착즙방식이 석류 주스의 품질과 생리활성에 미치는 영향

김희숙¹ · 오가윤¹ · 이송민¹ · 김지윤¹ · 이상현² · 장정수¹ · 이문현¹

¹(주)엔젤 식품연구소

²신라대학교 바이오산업학부 제약공학전공

Effect of Extraction Methods on the Quality of Pomegranate Juice and Physiological Activity

Hee Sook Kim¹, Ka-Yoon Oh¹, Song Min Lee¹, Ji-Youn Kim¹, Sang-Hyeon Lee²,
Jeong Su Jang¹, and Mun Hyon Lee¹

¹Food Research Center, Angel Co., Ltd.

²Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University

ABSTRACT This study aimed to compare the quality characteristics of pomegranate juice based on the extraction methods applied: centrifugal, single-gear, and twin-gear. Changes in the metabolic activities during digestion condition were further investigated. The twin-gear method was eventually identified as the optimal method, through comprehensive evaluation of the extraction rate, particle size, proximate composition, and the mineral and vitamin contents. Pomegranate juice derived using the twin-gear method had high-levels of bioactive substances such as phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, and selenium. Consequently, this juice exerted significant inhibitory effects on lipid peroxidation. Phenolic compounds are known to exhibit a high-correlation with skin-lightening, anti-aging, and anti-diabetic activities. An *in vitro* digestion model was used to evaluate changes in the antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities. Compared to levels observed before digestion, the results revealed a marked increase in the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging, ferric reducing antioxidant power, and superoxide dismutase-like activities as digestion progressed through the gastric phase condition, whereas most of these effects were stabilized or inhibited as digestion progressed through the intestinal phase. The ACE inhibitory activity was observed to increase after being subjected to gastric and intestinal digestion conditions. The correlation coefficients (r^2) for ACE inhibition and antioxidant activities were in the range 0.681 ~ 0.952, thus indicating a highly positive correlation. The findings of this study indicate that the bioactivity of pomegranate juice is enhanced, as determined by the increase in various physiological activities as well as increase in the bioaccessibility and bioavailability of bioactive substances during digestion.

Key words: *Punica granatum* L., extraction method, physiological activity, antioxidant, *in vitro* digestion

서 론

석류(*Punica granatum* L.)는 석류과에 속한 낙엽 소목으로 중앙아시아(이란, 터키)를 중심으로 북아프리카, 유럽까지 전 세계적으로 재배되고 있으며, 다양한 기능성을 가지고 있어 식품, 의약품, 화장품 등의 분야에서 관심이 증가하고 있다. 한편, 석류에는 페놀 화합물, 플라보노이드, 안토시아닌, 지방산, 유기산, 알칼로이드, 비타민, 에스트로젠 등이 함유되어 있으며, 이들 항산화 물질들의 존재로 인해 자유라디칼 소거능을 나타낸다(Shaygannia 등, 2016). 자유라디

칼은 산화적 스트레스를 유발하여 모든 종류의 생체분자, 지질, 단백질, 탄수화물, DNA를 반응시키고 손상시키는 능력을 가진 활성 분자로, 암, 알츠하이머, 만성 질환, 당뇨병 및 기타 퇴행성 질환과 같은 질병을 일으킨다. 이러한 질병들을 예방하기 위해 식품으로부터 천연 항산화제의 개발이 이루어지고 있으며, 다양한 항산화 성분들이 함유된 석류는 항산화, 항암, 항당뇨, 골관절염, 간 보호 등과 같은 생리활성이 있는 것으로 보고되었다(Na 등, 2016).

석류는 위와 같이 다양한 효능을 가지고 있지만, 가식부 비율이 20~30%로 폐기율이 높으며 석류를 섭취하려면 껍질을 제거하고 과육이 있는 부분을 선별해야 한다(Jin, 2011). 또한 과육이 씨앗을 감싸고 있어 분리해서 섭취하기 힘들고 씨앗을 같이 섭취했을 때 입안에서 이물감을 느낄 수 있다. 이러한 불편함은 착즙기로 제조한 주스를 섭취함으로써 해결할 수 있다. 또한, 채소, 과일을 착즙하여 영양적 가치는

Received 24 Nov 2020; Revised 11 Jan 2021; Accepted 13 Jan 2021
Corresponding author: Jeong Su Jang, Food Research Center, Angel Co., Ltd., 74, Saebyeoksijang-ro, Sasang-gu, Busan 46988, Korea, E-mail: jeongsu25@naver.com

Author information: Sang-Hyeon Lee (Professor)

물론 향, 맛, 색 등의 관능적인 특성을 향상시킬 수 있다.

현재 시판되는 착즙기 중 대부분의 시장점유율을 차지하고 있는 방식은 원심분리형 착즙기(centrifugal juicer), 기어가 장착된 착즙기(masticating juicer), 쌍기어가 장착된 착즙기(twin gear masticating juicer or triturating juicer)이다. 원심분리형 착즙기는 해당 바닥면의 분쇄날이 8,000 rpm 이상인 고속 회전방식으로 많은 양의 착즙이 가능하지만, 고속 회전으로 인한 열과 충격으로 영양소가 파괴된다는 우려로 인해 열과 충격을 최소화하여 영양소 파괴를 줄이는 방법에 대한 소비자들의 관심이 증가하고 있다. 이에 따라 저속 착즙기(80 rpm 이하)에 대한 선호도가 증가하고 있으며, 국내에서는 주로 masticating juicer가 높은 시장점유율을 차지하고 있다. 저속 착즙기는 적은 영양소 파괴와 높은 수율을 나타내고 있으나 아직까지 고속 착즙기와 저속 착즙기에 대한 주스의 품질 특성 연구는 미미한 실정이다(Kim 등, 2015b). Park 등(2019a)의 연구에 따르면 원심분리형, 외기어 방식, 쌍기어 방식의 착즙기를 이용하여 당근 주스를 착즙 시 착즙방식에 따라 착즙률, 입도, 영양성분 등 주스의 품질이 상당한 차이를 나타냈는데, 이에 과육이 종자를 감싸고 있는 형태인 석류 착즙 시에도 원심분리형, 외기어 방식, 쌍기어 방식의 3가지 착즙방식에 따라 주스의 품질 차이를 나타내는지 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 고속 및 저속 착즙기에 대해 시장 점유율 및 소비자 선호도 등을 고려하여 원심분리형, 외기어 방식 및 쌍기어 방식의 착즙기를 선정하였으며, 착즙방식에 따른 석류 주스의 착즙률, 입도분석, 그리고 영양성분 함량 등 품질 특성 차이를 조사하고 효율이 높은 착즙방식을 선별하고자 하였다. 최종 선별된 착즙방식에 따라 제조된 석류 주스의 지방산 함량, 항산화, 항노화, 미백 활성, 항당뇨와 같은 여러 생리활성을 조사하고, 소화 과정에 따른 생리활성 변화를 확인하기 위해 *in vitro* 소화 모델을 이용하여 항산화 활성과 ACE 저해 활성 측정을 통해 생체접근율(bioaccessibility) 및 생체이용률(bioavailability)의 변화를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 착즙 조건

본 연구에 사용된 석류는 미국 캘리포니아로부터 수입한 것을 지역 재래시장(Busan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 구입한 석류를 깨끗이 세척한 후 껍질을 제거하고 착즙하였으며, 원심분리형(고속 착즙기, BJE820, Breville Pty Ltd., Sydney, Australia), 외기어 방식(저속 착즙기, HVS-STF14, Hurom, Gimhae, Korea) 그리고 쌍기어 방식(저속 착즙기, Angelia 8000, Angel Co., Ltd., Busan, Korea)의 착즙기를 사용하여 석류 주스를 제조하고 100 mesh 체로 여과하여 사용하였다. 착즙률(%)은 원재료 중량 대비 착즙액의 중량에 100을 곱한 값으로 정의하였다. pH는 pH me-

ter(ST2100-F, OHAUS, Seoul, Korea)를 사용하였고, 당도는 당도계(Atago Pocket PAL-1, Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

입도 분석

착즙방법에 따라 제조된 석류 주스의 입자 분포 양상을 측정하기 위해 입도 분석기(Beckman Coulter LS 13 320, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 사용하여 0.04 μm 에서 2,000 μm 까지 입자크기를 측정하였다. 입도 분포는 최소입자($\times 10$, 10%), 중간 입자($\times 50$, 50%), 최대 입자($\times 90$, 90%)를 측정하여 평균값(mean), 중앙값(median), 최빈값(mode)으로 나타냈다.

