

청귤의 항산화 및 항균 활성

최미현 · 김경희 · 육홍선

충남대학교 식품영양학과

Antioxidant and Antibacterial Activity of Premature Mandarin

Mi-Hyun Choi, Kyoung-Hee Kim, and Hong-Sun Yook

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University

ABSTRACT This study compared the antioxidant and antibacterial activity of premature mandarin juice (PMJ), premature mandarin peel (PMP), and premature mandarin fruit (PMF). The total phenol contents were 12.36~12.70 gallic acid equivalents mg/g. The IC₅₀ values of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity were in the order of PMF (2.37 mg/mL), PMJ (2.58 mg/mL), and PMP (3.06 mg/mL). The IC₅₀ values of the 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate) radical scavenging activity were in the order of PMF (5.91 mg/mL), PMJ (6.58 mg/mL), and PMP (9.74 mg/mL). The ferric reducing antioxidant power value (1 mg/mL) was highest in the PMJ (0.66 mM/g) without significant differences in the other samples. As a result of the antimicrobial activity measurement, PMJ exhibited antimicrobial activity against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Pseudomonas aeruginosa* but not *Bacillus subtilis* at a concentration of 5 mg/disc, and showed the highest antimicrobial activity with 16 mm for *B. cereus* and 15 mm for *P. aeruginosa* at a concentration of 10 mg/disc. The tyrosinase inhibition activity values (1 mg/mL) of PMJ, PMP, and PMF were 59.15%, 60.92%, and 65.58%, respectively. At the same concentration, the elastase inhibition activity values of PMJ, PMP, and PMF were 72.79%, 60.24%, 66.16%, respectively. Therefore, premature mandarin is a potential industrial raw material for health functional foods and cosmetics.

Key words: premature mandarin, antioxidant activity, antibacterial activity

서 론

최근 생활환경과 식생활 패턴의 변화 등으로 현대인들은 노화를 포함한 각종 성인병 발생의 원인이 되는 활성산소(ROS, reactive oxygen species)에 주목하고 있다. 인체 내에는 안정한 상태의 산소가 효소계, 환원 대사, 화학약품, 공해 물질, 광화학 반응과 같은 환경적 및 생화학적 요인에 의하여 superoxide anion radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide radical 및 singlet oxygen과 같은 반응성이 큰 활성산소로 전환된다. 이들은 강한 산화력으로 류마티스 관절염, 당뇨병, 동맥경화, 암 등 각종 질병과 생체 대사과정에서 생성되어 세포막 지방질을 과산화시키고 세포막 투과성의 변화를 초래하여 DNA 손상을 유발한다(Kwon 등, 2007; Valko 등, 2007; Kim 등, 2007). 따라서 생체 내 항산화 방어시스템을 증가시키거나 ROS를 조절할 수 있

는 합성 또는 천연 항산화제 개발연구의 필요성이 강조되고 있고 이에 대한 탐색이 활발히 진행되었다(Valko 등, 2006). 이러한 노화 및 각종 질병을 예방하고 치료하기 위한 목적으로 초기에 사용되었던 BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisole)는 합성 항산화제로서 효과가 우수하고 경제성 때문에 많이 이용되었으나, 생체 효소, 지방의 변이 및 독성으로 인해 인체에 암을 유발할 수 있다는 안전성 문제로 phenolics, flavonoids, carotenoids 등과 같은 천연 항산화제의 개발이 요구되고(Branen, 1975; Williams 등, 1990), 각종 생약제나 과일, 채소와 같은 천연물 유래의 항산화제를 개발 이용하려는 연구 추세로 변화되고 있다(Masaki 등, 1995). 과채류에는 천연물질인 플라보노이드가 다량 함유되어 있으며 이들은 항알레르기성, 항암성, 항바이러스성, 항염성 등 다양한 생리활성 기능을 갖는 것으로 밝혀지면서 이에 대한 관심이 고조되고 있다. 플라보노이드는 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones로 구성되어 있으며, 그 구조에 따라 특정 플라보노이드는 항산화 및 항균성을 갖고 있다(Lam 등, 1994).

감귤은 다른 과실에 비해서 풍부한 과즙, 독특한 향미 및 고유한 색을 가지고 있을 뿐만 아니라 여러 고기능성 성분이

Received 21 February 2019; Accepted 8 May 2019

Corresponding author: Hong-Sun Yook, Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
E-mail: yhsuny@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6840

Author information: Mi-Hyun Choi (Graduate student), Kyoung-Hee Kim (Researcher), Hong-Sun Yook (Professor)

알려져 있다(Lee 등, 2009). 감귤류의 기능성 성분인 flavonoid는 현재까지 약 40여종 이상의 구조가 밝혀져 있으며(Gattuso 등, 2007), 주요 flavonoid 화합물로서 naringin, hesperidin, naringenin, hesperetin, nobiletin 그리고 tangeretin 등이 있고(Kabe 등, 2005; Valko 등, 2007), hesperidin, neohesperidin 및 naringin에 대한 분석과 효능에 대한 연구가 다수 진행되어 왔다(Seo 등, 2003). 이러한 플라보노이드의 생리활성에 대한 연구로는 항산화 작용, 고지혈증 억제작용, 항균효과, 항염효과, 암세포의 증식억제, 고혈압 예방 등의 혈관 건강증진 등이 보고되고 있다(Huang과 Ho, 2010). 특히 과육보다 감귤박에 생리활성물질이 많이 함유되어 있는데(Li 등, 2009), 감귤박 또한 flavonoid류가 많이 함유되어 있어 항산화 작용이 있다고 보고되었고(Choi 등, 2007) pinene, linalool 등의 휘발성 물질이 함유되어 있어 항균작용이 있으며, carotenoids, bioflavonoids와 같은 물질이 항염, 항암, 항산화 등 다양한 생리적 작용을 나타낸다고 알려진 바 있다(Erlund, 2004; Kim과 Shin, 2003).

