

유자씨 오일의 항산화, 항염, 항알러지 효과 및 인체 피부보호 효과에 대한 연구

고 은 아* · 남 승 희*** · 정 하 나** · 김 보 윤* · 곽 상 화* · 김 선 영* · 홍 인 기* · 강 학 희*

*한국콜마(주) 종합기술원

**전남대학교 식품공학과 & 농업과학기술연구소 연구교수

(2020년 6월 12일 접수, 2020년 7월 27일 수정, 2020년 8월 10일 채택)

Antioxidant, Anti-inflammatory and Anti-allergenic Effects of *Citrus Junos* seed Oil and its Human Skin Protection

Eun Ah Ko⁺, Seung-Hee Nam⁺⁺⁺, Hana Jeong^{**}, Bo Yun Kim^{*}, Sang Hwa Kwak^{*},
Sunyoung Kim^{*}, In Ki Hong^{*}, and Hakhee Kang^{*}

^{*}Kolmar Korea R&D Center, 61, Heolleung-ro 8-gil, Seocho-gu, Seoul 06800, Republic of Korea

^{**}Institute of Agricultural Science and Technology & Department of Food Science & Technology,
Chonnam National University

(Received June 12, 2020; Revised July 27, 2020; Accepted August 10, 2020)

요약: 본 연구에서는 유자 완숙과의 중량비 13%를 차지하지만 대부분 폐기 처분되어 활용이 되지 않는 유자씨앗의 활용도를 높이기 위하여, 냉압착 방법으로 추출한 유자씨 오일의 피부미용 효능을 연구하였다. 유자씨 오일은 주로 oleic acid와 linoleic acid로 이루어진 불포화 지방산을 약 74% 함유 하는 것으로 확인되었으며, 주로 유자 과피에 포함되는 limonene은 약 0.0187%로 매우 낮은 함량을 포함하였다. 유자씨 오일의 DPPH radical 소거 활성능력을 평가한 결과, 5% 농도에서 26%의 DPPH 라디칼 소거능력을 확인하였다. 항염 효능을 확인하기 위해 유자씨오일에 대한 RAW 264.7 세포 독성 시험 및 NO 생성을 시험한 결과, 세포 독성을 나타내지 않는 0.05% 농도에서 NO 생성을 53% 억제하였다. 그리고 항알러지 효능확인을 위한 RBL-2H3 세포 독성 및 β -hexosaminidase 방출 억제 효능 시험에서도 세포 독성을 나타내지 않는 0.05% 농도에서 β -hexosaminidase 방출을 26% 억제함을 확인하였다. 마지막으로 유자씨 오일을 5% 함유한 O/W 에멀전의 인체 적용 시험 결과에서는 caprylic/capric triglyceride를 동량 함유하는 대조 에멀전에 비하여 높은 피부 보습 효능을 나타내었다. 따라서 유자씨 오일은 우수한 스킨케어 소재로 활용 될 수 있을 것으로 판단된다.

Abstract: In this study, in order to increase the utilization of *Citrus junos* seeds, which account for 13% of the weight ratio of *Citrus junos* ripened fruit, but are mostly discarded and not utilized, the efficacy of skin beauty of *Citrus junos* seed oil extracted by cold pressing was studied. *Citrus junos* seed oil was found to contain approximately 74% of unsaturated fatty acids consisting mainly of oleic acid and linoleic acid, and limonene, which is mainly contained in *Citrus junos* peel, contained a very low content of about 0.0187%. As a result of evaluating the DPPH radical scavenging activity of *Citrus junos* seed oil, 26% of DPPH radical scavenging ability was confirmed at 5% concentration of *Citrus junos* seed oil. To confirm the anti-inflammatory effect, as a result of testing RAW 264.7 cytotoxicity test and NO production for *Citrus junos* seed oil, NO production was suppressed by 53% at a concentration of 0.05% that does not show cytotoxicity. In addition, in the RBL-2H3 cytotoxicity and β -hexosaminidase release inhibitory efficacy test

† 주 저자 (e-mail: a8020@kolmar.co.kr)

call: +82-10-3616-3352/+82-2-3459-5550

†† 주 저자 (e-mail: namsh1000@hanmail.net)

call: +82-10-4265-0308/+82-62-530-0207

for anti-allergic efficacy confirmation, it was confirmed that β -hexosaminidase release was suppressed by 26% at a concentration of 0.05% that did not show cytotoxicity. Lastly, in the human skin application test result of O/W emulsion containing 5% of *Citrus junos* seed oil, it showed higher skin moisturizing effect than the control emulsion containing the same amount of caprylic/capric triglyceride. Therefore, it is thought that *Citrus junos* seed oil might be used as an excellent skin care material.

Keywords: *Citrus junos*, unsaturated fatty acid, anti-inflammation, anti-allergy, moisturization

1. 서 론

인체의 피부는 화학자극제, 환경오염 및 자외선과 같은 외부의 자극에 노출되면 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 증가시켜 피부의 면역 기능 저하, 염증성 알러지 질환인 여드름, 아토피성 피부염 유발 및 기미, 주름, 탄력 감소 등의 각종 기능 저하로 인한 노화가 촉진 된다[1-3]. 따라서, 유기체는 다양한 방어 시스템과 글루타티온과 같은 항산화 물질을 사용하여 상대적으로 낮은 농도의 활성 산소를 유지해야 하며[4], 흔히 항산화 화합물로 불리는 폴리페놀은 다양한 세포 및 분자과정을 조절하기 위해 표적 단백질과 상호작용하여 건강을 지키는데 중요한 역할을 한다[5, 6]. 비만세포는 골수의 조혈줄기세포에서 유래한 세포로 말초신경에 가까운 혈관 주위의 피부에서 발견되며 여러 면역반응에 관여하며[7], 염증 매개체의 방출을 통한 조직의 리모델링과 염증관련 세포들의 활성화 등 다양한 기능을 한다고 알려져 있다[8]. 활성화된 비만세포 표면에 발현하는 면역글로블린 E(IgE) 수용체인 FcεRI에 IgE 및 특이적 알러젠이 결합하게 되면, 세포질 내 칼슘 농도의 증가와 탈과립으로 인해 히스타민, 인터루킨(interleukin, IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF- α) 등과 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 혈관을 확장시키고 혈관투과도를 증가시켜 가려움증, 발진 등의 알러지 반응을 일으킨다[9, 10].

