



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

꽃굴의 지역, 크기, 채집시기에 따른
지표분석과 항산화 활성 및 항염 효과

濟州大學校 大學院

食品營養學科

玄壽美

2021年 12月

꽃밭의 지역, 크기, 채집시기에 따른 지표분석과 향산화 활성 및 항염 효과


指導教授 姜 仁 慧

玄 壽 美


이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2021年 12月

玄 壽 美의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 이 원 경 

委 員 강 인 희 

委 員 홍 기 배 

濟州大學校 大學院

2021年 12月

Antioxidant and anti-inflammatory activity from
extracts from premature mandarin according to
the region, size and the picking time

Sumi Hyeon

(Supervised by Professor Inhae Kang)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

2021. 12.

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE & NUTRITION

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

Contents

ABSTRACT

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

I .서론	01
II. 이론적 배경	03
1. 활성산소	03
2. 염증	03
3. 꽃굴	05
III. 실험 재료 및 방법	06
1. 실험재료	06
2. 시료의 준비	06
3. 실험방법	07
1) 이화학적 특성	07
(1) Hesperidin 지표 성분 설정 및 분석	07
(2) TPC (Total polyphenol content) 함량 측정	07
2) 항산화 효과	08
(1) DPPH radical 소거 활성 측정	08
3) 세포배양 및 NO 활성 저해 효과 측정	08

(1) 세포 배양	08
(2) 세포 독성 평가(MTT)	08
(3) NO 활성 저해 측정	08
4. 통계처리	09
IV. 결과 및 고찰	10
1. 이화학적 특성	10
1) hesperidin 지표 성분 설정 및 분석 결과	10
2) TPC (Total polyphenol content) 측정 결과	21
2. 항산화 효과	25
1) DPPH radical 소거 활성 측정 결과	25
3. 세포 배양 및 NO 활성 저해 효과	29
1) 세포 배양	29
2) 세포 독성 평가 (MTT assay) 결과	29
3) NO 활성 저해 결과	36
V. 요약 및 결론	42
VI. 참고 문헌	44

Abstract

Antioxidant and anti-inflammatory activity from extracts from
premature mandarin according to the region, size and the
picking time

Sumi Hyeon

The purpose of this study was to examine the antioxidant activity and anti-inflammatory effect according to the region, size, and the picking time of Premature Mandarins(PM).

A PM which is an unripe fruit of tangerine, has higher contents of polyphenol and flavonoids such as hesperidin, rutine, etc., than that of a ripe mandarin and it contains a lot of dietary fiber and organic acids, etc., and has a high antioxidant effect.

In our study, the PMs were picked in July and August, in Aewol and Namwon region and were classified by its sizes. The peels, Citrus Unshius Pericarpium (CUP), of the PMs purchased in September were extracted with 50% ethanol and with this sample, the hesperidin content, antioxidant and anti-inflammatory effect were comparatively analyzed. The content of hesperidin in the PMs were 3.46, 2.96, 2.62, 1.68, 1.58, 1.96, and 1.56% and a slight increase in its level in 5~6cm and 6~7cm, however; it was seen that the hesperidin content level decreased as the picking time was delayed and the size increased. The differences by regions showed a similar level. The Total Polyphenol Content(TPC) levels were 54.0, 41.4, 37.8, 29.5, 23.2, 22.9, and 19.3 mg GAE/g and this appeared to be decreasing as the picking time

delayed and the size increased, and there were no differences in regions. The TPC of CUP was 25.0mg GAE/g and it was confirmed to be lower than PM. The DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activities were 67.1, 60.9, 46.7, 41.8, 33.3, 27.4, and 35.8% and as the picking time was delayed and the size increased, the DPPH radical scavenging activity was seen to be decreasing. There were no regional differences. The PMs of September showed 35.8% which was higher than those of August and it was a smaller number than that of 4-5cm sized ones of August and as the picking time is delayed, it can be said that the DPPH radical activity decreased. The DPPH radical scavenging activity in the CUP extract was 28.1% and it was confirmed to be lower than PM. Lastly, in order to examine the effect of NO(Nitric Oxide) inhibitory, PM's MTT assay cytotoxicity was tested and all samples were found to be non-toxic up to 400µg/ml. In addition, the results of the NO inhibitory effect were 17.91, 14.70, 13.19, 10.19, 6.93, and 2.26% and it tended to decrease as the picking time was delayed and the size decreased. It was confirmed that no regional differences were seen in all of hesperidin, total polyphenols, DPPH radical scavenging activity, and NO activity inhibitory effects.

Although there is no regional differences in PM, we have found the smaller size and earlier the picking time, the more antioxidant and anti-inflammatory effects than CUP.

LIST OF TABLES

Table 1. Condition of HPLC for analysis of hesperidin

Table 2. Condition of HPLC for analysis of hesperidin

Table 3. Content of hesperidin for premature mandarin

Table 4. Total polyphenol content of premature mandarin

Table 5. DPPH scavenging activity of premature mandarin

Table 6. Inhibition of nitric oxide production by premature mandarin in RAW
264.7 cells

LIST OF FIGURES

- Figure 1. HPLC chromatograms of standard mixture and Citrus Unshiu pericarpium
- Figure 2. HPLC chromatograms of premature mandarin
- Figure 3. HPLC chromatograms of standard hesperidin
- Figure 4. HPLC chromatograms of standard naringin
- Figure 5. UV Spectrum compared with hesperidin and premature mandarin
- Figure 6. HPLC chromatograms of hesperidin for premature mandarin
- Figure 7. Total polyphenol content of premature mandarin
- Figure 8. DPPH scavenging activity of premature mandarin
- Figure 9. Cell viability of extract from premature mandarin in RAW 264.7 cells.
- Figure 10. Effect of extract from premature mandarin on the NO production of macrophage cell (RAW 264.7)
- Figure 11. Inhibition of nitric oxide production by premature mandarin in RAW 264.7 cells

I. 서론

감귤은 운향목 운향과(Rutaceae) 감귤속(Citrus)에 속하는 식용식물로 다양한 생리활성 물질을 함유 하고 있으며 과육 보다 과피 에 생리 활성 물질들이 많이 함유 되어 있다고 보고된다. [1] 감귤 대부분은 제주에서 재배 하며 전국 생산량의 99.9%를 차지한다. 제주에서는 감귤산업의 경쟁력 강화 및 품질의 고급화를 위하여 매년 8~10월에 약 5~10만톤 의 풋귤을 폐기하는 수상적과를 실시하고 있으며 폐기 되는 풋귤들이 주변 환경을 오염시키는 요인으로 작용한다고 알려져 있다. [2] 감귤은 다른 과일에 비해 고유한 색, 풍부한 과즙을 가지고 있으며 [3] 감귤에는 60여종 이상의 flavonoid 구조가 밝혀져 있으며 naringin, hesperidin, nobilitin 에 대한 효능이 밝혀져 있고 flavonoid, Vitamin C, 구연산과 같은 기능성 물질을 함유 하고 있어 항산화, 항염증, 알콜성 간질환 과 같은 효과를 갖는다. [4][5] 또한 감귤 과피에 식이섬유가 다량 함유 되어 있어 cadmium 투과 억제 능력과 간지질 함량을 낮추는 효과를 가지고 있으며 혈중 콜레스테롤 저하 및 중금속 해독 기능 등과 같은 성질을 갖고 있다고 보고 되고 있다. 감귤 과피에 함유 되어 있는 식이섬유는 주로 pectin으로 성숙과 저장중에 변화 된다고 보고 되었다.[2] 감귤의 미숙과인 풋귤은 제주특별자치도 감귤생산 및 유통에 관한 조례에 따라 농약 안전사용 기준을 준수하여 감귤의 기능성 성분을 이용할 목적으로 제주특별자치도지사가 정한 날짜까지 출하하는 노지감귤의 미숙과이며 제주지역에서 2월 녹색에서 3~4월 노란색으로 착색되는 재래종 풋귤과는 다른 품종으로 구분된다.[6] 풋귤일때 완숙과보다 polyphenol과 hesperidin, naringin, rutin등의 flavonoids 함량이 높은 것으로 알려져 있으며 식이섬유, 유기산도 많이 함유 되어 있으며 [7] elastase, tyrosinase 저해 효과가 우수 하며 높은 항산화 효과로 건강식품 개발 가능성이 있다고 보고되었다.[8]

인체 내에는 산화를 촉진하는 물질과 억제하는 물질이 서로 평형을 이루고 있으나, 물질의 균형 상태가 무너지면 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 과다 생성된다. ROS는 에너지를 생성 하기 위하여 체내 세포호흡 과정에서 필연

적으로 생성되거나 스트레스, 흡연 등 외부적 요인에 의해 생성된다. 과도한 ROS의 축적은 DNA 변형 등을 초래하여 세포와 반응하여 조직내에 치명적인 손상을 입혀 염증, 노화, 암과 같은 여러 가지 질병들의 원인이 된다. [9] 이에 생체 내에서 ROS가 과도하게 생성되는 것을 억제 하기위하여 butylated hydroxy anisole(BHA), butylated hydroxy toluene(BHT) 과 같은 합성 항산화제가 개발 되었으나 그 자체가 독성을 나타내고 과량 섭취할 경우 여러 가지 부작용과 발암성이 발견되어 사용을 자제하고 있으며 합성 항산화제를 대체하기 위하여 항산화 효과가 높으며 인체에 무해한 과일, 채소 등에서 유래한 천연 항산화 물질에 대한 개발이 요구 되고 있다.[10] 과채류 등 식물체에는 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물이 많이 함유되어 있어 항염 및 항산화 효과를 가진다고 주목받고 있다. [7]

염증반응은 체내에 바이러스나, 세균, 박테리아, 물리적 자극, 화학적 자극 등의 유해물질의 유입에 대한 생체의 방어 반응으로 체내의 면역 세포가 염증 매개 물질들을 분비하며 손상된 조직을 정상 상태로 복구 하려는 기전이다. [11] 이러한 염증 반응이 장기적으로 지속될 경우 신경성 퇴행성질환과 같은 각종 만성질환과 암등이 발병한다.[12] 흡연이나 음주, 고지방 식이로 인한 비만 등은 염증 반응을 유발하는 다른 하나의 원인으로 체내에서 생산되는 산화적 스트레스를 증가시켜 염증 반응을 유발하여 만성 질환을 일으킨다. [13] 항산화 효과가 뛰어난 물질의 섭취는 산화적 스트레스를 감소 시키기 때문에 염증반응 저해에 도움을 준다고 보고 된다.[14][15] 현재 염증 질환 치료제로서 사용하는 항염증제는 대부분이 스테로이드 및 비스테로이드 성이며 이와 같은 항염증제들은 장기간 복용 시 위염, 신장염, 신장질환 등의 부작용의 위험이 크기 때문에 이를 대체할 천연물 유래 항염증제제의 개발이 활발히 연구되고 있다.[16]

따라서 본 연구에서는 꽃굴을 지역, 크기, 채집시기로 구분하였으며, 구분한 꽃굴, 9월 구입한 꽃굴과 진피를 50% EtOH 추출물을 제조하여 Hesperidin함량, 항산화 및 항염효과를 비교 분석하여 꽃굴의 기능성 식품 원료 소재로서의 가능성을 확인하고자 한다.

II. 이론적 배경

1. 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)

활성산소(Reactive oxygen species, ROS)는 superoxide anion, peroxy radical, hydroxyl radical 등 여러종류의 free radical로 이루어져있다. ROS는 동물 식물 내의 체내 세포들이 대사과정에서 생성되는 산화화합물로 현대인의 질병인 동맥경화, 암 등의 원인과 노화의 원인으로 주목되고 있다. ROS는 세포 호흡 과정중에 생성되는 부산물로 강력한 산화력을 지니며[17] 과잉된 ROS는 세포구성성분인 DNA, 단백질 등에 산화적 손상을 일으켜 세포의 정상적인 대사를 저해 하여 조직내에 치명적인 손상을 입혀 염증, 노화, 암과 같은 여러 가지 질환의 원인이 된다.[8] 산화스트레스는 대식세포를 활성화 시키고 염증 사이토 카인의 분비를 촉진시킴으로서 염증반응을 악화시킨다. 악화된 염증 반응은 ROS를 다시 생성하여 산화스트레스를 증가, 이와같은 악순환으로 이루어지며 이는 항산화 활성과 염증과 밀접한 관련이 있다고 보고 된다.[18] 생체 내 항산화 방어 시스템을 증가시키거나 ROS를 조절 할 수 있는 합성 항산화제로는 Butylated hydroxy toluene(BHT), butylated hydroxy anisole(BHA) 등이 있었으나 생체효소,지방의 변이 및 독성으로 인체에 암을 유발 할 수 있어 flavonoid, tocopherol, ascorbic acid과 같은 천연유래 항산화제에 대한 연구가 진행되고 있으며[9] 최근 천연물 유래의 항산화제를 개발 연구 하는 추세로 변하고 있다. [19]

2. 염증(Inflammation)

염증(Inflammation)은 체내에 바이러스나, 세균, 박테리아, 물리적 자극, 화학적 자극 등의 유해물질의 유입에 대한 생체의 방어 반응으로 세포 내 다양한 염증 조절 인자들이 매개체로 관여 한다. 염증 반응은 염증으로 인하여 발생된 물리적 조직 손상등으로부터 인체를 보호 하기 위한 1차적 면역 반응 이지만, 염증반응이 과해지면 류마티스, 동맥경화증, 다발성 경화증을 유발하는 원인이 된다.[20]

염증은 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 전염증성 사이토카인들에 의해 유발되며 [21] IL-1 β (interlukin-1 β), TNF- α (tumor necrosis factor- α)는 염증반응 초기에 분비되는 염증 유발 인자로 IL-6(interlukin-6)의 사이토카인을 생성해 염증을 유발한다.[22] 염증반응에 관여하는 대표적인 세포는 대식세포(macrophage)로 여러 종류의 숙주 반응에 관여하여 숙주의 방어와 항상성 유지에 관여하며[23] 자극이나 면역세포들이 분비하는 사이토카인 등에 의해 활성화 되어 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), proinflammatory cytokine를 생성하여 통증, 발열 등의 염증반응을 유발하고, 염증 유발 부위로 면역 세포의 이동을 촉진 시킨다. [24] 대식세포가 세포외막에 존재하는 내독소로 알려진 LPS(lipopolysaccharide)의 자극을 받으면 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 전염증성 사이토카인의 다량 분비를 유도시킨다.[21] 이런 염증 매개 물질의 생성은 arachidonic acid가 cyclooxygenase(COX)의 작용을 거쳐 prostaglandin(PG)으로 바뀌는 과정 및 nitric oxide(NO)의 대량 생성 과정으로 이어진다.[25] 체내 염증 과정에서는 과량의 NO 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증 인자가 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase(COX-2)에 의해 형성된다.일반적인 NO의 형성은 종양을 제거하거나 박테리아를 죽이는 역할을 하지만[26] 염증 상태에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 다량으로 생성되는 NO는 염증 매개 물질의 생합성을 촉진함으로써 염증을 악화시켜 신경손상, 조직손상, 유전자변이를 일으킨다고 알려져 있다.[27] 지속적인 염증 반응은 nitric oxide(NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α)등 과도한 염증 매개 물질의 분비로 인해 점막손상을 촉진하고 과민성 알러지 질환, 만성염증, 암 등과 같은 다양한 질환을 일으킨다.[28][29] 염증은 기간에 따라 급성(acute)염증과 만성(chronic)으로 나눌수 있으며 급성 염증 반응은 주로 물리적이거나 외부에 의한 감염 등에 의해 일어나며 수분에서 수 시간 이내에 즉각적인 조직손상을 유발하며 만성은 급성에 비해 장기적이고 지속적으로 이루어지며[30] 단핵구나 대식세포(marcrophage) 등 면역세포의 조직으로서 침윤을 동반하는 특징을 가지고 있으며 조직의 파괴 및 치유 과정을 통하여 혈관신생이나 섬유화를 유발한다.[31][32]

3. 풋굴(Premature mandarin, PM)

감귤 대부분은 제주에서 재배하며 감귤산업의 경쟁력 강화 및 품질의 고급화를 위해 매년 8~10월에 약 5~10만톤의 풋귤을 폐기하는 수상적과를 실시하며 폐기되는 풋귤들이 주변 환경을 오염시키는 요인으로 작용한다고 알려져 있다.[2] 감귤의 미숙과인 풋귤은 제주특별자치도 감귤생산 및 유통에 관한 조례에 따라 농약 안전사용 기준을 준수하여 감귤의 기능성 성분을 이용할 목적으로 제주특별자치도지사가 정한 날짜까지 출하하는 노지감귤의 미숙과이며 제주지역에서 2월 녹색에서 3~4월 노란색으로 착색되는 재래종 풋귤과는 다른 품종으로 구분된다.[6] Flavonoid의 함량은 과실의 숙성에 따라 감소하며 [33] 풋귤일때 완숙과보다 polyphenol과 hesperidin, naringin, rutin등의 flavonoids 함량이 높은 것으로 알려져 있으며 식이섬유, 유기산도 많이 함유 되어 있다. [7] 또한 elastase, tyrosinase 저해 효과가 우수 하여 높은 항산화 효과로 건강식품 개발 가능성이 있다고 보고되었다.