감귤류의 부산물은 가공공정뿐만 아니라 감귤 생육 시 청굴의 형태로도 발생한다. 제주 지역에서 감귤의 생산량 감축과 품질의 고급화를 위해 매년 8~10월에 약 5~10만 톤 정도의 청굴을 나무에서 따서 폐기하는 수확 적과를 실시하고 있으며, 폐기되는 청굴 대부분이 과수원 주변 환경을 오염시키는 요인으로 작용하고 있다(Kang 등, 2005). 감귤 미숙과는 완숙과에 비해 유기산, 식이섬유, polyphenol 그리고 flavonoids인 hesperidin, naringin, rutin 등이 많이 함유되어 있고, 특히 과피 중에 식이섬유, essential oil, carotenoids, flavonoids 등의 생리활성 성분이 많이 함유되어 있으며 과육보다 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Park 등, 2011; Kim, 2009; Jeoung 등, 2012; Choi 등, 2007). Song 등(1998)은 hesperidin과 naringin을 생약 소재로 이용하려는 시도가 이루어지고 있어 열매따기(적과)에서 얻어지는 청굴을 수확하여 가공 처리하는 것이 필요하다고 하였으나, 현재까지 청굴에 대한 연구로는 껍질수로 처리한 발아콩 유래의 두릅 펩타이드를 포함하는 근력 및 근육량 향상용 조성물(Song 등, 2016), 감귤 미숙과 식초의 특성과 항산화 활성(Yi 등, 2014)으로 감귤 부산물보다 연구가 미비한 실정이다. 본 연구에서는 청굴을 착즙한 후 생성되는 착즙액, 착즙박, 착즙하지 않은 원물 형태의 항산화 및 항균 활성을 비교 분석하여 청굴의 천연 항산화제, 건강 기능성 식품 원료 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 청굴 및 감귤 착즙박은 제주테크노파크에서 제공받았다. 청굴 시료는 청굴 전체, 청굴을 착즙한 후 생성된 착즙액 및 청굴박을 각각 -70°C에서 24시간 동안 냉각한 후 5일간 동결건조 하였다. 동결건조물을 분쇄한 후

40 표준체(체눈 크기 425 µm)에 내려 분말화하였다.

시험용액 제조

청굴의 항산화 활성 및 항균 활성 평가에 사용된 시험용액은 분말 1 g에 70% 메탄올(Samchun Pure Chemical Co., Ltd., Pyeongtaek, Korea) 9 mL를 가하여 24시간 동안 추출한 후 원심분리(3,600 rpm, 20 min, LaboGene 416, LaboGene™, Holstebro, Denmark) 하여 생성된 상층액을 일정 농도로 희석하여 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin과 Denis의 방법(1912)을 참고하여 측정하였다. 시험용액 10 µL와 Folin-Ciocalteu's reagent(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 10 µL를 가하여 진탕하고 3분간 방치한 다음 10% Na₂CO₃(Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Ansan, Korea) 용액 150 µL를 섞어 1시간 후 765 nm에서 흡광도를 측정(xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)하였다. 결과 값은 표준물질인 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 검량선을 작성한 후 수율을 적용하여 g 중 mg gallic acid(GAE, dry basis)로 표시하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 Blois(1958)의 방법을 참고하여 측정하였다. 일정 농도로 제조한 시험용액 100 µL에 0.2 mM DPPH(Sigma-Aldrich Co.) 용액 100 µL를 가하여 섞은 뒤 암실에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도(Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 측정하였다. 이때 대조군으로 시료 대신 시료를 녹인 용매인 70% 에탄올(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)을 사용하였으며 반응한 결과 값을 50% 감소시키는 시료의 농도를 IC₅₀ 값(mg/mL)으로 나타내었다. 양성대조군으로 기존의 항산화제인 ascorbic acid(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 사용하여 비교하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거 활성

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] radical scavenging activity의 측정은 Fellegrini 등(1999)의 방법에 따라 측정하였다. ABTS solution은 7 mM ABTS(Sigma-Aldrich Co.)와 140 mM K₂S₂O₈(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)을 섞어 암실에서 12~16시간 동안 방치한 후, 이를 absolute ethanol(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)과 1:88 비율로 섞어 734 nm에서

흡광도(Bio-Rad Laboratories, Inc.) 값이 0.7 ± 0.02 가 되도록 조절하여 제조하였다. 일정 농도로 제조한 시료 50 μ L에 ABTS solution 1 mL를 가한 다음 30초간 진탕하고 2.5 분간 암반응 시켜 734 nm에서 흡광도(Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 측정하였다. 이때 대조군으로 시료 대신 시료를 녹인 용매인 50% 에탄올(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)을 사용하였으며 반응한 결과 값을 50% 감소시키는 시료의 농도를 IC₅₀ 값(mg/mL)으로 나타내었다. 양성대조군으로 기존의 항산화제인 ascorbic acid(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 사용하여 비교하였다. ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}}\right) \times 100$$

