



Functional properties of newly bred Green ball apple (*Malus pumila* Mill.)

Eun-Ho Lee¹, Ye-Jin Kim¹, Soon-Il Kwon², Jeong-Hee Kim², In-Kyu Kang³,
 Byung-Oh Kim¹, Young-Je Cho^{1*}

¹School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Apple Research Institute, NIHHS, RDA, Gunwi 39000, Korea

³Department of Horticultural Science, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

신품종 그린볼(Green ball; *Malus pumila* Mill.) 사과의 기능성

이은호¹ · 김예진¹ · 권순일² · 김정희² · 강인규³ · 김병오¹ · 조영제^{1*}

¹경북대학교 식품공학부, ²국립원예특작과학원 사과연구소,

³경북대학교 원예과학과

Abstract

The peel of newly bred Green ball apple was extracted using water and ethanol. Water and 70% ethanol extract showed high phenolic contents of 5.30 and 8.31 mg/g, respectively. The water and ethanol extracts of Green ball apple peel showed 88.26% and 100% DPPH radical scavenging activity, and 99.27% and 99.09% ABTS radical scavenging activity at phenolic concentration of 100 µg/mL, respectively. The water and ethanol extract of Green ball apple peel showed antioxidant protection factor of 1.43 PF and 1.21 PF, respectively. The water and ethanol extracts showed 60.29% and 75.92% anti-oxidative effect on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) at phenolic concentration of 100 µg/mL. Hence, Green ball apple peel extract can be considered a potential anti-oxidant with anti-aging properties. The water and ethanol extracts 6.45% and 20.78% hyaluronidase inhibition, respectively, at phenolic concentration of 200 µg/mL. The water extract showed 4.55% and 40.06% elastase inhibition and collagenase inhibition, while the ethanol extract showed 63.38% and 80.07% inhibition, respectively. Green ball apple peel was found to exhibit anti-oxidation activity, as well as hyaluronidase, elastase and collagenase inhibitory activities. Therefore, Green ball apple peel can be considered a potential source for new functional foods.

Key words : new breed, Green ball apple, peel, functional properties

서 론

한국의 과수 품목 중에서 대표 과일의 하나인 사과(*Malus pumila* Mill.)는 최근 소득 향상의 패턴에 따라 소비 형태가 질 좋은 사과를 선호하는 형태로 변화되고 있으며, 당분, 유기산, 펙틴의 함량이 높고 맛과 향이 좋아 꾸준한 소비

패턴을 가지는 과일이다(1,2). 가장 대표적인 사과 품종인 후지(Fuji; *Malus domestica* Borkh.)는 국내 과실 총 생산량의 약 30%를 차지하고 있으며, 당해 생산된 사과는 약 50% 정도가 그해에 소비되고, 나머지는 저장되어 이듬해에 소비되어지고 있다. 또한 우리나라 사과는 국외에서는 일본 사과에 비해 인지도와 가격이 낮은 수준을 형성하고 있으며, 중국사과와 미국 및 칠레산 사과보다는 품질이 우수한 중간 정도로 인식되고 있다. 그러나 한국산 사과가 가지는 식품안전성과 가격경쟁력의 우위점을 활용하여 알프스오 토메 품종과 산사 품종을 교배하여 육성한 신육성 품종인 루비에스 품종이나 골든데리셔스와 후지를 이용하여 교배하여 육성한 그린볼 품종과 같은 고품질 신품종의 사과를

*Corresponding author. E-mail : yjcho@knu.ac.kr

Phone : 82-53-950-7755, Fax : 82-53-950-7762

Received 20 August 2018; Revised 13 September 2018;

Accepted 17 October 2018.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

개발한다면 중국을 중심으로 동남아 등 다양한 국가로의 수출이 가능할 것으로 예상된다(3).

사과는 분류학상 장미과에 속하는 다년생 목본식물로서 유럽, 아시아 및 북아메리카의 북반구에서 재배된다(4). 민간에서 사과는 미용, 구토, 구충, 정혈, 변비 등에 약으로 쓰이고 있다. 사과는 심혈관 질환, 암, 당뇨 등 만성성인병의 발병위험을 낮추어 줄 수 있는 것으로 보고되고 있으며(5), 사과에 함유되어 있는 폴리페놀은 사과의 항산화 활성에 주요 역할을 하는 천연물질이다(6). 특히 사과의 폴리페놀 등의 기능성 성분은 고혈압이나 동맥경화와 같은 성인병 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(7). 사과에 함유되어 있는 procyanidin, chlorogenic acid, caffeic acid, epicatechin, catechin, p-coumaroyl quinic acid, rutin, phloridzin, quercetin과 같은 다양한 폴리페놀 물질은 피부 노화 등의 미용식품 원료로 활용되며, 비만, 염증, 동맥경화, 당뇨, 고혈압 같은 성인병과 각종 암과 같은 퇴행성 질환의 예방에 효과가 있다고 알려져 있다(8,9). 이러한 페놀성분은 과일의 과육보다 과피에 더 많은 것으로 알려지고 있으며, 항산화 활성을 비롯한 생리활성도 과피가 더 우수한 것으로 보고되고 있어 과일 껍질의 기능성 및 활용 방안에 대한 관심이 증가하고 있다(10-12).

따라서 본 연구에서는 국내에서 육성한 신육성 품종인 그린볼(Green ball) 품종의 사과가 가지는 다양한 생리활성을 검토하여 고부가가치 기능성소재로서 개발을 시도하였다.

재료 및 방법

시험 재료

시험재료는 경북 군위군 소재의 사과연구소에서 교배조합으로 골든데리셔스(Golden delicious; 모본)와 후지(Fuji; 부분)를 이용하여 교배하여 육성한 신 육성 품종인 그린볼 사과를 사용하였다. 시료는 그린볼 사과나무로부터 사과를 수확한 후 이물질을 제거하고 사과를 구성하고 있는 껍질, 과육 및 whole 사과를 대상으로 실험하였다. 껍질, 과육, whole 사과 시료는 동결건조(freeze dryer, FD8518, Ilshinbiobase, Yangju, Korea)하여 수분을 제거한 후 40 mesh로 분쇄하여 4°C 저온고에 보관하며 시료로 사용하였다.

