이렇게 전환된 성분들은 항산화 활성을 증가시키는데 기여한 것으로 판단된다. 본 연구결과에서 보면 당유자 과피를 식품 미생물인 효모를 이용하여 발효한 경우 항산화 활성들이 증가되는 사실을 알 수 있어 기능성 증대가 가능한 것으로 판단된다.



IV. 당유자 과피 추출물에 의한
HL60 세포의 Apoptosis 유도

1. 재료 및 방법

1) 재료 및 추출

제주 재래 감귤인 당유자 (*Citrus grandis* Osbeck)는 2009년 3월에 채집한 과피를 제주도 서귀포시 대정읍에 있는 금산건강원에서 구입하였다. 당유자 과피 1 kg을 증류수로 세척 후, 습식분쇄기로 분쇄하여 -80°C 에서 냉동 보관한 후 동결 건조기를 이용하여 48시간 건조하였다. 건조된 과피 분말 1 g을 80% 에탄올 100 mL에 넣어 상온에서 24시간 추출하였으며 추출 후 membrane filter (0.45 μm , Whatman, USA)로 여과하여 당유자 과피 추출물(CGP)을 만들어 시료로 하였다.

2) 세포 배양

HL60 (human promyelocytic leukemia cells), B16 (murine melanoma cells), HT29 (human colon cancer cells), MCF-7 (human breast cancer cells) 및 Vero (monkey kidney cells) 세포주를 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양 받아 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (GIBCO, Grand Island, NY, USA)과 10%의 fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA)이 함유된 RPMI 1640 또는 DMEM 배지 (GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C 5% CO_2 incubator에서 배양하였으며, 계대 배양은 2~3일에 한 번씩 시행하였다.

3) 암세포 증식 억제 효과 측정

4종의 암세포 (혈액암: HL60, 유방암: MCF-7, 피부암: B16, 대장암: HT29)에 대한 당유자 과피 (CGP)의 80% 에탄올 추출물이 암세포 증식 억제 효과를 MTT 방법(151)을 사용하여 측정하였다. 이를 위해 암세포별로 세포수를 5×10^4 cell/mL의 농도로 조정하여 96-well plate의 각 well에 넣고, 시료를 농도별로 첨가하였다. 이를 48 시간 배양한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphe-

nyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 μ L (2 mg/mL)을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 150 μ L를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (Bio-TEK instruments. Inc., Winooski Vermont, WI, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포 증식억제 정도를 나타내었다.

4) MTT를 이용한 세포 독성 측정

CGP 추출물의 세포 독성을 측정하기 위한 방법으로 MTT 분석(151)을 실시하였다. Vero 세포주를 1×10^5 cell/mL로 맞춘 후, 190 μ L 씩 96-well plate에 분주하였고 CGP 추출물을 250, 500, 750 및 1,000 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 이를 48시간 37°C incubator에서 배양한 다음, MTT (2 mg/mL) 50 μ L 씩 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, DMSO 150 μ L를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. CGP 추출물의 농도에 따른 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포에 대한 샘플 독성 정도를 나타내었다.

5) 미토콘드리아 막 투과성 측정 (JC-1 staining)

Apoptosis가 유도되는 과정 중의 하나인 미토콘드리아 막의 투과성을 조사하기 위하여 dual-emission potential-sensitive probe JC-1을 사용하였다(152). JC-1은 막 전위 (membrane potential)에 따라 red와 green fluorescent의 비율로 막의 탈분극 정도를 나타낼 수 있다. 이를 이용하여 공초점 현미경 {Laser Scanning Microscope 5 PASCAL program (Carl Zeiss, Jena, Germany)}과 BD

FACSCalibur™ Flow Cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 방법을 통하여 CGP 추출물에 대한 HL60 세포의 막 전위차에 따른 투과성을 분석하였다.

6) 세포주기 분석

HL60 세포 (1×10^5 cell/mL)에 CGP 추출물을 250, 500 및 750 $\mu\text{g/mL}$ 로 각각 처리하여 48시간 배양한 후, HL60 세포를 수확하여 PBS (Phosphate buffered saline)로 세척하였다. HL60 세포를 4°C에서 70% 에탄올로 30분 동안 고정시킨 후, PBS로 세척하고, RNase A를 처리한 다음 propidium iodide (PI, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 염색하고, flow cytometry로 세포주기를 분석하였다(153).

7) 염색에 의한 세포핵의 형태 관찰 (Hoechst 33342 staining)

24-well plate에 1×10^5 cell/mL로 분주한 후 CGP 추출물을 250, 500 및 750 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 각각 처리하였다. 48시간 배양한 후 Hoechst 33342 (Sigma, MO, USA) 10 mg/mL를 각각 1.5 μL 씩 첨가하여 10분 동안 37°C incubator 에서 반응시켰다. 이를 형광 현미경 (Cool SNAP-Pro Color digital camera)을 이용하여 세포 형태를 분석하였다(154).

8) Western blot 분석에 의한 단백질 발현 분석

배양을 끝난 세포를 수집하여 2~3회 PBS (Phosphate buffered saline)로 세척한 후 1 mL의 lysis buffer를 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (Bovine serum albumin)를 표준 단백질로 하여 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 μg 의 lysate를 8~12% mini gel SDS-PAGE (Poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF 막 (BIO-RAD)에 300 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 막의 blocking은 5% skim milk가 함유

된 TTBS (TBS+0.1% Tween 20) 용액을 상온에서 2시간 동안 실시하였다. 단백질 발현량을 검토하기 위한 항체로는 Cell Signaling (Cell Signaling Inc., MA, USA)사의 Bcl-2, Bax, Caspase-3 및 PARP를 사용하였으며, TTBS 용액에서 1:1,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (Amersham Pharmacia Peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech., NY)를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 1분간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Pharmacia Biotech., NY)과 3분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다(155).



2. 결과 및 고찰

1) CGP 추출물의 암세포 증식 억제

감귤의 과피에는 생리활성을 나타내는 많은 성분들이 함유되어 있다고 보고되어 있으며, 대표적으로 naringin, hesperidin, neohesperidin, tangeretin 및 naringenin 등의 플라보노이드가 있다. 이들 플라보노이드 성분들이 항산화, 항염 및 항암 활성을 나타낸다고 보고되어져 있으며(156-158) 특히 당유자 과피에는 naringin, neohesperidin 및 hesperidin이 많이 함유되어 있다(149). 따라서 CGP 추출물의 암세포 증식 억제 활성을 4종의 암세포를 대상으로 MTT 방법을 통하여 측정하여 Fig. 9에 나타내었다. Fig. 9의 결과를 보면 CGP 추출물을 250, 500 및 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하고 48시간을 배양하였을 때 대장암 HT29, 유방암 MCF-7 및 피부암 B16 암세포에서는 40% 미만의 증식 억제 활성을 보였지만 혈액암 HL60 암세포에서는 농도가 증가할수록 세포 증식 억제 활성이 증가하는 경향을 볼 수 있었고, 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 60% 이상의 세포 증식 억제 활성을 보였다. 또한 HL60 세포에 CGP 추출물을 처리 시간에 따른 증식 억제 활성을 측정한 결과는 Fig. 10에 나타내었다. Fig. 10을 보면 24, 48 및 72시간 동안 CGP 추출물을 처리하였을 때 증식 억제 활성이 시간 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 그리고 농도별로 250, 500, 750 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하였을 때 역시 농도 의존적으로 암세포 증식 억제 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 혈액암 HL60 세포에 CGP 추출물은 농도와 시간 의존적으로 세포 증식을 억제하였는데, 이는 이전 연구결과와(149,156,158) 비교하여 보았을 때 CGP 추출물 안에 함유되어진 플라보노이드 성분의 증가에 따른 결과라 판단된다. 따라서 혈액암 HL60 세포를 선정하여 apoptosis 유도 과정을 조사하였다. 그리고 CGP 추출물의 독성을 측정하기 위하여 정상 세포인 Vero 세포 (monkey kidney cells)에 CGP 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 결과는 Fig. 11에 나타내었다. Fig. 11을 보면, CGP 추출물을 처리하지 않은 control을 100%로 하였을

때 모든 농도에서 4% 미만으로 세포 증식을 억제하였기에 CGP 추출물은 정상 세포에 독성이 없다고 판단된다.

위의 결과를 토대로 보면 HL60 세포에 대하여 CGP 추출물이 apoptosis 유도 와 연계성이 있을 것으로 예측되어, CGP 추출물이 HL60 세포를 대상으로 apoptosis 유도에 따른 세포의 형태적 변화 및 세포 주기 변화를 관찰하였다.



