반응표면분석법에 의한 진굴 과피 추출물의 알코올 대사 효소 활성 최적화

박혜원 · 이승철

경남대학교 바이오융합학부

Optimization of Alcohol Metabolic Enzyme Activity of an Extract of *Citrus sunki* Hort. Tanaka Peel by Response Surface Methodology

Hye-Won Park and Seung-Cheol Lee

School of Bioconvergence, Kyungnam University

ABSTRACT Optimal heating conditions for *Citrus sunki* Hort. Tanaka peel (CP) were obtained by using the response surface methodology (RSM) to enhance the alcohol metabolic enzyme activity of the CP extract. Heating temperature and time were independent variables, while alcohol dehydrogenase (ADH) activity, acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activity, DPPH radical scavenging activity, total flavonoid contents (TFC), and total phenol contents (TPC) of the extracts were dependent variables. With 11 conditions as specified by the RSM, the acquired optimal heating temperature and time were 144.8°C and 50.2 min, respectively. ADH activity, ALDH activity, DPPH radical scavenging activity, TFC, and TPC of the CP extract prepared under optimal conditions were predicted to be 250.27%, 216.55%, 85.58%, 0.132 mg QE/mL, and 3.153 mg GAE/mL, respectively. Under optimum conditions, the experimental and predicted values showed excellent reproducibility within the 95% confidence interval. This is the first report on the alcohol metabolic enzyme activity of CP extract, and these optimum heating conditions for CP can support the development of functional foods for overcoming a hangover.

Key words: *Citrus sunki* Hort. Tanaka, peel, alcohol metabolic enzymes, heating, response surface methodology

서 론

감귤류(*Citrus*)는 운향과 감귤속에 속하는 상록 소교목을 총칭하며, 전 세계적으로 열대 및 아열대 지역에서 널리 재배되고 있다(Liu 등, 2012). 감귤류에는 비타민 A, C, E 및 플라보노이드, 카로티노이드, 펙틴, 각종 무기질 등 다양한 유용 물질들이 함유되어 있으며, 이러한 성분들로 인해 항산화, 항염, 항돌연변이, 항암, 항노화 등과 같은 생리활성을 가지는 것으로 보고된다(Zou 등, 2016; Ke 등, 2015; Rajendran 등, 2014).

우리나라에는 제주도 지역에서 예로부터 12품종의 감귤류가 자생하였음이 확인되었으나(Kim, 1988), 현재는 일본에서 도입된 온주밀감 품종이 널리 재배되고 있다. 이에 제주 재래종 감귤의 이용을 높이기 위한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(Kim 등, 2009a; Kim 등, 2009b; Rhyu 등, 2002). 진굴(*Citrus sunki* Hort. Tanaka)은 제주 자생 감귤류의 일

종으로 산물 또는 산귤이라고 불린다. 햇볕에 말린 진굴의 과피는 진피라 하여 한의약 소재로 널리 이용되고 있으며, 한방학적으로 위장 장애, 천식, 가래, 식욕부진 및 동맥경화 등에 효과가 있다고 알려져 있다(Hyon 등, 2010a; Chung 등, 2000). 진굴 과피의 생리활성에 대한 연구로는 항산화, 항염, 뇌 신경세포 보호 효과, 종양세포 증식 억제 등이 보고되어 있다(Hyon 등, 2010b; Shin 등, 2011; Ko와 Lee, 2015; Kang 등, 2005). 한편 진굴 과피를 함유한 한방음료는 알코올을 투여한 쥐의 혈중 알코올 및 아세트알데하이드 농도를 감소시키고 알코올 대사 관련 효소의 활성을 증가시킨다고 보고하였다(Hwang 등, 2010).

식물성 식품 소재의 유용 물질들 중 폴리페놀 화합물은 공유 결합되어 불용성의 거대 분자 상태로 존재하는 경우가 많다(Acosta-Estrada 등, 2014). 생리활성이 높은 추출물을 제조하기 위해서는 불용성의 폴리페놀 화합물을 유리화시키는 효율적인 공정이 필요하다(Li 등, 2020). 발효(Gar-

Received 15 March 2021; Revised 13 April 2021; Accepted 14 April 2021

Corresponding author: Seung-Cheol Lee, School of Bioconvergence, Kyungnam University, 7, Gyeongnamdaehak-ro, Masanhappo-gu, Changwon-si, Gyeongnam 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.

beta 등, 2018), 효소 처리(Domínguez-Rodríguez 등, 2021), 원적외선 조사(Lee 등, 2003), 열처리(Jeong 등, 2004) 등의 다양한 방법이 저분자 형태의 폴리페놀 화합물을 유리화시키기 위해 이용되었다. 이 중에서 열처리 방법은 단순하지만 효율적으로 유용 폴리페놀 물질을 유리화시킬 수 있어 널리 이용되고 있다(Hamaizu 등, 2010). 열처리는 감귤 껍질과 땅콩 껍질, 표고버섯 및 과채류 등 다양한 식품군에서 총 항산화 활성과 유용성분의 생체이용률을 증진시킨다고 보고되었다(Jeong 등, 2004; Lee 등, 2006; Lee 등, 2015; Juaniz 등, 2016; Dewanto 등, 2002).

