

제주 감귤피에서 추출한 *d*-limonene 오일의 항균 효과에 대한 연구

임호섭* · 윤철훈 · 오은하†

*고려대학교 부설 보건과학연구소

†노동부 산업안전보건국 안전보건정책과

대진대학교 화학공학과

(2009년 7월 5일 접수 ; 2009년 9월 22일 채택)

A study on the antibiotic effect using the *d*-limonene oil extracted to wasted mandarin peels in Cheju

Ho-sub Im* · Cheol-Hun Yoon · Eun-ha Oh†

* *Research Institute of Health Sciences, Korea University, Jeongneung-Dong, Sungbuk-Ku, Seoul, Korea 136-703, Korea*

† *Ministry of Labor Occupational Safety and Health Bureau Safety and Health Policy Division, Ministry of Labor, Gwacheon, 427-718, Korea*

*Department. of chemical Engineering, University of DeaJin, Pocheon, 487-711, Korea
(Received July 5, 2009 ; Accepted September 22, 2009)*

Abstract : The objection of this research is to conform of practicable possibility and recycling of producing junk after citrus fruits is processed. In the middle of practicable possibility, with verification of antibiosis that tactiling sensibility in a microorganism. With extracting *d*-limonene oil that have 70~90% a component of oil out of junk citrus peel, making certain the about 12000ppm(1.2%) concentration of it. By means of antibiosis property over the a pathogenic bacterium as well as a residence bacterium, considering the limit of application against daily living supplies needs to antibiosis. Antibiosis effect of a stationing bacterium in the body permanently and by means of antibiosis verification of special bacteria *Propionibacterium. Acnes* that causative skin trouble is selected, in based the antibiotic sencitivity test check up result of minimal inhibitory concentration(MIC).

Keywords : *d*-limonene oil, Antibiosis effect, minimal inhibitory concentration, *Propionibacterium acnes*

†주저자 (e-mail : waoeh@hanmail.net)

1. 서론

2007년도 국내산 감귤의 연간 생산량은 약 810,000톤이며, 외국의 경우 2005년 브라질과 미국을 포함한 주요 20개국의 감귤류 생산량은 122,822,000톤이나 되며, 이들 중 85%가 주스로 가공되는데, 가공 중 엄청난 양의 과피 등이 부산물로 나오고 있다[1-3]. 감귤피의 처리에 있어 이미 오래 전부터 알려진 대로, 건조시킬 경우 그 자체로도 진피라는 한약재로 쓰일 뿐 만 아니라 별도의 전처리 없이도 사료로서 대단히 유용하게 활용될 수 있는 것으로 연구되어 있다. 실제로도 사료로 많이 이용되고 있으며, 퇴비화 기술도 이미 개발되어 활용되고 있다.[4,5] 또한 감귤피에는 정유성분과 여러 가지 카로티노이드, 플라보노이드 및 각종 비타민 등이 다량 함유되어진 것이 특징이며, 이들의 생리기능 활성에 대한 평가연구도 활발히 진행되고 있다. 특히 정유성분의 70~90%를 차지하는 리모넨(*d*-limonene)은 중추신경의 흥분을 진정시켜주며 항암작용이 있는 것으로 알려져 있는데, 상쾌한 향과 인체에 대한 무독성 때문에 향수, 방향제, 비누 등의 화장품과 식품산업 등에 널리 사용되고 있다.[6,7]

