효소 처리한 진피의 생리활성

박혜원 · 이승철

경남대학교 바이오융합학부

Physiological Activities of Enzyme-Treated *Citrus sunki* Hort. Tanaka Peel

Hye-Won Park and Seung-Cheol Lee

School of Bioconvergence, Kyungnam University

ABSTRACT Commercial enzymes namely Celluclast, Pectinex, and Viscozyme were treated with *Citrus sunki* Hort. Tanaka peel (CP), and the extraction yield, total phenolic content, total flavonoid content, DPPH radical scavenging activity, nitrite scavenging activity, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition activity, and the effect on the alcohol metabolic enzyme activity of the CP reactants were determined. As a result, Celluclast was selected as an appropriate enzyme to increase the physiological activities of CP. The optimal reaction conditions were found to be a pH of 4.5, at 50°C for 48 h. The above results suggest that the enzyme treatment method can help in the development of functional foods using CP.

Key words: *Citrus sunki* Hort. Tanaka peel, enzyme treatment, Celluclast, ACE inhibition activity

서 론

감귤류(*Citrus*)는 각종 비타민, 무기질, 플라보노이드를 비롯한 페놀 화합물, 카로티노이드와 리모노이드 등의 테르페노이드를 포함하여 약 170여 개 이상의 생리활성 물질을 함유하는 것으로 알려져 있다(Zou 등, 2016). 예부터 한의학에서는 천식, 가래, 위장장애, 동맥경화 등에 효과가 있다고 하여 감귤의 과피를 말려 약재로 사용하였다. 그중에서도 제주 자생종인 진귤(*Citrus sunki* Hort. Tanaka)의 과피를 으뜸으로 하였으며 이를 진피라 한다(Chung 등, 2000). 산귤이라고도 불리는 진귤의 과피(진피)는 일반 감귤의 과피에 비해 감귤류 특유의 hesperidin, naringin, tangeretin, nobiletin 등의 polymethoxyflavones(PMFs)와 각종 페놀 화합물을 더 많이 함유하는 것으로 보고되었다(Ko와 Lee, 2015; Hyon 등, 2010).

그러나 대부분의 유용 생리활성 물질들은 주로 식물 세포벽의 구성 성분과 결합한 형태로 존재한다. 특히 플라보노이드 화합물은 전체 중 약 50~80%가 배당체 형태로 체내에서 활용되기 어려우며, 비배당체 형태에 비해 생체 이용률 및 항산화, 항염, 항암, 지질과산화억제 활성 등이 낮은 것으로

알려져 있다(Cha와 Cho, 2001; Ratty와 Das, 1988). 이에 따라 불용성의 고분자 화합물 및 플라보노이드의 생체 이용률을 높이기 위해 가열, 효소 반응, 마이크로파 처리 등 다양한 방법이 응용되고 있다(Huang 등, 2006; Ahn 등, 2005; Hayat 등, 2009). 효소는 안정적으로 식물 세포벽의 구성 성분을 분해하여 수용 및 여과성을 증대시키고, 생리활성 물질의 용출을 도우며, 고분자 화합물을 저분자 형태로 전환시킬 수 있어 식품가공 산업에서 널리 이용되고 있다(Park과 Kim, 2009; Park 등, 2019). 최근 효소를 이용한 기능성 물질 추출에 대해 노니주스의 스코폴레틴 함량 증가(Kim 등, 2020), 토마토의 라이코펜 추출 수율 증가(Choudhary와 Ananthanarayan, 2007) 및 사과껍질로부터 총 페놀 함량 증가에 따른 항산화 활성 증가(Park과 Kim, 2009)가 보고되었다. 또한 효소를 이용하여 감귤 과피에 존재하는 배당체 형태의 플라보노이드를 aglycone 형태로 전환시켜 유용 생리활성 성분의 추출성을 증진시켰다고 보고되었다(Ahn 등, 2005; Park 등, 2019).

본 연구에서는 탄수화물 분해와 관련한 상업용 효소를 진피에 처리하여 그 분해물의 생리활성을 분석하였고 이를 통해 진피의 이용성을 향상시키고자 하였다.

Received 2 July 2021; Revised 31 August 2021; Accepted 15 September 2021

Corresponding author: Seung-Cheol Lee, School of Bioconvergence, Kyungnam University, 7, Gyeongsangdaehak-ro, Masanhappo-gu, Changwon-si, Gyeongsang 51767, Korea, E-mail: sclee@kyungnam.ac.kr

Author information: Hye-Won Park (Graduate student), Seung-Cheol Lee (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

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

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용된 진피는 제주다복산물 농장에서 2019년 1월 수확된 진귤(*Citrus sunki* Hort. Tanaka)을 구입하여 과피를 모은 뒤 상온에서 5일간 자연 건조시킨 것을 사용하였다. 진피는 곱게 분쇄하여 35 mesh 체에 거른 후 통과한 분말을 -70°C deep freezer에 보관하면서 시료 제조에 사용하였다. 실험에 사용된 효소는 액상 타입의 Celluclast[®] 1.5L(cellulase), Pectinex[®] Ultra SP-L(Pectinase mix), Viscozyme[®] L(Carbohydrase mix)로 Novozyme Co. (Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하였으며, 분석에 사용된 acetaldehyde, acetaldehyde dehydrogenase(ALDH), alcohol dehydrogenase(ADH), ascorbic acid, captopril, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), ethyl acetate, ethanol, Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, HCl, hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL), 2-mercaptoethanol, methyl alcohol, NAD^{+} , 1-naphthylamin, quercetin, rabbit lung acetone powder, Tris(hydroxymethyl)-amino-methane은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 그 외의 시약은 분석용 특급 이상을 사용하였다.

효소 처리 진피 시료 제조

초기 효소 처리 실험에서는 진피 분말 1 g에 증류수 99 mL를 넣고, pH를 4.5로 맞춘 뒤 각 효소 1 mL를 넣은 것을 100 rpm, 50°C 의 진탕배양기(Daewon Science, Bucheon, Korea)에서 24시간 반응시켰다. 이후 90°C 에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시킨 후 Whatman No. 1 여과지(Whatman, Maidstone, UK)로 감압 여과하였다. 여과액을 원심분리(4°C , 10 min, 5,000 rpm)하여 얻은 상정액을 최종 분석 시료로 사용하였다. 이상의 실험에서 적합 효소를 정한 뒤, 해당 효소와 진피 간의 최적 반응조건을 구하기 위하여 단계별로 pH(4.5, 5.0, 5.5, 6.0), 온도(50°C , 55°C , 60°C), 시간(12 h, 24 h, 36 h, 48 h)을 달리하여 효소를 처리한 후 위와 같은 방법으로 분석 시료를 제조하였다.

