

발간등록번호
--------

11-1543000-001014-01
----------------------

생물전환기술을 이용한 유자 정유의 Flavor Profile 증진  
및 제품화 기술을 통한 자생유자의 산업화

(Flavor Profile Enhancement of Yuzu Essential Oil by  
Biotransformation and its Product Development for Korean  
Yuzu commercialization)

아로마라인(주)

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생물전환기술을 이용한 유자 정유의 Flavor Profile 증진 및 제품화 기술을 통한 자생유자의 산업화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 11월 12일

주관연구기관명 : 아로마라인(주)

주관연구책임자 : 오 재 순

세부연구책임자 : 양 현 철

연 구 원 : 김 영 효

연 구 원 : 이 진 영

연 구 원 : 지 윤 영

협동연구기관명 : 세종대학교

협동연구책임자 : 김 용 휘

연 구 원 : 김 경 주

연 구 원 : 권 순 향

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 지 영 민

연 구 원 : 이 정 혜



# 요 약 문

## I. 제 목

생물전환기술을 이용한 유자 정유의 Flavor Profile 증진 및 제품화 기술을 통한 자생유자의 산업화

## II. 연구성과 목표 대비 실적

- 1) 효소를 이용한 유자의 전처리 및 유자 정유 생산성 및 특성 향상 기술의 개발을 목적으로 본 연구 에서는 효소를 이용하여 유자 정유 추출 수율을 크게 향상 시켰으며 향후 이를 이용한 제품개발 및 공급이 활성화 될 것으로 기대된다.
- 2) 정유의 관능평가 및 기기분석을 통한 특이 방향성분분석을 통해 Flavor Profile Analysis하여 유자에 함유된 유자 특유의 향기 성분을 관찰할 수 있었으며 유자향 조합에 활용할 수 있었다.
- 3) 유자 정유의 Flavor Profile 극대화를 위해 방향성분의 조성 최적화를 위한 유자 정유 미생물/효소를 이용한 생물전환 기술의 개발을 목적으로 여러 미생물을 이용하여 유자 정유의 특징적인 향기성분에 변화를 관찰하였다.
- 4) 유자 정유를 이용한 천연향료 소재 개발 및 조향기술을 통한 유자정유 기반 천연향료생산 기술개발을 목적으로 유자 향기성분을 조합함으로써 천연 유자 정유의 공급에 한계를 극복하고 관련 산업에 전반적으로 응용 가능할 것으로 기대된다.
- 5) 유자정유기반 천연향료를 이용한 제품적용기술 개발과 함께 수출 전략 개발을 목표로 유자향을 개발하여 제품에 적용시킴으로서 국내는 물론 국외수출을 지속적으로 유지하고 있다.

## III. 연구개발의 목적 및 필요성

향료산업은 높은 부가가치를 지닌 산업으로 실생활 및 식품 및 화장품등의 고부가 산업체에 서 없어서는 안 될 아주 중요한 부분을 차지하고 있다. 향료 산업의 발전 없이는 고부가의 제품개발에 한계를 가지고 있어 관련 산업의 발전을 기대하기 어려운 바, 특히 식품 산업적 측면에서는 국내시장의 다양한 향료 개발 기술 및 새로운 향료소재 개발이 필수적으로 선행되어야 한다.

향료소재개발 방법은 크게 aroma chemical을 이용한 조합-합성 기술과 천연으로부터 추출하는 기술로 구분할 수 있으며, 일반적으로 이 두 가지를 같이 병용하여 제품이 개발되어 진다고 하겠다. 우리나라와 같이 천연자원이 부족한 곳에서는 화학적 조합-합성 기술에 의존하는 경향이 많지만, 천연제품에 대한 소비자의 욕구를 충족시키기 위하여, 또는 지역별로 특화된 농림산물 소재로부터 제품개발을 목적으로 할 때에는 천연소재의 가공기술 개발이 반드시 필요하다.

한편, 식품의 경우도 다양한 형태로 가공되기 때문에 공정상에서 본래의 맛과 향이 변질 될 수밖에 없다. 따라서 보다 천연적인 이미지를 상승시키고 기호성을 증대시키기 위해서는 천연의 flavor가 부향 되는 것이 최근의 추세이다. 하지만 국내 방향 자생식물을 이용한 천연향료소

재의 생산량 한계가 있어 시장성 확대가 어렵다. 이를 해결하기 위하여 Flavor Profile Analysis를 통해 향료업체는 천연향료 소재 생산과 더불어 일정한 생산량에 향취의 Intensity가 강하시키는 기술개발이 시도되고 있다. 이를 위하여 천연 방향식물의 미생물/효소를 이용한 전처리 기술 개발과 함께, Impact chemical의 동정과 함께, Flavor Profile을 최적화 및 천연향료의 향의 강도를 증가할 수 있도록 Key-compound 생산을 위해 미생물/효소를 이용한 Biotrasformaion 기술개발을 통하여 더 많은 고품질의 천연향료를 생산 하여 생산량의 한계로 인한 세계시장의 수출장벽을 해결해야할 필요성이 있다.

유자는 천연의 뛰어난 방향성을 지니고 있는 대중적 과실로 오랜 기간 동안 널리 이용되고 있다. 유자는 식용작물로서의 한계를 가지고 있으나, 유자의 과피 및 과육에는 방향성 정유성분이 다량 존재하여 주로 과피가 음료나 향료 등에 제한적으로 이용되고 있다. 그러나, 일본에서는 유자 생산량의 56% 수준이 가공품으로 이용되고 있으며, 이들 가공품 중에서도 향료 소재가 가장 높은 고부가 제품으로 유통되고 있다. 또한, 전 세계적으로 선호가 높은 citrus계 향료 중에서도 유자는 아주 고가의 향료소재의 향의 특이성이 국제적으로 인정되고 있다.

전세계적으로 가장 많이 생산되고 사용되고 있는 천연 향료소재는 Citrus계 식용작물 및 부산물을 이용한 Citrus Essential Oil로서, orange, lemon, grapefruit, lime등의 essential oil이 주로 사용되고 있으며, citrus계 essential oil을 기반으로 조향된 향료가 kg당 1~3만원대의 가격을 형성하고 있지만, 유자 essential oil를 함유한 조향향료는 거의 20배 (20-30만원/kg)에 가까운 가격을 형성하고 있는 상황이다.

유자로부터 천연향료소재를 개발한다면 이를 기반으로 한 한국적인 향미의 특성에 따라 다양한 제품에 이용될 수 있는 천연향료를 개발할 수 있으며, 이에 따른 한국의 독창적인 풍미를 지닌 식품의 개발이 가능할 수 있다. 본 연구는 산업화를 주목적으로, 한국 자생 유자를 향료소재로 개발하여 유자의 시장성을 확대하고, 생물전환기술을 이용하여 고부가 천연소재로 가치를 향상시켜 다양한 제품에 적용할 수 있는 수출용 고품질의 천연 유자 향료 소재를 개발할 필요가 있다.

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

##### 1. 유자 정유의 생산성 극대화 및 Flavor특성 향상기술의 개발

가. 생물학적 및 물리적인 전처리 기술을 이용한 유자 정유의 생산성 향상

- 1) 유자 정유의 추출 및 정제
- 2) Oil sac 분리를 위한 물리적 처리 기술: 정유 회수율을 높이기 위해 정유 성분을 함유하고 있는 oil sac을 유자 과피에서 분리하기 위해 과피의 외부의 flavedo portion을 분리하는 물리적 방법
- 3) 미생물/효소처리 기술: 유자 과피의 cellulose에 의해서 유자 정유의 회수율이 저해됨으로써 생물학적 방법으로 oil sac을 보다 쉽게 분리를 위해서 cellulose을 분해하는 효소(xylanase, cellulase)의 처리하여 정유의 회수율을 높이는데 목표를 두고, 유자 과피에 효과적으로 작용하는 최적 효소를 선별하고 최적의 전처리 반응 조건을 확립한다.

나. 생물학적 전처리를 통한 유자 정유의 Flavor 특성의 강화 기술개발

- 1) 유자 정유의 Flavor Profile 향상 전처리 기술
- 2) 정유의 부향 성분조성 향상을 위한 유자 생물전환기술

3) 향기 성분의 보관 및 Delivery 기술 개발 기반 연구

**2. 유자정유의 Flavor Profile Analysis 및 생물전환기술을 이용한 정유의 Flavor 특성 극대화 기술개발**

- 가. 유자 정유의 방향성분 조성 및 조성 비율을 위한 GC-MS Analysis
- 나. 유자 정유 특유 방향성분 분석 (미량 및 특히 성분의 구성분석)을 미량 정성/정량 High-resolution gas chromatography olfactometry (HRGCO) 및 GC-MS 분석
- 다. Flavor Profile Analysis를 통한 Artificial 유자 정유 Creation (flavor chemical Library)
- 라. Flavor Profile Analysis를 통한 유자 정유 부향 향기성분의 동정
- 마. 유자 정유 부향 향기성분의 천연합성을 위한 생물전환기술 (Biotransformation) 개발
  - 1) 동정된 부향 성분의 증가를 위한 처리 미생물/효소의 선별
  - 2) 부향 성분의 천연합성을 위한 천연향료물질의 생물전환기술

**3. 천연 유자 정유의 천연향료소재제품화 및 제품화 적용기술의 개발**

- 가. 천연 유자 정유 분석 기술을 기반으로 한 천연 유자 향료 소재의 개발
  - 1) 천연 향료물질 및 Chemical 조합 : 기기분석의 발달로 인해 천연물로부터 향기성분의 분석 수준이 많이 향상 되었지만 아직 천연소재로부터 유효성분을 추출하는 기술이 미숙하여 정확한 향료성분을 동정하는데 애로사항이 많다. 보다 정확한 data를 확보하기 위해서는 천연소재로부터 유효성분을 추출하는 기술이 무엇보다 중요하다. 그 유효성분들로부터 기기분석을 할 때 바람직한 제품을 만들 수 있는 것이다. 현재까지 보고된 바에 의하면(표 3) 유자의 과피로부터 향취에 기여도가 높은 미량성분들은  $\alpha$ -pinene, sabinene,  $\alpha$ -phellandrene, Myrcene, d-limonene,  $\beta$ -phellandrene,  $\gamma$ -terpinene, p-cymene, linalool, trans- $\beta$ -farnesene,  $\alpha$ -terpineol 등이 있다.  
지금까지 추출, 분석 등 다양한 방법들이 있었지만 실질적인 유자의 정성, 정량분석을 하는데 미비했다고 볼 수 있다. 이것은 단순히 조향사들이 그 data를 참고하여 compounding 해 보면 쉽게 알 수 있다. 그렇기 때문에 우리는 지금까지 유효성분들의 정확한 정성, 정량적 분석이 되지 않고 있는 주요성분들을 동정하고자 한다. 그러기 위해서는 무엇보다도 추출하는 기술이 중요하다. 우리는 생물전환 기술을 이용하여 유효성분을 추출하여 또 그것을 분석하고자 하였다. 유자의 중요한 유효성분들은 thymol, linalool, perillaldehyde 등이 있으며 유자의 이미지를 특징지을 수 있는 정확한 data를 얻을 때 비로소 현재 보다 부가가치가 아주 높은 향료 제품으로 개발이 가능하게 된다.
  - 2) 조합된 시료의 기기분석 및 조합된 시료의 관능 테스트

나. 천연 유자 정유를 기반으로 한 식품 제형별 천연 유자향 및 Compound Flavor 개발

- 1) 유자 정유를 이용한 천연향의 제조 : 생물전환기술을 통한 유자 정유를 기반으로 천연향료 오일의 분석과 일부 선진국의 기존 상품화된 향료를 GC/Mass기기에 의하여 분석한 후 기초적인 data를 작성한다. data 중의 유효한 향료 Chemical을 정성한 후, 용도에 따른 법규(예: 용도가 식품향의 경우 FEMA(Flavor & Extract Manufacture Association) 및 식품첨가물공정 등 재여부 확인)를 검토하고 단품향 sample을 입수하고 아울러 유사 천연오일 및 사용가능 한 천

연오일들을 검토한 후 향료 조합을 시작한다.

향료조합에는 Creation과 Imitation 두가지 방법이 있는데 순수 학문적으로 천연 소재의 향료를 Imitation하는 것이 가치가 있지만 실용적인 측면 뿐만 아니라 경제성을 감안 한다면 Creation쪽이 더 가치가 있다. 본 연구 과제에서는 학문적, 실용적인 측면에서 접근하여 두 가지 방법으로 연구를 진행하고자 한다.

천연 향료물질 및 Chemical에 의한 수십번 또는 수백번의 조합의 accord를 거친 후 바람직한 향료가 완성되게 된다. 그 후 시료의 관능test에 들어간다. Top note, Middle note, Base note 등의 조화 및 지속성 그리고 상품으로서 가치 및 경제성 등을 함께 검토한 후 적용가능제품에 대하여 Application test를 하게 된다. 적용 용도에 따라서 용제의 선택, 내열성, 수용화, 유용화 등이 이때 결정된다. 제품을 application 하는데 있어 가장 중요한 것은 경쟁력 및 기호성(상품성)등이 있는 것을 개발하게 된다.

- 2) 장기간 보관 중 유분리 등에 대한 문제점 해결을 위한 균질 조건 확립
- 3) 천연향의 제품 저장에 따른 관능평가 (조향사 및 전문패널)

다. 천연 유자 향료소재의 개별식품 제품적용기술 개발

- 1) Essence화를 통한 기능성 drink개발
- 2) LDPE, HDPE에 적용하여 6month 이상의 지속성 향료개발 (기능성 포장재)
- 3) 고기능 (long lasting 향료) Gum용 향료 개발 적용
- 4) 기능성 아이스크림
- 5) 기능성 요구르트
- 6) W/S, O/S, Emulsion type 개발 및 수출

라. 유자박의 사료화 및 Cellulic material을 이용한 식품 및 화장품 소재 개발

- 1) 폐유자을 활용하여 동물 사료 및 식품/화장품 소재 개발 가능성 확인  
(기능성 Gum, 비누등)
- 2) Citrus oil은 다양하게 적용이 가능하므로 음료에 적용되는 type은 향수로서 개발이 가능하고 gum에 적용되는 type은 천연 비누로 개발이 가능하다.

## V. 연구개발결과

### 1. 유자 정유의 생산성 극대화 및 Flavor특성 향상기술의 개발

#### 가. 유자의 과피만을 이용한 생물학적 및 물리적 전처리 공정과 정유 추출 수율:

유자 과피만을 이용한 정유 추출 실험에서는 효소 전처리를 한 후 착즙한 실험 군에서 효소 처리를 하지 않은 실험군보다 약 10배정도의 확연하게 높은 양의 oil이 추출되는 것으로 나타났다. 한편 효소별 추출 수율은 큰 차이를 보이지 않았다. 시간에 따른 정유추출 수율은 전체적으로 효소 반응 3시간 사이에 급격한 증가를 보이며 6에서 9시간 사이에 최대의 수율을 나타냈다. 이후 시간대에서는 소폭으로 수율의 감소가 나타났다. 따라서 유자 정유 추출의 최대 수율을 보이는 시간은 6시간이 적당한 것으로 나타났다. 결과적으로 수율이 가장 높은 반응시간인 6시간대의 수율은 약1%대로 나타났으며 이를 기준으로 유자 전체중량에 대한 비율은 평균 0.33%의 수율로 나타났다. 한편 효소별 반응에 따른 pH는 유의적인 변화를 보이지 않았다.

#### 나. 유자 원과를 이용한 essential oil 추출 수율 및 특성:

유자 원과를 이용한 정유 추출 실험에서는 효소반응을 하지 않고 착즙한 유자의 정유추출 수율과 효소 반응 후 착즙한 유자 정유추출 수율이 약 2~2.5배정도 높은 수율을 보였다. 또한 과피만으로 실험하였을 때보다 과육과 씨를 포함한 원과의 정유추출 수율이 0.1~0.2% 높게 나타났다. 이는 유자 씨에 함유되어 있는 지방산이 일부 추출된 것으로 보인다. 효소마다 조금씩 차이가 있으나 6시간에서 9시간대 사이의 수율이 가장 높은 것으로 나타났으며 9시간 이후에는 수율이 감소하는 것으로 나타났다. 결과적으로 수율이 가장 높은 반응 시간대인 6~9시간의 반응 수율은 전체 중량에 대한 비율은 0.3~0.5%로 나타났다.

#### 다. 전처리 조건에 따른 유자 정유의 Flavor profile 특성:

분석 결과 유자의 껍질에서 추출한 정유의 향기성분은 약 60여종이 분리되었으며 그중 35종이 동정되었다. 주성분으로는 limonene 55.63%로 가장 많았다. 다음으로는  $\gamma$ -terpinene이 14.06%의 함량을 보였으며, myrcene, sabinene이 12.73% 다음으로  $\alpha$ -pinene과  $\beta$ -pinene이 각각 5.45%와 2.04%,  $\beta$ -Farnesene이 2.02%, linalool 1.38%순으로 나타났다. 이와 같은 결과는 다른 연구자들에 연구결과와 유사한 수치를 보였다. 결론적으로 효소처리 후 추출한 정유와 자연적인 정유와의 차이는 거의 없었으며, 효소처리 후 약 9~10배정도의 수율향상을 나타낸 결과 봤을 때 기존에 자연에 가까운 천연 유자 향을 추출하기 위해 손으로 직접 유포를 터트리는 방식의 추출방법을 대체하여 수율적인 측면에서 상업화 가능성이 충분하다고 보여진다. 한편 과피만을 이용한 추출물과 통 유자에서 추출한 Flavor profile간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

#### 라. 폐 유자박을 이용한 유자 essential oil 생산:

유자 가공 공정시 발생하는 폐유자박의 특성 및 재활용 가능성 여부를 알아보기 위해 고흥에 위치하고 있는 유자 가공 업체를 방문하여 유자 가공시 발생하는 폐유자박을 조사하였다. 유자 폐기물은 크게 2가지로 구분되었으며, 가공 전처리시 발생된 폐유자박을 이용하여 정유 성분을 추출하였으나 가공 전처리시 유포낭의 손실로 인해 정유 추출이 불가능하였다. 그러나 상품가치가 떨어져 착즙만 한 뒤 폐기되는 부산물에서는 유포낭의 손실이 비교적 적어 유자정유 추출 가능성이 충분하다고 판단된다.

#### 마. *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994를 이용한 유자 정유성분의 변화:

실험결과 *Pseudomonas* sp.에 의해 유자 정유에 존재하는 이중결합의 화합물을 hydroxylation 시켜 유자 정유의 향기성분 변화와 관능적 차이를 알아보기 위해 *Pseudomonas* sp.을 배양한 후 세포를 sonication한 뒤 각각의 조건에 따라 반응하여 GC/MS 분석 및 관능평가를 실시하였으나 유의적인 변화를 볼 수 없었다. 향후 실험에서는 hydroxylation 반응 시 NADH를 첨가하여 반응 여부를 알아보는 실험을 계획 중에 있으며, cell을 sonication하지 않고 배양도중에 유자 정유를 첨가하여 균체로부터 Microbial transformation을 유도하는 실험을 계획 중에 있다.

#### 바. (FAB I)를 이용한 유자 정유성분의 변화:

NADH-의존성 Enoyl-acyl carrier protein reductase인 FAB I 환원효소에 의하여 유자로부터 추출한 정유에 이중결합을 제거하여 관능적 특성 및 향기성분 변화를 알아보기 위한 실험을 하였다. 먼저 *Pseudomonas aeruginosa* genomic DNA에서 얻은 FabI gene PCR을 통해서 증폭한 뒤 재조합 plasmid를 heat-shock 방법을 이용하여 *Escherichia coli* BL21 (DE3)에

transformation, over expression하였다. 그런 다음 세포를 sonication한 뒤 gel-filtration chromatography를 이용하여 정제 단계를 통해 1L당 1g의 FAB I 단백질을 확보했다. 확보된 단백질을 이용하여 유자 정유와 각각의 조건에서 반응시킨 뒤 GC분석 결과 유자 정유와 FAB I 간에 일반적인 반응에서는 별다른 변화를 보이지 않았다.

#### 사. 유자의 미생물/효소 전처리 조건에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석:

세종대로부터 분양 받은 3종의 곰팡이의 발육 속도, 집락의 표면 및 뒷면의 색조를 관찰한 결과 발육속도는 yuzu 12, yuzu 2, yuzu 2-1의 순서로 성장하였으며, 집락의 표면과 뒷면의 색상은 각각 yuzu 2에서 청녹색과 진 노란색, yuzu 2-1에서는 회색과 밝은 노란색, yuzu 12에서는 회색과 아이보리색에 가까운 색의 특징이 관찰되었다. 또한 각각의 곰팡이를 100ml의 PDB 액체배지에 22℃, 150rpm에서 3일간 배양시킨 후 건조중량은 Yuzu 2의 중량이 4.17~4.20 g/L로 가장 높았고 나머지 균의 중량이 각각 Yuzu 2-1: 3.89~3.93 g/L, Yuzu 12: 2.00~2.11 g/L 순으로 나타났다. 유자 시료에 곰팡이를 접종한 뒤 22℃, 습도80~90%, 10~20일간 배양시킨 후 essential oil의 추출 수율은 소폭 증가 하였으며, 이는 곰팡이에 의한 세포벽의 분해로 보여진다. 이들의 향기성분의 변화를 관찰한 결과 배양전의 시료와 큰 차이를 보이지 않았고 주요 성분으로는 limonene의 함량이 가장 높았으며 다음으로 gamma-terpinene, sabinene, myrcene, beta-pinene, alpha-pinene 순으로 나타났다. 한편 곰팡이를 배양시킨 시료에서 시간이 경과함에 따라 limonene의 함량이 보존되는 경향을 보였다.

#### 아. 저장 온도 및 기간에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석:

저장 온도와 기간에 따른 유자 정유의 향기성분의 변화로는 limonene의 온도별 평균 함량이 70.42%, 70.15%, 69%로 소폭 줄어드는 경향을 보였으며, cymene, bicyclogermacrene 등 모노테르펜 등의 종류는 감소하였다. 반면에 spathulenol, thymol 등의 함량은 증가하는 경향을 보였다. 또한 4℃에 보관한 시료에서 gamma-lactone의 성분이 다량으로 발견되었고 함량은 각각 30일 9.41%, 60일 1.71%, 90일과 120일 시료에서 각각 0.21%, 0.07%의 함량으로 저장기간이 증가 할수록 빠르게 감소하는 경향을 보였다. ethyl ester 함량 또한 30, 60, 90일 시료에서 각각 1.37%, 0.29%, 0.09%로 확인 되었고 120일의 시료에서는 검출되지 않았다.

#### 자. 항산화제 첨가에 따른 유자 정유의 저장 조건별 Flavor Profile 분석:

BHA(butylated hydroxyanisole), PG(propyl gallate), Tocopherol의 항산화제를 이용한 저장 조건별 유자 정유의 향기 성분을 분석한 결과 3종에 시료에서 공통적으로 bicyclogermacrene, gamma-Terpinene이 저장 온도와 기간이 증가 할수록 함량이 낮아지는 경향을 보였다. 반면에 spathulenol의 경우 저장온도와 기간이 증가할수록 함량이 증가하는 모습을 보였다. 반면 3종의 항산화제를 첨가한 시료에서 첨가하지 않은 시료보다 향기성분의 변화 정도가 낮아지는 것을 확인하고 향후 항산화제 첨가 함량과 저장 기간을 증가시켜 유자 정유의 향기성분의 변화를 관찰함으로써 저장 및 유통과정에서 발생할 수 있는 유자 정유의 향기성분 변성을 방지하여 양질의 제품으로 산업전반에 응용 가능성을 보여주었다.

## 2. 유자 정유의 Flavor Profile Analysis 및 생물전환기술을 이용한 정유의 Flavor 특성극대화 기술 개발

### 가. 유자 정유의 Flavor Profile Analysis 분석 및 미량 방향성분 정성/정량 GC-MS 성분 분석

#### (1). 유자부위별 Cold-pressed 유자 정유의 관능평가:

유자의 특징적 향은 크게 5가지로 나눌 수 있음: 즙이 많은/침이 고이는(juicy/salivation), 약향(medicinal), 뚝은향(pungent), 단향(sweet) & 꽃향(floral). 2012년 부위별 유자 essential oil을 보면 hand-pressed와 Fruit(유자 과육 추출물)의 essential oil은 에스터향이 강하고, 특히 Hand Press는 여러 과일향과 단향이 강했다. 특히 Hand Press의 essential oil은 즙이 많은 향(신향이 강한), 약향, 뚝은향과 같은 자극적인 향이 거의 없는 반면 꽃향과 단향은 진한 전체적으로 호감가는 향이었다

#### (2). Distilled 유자 정유의 성분 분석:

통 유자, albedo를 제거하거나 제거하지 않은 껍질을 사용하여 3가지 증류 유자 정유를 얻었다. Albedo를 제거한 유자 정유가 가장 투명한 반면, 통 유자의 정유는 노란 빛을 띄고 유자 껍질(whole peel - albedo 제거하지 않은)은 검정색이었다. albedo를 제거한 유자 껍질 slurry는 fiber가 적었지만 albedo를 제거하지 않은 껍질 slurry나 통 유자는 fiber가 많아 증류과정 중 pot에서 껍질이 원활히 섞이지 못해 pot 안쪽에 달라붙어 타버린 것으로 생각된다. 통 유자 slurry는 과즙에서 나온 물이 많아 통 껍질보다 덜 탄 것으로 판단된다.

#### (3). Distilled 유자 정유의 관능평가:

2012년도 고흥 유자를 통째, 그리고 albedo를 제거하거나 제거하지 않은 껍질에서 얻어진 증류 유자 정유의 관능평가를 실시하였다. Albedo를 제거하지 않은 껍질의 정유는 탄내가 아주 심해서 정확한 관능평가를 실시하기 어려웠다. 통 껍질을 이용하여 얻은 정유 역시 약간 탄내가 있어서 정확한 평가가 어려웠으나, 유자 특유의 달콤한 꽃향을 감지할 수 있었다. Albedo를 제거한 껍질로 얻은 정유는 탄내가 없고 가장 fruity하고 floral한 달콤한 향이었다. 더불어 유자 특유의 뚝은 향과 약향도 적절히 갖고 있는 것을 알 수 있었다.

#### (4). 유자 정유의 GC-MS 분석:

재배년도별로 유자 정유의 차이를 알아보기 위해 2008, 2010, 2012년도 냉압착 유자 정유와 증류 유자 정유의 GC-MS 분석을 실시하였다. GC-MS 분석 결과, 세 가지 정유에는 대부분 같은 물질이 나왔지만  $\alpha$ -phellandrene은 2010년 유자에만 있었고 2008년이나 2012년 유자에는 없는 것으로 나왔다. 더불어 같은 물질을 함유하고 있다고 해도 년도 마다 물질의 양이 차이가 많이 나는걸 알 수 있었다. 예를 들어  $\beta$ -phellandrene은 2008, 2010, 2012년도에 각각 1.37, 4.57, 3.21(area %)를 함유되어 있었다. 이와 같이 농산물인 유자는 aroma profile이 재배년도에 따라 달라진다는 것을 알 수 있었다. 따라서 일정한 aroma profile의 유자 정유를 지속적으로 생산하기 위해서는 microbial biotransformation을 통해 유자 향을 보완하거나 향상시킬 수 있는 천연 향료 물질을 합성하는 것이 매우 중요하다고 사료된다.

## 나. Flavor Profile Analysis를 통한 유자정유 부향 향기성분의 동정

### (1). GC/GC-MS를 통하여 flavor Profile Analysis:

2008년의 추출된 증류 방식 정유시료와 냉압착 방식으로 추출된 유자 정유의 GC 분석해보니, 2008년 시료가 2010에 비해 peak의 수에 차이가 보였다. 특히 향을 맡았을 때 4가지 시료 중에서 가장 호감가는 aroma를 갖고 있다고 생각한 냉압착 유자 정유시료를 2010년 두개의 정유 시료와 비교 시 성분피크가 상대적으로 적었다. 2010년도 두 개의 정유 시료는 상대적으로 무겁고 뚝은 향이 강하였는데 아마도 여러 가지 향 물질이 존재하기 때문이라고 추측된다.

### (2). 관능평가를 통한 미량/특유 정유 성분의 방향 특성 확인:

2008년도와 2010년도의 증류 방식으로 얻은 유자 정유는 씹싸래하면서도 달콤하고 고무 bottom note를 지니고 있었다. 그리고 2008년도 냉압착 유자 정유는 4가지 정유 중 가장 향기롭다고 생각되는 aroma profile이라고 평가되었다. 냉압착 유자 정유는 특히 가벼운 꽃 향기와 시원한 사과, 레몬 향, 그리고 씹싸름한 bottom note를 갖는 특징이 있었다. 마지막으로 2010년도 냉압착 유자 정유는 가장 비호감의 향을 갖고 있었다. 대체적으로 짙은 음식의 향과 같은 sour 향과 묵직한 고무향을 맡을 수 있었다.

### (3). 부향 성분의 동정:

유자 Essential Oil의 관능 특성을 향상시킬 수 있는 부향성분을 관능평가를 통하여 동정함. 유자 Essential Oil의 관능평가를 통해 유자 Essential Oil의 관능적 특성을 향상 시킬 수 있는 부향성분은 Citral / Linanool / Tymol / Nonanal등의 성분이 확인되었다. 부향성분 중 천연 Citral과 Linanool은 Citrus oil의 생산과정 중 부산물로 공급되어 상대적으로 가격이 저렴하여 Flavor House가 쉽게 사용할 수 있어 Biotransformation에 의한 생산 공정의 개발이 필요하지 않아 시장에 판매되고 있지 않은 천연 Thymol과 Nonanal의 Biotransformation공정 개발을 위한 특성평가를 실시하였다.

### (4) Thymol과 Nonanal 첨가 시 유자 향미 프로파일 변화:

유자의 중요한 유효성분으로 알려진 Citral, Linalool, Thymol 중 유자 정유의 질적 향상을 위한 미생물 생물전환 공정을 위해 생산될 target compound의 선정을 위해 시장 조사를 통해 가격 경쟁력을 비교하였다. 강한 과일향 또는 꽃향을 부여하기 위하여 Flavors와 Perfume의 소재로 많이 사용되는 Nonanal을 추가로 평가에 사용하였다. Citral과 Linalool은 Natural 또는 Synthetic 사이의 가격 편차가 크지 않고 상대적으로 저렴한 반면, Thymol과 Nonanal은 단지 Synthetic만이 시장에 판매되고 있으며 가격 경쟁력 또한 우수하다. 따라서 본 연구에서는 Nonanal과 Thymol을 유자 정유에 첨가하여 관능적 특성 변화를 비교하였다.

### (5) Tymol과 Nonanal에 의한 유자 Essential Oil의 관능적 특성의 향상:

Thymol을 첨가한 시료는 전반적으로 thymol 고유의 탄내가 top-note에 강했으나, middle-note에는 신내와 꽃향 그리고 탄내가 낮다. 그러나 농도가 높아질수록 thymol 고유의 탄내로 인해 약냄새를 포함한 화학적 냄새가 두드러지게 나타났다. Nonanal의 경우, top-note에 신내와 꽃향 그리고 비누향이 낮으며 middle-note에는 뚝은 느낌을 주고 나무향이 낮으며 bottom-note에는 곰팡이향이 낮다. 농도가 증가함에 따라 꽃향과 신냄새가 증가하였으나, 0.005%부터 인위



적이고 화학적인 느낌을 주었다. 이러한 결과로 보아, 소량의 thymol은 middle-note에서 그리고 nonanal의 경우는 top-note에서 유자 고유의 신내와 꽃향 단내를 부가하여 유자향의 지속성을 높여 줄 것이라 기대된다. 따라서 thymol과 nonanal을 미생물 생물전환에 의해 천연 합성하여 유자 정유에 첨가한다면 현재 보다 부가가치가 높은 천연 향료제품으로 개발이 가능하다. 뿐만 아니라, 현재 synthetic에 의존하는 thymol과 nonanal 시장에 천연 향료로서의 경쟁력과 기호성(상품성)이 있다.

## 다. 유자 정유 부향 향기성분의 천연합성을 위한 생물전환기술(Biotransformation) 개발

### (1) limonene/citral을 기질로 활용하는 미생물 균주 선발:

GC 분석 결과, 10개의 균종에서 citral을 사용했을 때 10개의 균주에서, limonene을 사용했을 때 9개의 균주에서 피크 변화를 보였으며 2개의 균종은 citral과 limonene 모두 피크 변화를 보였다. *Pseudomonas* 종은 8개와 6개가 각각 citral 혹은 limonene을 전환시켰으며 특히 2개 균주가 citral과 limonene을 모두 전환시킬 수 있었다. *Gluconobacter* 종은 2개와 3개가 각각 citral 혹은 limonene을 전환할 수 있는 능력을 보였다. GC chromatogram에서 citral은 18분과 19분대에서 각각 peak 하나씩, 총 2개 나오고 limonene은 7분대에서 peak가 하나 보이는 걸 알 수 있었다. 그러나 *Pseudomonas* 혹은 *Gluconobacter* 균종을 접종하고 24시간 후 다시 GC 분석을 해보았을 때 위에 나와 있는 21종이 각각 citral/limonene 혹은 두가지 모두 생물전환에 의해 새로운 물질이 형성되어 Citral 혹은 Limonene의 peak 이외의 다른 peak(s)가 검출된 것을 확인할 수 있었다.

### (2) 천연합성된 물질의 GC-MS분석:

GC 분석을 통해 두 가지 기질 농도에서의 미생물의 생물전환 능력을 확인해 본 결과 *Pseudomonas Putida* KCTC 2198이 800 uL에서, *Pseudomonas septica* ATCC 14545가 800 uL에서, 그리고 *Pseudomonas diminuta*가 200, 800 uL에서 peak 변화를 보이지 않았다. 이는 기질 200 uL의 전환은 가능하나 800 uL가 첨가됐을시 미생물에게 toxic한 농도가 되어 생물전환이 불가능했던 것이라 추측된다. 나머지 42가지 샘플의 GC-MS 분석을 통해서 각 미생물이 citral 혹은 limonene을 이용해 생성해낸 물질이 무엇인지 확인해보았다.

### (3) 유자 정유의 impact chemical로 사용된 합성 물질:

표 2-24, 25, 26에 각각 6-methyl-5-hepten-2-one, carveol, 그리고 carvone을 area %를 기준으로 21가지 미생물 중 가장 많이 생산한 미생물에서 가장 적게 생산하는 순서대로 나열하였다. Area %를 기준으로 한 순서이기 때문에 기질을 200 uL 넣었을 시 해당되는 물질을 가장 많이 생산한 미생물이 가장 효율적인 생물전환을 했다고 해석될 수도 있다. 6-methyl-5-hepten-2-one은 ATCC 1199에 limonene 800 uL를, carveol은 ATCC 17810에 limonene 200 uL를 사용했을 시 carvone은 KCTC 12937에 limonene 800 uL를 사용했을 시 각각 가장 높은 생산율인 29.62%, 13.34%, 그리고 8.51%(area %)를 나타내는 것을 알 수 있었다. 따라서 유자 정유의 impact chemical인 3가지 물질을 가장 많이 혹은 효율적으로 생산한 미생물을 대상으로 fermentor를 이용해 생물전환 상업적 공정을 개발이 가능할 것으로 생각된다.

#### (4) Flavor Profile Analysis 및 관능평가를 통한 천연 유자 정유 Creation:

관능평가 결과 0.01% 농도에서 향에선 같은 수의 패널들이 (4:4) carvone과 carveol이 들어간 유자 flavoring을 유자 정유 보다 더 호감이 간다고 표시하였다. 특히 carvone이 들어간 유자 flavoring은 sweetness가 강해지고 floral과 juiciness는 control 보다 약간 더 높아졌으며 약 향과 짙은 향이 더 강해진 것을 알 수 있었다. 맛 평가에서는 0.01%에서는 향료 물질의 향이 너무 진해 유자 특유의 향이 가려지는 경향이 있어 더 낮은 농도인 0.001%와 0.005%에서 실험을 진행하였다. 그림 2-16에서 보여지는 바와 같이, 향료 물질이 더해진 flavoring이 5가지 특성에서 control에 비해 두드러진 차이를 보였다. 특히 6-methyl-5-hepten-2-one은 control보다 깊고 무거운 맛을 갖고 있어 floral과 juiciness 면에서는 수치가 낮게 나왔다는 것을 알 수 있었다. 0.001%와 0.005%에서 실행된 taste 평가에서는 0.001%의 carvone 과 carveol이 4:3으로 가장 높은 호감도를 보였다. Base로 쓰여진 유자 정유의 달콤하고 fruity한 향에 minty하고 fresh한 향이 더해져 synergistic 효과를 보인 것으로 평가되었다. 이 두가지 농도에서는 호감가는 flavor를 만들어 내지 못했으나 다른 농도, 특히 더 낮은 농도에서는 6-methyl-5-hepten-2-one의 바나나와 달콤한 과일 향이 짧은 지속성을 갖은 유자 정유의 fruity하고 floral 한 aroma profile의 향상 효과를 이끌어 낼 것으로 생각된다. 따라서 microbial biotransformation을 통해 얻을 수 있는 nonanal, 6-methyl-5-hepten-2-one, carveol 과 carvone은 유자 정유에 첨가되었을 시 각각의 flavor characteristics를 부가해 유자 정유의 aroma의 표준화 및 quality를 향상시킬 수 있을 것으로 예상된다. 향후에는 6-methyl-5-hepten-2-one, carveol과 carvone의 생산에 대한 생물전환 공정 개발에 대한 후속 연구가 필요한 것으로 생각된다.

### 3. 천연 유자 정유를 기반으로 한 식품 제형별 천연 유자향 및 Compound Flavor 개발

#### 가. 유자 정유의 GC/Mass 및 Chemical 조합

##### (1). 유자정유의 GC/Mass 분석

유자의 과피로부터 향취에 기여도가 높은 성분들은  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, Myrcene, d-limonene,  $\gamma$ -terpinene,  $p$ -cymene, Terpinolene, linalool, Sabinene 등과 같이 비교적 함량이 많은 성분도 있지만 Camphene,  $\alpha$ -Terpinene,  $\beta$ -Caryophyllene, Octanal, Nonanal등의 미량성분 등도 유효성분으로 나타났다. 또한 비효소처리 Essential Oil과 효소처리 Essential Oil 은 유의적인 차이가 없으며 관능적으로도 차이가 없었다.

##### (2). 조합시료의 GC/mass 분석 및 관능테스트

GC/Mass 분석의 결과를 토대로 배합비를 작성한 뒤 유자정유에 향취를 좌우하는 미량 chemical을 조정하여 시료 5종을 제조하여 관능 테스트를 실시하였다. 시료 5종에 대한 관능 테스트 결과 유자 정유와 유사한 향취를 갖는 배합비를 찾을 수 있었다. 하지만 과즙감이나 유자껍질의 쓴 느낌의 향취 등이 많이 차이가 났다. 천연 유자정유의 경우는 Top Note는 굉장히 좋지만 단점으로 향취의 지속력이 약하고 시간이 경과하면 산패된다는 단점이 있다. 이에 반면 조합된 합성향료의 경우에 천연 유자정유와 반대로 Top Note는 비교적 약하지만 지속력은 좋은 편이었다.

### (3). 결론

Citrus계 향료의 가장 중요한 point는 향취의 지속성과 아울러 제품 적용시의 일정한 지속성을 가지는 것이다. 즉 유자 정유의 가치는 경시 변화에 따른 일정한 품질, 유자의 독특하고 강한 refresh image, 향취의 지속성이 일정하게 유지되는 것이 중요하다 라고 생각할 수 있다.

천연향료의 분석을 통한 결과에서 유자향료의 품질을 결정할 수 있는 Middle, Last note를 구성하는 보다 무거운 휘발성 향기성분에 대해서 집중적으로 연구를 하여 chemical을 이용하여 천연향에 가까운 향료의 개발과 이 향료를 이용한 제품개발에 주력하여 하면 더 좋은 제품을 만들 수 있을 것이라 사료된다.

## 나. 유자정유를 이용한 천연향의 제조 및 경제성 분석

### (1). 음료용 천연향 제조

음료용 천연향 제조를 위해 추출한 유자 Essential oil의 비율을 조정하여 Ethyl alcohol, Water를 조합하여 추출 및 부산유를 제거한 결과 유자 Essential oil 10, Ethyl alcohol 120, Water 80의 비율에서 회수율이 92.2%로 가장 낮았으며 Essential oil 20, Ethyl alcohol 120, Water 80의 회수율이 95.4%였으며, 향취의 강도 또한 적절하여 가격적인 측면에서 Essential oil이 적게 사용되고 향의 강도에서도 우수한 Essential oil 20, Ethyl alcohol 120, Water 80의 배합비가 음료용 천연향을 제조하기에 가장 적합한 배합비임을 알 수 있었다.

### (2). 껌용 천연향 제조

	Yuzu essential oil	Citrus essential oil	Total
#A	50	0	50
#B	45	Lemon essential oil (5)	50
#C	45	Orange essential oil (5)	50
#D	45	Grapefruit essential oil (5)	50
#E	45	Lime essential oil (5)	50

유자 essential oil에 citrus계열의 essential oil을 첨가한 천연향 제품을 껌에 적용하여 업체에 제시한 결과 #A, #B 및 #D가 가장 선호도가 높았으며 #C와 #E는 유자의 특징적인 맛과 향을 가려 선호도가 좋지 않았다. 이러한 결과를 반영하여 #A, #B 및 #D를 업체에 제시 하였다.

## 다. 장기간 보관 중 유분리 등에 대한 문제점 해결을 위한 균질조건 확립(유화향료)

### (1). 천연향의 제품 저장에 따른 관능평가

천연 유자향을 저장 조건을 다르게 하여 저장한 후 성상을 관능 test한 결과 저장 기간이 길어짐에 따라 미세하게 색이 진해졌다. 오븐(50℃)에서 저장했을 시 색의 변화가 가장 컸으며, 다음은 실온(25℃), 가장 색의 변화가 적은 조건은 냉장(4℃)보관 이었다.

저장조건에 따른 천연 유자향의 GC/MSD분석 결과 몇몇 Peak에서 미세한 높낮이 변화를 보였으나 전체적으로 큰 변화는 없었다.

3주간의 실험 결과 세 조건 모두 점성에 대한 변화는 없으며 성상은 조금 진해졌으나 육안상

큰 차이가 없는 미세한 변화였다. 향취 또한 저장 기간이 길어질수록 약간 강도가 약해지거나, 오픈 보관 조건 경우 절인 유자 향취가 조금 나타났으나 전체적으로 큰 변화가 없음을 확인하였다.

흡광도와 TIC는 모든 천연 유자향에서 동일한 패턴을 보였으며 시간이 지남에 따른 약간의 강도차이 만을 나타내었다.

결과를 종합해보면 천연 유자향의 성상, 향취 모두 안정성이 뛰어난 것을 알 수 있었다. 또한 실온 보관에 이상이 없으며 장기 보관이 필요한 경우 냉장 보관을 통해 품질 유지가 가능한 것으로 보인다. 또한 수입산 제품과의 품질을 비교한 결과 수입 유자 에센셜 오일보다 효소전처리 방법으로 추출된 에센셜 오일에서 보다 더 유자 특유의 향기 성분이 분석되었다.

## (2). 껌용 천연향의 저장 조건에 따른 관능평가

껌용 천연 유자향의 경시변화의 관찰을 위해 단기실험을 2014. 06. 02(초기값)부터 2014. 06. 20(최종값)까지 3주간 진행 할 예정이며 주 2회총 6회 측정 할 예정이다. 업체에 제시한 5가지 껌용 천연 유자향 중 가장 선호도가 좋았던 #A, #B 및 #D (표 4. 참고)를 이용하여 경시변화 실험을 진행 한 결과 유의적인 차이가 없었다.

## 라. 천연 유자 정유의 천연향료소재 제품화 및 제품화 적용기술의 개발

### (1). 식품 소재 개발 가능성 확인

**유자 음료:** 국내 flavor의 향료시장은 음료류 38%, 빙과류 25%, 캔디류 17%, 껌류 18%, 기타 2% 정도로서 향료 시장에서 음료가 차지하는 비중이 가장 크다고 할 수 있다. 특히 유자는 가장 대중적인 제품의 형태가 유자 음료이기도 하다. 그러나 현재까지 유자음료의 형태는 단순히 당침법을 이용한 음료의 형태로서 주로 가정에서 소비되는 측면이 있어 음료산업에서의 유자의 소비는 미비하다고 할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 유자농축액 및 유자과즙 유자 향을 이용하여 음료 제품으로서 적용 가능성을 확인하기 위하여 다음과 같은 배합비로 음료 제품을 개발 하였다.

**유자 아이스크림:** 유자 향료 및 유자 과즙을 이용하여 소비자의 고급감, natural 지향적으로 fresh하고 유자의 과즙감을 사용하여 여러 기능성을 부각시킴으로서 건강지향적인 제품개발 및 다양성을 요구하는 소비자들의 욕구를 충족시킬 수 있을 것으로 사료된다. 본 실험에서는 유자향과 유자 과즙을 이용하여 아이스크림 제품에 응용가능성을 확인하기 위하여 아이스크림 제품을 개발 하였다.

**유자 요거트:** 유자 소재를 이용한 제품의 다양성 및 유자의 기능성을 부여하여 건강기능식품의 개발의 필요성이 요구되어지고 있다. 따라서 본 실험에서는 조합된 유자향 및 유자 과즙과 유자 농축액을 이용하여 유제품에 응용 가능성을 확인하기 위하여 유자 요거트 제품에 적용하여 가능성을 확인 하였다.

