



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

부지화와 세토카 감귤의 유리당 ·
유기산 · 플라보노이드 분석 및 정유의
생리활성 연구

濟州大學校 教育大學院

化學教育專攻

姜美愛

2012年 8月

부지화와 세토카 감귤의 유리당 ·
유기산 · 플라보노이드 분석 및 정유의
생리활성 연구

指導教授 姜 昌 禧

姜 美 愛

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함

2012年 8月

姜美愛의 教育學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 印

委 員 _____ 印

委 員 _____ 印

濟州大學校 教育大學院

2012年 8月

Analysis of Free Sugars, Organic Acids
and Flavonoids in Shiranuhi and Setoka
Citrus Fruits, and Bioactivity of Essential Oil

Mi Ae Kang
(Supervised by Professor Chang-Hee Kang)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Education

2012. 8.

This thesis has been examined and approved.

MAJOR IN EDUCATION OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

국 문 초 록

고품질 만감류인 부지화와 세토카의 유리당, 유기산, 플라노이드 성분을 분석하고, 에센셜 오일의 항산화 및 항균 활성 확인을 통해 기능성 소재 가능성을 검토하였다. 부지화와 세토카 과즙의 유리당 함량을 분석한 결과, 각각 11.8%, 11.5%로 서로 비슷한 수준을 나타내었고, 유기산 함량은 각각 1.31%, 1.68%로 세토카가 더 높은 농도를 나타내었다. 그리고 이를 기초로 환산한 당산비는 부지화가 8.7, 세토카가 7.0으로 부지화가 더 높은 수준을 나타내었다. 과육과 과피의 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 총플라보노이드는 두 품종 모두 과육보다 과피에서 더 높았고, 부지화보다는 세토카에서 1g 당 54.28 mg Naringin으로 더 높은 함량을 나타내었다. 주요 플라보노이드 성분은 narirutin과 hesperidin이었으며, 대체적으로 두 성분의 합이 총플라보노이드와 유사한 값을 나타내었다.

부지화와 세토카 감귤의 미숙과 및 완숙과 껍질에서 추출한 에센셜 오일의 주요 성분은 dl-limonene, sabinene, linalool, 4-terpineol 등으로 확인되었고, 이들 중 limonene의 함량이 75% 이상으로 가장 높았다. 에센셜 오일의 항산화능을 측정한 결과, 부지화 감귤의 SC₅₀ 값은 완숙과에서 65.5 μ L/mL, 미숙과에서 36.1 μ L/mL이었고, 세토카의 SC₅₀ 값은 완숙과 40.3 μ L/mL, 미숙과 35.3 μ L/mL로 두 품종 모두 완숙과보다는 미숙과 껍질의 활성이 더 우수한 것으로 조사되었다. 또한 에센셜 오일의 항균활성을 조사해 본 결과, 전체적으로 활성을 보였고 특히 내성균주에 대한 항균력이 큰 것으로 확인되었다.

목 차

LIST OF TABLES	iii
LIST OF FIGURES	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. 시약 및 기기	4
2. 재료	4
3. 성분분석	
3-1-1. 유리당 함량 분석	7
3-1-2. 유기산 함량 분석	8
3-2. 총 플라보노이드 함량 분석	10
3-3. 플라보노이드 성분 분석	11
3-4. 정유성분 분석	14
3-5. DPPH 활성 검색	15
3-6. 항균활성 측정	16
3-7. 최소억제농도 측정	17
3-8. 통계분석	17
III. 결과 및 고찰	
1. 유리당과 유기산 함량 분석	19
2. 총 플라보노이드 함량 분석	23
3. 플라보노이드 성분 분석	24
4. 정유성분 분석	29
5. DPPH 활성 검색	33
6. 항균활성 측정	35

IV. 결론	37
V. 참고문헌	39
ABSTRACT	43

LIST OF TABLES

Table 1. Ion Chromatography conditions for free sugars analysis	8
Table 2. Ion Chromatography conditions for organic acids analysis	9
Table 3. HPLC conditions for the flavonoid analysis	12
Table 4. Gradient elution conditions for the separation of flavonoids	12
Table 5. GC-MSD conditions for the analysis of major essential oil components	14
Table 6. List of microorganisms used for antimicrobial activity	16
Table 7. Contents of major free sugar species in shiranuhi and setoka citrus fruits	20
Table 8. Contents of major organic acid species in shiranuhi and setoka citrus fruits	20
Table 9. Flavonoid contents in shiranuhi and setoka citrus fruits	25
Table 10. Retention time and peak area ratio of GC-MS total ion chromatograms for the essential oil components in Shiranuhi citrus fruit	31
Table 11. Retention time and peak area ratio of GC-MS total ion chromatograms for the essential oil components in Setoka citrus fruit	32
Table 12. Antimicrobial activities of shiranuhi essential oil on several microorganisms	35
Table 13. Antimicrobial activities of setoka essential oil on several microorganisms	36

LIST OF FIGURES

Figure 1. Chemical structures of Citrus flavonoids	3
Figure 2. Picture of shiranuhi and setoka	6
Figure 3. Standard calibration curves for the analysis of free sugars	8
Figure 4. Standard calibration curves for the analysis of organic acids.....	10
Figure 5. Curve for gradient elution using 0.1% acetic acid and acetonitrile solvents	13
Figure 6. Paper disc diffusion and minimum inhibitory concentration tests	14
Figure 7. Ion Chromatograms of free sugar species in standard material	21
Figure 8. Ion Chromatograms of organic acid species in standard material	22
Figure 9. Contents of total flavonoid contents in shiranuhi and setoka citrus fruits	23
Figure 10. HPLC chromatograms of flavonoids	26
Figure 11. HPLC chromatograms of flavonoids	27
Figure 12. Contents of flavonoids in shiranuhi and setoka citrus fruit	28
Figure 13. Major constituents of the essential oil in shiranuhi and setoka citrus fruit	30
Figure 14. DPPH radical scavenging activity for essential oil in shiranuhi citrus fruit	33
Figure 15. DPPH radical scavenging activity for essential oil in setoka citrus fruit	34

I. 서론

제주도에서 재배되는 감귤류는 전체 과수 생산량의 30%를 차지하고 있으며, 이들 중 80-85%는 생식용으로, 20-25%가 가공용으로 소비되고 있다.²⁴ 감귤류는 유기산과 당분의 독특한 향미와 풍부한 과즙, 다량의 비타민 C를 함유하고 있어 생과와 과즙음료의 원료로서 널리 이용되고 있다.²⁵ 이러한 제주 감귤은 대부분 온주밀감 위주로 재배되어 왔다. 그러나 최근에는 수입자유화와 다양한 과실들과의 경쟁이 치열하게 전개되면서 품질 높은 과일의 선호도가 높고, 온주밀감만으로 경쟁에 어려움이 있어서 고품질 감귤인 만감류 재배가 꾸준히 증가하고 있다⁴. 특히 최근 만감류 중에서도 세토카(Setoka, 천혜향)와 부지화(Shiranuhi, 한라봉)가 가장 많이 재배되고 있어서 이들의 상품성과 가치를 향상시키기 위한 다양한 노력이 필요한 것으로 보인다. 감귤의 상품가치를 향상시키기 위해서는 감귤의 주요 성분인 유리당, 유기산 등의 정량적인 분석을 통해 타 감귤류와 비해 이들 품종들의 우수성을 검증할 필요가 있다. 그리고 이들 품종에서 추출한 플라보노이드, 정유 성분들의 생리활성을 확인하고 새로운 기능성 소재로서의 활용 가능성을 평가하는 것 역시 중요한 검토 사항이다.

감귤류의 과피는 전 과실의 약 20~50%를 차지하고 있으며, 특히 감귤에는 hesperidin, rutin, narirutin, naringin, neohesperidin 등과 같은 flavonoid가 다량 함유되어 있다(Figure 1). 그리고 향기성분으로 d-limonene 등의 여러 limonoid류를 다량 함유하고 있고, 색소성분으로 carotenoid계 물질을 함유하고 있다. 최근에는 이러한 물질들의 생리활성에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 기능성 식품으로서의 가치가 재조명 되고 있다.^{14, 34}

Flavonoid류 물질의 종류는 약 4,000종 이상이 알려져 있고, 감귤에서도 60여종이 함유되고 있는 것으로 알려져 있다. flavonoid류는 담황색이나 노란색을 나타내는 색소화합물로서 식물 중에는 당과 결합된 배당체 형태로 함유되어 있으며, 섭취 시 별다른 부작용이 없는 것으로 알려져 있다.^{2,22} 감귤류 flavonoid의 성분은 주로 hesperidin, neohesperidin, naringin 등이며 기존의 연구에서도 주로 이들을 중심으로 분석 및 연구가 이루어져 왔다.^{11,23,28,31} 감귤류 flavonoid

의 기능성에 대한 연구로는 항산화 작용^{1,13}, 고지혈증 억제작용¹⁶, 항균효과¹², 혈압강화 효과³⁰ 등의 다양한 생리활성이 보고되고 있다.

또한 감귤 과피에는 carotenoid, bioflavonoid, pectin, terpene 류 등이 과육보다 풍부하게 함유되어 있다. 그러나 이러한 중요한 기능성 물질들을 함유하고 있는 감귤 과피는 그 일부가 한약재로 쓰이는 것 외에는 대부분 자연에 투기 또는 방치됨으로써 오히려 환경오염 문제를 야기하고 있다.¹⁹ 최근에는 이를 가축사료나 토양 비료로 이용하는 등 활용을 위한 다양한 시도가 이루어지고 있다. 그러나 아직까지는 이를 활용하기 위한 적절한 방법들이 다양하게 제시되지 못하고 있는 실정이고, 좀 더 효율적이고 친환경적인 방법들에 대한 연구 필요성이 대두되고 있다.

이에 본 연구에서는 소비와 함께 부산물로 발생하는 감귤 과피의 활용 방안을 모색하기 위한 목적으로 과피에서 정유성분을 추출하여 새로운 기능성 소재로서의 가능성 검토를 위한 연구를 수행하였다. 특히 고품질 감귤을 생산하기 위해 열매숙기를 하는 과정에서 다량으로 발생하는 미숙과에 대한 활용 가능성을 중점적으로 모색하였다.