FRAP

FRAP(ferric reducing antioxidant power) 측정 방법은 Benzie와 Strain(1996)의 방법을 참고하여 측정하였다. FRAP reagent는 acetate buffer(300 mM, pH 3.6)와 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma-Aldrich Co.), 20 mM FeCl₃·6H₂O(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 섞은 후 37°C의 incubator에서 10분간 반응시켜 제조하였다. 시료 10 μ L에 증류수 30 μ L와 FRAP reagent 300 μ L를 넣고 37°C에서 10분간 암반응 시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정(Bio-Rad Laboratories, Inc.)하였다. 양성대조군으로 0.1 mg/mL 농도의 ascorbic acid(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 사용하여 비교하였으며 FRAP 활성은 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 및 0.5 mM의 농도로 반복하여 작성한 ferrous sulfate(FeSO₄)의 검량식에 대입해 환산하여 시료 1 g당 환원력(mM/g)으로 나타내었다.

항균 활성 평가

항균 활성은 각 균주를 대상으로 disc diffusion assay(Bauer 등, 1966)에 의해 측정하였다. 항균 활성 측정에 사용된 균주는 Gram 양성균으로 *Bacillus cereus*(*B. cereus*) KCTC 1012, *Bacillus subtilis*(*B. subtilis*) KCTC 1022, *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*) KCTC 3881과 Gram

음성균으로 *Enterobacter cloacae*(*E. cloacae*) KTCT 1685, *Escherichia coli*(*E. coli*) KTCT 2441, *Salmonella enterica*(*S. enterica*) KTCT 1925, *Pseudomonas aeruginosa*(*P. aeruginosa*) KTCT 1636의 총 7종을 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea) 및 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 배지는 휴면 상태의 균주들을 Table 1의 조건으로 생육 배양하였다. 즉 분양받은 균주를 nutrient broth(BD Diagnostic System, Sparks, MD, USA)에 접종하고 30°C에서 24~30 시간씩 3회 계대 배양하여 600 nm에서 측정(Bio-Rad Laboratories, Inc.)한 흡광도 값이 $0.4 \sim 0.6 (1 \times 10^5 \text{ CFU/mL})$ 범위 안에 들게 한 후 항균 활성 측정을 위한 균주로 사용하였다. 활성화된 각 균주를 nutrient agar(BD Diagnostic System)에 100 μ L씩 분주한 뒤 멸균 spreader로 도말하여 항균시험용 평판배지를 준비하였다. 시험용액은 disc당 5, 10 mg이 되도록 paper disc(8 mm)에 천천히 흡수시킨 후 건조 과정을 거쳐 용매를 휘발시킨 뒤, 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 24~30시간 동안 30°C의 incubator에서 배양한 다음 disc 주변에 생성된 생육 저해환(clear zone)의 직경(mm)을 측정하여 항균력을 비교하였다.

Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해 활성은 Flurkey(1991)의 방법을 참고하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 용해시킨 효소액(mushroom tyrosinase, 100 unit/mL, Sigma-Aldrich Co.) 25 μ L와 기질인 10 mM L-DOPA(dihydroxyphenylalanine, Sigma-Aldrich Co.) 50 μ L, 0.1 M potassium phosphate buffer 125 μ L를 혼합한 다음 시료 50 μ L를 첨가하여 37°C의 incubator에서 15분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정(Bio-Rad Laboratories, Inc.)하였다. Tyrosinase 저해 활성은 다음의 환산식에 의하여 계산되었으며 tyrosinase 효소의 작용 저해 효과를 나타내는 대표적인 물질인 kojic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 양성대조군으로 사용하여 비교하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition ability (\%)} = \left(1 - \frac{A - B}{C}\right) \times 100$$

A: Absorbance at 475 nm determined with sample

Table 1. List of strains used for antibacterial experiments

	Strain	Media ¹⁾	Temperature (°C)
Gram (+) bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	NA/NB	30
	<i>Bacillus subtilis</i>	NA/NB	30
	<i>Staphylococcus aureus</i>	NA/NB	30
Gram (-) bacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	NA/NB	30
	<i>Escherichia coli</i>	NA/NB	30
	<i>Salmonella enterica</i>	NA/NB	37
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA/NB	37

¹⁾NA: nutrient agar, NB: nutrient broth.

