

## 미숙사과 용매 추출물의 항산화성

원향례·박미원\*·최무영  
상지대학교 식품영양학과, 한국식품연구원\*

### Antioxidant Properties of Unripened Apple Extracts

Won, Hyang Rye · Park, Mee Weon\* · Choi, Moo Young  
Dept. of Food and Nutrition Sangji University, Wonju, Korea  
Korea Food Research Institute, Songnam, Korea\*

#### ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the antioxidant properties of unripened apple extracts. The amount of total flavonoids in the peel and 5/30 samples were 2.7 times and 5.0 times higher than the flesh and 6/30 samples, respectively. The degree of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibition activity in hot water extracts was higher than the other extracts. In the 5/30 sample, a 0.1% concentration of unripened apple powder showed almost the same electron-donating ability with a 0.5% concentration of the 6/30 sample. More than 90% of the electron-donating ability was observed from the peel extracts regardless of solvents used for extraction. The nitrite-scavenging effects of acetone and methanol extracts of the 5/30 sample were the strongest at pH 1.2, and especially the 80% methanol extracts exhibited a powerful scavenging effect of more than 90% at pH 3.0.

Key words: unripened apple extracts, total flavonoids, ACE inhibiting ability, electron-donating ability, nitrite-scavenging effects

#### I. 서론

페놀화합물은 식물성 식품에서 유래하는 산화 반응으로 갈변에 영향을 주어 산화반응을 일으키고(Goldberg 1994) 그들의 대부분은 수용성 플라보노이드류로서 항산화작용, 효소저해작용 및 항변이원성 등 각종 기능특성이 있는 것으로 알려져 있다(Singleton 1972). 페놀성 물질의 항산화 연구로는 차잎 중의 (-)- epigallocatechin gallate가

강한 항산화 효과가 있다(Matsuzaki & Hara 1985)고 하며, 이와 관련하여 국내산 식물성 식품중 폴리페놀화합물의 함량과 이들의 생리활성에 관한 연구(Lee & Lee 1994)가 활발히 진행중에 있다.

사과는 매년 재배과정에서 5월 말경부터 6월에 걸쳐 20~30%의 미숙과가 적과되어 현장에서 폐기처분되고 있는 실정이며, 이러한 적과시 발생하는 미숙상태의 사과는 성숙과에 비해 여러 가지 성분상의 차이를 가져 유기산류, 아미노산,

칼슘이온 등이 많이 존재하며 또한 미숙과실 중에는 폴리페놀류의 함량이 성숙과실의 10배 이상의 농도로 존재한다. 사과 폴리페놀화합물에 대한 연구로는 성숙, 저장 중 폴리페놀화합물의 변화(Burda et al. 1990), 사과 주스 가공 및 저장 중 폴리페놀 함량 변화(Spanos et al. 1990), 사과에서 분리한 플라보노이드의 항산화 활성(Shuis et al. 1997), 폴리페놀화합물이 갈변에 미치는 영향(Amiot et al. 1992), 사과 폴리페놀화합물의 항알레르기 효과(Kanda et al. 1998), 사과 페놀계 물질 분포(Oleszek et al. 1998; Dick et al. 1987) 등에 관한 많은 연구가 진행되었다.

본 연구는 사과 적과 시 대량으로 발생하는 원예부산물 중의 하나인 미숙사과의 활용도 증진을 위한 연구의 일환으로 미숙사과 용매추출물의 항산화 특성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용한 시료는 개화 후 40일 정도 된 중량이 5g인 부사(5월30일)를 가평군 농장에서 적과시 직접 채취하여 사용하였으며 개화 후 70일 정도 된 중량 40g 정도의 부사(6월30일)는 수작업으로 1)씨만을 제거한 미숙과 전체(과육+과피)와 2)과피, 3)과피, 핵을 제거한 과육부위로 분리한 것을 동결건조하여 사용하였다.

### 2. 용매추출물의 제조

부위를 달리한 미숙사과 분말에 각기 다른 추출용매를 사용하여 추출액을 제조하였다. 열수추출물은 분말 0.5g을 300ml의 증류수에 현탁시킨 후 98℃에서 1시간 환류추출하고 여과한 여액을 45℃ 진공농축기에서 농축하여 증류수로 100ml 정용하고 10,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 75% 아세톤과 80% 메탄올추출물은 80℃에서 1시간 환류추출하여 열수추출물과 동일한 방법으로 제조하였다.