**유자 젤리:** 조합된 유자향 및 유자 과즙액을 이용하여 젤리 제품에 응용 가능성을 확인하기 위하여 제품을 개발하였다.

**유자 껌:** Gum에 응용하기 위해서 물성 및 지속성(long lasting)이 중요한 요소이다. 유자는 감귤류의 특성상 향의 지속성이 떨어진다는 단점을 가지고 있다. 본 실험에서는 유자 향기성분의 지속성을 늘리기 위하여 유자향의 조합조건을 달리하여 지속가능한 유자향을 개발하였다. 조합된 유자 향을 이용하여 껌 제품으로서 응용가능성을 확인하기 위하여 제품을 개발하였다.

## (2). 향장품 소재 개발 가능성 확인

유자향을 소재로 하여 향자아품 소재로서의 적용 가능성을 확인하기 위하여 유자 세안제 및 비누, 입욕제, 향초등을 개발 하였다.

## (3). 폐유자박을 활용한 동물 사료소재로서 개발 가능성 확인

**유자박 사료:** 고기능성 성분을 다량 함유하고 있는 유자 부산물을 이용하여 동물성 사료 소재로서의 가능성을 확인하여 동물에 질병예방과 면역력 증가를 기대할 수 있을 것이라 생각되어 사료제품에 소재로서 응용하여 제품을 개발 하였다.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

가. 국제적 경쟁력을 갖춘 국내의 다양한 향료 원료로부터 향료를 추출하고 분석하여 실체를 파악하는데 있어, 효소를 이용한 전처리 방법이 유용한 방법임을 확인 하였다.

나. 한국산 유자의 향은 전 세계적으로 citrus계의 향중에서 가장 각광 받아 왔음에도 국내에서 그 향의 실체를 파악치 못하여 유자과즙의 형태로 혈값에 수출되어 왔던 품목이었으나, 본 연구의 결과 실체를 파악함으로써 compounding flavor를 자유자재로 조합할 수 있게 되어, 주문자의 요구에 즉각적으로 대응할 수 있는 체제를 갖추었다.

다. 본 과제에서는 유자의 essential oil로부터 유자향 추출에 관한 것으로 국한하였으나, 과제 진행중 수용성 유자과즙 자체도 훌륭한 유자향이 될 수 있음을 파악 하였다. 따라서 기존에 이미 알려진 유자의 향산화성 및 항암 효과와 더불어 수용성 유자 과즙을 이용한 다양한 제품을 개발 하여 홍보 한다면 유자 농가의 소득 증진에 직접적 도움이 되리라 생각된다.

라. 본 연구에서 개발된 compounding flavor는 음료에도 적용 가능한 수용성으로 향후 다양한 유자 음료 개발에 지대한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

마. 향후 유자 향료의 품질을 결정할 수 있는 middle note 및 last note를 구성하는 보다 무거운 휘발성 향기성분과 threshold가 낮은 성분들에 대해서 집중적으로 연구하여, aroma chemical로 조합하여 천연향에 가까운 향료의 개발과 이 향료를 이용한 제품개발에 주력하면 더 좋은 제품을 만들 수 있을 것이라 사료된다.

## SUMMARY

This study was designed and carried out to investigate new technologies that could be used in improving flavor (chemical) profiles of “Yuzu Essential Oil (oil)” by enzymatic and/or microbial biotransformation, and to develop its commercial applications, such as yuzu flavor formulations.

In this study, the recovery of yuzu oil was greatly enhanced (*i.e.*, 2–10 times) by enzymatic pretreatments of yuzu fruit peels, such as pectinase with cellulase and/or xylanase. In addition, to improve the recovery rate of yuzu oil from yuzu fruit peels, residential fungal cultures, that could be grown on yuzu fruit peels by producing cellulosic degradation enzymes, were isolated. The recovery of yuzu oil has been increased following fungal destruction of yuzu fruit peels. Also yuzu oil could be recovered following yuzu fruit juice extraction (by-product) from Goheung yuzu cultivar. However, flavor (chemical) profiles and quality of yuzu oils, were not affected by either enzymatic and/or microbial pretreatments of yuzu fruit peels. The overall flavor chemical contents of the recovered yuzu oils except limonene were not significantly changed with antioxidant regardless their storage conditions, such as temperature and time.

Yuzu oils were extracted by cold-press and distillation methods. Distilled yuzu oil from yuzu fruit peels without albedo were a clear colored while distilled yuzu oil from yuzu fruit peels with albedo were dark black colored due to burning of albedo during distillation. The yuzu oil extracted from whole fruit had the best quality in color and smells, and was somewhat sweet and floral, but also yuzu characteristic acidic and pungent notes, and had a hint of burnt aroma in sensory evaluation of distilled yuzu oils. These flavor characteristics were important to apply yuzu oil into winning commercial flavor formulations

Recovered yuzu oils were analyzed by qualitative/quantitative GC-MS and sensory analysis to identify characteristic and key trace components that could busting “yuzu” flavor characteristics in essential oil itself and eventually using yuzu flavor formulations. During sensory analysis, thymol and nonanal were identified as “yuzu flavor busters” at lower levels. The addition of thymol and/or nonanal could enhance flavor quality and subsequently improve commercial values of yuzu oil enhancing fruity, floral or refreshing attributes that may contribute to positive effects on the yuzu aroma. However, the supply of natural thymol and nonanal was limited and too expensive to use in flavor formulation. So, it is important to develop a natural processes to produce thymol and nonanal and have a significant commercial value.

Initially, to develop biotransformation processes for the natural biosynthesis of thymol, natural citral and limonene from citrus essential oil extraction that were abundantly available and cheap, were used as a substrate. It was expected that citral and/or limonene might undergo “aromatization” and could be converted into p-cymene and then thymol by microbial biotransformation. The total of 21 species out of 79 microbial species screened, did show capability of transforming citral or limonene into other flavor chemicals, but not thymol. The possibility for the production of value-added natural flavor chemicals from citral and/or limonene is being fully explored.

Contrary to the thymol biotransformation process development, the development of natural nonanal production from nonanol by microbial biotransformation was successful. *Gluconobacter cerinus* ATCC 23777 was initially screened for this bioconversion of nonanol to nonanal via microbial oxidation reaction. UV mutagenesis was carried out to select *G. cerinus* super aldehyde producer mutant (SH1). A commercial biotransformation process for the production of natural nonanal was developed at the production level of > 14g/liter in the fermenter.

For the application of yuzu oil into commercial flavor formular that could be used in various food types, such as drinks, beverages, gums, yogurts, jellies and icecreams, and household fragrance types, such as soups, facial washer, body washer, air fresheners and candles, various flavor/fragrance were formulated and analysed by GC-MS and sensory evaluation. As an essential oil, yuzu oil had good top notes but less persistency. However, formulated yuzu flavor containing yuzu oil was fairly good top notes with persistency. Yuzu flavor formular were fairly stable in the long-term storages at various temperature (4, 25, and 50°C).

Recently, the yuzu flavor was formulated by Aromaline, and actually introduced into lower alcoholic beverages “Soju” as a part of this projects in terms of applications and commercialization. The “Yuzu” flavored soju was so popular for young, specially woman, and yuzu flavor production in Aromaline actually contributed its revenue increase in 2015.

In conclusion, the production of yuzu essential oil from Goheung Yuzu cultivar, not just can increase farm incomes, but also can enhance ability natural flavor formulation by not just the production of natural essential oil, but also the application of biotransformation technology for the production of high valued flavor chemicals. The technology developed in this projects eventually improve the competitiveness of Korean flavor and fragrance industry in world.

## CONTENTS

### **Chapter 1. Scopes of the Study**

#### **I. Objectives of the Study**

1. Flavor and Fragrance Industry (F&F Industry)
  - A. F&F Industry as a High-Valued Industry
  - B. Development of new Ingredients in F&F Industry
2. Challenges in Korean F&F Industry
3. Future Prospects

### **Chapter 2. Trends of Global F&F Industry - Technical Developments**

#### **I. Production & Markets**

1. Global F&F Industry
2. F&F Industry in Korea

#### **II. Technical Developments in Korean F&F Industry**

1. Limitation of F&F Industry in Korea
2. Future Technical Advancements

#### **III. Results in this Study**

### **Chapter 3. Results & Discussion of the Study**

#### **I. Development of Biological Pre-treatment Methods to Improve Yuzu Essential Oil Recovery**

1. Extraction of Yuzu Essential Oil
2. Materials and Methods
  - A. Yuzu Essential Oil Recovery following Physical and Enzymatic Pretreatment of Yuzu Fruit Peel
  - B. Yuzu Essential Oil Recovery following Physical and Enzymatic Pretreatment of Yuzu Fruit
  - C. Characterization of Yuzu Oils with various Pretreatments
    - (1). Characterization of Extracted Yuzu Oils
    - (2). Characterization of Yuzu Oil from Yuzu Fruit Peel following various Enzymatic Pretreatments



- (3). Characterization of Yuzu Oil from Yuzu Fruit Peel following various Enzymatic Reaction Conditions
- 3. Production of Yuzu Oil from Wastes of Yuzu Juice Extraction
  - A. Evaluation of Waste Properties during Yuzu Juice Extraction
- 4. Microbial/Enzymatic Processes for Enhancing Characteristic Components in Yuzu oil and their Characterization
  - A. Changes in chemical composition by *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994
  - B. Changes in chemical composition by Enoyl-acyl carrier protein reductase (FAB I)
- 5. Recovery of Yuzu oil by Pretreatment of Yuzu using intrinsic fungal cultures
  - A. Isolation of Intrinsic Fungi
  - B. Growth of Intrinsic Fungi
  - C. Recovery of Yuzu oil following fungal culturing
  - D. Chemical composition of recovered Yuzu oil following fungal culturing
- 6. Flavor Chemical Profile Analysis following Storage conditions
  - A. Temperature and Times
  - B. Antioxidant
- 7. Results and Discussions
  - A. Optimization of Yuzu oil Extraction by biological pretreatment
    - (1) Yuzu Essential Oil Recovery following Physical and Enzymatic Pretreatment of Yuzu Fruit Peel
    - (2) Yuzu Essential Oil Recovery following Physical and Enzymatic Pretreatment of Yuzu Fruit
    - (3) Characterization of Yuzu Oils with various Pretreatments
  - B. Characterization of Yuzu Oil from Wastes of Yuzu Juice Extraction
  - C. Changes in chemical composition by *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994
  - D. Changes in chemical composition by Enoyl-acyl carrier protein reductase (FAB I)
  - E. Microbial/Enzymatic Processes for Enhancing Characteristic Components in Yuzu oil and their Characterization
  - F. Flavor Chemical Profile Analysis following Storage conditions - Temperature & Times
  - G. Flavor Chemical Profile Analysis following Storage with Antioxidant

## II. Flavor Profile Analysis of Yuzu Oil and Enhancement of Yuzu Characteristics using Microbial Biotransformation

1. Flavor Profile Analysis of Yuzu oil & Identification of trace characteristic components by GC-MS Analysis
  - A. Introduction
  - B. Materials and Methods
    - (1) Yuzu Fruit (Goheung)
    - (2) Yuzu oil by Cold-pressed Extraction
    - (3) Yuzu oil by Distillation
    - (4) Living Flavor Analysis of Yuzu oil
    - (5) GC-MS Analysis of Yuzu oil
  - C. Results & Discussions
    - (1) Sensory Evaluation of Yuzu Oils recovered from various part of Yuzu Fruit using Cold-pressed Extraction
    - (2) Flavor Chemical Profile Analysis of Distilled Yuzu Oil
    - (3) Sensory Evaluation of Distilled Yuzu Oil
    - (4) GC-MS Analysis of Yuzu Oil
    - (5) Living Flavor Analysis of Yuzu Oil by GC-MS analysis
2. Identification of Busting chemical components to improve Yuzu Characters by Flavor Profile Analysis
  - A. Materials and Methods
    - (1) Flavor Profile Analysis of Yuzu Oil
    - (2) Identification of Busting chemical components to improve Yuzu Characters by Sensory Evaluation
    - (3) Optimization of Yuzu Characters by adding Busting chemical components
  - B. Results and Discussions
    - (1) Flavor Profile Analysis by GC/GC-MS analysis
    - (2) Identification of Busting chemical components to improve Yuzu Characters by Sensory Evaluation
    - (3) Identification of Busting chemical components
    - (4) Changes in Flavor Profile by Addition of Thymol and Nonanal
    - (5) Enhancing sensory characteristics of Yuzu oil by addition of Tymol and Nonanal
3. Development of Natural Biotransformation Process for Busting chemical components to improve Yuzu Characters
  - A. Introduction
  - B. Materials and Methods

- (1) Development of Microbial Biotransformation Processes for Impact chemicals from Limonene/citral
    - (a) Screening Microbial cultures for Biotransformation
    - (b) Optimization of Microbial Biotransformation
    - (c) GC-MS Analysis
    - (d) Flavor Profile Analysis and Sensory Evaluation of Naturally formulated Yuzu flavor
  - (2) Development of Microbial biotransformation for Nonanal Production
    - (a) Screening Microorganism for biotransformation of Nonanol to Nonanal
    - (b) GC Analysis
    - (c) Mutagenesis of *Gluconobacter cerinus* ATCC23777 for alcohol Dehydrogenase mutants
    - (d) Microbial Biotransformation for Nonanal Production
    - (e) Analysis of Alcohol Dehydrogenase(ADH) and Aldehyde Dehydrogenase(ALDH) activities of *Gluconobacter cerinus* ATCC 23777
    - (f) Analysis of Alcohol Dehydrogenase(ADH) and Aldehyde Dehydrogenase(ALDH) activities of *Gluconobacter cerinus* ATCC 23777, mutants JH4, JHS3
- C. Results and Discussions
- (1) Development of Microbial Biotransformation Processes for Impact chemicals from Limonene/citral
    - (a) Screening Microbial cultures for Biotransformation
    - (b) GC-MS Analysis
    - (c) Flavor Profile Analysis and Sensory Evaluation of Naturally formulated Yuzu flavor
  - (2) Development of Microbial biotransformation for Nonanal Production
    - (a) Screening Microorganism for biotransformation of Nonanol to Nonanal
    - (b) Mutagenesis of *Gluconobacter cerinus* ATCC 23777 for alcohol Dehydrogenase mutants
    - (c) Alcohol Oxidation by *Gluconobacter cerinus* ATCC 23777 Mutants
    - (d) Biotransformation for production of Nonanal by *Gluconobacter cerinus* ATCC 23777 Mutants
    - (e) Analysis of Alcohol Dehydrogenase(ADH) and Aldehyde Dehydrogenase(ALDH) activities of *Gluconobacter cerinus* ATCC 23777
    - (f) Analysis of Alcohol Dehydrogenase(ADH) and Aldehyde

Dehydrogenase(ALDH) activities of *Gluconobacter cerinus*  
ATCC 23777, mutants JH4, JHS3

### **III. Application of Natural Yuzu Oil in Commercial Flavor Formulations and their Uses in Foods**

1. Development of Natural Flavors
  - A. Yuzu Flavor Creation following GC-MS Analysis of Yuzu Oil
    - (1). GC-MS Analysis of Yuzu Oil
2. Creation of Yuzu Flavors following GC-MS Analysis
  - A. GC-MS Analysis and Sensory Evaluation of Yuzu Flavors
    - (1). GC-MS Analysis of Yuzu Flavors
    - (2). Sensory Evaluation of Yuzu Flavors
    - (3). Analysis of Sensory Results
3. Natural Flavor Creation with Yuzu oil and Evaluation of Economic Value
  - A. Natural Flavors for Beverages
  - B. Natural Flavors for Gums
4. Emulsification of Natural Yuzu Flavors for Long-term Storage
5. Sensory Evaluation for Foods with Natural Yuzu Flavors
  - A. Sensory Evaluation for Beverages with Natural Yuzu Flavors
  - B. Sensory Evaluation for Gums with Natural Yuzu Flavors
6. Applications of flavor
  - A. Yuzu drink
  - B. Yuzu ice cream
  - C. Yuzu yoghurt
  - D. Yuzu jelly
  - E. Yuzu gum
7. Applications of fragrance
  - F. Yuzu form cleanser
  - G. Yuzu soap
  - H. Yuzu bath salt
  - I. Yuzu candle
8. Applications of Yuzu waste
  - A. Animal feed from yuzu waste

## **Chapter 4. Accomplishments and contributions**

### I. Scope of the Study and Accomplishments

1. Scopes of Research Projects
2. Accomplishments

### II. Contributions to related Areas

## **Chapter 5. Applications of the study**

## **Chapter 6. References**

# 목 차

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적

1. 국내외 향료산업의 현황
  - 가. 고부가 산업으로서의 향료산업
  - 나. 향료산업의 경쟁력 확보를 위한 향료소재의 개발
2. 국내 향료산업의 문제점
3. 앞으로의 전망

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 생산 및 시장 현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

### 제 2 절 국내 업계 동향

1. 국내 향료산업 발전의 저해요인
2. 향료 산업의 발전 방안

### 제 3 절 국외 관련 기술

1. 국외 제품생산 및 시장 현황

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 유자 정유의 생산성 극대화를 위한 생물학적 전처리 기술 개발

1. 천연향 추출법
2. 연구내용 및 결과
  - 가. 유자의 과피만을 이용한 효소 및 물리적 전처리 공정과 정유 추출 수율
  - 나. 유자 원과를 이용한 효소적 전처리 공정과 정유 추출 수율
  - 다. 전처리 조건에 따른 유자 정유의 Flavor profile 특성
    - (1). 유자 정유 추출물의 Flavor profile 특성
    - (2). 유자 과피를 이용한 효소별 정유 추출물의 Flavor profile 특성
    - (3). 유자 과피를 이용한 효소반응 시간에 따른 정유 추출물의 Flavor profile 특성
3. 폐 유자박을 이용한 유자 essential oil 생산
  - 가. 공정별 발생하는 유자박 특성 평가
4. 부향 성분 향상 및 주요 부향 성분 확인을 위한 정유의 미생물/효소 처리 공정
  - 가. Pseudomonas sp. NRRL B-2994를 이용한 유자 정유성분의 변화

- 나. Enoyl-acyl carrier protein reductase (FAB I)를 이용한 유자 정유성분의 변화
- 5. 곱팡이로부터 생물전환에 따른 유자 정유의 추출 수율 및 향기성분의 변화
  - 가. 곱팡이 분리
  - 나. 곱팡이 배양
  - 다. 곱팡이 배양에 따른 essential oil의 추출 수율
  - 라. 곱팡이 배양에 따른 essential oil의 향기성분 변화
- 6. 저장 조건에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석
  - 가. 저장 온도 및 기간에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석
  - 나. 항산화제 첨가에 따른 유자 정유의 저장 조건별 Flavor Profile 분석
- 7. 결과 및 고찰
  - 가. 유자 정유의 생산성 극대화를 위한 생물학적 전처리
    - (1). 유자의 과피만을 이용한 생물학적 및 물리적 전처리 공정과 정유 추출 수율
    - (2). 유자 원과를 이용한 essential oil 추출 수율 및 특성
    - (3). 전처리 조건에 따른 유자 정유의 Flavor profile 특성
  - 나. 폐 유자박을 이용한 유자 essential oil 생산
  - 다. Pseudomonas sp. NRRL B-2994를 이용한 유자 정유성분의 변화
  - 라. (FAB I)를 이용한 유자 정유성분의 변화
  - 마. 유자의 미생물/효소 전처리 조건에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석
  - 바. 저장 온도 및 기간에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석
  - 사. 항산화제 첨가에 따른 유자 정유의 저장 조건별 Flavor Profile 분석

## 제 2 절 유자 정유의 Flavor Profile Analysis 및 생물전환기술을 이용한 정유의 Flavor 특성극대화 기술 개발

- 1. 유자 정유의 Flavor Profile Analysis 분석 및 미량 방향성분 정성/정량 GC-MS 성분 분석
  - 가. 서론
  - 나. 연구개발의 내용 및 방법
    - (1) 유자 시료 구입
    - (2) Cold-pressed 유자 정유 추출
    - (3) Distilled 유자 정유 추출
    - (4) 유자의 living flavor 추출
    - (5) 유자 정유 GC-MS 분석 조건
  - 다. 연구 결과 및 고찰
    - (1) 유자부위별 Cold-pressed 유자 정유의 관능평가
    - (2) Distilled 유자 정유의 성분 분석
    - (3) Distilled 유자 정유의 관능평가
    - (4) 유자 정유의 GC-MS 분석
    - (5) 유자의 GC-MS living flavor 분석

## 2. Flavor Profile Analysis를 통한 유자정유 부향 향기성분의 동정

### 가. 연구개발의 내용 및 방법

- (1) 기존 유자 Essential Oil의 Flavor Profile Analysis
- (2) 관능평가를 통한 미량/특유 정유 성분의 방향 특성 확인
- (3) 부향 향기 성분과 정유 성분의 최적 혼합비율 기준 설정

### 나. 연구결과 및 고찰

- (1) GC/GC-MS를 통하여 flavor Profile Analysis
- (2) 관능평가를 통한 미량/특유 정유 성분의 방향 특성 확인
- (3) 부향성분의 동정
- (4) Thymol과 Nonanal 첨가 시 유자 향미 프로파일 변화
- (5) Tymol과 Nonanal에 의한 유자 Essential Oil의 관능적 특성의 향상

## 3. 유자 정유 부향 향기성분의 천연합성을 위한 생물전환기술

### (Biotransformation) 개발

### 가. 서론

### 나. 연구개발의 내용 및 방법

- (1) Limonene/citral을 기질로 Impact chemical Microbial Biotransformation 공정 개발

- (가) 생물공정에 사용할 미생물 균주 선발
- (나) 미생물의 천연합성을 위한 최적 공정 조건
- (다) 천연합성된 물질의 Gas Chromatography 분석
- (라) Flavor Profile Analysis 및 관능평가를 통한 천연 유자 정유 Creation

- (2) Nonanal 생산 위한 Microbial biotransformation 개발

- (가) Microorganism screening for biotransformation of Nonanol to Nonanal
- (나) GC Analysis
- (다) *Gluconobacter cerinus* ATCC23777균주를 이용한 고효성 Alcohol Dehydrogenase 돌연변이 균주 선발
- (라) Nonanal 생합성을 위한 Fermentation
- (마) *Gluconobacter cerinus* ATCC23777 균주의 Alcohol Dehydrogenase(ADH)와 Aldehyde Dehydrogenase(ALDH)의 활성 분석
- (바) *Gluconobacter cerinus* ATCC23777과 JH4, JH S3의 Alcohol Dehydrogenase(ADH)와 Aldehyde Dehydrogenase(ALDH)의 활성 비교

### 다. 연구결과 및 고찰

- (1) Limonene/citral을 기질로 Impact chemical Microbial Biotransformation 공정 개발

- (가) limonene/citral을 기질로 활용하는 미생물 균주 선발
- (나) 천연합성된 물질의 GC-MS분석
- (다) 천연합성된 물질의 GC-MS 분석
- (라) 유자 정유의 impact chemical로 사용된 합성 물질
- (마) Flavor Profile Analysis 및 관능평가를 통한 천연 유자 정유 Creation



- (2) 유자 Impact Chemical “Nonanal” Microbial biotransformation Process
  - (가) Nonanal 생성 균주의 선별
  - (나) Mutagenesis of *G. cerinus* ATCC 23777
  - (다) *G.cerinus* ATCC23777과 돌연변이 균주의 생육 특성과 Ethanol 산화 특성조사
  - (라) *G.cerinus* ATCC23777과 선발된 균주 JH4, JH S3를 이용한 Nonanal 생산
  - (마) *Gluconobacter cerinus* ATCC23777의 Alcohol Dehydrogenase(ADH)와 Aldehyde Dehydrogenase(ALDH)의 활성 위치 분석
  - (바) *Gluconobacter cerinus* ATCC23777과 JH4, JH S3의 Alcohol Dehydrogenase(ADH)와 Aldehyde Dehydrogenase(ALDH)의 활성 비교

### 제 3 절 천연 유자 정유의 천연향료소재제품화 및 제품화 적용기술의 개발

1. 천연소재로부터 향료를 개발하는 방법
  - 가. 유자정유의 GC/Mass 분석에 따른 Chemical 조합
    - (1). 유자정유의 GC/Mass 분석
2. GC/Mass분석에 따른 Chemical 조합
  - 가. 조합시료의 GC/mass 분석 및 관능테스트
    - (1).조합시료의 GC/mass 분석
    - (2). 재조합 시료의 관능 테스트
    - (3). 재조합 시료의 관능 테스트
    - (4). 결론
3. 유자정유를 이용한 천연향의 제조 및 경제성 분석
  - 가. 음료용 천연향 제조
  - 나. 껌용 천연향 제조
4. 장기간 보관 중 유분리 등에 대한 문제점 해결을 위한 균질조건 확립(유화향료)
5. 천연향의 제품 저장에 따른 관능평가
  - 가. 음료용 천연향의 저장 조건에 따른 관능평가
  - 나. 껌용 천연향의 저장 조건에 따른 관능평가
6. 식품 소재 개발 가능성 확인
  - 가. 유자 음료
  - 나. 유자 아이스크림
  - 다. 유자 요거트
  - 라. 유자 젤리
  - 마. 유자 껌
  - 바. 유자 주류
7. 향장품 소재 개발 가능성 확인
  - 가. 유자 세안제
  - 나. 유자 비누

- 다. 유자 입욕제
- 라. 유자 향초
- 8. 폐유자박을 활용한 동물 사료소재로서 개발 가능성 확인
- 가. 유자박 사료

## **제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도**

### 제 1 절 연구개발 착안점 및 달성도

1. 연구 계획시의 착안점
2. 연구 수행후의 달성도

### 제 2 절 관련분야의 기술발전에의 기여도

## **제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획**

## **제 6 장 참고문헌**

## 제 1장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발의 목적

### 1. 국내외 향료산업의 현황

#### 가. 고부가 산업으로서의 향료산업

소비자들의 소득 수준이 높아짐에 따라 현재 well-being이라는 시장 추세에 소비자들의 욕구는 천연지향, 건강 지향적인 제품을 선호하게 되었다. 시장 형성의 주도권을 이끌기 위해서는 다양한 소비자요구를 충족시킬 수 있는 천연향료를 개발하여 이를 이용한 식품제품화 하는 것이다.

천연향료의 소재는 동식물로부터 약 1500여종의 향료 소재가 있지만, 상업적으로는 200여종이 사용된다. 그 형태로는 Essential oil, Absolute, Concrete, Resinoide, Oleoresine, Tincture & Infusion, Balsam, Recovery flavor있으며, 인도 및 중국의 대량 재배에 따른 원료 방향 식물의 재배와 선진국을 중심으로 한 고부가 Essential oil production 기술 개발 및 상업화가 추진되고 있어 경제대국으로서의 새로운 산업 진출 및 차세대 먹거리 사업이 고부가 산업으로 발전할 필요가 있다.

천연향료의 소재는 대부분 식물체에서 수증기증류(Steam distillation), 압착법 (Expression), 흡착·흡수법(Absorption), 냉침법(Enfleurage), 온침법(Maceration), 용제 추출법(Solvent Extraction), 침출물(Percolation)등에 의해 채취되는 것이 대부분으로, 정유 생산량의 증대 및 생산된 정유의 Flavor Profile을 증진 시킬 수 있는 생물/화학적 전처리 공정의 개발과 함께, 미생물을 포함한 생물자원을 이용한 생물전환기술의 적용 및 이를 이용한 식품을 포함한 제품의 상업화 기술의 개발이 절대적으로 필요함.

향료산업은 국가의 경제적 발전과 밀접한 관계를 가지고 있어, 대부분의 향료산업은 선진국가인 미국, 유럽국가 및 일본을 중심으로 발달하였으며, 향료산업이 발달한 유럽은 약 300여년, 일본은 약 100여년 정도의 오랜 역사를 가진 반면, 경제적으로 낙후되었던 국내 향료 산업은 50여년의 짧은 역사를 가지고 있어 아직 유럽, 일본 등에 대한 기술 및 원료에 대한 수입 의존율이 높은 상태로 경제력의 증가와 더불어 국내 향료산업은 아직 성숙되지 않아 선진국형 향료산업의 발전이 절대적으로 필요하다.

경제 발전과 함께 소비자의 새로운 소비경향을 반영하기위해 국내 향료산업의 발달 속도는 미국 및 유럽이나 일본 등과 비교해 매우 급진장하고 하고 있으나, 천연 및 합성 향료물질의 개발이 미약하여, 향료산업 선진국과 비교하여 대부분 외국 향료 물질을 수입하여 조합하는 조합향료 개발에 치중하고 있어, 독창성 및 가격 경쟁력에 제한이 있어 한국 고유의 향료물질의 개발을 통한 새로운 향료 산업의 발전을 위해 수입향료를 국내 기술로 대체 개발하는 노력이 시급한 것으로 분석되고 있다.

#### 나. 향료산업의 경쟁력 확보를 위한 향료소재의 개발

**천연향료소재의 제한:** 향료소재에는 천연향료, 합성향료가 있다. 천연향료에는 동물성향료, 식물성향료로 나눌 수 있고 식품향료에는 주로 식물성향료가 이용되고 있다. 식물성향료에는 식물의 여러 부위를 이용(과실, 잎, 과피, 종자, 뿌리)하여 압착, 증류, 추출 등의 방법으로 향료 소재를 채취하게 된다. 하지만 천연향료는 재배 면적 및 정유의 수율의 한계를 지닌 경제적인 측면의 문제점과 기후 등의 환경요인에 의한 원료수급 불안정한 단점이 있어, 천연향료소재의

양적 제한에 따른 소비자 기호도를 충족시키지 못하는 한계를 가지고 있다..

**합성향료소재의 제한:** 반면, 합성향료소재는 천연향료소재에 존재하는 구성성분 중 향료특성의 지닌 화학물질의 선택하여, 유기화학 합성기술을 이용하여 생산된 NI (nature identical chemical; eg., vanillin, maltol 등)과, 인위적으로 향기성분을 가진 화학물질을 유기합성기술을 이용하여 합성한 artificial chemical(eg., ethyl vanillin, ethyl maltol 등)으로 구분되어 생산되고 있으며, 1900년대 이후 급속도로 발전한 향료산업을 위한 향료소재의 공급 및 가격 안정성과 이를 포함한 제품의 품질 안정성을 유지할 수 있어 향료개발에 많이 이용되고 있으나, 최근 소비자의 천연 향료에 대한 선호도로 인하여 천연향료물질로 대체를 위한 기술개발이 활발히 진행되고 있다.

**천연향료소재개발을 위한 새로운 기술개발 동향:** 21세기 well-being 트렌드에 따른 소비자의 천연향료소재 선호도 증가에 따라, 미국 및 유럽과 일본 향료회사를 중심으로;

- 천연향료소재를 위한 새로운 생물자원의 확보 및 재배와 Essential oil의 생산성증대 및 질적향상을 위한 새로운 추출법의 개발이 진행되고 있으며,
- 방향식물의 분석을 통한 천연향료소재의 향기 특성의 화학적 연구를 통해서 방향성분과 조성을 규명하고,
- 천연향료소재의 향료특성을 강화하기 위해 Flavor Profile분석을 통한 방향특성의 극대화, 미생물/효소를 이용한 생물전환기술을 이용하여 상대적으로 공급과 가격이 저렴한 천연향료 소재의 고부가 천연향료소재로의 전환을 시도하고 있으며,
- 분석기기의 발전으로 천연향료에 함유되어 있는 극미량의 특이 또는 독창성을 줄 수 있는 향기성분을 동정이 가능하여, 생물전환공정 및 환경친화적 유기합성 방법을 통한 유기생합성의 방법이 개발되고 있어 이러한 이유로 고부가 산업으로서의 향료산업의 전망은 밝다고 할 수 있겠다.

**소비자의 상상력을 위한 새로운 향료의 창조:** 최근 소비자는 기존에 존재하지 않은 새로운 삶의 경험을 위하여 새로운 느낌을 줄 수 있는 Fusion 향료의 개발을 요구하고 있어 천연에 존재하지 않는 합성향료의 출현과 더불어 천연에는 없는 환상적인, 추상적인 향을 개발하는 연구가 시작되어 천연 및 합성 향료소재의 다양성이 증가되면서 “조합향료의 명작”의 개발과 함께 식품을 포함한 제품의 적용기술 개발이 활발히 진행되고 있다.

**고부가 기술집약적 산업인 향료산업:** 향료산업은 다른 화학 산업에 비하여 고부가가치 산업이며, 기술 집약적 산업이라고 할 수 있다. 현재 세계 향료시장은 약 112억불의 규모이며 이 중 한국 시장은 약 1.4억불로 전체의 약 1.6%를 점유하고 있다. 국내 향료시장은 금액적으로 약 1,200억원 수준으로 해마다 증가추세에 있다. 국내 향료시장은 대부분 외국향료 회사가 점유하고 있다.

**한국 향료산업의 해외의존도:** 외국 향료업체의 국내 시장 점유율을 보면 일본이 약 52%를 차지하고 있으며, 그 다음으로 싱가포르가 11.4%를 차지하고 있다. 외국향료사중 일본이 국내 시장의 대부분을 점유하는 이유는 식품에 대한 기호도가 비슷하고, 원활한 원료수급과 기술지원 때문이라고 사료된다. 국내시장을 점유하고 있는 주요 외국향료업체들로는 TAKASAGO (일본), IFF(미국), SYMRISE(독일), GIVAUDAN(스위스)등이다.

## 2. 국내 향료산업의 문제점

**국내 향료산업의 영세성:** 국내 향료 생산업체는 아주 영세하고, 외국 향료사에 비해서 투자 부족과 기술적 어려움 등으로 경쟁력이 떨어지고, 지속적, 장기적인 기술개발보다는 현안에 급급한 모습을 보이고 있으며, 외국향료사의 Key Base원료를 수입하고 판매하고 있어 기술개발은 등한시하는 실정이다. 향료의 공급을 위해 향료공급업체가 난립하고 국내 생산업체의 연구개발 부족으로 인하여 경쟁력이 매우 취약하며, 국내 향료산업의 경쟁력은 최근 천연 및 합성 향료물질의 개발과 함께 선진 조향기술을 도입한 중국에도 뒤떨어지고 있다.

**국내 향료산업의 기술적 낙후성:** 국내 향료산업은 원료의 수급을 포함한 향료완제품의 수입 판매에 의존하고 있어, 기술적 역량이 부족하여 합성향료측면에서도 아직 선진향료회사와 비교할 때 60여년이라는 기술 격차가 있다고 한다. 뿐만 아니라 천연향료에 대해서는 연구개발이 전무한 상태로 초기 걸음마 과정이라고 할 수 있겠다.

**독창적 향료소재개발을 통한 국내 향료산업의 전환:** 산업향료 역사가 긴 선진향료 회사 (IFF, FIRMENICH, TAKASAGO, GIVAUDAN etc.)는 축적된 향료기술 및 원료 생산기술로서 국내 향료시장을 잠식하고 있으며, 이에 대처하기 위해서는 국내 향료산업의 경제적 안정성 확보와 국내 시장에 적합한 향료생산을 위한 독창적 향료소재의 개발과 함께 조향을 위한 기술 축적이 시급한 실정으로, 독창적 향료소재의 개발은 국내 향료산업의 국제경쟁력 향상에 있어 중요한 관건이다.

## 3. 앞으로의 전망

**국내 천연향료소재의 개발:** 국내에서는 부가가치가 높은 향료소재를 생산하기 위한 기술개발과 새로운 향료 조합기술에 주력하는 한편 국내시장에 적합한 향료 개발과 국내에 자생하는 식물의 향기성분을 분석하여 천연향료의 국산개발에 힘을 쏟고 있다. 이를 위하여 국내 천연자원을 원료로 하여 국내 천연향료소재를 우리가 개발하는 것이 중요하며, 국내 향료산업이 국내를 넘어 국제 경쟁력을 가질 수 있는 가장 바람직한 방향이다..

**국내 향료산업의 발전방향:** 소득 수준의 증대와 Life style의 변화로 건강과 천연에 대한 관심이 고조되고 있고 천연 소재에 대해서도 관심 또한 높아지고 있다. 특히 제품의 선호도에 절대적으로 영향을 미치는 flavor는 거의 인공적인 즉 aroma chemical로 구성되어져 있다. 국내는 이러한 시대 변화에 부응하지 못하고 천연향료 소재를 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다. 뿐만 아니라 합성향료도 수입에 의존하고 있는 실정이다.

**본 연구의 중요성:** 일반적으로 국내에 공급되는 외국 향료는 Know-how노출, 보안성 때문에 향료조향에 필요한 “Base” 를 절대적으로 팔지 않는다. 즉 희석 제품만 국내에 팔고 있다. 이 연구를 통해서 독자적인 국내외에 인정받고 있는 “유자정유 (Yuzu Essential Oil)을 중심으로 한 천연향료소재의 개발과 함께 제품응용 기술을 개발할 경우 기존의 고부가가치인 합성향료를 수입 대체함과 동시에 수출산업화 할 수 있다. 천연향료소재의 경우 개발하고자하는 제품의 생산수율은 약 12% 정도가 되며 개발 제품이 국내에 약 1,000,000원/kg이고, 그것을 향료 제조 시 약 10,000원/kg 로 예상되어(100배의 고부가 향료원료의 생산) 충분한 경쟁력과 경제성을 가지고 있어 수출에도 큰 역량을 집중할 수 있다고 사료되며, 추가적으로 수입 향료 Natural Identical Type Base가치를 본다면 500,000원 /kg 정도이나 국내에서 Natural Identical Type향료 개발 시 10,000원/kg 에 생산 가능하리라 추산된다(50배의 고부가 제품의 생산).

**유자(Yuza):** 유자(*Citrus yuza*)는 감귤류에 속하는 작물로서 우리나라에서는 제주를 포함하여 고흥, 거창, 완도, 장흥, 강진, 거제 및 남해 등의 남해안 일대에서만 자생한다. 국내 전국 유자재배면적은 1,817ha이며 이중 전남 유자재배 면적은 1,098ha로 전국 60%를 차지하고, 유자생산량은 2010년 기준으로 고흥 3,000 ton, 완도 1,000 ton, 거제 1,200 ton 등 국내생산량은 약 6,000 ton정도 생산되고 있다. 하지만 유자는 과피가 두껍고 과육을 바로 소비할 수 있는 과실의 특성이 떨어져, 당침등의 제품개발과 함께 음료의 개발에 제한적으로 사용되고 있다. 현재, 유자는 우리나라의 자생식물로, 유자청으로 주로 가공되어 세계 여러 나라로 수출되고 있으며, 특히 남해지방은 기온, 강수량 및 일조량 등이 유자 재배에 적합한 지리적 특성을 가진 대표적인 산지로 그 품질의 우수성이 소비자들로부터 인정되고 있으나, 이에 대한 과학적 자료가 요구되고 있다. 유자는 수확시기가 11월에서 12월로 한정되어 있고, 저장성이 좋지 않아 가용 이용면에 있어서는 매우 미흡한 실정으로 주로 관상용이나 가정에서 단순히 유자차를 만들고 또는 소규모 가공공정을 통하여 단순 1차가공제품인 유자청을 제조하는 데 그치고 있는 실정으로 전체 유자 가공량은 매우 미약한 편이다. 특히 유자는 기호성이 높고 수요가 많아지고 있어 유자의 소비촉진 및 부가가치의 향상을 위해서 기호성과 상품성을 높일 수 있는 각종 제품의 향상을 위해서 기호성과 상품성을 높일 수 있는 각종 제품의 개발, 저장성 향상 및 제조설비에 관한 체계적이고 합리적인 공정설계에 관하여 연구를 적극적으로 해야 할 필요가 있으나, 이에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

**유자 정유의 우수성:** 유자는 천연의 뛰어난 방향성을 지니고 있는 대중적 과실로 오랜 기간 동안 널리 이용되고 있다. 유자는 식용작물로서의 한계를 가지고 있으나, 유자의 과피 및 과육에는 방향성 정유성분이 다량 존재하여 주로 과피가 음료나 향료 등에 제한적으로 이용되고 있다. 그러나, 일본에서는 유자 생산량의 56% 수준이 가공품으로 이용되고 있으며, 이들 가공품 중에서도 향료 소재가 가장 높은 고부가 제품으로 유통되고 있다. 또한, 전 세계적으로 선호도가 높은 citrus계 향료 중에서도 유자는 아주 고가의 향료소재로써 향의 특이성이 국제적으로 인정되고 있다.

**유자 정유의 시장 전망:** 전 세계적으로 가장 많이 생산되고 사용되고 있는 천연 향료소재는 Citrus계 식용작물 및 부산물을 이용한 Citrus Essential Oil로서, orange, lemon, grapefruit, lime등의 essential oil이 주로 사용되고 있으며, citrus계 essential oil을 기반으로 조향된 향료가 kg당 1~3만원대의 가격을 형성하고 있지만, 유자 essential oil를 함유한 조향향료는 거의 20배 (20-30만원/kg)에 가까운 가격을 형성하고 있는 상황이다.

**유자를 이용한 국내 농업의 고부가화:** 현재 천연향료소재로써 세계적으로 널리 각광받고 유통되고 있는 원료농산물은 orange, lemon, grapefruit, lime, mandarine 및 유자 등의 citrus계통 원료농산물이며, 이들 중에서도 우리나라에서는 유자가 경제·산업적 측면에서 파급효과가 큰 원료 농산물이다. 원료농산물로 선택한 유자는 최근 수년간의 과잉생산에 비해 아직도 1차적 가공 및 유통수준에 머물러 있는 기술수준과 소비량 감소가 가장 큰 원인으로 보고되고 있으며, 여기에 농산물 수입 개방화 정책이라는 거대한 파도에 고전하고 있는 농산물이다. 유자를 이용한 천연 향료소재 개발과 함께 조향향료의 개발 및 제품 적용기술의 개발은 산업적인 측면 및 경제적 측면으로 볼 때 안정적인추출기술의 개발과 함께, 당사의 조향기술을 조합할 경우, 국내 농업의 고부가 산업화와 함께 향료산업의 충분한 세계 경쟁력을 갖출 수 있을 것이다.

## 제 2장 국내외 기술개발 현황



## 제 1절. 생산 및 시장현황

### 1 국내 제품생산 및 시장 현황

국내 향료 산업은 향료의 원료인 aroma chemicals, essential oils등에 대한 수입 의존율이 100%에 이르고 있다. 특히, 국내 향료 시장은 연간 약 1800-2000억 원 이상의 시장규모를 형성하고 있고 다른 동남아 지역의 향료시장에 비해 규모가 작고 조합향료의 형태로 수입되는 향료의 비중이 높아 아직까지 기술개발은 저조한 상태이다. 최근 업체들의 향료 연구개발로 인해 flavor 및 fragrance를 자체 개발을 하고 있지만 조합 향료의 수입량에 비해서 미비한 실정이다.

향료 연구개발의 애로사항은 여러 가지가 있겠지만 그중에서도 원료의 높은 수입 의존율, 조향기술부족, 조향사 육성 부족 등이 주요한 문제점으로 작용하고 있는 것으로 알려지고 있다. 또한 국내 향료 시장은 조합향료의 수입관세와 aroma chemical의 수입관세가 비슷하게 규정되어 있어 조합향료의 수입비중이 상대적으로 증가, 국내 제조업체들의 향료 개발에 따른 어려움을 가중시키고 있는 것으로 알려졌다.

국내향료 시장은 flavor 비중이 fragrance에 비해 상대적으로 높아 flavor가 전체 시장의 약 60% 정도를 차지하고 있으며, fragrance가 약 35% 정도를 차지하고 있다. 그 중 국내 flavor의 향료시장은 음료류 38%, 빙과류 25%, 캔디류 17%, 껌류 18%, 기타 2% 정도로 추정되고 있다. 국내 fragrance분야는 생활수준향상과 함께 성장 가능성을 보여주고 있으나 아직 도입단계에 있는 실정이다. 도표1를 살펴보면 일본에 대한 의존율이 상당히 높은 것을 볼 수 있다. 그 중 식품향료는 거의 75%에 가까운 수입 의존율을 보이고 있는 실정이다. 이는 국내보다 많은 향료 연구개발이 되어있고 국내향료시장과 유사한 시장을 형성하고 있으며 또한 제품에 대한 기호도가 비슷한 이유이다. 뿐만 아니라 지역적으로 제품 수급이 용이하며 기술적 서비스가 유리한 장점을 가지고 있기 때문에 식품향료에 대한 강점을 가지고 있다.

한국의 업체는 외국 향료사에 비해서 투자부족과 기술적 어려움 등으로 경쟁력이 떨어지고, 지속적, 장기적인 기술개발보다는 현안에 급급한 모습을 보이고 있으며, 외국향료사의 key base원료를 수입하고 판매하고 있어 기술개발은 등한시하는 실정이다. 또한 향료공급업체의 난립으로 시장질서가 문란하고 국내생산업체의 연구개발 부족으로 인하여 경쟁력이 매우 취약해지고 있다.

최근, 국내향료산업의 경쟁력은 중국에도 뒤떨어지는 것으로 나타나서 문제의 심각성을 더하고 있다. 그러나, 최근에는 국내 수요시장에서 국내 연구개발에 의한 향료 개발에 수요업체가 협조하는 추세에 있으며, 장기적으로 국내 기호에 맞는 우리 고유의 향료를 중심으로 향료의 시장 점유율이 확대될 것으로 기대되고 있으며 향료 업체와 수요업체의 자구책 마련이 조금씩 시도되고 있는 것으로 알려지고 있다.

표 1. The amount of imported flavor from abroad

순위	국가명	금액(백만원) (2009)	%	금액(백만원) (2010.10월)	%
1	일본	66,450	51.95	62,421	51.38
2	싱가포르	14,582	11.40	13,522	11.13
3	독일	12,550	9.81	12,540	10.32
4	프랑스	8,420	6.58	8,013	6.60
5	미국	7,218	5.64	7,062	5.81
6	스위스	5,995	4.69	5,895	4.85
7	중국	4,266	3.33	4,054	3.34
8	영국	3,722	2.91	3,542	2.92
9	네덜란드	2,980	2.33	2,683	2.21
10	스페인	908	0.71	885	0.73
11	기타	826	0.65	868	0.71
	총 계	127,917	100	121,485	100

## 제 2절 국내 업계 동향

국내 향료시장은 59년에 한국농산을 시작으로 63년에 일본의 다가사코향료와 기술 제휴한 보락을 비롯해 76년에 프랑스 SICALAV사와 합작으로 설립된 한불화농, 서울향료, 롯데쇼핑, 삼화향료 등이 시장에 참여해 국내 향료시장을 형성했다. 이들 국내 향료 업체중의 일부업체에서 aroma chemical을 이용한 조합향료 개발에 박차를 가하고 있고 지속적인 연구개발을 통한 시장 확대에 나서고 있다.