일반성분 분석

석류 주스의 일반성분 함량은 식품공전 방법(MFDS, 2020b)으로 분석하였다. 수분 함량은 105°C 상압가열건조법, 조단백질 함량은 자동 질소 정량분석기(Kjeltec Auto 2300, Foss, Laurel, USA)를 이용한 micro-Kjeldahl법, 조지방 함량은 산분해법, 조회분 함량은 직접회화법으로 각각 분석하였다.

미네랄 분석

미네랄은 식품공전 방법(MFDS, 2020b)에 따라 분석하였다. 석류 주스 1 g과 HNO_3 용액 10 mL를 혼합하여 microwave(Multiwave 3000, Anton paar GmbH, Graz, Austria)로 190°C에서 35분 동안 온도를 높이면서 용매를 완전히 없앤 후 방랭하여 분석하였다. 분석에는 ICP-OES (Optima 8300, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 분광분석법으로 분석하였다.

비타민 함량 분석과 지방산 분석

비타민 B군과 E는 Martins-Junior 등(2008) 및 식품공전 방법(MFDS, 2020b)에 따라 high performance liquid chromatography(HPLC, HPLC 1100 Series, Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 지방산은 식품공전 방법(MFDS, 2020b)의 gas chromatography(GC, Agilent 7890 GC, Agilent)를 이용하여 분석하였다.

소화효소 활성 측정

석류 주스의 소화효소 활성을 측정하기 위해서 α -amylase와 protease 활성을 측정하였다. Protease 활성은 식품첨가물공전(MFDS, 2020a)의 식물 단백질 가수분해효소(plant protease) 시험법에 따라 측정하였으며, 1 unit은 상기 시험조건에서 1시간 동안 tyrosine 1 μg 상당량을 유리시키는 효소의 양으로 정의하였다. 또한, 고체배지에서의 protease 활성을 측정하기 위해서 1% skim milk 배지를 이용하여 석류 주스 물 추출물을 접종한 뒤 37°C에서 24시간 배양하여 확인하였다. α -Amylase 활성 측정은 Doehlert와

Duke(1983)의 방법을 응용하여 수행하였다. β -Amylase 및 기타 protease의 불활성화를 위해 Ca^{2+} 의 존재 하에 70°C에서 20분간 가열하여 전처리하였다. 전처리한 시료 0.1 mL와 0.5%(w/v) soluble starch(Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 0.4 mL를 혼합하여 55°C에서 10분간 반응시킨 후 3,5-dinitrosalicylic acid solution(DNS) 0.25 mL를 가하여 100°C에서 15분 동안 가열하였다. 그 후 ice에 냉각 후 증류수로 희석하여 분광광도계(Multiskan Go, Thermo Scientific, Vantaa, Finland)를 이용해 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. α -Amylase 활성의 1 unit은 starch로부터 1 μg 의 maltose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소량으로 정의하였다. 또한, 고체배지에서의 α -amylase 활성을 측정하기 위해서 1% starch 배지를 이용하여 석류 주스 물 추출물을 접종한 뒤 37°C에서 24시간 배양하여 확인하였다.

총 페놀 화합물, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량 측정

항산화 활성과 밀접한 관련성을 갖는 총 페놀 화합물(TPC, total phenolic content) 및 플라보노이드 함량(TFC, total flavonoid content)은 각각 Folin-Denis 방법(1912)과 Davis 방법(1947)을 응용하여 측정하였다. TPC는 분석 시료 500 μL 와 0.1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 500 μL 를 혼합하여 상온에서 3분 동안 방치한 후 10% Na_2CO_3 500 μL 를 첨가하여 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 시료를 원심분리(12,000 $\times g$, 25°C, 10분)하여 상등액을 회수한 뒤 분광광도계로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였으며, 분석 시료와 동일하게 분석하여 작성한 표준 검량선으로 TPC를 구하였다. TFC는 분석시료 60 μL 와 diethylene glycol 600 μL , 1 N NaOH 60 μL 를 혼합하여 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 표준 검량선을 작성한 후 TFC를 계산하였다. 총 안토시아닌 함량(TAC, total anthocyanin content)은 Lee 등(2005)의 방법을 응용하여 측정하였다. 분석시료 0.1 mL에 각각 pH 1.0 buffer(0.2 M potassium chloride + 0.2 M hydrochloric acid)와 pH 4.5 buffer(0.2 M potassium chloride + 0.1 M citric acid)를 2 mL 혼합한 다음 분광광도계를 이용하여 520 nm와 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 안토시아닌 함량은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Total anthocyanin content (mg/100 g)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1,000) / (\epsilon \times 1)$$

$$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4.5}$$

$$\text{MW} = \text{molecular weight of cyanidin-3-glucoside} = 449.2 \text{ g/mol}$$

DF = dilution factor

ϵ = the molar absorptivity = 26,900 L/cm $\cdot$ mol

지질과산화 저해 활성 측정

석류 주스의 지질과산화 저해 활성은 석류 주스를 5배 희석한 메탄올 추출물을 100% 농도로 하여 측정하였다. 메탄올 추출물에 2.5% linoleic acid(Sigma-Aldrich Co.), 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 및 증류수를 혼합하여 반응용액을 제조한 후 40°C에서 반응시키며 하루 간격으로 ferric thiocyanate 방법을 이용하여 측정하였다(Ohkawa 등, 1979). 반응용액 0.1 mL와 75%(v/v) EtOH (Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Ansan, Korea) 9.7 mL, 30%(w/v) ammonium thiocyanate(NH_4SCN , Duksan Pure Chemical Co., Ltd.) 0.1 mL, 20 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mL를 넣고 교반하여 상온에서 5분동안 방치 후 분광광도계를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 α -tocopherol(Sigma-Aldrich Co.)을 1 mg/mL의 농도로 제조하여 동일하게 실험을 진행하였다.

Tyrosinase 저해 활성 및 DOPA 산화 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해 활성과 DOPA 산화 저해 활성은 Kim 등(2015a)의 방법에 따라 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 석류 주스 20 μL , 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 용해시킨 효소액(tyrosinase from mushroom, 2,000 units/mL, Sigma-Aldrich Co.) 20 μL , 0.1 M sodium phosphate buffer 220 μL 를 혼합한 후, 기질인 1.5 mM L-tyrosine(Sigma-Aldrich Co.)을 40 μL 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 이후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. DOPA 산화 저해 활성은 석류 주스 20 μL , 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 용해시킨 효소액(tyrosinase from mushroom, 2,000 units/mL, Sigma-Aldrich Co.) 20 μL , 0.1 M sodium phosphate buffer 220 μL 를 혼합한 후 기질인 2.0 mM L-DOPA(Sigma-Aldrich Co.)를 40 μL 첨가하여 37°C에서 20분 동안 반응시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 arbutin(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다.

Collagenase 저해 활성

Collagenase 저해 활성 측정은 Riani 등(2018)의 방법을 응용하여 측정하였다. 석류 주스 50 μL , 5 M NaCl과 100 mM CaCl_2 가 첨가된 50 mM Tricine buffer(pH 7.5) 50 μL , collagenase(1 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.) 50 μL 를 혼합한 뒤 N-[3-(2-furyl)acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (0.48 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.) 50 μL 를 첨가하여 25°C에서 15분 동안 반응시켰다. 이후 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 EGCG(epigallocatechin gallate, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다.

α -Glucosidase 저해 활성 측정

α -Glucosidase 저해 활성은 Hwang 등(2014)의 방법을 응용하여 측정하였다. 석류 주스 50 μ L에 α -glucosidase (0.5 U/mL) 50 μ L와 67 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8) 50 μ L를 첨가하여 혼합한 후, 37°C에서 5분간 pre-incubation 한 뒤 10 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside solution 100 μ L를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 이후 1 M Na_2CO_3 750 μ L를 첨가하여 반응을 종결시킨 다음 *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside로부터 유리되어 나오는 *p*-nitrophenol을 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 측정하였다. 양성 대조군으로는 acarbose(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다.

