

碩士學位論文

제주산 ‘부지화’ 감귤의 과실
 β -cryptoxanthin 분석



濟州大學校 産業大學院

生命産業工學科

金 渡 玪

2004年 8月

석사학위논문

제주산 ‘부지화’ 감귤의 과실
 β -cryptoxanthin 분석

지도교수 김 찬 식
김도현

이 논문을 공학석사학위 논문으로 제출함



2004년 6월

김도현의 공학석사학위 논문을 인준함

심사위원장 (인)

위 원 (인)

위 원 (인)

제주대학교 산업대학원

2004년 6월

요약

제주도에서 하우스 재배되고 있는 부지화(*C. unshiu* Marc × *C. sinensis* Osb) × (*C. reticulata* Blanco)을 착색시기인 10월에서 다음해 수확시기인 2월까지의 과실에 대한 β -Cryptoxanthin 함량을 조사하였다. 부지화는 과육과 과피로 나누어 carotenoids 추출에 이용하였다. 추출할 carotenoids 중 β -Cryptoxanthin은 TLC(Thin-layer chromatography)방법에 의하여 확인하였고, HPLC(High Performance Liquid chromatography)방법에 의하여 측정하였다. 부지화의 과피내 β -Cryptoxanthin의 함량은 0.145mg%(10월) < 0.281mg%(11월) < 0.384mg%(12월) < 1.23mg%(1월) < 1.707mg%(2월)mg%였다 그리고 과육내 β -Cryptoxanthin은 함량은 0.06mg%(10월) < 0.079mg%(11월) < 0.188mg%(12월) < 0.255mg%(1월) < 0.645mg%(2월)로 측정되었다. β -Cryptoxanthin은 과육보다 과피의 함량이 많았고, 과실이 성숙되어 가면서 함량이 증가함을 보였다.

목 차

목차	i
요약	ii
List of Tables	iii
List of Figures	iv
I. 서론	1
1. carotenoids의 생합성 경로	3
2. β -Cryptoxanthin	5
II. 재료 및 방법	6
1. 재 료	6
2. 시 약	6
3. Chromatography	7
4. carotenoids의 추출	8
III. 결과 및 고찰	9
IV. References	30
감사의 글	33

List of Table

Table 1. Operating condition of HPLC for carotenoids.	11
--	----



List of Figures

- Figure 1. Extract scheme of carotenoids in peel and flesh of [(*C. unshiu* Marc × *C.sinensis* Osb)×(*C. reticulata* Blanco)]. 12
- Figure 2. Standard Calibration of β-cryptoxanthin by HPLC 13
- Figure 3. TLC chromatograms of standards of β-cryptoxanthin, and carotenoids peel of [(*C. unshiu* Marc × *C.sinensis* Osb)×(*C. reticulata* Blanco)] varieties.
A : Standard of β-cryptoxanthin, B : Oct. , C : Nov. , D : Dec. , E : Jan. , F : Feb.
TLC conditions : 1) Plate; Silica gel 60 F254 TLC (Merck), 2) Solvent system; Hexane/Acetone(75/25, v/v) 14
- Figure 4. TLC chromatograms of standards of β-cryptoxanthin, and carotenoids flesh of [(*C. unshiu* Marc × *C.sinensis* Osb)×(*C. reticulata* Blanco)] varieties.
A : Standard of β-cryptoxanthin, B : Oct. , C : Nov. , D : Dec. , E : Jan. , F : Feb.
TLC conditions : 1) Plate; Silica gel 60 F254 TLC (Merck), 2) Solvent system; Hexane/Acetone(75/25, v/v) 15
- Figure 5. β -Cryptoxanthin content from flesh of (*C. unshiu* Marc × *C.sinensis* Osb)×(*C. reticulata* Blanco) varieties. Standard of β-cryptoxanthin. 16

Figure 6.	β-Cryptoxanthin content from flesh of (<i>C. unshiu</i> Marc × <i>C.sinensis</i> Osb)×(<i>C. reticulata</i> Blanco) varieties. Oct.	17
Figure 7.	β-Cryptoxanthin content from flesh of (<i>C. unshiu</i> Marc × <i>C.sinensis</i> Osb)×(<i>C. reticulata</i> Blanco) varieties. Nov.	18
Figure 8.	β-Cryptoxanthin content from flesh of (<i>C. unshiu</i> Marc × <i>C.sinensis</i> Osb)×(<i>C. reticulata</i> Blanco) varieties. Dec.	19
Figure 9.	β-Cryptoxanthin content from flesh of (<i>C. unshiu</i> Marc × <i>C.sinensis</i> Osb)×(<i>C. reticulata</i> Blanco) varieties. Jan.	20
Figure 10.	β-Cryptoxanthin content from flesh of (<i>C. unshiu</i> Marc × <i>C.sinensis</i> Osb)×(<i>C. reticulata</i> Blanco) varieties. Feb.	21
Figure 11.	β-Cryptoxanthin content from peel of (<i>C. unshiu</i> Marc × <i>C.sinensis</i> Osb)×(<i>C. reticulata</i> Blanco) varieties. Standard of -cryptoxanthin	22
Figure 12.	β-Cryptoxanthin content from peel of (<i>C. unshiu</i> Marc × <i>C.sinensis</i> Osb)×(<i>C. reticulata</i> Blanco) varieties. Oct.	23
Figure 13.	β-Cryptoxanthin content from peel of (<i>C. unshiu</i> Marc × <i>C.sinensis</i> Osb)×(<i>C. reticulata</i> Blanco) varieties. Nov.	24
Figure 14.	β-Cryptoxanthin content from peel of (<i>C. unshiu</i> Marc × <i>C.sinensis</i> Osb)×(<i>C. reticulata</i> Blanco) varieties. Dec.	25

Figure 15. β -Cryptoxanthin content from peel of (*C. unshiu* Marc
 \times *C.sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties. Jan.
..... 26

Figure 16. β -Cryptoxanthin content from peel of (*C. unshiu* Marc
 \times *C.sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties. Feb.
..... 27

Figure 17. β -Cryptoxanthin content from flesh of [(*C. unshiu* Marc
 \times *C.sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco)]
varieties.
A : Oct. , B : Nov. , C : Dec. , D : Jan. , E : Feb.
..... 28

Figure18. β -Cryptoxanthin content from flesh of[(*C. unshiu* Marc
 \times *C.sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco)] varieties.
A : Oct. , B : Nov. , C : Dec. , D : Jan. , E : Feb.
..... 29



I. 서론

‘한라봉(부지화)’는 만다린계의 교잡종으로 1972년에 일본 농림수산성과 수시시험장에서 청견에 폰칸(중야)3호를 교배하여 최초로 육성되었으며, 이후 많은 연구가 이루어져 1984년에 감귤 주산지현의 시험연구기관에서 농림11호로서 농림등록 되었고 1997년 7월에 종묘법에 근가하는 품종등록으로서 보급단계에 되었다.(河瀨憲次,1999) 제주에는 1990년대 초반에 일부 독농가와 농업기술센터의 시범사업으로 도입 재배되기 시작 하였다. 부지화는 온주밀감에 비하여 과형이 독특하고 과육의 당도와 향미가 우수 할 뿐만 아니라 먹기 쉬운 점 등 과실의 장점이 인정되어 1990년에는 품종명 ‘한라봉(*C. unshiu* Marc × *C. sinensis* Osb) × (*C. reticulata* Blanco)라고 명명되었다(Thurnham et al., 1998).

