J Plant Biotechnol (2018) 45:279–286
DOI:https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.3.279

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

당유자 과피 메탄올 추출물 및 분획물의 생리활성 검정

고현민 · 김주성

Physiological activity of methanol extract and fractions from *Citrus grandis* Osbeck pericarp

Hyun Min Ko · Ju-Sung Kim

Received: 28 August 2018 / Revised: 12 September 2018 / Accepted: 12 September** 2018
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Citrus grandis* Osbeck pericarp is used as tea, herbal medicine, etc., but is not commercialized in various ways. So, in this study, we identified potential for use of *Citrus grandis* Osbeck as health functional foods, cosmetics and food preservatives. Methanol extract of *Citrus grandis* Osbeck pericarp was fractionated with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol, to quantitatively analyze total phenol and flavonoid, and investigate antioxidative and enzyme inhibitory activities. Total phenol and flavonoid contents were highest in ethyl acetate fraction, FRAP and ORAC results also revealed highest activity in proportion to total phenol content. DPPH radical scavenging activity revealed that ethyl acetate, butanol and dichloromethane fraction manifested highest activity without significant difference. However, dichloromethane fraction revealed higher TEAC value and tyrosinase inhibitory activity than ethyl acetate fraction, and hexane fraction manifested best results with superoxide radical scavenging activity and α-glucosidase inhibitory activity. Antimicrobial activity also revealed best effect in dichloromethane and hexane fractions. So, based on the following results, use of dichloromethane fraction as material of natural functional cosmetics, ethyl acetate fraction for health functional foods, and hexane fractions for pharmaceuticals and food preservatives, would be most practical for product development.

H. M. Ko · J.-S. Kim
제주대학교 식물자원환경전공
(Major in Plant Resource and Environment, SARI, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea)
e-mail: aha2011@jejunu.ac.kr

Keywords Flavonoid, α-Glucosidase, Microorganism, Oxygen free radical, Phenol, Tyrosinase

서 언

활성산소(free radical)의 종류는 hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide radical 등으로 다른 물질로부터 전자를 얻으려는 성질이 강하여 체내에서 세균을 억제하며 면역체계의 개선 등의 역할을 수행한다. 하지만 스트레스나 자외선 및 화학물질 같은 외부요인에 노출되는 경우에 활성산소의 생성량이 증가하게 되며 이에 따라 세포막과 DNA, 단백질 등이 손상되어 염증, 동맥경화, 노화를 비롯한 암 등 각종 성인병을 초래한다(Ko et al. 2017). 최근에는 비타민과 카로테노이드, 식물로부터 유래한 phenol 및 flavonoid 등이 항산화 작용의 주요 역할을 하는 성분임이 밝혀지면서 활성산소로부터 유발되는 피해를 막고자 많은 연구가 진행되고 있다(Carrasco-Pancorbo et al. 2005).

제주도에서 재배되는 당유자(*Citrus grandis* Osbeck)는 운향과에 속하는 귤나무로 열매의 형태는 계란형으로 껍질은 오돌토돌하다. 열매의 크기는 세로 약 10 ~ 12 cm, 가로 9 ~ 10 cm 이다. 무게는 약 250 ~ 500 g으로 약 10개 정도의 종자가 내부에 위치하고 있다. 또한 열매는 예로부터 감기와 간 보호 등에 효과가 있어 약재로 사용되어왔다. 당유자의 유기산 함량은 유자에 비하여 2배 높고 비타민 C 함량은 4배가 높다. 또한 당유자에는 비타민 외에도 주성분인 hesperidin, naringin, naringenin, narirutin, neohesperidin, rutin 등의 플라보노이드류가 있다(Jiang et al. 2014; Mäkynen et al. 2013). Hesperidin과 naringin은 체내에 독성을 일으키지 않으며 항산화 작용, 콜레스테롤 저해 및 각종 암세포의 억제, 항균, 항알러지 등 다양한 기능을 수행하여 질병 예방에 도움을 준다

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(Moon et al. 2015). 따라서 현대인들의 관심이 높아졌을 뿐만 아니라 최근 의약품, 건강 기능성 식품, 화장품 등의 소재로 활용할 수 있는 가능성을 보고자 국내외에서 많은 연구가 진행되었다. 당유자의 국내외 연구동향을 보면 당유자 잎 추출 및 분획물의 위암 효과(Moon et al. 2009), 발효 처리한 당유자 추출물의 항산화 및 α-glucosidase, α-amylase 저해활성을 통한 항당뇨 효과(Kim et al. 2009), 미숙과 추출물의 미백 효과(Kim et al. 2014) 및 메탄올 추출, 분획물의 항염증 효과(Lee et al. 2006)가 보고되었으며 당유자 과피를 원료로 한 연구로는 에탄올 추출물을 HL-60 cell에 처리하였을 때 아포토시스 유도 관여(Hyon et al. 2009a), 비만과 고혈압 억제 활성(Hong et al. 2010), 미생물을 처리를 한 발효물의 항산화 활성(Hyon et al. 2009b) 등이 보고되어 있다.

