

발효 김치로부터 분리한 프로바이오틱 균주에 의한 지실추출물 발효와 항산화능 분석

배영민* · 유선균†

*창원대학교 미생물학과

†중부대학교 식품생명과학과

(2015년 8월 20일 접수; 2015년 9월 25일 수정; 2015년 9월 30일 채택)

Probiotic Microbial Fermentation of *Poncirus trifoliata* Extract by Probiotic Strain Isolated from Fermented Gimchi and Antioxidant Activity

Young-Min Bae* · Sun-Kyun Yoo†

*Department of Microbiology, Changwon National University

†Department of Food and Biotechnology, Joongbu University.

(Received August 20, 2015; Revised September 25, 2015; Accepted September 30, 2015)

요약 : 피부의 피부 노화, 질환, 훼손은 내부적인 요인으로서 활성산소라는 사실이 밝혀진 이래로 합성 항산화제를 대체할 수 있는 천연물 항산화제에 대하여 많은 연구가 진행 중이다. 이들 중에 지실은 오래전부터 만성적인 염증, 알리지 완화, 항산화 기능을 하는 것으로 알려져 왔다. 미생물을 이용한 발효는 조직에 결합 되어 있는 생리활성 물질의 유리로 생체이용율(bioavailability) 훨씬 높아지는 것으로 알려 졌다. 따라서 본 연구는 지실 열수 추출물을 기질로 GRAS 알려진 균주를 이용하여 발효를 수행하고 발효가 항산화 능력에 미치는 영향에 대하여 알아보하고자하였다. 지실 열수 추출물은 항산화 기능을 가지고 있는 hesperidine, naringine, luteoilin, imperatorin 등의 플라보노이드 및 furocoumarin 등이 동정이 되었고 함유량은 hesperidine naringine, imperatorin, luteolin 순이었다. 열수 추출물을 기질로 하여 분리된 *Leuconostocs* sp. strain JYK로 발효를 수행한 결과 지실 열수 추출물을 사용한 경우에는 71.2 ± 4.58 (mg/g)의 총 페놀 함량이 있는 것으로 측정이 되었고 반면에 발효 추출물에는 89.2 ± 13.47 (mg/g)으로 약 25.3% 증가된 것으로 나타났다. 총 플라보노이드 화합물은 지실 열수 추출물에는 25.1 ± 4.12 (mg/g)의 총 플라보노이드 함량이 있는 것으로 측정이 되었고 반면에 발효 추출물에는 31.0 ± 4.06 (mg/g)으로 약 23.5% 증가된 것으로 나타났다. DPPH 소거능은 지실 열수 추출물에는 70.9% 반면에 발효 추출물은 86.2% 측정이 되었다. 총 항산화 능력은 18.7% 발효추출은 26.6%로 발효를 통하여 약 40% 증가하였다. 따라서 미생물 발효를 통하여 천연물에 포함이 되어있는 기능성 물질에 대한 생체 이용률을 높인다면 산화적 스트레스에 의한 피부 노화 완화 및 개선 작용으로 기능성 화장품 및 식품의 소재로 활용 가치를 높여 줄 것으로 기대를 한다.

주제어 : 지실, 발효, 항산화능, 발효, 미생물

†Corresponding author
(E-mail: skyoo@joongbu.ac.kr)

Abstract : To protect skin problems, new natural material alternative to synthetic antioxidants has been extensively selected from natural sources such as plants, animals, and microorganisms. *Poncirus trifoliata* of those has been widely used as treatment of allergy, chronic inflammatory diseases, and natural antioxidant. In recent days, microbial fermentation to natural products has been reported to increase feasibly their bioavailability. Accordingly, we performed the fermentation using hot water extract of *Poncirus trifoliata* by isolated *Leuconostocs* sp. strain JYK and investigated the change of antioxidative activity. Antioxidative material such as hesperidine naringine, imperatorin, and luteolin was found in hot water extract of *Poncirus trifoliata*. Total phenolics compounds and flavonoids in hot water extract were 71.2 ± 4.58 GAE(mg/g) and 25.1 ± 4.12 hesperidine(mg/g), respectively. After fermentation, their values were 89.2 ± 13.47 GAE(mg/g) and 31.0 ± 4.06 hesperidine(mg/g), respectively. After fermentation, ABTS[2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] and DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical were highly enhanced from 70.2 ± 9.01 to 86.2 ± 3.72 and 18.7 ± 1.81 to 26.6 ± 4.06 , respectively. Thus microbial fermentation offers a tool to further increase the bioactive potential of *Poncirus trifoliata*.