B: Absorbance at 475 nm determined with buffer instead of enzyme

C: Absorbance at 475 nm determined with buffer instead of sample

Elastase 저해 활성

Elastase 저해 활성 측정은 Kraunsoe 등(1996)의 방법을 참고하여 측정하였다. 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0) buffer 350 μ L에 *n*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide(Sigma-Aldrich Co.) 125 μ L와 시료 20 μ L를 첨가한 후 50 μ L/mL elastase(pancreatic from porcine pancreas, PPE, 1.4 units/mg, Sigma-Aldrich Co.) 5 μ L를 가하여 37°C의 incubator에서 20분 동안 반응시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정(Bio-Rad Laboratories, Inc.)하였다. Elastase 저해 활성은 다음의 환산식에 의하여 계산되었으며 노화된 피부를 개선해주는 대표적인 물질인 ascorbic acid(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 양성대조군으로 사용하여 비교하였다.

$$\text{Elastase inhibition ability (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100$$

A: Absorbance at 410 nm determined with sample

B: Absorbance at 410 nm determined with buffer instead of enzyme

C: Absorbance at 410 nm determined with buffer instead of sample

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 실시한 후 평균값으로 나타내었으며, 얻어진 결과는 SPSS 24.0(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 일원배치 분산분석을 하였다. 유의성이 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $P < 0.05$ 수준에서 유의차 검정을 하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량

식품이나 체내 생체막에 존재하고 있는 지질은 활성산소

에 의해 산화되어 식품의 품질변화나 생체노화를 일으키는 것으로 알려져 있는데, 이러한 산화를 방지하기 위하여 천연 항산화제인 페놀성 화합물이 널리 이용되고 있다(Nijveldt 등, 2001). 폴리페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포하는 2차 대사산물로서 수산기를 가지는 방향성 화합물을 총칭하는 것으로, hydroxycinnamic acid를 비롯한 대부분의 폴리페놀 화합물은 세포벽, 다당류, 리그닌 등과 에스테르 결합하여 있거나 중합체로 존재하며, 수산기를 통한 수소 공여와 페놀고리 구조의 공명 안정화에 의해 항산화 능력을 나타낸다(Yusof 등, 1990; Herrmann과 Nagel, 1989). 청귤 착즙액 및 착즙박, 청귤의 총 폴리페놀 측정 결과는 Table 2에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 청귤(12.70 GAE mg/g), 착즙액(12.39 GAE mg/g), 착즙박(12.36 GAE mg/g)의 순서로 나타났으며 이들 사이에서 유의적 차이가 존재하지 않았다.

Song 등(2013)은 감귤 착즙박과 통과를 에탄올로 추출한 후 생성된 추출물을 건조하고 분말화한 시료의 총 폴리페놀을 측정하였으며, 그 결과 각각 0.96 GAE mg/g, 2.09 GAE mg/g으로 나타났다고 보고하였다. 본 연구에서 청귤이 착즙박에 비해 폴리페놀 함량이 더 높은 결과와 유사하였고, 수치로 매우 높게 나타났으므로 본래 시료를 동결건조 한 후 용매 추출하였을 때 폴리페놀의 추출 수율이 높아지는 것으로 사료된다.

Kim 등(2009)은 제주재래종 감귤의 과피를 분쇄한 후 그대로 추출하여 수확 시기별로 총 폴리페놀 함량을 측정하였고 그 결과 8월에 수확된 미숙 형태의 감귤 과피의 총 폴리페놀 함량이 0.85~2.29 CE mg/g이라고 보고하였으며 수확 시기가 늦어질수록 감소하는 경향을 나타낸다고 보고하여 청귤은 성숙한 형태인 감귤보다 높은 페놀 함량을 가지는 것으로 생각되며, 미숙과가 숙아진 시기에 따른 폴리페놀 함량에 대한 구체적 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

DPPH 라디칼 소거 활성

청귤 착즙액 및 착즙박, 청귤의 DPPH 라디칼 소거 활성 측정 결과는 Table 2에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거 활성은 청귤이 가장 높았으며, 이어서 착즙액, 착즙박의 순서로 나타났다. 이때 IC₅₀ 값은 각각 2.37 mg/mL, 2.58 mg/mL, 2.70 mg/mL, 3.06 mg/mL였으며 모든 시료에서 유의적인 차이가 존재하였다($P < 0.05$). Song 등(2013)은 1 mg/

Table 2. Antioxidant activity of premature mandarin

	PMJ ¹⁾	PMP	PMF
Total polyphenol (GAE mg/g)	12.39±0.54 ^{a2)3)}	12.36±0.11 ^a	12.70±0.16 ^a
DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ , mg/mL) ⁴⁾	2.58±0.02 ^b	3.06±0.04 ^a	2.37±0.04 ^c
ABTS radical scavenging activity (IC ₅₀ , mg/mL) ⁴⁾	6.58±0.11 ^b	9.74±0.23 ^a	5.91±0.08 ^c
FRAP (ferric reducing antioxidant power, mM/g)	0.66±0.07 ^a	0.20±0.00 ^b	0.21±0.01 ^b

¹⁾PMJ, premature mandarin juice; PMP, premature mandarin peel; PMF, premature mandarin fruit.

²⁾Mean±SD (n=3).

³⁾Different letters within a same row differ significantly ($P < 0.05$).

⁴⁾Amount required for 50% reduction of radical scavenging activity.

mL 농도의 감귤 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였으며, 그 결과 과육에서 41.87%, 과피를 포함한 감귤에서 72.51%로 나타나 과육보다 과피를 포함한 경우 감귤의 항산화 활성이 높아진다고 하였다. 이는 본 연구에서 청귤 착즙액의 라디칼 소거 활성에 비해 과육과 과피를 포함하는 청귤의 소거 활성이 높은 결과와 일치하였다. 한편 Lee 등(2017)은 자몽 과육과 과피의 70% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 과피보다 과육에서 더 높았다고 보고하였으므로 청귤 착즙액은 착즙박에 비해 높은 라디칼 소거 활성을 가지는 것으로 사료되며, 청귤의 라디칼 소거능 증가에 착즙액이 착즙박보다 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다.

