

碩士學位論文

陳皮的 효모 발효에 관한 연구

지도교수 임사비나

지도교수 김 남 재

慶熙大學校 大學院

韓方應用醫學科

尹 喆 相

2007년 2월

碩士學位論文

陳皮의 효모 발효에 관한 연구

지도교수 임사비나

지도교수 김 남 재

慶熙大學校 大學院

韓方應用醫學科

尹 喆 相

2007년 2월

陳皮의 효모 발효에 관한 연구

지도교수 임사비나

지도교수 김 남 재

이 論文을 韓醫學 碩士學位 論文으로 提出함

慶熙大學校 大學院

韓方應用醫學科 新藥開發專攻

尹 喆 相

2007年 2月

尹喆相의 韓醫學 碩士學位 論文을 認准함

主審敎授 이 제 현 (印)

副審敎授 임사비나 (印)

副審敎授 김 남 재 (印)

慶熙大學校 大學院

2007年 2月

<目 次>

I. 緒 論	1
II. 實 驗	3
1. 약재	3
2. 발효균주	3
3. 시약	3
4. 실험기기	5
5. 발효물의 조제	6
5.1. 陳皮 액체발효	6
5.2. 非열처리 陳皮 고체발효	6
5.3. 열처리 陳皮 고체발효	6
5.4. 지표성분 발효	6
6. 분석용 검액의 조제	7
6.1. 액체발효물의 검액 조제	7
6.2. 고체발효물의 검액 조제	7
6.3. 지표성분발효물의 검액 조제	7
7. HPLC 분석 조건	8
8. 통계처리	8
III. 成 績	9
1. HPLC 분석	9
2. 陳皮 액체발효의 변화	11
2.1. 陳皮 액체발효물의 pH	11
2.2. 陳皮 액체발효물의 비중	13
2.3. 陳皮 액체발효물의 지표성분 분석	15
3. 陳皮 고체발효물의 지표성분 분석	18
3.1. 非열처리 陳皮 고체발효물의 지표성분 분석	18
3.2. 열처리 陳皮 고체발효물의 지표성분 분석	21

4. 지표성분의 발효 변화	24
IV. 考 察	26
V. 結 論	30
VI. 參考文獻	31
ABSTRACT	36

<List of Table>

Table I. pH of <i>Citrus unshiu</i> peel by Liquid Fermentation	12
Table II. Specific Gravity of <i>Citrus unshiu</i> peel by Liquid Fermentation	14
Table. III. Contents of Hesperidin of <i>Citrus unshiu</i> peel by Liquid Fermentation	16
Table. IV. Contents of Hesperidin of Non-heated <i>Citrus unshiu</i> peel by Solid Fermentation	19
Table. V. Contents of Hesperidin of Heated <i>Citrus unshiu</i> peel by Solid Fermentation	22
Table. VI. Standard Concentrations by the Fermentation	25

<List of Figure>

Fig. 1. Chemical structures of Citrus flavonoids	4
Fig. 2. HPLC chromatogram of naringin, hesperidin, neohesperidin, narigenin and hesperetin(1: naringin, 2: hesperidin, 3: neohesperidin, 4: narigenin, 5: hesperetin)	10
Fig. 3. pH of <i>Citrus unshiu</i> peel by liquid fermentation	12
Fig. 4. Specific Gravity of <i>Citrus unshiu</i> peel by liquid fermentation	14
Fig. 5. Contents of hesperidin of <i>Citrus unshiu</i> peel by liquid fermentation	16
Fig. 6. HPLC chromatogram of <i>Citrus unshiu</i> peel by liquid fermentation(A : 0 day, B : 1 day, C : 2 day, D : 3 day, E : 5 day, F : 7 Day)	17
Fig. 7. Contents of hesperidin of non-heated <i>Citrus unshiu</i> peel by solid fermentation	19
Fig. 8. HPLC chromatogram of non-heated <i>Citrus unshiu</i> peel by solid fermentation(A : 0 day, B : 2 day, C : 4 day, D : 6 day, E : 10 day, F : 14 Day)	20
Fig. 9. Contents of hesperidin of heated <i>Citrus unshiu</i> peel by solid fermentation	22
Fig. 10. HPLC chromatogram of heated <i>Citrus unshiu</i> peel by solid fermentation(A : 0 day, B : 2 day, C : 4 day, D : 6 day, E : 10 day, F : 14 Day)	23
Fig. 11. Standard concentrations by the fermentation	25

I. 緒 論

최근 한의학 시장변화와 한의학 발전에 대한 시대 요구로 한의계 뿐만 아니라 다른 많은 분야에서 한약의 약리 기전에 대한 연구를 수행하고 있으며, 그 연구 성과로 한약을 응용한 신약 개발은 단일 한약재나 복합 한약재 중에서 특수한 약리 작용을 나타내는 약리 성분을 추출하는 방법을 택하거나 혹은 기존 전탕 방식의 한약이 아닌 새로운 방식의 한약 제형 변화에 대한 많은 노력이 이루어지고 있다.

한약 제형 변화의 성공적인 시도는 전통의 爐法의 방식을 계승하여 기존의 탕전액을 증류 추출 방식을 도입하여 증류방식의 탕약을 개발한 것이었다. 증류방식의 탕약은 약의 농도가 낮아서 맛이 강하지 않아 아이들이 먹기 편해 소아전문 한의원들을 중심으로 많이 사용되고 있지만, 동일 처방의 일반 전탕액과 증류방식 탕약 간의 약효 성분이나 약리 작용 등의 연구는 아직 충분하지 않아서 증류탕약이 널리 쓰이는 것에 비해 앞으로도 더 많은 연구 자료를 확보하는 일이 필요한 실정이다.

발효(fermentation)는 동·서양을 막론하고 오랫동안 우리의 식생활과 밀접한 관계를 가져온 가공 형태로서 산미료 이외에도 식품 보존 효과와 의약용으로 이용되어 왔다. 최근에는 소화액의 분비촉진, 피로회복, 당뇨병과 비만, 노화방지와 혈중 알코올 농도 상승 지연, 항종양 효과 등 그 기능성이 주목을 받고 있어 독특한 풍미를 갖는 발효 식품은 식생활의 다양화로 그 수요는 날로 증가 추세에 있다¹⁾.

한의학계에서 전통적으로 이용하고 있는 발효 한약재로는 冬蟲夏草, 神麴, 淡豆豉, 紅麴 등이 있었는데, 최근에는 발효인삼²⁾ 등과 같이 한약재를 발효 방법을 이용하여 원래 한약이 가지고 있는 약리 작용에 부가하여 발효산물의 첨가를 통하여 일차적으로 소화작용을 촉진시키는 것뿐만 아니라 발효를 통하여 기존의 약리 작용을 높이는 기능성을 부여하려는 연구가 많이 행해지고 있다.³⁾

陳皮는 귤 *Citrus unshiu* Markovich 또는 기타 동속 근연식물(운향과 Rutaceae)의 성숙한 과피⁴⁾로서 다른 한약재와 달리 우리나라 제주도의 감귤 재배⁵⁾와 관련되기 때문에 농화학⁶⁾, 원예학, 식품영양학⁷⁾, 식품공학⁸⁾ 등 여러 분야에서 많은 활발한 연구가 이루어지고 있다.

陳皮는 「神農本草經」의 上品에 橘柚라는 항목으로 味辛 溫 無毒, 主胸中痰熱 逆氣 利水穀, 久服去臭, 下氣, 通神한다고 되어 있으며, 「名醫別錄」에는 下氣, 止嘔咳, 除膀胱留熱, 停水 五淋, 利小便, 主脾不能消穀, 氣衝胸中, 吐逆霍亂, 止洩, 去寸白한다^{9),10)}고 수록된 이래로 理氣調中, 燥濕化痰, 健脾化中の 효능으로 胸腹脹滿, 不思飲食, 嘔吐, 咳嗽痰多 등을 치료하는 작용이 있다¹¹⁾⁻¹⁴⁾고 기재되어 있다.