우리나라의 귤 재배지는 연평균기온이 높고 가장 남쪽에 있는 제주도가 과거부터 재배의 중심지가 되어 왔고 재배역사도 오래되었다. 보통 제주감귤이라고 하면 온주 밀감을 말한다. 이는 우리나라의 귤 재배지역이 세계적으로 가장 북쪽에 위치하고 있어서 내한성이 강한 온주 밀감이 주종을 이루고 있기 때문이다[8]. 과피의 바깥쪽에 있는 후라베도(flavedo, 과피색소층)에 산재되어 있는 무수한 유포 중에는 약 1%의 정유가 포함되어 있는데, 그 대부분은 리모넨이고 그밖에 알데히드, 알코올, 에스테르, 케톤, 유기산 등의 방향물질과 이들을 용해하여 주고 있는 테르펜류(terpene)와 왁스를 함유하고 있다. 또한 후라베도 층을 형성하고 있는 세포 중에는 색소체가 발달하여 과실이 익기 전에는 엽록소와 카로티노이드 색소가 같이 있지만 성숙되면서 엽록소가 파괴되고, 차츰 소실되어 황색의 고유한 색깔을 띠게 된다[9,10].

이러한 상황에도 불구하고 문제가 되는 것은 감귤박이 년 중 일정한 양이 꾸준히 발생하는 것이 아니라 약 2개월이라는 짧은 기간 동안 집중적으로 발생되기 때문에 저장 문제가 해결

되지 않아 지역적 현안 문제로 대두되고 있으며, 집중 발생 시에는 처분이 어려워 상당량을 해양투기 하고 있는 실정이다. 최근 들어 사회적으로 환경 문제에 대한 위기의식이 확산되고 있고 이와 더불어 생활수준의 질적 향상에 따라 무공해 연료와 쾌적한 환경에 대한 인식이 점차 높아지고 있으며 국지적인 환경오염 문제가 심각하게 대두되고 있는 실정이다. 따라서 발생된 오염 물질을 단순히 처리하는 방법이 아니라 에너지와 자원의 소비를 줄이면서 오염물질의 발생을 원천적으로 없애거나 최소화하는 방법으로 환경 문제를 해결해야 하는 인식 전환이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 해양투기 등으로 인해 환경적 문제를 일으키는 감귤피를 활용하여 추출한 정유성분인 리모넨을 이용하여 미생물에 대한 감수성을 나타내는 항균제로서의 이용 가능성을 연구하여 보았다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

본 연구에 사용된 감귤박은 가공공정으로부터 얻어진 감귤의 껍질을 이용하였는데, 건조시키지 않고 유수분이 있는 상태로 이용하였다. 보관은 냉장보관으로 약 4℃로 유지시켜 보관하였으며, 최대한 오염이 되지 않은 상태를 유지하여 과육으로부터 분리하여 3일을 넘기지 않고 실험에 이용하였다. 상주세균의 배양을 위해서 일반 인큐베이터(Line Bio-D021)를 이용하였고, 특정질병 세균인 여드름 유발세균의 생육조건을 맞추기 위해 CO₂ 인큐베이터(Line Bio-D035)에서 배양을 하였다. 목적하지 않는 세균의 제거를 위해 감압멸균기를 사용하였는데, 사용된 배지로는 nutrient agar, GAM broth(Nissui사 lot 05422) 배지가 감별성 및 특수성에 적절하였다. 혐기성 배양위한 초자기구로 상단에 알루미늄과 고무패킹으로 혐기조건을 이루도록 설계하였고, BBL Gaspak Pouch(Nissui사 2060651)를 사용하여 보다 적절한 혐기적인 조건을 만들었다. 실험을 진행하는 실험실 내부에 상주하는 세균 및 함께 실험하는 실험실 연구원의 신체에 상주하는 비병원성 및 병원성으로 추정되는 세균을 손, 구강, 얼굴 피부표면에서 채취하여 37℃에서 48시간

동안 영양 배지에서 배양 후 재차 각각의 균을 생성된 집락 차이에 따라 순수 배양하여 이용하였다. 여드름균인 *Propionibacterium acnes*(KCTC 5012)는 한국 생명공학 연구원 유전자은행에서 동결 건조된 상태로 분양받아서 활성화시킨 후 3번의 계대배양을 거친 후 이용하였다.