현재 당유자 과피는 차, 한약재 등으로 이용되고 있으나 다양하게 제품화 되고 있지는 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 대중화되지 않은 과피를 자원화하고 건강 기능성 식품 및 기능성 화장품, 식품보존제 등의 원료로서의 사용 가능성 등 고부가가치 창출에 있어 기초자료를 제공하고자 당유자 과피의 메탄올 추출물을 비극성에서 극성 용매 순으로 분획물을 제조하였으며 추출물 및 분획물의 phenol, flavonoid 함량 분석과 항산화 활성 및 효소 저해활성, 대표적인 식품 부패 미생물 *Micrococcus luteus, Bacillus cereus, Escherichia coli*와 기회감염을 일으키는 *Klebsiella pneumoniae*의 항균효과를 비교함으로써 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 당유자 과피의 추출물 및 분획물은 다음과 같이 제조하였다. 건조된 당유자 과피에 메탄올을 중량의 10배를 가하여 80°C에서 3시간동안 추출하고 여과하였으며 같은 과정을 3번 반복하였다. 여과 후에는 감압농축기(Hel-VAP Precision, Heidolph, Germany)로 농축한 후에 동결건조하였으며 이후 비극성에서 극성 순(헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올)으로 용매분획을 실시하였다. 획득한 분획물은 추출물과 동일한 과정을 거쳐 실험에 사용하였다.

총 페놀 및 플라보노이드 정량 측정

Total phenol 정량 측정은 Folin-Denis 방법을 변형하여 측정하였다(Singleton et al. 1999). Micro tube에 sample 20 uL와 증류수 700 uL를 가하고 Folin-Ciocalteu 시약 100 uL를 더하여 voltexing 한 후 2시간 동안 방치하였다. 이후 20% sodium carbonate를 100 uL씩 가하였다. 혼합액은 1시간 방치한 후 microplate reader (i-Mark 168-1135, Bio-Rad, USA)를 이용해 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였다. Sample의 흡광도는 gallic acid로 standard curve를 작성하여 GAE (gallic acid equivalent)로 나타내었다.

Total flavonoid 정량은 Kim et al. (2012)의 방법을 변형하여 측정하였다. Micro tube에 sample 100 uL와 10% aluminum nitrate 20 uL, 1 M potassium acetate 20 uL, 에탄올 300 uL를 혼합한 이후 증류수 560 uL를 가하여 1시간 동안 방치하였다. 이후 microplate reader를 사용하여 흡광도 값을 415 nm에서 측정하였다. Sample의 흡광도는 표준물질인 quercetin으로 standard curve를 작성하여 QE (quercetin equivalent)로 나타내었다.

Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) 측정

ABTS 소거능 측정은 Zulueta et al. (2009)의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 암소에 16시간 방치하여 ABTS radical을 생성시키고 이 용액의 흡광도 값을 734 nm에서 0.70 ± 0.02가 되도록 증류수로 희석하였다. 이후 sample 50 uL에 ABTS radical이 생성된 용액 1 mL를 혼합하여 3분간 반응시키고 UV-spectrometer (UV-1800, Shimadzu, Japan)를 이용해 734 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. Trolox를 이용하여 standard curve를 작성하고 시료 1 g당 trolox 농도(mM TE/g)로 나타내었다.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정

FRAP은 기존의 Benzie and Strain (1996)법을 변형하여 측정하였다. 측정에 사용되는 FRAP working solution은 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6), 10 mM 2,4,6-tripyridyls-triazine (TPTZ)와 20 mM $FeCl_3$를 10 : 1 : 1 비율로 실험 직전에 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 사용하였다. Sample 50 uL에 FRAP working solution 150 uL를 가한 이후 37°C에서 15분간 반응시켰다. Microplate reader를 이용해 595 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. $FeSO_4$를 이용하여 standard curve를 작성하고 시료 1 g당 $FeSO_4$ 환원력(mM FE/g)으로 나타내었다.

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

Sample의 ORAC 분석법은 Zulueta et al. (2009)의 방법을 변형하여 측정하였다. Sample 50 uL에 78 nM fluorescein 150 uL를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 다음에 221 mM 2,2'azobis (2-amino-propane) dihydrochloride (AAPH)를 첨가하였으며 excitation 파장 485 nm, emission 파장 535 nm에서 1분 간격으로 60분간 형광도를 측정하였다. 표준시약은 trolox를 사용하였으며 sample과 표준시약의 area under the curve (AUC) 값을 측정하였다. ORAC는 trolox로 작성된 standard curve를 사

용하여 sample 1 g당 trolox 농도(mM TE/g)로 나타내었다.

DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. Sample 40 uL에 0.15 mM DPPH 용액을 160 uL 가하였으며 30분간 반응 후 microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 양성 대조군으로는 BHT를 사용하였으며 sample의 소거활성은 DPPH radical을 50% 억제시키는데 필요한 농도인 DRC_{50} 값으로 나타내었다.

Superoxide radical 소거능 측정

Sample의 superoxide radical 소거활성은 Nishikimi et al. (1972)의 방법을 변형하여 측정하였다. Sample 50 uL에 62 uM nitro blue tetrazolium (NBT), 33 uM phenazine methosulfate (PMS), 98 uM β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)를 순서대로 50 uL씩 가하여 혼합한 후 560 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. Sample의 소거활성은 superoxide radical을 50% 억제시키는데 필요한 농도인 SRC_{50} 값으로 나타내었다.

