

진피 플라보노이드 생물전환 균주 분리 및 추출 베타세포에 대한 산화적 손상 억제 효과

박치덕¹, 정희경¹, 박창호¹, 정유석¹, 홍주현², 고희선³, 강동희³, 김현수^{3*}

Isolation of Citrus Peel Flavonoid Bioconversion Microorganism and Inhibitory Effect on the Oxidative Damage in Pancreatic Beta Cells

Chi-Deok Park¹, Hee-Kyung Jung¹, Chang-Ho Park¹, Yoo-Seok Jung¹, Joo-Heon Hong², Hee-Sun Ko³, Dong-Hee Kang³, and Hyun-Soo Kim^{3*}

접수: 2012년 1월 5일 / 게재승인: 2012년 1월 20일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, the optimum conditions of fermentation were determined by isolating the microorganisms with the ability to bioconvert the Citrus peel flavonoid, and the effect of the fermented Citrus peel extract which was bioconverted on the oxidative damage of HIT-T15 cell was investigated. The *Aureobasidium pullulans* Y-12 was isolated and identified with the strains having bioconversion activity. The fermentation conditions for bioconversion activity were confirmed to be optimal when culturing for three days at 25°C, 150 rpm in a culture medium containing 5% Citrus peel powder and 0.8% casitone. As a result of bioconversion, 32.8 mg/g and 21.5 mg/g of naringenin and hesperetin, which were aglycone flavones, were produced respectively. Also in the flavonoid content, it was confirmed that FCP produced 154.8 mg/g while CP produced 33.7 mg/g, thus producing more by approximately 4.6 times. As a result of treating FCP and CP

after inducing the oxidative damage for HIT-T15 cell by treating the deoxy-D-ribose with IC₅₀ (38 mM) concentration, the surviving rate was recovered to 90% for FCP treatments in the 0.01 mg/mL concentration and for CP treatments in the 0.025 mg/mL concentration. Also in the insulin secretion rate, FCP treatments increased by 206% and CP treatments by 132% when treated in the 0.1 mg/mL concentration. As the bioconverted FCP can inhibit the oxidative damage of HIT-T15 cell in the low concentration, it was considered its usability as the functional material for prevention of the type 2 diabetes.

Keywords: Citrus peel, Flavonoid, Bioconversion, *Aureobasidium pullulans* Y-12, HIT-T15

1. 서론

진피는 성숙한 감귤 과실의 껍질로 예로부터 한약재로 사용되어 왔으며, 대한약전에는 ‘귤나무 (*Citrus unshiu* Markovich) 또는 기타 동속 근연식물 (운향과, *Rutaceae*)의 성숙한 과 피’로 규정되어 있다 [1]. 한의학에서는 생약명으로 *Citri Unshii Pericarpium* 이라고도 하며, polyphenol류, vitamin류, essential oil 등과 함께 hesperidin, naringin, narirutin 등의 citrus 속 과일 특유의 플라보노이드류와 tangeretin, nobiletin 등 감귤류 고유의 플라보노이드를 함유하고 있다 [2-4]. 플라보노이드란 그리스어로 황색을 의미하는 flavus에서 유래된

¹대구테크노파크 바이오헬스융합센터

¹BioHealth Convergence center, Daegu Technopark, Daegu 704-801, Korea

²대구가톨릭대학교 외식식품산업학부

²Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

³계명대학교 미생물학과

³Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Tel: +82-53-580-5284, Fax: +82-53-580-5284

e-mail: hskim@kmu.ac.kr

것으로 감귤류에도 약 60여종 이상이 알려져 있는데 대부분 당과 결합된 배당체 (glycoside) 형태로 존재하며, 1939년 헝가리 Albert Szent-Gyorgyi에 의해 최초로 임상에 사용되었다 [5]. 플라보노이드는 혈관투과성 조절 및 vitamin C 보조 활성을 보여 vitamin P라고 불리기도 하며, 인체에 대한 1일 섭취량이 약 23~1,000 mg 정도로 특이한 부작용이 없는 것으로 알려져 있다 [6,7]. 플라보노이드는 polyphenolic 물질로 분자 구조에 따라 flavones, flavanones, flavonols, isoflavones, anthocyanidins 그리고 flavanols (또는 catechins) 등으로 분류되며, 그리고 이러한 구조의 차이에 의해 생체 내에서의 흡수 및 대사 그리고 생화학적 활성이 달라진다고 보고되고 있다 [8-10]. Ameer 등 [11]은 naringin과 hesperidin과 같은 배당체 플라보노이드의 체내 흡수형태를 조사한 결과, 혈액과 혈구에서는 aglycone 형태인 naringenin과 hesperetin만이 검출되었다고 보고한 바 있다. 이처럼 배당체 형태의 플라보노이드는 소화과정에서 장내세균이 분비하는 효소의 작용을 받아 당이 유리된 후 aglycone 형태로 전환되어 흡수되고 그 후 혈액, 뇨, 혈구 등으로 이동되어 검출된다는 것을 알 수 있다 [12,13]. 하지만 시중에 한약 재료 유통되는 진피는 체내에 바로 흡수될 수 있는 형태인 aglycone 플라보노이드의 함량이 극히 낮기 때문에 개개인의 장내 미생물 군총의 차이에 따른 효소활성의 차이에 의해 흡수되는 정도가 달라질 수 있다 [14,15].

당뇨병은 대표적인 만성질환으로 제 2형 당뇨병의 경우 말초조직의 인슐린 저항성과 함께 췌장 베타세포의 기능저하가 일어나는데, 베타세포 기능저하의 원인은 만성적인 고혈당과 혈중 유리지방산의 증가, 유전적 요인 등 다양한 가설이 제기되고 있다 [16]. 그 중 만성적 고혈당에 의한 비가역적인 베타세포 기능저하를 당독성 (glucose toxicity)라 하며, 고농도 포도당 상태에서 포도당 자가산화 (glucose autooxidation), 산화적 인산화 (oxidative phosphorylation), hexosamine 경로 등에서 발생하는 free radical로 인한 산화적 스트레스의 증가가 주요 요인으로 알려져 있다 [17,18]. 이로 인해 제 2형 당뇨병은 약물치료와 함께 적절한 항산화제의 섭취가 권장되고 있다.

