

제주산 금귤(*Fortunella japonica* var. *margarita*)의 생리활성 검색

부회정 · 이승우 · 이민영 · 김주희 · 김영대 · 이선주

제주대학교 화학과, 대기고등학교

요 약

제주에서 재배되는 금귤의 항산화, 미백 및 세균과 곰팡이 활성을 검색하였다. 금귤의 항산화 활성과 미백에 대해서는 우수한 활성을 보이지 않았다. 그러나 각종 세균과 누룩곰팡이를 대상으로 항균 및 항곰팡이 활성을 paper disc법에 따라 측정한 결과 *Micrococcus luteus*와 *Staphylococcus aureus*에 대하여서는 미숙과와 완숙과 모두에서 항균 능력이 있음을 확인할 수 있었다.

1. 서 론

최근 천연물을 이용한 신물질 탐색 연구가 활발히 이루어지면서 천연소재에 함유된 생리활성물질에 대한 관심이 증대되고 있고, 생물자원에서 새로운 유효성분을 찾기 위한 노력이 경쟁적으로 진행되고 있다. 특히, 육지부와 기후 및 토양이 달라 특이한 생체분포를 하는 제주지방에 서식하는 생물자원에서 얻어진 생리활성 물질은 인체 내에서 안전성이 높을 뿐 아니라, 활성 또한 매우 유리한 장점이 있는 것으로 밝혀지고 있어 제주지방의 생물자원에 대한 연구가치는 매우 크다고 할 수 있다.

금귤은 운향과의 상록관목으로 길이 2~3cm의 타원형의 열매를 맺는 과수로서 원산지는 중국이며 잎은 작고 그물맥인데 결핵이 뚜렷하지 않고, 둥근 금귤(*F. hindsii*)처럼 줄기에 가시가 많이 난 것도 있지만 대부분의 품종은 줄기에 가시가 없다. 금귤의 주된 재배종으로는 열매가 구형이고 작은(4~5g) 둥근 금귤, 열매가

명칭 그대로 타원형인 긴 금귤 등이 있다. 이 밖에 열매가 아주 작고(1g) 또한 먹을 수도 없으며 주로 관상용으로 분재를 하는 콩금귤 등이 있다. 제주 지역에는 주로 영과 금귤(*Fortunella crassifolia* Swing)이 재배되고 있는데 당도는 19브릭스, 산 함량은 0.95%, pH는 3.55, 당산비는 20.0으로 알려져 있다.

봄에 개화하여 성숙한 열매는 대개 1~2월에 수확하는데, 열매껍질은 오렌지색이며 매끄럽고 단맛이 있으나 과육은 단맛과 더불어 신맛이 강한 금귤에는 구연산(58.27%)을 비롯하여 사과산(32.49%), 주석산(9.14%), 말레산(0.08%)과 같은 유기산들과 폴리페놀성의 플라보노이드계 화합물이 포함되어 있는 것으로 조사되어 있다. 또한 금귤의 화학성분에는 수분(77.24%), 단백질(1.42%), 조지방(0.34%), 탄수화물(20.20%), 환원당(16.10%), 회분(0.78%), 비타민C 79.94mg/100g인 것을 비롯하여 Ca(117.2mg/100g), Mg(46.6mg/100g), K(257.4mg/100g), P(25.7mg/100g) 외에

Na, Fe, Zn과 같은 다수의 무기질이 존재하는 것으로 보고되어 있다.^{1,2}

본 연구에서는 대부분의 과일이 부패과정에 곰팡이가 관여하나 금귤의 부패과정에는 푸른 곰팡이가 발육하지 않는 점에 착안하여 완숙도에 따라 시기별로 달리 채집하여 얻은 금귤의 열매와 금귤의 잎에서 얻은 추출물로서 항곰팡이 효과를 비롯하여 제주도의 특성화된 연구분야인 향장소재 개발에 관련된 항산화효과, 미백효과, 항균효과 등의 검색을 통하여 고부가치의 유효성분 탐색 및 생리활성물질로서의 활용 가능성을 찾아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 추출

실험에 사용한 시료는 제주에서 재배되는 금귤로서 묘목에서 성목으로 성장하는 동안 어떠한 화학비료도 시비하지 않게 함과 아울러 농약을 하지 않도록 통제시킨 상태에서 성과로 완전히 자란 미숙과와 노랑게 잘 익은 완숙과 및 잎을 각각 11월 초순, 이듬해 2월 초순과 6월 중순에 채집하여 사용하였다.