총 페놀 함량

효소 처리 진피 시료의 총 폴리페놀 함량은 Gutfinger (1981)의 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 시료 1 mL에 2% Na_2CO_3 1 mL를 첨가하고 실온에서 3분간 반응시킨 뒤 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 첨가하여 20분간 암반응 시켰다. 그 후 $12,000\times g$ 에서 10분간 원심분리한 후 상정액을 분리하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(GA)를 사용하여 작성한 표준 농도곡선으로부터 환산하여 GA 당량(GAE/mL)으로 산출하였다.

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Chang(2002)의 방법을 참고하여 측정하였다. 효소 처리 진피 시료 0.5 mL에 95% ethyl alcohol 1.5 mL와 10% AlCl_3 , 1 M potassium acetate 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 넣고 혼합하여 25°C 에서 30분간 반응시킨 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정한 값을 quercetin으로 작성한 표준곡선과 비교하여 quercetin 당량(QE/mL)으로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성

효소 처리 진피 시료의 DPPH 라디칼 소거 활성은 Jeong 등(2004)의 방법에 따라 시료 0.1 mL에 0.041 mM DPPH 0.9 mL를 넣어 섞고, 상온에서 30분간 암반응한 뒤 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조구는 ascorbic acid를 사용하였으며, 음성대조구로는 시료 대신 증류수를 사용하였다. 각 시료의 DPPH 라디칼 소거 활성은 아래의 식과 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

아질산염 소거 활성

아질산염 소거 활성(nitrite scavenging ability, NSA)은 Kato 등(1987)의 방법을 참고하여 분석하였다. 먼저 각 시료 1 mL를 1 mM NaNO_2 1 mL와 혼합한 뒤 HCl 또는 citrate buffer(pH 1.2, 3.0, 6.0) 8 mL를 가하여 37°C 에서 1시간 반응시켰다. 이 용액 1 mL에 2% acetic acid 2 mL 및 Griess reagent 0.4 mL를 가하여 상온에서 15분간 반응시킨 뒤 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거 활성에 대한 반응식은 아래의 식과 같다.

$$\text{아질산염 소거 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

ACE 저해 활성

Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 활성은 Cushman과 Cheung(1971)의 방법에 따라 분석하였다. 먼저 1 g의 rabbit lung acetone powder에 50 mM sodium borate buffer(pH 8.3) 20 mL를 넣고 4°C 에서 24시간 교반한 후, 10분간 원심분리(4°C , $5,000\times g$)하여 ACE 조효소액을 얻었다. 이후 각 농도로 희석한 시료 50 μL 에 ACE 조효소액 50 μL 를 가하여 37°C 에서 10분간 방치 후, 5 mM의 HHL 100 μL 를 첨가하여 다시 37°C 에서 60분간 반응시켰다. 이에 1 M HCl 250 μL 를 가하여 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 0.5 mL를 첨가하여 30초간 교반하고 원심분리(4°C , 10 min, $5,000\times g$)하였다. 여기서 얻은 상정액 200 μL 를 80°C 에서 30분간 완전히 건조시킨 뒤, 증류수 1 mL를 가하여 균질화시킨 것을 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조구로는 captopril을 사용하였으며, ACE 저해 활성은 아래 식과 같이 계산하였다.

$$\text{ACE 저해 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH) 활성

효소 처리 진피 시료의 ADH 활성에 미치는 영향의 분석은 Bergmeyer(1974)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 증류수 0.7 mL에 1.0 M Tris-HCl buffer(pH 8.8) 0.38 mL, 20 mM NAD⁺ 0.15 mL, 0.2 M ethanol 0.15 mL를 가하고, 시료 50 µL를 첨가하여 섞은 후, 25°C 항온수조에 10분간 방치하였다. 그 후 ADH(0.25 unit/mL) 27.5 µL를 넣고 25°C에서 30분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조구로는 Hepos를 사용하였으며, 상대 활성(%)을 나타내기 위한 음성 대조구는 시료 대신 증류수를 사용하였다. ADH 활성은 아래 식으로 구하였다.

$$\text{ADH 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{실험구의 최대 흡광도}}{\text{대조구의 최대 흡광도}}\right) \times 100$$

아세트알데하이드 탈수소효소(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH) 활성

효소 처리 진피 시료의 ALDH 활성에 미치는 영향의 분석은 Koivula와 Koivusalo(1975)의 방법에 따라 측정하였다. 1.0 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 0.15 mL와 증류수 1.05 mL에 20 mM NAD⁺ 50 µL, 0.1 M acetaldehyde 50 µL, 3.0 M KCl 50 µL, 0.33 M 2-mercaptoethanol 50 µL를 가한 뒤, 시료 50 µL를 혼합하여 25°C에서 10분간 방치하였다. 이에 ALDH(0.1 unit/mL) 50 µL를 가하여 다시 25°C에서 15분간 반응시킨 것을 340 nm에서 측정하였다. 음성 대조구와 양성 대조구 및 ALDH 활성의 계산 방법은 ADH 활성과 동일하다.

$$\text{ALDH 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{실험구의 최대 흡광도}}{\text{대조구의 최대 흡광도}}\right) \times 100$$

통계 처리

모든 분석은 각 시료당 3 반복을 통해 이루어졌으며, IBM SPSS Statistics 23.0(SPSS, Armonk, NY, USA)의 Duncan's multiple range test를 사용하여 통계 처리하였다. 각 분석 결과의 평균값과 표준편차를 산출한 뒤 일변량 분석과 상관관계를 분석하였으며, $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

Celluclast, Pectinex, Viscozyme으로 처리한 진피의 특성

식물의 유용 물질 추출을 위해 일반적으로 이용되는 탄수화물 분해와 관련한 상업용 효소 Celluclast, Pectinex, Viscozyme으로 진피를 처리하였다. Celluclast는 cellulase를 주된 효소로 함유하고, 최적 조건은 pH 4.0~6.0, 50~60°C이다. Pectinex는 pectinase, pectintranseliminase,

pectiesterase를 함유하며 최적 조건은 pH 4.5 부근으로 50°C이고, Viscozyme은 arabanase, cellulase, β-glucanase, hemicellulase 및 xylanase 등을 함유한 탄수화물 가수분해 효소 복합물로써 pH 3.5~5.5, 25~55°C에서 잘 작용한다(Novozyme, 2021). 이들 3종류의 상업용 효소가 진피에 미치는 영향을 알기 위하여 pH 4.5, 50°C 조건에서 24시간 반응시킨 후, 그 분해물을 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다.

