

에탄올 농도별 당유자 잎의 최적추출조건 및 생리활성 평가

나카무라 마사야 · 라종환 · 김주성

Evaluation of biological activity for Dangyuja (*Citrus grandis*) leaves and investigation of optimal concentrations extracted by alternative ethanol concentrations

Masaya Nakamura · Jong-Hwan Ra · Ju-Sung Kim

Received: 1 February 2019 / Revised: 20 March 2019 / Accepted: 20 March 2019
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The *Citrus grandis* Osbeck is a special product in the Jeju island. The product has been as a remedy for liver damage and hang over. This study demonstrates how to investigate and compare the antioxidant, phenol content, tyrosinase and α -glucosidase inhibitory activity, antimicrobial, and alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activity with the *C. grandis* leaves extracted in different ethanol concentrations. From the yield, a 20% ethanol extract demonstrated the highest results among the other extracts. The distilled water extract showed the most abundant in a total phenol content and highest ABTS radical scavenging activity and reducing power assay. In the DPPH radical scavenging activity, α -glucosidase and tyrosinase inhibitory assay (used L-tyrosine as substrate), the 80% ethanol extract exhibited a higher value than other extracts. The 60% ethanol extract showed prominent activities in the tyrosinase inhibitory (used L-dopa as substrate), ADH and ALDH activity assay. In the minimum inhibitory concentration (MIC) assay, 60% and 80% ethanol extracts inhibited the bacterial growth almost similarly. Moreover, the gram-positive bacteria was more restrained than the gram-negative bacteria. The results revealed that the distilled water and 80% ethanol extract showed a relatively higher antioxidant activity compared to other extracts. The 60 ~

80% ethanol extracts demonstrated potential tyrosinase, α -glucosidase inhibitory, antimicrobial, ADH and ALDH activities. Therefore, the *C. grandis* is suggested to be considered as a functional material for various proposes.

Keywords ADH, ALDH, Antioxidant, *Citrus grandis* Osbeck, Ethanol extract, Leaves, Phenol

서 언

제주도 특산물의 하나인 당유자(*Citrus grandis* Osbeck)는 재래 감귤류의 일종으로서 운향과, 감귤아과에 속하는 귤나무이며 “왕귤” 또는 “렝유지”라 불린다(Hyon et al. 2009). 당유자는 동남아시아가 원산지인 온난한 기후에서 잘 자라며, 일본, 중국, 말레이시아, 대만에서는 생식용 또는 가공용으로 많이 생산되고 있다(Sawamura et al. 2001; Tao and Liu 2012; Shamsudin et al. 2015; Wang et al. 2016). 간 보호와 폭음에 의한 숙취 완화 등 민간의약품으로서 여러 가지 약용적 효과가 알려졌고(Lim et al. 2006), 인체에 기능성을 나타내는 주요 성분으로 비타민, 무기질, 유기산 등의 영양 성분, naringin, hesperidin, neoeriocitrin 등의 flavanone류, limonine 등의 휘발성분과 같이 다양한 유효성분을 함유하고 있는 것으로 보고되었다(Moon et al. 2009; Zhang et al. 2014). 당유자에 관한 연구로는 과피의 ethyl acetate 분획물과 정유가 *Aedes aegypti*의 산란과 공격을 효과적으로 억제하고, 대조군으로 사용한 N, N-diethyl-meta-toluamide과 유사한 효과를 보였다는 보고도 있고(Mano-renjitha et al. 2017), 꽃을 이용하여 효율적인 캘러스 형성을 유도하는 연구도 수행되었다(Zakaria et al. 2010). 또한 미숙과의 동결건조 추출물이 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 보

M. Nakamura · J.-H. Ra · J.-S. Kim* (✉)
제주대학교 생명자원과학대학 친환경농업연구소
(Majors in Plant Resource and Environment, College of
Agriculture and Life sciences, SARI, Jeju National University,
Jeju 63243, Korea
e-mail: aha2011@jejunu.ac.kr

고되었다(Kim et al. 2014). 생리활성에 관한 선행연구로는 과육에서 얻어진 추출물과 분획물의 항산화능 및 병원성 미생물에 대한 항균효과(Mokbel and Hashinaga, 2005; Lim et al. 2006), 과피 추출물의 혈중 지질 및 포도당 농도 개선에 대한 항비만 및 항당뇨 효과(Hong et al. 2010; Liu et al. 2017) 등이 있는 것으로 보고되었다. 지금까지 당유자의 다양한 효능 연구가 많이 수행되었지만 주로 과피, 과육, 과즙으로 이루어졌으며 잎에 대한 연구는 Kim et al. (2010a)과 Moon et al. (2009)의 항암 효과, Kim et al. (2008)의 항산화 효능, Rao et al. (2011)의 항당뇨 효과 등이 보고되어 있을 뿐이다. 또한 단일 용매 추출물(메탄올, 에탄올 등)이나 분획물을 이용한 연구가 대부분이며 아직까지 용매 농도별로 추출된 당유자 잎 관련 연구는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 당유자 잎을 에탄올 농도별(20%, 40%, 60%, 80%, 100%)로 추출하여 항산화능, 페놀 함량, 항당뇨 효과, 미백 효과, 항균 효과, 그리고 이전에 보고된 바가 없는 알코올 분해능 활성에 초점을 맞추어 당유자 잎의 생리활성을 포괄적으로 비교 분석함과 동시에 제주도 특산물로써 잎을 이용한 신소재 개발 원료로서의 이용 가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용한 당유자 잎은 2014년 10월초에 수확한 것을 제주특별자치도 식물자원연구소에서 구입하여 실험에 이용하였다. 이물질 제거 후 실온에서 10일동안 완전하게 건조시켜 믹서기로 분쇄하고 중량 10배의 용매(0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 에탄올)에 담가 90분 동안 25°C에서 초음파 추출기(Power sonic 520, Hwashin Co., Yeongcheon, Korea)를 이용하여 추출하였다. 추출된 용액을 Whatman No.2 여과지(Whatman International Ltd, Kent, England, UK)에 여과하여 감압농축기(Hei-VAP Precision 280 rpm; Heldolph, Germany)를 이용하여 농축하였다. 농축된 시료는 -20°C에서 보관하면서 분석실험을 실시하였다.

총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량을 측정하기 위하여 Singleton and Rossi (1965)의 실험 방법을 변형하여 수행하였다. 증류수로 희석된 샘플 용액에 50 µL의 Folin-Ciocalteu 시약을 첨가하여 5분 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 300 µL의 20% sodium carbonate를 넣고, 20분 동안 반응시킨 뒤 1 mL의 증류수를 첨가하여 725 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 샘플시료의 총 페놀 함량은 표준물질로 사용된 gallic acid의

표준액으로 작성한 검량선에 따라 계산하여 *garlic acid equivalent* (GAE, mg GAE/g)로 나타내었다.