채집한 시료는 깨끗한 물로 씻어 음지에서 말린 후 믹서기로 잘게 파쇄하여 열매를 90% methanol(MeOH)에 50일간 담가 놓은 후 비극성 용매부터 순차적으로 hexane, ethylacetate(EtOAc), butanol (n-BuOH), residue로서 분별깔대기에서 용매 분획하여 각각의 분획층을 얻었다. 이렇게 하여 얻은 추출물을 항산화효과, 미백효과, 항균 활성 검색 실험에 사용하였다. 항곰팡이 활성 검색에 사용된 열매와 잎 추출물은 90% ethanol(EtOH)에 담근 후 농축하여 사용하였다.

2. 세포 및 시약

Murine melanoma cell line인 B16F10 세포는 한국 세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다. 세포 배양은 100units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 항균 실험에 사용된 균주는 KCTC 유전자은행에서 분양받아 stock 상태로 보관 하였던 것을 37°C에서 배양하여 적당한 배지를 이용하여 실험에 사용하였다. 시료의 라디칼 소거효과를 측정하기 위하여 사용된 1,1-Diphenyl-2-picrihydrazyl(DPPH)와 미백효과 검증을 위해 사용된 mushroom tyrosinase, melanin은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다. 사용된 용매들은 Merck사 제품(USA)을 사용하였다.

3. DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색

시료의 항산화활성 검색은 DPPH법을 이용하여 radical 소거효과를 측정하는 Blois법을 활용하였다.³ DPPH(Sigma, USA) 약 2mg을 에탄올 15ml에 녹여 3000 μ l를 첨가시켜 잘 섞어준다. 준비된 DPPH 용액 450 μ l에 농도 1mg/ml의 시료를 50 μ l 넣어 잘 섞은 후 실온에서 10분 동안 방치 후 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 517nm의 파장에서 흡광도의 감소를 측정하였다. Free radical 소거 활성 정도는 다음과 같이 측정하였다.

$$\text{Free radical scavenging activity(\%)} = [A - (B - C)] / A \times 100$$

A는 control의 흡광도이고, B는 DPPH와

시료 용액의 혼합액이며 C는 에탄올과 시료의 혼합액이다.

4. 미백효과

4.1 Tyrosinase inhibition assay

Tyrosinase는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정단계에 관여하는 효소로서 이 효소의 활성억제 효과 정도를 *in vitro*에서 확인함으로써 미백성분의 함유 정도를 검색할 수 있다.^{4,5}

Tyrosinase 억제효과는 dopachrome 방법을 이용하여 UV/Vis 분광광도계로 측정하였다.

840 μ l의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 50 μ l의 시료용액, 50 μ l의 mushroom tyrosinase (75units/ml, Sigma Chemical Co.), 60 μ l의 L-tyrosine (0.6mM, Sigma Chemical Co.)을 첨가해 잘 섞은 후 15분간 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 배양한 후 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 억제 정도는 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도와 효소를 첨가시켜 배양한 후의 흡광도의 차이로 살폈다. Tyrosinase 활성 억제 정도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = \frac{(D-C) - (B-A)}{(D-C)} \times 100$$

A와 B는 각각 시료를 첨가한 용액의 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도와 효소를 넣어 배양한 후의 흡광도이고, C와 D는 각각 시료가 첨가되지 않은 용액의 효소를 넣기 전의 흡광도와 넣어서 반응 한 후의 흡광도이다.

