



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](#)

석사학위논문

제주산 감귤 및 레몬 잎 유래
에센셜오일과 아임계수 추출물의
성분 및 효능 연구

제주대학교대학원

화학과

김민정

2022년 12월

제주산 감귤 및 레몬 잎 유래
에센셜오일과 아임계수 추출물의
성분 및 효능 연구




지도교수 이 남 호

김 민 정

이 논문을 화학 석사학위 논문으로 제출함

2022 년 12 월

김민정의 화학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	윤 경 섭	
위 원	현 창 구	
위 원	이 남 호	

제주대학교 대학원

2022년 12월

Evaluation of Bioactivities and Chemical
Constituents on Essential oils and
Subcritical Water Extracts from *Citrus*
Unshiu and *Citrus limon* Leaves in Jeju

Minjeong Kim

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for
the degree of Master of Science [Doctor of Fisheries Science]

2022. 12.

This thesis has been examined and approved.

Kyung - Sup Yoon

CHANG-GU HYUN

Nam Ho Lee

12/22

Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Abbreviations	iv
List of Tables	v
List of Figures	vi
Abstract	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 실험 방법	8
1. 재료	8
2. 감귤 · 레몬 잎 에센셜오일 및 아임계수 추출	9
2.1. 시료 채취	9
2.2. 시료 추출	9
2.2.1. 에센셜오일 추출	9
2.2.2. 아임계수 추출	10
2.2.3. 열수 및 저온 추출	11
3. 성분 분석	12
3.1. GC-MS 성분 분석	12
3.2. HPLC 성분 함량 분석	13

4. 생리 활성 평가	15
4.1. 항산화	15
4.1.1. 총 폴리페놀 함량	15
4.1.2. DPPH radical 소거 활성	16
4.1.3. ABTS ⁺ radical 소거 활성	17
4.1.4. SOD 유사 활성	17
4.2. 항염	18
4.2.1. RAW264.7 세포 배양	18
4.2.2. 세포 독성 평가 (WST-1)	18
4.2.3. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	19
4.3. 미백	19
4.3.1. B16F10 melanoma 세포 배양	19
4.3.2. 멜라닌 합성 저해 활성	20
4.3.3. 세포 독성 평가 (WST-1)	20
4.4. 항균	20
4.4.1. 균주 배양	20
4.4.2. Paper disc diffusion method	21
5. 통계처리	22
III. 실험 결과	23
1. 성분 분석	23
1.1. 감귤 · 레몬 잎 에센셜오일 GC-MS 성분 분석	23

1.2. 감귤 · 레몬 잎 아임계수 HPLC 성분 함량 분석	26
2. 생리 활성 실험 결과	29
2.1. 항산화	29
2.1.1. 총 폴리페놀 함량	29
2.1.2. DPPH radical 소거 활성	30
2.1.3. ABTS ⁺ radical 소거 활성	34
2.1.4. SOD 유사 활성	36
2.2. 항염	37
2.2.1. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성	37
2.3. 미백	41
2.3.1. 멜라닌 합성 저해 효과 및 세포 독성	41
2.4. 항균	43
2.4.1. Paper disc diffusion method	43
IV. 요약 및 결론	45
V. 참고 문헌	47

List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
DOPA	Dihydroxyphenylalanine
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallic acid equivalent
GAM	Gifu anaerobic medium
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry
IC ₅₀	Inhibition concentration of 50%
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
α -MSH	α -Melanocyte stimulating hormones
NO	Nitric oxide
PBS	Phosphate buffered saline
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ROS	Reactive oxygen species
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
SOD	Superoxide dismutase
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TSB	Tryptic soy broth
WST	Water soluble tetrazolium salt

List of Tables

Table 1. Various process method of SWEs from <i>Citrus unshiu</i> and <i>Citrus limon</i> leaves	10
Table 2. GC/MS conditions	12
Table 3. HPLC chromatographic conditions of the control factors	13
Table 4. Chemical composition (%) of <i>Citrus unshiu</i> leaves essential oil	24
Table 5. Chemical composition (%) of <i>Citrus limon</i> leaves essential oil	25
Table 6. Contents of Standards from <i>Citrus unshiu</i> and <i>Citrus limon</i> Leaves Extract by Various Extraction Methods	28
Table 7. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities	34
Table 8. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities	36
Table 9. Anti-bacterial activities of Extracts and Essential oils from <i>Citrus unshiu</i> and <i>Citrus limon</i> leaves	44

List of Figures

Figure 1. Picture of Instruments	7
Figure 2. Picture of <i>Citrus unshiu</i> and <i>Citrus limon</i> leaves	8
Figure 3. HPLC chromatogram of Naringin, Naringenine, Neohesperidin, Hesperidin	12
Figure 4. Calibration curve of standard gallic acid	14
Figure 5. HPLC chromatogram of <i>Citrus unshiu</i> leaves SWE	25
Figure 6. HPLC chromatogram of <i>Citrus limon</i> leaves SWE	26
Figure 7. Total polyphenol contents of <i>Citrus unshiu</i> and <i>Citrus limon</i> leaves SWE and other extract method	28
Figure 8. DPPH radical scavenging activities of <i>Citrus unshiu</i> leaves and <i>Citrus limon</i> leaves Subcritical Water Extract by various extraction methods (temperatures and pressures)	30
Figure 9. DPPH radical scavenging activities of various water extracting method of <i>Citrus unshiu</i> leaves and <i>Citrus limon</i> leaf	31
Figure 10. DPPH radical scavenging activities of various concentration of SWEs from <i>Citrus unshiu</i> leaves and <i>Citrus limon</i> leaves	32
Figure 11. DPPH radical scavenging activities of various concentration of EOs from <i>Citrus unshiu</i> leaves and <i>Citrus limon</i> leaves	33
Figure 12. ABTS ⁺ radical scavenging activities of various concentration of Essential oil	34
Figure 13. ABTS ⁺ radical scavenging activities of various concentrations of <i>Citrus unshiu</i> leaves and <i>Citrus limon</i> leaves SWE.	35
Figure 14. Superoxide anion radical scavenging activity of SWE and EO from <i>Citrus unshiu</i> and <i>Citrus limon</i> leaves.	36
Figure 15. Effects of various process method SWEs from <i>Citrus unshiu</i> , <i>Citrus limon</i> leaves on NO production and cell viability	38

Figure 16. Effects of SWE from <i>Citrus unshiu</i> and <i>Citrus limon</i> leaves on NO production and cell viability	39
Figure 17. Effects of various method extracts from Citrus unshiu and Citrus limon leaves on NO production and cell viability	40
Figure 18. Effects of E.Os from <i>Citrus unshiu</i> and <i>Citrus limon</i> leaves on NO production and cell viability	41
Figure 19. Melanin contents and cell viability of various extracts method from <i>Citrus unshiu</i> and <i>Citrus limon</i> leaves	42
Figure 20. Melanin contents and cell viability of Subcritical water extracts from <i>Citrus unshiu</i> and <i>Citrus limon</i> leaves	43

Abstract

This study was conducted to identify the chemical components and to evaluate the bioactivities for the leaves extracts of two *Citrus* species such as *Citrus unshiu* (CU) and *Citrus limon* (CL) cultivated in Jeju. While much research has been done on the fruits of CU and CL, little has been focused on the leaves which are actually treated as a waste.

The essential oils were obtained by hydrodistillation method. Three types of CU and CL leaves extracts were prepared with cold water (room temperature, 2 h), hot water (100°C, 2 h), and by using subcritical water extractor (15min, 100/ 145/ 190°C and 70/ 90 bar).

Constituents of the essential oils were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The major constituents of CUL (*Citrus unshiu* leaves) EO were identified to be γ -terpinene, p-cymene, β -elemene. On the other hand, CLL (*Citrus limon* leaves) EO showed limonene, β -pinene and α -citral as the major components. The subcritical water extract (SWE) were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). SWE of CUL showed neohesperidin, naringin and naringenin as the main components. And SWE of CLL indicated the presence of neohesperidin and small amount of naringin.

For the anti-oxidative studies by DPPH and ABTS⁺ radicals, potent radical scavenging activities were observed in each EOs and extracts. It is interesting to observe that the SWE of the CU and CL leaves were the much higher antioxidant activity than those of the other extracts. Antimicrobial activity of essential oils of CU and CL leaves were tested against *Cutibacterium acnes*, which identified their activities by observing the clear zone in the paper disc method.

On the screening of skin-whitening activities, the EOs and SWEs inhibited the cellular melanogenesis and tyrosinase activities dose-dependently in a

-MSH stimulated B16F10 cells.

For the anti-inflammatory activity in RAW 263.7 cell, SWEs of CU and CL leaves as well as EOs inhibited NO production in a dose-dependent manner.

Base on the results obtained in this study, it is suggested that SWEs and EOs of CU and CL leaves has a potential for using as cosmetic materials related to the skin-related activities such as antioxidant and anti-inflammatory effects.

I. 서론

전세계적으로 환경 문제에 대한 인식이 높아짐에 따라 현재 분야를 막론하고 대두되는 키워드가 지속가능(Sustainability)이다. 지속가능성이란 개념은 WCED (World Commission on Environment and Development)에서 “미래 세대가 그들의 욕구를 충족시킬 수 있는 능력을 손상시키지 않으면서 현재 세대의 욕구를 충족시키는 개발”이라고 정의한데서 출발하고 있다.[1] 이는 출발점이고, 어떤 영역에서 어떤 시점에서 보느냐에 따라 논쟁이 가능하지만 결국 자연이 다양성과 생산성을 유지하고, 생태계를 균형 있게 유지하며 기능하는지 연구하는 것을 뜻한다. 기술의 발달로 인류가 자연을 착취하고 파괴한 역사가 지속되어 왔기 때문에, 지구의 자정 기능을 초과하여 이로 인한 여러 재해 및 생태계 파괴가 일어나고 있다. 이에 우리를 둘러싼 자연환경과 어떻게 조화롭게 살아가고 보호할 수 있는지에 대해 연구하기 위하여 지속가능성이 주요 이슈로 대두되어왔다.[2] 지속가능 활동에 대한 개념은 점점 확장되어 사용되는 추세이며, 지속가능의 대표적인 활동으로는 재생가능 원료 사용, 저탄소 공정, 폐기물 저감 활동 등 다양하다. 이러한 움직임 중에 하나가 바로 업사이클링이다. 업사이클링이란 ‘개선하다’라는 의미의 ‘업그레이드(Upgrade)’와 ‘재활용’이란 의미의 ‘리사이클링(Recycling)’이 결합된 단어이다. 1994년 독일의 디자이너 라이너 필츠(Reiner Pilz)가 소개한 용어로, 우리말로는 ‘재활용’이라고도 불리는데 쓸모가 없어져 버려지는 제품을 단순히 재활용하는 차원을 넘어 친환경적인 디자인이나 아이디어, 기술 등의 가치를 부가하여 새로운 제품으로 탄생시키는 활동이나 그러한 제품을 가리킨다.

본 연구에서는 업사이클링의 일환으로 제주의 지주산업인 감귤농가의 다양한 품종의 운향과(Rutaceae)의 감귤류 나무에서 시작하였다. 상품으로 판매되는 과육과 과피를 제외하고, 열매를 잘 맺을 수 있도록 하기위해 나무를 가지치기 하는 작업을 요한다. 이렇게 가지치기 한 후, 버려지는 감귤계열 나무의 잎을 사용하여 소재에 연관을 시키는 것에 초점을 맞추었다. 현재 감귤류의 과피, 과육에

대한 연구는 지속적으로 있어왔고, 감귤류의 bioflavonoides는 약 60 여종이 분리되어 그 구조가 밝혀져 있고 90% 이상이 hesperidin과 naringin으로 알려져 있다.[3] Hesperidin은 모세혈관의 수축을 촉진시켜 혈압을 강하하여 고혈압을 예방하며, naringin은 혈액내 LDL 콜레스테롤의 함량을 저하시키는 작용이 있다.[4] 또한 flavonoid의 기능성에 대한 평가로서는 항산화 작용, 순환기계 질환의 예방 및 개선효과, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스 등 다양한 생리적 작용이 보고되고 있다.[5] 이러한 성분에 의해 자연스레 감귤류의 생리활성 물질과 효능, 성분에 대한 연구가 활발히 이루어져왔다. 다만, 국내에서는 감귤의 과피, 과육, 꽃 등에 대한 연구가 대부분이며, 잎, 특히 이의 향기성분에 대한 연구는 아직 활발히 진행되지 않은 실정이며, 나아가 산업화 되어 활용된 사례가 전무한 실정이다.

이에 관련 연구결과를 바탕으로 본 연구에서는 감귤계 나무의 잎인 감귤 잎, 레몬 잎에서도 위와 같은 효능을 기대하여 다양한 추출 방법을 확립하여 이화학적 특성을 연구하고자 하였으며, 그 중에서 감귤 잎과 레몬 잎 아임계수와 에센셜오일에서 항산화 효과 및 생리활성 효과를 검증하고 천연 소재의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

항산화

산소는 생명유지를 위한 여러 대사반응에 필수요소이고, 인체 내 독극물질의 해독을 위해서도 필요하지만, 정상적인 대사과정을 통해 사용되는 산소중 일부는 유해한 활성산소종 (Reactive oxygen species, ROS)으로 변하게 된다.[6] 활성산소는 가장 안정한 형태인 삼중항산소(3O_2)가 환원되어 생성되며 인체에 손상을 미치는 대표적인 활성산소 종에는 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxy radical ($\cdot OH$), singlet oxygen (1O_2) 등이 있다.[7] 이와 같은 유해 활성산소는 대부분 자유라디칼이며 불안정한 상태의 활성산소는 짝 지어지지 않은 전자쌍을 채워서 안정화하려는 성질을 가지고 있기 때문에 주변 물질과 끊임없이 연쇄적으로 반응하여 결합하고자 한다. 따라서 적당량의 활성산소는 여러 병원체와 반응하고 결합하여 불활성화시키기 때문에 좋은 역할을 하지만 체내에 활성산소가 과다하게 분비하게 되면 생명유지에 필요한 단백질,

지방, 탄수화물 등의 필수 물질들도 무차별적으로 공격을 가하기 때문에 제 기능을 발휘하지 못하게 된다. 결국 과도한 활성산소 생성은 신체에 악영향을 끼쳐 각종 질병과 노화를 유발하는 주범이 되고 있다.[8] 본 연구에서는 총 폴리페놀 함량 시험, DPPH radical scavenging assay, ABTS⁺ radical scavenging assay, 그리고 Superoxide dismutase assay 를 실시함으로써 항산화 활성을 확인하였다.