또한 陳皮에 대한 약리작용으로 동맥경화 예방^{15),16)}, 기관지 수축 작용을 통한 平喘

效果, 항알레르기 효과, 항위궤양작용, 면역증강효과¹⁷⁾, 利膽作用, 祛痰作用, 위장평활근 이완작용 등이 보고되어 있다¹⁸⁾.

陳皮에는 정유 1.5~2%가 함유되어 있으며, 주성분은 limonene, isopropenyl toluene, 8-elemene, d-copaene, α-humulene, vitamin B·C와 flavonoid 배당체인 hesperidin과 naringin 등¹⁹⁾으로 건조된 陳皮는 정량에서 hesperin을 4.0% 이상 함유하여야 한다⁴⁾고 대한약전에 규정되어 있다.

陳皮의 지표성분인 hesperidin은 lipase의 활성을 증가시키고, 위궤양치료효과²⁰⁾, 혈압저하효과, 항바이러스작용, 항염증작용, 항알레르기작용, 항산화작용, 혈소판 응집억제효과, 항암작용²¹⁾⁻²⁵⁾ 등이 보고되었으며, naringin은 항균작용, 항산화작용, 지질과산화예방 및, antimutagenic 작용 등의 효능이 보고되어 있다^{20),26)-29)}.

Hesperidin과 naringin은 당과 결합한 형태로서 생리학적 활성이 매우 약하지만, 섭취 후 장내 미생물에 의해서 당이 제거되어 활성이 더 강한 hesperetin과 narigenin으로 전환된다고 알려져 있으며, 또한, 항균성에서도 일반적으로 플라노보이드의 비당체인 hesperetin과 narigenin이 배당체인 hesperidin과 naringin보다 더 우수한 것으로 나타나고 있다³⁰⁾.

본 연구에서는 한방 처방에서 理氣調中, 燥濕化痰 등의 작용으로 사용되고 있는 陳皮를 식품미생물로 흔히 사용되는 효모를 이용한 알콜발효 단계를 통해 陳皮 액체발효물과 陳皮 고체발효물을 제조하여 발효산물의 생리활성 효과를 파악하기 위하여 陳皮의 지표성분인 배당체 hesperidin이 비당체인 hesperetin으로 전환되는 여부를 조사하고 효모 발효 방법에 의한 발효한약의 가능성을 알아보고자 했다.

II. 實 驗

1. 약재

본 실험에서 사용된 陳皮는 2005년 제주도 서귀포시 동홍동 774-1번지에서 재배하여 무농약 재배 감귤로 인증번호 제 18-04-3-162호로 인증받은 제주산 온주밀감(*Citrus unshiu* Markovich)을 제주시 북제주군 애월읍 봉성리 850 참조아자연영농조합(T.064-773-1869)에서 과피만을 벗겨내어 건조시킨 과피를 검사한 陳皮로(주)옴니허브(동우당제약)에서 공급받아 사용하였다.(제조번호 D0601195, 검사일 06. 01. 03.)

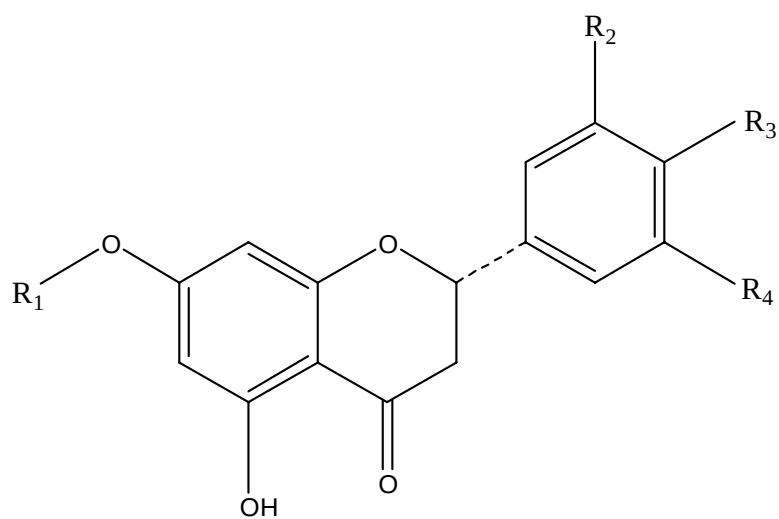
2. 발효균주

본 실험에 사용된 효모는 특허 받은 효모균주인 효모 *Saccharomyces exiguus* SJP6728AF1(등록특허 10-0536456)를 특허권자인 박세준으로부터 배양 받아 사용하였다.

3. 시약

陳皮에 함유된 flavonoid glycoside류의 정량에 사용한 표준품으로 hesperidin (hesperetin-7-rutinoside), neohesperidin, hesperetin (3,5,7-trihydroxy-4-methoxyflavone), naringin(narigenin-7-rhamnoglucoside), narigenin (4,5,7-trihydroxyflavone)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

HPLC용 Methanol(99.8, reagent, Merck Co., Darmstadt, Germany)을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 이상의 제품을 사용하였다.



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Hesperidin	Gle ⁶ -Rha	OH	OCH ₃	H
Neohesperidin	Gle ² -Rha	OH	OCH ₃	H
Hesperetin	H	H	OCH ₃	OH
Naringin	Gle ² -Rha	H	OH	H
Narigenin	H	H	OH	H

Fig. 1. Chemical structures of Citrus flavonoids

4. 실험기기

HPLC분석에 사용한 기기는 DIONEX SUMMIT HPLC system(Germany)으로 Pump는 P680 HPLC pump, 주입기는 ASI-100 automated sample injector, 검출기는 UVD 340 U UV/VIS- detector, CHROMELEON chromatography data system(version 6.40)으로 구성되어 있다.

원심분리기는 Refrigerated Micro centrifuge(Hanil)을 사용하였으며, 저울은 AX Analytical Balance을 사용하였고, pH 측정은 pH meter(710A, Orion, USA)로 측정하였다.

5. 발효물의 조제

5.1. 陳皮 액체발효

陳皮 600 g에 물 6 L를 넣고 1기압 상태에서 2시간 압력 추출하여 만든 陳皮전탕액 6 L에 일체의 첨가물 없이 분양 받은 효모배양액 10 ml를 접종한 후 온도 35~40℃, 습도 80~90 % 조건에서 7일간 혐기성 발효하였다. 시료 채취를 위해 매 1일 간격으로 발효액 200 ml씩 취하여 냉동 보관하였다.

5. 2. 非열처리 陳皮 고체발효

건조된 진피 1.8 kg을 밀폐된 용기에 충분한 물을 뿌려 완전히 수분을 함유한 상태로 만든 후 여기에 효모배양액 100 ml를 접종하고 온도 35~40℃, 습도 80~90 % 조건에서 14일간 혐기성 발효하여 시료 채취를 위해 매 2일마다 간격으로 100 g씩 취하여 냉동 보관하였다.

5. 3. 열처리 陳皮 고체발효

건조된 진피 1.8 kg을 찜기에 1시간 동안 찌는 전처리 과정을 거친 후에 非열처리 진피 고체발효와 같은 방법으로 발효하였다.