Ⅲ. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 풋굴은 제주시 애월읍(애월읍 유수암리 478-1)과 서귀포시 남원읍(남원리 732)에서 2020년 7월과 8월에 채집하였다. 7월의 풋굴은 3cm미만, 3~4cm, 4cm 이상의 크기별로 분류를 하였고 8월의 풋굴은 4cm~5cm, 5~6cm, 6~7cm 의 크기별로 분류를 하였다. 분류한 풋굴들은 흐르는 물로 세척 한 후 절단 하였다. 절단 후 열풍건조기 에서 50℃, 48~72시간 동안 건조하였다.

2. 시료의 준비

풋굴 추출물의 성분분석과 항산화 활성 및 항염효과를 측정하기 위해 열풍건조한 풋굴 분말을 에탄올 정제수 1:1(v/v)의 비율로 혼합 50% 에탄올로 60℃에서 3시간 추출 하였다. 이를 2회 반복한 후 추출한 추출액을 filter paper(0.5µm, 47mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) 로 여과 하여 추출물을 제조하였다. 여과 된 추출물을 감압농축기(회사, 50℃)를 이용하여 용매 제거 후 수득된 추출물을 동결건조기(일신) 에서 건조분말 시료 제조 후 냉동고(-4℃, 53%, (주)유니크대성)에 저장하며 실험에 사용하였다.

3. 실험 방법

1) 이화학적 특성

(1) Hesperidin 지표성분 설정 및 분석

분석은 PDA 검출기로 구성된 (Waters Acquity H Class) UPLC 를 사용하였으며, 분석 Software는 Empower를 사용하였다. 분석용 컬럼은 YMC J'sphere ODS-H80 Column(4.6mm x 250mm, 4µm, 8mm, YMC) 을 사용하였고 Injection volume은 10µL, 유속은 1.0mL/min, 컬럼온도 25°C에서 분석되었다.

표준 물질 함량은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{표준물질 함량(\%)} = \frac{\text{표준용액(ug/mL)} \times \text{표준품순도} \times \text{시험용액 Area}}{\text{시험용액 (ug/mL)} \times \text{표준용액 Area}}$$

(2) TPC(Total polyphenol content)

꽃꿀 추출물의 총 폴리페놀 함량(TPC) 은 변형 된 Folin-Denis 방법[19]을 통하여 측정하였다. 증류수 90µl 와 시료 (10mg/ml) 10µl를 96well에 각 첨가한 후 Folin-ciocalteu's phenol reagent(SIGMA-ALDRICH)를 10µl를 가한 후 실온에서 3분간 반응 시켰다. 2M Na₂ CO₃ 용액을 반응물에 20µl를 첨가하고, 1시간 암소에서 반응시켰다. Micro plate reader (BIO-RAD)에 의해 실온에서 750nm에서 측정하였다. 이때 표준검량곡선에 사용한 표준물질은 gallic acid(SIGMA) 이고 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000% 의 농도로 측정하여 작성된 표준검량곡선으로부터 각 추출물의 polyphenol 함량을 환산하였다. 측정단위로는 GAE(gallic acid equivalent)/g을 사용하였다.

2) 항산화 효과

(1) DPPH free radical 소거능 측정

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 Blois의 방법[34]을 약간 변형하여 측정하였다. 일정 농도로 제조한 시험용액 100 μ l에 0.4mM DPPH(Alfa aesar) 용액 100 μ l를 가하여 섞은 뒤 암실에서 30분간 방치하였다. 흡광광도계는 (BIO-RAD)에 의해 실온에서 517nm에서 측정하였다. DPPH radical 소거 활성은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A : DPPH 흡광도 값 - MeOH 흡광도 값

B : Sample의 DPPH 반응 흡광도 값 - Sample과 MeOH 혼합 흡광도 값

3) 세포 배양 및 NO 활성 저해 효과

(1) 세포배양

본 실험에 사용된 세포주는 마우스의 대식세포인 RAW264.7 세포를 사용하였으며, 세포 배양을 위해 10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% penicillin 으로 조성된 Dulbecco's modified Eagle's medium(gibco) 배지를 사용하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건을 유지하여 배양하였고 2일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

(2) MTT assay에 의한 세포 독성 시험

세포의 독성 정도를 확인하기 위하여 MTT 시험법으로 측정하였다. 96well plate 에 1x10⁵ cells/well로 190 μ l씩 seeding하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 후 24시간 동안 배양 한 후 각 농도(0, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml)로 10 μ l씩 sample 처리하여 다시 24시간 배양하였다. 이후 암소에서 5mg/ml의 농도의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 50 μ l을 첨가하여 암소에서 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시킨후, 상등액을 제거하였다. 여

기에 DMSO(Biosesang) 200 μ l를 첨가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 Micro plate reader (BIO-RAD)에 의해 실온에서 540nm로 흡광도를 측정하여 세포 생존률(%)을 계산하였다. 모든 실험군은 3회 반복하였으며 세포 생존율은 아래의 식에 따라 계산 하였다.

$$\text{cell Viability(\%)} = \text{시료의 평균 흡광도} / \text{대조군의 평균 흡광도} * 100$$

(3) Nitric oxide(NO)양의 측정

96well plate에 1×10^5 cells/well로 180 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 후 cell 이 60~70% 자란 후 (24시간) 시료 (200 μ g/ml) 로 10 μ l를 sample 처리하여 1시간 이후 LPS(Lipopolysaccharides from Escherichia coli:O111:B4) (1 μ g/ml) 로 염증 유도 하고 incubation 하였다. 24시간 배양 한 후 세포 배양 상등액 100 μ l와 Griess reagent[1%(w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoricacid와 0.1%(w/v) naphthylethylenediamine-HCl]를 100 μ l씩 혼합하여 96well plate에서 10분동안 반응시킨후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium Nitrite(NaNO₂) 를 사용하여 standard curve를 작성하여 NO 측정에 사용하였다. 모든 실험군은 3회 반복하였다.

4. 통계처리

제주 풋귤(Premature mandarin, PM)의 지역, 크기, 채집시기에 따른 지표분석과 항산화 활성 및 항염효과의 실험 결과는 mean \pm S.E.M 으로 표현하였으며, 유의적 차이에 대한 해석은 ANOVA(Graphpad prism 7.0, La Jolla, CA, USA)를 사용하였다 . $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 그 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 이화학적 특성

1) Hesperidin 지표 성분 설정 및 분석

풋귤(Premature mandarin, PM)의 지표 물질을 설정하기 위하여 대한민국 약전 제 11개정 및 식품의약품안전평가원 생약연구과 진피(Citrus unshius pericapium, CUP) 한약재 품질 표준화 연구사업단 보고서[35]를 참고하여 PM의 Flavonoid의 분석법을 확립 및 지표성분을 수립하기 위하여 Table 1 과 같이 분석법 연구를 진행하여 식품의약품안전평가원 생약연구과 진피 한약재 품질 표준화 보고서의 크로마토그램 (Figure1) 와 PM의 크로마토그램(Figure .2)을 찍어 머무름 값 (RT)을 확인한 결과 peak1은 narirutin, peak 2는 hesperidin, peak3은 neoponsirin으로 유추 할 수 있다. 추가적으로 Hesperidin과 Naringin 표준품을 구매하여 분석한결과(Figure 3,4) Naringin 은 시험 물질 내 없는 것으로 확인되었고, peak2는 동일한 RT값 과 동일한 UV spectrum의 패턴이 일치하여 (Table. 2) hesperidin으로 확인 하였다. 진피 한약재 품질 표준화 보고서 및 대한민국 약전 내 지표성분을 참고하여 hesperidin을 지표성분으로 설정하였다. 원료의 기능/지표 물질 분석을 용이하게 하기 위하여 기존 패턴 분석법을 개량, hesperiein의 특이성을 유지한 채 분석시간을 단축하여 Table.3 과 같이 HPLC 분석법을 설정하여 지역 및 크기, 채집시기에 따른 PM의 성분분석을 하였고(Figure. 5) hesperidin 함량을 계산하였다.(Table. 4)

설정된 분석법으로 크기에 따라 Hesperidin의 함량 분석 결과 크기가 작을수록, 채집시기가 빠를수록 Hesperidin 함량이 높은 것을 확인(Figure. 5.) 하였으며 9월 시중 유통되고 있는 PM의 함량이 8월의 5~6cm 의 PM과 함량이 유사하게

나타나는 것으로 보아 채집시기가 빠를수록 hesperidin 함량이 높은 것을 확인할 수 있다.

류 등(2002)[36] 제주 재래종 감귤류 9종 미숙과의 hesperidin 함량을 측정 한 결과 9종 중 5종 (감자, 동정귤, 병귤, 빈귤 및 진귤)에서 hesperidin 함량이 2차 채취시(Aug, 31th) 1차 채취(Aug, 9th)한 시료에 비해 약 25~35% 까지 함량이 감소 하였다고 보고 하였으며 2차 채취 이후 숙성이 진행됨에 따라 함량이 점차 감소하여 마지막 채취 시(Oct, 29th)에는 초기의 약 45~64% 까지 감소하였다고 보고하였다. ‘사두감’에서는 hesperidin 함량이 2차 채취 한 시료에 비해 1차 채취 한 시료에서 68%까지 함량이 감소 하였으며 그 이후에는 마지막 채취 시까지 변화가 거의 없었다고 보고 하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 풋귤은 감귤의 미숙과로 완숙과 보다 높은 식이섬유, 유기산, 폴리페놀 및 플라보노이드 가 높다고 알려져 있으며[7] hesperidin은 Flavonoid의 한 종류로서 hesperidin 함량도 수확시기가 빠를수록, 크기가 작을수록 hesperidin의 함량이 높게 나타난 것으로 판단된다.

Lee 등(2021) [37]에서 항산화 활성을 나타내는 식물 소재에서 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 항산화 결과와 일치 하다고 보고 하였다. 앞선 본 연구결과에서 크기가 작을수록, 채집시기가 빠를수록, CUP보다 플라보노이드, 총폴리페놀 함량이 높으며 PM에 풍부하게 함유되어 있는 hesperidin 등 [Flavonoid]의 항산화 물질이 항산화 활성을 증가시킨 것으로 사료된다. [38]

Song 등 (1998) [39] 에 따르면 감귤은 성숙함에 따라 유리당이 증가하며 유기산의 함량은 감소하며 과즙과 과피내의 Flavonoid계 성분인 naringin과 hesperidin 함량은 과피에 월등히 많이 함유 되어 있으며 미숙과 일 때 함량이 높으며 착색이 진행 됨에 따라 점차적으로 감소한다고 보고 하였으며 Kang 등(2005)[2]에 따르면 감귤 과피에 함유되어 있는 식이섬유는 주로 pectin으로 성숙과 저장중에 변한다고 보고하였다.

Instrument	Waters Acquity H Class UPLC			
Detector	PDA detector			
Wavelength	280nm			
Column	YMC J'sphere ODS-H80(4.6mm × 250nm, 4μm, 8mm)			
Mobile phase	A : 0.1% H3PO4 in D.W B : 0.1% H3PO4 in ACN			
	Flow(mL/min)	Time(min)	A(%)	B(%)
	1.0	0.0	82.0	18.0
		20.0	82.0	18.0
		60.0	45.0	55.0
		70.0	0.0	100
		80.0	0.0	100
		81.0	82.0	18.0
90.0		82.0	18.2	
Injection Vol.	10 μL			
Temperature	25 °C			
Run Time	90 min			