제주농업기술센터의 부지화 재배실태 보고에 따르면 한국 내 재배면적은 639.5ha, 생산량 6,940ton으로 이중 90%가 제주도내에서 생산되고 있다(Thurnham et al., 1998). 부지화의 생리낙과종료는 6월 하순이고, 착색시기는 10월 중순경이며 완색되는 시기는 12월 상순부터이다(Thurnham et al., 1998). 부지화는 독특한 영양생리적 특성 때문에 새로운 재배기술이 요구 되고 있으며 짧은 재배역사로 인해 아직까지 확립된 재배기술이 없다. 재배기술이 변화는 과실의 생리·화학적 변화를 가져오기 때문에 현재 재배되고 있는 부지화의 기능성 성분에 대한 자료가 필요하다. 최근 부지화에 대한 생육과 양분흡수에 관한 연구는 보고되었다(Whang et al., 1995). 하지만 과실에 대한 유효성분의 변화는 보고가 없다.

현재 보고 된 Carotenoids는 40여종으로서 그 중 하나인 β -Cryptoxanthin은 야채(채소)나 과일에 많이 존재하며, 특히 감귤류에 많은 함량이 존재한다(Berg, 1999). 이 β -Cryptoxanthin은 hydrocarbon, carotenoise, lutein 등과 함께 인간의 혈장과 조직에 존재한다(Krinsky et al., 1990). Vitamin A의 주요 원료인 β -Cryptoxanthin는 항암 효과를 지닐 뿐만 아니라

면역력을 강화시킬 수 있는 생물학적 활성물질이다(Cooper et al., 1999). antimutagenicity가 주로 hydrocarbon Carotenoids(α - β -carotene, lycopene)와 Xanthophylls(lutein, β -Cryptoxanthin)등과 많은 관련이 있다고 보고되었다(Pupin et al., 1999). 최근 생물학적 활성물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, Dorgan *et al* 은 β -Cryptoxanthin의 유방암에 대한 강한 항암효과가 있음을 보고 하였다(Cunningham et al., 1996). 또한 Nishio et al. 은 마우스를 이용한 대장암 실험에서 β -Cryptoxanthin이 β -Carotene 보다 높은 활성을 나타낸다고 보고 하였다(Matsumura et al., 1997).

생물학적 물질들의 기능이 밝혀짐에 따라 이물질들에 대한 정확한 정성·정량 분석기술의 발전에 중요성을 더하였다(Berg, 1999)

HPLC는 각종 동·식물 및 식품의 추출물들로부터 분리되는 여러 종의 carotenoids를 분석하는데 중요한 장치이다(Rauscher et al., 1998)(Slattery et al., 2000). HPLC로 사용하여 여러 종의 Carotenoids의 분리와 특징들에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으며, KO et al.은 HPLC를 이용한 감귤에서의 β -Cryptoxanthin 대해 보고하였다(Ko et al., 2000).

본 연구에서는 현재 보급 되고 있는 재배기술로 재배된 부지화 과실이 β -Cryptoxanthin의 함량을 TLC, HPLC 방법을 통해 과실의 성숙과정에 오는 변화량을 측정하였다.

1. carotenoids의 생합성 경로

식물 carotenoid는 15개의 공유된 이중결합까지 포함할 수 있는 polyene 사슬로 40-carbon isoprenoids이다. 그들의 화학적 특성 때문에, carotenoids는 모든 광합성 유기체의 필수적인 성분이다(Joseph, 2001). Carotenoids는 색소의 큰 군락 중의 하나를 형성하는데 식물에서 넓게 분산되어 조직의 황색, 오렌지색 및 붉은색의 원인이 된다(Zhu et al., 2002). 노란색, 오렌지색 및 붉은색 색소는 광산화로부터 보호하여 광합성을 위한 빛을 얻고, 또한 많은 다른 중요한 기능을 한다. 광합성 유기체에 있는 대부분의 중요한 carotenoids는 xanthophylls 또는 산화된 카로테노이드이다(Sun et al., 1996). β -carotene과 같은 특정 순환기의 carotenoids는 동물에 있는 비타민 A의 전구물질로 항암작용을 나타내는 중요한 영양의 인자로서 현재의 관심대상이다(Matsumura et al., 1997)..

carotenoids의 생합성은 식물과 algae의 엽록체에서 발생한다(Cunningham et al., 1996). isopentenyl pyrophosphate(IPP)의 세 분자와 dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP)의 한 분자의 축합은 모든 C₄₀ carotenoids의 반을 형성하는 diterpene geranylgeranyl pyrophosphate(GGPP)을 생산한다. 첫번째 비환형 C₄₀ hydrocarbon carotenoid와 Phytoene 구성의 중요한 단계는 C₂₀과 geranylgeranyl pyrophosphate(GGPP)사이의 두 분자의 말단과 말단간의 축합이다. geranylgeranyl pyrophosphate(GGPP)로부터의 phytoene 생합성은 효소에 의해 phytoene synthase (PSY)로 촉매된 두 단계 반응이다. 이 반응은 첫번째 C₄₀ carotenoid, Phytene, 모든 식물의 carotenoid의 골격을 만든다(Zhu et al., 2002).

Phytoene는 결과적으로 먼저 phytofluene의 형성 그리고 차례로 beta-carotene, neurosporene와 lycopene으로 구성되는 일련의 네가지 desaturation 반응이 이루어진다.

이러한 desaturation 반응은 carotenoid 색소에 있는 발색단과 그것에 의하여 무색의 phytoene에서 pink색 lycopene으로 되는 carbon-carbon 이중

결합을 연속적으로 연장하기 위해 공급한다. phytoene에 의한 네 순차적인 desaturation 작용은 식물에 있는 두 효소에 의해 촉매된다[phytoene desaturase(PDS)와 β -carotene desaturase(ZDS)].