5. 4. 지표성분 발효

지표성분(hesperidin, neohesperidin, naringin, narigenin) 일정량을 volumetric flask에 넣어 5 ml의 methanol에 녹인 후 500 μ l 씩 micro tube에 분주하여 건조시킨 후, 이 건조물을 멸균 증류수 500 μ l를 넣어 녹인 다음, 다시 녹인 액에 *Saccharomyces exiguus* 균주 500 μ l를 넣어 지표성분 발효액을 준비하였다. 준비된 발효액은 30℃에서 발효(OF-12, Jeio Tech Co., Ltd., Korea)시키면서 1일, 3일, 5일, 7일에 각각 취하여 분석용 시료로 사용하였다(n=3). 발효가 끝난 시료를 100℃로 끓고 있는 물에서 15분간 중탕하여 멸균한 후 분석할 때까지 냉동보관하였다.

6. 분석용 검액의 조제

6.1. 액체발효물의 검액 조제

냉동된 발효액을 상온에서 1시간 동안 물에 녹여 해동시킨 후 해동된 시료를 비커에 옮겨서 수욕 내에서 100℃로 30분간 가열하여 멸균하였다. 멸균된 발효액으로 각각 pH와 비중을 측정하였다.

멸균된 발효액을 50 ml falcon tube에 분주한 다음 각 falcon tube를 vortexing한 후, 1 ml씩 분주한 다음 5분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후, syringe filter(pore size=0.45 μm)로 여과하여 이것을 HPLC 측정용 검액으로 하였다.

6.2. 고체발효물의 검액 조제

냉동된 샘플을 70℃로 예열된 건조기에서 24시간 동안 건조시킨 후, 건조된 샘플을 분쇄하였다. 샘플 가루 1 g에 100 % MeOH 250 ml를 넣어 1.5 시간 동안 추출한 다음 12,500 rpm, 20℃에서 5분간 원심분리하여 상정액을 분리한 다음, syringe filter(pore size=0.45 μm)로 여과하여 이것을 HPLC 측정용 검액으로 하였다.

6.3. 지표성분발효물의 검액 조제

냉동된 시료를 상온에서 해동한 후, 해동된 시료를 vortexing한 뒤 각 500 μl 를 micro tube에 분주하고 여기에 methanol 500 μl 를 넣어 섞어준 다음, 12,500 rpm, 20℃에서 5분간 원심분리하여 상정액을 분리한 후, syringe filter(pore size=0.45 μm)로 여과 후 이것을 HPLC 분석용 검액으로 하였다.

7. HPLC 분석 조건

HPLC분석에 사용한 column은 Luna 5 μ C₁₈ (Phenomenex co., USA)이었으며, 이동상은 38% methanol로 하여 1.0 ml/min의 유속으로 흘려주었다. Inject volume은 10 μ l, column temperature는 40°C, UV Wavelength는 204 nm로 하였다.

8. 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 평균 $\pm$ 표준오차 (mean $\pm$ S.E.)로 기록하였고 실험군 간의 유의성 검정은 Bonferroni mutiple comparison method를 사용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우에 유의성으로 인정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. HPLC 분석

실험에 이용한 HPLC 분석 조건으로 표준품 naringin, hesperidin, neohesperidin, narigenin, hesperetin의 retention time은 각각 9.8 min, 11.0 min, 12.2 min, 31.8 min, 41.4 min 에서 검출되었다.(Fig. 2)

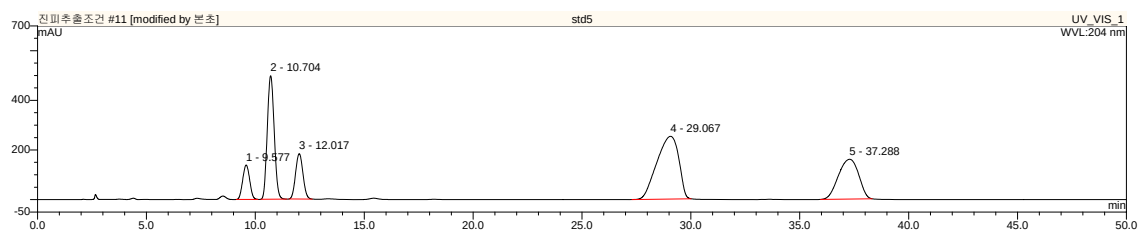


Fig. 2. HPLC chromatogram of naringin, hesperidin, neohesperidin, narigenin and hesperetin(1: naringin, 2: hesperidin, 3: neohesperidin, 4: narigenin, 5: hesperetin)

2. 陳皮 액체발효의 변화

2.1. 陳皮 액체발효물의 pH

陳皮전탕액을 7일 간 발효한 후 pH는 발효 전 4.65로 측정되었던 것이 발효 7일 후 3.01로 낮아졌으며, 처음 1일 사이에 4.65에서 3.54로 급격하게 낮아졌고 2일 이후에는 완만하게 낮아짐을 알 수 있었다.(Table I, Fig. 3).

Table I . pH of *Citrus unshiu* peel by Liquid Fermentation

Time course of fermentation(day)								
	0	1	2	3	4	5	6	7
pH	4.65	3.54	3.48	3.40	3.30	3.28	3.11	3.01

Fig. 3. pH of *Citrus unshiu* peel by liquid fermentation

2.2. 陳皮 액체발효물의 비중

陳皮전탕액을 7일 간 발효한 후 비중변화는 일관성을 보이지 않지만 발효시작 직후 낮아졌다가 다시 리바운드된 다음 조금 낮아졌는데 발효 전 1.018에서 7일 후 1.014로 0.004 낮아졌지만 크게 유의성있게 측정되지 않았다(Table II, Fig. 4).

Table II. Specific Gravity of *Citrus unshiu* peel by Liquid Fermentation

	Time course of fermentation(day)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Specific gravity	1.018	1.016	1.016	1.018	1.016	1.016	1.016	1.014

Fig. 4. Specific gravity of *Citrus unshiu* peel by liquid fermentation

2.3. 陳皮 액체발효물의 지표성분 분석

陳皮 액체발효물을 HPLC를 이용하여 지표성분을 분석한 결과 hesperidin은 검출되었지만, neohesperidin, hesperetin, naringin, narigenin은 검출되지 않았다.

陳皮 액체발효물의 hesperidin 함량은 발효 전 5.4142 ± 0.0173 (mg/g)에서 처음 1일 동안 증가하여 7.5475 ± 0.0269 (mg/g)으로 최고량을 보인 후 발효 3일째까지 감소하여 발효 5일째까지 5.4513 ± 0.0190 (mg/g)으로 감소된 안정된 상태를 보이다가 다시 증가하기 시작하여 발효 시작 7일 후에는 6.8495 ± 0.0191 (mg/g)으로 발효 시작 전보다 유의하게 증가하였다($p < 0.001$)(Table III, Fig. 5).

Table III. Contents of Hesperidin of *Citrus unshiu* peel by Liquid Fermentation

Time course of fermentation(day)								
	0	1	2	3	4	5	6	7
hesperidin	5.4142	7.5475	7.1832	5.6768	6.0656	5.4513	6.8716	6.8495
(mg/g)	± 0.0173	± 0.0269	± 0.0189	± 0.0810	± 0.0129	± 0.0190	± 0.0164	± 0.0191