DPPH radical 소거능 측정

1,1-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용한 항산화 활성 측정은 Musa et al. (2013)의 방법을 변형하여 수행하였다. 메탄올로 희석된 200 µL 샘플 용액을 96-well microtiter plate 두 번째 줄에 넣고 나머지는 100 µL의 메탄올을 가하였다. 두 번째 줄에서 마지막 줄까지 단계적으로 희석하여(1.56-200 µg/mL) 첫 번째 줄은 음성대조군으로 사용하였다. 희석된 용액에 100 µL의 DPPH (0.4 mM)를 첨가하여 암상태로 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 490 nm에서 microplate reader (iMark; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 소거능은 아래의 식으로 계산하여 50%가 되는 샘플량의 농도를 RC_{50} (µg/mL)로 나타내었고 양성대조군으로 *L*-ascorbic acid, α -tocopherol, butylated hydroxytoluene (BHT)을 사용하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [1 - A/B] \times 100$$

A: absorbance of sample solution, B: absorbance of control

ABTS radical 소거능 측정

2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)을 이용한 항산화 활성 측정 방법은 Re et al. (1999)의 실험 방법을 변형하여 수행하였다. 7 mM ABTS과 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 암조건의 실온에서 16 시간 동안 반응시킨 뒤 분광광도계(UV-1800, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 흡광도 값이 750 nm에서 1.2 ~ 1.3이 되도록 sodium phosphate buffer를 첨가하여 조절하였다. 준비된 샘플과 160 µL ABTS 용액을 96-well microtiter plate 두 번째 줄에 넣고 나머지는 100 µL의 증류수를 첨가하였다. 두 번째 줄에서 마지막 줄까지 단계적으로 희석하여(1.56 ~ 200 µg/mL) 첫 번째 줄은 음성대조군으로 사용하였고, 10분 동안 반응시킨 후 750 nm로 세팅된 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 소거능은 DPPH radical 소거능 측정과 같은 식으로 계산하였으며 50%가 되는 샘플량의 농도를 RC_{50} (µg/mL)로 나타내었고, 양성대조군으로 *L*-ascorbic acid, α -tocopherol를 사용하였다.

환원력 측정

샘플의 환원력을 측정하기 위하여 Oyaizu (1986)의 방법을 약간 변형하여 실험을 수행하였다. 농도별(100, 200, 300 µg/mL) 샘플용액에 500 µL의 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6)와 potassium ferriyanide를 첨가하여 50°C에서 20분 동안 반응시켰다. 이 용액에 250 µL의 10% trichloroacetic acid를

넣고, 상등액을 microtube에 분주하여 0.1% ferric chloride를 첨가하였다. 마지막으로 분광광도계를 이용하여 흡광도 값을 조사하였다. 환원력은 흡광도 값으로 나타내었고, 양성대조군으로 α -tocopherol을 사용하였다.

α -Glucosidase 저해활성 측정

α -Glucosidase 저해활성을 측정하기 위하여 Oki et al. (1999)의 방법을 변형하여 수행하였다. 200 μ L의 sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.8)와 50 μ L의 α -glucosidase 효소액(0.5 U/mL)을 순서대로 50 μ L의 샘플 용액과 혼합하여 15분 동안 37°C에서 반응시켰다. 이어서 기질로 100 μ L의 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG)를 첨가하여 10분 동안 37°C에서 반응시킨 후 750 μ L의 sodium carbonate를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 마지막으로 405 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 저해활성은 아래의 식으로 계산하여 50%가 되는 샘플량의 농도를 IC₅₀(mg/mL)으로 나타내었고, 양성대조군으로 acarbose를 사용하였다.

$$\% \text{ of inhibition} = [1 - (A/B)/C] \times 100$$

A: absorbance of sample solution, B: absorbance without treating pNPG, C: absorbance without treating sample solution.

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성은 Huang et al. (2013)의 방법을 변형하여 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)로 희석된 샘플 용액에 기질로 40 μ L의 L-tyrosine (1.66 mM), 효소로 tyrosinase (125 U/mL)를 순서대로 넣고, 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 실험 종료 후 microplate reader를 이용하여 495 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동시에 L-tyrosine 대신에 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa)를 기질로 이용하였으며 α -glucosidase 저해활성 측정과 같은 식으로 계산하여 백분율로 나타내었고, 양성대조군으로 arbutin를 사용하였다.

미생물 배양 및 항미생물 활성 측정

항미생물 활성 측정은 Kobayashi et al. (1995)의 two-fold dilution법을 변형하여 항균활성 정도를 분석하였으며 그람 양성균으로 *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (KCTC 1927), *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (KACC 14741), *Kocuria rhizophila* (KACC 14744), *Micrococcus luteus* (KACC 14819)의 5종, 그람 음성균으로 *Enterobacter cloacae* (KACC 11958), *Klebsiella pneumonia* (KACC 14816), *Escherichia coli* (KCTC 1924), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1750), *Proteus vulgaris* (KCTC 2433)의 5종, 효모로 *Saccharomyces cerevisiae* (KCTC 7913), *Pichia jadinii* (KCTC 7293), *Candida*

albicans (KCTC 7965)의 3종을 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 균주는 각각 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC, Suwon, Korea)와 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC, Taejeon, Korea)에서 분양 받아 실험에 사용하였으며 멸균된 액체 배지를 이용하여 각 미생물의 최적생육온도로 배양했고, 96-well microtiter plate에 분주하였다. 샘플의 최종농도가 7.8-1000 μ g/mL에 되도록 맞추고, 12 시간동안 배양한 후 육안으로 샘플의 미생물 저해활성을 관찰하였으며 양성대조군으로 tetracycline를 사용하였다.

ADH 및 ALDH 활성 측정

Alcohol dehydrogenase (ADH) 활성을 측정하기 위하여 수행된 실험은 Shim et al. (2013)이 고안한 방법을 변형하여 조사하였다. 100 μ L의 희석된 샘플 용액에 ethanol과 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 시약을 가하여 혼합한 뒤 glycine-NAOH (pH 8.8)을 첨가하여 1.8 mL가 되도록 조절하였다. 그 다음 혼합한 용액을 25°C에서 10분 동안 반응시킨 후 ADH (10 U/mL)을 첨가하고 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성 측정은 Tottmar et al. (1973)의 방법을 변형하여 수행하였다. 50 mM sodium phosphate buffer, 5 mM acetaldehyde, 0.5 mM NAD 용액, 0.1 mM ALDH을 순서대로 첨가하였다. 여기에 200 μ L의 샘플 시료를 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 370 nm에서 흡광도를 측정하였다. ADH 및 ALDH 활성 측정은 이전 실험을 통하여 300 μ g/mL의 농도로 설정하고 아래의 식을 이용하여 계산하였으며 무처리군을 control로 이용하여 100%로 나타내어 ADH 및 ALDH 활성을 비교 분석하였다.

$$\text{ADH (ALDH) activity (\%)} = (A/B) \times 100$$

A: absorbance of sample solution, B: absorbance without treating sample solution

통계처리

모든 데이터는 최소 2 반복으로 이루어졌으며 실험결과는 평균과 표준편차로 표기했고 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, ver. 18.0)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시하였다. 평균값의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하여 항목에 따라 유의적 차이가 있는 것에 대해서는 다중범위 검정(Duncan's Multiple Range Test)을 이용하여 분석하였으며 상관관계 지수는 피어슨 상관계수(Pearson correlation coefficient)에 따라 검증하였다.