국내 향료시장은 전체 시장의 80% 이상을 외국 업체들이 점유하고 있으며, 원료 또한 100% 수입에 의존하고 있어 향료개발에 대한 지속적인 투자가 요구되고 있다. 이러한 요구는 장기적으로 국내 소비취향에 적합한 고유의 향료개발을 촉진시킬 것으로 전망되고 있으며, 국내 제조업체의 시장점유율 향상이 기대되고 있다.

국내 향료제조업체로는 보락, 서울향료, 한불화농, 보락, 삼화향료, 삼정향료, 롯데쇼핑등이 있는데 서울향료와 한불화농만이 flavor와 fragrance를 같이 생산하고 있으며, 그 외 업체들은 flavor만을 생산하고 있다. 국내 제조업체에서 생산되고 있는 향료는 약 3000만달러 정도의 규모를 보이고 있어 전체 향료 시장의 약 15 - 20% 정도를 점유하고 있는 것으로 나타났다. 한편, 국내 향료 제조업체들은 외국 향료사에 비해서 투자부족과 기술적 어려움 등으로 경쟁력이 떨어지고, 지속적, 장기적인 기술개발보다는 현안에 급급한 모습을 보이고 있으며, 외국향료사의 key base원료를 수입, blending하여 판매하고 있으며 기술개발은 등한시하는 실정이다. 한때 몇몇 일부 업체에서 합성향료와 천연향료를 이용한 향료의 국산화를 위해 많은 연구를 진행하였으나 국내 향료시장은 내수품목 위주이다 보니 제품개발보다는 수익성에 급급하여 향료의 시장성 문란의 요인 등으로 인해 제품개발 투자 여건이 좋지 못한 실정에서 막대한 자금, 시간 등을 투자하여 제품개발을 한다 해도 시장성 또한 불안정한 상태이다. 더욱이 향료의 조합향료와 aroma chemical 의 수입관세가 비슷한 수준이기 때문에 국내향료사가 단품향료를 이용하여 기술개발을 하여도 원가 압박으로 인해 제조, 생산하여 판매한다는 것이 별 의미가 없는 일

이다.

역사가 긴 선진국의 향료사(IFF, FIRMENICH, TAKASAGO etc.)는 풍부한 부존자원과 고도의 정밀기술 축적에 따른 향료산업의 발전에 따라서 축적된 향료기술 및 원료 생산기술로서 국내 향료시장을 잠식하고 있으며, 이에 대처하기 위해서는 국내 향료산업의 경제적 안정성 확보와 국내 시장에 적합한 향료생산을 위한 기술축적이 시급한 실정이다. 최근의 향료산업의 발전은 기기분석 발전에 의해서 이뤄진다고 말하기도 하지만, 향료의 완성은 기기분석 data가 하나의 수단일 뿐, 그 완성은 조향기술에 달려있다.

국내향료 산업을 육성하기 위해서는 향료와 관련 산업의 긴밀한 협조, 관련회사는 물론 화학, 식품을 전문으로 하는 많은 연구자들에 의한 새로운 향료 합성 등의 분야에 더욱 많은 관심을 가져야 할 뿐 아니라, 정부 차원에서 향료의 원료인 aroma chemical과 조합향료의 수입세계의 차등을 두어야 하며, 향료에 대한 전문적 지식 부족으로 인해 야기되고 있는 aroma chemical과 조합향료를 수입하는 경우 통관상의 불합리한 점들의 해결방안도 마련되어야 할 것이다. 즉 aroma chemical을 통관 시, 이화학적 조사를 실시, 성분 분석을 통한 규제가 많은 반면, 조합향료의 경우에는 정밀분석에 어려운 점이 있어 제시한 Spec.을 기준으로 서류상의 검토만 실시 후 통관 하여온 실정이다.

이러한 어려운 여건 속에서도 일부 향료업계는 국내향료산업의 안정성 확보와 국내시장에 적합한 향료를 개발하기 위해 향료조합기술을 축적하고 있을 뿐만 아니라 기술 투자 및 조향사의 인재양성 등을 보다 적극적으로 하며, 어려운 여건 속에서도 국제경쟁력과 독창성이 있는 향료개발 등으로 해외시장 개척에 필요한 기술 know-how를 축적하고 있기 때문에 국내향료산업의 앞길은 밝다고 사료된다.

## 1. 국내 향료산업 발전의 저해요인

- 가. 재고관리 - 다품종소량생산에 따른 원료 재고. 즉 자금압박. 경쟁력의 저하
- 나. 일관 된 관세 적용 - 조합향료와 원료의 관세 비슷, 기술 개발해도 merit 없음
- 다. 조향기술인력 양성 - 조향기술자 부족
- 라. 향료 연구개발 - 내수품목위주(선도기술미비), 시장경제성 없음
- 마. 기술 개발 투자 여건 좋지 못함 - 영세성, 소규모화
- 바. 경제적, 시간적 투자 필요 - 제품개발에 대한 시장성 불안정, life cycle 짧음.
- 사. 수요업체의 국내향료 활성화 부재
- 아. 산업체의 R&D 부족으로 인한 경쟁력 저하-대외경쟁력저하

## 2. 향료 산업의 발전 방안

- 가. 향료산업의 육성책 마련-수입통관의 간소화
- 나. 향료산업과 관련분야의 긴밀한 협조체제 및 관심
- 다. 원료에 대한 수입관세의 차등화
- 라. 향료업체의 품목신고서, 원료수불, 유통기한 설정문제
- 마. Aroma chemical의 통관상 불합리점 및 관리상 애로사항 개선
- 바. 완제품 보다는 aroma chemical수입에 merit를 주어 조합 및 개발을 하도록 유도
- 사. 국내시장에 적합한 향료개발, 해외시장 개척
- 아. 향료조합 기술 축적을 위한 기술투자 및 인재양성

- 자. 주기적인 기술 세미나 개최하여 application, 조향기술 논의
- 차. 제품에 대한 cost-down, high quality, 국내 향료산업의 안정성 확보
- 카. 독창성이 있는 기술개발, 기업 활동의 speed-up
- 타. 한국향료공업협회의 활성화
- 파. 해외시장에 대한 향료의 global 대응도 업계가 노력하여야 할 일환

### 제 3절 국외 관련 기술

우리나라에 비해 다양한 연구가 진행되어 있는 일본에서는 유자과즙 저장시의 품질변화에 미치는 용기, 장소, 시간의 영향에 관하여, 또한 과즙의 장기 동결 저장시 품질의 변화 및 갈변현상의 파악, 유자 과즙의 제조 기술에 관한 연구, 유자의 limonoid, carotenoid, flavonoide 화합물의 구조와 생리적 영향 등에 관하여 다양하고 폭넓은 연구를 진행하였다. 이를 기초로 유자를 이용한 음료, 식초, 간장, 향료, 잼, 양념 등의 수백가지 이상의 가공 식품이 개발되어 가정에서의 유자소비가 상당한 양에 다다르고 있다(中西正昭 등 1971, 山崎裕三等 1989). 이외에도 유자과피에 존재하는 향료 물질의 정성 및 정량분석등에 대하여 보고하고 있다(Song 등 2000, Njoroge 등 1996, Song 등 1999).

유자를 소비하지 않는 구미에서는 유자와 유사하나 주로 과육이나 과즙만을 사용하는 다른 감귤류의 생리 활성 물질, 주로 bioflavonoids,에 대한 항산화성, 항암성에 대하여 연구가 진행되었다(Peterson 등 1998, Hollman 등 1997, Calomme 등). 이처럼, 감귤류의 구성성분의 생리활성에 관하여는 비교적 많은 연구가 진행되었으나 유자의 향료 물질에 대하여는 연구가 미미하여, Cieslinaki 등(1994) 및 Sovova 등(2001)이 초임계 이산화탄소에 대한 limonene의 용해도를 측정하여 보고한바있고, Mira 등(1996)이 오렌지 과피로부터 초임계 이산화탄소를 이용하여 essential oil의 추출을 보고 하였다. 그 외에도 초임계 이산화탄소를 추출용매로 이용하여 다양한 농산물로부터 essential oil을 추출 하려는 상당히 많은 연구가 이루어 졌으나 그러나 어떤 연구도 천연의 유자향을 추출 분석하여 그 조성을 파악하고 천연의 향에 근접하는 유자향의 compounding flavor를 조향하려는 노력은 보여지지 않았다. 아마도 유자는 구미에서는 흔치 않는 품종이기 때문일 것으로 사료된다.

#### 1. 국외 제품생산 및 시장 현황

세계 향료 생산업체들은 80년대를 기점으로 재편되기 시작해 세계적으로 1000여개 업체가 난립했으나 그 가운데 2/3가량이 영세성을 면치 못해 국제 경쟁력을 높이기 위해 서로 합병, 합작 통합함으로써 분업화하기 시작했다. 네덜란드 향료업체로 87년에 PPF와 Narrdan이 합병해 QUEST를 설립했고 Pauls Flavor & Fragrance가 Felton을 흡수해 supercritical CO<sub>2</sub>추출법을 도입, 천연정유 산업을 확대하고 있다. 또한 제약회사로 출발, 정밀화학 기술축적에 적극 나섰던 Roche는 63년에 스위스 향료 메이커인 지보단을 인수, 그 후 프랑스의 향료메이커인 Roure도 인수해 본격 향료시장에 진출했었다. 또한 SENSIENT는 confectionary에 강한 Felton사를 인수함으로써 새로운 향료 시장을 열었다.

이처럼 지난 80년대만 해도 향료소비는 주로 선진국들 위주로 행해졌으나 최근 들어 중동지역이나 인도, 중국 등이 새로운 향료시장으로 부각되고 있는 가운데 세계 향료 메이커들은 이를 겨냥, 생산에서 판매에 이르기까지 확고한 수요기반을 형성하고 있다. 이처럼 유럽, 미국 및

일본 등의 다국적 향료회사는 기존 향료시장을 기반으로 장기간에 걸쳐 축적된 향료 조합기술 및 원료향료 생산기술의 know-how를 확보하고 있다. 또한 생물공학, 유기 및 무기 합성기술을 이용해 안정성 및 향취의 질이 우수한 부가가치가 높은 원료향료를 생산하기 위한 기술개발과 이 원료를 이용한 새로운 향료조합 기술개발에 주력하는 것으로 알려지고 있다.

2010년 세계 향료 시장은 약 220억 달러 정도의 규모로 추정 되고 있다. 세계 향료 시장의 지역별 시장점유율(그림4-1 참조)은 유럽 28.3%, 북미 34.7%, 아시아 및 기타 32%, 남미 5% 정도인 것으로 나타났으며 유럽 및 북미, 남미의 시장 점유율이 이전과 비교해 큰 변화를 보이지 않고 있어 수요 성장이 정체 양상을 보이고 있는 것으로 분석되고 있다. 세계 인구의 15%를 차지하는 서유럽, 미국, 일본이 세계 향료시장의 75% 이상을 차지하고 있으며 아시아 및 기타 지역은 꾸준히 시장 점유율이 확대되고 있어 무궁한 성장 잠재력을 가지고 있을 뿐만 아니라 세계 선진향료사의 이 지역에 대한 투자가 집중되고 있는 실정이다. 특히 최근의 중국 및 인도의 향료 수요증가가 아주 눈 여겨 볼만하다고 하겠다.

세계 향료업체들은 아시아 시장을 겨냥하여 싱가포르에는 Givaudan, Symrise등이 진출해 있고 인도네시아에 IFF가 진출해 있다. 세계 향료 시장은 Givaudan, Firmenich, IFF, Symrise, Takasago, Mane, Sensient, Hasegawa, Robertet, Frutarom등 10업체가 76.2%를 점유하고 있으며 그 중 유럽과 일본의 시장 점유율이 높은 것으로 분석되고 있다. 한편, 일본 시장은 연간 약 2500억엔 정도의 시장규모를 보이고 있으며, 일본도 국내와 마찬가지로 향료원료인 천연향료 및 aroma chemical원료의 90% 이상을 수입에 의존하고 있으며 일본은 조합향료의 수입이 비중이 아주 낮고 aroma chemical을 이용한 연구 개발이 대부분 이뤄지는 것으로 알려져 있다.

Table4-1에서 알 수 있듯 2010년도 세계시장의 점유율은 Givaudan이 세계시장 21%를 점유하고 있고 Firmenich가 13% 그 다음으로 IFF가 12%를 점유하고 있다. 이러한 세계시장을 주도하는 회사의 점유율은 최근 수년간 큰 변화를 나타내고 있지 않다.

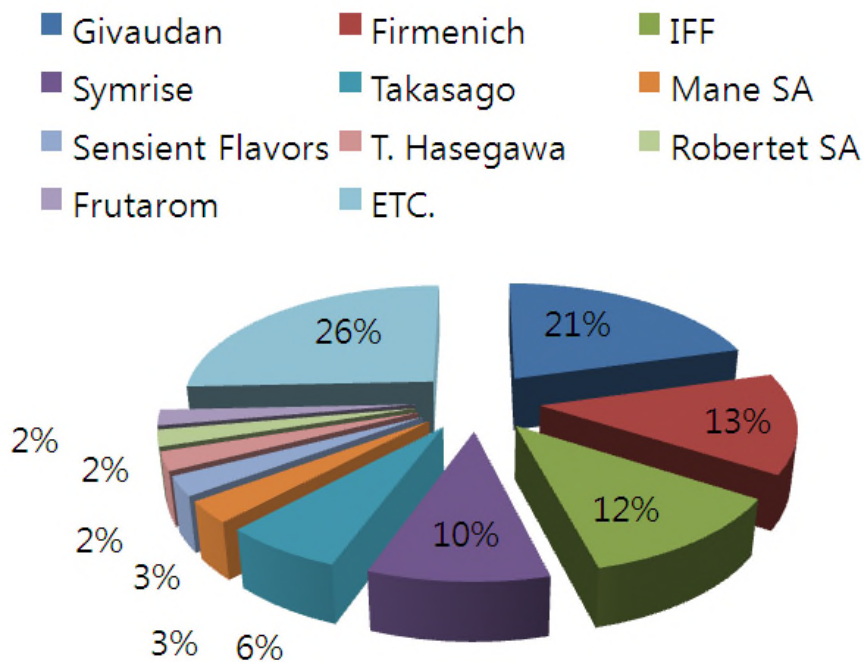


그림 1 . 2010 Flavor & Fragrance Industry Leaders

## World Flavor & Fragrance Market

2010 (Share)

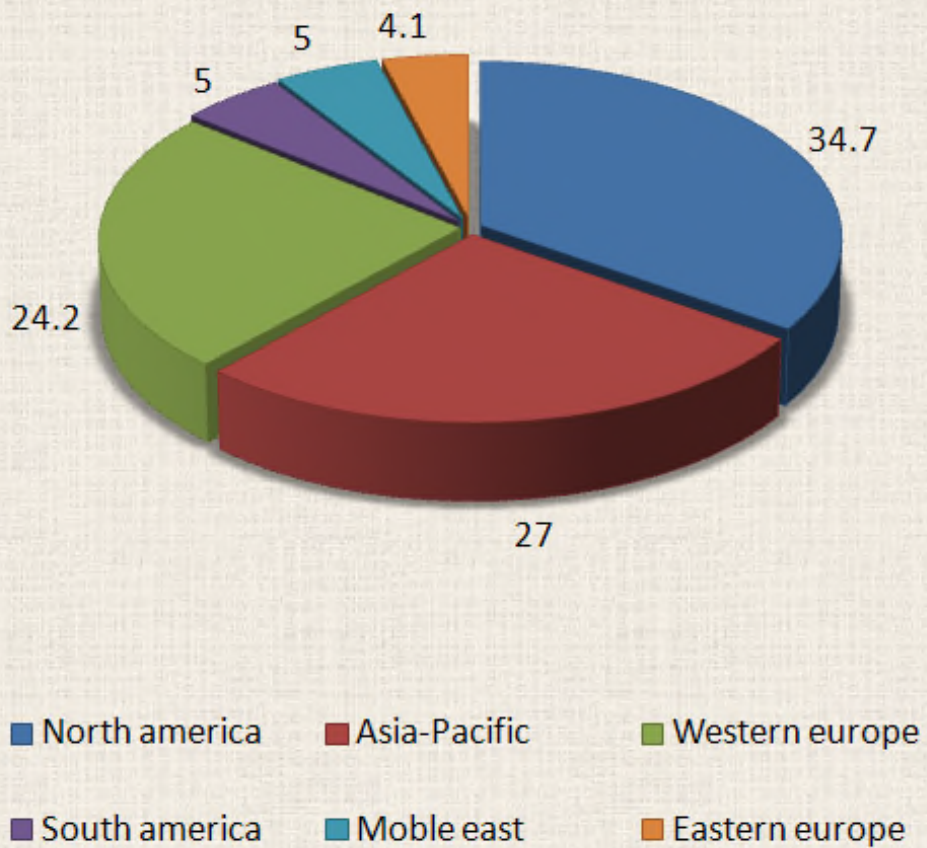


그림 2. Flavor & Fragrance Market

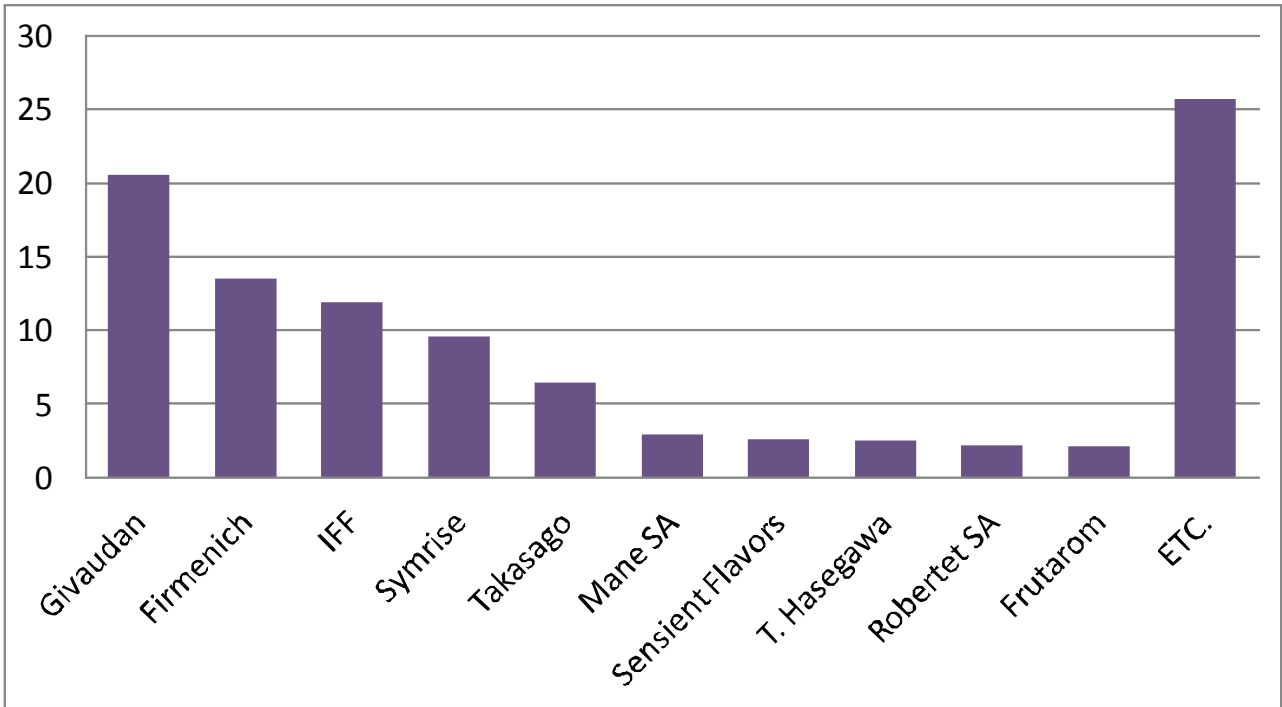


그림 3. Industry leaders in Flavor and fragrance  
 (Sales Volume in Billions-Final Estimates as of October 12, 2011)

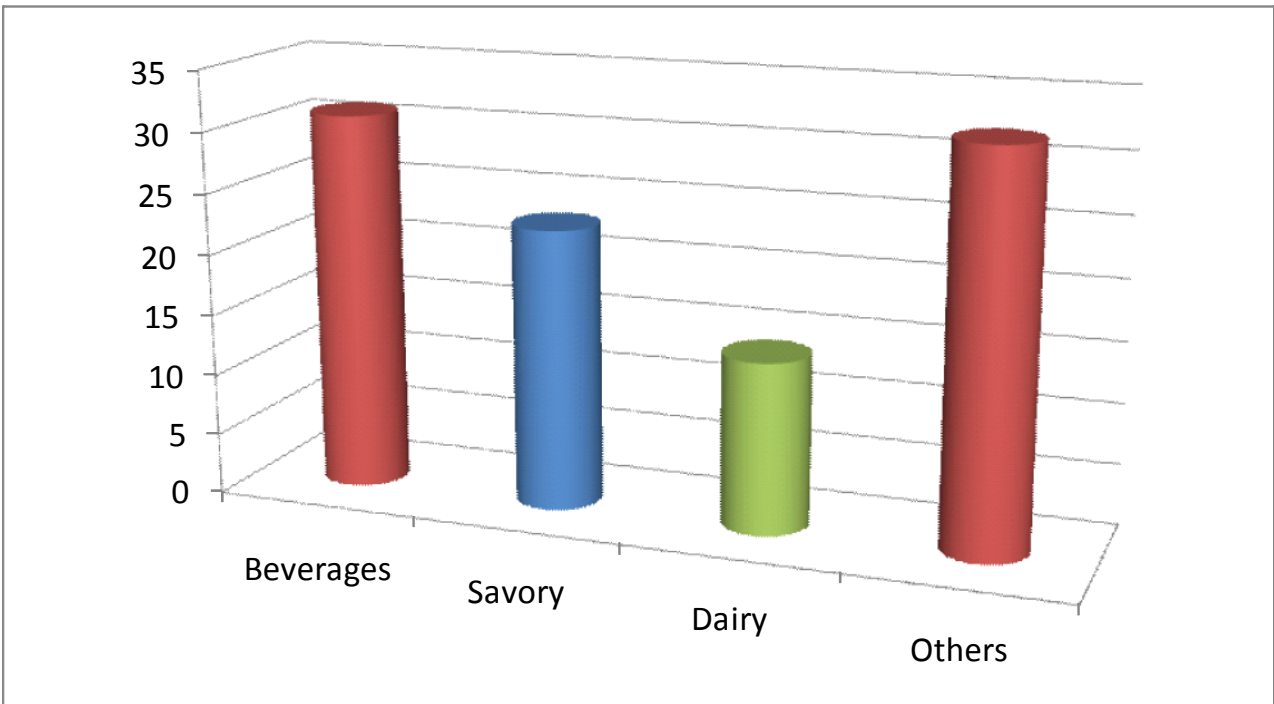


그림 4. World flavor market(09')

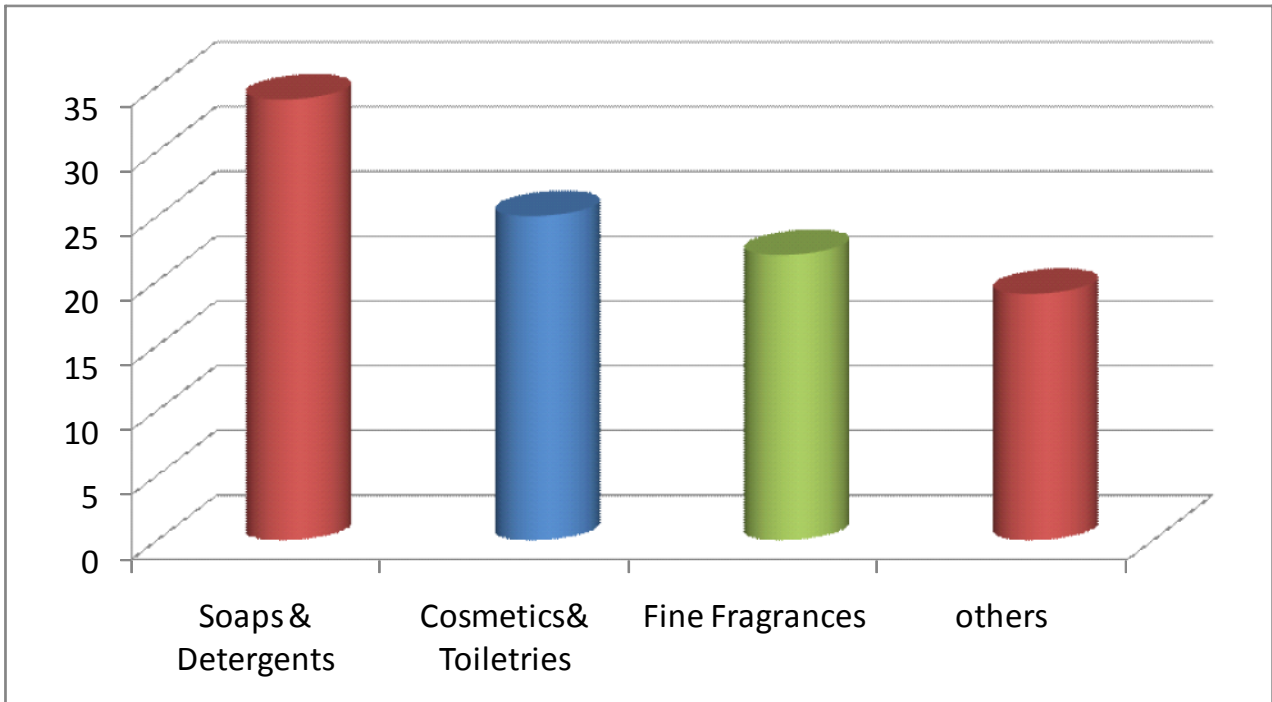


그림 5. World fragrance market(09')

자료 출처 :1. [www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)

2. Flavorist and Perfumer 저널

3. 한국 무역 통계 연감

4. 한국식품정보원, 한국 마케팅 신문, 식품의약 안전청 기고문 정리



## 제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

# 제 1절 유자 정유의 생산성 극대화를 위한 생물학적 전처리 기술 개발

## 1. 천연향 추출법

천연향료의 소재는 대부분 식물체이며, 오래 전부터 수증기 증류법, 추출법, 압착법, 침출법 등의 방법으로 채취되는 것이 대부분이다. 천연향료의 추출 채취방법에 대해서 살펴보면 다음과 같다.

### 가. 수증기 증류법(steam distillation)

향료 식물로부터 정유(Essential oil)를 채취하는 목적으로 가장 폭 넓게 이용되어지고 있는 방법이다. 향료원료의 부위에 물을 가해서 가열하거나, 가압수증기를 통과시켜서 수증기와 함께 정유를 유출시키는 것으로 정유를 실제의 비점보다 낮은 온도로 유출시키는 방법으로 Peru balsam oil, Rose otto (Bulgarian), Sandalwood oil 등의 Essential oil을 추출 할 때 많이 이용되어지고 있다.

### 나. 흡수법(absorption)

꽃의 정유처럼 원료가 고가이면서 정유의 함유량이 적거나 열에 불안정하며 물에 가용성분이 많은 경우에는 압착법과 수증기 증류법이 적당하지 않다. 이 같은 경우에 흡수법을 사용한다. 흡수법은 지방과 같은 불휘발성 용매에 흡수시켜 채취하는 방법이다.

(1) Enfleur age(냉침법- 동물유지에 꽃향기 성분을 흡착시켜 채유하는 방법으로 수지(pomade)를 에탄올로 추출하여 꽃 정유를 얻는 방법)

(2) Maceration(온침법- 따뜻한 정제수지에 꽃을 침적해서 수지중의 유효성분을 흡수시키는 방법으로 냉침법에 비해서 효율이 좋다.)

### 다. 용제 추출법(Solvent extraction)

향을 함유한 원료 꽃을 휘발성 용제(hexane, ethyl alcohol, benzene 등)를 이용하여 향기 성분을 추출방법이다. 1차적으로 추출한 추출물에서 용제를 제거하면 wax성분을 함유한 concrete를 얻을 수 있다. 또 이것에 에탄올(ethyl alcohol)을 가하여 이에 가용되는 유향성분을 얻을 수 있다. 여기서 에탄올을 제거하면 absolute를 얻을 수 있다.

### 라. 침출법(exudation)

식물의 줄기, 뿌리에 상처를 내서 침출하는 수액을 수집하는 것이다. Tolubalsam을 채취할 때 이용되어진다.

### 마. 극초단파 추출법 (Microwave Assited Process ; MAP)

극초단파를 식물 및 천연물에 조사하여 원하는 성분을 선택적으로 추출하는 방법으로 향 성분, 의약품 성분, 식물성 유지의 추출 등에 이용한다.

### 바. 연속 증류 추출법 (SDE, Nickerson & Liken 장치)

상압이나 감압하에서 수증기 증류하에 추출되는 향기 성분을 동일한 장치 내에서 연속적으로 추출하는 방법.

#### 사. 초임계 용매 추출법(Supercritical Fluid Extraction Method)

이산화탄소등의 초임계 상태하에서 특정성분, 이른바 생리활성 혹은 열에 불안정한 향기성분을 추출하는 방법으로 추출 장치의 제작에는 비용이 발생하나 운전상의 용이함으로 인해 최근 각광을 받는 추출법이다. 즉, 각 물질에는 고유한 임계점이 있으며, 이 임계점 이상의 온도 및 압력 영역에 있어서는 액체와 기체의 양 상태는 공존할 수 없게 되고, 물질은 초임계유체라 불리는 상태에 돌입하게 된다. 즉, 초임계유체란 "임계온도와 압력이상에서 존재하는 유체" 로 정의되며 기존의 용매에서 나타나지 않는 독특한 특성을 나타낸다.

#### 아. 저온 압착법(Coldpress Expression)

Coldpress extraction은 감귤류(citrus fruits)의 essential oil을 추출하는 가장 전통적인 방법이다. 이 방법은 열과의 접촉을 최소화하여 향이 열에 대한 산화로 인하여 향기성분의 변성 및 산패를 막을 수 있고 대량 생산이 가능하여 상업적으로 이용하기에 적합한 방법이다. 이러한 장점으로 인해 coldpress extraction의 가공 방법과 이를 응용한 기계들이 여러 가지의 형태로 발전되어 상업적으로 적용되고 있다. YEO(Yuzu essential oil)은 주로 oil sac이라고 하는 오일 주머니나 과일 껍질 표면 및 껍질 안쪽의 지방 샘에 존재하는데 이 껍질과 오일을 포함하고 있는 표피층을 coldpress 방법으로 추출하게 되면 물과 같은 에멀전을 얻을 수 있고 이를 원심 분리 하게 되면 YEO이 분리 된다. 그러나 이 방법은 유자의 펙틴성분과 YEO이 결합되어있기 때문에 분리가 용이 하지 못하여 YEO의 추출 수율이 낮다는 단점이 있다. 본 연구에서는 유자의 특성상 현재까지 밝혀진 YEO의 추출 방법으로는 낮은 효율과 비경제성으로 인해 상, 공업적으로 이용하는 것에 한계가 있음을 확인하였고, 따라서 보다 높은 수율의 천연 YEO을 추출하기 위한 새로운 방법으로 유자 과피에 생물학적 전처리를 통한 YEO의 추출 수율과 Gas Chromatography-Mass Spectrum (GC-MS)을 이용하여 향기성분을 조사 및 비교 분석 하였다.

## 2.연구내용및결과

### 가. 유자의 과피만을 이용한 효소 및 물리적 전처리 공정과 정유 추출 수율

시료의 전처리 유자는 2013년 전남 고흥지역에서 수확시기에 맞추어 유자 착즙액을 생산하는 (주)세일식품에서 직접 구입하였다. 구입한 유자는 세척하여 -20℃에서 냉동 보관하며 실험에 사용하였다. 전처리 공정은 냉동 보관중인 유자를 상온에서 해동하여 꼭지를 제거한 후 4등분한 다음 과육과 과피를 분리한다. 유자의 정유 성분은 대부분 겉껍질 부분에 있는 유포에 존재한다고 알려져 있으며 순수한 oil성분을 얻을 수 있어 대부분의 유자 정유에 관한 연구에서 cold press extraction 방법을 주로 사용한다. 따라서 본 연구에서는 최대한 순수한 유자oil성분을 추출하기 위하여 과육과 분리된 과피의 겉껍질(flavedo)과 안껍질(albedo)을 과도를 이용하여 분리하여 유포를 포함하고 있는 겉껍질(flavedo)부분을 시료로 사용하였다(그림1-1, 1-2).

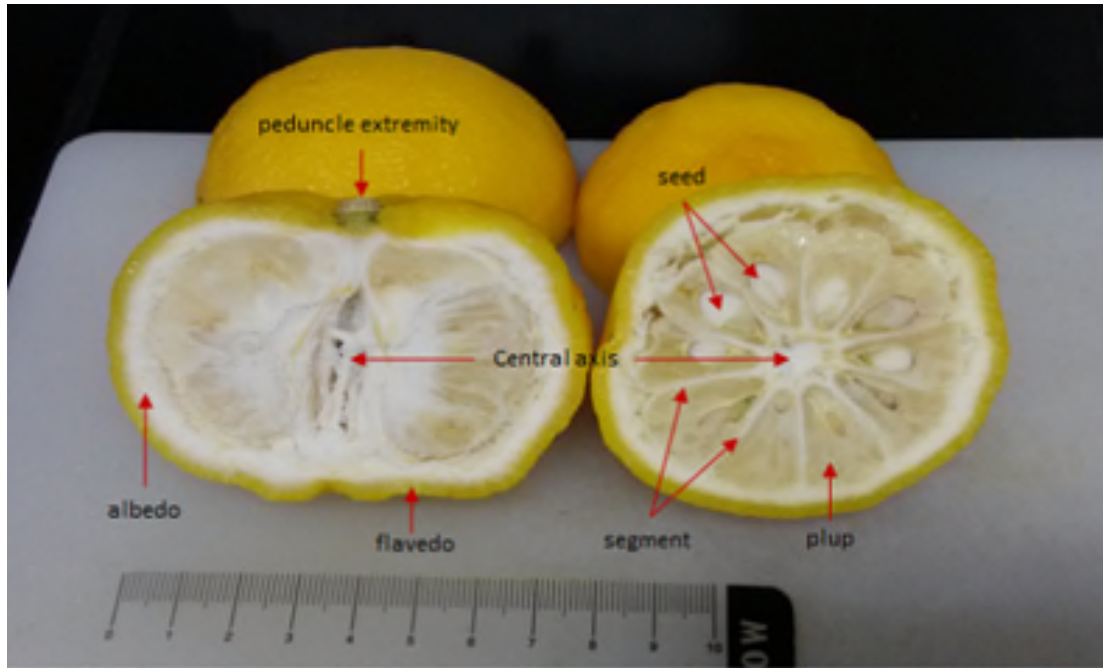


그림 1-1. Structure of yuzu



그림 1-2. Separation of flavedo and albedo for the preprocessing of yuzu

유자의 물리적 특성 유자의 총 중량은 무작위로 20개를 취하여 개별 총 중량으로 산출하였으며, 과육과 과피를 분리한 후 각각의 중량을 측정하여 유자 1개의 중량에 대한 비율을 나타내었다. 과실의 크기는 caliper(Mitutoyo Corp., Kanagawa, Japan)로 측정하여 높이와 폭으로 나타내었다. 높이는 과실의 꼭지를 바닥에 놓고 수직으로 길이를 측정하였으며, 과실의 폭은 과실 높이의 중간지점을 기준으로 절단한 후 절단면의 지름을 측정하였다. 과피의 두께는 과실 1개에 대하여 5회 이상 측정하여 평균값으로 나타내었다(표1-1).

과실의 중량은 총 중량, 과육, 과피의 겉껍질과 안껍질의 중량을 각각 측정한 결과 과실의 총

중량은 135~170g였으며, 과육과 씨의 중량은 각각 53~70g으로 전체 중량의 40%를 차지하였고, 씨의 중량은 16~22g으로 12%의 비중을 보였다. 또한 과피의 중량은 60~80g으로 전체 중량의 47%를 이루고 있었다. 한편 과피의 겉껍질(flavedo)과 안껍질(albedo)부분의 중량은 각각 40~60g, 18~22g으로 나타나 겉껍질이 안쪽 껍질 보다 약 2배 이상의 비율을 차지하고 있었다. 과실의 직경과 높이, 과피의 두께는 각각 65~80mm, 43~54mm, 60~75mm이었으며, 과피의 겉껍질과 안껍질의 두께는 각각 3.0~4.1mm 3.0~4.5mm로 나타났다.

표 1-1. Physical properties of yuzu

Goheung yuzu	
<b>Weight (g)</b>	
Whole yuzu	135~170g
Flesh (RW %) <sup>1)</sup>	53~70g (40±1%)
Seed (RW %)	16~22g (12±1%)
Peel (RW %)	65~80g (47±3%)
Flavedo (RW %)	45~55g (33±2%)
Albedo (RW %)	20~30g (15±2%)
<b>Size (mm)</b>	
Diameter	65~80 mm
Height	43~54 mm
Thickness of Peel	6.0~7.5 mm
Flavedo	3.0~4.1 mm
Albedo	3.0~4.5 mm

1) RW % (ratio for whole weight)

**생물학적 전처리를 위한 효소 선정:** 생물학적 방법으로 oil sac의 분리를 위해서 효소를 탐색, 선정하였다. 지난 1년차 과제에서는 sigma사의 cellulose, xylanase, pectinase를 사용하여 유자 과피를 전 처리 하였을 때, 효소전처리를 하지 않은 실험군에 비하여 높은 oil 수율 향상을 보였다. 그러나 sigma사의 제품은 단가적인 측면에 있어 상업화적인 이용에 부담감과 식품 가공의 이용에 안정성이 확보되지 못하다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위하여 본 연구에서는 식품용 효소로 널리 쓰이는 novozyme사의 Celluclast®, Pectinex®UltraSP-L, Shearzyme®Plus를 실험에 사용하였다.

표 1-2. Characteristics and species of commercial cellulolytic or glycolytic enzymes

효소명	상품명	기원	용도	최적반응 조건	활성
Xylanase (endo-1,4-)	Shearzyme® 500L	Aspergillus oryzae	가공시 여과력 향상	25℃, pH 5.5	350 EGU/g
Cellulase	Celluclast 1.5L	Tricoderma reesei	야채, 과일분해 및 수율향상	25℃, pH 4-7	700 EGU/g
Polygalacturonase	Pectinex Ultra SP-L	Aspergillus aculeatus	점도 감소	25℃, pH 4-5	9500 PGU/ml

**시료에 대한 생물학적 전처리 공정:** 물리적으로 전처리된 껌껍질(flavedo)을 삼각 플라스크 용기에 증류수와 1:3의 비율로 넣은 후 pH 4.0~5.0의 조건에서 개별 또는 1:1의 비율로 혼합된 효소 Xylanase (endo-1,4-), Cellulase, Polygalacturonase를 유자 껌껍질(flavedo)에 대하여 0.1%(w/w)의 농도로 넣어 shaker(SI-900R, JEIO TECH)를 이용하여 18℃, 150rpm에서 6시간 반응완료 후 시료를 착즙(엔젤 녹즙기 7000p)한다. 착즙된 시료를 6,000rpm, 4℃에서 20분간 centrifuge(Mega 21R, hanil science industry)하여 상층부의 oil 에멀전 부분만 추출하여 다시 12,000rpm, 4℃에서 20분간 centrifuge한 후 상층부의 맑은 oil층만 회수하여 밀봉하여 -20℃에서 냉동보관 하며 분석 시료로 사용하였다.(그림1-3)

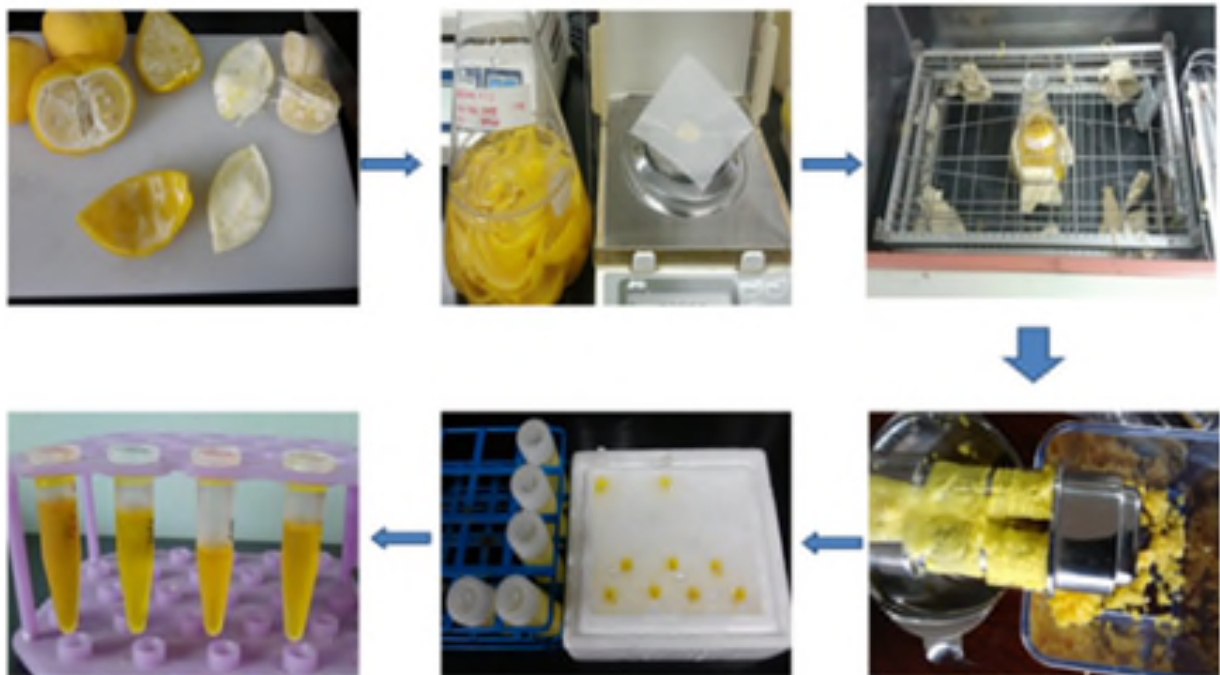
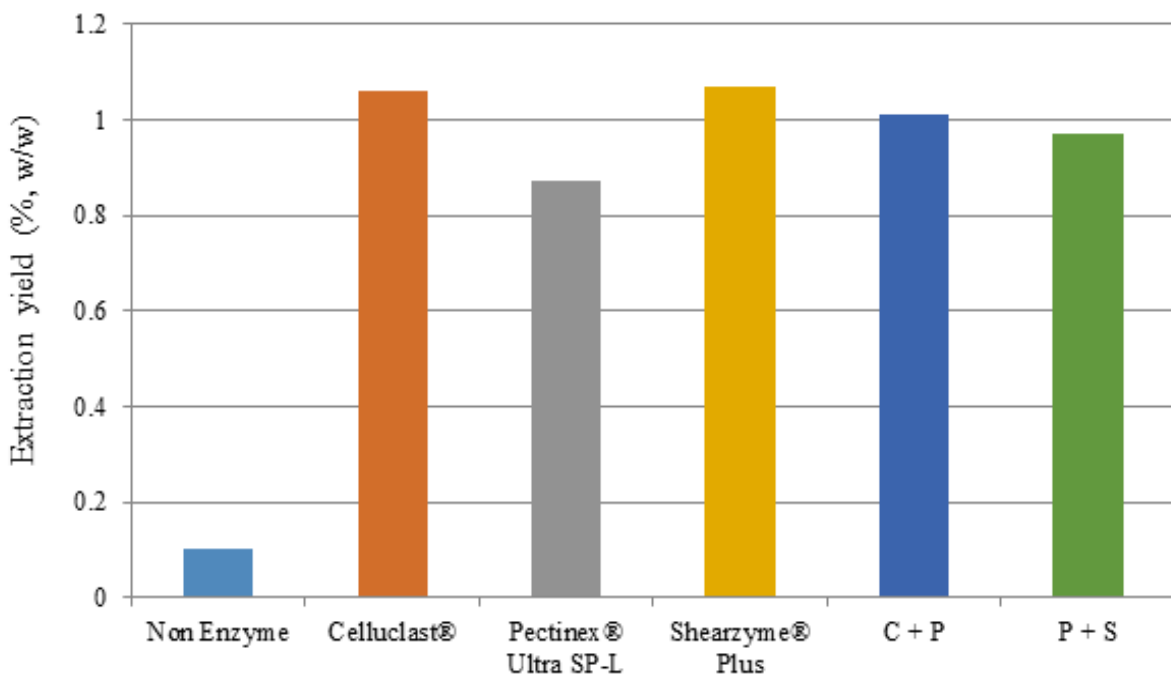


그림1-3. Extraction process after enzymatic treatment (Flavedo)

**효소별 전처리 반응 후 유자정유 추출:** 유자 정유의 생산성 극대화를 위하여 효소 전처리 후 oil을 추출하는 실험을 3회 반복하여 실시한 후 평균값을 나타내어 비교하였다. 실험 결과 효소 전처리를 한 후 착즙한 실험군에서 효소처리를 하지 않은 실험군보다 약 10배정도의 확연하게 높은 양의 oil이 추출되는 것으로 나타났다. 한편 효소별 추출 수율은 큰 차이를 보이지 않았다.

