

감마선 조사가 감귤 정유의 생리활성에 미치는 영향

김현주¹ · 조철훈¹ · 이나영¹ · 손준호² · 안봉전² · 육홍선³ · 변명우^{1*}

¹한국원자력연구소 방사선연구원 방사선식품생명공학연구팀

²대구한의대 화장품소재공학과

³충남대학교 식품영양학과

Effect of Gamma Irradiation on Physiological Activity of Citrus Essential Oil

Hyun Joo Kim¹, Cheorun Jo¹, Na Young Lee¹, Jun Ho Son², Bong Jeon An²,
Hong Sun Yook³ and Myung Woo Byun^{1*}

¹Radiation Food Science & Biotechnology Team, Advanced Radiation Technology Institute,
Jeonbuk 580-185, Korea

²Dept. of Cosmeceuticals Science, Daegu Hanny University, Gyeongsan 712-715, Korea

³Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

Physiological activity of citrus essential oil (CEO) was determined to examine possible use of the food processing by-product as a functional material for food and cosmetic composition. The effect of gamma irradiation on the change of physiological activity also investigated at 0, 10 and 20 kGy. Limonene contents of CEO was $88.3 \pm 1.30\%$. Electron donating ability of CEO was 69%. Lipid oxidation was retarded by CEO. CEO showed antimicrobial activity against 1 yeast, 4 molds and 4 bacteria species tested. More than 80% of inhibition of cancer cell growth was presented by CEO using A549, HT29, HepG2, B16F10 and G361 cells at a 500 ppm level. Irradiation of CEO did not affect any physiological functions. A *Salmonella* mutagenicity assay indicated that the 20 kGy irradiated CEO did not show any mutagenicity. Therefore, CEO, which is a major by-product in citrus processing, could be used as a functional material in various application.

Key words: citrus essential oil, physiological activity, gamma irradiation

서 론

식품을 가공하는 데 있어 얻어지는 다량의 부산물은 경제적인 면과 생물학적 산소요구량 때문에 부산물 처리여부가 문제시 되고 있으며, 특히 식물에서 얻어지는 부산물 중에는 다량의 페놀 화합물을 함유하고 있어 환경에도 바람직하지 않은 영향을 주고있다. 페놀화합물은 항암효과 뿐만 아니라 항알레르기, 항바이러스, 항염 등 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려지면서 이에 대한 연구가 증가되고 있는 추세이다(1,2).

감귤류는 기능성이나 약효 성분이 많이 함유되어 있는 과일로서 우리나라는 기상적, 지리적으로 감귤 재배지 중 최북단에 위치하고 있어 내한성이 강한 만다린계의 온주밀감이나 감귤 생산의 주종을 이루고 있다. 감귤류에 함유된 성분으로 synephrine, flavonoids, limonoids, carotenoids 등의 다양한 화합물들이 알려져 있으며, 감귤류의 품종은 극히 많아 화학

적으로 검토되지 않은 성분들이 많이 있다. 또한 검토가 이루어진 것들 중에서도 기능성분의 확실한 평가가 매우 빈약한 실정이다(3).

감귤 정유는 감귤 껍질 flavedo층의 유선(oil glands)중에 함유되어 있는 방향성분으로, 동일 감귤 종(species)내에서도, 기후, 풍토, 과실의 속도, 저장기간 등에 따라 성분의 변화가 있다고 하였으며(4), 살균(5), 살충(6)효과 같은 다양한 생물활성을 가지고 있어 세정제, 식품향료, 의약품 등에 첨가제로 이용되고 있다. 정유의 주 성분인 d-limonene은 *Aspergillus parasiticus*의 성장과 aflatoxin 생성을 억제한다는 보고(7)와 citrus oil이 식물 병원균인 *Colltotrichum falcatum*, *Fusarium moniliforme*, *Ceratocystis paradoxa* 등에 항균성을 나타낸다는 보고가 있다(8). 또한 최근 Jo 등(9)은 무좀균과 비듬균의 생장억제에 감귤 정유가 효과적으로 식품 및 공중보건제품의 소재로 적합하다고 발표하였다.

감마선 조사기술은 식품의 저장 중 영양 및 관능적인 품질

*Corresponding author. E-mail: mwbyun@kaeri.re.kr
Phone: 82-63-570-3200, Fax: 82-63-570-3201

의 저하없이 병원성 및 부패성 미생물을 없애는 가장 효율적인 방법으로 알려져 있고(10), 전세계적으로 그 사용이 증가하고 있다. 최근에는 체내대사저해물질인 phytic acid에 감마선 조사를 함으로써 phytic acid 수준은 저감화하고, 동시에 항산화 작용을 증가시켰다는 연구가 보고된 바 있다(11). Jo 등(12)은 녹차추출물을 감마선 조사를 함으로써 색상을 개선하고 기능성을 유지 또는 상승시켰으며, Jeon 등(13)은 오미자 추출물에 감마선을 조사함으로써 항산화 및 항균 작용을 증가시켰다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 폐자원을 활용한 기능성 신소재 개발 연구를 위해 감귤 음료 가공 중 생성되는 부산물인 감귤 과피를 추출·정제하여 얻어진 감귤 정유의 생리활성 효과를 알아보았으며, 더불어 감마선 조사에 의한 감귤 정유의 생리활성에 변화가 일어나는지도 살펴보았다.