Fig. 5. Contents of hesperidin of *Citrus unshiu* peel by liquid fermentation

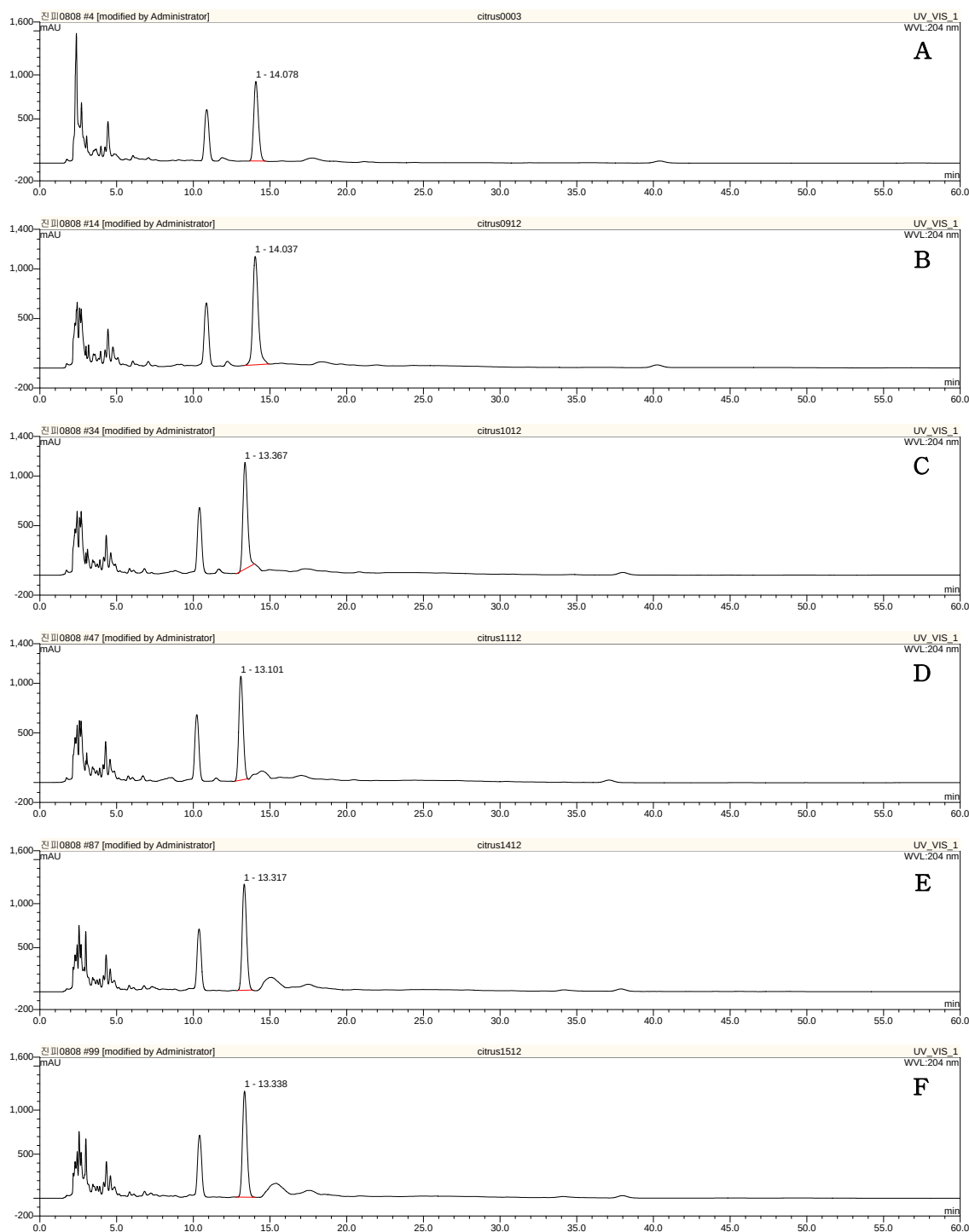


Fig. 6. HPLC chromatogram of *Citrus unshiu* peel by liquid fermentation (A: 0 day, B: 1 day, C: 2 day, D: 3 day, E: 5 day, F: 7 Day)

3. 陳皮 고체발효물의 지표성분 분석

3.1. 非열처리 陳皮 고체발효물의 지표성분 분석

非열처리 陳皮 고체발효물을 HPLC를 이용하여 지표성분을 분석한 결과 hesperidin은 검출되었지만 neohesperidin, hesperetin, naringin, narigenin은 검출되지 않았다.

非열처리 陳皮 고체발효물의 hesperidin 함량은 발효 전 64.4671 ± 0.1010 (mg/g)에서 크게 변화없다가 발효 6일째부터 감소하기 시작하여 발효 10일째 55.0873 ± 0.3993 (mg/g)으로 최소량을 보인 후($p < 0.001$) 다시 증가하여 발효 14일 후 68.0428 ± 0.3006 (mg/g)으로 증가했지만 발효 전후의 변화량은 통계적으로 유의하지 않았다(Table IV, Fig. 7)

Table IV. Contents of Hesperidin of Non-heated *Citrus unshiu* peel by Solid Fermentation

	Time course of fermentation(day)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
hesperidin	64.4671	68.4527	69.9983	70.9750	66.1073	55.0873	62.4533	68.0428
(mg/g)	±0.1010	±0.3545	±0.1757	±0.3866	±0.1466	±0.3993	±0.2545	±0.3006

Fig. 7. Contents of hesperidin of non-heated *Citrus unshiu* peel by solid fermentation

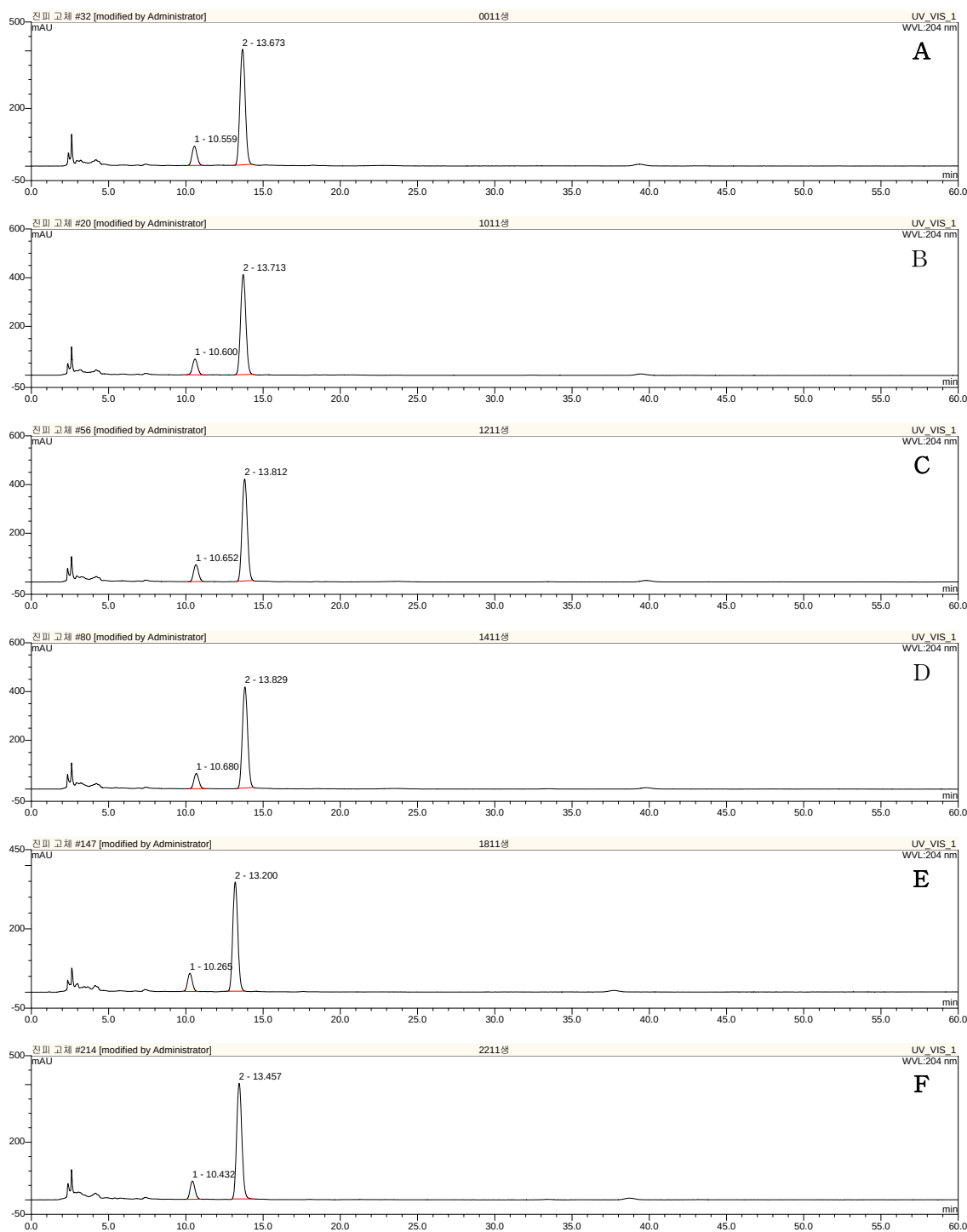


Fig. 8. HPLC chromatogram of non-heated *Citrus unshiu* peel by solid fermentation(A: 0 day, B: 2 day, C: 4 day, D: 6 day, E: 10 day, F: 14 Day)

