

감귤기능성 및 부산물이용 고부가가치 가공제품 개발 연구

Development of new processing goods using functional citrus materials

주관연구기관	국립원예특작과학원 감귤시험장
연구책임자	최형훈
발행년월	2011-02
주관부처	농촌진흥청
사업관리기관	농촌진흥청
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201400000469
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 14:00:33

저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

< 완결과제 최종보고서 >

제 출 문

농촌진흥청 장 귀하

본 보고서를 “감귤기능성 및 부산물이용 고부가가치 가공제품 개발 연구” 과제의
보고서로 제출합니다.

제1협동연구과제 : 수입오렌지와 차별화 연구를 통한 국내산 감귤류의 우수성 입증

제1세부연구과제 : 기능성 제품개발을 위한 기능성 물질 대량 추출방법 개발 연구

제2협동연구과제 : 감귤기능성 제품개발연구

제2세부연구과제 : 감귤부산물 이용방법 연구

2011. 2. 28

주관연구기관명 : 국립원예특작과학원
감귤시험장

주관연구책임자 : 최 영 훈

연 구 원 : 이 선 이

“ : 이 지 현

제1협동연구기관명 : 제주대학교

제1협동연구책임자 : 이 영 재

제2협동연구기관명 : 제주대학교

제2협동연구책임자 : 한 창 훈

요 약 문

I. 제 목

감귤기능성 및 부산물이용 고부가가치 가공제품 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라 제주도에서 재배되는 감귤류는 전체 과수 중 생산량 1위이며 이들 생산량 중 70%가 생과로 소비되고 30%가 가공용으로 소비되고 있으며, 가공량이 매년 증가하고 있다. 특히, 감귤 가공 공정시 감귤 과피가 가공부산물로 발생되는데 감귤 과피에는 에센셜 오일, 카로티노이드, 플라보노이드, 셀룰로오스, 펙틴, 리모노이드, 테르펜 등 기능성 물질이 다량으로 함유되어 있어 감귤과피를 이용한 활용성에 대한 연구가 필요한 실정이다.

우리 농산물의 기능성 연구를 통하여 우리나라 감귤의 우수성을 확보하고 외국산 오렌지와 차별화 할 수 있는 국내산 감귤류의 기능성 성분의 효과를 홍보하여 소비자들의 호감을 증대시키고 생과소비의 활성화를 도모 할 수 있다. 뿐만 아니라, 감귤류의 가공과정에서 발생하는 감귤박 처리 기술 개발로 가공산업의 활성화에 기여할 수 있으며, 감귤박을 이용한 기능성 관련 제품연구로 감귤 가공제품의 판로를 확대시킬 수 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

외국산 대비 국내산 감귤의 기능성 성분 분석을 통해 감귤의 우수성을 확인하고 동물 및 현장실증 시험을 통하여 체지방 연소효과 및 혈행개선 효과를 과학적으로 검정하였다.

감귤의 기능성 성분을 이용한 제품개발을 위하여 추출효율 극대형 장치의 효율 검정을 위하여 스크루형 착즙기 및 열수 추출기의 추출효율을 비교하였다. 뿐만 아니라, 기능성물질 추출의 대량생산을 위하여 다양한 크기의 MW cutoff를 갖는 membrane filter를 이용하여 여과 및 농축단계에서의 당제거 효과 및 기능성물질의 함량을 비교 분석하였고, 발효균주를 이용한 당 농도 제거 실험을 통해 대용량 추출의 효율성을 확인하였다. 당 농도 제거 실험을 위하여 감귤의 부위별 동결건조 샘플을 준비하고 감귤시험장 발효균주(CMY-28)를 이용하여 당 제거 효율을 확인하였다.

감귤기능성을 이용한 가공제품 개발을 위하여 초산발효 균주를 탐색하고 선발된 균주는 공시균주와 비교하여 그 특성과 기호도를 검증하였다.

감귤 가공과정에서 대량으로 발생하는 감귤 가공부산물의 단백질 생성이 가능한 균주의 발효 가능성을 검증하였다. 감귤부산물은 분해효율이 높은 당분해효소를 처리하여 단백질 생산균

주의 생육배지로 활용하여 생성량을 확인하였다. 그리고 감귤부산물을 이용해 상품성 높은 활성탄 제조 가능성을 확인하였다.

IV. 연구개발결과

외국산 대비 국내산 감귤의 기능성 성분의 우수성을 확인하기 위하여 국내산 감귤류의 기능성 성분을 분류하고 기능성 성분을 이용한 감귤기능성음료를 제조하고, 국내산 감귤의 비만억제 효과 및 혈행 개선 등의 과학적 입증을 위하여 현장실증시험을 수행하였다. 고도비만 학생을 대상으로 운동량과 연계하여 체지방 연소효과를 확인하였고, 성인 여성을 대상으로 기능성 추출물의 혈행 개선 및 체지방 연소 효과를 확인하였다. 동물(Rat)을 이용하여 비만을 유발시킨 후 비만억제 관련 효과 및 혈중 지질개선 효과, 혈행개선 효과, 혈당저하 효과 등의 작용기전을 확인하여 비만 치료제로써의 가능성을 보였다.

기능성 제품개발을 위해서는 효율적인 기기선택 및 설비구성이 매우 중요하다. 본 시험에서는 산업적으로 효율적인 설비구성을 위한 설비부분별 추출효율을 검토 하기 위한 시험을 수행하였다. 우선 과육의 착즙을 위한 추출기는 연구결과 스쿠루형 착즙기가 산업화공정에 유리할 것으로 사료 되었다. 컬럼법에 의한 추출 장치는 내부에 충전재(SDVB)를 충전에 의한 흡착/탈착법이(특허등록) 효과적이었다.

대규모 추출 플랜트 부분별 추출은 여과막 #50,000가 시간당 여과수율이 높았고 일반적인 UF처리(잔여물)는 여과막 #50,000가 유리할 것으로 사료되었다. 동결건조 수율을 검토해 본 결과 하귤즙은 1.75%, 온주밀감 청과즙은 1.50%의 수율을 보였다. 지금까지의 연구결과를 바탕으로 산업체 기술이전을 통해 감귤기능성이 코팅된 감귤쌀(특허출원)을 개발하였다. 감귤쌀에 기능성분은 쌀 1g당 약 200-400ppm의 플라보노이드 함유될 수 있도록 코팅시 첨가될 수 있도록 하였다. 감귤에 함유된 기능성성분의 체내흡수효율 및 산업화에 적합한 물질로 만들기 위한 당제거 시험결과 감귤시험장 개발균주인 CMY-28(citrus marmelo yeast)을 이용하여 발효를 실시하여 처리한 것이 처리 후 25시간에서 당(Total sugar)은 50% 이상 제거 시킬 수 있었다.

감귤 기능성 제품개발을 위한 음료제조를 위해 기초 배합물로 5% 온주밀감 청과즙을 기본으로 하여 제조한 음료의 기호도가 가장 높게 나타났다. 기능성성분 첨가를 위하여 하귤추출물을 포함한 감귤액에 선발된 초산균주와 공시균주를 이용하여 초산발효를 한 결과, 공시균주를 이용한 식초보다 선발균주를 이용한 식초의 기호도가 2.5배 이상으로 높게 나타났다. 감귤시험장에서 개발된 감귤초를 응용하여 감귤초 고등어 병조림, 감귤초 고추장, 감귤초 다시마 병조림, 감귤초 파래김 병조림, 감귤초 미역 병조림 등 다양한 병조림을 제조하였으며, 감귤초 고추장의 경우는 기호도가 4.71까지 나타나감귤초를 이용한 병조림 가공제품의 충분한 상품성을 나타내었다.

본 연구에서는 감귤과피의 효소처리에 의한 기능성물질 추출 및 산업적 이용을 위해 실시하였다. 또한 고형상태의 감귤과피를 상업적으로 다양한 이용도 제고를 위한 효소처리 분해방법 검토결과, **Viscozyme L**은 carbohydrase로 *Aspergillus aculeatus*에 유래하는 효소로 본연구결과 감귤껍질 분해에 효과적이었다. 특히 분해된 감귤로 부터 유효물질인 naringenin과 hesperetin을 대량으로 얻을 수 있었다. 또한 감귤박을 이용한 알콜생산 가능성 검토결과, 발효처리 8일에서 기대 수치인 당 농도의 50% 알콜생성이 이루어 졌다. 대규모 감귤박처리를 위해 제주도 서귀포시 한남리에 설치된 연간 50,000ton 규모의 감귤가공공장을 대상으로 현지시험을 수행한 결과, 현재 생산되고 있는 감귤pulp 압착박의 물성과 성상으로는 소화공정을 진행시키기 어려운 조건을 가지고 있었다. 또한 현재공정에서는 일반적으로 가수가 필요하며, 가수용 물은 증발농축기의 응축수 및 방류폐수 재이용 등을 고려할 필요가 있었다. 여과박(함수율 65% 정도)은 건조기에서 혐기성시스템에서 발생된 steam을 재이용으로 전체적인 시스템운영의 경제성과 운전에너지 효율을 최적화 시킬 수 있을 것으로 사료되었다. 원심분리조와 Decanter drum내부의 난류를 최소화 할 수 있는 유체역학적인 설계가 이루어 져야 할 것으로 보인다.

효소 처리물 이용 감귤 부산물의 단백질 발효 가능성 검토 결과 감귤 배지를 통해 균사체를 성장시킬 수 있으며, 생성된 균사체를 이용해 동물 사료 등으로 활용할 수 있을 것으로 전망된다. 또한 균사체 성장 후 남겨진 배양액까지 함께 활용할 수 있다면 보다 많은 단백질과 유도체물질들을 공급할 수 있을 것으로 기대된다.

감귤박의 탄화 및 활성화 공정의 효율성을 높이기 위해서는 활성탄의 목적에 맞게 제조 공정을 설계한 후 각각의 조건에 따른 이용 범위를 확립할 필요성을 알았다.

V. 연구개발결과의 활용계획

감귤로부터 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 억제작용, 간질환 개선 효과, 암세포 증식 억제작용, 지질 과산화 억제 작용, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 면역증강, 모세혈관 강화작용 등의 생리활성을 갖는 원료를 추출하여 식품, 의약품으로의 활용 할 수 있다. 감귤가공 부산물로부터 가축사료첨가용 기능성물질을 생산하기 위한 효소 및 생균제 처리 극대화 연구를 통해 감귤소비를 촉진시킬 수 있는 홍보자료로도 활용이 가능하다.

감귤 기능성 물질의 제품화 연구를 위하여 대용량 추출법 및 부산물 이용방법을 관련 기업체에 기술이전 함으로써 감귤 가공산업을 활성화 시킬 수 있다. 이를 위하여 산업체 현장연구를 추가적으로 실시하여 추출장치의 최적화 모델의 설정이 우선되어야 하며 제품생산을 위한 표준화연구 또한 병행되어야 한다.

S U M M A R Y

Obesity is a major public health problem and significant risk factor for many serious diseases including coronary artery disease, cancer, and diabetes. This study was performed to investigate the hypolipidemic effects and anti-hypertensive effect of *Unshu* and *Citrus grandis Osbeck* Fruit, which is bred on Jeju island, in rats fed a high-fat diet and Human bodies. After feeding the high fat diet, body weight gain and relative weight of adipose tissues and liver significantly increased in HFD group, but Citrus fruit extract supplementation protected these HFD-induced changes. The levels of serum triglyceride, total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, and the atherogenic index significantly decreased in the HFD+Citrus fruit extract group compared with the HFD group. The systolic blood pressure was significantly increased by feeding the high fat diet, whereas the supplementation of Citrus fruit extract effectively prevented the elevation of blood pressure. Therefore, these results suggest that Citrus fruit extract exerts a beneficial effect on obesity by improving lipid metabolism and alleviating obesity-related hypertension.

A development of functional material product from the machinery and tools selection which is efficient and equipment composition are very important respectably. Investigates the equipment partial by extraction efficiency for the equipment composition which industrial is efficient from the test which sees the test for accomplished.

The fruit juice extractor screw type was thought good thing for industrialization. The extraction plant in compliance with the Useful column law was effective to fill on the inside. In order to extractive flavonoide in citrus fruit, SDVB is effective column packed material. Fermenting method(application yeast : citrus marmelo yeast) was best for remove sugar content in Citrus extract material.

In the customer interest, blending citrus fruit extract 5% is best for the development of citrus functional Juice. Develop products that are different in food like citrus vinegar, Mackerel bottling, citrus hot paste, Tangleweed bottling, green algae bottling and so on.

This research conduct in order to propel a citrus functional material industrialization. In the result of this research, Viscozyme L is best degradation of enzyme of citrus peel. the alcohol creation was possible with the enzyme extract of ctirus fruit peel. Large scale control of citrus processing by-product was accomplished from the citrus juice factory in Jeju and then various research was conducted from this.

In the result of protein creation possibility, When used the hypha body, was possible and then the carbonization was possible with used citrus peel.

제 1 장 서 론

감귤은 과주 중 생산량 1위로 한국과수의 총생산량의 1/4이상을 차지하는 제주도 1차 산업의 중추적 역할로 '09년 기준 농협·감귤협회의 감귤유통처리실태분석자료에 의하면 제주도 내 감귤류 재배면적은 20,898ha, 총생산량은 741천톤, 조수익은 6,011억원으로 농업 조수입의 50% 이상을 차지하고 있다. 우리 농산물의 생산량 증가와 함께 기능성 연구를 통해 우리 농산물의 우수성을 홍보하여 소비자들의 호감을 증대시킬 수 있는 전략이 필요하다. 특히, 수입 농산물이 증가하는 현대에는 외국산 오렌지와 차별화 할 수 있는 국내산 감귤류의 기능성 성분 효과 구명이 절실하다. 외국은 향산화, 콜레스테롤 억제, 항암작용 등 감귤류의 기능성 관련 제품연구가 활발히 이루어지고 있으나, 우리나라는 감귤 기능성 관련 제품연구가 취약한 상황이다.

현대인들의 식습관의 변화로 인해 비만인구가 증가하고 있으며, 비만억제와 관련된 감귤 유효성분 구명을 위한 분석실험이 절대적으로 요구되고 있다. 외국의 경우에도 펙틴 및 식이섬유와 감귤류의 기능성 성분 비만관련 연구가 미약한 실정이다.

뿐만 아니라, 감귤류의 생산량이 증가함에 따라 가공물량이 증가하고 있으며, 연간 10만톤의 감귤방이 발생되나, 일부 한약재로 활용될 뿐 연간 10억원의 비용을 들여 해양투기하여 처리하였으나, 국제적인 환경보호법에 따라 해양투기가 불가능해 졌기 때문에 감귤 가공부산물 처리에 대한 기술 개발이 시급한 실정이다.

본 연구에서는 우리 농산물의 기능성 연구를 통하여 우리나라 감귤의 우수성을 확보하고 외국산 오렌지와 차별화 할 수 있는 국내산 감귤류의 기능성 성분의 효과를 홍보하여 소비자들의 호감을 증대시키고 생과소비의 활성화를 도모하고자 한다. 뿐만 아니라, 감귤류의 가공과정에서 발생하는 감귤박 처리 기술 개발로 가공산업의 활성화에 기여할 수 있으며, 감귤박을 이용한 기능성 관련 제품연구로 감귤 가공제품의 판로를 확대시킬 수 있을 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 감귤류 Bioflavonoids의 약리활성 조사 (1997, 복성혜)
- 감귤함유 물질 비만억제 효과확인(2005 ~ 2007, 난지연, 제주대)
- 감귤청과이용 기능성 분류 및 가공품 개발연구 (2000, 난지연)
- 콜레스테롤 함유 식이 랫드에서 감귤껍질추출물의 체중 감소효과 (2003, 생명공학연구소)
- 감귤에서의 나리루틴 분류연구(2006, 제주 하이테크진흥원)
- 감귤류의 (R)-리모넨의 중추신경의 흥분을 진정효과, 오렌지유의 암발생 억제효과(1994, L.K.T. Lam)
- 감귤류 플라보노이드의 항암효과(1998, 矢野昌充)
- 감귤류 쓴맛이 주요인인 리모노이드, 리모닌 및 노미린의 발암억제 작용(1994, L.K.T. Lam)
- 감귤류의 유전자원과 관련된 기능성 성분의 분포보고(1997, 일본 와카야마농시)
- 온주밀감에 다량 함유된 β 크립트키산틴의 항암효과가 보고되고 이를 대량으로 추출하여 산업적으로 암예방 및 중앙치유 등에 이용가능(1998, 矢野昌充)
- 감귤류 과피에 함유된 토코페롤 등에 의한 감귤류의 항산화작용 확인(1999, 石川祐子)
- 감귤에 함유된 Auraptene(Coumarin계 화합물)은 발암억제 활성보유(1999, 川井悟)
- 감귤류에 함유된 기능성성분으로는 테르페노이드류, 플라보노이드류, 카로티노이드류(β -carotene), 리모노이드류 등으로 이런 성분들과 관련된 인체에서의 생리활성, 항산화 활성에 대해 검토(일본 등)
- 인체에 장애를 주는 효소류의 활성저해작용(ex: 안지오텐신 변화효소 저해작용) 등에 대해 연구 수행되고 있음(2002, 일본 약학연구소 등)
- 당유자 앞에서 분리한 활성성분이 3T3-L1 cell에서 adiponectin 분비와 insulin receptor phosphorylation의 증가보고(2009, 태국)

최근 여러 연구를 통하여 감귤류의 항산화 및 항암효과 등이 보고되고 있으나, 비만 및 대사성 질환에 대한 연구가 미비하다. 본 연구에서는 학술적 현장실증시험 및 동물실험을 통하여 비만개선 효과, 혈행 및 고혈압 개선 효과 등을 입증하고자 한다. 이와 같은 생리활성을 갖는 기능성 원료 및 성분의 작용기전에 대한 연구를 통해 건강기능식품 및 건강 증진용 제품의 개발이 뒤따를 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 수입오렌지와 의 차별화 연구를 통한 국내산 감귤류의 우수성 입증

1. 서론

비만은 열량섭취와 소비의 불균형으로 인하여 체지방 축적이 야기되는 대사성 질환의 일종으로, 현대 사회의 급속한 비만인구의 증가는 전세계적으로 심각한 사회적 문제가 되고 있다. (Kopelman, 2000; Hill et al., 2007).

혈중 콜레스테롤과 low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C)의 농도 증가 및 high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C)의 감소는 비만의 특징적 소견으로, 고콜레스테롤혈증 (hypercholesterolemia)과 고중성지방혈증(hypertriglyceridemia)이 동반되며, 고혈압, 동맥경화등 심혈관계 질환, 지방간 및 당뇨병 등의 질병에 대한 위험성이 증가하게 된다. (Festi et al., 2004). 따라서, 지질대사의 개선은 비만을 비롯한 여러 질병의 예방 및 치료에 유익한 효과를 줄 것으로 기대되고 있다. 현재 주로 사용되고 있는 비만 치료제인 sibutramine과 orlistat의 경우에도 각각 심혈관계 및 위장관계에 부작용이 있는 것으로 알려져 있어 (Fujioka et al., 2000; McMahon et al., 2000; Leung et al., 2003), 부작용이 없는 항비만치료 약물의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

이에 따라 천연물을 대상으로 한 항비만 효능에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 비만 실험동물 모델에서 Park et al. (2005)은 화살나무(Euonymus alatus)의 지질개선 효과와 혈당저하 효과를 보고하였고, Nakayama et al. (2007)은 한방약의 항비만 효과를 보고하였다. 또한 Hsu and Yen (2007)은 고지방식으로 유도한 비만 실험동물 모델에서 나타나는 이상지질혈증(dyslipidemia)과 지방간증(hepatosteatosis) 및 산화적 스트레스(oxidative stress)에 대한 gallic acid의 억제 효과를 보고하였다. 따라서, 본 연구에서는 국내산 감귤류의 항비만 효과를 확인하기 위하여 체지방 연소효과 구명과 고지방식이(High Fat Diet)로 유도한 비만 동물모델에서 국내산 감귤의 효과를 확인하였다.

2. 국내산 감귤류의 기능성성분 분류연구

가. 국내산감귤과 수입오렌지의 기능성 성분분석 및 함량비교

LC/MS 분석을 통해 국내산 감귤과 수입오렌지의 기능성 성분을 분석한 결과 naringin, hesperidin, hesperetin, nobiletin의 성분이 검출되었고 각각의 함량은 아래의 표와 같다.

표 1-1. 국내산 감귤과 수입오렌지의 기능성 성분 함량 비교

	Naringin (ppm)	Hesperidin (ppm)	Hesperetin (%)	Nobiletin (%)
수입오렌지 과피	6.14 (10.50%)	128.82 (54.59%)	5.00	0.07
과육	24.67 (6.97%)	762.35 (55.23%)	4.13	0.6
온주밀감 과피	11.76 (16.65%)	181.70 (60.05%)	5.06	0.22
과육	18.64 (28.10%)	141.04 (44.29%)	5.00	0.06

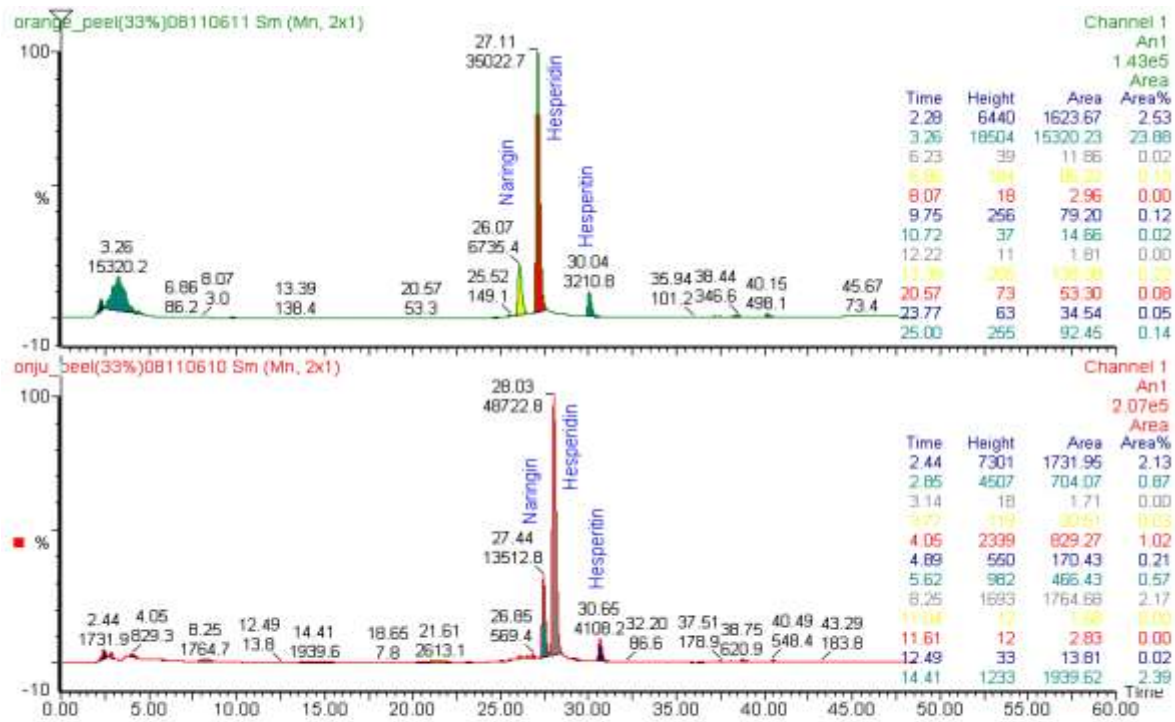


그림 1-1. 국내산 감귤과 수입오렌지 과피의 LC/MS 크로마토그램.

