

미숙감귤의 항산화 및 항노화 활성에 대한 평가

최문열^{1#}, 박해진², 김재수³, 김미려^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : DHU 바이오융복합시험센터

3 : 대구한의대학교 한의과대학 침구의학교실

Evaluation on antioxidative and antiaging effect of immature fruits from *Citrus unshiu* Markovich

Moon-Yeol Choi^{1#}, Hae-Jin Park², Jae Soo Kim³, Mi Ryeo Kim^{1*}

1 : Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Daegu, Korea,

2 : DHU Bio Convergence Testing Center,

3 : Department of Acupuncture & Moxibustion medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University,
Daegu, Korea,

ABSTRACT

Objective : This study was designed to investigate effect of immature fruits from *Citrus unshiu* Markovich to mature them on antioxidative and antiaging-related enzyme activities *in vitro*.

Methods : Fruits from Open field-cultivated *C. unshiu* Markovich (ripe and unripe fruits of Citri) made a purchase in Jeju island. We measured total polyphenol and flavonoid contents in mature *C. unshiu* Markovich (MC) and immature *C. unshiu* Markovich (IMC) 70% ethanol extract. DPPH free radical, ABTS radical, and hydroxyl radical scavenging activities in both extracts were determined. Also, reducing power, SOD-like activities, elastase inhibition, and collagenase inhibition activities of these extract were assayed at 5, 1, 0.5, and 0.1 mg/ml.

Results : The total polyphenol contents in the ethanol extract of IMC were higher than those of MC (26.99 ± 0.89 mg/TAEg). And total flavonoid contents in them were very similar to both extract (MC; 7.25 ± 0.4 mg/RUEg and IMC; 7.44 ± 0.18 mg/RUEg). DPPH free radical scavenging activities, ABTS radical scavenging capacity, reducing power, and SOD-like activities of IMC-treated group showed significant increase compared to those of MC group in all treated concentrations. Particularly, DPPH free radical scavenging and elastase inhibition activities in IMC-treated group at 5 mg/ml showed similar with positive control group. Besides, IMC extract at 5 mg/ml concentration surpassed positive control (BHA or Vit. C) in SOD-like activities and ABTS radical scavenging capacity.

Conclusion : These results suggest that IMC ethanol extract may be used as a natural antioxidant and a antiaging material for development of functional foods and cosmeceuticals.

Key words : Anti-oxidant, anti-aging, *Citrus unshiu* Markovich, immature, total polyphenol contents

I. 서 론

감귤(*Citrus unshiu* Markovich)은 운향과(Rutaceae) 감귤속(*Citrus*)의 식용 식물로 다양한 생리활성 물질을 함유하고

*Corresponding author : Mi Ryeo Kim, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine Daegu Haany University, 165 Sang-dong, Suseong-gu Daegu 706-827, Korea.

· Tel : +82-53-770-2300 · Fax : +82-53-770-2312 · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr

#First author : Moon-Yeol Choi, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine Daegu Haany University, 165 Sang-dong, Suseong-gu Daegu 706-827, Korea.

· Tel : +82-53-770-2300 · Fax : +82-53-770-2312 · E-mail : yeol6234@hanmail.net

· Received : 11 Dec 2020 · Revised : 05 Jan 2021 · Accepted : 25 Jan 2021

있으며, 대표적으로 폴리페놀류와 비타민류 등이 있다고 알려져 있다. 특히 과육보다 과피에 생리활성물질들이 많이 함유되어 있으며, 과피의 경우 항염, 항암 및 항산화 등 다양한 생리적 작용을 나타낸다고 보고되어 있다¹⁾.

통계에 따르면 국내 감귤이 거의 재배되는 제주지역 생산량은 2015년 기준 67.3만톤에 달하며, 재배면적은 줄고 있으나, 생산량은 증가하고 있다²⁾. 감귤류에는 flavonoid류, carotenoid류, coumarin류, phenylpropanoid류, limonoid류 등 지금까지 60여종의 생리활성물질이 밝혀져 있으며^{3,4)}, 그 중 감귤류에서 풍부한 carotenoid, bioflavonoid 및 terpenes 등은 고혈압 예방, 혈중 LDL 콜레스테롤 저하 및 HDL 콜레스테롤 함량 증가를 통한 순환계 질환의 예방 및 개선효과 등 여러 생리작용들이 보고되고 있다⁵⁻⁹⁾. 감귤 전체, 과피, 과육의 부위별 성분연구에서 flavonoid, 항산화 vitamin, 식이섬유 함량이 과피 분말에서 가장 높았고¹⁰⁾, 감귤 성숙과에 비해 미숙과에 유기산, 식이섬유, polyphenol 및 flavonoid인 hesperidin, naringin, rutin 등이 많이 함유되어 있었다. 특히 과피 중에는 식이섬유, essential oil, carotenoids, flavonoids 등의 생리활성 성분이 많이 함유되어 있어서 과육보다 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다^{1,11-14)}.

현재 가장 널리 사용되고 있는 항산화제는 천연유래 항산화제인 ascorbic acid, tocopherol과 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), tertiary butylhydroquinone (TBHQ), propyl gallate (PG) 등이 있다. 일반적으로 합성 항산화제는 경제적 이점과 탁월한 효과로 인해 다방면에서 사용되고 있으나 열안정성이 떨어지고 발암위험이 제기되고 있는 등 심각한 부작용을 초래한다¹⁵⁾. 또한, 합성 항산화제 자체가 독성을 나타낼 뿐만 아니라 고농도의 BHA, BHT 및 TBHQ를 경구 투여할 경우, 간비대증 및 암을 유발하며, 특히 BHT의 경우, microsomal enzyme activity를 증가시킨다. 이에 Lee 등¹⁶⁾, Kang 등¹⁷⁾, Kim 등¹⁸⁾은 천연물질이면서 독성이 없는 안전한 천연 항산화제에 대한 연구를 보고하고 있으며, 식물기원의 안전성과 안정성이 확보된 항산화제의 가능성을 검토해야 한다고 시사한 바 있다.