그린볼 사과로 부터 phenolic 성분 추출물 제조

추출물의 제조는 열수 추출물의 경우 그린볼 사과의 시료 분말 1 g을 증류수 200 mL에 침지하여 추출물이 100 mL가 될 때까지 가열한 후 냉각하여 24시간 동안 교반 추출하였으며, ethanol 추출물의 경우에는 그린볼 사과 분말 1 g에 10-100% 농도의 ethanol 100 mL를 첨가하여 4°C의

shaking incubator에서 24시간 동안 교반 추출하였으며, methanol, acetone, ethyl acetate, butanol 추출물은 100% 농도로 동일한 조건으로 교반 추출하였다. 각 추출물은 Whatman No.1 filter paper(Whatman Inc., Piscataway, NJ, USA)로 여과한 후 시료의 phenolic compounds 농도를 각각 25, 50, 75, 100 µg/mL 또는 50, 100, 150, 200 µg/mL phenolics 농도로 설정하여 rotary vacuum evaporator(Eyela NE, Tokyo, Japan)에서 농축하였으며, 필요 농도에 따라 증류수로 희석하여 4°C 냉장고에서 저온 보관하며 실험에 사용하였다.

Total phenolic compounds 정량

Total phenolic 정량은 Folin과 Denis의 방법(13)에 준하여 추출물 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 잘 섞어 5분간 방치한 후 Na₂CO₃ 1 mL를 가하여 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 저해 효과

DPPH radical 저해 효과 측정은 Blois의 방법(14)에 준하여, 시료 0.5 mL에 60 µM DPPH 3 mL를 넣고 vortex한 후 15분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 저해 효과는 시료 용액의 반응구와 대조구의 흡광도 차이로 계산하여 나타내었다.

2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical 저해 효과

ABTS radical 저해 효과 측정은 Pellegrini 등의 방법(15)에 준하여, 7 mM ABTS와 140 mM K₂S₂O₈을 5 mL:88 µL로 섞어 어두운 곳에 12-16시간 방치시킨 후, 이를 ethanol과 1:88의 비율로 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.02가 되도록 조절된 ABTS solution을 사용하여 시료 용액 50 µL와 ABTS solution 1 mL를 30초 동안 섞은 후 2.5분간 incubation하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 시료 용액의 반응구와 대조구의 흡광도 차이로 계산하여 나타내었다.

Antioxidant protection factor(PF) 측정

PF 측정은 Andarwulan과 Shetty의 방법(16)에 준하여, 10 mg의 β-carotene을 50 mL의 chloroform에 녹인 용액 1 mL를 evaporator용 수기에 넣고 40°C water bath에서 chloroform을 증류시킨 후 20 µL linoleic acid, 184 µL tween 40과 50 mL H₂O₂를 가하여 emulsion을 만들고, 5 mL의 emulsion에 시료 100 µL를 혼합하여 vortex로 잘 섞어 준 뒤 50°C에서 30분간 반응 시켜 냉각시킨 다음, 470 nm에서

흡광도를 측정하여 PF값은 반응구의 흡광도 대비 대조구의 흡광도 값으로 계산하였다.

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARs) 저해 효과

TBARs 저해 효과 측정은 Buege와 Aust의 방법(17)에 준하여, 1% linoleic acid와 1% Tween 40으로 emulsion을 만들고 emulsion 0.8 mL와 시료 0.2 mL를 섞은 후 50°C water bath에서 10시간 반응시켰다. 반응액 1 mL에 TBA reagent 2 mL를 가하고 15분간 boiling한 다음 10분간 냉각시키고, 15분간 1,000 rpm으로 원심분리하여 실온에서 10분간 방치 후 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARs값은 시료 용액의 반응구와 대조구의 흡광도 차이로 계산하여 나타내었다.

Hyaluronidase(HAase) 저해 효과

HAase 저해 효과는 Dorfman와 Ott의 방법(18)에 준하여, sodium-hyaluronic acid(HA)로부터 형성된 N-acetylglucosamine을 glucosazoline 유도체로 변형시킨 후 ρ -dimethyl-aminobenzaldehyde(DMAB)로 발색시켜 흡광도 600 nm에서 투과도를 측정하였다. HAase 저해효과는 시료 용액의 반응구와 대조구의 투과도 차이로 계산하여 나타내었다.

Elastase 효소저해 효과

Elastase 저해 효과는 Kraunsoe 등의 방법(19)에 준하여, 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 1 mL에 기질액 0.8 mM N-succinyl-(Ala)3- ρ -nitroanilide 용액 0.1 mL의 혼합액에 1.0 U/mL porcine pancreatic elastase(PPE)(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 효소용액 0.1 mL와 50-200 μ g/mL phenolic compounds 농도의 각 시료 0.1 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 25°C에서 20분간 반응시킨 후 ρ -nitroaniline 생성량을 흡광도 410 nm에서 측정하였다. Elastase 저해효과는 시료용액의 첨가 반응구와 무첨가 대조구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Collagenase 효소저해 효과

Collagenase 저해 효과 측정은 Wunsch와 Heidrich의 방법(20)에 준하여, 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL와 50-200 μ g/mL phenolic compounds 농도의 각 시료 용액 0.1 mL의 혼합액에 0.2 mg/mL collagenase(Sigma-Aldrich Co.) 0.15 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지시킨 다음, ethyl acetate 2 mL를 첨가하고 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해효과는 시료용액의 반응구와 대조구의 흡광도 감소율