Tyrosinase 저해활성 측정

Sample의 tyrosinase 저해활성은 Ko et al. (2017)의 방법으로 측정하였다. Sample 10 uL에 증류수와 1 mM L-tyrosine, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)를 9 : 10 : 10 비율로 혼합한 혼합액 170 uL, mushroom tyrosinase (1 KU/mL) 20 uL을 가한다. 이후 37°C에서 15분간 반응시켜 생성된 DOPA chrome을 microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 arbutin을 사용하였으며 sample의 저해활성은 50% 저해활성 농도인 inhibitory concentration 50 (TIC_{50})으로 나타내었다.

α-Glucosidase 저해활성 측정

Sample의 α-glucosidase 저해활성은 Kim and Kim (2016)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 sample 20 uL에 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 120 uL와 α-glucosidase (0.3 U/mL) 50 uL를 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 이후 2 mM *p*NPG 10 uL를 추가적으로 가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 30분 경과 후 반응 정지를 목적으로 100 mM Na_2CO_3를 100 uL 더하여 정지시키고 microplate reader를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 acarbose를 사용하였으며 sample의 저해활성은 50% 저해활성 농도인 농도인 inhibitory concentration 50 (GIC_{50})으로 나타내었다.

항균 활성 측정

Sample의 항균 활성을 측정하기 위해 사용된 균주는 그람양성균 *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Micrococcus luteus* (KCTC 1056)와 그람음성균 *Escherichia coli* (KCTC 1924), *Klebsiella pneumoniae* (KCTC 2208)으로 한국생명공학연구원 미생물자원센터에서 분양받아 20% glycerol medium으로 -80℃에서 보관하였으며 각 균주는 3회 계대배양하여 실험에 사용하였다. 시간에 따른 항미생물 생장 저해 효과를 측정하기 위하여 sample 및 양성대조군으로 사용한 tetracycline, streptomycin의 최종농도는 균액과 혼합하였을 때 1 mg/mL 되도록 조정하였으며 각 균주는 생육적정온도에서 배양하여 균의 정지기인 24시간동안 4시간 간격으로 microplate reader를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

모든 실험결과들은 평균±표준편차로 나타내었으며 통계분석은 SPSS (Ver. 20, IBM, Corp., 2011)를 사용하여 ANOVA 분석을 실시하였으며 유의적으로 차이가 있는 항목에는 Tukey's Multiple Range Test를 사용하여 유의성을 분석하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

총 페놀 및 플라보노이드 정량

당유자 과피 메탄올 추출물 및 분획물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량 분석결과는 Table 1과 같다. 총 페놀 함량은 에틸아세테이트 분획물(163.19 ± 2.34 mg), 부탄올 분획물(105.06 ± 3.05 mg), 디클로로메탄 분획물(64.33 ± 2.65 mg), 메탄올 추출물(41.66 ± 2.08 mg), 헥산 분획물(25.55 ± 2.38 mg), 물 분획물(16.55 ± 1.66 mg) 순으로 높았다. 총 플라보노이드 함량은 에틸아세테이트 분획물(10.06 ± 0.09 mg), 디클로로메탄 분획물(8.15 ± 0.45 mg), 부탄올 분획물(6.74 ± 0.58 mg), 메탄올 추출물(1.59 ± 1.12 mg), 헥산 분획물(1.11 ± 0.65 mg) 순으로 높았으며 물 분획물에서는 플라보노이드가 검출되지 않았다. 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 활성을 보였는데 이는 메탄올 추출물의 phenolic hydroxyl기의 활성 물질이 에틸아세테이트 분획물로 이행된 것으로 사료된다(Kim et al. 2010).

항산화 활성

당유자 과피 메탄올 추출물 및 분획물의 TEAC 값은 디클로로메탄 분획물(269.31 ± 9.87 mM) > 에틸아세테이트 분획물

Table 1 Total phenol and flavonoid contents according to *Citrus grandis* Osbeck pericarp extract and fractions

Sample	Total phenol (mg GAE/g)[a]	Total flavonoid (mg QE/g)[b]
Methanol extract	41.66±2.08 d	1.59±1.12 d
Hexane fraction	25.55±2.38 e	1.11±0.65 d
Dichloromethane fraction	64.33±2.65 c	8.15±0.45 b
Ethyl acetate fraction	163.19±2.34 a	10.06±0.09 a
Butanol fraction	105.06±3.05 b	6.74±0.58 c
Aqueous fraction	16.55±1.66 f	Non detected

Means with different letters (a - f) in the same column are significantly different at Tukey multiple range test ($p < 0.05$)
[a]mg GAE/g: mg gallic acid equivalent per sample 1 g
[b]mg QE/g: mg quercetin equivalent per sample 1 g

Table 2 TEAC, FRAP and ORAC according to *Citrus grandis* Osbeck pericarp extract and fractions