**표 1-3. Extraction yield of essential oil after enzymatic treatment**

Enzyme	(w/w)
Non enzyme (Standard)	0.312±0.09g / 300g (0.1% w/w)
Celluclast® (Cellulase)	3.177±0.12g / 300g (1.06% w/w)
Pectinex®Ultra SP-L (Polygalacturonase)	2.598±0.1g / 300g (0.87% w/w)
Shearzyme®Plus (Cellulase+Xylanase)	3.219±0.07g / 300g (1.07% w/w)
Celluclast® + Pectinex®Ultra SP-L	3.042±0.1g / 300g (1.01% w/w)
Pectinex®Ultra SP-L + Shearzyme®Plus	2.894±0.04g / 300g (0.97% w/w)



**그림 1-4. Extraction yield of essential oil after enzyme treatment**

효소별 반응 후 시료의 pH을 알아보기 위하여 pH meter(Orion 3 star series meter, USA)를 이용하여 측정하였다.

표 1-4. Variations of pH after enzyme treatment

Enzyme	pH
반응 전	4.12~4.16
Celluclast <sup>®</sup> (Cellulase)	3.74
Pectinex <sup>®</sup> Ultra SP-L (Polygalacturonase)	3.92
Shearzyme <sup>®</sup> Plus (Cellulase+Xylanase)	3.71
Celluclast <sup>®</sup> + Pectinex <sup>®</sup> Ultra SP-L	3.94
Pectinex <sup>®</sup> Ultra SP-L + Shearzyme <sup>®</sup> Plus	3.75

효소별 반응 시간에 따른 유자정유 추출: 시료에 효소별 반응 시간에 따른 유자 정유의 추출 수율을 알아보기 위하여 1,3,6,9,12시간별로 나누어 실험한 결과 효소 반응 3시간 사이에 급격한 증가를 보이며 6에서 9시간 사이에 최대의 수율을 나타냈다. 이후 시간대에서는 수율의 감소가 나타났다. 따라서 유자 정유 추출의 최대 수율을 보이는 시간은 6시간이 적당하며 이후 시간대에서는 수율이 전반적으로 소폭 낮아지는 결과를 보였다. 수율이 가장 높은 반응시간인 6시간대의 유자 껍질에 대한 수율이 약1%대로 나타났으며 이를 기준으로 유자 전체무게에 대한 비율은 평균 0.33%의 수율로 나타났다.

표 1-5. Extraction yield of essential oil by each enzyme reaction time (Flavedo)

Enzyme	1시간	3시간	6시간	9시간	12시간
non enzyme (standard)	0.318g / 300g (0.11%,w/w)				
Celluclast <sup>®</sup> (Cellulase)	0.75g (0.25%)	2.35g (0.78%)	3.297g (1.1%)	3.098g (1.03%)	2.846g (0.95%)
Pectinex <sup>®</sup> UltraSP-L(Pectinase)	0.94g (0.31%)	2.221g (0.74%)	2.686g (0.9%)	2.665g (0.89%)	2.452g (0.82%)
Shearzyme <sup>®</sup> Plus (Cellulase+Xylanase)	0.89g (0.3%)	2.265g (0.76%)	3.268g (1.09%)	3.236g (1.08%)	3.012g (1%)
Celluclast <sup>®</sup> +Pectinex <sup>®</sup> UltraSP-L (Cellulase+Pectinase)	0.96g (0.32%)	2.541g (0.85%)	3.151g (1.05%)	3.021g (1.01%)	2.894g (0.97%)
Cellulase+Xylanase+Pectinase (C+X+P)	0.93g (0.31%)	2.611g (0.87%)	2.95g (0.98%)	2.851g (0.95%)	2.613g (0.87%)



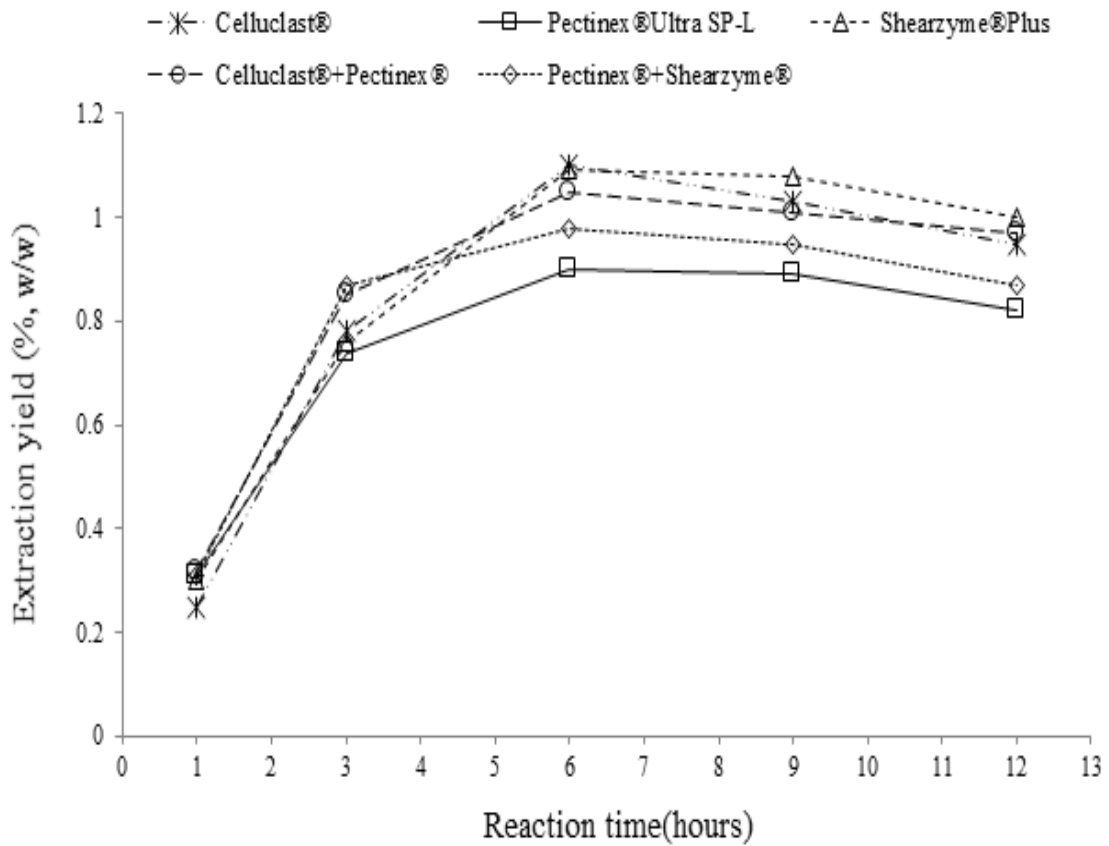


그림 1-5. Extraction yield of essential oil by each enzyme reaction time (Flavedo)

#### 나. 유자 원과를 이용한 효소적 전처리 공정과 정유 추출 수율

통 유자를 이용한 물리적 전처리: 가)항에서는 과피만을 이용하여 유자의 정유 추출 수율 및 향기성분의 특성을 분석하고자하였다. 본 나)항에서는 유자 전체 즉 유자의 씨를 포함한 과육과 과피를 함께 각각의 효소를 처리하여 추출된 essential oil의 수율과 향기성분의 특성을 알아보기 위하여 유자 원과를 모두 사용하여 실험하였다. 실험 방법은 위 실험과 동일한 방법으로 하였다.

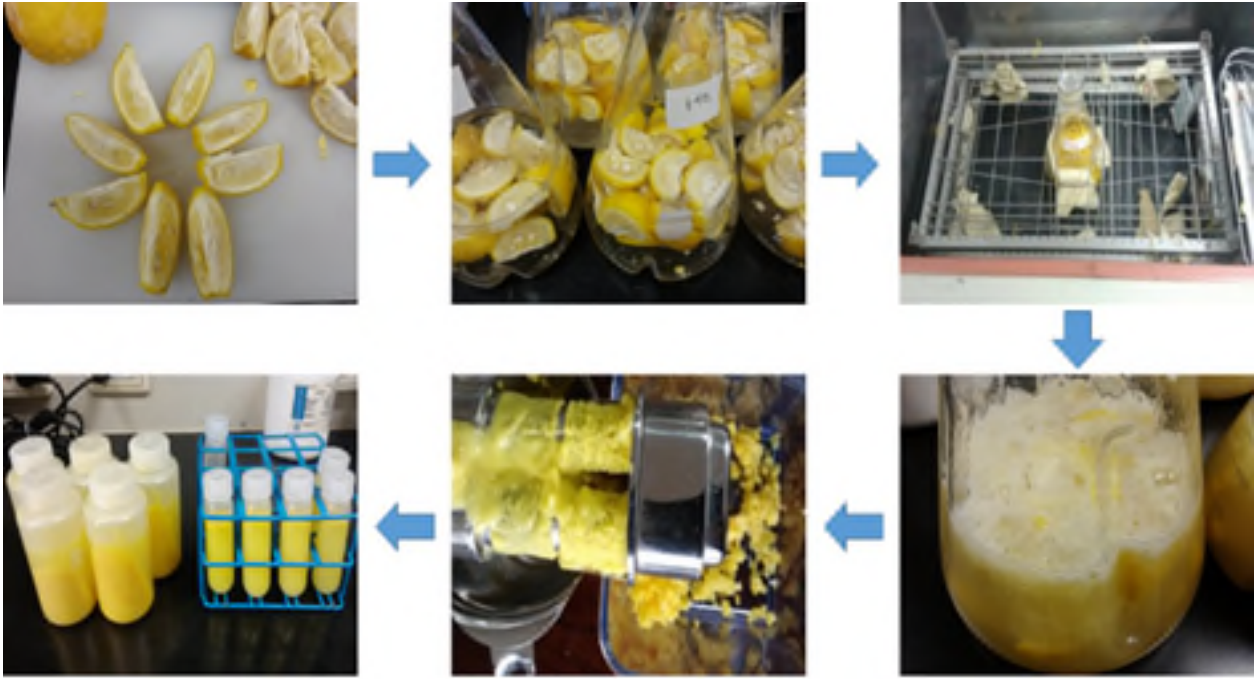


그림 1-6. Extraction process for essential oil of yuzu enzyme treatment  
(Whole yuzu)

**시간에 따른 효소별 전처리 반응 후 유자정유 추출:** 유자의 씨를 포함한 과육과 과피에 시간에 따른 효소별 전처리 반응이 유자 정유의 추출 수율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1, 3, 6, 9, 12 시간별로 나누어 실험 하였다. 효소반응을 하지 않고 착즙한 유자의 정유추출 수율과 효소 반응 후 착즙한 유자 정유추출 수율을 비교하였을 때, 효소처리군이 약 2~2.5배정도 높은 수율을 보였다. 또한 과피만으로 실험하였을 때보다 과육과 씨를 포함한 원과의 정유추출 수율이 0.1~0.2% 높게 나타났다. 이는 유자 씨에 함유되어 있는 지방산이 일부 추출 된 것으로 보인다. 효소마다 조금씩 차이가 있으나 6시간에서 9시간대 사이의 수율이 가장 높은 것으로 나타났으며 9시간 이후에는 수율이 감소하는 것으로 나타났다.

표 1-6. Extraction yield of essential oil by each enzyme reaction time  
(Whole yuzu)

Enzyme	1시간	3시간	6시간	9시간	12시간
non enzyme (standard)	0.6g / 300g (0.2%,w/w)				
Celluclast <sup>®</sup> (Cellulase)	0.75g (0.25%)	0.67g (0.22%)	0.86g (0.29%)	1.23g (0.41%)	1.01g (0.34%)
Pectinex <sup>®</sup> UltraSP-L(Pectinase)	0.94g (0.31%)	0.98g (0.33%)	1.33g (0.44%)	0.88g (0.29%)	0.43g (0.14%)
Shearzyme <sup>®</sup> Plus (Cellulase+Xylanase)	0.27g (0.09%)	0.65g (0.22%)	1.01g (0.34%)	0.91g (0.3%)	0.76g (0.25%)
Celluclast <sup>®</sup> +Pectinex <sup>®</sup> UltraSP-L (Cellulase+Pectinase)	0.96g (0.32%)	0.95g (0.32%)	1.19g (0.4%)	1.52g (0.51%)	0.84g (0.28%)
Cellulase+Xylanase+Pectinase (C+X+P)	0.93g (0.31%)	1.09g (0.36%)	1.43g (0.48%)	1.59g (0.53%)	0.72g (0.24%)

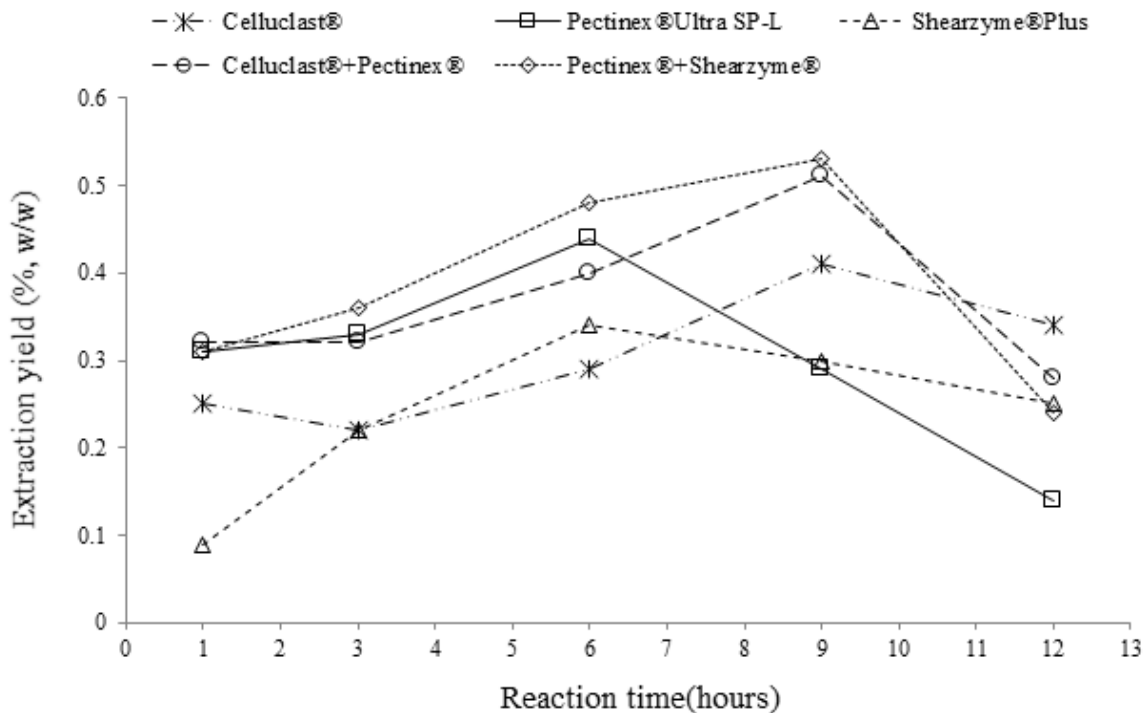


그림 1-7. Extraction yield of essential oil by each enzyme reaction time  
(Whole yuzu)

**다. 전처리 조건에 따른 유자 정유의 Flavor profile 특성**

유자 전처리의 조건에 따라서 추출된 essential oil의 flavor profile 특성을 알아보기 위해 각각의 조건에 의해 추출된 시료를 microtube에 1mL을 담아 centrifuge(Hanil-micro 17R)에서 13,000rpm으로 3분간 원심분리 후 GC-MS 분석하였다. 분석 조건은 다음과 같다 (표1-7).

**표 1-7. Analytical condition of GC/MS**

Model	7890A/5975C, Agilent
Inlet	250°C, Split mode 80:1, 1 $\mu$ l injection
Oven	45°C→3°C/min→100°C, 2min→3°C/min 175°C, 2min→3°C/min→246°C, 2min total 73min
Column	DB-WAX(30x0.25x250)
MSD	Scan mode

**(1) 유자 정유 추출물의 Flavor profile 특성**

유자 과피의 정유 추출물의 Flavor profile 특성을 알아보기 위해 GC-MS 분석과 각 피크별 주요 성분과 구조를 그림1-8과 표1-8에 나타내었다 (그림1-8)(표1-8).

분석 결과 유자의 껍질에서 추출한 정유의 향기성분은 약 60여종이 분리되었으며 그중 35종이 동정되었다. 주성분으로는 limonene이 55.63%로 가장 많았는데 이 물질은 감귤류의 중요한 향기 물질로 오렌지, 만다린, 레몬과 같은 감귤류에서 가장 높은 비중을 차지하고 있다. 다음으로는  $\gamma$ -terpinene이 14.06%의 함량을 보였으며, myrcene, sabinene이 12.73% 다음으로  $\alpha$ -pinene과  $\beta$ -pinene이 각각 5.45%와 2.04%,  $\beta$ -Farnesene이 2.02%, linalool 1.38%순으로 나타났다.

이와 같은 결과는 Jeong등에 의한 실험에서 terpinene계 탄화수소인 limonene 및  $\gamma$ -terpinene이 전체의 87%로 가장 많은 부분을 차지하는 것으로 보고하였으며, 이들 향기 성분은 sweet orange와 만다린에 60~90%정도 함유 되어 있다고 보고하고 있다. 또한 dl-limonene,  $\gamma$ -terpinene,  $\beta$ -farnesene, sadinene, linalool,  $\beta$ -myecene 및 terpinolene의 7종이 유자 착즙 액의 주요 향기성분으로 전체의 약 92.4%를 차지한다는 보고도 있는데, 본 유자 과피의 정유 분석 결과도 이와 유사한 경향으로 나타났다. 특히 (Park, 2008)은 유자의 추출 방법에 따른 향기 성분의 변화에 관하여, 연구에서 손으로 유자 과피에 존재하는 유폴을 하나씩 터트리 정유 성분을 포집하는 방법이 열과 화학적으로 추출하는 방법에 비해 가장 안정적이며 가장 자연에 가까운 형태의 향기를 얻을 수 있으므로 가장 이상적인 향의 형태라고 할 수 있으며 실질적으로 일본에서는 이와 같은 방법을 많이 쓰고 있다. 하지만 원시적인 방법과 매우 낮은 수율로 인해 상업화하기 어려운 단점이 있다고 보고하고 있다. 따라서 본 유자껍질에서 추출한 향기성분 분석과 손으로 짜서 추출한 향기성분을 비교해본 결과 거의 유사한 형태의 피크와 검출량을 보였다. 따라서 본 실험의 물리적 착즙방법으로 추출된 향기성분은 우리가 일상에서 가장 친근히 느끼고 쉽게 접할 수 있는 향의 형태로 상당히 이상적인 향의 형태를 얻을 수 있었다.

File : C:\msdchem\1\data\140219\YUZU\_ST.D  
 Operator :  
 Acquired : 19 Feb 2014 11:00 using AcqMethod LIQUID\_WAX.M  
 Instrument : MSD  
 Sample Name : YUZU\_ST  
 Misc Info :  
 Vial Number : 1

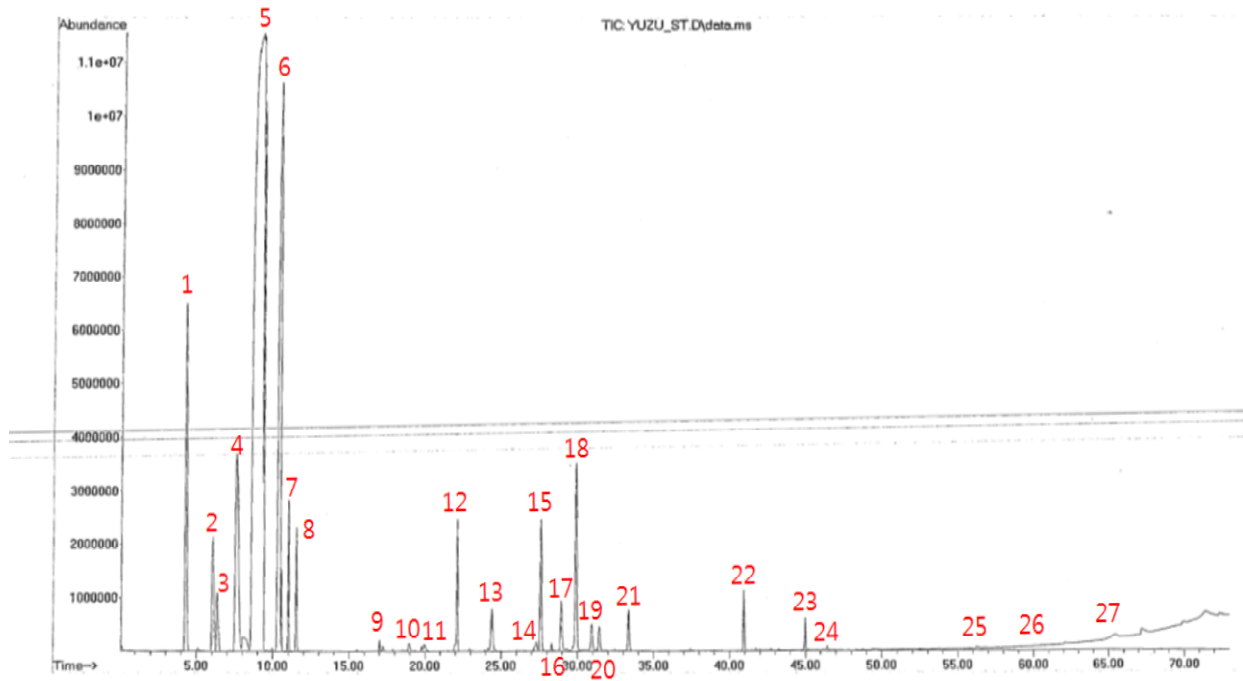
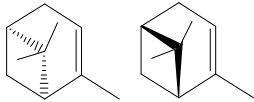
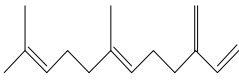
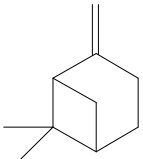
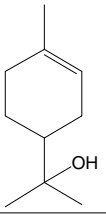
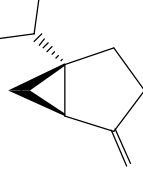
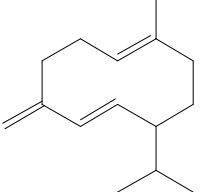
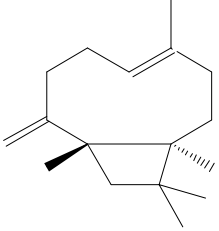
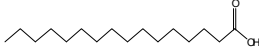
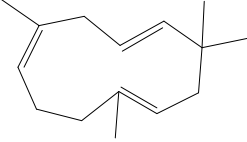


그림 1-8. volatile aroma components of yuzu flavedo by GC/MS

표 1-8. Main volatile aroma components

번호	화합물	구조	번호	화합물	구조
1	alpha-Pinene		15	beta-Farnesene	
2	beta-Pinene		16	alpha-Terpineol	
3	Sabinene		17	1(10),4(14),5-Germacatriene, (-)-Germacatriene D	

4	Myrcene		18	Bicyclogermacrene	
5	Limonene		19	delta-Cadinene	
6	gamma-Terpinene		20	alpha-Terpinene	
7	<i>P</i> -Cymene		21	Germacrene-B	
8	Terpinolene		22	Caprylic acid	
9	<i>p</i> -alpha-Dimethyl styrene		23	Thymol, Carvacrol	
10	delta-Elemene		24	(-)- <i>T</i> -Muurolol	
11	Decanal		25	Lauric acid	
12	Linalool		26	Myristic acid	

13	beta-Caryophyllene		27	Palmitic acid	
14	3,7,10-Humulatriene				

(2) 유자 과피를 이용한 효소별 정유 추출물의 Flavor profile 특성

각각의 효소별로 6시간씩 반응한 후 추출한 정유를 GC-MS를 이용하여 peak area%값으로 GC 분석 데이터를 비교하였다(표1-9)(그림1-9).

표 1-9. GC/ MS analysis of yuzu essential oil by enzyme reaction

(peak area%)

Compounds	St <sup>1)</sup>	Cel <sup>2)</sup>	Pec <sup>3)</sup>	Shea <sup>4)</sup>	Cel+ Pec <sup>5)</sup>	Cel+ Xyl+ Pec <sup>6)</sup>
Dimethylamine	0.04	.	.	.	.	.
l-alpha-Pinene, d-alpha-Pinene, alpha-Pinene(2902)	5.45	6.59	6.42	6.44	6.74	6.49
Camphene(2229)	0.03	0.03	0.04	0.06	0.03	0.04
beta-Pinene(2903)	2.04	2.46	2.36	2.46	2.54	2.49
Hexanal(2557)	.	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03
Myrcene(2762), Sabinene	12.73	12.21	12.52	11.92	12.79	12.07
3-Carene(3821)	0.01	.	.	.	.	.
Myrcene(2762), Sabinene, alpha-Phellandrene(2856)	1.11	0.53	0.85	0.56	0.58	1.05
D-Limonene(2633), d,l-Limonene, l-Limonene	55.63	53.60	54.72	53.55	55.43	53.25
Gamma-Terpinene(3559)	14.06	14.97	14.08	14.55	14.73	14.44
3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene(3539)	0.48	0.50	0.52	0.87	0.96	0.90
O-Cymene(2356)	1.11	1.46	1.34	1.27	0.01	1.36
Terpinolene(3046)	1.23	1.48	1.38	1.43	1.50	1.43
Nonanal(2782)	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02

p-alpha-Dimethyl styrene(3144)	0.10	0.13	0.11	0.10	.	0.11
alpha-Terpinene(3558), Terpinolene(3046)	0.01	.	.	0.47	0.01	.
Decanal(2362)	0.06	0.07	0.06	0.08	0.09	0.09
Trans,trans-2,4-Hexadienal(3429)	.	.	0.01	.	.	0.01
Cis-4-Decenal	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Carvacryl methyl ether	.	.	.	.	0.02	.
1(10),4(14),5-Germacatriene	0.92	0.93	0.85	0.92	0.89	0.91
Carvone(2249), p-Mentha-1,4(8)-dien-3-one(3560)	.	.	.	0.01	.	.
Linalool(2635)	1.38	1.52	1.37	1.70	1.85	1.71
1-Methyl-3-methoxy-4-isopropyl benzene(3436)	0.01	0.02	0.01	0.02	.	0.02
beta-Caryophyllene(2252)	0.84	0.76	0.77	0.73	0.74	0.70
Trans-2-Dodecan-1-al(2402)	.	0.01	.	.	.	.
Undecanal(3092)	.	0.02	0.02	.	0.02	0.02
Tridecanal	0.02	.	.	.	.	.
3,7,10-Humulatriene	0.17	0.15	0.15	0.14	0.14	0.14
beta-Farnesene	2.02	2.06	2.01	2.38	.	2.36
alpha-Terpineol(3045)	0.08	0.07	0.06	.	0.08	.
Farnesol(2478)	.	.	0.01	.	.	.
Lauric aldehyde(2615)	.	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
p-Mentha-1,8-dien-7-al(3557)	0.01	0.01	0.01	.	0.01	.
2,4-Decadienal(3135), Trans,trans-2,4-Decadien-1-al(3135)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Aromadendrene	0.02	0.02	0.01	.	.	0.02
Myristaldehyde(2763)	.	.	.	.	.	0.01
Viridiflorol	.	0.02	.	.	.	.
Elemol	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
beta-Bisabolene, Aromadendrene	0.02	.	.	.	.	0.01
Thymol(3066)	0.30	0.24	0.21	0.22	0.26	0.23
Thymol(3066), Carvacrol(2245)	0.01	0.01	0.01	0.01	.	0.01
Longifolene	0.01	.	.	.	.	.
Ethyl linoleate	.	.	.	.	.	0.01

1) non enzyme (standard), 2) Celluclast®(Cellulase), 3) Pectinex®UltraSP-L(Pectinase)

4) Shearzyme®Plus (Cellulase+Xylanase)

5) Celluclast®+Pectinex®UltraSP-L (Cellulase+Pectinase)

6) Cellulase+Xylanase+Pectinase (Cellulase+Xylanase+Pectinase)



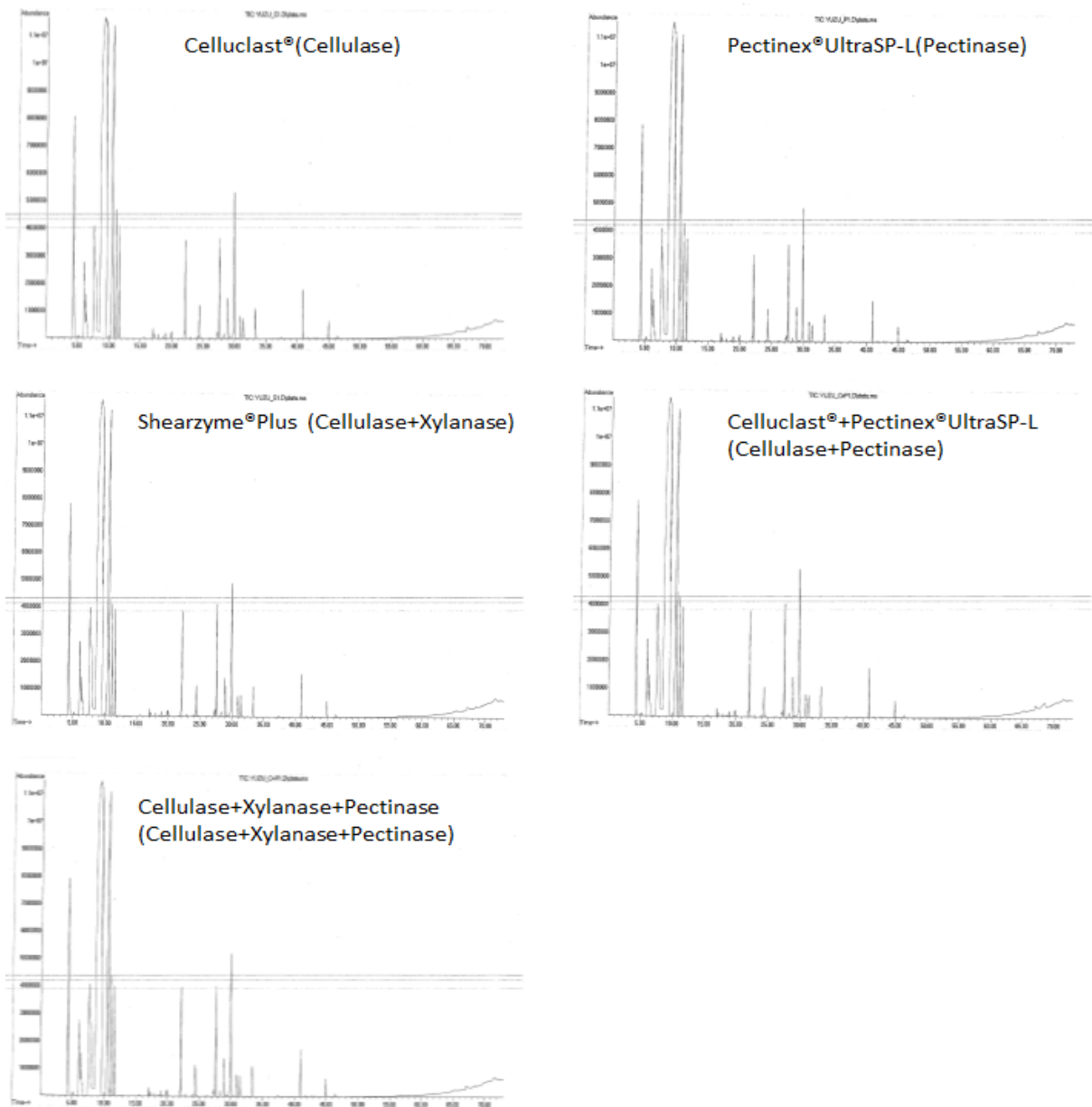


그림 1-9. GC/ MS peaks of yuzu essential oil by each enzyme reaction

실험결과 효소를 처리하지 않은 유자 껍질과 각각의 효소를 처리하여 6시간 반응후 추출한 유자 정유 성분을 살펴보면 향의 성분 차이와 양의 변화가 크게 다르지 않았다. 각각의 효소를 처리한 시료에서 limonene 함량이 53.25~55.43%로 가장 많았고  $\gamma$ -terpinene이 14.08~ 14.97%로 많았으며 myrcene, sabinene 이 11.92~12.79%를 다음으로  $\alpha$ -pinene과  $\beta$ -pinene이 각각 6.42~6.74%, 2.36~2.54%,  $\beta$ -farnesene이 2.01~2.38%, linalool이 1.37~1.85%로 효소처리 하지 않은 시료와 거의 유사한 형태와 검출량을 보였다. 다만 효소처리한 시료에서  $\alpha$ -pinene 함량이 약 1%정도 높게 검출되었다.

결론적으로 효소처리 후 추출한 정유와 자연적인 정유와의 차이는 거의 없다고 볼 수 있으며, 수율 적으로 봤을 때 효소처리 후 약 9~10배정도의 수율향상을 나타낸 걸로 봤을 때 충분히

상업화 가능성이 있다고 보여 진다.

**(3) 유자 과피를 이용한 효소반응 시간에 따른 정유 추출물의 Flavor profile 특성**

위의 실험에서는 각각의 효소별로 반응 후 추출한 정유성분의 GC-MS분석 데이터 값이 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 효소 반응 시간별 향기성분의 변화를 알아보기 위해 효소별 정유 추출시 가장 높은 수율을 보인 Celluclast®(Cellulase)를 이용하여 1, 6, 12, 18, 24시간별로 6시간 간격으로 반응 후 정유추출물의 향기 성분을 분석하여 area값이 1%이상인 성분을 표로 나타내었다. GC-MS의 분석 조건은 위 실험과 동일한 조건으로 실험하였다(표1-10).

**표 1-10. GC/ MS analysis of area 1% plus of yuzu essential oil by each enzyme reaction time**

Compounds	(peak area%)				
	1시간	6시간	12시간	18시간	24시간
alpha-Pinene(2902), d-alpha-Pinene	5.45	5.91	5.77	5.69	5.66
Sabinene, beta-Pinene(2903)	1.64	1.41	1.62	1.54	1.45
Sabinene	3.58	3.47	3.61	3.56	3.51
Sabinene, Myrcene(2762), alpha-Phellandrene(2856)	8.52	7.30	7.58	7.34	7.36
l-Limonene, d,l-Limonene	56.11	55.68	52.79	51.94	52.22
gamma-Terpinene(3559)	14.39	15.40	15.16	15.10	14.97
Terpinolene(3046)	1.39	1.55	1.50	1.51	1.52
p-Cymene(2356)	.	.	1.99	2.43	2.49
Linalool(2635)	2.30	2.02	2.65	2.71	2.66
beta-Farnesene	2.52	2.95	2.82	2.97	3.11
beta-Caryophyllene(2252)	0.89	0.91	0.97	1.01	0.99
1(10),4(14),5-Germacatriene	1.09	1.11	1.20	1.27	1.19

분석 결과 각각의 시간별로 66~78가지의 향기성분이 검출되었으며 그중 1%이상의 area값을 갖는 성분만을 비교 분석하였다. 시간별 모든 시료에서 거의 유사한 조성 비율을 나타내었다. 그중 주요 성분 변화로는 가장 많은 함량을 보인 limonene이 1시간 반응시 56.11%에서 반응 시간이 길어질수록 많게는 약5%정도의 감소를 나타내었다. p-Cymene의 함량은 초기 6시간 반응 에서는 확인되지 않았으나 이후 시간부터 24시간까지 계속 증가하는 모습을 보였으며, beta-Farnesene 함량 또한 반응 시간이 길어질수록 늘어나는 것으로 나타났다.

한편 천연물의 특성상 지표물질의 수율은 지역적, 수확시기에 따른 변동의 폭이 높아 한계가 있으며, 정유의 향기성분은 특정 지표물질이 아닌 여러 가지 화합물이 조화를 이루어 특유의 향취를 나타냄으로서 특정 지표물질로 수율을 제시하기에는 한계가 있다. 따라서 추출 방법에 따른 유자 정유의 향기성분을 비교하였다. 효소 반응법을 이용한 유자정유를 증류법, 초임계 추출법, 저온 압착법, Hand press 방법으로 추출된 유자정유의 향기성분과 비교 분석한 결과 가장 자연에 가까운 향취를 보인다고 알려져 있는 Hand press의 방법으로 추출되어진 유자 정유의 향기성분과 거의 유사한 결과를 보였다.

표 1-11. 추출 방법에 따른 유자정유의 향기성분 비교

Compound	Area (%)				
	Distillation* (증류법)	SFE* (초임계 추출법)	Cold press* (저온 압착법)	Hand press*	Enzyme reaction (효소 반응법)
alpha-Pinene	2.941	0.555	3.014	3.594	3.41
beta-Pinene	1.165	0.628	1.114	1.368	1.22
Myrcene	1.865	0.349	3.933	3.590	3.39
Limonene	58.625	31.298	57.865	59.579	70.16
Sbinene	4.881	2.012	8.572	4.749	3.1
gamma-Terpinene	12.951	4.936	14.012	12.494	9.57
p-cymene	1.112	0.274	1.456	0.834	2.27
Linalool	6.070	0.872	1.275	3.189	1.13
alpha-Terpineol	1.681	.	0.073	0.287	0.05
Beta-farnesene	0.748	.	1.478	1.362	1.40
bicyclogermacrene	0.939	.	2.530	2.055	1.94

\* 박병석, 2008, 유자의 추출 방법에 따른 향기 성분의 변화, 경희대학원석사학위논문

### 3. 폐 유자박을 이용한 유자 essential oil 생산

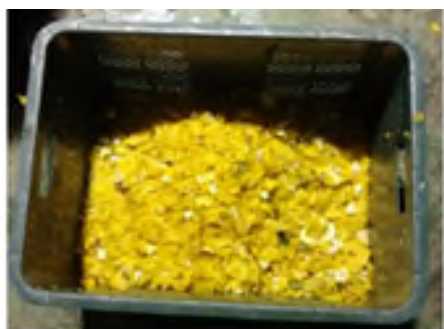
#### 가. 공정별 발생되는 유자박 특성 평가

유자 가공 공정 조사: 유자 가공 공정시 발생하는 폐유자박의 특성 및 재활용 가능성 여부를 알아보기 위해 고흥에 위치하고 있는 유자 가공 업체인 (주)세일식품을 가공 시기에 맞춰 방문하여 유자 가공의 전반적인 공정과 가공시 발생하는 폐유자박을 조사하였다. 이번 방문한 업체는 유자 재배농가들로부터 수매하여 생유자, 유자 당절임, 유자과즙, 유자껍질 등으로 가공하여 판매하는 업체로써 전반적인 가공 공정은 다음과 같다(그림1-10).



그림 1-10. Processing process of yuzu product

가공 공정으로는 유자 입고 후 작업자들에 의해 유자의 상처 난 부분을 전처리하는 단계로부터 시작하여 이동식 벨트를 지나 세척단계를 거쳐 벨트식 착즙단계에서 유자즙을 착즙하게 된다. 착즙된 유자 과즙은 씨와 분리되어 따로 저장되어지며, 착즙 후 과피는 다시 슬라이스 단계를 거쳐 상품화 되어 진다. 이와 같은 공정상에서 발생하는 폐유자 자원은 두 가지로 분류된다. 첫 번째로 발생하는 폐유자 자원은 초기 원료 투입 전 작업자들에 의한 전처리 상에서 발생되며, 두 번째로는 상처가 심하거나 상품가치가 떨어져 판매하기 어려운 유자들은 벨트식 착즙 공정만을 거친 후 착즙된 유자즙만을 상품으로 사용하고 나머지 과피는 모아 폐기하고 있는 실정이다.



(1) 전처리시 발생하는 유자박



(2) 비 상품화 유자

그림 1-11. Yuzu waste

**폐유자박을 이용한 유자향기 성분 추출:** 본 연구에서는 버려지고 있는 유자의 폐자원을 활용하여 유자향기 물질을 추출하기 위해 폐유자박을 이용하여 정유 추출실험을 실행하였다. 첫째 발생하는 폐유자박에서는 유자 정유를 함유하고 있는 유포의 손실로 인해 기존의 실험방법으로는 정유성분이 추출되지 않았다(그림1-12). 이는 작업자들에 의한 유자 전처리 공정시에 필터를 이용하여 상처 난 부위 등을 제거 하는 공정에서 유자 겉껍질 부위에 존재하는 유포가 손상되면서 정유의 손실로 이어진 것으로 보인다. 따라서 본 실험방법으로는 향기물질의 추출에 한계가 있다고 보여지며, 현재 증류추출법에 의한 향기물질 추출을 연구하고 있다. 한편 비 상품화 유자를 모아 착즙 후 버려지는 유자박은 비교적 유포의 손실이 적고 유자의 과즙이 착즙된 상태로써 유자 정유의 추출공정에 용이하단 장점이 있어 상업적인 활용도가 크다는 것을 알 수 있었다.

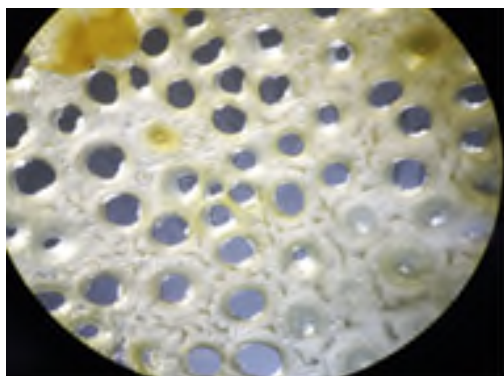


그림 1-12. Damaged oil spore of waste yuzu(left), Oil spore of yuzu flavedo(right)

#### 4. 부향 성분 향상 및 주요 부향 성분 확인을 위한 정유의 미생물/효소 처리 공정

##### 가. *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994를 이용한 유자 정유성분의 변화

최근 식물유에 다량 함유된 불포화 지방산으로부터 미생물의 monooxygenase의 hydroxylation 기작에 의해 hydroxy fatty acid (HFA)로 변환된다는 연구가 다수 보고되고 있다. 이처럼 미생물의 생물전환에 의해 생성된 HFA는 첨가된 hydroxy group에 의해 non-hydroxylated fatty acid에 비하여 높은 점성과 반응성 등과 같은 특이한 성질을 갖으며, 이러한 특성으로 인하여 resins, waxes, nylons, plastics, lubricants, cosmetics 등의 산업적으로 중요한 전구물질로 사용될 수 있다고 보고되고 있다. 따라서 이러한 연구들을 바탕으로 유자 정유에 함유된 향기성분의 화합물에 존재하는 이중결합을 hydroxylation 시켜줌으로써 향기성분의 변화와 관능적 차이를 통해 유자 정유의 주요 flavor 성분 확인과 부향 성분 향상을 위해 본 실험을 실시하였다.

**실험 방법:** 실험에 사용할 미생물로는 높은 수산화 반응 활성을 지닌 것으로 보고되고 있는 *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994을 분양받아 사용하였다. 분양받은 균주는 Nutrient Broth medium에서 24시간 28℃에서 배양한 후, -80℃에서 보관하였다. 동결 보관된 *Pseudomonas* sp.를 증식용 배지에 접종하여 48시간 동안 25℃에서 배양하여 hydroxylation 반응을 위한 생산배지의 접종균주(inoculum)로 사용하였으며, 증식용 배지의 조성은 yeast extract 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, tween 80 0.02%로 구성되었으며 pH는 25% KOH를 사용하여 멸균 전 pH 7.0으로 조정하였다. 멸균된 증식용 배지에 동결 보관된 균주를 접종하기 전, glucose 0.25%(멸균)를 첨가하였다. 100 ml 증식용 배지를 넣은 500 ml 삼각 플라스크에 동결 보관된 균주를 1% 접종하고 shake incubator(SI-900R, JEIO TECH)에서 25℃, 150 rpm으로 48시간 배양하였다. 본 배양을 위한 생산배지의 조성은 yeast extract 1.0%, soypeptone 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, tween 80 0.02%로 구성되었으며, pH는 25% KOH를 사용하여 멸균 전 pH 6.5로 조정하였다. 멸균된 생산배지에 glucose 0.5%(멸균)를 첨가한 후 접종하였다. 1L 생산배지를 넣은 2L 삼각플라스크에 접종균주(inoculum) 1%를 접종하고 전 배양과 동일한 조건으로 24~30시간 배양하였다. 탄소 원료로 넣어준 glucose양이 0이 되고 spectrophotometer (HP, hewlett packard, 8453)를 이용하여 1/10로 희석된 배양액이 optical density (O.D.660)가 약 1이 되었을 때, 배양액을 6000rpm에서 20분간 centrifuge하여 *Pseudomonas* sp를 수확 한다. 수확된 균50g과 D.W 50ml, PMSF 1%를 비커에 넣고 Ultrasonic processor(영진코퍼레이션, VCX 750)을 이용하여 10℃ 이하에서 cell을 분해한다. sonication이 완료된 시료에 10%의 유자 정유를 혼합하여 각각의 조건에 따라 반응 한다. 반응이 완료된 유자 정유는 다시 centrifuge하여 회수한 다음 GC-MS분석을 하였다.

***Pseudomonas* sp. 반응 후 GC/MS 분석:** 분석결과 *Pseudomonas* sp.에 의해 유자 정유에 존재하는 이중결합의 화합물을 hydroxylation 시켜 유자 정유의 향기성분 변화와 관능적 차이를 알아보기 위해 *Pseudomonas* sp.을 배양한 후 각각의 조건에 따라 반응하여 GC/MS 분석 및 관능평가를 실시하였으나 유의적인 변화를 볼 수 없었다(그림1-13). *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994이 지방산을 hydroxylation 반응 시 정확한 반응 기작은 아직 밝혀지지 않아 실험 설계 시 어려움이 많다. 따라서 향후 실험에서는 hydroxylation 반응 시 NADH를 첨가하여 반응 여부를 알아보는 실험을 계획 중에 있으며, cell을 sonication하지 않고 배양도중에 유자 정유를 첨가하여 균체로부터 Microbial Transformation을 유도하는 실험을 계획 중에 있다.



