

최 중
연구보고서

유자씨의 고부가가치화를 위한

가공제품 개발

Development of Processed Yuja(*Citrus*
junos) Seed Products

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유자씨의 고부가가치화를 위한 가공제품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 4월 24일

주관연구기관명: 한국식품연구원

총괄연구책임자: 최 인 욱

연 구 원: 석 호 문

연 구 원: 박 용 곤

연 구 원: 최 희 돈

연 구 원: 김 윤 숙

연 구 원: 신 동 빈

연 구 원: 성 기 승

연 구 원: 최 소 연

연 구 원: 남 보 라

위탁연구기관명: 경희대학교

위탁연구책임자: 황 은 주

요 약 문

I. 제목

유자씨의 고부가가치화를 위한 가공제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

유자(*Citrus junos* SIEB. ex TANAKA)는 그의 독특한 향미로 인하여 오래전부터 차류 등의 기호식품으로서 국내에서 널리 애용되어 왔다. 유자는 풍부한 비타민 C와 구연산 등을 함유하고 있어 액즙이 풍부하고 향기가 좋으며 면역활성이나 항암작용에 탁월한 효과를 보이는 쓴맛 성분인 limonoid 등과 flavonoids계 성분이 다량 함유되어있어 예로부터 민간요법의 하나인 감기, 신경통 등의 치료제로서도 이용되어 왔다. 유자를 가공할 때 총 중량의 15%에 이르는 유자씨는 대부분 폐기처분되는 실정이며 이들 유자씨를 활용한 가공제품이나 유자씨에 대한 식품원료로서의 성분 또는 생리활성 등에 관한 연구는 국내외적으로 거의 이루어져 있지 않은 실정이다. 본 연구를 통하여 유자씨의 식품학적 및 생리활성 특성 등에 관한 연구를 수행하고 이를 활용한 중간식품소재와 가공제품 등을 개발하여 유자씨의 고부가가치화에 대한 기반을 수립하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 유자씨의 식품학적 특성

- 유자씨의 일반성분 조성
- 유자씨 기름의 특성 및 지방산조성
- 유자씨 분획 및 특성
- 유자씨의 가공적성

2. 유자씨의 생리활성

- Polyphenol 분획의 항산화활성
- Polyphenol 분획의 면역력 증강 활성
- Polyphenol 분획의 항암활성
- Polyphenol 분획의 항균활성
- Triterpenoid 분획의 면역력 증강 활성
- Triterpenoid 분획의 항암활성
- Triterpenoid 분획의 미백활성
- 발아유자 생산조건
- 발아유자의 항산화활성
- 발아유자의 항비만활성

3. 유자씨를 이용한 가공제품 개발

- 유자씨 기름 및 추출물의 탈고미 조건 설정
- 유자씨 추출물의 중간식품소재화 기술 개발
- 유자씨 추출물을 이용한 다양한 가공제품 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 유자씨의 식품학적 특성

유자씨 수분의 함량은 10.54%였으며, 회분은 2.5%, 조지방은 31.43%, 조단백질은 15.29%, 탄수화물은 40.25%를 차지하였다. 유자씨 기름의 구성 지방산을 분석한 결과, oleic, linoleic 등의 불포화지방산은 전체 지방산의 76%, 포화지방산은 24%인 것으로 나타났다. 유자씨 기름을 일반 식물유에 2% 정도 혼합하였을 때, 기름의 과산화물가 생성이 지연되는 효과가 있었으며 이를 바탕으로 유자씨 기름을 일반 식물유에 소량 혼합하여 유자씨 기름의 천연항산화제로서의 항산화효과가 부가된 혼합유의 제조가 가능할 것으로 사료된다.

2. 유자씨의 생리활성

가. Polyphenol 함유 분획

유자씨로 부터 각 종 생리활성의 주요성분인 polyphenol 화합물 등이 다량 함유된 분획을 얻기 위해 탈지된 유자씨를 100% methanol, 70% ethanol 및 열수를 이용하여 추출하여 특성을 비교하였다. 각 용매별 유자씨 추출물의 polyphenol 화합물 함량은 methanol 추출물에서 가장 높았으며 항산화력 측정 결과, methanol 추출물이 가장 우수한 DPPH radical 소거능, ABTS anion소거능, β -carotene bleaching 능력을 나타내었다.

Methanol 추출물을 용매의 극성에 따라 재차 분획하여 항산화력을 조사한 결과, polyphenol 화합물의 함량이 가장 높은 butanol층의 항산화력이 가장 우수하였고 다음으로 ethyl acetate 분획에서 높게 나타났으며 전반적으로 각 층에서의 항산화력은 polyphenol 화합물의 함량에 비례하는 것으로 나타났다.

유자씨 추출물의 첨가가 macrophage의 viability에 미치는 영향을 살펴본 결과, 유자씨 추출물을 첨가함으로써 macrophage의 생육이 증가되었다. Macrophage가 생성하는 H_2O_2 의 양은 유자씨 추출물을 첨가함으로써 증가하였으며 NO 생성능에서는 butanol 추출물에서만 NO의 생성 증가를 유도하였다. 유자씨 추출물을 15일 동안 실험 mouse에 경구투여시킨 후, 복강내 macrophage를 얻고 이들이 암세포인 B16에 대한 생육억제효과를 관찰한 결과, 유자씨 추출물의 경구투여가 macrophage의 활성화를 유도하여 효과적으로 B16 cell의 생육을 저해하였다는 것을 알 수 있었다. 비특정 면역활성에서 macrophage와 함께 중요한 역할을 하는 T-cell의 유자씨 첨가에 대한 영향을 관찰한 결과, human T lymphoblast인 MOLT-4 cell에 특히 유자씨 methanol 추출물을 첨가하였을 때 농도의존적으로 T cell의 total viability가 증가됨을 알 수 있었다.

한편, 유자씨 추출물의 첨가가 각종 암세포에 대하여 생육저해효과를 유도하는지 여부에 관한 연구를 진행하였다. 유방암세포(MCF-7)에 대한 생육억제효과를 조사한 결과, ether와 ethyl acetate 분획에서 1000ppm이상 첨가시 유방암 생육억제효과가 나타났다. Ether 분획과 ethyl acetate 분

획에서 대장암 세포(HT29)의 생육억제 효과가 관찰되었으며 임과 종양 세포(P388D1)의 생육억제 효과는 ethyl acetate 분획에서만 관찰되었다.

유자씨 추출물을 4종류의 병원균주와 여드름균인 *Propionibacterium acnes*의 배양시 함께 첨가하여 생육저해효과를 관찰하였을 때, methanol추출물의 경우 *S. aureus*에 대해서만 생육저해효과를 나타내었다. Methanol 추출물의 각 분획별 *S. aureus*에 대한 항균효과 결과 ethyl acetate 분획에서 효과가 나타났다.

나. Triterpenoid 함유 분획

분획별 triterpenoid 함량 분석 결과 methanol 추출물에서 limonin과 nomilin의 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며 methanol 분획을 methylene chloride로 재차 추출하였을 때, limonin과 nomilin 함량이 30% 이상으로 농축된 추출물을 얻을 수 있었다. 유자씨 triterpenoid 추출물의 종양 세포에 대한 생육억제효과를 조사한 결과, 임과 종양 세포(P388D1)에 대해서 500ppm 첨가시 50% 이상의 생육억제효과가 나타났다. 피부 미백 효과 측정을 위해 B16/F1 melanoma cell line에 유자씨의 triterpenoid 추출물을 농도별로 처리하여 멜라닌 생성량을 측정된 결과 triterpenoid 추출물을 처리함으로써 melanoma cell의 분화가 농도의존적으로 억제됨을 관찰 할 수 있었다.

다. 발아유자

발아 유자의 줄기부분을 methanol로 추출하여 polyphenol화합물의 함량을 측정된 결과, 발아 하지 않은 유자씨에 비해 줄기부분에 polyphenol화합물의 함량이 2배가량 증가되었으며 특히 발아가 진행됨에 따라 citrus 특유의 flavonones들인 neohesperidin, naringenin, hesperitin 등의 함량이 증가하였다. 발아유자 methanol 추출물의 DPPH소거능, ABTS anion 소거능, β -carotene bleaching 효능 등을 측정된 결과, 발아유자 추출물이 유자씨 추출물에 비해 월등히 우수한 항산화력을 가지는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 발아로 인해 증가된 유자 특유의 naringenin, hesperitin 등의 증

가에 의한 영향으로 생각되어진다.

발아유자추출물의 지방세포분화 억제효과측정 결과 발아유자추출물이 3T3-L1 preadipocyte의 adipocyte로의 분화 억제력이 높은 것으로 나타났으며 동물실험을 통한 지방체내흡수 정도를 조사한 결과, 올리브유 투여 후 발아유자씨를 투여하였을 때, 혈중지방농도가 현저히 저하됨을 관찰 할 수 있었다.

3. 유자씨 식품소재 및 가공제품 개발

가. 유자씨 중간 식품소재 개발

유자씨 추출물의 고미제거를 위하여 유자씨 추출물을 maltodextrin과 함께 toluzyme 3.0L으로 처리하였을 때 쓴 맛의 주요 구성성분인 hydrophobic flavonoids가 toluzyme과 maltodextrin에 의하여 glycosylation이 일어나 hydrophylic한 flavonoids로 변환되었으며 따라서 특유의 쓴맛이 저감되었다. 쓴맛이 저감된 유자씨 추출물에 cyclodextrin을 첨가하여 분무건조 하여 물에 대한 용해도가 증가된 분말 상태의 식품 소재를 제조하였다.

나. 유자씨 가공제품 개발

유자씨 기름을 첨가한 비누를 고체형과 튜브에 넣어 짜서 사용하는 foam형태로 제조하였다. 두제품 모두 보습력과 향이 뛰어난 것으로 평가받았다. 쓴맛이 저감된 유자씨 추출물의 분무건조 분말을 첨가하여 음료를 제조하였다. 유자씨 추출물이 25%인 분무건조 분말을 0.2%첨가하여 레몬 음료를 제조하였으며 기호도도 우수한 것으로 판명되었다.

또한, 유자씨의 triterpenoid추출물에서 멜라닌 합성 저해효과가 관찰되어 유자씨 추출물이 25%인 분무건조 분말을 4% 첨가하여 유자씨 추출물이 함유된 피부 미백 크림을 제조하였다.

SUMMARY

I. Title

Development of Processed Yuja(*Citrus junos*) Seed Products

II. Objectives and Significance

Citrus junos SIEB ex TANAKA, which is commonly called as "Yuja" in Korea, belongs to a citrus fruit that is mainly cultivated in northeast Asia. The fruit looks a bit like a very small grapefruit with an uneven skin, and can be either yellow or green depending on the degree of ripeness. Because of its peculiar tart flavor, closely resembling that of grapefruit, with overtones of Mandarin orange, yuja is mostly consumed in Korea being thinly sliced and combined with sugar or honey to make thick marmalade-like syrup containing pieces of chopped rinds. A table spoon of this syrup (which can be either made at home or purchased in a glass jar) stirred into a cup of hot water makes a beverage called "yuja cha" ("cha" meaning tea in Korea), which is used as a herbal remedy for the common cold and similar winter illness. Yuja seed takes about 15% of total weight of whole yuja fruit, and is abandoned during most of yuja processes. Health-beneficial phytochemicals such as flavonoids tend to concentrate in seeds rather than fresh or peels. There is few study, however, investigated on functional as well as physico-chemical properties of yuja seeds as a food material. Therefore, its meaningful to investigate on such properties of yuja seeds and, furthermore, develop certain types of processed yuja seed products.

III. Contents and Scope

1. Physico-chemical properties of yuja seeds
 - Proximate analysis of yuja seeds
 - Fatty acids composition of yuja seed oil
 - Fractionation of yuja seeds
 - Processing properties of yuja seeds

2. Bio-functionalities of yuja seeds
 - Anti-oxidant activities of polyphenol fractions
 - Immuno-stimulating activities of polyphenol fractions
 - Anti-carcinogenic activities of polyphenol fractions
 - Anti-microbial activities of polyphenol fractions
 - Immuno-stimulating activities of triterpenoids extracts
 - Anti-carcinogenic activities of triterpenoids extracts
 - Whitening activities of triterpenoids extracts
 - Optimal germinating condition for yuja seeds
 - Anti-oxidant activities of germinated yuja
 - Anti-obese activities of germinated yuja

3. Development of processed yuja seed products
 - Debitterization of yuja seed oil and yuja seed extract
 - Development of spray-dried yuja seed extract
 - Development of various processed yuja seed products

IV. Major Results and Conclusion

1. Properties of yuja seeds as food

According to proximate analysis of yuja seeds, they were composed of 10.54% water, 2.5% ash, 31.43% crude lipid, 15.29% crude protein and 40.25% carbohydrates. When fatty acid composition of yuja oil was examined, 76% of all fatty acids were composed of unsaturated fatty acids with majority in oleic and linoleic acids. Yuja oil was too bitter to consume whole of it, but when it was added up to 2% in corn oil, it could properly delay peroxide formation.

2. Polyphenol compounds extracts

To obtain polyphenol compounds-rich fractions, yuja seeds were extracted with methanol, 70% ethanol and hot water. Methanol extract contained the highest amounts of polyphenolic compounds. Anti-oxidant activities, which were measured by DPPH radical scavenging, ABTS anion scavenging and β -carotene bleaching activities, of the fractions tended to positively correlate with amounts of polyphenolic compounds in each fraction.

Methanol fraction was successively fractionated to water, buthanol, ethyl acetate and ether. Buthanol fraction that contained the highest amounts of phenolic compounds exhibited the best anti-oxidant activities.

Addition of yuja seed extract enhanced viabilities of macrophages. The compounds such as H_2O_2 , NO and, TNF- α that are released by macrophages to destroy foreign agents were more actively released by addition of yuja seed extract. Viabilities of human T lymphoblast were also significantly increased by addition of yuja seed extarct. When yuja seed extract was orally administered to C57BL/6 mouse for 15 day,

cytotoxic activities of peritoneal macrophages against B16 tumor cells were significantly increased.

Among yuja seed methanol extracts, ethyl acetate and ether fractions effectively suppressed growth of such tumor cells as MCF-7 and HT-29. Addition of yuja seed extract also inhibited the growth of pathogenic *Staphylococcus aureus*.

3. Triterpenoid extracts

Methanol extract of yuja seeds contained the highest amounts of limonin and nomilin. Methylene chloride was applied to extract more triterpenoids from methanol fraction. This fraction was composed of 37% of nomilin and 23% of nomilin. This triterpenoid fraction effectively suppressed differentiation of melanocytes from pre-melanocytes, which resulted in less melanin formation. Therefore, this triterpenoids extract can be applied as a whitening agent.

4. Yuja seed sprouts

Yuja seeds were germinated for 21 days with proper germinating environment. Sprout hypocotyls of germinated yuja seed were extracted with methanol and its composition and concentrations of phenolic compounds were compared with those of methanol yuja seed extract. Concentrations of phenolic compounds in hypocotyls were increased during germination, and their compositions were different from yuja seeds. Flavonones, which are specific in citrus, such as neohesperidin, naringenin and hesperitin, were newly produced during germination. When anti-oxidant activities of yuja sprouts and seeds extracts were compared, extract of yuja sprouts had stronger activities.

Yuja sprouts extracts were examined for anti-obese activities. Addition of yuja sprouts extracts to 3T3-L1 cells significantly

suppressed differentiation to adipocytes. Oral administration of yuja sprout extract to SD rats also inhibited excessive fat absorption into a body, which indicated that specific flavonones in yuja sprouts play lipase inhibiting activities. Conclusively, germinated yuja can be a potent anti-obesity agent.

5. Development of processed yuja seed products

To produce debitterized yuja seed extract, ethanol extract of yuja seed was treated with toluzyme 3.0L with the presence of maltodextrin. Hydrophobic flavonoids that are considered as major bittering compounds in yuja seeds were effectively glucosylated and became hydrophylyzed. These changes reduced bitterness of yuja seed extract effectively. Then, debittered yuja seed extract was subjected to spray drying process to produce soluble yuja seed extract powder. This powder was added up to 0.2% to produce yuja seed added lemon juice that was considered as palatable in sensory analysis. Yuja seed extract powder also added to process whitening cream. Yuja solid soap and foam cleansing were processed by adding yuja seed oil.

Contents

Chapter 1. Summary	
I. Objectives and Significance	
II. Contents and Scope	
Chapter 2. Present State of Domestic and Foreign Technologies	
I. Present State	
II. Future Prospects	
Chapter 3. Experimental Methods and Results	
I. Methods and Materials	
1. Physico-chemical properties of yuja seeds	
A. Proximate analysis	
1) Yuja seeds	
2) Moisture	
3) Lipid	
4) Protein	
5) Ash	
B. Properties of yuja seed oil	
1) Fatty acid composition	
2) Physico-chemical properties of yuja seed oil	
3) Anti-oxidant activities of yuja seed oil	
2. Functional properties of yuja seed	
A. Polyphenol-rich fraction	
1) Extraction	
2) HPLC analysis of phenolic compounds	
3) Contents of total phenolic compounds	
B. Functional properties of polyphenol-rich fraction	
1) Anti-oxidant activities	

2) Immunomodulating activities	
3) Anti-carcinogenic activities	
4) Anti-microbial activities	
C. Triterpenoid-rich fraction	
D. Functional properties of triterpenoid fraction	
1) Anti-oxidant activities	
2) Anti-microbial activities	
3) Skin whitening activities	
E. Germinated yuja	
F. Functional properties of germinated yuja	
1) Anti-oxidant activities	
2) Anti-obese activities	
3. Development of processed yuja seed products	
A. Development of yuja seed food additive	
1) Debittering condition	
2) Spray drying condition	
B. Development of processed yuja seed products	
1) Yuja seed beverage	
2) Yuja seed soaps	
3) Yuja seed whitening cream	

II. Results

1. Physico-chemical properties of yuja seeds	
A. Proximate components of yuja seeds	
B. Physico-chemical properties of yuja seed oil	
1) Fatty acid composition	
2) Physico-chemical properties	
3) Anti-oxidant activities	
2. Function properties of yuja seeds	
A. Polyphenol-rich fraction	
B. Functional properties of polyphenol-rich fraction	

1) Anti-oxidant activities	
2) Immunomodulating activities	
3) Anti-carcinogenic activities	
4) Anti-microbial activities	
C. Triterpenoid-rich fraction	
1) Extraction	
2) HPLC analysis of triterpenoids compounds	
D. Functional properties of triterpenoid fraction	
1) Skin whitening activities	
2) Tyrosinase inhibiting activity	
E. Germinated yuja	
1) Germinating process of yuja seeds	
2) Extracts of germinated yuja	
F. Functional properties of germinated yuja	
1) Anti-oxidant activities	
2) Anti-obese activities	
3. Development of processed yuja seed products	
A. Development of yuja seed food additive	
B. Development of processed yuja seed products	
1) Yuja seed beverage	
2) Yuja seed soaps	
3) Yuja seed whitening cream	
Chapter 4. Contributions to Related Technologies	
Chapter 5. Application of Results	
Chapter 6. Scientific Information of Current Technology	
Chapter 7. References	

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	
제 1 절 연구의 필요성	
1. 기술적 측면	
2. 경제·산업적 측면	
3. 사회·문화적 측면	
제 2 절 연구개발 목표와 내용	
1. 연구개발 목표와 내용	
2. 연차별 연구개발 목표와 내용	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
제 1 절 국내외 연구현황	
제 2 절 앞으로 전망	
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	
제 1 절 연구 수행 방법	
1. 유자씨의 식품학적 특성	
가. 유자씨의 일반성분	
1) 유자씨	
2) 수분	
3) 지방	
4) 단백질	
5) 회분	
나. 유자씨 기름의 특성	
1) 유자씨 기름의 지방산 조성	
2) 유자씨 기름의 이화학적 특성	
3) 유자씨 기름의 항산화 효과	
2. 유자씨의 생리활성	
가. Polyphenol농축 분획	

1) 각 분획 별 추출방법	
2) HPLC를 이용한 polyphenol조성 분석	
3) Total polyphenol 함량	
나. Polyphenol함유 분획의 생리활성	
1) 항산화 활성	
2) 면역 활성	
3) 항암 활성	
4) 항균 활성	
다. Triterpenoid함유 분획	
1) 추출방법	
2) HPLC를 이용한 triterpenoid조성 및 함량 분석	
라. Triterpenoid함유 분획의 생리 활성	
1) 피부 미백 효과	
2) Tyrosinase 저해 효과	
마. 발아유자	
1) 유자씨의 발아공정	
2) 발아유자씨 추출물 제조	
바. 발아유자의 생리활성	
1) 항비만 효과	
3. 유자씨 식품소재 및 가공제품 개발	
가. 유자씨 중간 식품소재 개발	
1) 탈고미 조건	
2) 분무건조 조건	
나. 유자씨 기름 제조	
1) 유자씨 기름의 탈고미 조건	
다. 유자씨 가공제품 개발	
1) 유자씨 음료	
2) 유자씨 비누	
3) 미백 크림	

제 2 절 연구 수행 결과	
1. 유자씨의 식품학적 특성	
가. 유자씨의 일반성분	
나. 유자씨 기름의 특성	
1) 유자씨 기름의 지방산 조성	
2) 유자씨 기름의 이화학적 조성	
3) 유자씨 기름의 항산화 효과	
2. 유자씨의 생리활성	
가. Polyphenol농축 분획	
나. Polyphenol함유 분획의 생리활성	
1) 항산화 활성	
2) 면역 활성	
3) 항암 활성	
4) 항균 활성	
다. Triterpenoid함유 분획	
라. Triterpenoid함유 분획의 생리 활성	
1) 항암 활성	
2) 항균 활성	
3) 피부 미백 효과	
마. 발아유자	
바. 발아 유자의 생리활성	
1) 항산화 활성	
2) 항비만 효과	
3. 유자씨 식품소재 및 가공 식품 개발	
가. 유자씨 중간 식품소재 개발	
나. 유자씨 가공제품 개발	
1) 유자씨 음료	
2) 유자씨 미백 크림	
3) 유자씨 비누	
제 4 장 목표달성도 및 관령분야에의 기여도	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보
제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 필요성

1. 기술적 측면

유자(*Citrus junos* SIEB. ex TANAKA)는 감귤류의 일종으로서 그 원생증추는 중국의 중남부 또는 동부의 히말라야산록에서 잇삼에 이르는 지역으로 추정하고 있으며, 우리나라에도 기후가 비교적 온화한 남해안지역에 자생하고 있다. 국내산 유자의 생산량과 재배면적은 1997년을 기준할 때 18,382톤, 4,608ha였으며 1998년도에는 유자가 풍작으로 생산량은 20,000톤에 달하였으나 생산량 증가에 따른 가격폭락으로 유자재배면적이 감소되어 2001년도에는 12,000톤 정도로 크게 감소되고 있다.