In vitro 소화시험

In vitro 소화 시험은 Attri 등(2017)의 방법을 응용하여 위장과 소장 소화 과정으로 나누어 인공소화를 재현하였다. 삼각플라스크에 석류 주스 5 mL를 1.2 g/L pepsin(Sigma-Aldrich Co.)과 8.0 g/L NaCl(Samchun Pure Chemical Co., Ltd., Pyeongtaek, Korea)을 혼합하여 35% HCl(Duksan Pure Chemical Co., Ltd.)로 pH를 1.2로 조정하여 제조한 pepsin-HCl solution 20 mL와 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 진탕배양하여 인공 위장 소화 과정을 거쳐 재현하였다. 다음으로 0.1 M phosphate buffer(pH 7.5)에 0.94 g/L pancreatin(Sigma-Aldrich Co.)을 첨가한 pancreatin solution(pH 7.5) 8 mL와 위장 소화액 5 mL를 혼합하여 37°C에서 2시간 동안 진탕배양 하여 인공 소장 소화 과정을 진행하였다. 대조군으로 증류수를 이용하여 동일한 소화 과정을 거쳐 수행하였으며, 각 소화 과정 단계별로 시료를 일정량 회수하여 -20°C에서 보관하며 이후 실험을 진행하였다.

In vitro 소화물의 ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능 측정은 Re 등(1999)의 방법을 응용하여 수행하였다. 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS, Sigma-Aldrich Co.) 용액과 2.6 mM potassium persulfate(Duksan Pure Chemical Co., Ltd.)를 혼합하여 차광조건으로 4°C에서 18시간 동안 반응시켜 ABTS 라디칼을 생성시킨 후, 흡광도 값이 734 nm에서 1.5 이하가 되도록 증류수로 희석하여 사용하였다. 단계별 소화물 50 μ L와 ABTS 용액 1 mL를 혼합하여 암실에서 30분 동안 반응시킨 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

In vitro 소화물의 환원력 측정

Ferric reducing antioxidant power(FRAP)는 Benzie와 Strain(1996)의 방법을 응용하여 측정하였다. FRAP reagent는 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(Sigma-

Aldrich Co.), 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)를 10:1:1(v/v/v)로 혼합하여 제조하였다. 단계별 소화물 250 μ L와 FRAP reagent 750 μ L를 혼합하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응액은 원심분리(12,000 $\times g$, 4°C, 5분)하여 상등액을 취해 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 ferrous sulfate($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Junsei Chemical Co., Ltd.)를 사용하여 표준 검량선을 작성하였으며, $\mu\text{M FeSO}_4$ equivalent/g으로 표시하였다.

In vitro 소화물의 SOD 유사 활성 측정

Superoxide dismutase(SOD) 유사 활성은 SOD assay kit(Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)을 이용하여 측정하였다. 단계별 소화물 40 μ L에 WST-1 solution 400 μ L와 enzyme solution 40 μ L를 첨가하여 혼합한 후 40°C에서 20분 동안 반응시킨 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

In vitro 소화물의 angiotensin I-converting enzyme (ACE) 저해 활성

ACE 저해 활성은 Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 응용하여 분석하였다. 단계별 소화물 25 μ L에 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 75 μ L와 HHL(N-hippuryl-histidyl-leucine, Sigma-Aldrich Co.) 50 μ L를 혼합한 후 ACE 조효소액 100 μ L를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 1 N HCl을 첨가하여 효소 반응을 정지시키고, ethyl acetate(Duksan Pure Chemical Co., Ltd.) 1.3 mL를 첨가해 충분히 혼합하여 원심분리(12,000 $\times g$, 4°C, 5분)하였다. 원심분리 후 상등액 1 mL를 회수하여 120°C에서 완전히 건조시키고, 증류수 1 mL를 첨가하여 충분히 혼합한 뒤 분광광도계를 이용하여 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 분석은 3회 이상 수행하여 평균 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ SD)로 표현하였다. 평균값의 유의한 차이는 SPSS(version 20.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)의 Duncan's multiple range test를 하였으며, 유의성 검증은 신뢰구간 $P < 0.05$ 에서 수행하였다. *In vitro* 소화 시험에서 항산화 활성과 ACE 저해 활성 간의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient($P < 0.01$)로 분석하였다.

결과 및 고찰

착즙방식에 따른 석류의 착즙률 비교

본 연구에서는 원심분리형(BRV), 외기어 방식(HUR) 그리고 쌍기어 방식(ANG)으로 석류를 착즙하였으며, 각 착즙 방식에 따른 착즙률, 당도, pH를 Table 1에 나타내었다. 석

Table 1. Comparison of pomegranate juice yield by extraction method

Extraction method	Twin gear (ANG)	Single gear (HUR)	Centrifugation (BRV)
Juice yield (%)	84.4±0.7 ^c	77.6±1.0 ^b	23.2±1.2 ^a
Residue (g)	41.1±3.2 ^a	48.6±6.7 ^a	307.3±25.7 ^b
Sugar contents (°Brix)	16.2±0.0	16.2±0.1	16.2±0.0
pH	3.6±0.0	3.5±0.0	3.3±0.0

Data are mean±standard deviation (n=3). Means with different letters (a-c) in the same row indicate significant differences among samples at $P<0.05$.

류 주스의 당도와 pH 측정 결과, 당도는 16.2°Brix, pH는 3.3~3.6으로 나타났다. Al-Maiman과 Ahmad(2002)의 연구 결과에서 석류 주스의 당도는 16.5°Brix, pH는 3.48이라고 보고하였는데 이는 본 연구의 측정값과 유사하였다. 착즙 방식에 따라 착즙률을 계산한 결과 쟁기어 방식의 착즙률이 84.4%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 외기어 방식(77.6%), 원심분리형(23.2%) 순으로 나타났다. 착즙방식을 비교해 보았을 때, 쟁기어 방식이 원심분리형 착즙기보다 3.6배 높은 착즙률을 보였으며 외기어 방식 착즙기보다 1.1배 높은 착즙률을 가지는 것을 확인하였다. 또한 착즙 후 배출된 찌꺼기의 무게를 비교한 결과, 쟁기어 방식의 저속 착즙기가 원심분리형 고속 착즙기보다 7.5배 낮은 찌꺼기 무게를 나타냈다. 각 착즙방식의 착즙률 차이는 착즙기의 착즙원리에 기인된 것으로 판단된다. Lee 등(2019)은 원심분리형 착즙기를 이용하여 신선초, 케일, 돌미나리를 착즙할 경우 고속 회전으로 인해 완전한 착즙이 이루어지지 않고 상당량의 찌꺼기가 발생하여 낮은 착즙률을 나타낸다고 보고하였으며, 본 연구에서도 저속 착즙기에 비해 월등히 낮은 착즙률을 나타내었다. 이는 석류의 과육이 종자를 감싸고 있기 때문에 압착 방식이 아닌 분쇄하는 방식인 원심분리형 고속 착즙기(6,500~13,000 rpm)의 경우에는 과육이 착즙되지 못하고 석류의 씨앗과 함께 대부분 찌꺼기로 배출되면서 착즙률이 낮아지는 것으로 판단된다. 이에 반해 저속 회전(60 rpm 이하)으로 압착하는 방식인 외기어 착즙방식과 쟁기어 착즙방식에서는 상대적으로 높은 착즙률을 보였다.

그중에서도 굵은 나선형의 외기어가 저속으로 착즙하는 방식보다 쟁기어 착즙방식이 가장 우수한 착즙률을 나타냈는데, 이는 2개의 수평 형태의 나선형 기어가 맞물려 저속으로 회전하면서 압착하는 쟁기어의 다단 착즙 원리로, 투입된 재료 속 과즙의 80% 정도까지 착즙이 가능한 것에 기인한 것으로 판단된다(Park 등, 2019a). 또한 Choi 등(2014)의 주스 제조 장치에 따른 채소 및 과일 주스의 품질 변화를 연구한 결과에서 석류를 착즙할 때 고속 착즙기(27.5%)나 블렌더(31.5%)를 사용하는 것보다 저속 착즙기(37.7~46.5%)를 사용하는 것이 착즙 수율면에서 유리하다고 보고하였다. 따라서 원심분리형의 고속 착즙기는 빠른 시간에 많이 착즙할 수 있지만 동량의 과일 또는 채소 착즙 시에 저속 착즙기보다 낮은 수율을 나타내어 수율적인 측면에서 고속 착즙기보다 저속 착즙기가 우수하며, 그중에서도 쟁기어 방식이 재료 투입량 대비 높은 수율로 가장 효율적이라고 판단된다.