항염

활성산소는 생체 내 여러 가지 세포의 작용을 조절하는 염증반응의 유발인자가 되기도 한다. 염증은 다양한 경로를 통한 외부 감염, 대사산물등 내외적 자극에 대한 생체 내 방어기전의 발현으로 세포 내 다양한 염증 조절 인자들이 매개체로 관여한다. 생체 내의 박테리아가 죽으면서 세포 외막에 존재하는 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)를 방출하여 대식세포를 활성화 시킨다. RAW264.7과 같은 대식세포들이 활성화되면 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 cytokine 등 다양한 염증반응을 유발하는 매개물질을 분비한다. 그 중 pro-inflammatory cytokine의 종류로는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) 및 interleukin-1 β (IL-1 β)가 있다. LPS의 자극을 받은 대식세포들은 이들을 분비하여 염증반응의 전사인자 발현을 유도한다. TNF- α 및 IL-6는 PGE₂의 발현을 유도하며, TNF- α 및 IL-1 β 는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 유도한다. PGE₂는 TNF- α 및 IL-6 등에 의해 활성화된 효소인 cyclooxygenase (COX)에 의해 arachidonic acid로부터 만들어지며, COX에는 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 대부분의 조직에서 꾸준히 만들어져 체내에서 혈소판의 형성, 위벽 보호 및 신장 기능의 유지 등과 같은 정상적인 생체 기능을 작용하는 반면에 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 과정에서 발현되는 유도성 효소이다. iNOS는 세포 내에 존재하지 않으나 TNF- α 및 IL-1 β 에 의해 유도되면 장시간동안 다량의 NO를 생성한다. NO는 세포내 항산화성 유지, 항암 작용과 세포독성에 관여하는 신호전달자이지만, 과량으로 존재할 경우 세포 손상이나 염증반응으로 이어져 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다.[9]

본 연구에서는 murine macrophage RAW 264.7 세포 내에 염증 매개 물질인 Nitric oxide (NO)를 측정함으로써 염증반응을 얼마나 저해하는지를 측정하였다.

미백

미백이란 피부나 치아를 아름답고 희게 만드는 것을 의미한다. 인간의 피부 색갈은 내적, 외적 요인에 의해 달라지게 되는데 그 중 피부색을 결정하는 근본적인 내적 인자는 천연 피부 색소인 멜라닌(melanin)이다. 멜라닌은 피부내 기저층에 존재하는 색소 세포인 melanocyte에서 합성되며 주변 각질 세포로 전이되어 사람의 피부색을 나타내는데 기미, 주근깨 등이 생기는 것은 멜라닌이라는 색소가 과도하게 생성되기 때문이다.[10] 멜라닌의 합성 경로를 살펴보면 melanocyte라는 멜라닌 생성세포 내의 소기관인 melanosome에서 합성되며 멜라노사이트의 수지상 돌기를 통하여 주위의 케라티노사이트로 이행한다. 멜라닌은 멜라노사이트 내에서 티로신이라는 아미노산으로부터 출발하여 도파(DOPA)로 다시 산화하여 도파퀴논(DOPA-quinone)이 생성되는 단계에서 티로시나아제라는 산화 효소가 관여한다. 그 후 자동 산화반응이 일어나 5,6 dihydroxyindol을 거치면서 indole-5,6-quinone이 형성되고 최종적으로 흑갈색의 멜라닌을 만들어낸다.[11] 이러한 이유로 외부자극에 의하여 과 발현된 멜라닌을 억제하고 미백효과를 얻기 위해서는 멜라닌 합성 효소의 발현을 저해시켜야 한다. 따라서, 본 연구에서는 α -melanin stimulating hormone (α -MSH)에 의하여 활성화된 B16F10 melanoma cell을 이용하여 멜라닌 생성 저해효과를 확인하였다.

항균

피부는 인체의 가장 바깥부분에 있으면서 가장 큰 면적 기관으로 수많은 미생물이 균형을 이루며 내외부적 요소로부터 피부 건강을 유지시킨다. 즉 건강한 피부는 특정 요인에 의해 유해하게 발현되지 않는 한 다른 미생물들과 균형을 이루고 있다. 그러나 환경오염 등 주위환경이나, 내외부자극으로 인해 피부 속 미생물의 생태계 균형을 깨트리게 되고 이로 인해 피부도 각종 세균에 노출되어 유해한 균이 침투할 가능성이 생기면서 피부 트러블을 유발 할 수 있다. 즉 모낭 내의 미생물이 번식하기에 알맞은 조건을 형성하여 혐기성균, 호기성구균, 진균

등이 번식하게 되는 환경이 주어지게 된다.

피부에 염증을 일으키는 피부질환 미생물은 *Cutibacterium acnes*와 *Staphylococcus epidermidis* 가 대표적이며, 이들은 피부나 생활환경에 존재하여 피부의 세포나 장벽 기능을 손상시켜 아토피 피부염이나 여드름을 유발한다.[12] 여드름은 모낭-피지선에서 발생하는 염증성 질환으로 발생기전은 androgen이 피지 분비를 촉진하고 *C.acnes*가 피지를 triglyceride와 유리 지방산으로 가수분해하면서 염증이 일어난다. 이때 모공이 두꺼워 각질로 채워지며 피지가 모낭관 밖으로 배출되지 못하여 여드름이 발생하는 것으로 알려져 있다.[13] 또한 *S.epidermidis*는 피부 내에 정상적으로 분포하는 호기성 피부 상재균으로 염증의 일차적 원인은 아니지만, 염증 발생 부위를 더욱 확장시키며 여드름을 악화시킨다고 알려졌다.[14] 이러한 피부 상재균 및 기타 세균에 의한 질환의 발생을 감소시키고 피부를 보호하기 위해서 항균제의 사용은 필수적이다. 다만, 현재 주로 사용되는 항균제인 triclosan, erythromycin, tetracyclin 등의 지속적인 사용은 내성을 일으킬 뿐만 아니라 조직 및 장기 손상, 과민반응과 같은 부작용을 일으킬 수 있다.[15] 이러한 문제점을 극복하기 위해 항균력이 우수하면서도 인체 독성 및 부작용을 최소화 할 수 있는 천연 유래 항균 물질의 개발에 대한 관심이 꾸준히 이어져오고 있다. 본 연구에서는 여드름 균인 *C.acnes*와 피부 상재균인 *S.epidermidis*를 사용하여 시료의 항균 활성을 확인하고자 하였다.

아임계수추출 (Subcritical Water Extraction, SWE)

아임계수 추출법은 물의 임계점(374°C, 22.1 MPa) 이하의 온도와 압력 조건에서 이온화된 물을 이용하여 물질을 분해하고 추출하는 방법이다.[16] 대기압에서의 100°C 이하 물은 물질의 전기적 특성을 나타내는 상대 유전율(relative permittivity, ϵ)이 매우 높기 때문에($\epsilon > 80$) 오로지 극성 화합물의 추출에만 이용할 수 있고, 따라서 비극성 flavonoid의 추출에는 효과적이지 않다. 하지만 아임계 추출은 상온, 상압의 물을 압력 및 온도의 조절을 통하여 아임계 상태로 만듦으로써 낮은 상대 유전율($1 < \epsilon < 25$)을 부여하므로 flavonoid와 같은 비극성 화합물을 추출하는데 매우 효과적이다.[17] 현재 사용되는 다양한 기능의 천연물의 추출 방법으로는 일반적으로 유기용매(에탄올, 헥산, 에틸아세테이트 등) 또는 열수

추출이 이용되고 있다. 그러나 에탄올 사용 시 농도가 증가할수록 유효성분의 함량은 증가하나 추출물 제조 수율은 감소하는 경향을 보이며, 높은 제조 경비 및 잔류 용매를 완전히 제거하는 등의 추가 공정이 필요하고 열수 추출에 사용되는 물은 안전한 추출 용매이나 생리활성 성분의 회수율이 높지 않거나 고온 장시간 추출로 인한 생산성의 저하 등의 문제가 있다.[18] 따라서 산, 알칼리 등의 촉매 없이, 유기용매가 아닌 물, 온도, 압력(40 - 200 °C, 1 - 130 bar)만으로 처리하는 아임계 추출의 경우, 친환경 공법으로 칭할 수 있으며, 추출 시간도 비교적 짧아 안정성, 경제성, 친환경 등의 장점이 많은 추출 방법이다.

에센셜오일 (Essential Oil)

식물의 꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 수지로부터 얻어지는 방향성 휘발성의 오일을 에센셜오일 (Essential oil)라고 한다. 주된 에센셜오일의 채취 방법으로는 증류법 (distillation), 압착법 (expression), 추출법(extraction) 등이 있다. 에센셜오일의 성분은 단일성분이 아니며 보통 수십 종류에 달하는 혼합물로, 동일 식물이라도 그 채취법이나 채취부분, 산지 등을 달리하면 성분의 비율도 달라진다.[19] 에센셜오일의 주요 구성성분은 탄소화합물이다. 주로 이소프렌(isoprene)의 2분자 결합형인 모노테르펜 (monoterpene) 탄화수소, 3분자 결합형인 세스키테르펜 (sesquiterpene) 탄화수소, 그리고 그것들로부터 유도되는 알코올, 알데히드, 케톤, 에스테르 등을 주로 하는 테르펜계 화합물의 혼합물이다. 물론 방향족 화합물, 지방족 화합물, 그 외의 유기화합물을 포함하는 경우도 많다. 에센셜오일은 자유라디칼에 의해 생성되는 활성산소종의 체내 축적을 예방하는 항산화 효능과 병원성 미생물의 생육을 억제하는 항균 효능 등을 나타낸다고 알려져 있다.[20] 에센셜오일의 종류는 상당히 다양하고 많은데, 국내에서는 여전히 이들 대부분을 수입에 의존하고 있는 실정이다.

가장 보편적인 향료 중 하나로 감귤계열(Citrus)의 향을 꼽을 수 있다. 대표적인 감귤계열로는 오렌지, 레몬, 만다린 등이 있다. 주로 감귤식물의 과피에 포함되는 향이 많은 이들에게 익숙한 향이지만, 앞서 설명한 바와 같이 부위에 따라 나눌 수가 있다. 예를 들어 Bitter Orange oil 은 *Citrus aurantium* 의 잎이나 줄기, 꽃, 과피로부터 향을 얻는데 잎이나 가지를 수증기 증류해서 얻어지는 향료를

Petitgrain bigarade 라하고, 꽃을 수증기 증류해서 얻어지는 향료를 Neroli, 과피를 압착하여 얻어지는 향료를 Bitter orange oil 이라고 한다. 주로 지중해, 기니아, 서부 인도, 브라질 등에서 재배된다.[21] 이처럼 감귤계 식물에서 추출되는 에센셜오일은 다양하고 그에 따른 활용도도 높다.

본 연구에서는 제주도의 상징인 온주 감귤 나무의 잎과 지속적으로 생산이 확대되고 있는 제주도 레몬 나무의 잎으로부터 에센셜오일 및 아임계수를 추출하여 다양한 생리활성을 확인하고, 유효성분을 확인하여 화장품 소재로서의 응용 가능성이 있을 것으로 예상하였다. 더불어 감귤 나무와 레몬 나무의 잎 부위를 이용함으로써 업사이클링 개념의 도입 가능성도 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 연구에서 시료의 추출은 오직 정제수로만 사용하였으며, 아임계수 추출을 위한 추출 기기는 SpeedExtractor E-916 (BUCHI Labortechnik AG, Switzerland)를 사용하였다. 추출물의 성분 분석에는 Gas chromatography-Mass selective detector (GC-MS, Agilent 7890A)과 High performance liquid chromatography (HPLC, Waters 2690/5)에는 Waters Sunfire column (C18, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm)을 사용하였고 검출기는 2998 PDA detector (Waters Co.)를 사용하였다. 분석을 위한 용매 모두 HPLC급 (J.T.Baker, USA)을 사용하였고, 그 외 분석을 위한 시약은 모두 표준시약 시판용 (Sigma-Aldrich, USA)으로 측정하였다.



Figure 1. Picture of Instruments (Subcritical water extractor, GC-MS, HPLC).

2. 감귤 · 레몬 잎 에센셜오일 및 아임계수 추출

2.1. 시료 채취

본 연구에 사용된 감귤잎과 레몬잎은 제주도 제주시 애월읍 장전리에서 채취하여 시료로 사용하였다. 채취한 잎은 생물과 건조물로 나누어 추출방법에 따라 사용하였다. 에센셜오일을 추출하기 위해 생잎을 사용하였고, 아임계수 추출을 위해 잎을 건조한 후 쇠질 분쇄하여 사용하였다.



Figure 2. Picture of *Citrus unshiu* (left) and *Citrus limon* (right)

2.2. 시료 추출

2.2.1. 에센셜오일 추출

채취한 감귤잎과 레몬잎을 분쇄하여 각 6,000 g을 Clevenger형 장치에 4시간동안 증류추출법으로 추출하였다. 추출된 에센셜오일과 하이드로졸(플로럴워터)을

분리 분획 한 후, 에센셜오일의 수분을 제거하기 위하여 무수황산나트륨을 사용하여, 각각 5.4 g (0.089%, w/w), 8.9 g (0.149%, w/w)의 에센셜오일을 얻었다. 감귤잎 에센셜오일은 노란색을 띠는 액상으로 감귤잎 특유의 향을 가지고, 레몬잎 에센셜오일은 미황색의 액상으로 레몬잎 특유의 향을 가지고 있다. 확보한 에센셜오일은 빛을 차단할 수 있는 갈색 유리병에 담아 냉장보관하여 실험에 사용하였다.