2.2. *d*-limonene oil 추출

Soxhlet 추출법 중 일반적인 에테르 추출법을 이용하여 감귤박으로부터 오일을 추출하였다. 또한 추출한 정유 성분을 헥산(*n*-hexane)과 아세톤을 1:1로 섞은 용매를 이용하여 HP5973 Mass Detector를 장착한 HP6890 Series gas chromatograph로 분석하였다. GC(HP6890)조건은 50℃에서 1분간 머무른 후 분당 5℃씩 온도를 올려주었으며, 150℃에서 2분간 체류시간을 주었다. 과육으로부터 분리시킨 감귤피를 이용하여 자체 제작한 압착기를 이용하여 압착추출을 시행하였으며, 자체 제작한 압착기의 재질은 강철 스테인레스로 상단부의 완전 개폐가 가능하며 하단부 끝에서 약 5mm 위로 4곳의 배출구를 만들어 유연한 파이프를 이용하여 1차 추출물을 얻는다. 1차 추출물 획득 시 미세철망으로 감귤피를 싸서 압착과 동시에 여과를 도모할 수 있게 하였다. 1차적으로 걸러진 감귤피는 감압여과를 이용하여 유수분과 미량의 미세 고형성분의 상태로 얻었다. 이 상태를 약 24시간 냉장 방치하면 미세 고형성분이 침전되고 감압여과 시 혼합된 증류수 층 위에 얇은 오일 층이 발생한다. 이 오일 층인 정유 성분을 리모넨 오일로 간주하여 GC-MS(HP6890)로 분석한 결과 라이브러리의 데이터와 일치함을 확인하여 리모넨 오일을 추출하였다.

2.3. 상주세균에 대한 항균성

실험을 위해 참가한 참가인원 10명(일상생활 패턴 그대로 유지)에서 얼굴피부 및 구강에서 멸균 면봉으로 세균 샘플을 채취하고 5개의 그룹으로 나누어 영양배지에서 37℃, 48시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다.

각각의 그룹에서 자란 세균들을 순수 배양하기 위해서 생화학적 성장 및 육안으로 뚜렷하게 구별되는 세균 집락을 멸균시킨 루프를 선별하여 영양 배지에 도말 배양 한 후 리모넨 오일을 도말한 배지에 약 50 μ l를 도포한 후 약

48시간가량 인큐베이터에서 배양하였다.

2.4. 여드름균(*propionibacterium acnes*)에 대한 항균성

동결건조 상태의 *P. acnes*(KCTC 5012)를 혐기성 세균 배양에 적합한 GAM broth를 이용하였고 실험방법의 신뢰도와 일관성을 위해 Kirby-Bauer disk 확산법을 기준해서 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standard)에 의해 표준화된 방법으로 실험을 하였다.

배지의 혐기성 조건을 만족시키기 위해 상층부를 고무패킹으로 덮은 후 알루미늄으로 가장자리를 밀봉한 자체제작 시험관을 이용하였다. 멸균 증류수 약 5ml에 동결된 분말을 적절하게 잘 풀어준 후 멸균 실린지를 이용하여 고무패킹 사이를 관통시켜 20ml GAM broth배지에 약 2ml 정도 분주하여 부드럽게 혼합 후 활성화시켰다.

실험이 진행되는 동안 혐기성 상태를 만들어 주는 무균작업대[*clean bench*(BioFree-3203)]에서 실시하였으며, 모든 실험 기기 및 균과 접촉이 있거나 있을 것으로 예상되는 것들은 고압증기멸균기(대흥과학 DAC-40)로 멸균 처리하여 실험을 진행하였다. 약 48시간 동안 CO₂ 인큐베이터에서 자체 제작한 혐기성 시험관을 BBL Gaspak Pouch안에 넣은 상태로 배양하였다. 배양후 충분한 활성을 주기 위해 3번의 계대 배양을 동일한 조건으로 하여 최종적으로 얻어진 균을 가지고 실험하였다.