Table. 1 Condition of HPLC for analysis of hesperidin

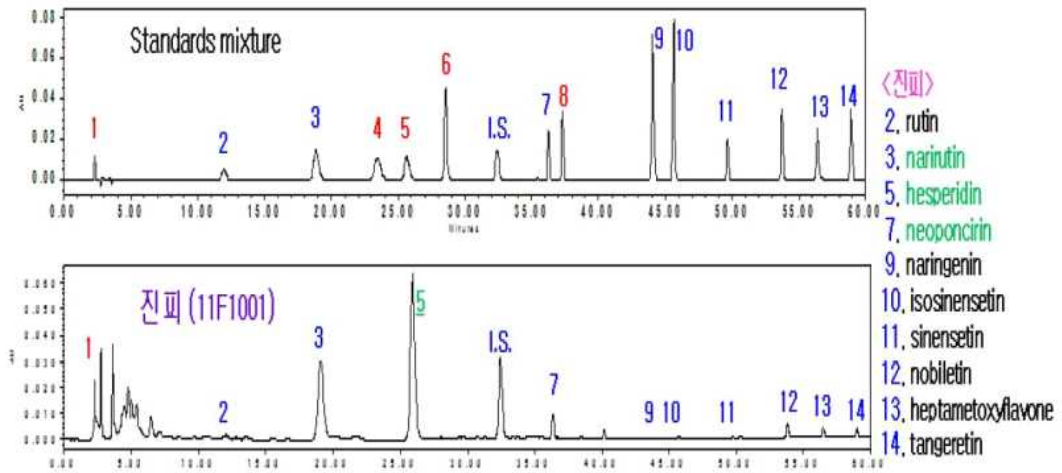


Figure 1. HPLC chromatograms of standard mixture and Citrus Unshiu Percaripium

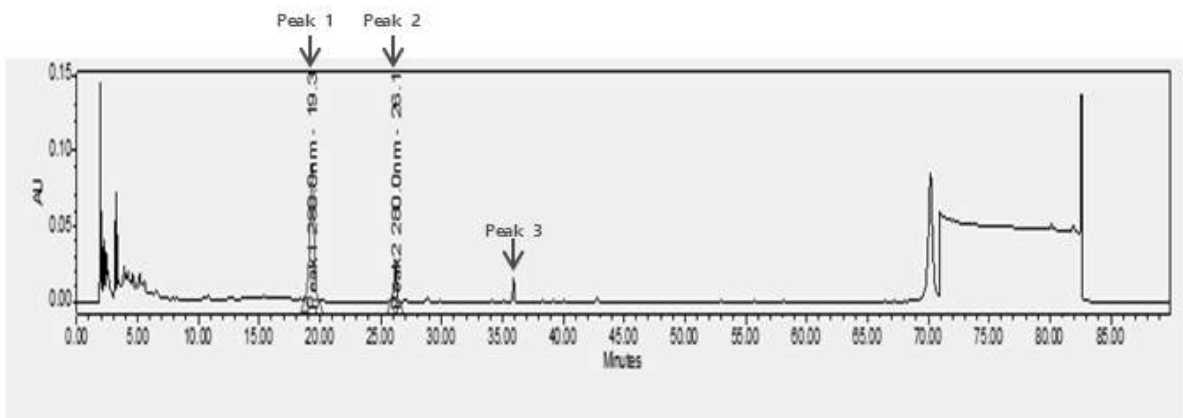


Figure 2. HPLC chromatograms of premature mandarin

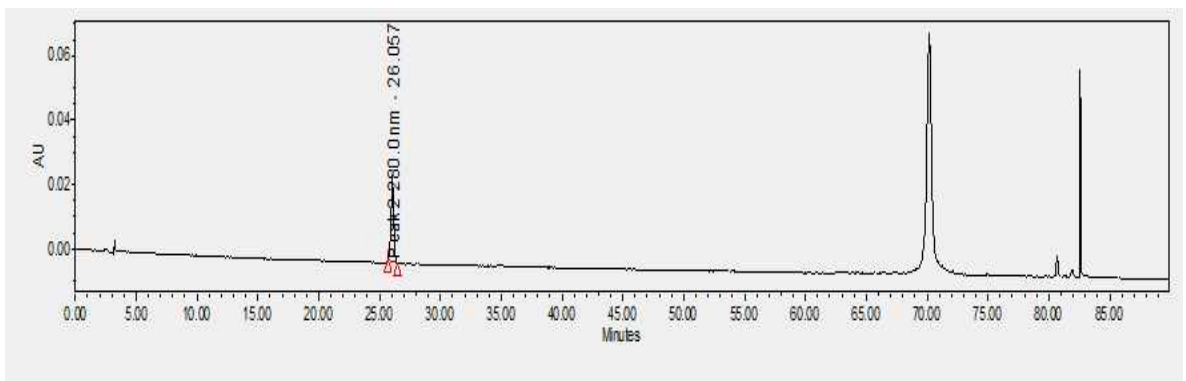


Figure 3. HPLC chromatograms of standard Hesperidin

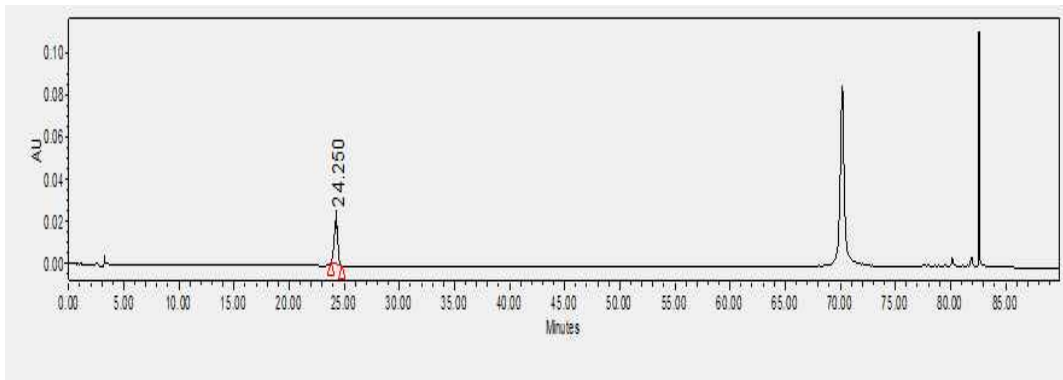


Figure 4. HPLC chromatograms of standard Naringin

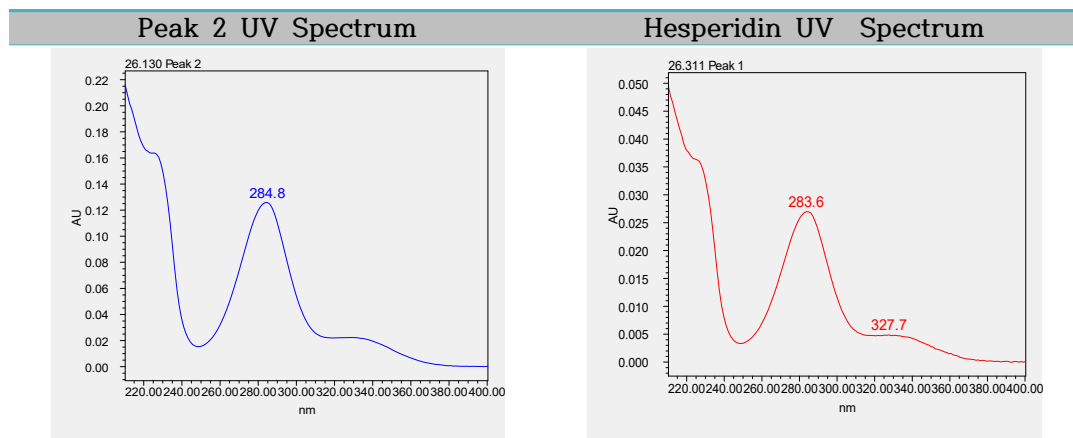
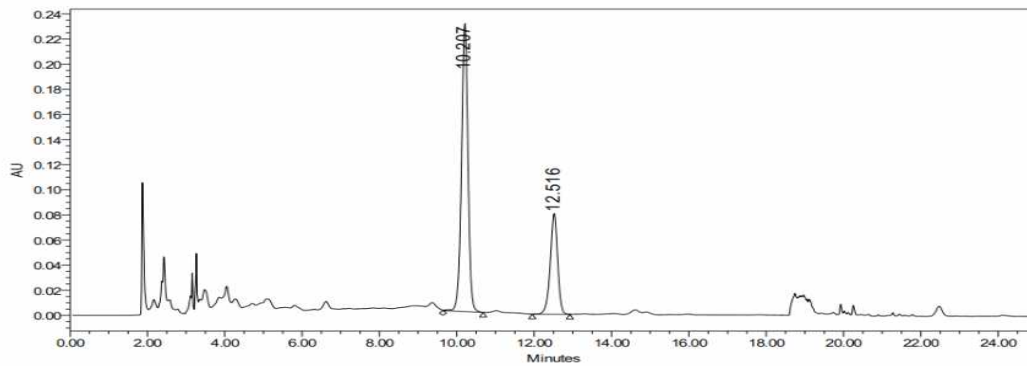


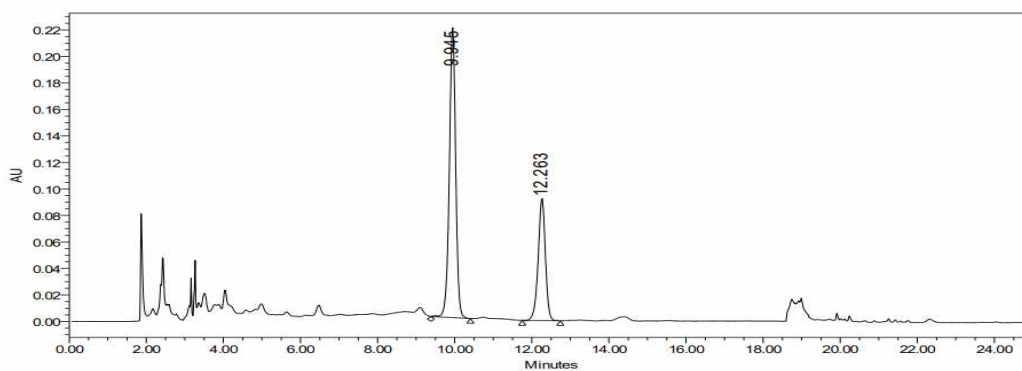
Figure 5. UV Spectrum compared with hesperidin and premature mandarin

Instrument	Waters Acquity H Class UPLC			
Detector	PDA detector			
Wavelength	280nm			
Column	YMC J'sphere ODS-H80(4.6mm × 250nm, 4μm, 8mm)			
Mobile phase	A : 0.1% H3PO4 in D.W B : 0.1% H3PO4 in ACN			
	Flow(mL/min)	Time(min)	A(%)	B(%)
	1.0	0.0	80.0	20.0
		14.0	78.0	22.0
		20.0	0.0	100
		25.0	0.0	100
		26.0	80.0	20.0
35.0		80.0	20.0	
Injection Vol.	10 μL			
Temperature	25 °C			
Run Time	35 min			

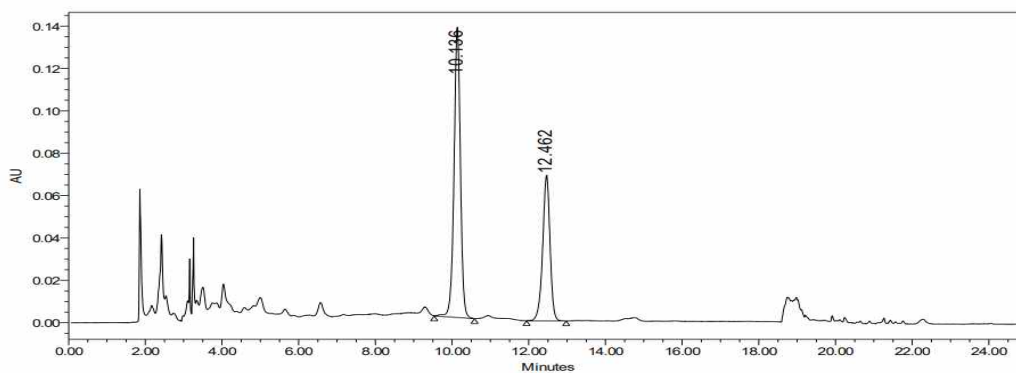
Table. 2 Condition of HPLC for analysis of hesperidin



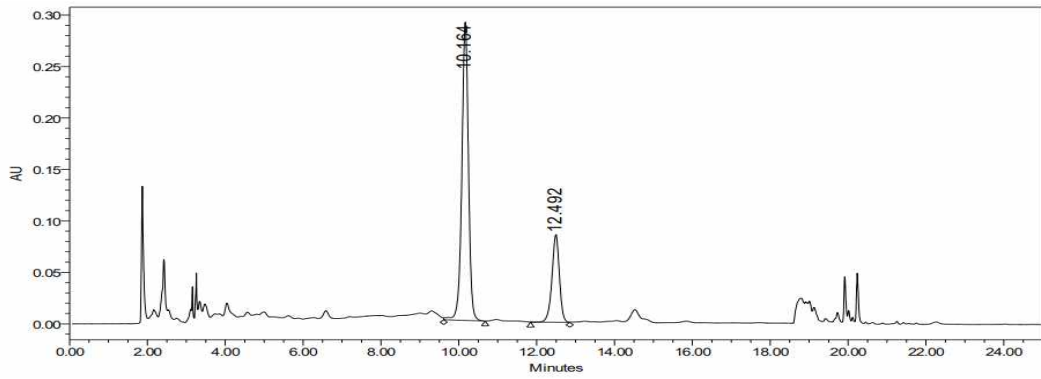
(SAM 1)



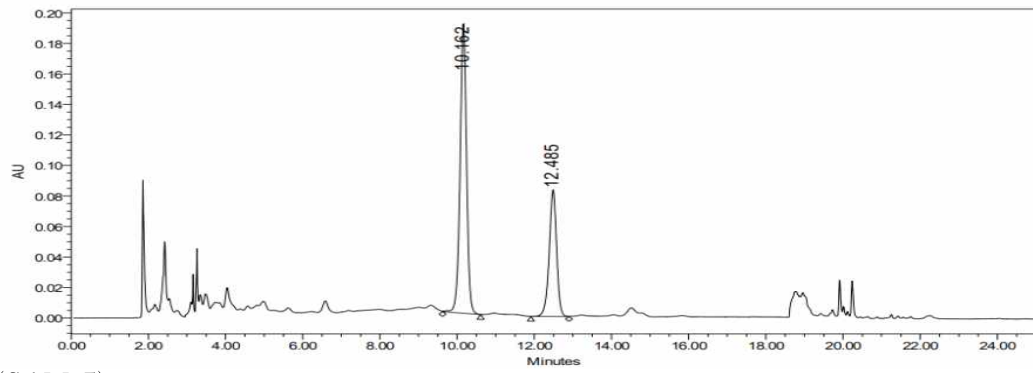
(SAM 2)



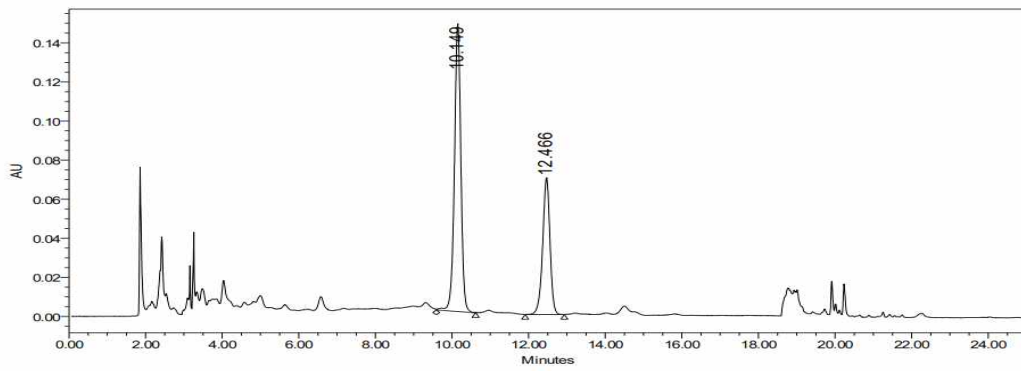
(SAM 3)



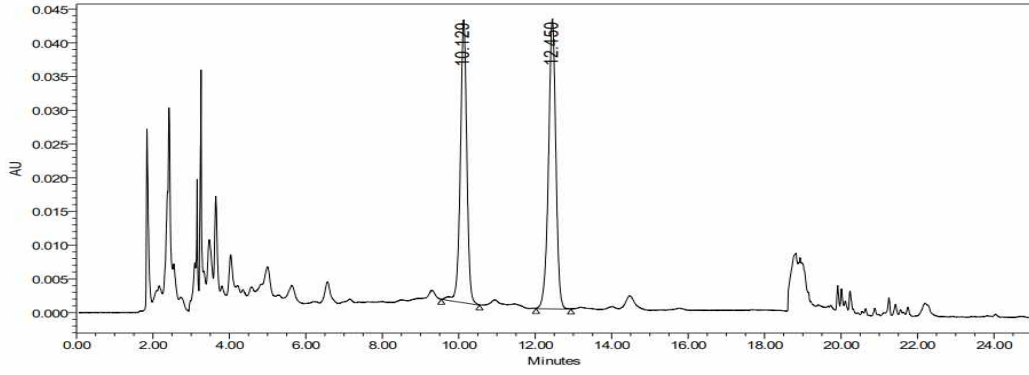
(SAM 4)