본 연구에서는 열처리를 이용하여 진귤 과피로부터 알코올 대사 효소 활성이 우수한 추출물을 제조하고자 하였다. 이때 열처리 온도와 시간을 요인변수로 설정하였으며 반응표면분석법을 적용하여 최적 조건을 구하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

분석을 위해 사용된 Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, NAD^+ , HCl, acetaldehyde, acetaldehyde dehydrogenase(ADH), alcohol dehydrogenase(ADH), ethyl alcohol, 2-mercaptoethanol, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, quercetin은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 그 외 KCl, Na_2CO_3 , potassium acetate, AlCl_3 은 분석용 특급을 사용하였다.

진귤 과피 추출물 제조

제주다복산물농장(Jeju, Korea)에서 2019년 1월 수확된 완숙과 진귤(*Citrus sunki* Hort. Tanaka)을 구입하여 과피를 모은 후 이를 상온에서 5일간 자연 건조시켰다. 진귤 과피를 분쇄한 후 체 진동기를 사용하여 35 mesh 체를 통과한 분말을 진귤 과피 시료로 이용하였다. 진귤 과피 분말 5 g을 건조기(A-Sung Machinery Co., Ltd., Yangju, Korea)에서 각 조건에 맞추어 열처리하였다. 열처리한 진귤 과피 분말을 증류수 50 mL와 섞은 후 110°C에서 3시간 추출하고 Whatman paper No.1(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)에 여과한 것을 분석 시료로 사용하였다.

반응표면분석법 설계

진귤 과피 추출물의 생리활성 최적화를 위한 열처리 조건을 구하기 위해 중심합성계획법(central composite design)을 기반으로 한 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 MINITAB(Minitab Statistical Software, ver. 19, State College, PA, USA)으로 설계하였다. 열처리 온도(X_1)와 시간(X_2)을 각각 독립변수(X_i)로 하여 온도(70~150°C, X_1), 열처리 시간(20~60분, X_2)을 각각 -1.4142, -1, 0, 1, 1.4142의 5단계로 부호화하였으며(Table 1),

Table 1. Experimental design of heating conditions for *Citrus sunki* Hort. Tanaka peel

Variables	Symbol	Levels				
		-1.414	-1	0	1	1.414
Temp (°C)	X_1	70	82	110	138	150
Time (min)	X_2	20	26	40	54	60

Table 2에 나타난 바와 같이 11구간으로 설정하여 열처리를 실시하였다. 독립변수에 영향을 받는 종속변수(Y_n)는 ADH 활성(Y_1), ALDH 활성(Y_2), DPPH 라디칼 소거능(Y_3), 총 플라보노이드(Y_4), 총 폴리페놀 함량(Y_5)으로 설정하였고, 모든 실험은 총 3회 반복하여 이에 대한 평균값을 회귀분석에 이용하였다. 각 회귀분석의 결과는 다음 2차 다항 회귀모형식으로 나타내었다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2$$

이화학적 특성 분석

상기 방법으로 제조한 각 진귤 과피 추출물의 pH는 pH meter(pH-200L, Istek Co., Seoul, Korea)로 측정하였다. 색도는 color reader(Color JC801, Color Techno. System Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 명도(lightness, L), 적색도(redness, a), 황색도(yellowness, b)를 측정하였다. 이때 사용한 표준 백색판의 color lab 값은 각각 L 값 98.49, a 값 1.64, b 값 -1.29였다. 각 조건에 따라 열처리한 진귤 과피 추출물의 색차(ΔE)는 다음 아래와 같은 공식에 대입하여 산출하였다.

$$\Delta E = \sqrt{(L_1 - L_2)^2 + (a_1 - a_2)^2 + (b_1 - b_2)^2}$$

L_1, a_1, b_1 = 열처리 전 진귤 과피 추출물의 color lab 값

L_2, a_2, b_2 = 열처리 후 진귤 과피 추출물의 color lab 값

알코올 탈수소효소 활성

알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH) 활성은 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 에탄올 0.15 mL, 증류수로 10배 희석한 진귤 과피 추출물 50 μL 를 첨가하여 섞은 후, 25°C 항온수조에서 10분간 방치시켰다. 그 후 ADH (0.25 unit/mL) 27.5 μL 를 넣고 25°C에서 30분간 반응시킨 다음 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 Hepos를 사용하였으며, 상대 활성(%)을 나타내기 위한 음성 대조군은 시료 대신 증류수를 사용하였다. ADH 활성도는 반응 종료 후 시료의 최대 흡광도를 대조군에서의 최대 흡광도에 대한 비율로 나타내었으며 반응식은 아래와 같다.

$$\text{ADH 활성(\%)} = \frac{\text{실험구 최대 흡광도}}{\text{대조구 최대 흡광도}} \times 100$$

Table 2. Experimental data of extracts from heated *C. sunki* Hort. Tanaka peel according to response surface methodology (RSM)