혐기성균은 통상적으로 항균성 실험시 디스크 확산법 사용을 하지 않는 것으로 알려져 있으나, 최근 참고 문헌 자료[11-15]에 나타난 것과 같이, *P. acnes*의 항균 실험으로 디스크 확산법 이용 사례가 있어 디스크 확산법과 액체 배지 희석법을 함께 이용하였다. GAM broth는 액체 배지이므로 디스크 확산법 이용을 위해 Agar를 첨가하여 이용하였다.

2.5. 항균실험에 이용한 배지의 조성

GAM broth 5.9g에 Agar 1.5g을 첨가한 후 멸균한 증류수 100ml에 완전히 녹인 후 다시 멸균하였다. 멸균 후 약 45℃로 유지시켜 petri dish에 약 1/3정도 잠기게 분주하였고, 배지가 적당히 식고 잔여 수증기가 사라지면 GAM broth에서 배양한 균주를 멸균 생리수에 희석

하여 멸균 면봉을 사용하여 배지 표면에 끌고 루 접종하였다.

이때 면봉에 수분이 너무 많으면 균 접종시 영향을 미칠 수 있으므로 시험관 내부에서 면봉을 잘 돌려서 필요이상의 수분을 제거해 주었다. 균을 접종한 후 배지표면을 적당히 자연 건조 시켰다. 멸균 디스크에 추출한 리모넨 오일을 50 μ l, 20 μ l, 10 μ l 흡수 시키고 배지 표면에 올려놓은 후 혐기적인 조건에서 37 $^{\circ}$ C, 48시간 에서 배양하고 생육억제대법(inhibition zone)으로 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. d-limonene oil 추출

추출한 유성 성분을 정제하여 GC-MS로 분석한 결과 Fig. 1에서 보여주는 것과 같이 GC-MS 분석기 라이브러리의 데이터와 비교했을 때 추출한 유성 성분이 리모넨 오일임을 확인 할 수 있었다. Fig. 1은 Soxhlet 추출법으로 추출한 오일성분을 GC-MS로 정성 분석한 것으로 감귤박에 리모넨 오일이 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 추출한 오일성분의 무게를 측정된 결과 약 1.5 w/v%의 정유성분이 추출되었음을 확인 할 수 있었다.

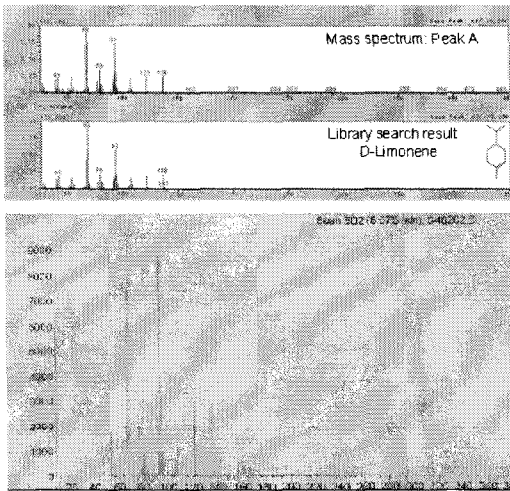


Fig. 1. Qualitative analysis of d-limonene.

분을 GC로 정량 분석한 것으로 용매로 2500배 희석한 리모넨의 농도가 4.842ppm를 나타내었다. 이로서 감귤박 중 리모넨 오일의 순수 농도를 약 12000ppm, 즉 매우 고농도로 리모넨 오일이 감귤박에 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다.

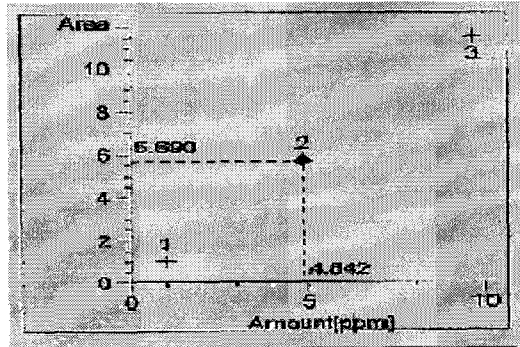


Fig. 2. Quantitative analysis of d-limonene on mandarin peels.