활성 라디칼과 활성 카아보닐 화합물들(Carbonyl group)로부터 유래된 라디칼은 생체 내에서 지질과산화 과정과 관련이 있으며, 이는 DNA의 손상과 돌연변이, 발암 및 노화 등에 관여한다고 알려져 있다. 피부에 대한 노화는 크게 내적인 노화와 외적인 노화로 구별되며, 나이가 들어감에 따라 자연스럽게 일어나는 현상인 내적인 노화는 피부의 탄력이 감소되며 잔잔한 주름이 생기는 것이 특징이며, 외적인 노화는 외부의 자극으로 인한 노화를 말하는데 가장 큰 요인인 자외선으로 인해 생성된 활성산소가 matrix metalloproteinases (MMPs) 생성을 촉진시킨다. 이렇게 생성된 MMPs는 콜라겐 또는 엘라스틴과 같은 진피층 피부를 지지하는 물질들의 분해, 변성을 가속화시켜 결과적으로 피부노화를 촉진시키게 된다^{19,20)}.

진피(Citri Pericarpium), 청피(Citri Reticulatae Viride Pericarpium) 및 수확시기에 따른 영귤의 항산화 연구는 보고된 바 있으나²¹⁻²³⁾, 진피 및 청피와 과육을 포함한 온주감귤 성숙과 및 미성숙과 추출물의 항산화 및 항노화 효과를 비교한 연구는 보고된 바 없다. 이에, 저자 등은 사전실험으로 진피, 청피, 성숙감귤 및 미숙감귤을 에탄올 추출, 동결건조한 결과

수율은 각각 24.8, 16.1, 38.9 및 21.4%로 나타났으며, 진피에 비해 성숙감귤은 10%이상, 청피에 비해 미숙과는 5% 이상으로 높은 동결건조물을 얻었다.

따라서 본 연구에서는 감귤의 과피인 진피 및 청피 외에 과육을 함께 사용하여 수득율과 채취의 간편성이 증가된 시료인 성숙과(MC)와 미성숙과(IMC)의 항산화 및 항노화 효능을 비교하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에서 사용한 감귤은 노지에서 재배한 제주도산을 사용하였으며, 미숙과(MC)는 7월경에 외관상 파랗고 직경 4 cm 이하를 구매하였고, 성숙과(IMC)는 9월경에 구매하여 물로 세척 후 불순물을 제거하고 8절로 세절하여 50℃에서 열풍 건조하였다. 건조된 감귤시료 각각에 시료량의 10배인 70% EtOH를 가하고, 90℃에서 냉각환류 추출한 후 buchner funnel를 사용하여 종이여과지로 2회 감압여과하였다. 80℃에서 시료 농도가 10 bx가 될 때까지 감압농축하였으며, 추출물을 deep freezer에서 -56℃까지 동결하고, 건조과정 중에 -40℃에서 30℃까지 상승시키면서 90시간 진공으로 건조하였으며, 성숙과 및 미숙과의 수득률은 각각 38.9% 및 21.4%였다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법²⁴⁾을 수정하여 측정하였다. 즉, 시료(성숙과; MC, 미숙과; IMC)를 증류수에 20 mg/ml의 농도로 용해한 뒤 500 μ l씩 분주하고, Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma)를 각각 500 μ l씩 첨가하여 혼합한 뒤 상온에서 3분간 방치한 후 10% Na₂CO₃ (sodium carbonate, Junsei)을 각각 500 μ l씩 첨가하여 총 시약의 양이 1.5 ml이 되게 하였다. 이 혼합액을 충분히 혼합한 뒤 상온에서 1시간 동안 반응시켰으며, UV/VIS spectrophotometer (Lambda35, Perkin Elmer)을 사용하여 흡광도 760 nm에서 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid (Sigma)를 표준물질로 표준 검량곡선을 작성하여 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 10 mg/ml의 농도의 시료 1 ml에 diethylene glycol (Junsei) 2 ml를 첨가 한 후 vortex mixer (G-560, Scientific industries)로 혼합한 뒤 0.1 N NaOH (Generay Biotech) 0.2 ml를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 방치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 플라보이드 배당체인 rutin hydrate (Sigma)를 이용하여 작성한 표준곡선으로 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

2) DPPH 전자공여능 측정

전자공여능 측정은 Blois²⁵⁾의 방법에 의한 DPPH free radical 소거법으로 측정하였다. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma)는 에탄올에 0.2 mM로 희석하여 사

용하였으며, 농도 별로 희석한 시료 (5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml)와 0.1 mg/ml의 농도로 희석한 양성대조군 BHA (Butylated hydroxyl anisole, Sigma) 각각 100 μ l에 DPPH용액을 50 μ l씩 넣은 후 10초간 vortex mixer (G-560, Scientific industries)로 혼합하였으며, 혼합 후 상온에서 차광하여 30분 반응시켰다. 그 후, 반응액을 517 nm로 흡광도를 측정하였다. 전자공여능 측정은 시료 첨가 전후의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

3) ABTS radical 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거 활성 측정은 Van den berg 등²⁶⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 2.45 mM potassium persulfate (Sigma)를 100 ml 증류수에 희석시킨 뒤 7 mM ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt, Sigma)를 혼합하여, ABTS 시약을 만들었다. 24동안 실온의 암소에서 ABTS radical을 생성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.7 ± 0.05 가 되도록 에탄올에 희석하여 사용하였다. ABTS 시약 1 ml에 농도 별로 희석한 시료 (5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml)와 0.1 mg/ml의 농도로 희석한 양성대조군 Vitamin C를 각각 0.05 ml 첨가한 후 30°C의 항온수조 (WB-11, Daihan Scientific)에서 20분간 방치시켜 반응한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 L-ascorbic acid (Sigma)를 사용하여 대조군에 대한 라디칼 소거 활성을 백분율로 나타내었다.

4) Hydroxyl radical 소거 활성 측정

Hydroxyl radical (\cdot OH) 측정은 Halliwell 등²⁷⁾의 방법을 참고하여 측정하였다. 농도별로 희석한 시료 (5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml)와 0.1 mg/ml로 용해한 양성 대조군 BHA (Butylated hydroxyl anisole, Sigma) 200 μ l에 10 mM iron(ii) sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 200 μ l, 10 mM EDTA (Generay) 200 μ l, 10 mM 2-deoxy-D-ribose 200 μ l와 0.1 mM H_2O_2 200 μ l을 첨가하여 항온수조에서 37°C, 1시간 동안 Fenton반응을 시켰다. 반응 완료 후 2.8% TCA (Duksan), 1% TBA (Sigma)를 각각 1 ml씩 가한 후, 100°C 에서 10분 간 가열하고 바로 급속 냉각시킨 후 흡광도를 520 nm에서 측정하였다. Hydroxyl radical 소거 활성 측정은 대조군에 대한 라디칼 소거 활성을 백분율로 나타내었다.