로 나타내었다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 측정하였고 자료의 통계처리는 SPSS 23 for windows(Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 표시하였고 분산분석 Duncan's multiple range test, one-way ANOVA를 실시하여 시료 간의 유의차를 $p < 0.05$ 수준으로 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

신육성 품종인 그린볼 사과의 껍질, whole 사과 추출물의 고형분과 phenolic의 생리활성 비교

사과의 껍질과 사과 전체의 phenolic 성분 함량과 그에 따른 생리활성 효능을 비교를 위해 phenolic 함량을 측정할 결과 Fig. 1에서와 같이 사과 껍질 water, ethanol 추출물에서는 4.26, 6.51 mg/g의 phenolic 함량을 나타내어, 사과 전체 water, ethanol 추출물의 2.72, 2.87 mg/g에 비해 상대적으로 높은 phenolic 함량을 나타내었다. 따라서 사과 전체보다 사과 껍질에 다량 함유되어 있는 phenolic 성분이 생리활성에 영향을 미치는 것으로 예상되어 사과 껍질 추출물로서 기능성 평가를 진행하였다.

사과의 고형분과 phenolic 성분의 생리활성 효능을 비교를 위해 DPPH radical 저해 효과를 측정한 결과 Fig. 2A에서와 같이 사과 껍질 water, ethanol 추출물의 100 μ g/mL 농도의 고형분에서는 각각 58.95%와 69.28%의 DPPH radical 저해 효과를 나타내었으나, 동일 농도의 phenolic compound의 처리에 의해서는 각각 92.47%와 80.62%의 DPPH radical 저해 효과를 나타내어 phenolic compound에 의해 활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, whole 사과에서도 Fig. 2A에서와 같이 water, ethanol 추출물의 100 μ g/mL 농도의 고형분에서는 각각 25.84%와 29.62%의 전자공여능을 나타내었으나, 동일 농도의 phenolic compound의 처리에서 각각 90.78%와 84.01%의 전자공여능을 나타내어 phenolic compound에 의해 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 고형분과 phenolic 성분의 생리활성 효능을 비교를 위해 ABTS radical 소거능을 측정한 결과 Fig. 2B에서와 같이 사과 껍질의 water, ethanol 추출물 100 μ g/mL 농도의 고형분에서 각각 9.93%와 9.53%의 ABTS radical 소거능을 나타내었으며, 100 μ g/mL phenolic 농도의 phenolic compound에서 각각 89.15%와 83.08%의 ABTS radical 소거능을 나타내었다. 또한 whole 사과의 water, ethanol 추출물의 100 μ g/mL 농도의 고형분에서는 Fig. 2B에서와 같이 각각 5.61%와 4.02%의 ABTS radical 소거능을 나타내었으나, 100 μ g/mL phenolic 농도에서 각각 90.34%와 91.44%의 ABTS radical

소거능을 나타내어 phenolic compound에 의해 활성을 나타내는 것으로 확인되어, 사과 생리활성에는 고형분 중에 함유된 phenolic compound에 의해 활성이 지배되는 것으로 다시 확인되었다. 따라서 향후 실험에서는 사과의 껍질 부분의 phenolic compound를 추출하여 기능성 식품활성을 검토하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

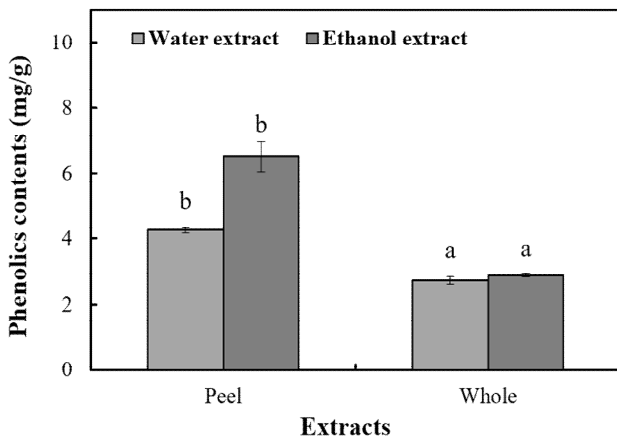


Fig. 1. The content of phenolic in water and ethanol extracts from peel and whole Green ball apple.

PW, peel water extracts; PE, peel ethanol extracts; WhW, whole fruit water extracts; WhE, whole fruit ethanol extracts. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests.

신육성 품종인 그린볼 사과의 용매 종류별, 농도별 phenolic compound 함량

추출은 각 용매의 특성에 따라 시료에 함유된 생리활성 물질 및 기능성 물질을 분리하는 방법이며, 추출 시 사용되는 용매의 설정은 생리활성 실험 전 단계에 중요한 영향을 미친다. 순수한 증류수를 이용한 열수 추출은 용매에 대한 유해성의 문제가 없고, 수율이 높으며 수용성 물질 추출에 많이 이용되고 있으며, 극성 용매인 에탄올 추출의 경우 추출 후 정제가 쉬우며, 식물체의 tannin, saponin, organic acid 등 다양한 유용성분 추출에 주로 이용되고 있다(22).

신육성품종인 그린볼 사과의 껍질 및 whole 사과 추출물의 ethanol 농도별, 유기용매별 phenolic 함량을 측정 한 결과 껍질의 용매별 추출물에서는 Fig. 3A에서와 같이 methanol, ethanol, water, acetone, butanol, ethyl acetate 순으로 7.46, 6.38, 5.30, 3.31, 3.24, 2.36 mg/g의 phenolic 함량을 나타내었고, 껍질 ethanol 농도별 추출물에서는 Fig. 3B에서와 같이 70% ethanol 추출물에서 8.31 mg/g으로 phenolic 함량이 가장 높게 용출되어 나타났다. Whole 사과의 ethanol 농도별 추출물에서는 Fig. 3C에서와 같이 60% ethanol 추출물은 3.49 mg/g의 phenolic 함량을 나타내었다. 따라서 높은 추출 수율과 기능성 식품 및 기능성 화장품에 적용시키기 위하여 그린볼 껍질, whole 사과를 각각 water와 70, 60% ethanol을 용매로 사용하여 추출물을 제조하여 실험을 진행하였다.

