

## 유자와 탕자 과피 추출물의 항산화 및 면역 활성 효과

박준희<sup>1</sup> · 강병원<sup>1</sup> · 김지은<sup>2</sup> · 서민정<sup>2</sup> · 이영훈<sup>2</sup> · 이재현<sup>3</sup> · 주우홍<sup>4</sup> · 최영현<sup>5</sup> · 임학섭<sup>6</sup> · 정영기<sup>2,6\*</sup> · 이복규

동의대학교 분자생물학과, <sup>1</sup>동아대학교 BK21 실버바이오 사업단, <sup>2</sup>동아대학교 생명공학과, <sup>3</sup>동아대학교 유전공학과, <sup>4</sup>창원대학교 생물학과, <sup>5</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실, <sup>6</sup>(주)천년약속 바이오연구소

Received February 27, 2008 / Accepted March 20, 2008

**Effect of Ethanol Extract from Peel of *Citrus junos* and *Poncirus trifoliata* on Antioxidant and Immune Activity.** Joon Hee Park, Byoung Won Kang<sup>1</sup>, Ji Eun Kim<sup>2</sup>, Min Jeong Seo<sup>2</sup>, Young Choon Lee<sup>2</sup>, Jai Heon Lee<sup>3</sup>, Woo Hong Joo<sup>4</sup>, Yung Hyun Choi<sup>5</sup>, Hak Seob Lim<sup>6</sup>, Yong Kee Jeong<sup>2,6\*</sup> and Bok Kyu Lee. Department of Molecular Biology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, <sup>1</sup>BK21 Center for Silver-Bio industrialization Project, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>3</sup>Department of Genetic Engineering, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>4</sup>Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea, <sup>5</sup>Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dong-eui University, Busan 614-052, Korea, <sup>6</sup>Department Bioinstitute, MILLENNIUM PROMISE CO., LTD., Gijang-gun, Busan 619-962, Korea - In this study, we compared with 80% ethanol extracts from peel of *Poncirus trifoliata* (PTP) and peel of *Citrus junos* (CJP) against antioxidant and immune activities. Total phenolics and flavonoids contents in PTP extracts were 60.75±1.15 and 33.75±0.15 mg/100 g, respectively, and those were lower than CJP extracts. Antioxidant activities of PTP were increased with the more concentration, and were similar to CJP. Antioxidant activities of PTP were increased with increasing of concentration, and were similar to those of CJP. The NO production in macrophage cell lines were increased in a dose-dependent manner, until 5 mg/ml of CJP and 1 mg/ml of PTP compared with control cells, but decreased at higher concentrations. The proliferation of mouse spleen cells were increased in a dose-dependent manner, until 1 mg/ml of CJP and PTP compared with control cells but decreased at higher concentrations. The NO production in macrophage cell lines treated with PTP and CJP were increased in a dose-dependent manner, compared with untreated control cells until the concentrations of 1~5 mg/ml (CJP) and 1 mg/ml (PTP) but decreased at higher concentrations than that. The proliferation of mouse spleen cells treated with PTP and CJP were increased in a dose-dependent manner, compared with untreated control cells until the concentration of 1 mg/ml but decreased at higher concentrations than that.

**Key words :** *Citrus junos*, *Poncirus trifoliata*, antioxidant activity, immune activity

### 서 론

최근, "well-bing"이라는 형태의 새로운 트렌드가 부각되어 많은 관심이 집중되고 있다. 이에 따라 질환예방의 목적으로 최근 생리활성 물질을 많이 함유한 식품에 대한 관심이 증가되었으며 이에 대한 연구가 진행되고 있다[1,24,25]. 최근 몇 년 동안 많은 과학자들의 연구에 의해 인체의 노화 및 여러 질병의 발생이 프리라디칼인 활성산소와 깊은 관계가 있음이 밝혀지고 있다. 활성산소는 세포생체막의 인지질 중 불포화지방산을 공격하여 과산화지질을 생성하고 축적함으로써 생체기능을 저하시키고 동시에 DNA를 손상시키거나 암을 유발하기도 하며, 세포의 노화에도 관련이 되어 인간의 노화와 치매에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이외에도 활성산소와 연관된 질병의 종류로는 성인호흡장애 증