5) 환원력 측정

환원력(Reducing power) 측정은 Oyaizu²⁸⁾법을 수정하여 사용하였다. 0.2 M 인산 완충액 (Phosphoric acid, Duksan, pH6.6) 100 μ l에 농도 별로 희석한 시료 (5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml)와, 0.1 mg/ml의 농도로 희석한 양성대조군 BHA (Butylated hydroxyl anisole, Sigma)를 각각 100 μ l와 1% potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Duksan) 500 μ l를 첨가한 후 항온 수조에서 50°C, 20분 동안 반응시킨 후 10% TCA (Trichloroacetic acid, Duksan)을 500 μ l 첨가 하여 1790 ref, 10분 원심분리를 하여 상층액을 채취하였다. 채취한 상층액에 0.1% FeCl_3 500 μ l을 첨가한 후 25°C, 15분 반응시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) SOD 소거 활성 측정

SOD (Superoxide radical) 소거능 측정은 Marklund 등²⁹⁾의 방법을 참고하여 측정하였다. Tris (Affymetrix) 50 mM과 EDTA (Generay) 10 mM 을 100 ml 증류수에 혼합한 뒤 1 N HCL (Duksan)를 사용하여 pH 8인 Tris-HCl buffer를 제조하였다. 각 농도 별로 희석한 시료(5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml)와 0.1 mg/ml의 농도로 희석한 BHA (Butylated hydroxyl anisole, Sigma) 200 μ l에 Tris-HCl buffer 2.6 ml와 7.2 mM로 희석된 pyrogallol (Sigma)을 200 μ l씩 첨가하고 10분 주기로 각 시료마다 1 N HCl을 첨가하여 반응을 종료시킨 후, 상온에서 420 nm로 흡광도를 측정하였다. SOD 소거능 측정은 대조군과 비교하여 소거 활성으로 나타내었다.

7) Elastase 활성 억제

Elastase 활성 억제측정은 각 농도 별로 희석한 시료(5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml) 0.5 ml에 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 2.5 U/ml 농도로 녹인 porcine pancreas elastase (Sigma)를 첨가한 후 기질로 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 0.6 U/ml 농도로 녹인 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide (Sigma) 50 μ l를 첨가하여 20분간 반응시킨 후 5분간 얼음에 방치하여 반응을 정지시켰다. 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 활성 억제는 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

8) Collagenase 활성 억제

Collagenase 활성 억제는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl_2 를 첨가한 반응원충액에 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg를 0.3 mg/ml 농도로 녹인 기질액 0.25 ml과 각 농도 별로 희석한 시료 (5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml) 0.1 ml를 혼합하였다. 그 후 혼합액에 collagenase 0.15 ml를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% Citric acid 0.5 ml를 넣어 반응을 정지시켰으며, ethyl acetate (Sigma) 1.5 ml를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

9) 통계분석

실험 결과는 3회 반복 측정한 후 실험결과를 평균 \pm 표준편차로 표기하였으며, IBM SPSS Statistics 22 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago)를 이용하여 각 군 평균의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 이상의 수준에서 student's t-test를 사용하여 검증하였다.

III. 결 과

1. 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 측정

감귤 미숙과 및 성숙과의 에탄올 추출물 10 mg/ml 농도에서 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석하였다. 총 폴리페놀 함량은 성숙과 에탄올 추출물에서 26.99 ± 0.89 mg/TAEg,

미숙과 에탄올 추출물에서 3.3 ± 0.92 mg/TAEg 로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 성숙과 에탄올 추출물에서 7.25 ± 0.4 mg/REg, 미숙과 에탄올 추출물에서 7.44 ± 0.18 mg/Reg 로 나타냈다 (Table 1).

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents in ethanol extracts of mature and immature fruits of *C. unshiu* Markovitch

Group	Total polyphenols (mg/TAEg) ¹⁾	Total flavonoids (mg/RUEg) ²⁾
MC	26.99 ± 0.89	7.25 ± 0.4
IMC	73.3 ± 0.92	7.44 ± 0.18

¹⁾ Total poly phenol contents are expressed as tannic acid equivalents (TAE).

²⁾ Total flavonoid contents are expressed as rutin equivalents (RUE). The results are the mean \pm SD from three replication. MC ; Mature fruits of *C. unshiu* Markovitch and IMC ; Immature fruits of *C. unshiu* Markovitch. (n=3)

2. DPPH 전자공여능 측정

감귤의 미숙과 및 성숙과의 에탄올 추출물을 5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml 농도로 처리하고 DPPH 전자공여능을 측정 한 결과, 성숙과 에탄올 추출물 처리군은 각각 $76.70 \pm 0.8\%$, $60.8 \pm 0.39\%$, $47.16 \pm 0.4\%$ 및 $29.54 \pm 1.2\%$ 로, 미숙과 에탄올 추출물은 $83.05 \pm 1.1\%$, $78.98 \pm 0.5\%$, $78.92 \pm 1.5\%$ 및 $46.87 \pm 0.37\%$ 로 두 추출물 모두 농도 의존적으로 증가하였다. 추출물 간 비교에서는 각 농도마다 미숙과 추출물군에서 유의한 증가를 보였다 (Figure 1).