3. 2. 열처리 陳皮 고체발효물의 지표성분 분석

열처리 陳皮 고체발효물의 HPLC 결과 hesperidin은 검출되었지만 neohesperidin, hesperetin, naringin, narigenin은 검출되지 않았다.

열처리 陳皮 고체발효물의 hesperidin 함량은 발효 전 67.6017 ± 0.3230 (mg/g)에서 발효 14일 후 59.8362 ± 0.6652 (mg/g)으로 통계적으로 유의있게 감소하였다 ($p < 0.05$)(Table V, Fig. 9).

Table V. Contents of Hesperidin of Heated *Citrus unshiu* peel by Solid Fermentation.

	Time course of fermentation(day)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
hesperidin	67.6017	67.5297	64.5568	67.4214	62.4719	61.9232	57.9563	59.8362
(mg/g)	±0.3230	±0.4241	±0.5441	±0.2324	±0.3915	±0.6268	±0.6937	±0.6652

Fig. 9. Contents of hesperidin of heated *Citrus unshiu* peel by solid fermentation

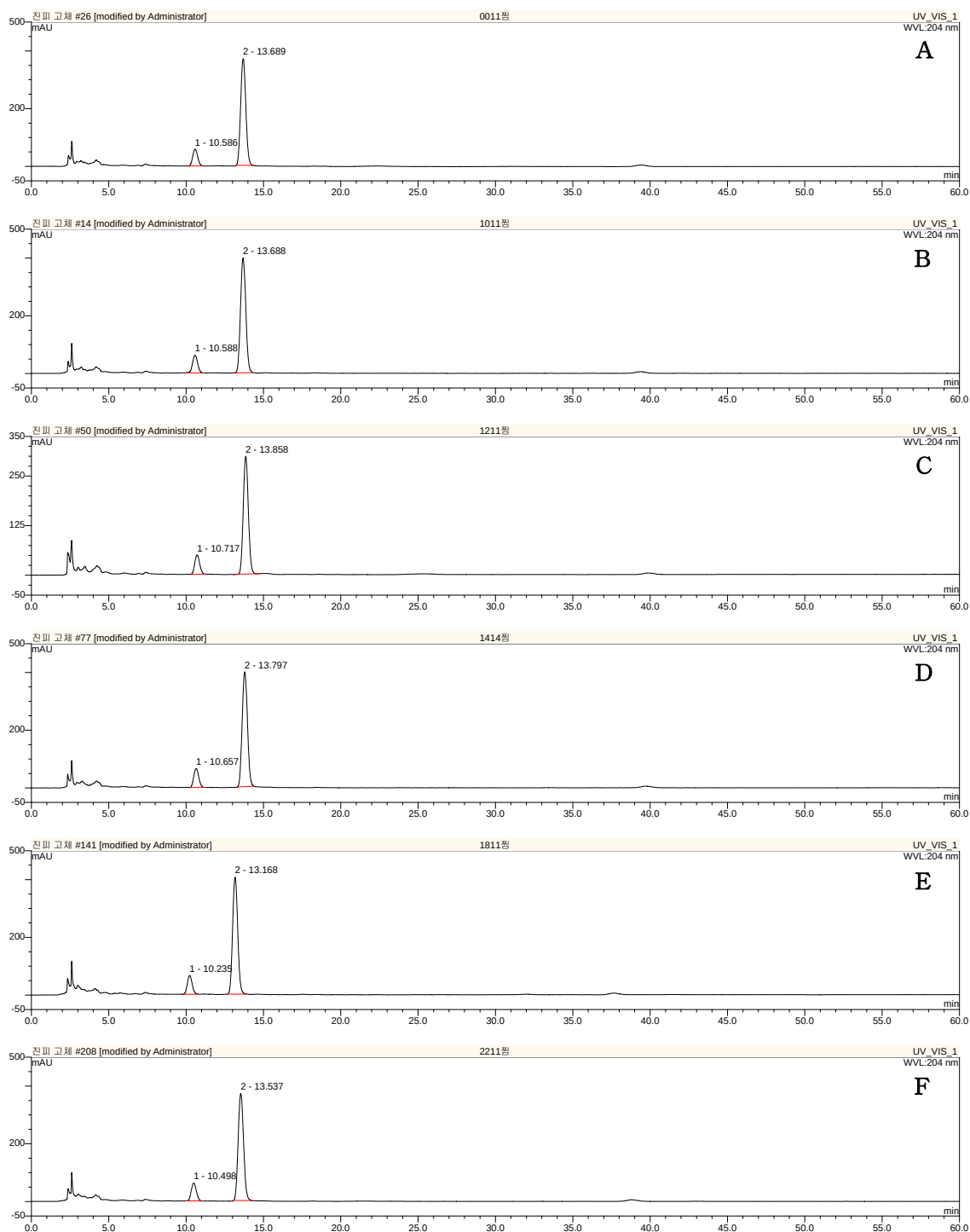


Fig. 10. HPLC chromatogram of heated *Citrus unshiu* peel by solid fermentation (A: 0 day, B: 2 day, C: 4 day, D: 6 day, E: 10 day, F: 14 Day)

4. 지표성분의 발효 변화

지표성분 hesperidin은 발효 전 0.0450 ± 0.0001 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 발효 3일째까지 조금 증가하였지만 발효 3일이 지나면서 감소하기 시작하여 7일 발효한 후에 0.0352 ± 0.0002 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 통계적으로 유의있게 감소하였다($p < 0.001$).

지표성분 neohesperidin은 발효 전 0.0609 ± 0.0001 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 7일 발효한 후에 0.0699 ± 0.0004 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 증가하였지만 통계적으로 유의성은 없었다.

지표성분 naringin은 발효 전 0.0464 ± 0.0003 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 7일 발효한 후에 0.0445 ± 0.0008 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 조금 감소하였지만 통계적으로 유의성이 없었다.

지표성분 narigenin은 발효 전 0.0338 ± 0.0015 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 발효 3일째까지 증가하여 최고량을 보이다가 이후 감소하기 시작하여 7일 발효한 후에는 0.0428 ± 0.0007 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 증가하였지만 통계적으로 유의성은 없었다.(Table VII, Fig. 11)

Table VI. Standard Concentrations by Fermentation

Sample ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Time course of fermentation(day)				
	0	1	3	5	7
Hesperidin	0.0450 ± 0.0001	0.0485 ± 0.0000	0.0488 ± 0.0002	0.0389 ± 0.0015	0.0352 ± 0.0002
Neohesperidin	0.0609 ± 0.0001	0.0553 ± 0.0002	0.0643 ± 0.0014	0.0637 ± 0.0012	0.0699 ± 0.0004
Naringin	0.0464 ± 0.0003	0.0477 ± 0.0002	0.0474 ± 0.0005	0.0446 ± 0.0003	0.0445 ± 0.0008
Narigenin	0.0338 ± 0.0015	0.0448 ± 0.0005	0.0481 ± 0.0016	0.0378 ± 0.0007	0.0428 ± 0.0007

Fig. 11. Standard concentrations by the fermentation

IV. 考 察

본 연구는 효모 *Saccharomyces exiguus* SJP6728AF1을 발효 균주로 하여 발효처리한 陳皮 액체발효물과 非열처리한 陳皮 고체발효물, 열처리한 陳皮 고체발효물의 물리화학적 변화를 분석하고자 수행하였다.