### 3. 색도

미숙사과의 부위별, 추출용매를 달리하여 얻은

추출물의 색도는 색차계(Color and Color Difference Meter, UC600 IV, Yasuda Seiki CO., Japan)를 이용하여 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 측정하였으며, 표준색판은 L=100, a=0, b=0이었다.

### 4. 총플라보노이드

미숙사과의 각 부위에 대한 총플라보노이드 함량은 동결건조 분말 0.5g에 50%(v/v) methanol 용액 60ml를 가하여 80℃에서 1시간 환류추출 후 냉각하고 50% methanol로 100ml 정용하여 여과한 여액을 시액으로 사용하였다. 시험관에 diethylene glycol 10ml와 시액 1ml를 취해 잘 혼합한 후 여기에 1N NaOH 1ml를 가하여 다시 잘 혼합하고 37℃에서 1시간 가온 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다(日本食品總合研究所 1990).

### 5. ACE(Angio covering enzyme) 저해작용

ACE 저해작용의 측정은 Cushman과 Cheung (1983)의 방법에 따라 추출물을 동결건조한 분말을 증류수에 용해한 시료로 측정하였다. 즉 시료 50 $\mu$ l에 ACE 조효소액 50 $\mu$ l, 10mM sodium borate buffer(pH 8.3) 100 $\mu$ l를 가한 후 37℃ shaking incubator에서 5분간 반응시켰다. 이 반응액에 기질인 hippuryl-histidyl-leucine용액(HHL, 27mg/2.5ml in sodium borate buffer) 50 $\mu$ l를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 250 $\mu$ l를 가하여 반응을 종료시켰다. 여기에 ethyl acetate 1.5ml를 가하여 vortex mixer로 15초간 진탕 후 3,000rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액 1ml를 취하였다. 이 상등액을 Temp-Block heater로 건조시킨 후 증류수 3ml를 가하여 용해시킨 다음 228nm에서 흡광도를 측정하여 시료첨가구와 무첨가구의 백분율로 측정하였다.

### 6. 아질산염 소거작용

아질산염 소거작용은 Kato 등의 방법(Kato et al 1987)으로 NaNO<sub>2</sub> 용액 2ml에 일정농도의 추출물 1ml를 가하고 0.1N HCl(pH 1.2), 0.1mM citrate buffer(pH 3.0, pH 4.0, pH 6.0)를 사용하여 반응용액의 pH를 각각 조정하여 반응용액의 부피를 10ml로 하였다. 이 액을 37℃에서 1시간 반응시

킨 후 각 반응액을 1ml씩 취하여 2% 초산용액 5ml, Griess 시약(30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1 : 1 비율로 혼합한 것, 사용직전 조제) 0.4ml를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치 후 분광광도계를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산량을 산출하였다. 대조구는 Griess 시약대신 증류수를 0.4ml 가하여 상기와 같은 방법으로 실시하였으며, 아질산염소거작용은 추출물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율로 나타내었다.

7. 전자공여작용

미숙사과 부위별 추출물의 전자공여작용(electron donating ability : EDA)은 Blois의 방법(Blois 1958)을 변형하여 측정하였다. 각 추출액의 α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 전자공여 효과로 시료의 환원력을 측정하였다. 즉 추출물 0.4ml에 2×10<sup>-4</sup>M DPPH용액(absolute ethanol에 용해) 0.8ml를 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하고 10분 후 분광광도계를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여효과는 시료첨가구와 첨가하지 않은 경우의 흡광도를 사용하여 백분율(%)로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. 색도

개화 후 70일경인 6월30일 채취한 미숙사과를 과피, 과육(씨제거) 및 씨만 제거한 전체부위(과육+과피)로 세분한 다음 동결건조한 분말에 각기 다른 종류의 용매로 추출한 추출물의 색도를 비교한 결과는 Table 1과 같다. 명도의 경우 열수추출물은 90.13~91.12로 미숙사과의 부위에 따른 차이를 나타내지 않았으나 75% 아세톤과 80% 메탄올추출물은 86.70~94.70의 범위로 부위에 따른 차이를 보여 과육>과육+과피>과피의 순으로 나타났다. 또한 적색도는 열수추출물의 경우에는 각 부위별 차이를 보이지 않았으나 아세톤과 메탄올추출물은 과피부위의 적색도가 다른 부위에 비해 월등히 높은 것으로 나타났으며, 특히 75%

아세톤추출물의 과피의 적색도가 -4.49로 가장 낮은 값을 보여 다른 부위와 유의적인 차이가 있음을 알 수 있었다. 황색도는 열수추출물에서 각 부위가 3.14~3.77로 뚜렷한 차이가 없었으나 아세톤과 메탄올추출물의 경우 과피 부위의 황색도가 12.52, 10.97로 특히 높게 나타났는데, 75% 아세톤>80% 메탄올추출물의 순으로 각 용매에 따른 유의적인 차이를 보였다. 이는 솔잎의 아세톤추출물이 열수 추출물의 황색도보다 높게 나타난 결과(Kang 1996)와 유사한 경향이였다.