Run No. ¹⁾	Conditions			Yield ²⁾ (%)	Response ³⁾									
	Temp (°C)	Time (min)	Color value ⁴⁾				pH ⁶⁾	ADH (%)	ALDH (%)	DPPH RSA (%)	TFC (mg QE/mL)	TPC (mg GAE/mL)		
			L		a	b							ΔE	
Non ⁵⁾	—	—	—	14.96	24.62 ^b	−4.83 ^{bc}	17.28 ^g	0.00	4.35 ^a	218.34	193.86	63.97	0.082	2.284
Fractional portion	1	82	26	19.47	24.06 ^c	−6.48 ^e	15.81 ^h	2.28	4.33 ^b	207.37	195.98	51.48	0.086	2.290
	2	138	26	16.31	14.37 ^j	−3.61 ^a	19.36 ^c	10.53	4.21 ^f	243.82	204.48	81.93	0.149	3.046
	3	82	54	17.28	23.85 ^d	−5.93 ^{de}	15.44 ^{hi}	2.27	4.32 ^c	210.11	202.56	51.26	0.107	2.286
	4	138	54	18.88	11.99 ^k	−6.11 ^e	15.28 ⁱ	12.86	4.16 ^g	245.55	215.62	83.69	0.132	3.134
Star portion	5	70	40	20.39	25.26 ^a	−6.85 ^c	17.87 ^f	2.20	4.34 ^b	206.24	193.90	51.70	0.089	2.288
	6	150	40	24.25	10.20 ^j	−8.16 ^f	12.20 ^j	15.65	4.15 ^g	250.29	217.07	83.32	0.126	3.061
	7	110	20	15.58	20.00 ^e	−5.79 ^{cde}	25.27 ^a	9.28	4.28 ^d	214.23	211.34	64.00	0.094	2.675
	8	110	60	24.11	17.73 ⁱ	−3.06 ^a	23.23 ^d	9.28	4.26 ^e	226.60	215.73	72.69	0.137	2.908
Central portion	9	110	40	18.15	18.22 ^h	−5.00 ^{cd}	23.80 ^c	9.14	4.26 ^e	220.31	209.11	72.39	0.123	2.874
	10	110	40	18.95	19.05 ^f	−5.01 ^{cd}	25.16 ^a	9.66	4.26 ^e	223.87	212.11	70.63	0.132	2.893
	11	110	40	18.50	18.63 ^g	−3.87 ^{ab}	24.50 ^b	9.43	4.27 ^e	221.38	211.36	70.34	0.131	2.820

¹⁾The number of experimental conditions by central composite design.

²⁾Extraction yield (mean of three separate experiments) from *C. sunki* Hort. Tanaka peel.

³⁾ADH, alcohol dehydrogenase activity; ALDH, acetaldehyde dehydrogenase activity; DPPH RSA, DPPH radical scavenging activity; TFC, total flavonoid contents; TPC, total phenolic contents.

⁴⁾L, degree of whiteness [0~100 (100=white, 0=black)]; a, degree of redness [−60~+60 (−=green, +=red)]; b, degree of yellowness [−60~+60 (−=blue, +=yellow)]; and ΔE , overall color difference.

⁵⁾*C. sunki* peel extract non heat-treated according to RSM.

⁶⁾Values with different letters (a-d) above the data are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$) of each sample was Non, 76; 1, 60; 2, 52; 3, 60; 4, 46; 5, 62; 6, 39; 7, 59; 8, 60; 9, 60; 10, 62; and 11, 61, respectively.

Ascorbic acid, a positive control, showed 38.04% of DPPH radical scavenging activity, respectively, at 10 $\mu\text{g/mL}$ concentration. The ADH·ALDH activity of undiluted Hepos, a positive control, showed 245.30 $\pm$ 0.68% ADH activity and 180.31 $\pm$ 0.31% ALDH activity.

아세트알데하이드 탈수소효소 활성

아세트알데하이드 탈수소효소(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)의 활성에 미치는 영향은 Koivula와 Koivusalo(1975)의 방법으로 측정하였다. 1.0 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 0.15 mL, 증류수 1.05 mL, 20 mM NAD⁺ 50 μL , 0.1 M acetaldehyde 50 μL , 3.0 M KCl 50 μL , 0.33 M 2-mercaptoethanol 50 μL , 증류수로 10배 희석한 진귤 과피 추출물 50 μL 를 혼합하여 25°C에서 10분간 방치한 뒤, ALDH(0.1 unit/mL) 50 μL 를 가하여 다시 25°C에서 15분간 반응시켰다. 생성된 NADH의 흡광도는 340 nm에서 측정했다. 음성 대조구와 양성 대조구 및 ALDH 활성은 ADH 활성 측정 방법과 동일하다.

$$\text{ALDH 활성(\%)} = \frac{\text{실험구 최대 흡광도}}{\text{대조구 최대 흡광도}} \times 100$$

DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 Jeong 등(2004)의 방법에 따라 증류수로 10배 희석한 진귤 과피 추출물 0.1 mL에 0.041 mM DPPH 0.9 mL를 넣어 섞고, 상온에서 30분간 암반응한 뒤 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조구로 ascorbic acid를 사용하였으며, 음성 대조구로는 시료 대신 증류수를 사용하였다. 각 시료의 DPPH 라디칼 소거능은 아

래의 식과 같이 계산하여 구하였다.