Keywords : Antioxidant, fermentation, flavonoids, phenolics compounds, *Poncirus trifoliata*,

1. 서론

피부는 신체에서 가장 큰 기관이며 질병을 방어하는 가장 중요한 방어벽이다. 이러한 중요성 때문에 건전한 피부를 훼손하는 어떠한 물질도 개인의 전체적인 건강을 악화 될수 있다[1]. 또한 피부는 외부에 노출 되어 있기 때문에 피부의 손상은 신체 기능 장애가 아닐지라도 사회생활에 나쁜 영향을 줄 수 있다. 최근 연구에 의하면 대부분의 피부의 질병 및 장애는 피부 노화, 질환, 훼손의 원인은 활성산소(ROS, reactive oxygen species) 라는 사실이 밝혀지고 있다[2]. 스트레스를 받고 있지 않은 정상적인 세포들은 미토콘드리아에서 일정하게 생산이 되는 활성 산소들을 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소를 생산을 하여 균형을 유지한다[1,3]. 그러나 산화적 스트레스(oxidative stress)를 받은 세포들은 위와 같은 균형이 해체 되고 세포내 활성 산소들 대량으로 증가를 한다. 세포에 대한 산화적 스트레스 원인들은 일반적으로 cigarette smoke, extreme temperature change 및 UV 광선으로 알려졌다.

생체 반응 도중에 상당량의 활성 산소들이 생성되는데 대부분 생체 제거기작에 의해서 소멸이 되지만 다량 또는 만성적으로 발생을 하는 경우에는 각종 피부 노화 질환의 원인이 된다[4]. 또

한 활성 산소는 멜라닌 생성 촉진 및 주름 생성의 원인 물질로 알려졌다[5]. 대표적인 생체내의 산화적 대사 부산물들 중에 활성산소들은 superoxide anion radicals(O_2^-), hydroxyl radicals (HO^\cdot), hydrogen peroxide (H_2O_2), 및 singlet oxygen (1O_2)으로 이루어졌다[3]. 따라서 활성산소 소거를 위해 합성 항산화제들인 BHT(butylated hydroxyltoluene), BHA(butylated hydroxyanisole), TBHQ(tert-butylhydroquinone), PG(propyl gallate)등이 상업적으로 사용이 되어 왔지만 그들의 독성 및 발암 가능성 등에 대하여 의문시 되어 왔다[6]. 따라서 식물성 천연물 유래 flavonoids, phenolics, limonoids, carotenoids, coumarins, phytosterols 같은 항산화 물질에 대한 연구는 최근에 집중적으로 보고되고 있다 [7-9].

지실은 Rutaceae에 속한 *Poncirus trifoliata*의 열매로 1-2 cm 정도의 어린열매를 채취하여 건조한 것이다[10]. 지실은 오래전부터 만성적인 염증, 알리지 완화, 소화 촉진하는 것으로 알려져 왔다[11-12]. 이러한 기능과 관계되고 있는 것으로 보이는 생리활성 물질들인 poncrin, coumarin, hesperibine, naringin, phellopterin 등이 동정이 되었다고 보고되었다[13-14]. 지실은 암세포의 자살을 촉진 시키는 것으로 anti-leukemic 효과가 있다고 보고되었다[15]. 지실 추출물은 염증의 활성을 억제 시키고 복용시 장

내 해로운 세균에 대한 항균작용이 있다[12]. 또한 생리 활성 작용으로 항산화와 세포내 지질 합성의 저하 효과가 있다고 발표를 하였다[16].

최근에 미생물을 이용한 생리 활성 물질 발효가 활발하게 진행이 되고 있다. 천연물에 대한 발효는 미생물의 에너지원을 제외한 영양 성분들이 대부분 그대로 유지가 되고 미생물이 생산하는 각종 가수분해효소들과 세포내 조직에 결합되어 있는 생리활성 물질들이 유리되기 때문에 생체이용률(bioavailability)이 훨씬 높아지는 것으로 알려 졌다[17-18]. 따라서 지실을 소금에 절여 비살균 자연 발효 시킨 후에 추출하여 미백제 품에 적용한 사례는 있으나 프로바이오틱(probiotic)과 같은 단일 균주를 이용한 미생물 발효에 대한 연구는 드물다. 그러므로 본 연구는 지실 추출물을 기질로 발효 김치로부터 일반적으로 GRAS(generally recognized as safe)로 알려진 프로바이오틱 균주를 분리를 하여 발효를 수행하고 발효생성물의 향산화 활성에 대한 연구를 수행 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 재료

실험에 사용한 시약으로 Folin-Ciocalteu phenol reagent, gallic acid, hesperidine, naringine, luteolin, imperatorin, trolox, chlorogenic acid, ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonic acid), aluminum chloride, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical), potassium persulfate, 등은 Sigma Aldrich Company (Seoul, Korea)에서 구입하였으며 그 외에 사용된 시약들은 모두 1급 이상의 등급을 사용하였다. 지실은 건조된 상태로 유림당 생약(금산군, 충남)에서 구입을 하였다.