따라서 본 연구에서는 풍부한 플라보노이드를 함유하여 항산화능이 우수한 것으로 알려진 진피를 대상으로 미생물을 이용한 생물전환 기법을 활용하여 진피에 함유된 배당체 플라보노이드를 비배당체로 전환시켜 새로운 기능성 식품 소재로 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에 사용된 진피는 2008년도 재배된 제주도산 유기농 온주밀감으로 제조된 것으로 (주)옴니허브 (Daegu, Korea)에서 구입하였고, 플라보노이드 분석을 위한 표준물질로 hesperidin, narirutin은 Chromadex사 (Irvine, CA, USA), naringin, naringenin, hesperetin은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 그리고 β -glucosidase

활성 측정을 위해 사용된 esculin과 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG), sodium acetate, p-nitrophenol 등의 시약도 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. HIT-T15 세포주는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였고, 세포주 배양에 사용된 배지인 RPMI-1640과 Fetal bovine serum (FBS), penicillin 그리고 streptomycin은 (주)웰진 (Daegu, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다.

2.2. 생물전환 균주 분리 및 동정

진피 플라보노이드의 생물전환 균주 분리는 플라보노이드와 폴리페놀이 풍부하여 항산화능이 우수한 것으로 알려져 있는 감잎, 비파엽 그리고 본 연구의 재료인 진피를 분리원으로 하여 배당체 플라보노이드의 전환에 필요한 β -glucosidase 활성을 가지는 균주를 분리하였다. 각 재료의 조분체물 1 g을 멸균수 10 mL에 현탁하고, 10배씩 단계 희석하여 tryptic soy agar (TSA), nutrient agar 그리고 potato dextrose yeast extract (PDY) agar 배지에 각각 100 μ L씩 접종하여 30°C에서 2~3일간 배양하면서 생성되는 colony의 형태와 색상을 기준으로 1차 분리하였다. 1차 분리된 균주는 상기의 분리배지에 0.1% esculin과 0.05% ferric ammonium citrate를 첨가한 esculin 평판배지에 배양하여 colony 주위가 검게 발색되는 것을 육안으로 관찰하여 2차 분리하였으며, 최종 선별은 β -glucosidase 활성을 측정하여 활성이 가장 우수한 균주를 공시균주로 사용하였다.

최종 선정균의 동정은 현미경 (Axio imager, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용한 형태학적인 특징과 (주)솔젠트사에 의뢰하여 선정균의 18S rDNA를 universal primer인 ITS1 (forward), ITS4 (reverse)를 이용하여 sequencing 하고, NCBI 홈페이지 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 blast search program을 이용하여 염기서열의 상동성을 조사하여 동정하였다.

2.3. β -glucosidase 활성

배당체 플라보노이드인 hesperidin, narirutin 그리고 naringin의 당쇄 부분을 가수분해하는 효소인 β -glucosidase의 활성은 Leite 등 [19]의 방법에 따라 측정하였다. 분리 균주의 배양 상등액을 조효소액으로 하여 4 mM의 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG)를 포함한 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 2 mL에 조효소액 200 μ L를 가하고 40°C 항온수조에서 30분간 반응시킨 후, 0.5 M의 차가운 Na_2CO_3 용액 2 mL을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이때 유리된 p-nitrophenol의 양은 405 nm에서 흡광도를 측정하여 p-nitrophenol을 이용한 표준 검량선으로부터 산출하였고, β -glucosidase 활성은 상기 반응조건에서 반응시간 분당 1 μ M의 p-nitrophenol을 생성하는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

2.4. 시료 제조 및 플라보노이드 함량

진피 플라보노이드의 생물전환 시료 제조는 진피 발효액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 (Avanti J-25, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)하여 상등액을 제거하고 남은 진피

발효물 (pellet)에 사용된 진피 분말의 20배 (W/V) 에탄올을 첨가하여 70°C에서 3시간 추출하였다. 추출액은 여과지 (whatman paper No.2)를 이용하여 여과하고, 감압농축기 (N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 45°C에서 농축한 후, 동결건조기 (PVTFD10R, Ilshin lab, Yangju, Korea)를 이용하여 분말화하였고, 이를 fermented citrus peel extract powder (FCP)로 표시하였다. 대조군은 발효하지 않은 생진피 분말을 동일한 방법으로 제조하였으며, citrus peel extract powder (CP)로 표시하였다.

생물전환 된 플라보노이드의 함량은 Jung 등 [20]의 방법에 따라 발효 진피 추출물을 5 mg/mL이 되도록 20% dimethyl formamide (DMF)를 함유한 메탄올에 용해하여 5분간 초음파처리 하고, 0.2 µm syringe filter로 여과한 용액을 분석용 시료로 제조하여 HPLC (Waters 2795, Waters Co., Milford, USA)로 분석하였다. 분석용 칼럼은 Waters사의 Sunfire C₁₈ (4.6 mm ID × 150 mm, 5 µm particle size)을 사용하였으며, 용출은 메탄올 (A)과 0.5% 초산을 함유한 증류수 (B)를 이용하여 초기 10분까지 A:15%, 20분까지 A:30%, 35분까지 A:40%, 50분까지 A:65%, 60분까지 A:15%의 gradient 조건하에서 UV 280 nm, 1.0 mL/min, 컬럼 온도 30°C에서 10 µL의 시료를 주입하여 분석하였다.

2.5. 생물전환을 위한 발효조건

생물전환을 위한 분리균의 배양은 발효 기질로 사용된 진피를 분쇄하여 30 mesh 체를 통과한 진피 분말 1.5 g에 20배 (W/V)의 증류수를 첨가하여 제조한 진피 발효 배지를 기본 배지로 이용하였으며, PDY broth에서 36시간 배양한 전배양액을 5%되게 접종하여 배양하였다. 생물전환 수율 향상을 위한 최적 발효조건 확립을 위해 28°C, 150 rpm, 72시간 배양을 기본조건으로 탄소원, 질소원의 영향과 발효 온도의 영향을 검토하였다.

2.6. 세포배양 및 독성

Hamster pancreatic β-cell인 HIT-T15 cell의 배양은 Miyake 등 [21]의 방법에 따라 10% FBS, 100 units/mL penicillin 그리고 100 ng/mL의 streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 (glucose 11.1 mM 포함) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. FCP와 CP의 세포 처리 농도를 결정하기 위해 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]법을 이용하여 세포 독성을 확인하였다. 24 well plate에 well 당 10⁴개의 세포를 분주하여 24시간 배양한 후, FCP와 CP를 DMSO에 적당한 농도로 용해시켜 배지에 첨가한 다음, 24시간 추가 배양하였다. 이후 각 well에 MTT (5 mg/mL)를 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 뒤, 상등액을 제거하고 DMSO 300 µL를 첨가하여 세포 내 formazan을 충분히 용해시켜 microplate reader (Asys UVM340, Biochrom, UK)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고 시료를 처리하지 않은 대조군을 100%로 하여 세포 독성을 측정하였다.