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

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Chang(2002)의 방법에 따라 측정되었다. 증류수로 5배 희석한 진귤 과피 추출물 0.5 mL에 95% 에탄올 1.5 mL를 첨가한 후 10% AlCl₃과 1 M potassium acetate 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 넣고 혼합하여 실온(25°C)에서 30분간 반응시켰다. 이를 415 nm에서 흡광도를 측정한 값을 quercetin으로 작성한 표준곡선과 비교하여 quercetin 당량(QE/mL)으로 나타내었다.

총 페놀 함량

진귤 과피 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Gutfinger(1981)의 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 증류수로 40배 희석한 진귤 과피 추출물 1 mL에 2% Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하고 실온에서 3분간 반응시킨 뒤 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 첨가하고 20분간 암반응 시켰다. 그 후 12,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 분리하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(GA)를 사용하여 작성한 표준농도 곡선으로부터 환산하여 GA 당량(GAE/mL)으로 산출하였다.

통계처리

RSM 모델의 통계적 유의성 및 적합성 결여 그리고 회귀 계수는 MINITAB(Minitab Statistical Software, version 19)의 분산분석(ANOVA)을 통해 결정하였으며, P -value가 0.05 이하인 것을 유의미하다고 판단하였다. 또한 모델의 이화학적 특성에 대한 유의성 검정은 IBM SPSS Statistics 23.0(SPSS, Armonk, NY, USA)의 Duncan's multiple range test를 사용하여 $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

이화학적 특성

진굴 과피를 다양한 조건에서 열처리한 후 110°C에서 3 시간 열탕 추출하여 수율을 Table 2에 나타내었다. 무처리구에 비해 열처리한 시료에서 수율이 높았으며, 대체로 온도와 시간이 증가할수록 추출 수율도 증가하였다.

식품에 열처리를 할 경우 이화학적, 영양학적 변화가 일어나 식품의 질감이나 색, 맛, 향 등이 영향을 받게 된다(Lee 등, 2015). 이에 따라 열처리에 따른 진굴 과피 추출물의 이화학적 특성을 관찰하기 위해 색도 및 pH를 분석하여 Table 2에 나타내었다. 먼저 Hunter's color value로 명암을 나타내는 L 값, 적색의 정도를 나타내는 a 값, 황색의 정도를 나타내는 b 값에 대해 분석한 결과 열처리를 하지 않은 진굴 과피 추출물(control)의 L 값은 24.62, a 값은 -4.83, b 값은 17.28이었으며, 이와 열처리한 진굴 과피 추출물 간의 색차(ΔE)는 2.28~15.65의 범위로 나타났다. RSM 모델에 따라 열처리한 진굴 과피 추출물의 L 값은 처리 온도 및 시간이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였고, a 값 또한 일정온도 이상으로 열처리함에 따라 값이 감소하였으며 열처리 시간에 더 많은 영향을 받는 것으로 나타났다. 한편 b 값은 110°C의 열처리에서 높은 값을 나타냈으나, 138°C와 같은 일정온도 이상의 고온에서는 현저히 낮아진 값을 보였다.

Jo와 Surh(2016)에 따르면 다양한 방법으로 열처리한 마늘의 이화학적 특성 분석에서 대조구에 비해 시료 모두 L 값이 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. Lee 등(2015)은 열처리한 표고버섯의 경우 열처리가 진행됨에 따라 명도가 감소하였고, 황색도의 경우 값이 증가하다 일정시간 이상 처리될 경우 오히려 감소하였다고 보고하였다. 이와 같이 열처리는 비효소적 갈변을 유발하며 본 연구에서도 일정온도 이상의 고온에서는 과한 갈변이 진행되어 L 값이 급격히 감소하게 되고 이에 따라 b 값 또한 낮아진 것으로 보인다.

RSM에 따라 열처리한 진굴 과피 추출물의 pH는 열처리하지 않은 control과 비교하였을 때 열처리 온도 및 시간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며, pH 4.15~4.34의 범위로 나타났다. 이와 같은 결과는 Min 등(2002)에서 진굴 과피를 열수 추출하였을 때 처리 시간이 증가할수록 시료의 pH가 감소하는 경향을 보인 것과 비슷한 결과였다.

알코올 대사 효소의 활성에 미치는 영향

체내로 흡수된 대부분의 알코올은 간으로 이동하여 ADH에 의해 알데하이드로 변환되고, 이후 ALDH에 의해 산화되는 과정을 통해 분해된다. RSM 모델에 따라 열처리된 진굴 과피 추출물이 알코올 분해 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료를 10배 희석한 뒤 ADH와 ALDH의 활성을 분석하고 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 효소 활성을 100%라고 하였을 때, 열처리한 진굴 과피 추출물은 모두 100% 이상의 효소 활성을 보였다. 먼저 열처리하지 않은 진굴 과피 추출물의 ADH와 ALDH의 활성이 각각 $218.34 \pm 0.3\%$, $193.86 \pm 0.3\%$ 였을 때 열처리한 진굴 과피 추출물의 ADH의 활성 범위는 206.24~250.29%였으며, ALDH의 활성 범위는 193.9~217.07%로 나타났다. 이와 같은 결과는 양성 대조구인 Hepos의 효소 활성과 비교하였을 때 Hepos 원액(ADH $245.3 \pm 0.69\%$, ALDH $180.31 \pm 0.3\%$)과 비슷한 수준이었으며, 열처리가 진행됨에 따라 우수한 효소 활성을 보이는 것으로 나타났다.