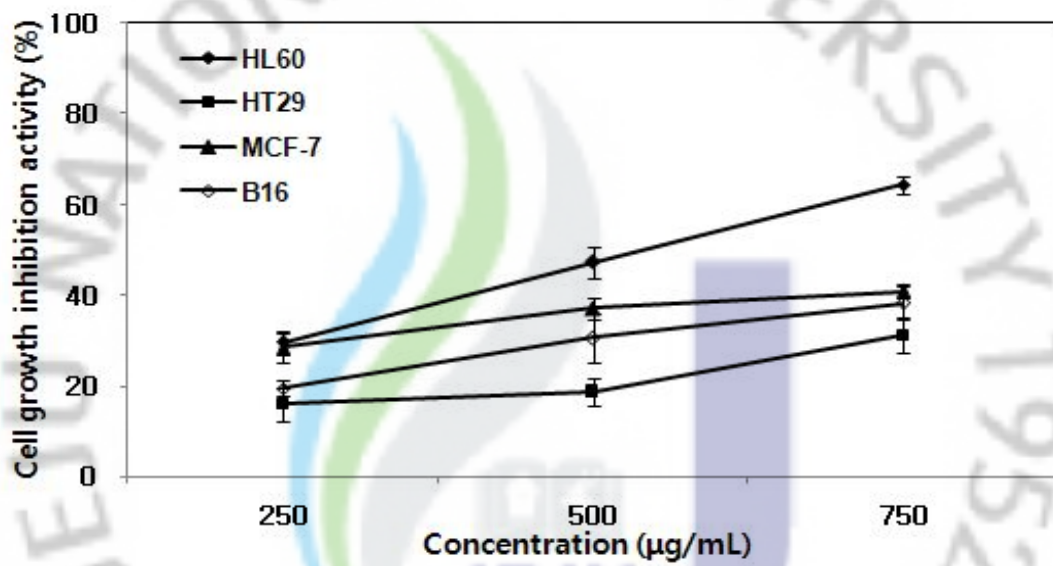


Fig. 9. Inhibitory effects of CGP extract against growth of the tumor cell lines (HL60, HT29, MCF-7 and B16 cells).

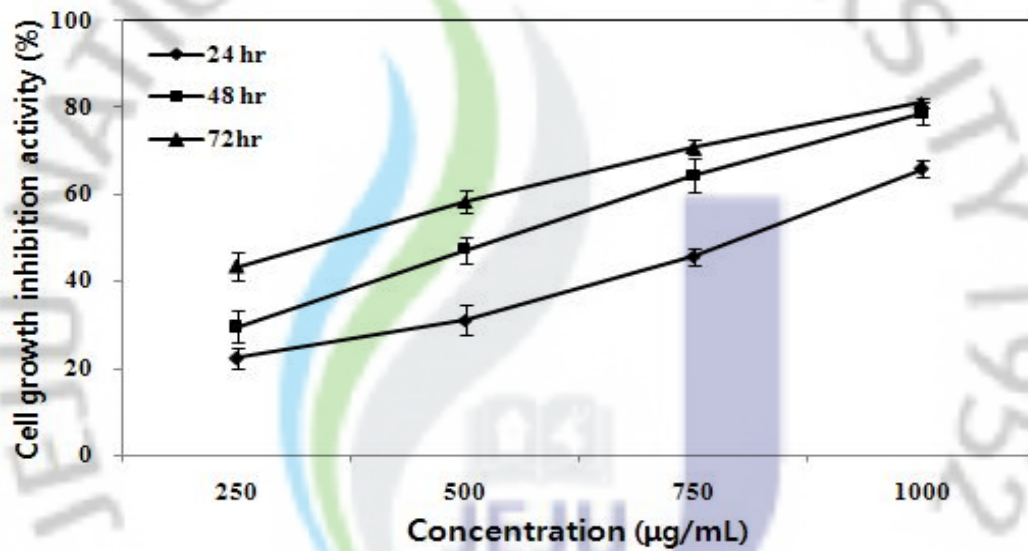


Fig. 10. Inhibitory effect of CGP extract against cell growth of HL60 cells.

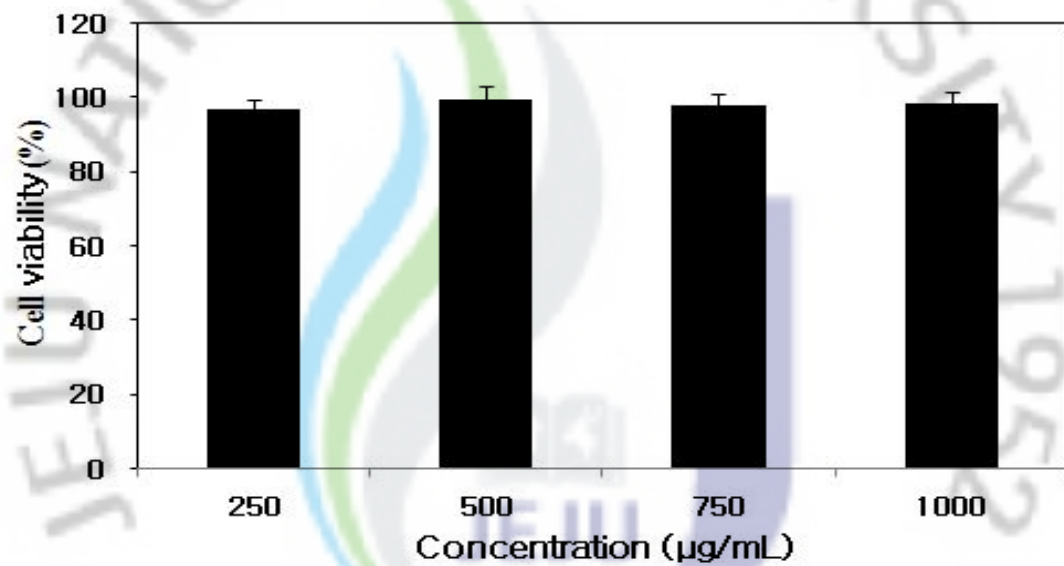


Fig. 11. Cytotoxicity effect of CGP extract on the cell viability of Vero cells.

2) Apoptosis에 따른 미토콘드리아 막 투과성 변화

J aggregate (JC-1) fluorescence를 이용한 미토콘드리아 막 전위 (mitochondrial membrane potential)를 측정하였다. JC-1은 미토콘드리아 막에 쉽게 들어갈 수 있는 lipophilic cation dye로서 낮은 막 전위에서는 green-fluorescent monomer (527 nm) 상태로 나타나고 미토콘드리아의 전압이 증진된 막 전위에서는 red-fluorescent J aggregate (595 nm)를 형성한다. 세포가 apoptosis가 일어나게 되면 미토콘드리아 막이 탈분극화 되면서 JC-1이 막을 투과하여 녹색을 띄게 된다(159). Fig. 12는 공초점 현미경을 이용하여 측정한 데이터로서 무처리구인 control과 CGP 추출물 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 구를 보면 분극화 현상이 나타나는 red dye에서는 control 구의 모든 세포가 염색이 되어 있으나 CGP를 처리한 구는 염색되어진 세포가 거의 나타나지 않았다. 그리고 탈분극화 현상이 나타나는 green dye에서는 CGP를 처리한 구에서만 세포가 전반적으로 염색된 것을 확인할 수 있었다. 이는 CGP 추출물에 의해서 미토콘드리아 막 투과성이 증가하였음을 나타낸다. 막의 투과성 정도를 알아보하고자 flow cytometry 방법을 이용하여 측정하였다. Fig. 13을 보면 CGP 추출물을 250, 500 및 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 HL60 세포에 처리하였을 때 무처리구인 control 그룹에서의 FI (Fluorescence intensity) 값인 117.49보다 증가한 148.56, 155.68 및 175.82로 나타났다. 이는 CGP 추출물의 농도가 증가함에 따라 막의 전위차가 낮아지게 되면서 막 투과성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이로서 CGP 추출물은 HL60 세포의 미토콘드리아 막 투과성을 변화시킴으로서 apoptosis 유도한다는 것을 알 수 있었다.