결과 및 고찰

당유자 잎의 에탄올 농도별 추출수율

용매 추출은 식물체의 생리활성 물질을 얻는데 가장 많이 사용되는 방법으로 식물 종류, 추출방법 및 시간, 용매 극성 등에 따라 다르며 기본적으로 일정한 추출 시간과 온도하에서는 사용하는 용매의 종류와 식물체가 가진 물질의 생리활성을 결정하는 큰 요인이 된다. 따라서 수율은 용매와 밀접한 관계가 있으며 효율적인 추출을 위하여 실험설계가 중요한 요소가 된다(Fatiha et al. 2012). 에탄올 농도별 당유자 잎의 추출수율은 Table 1에 나타내었다. 20% 에탄올 추출물이 27.62±0.91%로 가장 높은 수율을 나타냈으며 40%, 80%, 60%, 물, 100% 에탄올 추출물 순으로 유의적인 수율 감소가 관찰되었다. 특히 100% 에탄올 추출물이 3.82±0.31%로 다른 추출물보다 상당히 차이가 나타났으며 비교적 에탄올과 물의 혼합 추출에서 높은 수율이 확인되었다. 이는 약용 허브인 *Linnophila aromatica*을 에탄올 농도별로 추출한 Do et al. (2014)의 결과와 유사한 결과를 보였으나, 칠피의 에탄올 농도별 추출에서 물 추출물이 약간 낮은 수율을 나타내었으나 에탄올 혼합 추출물과는 유의한 차이가 없었다는 보고(Kim et al. 2010b)와는 차이를 보였다.

총 페놀 함량

페놀 화합물은 예로부터 인체에 주요한 역할을 하는 물질로 다양한 생리활성에 작용하는 것으로 알려져 왔으며 지금까지 수 많은 연구가 수행되어 왔다(Ho et al. 2018). 본 실험에서도 페놀 함량과 실시한 생리활성 사이에 연관이 있는지를 알아보기 위하여 총 페놀 함량을 측정하여 mg GAE/g로 나타내었다(Table 1). 앞서 고찰한 수율과 반대로 물(628.27±28.11), 100% 에탄올(568.82±30.42) 추출물에서 높은 함량을 나타냈으며 다음으로 40%(557.92±20.30), 60%(543.60±10.53), 20%

(486.32±19.40), 80% 에탄올 추출물(466.40±3.50)의 순이었다. 당유자 과피를 극성순으로 분획하여 우수한 활성을 보인 ethylacetate 분획물의 페놀 함량이 163.19±2.34 mg GAE/g이라는 보고(Ko and Kim, 2018)와 당유자 잎 ethylacetate 분획물에서 202.1±0.8 mg GAE/g로 가장 높게 나타났다고 하여(Kim et al. 2008) 측정 방법이 약간 다른 것을 고려하여도 이들 실험 결과와 비교해볼 때 높은 페놀 함량을 나타내는 것을 알 수 있었다.

DPPH radical 소거능

라디칼은 불안정한 것으로 알려져 있지만 DPPH 라디칼은 분자 내 라디칼을 보유하고 있으며 다른 라디칼과 결합함으로써 complex을 형성하기에 비교적 안정하고 항산화제부터 전자 및 수소 분자를 받으면 라디칼이 소거되어 특유의 보라색이 노란색으로 엷어지는데(Ju et al. 2009), 그 소거능을 RC₅₀로 나타내었다(Table 2). 모든 추출물에서 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid, α-tocopherol, BHT보다 높은 활성을 보이지 않았으며 80% 에탄올 추출물까지 에탄올 농도가 증가할수록 소거능이 증가하는 것으로 나타났다. 특히 80% 에탄올 추출물에서 174.32±8.45 µg/mL로 가장 높은 소거능을 나타냈으며 100% 에탄올 추출물에서는 500 µg/mL 이상의 가장 낮은 활성을 보였다. 또한 물 추출물에서 375.2±2.99 µg/mL로 나타났는데 Lim et al. (2006)은 당유자 미숙과 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, 그리고 물 분획물 중에서 물 분획물이 DPPH 소거능이 가장 높아 α-tocopherol과 유사한 활성을 보였다고 보고하였는데, 추출 방법 특히 본 실험에서는 잎을 사용했지만 껍질을 포함한 과실을 사용했기 때문이라 생각된다. 또한 페놀 함량과 라디칼 소거능은 비례한다고 보고되었으나(Al-Dabbagh et al. 2018), 본 연구에서는 DPPH radical 소거능과 페놀 함량과의 상관 관계는 r=0.463으로 낮게 나타나(Table 6), DPPH 소거능은 페놀 화합물 이외의 물질이 관여하고 있는 것으로 사료되었다. 당유자 잎 chloroform 분획물에서

Table 1 Extraction yields and total phenolic content of the *Citrus grandis* leaves obtained according to different ethanol concentrations and distilled water

Extracts	Yield (%) ^a	Total phenol (mg GAE/g) ^b
Distilled water extract	20.70±1.36 c	628.27±28.11 a
20% ethanol extract	27.62±0.91 a	486.32±19.40 c
40% ethanol extract	23.77±0.98 b	557.92±20.30 b
60% ethanol extract	21.22±1.60 c	543.60±10.53 b
80% ethanol extract	23.75±0.29 b	466.40±3.50 c
100% ethanol extract	3.82±0.31 d	568.82±30.42 b

Values are mean value ± standard deviation (SD) of duplicate determinations. The values with the same superscript letter along the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

^aPercentage yield from the dried plant material

^bTotal phenolic content analyzed as gallic acid equivalent (GAE) mg/g of extract

vitamin류인 vitamin E, 식물성 스테롤류인 campesterol, ethylacetate 분획물에서 triterpene류인 α -amyrin 등이 동정되었으며(Kim et al. 2008; Moon et al. 2009), 항산화 효과가 있는 것으로 보고되어(Yoshida and Niki, 2003; Traber and Atkinson, 2007; Melo et al. 2010) 이러한 소수성 물질들이 DPPH radical 소거능에 비교적 높게 기여하고 있을 것으로 사료된다.

ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능은 간편하게 샘플의 radical 소거능을 측정할 수 있는 방법으로, 안정한 radical이기 때문에 많이 사용되며 potassium persulfate를 산화제로 사용하여 발생한 ABTS radical과 항산화 효과가 있는 물질이 만나면 흡광도가 감소하게 되며 control과 비교하여 그 차이를 일정한 시간 후에 734 nm 부근에서 측정한다(Schaich et al. 2015). 당유자 잎의 에탄올 농도별 추출물의 ABTS radical 소거능은 Table 2에 나타내었다. 에탄올 농도가 증가할수록 활성이 감소하는 경향을 보여 물>20%>40%>60%>80%>100% 에탄올 추출물 순으로 나타났다. DPPH radical 소거능과 같이 100% 에탄올 추출물에서 500 μ g/mL 이상의 낮은 활성이 나타났으며 100% 에

탄올 추출에서는 radical 소거능에 관여하는 물질이 덜 추출된다는 것이 확인되었고 백부자(*Aconiti koreani Rhizoma*)의 에탄올 농도별 추출물을 사용한 Yoon et al. (2005)의 결과와 일치하였다. 한편 DPPH radical 소거능이 낮았던 물 추출물에서 180.42 \pm 4.95 μ g/mL로 가장 높게 나타났다. DPPH radical은 반응성이 높은 수산기만 반응하는 반면 ABTS radical은 수산기에 대한 선택성이 낮아 DPPH radical 소거능에서 반응하지 않았던 물질이 소거능에 관여하는 것으로 알려져 있으며(Takahashi and Higuchi, 2007) 본 연구에서도 DPPH radical 소거능에서 측정되지 않은 물질이 ABTS radical 소거능에 관여한 것으로 추정된다.