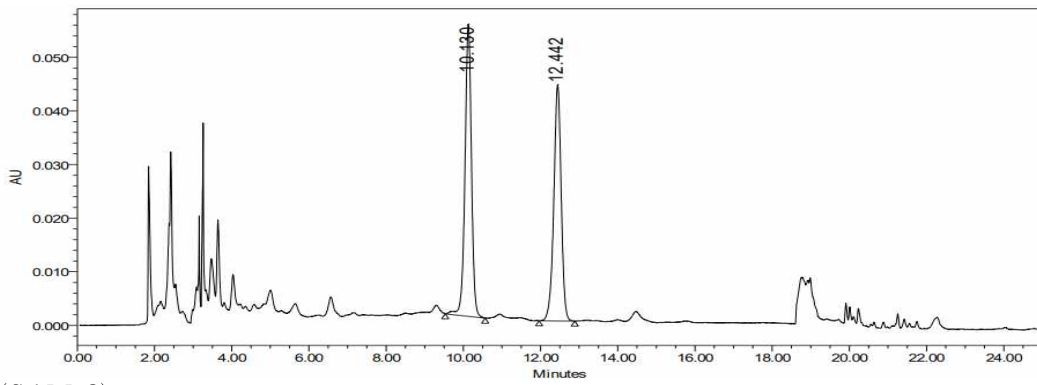
(SAM 5)



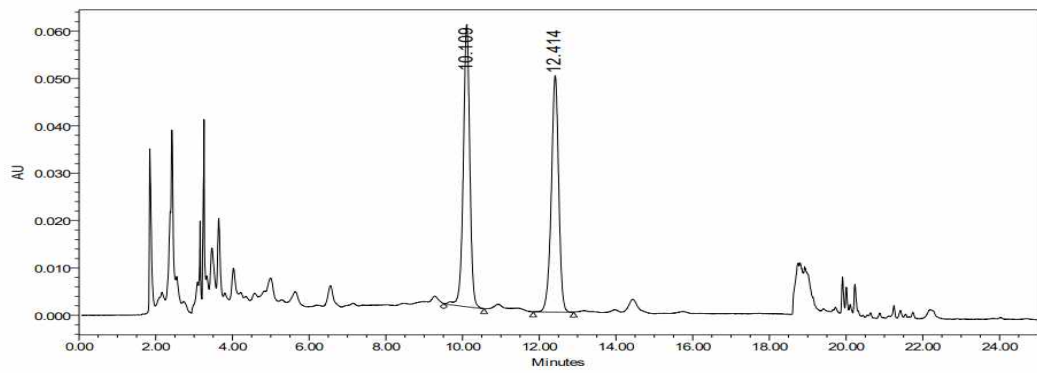
(SAM 6)



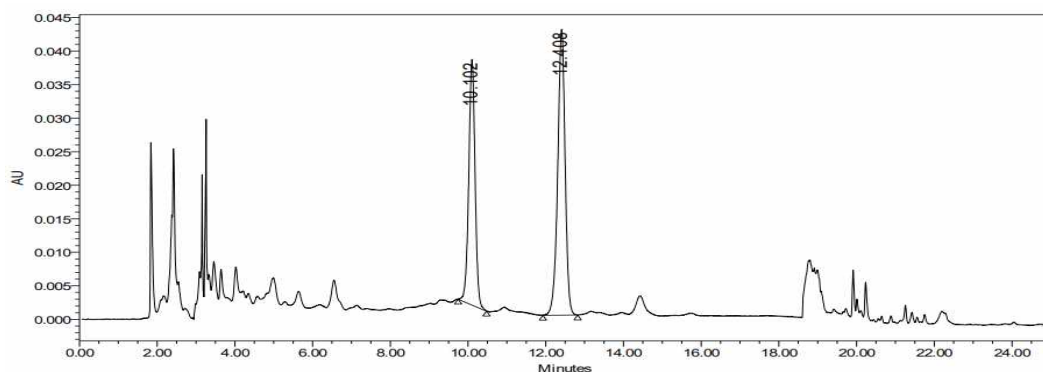
(SAM 7)



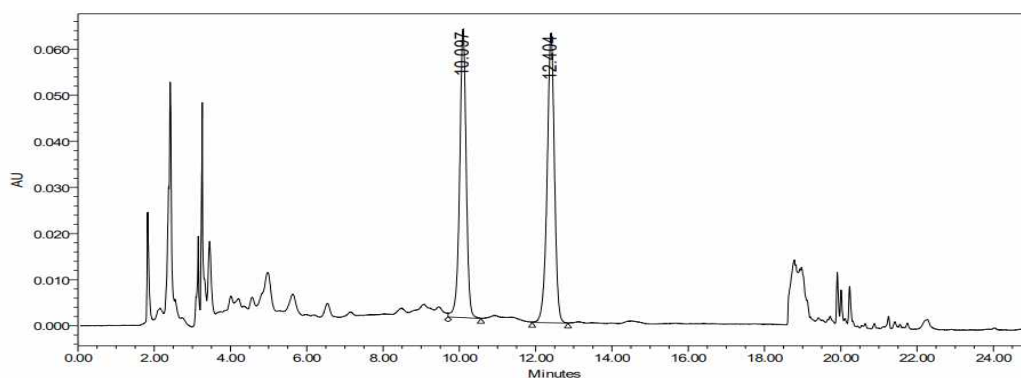
(SAM 8)



(SAM 9)



(SAM 10)



(SAM 11)

Figure. 6. HPLC chromatograms of Hesperidin for premature mandarin

#SAM1: Premature mandarins harvested in July, Aewol, 2~3cm; #SAM2: Premature mandarins harvested in July, Aewol, 3~4cm; #SAM3: Premature mandarins harvested in July, Aewol, 4~5cm; #SAM14: Premature mandarins harvested in July, Namwon, 2~3cm; #SAM5: Premature mandarins harvested in July, Namwon, 3~4cm; #SAM6: Premature mandarins harvested in July, Namwon, 4~5cm; #SAM7: Premature mandarins harvested in August, Namwon, 4~5cm; #SAM8: Premature mandarins harvested in August, Namwon, 5~6cm; #SAM9: Premature mandarins harvested in August, Namwon, 6~7cm; #SAM10: Premature mandarins purchased in September; #SAM11: Citri Unshiu Peel;

Area	Date of harvested	size	Hesperidin (%)
Aewol	Jul	2-3cm	3.15
		3-4cm	3.18
		4-5cm	2.91
Namwon	Jul	2-3cm	3.46
		3-4cm	2.96
		4-5cm	2.62
	Aug	4-5cm	1.68
		5-6cm	1.58
		6-7cm	1.96
Purchase	Sep		1.56

Table 3. Content of hesperidin for premature mandarin

2) TPC(Total polyphenol content)

폴리페놀은 식물계에 존재하는 2차 대사산물로 분자 내에 phenolic hydroxyl 기를 가지고 있는 방향족 화합물로 단백질과 같은 거대 분자와의 결합을 통해 항산화, 항염증, 항암성 등의 생리활성을 가지고 있다고 밝혀져있다. [40]

본 실험에서 분석한 크기 및 지역에 따른 풋굴(Premature mandarin, PM에 대한 총 폴리페놀 함량(Total polyphenol content, TPC)을 분석한 결과는 Figure. 6과 같다. 각 시료를 10mg/ml의 농도로 희석한 후 비교하였다. 7월에 애월에서 채집한 2~3cm 크기의 PM의 TPC는 48.0mg GAE/g, 3~4cm 크기는 40.5mg GAE/g, 4~5cm 크기는 36.7mg GAE/g 였으며 남원에서 채취한 2~3cm 크기의 PM은 54.0mg GAE/g, 3~4cm 크기는 41.4mg GAE/g, 4~5cm 크기는 37.8mg GAE/g으로 PM의 크기가 작을수록 TPC가 높게 나타났다. 7월에 채집한 PM은 크기가 작을수록 TPC가 높게 나왔지만 지역에 따른 TPC 비교시 2~3cm 풋굴에서는 남원지역의 TPC는 높은 것으로 나타나나 3~4cm 이상의 크기에서의 차이는 비슷한 수준으로 유의적 차이가 없었다.

채집 시기에 따른 PM과 CUP에 대한 TPC 분석한 결과는 Fig.7 과 같다. 남원에서 7월에 채집한 2~3cm 크기의 PM은 54.0mg GAE/g, 3~4cm 크기는 41.4mg GAE/g, 4~5cm 크기는 37.8mg GAE/g 였으며 8월에 채집한 4~5cm 크기의 PM은 29.5mg GAE/g, 5~6cm 크기는 23.2mg GAE/g, 6~7cm 크기는 22.9mg GAE/g으로 채집시기가 빠를수록 TPC가 높게 나왔다.

9월에 구입한 PM의 TPC는 19.3mg GAE/g으로 7,8월에 채집한 PM의 TPC보다 낮은 것을 확인 할수 있으며, CUP의 TPC는 25.0 mg GAE/g으로 CUP 보다 PM의 TPC가 높다는 것을 확인 할 수 있다.

박 등 (2020)[41]은 수확 시기(7월-9월) 및 원료 조건에 따른 풋굴 식초의 항산화 활성을 측정 하였으며, 7월에 수확된 풋굴착즙액에서 가장 높은 총 페놀 함량이 확인되었다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 또한 김 등 (2009) [42]은 수확시기별 제주재래종 감귤착즙액의 Flavonoids 분포 및 항산화 활성을 측정 하였으며, 수확시기에 따른 감귤착즙액의 총 폴리페놀 함량은 대부분의 시료에서 성숙이 덜 된 미숙과인 8월 하순에 함량이 가장 높은 것으로 나

타났으며, 수확시기가 늦어질수록 감소하는 경향을 보인다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내는 것을 확인 할 수 있다. PM은 감귤의 미숙과로 완숙과 보다 높은 식이섬유, 유기산, 폴리페놀, 및 플라보노이드가 높다고 알려져 있어[43] 본 연구에서도 수확시기가 빠를수록, 크기가 작을수록, CUP보다 PM의 TPC가 높게 나타 난 것으로 판단된다.

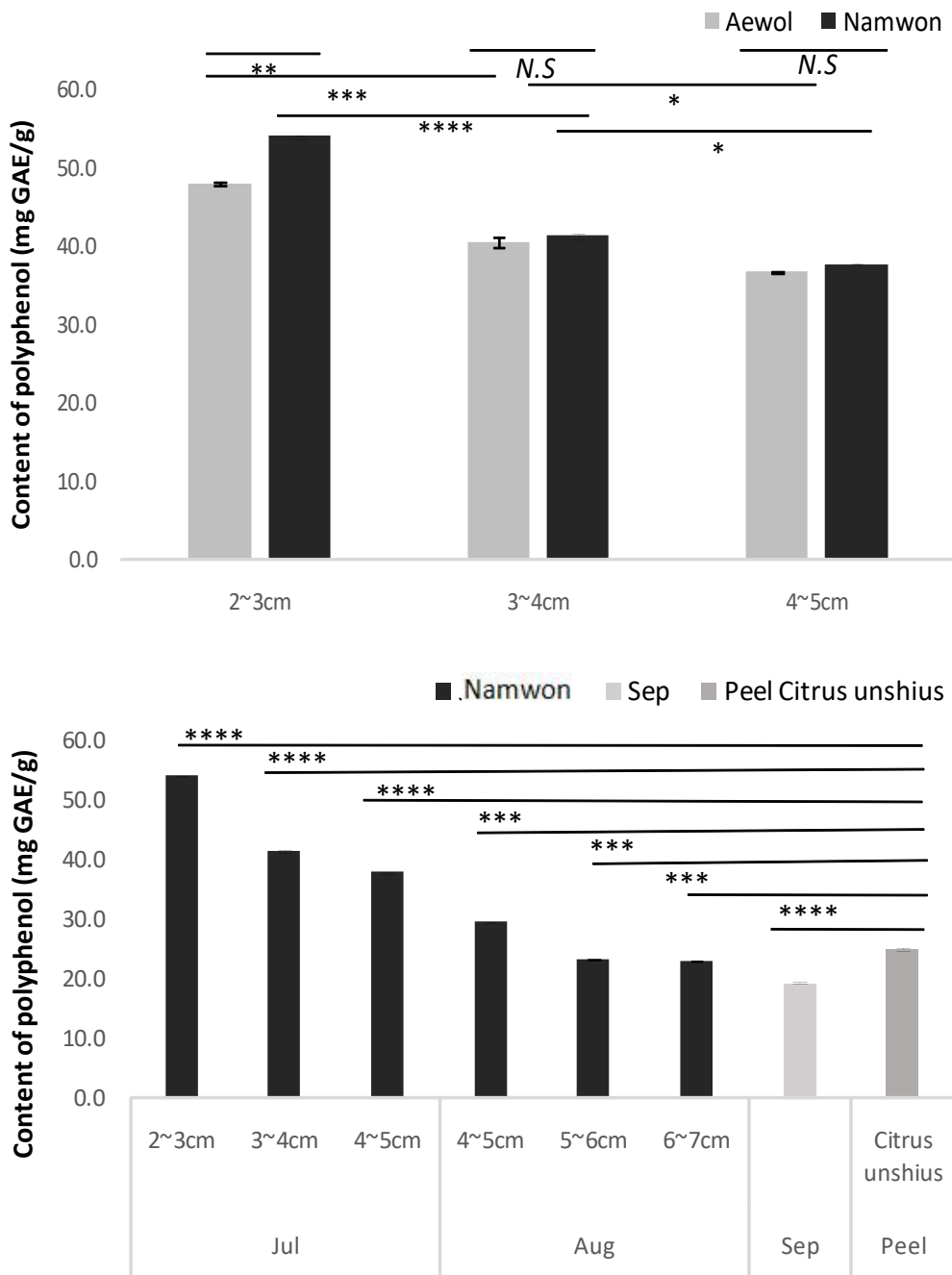


Figure. 7. Total polyphenol content of premature mandarin

All values are presented as the mean ± S.D

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001

sample			Total polyphenol contents(mg GAE/g)
Area	Date of harvested	size	
Aewol	Jul	2~3cm	48.0±0.006
		3~4cm	40.5±0.024
		4~5cm	36.7±0.004
ONamwon	Jul	2~3cm	54.0±0.006
		3~4cm	41.4±0.011
		4~5cm	37.8±0.006
	Aug	4~5cm	29.5±0.001
		5~6cm	23.2±0.001
		6~7cm	22.9±0.005
Purchased	Sep		19.3±0.005
Citri unshiu peel			25.0±0.008

Table 4. Total polyphenol content of premature mandarin

All values are presented as the mean ± S.D

2. 항산화 효과

1) DPPH 라디칼 소거능 측정

본 실험에서 분석한 크기 및 지역에 따른 풋귤(Premature mandarin, PM)에 대한 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 Figure. 8 과 같다. 각 시료를 0.5mg/mL의 농도로 희석한 후 비교 하였다. 7월에 애월에서 채집한 2~3cm 크기의 PM은 66.5%, 3~4cm 크기는 62.0%, 4~5cm 크기는 52.2% 이었으며 7월에 남원에서 채취한 2~3cm 크기의 PM은 67.1%, 3~4cm 크기는 60.9%, 4~5cm 크기는 46.7% 으로 PM의 크기가 작을수록 DPPH radical 소거능이 높게 나타났으나 애월에서 채집한 4~5cm 크기의 함량이 남원에서 채집한 4~5cm 크기의 PM 보다 높게 나왔지만 2~3cm, 4~5cm 크기의 PM에서 DPPH radical 소거능의 차이는 비슷한 수준으로 유의적 차이가 없었다.

채집 시기에 따른 PM에 대한 DPPH radical 소거능 활성은 Figure.9 와 같다. 남원에서 7월에 채집한 2~3cm 크기의 PM의 DPPH radical 소거능 활성은 67.1%, 3~4cm 크기는 60.9%, 4~5cm 크기는 46.7% 이었으며 8월에 채집한 4~5cm 크기의 PM은 41.8%, 5~6cm 크기는 33.3%, 6~7cm 크기의 PM은 27.4%로 채집 시기가 빠를수록 DPPH radical 소거 활성이 높다는 것을 확인 할 수 있었다.