면역세포의 대표적인 염증 매개체인 nitric oxide (NO)는 cyclooxygenase (COX-2)와 iNOS (inducible nitric oxide synthase)에 의해 발생되며, 생체 내에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 불안정하며 반응성이 높은 자유라디칼로서 혈관 이완, 항암 등의 다양한 생리학적 활성을 갖지만 과량 생성될 경우 세포 손상 및 염증성 질환 발병 기전에 관여하게 된다[11, 12]. 이러한 염증성 알러지 질환의 치료제로 소염제, 항히스타민제 또는 항류코트리엔제가 처방되어 사용되고 있으나, 일시적

증상 완화 효과와 더불어 다양한 부작용이 밝혀져 장기복용에는 많은 어려움이 있어 약물대신 사용할 수 있는 천연물이 필요한 실정이다[13].

유자 (*Citrus junos* Sieb. ex TANAKA)는 비타민 C, 구연산, 카로틴, 헤스페리딘, 폴리페놀과 플라보노이드 성분을 다량 함유하고 있어[14] 면역력 증진, 미백, 항산화, 항비만, 항암 및 항아토피 등의 효과를 가지는 것으로 알려져 있다[15, 16]. 그러나 유자는 껍질이 두껍고 종자가 많으며, 강한 산미와 고유한 향을 가져 직접 생식보다는 대부분이 수확 직후 가공공정을 통하여 1 차 가공품인 유자청으로 대부분 이용되고 있다[17]. 완숙과의 부위별 중량 비율은 과피 45%, 과육 27%, 과즙 15%, 종실 13% 이며, 과피는 유자차 가공에 주로 이용하고 유자차 제조 후 부산물인 유자즙은 식초 및 분말 제품의 제조 등에 이용되고 있으나, 유자씨는 대부분 폐기처분 되고[18], 그 활용을 위한 연구는 아직 활발히 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 유자씨는 일반성분 분석에서 지방의 함량이 약 35%로 가장 높았고 조단백질 16%, 수분 7.2%, 조회분 3%으로 보고되었고[19] 유자씨의 지방산은 linoleic acid 33.0%, oleic acid 27.7%, palmitic acid 16.5%, stearic acid 11.0%, linolenic acid 1.5%로 oleic acid와 linoleic acid가 대부분을 차지한다[20]. 유자씨의 효능에 대한 연구는 유자씨 추출물의 항산화, 항암, 항노화 및 미백효과 및 유자씨의 항산화 효과[21, 22] 등이 있다.

이에 본 연구는 기존에 폐기되고 있는 유자씨를 효율적으로 활용하기 위하여 유자씨 오일을 추출하고 지방산 분석 및 대식세포를 이용한 항염증과 항알러지 효과를 확인 함으로써 이를 이용한 다양한 제품의 개발 및 응용에 근거 자료를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

유자 종자와 냉압착 방식으로 제조한 유자씨 오일은 전남 고흥군에 있는 농업회사법인 (주)에덴식품(Korea)에서 제공 받았다. 정제수(deionized water), glycerine (Aldivia, France), Fiber Design™ (citrus limon powder, Sclerotium gum, France), salicylic acid (JQC Pharmaceutical, China), α -Bisabolol (바이오스펙트럼, Korea), caprylic/capric triglyceride(InterMed Esters Sdn, Malaysia)에서 구입했다. Foiln-Ciocalteu's phenol reagent, 1,1-diphenyl -2-picrylhydrazyl (DPPH) 는 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), lipopolysaccharide dimethyl sulfoxide (DMSO), griess reagent (sulfanilamide, *N*-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride), anti-dinitrophenol-IgE (anti-DNP-IgE), dinitrophenol-human serum albumin (DNP-HSA), *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide는 Sigma (USA)에서 구입 사용하였다

2.2. 유자씨 오일 추출(*In Vitro*)

유자열매에서 종자만을 분리하여 수집한 유자씨 500 g 을 세척한 뒤 60 °C air dry 조건으로 종자를 건조시켜 수분함량이 20 중량 % 범위 내가 되도록 조절한 뒤, 종자를 분쇄하여 분말을 제조했다. 분말을 유압식 착유기에 넣어 종자 오일을 추출하고, 여과필터로 여과하여 유자씨 오일을 제조하였다. 유자씨 오일은 항산화효과 (DPPH 소거능), 세포주를 이용한 항염, 항알러지 시험 등에 사용하였다.

2.3. 유자씨 오일의 성분분석 (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

지방산 유도체(fatty acid methyl ester)는 palmitic acid (C16 : 0), stearic acid (C18 : 0), oleic acid (C18 : 1), linoleic acid (C18 : 2), linolenic acid (C18 : 3)가 혼합되어 있는 FAME Mix GLC-20 (Supelco, USA)를 사용하였다[23,24]. Methylation (Transesterification) 과정은 유자 oil 50 μ L에 *n*-hexane 2 mL, catalyst 용액 2 mL를 혼합 후 냉동 조건에서 10 h 이상 방치하였고 상층을 분석용 vial에 옮긴 후 분석을 실시하였다. 장비는 TQ8040 (triple quadrupole mass spectroscopy (Shimadzu, Japan) 로 column은 DB5-MS (0.25 mm \times 30 m, 0.25 μ m) 를 사용하였다. 시료주입기와 검출

기 온도는 260 °C, 컬럼 온도는 80 °C로 시작하여 200 °C 까지 올려주었다. 운반기체(carrier gas)는 He을 사용하였고, 컬럼 유속은 1.0 mL/min 이었다. Oven 온도는 140 °C(1 min holding), 2.5 °C/min - 265 °C, 5 °C/min - 310 °C, 5 min 순으로 진행하였다. MS 조건은 EI voltage (70 eV), scan range (20 - 600 *m/z*)에서 수행하였다. 지방산의 정량은 내부표준물질 pentadecanoic acid (C15 : 0)의 면적에 기준하여 반응지수(response factor)를 보정하지 않고 환산하였으며 용출시간(retention time)과 질량스펙트럼이 일치하는 7 개 peak를 포함하여 지방산 총량으로 하였다. 또한 리모넨함량도 조사하기 위해 GC-MS/MS로 수행하였으며 분석조건은 유사하나 oven 온도는 100 °C(2 min holding) - 4 °C/min \rightarrow 160 °C - 15 °C/min \rightarrow 310 °C (5 min holding), total 32 min 간, inject mode는 split (20 : 1), 운반기체(carrier gas)는 N₂ 을 사용하였고, 컬럼 유속은 1.0 mL/min, 온도조건은 250 °C(inject port), 300 °C(detector)이었다.

2.4. DPPH Radical 소거 활성 측정

DPPH radical 소거 활성은 Blois 방법[25]을 변형하여 측정하였다. DPPH 0.5 mM을 absolute ethanol 100 mL에 용해한 후, absolute ethanol 용액을 대조구로 하여 540 nm에서 DPPH용액의 흡광도를 약 1.0이 되도록 희석하여 사용하였다. 시료 0.1 mL에 DPPH용액 0.1 mL을 혼합하여 정확히 30 min 동안 반응시킨 후 UV-visible spectrophotometer (UV-1601, 기기회사명, 나라명 작성필요)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거 활성을 계산하였다.

