



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)



碩士學位論文

감귤 과피 발효물 및 정유성분의
생리활성에 관한 연구

濟州大學校 大學院

獸醫學科

玄珠美

2012年 2月



목 차

목	차
.....	i
L i s t o f T a b l e s	
.....	iii
L i s t o f F i g u r e s	
.....	iv
L i s t o f A b b r e v i a t i o n s	
.....	vi
A B S T R A C T	
.....	1
I . 서	론
.....	
...	3
II . 재 료 및 방 법	
.....	8
감	시
.....	8
정 유	성 분
.....	9
발	효
.....	9
발	효
.....	9
발	효
.....	9



항 산 화 활 성 측 정	10
.....	10
- DPPH radical scavenging activity test	10
.....	10
- Superoxide anion radical scavenging activity test	1
1	1
항 균 활 성 측 정	12
.....	12
- Paper disc diffusion method	12
.....	12
물 질 추 출	3
1	3
항 염 활 성 측 정	14
.....	14
- 세포 배 양	14
.....	14
- Cell viability	14
.....	14
- Nitric oxide (NO) 측정	15
.....	15
- 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-6) 측정	15
.....	15
- Immunoblotting	16
.....	16
물 질 성 분 분 석	17
.....	17
- 시 약	17
.....	17



- H P L C 분 석 조 건	17
- 단 일 물 질 의 분 리 및 N M R 분 석	19
통 계 분 석	19
III . 결 과	20
정 유 성 분 의 항 산 화 활 성	20
정유성분의 항균활성	21
발효물의 항산화 활성	23
- D P P H radical scavenging activity	23
- Superoxide anion radical scavenging activity	25
발효물의 항염 활성	27
- Nitric oxide (NO) 생성량 측정	27
- i N O S 및 C O X - 2 단 백 발 현	29
- 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6) 생성 억제 정도 측정	32
발 효 물 의 물 질 분 석	34
- H P L C 를 이 용 한 발 효 전 후 추 출 물 의 성 분 분 석	34
- 발 효 물 로 부 터 분 리 된 단 일 물 질 의 N M R 분 석	36



IV	고	찰
3		9
V	결	론
4		3
VI	국	문
	요	약
		44
VII	참	고
	문	헌
		46

List of Tables

Table 1. ESR spectroscopy conditions of the control factors of DPPH radical scavenging activity	10
Table 2. ESR spectroscopy conditions of the control factors of superoxide anion radical scavenging activity	11
Table 3. Changes of HPLC gradient elution on the separation for mixture of flavonoids	18
Table 4. HPLC chromatographic conditions of the control factors	18

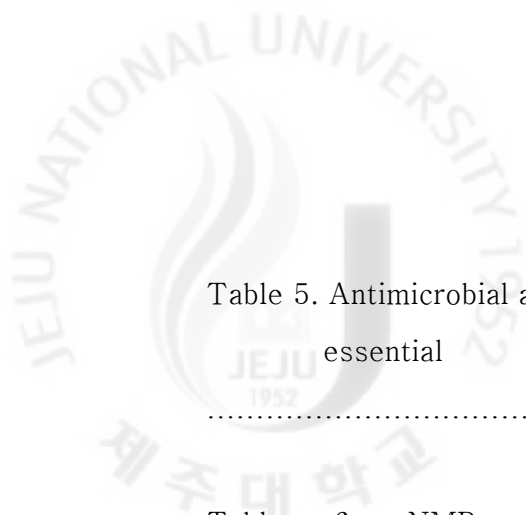


Table 5. Antimicrobial activities of *Citrus unshiu* peel extracts
essential oil on several microorganisms
.....22

Table 6. NMR spectroscopic data for hesperitin-7-O-glucose
.....37

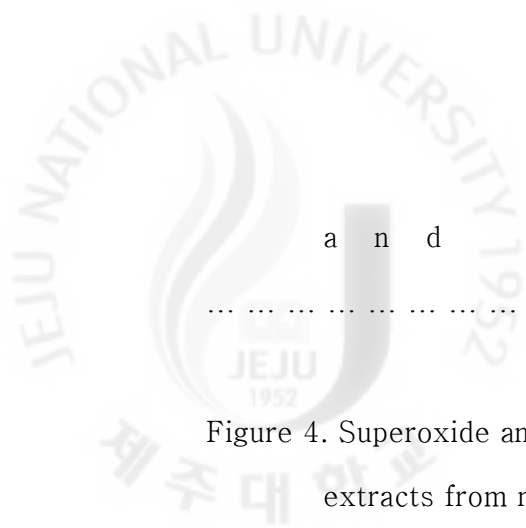
Table 7. NMR spectroscopic data for feruloylmethane
.....38

List of Figures

Figure 1. Pictures of Unshu, matured and immatured Setoka
..... 8

Figure 2. DPPH radical scavenging activities of citrus peel essential oil20

Figure 3. DPPH radical scavenging activities of ethyl acetate extracts
from non-fermented citrus peel(A), fermented citrus peel(B),



a n d n e o h e s p e r i d i n (C)
 2 4

Figure 4. Superoxide anion radical scavenging activities of ethyl acetate
 extracts from non-fermented citrus peel(A),
 fermented citrus peel(B), and neohesperidin(C)
 2 6

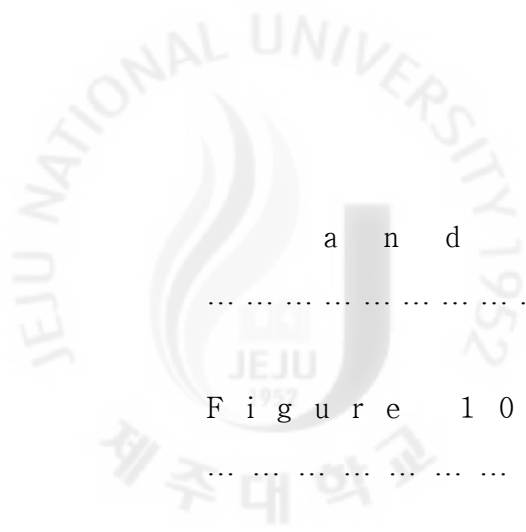
Figure 5. Inhibitory effects of EtOAc extracts from fermented
 citrus peel with *A.niger* on the production of nitric oxide(NO)
 in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line
 2 8

Figure 6. The expression of inducible nitric oxide synthases(iNOS)
 in R A W 2 6 4 . 7 c e l l s a c t i v a t e d w i t h L P S
 3 0

Figure 7. The expression of cyclooxygenase-2 (COX-2)
 in R A W 2 6 4 . 7 c e l l s a c t i v a t e d w i t h L P S
 3 1

Figure 8. TNF- α productions of ethyl acetate extracts from
 non-fermented citrus peel, fermented citrus peel
 a n d n e o h e s p e r i d i n
 3 2

Figure 9. IL-6 productions of ethyl acetate extracts from
 non-fermented citrus peel, fermented citrus peel



a n d n e o h e s p e r i d i n	33
.....
F i g u r e 1 0 . H P L C c h r o m a t o g r a p h y	35
.....



List of Abbreviations

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>C. unshiu</i>	<i>Citrus unshiu</i>
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESR	Electron Spin Resonance
EtOAc	Ethyl acetate
FBS	Fetal Bovine Serum
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IgG	Immunoglobulin G
IL-6	Interleukin-6
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
LPS	Lipopolysaccharide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Nitric Oxide
PVDF	Polyvinylidene fluoride
ROS	Reactive Oxygen Species
SC ₅₀	Scavenging Concentration of 50%
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
VLC	Vacuum Liquid Chromatography



ABSTRACT

'Satuma mandarin' of Citrus, yield of which is the highest among fruits produced in Jeju Island, is extensively consumed for processed food items. The amount of by-products of citrus produced from the processing within a short period after the harvest is tremendous. These by-products are mostly dumped into land or neglected because of cost involved in processing them. Various studies are currently underway to effectively deal with these by-products.

In the present study, we aimed to explore the usefulness of the by-products as a new material by examining the anti-oxidative and anti-microbial activity of essential oil extracted from citrus peels, and anti-oxidative and anti-inflammatory activity of fermented extracts of citrus peels.

First, essential oils were extracted from peels of mature fruit of Unshu (*Citrus unshiu*), and of immature and mature fruit of Setoka (*Citrus unshiu* x *Citrus sinensis*] x *Citrus reticulata*] x [*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*]), and the anti-oxidative activity (DPPH radical) of the essential oil was measured. The anti-oxidative activity of immature fruit of Setoka was the highest. Test of anti-microbial activity using paper disc method showed that the essential oils of citrus was excellent against food poisoning bacteria, *L. mono* and acne causing bacteria *P. acnes*. In particular, the anti-microbial activity of immature fruit of Setoka was the highest.

Second, the peel of Unshu (*C. unshiu*) was fermented and the changes in physiological activity of extracts from the fermented peels were examined. Hydrothermal extraction of pulverized peels of citrus was performed, and *Aspergillus niger* was added to the extract. Then the extract was shake-cultured, and extraction

was performed using EtOAc. As a control group, we extracted peel from hydrothermal extraction to EtOAc in advance addition *A. niger*. Anti-oxidative activity (DPPH, Superoxide anion radical) measured by ESR spectrophotometer showed that extracts obtained after fermentation had better concentration-dependent activity than extracts obtained before fermentation. In addition, anti-inflammatory activity of the extracts was examined using RAW264.7 murine macrophage cells stimulated with LPS. NO production, iNOS, and COX-2 expression significantly decreased more in extracts obtained after fermentation than extracts obtained before fermentation. TNF- α and IL-6 production, both of which are pro-inflammatory cytokine were inhibited by extracts obtained after fermentation. HPLC analysis of the extracts obtained before and after fermentation showed that neohesperidin level considerably increased after fermentation, and hesperetin-7-*O*-glucose and feruloyl methane that were not observed before fermentation were found after the fermentation. As neohesperidin which increased a lot did not show considerable activity, further test of newly produced single material is expected to reveal anti-inflammatory mechanism. It is expected that the identification and promotion of the function of the by-products of citrus will help find a new use of citrus of Jeju Island.