Sample	TEAC (mM TE/g)[a]	FRAP (mM FE/g)[b]	ORAC (mM TE/g)[a]
Methanol extract	66.07±8.32 d	178.52±9.10 d	2037.43±167.53 c
Hexane fraction	68.57±11.56 d	141.89±18.92 d	1190.83±132.03 d
Dichloromethane fraction	269.31±9.87 a	457.72±24.69 c	2273.00±104.81 c
Ethyl acetate fraction	236.84±2.36 b	617.57±42.46 a	5961.00±266.98 a
Butanol fraction	180.02±4.81 c	514.33±28.91 b	5222.18±333.13 b
Aqueous fraction	57.64±2.48 d	64.18±19.42 e	687.65±121.47 d

Means with different letters (a - e) in the same column are significantly different at Tukey multiple range test ($p < 0.05$)
[a]mM TE/g: mM trolox equivalent per sample 1 g
[b]mM FE/g: mM ferrous sulfate equivalent per sample 1 g

(236.84 ± 2.36 mM) > 부탄올 분획물(180.02 ± 4.81 mM) > 헥산 분획물(68.57 ± 11.56 mM), 메탄올 추출물(66.07 ± 8.32 mM), 물 분획물(57.64 ± 2.48 mM) 순으로 디클로로메탄 분획물이 가장 높은 TEAC 값을 보였다(Table 2). 본 연구와 유사한 결과로 Lee and Moon (2003)은 왕대 줄기를 용매 극성별로 분획하여 TEAC 값을 측정한 결과 디클로로메탄 분획물에서 TEAC 값이 가장 높았다고 보고하였으며 다음으로 에틸아세테이트, 부탄올, 물, 헥산 분획물 순으로 높다고 보고하였다.

FRAP assay는 직접적으로 프리라디칼을 소거하는 방식과는 다르게 낮은 pH에서 환원력을 가지는 물질에 의해 낮은 pH에서 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ)로 환원되는 원리를 이용한다(Jeon et al. 2012). 당유자 과피 메탄올 추출물 및 분획물의 FRAP 값은 에틸아세테이트 분획물(617.57 ± 42.46 mM)에서 가장 높은 값을 나타냈으며 다음으로 부탄올 분획물(514.33 ± 28.91 mM), 디클로로메탄 분획물(457.72 ± 24.69 mM), 메탄올 추출물(178.52 ± 9.10 mM), 헥산 분획물(141.89 ± 18.92 mM), 물 분획물(64.18 ± 19.42 mM) 순으로 높은 값을 보였다(Table 2). 본 연구에서 FRAP 값은 총 페놀 함량에 비례하여 나타나는 경향을 보였는데, Tabart et el. (2009)와 Sanchez-Gonzalez et al. (2005)가 앞서 보고한 시료에 함유된 폴리페놀 함량은 FRAP 값과 높은 상관관계를 보였다는 연구결과와 비슷한 경향을 보였다.

ORAC assay는 flavonoid, vitamin C 등과 같은 물질들의 항산화능을 분석하여 수치로 나타내는 방법으로 프리라디칼 손상에 대한 억제시간 및 억제능을 모두 반영한 항산화 측정 방법이다(Kim et al. 2014). 당유자 과피 메탄올 추출물 및 분획물의 ORAC 값은 에틸아세테이트 분획물(5961.00 ± 266.98 mM), 부탄올 분획물(5222.18 ± 333.13 mM), 디클로로메탄 분획물(2273.00 ± 104.81 mM), 메탄올 추출물(2037.43 ± 167.53 mM), 헥산 분획물(1190.83 ± 167.53 mM), 물 분획물(687.65 ± 121.47 mM) 순으로 높은 값을 보였다(Table 2). ORAC 지수 또한 총 페놀 함량과 비례하여 나타나는 경향을 보였다.

당유자 과피 메탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거능 측정 결과는 다음과 같다(Table 3). DRC_{50} 값은 부탄올(229.01 ± 14.01 ug/mL), 에틸아세테이트(232.88 ± 16.78 ug/mL), 디클로로메탄 분획물(281.86 ± 16.89 ug/mL), 헥산 분획물(452.04 ± 2.99 ug/mL), 메탄올 추출물(670.29 ± 13.97 ug/mL) 순으로 나타났으며 부탄올, 에틸아세테이트, 디클로로메탄 분획물은 통계적으로 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한 물 분획물에서는 1000 ug/mL 농도 범위에서 활성을 확인할 수 없었다. 양성 대조군으로 사용한 BHT의 DRC_{50} 값은 13.50 ± 2.74 ug/mL로 부탄올, 에틸아세테이트, 디클로로메탄 분획물보다 다소 높은 활성을 보였다.