9월에 구입한 PM의 DPPH radical 소거능 활성은 35.8% 로 8월에 구입한 5~6cm 크기의 PM과 값이 유사하지만 채집시기가 빠를수록 활성이 높다고 볼수 있다. 또한 진피(Citrus unshius pericarpium, CUP)의 DPPH radical 소거능 활성은 28.1%로 CUP보다는 PM의 활성이 높다는 것을 확인 할 수 있다.

이 등(2014) [44] 은 감귤 미숙과 식초와 완숙과 식초에 대한 DPPH 자유 라디칼 소거활성을 측정 하였으며 감귤 미숙과 식초의 DPPH 자유라디칼 소거 활성은 29%, 완숙과 식초의 DPPH 자유 라디칼 소거 활성은 5%로 감귤 미숙과 식초가 완숙과 식초에 비해 약 5.8배 높다고 보고 하였으며 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거활성간의 상관계수를 계산 한 결과 0.932와 0.951로 매우 높아 총 DPPH 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성은 총 페놀 및 플라보노이드의 함량과 밀접한 관계가 있음을 보고하였다. Jang 등(2012) [45] 도 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성은 밀접한 관계가 있으며 총 페놀의 함량의 높을수록

항산화 활성이 증가한다고 보고하였다. 앞서 본 연구에도 총 페놀 함량이 많은 시료 일 수록 높은 DPPH radical 소거능을 보였다.

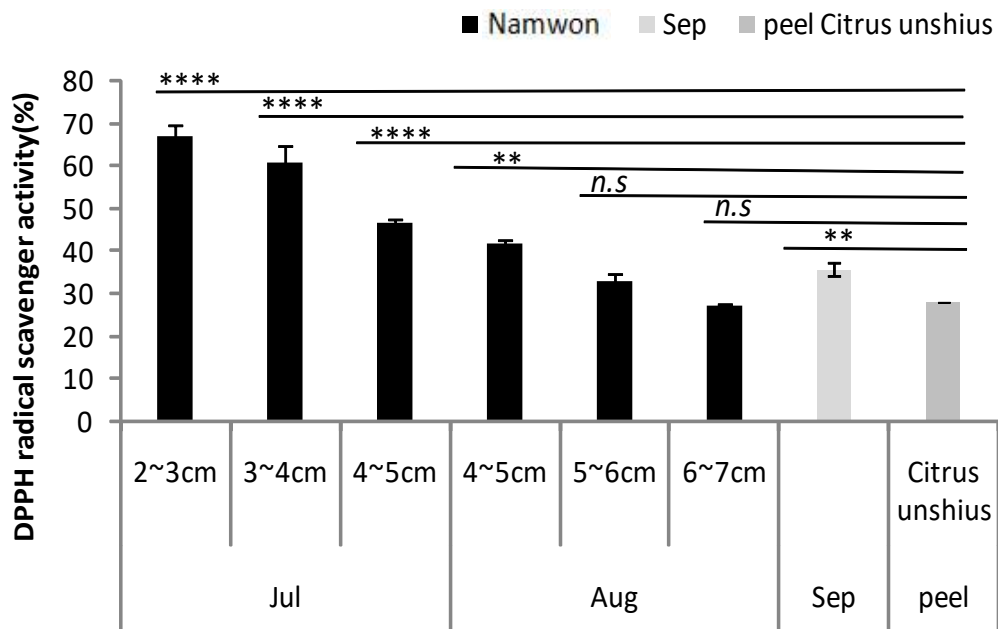
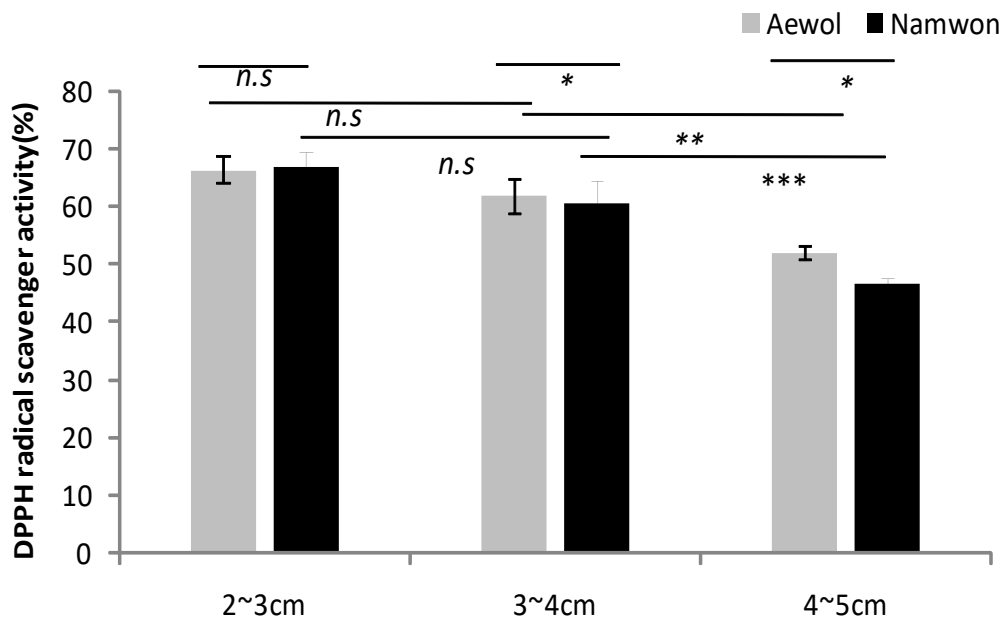


Figure. 8. DPPH scavenging activity of premature mandarin

All values are presented as the mean \pm S.D

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

sample			DPPH radical scavenging activity(%)
Area	Date of harvested	size	
Aewol	Jul	2~3cm	66.5±2.29
		3~4cm	62.0±2.88
		4~5cm	52.2±1.15
Namwon	Jul	2~3cm	67.1±2.64
		3~4cm	60.9±3.76
		4~5cm	46.7±0.98
	Aug	4~5cm	41.8±0.84
		5~6cm	33.3±1.68
		6~7cm	27.4±0.25
purchased	sep		35.8±1.55
Cutri unshiu peel			28.1±0.14

Table 5. DPPH scavenging activity of premature mandarin

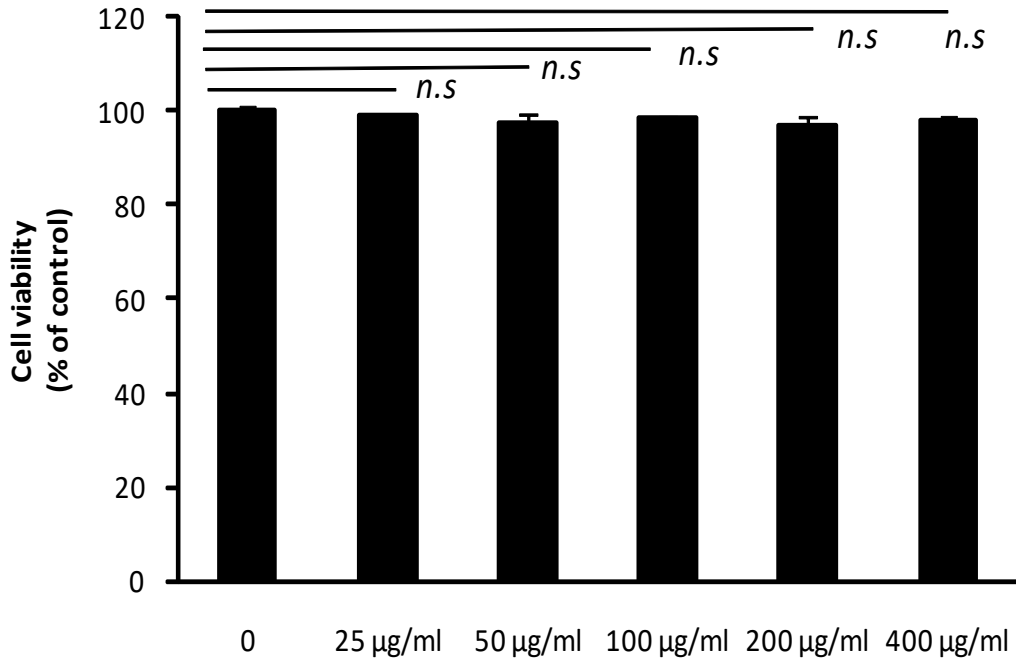
All values are presented as the mean ± S.D

3. 세포 배양 및 NO 활성 저해 효과

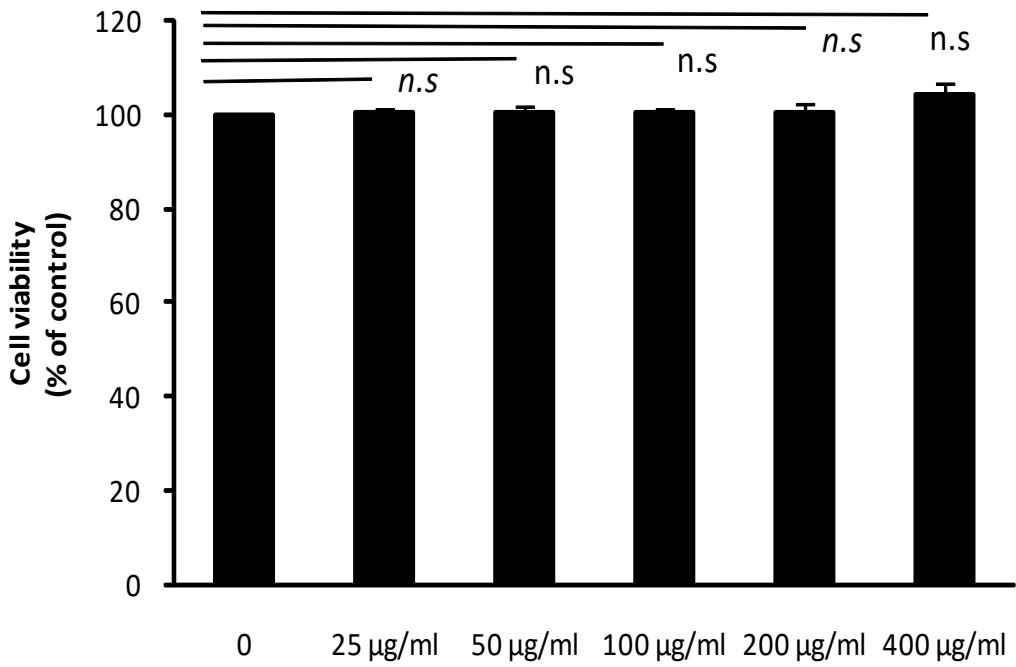
1) 세포배양

2) MTT assay에 의한 세포 독성 시험

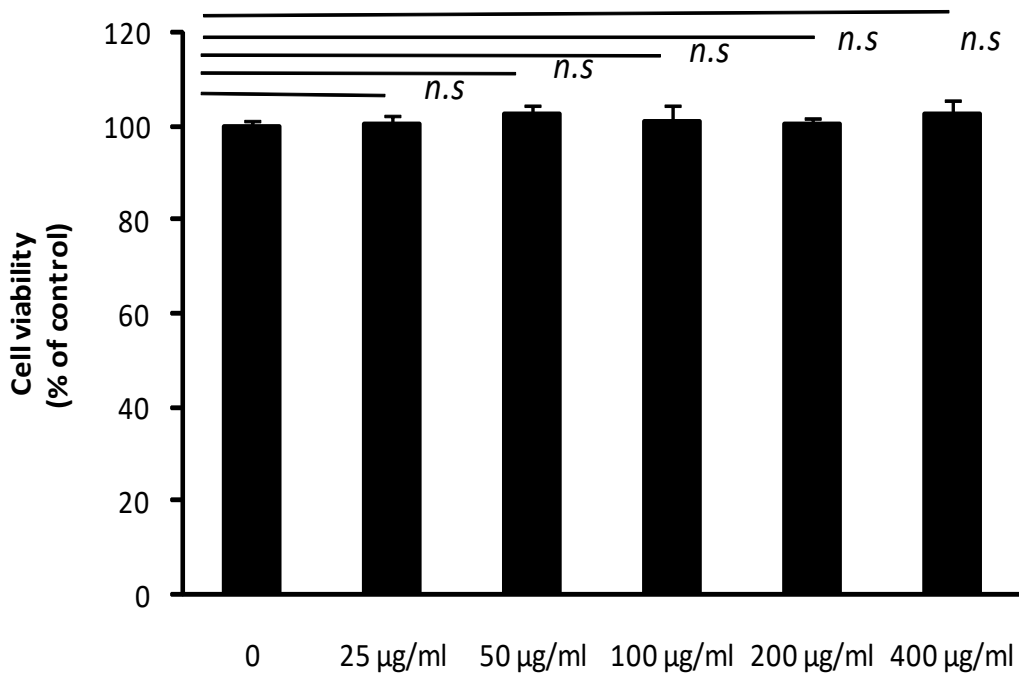
염증에 주요한 역할을 담당하는 대식세포(RAW 264.7)를 이용하여 50% 에탄올 풋갈 추출물에 세포 독성을 확인한 결과는 Fig.10과 같다. 샘플 11종 모두 각 농도 (0, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml) 의 시료를 24시간 처리하여 세포 독성을 관찰하였다. 0에서 400 μ g/ml에서 모두 세포 생존율이 90% 이상으로 나타나 세포 사멸에 큰 영향을 주지 않는 것으로 확인되어 본 실험에서 NO 억제능 측정을 위해 (200 μ g/ml) 의 농도로 항염 실험을 진행 하였다.