I. 서론

감귤은 우리나라 과수 생산량의 30%를 차지하는 국내에서 가장 많이 생산되는 과일로서, 과실 그 자체로 식용될 뿐만 아니라 주스, 통조림 등의 가공제품으로 20% 이상이 소비되고 있다[2, 18, 23]. 감귤은 타 과실에 비해서 풍부한 과즙, 독특한 향미 및 고유한 색을 가지고 있을 뿐만 아니라 고 기능성 성분들의 보고로 잘 알려져 있다[19]. 감귤류의 flavonoid 는 현재까지 약 60 여종 이상의 구조가 밝혀져 있으나, 주요 성분인 hesperidin, neohesperidin 및 naringin 에 대한 분석이 주로 연구되어 왔으며[3, 17, 24, 27], 기능성에 대한 연구로는 항산화 작용[6], 고지혈증 억제작용[10, 15], 항균효과[4], 암세포의 증식 억제[12, 29], 고혈압 예방, 혈관 건강 증진[1, 11, 26] 등이 보고되어 있다. 또한, 최근 여러 연구자들에 의해 감귤류의 암 예방물질에 관한 연구가 활발히 진행되면서 flavone 류 중 polymethoxyflavone 류가 감귤류의 특징적인 성분으로 밝혀졌고, 혈소판 응집억제, 임파구 증식억제, 항 궤양, 항염증 등의 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다[13].

하지만 감귤류의 대표적인 flavonoid 인 naringin, hesperidin 및 neohesperidin 등은 배당체 형태로 이루어져 있어 aglycone (비당체) 형태인 naringenin 및 hesperetin 에 비하여 생리활성이 떨어지므로, 감귤 배당체 형태의 flavonoid 를 aglycone 형태로 전환함으로써 기능성 향상을 기대할 수 있다.

이에 본 연구에서는 특정 미생물을 이용하여 배당체 형태인 flavonoid 화합물들을 aglycone 형태로 전환함과 동시에, 세포벽 구성성분의 가수분해를 통하여 유효 생리활성 성분의 추출성을 증대시키고자 하였다.

본 연구에 사용된 *Aspergillus niger* 는 주로 식품 발효에 쓰이고 있으나 구연산 제조[8]나 일부 약품생산에도 유용하게 이용되고 있어 온주밀감의 과피 발효에 사용하여 온주밀감 과피의 항산화 활성 뿐만 아니라 염증 억제 효과 증대 여부를 확인하고자 하였다.

감귤의 발효 산물을 이용한 항산화 효과와 항 염증 효과와의 연관관계 및 그 기전을 밝히는 것은 기본적인 효능연구와 향후 기능성 소재 개발과정에 있어서 중요한 의미가 있다고 할 수 있다.

항산화 반응이 우리 몸에 필요한 이유는 산화스트레스(Oxidative stress)는 생체에서 여러 중요한 기본적인 생명현상이며, 산화반응이 일어나면 세포 내 미토콘드리아와 peroxisome, 그리고 xanthine oxidase, NADPH oxidase 및 cyclooxygenase (COX) 등과 같은 효소들은 oxygen, superoxide, hydroxyl radical (\cdot OH), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등과 같은 염증반응에 관여하는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)를 생성하여 직·간접적인 손상을 일으킨다고 알려져 있다[41].

이러한 염증 반응은 생체나 조직에 물리적인 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 침습이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), leukotriene 과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대 되면서 염증을 유발한다. 또한 지속적인 염증 반응은 점막 손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 일으킨다[50].

염증에 관여하는 염증 매개 물질의 형성은 phospholipase A_2 의 활성화로 인하여 arachidonic acid 가 prostaglandin 으로 바뀌는 과정 및 nitric oxide (NO) 형성 과정으로 이어지게 된다. 체내 염증 과정에서는 과량의 NO 및

prostaglandin E_2 (PGE₂)등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해 형성된다[48].

일반적인 NO 의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만[49], 염증 상태에서 iNOS 에 의해 과잉 생산된 NO 는 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진 시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[36]. 또한, COX-2 는 염증반응, 면역반응에 깊이 관여하고 있는 PGE₂ 를 형성시킨다[35]. 이와 같은 염증 매개체들의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다.

대식세포(macrophage)는 염증 반응 시 NO 와 cytokine 을 생산하여 감염 초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다. 내독소로 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람-음성균의 세포 외막에 존재하며, macrophage 또는 monocyte cell 에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine 들을 증가시킨다[31]. 최근에 개발되어 광범위하게 사용되고 있는 합성 항산화제의 많은 부작용들로 인해서 천연물질 중에서 항산화 기능을 갖고 있는 생리활성물질을 찾고 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있다[46]. 실제로 항산화 효과가 있는 물질들은 동시에 높은 항 염증 작용을 수반하는 경우가 많아서[38, 40, 47], 동맥경화, 고혈압, 당뇨, 암, 관절염 등과 같은 산화적 손상과 관련이 높은 만성 염증성 질환에 대한 치료 및 개선제로서의 개발 가능성도 매우 높다.

이에 본 연구에서는 감귤 과피의 유효물질들이 이러한 염증반응을 효과적으로 억제시키는지 검토하고자 LPS 로 자극된 RAW264.7 macrophage 세포에서

세포가 방출하는 NO 생성량과, iNOS 및 COX-2 단백질의 발현과 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 변화를 조사하여 항 염증성 기능의 유무와 정도를 알아보려고 하였다.

또한 감귤 과피에는 carotenoid 류, bioflavonoid 류, pectin 및 terpene 류가 과육보다 풍부하게 함유되어 있다[7]. 그러나 이러한 중요한 기능성 물질들을 함유하고 있는 감귤 과피는 그 일부가 한약재로 쓰이는 것 외에는 대부분 자연에 투기 또는 방치됨으로써 환경오염 문제가 심각하게 대두되고 있다. 최근에는 가축 사료나 토양 비료로 이용하는 등 다양한 시도가 이루어지고 있으나 아직 미비한 실정이며 이를 좀 더 효율적이고 친환경적으로 해결하고자 많은 연구 중에 있다.

이에 본 연구에서는 감귤 과피의 또 다른 활용 방안 모색을 위해 감귤 과피에서 정유 성분을 추출하여 새로운 기능성 소재로 활용 가능성을 검토하고자 연구를 진행하였다.

정유는 식물의 특성에 따라 꽃, 잎, 줄기, 열매, 뿌리 등 각기 다른 부위로부터 추출이 가능하다. 식물에서 추출된 정유성분의 여러 가지 의학적 효과들 중에서 특히 살균, 방부효과는 인체와 일상 환경에 필요성이 부각되어 현대인들의 많은 관심을 받고 있다. 특히, 식품 및 화장품 업계에서는 다양한 균주에서 광범위하게 효과를 나타내는 천연항균제와 향산화제로서 식물성 정유를 이용하려는 시도가 이루어지고 있다. 이처럼 식물성 천연 정유는 본래 향미 기능 외에 부가가치가 상승되고 있다.

감귤의 정유성분은 과피 바깥쪽 flavedo (과피 색소층)에 산재되어 있는 무수한 유포 층에 약 1%가 포함되어 있다. 그 대부분은 리모넨(*d*-limonene)이며, 그 외에 aldehyde, alcohol, ester, ketone, organic acid 등의

방향물질과 이들을 용해하여 주고 있는 terpene 류와 왁스를 함유하고 있다[9, 21].

감귤 류 과피에 많이 포함되어 있는 것으로 알려진 limonene 은 중추신경의 흥분을 진정시켜주며 항암작용이 있는 것으로 알려져 있는데, 상쾌한 향과 인체에 대한 무독성 때문에 향수, 방향제, 비누 등의 화장품과 식품산업 등에 널리 사용되고 있다[16, 25].

본 연구에서는 아직 보고된 바가 없는 세토카(Setoka, 천혜향®)의 미숙과 및 완숙과 과피의 정유 성분을 추출하여 향균, 항염 등의 활성이 있는 에센셜 오일을 이용한 천연 원료를 개발하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 재배되고 있는 온주밀감 (*Citrus unshiu*)과 세토카(Setoka, [*Citrus unshiu* x *Citrus sinensis*] x *Citrus reticulata*) x [*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*])를 2010년 12월에 채집하여 사용하였다. 세토카 미숙과는 같은 해 9월에 채집하였다. 정유성분은 온주밀감과 세토카를 이용하여 추출하였고, 발효는 온주밀감의 과피를 자연건조 시킨 후, 분말화 하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

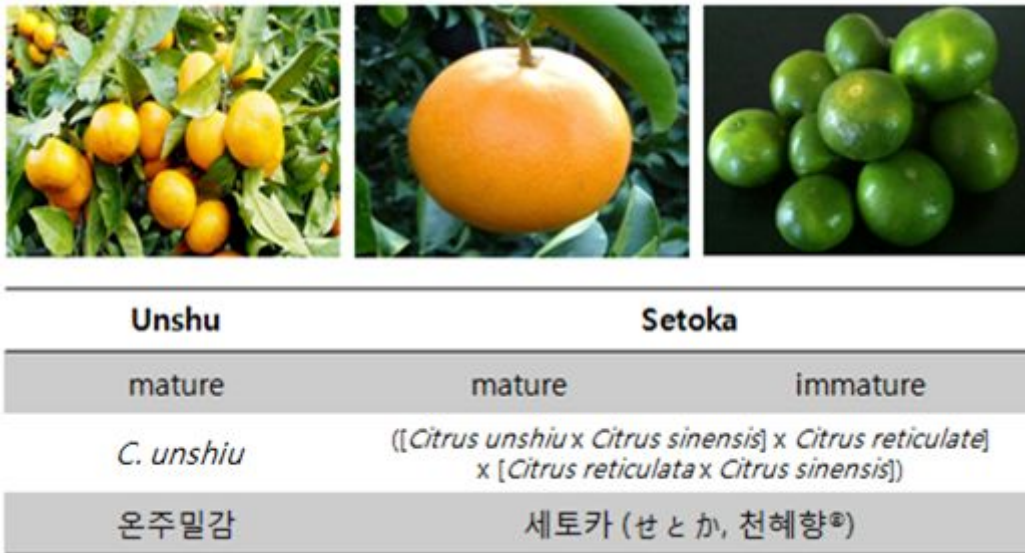


Fig. 1. Pictures of Unshu, matured and immatured Setoka.

정유성분 추출

정유성분은 과피를 증류정유추출장치에서 추출한 후, 갈색 병에 담아 4℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

발효

발효에 사용한 미생물은 *Aspergillus niger* KCTC6913 으로서, 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받아 실험에 사용하였다.