3.2. 상주세균에 대한 항균성

Fig. 3은 얼굴표면에 있는 상주세균에 대한 항균성을 보여주는 것으로 좌측배지가 대조군이고, 우측이 실험군으로 노란색의 색소를 띠는 세균의 발육이 저하되었음을 확인 할 수 있었다. 색소를 보아서는 여드름 유발균으로 추측되는 황색포도상구균으로 예상된다[12].

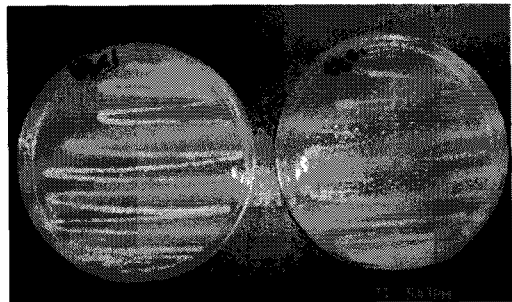


Fig. 3. Residence bacteria at face skin.

Fig. 2는 Soxhlet 추출법으로 추출한 오일성

Fig. 4는 구강 내에 상주하는 세균을 순수배양한 후 항균효과를 보여주는 그림으로 구강내부에 있는 상주세균은 대해서는 보다 탁월한 효과를 보여주는 것을 확인할 수 있었는데, 얼굴부위 상주세균들에 비해서 탁월한 세균성장

억제효과를 나타내었다. 추후 구강청정제나 치약 등의 구강 제품의 응용을 전망할 수 있다.

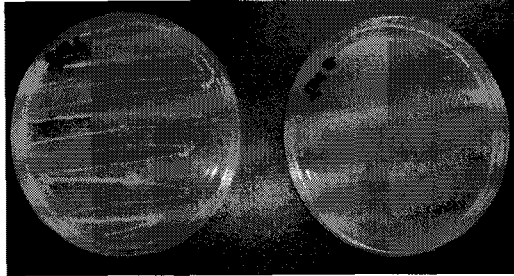
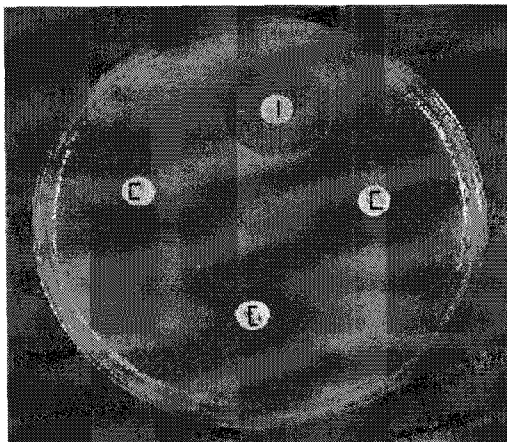


Fig. 4. Residence bacteria in the oral.

3.3. 여드름균(*propionibacterium acnes*)에 대한 항균성

특정 병원성 세균인 여드름 유발균에 대한 디스크 확산법에 의한 항균성을 확인하였다.

최저발육억제농도(MIC : minimal inhibitory concentration)와 상관관계를 유지하고 있는 Fig. 5의 측정결과는 약 10 μ l를 흡수시킨 디스크 페이퍼 주변의 최소형성억제대(MIC)는 약 4mm정도 측정 되었다.

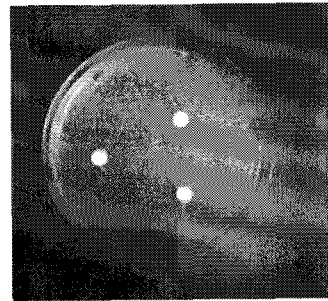


1 : Test - *d*-limonene oil of 10 μ l
C : control - No treatment

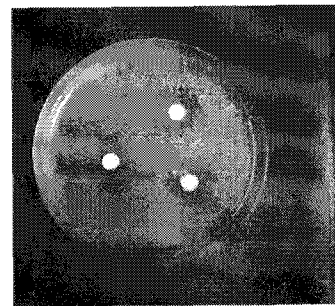
Fig. 5. Test result of 10 μ l Disk Diffusion.