2.2.2. 아임계수 추출

아임계수는 아임계 추출장치 (SpeedExtractor E-916, BUCHI)를 사용하여, 추출 시간은 15분으로 고정하고, 압력(70, 90 bar)과 온도(100, 145, 190 °C)의 조건을 변경하면서 추출을 진행하였다(Table 1). 감귤잎과 레몬잎을 건조 분쇄한 시료 각 0.3 g에 추출에 사용되는 모래 15 g을 섞어 추출 셀에 충전하고 섬유 필터를 셀 하부 및 상부에 부착한 후, 오븐에 장착하여 추출한다. 추출이 시작되면 1분간 용매인 증류수가 추출 셀에 채워지고 약 5분 동안 설정된 온도 및 압력에 도달한 후, 추출이 시작된다. 정해진 추출 시간이 끝나면 약 30초 내에 추출물이 collection vial에 수집된다. 수집된 아임계 추출물을 액상 그대로 시료로 사용하였고, 추출 후 냉동보관 후 실험에 사용하였다.

Table 1. Various process method of SWEs from *Citrus unshiu* and *Citrus limon* leaves

	Pressure (bar)	Temperature (°C)
<i>Citrus unshiu</i> leaves SWE	70	100
		145
		190
<i>Citrus limon</i> leaves SWE	90	100
		145
		190

2.2.3. 열수 및 저온 추출

아임계수와 일반 추출물과의 비교 실험을 하기 위해 감귤잎과 레몬잎을 건조 분쇄한 시료 3.0 g에 정제수 400 mL를 가하여 열수 (100℃, 2시간), 저온 (실온, 2시간) 추출하여 사용하였다. 일반 추출물은 마찬가지로 냉동 보관 후 실험에 사용하였다.

3. 성분 분석

3.1. GC-MS 성분 분석

추출한 각 에센셜오일의 성분 분석은 (재)제주테크노파크 생물종다양성연구소에 의뢰하여 성분을 확인하였다. 에센셜오일의 분석은 Gas chromatography-Mass selective detector (GC-MS, Agilent 7890A)를 이용하여 분석하였다. Table 2. 의 분석 조건으로 실험하였다. GC column은 CP-Sil 8 CD (0.25 μ , 30 m \times 0.25 mm, Agilent technologies)를 사용하였고 Carrier gas는 He을 사용하여 유속 1mL/min으로 하였다. 컬럼 오븐 온도는 60 $^{\circ}$ C를 2분간 유지한 뒤 분당 3 $^{\circ}$ C 비율로 상승시켜 300 $^{\circ}$ C로 올린 후 8분간 유지하였다. 이온화 방법으로는 electron ionization mode를 사용하였으며, inlet과 MS source, MS quadrupole 온도는 각각 250, 230, 150 $^{\circ}$ C로 설정하였다. 각 성분의 mass spectrum을 확인하기 위해 scan mode로 m/z 45-600 범위를 검출하였고, 성분들의 동정은 확보된 mass spectrum을 라이브러리 (W9N08.L, Wiley ver.9.0)와 비교하여 확정하였다. 라이브러리와 유사도가 90% 이상인 화합물만 동정하였으며, 동정된 화합물의 성분조성비는 전체 피크에서 각 피크가 차지하는 비율을 기반으로 산출하였다. 유사도가 90% 이상인 화합물에 대한 Area(%)는 3반복 분석 결과의 평균을 기입하였다. 각 에센셜오일의 시료 분석을 위해 hexan으로 20배 희석 후 제공하였다.

Table 2. GC/MS conditions

Instrument	Agilent 7890A GC
Column	CP-Sil 8 CD (0.25 μ , 30 m \times 0.25 mm)
Inject temperature	250, 230, 150 $^{\circ}$ C
Injection volume	1 μ L
Oven temperature	60 $^{\circ}$ C (2 min) \rightarrow 3 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 300 $^{\circ}$ C (8 min)
Carrier gas flow	1.0 mL/min (He)
Spectrum library	W9N08, Wiley

3.2. HPLC 성분 함량 분석

추출한 시료의 지표 성분의 함량을 분석하기 위해 High performance liquid chromatography (HPLC, Waters 2690/5)를 사용하여 분석하였다. 분석을 위해 각 추출물은 0.45 μm filter를 여과하여 나온 여액을 사용하였다. 분석 조건은 Table 3. 와 같다. 검량선 작성을 위해 표준품 (Sigma-Aldrich, $\geq 90\%$)을 사용하였다. 각 성분은 문헌을 통해 hesperidin, neohesperidin, naringin, naringenine을 선정하여 분석을 진행하였다.[22] 분석 결과 나타난 표준시약과 샘플의 peak의 retention time과 파장을 비교하여 정성하였고, 감귤잎과 레몬잎 아임계수의 함유 성분의 함량은 표준시약을 농도별로 실험하여 얻은 standard substances의 peak 면적을 통해 작성한 standard curve로부터 구하였다(Figure 3).

Table 3. HPLC chromatographic conditions of the control factors

Instrument	Waters 2690/5		
Detector	PDA detector		
Wavelength	280 & 330 nm		
Column	SunFire C18, 5 μm , 4.6 \times 250 mm (Waters Co.)		
Flow rate	1 min/mL		
Injection volume	10 μL		
Mobile phase	A) 0.1 Acetic acid in H ₂ O, B) Acetonitrile		
Gradient condition	Time (min)	%A	%B
	0	90	10
	5	90	10
	10	75	25
	30	50	50
	35	90	10
	40	90	10

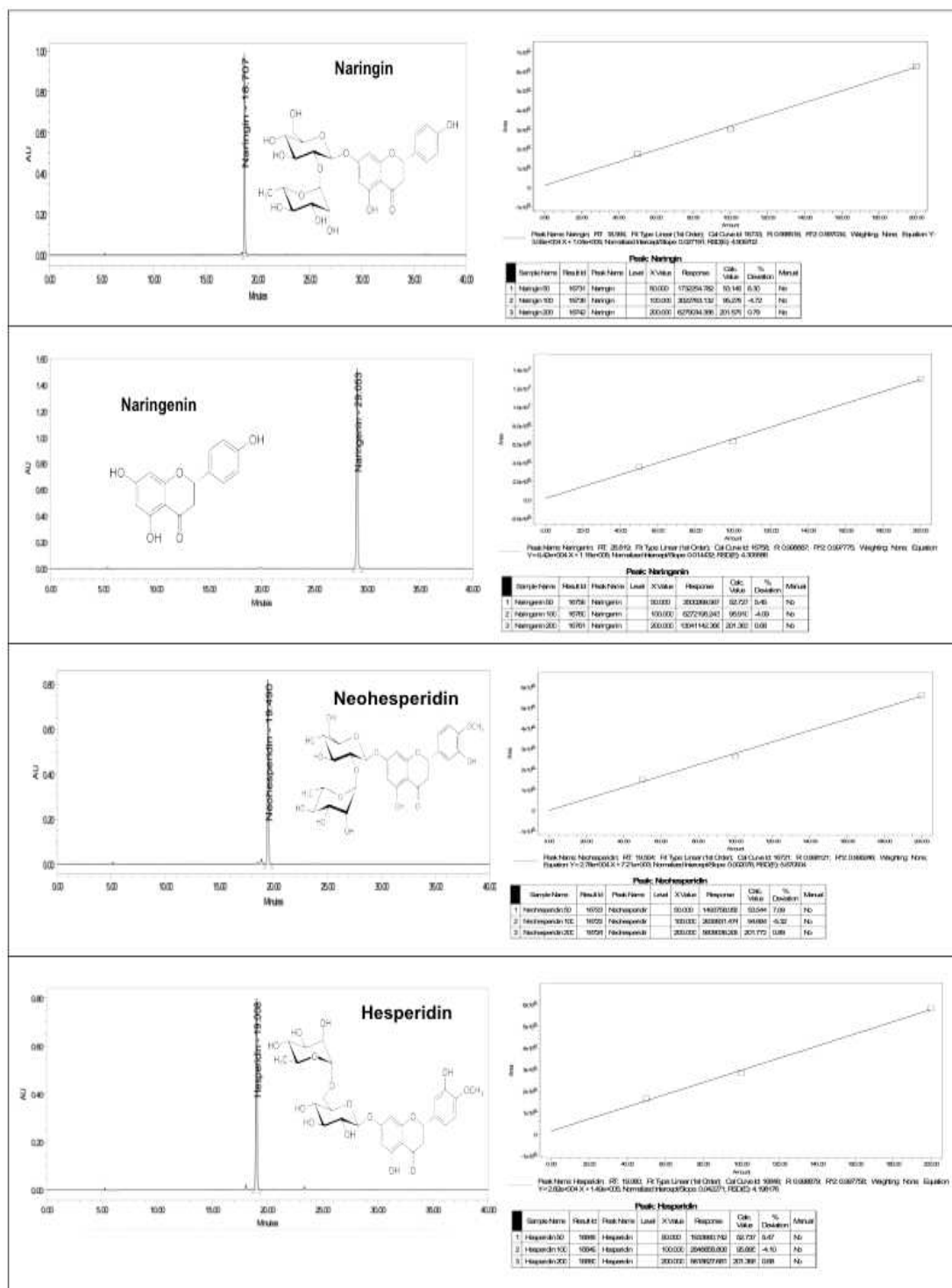


Figure 3. HPLC chromatogram of Naringin, Naringenin, Neohesperidin, Hesperidin on 280 nm with each of calibration curve

4. 생리 활성 평가

4.1. 항산화

시료의 항산화 활성을 측정하고자 총 폴리페놀 함량 시험, DPPH radical scavenging assay, ABTS⁺ radical scavenging assay, 그리고 Superoxide dismutase assay 를 실시하였다.

4.1.1. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀류 화합물의 함량은 Folin-Denis 등의 방법을 변형하여 실시하였다.[23]정량을 위한 표준 검정 곡선 (standard calibration curve) 작성에는 gallic acid를 표준물질로 사용하였다. 1 mg/mL 농도의 시료와 농도별로 희석한 gallic acid 표준 용액을 100 μ L씩 취한 후 증류수 900 μ L를 가하여 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-ciocalteu's phenol reagent 100 μ L를 첨가하여 상온에서 3분간 방치한 후 7% (w/v) Na₂CO₃ 용액 200 μ L를 가하여 혼합한 후 증류수 700 μ L를 넣어 total volume이 2 mL가 되도록 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 96 well plate에 옮긴 후 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정값을 표준 검정 곡선에 대입하여 시료 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양으로 환산하였다. 표준 검정 곡선의 R²값은 0.99 이상이었다(Figure 4).

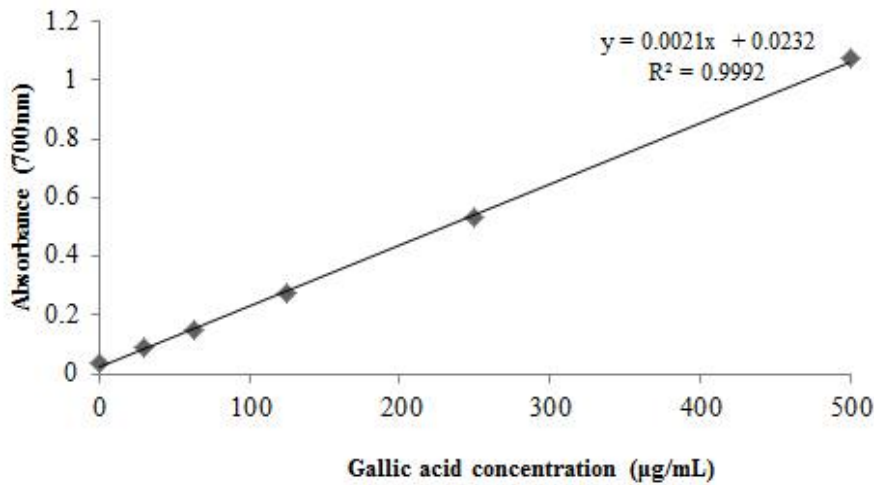


Figure 4. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenol contents

4.1.2. DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 Blois 등의 방법을 응용하여 실시하였다.[24] DPPH 시약은 MeOH를 사용하여 0.3 mM 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 시료를 각각 100 µL씩 넣고 0.3 mM DPPH 용액을 100 µL씩 가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였고 radical 소거 활성은 다음과 같은 식을 이용하여 %로 계산하였으며 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50% 저해할 때의 시료 농도 (SC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였으며 양성 대조군 (positive control)은 ascorbic acid (Vitamin C)를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left[1 - \frac{(S - B_1)}{(C - B_2)} \right] \times 100$$

C : solvent와 DPPH용액의 흡광도

B₁ : 시료 자체의 흡광도

B₂ : solvent 자체의 흡광도

S : 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

4.1.3. ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) cation radical 소거 활성 실험은 Re 등의 방법을 응용하여 실시하였다.[25] ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하기 위해 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM potassium persulfate를 실온의 암소에서 반응시켜 ABTS cation을 형성시킨다. ABTS⁺ 용액은 732 nm에서 흡광도가 0.706±0.040으로 희석하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 시료를 농도별로 각각 100 μL씩 가한 후 희석한 ABTS⁺ 용액 100 μL를 첨가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도 (SC₅₀)를 구하였다. 양성 대조군 (positive control)은 ascorbic acid (Vitamin C)를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left[1 - \frac{(S - B_1)}{(C - B_2)} \right] \times 100$$

C : solvent와 ABTS⁺용액의 흡광도

B₁ : 시료 자체의 흡광도

B₂ : solvent 자체의 흡광도

S : 시료와 ABTS⁺ 반응액의 흡광도

4.1.4. SOD (Superoxide dismutase) 유사 활성 측정

SOD는 대표적인 항산화 효소로서 항산화 능력을 측정하는 지표로 측정되어 왔으며, SOD (Superoxide dismutase)의 활성은 초과산화이온을 과산화수소로 바꾸는 효소로 작용하여 활성산소를 없애는 역할을 하는 실험으로 Xanthine oxidase가 만들어내는 활성산소종을 없앨 수 있는 항산화 효소가 얼마나 있는지 측정하는 실험을 진행하였다.[26] 추출물 내 SOD 유사 활성을 측정하기 위해 EX-SOD Assay Kit (dogenbio Co.Ltd., Korea)를 사용하였다. 다양한 농도로 희석한 sample을 각 sample well과 blank well에 20 μL씩 넣고 WST working solution을 각 well에 200 μL씩 분주한다. 그리고 Enzyme working solution을

well에 각각 20 μ L씩 넣은 후 조심스럽게 섞어준 후, 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각 시료의 저해 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도(IC₅₀)를 구하였다. 양성 대조군 (positive control)은 ascorbic acid (Vitamin C)를 사용하였다.

$$\text{SOD activity (\%)} = \frac{[(Abs_{\text{sample control}} - Abs_{\text{control blank}}) - (Abs_{\text{sample}} - Abs_{\text{sample blank}})]}{(Abs_{\text{sample control}} - Abs_{\text{control blank}})} \times 100$$

4.2. 항염

4.2.1. RAW264.7 세포 배양

마우스 대식세포 계열 (Murine macrophages cell line)인 RAW264.7 cell은 ATCC (American Type Cell Culture)로부터 분양받아 실험에 사용하였으며, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin과 10% FBS (fetal bovine serum, gibco Inc., USA)이 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, gibco Inc., USA) 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였고 2-3일 간격으로 계대 배양을 실시하였다.