4.2 Melanogenesis inhibition assay

금굴추출물의 멜라닌 생성을 억제했는지를

cell 수준에서 Gordon PR 방법을 응용하여 알아보았다.^{6,7}

시료 물질의 멜라닌 생성 억제 정도를 B16F10 세포를 이용하여 최종 생성되는 멜라닌 생성 억제 정도를 측정하였다. 세포를 24 well plate에 1.5×10^5 cells/ml로 plating 한 후, 세포부착을 위해 24시간 배양한다. 세포의 부착을 확인하고 시료를 처리하여 37 $^{\circ}$ C 10% CO₂ 항온기에서 3일간 배양하였다. Plate의 배지 제거 후 세포를 수확하여 1N NaOH를 첨가하여 세포를 완전히 녹인 후 450nm에서 ELISA로 측정하여 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하였다.

합성 멜라닌을 이용하여 표준용액을 만들고 시료와 대조군, 표준용액을 96 well plate에 넣고 흡광도를 측정한다. 멜라닌 농도는 합성 멜라닌으로 작성된 표준 농도 곡선으로부터 결정하였다. 대조군은 알부틴으로 현재 화장품의 미백제로 상용화되고 있는 물질이다.

5. 항균활성 검색

실험 시료의 항균활성 측정은 그람양성과 그람음성 두 종류 균에 대해 시료의 농도를 5mg/disc, 10mg/disc, 15mg/disc으로 각각 다르게 하여 항균력을 측정하였다. 시험 대상균으로는 식중독과 부패의 원인이 되는 그람양성균인 *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* 와 그람 음성균인 *Escherichia coli* 균주를 사용하였다.

각 균주별로 고체배지에 도말하여 하루 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하여 단일 콜로니를 취한 다음 액체배지 3ml에 접종하여 다시 하루 동안 배양기에서 배양한 후, 배양된 균들을 회석하여 고체배지에 도말한 후 하루 동안 37 $^{\circ}$ C로 배양기에서 배양시켰다. 테스트할 시료의 분획층을 농도별로 다르게 회석하여 준비한 다음 멸균해

둔 디스크에 시료를 30 μ 씩 천천히 떨어뜨린 다음 건조시켰다. 농도가 결정된 균액 50 μ 를 시험관에 top agar 3ml와 함께 가한 후 굳기 전에 bottom agar가 들어있는 페트리접시에 넣은 다음, 건조시킨 디스크를 균에 대한 분획층 별로 넣어 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 배지의 생육저해 고리(clear zone, mm)의 크기로 항균활성을 측정하였다. 이때 대조균은 시료를 녹인 용매를 사용하였다.

6. 항곰팡이 활성 검색

한국유전자은행(KCTC)으로부터 구입한 누룩곰팡이의 일종인 *Aspergillus niger*와 제주산 하우스 밀감으로부터 분리한 *Saccharomyces* 속 효모 1종을 이용하여 페이퍼 디스크 방법으로 실험하였다.

PDB (Potato Dextrous Broth) 배지를 만들어 멸균시킨 후, 페트리접시에 넣은 다음 위 곰팡이를 PDB 배지에서 48시간 배양시킨 후, 배양시킨 곰팡이를 PDA (Potato Dextrous Agar) 배지에 조심스럽게 도말한 다음 배지 위에 멸균된 paper disc를 시료 수에 맞게 넣어 밀착시킨 다음 500mg/ml의 농도로 만든 금굴 및 금굴 잎의 에탄올 추출물을 50 μ 가해준다. 이를 배양기에서 25 $^{\circ}$ C, 48시간 배양시킨 결과 시료의 항곰팡이 활성으로 인해 생성되는 disc 주변의 생육저해 고리

(clear zone, mm)의 직경을 측정하였다.

III. 실험 결과

1. 항산화 활성 검색

본 실험에 사용된 DPPH는 안정한 형태로 존재하는 라디칼 화합물로서, 시료에 의하여 라디칼이 제거되면 UV/Vis 분광광도계에서 517nm의 흡수파장이 사라지게 된다. 생체 내 산화물질로 작용하는 활성 산소 등은 대표적 라디칼 물질로서, 라디칼 소거 활성물질은 항산화제로 인식되고 있다.