Fig. 6은 리모넨 오일의 농도를 달리하여 디스크 확산법의 실험결과를 보여주는 것으로 20 μ l의 리모넨 오일을 흡수시킨 디스크 주변의 MIC는 6.0mm로 측정되었으며, 50 μ l의 리모넨

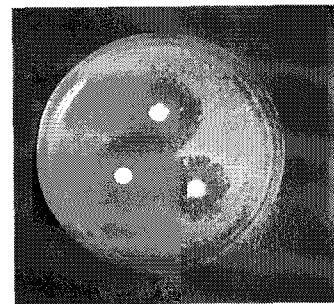
오일을 흡수시킨 디스크 주변 MIC는 13.0mm로 측정되어 농도가 높을수록 그 항균효과가 커진다는 것을 보여주었다[16].



(a) No treatment



(b) 20 μ l *d*-limonene



(c) 50 μ l *d*-limonene

Fig. 6. Disk Diffusion test result of *Propionibacterium acnes*.

액체배지 희석법으로 MIC를 측정한 결과 Fig. 7에서와 같이 128 μ g/ml로 확인되었고 소량의 농도로도 균이 억제되었는데 이것은 리모넨 오일이 효과적이란 것을 나타내 주고 있다.

액체배지 희석법에서 대조군의 조건은 선택배지로 GAM broth 3ml에 Tween 80 0.5%와 DMSO 100 μ l 및 여드름균이 들어있으며, 리모넨이 유성인 점을 감안하여 증류수에 희석이 잘 이루어지도록 Tween 80을 첨가하였으며, 세균이 잘 분산될 수 있는 조건으로 DMSO를 첨가한 buffer제를 이용하였다. 균의 농도는 McFarland No. 0.5로 표준탁도관 기준 1.5 x 10⁶/ml로 하였다. 최종실험 결과 리모넨 오일의 MIC는 128 μ g/ml로 측정되었다.

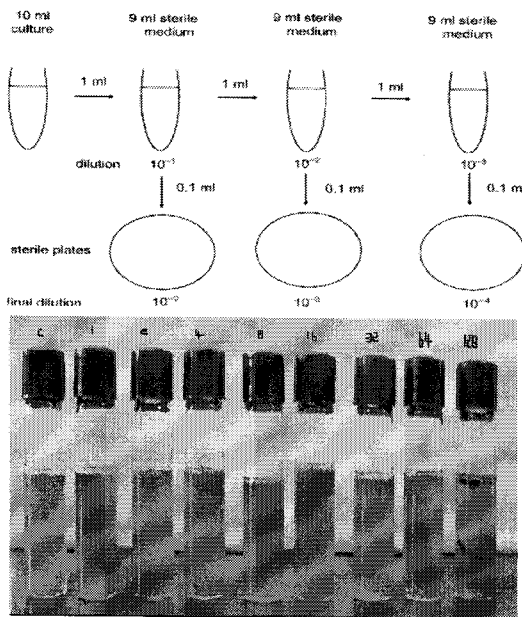


Fig. 7. Broth dilution test result of *Propionibacterium acnes* broth dilution.

4. 결론

감귤가공 이후 발생하는 감귤박에는 리모넨 오일이 함유되어 있음이 검증되었으나 본 실험에서는 그 추출량이 극미량이라 에테르를 이용한 Soxhlet 추출법과 병행하여 추출을 진행하였다. 리모넨 오일의 효과적이고 실용적인 적용을 위해서는 신속하고 간편하게 얻을 수 있는 대량추출 방법이 시급히 요구되고, 감귤피로부터 얻을 수 있는 순수 리모넨 오일은 문헌상 약 1.2%(12,000ppm) 정도이지만 안정한 대량추출법이 개발된다면 보편적인 실생활로의 응용

이 가능할 것으로 전망된다.