재료 및 방법

감귤 정유 추출

감귤 정유를 추출하기 위한 감귤 과피는 제주도지방개발공사(Jeju Provincial Development Co., Jeju, Korea)에서 감귤 가공 중 얻어진 감귤 과피 부산물을 이용하였다. 과피를 2차 펄프 제거과정을 통해 압착하여 감귤 추출물을 얻었다. 이를 4단계에 거쳐 살균 및 냉각을 한 후 분별증류를 하여 감귤 정유를 얻었으며 이를 실험에 사용하였다.

감마선 조사

감마선 조사는 한국원자력연구소(Daejeon, Korea) 내 선원 10만 Ci, Co-60 감마선 조사시설(point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co., Ltd., Ottawa, ON, Canada)을 이용하여 실온($14 \pm 1^\circ\text{C}$)에서 분당 83.3 Gy의 선량율로 각각 0, 10 및 20 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter(5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다. 조사된 귤 정유는 screw-bottle에 밀봉하여 실온에 보관하여 실험에 사용하였다.

감귤 정유의 limonene 함량 분석

감귤 정유 및 감마선 조사된 정유의 limonene 함량은 기체 크로마토그래프(Agilent GC 6890, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. Limonene 분석을 위한 GC 분석 컬럼으로 HP-INNOWax capillary(30.0 m \times 250 μm \times 0.25 μm)를 사용하였고, 컬럼 온도는 60°C 에서 5분간 유지하고 이어서 210°C 까지 분당 10°C 승온한 후 10분간 유지하였다. 검출기는 Flame Ionization Detector(FID)를 사용하였고, 주입구의 온도는 210°C 였으며 검출기의 온도는 240°C 를 유지하였다. 운반기체는 질소가스(0.9 mL/min)를 사용하였고 시료의

주입량은 1 μL 였으며 split mode(split ratio=20:1)로 분석하였다.

감귤 정유의 항산화 효과 측정

감귤 정유의 항산화 활성은 전자공여능(electron donating ability)과 지질산패도(2-thiobarbituric acid reactive substance value, TBARS)를 이용하여 측정하였다.

감귤 정유의 전자공여능은 Blois(14)의 방법을 이용하여 측정하였다. 감귤 정유 1 mL에 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) 2 mL을 넣고 교반한 후 30분 동안 실온에 정치한 다음 반응용액을 분광광도계(UV 1600 PC, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 다음과 같은 계산식에 의해 환산되었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = [1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도})] \times 100$$

지질산패도(TBARS)의 측정은 분쇄돈육 5 g을 15 mL 증류수와 감귤 정유 1 mL과 함께 균질기(DIAX 900, Heidoph Co., Ltd., Germany)를 사용하여 균질화하였다. 균질화된 시료를 37°C 항온수조에서 저장하면서 0, 60, 120 및 180분 후에 시료 1 mL을 취하여 2-thiobarbituric acid(TBA)/trichloroacetic acid(TCA) 용액(20 mM TBA in 15% TCA) 2 mL과 50 μL BHA를 혼합한 후 90°C 수조에서 15분간 가열한 후 얼음물에서 10분간 냉각하였다. 반응용액을 원심분리기(VS-5500, Vision scientific Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 600 \times g에서 20분 동안 원심분리한 후 그 상등액을 분광광도계(UV 1600 PC, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 532 nm에서 측정하였다. 대조구는 감귤 정유 대신 증류수를 사용하였다. 측정된 흡광도를 기준으로 표준곡선에 따라 TBARS값을 mg malondialdehydes/kg sample로 계산하였다.

감귤 정유의 항균 효과 측정

감귤 정유의 항균효과는 paper disc를 이용한 agar diffusion법 및 최소저해농도(Minimum Inhibition Concentration; MIC)를 이용하여 측정하였다.

감귤 정유의 생육 저해환 측정을 위해 멸균한 각각의 생육 배지를 petri dish에 15 mL씩 분주하여 응고시킨 후 균 배양액 0.1 mL을 접종한 후 고르게 퍼지도록 하였다. 그 다음 멸균된 paper disc를 평판배지 표면에 밀착시킨 후 귤 정유 50 μL 를 첨가하여 각 균주의 배양온도에서 배양하여 paper disc 주변에 생성된 저해환(mm)의 직경을 나타냈으며 실험은 2회 반복하여 평균값으로 나타냈다.