2.7. 산화적 손상에 대한 세포 생존율 및 인슐린 분비능

고농도 당에 의한 세포의 산화적 손상 유도는 2-deoxy-D-

ribose (dRib)를 HIT-T15 cell에 10~60 mM의 농도로 처리한 후, MTT 법을 통해 세포 생존율을 조사하여 생존율 50%를 나타내는 IC₅₀ 농도를 결정하였다. 그리고 FCP와 CP의 처리에 따른 세포 생존율의 변화는 DMSO에 농도별로 용해한 각 시료를 배양된 세포에 첨가하여 30분간 반응시킨 후, IC₅₀ 농도의 2-deoxy-D-ribose를 첨가하여 추가 배양한 후, MTT 법을 통해 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 산화적 손상에 의한 세포 생존율을 비교하였다. 그리고 상기와 같은 방법으로 농도별로 시료가 처리된 세포의 인슐린 분비능 변화를 조사하기 위해 세포배양 상등액을 취하여 4°C에서 10분간 원심분리한 후, 상등액 10 µL의 인슐린 함량을 Mercodia high range rate insulin ELISA kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, 세포배양 상등액의 단백질 함량은 Bradford reagent (Thermo, Pittsburgh, PA, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 인슐린 분비량은 단백질 함량 (mg) 당 인슐린 분비량 (µL)으로 계산한 후, 대조군과 비교하여 인슐린 분비능 (%)으로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 생물전환 균주의 분리

β-glucosidase 활성을 보유한 균주의 분리는 1차적으로 각 분리원으로부터 배양된 colony의 색상과 형태 기준으로 총 29균주를 분리하였으며, 현미경 검경을 통해 세균으로 판단되는 13종과 효모로 판단되는 16종으로 구분하였다. 각각의 균에 대해 2차적으로 esculin 가수분해능을 확인한 결과 효모로 판단되는 4종에서 β-glucosidase에 의해 esculin이 가수분해되어 생성된 esculetin이 철 이온과 반응하여 colony 주위가 검게 발색되는 현상을 확인할 수 있었다 (data not shown). 최종적으로 esculin 가수분해능이 확인된 이들 4종의 균을 PDY 배지를 이용하여 28°C에서 2일간 배양하여 배양액 중의 β-glucosidase 활성을 측정된 결과, Fig. 1에서 보인 바와 같이 4종 모두 효소 생산이 확인되었고, 특히 Y-12 균주가 555 mU으로 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 이는 Leite 등 [19]이 *Aureobasidium pullulans*를 이용하여 다양한 탄소

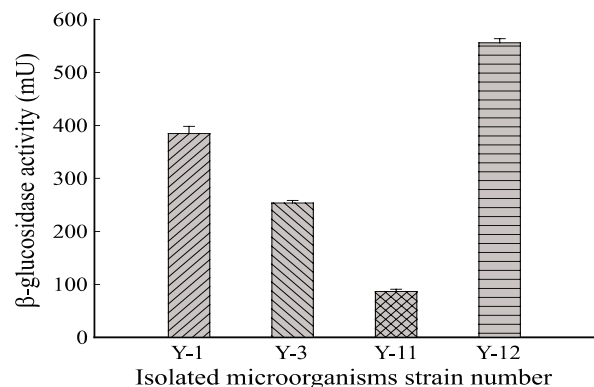


Fig. 1. β-glucosidase activity of isolated microorganisms. Data values were expressed as mean ± SD of triplicate experiments.

원에서 β -glucosidase를 측정된 결과, wheat bran에서 1.0 U/mL, soy bran에서 0.15 U/mL, soy peel에서 0.2 U/mL, corncob에서 0.35 U/mL, corn straw에서 0.1 U/mL의 활성을 나타낸다고 보고한 것과 비교할 때, 분리된 Y-12 균주의 효소 생산능이 비교적 양호한 것으로 판단되며 효소 활성이 확인된 균주를 대상으로 진피 배지에서 실제로 생물전환 반응이 일어나는지 조사하였다.

3.2. 생물전환 전환물 확인

효소 활성이 검출된 4종의 분리균이 hesperidin과 narirutin 같은 배당체 플라보노이드를 비배당체로 전환할 수 있는지를 확인하기 위해 진피 발효 배지에 분리균을 배양하고, 에탄올 추출하여 HPLC 분석을 수행하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 가장 높은 β -glucosidase 활성을 보인 (Fig. 1) Y-12 균주는 발효 전에는 검출되지 않았던 hesperetin과 naringenin peak가 검출되어 효소의 작용에 의해 hesperidin으로부터 hesperetin이 생성되고, narirutin으로부터 naringenin이 생성됨을 확인하였다. 그리고 분리균 4종 모두에서 전환 활성이 나타났으며, 효소 활성이 가장 높은 Y-12 균주가 naringenin 47.5 μ g/mL, hesperetin 51.3 μ g/mL로 전환 활성 역시 가장 우수하였다 (Table 1). 이 결과에서 생물전환능이 가장 우수한 Y-12 균주를 최종 생물전환 공시균주로 선정하였다.

Table 1. Contents of the bioconverted flavonoid from isolated microorganisms

Strain No.	Flavonoid contents (μ g/mL)		
	Naringenin (NA)	Hesperetin (HE)	NA + HE
Y-1	43.9	42.2	86.1
Y-3	38.3	45.6	86.1
Y-11	28.8	42.9	86.1
Y-12	47.5	51.3	86.1

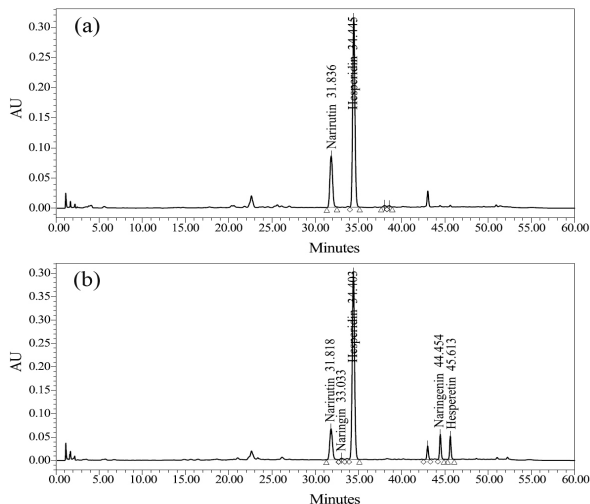


Fig. 2. Bioconversion of citrus peel flavonoids by fermentation. Isolated microorganism Y-12 was fermented at 28°C, 150 rpm for 3 days. Mobile phase: methanol/0.5% acetic acid (15 : 85~65 : 35, v/v), column: Sunfire C₁₈ 5 μ m, flow rate: 1.0 mL/min, detection: UV at 280 nm. (a) non-fermentation, (b) after-fermentation.