추출 수율: 효소 처리 진피 시료의 추출 수율을 분석한 결과 모든 시료는 60% 이상이였으며 효소를 처리하지 않은 대조구(52.00%)에 비해 수율이 증가하였다. 특히 Viscozyme 처리군이 77.32%로 가장 높은 수율을 보였으며, Celluclast 처리군도 75.49%로 비교적 높았다. 일반적으로 식물의 세포벽에는 cellulose, hemicellulose, pectin 등이 함유되어 있으며, 감귤 과피는 수용성 식이섬유와 불용성 식이섬유가 각 1.09%, 4.77%, 총 식이섬유 5.86%를 함유한다(Eun 등, 1996). Lee 등(2007)은 감귤 과피에 Viscozyme을 처리한 결과 효소가 처리됨에 따라 가용성 고형분의 함량이 증가하며, 플라보노이드를 비롯한 기능성 성분이 효과적으로 유리되었다고 보고하였다. 진피의 경우에는 Viscozyme과 Celluclast가 고형분 추출에 유리함을 확인하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량: 각 효소가 진피 시료의 주요 기능성 성분에 미치는 영향을 조사하기 위하여 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석하였다. 그 결과 효소를 처리한 진피 시료의 총 폴리페놀 함량은 Viscozyme (435.87 µg GAE/mL), Pectinex(411.37 µg GAE/mL), Celluclast(403.03 µg GAE/mL) 순으로 나타났으며, 대조구(141.20 µg GAE/mL)보다 유의적으로 크게 증가하였다. Park 등(2019)은 감귤 과피에 Viscozyme과 Pectinex를 처리하였을 때 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 증가하였다고 보고하였으며, Zheng 등(2009)은 탄수화물 가수분해 효소를 사용하여 미숙 사과를 추출한 결과 Viscozyme, Pectinex, Celluclast 순으로 페놀이 많이 용출되었다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하는 경향을 보였다.

일반적으로 진피의 우수한 생리활성은 이에 다량 함유된 ferulic acid, coumaric acid, vanillic acid 등의 phenolic acids와 각종 플라보노이드가 크게 기인하는 것으로 보고된다(Hayat 등, 2009; Hyon 등, 2010). 그중에서도 감귤류 특유의 플라본을 비롯한 플라보노이드 성분들은 항염, 항산화, 항암 등의 활성을 나타내며, 특히 항산화 활성과의 상관성이 매우 높은 것으로 알려져 있다(Chung 등, 2000; Yu 등, 2014). 효소 처리에 따른 진피 시료의 총 플라보노이드 함량은 효소가 처리되지 않은 대조구의 총 플라보노이드 함량이 19.12 µg QE/mL일 때, Celluclast를 처리한 진피 시료가 29.12 µg QE/mL로 가장 우수한 함량을 나타내었고, Viscozyme과 Pectinex 처리군의 경우 각각 17.74 µg QE/mL, 17.32 µg QE/mL로 나타나 비교적 낮은 플라보노이드 용출성을 보였다. Park 등(2019)은 감귤 과피에 효소

Table 1. Comparative analyses of *Citrus sunki* (Hort. Tanaka) peel extract treated with three different enzymes

Enzyme	Yield ²⁾ (%)	TPC (μg GAE/mL)	TFC (μg QE/mL)	DPPH RSA (%)	NSA (%)			ACE IA (%)	ADH (%)	ALDH (%)
					pH 1.2	pH 3.0	pH 6.0			
Non ¹⁾	52.00±0.02 ^{c3)}	141.20±1.32 ^d	19.12±0.86 ^b	82.77±1.08 ^b	28.88±0.36 ^d	17.90±2.74 ^d	7.59±0.30 ^d	13.21±0.51 ^d	320.33±2.52 ^b	216.35±0.32 ^b
Celluclast	75.4±0.01 ^a	403.03±0.29 ^c	29.12±0.74 ^a	85.41±0.34 ^a	40.12±0.16 ^c	30.72±0.26 ^c	10.86±0.30 ^b	45.16±0.10 ^a	343.67±1.04 ^a	246.94±0.57 ^a
Pecticex	67.74±0.01 ^b	411.37±0.76 ^b	17.32±0.59 ^c	82.62±0.79 ^b	47.10±0.14 ^b	36.23±0.48 ^b	12.03±0.22 ^a	36.32±1.58 ^c	282.67±2.52 ^c	192.51±1.92 ^d
Viscozyme	77.32±0.01 ^a	435.87±1.26 ^a	17.74±0.55 ^c	84.46±0.34 ^a	54.44±0.14 ^a	41.35±0.13 ^a	9.83±0.42 ^c	40.91±1.18 ^b	283.17±1.44 ^c	196.26±1.24 ^c

TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoid content; DPPH RSA, DPPH radical scavenging activity; NSA, nitrite scavenging activity; ACE IA, ACE inhibition activity; ADH, alcohol dehydrogenase activity; ALDH, acetaldehyde dehydrogenase activity.

¹⁾*C. sunki* peel extract non enzyme-treated.

²⁾Extraction yield from *C. sunki* peel.

³⁾Means with different letters (a-d) within a column are significant difference according to Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

Ascorbic acid, a positive control, showed 27.33% of DPPH radical scavenging activity at 10 μg/mL concentration.

The ADH and ALDH activity of Hepos, a positive control, showed 298.48±1.01% and 170.41±0.99%, respectively.

Captopril, a positive control, showed 17.88% and 45.31% of ACE inhibition activity at 0.1 and 0.3 μg/mL concentration, respectively.

처리를 하였을 때 주요 플라보노이드인 heperidin과 nari-rutin의 함량은 비배당체로 분해됨에 따라 감소하였으나 총 플라보노이드의 함량이 증가하였다고 보고하였다. Ruviaro 등(2019)에 따르면 Celluclast의 처리는 감귤류의 부산물에서 대조군 대비 narirutin 함량이 약 4.7배, hesperidin 함량 약 2.4배를 증가시키는 것으로 나타나 Celluclast가 페놀성 화합물을 추출하는데 가장 효율적이라고 보고하였다.