감귤 정유의 최소저해농도 측정을 위해 멸균된 배지에 일정농도의 귤 정유를 첨가한 후 활성화시킨 미생물 배양액을 각각의 배지에 1%(v/v)씩 접종하였고, 72시간 동안 배양하여 표준한천배양법을 이용하여 측정하였다. 효모, 곰팡이 및

세균의 생균수 계수는 각 균주의 최적 배지 및 최적온도에 72시간 배양한 후 집락수를 계수하였으며, 미생물 수는 시료 1 mL 당 colony forming unit(CFU)로 계수하였다. 이 때 굴정유를 녹이기 위해 사용한 10% dimethyl sulfoxide(DMSO) 자체의 항균력을 배제하기 위하여 처리농도와 동일하게 10% DMSO만을 첨가한 대조구를 설정하였다.

감귤 정유의 암세포 증식 억제 효과 측정

감귤 정유의 암세포주에 대한 증식 억제 효과는 Chermichael 등(15)의 방법에 따라 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 실시하였다. 본 실험에 이용한 세포 A549(lung cancer), HT-29(colon cancer), HepG2(liver cancer), G361(melanoma), B16F10(melanoma) 등은 Korean Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하였다. 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 unit/mL의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 RPMI 1640(Gibco-BRL Co., Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

배양된 암세포주를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well이 되게 분주하고 시료를 20 µL 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였고, 대조군은 시료와 동량의 DMSO를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 20 µL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well 당 DMSO: ethanol(1:1) 150 µL를 가하여 30분간 교반한 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포주의 성장억제효과를 측정하였다. 암세포 증식 억제율은 다음 계산식에 의해 환산되었다.

$$\text{암세포 증식 억제율(\%)} = [1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도})] \times 100$$

감마선 조사 감귤 정유의 돌연변이원성 시험

시험방법은 Maron과 Ames(16)의 방법에 준하여 실시하였다. 시험에 사용된 균주는 *Salmonella* Typhimurium LT2를 친주로 하는 *S. Typhimurium* TA98과 TA100으로 한국화학연구소 안전성 센터에서 분양받아 형질을 확인 후 사용하였다. 대사활성을 위한 간 균질액(S9 fraction)은 Sprague-Dawley rat의 간으로부터 분리한 것으로 Oriental Yeast Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, 5%(v/v)의 S9 mixture를 제조하여 사용하였다. S9 mixture는 0.5 mL/plate로 처리했으며, 그의 활성은 2-aminoanthracene(2-AA)의 돌연변이 유발로 확인하였다. 음성대조물질로는 시험물질의 조제에 사용한 DMSO를 사용하였으며, 양성대조물질로는 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO), sodium azide(SA) 및 2-AA를 Sigma사(St Louis MO, USA)로부터 구입하여 이용하였다.

시험물질의 처리는 대사활성계 적용(+S) 및 미적용(-S)하여 direct plate incorporation 방법으로 하였으며, 각 농도

군당 2개 plate를 사용하였다. 시험물질 0.1 mL과 S9 mixture(또는 멸균증류수) 0.5 mL에 nutrient broth에서 12시간 배양시켜 대수기(약 2×10⁹ cells/mL) 상태에 이르도록 한 균의 배양액 0.1 mL을 top agar에 혼합하여 minimal glucose agar plate에 부어 고화시킨 다음, 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 집락수를 계수하였다.

시험 결과는 복귀돌연변이 집락수의 평균과 표준편차로 나타내었으며, 돌연변이 유발성의 판정은 복귀변이 집락수가 용매 대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 하였다.

통계 분석

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 얻어진 결과들은 SPSS software(17)에서 프로그램된 general linear model procedure, least square 평균값을 Duncan's multiple range test 방법을 사용하여 평가하였다(p<0.05).

결과 및 고찰

감귤 정유의 limonene 함량

감귤 정유의 주 성분인 limonene의 함량변화를 분석한 결과 88.3±1.30%로 나타났다. 0, 10 및 20 kGy로 감마선 조사한 limonene의 함량은 유의적으로 차이가 없는 것으로 확인하였다(p>0.05). Dugo 등(18)은 과일에 함유한 limonene의 함량이 레몬, 오렌지 및 포도에서 각각 50%, 93% 및 97% 함유하였다고 보고하였다. Kim 등(19)은 온주밀감 정유를 분석한 결과 limonene 함량이 68.69%로 나타났고, 외국에서 생산된 감귤의 limonene 함량과 큰 차이가 없었다고 보고하였다. Moussaid 등(20)은 2 kGy로 감마선 조사하였을 때 오렌지의 limonene 함량이 증가하였으나 유의적인 차이는 없다고 보고하였으며 본 실험 결과와 유사하였다.

감귤 정유의 항산화 효과

감마선 조사한 감귤 정유의 전자공여능 측정 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 자유라디칼을 소거하는 능력은 지방산화 억제력과 깊은 상관관계가 있으며 본 실험에서 사용한 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능 시험은 천연물 특히 식물체에 존재하는 성분의 라디칼 소거능을 확인하는 데 광범위하게 사용되고 있다. 굴 정유 원액에 대한 전자공여능은 약 69%로 나타났다. 그러나 감마선 조사에 의한 변화는 유의적인 차이가 없었다.