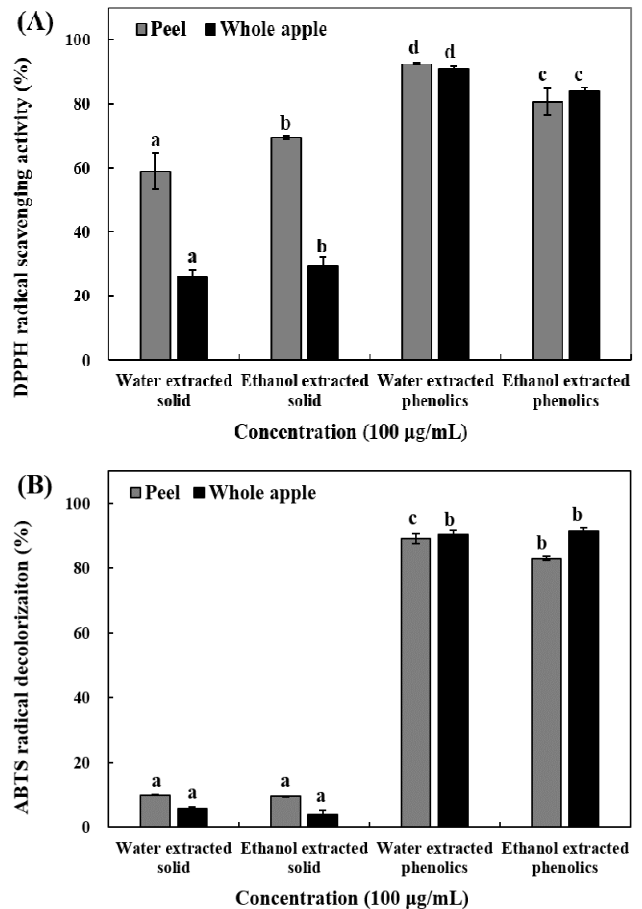


Fig. 2. The DPPH radical scavenging activity of peel and whole apple (A) and ABTS activity of peel and whole apple (B) on extracted solid and phenolics from Green ball apple.

Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests.

사과 껍질과 whole 사과 추출물간의 phenolic compounds 함량 차이에서는 껍질 추출물이 whole 사과 추출물보다 약 2.3배 정도의 높은 함량을 나타내었다. 위의 결과에 따라 water, 70, 60% ethanol로 추출한 추출물을 실험의 재현성을 위해 phenolic 함량을 25-200 µg/mL으로 조절하여 항산화 효과 및 기능성 식품으로서의 활성을 검증하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 저해 효과

항산화물질은 체내의 세포내에서 해로운 반응을 일으키는 free radical이 DNA를 공격하거나, 지질을 산화시키기 전에 그들을 중화시켜 버린다. 따라서 항산화제는 인류가 현재 관심을 집중하는 기능성 혹은 생리활성물질의 하나로써 식품의 변질을 방지하고 인체에서의 노화 방지, 성인병 예방 등의 기능을 할 수 있는 물질로 알려져 있다(23,24). 항산화제는 반응성이 높아 체내 유해물질과 반응하여 세포내 주요 물질들이 활성산소에 의한 연쇄반응을 막아 주어 세포를 보호하는 역할을 한다. 체내에는 항산화 효소계인

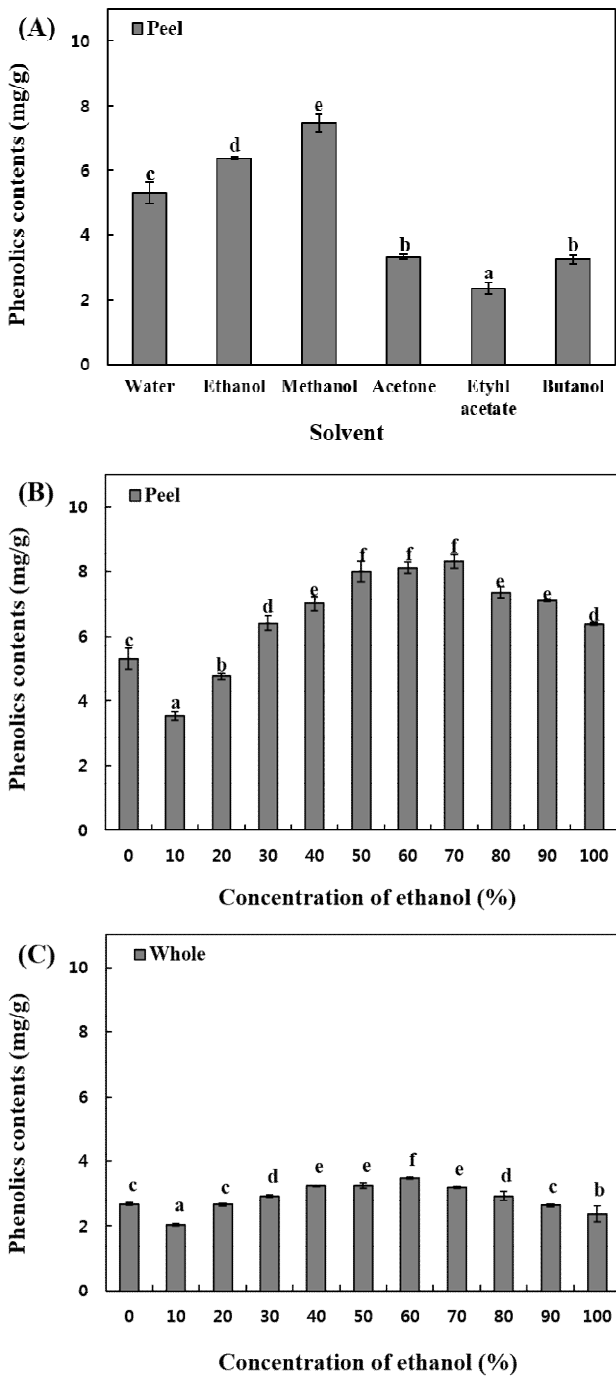


Fig. 3. The phenolic contents in extracts by different solvents (A) and by different concentrations of ethanol (B), (C) from Green ball peel and whole apple.

Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests.

superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase(GST) 등이 존재하며, 저분자로 항산화제 혹은 free radical scavenger 역할을 하는 항산화 물질인 vitamin C, vitamin E, β -carotin, carotenoids, flavonoids 및 selenium을 비롯한 몇 가지 무기질 등이 인체

를 보호 하는 것으로 알려져 있다(25).

그린볼 껍질 추출물의 항산화 효과를 평가하기 위해 DPPH radical 저해 효과를 측정한 결과 Fig. 4A에서와 같이 그린볼 껍질의 water, ethanol 추출물의 25-100 $\mu\text{g/mL}$ phenolic 농도에서 각각 82.94-88.26, 89.56-100.00%의 DPPH radical 저해 효과를 나타내었다. 대조구로 사용한 후지 품종 껍질의 water, ethanol 추출물은 Fig. 4A에서와 같이 85.16-87.55, 87.80-94.40%의 radical 저해 효과를 나타내어 100 $\mu\text{g/mL}$ phenolic의 농도에서 후지 품종에 비해 그린볼 추출물이 다소 우수한 DPPH radical 저해 효과를 나타내었다.

2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfo nic acid)(ABTS) radical 저해 효과

그린볼 껍질의 추출물을 이용하여 ABTS radical 소거능을 측정한 결과 Fig. 4B에서와 같이 그린볼 껍질의 water, ethanol 추출물의 25-100 $\mu\text{g/mL}$ phenolic 농도에서 각각 44.36-99.27%, 41.99-99.09%의 radical 소거능을 나타내었다. 대조구로 사용한 후지 품종 껍질의 water, ethanol 추출물은 Fig. 4B에서와 같이 40.15-99.46%, 38.70-98.22%의 radical 저해효과를 나타내어 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 phenolic 농도에서는 그린볼 추출물이 후지 추출물에 비해 ABTS radical 저해 효과가 더 우수한 것으로 확인되었으며, 수용성 항산화능을 나타내는 DPPH, ABTS radical 저해 효과에서 효능이 있다는 것을 확인하였다.

Antioxidant protection factor(PF) 측정

11개의 이중 결합으로 구성되어 있어 높은 불포화 성질을 가지고 있는 β -carotene은 peroxy radical과 매우 쉽게 반응하는데 불포화된 탄소 중 하나에 선택적 연쇄 절단되어 항산화제로서 작용하는 성질을 이용하여 지용성 항산화능을 나타내는 PF를 측정한 결과 Fig. 4C에서와 같이 그린볼 껍질의 water, ethanol 추출물의 25-100 $\mu\text{g/mL}$ phenolic 농도에서 각각 1.23-1.43 PF와 1.19-1.21 PF를 나타내었다. 대조구로 사용한 후지 품종 껍질의 water, ethanol 추출물은 Fig. 4C에서와 같이 25-100 $\mu\text{g/mL}$ phenolic 농도에서 각각 1.22-1.29 PF와 1.26-1.37 PF 값을 나타내어 후지 품종에 비해 그린볼 추출물의 더 높은 PF 값을 확인할 수 있었으며, 우수한 지용성 항산화능이 있다고 판단되었다.

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARs) 저해 효과

그린볼 껍질 추출물을 이용하여 또 다른 지용성 항산화능을 나타내는 TBARs를 측정한 결과 Fig. 4D에서와 같이 그린볼 껍질의 water, ethanol 추출물에서 각각 24.88-60.29, 29.66-75.92%의 활성을 나타내었다. 대조구로 사용한 후지 품종의 껍질의 water, ethanol 추출물은 Fig. 4D에서와 같이 각각 32.60-55.40, 20.57-72.48%의 활성을 나타내었다. 그린