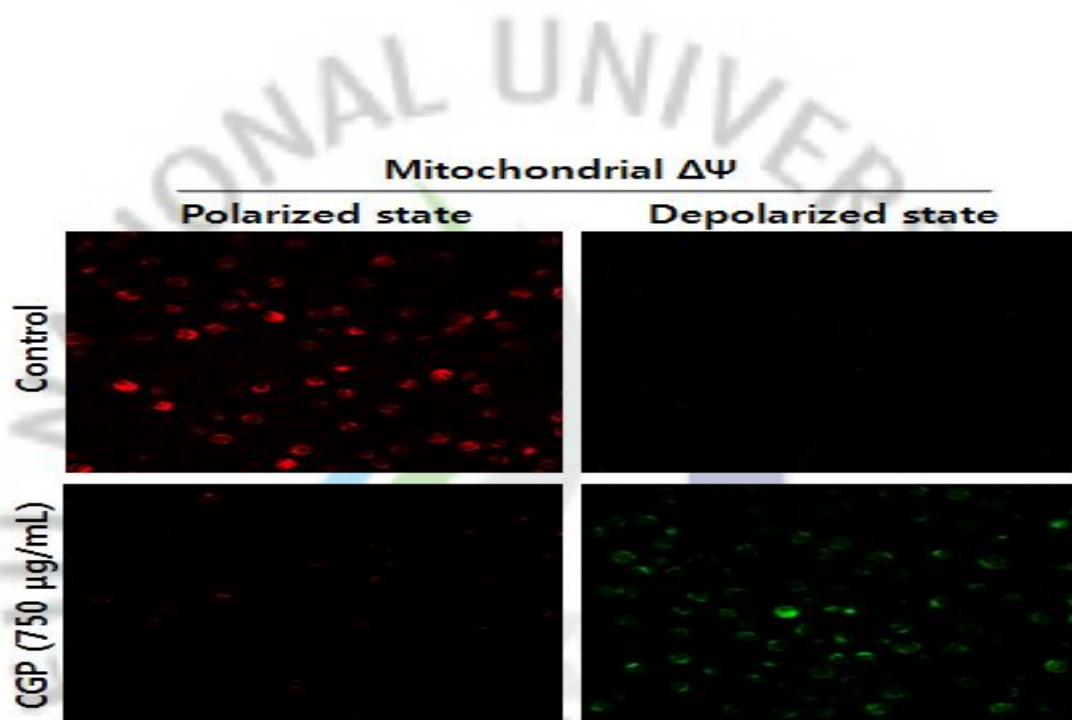


Fig. 12. Representative confocal images illustrate the increase in the green fluorescence intensity of JC-1 by membrane damage in CGP treated HL60 cells as compared to control (Original magnification $\times 200$).

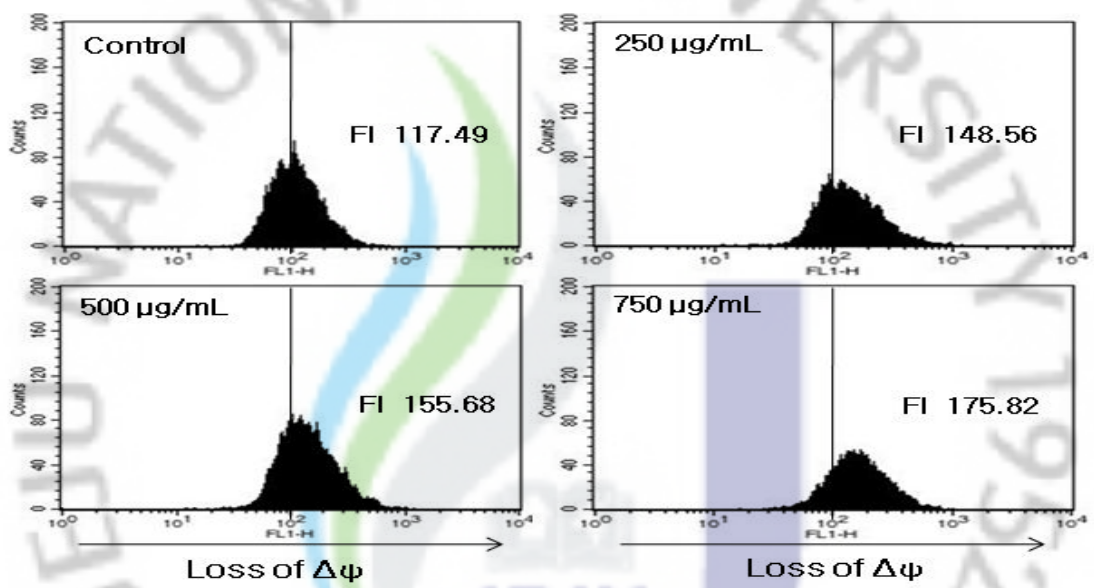


Fig. 13. Fluorescent intensity of membrane potential was detected in CGP treated HL60 cells by flow cytometry after JC-1 staining.

3) Apoptosis에 따른 세포 형태 및 주기 변화

Apoptosis 유도 기전에 대하여는 확실하게 증명된 바는 없지만 세포질 내 칼슘치가 증가되어 칼슘 의존성 endo-nuclease가 활성화 되어 핵 내의 DNA 분절이 일어나며, transglutaminase가 활성화되어 세포질 내 단백질의 cross-linking이 일어나면서 세포질 농축이 일어나고 수액이 세포 밖으로 빠져나가면서 apoptotic body를 형성하는 것으로 알려져 있다(160-162). 따라서 CGP 추출물을 처리하였을 때 HL60 세포가 apoptosis의 유도에 따른 형태적 변화를 Hoechst 33342를 사용하여 핵을 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다. Fig. 14를 보면 무처리구인 control은 원형의 온전한 핵 모양을 나타내고 있는 반면, CGP 250, 500 및 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 경우에는 농도가 증가할수록 세포 밀도의 감소하였고 더불어 apoptosis를 유도할 때 특이적인 핵 내 DNA의 단편화에 의한 염색질 응축에 의하여 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 처리 농도에 따라 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이러한 CGP에 의한 apoptosis 유도의 정도를 정량적으로 비교하기 위하여 DNA flow cytometry 분석을 이용하였다. 이는 CGP 추출물이 HL60 세포에 apoptosis 유도를 통하여 sub-G₁ hypodiploid 세포가 증가하는지를 측정하는 방법이다. 즉, DNA에 특이적으로 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI (propidium iodide)로 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 세포 주기를 분석하였고 sub-G₁ 구간을 세포 내 DNA 함량에서 환산하여 apoptotic cell을 백분율로 나타내었다. 그 결과, Fig. 15를 보면 무처리구인 control은 2.3% 정도의 sub-G₁ 함량을 나타내었으나 CGP 250, 500 및 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 경우 28.4, 38.4 및 49.9%로 sub-G₁ 함량이 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 CGP 추출물에 의한 HL60 세포의 형태와 주기의 변화는 apoptosis 유도와 연관이 있음을 알 수 있었다.

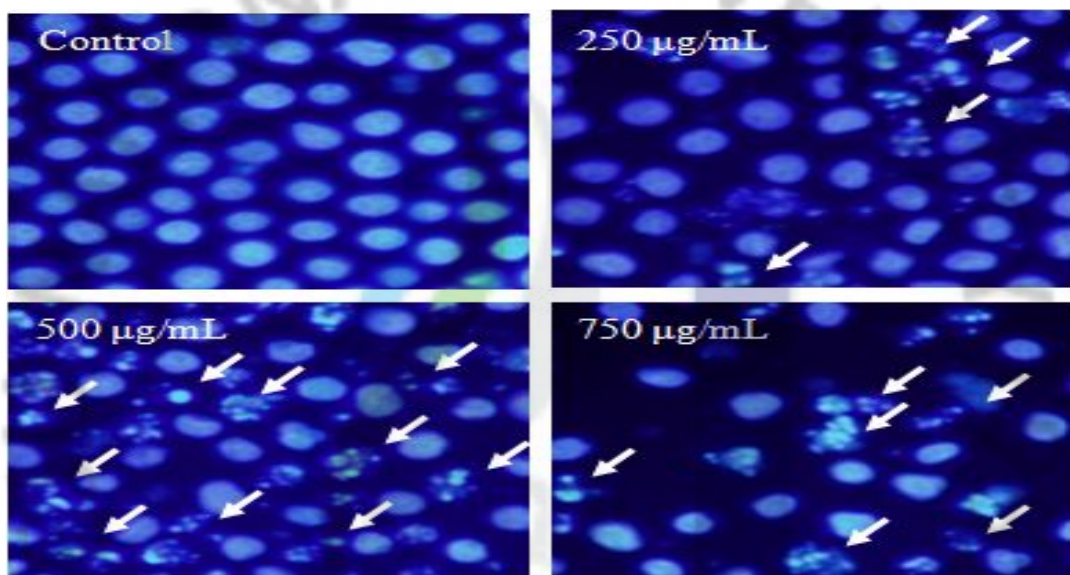


Fig. 14. Apoptotic body formation was observed under a fluorescent microscope after Hoechst 33342 staining and are indicated by arrows (Original magnification $\times 400$).