Table 1. Lightness, redness and yellowness of unripened apples by parts and extracting conditions

| Extraction conditions | Lightness                       | Redness                         | Yellowness                      |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Hot Water             |                                 |                                 |                                 |
| flesh                 | <sup>b</sup> 91.12              | <sup>a</sup> -0.14              | <sup>a</sup> 3.14               |
| whole                 | 90.26                           | <sup>a</sup> -0.11              | <sup>b</sup> 3.56               |
| peel                  | 90.13                           | <sup>a</sup> -0.10              | <sup>c</sup> 3.77               |
| 75% acetone           |                                 |                                 |                                 |
| flesh                 | <sup>a</sup> 94.05 <sup>A</sup> | c-1.03A                         | <sup>a</sup> 3.11 <sup>C</sup>  |
| whole                 | 91.38 <sup>A</sup>              | c-1.46B                         | <sup>a</sup> 5.24 <sup>B</sup>  |
| peel                  | 86.70 <sup>B</sup>              | c-4.49C                         | <sup>a</sup> 12.52 <sup>A</sup> |
| 80% methanol          |                                 |                                 |                                 |
| flesh                 | <sup>a</sup> 94.70 <sup>A</sup> | <sup>b</sup> -0.79 <sup>A</sup> | <sup>b</sup> 2.29 <sup>C</sup>  |
| whole                 | 91.68 <sup>AB</sup>             | <sup>b</sup> -0.91 <sup>A</sup> | <sup>a</sup> 4.72 <sup>B</sup>  |
| peel                  | 89.19 <sup>B</sup>              | <sup>b</sup> -2.87 <sup>B</sup> | <sup>b</sup> 10.97 <sup>A</sup> |

A~B means Duncan's multiple range test by parts.  
a~c means Duncan's multiple range test by different extracting conditions

2. 총플라보노이드

미숙사과의 채취시기별, 부위별 총플라보노이드의 함량을 측정된 결과는 Fig. 1에 나타나 있다. 과피부위가 657.11mg%로 과육부위의 239.72mg%보다 2.7배 높은 함량을 보였으며, 미숙사과의 씨만 제거하고 과피와 과육을 분리하지 않은 시료(과육+과피)는 이들 개개 부위의 중간정도인 350.87mg%의 함량을 나타내었으나 수확시기가 빠른 5월 30일 시료는 총플라보노이드 함량이

1,706.4mg%로 6월 30일의 것보다 약 5배 높은 것으로 나타났다.



Fig. 1. Contents of total flavonoids in unripened apples by parts (s-1 : 5/30, whole)

3. ACE 저해작용

5월 30일 수확한 미숙사과 용매추출물을 대상으로 혈압상승작용을 가지는 angiotensin II를 생성하는 angiotensin I converting enzyme에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 미숙사과 추출물의 경우 추출용매에 관계없이 50%미만의 ACE 저해작용을 보였으나 열수추출물이 47.1%로 가장 그 중 가장 높았다. 이는 솔잎 추출물의 ACE 저해효과에서 열수추출물이 아세톤 추출물에 비해 약 10% 높은 저해능을 보인다는 결과 (Kang 1996)와 유사하였다.

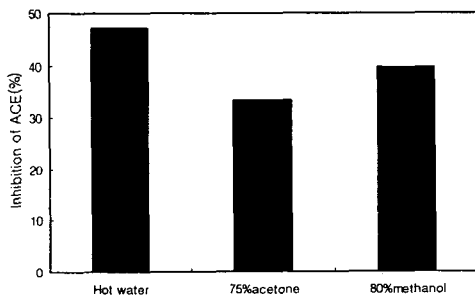


Fig. 2. Inhibition of angiotensin I converting in unripened apples by different extracting conditions