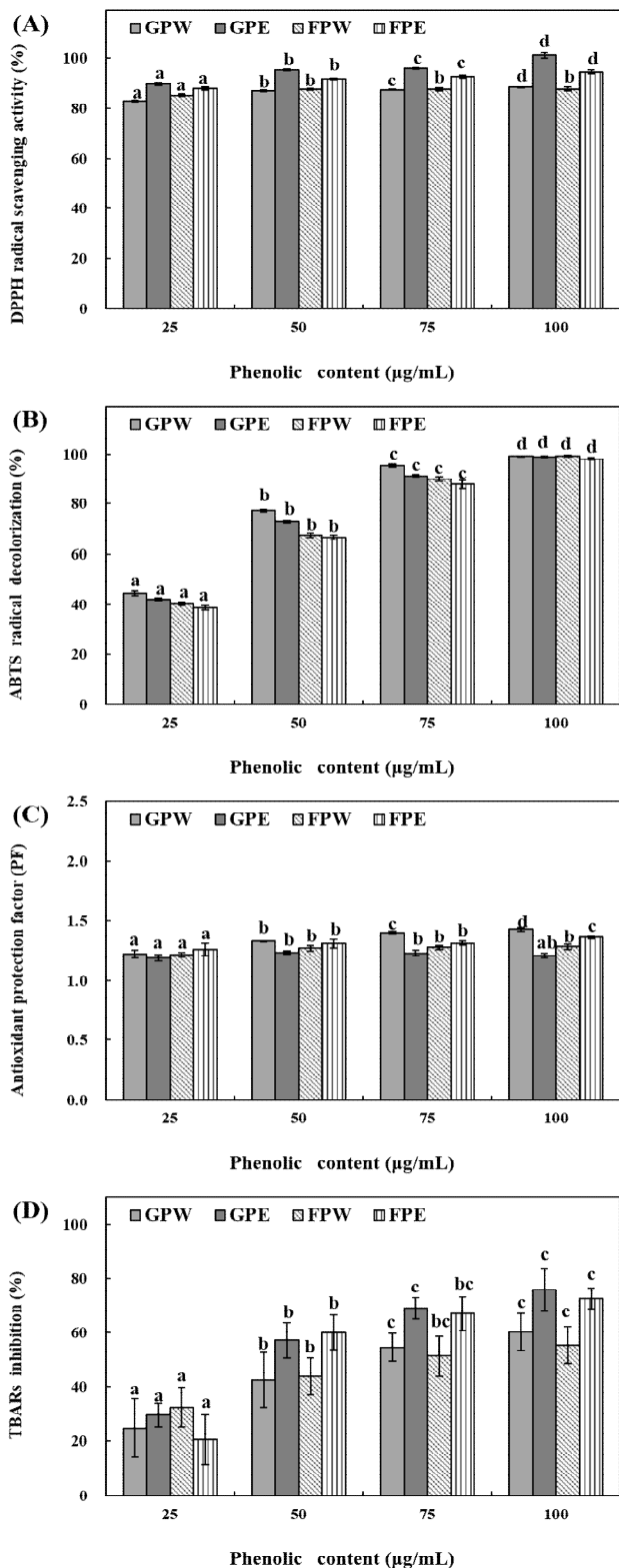


Fig. 4. DPPH (A), ABTS radical cation decolorization (B), antioxidant protection factor (C) and TBARs inhibition (D) activity of water and ethanol extracts from peel of Green ball.

GPW, Green ball peel water extracts; GPE, Green ball peel ethanol extracts; FPW, Fuji peel water extracts, FPE, Fuji peel ethanol extracts. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests.

볼 사과 껍질 추출물이 100 µg/mL phenolic 농도에서 후지 품종의 사과에 비해 더 우수한 지용성 항산화능을 가진 것으로 확인되었다. 따라서 그린볼 품종의 사과는 높은 항산화 활성을 가짐으로 인해서 항노화를 위한 기능성 소재로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

사과 신육성품종 그린볼 사과 껍질의 hyaluronidase 저해 효과

고분자의 hyaluronic acid(HA)는 염증 형성의 중요 요인인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하는 반면, HA의 분해산물 혹은 저분자의 HA는 상처 치유 과정에서 inflammation, fibrosis, collagen deposition을 증가시킨다. 또한 HAase는 일반적으로 항상성 유지를 위해 불활성 형태로 리소좀 등에 존재하고 있지만, 신체적 상해나 류마티즘과 같은 염증성 질환이 발병하였을 때 활성화 되어 혈관계 투과성 및 염증반응에 관여하므로 염증 유발 물질로 알려져 있으며, 알레르기 반응과 암세포 전이 등에도 관여한다고 보고되어 있다(26).

염증 유발에 관련이 있는 효소인 HAase 저해 효과를 측정 한 결과 Fig. 5A에서와 같이 그린볼 껍질의 water 추출물에서는 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 0.00-6.45%의 저해 효과를 나타내었고, 그린볼 껍질의 ethanol 추출물에서는 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 13.16-20.78%의 저해 효과를 나타내었다. 대조구로 사용한 후지 품종의 껍질의 water 추출물은 0.03-1.79%의 저해 효과를 나타내었고, 후지 껍질 ethanol 추출물에서는 1.29-12.72%의 저해 효과를 나타내어 그린볼 추출물이 50-200 µg/mL의 농도범위에서는 후지 껍질 추출물에 비해 더 우수한 효과를 나타내었고 특히 ethanol 추출물에서 상대적으로 후지보다 더 높은 항염증효과를 나타내어, 그린볼 껍질 추출물이 항염증 효과를 활용한 기능성 제품의 산업화에 적용이 가능하다고 판단되었다.

사과 신육성품종 그린볼 사과 껍질의 elastase 저해 효과

구조 단백질인 elastin은 피부 노화가 진행됨에 따라 생성량이 감소하고, 피부 노화 정도에 따라 type-1 collagenase의 생합성이 증가하여 진피 내 교원섬유 및 탄력섬유와 같은 기질 단백질의 분해를 유도하여 피부탄력을 떨어뜨리고 피부 주름의 생성을 야기한다. 인체의 중성구 과립구 내에 존재하는 elastase는 피부탄력성 섬유(elastin)을 분해하는 효소로 elastase의 저해는 피부 주름의 개선을 의미한다(27,28).

인체의 피부탄력을 유지해주는 elastin을 분해하여 피부 주름을 생성시키는 효소인 elastase의 저해 효과를 측정 한 결과 Fig. 5B에서와 같이 그린볼 껍질의 water 추출물에서는 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 3.90-4.55%의 저해 효과를 나타내었고, 그린볼 껍질의 ethanol 추출물에서는