감귤 정유는 과피 내 flavonoid(과피 색소층)에 산재되어 있는 무수한 유포 층에 약 1%가 함유되어 있는 방향성 성분이다. 그리고 동일 감귤 종(species)내에서도 기후, 풍토, 과실의 숙도, 저장기간 등에 따라 성분의 변화가 있으며²⁰, 살균⁸, 살충효과¹⁰ 같은 다양한 생물활성을 가지고 있어서 세정제, 식품향료, 의약품 등에 첨가제로 이용되고 있다¹⁷. 감귤 정유의 주성분은 리모넨(d-limonene)이며, 그 외에 aldehyde, alcohol, ester, ketone 등의 다양한 방향물질과 이들을 용해하여 주고 있는 terpene류와 왁스를 함유하고 있다⁹. 감귤류 과피에 많이 포함되어 있는 것으로 알려진 limonene은 중추신경의 흥분을 진정시켜주며 항암작용이 있는 것으로 알려져 있는데, 상쾌한 향과 인체에 대한 무독성 때문에 향수, 방향제, 비누 등의 화장품과 식품산업 등에 널리 사용되고 있다.²⁹

본 연구에서는 주로 온주밀감 위주의 제주 감귤이 최근에 고품질 만감류 재배로 대체되는 추세에 따라 부지화와 세토카 만감류를 대상으로 주요 성분들을 정량적으로 분석하고자 하였다. 또한 이들의 에센셜 오일의 항산화 및 항균활성 검

증을 통해 새로운 기능성 소재로서의 가능성을 검토하기 위한 연구를 수행하였다. 이를 위해 부지화과 세토카 육질의 여러 유리당과 유기산 성분 함량을 분석하였다. 그리고 두 품종의 완숙과와 미숙과 과피로부터 정유를 추출하여 성분분석을 실시하고, 이들의 생리활성 확인을 통해 새로운 기능성 소재로서의 활용 가능성을 검토하였다.

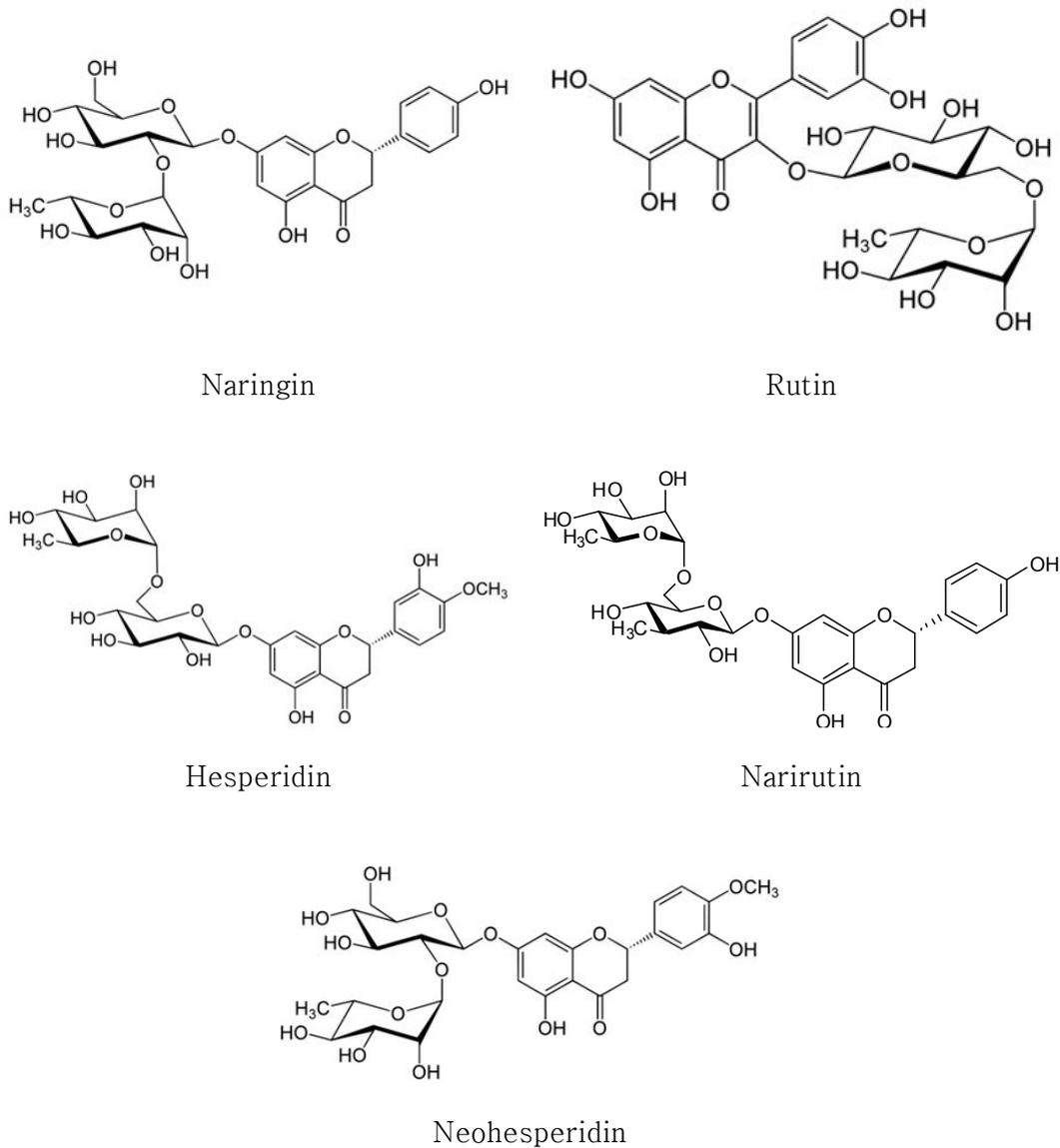


Figure. 1. Chemical structures of Citrus flavonoids

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

시료의 추출에 사용된 용매는 Merck의 제품을 사용하였다. 시료의 유리당 유기산 함량 분석에 사용된 IC(Ion Chromatography)는 ICS-3000(Dionex, USA)을 사용하였으며 이동상과 재생액에 사용된 용매는 Merck, Fluka 및 Pierce의 제품을 사용하였다. 플라보노이드 함량 분석에 사용된 HPLC(High performance liquid chromatography)는 e2695 Separations module(Waters, USA)을 사용하였으며, 이동상에 사용된 용매는 Merck의 제품을 사용하였다. 그리고 정유성분 분석에는 모델 7890A GC system(Agilent, USA) GC-MSD를 사용하였다. 또 향균 및 향산화 활성 검색에는 Thermo Electron labsystems사의 모델 Multiskan EX UV-visible spectrophotometer(ELISA reader)를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 부지화 (Shiranuhi, [*Citrus unshiu* x *Citrus sinensis*] x *Citrus reticulata*)와 세토카 (Setoka, [[*Citrus unshiu* x *Citrus sinensis*] x *Citrus reticulata*] x [*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*])는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 2011년 2월에 채집하여 사용하였으며, 미숙과는 같은 해 9월 서귀포시 농가에서 채집하여 사용하였다. Flavonoid 함량 분석은 완숙과를 각각 과피와 과육으로 나누어 건조 시킨 후 분쇄하여 사용하였고, 에센셜 오일은 각각의 완숙과와 미숙과의 과피를 증류정유추출장치를 사용하여 3시간 동안 추출한 후 추출한 후 갈색병에 담아 4℃ 보관하여 실험에 사용하였다.

2-1. 부지화

부지화는 1973년 일본 과수시험장 구치노쓰 지장에서 청견×폰칸(중야3호)를 교배하여 육성한 교잡종으로서 만다린계통의 일종이다. 일본에서는 처음에 꼭지 깃이 튀어나온 과실모양을 나타내어 ‘데코폰’ 이라고 불렀으나, 1990년에 품종 이름을 ‘부지화(不知火 : shiranuhi)’라고 명명하였다. 그렇지만 품종등록을 받지 않았기 때문에 지적재산권에 해당되는 품종보호대상이 되지 않는다. 제주도에 는 1991년에 일본 사가현 과수품종육성센터를 통하여 공식적으로 도입되기 시작하여 1997년에는 80 ha에서 500톤 정도 생산됨으로서 본격적인 출하가 이루어졌는데 이때 부지화 꼭지 모양이 한라산 정상 의 봉우리와 비슷하다고 하여 「한라봉」이라는 상표명을 붙여 판매되기 시작하여 1998년 10월에 부지화 감귤상표명칭 선정심사위원회에서 한라봉으로 상표명칭이 결정되었고, 지금까지 출하와 판매에 이 명칭을 사용하고 있다. 부지화는 과즙의 당도가 다른 감귤보다 높고 씹는 맛이 좋을 뿐 아니라 향기가 좋으며 과실 크기에 비해 껍질 벗기기도 쉬워 소비자로부터 높은 평가를 받고 있다⁵.

2-2. 세토카

세토카는 교잡육종으로 선발되었는데 「청견×양콜」을 교배모친으로 하여 육성한 품종에 마코트를 다시 교잡시켜 육성된 품종이다. 고당도 품종인 양콜과 마코트는 숙기가 4월로 매우 늦을 뿐만 아니라 노지에서 재배하면 제대로 특성을 발휘하지 못하기 때문에 가온이나 무가온 하우스에서 재배되고 있듯이 세토카도 하우스재배가 필요한 품종이다. 세토카의 이름은 품종을 육성한 일본 과수시험장 구치노쓰지장에서 가까운 瀬戸(세토)라는 지명이 해안지역으로 재배가 확대된 것에서 유래하였다고 한다. 그러나 제주도에서는 세토카를 백록향, 미래향, 탐

라향 등 여러 상표로 본격 출하되고 있는데 상표명이 많아 농협중앙회 제주지역 본부와 (사)제주감귤협의회에서 공모하여 공동브랜드명을 2005년 9월 15일부터 「천혜향」으로 명명하여 육성하고 있다.

육성품종의 과실은 200~280g이며, 과실모양은 편원형이다. 과피의 면은 매끈하고 속기는 3월 상순부터 3월 하순이며 진하고 깊은 맛이 있다. 과즙의 당도는 13°Bx 정도로 고당도이다⁴.



부지화(Shiranuhi)

세토카(setoka)

Figure 2. Picture of shiranuhi and setoka

3. 성분분석

3-1. 유리당과 유기산 함량 분석

유리당과 유기산의 함량은 이온크로마토그래피법으로 분석하였다. 분석 시료는 부지화와 세토카 감귤 각각의 착즙액을 증류수로 1000배 희석하고 0.45 μm PVDF filter(millipore)로 여과한 후 Ion Chromatograph(Dionex, 모델 ICS-3000, USA)를 이용하여 분석하였다.

3-1-1. 유리당 함량 분석

유리당은 CarboPac™ PA1 4x250 mm Analytical 분리관, 1000 mM NaOH와 증류수 용리액, amperometry(전류법)로 검출기를 이용하여 분석하였다(Table 1 참조). 유리당 성분은 감귤류에 많이 포함된 단당류 glucose와 fructose, 이당류인 sucrose를 대상으로 분석하였고, 정량분석을 위한 검정곡선용 표준용액은 미국 Sigma사의 특급시약을 사용하여 glucose와 fructose는 12.5, 25, 50, 100 ppm, sucrose는 25, 50, 100, 200 ppm 농도로 조제하였다. 그리고 과즙 시료의 농도범위는 사용한 표준용액의 농도범위와 일치하도록 증류수를 적절히 희석하여 사용하였고, 각 성분별로 3회 반복측정 후 평균한 농도를 산출하였다.