4.2.2. 세포 독성 평가

세포 독성 평가는 WST-1 assay를 이용하였다. 24 well plate에 RAW264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 μ g/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 상등액을 제거하고 새로운 배지를 각 well에 500 μ L 분주하고 Ez-cytox (Daeillab service co. Ltd., Korea) 시

약을 각 well에 50 μ L 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 30-40분 동안 반응시켰다. 이후 96 well plate에 200 μ L씩 첨가하여 이를 450 nm 흡광도에서 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

4.2.3. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7 cell과 염증이 유발된 마우스 혈청 내에서 염증 매개물질 중 하나인 NO 생성량을 측정하기 위해 Griess reagent system (Intron, Korea)을 이용하였고 그 방법은 다음과 같다. 24 well plate에 RAW264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 μ g/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 생성된 nitric oxide의 양을 측정하기 위해 96 well plate에 세포 상등액 100 μ L와 N1 buffer 50 μ L를 각 well에 처리하여 10분간 상온에서 반응시킨 후 N2 buffer 50 μ L를 각 well에 처리하고 10분간 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였으며 sodium nitrite (NaNO₂)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준 검정 곡선을 통해 정량하였고 표준 검정 곡선의 r²값은 0.99 이상이었다. 양성 대조군으로는 2-amino-4-picoline (2 μ M)을 사용하였다.

4.3. 미백

4.3.1. B16F10 melanoma 세포 배양

Murine B16F10 melanoma cell 은 ATCC (American Type Cell Culture, USA)로부터 분양받아 10% FBS (fetal bovine serum, gibco Inc., USA), 100 units/mL penicillin 및 100 μ g/mL streptomycin이 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, gibco, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서

배양하였으며, 3-4일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4.3.2. 멜라닌 합성 저해 효과 측정

24 well plate에 3.0×10^4 cell/well 로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cell의 배지를 100 nM α -MSH가 포함된 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 72시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffer saline)로 세척한 후, tyrosin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 1 N NaOH 300 μ L를 첨가하여 70°C에서 30분간 반응시켜 세포 내의 melanin을 녹여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성 대조군으로는 arbutin을 사용하였다.

4.3.3. 세포 독성 평가

세포 독성 평가는 WST-1 assay를 이용하였다. WST-1 assay 는 B16F10 cell 을 well plate에 실험조건에 맞게 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 전 배양한 후, α -MSH (100 nM)와 시료를 농도별로 처리하여 배양하였다. 이후 상등액을 제거하고 새로운 배지를 각 well에 200 μ L 분주하고 Ez-cytox (Daeillab service co. Ltd., Korea) 시약을 각 well에 20 μ L 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 30-40분 동안 반응시켰다. 이후 96 well plate에 200 μ L씩 첨가하여 이를 450 nm 흡광도에서 측정하였다. 세포 생존율은 다음의 식에 의해 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100$$

4.4. 항균 효능 분석

4.4.1. 균주 배양

본 연구에 사용된 표피포도상구균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM

3709, 3710, 3711)와 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010)을 항생제 내성균주은행 (Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받아 사용하였다. *S.epidermidis*는 배양배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37°C에서 배양하였으며, 24시간마다 계대 배양하였다. *C.acnes*는 배양배지를 GAM (Gibu anaerobic medium) broth로 하여 37°C 혐기 상태로 48시간마다 계대 배양하였다.

4.4.2. Paper disc diffusion method

시료의 항균 활성을 측정하기 위해 paper disc diffusion method를 실시하여 각 균주에 대한 생육 저지환을 측정하였다.

S.epidermidis(CCARM 3709, 3710, 3711)는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여 1.5×10^7 CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8 % agar를 포함하는 TSB 배지에 넣어 준비해둔 하드배지(1.5% agar) 위에 부어준 후 굳힌다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다.

*C.acnes*의 균수를 조절 (5.0×10^7 CFU/mL)하여 0.8% agar를 포함하는 소프트 배지에 넣고 1.5% agar를 포함하는 고체 배지 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료를 100 μ L씩 분주한 직경 8 mm paper disc를 올리고 37°C에서 48시간 혐기 배양한 후 형성된 생육 저지환의 크기를 측정하였다. 이때 양성 대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.

5. 통계 처리

본 연구에서 얻어진 결과에 모든 값은 3회 이상의 반복 실험의 측정 값의 평균 \pm 표준오차로 나타내었고 실험 결과 값에 대한 통계적 분석은 Student's t-test를 이용하여 분석하였으며, p 값이 0.05 이하이면 유의성이 있다고 판단하였다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Ⅲ. 실험 결과

1. 성분 분석

1.1. 감귤잎 및 레몬잎 에센셜오일의 GC-MS 성분 분석

감귤잎과 레몬잎의 에센셜오일을 분석한 결과, 감귤잎 에센셜오일에서는 39개의 성분이, 레몬에서는 24개의 성분이 유사도 90% 이상으로 확인되었다.

감귤잎에서 유사도 90% 이상으로 확인된 94.80%의 성분 중 44.03%의 비율로 함유되어 가장 높은 함량을 나타낸 γ -Terpinene은 monoterpene으로 항염증 효능을 가진다고 알려져있다.[27] 두 번째로 높은 13.06% 함량을 나타낸 p-Cymene, β -Elemene이 7.67%로 뒤를 이었다. 이들 성분은 항균력을 가진다고 알려져있다.[28]

레몬잎 에센셜오일에서 유사도 90% 이상으로 확인된 79.43%의 성분 중에서는 Limonene이 47.93%로 가장 많은 비율을 차지하였으며, 감귤류 계열에 가장 많이 함유된 것으로 알려진 성분으로 주로 감귤계 과피에 존재하는 monoterpene 화합물로 감귤계 고유의 향을 나타내는 성분이다.[29] 그리고 10.67% 함유된 β -Pinene, α -Citral이 3.97%로 뒤를 이었다.

감귤잎과 레몬잎의 에센셜오일에 대한 성분 분석 결과는 각각 Table 4와 Table 5에 나타내었다.

Table 4. Chemical composition (%) of *Citrus unshiu* leaves essential oil

Peak	Compound	Similarity* (%)	RT** (min)	Area*** (%)
1	alpha-Tujene	91	7.182	0.93±0.15
2	alpha-Pinene	97	7.485	2.28±0.31
3	Camphene	96	8.036	0.03±0.00
4	Sabinene	96	8.866	0.47±0.07
5	beta-Pinene	96	9.144	4.75±0.15
6	beta-Myrcene	93	9.432	0.56±0.07
7	l-Phellandrene	96	10.139	0.08±0.01
8	alpha-Terpinene	97	10.595	0.65±0.08
9	p-Cymene	97	11.087	13.06±0.29
10	Limonene	97	11.224	2.97±0.28
11	beta-trans-Ocimene	97	11.682	1.55±1.27
12	gamma-Terpinene	95	12.700	44.03±1.79
13	1-Octanol	91	12.864	0.06±0.00
14	p-Cresol	96	13.108	0.03±0.01
15	α-Terpinolene	97	13.627	2.38±0.20
16	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)	98	13.812	1.24±0.12
17	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol	96	14.323	5.49±0.28
18	Fenchyl alcohol	93	15.026	0.02±0.00
19	4-Terpineol	97	17.812	0.59±0.04
20	3-Methylacetophenone	93	18.01	0.04±0.00
21	Terpineol	91	18.478	0.77±0.05
22	Decanal	91	18.874	0.11±0.01
23	Bornylene	93	20.455	0.04±0.01
24	Thymol	91	22.697	0.06±0.00
25	Carvacrol	91	23.071	0.04±0.00
26	4-Vinylguaiacol	95	23.593	0.07±0.00
27	alpha-Terpinene	96	24.621	0.06±0.00
28	beta-Elemene	96	27.189	7.67±0.27
29	trans-Caryophyllene	98	28.381	2.10±0.12
30	alpha-Caryophyllene	98	29.813	0.99±0.06
31	Germacrene D	97	30.822	0.08±0.01
32	beta-Selinene	98	31.142	0.15±0.06
33	Germacrene B	98	31.456	0.44±0.02
34	delta-Cadinene	99	32.341	0.12±0.01
35	Elemol	92	33.508	0.31±0.03
36	gamma-Eudesmol	99	36.748	0.08±0.00
37	Phytol	92	52.667	0.44±0.00
38	Linolenic acid	95	53.54	0.05±0.01
39	Ethyl linoleate	95	54.312	0.03±0.00

*Similarity below 90% means low consistency

**Retention time

***Each value is the mean of three replications \pm standard deviation

Table 5. Chemical composition (%) of *Citrus limon* leaves essential oil

Peak	Compound	Similarity* (%)	RT** (min)	Area*** (%)
1	alpha-Thujene	91	7.163	0.05 \pm 0.01
2	alpha-Pinene	97	7.453	0.81 \pm 0.05
3	Camphene	97	8.038	0.06 \pm 0.01
4	Sabinene	96	8.862	0.70 \pm 0.04
5	beta-Pinene	95	9.152	10.67 \pm 0.03
6	6-Methyl-5-hepten-2-one	98	9.255	0.62 \pm 0.01
7	beta-Myrcene	95	9.423	0.55 \pm 0.03
8	delta-3-Carene	97	10.273	1.29 \pm 0.03
9	p-Cymene	96	10.971	0.36 \pm 0.04
10	Limonene	95	11.348	47.21 \pm 2.90
11	beta-Ocimene	98	11.783	0.67 \pm 0.00
12	gamma-Terpinene	97	12.309	0.16 \pm 0.00
13	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol	96	14.166	3.11 \pm 0.21
14	4-Terpineol	96	17.808	1.47 \pm 0.05
15	cis-Carveol	95	20.256	0.12 \pm 0.01
16	beta-Citral	95	20.508	2.70 \pm 0.22
17	Carvone	95	20.743	0.37 \pm 0.02
18	Geraniol	95	21.113	1.52 \pm 1.35
19	alpha-Citral	95	21.868	4.06 \pm 0.35
20	Geranyl acetate	90	26.495	0.76 \pm 0.05
21	trans-Caryophyllene	99	28.31	0.83 \pm 0.09
22	alpha-Farnesene	93	28.804	0.13 \pm 0.01
23	alpha-Caryophyllene	98	29.765	0.09 \pm 0.01
24	beta-Bisabolene	96	31.853	0.26 \pm 0.03

*Similarity below 90% means low consistency

**Retention time

***Each value is the mean of three replications \pm standard deviation

1.2. 감귤 및 레몬잎 추출물의 HPLC 성분 함량 분석 및 성분 비교

감귤류에서 주로 추출되는 플라보노이드 표준품 4종(Naringin, Naringenin, Hesperidin, Neohesperidin)에 대해 감귤잎 아임계수와 레몬잎 아임계수 및 추출물에서의 성분 함량을 분석하였다.

그 결과, 감귤잎 아임계수 추출물에서 지표성분이 naringin (37.9 mg/g), naringenin (6.7 mg/g), neohesperidin (8.2 mg/g)을 확인하였고, 레몬잎 아임계수 추출물에서는 neohesperidin (2.9 mg/g), naringin (0.7 mg./g)을 확인하였다. 감귤잎 열수추출물과 저온추출물, 레몬잎 열수추출물과 저온추출물에서는 지표성분이 확인되지 않았다.

감귤잎 및 레몬잎 아임계수 추출물에 대한 HPLC 성분 함량 분석결과는 각각 Figure 5와 Figure 6에 나타내었다. 이들 추출물과 열수 추출물 및 저온 추출물과의 비교 분석 결과는 Table 6에 정리하였다.