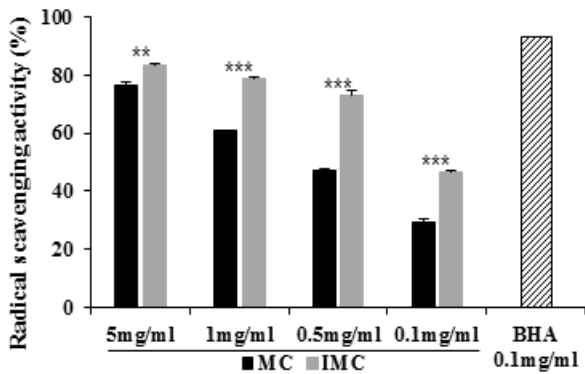


Figure 1. DPPH radical scavenging activities of ethanol extracts from mature and immature fruits of *C. unshiu* Markovitch. The Results are values are mean \pm S.D., Significant differences between MC VS IMC are indicated ; **p < 0.01, *** < 0.001. MC ; Mature fruit of *C. unshiu* Markovitch, IMC ; Immature fruit of *C. unshiu* Markovitch, BHA ; Butylated hydroxy-anisole. (n=3)

3. ABTS radical 소거 활성 측정

감귤의 미숙과 및 성숙과의 에탄올 추출물을 5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml 농도로 처리하고 ABTS radical 소거 활성을 측정 한 결과, 성숙과 에탄올 추출물은 각각 $19.11 \pm 0.49\%$, $6.1 \pm 0.16\%$, $4.23 \pm 0.77\%$ 및 $2.2 \pm 0.43\%$ 로, 미숙과 에탄올 추출물은 각각 $29.39 \pm 0.49\%$, $12.69 \pm 0.21\%$, $8.33 \pm 0.38\%$ 및 $3.48 \pm 0.31\%$ 로 나타나 두 추출물 모두 농도 의존적으로 증가하였다. 두 추출물간 비교에서는 5, 1 및 0.5 mg/ml

에서 미숙과 추출물 군에서 모두 유의성 있게 높은 라디칼 소거능이 측정되었다. 특히 5 mg/ml 농도의 미숙과 에탄올 추출물의 경우 양성대조군인 vitamin C 보다 높은 소거능을 나타내었다 (Figure 2).

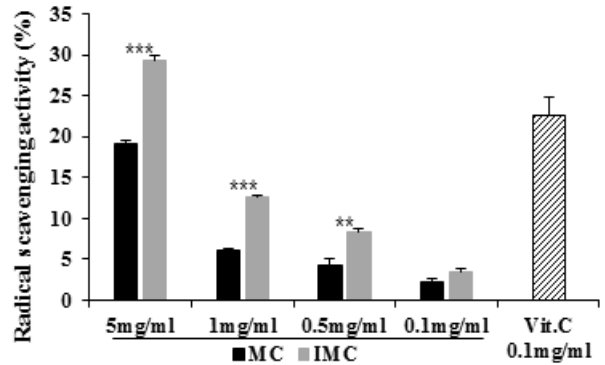


Figure 2. ABTS radical scavenging activity of ethanol extracts from mature and immature fruits of *C. unshiu* Markovitch. The Results are values are mean \pm S.D., Significant differences between MC VS IMC are indicated ; **p < 0.01, *** < 0.001. MC ; Mature fruit of *C. unshiu* Markovitch and IMC ; Immature fruit of *C. unshiu* Markovitch. (n=3)

4. Hydroxyl radical 소거 활성 측정

감귤의 미숙과 및 성숙과의 에탄올 추출물을 5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml 농도로 처리하고 Hydroxyl radical 소거 활성을 측정 한 결과, 성숙과 에탄올 추출물은 각각 $45.65 \pm 1.06\%$, $31.43 \pm 0.56\%$, $24.28 \pm 1.63\%$ 및 $26.93 \pm 0.23\%$, 미숙과 에탄올 추출물은 각각 $48.66 \pm 0.7\%$, $25.44 \pm 0.81\%$, $26.73 \pm 1.4\%$ 및 $23.8 \pm 1.59\%$ 의 라디칼 소거능을 나타냈으며, 군 간 차이는 없었다 (Figure 3).

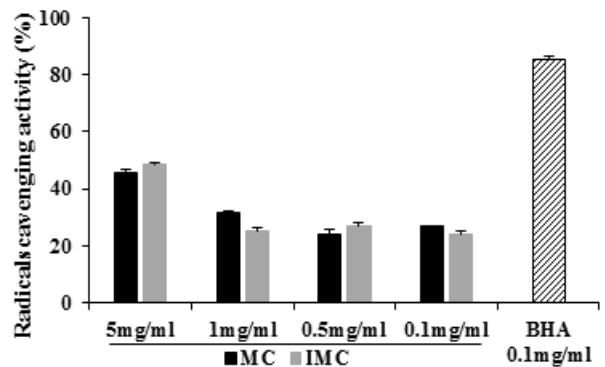


Figure 3. Hydroxyl radical scavenging activity of ethanol extracts from mature and immature fruits of *C. unshiu* Markovitch. The Results are values are mean \pm S.D., Significant differences between MC VS IMC are indicated. MC ; Mature fruit of *C. unshiu* Markovitch, IMC ; Immature fruit of *C. unshiu* Markovitch, BHA ; Butylated hydroxy-anisole. (n=3)

5. 환원력 측정

감귤의 미숙과 및 성숙과의 에탄올 추출물을 5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml 농도로 처리하고 환원력을 측정 한 결과, 성숙과 에

탄을 추출물은 각각 $64.97 \pm 0.91\%$, $21.77 \pm 0.48\%$, 12.07 ± 3.53 및 $4.12 \pm 0.71\%$ 로, 미숙과 에탄올 추출물은 각각 $74.24 \pm 0.22\%$, $41.09 \pm 0.72\%$, $23.15 \pm 1.21\%$ 및 $6.81 \pm 2.4\%$ 로 농도의존적으로 높은 환원력을 나타냈다. 특히, 모든 농도에서 미숙과 에탄올 추출물이 성숙과 에탄올 추출물보다 유의적으로 높은 환원력을 나타냈다. 미숙과 에탄올 추출물이 우수한 환원력을 가지고 있는 것으로 나타났다 (Figure. 4).