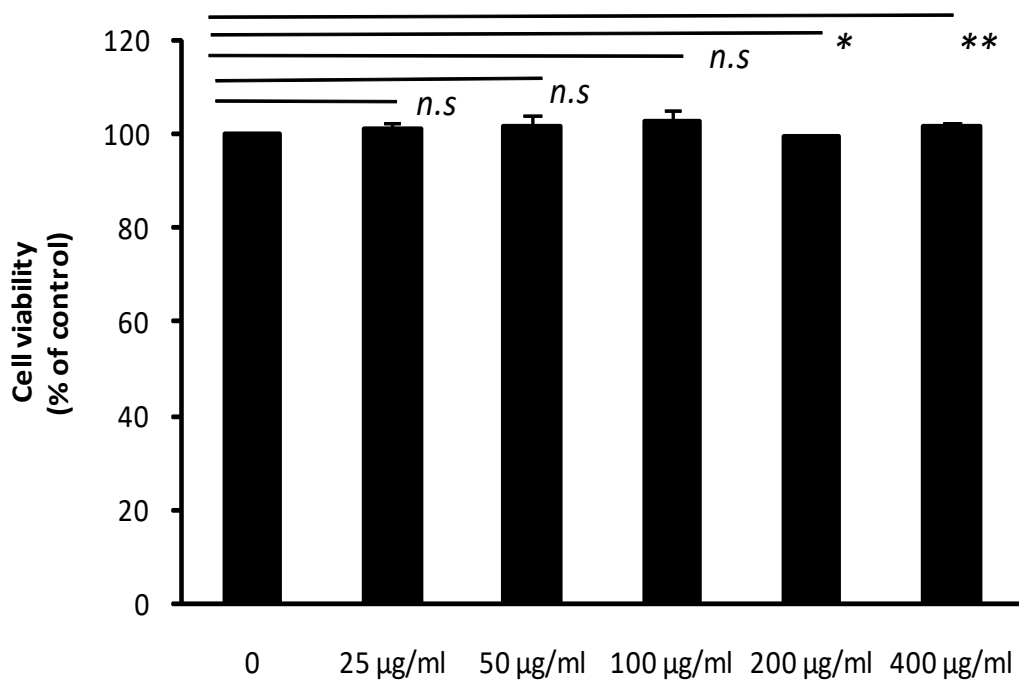
(SAM 1)



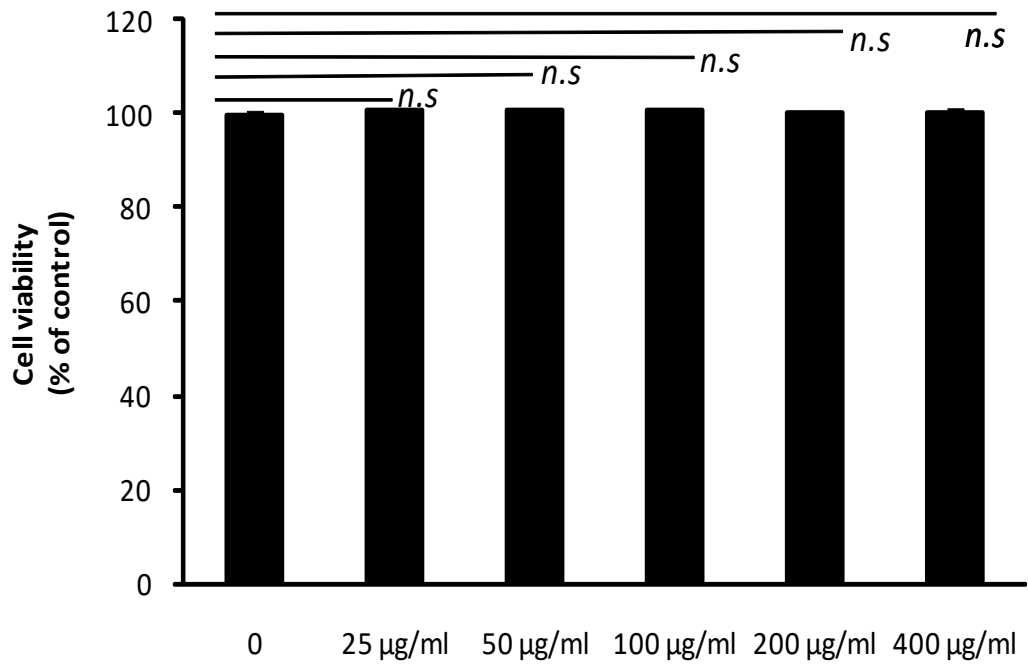
(SAM 2)



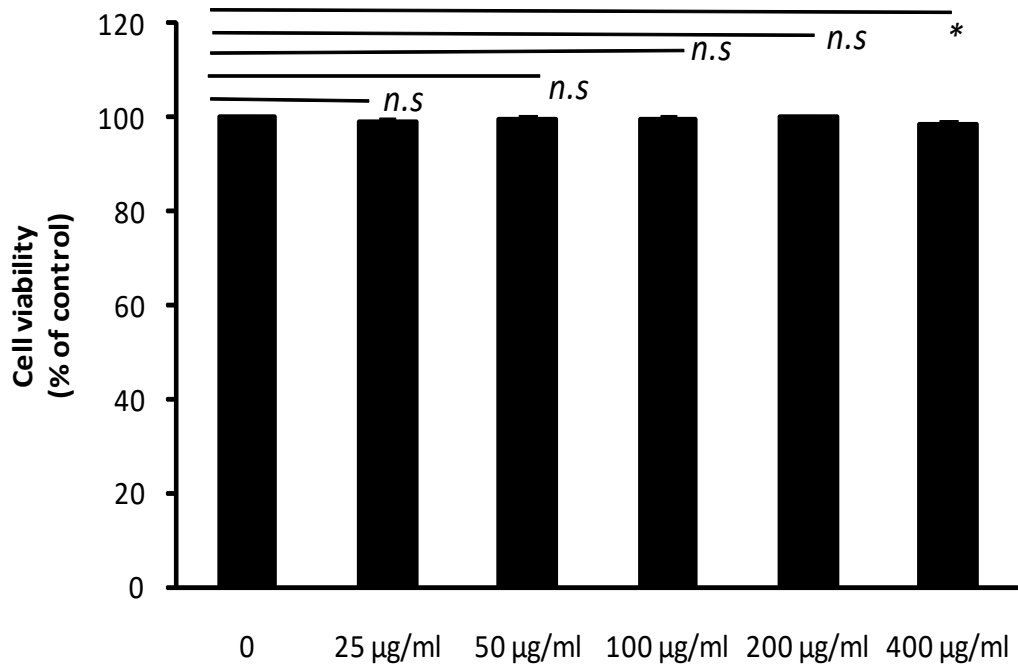
(SAM 3)



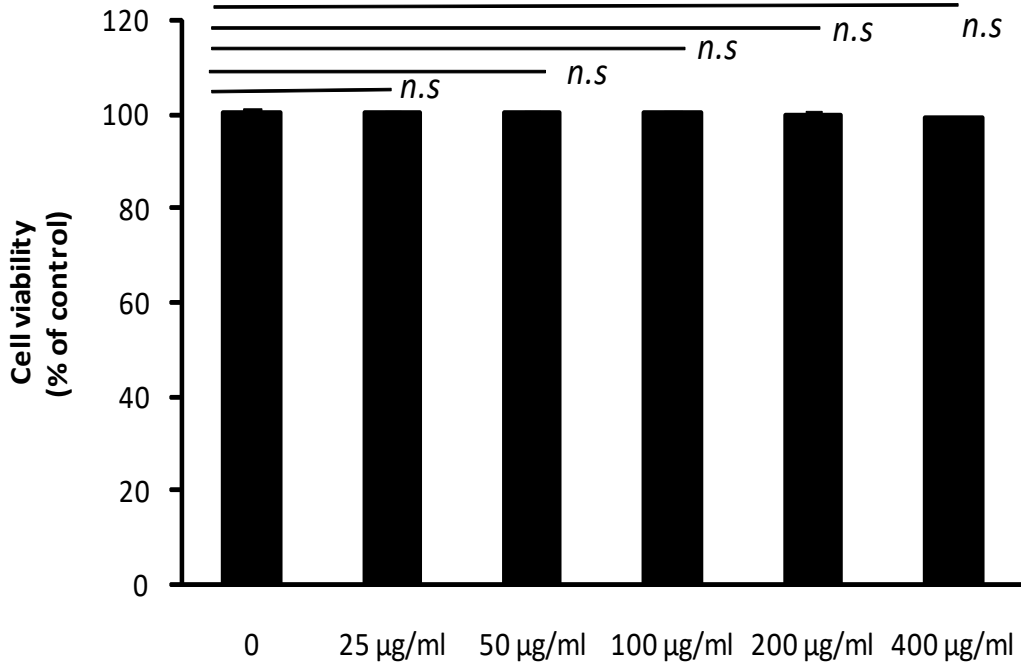
(SAM 4)



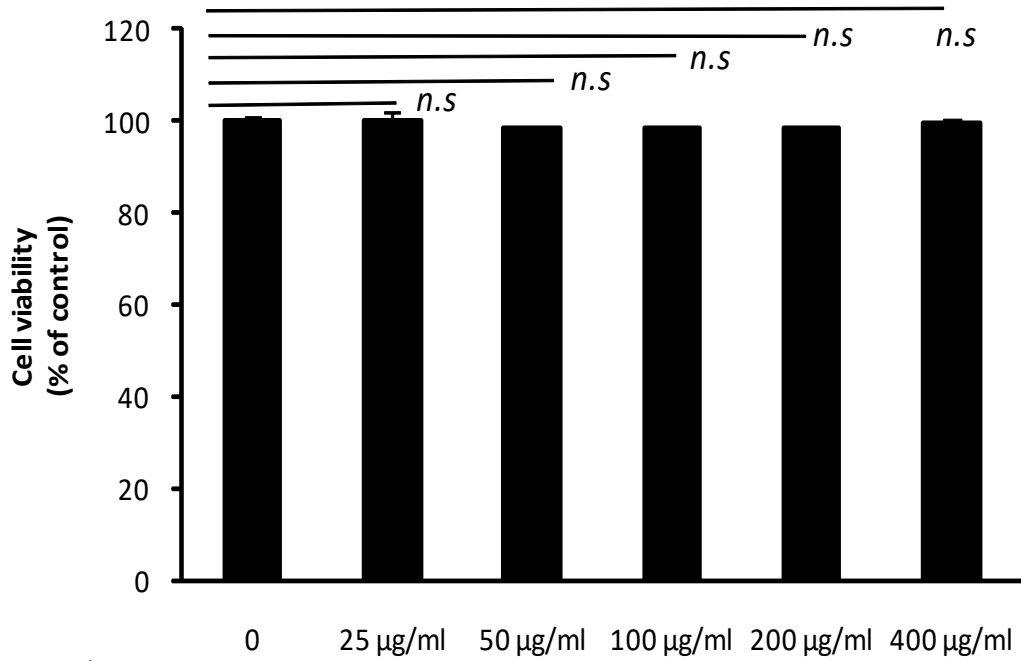
(SAM 5)



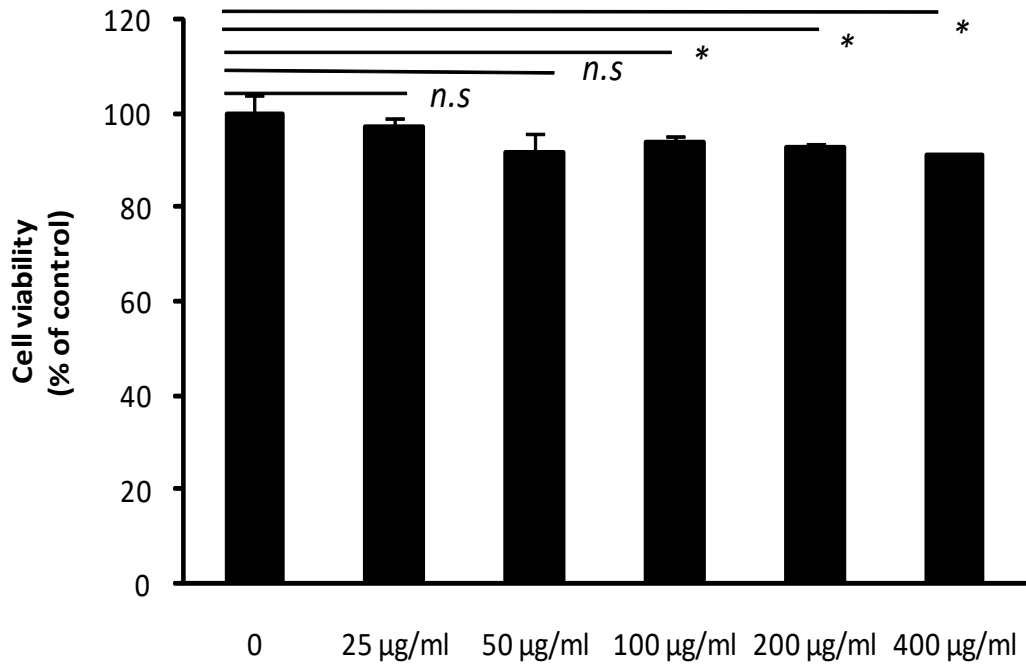
(SAM 6)



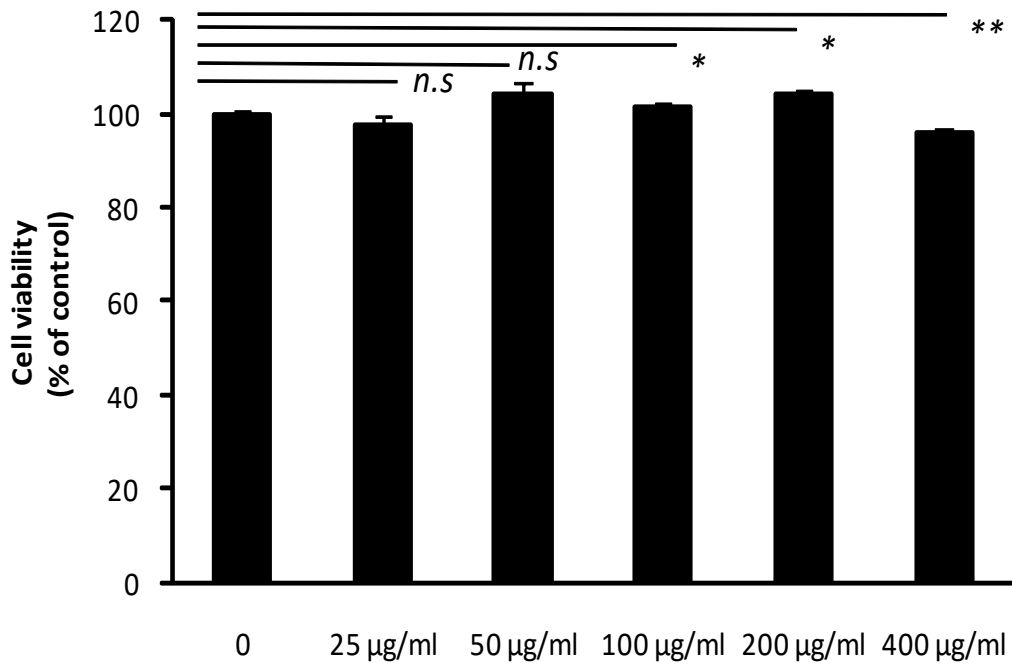
(SAM 7)



(SAM 8)



(SAM 9)



(SAM 10)

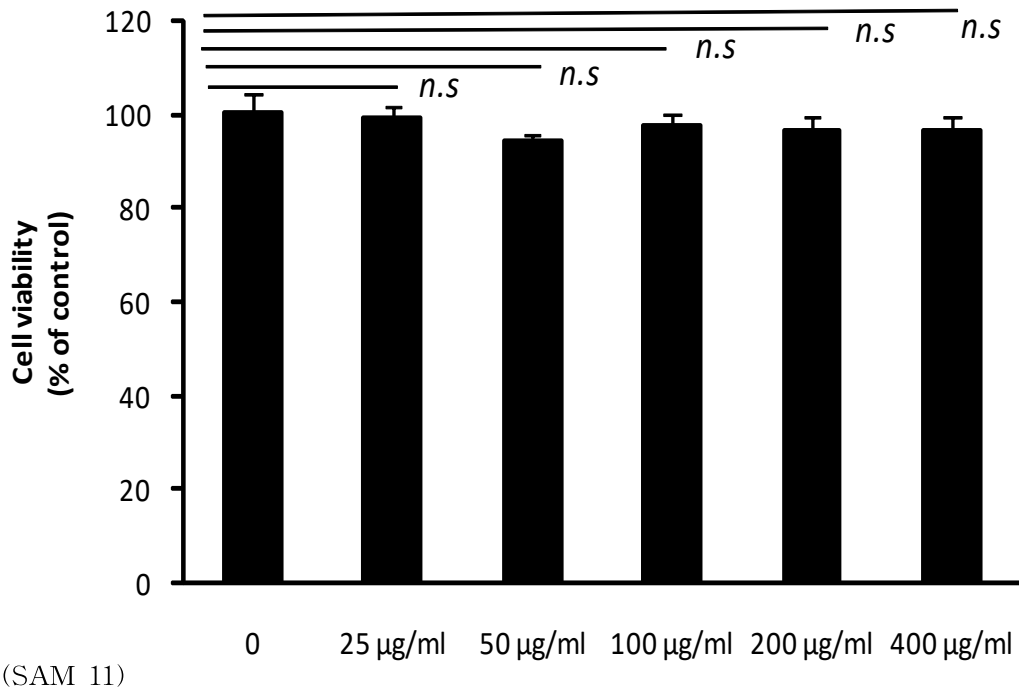


Figure 9. Cell viability of premature mandarin in RAW 264.7 cells.