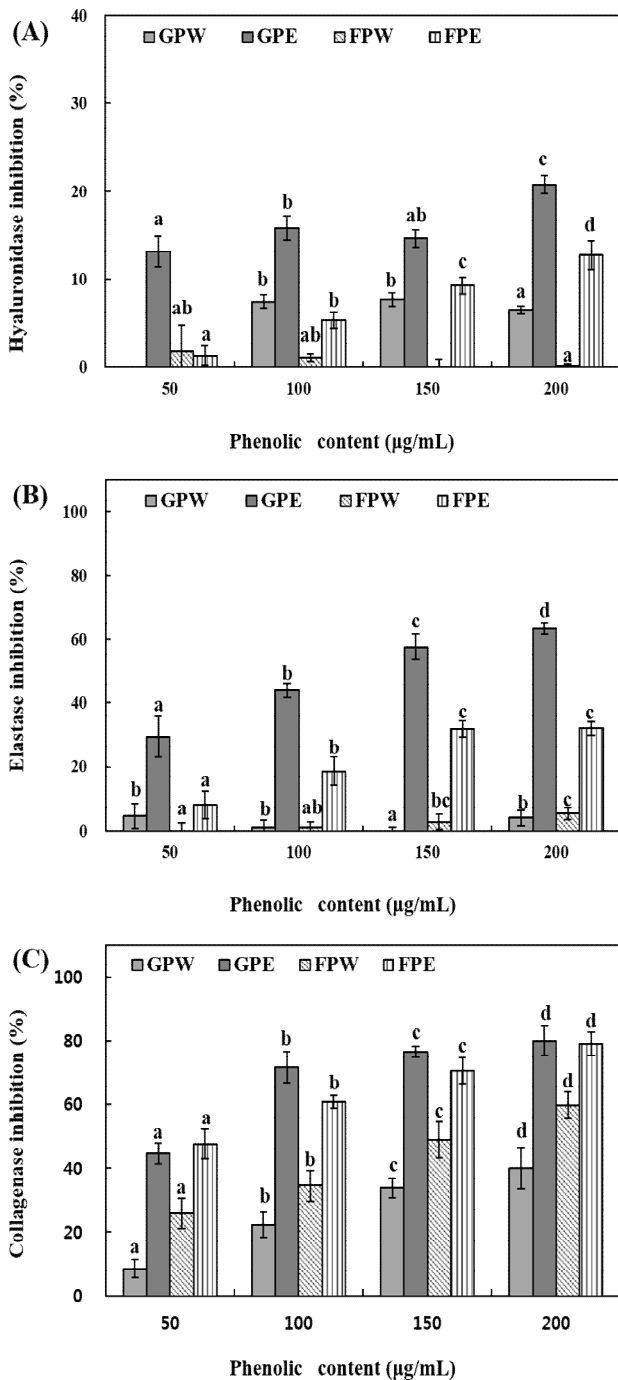


Fig. 5. Inhibitory activity of water and ethanol extracts from peel of Green ball on hyaluronidase (A), elastase (B) and collagenase (C).

GPW, Green ball peel water extracts; GPE, Green ball peel ethanol extracts; FPW, Fuji peel water extracts; FPE, Fuji peel ethanol extracts. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests.

29.39-63.38%의 비교적 높은 저해 효과를 나타내었다. 대조구로 사용한 후지 품종의 껍질 추출물의 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 water 추출물은 0-5.35%의 저해효과를 나타내었고, 후지 껍질 ethanol 추출물에서는 8.02-32.10%

의 저해 효과를 나타내어 그린볼 ethanol 추출물은 모든 농도에서 후지 ethanol 추출물에 비해 elastase 저해 효과가 더 우수하다고 판단되었다.

사과 신육성품종 그린볼 사과 껍질의 collagenase 저해 효과

Collagen은 연골과 피부에서 기계적 견고성과 결합조직의 저항력, 조직력, 세포분할과 분화를 유도하는 기능을 가지고 있으며, 자연노화에 따른 세포 활성 감소와 같은 내적요인과 여러 유해 환경에 의한 스트레스 증가, 자외선 조사에 의한 광노화와 같은 외적 요인에 의해 분해된다. 이러한 collagen의 감소는 피부의 탄력을 저하시켜 연골성분의 감소와 피부노화의 원인이 된다고 보고되어 있다(29).

Collagen을 분해하는 enzyme인 collagenase를 이용하여 저해효과를 측정된 결과 Fig. 5C에서와 같이 그린볼 껍질 추출물의 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 water 추출물에서는 8.44-40.06%의 저해 효과, ethanol 추출물에서는 44.66-80.07%로 상대적으로 더 높은 저해효과를 나타내었다. 대조구로 사용한 후지 품종 껍질의 water 추출물은 Fig. 5C에서와 같이 25.89-59.73%의 저해 효과를 나타내었고, ethanol 추출물에서는 47.79-79.05%의 저해 효과를 나타내었으며, ethanol 추출물의 경우에는 50-200 µg/mL의 phenolic 농도에서 그린볼 추출물이 후지 품종과 유사한 저해효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

따라서 그린볼 껍질 추출물은 연골의 구성과 피부 탄력을 유지하는데 중요한 단백질인 elastin과 collagen을 분해에 영향을 미치는 enzyme인 elastase 및 collagenase를 억제하여 미용식품으로서 긍정적인 효과를 미치는 것으로 확인되었다.

상기의 결과에서와 같이 그린볼 품종의 사과는 항산화 효과, hyaluronidase 억제효과, elastase 및 collagenase 억제 효과 등의 기능성 검정에서 매우 우수한 생리활성을 가지며, 이러한 생리활성은 껍질 추출물에서 상대적으로 매우 우수한 활성을 나타내었다. 따라서 산업화를 위해서는 과육은 식용으로 소비하고 버려지는 껍질을 활용하여 기능성 소재로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

요 약

신육성품종 그린볼 껍질로부터 phenolic compounds를 추출 후 항산화, hyaluronidase 활성억제, elastase 및 collagenase 효소 활성억제 등의 생리활성을 검정하여 신육성품종 사과의 기능성 소재로서의 활용가능성을 살펴보았다. 그린볼 껍질로부터 생리활성으로 작용하는 phenolic 화합물을 추출하기 위하여 water과 ethanol로 추출하였을 때 각각 5.30, 8.31 mg/g의 비교적 높은 phenolic 함량을 나타내었으며,