陳皮의 액체발효물, 非열처리 고체발효물, 열처리 고체발효물의 HPLC 분석 결과 hesperidin은 검출되어 정량화하여 비교실험에 사용하였지만, neohesperidin, hesperetin, naringin, narigenin은 검출되지 않아 성분 비교실험에 사용하지 못 했다. Hesperidin과 naringin은 陳皮의 주요성분으로서 과육보다는 과피에 많이 검출되는데³¹⁾ 이번 실험에서는 hesperidin만이 검출되고 naringin은 검출되지 않았다. 이는 분석에 사용한 陳皮 품종인 온주밀감 *Citrus unshiu* Markovich이 다른 품종에 비해 단 맛이 강하고 쓴 맛이 적어 상대적으로 naringin의 함량이 적고, 시기별로도 1~2월에 재배된 품종이 naringin의 함량이 적다³²⁾고 보고되었으며, 한약재로 가공하는 전처리 과정에서 유실되었을 가능성 등을 생각해 볼 수 있다.

정³³⁾은 온주밀감 *Citrus unshiu* Markovich의 과피의 정유 성분을 분석하여 1-ethyl-1-methy-cyclohexane(36.25%), butylated hydroxy toluene(8.09%), furfural(6.13%), N-butyl isobutyl phthalate(5.76%)의 순으로 검출되었다고 보고했다.

본 연구에서는 陳皮전탕액을 7일 간 액체발효한 후 pH는 발효 전 4.65로 측정되었던 것이 발효 1일 만에 3.54로 급격하게 낮아져 7일 발효 후 3.01로 낮아졌으며, 비중은 발효 전 1.018에서 7일 후 1.014로 0.004 낮아졌지만 유의성 있는 큰 변화는 없었다. 이는 陳皮에 함유된 당분의 함량이 적어 알코올 생성이 많이 일어나지 않은 것으로 판단할 수 있는데, 유 등의 연구⁷⁾에서 陳皮침출차의 pH는 진피의 함량이 많고, 온도가 높을수록, 가열시간이 길어질수록 감소한다고 보고하였는데, 이는, 陳皮에서 검출되는 유기산의 종류는 oxalic acid, citric acid, malic acid로 진피 함량이 많고 침출온도가 높고 가열 시간이 길어질수록 유기산의 침출이 많아져서 pH가 감소하는 것으로 판단하였다. 또한 같은 연구에서 陳皮 침출차의 당도는 0.9~1.0°Brix로 측정되었는데, 이는 비중의 변화로 측정된 알코올 함량이 [알코올 도수 (v/v%)=(초기비중-종료비중)X131+0.3]의 계산식³⁴⁾에 의해 약 0.8%로 측정되어 陳皮전탕액의 당도가 극히 낮음을 알 수 있었다.

陳皮전탕액 액체발효물의 hesperidin 함량은 발효 처음 1일 동안 증가하였다가 발효 3일째까지 감소하여 발효 5일째까지는 감소된 안정된 상태를 보이다가 다시 증가하기 시작하여 발효 시작 7일 후에는 유의하게 증가하였는데 이는 非열처리 陳皮

고체발효물의 hesperidin 함량이 발효 10일째까지 감소하다가 다시 증가하여 발효 14일 후에 조금 증가하는 양상을 보이고 있는 것과 유사한 발효 변화를 보여주었다. 이는 효모 *Saccharomyces exiguus* SJP6728AF1의 분해 작용과 극격히 낮아진 pH와 상관 관계가 없는 것으로 사료되나 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것이다.

열처리한 陳皮 고체발효물의 hesperidin 함량은 발효 전에 비해 발효 14일 후 통계적으로 유의있게 감소하여 陳皮를 발효시키는 효과적인 방법은 陳皮 고체를 열처리를 한 후 발효하는 것으로 추정해 볼 수 있다.

지표성분 hesperidin, neohesperidin, naringin, narigenin을 효모 *Saccharomyces exiguus* SJP6728AF1로 7일 발효시킨 결과, 본 실험에 사용한 효모 *Saccharomyces exiguus* SJP6728AF1은 hesperidin은 분해하는 능력이 있는 것으로 생각되지만, neohesperidin, naringin, narigenin은 대사시키는 능력을 갖지 못한 것으로 판단된다.

이는 발효미생물에 따라 배당체에 결합된 당의 종류나 결합 방식에 따른 선택적 대사능력에 기인할 것으로 생각된다. 이러한 예는 우리나라 약주에서 분리되어 약주를 만드는데 사용하는 효모 *Saccharomyces coreanus*가 당류 중에서 maltose와 lactose를 발효시키지 못 하고³⁵⁾, 이러한 선택적 당 분해 특성이 효모와 같은 발효미생물을 동정하는 특성이 된다³⁶⁾.

발효(fermentation)는 좁은 의미로는 효모, 곰팡이와 세균류 따위의 미생물에 의하여 유기화합물이 산화작용으로 인간에 유익한 알코올류, 유산류, 탄산가스 등을 생산하는 것을 말하지만 넓은 의미로는 미생물을 이용하여 그 자신의 효소 작용으로 유기물을 분해 또는 변화시켜 각기 특유한 최종산물을 만들어내는 모든 현상들을 말하며 이는 인체의 음식물 대사 과정 또한 넓은 의미의 발효과정으로 이해하게 한다.

고대에는 미생물의 존재를 알지 못한 채 자연발효법에 의해서 발효된 술, 치즈, 빵 등의 발효식품들을 오랫동안 이용하여 오다가 1676년 레벤후크에 의해 미생물이 처음 발견된 이후에 1800년대 중반에 파스퇴르가 발효는 효모의 생활 작용이며 부패는 잡균에 의해 일어난다는 것을 발견하여 발효현상을 밝혀낸 이후, 미생물을 이용한 산업은 20세기 후반 유전공학을 도입하여 눈부시게 발전하여 왔다. 최근에는 미생물을 이용한 산업이 전통적인 분야인 주류나 발효식품 분야뿐만 아니라 의약품 개발, 농업, 식품, 축산, 환경 분야에서 각종 고부가가치 생산물을 얻기 위하여 그 폭이 계속 넓어지고 있다.

최근에는 콩, 우유 등의 일반 식품뿐만 아니라, 인삼²⁾, 복분자, 구기자, 오가피, 계피, 산사³⁷⁾ 등과 같은 한약재를 발효하여 발효에 의하여 소화를 용이하게 하고 맛과 향을 개선할 뿐만 아니라 원래 한약이 가지고 있는 약리 작용을 높이기 위한 발효

방법에 대한 연구가 많이 행해지고 있다.

대부분의 flavonoid 화합물은 배당체의 형태로서 전체 flavonoid의 50~80%를 차지하며 배당체를 구성하는 당으로는 glucose, arabinose, galactose, rhamnose, xylose 등이 있으며, 대부분 활성물질과 α -1,4 나 β -1,4 결합을 하고 있다.