#SAM1: Premature mandarins harvested in July, Aewol, 2~3cm; #SAM2: Premature mandarins harvested in July, Aewol, 3~4cm; #SAM3: Premature mandarins harvested in July, Aewol, 4~5cm; #SAM14: Premature mandarins harvested in July, Namwon, 2~3cm; #SAM5: Premature mandarins harvested in July, Namwon, 3~4cm; #SAM6: Premature mandarins harvested in July, Namwon, 4~5cm; #SAM7: Premature mandarins harvested in August, Namwon, 4~5cm; #SAM8: Premature mandarins harvested in August, Namwon, 5~6cm; #SAM9: Premature mandarins harvested in August, Namwon, 6~7cm; #SAM10: Premature mandarins purchased in September; #SAM11: Citri Unshiu Peel;

All values are presented as the mean ± S.D

*p<0.05; **p<0.01;

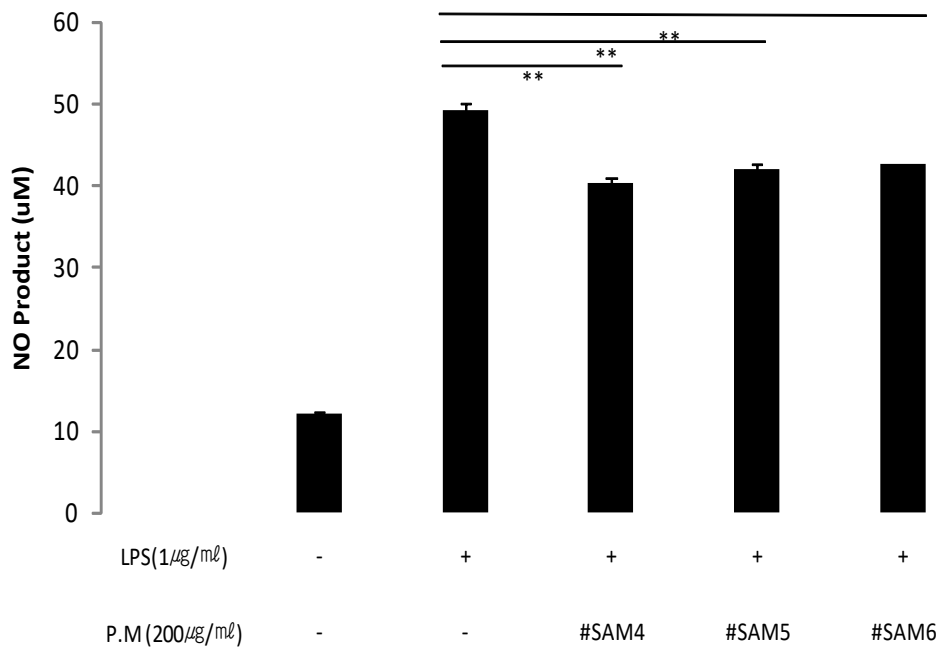
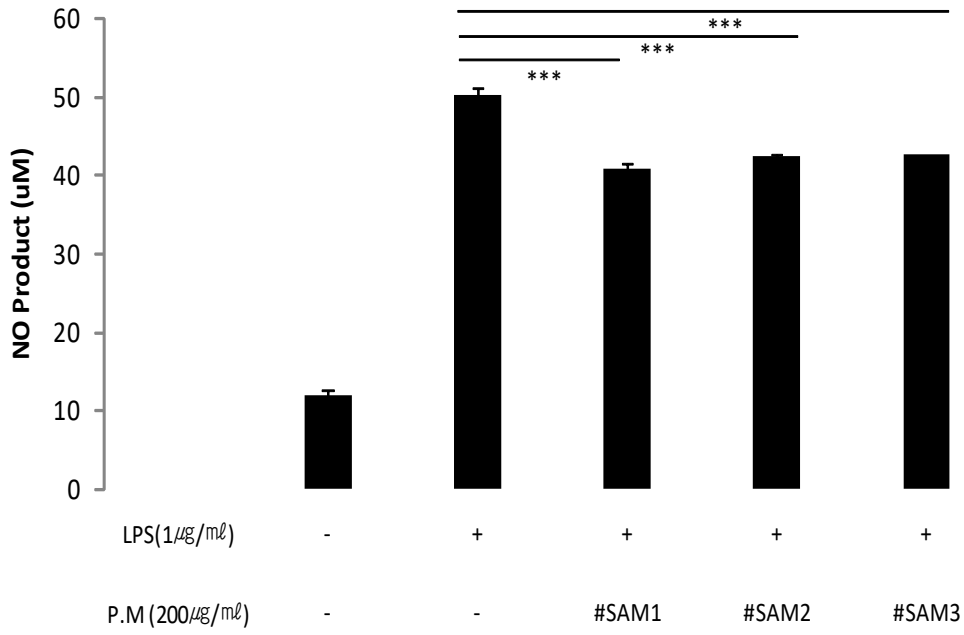
3) NO 억제능 검정

MTT assay 수행 결과 세포독성을 나타내지 않는 농도인 200 μ g/ml 에서 항염증 효과를 확인하기 위해 Griess reagent를 이용하여 NO생성 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 11과 같다. RAW 264.7 cell에 각각 200 μ g/ml 추출물과 1 μ g/ml LPS를 24시간 동안 처리하였고 P.M 추출물의 항염증 효과를 확인한 결과, 생성된 NO 측정치는 LPS를 1 μ g/ml로 처리한 세포의 NO 생성량을 LPS를 처리하지 않은 대조구와 비교하였을 때 상당히 증가하였음을 알 수 있었다.

풋귤(Premature mandarin, PM) 의 LPS 처리구에 대비한 NO inhibition 값은 Table 7, Fig.12, Fig.13과 같다. 7월에 애월에서 채집한 2~3cm 크기의 No inhibition 값은 18.76%, 3~4cm는 15.68%, 4~5cm는 15.33 % 로 크기가 작을수록 NO inhibition 값이 높았으며 7월에 남원에서 채집한 PM의 NO inhibition 값 또한 2~3cm에서는 17.91%, 3~4cm 는 14.70%, 4~5cm 13.19%로 크기가 작을수록 NO Inhibition 값이 높은 것을 확인 할 수 있었다.

채집 시기에 따른 No inhibition 값은 7월 2~3cm 는 17.91%, 3~4cm 는 14.70%, 4~5cm 는 13.19% 였고 8월의 4~5cm 크기의 풋귤은 10.19%, 5~6cm 는 6.93, 4~5cm 는 2.26%로 채집 시기가 빠를수록 No inhibition 값이 높다는 것을 확인 할 수 있었다.

9월에 구입한 PM의 LPS 처리구에 대비한 NO inhibition 값은 6.03% 으로 8월에 채집한 6~7cm 크기의 PM보단 높지만 전반적으로 채집시기가 빠를수록 NO inhibition 값이 높다는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 진피(Citrus unshius pericarpium, CUP) 의 LPS 처리구에 대비한 NO inhibition 값은 6.29%로 9월의 PM과 비슷한 값을 확인 할 수 있었다.



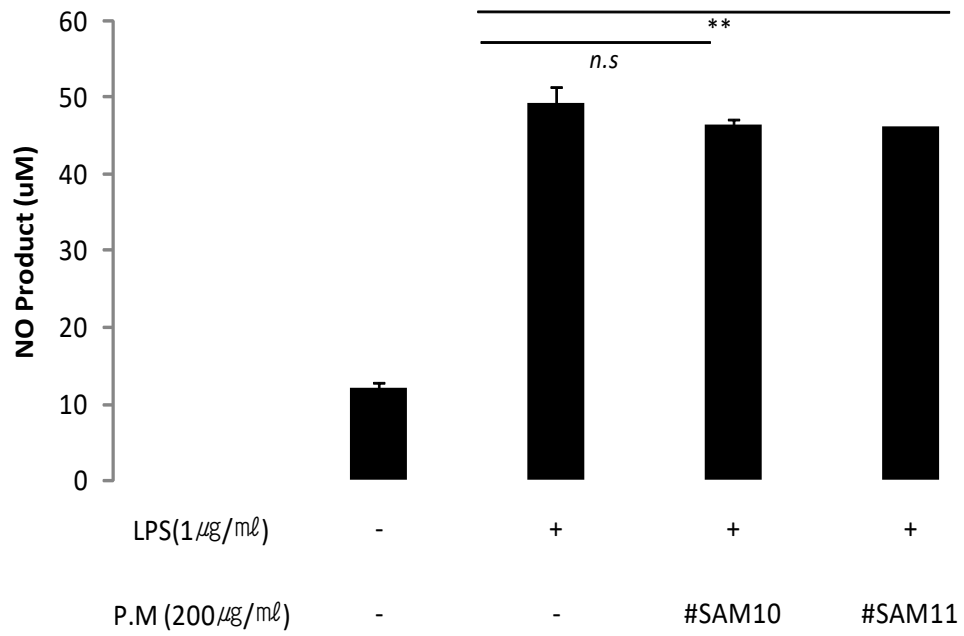
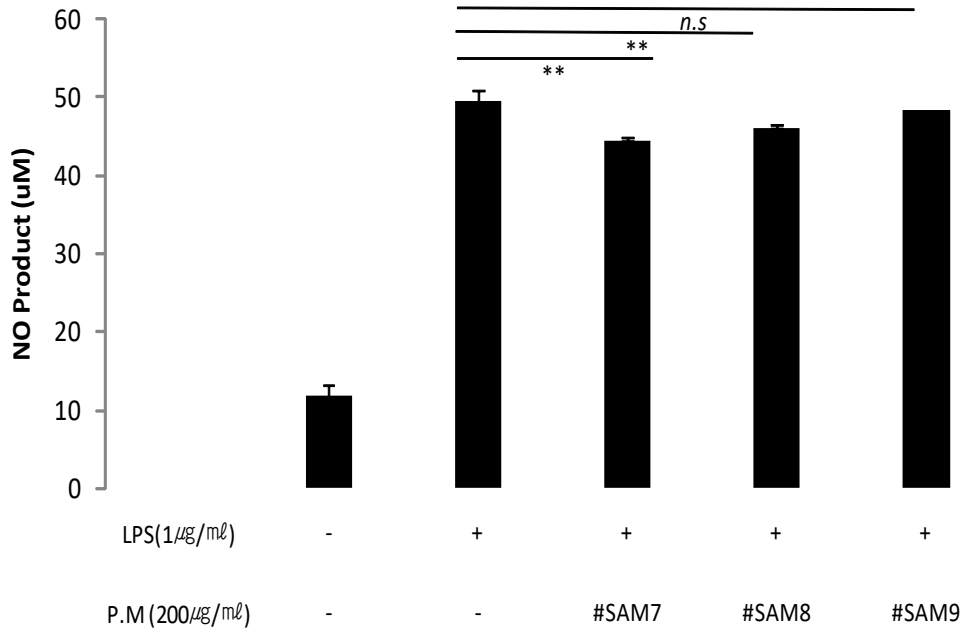


Figure. 10. Effect of extract from premature mandarin(PM) on the NO production in macrophage cell(RAW 264.7).

#SAM1: Premature mandarins harvested in July, Aewol, 2~3cm; #SAM2: Premature mandarins harvested in July, Aewol, 3~4cm; #SAM3: Premature mandarins harvested in July, Aewol, 4~5cm; #SAM14: Premature mandarins harvested in July, Namwon, 2~3cm; #SAM5: Premature mandarins harvested in July, Namwon, 3~4cm; #SAM6: Premature mandarins harvested in July, Namwon, 4~5cm; #SAM7: Premature mandarins harvested in August, Namwon, 4~5cm; #SAM8: Premature mandarins harvested in August, Namwon, 5~6cm; #SAM9: Premature mandarins harvested in August, Namwon, 6~7cm; #SAM10: Premature mandarins purchased in September; #SAM11: Citri Unshiu Peel;

All values are presented as the mean \pm S.D

p<0.01; *p<0.001;

sample			NO Inhibition (%)
Area	Date of harvested	size	
Aewol	Jul	2~3cm	18.76±0.81
		3~4cm	15.68±0.67
		4~5cm	15.33±0.32
Namwon	Jul	2~3cm	17.91±0.76
		3~4cm	14.70±0.47
		4~5cm	13.19±0.68
	Aug	4~5cm	10.19±1.21
		5~6cm	6.93±0.25
		6~7cm	2.26±0.25
Purchased	Sep		6.03±1.87
Citri unshiu peel			6.29±0.65

Table. 6. Inhibition of nitric oxide production by premature mandarin in RAW 264.7 cells.

All values are presented as the mean ± S.D

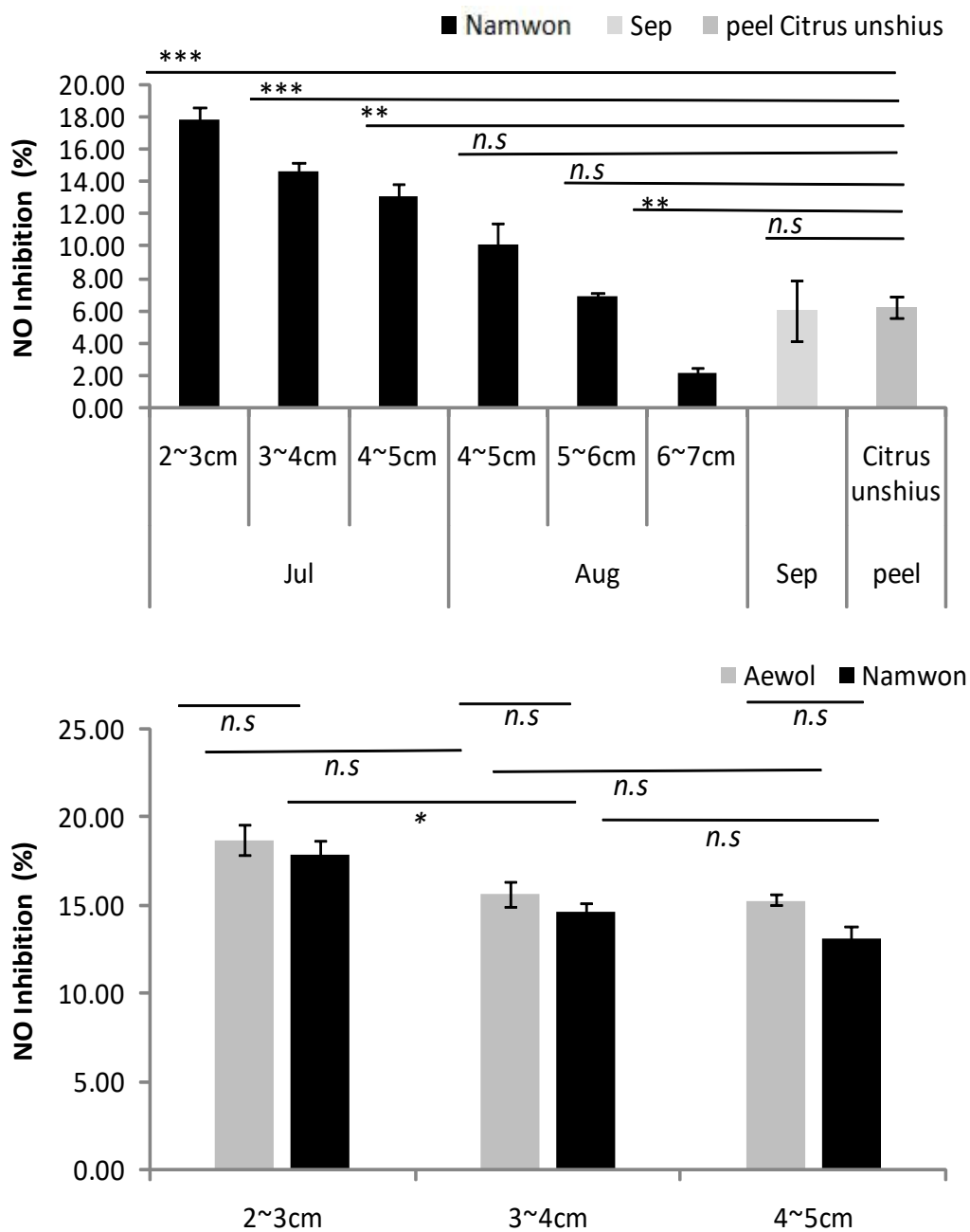


Figure. 11 Inhibition of nitric oxide production by premature mandarin in RAW 264.7 cells.