1. 리모넨 오일은 인체 안면부위 및 구강의 상주세균에 대한 항균성을 갖고 있으며, 특정 병원성 세균으로 알려진 여드름 유발균인 *Propionibacterium acnes* 생육을 저지하는 항균성을 갖고 있다. 인체에 무해하여 피부 트러블이 잦은 민감성 피부에 적합한 세안제로써 적용 가능성이 있다.
2. *Propionibacterium acnes*의 최소억제농도(MIC)는 128 μ g/ml로 측정되었고, 리모넨 오일이 여드름균에 대해 항균성을 갖고 있음을 확인하였다. 여드름균 유발을 억제, 예방할 수 있는 세안제, 비누 및 구강제 등의 피부와 관련된 목욕 용품으로의 활용이 기대된다.

참고문헌

1. E. Y. Lee, Optimization of Separation Process of Bioflavonoids and Dietary Fibers from Tangerine Peels using Hollow Fiber Membrane, *J. Food Sci. Tech.*, 30(1), 151 (1998).
2. C. M. Kim, Taxonomical and phytochemical Studies of Citrus Plants Native to Je Ju Island(1), *J. Kor. Nat. Prod. Sci.*, 10(1), 53 (2001).
3. Y. S. Ha, Characterization of Emulsion Properties for D-limonene, *J. Kor. Envir. Sci.*, 7(6), 875 (1998).
4. S. K. Jung, S. H. Kim, Status of Citrus Fruit Production and View of Utilization in Cheju, *Kor. Soc. Food Sci. and Nutri.*, 5(2), 42 (2000).
5. J. S. Ko, S. H. Kim. Physicochemical Properties and Chemical Compositions of Citrus Fruits Produced in Cheju, *J. the Kor. Agr. Chem. Soc.*, 38(6), 541-545 (1995)
6. S. Langer and D. L. Wise, Medical Applications of Controlled Release, *CRC Press*, Florida, U.S.A., 2, 2 (2004).

7. H. B. Rosen, J. Chang, G. E. Wnek, R. J. Linhardt and R. Langer, Bioerodible polyanhydrides for controlled drug delivery, *Biomaterials.*, 4, 131 (2004).
8. A. J. Corraz *et. al.*, Dual-Action Penems and Carbapenems, *J. Med. Chem.*, 35, 1828 (1992).
9. A. C. Oyrton, Jr. Monteiro, Claudio Airoidi, Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system, *Inter. J. Bio. Macro.*, 26, 119 (1999).
10. M. Kawase, N. Michibayashi, Y. Nakashima, N. Kurikawa, K. Yagi and T. Mizoguchi, Application of Giutaraldehyde-Crosslinked Chitonsan as a Scaffold for Hepatocyte Attachment, *Bio. Pharm. Ball.*, 20, 708 (1997).
11. F. D. Williams, P. G. Wilkins, *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2, 586 (1988).
12. J. L. Mainardi, D. M. Shlaes, *et. al.*, Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphyococcus aureus*, *J. Infect. Dis.*, 171, 1646 (2005).
13. Williams & Wilkins, Baltimore, R. E. Gosselin, Eds, *Clinical oxicology of Commercial Products*, 5, 344 (1984).
14. A. C. Tanquary, R. E. Lacey, *Controlled Release of Biologically Active Agents*, Plenum press, p. 234 (1994).
15. D. B. Lee, K. H. Kwon, W. S. Cha, J. W. Na., "Chitosan Microsphere Preparation" *J. Chitin Chitosan*, 4(2), 288 (2000).
16. H. Tsuruta, Absorption of solvent mixture, *Ind. Health*, 34, 369 (2006).