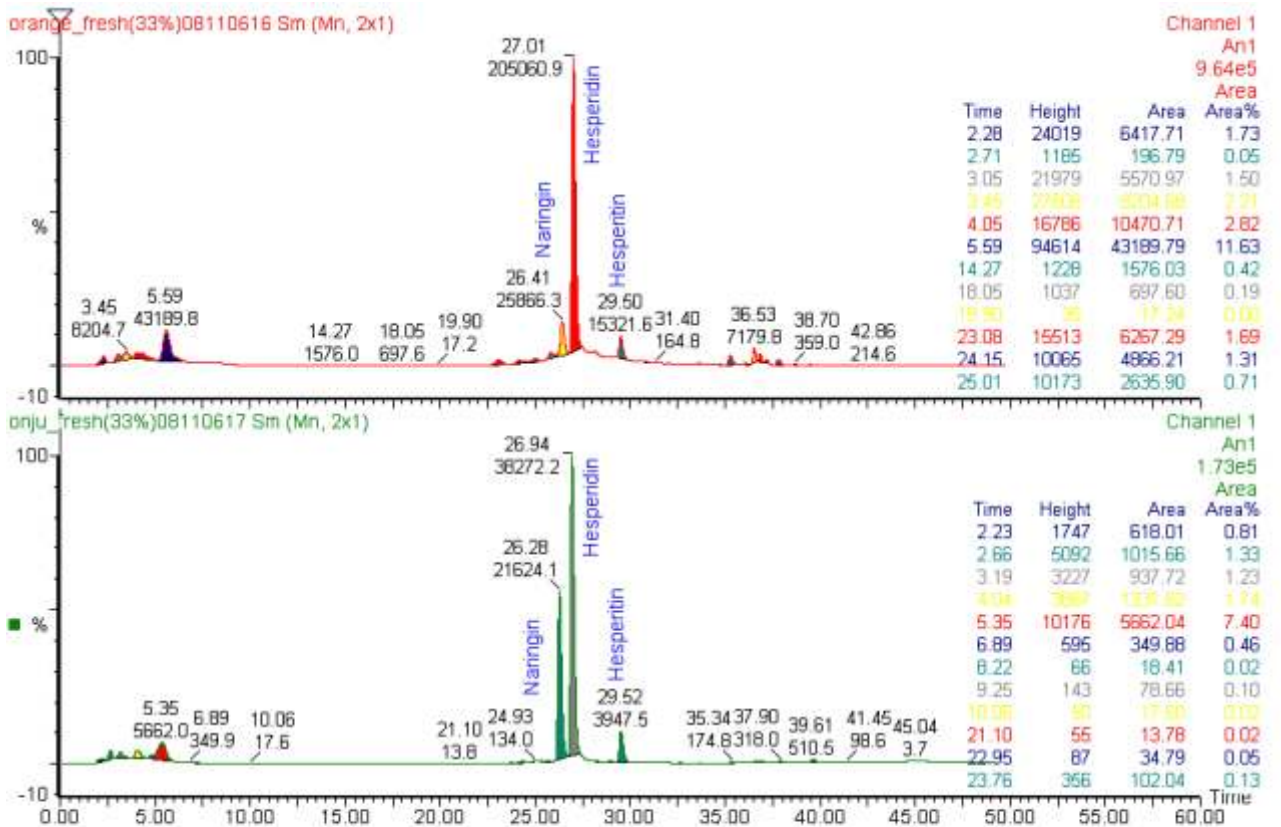


그림 1-2 국내산 감귤과 수입오렌지 과육의 LC/MS 크로마토그램.

나. 고지방식이(HFD)로 유도한 비만 동물모델에서 국내산 감귤의 효과 확인

5주령의 수컷 흰 쥐에게 고지방식이를 10주간 급여하여 비만을 유도(HFD)하였고 비만 유도와 동시에 200 mg/kg 농도의 시료를 10주간 매일 경구투여(HFD+시료 1, 2, 3, 4)함으로써 감귤 시료의 비만 예방효과를 확인하였다. 그리고 5주령의 수컷 흰 쥐에게 5주동안 고지방식이를 급여하여 비만을 유발한 이후, 다시 5주간 고지방식이와 200 mg/kg 농도의 시료 3을 매일 경구투여(HFD/HFD+시료 3)하여 감귤 시료의 비만 치료효과를 확인하였다.

고지방식이 및 시료 투여군에서 사료효율이 정상식이군(ND)에 비해 높음에도 불구하고 시료 투여에 의해 증체량이 고지방식이군(HFD)보다 감소하였다. 또한 복강내 지방과 부고환 지방의 무게가 고지방식이군에서 증가하였고 시료 투여군에서 감소하였다. 그리고 비만시 나타나는 고환의 위축이 고지방식이군에서 나타났고 시료 투여군에서 회복되었다.

표 1-2. 증체량, 사료효율, 체지방 및 고환 무게 변화

	Weight gain (g)	F.E.R.	Peritoneal fat (g/100 g B.W)	Epididymal fat (g/100 g B.W)	Testis (g/100 g B.W)
ND	380.9±11.6	0.18±0.01	2.38±0.18	1.71±0.06	0.71±0.02
HFD	458.4±30.5 ⁺	0.38±0.03	5.99±0.42 ⁺⁺⁺	3.33±0.39 ⁺⁺	0.54±0.02 ⁺⁺⁺
HFD+시료 1	417.1±20.1	0.38±0.01	5.20±0.38	2.93±0.20	0.59±0.02
HFD+시료 2	424.5±11.8	0.38±0.03	5.11±0.53	2.84±0.52	0.58±0.02
HFD+시료 3	379.9±20.5 [*]	0.36±0.01	5.03±0.21	3.09±0.12	0.60±0.03
HFD+시료 4	391.6±21.9 [*]	0.36±0.02	4.96±0.51	2.84±0.44	0.63±0.02 [*]
HFD+HFD/시료 3	407.9±14.6	0.38±0.01	5.39±0.25	3.08±0.23	0.60±0.01

혈청 내 총콜레스테롤과 중성지질의 함량을 조사한 결과, 정상식이군보다 고지방식이군에서 증가하였고 시료 투여군에서 감소하였다.

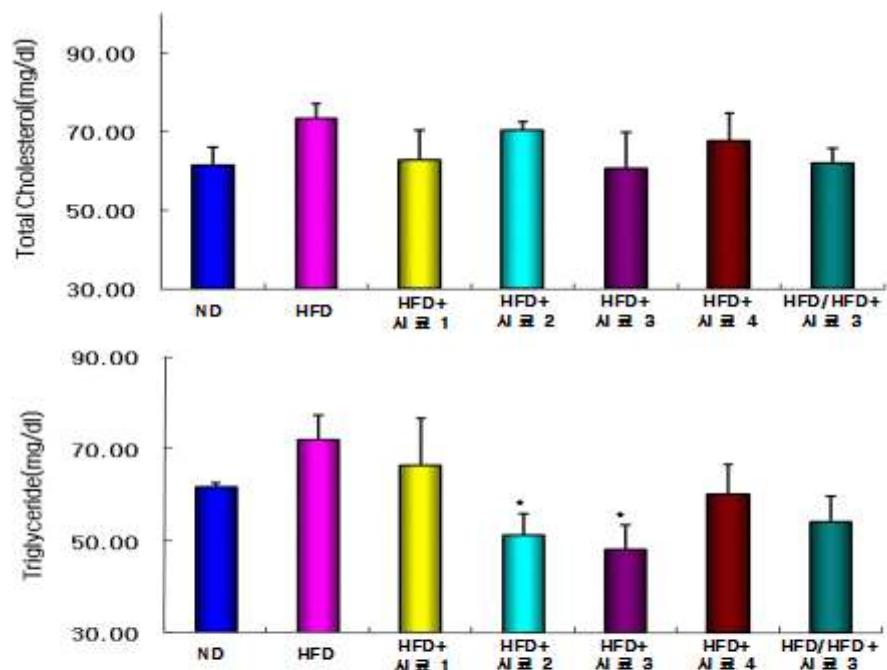


그림 1-3 . 혈청 내 총콜레스테롤과 중성지질의 함량 변화.

* $p < 0.05$ vs. ND.

다. 3T3-L1 cell (전지방세포)을 이용한 국내산 감귤의 지방세포로의 분화 억제 효과 확인
전지방세포에 IBMX, dexamethasone, insulin을 처리하여 지방세포로 분화시킨 Control군에서 지방세포를 염색하는 Oil Red O의 염색성이 진하게 나타났고 시료를 처리한 결과 Oil Red O의 염색성이 현저히 감소하여 감귤 시료의 지방세포 분화억제 효과를 확인하였다.

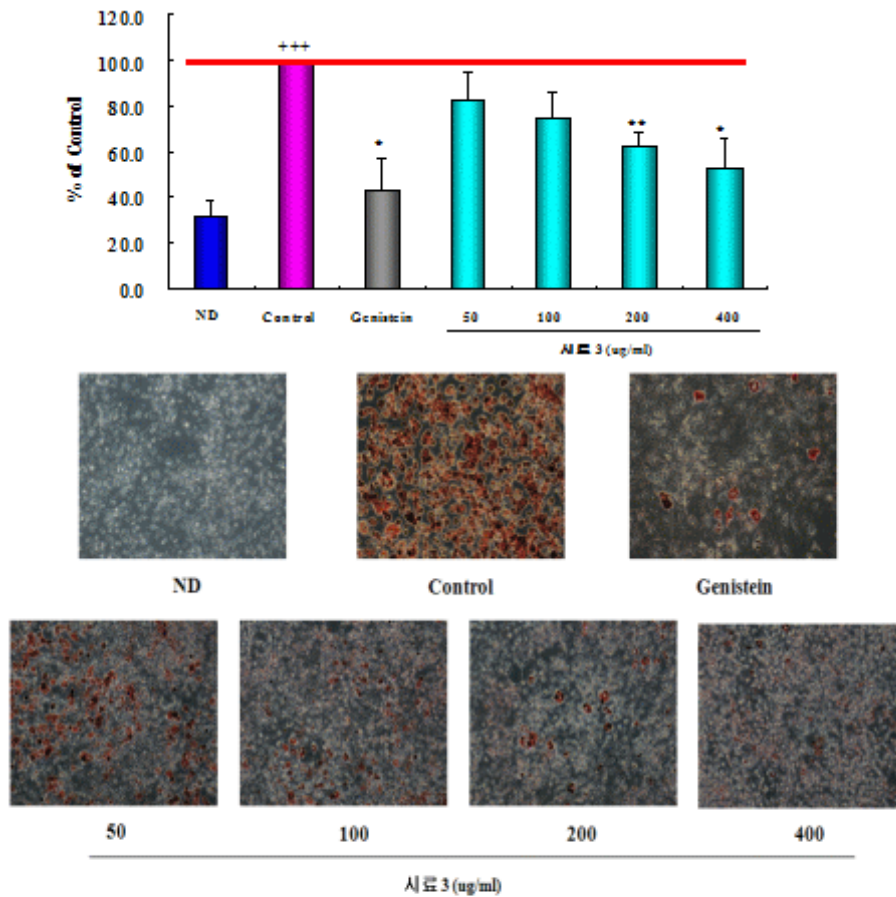


그림 1-4 감귤 시료의 지방세포 분화 억제 효과.
*** $P < 0.001$ vs. ND, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Control

라. 중학생을 대상으로 비만에 대한 감귤 음료의 효과 확인

비만한 중학생을 대상으로 감귤 음료를 한달동안 마시게 한 결과 BMI 수치 및 혈청 내 총 콜레스테롤 함량이 시험 전에 비해 감소하였다. 그리고 운동만을 수행한 학생군 보다 감귤 음료를 마시면서 운동을 한 학생군의 BMI 수치, 복부지방률 및 혈청 내 총콜레스테롤 함량이 많이 감소되었다.

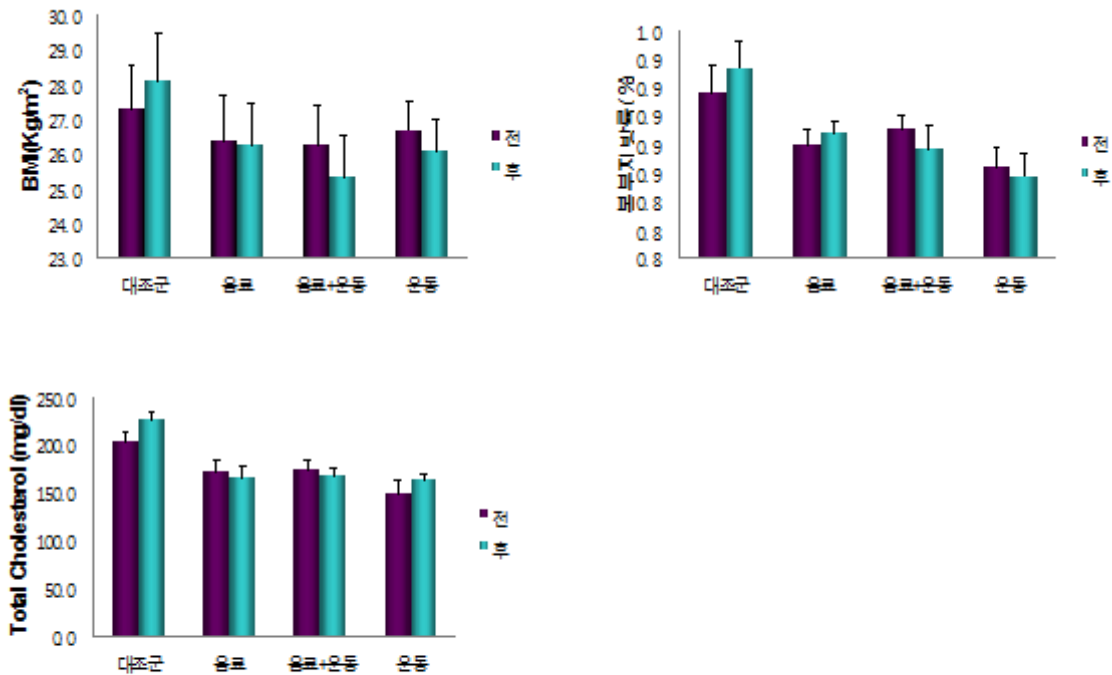


그림 1-5. 비만한 중학생을 대상으로 한 감귤 음료의 비만 억제 효과.

3. 감귤기능성 체지방 연소효과 구명(연소효과)

가. 학술 임상시험(기능성추출물의 체지방 연소 효과)

- 본 실험은 대상자의 동의하에 이루어졌음.
- 본 실험은 생명윤리위원회에 상정 계류 중

표 1-4. 감귤 기능성 농도별 혼합 음료 조성

	농도(%)		
	음료 A	음료 B	음료 C
과 피	0	10	20
과 육	0	10	20
청과즙	15	30	30
물	85	50	30

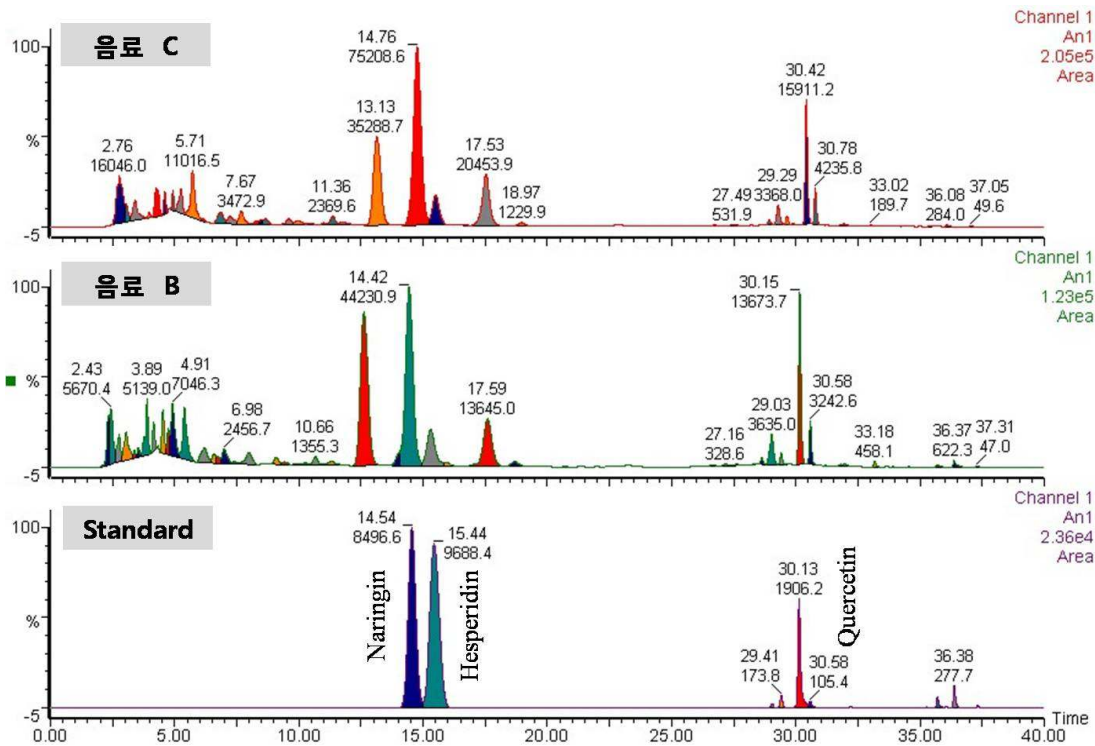


그림 1-6. 감귤음료의 HPLC 크로마토그램

표 1-4. 감귤 기능성 음료 섭취군 설정

섭취군		인원수	기간			
			1개월	2개월	3개월	4개월
I	N*	6	음료 A	음료 A	음료 B	음료 B
	O*	6	음료 A	음료 A	음료 B	음료 B
II	N*	9	음료 B	음료 B	음료 C	음료 C
	O*	6	음료 B	음료 B	음료 C	음료 C

**N: 정상체중군(BMI 기준 25미만), O: 과체중군(BMI 기준 25이상)

나. 감귤 기능성 음료 섭취군 조사 항목

- 체성분 검사 ; 체중, 체지방량, 체지방율, BMI

- 혈청 생화학적 검사 ; 총콜레스테롤, 중성지방, hsCRP

다. 결과

- (1) I -N(음료 A+음료 B)에서의 감귤 혼합 음료 효과
; 체중 및 BMI가 감소하는 경향을 보였으며, 특히 혈청 cholesterol의 농도를 크게 감소시키는 효과를 보였다(표 1-5, 그림 1-7).
- (2) I -O(음료 A+음료 B)에서의 감귤 혼합 음료 효과
; 체중 및 BMI, 체지방량, 체지방율이 감소하는 경향을 보였고, 특히 혈청 cholesterol의 농도를 효과적으로 감소시켰다. 또한, 염증지표인 hsCRP의 농도를 섭취전과 비교시, 감소하는 경향을 보였다(표 1-5, 그림 1-7).
- (3) II -N(음료 B+음료 C)에서의 감귤 혼합 음료 효과
; 체중 및 BMI, 혈청 cholesterol의 농도, 혈청 hsCRP가 이 감소하는 경향을 보였다(표 1-6, 그림 1-8).
- (4) II -O(음료 B+음료 C)에서의 감귤 혼합 음료 효과
; 혈청 triglyceride 및 혈청 cholesterol의 농도를 효과적으로 감소시켰으며, 또한 염증지표를 감소시켰다(표 1-6, 그림 1-8).

위의 실험을 통하여, 감귤 혼합 음료의 섭취는 비만 개선에 도움이 될 수 있을 것으로 생각되며, 특히, 혈청 cholesterol을 효과적으로 감소시키는 것으로 보아, 혈청 지질대사 개선 및 혈행 개선에 효과가 있을 것으로 사료된다.

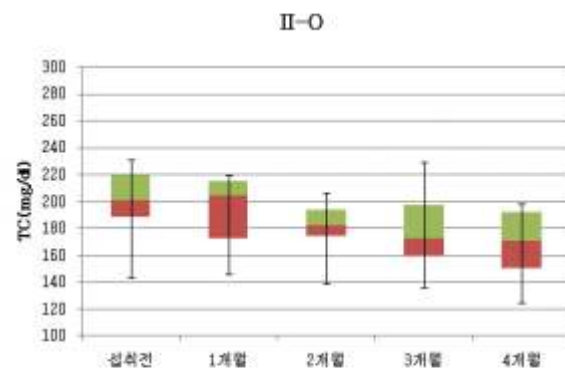
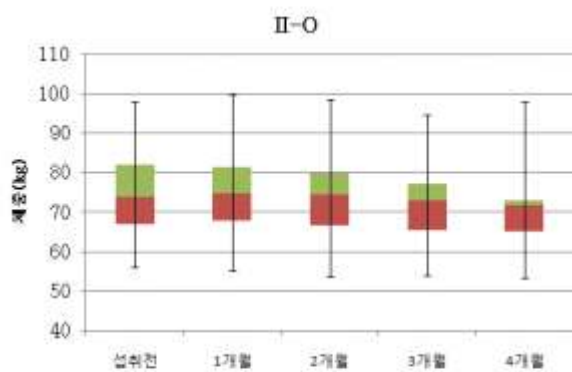
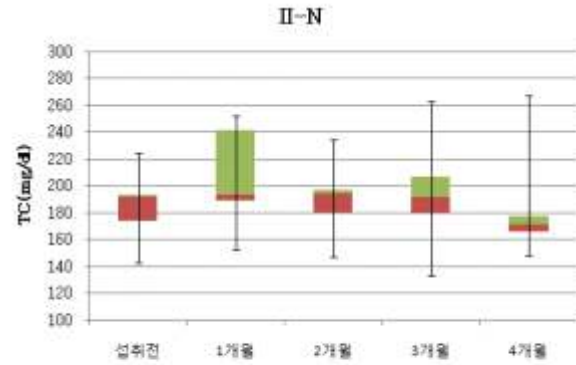
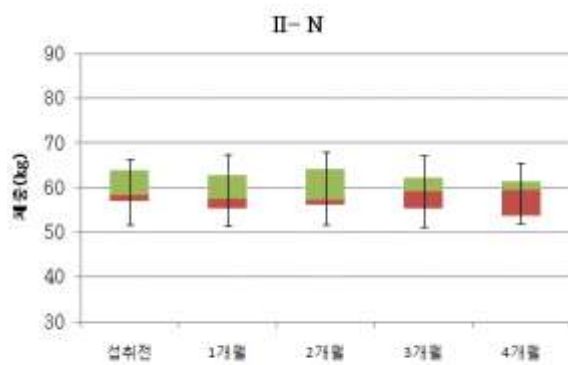


그림 1-8. 정상 및 과체중군에서 혼합음료 II에 의한 체성분 및 혈청 지질 개선 효과.

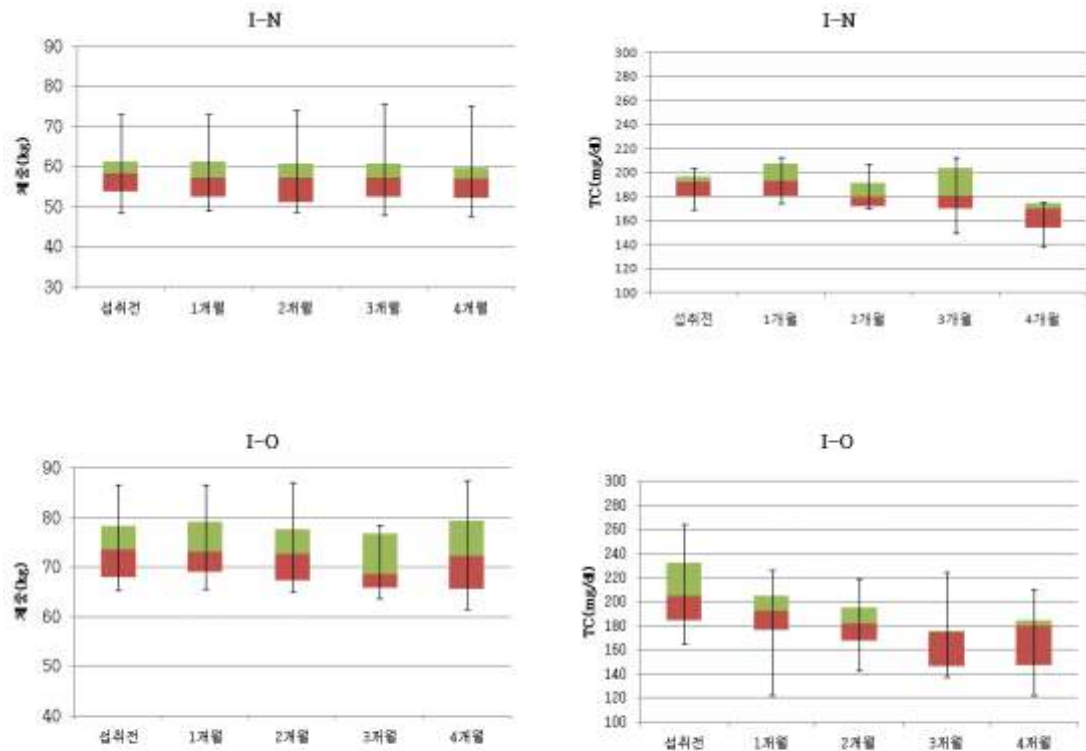


그림 1-7. 정상 및 과체중군에서 혼합음료 I에 의한 체성분 및 혈청 지질

표 1-5. 정상 및 과체중군에서 혼합음료 I에 의한 체성분 및 혈청 지질 개선 효과

섭취군		측정항목	음료 섭취 기간(월)			비고 (정상범위)
			0	2	4	
I	N	체중(Kg)	58.8±3.4	58.0±3.8	57.9±3.9	
		체지방량(Kg)	16.5±1.5	15.8±1.2	17.1±1.7	
		체지방율(%)	27.9±1.0	27.2±0.5	29.3±1.0	18~28
		BMI	23.3±0.6	23.1±0.7	22.9±0.8	18.5~25
		serum TG (mg/dl)	66.7±4.4	69.8±12.6	69.2±5.7	50~150
		serum TC (mg/dl)	188.4±5.4	183.6±6.0	163.0±6.4*	150~250
		hs CRP (ug/ml)	0.3±0.2	0.1±0.1	0.2±0.2	0~4
I	O	체중(Kg)	74.2±3.3	73.7±3.5	73.1±4.4	
		체지방량(Kg)	27.3±1.7	27.0±1.5	26.2±21	
		체지방율(%)	36.6±0.7	36.6±0.8	35.6±1.5	18~28
		BMI	27.8±0.9	27.6±1.0	27.3±1.3	18.5~25
		serum TG (mg/dl)	107.7±20.8	94.3±23.8	91.7±22.4	50~150
		serum TC (mg/dl)	210.0±15.3	181.5±10.8	169.5±13.4*	150~250
		hs CRP (ug/ml)	0.9±0.6	0.6±0.4	0.2±0.1	0~4

p<0.05,
**p<0.01
compar
ed to
HFD

표
1-6. 정
상 및
과 체 중
군 에 서
혼 합 음
료 II 에
의 한 체
성 분 및
혈 청 지

질 개선 효과

섭취군		측정항목	음료 섭취 기간(월)			비고 (정상범위)
			0	2	4	
II	N	체중(Kg)	59.6±1.5	59.3±1.8	58.5±2.2	
		체지방량(Kg)	18.6±1.0	18.2±1.0	18.0±1.3	
		체지방율(%)	31.1±1.2	30.6±1.1	30.7±1.3	18~28
		BMI	23.4±0.4	23.2±0.5	23.0±0.6	18.5~25
		serum TG (mg/dl)	80.4±11.8	68.3±4.2	107.2±21.1	50~150
		serum TC (mg/dl)	189.7±8.2	191.6±8.2	183.6±17.3	150~250
		hs CRP (ug/ml)	0.3±0.2	0.2±0.1	ND	0~4
II	O	체중(Kg)	73.5±6.0	74.7±6.2	74.0±6.1	
		체지방량(Kg)	28.0±3.7	28.4±3.7	28.5±3.4	
		체지방율(%)	37.3±1.9	37.2±1.9	38.0±1.4	18~28
		BMI	29.5±1.6	29.9±1.8	29.7±1.9	18.5~25
		serum TG (mg/dl)	94.7±20.4	111.3±20.7	88.7±7.7	50~150
		serum TC (mg/dl)	203.6±12.8	192.1±9.6	175.6±11.9	150~250
		hs CRP (ug/ml)	0.3±0.2	0.2±0.1	ND	0~4

4. 여러 가지 감귤류의 혈압에 미치는 영향 비교(*in vivo*)

가. 고혈압 동물모델 : 고지방식이(HFD)로 비만을 유도하여 이차적으로 고혈압을 유발한 동물 모델

나. 효과 검정 시료

- 감귤류 5종의 과피

Citrus1, 지각; Citrus2, 당유자; Citrus3, 중문실생; Citrus4, 하귤과피;

Citrus5, 하귤과실(과피+과육)

다. 혈압 측정 : Tail-cuff method 이용

라. 결과

- 정상사료(ND) 식이군의 혈압이 102.5±4.8 mmHg로, 정상 혈압을 유지한 반면, HFD를 식이한 군의 혈압은 135.9±5.1 mmHg로써 고혈압이 유발되었다. 5종의 감귤류 과피를 함께 식이한 군에서는 정도의 차이는 있지만 모두 혈압을 감소시키는 효과를 보였고, 그 중 Citrus 2와 Citrus 3의 감귤류가 가장 좋은 효과를 보였다(그림 1-9).