Shimoda 등 [22]은 식물세포인 *Eucalyptus perriniana*를 이용하여 생물전환을 수행한 결과 naringin으로부터 naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside, naringenin 그리고 naringenin 5,7-O- β -D-diglucopyranoside 등 7종류의 naringin 유도체와 naringenin으로부터 naringenin 4-O- β -D-glucopyranoside, naringenin 5-O- β -D-glucopyranoside 등 7종류의 생물전환 유도체를 확인하였는데, 이는 플라보노이드에 결합된 당의 결합위치와 종류를 변화시켜 일어난 결과로 당쇄부분을 제거한 본 연구에 비해 더욱 다양한 종류의 플라보노이드 화합물이 만들어지는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서도 발효 과정에서 전환된 aglycone의 당쇄에 변화를 줄 수 있는 새로운 효소의 이용 등 발효 공정에 대한 연구를 보완한다면 기능적으로 더욱 우수한 소재의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

3.3. 분리균주 동정

생물전환 활성이 가장 우수한 것으로 확인된 Y-12 균주의 동정은 현미경을 통한 형태학적인 특징 조사와 함께 18S rDNA 분석을 수행하였다. Y-12 균주의 염기서열 분석은 (주)솔젠트사 (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 rDNA를 universal primer인 ITS1 (forward), ITS4 (reverse)를 이용하여 염기서열을 분석한 후, NCBI의 blast search를 통해 상동성을 조사하여 동정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보인 바와 같이 *Aureobasidium pullulans*의 염기서열과 상동성 100%로 일치하여 최종적으로 *Aureobasidium pullulans* Y-12로 명명하였다. 현미경을 통한 형태학적 특징에서도 Fig. 4에서처럼 *Aureobasidium* sp. 균주의 전형적인 생육 특징인 budding과 mycelium이 관찰

Score = 1158 bits (584), Expect = 0.0
Identities = 584/584 (100%)
Strand = Plus / Plus

```

Query 1  CTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAGTAAGGGTCTCAGCGCCGACCT 60
      |||
Sbjct 1  CTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAGTAAGGGTCTCAGCGCCGACCT 60
Query 61  CCAACCCCTTTGTTGTTAAACTACCTTGTTCCTTTGGCGGGACCCTCGGTCTCGAGCCG 120
      |||
Sbjct 61  CCAACCCCTTTGTTGTTAAACTACCTTGTTCCTTTGGCGGGACCCTCGGTCTCGAGCCG 120
Query 121  CTGGGGATTCGTCCAGGCGAGCGCCGCCAGAGTTAAACCAAACTCTTGTATTATTAACC 180
      |||
SBJCT 121  CTGGGGATTCGTCCAGGCGAGCGCCGCCAGAGTTAAACCAAACTCTTGTATTATTAACC 180
QUERY 181  GGTGCTGCTGAGTTAAATTTTGAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT 240
      |||
SBJCT 181  GGTGCTGCTGAGTTAAATTTTGAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT 240
QUERY 241  CGCATCGATGAAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAA 300
      |||
SBJCT 241  CGCATCGATGAAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAA 300
QUERY 301  TCATCGAATCTTTGAACGACATTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGCGA 360
      |||
SBJCT 301  TCATCGAATCTTTGAACGACATTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGCGA 360
QUERY 361  GCGTCATTACACCACTCAAGCTAGTCTTGGTATTGGCGTCTGCTTCTAGTTGGCGCGCC 420
      |||
SBJCT 361  GCGTCATTACACCACTCAAGCTAGTCTTGGTATTGGCGTCTGCTTCTAGTTGGCGCGCC 420
QUERY 421  TTAAGAACCTCGCGGAGGCCACTCGGCTTATAGGCGTAGTAGAATTTATCGAACGCTCG 480
      |||
SBJCT 421  TTAAGAACCTCGCGGAGGCCACTCGGCTTATAGGCGTAGTAGAATTTATCGAACGCTCG 480
QUERY 481  TCAAAGGAGAGGAACTCTGCCACTGAAACCTTTATTTTCTAGGTTGACCTCGGATCAG 540
      |||
SBJCT 481  TCAAAGGAGAGGAACTCTGCCACTGAAACCTTTATTTTCTAGGTTGACCTCGGATCAG 540
QUERY 541  GTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA 584
      |||
SBJCT 541  GTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA 584

```

Fig. 3. Alignment of partial 18S rDNA sequence of the strain Y-12 and *Aureobasidium pullulans*.

되었으며, PDA 배지에서 7일간 배양한 후, 검게 변색되지 않는 것으로 보아 멜라닌 색소는 생성하지 않는 것으로 확인되었다. *A. pullulans*는 균체 외로 pullulan과 같은 중성 세포 외 다당류 (neutral exopolysaccharide)를 생산하는 것으로 알려져 산업적으로 이용되고 있으며 일본에서는 이 균주의 배양액을 정제하여 기능성 식품 소재로도 제품화 되고 있다. *A. pullulans*는 불완전곰팡이의 일종으로 효모와 비슷한 생육 형태를 보여 흑효모라고도 하며 일부 균에서는 멜라닌 색소를 생성하기도 한다 [23,24]. 또한 Leite 등 [19]은 β -glucosidase를 정제하여 열 안정성을 보고한 바 있고, Li 등 [25]은 *A. pullulans* Y-2311-1로부터 xylanase를 정제하고 효소학적 특성을 보고하였을 뿐 아니라 tannase 생산에 대한 보고 [26]도 있는 등 다양한 효소 생산성을 가진 균주로 보고 되어 있어 산업적 이용가치가 높다.