Cui 등(2007)은 진굴 과피의 에탄올 추출물에 유산균과 효모를 접종하여 배양한 발효물이 우수한 ADH, ALDH 활성을 나타내었고 알코올로 손상된 간세포를 보호한다고 보고하였다. 서론에서 서술한 바와 같이 진굴 과피의 여러 생리 활성이 보고되었지만 진굴 과피 추출물 자체의 알코올 대사 효소 활성에 대한 자료는 발견하기 어려웠다. 한편, Hwang 등(2019)은 100°C에서 6시간 가온·환류하여 제조한 온주밀감 과피 추출물은 ADH와 ALDH에 대해 유의적으로 활성화시키지 못하였다고 보고하였으며, Do 등(2017)도 80°C에서 8시간 추출한 온주밀감 과피 추출물의 ADH, ALDH 활성이 각각 104%, 103%로 나타나 알코올 대사에 크게 영향을 주지 않았다고 보고하였다. 본 연구에 사용한 진굴 과피와 온주밀감의 과피의 성분 차이는 자세히 보고되지 않았으나 진굴 과피의 메탄올 추출물이 온주밀감 과피의 메탄올 추출물보다 총 폴리페놀 함량이 높고(Hyon 등, 2010a), 조단백질과 조회분 함량이 더 높다고 보고되었다(Hyon 등, 2010b). 또한, 진굴 과피에는 polymethoxyflavones(PMFs)를 비롯한 플라보노이드 성분이 온주밀감에 비해 다량 함유되어 있다(Choi 등, 2007). 특히 naringin은 온주밀감의 과피에서는 발견되지 않으나 진굴 과피의 70% 에탄올 추출물에는 4.60 mg/g 검출되었다. Seo 등(2003)은 naringin이 ADH와 ALDH 활성을 촉진한다고 보고하였다. 따라서 naringin을 비롯하여 일반적인 온주밀감에 존재하지 않는 진굴 과피 고유의 여러 성분들이 알코올 대사 효소 활성에 기여하는 것으로 보이며, 이에 대해서는 추후 더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

추출 조건이 항산화 성분 및 활성에 미치는 영향

반응표면분석에 따라 추출한 진굴 과피 추출물의 항산화 활성을 분석하기 위하여 10배 희석한 시료의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하고 이를 Table 2에 나타내었다. 분석 결과

열처리하지 않은 진굴 과피 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 63.97%일 때, RSM에 따라 열처리한 진굴 과피 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 51.26~83.69%의 범위로 나타났다. 초반 낮은 온도 처리 조건에서는 라디칼 소거능이 감소하는 경향을 보였으나 100°C 이상의 열처리 조건에서는 처리온도 및 시간이 증가할수록 전자공여능이 증가하는 모습을 보였다. 양성 대조구인 ascorbic acid의 경우 10 µg/mL 농도일 때 38.04%의 DPPH 라디칼 소거능을 보였다.

일반적으로 진굴 과피의 우수한 항산화 활성은 진굴 과피에 다량 함유되어 있는 플라보노이드와 이를 포함한 여러 페놀성 물질이 크게 기인하는 것으로 알려져 있다(Yu 등, 2014; Hyon 등, 2010a). 이러한 페놀성 화합물은 식물에서 자연적으로 발생하는 이차 대사산물로 수소 또는 전자공여체로서 항산화제 역할을 하며, 우리 몸의 항산화 체계와 반응하여 이의 활성을 증대시키거나 금속 킬레이트화와 같은 잠재력을 갖는 것으로 보고되었다(Rice-Evans 등, 1997). 한편, 식품의 명도(L)가 열처리 후 감소하는 현상은 열처리에 따라 나타나는 Maillard 반응 또는 Caramel 반응과 같은 비효소적 갈변 반응에 의해 나타나는 것으로, 이 같은 비효소적 갈변이 일어나게 되면 그 과정에서 항산화력을 갖는 화학성분이 생성된다고 알려져 있다(Manzocco 등, 2000). 본 결과에서의 명도(L) 감소 현상(Table 2)도 항산화 활성에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