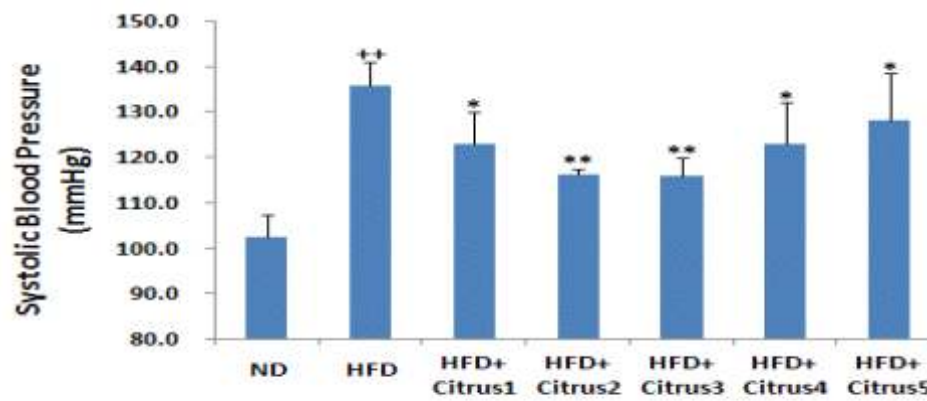


그림 1-9. 고지방식으로 유도한 고혈압 동물모델에서 5종의 감귤류가 혈압에 미치는 영향.

** $p < 0.01$ compared to ND; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to HFD.

4. 감귤 과피 농축물의 항혈전 활성 검색(*in vitro*)

가. 사람의 전혈 혈소판 응집억제 활성 측정

- 자발적인 체혈 참여로 얻은 사람의 전혈에서 collagen 처리에 의한 혈소판 응집에 대하여 감귤 과피 농축물의 항혈전 활성을 500VS Chrono-log aggregometer (Chrono Log, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다(전원경 등; 2007, 한국응용생물화학회지).

나. 결과

- Collagen으로 유도한 혈소판 응집에 대하여 감귤 과피 농축물이 약 17%의 억제효과를 보였다.

5. 감귤 과피 농축물의 혈행개선 효과 검색(*in vivo*)

가. 동물모델 : 고지방식이(HFD)에 의한 고혈당 유발 모델

나. 효과 검색 시료

- 감귤 과피 농축물

- 10주동안 HFD를 먹이시킴으로써 동물모델을 유발한 후, 3주간 경구투여

다. 체중 및 혈당 변화 관찰

라. 결과

- 감귤 과피 농축물의 투여 직전의 체중에 대하여 투여가 끝났을 때의 체중변화를 %로 산출한 결과, 감귤 과피 농축물의 투여에 의해 체중 감소효과를 보였다(그림 1-10).

- HFD의 식이로 상승된 혈당이 감귤 과피 농축물의 투여에 의해 감소되었다(그림 1-11).

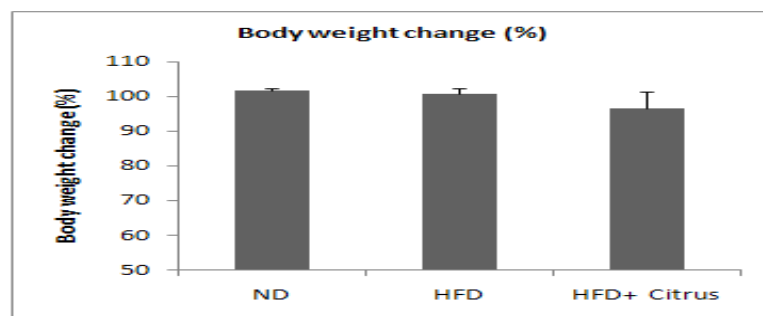


그림 1-10. 동물모델에서 감귤 과피 농축물에 투여에 의한 체중 감소 효과.

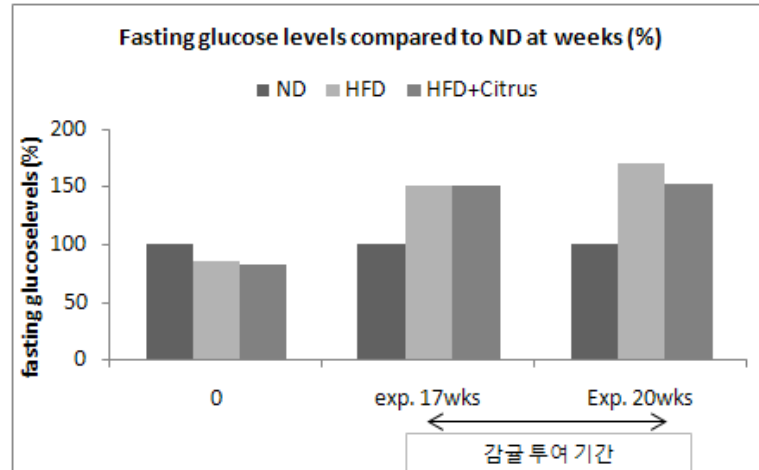


그림 1-11. 동물모델에서 감글 과피 농축물의 혈당 감소 작용에 의한 혈행 개선 효과.

- 혈당이 상승되면 혈액의 점도가 증가되기 때문에 혈액의 흐름이 방해받는데, 감글 과피 농축물이 혈당을 떨어뜨림으로써, 혈행개선 효과를 보였다.

6. 비만 및 인슐린저항성 마우스 모델의 혈관에서의 항당뇨 효과 실험

가. 동물실험

(1) 질환모델 확립 : C57BL/6N mice (수컷, 5주령)에 6주간 고지방사료를 급이 시킴으로써 대사성질환이 동반되는 질환동물 모델 확립. 4주째부터 2주간은 감글의 경구투여를 병행하여 체중변화를 관찰하고 혈관에서의 인슐린 작용기전 및 세포 신호전달을 확인하였다.

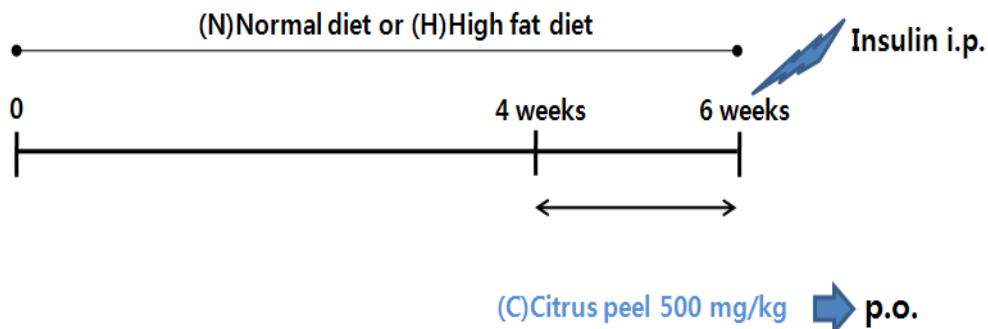


표1-7. 실험동물군

Cage No.	Group	마리수	처리방법
1,2,3,4	Normal Diet (N군)	16	6주간 Normal Diet를 급이
5,6,7	High fat Diet (H군)	12	6주간 High fat Diet를 급이
8,9,10	High fat Diet / Citrus (H/C군)	12	4주간 High fat Diet 급이 후 2주간 High fat Diet 급이 및 Citrus peel (500 mg/kg) 경구투여

(2) 체중변화 : 실험 초기 체중 (약 20 g)은 거의 동일하였으나 2주 후부터 H군의 경우 N군에 비하여 체중의 증가가 관찰되었고, H/C 군에 경우 H군에 비하여 6주째 체중이 유의성있게 감소됨을 확인하였다.

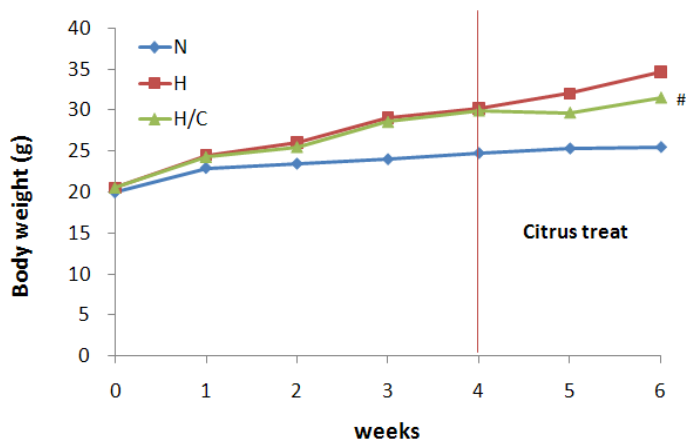


그림 1-12. 체중변화

※ 실험 6주째 마지막 날 공복혈당을 측정하고 human insulin (5U/kg)을 주입한 10분 후 경추 탈골법으로 희생시킨 후 혈관을 적출하여 Western blot analysis로 Akt, eNOS, p38의 발현 및 인산화를 확인하였다.

(3) 항당뇨 효과

- 공복혈당 : 실험 6주째 공복혈당을 관찰한 결과 H군에 경우 N군에 비하여 공복혈당이 현저하게 증가함을 관찰하였음. H/C군에 경우 공복혈당이 H군에 비하여 감소하는 경향을 보였다.

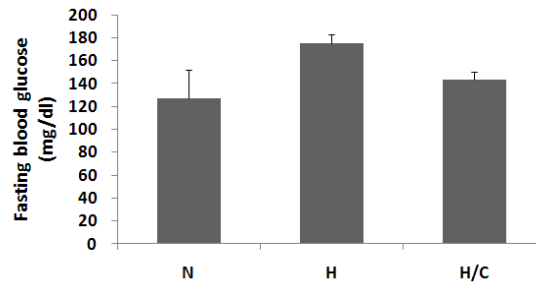


그림 1-13. 공복혈당변화

(4) Akt의 인산화 : 실험 6주째 마지막 날 human insulin (5 U/kg)을 주입한 10분 후 경추탈 골법으로 희생시킨 후 혈관을 적출하여 Western blot analysis로 Akt의 인산화를 확인하였고, H 군에 경우 N군에 비하여 Akt의 인산화가 현저히 줄어들음을 확인하였으나, H/C군에 경우 Akt의 인산화가 크게 증가하였다.

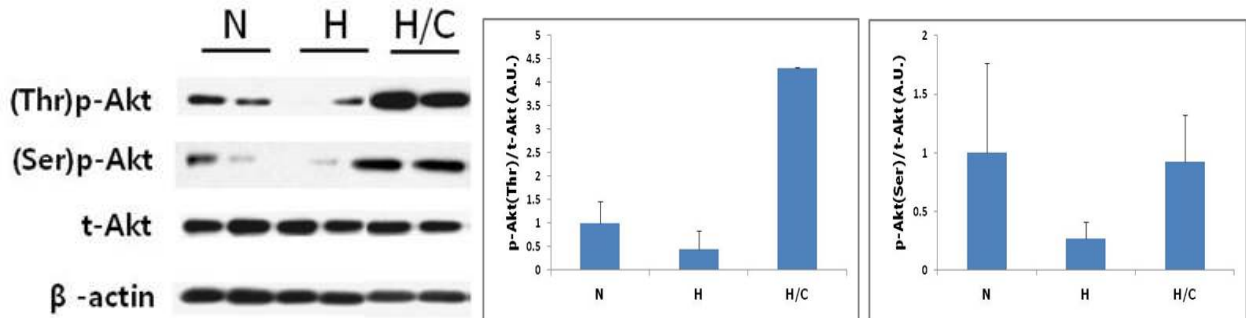


그림 1-14. Akt의 인산화

(5) 세포신호 전달

- eNOS의 인산화 : H군에 경우 N군에 비하여 eNOS의 인산화가 현저히 감소하였으나, H/C 군에 경우 eNOS의 인산화가 다시 회복함을 확인하였다.

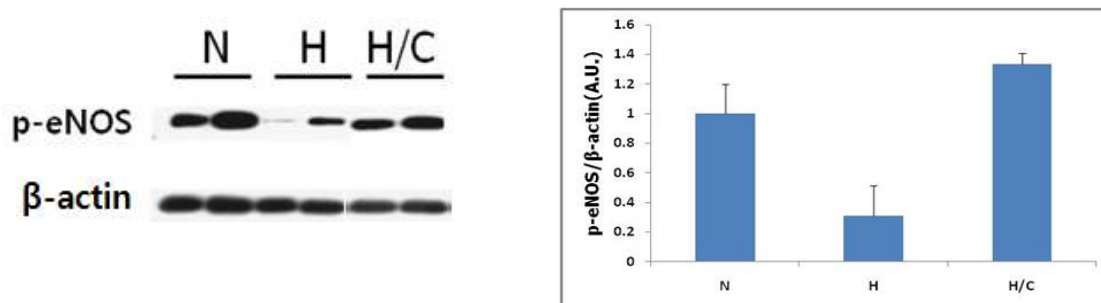


그림 1-15. eNOS의 인산화

(6) p38의 인산화 : H군에 경우 N군에 비하여 p38의 인산화가 현저히 증가함을 확인하였으나, H/C군에 경우 p38의 인산화가 감소함을 관찰할 수 있었다.

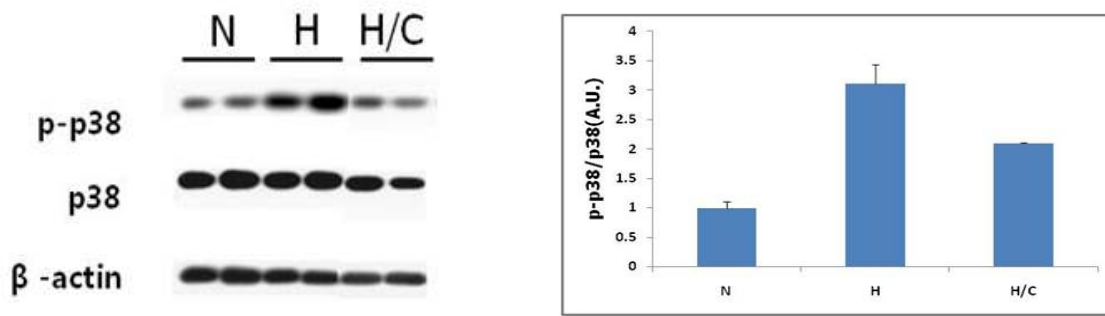
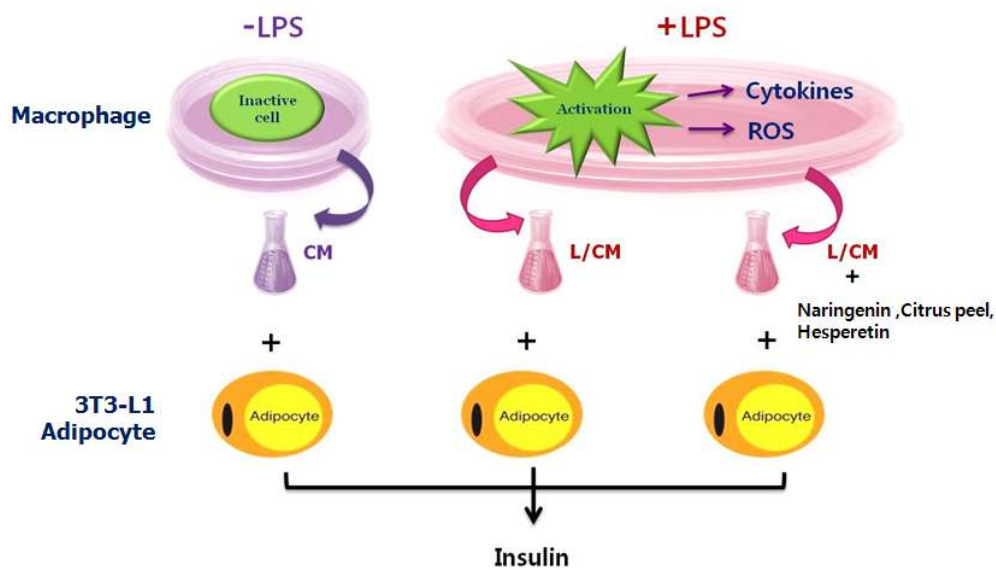


그림 1-16. p38의 인산화

나. 세포실험

- 인슐린 저항성 지방세포에 Citrus peel 및 Naringenin, Hesperetin을 처리하여 항염 및 항당뇨 효과를 관찰하였다.

(1) 인슐린 저항성 세포 모델 확립



Insulin signal & Inflammatory factors

※ Macrophage cell에 LPS (1 ug/ml) 를 처리하여 생성된 L/CM(LPS treated conditioned media) 배지를 sample과 함께 adipocyte에 처리하여 insulin signal 과 inflammatory signal을 관찰하였음

(2) 항염효과

- iNOS의 발현 : L/CM을 처리한 지방세포의 경우 iNOS의 발현이 증가함을 확인하였고, Naringenin 50, 100 uM에서 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

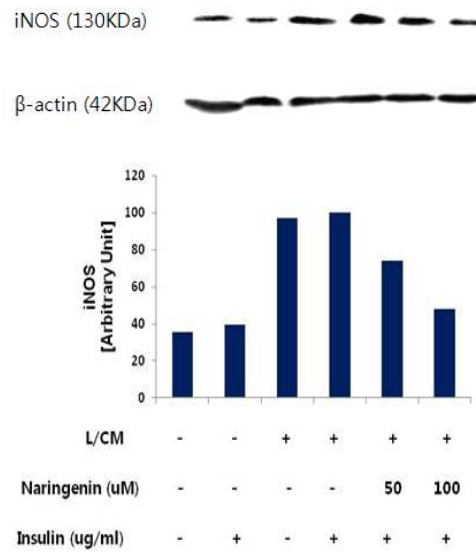


그림 1-17. iNOS의 발현

(3) Akt의 인산화 : L/CM을 처리한 지방세포의 경우 Akt의 인산화가 다소 감소함을 확인하였고, Naringenin 50, 100 uM에서 회복되는 것을 관찰하였다.

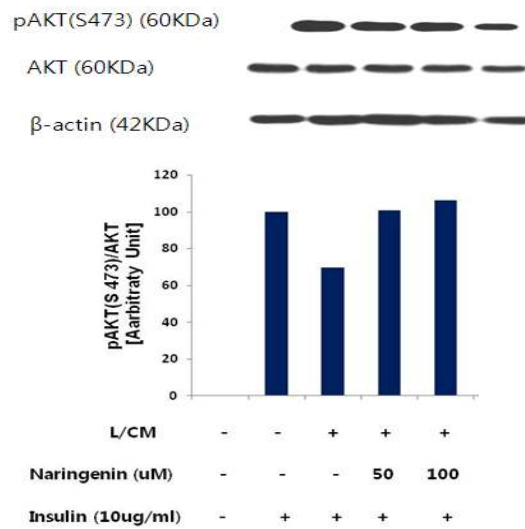


그림 1-18. Akt의 인산화

(4) iNOS의 발현 : L/CM을 처리한 지방세포의 경우 iNOS의 발현이 증가함을 확인하였고, citrus peel 200, 400, 800 ug에서 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

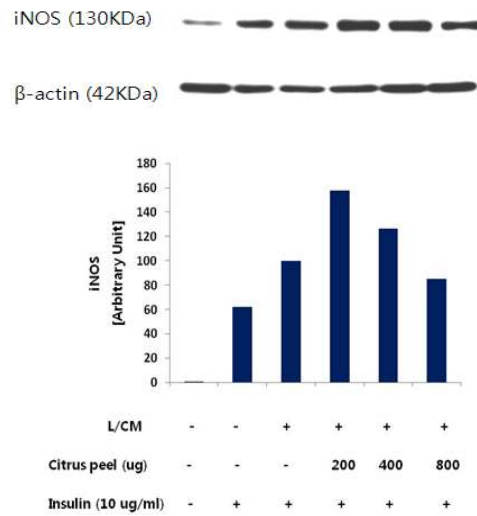


그림 1-19. iNOS의 발현

(5) Akt의 인산화 : L/CM을 처리한 지방세포의 경우 경우 Akt의 인산화의 변화가 관찰되지 않았으며, citrus peel 200, 400, 800 ug에서 인산화가 농도 의존적으로 감소하였다.

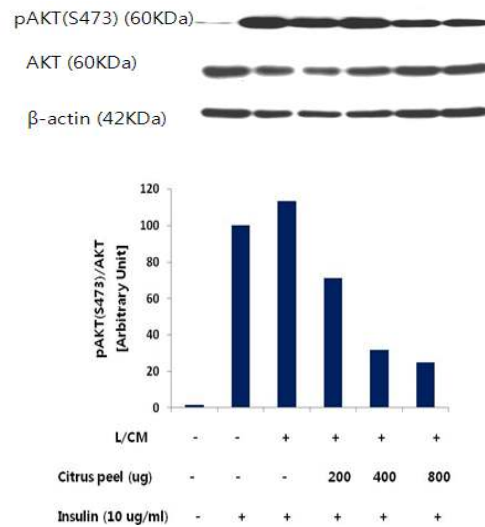


그림 1-20. Akt의 인산화

(6) iNOS의 발현 : L/CM을 처리한 지방세포의 경우 iNOS가 증가함을 관찰하였고, Hesperetin 25, 50, 100 uM에서 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다.

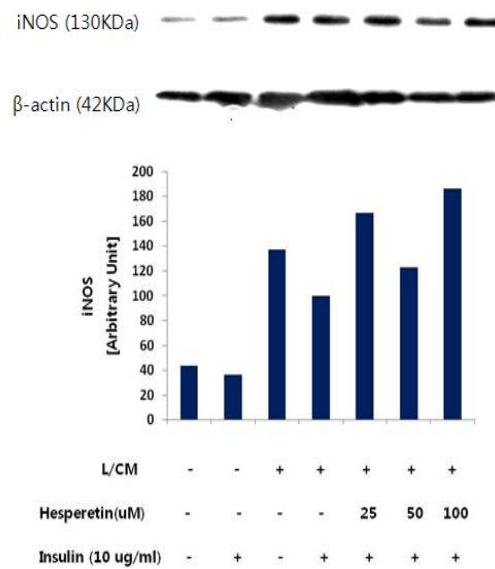


그림 1-21. iNOS의 발현

(7) Akt의 인산화 : L/CM을 처리한 지방세포의 경우 Akt의 인산화가 감소함을 확인하였고, Hesperetin 25, 50, 100 uM에서 감소하는 것을 확인하였다.