항산화 활성: 각 시료의 항산화능을 DPPH 라디칼 소거 활성을 통해 분석하였다. 그 결과 효소 처리를 하지 않은 대조군이 82.77%일 때 Celluclast 처리군이 85.41%로 가장 높은 라디칼 소거능을 보였으며, 그 외 Viscozyme, Pectinex 처리군이 각각 84.46%, 82.62%의 라디칼 소거능을 보였다. 양성대조구인 ascorbic acid의 경우 10 μg/mL의 농도일 때 27.33%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 효소를 처리함에 따라 진피 추출물은 대조구에 비해 라디칼 소거 활성이 증가하는 경향을 보였으나 유의적으로 큰 차이는 없었다. 식물의 우수한 항산화 활성은 플라보노이드나 이를 비롯한 페놀성 화합물에 기인하는 것으로 잘 알려져 있으나 본 연구의 DPPH 라디칼 소거 활성 결과는 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량의 경향과 다소 차이를 보였다. Lee 등(2012)은 귤껍질을 포함한 각종 과일껍질의 우수한 DPPH 라디칼 소거 활성이 폴리페놀 화합물에 기인한다기 보다 자체 내 함유된 비타민 C와 더 높은 상관성을 가진다고 보고하였다. 감귤류의 과육에는 16.78~58.30 mg/100 g의 비타민 C가 함유되어 있으며(Najwa와 Azlan, 2017), 과육과 껍질의 비타민 C 함량은 크게 차이가 없다고 보고되었다(Elkhatim 등, 2018). 또한 Yoo와 Moon(2016)은 감귤 껍질에 대해 카로티노이드와 비타민 C가 강력한 항산화 활성을 나타내었으며, 감귤 과피 100 g당 총 카로티노이드 60.1 mg, 비타민 C 74.6 mg을 가진다고 보고하였다. 따라서 본 연구결과에서 나타난 진피 시료의 우수한 DPPH 라디칼 소거 활성은 페놀 화합물보다 비타민 C나 카로티노이드와 같은 항산화 물질이 직접적으로 관여했을 것으로 추측된다.

아질산염 소거 활성: 각 효소 처리 시료의 아질산 소거능(NSA)은 무처리 대조군에 비하여 모두 우수한 소거능을 나타냈으며 pH 영역이 낮을수록 더 높은 소거 활성을 보였다. 특히 산성영역인 pH 1.2와 3.0에서 Viscozyme 처리군이 41.35~54.44%의 가장 우수한 아질산 소거능을 보였으며, pH 6에서는 Pectinex 처리군(12.03%)과 Celluclast 처리군(10.86%)이 우수한 아질산 소거 활성을 보였다. 질산염은 주로 채소류 및 육류가공품에 함유되어 있으며 체내 다량 축적될 경우 methemoglobinemia 등의 중독 증상과 아질산염, 제 2급 및 제 3급 아민과의 nitrosation을 일으켜 발암물질인 N-nitrosamine을 생성한다(Kang 등, 1996). 이러한 nitrosation은 위장 내부와 같은 산성조건에서 더 쉽게 일어날 수 있다. Cooney와 Ross(1987)에 의하면 각종 페놀성 화합물은 특히 산성조건에서 nitrosating agents에 의해 quinone 물질로 산화되어 아민류와 반응하는 nitrite를 ni-

trite oxide로 변환시킴으로써 nitrosation 반응을 강력하게 억제하는 것으로 보고된다. 따라서 효소 처리한 진피 시료의 우수한 아질산 소거능은 효소 처리에 따라 용출된 다양한 페놀성 물질과 관련이 높은 것으로 추측된다.

ACE 저해 활성: ACE(dipeptidyl carboxypeptidase)는 Angiotensin I을 혈관 수축제로 작용하는 Angiotensin II로 전환시키는 효소로, renin-angiotensin system(RAS)에서 혈압조절과 심혈관 기능에 중요한 역할을 하며 항고혈압의 지표로 널리 사용되고 있다(Li 등, 2004). 효소를 처리한 진피 추출물의 항고혈압 활성을 분석하기 위하여 ACE 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 Table 1에 나타난 바와 같이 Celluclast 처리구가 45.16%로 가장 우수한 저해 활성을 보였고, Viscozyme, Pectinex 처리구가 각 40.91%, 36.32%의 ACE 저해 활성을 보였다. 이 중 가장 우수한 ACE 저해 활성을 보인 Celluclast 처리구는 무처리 대조구(13.21%) 대비 약 3.4배 더 높은 저해 활성을 나타내었으며, 양성 대조구인 captopril과 비교하였을 때 0.3 µg/mL 농도의 저해 활성(45.31%)과 유사한 수준이었다. Lee 등(2007)은 효소를 처리하지 않은 감귤(*C. unshiu*) 과피 플라보노이드 추출액(10 mg/mL)의 경우 5.26%의 낮은 ACE 저해 활성을 보였으나, Viscozyme를 처리하면 동일 조건에서 71.15%의 높은 ACE 저해 활성을 나타내었다고 보고하여 본 연구와 일치하는 경향을 보였다.

일반적으로 ACE 저해제와 관련하여 각종 peptide 및 페놀성 화합물, 키토산 올리고당, benzyl succinate 유도체 등이 우수한 ACE 저해 활성을 나타낸다고 보고하고 있다(Li 등, 2004; Hong 등, 1998; Choi 등, 2000; Vázquez-Valadez 등, 2013). Hidalgo 등(2012)에 따르면 페놀성 화합물은 O-glycoside 구조 및 hydroxyl 그룹에 의해 ACE 중심 내 아연 원자와 킬레이트 복합체를 형성함으로써 ACE 저해 활성을 나타낸다고 하며 caffeic acid와 gallic acid, coumaric acid 등의 일부 페놀산 및 flavane-3-ols를 포함하는 페놀 화합물이 우수한 ACE 저해 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다(Lacaille-Dubois 등, 2001). 따라서 본 연구의 진피 시료에서 나타난 ACE 저해 활성은 효소가 처리됨에 따라 용출된 진피의 페놀성 화합물이 큰 영향을 미쳤을 것으로 유추된다.

알코올 분해대사 효소 활성에 미치는 영향: ADH(alcohol dehydrogenase)와 ALDH(aldehyde dehydrogenase)는 간에 존재하는 알코올 분해대사의 주요 효소로, ADH에 의해 체내로 들어온 알코올이 acetaldehyde로 분해되고, 이를 다시 ALDH가 acetic acid로 산화시킨다. 효소 처리한 진피 추출물이 알코올 분해대사 효소 활성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 ADH 및 ALDH 활성을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 추출물이 첨가되지 않은 음성 대조구의 효소 활성을 100%라고 하였을 때, 진피 시료 모두 100% 이상의 우수한 ADH, ALDH 활성을 나타내었다. 효소를 처리하지 않은 진피 시료의 경우 ADH, ALDH 활성은 각각 320.33%,

216.35%였다. Viscozyme과 Pectinex 처리구는 무처리구보다 유의적으로 ADH, ALDH 효소 활성을 높이지 못하였으나 Celluclast를 처리한 진피 시료의 경우 ADH 활성 343.67%, ALDH 활성 246.94%로 증가하였다. 이는 양성 대조구인 Hepos 원액(ADH 298.48%, ALDH 170.41%)보다 더 뛰어난 수준이었다. Hwang 등(2010)은 진피를 포함하는 한방음료의 우수한 알코올 대사 효소 활성과 간 기능 개선 효과에 대해 보고하였으며, Cui 등(2007)은 유산균과 효모를 사용하여 제조한 진피 발효물이 우수한 ADH, ALDH 활성과 간세포 보호효과를 나타낸다고 보고하였다.