광합성 유기체에 있는 lycopene의 고리화는 carotenoids 생합성 경로에 중요한 분기점을 나타낸다. 두 β -rings을 갖는 β -Carotene은 필수적인 최종 생성물이며, 식물의 광합성 기관에서 일반적으로 제공되는 몇몇 다른 carotenoids를 위한 전구물질의 역할을 한다. 하나의 β 와 하나의 β -ring을 갖는 β -Carotene은 많은 녹색식물의 광합성 막에 있는 주된 carotenoid 색소인 lutein의 직접적인 전구물질이다. 두 β -ring이 있는 Carotenoids는 식물에서 일반적으로는 발견되지 않는다. Xanthophylls 또는 산화된 carotenoids는 식물의 틸라코이드 막에 있는 carotenoid 색소의 대부분을 구성한다 (Cunningham et al., 1996). 효소의 몇몇은 산소 공유 그룹으로 변경된 carotenoids와 xanthophyll 생합성에 깊이 관련되며, 또한 박테리아와 고등 식물에서의 β -cryptoxanthin과 zeaxanthin과 같은 특징을 갖는다.(Linden, 1999) (Figure 1)



2. β -Cryptoxanthin

감귤 과실에서의 Carotenoids는 폭넓게 사람의 건강을 보호한다고 알려져 왔다(Matsumura et al., 1997). 다양한 천연 Carotenoids는 anticarcinogenic 활성을 가지고 있다고 증명되었다(Nishino et al., 1998). 면역학적인 몇몇 연구는 Carotenoid소비와 어떠한 암의 발생 사이의 역관계를 확인하였다(Riso et al., 1997),(Cunningham et al., 1996). 감귤류 과실로부터의 Carotenoids의 항암 효과는 주로 그들의 항산화 기능 때문이다(Sumida et al., 1999). 최근 arotenoids는 유익한 건강 영향이 보고되어 주의를 끌었다(Pupin et al., 1998),(Matsumura et al., 1997). 특별히 β -Cryptoxanthin 기능은 사람의 질병에 대하여 보호하는 역할을 한다(Hirschberg et al., 2001),(Stewart et al., 1977). β -Cryptoxanthin은 antioncogene의 발현을 자극하기 위해 제시되었다(Nishino et al., 1998).

Dorgan et al.은 β -Cryptoxanthin이 유방암에서 항암활성 효과를 보여준다고 보고되었다(Dorgan et al., 1998). 쥐에서의 피부암이나 결장암을 막는 vivo 실험에서 β -Cryptoxanthin은 β -carotene보다 높은 항암 활성을 보여준다(Matsumura et al., 1997).

최근, 다양한 건강과 영양활성에 이용되는 음식에 들어있는 보다 정확한 자료와 여러 가지 Carotenoids의 농축 얻는 데에 중요성이 있다(Sumida et al., 1999). 감귤류 과실의 각각의 Carotenoid 함량 자료는 더욱더 중요하게 되었다. 분리와 검출 quantitation 과정의 다양한 변화는 Carotenoids의 연구에서 사용되었다(Sumida et al., 1999).

Nisio et al.에 감귤류 unshiu Marcovitch는 미국에서 재배된 그레이프프룻, 레몬, 오렌지보다 엄청난 양의 포함한다고 보고하였다(Matsumura et al., 1997). 감귤류 과실로부터 Carotenoids의 분리에 관계된 몇 가지의 보고는 있지만, 국내의 감귤류 과실과 외국의 감귤류과실에서의 β -Cryptoxanthin의 체계적인 분석 또한 보고되어 지고 있다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

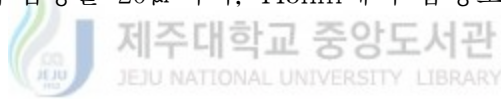
본 실험에서 사용된 시료는 착색시기인 10월부터 수확시기인 다음해 2월까지 시설재배된 것으로서 농가에서 수확되었다. 수확된 과실은 과육과 과피로 나누어 각각 슬라이스 처리하여 -70°C 에서 냉동 하였다. -70°C 에서 냉동된 시료를 carotenoids 추출에 사용하였다.

2. 시약

Standard로 사용된 β -Cryptoxanthin, β -carotene은 각각 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 와 Extrasynthese(Genay, France)로부터 구입하였다. 항산화제로는 0.1%의 butylated hydroxy toluen (BHT, sigma, USA)을 사용하였다. 이외 분석에 사용한 모든 시약은 HPLC-grade를 사용하였다.

3. Chromatography

Carotenoid는 silica gel TLC plates(silica gel 60 F254, Merck, USA)로 분석하였으며 Hexane/Acetone(3/1, v/v)를 전개용매로 사용하였다. HPLC(High Performance Liquid chromatography)장치는 Spectra-physics (spectra SYSTEM) P4000 pump(spectra-physics Analytical, Inc,CA, USA) UV1000 uv/vis detector(spectra-physics Analytical, Inc,CA,USA) 그리고 As3500 Autosampler (TSP Inc., CA,USA)로 구성되어 있다. 분리는 μ BondapakTM C18 revers phase column(3.9×300mm, particle size 10 μ m)(waters chromatography, Milford, MA, USA)을 사용하였다. HPLC분석에 사용된 이동상은 Methanol, water와 methyl tert-butyl ether (MTBE)로 HPLC-grade를 0.5 μ m PTFE membrane filter(ADVANTEC) MFS, Inc, CA, USA)로 여과하여 사용하였다. 분석조건은 Table 1.과 같다. 시료주입량을 20 μ l이며, 445nm에서 흡광도를 측정하였다.



4. carotenoids의 추출

과피 10g(또는 100g의 과육)에 $MgCO_3$ 1g과 40% methanol 70ml를 가하여 juice mixer(LG, seoul, korea)를 이용하여 분쇄한다. 분쇄 후 7000rpm으로 7분간 원심분리를 한다. 원심분리(7000rpm, 7min, 10°C)를 통해 상등액을 분리·제거한다. 상등액을 제거한 과피에 0.1% BTH를 함유한 Acetone/methanol (7/3, v/v), 140ml를 가하여 1시간동안 교반(170rpm, 10°C)한 후 감압여과장치를 이용하여 여과한다. 이 과정을 색소가 모두 추출될 때 까지 반복하여 실행한다.

추출물은 1L 분액깔때기에 넣고 3차증류수 150ml, ethyl ether 250ml와 10% NaCl 100ml를 가하여 흔들여 준 다음 분액이 될 때까지 놓아둔다.