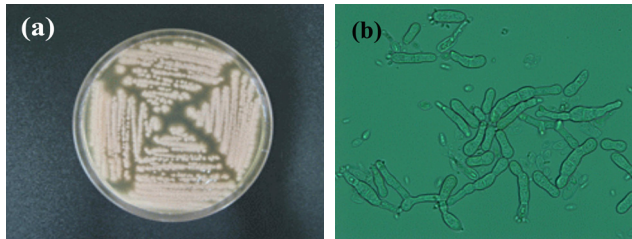


Fig. 4. Photographs of *A. pullulans* Y-12. (a) *A. pullulans* Y-12 was incubated at 28°C for 7 days on PDY medium, (b) Microscope image ($\times 400$).

3.4. 진피 발효의 최적 조건

A. pullulans Y-12에 의한 최적 생물전환 조건을 조사하기 위해 탄소원, 질소원, 온도, 교반속도 그리고 발효시간에 따른 영향을 조사하였다. 먼저 탄소원을 2% 첨가하여 배양한 결과 Table 2에서처럼 arabinose에서 naringenin이 53.3 $\mu\text{g/mL}$, hesperetin이 51.7 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높게 나타났으나, 탄소원을 첨가하지 않은 무첨가구에서도 naringenin이 52.0 $\mu\text{g/mL}$, hesperetin이 51.3 $\mu\text{g/mL}$ 로 거의 유사한 수준의 전환율을 나타내어 탄소원 첨가에 대한 영향은 없는 것으로 나타났다.

Table 2. Effect of carbon sources on bioconversion of citrus peel by *A. pullulans* Y-12

Carbon sources	Flavonoid contents ($\mu\text{g/mL}$)		
	Naringenin (NA)	Hesperetin (HE)	NA + HE
Arabinose	53.3	51.7	105.0
Fructose	44.3	42.0	86.2
Galactose	28.0	36.6	64.6
Glucose	41.1	38.7	79.8
Glycerol	54.2	48.0	102.1
Lactose	48.8	41.9	90.7
Maltose	49.6	44.3	93.9
Soluble starch	54.3	49.0	103.3
Sucrose	46.0	41.3	87.2
Xylose	49.7	44.2	93.9
None	52.0	51.3	103.4

A. pullulans Y-12 was fermented at 28°C, 150 rpm for 3 days on various carbon sources.

질소원을 0.2% 첨가하여 배양한 결과 무기질소원 보다 유기질소원에서 전환물 생성량이 높게 나타났으며, 특히 casitone 첨가군에서 naringenin이 66.6 $\mu\text{g/mL}$, hesperetin이 59.4 $\mu\text{g/mL}$ 로 무첨가군에 비해 약 27% 정도 증가되었다 (Table 3). 최적 질소원으로 선정된 casitone의 첨가 농도는 0.8% 일 때 naringenin 67.6 $\mu\text{g/mL}$, hesperetin 75.7 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 양호하였으며, casitone 첨가량이 증가될수록 hesperetin의 함량이 증가되는 경향이 나타났다 (Table 4).

Table 3. Effect of nitrogen sources on bioconversion of citrus peel by *A. pullulans* Y-12

Nitrogen sources	Flavonoid contents ($\mu\text{g/mL}$)		
	Naringenin (NA)	Hesperetin (HE)	NA + HE
Casitone	66.6	59.4	126.0
Malt extract	60.9	43.9	104.8
Peptone	61.9	50.1	112.0
Soytone	62.4	52.5	114.9
Tryptone	58.1	50.8	108.9
Yeast extract	60.0	49.5	109.5
NaNO ₃	57.9	45.2	103.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	50.1	41.1	91.2
NH ₄ Cl	47.3	36.7	83.9
None	55.8	42.8	98.7

A. pullulans Y-12 was fermented at 28°C, 150 rpm for 3 days on various nitrogen sources.

Table 4. Effect of nitrogen concentration on bioconversion of citrus peel by *A. pullulans* Y-12

Casitone concentration (%)	Flavonoid contents ($\mu\text{g/mL}$)		
	Naringenin (NA)	Hesperetin (HE)	NA + HE
0.2	58.6	56.6	115.2
0.4	60.8	64.2	125.0
0.6	62.9	70.4	133.3
0.8	67.6	75.7	143.3
1.0	64.8	77.3	142.1

A. pullulans Y-12 was fermented at 28°C, 150 rpm for 3 days on various concentrations of casitone.

Table 5. Effect of fermentation temperature on bioconversion of citrus peel by *A. pullulans* Y-12

Temperature (°C)	Flavonoid contents ($\mu\text{g/mL}$)		
	Naringenin (NA)	Hesperetin (HE)	NA + HE
15	45.8	63.2	108.9
20	65.7	88.8	154.5
25	76.4	88.5	164.9
28	61.9	74.3	136.2
30	47.6	62.0	109.6
35	ND	11.3	11.3
40	ND	ND	ND

A. pullulans Y-12 was fermented at 150 rpm for 3 days on various temperature. ND: none detected.

발효 온도에 대한 영향을 검토하기 위해 0.8% casitone 이 첨가된 진피 발효 배지를 이용하여 15~40°C 범위에서

3일간 발효시킨 결과, Table 5에 나타난 것처럼 25°C에서 naringenin 76.4 µg/mL, hesperetin 88.5 µg/mL로 가장 우수하였으며 20°C에서도 비슷한 수준을 유지하였다. 그러나 35°C 이상에서는 급격하게 감소되어 25°C 내외의 비교적 낮은 온도에서 생물전환 반응이 더욱 잘 일어나는 것으로 조사되었다.

3.5. HIT-T15의 세포 독성

세포 실험을 위한 시료는 공시균주 (Y-12)를 이용하여 발효 최적 조건으로 발효시킨 후, 실험재료 및 방법에 따라 생물전환 된 발효진피 추출물 (FCP)과 대조구인 생진피 추출물 (CP)를 제조하였다. 그 결과 각각의 플라보노이드 함량과 추출 수율은 Table 6에 나타난 것처럼 FCP에서 생물전환 된 naringenin과 hesperetin이 각각 32.8 mg/g과 21.5 mg/g를 포함하여 총 154.8 mg/g의 플라보노이드를 함유하여 CP에 비해 약 4.6배 정도 높은 함량을 가진 것으로 확인되었다.