2.5. 세포배양

대식세포(RAW 264.7)는 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 분양 받았으며, 비만세포(RBL-2H3)는 American type culture collection (ATCC, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 대식세포는 1% penicillin-streptomycin (Welgene, Korea) 및 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Korea)이 포함된 DMEM (Welgene, Korea)를 사용하였으며, 비만세포는 1% penicillin-streptomycin 및 10% fetal bovine serum이 포함된 MEM (Sigma, USA)을 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다[26].

2.6. 세포생존율 측정

세포생존율 측정을 위해 96 well plate에 대식세포를 1 \times

10^5 cells/well로, 비만세포를 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하고 24 h 동안 배양한 후 추출물을 농도별로 첨가하여 24 h 처리하였다. 최종농도가 5 mg/mL 이 되도록 MTT 용액을 넣고 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 3 h 동안 반응시킨 후, microplate reader (Spectramax Plus 384, Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다[26].

2.7. 산화질소(Nitric Oxide, NO) 생성 측정

산화질소 생성에 대한 시료의 효과를 알아보기 위해 griess reagent를 사용하여 NO의 생성량을 측정하였다[27]. 먼저, RAW 264.7 (1×10^5 cells/well)에 LPS를 1 µg/mL 농도로 처리하고 시료를 농도별로 처리하여 24 h 배양 하였다. 각 실험군의 배양 상층액 100 µL와 griess reagent 를 동량으로 혼합하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산화질소 생성량은 sodium nitrate (NaNO₃)를 표준으로 사용하여 검량선을 작성하여 계산하였다. Positive control로 iNOS의 활성을 저해함으로써, NO 생성을 억제하는 저해제로 L-NAME (250 µM)을 사용하였다[28].

2.8. β-Hexosaminidase Inhibition 측정

RBL-2H3 cell에서 추출물의 β-hexosaminidase 방출 억제 효과를 시험하였다. 먼저, RBL-2H3 세포를 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 동일하게 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 overnight하였다. Above cell을 PBS를 이용하여 세척한 후, 각 well에 anti-DNP-IgE (50 ng/mL)를 처리하여 24 h 배양 하였다. Anti-DNP-IgE로 감작된 cell을 1% FBS 첨가한 MEM배지로 2회 세척하고 160 µL을 첨가하여 37 °C 에서 20 min 간 배양하였다. 그 후 각 농도별 추출물과 1 µ

g/mL 농도의 DNP-BSA 20 µL을 첨가하여 37 °C에서 1 h 동안 반응시켜 세포가 과립을 형성하도록 자극한 후, 상층액을 원심분리하였다 (4 °C, 13000 rpm, 10 min). 원심분리한 상층액 25 µL을 0.1 M citrate buffer (with 10mM p-nitropheny -N- acetyl-β -D-glucosaminide, pH 4.5) 50 µL을 첨가하여 37 °C에서 1 h 동안 반응시켰다. 그 후 stop buffer (0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 10.0) 100 µL을 첨가하여 반응 정지시키고, microplate reader (Spectramax Plus 384)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control로 5 µM wortmannin을 사용하였다[26].

2.9. 유자씨 오일을 5% 함유한 O/W 에멀전 제조

In vivo 인체적용시험을 위해 유자씨 오일 함유 O/W 에멀전을 Table 1의 조성으로 제조하였다.

정제수, glycerine 그리고 Fiber design™(Citrus limon powder 57%, Sclerotium gum 43%)으로 구성되어 있는 수상부를 agi mixer (기기모델명, 기기회사명, 나라)를 이용하여 혼합한 다음 75 °C로 가온하였다. 또한, 별도의 반응기에 준비된 유자씨 오일, salicylic acid, α-Bisabolol으로 구성되어 있는 유상부를 혼합한 뒤 이를 약 75 °C로 가온하였다. 이 후, 상기 수상부에 유상부를 투입한 다음, 호모 믹서를 이용하여 약 3,000 rpm 으로 5 min 동안 교반하면서 예비 유회한 후, 약 6,000 rpm 으로 5 min 동안 유회 교반하였다. 예비 유회와 본 유회는 모두 약 75 °C에서 실시되었다. 이어서, 상기 조성물을 약 35 °C로 냉각함으로써, 시험용 O/W 에멀전을 수득하였다. 대조군은 유자씨 오일 대신에 caprylic/capric triglyceride를 동량 적용하여 동일 공정으로 제조하였다.

Table 1. Composition of O/W Emulsion for *In Vivo* test

Phase	Ingredients	%(w/w)	
		Control	Experimental sample
Water	D.I water	85.0	85.0
	Fiber design™	2.0	2.0
	Glycerine	7.0	7.0
Oil	Citrus junos seed oil	-	5.0
	Caprylic/capric triglyceride	5.0	-
	Salicylic acid	0.5	0.5
	α-Bisabolol	0.5	0.5

2.10. 유자씨 오일 5% O/W 에멀전의 *In Vivo* 보습력 측정

본 실험은 한국콜마에서 진행하였으며, 피험자는 실험의 목적, 내용 등에 대해 이해하고 자발적으로 참여의사를 밝힌 사람으로서 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 만 20 ~ 60 세 지원자를 대상으로 하였다. 성별에 의한 피부 측정 값의 편차를 줄이기 위해 피험자는 여성 20 명으로 지정하였으며, 평균 연령은 47.5 세 였다. 피험자는 준비된 세안제로 세안을 하고 일정한 항온 항습조건(20 ~ 24 °C, 45 ~ 55% 습도)에서 30 min 동안 대기한 후 측정하였다. 측정 항목은 수분량으로 측정 부위는 뺨을 측정하였으며 5 회 반복 측정하여 최대, 최소 값을 제외한 3 개 값의 평균 값을 사용하였다.

피험자는 유자씨오일을 함유하는 O/W 에멀전 및 대조 O/W 에멀전을 코를 중심으로 얼굴을 반으로 나누어 각각 적용하였으며, 이중맹검법으로 진행하여 시험자와 피험자 모두 시험물질을 알지 못하도록 하였다. 제품은 2 주 동안 1 일 2 회 아침, 저녁으로 사용하였으며, 제품 사용 전 및 사용 1 주 후, 2 주 후에 수분량 측정을 진행하였다.