분액된 상층과 하층에서 상층(ether층)을 분리하여 vacuum evaporator (EyEra, Japan)를 이용하여 35°C에서 농축시킨다.

농축액에 ethyl ether 10ml과 20% methanolic KOH 10ml를 첨가하여 2시간동안 실온의 암소에서 Saponification 한다. Saponify 된 것을 분액깔때기에 옮기고, 포화상태인 NH_4Cl 용액 20ml와 ethyl ether 50ml를 첨가하여 유기층과 수용층으로 분액한다. 수용층을 제거하고 3차증류수로 여러 번 반복하여 씻어준다. 씻어준 수용층은 제거하고, 유기층은 농축, 건조(35°C)시킨다. 완전건조가 되면 1% BHT가 함유된 MTBE/methanol(1/1,v/v) 5ml에 재용해시키고 0.45 μ m PTFE Syring filter (Micro Filtration System, CA, USA)를 통해 여과하였다. 위 과정으로부터 추출·정제된 carotenoid를 HPLC 분석에 이용하였다.(Fig. 1)

III. 결과 및 고찰

부지화에서의 Carotenoid추출은 성공적으로 이루어 졌으며 추출된 Carotenoid중 β -Cryptoxanthin은 표품과 부지화의 과육과 과피로부터 추출·정제한 Carotenoids를 함께 전개하는 TLC방법으로 확인되었다. 전개한 TLC는 Fig. 3, 4 에서 보는 것과 같이 다른 화합물과 함께 확인되었으며 R_f 0.9에서 β -carotene, R_f 0.32에서 β -Cryptoxanthin이 뚜렷한 밴드로 확인되었다. 또한 착색기인 10월에서부터 수확기인 2월로 갈수록 β -Cryptoxanthin의 밴드가 진해지는 것을 볼 수 있다.

HPLC 분석된 결과는 Fig 5, 6에서 보듯이 HPLC분석조건(table.1) 하에서 β -Cryptoxanthin은 다른 화합물들에 비하여 잘 분리 되었으며, retention time 20-25분에서 확인 되었다. retention time 27분에 peak는 β -carotene이다. 부지화의 과육의 HPLC분석결과로부터 β -Cryptoxanthin의 면적 값을 Standard로부터 얻은 검량선(fig. 2)에 대입하여 함량 값을 산출하였다.

분석된 β -Cryptoxanthin의 함량 값은 과육에서 10월에 0.06mg%, 11월이 0.079mg%, 12월이 0.188mg%, 1월이 0.255mg%, 2월이 0.645mg%였으며, 과피에서 10월에 0.145mg%, 11월이 0.281mg%, 12월이 0.384mg%, 1월이 1.23mg%, 2월이 1.707mg%였다.(Fig. 7, 8)

과육과 과피 모두 착색기인 10월에 가장 낮은 함량을 나타내었고 수확기인 2월에 가장 높은 함량을 나타내었다. 이 사실로부터 과실이 익어 감에 따라 β -Cryptoxanthin의 함량이 증가함을 알 수 있다.

또한 과실의 성숙되어가면서 비대기에 급격한 무게의 증가를 보이나 β -Cryptoxanthin의 함량은 높은 증가를 보이지 않았다.

그러나 12월 착색시기가 종결되면서 급격한 함량의 증가를 보였는데 부지화 과피의 β -Cryptoxanthin함량은 11월에서 12월에 0.85mg% 높은 증가를 보였다. 과육에서는 12월보다 한달 늦은 1월에 비해 2월이 0.385mg%로 높은 증가를 보였다. 이 함량의 증가는 외부로부터의 스트레스에 의한

증가이거나 생물이 갖고 있는 독특한 메타볼리즘에 의한 것으로 판단된다.

본 연구로부터 얻어진 결과들은 재배방법의 변화로부터 유용한 성분의 함량을 증가시킬 수 있다고 판단된다. 또한 최근 들어 β -Cryptoxanthin과 같은 항암성분의 있는 물질에 관여하는 유전자를 찾아내어 유용한 물질이 존재하지 않는 식물체에 적용하는 형질전환식물체연구 및 유용한 물질의 함량을 증폭하기 위한 전사조절 유전자의 연구가 활발히 진행되고 있는 반면 재배방법의 변화로 함량의 증가를 이끌 수 있는 연구는 이루어지지 않고 있다. 어떠한 재배방법의 변화나 유전자조작에 의한 함량의 증가를 평가하기 위해서는 현재의 재배방법에서 재배된 과실에서의 함량에 관한 기본적인 자료가 있어야 되므로 본 연구의 중요성을 들 수 있다.



Table 1. Operating condition of HPLC for carotenoids.

Solvent Degassers :	Spectra-physics Analytical, Inc. part number A0099-504
Gradient pumps :	Spectra-physics Analytical, Inc. (P4000)
Autosamplers :	Thermo Separation Products Inc. (AS1000)
UV/Vis Detectors :	Spectra-physics Analytical, Inc. (UV1000)
Column :	μ Bondapak TM C18 revers phase column (125Å, 10 μ m, 3.9×300mm), waters