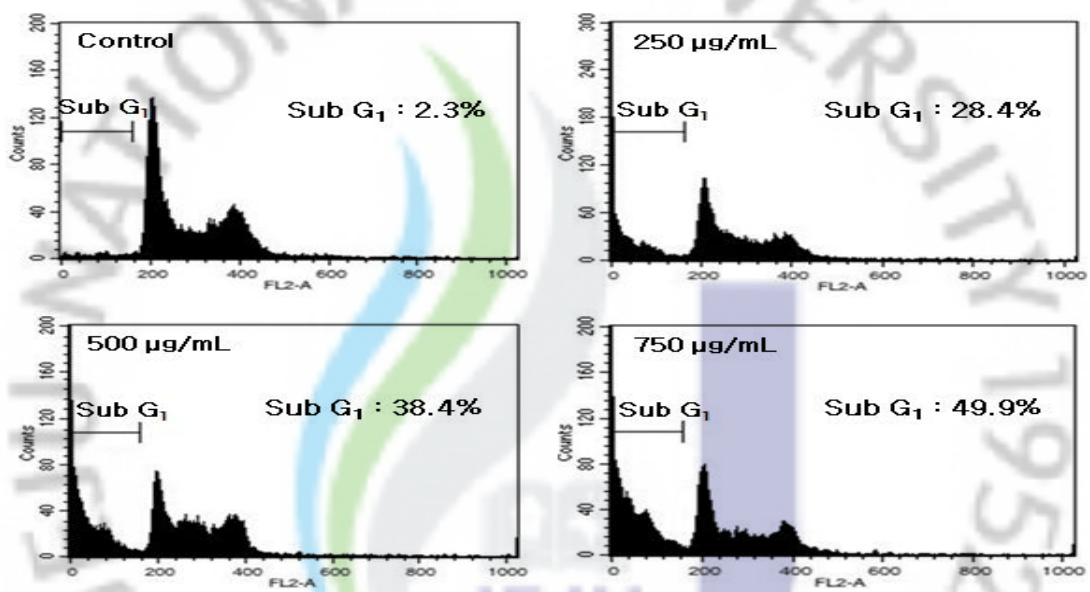


Fig. 15. Apoptotic sub-G₁ content was detected by flow cytometry after propidium iodide staining.

4) Apoptosis 관련 단백질의 발현 변화

이전 결과에서 확인된 CGP 처리에 따른 HL60 세포의 apoptosis 유도에 관여하는 기전의 해석을 위하여 Bcl-2 family, caspase 및 PARP의 발현 변화를 western blot을 이용하여 조사하였다. Bcl-2 family 단백질은 미토콘드리아 막 투과성을 조절하는 단백질로, 미토콘드리아 막에 존재하거나 세포 사멸유도 신호에 의하여 미토콘드리아 막으로 이동하여 세포사멸을 조절하는 중요한 조절인자이다. Bcl-2 family 단백질은 아미노산 서열의 유사성과 단백질의 기능에 따라 anti-apoptotic 단백질과 pro-apoptotic 단백질 등으로 나뉜다(163). Pro-apoptotic 단백질은 미토콘드리아 막 바깥쪽으로 이동하여 막 투과성을 증가시킴으로써 cytochrome c의 방출을 촉진하여 세포사멸을 유도하고, 반면 anti-apoptotic 단백질은 미토콘드리아의 막의 탈분극을 억제하여 세포사멸을 억제한다고 보고되었다(164). HL60 세포에 CGP를 처리하였을 때 막 투과성에 의한 apoptosis 유도가 일어나는지 단백질 발현을 통하여 확인해 본 결과는 Fig. 16에 나타내었다. Fig. 16을 보면 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현은 CGP를 농도별로 처리하였을 때 무처리구에 비하여 농도 의존적으로 감소하였으며 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 경우 무처리구에 비하여 CGP 농도가 증가함에 (250, 500 및 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 따라 확연히 증가하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 막 전위차에 (JC-1 staining) 따른 confocal image와 flow cytometry 결과가 일치하는 것으로 보아 막의 투과성 변화로 인한 apoptosis의 유도가 일어났으리라 판단된다. 그리고 세포의 apoptosis의 다양한 기전 중의 하나인 caspase activation은 세포 내 단백질이 caspase에 의하여 분해되면서 신호가 전달되는 과정으로서 여러 종류의 caspase들이 세포사멸에 관여하며 caspase 활성을 통해 세포사멸의 정도를 파악할 수 있다(165). 또한 caspase의 활성화에 동반된 apoptosis가 유도되었을 때 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질 중 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질은 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 활성화된 caspase-3에 의하여 단백질의 분해가

일어나면 PARP의 기능이 상실하게 되고, 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편의 관찰되거나 주 band의 발현이 감소된다고 보고되었다(166). Fig. 16을 보면 cleaved caspase-3의 단백질 발현량이 CGP를 농도별로 처리하였을 때 무처리구에 비하여 농도 의존적으로 증가하진 않았으나 발현되었다는 것을 알 수 있었으며 또한 caspase-3에 의해 활성화된 cleaved PARP 형태의 단백질 역시 농도 의존적으로 발현량이 증가하는 것을 알 수 있었다.

위의 결과를 보면 CGP 추출물은 HL60 세포에서 apoptosis를 유도한다는 것을 알 수 있었다. 세포의 증식을 억제하고 apoptosis의 유도 단계인 막 전위의 탈분극 현상으로 인한 투과성 증가, apoptosis의 전형적 형태를 띄는 apoptotic body 생성 및 DNA-hypodiploid 상태인 sub-G1의 생성을 확인하였고 western blot을 통하여 CGP 추출물이 HL60 세포를 apoptosis를 유도하여 증식을 억제하는 기전을 확인할 수 있었다. 이렇게 CGP가 HL60 세포를 apoptosis 유도를 통한 증식을 억제할 수 있는 요인은 플라보노이드라고 사료된다. 이전 연구에서 보면 CGP에는 많은 플라보노이드가 함유되어 있다고 보고되어 있으며(36,149) 본 연구자도 전 연구에서 LC/MS를 통하여 CGP의 플라보노이드를 분석하였다. CGP에는 neohesperidin, naringin, hesperidin, tangeretin, nobiletin 등 수십 종의 플라보노이드를 함유하고 있었다. 이런 플라보노이드는 폴리페놀계의 하나의 큰 그룹으로서 우리가 소비하는 과일과 채소에 많이 함유되어 있다고 알려져 있으며 최근 연구 결과를 보면, 플라보노이드가 항산화, 항염, 항균 및 항암 등의 생리 활성이 있다고 보고되고 있다(2-5). 그리고 플라보노이드 한 성분인 naringin의 경우 당유자와 감귤류에 많이 함유된 성분으로서 보고되어 왔고 이를 이용한 항암 연구를 보면 mouse leukemia P388 세포에서 apoptosis를 유도하여 세포 증식을 억제하였다고 보고되었으며 naringin의 비당체 형태인 naringenin도 유방암 세포인 MDA-MB-231와 대장암 세포인 Caco-2에서 DNA-hypodiploid 생성을 유도하여 세포 증식을 억제하였다(156). 또한 hesperidin도 유방암 세포인 MCF-7과 전립

선암인 PC-3에서도 androgen의 조절 작용에 따른 세포 증식을 억제하였고(167), 그 외에도 tangeretin이 혈액암 HL60 세포에서, nobiletin이 신경아세포종 SH-SY5Y에서 각각 apoptosis를 유도하여 세포 증식을 억제한다고 보고되었다 (168,169). 이렇게 플라보노이드는 세포내나 분자 범위의 넓은 범위에서 작용하여 항종양과 암세포 증식 억제 활성화에 영향을 나타내었다. 암세포의 증식을 억제하기 위한 세포내 대사의 조절 인자로서 보면 세포 형태와 주기를 변화시킴으로서 세포의 apoptosis를 유도 하거나(170,171) 혹은 분자 범위에서는 플라보노이드가 receptor, enzymes 및 kinases에서 상호 작용을 통하여 증식 억제를 유도하였다 (172-174).

위 결과와 이전 연구를 토대로 보면 당유자 과피 (CGP) 추출물에 함유되어진 플라보노이드는 HL60 혈액암 세포에서 apoptosis를 유도하여 세포 증식을 효과적으로 억제하였기에 항암과 관련되어진 기능성 식품 및 소재 개발 원료로서 이용 가능성이 높다고 판단된다.