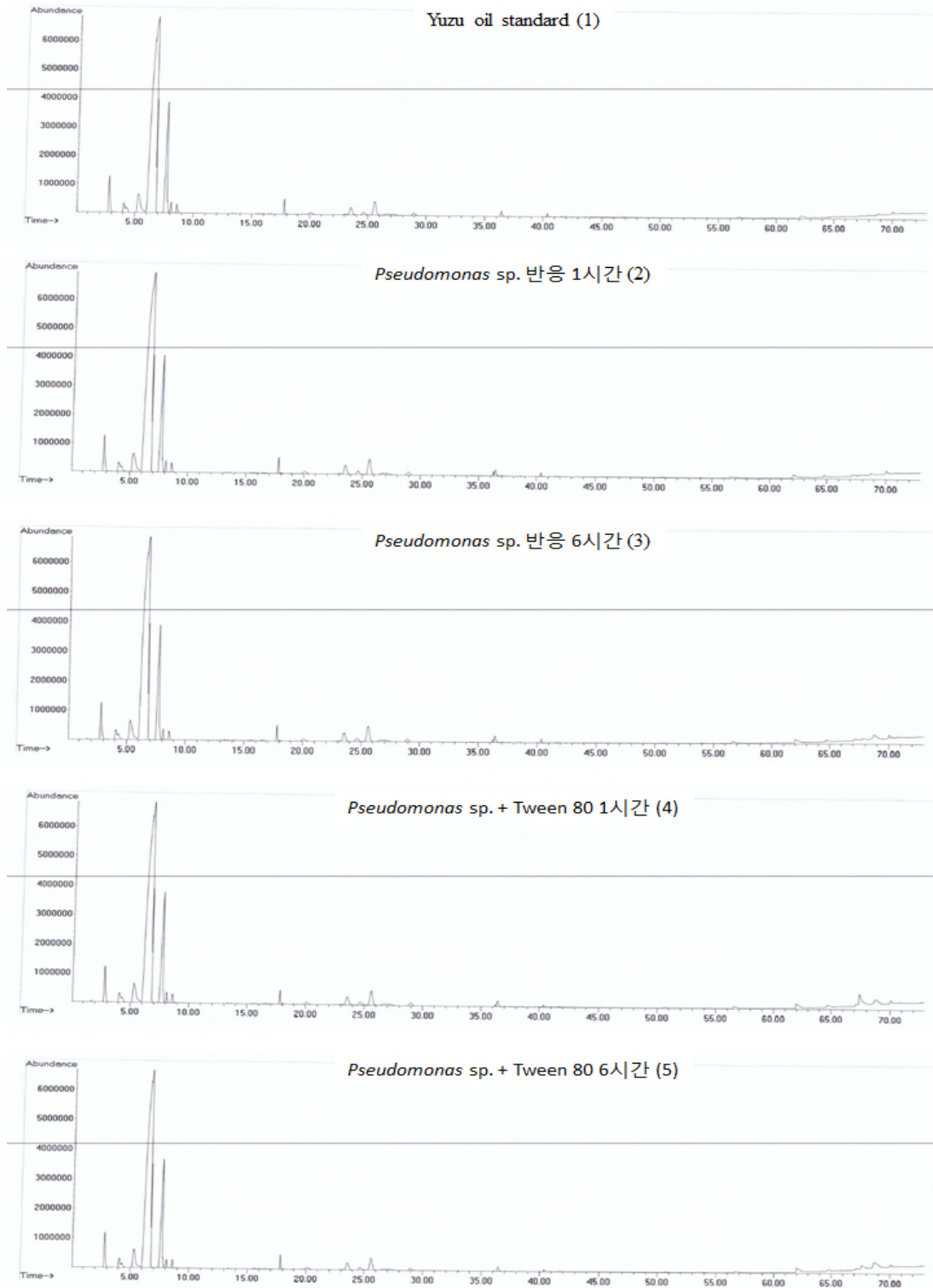


그림 1-13. GC/ MS analysis after reaction with *Pseudomonas* sp. : (1)Standard yuzu oil, (2)sonication후 *Pseudomonas* sp.에 150rpm, 25℃에서 1시간 반응, (3)sonication후 *Pseudomonas* sp.에 150rpm, 25℃에서 6시간 반응, (4)sonication후 *Pseudomonas* sp.에 Tween 80(유자오일의14%)처리 후 150rpm, 25℃에서 1시간 반응, (5)sonication후 *Pseudomonas* sp.에 Tween 80(유자오일의14%)처리 후 150rpm, 25℃에서 6시간 반응

### 나. Enoyl-acyl carrier protein reductase (FAB I)를 이용한 유자 정유성분의 변화

Enoyl-acyl carrier protein reductase (FAB I)는 지방산 생합성의 각 사이클에 포함되는 4개의 반응의 최종 단계에서 환원효소로서 작용한다. 지방산 합성효소의 작용에 의한 지방산의 생합성 과정에 있어 1 단계는 malonyl-ACP를 acetyl-CoA(FabH, 합성효소 III)와 축합시키는  $\beta$ -ketoacyl-ACP 합성효소에 의해 촉매화된다. 이어지는 순서로, malonyl-ACP는 성장쇄 acyl-ACP(FabB 및 FabF, 각각 합성효소 I 및 II)로 축합된다. 연장 주기의 제2 단계는 NADPH-의존성  $\beta$ -ketoacyl-ACP 환원효소(FabG)에 의한 케토에스테르 환원이다.  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP 탈수효소(FabA 또는 FabZ 중 하나)에 의한 후속 탈수화는 trans-2-enoyl-ACP를 유도하고, 이는 다시 NADH-의존성 enoyl-ACP 환원효소(Fab I)에 의하여 acyl-ACP로 전환된다. 각 주기 당 2 개의 탄소 원자를 추가시키는 이 주기의 추가적인 반복은 결과적으로 palmitoyl-ACP를 유도하고, 이 즉시 주로 palmitoyl-ACP에 의한 Fab I의 피드백 억제로 인해 주기가 대체로 정지된다. 이에, Fab I은 주요한 생합성효소이고, 세균 지방산 생합성의 전체 합성 경로에 있어서 중요한 조절점이다. 따라서 위와 같은 내용을 바탕으로 유자 정유에 존재하는 여러 화합물을 enoyl-acyl carrier protein reductase 인 (FAB I)로부터 이중결합을 제거해 주어 관능적 특성 및 GC/MS분석을 통한 flavor profile의 변화를 분석하여 유자 정유의 Key flavor를 도출해내기 위한 목적으로 본 실험을 실시하였다.

### FAB I 를 얻기 위한 클로닝 및 단백질 확보

*Pseudomonas aeruginosa* genomic DNA에서 얻은 FabI gene은 forward primer 5'-**GGAATTCCATATGGGATTTCTCACAGGAAAA**-3'와 reverse primer 3'-**CCGCTCGAGGTCGTCGTCCAGC**-5'(NdeI와 XhoI recognition sites 는 bold로 나타냄)를 사용하여 PCR을 통해서 증폭되었다.

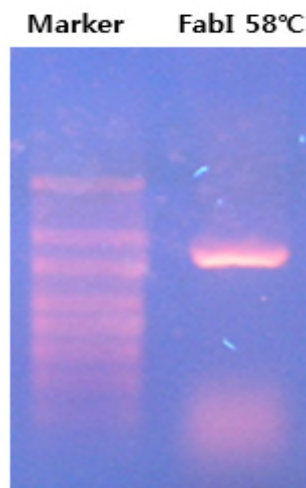


그림 1-14. FabI gene copy at 58°C

증폭된 DNA fragment는 NdeI 과 XhoI으로 digestion 후, pET-22b vector에 ligation 되었다. 재조합 plasmid는 heat-shock 방법을 이용하여 Escherichia coli BL21 (DE3)에 transformation, over expression이 되었다. Ampicillin을 넣어준 LB 배지에 optical density 0.6 값이 될 때까지 culture 한다. Protein expression 은 0.2 mM IPTG를 넣어주고 추가적으로 37°C에서 6시간 더 키워준다. 5000g에서 30분 동안 centrifugation 시킨다.



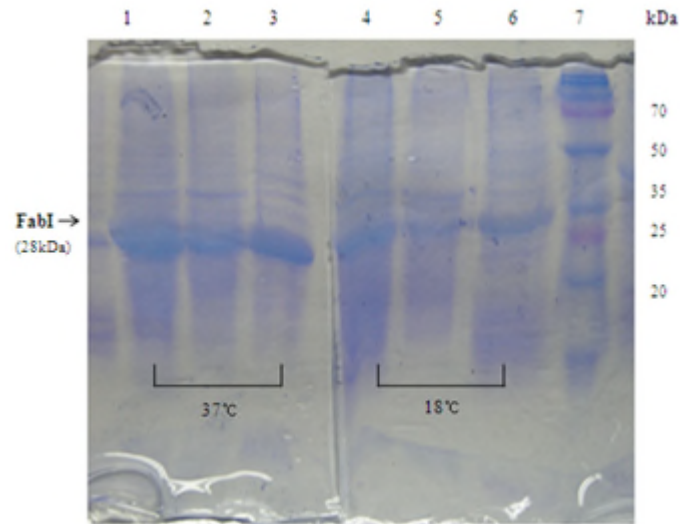


그림 1-15. Solubility test of FabI on 15% SDS-PAGE gel electrophoresis  
(Lane 1, 4: Total, 2, 5: Pallet, 3, 6: Crude, 7: Protein size maker)

**단백질의 순수 정제:** Harvest된 cell pallets은 buffer A(20 mMTris-HClpH7.9,500 mMNaCl,5 mMimidazole)에 넣고 sonication으로 cell lysis를 하였다. 그 후, 20000g에서 40분 동안 원심분리를 하였고, supernatant는  $Ni^{2+}$ -chelatedcolumn에 loading되었다. Bound 단백질은 buffer B (20 mMTris-HClpH7.9,500 mMNaCl,1 M imidazole)의 linear gradient로 elution되었다. FabI 단백질이 있는 Fractions은 SDS-PAGE에서 확인하였고 gel-filtration chromatography를 이용하여 마지막 단계 정제를 하였다 (gel buffer (20 mMTris-HClpH 7.9, 200 mMNaCl,2 mM DTT)).FabI의 soluble fractions을 모아서 12 mg ml<sup>-1</sup>까지 농축하여, 1L당 1g의 FabI 단백질을 확보했다. 단백질 농도는 Bradford assay를 통해 측정되었고, purity는 15% SDS-PAGE에서 확인되었다.

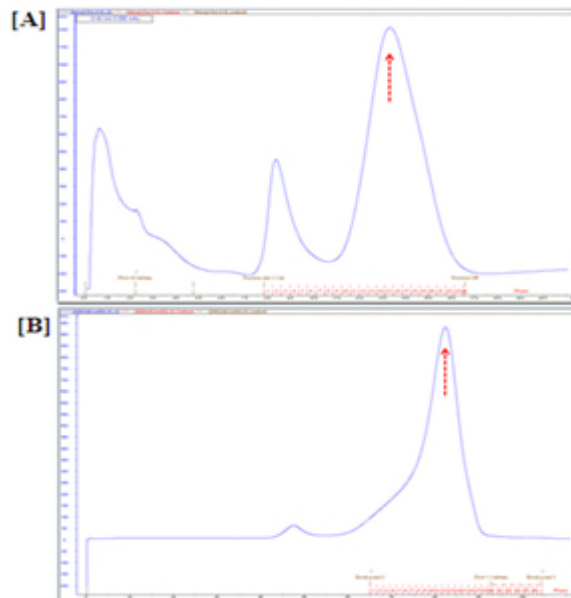


그림 1-16. Elution profile of  $Ni^{2+}$ -chelatedcolumn [A], elution profile of gel-filtration chromatography [B]

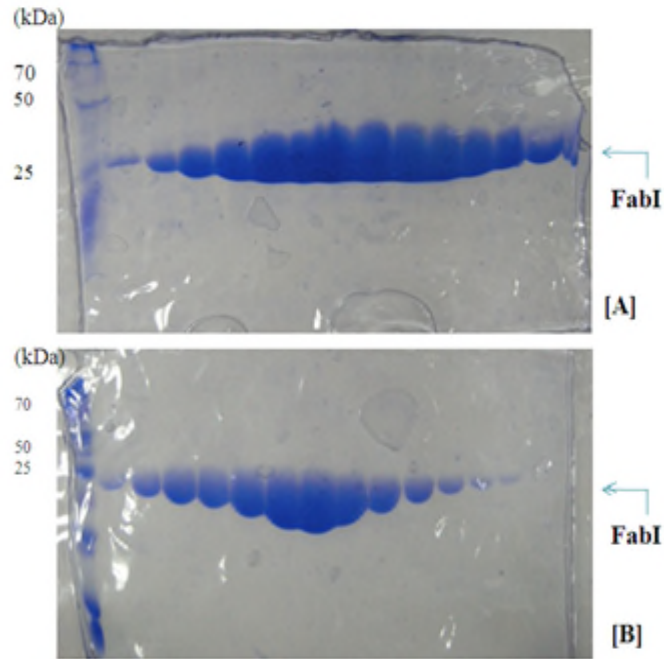
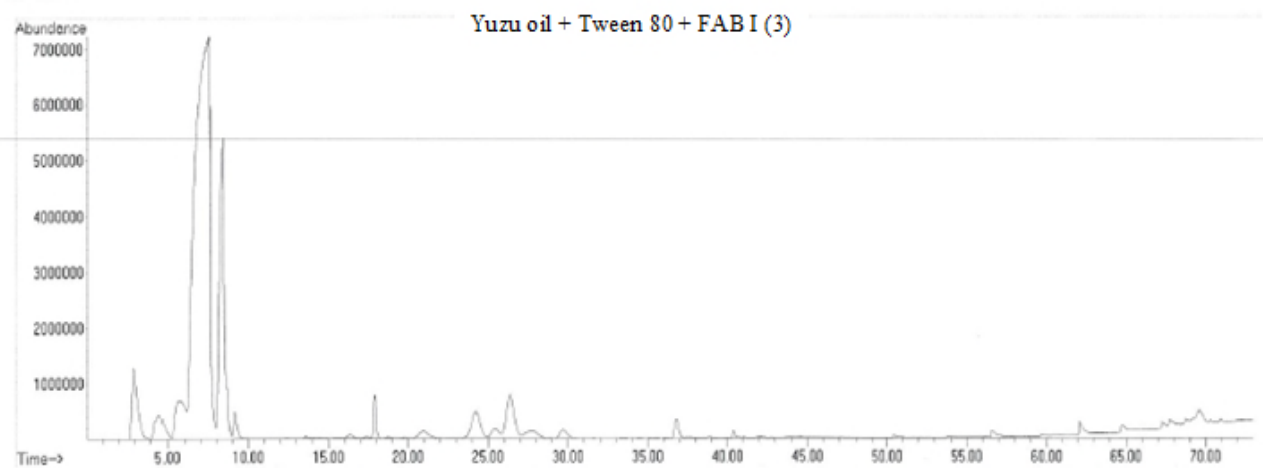
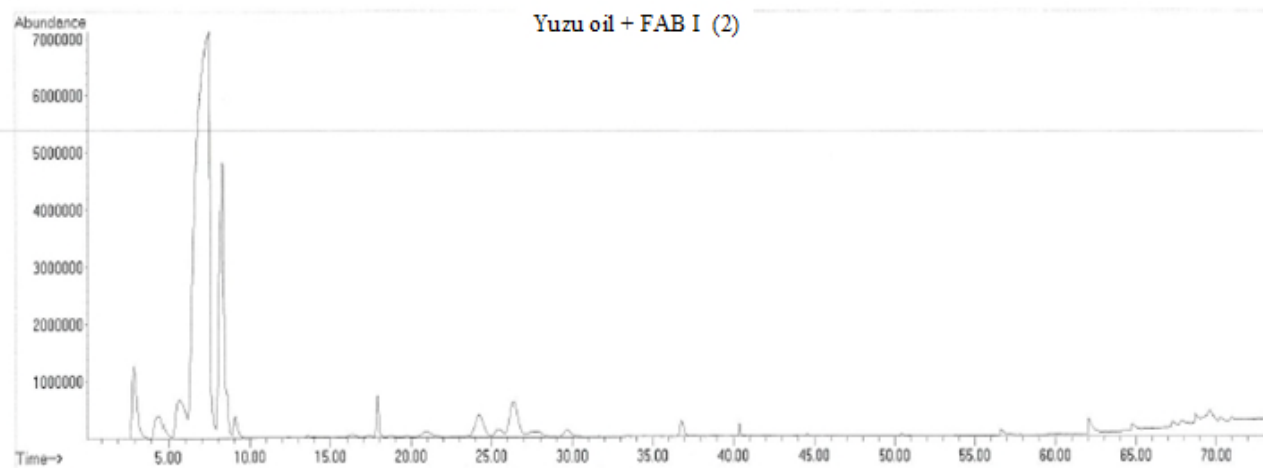
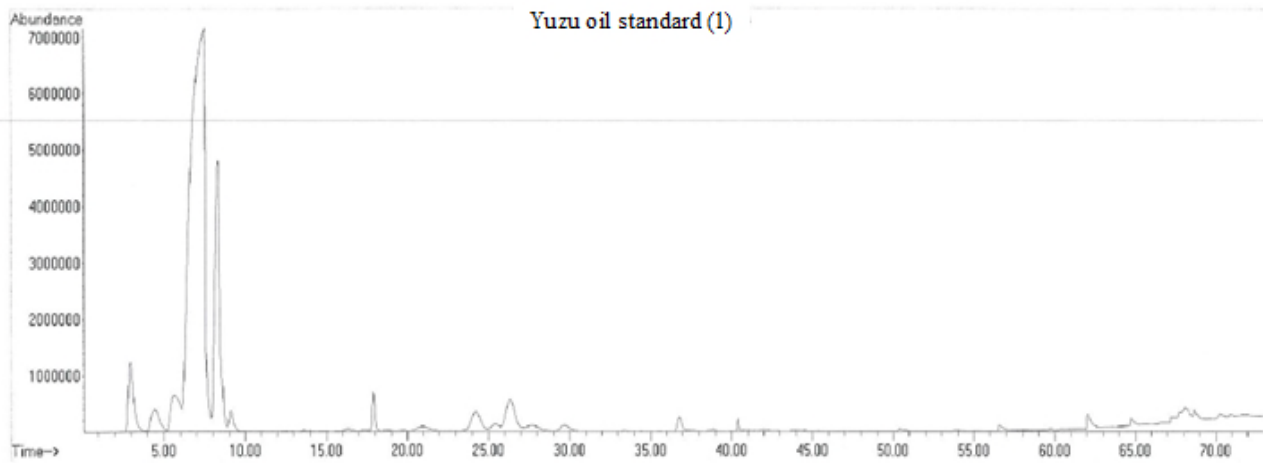


그림 1-17. SDS-PAGE of FabI from Ni<sup>2+</sup>-chelatedcolumn [A], SDS-PAGE of FabI from gel-filtration chromatography [B]

**FAB I 와 유자 정유와의 반응:** 위의 과정으로부터 얻어진 FAB I 는 -80℃에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 유자 정유와 FAB I의 반응을 위한 실험으로 0.1M의 Sodium phosphate buffer에 0.4mM의 NADH를 만든 다음 10mg/ml의 FAB I 와 유자 정유를 총 시료에 각각 10%를 cap tube에 넣어준다. 시료를 shaking water bath (비전과학)을 이용하여 170rpm, 37℃에서 1시간 반응 후 13000rpm으로 10분간 centrifuge하여 상층액의 oil 부분만을 회수하여 아로마 라인으로 GC/MS 분석을 의뢰하였다. 한편 실험에 변수로 유자 정유와 FAB I 반응 시료를 methylation하여 분석 하였다. methylation 반응으로는 FAB I 와 반응이 완료된 시료의 상층부분의 oil만을 추출하여 시료의 5배의 10% BF<sub>3</sub> methanol을 첨가 하여 시료를 100℃ 끓는 물에 5분간 증탕한다. 시료가 식은 후 1~2배의 D.W로 BF<sub>3</sub> methanol을 제거해준 다음 포화 Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>로 오일층을 분리하여 상층액을 회수한 후 분석에 사용하였다.



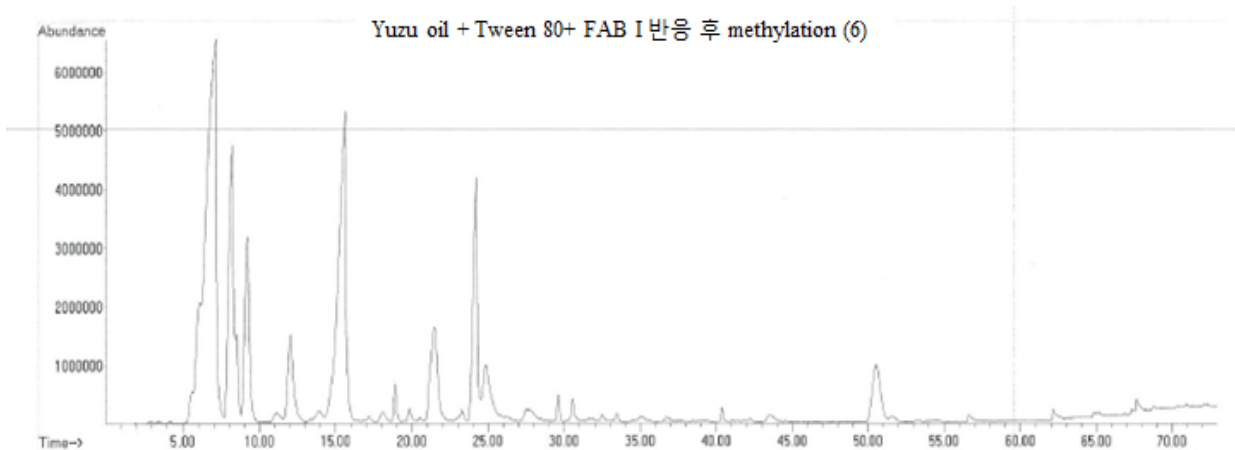
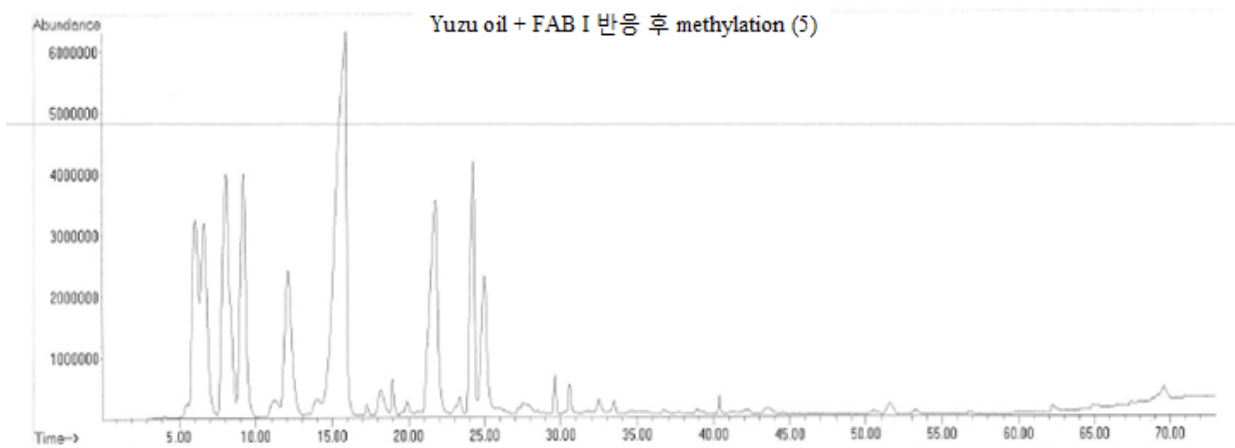
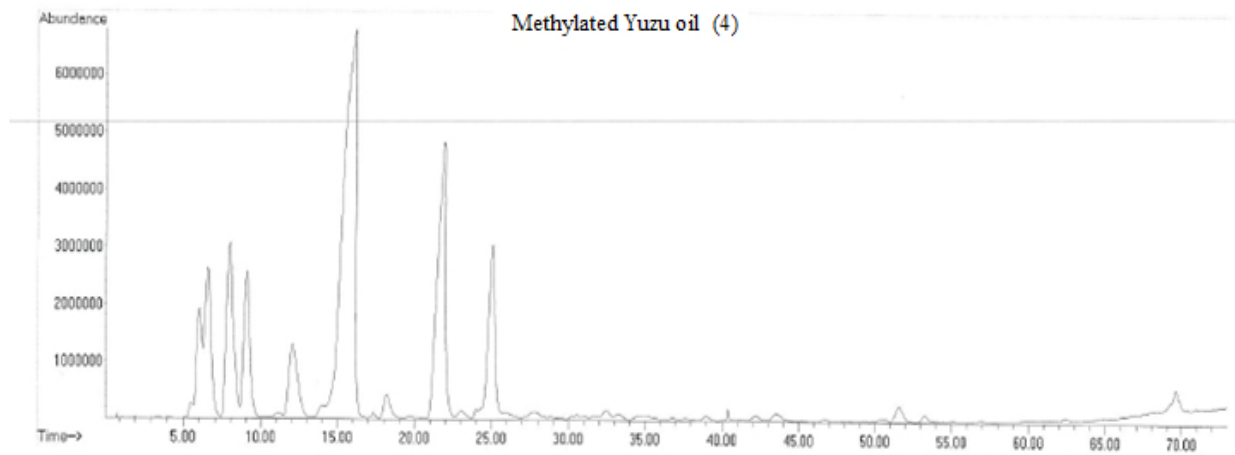


그림 1-18. GC/ MS analysis after reaction with Enoyl-acyl carrier protein reductase (FAB I): (1)Standard yuzu oil, (2)Yuzu oil 과 FAB I 반응 후, (3)Yuzu oil에 tween 80 첨가 후 FAB I 반응, (4)Methylation된 yuzu oil, (5)FAB I 반응 후 methylation된 yuzu oil, (6)Tween 80 첨가된 yuzu oil과 FAB I 반응한 후 methylation.

## 5. 곰팡이로부터 생물전환에 따른 유자 정유의 추출 수율 및 향기성분의 변화

### 가. 곰팡이 분리

유자 과피로부터 분리된 3종의 곰팡이를 세종대로부터 분양받아 특성을 알아보기 위한 실험을 하였다. 먼저 5ml의 증류수를 가하여 포자를 수집한 뒤 멸균된 한청을 이용하여 여과시킨다. 여과된 균주 1ml을 접종하여 22°C에서 5일 배양한 후 성장한 곰팡이를 관찰, 분리하였다. 1차적으로 분리된 곰팡이를 순수 분리하기 위하여 각각 PDA배지에 접종하여 평판배지 상에서 균총의 형태가 다른 것들은 서로 다른 균으로 가정하여 분리하였으며, 곰팡이의 발육 속도, 집락의 표면 및 뒷면의 색조를 관찰하였다.

관찰결과 yuzu 12의 발육속도가 가장 빨랐으며 균총의 밀도가 다른 2종의 균보다는 낮고 비교적 느슨하게 관찰되었다. 한편 yuzu 2-1의 뻗어나가는 속도가 가장 느렸으며 균총의 형태는 반대로 다른 2종의 균총보다 뽕뽕하고 높은 밀도를 보였다.

Yuzu 2의 집락 표면의 자실체 부분의 색상은 푸른색을 띤 녹색을 보였으며, 뒷면의 균사체의 부분은 개나리 색에 가까운 진노란 색상을 보였다. Yuzu 2-1의 집락의 표면은 푸른색을 띤 회색에 가까운 색상을 보였으며 균사가 성장하여 뻗어나가는 초기 즉 균총의 가장 가장자리 부분이 다른 2종의 균과는 다르게 흰색의 색상이 뚜렷하게 관찰되었다. 뒷면의 색상은 밝은 노란색을 띄었다. Yuzu 12의 표면은 회색의 색상을 보였으며, 뒷면의 색상은 접종 중심부의 색상은 검은색을 띄며 뻗어나가는 균사는 아이보리색에 가까운 색상을 보였다.

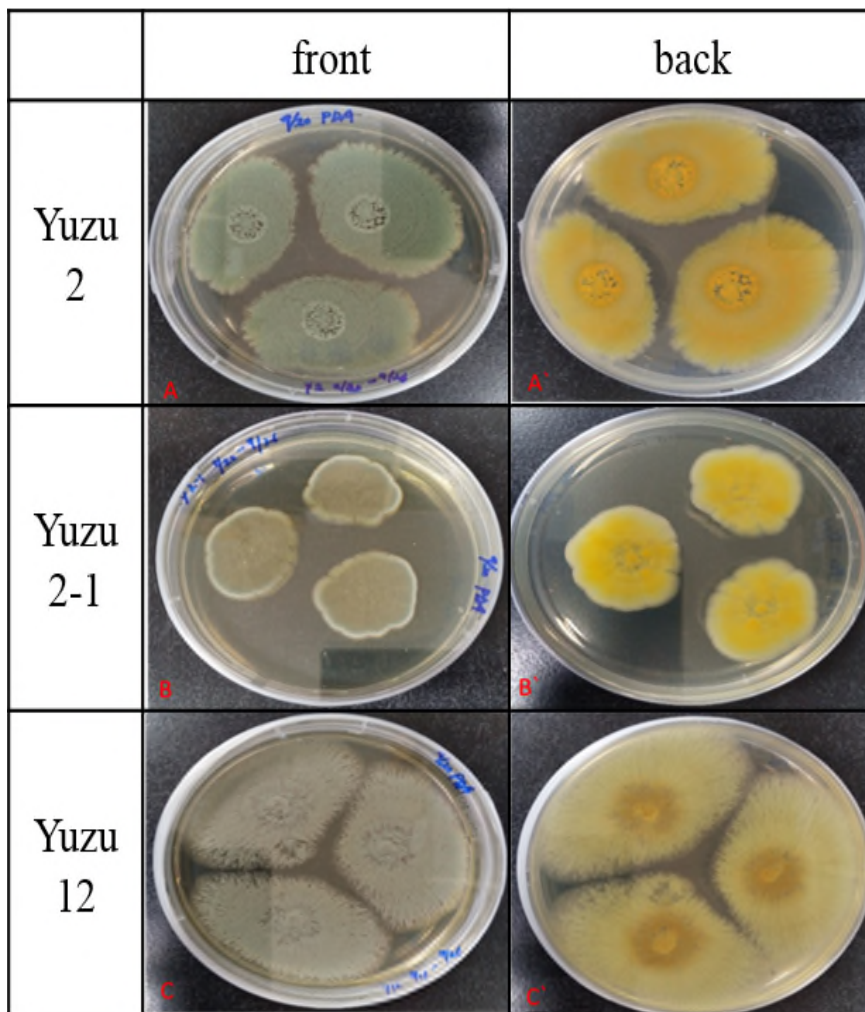


그림 1-19. Isolated fungi from yuzu peel. (A, A': yuzu 2, B, B': yuzu 2-1, C, C': yuzu12)

**나. 곰팡이 배양**

3종의 곰팡이 균의 집락이 형성된 PDA 고체 배지 상에 5ml의 증류수를 가하여 포자를 수집한 뒤 멸균된 한천을 이용하여 여과시킨다. 여과된 균을 100ml의 PDB 액체배지에 접종하여 shaker(SI-900R, JEIO TECH)를 이용하여 22℃, 150rpm에서 3일간 배양시킨다. 배양이 완료된 곰팡이의 건조 중량을 측정하기 위해 배양액 100ml을 filter paper(whatman No.2)로 균체를 여과한다. Dry oven (vision scientific co. LTD)을 이용하여 105℃에서 1시간 건조한 후 측정된 무게를 3번 반복하여 측정된 평균값을 건조 중량으로 측정하였다. 그런 다음 1L용량의 PDB 액체배지에 10% 건조 중량 기준 0.2g~0.4g을 접종하여 3일간 배양시킨다.

유자 과피 400g씩을 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액에 3분간 침지하여 살균한 뒤 멸균증류수로 3회 세척하여 포자현탁액에 직접 침지시켜 포자를 접종하였다. 포자를 접종한 유자 과피는 70% ethanol에 살균된 밀폐용기에 넣은 후 멸균증류수를 따로 넣어주어 80%~90%의 습도가 유지되도록 하였고 배양기(BI-600M, Jeio tech)를 이용하여 22℃에서 각각 10일에서 20일 동안 배양하였다. 배양 완료된 시료를 coldpress extraction 방법으로 essential oil을 추출하였으며, 위와 동일한 조건으로 GC-MS분석을 통해 향기성분을 조사하였다.

100ml의 PDB 액체 배지에 각각 3종의 곰팡이 균을 배양시킨 후 생장률을 알아보기 위하여 위의 조건으로 전체 중량을 측정하였다.

측정결과 Yuzu 2의 중량이 4.17~4.20 g/L로 가장 높았고 나머지 균의 중량이 각각 Yuzu 2-1: 3.89~3.93 g/L, Yuzu 12: 2.00~2.11 g/L 순으로 나타났다. (표1-11)

이와 같은 결과는 앞서 관찰한 PDA 고체배지 상에서의 균총의 번식속도와는 다르게 관찰되었다. 앞서 관찰한 실험에 서는 Yuzu 12의 성장 속도가 빠르고 균총의 크기가 가장 큰 반면 건조 무게는 가장 가볍게 관찰되었으며, yuzu 2의 고체배지 상에서의 균총은 뻗어나가는 속도가 가장 느리고 크기도 가장 작았으나 건조 무게는 가장 무겁게 관찰되었다.

또한, 각각의 곰팡이균 3종류를 유자 과피에 직접적으로 접종 시킨 다음 4일 후 곰팡이 집락이 형성됨을 육안으로 확인할 수 있었으며, 비교적 전체적으로 고루 퍼져 자라는 모습을 보였다. yuzu12의 균을 접종한 시료에서는 PDA 배지 상에서 색상과는 다르게 붉은색을 보이며 균의 집락이 관찰되었다. 각각의 시료에서 곰팡이 특유에 냄새를 느낄 수 있었으며, 곰팡이를 접종하지 않은 시료는 껍질 안쪽부분이 아직 단단하고 탄력이 있었으나, 곰팡이균을 접종한 시료에서는 시료가 매우 무르고 쉽게 뭉그러졌다. 이는 곰팡이의 섬유소 분해 능력으로 인한 것으로 보여 진다.

**표 1-12. Dry cell weight.**

	Dry cell weight
Yuzu 2	4.17~4.20 g/L
Yuzu 2-1	3.89~3.93 g/L
Yuzu 12	2.00~2.11 g/L





그림 1-20. Effect of fungal incubation time on the morphological changes of yuzu peel.

(A: Raw material, Y 12, Y 2-1, Y 2: after 10 days, Y 12', Y 2-1', Y 2': after 20 days)

**다. 곰팡이 배양에 따른 essential oil의 추출 수율**

각각의 곰팡이를 접종하여 coldpress 방법으로 추출 실험결과 곰팡이를 배양시킨 시료에서 그렇지 않은 시료보다 전반적으로 추출 수율이 소폭 상승한 것으로 나타났으며, 이와 같은 결과는 박테리어나 곰팡이가 식물세포벽에 침투하는 과정에서 분비하는 효소들에 의해 식물세포벽이 분해가 되는데 이중에 대표적인 폴리갈락투로나아제 즉 펙틴을 분해하는 효소로 알려져 있다는 기존에 연구들과의 상관성을 보여주는 결과라고 보여 진다. 또한 10일 배양의 시료에서 20일 배양의 시료보다 높은 추출 수율을 보였는데 이는 20일의 시료가 과분해 되어 추출시 용이하지 못한 것으로 보여 진다.

흥미로운 점은 균을 접종하지 않고 10일과 20일 후 추출한 YEO의 수율이 냉동보관 되어있는 비교적 신선한 시료를 바로 추출 실험하였을 경우보다 월등히 높은 추출 수율을 보였다. 이는 시간이 지나면서 유자 자체적으로 자가분해에 의한 것으로 보여 진다.

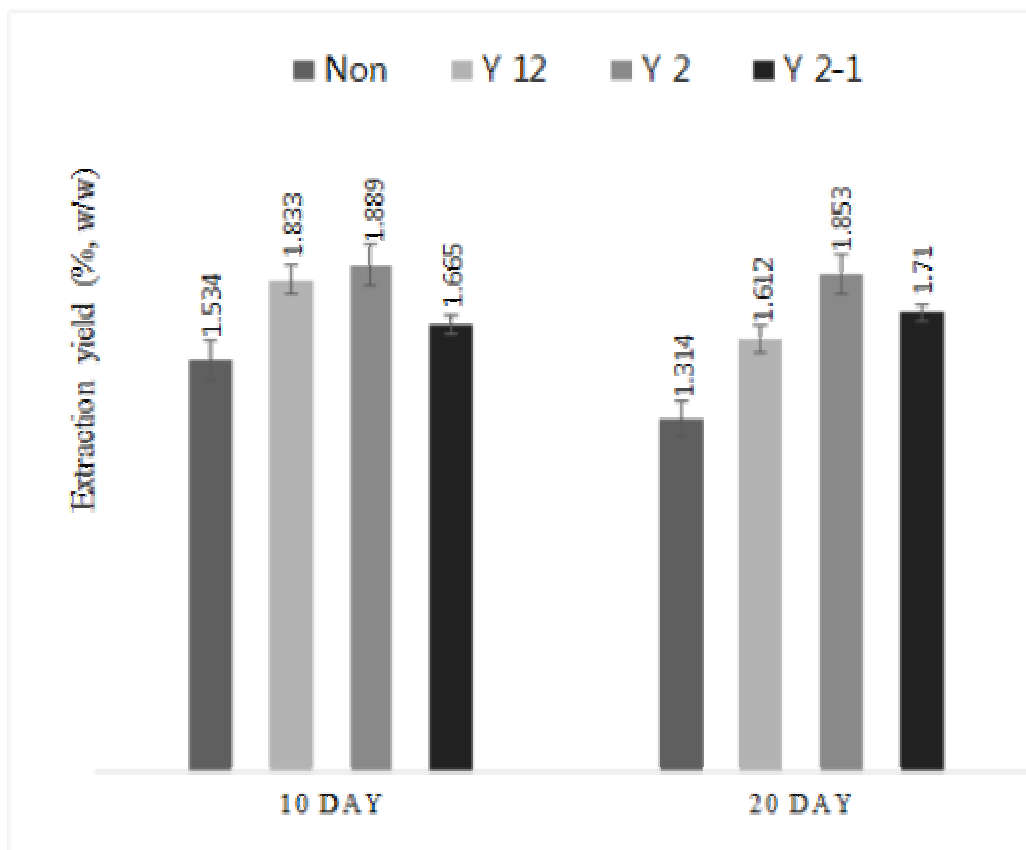


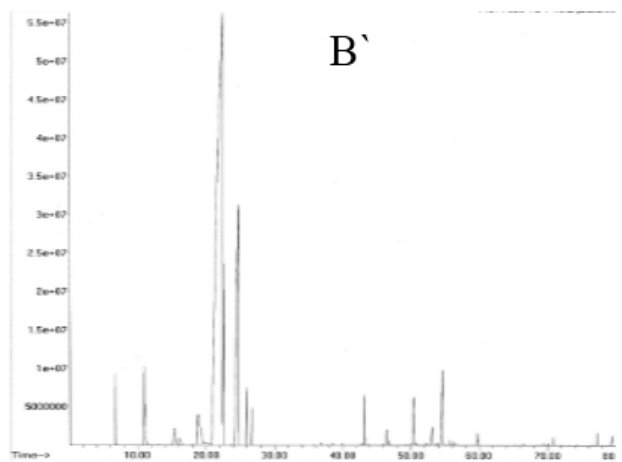
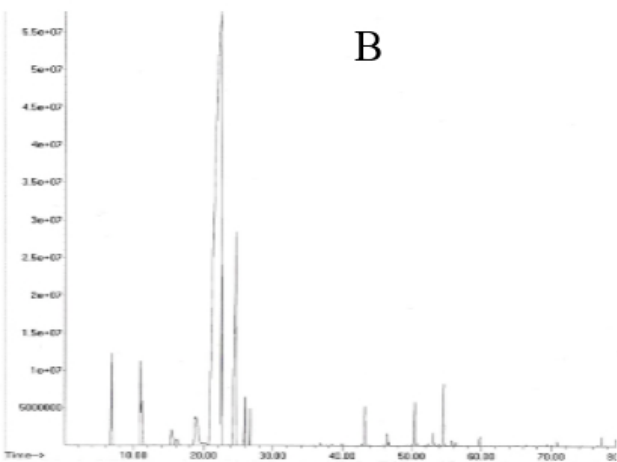
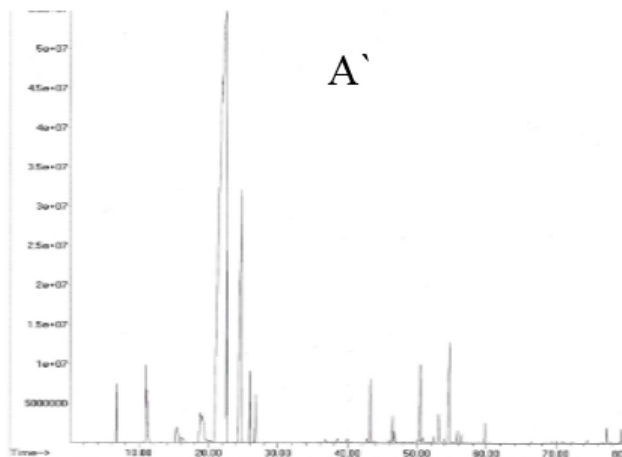
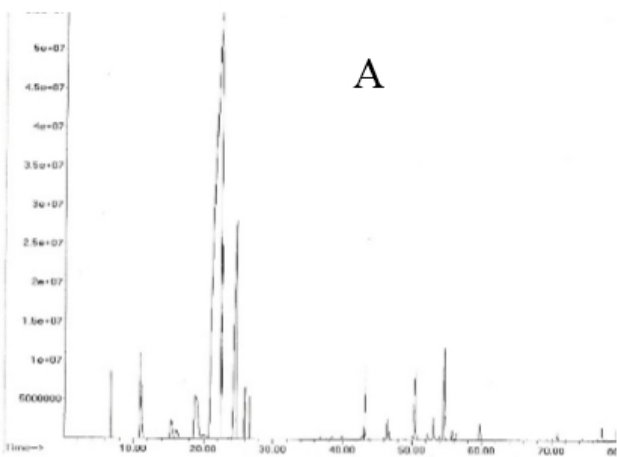
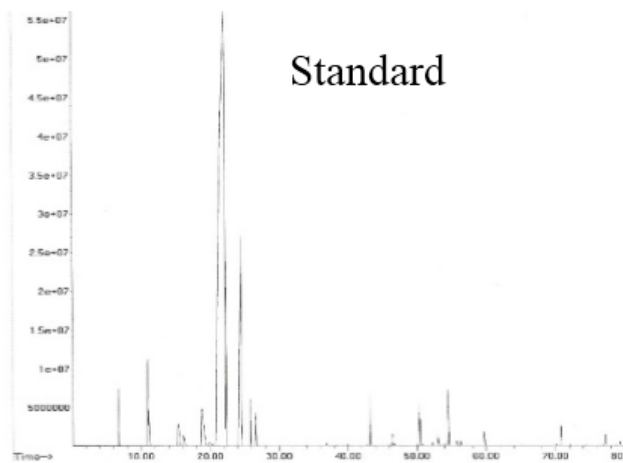
그림 1-21. Extraction yield of essential oil by each fungi incubation time (Fungi culture condition: 22°C, humidity: 80~90%, 10~20day)



#### 라. 곰팡이 배양에 따른 essential oil의 향기성분 변화

곰팡이 배양에 따른 향기성분의 변화를 알아보기 위해 유자 과피로부터 분리한 3종에 곰팡이를 유자 과피에 배양하여 에센셜 오일을 추출하였다. 정유추출물의 향기 성분을 분석하여 표로 나타내었다. GC-MS의 분석 조건은 위 실험과 동일한 조건으로 실험하였다.

분석 결과 각각의 곰팡이 종류별로 약 63가지의 향기성분이 검출되었다. 곰팡이 종류별 모든 시료에서 거의 유사한 조성 비율을 나타냈으며, 기준 시료의 성분과 큰 차이를 보이지 않았다. 모든 시료에서 limonene의 함량이 가장 높았으며 다음으로 gamma-terpinene, sabinene, myrcene, beta-pinene, alpha-pinene 순으로 나타났다. 기준시료기 비교하였을 때 limonene의 함량이 2%정도씩 줄어드는 경향을 보였다. 그러나 곰팡이를 배양하지 않고 10~20일 동안 방치한 시료에 limonene함량의 감소폭이 곰팡이 배양시료보다 크게 나타났으며, 이 같은 결과는 곰팡이에 의한 limonene의 성분이 어느 정도 보존되었다고 보여 진다. 이와 같은 결과는 곰팡이의 성장 시 colony에 의해서 시료의 표피가 둘러싸이면서 산소와의 접촉을 차단하여 곰팡이를 배양하지 않은 시료보다 limonene의 산화 정도가 낮아진 것으로 추론 할 수 있다. 또한 관능평가 결과 곰팡이 배양 완료 후 시료에서는 곰팡이 특유에 이취가 났으며, 착즙 후 에센셜 오일에서는 이취를 느낄 수 없었고 기준 시료와 거의 같은 향기를 느낄 수 있었다.