Kang 등(21)은 추출방법을 달리한 귤피 추출액의 전자공여능이 33%로 나타났으며 감마선 조사에 의한 차이는 없는 것으로 보고하였다. Jeong 등(22)의 보고에서는 감귤 과피에 공유결합되어 존재하는 페놀 화합물이 원적외선이 절단하여 유리되어 페놀 함량이 증가되면서 DPPH 라디칼 소거능의 증가에 영향을 준다고 하였다.

감귤 정유가 지질산패에 미치는 영향을 알아보기 위해 분

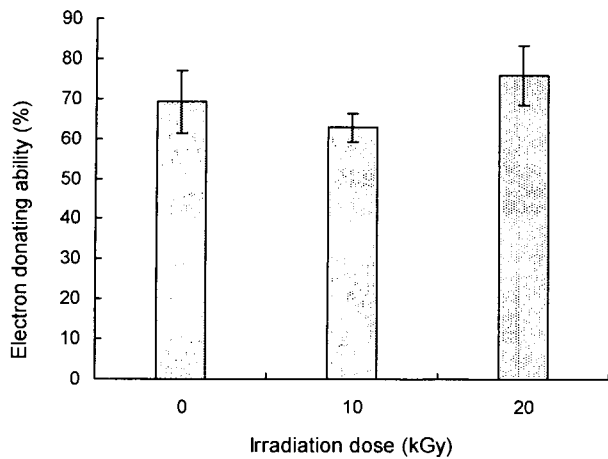


Fig. 1. Electron donating ability (%) of irradiated citrus essential oil.

쇄돈육을 이용하여 저장시간에 따른 지질산패도를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 대조군과 감귤 정유 첨가에 따른 지질 산패도는 감귤 정유 첨가(5%) 시 대조군보다 낮게 나타나 지질산패가 억제되었음을 확인하였다. 그러나 감마선 조사에 의한 변화는 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다. Jo 등(23)은 냉동 건조한 감귤 과피 추출물 분말(0.1%)이 쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 연어 패티 등의 육제품의 지방산화를 억제하였다고 보고하였다. 또한 Kulisic 등(24)의 연구에서도 oregano 정유(500 ppm)가 난황의 지방산화를 억제하였다고 보고하였다. 본 연구 결과에서 보듯이 감귤 정유를 식육에 첨가 시 지방산화 억제효과가 있는 것으로 판단된다.

감귤 정유의 항균 효과

감귤 정유의 항균효과 측정을 위해 세균 5종, 효모 1종 및 곰팡이 4종에 대한 disc 법을 이용한 생육 저해환 측정 결과를 Table 1에 나타내었다. 이 중 효모인 *Pichia sub-*

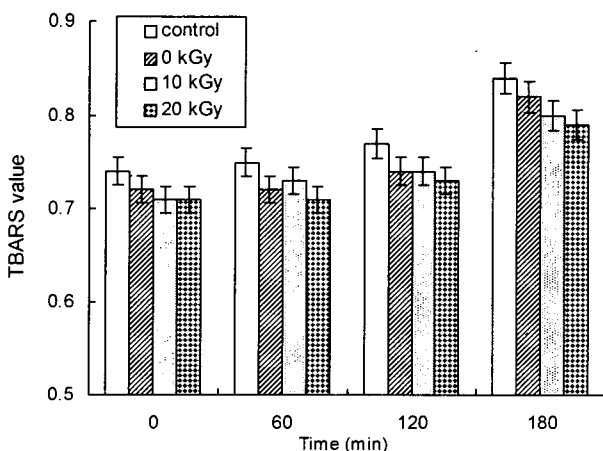


Fig. 2. 2-thiobarbituric acid reactive substance value (TBARS) of meat homogenate containing citrus essential oil (5%) during storage at 37°C.

Table 1. Antimicrobial activity of citrus essential oil measured by paper disc diffusion method

Microorganisms	Diameter (mm)		
	0 kGy	10 kGy	20 kGy
Bacteria			
<i>Salmonella</i> Typhimurium	16.5 ¹⁾	14.5	17.5
<i>Escherichia coli</i>	13.5	14.5	11.5
<i>Listeria ivanovii</i>	14	13	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	11.5	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- ²⁾	-	-
Yeast			
<i>Pichia subpelliculosa</i>	44	43.4	43.1
Mold			
<i>Aspergillus flavus</i>	20.9	19.6	20.9
<i>Aspergillus usami</i>	20.3	20.3	20.3
<i>Penicillium verruculosom</i>	14.4	18.3	14.4
<i>Muco hiemalis</i>	29.4	14.4	26.2

¹⁾Clear zone diameter (disc diameter; 8.0 mm).

²⁾No inhibition effect.