Table 1. Ion Chromatography conditions for free sugars analysis

Model	ICS-3000(Dionex)
Cloumn	CarboPac™ PA1 4x250mm, Analytical
Detector	INT Amperometry
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	10 μ L
Mobile phase	100 mM NaOH/ D.W

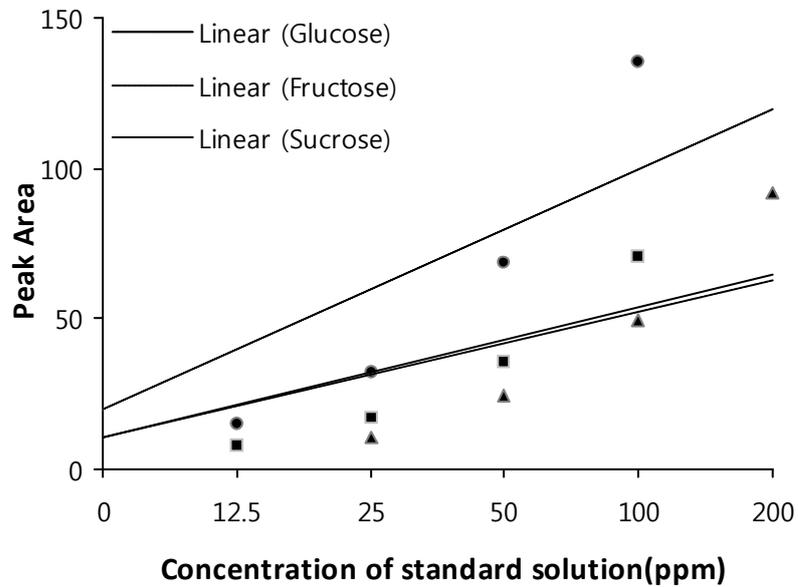


Figure 3. Standard calibration curves for the analysis of free sugars.

3-1-2. 유기산 함량 분석

유기산 성분은 IonPac® ICE-AS6 9x250 mm Ion Exclusion 분리관, 0.4 mM Heptafluorobutric acid 용리액, conductivity(전도도법) 검출기를 이용하

여 분석하였다(Table 2 참조). 유기산은 oxalic acid, malic acid, citric acid 3종을 대상으로 분석하였고, 정량분석을 위한 검정곡선 작성용 표준용액은 Sigma사의 특급시약으로 각각 2.5, 5, 10, 20 ppm 농도로 조제하여 사용하였다. 이때 과즙 시료의 농도는 유리당 분석에서와 동일하게 표준용액의 농도범위와 일치하도록 증류수로 희석하여 사용하였고, 각 성분별로 3회 반복실험 후 평균농도를 산출하였다.

Table 2. Ion-Chromatography conditions for organic acids analysis

Model	ICS-3000 (Dionex)
Column	IonPac® ICE-AS6 9x250mm, Ion Exclusion
Detector	conductivity
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	10 μ L
Mobile phase	0.4 mM, Heptafluorobutric acid

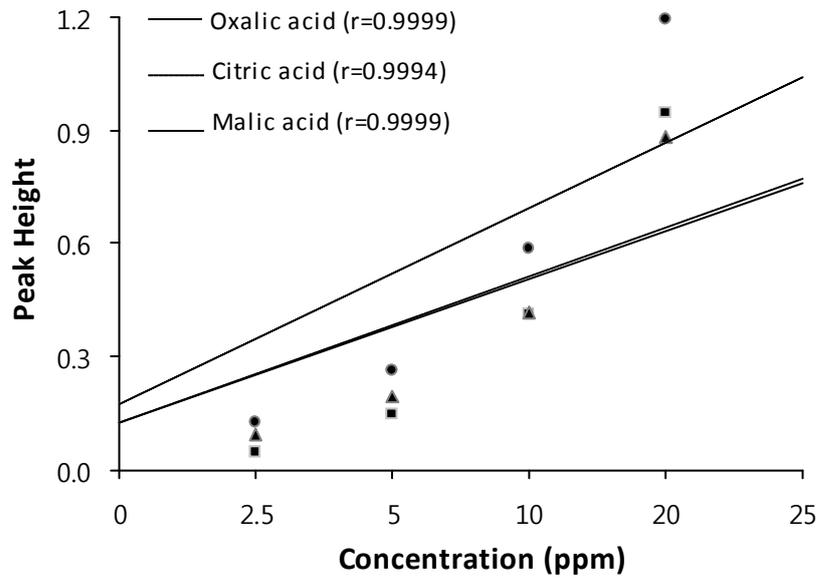


Figure 4. Standard calibration curves for the analysis of organic acids.

3-2. 총 플라보노이드 함량 분석

총 flavonoid 함량은 diethylene glycol 비색법을 이용하여 정량분석하였다²⁶. 분석용 시료는 부지화과 세토카 감귤의 과피와 과육을 분리하여 각각을 건조시킨 후 분쇄하여 준비하였다. 이렇게 분쇄한 분말시료를 70% MeOH로 1시간 동안 초음파 추출하여 0.22 μ m PVDF filter(millipore)로 여과한 후 감압농축하였다. 농축한 시료는 MeOH : DMSO = 1 : 1 인 용매를 사용하여 1 mg/mL가 되도록 조제한 후 이를 분석용 시료로 사용하였다. 시료 10 μ L에 diethylene glycol 1 mL, 1N NaOH 10 μ L를 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 1시간 동안 반응시키고, UV-Visible spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량분용 표준검정곡선은 naringin 표준용액을 사용하여 작성하였고, 각 시료에 대해 3회 반복실험을 실시한 후 평균값을 산출하였다. 그리고 총 flavonoid 함량은 건조시료 1 g 당 naringin 함량을 mg 단위로 나타낸 값 (mg naringin/g)으로 제시하였다.

3-3. 플라보노이드 성분 분석

부지화와 세토카의 Flavonoid 성분은 액체크로마토그래피법(HPLC)으로 분석하였다. HPLC 분석을 위한 부지화와 세토카 시료는 각각을 과피와 과육으로 분리하고, 이를 건조시켜 분쇄한 후 이용하였다. 분쇄 시료 1 g을 70% MeOH 10 mL에 넣고, 1시간 동안 초음파 추출하여 0.22 μ m PVDF filter(millipore)를 이용하여 여과한 후 이 여액을 분석하였다. Flavonoid 각 성분 분석에는 HPLC(Waters, 모델 e2695 Separations module, USA)를 이용하였고, YMC-Pack Pro C18 RS 분리관(250 \times 4.6 mm, S-5 μ m, 8 nm), UV-Visible Detector(Waters 2489)를 사용하였다. HPLC 분리 시 유속은 1 mL/min, 검출기 파장은 280 nm이며, acetonitrile과 0.1% acetic acid 용액을 사용하여 기울기 용리시켰고, 데이터 분석 S/W는 Waters의 Empower System을 이용하였다. 이러한 HPLC 기기분석 및 용리 조건은 Table 3 및 Table 4와 같다. 플라보노이드 성분의 정량분석은 감귤류에 많이 함유되어 있는 것으로 알려진 플라보노이드 성분의 정량분석은 감귤류에 많이 함유되어 있는 것으로 알려진 rutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, neohesperidin dihydrochalcone(NHDC), quercetin, apigenin, naringenin, hesperetin, nobiletin, tangeretin, auraptene 등 12종을 대상으로 분석하였다. 검정곡선 작성용 표준용액은 위의 12종 플라보노이드 성분들에 대해 Sigma사의 특급시약을 MeOH과 DMSO 용매에 녹여 각각 25, 50, 100, 200 ppm 농도가 되도록 희석하여 조제하였다.

Table 3. HPLC conditions for the flavonoid analysis

Instrumental	Conditions
Injection volume	10 μ L
Column	YMC-Pack Pro C18 RS 250 \times 4.6 mm, S-5 μ m, 8 nm
Mobile phase	Solvent A : acetonitrile Solvent B : 0.1% acetic acid
Flow rate	1.00 mL/min
Column Temperature	40 $^{\circ}$ C
Wavelength	280 nm
Detector	Waters 2489 UV-Visible (Waters, USA)
Separations Module	Waters e2695 (Waters, USA)

Table 4. Gradient elution conditions for the separation of flavonoids.

Time (min)	Flow (mL/min)	0.1% Acetic acid (%)	Acetonitrile (%)
0	1.0	90	10
5	1.0	75	25
30	1.0	60	40
35	1.0	0	100
43	1.0	90	10

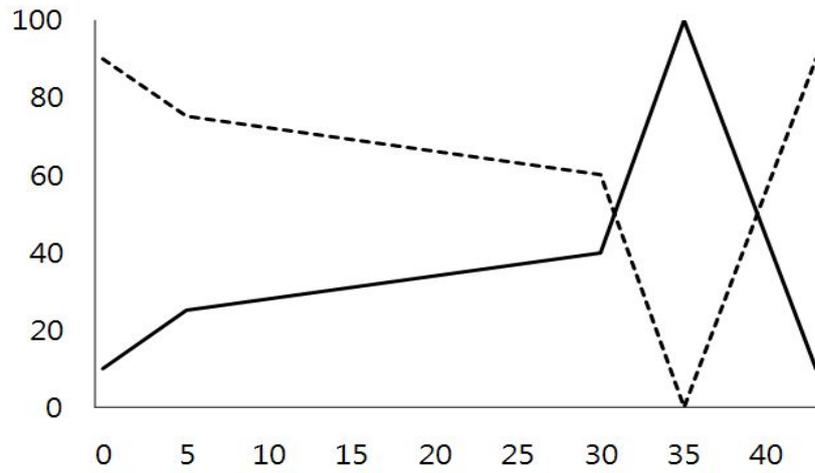


Figure 3. Curve for gradient elution using 0.1% acetic acid (dotted line) and acetonitrile (solid line) solvents.

3-4. 정유성분 분석

정유성분분석은 gas chromatography spectrometric detector(GC-MSD)에 의하여 분석하였다. Agilent Technologies 7890A GC System/5975C inert XL MSD with Triple-Axid Detector에 의해 분석하였다. Column은 세토카의 완속과와 미속과 오일은 HP-5MS(0.25 μ m x 30m x 0.25mm(ID)), 부지화의 완속과와 미속과 오일은 DB-17(0.25 μ m x 30m x 0.25mm(ID)), carrier gas는 He을 사용하여 유속 1.5 mL/min으로 하였다. 검출기 온도는 270 $^{\circ}$ C, temperature program은 40 $^{\circ}$ C에서 5분 유지하였고, 100 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/min 속도로 승온시켰다. 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지하였고, 230 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/min으로 승온시킨 후 230 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지하였다.

Table 5. GC-MSD conditions for the analysis of major essential oil compinents.

Instrumental	Conditions
GC-MSD	7890A GC System/5975C inert XL MSD with Triple-Axid(Agilent)
Column	setoka:HP-5MS(0.25 μ m \times 30m \times 0.25mm ID) shiranuhi:DB-17(0.25 μ m \times 30m \times 0.25mm ID)
Injection temperature	230 $^{\circ}$ C
Injection volume	1 μ L
Oven temperature	40 $^{\circ}$ C(5min) \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 100 $^{\circ}$ C(5min) \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 230 $^{\circ}$ C(5min)
Carrier gas flow	1.5mL/min(He)
Ionization voltage	70 eV
Spectrum library	Wiley
Monitoring mode	SIM mode

3-5. DPPH 활성 검색

감귤 성분의 항산화 활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging법에 의해 추출물의 라디칼 소거능을 측정하여 확인하였다. DPPH radical scavenging은 항산화 활성 측정을 위해 가장 광범위하게 이용되고 있으며, 특히 phenol과 aromatic amine의 항산화 활성 검색에 많이 이용되고 있다. DPPH는 자체 홀수전자에 의해 515 nm에서 강한 흡수 스펙트럼을 나타낸다. 그러나 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 받아 안정한 분자로 바뀌면서 흡수스펙트럼도 소멸된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH 색은 점점 열어지게 되고, 반응 액의 색이 노란색으로 변하는 것을 육안으로 확인할 수 있다. 이렇게 감소하는 흡광도 값을 측정함으로써 radical의 소거 활성을 알 수 있다.

DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 방법을 이용하였다.⁷ DPPH를 에탄올 용매에 0.2 mM 농도로 녹인 후, 다양한 농도의 시료에 대해 활성을 측정하였다. 준비된 0.2 mM DPPH와 시료를 섞고 실온에서 10분간 방치한 후 UV-Visible spectrophotometer를 사용하여 515 nm 에서 흡광도를 측정하였다. DPPH의 흡광도가 50% 감소 할 때 나타나는 시료의 농도 (SC₅₀)를 확인하였으며, 각 시료는 3회 반복실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 사용된 대조군으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect(\%)} = \{1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}/A_{\text{control}})\} \times 100$$

A_{control} : DPPH 용액의 흡광도

A_{sample} : DPPH 용액과 시료 반응액의 흡광도

A_{blank} : 시료자체의 흡광도

3-6. 항균활성 측정

에센셜 오일의 항균활성은 Paper disc diffusion method를 이용하여 측정하였다. 여드름 유발균인 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*에 대해 Piddock²⁷과 Kudo²¹ 등의 방법에 따라 paper disc법으로 생육 억제율을 측정하였다. 모든 균은 0.8% 한천(agar) 배지에 0.5 McFarland로 넣어 1.5% 한천을 포함하는 각각의 배지 위에 붓고, 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 8 mm의 멸균된 paper disc를 올려 37℃에서 24~48 시간 배양하였다. 그리고 디스크 주변에 형성된 원형 발육 저지 환의 크기를 비교하여 항균활성을 측정하였다. 이때 *P. acnes* 는 GAM 배지에서 혐기 배양하였고, *S. epidermidis* 는 TSA 배지에서 호기 배양하였다.

Table 6. List of microorganisms used for antimicrobial activity.

Strains	Drug-resistant patterns of skin pathogens (MIC; µg/mL)
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	Susceptible
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	Clindamycin (64)
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	Clindamycin (64)
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	Susceptible
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	Erythromycin (>32) Clindamycin (>16) Chloramphenicol (64)
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	Tetracycline (>32)

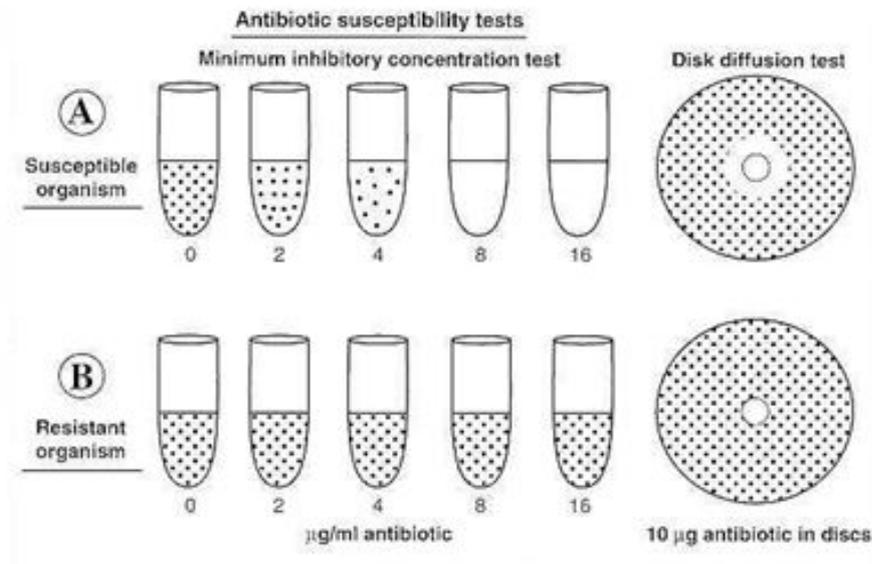


Figure 4. Paper disc diffusion and minimum inhibitory concentration tests.

3-7. 최소억제농도 측정

최소억제농도 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) 측정은 액체배지 희석법 (broth dilution method) 을 변형하여 사용하였다. *P. acnes* 와 *S. epidermidis* 를 각각의 배양배지와 조건에서 배양한 후 균 현탁액을 약 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL 농도로 희석하여, 최종농도가 10^5 CFU/mL 이 되도록 조절하였다. 다양한 농도의 시료를 처리하고 각 균주의 생육적온에서 배양 후, 균 증식이 나타나지 않는 최소농도를 MIC로 정하였다.

3-8. 통계분석

유리당, 유기산 함량분석, 항균활성 측정 및 최소억제농도 측정은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목별로 평균과 표준편차를 구하여 ‘평균 \pm 표준편차 (SD)’ 로 나타내었고, 95% ($p < 0.05$) 신뢰수준에서 통계적 유의차

를 평가하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 유리당과 유기산 함량 분석

감귤류의 당을 구성하는 주요 유리당은 glucose, fructose, sucrose 등이며, 유리당의 함량과 조성비는 식미에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.²⁹ 세토카, 부지화의 완숙과를 이용하여 과즙에 함유된 유리당과 유기산 성분의 함량을 이온 크로마토그래피법으로 분석하였고, 그 결과를 Table 7~8에 수록하였다. 그리고 유리당과 유기산의 이온 크로마토그램을 각각 Figure 5와 Figure 6에 나타내었다. Table 7의 결과와 같이 유리당은 세토카와 부지화 두 품종 모두 sucrose의 함량이 각각 7.02%, 6.42%로 가장 높은 농도를 나타내었다. 그리고 sucrose, glucose, fructose의 함량비가 약 2:1:1로 서로 비슷한 당 함량을 나타내었다. 반면에 유기산은 Table 8의 결과와 같이 두 품종 모두 citric acid의 함량이 각각 1.45%, 1.06%로 가장 높은 농도를 보였고 부지화보다는 세토카에서 citric acid의 함량이 더 높은 것으로 조사되었다.

또한 유리당과 유기산 모두의 함량을 전체적으로 비교해 본 결과 유리당은 세토카와 부지화에서 서로 비슷한 농도 수준을 나타내지만, 유기산 함량은 세토카에서 더 높게 나타났다. 그리고 식미감의 척도로 사용되고 있는 당산비를 비교해 본 결과에서는 세토카와 부지화의 당산비가 각각 7.0과 8.7을 보여 세토카보다는 부지화의 식미감이 다소 더 우수한 것으로 확인되었다.

Table 7. Contents of major free sugar species in shiranuhi and setoka citrus fruits.

(Unit : %)				
Citrus Fruits	Glucose	Fructose	Sucrose	Total
Shiranuhi	2.46±0.10	2.60±0.04	6.42±1.35	11.47±1.41
Setoka	2.34±0.16	2.40±0.21	7.02±0.54	11.76±0.91

(3 times injection per each sample)

Table 8. Contents of major organic acid species in shiranuhi and setoka citrus fruits.

(Unit : %)				
Citrus Fruits	Oxalic acid	Citric acid	Malic acid	Total
Shiranuhi	0.07±0.001	1.06±0.17	0.18±0.03	1.31±0.06
Setoka	0.08±0.08	1.45±1.45	0.16±0.16	1.68±0.14

(3 times injection per each sample)

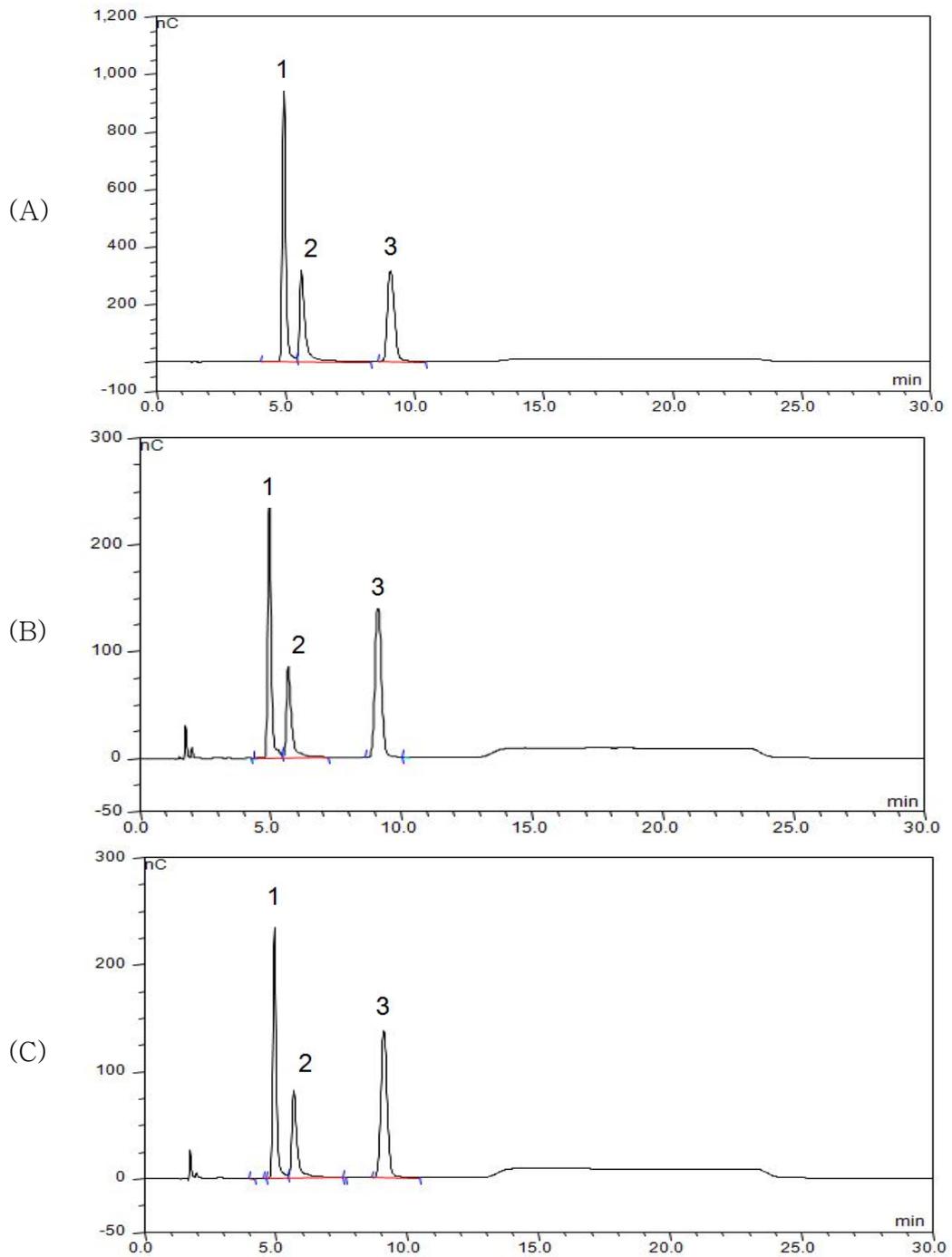


Figure 5. Ion Chromatograms of the free sugar species (1:glucose, 2:fructose, 3: sucrose) for standard material (A), Shiranuhi citrus fruit (B), and Setoka citrus fruit (C).