금굴 및 금굴잎의 MeOH층, Hexane층, EtOAc층, BuOH층, residue층 모두 5개 층의 항산화효과를 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrihydrazyl) 용액을 이용하여 측정하였다. 시료들을 100 μ g/mL의 농도에서 각각 세 차례의 실험을 하여 그 평균값으로 항산화 활성도를 계산하였다. 그 결과를 table 1에 도표화 하였다. 라디칼 소거력을 측정한 결과 미숙 금굴의 MeOH층에서 39.4%로 가장 높게 측정되었으나 대조균으로 사용한 BHA(79.7%) 보다는 현저하게 낮았다. 모든 분획층에 걸쳐 완숙금굴보다 미숙금굴에서 항산화 효과가 높게 측정되었다.

Table 1. The free radical scavenging effects of methanol extracts and several subfractions of *Fortunella japonica* var. *margarita*. (sample concentration : 100 μ g/ml)

구분	Inhibition(%)					
	MeOH층	Hexane층	EtOAc층	BuOH층	residue층	BHA
미숙금굴의 MeOH 추출물	39.42	27.23	32.15	33.70	27.54	79.74
완숙금굴의 MeOH 추출물	13.65	11.35	23.38	27.40	25.84	77.88

2. 미백효과

2.1 Tyrosinase inhibition assay

금굴 시료의 미백효과 성분의 함유 여부를 관찰하기 위하여 MeOH층, Hexane층, EtOAc층, BuOH층, residue층의 타이로시네즈 활성 억제를 측정하였다. 타이로시네즈 활성 억제 효과는 효소를 첨가한 대조군과 각 시료가 들어있는 반응 시료용액의 흡광도 차이

를 백분율을 이용하여 수치가 높을수록 타이로시네즈 활성 억제 효과가 우수하다. 추출물들은 각각 세 차례의 실험을 통하여 평균값을 구하였고, 그 결과는 table 2에 나타내었다.

각 시료들은 세 차례에 걸쳐 타이로시네즈 활성 억제 효과를 측정된 결과 대부분의 시료에서 높은 효과를 나타내고 있지는 않으나 미숙 금굴의 BuOH 에서는 오히려 -158%로 매우 낮은 값을 보이는 것이 특징적이다.

Table 2. Screening of tyrosinase inhibition on the solvent fraction and methanol extracts of *Fortunella japonica var. margarita*. (sample concentration : 50µg/ml)

Inhibition(%)						
구분	MeOH층	Hexane층	EtOAc층	BuOH층	residue층	알부틴
미숙금굴의 MeOH 추출물	2.35	-25.03	-18.90	-158.00	2.25	52.27
완숙금굴의 MeOH 추출물	1.28	-9.12	-10.01	-25.07	10.8	48.74

2.2 Melanogenesis inhibition assay

세포 수준에서의 실험 시료의 멜라닌 최종 생성 억제 정도를 확인하기 위하여 B16F10 cell에 시료를 처리하여 3일 후 최종 생성된

멜라닌 양을 측정하였다. 결과는 table 3에 정리하였다. 세포에서의 실험 결과는 전체적으로 좋은 활성을 보이진 않았다.