*pelliculosa*에 대한 생육저해환이 43~44 mm로 나타났으며, 곰팡이에 대한 생육저해환은 14~30 mm로 나타났다. 세균에 대한 생육저해환은 *Pseudomonas aeruginosa*를 제외하고 10~18 mm 정도로 감귤 정유는 대부분의 미생물의 생육을 억제시키는 것으로 확인되었다.

감귤 정유의 최소저해농도 측정을 위해 생육 저해환 측정 결과를 토대로 항균활성을 보인 세균 4종, 효모 1종 및 곰팡이 4종에 대한 농도에 따른 생육저해효과 결과를 Table 2~4에 나타냈다. Paper disc 법에서 감귤 정유에 민감한 것으로 나타난 효모 *Pichia subpelliculosa*에 대한 시험에서 농도범

Table 2. Inhibition of yeast growth by citrus essential oil with different concentrations

Sample	Concentration (ppm)	Microorganisms (log CFU/mL)
		<i>Pichia subpelliculosa</i>
Initial		4.50
Control		7.12 ^a
0 kGy	10	6.50 ^a
	100	4.65 ^b
	250	ND ^{c1)}
	500	ND ^c
	SEM ²⁾	0.02
10 kGy	10	5.94 ^a
	100	ND ^b
	250	ND ^b
	500	ND ^b
	SEM ²⁾	0.07
20 kGy	10	6.03 ^a
	100	2.40 ^b
	250	ND ^c
	500	ND ^c
	SEM ²⁾	0.06

¹⁾Viable not detected at detection limit <10¹ CFU/mL.

²⁾Standard errors of the mean (n=8).

^{a-c)}Means with the same letter in each sample are not significantly different (p<0.05).

Table 3. Inhibition of bacterial growth by citrus essential oil with different concentrations

Sample	Concentration (ppm)	Microorganisms (log CFU/mL)			
		<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>S. aureus</i>
Initial	1,000	6.38	7.584	7.32	6.76 ^a
Control	1,000	8.30	8.38	8.24 ^a	8.05 ^a
0 kGy	1,000	8.26 ^a	8.01 ^a	9.43 ^a	8.12 ^a
	2,500	ND ^{b1)}	7.91 ^a	8.05 ^b	7.98 ^a
	5,000	ND ^b	7.79 ^b	3.75 ^c	2.82 ^b
	10,000	ND ^b	7.57 ^c	ND ^d	ND ^c
	SEM ²⁾	0.02	0.03	0.11	0.09
10 kGy	1,000	8.48 ^a	7.92 ^a	9.72 ^a	7.95 ^a
	2,500	ND ^b	7.74 ^{ab}	7.79 ^b	7.68 ^b
	5,000	ND ^b	7.60 ^{bc}	2.95 ^c	4.70 ^c
	10,000	ND ^b	7.44 ^c	ND ^d	ND ^d
	SEM ²⁾	0.01	0.07	0.14	0.04
20 kGy	1,000	8.29 ^a	8.30 ^a	9.19 ^a	7.97 ^a
	2,500	ND ^b	7.84 ^b	7.25 ^b	7.82 ^a
	5,000	ND ^b	7.78 ^{bc}	3.27 ^c	2.99 ^b
	10,000	ND ^b	7.69 ^c	ND ^d	ND ^c
	SEM ²⁾	0.04	0.04	0.09	0.05

¹⁾Viable not detected at detection limit <10¹ CFU/mL.

²⁾Standard errors of the mean (n=8).

^{a~d}Means with the same letter in each sample are not significantly different (p<0.05).

Table 4. Inhibition of fungal growth by citrus essential oil with different concentrations

Irradiation dose (kGy)	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus usami</i>	<i>Muco hiemalis</i>	<i>Penicillin verruculosom</i>
0	10,000 ¹⁾	5,000	- ²⁾	-
10	1,000	1,000	5,000	5,000
20	5,000	1,000	-	10,000

¹⁾Concentration (ppm) of CEO for inhibition of fungal growth.

²⁾No inhibition effect.

위는 10, 100, 250 및 500 ppm으로 하였으며 그 결과 대조군은 초기 배양액보다 3 log cycle 정도 자랐으며 비조사구는 250 ppm, 조사구는 100~250 ppm 첨가 시 효모의 생육을 억제하는 것으로 확인되었다. 주요 식중독 세균 4종(*Salmonella Typhimurium*, *Escherchia coli*, *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus aureus*)에 대한 시험에서 농도 범위는 1,000, 2,500, 5,000 및 10,000 ppm으로 하였다. 그 결과 *Salmonella Typhimurium*의 경우 대조군은 초기 배양액보다 2 log cycle 정도 자랐으며 감귤 정유는 2,500 ppm 첨가시 세균의 생육을 억제하는 것으로 나타나 다른 세 균주에 비해 *Salmonella Typhimurium*에 대한 항균 활성이 가장 뛰어난 것으로 확인되었다. *Listeria ivanovii*와 *Staphylococcus aureus*의 경우 감귤 정유 5,000 ppm 첨가시 초기 배양액보다 5~6 log cycle 정도 감소하였으며 10,000 ppm 첨가시 생육이 억제되었음을 확인하였다. *Escherchia coli* 경우 감귤 정유는 10,000 ppm 첨가 시 1,000 ppm 첨가할 때보다 1 log cycle 정도 감소한 것으로 나타나, 다른 균주에 대한 항균활성보다 낮은 것으로 확인되었다. 곰팡이 4종(*Aspergillus flavus*, *Aspergillus*