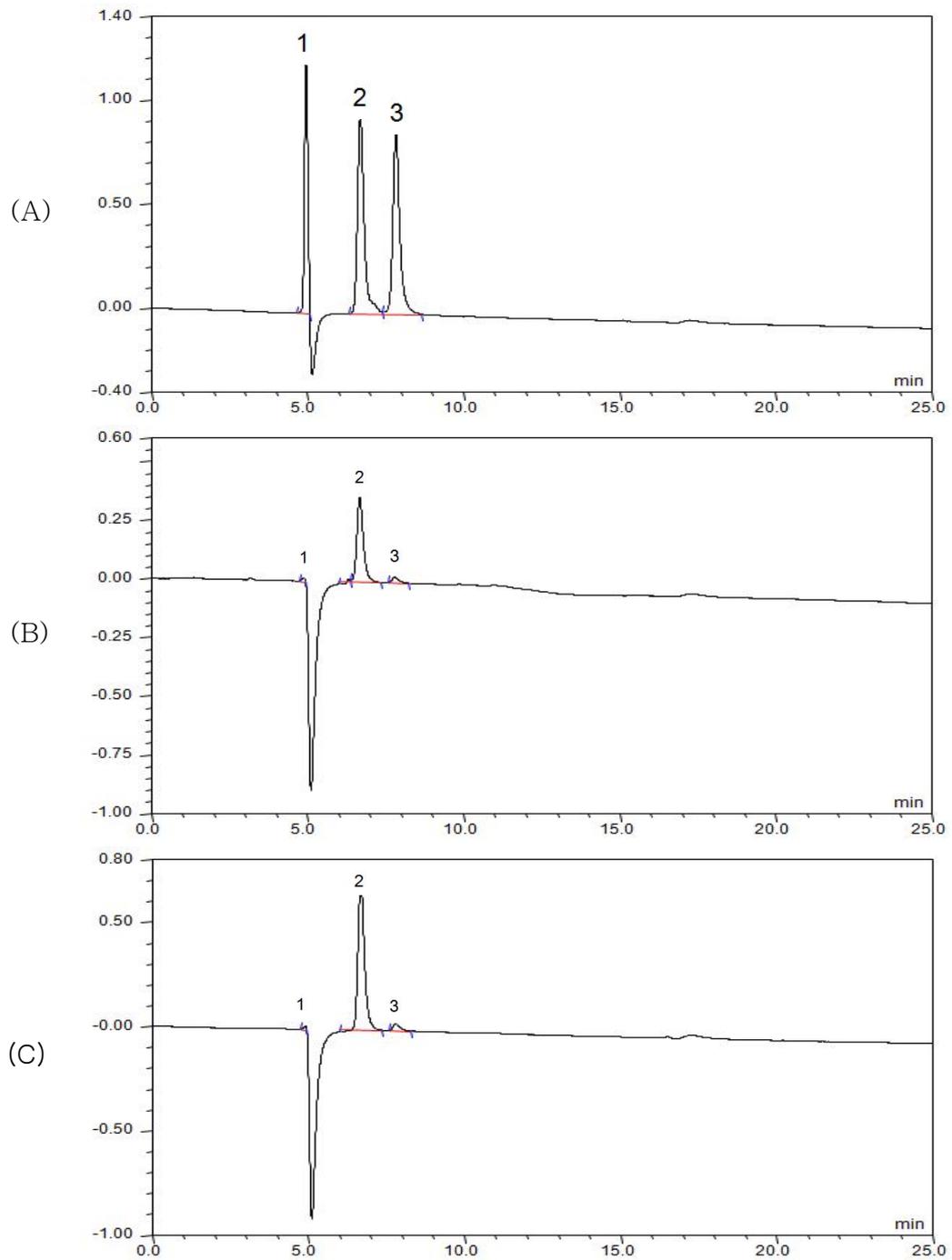


Figure 6. Ion Chromatograms of the organic acid species (1: oxalic acid, 2: citric acid, 3: malic acid) for standard material (A), Shiranuhi citrus fruit (B), and Setoka citrus fruit (C).

2. 총 플라보노이드 함량 분석

세토카, 부지화의 완숙과를 이용하여 각각 과피와 과육에 포함된 총 플라보노이드 함량을 조사하였다. 총 플라보노이드 함량은 diethylene glycol 비색법을 이용하여 건조시료 1 g 당 naringin 함량을 mg 단위로 환산하였고, 그 결과를 Figure 7에 나타내었다. 그림의 결과와 같이 세토카와 부지화 모두 과피 내에서의 총 플라보노이드 함량이 과육에서보다 높은 것으로 나타났다. 과피와 과육 모두에서 총 플라보노이드 함량이 부지화보다는 세토카에서 더 높은 것으로 조사되었다. 또한 과육에서는 두 품종의 함량 차이가 크지 않지만 과피에서는 세토카의 총 플라보노이드 함량이 훨씬 더 높은 경향을 보였다.

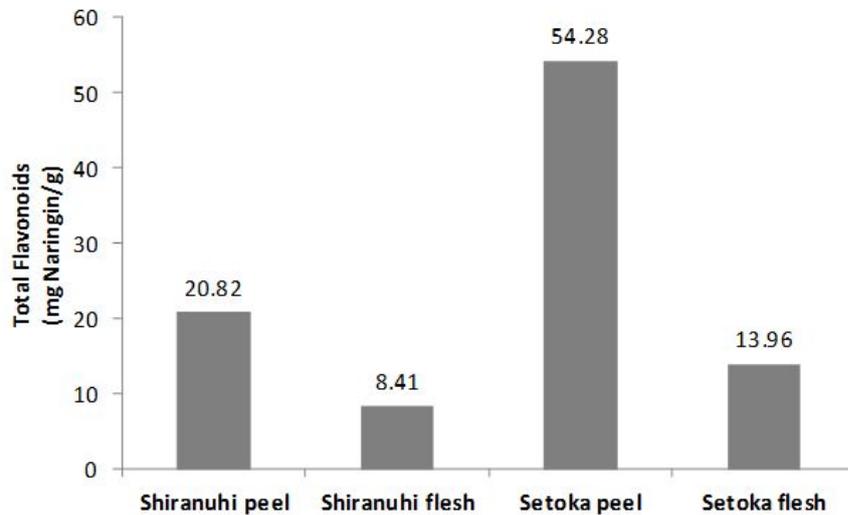


Figure 7. Comparison of total flavonoid contents in shiranuhi and setoka citrus fruits.

3. 플라보노이드 성분 분석

세토카와 부지화 완숙과에서 과피와 과육 각각에 함유된 주요 플라보노이드 성분의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석 결과는 건조시료 1 g안에 들어있는 주요 플라보노이드 성분의 양으로 환산하여 나타내었고, 그 결과를 Table 9와 Figure 7, 8에 수록하였다. 이 결과에서 보는 바와 같이 과피에서의 플라보노이드는 narirutin, hesperidin, nobiletin이 대부분을 차지하는 것으로 확인되었다. 그리고 이들 성분들 각각의 함량을 상대 비교해 본 결과 부지화 과피에서는 narirutin보다 hesperidin의 함량이 더 높지만, 세토카 과피에서는 narirutin 함량이 더 높았으며 전체적으로 다른 감귤류들에 비해 훨씬 더 높은 함량을 나타내었다. 마찬가지로 방법으로 과육에 포함된 주요 플라보노이드 성분을 분석하였고, 그 결과를 Table 9와 Figure 8~9에 나타내었다. 표와 그림에서 보는 바와 같이 플라보노이드 성분은 과피에 비해 과육에서 훨씬 낮은 농도를 나타내었으며, 세토카와 부지화 두 품종 모두 hesperidin보다는 narirutin의 함량이 더 높은 것으로 확인되었다.

두 품종 간의 차이를 비교해 보면, 부지화에서는 과육, 과피 모두 narirutin과 hesperidin의 함량이 차이를 보이나 그 차이가 그리 크지 않은 반면 세토카에서는 과육, 과피 모두에서 narirutin의 함량이 대부분을 차지하는 것으로 조사되었다. 또한 HPLC를 이용하여 분석한 flavonoid의 함량과 diethylene glycol 비색법을 이용하여 구한 총 flavonoid의 함량을 비교해 본 결과, Figure 10과 같이 서로 비슷한 농도변화 양상을 보임을 알 수 있었다.

Table 9. Flavonoid contents in shiranuhi and setoka citrus fruits.

(Unit : $\mu\text{g/mL}$)

Flavonoids	Shiranuhi		Setoka	
	peel	flesh	peel	flesh
Rutin	36.88	27.90	43.07	Nd
Narirutin	88.40	81.95	525.39	152.77
Naringin	23.90	Nd	12.07	Nd
Hesperidin	209.55	55.63	52.59	22.30
Neohesperidin	Nd	Nd	15.50	Nd
Neohesperidin dihydrochalcone	11.36	Nd	Nd	Nd
Quercetin	Nd	Nd	Nd	Nd
Apigenin	Nd	Nd	Nd	Nd
Naringenin	Nd	Nd	Nd	Nd
Hesperetin	Nd	Nd	Nd	Nd
Nobiletin	42.22	Nd	41.78	Nd
Tangeretin	7.96	5.17	8.09	Nd
Auraptene	13.27	Nd	Nd	Nd

1) Each mean was calculated from values of three experiments.

2) Nd ; Not detected.