환원력

환원력 측정은 potassium ferricyanide (Fe^{3+})가 ferrocyanide (Fe^{2+})로 환원되는 정도를 조사하여 환원력이 클수록 녹색이 가깝게 발색된다. 활성 정도는 샘플이 가진 reductone과 관계가 있으며 수소 분자를 공여함으로써 연쇄반응을 방지하므로 항산화 활성이 큰 물질일수록 높은 흡광도 값을 나타낸다(Saha and Paul, 2014). 당유자 잎의 환원력을 평가한 결과(Table 3),

Table 2 The result of the DPPH and ABTS radical scavenging in *Citrus grandis* leaves according to different ethanol concentrations and distilled water

Extracts	DPPH RC ₅₀ (μ g/mL) ^a	ABTS RC ₅₀ (μ g/mL) ^a
Distilled water extract	375.21 \pm 2.99 d	180.42 \pm 4.95 b
20% ethanol extract	240.26 \pm 10.05 c	218.02 \pm 2.38 b
40% ethanol extract	192.55 \pm 0.95 bc	300.67 \pm 9.54 c
60% ethanol extract	196.38 \pm 2.66 bc	311.78 \pm 15.03 c
80% ethanol extract	174.32 \pm 8.45 b	482.73 \pm 13.51 d
100% ethanol extract	> 500 e	> 500 e
L-Ascorbic acid	1.21 \pm 0.04 a	3.48 \pm 0.02 a
α -Tocopherol	3.98 \pm 0.01 a	11.72 \pm 0.04 a
Butylated hydroxytoluene	42.66 \pm 1.81 a	

Values are mean value \pm standard deviation (SD) of duplicate determinations. The values with the same superscript letter along the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

^aRC₅₀: Amount required for a 50% reduction of DPPH (ABTS) free radicals after 30 minutes

Table 3 Reducing power ability of the *Citrus grandis* leaves according to different ethanol concentrations and distilled water

Extracts	100 μ g/mL	200 μ g/mL	300 μ g/mL
Distilled water extract	0.097 \pm 0.004 b	0.189 \pm 0.002 b	0.269 \pm 0.07 b
20% ethanol extract	0.075 \pm 0.004 cd	0.157 \pm 0.007 cd	0.214 \pm 0.013 c
40% ethanol extract	0.087 \pm 0.004 bc	0.177 \pm 0.007 bc	0.231 \pm 0.004 bc
60% ethanol extract	0.076 \pm 0.008 cd	0.180 \pm 0.006 bc	0.231 \pm 0.022 bc
80% ethanol extract	0.080 \pm 0.003 bcd	0.158 \pm 0.008 cd	0.215 \pm 0.008 c
100% ethanol extract	0.063 \pm 0.006 d	0.146 \pm 0.006 d	0.234 \pm 0.002 bc
α -Tocopherol	0.248 \pm 0.006 a	0.603 \pm 0.029 a	0.950 \pm 0.026 a

Values are mean value \pm standard deviation (SD) of duplicate determinations. The values with the same superscript letter along the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

Table 4 α -Glucosidase inhibitory activity of the *Citrus grandis* leaves according to different ethanol concentrations and distilled water

Extracts	IC ₅₀ (μ g/mL) ^a
Distilled water extract	>500 d
20% ethanol extract	>500 d
40% ethanol extract	>500 d
60% ethanol extract	416.35±11.07 c
80% ethanol extract	336.57±2.03 b
100% ethanol extract	418.18±3.56 c
Acarbose	83.81±3.14 a

Values are mean value \pm standard deviation (SD) of duplicate determinations. Values with the same superscript letter along the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

^aIC₅₀: Concentration requires to reduce 50% of α -glucosidase (μ g/mL).

농도 의존적으로 환원력을 나타내어 물 추출물이 100, 200, 300 μ g/mL에서 각 0.097±0.004, 0.189±0.002, 0.269±0.07으로 가장 우수하게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 그리고 에탄올 농도가 증가함에 따라 활성이 감소하는 경향을 보여 40%, 60% 에탄올 추출물이 모든 첨가 농도에서 비교적 높은 활성

을 나타냈으나 20%, 100% 에탄올 추출물에서는 낮은 활성을 나타냈다. 하지만 Padmanabhan and Jagle (2012)가 보고한 약용식물인 *Aloe vera* (0.045±0.004)와 *Bacopa moninera* (0.038±0.015) 에탄올 추출물과 100 μ g/mL의 농도로 비교해볼 때 모든 당유자 잎 추출 농도에서 보다 뛰어난 환원력이 있음을 보여주었다. 또한 페놀 함량과 환원력의 관계를 보았을 때 (Table 6) radical 소거능과 달리 $r=0.848$ ($p < 0.001$)로 높은 상관관계가 나타나서 페놀 화합물이 환원력에 큰 역할을 하고 있다는 최근 보고와 일치하였다(Ebrahimzadeh et al. 2018). 이는 당유자의 주성분인 naringin과 hesperigin 등 페놀 화합물에 기인한다고 생각되며(Zefang et al. 2016) naringin과 hesperidin이 우수한 환원력을 가진다고 볼 수 있다(Castro-Vazquez et al. 2016).

α -Glucosidase 저해활성

α -Glucosidase는 식후 탄수화물(다당류)이 α -amylase에 의해 변형된 이당류를 단당류로 가수분해할 때 관여하는 효소이며 그 후 소장에서 흡수되어 각 장기에서 사용되지만 빠르게 흡수되면 혈당치가 높아져 다양한 질환을 유발하기도 한다. α -Glucosidase 저해제로 acarbose, miglitol, voglibose 등이 사용되고 있으나 부작용이 보고되어 천연 추출물에서 α -glucosidase

Table 5 Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the *Citrus grandis* leaves according to different ethanol concentrations and distilled water against microorganisms

		Minimum inhibitory concentration (μ g/mL) ^a						
		H ₂ O ^b	20E	40E	60E	80E	100E	Tet
Gram positive bacteria	B.c	- ^c	-	1000	125	250	250	8
	S.a	-	-	-	500	500	-	8
	B.s	-	-	-	500	500	-	8
	K.r	-	-	-	1000	500	-	8
	M.l	-	-	-	500	500	-	8
Gram negative bacteria	E.cl	-	-	-	-	-	-	8
	K.p	-	-	-	-	-	-	8
	E.c	-	-	-	-	-	-	8
	P.a	-	-	-	-	1000	-	8
	P.v	-	-	-	1000	250	-	8
Yeast	S.c	-	-	-	-	-	-	-
	P.j	-	-	1000	1000	1000	-	-
	C.a	-	-	1000	1000	1000	-	-

B.c: *Bacillus cereus* (KCTC 1012), S.a: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (KCTC 1927), B.s: *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* (KACC 14741), K.r: *Kocuria rhizophila* (KACC 14744), M.l: *Micrococcus luteus* (KACC 14819), E.cl: *Enterobacter cloacae* (KACC 11958), K.p: *Klebsiella pneumoniae* (KACC 14816), E.c: *Escherichia coli* (KCTC 1924), P.a: *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1750), P.v: *Proteus vulgaris* (KCTC 2433), S.c: *Saccharomyces cerevisiae* (KCTC 7913), P.j: *Pichia jadinii* (KCTC 7293), C.a: *Candida albicans* (KCTC 7965).