후군, 당뇨병, 심장혈관질환, 백내장, 류마티스 관절염 등이 있다[3,5,10,16,19]. 이러한 프리라디칼 반응으로부터 활성산소의 역할이 대두되어 이들의 제거에 대한 관심이 높아지고 있다. 항산화제는 활성산소를 제거시키는 역할을 하고 있는 물질로서 예방적 항산화제인 superoxide dismutase, 천연 항산화제인 phenolic 화합물, flavone 유도체 등이 있으며, 합성 항산화제로서는 BHT, BHA 등 많은 항산화제가 개발되어 있다[6,7,14]. 그러나 이들 항산화제들은 열 안정성이 떨어지고 발암의 위험성이 제기되고 있으며, tocopherol과 같은 천연물은 단독으로는 산화연쇄반응의 저지 능력이 낮고, 가격이 비싼 단점이 있다. 따라서 최근에는 생약 추출물 등에서 보다 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위한 많은 연구가 활발히 이루어지고 있다[8,17,27].

탕자(*Poncirus trifoliata*)는 다른 감귤류 보다 내한성이 강하고 촌락부근에 흔히 울타리용으로 심고 있는 귀화 식물로서 식용, 관상용, 밀원용, 약용 등으로 이용된다. 동의보감 탕액 편에서는 탕자 과피에 대하여 독이 없는 약재로 폐기로 기침

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7557, Fax : +82-51-206-0848

E-mail : ykj9912@dau.ac.kr

하는 것을 주치하고 가슴에 물려 있는 담을 풀어내며 풍으로 가렵고 마비되는 증세, 장풍으로 생긴 치질을 치료한다고 그 효능에 대해 설명하고 있다. 최근 탕자에 관한 연구로는 병원성 세균에 대한 탕자즙의 항균효과와 limonene, myrcene,  $\beta$ -caryophyllene, trans- $\beta$ -ocimene,  $\beta$ -pinene, 3-thujene, 7-geranyloxy coumarin 등 탕자의 향기 성분과 관련된 연구, “지실과 지각”에서 flavonoid glycoside의 분리 및 과피와 과육에서의 성분 등 주로 이화학적 연구와 합염증, 항과민증, 항유해장내 세균, 멜라닌 생성억제 등의 기능이 확인되었다[6,14,27].

이에 본 연구에서는 다양한 효능과 건강기능성 소재로서의 가치가 인정되며, 식품가공분야에서 활용도가 높을 것으로 기대되는 것임에도 불구하고 아직까지 연구가 미흡한 탕자의 과피 추출물에 대한 항산화 활성과 면역 기능을 같은 운향과 감귤 속에 속하는 유자의 과피 추출물과 비교 분석함으로써 탕자 과피의 생리활성 식품소재화의 기초 자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 과피 추출물의 제조

실험에 사용한 유자는 일반시장에서(남해산) 구입하였으며, 탕자는 경상북도 청도군에서 채배된 것을 구입하였다. 각 열매의 과육과 분리한 과피를 동결건조 하고 파쇄한 후, 각 과피의 건조물 중량에 대해 각 10배의 80% EtOH을 가하여 60°C에서 환류 냉각시키면서 6시간씩 2회 반복 추출하였다. 추출물을 감압 여과(pore size 6 mm)하고 여액을 50°C에서 회전식 진공증발 농축기로 완전 건조 시킨 후 -80°C에서 냉동보관 하면서 실험에 사용하였다.

### 총 Phenol 및 총 Flavonoids 함량 측정

총 phenol 함량은 Folin-Denis법[8]에 따라 각 추출물 0.2 ml에 folin-ciocalteau 시약 및 10% sodium carbonate anhydrous 용액을 각 1 ml씩 차례로 가한 다음 실온에서 1시간 정치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Caffeic acid (0~200 mg/ml)의 표준용액을 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 phenol 함량을 산출하였다. 총 flavonoids는 Moreno 등[17]의 방법에 따라 추출물 0.5 ml에 10% aluminum nitrate 0.1 ml, 1 M potassium acetate 0.1 ml 및 ethanol 4.3 ml를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 정치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 하여 0~200 mg/ml 범위에서 얻어진 표준 검량선으로부터 추출물의 총 flavonoids 함량을 산출하였다.