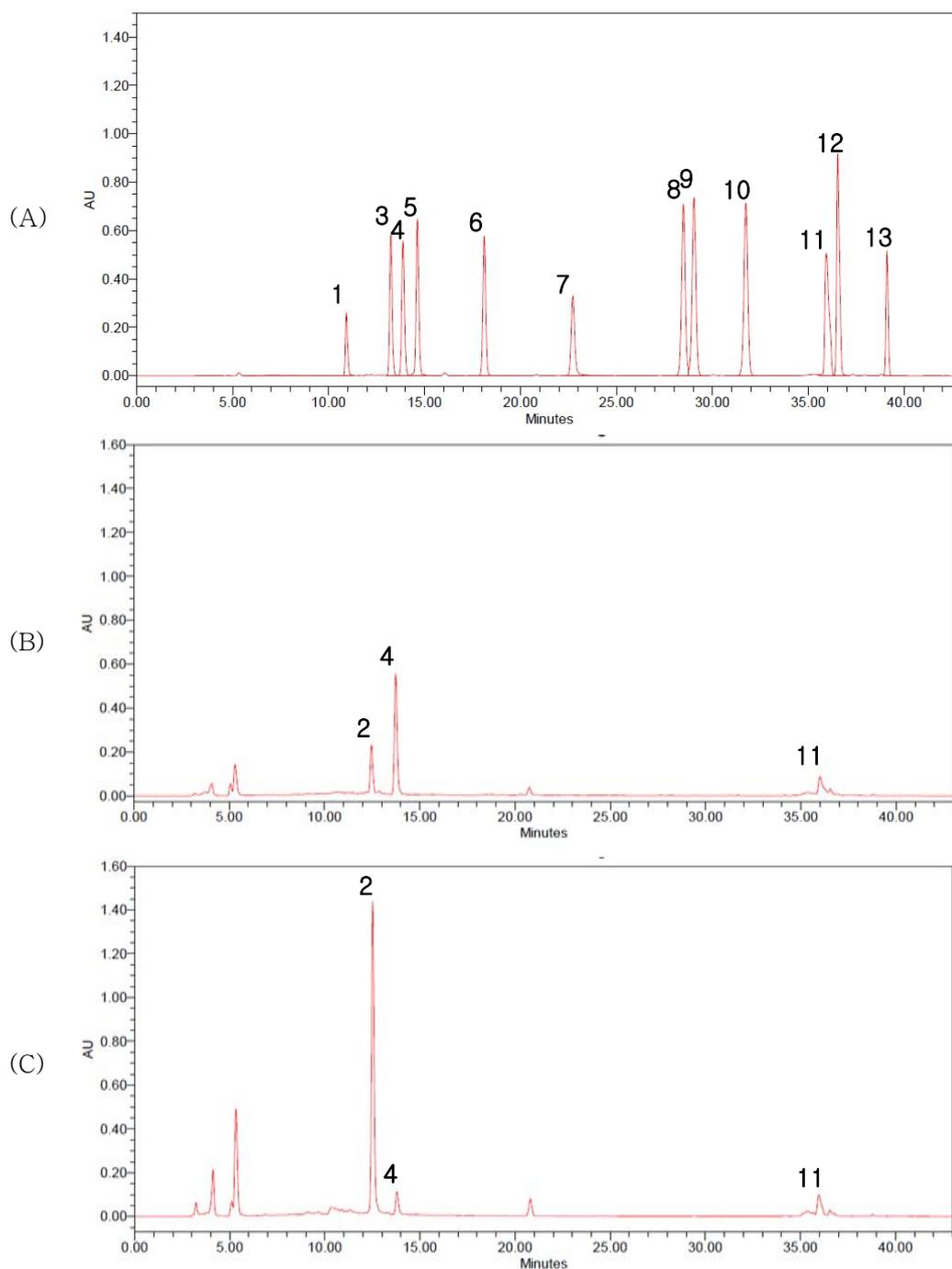


Figure 8. HPLC chromatograms of flavonoids.

(A) Standard flavonoids (1: rutin, 2: narirutin, 3: naringin, 4: hesperidin, 5: neohesperidin, 6: neohesperidin diglychalcone, 7: quercetin, 8: apigenin, 9: naringenin, 10: hesperetin, 11: nobiletin, 12: tangeretin, 13: auraptene); (B) Shiranuhi peel sample; (C) Setoka peel sample

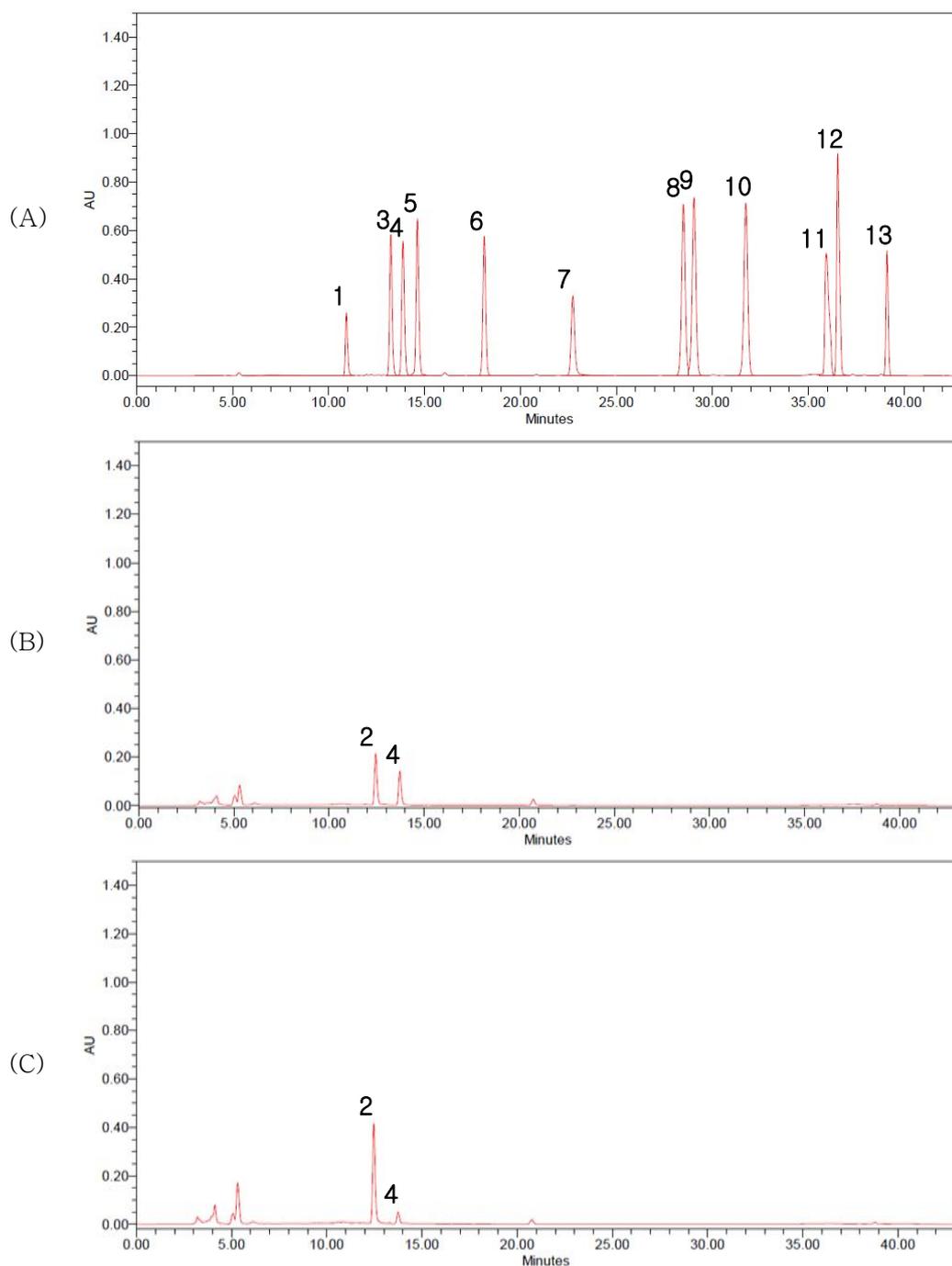


Figure 9. HPLC chromatograms of flavonoids.

(A) Standard flavonoids (1: rutin, 2: narirutin, 3: naringin, 4: hesperidin, 5: neohesperidin, 6: neohesperidin diglychalcone, 7: quercetin, 8: apigenin, 9: naringenin, 10: hesperetin, 11: nobiletin, 12: tangeretin, 13: auraptene); (B) Shiranuhi flesh sample; (C) Setoka flesh sample

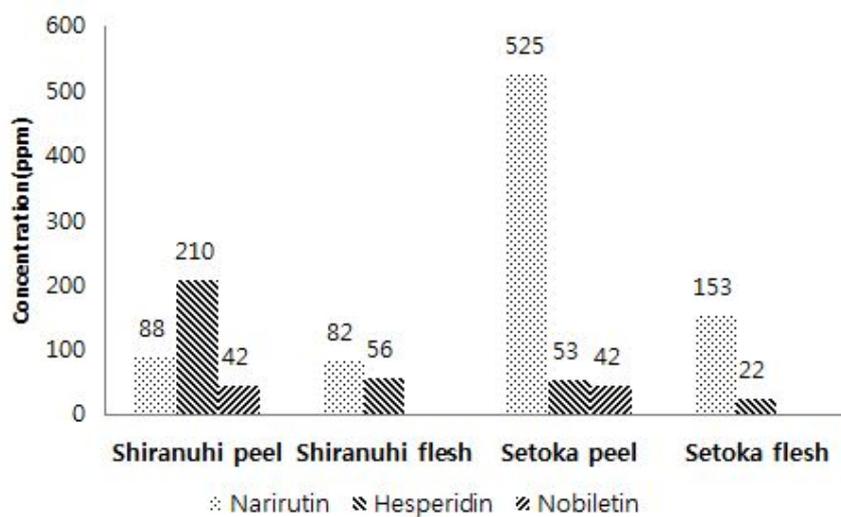


Figure 10. Contents of flavonoids in shiranuhi and setoka citrus fruits.

4. 정유성분 분석

세토카 완속과와 미속과 에센셜 오일의 화학조성을 GC-MS를 이용하여 분석하였고, 그 결과를 Table 10에 수록하였다. GC-MS 분석을 통해 완속과 에센셜 오일은 약 96%, 미속과 에센셜 오일은 약 93%의 성분을 확인할 수 있었다. 그리고 분석결과로부터 세토카 에센셜 오일 성분 중 주요 성분은 dl-limonene으로 미속과 (71.08%)보다 완속과 (90.15%)에 더 많이 포함되어 있음을 알 수 있었다. 또 완속과보다는 미속과에서 sabinene(2.99%), α -terpinene(0.95%), Lin-alool(7.21%), 4-terpineol(6.47%) 등이 더 많이 포함되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 동일환 방법으로 부지화 완속과와 미속과 에센셜 오일의 화학조성을 분석하였고, 그 결과를 Table 11에 수록하였다. Table 11과 같이 완속과 에센셜 오일은 약 99%, 미속과 에센셜 오일은 약 95%의 성분을 확인하였으며, 화학 성분 중 주요성분은 세토카 에센셜 오일과 마찬가지로 dl-limonene으로 미속과 (75.21%)보다 완속과 (95.19%)에 더 많이 포함되어 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 세토카 에센셜오일의 경우와는 반대로 미속과보다 완속과 에센셜오일에서 sabinene(1.13%), β -myrcene(1.39%)이 더 높은 함량을 나타내었으며, sesquiterpene hydrocarbon인 α -farnesene이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

이러한 GC-MS 분석을 통해 에센셜오일 성분의 함량을 상호 비교해 본 결과, 두 품종 모두 완속과보다는 미속과에서 dl-limonene의 함량이 더 적은 대신에 다양한 종류의 monoterpene hydrocarbon류와 monoterpene alcohol류가 포함되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 감귤이 성숙기를 거치면서 dl-limonene의 양이 점차 증가하는 경향을 보임을 예측할 수 있었다.