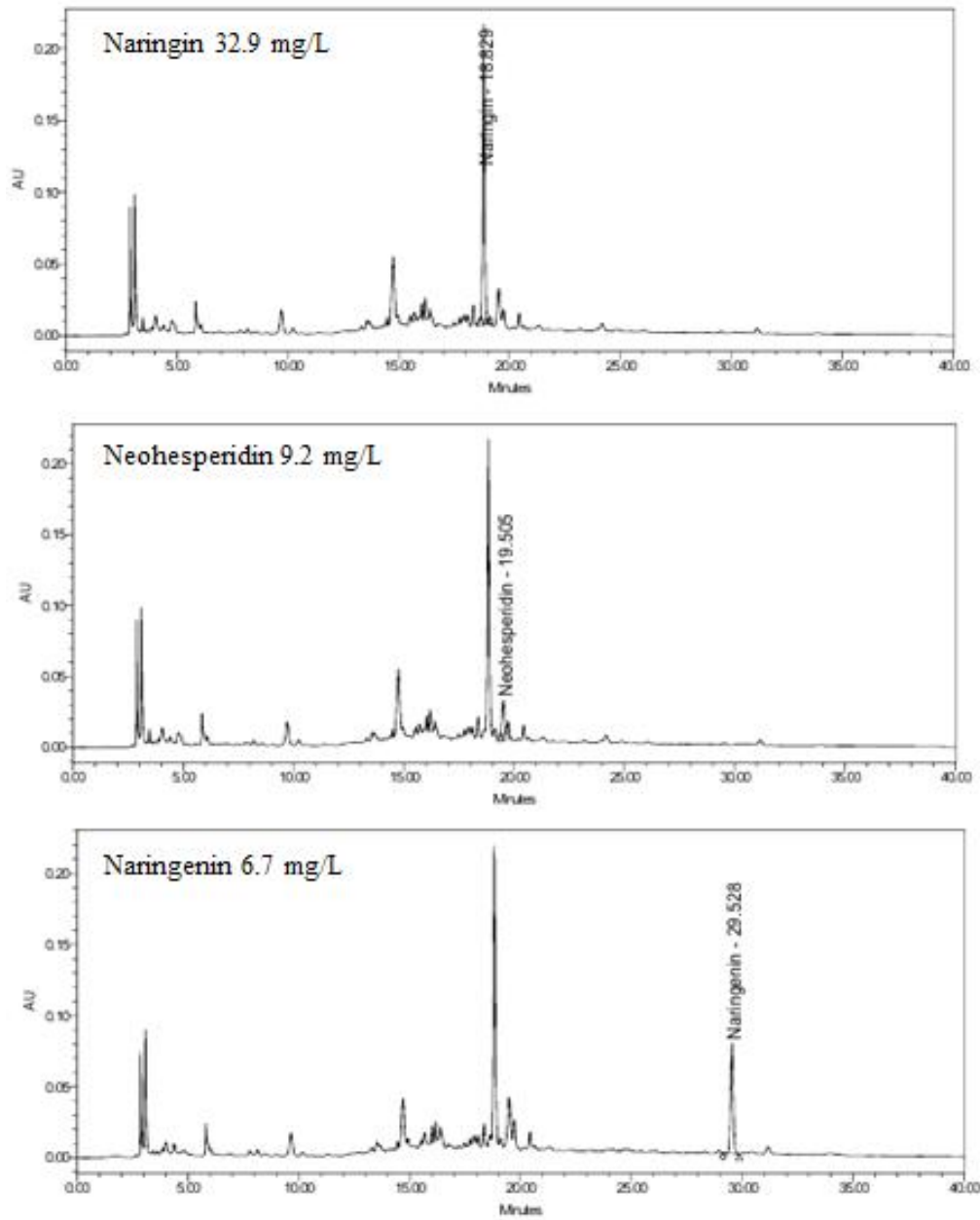


Figure 5. HPLC chromatogram of *Citrus unshiu* leaves SWE (Subextract water extract).

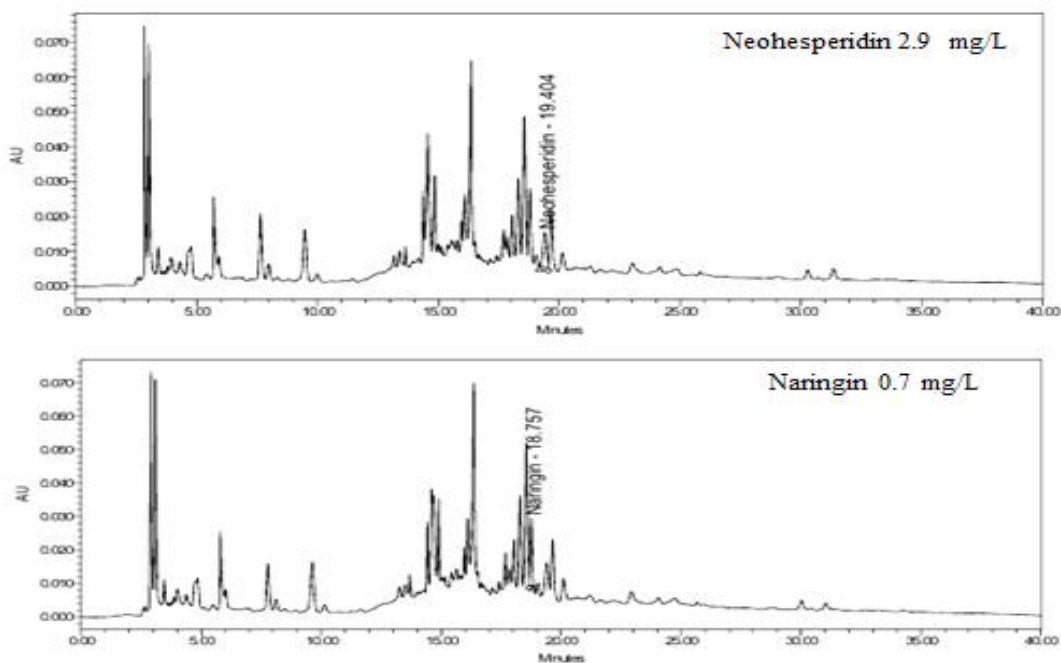


Figure 6. HPLC chromatogram of *Citrus limon* leaves SWE (Subextract water extract).

Table 6. Contents of Standards from *Citrus unshiu* and *Citrus limon* Leaves Extract by Various Extraction Methods (CUL: *Citrus unshiu* leaves, CLL: *Citrus limon* leaves, SW: Subcritical Water, HW: Hot water, W: Water)

*N.D : Not detected.

No.	Extraction method		Contents (mg/L)		
			Naringin	Naringenin	Neohesperidin
1	CUL SW	70 bar, 190 °C	32.9	6.7	8.2
2	CUL HW	100 °C, 2 h	N.D	N.D	N.D
3	CUL W	room temperature, 2 h	N.D	N.D	N.D
4	CLL SW	70 bar, 190 °C	0.7	N.D	2.9
5	CLL HW	100 °C, 2 h	N.D	N.D	N.D
6	CUL W	room temperature, 2 h	N.D	N.D	N.D

2. 생리 활성 평가

2.1. 항산화

2.1.1. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 표준물질 gallic acid의 표준 검정 곡선을 이용하여 감귤잎 및 레몬잎 추출물들의 1 L당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE: gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었고, 실험결과는 다음과 같다.

감귤잎 아임계수 추출물(CUL)과 레몬잎 아임계수 추출물(CLL)은 일반 추출물(열수, 저온 추출물)에 비해 월등히 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다. 동일한 농도에서 감귤잎 아임계수 추출물은 일반 추출물에 비해 2배 이상 차이가 나는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 7).

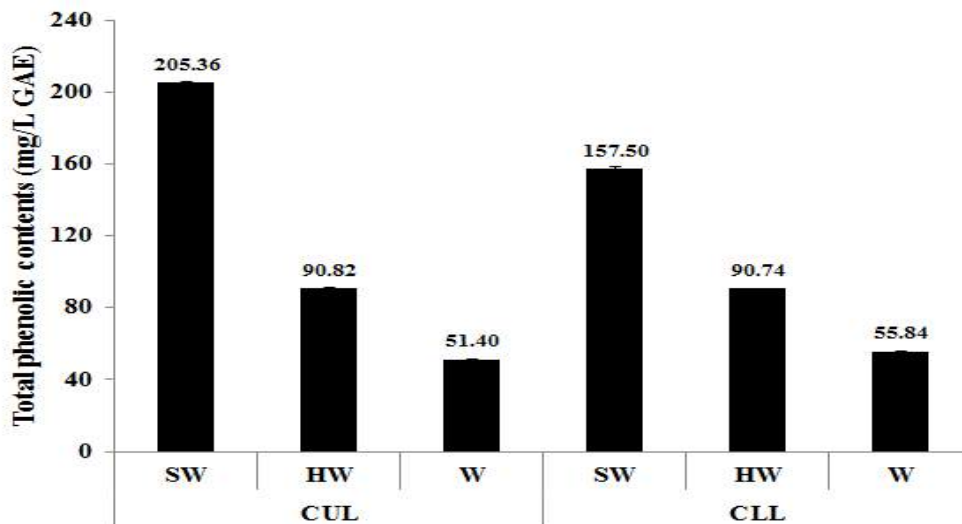


Figure 7. Total polyphenol contents of *Citrus unshiu* and *Citrus limon* leaves SWE and other extract method.(SW: Subcritical Water, HW: Hot water, W: Water)

2.1.2. DPPH radical 소거 활성 측정

감귤잎과 레몬잎 에센셜오일과 Table 1.에서와 같은 조건별로 추출한 아임계수 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 그 결과, 감귤잎과 레몬잎 아임계수 모두 압력조건 70 bar, 온도는 190 °C에서 가장 좋은 활성을 나타내었고, 동일 조건의 아임계수 추출물을 추가적으로 진행한 항산화 실험에 반영하였다 (Figure 8).

또한 시료별 아임계수 추출물과 열수추출물, 저온추출물을 같은 농도에서 비교한 결과, 아임계수 추출물의 DPPH radical 소거 활성이 가장 좋은 것으로 나타났다(Figure 9).

아임계수 추출물에 대하여 0.7 - 50 %의 농도로 실험을 실시하였고, 에센셜오일에 대하여 0.07 - 5 %의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀값을 계산하였다(Figure 10,11).

그 결과, 모든 추출물에서 농도의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 보였고, 각 추출물들의 SC₅₀값은 감귤잎 에센셜오일(1.16%), 레몬잎 에센셜오일(4.52%), 감귤잎 아임계수 추출물(4.45%), 레몬잎 아임계수 추출물 (4.87%)로 확인되었다 (Table 7).

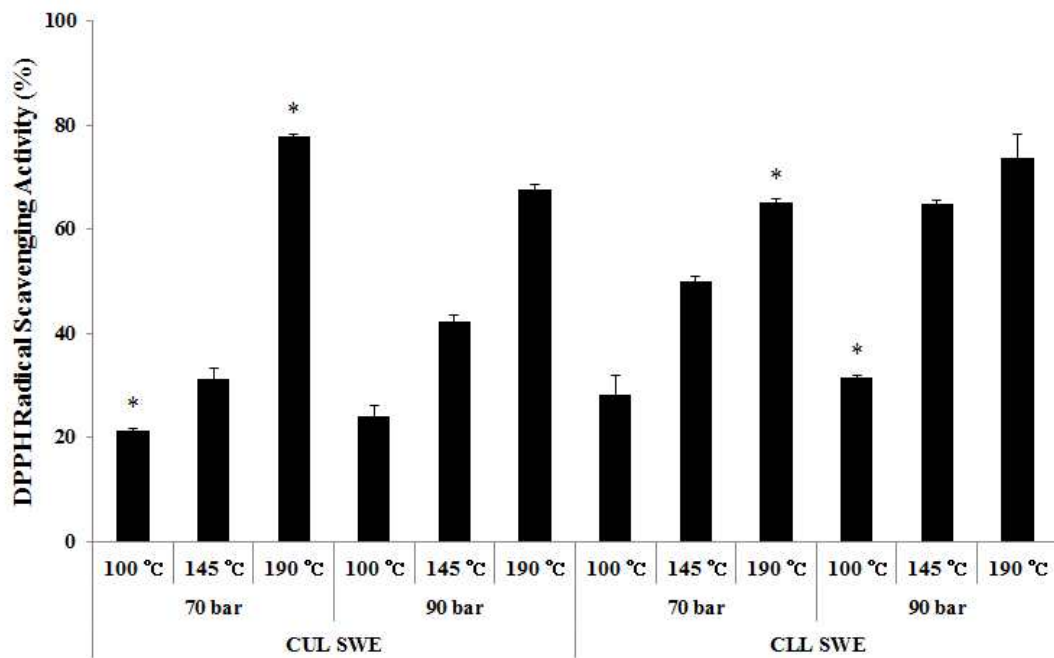


Figure 8. DPPH radical scavenging activities of *Citrus unshiu* leaves(CUL) and *Citrus limon* leaves(CLL) Subcritical Water Extract by various extraction methods (temperatures and pressures). The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p <0.05; ** p <0.01