Superoxide radical 소거능의 측정원리는 다음과 같다. NBT는 PMS와 NADH로 인해 유발된 superoxide radical로 인하여

Table 3 DPPH and superoxide radical scavenging assay according to *Citrus grandis* Osbeck pericarp extract and fractions

Sample	DRC_{50}[a]	SRC_{50}[b]
Methanol extract	670.29±13.97 d	>1500 d
Hexane fraction	452.04±2.99 c	757.89±34.26 a
Dichloromethane fraction	281.86±16.89 b	883.31±64.38 b
Ethyl acetate fraction	232.88±16.78 b	815.86±29.40 ab
Butanol fraction	229.01±14.01 b	1161.24±40.77 c
Aqueous fraction	>1000 e	>1500 d
BHT	13.50±2.74 a	-

Means with different letters (a - e) in the same column are significantly different at Tukey multiple range test ($p < 0.05$)
[a]DRC_{50}: Concentration required to reduce 50% of DPPH at 30 minutes once reaction starts (ug/mL)
[b]SRC_{50}: Concentration required to reduce 50% of superoxide at 5 minutes once reaction starts (ug/mL)

Table 4 Tyrosinase and α-glucosidase inhibitory activity of *Citrus grandis* Osbeck pericarp extract and fractions

Sample	TIC_{50}[a] (ug/mL)	GIC_{50}[b] (ug/mL)
Methanol extract	> 1000 d	>1000 c
Hexane fraction	>1000 d	37.22±1.06 a
Dichloromethane fraction	642.73±13.94 b	>1000 c
Ethyl acetate fraction	723.08±6.38 c	>1000 c
Butanol fraction	>1000 d	>1000 c
Aqueous fraction	>1000 d	>1000 c
Arbutin	71.30±10.60 a	-
Acarbose	-	407.97±9.60 b

Means with different letters (a - d) in the same column are significantly different at Tukey multiple range test ($p < 0.05$).
[a]TIC_{50}: Concentration required to reduce 50% of tyrosinase
[b]GIC_{50}: Concentration required to reduce 50% of α-glucosidase

자주색의 formazan으로 환원되며 superoxide radical 소거능을 갖는 시료에 의하여 formazan의 생성이 저해된다(Rhim et al. 2009). 당유자 과피 메탄올 추출물 및 분획물의 superoxide radical 소거능은 전반적으로 DPPH radical 소거능보다 낮은 활성을 보였다(Table 3). 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 디클로로메탄 분획물, 부탄올 분획물 순으로 활성이 우수하였으며 메탄올 추출물과 물 분획물에서는 1500 ug/mL 범위에서 활성이 측정되지 않았다. Superoxide radical 소거능은 페놀 및 플라보노이드 함량과 FRAP, ORAC 결과와는 다르게 헥산 분획물에서 가장 높은 활성을 보였다. 이는 헥산 분획물에 존재하는 폴리페놀성 물질 이외에도 다른 성분들 간의 상호작용에 의하여 superoxide radical 저해활성이 증대된 것으로 사료된다(Zheng and Wang, 2001).

효소 저해활성

Tyrosinase는 자외선을 흡수하고 방어하는 역할을 갖는 멜라닌의 생합성 과정에 중요한 역할을 하는 효소로 tyrosinase 생성 저해활성을 측정함으로써 피부 미백에 영향을 미치는 정도를 검정할 수 있다. 당유자 메탄올 추출물 및 분획물의 기능성 화장품 소재로서 활용가능성을 확인하고자 tyrosinase 저해활성을 측정하였다. TIC_{50} 값은 디클로로메탄 분획물(642.73 ± 13.94 ug/mL), 에틸아세테이트 분획물(723.08 ± 6.38 ug/mL) 순으로 활성이 높게 측정되었으며 메탄올 추출물 및 헥산, 부탄올, 물 분획물에서는 1000 ug/mL 농도 범위에서는 50% 저해활성 농도를 구할 수 없었다(Table 4). 양성 대조군인 arbutin의 tyrosinase IC_{50} 값(71.30 ± 10.60 ug/mL)은 분획물 중 활성이 가장 높게 측정된 디클로로메탄 분획물(642.73 ± 13.94 ug/mL)과 비교하여 약 9배 이상 높은 활성을 보였다. Cha et al. (2010)에 의하면 tyrosinase에 저해활성을 갖는 천연물에서 유래된 화합물로는 phenolic compound, flavonoid, isoflavonoid, glycolic acid 등이 있으나 본 연구에서 측정하였던 총 phenol 및 flavonoid 함량에 비례하여 활성이 나타나지는 않았다. 이는 phenol 및 flavonoid 외 다른 물질이 tyrosinase를 억제하는데 기인한 것으로 생각되며 원인을 밝히기 위해서 물질 분리 및 정제 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

α-Glucosidase는 체내에 흡수된 탄수화물을 단당류로 분해하는 작용을 하는 효소로 이를 억제하기 위하여 현재 처방되는 대표적인 당뇨 치료제로는 acarbose와 voglibose가 있다.