실제 감귤의 과피인 陳皮에는 이러한 배당체 형태의 naringin과 hesperidin 등의 배당체 형태로 대부분 존재하며³¹⁾, 이러한 배당체 형태의 naringin과 hesperidin은 비당체 화합물인 narigenin과 hesperetin에 비해 항산화, 소염, 항암 활성 등이 떨어지는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

최근의 연구결과들은 배당체는 소장에서 흡수될 수 없으며 gastrointestinal(GI) tract 전반에 걸쳐 흡수되기 전에 장관에 존재하는 미생물의 효소에 의해 가수분해되어 비당체로 전환되며, 당의 β 결합은 장관에서 미생물에 의해 접촉되지 않고서는 분해되지 않는다고 하였다. 陳皮의 주요 flavonoid인 배당체 형태의 naringin과 hesperidin이 체내에 섭취되는 경우, 소장이나 대장에 존재하는 미생물들이 분비하는 효소에 의해 분해되어 체내에 흡수되어야만 생리활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 생리활성은 배당체의 존재에 따라 좌우되며, 배당체의 종류, 결합 위치에 따라 소장에서의 흡수율이 좌우된다. 주로 배당체에 비해 비당체가 혈액내로의 흡수나 생리활성면에서 더 효과적이며³⁸⁾, 소장에 존재하는 β -glucosidase 활성에 의한 deglycosylation 과정이 flavonoid 배당체 흡수 및 대사 과정에 중요한 것으로 알려져 있다^{39),40)}. 인체에서는 glucocerebrosidase, lactase, phlorizin, hydrolase와 broad-specific enzyme 등의 세 가지 β -glucosidase가 동정되었으며, broad-specific enzyme은 간, 신장, 소장에 존재하며 흡수, 대사, 배출, 생리활성에 관여하는 것으로 알려졌다. 배당체 형태의 비활성 flavonoid를 분해할 수 있는 효소나 미생물이 존재하지 않으면 비당체로 분해되지 못하여 흡수율이 떨어져 대부분 체외로 배설된다. 또한 섭취되는 陳皮와 같은 식물체 세포벽은 분해하기 어려운 pectin, cellulose, hemicellulose, β -1,4-glucan 등과 같은 성분들로 구성되어 있으며, 대부분의 생리활성을 나타내는 물질들은 이들 내부에 존재한다. 이러한 배당체는 조리과정에서는 거의 변형이 되지 않지만 발효나 자가분해과정을 통해 유리된다³⁹⁾.

감귤은 농업생산품으로 한정된 계절에만 생산되기 때문에, 감귤의 생산량을 늘리거나 혹은 잉여생산량을 보존하고 품질이 떨어지는 감귤을 가공하는 방법들에 대한 산업적인 연구 노력이 꾸준히 있어 왔으며, 또한 감귤류의 과피인 陳皮가 한약재로 사용되어지는 것에 착안하여, 감귤을 가공할 때마다 폐기물로 버려지는 감귤의 과피를 산업적으로 이용할 수 있는 방법에 대한 연구가 꾸준히 이어지고 있다^{7),15),41)~44)}.

발효방법을 이용한 陳皮의 연구는 주로 식초나 주류와 같은 陳皮음료의 개발^{8),45),46)}

과 진피의 flavonoid인 hesperidin과 naringin의 함량, 생리기능 활성화에 대한 연구가 이루어지고 있다⁴⁷⁾.

안 등⁴³⁾은 당 분해효소 AMG 300L, Pectinex 100L, Viscozyme으로 단독 또는 혼합 처리하여 감귤을 발효처리한 연구에서 효소로 처리한 감귤에서 naringenin과 hesperidin의 함량이 증가하였는데 특히, Viscozyme으로 처리한 경우 가장 많이 검출된 것을 보고하였고, 문 등⁴⁷⁾은 감귤을 젖산균 *Lactovacillus plantarum* ATCC8014와 효모 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0203로 7일간 발효시킨 연구에서 감귤발효액에서 감귤추출액보다 각각 1.9배의 naringenin과 6.2배의 hesperetin이 검출된 것을 보고하였다.

상기 연구들과 달리 효모 *Saccharomyces exiguus* SJP6728AF1을 발효 균주로 하여 실험한 본 연구에서는 같은 陳皮전탕액을 7일간 발효한 후의 hesperidin과 naringin의 함량은 오히려 증가한 것으로 나타났다.

이는 효모 *Saccharomyces exiguus* SJP6728AF1의 특성⁴⁸⁾에 따른 상반된 결과인 것을 가정해보며 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이러한 결과는 한약재를 발효할 때 무조건 비당체가 증가하여 생리기능 활성화가 촉진되는 것이 아니라 단일 혹은 복합 발효균주의 선택에 따라 발효물의 활성이나 효과 기능 등에 있어서 많은 차이가 날 수 있다는 것을 제시하고 있다.

또한 본 연구에서는 같은 균주로 발효하더라도 陳皮의 액체발효, 非열처리한 陳皮의 고체발효, 열처리한 陳皮의 고체발효 중에서 陳皮를 열처리한 후 고체발효한 것이 陳皮를 발효하는 효과적인 방법을 제시하고 있어, 같은 균주를 사용하더라도 발효방법에 따라 발효물의 효능이 차이가 있음을 제시하고 있다.

식품미생물에 의한 발효는 한약의 기능성을 한층 증진시키는 개발방법 중의 하나로서 그 가능성이 높을 것으로 기대되며, 앞으로 발효한약을 개발하기 위하여 발효균주의 선택, 발효조건, 발효 방법 등에 대한 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

陳皮전탕액과 고체 陳皮를 효모 *Saccharomyces exiguus* SJP6728AF1로 발효한 후의 발효산물의 변화를 알아보기 위해 분석 실험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 陳皮전탕액을 7일 간 발효한 후 pH는 발효 전 4.65로 측정되었던 것이 발효 7일 후 3.01로 낮아졌다.
2. 액체발효물의 hesperidin 함량은 발효 처음 1일 동안 증가하였다가 발효 3일째까지 감소하여 발효 5일째까지는 감소된 안정된 상태를 보이다가 다시 증가하기 시작하여 발효 시작 7일 후에는 유의하게 증가하였다.
3. 열처리 고체발효물의 hesperidin 함량은 발효 전에 비해 발효 14일 후 통계적으로 유의하게 감소하였다.
4. 陳皮의 지표성분 hesperidin, neohesperidin, naringin, narigenin을 7일 발효한 결과 neohesperidin, naringin, narigenin의 함량은 변화가 없었으며, hesperidin의 함량은 통계적으로 유의있게 감소하였다.

VI. 參 考 文 獻

1. 金東伸. 식품발효미생물학. 서울:유한문화사. 1998:17-18
2. 정동원, 문상관, 홍진우, 신원준, 박영민, 정재한, 김창현, 민인규, 박성욱, 정우상, 박정미, 고창남, 조기호, 김영석, 배형섭. 인삼, 홍삼 및 발효 홍삼이 정상인의 뇌혈류, 평균혈압, 맥박수에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 2006;27(3):38-50
3. 김희영, 최보희, 황혜정, 김혁, 이강민, 황대현, 심인섭, 이해정. Streptozotocin 당뇨모델에 대한 신당뇨방의 효과. 동의생리병리학회지. 2004;18(5):1331-1336
4. 藥學大學協議會藥典分科會. 大韓藥典 제8개정 해설서 [의약품 각조 제1부·2부]. 서울: 신일상사. 2003:1248-1249
5. 제주감귤농업협동조합. 감귤과 주요 품종집. 2002:3-8. 141-149
6. 차재영, 조영수. 감귤류 플라보노이드의 생리기능 활성. 한국농화학회지. 2001; 44(2):122-128
7. 유경미, 김채은, 김동일, 허담, 황인경. 제주산 진피를 인용한 단일 침출차의 가공 특성 및 향산화성. 한국조리과학회지. 2005;21(3):354-359
8. 고영환, 김재하, 고정삼, 김창진. 밀감양조주 생산용 효모의 선별, 동정 및 Citric Acid 분해. 한국식품과학회지. 1997;29(3):588-594
9. 吳普 等 述. 神農本草經. 北京: 科學技術文獻出版社. 1996:42
10. 木寸庚一 等 述. 經史證類大觀本草. 東京: 廣川書店. 1970:510
11. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社. 1982:1785-1798
12. 汪昂. 本草備要. 沈陽:遼寧科學技術出版社. 1997:52-53