입도 분석

착즙 주스에 분산된 입자크기는 시각적으로뿐만 아니라 섭취 시 부드러운 목 넘김과 미각적 역할을 하기 때문에 품질 지표의 중요한 요소로 작용한다(Park 등, 2019b). 이와 관련하여 본 연구에서는 원심분리형, 외기어 방식 그리고 쟁기어 방식으로 착즙한 석류 주스의 입자크기를 Table 2에 나타내었다. 각각의 착즙방법에 의해 착즙된 석류 주스의 평균 입자크기는 쟁기어 방식 49.09 μm , 외기어 방식 350.23 μm , 원심분리형 215.33 μm 로 쟁기어 방식에 의해 착즙된 석류 주스에서 가장 작은 입자가 분산된 것으로 나타났다. 같은 저속 착즙기인 쟁기어 방식과 외기어 방식의 최소 입자분포(<10%)의 입자크기를 보면 외기어 방식이 4.77 μm 로 쟁기어 방식(1.71 μm)보다 큰 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라 중간 입자분포(<50%)와 최대 입자분포(<90%)에서도 외기어 방식의 석류 주스가 쟁기어 방식으로 착즙된 석류 주스보다 큰 것으로 나타났다. 분산값 또한 입자의 평균 크기와 최소, 중간, 최대 입자 분포의 평균 크기가 가장 작은 것으로 확인된 쟁기어 방식이 5,911.33 μm^2 로 외기어 방식(116,189.67 μm^2)과 원심분리 방식(61,834.33 μm^2)과 비교하여 매우 낮은 분산 값을 보여 쟁기어 착즙방식이 석류를

Table 2. Comparison of particle size of pomegranate juice according to extraction method

Extraction method	Twin gear (ANG)	Single gear (HUR)	Centrifugation (BRV)
Mean (μm)	49.09±1.05 ^a	350.23±0.70 ^c	215.33±0.52 ^b
Median (μm)	8.18±0.76 ^a	271.13±0.38 ^c	92.95±1.22 ^b
Mode (μm)	6.45±0.00 ^a	660.63±3.15 ^c	457.13±2.16 ^b
Variance (μm^2)	5,911.33±13.23 ^a	116,189.67±28.16 ^c	61,834.33±15.25 ^b
<10% (μm)	1.71±0.09 ^a	4.77±1.36 ^b	4.08±0.19 ^b
<25% (μm)	3.75±0.24 ^a	35.01±3.41 ^c	9.10±1.18 ^b
<50% (μm)	8.18±0.76 ^a	271.13±2.26 ^c	92.95±2.01 ^b
<75% (μm)	68.71±5.82 ^a	572.80±4.25 ^c	392.27±4.22 ^b
<90% (μm)	184.03±2.16 ^a	845.83±2.11 ^c	593.47±3.12 ^b

Data are mean±standard deviation (n=3). Means with different letters (a-c) in the same row indicate significant differences among samples at $P<0.05$.

더 미세하고 고르게 착즙하는 것으로 판단된다. 따라서 쥬기어 방식이 원심분리형과 외기어 방식의 착즙기에 비해 주스 속에 분포하는 입자가 작기 때문에 섭취했을 때에도 이물감이 느껴지는 정도가 가장 적어 부드러운 석류 주스를 섭취할 수 있을 것이라고 생각된다.

착즙방식에 따른 석류의 일반성분, 미네랄, 비타민 함량 비교

착즙방식에 따른 석류 주스의 일반성분, 미네랄, 비타민 함량을 분석한 결과를 Table 3에 나타내었다. 농촌진흥청 식품성분표(RDA, 2019)에 따르면 석류는 수분 78.3%, 탄수화물 20.7%, 단백질 0.3%, 지질 0.2%, 회분 0.5%로 원심분리형, 외기어 방식, 쥬기어 방식과는 다소 상이하게 나타났는데, 이는 품종, 착즙방식, 씨앗 착즙 유무에 의해 차이가 나는 것으로 판단된다. 3가지 착즙방식 간의 일반성분을 비교해보면 조지방, 조단백, 열량의 경우에는 쥬기어 방식, 외기어 방식, 원심분리형 순으로 나타났으며, 탄수화물은 원심분리형, 외기어 방식, 쥬기어 방식 순으로 나타났다. 조단백과 조지방에서 가장 큰 차이를 보였는데 이는 착즙과정에서 씨앗의 착즙 여부에 의해 차이가 나는 것으로 생각된다.

미네랄 함량을 분석한 결과, 8종의 미네랄 모두 쥬기어 방식, 외기어 방식, 원심분리형 순으로 높게 나타나 착즙방식에 따른 경향성을 나타내었다. 농촌진흥청 식품성분표(RDA, 2019)에 따르면 100 g 기준으로 칼륨(242.00 mg), 인(39.00 mg), 마그네슘(16.00 mg), 칼슘(6.00 mg), 나트륨(1.00 mg), 아연(0.56 mg), 철(0.26 mg), 망간(0.14 mg), 셀레늄(0.29 µg) 순으로 나타내었다. 또한, Al-Maiman과

Ahmad(2002)의 연구에 따르면 석류 주스와 씨앗에서 미네랄 함량이 높은 것은 칼륨, 나트륨, 칼슘, 마그네슘, 인, 철, 아연, 구리 순으로 본 연구결과와 차이를 나타내었다. 씨앗과 주스에서 칼륨 함량은 각 253 mg/100 g, 307 mg/100 g인 반면, 본 연구에서 쥬기어 방식과 비교했을 때 208.94 mg/100 g으로 상당히 낮았다. 인의 경우에는 씨앗과 주스에서 각 6.26 mg/100 g, 6.12 mg/100 g으로 확인되었으나 본 연구에서는 28.31 mg/100 g로 각각 4.52배, 4.63배 높게 나타났다. 이는 품종, 재배환경, 저장조건, 착즙방식에 따른 차이에 기인된 것으로 판단되며, 미네랄이 풍부한 석류 주스는 양질의 미네랄 급원이 될 수 있을 것으로 판단된다. 특히 셀레늄은 항암 효과뿐만 아니라 여러 질병을 예방하는 미네랄로 알려져 있는데, 이는 활성산소로부터 selenomethione 및 selenocysteine의 유기화합물 형태로 전환되면서 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Song과 Choi, 2019). 성인 남녀를 기준으로 셀레늄의 1일 권장 섭취량은 60 µg인데, 쥬기어 방식으로 석류 100 g을 착즙했을 때 40 µg을 섭취할 수 있으므로 석류 150 g을 착즙할 경우 셀레늄의 1일 권장 섭취량을 충족시킬 수 있는 것으로 확인하였다. 또한, 셀레늄은 가열 시 휘발하는 것으로 알려져 있는데 비가열 콜드프레스 방식인 쥬기어 방식으로 석류를 착즙하면 상대적으로 높은 함량을 섭취할 수 있어 영양학적으로 유리할 것으로 생각된다(Kim 등, 2017).

석류 주스의 비타민 함량을 확인한 결과, 미네랄과 마찬가지로 3가지 방식 중 쥬기어 방식에서 비타민 B군과 비타민 E 함량이 가장 높게 나타났다. 농촌진흥청 식품성분표

Table 3. Nutrition composition of pomegranate juice according to extraction method