발효조건

미생물의 seed 배양은 열수 추출한 potato dextrose broth (PDB)를 사용하여 30℃에서 2 일 동안 진탕 배양 하였다. 발효를 위해 5% (v/v) 온주밀감 과피 분말이 함유된 PDB 배지를 사용하였으며, seed 배양한 균주를 5L Jar fermentor 에 10% (v/v) 접종한 후 30℃ 항온 조건에서 5 일 동안 진탕 배양하였다.

항산화 활성 측정

-DPPH radical scavenging activity test

시료의 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity test 는 Nanjo 등의 방법 [20]에 의하여 측정하였다. 10 μ L 시료용액에 90 μ L DPPH 용액(0.2 mM)을 첨가하여 2 분 동안 반응시키고, quartz capillary tube 에 옮긴 후 electron spin resonance (ESR) spectrophotometer (JEOL Lts., Tokyo, Japan)로 측정하였다.

시료에 대한 radical 소거율(%)은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, ESR 분석 조건은 다음 표와 같았다(Table 1).

$$\text{Activity}(\%) = \frac{\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern}}{\text{ESR signal intensity for the control medium}} \times 100$$

Table 1. ESR spectroscopy conditions of the control factors of DPPH radical scavenging activity

Control factor	Condition
Frequency	9.4375 GHz
Magnetic field	337 mT
Power	1 mW
Modulation width	0.8 mT
Amplitude	500
Sweep width	10 mT
Scan time	0.5 min
Time constant	0.03 sec

-Superoxide radical scavenging activity test

1.5 M 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO, in potassium phosphate buffer, pH 7.4), 5 mM 2,6-dihydroxypurin (xanthine), 0.25 U/mL xanthine oxidase, 그리고 각 시료들을 농도 별로 준비하여 실험을 수행하였다. sample 10 μ L, DMPO 30 μ L, xanthine 30 μ L, xanthine oxidase 30 μ L 를 넣고 25°C에서 5 분 동안 반응시키고, quartz capillary tube 에 옮긴 후 ESR spectrophotometer 로 측정하였다.

시료에 대한 radical 소거율(%)은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, ESR 분석 조건은 다음 표와 같았다(Table 2).

$$\text{Activity(\%)} = \frac{\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern}}{\text{ESR signal intensity for the control medium}} \times 100$$

Table 2. ESR spectroscopy conditions of the control factors of superoxide anion radical scavenging activity

Control factor	Condition
Frequency	9.4375 GHz
Magnetic field	337 mT
Power	5 mW
Modulation width	0.2 mT
Amplitude	700
Sweep width	10 mT
Scan time	0.5 min
Time constant	0.03 sec

항균활성 측정

-Paper disc diffusion method


정유성분의 항균활성을 측정하기 위해 식중독 유발균인 *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thypimurium*, 여드름 유발균인 *Staphylococcus epidermidis* 와 *Propionibacterium acnes* 에 대하여 Piddock[23]과 Kudo[14] 등의 방법에 준하여 실시하였다. 모든 균은 0.8% agar 를 포함하는 배지에 0.5 MacFarland 로 넣어 1.5 % agar 를 포함하는 각각의 배지 위에 붓고, 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm 의 멸균된 paper disc 를 올려 37℃에서 24-48 시간 배양한 다음 디스크 주변에 형성된 inhibition zone 의 직경 (mm) 을 측정하였다.

Listeria monocytogenes 은 LA 배지, *Salmonella thypimurium* 은 NB 배지, *Staphylococcus epidermidis* 는 TSA 배지에서 37℃에 호기 배양하였고, *Propionibacterium acnes* 는 37℃에서 혐기 배양하였다.

물질 추출

배양이 종료된 감귤 발효물은 여과지로 여과한 후 동량의 ethyl acetate (EtOAc)를 첨가하여 2 시간 동안 교반 추출하고 EtOAc 층만 분리 후, 감압 농축하여 사용하였다.

발효균과 동일한 양의 온주밀감 과피 분말을 함유하는 PDB 배지에 미생물을 접종하지 않고 EtOAc 추출한 추출물을 발효 전 실험군의 시료로 사용하였다.



항염 활성 측정

-세포 배양

Murine macrophage cell line 인 RAW264.7 은 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받아 1% Penicillin-streptomycin 과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3 일에 한 번씩 계대배양 하였다. Lipopoly-saccharide (LPS, E. coli serotype 0111:B4)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO., USA)로부터 구입하여 사용하였다.

-Cell viability

RAW264.7 세포 (1.5×10^5 cells/mL)를 18 시간 전 배양하고 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 24 시간 배양한 후, 3-(4,5dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) 100 μ g 을 첨가하여 4 시간 동안 추가 배양하였다. 1,000 rpm 에서 10 분간 원심 분리한 후 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) 200 μ L 를 가하여 MTT 의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시켜 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장억제 정도를 조사하였다.

-Nitric oxide (NO) 측정

RAW264.7 cell (1.5×10^6 cells/mL)을 18 시간 전 배양 후, 시료와 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 동시 처리하여 24 시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 $100 \mu\text{L}$ 와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) nathylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] $100 \mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 well plate 에서 10 분 동안 반응시킨 후 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO_2)를 표준용액으로 사용하여 정량하였다.

-염증성 사이토카인(TNF- α , Interleukin -6) 측정

RAW264.7 cell (1.5×10^6 cells/mL)을 24 시간 배양 후, LPS를 $1 \mu\text{g/mL}$ 로 처리하여 cytokine 생성을 자극하고 동시에 시료를 농도 별로 처리하였다. 24 시간 배양 후 상등액을 취하여, 각각 BD Bioscience 사(USA)의 mouse TNF- α 및 mouse IL-6 ELISA kit 를 사용하여 cytokine 을 정량하였다.

-Immunoblotting

세포의 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 Western blot analysis 로 확인하였다. RAW264.7 cell (1.0×10^6 cells/mL)을 18 시간 전 배양 후, LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)와 시료를 농도 별로 동시 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하고 $200 \mu\text{L}$ 의 lysis buffer (Pro-prep, Intron biotechnology)를 가하여 균질화 한 후, 14000 rpm 에서 20 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준용액으로 하여 Bio-Rad Protein assay kit 로 정량 하였다. 동일한 양의 단백질($30 \mu\text{g/sample}$)을 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기영동 한 후, pore size $45 \mu\text{m}$ PVDF membrane (Millipore, USA)으로 단백질을 transfer 하였다. 1 차 항체는 NOS2 (1:1000 dilutions; Santa Cruz Biotechnology), COX-2 (1:1000 dilutions; Santa Cruz Biotechnology) 및 β -actin (1:5000 dilutions; Sigma)을 사용하였고 2 차 항체는 HRP 가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-goat IgG(1:5000 dilutions; Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였다. ECL 기질(West-zol, Intron biotechnology)과 반응 시킨 후, MCID Analysis 7.0 Software(MCID™, USA)를 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.



물질 성분분석

-시약

실험에 이용된 모든 시약은 HPLC grade 를 사용하였다. acetonitrile 과 acetic acid 는 Merck, HPLC 분석에 사용된 표준물질 (rutin, nari-rutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, neohesperidin dihydrochalcone, naringenin, hesperetin) 은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO., USA)의 제품을 사용하였다.

-HPLC 분석 조건

HPLC(High performance liquid chromatography) 분석은 Waters 2489 UV/visible detector, Waters e2695 Separations module (Waters, USA)을 사용하였으며, 분석 column 은 YMC Pro C18 RS (250 X 4.6 mm)을 사용하였다. 유속은 1 mL/min 으로 유지하였고 UV 280 nm 에서 검출하였으며, 이동상 조건은 Table 3 과 같았다. 데이터 분석 S/W 는 Waters 의 Empower System 을 사용하였다(Table 3-4).

Table 3. Changes of HPLC gradient elution on the separation for mixture of flavonoids

Time (min)	Flow	acetonitrile (%)	0.1% acetic acid (%)	Curve
0	1 mL/min	20	80	0
8		40	60	6
15		40	60	6
18		60	40	6
24		60	40	1
27		90	10	6
30		90	10	1
31		20	80	6
37		20	80	6

Table 4. HPLC chromatographic conditions of the control factors

Control factor	Condition
Injection volume	10 μ L
Column	YMC Pro C18 RS (250 X 4.6 mm)
Mobile phase	Solvent A : acetonitrile, Solvent B : 0.1 % acetic acid
Flow rate	1.00 mL/min
Column Temperature	40°C
Wavelength	280 nm
Detector	Waters 2489 UV/Visible (Waters, USA)
Separations Module	Waters e2695 (Waters, USA)

단일물질의 분리 및 NMR 분석

추출물을 단일물질로 분리하기 위하여 silica gel (0.002–0.025 mm, Sigma)을 이용한 VLC (Vacuum Liquid Chromatography)를 실시하였다.

정제된 단일물질의 NMR 분석은 JNM-LA400 (FT NMR system, JEOL Co.)을 이용하여 단일 물질의 구조를 동정하였다. 용매는 CIL 의 NMR 전용 용매로 pyridine- d_5 , chloroform- d 를 사용하였다.

통계분석

통계처리는 SPSS 12.0K for Windows (Release 12.0.0, SPSS Inc., USA)를 사용하여 Student' t-test 및 one-way ANOVA test 로 유의성 검정을 실시하였다. 여러 군과의 비교를 위하여 다중검정법인 Duncan test 및 LSD test 를 실시하였으며, p 값이 0.05 미만일 때를 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. 결 과

정유성분의 항산화 활성

온주, 세토카 미숙과 및 완숙과에서 추출한 정유성분 원액을 ESR을 이용하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2 와 같이 세토카 미숙과 추출물에서 잔존하는 radical의 양이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2).