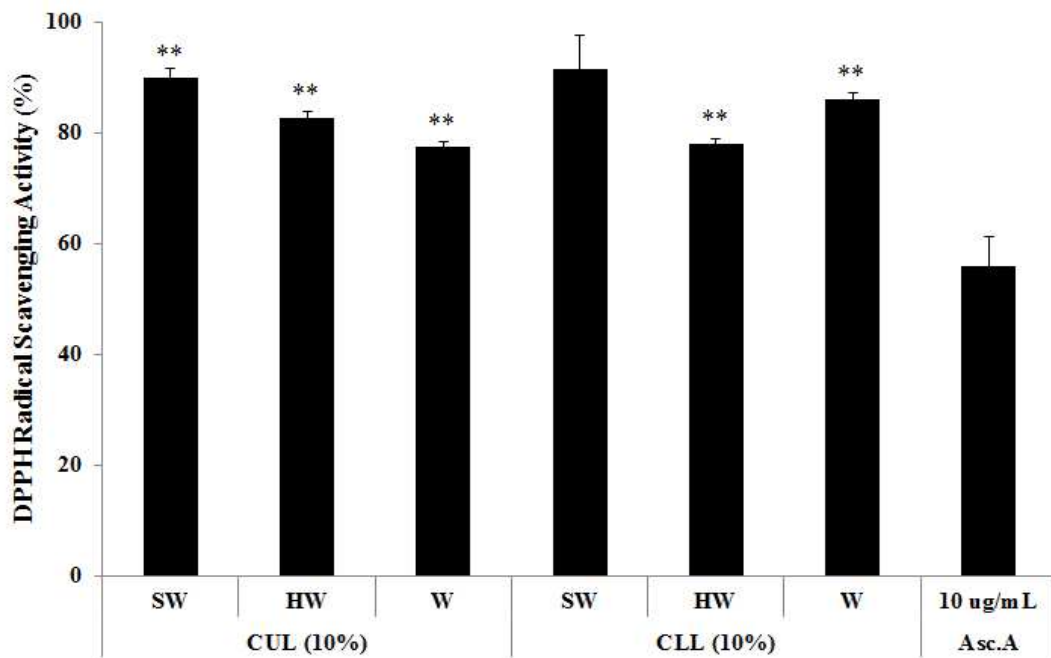


Figure 9. DPPH radical scavenging activities of various water extracting method(SW: Subcritical Water, HW: Hot water, W: Water) of *Citrus unshiu* leaves(CUL) and *Citrus limon* leaves(CLL). The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

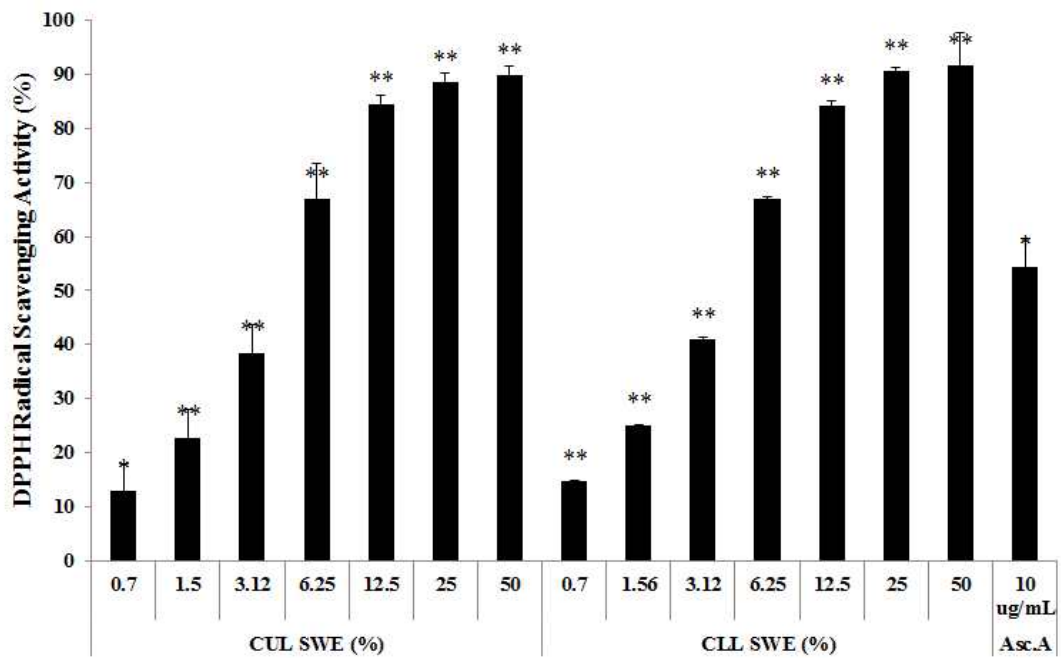


Figure 10. DPPH radical scavenging activities of various concentration of SWEs (Subcritical water extract) from *Citrus unshiu* leaves(CUL) and *Citrus limon* leaves(CLL). The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p <0.05; ** p <0.01

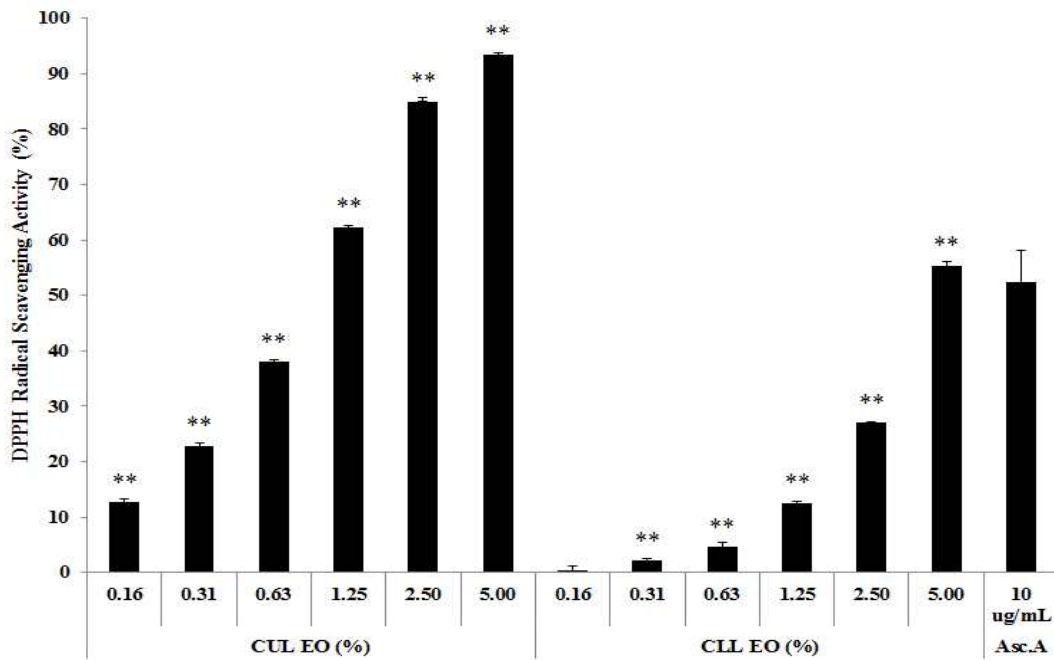


Figure 11. DPPH radical scavenging activities of various concentration of EOs (Essential oil) from *Citrus unshiu* leaves(CUL) and *Citrus limon* leaves(CLL).The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p <0.05; ** p <0.01

Table 7. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities of Subcritical water extracts and Essential oils from *Citrus unshiu* leaves and *Citrus limon* leaves

	<i>Citrus unshiu</i> leaves SWE	<i>Citrus limon</i> leave SWE	<i>Citrus unshiu</i> leaves E.O	<i>Citrus limon</i> leaves E.O
SC_{50} (%)	4.45	4.87	1.16	4.52

2.1.3. ABTS+ radical 소거 활성 측정

감귤잎과 레몬잎 에센셜오일과 아임계수 추출물에 대하여 ABTS+ radical 소거

활성을 측정하였다. 감귤잎 에센셜오일에 대하여 0.008 - 0.250 %, 레몬잎 에센셜오일에 대하여 0.08 - 2.50 %의 농도로 실험을 실시하였고, 각 아임계수 추출물에 대하여 0.08 - 2.50 %의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀값을 계산하였다 (Figure 12, 13).

그 결과, 모든 추출물에서 농도의존적으로 ABTS⁺ radical 소거 활성을 보였고, 각 추출물들의 SC₅₀값은 감귤잎 에센셜오일 (0.23%), 레몬잎 에센셜오일 (0.20%), 감귤잎 아임계수 추출물 (1.14%), 레몬잎 아임계수 추출물 (1.09%)로 확인되었다 (Table 8).

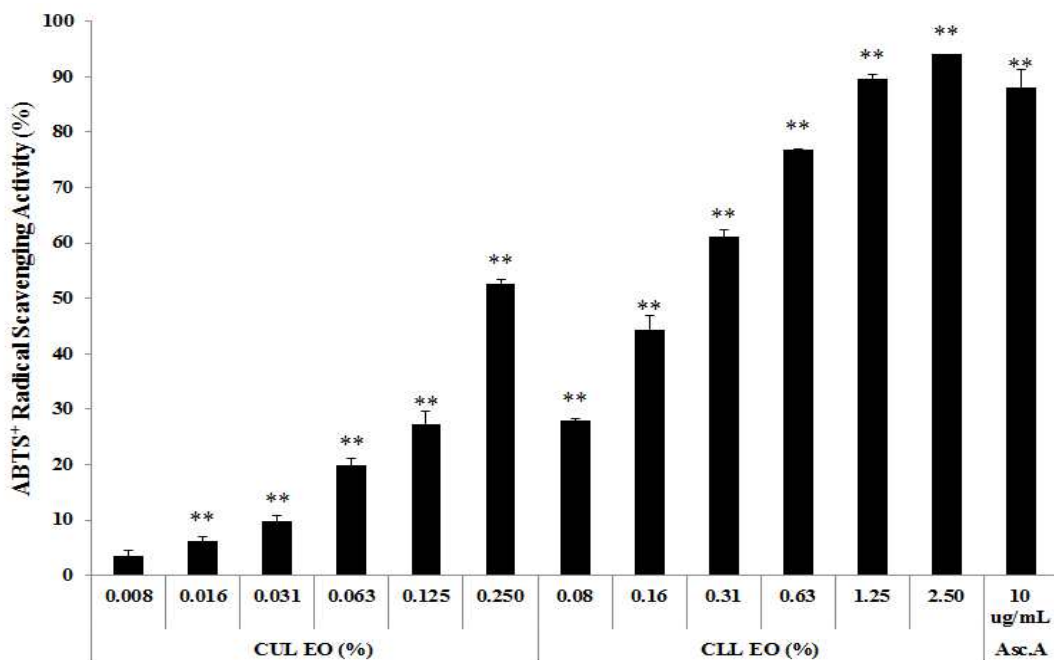


Figure 12. ABTS⁺ radical scavenging activities of various concentration of Essential oil from *Citrus unshiu* and *Citrus limon* leaves Essential oil. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p <0.05; ** p <0.01

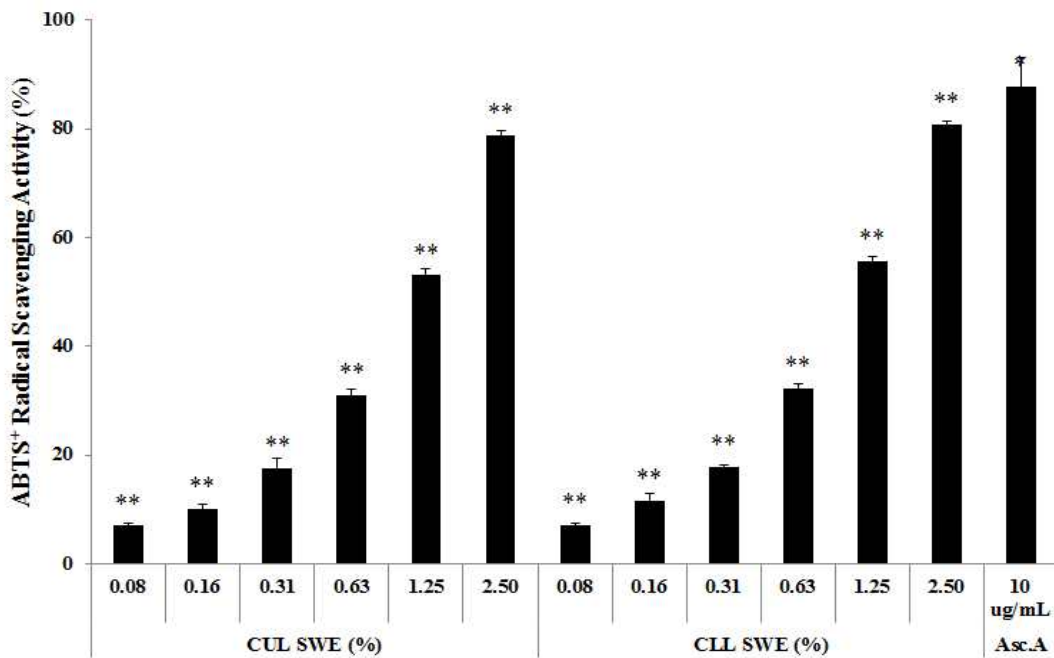


Figure 13. ABTS⁺ radical scavenging activities of various concentrations of *Citrus unshiu* leaves(CUL) and *Citrus limon* leaves(CLL) SWE. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p <0.05; ** p <0.01

Table 8. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of Subcritical water extracts and Essential oils from *Citrus unshiu* leaves and *Citrus limon* leaves

	<i>Citrus unshiu</i> leaves SWE	<i>Citrus limon</i> leave SWE	<i>Citrus unshiu</i> leaves E.O	<i>Citrus limon</i> leaves E.O
SC ₅₀ (%)	1.14	1.09	0.23	0.20

2.1.3. SOD (Superoxide Dismutase) 유사 활성 측정

감귤잎과 레몬잎 에센셜오일과 아임계수 추출물에 대한 Superoxide anion radical (O²⁻) 소거 능력을 확인하였다.

그 결과 모든 추출물에서 높은 활성을 보였다(Figure 14).