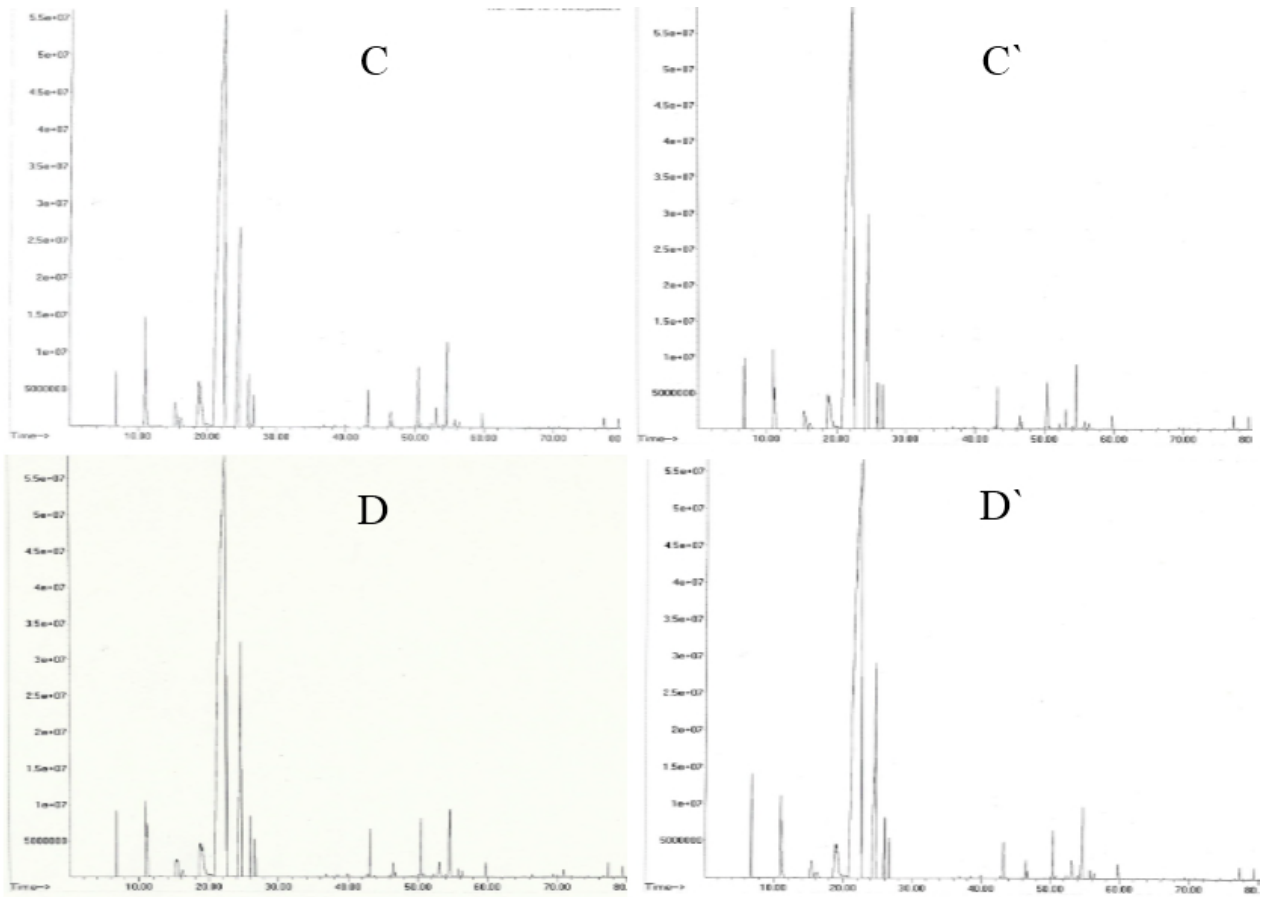


그림 1-22. GC peaks of yuzu essential oil by each fungi incubation.

(A: Non inoculation after 10 day, A': Non inoculation after 20 day, B: Inoculation yuzu 2 after 10 day, B': Inoculation yuzu 2 after 20 day, C: Inoculation yuzu 2-1 after 10 day, C': Inoculation yuzu 2-1 after 20 day, D: Inoculation yuzu 12 after 10 day, D': Inoculation yuzu 12 after 20 day)

㉔ 1-13. GC/ MS analysis of yuzu essential oil by each fungi incubation.

(peak area%)

No	Compound	S <sup>1)</sup>	non-10 <sup>2)</sup>	non-20 <sup>3)</sup>	y2-10 <sup>4)</sup>	y2-20 <sup>5)</sup>	y2-1-10 <sup>6)</sup>	y2-1-20 <sup>7)</sup>	y12-10 <sup>8)</sup>	y12-20 <sup>9)</sup>
1	Methanamine	0.590	0.67	0.57	1.42	0.92	0.79	0.57	0.76	1.59
2	alpha-pinene	1.980	1.65	1.35	1.83	1.68	1.65	2.36	1.73	1.58
3	alpha-thujene	0.760	1.01	1.21	0.96	0.91	0.89	1.31	1.1	1.34
4	beta-pinene	1.010	0.93	0.89	0.97	1.08	0.91	1.28	1.01	0.94
5	beta-myrcene	2.950	1.2	2.56	3.16	3.02	2.55	3.78	2.51	.
6	d-limonene	70.85	66.39	66.54	71.33	68.79	68.58	67.28	68.49	68.61
7	sabinene	3.480	3.1	2.65	2.66	3.18	0.34	3.31	0.78	3.43
8	gamma-terpinene	10.27	9.8	10.9	10.16	10.81	11.34	9.07	13.58	12.32
9	p-cymene	0.750	0.79	1.03	0.85	0.8	0.89	0.81	0.95	0.89
10	alpha-terpinene	0.850	1.4	0.64	0.6	0.62	0.56	0.47	0.56	0.66
11	6-Octen-2-one	.	0.01	0.01	.	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
12	alpha-dimethylstyrene	0.060	0.08	0.08	.	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06
13	alpha-cubebene	0.020	0.04	0.04	0.05	0.05	0.09	0.02	0.09	0.06
14	Decanal	.	0.06	0.02	.	.	.	.	0.01	.
15	p-mentha-1,3-diene	0.040	.	0.11	0.01	.	.	0.07	.	.
16	alpha-copaene	0.060	0.02	0.16	0.1	0.1	0.12	0.1	0.1	0.1
17	beta-linalool	0.790	0.92	0.8	0.55	0.62	0.68	0.51	0.61	0.46
18	alpha-phellandrene	0.020	0.03	0.04	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.05
19	beta-elemene	0.020	0.02	0.08	0.06	0.04	0.12	0.05	0.1	0.02
20	caryophyllene	0.350	0.51	0.62	0.33	0.36	0.41	0.42	0.35	.
21	terpinen-4-ol	0.030	0.1	0.14	0.07	0.06	0.08	0.1	0.1	0.1
22	beta-sesquiphellandrene	0.040	0.06	0.06	0.04	.	0.14	0.05	0.05	0.16
23	beta-farnesene	1.070	1.59	1.9	1.06	1.21	1.3	1.57	1.34	1.22
24	alpha-humulene	0.060	0.1	0.12	0.06	0.07	0.07	0.09	0.08	0.07
25	alpha-terpineol	0.040	0.07	0.08	0.03	0.07	0.4	0.05	0.04	0.05
26	1(10),4(14),5-germacatriene	0.700	0.95	1.81	0.54	1.49	0.86	0.84	0.69	0.74
27	alpha-murolene	0.040	0.09	0.1	0.05	0.06	0.07	0.08	0.05	0.08
28	bicyclogermacrene	1.520	2.24	2.45	1.53	1.7	1.89	2.27	1.69	1.77
29	delta-cadinene	0.140	0.02	0.26	0.12	0.01	0.12	0.2	0.19	0.21
30	camphene	0.040	0.02	0.04	0.01	0.01	.	0.03	0.01	0.01
31	beta-sesquiphellandrene	0.140	0.13	0.23	0.08	0.17	.	0.13	0.13	.
32	butanoic acid	0.010	0.01	0.02	.	0.01	0.03	.	.	0.02
33	alpha-amorphene	0.020	0.01	0.02	.	.	0.01	.	.	.
34	p-mentha-1,8-dien-7-ol	0.010	0.01	0.01	0.01	.	0.01	0.02	0.01	.
35	L-linalool	.	0.02	0.02	0.02	.	.	0.03	0.03	0.02
36	nerolidol	0.030	0.03	0.04	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.02
37	endo-1-bourbonanol	0.350	0.11	.	0.08	0.03	.	0.04	0.12	0.02
38	Caprylic acid	.	0.01	0.01	.	0.02	.	0.01	.	.
39	cedrene	.	.	0.1	.	0.22	.	.	.	.
40	viridiflorol	0.010	0.01	0.03	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
41	triacetin	0.010	0.01	.	.	.	0.01	.	.	.
42	spathulenol	0.010	0.02	0.04	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
43	gamma-cadinene	0.020	0.02	0.03	0.02	.	0.01	0.02	.	0.02
44	thymol	0.170	0.18	0.22	0.15	.	0.19	0.17	0.2	0.17
45	isospathulenol	.	0.01	0.02	.	0.01	.	.	.	0.01
46	alpha-cadinol	.	0.17	0.22	0.12	0.25	0.16	0.18	0.18	0.17

47	4-bromo	.	0.01	0.1	.	.	.	.	0.02	0.01
48	beta-eudesmol	0.090	.	0.01	.	0.01	0.01	.	0.01	0.01
49	Carvacrol	.	.	.	.	0.01	.	.	0.01	.
50	diazene	0.010	0.01	.	.	.	.	.	0.01	.
51	dodecanoic acid	0.010	0.03	0.03	0.01	0.01	.	0.02	0.02	0.02
52	cyclohexene	0.010	0.01	0.01	.	.	0.01	0.02	0.01	0.01
53	capric acid	0.010	0.01	0.09	.	.	0.02	.	0.01	0.01
54	2,3-dimethoxyphenylacetonitrile	.	.	0.02	.	0.01	.	.	0.01	0.01
55	beta-selinen	.	0.01	0.02	.	.	.	.	.	.
56	Stearic acid	.	0.06	0.06	.	0.06	0.07	0.05	0.06	0.05
57	(Z)6,(Z)9-Pentadecadien-1-ol	.	0.02	.	.	.	0.03	.	.	0.01
58	oleic acid	0.020	0.14	0.11	0.02	0.04	0.02	0.1	0.09	0.12
59	myristic acid	0.050	0.1	0.11	0.07	0.04	0.1	0.06	0.07	0.8
60	linoleic acid		1.31	0.02	0.39	0.71	0.71	0.85	0.87	0.39
61	Palmitinic acid	0.360	0.55	0.73	0.3	0.53	0.48	0.55	0.54	0.01
62	linolenic acid		0.54	1.22	0.08	0.29	0.45	0.33	0.33	0.73
63	Heptadecanoic acid	0.050	0.07				0.06	0.07	0.07	

- 1) Standard, 2) Non inoculation after 10 day, 3) Non inoculation after 20 day,
- 4) Inoculation yuzu 2 after 10 day, 5) Inoculation yuzu 2 after 20 day,
- 6) Inoculation yuzu 2-1 after 10 day, 7) Inoculation yuzu 2-1 after 20 day,
- 8) Inoculation yuzu 12 after 10 day, 9) Inoculation yuzu 12 after 20 day,

## 6. 저장 조건에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석

### 가. 저장 온도 및 기간에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석

저장 온도와 기간에 따른 유자 정유의 향기성분의 변화를 알아보기 위한 실험으로 2년차 과제 실험과 동일한 방법으로 추출된 유자 정유를 -20℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

저장온도는 각각 4℃, 20℃, 30℃에서 30일 간격으로 각각 30일, 60일, 90일, 120일 동안 보관한 뒤 GC-MS분석을 실시하였다.

실험 결과 대부분에 시료에서 유의적인 차이는 보이지 않았다. 특이한 점은 4℃에 보관한 시료에서 gamma-lactone의 성분이 다량으로 발견되었고 함량은 각각 4℃에서 30일간 보관하였을 때 9.41%, 60일 보관된 시료에서 1.71%, 90일과 120일 시료에서 각각 0.21%, 0.07%의 함량으로 저장기간이 증가 할수록 빠르게 감소하는 경향을 보였다. ethyl ester 함량 또한 30, 60, 90일 시료에서 각각 1.37%, 0.29%, 0.09%로 확인 되었고 120일의 시료에서는 검출되지 않았다. 한편 4℃, 20℃, 30℃저장 온도별 limonene의 평균 함량은 각각 70.42%, 70.15%, 69%로 저장 온도가 높을수록 소폭 줄어드는 경향을 보였다. bicyclogermacrene 역시 저장 온도와 기간이 증가 할수록 함량이 낮아지는 경향을 보였다. 반면에 spathulenol, thymol의 경우 저장온도와 기간이 증가할수록 함량이 증가하는 모습을 보였다. 이와 같은 결과는 (simon M)의 저장온도와 기간에 따른 유자의 향기성분을 분석한 결과 전체적으로 모노테르펜의 종류는 온도와 저장기간이 증가할수록 감소하는 모습을 보였고 linalool과 alpha-terpineol 같은 산화물이나 spathulenol등은 시간과 온도가 증가할수록 함량이 증가한다고 보고하고 있다. 본 실험에서도 이와 유사한 결과를 가져왔으며, 다만 저장온도와 기간의 범위를 넓게 설정하여 수치의 변동

폭이 본 실험보다는 크게 나타난 것으로 보여 진다. 또한 20℃에서 6개월 이후로 저장한 시료에서부터 유의적인 향기 성분의 변화를 가져온 것으로 보고하고 있어 본 실험설정이 비교적 안정된 저장 조건이라고 판단되며 향후 실험 설정 범위를 넓혀 유자 에센셜 오일의 향기 성분 변화를 알아보는 실험을 계획 중에 있다.

표 1-14. Relative compositional changes in yuzu essential oil during storage.

(peak area%)

No	Compound	y4-30	y4-60	y4-90	y4-120	y20-30	y20-60	y20-90	y20-120	y30-30	y30-60	y30-90	y30-120
1	alpha-Pinene	2.47	2.74	2.79	1.67	3.51	2.81	3.41	2.4	3.38	2.89	3.69	3.75
2	Camphene					0.02	0.02	0.02				0.03	0.02
3	beta-Pinene	0.83	0.91	0.94	0.46	1.23	1.23	1.22	0.93	0.98	0.99	1.3	1.32
4	Sabinene	0.37	0.41	0.43	0.12	0.54	0.52	0.53	0.38	0.44	0.44	0.58	0.6
5	beta-Myrcene	2.56	2.79	2.87		2.84	3.64	3.39	2.45	3	2.86	3.62	3.83
6	alpha-Terpinene	0.26	0.3	0.31		0.27	0.33	0.05	0.02	0.33	0.26	0.34	0.36
7	dl-Limonene	64.32	70.23	71.53	75.58	69.36	70.74	70.16	70.34	71.91	69.04	67.18	67.87
8	Sabinene	2.59	2.76	2.8	1.38	2.79	2.7	3.1	2.63	3.06	2.63	2.77	2.38
9	beta-Ocimene				0.14	0.01	0.01	0.02		0.1	0.01	0.01	0.01
10	gamma-Terpinene	9.42	10.32	10.59	10.63	9.92	9.33	9.57	8.8	9.55	9.65	10.22	10.25
11	Cymene	0.77	0.88	0.87	1.01	1.32	1.67	2.27	2.53	0.88	1.38	1.47	1.61
12	alpha-Terpinolene	0.5	0.54	0.57	0.6	0.53	0.49	0.59	0.49	0.51	0.51	0.45	0.44
13	o-Allyltoluene							0.06		0.04			
14	alpha-dimethylstyrene	0.03	0.02	0.06	0.03	0.05	0.05		0.02				
15	3-Ethylidene-1-methyl-1,4-cycloheptadiene						0.02						0.02
16	p-Mentha-1,5,8-triene	0.02			0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02		
17	(+)-Limonene oxide					0.02	0.08	0.21		0.01	0.13	0.11	0.1
18	Cyclohexylethyne				1.42								
19	epoxyterpinolene											0.03	0.02
20	alpha-Terpinene	0.17	0.19	0.2	0.23	0.19	0.11	0.14	0.16	0.15	0.17	0.11	0.07
21	1,3,6-Heptatrien		0.08			0.06		0.02					
22	Bicycloelemene						0.04				0.03		
23	Camphene									0.06			
24	Copaene	0.02	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.07	0.17		0.05	0.08	0.06
25	Decanal		0.03	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02
26	Linalool	0.82	0.89	0.92	0.88	0.93	0.89	1.13	1.11	0.85	1.2	1.02	0.81
27	Zingiberene					0.02	0.03	0.03		0.02			0.02
28	beta-Elemene	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.18	0.18	0.13	0.12	0.21	0.14	0.11
29	Caryophyllene	0.31	0.35	0.13	0.36	0.38	0.34	0.42	0.4	0.32	0.48	0.41	0.3
30	trans-p-Mentha-2,8-dienol					0.01		0.02	0.03			0.02	0.02
31	gamma- Elemene		0.07		0.07	0.06		0.07	0.06	0.06	0.08	0.07	0.06
32	beta.-Famesene	0.91	1.01	1.04	1.05	1.08	1.05	1.24	1.4	0.94	1.5	1.33	1.13
33	ethyl ester	1.37	0.29	0.09									
34	alpha.-Humulene				0.04	0.06	0.06	0.06	0.08	0.05	0.12	0.08	0.07
35	Linalyl propionate									0.04			0.06
36	alpha-Terpineol	0.06	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05		0.04	0.08	0.07	0.06
37	alpha-Muurolene	0.03	0.03	0.04	0.02	0.05	0.04	0.05	0.07	0.03	0.07	0.06	0.04
38	bicyclogermacrene	1.28	1.23	1.3	1.2	1.14	0.65	0.4	0.31	0.99	0.7	0.6	0.34
39	delta-Cadinene	0.09	0.09	0.09	0.1	0.13	0.1	0.12	0.18	0.09	0.15	0.15	0.09
40	beta-Sesquiphellandrene	0.07	0.07	0.08	0.8	0.15	0.08	0.14	0.1	0.1	0.12	0.1	0.1
41	Phellandreneepoxide										0.01		0.01
42	Germacrene B	0.18	0.14	0.21	0.14	0.21	0.14	0.17	0.51	0.14	0.21	0.18	0.19
43	gamma-Lactone	9.41	1.73	0.21	0.07								
44	gamma.-Muurolene									0.01			
45	Valencene					0.02	0.01		0.06				
46	Caryophyllene oxide											0.02	0.11

47	bergamotene										0.05		
48	Nerolidol	0.05	0.02		0.02	0.03				0.02	0.03	0.03	0.03
49	p-Cymen-8-ol					0.02	0.02	0.03			0.03	0.02	0.01
50	GermacreneD	0.31	0.31	0.33	0.32	0.42	0.28	0.28	0.2	0.29	0.38	0.33	0.24
51	delta.-Nonalacton	0.06	0.07	0.04									
52	Glycerol 1,2-diacetate									0.06			
53	Triacetin										0.09	0.06	0.02
54	Elemol	0.03		0.02	0.02		0.03						0.03
55	(S)-5-Dodecanolide				0.03								
56	Cyclohexanol											0.02	0.05
57	spathulenol	0.02	0.04	0.05	0.06	0.42	0.55	0.02	1.07	0.17	0.88	0.94	0.98
58	Germacrene D-4-OL	0.17	0.19	0.19	0.19	0.29	0.17			0.02	0.2	0.16	0.15
59	Thymol	0.08	0.09	0.09	0.09	0.14	0.09		0.22	0.1	0.14	0.13	0.13
60	alpha.-Cadinol		0.04	0.04	0.05	0.09	0.01			0.07	0.09	0.03	0.01
61	Cyclopentanone											0.04	
62	Carvacrol				0.01	0.01	0.01			0.01	0.01	0.01	
63	isospathulenol			0.02	0.02	0.11	0.12			0.06	0.23	0.05	0.24
64	2-Naphthalenemethanol	0.03										0.02	
65	4-bromo-									0.01	0.04	0.02	0.04
66	alpha-Copaene-8-OL								0.03			0.1	0.09
67	Capric acid					0.01					0.03	0.02	0.02
68	1,2-Cyclohexanediol										0.03	0.03	0.05
69	Alloaromadendrene oxide												0.01
70	Ledene oxide											0.04	
71	Lauric acid				0.01		0.02			0.01	0.04	0.03	0.02
72	Isobarbatene ketone										0.01		
73	Adamantane											0.04	
74	Oleic Acid		0.17										
75	Myristinic acid	0.02	0.02	0.02	0.03	0.06	0.05		0.02	0.04	0.04	0.04	0.04
76	Linoleic acid		0.07	0.32	0.21				0.11			0.4	0.52
77	Palmitinic acid	0.2	0.17	0.18	0.18	0.28	0.31		0.34	0.25	0.26	0.24	0.24
78	Linolenic acid		0.43	0.08		0.1						0.12	
79	Stearic acid										0.04	0.04	0.05
80	Nonadecanoic acid				0.02					0.04			

y4-30: yuzu essential oil(YEO) stored for 30 days at 4°C.

y4-60: YEO stored for 60 days at 4°C.

y4-90: YEO stored for 90 days at 4°C.

y4-120: YEO stored for 120 days at 4°C.

y20-30: YEO stored for 30 days at 20°C.

y20-60: YEO stored for 60 days at 20°C.

y20-90: YEO stored for 90 days at 20°C.

y20-120: YEO stored for 120 days at 20°C.

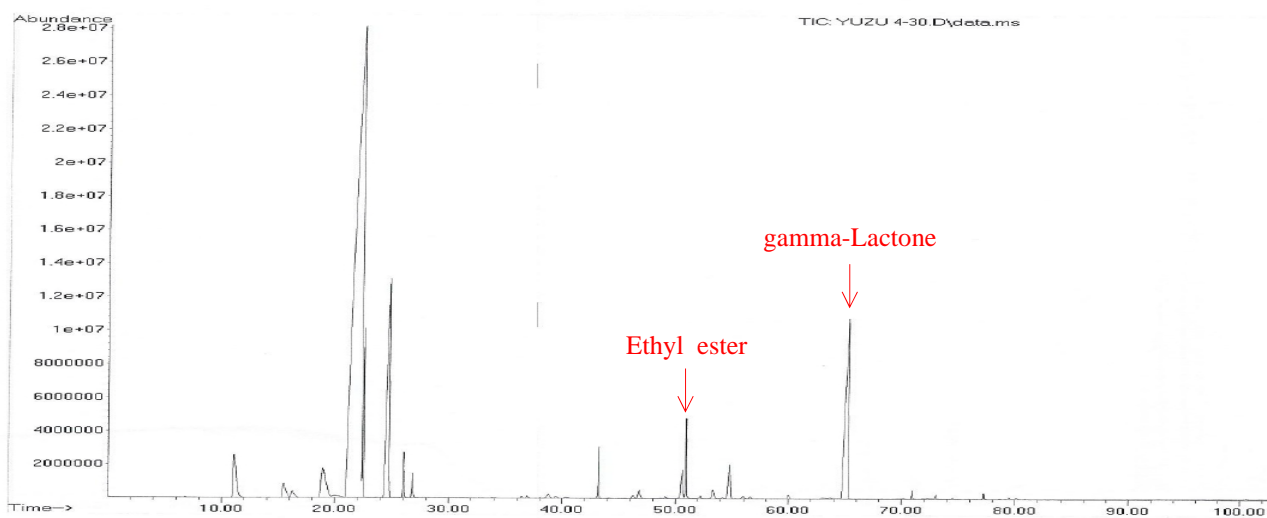
y30-30: YEO stored for 30 days at 30°C.

y30-60: YEO stored for 60 days at 30°C.

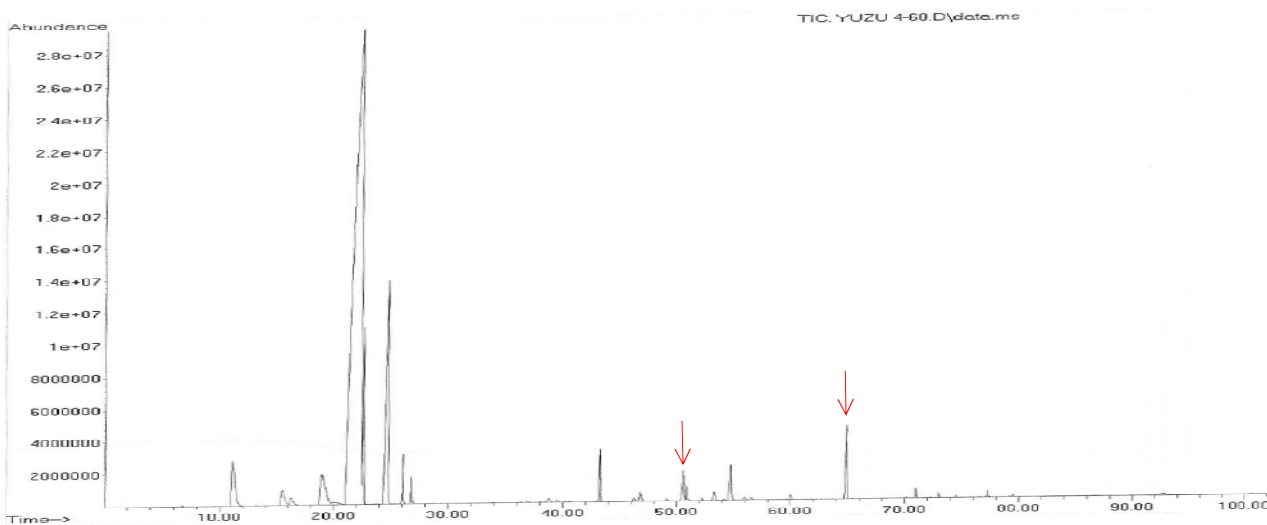
y30-90: YEO stored for 90 days at 30°C.

y30-120: YEO stored for 120 days at 30°C.

File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 4-30.D  
Operator :  
Acquired : 15 Dec 2014 8:20 using AcqMethod AUTO(FEAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 4-30  
Misc Info :  
Vial Number : 1

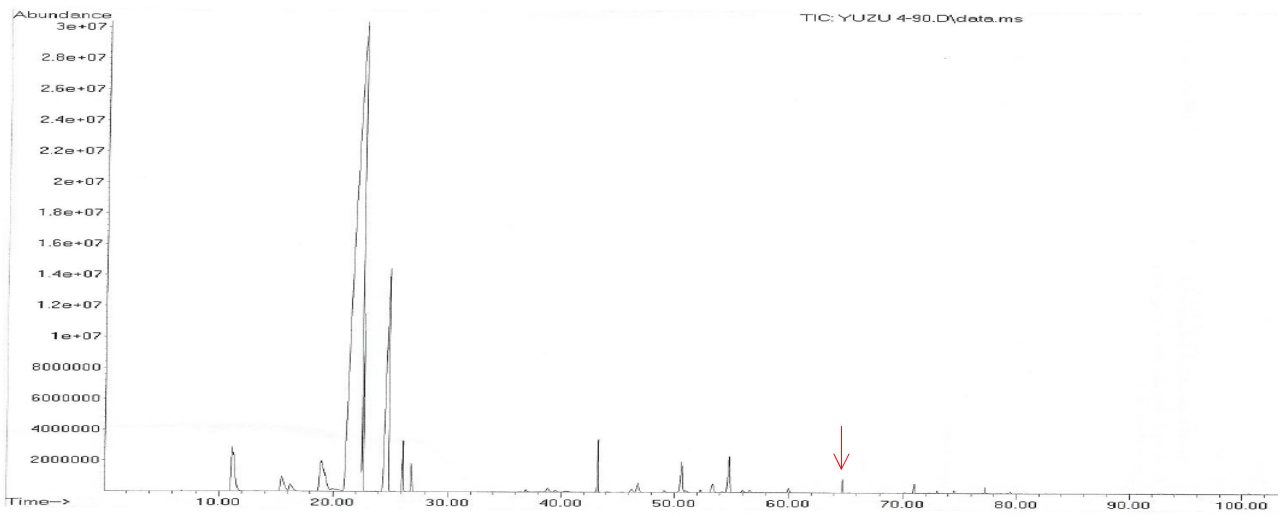


File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 4-60.D  
Operator :  
Acquired : 15 Dec 2014 10:48 using AcqMethod AUTO(FEAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 4-60  
Misc Info :  
Vial Number : 2





File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 4-90.D  
Operator :  
Acquired : 15 Dec 2014 13:16 using AcqMethod AUTO(EFAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 4-90  
Misc Info :  
Vial Number : 3



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 4-120.D  
Operator :  
Acquired : 15 Dec 2014 16:17 using AcqMethod AUTO(EFAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 4-120  
Misc Info :  
Vial Number : 4

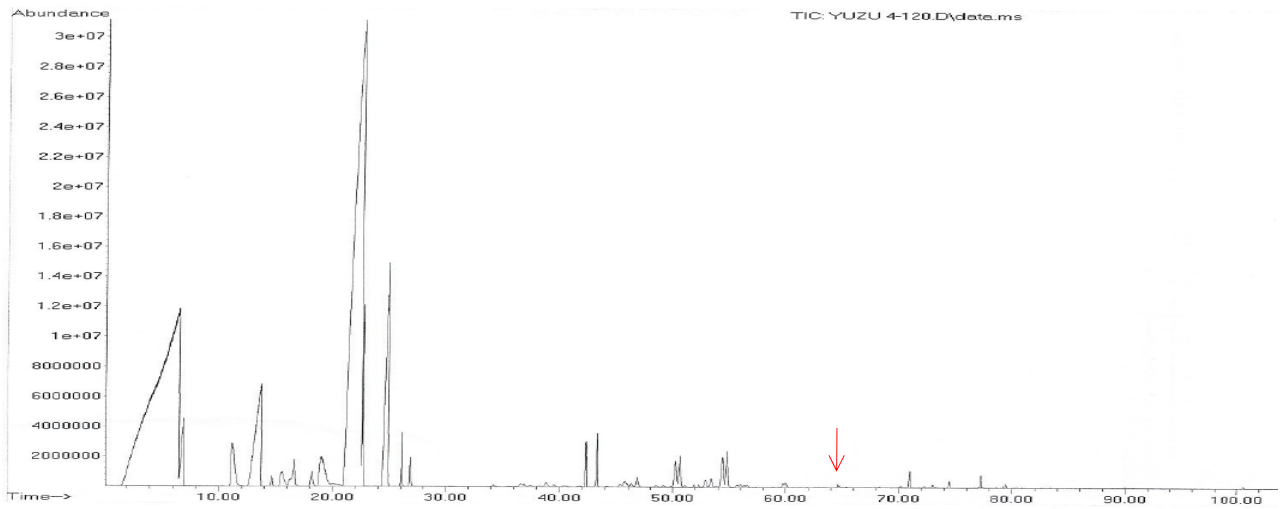
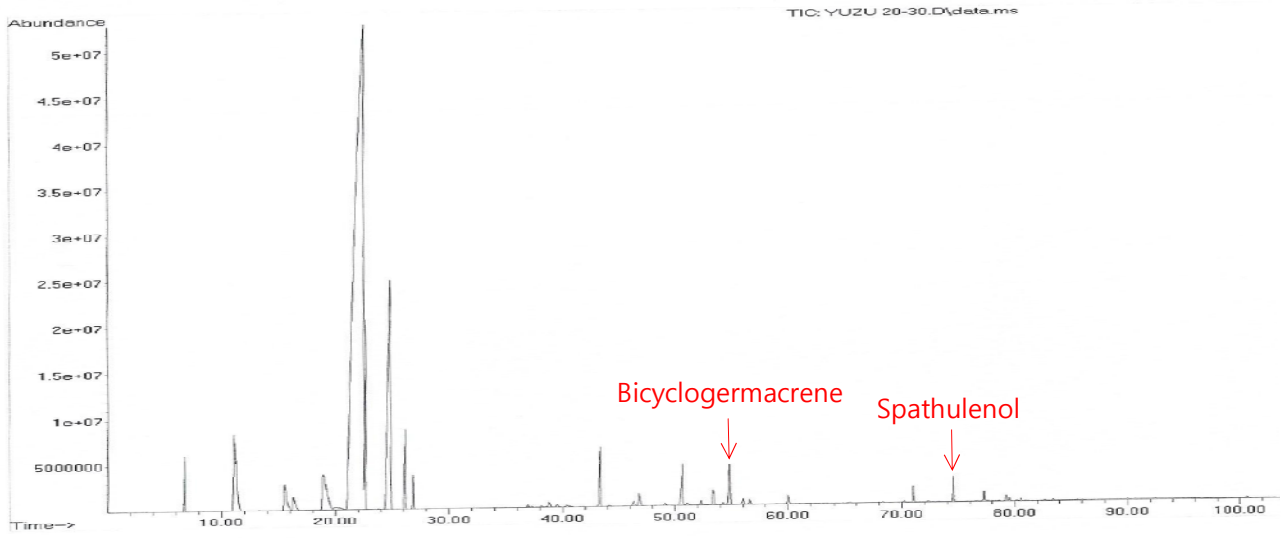
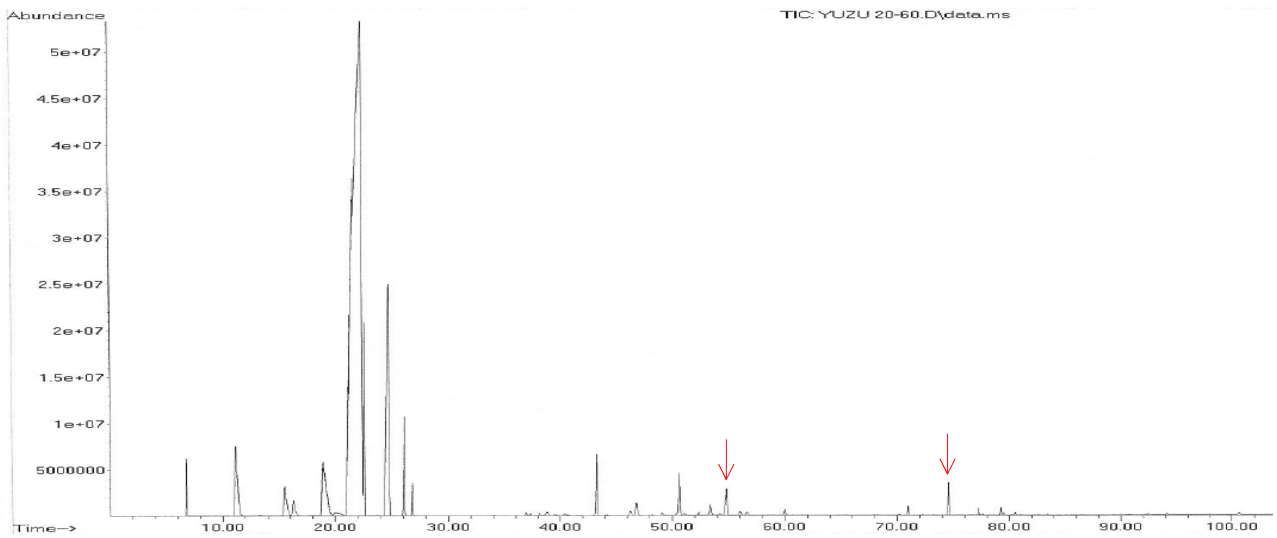


그림 1-23. GC peaks of yuzu essential oil stored for 30~120 days at 4℃.

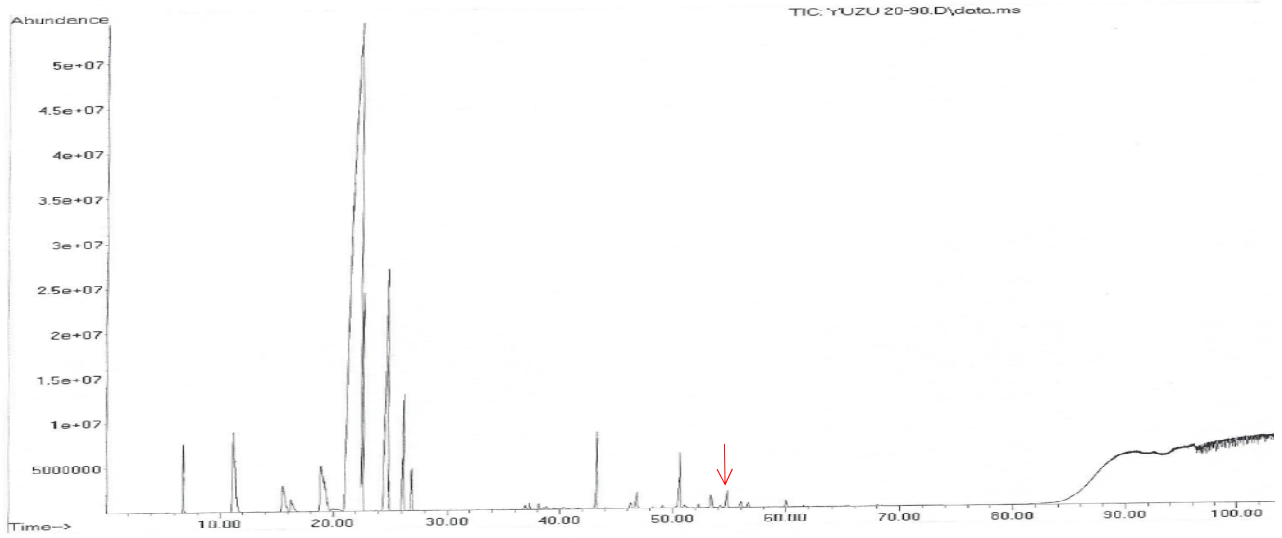
File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 20-30.D  
Operator :  
Acquired : 8 Dec 2014 13:00 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 20-30  
Misc Info :  
Vial Number : 24



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 20-60.D  
Operator :  
Acquired : 8 Dec 2014 17:56 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 20-60  
Misc Info :  
Vial Number : 25



File : C:\medchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 20-90.D  
Operator :  
Acquired : 8 Dec 2014 20:23 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 20-90  
Misc Info :  
Vial Number : 26



File : C:\medchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 20-120.D  
Operator :  
Acquired : 9 Dec 2014 9:58 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 20-120  
Misc Info :  
Vial Number : 27

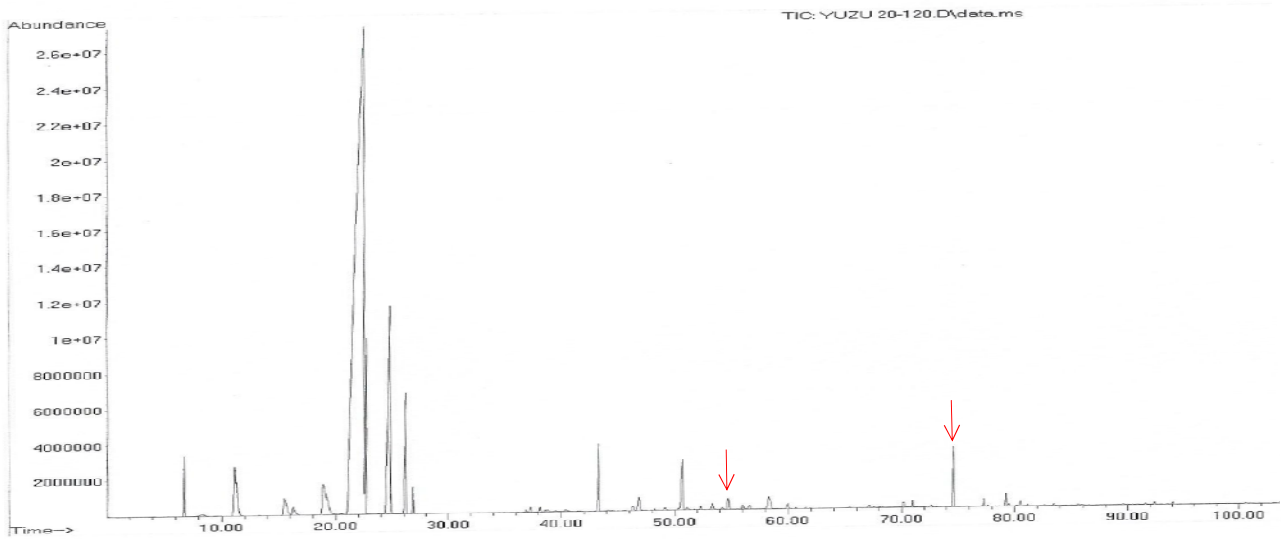
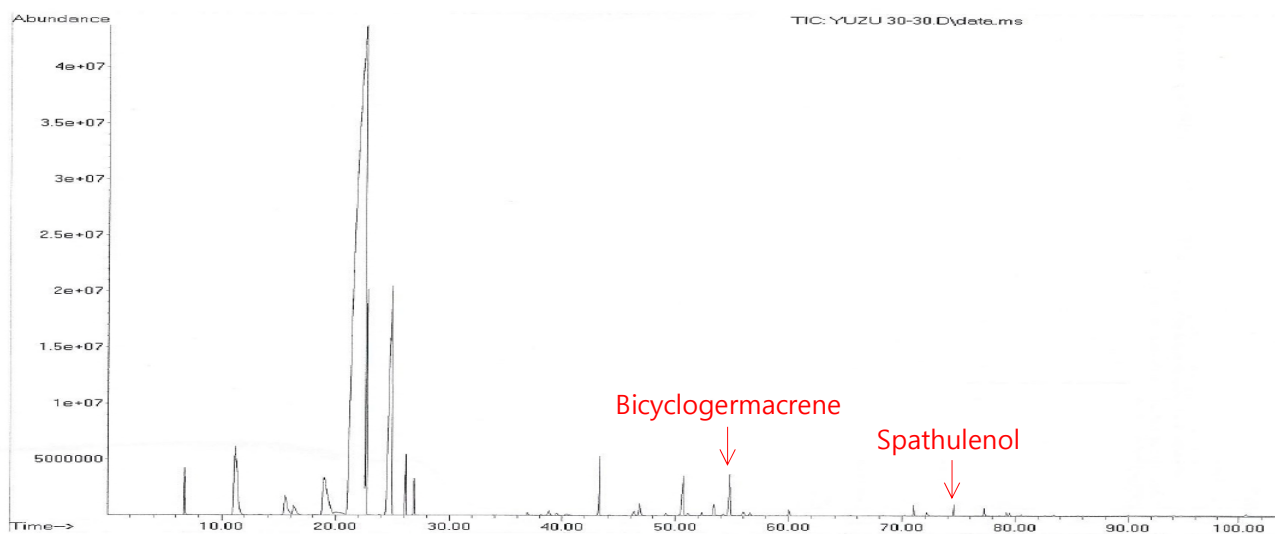
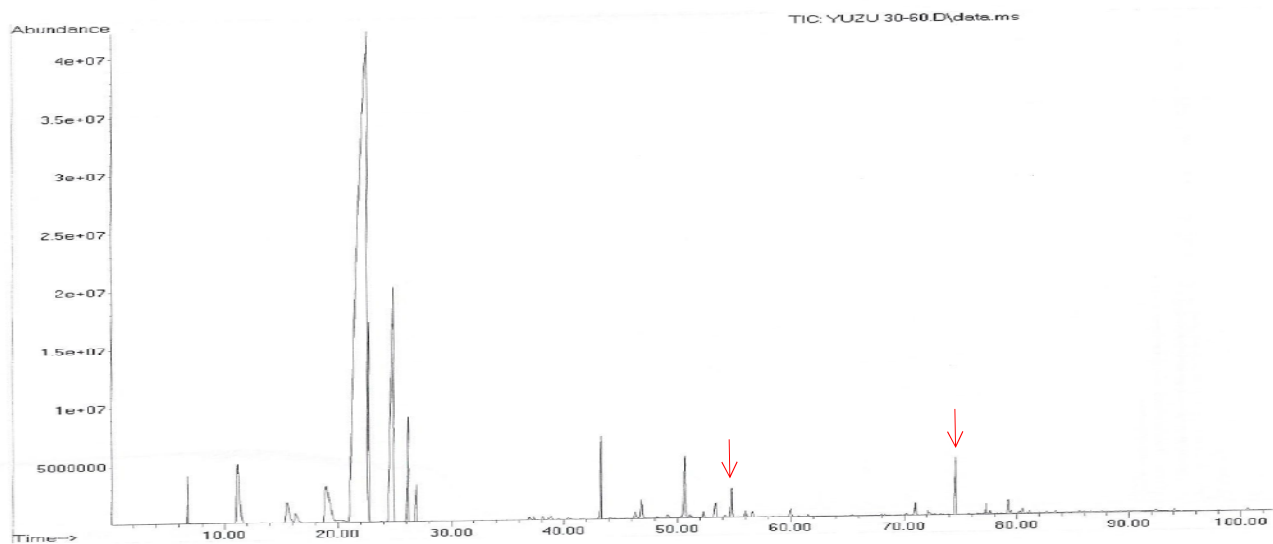


그림 1-24. GC peaks of yuzu essential oil stored for 30~120 days at 20°C.