### DPPH radical에 대한 소거활성 측정

DPPH radical에 대한 소거활성 측정은 Blois [2]의 방법

을 변형하여 50~200 mg/ml의 시료 0.2 ml에 0.1 M 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl 용액 0.8 ml를 가하여 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하고 시료 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right)$$

### Superoxide dismutase (SOD) 유사활성

Superoxide dismutase 유사활성은 MarKlund 등[15]의 방법에 따라 행하였다. 추출물 0.2 ml과 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml을 Tris-HCl buffer (0.2 M, pH 8.5) 3 ml와 혼합하여 25°C에서 10분간 방치한 후 1 N HCl 1 ml로 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

(A: control absorbance, B: sample absorbance)

### Linoleic acid 시스템에서의 항산화 효과

CJP와 PTP에 의한 linoleic acid를 기질로 한 과산화 반응에서 과산화물의 생성 억제효과는 Nakatani 등[18]의 thiocyanate method에 따라 측정하였다. 2.51% linoleic acid 에탄올 용액 2.8 ml, 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 9 ml를 각 시료 추출물과 혼합한 후, 40°C에서 incubation하면서 하루간격으로 과산화물의 함량 변화를 측정하였다. 측정 방법으로는 시료액 100 ml를 취하여 75% 에탄올 9.7 ml에 희석한 후 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml, 20 mM iron (II) chloride (in 3.5% HCl) 0.1 ml 씩을 가한 다음 정확히 5분 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 각 시료의 과산화물 함량의 지표로 삼았다.

### 환원력의 측정

환원력은 Oyaizu [20]의 방법에 따라 행하였다. 각 시료 추출물 0.2 ml에 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) 0.2 ml, 1% potassium ferricyanide 0.2 ml를 차례로 가한 다음 50°C 수욕상에서 20분간 반응시켰다. 여기에 10% trichloroacetic acid (TCA) 용액 0.2 ml를 가하여 13,500×g에서 15분간 원심 분리한 후 얻은 상등액 0.3 ml에 증류수 0.3 ml과 0.1% ferric chloride 0.1 ml를 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

### NO 생성능

NO 생성능은 안정된 NO 산화물인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite)를 Griess 반응을 이용하여 측정하였다[26]. 실험에 사용한 대식 세포 주 RAW264.7는 한국세포주은행(Korean Cell Line

Bank, KCLB<sup>®</sup>)으로부터 분양 받아 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다. LPS의 농도는 1 mg/ml로 제조하여 각 농도별 CJP 또는 PTP와 혼합하여 사용하였다. CJP와 PTP를 각 농도별로 첨가한 후 RAW264.7을 48시간 배양하고 배양 상층액을 96 well plate에 100 µl씩 넣고 여기에 Griess 시약(0.1% N-1-naphthyl-1-ethylenediamine in H<sub>2</sub>O: 1% sulfanilamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>을 1:1로 혼합)을 첨가하여 10분간 반응 시킨 후 96well plate용 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정 하였다. Nitrite의 standard 농도는 sodium nitrite 64 mM에서부터 0.5 mM까지 2배씩 희석하여 표준곡선에 비교되어 측정하였다.

### 면역세포 증식능

본 실험에 사용된 생쥐(BALB/c)는 대한실험동물센터(충북 음성군)에서 구입한 생후 8~12주 된 암컷을 사용하였고, 실험 전 까지 고형사료와 1차 증류수를 공급하면서 사육하였다. 비장 세포 분리를 위해 생쥐(BALB/c)를 경추탈골로 희생시킨 후 알코올로 소독하여 절개, 개복하여 비장을 획득하였다. 분리한 비장을 single 세포로 만들어 4°C, 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 RPMI 1640배지로 3회 세척 후 세포를 회수하여 RPMI 1640배지로 세포를 희석하여 실험에 사용하였다[13]. LPS와 ConA의 농도는 각각 1 mg/ml로 제조하여 각 농도별 CJP 또는 PTP와 혼합하여 사용하였다. 사용하였다. 분리하여 희석한 비장세포를 96well plate에 넣고 여기에 시료를 농도별로 넣어 배양한 다음 각 조건에 따른 증식 정도를 측정하였다. 비장세포 증식측정은 배양 48시간 후 Cell titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution를 사용하여 각각 배양된 배양액 100 µl에 Cell titer 15 µl씩 첨가하여 4~8시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 총 phenol과 총 flavonoids의 함량

CJP와 PTP의 총 phenol과 총 flavonoids 함량을 측정한 결과를 Table. 1에 나타내었다. Citrus류의 과피나 종자에는 phenolic acids와 flavonoids 같은 phenolic compounds들이 많이 함유되어 있으며, 종자보다 과피에서 더 많이 함유되어