한편, 진피와 달리 일반적인 감귤의 과피는 ADH와 ALDH 활성을 유의적으로 증진시키지 못하는 것으로 보고되었다(Do 등, 2017; Hwang 등, 2019). 진피는 일반 감귤 과피에 비해 naringin 및 polymethoxyflavones(PMFs)와 같은 감귤류 특유의 플라보노이드 성분과 그 외 페놀 화합물, 조단백질, 조지방 함량을 더 많이 포함하는 것으로 알려져 있다(Choi 등, 2007; Hwang 등, 2013; Hyon 등, 2010). 특히 진피에 다량 함유된 naringin은 ADH, ALDH 활성 모두를 효과적으로 증진시키며, hesperidin은 ADH 활성, rutin은 ALDH 활성을 크게 증가시켜 알코올성 신경 독성으로부터 세포 보호효과를 가진다(Seo 등, 2003; Kim 등, 2006; Song 등, 2014). 따라서 진피에 함유된 일부 플라보노이드 화합물들이 알코올 분해대사 효소 활성을 증진시키는 것으로 추측되며, Celluclast가 이러한 유용 성분들을 가장 효과적으로 용출시키는 것으로 판단된다.

상관관계: 각기 다른 효소를 처리한 진피 추출물의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거 활성, 아질산염 소거 활성 그리고 ACE 저해 활성 및 ADH, ALDH 효소 활성에 대한 상관관계를 분석하여 Table 2에 나타내었다. 그 결과 ADH와 ALDH 효소 활성간의 상관관계수가 0.976으로 가장 높게 나타났으며, 이들은 모두 총 플라보노이드 함량과의 상관성이 매우 높았다. 따라서 효소 처리한 진피 추출물의 우수한 알코올 대사 효소 활성은 진피 내 함유된 naringin, hesperidin, rutin 등의 플라보노이드류에 큰 영향을 받은 것으로 보인다.

한편 DPPH 라디칼 소거 활성은 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량에 대한 상관관계수가 각각 0.454, 0.659로 나타나 비교적 낮은 상관성을 보였다. Lee 등(2012)의 보고에 따르면 감귤류의 높은 DPPH 라디칼 소거 활성은 페놀성 화합물보다 자체 내 함유된 비타민 C의 항산화 작용과 더 밀접한 관계를 갖는 것으로 나타났으며, Del Caro 등(2004)도 감귤류의 항산화 능력이 플라바논 배당체의 존재보다는 비타민 C 함량과 높은 상관성을 가진다고 보고하였다.

아질산염 소거 활성은 총 페놀 함량과 상관성이 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 phenolic acids 대부분 우수한 아질산 소거능을 보인 반면, 상대적으로 수용성이 낮은 naringin, hesperidin 등 일부 플라보노이드 화합물은 아질산 소거능을 보이지 않았다고 보고한 Kang 등(1996)의 결과와

Table 2. Correlation analysis in TPC, TFC, DPPH RSA, NSA, ACE IA, ADH, and ALDH of *Citrus sunki* (Hort. Tanaka) peel extracts treated with enzymes

	TPC	TFC	DPPH RSA	NSA	ACE IA	ADH	ALDH
TPC	1	0.136	0.454	0.891**	0.954**	-0.352	-0.154
TFC		1	0.659*	-0.269	0.406	0.873**	0.948**
DPPH RSA			1	0.250	0.641*	0.427*	0.572
NSA				1	0.750**	-0.681*	-0.517
ACE IA					1	-0.068	0.138
ADH						1	0.976**
ALDH							1

TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoid content; DPPH RSA, DPPH radical scavenging activity; NSA, nitrite scavenging activity; ACE IA, ACE inhibition activity; ADH, alcohol dehydrogenase activity; ALDH, acetaldehyde dehydrogenase activity.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

유사하였다.

ACE 저해 활성의 경우 총 페놀 및 플라보노이드 함량 모두에 영향을 받았으나 총 페놀 함량과의 상관관계수가 0.954로 플라보노이드보다 더 우수한 상관성을 나타내었다. 이는 페놀 화합물의 함량이 증가함에 따라 ACE 저해 활성이 강화되었다는 Kessy 등(2018)의 보고와 일치하였으며, 플라보노이드 및 페놀성 화합물의 ACE 저해 활성을 위한 킬레이트 생성은 페놀성 수산기에 의해 수행될 수 있다는 Lacaille-Dubois 등(2001)의 보고를 근거로 하였을 때 본 연구에서 나타난 ACE 저해 활성은 진피의 페놀성 화합물이 크게 기인하였을 것으로 추측된다.

Celluclast 처리 조건 검토

상기 결과를 바탕으로 진피의 생리활성 추출에 유리한 Celluclast를 선택하여 다양한 조건에서 처리하여 최적의 조건을 구하였다.

최적 pH: Celluclast의 반응 추천 범위인 pH 4.5~6.0 사이의 4가지 조건에서 효소를 처리하였다. 그 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 추출 수율은 pH 4.5일 때 75.83%로 가장 높았으며, pH가 증가할수록 추출 수율이 감소하는 모습을 보였다. 이러한 결과는 Cho와 Yoo(1997)가 양파에 Celluclast와 Pectinex를 처리하였을 때 나타난 pH의 영향과 일치하였다. 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량은 pH가 낮을수록 유의적으로 높게 나타났으며, 아질산염 소거 활성과 ACE 저해 활성 또한 pH가 낮을수록 활성이 높게 나타나 pH 4.5에서 가장 우수한 활성을 나타내었다. 한편 알코올 분해대사의 주요 효소인 ADH와 ALDH 활성 및 DPPH 라디칼 소거 활성은 유의적으로 거의 차이를 보이지 않았으나 이들 또한 pH 4.5에서 가장 높은 효소 활성을 보였다.