ethanol 추출물에서 상대적으로 더 높은 phenolic 화합물량을 나타내었다. 그린볼 껍질 추출물의 DPPH, ABTS radical 저해 효과를 나타내는 phenolic 화합물량을 50-100 µg/mL의 범위에서 농도를 달리하여 측정된 결과 water과 ethanol 추출물 100 µg/mL phenolic 농도에서 각각 88.26, 100.00%의 DPPH radical 저해 효과와 99.27, 99.09%의 매우 높은 ABTS radical 저해 효과를 나타내었다. PF는 water과 ethanol 추출물 100 µg/mL phenolics 농도에서 각각 1.43, 1.21 PF를 나타내었으며, TBARs는 100 µg/mL phenolics 농도에서 water 추출물은 60.29%, ethanol 추출물은 75.92%의 항산화능을 나타내어, 그린볼 사과 껍질 추출물의 경우 대조구로 사용한 후지 품종에 비하여도 항산화 효과가 우수하여 노화방지를 위한 천연 항산화제로 활용가능성이 매우 높은 것으로 판단하였다. 그린볼 껍질 추출물을 이용하여 항염증 효과를 나타내는 hyaluronidase 저해 효과를 측정된 결과 water, ethanol 추출물 200 µg/mL phenolics 농도에서 각각 6.45, 20.78%의 저해 효과를 나타내었으며, 후지 품종에 비해 항염증 효과가 더 우수한 것으로 확인되었다. Elastase 및 collagenase 저해 효과를 측정된 결과 water 추출물에서는 200 µg/mL phenolics 농도에서 각각 3.90, 40.06%의 저해 효과를 나타내었고, ethanol 추출물에서는 200 µg/mL phenolics 농도에서 각각 63.38, 80.07%의 저해 효과를 나타내었다. 대조구로 사용한 후지 품종의 elastase 억제효과에 비해 그린볼이 상대적으로 더 우수한 억제효과를 나타내었고, collagenase의 경우도 100-150 µg/mL phenolics 농도범위에서 후지 품종에 비해 상대적으로 더 우수한 저해 활성을 나타내었다. 따라서 그린볼 사과의 껍질 추출물은 생리활성에 관여하는 효소들에 대한 억제효과가 우수하여 기능성 소재로 활용가능성이 매우 높은 것으로 판단하였다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 농촌진흥청 어젠다사업(과제번호: PJ01245503, 사과 신육성 품종 이용성 증대 연구)의 연구비 지원에 의해 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Shin EJ (2011) Development of the natural apple vinegar using apple juice. MS Thesis, Hoseo University, Korea, p 2-4
- Hwang TY, Son SM, Lee CY, Moon KD (2001) Quality changes of fresh-cut packaged Fuji apples during storage. Korean J Food Sci Technol, 33, 469-473
- Jin SY, Sim KH, Lee EJ, Gu HJ, Kim MH, Han YS, Park JS, Kim YH (2014) Changes in quality characteristics and antioxidant activity of apples during storage. Korean J Food Nutr, 27, 999-1005
- Kwon OJ (2016) Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of immature fruits of *Malus pumila* cv. Fuji. Korean J Food Preserv, 23, 585-590
- Boyer J, Liu RH (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. Nutr J, 3, 1-15
- Vinson JA, Su X, Zubic L, Bose P (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. J Agric Food Chem, 49, 5315-5321
- Shin EJ, Kang BH, Lee SH, See DS, Hur SS, Shin KS, Kim SH, Son SM, Lee JM (2011) Monitoring on alcohol fermentation properties of apple juice for apple vinegar. Korean J Food Preserv, 18, 986-992
- Yun HJ, Lim SY, Hur JM, Jeong JW, Yang SH, Kim DH (2007) Changes of functional compounds in, and texture characteristics of, apples, during post-irradiation storage at different temperatures. Korean J Food Preserv, 14, 239-246
- Hwang IW, Kim CS, Chung SK (2011) The physicochemical qualities and antioxidant activities of apple juices marketed in Korea. Korean J Food Preserv, 18, 700-705
- Wolfe K, Wu X, Liu RH (2003) Antioxidant activity of apple peels. J Agric Food Chem, 51, 609-614
- Henriquez C, Almonacid S, Chiffelle I, Valenzuela T, Araya M, Cabezas L, Simpson R, Speisky H (2010) Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. Chil J Agric Res, 70, 523-536
- Kubola J, Siriamornpun S (2011) Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). Food Chem, 127, 1138-1145
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem, 12, 239-243
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
- Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C (1999) 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, 299, 379-389
- Andarwulan N, Shetty K (1999) Phenolic content in

- differentiated tissue cultures of untransformed and agrobacterium-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). *J Agric Food Chem*, 47, 1776-1780
17. Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-310
 18. Dorfman A, Ott ML (1948) A turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. *J Biol Chem*, 172, 367-375
 19. Kraunsoe JA, Claridge TD, Lowe G (1996) Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 35, 9090-9096
 20. Wunsch E, Heidrich HG (1963) Zur quantitativen bestimmung der kollagenase. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 333, 149-151
 21. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med*, 20, 933-956
 22. Cheon JH (2015) Effects of *Backhousia citriodora* extracts on antioxidant activity and bone formation. MS Thesis, Silla University, Korea, p 4-6
 23. Farag RS, Badei AZMA, Hewedi FM, El-Baroty GSA (1989) Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J Am Oil Chem Soc*, 66, 792-799
 24. Frei B (1994) Natural antioxidants in human health and disease. Academic Press Publisher, Cambridge, MA, USA, p 40-55
 25. Borrello S, Seccia A, Galeotti T, Bartoli GM, Farallo E, Serri F (1984) Protective enzymes in human epidermal carcinomas and psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 276, 338-340
 26. Ghosh P (1994) The role of hyaluronic acid in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol*, 12, 75-82
 27. Lee SJ, Kwon YY, Cho SW, Kwon HS, Shin WC (2013) Effects of Ehwa *Makgeolli* containing oriental herbs on skin whitening and wrinkles. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 42, 550-555
 28. Lee JY, An BJ (2012) Whitening and anti-wrinkling effects of fractions from *Prunus persica* Flos. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 40, 364-370
 29. Giacomoni PU, Rein G (2001) Factors of skin aging share common mechanisms. *Biogerontology*, 2, 219-229