피부 표면의 수분량은 *comeometer* (CM 825, Courage+Khazaka, Germany)를 이용하여 뺨을 5 회씩 측정하였으며 측정치의 최대, 최소 값을 제외한 3 개 값의 평균을 구하였다. 측정단위는 기기에서 부여하는 임의의 단위 (*arbitrary unit*, A.U.)로 표현 되며, 측정값이 높을수록 피부 표면 수분량이 높음을 의미한다.

수분 개선율은 제품 사용 전 대비 사용 1 주 및 2 주 후 수분 개선 정도를 의미하며, 개선율은 다음과 같은 산식에 의해 도출하였다.

$$\text{수분 개선율(\%)} = (\text{제품 사용 후 측정치} - \text{제품 사용 전 측정치}) / \text{제품 사용 전 측정치} \times 100$$

2.11. 통계처리

본 연구의 모든 실험은 3 회 반복하여 측정한 평균과 표준편차로 나타내었으며, 각 실험결과에 대한 통계분석은 *student's t-test*를 이용하여 분석하였으며 대조군과 비교해 각 실험군의 평균치 간의 유의적 차이를 검증하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$ 또는 $p < 0.001$).

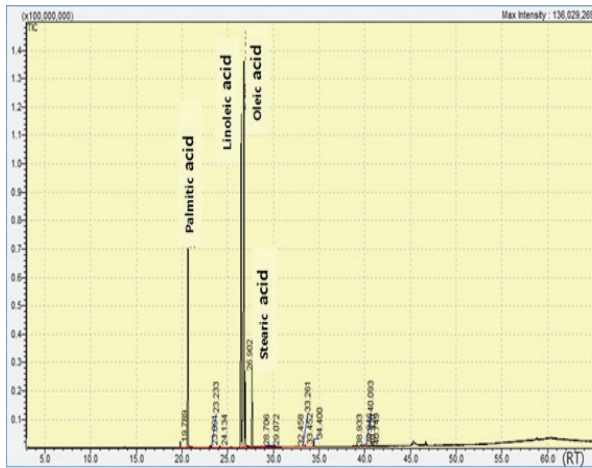
3. 결과 및 고찰

3.1. 유자씨 오일의 지방산 조성

세척 및 건조 된 유자씨를 저온 압착기로 65 °C에서 착유한 종실유의 지방산 함량을 분석한 결과는 Table 2와 Figure 1과 같다. 유자씨 오일에서 지방산은 총 5 종이 동정되었으며 *linoleic acid*, *oleic acid*, *stearic acid* 및 *palmitic acid* 가 주요 지방산으로 각각 $32.2 \pm 0.72\%$, $40.8 \pm 0.51\%$, $7.30 \pm 9.33\%$, $16.2 \pm 0.21\%$ 로 포화지방산이 23.50%, 불포화지방산이 74.00% 함유 된 것으로 나타났다. 본 실험에서 사용된 저온압착법에 의해 얻어진 유자씨 오일은 기존 고온압착법에 의한 유자씨 오일과 비교해 볼 때 지방산 함량의 차이가 큰 것으로 나타났다. 주요 지방산으로 *linoleic acid*, *oleic acid* 및 *palmitic acid*가 고온압착법에 의해서 $29.33 \pm 2.39\%$, $24.14 \pm 2.28\%$, $14.20 \pm 2.20\%$ 로 전체 지방산 함량의 67.67%를 차지하였으며 저온 압착기로 얻어진 주요 지방산의 함량인 90.2%에 비해 22.5%가 감소된 것으로 나타났다[29]. 식용유지는 제조공정 및 단순가열에 의해서도 구성 지방산이 변화되는데[30] 볶은 유자씨 오일에서 지방산의 함량이 감소된 것도 이와 유사한 결과라 생각 된다. 또한 유자씨 오일에서 유자이나 감귤피에 다량 존재 하며 피부에 *allergen* 으로서 알려진 *limonene* 함량을 GC-MS/MS로 정량, 정성 분석한 결과 다행히 0.187%로 미량 존재하는 것을 확인하여 이를 이용한 피부보호 효과 실

Table 2. Fatty acid composition of *Citrus junos* seed oils by GC-MS

	Fatty acid contents	Content(%)
1	Plamitic acid (16 : 0)	16.2 ± 0.21
2	Stearic acid (18 : 0)	7.3 ± 0.30
3	Oleic acid (18 : 1n -9, 9' Cis)	35.2 ± 0.63
4	Oleic acid (18 : 1n -9, 11' Cis)	5.6 ± 0.51
5	Linoleic acid (C18 : 2n-6, Cis)	33.2 ± 0.72
6	Unknown	5.0
	Total	100



Item	GC-MS Condition
Instrument	TQ8040 (triple quadrupole mass spectroscopy) Shimadzu (Kyoto, Japan)
Column	DB5-MS (0.25 mm X 30 m, 0.25 um)
Methylation	50 µL에 n-hexane 2 mL + catalyst 용액 2 mL 혼합후 냉동조건 10시간 방치 및 분석
Oven	140 °C (1 min holding) -- 2.5 °C/min --> 265 °C -- 5 °C/min --> 310 °C (5 min holding)
Injector	260 °C / 250 °C
Split ratio	30: 1
Injection volume	1 µL
MS condition	El voltage (70 eV), scan range (20-600 m/z)
Carrier gas	He (1 mL/min)

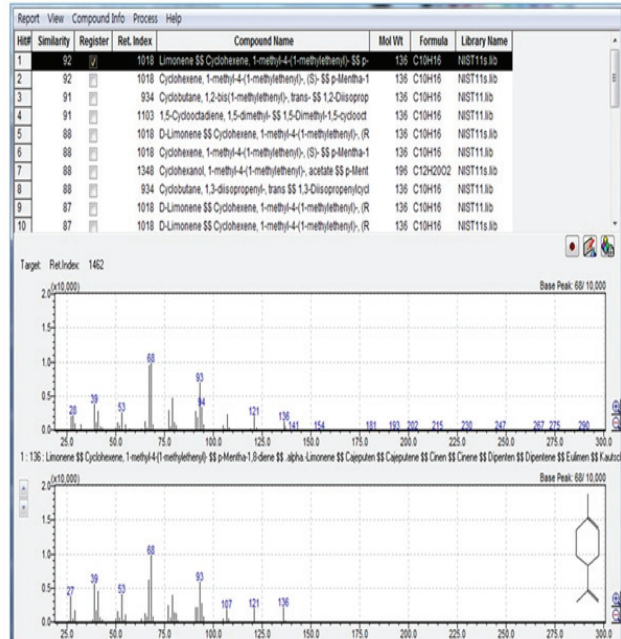
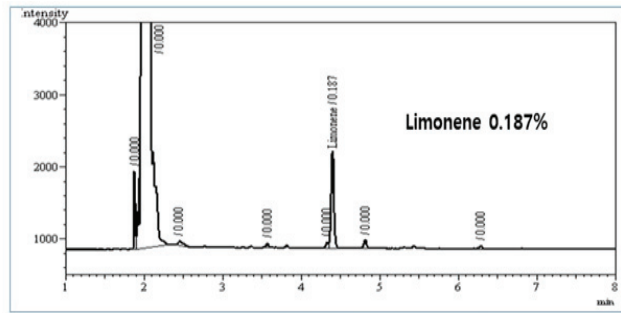


Figure 1. Fatty acid profiles of *Citrus junos* seed oils and limonene quantification by GC-MS or GC-MS/MS analysis.