현재 국내 주요 유자 산지를 보면 전남 고흥, 완도, 장흥, 진도, 경남 거제, 남해, 통영 등이며 이들 지역의 생산자 단체인 협동조합을 중심으로 '유자전국협의회'를 결성하여 유자의 생산, 가공, 판매 등에 관한 상호 협력 및 공동 사업을 추진하고 있으며 현재 22개 회원조합이 가입되어 있으며 전국 유자 생산량의 90% 이상을 점유하고 있다. 2003년 현재 총 유자생산량 중 7,000여톤이 주스, 쥘, 음료 등의 가공제품으로 생산되고 있으며 전남지역에서 50%이상의 가공품이 생산되고 있다.

유자는 일본에서는 yuzu 또는 simikan이라는 이름으로 상업적으로 이용되고 있고 과육과 과피를 여러 가지 식품조리 및 목욕, 미용품에 첨가하고 있다. 국내에서도 유자의 독특한 향미로 인하여 오래전부터 차류등의 기호식품으로서 널리 애용되어 왔으며 유자는 풍부한 비타민 C와 약 4%의 구연산을 함유하고 있어 액즙이 풍부하고 향기가 좋으며 면역활성이나 항암작용에 탁월한 효과를 보이는 쓴맛 성분인 limonoid 등의 플라보이드계 성분이 다량 함유되어있어 예로부터 민간요법의 하나인 감기, 신경통등의 치료제로서도 이용되어 왔다.

유자를 가공할 때 총 중량의 15%에 이르는 유자씨는 대부분 폐기처분되는 실정이며 이들 유자씨를 활용한 가공제품이나 유자씨에 대한 식품원

료로서의 성분 또는 생리활성 등에 관한 연구는 국내외적으로 거의 이루어져 있지 않은 실정이다. 유자와 함께 citrus fruit에 포함되는 자몽의 씨추출물은 탁월한 항산화력과 항균력을 가진 것으로 알려져 있으며 오래전부터 DF-100이란 상품명으로 화학보존제를 대체하는 천연식품보존제로 전 세계적으로 널리 사용되고 있다.

한편, 현대인들의 과중한 업무로 인한 스트레스와 식단의 서구화 등으로 인하여 각종 성인병 및 암발생률의 증가 현상이 일어나고 있으며 각 개인의 건강관리를 위해 그 어느 때 보다도 많은 지출이 이루어지고 있는 실정이다. 또한 건강 기능성 관련 식품들이 소비자들에게 많은 호응을 얻고 있으며 관련 업체에서 해마다 수많은 기능성 제품들을 출시하여 시장규모가 점차 확대되고 있다.

자몽씨의 경우에서처럼 유자에 풍부히 함유되어있는 polyphenol류나 flavonoid 계통의 성분이 유자씨에 고농도로 농축되어 있을 가능성이 있으며 체계적인 연구를 통하여 이들 성분에 대한 각종 생리활성에 대한 구명 및 이들 연구결과를 활용하여 다양한 건강 지향적 가공식품이 개발된다면 신소재 건강식품개발과 관련된 국내 연구력의 향상에 크게 이바지 할 수 있으리라 사료된다.

2. 경제·산업적 측면

2003년말 현재 7,096톤의 유자가 유자가공에 소요되고 있으며 씨 무게를 전체중량의 15%로 가정하면 연간 1,000톤 이상의 유자씨가 가공업체로부터 생산되어 폐기처분되고 있는 실정이다.

유자의 가공은 전남지역에서 50%이상 이루어지고 있으며, 그밖에 경기와 경남지역에서 나머지 50%에 해당하는 유자가공품이 생산되고 있다. 전남지역 중에서 특히 고흥이 전남전체 유자생산량의 41%와 전국생산량의 23%를 차지하고 있으며 재배 면적은 395ha에 이르며 연간 40여억원의 농가소득을 올리고 있다. 본 연구를 통하여 유자가공시 대량생산되어 폐기처분되는 유자씨의 식품자원으로서의 활용이 성공적으로 이루어진다면 유자생산농가 뿐만 아니라 유자가공업체의 소득증대 기여, 지역 경제활성화와 지역민 고용창출 등에 크게 기여할 것으로 사료된다.

3. 사회·문화적 측면

최근 비약적인 경제발전으로 인한 국민생활수준의 향상으로 개인의 건강에 대한 관심이 점차 고조되고 있는 추세이며 특히 불규칙한 생활습관이나 과중한 스트레스, 음식에 대한 편협한 기호 등으로 인하여 갖가지 성인병, 암 등의 발생율이 증가하고 있다. 미국의 경우, 암의 발생원인에 대하여 추정된 결과 식생활 습관이 가장 높은 35%를 차지하였고 이어서 흡연이 30%이며 나머지요인들은 10%이하로 미미한 비율을 차지한다고 보고하였으며 이와 같은 조사결과는 각종 질병의 치료나 예방에 식생활 습관이 깊이 관여하고 있음을 시사한다.

식품에 대한 최근 연구동향은 영양을 위주로하는 식품의 1차기능과 맛, 기호성 측면의 2차기능보다 질병의 예방과 치료에 도움이 되는 생체조절측면의 3차기능을 가진 기능성(건강) 식품의 개발에 많은 초점이 맞춰지고 있다. 국내에서도 국민들이 점차적으로 기호성과 고급성을 중요시하게 되고 기호의 다양화 및 성인병에 대한 국민의 관심증가와 이의 해결을 식품에서 찾으려는 경향에 따라 1980년대 이후부터 기능성 식품의 수요가 급격히 늘어나고 있는 추세이다.

유자는 독특한 향기와 비타민C가 풍부하여 한의학에서는 유자차가 감기의 예방과 치료에 효과가 크며 또한 식욕을 증진시키고 숙취를 풀어주며 가래가 끓는 오래된 기침을 삭이고 산후복통에도 좋다고 알려져 있다. 유자와 같은 citrus fruit에 많이 함유된 flavonoid 화합물은 항암 등에 탁월한 효과가 있다고 보고 된다. 따라서 유자씨에는 flavonoid 등의 유효성분이 농축되어 있을 수 있으며 이를 이용하여 면역부활활성이 있는 식품소재를 개발 할 수 있으면 국민 건강 증진에 기여할 수 있으리라 기대된다.

제 2 절 연구개발 목표와 내용

1. 연구개발 목표와 내용

유자가공시 폐기물로 대량 생산되는 유자씨의 고부가가치화를 위하여 유자씨의 생리활성에 대한 연구 및 이를 활용한 중간식품소재와 가공제품을 개발하는 것이 본 연구의 최종목표이다.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○유자씨의 식품학적 특성 연구 ○유자씨의 가공적성 연구 ○유자씨 추출물의 생리기능적 특성 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식품학적 성분 본체 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 단백질, 지질, 수분 등 일반성분 - 지방산조성 등 ○ 폴리페놀화합물 등 이화학적 특성 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 각 분획별 함량 및 조성 등 ○ 유자씨의 가공적성 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 추출용매별(극성, 비극성) 추출율 검토 - 추출물의 열안정성 검토 ○ 유자씨의 적정 가공방법 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 백음처리 등 전처리 기술 개발 - 탈고미조건 설정 ○ 각 성분별 항산화활성 연구 ○ 각 추출성분의 면역촉진활성 연구 (<i>in vitro</i>) ○ 각 추출성분의 diet효과에 관한 연구
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○유자씨 추출물의 식품학적 특성 연구 ○유자씨를 이용한 다양한 가공제품 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유자씨추출물의 폴리페놀화합물 등 이화학적 특성 구명 ○ 상업적 생산을 위한 최적의 유자씨 가공공정 확립 및 유자씨 가공제품 개발(시제품) <ul style="list-style-type: none"> - 고품질 유자종실유, 고농축 유효성분 액기스제품 등

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 연구현황

감귤류에 관한 연구로서는 일반성분, 아미노산, 당, 유기산, 색소, 고미 성분, 향기성분, 펙틴물질 등 여러 분야에 걸쳐 많은 연구가 국내외에서 이루어져 왔으나 유자에 관한 연구는 그다지 많지 않고 연구의 대부분이 특정성분(flavanon, flavnol 화합물 등)의 분석 등 단편적인 연구에 치중되어 있으며 특히 유자씨에 관한 체계있는 연구는 이루어진 바가 거의 없는 실정이다.

1987년 농산물유통공사 산하 종합식품연구원에서 행한 유자관련 연구 결과를 살펴보면, 유자종실의 지방함량은 32-44%로서 높고 종실유의 지방산조성은 Palmitic, Palmitoleic, Stearic, Oleic, linoleic 및 linolenic acid 등으로 구성되어 있으나 이중 oleic 과 linoleic acid 등의 불포화지방산이 주종을 이루고 있어 좋은 유자자원인 것으로 판단되었으며, 이들 지방산조성은 품종간에는 서로 차이를 보였으나 수확시기에 따른 변화는 나타나지 않았다. 또한 TLC와 HPLC를 사용하여 감귤류 고미성분인 동시에 항암작용이 탁월하다고 알려진 limonin 과 nomilin을 분리 측정 한 결과, 이들 성분은 종실에는 다량 함유되어 있으나 과육과 과피에는 그다지 많지 않아 유자씨의 생리활성소재로서의 활용가능성을 제시해주고 있다.

1993년 국내에서 발표된 ‘유자종실 sterol’의 연구결과에 의하면 유자종실기름의 불검화물량은 기름 1g당 19.2mg으로서 1.9%이었고 불검화물의 분획 pattern은 less polar compounds가 20.3%, 4,4-dimethylsterol이 9.6%, 4-desmethylsterol이 47.1% 및 미전개물질이 22.9% 이었으며 sterol 조성은 cholesterol이 0.3%, campesterol이 11.9%, stigmasterol이 9.3%, beta-sitosterol이 72.2% 및 미지 sterol이 6.3%이었고 불검화물량, 불검화물의 분획 pattern 및 sterol조성은 타 식물종실유와 거의 같은 경향을 나타낸다고 보고하였다.

제 2 절 앞으로 전망

최근 들어 건강에 대한 국민의 관심이 날로 높아져가고 있고 따라서 식품을 맛있게 섭취하면서도 건강을 유지할 수 있는 기능성식품에 대한 요구가 증대되고 있다. 본 연구를 통하여 유자씨의 생리활성 성분들에 대한 연구가 체계적으로 이루어지고 기능성 물질들을 적절히 추출, 분리, 정제하여 식품소재화 및 이를 활용한 건강 지향적 가공제품이 개발된다면 폐자원의 고부가가치화와 국민건강 증진에 기여할 수 있으리라 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 수행 방법

1. 유자씨의 식품학적 특성

가. 유자씨의 일반성분

1) 유자씨

본 연구에서 사용된 유자씨는 전남 고흥지방에서 2005년 11월과 2006년 11월 생산된 유자로부터 분리하였으며 분리된 씨는 흐르는 물에 2~3회 깨끗이 세척하여 이물질을 제거하고 50℃에서 overnight 건조시켜 사용하였다. 건조된 씨는 정미기를 이용하여 껍질을 제거한 후 각종 실험 재료로 사용되었다.

2) 수분

미리 가열하여 항량을 구한 칭량접시(W_0 g)에 시료 3g(W_1)를 취했다. 이것을 건조기에 넣고 약 3시간 수분을 날려 보내고 데시케이터에 넣은 다음 30분간 방냉 시키고 이것의 무게를 측정한다. 다음 다시 건조기에 넣고 2시간 동안 건조하고 다시 30분간 방냉하는 조작을 반복했다. 시료가 들어 있는 칭량접시의 무게가 항량에 도달하면 무게(W_2)를 측정하여 수분의 함량을 계산했다.

$$\text{수분(\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

W_0 : 칭량접시의 무게(g)

W_1 : 건조 전 칭량접시와 시료의 무게(g)

W_2 : 건조 후 칭량접시와 시료의 무게(g)

3) 지방

검사시료 5g을 평량하여 무수황산나트륨 5g을 가하여 충분히 마쇄하고 105℃의 건조기속에서 3시간 건조시켰다. 원통여지에 탈지면 소량을 넣고 그 위에 건조시료를 취한 다음 다시 탈지면으로 덮고 이것을 속실텐트출관에 넣었다. 지방수기에 에칠에텔 150ml를 취하고 추출관 및 냉각관을 연결하여 60℃의 수욕상에서 12~16시간 침출시켰다. 추출이 완료되면 수기 중의 에텔을 미리 건조시켜 평량 된 평량병에 옮기고 항온수조상에서 에텔을 증발 건조시킨 다음 105℃에서 항량이 될 때까지 건조시켜 증가된 양을 지방량으로 하였다.

$$\text{지방질 함량 (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W_1 : 추출건조 후의 전체 무게(g)

W_0 : 지방 수기의 무게(g)

S : 시료의 무게 (g)

4) 단백질

시료는 2g을 취하여 단백질 분해관에 넣고 분해관에 황산 20ml와 촉매제를 넣는다. 분해가 끝난 후 증류수 50ml를 넣어 염을 녹인 다음 증류기에서 35%의 NaOH를 넣는다. 가열에 의하여 수증기를 증류하여 발생하는 암모니아를 4% boric acid 100ml로 포집한 다음 0.1N HCl로 적정하여 총 질소 함량을 계산하고 단백질 환산계수(6.25)를 사용하여 단백질 함량을 구하였다.

$$\text{조 단백질량(\%)} = 0.0014 \times \frac{(V_1 - V_0) \times f \times N}{s} \times 100$$

V_0 = 공 시료의 0.1N HCl 소비량(ml)

V_1 = 분 시료의 0.1N HCl 소비량(ml)

f = 0.1N HCl의 Factor

N = 질소계수

s = 시료량(mg)

0.0014 : 0.1N HCl 1ml에 상당하는 질소량(g)

5) 회분

마쇄한 시료 5g을 회화용기에 취하고 히터에서 예비가열 처리한 다음 550℃에 도달한 전기 회화로에 넣고 회색 부근이 될 때까지 회화시켰다. 회화가 되면 회화용기를 꺼내어 약 200℃ 정도로 식힌 다음 데시케이터에 넣고 약 30분간 방치한 다음 회화용기의 온도가 실온에 도달하면 무게를 신속히 측정하고 회화용기는 전기 회화로에 다시 넣은 다음 항량에 도달할 때까지 다시 회화시키고 방냉하는 조작을 반복했다.

$$\text{회분}\% = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W_1 : 회분을 포함한 회분용기의 총 무게(g)

W_0 : 빈 회화용기의 무게(g)

S : 시료의 무게(g)

나. 유자씨 기름의 특성

1) 유자씨 기름의 지방산 조성 분석

유자로부터 유자씨를 분리 한 후 씨껍질을 제거하고 압착법에 의거 유자씨 기름을 추출하였다. 추출한 지방질 약 0.2g을 정확히 취하여 50ml의 둥근플라스크에 취하고 0.5N NaOH/methanol용액 5ml를 가한 다음 잘 섞어주고 15분간 80℃의 모래 반응조에서 환류냉각시키면서 유지를 검화시켰다. 여기에 10% BF_3 /Methanol용액 5ml 가하여 80℃에서 15분간 환류냉각시키면서 지방산 methylester화합물을 만들었다. Methylester화합물을 추출하기 위하여 5ml의 헥산을 가하여 1분간 80℃에서 유지한 후 포화식염수를 가하여 헥산층을 분리시키고 헥산층을 취하여 무수황산나트륨 층을 통과시켜 얻은 지방산 methylester화합물 1 μ l를 불꽃이온화검출기(FID) 및 모세관 칼럼(HP-FFAP, 0.32mm i.d. x 30m x 0.25 μ m film thickness, HP, USA)이 장착된 가스크로마토그래피(Hewlett packard, USA)에 주입하여 분석하였다. 이때 주입기 및 검출기의 온도는 각각 260℃ 및 280℃로 하였으며 오븐온도는 120℃에서 2분간 유지한 후 분당 4℃씩 260℃까지 상승시

켜 260℃에서 10분간 유지하였다. 헬륨을 운반기체로 사용하였으며 유속은 1.5ml/min로 유지하였고 분할비율은 1 : 30으로 하였다. 각 지방산의 확인은 표준품의 Rt값으로 확인하였고 지방산 조성은 각 지방산에 대한 면적법에 의하여 산출하였다.

2) 유자씨 기름의 이화학적 특성

수분은 시료 약 3g을 정확히 취하여 karl fisher법에 의거 측정하였으며 비중은 비중계를 이용하여 측정하였다. 굴절율은 Abbe refractometer를 이용하여 측정하였으며 산가, 과산화물가 및 불비누화가는 식품공전(2005년)에 의거 측정하였다.

3) 유자씨 기름의 항산화 효과

유자씨 기름의 항산화능력의 측정은 Rancimat 679(Metrohm, Switzerland)를 이용하여 110℃에서 induction time을 측정하였다. 이때 공기주입량은 시간당 20l로 하였다. 유자씨 기름을 대두유에 1%와 2% 혼합하여 측정하였으며 대조구로서는 유자씨 기름을 첨가하지 않은 대두유를 사용하였고 비교구로서는 항산화제인 BHA 및 BHT를 각각 100ppm으로 첨가하여 시료로 사용하였다.

2. 유자씨의 생리활성

가. Polyphenol농축 분획

1) 각 분획 별 추출방법

50°C dry oven에서 overnight시켜 건조된 유자씨의 껍질을 제거한 후, 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 헥산에 24시간 침지시켜 지방성분을 제거하여 사용하였다. 건조된 무게의 20배(w:v)의 100%methanol, 70% ethanol 및 열수로 3시간 동안 환류추출하였다. 추출 후 여과하여 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압농축 후 72시간동안 동결 건조하여 추출물을 얻었다. 건조 전 무게와 동결건조 후 얻어진 추출물 무게의 비율을 계산하여 수율을 계산하였다.

또한, 추출된 methanol층을 재차 분획하기 위하여 건조된 methanol 추출물을 물에 용해시킨 후, 동량의 ether를 첨가하여 2시간 추출하여 ether층을 얻고, 남은 물층에 다시 ethyl acetate, butanol을 순차적으로 첨가하여 각각의 용매추출물을 얻었다.

2) HPLC를 이용한 polyphenol조성 분석

각 용매추출물의 polyphenol화합물의 조성은 표 1과 같은 HPLC 분석조건에 의해 실시하였다.

표 1. 유자씨 용매추출물의 flavonoids HPLC 분석조건

Instrument	Jasco PU-990 Pump/Jasco 851-AS sampler Jasco 807-IT Integrator (Japan) Sedex 55 Light Scattering Detector (France)
Column	Waters μ Bondapak C ₁₈
Flow rate	0.7 ml/min
UV detector	280nm
Solvent	A ; 50mM phosphoric acid B ; Methanol
Gradient	0~10min, 2~5% solvent B; 10~50min, 5~35% solvent B; 50~60min, 35~40% solvent B ; 60~70min 40~60% solvent B ; 70~90min 60% isocratic with solvent B

3) Total polyphenol 함량

농도별로 준비된 시료 0.125ml에 증류수를 0.5ml와 folin-ciocalteu's phenol reagent 0.125ml 첨가하여 6분간 반응 시켰다. 반응 후 7% sodium carbonate solution 1.25ml과 증류수 3ml 첨가하여 90분간 반응시킨 후 분광광도계를 사용하여 760nm에서 OD값을 측정하였다. Rutin을 이용하여 작성한 standard curve으로 부터 총 polyphenol 함량을 계산하였다.

나. Polyphenol농축 분획의 생리활성

1) 항산화 활성

가) DPPH radical 소거능

유자씨 추출물의 DPPH radical 소거능은 Williams 등(1971)의 방법을 변형하여 측정하였다. 농도별 추출물 1.0ml에 0.1mM DPPH solution(in EtOH) 0.2ml을 넣고 10초간 vortexing한 후 20분간 반응시킨 후 525nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음과 같이 계산하였으며, 각 추출물의 IC₅₀ 값은 농도에 따른 곡선식에 의해 산출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

(A₀ : Absorbance of control / A₁ : Absorbance of sample)

나) ABTS anion 소거능

유자씨 추출물의 ABTS anion radical 소거능은 Van der Berg 등(1999)의 방법과 유사하게 측정하였다. 실험 12~16시간 전에 제조해 둔 7mM ABTS solution(containing of 2.45mM potassium persulfate)은 734nm에서 0.7±0.02의 흡광도를 나타내도록 5mM PBS에 희석한 후 10ul의 농도별 추출액에 990ul의 희석된 ABTS solution을 첨가하여 vortexing한 후 10분 반응 후에 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거능은 다음과 같이 계산하였으며, 각 추출물의 IC₅₀ 값은 농도에 따른 곡선식에 의해 산출하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity(\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

(A₀ : Absorbance of control / A₁ : Absorbance of sample)

다) β -carotene bleaching assay

β -carotene bleaching assay는 Jayaprakasha 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 1.0ml β -carotene solution(1.67mg/ml chloroform)에 linoleic acid 40mg과 Tween 20 400mg을 넣고 vortexing한 후 nitrogen gas로 chloroform을 제거하였다. 곧바로 DW 5-10ml을 넣고 흔들어주어 emulsion을 형성시킨 후 0.01M hydrogen peroxide(H₂O₂)로 volumn을 100ml로 맞췄다. 2ml씩 나누어 담고 농도별 sample 100 μ l넣어 준 후 50 $^{\circ}$ C water bath에 넣어두면서 시간별로 470nm에서 O.D값을 측정하였다.

2) 면역 활성화

가) Cell line

유자씨 추출물의 면역활성을 측정하기 위해 murine macrophage cell line인 RAW 264.7을 KCLB에서 분양받았다. Culture flask에 cell을 seeding한 후 DMEM medium에 10% fetal bovine serum(FBS) 및 1% penicillin- streptomycin(10,000U/ml)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 습도 조건이 유지되는 incubator에서 배양하였다. 배지는 주 2회 교체하였고 주 1~2회 계대 배양하였다.