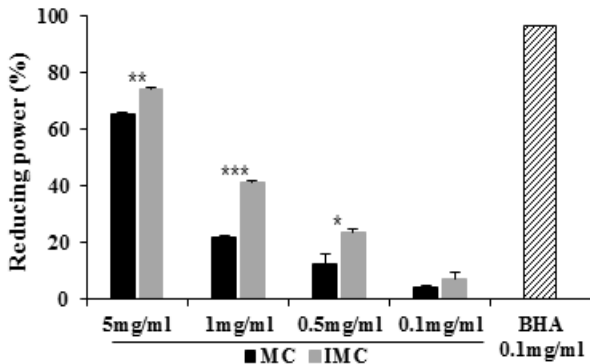


Figure 4. Reducing power of Ethanol extracts from mature and immature fruits of *C. unshiu* Markovich. The Results are values are mean \pm S.D., Significant differences between MC VS IMC are indicated ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** < 0.001 . MC ; Mature fruit of *C. unshiu* Markovich, IMC ; Immature fruit of *C. unshiu* Markovich, BHA ; Butylated hydroxy-anisole. (n=3)

6. SOD 소거 활성 측정

감귤의 미숙과 및 성숙과의 에탄올 추출물을 5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml 농도로 처리하고 SOD 소거 활성을 측정된 결과, 성숙과 에탄올 추출물은 각각 $53.58 \pm 0.35\%$, $25.3 \pm 3.33\%$, $28.27 \pm 1.57\%$ 및 $28.45 \pm 1.52\%$ 로, 미숙과 에탄올 추출물은 각각 $89.88 \pm 1.52\%$, $47.99 \pm 3.49\%$, $41.01 \pm 1.84\%$ 및 $29.84 \pm 3.14\%$ 로 농도의존적으로 높은 소거활성이 측정되었다. 5 mg/ml 농도에서 미숙과 추출물의 소거활성이 성숙과에 비해 유의적으로 높게 측정되었으며, 그 값은 양성 대조군인 BHA 소거능보다 높은 것으로 나타났다 (Figure. 5).

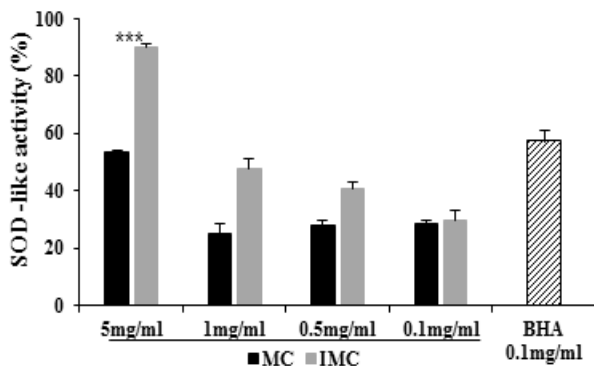


Figure 5. SOD-like activities of ethanol extracts from mature and immature fruits of *C. unshiu* Markovich. The Results are values are mean \pm S.D., Significant differences between MC VS IMC are indicated ; *** < 0.001 . MC ; Mature fruit of *C. unshiu* Markovich, IMC ; Immature fruit of *C. unshiu* Markovich, BHA ; Butylated hydroxy-anisole. (n=3)

7. Elastase 활성 억제

감귤의 미숙과 및 성숙과의 에탄올 추출물을 5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml 농도로 처리하고 elastase 활성 억제를 측정된 결과, 성숙과 에탄올 추출물은 각각 $53.27 \pm 1.06\%$, $25.98 \pm 6.08\%$, $16.84 \pm 3.87\%$ 및 $4.25 \pm 0\%$ 로, 미숙과 에탄올 추출물은 각각 $83.3 \pm 0.4\%$, $50.78 \pm 1.43\%$, $26.73 \pm 10.5\%$ 및 $15.16 \pm 0.05\%$ 나타나, 두 추출물 모두 농도 의존적으로 높은 억제율을 보였다. 모든 농도에서 미숙과의 에탄올추출물이 성숙과의 에탄올추출물보다 유의적으로 높은 저해율을 나타냈으며, 특히 고농도 처리군인 5 mg/ml에서 미숙과 추출물의 elastase 저해율은 양성대조군인 Vit. C와 유사한 것으로 나타났다 (Figure. 6).

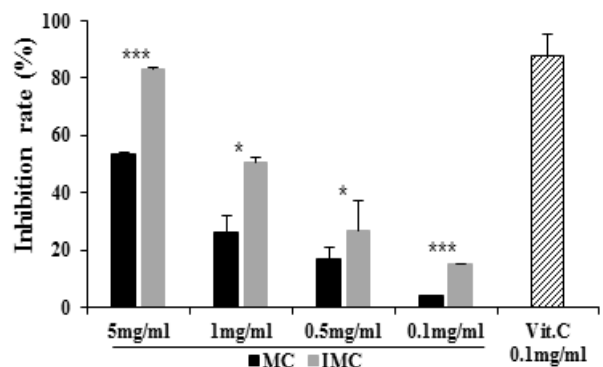


Figure 6. Effect of ethanol extracts from mature and immature fruits of *C. unshiu* Markovich on elastase activities. The Results are values are mean \pm S.D., Significant differences between MC VS IMC are indicated ; * $p < 0.05$, *** < 0.001 . MC ; Mature fruit of *C. unshiu* Markovich, IMC ; Immature fruit of *C. unshiu* Markovich. (n=3)

8. Collagenase 활성 억제

감귤의 미숙과 및 성숙과의 에탄올 추출물 5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml 농도로 처리하고 collagenase 활성 억제를 측정된 결과, 성숙과 에탄올 추출물은 각각 $34.9 \pm 5\%$, $29.13 \pm$

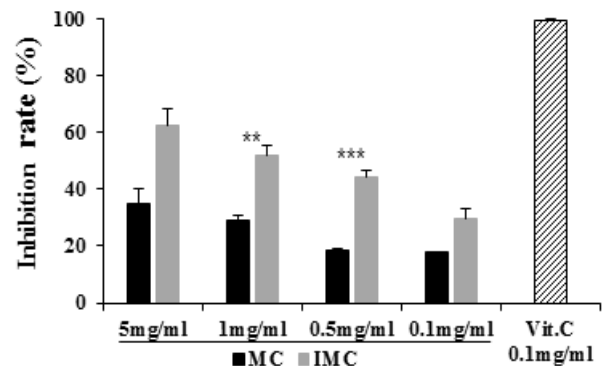


Figure 7. Effect of ethanol extracts from mature and immature fruits of *C. unshiu* Markovich on collagenase activities. The Results are values are mean \pm S.D., Significant differences between MC VS IMC are indicated ; ** $p < 0.01$, *** < 0.001 . MC ; Mature fruit of *C. unshiu* Markovich, IMC ; Immature fruit of *C. unshiu* Markovich. (n=3)

1.73%, 18.46 ± 0.47 및 18.19%로, 미숙과 에탄올 추출물은 각각 $62.76 \pm 5.08\%$, $51.82 \pm 3.66\%$, $44.55 \pm 2.02\%$ 및 $29.78 \pm 3.3\%$ 로 높은 저해율을 나타냈다. 두 추출물 모두 농도 의존적으로 증가하였으며, 모든 농도에서 미숙과 에탄올 추출물이 성숙과 에탄올추출물보다 높은 저해율을 나타냈다 (Figure. 7).