험에 안심하고 사용할 수 있다는 것을 확인하였다.

3.2. DPPH Radical 소거 활성 능력

전자공여능은 활성라디칼에 전자를 공여하여 인체의 노화 억제 작용과 식품 중의 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있으며[31], 유자씨 오일의 항산화능을 측정하기 위하여 활성산소의 한 종류인 DPPH 라디칼 소거능 평가를 진행하였다. 유자종실의 농도별(0.005%, 0.05%, 0.5%, 5% 및 50%) DPPH radical 소거 활성을 조사한 결과는 Figure 2에 나타내었다. 그 결과 유자씨 오일은 5% 농도에서 26%와 50% 농도에서 67%의 DPPH 라디칼 소거능력 효과를 나타내었다(Figure 2). 이는 유자종실 존재하는 성분이 5% 이상 농도에서 항산화 효능을 가지며, 함량이 증가함에 따라 추출되는 항산화 성분이 증가함을 나타낸다.

3.3. 산화질소(Nitric Oxide, NO) 생성 억제

대식세포는 순환전구세포인 단핵구가 조직에서 성숙한 세포로서 선천면역과 적응면역에 있어서 중심적인 역할을 담당하며, NO는 박테리아나 종양을 제거하는 역할을 하지만, LPS로 자극을 주어 생체의 피부가 염증 상태에 빠지게 되면 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 발현되어, 생성된 NO는 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[32].

유자씨 오일의 농도별(0.001%~10%) 세포독성 측정과 실험에 사용 될 농도 범위 결정을 위해 MITT assay를 시행하였다. Raw 264.7 대식 세포에 대한 세포독성을 측정한 결과, 0.05% 이하 농도에서 세포생존율이 90% 이상으로 나타났다(Figure 3). 상기 세포독성 평가 결과를 토대로 Raw 264.7 세포에서 유자씨 오일이 염증 유발 인자인 NO 생성을 억제하는지 확인하기 위하여 NO 생성 억제능을 평

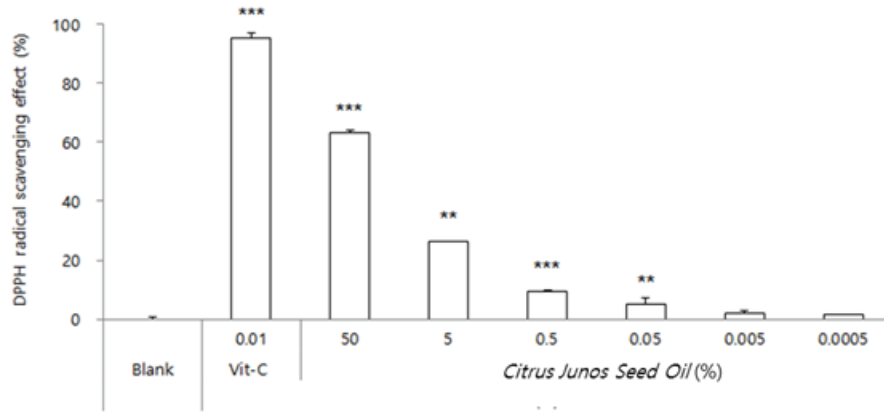


Figure 2. DPPH radical scavenging activity of *Citrus junos* seed oil. Each value represents the mean \pm SD of triplicates and percentages of control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with control.

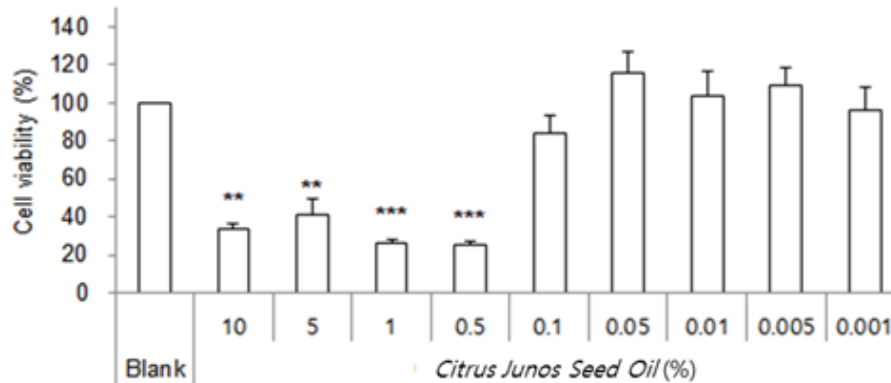


Figure 3. The cell viability of macrophage (RAW 264.7) incubated with *Citrus junos* seed oil. Each value represents the mean \pm SD of triplicates and percentages of control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with blank control.

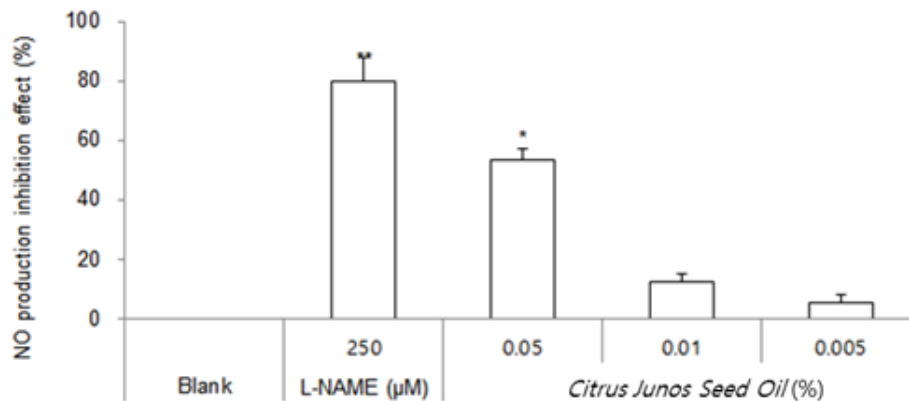


Figure 4. NO production suppression effect of macrophage(RAW 264.7) incubated with *Citrus junos* seed oil. Each value represents the mean \pm SD of triplicates and percentages of control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with control.