Composition	Contents	Unit	Twin gear (ANG)	Single gear (HUR)	Centrifugation (BRV)
Proximate composition	Carbohydrate	g/100 g	13.77±0.24 ^a	14.79±0.11 ^b	15.20±0.02 ^c
	Crude lipid	g/100 g	1.62±0.26 ^c	0.98±0.12 ^b	0.24±0.02 ^a
	Crude protein	g/100 g	1.21±0.01 ^c	0.96±0.01 ^b	0.31±0.01 ^a
	Crude ash	%	0.44±0.01 ^c	0.40±0.01 ^b	0.29±0.00 ^a
	Moisture	%	82.97±0.00 ^b	82.88±0.00 ^a	83.96±0.01 ^c
	Calorie	kcal/100 g	74.50±1.32 ^c	71.75±0.60 ^b	64.20±0.16 ^a
Mineral	Phosphorus (P)	mg/100 g	28.31±0.08 ^c	21.18±0.18 ^b	9.37±0.04 ^a
	Magnesium (Mg)	mg/100 g	11.85±0.10 ^c	8.94±0.02 ^b	5.08±0.06 ^a
	Calcium (Ca)	mg/100 g	5.74±0.04 ^c	4.03±0.03 ^b	2.02±0.10 ^a
	Potassium (K)	mg/100 g	208.94±0.10 ^c	173.55±0.14 ^b	147.57±1.00 ^a
	Zinc (Zn)	mg/100 g	0.21±0.02 ^b	0.15±0.03 ^a	0.11±0.02 ^a
	Manganese (Mn)	mg/100 g	0.11±0.02 ^c	0.06±0.01 ^b	0.01±0.00 ^a
	Iron (Fe)	mg/100 g	0.20±0.02 ^c	0.15±0.02 ^b	0.03±0.00 ^a
	Selenium (Se)	mg/kg	0.40±0.02 ^c	0.28±0.02 ^b	0.17±0.02 ^a
Vitamin	B ₁	mg/100 g	ND	ND	ND
	B ₂	mg/100 g	ND	ND	ND
	B ₃	mg/100 g	0.009±0.000 ^a	0.008±0.001 ^a	ND
	B ₅	mg/100 g	0.035±0.002 ^c	0.025±0.002 ^b	0.005±0.000 ^a
	B ₆	mg/100 g	0.008±0.001 ^b	0.003±0.001 ^a	0.002±0.002 ^a
	E	mg/100 g	0.281±0.003 ^c	0.212±0.003 ^a	0.273±0.001 ^b

Data are mean±standard deviation (n=3). Means with different letters (a-c) in the same row indicate significant differences among samples at $P<0.05$.

ND: not detected.

(RDA, 2019)에 따르면 비타민 B₁(0.101 mg/100 g), 비타민 B₂(0.022 mg/100 g)를 함유하고 있으나 쟁기어 방식, 외기어 방식 및 원심분리형으로 착즙 시 비타민 B₁, B₂의 경우에는 모두 확인되지 않았는데, 이는 비타민이 산소, 빛 등의 여러 요인에 영향을 받기 때문에 검출되지 않았던 것으로 판단된다. 결과적으로 쟁기어 방식으로 착즙 시 높은 수율과 영양학적인 측면에 있어 유리할 것으로 판단되어 3가지 착즙방식 중 쟁기어 방식을 선정하여 연구를 수행하였다.

석류 주스의 지방산 함량 분석

쟁기어 방식으로 착즙된 석류 주스의 지방산 함량은 Table 4에 나타내었다. 농촌진흥청 식품성분표(RDA, 2019) 중 석류의 지방산 조성을 보면 100 g 기준으로 총 포화지방산은 0.05 g, 총 불포화지방산은 0.14 g으로 나타났으며, 본 연구에서의 총 포화지방산은 0.049 g, 총 불포화지방산은 0.085 g으로 나타내었다. 먼저 총 포화지방산의 경우, 100 g 기준으로 팔미트산과 스테아르산은 농촌진흥청 식품성분표에서 각각 0.032 g, 0.017 g으로 나타났지만, 본 연구에서는 각각 0.026 g, 0.014 g으로 다소 낮은 함량을 나타내었다. 총 불포화지방산의 경우 100 g 기준으로 올레산, 리놀레산, 리놀렌산은 농촌진흥청 식품성분표에서 각각 0.046 g, 0.078 g, 0.003 g으로 조사된 반면 본 연구에서는 각각

0.034 g, 0.046 g, 0.001 g으로 다소 차이가 나타났다. 이러한 차이는 착즙방식에 따른 결과 차이에 기인한 것으로 판단된다.

소화효소 활성 측정

석류 주스의 생리학적 특성을 규명하기 위해 protease 및 α -amylase 활성 측정을 통해 소화효소 활성을 조사하였다(Fig. 1). 그 결과, 석류 주스 100%의 농도에서 62.2 U/mL로 비교적 높은 protease 활성을 나타냈으며 농도 의존적인 결과를 나타내었다. Choi 등(2014)의 연구에 따르면 식약처 고시 3가지(SAP, HUT, plant) 방법을 이용하여 저속 착즙기로 석류를 착즙했을 때 protease 활성을 확인할 수 있었는데 이는 본 연구 결과와도 일치하였다. 또한, skim milk agar plate에서도 석류 주스 100%의 농도와 비교했을 때, protease 50 μ L/mL 농도와 유사하게 나타나 protease 활성을 확인할 수 있었다. 따라서 석류 주스의 섭취는 단백질과 펩타이드 결합을 가수분해시킴으로써 섭취 시 소화를 도울 수 있을 것으로 판단된다. α -Amylase 효소 활성은 100% 농도에서 0.9 U/mL로 낮은 활성을 나타냈으며 starch agar plate에서도 활성을 나타내지 않았다. Choi 등(2014)의 연구에서 12종의 과일과 채소의 amylase 활성을 측정한 결과, 당근을 제외한 11종의 과일과 채소에서는 활성이 나타나지 않았다고 보고하였는데, 본 연구에서도 매우 낮은 활성을 나타내 효과는 미미할 것으로 판단된다.

Table 4. Fatty acid compositions and phenolic compound contents of pomegranate juice

Composition		Pomegranate juice
Saturated fatty acid (g/100 g)	Capric acid (C10:0)	0.001±0.000 ^a
	Palmitic acid (C16:0)	0.026±0.001 ^c
	Stearic acid (C18:0)	0.014±0.001 ^d
	Arachidic acid (C20:0)	0.005±0.000 ^c
	Behenic acid (C22:0)	0.003±0.001 ^b
	Σ SFA ¹⁾	0.049±0.010
Unsaturated fatty acid (g/100 g)	Oleic acid (C18:1, Cis)	0.034±0.001 ^f
	Linoleic acid (18:2, Cis)	0.046±0.002 ^g
	Linolenic acid (C18:3n-3)	0.001±0.000 ^a
	Gadoleic acid (C20:1)	0.004±0.001 ^c
	Σ USFA ²⁾	0.085±0.023
Total fatty acid		0.134±0.006
Phenolic compounds	TPC ³⁾	92.91±2.26
	TFC ⁴⁾	86.25±3.86
	TAC ⁵⁾	5.38±0.06

¹⁾Total saturated fatty acid.

²⁾Total unsaturated fatty acid.

³⁾TPC: total phenolic content, calculated as mg GAE (gallic acid equivalents)/100 g sample.

⁴⁾TFC: total flavonoid content, calculated as mg QE (quercetin equivalents)/100 g sample.

⁵⁾TAC: total anthocyanin content, calculated as mg Cyd-3-glu (cyanidin-3-glucoside)/100 g sample.

Data are mean±standard deviation (n=3). Means with different letters (a-g) indicate significant differences among samples at $P<0.05$.

TPC, TFC, TAC 및 지질과산화 저해 활성 측정

페놀 화합물은 플라보노이드, 탄닌, 쿠마린(coumarins), 리그난(lignans) 등을 포함하며 지질과산화, DNA와 단백질 손상을 예방할 수 있다. 석류에는 사과산, 구연산 등의 유기산과 엘라그산(ellagic acid)을 생성하는 탄닌질이 함유되어 있는데, 엘라그산은 우수한 항암효과를 갖는 천연물질로 알려져 있다. 특히, ellagitannin, gallotannin(punicalin, punicalagin, pedunculagin, punigluconin, granatin B, tellimagrandin I) 및 안토시아닌과 같은 페놀 화합물을 다량 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 2010). 석류 주스의 TPC, TFC, TAC 및 지질과산화 저해 활성의 결과는 Table 4와 Fig. 2에 나타내었다. TPC, TFC, TAC는 각각 92.91 mg GAE/100 g, 86.25 mg QE/100 g, 5.38 mg Cyd-3-glu/100 g을 함유하고 있는 것으로 확인할 수 있었다. 이러한 성분들은 지질과산화와 DNA 그리고 단백질 손상을 예방하는 효과가 있는 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서는 지질과산화에 대한 항산화 효과를 확인해보고자 하였다.

인체 내에서 생성되는 유해 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 DNA, 단백질, 효소와 반응함으로써 생체 조직의 손상, 기능의 변화 등을 일으켜 노화를 비롯한 다양한 질병을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 특히 hydroxyl free radical($\cdot$ OH)은 반응성이 매우 강하기 때문에 생체막의 지질과 반응하여 지질과산화를 형성한다(Zu와 Yang,

Fig. 1. Digestive enzyme activities of pomegranate juice. (A) Protease activity determined by plant protease method, (B) Protease activity on skim milk agar plate, (C) α-Amylase activity, (D) α-Amylase activity on starch agar plate. Data are mean±standard deviation (n=3). Means with different letters (a-c) indicate significant differences among samples at $P<0.05$.