^aThe MIC value against bacteria was determined through the serial two-fold dilution method. The growth of the bacteria was evaluated by the degree of turbidity of the culture with the naked eye in twelve hours.

^bH₂O, distilled water extract; 20E, 20% ethanol extract; 40E, 40% ethanol extract; 60E, 60% ethanol extract; 80E, 80% ethanol extract, 100E, 100% ethanol extract; Tet, tetracycline

^c- : >1000 μ g/mL

Table 6 Correlation analysis between the total phenol content and each assay

	TPC	RDP	DPPH	ABTS	α -Glu	L-Tyro	L-Dopa	ADH	ALDH
TPC	1	0.848***	0.463	-0.124	0.33	-0.691**	-0.486	-0.351	-0.197

TPC, total phenol content assay; RDP, reducing power assay; DPPH, DPPH radical scavenging assay; ABTS, ABTS radical scavenging assay; α -Glu, α -glucosidase inhibitory assay; L-Tyro, L-tyrosine inhibitory assay; L-Dopa, L-dopa inhibitory assay; ADH, alcohol dehydrogenase assay; ALDH, aldehyde dehydrogenase assay

***, significance $p < 0.001$

** , significance $p < 0.01$

를 저해하는 물질을 찾아내는 연구가 활발히 진행되고 있다 (Taha et al. 2016). α -Glucosidase 저해활성을 측정하여 IC₅₀로 나타낸 결과 80% 에탄올 추출물에서 336.57±2.03 μ g/mL로 다른 농도와 비교하면 뚜렷하게 높게 나타났으며 60%, 100% 에탄올 추출물에서는 비슷한 활성을 가지는 것으로 나타났다(Table 4). 물, 20%, 40% 에탄올 추출물의 경우 500 μ g/mL 이상으로 매우 낮게 나타나서 대조군으로 사용된 acarbose와 비교해볼 때 모든 추출 농도에서 뛰어난 활성이 보이지 않았다. 이는 황칠 잎의 에탄올 농도별 추출에서 60%, 80%, 100% 에탄올 추출물이 물, 20%, 40% 에탄올 추출물에 비해 월등히 높은 활성을 나타낸 것과 일부 일치하였지만 본 실험에서는 페놀 함량과의 연관성이 $r=0.330$ 으로 유의성이 없게 나타났으며(Table 6), 황칠 잎 추출물에서 -0.614 ($p<0.05$)로 나온 것과 비교하였을 때(Nakamura et al. 2016) 페놀 화합물이 아닌 다른 물질이 α -glucosidase 저해활성에 큰 기여를 하고 있음을 확인할 수 있었다. Mohamed et al. (2012) 은 쿠미스크친(*Orthosiphon stamineus*)의 에탄올 추출물에 대한 α -glucosidase 저해 활성을 조사한 결과 페놀이나 플라보노이드가 저해능에 관여하고 있다고 하면서 다른 물질 즉 배당체나 탄수화물들도 α -glucosidase 저해 활성에 기여하고 있다는 점을 시사하였다.

Tyrosinase 저해활성

피부를 자외선이나 외부의 자극으로부터 보호하는 역할을 하는 멜라닌은 피부 안의 멜라노사이트에서 생합성되며 tyrosine이 활성효소인 tyrosinase 그리고 기질로 L-dopa, L-tyrosine과 반응하여 생성된다. 하지만 멜라닌이 과하게 생성되면 피부의 신진대사가 느려져 기미, 주근깨를 형성하며 피부암을 유발하는 큰 요인이 된다. 따라서 tyrosinase를 저해하여 멜라닌의 과잉생산을 억제하는 천연물질을 찾아낼 필요가 있다(Aumeeruddy-Elalfi et al. 2016). L-Tyrosine, L-dopa를 기질로 하여 tyrosinase 저해활성을 조사한 결과는 Figure 1과 같다. L-Tyrosine을 기질로 한 경우 에탄올 농도가 증가할수록 활성이 증가하여 80% 에탄올 추출물이 가장 우수한 활성을 보여 500 μ g/mL의 농도에서 80% 가까운 높은 수치를 나타냈다. 80% 에탄올 추출물에 비하여 100% 에탄올 추출물에서는 오히려 저해능이 감소하는 경향이 나타났지만 40%, 60%,

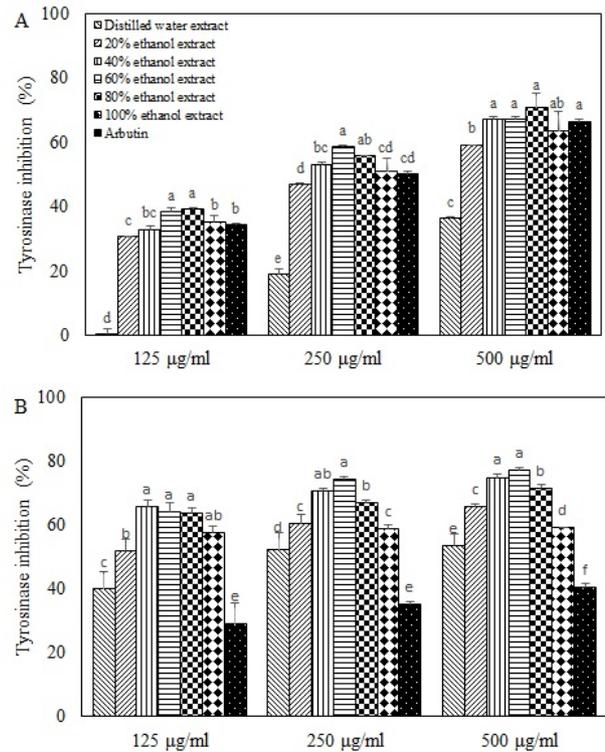


Fig. 1 Tyrosinase inhibitory activity for using L-tyrosine (A) and L-dopa (B) as substrate of the *Citrus grandis* leaves according to different ethanol concentrations and distilled water. Values are mean value \pm standard deviation (SD) of duplicate determinations. Values with the same superscript

80%, 100% 에탄올 추출물에서 대조군으로 사용된 arbutin보다 뛰어난 결과를 보였으며 저농도 에탄올로 추출할 경우에도 어느 정도 저해활성이 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 제주도에서 자생하는 조릿대 추출물의 tyrosinase 저해활성이 20% 에탄올부터 추출 농도가 높아짐에 따라 활성이 증가하여 60% 에탄올을 기준으로 감소한다는 보고(Ra et al. 2017)와 일부 일치하였다. L-Dopa를 기질로 하여 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 L-tyrosine을 기질로 한 경우와 유사한 경향이 나타났으나 물, 20%, 80%, 100%, 40% 에탄올 추출물 순서였으며 60% 에탄올이 다른 추출물보다 높은 활성을 나타냈을 뿐만 아니라 arbutin보다 더 높은 저해 활성을 보여주었다. 이 결과는 10종의 약용식물을 메탄올로 추출하여 500 μ g/mL 농도에서 가장 우수한 활성을 나타낸 *Glycyrrhiza glabra* 뿌리

추출물의 65.67% (Nannapaneni et al. 2016)과 당귤(*Citrus sinensis*) 껍질 에탄올 추출물에서 250 µg/mL 농도에서 50% 정도의 활성을 나타낸 실험 결과(Wuttisin et al. 2017)와 비교해 볼 때 당유자 잎 추출물이 더 높은 수치임을 확인할 수 있었다. 그리고 페놀 화합물 함량 간의 정의 상관관계가 L-tyrosine, L-dopa를 기질로 한 경우 각각 -0.691, -0.486으로 나타났으며 (Table 6) L-tyrosine을 기질로 한 경우 유의한 상관관계 ($p < 0.01$)가 성립되어 어느 정도 페놀 화합물이 저해 활성에 기여하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 감귤류인 핫사쿠 (*Citrus hassaku*)에서 분리된 naringin, heperigin이 높은 저해 활성을 보이는 연구가 보고되었으며 (Itoh et al. 2009), 환원력 측정과 같이 당유자에 함유되어 있는 naringin, heperigin이 tyrosinase 저해활성에 큰 역할을 한다고 판단된다.