4. 전자공여작용

미숙사과 용매추출물의 전자공여작용을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 수확시기, 추출용매의 종류에 관계없이 추출물의 제조시 사용된 시료의 농도가 증가함에 따라 전자공여작용은 모두 증가하는 것으로 나타났다. α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH)에 대한 추출물의 전자공여 효과는 열수추출물보다는 75% 아세톤, 80% 메탄올추출물이 높은 것으로 나타났으나 실험시 사용된 추출물 제조용 미숙사과 분말의 농도가 높을 수록 용매간의 차이는 적었다. 미숙사과의 부위별로 볼 때 0.5%농도에서 과피부위가 52.0~81.0%로 높았고 과육부위가 32.2~61.1%로 가장 낮았다. 특히 과피부위는 시료 1.0%농도에서 추출용매에 관계없이 90%이상의 전자공여 효과를 나타내었다. 미숙사과의 수확시기별로 볼 때 5월 30일 수확한 시료를 사용한 추출물은 미숙사과 분말농도 0.1% 에서도 6월 30일 시료의 0.5%농도와 거의 유사한 전자공여효과를 보여 일반적으로 과수원에서 사과를 적과하는 시기인 개화 후 40~50일 정도에 채취한 시료가 전자공여작용이 높음을 알 수 있었다.

Table 2. Electron donating ability of unripened apples by parts and different extracting conditions (% , dry basis)

| Extracting conditions | 5/30(whole) |       |       | 6/30  |       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                       | 0.1 %       | 0.2 % | 0.3 % | flesh |       | whole |       | peel  |       |
|                       |             |       |       | 0.5 % | 1.0 % | 0.5 % | 1.0 % | 0.5 % | 1.0 % |
| Hot water             | 34.3        | 69.3  | 91.0  | 32.2  | 72.3  | 34.3  | 81.8  | 52.0  | 90.1  |
| 75% acetone           | 56.1        | 71.8  | 93.7  | 61.1  | 91.1  | 80.4  | 95.1  | 81.0  | 95.3  |
| 80% methanol          | 44.1        | 74.7  | 94.3  | 55.1  | 84.8  | 71.7  | 94.4  | 81.8  | 95.3  |

5. 아질산염소거작용

5월 30일 수확한 시료의 농도와 추출용매를 달리하여 얻은 추출물의 아질산염소거작용을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 추출용매에 관계없이 반응 pH 1.2에서 가장 높은 아질산염소거작용

을 보였고, 특히 80% 메탄올추출물은 반응 pH 3.0에서 다른 추출물과는 달리 약 90%에 가까운 효과를 나타내었다. 시료의 농도가 상승함에 따라 아질산염소거작용은 증가하였으나 추출용매에 따라 다소 차이를 보여 열수추출물은 15mg%, 75% 아세톤은 10mg%, 80% 메탄올추출물은 5mg% 이상의 농도에서 각각 90% 이상의 아질산염소거작용을 보였다.

**Table 3.** Nitrite scavenging ability of unripened apples by different extracting conditions(5/30-whole) (% , dry basis)

| Extracting conditions | Conc. (mg%) | pH    | pH    | pH    | pH    |
|-----------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|
|                       |             | 1.2   | 3.0   | 4.2   | 6.0   |
| Hot water             | 5           | 56.60 | 41.14 | 4.22  | 0     |
|                       | 10          | 55.17 | 37.91 | 6.01  | 0     |
|                       | 15          | 96.22 | 55.16 | 9.78  | 0     |
| 75% acetone           | 5           | 77.23 | 51.33 | 2.71  | 0     |
|                       | 10          | 91.16 | 64.92 | 11.68 | 2.68  |
|                       | 15          | 96.95 | 75.02 | 23.48 | 0     |
| 80% methanol          | 5           | 94.21 | 86.59 | 14.62 | 8.96  |
|                       | 10          | 96.26 | 88.36 | 32.35 | 16.94 |
|                       | 15          | 96.51 | 95.77 | 46.18 | 37.32 |

6월 30일 채취한 시료 분말을 0.1%농도로 조정하여 얻은 추출물의 아질산염소거작용(Table 4)는 부위에 관계없이 80% 메탄올을 용매로 사용할 경우 가장 높았고, 반응 pH 1.2에서 과피의 경우 열수추출물이 70.65%, 80% 메탄올추출물이 85.25%