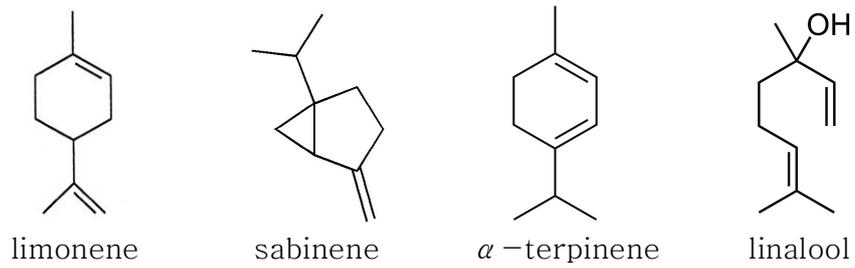


Figure 11. Major constituents of the essential oil in setoka and shiranuhi citrus fruits.

Table 10. Retention time and peak area ratio of GC-MS total ion chromatograms for the essential oil components in Shiranuhi citrus fruit.

Species	RT (min)	Peak area(%)	
		Mature fruit	Immature fruit
Monoterpene hydrocarbons :			
Alpha-pinene	8.8	0.46	
Sabinene	11.0	1.13	0.14
Beta-myrcene	11.6	1.39	0.74
Alpha-terpinene	12.6		0.83
DL-limonene	13.0	95.19	75.21
Isocineole	13.1		0.41
Beta-Ocimene	13.9	0.20	0.77
Gamma-terpinene	14.5		1.16
Alpha-terpinolene	15.6		0.57
		98.37	79.84
Alcohols :			
Linalool	16.2	0.53	0.47
Cyclohexanol	18.5		0.88
4-terpineol	19.7	0.13	5.56
Alpha-terpineol	20.7		8.68
		0.66	15.59
Sesquiterpene hydrocarbons :			
Alpha-farnesene	31.4	0.24	
		0.24	
Total		99.27	95.42

Table 11. Retention time and peak area ratio of GC-MS total ion chromatograms for the essential oil components in Setoka citrus fruit.

Constituents	RT	Peak area(%)	
		Mature fruit	Immature fruit
Monoterpene hydrocarbons :			
Alpha-Thujene	12.4		0.08
Sabinene	15.4	1.12	2.99
Beta-myrcene	16.9	1.12	1.26
Alpha-terpinene	18.4		0.95
p-Cymene	19.1		0.18
DL-limonene	19.3	90.15	71.08
Beta-Ocimene	21.0		0.40
Gamma-terpinene	21.5	0.33	1.87
Alpha-terpinolene	23.6		0.53
		92.72	79.34
Alcohols :			
Linalool	24.7	2.10	7.21
4-terpineol	29.9	1.16	6.47
2-cyclohexen-1-ol	32.9	0.46	
Carvol	34.5		0.51
		3.72	14.19
Total		96.44	93.53

5. DPPH 활성 검색

세토카와 부지화 에센셜 오일의 항산화 활성을 DPPH 분석법을 이용하여 측정하였고, 그 결과를 Figure 12~13에 나타내었다. 세토카와 부지화 에센셜 오일 모두 농도 의존적으로 DPPH radical scavenging 활성을 보였으며, SC₅₀ 값은 대조군인 Vit.C 10.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다는 떨어지지만 세토카 에센셜오일에서는 완숙과와 미숙과가 각각 40.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 와 35.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 의 활성을 보였고, 미숙과에서 더 좋은 활성을 보였다. 부지화 에센셜오일에서도 완숙과와 미숙과 에센셜오일의 SC₅₀ 값이 각각 65.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 과 36.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 로 미숙과에서 더 좋은 활성을 나타내었다.

두 품종 모두 미숙과 에센셜오일에서 더 좋은 활성을 보이는 것으로 보아 정유성분 중 alcohol 성분의 함량 차이에 의하여 alcohol 성분이 많이 포함되어 있는 미숙과에서 radical 소거 능력이 더 좋은 것임을 예측할 수 있었다.

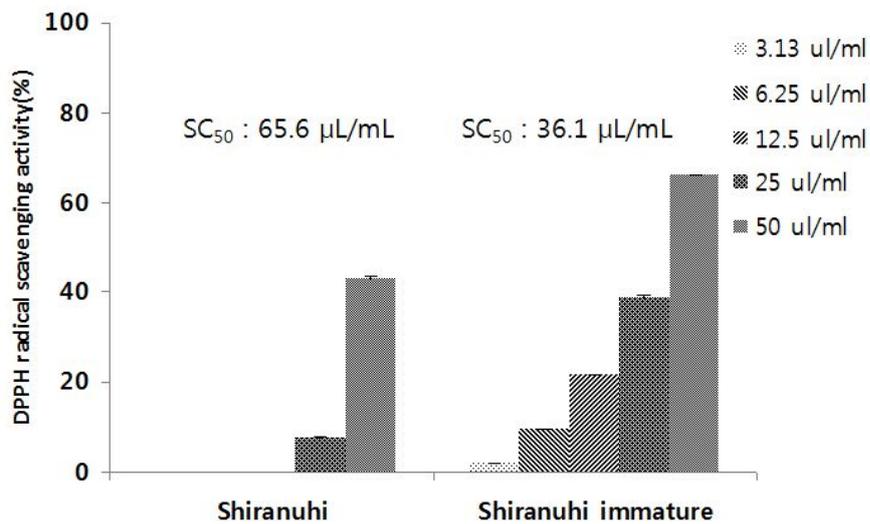


Figure 12. DPPH radical scavenging activity for essential oil in Shiranuhi citrus fruit. Data expressed as a percentage of control and are mean \pm SEM of triplicated experiments.

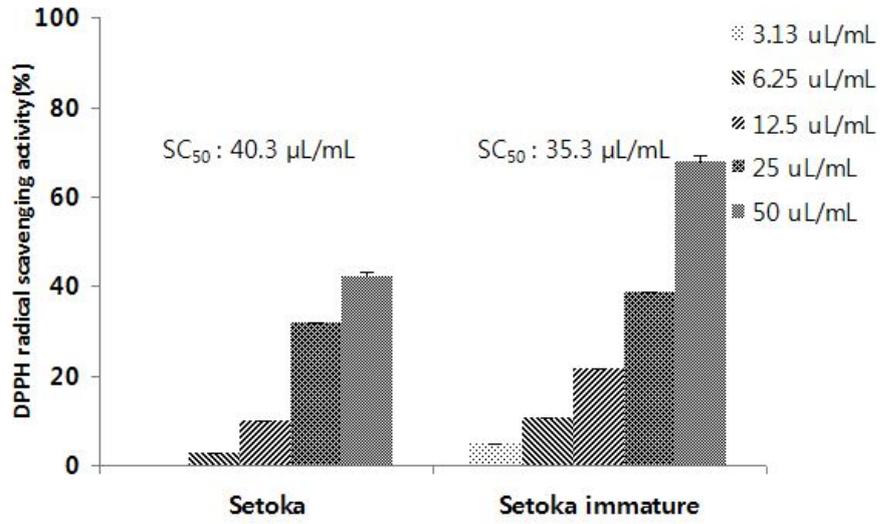


Figure 13. DPPH radical scavenging activity for essential oil in Setoka citrus fruit. Data expressed as a percentage of control and are mean±SEM of triplicated experiments.

6. 항균활성 측정

세토카와 부지화 에센셜 오일의 항균 활성 측정을 위해 여드름 유발균 *S. epidermidis*와 *P. acnes*에 대하여 paper disc법으로 생장 억제율을 측정하였고, 그 결과를 Table 12~13에 수록하였다. 그 결과 완숙과 미숙과 에센셜오일 모두 항균활성을 보였으며 특히 내성 균주에 대해서도 항균활성을 보였다.

세토카와 부지화 에센셜오일 모두 완숙과 보다는 미숙과 에센셜 오일에서 더 좋은 항균활성을 보였으며, 이는 MIC를 통하여 monoterpene류보다 alcohol류의 항균활성이 더 좋다는 기존의 실험 결과¹⁸를 토대로 미숙과에는 alcohol류가 많이 함유되어 있어 이러한 실험결과가 나왔음을 알 수 있었다.

Table 12. Antimicrobial activities of Shiranuhi essential oil on several microorganisms.

Strains	Mature fruit		Immature fruit	
	Disc paper (mm)	MIC values (μ L/mL)	Disc paper (mm)	MIC values (μ L/mL)
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	11	20	10	5
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	9	40	10	5
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	8	Nd	9.5	40
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	11	20	12	10
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	11	20	12	5
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	10.5	20	11	5

Table 13. Antimicrobial activities of Setoka essential oil on several microorganisms.

Strains	Mature fruit		Immature fruit	
	Disc paper (mm)	MIC values (μ L/mL)	Disc paper (mm)	MIC values (μ L/mL)
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	11	5	10	10
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	11	10	10	10
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	8	Nd	9	10
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	11	5	12	10
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	10	5	11	10
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	11	5	10	10

IV. 결론

최근 소비가 증가하고 있는 고품질 만감류인 부지화와 세토카의 주요 성분을 분석하였고, 에센셜 오일의 생리활성 측정을 통해 기능성 소재로서의 가능성을 검토하였다. 이를 위해 부지화와 세토카 감귤의 유리당, 유기산, 플라보노이드 함량을 분석하였다. 그리고 미숙과와 완숙과 에센셜 오일 성분을 분석하고, 항산화 및 항균활성을 검색한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 이온크로마토그래피 분석을 통해 세토카와 부지화의 유리당, 유기산을 분석한 결과, 유리당은 각각 11.8%, 11.5%로 서로 비슷한 함량을 나타내었다. 그러나 유기산 함량은 세토카와 부지화가 각각 1.68%, 1.31%로 세토카에서 더 높은 경향을 보였고, 당산비는 세토카가 7.0, 부지화가 8.7로 부지화에서 더 높은 결과를 얻을 수 있었다.
- Diethylene glycol 비색법을 이용하여 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 두 품종 모두 과피에서 총 플라보노이드 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 또 HPLC를 이용하여 플라보노이드 성분을 분석해 본 결과, 주 성분은 narirutin, hesperidin이었으며, 과육보다는 과피에 많은 양의 플라보노이드가 함유되어 있고 부지화보다 세토카에 더 많은 양의 narirutin이 함유되어 있음을 알 수 있었다.
- GC-MS를 이용하여 부지화와 세토카의 완숙과와 미숙과 에센셜 오일의 성분을 분석한 결과, 주요 성분은 dl-limonene, sabinene, linalool, 4-terpineol 이었다. 특히 dl-limonene의 함량이 75% 이상이었고 미숙과 보다는 완숙과 에센셜 오일에 더 많이 포함되어 있었다. 성분들을 group별로 분류했을 때 미숙과에서 monoterpene류의 양이 적은 대신에 alcohol류의 양이 많은 것으로 나타났다. 이는 monoterpene류의 양, 특히 limonene의 양이 과실의 성숙에 따라 점차 많아지는 것으로 예측할 수 있었다.