Table 3. Effect of *Fortunella japonica var. margarita* solvent fractions on melanin contents of B16F10 melanoma cells. (sample concentration : 100µg/ml)

저해율(%)						
구분	MeOH층	Hexane층	EtOAc층	BuOH층	residue층	알부틴
		-2.59	18.93	15.05	19.6	2.89

3. 항균활성

시료의 농도를 1mg/disc, 2mg/disc, 3mg/disc, 4mg/disc, 5mg/disc, 10mg/disc, 15

mg/disc로 달리하면서 여러 가지 각 균에 대한 항균력을 측정된 결과 예상했던 것과는 다른 결과를 볼 수 있었다. 시료의 농도가 4mg

/disc 이하일 때에는 모든 균주에 대하여 항균능력을 볼 수 없었으나 농도가 5mg/disc 이상부터는 완숙과 보다 미숙과에서 더 높은 항균능력을 나타내기 시작하였다. 대체로 극성도가 낮은 용매추출이 항균능력이 있는 것으로

나타났다. 시료의 농도가 15mg/disc일 때 미숙과와 완숙과의 몇 가지 세균에 대한 항균활성실험으로 얻은 결과를 다음과 같이 나타내었다(Table 4, 5).

Table 4. The antibacterial activities of solvent fraction and methanol extracts of unripe *Fortunella japonica* var. *margarita*. (sample concentration : 15mg/dise)

균주	미숙금귤분획층의 clear zone (단위 : mm)				
	MeOH층	Hexane층	EtOAc층	BuOH층	residue층
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	7.5	9	8	1
<i>Micrococcus luteus</i>	2	10	11	5	1
<i>Bacillus cerceus</i>	3	2.9	3	-	1
<i>Escherichia coli</i>	1	-	3	-	-

Table 5. The antibacterial activities of solvent fraction and methanol extracts of ripe *Fortunella japonica* var. *margarita*. (sample concentration : 15mg/dise)

균주	완숙금귤분획층의 clear zone (단위 : mm)					
	MeOH층	Hexane층	EtOAc층	BuOH층	residue층	열수추출
<i>Staphylococcus aureus</i>		-	0.5	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>		2	4	4	-	3
<i>Bacillus cerceus</i>		-	3	2	-	1
<i>Escherichia coli</i>		-	1.5	1	-	-

단구균(*Micrococcus luteus*)에 대하여서는 미숙과나 완숙과 모두에서 항균능력이 있음을 보여주고 있어 이에 대한 후속실험의 가치가 있어 보인다.

4. 항곰팡이 활성

누룩곰팡이의 일종인 *Aspergillus niger*를 사용하여 금귤 잎과 금귤의 EtOH 추출물에 대한 항곰팡이 활성효과를 측정한 결과 시료의

농도가 100mg/ml에서는 금귤 잎의 EtOH 추출물은 약간의 활성을 보이는데 반하여 금귤의 EtOH 추출물에서는 활성을 볼 수 없었다.

금귤의 EtOH 추출물에 대한 항곰팡이 활성을 탐구 조사한 결과 눈에 띄게 좋은 결과를 볼 수 없었던 것은 시료를 만들 때 당이 많이 포함된 과육을 따로 분리하여 처리하지 못한 때문일 것으로 생각된다. 또한 금귤의 부패 시 곰팡이가 발육하여 증식하지 않는 것은 금귤의 껍질 부위에 정유성분인 다량의 리모넨

(Limonene)이 존재하여 항곰팡이 작용을 해 줄 뿐만 아니라 금귤의 과피가 두꺼워(4.63 mm) 곰팡이나 각종 세균의 침입을 막아 주기 때문일 것으로 여겨진다.

IV. 결 론

농약과 화학비료를 일체 사용하지 않게 통제시킨 제주산 금귤을 미숙과와 완숙과별로 따로 채취하여 90% MeOH에 담가 놓아 생긴 침출액을 농축시킨 후, 담근 시료는 용매별로 분획·농축 건조시켜 hexane층, EtOAc층, BuOH층, residue층의 추출물을 얻을 수 있었다. 금귤의 새로 돌아난 잎과 열매의 90% EtOH 추출액을 농축하여 얻은 EtOH 추출물과 90% MeOH에 담근 미숙과 및 완숙과 추출, 그리고 그 분획층에서 얻은 추출물로써 수행한 항산화효과, 미백효과, 항균효과, 항곰팡이 활성 효과 등의 실험을 통하여 제주산 금귤의 추출물에서 의미 있는 사실들을 발견할 수 있었다.