**Table 4.** Nitrite scavenging ability of unripened apples by parts and extracting conditions(6/30) (% , dry basis)

| Extracting conditions |        | flesh     | whole  | peel  |
|-----------------------|--------|-----------|--------|-------|
|                       |        | Hot water | pH 1.2 | 25.63 |
|                       | pH 4.2 | 6.92      | 9.10   | 9.19  |
| 75% acetone           | pH 1.2 | 19.53     | 21.84  | 80.02 |
|                       | pH 4.2 | 9.70      | 9.38   | 12.19 |
| 80% methanol          | pH 1.2 | 71.66     | 71.66  | 85.25 |
|                       | pH 4.2 | 40.72     | 40.72  | 41.58 |

로 다른 부위에 비해 높은 아질산염소거작용을 보였다. 그러나 80% 메탄올추출물은 시료의 부위에 관계없이 다른 용매추출물 보다 아질산염소거능이 우수한 것으로 나타났다.

#### IV. 결론 및 요약

명도는 열수추출물의 경우 미숙사과의 부위에 따른 차이를 나타내지 않았으나 75% 아세톤과 80% 메탄올추출물은 부위에 따른 차이를 보여 과육>과육+과피>과피의 순으로 나타났다. 적색도는 아세톤과 메탄올추출물은 과피부위의 적색도가 다른 부위에 비해 월등히 낮은 것으로 나타났다. 한편 황색도는 75% 아세톤>80% 메탄올추출물의 순으로 각 용매에 따른 차이를 보였다. 5월 30일 수확한 시료는 분말농도 0.1%에서 6월 30일 시료의 0.5%와 유사한 전자공여효과를 보였고, 과피부위는 추출용매에 관계없이 90%이상의 효과를 나타내었다. 또한 5월 30일 시료의 아질산염소거작용은 추출용매에 관계없이 pH 1.2에서 가장 높았고, 특히 80% 메탄올추출물은 pH 3.0에서 다른 추출물과는 달리 약 90%에 가까운 효과를 보였다. 총플라보노이드의 함량은 과피부위가 과육부위에 비해 2.7배, 5월 30일 시료가 6월 30일 시료보다 5배 높았다.

#### 참고문헌

Amiot MI, Tacchini M, Aubert S, Nicolas J(1992) Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J Food Sci* 57(4), 958-962.

Blois MS(1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26, 1199-1200.

Burda S, Oleszek W, Lee CY(1990) Phenolic Compounds and their changes in Apples during Maturation and Cold Storage. *J Agric Food Chem* 38, 945-948.

Cushman DW, Cheung HS(1983) Spectrophotometric assay properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 20, 1637.

Dick AJ, Redden PR, DeMarco PC, Lidster PD, Gridley TB(1987) Flavonoid glycosides of Spartan apple peel. *J Agric Food Chem* 35, 529-531.

Goldberg I(1994) Functional foods. Chapman & Hall;

- New York. p 56-59.
- Kang YH(1996) Functional properties of pine needle extracts and their effects on serum and liver of rats fed high fat diet. Kyungpook National University; Taegu.
- Kanda T, Akjyama H, Yanagina A, Tanabe S, Goda Y, Toyoda M, Teshima R, Saito Y(1998) Inhibitory effects of apple polyphenol on induces histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. Biosci. Biotechnol. Biochem 62(7), 1284-1289.
- Kato H, Lee IE Chuyen NV, Kim SB, Hayase F(1987) Inhibition of nitrosamine formentation by nondialyzable melanoidins. Agric. Biol Chem 51, 1333-1338.
- Lee JH, Lee SR(1994) Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods. Korean J Food Sci Technol 26(3), 310-316.
- Lee JH, Lee SR(1994) Some of physiological activity of phenolic substances in plant foods. Korean J Food Sci Technol 26(3), 317-323.
- Matsuzaki K, Hara Y(1985) Antioxidative activity of tea leaf catechins. Nippon Nogeikagaku kaishi 59, 129.
- Oleszek W, Lee CY, Jaworski AW, Price KR(1998) Identification of some phenolic compounds in apples. J Agric Food Chem. 36, 430-432.
- Singleton VL(1972) Common plant phenols other than anthoyanins, contributing to coloration and decoloration. Adv Food Res Suppl 3, 143.
- Sluis AA, Dekkerm M, Jongen WM(1997) Flavonoids as Bioactive components in apple products. Cancer Letter 114, 107-108.
- Spanos GA, Wrolstad RE, Heatherbell DA(1990) Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. J Agric Food Chem 38, 1572-1579.
- 日本食品総合研究所(1990) 食品品質 評価のための品質特性 マニコアル(2), p 61.