Table 6. Major flavonoid contents of non-fermentation and after fermentation from citrus peel

Sample	Flavonoid contents (mg/g powder)					Yield (%)
	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Naringenin	Hesperetin	
CP	16.3	0.8	16.1	-	0.5	35.1
FCP	12.3	1.0	87.2	32.8	21.5	7.74

CP와 FCP가 2-deoxy-D-ribose 노출로 산화적 손상이 유도된 HIT-T15 세포에서 세포 회복능과 인슐린 분비능의 개선에 효과가 있는지를 조사하기 위해 MTT assay를 통해 세포 독성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5에서처럼 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교해 CP는 1 mg/mL 농도에서도 97%의 세포 생존율을 나타내어 세포 독성이 관찰되지 않았으나, FCP는 0.5 mg/mL 이상의 농도에서 약한 세포 독성이 확인되었다. 그러나 0.1 mg/mL 농도에서는 생존율 94%로 독성이 나타나지 않아 0.1 mg/mL 이하를 시료 처리 농도로 설정하였다.

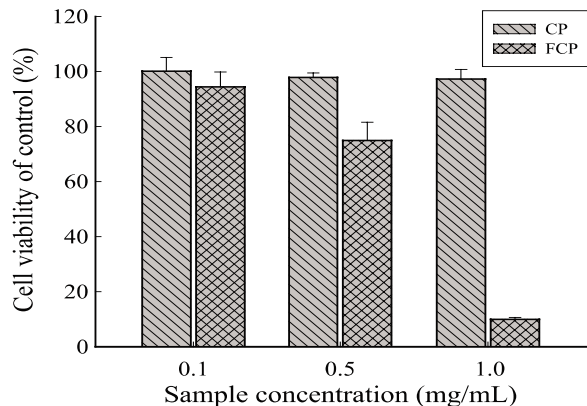


Fig. 5. Effect of citrus peel extract and fermented citrus peel extract on cell viability of HIT-T15. CP: citrus peel extract powder, FCP: fermented citrus peel extract powder. Data values were expressed as mean ± SD of triplicate experiments.

3.6. 세포 회복능

제 2형 당뇨병의 병인은 말초조직의 인슐린 저항성과 췌장의 β-cell 기능저하로 설명되는데, β-cell 기능저하의 정확한 기전은 알려져 있지 않지만 만성적인 고혈당, 혈중 유리 지방산의 증가, 아밀로이드 폴리펩타이드 그리고 유전적 요인 등이 가설로 제기되고 있다. 만성적인 고혈당에 의한 비가역적인 β-cell 기능저하를 당독성 (glucose toxicity)이라고 하는데, 고농도 포도당에 의한 산화적 스트레스의 증가가 원인인 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 산화적 스트레스를 유도하기 위해 사용된 2-deoxy-D-ribose는 glucose에 비해 환원력이 크기 때문에 단시간에 β-cell의 산화적 스트레스를 유발할 수 있어 *in vitro* 연구에서 glucose 대신 당독성 연구에 효과적으로 이용될 수 있다 [16,27]. 따라서 2-deoxy-D-ribose로 세포의 산화적 손상을 유도하여 FCP와 CP에 의한 회복능을 조사하기 위해 HIT-T15 세포에 2-deoxy-D-ribose를 10~60 mM의 농도로 처리한 후 무처리구 대비 50%의 생존율을 나타내는 IC₅₀ 농도 (38 mM)를 확인하였다. 2-deoxy-D-ribose를 처리한 HIT-T15 세포에 FCP와 CP를 첨가하여 세포 회복능을 비교해 본 결과, Fig. 6에서처럼 2-deoxy-D-ribose를 IC₅₀ 농도로 처리한 대조군에서는 생존율이 54%로 감소되었고, 각 시료 처리군 (0.01, 0.025, 0.1 mg/mL)에 의해 산화적 손상을 받은 세포의 생존율이 77~90%까지 회복됨을 확인하였다. FCP와 CP간의 차이는 크지 않았으나 CP는 0.025 mg/mL 농도에서 생존율 90%로 회복능이 가장 우수하였고, FCP는 이보다 1/5 낮은 농도인 0.01 mg/mL에서 동일하게 90%의 생존율을 나타내어 CP보다 우수하였다. Cha 등 [28]은 감귤 유래의 배당체 (hesperidin, naringin)와 비배당체 (hesperetin, naringenin) 플라보노이드에 대한 항산화 활성을 비교하여 DPPH 측정법에 의한 수소공여능이 hesperetin > naringenin > hesperidin > naringin 순으로 활성이 우수하고, linoleic acid를 이용한 TBA 측정 및 microsome 생체막 지질 과산화물을 측정하는 TBARS법에서도 hesperetin

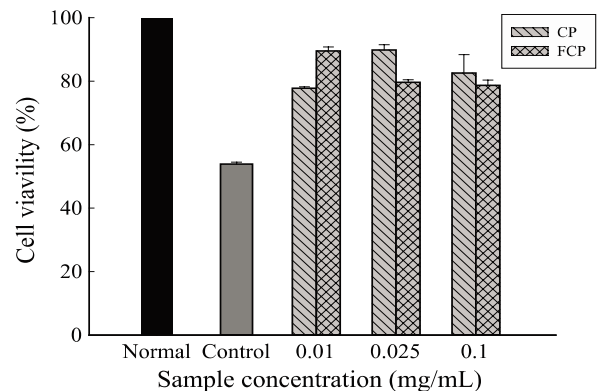


Fig. 6. Effect of cell viability by citrus peel extract and fermented citrus peel extract in HIT-T15 cells treated by 2-deoxy-D-ribose. Normal was treated with DMSO, and control was added DMSO and 38 mM 2-deoxy-D-ribose (IC₅₀). CP and FCP were pre incubated for 1 h at 37°C before treatment of 2-deoxy-D-ribose in HIT-T15. CP: citrus peel extract powder, FCP: fermented citrus peel extract powder. Data values were expressed as mean ± SD of triplicate experiments.

이 가장 강한 항산화 활성을 나타내어 배당체보다 비배당체일 때 항산화 활성이 더욱 높아진다고 보고하였고, Kang 등 [29]은 제주도에서 자생하는 진피의 과피를 젖산균과 효모를 이용하여 발효시키고 HepG2 세포를 이용하여 발효 전후의 항산화 활성을 비교한 결과, 발효에 의해 항산화 활성 뿐만 아니라, 항염증 활성 또한 증가되었다고 보고하였다. 이러한 결과를 본 연구 결과와 비교할 때 FCP가 CP보다 세포 회복능이 우수한 것은 발효에 의해 상대적으로 항산화 활성이 높은 비배당체 플라보노이드가 상당량 생성되어 산화적 스트레스에 노출된 세포를 보호하는 효과가 우수하게 나타났기 때문인 것으로 사료된다.