IV. 고찰

현대인들은 과학기술 문명의 급속한 발달로 인하여 경제적, 시간적으로 풍요로운 삶을 누리고 있다. 그로 인해 건강, 외적 아름다움에 대한 욕구가 강해지면서 피부노화에 대한 관심이 높아지고 있다. 피부노화는 외부 환경적 요인, 생리적인 요인, 영양학적 요인, 기타 스트레스, 생활습관 및 잘못된 관리습관 등에 유발 될 수 있으나 피부노화의 원인으로 밝혀진 것 중 가장 크게 대두 되고 있는 것은 자외선과 호흡을 통해 생성되는 활성산소이다. 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 산화적 손상을 일으키는 물질이며 SOD, glutathione peroxidase 및 catalase 등의 항산화 효소들로 인해서 제거된다고 알려져 있으며³⁰⁾, 활성산소가 피부노화의 주원인으로 밝혀짐에 따라 활성산소를 제거하여 피부노화를 예방하고 지연시킬 수 있는 항산화 및 항노화 소재가 많이 개발되고 있다³¹⁾.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 화합물은 유리 라디칼에 의한 손상을 방지하여, 생체를 보호하는 중요한 성분으로 주목받고 있으며, 특히 항산화 효능이 강한 화합물로 알려져 있다³²⁻³⁷⁾. 이에 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 측정을 해 본 결과, 미숙감귤의 에탄올 추출물이 성숙감귤의 에탄올 추출물보다 항산화 효능이 강한 화합물이 많이 포함되어 있음을 알 수 있으며, 이로 인해 항산화 효과가 뛰어난 것을 예측할 수 있었다.

항산화능은 자유라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력을 평가하는 것이다. 본 연구에서는 DPPH의 라디칼 소거 활성이 활성라디칼에 전자를 공여하여 토코페놀, 아스코르빈산, polyhydroxyl 방향족 화합물에 의하여 활성라디칼이 환원되어 원래 색상인 짙은 자색이 탈색되는 점을 이용하였다³⁸⁾. Hong 등³⁹⁾은 기능성 물질 개발에 대한 연구의 일환으로 삼고자 성숙에 따른 딸보리수 과일의 에탄올 추출물을 이용하여 DPPH의 라디칼소거능을 측정하였으며, 모든 농도에서 70% 이상의 전자공여능 효과를 나타내었다. 이를 비추어보아, 미숙감귤의 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 높은 전자공여능 효과를 나타냈다. Park 등²¹⁾과 Lee 등²²⁾의 연구보고와 유사하게 진피 및 청피의 DPPH 전자공여능이 나타났다. 또한, Lee 등²³⁾은 성숙도에 따른 영귤의 항산화능을 보고한 바 있는데, 본 실험에서의 온주감귤의 성숙과 및 미숙과의 항산화 효능이 더 우수하게 나타났다.

ABTS radical 소거 활성은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 시료 중의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical이 청록색으로 탈색되는 원리를 이용하여 분석하는데, 청록색으로 탈색된 free radical의 제거 정도로 ABTS+·의 소거능을 측정할 수 있고 탈색 반응이 1분 안에 종료되어 단시간에 측정 가능한 장점이 있다^{40,41)}. Hydroxyl free radical은 생체 내에서 세포구성 성분들인 지질,

단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴 작용을 일으키는 물질로 각종 질병을 야기하는 것으로 알려져 있다. 따라서 Hydroxyl radical 소거 활성 측정은 ABTS radical 소거활성과 마찬가지로 시료 중의 항산화 물질에 의해 OH가 제거되는 방법이며, OH를 제거하는 것은 생체 내 시스템 보호를 위해서 매우 중요하다고 알려져 있다⁴²⁾. 본 실험에서는 표준물질인 BHA가 85%으로 시료물질보다 높은 활성을 보였으나, 5, 1 및 0.1 mg/ml에서 미숙과 에탄올 추출물이 성숙과 에탄올 추출물 보다 더 높은 활성능력을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

환원력은 일반적으로 전자의 이동이나 공여가 가능한 물질, 전자, 산소 및 수소 등이 산화를 통해 활성산소를 발생하는 것에 대한 억제능력을 뜻한다³⁸⁾. 이에 따라 본 실험에서 환원력 측정을 해 본 결과 두 추출물 모두 농도 의존적으로 환원력이 증가하므로, 전자의 이동이나 공여가 가능한 물질인 전자, 산소 및 수소 등의 산화를 억제시킴으로써 효과적으로 활성산소의 발생을 억제할 것으로 생각된다.

SOD (Superoxide dismutase)는 생체 내에 O_2^- (superoxide)의 소거에 관여하는 효소이며, 생체 내에서 산화적 장애를 초래한다. 감귤 과실 추출물의 항산화효능을 검증하고자 SOD 활성을 측정해본 결과 5 mg/ml 농도의 미숙과 에탄올 추출물에서 가장 효과가 뛰어났으므로, 미숙과의 에탄올 추출물을 고농도 처리했을 때 O_2^- (superoxide)를 효율적으로 억제하는 것으로 나타났다⁴³⁾.

Elastase는 피부탄력을 유지하는 단백질인 elastin의 분해에 관여하며 collagen을 분해할 수 있는 가수분해 효소이다. 또한 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에서는 활성이 높아져 조직파괴의 직접적인 원인이 되며, 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발한다⁴⁴⁾. 5 mg/ml 농도에서 성숙과 에탄올 추출물의 저해율(52.27%)보다 미숙과 에탄올 추출물의 저해율(83.3%)이 더 높게 측정됨으로써 미숙과 추출물의 피부탄력 감소 및 주름생성 억제능이 우수하다는 것을 알 수 있으므로, 이와 관련된 항노화 소재로서의 활용 가능성을 시사한다.