Table 1. Total phenolic compounds and total flavonoids contents of CJP and PTP

	Total phenolic compounds (mg/100 g)	Total flavonoids (mg/100 g)
CJP	75±1.13	42.05±0.21
PTP	60.75±1.15	33.75±0.19

있음이 보고되어진 바 있다[28]. 페놀성 물질은 식물계에 널리 분포하는 2차 대사산물로서 수산기를 가지는 방향성 화합물을 총칭하는 것으로, hydroxycinnamic acid를 비롯한 대부분의 페놀 화합물은 세포벽 다당류 리그닌 등과 ester 결합되어 있거나 중합체로 존재하며, 수산기를 통한 수소공여와 페놀 고리 구조의 공명 안정화에 의해 항산화 능력을 나타낸다[11,28]. 총 phenol 함량은 검정곡선( $r=0.9994$ )에 준하여 CJP에서 75±1.13 mg/100 g, PTP에서는 60.75±1.15 mg/100 g의 함량을 보여 CJP가 PTP보다 약 15%정도 더 페놀 함량이 많았다. 또한 페놀류 중에서도 가장 많은 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려진 flavonoids는 구조에 따라 flavones, flavanones, flavonols, isoflavones, anthocyanidins, flavanols (또는 catechins)로 구분할 수 있으며, citrus류는 그 중 isoflavones을 제외한 5개 그룹의 60개(types) 이상의 flavonoids들이 밝혀져 있다[21]. 그들은 항산화 활성, 항염증 활성, 아테롬성 동맥경화증 예방, 항암과 암 예방 효과, 항균활성 등의 생리활성을 가지고 있음이 연구를 통하여 밝혀지고 있다[9,7,4,12]. CJP와 PTP의 총 flavonoids 함량은 표준곡선( $r=0.9999$ )에 의해 CJP는 42.05±0.21 mg/100 g을, PTP는 33.75±0.19 mg/100 g의 함량을 보여 CJP가 PTP보다 총 phenol 함량 뿐만 아니라 총 flavonoids 함량에 있어서도 더 많은 것으로 나타났으나, CJP에서는 총 phenol 함량에 대한 총 flavonoids가 차지하는 비율은 약 56%, PTP에서는 약 55%를 나타내어, 각 시료들의 총 phenol에 대한 총 flavonoids 함량은 거의 비슷하게 나타났다.

### DPPH radical 소거활성

전자공여능은 phenolic acid와 flavonoids 등 페놀성 물질에 의한 항산화 작용의 지표이며 환원력이 큰 물질일수록 전자공여능이 높아진다고 보고되어 있다[23]. CJP와 PTP에 대한 전자공여능을 측정한 결과 두 시료 모두 전자공여능이 나타났으며 농도에 의존하여 전자공여능이 유의적으로 상승하였다(Fig. 1). CJP는 50 mg/ml에서 53%의 활성을 보이며 농도가 증가할수록 소거활성도 증가하여, 150 mg/ml에서는  $\alpha$ -tocopherol보다 높은 95%의 소거활성을 나타내었다. PTP 역시 농도에 따라 높은 소거활성을 나타내었는데 50 mg/ml에서 42%의 활성이 200 mg/ml에서는 88%의 높은 소거활성을 보여 CJP와 PTP는 200 mg/ml에서 천연 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol과 상응하는 활성을 나타내었다. Shin 등[23]은 유자 착즙액으로부터 전자공여능을 측정한 결과 농도에 따른 전자공여능의 증가를 확인하였으며, 0.1% 및 0.2% 농도의 시료액 첨가 시 80% 이상의 전자공여능을 나타낸다고 하여 본 실험과 유사함을 보였다.

### Superoxide dismutase (SOD) 유사활성

Superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 산화억제 작용을 측정하기 위해

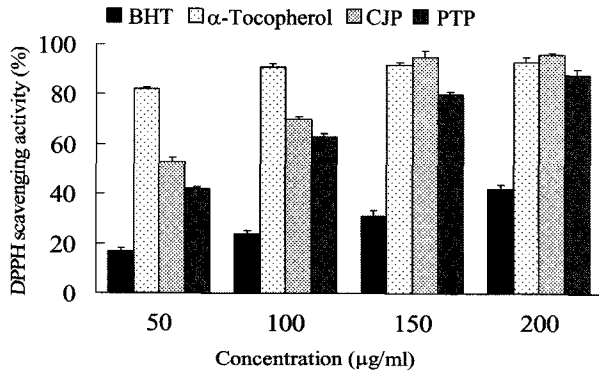


Fig. 1. DPPH scavenging activity of ethanol extract from CJP and PTP. The results represents the means±SD and averages of triplicate experminents.