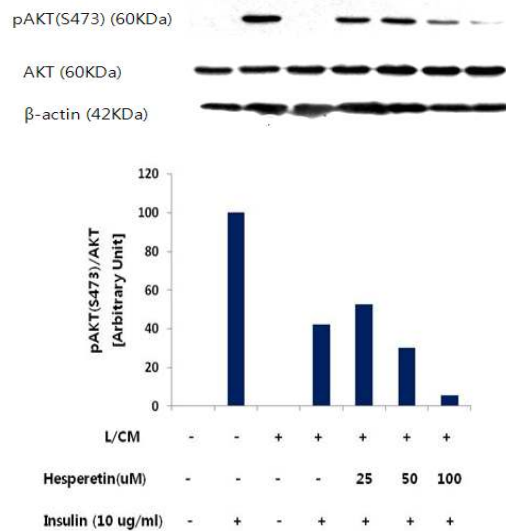


그림 1-22. Akt의 인산화

7. 비만 및 인슐린저항성 마우스 모델의 간과 근육에서의 항당뇨 효과 실험

가. 질환모델 확립 : C57BL/6N mice (수컷, 6주령)에 20주간 고지방사료를 급이 시킴으로써 대사성질환이 동반되는 질환동물 모델 확립하였다. 17주째부터 3주간은 감귤의 경구투여를 병행하여 체중변화를 관찰하고 간과 근육에서 인슐린 작용기전 및 세포 신호전달을 확인하였다.

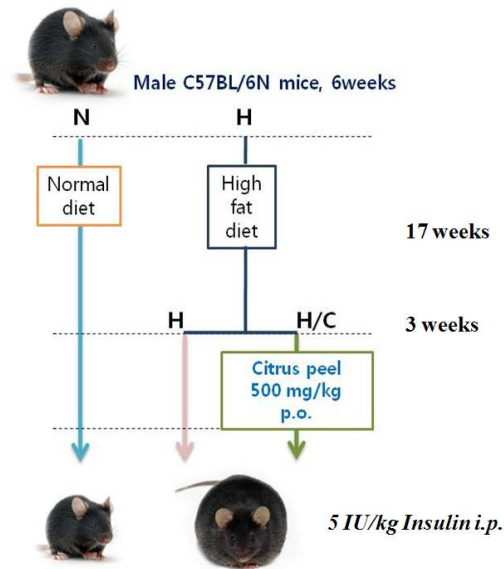


그림 1-23. 실험동물군

나. 체중변화 : 실험 초기 체중 (약 20 g)은 거의 동일하였으나 2주 후부터 H군의 경우 N군에 비하여 체중의 증가가 관찰되었음. H/C 군에 경우 H군에 비하여 체중이 약간감소됨을 확인하였었다.

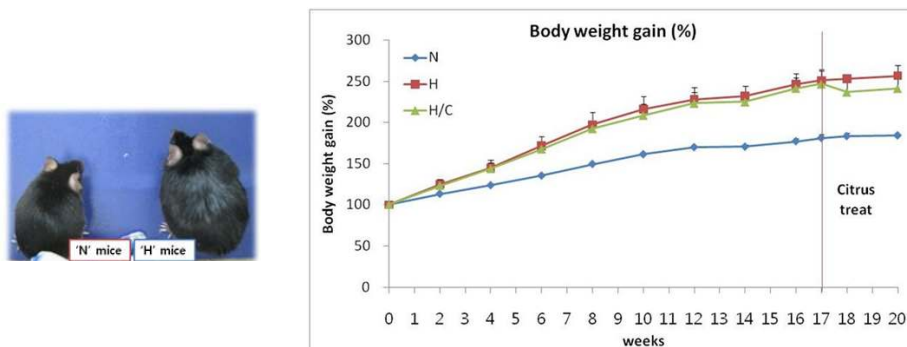


그림 1-24. 체중변화

※ 실험 20주째 마지막 날 공복혈당을 측정하고 human insulin (5U/kg)을 주입한 10분 후 경추탈골법으로 희생시킨 후 간과 근육을 적출하여 Western blot analysis로 Akt, GSK,GS의 발현 및 인산화를 확인하였음.

다. 공복혈당 : 실험 20주째 공복혈당을 관찰한 결과 H군에 경우 N군에 비하여 공복혈당이 현저하게 증가함을 관찰하였음. H/C군에 경우 공복혈당이 H군에 비하여 감소하는 경향을 보였다.

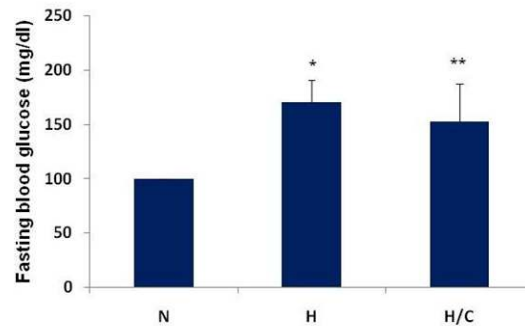


그림 1-25. 공복혈당변화

라. Akt의 인산화 : 실험 20주째 마지막 날 human insulin (5 U/kg)을 주입한 10분 후 경추탈골법으로 희생시킨 후 간을 적출하여 Western blot analysis로 Akt의 인산화를 확인하였다. H군에 경우 N군에 비하여 Akt의 인산화가 현저히 줄어듦을 확인하였으나, H/C군에 경우 Akt의 인산화가 크게 증가하였다.

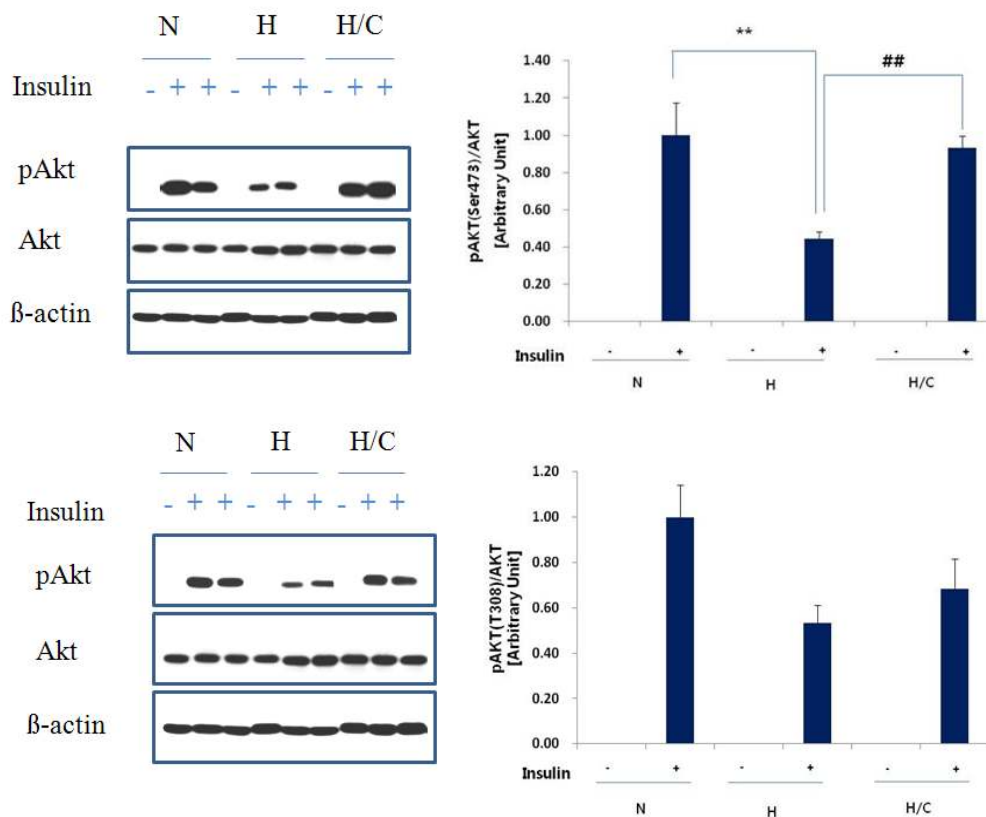


그림 1-26. Akt의 인산화

마. GSK의 인산화 : 실험 20주째 마지막 날 human insulin (5 U/kg)을 주입한 10분 후 경추탈골법으로 희생시킨 후 간을 적출하여 Western blot analysis로 GSK의 인산화를 확인하였다. H/C군이 GSK의 인산화에 영향을 미치지 않았다.

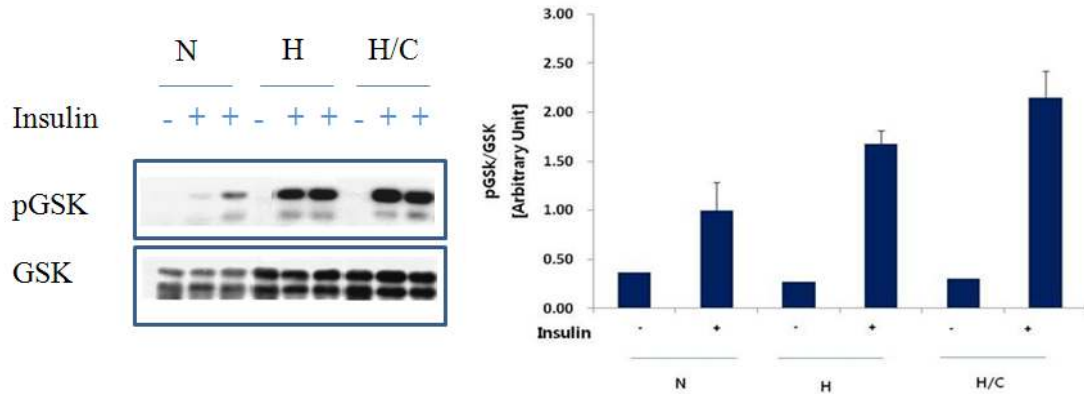


그림 1-27. GSK의 인산화

바. GS의 인산화 : 실험 20주째 마지막 날 human insulin (5 U/kg)을 주입한 10분 후 경추탈골법으로 희생시킨 후 간을 적출하여 Western blot analysis로 GS의 인산화를 확인하였다. H/C군이 GS의 인산화에 영향을 미치지 않았다.

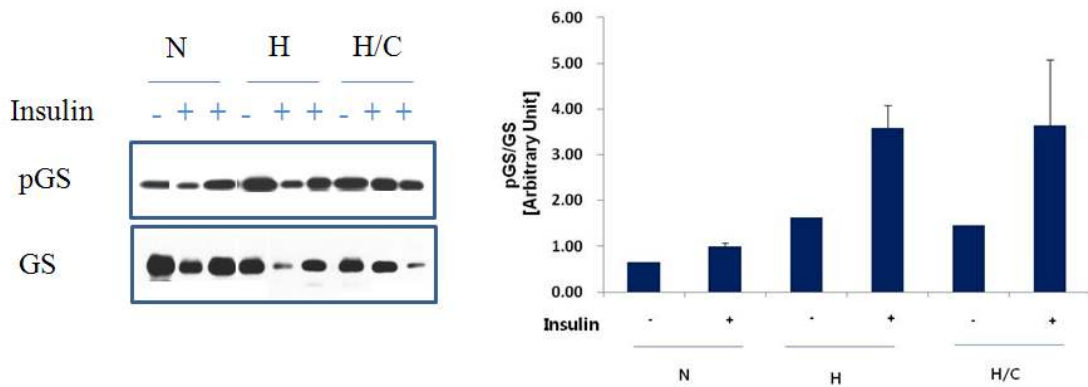


그림 1-28. GS의 인산화

사. Akt의 인산화 : 실험 20주째 마지막 날 human insulin (5 U/kg)을 주입한 10분 후 경추탈골법으로 희생시킨 후 근육을 적출하여 Western blot analysis로 Akt의 인산화를 확인하였다. H군에 경우 N군에 비하여 Akt의 인산화가 현저히 줄어들음을 확인하였으나, H/C군에 경우 Akt의 인산화가 크게 증가하였다.

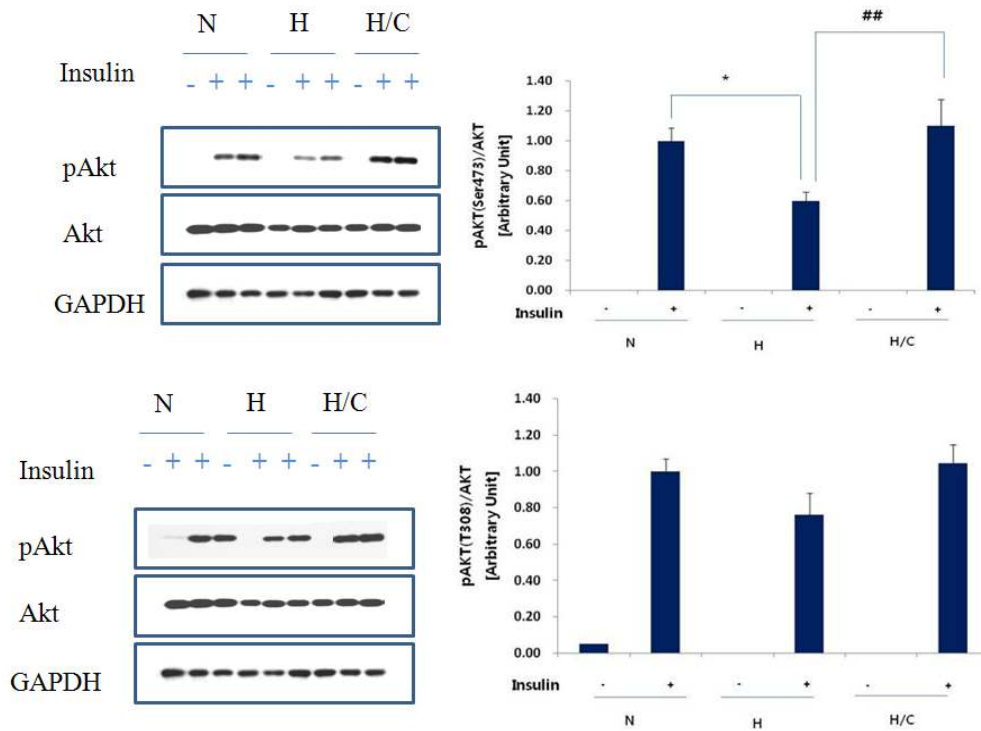


그림 1-29. Akt의 인산화

사. GSK의 인산화 : 실험 20주째 마지막 날 human insulin (5 U/kg)을 주입한 10분 후 경추탈골법으로 희생시킨 후 근육을 적출하여 Western blot analysis로 GSK의 인산화를 확인하였다. H/C군이 GSK의 인산화에 영향을 미치지 않았다.

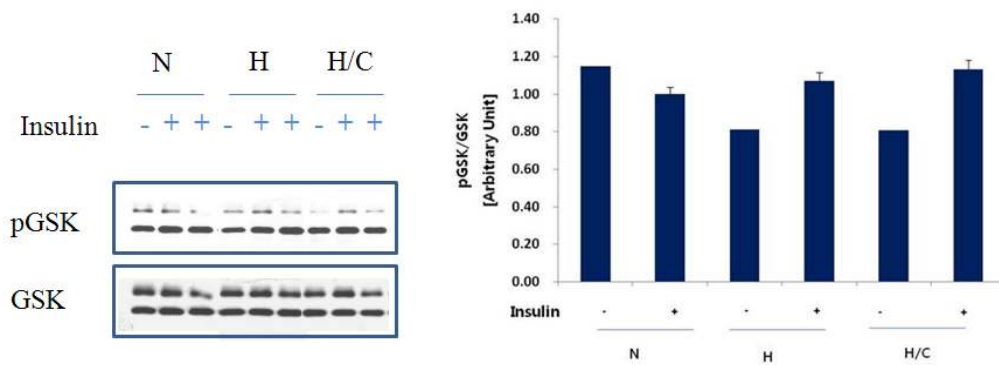


그림 1-30. GSK의 인산화

자. GS의 인산화 : 실험 20주째 마지막 날 human insulin (5 U/kg)을 주입한 10분 후 경추탈골법으로 희생시킨 후 근육을 적출하여 Western blot analysis로 GS의 인산화를 확인하였다. H/C군이 GS의 인산화에 영향을 미치지 않았다.

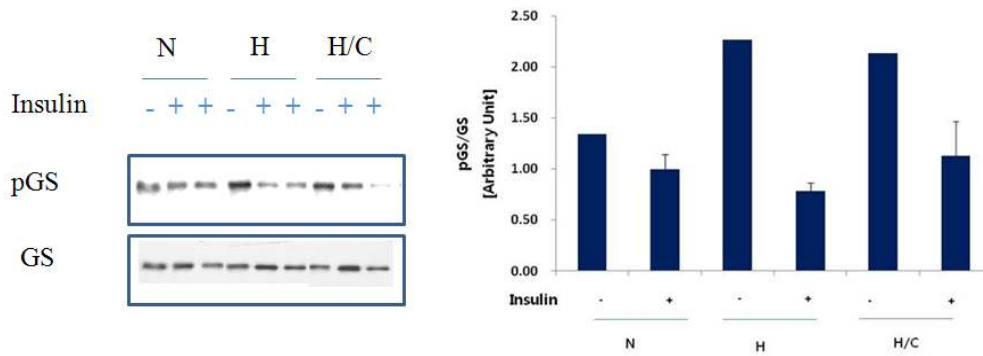


그림 1-31. GS의 인산화

8. 비만 및 인슐린저항성 마우스 모델에서의 Naringin의 항당뇨 효과 실험

가. 질환모델 확립 : C57BL/6N mice (수컷, 6주령)에 20주간 고지방사료를 급여 시킴으로써 대사성질환이 동반되는 질환동물 모델 확립하였다. 21주째부터 4주간은 Naringin의 경구투여를 병행하여 체중변화를 관찰하고 간과 근육에서 인슐린 작용기전 및 세포 신호전달을 확인하였다.

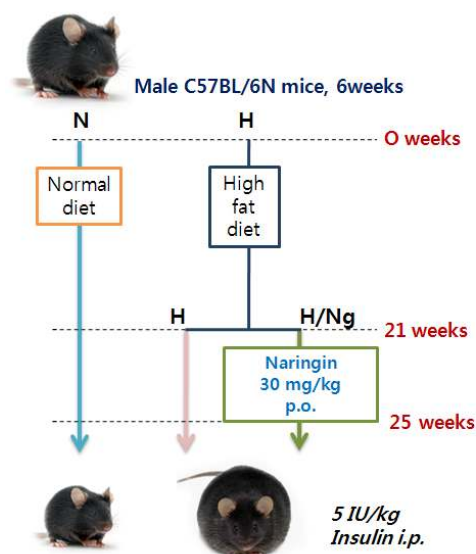


그림 1-32. 실험동물군

나. 체중변화 : 실험 초기 체중 (약 20 g)은 거의 동일하였으나 2주 후부터 H군의 경우 N군에 비하여 체중의 증가가 관찰되었다. H/C 군에 경우 H군에 비하여 체중의 변화가 관찰되지 않았다.

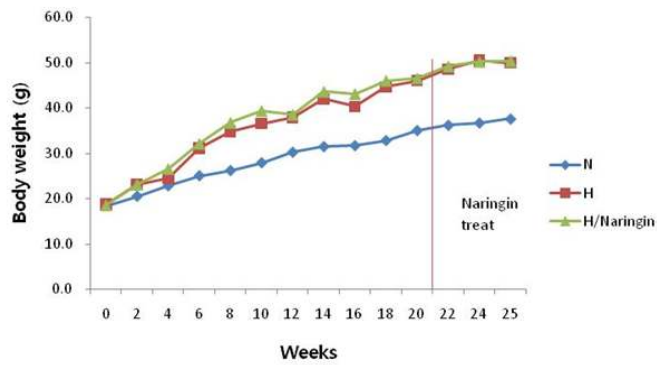


그림 1-33. 체중변화

※ 실험 25주째 마지막 날 공복혈당을 측정하고 human insulin (5U/kg)을 주입한 10분 후 경추탈골법으로 희생시킨 후 간과 근육을 적출하여 Western blot analysis로 Akt의 발현 및 인산화를 확인하였음.

다. 공복혈당 : 실험 25주째 공복혈당을 관찰한 결과 H군에 경우 N군에 비하여 공복혈당이 현저하게 증가함을 관찰하였다. H/Ng군에 경우 공복혈당이 H군에 비하여 감소하는 경향을 보였다.

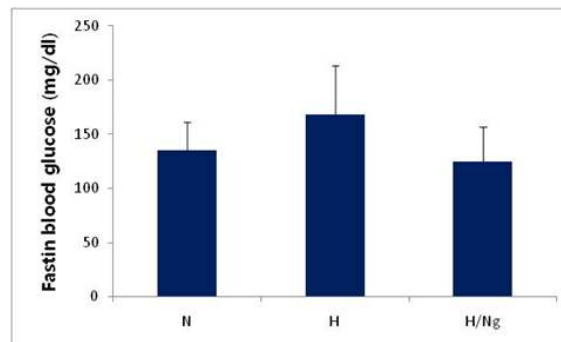


그림 1-34. 공복혈당변화

라. Akt의 인산화 : 실험 25주째 마지막 날 human insulin (5 U/kg)을 주입한 10분 후 경추탈골법으로 희생시킨 후 간을 적출하여 Western blot analysis로 Akt의 인산화를 확인하였다. H군에 경우 N군에 비하여 Akt의 인산화가 현저히 줄어들음을 확인하였으나, H/Ng군에 경우 Akt의 인산화가 크게 증가하였다.

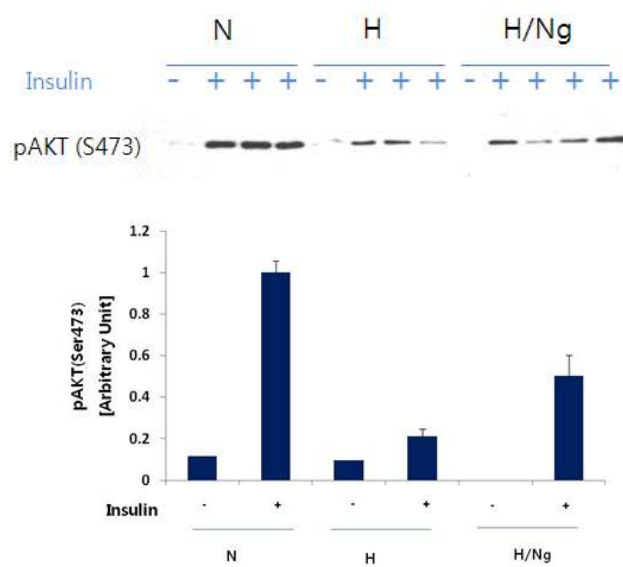


그림 1-35. Akt의 인산화

제 2 절 기능성 제품개발을 위한 기능성 물질 대량 추출방법 개발 연구

1. 서론

세계 감귤 기능성 연구현황을 보면 일본의 감귤류의 항산화 활성에 관한 활성본체 탐색, 감귤 과피추출액으로 혈압강하제(ACE저해제), 혈전용해제, 피부노화억제 및 에이즈 바이러스 증식억제 연구 등이 추진되고 있다

미국의 경우는 이미 많은 감귤류 기능성제품 등이 시장에 출시되어 판매되고 있다. Citrus Bioflavonoids추출물의 식품첨가 관련, 항암, 항바이러스, 항염 및 혈액중의 혈색소 억제,심장병, 뇌졸중 및 혈액 중에 해로운 물질(주로 산소라디칼)의 생성 저해, 나린진이 백혈병 세포를 정상세포로 변화시키는 작용 구명, 헤스페리딘과 리모노이드가 상호작용하여 콜레스테롤 대사(代謝)의 촉진을 통한 심장병예방 효과구명 등의 연구가 이루어지고 있다.

세계 선진국 등지에서는 건강기능성 식품으로 많은 제품이 출시되고 있으며 새로운 적용성 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

우리도 이러한 추세에 발 맞추기 위해서는 기본적인 산업화연구가 추진되어야 한다. 그래서 본 연구가 수행되었다.

2. 대규모 추출을 위한 플랜트 설비구성

기능성 제품개발을 위해서는 효율적인 기기선택 및 설비구성이 매우 중요하다.본 시험에서는 효율적인 설비구성에 의한 설비부분별 추출효율을 검토 검토하기 위해 시험을 수행하였다.

우선 과육의 착즙을 위한 추출기의 선택은 수율향상을 위해 매우 중요하다. 그래서 기능성 추출공장에서 많이 사용되고 있는 착즙기인 유압식, 스쿠류형 착즙기를 이용하여 시험을 수행하였다. 시험결과 스쿠류형 압착기는 과즙률이 49.9%로 유압식 착즙기에 비해 착즙수율이 다소 떨어지는 경향을 보였으나, 시간당 착즙효율이 높아 시간당 많은 착즙량을 원하는 산업화공정에 유리할 것으로 사료 되었다.

표 2-1. 착즙형태별 착즙 효율

착즙기 종류	과육율(%)	과즙율(%)	착즙량(L/hr)	청 정 도
유압식착즙기	79.2	57.7	48	+++ ^z
스쿠류형착즙기	79.6	49.9	114	+

^z 많음:+++, 보통:++, 혼탁:+

본 기능성 추출연구를 위해 제주특별자치도 제주시 삼양동에 위치하고 있는 (주)시트런스 추출공장의 추출장치를 이용하였다. 표 2-1의 물성을 가지고 있는 착즙물을 가지고 기능성 추출

을 위한 장치구성은 아래 그림 1과 같이 하였다.