Mobile phase

A solvent = MeOH : H₂O : MTBE = 95 : 1 : 4

B solvent = MeOH : H₂O : MTBE = 25 : 71 : 1

Injection volume : 20 μ l

temperature : room temp

Flow rate : 1 ml / min

Wave length : 445nm

Gradient table

Time(mim)	A(%)	B(%)
0	100	0
12	100	0
25	0	100
30	100	0

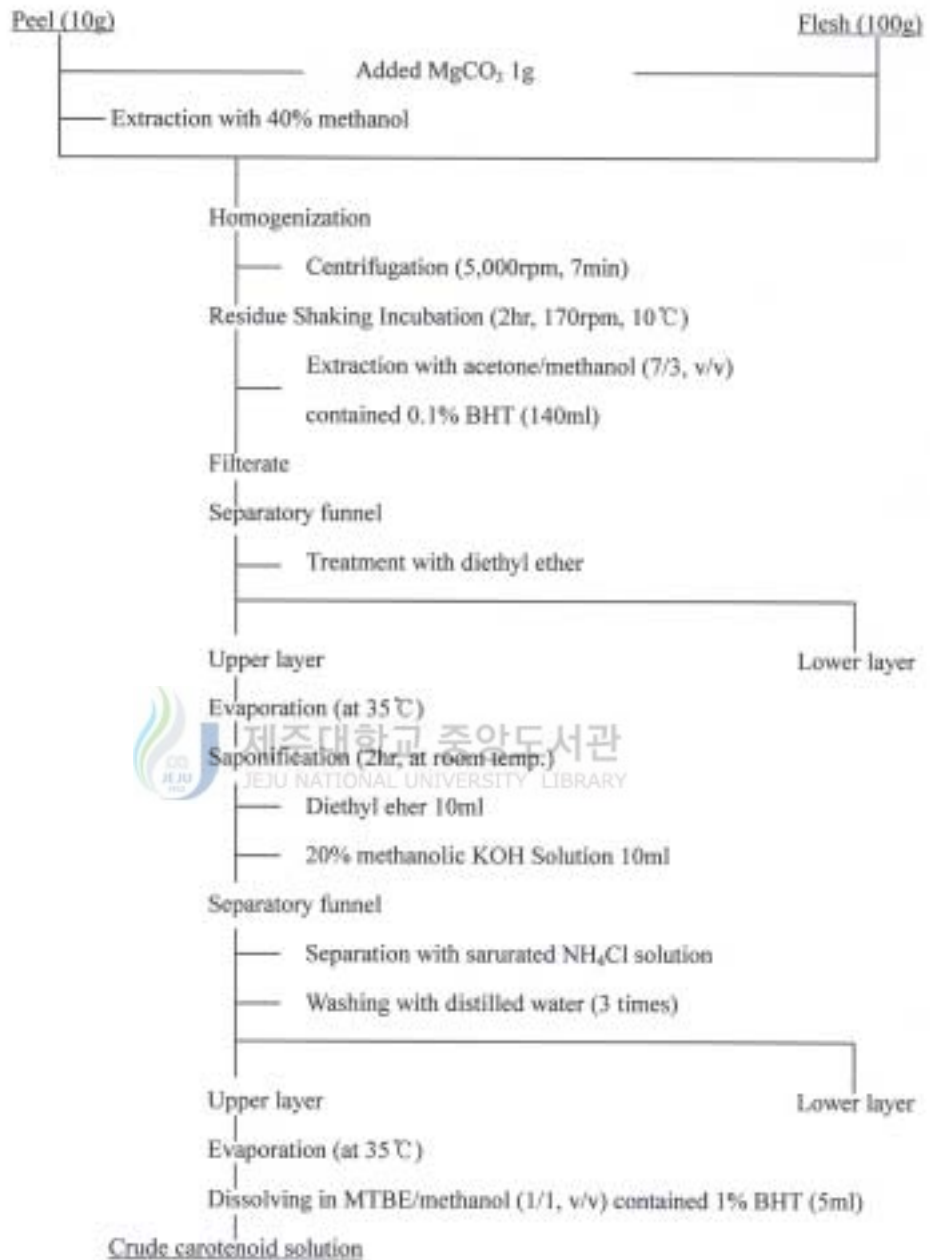
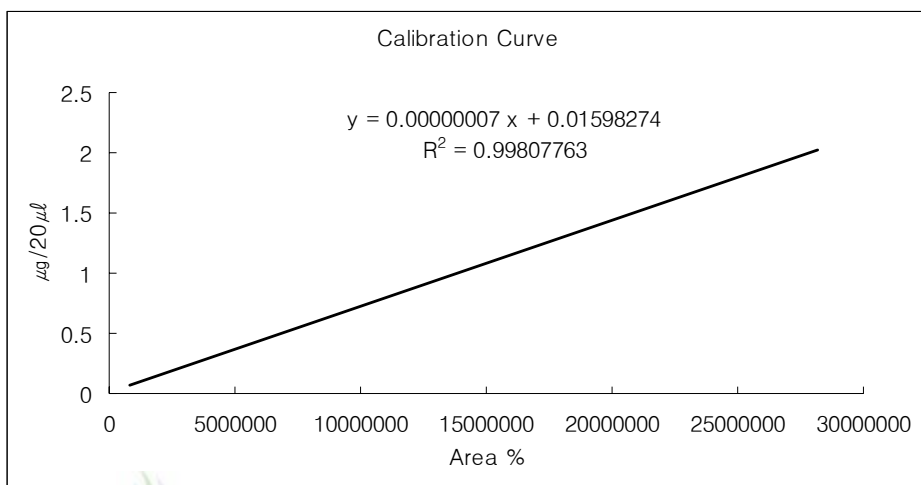


Figure 1. Extract scheme of carotenoids in peel and flesh of [(*C. unshiu* Marc × *C. sinensis* Osb) × (*C. reticulata* Blanco)].



제주대학교 중앙도서관
JCU INTERNATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 2. Standard Calibration of β -cryptoxanthin by HPLC

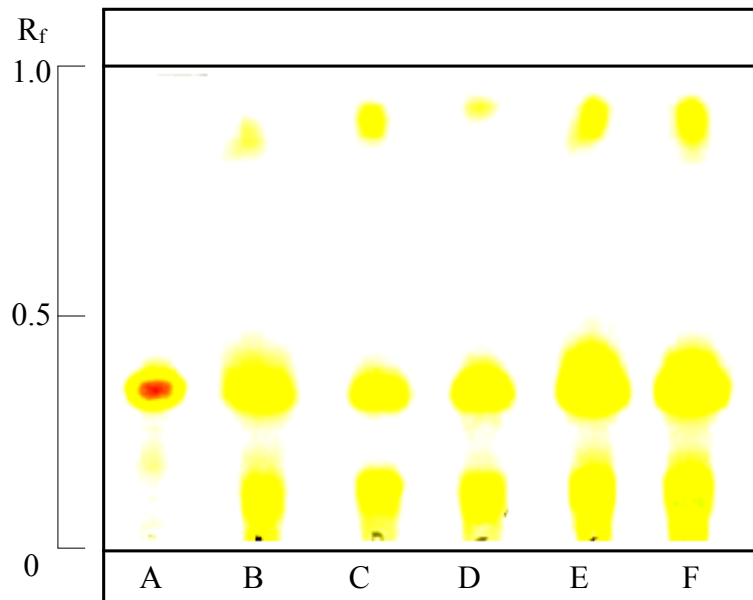


Figure 3. TLC chromatograms of standards of β -cryptoxanthin, and carotenoids peel of [(*C. unshiu* Marc \times *C.sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco)] varieties. A : Standard of β -cryptoxanthin, B : Oct. , C : Nov. , D : Dec. , E : Jan. , F : Feb.
TLC conditions : 1) Plate; Silica gel 60 F254 TLC (Merck), 2) Solvent system; Hexane/Acetone(75/25, v/v)