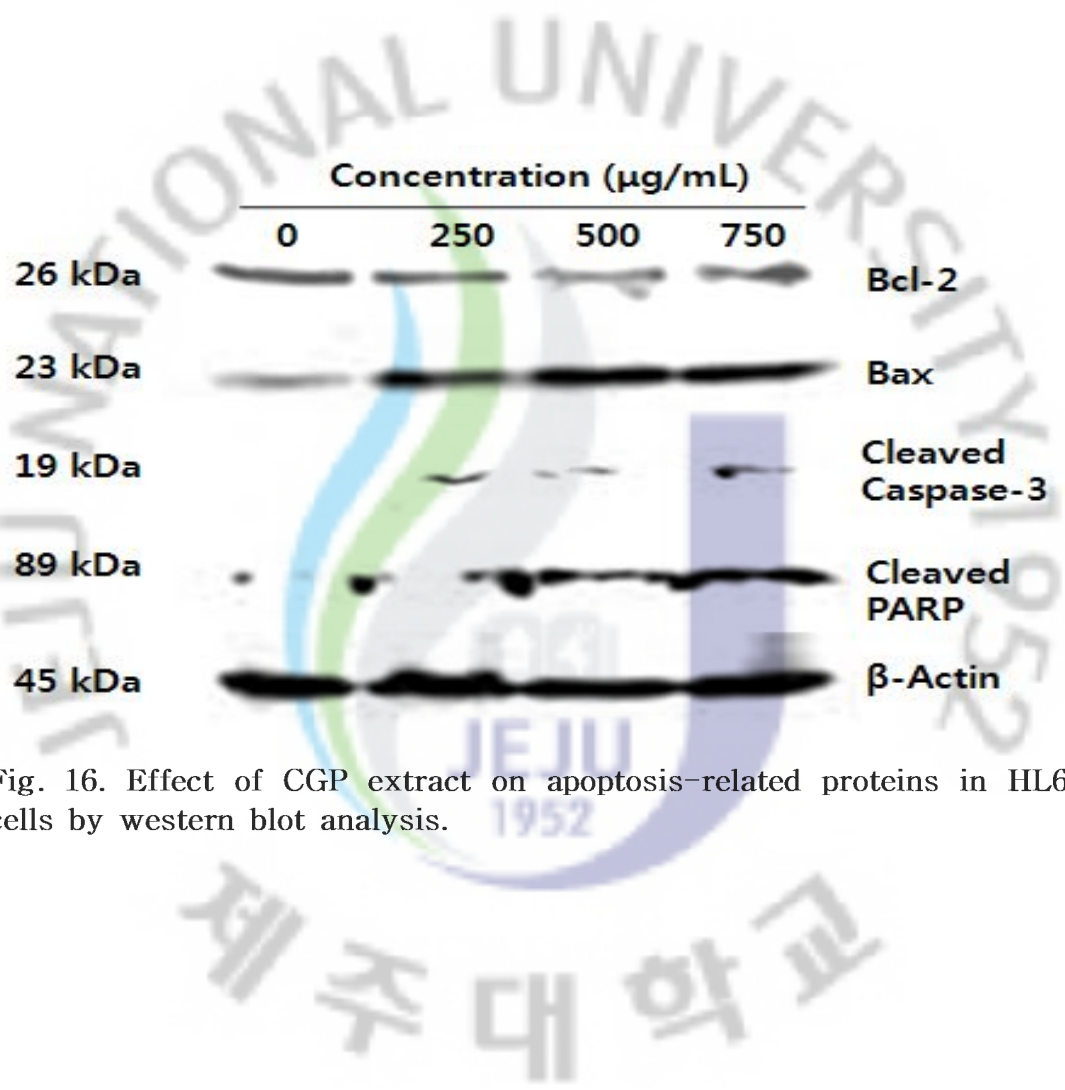


Fig. 16. Effect of CGP extract on apoptosis-related proteins in HL60 cells by western blot analysis.

V. 요약

당유자 과피의 효소 추출물의 항산화활성을 검정하고 온주밀감과 비교한 결과 총 플라보노이드 함량은 탄수화물분해효소와 단백질분해효소에서 각각 24.3~59.8 및 18.4~30.0 mg/100g (dry base) 범위로서 당유자의 ultraflo 추출물 가장 높았다. DPPH 소거활성은 당유자 과피 추출물이 온주밀감에 비하여 매우 높았다. Hydrogen peroxide 소거활성은 당유자의 viscozyme 및 kojizyme 추출물에서 높게 나타났다. Alkyl radical 소거활성은 당유자와 온주밀감의 효소추출물 모두에서 높게 나타났다. 그러나 hydroxyl radical 소거활성은 다른 활성산소종들에 비하여 상대적으로 낮았다.

당유자 과피를 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)로 발효하여 발효 전후의 항산화 활성 및 성분 변화 측정한 결과 당유자 과피를 발효하였을 때 발효 전보다 더 높은 항산화 활성이 높았으며, flavonoid 분포에 변화가 나타났다. 이러한 결과로부터 당유자 과피를 효모로 발효하였을 때 생리활성 성분 증가 및 이에 따른 항산화 활성 증가함을 알 수 있었다.

당유자 과피 추출물은 4종의 암세포 중 혈액암 세포 HL60 세포에서 높은 세포 성장 억제율을 보였으며, HL60세포에 대하여 농도별, 시간별, 세포 성장 저해 효과를 보였다. 또한 당유자 과피 추출물은 HL60 세포의 미토콘드리아 막 전위차를 탈분극화함으로써 apoptosis를 유도하였으며, apoptosis의 전형적인 형태인 apoptotic body 유도함으로써 세포 주기 분석한 결과 sub G₁ 생성 증가하여 apoptosis를 유도하였고, 또한 apoptosis 관련 단백질의 발현을 측정한 결과 Bcl-2의 감소와 Bax의 증가를 보임으로써 당유자 과피 추출물은 HL60 혈액암세포에 대하여 미토콘드리아 의존적으로 apoptosis 유도함을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터, 당유자 과피 효소추출물은 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 보아 현재 한방 재료로 많이 이용되고 있는 온주밀감을 당유자 과피로 대체하여 이용할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 이를 이용하여 기능성 식품 및

의약품 소재로서의 가능성이 있을 것으로 판단된다.



참 고 문 헌

1. Lee HY, Seog HM, Nam YJ, Chung DH. Physico-chemical properties of Korean mandarin (*Citrus reticula*) orange juice. Korean J Food Sci Technol 19: 338-345 (1987)
2. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavenger and antioxidants. Free Radical Biol Med 9: 19-21 (1990)
3. Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. J Nutr Biochem 7: 66-76 (1996)
4. Damon P, Flandre O, Michel F, Perdrix L, Lavrid C, Crastes de Paulet A. Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. Study of prostaglandin E2 and F2 alpha and thromboxane B2 release and histological changes. Arzneimittel Forschung 37: 1149-1153 (1987)
5. Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: Cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. J Nutr 29: 1182-1185 (1999)
6. Laura B. Polyphenols: Chemistry, dietary, metabolism and nutritional significance. Nutr Rev 56: 317-333 (1998)
7. Cha JY, Kim SY, Jeong SJ, Cho YS. Effects of hesperetin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. Korean J Life Sci 9: 389-394 (1999)
8. Manthey JA, Grohmann K. Phenols in citrus peel byproducts: Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in

- citrus peel molasses. J Agric Food Chem 49: 3268-3273 (2001)
9. Rouseff RL, Martin SF, Youtsey CO. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin in citrus. J Agric Food Chem 35: 1027-1030 (1987)
 10. Kim JH, Kwon SH, Kim JK, Kim MK. Effects of different mandarin formulations on antioxidative capacity and oxidative DNA damage in fifteen-month aged rats. Korean J Nutr 39: 610-616 (2006)
 11. Kim YD, Kim YJ, Oh SW, Kang YJ, Lee YC. Antimicrobial activities of solvent extracts from *Citrus sudachi* juice and peel. Korean J Food Sci Technol 31: 1613-1618 (1999)
 12. Moresi M, Clementi F, Rossi J, Medici R, Vinti L. Production of biomass untreated orange peel by *Fusarium avenaceum*. Appl Microbiol Biotechnol 27: 37-45 (1987)
 13. Kamiya S, Esaki S. Recent advances in the chemistry of the citrus flavonoids. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 18: 38-48 (1971)
 14. Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS. Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoids in *Citrus sinensis*. J Korean Soc Food Nutr 21: 136-142 (1992)
 15. Monforte MT, Trovato A, Kirjavanien S, Forestieri AM, Galati EMI, Curto RB. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. Famco 50: 595-599 (1995)
 16. Kim HK, Jeong TS, Lee MK, Park YB, Choi MS. Lipid-lowering efficacy of hesperidin metabolites in high-cholesterol fed rats. Clin Chim Acta 327: 129-137 (2003)
 17. Yoshio S. Bacterial paramedicidal and spermatocidal actions of some

- flavonoids. Gifu Ika Daigaku Kiyo 10: 123-130 (1963)
18. Ahn SC, Kim MS, Lee SY, Kang JH, Kim BH, Oh WK, Kim BY, Ahn JS. Increase of bioactive flavonoid aglycone extractable from Korean citrus peel by carbohydrate-hydrolysing enzymes. Korean J Microbiol Biotechnol 33: 288-294 (2005)
 19. Puri M, Banerjee UC. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. Biotechnol Adv 18: 207-217 (2000)
 20. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. FEBS Lett 436: 71-75 (1998)
 21. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 39: 44-84 (2007)
 22. Kim HJ, Jin CB, Lee YS. Antioxidative activities of phenolic compound isolated from *Inonotus obliquus*. Korean J Pharmacogn 38: 1-16 (2007)
 23. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. J AOCS 75: 199-212 (1998)
 24. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact 160: 1-40 (2006)
 25. Masaki H, Skai S, Atsumi T, Sakurai H. Active oxygen scavenging activity of plant extracts. Biol Pharm Bull 18: 162-166 (1995)
 26. Doll R, Peto R. The cause of cancer, quantitative estimate of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst 66: 1191-1308 (1981)