superoxide와 반응하여 갈변물질을 내는 pyrogallol 자동 산화반응을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 4가지 시료 모두 농도의 증가에 따라 superoxide의 산화억제능 증가를 나타내었으나, 전체적인 활성은 낮게 나타났다. 50 mg/ml에서 모두 5% 미만의 비슷한 활성을 보이나, 100 mg/ml에서는 BHT와 PTP가 4.5%로 동일하였으며, α-tocopherol과 유자가 각 9%와 8%의 활성을 나타내었다. 150 mg/ml에서는 α-tocopherol이 21%로 활성이 증가하였으며 BHT와 CJP가 각 9.5%와 11%의 비슷한 활성을 보였고, 200 mg/ml에서는 α-tocopherol 만이 20%를 넘는 27%의 활성을 보였으며 BHT, CJP, PTP의 순으로 활성이 높게 나타났다.

**Linoleic acid 시스템에서의 항산화 효과**

Linoleic acid 에멀전 기질에서의 CJP와 PTP의 항산화 효과를 Fig. 3에 나타내었다. BHT, α-tocopherol, CJP와 PTP 및 대조구의 과산화물의 변화를 비교한 결과 저장 초기 흡광도는 0.04였으나 대조구는 저장 2일째 급격한 상승곡선을 그리며 0.60을 나타내며 저장 5일에는 1.20을 나타내었다. 나머지 4개의 시료는 관찰 7일까지 0.5를 넘지 않았으며 저장 7일에

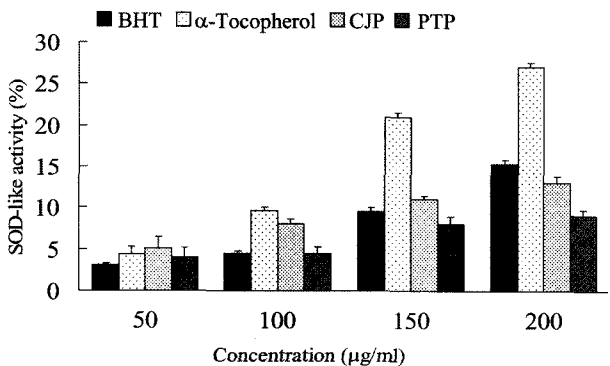


Fig. 2. SOD-like activity of ethanol extract from CJP and PTP. The results represents the means±SD and averages of triplicate experminents.

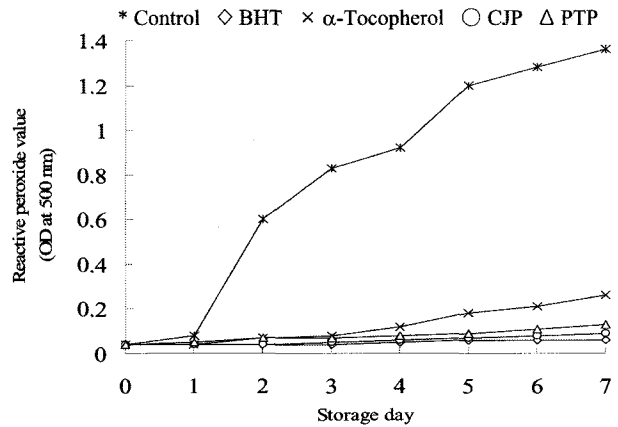


Fig. 3. Changes in the peroxide content of the linoleic acid emulsion substrates containing CJP and PTP.

α-tocopherol은 0.26, PTP는 0.13, CJP는 0.09, BHT는 0.06로 저장기간에 따라 과산화물의 함량도 증가하나 α-tocopherol을 제외한 나머지 3개의 시료는 유의할 만한 증가율을 보이지 않아, CJP와 PTP가 linoleic acid 에멀전 기질에서 천연 항산화제인 α-tocopherol에 비해 높은 과산화물 생성억제효과를 나타내었다. 그러나 본 실험에서는 저장기간이 7일로 비교적 짧아 항산화 효과의 구체적인 판단은 어려웠으므로 앞으로 저장기간을 보다 길게 하여 처리구별 유지의 유도기간을 측정하여 비교하는 실험을 수행해야 할 것으로 판단된다.