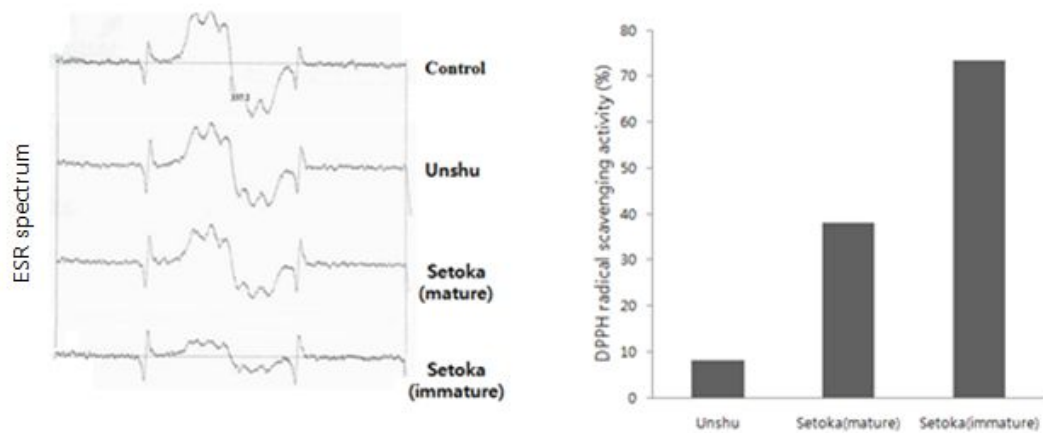


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities of citrus peel essential oil.

정유성분의 항균활성

감귤 과피 정유성분의 항균 활성 측정을 위해 식중독 유발균 *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thypimurium*, 여드름 유발균 *Staphylococcus epidermidis* 와 *Propionibacterium acnes* 에 대하여 paper disc 법으로 생장 억제율을 측정하였다. 감귤 과피 정유성분은 *L. monocytogenes* 과 *P. acnes* 균에 대하여 강한 억제작용을 보였으며, 이는 항생제 내성 균주[30]에도 좋은 항균활성을 나타내었다. 특히, 세토카 미숙과피의 정유성분은 *L. monocytogenes*, *S. thypimurium*, *S. epidermidis*, *P. acnes* 에서 강한 항균활성을 보였다(Table 2).

Table 5. Antimicrobial activities of *Citrus unshiu* peel extracts essential oil on several microorganisms

Strains	Drug-resistant patterns of skin pathogens	Inhibition zones (mm)		
		Unshu	Setoka	
			mature	immature
<i>L. mono</i> ScottA	Susceptible	14	13	14
<i>L. mono</i> L10	Ampicillin	12	13	14.5
<i>L. mono</i> L68	Ampicillin	10	13	12
<i>S. thypi</i> ATCC 14028	Susceptible	8	10	11
<i>S. thypi</i> CCARM2	Oxacillin	8	9	11
<i>S. thypi</i> CCARM211	Oxacillin	8	10	12
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	Susceptible	12	11.5	13
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	Erythromycin	8.5	8.5	8.5
	Clindamycin			
	Chloramphenicol			
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	Tetracycline	8.5	10	10
<i>P. acnes</i> CCARM0081	Susceptible	12	11	13
<i>P. acnes</i> CCARM9009	Clindamycin	11	11	13
<i>P. acnes</i> CCARM9010	Clindamycin	10	10	13

발효물의 항산화 활성

- DPPH radical scavenging activity

온주밀감(*C. unshiu*) 과피를 이용한 발효 전과 발효 후 ethyl acetate 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 발효 전·후 ethyl acetate 추출물과 neohesperidin을 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 실험을 실시하였고, SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과 Fig 3과 같이 감귤 발효물에서 잔존하는 radical의 양이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. SC_{50} 값은 발효 전 $0.448 \pm 0.001 \text{ mg/mL}$, 발효 후 $0.068 \pm 0.001 \text{ mg/mL}$ 로 발효물이 5배정도 높은 radical 소거능을 나타내었으며, 단일물질로 정제된 표준물질 neohesperidin의 SC_{50} 값인 $1.314 \pm 0.001 \text{ mg/mL}$ 보다 발효물이 18배 이상 높은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Fig. 3).

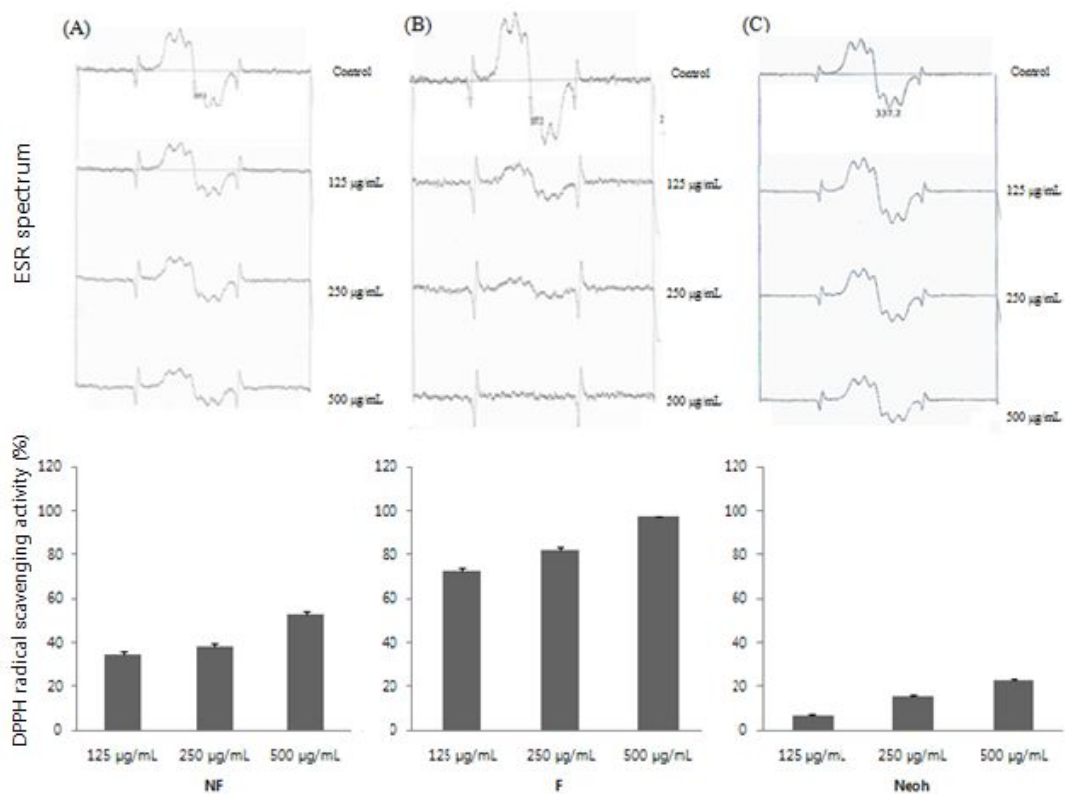


Fig. 3. DPPH radical scavenging activities of ethyl acetate extracts from non-fermented citrus peel (A) and fermented citrus peel (B), and neohesperidin (C).

– Superoxide anion radical scavenging activity

발효 전과 발효 후 감귤 과피 ethyl acetate 추출물의 Superoxide anion radical 소거 활성을 측정하였다. 발효 전후 추출물과 neohesperidin을 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 실험을 실시하였고, SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 감귤 발효물에서 잔존하는 radical의 양이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. SC_{50} 값은 발효 전 $0.952 \pm 0.001 \text{ mg/mL}$, 발효 후 $0.514 \pm 0.001 \text{ mg/mL}$ 로 발효물이 2배 정도 높은 radical 소거능을 보였으며, 단일물질로 정제된 표준물질 neohesperidin의 SC_{50} 값인 $1.134 \pm 0.001 \text{ mg/mL}$ 보다 발효물이 2배 이상 높은 superoxide anion radical 소거 활성을 보였다(Fig. 4)

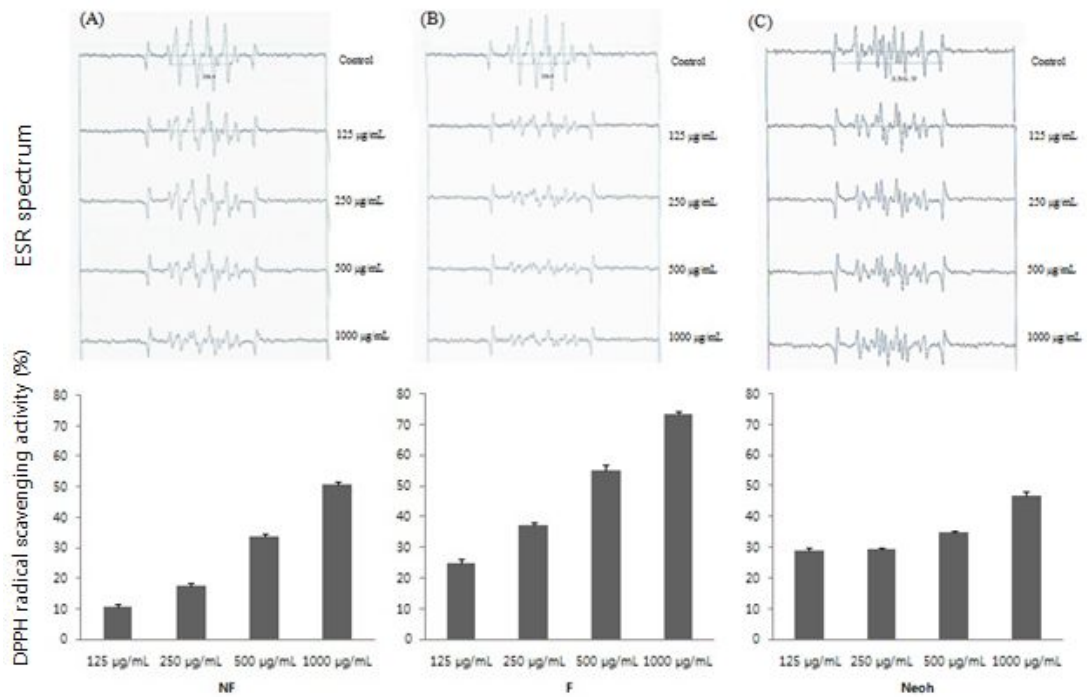


Fig. 4. Superoxide anion radical scavenging activities of ethyl acetate extracts from non-fermented citrus peel (A) and fermented citrus peel (B), neohesperidin (C).

발효물의 항염 활성

- Nitric oxide (NO) 생성량 측정

RAW264.7 세포를 18 시간 배양 후 LPS 로 자극시키고 동시에 시료를 농도 별로 투여하여 24 시간 후에 NO 생성량을 측정하였다. LPS 단독 처리군에 비하여 neohesperidin 처리군은 큰 효과가 나타나지 않았지만 감귤시료를 처리군은 NO 의 생성량이 농도 의존적으로 저해되었으며, 특히 발효추출물의 경우에는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리 농도에서 80% 이상의 NO 억제 효과가 유의성 있게 나타났다. 또한, 실험한 농도에서는 세포독성이 낮아 기본적으로 세포의 생존율에 영향을 주지 않는다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 5).