27. Barisic K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm* 53: 151-164 (2003)
28. Frankfurt OS, Krishan A. Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells. *Anti-cancer Drugs* 14: 555-561 (2003)
29. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485-495 (2000)
30. Clarke PG, Clarke S. Historic apoptosis. *Nature* 378: 230 (1995)
31. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells *in vitro*. *Am J Pathol* 138: 447-453 (1991)
32. Chresta CM, Arriola EL, Hickman JA. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Behring Inst Mitt* 97: 232-240 (1996)
33. Kim KN, Kim SB, Yoon WJ, Yang KS, Park SY. Induction of apoptosis by *Scolopendra subspinipes mutilans* in human leukemia HL-60 cells through Bcl-xL regulation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1408-1414 (2008)
34. Kim YJ, Moon JY, Kim JH, Kim HG, Kim JH, Cho SK. Effects of mixing method and storage period of *Dangyuja*-sugar mixture on customer preferences for *Dangyuja*-tea. *Korean J Food Preserv* 14: 160-164 (2007)
35. Lee HJ, Kang GJ, Yoon WJ, Kang HK, Kim YS, Kim SM, Yoo ES. Anti-inflammatory effect of unripe fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW 264.7 and HaCat cells. *Korean J Pharmacogn* 37: 74-80 (2006)
36. Lim HK, Yoo ES, Moon JY, Jeon YJ, Cho SK. Antioxidant activity of extracts from *Dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) fruits produced in Jeju island. *Food Sci Biotechnol* 15: 312-316 (2006)
37. 육창수. 아세아생약도감. 도서출판 경원, 서울 p 305 (1997)

38. Song EY, Choi YH, Kang KH, Koh JS. Quality characteristics of citrus fruits according to the harvest date and variety. *Agric Chem Biotechnol* 40: 416-421 (1997)
39. Lim HK, Moon JY, Kim HN, Cho MJ, Cho SK. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by the hexane fraction of an extract of immature *Citrus grandis* Osbeck fruits. *Food Chem* 114: 1245-1250 (2009)
40. Lee CH, Kang YJ. HPLC analysis of some flavonoids in citrus fruits. *Korean J Post-Harvest Sci Technol Agric Prod* 4: 181-187 (1997)
41. Rhyu MR, Kim EY, Bae IY, Park YK. Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits. *Korean J Food Sci Technol* 34: 132-135 (2002)
42. Kim YC, Koh KS, Koh JS. Changes of flavonoids in the peel of Jeju native citrus fruits during maturation. *Food Sci Biotechnol* 10: 483-487 (2001)
43. Satoru K, Yasuhiko T, Eriko K, Kazunori O, Masamichi Y. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruit. *J Agric Food Chem* 47: 3565-3571 (1999)
44. Kim JW, Jeon YJ, Lee SC. Effect of far-infrared irradiation and heat treatment on the antioxidant activity of extracts from *Citrus pomaces*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 60-64 (2006)
45. Moon SW, Kang SH, Jin YJ, Park JG, Lee YD, Lee YK, Park DB, Kim SJ. Physiological activity/nutrition: Fermentation of *Citrus unshiu* Marc. and functional characteristics of the fermented products. *Korean J Food Sci Technol* 36: 669-676 (2004)
46. Chung SK, Kim SH, Choi YH, Song EY, Kim SH. Status of citrus fruit production and view of utilization in Cheju. *Food Ind Nutr* 5: 42-52 (2000)

47. 김창명. 제주 감귤산업의 발전전략. 한국식품저장유통학회 학술대회 특별강연 II. p39-56 (2006)
48. Yang CB, Park H, Kim ZU. Studies on the chemical composition of citrus fruits in Korea (I) -The chemical composition of main varieties. Agric Chem Biotechnol 8: 29-37 (1967)
49. Park H, Kim YS, Kim ZU. Studies on the chemical composition of citrus fruits in Korea (II) -Changes of acid and sugar components with growth. Agric Chem Biotechnol 9: 41-57 (1968)
50. Han HR, Kim HL, Kang SS. Studies on the changes of acid and sugar content of citrus varieties at different growing stages in Cheju-Do. Hort Environ Biotechnol 7: 35-40 (1970)
51. Park H, Yang CB, Kim ZU, Lee CY. Studies on the chemical composition of citrus fruits in Korea (III) -On the free amino acids, sugars and pectin content in main varieties. Agric Chem Biotechnol 9: 97-104 (1968)
52. Kim BJ, Kim HS, Kang YJ. Comparison of physico-chemical components on citrus varieties. Korean J Post-Harvest Sci Technol Agric Prod 2: 259-268 (1995)
53. Koh JS, Kim SH. Physicochemical properties and chemical compositions of citrus fruits produced in Cheju. Agric Chem Biotechnol 38: 541-545 (1995)
54. Koh JS, Yang SH, Yang YT, Jwa CS. Physicochemical properties of early cultivar of *Satsuma* mandarin sampled at different harvested dates in Cheju. Agric Chem Biotechnol 41: 141-146 (1998)
55. Song EY, Choi YH, Kang KH, Koh JS. Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of Cheju citrus fruits according to harvest date. Korean J Food Sci Technol 30: 306-312 (1998)
56. Lee SH, Park HJ, Back OH, Chun HK, Rhie SG, Lee GS. Comparison of

- the nutritional composition of 3 kinds of citrus produced on Jeju Island, Korea. Korean J Community Living Sci 16: 15-20 (2005)
57. Crandall PG, Kesterson JW, Dennis S. Storage stability of carotenoids in orange peel oil. J Food Sci 48: 924-927 (1983)
58. Seo SS, Kim MH, No HK, Kim SD. Cooking characteristics of coated rice with water homogenate of citrus fruit peel. J East Asian Soc Dietary Life 12: 318-325 (2002)
59. Seo SS, Youn KS, Shin SR, Kim SD. Optimal condition for manufacturing water extract from mandarin orange peel for colored rice by coating. Korean J Food Sci Technol 35: 884-892 (2003)
60. Whang HJ, Yoon KR. Carotenoid pigment of citrus fruits cultivated in Korea. Korean J Food Sci Technol 27: 950-957 (1995)
61. Shim KH, Sung NK, Kang KS, Choi JS, Jang CW. Isolation and physicochemical properties of carotenoid pigments from orange peels. J Korean Soc Food Nutr 23: 143-149 (1994)
62. Kim BJ, Kim HS, Koh JS, Kang YJ. Carotenoid, color value, UV spectrum, organic acid and free sugar contents of citrus varieties produced in Cheju. Korean J Post-Harvest Sci Technol Agric Prod 3: 23-32 (1996)
63. Hwang HJ, Yoon KR. Carotenoid pigment of citrus fruits cultivated in Korea. Korean J Food Sci Technol 27: 950-957 (1995)
64. 이영시. 신제품 신기술. 8: 56 (1976)
65. Chang HN, Nam KE, Hur JW. Studies on the utilization of Korean citrus peel waste; 2. Contents of pectin, hesperidin and naringin. Korean J Food Sci Technol 9: 251-254 (1977)
66. Moon SJ, Sohn KH, Lee MH, Lee MH. The content and chemical and physical properties of the pectin in tangerine peel. Korean J Food Sci

- Technol 14: 63-66 (1982)
67. Kim YK, Hyun SW, Ko YH. Analysis of essential oils from the peel of mandarine (*Citrus unshiu* Marc. var. Okitsu). Korean J Food Sci Technol 31: 1178-1183 (1999)
68. Kim H, Jo DH, Park YH, Lee CY, Lee YH. Quantitative determination of flavor constituents of Korean *milgam* (*Citrus unshiu*) juice. J Korean Agric Chem Soc 23: 106-114 (1980)
69. Yang YT, Kim MS, Hyun KH, Kim YC, Koh JS. Chemical constituents and flavonoids in citrus pressed cake. Korean J Food Preserv 15: 94-98 (2008)
70. Chang HN, Hur JW. Studies on the utilization of Korean citrus peel waste; 1. Drying of citrus peel by hot air. Korean J Food Sci Technol 9: 245-250 (1977)
71. Senevirathne M, Jeon YJ, Ha JH, Kim SH. Effective drying of citrus by-product by high speed drying: A novel drying technique and their antioxidant activity. J Food Eng 92: 157-163 (2009)
72. Eun JB, Jung YM, Woo GJ. Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of Korean tangerine (*Citrus aurantium* var.). Korean J Food Sci Technol 28: 371-377 (1996)
73. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Quantization of flavonoid constituents in citrus fruits. J Agri Food Chem 47: 3565-3571 (1999)
74. Kim JH, Kim MK. Effect of different part of mandarin intake on antioxidative capacity in 15-month-old rats. Korean J Nutr 36: 559-569 (2003)
75. Yoon CH, Jwa SM. Isolation of anti-tumor promoters from citrus peels. J Korean Soc Appl Biol Chem 49: 25-29 (2006)