- 부지화와 세토카의 완속과와 미속과 에센셜 오일을 이용하여 DPPH radical scavenging 활성, paper disc diffusion test 및 MIC를 측정한 결과, 농도 의존적으로 DPPH radical scavenging 활성을 보였으며 완속과 보다는 미속과에서 활성이 높았다. 항균활성 역시 미속과 에센셜 오일에서 더 좋은 활성을 보였고 특히 내성균에 대한 항균활성을 보여 이후 여드름 관련 제품의 소재로서의 사용 가능성을 확인할 수 있었다.
- 본 실험결과를 통하여 고품질 감귤인 부지화 및 세토카 과피추출물과 에센셜 오일을 이용한 기능성 상품 및 여드름 관련 향장품으로의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

V. 참고문헌

1. 고영국 (2009) 제주산 재래감귤 과피와 종자 추출물의 항산화 활성 및 주요 플라보노이드 분포, 제주대학교 대학원, 석사학위논문.
2. 김은식 (2011) 천연화장품 신소재 개발을 위한 감귤류의 생리활성 연구, 순천대학교 대학원, 박사학위논문.
3. 이지현 (2011) 열처리에 의한 온주밀감의 산함량 감소, 제주대학교대학원, 석사학위논문.
4. 현동희, 현광철, 양원석, 오승진 (2012) 세토카(천혜향) 재배기술, 제주특별자치도농업기술원 서귀포농업기술센터
5. 현동희, 양원석, 오승진 (2012) 명품 한라봉 재배기술, 제주특별자치도농업기술원 서귀포농업기술센터
6. Bakkali F, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar (2008) Biological effects of essential oils-A review, *Food and Chemical Toxicology*, 46:446-475.
7. Blois, M.S (1958) Antioxidant determined by the use a stable free radical, *Nature*, 26: 1199-1200.
8. Dabbah R, V.M. Edward (1970) Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected foodborne bacteria, *Appl Microbiol* 19:27-31.
9. Diaz S, S. Espinosa, E.A. Brignole (2005) Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids optimal process and solvent cycle design, *J of Supercritical Fluids*, 35:49-61.
10. Donpedro K.N., (1996) Fumigant toxicity of citrus peel oils against adult and immature stages of storage insect pests, *Pesticide Sci*, 47:213-223.
11. Eun JB, Jung YM, GJ Woo (1996) Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of Korean tangerine (*Citrus aurantium* var.), *Korean J Food Sci Technol*, 28: 371-377.

12. Han SS, You IJ. 1988. Studies on antimicrobial activities and safely of natural naringin in Korea. *Korean J Mycol.* 16:33-40
13. Jeong WS, SW Park, SK Chung (1997) The antioxidative activity of Korean citrus unshiu peels, *Food Biotechnol*, 6:292-296.
14. Johnson RL. AK Htoon, KJ Shaw (1995) Detection of orange peel extract in orange juice, *Food Australia*, 47:426-432.
15. Kelebek H., S. Selli, A. Canbas, T. Cabaroglu (2009) HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan, *Microchemical J.*, 91:187-192.
16. Kim BK, JY Cha, YS Cho (1999) Effects of citrus flavonoid, hesperidin and naringin on lipid metabolism in HepG2 cells, *J Life Sci*, 9:382-288.
17. Kim HJ, Jo CH, Lee NY, Son JH, An BJ Yook HS, Byun MW. 2005. Effect of gamma irradiation on physiological activity of citrus essential oil. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 34:797~804.
18. Kim SS, JS Baik, TH Oh, WJ Yoon, NH Lee, CG Hyun (2008) Biological Activities of Korean Citrus obovoides and Citrus natsudaidai Essential Oils against Acne-Inducing Bacteria *Biosci., Biotechnol Biochem*, 72(10), 2507-2513.
19. Kim YK, MG Lee, SR Lee (1997) Elimination of fenitrothion residues during dietary fiber and bioflanoid preparation from mandarin orange peels, *Korean J Food Scd Technol*, 29:223-229.
20. Kimball D.A. (1991) Citrus oils, aromas, and essences. In *Citrus processing: quality control and technology*, Van Nostrand Reinhold, New York, USA. p 73-101.
21. Kudo T, N. Saga (1990) Development of a simple method for antibiotic susceptibility testing in algae using paper disks, *Nippon Suisan Cakkaishi*, 56:455-461.

22. Kuhnau J. (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World Rev Nutr Diet*, 24:117-91.
23. Lee CH, YJ Kang (1997) HPLC analysis of some flavonoids in citrus fruits, *Korean J. Post-harvest Sci Technol Agri. Products*, 4: 181-187.
24. Lee HY, HM Seog, YJ Nam, DH Chung (1987) Physico-chemical properties of Korean Madarin (*Citrus reticula*) orange juice, *Korean J food Sci Technol*, 19:338-345.
25. Lee JH, HJ An, SY Lee, YH Choi, BS Lim, YH Kang (2009) Changes in Quality Characteristics of 'setoka'(Citrus spp.) Using Different Storage Method, *Korean J Food Preserv*, 16:644-649.
26. NFRI (1990) Manuals of quality characteristic analysis for food quality evaluation (2), National Food Research Institute, Tsukuba, Japan. pp. 61(in Japanese).
27. Piddock LJV (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria, *J Appl Bacteriol*, 68:307-312.
28. Rhyu MR, EY Kim, IY Bae, YK Park (2002) Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits, *Korean J Food Sci Technol*, 34:132-135.
29. Rosen HB, J. Chang, G.E Wnek, R.J. Linhardt, R. Langer (1983) Bioerodible polyanhydrides for controlled drug delivery, *Biomaterials*, 4:131-133.
30. Son HS, HS Kim, TB Kwon, JS Ju (1992) Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoids in citrus sinensis
31. Song EY, YH Choi, KH Kang, JS Koh (1998) Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of cheju citrus fruits according to harvest date, *Korean J Food Sci Technol*,

- 30:306-312.
32. Song HS, YH Park, DG Moon (2005) Volatile flavor properties of hallabong grown in open field and green house by GC/GC-MS and sensory evaluation, J Korean Soc Food Sci Nutr, 34:1239-1245.
- 33 Song HS (2008) The volatile composition kiyomi peel oil (Citrus unshiu Marcov. × C. sinensis Osbeck) cultivated in Korea, J Food Sci Nutr, 13:292-298.
- 34 Whang HJ, KR Yoon (1995) Carotenoid pigment of citrus fruits cultivated in Korea, Kor. J food Sci Technol, 27(6): 950-957.

ABSTRACT

This study has aimed to analyze the free sugars, organic acids, and flavonoids of Shiranuhi and Setoka citrus fruits among high quality Citrus hybrids which have recently shown an increased consumption, and examine the possibility of new functional materials according to the verification of anti-oxidant and anti-microbial activities using essential oils.

The analytical result of free sugar and organic acid contents in diluted juice of Shiranuhi and Setoka citrus fruits showed they had similar free sugar contents as 11.8% and 11.5% respectively, whereas Setoka had higher free acid content than Citrus Shiranuhi as 1.68% > 1.31%. However, according to the comparison between soluble solid-acid ratios, which are regarded as an index of palatability of citrus oranges, Citrus Shiranuhi showed a higher ratio than Setoka, that is 8.7 and 7.0, respectively.

By way of drying and grinding the flesh and peel without fruit juice, 70% MeOH was extracted, and then the flavonoid contents were analyzed. As a result, for both citrus cultivars, the total flavonoid content was higher in flesh than in peel. However the total flavonoid content in Setoka was higher than in Citrus Shiranuhi. Particularly, the flavonoid content in Setoka peel was considerably high as 54.28 mg naringin/g. Qualitative and quantitative analysis of each extract indicated that the main flavonoids were narirutin and hesperidin, and showed these two flavonoids occupied most of the total flavonoid content.

Using Essential Oil Determination Apparatus, the essential oils were extracted from the peels of immature and mature citrus fruits of Shiranuhi and Setoka. The GC-MS analysis of ingredients in each oil

showed that main ingredients were dl-limonene, sabinene, linalool and 4-terpineol, and the content of limonene was the highest as 75%. According to DPPH radical scavenging experiment for each oil, SC₅₀ values of Citrus Shiranuhi were quite low as 65.5 µL/mL for mature fruits and 36.1 µL/mL for immature ones, showing good anti-oxidizing activity, compared to that of vitamin C as a control group, 6.9 µg/mL. Moreover, for SC₅₀ values of Setoka, immature fruits showed better activity as 35.3 µL/mL. In order to examine anti-microbial activities for essential oils, the paper disc method and MIC were conducted on *P. acnes* and *S. epidermidis* as skin-related microorganisms. As a result, they generally showed anti-microbial activities, particularly for resistant bacteria.

In conclusion, the results of this study suggested the development possibility of functional products and acne-related products by using peel extracts and essential oils from high-quality citrus fruits, more specifically, Citrus Shiranuhi and Setoka.

감사의 글

새로운 도전을 하고자 하는 마음을 가지고 교육대학원에 입학하고 어느덧 2년 하고도 반년이라는 시간이 지났습니다. 길지도 짧지도 않은 시간이었지만 많은 분들의 격려와 도움으로 졸업을 앞두게 되었습니다. 이 모든 일들이 저 혼자만의 힘으로는 이룰 수 없었음을 알기에 도움을 주신 분들에게 고마운 마음을 지면으로나마 표현하려 합니다.

먼저, 늘 부족한 저에게 따뜻한 관심으로 격려해 주시고 본 논문이 완성될 수 있도록 아낌없는 지도로 이끌어 주신 강창희 교수님께 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 화학과를 입학했을 때부터 항상 따뜻하게 지켜봐 주신 정덕상 교수님, 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 김원형 교수님, 이선주 교수님, 이남호 교수님께도 감사드립니다.

대학원 입학 결정과 동시에 우연한 기회에 감귤시험장에서 일하게 되면서 여러 분야의 실험을 접하게 되었고, 늘 따뜻한 미소로 아낌없는 조언과 실험을 할 수 있도록 배려해주신 최영훈 장장님, 덕분에 무사히 논문을 마치게 되었습니다. 항상 제 논문 걱정해 주시고 도움을 주셨던 이지현 연구사님, 이선이 연구사님, 박경진 연구사님, 박석만 연구사님. 연구사님들의 전폭적인 지지가 있었기 때문에 무사히 실험을 마치게 되었습니다. 감귤시험장에 오시게 되면서 부족한 제 실력에도 항상 웃으시면서 도와주시고, 걱정해주신 김상숙 박사님. 진심으로 감사드립니다. 실험하고 논문 쓰는 동안 늦은 시간에 연락해도 귀찮아하지 않고 친절하게 가르쳐 주신 주미언니, 실험 같이 하느라고 늦게까지 열심히 도와주신 소담 오빠, 부족한 동기를 위해 열심히 도와준 승준이, 하나, 승희. 정말 고마워^^ 논문 발표 때문에 고생할 때 피곤할 텐데도 열심히 도와준 분석방, 물리방 식구들. 정말 고맙습니다. 항상 고민하고 투정부릴 때마다 다 받아준 우리 GUS. 하나, 승희, 유재, 미주.... 모두 고마워^^

마지막으로 대학원 가겠다고 반대하셨을 때, 제 고집대로 밀고 나갔지만 뒤에서는 항상 걱정해 주신 엄마, 아빠, 할머니. 정말 고맙습니다. 저를 격려해주시고 응원해 주시는 모든 분들이 있었기 때문에 지금의 제가 있는 것 같습니다. 모두 사랑합니다.