usami, *Muco hiemalis*, *Penicillin verruculosom*)에 대한 시험에서 농도 범위는 1,000, 5,000 및 10,000 ppm으로 하였으며, 그 결과 감귤 정유는 *Aspergillus usami*에 대한 항 곰팡이 활성이 가장 뛰어난 것으로 확인되었고 *Muco hiemalis*에 대한 항 곰팡이 활성이 가장 낮은 것으로 나타났다.

이와 같이 감귤 정유의 항균활성 시험결과, 효모는 250 ppm, 세균은 2,500~5,000 ppm, 곰팡이는 5,000~10,000 ppm에서 생육이 저해되는 것을 확인하였으며 감마선 조사에 의한 변화는 유의적인 차이가 없었다. 식물에서 추출된 정유와 정유의 구성성분은 항균활성이 뛰어나서 식품 내 잔존하는 미생물의 성장을 억제할 수 있는 식품 첨가물로서의 사용여부에 많은 연구가 이루어지고 있다(9). Lee 등(25)은 감귤 정유의 항균활성 연구에서 주성분인 limonene보다는 terpenoid와 phenolic compounds에 의한 항균효과가 크다고 보고하였다. Yamazaki 등(26)은 carvacrol과 thymol이 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균력이 뛰어난 반면, limonene, pinene, allyl isothiocyanate와 linalool은 낮은 항균활성을 보였다고 보고하였다. 한편, Jang(27)은 limonene 자체가 대부분의 미생물에 대하여 독성을 지니므로 이에 기인한 대량 생산의 어려움과 같은 문제점이 돌출되어 limonene의 bioconversion을 통한 고부가가치 물질 개발에 어려움을 주고 있다고 보고하였다. Caccioni 등(28)은 과일의 성분이 곰팡이를 억제하는 특징이 있어서 감귤 정유도 식품 및 화장품 산업에 적용할 수 있는 소재가 될 것이라고 보고하였으며 최근 감귤 정유가 무좀균과 비듬균의 성장억제에도 효과가 있다는 보고(9)가 있어 본 연구결과를 뒷받침하였다.

MTT assay에서 감귤 정유의 암세포 증식억제 효과

MTT 검색법은 96-well plate를 사용하며 검사결과를 ELISA reader(Multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단하게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 sulforhodaminb(SRB) 검색법과 더불어 널리 사용되고 있는 방법 중 하나이다(29).

감귤 정유의 암세포에 대한 세포증식 억제율은 Fig. 3에 나타났다. 감귤 정유 500 ppm 첨가시 A549(lung), HT-29(colon), HepG2(liver), B16F10(melanoma) 및 G361(melanoma)세포에 대한 증식 억제율은 각각 90, 95, 92, 92 및 91%로 높은 세포 증식 억제율을 보였다. 감마선 조사에 의한 차이는 없는 것으로 확인되었다.

Kim 등(30)은 솔잎 추출물이 폐암 세포인 A549에 대하여

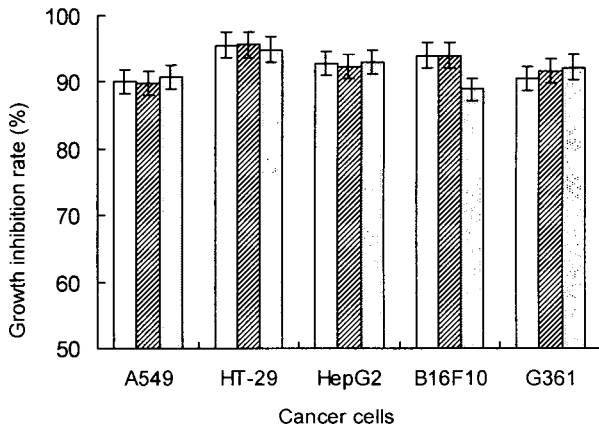


Fig. 3. Growth inhibition effect of citrus essential oil (500 ppm) on cancer cells.

The cell lines used were lung (A549), colon (HT29), liver (HepG2), melanoma (B16F10 and G361) cells.

□: 0 kGy, ▨: 10 kGy, ▤: 20 kGy.

85.99%, 78.59%의 증식억제 효과를 보였다고 보고하였으며, Lee 등(31)은 광항 추출물 및 정유의 항암 효과는 ED₅₀ 1.24~6.81 µg/mL의 범위에서 증식억제 효과가 있다고 보고하였다.