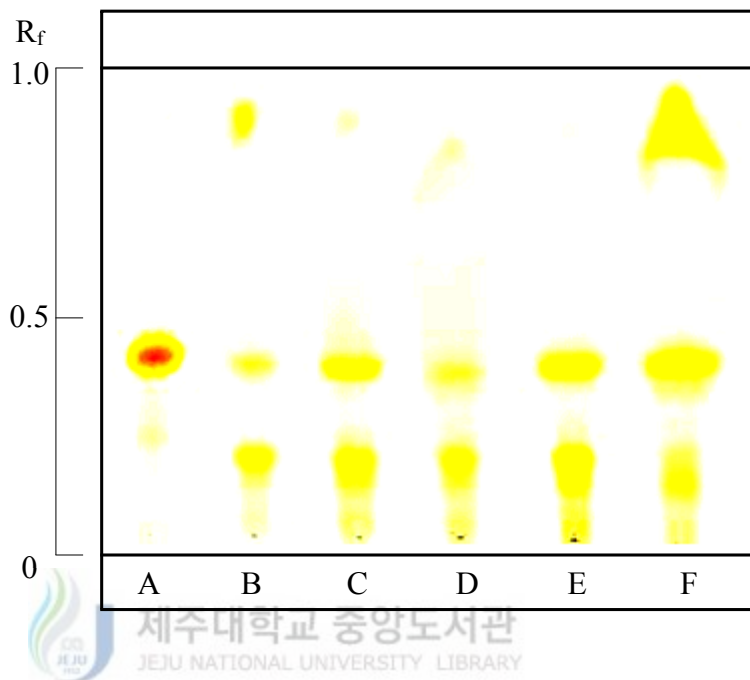


Figure 4. TLC chromatograms of standards of β -cryptoxanthin, and carotenoids flesh of [(*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco)] varieties.

A : Standard of β -cryptoxanthin, B : Oct. , C : Nov. , D : Dec. , E : Jan. , F : Feb.

TLC conditions : 1) Plate: Silica gel 60 F254 TLC (Merck), 2) Solvent system: Hexane/Acetone(75/25, v/v)

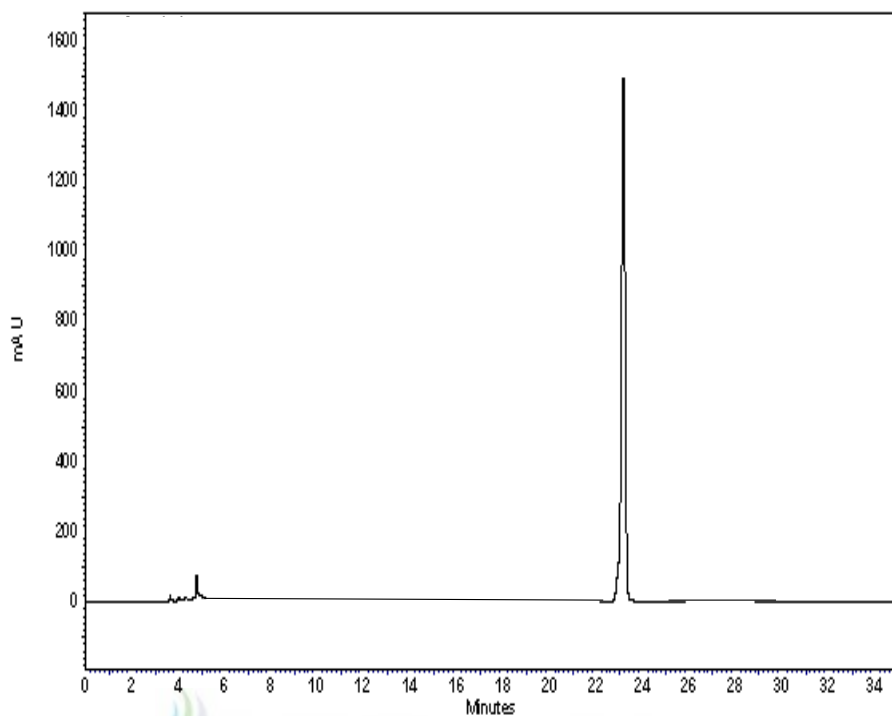


Figure 5. β -Cryptoxanthin content from flesh of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties. Standard of β -cryptoxanthin.

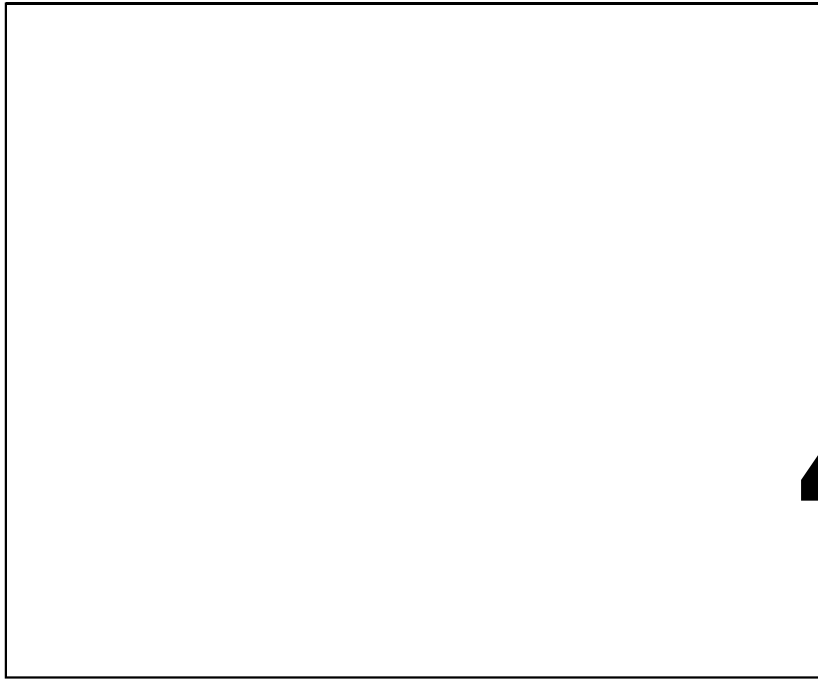




Figure 6. β -Cryptoxanthin content from flesh of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties, Oct.

Figure 7.  β -Cryptoxanthin content from flesh of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties. Nov.


90

Figure 8.  β -Cryptoxanthin content from flesh of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties, Dec.

400

Figure 9. β -Cryptoxanthin content from flesh of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties, Jan.

450

Figure 10.  β -Cryptoxanthin content from flesh of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties, Feb.