2.2. 균주 분리

본 연구에서는 GRAS(generally recognized as safe)로 알려진 미생물을 이용하여 발효를 수행하기 위해서 김치로부터 균주를 분리를 하였다. 김치 용기의 바닥부근에서 한 백금이를 취하여 MRS(Difco, NJ, USA) 평판 배지에 옮겨 30°C에서 48시간 배양을 하였다. 유산균으로 보이는 콜로니들을 선택하여 실험을 3% 함유한 TSA(Difco, NJ, USA) 평판배지에 옮겨 24 시간

배양을 하였다. 최종적으로 협막을 생산하는 전형적인 텍스트란 생산 균주들을 선택하였다. 발효 특성을 비교한 결과 최종적으로 한 균주를 선택하여 동정을 수행하였다.

분리 균주의 동정은 Shin and Yoo(2012)의 방법을 조절을 하여 수행을 하였다. 분리 정제한 16S rRNA 염기서열은 ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)를 사용하여 수행을 하였고, 상동성은 DDBJ/NCBI/GenBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다. 각 염기서열의 상동성은 alignment Clustal X program를 이용하여 병렬로 정렬하였으며 계통도의 작성은 근린 결합법에 의거하여 결정하였다[19].

2.3. 지실 추출물제조 및 농축

지실 추출물 제조를 위해서 부직포에 담은 건조 지실 300 g 과 정제수 2 l 를 5 l 둥근 추출용 플라스크에서 수행을 하였다. 지실을 정제수에 잠기게 한 후에 플라스크를 환류장치에 연결하고 4°C 냉각 순환수조에 연결을 하였다. 추출은 95°C에서 4시간 수행을 하였다. 추출 후 잔여 물을 제거하기 위하여 부직포를 두 겹으로 하여 순수 추출액을 회수하였다. 추출물은 농축 전까지 4°C이하에서 냉장보관 하였다. 추출액의 농축은 감압 농축기에서 수행을 하였다. 수조의 온도를 60°C로 맞추고 냉각순환조의 온도가 4°C이하로 내려가면 물을 순환시켜 감압상태 하에서 최종 농축액이 50 °brix 가 될 때 까지 농축을 수행하였다. 농축이 완료되면 4°C이하에서 실험에 사용할 때까지 냉장보관을 하였다. 실험에 필요한 지실 엑기스는 해동 후 20 °brix로 희석을 한 다음 동결건조 하여 사용을 하였다.

2.4. 지실 추출물 발효

프로바이오틱 균주를 이용한 지실 발효에 사용된 염 배지(mineral medium; MM)는 증류수 1 l에 3 g K₂HPO₄, 0.01 g FeSO₄·H₂O, 0.01 g MnSO₄·7H₂O, 0.01 g NaCl, 0.05 g CaCO₃, 0.1 g 에 용해하여 pH를 7.0으로 보정하여 제조를 하였다. 염 배지에 0.5% (w/v) 효모 추출물(Yeast extract)을 포함하였을 때는 MMY로 표기를 하였다. 지실 발효 배지(MMY2P)는 MMY에 지실 농축액 2% (w/v)를 희석을 하고 pH를 7.0으로 보정을 하여 제조를 하였다. 종균(seed culture) 배양은 MMP2P 배지 50 ml를 250 ml

배양플라스크에 분주를 하였다. 배양은 진탕배양기(SI-300R, Lab co., Korea)에서 30°C, 150 rpm 조건으로 24시간 동안 진탕배양 하였다. 배양액은 본 배양 발효를 위한 종균으로 사용을 하였다.

본 배양을 위한 배지의 조성은 MMY에 지실 농축액 10%(w/v)를 희석을 하고 pH를 6.5로 보정을 하여 제조를 하였다. 본 배양은 Working volume 2 L의 회분식 발효기 (Semitel, Daejon, Korea)에 배지 1.2 L를 넣고 에서 30°C, 100rpm 조건으로 48 시간 동안 수행을 하였다. 발효 종료 후 세포를 제거하기 위하여 10,000 rpm, 20 분간 원심분리를 하였다(Supra, Incheon, Korea). 원심분리 관으로부터 상등 액을 취하여 모으고 위와 같은 방법으로 농축을 하여 농축이 완료되면 4°C이하에서 실험에 사용할 때까지 냉장보관을 하였다.

2.5. 지실추출물 폴리페놀 및 플라보노이드 성분분석

지실의 폴리페놀 및 플라보노이드 분석은 HPLC를 이용하여 수행을 하였다. 분석에 사용된 HPLC의 구성은 Shimadzu LC-20AD pump, CTO-20AC oven, Sil-20AC auto-sampler, PDA-20A UV detector, CBM-20A system controller, LC Workstation software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) 로 이루어 졌다. 물질의 분리를 위한 컬럼은 Agilent C₁₈을 사용하였다. 용매의 용출속도는 1.0 ml/min이었다. 컬럼 오븐의 온도는 40°C를 유지 하였다. 총 UV 감지기의 파장은 275 nm에서 수행을 하였다. 분석을 위한 샘플의 양은 10 ul 이었다. 이동상 용매는 (A) acetonitrile 과 (B) acetic acid를 사용하였고, 90%-60% B 용매조성을 0-15분 유지하고, 60-20% B 용매를 15-25분, 20-0%를 25-26분, 0% B를 26-34분, 0-90% B를 34-35 분, 90% B를 10분으로 하여 가동을 하였다.