하지만 장기간에 걸쳐 복용할 경우 구토 및 설사 또는 복부 팽만감 등의 부작용이 유발되는 사례가 발생하여 최근에는 천연물에서 유래한 새로운 소재 개발이 꾸준하게 연구되고 있다(Bischoff, 1995). 당유자 메탄올 추출물 및 분획물의 혈당 강하제로서 활용가능성을 확인하고자 α-glucosidase 저해활성을 측정한 결과는 다음과 같다(Table 4). GIC_{50} 값은 헥산 분획물에서 37.22 ± 1.06 ug/mL로 나타났으며 메탄올 추출물 및 다른 분획물에서는 실험 농도범위인 1000 ug/mL 내에서 저해활성을 보이지 않았다. 또한 양성 대조군으로 사용한 acarbose의 GIC_{50} 값은 407.97 ± 9.60 ug/mL로 헥산 분획물의 활성이 10배 이상 뛰어난 것을 확인하였다. 이와 비슷한 경향을 보여주는 연구로 Jung et al. (2009)이 보고한 대나무 메탄올 추출물 및 분획물의 α-glucosidase의 저해활성 측정 결과 헥산 분획물의 GIC_{50} 값은 33.6 ug/mL로 활성이 가장 우수하였다. 또한 Kang et al. (2012)이 보고한 참모자반 메탄올 추출물 및 분획물의 α-glucosidase의 저해활성 측정 결과 헥산 분획층에서 가장 우수한 활성을 보였는데 이는 sargaquinoic acid 및 sargahydroquinolic acid 성분이 활성을 나타내는 것으로 보고하였다. 하지만 본 연구에서는 당유자 과피의 혈당 강하 효과가 우수하였음을 확인하였으나 α-glucosidase가 어떤 성분에 의해 저해되는지 원인을 밝히기 위해서는 물질 분리 등의 후속 연구가 필요할 전망이다.

항균 활성

당유자 메탄올 추출물 및 분획물의 식품 부패 미생물(*M. luteus*, *B. cereus*, *E. coli)*과 기회감염을 일으키는 미생물(*K. pneumoniae*)의 생육 억제활성은 다음과 같다(Fig. 1). 그람양성균 *M. luteus*에서 메탄올 추출물 및 물, 부탄올 분획물 처리군은 무처리군과 유사한 경향을 보였으며 에틸아세테이트 분획물 처리군은 약한 저해활성을 보였다. 헥산 분획물 처리군은 12시간 동안 생장이 억제되었으나 이후에 다소 생장하였고 디클로로메탄 분획물 처리군은 양성대조군인 tetracycline, streptomycin 처리군과 같이 24시간 동안 생장이 억제되었다(Fig. 1A). 다른 그람양성균인 *B. cereus*에서 디클로로메탄, 헥산 분획물 처리군은 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트, 물, 부탄올 분획물 처리군에 비하여 높은 생육저해활성을 보였으나 양성대조군에 비하여 다소 낮은 저해활성을 보였다(Fig. 1B). 그람음성균인 *E. coli*에서 물, 부탄올 분획물 처리군은 무처리군과 유사한 경향을 나타냈으며 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물 처리군은 디클로로메탄, 헥산 분획물 처리군에 비하여 낮은 저해활성을 보였다. 또

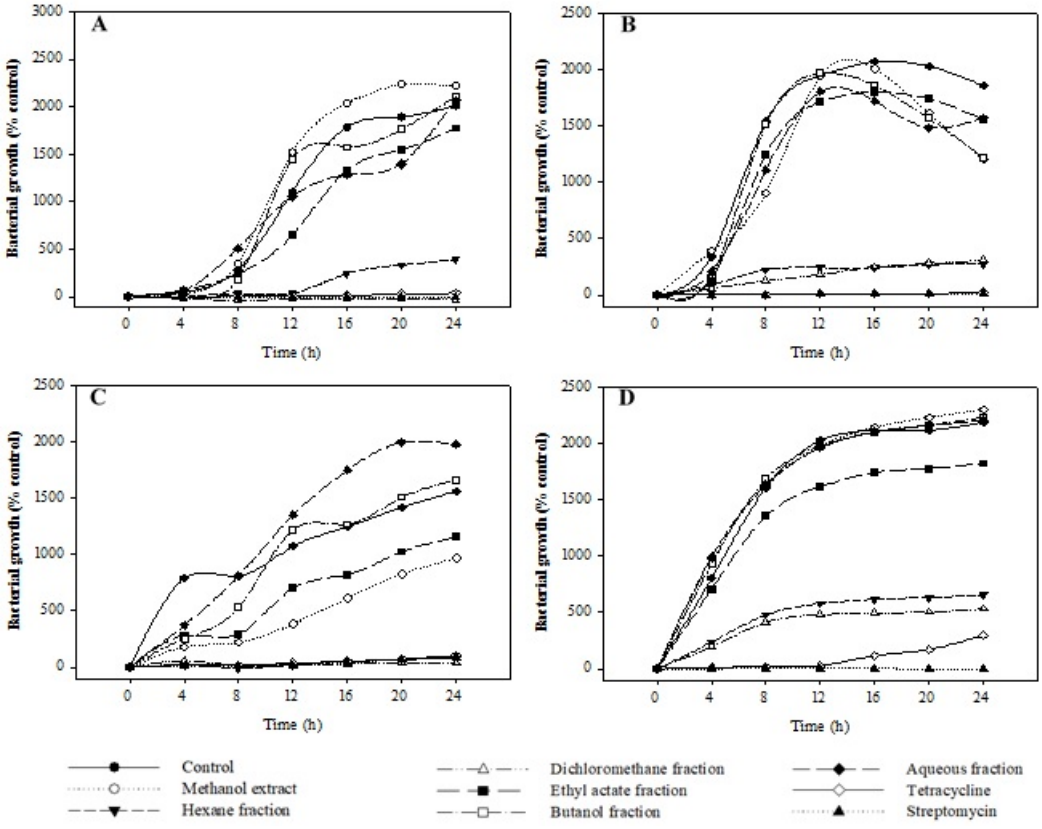

Fig. 1 Microorganism growth inhibition effect of *Citrus grandis* Osbeck pericarp extract and fractions. (A) the growth curve of *Micrococcus luteus*, (B) the growth curve of *Bacillus cereus*, (C) the growth curve of *Escherichia coli*, (D) the growth curve of *Klebsiella pneumoniae*