3.7. 인슐린 분비능

β -cell에서 발효 추출물의 인슐린 분비능 개선 효과를 조사하기 위해 2-deoxy-D-ribose로 손상을 일으킨 HIT-T15의 세포 생존율과 함께 인슐린 분비량을 조사하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 2-deoxy-D-ribose만 처리한 대조군의 인슐린 생산은 452 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein으로 정상군의 인슐린 생산량에 비해 68%로 수준으로 감소하였다. 그러나 시료의 첨가에 따라 인슐린의 분비능이 농도 의존적으로 회복되었으며 특히, FCP 0.025 mg/mL 농도에서 인슐린 생산량이 평균 757 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein으로 정상군 (661 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)과 유사한 수준으로 나타났다. CP의 경우 0.05 mg/mL 이상의 농도에서는 더 이상 증가되지 않았으나 FCP의 경우 0.1 mg/mL에서도 정상군보다 약 2배 정도 높은 인슐린 분비능을 나타내어 FCP가 CP보다 산화적으로 손상된 췌장 세포의 생존율 회복 및 인슐린 분비 개선에 더욱 좋은 효과를 가진다는 것을 확인하였다. 이는 alloxan 처리로 β -세포 손상을 유도한 후, 돼지감자 추출물을 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 처리하였을 때 인슐린 분비량이 유의적으로 증가되었다는 Kim 등 [30]의 보고와 진피 주정 추출물을 0.125 mg/mL 농도로 처리한 결과 인슐린

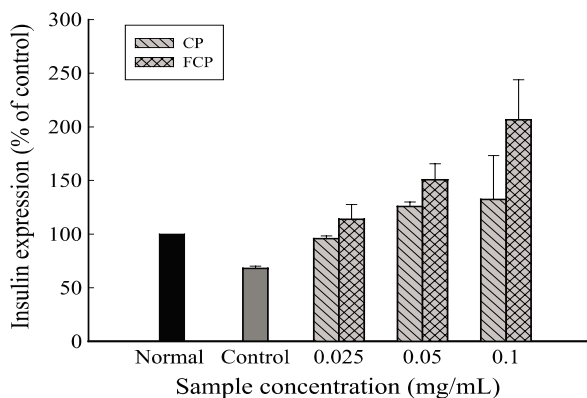


Fig. 7. Effect of insulin secretion by citrus peel extract and fermented citrus peel extract in HIT-T15 cells treated by 2-deoxy-D-ribose. Normal was treated with DMSO, and control was added DMSO and 38 mM 2-deoxy-D-ribose (IC_{50}). CP and FCP were preincubated for 1 hr at 37°C before treatment of 38 mM 2-deoxy-D-ribose in HIT-T15. CP: citrus peel extract powder, FCP: fermented citrus peel extract powder. Secreted insulin was measured with super natant from HIT-T15 cell culture. Data values were expressed as mean \pm SD of triplicate experiments.

분비가 약 1.6배 정도 증가한다고 보고한 Jung 등 [31]의 결과와 비교할 때 FCP가 낮은 농도에서도 유의적인 효과를 가지는 것으로 나타났다.

앞에서 언급한 것처럼 제 2형 당뇨의 다양한 원인 중 하나는 췌장세포가 고농도 포도당에 장시간 노출되었을 때 발생하는 산화적 스트레스로 알려져 있는데, 이때 포도당 자가산화 및 해당과정에서 발생하는 glyceraldehyde-3-P, dihydroxyacetone phosphate와 같은 반응성 중간산물의 증가로 ROS가 축적되어 췌장세포의 기능이 약화되는 것이다 [32,33]. 이로 인해 췌장세포의 용적 (β -cell mass) 감소와 인슐린 분비 저하 현상이 일어나고 이 상태가 장시간 유지 되면 만성질환으로 발전하게 된다. 따라서 본 연구에 사용된 FCP가 산화적 스트레스에 노출된 췌장세포의 손상을 억제함으로써 제 2형 당뇨의 예방에 효과가 있는 기능성 소재로 개발 가능성을 확인하였다.

4. 결론

본 연구에서는 진피에 함유되어 있는 배당체 플라보노이드 화합물을 비배당체로 전환시켜 인체 흡수율을 증대시키고 동시에 고함량의 플라보노이드를 함유하는 기능성 소재를 개발하고자 하였다. 이를 위해 배당체를 비배당체 (aglycone)로 생물전환 할 수 있는 균주를 분리하여 동정하고 최적 발효 조건을 규명하였다. 그 결과 생물전환 활성을 가지는 4종의 균주를 분리하였고, 전환능이 가장 우수한 균주의 18s rDNA 분석을 통한 동정결과 *Aureobasidium pullulans*로 확인되었다. 분리균의 β -glucosidase 활성은 555 mU이었으며, 생물전환을 위한 발효 최적조건은 5% 진피분말에 질소 원료로 0.8% casitone을 첨가한 배지에서 25°C, 150 rpm으로 3일간 배양 시 가장 우수한 전환율을 나타내었다. 최적 조건으로 생물전환 된 진피 (FCP)와 일반진피 (CP) 추출물의 플라보노이드 함량은 각각 154.8 mg/g, 33.7 mg/g으로 발효에 의해 약 4.6배 정도 함량이 증가되었고, 생물전환의 산물인 hesperetin과 naringenin도 21.5 mg/g과 32.8 mg/g으로 많은 양이 확인되었다. FCP와 CP의 항당뇨 기능성을 확인하기 위해 HIT-T15 세포에 산화적 손상을 유도한 후, 세포의 생존율 및 인슐린 분비량의 변화를 조사하였다. 그 결과 2-deoxy-D-ribose를 IC_{50} 농도로 처리한 대조군 (생존율 54%)에 비해 FCP와 CP를 0.01~1 mg/mL 농도로 처리함으로써 생존율이 77~90%까지 회복되었다. 특히 FCP군은 0.01 mg/mL 농도에서 생존율이 90%까지 회복되었고, CP군은 0.025 mg/mL 농도에서 90% 생존율을 나타내어 FCP가 보다 낮은 농도에서 효과를 나타내었다. 인슐린 분비량에서도 대조군이 452 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein으로 정상군의 68%로 수준으로 감소된 반면, FCP와 CP 처리군은 농도에 따라 유의적으로 증가하여 0.025 mg/mL 처리 농도에서 FCP군이 113%, CP군이 95%로 정상세포 수준으로 회복되었으며, 특히 0.1 mg/mL 농도에서는 CP 처리군이 132%, FCP 처리군이 206%로 정상세포보다 오히려 2배 높게 나타났다. 이러한 결과로 생물전환을 통해 인체에 흡수가 쉬운 비배당체를 포

함하는 고탐량 플라보노이드 소재를 개발하였고, 脼장세포의 산화적 손상 억제 효과가 일반진피 추출물보다 우수함을 확인하여 추가적인 연구를 통해 항당뇨 기능성 소재로서의 개발 가능성을 확인하였다.