항미생물 활성

미생물에 의하여 발생하는 식중독이나 감염성 질환으로 인한 피해가 최근 들어 동반상승하고 있는 실정이며 이들 원인균의 피해를 방지하기 위한 항균성 식품개발과 강한 항균성을 가진 물질을 식물에서 얻고자 하는 연구가 수행되고 있다 (Bensizerara et al. 2013). 당유자 잎의 에탄올 농도별 추출물의 미생물에 대한 저해활성은 Table 5와 같이 40% 에탄올 추출물이 *B. cereus*, *P. jadinii*, *C. albicans* 3종을 1000 µg/mL 농도에서 약한 저해 활성을 나타냈지만 60%, 80%, 100% 에탄올 추출물은 모든 그람 양성균에 1000 µg/mL 및 그 이하의 농도에서 효과가 있었고, 그람 음성균에서도 *P. aeruginosa*과 *P. vulgaris*에 저해활성이 관찰되었다. 특히 *B. cereus*과 *P. aeruginosa*을 125 ~ 250 µg/mL 농도에서 효과적으로 억제하여 이들 2종에 저해활성이 있는 물질이 당유자 잎에 존재하는 것을 확인하였다. 효모의 경우는 100% 에탄올 추출물이 250 µg/mL 농도에서 *P. jadinii*에 대한 저해활성을 보였으나 비교적 낮은 활성을 나타냈다. Galdiero et al. (2012)이 보고한 바와 같이 그람 음성균이 그람 양성균보다 구조적인 방어기작이 있어 저해활성이 그람 양성균에서 더 크다고 한 점은 본 실험에서도 나타났다. 반대로 물, 20% 에탄올 추출물이 본 실험 범위 내에서는 활성을 보이지 않았으며 친수성 물질보다 소수성 물질이 더 관여하고 있는 것으로 예상되며, 또한 페놀 화합물이 미생물의 세포 벽에 작용하여 결국 세포 사멸을 유발함으로써 활성을 나타냈다는 Shan et al. (2009)의 결과와 달리 본 실험에서는 가장 함량이 적은 80% 에탄올 추출물이 높은 활성을 보인 반면에 함량이 가장 많은 물 추출물에서 낮은 저해활성이 나타나 앞서 서술한 ABTS radical 소거능, α -glucosidase 저해활성과 같이 페놀 화합물 외의 물질이 관여할 것으로 추측된다.

ADH 및 ALDH 활성

간으로 운반된 알코올은 ADH, ALDH와 같은 효소 그리고 보

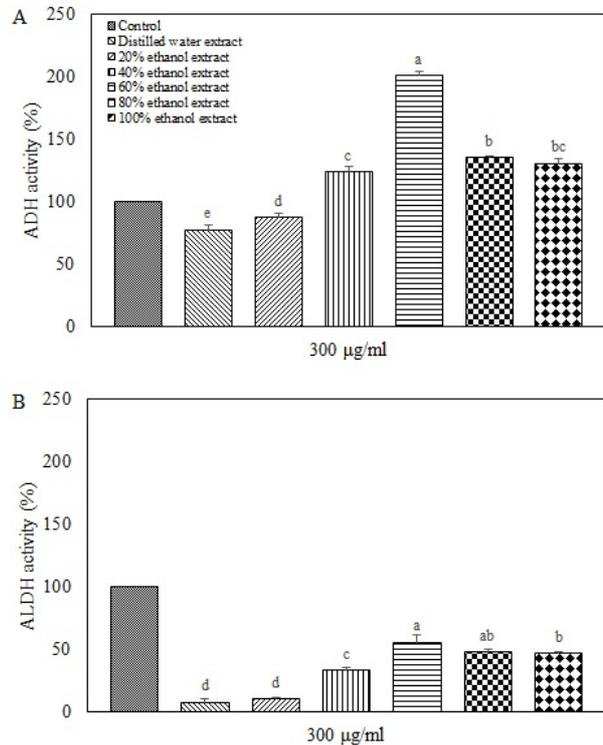


Fig. 2 Alcohol dehydrogenase (A) and aldehyde dehydrogenase (B) activity of *Citrus grandis* leaves according to different ethanol concentrations and distilled water (300 µg/mL). Values are mean value \pm standard deviation (SD) of duplicate determinations. Values with the same superscript

효소인 NAD에 의하여 산화되며 ADH는 알코올을 acetaldehyde로, ALDH는 acetaldehyde를 acetic acid로 단계적으로 전환하여 결국 이산화탄소와 물로 되어 인체에 무해하게 분해된다. 그러나 다량의 알코올 그리고 만성적 섭취는 이들 효소의 활성을 억제하며 분해능력을 약하게 시키므로 간 장해를 비롯한 다양한 질병을 일으키는 것으로 알려졌다(Matsumoto 2011). 따라서 ADH와 ALDH의 활성을 촉진하는 물질을 찾기 위하여 당유자 잎 추출물의 ADH 및 ALDH 활성을 측정하여 Figure 2에 나타내었다. ADH 활성에서는 물 < 20% < 40% < 100% < 80% < 60% 에탄올 추출물 순서로 나타나 40%, 60%, 80%, 100% 에탄올 추출물이 control과 비교하여 각각 24%, 100%, 35%, 30% 정도 증가한 것으로 나타났다. 특히 60% 에탄올 추출물이 2배 정도 활성이 촉진되어 발효된 구기자 열매 에탄올, 메탄올, ethylacetate, 열수추출물이 각각 500 µg/mL에서 153.6%, 152.0%, 142.3%, 180.7%의 활성을 보였다는 보고(Choi et al. 2016)와 Choi and Jung (2016)의 모링가 잎 80% 에탄올(108.87%)과 열수 추출물(132.98%) 실험결과와 비교하여도 상당히 우수한 활성을 보임을 확인할 수 있었다. 하지만 ADH 활성과 비교하여 ALDH 활성은 모든 추출 농도에서 control보다 낮은 활성을 보였으며 그 중에 60% 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 나타냈으나 control의 반 정도의 활성에 불과하였다. Kang et al. (2002)에 의하면 ADH 및 ALDH 활

성을 촉진시키는데 영향을 미치는 주요한 인자로 asparagine 과 methionine 같은 아미노산과 Ca^{2+} 과 Zn^{2+} 같은 무기질이 독자적으로 작용하는 것보다 상호적으로 작용하는 것이 촉진 효과가 크다고 하며, ADH 및 ALDH 활성을 촉진하는 아미노산은 대부분 친수성이고, 무기질 역시 물에 잘 용해되기 때문이라고 보고한 것과 더불어 아미노산 중 소수성이며 알코올 분해에 효과가 있는 alanine도 기여하고 있다고 보고하였다. 또한 수용성 아미노산들의 ADH 및 ALDH 활성을 측정한 Cha et al. (2009)의 보고에 따르면 ADH 활성은 크게 증가한 것으로 나타난 반면에 ALDH 활성은 ADH 활성보다 촉진 효과는 없었다는 실험결과도 있다. 본 연구와 이들의 결과를 종합하여 볼 때 ALDH를 촉진시키는 물질보다 ADH를 촉진시키는 물질이 풍부하게 함유되어 있고, ADH 활성의 경우 저농도에서 수용성 아미노산과 무기질이 크게 관여하고 있는 것으로 추측되며 고농도에는 alanine 같은 소수성 아미노산에 의존하고 있을 것으로 예상된다.