2004). 석류 주스의 지질과산화 저해 활성을 조사한 결과 (Fig. 2), 음성 대조군은 7일 차까지는 반응 시간이 증가함에 따라 리놀레산이 산화되면서 흡광도 증가가 관찰되었으며, 8일 이후에는 Fe^{3+} -thiocyanate complex의 생성량이 감소하면서 흡광도 값이 감소하였다. 반면, 석류 주스 메탄올

추출물 100% 농도에서는 리놀레산의 산화가 상당히 저해되어 흡광도 증가가 미미하게 나타났으며, 메탄올 추출물 50% 농도에서는 8일 차, 메탄올 추출물 10% 농도에서는 7일 차까지 흡광도 증가가 미미하게 나타났으나 이후 리놀레산의 산화가 진행됨에 따라 흡광도 값이 증가하기 시작하였다. 특히, 메탄올 추출물 100% 농도에서는 양성 대조군으로 사용된 천연 항산화제인 α-tocopherol(1 mg/mL)보다 지질과산화 저해 활성이 더 높은 것으로 나타났다. 이는 페놀 화합물, 플라보노이드, 안토시아닌, 셀레늄과 같은 유용 성분들이 풍부하게 함유되어 있기 때문인 것으로 판단된다.

Fig. 2. Lipid peroxidation inhibitory activity of pomegranate juice. Data are mean±standard deviation (n=3). Means with different letters (a-d) indicate significant differences among samples at $P<0.05$.

Tyrosinase 저해 활성, DOPA 산화 저해 활성 측정

멜라닌 생성과정에 작용하는 주요 효소인 tyrosinase는 체내에서 멜라닌 색소를 생성함으로써 기미, 주근깨 등을 발생시켜 피부노화를 촉진시킨다. 피부노화를 방지하기 위해서 멜라닌 생합성 대사작용 단계에서 tyrosinase의 작용을 억제함으로써 L-tyrosine을 L-DOPA로 전환시키거나 L-DOPA를 L-DOPA quinone으로 산화시키는 반응을 억제해야 한다(Tsatmali 등, 2002). 따라서 멜라닌 생성과정에 작용하는 주요 효소인 tyrosinase의 저해 활성을 확인하

Fig. 3. (A) Tyrosinase inhibitory activity and (B) DOPA oxidation inhibitory activity of pomegranate juice. Arbutin was used as a positive control. Data are mean±standard deviation (n=3). Means with different letters (a-e) indicate significant differences among samples at $P<0.05$.

기 위해 tyrosinase의 기질인 L-tyrosine과 L-DOPA를 이용하여 멜라닌 생성 과정의 초기 단계인 가역적 산화반응에 대한 저해 활성을 측정하고자 하였다. 양성 대조군으로 사용된 arbutin은 1 mg/mL의 농도에서 50.81%의 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다. 석류 주스 100% 농도에서 35.48%의 tyrosinase 저해 활성을 나타내었는데, 이는 1 mg/mL arbutin의 농도보다는 활성이 낮으나 0.5 mg/mL arbutin보다는 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3A). DOPA 산화 저해 활성에서는 양성 대조군으로 사용된 arbutin이 1 mg/mL의 농도에서 22.35%의 DOPA 산화 저해 활성을 나타내었으며, 석류 주스 100% 농도에서 17.86%로 tyrosinase 저해 활성과 유사하게 1 mg/mL의 arbutin보다는 다소 낮으나 0.5 mg/mL의 arbutin 농도보다 높은 DOPA 산화 저해 활성을 나타내었다(Fig. 3B). Chung(2015)의 연구에 따르면 석류 1 mg/mL의 농도에서 약 44.09%의 tyrosinase 저해 활성을 보였으며, 이는 본 결과보다는 다소 높은 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다. 또한, TPC가 높을수록 tyrosinase 저해 활성이 높은 것으로 보고되었는데, tyrosinase와 L-DOPA 산화 저해 활성과 TPC 간의 상관관계수는 $r^2=0.97$ 이상으로 높은 상관관계를 나타내었다(data not shown). 결과적으로 석류 주스에 멜라닌 생성 단백질을 억제시키는 성분이 함유되어 있는 것으로 판단되며 멜라닌 생합성 대사작용을 억제시킴으로써 미백 활성을 나타낼 것으로 기대된다.

Collagenase 저해 활성 측정

피부의 탄력 및 주름과 관련하여 핵심 지표 물질로 collagen이 많이 알려져 있다. Collagen은 대부분 피부의 진피층에 약 70~80%를 차지하고 있으며(Jang 등, 2013), 자외선이나 외부 환경 등의 요인에 따라 활성화되는 collagenase에 의해 분해되어 주름 생성과 탄력 저하를 일으켜 피부 노화의 원인이 된다(Kim 등, 2018). 따라서 석류 주스의 collagenase 저해 활성을 측정하고자 하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 EGCG는 1 mg/

Fig. 4. Collagenase inhibitory activity of pomegranate juice. EGCG was used as a positive control. Data are mean±standard deviation (n=3). Means with different letters (a-d) indicate significant differences among samples at $P<0.05$.

mL의 농도에서 48.61%의 활성을 나타냈고, 석류 주스 100% 농도에서 40.71%의 저해 활성을 나타내었다. Thring 등(2009)의 연구에 따르면 건조된 석류를 열수 추출하여 collagenase 저해 활성을 측정한 결과, 약 10% 정도로 본 연구와 비교했을 때 낮은 collagenase 저해 활성을 나타내었는데, 이는 재배조건, 품종, 추출조건에 따른 차이에 기인한 것으로 판단된다. 따라서 석류 주스를 섭취함으로써 피부노화 축진을 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

α -Glucosidase 저해 활성

α -Amylase 및 α -glucosidase 저해 활성은 혈당수치 상승 억제의 지표로 사용되고 있다(Lee 등, 2008). α -Amylase 및 α -glucosidase는 장에서 흡수되는 이당류나 다당류를 단당류로 가수분해하는 효소로 식후 혈당을 상승시키는데 α -glucosidase의 활성을 저해함으로써 식후 혈당 상승을 억제할 수 있다(Sulistiyan 등, 2016). 플라보노이드가 풍부한 식품을 섭취하면 α -glucosidase를 저해함으로써

Fig. 5. α -Glucosidase inhibitory activity of pomegranate juice. Acarbose was used as a positive control. Data are mean $\pm$ standard deviation (n=3). Means with different letters (a-e) indicate significant differences among samples at $P<0.05$.

당뇨병을 예방할 수 있는데, 이 플라보노이드는 α -amylase 보다 α -glucosidase에 대한 저해 효과가 더 뛰어나서 α -glucosidase는 당뇨를 조절하기 위한 실질적인 표적이 될 수 있다고 알려져 있다(Testa 등, 2016; Promyos 등, 2020). 석류 주스의 α -glucosidase 저해 활성 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 acarbose는 10 mg/mL의 농도에서 54.89%의 α -glucosidase 저해 활성을 나타내었으며 석류 주스 100%의 농도에서 68.22%의 α -glucosidase 저해 활성을 나타냄으로써 양성 대조군보다 높은 활성을 나타내었다. 또한, 석류 주스 50%의 농도에서 5 mg/mL의 acarbose보다 α -glucosidase 저해 활성이 유의적으로 높게 나타났다. TFC와 α -glucosidase 간의 상관관계를 확인한 결과, $r^2=0.99$ 로 높은 상관관계를 나타냈다(data not

shown). 이는 플라보노이드가 풍부한 석류 주스를 섭취함으로써 α -glucosidase의 저해 활성을 높여 식후 혈당을 억제하는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

In vitro 소화물의 항산화 활성 측정

석류 주스의 소화 과정에 따른 항산화 활성 변화를 확인하기 위해 ABTS 라디칼 소거능, FRAP assay, SOD 유사 활성을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 항산화능에 의해 ABTS가 소거되어 청록색의 본래 색이 탈색되는 원리를 이용하는 방법으로 석류 주스의 ABTS 라디칼 소거능은 Table 5에 나타내었다. 소화 전의 활성보다 소화 단계를 거치면서 ABTS 라디칼 소거능이 유의적으로 증가함을 보였으며($P<0.05$), 소화 전보다 소화 후 약 1.23~1.31배 증가하였다. FRAP assay는 ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용하여 ferric ion이 ferrous로 전환되는 과정을 측정한다. FRAP assay를 통하여 석류 주스의 소화 과정에 따른 환원력 측정 결과, ABTS 라디칼 소거능과 유사한 경향을 보였으며, pepsin-HCl 처리된 위장 소화조건에서 얻은 소화물 100% 농도에서 유의적으로 가장 높은 환원력을 보였다. 모든 농도에서 소화 전에 비해 위장 소화조건 단계를 거치면서 환원력이 증가하였지만, 위장 소화조건에 비해서 pancreatin이 처리된 소장 소화조건에서는 환원력이 감소하는 경향이 나타났다(Table 5). SOD 유사 활성 측정 결과 ABTS 라디칼 소거능과 FRAP assay의 결과와 유사하게 소화가 진행됨에 따라 활성이 높게 나타났다(Table 5). Choi 등(2014)의 연구에 따르면 100 mg/mL 석류 주스의 SOD 유사 활성 값이 60% 이상으로 본 연구에서 100% 농도의 소화 전 결과(65.88%)와 유사한 것으로 확인되었다.