Stella 등(2011)은 오렌지 주스에서 총 페놀 함량이 높을수록 항산화능이 높았다고 하였으며, Kähkönen 등(1999)의 연구에서도 과실류의 총 폴리페놀 함량은 항산화 활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다. 채소류의 경우에도 DPPH 라디칼 소거 활성은 페놀성 화합물과 서로 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(Kim 등, 2012). 본 연구에서도 총 폴리페놀 함량 측정 결과 수치로 청귤이 가장 높게 나타났는데, 이러한 결과 또한 라디칼 소거 활성에 영향을 미친 것으로 생각된다.

ABTS 라디칼 소거 활성

ABTS 라디칼은 cation radical, DPPH 라디칼은 free radical이므로 추출물의 특성에 따라 활성이 다를 수 있어 두 종류의 라디칼 소거능을 모두 분석할 필요가 있다(Shin과 Lee, 2010). 청귤 착즙액 및 착즙박, 청귤의 ABTS 라디칼 소거 활성을 평가한 결과는 Table 2에 나타내었다. ABTS 라디칼 소거 활성은 청귤이 가장 높았으며, 착즙액, 착즙박의 순서로 나타났다. 이때 IC₅₀ 값은 각각 5.91 mg/mL, 6.58 mg/mL, 9.74 mg/mL로 모든 시료에서 유의적인 차이가 존재하였다. 이러한 결과는 DPPH 라디칼 소거 활성의 경향과 일치하였으므로 청귤의 ABTS 라디칼 소거 활성 또한 페놀 함량과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다. 또한 DPPH 라디칼 소거 활성보다 결과 수치가 낮았으므로 청귤 시료는 ABTS 라디칼 소거 활성보다 DPPH 라디칼 소거 활성에 대해 더 높은 활성을 나타내는 것으로 판단된다. Yi 등(2014)의 연구에 따르면 감귤 미숙과 식초가 완숙과 식초보다 3.4 배 높은 ABTS 소거능을 나타내었다고 보고했으며, Barreca 등(2011)도 감귤의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 평가한 결과 성숙과보다 미숙과의 활성이 더 높게 나타났다고 보고하여 미숙과 형태인 청귤 또한 감귤보다 높은 활성을 가질 것으로 생각되며, 청귤의 숙기에 따른 ABTS 라디칼 소거능에 관련한 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

FRAP

청귤 착즙액 및 착즙박, 청귤의 FRAP 측정 결과는 Table 2에 나타내었다. 1 mg/mL 농도에서 청귤 착즙액의 FRAP

value(0.66 mM/g)가 가장 높게 나타났으며 나머지 시료에서는 유의적 차이가 존재하지 않아 다른 항산화 측정 결과와 다소 다른 경향성을 나타내었다. FRAP assay는 DPPH 라디칼 소거능 및 ABTS 라디칼 소거능을 확인하는 방법과는 다른 원리로(Bogin과 Abrams, 1976), 산성 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe³⁺-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe²⁺-TPTZ)으로 전환되는 원리를 이용한 것으로, 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 시료 내의 총 항산화능을 측정하는 방법이다(Benzie와 Strain, 1996). Park 등(2007)은 총 폴리페놀 함량과 FRAP 활성 간의 상관관계를 조사하였으며 서로 0.971, 0.939의 높은 양의 상관관계를 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에서도 총 폴리페놀 함량이 청귤 착즙액에서 유의적으로 높았으며 이러한 성분과 FRAP 활성이 밀접한 관련성이 있는 것으로 사료된다.

항균 활성

청귤 착즙액 및 착즙박, 청귤의 항균 활성 측정 결과는 Table 3에 나타내었다. 5 mg/disc의 농도에서 청귤 착즙액이 *B. subtilis*를 제외한 모든 균주에 대해 항균력을 나타내었으며 이외의 시료에서는 항균력이 나타나지 않았다. 10 mg/disc 농도에서 청귤 착즙액은 모든 균주에 대해 활성이 있었고 이 중에서도 *B. cereus*에 대해 16 mm, *P. aeruginosa*에 대해 15 mm로 가장 큰 저해환을 나타내었다. 같은 농도에서 청귤 착즙박은 *B. cereus* 및 *B. subtilis*에 대해 10 mm, 청귤은 모든 균주에 대해 10~11 mm의 생육 저해환을 나타내었다. Kim 등(1999)이 일본산 귤의 일종인 영광의 과즙 및 과피 추출물에 대한 항균력을 측정한 결과, 과즙 추출물이 과피 추출물보다 항균 효과가 높았으며 Gram 양성균보다 Gram 음성균의 항균력이 더 우수하다고 보고하였다. 본 연구에서도 5 mg/disc 농도에서 시료 중 청귤 착즙액에서만 항균 활성이 나타났고 Gram 양성균인 *B. subtilis*에서만 활성이 나타나지 않아 청귤 과즙이 과피가 포함된 착즙박과 청귤보다 항균 활성이 높은 것으로 생각되며 Gram 음성균에 대해 항균력이 더 우수한 것으로 생각된다. 또한 10

Table 3. Antibacterial activity of premature mandarin

mg/disc Strain	Clear zone (mm)					
	PMJ ¹⁾		PMP		PMF	
	5	10	5	10	5	10
<i>B. cereus</i>	12	16	— ²⁾	10	—	10
<i>B. subtilis</i>	—	12	—	10	—	11
<i>E. cloacae</i>	10	14	—	—	—	10
<i>E. coli</i>	10	10	—	—	—	10
<i>P. aeruginosa</i>	11	15	—	—	—	10
<i>S. aureus</i>	10	14	—	—	—	10
<i>S. enterica</i>	10	14	—	—	—	10

¹⁾PMJ, premature mandarin juice; PMP, premature mandarin peel; PMF, premature mandarin fruit.