76. Kuhnan J. The flavonoids, A class of semi-essential food components : Their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24: 117-191 (1976)
77. Mouly PP, Arzouyan CR, Gaydou EM, Estienne JM. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. *J Agric Food Chem* 42: 70-79 (1994)
78. Garg A, Garg S, Zaneveld LJD, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res* 15: 655-669 (2001)
79. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007-1011 (1993)
80. Nelson EK. The occurrence of a pentamethyl flavonol in tangerine peel. *J Am Chem Soc* 56: 1392-1393 (1934)
81. Tseng KF. Nobiletin. Part 1. *J Chem Soc (London)*: 1003-1004 (1938)
82. Swift LJ. Thin-layer chromatographic-spectrophotometric analysis for neutral fraction flavones in orange peel juice. *J Agric Food Chem* 15: 99-101 (1967)
83. Veldhuis MK, Swift LJ, Scott WC. Fully-methoxylated flavones in Florida orange juices. *J Agric Food Chem* 18: 590-592 (1970)
84. Tatum JH, Berry RE. Six new flavonoids from citrus. *Phytochem* 11: 2283-2288 (1972)
85. Ting SV, Rouseff RL, Dougherty MH, Attaway JA. Determination of some methoxylated flavones in citrus juices by high performance liquid chromatography. *J Food Sci* 44: 69-71 (1979)
86. Rouseff RL, Ting SV. Quantitation of polymethoxylated flavones in orange juice by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 176: 75-87 (1979)

87. Bianchini JP, Gaydou EM. Separation of polymethoxylated flavones by straight-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 190: 233-236 (1980)
88. Gaydou EM, Bianchini JP, Randriamiharisoa RP. Orange and mandarin peel oils differentiation using polymethoxylated flavone composition. *J Agric Food Chem* 35: 525-529 (1987)
89. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Nonomura-Nakano M, Nesumi H, Yoshida T, Sugiura M, Yano M. Quantitative study of fruit flavonoids in *Citrus* hybrids of King (*C. nobilis*) and Mukaku Kishu (*C. kinokuni*). *J Agric Food Chem* 49: 3982-3986 (2001)
90. El-Domiaty MM, Abdel-Aal MM, El-Shafae AM. On the chemical, botanical, and chemotaxonomical evaluation of the genus *Citrus*. Part I: Polymethoxyflavone of the leaf of *Citrus deliciosa* Ten. *Nat Prod Sci* 2: 106-114 (1996)
91. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M, Koizumi M, Ito C, Furukawa H. Quantitative study of flavonoids in leaves of *Citrus* plants. *J Agric Food Chem* 48: 3865 - 3871 (2000)
92. Baik SO, Bock JY, Chun HJ, Jeong SI, Han WS, Kim IK. Quantitative distribution and analysis of methoxylated flavonoids in citrus and Korean chung-pi. *Anal Sci Technol* 14: 331-339 (2001)
93. Kim YC, Koh KS, Koh JS. Changes of some flavonoids in the peel of satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) harvested during maturation. *Agric Chem Biotechnol* 44: 143-146 (2001)
94. Kim YC, Koh KS, Koh JS. Changes of some flavonoids in the peel of late maturing citrus during maturation. *J Food Sci Nutr* 7: 1-4 (2002)
95. Kwon GJ, Choi DS, Wang MH. Biological activities of hot water extracts

- from *Euonymus alatus* leaf. Korean J Food Sci Technol 39: 569–574 (2007)
96. Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohta H. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. Biosci Biotechnol Biochem 70: 178–192 (2006)
97. Jeong WS, Park SW, Chung SK. The antioxidative activity of Korean *Citrus unshiu* peels. Food Biotechnol 6: 292–296 (1997)
98. Kim HJ, Bae KH, Lee HJ, Eun JB, Kim MK. Effects of hesperidin extracted from tangerine peel on Cd and lipid metabolism, and antioxidative capacity in rats. Korean Nutr Soc 32: 137–149 (1999)
99. Sohn JS, Kim MK. Effect of hesperidin and naringin on antioxidative capacity in the rat. Korean Nutr Soc 31: 687–696 (1998)
100. Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K, Uchino K. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. Biosci Biotechnol Biochem 61: 102–104 (1997)
101. Jang SY, Choi HK, Ha NY, Kim OM, Jeong YJ. Study on the antimicrobial effects of citrus peel by different extract methods. Korean J Food Preserv 11: 319–324 (2004)
102. Ahn MS, Kim HJ, Seo MS. A study on the antioxidative and antimicrobial activities of the *Citrus unshiu* peel extracts. Korean J Food Culture 22: 454–461 (2007)
103. Oh HJ, Ahn HM, Kim SS, Yun PY, Jeon GL, Ko YH, Riu KZ. Composition and antimicrobial activities of essential oils in the peel of citrus fruits. J Appl Biol Chem 50: 148–154 (2007)
104. Oh HS, Park WB, An YS, Oh MC, Oh CK, Kim SH. Antimicrobial activity of extracts from citrus seeds. Korean J Culinary Res 9: 69–80 (2003)
105. Cho SH, Lee SY, Kim JW, Ko GH, Seo IW. Development and application

- of natural antimicrobial agent isolated from grapefruit seed extracts
-Antimicrobial activities of grapefruit seed extract. J Food Hyg Safety 10:
33-39 (1995)
106. Choi JD, Seo IW, Cho SH. Studies on the antimicrobial activity of grape
fruit seed extract. Bull Korean Fish Soc 23: 297-302 (1990)
107. Koh JH, Hwang MO, Moon JS, Hwang SY, Son JY. Antioxidative and
antimicrobial activities of pomegranate seed extracts. Korean J Food
Cookery Sci 21: 171-179 (2005)
108. Koh MS. Antimicrobial activity of *Saururus chinensis* Baill extract. J
Korean Soc Food Sci Nutr 33: 1098-1105 (2004)
109. Chung KH, Lee SH, Lee YC, Kim JT. Antimicrobial activity of Omija
(*Schizandra chinensis*) extracts. Korean Soc Food Sci Nutr 30: 127-132
(2001)
110. Yeo SG, Ahn CW, Kim IS, Park YB, Park YH, Kim SB. Antimicrobial
effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. Korean
Soc Food Sci Nutr 24: 293-298 (1995)
111. Ko MS. Chemical composition in stalks and leaves of *Sasa borealis* Makino
and antioxidative and antimicrobial activities of extracts. Korean J Food
Preserv 15: 125-132 (2008)
112. Bae JH. Effect of *Artemisia capillaris* extract on the growth of
food-borne pathogens. Korean Nutr Soc 36: 147-153 (2003)
113. Seo KS, Huh CK, Kim YD. Composition of antioxidative and antioxidant
activities of *Prunus mume* fruit in different cultivars. Korean J Food
Preserv 15: 288-292 (2008)
114. Joung YM, Park SJ, Lee KY, Lee JY, Suh JK, Hwang SY, Park KE,
Kang MH. Antioxidative and antimicrobial activities of *Lilium* species

- extracts prepared from different aerial parts. Korean J Food Sci Technol 39: 452-457 (2007)
115. Emim JA, Olivera AB, Lapa AJ. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin and the isoflavonoids, duartin and claessequinone, in rats and mice. J Pharm Pharmacol 46: 118-122 (1994)
116. 허창걸. 북한동의보감. 창조문화사, 서울 p 131 (2003)
117. Min SH, Park HO, Oh HS. A study on the properties of hot water extracts of Korean dried tangerine peel and development of beverage by using it. Korean J Soc Food Cookery Sci 18: 51-56 (2002)
118. Oshiba J, Kato M. Nutritional Regulation III, Depression of cardiac action by the isolated naringin. Mukogawa Joshidaigaku Kyo 29: 1-8 (1981)
119. Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, Forertieri AM, Tripodo MM. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. Part 1. Anti-inflammatory and analgesic activity. Farmaco 49: 709-712 (1994)
120. Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Hirose Y, Wang A, Mori H, Satoh K, Hara A, Ogawa H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of β -carotene. Cancer Res 54: 4653-4659 (1994)
121. Tanaka T, Makita H, Kawabata K, Mori H, Kakumoto M, Satoh K, Hara A, Sumida T, Fukutani T, Tanaka T, Ogawa H. Modulation of N-methyl-N-amyl nitrosamine induced rat oesophageal tumourigenesis by dietary feeding of diosmin and hesperidin, both alone and in combination. Carcinogenesis 18: 761-769 (1997)
122. Smith CJ. Non-hormonal control of vaso-motor flushing in menopausal patients. Chicago Med 67: 193-195 (1964)

123. Aboobaker VS, Balgi AD, Bhattacharya RK. *In vivo* effect of dietary factors on the molecular action of aflatoxin B1: role of non-nutrient phenolic compounds on the catalytic activity of liver fractions. *In Vivo* 8: 1095-1098 (1994)
124. Martin MJ, Marhuenda E, Perez-Guerrero C, Franco JM. Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology* 49: 144-150 (1994)
125. Gordon PB, Holen I, Seglen PO. Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid. *J Biol Chem* 270: 5830-5838 (1995)
126. Morin P, Gallois A, Richard H. Fast separation of polymethoxylated flavones by carbon dioxide supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr* 586: 171-176 (1991)
127. Motoharu J-I. Chemical study of *Citrus* plants in the search for cancer chemopreventive agents. *Yakugaku Zasshi* 125: 231-254 (2005)
128. Iwase Y, Takemura Y, Ju-ichi M, Yano M, Ito C, Furukawa H, Mukainaka T, Kuchide M, Tokuda H, Nishino H. Cancer chemopreventive activity of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone from the peel of citrus plants. *Cancer Lett* 163: 7-9 (2001)
129. Yoshimizu N, Otani Y, Saikawa Y, Kubota T, Yoshida M, Furukawa T, Kumai K, Kameyama K, Fujii M, Yano M, Sato T, Ito A, Kitajima M. Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Aliment Pharmacol Ther* 20: 95-101 (2004)
130. Lin N, Sato T, Takayama Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy fla-

- vonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochem Pharmacol* 65: 2065-2071 (2003)
131. Bracke ME, Depypere HT, Boterberg T, Van Marck VL, Vennekens KM, Vanluchene E, Nuytinck M, Serreyn R, Mareel MM. Influence of tangeretin on tamoxifen's therapeutic benefit in mammary cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 354-359 (1999)
132. Suzuki M, Sasaki K, Yoshizaki F, Oguchi K, Fujisawa M, Cyong JC. Anti-hepatitis C virus effect of *Citrus unshiu* peel and its active ingredient nobiletin. *Am J Chin Med* 33: 87-94 (2005)
133. Mak NK, Wong-Leung YL, Chan SH, Wen J, Leung KN, Fung MC. Isolation of anti-leukemia compounds from *Citrus reticulata*. *Life Sci* 58: 1269-1276 (1996)
134. Kunizane H, Ueda H, Yamazaki M. Screening of phagocyte activities in plant: enhancement of TNF production by flavonoids. *J Pharmaceu Soc Japan* 115: 749-755 (1995)
135. Folin O, Denis W. A volumetric method for the determination of phenols (phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem* 22: 305-308 (1915)
136. Zhuang XP, Lu YY, Yang GS. Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. *Chinese Herbe Med* 23: 122-124 (1992)
137. Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki H, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biol Med* 21: 885-902 (1996)
138. Rosen GM, Rauckman EJ. Spin trapping of the primary radical involved in the activation of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene by cumene hydroperoxide hematin. *Molec Phamacol* 17: 233-238 (1980)
139. Hiromato K, Johkoh H, Sako, Kikugawa K. DNA breaking activity of the

- carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). Free Radical Res Commun 19: 323-332 (1993)
140. Müller HE. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS peroxidase medium. Zentralbl Bakterio Mikrobio Hyg 259: 151-158 (1995)
141. Mahinda S, Jeon YJ, Kim SH. Effect of far-infrared radiation for drying citrus by-products and their radical scavenging activities and protective effects against H₂O₂-induced DNA damage. J Food Sci Nutr 13: 313-320 (2008)
142. Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. J Korean Soc Food Sci 38: 462-469 (2009)
143. Goinstein S, Martin-Belloso O, Park YS, Hanuenkit R, Lojek A, Ciz M, Caspi A, Libman I, Trakhtenberg S. Composition of some biochemical characteristics of different citrus fruit. Food Chem 74: 309-315 (2001)
144. Shin DB, Lee DW, Yang R, Kim JA. Antioxidative properties and flavonoids contents of matured *Citrus* peel extracts. Food Sci Biotechnol 15: 357-362 (2006)
145. Kim HS, Lee CW, Kim DH, Kim GO, Kim SJ, Chang IS. The study on the whitening effects and antioxidant activity of various citrus fruits. J Soc Cosmet Scientists Korea 33: 69-77 (2007)
146. Yusof S, Ghazali HM, King GS. Naringin content in local citrus fruits. Food Chem 37: 113-121 (1990)
147. Hermann K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxyl-benzoic acid compounds in foods. Crit Rev Food Sci Nutr 28: 315-347 (1989)

148. Xu XM, Jun JY, Jeong IH. A study on the antioxidant activity of Hae-songi mushroom (*Hypsizigus marmoreus*) hot water extract. J Korean Soc Food Sci Nutr 36: 1351-1357 (2007)
149. Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. J Korean Soc Food Sci 38: 462-469 (2009)
150. Chance S, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 59: 527-605 (1979)
151. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemisensitivity testing. Cancer Res 47: 936-942 (1987)
152. Oh GJ, Youm JH. Apoptotic signaling pathway by cadmium in Hepalclc7 cells. J Toxicol Pub Health 17: 215-223 (2001)
153. Nocoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods 139: 271-279 (1991)
154. Luo Y, Kessel D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthaloyanine. Photochem Photobiol 66: 479-483 (1997)
155. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254 (1976)
156. Kanno Si, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, Ohtake T, Kimura K, Ishikawa M. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. Biol Pharm Bull 28: 527-530 (2005)

157. Kamaraj S, Ramakrishnan G, Anadakumar P, Jagan S, Devaki T. Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo(α)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Invert New Drugs* 27: 214-222 (2009)
158. Karen LM, Peter JF, James K. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Letters* 251: 168-178 (2007)
159. Jung JI, Lim SS, Choi HJ, Cho HJ, Shin HK, Kim EJ, Chung WY, Park KK, Park JH. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* 17: 689-696 (2006)
160. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissue: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 11: 95-103 (1992)
161. Fesus L, Davies PJA, Piacentini M. Apoptosis: molecular mechanisms in the programmed of cell death. *Eur J Cell Biol* 56: 170-177 (1991)
162. Fesus L, Thomazy V, Autuori F, Ceru MP, taresa E, Piacentini M. Apoptosis hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* 245: 150-154 (1989)
163. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607 (2003)
164. Koesmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an antioxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4: 327-332 (1993)
165. Vegran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance. *Bull Cancer* 92: 219-226 (2005.)

166. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53: 3976-3985 (1993)
167. Lee CJ, Wilson L, Jordan MA, Nguyen V, Tang J, Smiyun G. Hesperidin suppressed proliferations of both human breast cancer and androgen-dependent prostate cancer cells. *Phytotherapy Res* [Epub ahead of print] (2009)
168. Hirano T, Abe K, Gotoh M, Oka K. Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Brit J Cancer* 72: 1380-1388 (1995)
169. Yukihiro A, Tomohiro I, Kenji O, Munekazu I, Yoshinori N. Interactive effects of polymethoxy flavones from citrus on cell growth inhibition in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Bioorg Med Chem* 16: 2803-2810 (2008)
170. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cell lines. *Eur J Nutr* 38: 133-142 (1999)
171. Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol* 60: 1051-1059 (2000)
172. Collins-Burow BM, Burow ME, Duong BN, MxLachlan JA. Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and -independent mechanisms. *Nutr Cancer* 38: 229-244 (2000)

173. Jacobson KA, Moro S, Manthey JA, West PL, Ji XD. Interactions of flavones and other phytochemicals with adenosine receptors. *Adv Exp Med Biol* 505: 163-171 (2002.)
174. Gamet-Payrastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tullieux J, Chap H, Payrastre B. Flavonoids and the inhibition of Pkc and Pi 3-kinase. *Gen Pharmacol* 32: 279-286 (1999)



謝 辭

오늘이 있기까지 부족한 저를 사랑으로 이끌어 주시고 세심한 지도와 격려를 하여 주신 김수현 교수님께 마음 깊이 감사드립니다. 그리고 바쁘신 일정에도 불구하고 이 논문을 검토하여 주시고 많은 조언을 아끼지 않으신 강영주 교수님, 고용구 원장님, 임상빈 교수님, 오창경 교수님께 깊은 감사를 드리며, 아낌없는 성원과 격려를 보내주신 하진환 교수님, 고영환 교수님, 김광표 교수님, 송대진 교수님께 감사드립니다.

본 논문이 완성되기까지 실험을 할 수 있도록 세심한 배려를 하여주시고 물심 양면으로 적극 후원을 하여 주신 제주대학교 해양과학대학 전유진 교수님께 깊은 감사의 말씀을 올립니다. 아울러 논문 실험기간 내내 자기 일처럼 많은 실험과 자료를 정리하는데 도움을 주신 강성명님, 마힌더 박사에게 감사드립니다.

또한 본 논문이 완성될 수 있도록 조언과 격려를 아끼지 않았던 제주산업정보대학 오명철 교수님, 양태석 교수님께 감사드립니다. 그리고 자료를 정리하는데 많은 도움을 주신 제주개발공사 김용덕 박사, 고원준님, 제주산업정보대학 임주병님께 감사드립니다.

식품생화학실험실 대학원생들과 청룡수산 안용석 연구소장, 심사과정에서 모든 일을 도와주신 김태현 조교에게 감사드립니다.

제가 성장하는데 늘 걱정이 끊이지 않았던 지금 고인이 되신 아버님, 그리고 여전히 건강하신 어머니님, 매형인 경성대학교 문윤희 교수님과 현금희 누님께 감사드립니다.

끝으로 제가 힘들어 할 때 항상 옆에서 큰 용기를 주며 힘을 실어준 사랑하는 아내 계란이와 우리 집 대들보인 큰딸 진영, 착한 딸 주리, 똑똑한 아들 진호에게 이 작은 결실을 드립니다.

2009년 12월

玄 載 皙