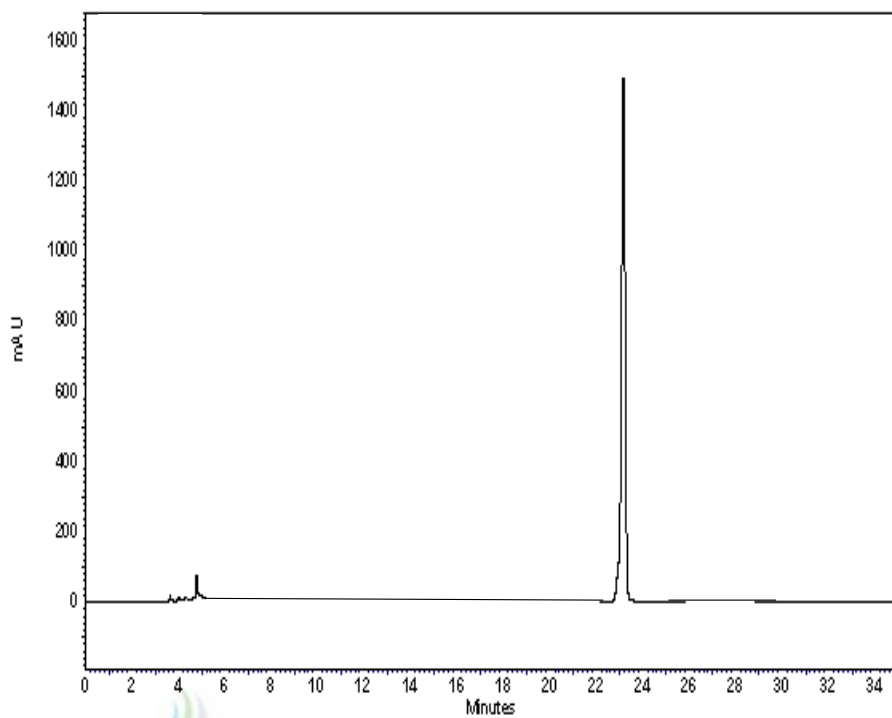


Figure 11. β -Cryptoxanthin content from peel of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties. Standard of β -cryptoxanthin

90

Figure 12. β -Cryptoxanthin content from peel of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties, Oct.

160

Figure 13. β -Cryptoxanthin content from peel of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties, Nov.

Figure 14. β -Cryptoxanthin content from peel of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties, Dec.

1600

Figure 15. β -Cryptoxanthin content from peel of (*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties, Jan.



Figure 16. β -Cryptoxanthin content from peel of (*C. unshiu* Marc \times *C.sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco) varieties, Feb.

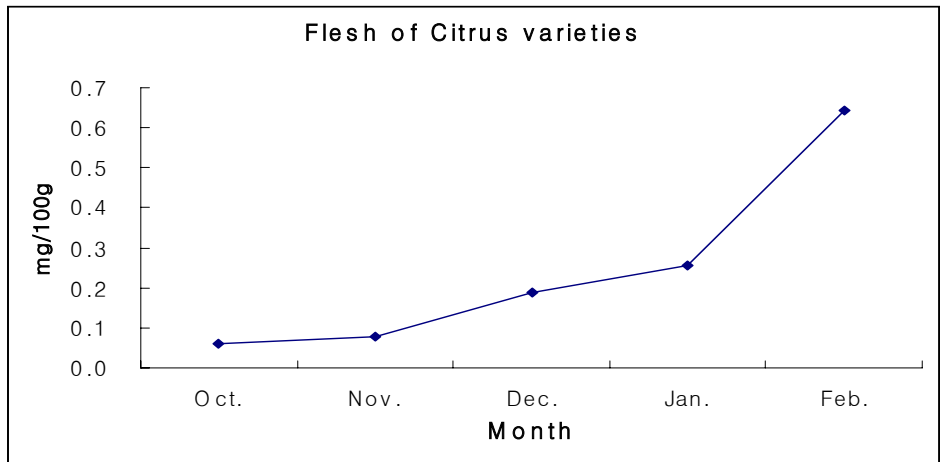


Figure 17. β -Cryptoxanthin content from flesh of [(*C. unshiu* Marc \times *C. sinensis* Osb) \times (*C. reticulata* Blanco)] varieties.

A : Oct. , B : Nov. , C : Dec. , D : Jan. , E : Feb.



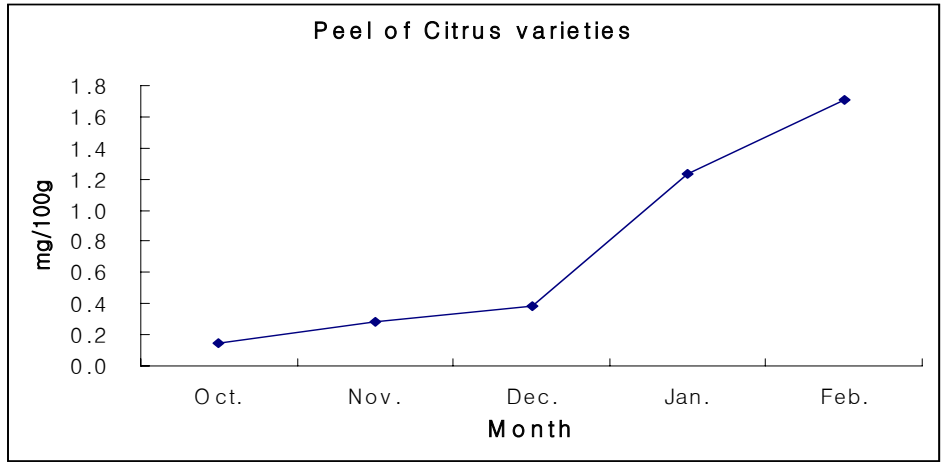


Figure18. β-Cryptoxanthin content from flesh of [(*C. unshiu* Marc × *C. sinensis* Osb) × (*C. reticulata* Blanco)] varieties.
 A : Oct. , B : Nov. , C : Dec. , D : Jan. , E : Feb.