²⁾Not detected.

mg/disc의 농도에서 Gram 양성 및 음성균에서 모두 항균 활성을 나타내어, 청귤은 영귤보다 다양한 균주에 대한 항균력을 가지는 것으로 생각된다. 감귤류에 함유된 naringin은 항균력을 가지고 있다. 본 연구에 사용된 청귤 착즙액, 착즙박, 청귤의 naringin 함량 측정 결과, 착즙액(32.09 mg/g), 청귤(31.13 mg/g), 착즙박(22.32 mg/g)의 순서로 나타나 (data not shown) naringin 함량이 항균 활성에 영향을 미쳐 착즙액의 항균 활성이 가장 높게 나타났고 착즙박의 항균 활성이 비교적 낮은 것으로 생각된다.

한편 Jeong 등(2005)은 국내산 무화과의 성숙 시기에 따른 식중독균에 대한 성장 억제 효과를 확인하기 위해 미숙과 I (63일), 미숙과 II (79일), 완숙과를 메탄올로 추출한 후 여러 농도로 처리한 결과, 모든 대상 균주는 추출물의 농도가 증가함에 따라 성장이 억제되는 것으로 나타났으며 미숙과는 완숙과보다 낮은 농도에서 뚜렷한 저해 활성을 나타내어, 더 큰 항균력을 가지고 있다고 보고하였다. Choi 등(2009)의 연구에서도 부산물로서 비가식부인 꾸지뽕의 근피와 잎의 수확 시기에 따른 항균력이 미성숙기에 비해 수확기에 감소하였다는 결과를 나타내었다. 따라서 미성숙한 형태인 청귤이 감귤보다 항균력이 더 높은 것으로 생각되어 이에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Tyrosinase 저해 활성

피부 미백효과를 측정하는 하나의 지표로 tyrosinase 활성을 측정하고 이를 효과적으로 저해하는 생리활성물질을 탐색하는 것이 화장품 산업에서 매우 중요한 부분이다(Cabanes 등, 1994). 청귤 착즙액 및 착즙박, 청귤의 tyrosinase 저해 활성 측정 결과는 Table 4에 나타내었다. 양성대조군인 kojic acid는 0.5 mg/mL의 농도에서 56.16%의 저해율을 나타내었고 청귤 착즙액(59.15%), 착즙박(60.92%), 청귤(65.58%)은 이보다 높은 활성을 보였으며, 이 중에서도 청귤이 유의적으로 높은 활성을 나타내었다.

Oh 등(2012)은 제주 재래종 감귤 유과를 94% 에탄올 추출물을 동결건조 한 후 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과, 2 mg/mL 농도에서 6.9~23.6%로 나타났다고 보고하였다. 따라서 앞서 언급한 바와 같이 감귤류 시료를 추출하는 경우 용매 추출물을 건조하는 것보다 원 시료를 동결건조 및 분말화한 후 용매 추출을 하는 것이 항산화 물질의 수율을 높이는 것으로 사료된다.

본 연구와 시료 처리법이 비슷한 연구에 따르면, Kim 등(2014)이 습식분쇄한 당유자 미숙과를 동결건조 한 후 건조물의 70% 에탄올 추출물에서 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 0.1% 농도에서 약 23.97%의 저해능을 나타냈다고 보고했으며, Song(2014)은 이와 시료 처리 순서를 바꾸어 습식분쇄한 당유자 미숙과를 건조한 후 추출물을 동결건조한 다음 tyrosinase 저해 활성 측정 시 0.1% 농도에서 22.97%로 나타나 추출물의 건조물보다 건조 후 추출하는 경우 활성이 좀 더 높게 나타났다.

Table 4. Inhibition activity on tyrosinase and elastase of premature mandarin (%)

	Tyrosinase inhibition activity	Elastase inhibition activity
PMJ ¹⁾	59.15±0.64 ^{c23)}	72.79±0.57 ^b
PMP	60.92±1.34 ^b	60.24±1.71 ^b
PMF	65.58±1.13 ^a	66.16±1.38 ^a

¹⁾PMJ, premature mandarin juice; PMP, premature mandarin peel; PMF, premature mandarin fruit.

²⁾Mean±SD (n=3).

³⁾Different letters within a same column differ significantly ($P < 0.05$).