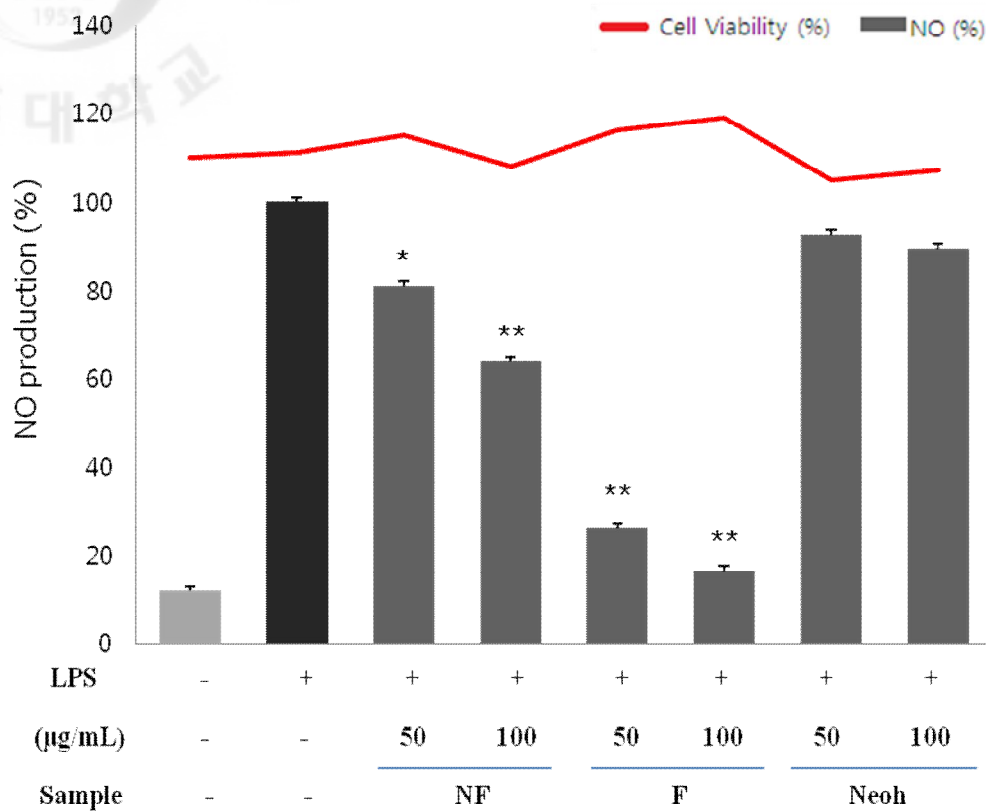


Fig. 5. Inhibitory effects of EtOAc extracts from fermented Unshu peel with *A. niger* on the production of nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line. LPS(-); saline without LPS, LPS(+); lipopolysaccharide without extract, NF; EtOAc extract from non-fermented citrus peel, F; EtOAc extract from fermented citrus peel, Neoh; neohesperidin. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

- iNOS 및 COX-2 단백질발현

LPS 로 유도된 대식세포는 염증을 일으키게 되고, 염증유발 단백질로 알려진 iNOS 와 COX-2 단백질 발현 정도를 Western blot 을 통해 확인하였다.

정제된 단일 물질인 neohesperidin 에서는 큰 효과가 나타나지 않았지만 감귤시료를 처리하였을 때 염증 유발 단백질의 발현이 현저히 저해되었으며, 특히 발효추출물의 경우에는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리 농도에서 90%의 염증억제 효과를 나타내었다(Fig. 6). PGE₂ 의 생성을 유도하는 COX-2 단백질은 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 발효추출물에서 10%이하의 저해 효과를 나타내었다(Fig. 7).

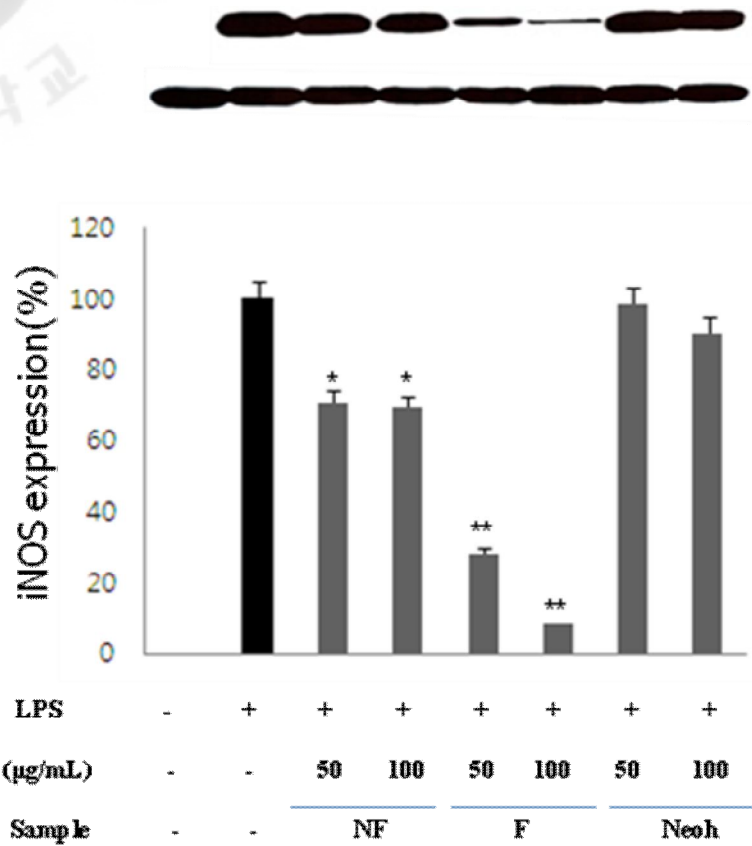


Fig. 6. The expression of inducible nitric oxide synthases (iNOS) in RAW264.7 cells activated with LPS. LPS(-); saline without LPS, LPS(+); lipopolysaccharide without extract, NF; EtOAc extract from non-fermented citrus peel, F; EtOAc extract from fermented citrus peel, Neoh; neohesperidin. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

COX-2
 β-actin

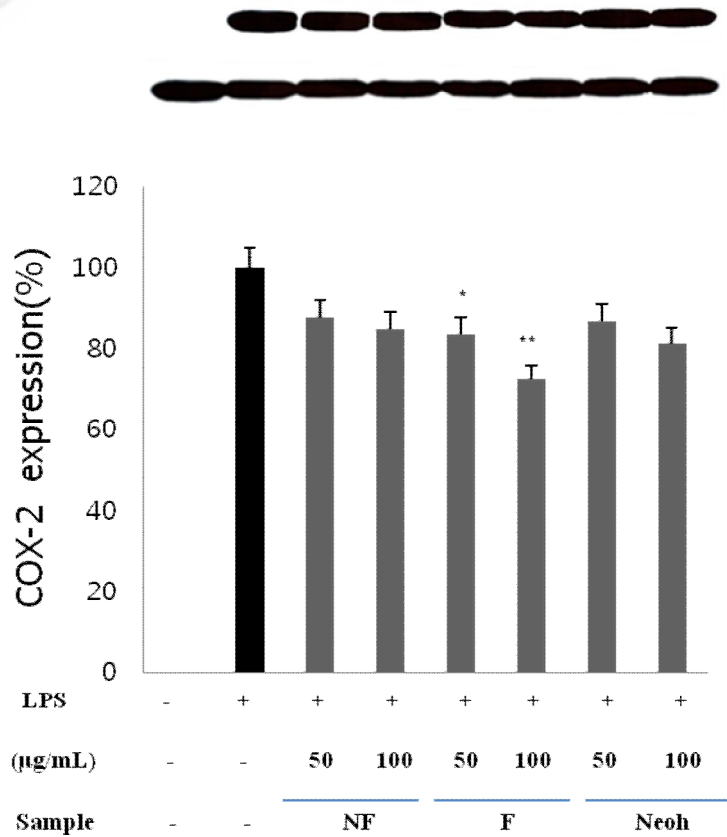


Fig. 7. The expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in RAW264.7 cells activated with LPS. LPS(-); saline without LPS, LPS(+); lipopolysaccharide without extract, NF; EtOAc extract from non-fermented citrus peel, F; EtOAc extract from fermented citrus peel, Neoh; neohesperidin. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

-염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6) 생성 억제 정도 측정

LPS 로 유도된 대식세포는 pro-inflammatory cytokine 을 분비하게 되는데 이를 통하여 염증반응의 정도를 알아볼 수 있다. 각 시료들이 이러한 cytokine 들을 얼마나 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 TNF- α 와 IL-6 를 세포 배양액을 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, TNF- α 와 IL-6 모두 발효추출물에서 cytokine 억제 정도가 가장 높게 나타남을 확인하였다(Fig. 8-9).