적 요

제주도 특산물로 알려진 당유자의 잎을 이용한 연구는 미흡한 실정이며, 특히 용매 농도별로 다양한 생리활성을 측정하는 연구는 지금까지 보고되어 있지 않았다. 이에 따라 본 연구에서는 에탄올 농도별로 추출된 당유자 잎에 대한 생리활성을 측정하였다. 수율과 총 페놀 함량은 각각 20% 에탄올, 물 추출물이 가장 높은 함량을 가진 것으로 나타났으며 가장 낮은 수율을 보인 100% 에탄올 추출물에서 비교적 높은 페놀 함량이 나타나 수율에 비하여 많은 페놀 함량이 확인되었다. 환원력과 ABTS radical 소거능 실험 결과 물 추출물이 가장 높은 활성을 나타냈으며 80% 에탄올 추출물이 DPPH radical 소거능, α -glucosidase, L-tyrosine을 기질로 한 tyrosinase 저해 활성에서 가장 우수한 활성을 가진 것으로 나타났다. 또한 L-dopa를 기질로 한 tyrosinase 저해 활성과 지금까지 보고된 바 없는 ADH 및 ALDH 활성에서는 60% 에탄올 추출물이 가장 뛰어난 활성을 촉진시켰고 미생물 생육을 억제하는 능력이 60%, 80% 에탄올에서 거의 동일하게 나타났다. 이 결과에서 항산화 효과를 얻고자 할 때는 물이나 80% 에탄올로, 그 외 생리활성(α -glucosidase 저해활성, tyrosinase 저해활성, 항미생물 활성, ADH 및 ALDH 활성)에서는 60~80% 에탄올로 추출하는 것이 가장 효과적일 것으로 사료된다. 본 실험의 결과는 당유자 잎을 신소재 개발 원료로서 사용하는데 하나의 기초 자료가 될 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원이 지원

하는 지역특화산업 육성사업(R0003895)으로 수행된 연구결과입니다.

References

- Al-Dabbagh B, Elhaty IA, Hrouf AA, Sakkaf RA, El-Awady R, Ashraf S, Amin A (2018) Antioxidant and anticancer activities of *Trigonella foenum-graecum*, *Cassia acutifolia* and *Rhazya stricta*. BMC Complem Altern M 18:240
- Aumeeruddy-Elalfi Z, Gurib-Fakim A, Mahomoodally MF (2016) Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants. South Afr J Bot 103:89-94
- Bensizerara D, Menasria T, Melouka M, Cheriet L, Chenchoumi H (2013) Antimicrobial activity of xerophytic plant (*Cotula cinerea* Delile) extracts against some pathogenic bacteria and fungi. Jordan J Biol Sci 6:266-271
- Castro-Vazquez L, Alañón ME, Rodríguez-Robledo V, Pérez-Coello MS, Hermosín-Gutiérrez I, Díaz-Maroto MC, Jordán J, Galindo MF, Arroyo-Jiménez MM (2016) Bioactive flavonoid, antioxidant behavior, and cytoprotective effects of dried grape fruits peels (*Citrus paradisi* Macf.). Oxid med Cell Longev 2016
- Cha JY, Jung HJ, Jeong JJ, Yang HJ, Kim YT, Lee YS (2009) Effects of amino acids on the activities of alcohol metabolizing enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH). J Life Sci 19:1321-1327
- Choi JH, Kang DH, Kim HS (2016) Separation and characteristics of ADH and ALDH activator in fermented *Lycii fructus* extract. Korean Soc Biotechnol Bioeng 31:134-143
- Choi YJ, Jung KI (2016) Anti-diabetic, alcohol-metabolizing, and hepatoprotective activities of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaf extract. J Korean Soc Food Sci Nutr 45:819-827
- Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. J Food Drug Anal 22: 296-302
- Ebrahimzadeh MA, Khalili M, Dehpour AA (2018) Antioxidant activity of ethyl acetate and methanolic extracts of two marine algae, *Nannochloropsis oculata* and *Gracilaria gracilis*-an *in vitro* assay. Braz J Pharm Sci 54:e17280
- Fatiha B, Khodir M, Farid D, Tiziri R, Karima B, Sonia O, Mohamed C (2012) Optimization of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from Algerian mint (*Mentha spicata* L.). Phcog Commn 2:72-86
- Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Tarallo R, Pepa MED, D'Oriano V, Galdiero M (2012) Microbe-host interaction: Structure and role of gram-negative bacterial porins. Curr Protein Pept Sci 13:845-854
- Ho LH, Ramli NF, Tan TC, Muhamad N, Haron MN (2018) Effect of extraction solvents and drying conditions on total phenolic content and antioxidant properties of water melon rind