Elastase 저해 활성

청귤 착즙액 및 착즙박, 청귤의 elastase 저해 활성을 측정한 결과는 Table 4에 나타내었다. 양성대조군인 ascorbic acid는 0.1 mg/mL의 농도에서 88.51%로 매우 높은 저해율을 보였고, 모든 시료의 측정 결과는 이보다 낮았으나 청귤 착즙액의 경우 72.79%로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 청귤 착즙박(60.24%), 청귤(66.16%)의 저해 활성 또한 60% 이상의 저해 활성을 나타냈으며, 이는 1 mg/mL 농도의 석류 과피 메탄올 추출물(Roh, 2005)에 비해 높아 청귤 착즙액 및 착즙박, 청귤은 우수한 주름 개선 효과가 있는 것으로 생각된다. Jeong 등(2011)은 사과 과육 및 과피를 용매 분획한 후 총 페놀 함량이 높은 ethyl acetate(EtOAc) 분획물에 대한 항산화 및 elastase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 항산화 활성은 과육보다 과피에서 더 높게 나타났으며, elastase 저해 활성은 과육에서는 나타나지 않았고 과피에서는 농도 의존적으로 증가하였으며 0.5 mg/mL의 농도에서 46.40%의 높은 저해율을 나타냈다고 보고하였다. 이는 본 연구의 항산화 활성 평가 결과, 과피를 포함하고 있는 청귤, 청귤 착즙박이 착즙액보다 더 높게 나타난 것과는 유사하였으나 elastase 저해 활성 측정 결과에서 항산화 활성이 비교적 낮은 착즙액이 가장 높게 나타난 것과는 다른 경향이었다. 따라서 용매 분획 등의 과정을 통해 청귤의 페놀성 물질을 규명한 후 이들이 elastase 저해 활성에 미치는 영향에 대한 연구가 좀 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 청귤을 착즙한 후 생성되는 착즙액, 착즙박, 착즙하지 않은 원물의 형태로 처리한 후 이들의 항산화 및 항균 활성을 비교 분석하였다. 총 폴리페놀 측정 결과 청귤(12.70 GAE mg/g), 청귤 착즙액(12.39 GAE mg/g), 청귤 착즙박(12.36 GAE mg/g)의 순서로 나타났다. DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거 활성 측정 결과, 청귤, 착즙액, 착즙박의 순서로 나타났으며, 모든 시료에서 유의적인 차이가 존재하였다. FRAP 측정 결과 1 mg/mL 농도에서 청귤 착즙액의 FRAP value(0.66 mM/g)가 가장 높았고 나머지 시료에서는 유의적 차이가 존재하지 않았다. 항균 활성을

측정한 결과 5 mg/disc의 농도에서 청귤 착즙액이 *B. subtilis*를 제외한 모든 균주에 대해 항균력을 나타내었고, 10 mg/disc 농도에서 모든 시료는 활성을 나타내었으며 청귤 착즙액이 *B. cereus*에 대해 16 mm, *P. aeruginosa*에 대해 15 mm로 가장 큰 항균 활성을 나타내었다. Tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 청귤 착즙액, 착즙박, 청귤은 각각 59.15%, 60.92%, 65.58%로 나타났다. Elastase 저해 활성을 측정한 결과 청귤 착즙액, 착즙박, 청귤은 각각 72.79%, 60.24%, 66.16%로 주름 개선 효과를 나타내었다. 이상의 연구 결과 청귤 착즙액 및 착즙박, 청귤은 우수한 항산화 활성을 가지고 있으며, tyrosinase 및 elastase 저해 효과가 우수하여 건강기능식품, 화장품 관련 산업적 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Barreca D, Bellocchio E, Caristi C, Leuzzi U, Gattuso G. Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) juice: Flavonoid distribution and antioxidant properties. *Food Res Int.* 2011. 44:2190-2197.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966. 45:493-496.
- 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.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958. 181:1199-1200.
- Bogin E, Abrams M. The effect of garlic extract on the activity of some enzymes. *Food Cosmet Toxicol.* 1976. 14:417-419.
- Branel AL. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc.* 1975. 52:59-63.
- Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol.* 1994. 46:982-985.
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J, et al. Antimicrobial activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to the parts harvested and time. *Korean J Med Crop Sci.* 2009. 17:335-340.
- 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.
- Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res.* 2004. 24:851-874.
- Fellegri N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol.* 1999. 299:379-389.
- Flurkey WH. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J Food Sci.* 1991. 56:93-95.
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem.* 1912. 12:239-243.
- Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid composition of *Citrus* juices. *Molecules.* 2007. 12: 1641-1673.
- Herrmann K, Nagel CW. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1989. 28:315-347.
- Huang YS, Ho SC. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chem.* 2010. 119:868-873.
- Jeong HR, Jo YN, Jeong JH, Jin DE, Song BG, Heo HJ. Whitening and anti-wrinkle effects of apple extracts. *Korean J Food Preserv.* 2011. 18:597-603.
- Jeong MR, Cha JD, Lee YE. Antibacterial activity of Korean Fig (*Ficus carica* L.) against food poisoning bacteria. *Korean J Food Cook Sci.* 2005. 21:84-93.
- Jeoung SH, Gim SB, Choi HJ, Kim DH. Study of anti-microbe activity of essential oil (Unshiu oil) purified from *Citrus unshiu* S. Marcov. *Journal of Haehwa Medicine.* 2012. 20:67-78.
- Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal.* 2005. 7:395-403.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 1999. 47: 3954-3962.
- Kang YJ, Yang MH, Ko WJ, Park SR, Lee BG. Studies on the major components and antioxidative properties of whole fruit powder and juice prepared from premature mandarin orange. *Korean J Food Sci Technol.* 2005. 37:783-788.
- Kim HJ, Jin C, Lee YS. Antioxidative activities of phenolic compounds isolated from *Inonotus obliquus*. *Korean J Pharmacogn.* 2007. 38:164-169.
- Kim K, Cha H, Song HK, Lee YN, Ahn KJ, An IS, et al. Inhibitory effects of freeze dried unripe dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extracts on melanogenesis. *Kor J Aesthet Cosmetol.* 2014. 12:403-408.
- Kim KH, Kim HJ, Byun MW, Yook HS. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from six vegetables containing different sulfur compounds. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012. 41:577-583.
- Kim YD, Kim YJ, Oh SW, Kang YJ, Lee YC. Antimicrobial activities of solvent extracts from *Citrus sudachi* juice and peel. *Korean J Food Sci Technol.* 1999. 31:1613-1618.
- 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.* 2009. 38:462-469.
- Kim YD. Study on the composition of flavonoids and biological activities from Jeju citrus fruits. Dissertation. Jeju National University, Jeju, Korea. 2009.
- Kim YS, Shin DH. Researches on the volatile antimicrobial compounds from edible plants and their food application. *Korean J Food Sci Technol.* 2003. 35:159-165.
- Kraunsoe JAE, Claridge TDW, Lowe G. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by hemologues of bovine pancreatic tyrosin inhibitor. *Biochemistry.* 1996. 35: 9090-9096.
- Kwon GJ, Choi DS, Wang MH. Biological activities of hot water extracts from *Euonymus alatus* leaf. *Korean J Food Sci Technol.* 2007. 39:569-574.
- Lam LKT, Zhang J, Hasegawa S. Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. *Food Technol.* 1994. 48: 104-108.
- Lee HJ, Son CY, Lim JW, Yoon JS, Noh JS, Jung GS. Comparison of antioxidant activity of grapefruit pulp and pericarp