13. 黃宮綉. 本草求真. 北京:人民衛生出版社. 1987:129-130
14. 全國韓醫科大學 本草學教室 共編. 本草學. 서울:永林社. 1998:348
15. 민성희, 박희옥, 오혜숙. 국내산 진피(陳皮)열수추출물의 특성과 진피 음료 개발에 관한 연구. 한국조리과학회지. 2002;18(1):51-56
- 16 康城溶. 陳皮의 腦血流力學에 관한 研究. 大韓本草學會誌. 2000;15(1):59-65
17. 염정열, 은재순. 진피 및 청피가 생쥐의 면역세포에 미치는 영향. 생약학회지. 1998;29(3):173-178
18. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외 역. 강소신의학원 편. 중약대사전. 서울:도서출판 정담. 2004:529-533
19. 안덕균. 한국본초도감. 서울:(주)교학사. 1999:463
20. Francesca Borrelli, Angelo A. Izzo. The plant Kingdom as a source of Anti-ulcer remedies. Review. *Phytother Res.* 2000;14:581-591
21. 김호철. 韓藥藥理學. 서울: 집문당. 2002:263-268.
22. Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. Review. *J. Nat. Prod.* 2000;63:1035-1042
23. Harborne, J. B., Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. Review. *Phytochemistry.* 2000;55:481-504
24. Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H. Antioxidant activity and phenolic composition Citrus peel and seed extract. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46:2123-2129

25. A. Garg, S. Garg, L. J. D. Zaneveld and A. K. Singla. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid Hesperidin. *Phytother Res.* 2001;15:655-669
26. Satou Kwaii, Yasuhiko Tomono, Eriko Kazunori Ogawa, Mutsuko Nonomura-Nakano. Quantitative study of fruit flavonoids in Citrus hybrids of king(C. noblis)and Mukaku(C. Kinokuni). *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:3982-3986
27. Ameer B., Weintraub RA, Johnson JV, Yost RA, Rouself RL. Flavonone absorption after naringin, hesperidin and Citrus administration. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;60:34-40
28. Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 1997;22:749-760
29. Corrado Caristi, Ersilisa Bellocco, Vincenza Panzerra, Giovanni Toscano, Rosa Vadala, and Ugo Leuzzi. Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in Lemon Juices from Sicilian Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:3528-3534
30. 김동현. 한방미생물학. 서울: 도서출판 효일. 2002:166-169
31. 은종방, 정영민, 우건조. 감귤과육 및 과피의 식이섬유와 플라보노이드 검색 및 정량. 한국식품과학회지. 1996;28(2):371-377
32. 송은영, 최영훈, 강경희, 고정삼. 제주산 감귤류의 숙기에 따른 유리당, 유기산, 헤스페리딘, 나린진, 무기물 함량의 변화. 한국식품과학회지. 1998;30(2):306-312
33. 정의동. 陳皮類 한약재의 hesperin과 精油成分 比較. 경희대학교 석사. 2004:33
34. 조호철. 나만의 맥주 만들기. 서울:넥서스BOOKS. 2005:64
35. 한국약용식물학연구회編. 종합약용식물학. 서울:학창사. 2006:84

36. 차성관, 이해숙, 김영배, 고영희. 컴퓨터 시스템에 의한 효모균주의 동정. 산업미생물학회지. 1988;16(6):443-449
37. 전정우. 산사발효액이 고지방 식이에 있어 지질 농도 개선에 관한 기능성 평가. 원광대학교 석사. 2004
38. Izumi, T., M. K. Piskula, S. Osawa, A. Obata, K. Tobe, M. Saito, S. Kataoka, Y. Kubota, and M. Kikuchi. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* 2000;130:1695-1699
39. Day, A. J., M. S. Dupont, S. Ridley, M. Rhodes, M. J. Rhodes, M. R. Morgan, and G. Williamson. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and Liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 1998;436:71-75
40. Nemeth, K. G. W. Plumb, J.G. Berrin, N. Juge, R. Jacob, H. Y. Naim, G. Williamson, D. M. Swallow, and P. A. Kroon. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell betaglucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J. Nutr.* 2003;42:29-42
41. 양현석, 유광원, 최양문. 굴피로부터 분리한 마우스의 장관면역 활성 다당류의 검색. 한국식품영양과학회지. 2004;33(9):1476-1485
42. 강신해, 이영재, 이창홍, 김세재, 이대호, 이영기, 박덕배. 제주자생 진귤(*Citrus sunki* Hort. Tanaka) 과피의 생리활성. 한국식품과학회지. 2005;37(6):983-988
43. 안순철, 김민수, 이선희, 강주형, 김보혜, 오원근, 김보연, 안종석. 당 분해효소를 이용한 감귤 Flavonoid 무배당체 함량의 증가. 한국미생물생명공학회. 2005;33(4):288-294
44. 문영건, 이경준, 김기영, 송춘복, 전유진, 허문수. Probiotics를 이용하여 발효시킨 감귤 가공부산물 발효물의 특성. 한국미생물생명공학회지. 2006;34(2):158-165

45. 김미림, 최경호. 제주 감귤식초 발효균주 선발. 한국조리과학회지. 2005;21(2):243-249
46. 김미림, 최경호. *Gluconacetobacter hansenii* CV1에 의해 발효된 감귤식초의 관능적 특성. 한국조리과학회지. 2005;21(2):263-269
47. 문상욱, 강신해, 진영준, 박지권, 이영돈, 이영기, 박덕배, 김세재. 감귤의 발효와 발효산물의 기능적 특성. 한국식품과학회지. 2004;36(4):669-676
48. 박세준. 신균주 사카로마이세스속에스제이피6728에이에프1(기탁번호 케이씨씨엠-10675피)미생물 및 이들을 이용한 악취방지용 미생물제. 대한민국특허. 2005. 특허등록번호 10-0536456

ABSTRACT

Studies of *Citrus unshiu* peel by yeast fermentation

Cheol Sang Yun

Department of Applied Korean Medicine

Graduate School

KyungHee University, Seoul, Korea

(Directed by Prof. Sabina Lim, K.M.D., Ph.D.

and Prof. Nam Jae Kim, P.D., Ph.D.)

In this study, we investigated physicochemical properties of *Citrus unshiu* peel products fermented with *Saccharomyces exiguus* SJP6728AF1.

The pH of *Citrus unshiu* peel by liquid fermentation was decreased according to the fermentation time increased. Among the flavonoids in the *Citrus unshiu* peel, hesperidin were identified before and after fermentation on the *Citrus unshiu* peel, but neohesperidin, hesperetin, naringin and narigenin were not detected. The contents of hesperidin of *Citrus unshiu* peel by liquid fermentation was a little increased, and the contents of hesperidin of *Citrus unshiu* peel by solid fermentation was decreased.

Flavonoid glycones such as naringin and hesperidin in *Citrus unshiu* peel are slower absorbed and consequently less active than their aglycone, narigenin and hesperetin, respectively. It is clear from this results that the heated *Citrus unshiu* peel by solid fermentation may be applied to new herbal medicine development with transforming flavonoid glycones to active aglycons. However, the fermentation conditions should be improved to produce the more active compounds.

Key word : *Citrus unshiu*, *Saccharomyces exiguus*, fermentation, flavonoid, hesperidin