가 하였다. 그 결과 유자씨 오일은 농도 의존적으로 NO 생성을 억제함을 확인하였으며, 0.005%, 0.01%, 및 0.05% 농도에서 NO 생성을 5%, 12%, 및 53% 억제 하였으며, positive control로 처리한 L-NAME 250 μ M 농도에서는 NO 생성을 79% 억제 하였다(Figure 4). 이상의 결과에서 유자씨 오일은 0.1% 이하 농도에서는 Raw 264.7 대식세포에 대한 세포 독성은 나타나지 않았으며, 유자씨 오일 농도별 (0.005%~0.05%)에 대한 NO 생성능은 모든 구간에서 농도 의존적으로 NO 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

3.4. β -Hexosaminidase 방출 억제

일반적으로 알러지는 IgE에 감작된 비만세포의 알레르겐과의 반응으로 과립상태에서 존재하는 히스타민 (histamine)

과 β -hexosaminidase가 외부로 방출되며[33, 34], 비만세포의 탈과립 지표로 알러지의 생물학적 측정에 이용되고 있다.

유자씨 오일의 세포독성 측정과 실험에 사용 될 농도 범위 결정을 위해 MIT assay를 시행하였다. RBL-2H3 mast 세포에 대한 세포독성을 측정한 결과, 0.05% 이하 농도에서 세포생존율이 90% 이상으로 나타났다(Figure 5). 상기 세포독성 평가 결과를 토대로 RBL-2H3 세포에서 유자씨 오일이 알러지반응이 나타날 때 분비되는 물질인 β -hexosaminidase 방출을 억제하는지 확인하기 위하여 β -hexosaminidase 방출 억제능을 평가 하였다. 그 결과 유자씨 오일은 농도 의존적으로 β -hexosaminidase 방출을 억제함을 확인하였으며, 0.005%, 0.01%, 및 0.05% 농도에서 β -hexosaminidase 방출 억제력이 2%, 12%, 및 26% 억제하였으

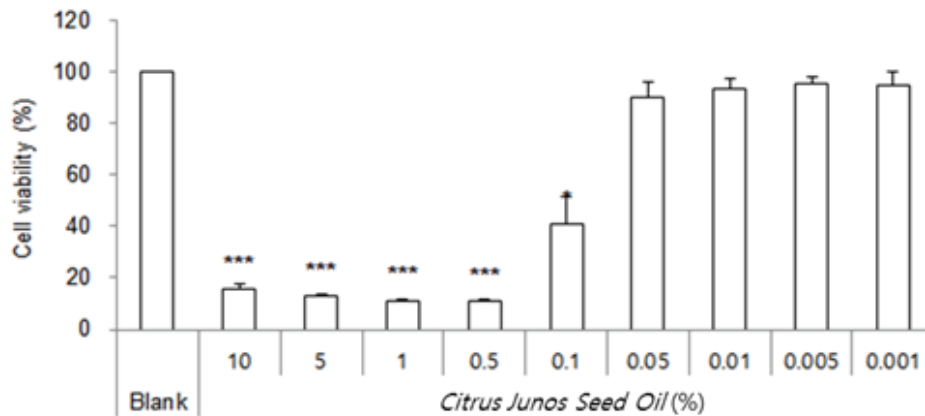


Figure 5. The cell viability of Mast cell (RBL-2H3) incubated with *Citrus junos* seed oil. Each value represents the mean \pm SD of triplicates and percentages of control. * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared with blank control.

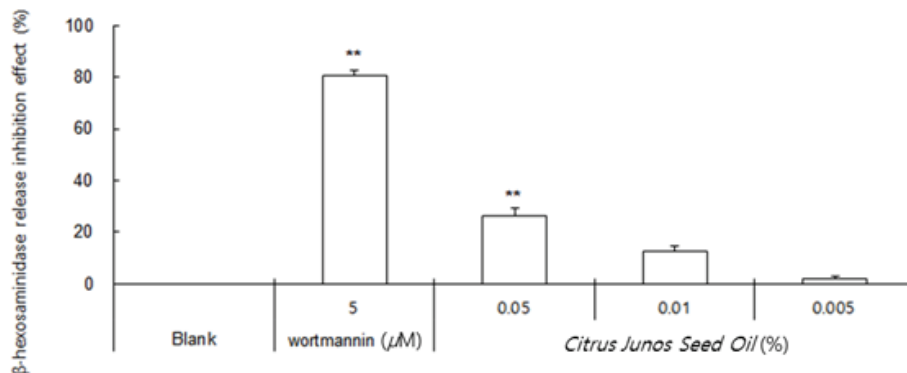


Figure 6. Effect of β -hexosaminidase in macrophage (RBL-2H3) incubated with *Citrus junos* seed oil. Each value represents the mean \pm SD of triplicates and percentages of control. * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared with control.

며, Positive control로 처리한 wortmannin 5 μ M 농도에서는 β -Hexosaminidase 방출 억제력이 80% 억제 하였다(Figure 6).

3.5. 유자씨 오일의 피부 보습 효과

유자씨 오일을 5% 포함하는 O/W 에멀전과 caprylic/capric triglyceride를 5% 포함하는 O/W 에멀전의 피부 보습 효과를 비교 평가하기 위하여, 피부 수분 함유도를 측정 하였다(Figure 7). 에멀전 사용 전과 사용 1 주 후, 2 주 후의 피부 수분함유도를 측정한 결과 1 주차에는 유자씨 오

일을 함유하는 O/W 에멀전을 사용한 피부의 수분함유도가 다소 낮게 측정 되어 약 1.31% 감소하는 것으로 확인되었으나, 2 주차에는 수분 보유도가 3.90% 상승하는 것으로 확인 되었다. 대조시료인 caprylic/capric triglyceride 함유 에멀전은 1 주차에 피부 수분 보유도가 1.31% 상승하였고, 2 주차에는 3.01%가 상승하였다. 이렇게 2 주 이상의 사용으로 유자씨 오일을 함유한 에멀전은 화장품 조성에 널리 사용되는 caprylic/capric triglyceride 에 비하여 우수한 피부 수분 증가 효과를 나타내었다(Figure 8). 유자씨 오일에 고