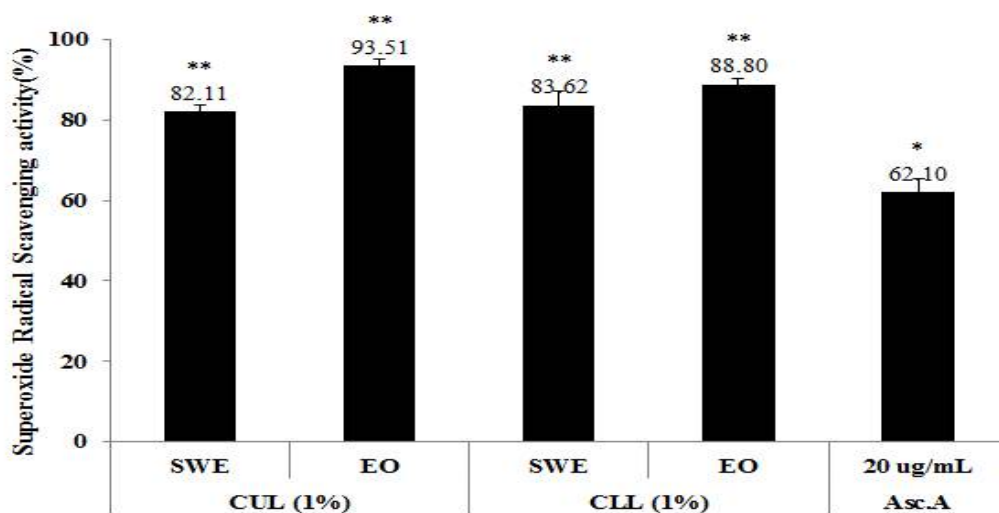


Figure 14. Superoxide anion radical scavenging activity of SWE(Subcritical Water Extract) and EO(Essential Oil) from *Citrus unshiu* and *Citurs limon* leaves. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p <0.05; ** p <0.01

2.3. 항염

2.3.1. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

감귤 및 레몬 잎 에센셜오일과 아임계수 추출물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포독성을 확인하였다. 세포 독성이 나타나지 않는 농도에서 실험을 진행하였다.

다양한 온도와 압력 조건에서 추출한 아임계수(Table 1)에 대한 실험 결과, 감귤잎 아임계수에서는 70 bar 190 °C에서 가장 우수한 결과를 가졌으며, 온도가 높아질수록 활성이 좋아지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 15).

또한, 활성이 가장 좋은 조건의 추출물에 대해 농도별 실험을 진행하였고 모든 아임계수 추출물과 에센셜오일에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 nitric oxide

생성을 억제시켰다(Figure 16, 18).

아임계수와 일반 추출물의 활성을 비교하기 위하여 동일한 농도에서 실험을 진행하였고, 그 결과 감귤잎, 레몬잎 아임계수 추출물이 열수추출물과 저온추출물에서보다 뛰어난 활성을 나타냈다(Figure 17).

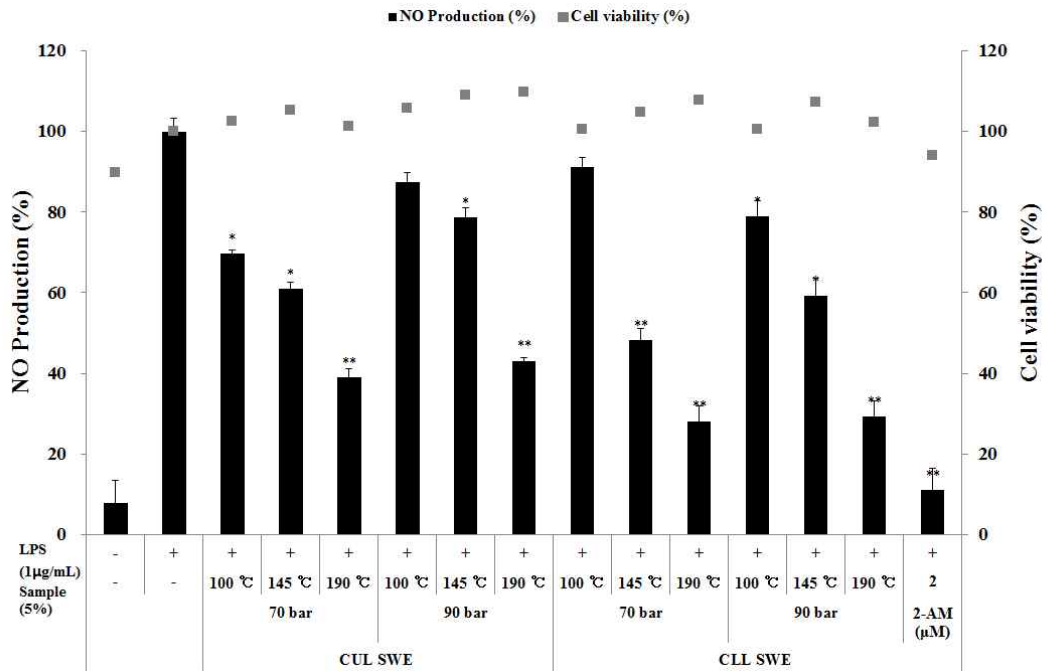


Figure 15. Effects of various process method SWEs from *Citrus unshiu*, *Citrus limon* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells with various extract method process. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus extracts from *Citrus unshiu*, *Citrus limon* leaves for 24 hours. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

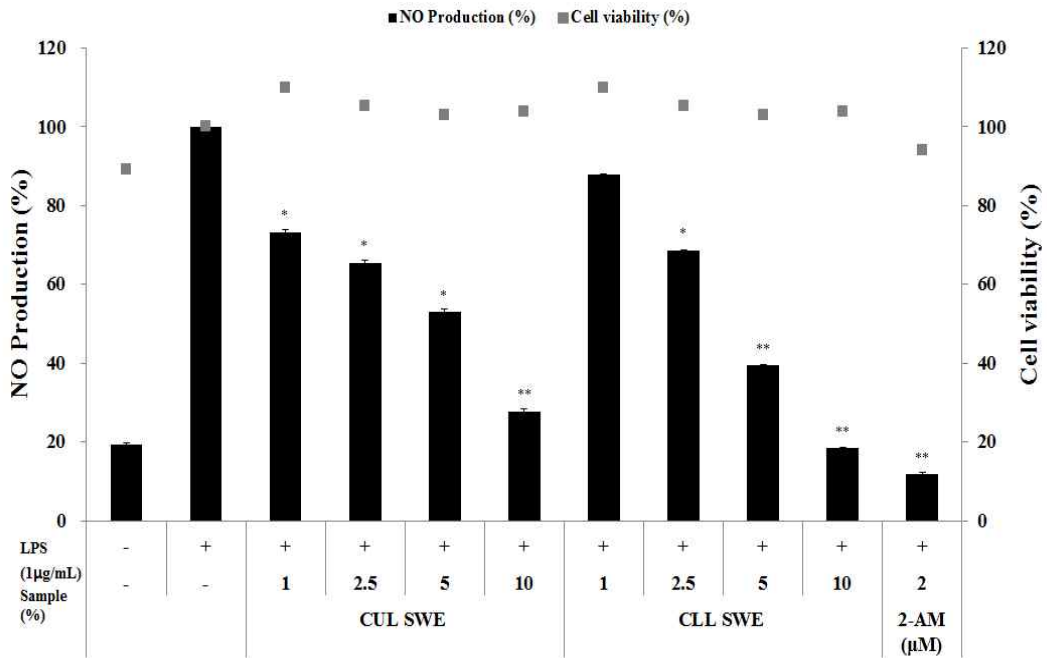


Figure 16. Effects of SWE (Subcritical water extract) from *Citrus unshiu* and *Citrus limon* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells with various concentration. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus extracts from *Citrus unshiu*, *Citrus limon* leaves for 24 hours. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

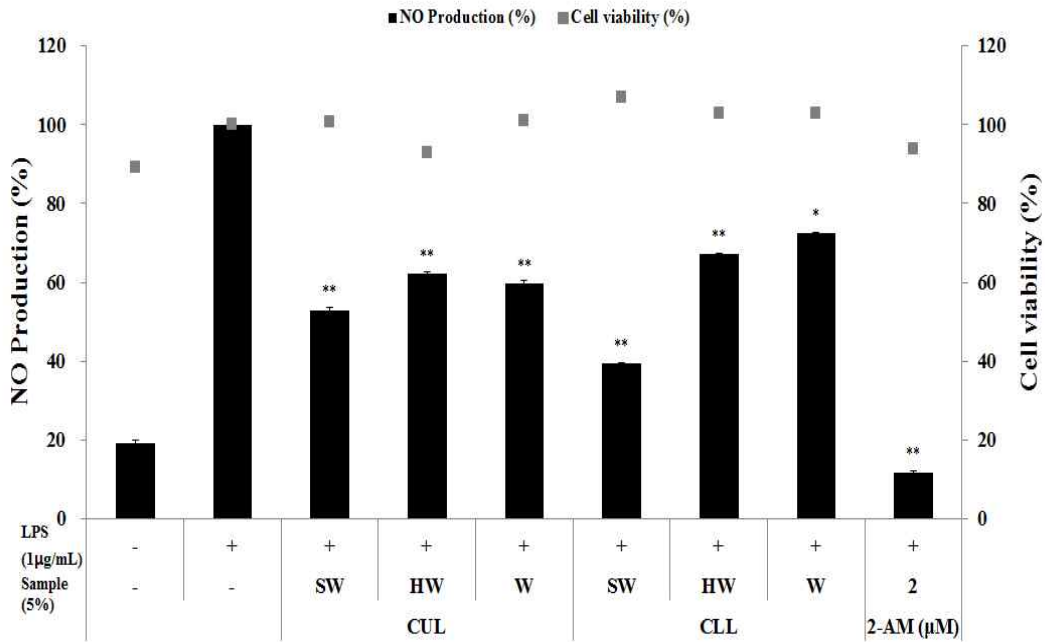


Figure 17. Effects of various method extracts(SW: Subcritical Water, HW: Hot water, W: Water) from *Citrus unshiu* and *Citrus limon* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells with various extract method process. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus extracts from *Citrus unshiu*, *Citrus limon* leaves for 24 hours. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

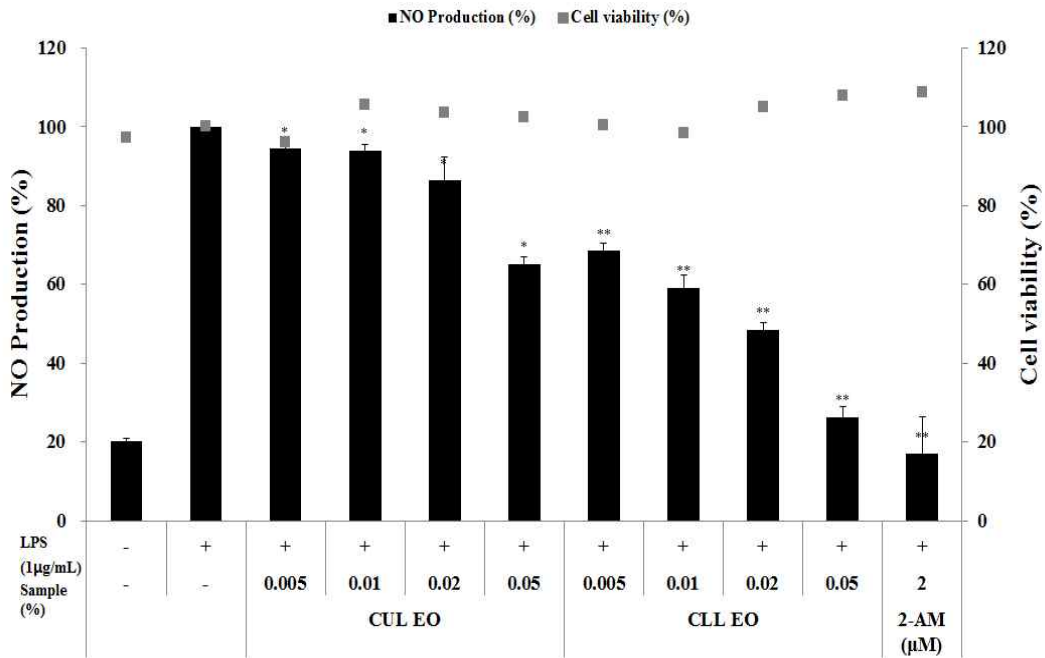


Figure 18. Effects of E.Os (Essential oils) from *Citrus unshiu* and *Citrus limon* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus extracts from *Citrus unshiu*, *Citrus limon* leaves and 2-amino-4-picoline (positive control, 2 µM) for 24 hours. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

2.2. 미백

2.2.1. 멜라닌 합성 저해 효과 측정

B16F10 melanoma cell을 이용하여 감귤잎, 레몬잎 아임계수 추출물의 멜라닌 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 실험을 재차 진행하여 결과를 확인하였다.

먼저, 감귤잎, 레몬잎 아임계수와 각각의 일반 추출물(열수, 저온 추출물)을 동일한 조건의 농도(10%)로 실험을 진행한 결과, 아임계수 추출물의 멜라닌 생성

억제 활성이 일반 추출물보다 우수함을 확인할 수 있었다(Figure 19).

감귤잎 및 레몬잎 아임계수에서 농도 의존적으로 melanin 생성을 억제하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 20).