- extracts. Proceedings of the Korean Environmental Sciences Society Conference. 2017 Nov 2-4. Gyeongju, Korea. p 205.
- Lee JH, An HJ, Lee SY, Choi YH, Lim BS, Kang YJ. Changes in quality characteristics of 'Setoka' (*Citrus spp.*) using different storage methods. *Korean J Food Preserv.* 2009. 16:644-649.
- Li S, Pan MH, Lo CY, Tan D, Wang Y, Shahidi F, et al. Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. *J Funct Foods.* 2009. 1:2-12.
- Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol Pharm Bull.* 1995. 18: 162-166.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001. 74:418-425.
- Oh DM, Park YJ, Huh BG. Physiological activity of extract from self-sown young citrus fruits in Jeju Island. *J Korean Soc People Plants Environ.* 2012. 15: 413-419.
- Park GH, Lee SH, Kim HY, Jeong HS, Kim E, Yun YW, et al. Comparison in antioxidant effects of four citrus fruits. *J Food Hyg Saf.* 2011. 26:355-360.
- Park JW, Lee YJ, Yoon S. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities determined by different assays. *Korean J Food Cult.* 2007. 22:353-358.
- Roh BK. Anti-oxidant and anti-aging activities of *Punica granatum* extracts. Master's thesis. Chung-Ang University, Seoul, Korea. 2005.
- Seo SS, Youn KS, Shin SR, Kim SD. Optimal condition for manufacturing water extract from mandarin orange peel for colored rice by coating. *Korean J Food Sci Technol.* 2003. 35:884-892.
- Shin SR, Lee CH. Antioxidant effects of the methanol extracts obtained from aerial part and rhizomes of ferns native to Korea. *Korean J Plant Res.* 2010. 23:38-46.
- Song EY, Choi YH, Kang KH, Koh JS. Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of Cheju citrus fruits according to harvest date. *Korean J Food Sci Technol.* 1998. 30:306-312.
- Song HK. Inhibitory effect of unripe Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extracts on melanogenesis. Master's thesis. Konkuk University, Seoul, Korea. 2014.
- Song JH, Jang JH, Park SH, Jung HW, La CS, Kim WK, et al. Composition for increasing muscular strength and muscle mass comprising bean juice-peptides derived from germinated bean treated with green mandarin water. Korean Patent 10201 80036167. 2016.
- Song YW, Moon KS, Cho SK. Antioxidant activity and nutrient content of ethanol and hot-water extracts of *Citrus unshiu* pomace. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2013. 42:1345-1350.
- Stella SP, Ferrarezi AC, dos Santos KO, Monteiro M. Antioxidant activity of commercial ready-to-drink orange juice and nectar. *J Food Sci.* 2011. 76:C392-C397.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007. 39:44-84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact.* 2006. 160:1-40.
- Williams GM, Wang CX, Iatropoulos MJ. Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies. *Food Chem Toxicol.* 1990. 28:799-806.
- Yi MR, Hwang JH, Oh YS, Oh HJ, Lim SB. Quality characteristics and antioxidant activity of immature *Citrus unshiu* vinegar. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2014. 43:250-257.
- Yusof S, Ghazali HM, King GS. Naringin content in local citrus fruits. *Food Chem.* 1990. 37:113-121.