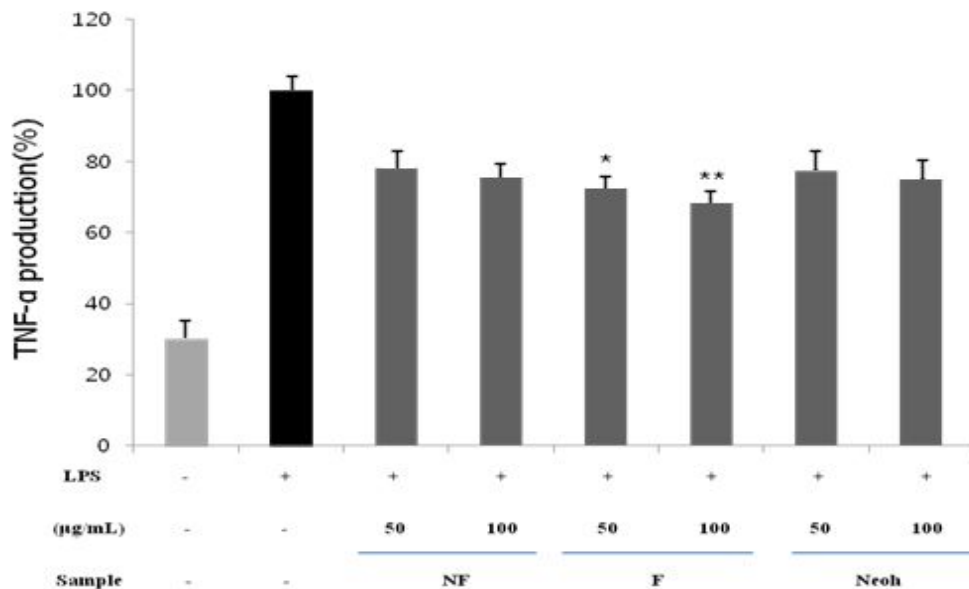


Fig. 8. TNF- α productions of ethyl acetate extracts from non-fermented citrus peel, fermented citrus peel and neohesperidin. LPS(-); saline without LPS, LPS(+); lipopolysaccharide without extract, NF; EtOAc extract from non-fermented citrus peel, F; EtOAc extract from fermented citrus peel, Neoh; neohesperidin. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

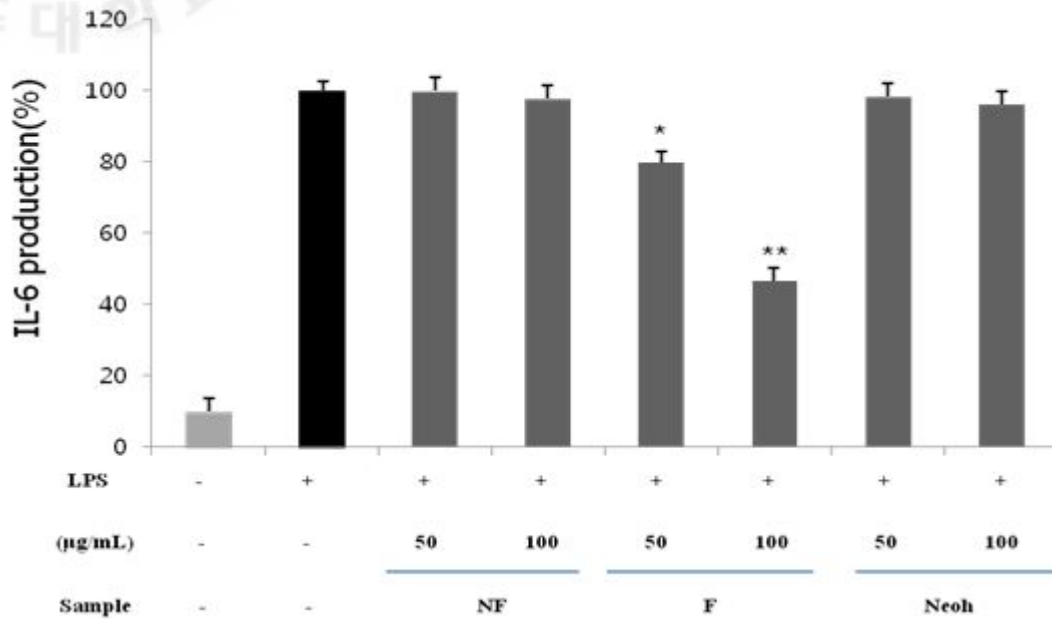


Fig. 9. IL-6 productions of ethyl acetate extracts from non-fermented citrus peel, fermented citrus peel and neohesperidin. LPS(-); saline without LPS, LPS(+); lipopolysaccharide without extract, NF; EtOAc extract from non-fermented citrus peel, F; EtOAc extract from fermented citrus peel, Neoh; neohesperidin. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

발효물의 물질분석

-HPLC 를 이용한 발효 전후 추출물의 성분분석

감귤 flavonoid 의 8 가지 표준물질(rutin, nari-rutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, neohesperidin dihydrochalcone, naringenin, hesperetin)을 이용하여 각 물질의 retention time (RT)을 확인하였고, 이를 이용하여 각 추출물의 성분분석에 활용하였다.

감귤 과피를 배지에 첨가하여 배양한 결과, 감귤 과피(Fig.10.B)에 다량 함유되어 있는 nari-rutin 과 hesperidin 이 배양일에 따라 점점 감소하였고, 5 일 배양한 발효추출물(Fig.10.C)에서 neohesperidin 이 현저하게 증가하였다. 또한, RT 7.9 min 과 11 min 에서 감귤 함유 flavonoid 가 아닌 새로운 물질이 용출되는 것을 확인하였다(Fig. 10).

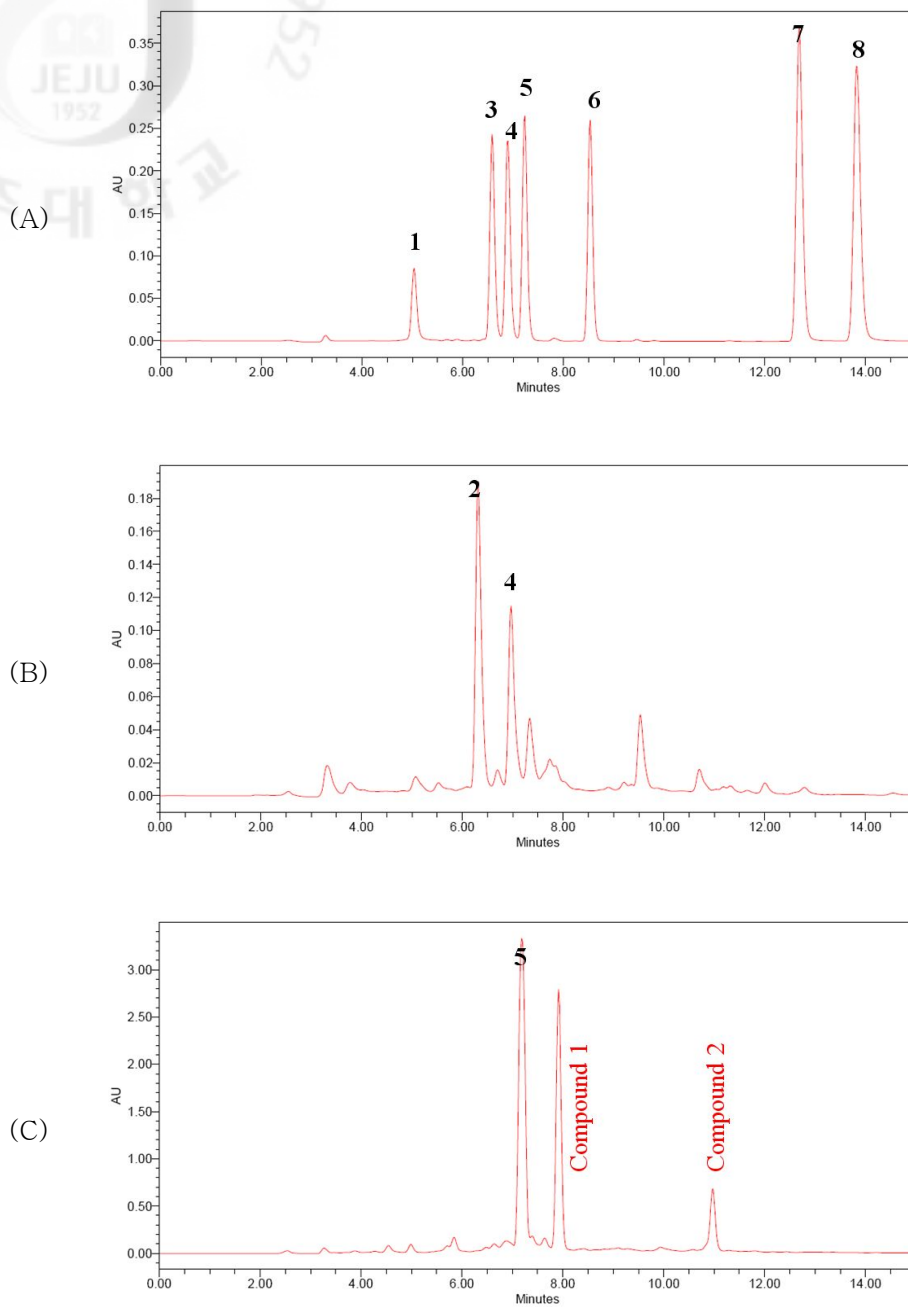


Fig. 10. HPLC chromatography.

(A) Separation of standards. (1) rutin, (2) nari-rutin, (3) naringin, (4) hesperidin, (5) neohesperidin, (6) neohesperidin dihydrochalcone, (7) naringenin, (8) hesperetin; (B) non-fermented citrus peel; (C) fermented citrus peel with *A. niger* for 5 days.

발효물로부터 분리된 단일물질의 NMR 분석

NMR 분석을 통하여 감귤 발효 EtOAc 추출물을 VLC 로 분리, 정제하여 새로 생성된 두 개의 peak 에서 각각 단일물질로 분리하였다. 분리한 화합물질들은 1D, 2D NMR 을 이용하여 화합물을 예측하였고, 문헌과 대조하여 동정하였다.

분리된 단일 물질 compound 1 은 hesperidin 구조에서 mannose 가 떨어져 나간 hesperetin-7-O-glucose 구조를 갖는 물질임을 확인하였다(Table 6). 또한, 단일 물질 compound 2 는 강황의 색소성분 curcumin 의 기본구조인 feruloyl methane 임을 확인하였다(Table 7).