본 연구에 이용되는 장치는 크게 추출 장치와 농축 및 확인장치로 구분된다. 추출 장치는 착즙 및 여과장치를 이용하였고, 기능성 추출 컬럼 내부에 충전재(SDVB)를 충전시킨 후 조추출물이 주입시 충전재와 플라보노이드의 연속적인 순환에 의해 흡착/탈착이 이루어져 분획이 지속적으로 일어날 수 있도록 대형컬럼의 입구측과 연결시켰고, 시료가 저장된 조추출물 저장조는 플래시 모듈 컬럼(Flash module column)을 이용하였다. 플래시 모듈 컬럼은 입구에 조추출물을 지속적으로 주입하기 위한 조추출물 연속주입기(연속식 syringe)를 장착시킨 후 연속적으로 투입될 수 있도록 하였다. 특히 여과물의 청정도를 유지시키기 위해 저장조와 대형 컬럼 사이에 여과 장치(MF 0.45 μ)를 이용하여 여과 하였다. 그리고 여과액 저장조는 청정도를 유지시키기 위해 실리카가 충전된 Coatec 소재의 여과장치(filter, silica cotec)를 이용 하였다. 대형컬럼의 분리를 위해서는 연속적으로 분광기(230~290nm/spectrometer)를 통과시키면서 확인하고 분획물은 초기 피크가 시작되는 시점에서 끝나는 시점까지 모두 회수한 후 수집부로 보내고 이외의 용매는 반송라인을 통해 다시 최종 멸균장치로 보내도록 하였다.



그림 2-1. 산업화형 기능성추출 모식도

상기 추출 장치로부터 과피 및 과육으로 분리하여 분획된 추출물은 농축 및 중요성분별 분석을 통해 확인을 실시하였다. 1차 추출물은 증발농축기에서 농축시킨 후 동결건조를 실시하였다. 또한 농축물의 변화와 순도검사를 위해 LC/MS를 이용하여 분석하였다. 검토해 본 결과 아래의 그림 및 표에서와 같이 추출 효율을 검토해 볼 수 있었다.

LC 및 LC/MS로 수집된 Chromatograph에서 유효 플라보노이드 함량은 과피농축추출물이 과육농축추출물보다 많은 양이 추출되었다. 또한 성분별 Total Peak의 Area 값을 중심으로 환산한 주요성분의 분포는 과피농축추출물과 과육농축추출물모두 Naringin이 많이 검출되었다. 인체의 유효 흡수형태인 Hesperitin의 경우는 과육, 과피 모두 2% 정도가 검출되었다.

표 2-2. 과육 및 과피 농축추출물의 플라보노이드 함량 분석(10x)

감귤과실부위	Naringin (ppm)	Hesperidin (ppm)	Hesperitin (%)	Nobiletin (%)
과피농축추출물	194.93 (31.16%)	282.36 (19.50%)	2.20	0.61
과육농축추출물	165.85 (17.07%)	85.56 (28.11%)	1.97	0.09

3. 대규모 추출 플랜트 부분별 추출 효율 극대화를 위한 구성요건

산업화를 추진하기 위해서는 대규모 추출 플랜트 부분별 추출 효율의 개선을 통해 추출효율을 극대화시켜야 한다. 우선 착즙초기 원물의 조성조건별 착즙효율을 검토하기 위해 제주에서 재래귤로 인정되어 가장 많이 재식되어 있는 하귤(*Natsudaidai*)과 제주에서 총재배량의 90%로 가장 많이 재배되고 있는 온주밀감(*Miyagawa-wase*)의 미숙과(Immature fruit)를 이용하여 플랜트 부위별 추출효율을 검토하였다.

본 연구는 산업화연구로서 감귤을 이용한 기능성추출 플랜트가 우리나라에서 유일하게 설비되어있는 국립원예특작과학원 감귤시험장의 기술이전업체인 (주)시트런스의 플랜트를 이용하여 시험을 실시하였다. 플랜트 부위 중 가장 초기단계인 착즙기의 추출효율 검토하였다. (주)시트런스의 착즙기는 생산부분에서 가장 좋게 나타난('08 감귤시 시험결과) 스크루형 착즙기가 장치되어있어 이것을 이용하여 착즙효율을 검토하였다. 착즙효율을 검토해 본 결과 착즙수율은 하귤, 온주밀감 청과 모두 과육보다는 과피가 많았다. 이에 대한 원인은 과피를 열수에 침지후 (92℃, 40분) 추출을 실시한 결과로 검토되었다.

표 2-3. 스크루형 착즙기 착즙효율 검토

적용품종		착즙수율(%)
하귤	과육	31.0
	과피(열수추출)*	70.5
청과 (온주밀감)	과육	28.5
	과피(열수추출)	68.5



* 열수처리 후 착즙기이용 추출(총투여량-착즙박잔여)

표 2-4. 열수 추출기 추출효율 검토

적용품종	추출수율(%)	
하골(과육+과피)	70.0	
온주밀감 청과(과육+과피)	68.2	

* 25Kg 기준 설정, 추출온도 : 92℃ × 40분

여과는 잔존물(섬유, 당분 일부)을 제거하기위해 필수적으로 수행되어야 할 부분이다. 본 연구에서 이용된 여과는 감귤의 과육과 과피를 혼합하여 건조시킨 후 열수 추출과정을 통해 생산된 착즙물을 이용하여 추출효율을 검토하였다. 또한 여과기는 UF(Ultra filter)로 구동모터는 5,000rpm으로 처리시 추출물의 온도는 25℃로 조정하여 실시하였다. UF의 가장 중요한 부분인 여과막은 #50,000, #100,000(SK module)을 사용하여 여과효율을 검토하였다.

검토결과 하골, 온주밀감 청과 모두 여과막 #50,000가 시간당 여과수율이 높았다. 이러한 원인은 여과막의 투과공극에 영향을 받은 것으로 사료되고 일반적인 UF처리(잔여물)는 여과막 #50,000가 유리할 것으로 사료되었다.

표 2-5. UF 추출효율

적용품종 및 UF처리		여과량L(수율%)/hr	
하골	UF#50000	17.5(70)	
	UF#100000	15.5(62)	
청과 (온주밀감)	UF#50000	17.0(68)	
	UF#100000	14.5(58.0)	

* 5,000rpm기준, 가동온도 : 25℃

2007년도 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 수행된 연구결과를 보면 플라보노이드는 80% 에탄올에서 SDVB I> LiChrolut(RP-18, EN)> Amberile Xad 순으로 회수율이 높은 결과를 얻었다. 본 연구결과를 바탕으로 SDVB컬럼을 선택해 플라보노이드 순수물을 추출하였다. 본 연구에서 사용된 펌프 조건은 Gradient HPFC Pump로 Flow Rate는 100ml/min(Pressure Limit : 100Psi(7 Bar)로 하고 Solvent Delivery는 Constant Volume(3ml) Electric로 하였다. 검출을 위한 파장조건은 UV Detector(dual wavelength(200-320nm))를 사용하였다. 추출조건은 Fraction modes로 UV Slope 및 Volume, Time에 의한 추출을 실시하였다. 특히 대용량 추출

조건은 Compression Module에 의한 연속식으로 추출하여 효율을 검토하였다.

여과 추출물의 기준을 500ml로 하고 가동시 과즙의 온도를 25℃로 조정한 후 추출효율을 검토해 본 결과 하귤, 온주밀감 청과모두 과피가 추출을 위한 컬럼 수율이 높은 경향이었고 온주밀감 청과보다는 하귤이 추출을 위한 컬럼수율이 높은 경향이였다.

표 2-6. Column(SDVB) 추출효율

적용품종 및 Column		컬럼수율ml(%) / min	
하귤	과육	120(24)	
	과피	130(26)	
청과 (온주밀감)	과육	115(23)	
	과피	120(24)	

* 500ml, 가동온도 : 25℃

동결건조는 제주도 아라동에 위치한 제주하이테크진흥원 공동기기 활용관에 있는 20kg형 Bulk try type(FAST COOLING / FAST DEFROSTING SYSTEM)을 활용하여 추출물의 동결건조효율을 검토하였다. 동결건조수율은 건조량을 총투여량으로 나눈 후 100분율로 표시하였다.

동결건조 수율을 검토해 본 결과 하귤즙은 1.75%, 온주밀감 청과즙은 1.50%의 수율을 보였다.

표 2-7. 동결건조 효율

적용품종 및 Column		동결건조수율(%)	
하귤즙	과육+과피	1.75	
청과즙 (온주밀감)	과육+과피	1.50	

* 20 L기준, 동결건조수율= (건조량/총투여량)*100

최종 추출물을 가지고 감귤에 가장 많이 함유되어 있는 순수플라보노이드중 Narigin+Hesperidin 함량을 검토해 본 결과 하귤은 13.75%, 온주밀감 청과는 17.81%로 하귤에 비해 청과가 많은 양이 검출되었다.

표 2-8. 추출물 플라보노이드 함량(Narigin+Hesperidin)

적용품종	플라보노이드함량%(초기추출물:액상 %)
하귤(과육+과피)	13.75(1.35)
온주밀감 청과(과육+과피)	17.81(1.57)

표 2-9. 온주밀감 청과즙 고형물

과실부 위	당 고형물				산 고형물			
	glucose (%)	fructose (%)	sucrose (%)	soluble solid (°brix)	citric (%)	malic (%)	oxalic (%)	titrated acidity(%)
과육	0.70	0.62	1.39	7.00	2.48	0.17	0.46	2.51
과피	0.74	0.50	0.28	-	0.33	0.78	0.45	-

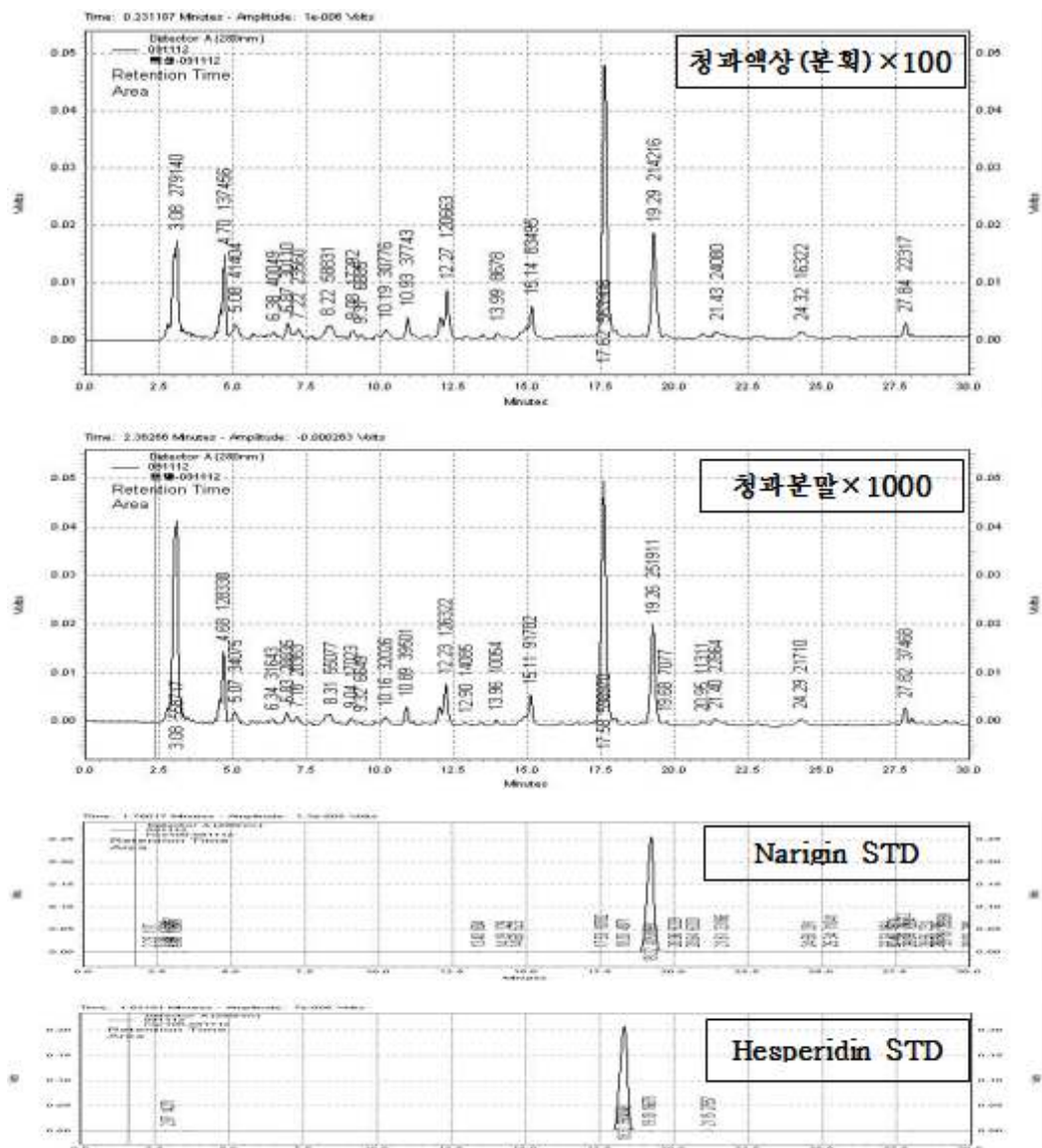


그림 2-2. 감귤기능성물질 대량추출물 Chromatogram



그림 2-3. 감귤기능성물질 대량추출물 시제품

4. 대량 추출물 이용 감귤쌀 제조

지금까지의 연구결과를 바탕으로 산업체 기술이전을 통해 감귤기능성이 코팅된 감귤쌀을 개발하였다. 감귤쌀을 개발한 배경을 살펴보면 감귤류 Flavonoid를 이용한 가공제품의 세계 시장 동향은 각 나라별로 제조 및 유통방법 등에서 상당한 차이를 보이고 있다. 현재 감귤류에서 추출한 기능성물질은 매우 고부가가치로 알려져 있다. 예를 들면 감귤류에서 추출한 고지혈증 치료제인 ‘로바스타틴’의 시장을 보면 2003년에는 100억\$ 시장이 형성되었고 현재는 200억\$ 이상으로 추정되고 있다. 현재 의약품원료로 이용되는 총량을 가격으로 환산해 보면 1억\$의 시장에서 감귤류이용을 10% 점유율로 추정해 볼 때 천만\$ 수준으로 평가 되고 있고 시장점유율도 급격한 증가세를 보이고 있다.

또한 감귤 Flavonoid가 함유된 건강보조제는 세계시장에서 대부분 소규모 업체들에 의해 판매 유통되고 있다. 시장 규모는 판매망이 너무나 혼재되어있어 규모를 한눈에 알 수는 없지만 매우 많은 양이 유통되고 있음이 판단된다. 건강보조제용 원료 단가도 80~180 \$/kg 정도의 높은 가격으로 유통되고 있다. 이러한 고부가가치를 창출키 위해 개발된 감귤쌀은 지금까지의 연구결과를 바탕으로 개발었다. 감귤쌀에 기능성분은 쌀 1g당 약 200~400ppm의 플라보노이드 함유될 수 있도록 코팅시 첨가될 수 있도록 하였다.

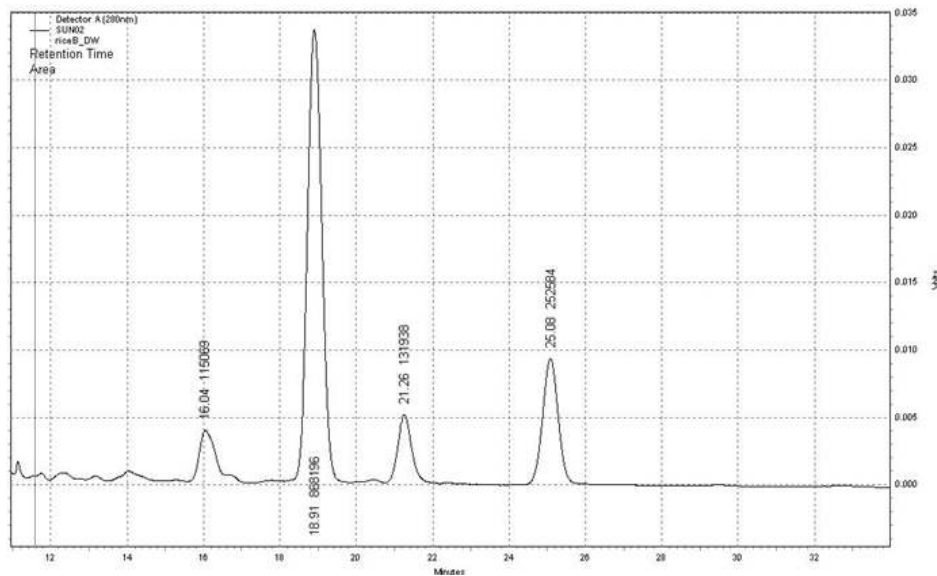


그림 2-4. 감귤쌀의 HPLC 크로마토그램



그림 2-5. 감귤쌀 시제품

5. 순수착즙액 Microfilter를 이용 당 농도 조절 여과법 개선 결과

감귤에 함유된 기능성성분의 체내흡수효율 및 산업화에 적합한 물질로 만들기 위해서는 당제거가 매우 중요한 요인이다. 본 연구에서는 Membrane filter의 MW 에 따른 당성분 cutoff와 발효적 방법적용에 의한 당제거시험을 수행 하였다.

Membrane filter의 MW를 이용하여 cutoff에 따른 당제거 효율 실험 결과, microfilter와 ultrafilter 모두 여과에 의한 나린진 함량 차이는 나타나지 않았으나, 0.45 μ m filter 여과 결과 glucose가 68%의 높은 제거율을 나타내 가능성을 보였다.

표 2-10. 하귤 착즙액의 여과 Mesh별 투과물의 Naringin 함량

처 리		여과 Mesh	
		0.45μm	MW 100,000
Naringin(ppm)	여과액	776.1	993.1
	잔여액	756.5	996.7

표 2-11. 여과 Mesh별 하귤착즙액의 유리당 제거 효율

		여과 Mesh	
		0.45um	MW 100,000
유리당(×100%)	glucose	68.18	42.66
	fructose	37.02	29.74
	sucrose	12.75	20.44

그러나 플라보노이드 38% 함유된 대용량 추출물을 이용해 여과 Mesh별 투과물의 가용성고형물 변화를 검토해 본 결과 여과액에서는 소량이 제거 되는 정도만 보였는데 MW 30,000와 0.45μm에서 0.3°brix 정도가 제거되었다

표 2-12. 대용량 추출물(플라보노이드 38% 함유)의 여과 Mesh별 투과물의 가용성고형물 변화

처 리		여과 Mesh				
		control	MW 30,000	MW 100,000	MW 300,000	0.45μm
Soluble solid (°brix)	여과액	10.1	9.8	9.9	10	9.8
	잔여액	10.1	10	10	10.1	10.1

* 처리시 추출물 온도 : 6℃

보다 정밀한 여과효과를 검토하기 위해 IC(Ion-chromatograph)를 이용해 여과 Mesh별 투과물의 Total sugar의 함량 변화를 검토한 결과에서도 MW 30,000와 0.45μm에서 소량 제거되는 효율만 보였다. 특히 2당류인 Sucrose는 0.45μm에서 소량 제거되는 효율만 보였다.

표 2-13. 대용량 추출물(플라보노이드 38% 함유)의 여과 Mesh별 투과물의 Total sugar의 함량 변화

처 리		여과 Mesh				
		control	MW 30,000	MW 100,000	MW 300,000	0.45 μ m
Total sugar (ppm)	여과액	3056.8	2986.7	3066.2	3010.1	3000.7
	잔여액	3056.8	2977.3	2958.6	2879.1	2968.0

* 처리시 추출물 온도 : 6℃, Total sugar = sucrose+glucose+fructose

표 2-14. 대용량 추출물(플라보노이드 38% 함유)의 여과 Mesh별 투과물의 Sucrose의 함량 변화

처 리		여과 Mesh				
		control	MW 30,000	MW 100,000	MW 300,000	0.45 μ m
Sucrose(ppm)	여과액	1483.6	1471.9	1495.3	1476.6	1446.2
	잔여액	1483.6	1471.9	1338.7	1432.2	1436.9

* 처리시 추출물 온도 : 6℃

HPLC를 이용해 여과물의 플라보노이드 여과정도를 검토해 본 결과 처리모두 여과의 영향을 볼 수 없었다. 본 결과로 여과에 의한 플라보노이드의 증감에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

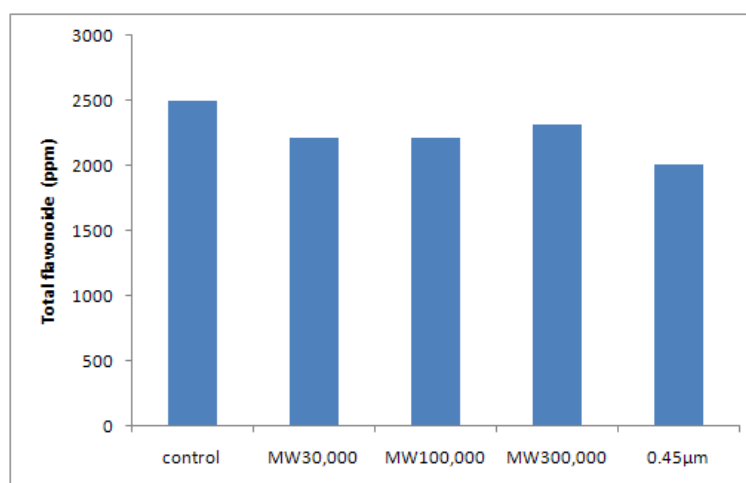


그림 2-6. 대용량 추출물(플라보노이드 38% 함유)의 여과 Mesh별 여과액의 Total flavonoid의 함량 변화

당제거의 효율적인 방법으로 발효에 의해 에너지원으로 당을 사용하고 생성된 알콜은

증류에 의해 제거하는 방법을 적용하여 시험을 실시하였다. 우선 처리시 대용량 추출물(플라보노이드 38% 함유)을 가용성고형물을 기준으로 20°brix로 희석 한 후 감귤시험장 개발균주인 CMY-28(citrus marmelo yeast)을 이용하여 발효를 실시하였다. 시험결과 35시간이 경과되면서 5°brix가 감소되는 경향이였다. 그러나 장기간 발효 시간을 유지시켜 가용성고형물의 감소되는 양을 증가 시키려고 하였으나 100시간 이상소요 되어도 가용성고형물이 감소되는 양은 적었다.

표 2-15. 대용량 추출물에 발효균주(CMY-28) 투여에 의한 가용성 고형물 변화

	투여 후 경과 시간(hour)				
	0	15	20	35	108
가용성 고형물(°brix)	20	17	17	15	14

※ 발효온도 : 30℃

그러나 Total sugar(sucrose+glucose+fructose)를 분석해 본 결과 시험결과 35시간이 경과되면서 Total sugar의 함량이 50%이상이 감소되는 경향을 보였다. 장기간 발효 시간을 유지시켜 본 결과에서도 72%의 가용성고형물의 감소되는 결과를 나타내었다.

표 2-16. 대용량 추출물에 발효균주(CMY-28) 투여에 의한 Total sugar 함량 변화

	투여 후 경과 시간(hour)				
	0	15	20	35	108
Total sugar(ppm)	5131.1	3763.8	3416.3	2530.7	1458.5

※ 발효온도 : 30℃ Total sugar = sucrose+glucose+fructose

Sucrose 함량 변화를 검토해 본 결과 35시간이 경과되면서 함량이 26%가 감소되는 경향을 보였다. Total sugar의 함량이 50%이상이 감소되는 경향과 대비에서는 발효시 2당류인 Sucrose보다 단당류인 Glucose와 Fructose의 이용률이 높아서 발생된 결과로 나타났다.

표 2-17. 대용량 추출물에 발효균주(CMY-28) 투여에 의한 Sucrose 함량 변화

	투여 후 경과 시간(hour)				
	0	15	20	35	108
Sucrose(ppm)	1038.5	933.0	778.6	771.7	562.4

※ 발효온도 : 30℃

대용량 추출물에 발효균주(CMY-28) 투여에 의한 Total flavonoide(Naringin+Hesperidin+Narirutin)의 함량 변화를 검토해 본 결과 35시간이 경과되는 시점에서도 다소 증가되는 경향을 보였으나, 장기간 발효 시간을 유지시킨 결과 Total flavonoide 함량이 14% 감소되는 경향을 나타내었다. 본 연구결과 Total flavonoide 함량이 유지되고 당 제거가 되는 시점은 발효균주(CMY-28) 투여 후 35시간이 적정할 것으로 보였다. 특히 25시간에서 당(Total sugar)은 50% 이상 제거 시킬 수 있을 것으로 보였다.

표 2-18. 대용량 추출물에 발효균주(CMY-28) 투여에 의한 Total flavonoide*함량 변화

	투여 후 경과 시간(hour)				
	0	15	20	35	108
Total flavonoide(ppm)	4970.7	5131.3	5160.5	5155.9	3755.5

※ 발효온도 : 30℃ *Total flavonoide = Naringin+Hesperidin+Narirutin

대용량 추출물의 열풍건조방법별 Total flavonoide함량 변화를 검토 해본 결과 동결건조법, 저온열풍, 자연건조법 모두 Total flavonoide함량 변화가 없었으나 지속적인 90℃이상의 건조시간은 Total flavonoide함량을 감소시키는 원인인 것을 알 수 있었다. 하지만 건조시간 측정은 건조 표면적과 바람의 세기와 상관이 있어 정밀한 측정을 할 수없었으나 동결건조는 200L 처리시 72 시간이 소요되었다.