감마선 조사 감귤 정유의 돌연변이원성 유무 검증

예비시험결과에 따라 모든 시료는 200 µg/plate를 최고농도로 설정하여 복귀돌연변이 시험을 수행하였다. 감마선 조사한 귤 정유를 첨가하였을 때 *Salmonella* Typhimurium TA98와 TA100에 대한 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과는 Table 5와 같다. 우선 대사활성 부재시의 경우, 감마선 조사한 귤 정유는 모든 시험군주에서 시험 적용 농도인 50~200 µg/plate의 범위에서 복귀돌연변이 집락수가 용매 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 대사활성계(S-9 mixture)를 도입하였을 때 시험물질에 대해 *Salmonella* Typhimurium을 이용한 복귀돌연변이 시험 결과에서도 시험한 모든 검체는 적용 농도에서 복귀돌연변이 집락수가 유의적으로 차이가 없었다. 일반적으로 돌연변이원성의 판정은 음성대조군 복귀변이 집락수의 2배 경위를 양성으로 하므로 귤 정유에 대한 시험적용농도에서 복귀변이를 유발하지 않는 것으로 보아 감마선 조사에 의한 돌연변이원성은 없는 것으로 나타났다.

정유 중에 세포 성장억제효과 및 항균효과를 나타낸다는 보고(32)가 있었으나 limonene 자체가 대부분의 미생물에 대하여 독성을 지닌다고 한다(27). 또한 Park(32)은 많은 정유가 acetaminophen으로 유도한 지질과산화물을 저해한다는 보고를 하였지만 생리활성 정유의 개발을 위해서는 물성과 관련하여 돌연변이원성에 대한 연구가 필요하다고 보고하였다. 따라서 200 µg 이하 감귤 정유는 독성을 일으키지 않으며 유용하게 쓰일 수 있는 식품 및 화장품 소재라 사료된다.

Table 5. Revertant colonies in the *Salmonella* Typhimurium reversion assay of the citrus essential oil

Irradiation dose (kGy)	Dose (µg/plate)	Number of revertant colonies (His+) per plate			
		TA98 (-S9)	TA98 (+S9)	TA100 (-S9)	TA100 (+S9)
0	200	3±5 ¹⁾	6±1	79±7	126±18
	50	4±7	8±2	93±4	170±4
	10	6±3	11±1	97±18	189±19
10	200	5±1	13±8	100±8	197±7
	50	6±2	13±4	121±5	216±28
	10	10±1	23±8	153±31	242±13
20	200	3±1	10±1	188±16	209±9
	50	5±2	10±1	188±7	283±14
	10	6±3	11±15	204±24	257±9
Negative control	DMSO	47±17	52±3	258±20	318±15
Positive control	4-NQO	0.5	1,460±283		
	2-AA	2		1,193±123	
	SA	0.5			1,940±57
	2-AA	2			1209±564

Abbreviations: 4-NQO, 4-nitroquinoline-1-oxide; SA, sodium azide; 2-AA, 2-aminoanthracene.

¹⁾Values are the mean±SD (p<0.05).

이상의 결과를 종합한다면 감귤 정유는 항산화, 항균, 암세포 성장 억제 등의 기능을 가진 천연 소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

폐자원을 이용한 기능성 신소재 개발 연구를 위해 감귤 음료 가공 중 생성되는 부산물인 감귤 과피를 추출·정제하여 얻어진 감귤 정유의 생리활성 효과를 검증하고 감마선에 의한 영향도 확인하였다. 감귤 정유의 limonene의 함량은 88.3±1.30%로 나타났으며 감마선 조사한 시료에서도 limonene의 함량은 차이가 없는 것으로 나타났다. 감귤 정유의 전자공여능은 약 70%로 나타났으며 돈육에 감귤 정유 첨가 시 지질산패가 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 감귤 정유에 대한 항균 활성은 paper disc diffusion test 결과를 바탕으로 농도에 따른 생육저해효과를 측정한 결과 yeast는 250 ppm에서, bacteria는 2,500~5,000 ppm에서, mold는 5,000~10,000 ppm에서 생육이 억제되어, yeast에 대한 항균활성이 가장 우수한 것으로 나타났다. MTT assay를 이용한 세포독성실험 결과 대부분의 암세포에서 약 90% 이상의 억제율을 보였으며 Ames test를 이용한 복귀돌연변이 시험에서는 200 µg/plate이하일 때 감귤 정유의 돌연변이원성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 전체적인 시험 결과 감마선 조사에 의한 생리활성 변화의 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서 식품 및 공중보건제품 소재로서 가공부산물인 귤 정유는 경제적이면서 효과적으로 사용될 수 있으리라 기대된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 원자력중장기연구개발사업으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Meyer A, Yi O, Person D, Waterhouse AL, Frankel E. 1997. Inhibition of human low-density lipoproteins oxidation in relation to phenolic antioxidants in grapes. *J Agric Food Chem* 43: 1638-1643.
2. Miler EG, Gonzales-Sanders AP, Couvillion AM, Binnie WH, Hasegawa S, Lam LKT. 1994. Citrus limonoids as inhibitors of oral carcinogenesis. *Food Technol* 48: 110-114.
3. Jeong TS, Choi MS, Park YB, Bok SH. 2000. Cholesterol-lowering or antiatherogenic effects of citrus bioflavonoids and their mechanisms. *Food Industry and Nutrition* 5: 21-26.
4. Kimball DA. 1991. Citrus oils, aromas, and essences. In *Citrus processing: quality control and technology*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. p 73-101.
5. Dabbah R, Edward VM. 1970. Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected foodborne bacteria. *Appl Microbiol* 19: 27-31.
6. Donpedro KN. 1996. Fumigant toxicity of citrus peel oils