한 디클로로메탄, 헥산 분획물 처리군은 양성대조군과 같이 24시간 동안 생장이 억제되었음을 확인하였다(Fig. 1C). 또한 기회감염을 일으키는 *K. pneumoniae*는 사람의 임상재료에서 가장 흔히 분리되며 모든 감염증을 유발하는 균으로 알려져 있다(Kim, 2009). *K. pneumoniae*에서 메탄올 추출물, 부탄올, 물 분획물 처리군은 무처리군과 유사한 경향으로 생장억제 효과가 나타나지 않았으며 에틸아세테이트 분획물 처리군은 미미한 저해 활성을 보였다. 디클로로메탄, 헥산 분획물 처리군은 메탄올 추출물 및 다른 분획물 처리군보다는 높은 활성을 보였으나 양성처리군과 비교하였을 때는 다소 낮은 활성을 보였다(Fig. 1D). 본 연구에서는 Kim and Kim (2016)이 앞서 보고한 식물의 페놀성 화합물이 미생물 생장을 억제시킴으로써 항균효과를 나타낸다는 연구결과와는 달리 페놀함량이 비교적 낮은 헥산, 디클로로메탄 분획물에서 높은 항균활성을 보였다. 이는 헥산 분획층에 용출된 당유자 과피 성분 중 비극성이며 친유성인 물질이 높은 항균활성을 가지는 것으로 보이며 가는잎향유에서 추출한 에센셜오일은 우수한 항균활성을 갖고 있어 식품 보존제로서의 잠재력을 갖고있다는 Kwon et al. (2017)의 연구결과와 물레나물 에탄올 추출물의 헥산 분획물에서 식중독 미생물 증식이 가장 억제되었음을 보고한 Han et al. (2002)의 연구결과는 다음 의견을 뒷받침 해준다. 또한 디클로로메탄 분획물에서도 페놀 외 다른 성분이 미생물의 생장을 억제시킨 것으로 사료되며 활성이 확인된 헥산과 디클로로메탄 분획물에서 물질 분리 등의 추가적인 연구를 통해 미생물의 생장을 억제하는 물질에 대하여 규명이 필요할 것으로 보인다.

적 요

당유자 과피는 차, 한약재 등으로 이용되고 있으나 다양하게 제품화 되고 있지는 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 당유자 과피의 건강 기능성 식품 및 화장품, 식품보존제 등의 활용 가능성을 확인하였다. 당유자 과피 메탄올 추출물을 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하여 총 페놀 및 플라보노이드 정량 분석과 항산화 활성, 효소 저해활성, 항미생물 활성을 탐색하였다. 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 함량을 보였으며 FRAP과 ORAC 실험결과 또한 총 페놀 함량과 비례하여 가장 우수한 활성이 측정되었다. 또한 DPPH radical 소거능 실험 결과 에틸아세테이트, 부탄올, 디클로로메탄 분획물은 유의적 차이 없이 가장 높은 활성을 나타내었다. 그러나 디클로로메탄 분획물은 TEAC 값과 tyrosinase 저해 활성이 에틸아세테이트 분획물보다 더 높은 활성을 보였으며 헥산 분획물에서는 superoxide radical 소거능 및 α-glucosidase 저해활성이 가장 우수한 결과를 보였다. 또한 항균 활성은 디클로로메탄 및 헥산 분획물에서 가장 우수한 효과를 보였다. 따라서 다음의 결과를 바탕으로 천연 기능성 화장품의 소재로는 디클로로메탄 분획물, 건강기능성 식품의 소재로는 에틸아세테이트 분획물, 의약품 및 식품보존제의 소재로는 헥산 분획물을 활용하는 것이 각 제품 개발에 있어 가장 유용할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2018학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

References

Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem 39:70-76

Bischoff H (1995) The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. Clin Invest Med 18:303-311

Blois MS (1958) Antioxidant determinations by use of a stable free radical. Nature 181:1199-1200

Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Del Carlo M, Gallina-Toschi T, Lercker G, Compagnone D, Fernandez-Gutierrez A (2005) Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. J Agric Food Chem 53:8918-8925

Cha JY, Yang HJ, Jeong JJ, Seo WS, Park JS, Ok M, Cho YS (2010) Tyrosinase inhibition activity and antioxidant capacity by fermented products of some medicinal plants. J Life Sci 20:940-947

Han JS, Lee JY, Baek NI, Back IW, Shin DH (2002) Isolation of growth inhibition substance on food borne microorganisms from *Hypericum ascyron* L. and application to food preservation. Korean J Food Sci Technol 34:274-282

Hong HJ, Jin JY, Yang H, Kang WY, Kim DG, Lee S, Choi Y, Kim JH, Han CH, Lee YJ (2010) Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) peel improves lipid profiles and alleviates hypertension in rats fed a high-fat diet. Lab Anim Res 26:361-367