나) H₂O₂ 생성량 측정

Macrophage가 생성한 H₂O₂ 양은 H₂O₂ 표준품을 serial dilution으로 3400~1060.25ng/ml 되게 96 well plate에 분주하였고, RAW 264.7를 24시간 배양한 후 얻은 supernatant 50 μ l을 첨가하였다. 각 well에 발색제 100 μ l을 첨가하고 10초간 잘 혼합한 후 상온에서 30분동안 incubation하면서 발색시켜 ELISA reader로 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

다) NO 생성능 측정

NO 생성의 지표로서 macrophage 배양액 내에 유리된 nitrite 양을 측정하였다. RAW 264.7를 96 well plate에 seeding하여 24시간 배양 후 얻은

supernatant 100ul와 100ul Griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid : 1% N-naphthylamine-2HCl in water = 1 : 1 (v/v))을 혼합하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

라) TNF- α 생성량 측정

Macrophage가 생성하는 TNF- α 는 항암효과에 영향을 주는 중요한 면역인자로 알려져 있다. RAW 264.7 macrophage가 생성한 TNF(tumor necrosis factor)- α 의 양은 TNF- α standard 물질을 serial dilution으로 2000~31.25pg/ml이 되게 96 well plate에 분주하였고, 회수한 cell을 24시간 배양 후 얻은 supernatant 50ul을 첨가한 다음 mixing한다. Plate shaker에서 500rpm으로 실온에서 2시간동안 incubation한 후 각 well의 내용물을 제거하여 모든 well에 wash solution 400ul을 가하여 3회 washing 하였다. 각 well에 yellow antibody 50ul을 넣은 후 plate shaker에서 500rpm으로 상온에서 2시간 동안 incubation 후, 전 단계와 동일하게 3회 washing하였다. 각 well에 blue conjugate 50ul씩 가한 후 plate shaker에서 500rpm으로 상온에서 30분 동안 incubation 후, 다시 3회 washing한 후, 각 well에 substrate solution 50ul씩 넣고 실온에서 상온에서 30분 동안 incubation 하였다. Stop solution 50ul을 넣어 반응을 중지시킨 후, ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

마) Macrophage의 B16에 대한 cytotoxicity(동물실험)

생후 7주된 C57BL/6종의 mouse를 구입한 후 일주일 동안 기본식으로 안정화 시킨 후 체중 25g내외의 것을 실험에 사용하였다. 실험군은 100 mg/kg의 유자씨 70% ethanol 추출물 하루에 일회씩 경구투여 하였고, 시료대신 동일량의 saline을 경구투여한 구를 control구로 하였다. 실험군당 7마리씩 15일간 사육하였고, 사육실의 온도는 20~22 $^{\circ}$ C로 유지하며 사육기간 동안 물과 식이는 자유롭게 섭취하게 하였다. Mouse로부터 macrophage를 회수하기 위하여 mouse를 ether로 희생시킨 후 복강에 8ml의 RPMI1640 배지를 주입하여 부드럽게 마사지하고 복강세포를 수확하였다. 회수한 복강세포를 배지로 2회 세척한 후 10% FBS를 함유한

RPMI1640 배지를 사용하여 5×10^4 cell/ml로 희석하였다. 세포액 0.2ml을 96well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양하여 monolayer를 형성하게 되면 비부착세포를 제거하였다. Macrophage의 cytotoxicity는 분리한 macrophage에 암세포로 사용된 B16 세포를 target cell(1×10^4 cell/ml)로 가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 50µl(1mg/ml)의 MTT를 가하고 2시간 더 배양하였다. supernant를 제거한 후 150µl의 DMSO를 가해 formazan 결정을 용해하고 ELISA를 이용하여 540nm에서 값을 측정하는 후 다음 식에 의해 cytotoxicity를 계산하였다.

$$\text{Macrophage의 Cytotoxicity(\%)} = 100 - \left\{ \frac{\text{O.D(Macrophage+B16)} - \text{O.D(Macrophage)} \times 100}{\text{O.D(B16)}} \right\}$$

바) T-cell 활성화

유자씨 추출물의 T-cell 활성능을 측정하기 위하여 human T lymphoblast인 MOLT-4 (KCLB)를 사용하였다. Culture flask에 세포를 seeding 한 후 RPMI 1640 Medium에 10% fetal bovine serum(FBS) 그리고, 1% penicillin- sterptomycin(10000U/ml)을 첨가한 배양 배지를 사용하여 배양하였다. 배양조건은 5% CO₂와 95% 습도 조건이 유지되는 Incubator를 이용하여 37°C에서 배양하고, 배지는 주 2회 교체해 주고, 주 1~2회 계대 배양하였다. 96-well plate에 세포를 seeding하고 하루동안 배양하였으며, 대조군과 여러 농도의 올리고당을 처리한 군을 24시간, 48시간 계속 배양한 후, MTT 용액으로 30분간 반응시켰다. 0.04M HCL/isopropyl alcohol로 MTT 용액을 dissolve 시킨 후 microplate reader로 570 nm에서 absorbance를 측정하였다. Total cellular RNA는 Trizol solution(Gibco BRL)을 이용하여 분리한 후, 1ml의 Trizol solution을 처리하여 cell을 용해시켜 세포 추출물을 1.5ml microtube에 모아서 chloroform 처리하고 vortex한 후 4°C에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리를 통하여 상층액을 수거하였다. 이 상층액에 isopropanol을 mix하여 5~15분 정도 상온에 두었다가 4°C에서 12,000rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하

고 RNA pellet 에 1.5ml 75% ethanol로 세척하고 4℃에서 12,000rpm으로 5분 동안 원심 분리하였다. 5~10분간 상온에서 완전히 건조시킨 후, 100 μ l의 DEPC(diethylpyrocabonate) water에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer를 사용하여 정량하였다. 분리한 RNA를 reverse transcriptase로 cDNA template을 만들며 cDNA template을 gene-specific한 oligonucleotide (primer)를 사용하여 PCR로 증폭한 후 band intensity를 gel documentation system으로 정량하여 mRNA 발현정도를 조사하였다. Primer는 MIT에서 제공하는 Web program (Primer-3 primer pickup)을 이용하여 design하였다.

3) 항암 활성

가) 부착 세포

유자씨 추출물의 항암 활성을 측정하기 위해서 사용한 종양 세포 중 부착 세포인 HepG2(human liver cancer cell), HT-29(human colon cancer cell), MCF-7(estrogen receptor- positive breast cancer cell), 및 WiDr(human colon cancer cell) cell lines은 KCLB (Korean Cell Line Bank)에서 분양받았다. Culture flask에 cell을 seeding한 후 DMEM(HepG2, WiDr) 또는 RPMI(HT29, MCF-7) medium에 10% fetal bovine serum(FBS) 및 1% penicillin-streptomycin(10,000 U/ml)을 첨가하여 37℃, 5% CO₂, 95% 습도조건이 유지되는 incubator에서 배양하였다. 배지는 주 2회 교체하였고 주 1~2회 계대 배양하였다. 유자씨 추출물의 항암효과는 색차계를 이용하여 측정하였다. 각 cancer cell line을 96-well plate의 각 well에 2.5 × 10⁴가 되도록 seeding하는 동시에 추출물을 농도별로 처리하여 배양하였다. 20시간 후 50ul(1mg/ml)의 MTT를 가하여 4시간 추가 배양하고 supernatant를 제거한 후 150ul의 DMSO를 가해 formazan 결정을 용해하였다. ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정한 후 sample을 처리하지 않은 control과 비교하여 저해활성을 산출하였다.

나) 부유 세포

유자씨 추출물의 항암효과를 측정하기 위해서 사용한 종양 세포 중 부

유 세포인 L1210(mouse leukemia tumor cell)와 P388D1(mouse lymphoid neoplasm) cell lines은 KCLB에서 분양받았다. Culture flask에 cell을 seeding한 후 RPMI medium에 10% FBS 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 위의 부착세포와 같이 계대배양 하여 사용하였다. 부유 세포는 seeding과 sample 처리 24시간 후 20ul의 WST-1(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt)를 가하고 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 한 후 sample 을 처리하지 않은 control과 비교하여 저해활성을 산출하였다.

4) 항균 활성

한국식품연구원에서 분양받은 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Propionibacterium acnes*을 계대배양을 통해 미생물의 활성을 높인 후 일정균수로 희석하고 유자씨 추출물을 농도별로 첨가하여 petrifilm에 37℃에서 48시간 배양 후 균수를 측정하였다.

다. Triterpenoid 분석

1) 추출방법

유자씨를 hexane에 24시간 침지시켜 지방성분을 제거하고 건조시킨 후 methanol을 첨가하여 추출하였다. 추출된 methanol 추출물을 filtration 후 건조시켰으며 이 추출물에 다시 methylene chloride를 첨가하여 추출하였다.

2) HPLC를 이용한 triterpenoid조성 및 함량 분석

유자씨의 triterpenoids조성은 표 2의 HPLC분석조건에 의하여 비교하였다.

표 2. 유자씨 용매추출물의 triterphenoids HPLC 분석조건

Instrument	Jasco PU-990 Pump/ Jasco 851-AS sampler Jasco 807-IT Integrator (Japan) Sedex 55 Light Scattering Detector (France)
Column	Water μ Bondapak C ₁₈
Flow rate	1.0ml/min
UV detector	210nm
Solvent	A; Acetonitrile B; Methanol C; H ₂ O
Isocratic	A : B : C = 10 : 41 : 49

라. Triterpenoid함유 분획의 생리 활성

1) 피부 미백 효과

유자씨 추출물의 미백효과를 측정하기 위해 사용한 세포주인 B16/F1(murine melanoma) cell line은 KCLB에서 분양받았다. 구입한 세포는 5% FBS, 1% penicillin streptomycin, 200ul α -MSH(α -Melanocyte stimulating hormone)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 생성된 멜라닌을 정량하기 위해 6-well plate에 3×10^5 cell/well의 농도로 세포를 접종한 후 유자씨 추출물을 농도별로 처리하고 48시간동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 5분간 원심분리하여 얻은 세포 침전물을 1ml의 PBS로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1 N NaOH(+10% DMSO) 용액을 200ul를 첨가하여 용해시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Tyrosinase 저해효과

Kubo의 방법에 준하여 96 well plate에 8.3mM 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine(in 67 mM phosphate buffer pH 6.8) 120 μ l과 각 시료 40 μ l를 혼합하여 490nm 흡광도(S₁)를 측정(UV-Visible Spectrophotometer)한 후 tyrosinase(125unit/mg solid) 40 μ l를 첨가하여 실온에서 10분간 반응(FM: 37°C, 20분간 incubation한 후 4분간 정지)시켜 490nm 흡광도(S₂)를

측정하였다.

마. 발아유자

1) 유자씨의 발아 공정

발아유자 줄기의 식품 소재화를 위하여 그림1의 공정에 의하여 유자씨를 발아시켜 사용하였다

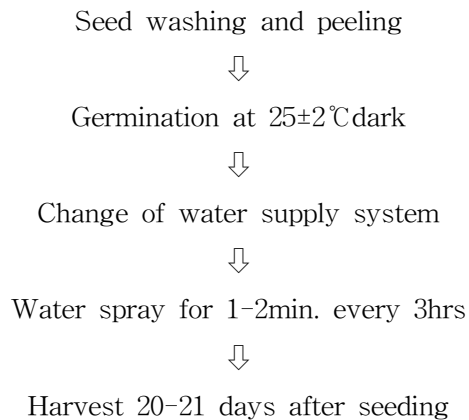


그림 1. 유자씨의 발아 공정

2) 발아유자 추출물 제조

발아된 유자씨는 줄기 부분만 떼어내어 50℃ dry oven에서 건조한 후 분쇄하여 사용하였다. 건조된 무게의 20배(w:v)의 methanol로 70℃에서 3시간 동안 환류추출 하였으며, 추출 후 여과하여 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압 건조하여 사용하였다.

바. 발아유자의 생리활성

1) 항비만 효과

가) 지방세포분화억제 효과 측정(3T3-L1 cell)

3T3-L1을 분화시키고 지방축적(adipogenesis)을 유도하여 특정한 소재의 첨가가 지방축적에 미치는 영향을 측정하는 방법으로서 pre-adipocyte 상태의 3T3-L1 cell line에 dexamethason, isobuthylmethylxanthine 그리고 insulin으로 처리하여 cell의 분화(differentiation)를 유도하면 PPAR γ 등의 지방합성 촉진 인자들의 발현이 일어나고 궁극적으로 지방의 세포내 축적이 이루어진다. 대체적으로 3T3-L1 cell line의 pre-adipocyte 기간을 포함하여 9일 안에 지방의 축적이 일어나며 축적된 지방구를 Oil Red O 용액으로 추출하고 520nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포내 지방축적 정도를 측정하는 방법이다. 본 연구에서는 유자씨 70% ethanol, 열수, triterpenoid, 및 발아 유자씨 추출물의 anti-adipogenic activity를 측정하기 위하여 3T3-L1 pre-adipocyte에 인슐린 등과 같은 adipocyte inducer를 첨가하여 adipogenesis를 유도하였으며, 각 유자씨 추출물을 inducer들과 함께 첨가하여 adipogenesis의 발생을 억제시키는 정도를 측정하였다.

나) Lipase inhibition 효과

Lipase 활성저해 효과 측정은 그림 2와 같이하였다. 표 3의 농도로 reaction mixture를 만들어 37°C에서 15분간 반응시킨 후 405nm에서 absorbance측정하였다. Blank는 enzyme대신 증류수를 사용하였으며 대조구는 시료 대신 용매를 사용하였다. Lipase activity(%)는 아래의 식으로 계산하였다.

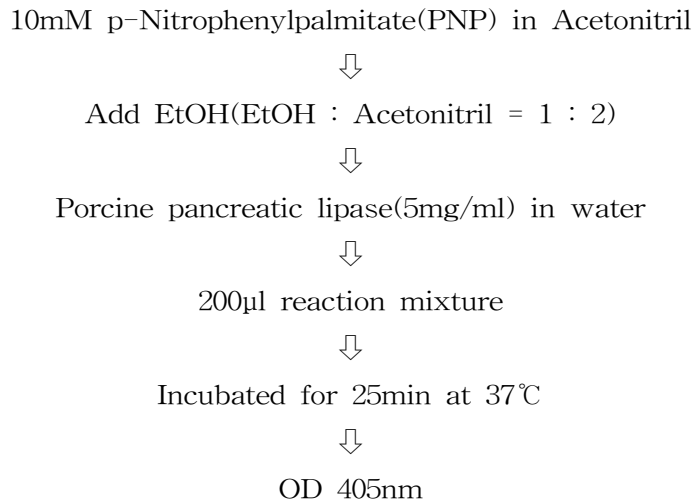


그림 2. Lipase activity 측정방법

표 3. Reaction mixture의 조성

Total reaction mixture - 200μl
Enzyme(porcine pancreatic lipase) - 0.30mg/ml
Sample - 1.0mg/ml,
PNP - 0.167mM
Tris-HCl buffer - 0.061M (pH 8.5)

$$\text{Lipase activity(\%)} = (\text{시료의 OD값} - \text{blank의 OD값}) / \text{대조구의 OD값}$$

다) 체내 지방흡수 저해 효과(동물실험)

(1) 실험동물 및 식이

실험동물은 6주령의 DS rat 수컷 흰쥐를 분양받아 1주일간 고행사료로 적응기간을 주었다. 적응기간 중 물과 고행식은 자유로이 섭취하도록 공급하였고, 식이는 4°C에서 보관하며 사용하였다. 실험동물들은 환경 조절된 사육실에서 분리사육하였고, 각 실험군당 6마리로 하였다.

(2) 분석시료 채취 및 처리

실험식이의 조성은 시료를 10mg/ml의 농도로 경구투여 하였다. 시료 대신에 증류수를 투여한 군을 대조군으로 하였다. 실험동물 1마리 당 올리브기름 0.5ml과 시료 1.0ml을 경구투여 한 후 1시간 간격으로 안와채혈법으로 4시간까지 채혈하였다. 채혈한 혈액은 3000rpm에서 15분간 원심분리 후 혈장을 분리하여 분석시료로 사용하였다. 분리한 혈장은 분석시까지 냉동 보관하였다.

(3) 중성지질 분석

분리한 혈청의 중성지질은 lipoprotein lipase 를 이용한 분석 kit(아산 제약주식회사, 대한민국)로 550nm에서 비색정량하였다.

3. 유자씨 식품소재 및 가공제품 개발

가. 유자씨 중간 식품소재 개발

1) 탈고미 조건

유자씨 추출물(70% EtOH)의 쓴맛을 제거하기 위하여 50g의 유자씨 추출물과 동량의 maltodextrin(DE 9~12)을 첨가하고 여기에 0.5, 1.0ml의 cyclodextrin glucose transferase(CGT)의 일종인 toluzyme(3.0L; Novozymes)을 첨가한 후, 증류수로 11되게 하여 잘 혼합하고 80℃에서 48시간 incubation 시킨 후, 121℃에서 15분간 멸균시켜 유자씨 쓴맛의 개선 효과를 9점법의 관능검사(1점: 안 쓰다.....5점: 보통 쓰다.....9점: 아주 쓰다)를 통하여 조사하였다.

2) 분무건조 조건

유자씨 에탄올 추출물을 cyclodextrin을 부형제로 하여 25brix가 되도록 혼합비를 1:1, 1:2, 1:3, 1:4(w/w)로 혼합한 homogenizer(T25 Basic, IKA, Germany)로 균질액을 제조하였다. 유자씨의 쓴맛을 줄이기 위하여 효소 처리한 추출액을 25brix가 되도록 혼합비를 1:5(16.7%), 1:3(25%)로 혼합하여 균질액을 제조하였다. 균질액을 분무건조기(B-191, Buchi, Swiss)를 이용하여 분말화하였으며, 기기 운용조건은 inlet temperature를 160-170℃로 조절하여 outlet temperature를 80-90℃로 설정하였고, 시료 공급속도는 6ml/min으로 하였다.

나. 유자씨 기름 제조

1) 유자씨 기름의 탈고미 조건

유자씨 기름의 쓴맛을 제거하기 위하여 백음공정과 압착에 의해 얻은 유자씨 기름 50ml에 동량의 activated charcoal(Samchun chemicals)를 첨가하고 완전히 흡착시켜 2시간 방치한 후, 압착하여 유자씨 기름을 분리하였다. Activated charcoal의 재활용 가능성을 알아보기 위해 activated

charcoal을 3차까지 재활용하여 기름을 추출하였다. 추출한 기름을 여과한 후 유자씨 기름의 쓴맛의 개선 효과를 9점법의 관능검사(1점: 안 쓰다.....5점: 보통 쓰다.....9점: 아주 쓰다)를 통하여 조사하였다.

다. 유자씨 가공제품 개발

1) 유자씨 음료

분무건조 유자씨 분말을 이용하여 음료를 제조하였다. 효소처리 방법을 이용하여 탈고미 된 유자씨 추출물을 사용하였으며 유자씨 추출물 함량이 25%인 분무건조 분말을 0.2% 첨가하여 제조하였다.

2) 유자씨 비누

유자씨로부터 추출해낸 기름을 첨가하여 고행비누와 foam 형태의 비누를 제조하였다. 각각 유자씨 기름은 2% 첨가하였다.

3) 미백 크림

분무건조 유자씨 분말을 이용하여 유자씨 크림을 제조하였다. 유자씨 추출물 함량이 25%인 분무건조 분말 4%를 ointment base에 첨가하여 제조하였으며 50℃에서 성분들이 골고루 균질화 될 때 까지 homogenizer를 이용하여 섞어주었다.

제 2 절 연구 수행 결과

1. 유자씨의 식품학적 특성

가. 유자씨의 일반성분

유자씨 수분의 함량은 10.54%였으며, 회분은 2.5%, 조지방은 31.43%, 조단백질은 15.29%, 탄수화물은 40.25%를 차지하였다. 이상과 같은 결과는 유자의 식품학적 특성을 연구한 농수산물유통공사 보고서(1993년)의 결과와 거의 일치하였다.

나. 유자씨 기름의 특성

1) 유자씨 기름의 지방산 조성

유자씨로부터 hexane을 이용하여 기름을 추출하고 가스크로마토그래프로 구성 지방산을 분석한 결과 불포화지방산은 전체 지방산 함량의 76%를 차지하였고 포화지방산은 약 24%인 것으로 나타났다(표 4). 불포화지방산은 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid가 각각 39%, 34.9% 및 1.5%로 대부분을 차지하였으며 palmitoleic acid, cis-10-heptadecanoic acid, cis-11-eicosenoic acid 및 erucic acid는 1%미만인 것으로 나타났다. 포화지방산은 palmitic acid가 가장 많은 18.7%, stearic acid는 4.6%차지하고 있었으며 myristic acid, heptadecanoic acid, arachidic acid, behenic acid 및 lignoceric acid가 소량 존재하는 것으로 나타났다. 일반적으로 citrus 과실에 존재하는 지방은 종실에 축적되어있으며 종실의 지방산 조성은 다른 성분과는 달리 품종에 따른 큰 차이는 보이지 않으며, 주로 oleic, palmitic, linoleic acids로 구성되어있어 우수한 기름자원이 될 소지가 있는 것으로 알려져 있다.

Injection Date : 2/2/2006 1:09:41 PM Seq. Line : 1
 Sample Name : 37mix Location : Vial 1
 Acq. Operator : D.W Seo Inj : 1
 Inj Volume : 1 ㄷ

 Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAT.M
 Last changed : 2/2/2006 1:07:25 PM by D.W Seo
 Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAT.M
 Last changed : 2/3/2006 9:54:31 AM by D.W Seo
 (modified after loading)

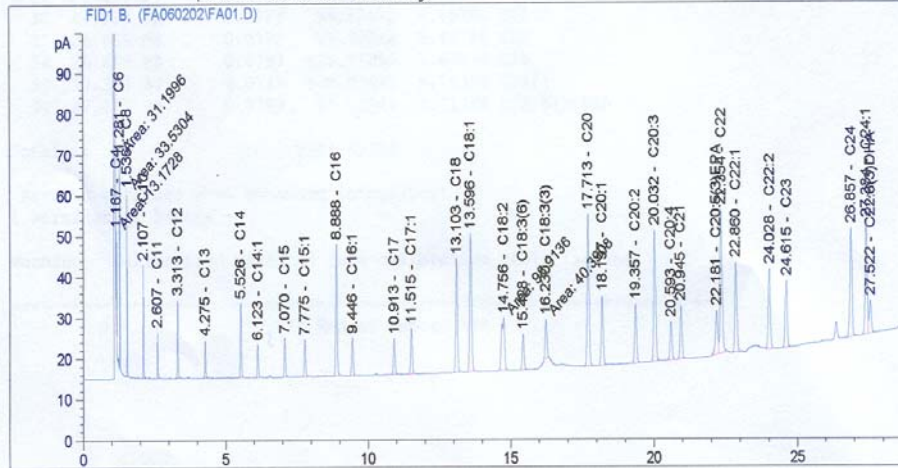


그림 3. 지방산표준품의 GC chromatogram

Injection Date : 2/2/2006 7:34:42 PM Seq. Line : 1
 Sample Name : 1 Location : Vial 2
 Acq. Operator : D.W Seo Inj : 1
 Inj Volume : 1 ㄷ

 Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAT.M
 Last changed : 2/2/2006 7:33:09 PM by D.W Seo
 Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAT.M
 Last changed : 2/3/2006 9:25:43 AM by D.W Seo
 (modified after loading)

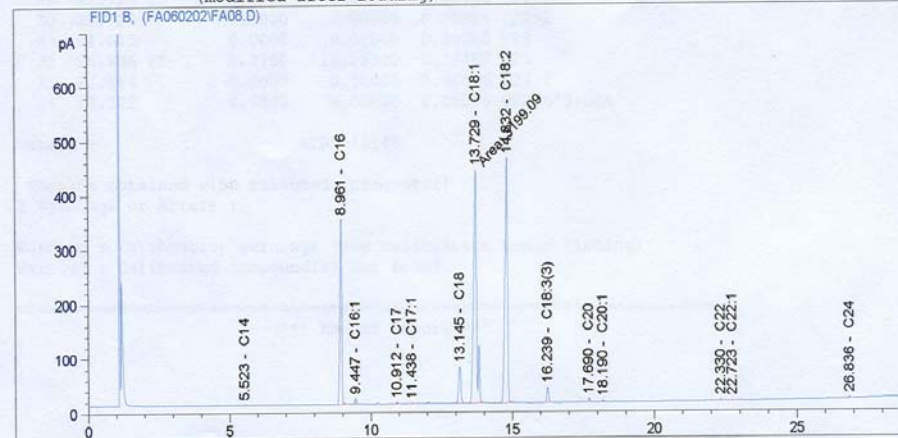


그림 4. 유자씨 기름에 함유된 지방산의 GC chromatogram

표 4. 유자씨 기름의 지방산 조성

지방산	Common Name	평균	표준편차
C14	Myristic Acid	0.03	0.002
C16	Palmitic Acid	18.68	0.423
C16:1	Palmitoleic Acid	0.43	0.012
C17	Heptadecanoic Acid	0.12	0.001
C17:1	cis-10-Heptadecanoic Acid	0.06	0.000
C18	Stearic Acid	4.50	0.050
C18:1	Oleic Acid	38.95	0.224
C18:2	Linoleic Acid	34.92	0.135
C18:3(3)	Linolenic Acid	1.49	0.006
C20	Arachidic Acid	0.37	0.013
C20:1	cis-11-Eicosenoic Acid	0.16	0.008
C22	Behenic Acid	0.11	0.005
C22:1	Erucic Acid	0.05	0.007
C24	Lignoceric Acid	0.13	0.012
합계		100.00	

2) 유자씨 기름의 이화학적 조성

유자씨 기름의 이화학적인 특성을 조사한 결과 표 5와 같은 결과를 얻었다. 특히 과산화물가가 비교적 높은 편이어서 유통기간이 긴 유자씨 기름을 상업적으로 생산하려면 과산화물가를 낮추는 전처리공정이 필요할 것으로 사료된다.