**환원력**

CJP와 PTP에 대한 철 이온의 환원력(Fe<sup>3+</sup>가 Fe<sup>2+</sup>로 변화)을 측정하여 흡광도로 나타낸 결과, Fig. 4에서와 같이 시험에 사용된 4가지 시료 모두 농도에 따른 환원력 증가를 나타냈다. BHT의 경우 DPPH 소거능과 비슷하게 환원력 증가율이 다른 시료들 보다 크지 않았으며, α-tocopherol은 DPPH 소거능과는 달리 50 mg/ml에서 가장 낮은 환원력을 나타내었고 200 mg/ml에서 1.4를 나타내어 환원력이 증가함을

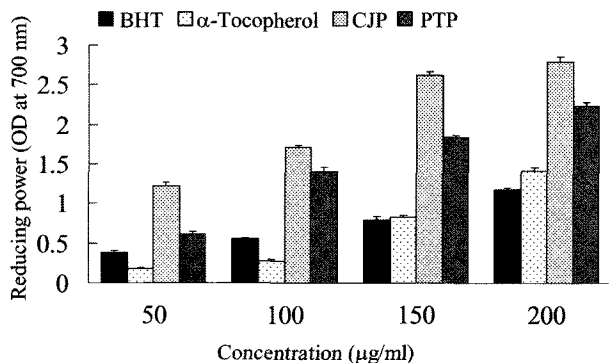


Fig. 4. Reducing power of ethanol extract from CJP and PTP. The results represents the means±SD and averages of triplicate experminents.

확인할 수 있었다. CJP는 50 mg/ml에서 이미 1.2를 나타내며 150 mg/ml에서는 2.6을 나타내어 유의할 만한 환원력 증가를 확인 할 수 있었다. PTP는 CJP에 이어 두 번째로 높은 환원력을 나타내었는데, 100 mg/ml에서 1.4를 나타내며 200 mg/ml에서는 2.2를 나타내어 농도에 따른 환원력의 증가를 확인할 수 있었다.

**NO 생성능**

CJP와 PTP의 대식세포 활성화 여부를 탐색하기 위해 대식세포주인 RAW 264.7에 각 시료를 농도별로 처리하여 배양액 중 대식세포가 생산한 NO로부터 산화된 NO<sub>2</sub> 농도를 측정 한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 대식세포에 CJP를 단독으로 처리한 결과 1~5 mg/ml에서 4.2 mM의 최대 NO 생성을 나타내었으며 LPS와 혼합 처리시에는 0.5 mg/ml과 1 mg/ml에서 5.7 mM로 최대 NO 생성능을 보였다. PTP를 대식세포에 단독으로 처리하였을 경우 0.5~1 mg/ml에서 3.9 mM의 최대 NO 생산을 나타내었으며 LPS와 혼합 첨가 시에도 단독 처리 시와 동일한 0.5~1 mg/ml에서 5.9 mM의 최대 NO 생성능을 보였다. 각 추출물을 단독처리 시 모두 최대 NO 생성을 나타낸 1 mg/ml에서 CJP가 PTP보다 0.3 mM 더 많은 생성을 나타내었으나, LPS와 혼합 처리한 경우 두 시료 모두 최대치를 보인 1 mg/ml 농도에서는 PTP가 0.3 mM 더 많은 NO 생성을 나타내었다. 이상의 결과로 CJP와 PTP는 대식세포의 생성을 도와 NO 생성량을 유도하는 것으로 사료된다.

**면역세포 증식능**

생쥐의 비장세포를 이용하여 면역세포 증식에 미치는 CJP와 PTP의 영향을 측정하기 위해 각 추출물을 0.1~30 mg/ml 농도로 처리하여 세포의 증식을 유도한 결과를 Fig. 6에 나타

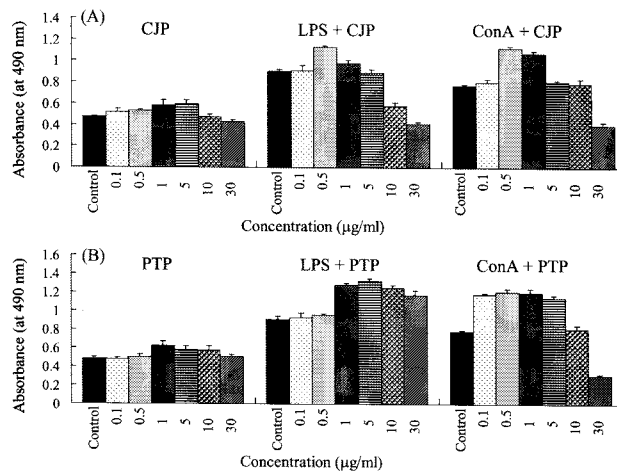


Fig. 5. Effects of (A) CJP and (B) PTP on the production of nitric oxide. The results represents the means±SD and averages of triplicate experiments.