Hyon JS, Kang SM, Kim AD, Oh MC, Oh CK, Kim DW, You JJ, Kim SH (2009a) Induction of apoptosis by *Citrus grandis* osbeck peel (CGP) extract in HL60 cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 38:1317-1323

Hyon JS, Kang SM, Han SW, Kang MC, Oh MC, Oh CK, Kim DW, Jeon YJ, Kim SH (2009b) Flavonoid component changes and antioxidant activities of fermented *Citrus grandis* Osbeck peel. J Korean Soc Food Sci Nutr 38:1310-1316

Jeon SM, Lee JY, Kim HW, Lee YM, Jang HH, Hwang KA, Kim HR, Park DS (2012) Antioxidant activity of extracts and fractions from *Aster scaber*. J Korean Soc Food Sci Nutr 41:1197-1204

Jiang J, Shan L, Chen Z, Xu H, Wang J, Liu Y, Xiong Y (2014) Evaluation of antioxidant-associated efficacy of flavonoid

extracts from a traditional Chinese medicine Hua Ju Hong (peels of *Citrus grandis* (L.) Osbeck). J Ethnopharmacol 158:325-330

Jung SI, Kang ST, Choi CY, Oh, KY, Cho JK, Rengasamy R, Park KH (2009). Linoleic acid from bamboo (*Phyllostachys bambusoides*) displaying potent α-glucosidase inhibition. J Life Sci 19:680-683

Kang SH, Cho EK, Choi YJ (2012). α-Glucosidase inhibitory effects for solvent fractions from methanol extract of *Sargassum fulvellum* and its antioxidant and alcohol-metabolizing activies. J Life Sci 22:1420-1427

Kim EJ, Choi JY, Yu M, Kim MY, Lee S, Lee BH (2012) Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. Korean J Food Sci Technol 44:337-342

Kim GN, Shin JG, Jang HD (2009) Antioxidant and antidiabetic activity of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saitoi*. Food Chem 117:35-41

Kim HH, Park GH, Park KS, Lee JY, An BJ (2010) Anti-oxidant and anti-inflammation activity of fractions from *Aster glehni* Fr. Schm. Kor J Microbiol Biotechnol 38:434-441

Kim JS, Kim KC (2016) Antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities of *Tradescantia pallida*(Rose) Hunt leaf extract and fractions. Korean J Med Crop Sci 24:222-227

Kim K, Cha H, Song HK, Lee YN, Ahn KJ, Ahn IS, An S (2014) Inhibitory effects of freeze dried unripe Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extracts on melanogenesis. Asian J Beauty Cosmetol 12:403-408

Kim SJ (2009) Identification and distribution of the pathogenic microorganisms isolated from edible ice in north area of Daegu, Korea. Kor J Microbial 45:86-90

Ko HM, Eom TK, Song SK, Jo GY, Kim JS (2017) Tyrosinase and α-glucosidase inhibitory activities and antioxidant effects of extracts from different parts of *Hypochaeris radicata*. Korean J Med Crop Sci 25:139-145

Kwon HJ, Lee SJ, Eom SH, Hyun TK (2017) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from aerial parts and cell suspension cultures of *Elsholtzia angustifolia*. Bioscience Research 14:592-597

Lee HJ, Kang GJ, Yoon WJ, Kang HK, Kim YS, Kim SM, Yoo ES (2006) Anti-inflammatory effect of unripe fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW264.7 and HaCaT cells. Kor J Pharmacogn 37:74-80

Lee MJ, Moon GS (2003) Antioxidative effects of Korean bamboo trees, Wang-dae, Som-dae, Maengjong-juk, Jolit-dae and O-juk. Korean J Food Sci Technol, 35:1226-1232

Mäkynen K, Jitsaardkul S, Tachasamran P, Sakai N, Puranachoti S, Nirojsinlapachai N, Chattapat V, Caengprasath N, Ngamukote S, Adisakwattana S (2013) Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand. Food Chem 139:735-743

Moon JY, Kim H, Cho M, Chang WY, Kim CT, Cho SK (2009) Induction of apoptosis in SNU-16 human gastric cancer cells by the chloroform fraction of an extract of Dangyuja (*Citrus grandis*) leaves. J Korean Soc Appl Biol Chem 52:168-175

Moon SH, Assefa AD, Ko EY, Park SW (2015) Comparison of flavonoid contents and antioxidant activity of yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) based on harvest time. Kor J Hort Sci Technol 33:283-291

Nishikimi M, Rao NA, Yagi K (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem Biophys Res Commun 46:849-854

Rhim TJ, Jeong HS, Kim YJ, Kim DY, Han YJ, Kwon HY, Kwon KR (2009) A study on the comparison of antioxidant effects among cultivated ginseng, and cultivated wild ginseng extracts-using the measurement of superoxide and hydroxy radical scavenging activities. J Pharmacopuncture 12:7-12

Sánchez-González I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F (2005) In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). Food Chem 90:133-139

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol 299:152-178

Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J (2009) Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. Food Chem 113:1226-1233

Zheng W, Wang SY (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J Agric Food Chem 49: 5165-5170

Zulueta A, Esteve MJ, Frigola A (2009) ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chem 114:310-316