2.6. 항산화능 분석

2.2.1. 총 페놀 화합물 함량

전체 페놀의 함량은 gallic acid를 표준 물질로 하여 Folin-Ciocalteu reagent(FCR)발색방법으로 정량을 하였다. gallic acid 표준물질 제조는 20, 40, 60, 80, 및 100 mg/l 용액을 만들어 1 ml를 9 ml 초 순수 정제수에 혼합을 하여 제조를 하였

다. 분석은 1.5 ml Na₂CO₃ (20 g/100 ml), 500 ul FCR, 6 ml deionized water, 100 ul 샘플용액을 혼합하여 2 시간 반응을 시켰다. 반응 후에 4000 rpm에서 5분간 원심분리를 한 후에 상등액을 765 nm에서 흡광도를 측정을 하였다. 분석이 된 전체 페놀양은 추출물의 동결 건조량의 g 당 gallic acid equivalent(GAE)의 양으로 계산을 하였다.

2.2.2. 총 플라보노이드 함량

전체 플라보노이드의 정량은 aluminium chloride 비색법을 이용하여 측정을 하였고, 헤스피리딘을 표준물질로 하여 20, 40, 60, 80, 100 mg/L 용액을 만들어 1 mL를 9 mL deionized water에 혼합을 하여 제조를 하였다. 0.5 mL 샘플용액을 1.5 mL 95% 알콜로 혼합을 한 다음 0.1 mL 10% aluminium chloride, 0.1 mL 1 M NaOH, 2.8 mL deionized water를 첨가 한 다음 상온에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응후에 415 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 전체 플라보노이드 양은 시료의 동결 건조량의 g 당 hesperidine의 양으로 평가를 하였다.

2.2.3. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 측정은 Hung et al.(2009) 방법을 변형을 하여 측정을 하였다. 지실 추출물 및 발효 지실 추출물을 정제수에 용해를 하여 농도 5% (w/v)시료를 만들었다. 측정에 사용된 DPPH의 농도는 75 μM로 제조를 하였다. 라디칼 반응은 DPPH 용액 3.9 ml 와 추출물 샘플 100 μl를 혼합을 하고 상온에서 30분 이루어졌다. 반응 후에 515 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 대조구는 DPPH 용액 3.9 ml 와 메탄올 100 μl를 혼합을 하여 제조를 하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 대조구에 대한 시료의 흡광도를 비교를 하여 아래와 같은 식으로 계산을 하였다.

$$\text{DPPH 소거능(\%)} = \frac{[(\text{추출 무 첨가구의 흡광도} - \text{추출물 첨가구 흡광도}) / \text{추출물 무 첨가구 흡광도}] \times 100}$$

2.2.4. 전체 항산화능 측정

전체 항산화능 측정은 trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) 방법에 의하여 측정을 하였다[20]. 추출물 항산화 물질이 존재하게 되면 이들 농도에 비례하여 ABTS⁺ 는 탈색이 되

며, 이러한 색의 변화를 734 nm에서의 흡광도로 조사를 하였다. 측정은 시료의 ABTS⁺를 소거하는 항산화 능력을 표준물질인 trolox의 항산화 능력표준곡선과 비교를 하여 계산을 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 지실추출물 발효 균주의 분리 및 동정

채소를 이용한 김치 발효식품에서 균주를 분리하기 위해서 김치 국물을 무균적으로 한 백금이를 취해서 MRS 배지에 도말하였다. 전형적으로 보이는 총 50여개 이상 콜로니를 취하여 지실 추출물을 기질로 하여 성장 및 배양특성을 비교한 후에 최종 균주를 선택하였다. 선정된 균은 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석결과, *Leuconostoc* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서, *Leuconostoc citreum* ATCC 49370과 100%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 따라서 분리된 균을 *Leuconostoc* strain sp. JJLM 으로 명명하였다. 분리된 균주는 전형적인 구균 형태를 보

여주었고(Fig. 2) 설탕 3% (w/v) 농도에서 혐박인 전형적인 유백색의 텍스트란의 생산을 보여주었다.

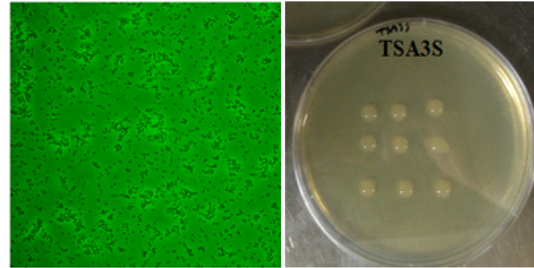


Fig. 1. Morphology and colonies of *Leuconostoc* sp. strain JJLM isolated from fermented gimchi. Colonies were grown at TSA agar medium plus 3% sucrose (w/v) for 24 h.