진굴 과피 추출물의 총 플라보노이드 및 페놀 함량을 분석하여 Table 2에 나타내었다. 그 결과 총 플라보노이드 함량은 0.086~0.149 mg QE/mL, 총 페놀 함량은 2.286~3.134 mg GAE/mL의 범위로 측정되었으며, 전체적으로 열처리 온도 및 시간이 증가함에 따라 함량이 증가하는 경향을 보였다. 다만 150°C 이상의 고온에서 장시간 처리될 경우에는 열에 약한 플라보노이드와 페놀 성분이 손실되어 용출 함량이 감소하는 것으로 나타났다. Hwang 등(2016)은 로스팅 처리 온도와 시간이 증가함에 따라 진굴 과피 추출물의 총 페놀과 전자공여능이 증가한다고 보고하였으며, Juaniz 등(2016)과 Kim 등(2008)에서는 과채류를 열처리한 결과 항산화 활성 및 총 페놀과 플라보노이드 함량이 증가하였다고 보고하였다. Jeong 등(2004)에 따르면 열처리한 감귤 껍질 추출물을 분석한 결과 가열온도 및 시간이 증가함에 따라 총 페놀 함량과 라디칼 소거능이 증가하였으며, 저분자의 페놀 화합물이 새롭게 형성되었다고 보고하였다. 이와 같은

현상은 구조적 특성상 phenolic hydroxyl기에 의하여 기타 거대분자들과 결합한 형태로 존재하던 페놀성 물질이(Kim 등, 2008) 열과피에 의해 결합구조가 끊어지면서 유용성분들이 용출된 것으로 보인다.

반응표면 회귀식 및 분산분석

이상의 결과를 바탕으로 구한 반응표면 회귀식을 Table 3에 나타내었으며, 이에 대한 분산분석 결과는 Table 4에 표기하였다. 변수들에 대한 R²는 각 회귀식이 얼마나 결과를 잘 설명하였는지 해당 반응모델의 적합도를 통계량으로 나타낸 것이다. ADH 회귀식에 대한 R²값은 0.9794로 $P < 0.001$ 수준에서 유의하였으며, ALDH의 경우 R²값이 0.8654로 $P < 0.01$ 수준에서 유의함이 확인되었다. DPPH 라디칼 소거능 및 총 페놀의 이차 회귀식에 대한 R²값은 각각 0.9618, 0.9551로 $P < 0.001$ 수준에서 유의하였으며, 총 플라보노이드의 경우 R²값이 0.8492로 $P < 0.01$ 수준에서 유의한 것으로 나타나 적합성이 확인되었다. 모든 분석 결과는 열처리에 따라 값이 증가하는 경향을 보였으며, 회귀분석 결과 전체적으로 열처리 시간보다 열처리 온도에 대한 F-value가 더 높고, 열처리 온도(X₁)에 대한 유의성이 $P < 0.001$ 수준에서 유의하였으므로 열처리 온도가 분석 결과에 더 큰 영향을 주는 변수인 것으로 판단된다.

최적 열처리 조건 예측 및 검증

추출조건에 따른 종속변수의 반응표면 모델에 대한 적합성을 Table 4에 나타내었으며, 모든 모델이 $P < 0.001$ 수준에서 유의함을 확인하였다. 적합성 결여 검정(lack of fit)은 P -value가 0.05 이상이어야 적합성이 인정된다. 이에 따라 회귀분석 결과를 바탕으로 한 알코올 분해 효소 활성과 항산화력, 총 플라보노이드 함량, 총 폴리페놀 함량에 대한 적합성 결여 검정은 모두 $P > 0.05$ 로 적합성이 인정되었으며, 모든 모델의 R²는 높은 수준으로 유의성을 보였다.

각 회귀계수와 상수에 대하여 회귀식을 성립하고 이를 바탕으로 열처리 온도(X₁)와 열처리 시간(X₂)에 대한 상호작용을 반응표면 그래프로 나타내었다(Fig. 1). 반응표면에 따라 예측된 각 종속변수 결과 값의 정상점은 최대점 형태로 하였을 때 ADH 활성의 경우 열처리 온도 150°C, 처리시간 60분, ALDH 활성은 열처리 온도 140°C, 처리시간 60분으로 나타났으며, DPPH 라디칼 소거능의 경우 150°C, 50.6

Table 3. Polynomial equation calculated by RSM for the extracts from heated *C. sunki* Hort. Tanaka peel

Response ¹⁾	Second order polynomials
ADH	$Y = 221.85 + 16.77X_1 + 2.75X_2 + 3.80X_1^2 - 0.12X_2^2 - 0.26X_1X_2$
ALDH	$Y = 221.85 + 16.77X_1 + 2.75X_2 + 3.80X_1^2 - 0.12X_2^2 - 0.26X_1X_2$
DPPH RSA	$Y = 71.12 + 13.45X_1 + 1.73X_2 - 2.01X_1^2 - 1.60X_2^2 + 0.49X_1X_2$
TFC	$Y = 0.12876 + 0.01766X_1 + 0.00825X_2 - 0.00887X_1^2 - 0.00480X_2^2 - 0.00937X_1X_2$
TPC	$Y = 2.8623 + 0.3371X_1 + 0.0517X_2 - 0.1050X_1^2 - 0.0464X_2^2 + 0.0232X_1X_2$

¹⁾ADH, alcohol dehydrogenase activity; ALDH, acetaldehyde dehydrogenase activity; DPPH RSA, DPPH radical scavenging activity; TFC, total flavonoid contents; TPC, total phenolic contents.