All values are presented as the mean ± S.D

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001;

IV. 요약 및 결론

본 연구는 풋귤(Premature mandarin, PM) 의 지역, 크기, 채집시기로 구분하였으며 9월 구입한 PM과 진피(Citrus unshius pericarpium, CUP) 를 50% Ethanol 로 추출한 후 얻은 추출물에 대해 hesperidin 함량과 항산화 항염 효과를 비교 분석하였으며 hesperidin 함량, 총폴리페놀함량, DPPH 라디칼 소거능, 세포 배양 과 NO 활성 저해 효과를 측정된 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Hesperidin 분석

- (1) 채집 시기가 빠를수록, 크기가 작을수록 hesperidin 함량이 높게 나타났으며 지역에 따른 차이는 비슷한 수준으로 유의적 차이는 없었다.
- (2) CUP에 비해 PM의 함량이 높은 것을 확인 할 수 있었다.

2. 총 폴리페놀 함량

- (1) 채집 시기가 빠를수록 크기가 작을수록, 폴리페놀 함량(Total polyphenol content, TPC) 이 높게 나타났으며 지역에 따른 TPC는 비슷한 수준으로 유의적 차이가 없었다.
- (2) CUP의 TPC는 25%로 8월에 채집한 4~5cm의 PM의 TPC 인 29.5% 보다 함량이 적어 CUP보다 PM의 TPC가 높은 것을 확인 할 수 있었다.

3. DPPH 라디칼 소거능 측정

- (1) 채집시기가 빠를수록, 크기가 작을수록, DPPH 라디칼 소거능이 높았으며 지역에 따른 DPPH 라디칼 소거능은 비슷한 수준으로 유의적 차이가 없었다.
- (2) CUP의 DPPH 라디칼 소거능은 28.1%로 8월에 채집한 5~6cm 크기의 PM의 DPPH 라디칼 소거능 인 33.3% 보다 낮아 CUP보다 PM의 DPPH 라디칼 소거능이 높은 것을 확인 할 수 있었다.

4. 세포 배양 및 NO 활성 저해 효과

- (1) 농도 별로 (0, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml) RAW 264.7 세포에 대한 생존 능력을 확인 한 결과 모두 독성을 나타내지 않았다.
- (2) 세포 독성을 나타내지 않는 농도인 200 μ g/ml에서 NO 활성 저해 효과를 확인 한 결과 채집시기가 빠를수록, 크기가 작을수록 NO inhibition 값이 높았으며 지역에 따른 NO inhibition 값은 비슷한 수준으로 유의적 차이가 없었다.
- (3) CUP의 NO inhibition 값은 6.29%로 8월에 채집한 5~6cm 크기의 PM의 NO inhibition 값인 6.93보다 낮아 CUP보다 PM의 NO inhibition 값이 높은 것을 확인 할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼때 지역적 차이는 크지 않으나 크기가 작고 채집시기가 빠른 착색이 덜 진행 된 PM은 pectin, 유기산과 hesperidin의 함량이 높아 항산화 활성이 뛰어나며 산화적 스트레스 감소에 도움을 주어 염증 반응 저해에 도움을 줄 것으로 사료된다[14][15]

이는 꽃굴의 지역, 크기, 채집 시기에 따른 지표 분석과 항산화 활성 및 항염효과 연구에 있어 기초 자료로 활용되며, PM을 이용한 천연 항산화제 및 천연 항염제 로의 기능성 식품 및 화장품 원료에 활용 가능성이 높을 것이라 생각된다.

V. 참고문헌

- [1] Hwang, J. H., Park, K. Y., Oh, Y. S., & Lim, S. B. (2013). Phenolic compound content and antioxidant activity of citrus peels. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(2), 153-160.
- [2] Kang, Y. J., Yang, M. H., Ko, W. J., Park, S. R., & Lee, B. G. (2005). Studies on the major components and antioxidative properties of whole fruit powder and juice prepared from premature mandarin orange. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 37(5), 783-788.
- [3] Lee, J. H., An, H. J., Lee, S. Y., Choi, Y. H., Lim, B. S., & Kang, Y. J. (2009). Changes in quality characteristics of 'Setoka' (Citrus spp.) using different storage methods. *Korean Journal of Food Preservation*, 16(5), 644-649.
- [4] Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food chemistry*, 196, 885-896.
- [5] Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- [6] Kim, H. N., Ko, S. B., & Kim, B. S. (2021). Economic Impacts of the increase in Green Immature Citrus Demand on Jeju Field Citrus Industry. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, 22(4), 108-114.
- [7] Park, B., Choi, J. W., Kim, S. H., Yun, Y. R., & Jung, J. H. (2020). Antioxidant activity of premature mandarin vinegar according to harvest period and raw material conditions. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 333-341.
- [8] Choi, M. H., Kim, K. H., & Yook, H. S. (2019). Antioxidant and antibacterial activity of premature mandarin.
- [9] Jeon, S., Kwon, H., Han, S., Lee, J., & Cho, Y. (2014). Antioxidant effect of Korean royal jelly in oxidative stress induced HepG2 cell. *J Apic*, 29, 305-311.

- [10] Kim, S. S., Park, K. J., Yun, S. H., & Choi, Y. H. (2019). Bioactive compounds and antioxidant capacity of domestic citrus cultivar 'Haryejosaeng'. *Korean Journal of Food Preservation*, 26(6), 681-689.
- [11] Nam, J. H., Seo, J. T., Kim, Y. H., Kim, K. D., Yoo, D. L., Lee, J. N., ... & Park, H. J. (2015). Inhibitory Effects of Extracts from *Arabis glabra* on Lipopolysaccharide Induced Nitric Oxide and Prostaglandin E₂ Production in RAW264.7 Macrophages. *Korean Journal of Plant Resources*, 28(5), 568-573.
- [12] Lee, S. H., Suh, S. J., Lee, K. H., Yang, J. B., Choi, S. U., & Park, S. S. (2013). Anti-inflammatory effect of peel extracts from citrus fruits. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 28(4), 342-348.
- [13] Ryu, J. H., Ahn, H., Kim, J. Y., & Kim, Y. K. (2003). Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS activated macrophages. *Phytotherapy Research*, 17(5), 485-489.
- [14] Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
- [15] Bak, M. J., Jeong, J. H., Kang, H. S., Jin, K. S., Ok, S., & Jeong, W. S. (2009). *Cedrela sinensis* leaves suppress oxidative stress and expressions of iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathways in RAW 264.7 cells. *Preventive Nutrition and Food Science*, 14(4), 269-276.
- [16] Kim, M. J., Bae, N. Y., Kim, K. B. W. R., Park, J. H., Park, S. H., Choi, J. S., & Ahn, D. H. (2016). Anti-inflammatory effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract on LPS-induced RAW 264.7 cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 45(2), 181-187.
- [17] Papa, S., & Skulachev, V. P. (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Detection of mitochondrial diseases*, 305-319.
- [18] Ha, Y. B., Park, J. H., Jang, J. W., Lim, D. W., & Kim, J. E. (2016). Comparative study for anti-inflammatory and anti-obesity effect of fractions

from leaf and stem of *Sasa borealis*. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, 30(4), 229-235.

[19] Masaki, H., SAKAKI, S., ATSUMI, T., & SAKURAI, H. (1995). Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(1), 162-166.

[20] Ko, C. S., Hyun, W. C., Kim, J. H., Ko, Y. J., Song, S. M., Ko, M. H., ... & Yoon, W. J. (2015). Anti-inflammatory effects on 80% ethanol extract and ethyl acetate fraction of *Acrosorium yendoi* Yamada in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Korean Journal of Plant Resources*, 28(5), 574-581.

[21] Kim, R. G., Shin, K. M., Chun, S. K., Ji, S. Y., Seo, S. H., Park, H. J., ... & Lee, K. T. (2002). In vitro Antiinflammatory Activity of the Essential Oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in Murine Macrophage Raw 264.7 Cells. *Yakhak Hoeji*, 46(5), 343-347.

[22] Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., ... & Mantovani, A. (1993). Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*, 261(5120), 472-475.

[23] Kim, D. H., Park, S. J., Jung, J. Y., Kim, S. C., & Byun, S. H. (2009). Anti-inflammatory Effects of the Aqueous Extract of Hwangnyeonhaedok-tang in LPS-activated Macrophage Cells. *The Korea Journal of Herbology*, 24(4), 39-47.

[24] Kim, Y. S., Lee, S. J., Hwang, J. W., Kim, E. H., Park, P. J., & Jeong, J. H. (2012). Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 41(9), 1205-1210.

[25] Jeong, D. H., Kang, B. K., Kim, K. B. W. R., Kim, M. J., & Ahn, D. H. (2014). Anti-inflammatory activity of *Sargassum micracanthum* water extract. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 57(3), 227-234.

[26] Yoon, W. J., Lee, J. A., Kim, K. N., Kim, J. Y., & Park, S. Y. (2007). In vitro anti-inflammatory activity of the *Artemisia fukudo* extracts in murine

macrophage RAW 264.7 cells. Korean Journal of Food Science and Technology, 39(4), 464-469.

[27] Kim, M. J., Bae, N. Y., Kim, K. B. W. R., Park, J. H., Park, S. H., Choi, J. S., & Ahn, D. H. (2016). Anti-inflammatory effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract on LPS-induced RAW 264.7 cells. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 45(2), 181-187.

[28] Jew, S. S., Bae, O. N., & Chung, J. H. (2003). Anti-inflammatory effects of asiaticoside on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 cell line. J. Toxicol. Pub. Health, 19(1), 33-37.

[29] Park, S. B., Song, H. M., Kim, H. N., Park, G. H., Son, H. J., Um, Y., ... & Jeong, J. B. (2018). Anti-inflammatory effect of Biji (Soybean curd residue) on LPS-stimulated RAW264. 7 cells.

[30] Lomba, K. S. B., de Souza Breves, T. F. C., Sete, M. R. C., Pires, F. R., & da Silva Figueredo, C. M. (2015). Use of minimally invasive gingival biopsies in the study of inflammatory mediators expression and their correlation with gingival fluid in patients with chronic periodontitis. Indian Journal of Dental Research, 26(2), 126.

[31] Wang, X., & Rivière, I. (2015). Manufacture of tumor-and virus-specific T lymphocytes for adoptive cell therapies. Cancer gene therapy, 22(2), 85-94.

[32] Choi, Y. J., Kim, H. S., Je, J. G., Wang, L., & Jeon, Y. J. (2019). Antioxidant activity of brown seaweed, *Ecklonia maxima*, collected from South Africa. Journal of Marine Bioscience and Biotechnology, 11(1), 29-35.

[33] Rhyu, M. R., Kim, E. Y., Bae, I. Y., & Park, Y. K. (2002). Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits. Korean Journal of Food Science and Technology, 34(1), 132-135.

[34] Lee, S. H., Suh, S. J., Lee, K. H., Yang, J. B., Choi, S. U., & Park, S. S. (2013). Anti-inflammatory effect of peel extracts from citrus fruits. Journal of Food Hygiene and Safety, 28(4), 342-348.

[35] 식품의약품안전평가원 생약연구과 진피 한약재 품질 표준화 연구사업단 보

고서

- [36] Rhyu, M. R, Kim, E. Y, Bae, I. Y, Park, Y. K (2002). Korean J Food SCI Technol, 34(1), 132-135 Contents of Naringin, Hesperidin and Neohesperidin in Premature Korean Citrus Fruits
- [37] Lee, S.L,& Joo, S.Y. (2021). Effects of premature mandarin powder on the quality characteristics and antioxidant activities of scone. Korean Journal of Food Preservation. The Korean Society of Food Preservation.
- [38] Yi, M. R., Kang, C. H., & Bu, H. J. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts from red beet (*Beta vulagaris*) root. Korean Journal of Food Preservation, 24(3), 413-420.
- [39] Song, E. Y., Choi, Y. H., Kang, K. H., & Koh, J. S. (1998). Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of Cheju citrus fruits according to harvest date. Korean Journal of Food Science and Technology, 30(2), 306-312.
- [40] Park, B., Choi, J. W., Kim, S. H., Yun, Y.-R., Lee, Y. ran, Lee, Y. mi, & Jung, J.-H. (2020). Antioxidant activity of premature mandarin vinegar according to harvest period and raw material conditions. Korean Journal of Food Science and Technology, 52(4), 333 - 341.
- [41] Kim, Y. D., Ko, W. J., Koh, K. S., Jeon, Y. J., & Kim, S. H. (2009). Composition of Flavonoids and Antioxidative Activity from Juice of Jeju Native Citrus Fruits during Maturation. The Korean Journal of Nutrition. The Korean Nutrition Society.
- [42] Nam, J. H., Seo, J. T., Kim, Y. H., Kim, K. D., Yoo, D. L., Lee, J. N., ... & Park, H. J. (2015). Inhibitory Effects of Extracts from *Arabis glabra* on Lipopolysaccharide Induced Nitric Oxide and Prostaglandin E₂ Production in RAW264. 7 Macrophages. Korean Journal of Plant Resources, 28(5), 568-573.
- [43] Yi, M.R, Hwang, J.H. Oh, Y.S. Oh, H.J. & Lim, S.B. (2014). Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Immature Citrus unshiu Vinegar. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. The Korean

Society of Food Science and Nutrition.

[44] Jang, G.Y., Kim, H.Y., Lee, S.H., Kang, Y.R., Hwang, I.G, Woo, K.S. Jeong, H.S. (2012). Effects of Heat Treatment and Extraction Method on Antioxidant Activity of Several Medicinal Plants. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition.

[45] Hyun, J. M., Park, K. J., Kim, S. S., Park, S. M., Lee, Y. J., & An, H. J. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory effects of solvent fractions from the peel of the native Jeju citrus 'Hongkyool'and 'Pyunkyool'. Journal of Life Science, 25(10), 1132-1138.

[46] Rocca, B., & FitzGerald, G. A. (2002). Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. International immunopharmacology, 2(5), 603-630.

[47] Lee, H. J., Kang, G. J., Yoon, W. J., Kang, H. K., Kim, Y. S., Kim, S. M., & Yoo, E. S. (2006). Anti-inflammatory effect of unripe fruit of Citrus grandis Osbeck in RAW 264.7 and HaCaT cells. Korean Journal of Pharmacognosy, 37(2), 74-80.