표 5. 유자씨 기름의 이화학적 특성

조사항목	평균	표준편차
수분	0.21	0.016
비중(25℃/25℃)	0.925	0
굴절율(25℃)	1.4738	0
요오드가	100.3	3
산가	4.84	0.035
과산화물가	44.12	0.45
불비누화가	0.41	0.023

3) 유자씨 기름의 항산화 효과

Rancima를 이용하여 유자씨 기름의 항산화 효과 측정 결과 100℃에서 과산화물의 생성 유도시간이 대조구는 6.72시간인 것에 비해 유자씨 기름 1% 첨가구에서 6.88시간, 2% 첨가구에서 7.00시간으로 나타나 유자씨 기름 첨가에 의해 산화가 지연되는 효과가 있는 것으로 측정 되었다(표 6). 이러한 결과는 유자씨 기름에 함유된 다양한 항산화 성분에 기인한 것으로 생각되어진다.

표 6. 유자씨 기름의 항산화 효과

	Induction time(hr.)
대조구	6.72
BHA	7.08
BHT	7.17
유자씨 기름 1% 첨가구	6.88
유자씨 기름 2% 첨가구	7.00

유자씨 기름은 고미가 너무 강하여 그 자체로는 상용화가 불가능하다. 유자씨 기름을 콩기름 등 일반 식물성 기름에 2% 정도 첨가하였을 때는 맛과 향에 큰 영향을 미치지 않았으며 오히려 유자 특유의 향을 부여하여

기호적으로도 나쁘진 않았다. 아울러 위에서 관찰된 바와 같이 유지의 산패를 지연시키는 효과가 있어 유자씨 기름을 소량 첨가한 혼합유로의 활용 가능성이 클 것으로 기대된다.

유자씨 기름의 고미를 제거하기 위하여 백음공정과 압착에 의해 얻은 유자씨 기름에 동량의 activated charcoal를 첨가하여 고미성분의 제거를 시도하였다. 활성탄에 의한 유자씨 기름의 쓴맛 제거 정도를 알아보기 위하여 9점 척도를 이용하여 관능검사를 실시하였다. 관능 검사 결과 활성탄 처리군에서 4.5점으로 쓴맛은 어느 정도 제거된 것으로 나타났다. 또한 활성탄의 재활용 정도를 알아보기 위하여 활성탄을 2회, 3회까지 재활용하여 사용한 결과 2차 재활용 시 6.8점, 3차 재활용 시 8.3점으로 나타나 재활용 시 쓴맛제거 효과는 크게 떨어지는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 유자씨 기름의 상용화에 가장 걸림돌이 되는 고미를 저하시키기 위한 방법으로 activated charcoal을 이용한 방법을 시도하여 보았으나 효력면이나 경제성 면에서 특별한 효과가 없어 앞으로 유자씨 기름의 탈고미에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 간주된다.

2. 유자씨의 각종 생리활성

가. Polyphenol농축 분획

유자씨에서 일반적으로 생리활성이 강하다고 알려진 flavonoids를 포함한 polyphenol 화합물이 농축된 분획을 얻기 위해, 지방이 제거된 유자씨를 100% methanol, 70% ethanol 및 열수를 이용하여 추출하여 특성을 비교하여 보았다. 먼저, 유자씨를 100% methanol을 이용하여 추출하였을 경우 추출 수율은 약 11.4%였으며 70% ethanol 추출물의 경우 13.1%, 열수 추출물의 경우 9.7%였다.

각각의 용매별 유자씨 추출물의 total polyphenol 함량은 아래 그림 5와 같이 methanol 추출물에서 34.9mg/g dry weight로 가장 높았으며 70% ethanol 추출물은 24.7mg/g dry weight, 열수추출물은 14.9mg/g dry weight로 측정되었다.

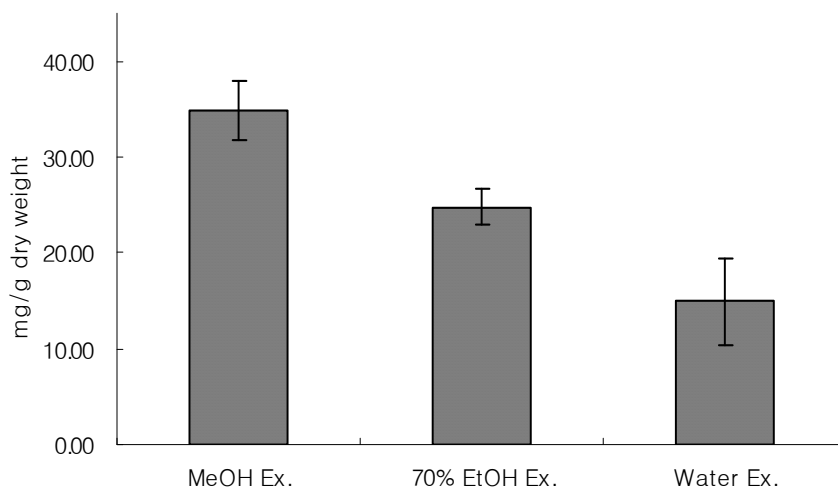


그림 5. 유자씨 추출물의 total polyphenol 함량

또한 polyphenol 화합물외에도 nomilin과 limonin과 같은 citrus 특유의 triterpenoid의 함량을 각 fraction 별로 HPLC를 이용하여 조사하였다(그림

6).

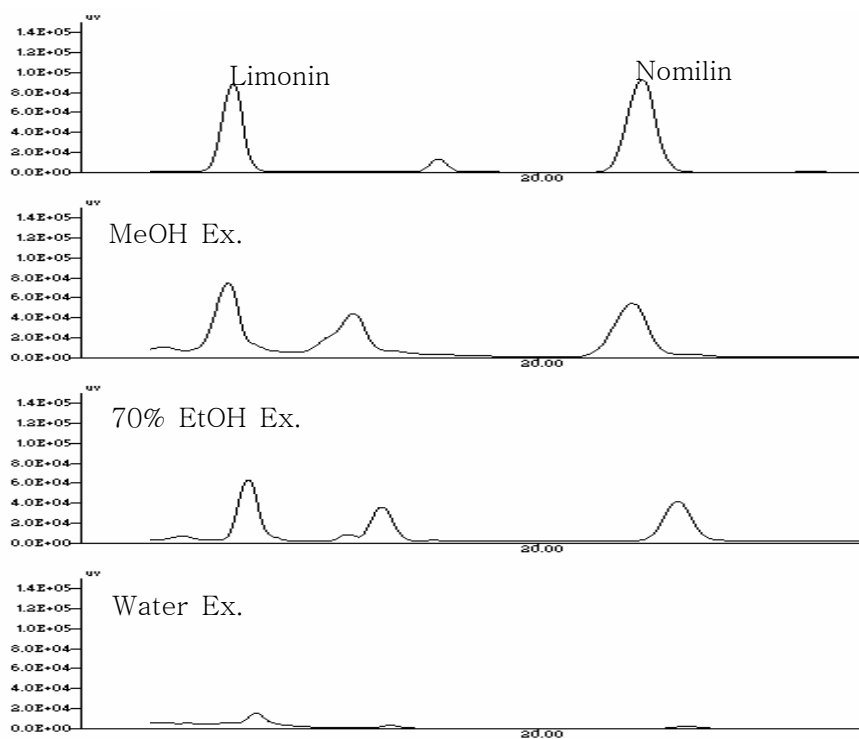


그림 6. HPLC chromatogram을 이용한 유자씨 추출물의 triterpenoid 조성

분획별 triterpenoid 함량 분석 결과, 그림 7과 같이 methanol 추출물에서 limonin은 23.5mg/g dry weight, nomilin은 14.2mg/g dry weight으로 가장 많은 것으로 나타났다.

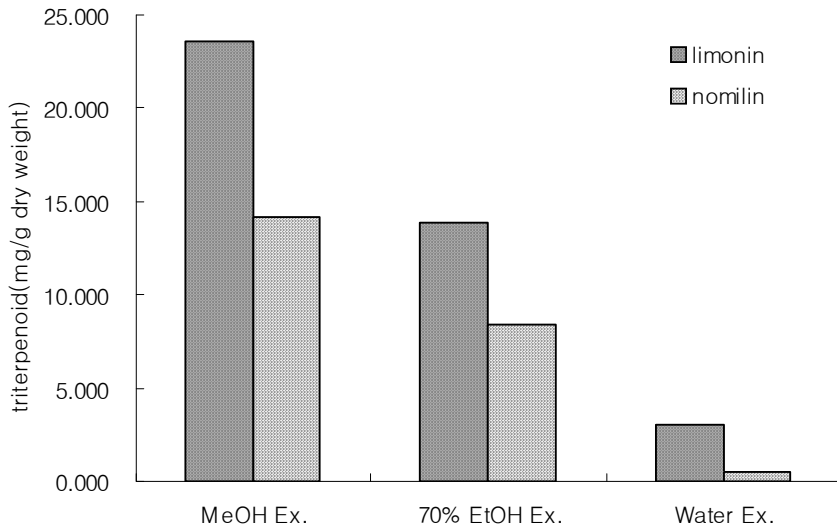


그림 7. HPLC chromatogram을 이용한 유자씨 추출물의 triterpenoid 함량

나. Polyphenol농축 분획의 생리활성

1) 항산화 활성

가) DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능 측정방법의 원리는 DPPH는 radical을 갖고 있는 물질로써 ethanol 용액에서는 보라색으로 발색되는데 항산화 활성을 갖는 물질 존재하에서는 DPPH의 radical이 소거되어 탈색되는 점을 측정하는 것이다. 유자씨 methanol 추출물의 경우 DPPH의 radical 소거능에 대한 IC₅₀값이 약 0.28mg/ml에서 측정되었으나 70% ethanol 추출물과 열수추출물의 경우 각각 0.31mg/ml 과 0.83mg/ml로 나타나 methanol 추출물의 DPPH의 radical 소거능이 가장 높은 것으로 나타났다.

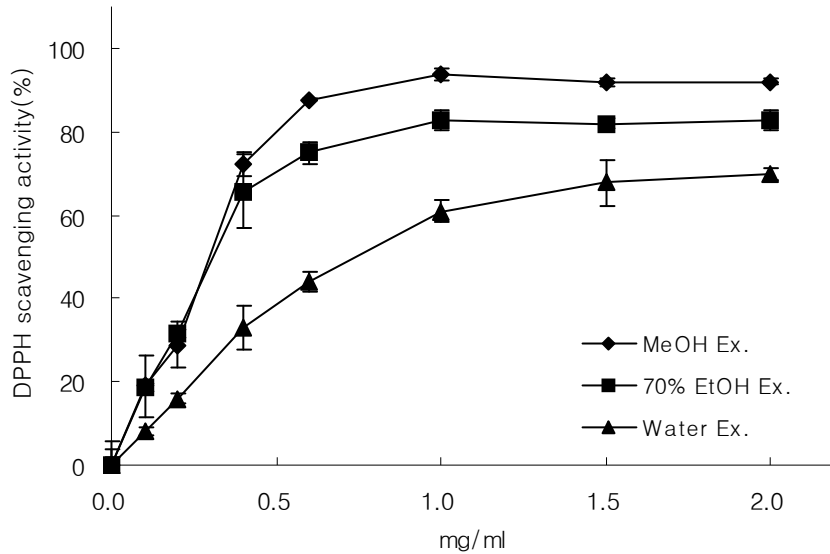


그림 8. 유자씨 추출물의 DPPH 소거능

앞서 관찰한 바와 같이 methanol 추출물에서의 total polyphenol 함량이 가장 높았으며 통상적으로 항산화력이 우수하다고 알려진 이들 polyphenol 화합물의 함량과 DPPH radical 소거능과 같은 항산화력과의 상관관계가 유자씨 추출물에서도 관찰되었다.

다음 단계로 methanol 추출물을 ether, ethyl acetate, butanol, water 순으로 용매의 극성에 따라 fractionation하여 각각의 fraction의 total polyphenol의 함량 및 DPPH 소거능을 조사하였다. 먼저 HPLC로 polyphenol 화합물의 조성을 살펴본 결과 용매의 극성에 따라 hydrophilic과 hydrophobic한 polyphenol 화합물의 조성이 다를 수 있었다(그림 9).

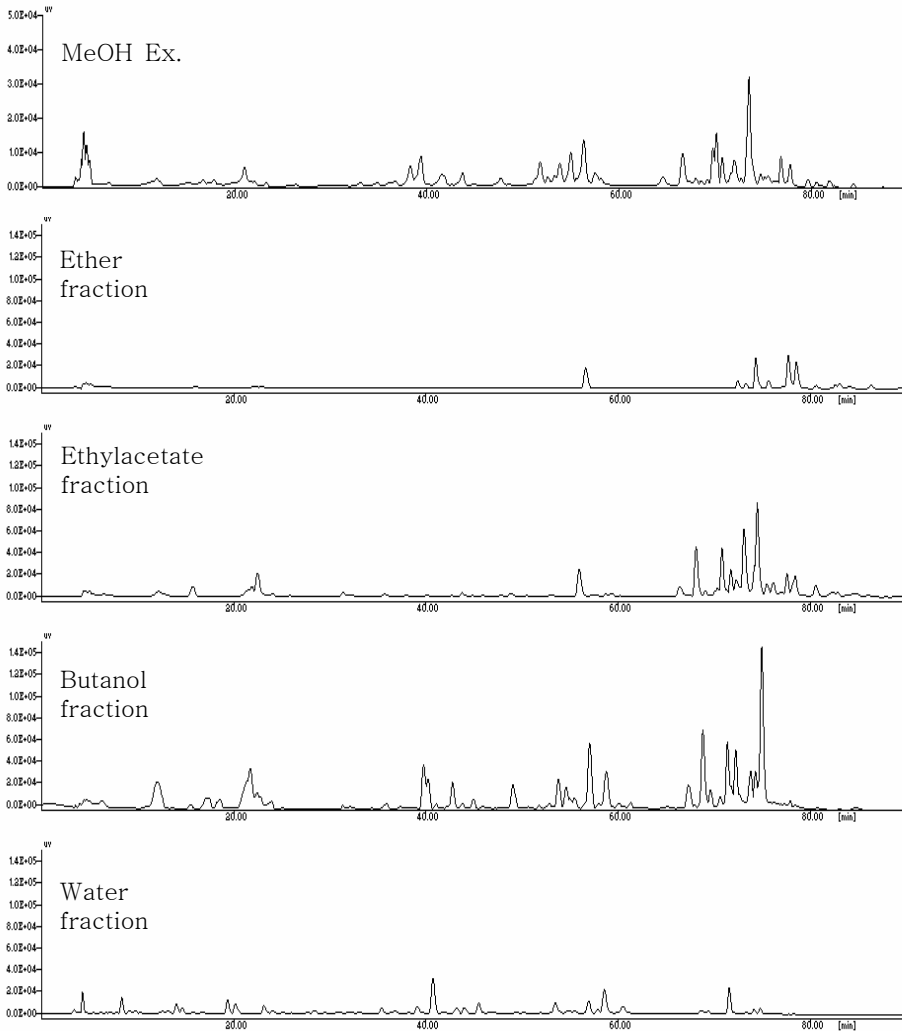


그림 9. 유자씨 MeOH fraction별 polyphenol 화합물 구성

유자씨 methanol 추출물의 각각의 fraction별 total polyphenol 함량 측정 결과 butanol fraction에서 80.60mg/g dry weight 으로 가장 높은 total polyphenol 함량을 나타냈으며 butanol > ethyl acetate > water > ether 순이었다(그림 10).

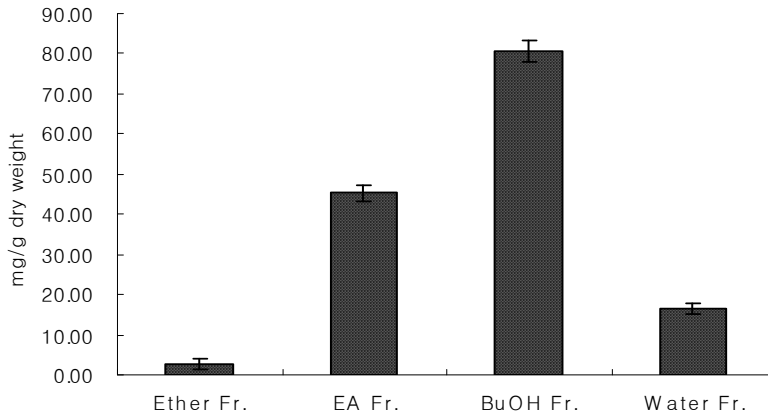


그림 10. 유자씨 MeOH fraction별 total polyphenol 함량

각각의 fraction별의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과에서도 polyphenol 함량이 가장 높았던 butanol fraction이 가장 높고 다음으로 ethyl acetate fraction에서 높게 나타났으며, 각 fraction 공히 농도의존적으로 radical 소거능이 있는 것으로 나타났다. 또한 각 fraction의 DPPH radical 소거능과 polyphenol 함량과는 특정농도구간 범위(500ppm 이하)에서 비례하는 관계를 보이는 것으로 나타났다(그림 11).

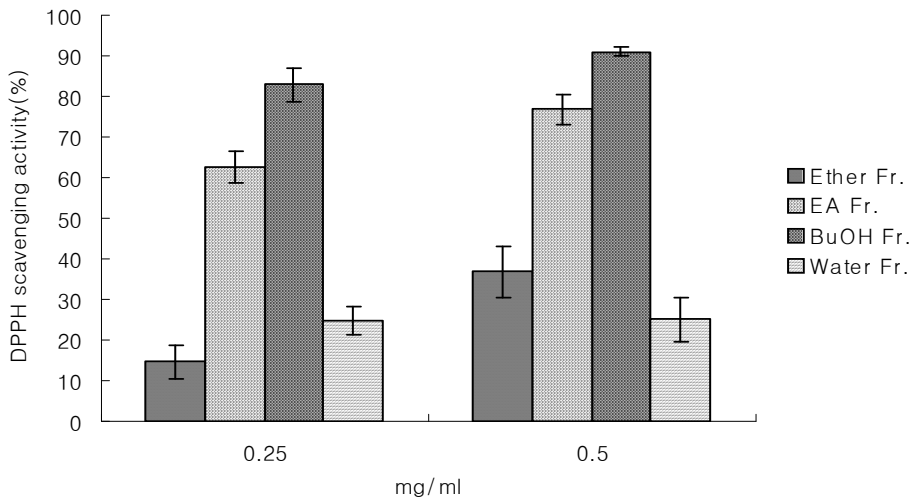


그림 11. 유자씨 추출물 fraction별 DPPH 소거능

나) ABTS anion 소거능

또 다른 항산화측정법으로서 ABTS anion 소거능을 측정한 결과, 70% ethanol 추출물에서 IC₅₀값이 0.1mg/ml로 가장 높게 나타났으나 methanol 추출물의 경우에도 약 0.12mg/ml로 나타나 큰 차이는 없는 것으로 나타났다.

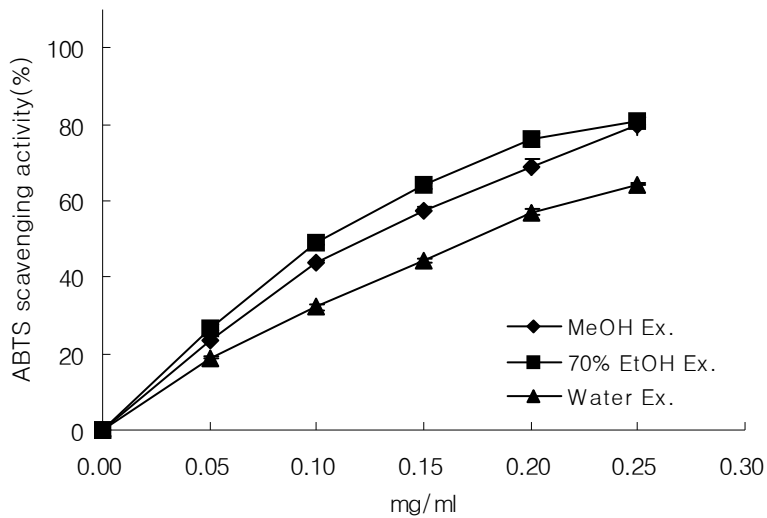


그림 12. 유자씨 추출물의 ABTS anion 소거능

유자씨의 각 fraction별 ABTS anion 소거능 측정 결과에서도 DPPH radical 소거능의 결과에서 볼 수 있듯이 각 fraction 공히 농도의존적으로 ABTS anion 소거능을 보였으며 butanol fraction에서 0.05mg/ml의 농도에서도 약 58.8%로 가장 높게 나타났으며 다음으로 ethyl acetate fraction 0.05g/ml에서 약 34.5%의 ABTS 소거능을 보였다(그림 13).