1. 금귤에 항산화물질이 다량 존재할 것이라는 가설과 달리 항산화효과는 미숙과의 MeOH층이 39.92%로 대조군으로 사용한 BHA(79.74%)보다 낮은 수준으로 미미하였고, 미숙과에서 완숙과에 이르게 되면 항산화물질의 양이 감소하는 것으로 보인다.
2. 금귤추출물의 hexane층, EtOAc층, BuOH층에서 타이로시네즈 활성 억제 저해율이 MeOH층(미숙과: 2.35%, 완숙과: 1.28%)과 residue층(미숙과: 2.25%, 완숙과: 10.8%)에서 아주 미미하게 나타났다. 그 중에서 BuOH층은 타이로시나제 활성 억제 저해율이 -158%로서 오히려 효소 활성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

3. 항균활성검색에서는 시료의 농도를 15mg/disc 이상으로 처리하였을 경우, 그람양성균인 단구균(*Micrococcus luteus*)에 대하여서는 미숙과와 완숙과 모두에서 항균 능력이 있음을 확인할 수 있었다. 특히 *Staphylococcus aureus* 주에 대한 미숙금귤의 항균력은 높게 나와 이 균주에 대한 천연 항균제로서의 가능성을 제시하였으며, 항균 물질의 분리 및 연구가 필요하다.
4. 항곰팡이 활성 검색에서는 올해 새로 돌아난 금귤 잎의 추출액은 예비실험에서 항곰팡이 활성이 있는 것을 확인할 수 있었지만, *Aspergillus niger*에 대한 항곰팡이 활성실험에서는 눈에 띄게 좋은 효과를 볼 수 없었다. 그러나 과일의 부패에 관여하는 푸른곰팡이균주를 이용한 추가적인 연구가 요망된다. 또한 금귤과 금귤 잎의 정유성분인 Limonene이 항곰팡이 활성과 항균활성에 미치는 영향을 조사하여 금귤의 부패과정에 대한 구체적인 연구가 요구된다.

이상의 결과를 보면, 금귤은 완숙도에 따라 그 활성 정도가 다르고 항균 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 미백과 항산화 효과는 미미한 정도로 확인되었다.

참고문헌

1. 안덕균, 한국본초도감, 경희대학교 한의과대학, 596
2. 고정삼, 김성학, 1995, 제주산 감귤류의 성분과 그 특성, 한국농화학회지, **38(6)**, 541-545.
3. Blois, M. S., 1958, Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**: 1199.

4. Kazuhisa M., Minoru F., 1996, Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **276**: 765-769.
5. Kyoung Tae Kim, Jin Guk Kim, 2004, Anti-melanogenesis Effect of Phenolic Compound Isolated from *Gastrodia elata*, **30**: 36-38.
6. Okano, Y., 1997, Evaluation of plant extracts as active agents for skin whitening, *Fragrance Journal*, **25(9)**: 56-62.
7. 한영숙, 2002, 항염증성 천연추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향, 아주대학교.
8. 강국철, 1999, 손바닥선인장으로부터 생리활성 성분의 분리 및 활성 확인, 제주대학교
9. 한영실, 2000, 백작약과 목단피로부터 향균물질의 동정 및 첨가식품의 보존효과

Screening of bioactive properties of *Fortunella japonica* var. *margarita* in jeju.

Hee-Jung Bu · Seung-woo · Lee · Min-Young Lee · Ju-Hee Kim
· Young-Dae Kim* · Sunjoo Lee

Department of Chemistry, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea,
Daekey high school, Jeju, Korea*

Abstract.

Solvent extracts of *Fortunella japonica* var. *margarita* obtained in Jeju island were investigated for bioactive properties such as radical scavenging, whitening, antibacterial and antifungal effects. No significant effects of whitening and radical scavenging with *Fortunella japonica* var. *margarita* extracts were shown. Solvent extracts of *Fortunella japonica* var. *margarita*, however, has shown moderate activities against several bacteria and fungi.