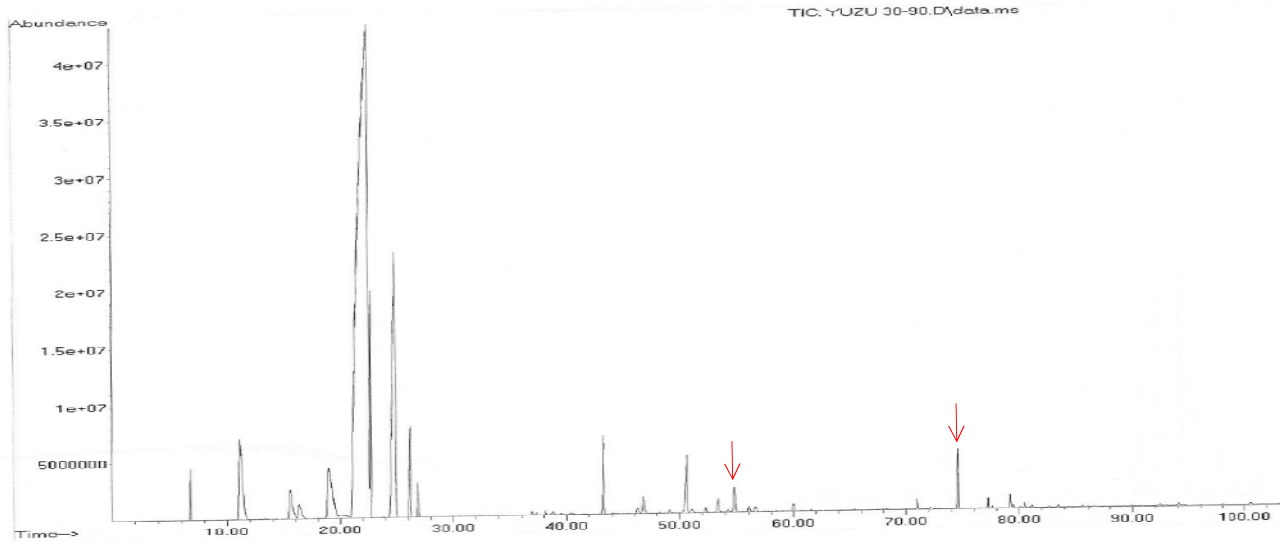
File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 30-30.D  
Operator :  
Acquired : 11 Dec 2014 14:07 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 30-30  
Misc Info :  
Vial Number : 1



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 30-60.D  
Operator :  
Acquired : 11 Dec 2014 19:03 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 30-60  
Misc Info :  
Vial Number : 2



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 30-90.D  
Operator :  
Acquired : 11 Dec 2014 21:31 using AcqMethod AUTO(FFAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 30-90  
Misc Info :  
Vial Number : 3



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU 30-120.D  
Operator :  
Acquired : 11 Dec 2014 23:58 using AcqMethod AUTO(FFAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU 30-120  
Misc Info :  
Vial Number : 4

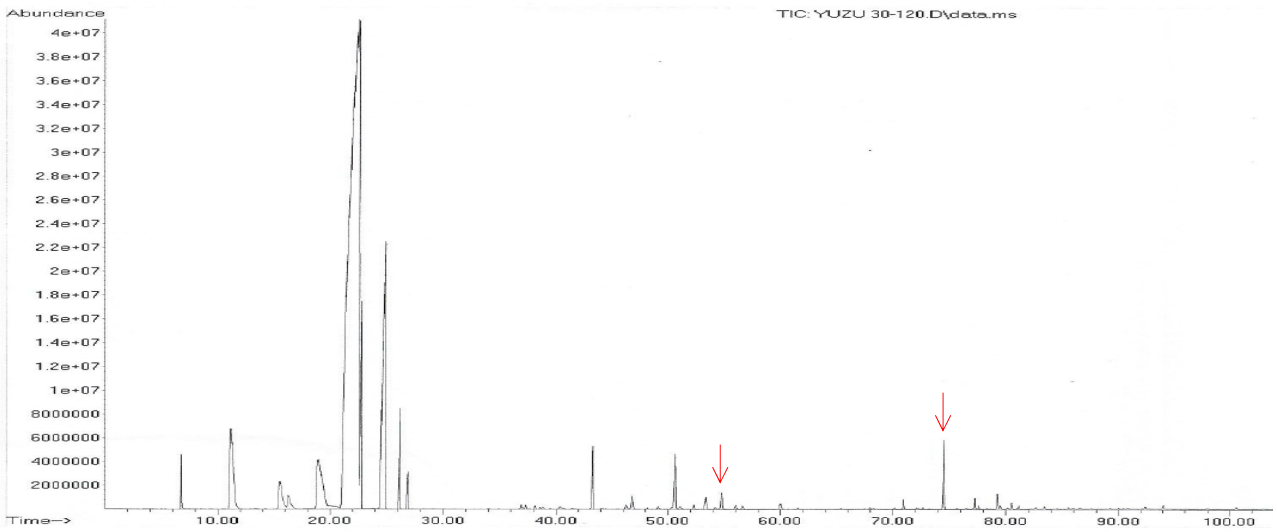


그림 1-25. GC peaks of yuzu essential oil stored for 30~120 days at 30°C.

#### 나. 항산화제 첨가에 따른 유자 정유의 저장 조건별 Flavor Profile 분석

유자 정유는 감귤류의 정유 특성상 불포화 화합물이 상당수 포함되어 있다. 이러한 화합물은 대부분 불안정하여 저장 조건 또는 시간이 지나면서 화합물이 변형된다는 단점이 있다. 이런 현상은 향기성분의 변성으로 이어져 산업전반에 걸쳐 문제시 되고 있다. 이러한 이유로 추출 공정부터 열을 가하지 않고 추출하는 cold press 방법을 보편적으로 사용하고 있으며, 추출 후 빛이 들지 않는 용기에 저온 보관하는 저장 방법으로 에센셜 오일의 변성을 막아왔다. 본 실험에서는 저장기간 동안 향기성분의 변성을 막고 양질의 자연적인 유자 정유의 향기 성분을 유지하기 위한 실험으로써 cold press 방법으로 추출된 유자 에센셜 오일에 상업적으로 쓰이고 있는 항산화제 3종을 이용하여 향기성분 변화를 측정하는 실험을 하였다. 본 실험 방법은 다음과 같다.

항산화제를 첨가한 유자 정유의 저장 온도와 기간에 따른 향기성분의 변화를 알아보기 위한 실험으로 2년차 과제 실험과 동일한 방법으로 추출된 유자 정유를  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 항산화제로는 Sigma Aldrich 사의 BHA(butylated hydroxyanisole), PG(propyl gallate), Tocopherol을 구입하여 실험에 사용하였다. 구입한 3종의 항산화제를 각각 유자 정유에 0.02%가 되도록 첨가한 뒤 Vortex mixer를 이용하여 충분히 용해 시켜준 다음  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 저장 하여 실험하였다. 저장온도는 각각  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 30일 간격으로 각각 30일, 60일, 90일, 120일 동안 보관한 뒤 GC-MS분석을 실시하였다.

실험 결과 항산화제를 첨가하지 않은 실험과 비슷한 향기성분의 변화를 보였다. 가장 뚜렷한 변화는 bicyclogermacrene이 저장 온도와 기간이 증가 할수록 함량이 낮아지는 경향을 보였다. 반면에 spathulenol의 경우 저장온도와 기간이 증가할수록 함량이 증가하는 모습을 보였다. 이를 제외한 나머지 향기성분은 큰 변화를 찾을 수 없었다. 또한 3종의 항산화제 종류에 따른 향기성분의 변화 정도 역시 유사하게 관찰 되었다. 각각의 항산화제를 첨가한 향기성분의 변화를 보면 BHA를 첨가한 시료에서는 gamma-Terpinene과 bicyclogermacrene 함량이 시간이 증가함에 따라 소폭 낮아지는 경향을 보였다. 수치로는 gamma-Terpinene이  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 30일 저장시 11.31%에서 120일 저장시 10.83% 였으며,  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 30일 저장시 11.77%에서 120일 보관 시 10.2%로 나타났다. Bicyclogermacrene 함량은  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 30일간 저장하였을 때 1.22%에서 90일 저장시 1.08%,  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 30일간 저장시 1.37%에서 120일 시료에서는 0.96%로 소폭 줄어드는 경향을 보였다. 반면에 spathulenol의 함량은  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 30일 저장시 0.27%에서 120일 저장시 0.56%,  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 30일 저장시 0.18%에서 120일 저장시 0.54%로 소폭 증가하는 모습을 보였다. 한편 저장 기간에 따라 향기성분의 증감현상이 관찰되었으나 저장 온도에 따른 차이는 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 따라서 저장 온도에 따른 변화보다는 저장 기간이 향기성분의 변화에 미치는 영향이 크다는 것을 알 수 있었다. PG와 Tocopherol 역시 BHA를 첨가한 시료와 비슷한 경향을 보였다. PG를 첨가한 시료에서 gamma-Terpinene의 변화로는  $20^{\circ}\text{C}$  30일과 120일이 각각 11.22%에서 9.94%로 낮아졌으며, Bicyclogermacrene 함량은  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 30일간 저장하였을 때 1.34%에서 120일 저장하였을 때 0.52,  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 30일과 120일 시료에서 각각 1.47%에서 0.92%로 소폭 낮아짐을 알 수 있었다. 반면에 spathulenol의 함량은  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 30일 저장시 0.14%에서 120일 저장시 1.25%,  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 30일 저장시 0.07%에서 120일 저장시 0.49%로 소폭 증가하는 모습을 보였다. 또한 Tocopherol을 첨가한 시료에서 gamma-Terpinene의 변화로는  $20^{\circ}\text{C}$  30일과 120일이 각각 10.27%에서 9.14%로  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 30일 저장시 10.7%에서 120일 저장

시 9.93%로 낮아졌으며, Bicyclogermacrene 함량은 20℃에서 30일간 저장하였을 때 1.22%에서 120일 저장하였을 때 0.55, 30℃에서 30일과 120일 시료에서 각각 0.94%에서 0.41%로 소폭 낮아짐을 알 수 있었다. 반면에 spathulenol의 함량은 20℃에서 30일 저장시 0.37%에서 120일 저장시 1.43%, 30℃에서 30일 저장시 0.11%에서 120일 저장시 0.9%로 소폭 증가하는 모습을 보였다.

이와 같이 각 향산화제 별로 향기 성분의 변화는 비슷한 양상을 보였으며, 모든 시료에서 저장 온도에 따른 향기성분의 변화보다는 저장 기간별 향기성분의 변화가 큰 것으로 관찰되었다. 또한 향산화제를 첨가하지 않은 시료에서는 저장 온도에 따른 향기 성분의 변화가 뚜렷하게 관찰되어 본 실험인 향산화제의 작용에 의한 향기성분의 변화는 저장 기간 동안 유자 정유의 향기성분의 변화를 억제하였다고 볼 수 있었으며, 향후 향산화제 첨가 함량에 따른 유자 정유의 향기성분 변화와 저장 기간을 증가시킴으로써 시료의 변화를 알아보는 실험을 추가적으로 할 계획이다.

**표 1-15. Compositional changes of volatile aroma components of yuzu essential oil after butylated hydroxyanisole(BHA) addition during storage .**

(peak area%)

No	Compound	B20-30	B20-60	B20-90	B20-120	B30-30	B30-60	B30-90	B30-120
1	alpha-Pinene	3.39	3.41	3.46	3.6	3.6	3.77	3.97	3.79
2	Camphene	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02		0.02
3	beta-Pinene	1.2	1.21	1.23	1.33	1.27	1.32	1.26	1.21
4	Sabinene	0.54	0.54	0.55	0.56	0.58	0.59	0.56	0.52
5	beta.-Myrcene	3.63	3.66	3.71	3.52	3.78	3.48	3.36	3.43
6	alpha.-Terpinene	0.37	0.38	0.37	0.35	0.42	0.38	0.31	0.13
7	dl-Limonene	64.37	65.56	65.55	62.4	65.68	67.13	66.67	67.4
8	Sabinene	3.06	3.16	3.13	3.08	2.81	2.97	2.58	2.78
9	beta-Ocimene	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02			0.01
10	gamma.-Terpinene	11.32	11.28	11.19	10.83	11.77	9.92	10.23	10.2
11	Cymene	1.29	1.34	0.51	1.48	1.23	1.09	1.33	1.52
12	alpha-Terpinolene	0.2	0.67	0.67	0.66	0.72	0.55	0.62	0.69
13	alpha-dimethylstyrene (3144)	0.06	0.06		0.08				
14	3-Ethylidene-1-methyl-1,4-cycloheptadiene		0.02				0.03		0.02
15	p-Mentha-1,5,8-triene	0.02				0.02		0.03	
16	Limonene oxide	0.01	0.02	0.06	0.07		0.02	0.07	0.06
17	Cyclohexylethyne		0.4						
18	alpha.-Terpinene	0.69	0.19	0.18	0.28	0.25	0.39	0.33	0.19
19	1,3,6-Heptatrien							0.08	
20	Bicycloelemene	0.08	0.02	0.07	0.1	0.09	0.09		0.06
21	Camphene		0.08	0.1					
22	Copaene	0.1	0.06	0.1	0.14	0.07	0.07	0.07	0.06
23	Decanal		0.04			0.04	0.04	0.03	0.03
24	Linalool	1.13	1.13	1.14	1.42	1.13	1.22	1.27	1.14
25	Zingiberene	0.03	0.03	0.03	0.04		0.03	0.03	0.03
26	beta.-Bisabolene		0.01						0.01
27	beta-Elemene	0.17	0.16	0.24	0.24	0.23	0.36	0.18	0.15
28	Caryophyllene	0.53	0.44	0.44	0.59	0.45	0.47	0.49	0.42
29	trans-p-Mentha-2,8-dienol		0.01					0.01	
30	gamma.-Elemene	0.09	0.07		0.12		0.09		0.08
31	beta-Famesene	1.32	1.28	1.32	1.8	1.33	1.36	1.42	1.26

32	alpha-Humulene		0.07	0.13	0.11	0.08	0.08	0.08	0.07
33	alpha-Terpineol	0.06	0.06	0.06	0.09	0.06	0.07	0.07	0.06
34	alpha-Muurolene	0.05	0.06	0.06	0.09	0.05	0.06	0.06	0.05
35	bicyclogermacrene	1.22	1.16	1.08	1.46	1.37	1.28	1.16	0.96
36	delta-Cadinene	0.12	0.12	0.12	0.19	0.12	0.13	0.14	0.13
37	beta-Sesquiphellandrene	0.1	0.14	0.1	0.14		0.04	0.03	0.1
38	Germacrene B	0.18	0.18	0.18	0.26	0.19		0.29	0.18
39	Valencene		0.01						0.05
40	Caryophyllene oxide				0.01				0.06
41	bergamotene		0.01						
42	Nerolidol	0.03		0.03	0.05	0.03	0.03		0.03
43	p-Cymen-8-ol	0.01		0.01	0.02				
44	1,6,10-Dodecatrien-3-ol		0.03					0.03	
45	GermacreneD	0.39	0.51	0.38	0.53	0.41	0.43	0.42	0.35
46	Elemol	0.03	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	
47	Cyclohexanol				0.08				
48	spathulenol	0.27	0.32	0.42	0.56	0.18	0.35	0.5	0.54
49	Germacrene d-4-ol	0.23	0.01	0.22	0.28	0.24	0.24	0.23	0.21
50	Thymol	0.12	0.1	0.13	0.18	0.12	0.13	0.14	0.13
51	alpha.-Cadinol	0.09	0.01	0.01		0.06	0.07	0.07	0.07
52	Cyclopentanone			0.01					
53	Carvacrol	0.02	0.01		0.01		0.01		
54	n-Hexyl salicylate	0.02	0.01						
55	isospathulenol	0.09	0.07	0.09	0.15	0.04	0.08	0.11	0.15
56	.beta.-Eudesmol		0.05						
57	4-bromo-		0.01					0.02	
58	alpha-Copaene-8-ol		0.03		0.05			0.04	
59	Capric acid	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.03		0.01
60	Alloaromadendrene oxide-(1)		0.01				0.04		
61	Ledene oxide								0.1
62	Tridecane	0.01	0.01						
63	1-Octadecene	0.04	0.02						
64	Lauric acid		0.03	0.02	0.02	0.02		0.02	0.02
65	Butylated hydroxyanisole	0.07	0.06	0.06	0.09	0.07	0.07	0.07	0.07
66	Oleic Acid	0.4				0.03			
67	alpha.-Eicosene		0.04	0.01					
68	1-Octadecen	0.21	0.01						
69	Myristinic acid	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.06	0.04
70	Linoleic acid	0.31	0.31	0.38	0.46	0.42	0.42	0.44	0.46
71	Palmitinic acid	0.23	0.21	0.21	0.33	0.25	0.25	0.28	0.26
72	Linolenic acid		0.11		0.11	0.13	0.12	0.13	0.15
73	Stearic acid	0.14	0.05		0.05	0.04	0.05	0.04	0.04
74	Nonadecanoic acid	0.04	0.03	0.03	0.01				

B20-30: yuzu essential oil(YEO) by BHA treatment stored for 30 days at 20°C.

B20-60: stored for 60 days at 20°C.

B20-90: stored for 90 days at 20°C.

B20-120: stored for 120 days at 20°C.

B30-30: stored for 30 days at 30°C.

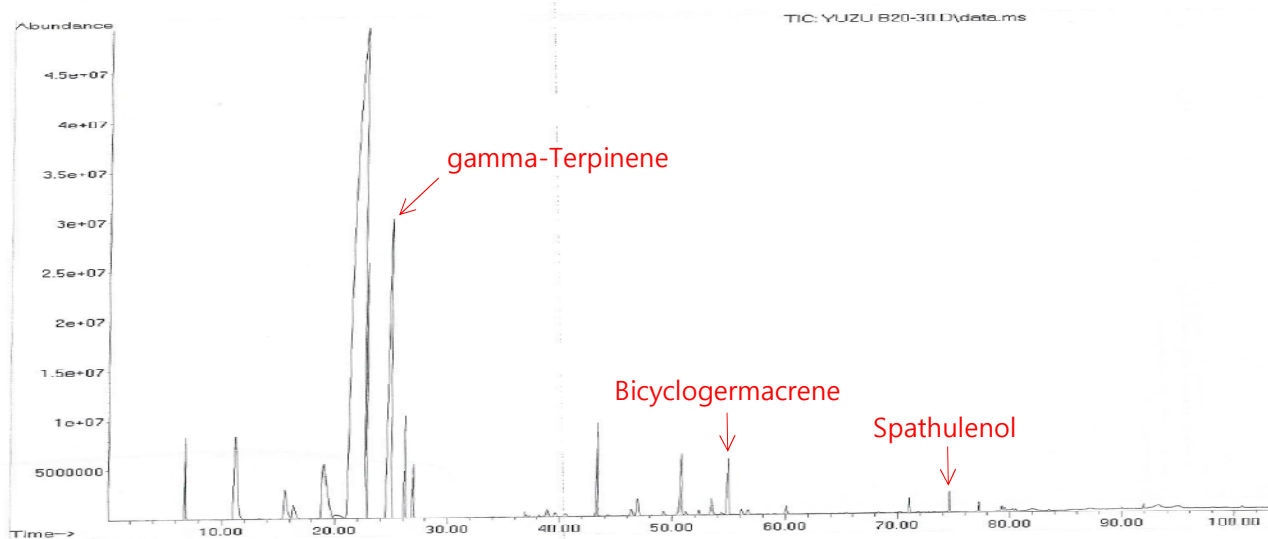
B30-60: stored for 60 days at 30°C.

B30-90: stored for 90 days at 30°C.

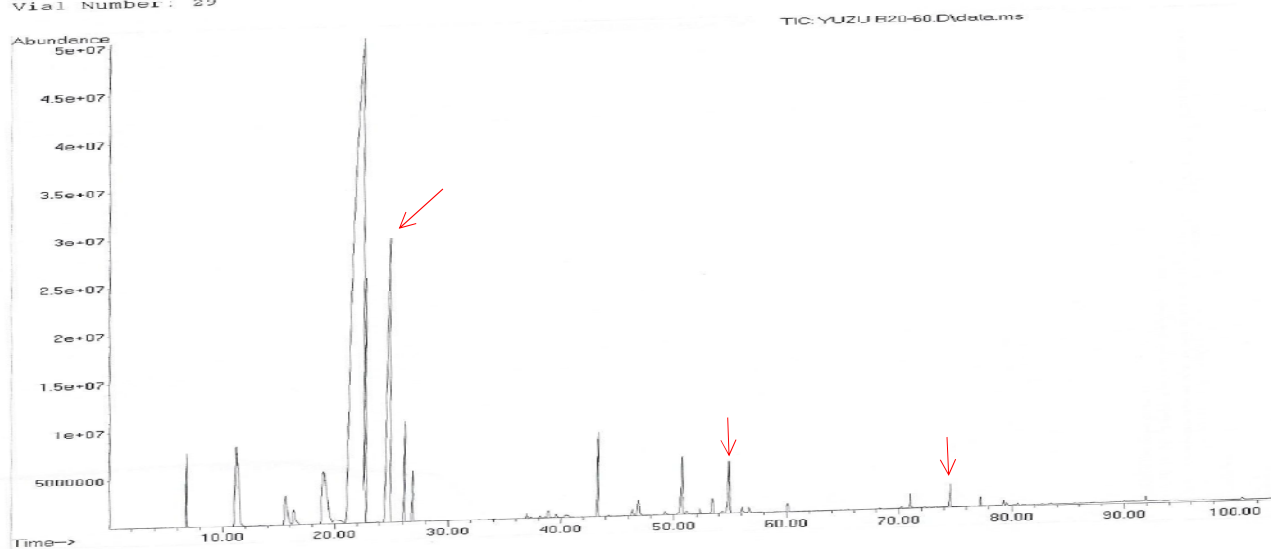
B30-120: stored for 120 days at 30°C.



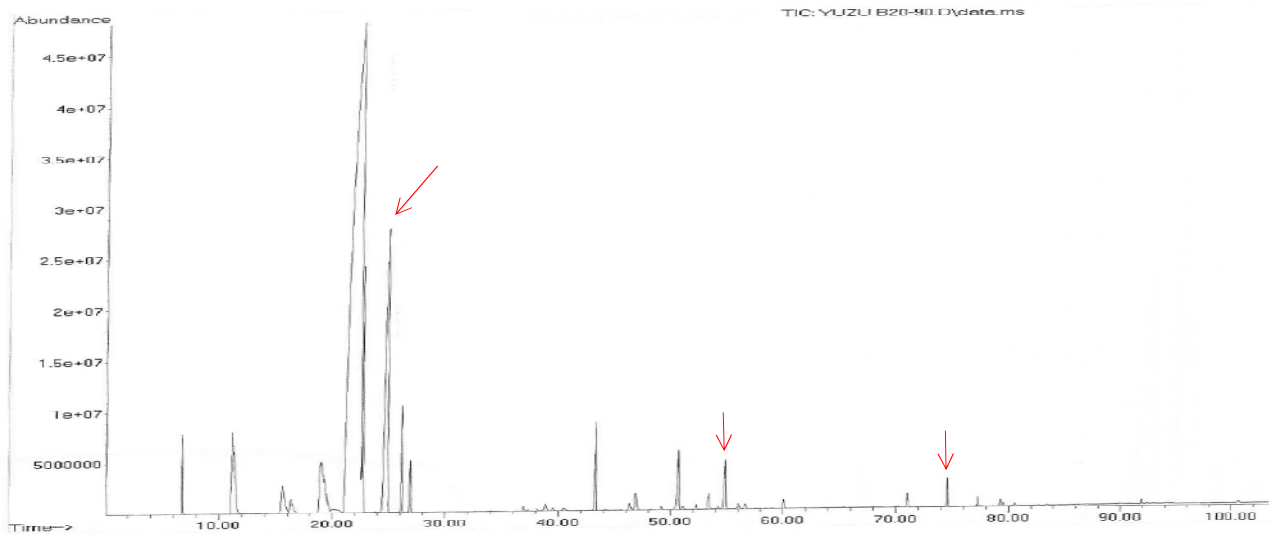
File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU B20-30.D  
Operator :  
Acquired : 9 Dec 2014 17:09 using AcqMethod AUTO(FFAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU B20-30  
Misc Info :  
Vial Number : 28



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU B20-60.D  
Operator :  
Acquired : 9 Dec 2014 19:37 using AcqMethod AUTO(FFAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU B20-60  
Misc Info :  
Vial Number : 29



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU B20-90.D  
Operator :  
Acquired : 9 Dec 2014 22:05 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU B20-90  
Misc Info :  
Vial Number : 30



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU B20-120.D  
Operator :  
Acquired : 10 Dec 2014 00:32 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU B20-120  
Misc Info :  
Vial Number : 31

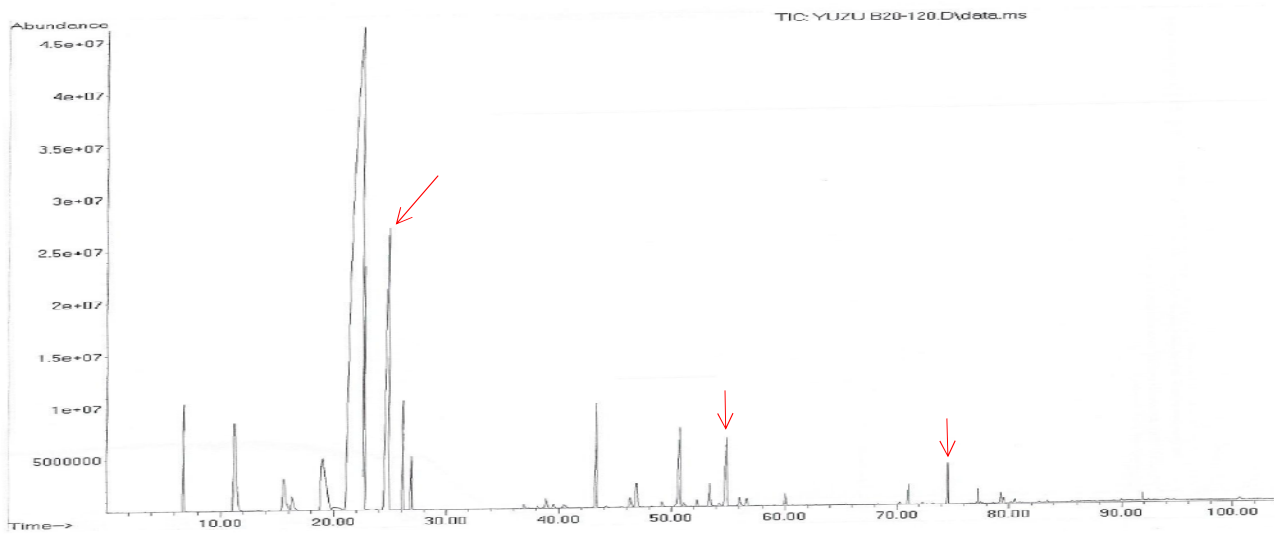
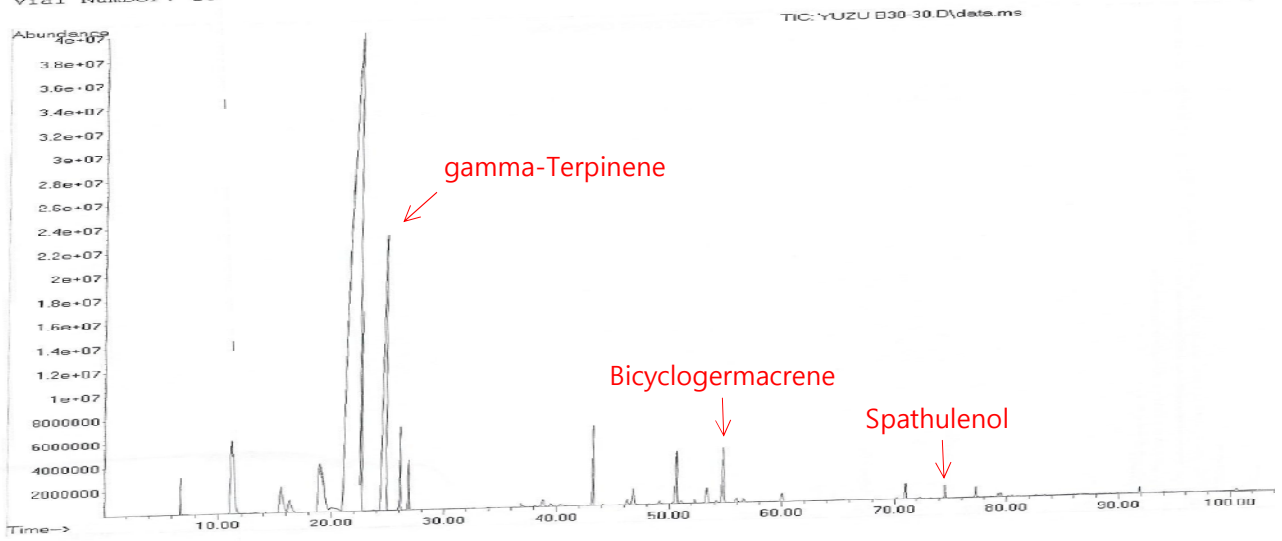
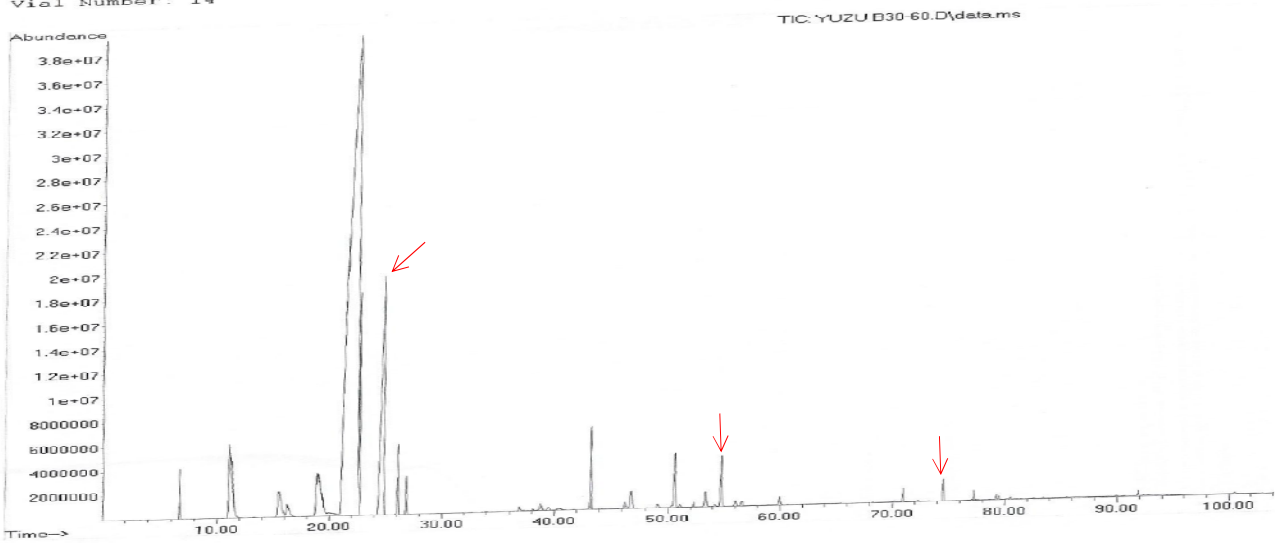


그림 1-25. GC peaks of yuzu essential oil by butylated hydroxyanisole(BHA) treatment stored for 30~120 days at 20°C.

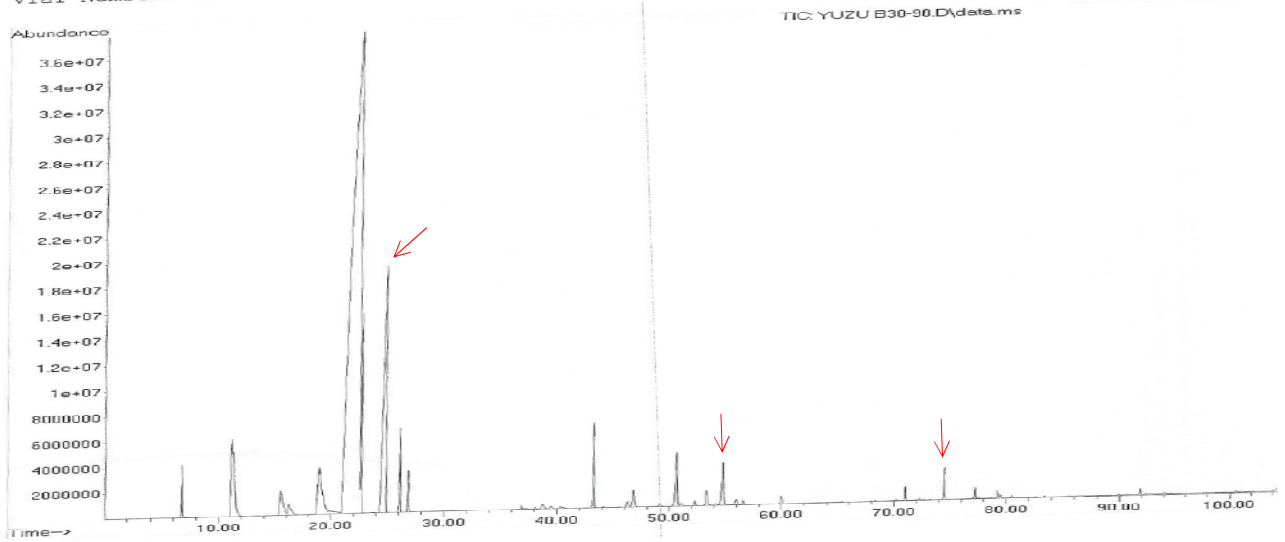
File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU B30-30.D  
Operator :  
Acquired : 12 Dec 2014 22:07 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU B30-30  
Misc Info :  
Vial Number : 13



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU B30-60.D  
Operator :  
Acquired : 13 Dec 2014 00:34 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU B30-60  
Misc Info :  
Vial Number : 14



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU B30-90.D  
 Operator :  
 Acquired : 13 Dec 2014 3:01 using AcqMethod AUTO(FRAP).M  
 Instrument : MSD  
 Sample Name : YUZU B30-90  
 Misc Info :  
 Vial Number : 15



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU B30-120.D  
 Operator :  
 Acquired : 13 Dec 2014 5:28 using AcqMethod AUTO(FRAP).M  
 Instrument : MSD  
 Sample Name : YUZU B30-120  
 Misc Info :  
 Vial Number : 16

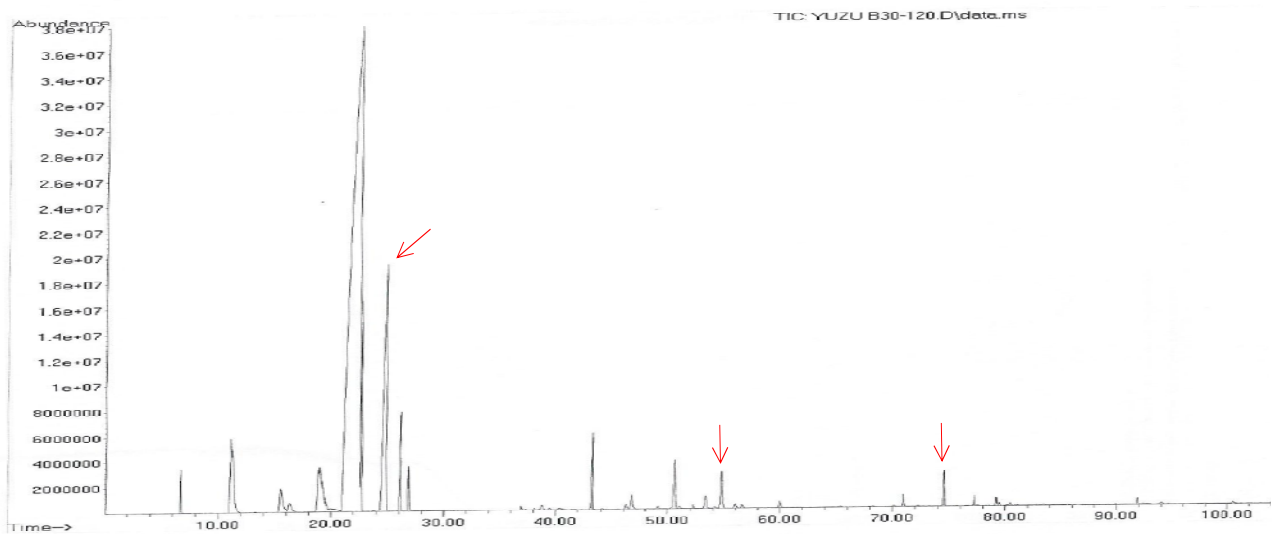


그림 1-26. GC peaks of yuzu essential oil by butylated hydroxyanisole(BHA) treatment stored for 30~120 days at 30℃.

☒ 1-16. Compositional changes of volatile aroma components of yuzu essential oil after propyl gallate(PG) addition during storage.

(peak area%)

No	Compound	p20-30	p20-60	p20-90	p20-120	p30-30	p30-60	p30-90	p30-120
1	alpha-Pinene	3.45	3.47	3.48	3.55	3.4	2.87	3.55	3.56
2	Camphene	0.02	0.02	0.02	0.02			0.02	0.02
3	beta-Pinene	1.23	1.23	1.23	1.04	1.03	0.98	1.24	1.25
4	Sabinene	0.55	0.55	0.55	0.42	0.52	0.44	0.6	0.56
5	beta-Myrcene	3.72	3.74	3.58	2.57	3	2.94	4.11	3.72
6	alpha-Terpinene	0.37	0.37	0.3	0.19	0.32	0.32	0.18	0.4
7	dl-Limonene	65.28	65.33	65.16	64.64	69.67	70.52	65.51	65.6
8	Sabinene	2.92	3.1	3	3.14	2.76	2.77	2.51	2.69
9	beta-Ocimene	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02
10	gamma-Terpinene	11.22	11.24	10.53	9.94	10.54	10.32	11.41	11.32
11	Cymene	1.32	1.43	2.5	3	0.91	1.8	1.63	1.75
12	alpha-Terpinolene	0.67	0.67	0.62	0.57	0.58	0.55	0.7	0.69
13	o-Allyltoluene	0.06							
14	p-Mentha-1,5,8-triene	0.02		0.02	0.02	0.02			0.02
15	Limonene oxide	0.01	0.01	0.16	0.18		0.04	0.06	0.02
16	epoxyterpinolene			0.04					0.02
17	alpha-Terpinene	0.24	0.3	0.15	0.12	0.19	0.17		0.16
18	1,3,6-Heptatrien	0.09							
19	Bicycloelemene		0.09			0.07	0.06	0.07	0.06
20	Camphene		0.02			0.02			
21	Copaene	0.07	0.07	0.07	0.09	0.05	0.05	0.07	0.07
22	Decanal	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	
23	Linalool	1.13	1.18	1.14		0.98	0.93	1.16	1.13
24	Zingiberene	0.03		0.03			0.03	0.03	
25	beta-Bisabolene			0.01				0.01	
26	beta-Elemene	0.18	0.18	0.24	0.19	0.16	0.16	0.27	0.24
27	Caryophyllene	0.45	0.46	0.44	0.42	0.45	0.35	0.45	0.43
28	trans-p-Mentha-2,8-dienol	0.01			0.02			0.01	
29	gamma-Elemene	0.09	0.09		0.07	0.06			
30	beta-Famesene	1.33	1.35	1.33	1.43	1.08	1.04	1.3	1.28
31	alpha-Humulene	0.08	0.08	0.09	0.1	0.06	0.06	0.08	0.07
32	alpha-Terpineol	0.06	0.07	0.07	0.08	0.05	0.05	0.07	
33	alpha-Murolene	0.06	0.06	0.05	0.08	0.05	0.05	0.06	0.06
34	bicyclogermacrene	1.34	1.25	0.59	0.62	1.47	0.97	1.07	0.92
35	delta-Cadinene	0.14	0.16	0.15	0.29	0.13	0.12	0.17	0.17
36	beta-Sesquiphellandrene	0.1		0.15	0.16	0.1	0.08	0.14	0.13
37	Germacrene B	0.18	0.19	0.18	0.36	0.19	0.23	0.25	0.18
38	gamma-Murolene			0.02	0.05		0.01	0.01	
39	Caryophyllene oxide			0.02	0.15			0.01	0.06
40	Nerolidol	0.03	0.03	0.02	0.06	0.02	0.02	0.03	0.04
41	p-Cymen-8-ol			0.02	0.04			0.01	0.01
42	GermacreneD	0.41	0.41	0.32	0.42	0.42	0.31	0.4	0.37
43	Elemol	0.03	0.03			0.02		0.04	0.03
44	spathulenol	0.14	0.26	0.82	1.25	0.07	0.21	0.41	0.49
45	Germacrene d-4-ol	0.21	0.19	0.14	0.17	0.17	0.15	0.16	0.14
46	Thymol	0.13	0.13	0.12	0.18	0.09	0.14	0.12	0.12
47	alpha-Cadinol	0.07	0.07	0.08	0.12	0.06	0.08	0.02	0.07
48	Carvacrol				0.01			0.01	
49	isospathulenol	0.06	0.1	0.21	0.38	0.03	0.12	0.17	0.16
50	2-Naphthalenemethanol				0.01			0.01	
51	4-bromo-		0.01	0.01	0.02			0.01	0.01

52	alpha-Copaene-8-ol	0.06					0.03		0.05
53	Capric acid	0.01			0.02		0.01	0.01	0.01
54	1,2-Cyclohexanediol			0.04	0.06				0.02
55	Alloaromadendrene oxide-(1)			0.01				0.02	0.01
56	1-Octadecene	0.03							
57	Lauric acid	0.02	0.03	0.02	0.01	0.01		0.02	0.02
58	Adamantane				0.05				
59	Oleic Acid				0.08				0.02
60	Myristic acid	0.04	0.05	0.04	0.07	0.03	0.05	0.04	0.04
61	Linoleic acid	0.6	0.42	0.41	0.22	0.35	0.5	0.32	0.57
62	Palmitic acid	0.23	0.23	0.24	0.42	0.17	0.27	0.26	0.27
63	Linolenic acid	0.17	0.13	0.11		0.07	0.15	0.07	0.17
64	Stearic acid	0.02	0.06	0.04	0.06	0.03	0.05	0.04	

p20-30: yuzu essential oil(YEO) by propyl gallate(PG) treatment stored for 30 days at 20°C.

p20-60: stored for 60 days at 20°C.

p20-90: stored for 90 days at 20°C.

p20-120: stored for 120 days at 20°C.

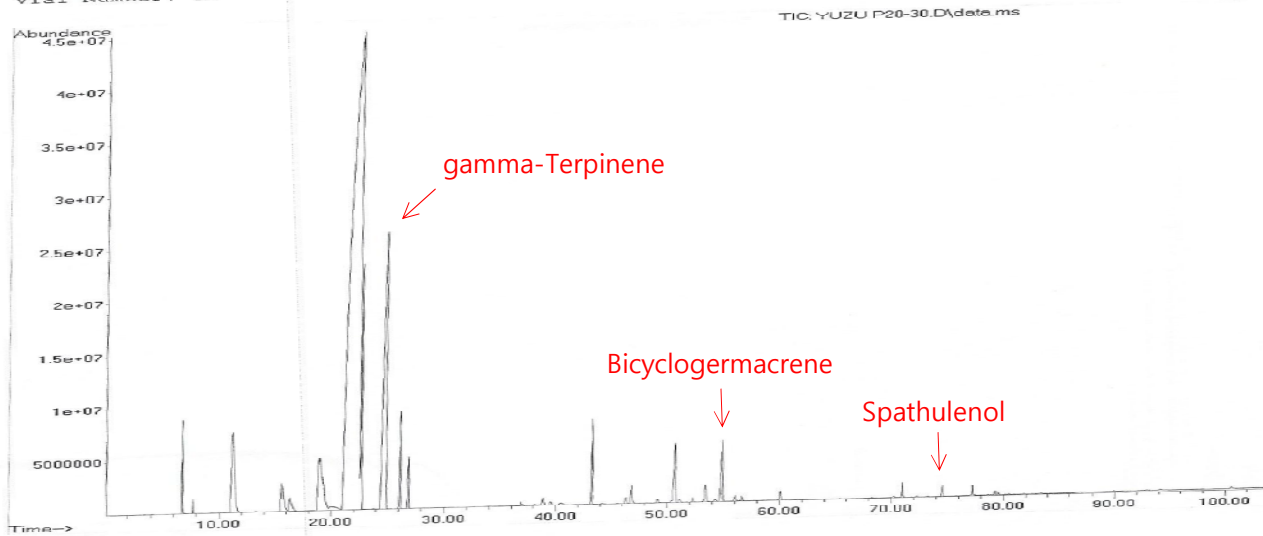
p30-30: stored for 30 days at 30°C.

p30-60: stored for 60 days at 30°C.

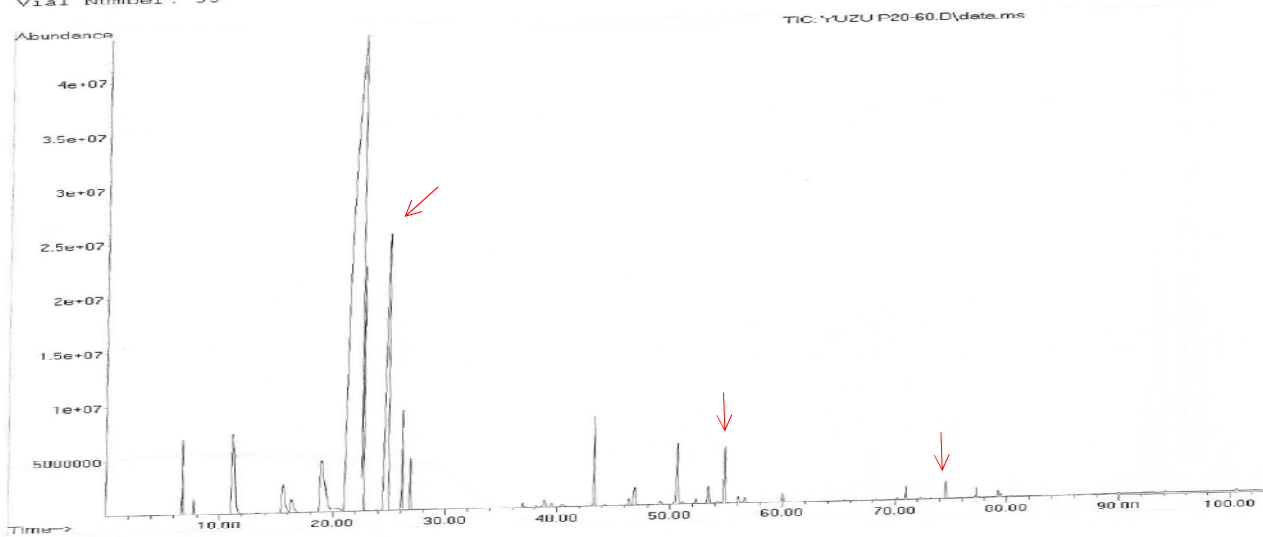
p30-90: stored for 90 days at 30°C.

p30-120: stored for 120 days at 30°C.