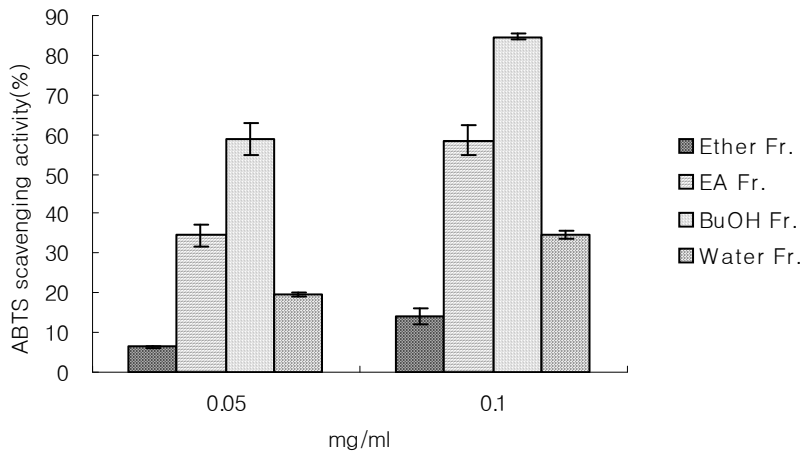


그림 13. 유자씨 MeOH fraction별 ABTS 소거능

다) β -carotene bleaching assay

β -carotene bleaching assay 결과 1시간 경과시 대조구에서는 이미 470nm에서 OD값이 약 0.4까지 떨어졌으나 유자씨 methanol추출물의 경우 4시간이 경과되어도 OD값이 약 1.3 정도로 밖에 떨어지지 않은 것을 알 수 있었다(그림 14). β -carotene bleaching의 메카니즘은 linoleic acid가 산화됨으로써 생성된 free radical들이 β -carotene을 산화시킴으로써 나타나는 현상으로 산화로 인한 β -carotene의 오렌지색의 제거 현상을 spectrophotometer로 측정하여 나타내었다. 유자씨 추출물을 첨가할 때, linoleic acid의 산화가 억제되어 free radical의 형성을 방해함으로써 β -carotene의 오렌지색이 제거되는 것을 억제한 것으로 판단되어졌다.

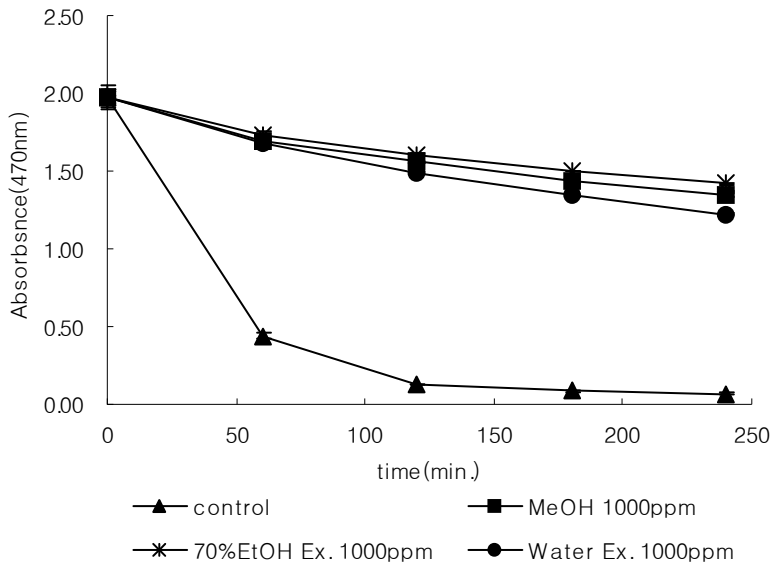


그림 14. 유자씨 추출물의 β -carotene bleaching 효과

유자씨 methanol 추출물의 각각의 fraction별 β -carotene bleaching assay 결과에서는 butanol fraction과 ethyl acetate fraction이 가장 항산화력이 높은 것으로 나타나 역시 polyphenol 함량이 높을수록 항산화력이 높은 것으로 간주되었다(그림 15).

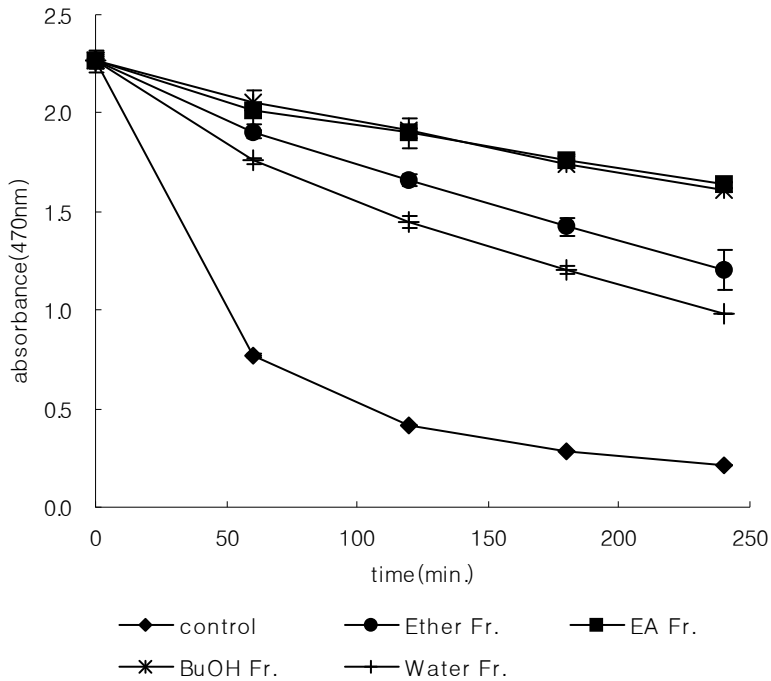


그림 15. 유자씨 fraction별 β -carotene bleaching 효과

이상의 결과에서와 같이 유자종실의 polyphenol 농축분획을 추출한 후, 각종 항산화 효과를 측정해 본 결과, polyphenol의 함량이 높을수록 항산화 효과가 우수하다는 결과를 얻을 수 있었으며 특히 상대적으로 hydrophobic한 flavonoids의 역할이 중요하게 작용되었을 것으로 간주된다.

생체내에서 산화스트레스에 의해서 과잉으로 생성된 활성산소 등의 유리기는 세포막 인지질의 불포화지방산과 혈중의 지질을 산화시키고 단백질과 핵산에도 장애를 주어 최종적으로 암을 비롯한 당뇨병, 동맥경화, 허혈성 심장질환 및 뇌질환을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 유자씨 추출물의 우수한 항산화력은 각종 만성질환의 예방에 유효한 영향을 미칠 것으로 기대된다.

2) 면역 활성화

가) 유자씨 추출물의 대식세포 생육촉진 효능

대식세포(macrophage)는 외부로부터의 침입균 또는 이물질에 비특이적으로 대응하여 H_2O_2 , NO 등을 분비하여 사멸시키는 등 체내 면역시스템의 유지에 중추적인 역할을 담당하고 있다. 따라서 대식세포의 활성을 높일 수 있는 성분을 식품원으로 섭취하면 원활한 신진대사와 면역력을 증강시켜 신체 건강성 유지에 중요한 역할을 할 수 있을 것이다. 가장 항산화력이 높았던 유자씨 MeOH 추출물을 재차 fractionation 시킨 후 이들의 첨가가 macrophage viability에 미치는 영향을 살펴본 결과, macrophages의 viability를 증가시키는 lipopolysaccharide(LPS)처리구와 비교하였을 때, 대체적으로 이들 추출물을 250ppm 또는 500ppm 첨가함으로써 macrophage의 생육이 LPS첨가군보다 오히려 더 효과적인 것으로 나타났으며 또한 농도의존적인 경향을 나타내었다(그림 16).

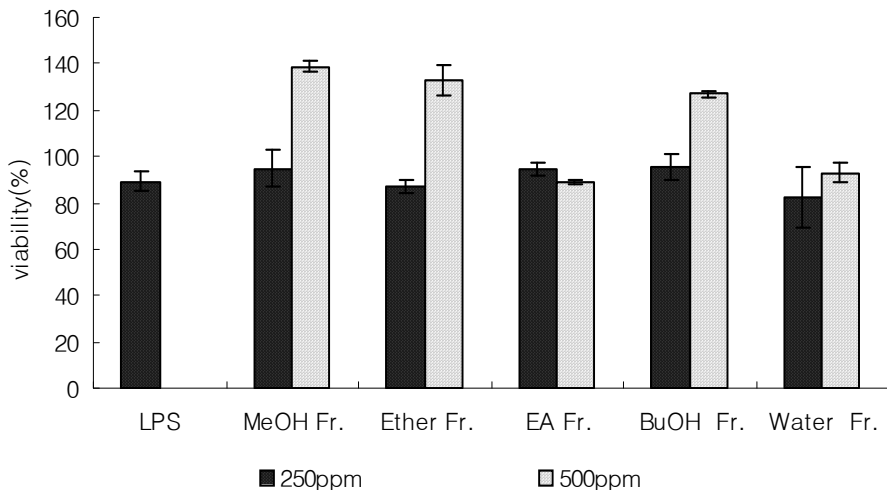


그림 16. 유자씨 MeOH fraction의 첨가가 macrophage의 viability에 미치는 영향

유자씨 MeOH fraction의 첨가가 macrophage가 생성하는 H₂O₂, NO, TNF-α 등 macrophage activity의 지표가 되는 물질들의 생성능의 변화에 관하여 연구하였다. H₂O₂의 생성은 유자씨 추출물을 첨가함으로써 LPS 처리군과 비슷한 수준으로 증가하는 경향을 보였다(그림 17).

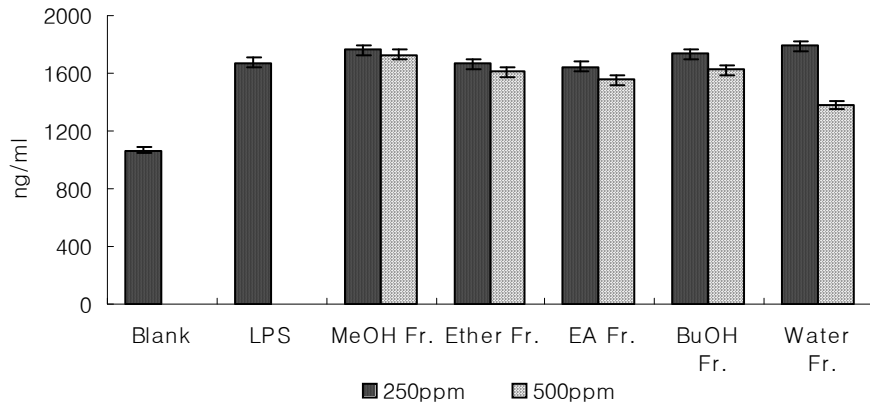


그림 17. 유자씨 MeOH fraction 첨가가 macrophage의 H₂O₂ 생성능에 미치는 영향

H₂O₂의 결과와는 달리 유자씨 MeOH 추출물의 NO 생성능에 미치는 영향은 그리 크지 않았으며 ether 추출물을 250ppm 첨가한 경우와 butanol 추출물의 경우에만 유의적으로 macrophage로부터 NO의 증가를 유도하였다(그림 18).

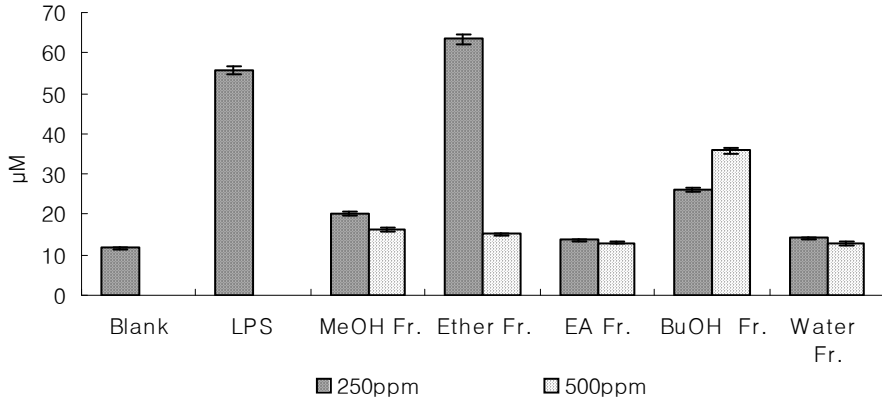


그림 18. 유자씨 MeOH fraction의 첨가가 macrophage의 NO생성능에 미치는 영향

한편, 유자씨 MeOH 추출물의 첨가가 macrophage로부터 TNF- α 의 생성능 변화에는 아무런 역할을 하지 못하는 것으로 간주된다(그림 19).

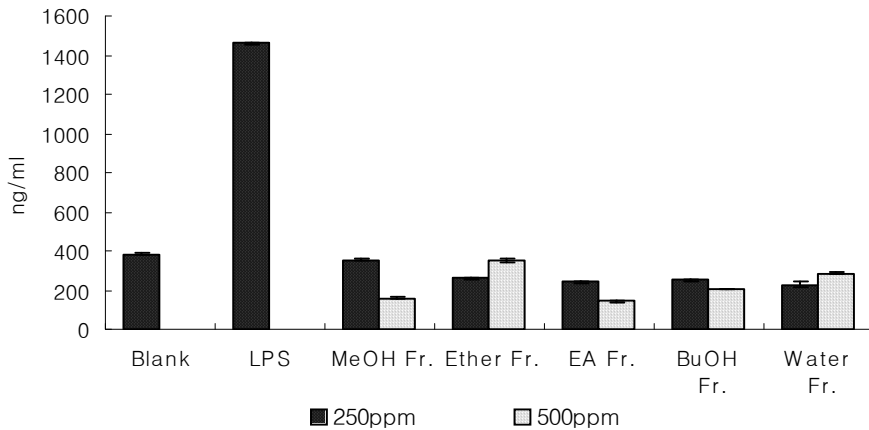


그림 19. 유자씨 MeOH fraction의 첨가가 macrophage의 TNF- α 생성능에 미치는 영향

이상과 같이 유자씨 추출물의 첨가가 대식세포의 활성화나 생육에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 가능성이 높을 것으로 기대되어진다.

나) 경구투여된 유자씨 추출물의 암세포 생육억제 효과

유자씨 70% ethanol 추출물의 경구투여가 암세포 생육억제에 미치는 영향을 연구하기 위해 유자씨 추출물을 C57BL/6 mice에 15일동안 경구투여시키고 복강에서 추출된 macrophage를 melanoma cell인 B16과 같이 incubation 시켜 macrophage에 의한 암억제효과를 연구하였다. B16 cell은 macrophage가 생성하는 NO나 TNF- α 에 sensitive한 것으로 알려져 유자씨 추출물의 경구투여가 macrophage의 활성화에 미치는 영향을 측정할 수 있다. 그림 20에서 보여진 바와 같이 식염수를 매일 경구투여한 control군(1)의 복강 내 macrophage는 B16 cell에 대하여 19% 생육저해효과를 나타내었으며, macrophage의 활성화촉진제로 알려진 LPS를 macrophage cell에 주입 후, B16 cell의 생육억제 정도를 조사한 군에서는 약 35%의 생육억제 효과가 나타났다(2). 유자씨 추출물을 매일 경구투여한 군(3)에서는 control에 비해 월등히 높은 macrophage의 B16 cell에 대한 생육억제(31%)가 관찰되었으므로 유자씨 추출물을 경구투여함으로써 체내 암세포의 성장을 어느 정도 억제할 수 있는 효력이 있을 것으로 기대되어진다.

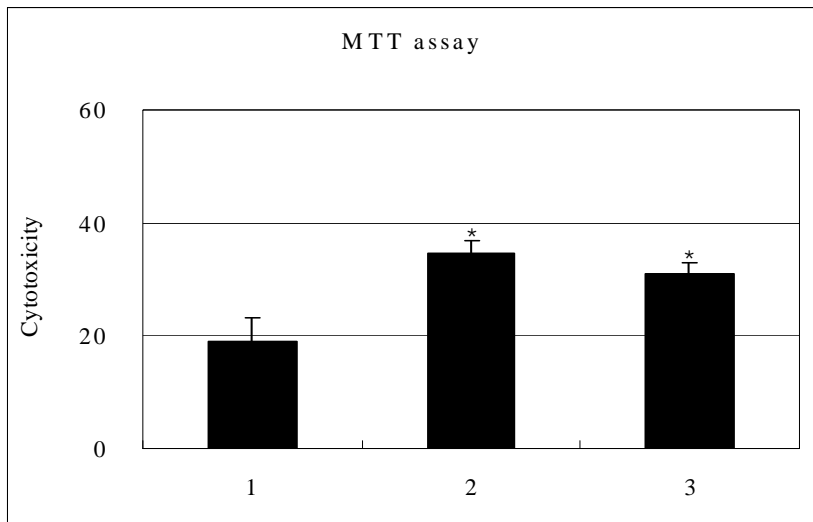


그림 20. 유자씨 경구투여의 B16 cell에 대한 cytotoxicity

다) 유자씨 추출물의 T-cell 활성화

유자씨 추출물의 human T lymphoblast인 MOLT-4 cell에 대한 activity를 조사하기 위하여 각 추출물을 500ppm 첨가하고 24시간 또는 48시간 배양시켰으며 각 추출물 공통으로 24시간 배양으로는 T-cell의 viability에 영향을 미치지 않았으며, 48시간 배양하였을 때는 물 추출물, butanol 추출물, methanol 추출물의 첨가가 T-cell의 viability를 증가시키는 것으로 나타났다 (그림 21). 특히 methanol 추출물에서 농도 의존적으로 뛰어난 T-cell 증식효과를 나타내었다(그림 22).

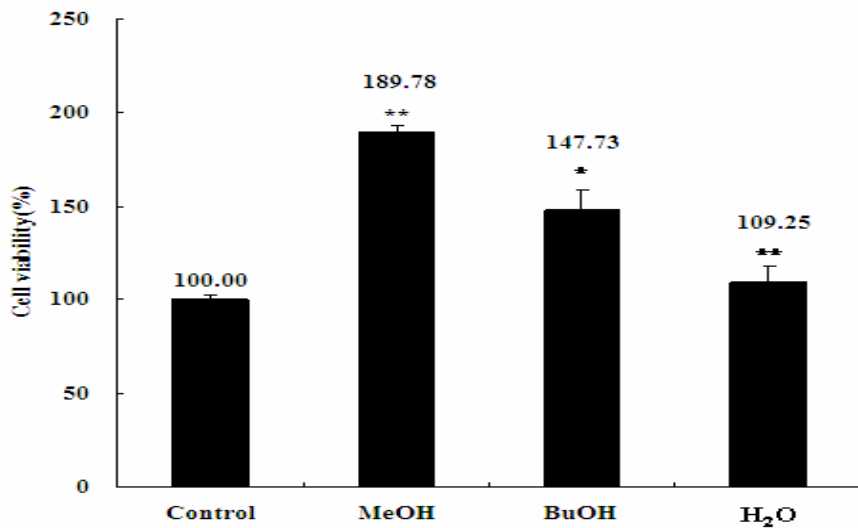


그림 21. 유자씨 추출물이 T-cell viability에 미치는 영향

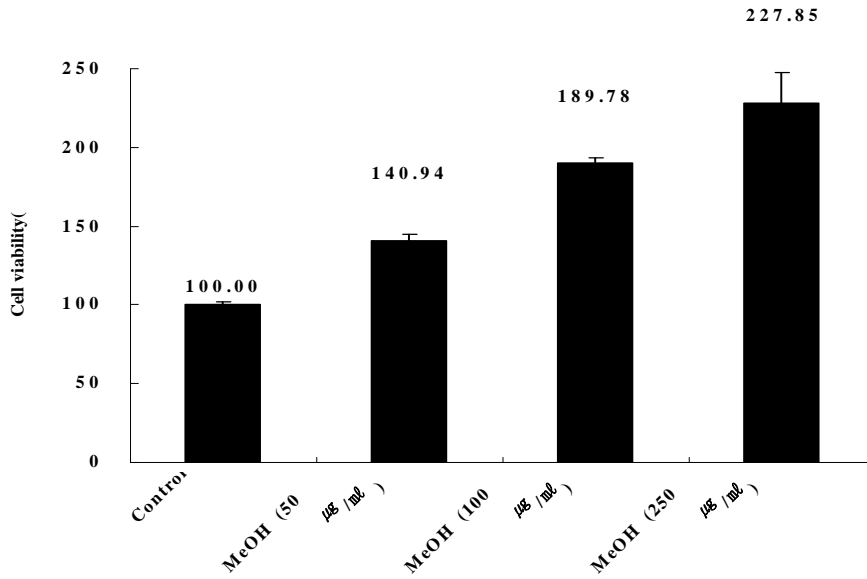


그림 22. 유자씨 methanol 추출물의 T-cell viability에 미치는 영향

유자씨 추출물의 첨가가 T-cell의 interleukin-2(IL-2)의 증폭에 미치는 영향을 조사한 결과, T-cell의 viability 결과와는 달리 triterpenoid 추출물을 첨가하여 24시간(lane 13) 또는 48시간(lane 14) 배양한 실험군이 IL-2의 발현을 가장 효과적으로 증폭시키는 결과를 보였다(그림 23).

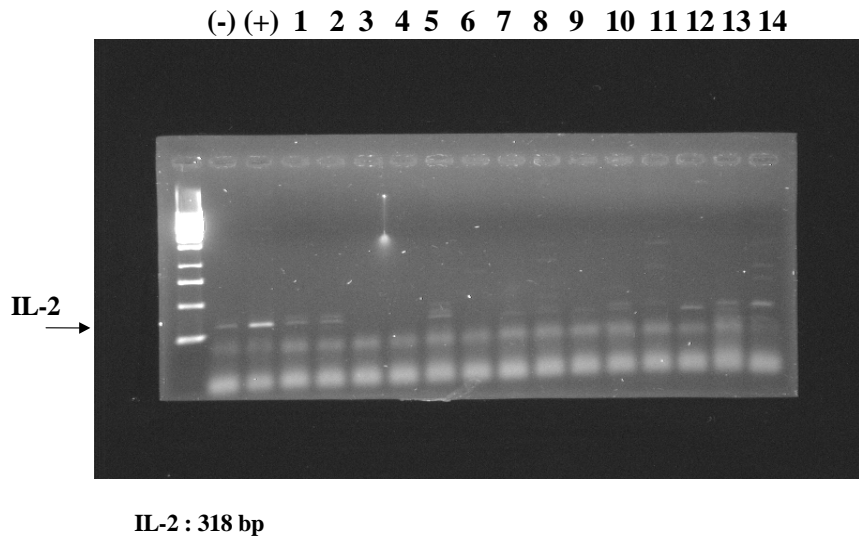


그림 23. 유자씨 추출물이 T-cell의 IL-2 발현에 미치는 영향

이상의 결과에서 볼 수 있듯이 유자씨 추출물이 면역 system에서 중추적인 역할을 하는 macrophage와 T-cell 등의 활성을 뚜렷이 증가시키는 활성이 관찰되어 이를 이용한 면역활성 증진용 식품소재의 개발이 가능하리라 사료된다.