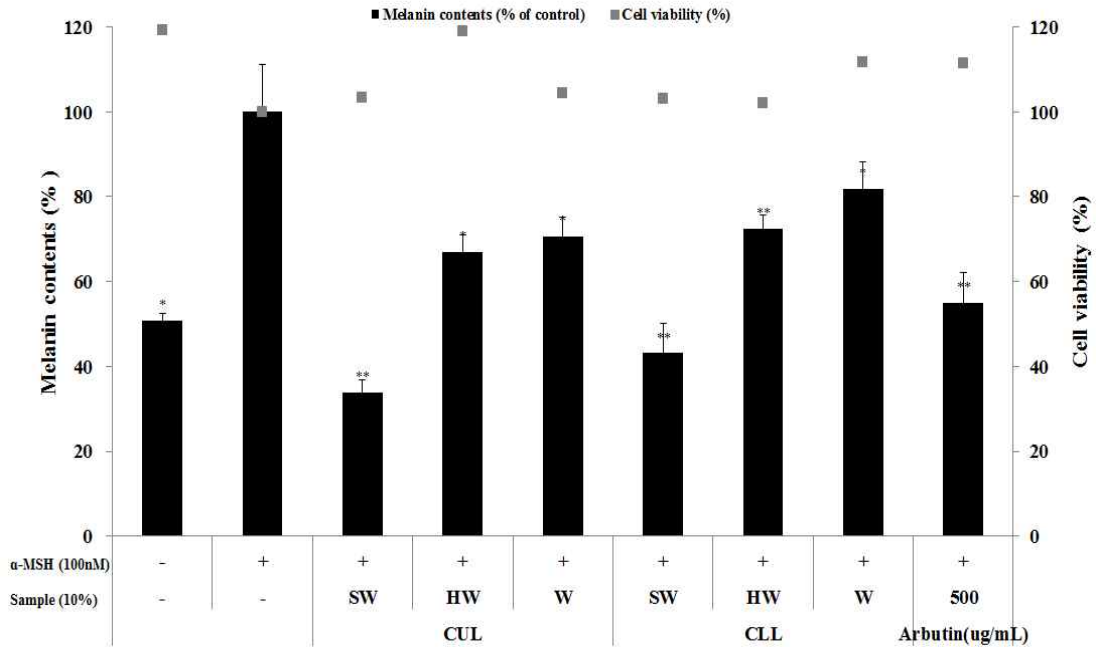


Figure 19. Melanin contents and cell viability of various extracts method from *Citrus unshiu* and *Citrus limon* leaves in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. (SWE: Subcritical water extract, HW: Hot water extract, W: Water extract) The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.* p <0.05; ** p <0.01

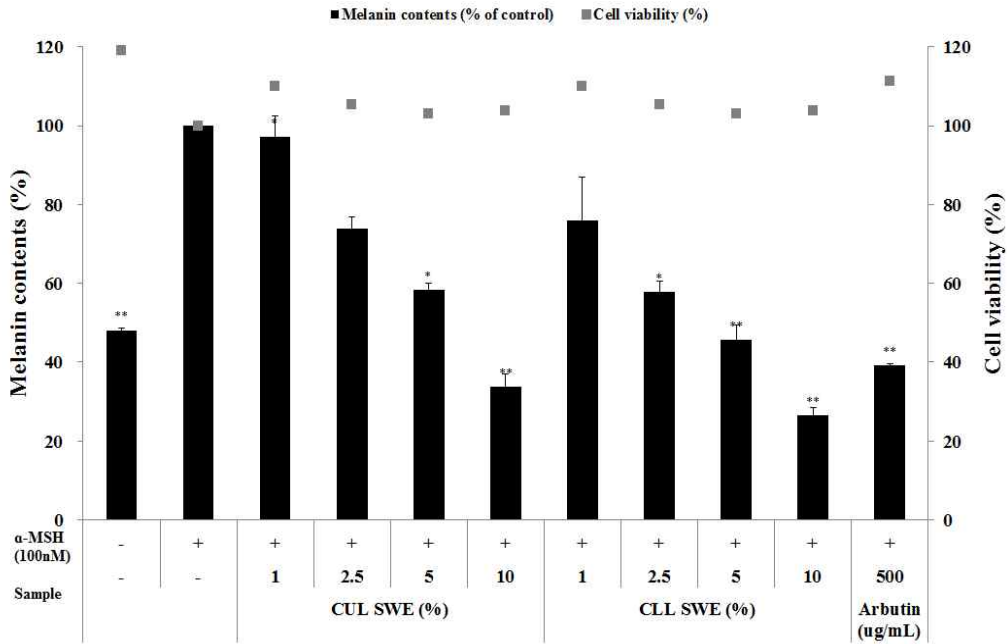


Figure 20. Melanin contents and cell viability of Subcritical water extracts from *Citrus unshiu* and *Citrus limon* leaves in α-MSH induced B16F10 melanoma cells. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

2.4. 항균 효능 분석

2.4.1. Paper disc diffusion method

감귤잎과 레몬잎 에센셜오일의 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *C.acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010)을 이용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다.

그 결과 아임계수 추출물 및 일반추출물(열수, 저온)에서는 항균 활성이 나타나지 않았으나, 감귤잎 에센셜오일, 레몬잎 에센셜오일에서는 모두 생육억제 활성을 나타내었다. 특히 항생제 내성균주인 CCARM 9009, 9010에 대해서도 생육억제 활성을 나타내었다(Table 9).

Table 9. Anti-bacterial activities of Extracts and Essential oils from *Citrus unshiu* and *Citrus limon* leaves

	Clear zone (mm)					
	<i>S.epidermidis</i>			<i>C. acnes</i>		
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010
<i>Citrus unshiu</i> leaves E.O	8.5	N.D	N.D	9.5	8.5	9.0
<i>Citrus limon</i> leaves E.O	9	N.D	N.D	9.0	8.5	9.5
Erythromycin	29	N.D	28	44	N.D	N.D

* Sample : 10%, 100 μ L

* Positive control : Erythromycin (1mg/mL, 100 μ L)

* Disc size : 8 mm

* N.D : Not Detected

IV. 요약 및 결론

본 연구는 제주산 감귤잎 및 레몬잎을 대상으로 에센셜오일과 아임계 추출방법을 시도하여 기존의 추출 방법과의 비교를 통해 기능적이고 효율적인 화장품 관련 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

현재까지의 연구결과는 주로 감귤계의 과피와 과육에 대한 연구가 주를 이루었으나, 가치치기 등으로 인해 버려질 수 있는 자원인 감귤잎과 레몬잎을 업사이클링을 통해 가치있는 자원으로써 이용 가능성을 연구하고자 하였다.

이를 확인하기 위해 본 연구는 제주에서 가장 많은 비율을 차지하는 온주밀감의 잎과 근래 제주에서 많은 사업화가 이루어지고 있는 레몬잎을 이용하여 항산화, 항염, 미백, 항균 활성을 검색하는 것으로 진행하였다.

제주산 감귤잎과 레몬잎을 이용하여 에센셜오일과 아임계수를 추출하였다.

추출한 에센셜오일과 아임계수를 각각 GC-MS (Gas chromatography-Mass selective detector, Agilent 7890A), HPLC (High performance liquid chromatography, Waters 2690/5)를 통하여 추출물의 성분을 분석하였고 그 결과, 감귤잎 에센셜오일에서는 39개의 성분이 유사도 90% 으로 확인되었고, 그 중 가장 높은 비율로 γ -terpinene, p-Cymene, β -Elemene 순으로 검출되었고, 레몬잎 에센셜오일에서는 Limonene, β -Pinene, α -Citral 외 21개의 성분이 검출되었다. 또한 감귤잎 아임계수에서는 감귤계에서 많이 발견되는 폴리페놀류인 neohesperidin, naringin, naringenin이 검출되었고, 레몬잎 아임계수에서는 neohesperidin 과 naringin이 검출되었다. 반면 일반추출물(열수, 저온 추출물)에서는 모두 발견되지 않았다.

추출한 추출물들의 항산화 활성을 확인하기 위하여 다양한 방법을 통해 실험을 진행하였다. DPPH 소거활성 실험 결과, 모든 추출물에서 높은 DPPH소거활성을 나타내었는데 SC₅₀값은 감귤잎 에센셜오일(1.16%), 레몬잎 에센셜오일(4.52%), 감귤잎 아임계수 추출물(4.45%), 레몬잎 아임계수 추출물(4.87%)로 확인

되었다. ABTS⁺ 소거 활성 실험 결과, 역시 모든 추출물에서 농도의존적으로 ABTS⁺ radical 소거 활성을 보였고, 각 추출물들의 SC₅₀값은 감귤잎 에센셜오일 (0.23%), 레몬잎 에센셜오일(0.20%), 감귤잎 아임계수 추출물(1.14%), 레몬잎 아임계수 추출물(1.09%)로 확인되었다. 이는 열수추출물과 일반 추출물에 비해 우수한 활성을 나타낸 것으로 확인되었다.

또한 마우스 대식세포인 RAW264.7 cell을 이용한 항염 실험 결과에서 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 실험을 진행하였다. 감귤잎과 레몬잎 아임계수 추출물의 최적의 조건을 확립하기 위해 다양한 조건으로 추출을 진행하였고, 아임계수 추출물과 일반 추출물(열수, 저온 추출)과 비교 실험을 진행한 결과, 감귤잎 및 레몬잎 아임계수 모두 일반 추출물보다 뛰어난 결과를 얻었으며, 각 아임계수 및 에센셜오일 에 대해 농도 의존적으로 NO 억제 활성을 확인할 수 있었다.

미백 활성을 확인하기 위해 B16F10 melanoma cell을 이용한 멜라닌 저해 활성 실험에서는 각 아임계수 추출물에서 농도의존적으로 활성을 저해함을 확인하였다.

감귤잎과 레몬잎 에센셜오일과 아임계수 추출물의 항균 활성을 확인하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710) 및 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010)을 이용하여 paper diffusion method을 통한 생육저지환을 측정하였다. 그 결과, 감귤잎과 레몬잎 에센셜오일에서는 S.epidermidis (CCARM 3709) 및 C.acnes (CCARM 0081, 9010)에 대한 항균 활성이 있음을 확인하였다.

이 같은 결과를 바탕으로 제주산 감귤잎 및 레몬잎을 이용한 에센셜오일과 아임계 추출물들은 항산화, 항염, 미백, 항균 효과 등 다양한 효능을 보유한 천연 유래 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었고, 이를 통해 버려지는 자원을 업사이클링 소재로 활용하여 다양한 기능성 소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

- [1] 홍상표, 지속가능성과 환경평가의 연계에 관한 연구, **2011**, *20(3)*, 269-279
- [2] Singh, J.; Sung, K.; Cooper, T.; West, K., & Mont, O. Challenges and opportunities for scaling up upcycling businesses - The case of textile and wood upcycling businesses in the UK. *Resources, Conservation and Recycling*, **2019**, *150*, 104439.
- [3] Baik, S. O., et al. "Analysis and quantitative distribution of glycosided flavonoids in citruses and Korean Chung-pi." *Analytical Science and Technology*, **2001**, *14.4*, 340-348.
- [4] 최찬익, 추출방법에 따른 감귤 과피 유래 Flavonoid의 추출효율 및 항산화 효과에 대한 비교. *산업식품공학* **2010**, *12(2)*, 166-172.
- [5] 박수남, 활성산소와 광노화 그리고 천연물. *대한화장품학회지* **2003**, *29(1)*, 75-77.
- [6] 김소희, 생달나무 잎 추출물의 항산화, 항염 및 항균 활성 성분 연구, 제주대학교 **2020**, 석사학위논문.
- [7] You, S. H.; Moon, J. S. A study on anti-oxidative, anti-inflammatory, and melanin inhibitory effects of Chrysanthemum Sibiricum extract. *J. of Korean Oil Chemists' Soc.* **2016**, *33(4)*, 762-770.
- [8] 염현숙, 물사과 가지, 풍란 켈러스 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구, 제주대학교 **2018**, 석사학위논문.
- [9] 김상숙, 새덕이나마 추출물의 활성성분 및 제주자생식물 에센셜오일의 항균, 항염 활성 규명, 제주대학교 **2011**, 박사학위논문.
- [10] 김나연, 미백화장품 연구동향. *보건산업기술동향* **2003**, 45-50.
- [11] 김은화, 천연 추출물을 이 한 미백화장품 개발 동향에 관한 연구. *대한피부미용학회지* **2006**, *4(2)*, 195.
- [12] 김미애, 보리밥나무 및 생달나무 가지의 항산화, 항염, 항균 활성 성분 연구, 제주대학교 **2022**, 석사학위논문.

- [13] Lee, S. Y.; Kim, B. A.; Shin, D. C.; Park, K. S.; Yang, J. C. A Study of Antimicrobial Effect of *Zostera marina* Extracts. **2016**, 33(2), 225-231.
- [14] Kim, N. R.; Lee, S. W.; Kim, M. R. Study on Antibacterial Activity of Propolis on Propionibacterium acnes as an Acne-Induced Bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **2020**, 49(6), 586-591.
- [15] Kim, S. S.; Hyun, J. M.; Kim, K. S.; Park, K. J.; Park, S. M.; Choi, Y. H. Influence of Essential Oil in 'Shiranuhi' Immature Fruit on Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **2013**, 21(6), 493-497.
- [16] H.S. Na, Characteristics of marine algae extracts using subcritical water extract method, *Korean J Food Preserv*, **2014**, 21(1), 62-68.
- [17] Cheigh, C. I., Comparison on the extract efficiency and antioxidant activity of flavonoid from Citrus peel by different extraction methods. *Food Engineering Progress* **2010**, 14(2), 166-172.
- [18] L. Ramos, E.M. Kristenson and U.A.Th. Brinkman, Current Use of Pressurised Liquid Extraction and Subcritical Water Extraction in Environmental Analysis. **2002**, *J. Chromatogr.* 975: 3-29.
- [19] Shoji Watanabe, 향료화학입문, 신일북스, **2006**, 17-51.
- [20] Bhargava, Kanika, et al. "Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce." *Food microbiology*, **2015**, 47, 69-73.
- [21] 양혜주, 향의 길라잡이, 남양문화, **2008**, 119-120.
- [22] Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Quantization of flavonoid constituents in citrus fruits. *J. Agri. Food Chem*, **1999**, 47, 3656-3571.
- [23] Folin, O.; Denis, W. "A colorimetric method for determination of phenols(phenol derivatives) in urine" *J. Biol. Chem.*, **1915**, 22, 305-308.
- [24] Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200.

- [25] Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A. Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radical Biology and Medicine*, **1999**, *26*, 1231-1237.
- [26] T. Y. Kim., et al. "Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of Jubak extracts" *The Korean Journal of Food And Nutrition* , **2010**, *23.3*; 299-305.
- [27] Burt, S., Essential Oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbial*, **2004**, *94*, 223-253.
- [28] Kordali, Saban, et al. "Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene." *Bioresource Technology*, **2008**, *99.18*: 8788-8795.
- [29] 이남호, 천연물화학, 신일서적, **2021**, 134.