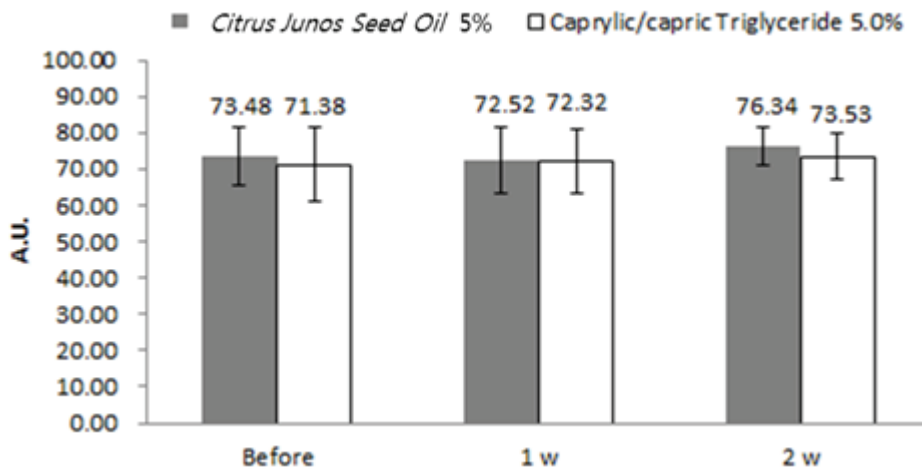


Figure 7. Changes in skin moisture content. The data are expressed mean \pm SD of triplicate experiments. Dark gray bar is a O/W emulsion containing *Citrus junos* seed oil 5% and open bar is a O/W emulsion containing caprylic/capric triglyceride 5%.

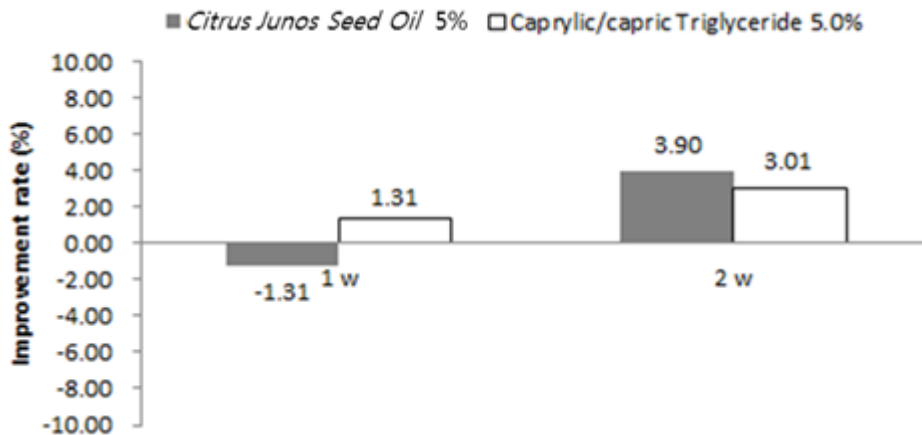


Figure 8. Skin moisture improvement rate. Data were calculated using the following equation. Skin moisture improvement rate(%) = (Skin moisture content that after use a O/W emulsion - Skin moisture content that before use the emulsion) / Skin moisture content that before use the emulsion \times 100. Dark gray bar is a O/W emulsion containing *Citrus junos* seed oil 5% and open bar is a O/W emulsion containing caprylic/capric triglyceride 5%.

함량 함유되어 있는 oleic acid 등의 불포화 지방산은 skin modulation 효과에 의하여 피부 미용 성분의 경피 흡수를 촉진시키기도 하지만, TEWL을 높이기도 하는 것으로 알려져 있다[35, 36]. 시험 시료 O/W 에멀전 사용 1 주차에 피부 수분함유도가 다소 낮아진 것은 유자씨 오일에 함유된 불포화 지방산이 피부 경피 수분 증발량을 높여 나타난 결과라고 예상 된다. 그렇지만 2 주 이상의 장시간 사용하게 되는 경우, Skin modulation 효과에 의한 수분 흡수 촉진 효능으로 피부의 수분이 증가되는 결과가 나타 난 것으로 판단된다.

4. 결 론

유자씨는 약 35%의 지방을 함유하며, 주로 oleic acid 및 linoleic acid 등의 불포화 지방산으로 이루어져 있다. 본 연구에서는 냉압착 방법으로 수득한 유자씨 오일을 수득하여 우수한 피부 에몰리언트로서의 가능성을 확인하였다. 유자씨 오일의 항산화 효능을 DPPH assay를 통하여 확인하였으며, 세포 실험을 통하여 항염 그리고 항알러지 효능을 확인하였다. 또한 유자씨 오일을 5% 함유한 O/W 에멀전을 인체 피부에 적용하였을 때, 2 주 이상 사용으로 대조시료인 caprylic/capric triglyceride 5% O/W 에멀전에 비하여 우수한 피부 수분 증가 효과가 확인 되었다. 이는 유자씨 오일에 함유된 불포화 지방산이 수분의 피부 침투를 촉진한 결과로 예상되며, 이로써 유자씨 오일은 다양한 피부 미용성분의 경피 흡수 촉진제로도 활용될 수 있을 것으로 생각 된다.

Acknowledgement

본 연구는 2020년도 정부(농림축산식품부)의 재원으로 농림식품기술기획평가원사업의 지원을 받아 (과제번호 319089-03-1-HD030) 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Reference

1. M. A. Beaven, J. Rogers, J. P. Moore, T. R. Hesketh, G. A. Smith, and J. C. Metcalfe, The mechanism of the calcium signal and correlation with histamine release in 2H3 cells, *J. Biol. Chem.*,

- 259(11), 7129 (1984).
2. S. Han, H. Zhang, L. Qin, and C. Zhai, Effects of dietary carbohydrate replaced with wild rice (*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz) on insulin resistance in rats fed with a high-fat/cholesterol diet, *Nutrients*, **5**(2), 552 (2013).
3. M. S. Mahmood, A. H. Gilani, A. Khwaja, A. Rashid, and M. K. Ashfaq, The *in vitro* effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on nitric oxide production, *Phytother. Res.* **17**(8), 921 (2003).
4. A. Bhattacharya, R. Chatopadhyay, S. Mitra, and S. E. Crowe, Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases, *Physiol. Rev.*, **94**(2), 329 (2012).
5. M. L. Rodriguez, J. M. Estrela, and A. L. Ortega, Natural polyphenols and apoptosis induction in cancer therapy, *J. Carcinog Mutagen*, **S6**, 1 (2013).
6. B. SaibanditH, J. P. E. Spencer, I. R. Rowland, and D. M. Commane, Olive polyphenols and the metabolic syndrome, *Molecules*, **22**(7), 1082 (2017).
7. P. Conti, C. E. Gallenga, G. Ronconi, A. Garaffa, and S. K. Kritas, Activation of mast cells mediates inflammatory response in psoriasis : Potential new therapeutic approach with IL-37, *Dermatologic Therapy*, **32**:e12943, 1 (2019).
8. T. L. Sumpter, S. C. Balmert, and D. H. Kaplan, Cutaneous immune responses mediated by dendritic cells and mast cells, *JCI Insight*, **4**(1):e123947. 1 (2019).
9. I. S. Hwang, E. K. Koh, J. E. Kim, Y. J. Lee, M. H. Kwak, J. Go, J. E. Sung, S. H. Song, and D. Y. Hwang, Effects of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Fruit Extract on Ultraviolet-induced Apoptosis of Skin Fibroblasts, *J. Life Sci.*, **24**(5), 467 (2014).
10. H. Zhang, P. Cao, L. B. Agellon, and C. K. Zhai, Wild rice (*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz) improves the serum lipid profile and antioxidant status of rats fed with a high fat/cholesterol diet, *Br. J. Nutr.* **102**(12), 1723 (2009).
11. H. J. Lee, E. A. Hyun, W. J. Yoon, B. H. Kim, M. H. Rhee, H. K. Kang, J. Y. Cho, and E. S. Yoo, *In*