Collagen은 활성산소 등으로 인해 감소하여 주름과 탄력저하 피부 처짐의 원인이 된다. Collagen은 트립신 등의 단백질 분해효소의 작용을 받지 않으나, collagenase에 의해 분해된다고 보고되고 있다. Collagen은 피부의 대부분을 구성하고 있는 단백질로서 collagenase의 활성감소는 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 매우 중요하다⁴⁵⁾. 본 실험에서 성숙과 에탄올 추출물(34.9%)보다 미숙과 에탄올 추출물(62.76%)이 더 높은 저해효과를 나타내 항노화 소재로서의 미숙과의 이용 가능성을 예측할 수 있다.

진피는 비·폐 2경에 효능을 발휘하며 이기건위(理氣健胃) 및 조습화담(燥濕化痰) 하는 작용을 지니고 있어 중기(中氣)가 불화하여 발생하는 흉민복창(胸悶腹脹), 구토, 예기(噁氣), 식욕부진 및 담다해수(痰多咳嗽) 등의 증상에 활용한다. 또한 청피는 산결소담(散結消痰), 건위소식(健胃消食)의 효능을 지니고 있어 유옹(乳癰), 유핵(乳核), 구학벽괴(久瘰癧), 징가적취(癥瘕積聚) 등의 치료하며 식적불소(食積不消)로 인한 완복창통(腕腹脹痛)에 응용할 수 있다고 알려져 있다⁴⁶⁾.

본 연구에서 진피와 청피를 각각 포함하는 성숙, 미성숙 감

귤을 소재로 항산화 및 항노화 비교실험을 진행한 결과, 감귤 과실의 에탄올 추출물은 항산화 활성을 가지고 있으며, 이 중 미숙감귤의 에탄올 추출물이 성숙감귤의 에탄올추출물보다 항산화 및 항노화 활성이 우수한 것으로 나타났다.

오미자 및 복분자, 딸기 등의 성숙과 및 미숙과 추출물을 소재로 하여 항산화 효과를 비교한 여러 연구들에서도 미숙과의 효능이 뛰어났음을 보고하였으며, 본 실험에서 도출된 결과와 일치하였다⁴⁷⁻⁵⁰⁾. 이 결과들을 통해 볼 때, 과육과 과피를 포함하는 감귤 미숙과의 에탄올 추출물은 청피보다 향상된 수득율로 인한 경제적인 장점이 있으며 피부노화 및 건강관리에 도움을 줄 수 있는 천연 항산화 소재로서 다방면에 활용될 수 있을 것이다. 그러나 관련 성분에 관한 자세하고 체계적인 연구는 추후 뒷받침 되어야 할 것이다.

V. 결 론

감귤 과실 에탄올 추출물의 성숙도에 따른 항산화 및 항노화 활성에 대한 효과를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 감귤 과실의 미숙과 및 성숙과 에탄올 추출물의 total polyphenol 및 total flavonoid 함량을 분석한 결과 flavonoid 함량 차이는 나지 않았으나, 미숙과 에탄올 추출물의 polyphenol 함량이 월등히 높은 것으로 나타났다.
2. 감귤 과실의 미숙과 및 성숙과 에탄올 추출물의 전자공여능, SOD 및 환원력을 분석한 결과 두 추출물 모두 농도의존적으로 증가하였으나, 미숙과 에탄올추출물의 효과가 더 우수하였다.
3. 감귤 과실의 elastase 및 collagenase 활성을 분석한 결과 성숙과에 비해 미숙과의 에탄올추출물군에서 억제 효능이 더 우수하였다.

이상의 결과로 보아 감귤 과실 추출물 중 과피와 과육을 모두 포함하는 미숙과 에탄올 추출물은 항산화 및 항노화 효과와 있는 다기능성 생리활성 효능 소재로서 관련 활성을 표방하는 화장품이나 식품에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다 (No. 2018R1A2B6009036).

References

1. Hwang JH, Park KY, Oh YS, Lim SB. Phenolic compound content and antioxidant activity of citrus peels. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* 2013 ; 42(2) : 153-160.

2. Yun YH. Changes in agricultural production in jeju over the past 20 years (1993 - 2013). Honam Regional Statistics Office, 2014 Nov 6. [cited 2020 Dec 3] Available from : URL : http://kostat.go.kr/regional/hn/hn_ntc/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=331818&pageNo=96&rowNum=10&amSeq=&Target=&sTxt=
3. Jeong WS, Park SW, Park SW, Chung SK. The antioxidative activity of korean *Citrus unshiu* peels. *Food Sci. Biotechnol.* 1997 ; 6(4) : 292-296.
4. Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats, *Lipids.* 1998 ; 33(7) : 689-784.
5. Kamiya S, Esaki S. Recent advances in the chemistry of the citrus flavonoids. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 1971 ; 18 : 38-48.
6. Kim YD, Kim YJ, Oh SW, Kong YJ, Lee YC. Antimicrobial activity of solvent extracts from *Citrus sudachi* juice and peel. *Korean J. Food Sci. Technol.* 1999 ; 31(6) : 1613-1618.
7. Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS. Isolation, purification and hypotensive effects of bioflavonoids in *Citrus sinensis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 1992 ; 21 : 136-142.
8. Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and acyl CoA: Cholesterol transferase are lower in rat fed citrus peel extract on a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr.* 1999 ; 129(6) : 1182-1185.
9. Monfote MT, Trovato A, Kirjavanine S, Forestieri AM, Galati EML, Curto RB. Biological effects of hesperidin a *citrus* flavonoid hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco.* 1995 ; 50(9) : 595-599.
10. Kim JH, Kim MK. Effect of different part of mandarin intake on antioxidative capacity in 15-month-old rats. *J. Nutr. Health.* 2003 ; 36(6) : 559-569.
11. Kang YJ, Yang MH, Ko WJ, Park SR, Lee BG. Studies on the major components and antioxidative properties of whole fruit powder and juice prepared from premature mandarin orange. *Korean. J. Food Sci. Technol.* 2005 ; 37(5) : 783-788.
12. Park GH, Lee SH, Kim HY, Jeong HS, Kim EY, Yun YW, Nam SY, Lee BJ. Comparison in antioxidant effects of four citrus fruits. *J. Food Hyg. Saf.* 2011 ; 26(4) : 355-360.
13. Kim YD. Study on the composition of flavonoids and biological activities from Jeju *citrus* fruits. PhD Dissertation. Jeju National Univ., Jeju, Korea, 2009.