- against adult and immature stages of storage insect pests. *Pesticide Sci* 47: 213-223.
7. Alderman GG, Marth EH. 1976. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by citrus oils. *Z Lebensm-Unters-Forsch* 160: 353-358.
8. Singh G. 1993. Chemical and fungitoxic investigation on the essential oil of *Citrus sinensis*. *Z Pflanzenschutz* 100: 69-74.
9. Jo C, Park BJ, Chung SH, Kim CB, Cha BS, Byun MW. 2004. Antibacterial and anti-fungal activity of *Citrus (Citrus unshiu)* essential oil extracted from peel by-product. *Food Sci Biotechnol* 13: 384-386.
10. WHO. 1999. High dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. WHO Technical Report Series 890. World Health Organization, Geneva. p 9-37.
11. Park HR, Lee CH, Ahn HJ, Cha BS, Byun MW. 2004. Radiolytic and antioxidative characteristics of phytic acid by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1252-1256.
12. Jo C, Son JH, Lee HJ, Byun MW. 2003. Irradiation application for color removal and purification of green tea leaves extract. *Radiat Phys Chem* 66: 179-184.
13. Jeon TW, Park JH, Shin MG, Kim KH, Byun MW. 2003. Effects of gamma irradiation on biological activities and color changes of extracts of *Schizandra fructus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 137-142.
14. Blois MS. 1958. Antioxidant activity determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
15. Charmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
16. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
17. SPSS. 1970. Statistical Package for the Social Science. Norman.
18. Dugo G, Verzera A, Stango H, d'Alcontres D, Cotoneo A, Ficarra R. 1993. On the genuineness of citrus essential oils. Part XLI. Italian bitter orange essential oil: composition and detection of contamination and addition of oils and terpenes of sweet orange and of lemon. *Flav Fragr J* 8: 25-33.
19. Kim YK, Hyun SW, Ko YH. 1999. Analysis of essential oils from the peel of Mandarin (*Citrus unshiu* Marc. Var. Okitsu). *Kor J Food Sci Technol* 31: 1178-1183.
20. Moussaid M, Lacroix M, Nketsia-Tabiri J, Boubekri C. 2000. Effects of irradiation in combination with waxing on the essential oils in orange peel. *Radiat Phys Chem* 57: 269-271.
21. Kang HJ, Jo C, Kim DJ, Seo JS, Byun MW. 2003. Physiological activities of citrus peel extracts by different extraction methods and gamma irradiation. *Kor J Food Preservation* 10: 388-393.
22. Jeong SM, Kim SY, Park HR, Lee SC. 2004. Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of extracts from *Citrus unshiu* peels. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1580-1583.
23. Jo C, Kang HJ, Lee M, Lee NY, Byun MW. 2003. The antioxidative potential of lyophilized citrus peel extract in different meat model systems during storage at 20°C. *J Muscle Foods* 15: 95-107.
24. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry* 85: 633-640.
25. Lee HO, Back SH, Han DM. 2001. Antimicrobial effects of *Chamaecyparis obtusa* essential oil. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 29: 253-257.

26. Yamazaki K, Yamamoto T, Kawai Y, Inoue N. 2004. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbial* 21: 283-289.
27. Jang HC. 1994. Microbiological bioconversion of limonene. *J Kor Food Sci* 27: 79-83.
28. Caccioni DR, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int J Food Microbial* 43: 73-79.
29. Ahn BJ, Lee SA, Son JH, Kwak JH, Park JM, Lee JY. 2004. Anticancer and antimicrobial activity of *Sanguisorba officinalis* L. *J Kor Soc Appl Biol Chem* 47: 141-145.
30. Kim EJ, Jung SW, Choi KP, Ham SS. 1998. Cytotoxic effect of the pine needle extracts. *Kor J Food Sci Technol* 30: 213-217.
31. Lee XS, Song HJ, Park KH, Shin MK. 2004. Anticarcinogenic effects of water extract of *Agastache rugosa* and *Agastache rugosa* essential oil. *Kor J Herbology* 19: 109-121.
32. Park HJ. 2002. Mutagenicity of the essential oils in Ames test. *Kor J Pharmacogn* 33: 372-375.

(2005년 4월 11일 접수; 2005년 6월 15일 채택)