- vitro* anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Cinnamomum camphora* extracts, *J. Ethnopharmacol.*, **103**(2), 208 (2006).
12. C. T. Ritchlin, S. A. Haas-Smith, P. Li, D. G. Hicks, and E. M. Schwarz, Mechanisms of TNF- α and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis, *J. Clin. Invest.*, **111**(6), 821 (2003).
 13. B. D. Hiraganahalli, V. C. Chinampudur, and A. Agarwal, Hepatoprotective and antioxidant activity of standardized herbal extracts. *Pharmacogn Mag.*, **8**(30), 116 (2012).
 14. S. K. Kang, M. J. Jang, and Y. D. Kim, A study on the flavor constituents of the citron (*Citrus junos*), *Korean J. Food Preserv.*, **13**(2), 204 (2006).
 15. J. H. Shin, S. J. Lee, J. K. Seo, E. W. Cheon, N. J. Sung, Antioxidant activity of hot-water extract from Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) peel, *J. Life Sci.*, **18**(12), 1745 (2008).
 16. Y. J. Lee, I. G. Hwang, E. M. Joung, H. Y. Kim, E. S. Park, K. S. Woo, and H. S. Jeong, Physiological activity and antiproliferation effects of citron seed extracts on cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **38**(12), 1672 (2009).
 17. H. S. Yang, S. J. Hwang, S. H. Lee, and J. B. Eun, The fermentation characteristics and sensory characteristics of *Makgeolli* with dried citron (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) peel, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **43**(5), 603 (2011).
 18. H. W. Nam, Y. H. Hyun, Drying of citron juice from by-product of citron tea manufacturing, *Korean J. Food Nutr.*, **16**(4), 334 (2003).
 19. O. C. Kwon, J. H. Shin, M. J. Kang, S. J. Lee, S. Y. Choi, and N. J. Sung, Antioxidant activity of ethanol extracts from citron (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) seed, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **35**(3), 294 (2006).
 20. S. J. Lee, S. Y. Choi, J. H. Shin, S. H. Kim, H. C. Lim, and N. J. Sung, Fatty acid composition and oxidative stability of citron seed oils, *J. Life Sci.*, **16**(3), 427 (2006).
 21. K. S. Woo, J. Y. Jeong, I. G. Hwang, Y. J. Lee, Y. R. Lee, H. J. Park, E. S. Park, and H. S. Jeong, Antioxidant activity of ethanol extraction on citron seed by response surface methodology. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **38**(3), 384 (2009).
 22. S. Y. Kim, K. S. Shin, Evaluation of physiological activities of the citron (*Citrus junos* Sieb. ex TANAKA) seed extracts, *Prev. Nutr. Food Sci.*, **18**(3), 196 (2013).
 23. J. B. Kim, K. H. Kim, S. K. Hwang, Y. H. Kim, K. J. Cho, Y. S. Hwang, and R. D. Park, The Composition of useful medium chain fatty acid in eight plant species, *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **44**(1), 20 (2001).
 24. J. Gamazo-vazquez, M. S. Garcia-Falcon, and J. Simal-Gandara, Control of contamination of olive oil by sunflower seed oil in bottling plants by GC-MS of fatty acid methyl esters, *Food control*, **14**(7), 463 (2003).
 25. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* **26**, 1199 (1958).
 26. S. H. Lim, S. I. Park, J. Y. Lee, and M. A. Choi, Comparison of anti-oxidative, anti-inflammatory, immune enhancement and anti-allergy effects of spring and autumn teas, *J. Kor. Tea Soc.*, **23**(4), 63 (2017).
 27. E. J. Lee, M. H. Yu, C. V. Garcia, K. H. Jhee, and S. A. Yang, Inhibitory effect of *Zizania latifolia* chloroform fraction on allergy-related mediator production in RBL -2H3 cells, *Food Sci. Biotechnol.*, **26**(2), 481 (2017).
 28. M. H. Lee, J. M. Lee, S. H. Jun, S. H. Lee, N. W. Kim, J. H. Lee, N. Y. Ko, S. H. Mun, B. K. Kim, B. O. Lim, D. K. Choi, and W. S. Choi, The anti-inflammatory effects of *Pyrolae herba* extract through the inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production, *J. Ethnopharmacol.*, **112**(1), 49 (2017).
 29. J. W. Jeong, D. J. Kwon, J. B. Hwang, and Y. J. Jo, Influence of the extraction method on quality of citron juice, *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**(6), 704

- (1994).
30. E. O .Cheo, Changes of functional components present in lipid foods during cooking, *Korean J. Food Cookery Sci.*, **21**(5), 742 (2005).
 31. M. Y. Shon, J. K. Seo, H. J. Kim, and N. J. Sung, Chemical compositions and physiological activities of Doraji (*Platycodon grandiflorum*), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**(4), 715 (2001).
 32. B. M. Choi, H. O. Pae, S. I. Jang, Y. M. Kim, and H. T. Chung, Nitric oxides a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**(1), 116 (2002).
 33. J. S. Han and D. H. Yi, Effect of pine needles fermentation extracts on antioxidant activity and inhibition of melanin synthesis, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **10**(3), 619 (2012).
 34. P. K. Moore, R. C. Babbedge, P. Wallace, Z. A. Gaffen, and S. L. Hart, 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure, *Br. J. Pharmacol.*, **108**(2), 296 (1993).
 35. H Tanojo, E Boelsma, H E Junginger, M Ponec, and H E Boddé, *In Vivo* human skin barrier modulation by topical application of fatty acids. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.*, **11**(2), 87 (1998).
 36. F. Yamashita, Y. Koyama, M. Kitano, Y. Takakura, and M. Hashida, Analysis of *in vivo* skin penetration enhancement by oleic acid based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum, *International Journal of Pharmaceutics*, **117**(2), 173 (1995).