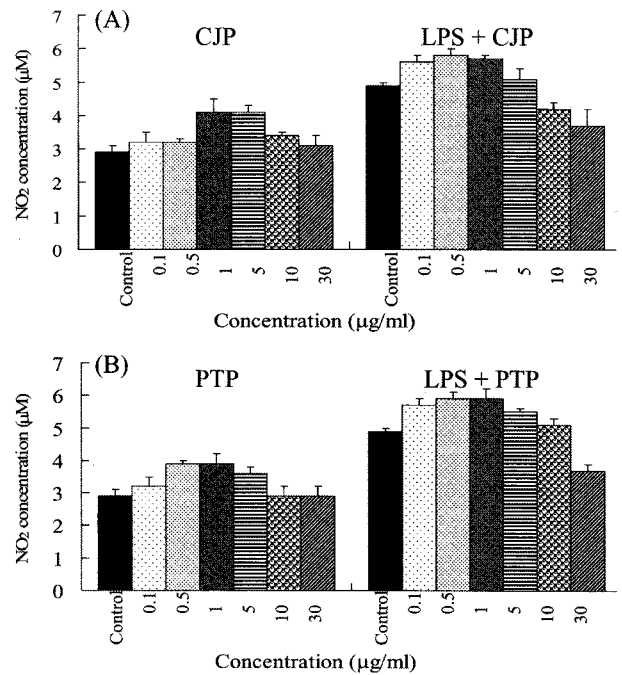


Fig. 6. Effects of (A) CJP and (B) PTP on the proliferation of spleen cells. The results represents the means±SD and averages of triplicate experiments.

내었다. 먼저, 생쥐의 비장세포에 CJP 단독으로 처리한 경우 1 mg/ml까지는 농도 의존적으로 면역세포의 증식을 유도하였으며, 비장세포의 B세포 증식을 자극하는 LPS를 1 mg/ml 혼합하였을 시 0.5 mg/ml의 농도에서 최대 증식을 나타내었다. 또한, 비장세포의 T세포 증식을 자극하는 ConA를 1 mg/ml 첨가하였을 경우에도 LPS처리 시와 동일한 0.5 mg/ml 농도에서 최대증식을 나타내었다. PTP를 단독으로 처리한 경우 CJP와 동일하게 1 mg/ml 까지 농도 의존적으로 세포 증식을 유도하며, LPS와 혼합 처리 시에는 단독 처리시보다 높은 5 mg/ml에서 최대증식을 보였고, ConA와 혼합하였을 경우는 단독 처리 시와 동일한 1 mg/ml에서 면역세포 최대 증식을 나타내었다. 이상의 결과로 CJP와 PTP가 비장 세포를 자극하여 T세포와 B세포 증식을 촉진하여 면역능을 증진시키는 것으로 추측할 수 있으나, B 세포와 관련이 있는 체액성 면역반응과 T세포와 관련이 있는 세포성 면역 중 어떤 반응을 유도하는지에 대해서는 알 수 없었다. 이와 관련하여 보다 구체적인 것은 추후 실험을 수행하여야 할 것으로 사료된다.

이상의 PTP의 생리활성에 관한 결과들을 토대로 살펴보면 PTP는 CJP와 아울러 우수한 항산화와 면역활성을 가지고 있으며, 이를 이용한 천연 물질의 생리활성 식품 소재로서의 가능성이 높다고 사료되고 현재, 각 생리활성에 관여하는 물질을 분리하기 위한 연구가 계속적으로 진행되고 있다.

## 요약

본 연구는 탕자(*Poncirus trifoliata*) 과피의 80% 에탄올 추출물(PTP)에 대한 항산화 활성과 면역 활성을 유자(*Citrus junos*) 과피 추출물(CJP)과 비교하였다. 총 phenol 함량과 총 flavonoids 함량은 PTP가 각각  $60.75 \pm 1.15$  mg/100 g과  $33.75 \pm 0.15$  mg/100 g이었으며, 이는 CJP에 비해 다소 낮았다. PTP의 항산화 활성은 농도 의존적으로 증가하였으며 CJP의 항산화 활성과 비슷하게 나타났다. 면역반응 중 대식세포가 생성하는 NO 생성량을 측정할 결과 CJP와 PTP를 단독으로 처리한 경우와 LPS와 혼합하여 처리한 경우 모두 1 mg/ml까지는 대조구와 비교하여 농도 의존적으로 증가하였으나 고농도에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 비장세포를 이용한 면역세포 증식능에서 CJP와 PTP를 첨가한 경우, 1 mg/ml까지는 대조구와 비교하여 농도 의존적으로 증가하였으나 고농도에서는 감소하였다.