표 2-19. 대용량 추출물의 열풍건조방법별 Total flavonoide*함량 변화

	건조방법				
	처리전	저온열풍 (60℃)	고온열풍 (92℃)	동결건조	자연건조 25±3℃
Total flavonoide (×10 ppm)	3800.2	3790.3	2931.3	3850.5	3805.1

* 건조 후 원래상태로 수분공급 후 측정, *Total flavonoide = Naringin+Hesperidin+Narirutin

본 연구결과 기술적 측면을 보면 경제적이고 효율적인 대용량 추출법 개발로 산업화에 손쉽게 접근 할 수 있는 기반을 마련 할 수 있었고, 또한 연구결과를 바탕으로 산업재산권 등이 창출될 수 있었다

대용량 추출법을 이용한 다면 감귤의 기능성 물질을 첨가제나 식품으로 이용 가능하여 지역의 관련 업체로 기술이전을 통해 감귤가공 산업 발전에 기여 될 수 있을 것으로 보여진다.

경제적 산업적 측면을 보면 현재 특성없이 생산되는 제주감귤 주스 5만톤을 기능성 주스로 제조시 고 부가가치가 창출 될 수 있는 가능성이 있을 것으로 사료된다(발생수익 1,500억 가능($50,000,000L \times 3,000\text{원}/L = 1,500\text{억}$)).

제 3 절 감귤기능성 제품개발 연구

1. 서론

감귤에는 기능성물질인 플라보노이드가 다량 함유되어 있다. 특히 9월에 수확되는 미숙과에는 완숙과에 대비하여 더욱 많은 양의 플라보노이드가 함유되어 있으며 특히 인체에 흡수되기 좋은 형태의 분자구조를 가지고 있어 기능성음료 개발 등 각종가공 등에 이용이 수월할 것으로 사료된다('98 감귤시험장). 이러한 맥락에서 감귤의 이용성을 증대시켜 감귤소비를 확대 시키고, 기능성 플라보노이드가 다량 함유된 감귤가공품 개발로 기능성 제품의 대량보급을 위한 방향 수립하고자 본연구를 수행하였다. 또한 감귤에 함유되어있는 각종의 기능성 물질을 먹기 좋은 가공품으로 제조하여 제주의 새로운 관광 상품을 창출하고 국민건강에 이바지 하고자 본 연구가 수행 되었다.

본 연구는 감귤기능성 순수물을 얻기 위해 추출되어진 2차 Crude물을 청과음료에 첨가 제조하여 음료로서의 가능성을 타진하였다.

2. 음료설정을 위한 기초 배합비율

가공공장에서 생산된 온주완숙밀감 과피를 이용하여 열수 추출을 수행한 후 이때 발생된 추출물을 UF Φ 0.42 μ m를 통과시켜 여과시킨 후 2차 Crude물을 획득한 후 동결건조를 실시하여 준비하였다. 또한 청과음료 조성은 9월에 수확된 온주밀감 청과를 압착법을 이용하여 착즙을 한 후(여과포:Mono-fila #1000) UF Φ 0.42 μ m를 통과시켜 청징한 청과즙을 획득한 후 여기에 정제수를 첨가하여 청과즙이 30%농도가 이루어 지도록 조성하였다. 30% 청과즙에 2차 Crude물 투여량을 총량의 %로 환산하여 5.0, 7.5, 10.0, 12.5% 수준으로 혼합하였다. 각기 혼합된 혼합물을 섭취가 쉽도록 당산조정을 실시하였다. 당도조성은 Sucrose 50%, Oligo당 50%를 혼합 한 후 혼합물의 당도가 8°brix되도록 혼합물에 투여하였고, 산도조성은 구연산 0.5%가 이루어 지도록 투여하였다(신선도 유지). 이외에 비타민b2, 수크랄로스, 시클로덱스트린등을 소량 투여하여 음료를 만들었다.

위의 조성물을 이용하여 음료를 제조하여 식미조사를 실시한 결과 밀감 2차 Crude물 투여량이 5.0%가 가장 우수한 결과를 도출하였다. 이에대한 원인은 밀감 2차 Crude물의 기본 식미가 플라보노이드의 쓴맛으로 인해 밀감 2차 Crude물 투여량이 적을수록 식미가 양호한 것으로 판단되었다.

표 3-1. 밀감 2차 Crude물 투여량에 따른 기호도 조사(n=10)

밀감 2차 Crude물 투여량 (%/총량)	외관	향기	맛	평균
5.0	4.1	3.8	4.3	4.1
7.5	3.8	4.0	3.6	3.8
10.0	3.8	4.1	3.4	3.8
12.5	3.2	4.4	3.2	3.6

* 5점 척도법기준 : 아주좋다 5, 좋다 4, 보통 3, 나쁨 2, 아주나쁨 1

3. 감귤부위별 이용을 위한 제품품질 평가

본 연구의 수행방법은 감귤의 부위별 동결건조 후 분쇄 한 후 분쇄된 동결건조물(외과피, 알베도, 양낭피, 과육)에 과당, 텍스트린, 구연산 등을 적절한 비율로 배합하여 제조된 분말을 감귤청과 음료에 첨가하여 물성을 검토해 보았다.

표 3-2. 감귤부위별 추출물의 특성검토

감귤부위	혼합비율 (과즙95%기 준)	외관* (혼탁도)	vitamin C (mg/100g)	naringin (ppm)	hesperidin(ppm)	기호도**
외과피	5	++	73.3	1300.4	2403.7	3.9
알베도	5	+++	13.2	1250.3	1910.4	3.2
양낭피	5	+++	12.6	320.5	1202.1	2.9
과육	5	+	21.5	670.1	1520.1	4.1
평균 (총혼합물)			30.2	885.3	1218.3	

* 혼탁도 : 없음-, 보통 +, 탁함++, 아주탁함+++

** 5점 척도법기준 : 아주좋다 5, 좋다 4, 보통 3, 나쁨 2, 아주나쁨 1

감귤 동결건조물(외과피, 알베도, 양낭피, 과육)을 기능성과즙에 첨가하여 제품특성을 검토해 본 결과 혼탁도는 알베도와 양낭피 건조물 첨가가 가장 탁도가 심했다. 비타민C의 경우에는 외과피가 가장 높은 경향이었고 플라보노이드류 중 나라진과 헤스페리딘의 경우에서도 외과피

가 가장 함유량이 많았다. 전체적인 기호도는 과육건조물이 좋았으나 기능성 함유량에서는 외과피에 미치지 못해 금후 기능성 수율증진을 위해서는 외과피의 활용도를 높힐 수 있는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료 되었다.

4. 감귤 음료의 기능성 성분 분석

LC/MS 분석을 통해 감귤 음료의 기능성 성분을 분석한 결과 다양한 종류의 플라보노이드인 rutin, naringin, hesperidin, quercetin, tangeretin의 성분 등이 검출 되었다. 또한 함량도 Total 플라보노이드가 1,000ppm이상 검출되어 기능성 음료로 충분한 가치가 있음을 알았다.

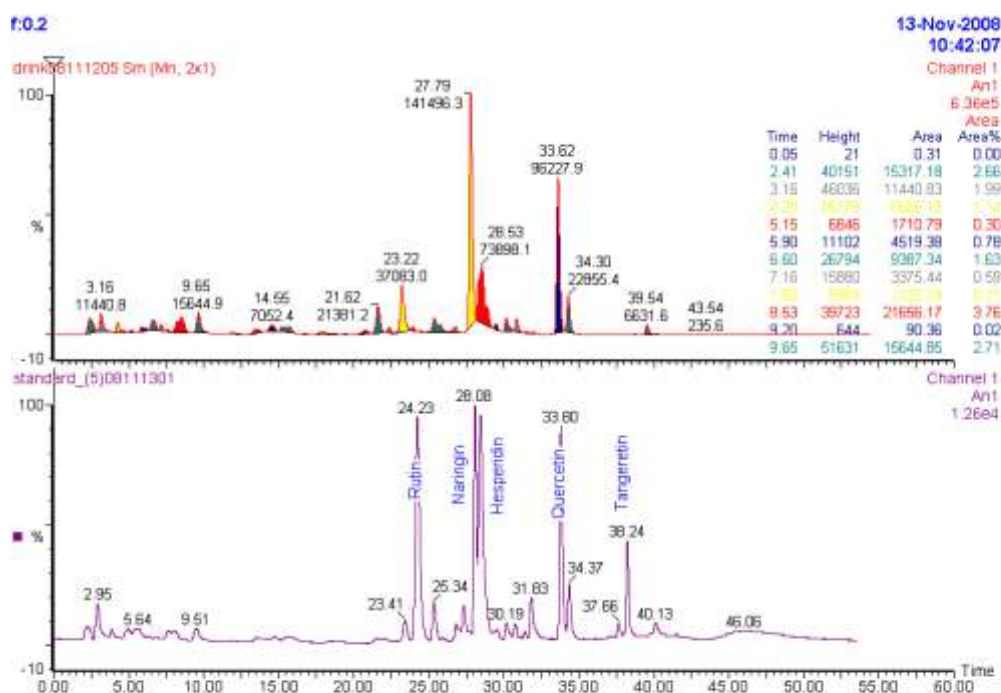


그림 3-1. 감귤 음료의 기능성 성분 분석 크로마토그램.

본 연구를 수행된 결과를 가지고 청과즙과 추출건조물을 이용하여 산업화를 추진할 경우 실용성을 판단해 보면 제주감귤 10만톤 가공시 100% 환원주스 5만톤을 기능성 주스로 제조시 최소 30%의 부가가치가 창출 가능할 것으로 사료되고 발생수익은 175억이 가능 (50,000,000L/1.5L 1병 X 1,750원 X 0.3)할 것으로 보였다.

5. 감귤의 알콜발효 및 초산발효

가. 수행방법

(1) 감귤착즙액의 알콜발효

초기 감귤착즙액의 당도는 11.2 brix, 산도는 0.4%였으며, 알콜발효를 위하여 감귤착즙액은 물과 1:1비율로 희석하여 CMY28 균주(1×10^6 cell/ml)를 접종하였다. 알콜발효는 15℃에서 정치배양하였다.

(2) 초산발효시 첨가되는 기능성성분의 분석

초산발효 과정에서 기능성성분의 변화를 분석하기 위하여 하귤(Natsudaidai)착즙액을 농축하여 HPLC 분석을 하였다. HPLC에 의한 분석을 위하여 SCL-10A controller, SPD-M10A UV spectrophotometric detector, LC-10AT liquid chromatography, FCV-10AL, DGU-14A(Shimadzu Scientific Co., Japan)을 사용하였다. 분석 column은 YMC C18 column(250X3.0mm), 이동상은 0.1% acetic acid/water(A)와 100% MeOH(D)로 표1.과 같은 이동상 조건으로 용출시켰다. 유속은 1ml/min으로 유지하였고 UV 280nm에서 검출하였다.

표 3-3. 기능성 분석을 위한 HPLC 이동상조건

min	B(%)	D(%)
12	60	40
19	60	40
30	0	100
33	0	100
35	80	20

(3) 초산발효를 위한 초산균주 탐색

초산발효를 위하여 감귤과실 착즙액을 자연발효를 통하여 10일 이상 15℃에서 정치배양한 후, 1% Ethanol이 첨가된 *Gluconobacter Oxydans* (10% glucose, 1% yeast extract, 2% , 1.5% agar(pH 6.8)) 평판배지에 도말하여 알콜분해능이 우수한 균주를 선발하였다.

(4) 감귤알콜발효물의 초산발효

알콜발효물은 물과 1:6(v/v)으로 희석하여 최종 알콜농도가 6%, 산함량이 0.4%이 되도록 맞추어고 플라보노이드가 함유되어 있는 하귤추출물을 10%(v/v)첨가하여 초산발효를 위한 감귤액을 준비하였다. 초산발효를 위하여 미생물유전자원은행에서 분양받은 초산균주인 *Acetobacter aceti* KACC11978과 감귤자연발효물로부터 분리한 초산균 SEA623-2균주를 접종하고 15℃에서 기포발생기로 산소를 공급하여 배양하였다.

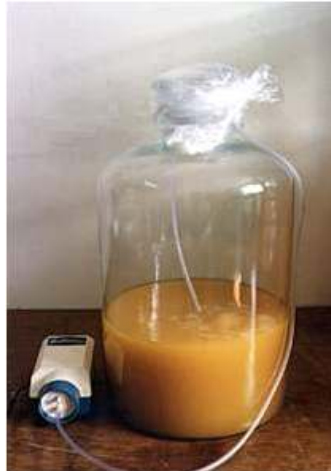


그림 3-2. 호기적조건에서의 초산발효

(5) 감귤알콜발효물을 이용한 감귤식초의 기호도 조사

감귤초산발효물은 5%당을 포함하는 탄산음료와 1:4(v/v)으로 희석하여 감귤식초 음료를 제조하였다. 감귤식초의 관능검사를 위하여 20대 남, 여 대학생 40명을 대상으로 감귤식초에 대한 맛, 향기, 색, 감촉에 대한 기호도를 조사하였다.

나. 시험결과

(1) 감귤착즙액의 알콜발효

- CMY28을 접종한 감귤착즙액은 7일 후, 알콜함량이 16%, 산도가 0.7%였다.



그림 3-3. 감귤착즙액의 알콜발효

(2) 초산발효시 첨가되는 기능성성분의 분석

- 초산발효시 기능성성분 첨가를 위하여 하귤추출물을 농축하여 분석한 결과 Naringin, Rutin등 1000ppm의 플라보노이드를 함유

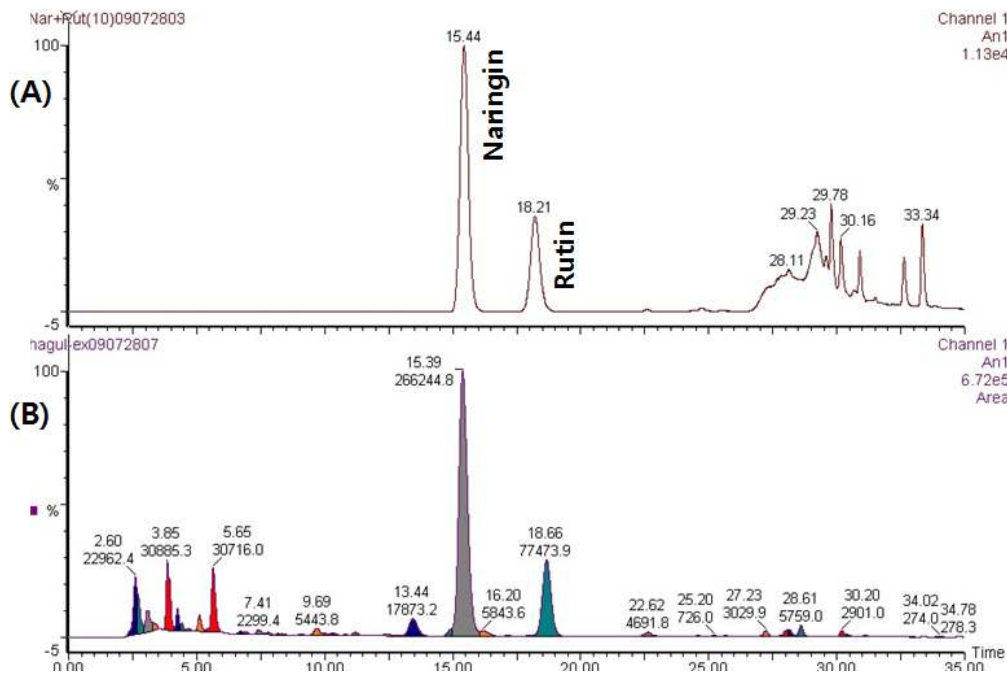


그림 3-4. 기능성성분 첨가를 위한 하갈추출물의 HPLC 크로마토그램
(A), Standard; (B) Natsudaiddai juice

(3) 초산발효를 위한 초산균주 탐색

감귤과실 착즙액을 자연발효액을 알콜이 함유된 *Gluconobacter Oxydans* 평판배지에 도말하고 투명환을 형성하는 12개의 단일 콜로니를 분리하였다. 분리균주 중 미생물배양체에서 식초향이 강하게 나타나는 SEA623-2균주를 감귤초산발효에 접종하였다.

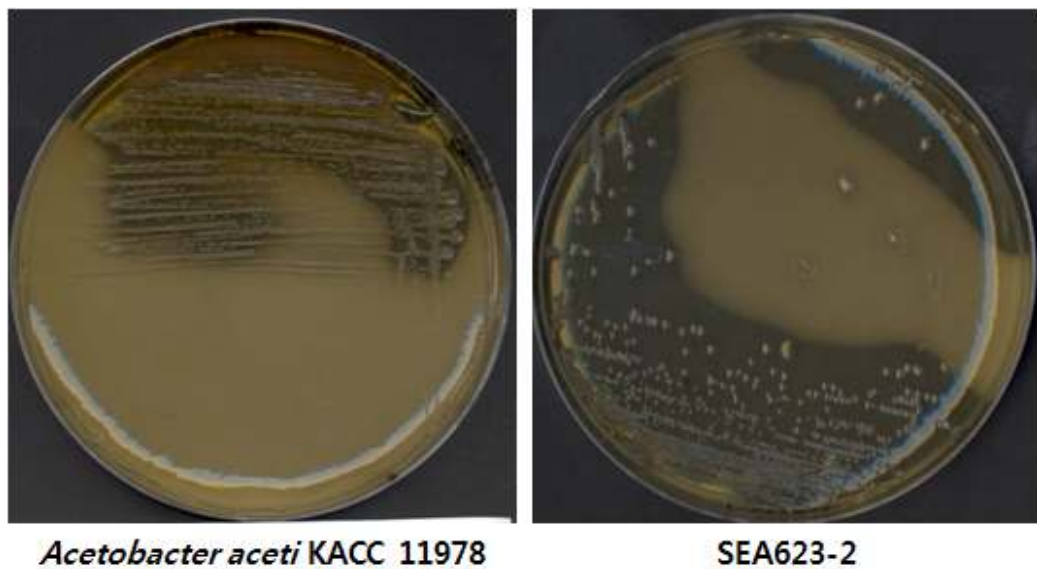


그림 3-5. 초산균주인 *Acetobacter aceti*와
감귤자연발효물로부터 분리한 알콜분해균주 SEA623-2

(4) 감귤알콜발효물의 초산발효

초산발효 배양일에 따른 발효물의 알콜함량은 공시균주인 KACC11978과 감귤발효액으로부터 분리한 SEA623-2와 큰 차이를 보이지 않았고, 10일 이후로 알콜함량이 1% 이하로 낮아졌다.

공시균주 KACC11978에 비하여 SEA623-2 균주의 산 생성속도는 3일 정도 느리지만 최종 산 생성량은 큰 차이를 보이지 않았다.

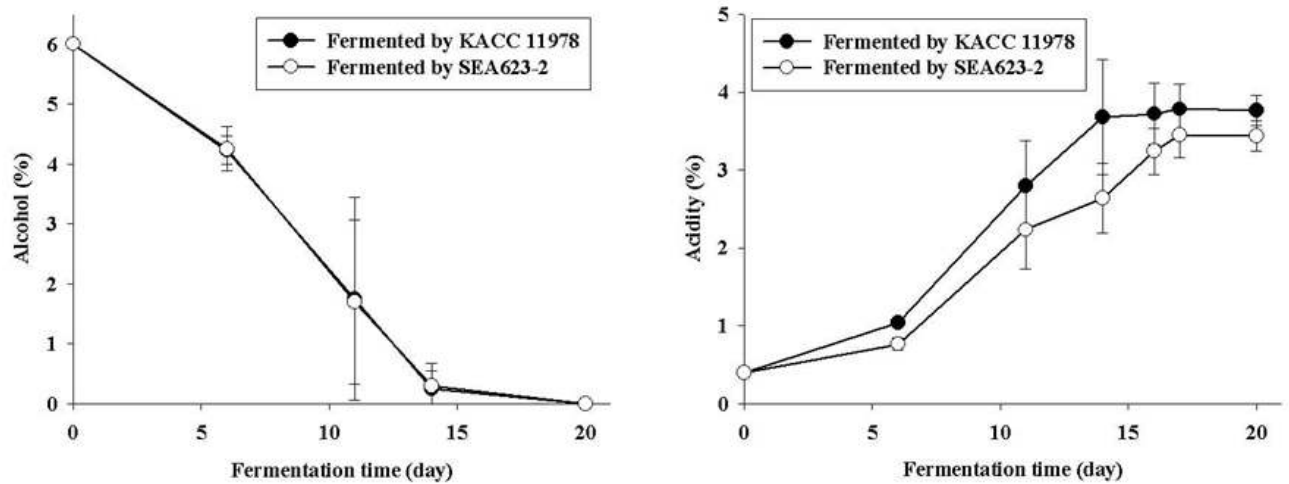


그림 3-6. 배양일에 따른 감귤 초산발효물의 알콜 및 산 함량변화

(5) 감귤초산발효물의 기능성성분 함량 변화

초산발효 배양일에 따라 감귤초산발효물의 기능성성분 중 배당체 형태의 naringin과 hesperidin의 함량이 감소하게 무배당체 형태의 naringenin과 hesperetin의 함량이 증가하였다.

SEA623-2균주에 의한 초산발효시 배당체형태의 naringin이 무배당체 형태의 naringenin으로의 전환속도가 공시균주에 비하여 매우 빠르며, 당분해효율이 좋았다.(그림 3-7, 8)

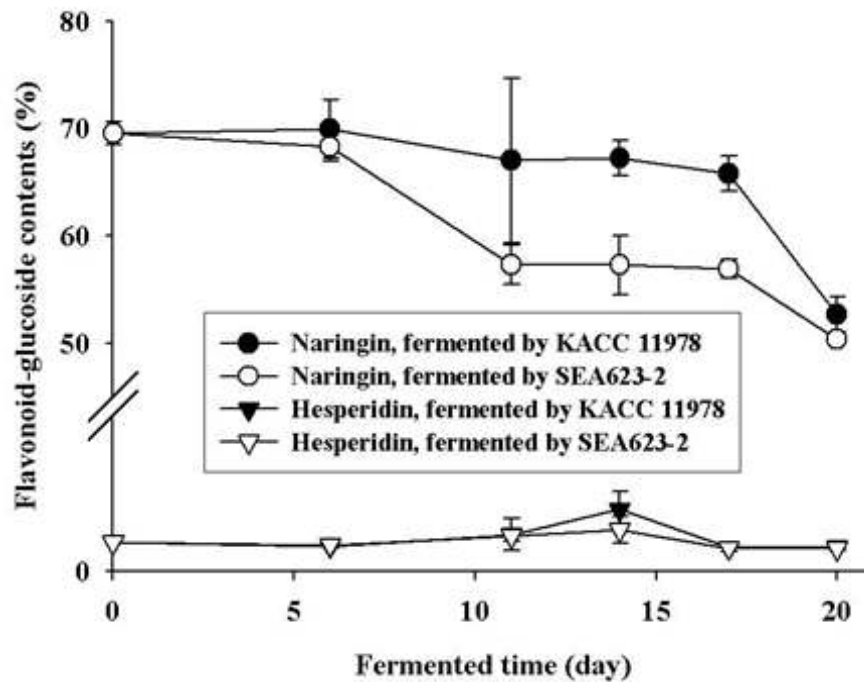


그림 3-7. 배양일에 따른 감귤 초산발효물의 naringin과 hesperidin 함량 변화

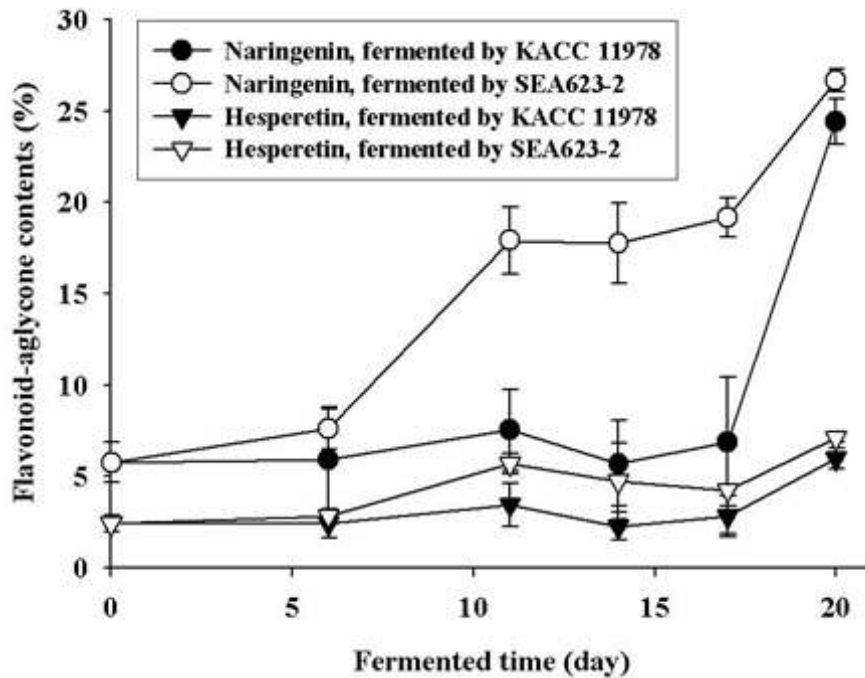


그림 3-8. 배양일에 따른 감귤 초산발효물의 naringenin과 hesperetin 함량 변화

(6) 감귤초산발효물을 이용한 감귤식초의 기호도 조사

전체적으로 SEA623-2를 이용하여 만들어진 감귤식초는 맛과 향 등 전체적으로 안정적인 기호도 분포를 나타내었다.