IV. References

1. Berg, H. V. D. 1999. Carotenoid interactions. *Nutr. Rev.* 57:1-10
2. Cooper, D. A., Eldridge, A. L. and Peters, J. C. Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: A reviews of recent research. *Nutr. Rev.* 57:201-214(1999)
3. Cottin, R, Citrus of the World. A Citrus directory Version 2.0, pp. 22-53. SRAINRA-CIRAD, France (2001)
4. Cunningham, Jr. F. X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. A., DellaPenna, D. and Gantt, E. 1996. Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell.* 8:1613-1626
5. Dorgan, J. F., Swanson, C. A., Potischman, N., Miller, R., Schussler, N. and Stephenson, H.E. Relation of serum carotenoids, retinol, α -tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a prospective stud in Colombia, Missouri USA cancer Causes control 9:89-97(1998)
6. Hart, D., J. and Scott, K., J Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.* 54:101-111(1995)
7. Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol.* 4:210-218
8. Ko, K-C., Kim, C-S., Lee, N. H., Lee, S-P. and Moon, D-K. Determination of β -Cryptoxanthin in peel and flesh of citrus fruits produced in Cheju Island. *Food Sci. Biotdchnol.* 9:288-291(2000)
9. Krinsky, N. I., Russett, M. D. and Handelman, G. J. Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. *J. Nutr.* 120:1654-1662 (1990)8.
10. Matsumura, H., Takeyama, H., Kusakabe, E., Burgess, J. G.,

- Matsunaga, T. 1997 Cloning, sequencing and expressing the carotenoid biosynthesis genes, lycopene cyclase and phytoene desaturase, from the aerobic photosynthetic bacterium *Erythrobacter longus* sp. strain Och 101 in *Escherichia coli*. *Gene*. 189-169-174
11. Nishino, H., Tokuda, H., and Yano, M. Anti-tumor promoting effect of cryptoxanthin, a natural carotenoid. The fourth joint meeting conference of the American association innovative approaches to the prevention, diagnosis, and therapy of cancer(1998)
 12. Nishino, H., Tokuda, H., Murakoshi, M., Satomi, Y., Masuda, M., Cancer prevention by natural carotenoids. *Biofactors* 13:89-94(2000)
 13. Nogata Y., Yoza, K. I., Kusumoto, K. I., Kohyama, N., Sekiya, K. and Ohta, H. Screening for inhibitory activity of citrus fruit extracts against platelet cyclooxygenase and lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.* 44:725-729(1996)
 14. Philip, T., and Chen, T.-S. Separation and quantitative analysis of some carotenoid fatty acid esters of fruits by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 432:113-126(1998)
 15. Pupin, A. M., Dennis, M. J. and Toledo, M.C.F. HPLC analysis of carotenoids in orange juice. *Food Chem.* 64:269-275 (1999)
 16. Rauscher, R., Edenharder, R. and Platt, K. L. In vitro antimutagenic and in vitro anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutation Res.* 413:129-142(1998)
 17. Riso, P. and Porrini, M. Determination of carotenoids in vegetable foods and plasma. *J. Vit. Nutr. Res.* 67:47-54 (1997)
 18. Slattery, M. L., Benson, J., Curtin, K., Ma, K.-N., Schaefer, D., and Potter, J. D. Carotenoids and colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:575-582(2000)
 19. Stewart, I. High performance liquid chromatographic determination of provitamin A in orange juice. *J. AOAC.* 60:132-126(1998)
 20. Stewart, I. provitamin A and carotenoid content of citrus juices. *J.*

- Agric. Food Chem. 25:1132-1137 (1977)
21. Sumida, T., Azuma, Y., Ogawa, H. and Tanaka, T. Inhibitory effects of β -Cryptoxanthin rich powder prepared Satsuma Mandarin(Citrus Unshiu Marc.)juice on azoxymethane-induced aberrant crypt foci of rats. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 46:473-479(1999)
 22. Sun, Z., Gantt, E. and Cunnungham, Jt. F. X. 1996. Cloning and functional analysis of the β -catotene hydroxylase of Arabidopsis thaliana. J.Biol. Chem. 271(40):24349-24352
 23. Tee, E. S., and Lim, C. L. The analysis of carotenoids and retinoids: A review. Food Chem. 41:147-193(1991)
 24. Thomas,W., Wilhilm, S and Helmut, S. β -Cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerine concentrate rich in β -Cryptoxanthin esters. Arch. Biochem. Biophy. 324:385-390 (1995)
 25. Thurnham, D. I., Smith, E. and Flora, P. S. Concurrent liquid-chromatographic assay of retinol, α -tocopherol, β -carotene, α -carotene, lycopene, and β -Cryptoxanthin in plasma, with tocopherolacetate as internal standard. Clin.Chem.34:377-381(1998)
 26. Whang, H-J. and Yoon, K-R. Carotenoid pigment of citrus fruits cultivated in Korean. J. Food Sci. Technol. 27:950-957 (1995)
 27. Zhu, C., Yamamura, S., Koiwa, H., Nishihara, M., and Sandmann, G. 2002. cDNA cloning and expression of carotdnogovic genes during flower development in Gentiana lutea. Plant Mol. Biol. 48:277-285
 28. 제주도 농업기술원. 2003. 한라봉재배현황.
 29. 박원표. 2003. 질소 결핍이 부지화[(C. unshiu Marc × C.sinensis Osb)×(C. reticulata Blanco)]의 생육과 양분흡수에 미치는 영향제주대학교 대학원 석사 학위 논문.
 30. 河瀬憲次. 1999. デコポンおつくりこなす。農文協, 213.pp

감사의 글

직장을 다니며 학업을 다시 시작해야 되겠다는 마음을 먹고 어렵게 산업대학원에 입학하게 되었습니다. 그리고 대학원생활을 하면서 부족한 저를 아낌없는 지도와 사랑으로 이끌어 주신 김찬식 지도교수님 마음 깊이 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 여러방면으로 도와주신 현해남 교수님, 류기중교수님, 고정삼교수님, 이효연교수님, 송관정교수님 너무나도 감사합니다.

산업대학원 생활을 하면서 또 다시 많은 경험을 하게 되었습니다. 신설학과인 응용생물산업학과 조교를 하게 되었고, 학생들에게도 올바르게, 진취적인 사고를 갖도록 노력하였습니다. 또한 학과행정일을 하면서 저 나름대로 만족을 느끼며 열심히 근무를 하였습니다. 또한 여러 조교선생님들을 알게 되었고 저에게는 많은 도움이 되었습니다.

논문을 준비하면서 실험을 하게 되었고 실험을 하다보니 기초과학의 중요성과 폭넓은 분야를 조금이나마 알게 되었습니다. 또한 실험을 하면서 부족한 부분을 채워준 허지만후배, 양권민후배, 홍종민후배, 김유왕후배에게도 감사의 인사를 이렇게 글로 대신하며, 고석형조교선생님, 친구인 부경환과 강태우에게도 감사의 마음을 전합니다.

산업대학원 생활은 저에게는 너무나도 소중한 시간이었고 저의 인생에 있어 많은 도움이 되리라 마음속으로 다시 한번 다짐을 해봅니다.

마지막으로 저를 낳아주시고 늘 사랑으로 지켜주셨던 아버님과 하늘에 계신 어머님, 저에게 큰 힘이 되어준 아내 강경희, 귀여운 진영, 진서에게도 고마움을 전하며 이 논문을 바칩니다.