## References

- Ames, B. M., M. K. Shigenaga and T. M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 7915-7922.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
- Branen, A. L. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxytoluene butylated hydroxyanisole. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **52**, 59-63.
- Carlsson, J. 1987. Salivary peroxidase: an important part of our defense against oxygen toxicity. *J. Oral Pathol. Med.* **16**, 412-416.
- Cheo, S. Y. and K. H. Yang. 1982. Toxicological Studies of antioxidants Butylated hydroxytoluene (BHT) and Butylated Hydroxyanisole (BHA). *Kor. Food Sci. & Tech.* **14**, 283-288.
- Chung, H. S., J. B. Lee, J. H. Seong and J. U. Choi. 2004. Chemical Components in Peel and Flesh of Trifoliata Oranges (*Poncirus trifoliata*). *Kor. J. Food Pre.* **11**, 342-346.
- Fukujawa, K. and Y. Takaishi. 1990. Antioxidant. *J. Act. Oxyg. Free rad.* **1**, 55-70.
- Gutfinger, T. 1958. Polyphenols in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 966-968.
- Halliwell, B. 1991. Drug antioxidant effects. *Drug* **42**, 56-605.
- Hatano, T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species. Tannins and related polyphenols. *Natural Medicines* **49**, 357-363.
- Herrman, K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **28**, 315-347.
- Hoogendoorn, H. and J. P. Piessens. 1987. Treatment of aphthous patients by enhancement of the salivary peroxidase system. *J. Oral Pathol. Med.* **16**, 425-427.
- Jeong, Y. R., M. H. Ha, S. H. Kim, S. K. Jo, M. W. Byun, H. W. Cho, K. I. Seo and S. T. Yee. 2000. Immuno suppressive effects of herbal plant extracts alloantigen reactive cell proliferation and cytotoxicity. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nur.* **29**, 1133-1138.
- Lee, Y. G. and I. H. Cha. 2001. Antibacterial Activity of *Poncirus trifoliata* Juice against Pathogenic Bacteria. *Kor. J. Life Sci.* **11**, 554-560.
- Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* **47**, 468-474.
- Masaki, H., S. Saksaki, T. Atumi and H. Sakurai. 1995. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162-166.
- Moreno, M., M. Isla, A. R. Sampietro and M. A. Vattuone. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J. Ethnopharmacology* **71**, 109-114.
- Nakatani, K. and H. Kikuzaki. 1987. A new actioxidative glucoside isolated oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agr. Biol. Chem.* **51**, 2727-2732.
- Omaye, S. T., K. A. Reddy and C. E. Cross. 1977. Effect of butylated hydroxytoluene and other antioxidants on mouse lung metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health* **3**, 826-836.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr.* **44**, 307-315.
- Peterson, J. S. and L. Dwyer. 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Research* **18**, 1995-2018.
- Shahidi, F. and P. K. Wanasundara. 1992. Phenolic antioxidant. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **32**, 67-103.
- Shin, J. H., J. Y. Lee, J. C. Ju, S. J. Lee, H. S. Cho and N. J. Sang. 2005. Chemical properties and nitrite scavenging Ability of citron (*Citrus junos*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 496-502.
- Wang, H., G. Cao and R. L. Prior. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 701-705.
- Willett, C. W. 1994. Diet and health: What should we eat. *Science* **264**, 532-537.
- Yee, S. T., Y. R. Jeong, M. H. Ha, S. H. Kim, M. W. Byun and S. K. Jo. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- $\alpha$  by herbal plant extract in mouse macrophage. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nur.* **29**, 342-348.
- Yi, J. M., M. S. Kim, H. N. Koo, B. K. Song, H. Y. Yoo and H. M. Kim. 2004. *Poncirus trifoliata* fruit induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Clinica Chimica Acta.* **34**, 179-185.
- Yusof, S., G. H. Mohd and G. Sweeking. 1990. Naringin content in local Citrus fruits. *Food chemistry* **37**, 113-121.