3) 항암 활성

유자씨에 함유된 limonin, nomilin, limonen, hesperidin 등은 뛰어난 발암억제 효과가 있는 것으로 보고되고 있어 유자씨 추출물로부터 항암효과가 기대되어진다. 본 연구에서는 유자씨 추출물의 유방암, 대장암, 백혈병, 임파종양세포 등에 대한 증식 억제 효과를 관찰하였다.

유자씨 MeOH 추출물의 유방암세포(MCF-7)에 대한 생육억제효과를 조사한 결과, ether와 ethyl acetate fraction에서 1000ppm이상 첨가 시 약 80%와 70%의 유방암 세포 생육억제효과가 나타났다(그림 24).

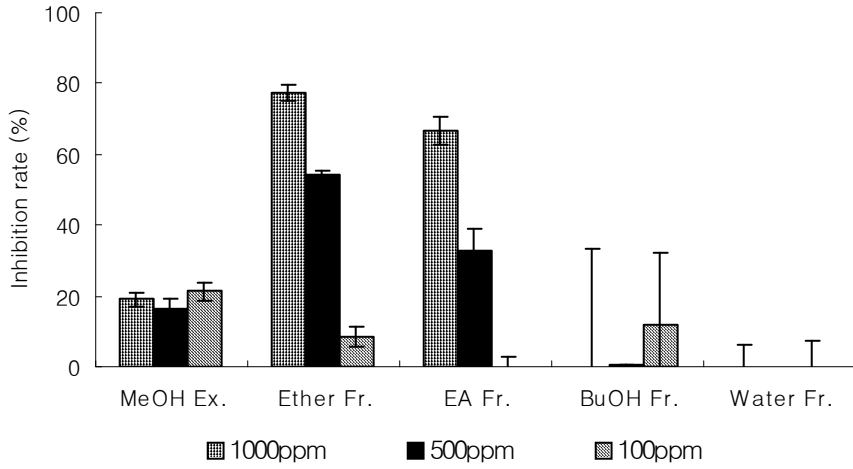


그림 24. 유자씨 추출물의 유방암 억제효과

대장암 세포(HT29)의 생육억제 효과는 ether fraction을 1000ppm 첨가 시 80%이상의 생육억제효과가 관찰되었으며 ethyl acetate fraction에서도 약 50%정도의 생육억제효과가 관찰되었다(그림 25).

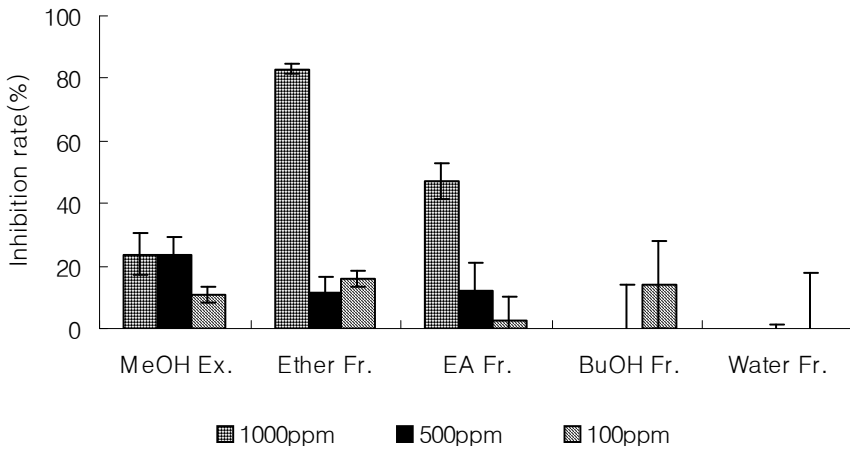


그림 25. 유자씨 추출물의 대장암(HT29) 억제효과

대장암 세포주인 WiDr의 생육억제에 대한 유자씨 추출물의 첨가효과는 나타나지 않은 것으로 사료 된다(그림 26).

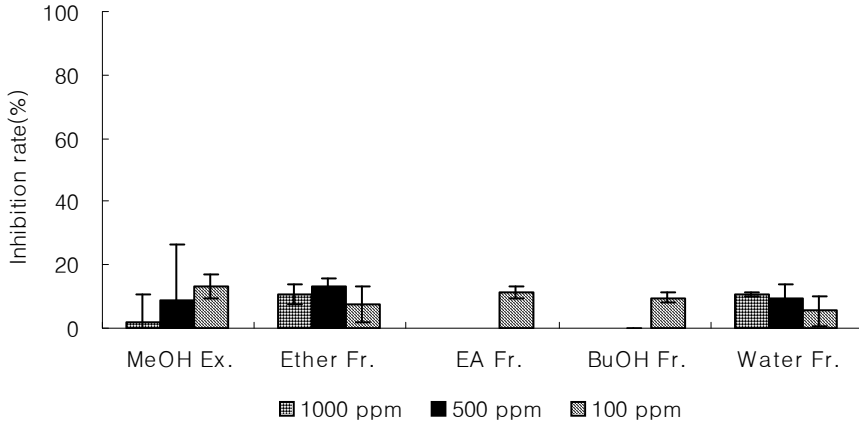


그림 26. 유자씨 추출물의 대장암(WiDr) 억제효과

간암세포주인 HepG-2 억제에 대한 유자씨 추출물의 첨가효과도 1000ppm이하에서 20%이하로 미미한 것으로 사료 된다(그림 27).

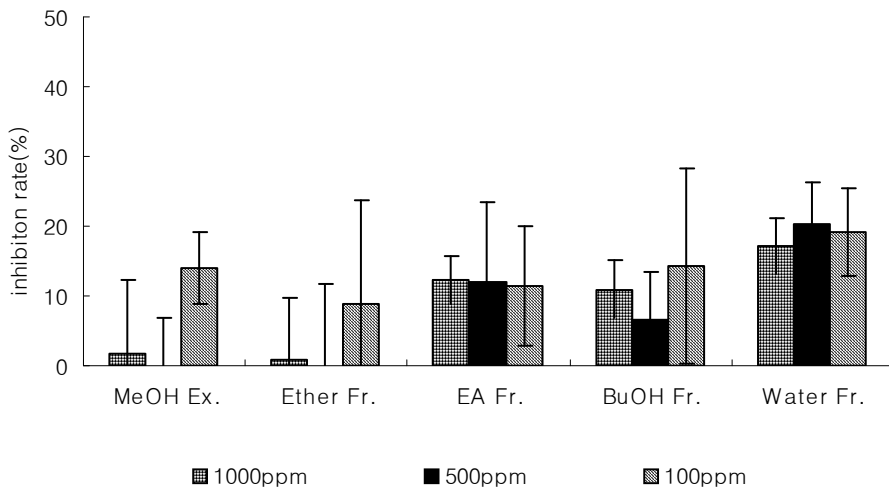


그림 27. 유자씨 추출물의 간암 억제효과

또한 백혈병 세포주인 L1210 억제에 대한 유자씨 추출물의 첨가효과는 나타나지 않은 것으로 사료 된다(그림 28).

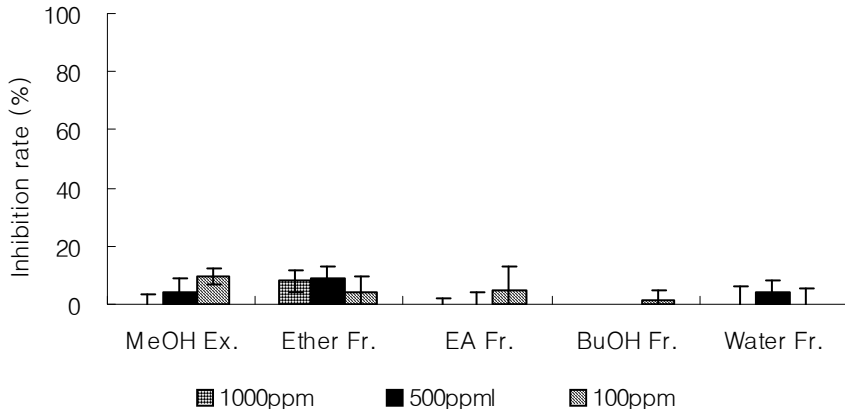


그림 28. 유자씨 추출물의 백혈병 억제효과

임파종양 세포(P388D1)의 생육억제 효과는 ethyl acetate fraction을 1000ppm 첨가 시 약 80%의 생육억제효과가 관찰되었다(그림 29).

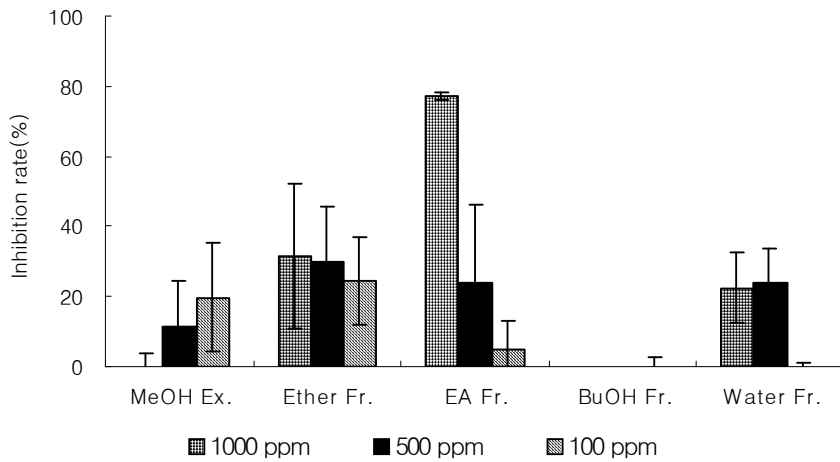


그림 29. 유자씨 추출물의 임파종양 억제효과

이상의 결과에서 볼 수 있듯이, polyphenol 화합물들이 각종 항암효과를 발휘한다고 보고되어 있으나, 본 실험에서의 유자씨 추출물은 각종 종양 세포에 대한 억제 효과가 polyphenol 화합물의 함량과 뚜렷한 상관관계가 없는 것으로 사료되며 특히 ether나 ethyl acetate fraction에 있는 다소 hydrophobic한 성분들이 항암효과에 중요한 역할을 하는 것으로 사료되나 차 후 연구를 통하여 이에 대한 좀 더 구체적이고 명확한 구명이 필요하리라 사료된다.

4) 항균 활성

유자씨 추출물과 흡사한 조성 및 용도를 가질 것이라고 생각되는 자몽씨 추출물은 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*에 대하여 항균효과가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 유자씨 추출물을 4종류의 병원균주와 여드름균인 *Propionibacterium acnes*의 배양시 함께 첨가하여 생육저해효과를 관찰하였을 때, methanol추출물의 경우 *S. aureus*에 대해서만 생육저해효과를 나타내었으며 500ppm 이상 첨가 시 90%에 가까운 생육억제율을 나타내었다(그림 30). *E. coli*나 *L. monocytogenes*, *P. acnes*에 대해서는 항균효과가 관찰되지 않았다.

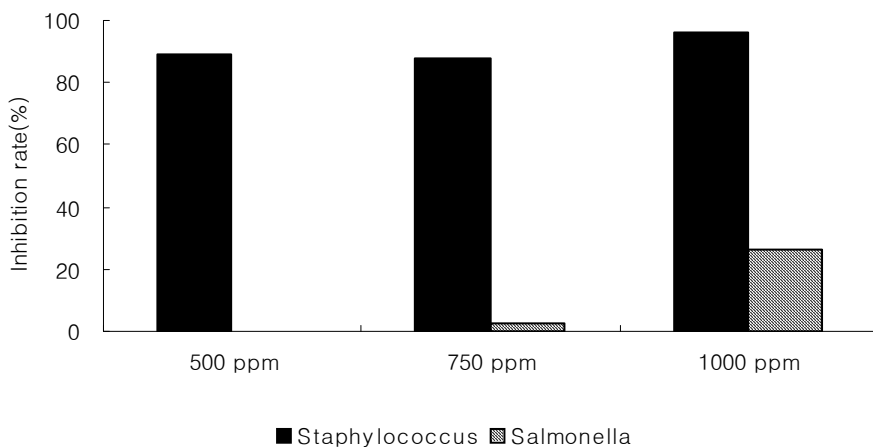


그림 30. 유자씨 methanol추출물의 *S. aureus*와 *S. typhimurium*에 대한 항균효과

우수한 항균 효과를 보인 methanol추출물의 각 fraction별 *S. aureus*에 대한 항균효과를 연구한 결과, 특히 ethyl acetate fraction에서 농도의존적으로 뛰어난 항균 효과가 나타났다.(그림 31)

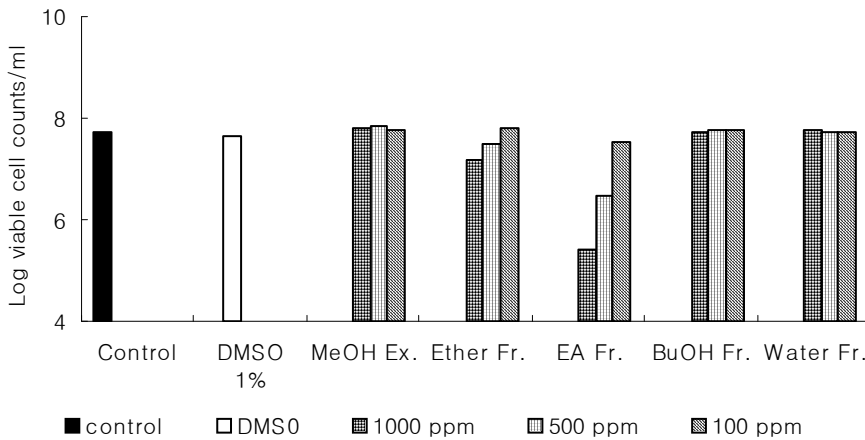


그림 31. 유자씨 methanol추출물의 각 분획별 *S. aureus*에 대한 항균효과

다. Triterpenoid함유 분획

유자씨로부터 triterpenoids를 추출하기 위하여 탈지된 유자씨를 acetone으로 추출하는 방법, methanol로 추출 후 methylene chloride로 재차 추출하는 방법, 그리고 탈지 유자씨로부터 methylene chloride로 추출하는 방법 등으로 triterpenoids 추출물을 얻었다. 각 fraction의 triterpenoids의 함량을 측정된 결과, methanol로 추출한 후, methylene chloride로 재차추출한 fraction에서 유자씨의 주요 triterpenoids인 nomilin과 limonin이 가장 효율적으로 추출되었으며, 추출물에서 이들 두 triterpenoid가 차지하는 비율은 각각 37%와 23%였다. 이 fraction을 이용하여 유자씨 triterpenoids에 대한 생리활성을 연구하였다.

라. Triterpenoid 함유 분획의 생리 활성

1) 항암 활성

유자씨 triterpenoid 추출물의 종양 세포에 대한 생육억제효과를 조사한 결과, 임파 종양 세포(P388D1)에 대해서 500ppm 첨가시 50% 이상의 생육억제효과가 나타났으며, 그 외의 종양 세포에 대한 생육억제효과는 나타나지 않는 것으로 사료 된다(그림 32)

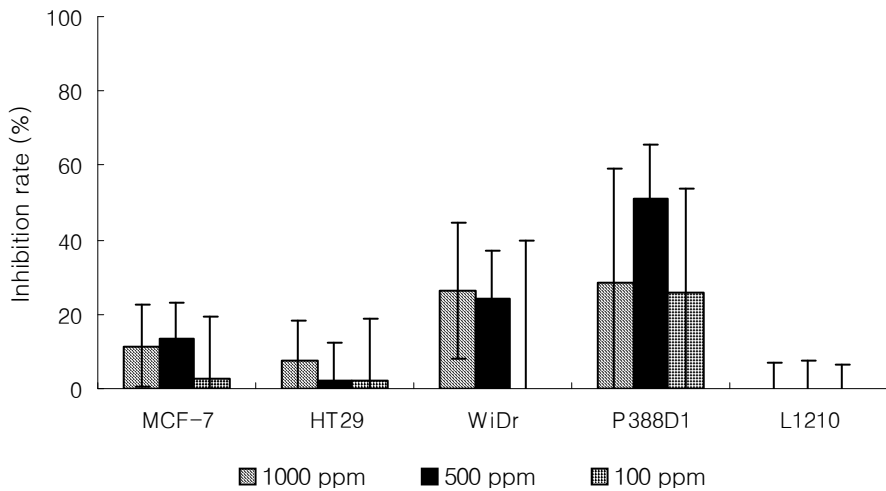


그림 32. 유자씨 Triterpenoid 추출물의 항암 활성

2) 항균 활성

유자씨 triterpenoid 추출물의 *S. aureus* 에 대한 항균효과를 연구한 결과 높은 항균효과는 나타나지 않는 것으로 사료된다(그림 33).

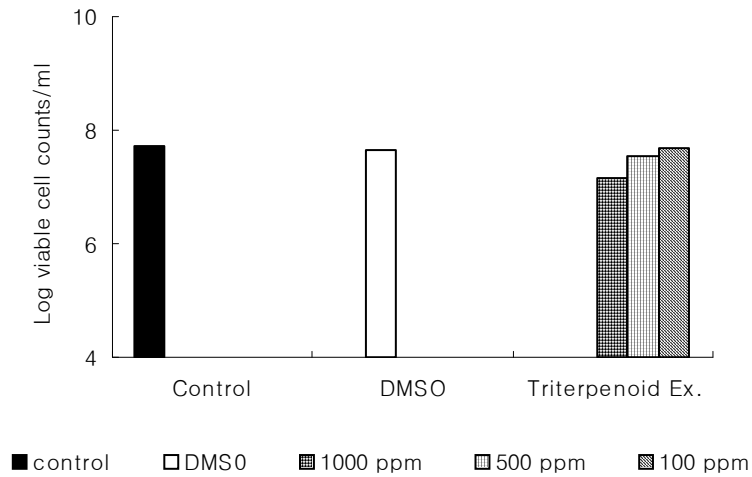


그림 33. 유자씨 triterpenoid 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균 효과

3) 피부 미백 효과

본 연구에서는 유자씨 triterpenoid추출물의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16/F1 melanoma cell line을 이용하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16/F1 melanoma cell line에 유자씨의 triterpenoid 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 다음 멜라닌 생성량을 측정한 결과 그림 34와 같이 triterpenoid 추출물 처리군에서 투여 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다.

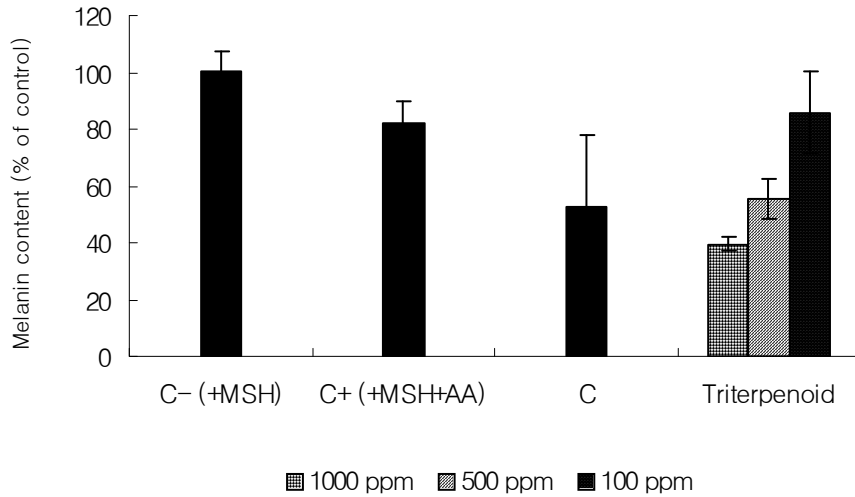


그림 34. 유자씨 triterpenoid 추출물의 멜라닌 생합성 저해 효과

한편, melanin 생성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase에 대한 활성 저해효과를 측정한 결과 triterpenoid의 첨가가 tyrosinase의 활성억제에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 유자씨의 triterpenoid는 피부 기저에서 normal melanocytes가 자외선, 호르몬 등에 의해 melanin 침착을 유도하는 activated melanocytes로의 분화를 억제하여 결과적으로 효과적인 미백효과를 나타내는 것으로 간주된다.

마. 발아유자

유자씨를 깨끗이 세척하여 껍질을 벗긴 후 50℃에서 12시간동안 온풍 건조시킨 유자씨를 25℃의 암실에서 적당한 수분을 공급하여 주며 21일동안 발아시켰다(그림 35).



그림 35. 유자씨의 발아 과정

발아유자의 줄기부분을 methanol로 추출한 후 유자씨 methanol 추출물과 총 polyphenol함량을 측정하여 비교한 결과, 발아유자 추출물의 경우 61.2mg/g dry weight으로 발아 하지 않은 유자씨 추출물에 비해 약 2배가

량 증가한 것을 알 수 있었다(그림 36).

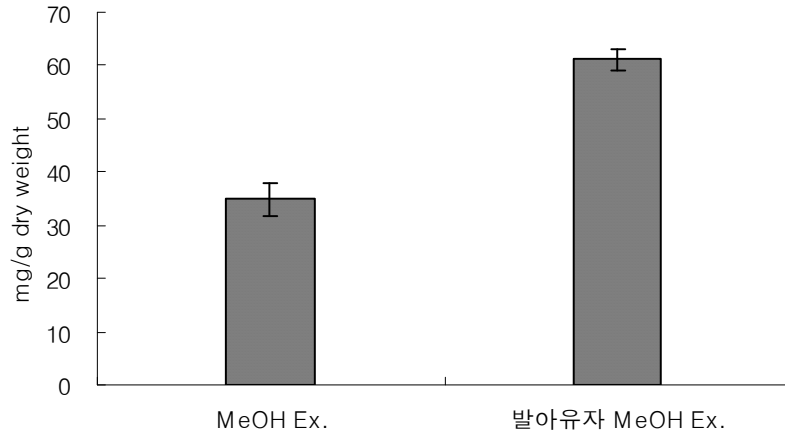


그림 36. 유자씨 추출물과 발아유자 추출물의 총 polyphenol 함량

유자씨 발아 전·후의 flavonoids 조성을 비교하여 보았을 때, 발아전에는 citrus fruits 고유의 flavonones 들인 naringin, neohesperidin, naringenin, 그리고 hesperitin의 함량은 기타 polyphenols와 flavonoids에 비하여 거의 낮은 편이었으나 발아가 진행됨에 따라 이들 citrus 특유의 flavonones 함량이 증가함을 알 수 있었다(그림 37).