최적 온도: Celluclast의 반응 추천 온도 범위 내(50, 55, 60°C)에서 제조한 진피 시료의 분석 결과는 Table 4와 같다. 추출 수율은 50°C에서 76.49%로 가장 높은 수율을 보였으며, 55°C에서는 74.16%, 60°C에서는 66.83%의 수율을 나타내어 온도가 상승할수록 감소하였다. 총 폴리페놀 함량에서 또한 동일한 양상을 나타내어 50°C 처리구에서

가장 높은 함량(409.90 µg GAE/mL)을 보였다. 한편 총 플라보노이드 함량은 55°C 반응구(29.05 µg QE/mL), 50°C 반응구(26.11 µg QE/mL), 60°C 반응구(23.16 µg QE/mL) 순으로 나타나 55°C에서 가장 우수한 함량을 보였다. ADH 효소 활성 또한 총 플라보노이드 함량과 동일한 55°C 반응구(344.20%)에서 가장 높은 활성을 보였으나 50°C와 유의적인 차를 보이지 않았다. 이들을 제외하고 DPPH 라디칼 소거 활성 및 아질산염 소거 활성을 비롯한 모든 분석에서는 온도가 낮을수록 높은 활성을 나타내었다. 따라서 Celluclast를 처리하여 진피 추출물을 제조할 때의 반응 온도는 50°C가 가장 적합한 것으로 판단되었다.

최적 추출 시간: Celluclast를 처리한 진피의 최적 추출 시간 설정을 위해 12~48 h의 조건에서 진피 시료를 제조하였다. 그 결과 Table 5에 나타난 바와 같이 추출 수율은 48 h 처리하였을 때 81.16%로 가장 높은 수율을 얻었으며 추출 시간이 증가할수록 수율 또한 증가하는 모습을 보였다. DPPH 라디칼 소거 활성 및 아질산염 소거 활성은 추출시간이 증가할수록 활성이 감소하는 경향을 보였으나 유의적으로 큰 차이는 아니었다. 이들을 제외한 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, ACE 저해 활성 그리고 ADH, ALDH 효소 활성은 모두 추출시간이 증가할수록 유의적으로 높은 결과를 보였다. 특히 총 플라보노이드 함량의 경우 48 h 처리구(51.38 µg QE/mL)는 12 h 처리구(26.42 µg QE/mL) 대비 약 2배 가량 함량이 증가하였으며, ACE 저해 활성은 약 1.3배 증가한 모습을 보였다. Ahn 등(2005)에 의하면 효소 처리의 시간이 증가함에 따라 감귤 추출물의 naringenin과 hesperetin의 함량은 증가하는 경향을 보였으며, 24~48 h 처리 시 배당체에서 aglycone 형태로의 전환량이 가장 높게 나타났다고 보고하였다. 따라서 진피의 기능성 추출을 위한 효소 Celluclast의 최적 반응시간은 48시간이 적합할 것으로 보인다. 이상에서 확인한 진피에 대한 Celluclast의 최적 처리 조건(pH 4.5, 50°C, 반응시간 48 h)에서 제조한 진피 시료는 효소를 처리하지 않은 대조구에 비하여 총 페놀 및 플라보노이드의 함량이 약 3배 증가하였으며, 특히 ACE 저해 활성에서는 약 4배가량 증가하였다.

Table 3. Effect of pH on Cellulast enzyme-treated *Citrus sunki* (Hort. Tanaka) peel extract

pH	Yield ¹⁾ (%)	TPC (μ g GAE/mL)	TFC (μ g QE/mL)	DPPH RSA (%)	pH 1.2	NSA (%)	pH 3.0	pH 6.0	ACE IA (%)	ADH (%)	ALDH (%)
4.5	75.83 $\pm$ 0.00 ^{a2)}	405.35 $\pm$ 1.34 ^a	26.88 $\pm$ 0.47 ^a	86.04 $\pm$ 0.13 ^a	41.21 $\pm$ 0.08 ^a	30.28 $\pm$ 0.22 ^a	30.28 $\pm$ 0.22 ^a	10.93 $\pm$ 0.23 ^a	45.18 $\pm$ 1.73 ^a	346.95 $\pm$ 0.30 ^a	248.95 $\pm$ 0.92 ^a
5.0	73.16 $\pm$ 0.01 ^{ab}	402.32 $\pm$ 0.51 ^b	25.80 $\pm$ 0.54 ^a	85.97 $\pm$ 0.39 ^a	39.62 $\pm$ 0.14 ^b	29.00 $\pm$ 0.92 ^b	29.00 $\pm$ 0.92 ^b	8.49 $\pm$ 0.26 ^b	37.68 $\pm$ 1.90 ^b	339.27 $\pm$ 1.39 ^b	246.25 $\pm$ 2.29 ^b
5.5	71.16 $\pm$ 0.01 ^b	395.59 $\pm$ 1.54 ^c	23.86 $\pm$ 0.84 ^b	85.45 $\pm$ 0.56 ^a	40.71 $\pm$ 0.49 ^a	27.80 $\pm$ 0.20 ^c	27.80 $\pm$ 0.20 ^c	7.70 $\pm$ 0.23 ^c	34.17 $\pm$ 1.74 ^c	338.22 $\pm$ 0.91 ^b	244.76 $\pm$ 0.92 ^b
6.0	69.83 $\pm$ 0.03 ^c	391.72 $\pm$ 1.52 ^d	23.01 $\pm$ 0.75 ^b	84.55 $\pm$ 0.25 ^b	39.43 $\pm$ 0.21 ^b	26.95 $\pm$ 0.13 ^d	26.95 $\pm$ 0.13 ^d	6.81 $\pm$ 0.31 ^d	32.31 $\pm$ 0.43 ^c	335.08 $\pm$ 0.52 ^c	244.36 $\pm$ 0.35 ^b

TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoid content; DPPH RSA, DPPH radical scavenging activity; NSA, nitrite scavenging activity; ACE IA, ACE inhibition activity; ADH, alcohol dehydrogenase activity; ALDH, acetaldehyde dehydrogenase activity.

¹⁾Extraction yield from *C. sunki* peel.

²⁾Means with different letters (a-d) within a column are significant difference according to Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

Table 4. Effect of temperature on Cellulast enzyme-treated *Citrus sunki* (Hort. Tanaka) peel extract

Temp. (°C)	Yield ¹⁾ (%)	TPC (μ g GAE/mL)	TFC (μ g QE/mL)	DPPH RSA (%)	pH 1.2	NSA (%)	pH 3.0	pH 6.0	ACE IA (%)	ADH (%)	ALDH (%)
50	76.49 $\pm$ 0.02 ^{a2)}	409.90 $\pm$ 0.51 ^a	26.11 $\pm$ 0.75 ^b	86.59 $\pm$ 0.22 ^a	41.54 $\pm$ 0.36 ^a	30.12 $\pm$ 0.22 ^a	30.12 $\pm$ 0.22 ^a	10.41 $\pm$ 0.92 ^a	45.25 $\pm$ 0.77 ^a	343.36 $\pm$ 1.82 ^a	246.86 $\pm$ 0.57 ^a
55	74.16 $\pm$ 0.01 ^b	401.31 $\pm$ 0.51 ^b	29.05 $\pm$ 0.75 ^a	86.52 $\pm$ 0.25 ^a	42.14 $\pm$ 0.52 ^a	27.25 $\pm$ 0.07 ^b	27.25 $\pm$ 0.07 ^b	8.79 $\pm$ 0.44 ^b	42.16 $\pm$ 0.81 ^b	344.20 $\pm$ 1.27 ^a	237.19 $\pm$ 0.57 ^b
60	66.83 $\pm$ 0.00 ^c	379.43 $\pm$ 0.29 ^c	23.16 $\pm$ 0.23 ^c	85.81 $\pm$ 0.33 ^b	40.30 $\pm$ 0.14 ^b	23.72 $\pm$ 0.07 ^c	23.72 $\pm$ 0.07 ^c	5.26 $\pm$ 0.51 ^c	35.06 $\pm$ 0.45 ^c	321.85 $\pm$ 0.77 ^b	223.79 $\pm$ 0.42 ^c

TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoid content; DPPH RSA, DPPH radical scavenging activity; NSA, nitrite scavenging activity; ACE IA, ACE inhibition activity; ADH, alcohol dehydrogenase activity; ALDH, acetaldehyde dehydrogenase activity.

¹⁾Extraction yield from *C. sunki* peel.

²⁾Means with different letters (a-c) within a column are significant difference according to Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

Table 5. Effect of reaction time on Cellulast enzyme-treated *Citrus sunki* (Hort. Tanaka) peel extract

Time (h)	Yield ¹⁾ (%)	TPC (μ g GAE/mL)	TFC (μ g QE/mL)	DPPH RSA (%)	pH 1.2	NSA (%)	pH 3.0	pH 6.0	ACE IA (%)	ADH (%)	ALDH (%)
12	70.49 $\pm$ 0.03 ^{c2)}	384.92 $\pm$ 0.54 ^c	26.42 $\pm$ 0.56 ^d	87.06 $\pm$ 0.12 ^a	41.49 $\pm$ 0.43 ^{ab}	29.76 $\pm$ 0.07 ^b	29.76 $\pm$ 0.07 ^b	10.50 $\pm$ 0.01 ^a	40.60 $\pm$ 0.39 ^d	336.14 $\pm$ 1.17 ^b	245.46 $\pm$ 1.95 ^c
24	75.16 $\pm$ 0.01 ^b	398.16 $\pm$ 0.54 ^b	28.94 $\pm$ 1.02 ^c	86.70 $\pm$ 0.33 ^{ab}	42.14 $\pm$ 0.57 ^a	30.32 $\pm$ 0.34 ^a	30.32 $\pm$ 0.34 ^a	10.40 $\pm$ 0.09 ^a	45.24 $\pm$ 1.13 ^c	344.55 $\pm$ 1.02 ^a	246.02 $\pm$ 0.42 ^c
36	77.16 $\pm$ 0.02 ^b	398.79 $\pm$ 0.47 ^b	39.27 $\pm$ 0.88 ^b	86.27 $\pm$ 0.54 ^b	41.03 $\pm$ 0.43 ^b	29.68 $\pm$ 0.13 ^b	29.68 $\pm$ 0.13 ^b	8.58 $\pm$ 0.39 ^b	47.27 $\pm$ 1.30 ^b	345.05 $\pm$ 0.74 ^a	250.37 $\pm$ 1.76 ^b
48	81.16 $\pm$ 0.01 ^a	402.37 $\pm$ 0.27 ^a	51.38 $\pm$ 1.25 ^a	86.49 $\pm$ 0.12 ^{ab}	40.65 $\pm$ 0.57 ^b	28.78 $\pm$ 0.34 ^c	28.78 $\pm$ 0.34 ^c	8.04 $\pm$ 0.23 ^c	51.54 $\pm$ 2.37 ^a	348.02 $\pm$ 0.86 ^a	253.86 $\pm$ 1.55 ^a

TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoid content; DPPH RSA, DPPH radical scavenging activity; NSA, nitrite scavenging activity; ACE IA, ACE inhibition activity; ADH, alcohol dehydrogenase activity; ALDH, acetaldehyde dehydrogenase activity.

¹⁾Extraction yield from *C. sunki* peel.

²⁾Means with different letters (a-d) within a column are significant difference according to Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

요 약

진피(진귤 과피)에 상업용 효소 Celluclast, Pectinex, Viscozyme을 처리하여 추출 수율, 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거 활성 및 아질산염 소거 활성, ACE 저해 활성, 알코올 분해대사 효소 활성을 분석하였다. 그 결과 가장 효과적으로 활성을 나타낸 효소는 Celluclast였으며, 진피와 Celluclast간의 최적 조건은 pH 4.5, 온도 50°C, 처리시간 48 h였다. Celluclast를 활용한 효소 처리는 진피의 생리활성을 효과적으로 증가시켰으며, 특히 ACE 저해 활성에 탁월한 효과를 보였다. 이상의 결과는 효소 처리 방법이 진피를 활용한 기능성 식품 개발에 도움을 줄 수 있을 것임을 시사한다.