Table 5. ABTS radical scavenging activity, reducing power, SOD-like activity, and ACE inhibitory activity of pomegranate juice at different phases of *in vitro* digestion

Contents	Concentration (%)	Before digestion	Stomach condition ¹⁾	Small intestine condition ²⁾
ABTS radical scavenging activity (%)	100	49.94 $\pm$ 1.02 ^a	64.62 $\pm$ 1.15 ^c	61.41 $\pm$ 0.78 ^b
	50	29.79 $\pm$ 0.44 ^a	38.06 $\pm$ 0.53 ^b	37.16 $\pm$ 0.22 ^b
	10	10.36 $\pm$ 0.76 ^a	12.71 $\pm$ 0.2 ^b	13.53 $\pm$ 0.4 ^b
FRAP (μ M $FeSO_4$ equivalent/g)	100	426.41 $\pm$ 17.71 ^a	457.15 $\pm$ 3.37 ^b	413.83 $\pm$ 19.52 ^a
	50	280.95 $\pm$ 7.75 ^{ab}	291.79 $\pm$ 4.89 ^b	274.59 $\pm$ 3.56 ^a
	10	69.31 $\pm$ 0.97 ^a	78.36 $\pm$ 1.70 ^b	78.05 $\pm$ 1.95 ^b
SOD-like activity (%)	100	65.88 $\pm$ 4.17 ^a	78.36 $\pm$ 3.18 ^b	84.87 $\pm$ 2.22 ^b
	50	46.32 $\pm$ 6.36 ^a	60.95 $\pm$ 4.80 ^b	69.41 $\pm$ 5.33 ^b
	10	18.75 $\pm$ 3.87 ^a	28.84 $\pm$ 4.99 ^b	31.81 $\pm$ 4.46 ^b
ACE inhibitory activity (%)	100	19.43 $\pm$ 2.47 ^a	60.20 $\pm$ 2.02 ^b	88.18 $\pm$ 1.37 ^c
	50	4.39 $\pm$ 0.72 ^a	30.29 $\pm$ 2.18 ^b	51.78 $\pm$ 1.01 ^c
	10	ND	10.09 $\pm$ 3.13 ^a	13.01 $\pm$ 0.85 ^a

¹⁾In order to meet stomach conditions, pepsin-HCl solution (pH 1.2) was added to pomegranate juice and digested at 37°C for 1 hour in the incubator.

²⁾In order to meet small intestine conditions, pancreatin solution (pH 7.5) was added to digestion solution of stomach conditions and digested at 37°C for 2 hour in the incubator.

Data are mean $\pm$ standard deviation (n=3). Means with different letters (a-c) in the same row indicate significant differences at $P<0.05$. ND: not detected.

Table 6. Correlation between antioxidant activity and ACE inhibitory activity by *in vitro* digestion

Contents	ABTS	FRAP	SOD-like	ACE inhibitory activity
ABTS	1	0.925**	0.952**	0.814**
FRAP	0.925**	1	0.916**	0.681**
SOD-like	0.952**	0.916**	1	0.859**
ACE inhibitory activity	0.814**	0.681**	0.859**	1

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity, FRAP: ferric reducing antioxidant power, SOD: superoxide dismutase, ACE: angiotensin I-converting enzyme.

**Significantly different at $P < 0.01$ using the Pearson's correlation coefficient.

ABTS 라디칼 소거능, FRAP assay, SOD 유사 활성 실험결과에서 소화 전보다 위장 소화조건 후의 항산화 활성이 증가되며 위장 소화조건에서 소장 소화조건을 거치면 항산화 활성이 비슷하게 유지되거나 감소하는 경향을 보였다($P < 0.05$). 이는 일반적으로 식이성 페놀 화합물이 위장 소화를 거치는 동안에는 안정적으로 유지되지만 페놀 화합물, 특히 플라보노이드는 알칼리 조건에 민감하여 소장 소화액과 같은 약알칼리 환경(pH 7.4)에서는 분해가 일어나 페놀 화합물이 감소한 결과로 판단된다(Fawole과 Opara, 2016).

In vitro 소화물의 ACE 저해 활성 측정

ACE 저해 활성은 혈압상승 억제제의 지표로 사용되고 있다. Angiotensin I은 ACE에 의해 angiotensin II로 전환되며, 이렇게 전환된 angiotensin II는 직접적으로 혈관을 수축하고 신장에서 aldosterone의 분비를 증가시켜 혈압을 상승시키는 작용을 한다(Ahn 등, 2009). 석류 주스의 항고혈압 활성을 알아보기 위해 ACE 저해 활성을 측정한 결과, 소화가 진행될수록 ACE 저해 활성이 높아지는 것을 확인하였다(Table 5). 단계별 소화물 100% 농도에서는 ACE 저해 활성이 소화 전에 비해 위장 소화조건과 소장 소화조건을 거치면서 각각 3.10배, 4.54배 증가하였다. ACE 저해 활성을 나타내는 성분으로는 단백질에서 유래된 peptide, 식물체에서 유래된 안토시아닌 및 flavan-3-ols와 같은 페놀 화합물이 잘 알려져 있다. Lee 등(2019)의 연구에 따르면 신선초, 케일, 돌미나리 주스를 이용한 *in vitro* 소화물 실험 결과에서 ACE 저해 활성이 소화 전보다 소화 후에 크게 증가되었다고 보고하였는데, 이러한 결과는 소화 전보다 소화 후에 다양한 소화효소 처리에 따라 ACE 저해 활성이 증가할 수 있음을 나타내고 있으며, 이는 위장액에 들어있는 펩신 효소의 작용으로 인하여 석류 주스의 ACE 저해 활성이 증가한 것과 일치하였다. 항산화 활성과 ACE 저해 활성 간의 상관관계를 확인한 결과(Table 6), ABTS 라디칼 소거능, FRAP assay, SOD 유사 활성 및 ACE 저해 활성 간에 높은 상관관계를 나타냈는데, 이는 70% 에탄올, 80% 메탄올, 75% 아세톤 추출물을 대상으로 측정한 화합물의 함량과 ACE 저해 활성 간에 상관관계가 있는 것으로 보고된 Han 등(2015)의 연구 결과와 유사하며 항산화 활성과 ACE 저해 활성 간에도 높은 상관관계가 나타난 것으로 판단된다. 따라서 석류 주스의 소화가 진행될수록 주스 내에 함유된 유효

성분들이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 이는 생체접근을 및 생체이용률을 크게 증가시켜 생리활성 효과가 향상될 수 있음을 나타내었다.