References

1. Korea Food & Drug Administration. (2005) The Korean Pharmacopeia. 8th ed., pp. 1455-1456. Shinil books, Seoul, Korea.
2. Son, H. S., H. S. Kim, T. B. Kwon, and J. S. Ju (1992) Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoid in citrus sinensis. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 21: 136-142.
3. Laura, B. (1998) Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56: 317-333.
4. Hyon, J. S., S. M. Kang, S. Mahinda, W. J. Koh, T. S. Yang, M. C. Oh, C. K. Oh, Y. J. Jeon, and S. H. Kim (2010) Antioxidative activities of extracts from dried *Citrus sunki* and *C. unshiu* peels. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1-7.
5. Kuhn, J. (1976) The flavonoids, A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 24: 117-191.
6. Hertog, M. G. L., E. J. M. Feskens, P. C. H. Hollman, M. B. Katan, and D. Kromhout (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet.* 342: 1007-1011.
7. Garg, A., S. Garg, L. J. Zaneveld, and A. K. Singla (2001) Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res.* 15: 655-669.
8. Garcia, B. O., J. Castillo, F. R. Marin, A. Ortuno, and J. A. Del Rio (1997) Uses and properties of citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4505-4515.
9. Erlund, I. (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.* 24: 851-74.
10. Elisa, T., L. G. Maurizio, G. Santo, D. M. Danila, and G. Marco (2007) Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* 104: 466-479.
11. Ameer, B., R. A. Weintraub, J. V. Johnson, R. A. Yost, and R. L. Rouseff (1995) Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60: 34-40.
12. Ross, J. A. and C. M. Kasum (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 19-34.
13. Kanaze, F. I., M. I. Bounartzi, M. Georgarakis, and I. Niopas (2007) Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61: 472-477.
14. Song, E. Y., Y. H. Choi, K. H. Kang, and J. S. Koh (1998) Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of Cheju fruits according to harvest date. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 30: 306-312.
15. Rhyu, M. R., E. Y. Kim, I. Y. Bae, and Y. K. Park (2002) Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34: 132-135.
16. Koh, G. P., J. T. Woo, D. H. Lee, S. J. Oh, S. W. Kim, J. W. Kim, Y. S. Kim, and D. B. Park (2007) Mechanism of 2-Deoxy-D-ribose-induced damage in pancreatic β -cells. *J. Kor. Diabetes* 31: 105-112.
17. Robertson R. P., J. Harmon, P. O. Tran, Y. Tanaka, and H. Takahashi (2003) Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52: 581-587.
18. Robertson, R. P. (2004) Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.* 279: 42351-42354.
19. Leite, R. S. R., H. F. Alves-Prado, H. Cabral, F. C. Pagnocca, E. Gomes, and R. Silva (2008) Production and characteristics comparison of crude β -glucosidase produced by microorganisms *Thermococcus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology.* 43: 391-395.
20. Jung, H. K., Y. S. Jung, C. D. Park, C. H. Park, and J. H. Hong (2011) Inhibitory effect of citrus peel extract on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54: 169-176.
21. Miyake, Y., K. Yamamoto, N. Tsujihara, and T. Osawa (1998) Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids* 33: 689-695.
22. Shimoda, K., N. Kubota, K. Taniuchi, D. Sato, N. Nakajima, H. Hamada, and H. Hamada (2010) Biotransformation of naringin and naringenin by cultured *Eucalyptus perriniana* cells. *Phytochemistry.* 71: 201-205.
23. Youssef, F., T. Roukas, and C. G. Biliaderis (1999) Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture. *Process Biochem.* 34: 355-366.
24. Lee, S. J., K. H. Ahn, C. S. Park, B. D. Yoon, and M. S. Kim (2009) Analysis of β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-Glucan Produced by *Aureobasidium pullulans* IMS-822. *Kor. J. Microbiol.* 45: 63-68.
25. Li, X. L., Z. Q. Zhang, J. F. D. Dean, K. E. L. Eriksson, and L. G. Ljungdahl (1993) Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3212-3218.
26. Debdulal, B. and B. Pati (2007) Optimization of tannase production by *Aureobasidium pullulans* DBS66. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 1049-1053.
27. Koh, G. P., K. S. Suh, S. Chon, S. J. Oh, J. T. Woo, S. W. Kim, J. W. Kim, and Y. S. Kim (2005) Elevated cAMP level attenuates 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage in pancreatic-cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 438: 70-79.
28. Cha, J. Y. and Y. S. Cho (2001) Biofunctional activities of flavonoids. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 44: 122-128.
29. Kang, S. H., Y. J. Lee, C. H. Lee, S. J. Kim, D. H. Lee, Y. K. Lee, and D. B. Park (2005) Physiological activities of peel of Jeju-indigenous *Citrus sunki* Hort. Tanaka. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 983-988.
30. Kim, J. L., C. R. Bae, and Y. S. Cha (2010) *Helianthus tuberosus* extract has anti-diabetes effects in HIT-T15 cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 31-35.
31. Jung, H. K., Y. S. Jung, C. D. Park, C. H. Park, and J. H. Hong (2010) Effect of the ethanol extract from citrus peels on oxidative damage in alloxan-induced HIT-T15 cell. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1102-1106.
32. Du X. L., D. Edelstein, L. Rossetti, I. G. Fantus, H. Goldberg, F. Ziyadeh, J. Wu, and M. Brownlee (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12222-12226.
33. Nishikawa T, D. Edelstein, X. L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M. A. Yorek, D. Beebe, P. J. Oates, H. P. Hammes, I. Giardino, and M. Brownlee (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787-90.