REFERENCES

- Ahn SC, Kim MS, Lee SY, Kang JH, Kim BH, Oh WK, et al. Increase of bioactive flavonoid aglycone extractable from Korean citrus peel by carbohydrate-hydrolysing enzymes. *Korean J Microbiol Biotechnol.* 2005. 33:288-294.
- Bergmeyer HU, Gacoehm K, Grassl M. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 2. Academic Press, New York, NY, USA. 1974. p 428-429.
- Cha JY, Cho YS. Biofunctional activities of citrus flavonoids. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol.* 2001. 44:122-128.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 2002. 10:178-182.
- Cho WD, Yoo KW. Preparation of onion hydrolysate for usage of sauce. *J Korean Soc Food Nutr.* 1997. 26:1147-1151.
- Choi SY, Ko HC, Ko SY, Hwang JH, Park JG, Kang SH, et al. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull.* 2007. 30:772-778.
- Choi YS, Kim BR, Jin LH, Lee BH, Shim TH, Lee SY. *In vitro* screening of dietary factors on buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) influencing the regulation of blood pressure, glucose and cholesterol level. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2000. 29:280-287.
- Choudhari SM, Ananthanarayan L. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chem.* 2007. 102:77-81.
- Chung SK, Kim SH, Choi YH, Song EY, Kim SH. Status of citrus fruit production and view of utilization in Cheju. *Food Industry and Nutrition.* 2000. 5:42-52.
- Cooney RV, Ross PD. N-nitrosation and N-nitration of morpholine by nitrogen dioxide in aqueous solution: Effect of vanillin and related phenols. *J Agric Food Chem.* 1987. 35:789-793.
- Cui ZG, Kim BY, Kang SH, Lee YJ, Lee DH, Lee YK, et al. Fermented peel of *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka promotes ethanol metabolism and suppresses body fat accumulation. *Food Sci Biotechnol.* 2007. 16:311-314.
- Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol.* 1971. 20:1637-1648.
- Del Caro A, Piga A, Vacca V, Agabbio M. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chem.* 2004. 84:99-105.
- Do J, Gwak J, Lee S, Rho JJ, Lee K, Kim DC. Effect of medicinal plant extracts on the ethanol-metabolizing enzyme activities. *Food Eng Prog.* 2017. 21:286-291.
- Elkhatim KA, Elagib RAA, Hassan AB. Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of sudanese citrus fruits. *Food Sci Nutr.* 2018. 6:1214-1219.
- Eun JB, Jung YM, Woo GJ. Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of Korean tangerine (*Citrus aurantium* var.). *Korean J Food Sci Technol.* 1996. 28:371-377.
- Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc.* 1981. 58:966-968.
- Hayat K, Hussain S, Abbas S, Farooq U, Ding B, Xia S, et al. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Sep Purif Technol.* 2009. 70:63-70.
- Hidalgo M, Martin-Santamaria S, Recio I, Sanchez-Moreno C, de Pascual-Teresa B, Rimbach G, et al. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. *Genes Nutr.* 2012. 7:295-306.
- Hong SP, Kim MH, Oh SW, Han CK, Kim YH. ACE inhibitory and antihypertensive effect of chitosan oligosaccharides in SHR. *Korean J Food Sci Technol.* 1998. 30:1476-1479.
- Huang H, Liang H, Kwok KC. Effect of thermal processing on genistein, daidzein and glycitein content in soymilk. *J Sci Food Agric.* 2006. 86:1110-1114.
- Hwang JH, Park KY, Oh YS, Lim SB. Phenolic compound content and antioxidant activity of citrus peels. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2013. 42:153-160.
- Hwang K, Kim J, Kim S. Eliminatory effect of functional drink added with several medicinal herb complex extracts on ethanol-induced blood alcohol concentration and hangover in rat. *J Chitin Chitosan.* 2019. 24:33-41.
- Hwang SJ, Choi HM, Park HJ, Lee JS, Heo D, Kim MR. Effects of medicinal herbal drink on alcohol metabolic enzyme in drunken rats. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 2010. 24:610-615.
- Hyon JS, Kang SM, Senevirathne M, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, et al. Antioxidative activities of dried and fresh citrus peels in Jeju. *Korean J Food Cook Sci.* 2010. 26:88-94.
- Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, et al. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J Agric Food Chem.* 2004. 52:3389-3393.
- Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol.* 1996. 28:232-239.
- Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem.* 1987. 51:1333-1338.
- Kessy HNE, Wang K, Zhao L, Zhou M, Hu Z. Enrichment and biotransformation of phenolic compounds from litchi pericarps with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition activity. *LWT-Food Sci Technol.* 2018. 87:301-309.
- Kim JM, Jeon YH, Jeong YJ, Yoon KY. Comparison of bioactive composition, antioxidant activity, and nitric oxide inhibition effect of enzyme-treated and commercial noni juice. *Korean J Food Sci Technol.* 2020. 52:75-80.
- Kim SJ, Seo HJ, Kim HJ, Cho YY, Kwon EY, Lee H, et al. Effect of hesperidin supplementation on lipid and antioxidant metabolism in ethanol-fed rats. *J Food Sci Nutr.* 2006. 11:289-297.
- Ko WC, Lee SR. Effect of immature *Citrus sunki* peel extract

- on neuronal cell death. *Korean J Med Crop Sci.* 2015. 23:144-149.
- Koivula T, Koivusalo M. Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochim Biophys Acta.* 1975. 397:9-23.
- Lacaille-Dubois MA, Franck U, Wagner H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine.* 2001. 8:47-52.
- Lee MH, Huh D, Jo DJ, Lee GD, Yoon SR. Flavonoids components and functional properties of citrus peel hydrolysate. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2007. 36:1358-1364.
- Lee MY, Yoo MS, Whang YJ, Jin YJ, Hong MH, Pyo YH. Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. *Korean J Food Sci Technol.* 2012. 44:540-544.
- Li GH, Le GW, Shi YH, Shrestha S. Angiotensin I – converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr Res.* 2004. 24:469-486.
- Najwa RF, Azlan A. Comparison of vitamin C content in citrus fruits by titration and high performance liquid chromatography (HPLC) methods. *Int Food Res J.* 2017. 24:726-733.
- Novozyme. Enzymes in juice, fruit and vegetable processing. 2021 [cited 2021 May 50]. Available from: <https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables>
- Park G, Park JY, Chang YH. Changes in flavonoid aglycone contents and antioxidant activities of citrus peel depending on enzyme treatment times. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2019. 48:542-550.
- Park MK, Kim CH. Extraction of polyphenols from apple peel using cellulase and pectinase and estimation of antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2009. 38:535-540.
- Ratty AK, Das NP. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol.* 1988. 39:69-79.
- Ruviaro AR, de Paula Menezes Barbosa P, Macedo GA. Enzyme-assisted biotransformation increases hesperetin content in citrus juice by-products. *Food Res Int.* 2019. 124:213-221.
- Seo HJ, Jeong KS, Lee MK, Park YB, Jung UJ, Kim HJ, et al. Role of naringin supplement in regulation of lipid and ethanol metabolism in rats. *Life Sci.* 2003. 73:933-946.
- Song K, Kim S, Na JY, Park JH, Kim JK, Kim JH, et al. Rutin attenuates ethanol-induced neurotoxicity in hippocampal neuronal cells by increasing aldehyde dehydrogenase 2. *Food Chem Toxicol.* 2014. 72:228-233.
- Vázquez-Valadez VH, Abrego VH, Martínez PA, Torres G, Zúñiga O, Escutia D, et al. Docking studies of methylthiomorpholin phenols (LQM300 series) with angiotensin-converting enzyme (ACE). *Open Med Chem J.* 2013. 7:30-38.
- Yoo KM, Moon B. Comparative carotenoid compositions during maturation and their antioxidative capacities of three citrus varieties. *Food Chem.* 2016. 196:544-549.
- Yu EA, Kim HG, Song Y, Kim GS, Kim JH, Kim DY, et al. Determination of flavonoids in the peel of Jingyul (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka) using a HPLC-MS/MS and the antioxidant activity. *J Agric Life Sci.* 2014. 48:227-234.
- Zheng H, Hwang IW, Chung SK. Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009. 10:912-919.
- Zou Z, Xi W, Hu Y, Nie C, Zhou Z. Antioxidant activity of *Citrus* fruits. *Food Chem.* 2016. 196:885-896.