3.2. 지실엑기스의 주요성분 분석

지실 열수 추출물로부터 지실의 기능성 성분으로 알려진 hesperidine, naringine, luteolin, imperatorin 을 표준시료와 대조를 하여 실험적

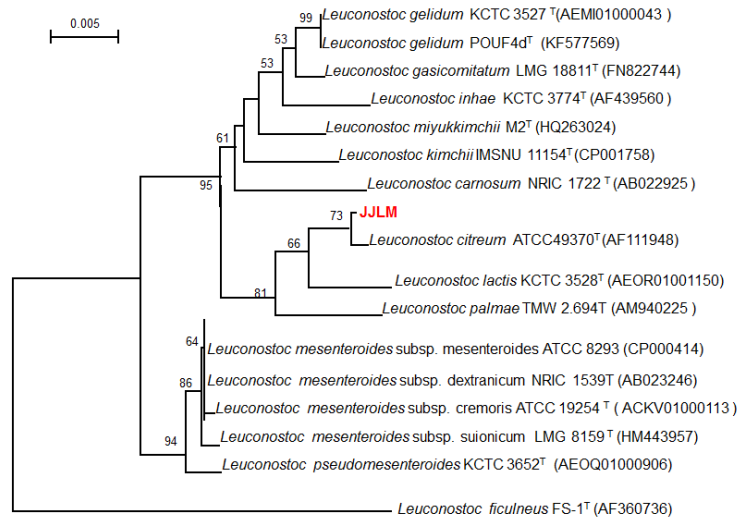


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the phylogenetic relationships of strain JJLM and representative species of the genera *Leuconostoc*. Phylogenetic tree based on rRNA gene sequences showing the position of strain. Numbers at branches are bootstrap values inferred from the BLAST program[20].

으로 동정을 하였다. Fig. 3의 크로마토그램 A는 지실 열수 추출물의 성분들을 보여 주는데 실험 조건에서 hesperidine, naringine, luteoilin, trolox(internal standard), imperatorin 순으로 용출이 되었다. Fig. 3의 크로마토그램 B는 표준샘플 chlorogenic acid, hesperidine, naringine, luteoilin, trolox(internal standard), imperatorin 등의 피크를 보여 주는데 추출물에서는 luteoilin의 검출은 미비 하였고 chlorogenic acid는 검출이 되지 않았다. 크로마토그램에 보여지는 항산화 기능을 지닌 것으로 알려진 배당체로 존재를 하는 플라보노이드인 hesperidine 과 naringine 배당체가 없는 플라보노이드인 luteolin, furocoumarin 계통의 imperatorin의 전형적인 구조는 Fig. 3과 같다.

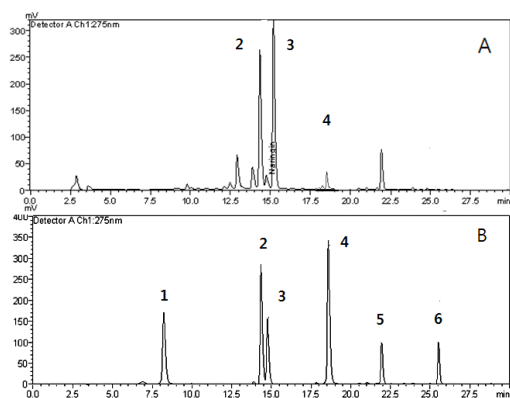


Fig. 3. HPLC chromatograms of extract of *Poncirus trifoliata*. (A) peaks of extract of *Poncirus trifoliata* include hesperidine(2), naringin(3), and luteolin(4). (B) peaks of authentic standards include chlorogenic acid(1), hesperidine(2), naringin(3), luteolin(4), and imperatorin(6). Internal standard is trolox(5).

농도가 알려진 internal standard를 이용하여 각각의 농도를 계산할 결과 hesperidine은 585 mg/100 g, naringine은 307.5 mg/100 g, luteolin은 1.4 mg/100 g, imperatorin은 5.2 mg/100 g 이었다 (Table 1).

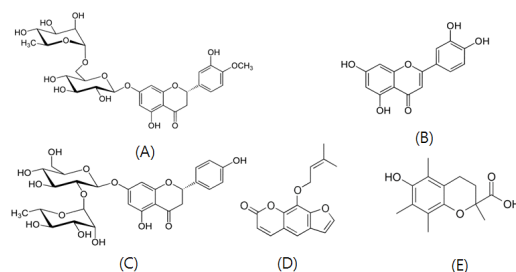


Fig. 4. Chemical structure of (A) hesperidine, (B) luteolin, (C) naringine, (D) imperatorin, and (E) trolox (internal standard).

Table 1. Composition and concentration of bioactive material of *Poncirus trifoliata* extract.