SEA623-2균주의 감귤식초는 맛과 향기에 대하여 47%가 좋다(4점 이상)는 기호도를 나타낸

반면, 공시균주 KACC11978균주의 감귤식초는 맛과 향기에 대해 27%와 15%만이 좋다(4점 이상)고 하였으며, 맛과 향기가 나쁘다고 표현한 사람이 SEA623-2 감귤식초에 비해 2.5배 이상 많은 것으로 나타났다.

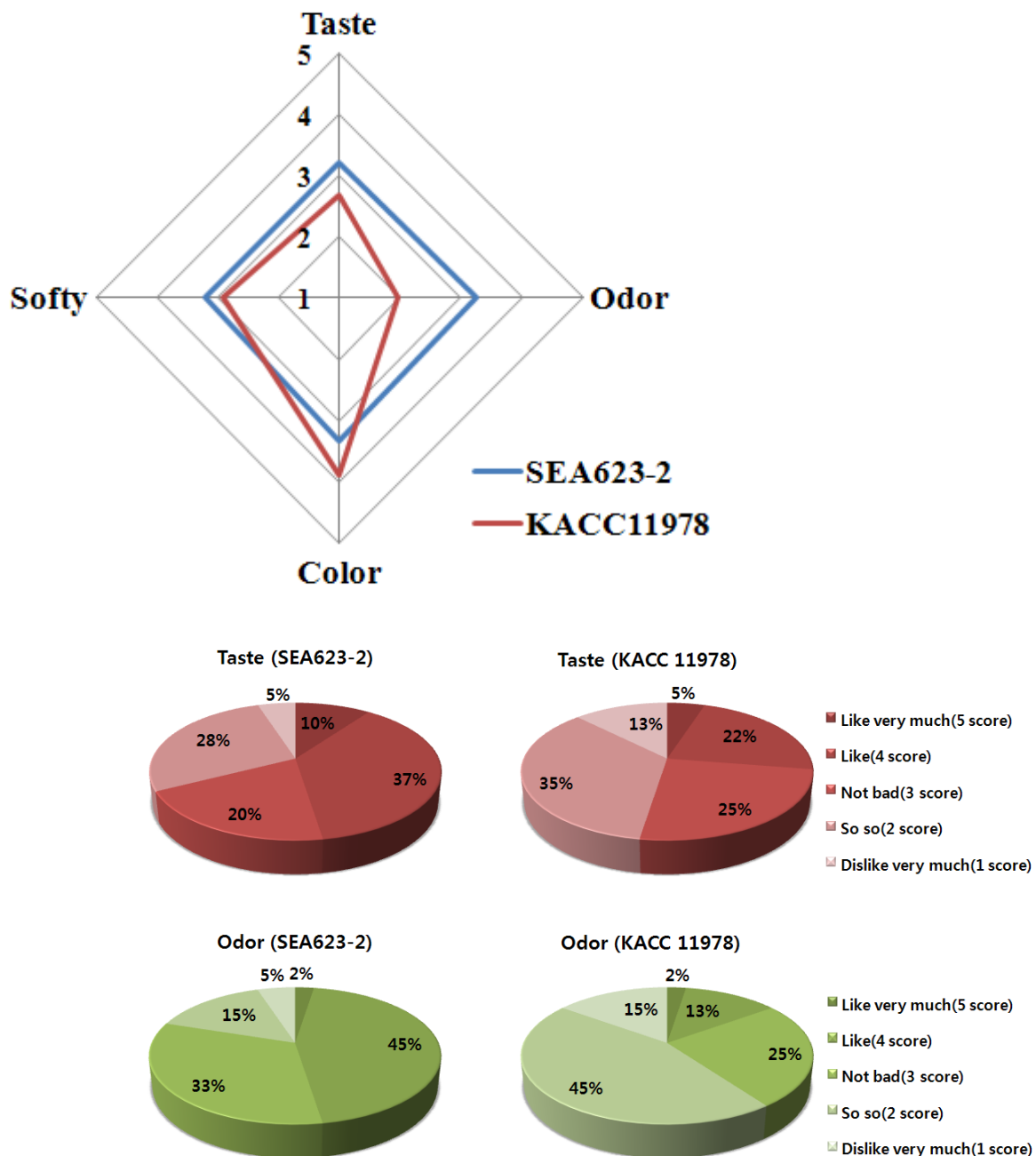


그림 3-9. 감귤식초음료의 기호도 조사

6. 감귤 발효식초의 제품개발

가. 감귤 발효식초를 첨가한 병조림의 제품개발 : 고온단기간 살균(HTST)법 사용



그림 3-10. 고온단기간 살균 (HTST)과정

(1) 감귤초 고등어 병조립 개발: 고등어살을 감귤발효식초에 넣고 75℃에서 15초간 순간 살균을 시킨 후 생선 병조립으로 제조



그림 3-11. 감귤초 고등어 병조립

(2) 감귤초고추장의 개발 : 고추장을 감귤발효식초에 넣고 75℃에서 15초간 순간 살균을 시킨 후 감귤 초고추장으로 제조



그림3-12. 감귤초고추장 병조립

(3) 감귤초 다시마 병조림 개발 : 다시마를 감귤발효식초에 넣고 75℃에서 15초간 순간 살균을 시킨 후 다시마 병조림으로 제조



그림 3-13. 감귤초 다시마 병조림

(4) 감귤초 파래김 병조림 개발 : 파래김을 감귤발효식초에 넣고 75℃에서 15초간 순간 살균을 시킨 후 파래김 병조림으로 제조



그림 3-14. 감귤초 파래김 병조림

(5) 감귤초 미역 병조림 개발 : 미역을 감귤발효식초에 넣고 75℃에서 15초간 순간 살균을 시킨 후 미역 병조림으로 제조

→ 얼음물로 4-5배 희석하면 여름철 냉국 또는 냉국수 국물 등 인스턴트 식품으로 활용이 가능하도록 개발



그림 3-15. 감귤초 미역
병조림

나. 기호도 조사



그림 3-16. 기호도 조사

번호	품목	기호도	비고
1	감귤초 고등어 병조림	3.57	- 참여인원: 총 7명 (남자5명, 여자2명) - 특히 감귤초고추장은 호응도가 좋았음
2	감귤초고추장	4.71	
3	감귤초 다시마 병조림	3.29	
4	감귤초 파래김 병조림	3.57	
5	감귤초 미역 병조림	3.57	

※ 기호도 : 1(아주나쁨), 2(나쁨), 3(보통), 4(좋음), 5(아주좋음)

제 4 절 감귤 부산물 이용방법 연구

1. 감귤과피의 효율적 분해 방법 설정

가. 과피 분해를 위한 효소선발 및 처리

제주에서는 매년 감귤박이 5만톤 이상 생산되고 있다. 그중에서 2/3이상이 감귤과피박으로 이에대한 처리가 매우 절실하다. 특히 런던협약에 의거 2012년 부터는 공해상 투기가 금지되어 이에 대한 처리방법이 조속히 마련되지 않는다면 매년 10만톤에 달하는 감귤가공물량의 처리가 어려워 생파에까지 영향을 미칠 수 있다. 본 연구는 이러한 문제를 해결하기위한 다각적인 방법을 모색키 위해 수행하였다.

본 연구에서는 감귤과피의 효소처리에 의한 기능성물질 추출 및 산업적 이용을 위해 실시하였다. 또한 고형상태의 감귤과피를 상업적으로 다양한 이용도 제고를 위해 효소에 의한 분해방법을 이용하였다.

본 실험에서는 AMG 300L (Novo Nordisk Co., Denmark), Pectinex 100L (Novo Nordisk), Viscozyme (Novo Nordisk) 및 Celluclast 1.5L등을 사용하였으며, 각 효소의 특징은 다음과 같다. 또한, 사용된 당 분해효소들은 국내 식품첨가물 공전, FAO/WHO, JECFA, 그리고 FCC 의 식품용 효소 규격에 적합한 것이다.

표 4-1. 공시효소 특성

	Pectinex 100L	Viscozyme L	AMG 300L	Celluclast 1.5L
Source	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
Character-ization	pectolytic enzyme (pectintranseliminase, polygalacturonase, pectinesterase)	multi-enzyme complex(arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase)	1,4- α -D-glucosidase (glucoamylase)	cellulase(the breakdown of cellulose into glucose, cellobiose and higher glucose polymers)

선발 분해효소의 세부특성을 보면 **Pectinex 100L**는 높은 pectolytic enzyme 활성을 갖고 있으며, *Aspergillus niger*에서 유래하는 효소이다. **Pectinex 100L**는 pectintranseliminase, polygalacturonase, pectinesterase등을 포함하며, hemicellulase와 cellulase의 낮은 활성도를 갖음. 표준활성도는 5,000 FDU 55℃/ml pH4.5와 55℃ 온도에서 최대 활성을 보이고 있다.

Viscozyme L은 multi-enzyme complex로 arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase를 포함하는 carbohydrase로 *Aspergillus aculeatus*에 유래하는 효소로 활성은 100FBG/g 으로 FBG는 Fungal β -glucanase unit을 기준으로 하고 있다. 적정 활성조건은 pH3.3 ~ 5.5이며 25 ~ 55 ℃이고 식물의 세포벽을 파괴하고 식물 체내의 유용 물질을 추출하는 과정에 착즙

수율 향상에 유용하게 쓰일 수 있다.

AMG 300L은 *Aspergillus niger* 유래의 효소로 Panose나 Isomaltose를 형성하는 Transglucosidase 활성은 없으나, 1,4- α -결합 뿐만 아니라, 1,6- α - 결합도 분해하여 포도당 생성한다. 역가는 300AGU/ml이며 AGU는 pH4.3과 25℃ 조건에서 분당 1 μ mol의 Maltose를 분해하는 효소의 양으로 정의된다. pH4.5에서 60℃에서 최적활성을 나타낸다.

Celluclast 1.5L는 *Trichoderma reesei*로부터 유래하고 있다. 효소에 의하여 cellulose로부터 glucose, cellobiose 그리고 glucose polymer로 분해함. 섬유질 성분을 용해시켜 점성을 낮춰주는 효과를 보인다. 역가는 700EGU/g이며 EGU=Endo-Glucanase Units. pH 4.5 ~ 6.0 와 50 ~ 60℃ 온도에서 안정된 활성을 보인다.

나. 분해효소를 이용한 감귤과피의 처리

분해효소배양 조건은 증류수에 20%의 감귤과피를 첨가하여 블렌딩하고 각각의 당분해효소를 5% 함량으로 첨가하여 50℃에서 2일간 배양하여 배양액의 성분변화를 분석하였다. 또한 분해효소 함량에 따른 처리는 증류수에 20%의 감귤과피를 첨가하여 블렌딩하고 당분해효소를 1%, 2%, 5%, 10% 함량으로 첨가하여 50℃에서 2일간 배양하여 배양액의 성분변화를 분석하였다.

표 4-2. 효소활성 조건

	Pectinex 100L	Viscozyme L	AMG 300L	Celluclast 1.5L
pH	4.5 ~ 5.0	3.3 ~ 5.5	4.5	4.5 ~ 6.0
temp.(℃)	55	25~55	60	50 ~ 60

다. 감귤과피 효소처리물의 분석

효소 전처리액으로부터 감귤의 주요 생리활성 성분인 flavonoid의 함량을 비교하기 위하여 동량의 Buthanol(BuOH)을 첨가하여 2시간 동안 초음파로 추출한 뒤, 진공건조기로 건조하였다. BuOH 추출물은 Methanol에 현탁한 후 일정량을 취하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 추출액에 함유된 flavonoid 성분을 분석하였다. HPLC에 의한 분석을 위하여 SCL-10A controller, SPD-M10A UV spectrophotometric detector, LC-10AT liquid chromatography, FCV-10AL, DGU-14A(Shimadzu Scientific Co., Japan)을 사용하였다. 분석 column은 YMC C18 column(150X6.0mm), 이동상은 0.1% acetic acid/water : 0.1% acetic acid/acetonitrile(70:30)로 용출시켰다. HPLC 분석에 사용된 모든 용매는 J. B Baker사의 HPLC용 용매를 사용하였다. 유속은 0.5ml/min으로 유지하였고 UV 254nm에서 검출하였다.

표 4-3. 분해효율

	Pectinex 100L	Viscozyme L	AMG 300L	Celluclast 1.5L
standard activity	5,000 FDU/ml	100FBG/g	300AGU/ml	700EGU/g

* FDU = measuring the depectinization of apple juice

* FBG = Fungal β -glucanase unit

* AGU = the amount of enzyme which hydolyzes 1 μ mol maltose per minute

* EGU = Endo-Glucanase Units

라. 당분해효소를 이용한 감귤 배양액 내의 flavonoid 분석

당분해효소를 처리하여 감귤과피내에 존재하는 flavonoid 중에서 다양한 생리활성을 갖는 무배당체 형태의 flavonoid의 함량 변화를 확인하기 위하여 표준 시료로 naringenin (Sigma Co., USA)과 hesperetin (Sigma Co., USA)을 구입하여 위와 같은 HPLC 조건에서 분석하였다. HPLC 검출기를 통해 얻은 flavonoid의 농도에 따른 peak의 면적을 측정하여 분석한 시료의 수치와 비교하여 그 함량을 환산하였다.

그 결과, 효소처리를 하지 않은 감귤추출액에 비하여 당분해효소를 처리한 배양액에서 4배 이상의 naringenin, hesperetin 함량의 증가를 보였으며, Pectinex 5XL과 Viscozyme L을 처리한 배양액의 경우에는 가장 높은 전환율을 보였고 분해효소에 대한 분해율은 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 공정에 의하여 감귤로부터 유효물질인 naringenin과 hesperetin을 대량으로 얻을 수 있다.

2. 분해시 생성물질검색을 통한 가축질병예방용 사료 첨가제 가능성 검토

(미생물생성물에 대한 항균활성검토)

가. Disc Diffusion Test

감귤시료는 감귤과피 동결건조 후 powder로 만들어 사용하였고, 당 분해효소 (Glucosidase)는 Novozyme사의 A(AMG), V(Viscozyme), P(Pectinex), C(Cellulclast), CT+C(Control)를 사용하였다.

효소처리 조건은 10% 감귤(20g/200ml)과 5% enzyme을 멸균수에 희석하였고, 대조군(Control)은 효소를 처리하지 않고 10% 감귤(20g/200ml)만 멸균수에 희석하여 반응시켰다. 또한 효소처리 반응은 55℃, 150rpm 진탕배양기에서 24시간 배양하였다.

나. Disc Diffusion test를 통해 감귤류의 항균효과 확인

본 연구에 이용된 세균은 축산물 잔류 검사시 자주 검사하는 대상 선발하여 고형의 Mueller-Hinton배지에 각 세균들을 도말하였다. 대상균주는 *E. coli*, *Bicillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*로 하였고, 시료는 A, V, C, P, CT+C로 정하여 도말하였는데, 시료를 disc에 적신 후 건조하여 도말된 세균 culture dish에 올려두고 24시간 배양한 후 세균의 성장억제 정도 평가하였다. 시험결과 모든 시료가 4종의 세균에 대하여 억제효과를 나타내지 않았다.

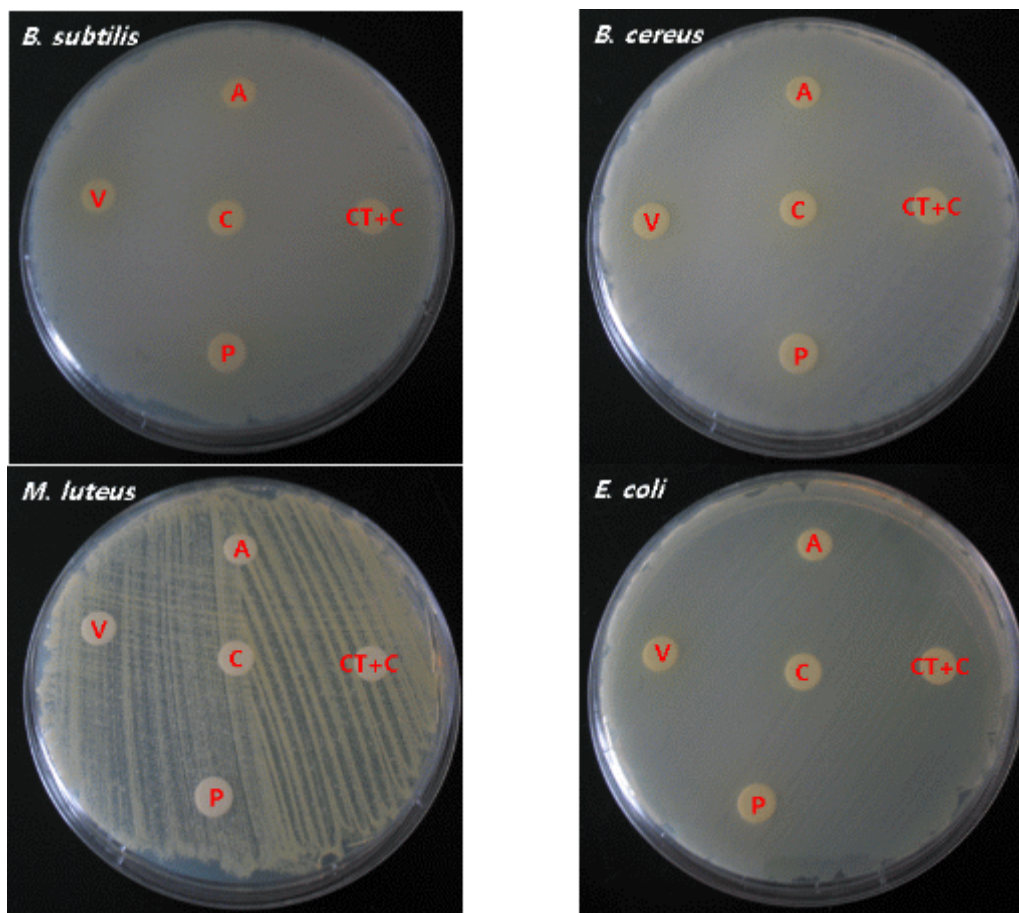


그림 4-1. Disc Diffusion test

3. 대용량발생 부산물의 이용성 검토와 효율적 처리방법

가. 처리공정별 바이오연료로의 이용성 검토

금 후 대용량 감귤박이용에 고려되고 있는 메탄 및 에탄올발생 시스템은 착즙박 Pulp에 함유된 높은 당분함량 및 수분함량의 효율적 이용과 경제성 측면에서 에너지사용효율이 중요하다. 효율적인 알콜생산이 가능한가를 검토를 위해 감귤박 착즙액 당 농도별 알콜 발생효율을 검토해 본 결과 8일에서 기대 수치인 당 농도의 50% 알콜생성이 이루어 졌다.

표 4-4. 감귤박 고형물

과실부위	당 고형물				산 고형물			
	glucose (%)	fructose (%)	sucrose (%)	soluble solid (°brix)	citric (%)	malic (%)	oxalic (%)	titrated acidity(%)
과육	1.48	1.54	2.50	10.0	0.68	0.16	0.39	0.73
과피	2.93	2.49	1.34	-	0.17	0.82	0.42	-

표 4-5. 감귤박 착즙액 당 농도별 알콜 발생효율

착즙액 당조성(°brix)	알콜 발생량(%)						
	4*	6	8	10	12	14	16
5	0.01	1.5	2.2	2.6	2.6	2.4	2.4
10	0.01	2.7	5.4	5.4	5.5	5.4	5.2

* 발효 일수



그림 4-2. 좌:에탄올 및 메탄 발생장치, (우)메탄가스 포집장치

나. 대규모 감귤박 처리를 위한 전처리 공정의 효율적 운영방법

대규모(3,000ton/1회) 감귤박처리를 위해 제주도 서귀포시 한남리에 설치된 연간 50,000ton 규모의 감귤가공공장을 대상으로 현지조사 및 시험을 수행하였다. 현재 생산되고 있는 감귤pulp 압착박을 효율적으로 분해하기 위해 원상태 자체로 반응조(소화조)에 투입해 본 결과 감귤박의 물성과 성상으로는 소화공정을 진행시키기 어려운 조건을 가지고 있었다.

표 4-6. 감귤가공시 발생 부산물 및 탈리액 발생량

	발생량(ton/day)		
	Dry matter	Water	Total
발생되는 부산물량	30	170	200
탈리액 발생량	30	135	165
탈리액 이용 시설요구량	200 m ³ /day(working volume 82.5%)		

특히 감귤박은 고형분 함량이 매우 높아서 소화조내에서 내용물의 균일한 혼합이 어려워 쉽게 섞이지 않는 문제가 발생하였다. 현재공정에서는 일반적으로 가수가 필요하며, 가수용 물은 증발 농축기의 응축수 및 방류폐수 재이용 등을 고려할 필요가 있었다.

가수율(Pulp압착박 : 물) 1 : 2 - 감귤pulp 침출탱크(유기물 extraction)
 전체용량 600~800 m³/day(200ton/1일 기준)

다. 대규모 처리공정 운전에너지 효율을 최적화

Pulp박에 함유된 당성분(Brix 10% 정도)을 최대한 추출한 후 탈수시스템(Decanter)을 도입하여 탈리여액은 혐기성소화공정의 유기물원으로 사용하고, 여과박(함수율 65% 정도)은 건조기에서 혐기성시스템에서 발생된 steam을 재이용하여 건조함으로서 전체적인 시스템운영의 경제성과 운전에너지 효율을 최적화 시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

- 탈리여액 volume추정량(Pilot 65% 함수율 기준): 탈수기의 효율(여과박의 함수율)에 따라 450 m³/day로 예상(혐기성소화조(메탄발효) 운전시스템의 원폐수)



그림 4-3. 감귤여과박처리공정(Pilot)

라. 대규모 감귤박 처리용 혐기성소화조의 고효율 방안

처리액의 유동성 및 고형분함량 최적조건 방안으로는 Pulp박/물의 가수율, 오염부하농도, 고형분함량, 소화공정 온도조절, 처리기간 등의 적절한 조정이 필요할 것으로 사료되었다.

마. Pilot시스템 운영결과 전체 시스템의 설계시 고려사항

당성분 추출을 위한 탱크의 구조 및 균일한 반응을 위한 교반시설을 혼합액의 탈수시스템(고형분함량)설치가 필요하고 소화공정 온도유지를 위한 Energy원 제공 (고온소화 50~55도, 중온소화 30~37도)이 필요 한 것으로 고려되었다. 유입 및 반출을 위한 이송설비가 필요하고, 유기물분해에 의해 생성되는 메탄가스의 처리 시스템 (CH₄ Steam 재이용 시스템)이 필요한 것으로 검토되었다.

※ Decanter를 통과한 탈리여액의 고형분함량이 혐기성시스템의 Type을 결정하는 중요한 factor로서, Solid함량이 높으면 Digester(소화조)를 사용하고 Solid함량이 낮으면 UASB type을 사용함.

Decanter 사용시 분리고형분 함수율 : 60~65%

※ 통상의 소화조는 고온소화(운전온도 50~55도, 체류기간 15~20일)와 중온소화(운전온도 30~37도, 체류기간 30일 이상)가 있으나 당 프로젝트의 경우 중온소화의 적용은 경제성이 없다고 판단됨.

※ 고온소화의 경우도 Energy 투입비용이 매우 높아 이로 인한 시스템 전체의 경제성 검토가 필요함.

※ UASB reactor는 중온소화(운전온도 30~37도, 체류기간 약 1일)에서 운전되므로 반응조의 크기가 상대적으로 작아 소요부지 및 투자비가 적으나, solid제거를 위한 전처리시스템의 고려가 필요할 것으로 사료되었다.

원심분리조 공정의 최적화는 체(Mesh)입자들을 포착하기 위해서 필요한 정제영역이 필요하고 고형물 이송을 위한 보울과 스크롤 사이의 속도차이를 명확히 해야하며, Decanter drum내부의 난류를 최소화 할 수 있는 유체역학적인 설계가 이루어 져야 할 것으로 보인다. 여기에 고형물의 효율적인 이송이 중요한 컨베어 비치(beach)의 설계가 이루어 져야 할 것으로 보인다.

표 4-7. 원심분리조(Decanter) 이용시 건조물 수율

	1일가동량(ton/day)		
	투입량	수분제거량	고형분
감귤고형물(1차고온건조후)	80	20	60
감귤건조물(함수율 10%기준)	32	20	12
		37.5	

4. 분해시 생성되는 부산물 이용을 위한 시스템 제안

○ 감귤Pulp박의물성특성으로는 적절한 교반이 가능한 유동성(가수)을 확보한 후, 당분을 최대한 추출하고, 재차 고액분리(Decanting)를 하여 탈수박을 분리하고, 고농도여액을 혐기성메탄발효공정에 투입, 생산된 biogas를 재이용하여 전체적인 경제성을 도모하여야 할 것으로 판단됨.