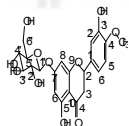


Table 6. NMR spectroscopic data^{a)} for hesperitin-7-O-glucose

position	δ_c	position	δ_c
2	78.6	1''	101.8
3	43.8	2''	74.9
4	197.4	3''	78.6
5	163.9	4''	71.2
6	97.9	5''	79.3
7	166.7	6''	62.5
8	96.8	OCH ₃	56.3
9	164.7		
10	104.6		
1'	132.6		
2'	115.5		
3'	149.7		
4'	149.3		
5'	112.6		
6'	118.4		

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in pyridin-*d*₅ solution at 400 and 100 MHz, respectively

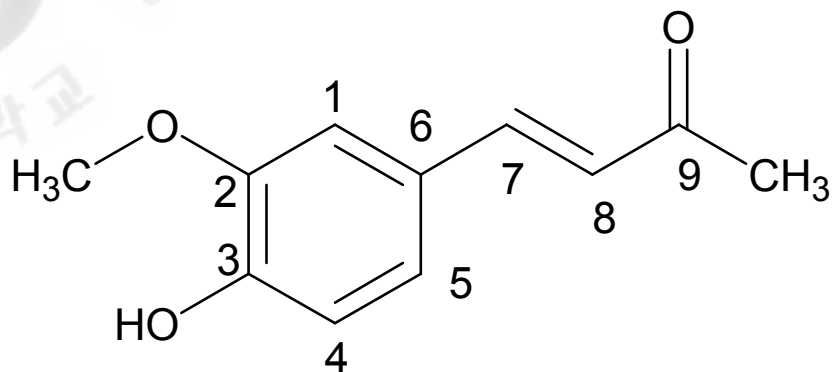


Table 7. NMR spectroscopic data^{a)} for feruloylmethane

position	δ_c
1	109.8
2	147.9
3	145.1
4	112.3
5	121.3
6	127.2
7	142.5
8	124.7
9	197.6
CH ₃	26.7
OCH ₃	55.2

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in chloroform-*d* solution at 400 and 100 MHz, respectively

IV. 고찰

감귤 과피에 포함되어 있는 다량의 flavonoid 및 flavonoide에 포함되어 있는 정유성분은 감귤의 다양한 효능을 구명하는데 있어서 매우 중요한 물질로 익히 알려져 있다. 하지만 과피에 함유되어 있는 대표적 flavonoid인 naringin, hesperidin 등은 대부분 당과 결합된 배당체 형태로 존재하기 때문에 aglycone 형태인 naringenin 및 hesperitin에 비하여 생리활성이 떨어진다고[22]. 따라서 본 연구에서는 발효 미생물 *A. niger*를 이용하여 배당체 형태인 flavonoid 화합물들을 aglycone 형태로 전환함과 동시에 유효 성분의 탐색을 통하여 기능성 향상의 효율성을 증대시키고자 하였다. 또한, 감귤류 과피 정유성분은 항산화, 항염 및 항균 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되어 있다[32, 42, 45]. 하지만 본 연구에서는 아직 보고된 바가 없는 세토카 정유성분에 대한 활성을 온주밀감과 비교하여 확인하였다.

감귤류 과피 정유성분은 상쾌한 향뿐만 아니라 중추신경 흥분억제기능이 알려져 있으며 또한 인체에 무해하기 때문에 향수, 방향제, 방부제 등으로 화장품과 식품산업 등에 널리 사용되고 있다[43]. 이러한 감귤류의 정유성분은 *d*-limonene이 70~90% 이상 차지하며, 강력한 항균활성을 갖고있다[5]. 이를 바탕으로 다양한 감귤류 정유성분의 항균활성이 보고되어 있지만, 아직 보고되지 않은 세토카의 정유성분에 대하여 항균실험을 진행하였다. 그 결과 온주밀감과 세토카 과피 모두 식중독 유발균 *L. mono* 및 여드름 유발균 *P. acnes*에서 전반적으로 좋은 억제반응을 보였고 특히, 세토카 미숙과피에서는 기존 온주밀감보다 좋은 항균활성을 보였다. 이는 감귤류에 공통적으로 함유되어 있는 limonene 성분에 의한 기본적인 활성 이외에 terpene, sesquiterpene 등 다양한 성분들이

품종 · 성숙도 · 수확시기 · 재배지역 등에 따라서 그 조성이 달라지기 때문에 시료 별 활성의 차이를 보인 것으로 사료된다.

또한, 우리 몸이 산화스트레스(Oxidative stress)를 받으면 세포 내에서 xanthine oxidase, NADPH oxidase 및 COX 등과 같은 효소들에 의하여 superoxide, hydroxyl radical 등과 같은 활성 산소종(ROS)를 생성한다[44]. 생체는 항상성 유지를 위해 산화(prooxidant)와 항산화(antioxidant) 작용들이 균형을 이루고 있으며, 이러한 균형이 깨져 산화의 영향이 커졌을 경우 산화에 의하여 세포에 여러 유해작용을 나타나게 된다[39]. 이는 염증반응도 크게 관여한다고 알려져 있다[38, 40]. 이에 따라 radical 소거능이 뛰어난 천연물에 대한 관심이 높아지고 있고 또한 항산화 효과와 더불어 항염 효과를 확인하는 데에 활발한 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서 온주밀감과 세토카 정유성분의 radical 소거능(DPPH)을 측정해 본 결과 세토카 미숙과 > 세토카 완숙과 > 온주밀감 순으로 우수한 radical 소거능을 보였으며 이는 향후 세토카의 기능성 연구에 좋은 자료로 활용될 것이라 사료된다. 또한, 미생물 발효를 통한 추출물의 radical 소거능(DPPH, superoxide anion)을 측정해 본 결과, 발효 전 추출물에 비하여 발효 후 추출물이 현저하게 radical을 감소시킴을 확인하였다. 이는 발효를 통하여 flavonoid의 형태가 전환됨에 따라 항산화 활성이 증가한 것으로 사료된다.

감귤에 함유되어 있는 hesperidin 또는 naringin 은 항산화 활성과 더불어 항염 활성을 갖고 있다고 보고되어 있는데[28, 33], 본 연구를 통해 추출된 감귤 과피 발효물 또한 항산화 활성과 더불어 항염증 실험 결과에도 좋은 결과를 보였다. 대식세포는 LPS 로 자극시키면 다양한 염증인자들이 증가되는데[34], 이에 추출물을 처리함으로써 유의성 있게 염증인자들을

감소시킴을 확인하였다. 감귤 과피의 항 염증 효과[28]는 보고된 바와 같이 농도의존적으로 활성을 나타냈다. 하지만 발효를 실시하여 얻은 물질이 기존 과피 추출물보다 염증인자들을 효과적으로 감소시킴을 확인하였다. 특히, iNOS 에 의해 과잉 생산된 NO 는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진 시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[26]. 이러한 NO 생성은 LPS 단독 처리군에 비하여 발효물에 의하여 최대 80% 이상 감소되었으며, iNOS 단백질발현도 현저히 억제되었다. 또한 COX-2 는 염증반응에 깊이 관여하고 있는 PGE₂ 를 생성하는데[29] 이러한 COX-2 단백질발현의 경우에도 발효군 처리군에서 유의성 있게 감소됨을 확인하였고, 염증성 cytokine(TNF- α , IL-6)의 생성도 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

발효를 통한 활성의 차이를 확인하기 위하여 HPLC 를 통하여 발효 전 후의 추출물의 성분을 분석하였다. 감귤 과피에는 보통 hesperidin 의 함량이 가장 많이 차지하고 있는데[41], 본 연구에서 과피의 EtOAc 추출물을 분석해 본 결과 hesperidin 과 더불어 nari-rutin 의 함량도 많이 차지하고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 배양이 진행됨에 따라 점점 감소하는 경향을 보였으며, 5 일 후 배양이 종료되었을 때에는 neohesperidin 의 함량이 급격하게 증가해 있었고, 표준물질 외의 두 물질로 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 미생물 발효로 인하여 물질 성분의 변화가 이루어짐에 따라 활성의 차이를 보였으며, 이는 flavonoid 형태가 미생물에 의해 당이 떨어진 형태로 변환됨으로써 활성의 증가가 이루어진 것으로 사료된다[37]. 표준물질 외에 새로 생성된 물질을 분리하여 구조를 확인해본 결과, hesperidin 구조에서 mannose 가 떨어져 나간 hesperetin-7-O-glucose 와, 강황의 색소성분 curcumin 의 기본구조인

feruloylmethane 임을 확인하였다. 이러한 결과로 향후 두 가지 단일물질의 다양한 활성 확인과 더불어 염증억제 작용기전 확인을 위한 자료로도 활용 가능할 것으로 사료된다.




V. 결 론

본 연구에서 감귤 과피 정유성분 및 발효물의 생리활성 확인을 통하여 다음의 결과를 얻었다.

온주밀감과 세토카 정유성분으로부터 우수한 항산화 및 항균효과가 있음을 확인하였고 특히, 세토카 미숙과피에서 가장 높은 활성을 보였다.

또한, 감귤 과피 발효물은 radical 및 염증인자(NO, iNOS, COX-2, 염증성 사이토카인)들을 효과적으로 억제시켜 항산화 및 항 염증 효과를 보였다. 발효 전 후 추출물의 성분 분석을 실시한 결과, 감귤 flavonoid 성분 이외의 두 가지 단일 물질의 생성을 확인하였고, 이는 hesperidin 구조에서 mannose가 떨어져 나간 hesperetin-7-O-glucose와, 강황의 색소성분 curcumin의 기본구조인 feruloyl methane 이었다.

이러한 결과로 감귤 정유성분, 발효물 등 감귤을 주 원료로 하는 생명공학제품들이 다양한 질환의 예방과 완화대책에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.



VI. 국 문 요 약

제주에서 생산량이 가장 많은 과수인 감귤은 가공용으로 많은 양이 소비되고 있다. 가공 후 발생하는 부산물은 감귤 수확 후 짧은 기간 동안 막대한 양이 되는데 이를 처리하기 위해 드는 비용 때문에 대부분 자연에 투기하거나 방치시키는 실정이다. 이러한 가공 부산물을 효율적으로 처리하기 위하여 여러 분야에서 다양한 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 감귤 과피에서 추출한 정유성분의 항산화 및 항균활성, 과피 발효 추출물의 항산화 및 항염 활성 확인을 통한 새로운 기능성 소재로서의 활용 가능성을 검토하고자 하였다.

먼저, 온주밀감(*C. unshiu*)의 완숙과와 세토카(천혜향®, [*Citrus unshiu* x *Citrus sinensis*] x *Citrus reticulata*) x [*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*])의 미숙과, 완숙과 과피의 정유성분을 각각 추출하였다. ESR을 통한 항산화 활성(DPPH radical)은 세토카 미숙과가 가장 좋은 활성을 나타내었다. Paper disc diffusion 법에 의한 항균활성은 식중독 유발균 *Listeria monocytogen* 및 여드름균 *Propionibacterium acnes*에 대하여 우수한 항균활성을 보였고 특히, 세토카 미숙과에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다.

두 번째 연구로는 감귤 과피를 이용하여 발효를 실시하고, 발효 후 추출물의 생리활성 변화를 확인하였다. 분말화시킨 온주밀감 과피를 열수추출 한 후, *Aspergillus niger* 를 첨가하고 5일간 진탕 배양하여 ethyl acetate로 추출하였다. 대조군으로는 *A. niger* 첨가 전, 열수 추출한 과피를 ethyl acetate로 추출하였다. 항산화 활성(DPPH, superoxide anion radical)을 ESR을 통하여 측정한다.