Compounds	Amount (mg/100g)
Hesperidin	585.0
Naringin	307.5
Luteoiln	1.4
Imperatorin	5.2

hesperidine은 플라보논의 배당체로서 항산화능력을 가지는 것으로 알려졌다[21]. 또한 콜레스테롤 및 혈압 수치를 낮추는 것으로 알려졌다[13]. naringin은 지실외에도 포도의 쓴맛에 관여를 하고 항산화 및 함압 작용을 하는 것으로 알려졌다[22]. luteolin은 노란색의 결정체인 플라보노이드로서 라디칼 소거능, 항산화 기능, 항염증 기능을 지니고 있는 것으로 알려졌다[23].

3.3. 총 페놀성 화합물 및 플라보노이드 함량

지실 열수 추출물 및 발효 추출물에 대한 총 페놀성 화합물 및 플라보노이드 함량을 분석을 비교를 하였다. 총 페놀성 화합물은 gallic acid를 대표 지표 물질로하여 측정을 하였는데 지실 열수 추출물에는 71.2±4.58 GAE mg/g의 총 페놀 함량이 있는 것으로 측정이 되었고 반면에 발효 추출물에는 89.2±13.47 GAE mg/g으로 약 25.3% 증가된 것으로 나타났다(Table 2). 지실에 hesperidine, naringine, luteolin으로 대표되는 플라보노이드의 함량을 포함한 총 플라보노이드 화합물은 hesperidine를 대표 지표 물질로하여 측정을 하였는데, 지실 열수 추출물에는 25.1±4.12

mg/g의 총 페놀 함량이 있는 것으로 측정이 되었고 반면에 발효 추출물에는 31.0 ± 4.06 mg/g으로 약 23.5 % 증가된 것으로 나타났다(Table 2).

지실의 생육시기별 어린 지실, 청지실, 노란지실의 총 페놀성 화합물의 양은 각각 45.6, 53.3, 49.3 mg/g이로서 생육시기에 따라 총 폴리페놀의 함량이 다르다[24]. 또한 지실의 부위별 함량을 보면 씨 및 과육보다 과피에 2-3배 많은 것으로 밝혀졌다[25]. 다른 유사한 결과를 보면, 대추씨에는 98.8 mg/g 과육에는 138.9 mg/g으로 나타나 지실과는 다른 결과를 보여준다[26]. 또한 동결 건조한 유자의 과피에는 2.94 mg/g 및 감귤의 과피에는 8.37 mg/g으로 나타나 지실과는 현저한 차이가 있었다[27-28]. 다른 과일로는 산수유에 5.15 mg/g 오미자에는 12.69 mg/g으로 발표가 되었다 [29]. 플라보노이드를 보면 지실의 생육시기별 어린 지실, 청지실, 노란지실의 함유량 각각 27.02, 27.82, 23.74 mg/g로서 생육시기에 따라 총 페놀성 화합물과는 달리 차이가 크지 않았다. 완숙 지실의 부위별 함량을 보면 과육에 20.39 mg/g으로 다른 부위보다 높았다[25]. 대추씨에는 35.56 mg/g 과육에는 131.8 mg/g으로 나타나 지실과는 다른 결과를 보여준다[26]. 산수유에 2.25 mg/g 오미자에는 2.94 mg/g으로 발표가 되었다 [29]. 따라서 본 연구 결과 지실의 총 페놀성 화합물 및 플라보노이드의 양은 대추에 함유된 양과 비슷하였다. 본 연구 결과, 미생물 발효는 항산화에 영향을 미치는 가용 생리 활성 물질의 양을 현저하게 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 미생물의 대사활동으로 생리 활성 물질들이 세포벽 및 세

포 구성 물질에 결합이 되어 있는 형태로부터 유리되기 때문인 것으로 보인다[18]. 본 연구 결과에서는 총 페놀성 화합물 및 플라보노이드의 양이 각각 20% 이상 증가하였다.

3.4. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능

지실 열수 추출물 및 발효 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 및 총 황산화 활성 능력에 대한 측정 결과가 Table 3과 같다. DPPH 소거능은 지실 열수 추출물에는 70.9% 반면에 발효 추출물은 86.2%로 측정이 되었다. 총 황산화 능력은 trolox를 대표 지표 물질로하여 측정을 하였는데 지실 열수 추출물에는 18.7% 발효추출은 26.6%으로 발효를 통하여 약 40% 증가하였다. DPPH의 측정 방법은 산소인 프리 라디칼이 생체 고분자체인 지질 단백질등과 결합을하여 피부의 노화 및 질병을 유발하는 물질로 밝혀진 이래로 황산화 물질의 라디칼 소거능력에 이용이 되고 있다 [30]. 지실의 생육시기별 어린 지실, 청지실, 노란지실의 DPPH 소거능은 0.5 mL 이상에서는 80% 이상의 소거능력을 보여주었다[24]. 지실 과피의 추출물은 다른 부위에 비하여 가장 높게 나타났다[25]. ABTS는 sodium persulfate 첨가에 의하여 ABTS 라디칼로 전환이 되어 파랑색으로 된다. ABTS 라디칼은 황산화 기능을 나타내는 비타민 C, 지용, 페놀성 화합물과 반응을 하여 무색의 중성 형태로 전환이 된다. 반응을 하지 않는 경우에는 ABTS는 안정화 되어있지만 페놀성 화합물과는 강렬하게 반응을 하여 점차 무색으로 된다[31]. 본 연구 보면 발효는 DPPH 및 ABTS 라디칼 반응에 영향을 주는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 앞서 언급을 한 총 페놀성