○ Decanter에서 pulp는 최대한 함수율이 낮은 조건으로 분리하여 건조기의 경제성을 높여야 함.

○ 감귤pulp박의 처리공정에서 혐기성소화공법을 도입하여 운영시 경제성에 도움 될 것으로 사료됨.

○ 감귤박의 저장성(산도vs부패성) 및 저장용기의 장기간 확보가 가능할 경우, 일반기업 감귤농축공장의 감귤Pulp박 위탁처리가 가능하여 가동율 증대 및 에너지 수익원 확보

- 제주도내에서 수거 및 통합 관리체계가 가능한 고농도 유기성폐수의 위탁 처리.

(2012년 Sludge해양투기 부분 규제의 사전대비 및 위탁처리비 증가에 대한 대응)

○ 가축분뇨 처리공정의 특정 process단계에 메탄발효를 활용하여, 생산되는 Bio-gas는 plant용 Energy원으로 재이용.

- 메탄발효 후 처리액에 대한 비료특성은 비교적 양호할 것으로 예측됨

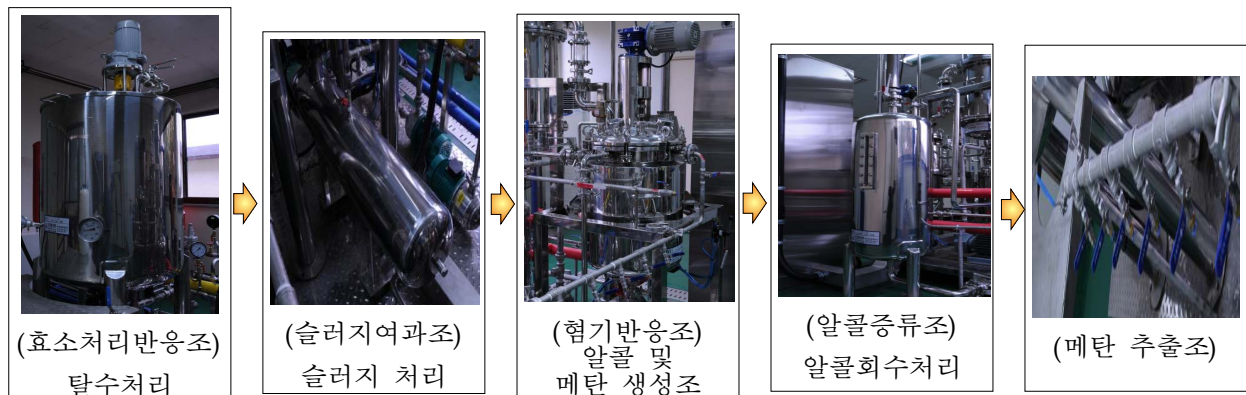


그림 4-4. 부산물 이용 Flow chart



그림 4-5. 부산물 이용 System

5. 감귤 부산물의 효율적 이용을 위한 단백질 발효법 적용성 검토

○ 효소 처리된 감귤 부산물의 단백질 발효 효율 확인

- 효소 처리를 통해 비상품 감귤을 분해하여 농도 50%의 감귤 배지를 만들고, 여기에 1%의 신균사체(E-1)를 접종하여 2주 동안 배양해 본 결과, E-1은 일정한 pH(6.53)를 유지하도록 하였으며, 배양 기간이 경과할수록 성장된 E-1의 wet weight은 꾸준히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 배양 10일 이후에는 wet weight가 100g/L를 넘어섰으며 배양하는 2주 동안 E-1은 감귤 배지에서 꾸준히 성장해가는 것을 확인할 수 있었다. Dry weight 또한, wet weight와 같이 일정하게 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 효소 처리를 통해 만들어진 감귤 배지를 통해 균사체를 성장시킬 수 있으며, 생성된 균사체를 이용해 동물 사료 등으로 활용할 수 있을

것으로 전망된다. 앞으로 E-1을 비롯해 다양한 균사체를 적용한다면 감귤 부산물은 단백질 발효법을 통해 동물 사료 등으로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

표 4-8. 시간 경과별 E-1균사체의 성장 정도

TIME(day)	pH	Wet Weight(g/L)	Dry Weight(g/L)
2	6.6	2	0.14
4	6.51	21	0.51
6	6.48	46	1.40
8	6.35	88	2.01
10	6.32	107	2.86
11	6.28	118	2.95
12	6.24	129	3.12
14	6.21	151	4.01
15	6.19	148	3.95

(※ medium : 50% 감귤배지(250ml/1L flask) + 1% 접종, cond. : 25°C incubation, 100 rpm)

- 감귤 부산물의 효소처리를 통해 만들어진 감귤배지를 이용해 보다 성장속도가 빠른 E-2 균사체를 배양하였다. 배양 기간이 약 10일 경과하였을 때, 기존의 E-1 균사체보다 약 두 배 이상 빠르게 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 배양 기간이 약 10일 경과하는 동안 pH는 평균 6.31 정도로 일정하게 유지하였으며, E-2 균사체의 성장은 wet weight와 dry weight 모두 활발하게 이루어지는 것을 알 수 있다. 그리고 단백질 성분 함량을 확인하기 위해서 Bradford assay를 통해 성장 시기별 E-2를 검정해 본 결과, 약 3mg/ml 정도의 조단백질을 일정하게 함유하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 배양된 E-2 내에서는 일정한 양의 조단백질을 함유하고 있기 때문에 감귤배지를 통해 꾸준히 성장시킨다면 이를 동물 사료 등으로 활용할 수 있는 좋은 단백질 공급원이 될 것으로 기대된다. 그리고 표2의 자료는 균사체만을 분석한 것으로 균사체 성장 후 남겨진 배양액까지 함께 활용할 수 있다면 보다 많은 단백질과 유도물질들을 공급할 수 있을 것으로 기대되기 때문에, 성장 후 남겨진 배지의 처리 방법에도 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

표 2. 시간 경과별 E-2 균사체의 성장 정도

TIME(day)	pH	Wet Weight(g/L)	Dry Weight(g/L)	Crude Protein(μ g/ml)
2	6.59	2	0.12	733.4
4	6.41	45	1.45	699.1
6	6.35	91	1.98	720.9
8	6.21	151	4.11	739.7
10	6.19	216	6.13	683.4
11	6.11	210	5.98	714.7

(※ medium : 50% 감귤배지(250ml/1L flask) + 1% 접종, cond. : 25 incubation, 100 rpm, Bradford assay는 1/4로 희석)

6. 기상활성화법을 통한 감귤 부산물의 활성탄 제조

가. 시료의 전처리

시험 재료로 이용되는 시료의 종류는 폐감귤박, 가공공장 펠릿, 청피(SFE를 통한 정유성분 제거된 재료)로 모두 3가지이다. SFE(초임계 추출)를 통해 정유 성분을 제거된 청피를 시험하는 이유는 감귤 껍질 고유의 정유 성분이 제거되어서 보다 정제된 탄소체를 얻을 수 있을 것으로 기대하기 때문이다. 가공 공장의 펠릿을 제외하고 폐감귤박과 청피는 음지의 상온에서 건조, 분쇄하여 18 mesh 크기로 입자를 일정하게 만들었다.



그림 4-6. 건조 후 분쇄한 폐감귤박



그림 4-7. 가공 공장 생산 펠릿



그림 4-8. 청피(SFE 처리)

나. 탄화 공정

준비된 시료는 탄화 공정의 효율성을 높이기 위해서 주위 대기가 환원된 상태에서 탄화 공정을 진행하였다. 온도는 200, 300, 400℃의 조건에서 0.5, 1, 1.5 hr 로 탄화시간을 달리하여 탄화 공정을 진행하여 요오드 흡착능을 통해 생성된 기공의 발달 정도를 확인하였다. 탄화 과정을 거치기 전에 질소 분위기 하에서 50~700℃까지 열중량 분석(TGA)를 실시하여 온도 변화에 따른 열중량 변화를 살펴보면 폐감귤박의 열분해 과정은 3단계로 구분된다. 1단계는 약 120℃까지로 주로 시료 내의 수분과 약간의 휘발성 물질이 증발하고, 2단계는 약 350℃ 까지이며 시료의 중간 감소율이 매우 크게 나타났으며, 주로 시료내의 휘발성 물질이 제거되는 것으로 사료된다. 3단계에서는 중량 감소율이 매우 작아지며, 열분해 반응이 서서히 종료되는 것을 관찰할 수 있었다.



그림 4-9. 탄화된 폐감귤박



그림 4-10. 탄화된 가공공장 펠릿

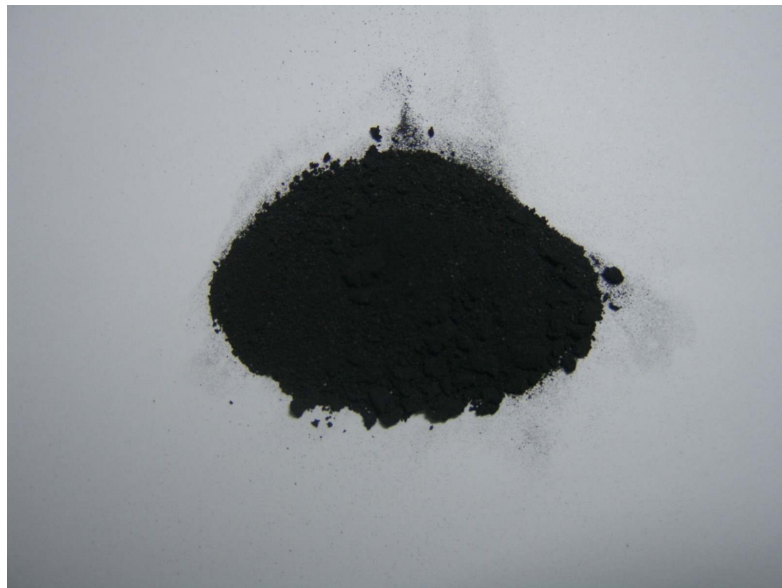


그림 4-11. 탄화된 청피(SFE 처리)

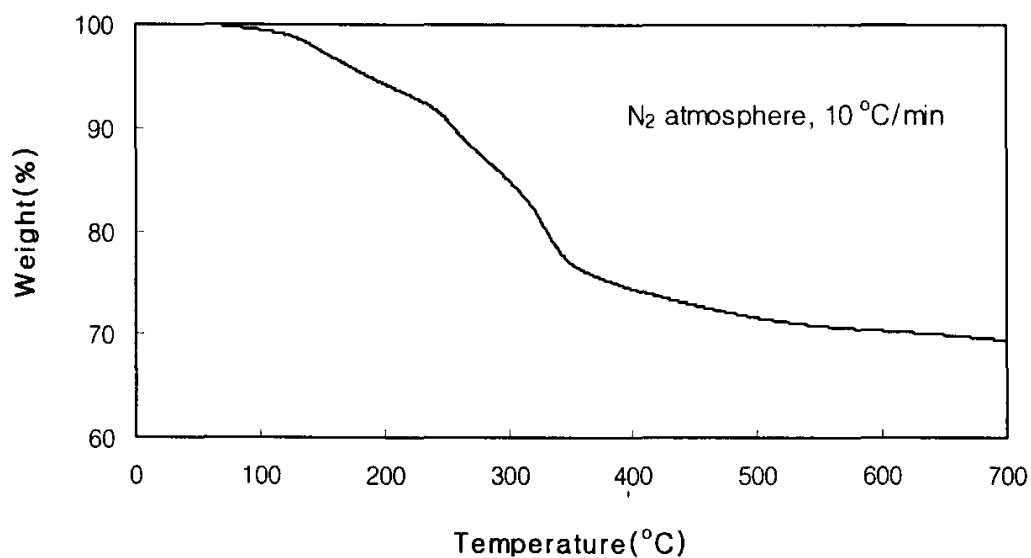


그림 4-12. 질소 환원 분위기 하에서의 폐감귤박 열중량 분석 결과

표 4-10. 폐감귤박의 탄화 온도 및 탄화 시간에 따른 요오드 흡착능 (단위:mg/g)

	200℃	300℃	400℃
0.5 hr	324	384	552
1.0 hr	398	425	621
1.5 hr	532	646	584

다. 활성화 공정

기존에 많이 연구되어진 약품활성화법은 약품으로 인한 2차 환경오염과 장비 부식 등의 문제점들이 발생하기 때문에, 여기에서는 STEAM 활성화법을 활용하였다. STEAM 활성화법을 통한 활성화 공정을 실시하여 감귤박 활성탄을 제조하고 최적의 조건을 확인하여서 제조 경비 감소와 효율성을 증가시킬 수 있는 방법을 확인하였다. 활성화 공정은 탄화 과정보다 높은 온도에서 실시하며 600, 700, 800℃의 조건으로 0.5, 1, 1.5 hr 으로 활성화 시켜서 활성탄의 물성을 확인한다.

라. 규격화 및 가공

만들어진 감귤박 활성탄을 활용할 수 있는 방법을 검토한다. 활성탄은 다양한 용도로 사용되어지고 있기 때문에, 그 목적에 맞게 제조 공정을 설계하여야하며 생산된 활성탄은 필요한 조건으로 가공되어야 한다. 이용하고자 하는 목적에 맞게 각각의 조건에 최적의 물성을 가질 수 있도록 감귤박 활성탄의 제조 공정을 확인하고 크기를 고려하여서, 각각의 조건에 따른 이용 범위를 확립한다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1절 : 목표대비 대외달성도

동물 및 현장실증 시험을 통해 감귤의 우수성에 대한 과학적인 근거를 제시하여 60여건 이상의 홍보 결과를 달성하였다. 그리고 추출효율 극대형 장치 검토 결과와 기능성 발효 음료개발 결과를 활용한 지식재산권을 출원하고 이를 이용하여 산업체에 기술이전을 진행하였다.

감귤 가공과정에서 발생하는 부산물의 다양한 활용을 위한 이용성을 검토하여 폐자원을 활용할 수 있는 녹색기술 개발에 일익을 담당하였다.

2절 : 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

1. 전문학술지 논문 게재

구분	저자명	논문제목	게재 학술지명	권 쪽수 (년도)	Impact factor
일반	1.홍현주, 진주연, 양희경, 강원영, 김동건, 이선이, 최영훈, 김재훈, 한창훈, 이영재	Dangyuja (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) peel improves lipid profiles and alleviates hypertension in rats fed a high-fat diet	Laboratory Animal Research	26(4), 361~367 (2010)	-

2. 학술발표

논문제목	국내/ 국외	학회명	주 저자명	공 동* 저자명	발표구분 (구두/ 포스터/주제 발표)
Analyzing on the functional material studies in Jeju Citrus industry	국내	대한약학회(2008)	최영훈	안현주, 이영재, 한창훈	포스터
Anti-Obesity Effect of Dang-yuja (Citrus grandis Osbeck) on High Fat Diet Fed Rats	국내	대한수의학회(2009)	홍현주	양희경, 강원영, 김동건, 최영훈, 한창훈, 이영재	포스터
Effect of Citrus on Insulin Resistance in an Obese Mice Model	국내	대한수의학회(2010)	홍현주	양희경, 강원영, 김동건, 정강민, 김중휘, 고태혁, 이영재, 한창훈	포스터
the Effects of Citrus Juice in Women on Blood Lipid Profiles	국외	일본 분자세포생물학회(2010)	홍현주	최영훈, 이선이, 한창훈, 김동건, 강원영, 이영재, 양희경	포스터
Protective Effects of Dang-yuja (Citrus grandis Osbeck) against High Fat Diet-induced Obesity	국내	대한생화학분자생물학회(2009)	홍현주	양희경, 강원영, 김동건, 최영훈, 한창훈, 이영재	포스터
과즙에 함유된 유리당 여파를 위한 Microfilter와 Ultrafilter가 플라보노이드 함량에 미치는 영향	국내	한국원예학회(2010)	최영훈	안현주, 이선이, 박경진, 박석만, 윤수현, 이동훈	포스터
감귤 당유자 함유 플라보노이드 추출물의 항산화 효과	국내	한국원예학회(2009)	최영훈	안현주, 이지현, 이선이, 한창훈, 이영재, 홍현주, 양희경, 강원영	포스터
the Effects of Citrus Juice on Lipid Profiles in Human Serum	국내	생화학분자생물학회(2010)	홍현주	최영훈, 이선이, 한창훈, 김동건, 강원영, 이영재, 양희경	포스터
Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects of Citrus	국내	대한수의학회(2009)	홍현주	최영훈, 이선이, 양희경, 강원영, 김동건, 정강민, 김중휘, 고태혁, 이영재, 한창훈	포스터
감귤 당유자 함유 플라보노이드 추출물의 혈류개선 효과	국내	한국원예학회(2009)	최영훈	안현주, 이지현, 이선이, 한창훈, 이영재, 홍현주, 양희경, 강원영	포스터
감귤의 주요 기능성 성분이 당뇨병 치료 작용기전에 미치는 영향	국내	한국원예학회(2010)	이영재	최영훈, 이선이, 박경진, 박석만, 홍현주, 한창훈	포스터

3. 특허 출원/등록

※출원인 중 제1발명자 밑줄 표기

재산권 종류	출원/ 등록	출원제목	출원일/ 등록일	출원번호/ 등록번호	소속		공 동* 책임자명
					기관	부서	
특허	출원	감귤로부터 플라보노이드 성분의 추출 및 정제방법	2008.02	2008-00178 51	원예원	감귤시험장	<u>최영훈</u> , 고상욱, 김용호, 윤수현, 서효덕
특허	등록	감귤로부터 플라보노이드 성분의 추출 및 정제 방법	2010.05	10-2008-00 17851	원예원	감귤시험장	<u>최영훈</u> , 고상욱, 김용호, 윤수현, 서효덕
특허	출원	감귤플라보노이드가 함유된 코팅 쌀의 제조방법 및 이에 따라 제 조된 감귤 플라보노이드가 함유 된 코팅쌀	2010.02	10-2010-00 13619	원예원	감귤시험장	<u>최영훈</u> , 안현주, 이지현, 이선이, 이영재
특허	출원	감귤로부터 플라보노이드 성분의 추출 및 정제방법	2008.07	08-16812	원예원	감귤시험장	<u>최영훈</u> , 고상욱, 김용호, 윤수현, 서효덕
특허	출원	감귤플라보노이드가 첨가된 감귤 식초의 제조방법 및 이에 따라 제조된 감귤 식초	2010.04	2-1998-005 031-4	원예원	감귤시험장	<u>최영훈</u> , 안현주, 이지현, 이선이, 한창훈

4. 기 타(유용유전자, 기능성물질, 형질전환체, 품종, 물질 등 실적)

- 특허미생물 1종 기탁(농업유전자원센터) : KACC91527P
- 사업화실적

유상/ 무상	실시 료	사업화 기술명	이전 업체명	계약기간	출원번호/ 등록번호	책임자 명	소속		공 동* 책임자 명
							기관	부서	
유상	90만원	감귤로부터 플라보노이드 성분의 추출 및 정제 방법	팜스데 이트	'09. 7~ '11. 6	실용 2008-0017851	최영훈	원예원	감귤시험 장	
유상	162만 원	감귤로부터 추출된 플라보노이드를 포함하는 비만개선음료 조성물 및 이의 제조방법	(주)모 아	'08. 6~ '09.12		최영훈	원예원	감귤시험 장	안현주, 윤수현, 이동훈, 이지현
유상	200만 원	감귤 기능성 물질 추출 방법 및 제품화 기반기술	시트런 스	'08.10~ '10.10		안현주	원예원	감귤시험 장	최영훈

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

☐ 기능성물질

- 감귤의 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 억제작용, 간질환 개선 효과, 암세포 증식 억제작용, 지질 과산화 억제 작용, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 면역증강, 모세혈관 강화작용 등의 생리활성을 갖는 원료를 추출하여 식품, 의약품으로의 활용
- 감귤가공 부산물로 부터 가축사료첨가용 기능성물질생성을 위한 효소 및 생균제 처리 극대화 연구를 통한 감귤소비촉진을 위한 홍보자료로 활용

☐ 기업화

- 대용량 추출법 및 부산물 이용방법관련 기업체 기술이전 추진

☐ 추가연구

- 산업체 현장연구를 통한 추출장치의 최적화 모델 설정

☐ 기술이전

- 대용량 추출장치 공정 및 기능성 발효물 생산 기법 기술 등 이전(가공업체)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 일본의 오키나와 남부에서 생산되어 주스로 가공되어지는 Citrus depressa Hayata(shiikwasa)를 고지방식으로 비만을 유도한 동물에게 먹였더니 체중이 감소하고 lipogenesis와 관련된 유전자의 발현을 억제시키는 효과를 확인하였다. (2011, Young-Sil Lee, Japan)
- blood orange 과즙이 안토시아닌 성분과 그 외의 물질에 의해 비만쥐의 체중 감소와 함께 지방의 축적을 감소 시키는 효과를 나타내었다. (2010, Tita L., Italy)
- 감귤류의 폴리페놀 성분은 항암물질로 알려져 있으며, 항암활성 뿐만 아니라 세포증식, 전이, 염증, 비만 등의 기작과 관련이 있다. 온주밀감의 폴리페놀 성분이 염증과 비만이 관련된 대장암 유발을 억제시키는 효과가 있다. (2010, Tanaka T., Japan)
- 천식예방약 혹은 항알러지약 등의 약물에 의해 체중이 증가하거나 비만이 유도되는 경우가 많다. 그런데 리모넨이 28.27% 함유된 라임 에센셜 오일을 약물과 함께 복용했을 때, 동물실험에서 약물에 의한 체중 증가를 억제시키는 효과를 나타냈다. (2010. Solmaz Asnaashari, Iran)

제 7 장 기타 중요 변동사항

해당사항 없음

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구장비 현황

연구기자재 및 연구시설	규 격	수량	활용용도	보유기관	확보방안	비 고
CO ₂ 측정기	set	1	생리분석	감글시험장	확보	
당산측정기	대	2	당산분석	"	"	
이온분석기	대	3	이온분석	"	"	
미세입자투사장치	대	10	시료전처리	"	"	
질량분석기 GC/Mass	대	1	휘발성분석	"	"	
발효조(Pilot system)	대	1	발효시험용	"	"	
냉동고(Deep freezer)	대	1	시료보관용	"	"	
질량분석기 (GC-MASS)	대	1	기능성분석	"	"	
초고속원심분리기	대	1	시료전처리	"	"	
HPLC	대	1	시료분석	"	"	
진탕배양기	대	1	시료전처리	"	"	
초저온냉동고	대	1	시료보관	"	"	
Autoclave	대	1	시료전처리	"	"	

제 9 장 참고문헌

- Kopelman, P.G. (2000) Obesity as a problem. *Nature* 404(6778), 635-643.
- Festi, D., Colecchia, A., Sacco, T., Bondi, M., Roda, E. and Marchesini, G. (2004) Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obesity Rev.* 5(1), 27-42.
- Fujioka, K., Seaton, T.B., Rowe, E., Jelinek, C.A., Raskin, P., Levovitz, H.E. and Weinstein, S.P. (2000) Weight loss with sibutramine improves glycaemic control and other metabolic parameters in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes. Metab.* 2(3), 175-187.
- McMahon, F.G., Fujioka, K., Singh, B.N, Mendel, C.M., Rowe, E., Rolston, K., Johnson, F. and Mooradian, A.D. (2000) Efficacy and safety of sibutramine in obese white and African American patients with hypertension: a 1-year, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Arch. Intern. Med.* 160(14), 2185-2191.
- Leung, W.Y.S., Thomas, G.N., Chan, J.C.N. and Tomlinson, B. (2003) Weight management and current options in pharmacotherapy: Orlistat and sibutramine. *Clin. Ther.* 25(1), 58-80.
- Park, S.H., Ko, S.K. and Chung, S.H. (2005) *Euonymus alatus* prevents the hyperglycemia and hyperlipidemia induced by high-fat diet in ICR mice. *J. Ethnopharmacol.* 102, 326-335.
- Nakayama, T., Suzuki, S., Kudo, H., Sassa, S., Nomura, M. and Sakamoto, S. (2007) Effects of three Chinese herbal medicines on plasma and liver lipids in mice fed a high-fat diet. *J. Ethnopharmacol.* 109, 236-240.
- Hsu, C.L. and Yen, G.C. (2007) Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *Br. J. Nutr.* 98, 727-735.
- Tanaka T., Yasui Y., Ishigamori-Suzuki R., Oyama T. (2008) Citrus compounds inhibit inflammation-and obesity-related colon carcinogenesis in mice. *Nutr Cancer.* 60(1), 70-80.
- Asnaashari S., Delazar A., Habibi B., Vasfi R., Nahar L., Hamedeyazdan S., Sarker SD. (2010) Essential oil from *Citrus aurantifolia* prevents ketotifen-induced weight-gain in mice. *Phytotherapy Research.* 24(12), 1893-1897.
- Titta L., Trinei M., Stendardo M., Berniakovich I., Petroni K., Tonelli C., Riso P., Porrini M., Minucci S., Pelicci PG., Rapisarda P., Reforgiato Recupero G., Giorgio M. (2010) Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. *Int. J. Obes.* 34(3), 578-588.
- Lee Y. S., Cha B. Y., Saito K., Choi S. S., Wang X. X., Choi B. K., Yonezawa T., Teruya., Nagai K., Woo J. T. (2011) Effects of a *Citrus depressa* Hayata (shiikuwasa) extract on obesity in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine.*