요 약

본 연구는 원심분리형, 외기어 방식 및 쌍기어 방식에 따른 석류 주스의 품질 특성을 비교하고 주스 섭취 시 소화 과정에 따른 항산화 활성 및 ACE 저해 활성을 측정함으로써 대사 활성의 변화를 조사하기 위해 수행되었다. 착즙방식에 따른 착즙률, 입도, 일반성분, 미네랄, 비타민 함량 등의 결과를 종합하여 3가지 방식 중 쌍기어 방식을 최종 선별하였다. 품질 지표로 protease와 α -amylase 활성을 확인하였으며, α -amylase 활성은 다소 미미하게 나타났으나 높은 protease 활성을 가짐으로써 소화에 도움을 줄 것으로 판단된다. 쌍기어 방식으로 착즙한 석류 주스에는 페놀 화합물, 플라보노이드, 안토시아닌, 셀레늄과 같은 유용 성분들이 풍부하게 함유되어 있어 결과적으로 높은 지질과산화 저해 활성을 나타냈으며, 이러한 페놀 화합물은 미백 활성, 항노화 활성, 항당뇨 활성과도 높은 상관관계를 나타내었다. 석류 주스의 섭취에 따른 항산화 활성 및 ACE 저해 활성의 변화를 조사하기 위해 *in vitro* 소화 모델을 이용하여 측정한 결과, ABTS 라디칼 소거능, FRAP assay, SOD 유사 활성 모두 소화 전보다 위장 소화조건에서 활성이 크게 증가되는 것을 확인하였으며, 위장 소화조건에서 소장 소화조건을 거치면 대부분 활성이 비슷하거나 감소하는 경향을 보였다. ACE 저해 활성에서는 소화 전보다 위장 소화조건, 소장 소화조건을 거침에 따라 활성이 증가되는 것을 확인하였으며, ABTS 라디칼 소거능, FRAP assay, SOD 유사 활성 및 ACE 저해 활성 간의 상관계수는 $r^2 = 0.681 \sim 0.952$ 로 높은 양의 상관관계를 보였다. 따라서 본 연구에서는 석류 주스의 항산화 활성, 미백 활성, 항노화 활성, 항당뇨 활성과 같은 생리활성 및 체내 소화 과정에 따라 유효 성분들의 생체접근을 및 생체이용률이 증가하여 생리활성 효과가 향상될 수 있음을 나타내었다.

REFERENCES

Ahn YS, Lee WW, Lee SH, Ahn G, Ko CI, Oh CK, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory effects of gelatin hy-

- drollysates prepared from *Tilapia mossambica* scales by hot water and enzymatic extraction. *Kor J Fish Aquat Sci.* 2009. 42:426-433.
- Al-Maiman SA, Ahmad D. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chem.* 2002. 76:437-441.
- Attri S, Singh N, Singh TR, Goel G. Effect of *in vitro* gastric and pancreatic digestion on antioxidant potential of fruit juices. *Food Biosci.* 2017. 17:1-6. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2016.10.003>
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996. 239:70-76.
- Choi MH, Kim MJ, Jeon YJ, Shin HJ. Quality changes of fresh vegetable and fruit juice by various juicers. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J.* 2014. 29:145-154.
- Chung HJ. Comparative study of antioxidant activity of imported tropical and subtropical fruits. *Korean J Food Preserv.* 2015. 22:577-584.
- Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol.* 1971. 20:1637-1648.
- Davis WB. Determination of flavanones in citrus fruits. *Anal Chem.* 1947. 19:476-478.
- Doehlert DC, Duke SH. Specific determination of α -amylase activity in crude plant extracts containing β -amylase. *Plant Physiol.* 1983. 71:229-234.
- Fawole OA, Opara UL. Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to *in vitro* digestion. *BMC Complement Altern Med.* 2016. 16:358. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1343-2>
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem.* 1912. 12:239-243.
- Han JH, Moon HK, Chung SK, Kang WW. Comparison of physiological activities of radish bud (*Raphanus sativus* L.) according to extraction solvent and sprouting period. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015. 44:549-556.
- Hwang CR, Tak HM, Kang MJ, Suh HJ, Kwon OO, Shin JH. Antioxidant and antiobesity activity of natural color resources. *J Life Sci.* 2014. 24:633-641.
- Jang MJ, Jun DH, Kim SH, Han SI, Lee JT. Anti-wrinkle effect of chestnut leaf. *J Life Sci.* 2013. 23:751-756.
- Jin SY. Antioxidant activities of solvent extracts from pomegranate endocarp. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2011. 40:1635-1641.
- Kim CJ, Shim JK, Kwon KC, Lim JD, Choi SK, Yu CY, et al. Changes in non-saponin fatty acid content and increases in inhibitory activities of collagenase and elastase by treatment with *Saccharomyces cerevisiae* of the supercritical fluid extracted oil of the adventitious roots culture of wild mountain ginseng. *Korean J Med Crop Sci.* 2018. 26:170-180.
- Kim MJ, Im KR, Yoon KS. Effect of medicinal herb prepared through traditional antidiabetic prescription on α -glucosidase activity and evaluation method for anti-melanogenesis agents using α -glucosidase activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015a. 44:993-999.
- Kim MJ, Kim JI, Kang MJ, Kwon B, Jun JG, Choi JH, et al. Quality evaluation of fresh tomato juices prepared using high-speed centrifugal and low-speed masticating household juicers. *Food Sci Biotechnol.* 2015b. 24:61-66.
- Kim S, Seo D, Park J, Kim SN, Choi Y, Nam JS, et al. Food composition of raw, boiled, and roasted sweet potatoes. *Korean J Community Living Sci.* 2017. 28:59-68.
- Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park E, Park HR, et al. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2008. 37:405-409.
- Lee CJ, Chen LG, Liang WL, Wang CC. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem.* 2010. 118:315-322.
- Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J AOAC Int.* 2005. 88:1269-1278.
- Lee SM, Park HJ, Kim HS, Kim JY, Lee SH, Jang JS, et al. Quality characterization by various juice extraction method and changes in physiological activities by *in vitro* digestion of *Angelica keiskei*, *Brassica oleracea*, and *Oenanthe javanica* vegetable juices. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2019. 48:718-727.
- Martins-Junior HA, Wang AY, Alabourda J, Pires MAF, Vega OB, Lebre DT. A validated method to quantify folic acid in wheat flour samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Braz Chem Soc.* 2008. 19:971-977.
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). Analysis methods for food additives. 2020a [cited 2020 Jul 9]. Available from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04_00.jsp
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). Korean food standards codex. 2020b [cited 2020 Apr 14] Available from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_01.jsp
- Na JR, Kim S, Jo A, Bae D, Oh KN, Kim YJ, et al. Anti-stress effect of *Punica granatum* L. extract against sleep deprivation-induced impairment. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2016. 45:1533-1543.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979. 95:351-358.
- Park HJ, Kim JY, Lee SM, Kim HS, Lee SH, Lee MH, et al. Effect of extraction method on quality characteristics of the carrot juice. *Korean J Food Sci Technol.* 2019a. 51:369-378.
- Park HJ, Lee SM, Kim JY, Kim HS, Lee SH, Jang JS, et al. Metabolic activity and physiological characteristics of wheat and barley grass juices extracted by a household extractor equipped with a twin gear. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2019b. 48:856-867.
- Promyos N, Temviriyankul P, Suttisansanee U. Investigation of anthocyanidins and anthocyanins for targeting α -glucosidase in diabetes mellitus. *Prev Nutr Food Sci.* 2020. 25:263-271.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999. 26:1231-1237.
- Riani MKL, Anwar E, Nurhayati T. Antioxidant and anti-collagenase activity of *Sargassum plagiophyllum* extract as an anti-wrinkle cosmetic ingredient. *Pharmacogn J.* 2018. 10:932-936.
- Rural Development Administration (RDA). Production and consumption status (pomegranate) DB 9.1. 2019 [cited 2019 Dec 11]. Available from: <http://koreanfood.rda.go.kr/kfi/ft/ftFoodSrch/list>
- Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A review study on *Punica granatum* L. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2016. 21:221-227.
- Song WY, Choi JH. Effects of selenium-treated *Spinacia oleracea* L. on antioxidative enzyme activities and oxidative damage in rats fed high-fat and high-cholesterol diets. *J Food Hyg Saf.* 2019. 34:388-395.

- Sulistiyani, Safithri M, Sari YP. Inhibition of α -glucosidase activity by ethanolic extract of *Melia azedarach* L. leaves. IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2016. 31:012025. doi: 10.1088/1755-1315/31/1/012025.
- Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, De Nigris V, Ceriello A. The possible role of flavonoids in the prevention of diabetic complications. Nutrients. 2016. 8:310. <https://doi.org/10.3390/nu8050310>
- Thring TSA, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. BMC Complement Altern Med. 2009. 9:27. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-27>
- Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. J Histochem Cytochem. 2002. 50:125-133.
- Zu SM, Yang KS. Anti-lipid peroxidation activity of *Acanthopanax* var. *albeofructus*. Yakhak Hoeji. 2004. 48:99-103.