- powder. *Sains Malays* 47:99-107
- 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
- Huang MH, Tai HM, Wang BS, Chang LW (2013) Inhibition of effect of water extract of *Flos Inulae* on mutation and tyrosinase. *Food Chem* 139:1015-1020
- Hyon JS, Kang SM, Han SW, Kang MC, Oh MC, Oh CK, Kim DW, Jeon YJ, Kim SH (2009) Flavonoid component changes and antioxidant activities of fermented *Citrus grandis* Osbeck peel. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:1310-1316
- Itoh K, Hirata N, Masuda M, Naruto S, Murata K, Wakabayashi K, Matsuda H (2009) Inhibitory effects of *Citrus hassaku* extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. *Biol Pharm Bull* 32:410-415
- Ju MJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK (2009) Physiological activities of mistletoe extracts from *Viscum album* L. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:529-534
- Kang BK, Jung ST, Kim SJ (2002) Effects of vegetable extracts by solvent separation on alcohol dehydrogenase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean J Food Sci Technol* 34: 244-248
- Kim H, Moon JY, Mosaddik A, Cho SK (2010a) Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by polymethoxylated flavone-rich *Citrus grandis* Osbeck (Dangyuja) leaf extract. *Food Chem Toxicol* 48:2435-2442
- Kim K, Cha H, Song HK, Lee YN, Ahn KJ, An IS, An S (2014) Inhibitory effect of freeze dried unripe Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extracts on melanogenesis. *Korean J Aesthetic Cosmetol* 12:403-408
- Kim MO, Kim JS, Sa YJ, Jeong HJ, Chun WJ, Kwon YS, Kim TY, Choi HS, Yu CY, Kim MJ (2010b) Screening of extraction solvent condition of fermented *Rhus verniciflua* stem bark by antioxidant activities. *Korean J Med Crop Sci* 18:217-223
- Kim Y, Cho M, Cho SK (2008) *In vitro* antioxidant and cytoprotective activities of the extract of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) leaves. *Food Sci Biotechnol* 17:1086-1091
- Ko HM, Kim JS (2018) Physiological activities of methanol extract and fraction from *Citrus grandis* Osbeck pericarp. *J Plant Biotechnol* 45:279-286
- Kobayashi A, Hagihara K, Kajiyama S, Kanzaki H, Kawazu K (1995) Antifungal compounds induced in the dual culture with *Phytolacca americana* callus and *Botrytis fabae*. *Z Naturforsch* 50:398-402
- Lim HK, Yoo ES, Moon JY, Jeon YJ, Cho SK (2006) Antioxidant activity of extracts from Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) fruits produced in Jeju Island. *Food Sci Biotechnol* 15: 312-316
- Liu Y, Ren C, Cao Y, Wang Y, Duan W, Xie L, Sun C, Li X (2017) Characterization and purification of bergamottin from *Citrus grandis* (L.) Osbeck cv. Yongjiazaoxiangyou and its anti-proliferative activity and effect on glucose consumption in HepG2 cells. *Molecules* 22:1227-1239
- Manorenjitha MS, Mailina J, Nuziah H, Ling SK, Zairi J (2017) Repellency effect of white flesh *Citrus grandis* osbeck fruit peel extracts against *Aedes aegypti* (Linn.) mosquitoes. *Int J Mosq Res* 4:88-94
- Matsumoto H (2011) Fundamental knowledge of alcohol metabolism. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 46:146-156
- Melo CM, Carvalho KMMB, Nevis JCS, Morais TC, Rao VS, Santos FA, Brito GAC, Chaves MH (2010) α , β -Amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine- induced acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 16:4272-4280
- Mohamed EAH, Siddqui MJA, Ang LF, Sadikun A, Chan SH, Tan SC, Asmawi MZ, Yam MF (2012) Potent α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanol extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism. *Evid Based Complem Altern Med* 12:176
- Mokbel M, Hashinaga F (2005) Evaluation of the antimicrobial activity of extract from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruits peel. *Pak J Biol Sci* 8:1090-1095
- Moon JY, Kim H, Cho M, Chang Y, 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
- Musa KH, Abdullah A, Kuswandi B, Hidayat MA (2013) A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chem* 41: 4102-4106
- Nakamura M, Ra JH, Kim JS (2016) The comparative analysis of antioxidant and biological activities for the *Dendropanax moribifera* LEV. leaves extracted by different ethanol concentrations. *Yakugaku Zasshi* 136:1285-1296
- Nannpaneni KK, Subbiah KA, Ayyanar K, Damodarasamy A (2016) Tyrosinase inhibitory potential of phytochemicals and mycomolecules. *Int J Green Pharm* 10:261-267
- Oki T, Matsui T, Osajima Y (1999) Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varied according to its origin. *J Agric Food Chem* 47:550-553
- Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44:307-315
- Padmanabhan P, Jagle SN (2012) Evaluation of DPPH radical scavenging activity and reducing power of selected medicinal plants and their combinations. *Int J Pharm Sci Drug Res* 4:143-146
- Ra JH, Nakamura M, Herath KHINM, Jee Y, Kim JS (2017) Antioxidant and hepatoprotective effects of different ethanol concentrations in extraction from leaves of *Sasa quepaertensis* Nakai. *South Afr J Bot* 112:376-382
- Rao YK, Lee MJ, Chen K, Lee YC, Wu WS, Tzeng YM (2011) Insulin-mimetic action of rhoifolin and cosmosiin isolated from *Citrus grandis* (L.) Osbeck leaves: Enhanced adiponectin secretion and insulin receptor phosphorylation in 3T3-L1 cells. *Evid Based Complementary Altern Med* 2011
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evan C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*

- 26:1231-1237
- Saha D, Paul S (2014) Evaluation of antioxidant and free radical scavenging activities of different fractions of *Pterospermum suberifolium* leaf extract. *Thai J Pharm Sci* 38:28-35
- Sawamura M, Song H, Choi HS, Sagawa K, Ukeda H (2001) Characteristic aroma components of Tosa-buntan (*Citrus grandis* Osbeck forma *Tosa*) fruit. *Food Sci Technol Res* 7:45-49
- Schaich KM, Tian X, Xie J (2015) Reprint of “Hardles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays.” *J Funct Food* 18:782-796
- Shamsudin R, Buang S, Aziz NA (2015) Effect of different extraction methods on the physico-chemical properties of pomelo juice. *Chem Eng Trans* 44:265-270
- Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H (2009) Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extract as natural preservatives of raw pork. *J Sci Food Agric* 89:1879-1885
- Shim KB, Lee HJ, Wang BS, Chang LW (2013) Changes in alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activity during the processing of salt-dried rockfish *Sebastes schlegeli*. *Korean J Fish Aquat Sci* 45:594-599
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol and Viticult* 16:144-158
- Taha M, Ismail NH, Imran S, Mohamad MH, Wadood A, Rahim F, Saad SM, Rehman AU, Khan KM (2016) Synthesis, α -glucosidase inhibitory, cytotoxicity and docking studies of 2-aryl-7-methylbenzimidazoles. *Bioorg Chem* 65:100-119
- Takahashi M, Higuchi S (2007) Search for functional polyphenols from local plants. *Rep Saitama Ind Technol Cen* 5:81-85
- Tao NG, Liu YJ (2012) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the peel of Shatian pummelo (*Citrus grandis* Osbeck). *Int J Food Prop* 15:709-716
- Tottmar SOC, Petterson H, Kiessling KH (1973) The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenases in rat liver. *Biochem J* 135:577-586
- Traber MG, Atkinson J (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 43:4-15
- Wang HL, Chen WY, Tsai PJ, Lin CY, Hsu YT, Chen LF, Wu WZ, Wang WC, Yang WJ, Chang CL, Liao WT (2016) Isolation of acidic mucilage from the outer seed coat of shaddock (*Citrus grandis* Osbeck) and evaluation of its functional properties. *Am J Plant Sci* 7:780-788
- Wuttisin N, Boonmak J, Thaipitak V, Thitilertdecha N, Kittigowittana K (2017) Anti-tyrosinase activity of orange peel extract and cosmetic formulation. *Int Food Res J* 24:2128-2132
- Yoon SJ, Kim JH, Lee KH, Kwon HJ, Chun SS, Cho YJ (2005) Antimicrobial effects and antioxidative activity of Baek-bu-ja (*Aconiti koreani* Rhizoma) by extraction solvent ratio. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48:258-262
- Yoshida Y, Niki E (2003) Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J Nutr Sci Vitaminol* 49:277-280
- Zakaria Z, Zakaria S, Khalid AH, Ishak MAM (2010) Induction of callus formation from different parts of *Citrus grandis* (Osbeck) flowers. *Biotropia* 17:1-7
- Zefang L, Zhao Z, Hongmei W, Zhiqin Z, Jie Y (2016) Phenolic composition and antioxidant capacity of Chinese local pummel cultivars' peel. *Horticul Plant J* 2:133-140
- Zhang M, Nan H, Wang Y, Jiang X, Li Z (2014) Comparison of flavonoid compounds in the flavedo and juice of two pummel cultivars (*Citrus grandis* L. Osbeck) from different cultivation regions in China. *Molecules* 19:17314-17328