결과 발효 후 추출물이 발효 전 추출물에 비하여 농도 의존적으로 우수한 활성을 나타내었다. 또한, LPS로 자극시킨 RAW264.7 macrophage cell을 이용하여 추출물의 항염 효과를 확인하였다. 발효 후 추출물이 발효 전 추출물보다 NO(Nitric Oxide) 생성이 유의하게 감소하였으며, iNOS와 COX-2 단백질발현도 발효 후 추출물이 유의성 있게 감소하였다. Pro-inflammatory cytokine인 TNF- α 와 IL-6 생성 또한 발효 후 추출물에서 억제효과를 보였다. HPLC를 통한 발효 전·후 추출물의 성분분석 결과 발효 후 neohesperidin의 양이 현저히 증가하였고, 발효 전에는 없었던 hesperetin-7-O-glucose와 feruloyl methane이 새로 생성됨을 확인하였다. 많은 양이 증가되었던 neohesperidin을 실험해 본 결과 크게 활성을 띄지 않았으므로 새로 생성된 단일물질에 대한 추가적인 실험을 통하여 항염증 작용기전을 확인해 볼 수 있을 것으로 기대한다.

본 연구 결과와 더불어 감귤 과피 등의 부산물을 기능성 도출 및 증대는 제주도 감귤의 새로운 활용방안으로 기대될 것이다.

VII. 참고 문헌

1. **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-methylglutaryl CoA reductase and acyl CoA: Cholesterol transferase are lower in rat fed Citrus peel extract on a mature of citrus bioflavonoids. *J Nutr* 1999, **129**, 1182-1185.
2. **Chung SK, KIM SH, Choi YH, Song EY, Kim SH.** Status of citrus fruit production and view of utilization in Cheju. *Food Industry and Nutrition* 2000, **5**, 42-52.
3. **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* 1996, **28**, 371-377.
4. **Han SS, You IJ.** Studies on antimicrobial activities and safety of natural naringin in Korea. *Kor J Mycol* 1988, **16**, 1-8.
5. **IM HS, YOON CH, OH EH.** A study on the antibiotic effect using the *d*-limonene oil extracted to wasted mandarin peels in Cheju. *J of the Korean Oil Chemists* 2009, **26**, 350-356.
6. **Jung WS, Park SW, Chung SK.** The antioxidative activity of Korean Citrus unshiu peels. *Foods Biotechnol* 1997, **6**, 292-296.
7. **Kamiya Esaki S.** Recent adnaces in the chemistry of the citrus flavonoids. *Nippn Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 1971, **18**, 38-48.
8. **Kang SK, Park HH, Lee JH, Lee YS, Kwon IB, Sung NK.** Citric acid fermentation from mandarin orange peel by *Aspergillus niger*. *Kor J Appl Microbiol Biocng* 1989, **17**, 510-518.
9. **Kawase M, Michibayashi N, Nakashima Y, Kurikawa N, Yagi K, Mizoguchi T.** Application of giutaraldehyde-crosslinked chitonsan as a scaffold for hepatocyte attachment. *Bio Pharm Ball* 1997, **20**, 708.
10. **Kim BK, Cha JY, Cho YS.** Effects of citrus flavonoid, hesperidin and naringin on lipid metabolism in HepG2 cells. *Korean J Life Sci* 1999, **9**, 382-388.
11. **Kim HJ, Bae KH, Lee HJ, Eun JB, Kim MK.** Effect of hesperidin extracted from tangerine peel on Cd and lipid metabolism, and antioxidative capacity in rats. *Korean Nutr Soc* 1999, **32**, 137-149.
12. **Kim JH, Kim MK.** Effect of different part of mandarin intake on antioxidative capacity in 15-month-old rats. *Korean J Nutr* 2003, **36**, 559-569.

13. **Kim YD, Ko WJ, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH.** Composition of Flavonoids and Antioxidative Activity from Juice of Jeju Native Citrus Fruits during Maturation. *Korean J Nutr* 2009, **42**, 278-290.
14. **Kudo T, Saga N.** Development of a simple method for antibiotic susceptibility testing in algae using paper disks. *Nippon Suisan Cakkaishi* 1990, **56**, 455-461.
15. **Kurowska EM, Borradaile NM, Spence JD, Carroll KK.** Hypocholester-olemic effects of dietary citrus juice in rabbits. *Nutr Res* 2000, **20**, 121-129.
16. **Langer S, Wise DL.** Medical Applications of Controlled Release. CRC Press 2004, **2**,
17. **Lee CH, Kang YJ.** HPLC analysis of some flavonoids in citrus fruits. *Korean J Postharvest Sci Technol* 1997, **4**, 181-187.
18. **Lee HY, Seog HM, Nam YJ, Chung DH.** Physico-chemical properties of Korean mandarin (*Citrus reticula*) orange juice. *Korean J Food Sci Technol* 1987, **19**, 338-345.
19. **Lee JH, An HJ, Lee SY, Choi YH, Lim BS, Kang YJ.** Changes in Quality Characteristics of 'setoka' (*Citrus spp.*) Using Different Storage Methods. *Korean J Food Preserv* 2009, **16**, 644-649.
20. **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 Radic Biol Med* 1996, **21**, 885-902.
21. **Oryton AC, Monteriro Jr, Airoidi C.** Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *Inter J Bio Macro* 1999, **26**, 119.
22. **Park JC, Yu YB, Lee JH.** Isolation and Structure Elucidation of Flavonoid Glycosides from *Lindera obrusiloba* BL. *J Korean Soc Food Nutr* 1996, **25**, 76-79.
23. **Piddock LJV.** Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J Appl Bacteriol* 1990, **68**, 307-312.
24. **Rhyu MR, Kim EY, Bae IY, Park YK.** Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits. *Korean J Food Sci Technol* 2002, **34**, 132-135.
25. **Rosen HB, Chang J, Wnek GE, Linhardt RJ, Langer R.** Bioerodible polyanhydrides for controlled drug delivery. *Biomaterials* 2004, **4**, 131.
26. **Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS.** Isolation, purification and hypotensive effects of bioflavonoids in Citrus peel extracts. *Food Soc Biotechnol* 1992, **15**, 357-362.
27. **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 1998, **30**, 306-312.

28. **Sood S, Arora B, Bansal S, Muthuraman A, Gill NS, Arora R, Bali M, Sharma PD.** Antioxidant, anti-inflammatory and analgesic potential of the *Citrus decumamna* L. peel extract. *Inflammopharmacology* 2009, **17**, 267-274.
29. **Yoon CH, Jwa SM.** Isolation of anti-tumor promoters from citrus peels. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2006, **49**, 25-29.
30. **Yoon WJ, KIM SS, OH TH, LEE NH, HYUN CG.** *Cryptomeria japonica* Essential Oil Inhibits the Growth of Drug-Resistant Skin Pathogens and LPS-Induced Nitric Oxide and Pro-Inflammatory Cytokine Production. *Polish Journal of Microbiology* 2009, **58**, 61-68.
31. **Axtelle T, Pribble J.** IC14, a CD14 specific monoclonal antibody, is a potential treatment for patients with severe sepsis. *Journal of endotoxin research* 2001, **7**, 310-314.
32. **Chalova V. I., Crandall P. G., Ricke S. C.** Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless Valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents. *Journal of the science of food and agriculture* 2010, **90**, 870-876.
33. **Galati E. M., Monforte M. T., Kirjavainen S., Forestieri A. M., Trovato A., Tripodo M. M.** Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco* 1994, **40**, 709-712.
34. **Isowa N., Keshavjee S. H., Liu M.** Role of microtubules in LPS-induced macrophage inflammatory protein-2 production from rat pneumocytes. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2000, **279**, L1075-1082.
35. **Kim JY, Jung KS, Jeon HG.** Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS letters* 2004, **569**, 321-326.
36. **Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E.** Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current drug targets Inflammation and allergy* 2005, **4**, 471-479.
37. **Lentini A., Forni C., Provenzano B., Beninati S.** Enhancement of transglutaminase activity and polyamine depletion in B16-F10 melanoma cells by flavonoids naringenin and hesperitin correlate to reduction of the in vivo metastatic potential. *Amino acids* 2007, **32**, 95-100.
38. **Liang Y. C., Huang Y. T., Tsai S. H., Lin-Shiau S. Y., Chen C. F., Lin J. K.** Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999, **20**, 1945-1952.
39. **Lin C. Y., Peng C. Y., Huang T. T., Wu M. L., Lai Y. L., Peng D. H., Chen P. F., Chen H. F., Yen B. L., Wu K. K., Yet S. F.** Exacerbation of Oxidative Stress-induced Cell

- Death and Differentiation in Induced Pluripotent Stem Cells Lacking Heme Oxygenase-1. *Stem cells and development* 2011,
40. **Lin Y. L., Lin J. K.** (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Molecular pharmacology* 1997, **52**, 465-472.
 41. **McCord J. M.** Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974, **185**, 529-531.
 42. **Mizrahi B., Shapira L., Domb A. J., Hourri-Haddad Y.** Citrus oil and MgCl₂ as antibacterial and anti-inflammatory agents. *Journal of periodontology* 2006, **77**, 963-968.
 43. **Mwaiko G. L.** Citrus peel oil extracts as mosquito larvae insecticides. *East African medical journal* 1992, **69**, 223-226.
 44. **Panickar K. S., Anderson R. A.** Effect of polyphenols on oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neuronal death and brain edema in cerebral ischemia. *International journal of molecular sciences* 2011, **12**, 8181-8207.
 45. **Takahashi Y., Inaba N., Kuwahara S., Kuki W.** Antioxidative effect of citrus essential oil components on human low-density lipoprotein in vitro. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2003, **67**, 195-197.
 46. **Tezuka Y., Irikawa S., Kaneko T., Banskota A. H., Nagaoka T., Xiong Q., Hase K., Kadota S.** Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *Journal of ethnopharmacology* 2001, **77**, 209-217.
 47. **Tsai S. H., Lin-Shiau S. Y., Lin J. K.** Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *British journal of pharmacology* 1999, **126**, 673-680.
 48. **Tsatsanis C., Androulidaki A., Venihaki M, Margioris A. N.** Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2006, **38**, 1654-1661.
 49. **Weisz A, Cicatiello L, Esumi H.** Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *The Biochemical journal* 1996, **316 (Pt 1)**, 209-215.
 50. **Willoughby D. A.** Heberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Annals of the rheumatic diseases* 1975, **34**, 471-478.