Table 2. Total phenolic contents and total flavonoid compounds of hot water extract and fermented extract of *Poncirus trifoliata*

	Total phenolic	Total Flavonoid
	GAE (mg/g) ^a	Hesperidine(mg/g) ^b
Extract before fermentation	71.2 ± 4.58	25.1 ± 4.12
Extract after fermentaion	89.2 ± 13.47	31.0 ± 4.06

^a Total phenolic contents were expressed as gallic acid equivalents(GAE) mg/g dried hot water extract. Values are means \pm SD (n=5).

^b Total flavonoid contents were expressed as hesperidine equivalents(GAE) mg/g dried hot water extract. Values are means \pm SD (n=5).

Table 3. DPPH scavenging capacity and total antioxidant activity of hot water extract and fermented extract of *Poncirus trifoliata*

	DPPH radical quenched ^a (%)	Total antioxidant capacity ^b (μmol TE/g)
Extract before fermentation	70.0±9.01	18.7±1.81
Extract after fermentation	86.2±3.72	26.6±4.06

^a The DPPH scavenging capacity was measured at 30 min of antioxidant-radical reaction. Initial concentration of DPPH radicals was 75 μmol. Values are means ±SD (n=5).

^b Data of antioxidant activity were expressed as μmol of trolox equivalents per g dry weight. Values are means ±SD (n=5).

화합물 및 플라보노이드의 양이 발효 후에 증가한 것과 같은 경향으로 보인다. 따라서 본 연구의 결과로부터 지실을 포함한 항산화 기능을 가지고 있는 천연물에 대한 발효는 물질들의 생체이용율을 개선하는 할것으로 기대를 한다. 한편 지실에 포함이 되어있는 항산화 관련 물질들에 대한 생물 전환(bioconversion)은 화학 구조의 전환과 관계있기 때문에 이어지는 연구에서 밝히고자 한다.

4. 결론

본 연구는 지실이 전통적으로 활성 산소의 작용과 관련이 깊은 것으로 알려진 만성적인 염증, 알리지, 노화등의 예방과 치료에 효능이 있음을 알려져 왔다. 그리고 대부분의 생리 활성 물질들은 세포 조직에 결합이 된 채로 존재를 하기 때문에 미생물을 이용한 발효는 조직에 결합되어 있는 생리활성 물질의 유리로 생체이용율(bioavailability) 훨씬 높아지는 것으로 알려졌다. 따라서 본 연구는 GRAS로 알려진 프리바이오틱 균주를 전통식품으로부터 분리하여 지실 추출물을 추출하여 추출물의 기능성분 분석 및 항산화 활성을 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 지실 추출물 발효 가능 균주는 발효 김치로부터 분리를 하였고 16S rRNA의 염기서열을 이용하여 동정한 결과 *Leuconostocs* sp. strain JJLM 으로 명명을 하였다.

2. 지실 열수 추출물의 기능 성분들은 항산화 기능을 가지고 있는 hesperidine, naringine, luteoilin, imperatorin등의 플라보노이드 및 furocoumarin등이 동정이 되었다. 분석결과 지실 건조 추출물당 hesperidine은 585 mg/100 g, naringine은 307.5 mg/100 g, luteolin은 1.4 mg/100 g, imperatorin은 5.2 mg/100 g 이었다

3. 발효를 수행한 결과 지실 열수 추출물을 사용한 경우에는 71.2±4.58 (mg/g)의 총 페놀 함량이 있는 것으로 측정이 되었고 반면에 발효 추출물에는 89.2±13.47 (mg/g)으로 약 25.3% 증가된 것으로 나타났다. 총 플라보노이드 화합물은 지실 열수 추출물에는 25.1±4.12 (mg/g)의 총 플라보노이드 함량이 있는 것으로 측정이 되었고 반면에 발효 추출물에는 31.0±4.06 (mg/g)으로 약 23.5% 증가된 것으로 나타났다.

4. DPPH 소거능은 지실 열수 추출물에는 70.9% 반면에 발효 추출물은 86.2% 측정이 되었다. 총 항산화 능력은 18.7% 발효추출은 26.6%로 발효를 통하여 약 40% 증가하였다.

따라서 이상의 결과들은 미생물 발효를 통하여 천연물에 포함이 되어있는 기능성 물질에 대한 생체 이용률을 높인다면 산화적 스트레스에 의한 피부 노화 완화 및 개선 작용으로 기능성 화장품 및 식품의 소재로 활용 가치를 높여 줄 것으로 기대를 한다.