Table 4. Analysis of variance for extraction variables as linear, quadratic term and interactions on response variables

		Model	Temp.	Time	Liner	Quadratic	Cross product	Lack of fit	R ²
	Df	5	1	1	2	2	1	3	—
ADH	Sum of square	2,402.09***	2,250.50***	60.31**	2,310.81***	91.02**	0.26	43.96	0.9794
	F-value	47.43	222.17	5.95	114.06	5.95	0.03	4.38	
ALDH	Sum of square	541.57***	368.89***	71.58**	440.48***	95.92	5.18	79.37	0.8654
	F-value	6.43	21.9	4.25	13.07	2.85	0.31	10.88	
DPPH RSA	Sum of square	1,500.99***	1,446.98***	23.87	1,470.85***	29.16	0.98	57.10	0.9618
	F-value	25.20	121.46	2	61.73	1.22	0.08	15.39	
TFC	Sum of square	0.00387***	0.00249***	0.00054**	0.00304***	0.00047	0.00035	0.00064	0.8492
	F-value	5.63	18.18	3.97	11.07	1.73	2.56	9.67	
TPC	Sum of square	0.99651***	0.90922***	0.02135	0.93057***	0.06379	0.00215	0.04398	0.9551
	F-value	21.29	97.12	2.28	49.70	3.41	0.23	10.35	

R²=coefficient of determination, Df=degree of freedom.

ADH, alcohol dehydrogenase activity; ALDH, acetaldehyde dehydrogenase activity; DPPH RSA, DPPH radical scavenging activity; TFC, total flavonoid contents; TPC, total phenolic contents.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig. 1. Response surface for (A) alcohol dehydrogenase activity, (B) acetaldehyde dehydrogenase activity, (C) DPPH radical scavenging activity, (D) total flavonoid contents, and (E) total phenolic contents.

분, 총 플라보노이드의 정상점은 141.6°C, 36.6분, 총 페놀 함량의 경우 150°C, 52.6분의 조건으로 나타났다.

위 내용을 종합하여 열처리한 진굴 과피 추출물의 알코올 분해효소 활성과 항산화 활성을 최대화할 수 있는 열처리 조건을 MINITAB software의 ‘response optimizer’를 통해 예측하였다. 그 결과 열처리 온도 144.8°C, 처리 시간 50.2분으로 나타났으며, 이에 대한 종속변수의 예측값을 Table

5에 나타내었다. 이때 추출 수율은 22.41%였고, 농도는 47 µg/mL였다. 반응표면분석법에 따라 예측된 최적 조건으로 실험한 결과 ADH 활성은 252.62±0.5%, ALDH 활성은 222.77±1.65% 그리고 DPPH 라디칼 소거능의 경우 89.3 ±12%, 총 플라보노이드 및 페놀 함량은 각 0.14±0.003 mg QE/mL, 3.20±0.01 mg GAE/mL의 결과를 나타냈다. 모든 분석 값은 예측값에 대한 95% 신뢰구간에 속하였으

Table 5. Verification of predicted and experimental results of the extracts from heated *C. sunki* Hort. Tanaka peel under optimal condition

Optimum conditions		Dependent variables	Predicted value	Multiple response prediction ¹⁾	Experimented value
Temp (°C)	Time (min)				
144.8	50.2	Alcohol dehydrogenase activity (%)	250.27	243.60~256.93	252.620
		Acetaldehyde dehydrogenase activity (%)	216.55	207.96~225.15	222.77
		DPPH radical scavenging activity (%)	85.58	78.35~92.81	89.30
		Total flavonoid contents (mg QE/mL)	0.132	0.107~0.156	0.137
		Total phenolic contents (mg GAE/mL)	3.153	2.950~3.356	3.201

¹⁾Multiple response predictions were established within the 95% confidence interval.

로 재현성이 검증되었다.