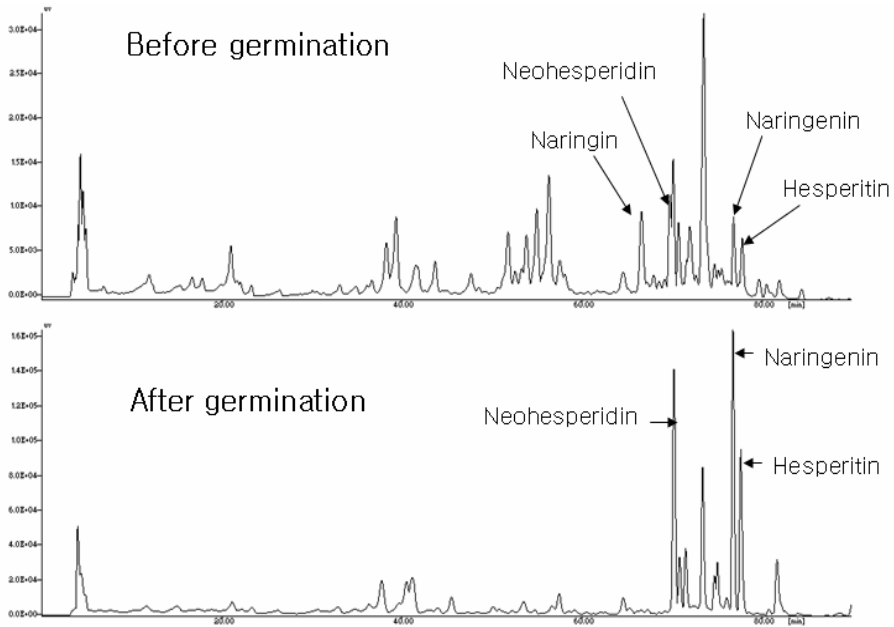


그림 37. 유자씨 발아 전·후의 polyphenol 화합물 조성비교

이와 같은 결과는 유자를 발아시킴으로 flavonoid들, 특히 citrus 특유의 flavonoes의 함량이 급격히 증가하는 것으로 관찰되었으며 이들 발아과정을 통하여 유자씨 보다도 항산화력 등 생리활성이 한층 강화된 추출물을 얻을 수 있으리라 기대되어진다.

한편, 발아과정 중 triterpenoid의 변화를 조사한 결과, 발아전의 nomilin과 limonin위주의 triterpenoi 조성이 발아 후에는 새로운 triterpenoid 계열의 물질이 생성되고 nimolin과 nomilin의 함량은 감소되는 경향을 보였다 (그림 38, 39).

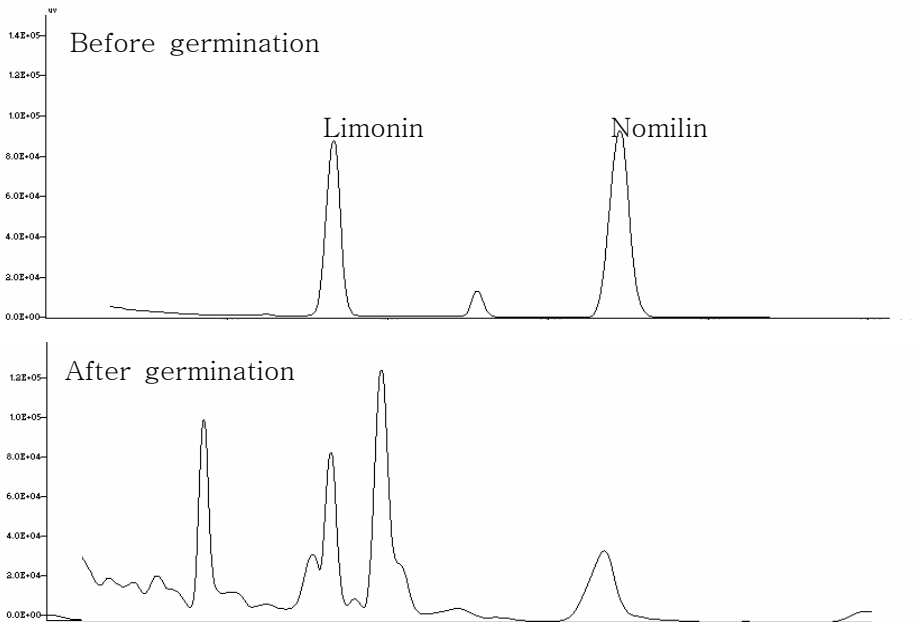


그림 38. 유자씨 발아전·후의 triterpenoid 화합물의 조성 비교

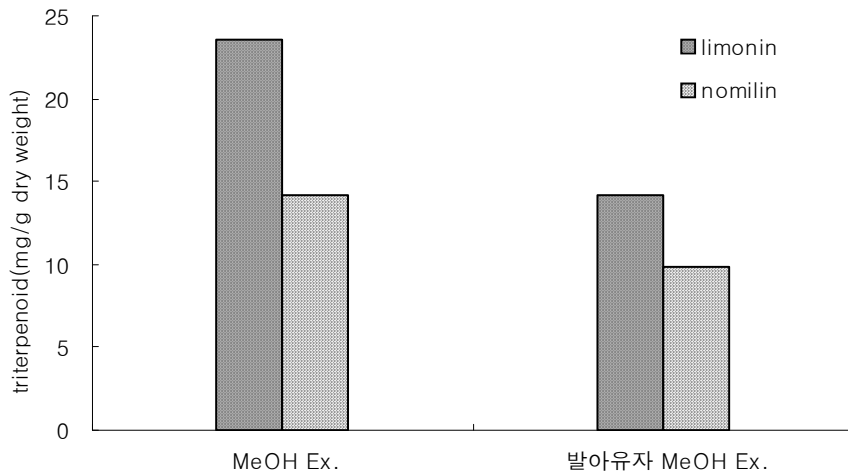


그림 39. 발아전·후의 triterpenoid 화합물의 함량 비교

바. 발아유자의 생리활성

1) 항산화 활성

가) DPPH radical 소거능

유자씨 methanol 추출물의 DPPH소거능을 측정한 결과, IC₅₀값이 약 0.3mg/ml에서 관찰되었으나 발아유자 추출물의 경우 IC₅₀값이 0.14mg/ml에서 관찰되어 발아유자 추출물이 훨씬 높은 DPPH소거능을 가지는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 발아로 인해 flavonoids 함량의 증가에 기인하는 것으로 사료되어진다(그림 40).

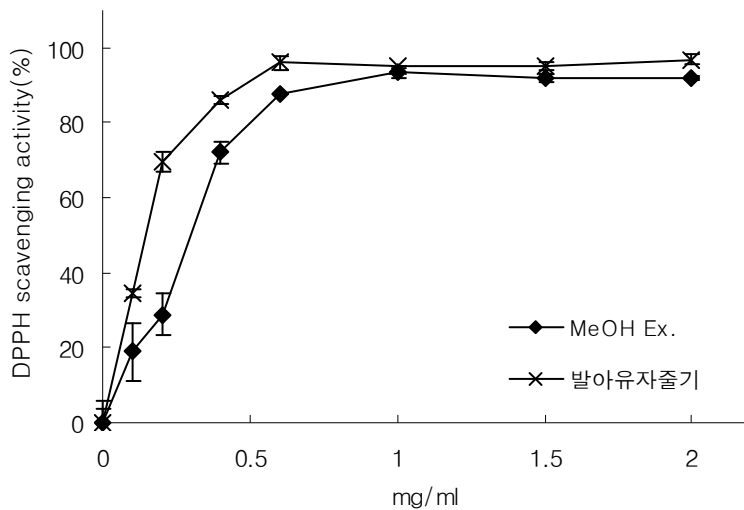


그림 40. 발아유자 추출물의 DPPH 소거능

나) ABTS anion 소거능

ABTS anion 소거능 또한 발아과정으로 인한 polyphenol의 증가로 발아유자 추출물의 경우 IC₅₀값이 0.06mg/ml에서 관찰되었으나 유자씨 methanol 추출물의 경우 IC₅₀값이 약 0.13mg/ml에서 관찰되어 발아유자 추출물이 훨씬 높은 ABTS소거능을 가지는 것으로 관찰되었다(그림 41).

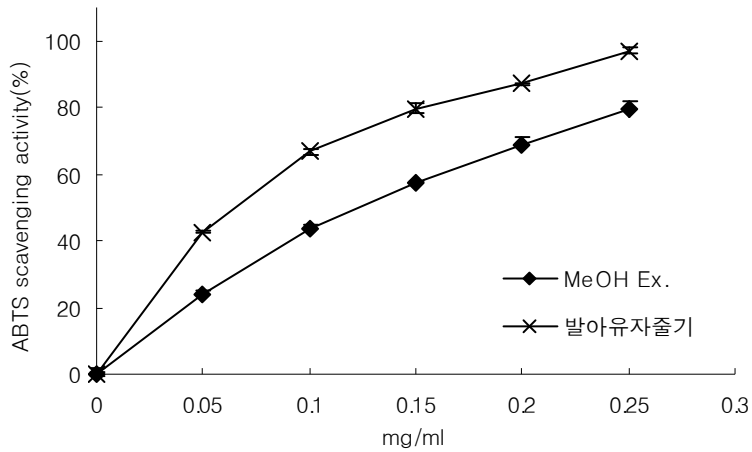


그림 41. 발아유자 추출물의 ABTS 소거능

다) β -carotene bleaching assay

β -carotene bleaching assay 결과 대조구는 470nm에서 absorbance가 시간 경과에 따라 큰 폭으로 감소하였으나 유자씨 methanol 추출물과 발아유자 추출물에서는 4시간가량 경과한 후에서 약 absorbance가 1.50정도 까지 밖에 떨어지지 않은 것으로 관찰되어 β -carotene의 bleaching 감소에 효과가 있는 것으로 나타났다. 하지만 유자씨 methanol추출물과 발아유자 추출물간에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(그림 42).

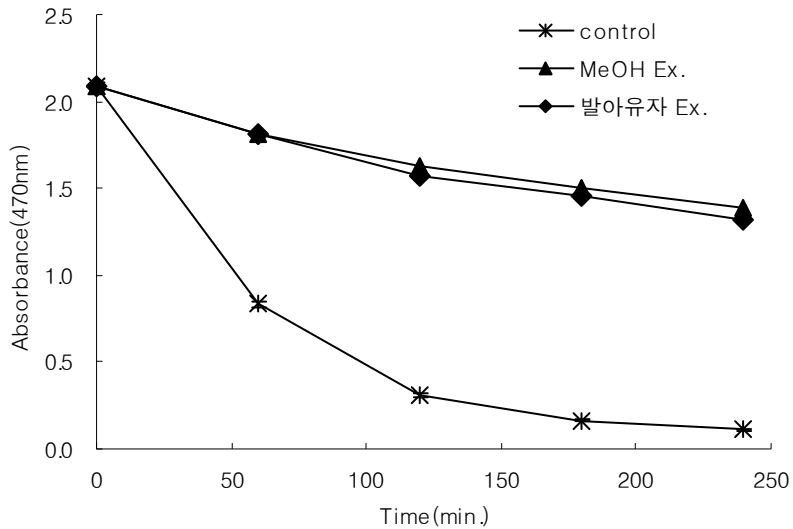


그림 42. 발아유자 추출물의 β -carotene bleaching assay

2) 항비만 효과

가) 지방세포분화억제 효과 측정 - 3T3-L1 cell

발아유자추출물의 지방세포분화 억제효과를 관찰하기 위하여 발아유자 추출물과 유자씨 추출물을 3T3-L1 preadipocyte에 투여한 후 adipocyte로의 분화억제력을 조사한 결과, 발아유자추출물을 첨가하였을 때 지방세포로의 분화가 농도의존적으로 저해됨을 알 수 있었다(그림 43).

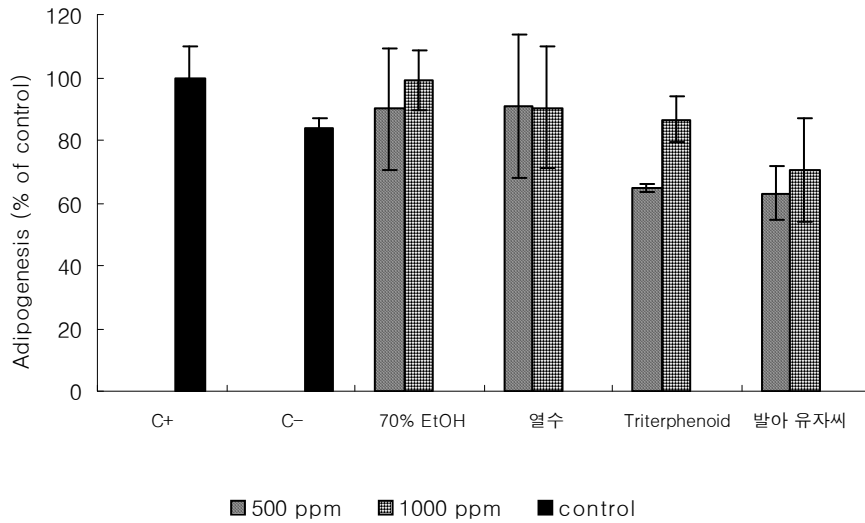


그림 43. 유자씨 및 발아유자 추출물의 지방세포분화 억제 효과

나) 체내 지방흡수 저해 효과 - 동물실험

발아유자추출물의 lipase 활성저해력을 조사하기 위하여 동물실험을 통한 지방체내흡수 정도를 조사한 결과, 올리브유를 먹은 후 발아유자씨를 섭취하였을 때, 혈중지방농도가 현저히 저하됨을 관찰 할 수 있었다(그림 44).

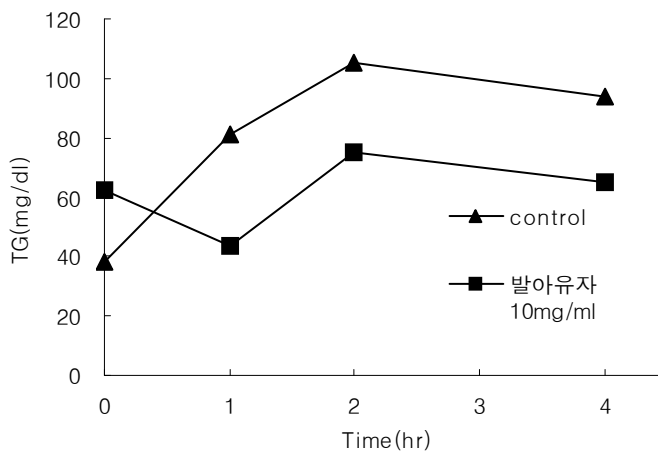


그림 44. 유자씨 추출물의 체내 중성지방 흡수 저해 효과

씨가 발아되는 과정을 통해 독립 개체로서 생존하기 위해 발아 전에 없던 물질이 생산되거나 전에 있던 물질이 다량 증가하여 영양소가 가장 증대되는 생리적 변화가 일어나게 된다. 이상과 같은 결과는 발아유자 추출물이 유자씨와 다르게 naringenin, hesperitin 등 citrus fruit 특유의 flavonones이 발아 중에 농축되며 이들이 우수한 항산화력 및 항비만효과를 나타냄으로, 이들 발아유자를 이용한 기능성소재의 개발이 가능하리라 기대된다.

3. 유자씨를 이용한 식품소재 및 가공제품 개발

가. 유자씨 중간 식품소재 개발

유자씨의 우수한 생리활성은 고미성분인 flavonoids 계통이나 triterpenoids에서 많이 발현된다. 따라서 이들 성분을 최대한 많이 함유한 분획은 식품소재로 사용하기에는 고미가 너무 강하여 고미를 완화시키는 방법의 개발이 필요하였다. 이를 위하여 유자씨 추출물을 activated charcoal, 규조토, 이산화규소 등을 이용한 물리적 방법을 사용하여 보았으나 이들 방법을 통해 고미성분은 제거되는 효과가 나타났으나 항산화력, 면역활성 효과 등의 생리활성은 예상했던 대로 대폭 감소되어서 유자씨 추출물로서의 특성이 거의 없었다. 이들 물리적방법 외에 효소적인 방법을 활용하여 유자씨의 고미를 완화시키는 방법을 강구하였다. 본 연구에 사용한 효소는 cyclodextrin glucunotrasferase의 일종인 toluzyme 3.0L(Novozyme社)을 이용하였으며 substrate로는 maltodextrin을 사용하였다. 유자씨 추출물을 maltodextrin과 함께 toluzyme으로 80℃에서 48시간 처리하였을 때 그림 45와 같이 쓴맛의 주요 구성성분인 hydrophobic flavonoids가 toluzyme과 maltodextrin에 의하여 glycosylation이 일어난 결과, hydrophylic한 flavonoids로 변환되었음을 알 수 있었다. 이렇게 변환된 flavonoids들은 특유의 쓴맛이 저감되었으며 섭취시 장내에서 glucosidase의 작용에 의해 deglycosylation이 일어나 aglycon의 형태로 흡수 될 수 있음으로 생리활성의 발현에는 효소처리 전·후의 차이는 없을 것으로 사료된다.

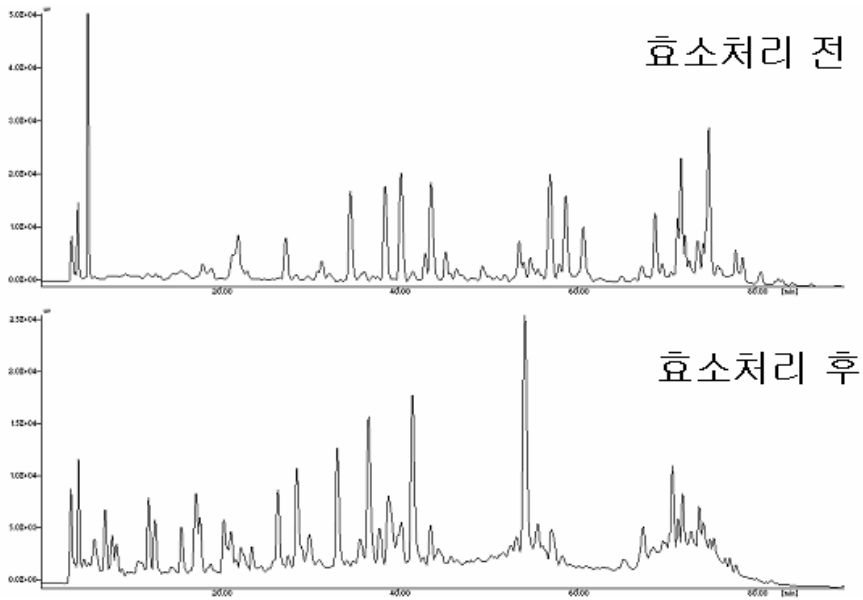


그림 45. 유자씨 추출물에 toluzyme 처리 전·후의 flavonoids 조성 차이

유자씨 ethanol 추출물 5g과 maltodextrin 5g에 toluzyme을 각각 0.5ml과 1.0ml을 첨가하여 반응시킨 효소처리군의 쓴맛정도를 toluzyme처리하지 않은 군과 비교하여 보았을 때, 무처리군의 쓴맛 정도는 9점으로서 아주 강한 쓴맛을 지니고 있었으나 0.5ml 처리한 군은 7.5점, 1.0ml 첨가한 군은 6.4로서 효소처리를 함으로서 농도의존적으로 쓴맛이 감소된다는 사실을 알 수 있었다.

이상과 같이 효소를 이용한 유자씨 추출물의 고미를 어느 정도 감소시킨 후 이들을 중간식품소재화 하고져 그림 46에 나타난 바와 같은 대략적인 공정으로 분무건조 된 유자씨 추출물을 제조하였다.

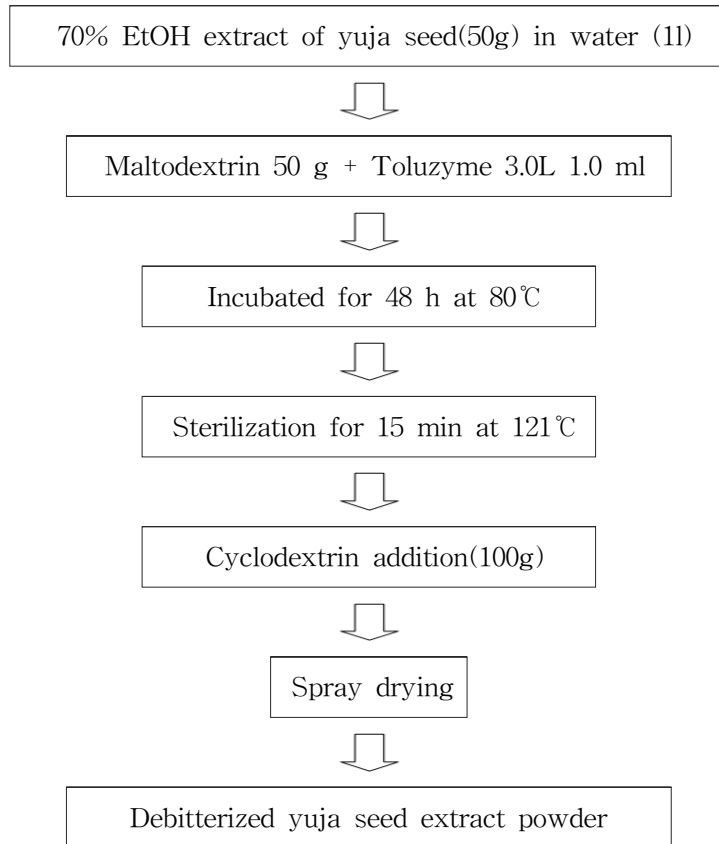


그림 46. 유자씨 추출물의 탈고미된 중간소재제품 제조공정

나. 유자씨 가공제품 개발

1) 유자씨 음료

유자씨 추출물의 중간소재로서 제조한 분무건조 유자씨 분말을 이용하여 레몬음료를 제조하였다. 효소처리 방법을 이용하여 탈고미 된 유자씨 추출물을 사용하였으며 유자씨 추출물 함량이 25%인 분무건조 분말을 0.2% 첨가하여 그림 47과 같은 공정으로 제조하였으며 성분 배합비는 표 7과 같다. 분무건조한 유자씨 추출물은 수용화가 용이하여 음료에 적용하기에 적합하였으며 유자씨 분말의 농도를 0.1%에서 1.0%까지 늘려가며 제

조하여 기호도 조사를 실시한 결과, 유자씨 분말의 첨가량이 0.5%이상으로 증가되면 음료에 쓴맛이 느껴져 기호도가 떨어지는 것으로 나타났으며, 유자씨 분말을 0.2%까지 첨가하였을 때, 고미에 의한 기호도 저하는 크게 나타나지 않았다.