Acknowledge

이 논문은 2015년도 중부대학교 학술 연구비 지원에 의하여 이루어졌습니다.

References

1. Liyana PCM, Shahidi F: Importance of insoluble bound phenolics to antioxidants properties of wheat. *J Agri food Chem* 54 : 1256-1264, 2006.
2. Rieger MM, Pains M: Oxidative reactions in and on the skin: mechanism and prevention. *Cosmetic Toiletries* 108 : 43-56, 1993.
3. Ruberto G, Baratta MT, Biondi DM, and Amico V: Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *J Appl Phycol* 13 : 403-407, 2001.
4. Harman D: Role of free radicals in aging and diseases. *Ann NY Acad Sci* 673 : 126-132, 1992.
5. Oikarinen A: The aging of skin: chronoaging verse photoaging. *Photodermatol, Phytommunol, photomed* 7 : 3-4, 1990.
6. Shahidi F: Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 44 : 158-163, 2000.
7. Craig WJ : An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bull* 49 : 481-493, 1999.
8. Karl JH, John MF: The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3 : 399-406, 2002.
9. Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer E.K, Prior RL, Huang D: Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *J Agri Food Chem* 50 : 2772-2777, 2002.
10. Lee S, Kim JH, Shun HK: Contents of poncirin and naringin in fruit of *Poncirus trifoliata* according to different harvesting times and locations for two years. *Kor J Pharmacogn* 42: 138-143, 2011.
11. Lee HT, Seo EK, Chung SJ, Shim CK: Prokinetic activity of an aqueous extract from dried immature fruit of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *J Ethnopharmacol* 102 : 131-136, 2005.
12. Kim HM, Kim HJ, Park ST: Inhibition of immunoglobulin E production by *Poncirus trifoliata* fruit extract. *J Ethnopharmacol* 66 : 283-288, 1999.
13. Ogawa K, Kawasaki A, Yoshida T, Nesumi H, Nakano M, Ikoma Y, Yano M: Evaluation of auraptene content in citrus fruits and their products. *J Agric Food Chem* 48 : 1763-1769, 2000.
14. Nizamutdinova IT, Jeong JJ, Xu GH, Lee SH, Kang SS, Kim YS, Chang KC, Kim HJ: Hesperidin, hesperidin methyl chalone and phellopterin from *Poncirus trifoliata* (Rutaceae) differentially regulate the expression of adhesion molecules in tumor necrosis factor- α -stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int Immunopharmacol* 8 : 670-678, 2008.
15. Jayaprakasha GK, Mandadi KK, Poulouse SM, Jadegoud Y, Nagana GGA, Patil BS: Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Poncirus trifoliata* (L.). *Raf Bioorg Med Chem* 15 : 4923-4932, 2007.
16. Lee E: Antihyperlipidemic and antioxidant effects of *Poncirus trifoliata*. *Korea J Plant Res* 19 : 279-276, 2006.
17. Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F, Dayde J: Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chemistry* 109: 709-721, 2008.
18. Katina K, Liukkonen KH, Kaukovirta-Norja A, Adlercreutz H, Heinonen SM, Lampi AM: Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or

- germinated rye. *J Cereal Sci* 46 : 348-355, 2007.
19. Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. CLUSTAL W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680, 1994.
 20. Nidaye M, Philippe C, Mukhtar H, Ahmad N: The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. *Archives Biochem Biophys* 508 : 164-170, 2011.
 21. Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S: Kinetics of radical-scavenging activity of hesperidin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res* 25 : 3367-3374, 2005.
 22. Schindler R, Mentlein R: Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells. *J Nutr* 136 : 1477-1482, 2006.
 23. Kelley KW, Johnson RW: Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proc Natl Acad Sci* 105 : 7534-7539, 2008.
 24. Jeon RH, Choi HJ, Moon SJ, Na MS: The effects of antioxidant and antimicrobial activity with *Poncirus trifoliata* ethanol extracts during growth. *J Kor Soc Cosm* 4 : 1225-1230, 2010.
 25. Lee YS, Yoon HG, Kim NW: The physiological activities of ripe fruit of *Poncirus trifoliata*. *Korean J Food Presev* 17 : 698-705, 2010.
 26. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS: Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *J Food Sci Technol* 38: 128-134, 2006.
 27. Ahn MS, Kim HJ, Sed MS: A study on the antioxidative and antimicrobial activities of the *Cirus unshju* peel extracts. *Korean J Food Culture* 22: 454-461, 2007.
 28. You JM, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR: Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338, 2005.
 29. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR: Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Sci Technol* 36 : 333-338, 2004.
 30. Pitchumoni SS, Doraiswamy PM: Current status of antioxidant therapy for alzheimers disease. *J Am Geriatr Soc* 46 : 1566-1572, 1998.
 31. Miller NJ, Davis MJ, Copinaththan V, Milner A: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonants. *Clinical Science* 26 : 265-277, 1993.