요 약

진갈 과피 추출물의 알코올 대사 효소활성을 증진시키기 위하여 반응표면분석법(RSM)을 이용해 진갈 과피에 대한 최적 열처리 조건을 구하였다. 진갈 과피에 대한 열처리 온도와 시간이 독립변수였고, ADH 활성, ALDH 활성, DPPH 라디칼 소거능, 총 플라보노이드 및 페놀 함량은 종속변수였다. RSM에 따른 11개 조건의 추출물을 제조하고 분석한 결과 최적 열처리 조건의 온도와 시간은 각각 144.8°C와 50.2분이었으며, 이 조건에서 제조된 진갈 과피 추출물의 ADH 활성, ALDH 활성, DPPH 라디칼 소거능, 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량은 각각 250.27%, 216.55%, 85.58%, 0.132 mg QE/mL, 3.153 mg GAE/mL로 예측되었다. 최적 조건에서 진갈 과피 추출물을 제조하여 분석한 결과 95% 신뢰구간 내에서 예측값에 대한 높은 재현성을 보였다. 이상의 결과는 진갈 과피 추출물의 알코올 대사 효소 활성에 대한 최초의 보고이며, 진갈 과피 추출물의 숙취해소를 위한 기능성 식품 개발에 기여할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2021년 경남대학교 대학혁신지원사업의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldivar SO. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.* 2014. 152: 46-55.
- Bergmeyer HU. Alcohol dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, NY, USA. 1974. p 428-429.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2002. 50:3010-3014.
- 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.
- Dominguez-Rodriguez G, Marina ML, Plaza M. Enzyme-assisted extraction of bioactive non-extractable polyphenols from sweet cherry (*Prunus avium* L.) pomace. *Food Chem.* 2021. 339:128086. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128086>
- Garbetta A, D'Antuono I, Sisto A, Minervini F, Cardinali A, Lavermicocca P. Effect of artichoke fermentation by probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LMG P-22043 and of digestion process on polyphenols and antioxidant activity. *J Funct Foods.* 2018. 45:523-529.
- Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc.* 1981. 58:966-968.
- Hamauzu Y, Takedachi N, Miyasaka R, Makabe H. Heat treatment of Chinese quince polyphenols increases rat plasma levels of protocatechuic and vanillic acids. *Food Chem.* 2010. 118:757-763.
- Hwang HJ, Park JA, Choi JJ, Kim HS, Cho MS. Roasting conditions for optimization of Citri Unshii Pericarpium antioxidant activity using response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2016. 45:261-268.
- 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 Orient Physiol Pathol.* 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.* 2010a. 26:88-94.
- Hyon JS, Kang SM, Senevirathne M, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, et al. Antioxidative activities of extracts from dried *Citrus sunki* and *C. unshiu* peels. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2010b. 39:1-7.
- 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.
- Jo H, Surh J. Effects of cooking methods with different heat

- intensities on antioxidant activity and physicochemical properties of garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2016. 45:1784-1791.
- Juaniz I, Ludwig IA, Huarte E, Pereira-Caro G, Moreno-Rojas JM, Cid C, et al. Influence of heat treatment on antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of selected vegetables. *Food Chem*. 2016. 197:466-473.
- Kang SH, Lee YJ, Lee CH, Kim SJ, Lee DH, Lee YK, et al. Physiological activities of peel of Jeju-indigenous *Citrus sunki* Hort. Tanaka. *Korean J Food Sci Technol*. 2005. 37:983-988.
- Ke Z, pan Y, Xu X, Nie C, Zhou Z. *Citrus* flavonoids and human cancers. *J Food Nutr Res*. 2015. 3:341-351.
- Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Korean J Food Sci Technol*. 2008. 40:166-170.
- Kim HY. Distribution, taxonomy, horticultural characters of the local *Citrus* spp. in Cheju, and the genetic markers among them. Dissertation. Chonnam National University, Cheonnam, Korea. 1988.
- Kim YD, Ko WJ, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation. *Korean J Nutr*. 2009a. 42:278-290.
- Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2009b. 38:462-469.
- Ko WC, Lee SR. Anti-apoptotic effect of fermented *Citrus sunki* peel extract on chemical hypoxia-induced neuronal injury. *J Nutr Health*. 2015. 48:451-456.
- Koivula T, Koivusalo M. Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochim Biophys Acta*. 1975. 397:9-23.
- Lee JG, Kim KI, Hwang IG, Yoo SM, Min SG, Choi MJ. Effects of various thermal treatments on physicochemical and nutritional properties of shiitake mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2015. 44:874-881.
- Lee SC, Jeong SM, Kim SY, Park HR, Nam KC, Ahn DU. Effect of far-infrared radiation and heat treatment on the antioxidant activity of water extracts from peanut hulls. *Food Chem*. 2006. 94:489-493.
- Lee SC, Kim JH, Jeong SM, Kim DR, Ha JU, Nam KC, et al. Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of rice hulls. *J Agric Food Chem*. 2003. 51:4400-4403.
- Li W, Yang R, Ying D, Yu J, Sanguansri L, Augustin MA. Analysis of polyphenols in apple pomace: A comparative study of different extraction and hydrolysis procedures. *Ind Crops Prod*. 2020. 147:112250. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112250>
- Liu Y, Heying E, Tanumihardjo SA. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2012. 11:530-545.
- Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli MC, Lerici CR. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci Technol*. 2000. 11:340-346.
- Min SH, Park HO, Oh HS. A study on the properties of hot water extracts of Korean dried tangerine peel and development of beverage by using it. *Korean J Food Cook Sci*. 2002. 18:51-56.
- Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasaiah U, et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta*. 2014. 436:332-347.
- Rhyu MR, Kim EY, Bae IY, Park YK. Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits. *Korean J Food Sci Technol*. 2002. 34:132-135.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 1997. 2:152-159.
- 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.
- Shin HS, Kang SI, Ko HC, Kim HM, Hong YS, Yoon SA, et al. Anti-inflammatory effect of the immature peel extract of *Jinkyool* (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka). *Food Sci Biotechnol*. 2011. 20:1235-1241.
- 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.
- Zou Z, Xi W, Hu Y, Nie C, Zhou Z. Antioxidant activity of *Citrus* fruits. *Food Chem*. 2016. 196:885-896.