14. Jeoung SH, Gim SB, Choi HJ, Kim DH. Study of anti-microbe activity of essential oil purified from *Citrus unshiu* S. *Marcov.* Daejeon Univ. Traditional Kor. Medicinal Res Instit. J. 2012 ; 20 : 67-78.
15. Park JY, Hwang JG, Yun JK, Han KH, Do Ej, Kim SO, Kim MR. Effect of ssanghwa-tang extract on antioxidant and anti-aging enzyme activities. *Kor. J. Herbol.* 2012 ; 27(3) : 67-74.
16. Lee KS, Kim MG, Lee KY. Antioxidative activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 2006 ; 35(2) : 182-186.
17. Kang WS, Kim JH, Park EJ, Yoon KR. Antioxidative property of turmeric (*Curcumae Rhizoma*) ethanol extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* 1998 ; 30(2) : 266-271.
18. Kim YJ, Kim SY, Jeong MJ, Lee UT, Choo ST, Youn SN, Kim MY. Antioxidant effect of ethanol extract from Plantaginis Herba. *Kor. J. Herbol.* 2018 ; 33(3) : 37-43.
19. Son JY, Son HS, Cho WD. Antioxidant effect of onion skin extract. *Korean J. Soc. Food Sci.* 1998 ; 14(1)
20. Hong ES, Ahn GW, Jo BK. The study on the potential anti-aging properties of *prunella vulgaris* extract *in vitro* and *in vivo*. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* 2008 ; 34(2) : 129-135.
21. Park HJ, Kang SA, Lee JY, Cho YJ. Antioxidant activities of extracts from medicinal plants. *Korean J. Food Preserv.* 2012 ; 19(5) : 744-750.
22. Lee SE, Seong NS, Park CG, Seong JS. Screenig for antioxidative activity of oriental medicinal plant materials. *Korean. J. Medicinal Crop Sci.* 2002 ; 10(3) : 171-176.
23. Lee JE, Kim JH, Kim MY. Changes in phenolic composition, antioxidant and antidiabetic properties of Jeju *Citrus sudachi* as influenced by maturity. *J. life Sci.* 2015 ; 25(11) : 1311-1318.
24. Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Boskou D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chem.* 2006 ; 94(1) : 19-25.
25. Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature.* 1958 ; 191 : 1199-1200.
26. Van den Berg R, Haenen GR, Van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 1999 ; 66 : 511-517.
27. Halliwell B, John MCG, Okezie IA. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem.* 1987 ; 165(1) : 215-219.
28. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutr.* 1986 ; 44 : 307-315.
29. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974 ; 47 : 469-474.
30. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 2007 ; 39 : 44-84.
31. Park JY, Hwang JG, Yun JK, Han KH, Do EJ, Kim SO, Kim MY. Effect of ssanghwa-tang extract on antioxidant and anti-aging enzyme activites. *Kor. J. Herbol.* 2012 ; 27(3) : 67-74.
32. Lu Y, Foo LY. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* 2000 ; 68(1) : 81-85.
33. Cha JY, Kim HJ, Chung CH, Cho YS. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 1999 ; 28 : 1310-1315.
34. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010 ; 2(12) : 1231-1246.
35. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 2002 ; 13(10) : 572-584
36. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Bio. Med.* 2004 ; 36(7) : 838-849.
37. Sohn HY, Ryu HY, Jang YJ, Jang HS, Park YM, Kim SY. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of *Saxifraga stolonifera*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol. Lett.* 2008 ; 36(3) : 195-200.
38. Jang HS, Yu EA, Han KS, Shin SC, Kim HK, Lee SG. Changes in total polyphenol contents and DPPH radical scavenging activity of *Agrimonia pilosa* according to harvest time and various part. *Korean J. medicinal Crop Sci.* 2008; 16(6) : 397-401
39. Hong JY, Nam HS, Lee YS, Kim NW, Shin SR. Anti-oxidant activity of ethanol extracts from fruits of *Elaeagnus multiflora* THUNB. during Maturation. *Korean J. Food Preserv.* 2006 ; 13(5) : 643-648
40. Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* sing. (pine mushroom). *J. Korean Soc.*

- Food Sci. Nutr. 2009 ; 38(5) : 555–560
41. Lee SG, Yu MH, Lee SP, Lee IS. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from svocado. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2008 ; 37(3) : 269–275
 42. Kim JE, Joo SI, LEE SP. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2009 ; 38(8) : 989–995
 43. Kim SJ, Jang TW, Kim DW, Park JH. Study on anioxidant and anti-inflammatory activities of *Persicaria tinctoria*. Kor. J. Herbol. 2015 ; 30(6) : 17–24.
 44. Kim TY, Jeon TW, Yeo SH, Kim SB, Kim JS, Kwak JS. Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of *Jubak* extracts. Korean J. Food & Nutr. 2010 ; 23(3) : 299–305
 45. Kang DH, Kim JW, Youn KS. Antioxidant activities of extracts from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. Korean J. Food Preserv. 2011 ; 18(2) : 236–243
 46. Pak WM, Kim KBWR, Kim MJ, Park JH, Bae NY, Park SH, Ahn DH. Anti-melanogenesis and anti-wrinkle effects of *Sargassum micracanthum* extracts. Microbiol. Biotechnol. Lett. 2016 ; 44(1) : 19–25
 47. Seo BI, Jung KY. Herbology. Revised edition. Kor : Daegu Haany Univ. press. 2010 : 226–227.
 48. Kim JM, Shin MS. Characteristics of *Rubus coreanus miq.* fruits at different ripening stages. Korean J. Food Sci. Technol. 2011 ; 43(3) : 314–347
 49. Choi SR, Kim CS, Kim JY, You DH, Kim JM, Kim YS, Song EJ, Kim YG, Ahn YS, Choi DG. Changes of antioxidant activity and lignan contents in *Schisandra chinensis* by harvesting times. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2011 ; 19(6) : 414–420
 50. Lim SJ, Hwang HS, Shin YJ. Physicochemical properties and antioxidant activities of 'Seolhyang' and 'Janghee' strawberries from different ripening stages grown in Korea. J. East Asian Soc. Dietary Life. 2016 ; 26(1) : 80–87