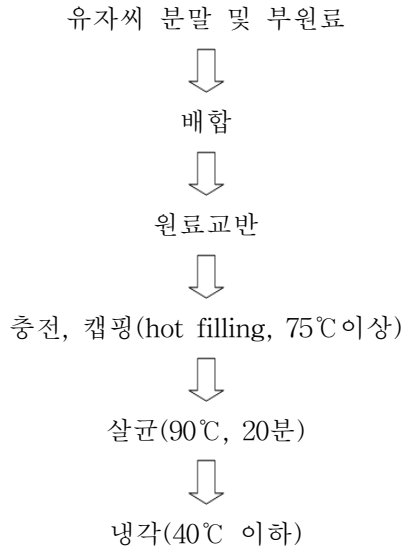


그림 47. 유자씨 음료 제조 공정

표 7. 유자씨 음료 성분비

Ingrident	Contents (%)
탈고미 된 유자씨 분무건조 분말	0.2
레몬 농축액	9.11
물	82.88
Vitamin C	0.1
Vitamin B ₁	0.001
Xylitol	1.28
고과당	4.6
Sugar	1.83
합계	100.00



그림 48. 유자씨 음료

2) 유자씨 미백 크림

유자씨 추출물의 중간소재로서 제조한 분무건조 유자씨 분말을 이용하여 유자씨 크림을 제조하였다. 피부미백 실험 결과 유자씨에 존재하는 triterpenoid 성분이 피부의 멜라닌 생성 억제 작용을 하여 피부 미백에 효과가 있는 것으로 나타나 유자씨 추출물을 이용하여 피부 미백 크림을 제조하였다. 유자씨 추출물 함량이 25%인 분무건조 분말을 4% 첨가하여 제조하였다(그림 48). 유자씨 분무건조 분말은 물에 녹여 ointment base에 첨가하였으며 아래 표 8의 비율로 크림 성분들을 혼합하여 50℃에서 성분들이 골고루 균질화 될 때 까지 homogenizer를 이용하여 섞어주었다. 완성된 크림은 튜브에 담아 짜서 바르도록 제조하였다.

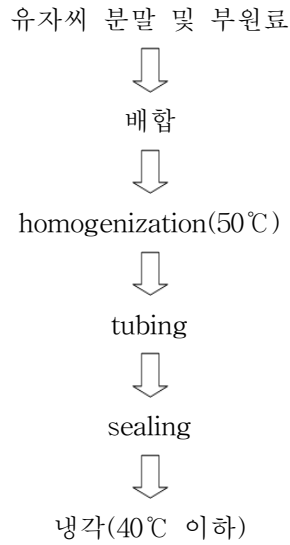


그림 49. 유자씨 미백 크림 제조 공정

표 8. 유자씨 미백 크림 성분비

Ingredient	Contents (%)
유자씨 추출물 분말	4
홍화씨유	15.8
사과향	0.2
Ointment base	80
합계	100.00



그림 50. 유자씨 미백 크림

3) 유자씨 비누

유자씨 기름이 함유된 고흥비누와 foam cleansing을 (주)한빛코리아의 협조로 그림 51, 52의 공정과 표 9, 10의 배합비로 제조하였다.

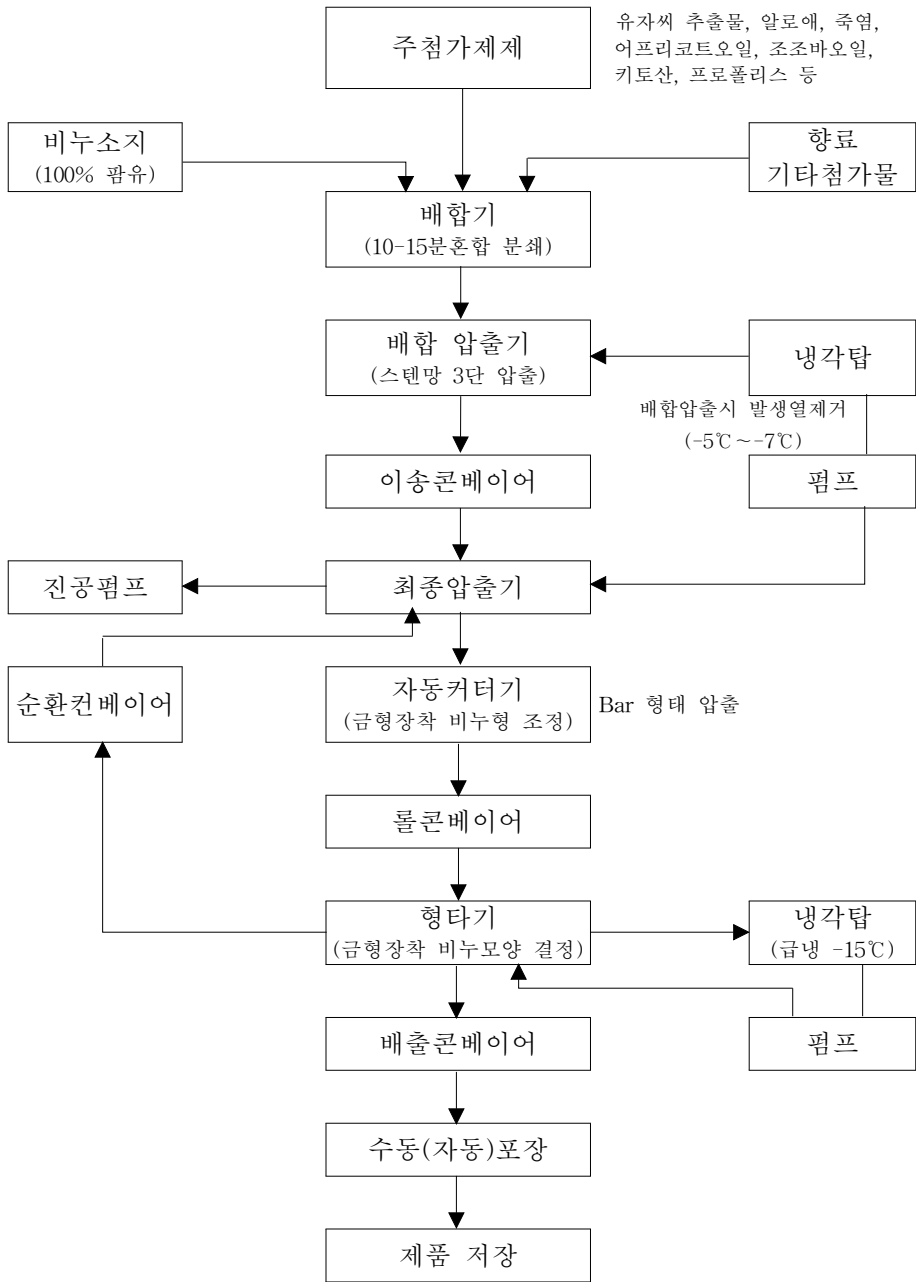


그림 51. 유자씨 고품비누 제조 공정

표 9. 유자씨 고형비누 성분비

Ingredients	Contents(%)
비누소지 (팜유)	93.1
유자씨 기름	2.0
죽염	0.5
토코페롤	0.3
알로에	0.3
글리세린	1.0
살구씨오일	0.3
올리브오일	0.3
프로폴리스	0.4
키토산	0.6
히아루론산	0.2
향료	1
Total	100.0

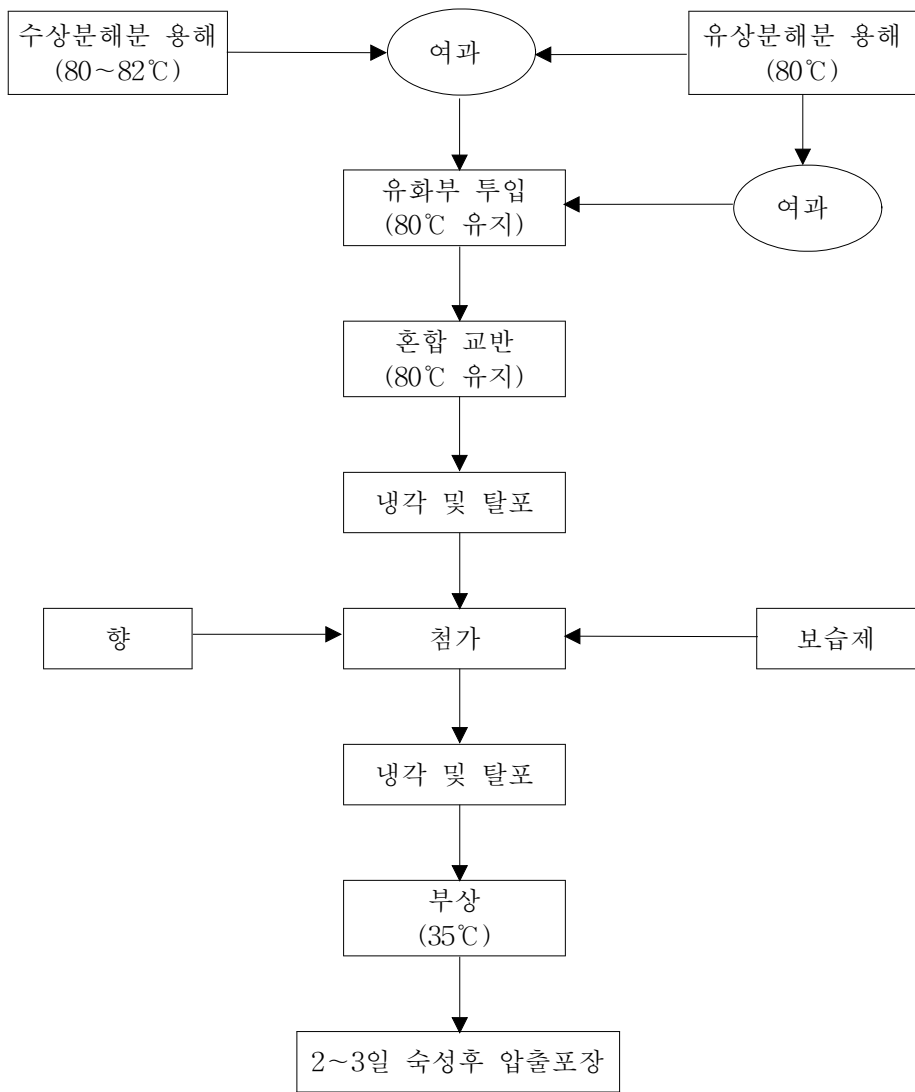


그림 52. 유자씨 foam cleansing 제조 공정

표10. 유자씨 foam clenasing 성분비

Ingredients	Contents(%)
Sodium lauroyl glutamate	31.00
Propylene glycol	10.00
PEG-32	10.00
Myristic acid	3.00
Stearic acid	1.00
Cocamide DEA(C.D.E.)	2.50
Lauramide DEA(L.D.E.)	2.50
Water	27.14
Processed salt	2.50
Sodium hyaluronate	2.00
Tocopherol	2.00
Retinol	1.96
유자씨 기름	2.00
Squalane	1.00
Perfume	0.50
Greentea extract	0.30
Algae	0.30
Germanium	0.20
Bio-ceramic	0.10
Total	100.00



그림 53. 유자씨첨가 고탄비누 및 foam cleansing

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
○유자씨의 식품학적 특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 유자씨의 일반성분 및 기름의 지방산 조성 등 식품학적 특성 구명 - 유자씨를 각종의 유기용매를 이용하여 생리활성이 강한 flavonoid류와 triterpenoid류 등으로 분리하고 이들의 조성 등에 관하여 연구 	20
○유자씨 추출물의 생리 기능적 특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 유자씨의 polyphenol-rich fraction과 triterpenoids-rich fraction을 얻어 이들에 대한 항산화, 면역증강활성, 항암활성, 항균활성 등 다양한 생리활성에 대하여 전반적으로 검토함 - 특히 triterpenoids 분획을 이용하여 피부미백 효과를 검토하였으며 유자씨를 발아시켜 이들의 발아중 생성되는 flavonoids 조성변화 및 이들을 활용하여 항비만소재로의 가능성에 대한 자료를 제시하였음 - 이러한 연구를 통하여 유자씨의 생리활성소재로서의 가능성에 대한 다양한 정보를 축적할 수 있었음 	50
○유자씨를 이용한 가공 제품개발	<ul style="list-style-type: none"> - 유자씨 추출물의 쓴맛을 효소를 사용하여 저감시키는 방법을 개발하여 생리활성 중간소재로서 상용화가 가능한 공정을 제시 - 유자씨 추출물을 이용하여 음료, 비누, 피부 cream 등을 제조할 수 있는 제조공정 제시 	30

2. 기여도

본 과제를 통하여 유자가공시 대량 생산되어 폐기처분되는 유자씨의 식품학적 특성 및 이들에 함유되어있는 생리활성 물질의 조성과 면역활성, 항산화, 항비만 등 다양한 생리활성과 관련한 유자씨의 기능성 식품소재로서의 가능성에 대한 연구가 체계적이고 광범위하게 진행되었다. 또한 유자씨 특유의 지나친 고미를 효소처리를 통하여 어느 정도 저감화시키는 기법을 개발하여 유자씨의 중간식품소재로서의 활용을 용이하게 할 수 있는 방법도 개발하였다. 아울러 유자씨 추출물이 첨가된 다양한 가공제품을 개발하여 유자씨의 활용성 극대화 및 고부가가치화를 위한 기반을 본 과제를 통하여 마련하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 과제를 통하여 획득한 유자씨 관련 기술은 국내특허 출원한 상태이며 유자씨의 각 종 생리활성, 발아유자의 flavonoid 조성 변화 및 항비만 활성 등과 관련한 새로운 연구결과는 *Phytomedicine*, *Food Chemistry* 등과 같은 세계적 권위의 학회지에 2건 이상 게재할 예정이다. 또한 현재 일본의 Oryza社 제품의 유자씨 추출물과 비교하여 본 과제를 통하여 개발된 유자씨 추출물 분말이 고미 저감화 공정의 개발을 통해 쓴맛이 약하고 수용화가 용이하며 flavonoid와 limonin 등의 생리활성 성분 함량이 높다는 장점을 살려서 참여기업을 통하여 일본시장에 진출할 수 있는 방안을 강구할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. High throughput debettering(미국특허 4,065,842)

감귤류 과즙의 쓴맛 및 산미 제거를 위한 방법 및 소재 개발을 하였다. 현재 구체화되어져 이용되고 있는 방법은 자몽의 쓴맛과 신맛이 제거 방법이나 또 다른 대체 방법으로 이 발명에서는 오렌지 과즙의 쓴맛과 신맛을 제거하였다. 이 방법은 빠른 속도로 throughput을 얻어낼 있다는 장점을 가지고 있다.

2. 신규 flavonoid배당체, 그 추출법 및 용도(日本特願平7-176923)

카테킨, 에피카테킨 또는 이것들을 2종류 이상 포함하는 폴리페놀 혼합물을 덱스트린, 사이클로덱스트린, 전분 혼합물에 배당화하여 신규 폴리페놀 배당체를 발명하였다. 신규 폴리페놀 배당체는 종래의 폴리페놀류가 가지는 강한 떫은맛이나 수렴성을 효과적으로 개선하고 정미성에서 우수할 뿐만 아니라 생체 내에서 폴리페놀류가 유리되는 것을 기대할 수 있다.

제 7 장 참고문헌

1. Y. W. Lee, J. H. Choi, W. H. Yoon, and C. H. Kim, 2005, Growth inhibitory effect of grapefruit seed extract on foodborne pathogens in *kanjang* paste and *kochujang* paste. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 25(4): 513-520
2. C. Bouaziz, S. Abid-Essefi, A. Bouslimi, E. Golli, and H. Bacha, 2006, Cytotoxicity and related effects of T-2 toxin on cultured Vero cells. Toxicon. 48: 343-352
3. J. Ranke, K. Mølter, F. Stock, U. bootin-Weber, J. Poczobutt, J. Hoffmann, B. Ondruschka, J. filser, and B. Jastorff, 2004, Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. Ecotoxicology and Environmental Safety. 58: 396-404
4. S. S. Lee, H. K. Jung, C. Oh, and T. B. Choe, 2004, Mechanism of melanogenesis inhibition by melanoston isolated from yeast. Korean J. biotechnol. Bioeng. 19(2): 118-124
5. W. Y. Choi, H. J. Chun, J. H. Lee, and S. H. Baek, 2003, Effects of methanol extract from *Cornis fructus* on melanogenesis. Korean J. Pharmacogen. 34(1): 70-74
6. Anne W. Harmon and Joyce B. Harp, 2001, Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. Am. J. Physiol Cell Physiol. 280: C807-C813'
7. J. Lin, M. A. Della-Fera, and C. A. Baile, 2005, Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. Obesity Resear. 13(6): 982-990
8. B. S. Ko, D. W. Jun, J. S. Jang, J. Ho. Kim, and S. M. Park, 2006, Effect of *sasa borealis* and white lotus roots and leaves on insulin action and secretion *in vitro*. Korean J. Food Sci. Technol.38(1): 114-20

9. Susan A. Habinowski and Lee A. Witters, 2001, The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 286: 852-856
10. M. Sawamura, Y. Wu, C. Fujiwara, M. Urushibata, 2005, Inhibitory effect of Yuzu essential oil on the formation of N-nitrosodimethylamine in vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4281-4287
11. G. K. Jayaprakasha, R. P. Singh, J. Pereira, K. K. Sakariah, 1997, Limonoids from *Citrus Reticulata* and their moult inhibiting activity in mosquito *Cluex Quinquefasciatus* Larvae. *Phytochemistry*. 44: 843-846
12. S. J. Jung, J. H. Lee, 2004, Screening for antioxdant activity of plant medicinal extracts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47(1): 135-140.
13. I. Amin, Y. Norazaidah, K. I. Emmy Hainida, 2006, Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. *Food chemistry*. 94: 47-52
14. G. K. Jayaprakasha, R. P. Singh, K. K. Sakariah, 2001, Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food chemistry*. 73: 285-290
15. K. L. Woo, J. I. Kim, M. C. Kim, D. K. Chang, 2006, Determination of flavonoid and limonoid compounds in Citron (*Citrus Junos* Sieb. et Tanaka) seeds by HPLC and HPLC/MS. *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.* 35(3): 353-358
16. K. M. Yoo, I. K. Hwang, 2004, *In vitro* effect of Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technaol.* 36: 339-344
17. G. K. Jayaprakasha, P. S. Negi, B. S. Jena, L. Jagan Mohan Rao, 2007, Antioxdant and antimutagenic activities of cinnamomun zeylanicum fruit extracts. *Jounal of food composition and analysis*.

20: 330-336

18. S. Ragaee, El-Sayed, M. Abdel-Aal, M. Noman, 2006, Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for use. *Food chemistry*. 98: 32-38
19. D. D. Majo, M. Giammanco, M. L. Guardia, E. Tripoli, S. Giammanco, E. Finotti. 2005, Flavanones in Citrus fruit: Structure-antioxidant activity relationships. *Food Research International*. 38: 1161-1166
20. O. C. Kwon, J. H. Shin, M. J. Kang, S. J. Lee, S. Y. Choi, N. J. Sung, 2006, Antioxidant activity of ethanol extracts from Citron(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) seed. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 294-300
21. Y. Y. Soong, P. J. Barlow, 2004, Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seed. *Food chemistry*. 88: 411-417
22. J. Yu, L. Wang, R. L. Walzem, E. G. Miller, L. M. Pike, B. S. Patil, 2005, Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids and coumarins. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2009-2014
23. M. A. Anagnostopoulou, P. Kefalas, V. P. Papageorgiou, A. N. Assimopoulou, D. Boskou, 2006, Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel(*Citrus sinensis*), *Food Chemistry*, 94: 19-25
24. K. M. Yoo, K. W. Lee, J. B. Park, H. J. Lee, I. K. Hwang, 2004, Variation in major antioxidants and total antioxidant activity of Yuzu(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) during maturation and between cultivars, *J. Agric. Food Chem.* 52: 5907-5913
25. K. J. Park, 2004, In vitro effects of the complex of Korean Citrus *junos* and medicinal herbs on the cell growth in CCD-986sk human fibroblast cell line, *Korean J. Environ. Biol.* 22: 83-88
26. V. E. Moodley, D. A. Mulholland, M. W. Raynor, 1995, Micellar electrokinetic capillary chromatography of limonoid glucosides from citrus seeds, *Journal of Chromatography A*, 718: 187-193

27. C. Kelly, C. Jewell, N. M. O'Brien, 2003, The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat, *Nutrition Research*, 23: 681-690
28. Luke K. T. Lam, Y. Li, S. Hasegawa, 1989, Effects of Citrus limonoids on glutathione S-Transferase activity in mice. *J. Agric. Food Chem.* 37: 878-880
29. A. Nakaizumi, M. Baba, H. Uehara, H. Iishi, M. Tatsuta, 1997, *d*-Limonene inhibits *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine induced hamster pancreatic carcinogenesis. *Cancer Letters*. 117: 99-103
30. M. R. Karim, F. Hashinaga, 2002, Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue. *Food Chem.* 76: 431-436
31. W. C. Quevedo Jr., T. J. Holstein, J. Dyckman, C. J. McDonald, E. L. Isaacson, 2000, Inhibition of UVR-induced tanning and immunosuppression by topical application of vitamins C and E to the skin of hairless(*hr/hr*) mice. *Pigment Cell Res.* 13: 89-98
32. S. Y. Choi, S. H. Kim, J. S. Hwang, B. G. Lee, H. C. Kim, S. Y. Kim, 2004, Benzylamide derivative compound attenuates the ultraviolet B-induced hyperpigmentation in the brownish guinea pig skin. *Biochemical Pharmacology.* 67: 707-715
33. A. Bocco, M. Cuvelier, H. Richard, C. Berset, 1998, Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2123-2129
34. Z. Herman, C. H. Fong, P. Ou, S. Hasegawa, 1990, Limonoid glucosides in orange juices by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1860-1681
35. K. Wolfe, X. Wu, R. H. Liu, 2003, Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* 51: 609-614
36. Liu M, Li XQ, Weber C, Lee CY, Brown J and Liu RH. 2002, Antioxidant and antiproliferative activity of raspberries. *J. Agric.*

Food Chem. 50: 2926-2930

37. M. Satoshi, Y. Kuniko, I. Mikiko, T. Chihiro, N. Masaaki, M. Shuzo, I. Manabu, Y. Koichi, and M. Ken-ichi, 2005, Insulin signaling in adipocytes differentiated from mouse stromal MC3T3-G2/PA6 cells. Biol. Pharm. bull. 28(11): 2040-204
38. X. R. Guo, H. x. Gong, Y. Q. Gao, L. Fel, Y. H. Ni, and R. H. Chen, 2004, A mutation in signal peptide of rat resistin gene inhibits differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Acta. Phrmacol. Sin. 25(12): 1705-1711
39. R. Singh, J. N. Artaza, W. E. Taylor, M. Braga, X. Yuan, N. F. Gonzalez-Cadavid, and S. Bhasin, 2006, Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: Nuclear translocation of androgen receptor canonical Wnt signalin to down-regulate adipogenic transcription factors. Endocrinology. 147(1): 141-154
40. L. H. Liu, X. K. Wang, Y. D. Hu, J. L. Kang, L. L. Wang, and S. Li, 2004, Effects of a fatty acid synthase inhibitor on adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells. Acta. Pharmacol. Sin. 25(8): 1052-1057
41. S. Keay and S. E. Grossberg, 1980, Interferon inhibits the conversion of 3T3-L1 mouse fibroblasts into adipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77(7): 4099-4103
42. F. Liu, J. K. Kim, Y. Li, X. Q. Liu, J. Liu, and X. Chen, 2001, An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. American Society for nutritional Sciences. 2242-2247
43. J. E. B. Reusch, L. A. Colton, and D. J. Klemm, 2000, CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. Molecular and Cellular Biology. 20(3): 1008-1020