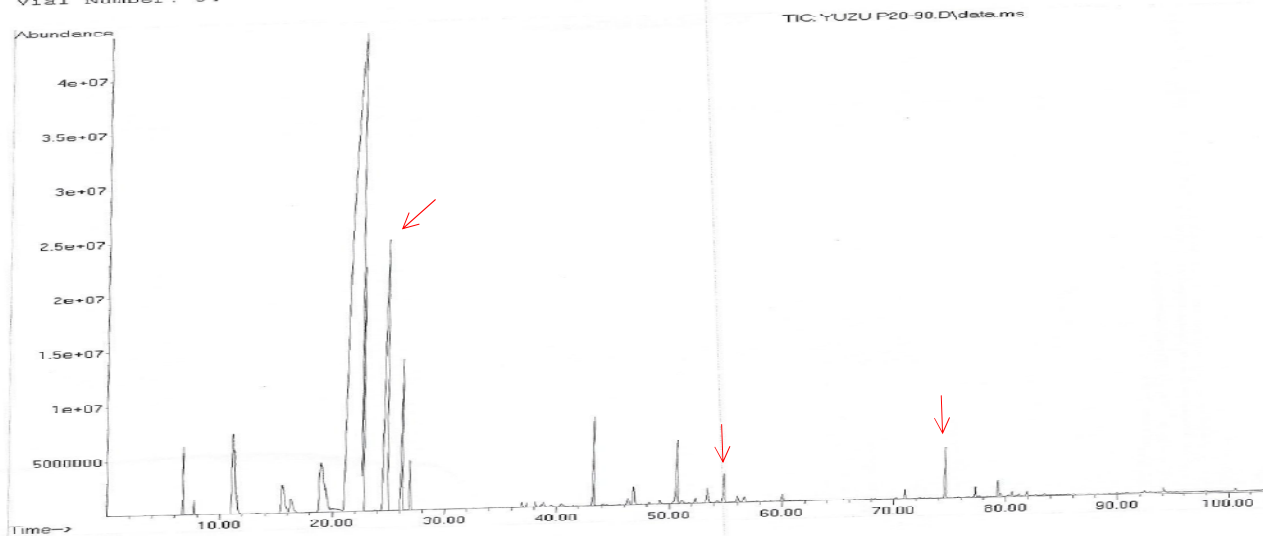
File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU P20-30.D  
Operator :  
Acquired : 10 Dec 2014 2:59 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU P20-30  
Misc Info :  
Vial Number : 32



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU P20-60.D  
Operator :  
Acquired : 10 Dec 2014 5:27 using AcqMethod AUTO(FAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU P20-60  
Misc Info :  
Vial Number : 33



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU P20-90.D  
Operator :  
Acquired : 10 Dec 2014 7:54 using AcqMethod AUTO(FEAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU P20-90  
Misc Info :  
Vial Number : 34



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU P20-120.D  
Operator :  
Acquired : 10 Dec 2014 20:43 using AcqMethod AUTO(FEAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU P20-120  
Misc Info :  
Vial Number : 35

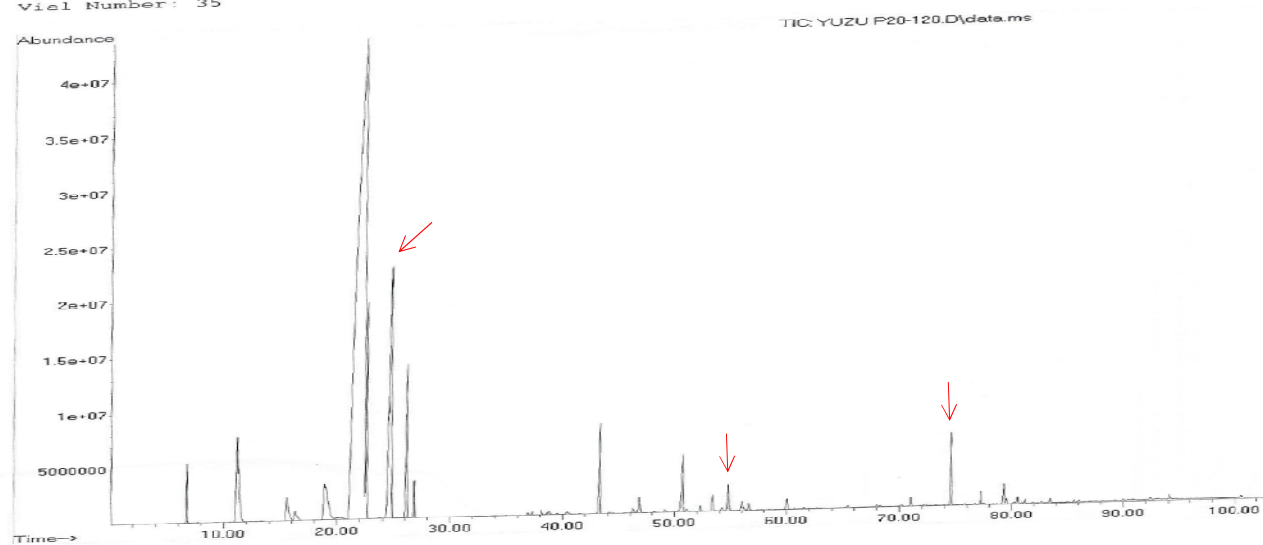
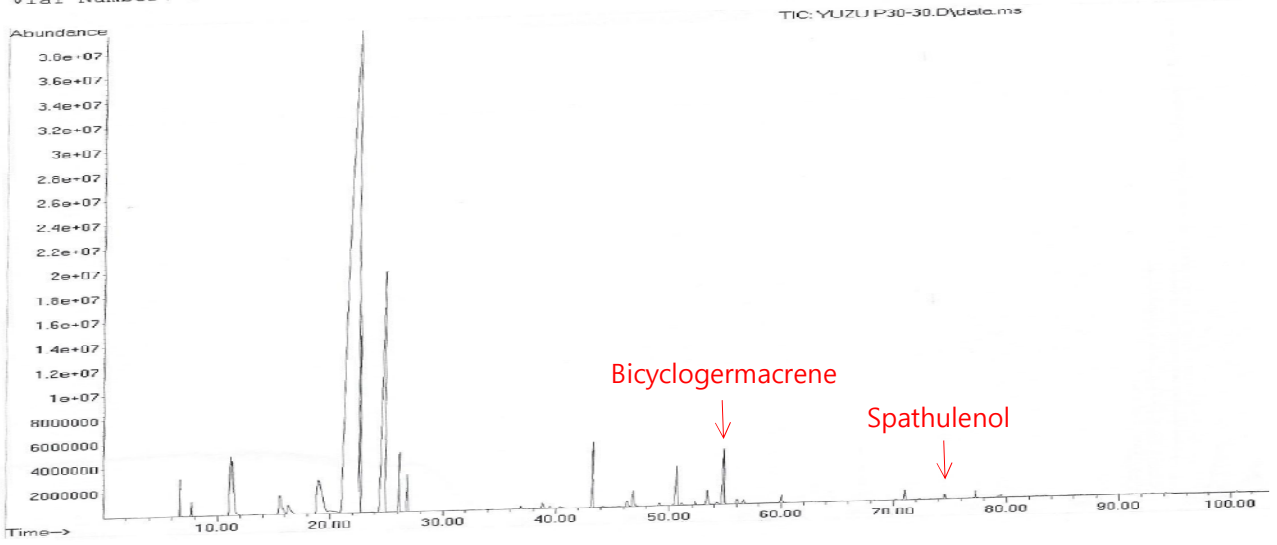


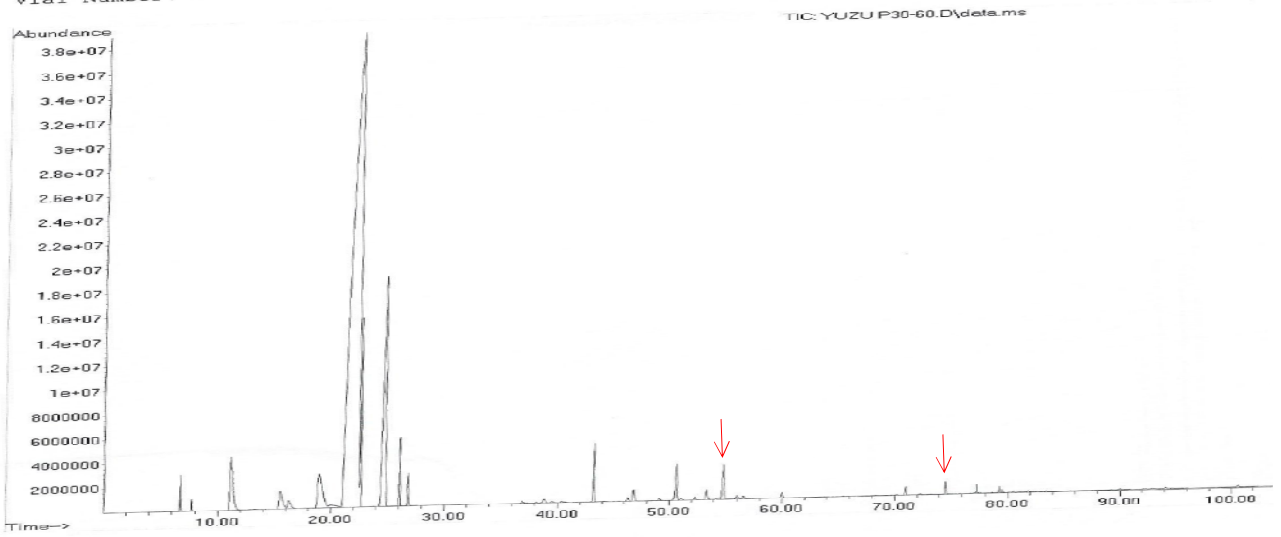
그림 1-27. GC peaks of yuzu essential oil by propyl gallate(PG) treatment stored for 30~120 days at 20°C.



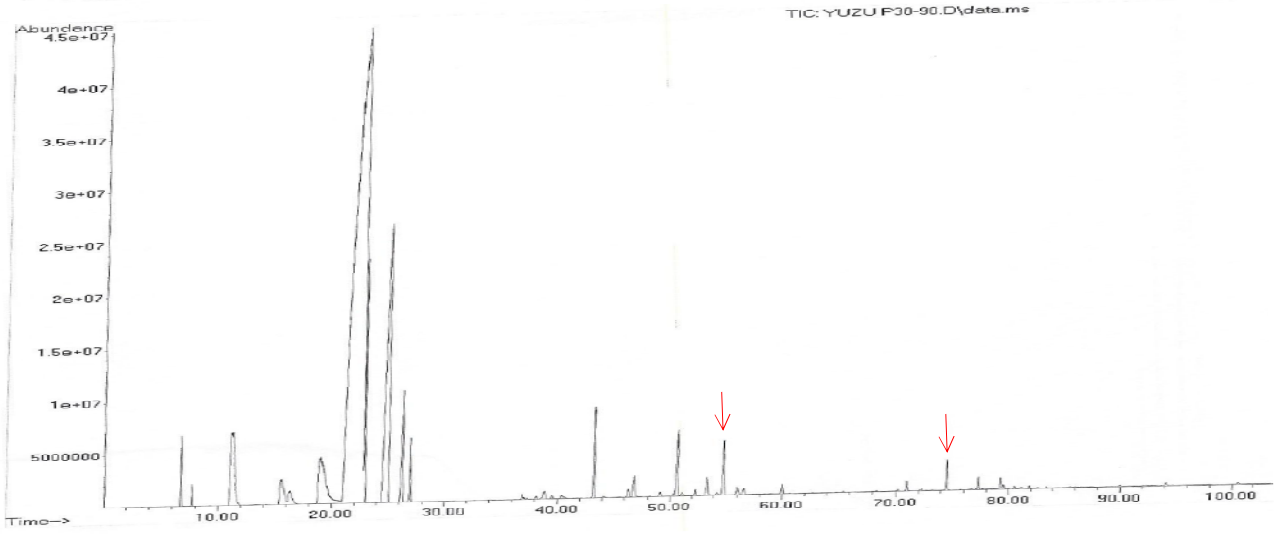
File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU P30-30.D  
Operator :  
Acquired : 12 Dec 2014 12:15 using AcqMethod AUTO(FEAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU P30-30  
Misc Info :  
Vial Number : 9



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU P30-60.D  
Operator :  
Acquired : 12 Dec 2014 14:43 using AcqMethod AUTO(FEAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU P30-60  
Misc Info :  
Vial Number : 10



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU P30-90.D  
 Operator :  
 Acquired : 12 Dec 2014 17:11 using AcqMethod AUTO(FEAP).M  
 Instrument : MSD  
 Sample Name : YUZU P30-90  
 Misc Info :  
 Vial Number : 11



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU P30-120.D  
 Operator :  
 Acquired : 12 Dec 2014 19:39 using AcqMethod AUTO(FEAP).M  
 Instrument : MSD  
 Sample Name : YUZU P30-120  
 Misc Info :  
 Vial Number : 12

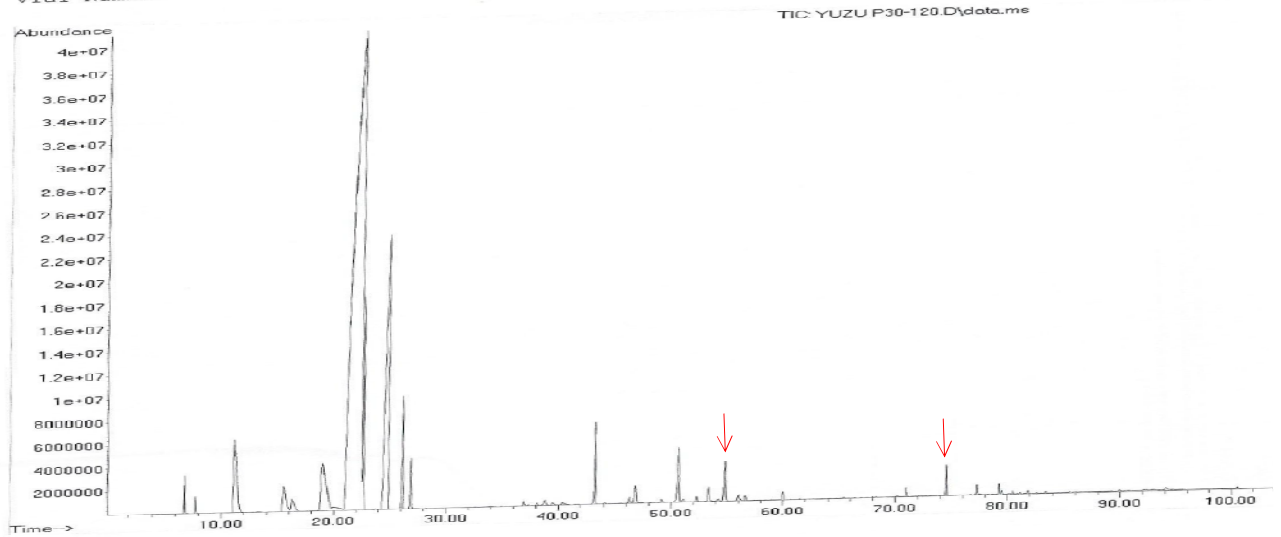


그림 1-28. GC peaks of yuzu essential oil by propyl gallate(PG) treatment stored for 30~120 days at 30°C.

☒ 1-17. Compositional changes of volatile aroma components of yuzu essential oil after tocopherol addition during storage .

(peak area%)

No	Compound	t20-30	t20-60	t20-90	t20-120	t30-30	t30-60	t30-90	t30-120
1	alpha-Pinene	2.55	3.51	3.37	3.71	3.91	3.59	3.46	3.69
2	Camphene		0.02	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02	0.02
3	beta-Pinene	0.91	1.01	1.03	1.36	1.38	1.26	1.23	1.3
4	Sabinene	0.47	0.5	0.52	0.56	0.65	0.57	0.55	0.59
5	beta.-Myrcene	3.82	3.34	3.29	3.26	4.55	3.82	3.61	3.73
6	alpha.-Terpinene	0.36	0.31	0.25	0.2		0.39	0.35	0.36
7	dl-Limonene	67.65	68.65	69.01	63.2	68.59	68.47	65.8	68.07
8	Sabinene	2.92	3.1	2.86	2.84	2.56	2.77	2.73	2.91
9	beta.-Ocimene	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02	0.02	0.02
10	gamma.-Terpinene	10.27	8.93	9.03	9.14	10.7	10.39	10.93	9.93
11	Cymene	1.61	0.35	0.24	2.91	1.13	1.25	1.87	2.14
12	alpha-Terpinolene	0.61	0.53	0.41	0.51	0.52	0.48	0.66	
13	p-Mentha-1,5,8-triene	0.02	0.02	0.01	0.02		0.02		
14	Limonene oxide	0.05	0.05	0.12	0.2	0.01	0.05	0.09	0.09
15	epoxyterpinolene			0.03	0.05			0.03	0.02
16	alpha.-Terpinene	0.13	0.15	0.06	0.18	0.16	0.17	0.11	0.16
17	1,3,6-Heptatrien	0.05							0.02
18	Camphene	0.02		0.03				0.04	
19	Copaene	0.05	0.05	0.05	0.11	0.05	0.04	0.07	0.05
20	Decanal	0.02	0.02		0.03	0.02	0.02	0.03	
21	Linalool	0.83	0.88	0.83	1.49	0.81	0.8	1.13	1
22	Zingiberene	0.02		0.02	0.04		0.02	0.03	
23	beta-Bisabolene			0.02		0.01			0.01
24	beta-Elemene	0.22	0.14	0.12	0.24	0.17	0.11	0.22	0.14
25	Caryophyllene	0.41	0.4	0.31	0.59	0.31	0.3	0.42	0.34
26	trans-p-Mentha-2,8-dienol	0.01		0.01				0.02	0.02
27	.gamma.-Elemene		0.08	0.05	0.1				
28	beta.-Famesene	1.38	1.4	0.93	1.88	0.87	0.9	1.25	0.96
29	alpha.-Humulene	0.09	0.08	0.04	0.09	0.05	0.05	0.08	0.06
30	Linalyl propionate		0.07						
31	ALPHA. TERPINEOL	0.07		0.04	0.09	0.04		0.06	0.06
32	.alpha.-Muurolene	0.06	0.05	0.03	0.07	0.04	0.03	0.05	0.03
33	bicyclogermacrene	1.22	1.08	0.36	0.55	0.94	0.7	0.7	0.41
34	delta.-Cadinene	0.13	0.14	0.1	0.21	0.09	0.09	0.13	0.12
35	beta.-Sesquiphellandrene	0.15	0.11	0.11	0.15	0.09	0.07	0.13	0.03
36	Germacrene B	0.19	0.19	0.18	0.24	0.19	0.21	0.17	0.16
37	Caryophyllene oxide			0.03	0.05	0.01	0.06	0.02	
38	bergamotene		0.02			0.02			0.02
39	Nerolidol	0.03	0.03	0.05	0.03	0.02	0.02	0.04	0.02
40	p-Cymen-8-ol	0.02	0.02	0.03	0.05		0.02	0.02	0.03
41	GermacreneD	0.42	0.4	0.21	0.4	0.27	0.25	0.34	0.27
42	Elemol	0.03	0.04		0.04	0.02	0.03	0.03	0.02
43	Cyclohexanol		0.01		0.02			0.01	
44	spathulenol	0.37	0.52	1.05	1.43	0.11	0.54	0.77	0.9
45	Germacrene d-4-ol	0.24	0.23	0.16	0.21	0.17	0.21	0.17	0.15
46	Thymol	0.12	0.12	0.13	0.17	0.08	0.13	0.11	0.1
47	alpha.-Cadinol	0.07	0.07	0.01	0.11	0.01	0.01	0.01	0.01
48	Cyclopentanone			0.03	0.01			0.03	0.03
49	Carvacrol	0.01	0.01		0.02			0.01	0.01
50	isospathulenol	0.1	0.16	0.29	0.36	0.03	0.18	0.25	0.19
51	.beta.-Eudesmol				0.01	0.04			0.06

52	2-Naphthalenemethanol							0.06	0.02
53	4-bromo-		0.01	0.04	0.06		0.03	0.02	
54	Capric acid	0.01	0.01	0.02	0.02		0.01	0.02	0.02
55	1,2-Cyclohexanediol			0.03	0.04			0.02	
56	Alloaromadendrene oxide				0.02			0.02	
57	Lauric acid	0.02		0.03	0.03	0.01		0.02	
58	Oleic Acid	0.05	0.02						
59	Myristic acid	0.04	0.04	0.04	0.07	0.02	0.04	0.04	0.04
60	Linoleic acid	0.64	0.44	0.43	0.45	0.21	0.51	0.44	0.34
61	Palmitic acid	0.24	0.25	0.25	0.38	0.15	0.24	0.24	0.2
62	Linolenic acid	0.2	0.13	0.13	0.15	0.06	0.15	0.13	0.07
63	Stearic acid	0.02	0.06	0.04	0.07	0.02	0.04	0.04	0.04
64	Nonadecanoic acid	0.05							

t20-30: yuzu essential oil(YEO) by tocopherol treatment stored for 30 days at 20°C.

t20-60: stored for 60 days at 20°C.

t20-90: stored for 90 days at 20°C.

t20-120: stored for 120 days at 20°C.

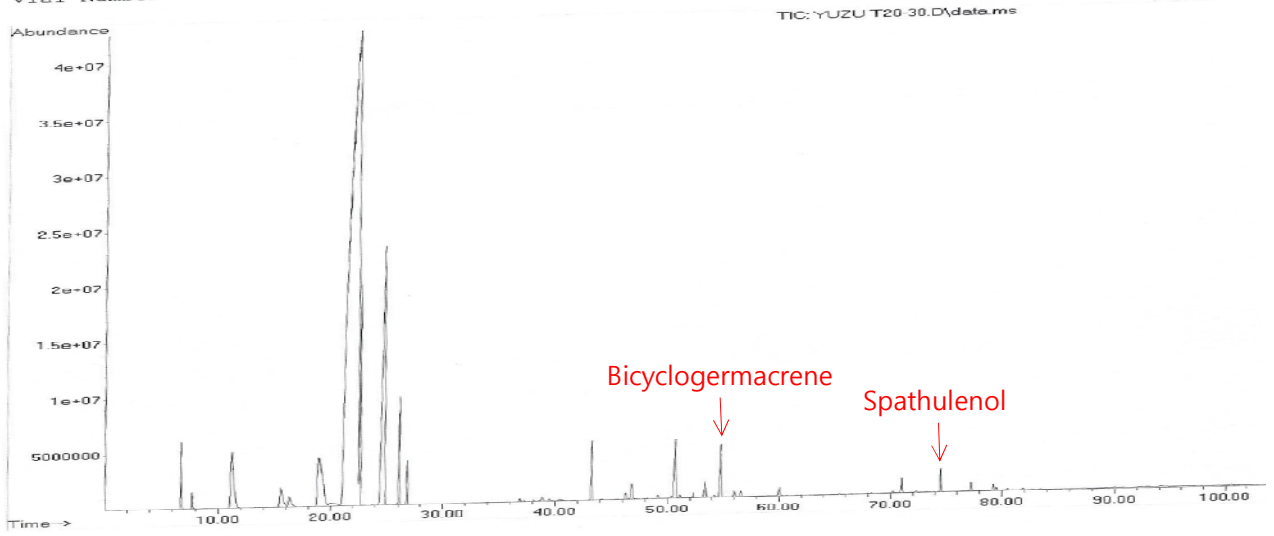
t30-30: stored for 30 days at 30°C.

t30-60: stored for 60 days at 30°C.

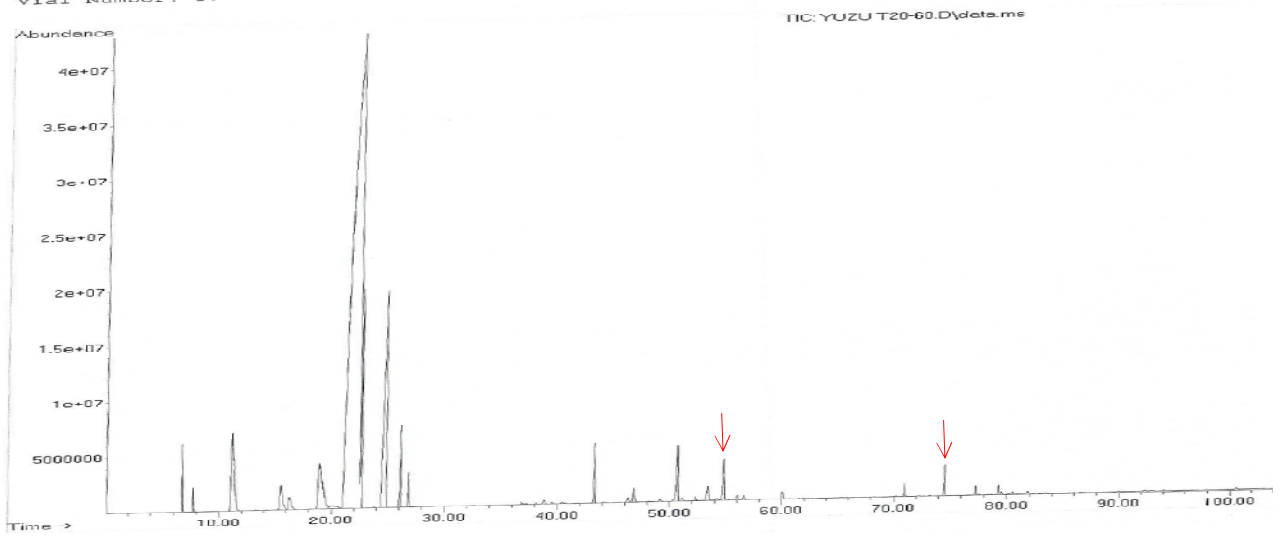
t30-90: stored for 90 days at 30°C.

t30-120: stored for 120 days at 30°C.

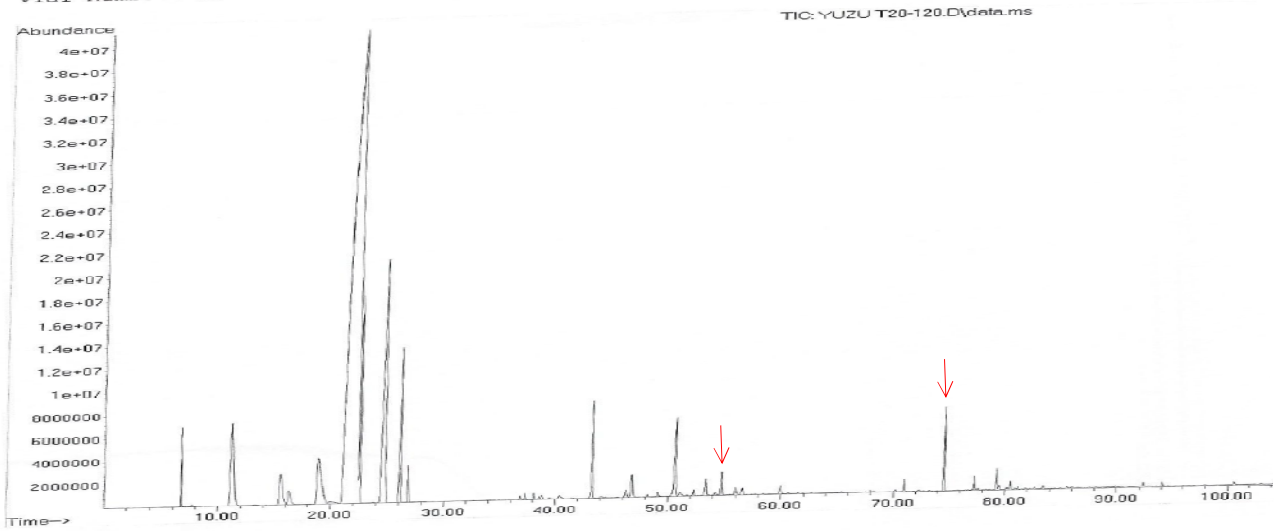
File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU T20-30.D  
Operator :  
Acquired : 10 Dec 2014 23:10 using AcqMethod AUTO(FRAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU T20-30  
Misc Info :  
Vial Number : 36



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU T20-60.D  
Operator :  
Acquired : 11 Dec 2014 1:38 using AcqMethod AUTO(FRAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU T20-60  
Misc Info :  
Vial Number : 37



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU T20-120.D  
Operator :  
Acquired : 11 Dec 2014 6:33 using AcqMethod AUTO(FRAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU T20-120  
Misc Info :  
Vial Number : 39



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU T20-90.D  
Operator :  
Acquired : 11 Dec 2014 4:05 using AcqMethod AUTO(FRAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU T20-90  
Misc Info :  
Vial Number : 38

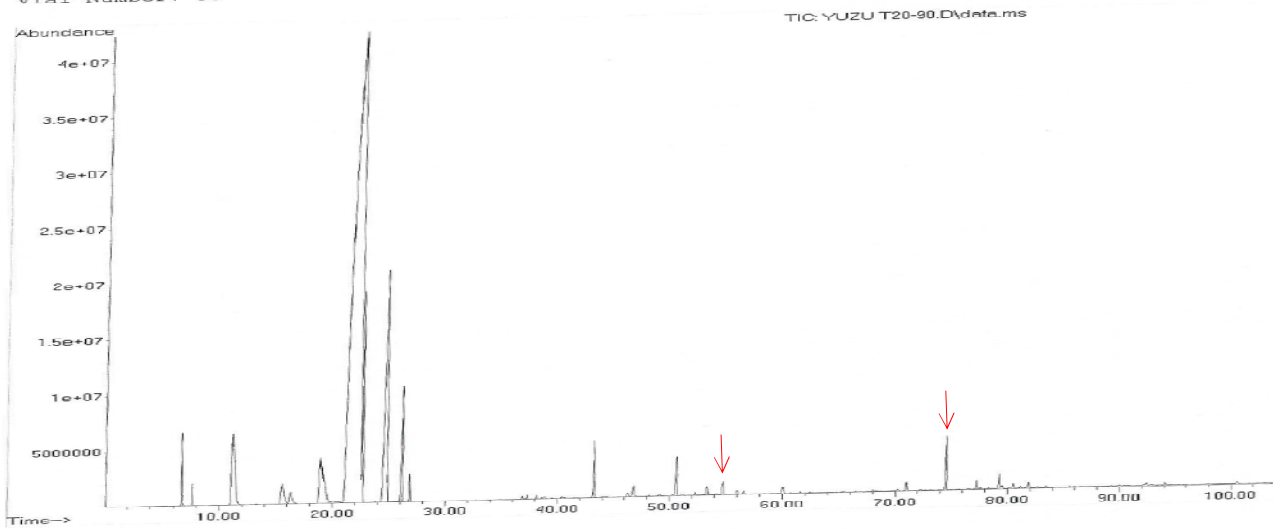
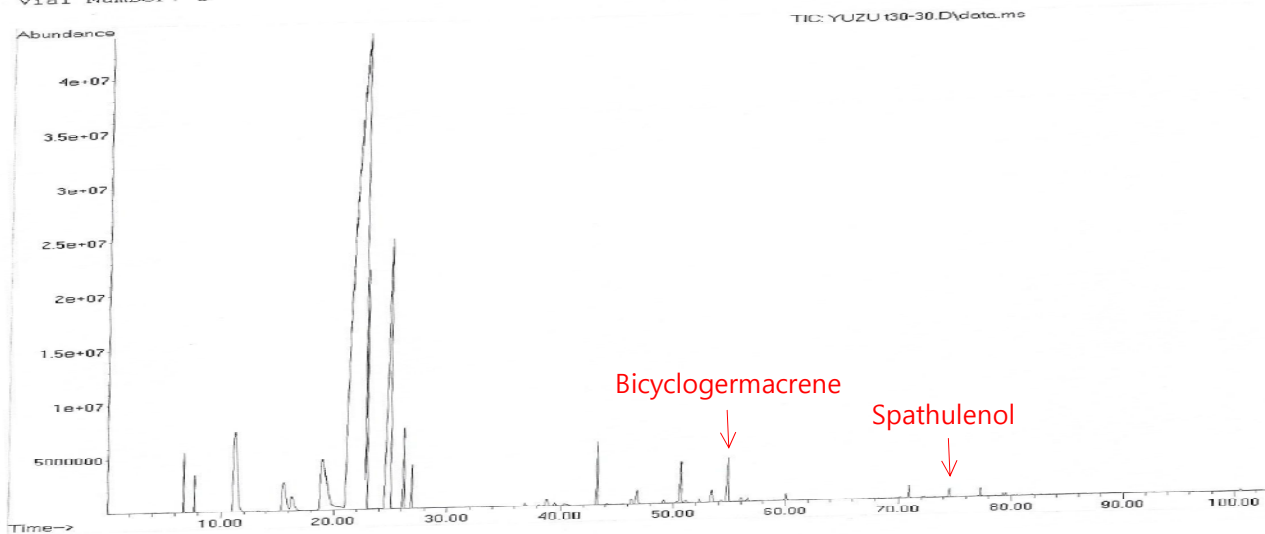
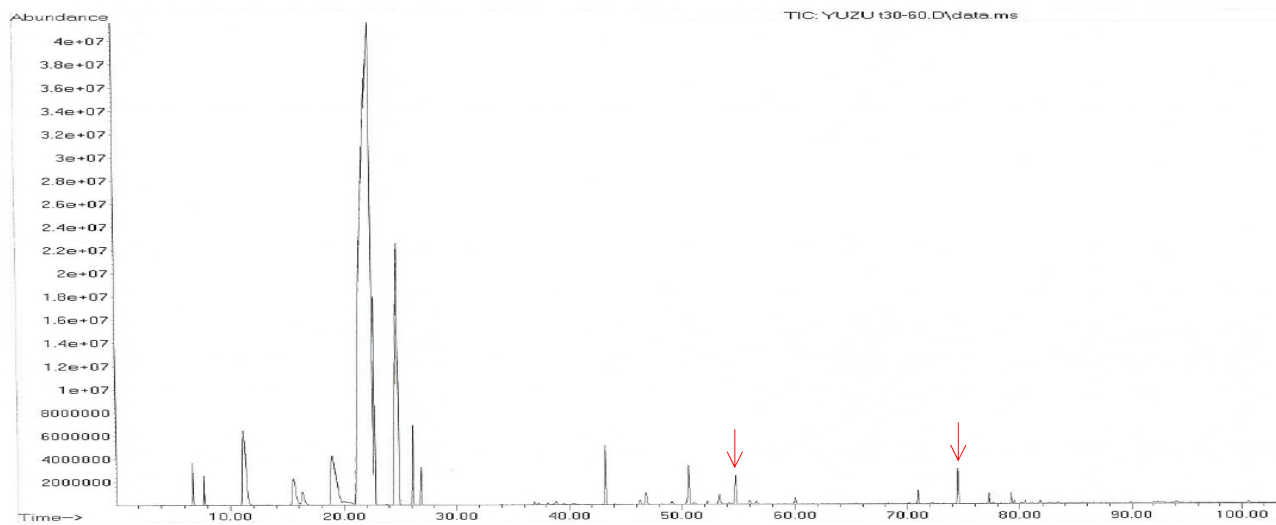


그림 1-29. GC peaks of yuzu essential oil by tocopherol treatment stored for 30~120 days at 20°C.

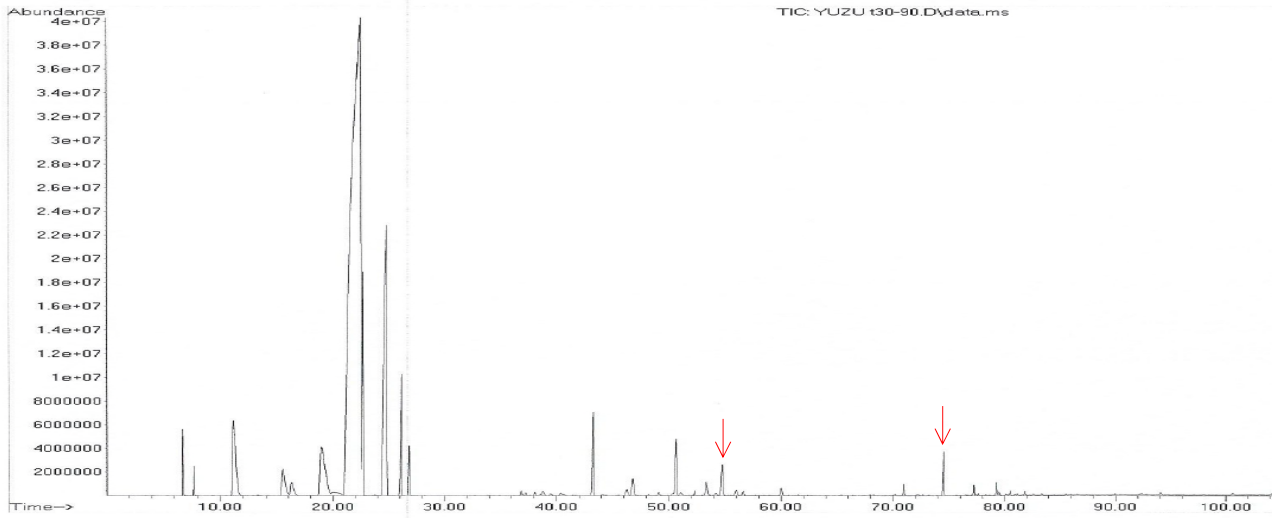
File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU t30-30.D  
Operator :  
Acquired : 12 Dec 2014 2:25 using AcqMethod AUTO(PFAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU t30-30  
Misc Info :  
Vial Number : 5



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU t30-60.D  
Operator :  
Acquired : 12 Dec 2014 4:52 using AcqMethod AUTO(PFAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU t30-60  
Misc Info :  
Vial Number : 6



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU t30-90.D  
Operator :  
Acquired : 12 Dec 2014 7:19 using AcqMethod AUTO(PFAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU t30-90  
Misc Info :  
Vial Number : 7



File : C:\msdchem\1\data\2014\Yuzu\YUZU t30-120.D  
Operator :  
Acquired : 12 Dec 2014 9:47 using AcqMethod AUTO(PFAP).M  
Instrument : MSD  
Sample Name : YUZU t30-120  
Misc Info :  
Vial Number : 8

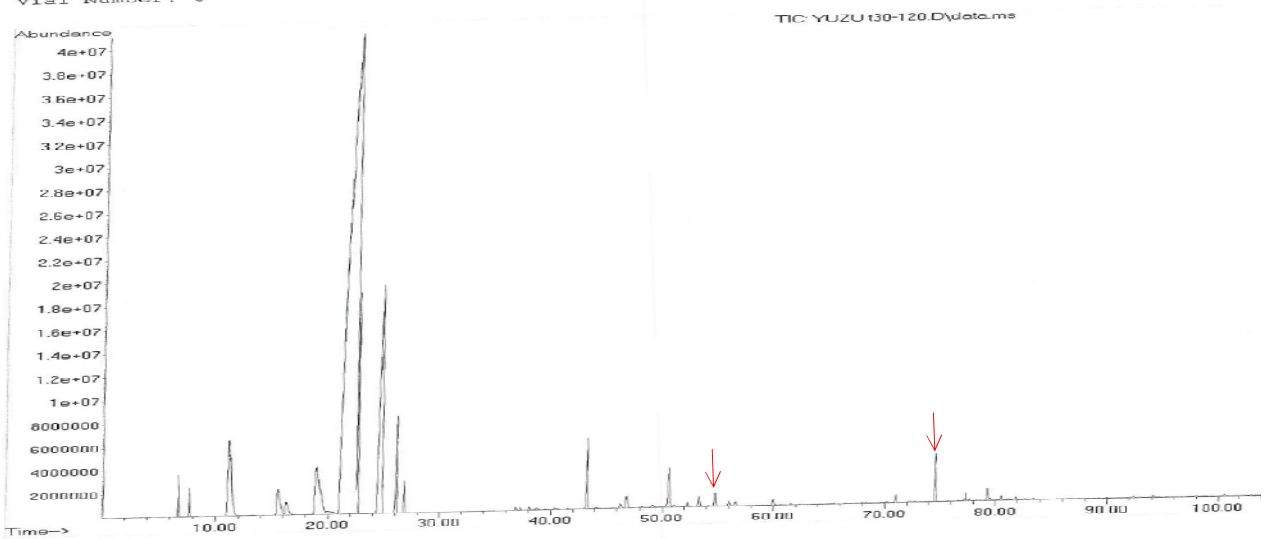


그림 1-30. GC peaks of yuzu essential oil by tocopherol treatment stored for 30~120 days at 30°C.



## 7. 결과 및 고찰

### 가. 유자 정유의 생산성 극대화를 위한 생물학적 전처리:

유자 정유의 생산성 향상을 위한 전처리 전 물리적 특성을 측정한 결과 과실의 총 중량은 135~170g이었으며, 과육과 씨의 중량은 각각 53~70g로 전체 중량의 40%를 차지하였고, 씨의 중량은 16~22g로 12%의 비중을 보였다. 또한 과피의 중량은 60~80g로 전체 중량의 47%를 이루고 있었다. 한편 과피의 겉껍질(flavedo)과 안껍질(albedo)부분의 중량은 각각 40~60g, 18~22g로 나타나 겉껍질이 안쪽 껍질 보다 약 2배 이상의 비율을 차지하고 있었다. 과실의 직경과 높이, 과피의 두께는 각각 65~80mm, 43~54mm, 60~75mm이었으며, 과피의 겉껍질과 안 껍질의 두께는 각각 3.0~4.1mm, 3.0~4.5mm로 나타났다.

### (1). 유자의 과피만을 이용한 생물학적 및 물리적 전처리 공정과 정유 추출 수율:

유자 과피만을 이용한 정유 추출 실험에서는 효소 전처리를 한 후 착즙한 실험 군에서 효소 처리를 하지 않은 실험군보다 약 10배정도의 확연하게 높은 양의 oil이 추출되는 것으로 나타났다. 한편 효소별 추출 수율은 큰 차이를 보이지 않았다. 시간에 따른 정유추출 수율은 전체적으로 효소 반응 3시간 사이에 급격한 증가를 보이며 6에서 9시간 사이에 최대의 수율을 나타냈다. 이후 시간대에서는 소폭으로 수율의 감소가 나타났다. 따라서 유자 정유 추출의 최대 수율을 보이는 시간은 6시간이 적당한 것으로 나타났다. 결과적으로 수율이 가장 높은 반응시간인 6시간대의 수율은 약1%대로 나타났으며 이를 기준으로 유자 전체중량에 대한 비율은 평균 0.33%의 수율로 나타났다. 한편 효소별 반응에 따른 pH는 유의적인 변화를 보이지 않았다.

### (2). 유자 원과를 이용한 essential oil 추출 수율 및 특성:

유자 원과를 이용한 정유 추출 실험에서는 효소반응을 하지 않고 착즙한 유자의 정유추출 수율과 효소 반응 후 착즙한 유자 정유추출 수율이 약 2~2.5배정도 높은 수율을 보였다. 또한 과피만으로 실험하였을 때보다 과육과 씨를 포함한 원과의 정유추출 수율이 0.1~0.2% 높게 나타났다. 이는 유자 씨에 함유되어 있는 지방산이 일부 추출 된 것으로 보인다. 효소마다 조금씩 차이가 있으나 6시간에서 9시간대 사이의 수율이 가장 높은 것으로 나타났으며 9시간 이후에는 수율이 감소하는 것으로 나타났다. 결과적으로 수율이 가장 높은 반응 시간대인 6~9시간의 반응 수율은 전체 중량에 대한 비율은 0.3~0.5%로 나타났다.

### (3). 전처리 조건에 따른 유자 정유의 Flavor profile 특성:

분석 결과 유자의 껍질에서 추출한 정유의 향기성분은 약 60여종이 분리되었으며 그중 35종이 동정되었다. 주성분으로는 limonene 55.63%로 가장 많았다. 다음으로는  $\gamma$ -terpinene이 14.06%의 함량을 보였으며, myrcene, sabinene이 12.73% 다음으로  $\alpha$ -pinene과  $\beta$ -pinene이 각각 5.45%와 2.04%,  $\beta$ -Farnesene이 2.02%, linalool 1.38%순으로 나타났다. 이와 같은 결과는 다른 연구자들에 연구결과와 유사한 수치를 보였다. 결론적으로 효소처리 후 추출한 정유와 자연적인 정유와의 차이는 거의 없었으며, 효소처리 후 약 9~10배정도의 수율향상을 나타낸 결로 봤을 때 기존에 자연에 가까운 천연 유자 향을 추출하기 위해 손으로 직접 유포를 터트리는데 방식의 추출방법을 대체하여 수율적인 측면에서 상업화 가능성이 충분하다고 보여진다. 한편 과피만을 이용한 추출물과 통 유자에서 추출한 Flavor profile간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

#### 나. 폐 유자박을 이용한 유자 essential oil 생산:

유자 가공 공정시 발생하는 폐유자박의 특성 및 재활용 가능성 여부를 알아보기 위해 고흥에 위치하고 있는 유자 가공 업체를 방문하여 유자 가공시 발생하는 폐유자박을 조사하였다. 유자 폐기물은 크게 2가지로 구분되었으며, 가공 전처리시 발생된 폐유자박을 이용하여 정유 성분을 추출하였으나 가공 전처리시 유포당의 손실로 인해 정유 추출이 불가능하였다. 그러나 상품가치가 떨어져 착즙만 한 뒤 폐기되는 부산물에서는 유포당의 손실이 비교적 적어 유자정유 추출 가능성이 충분히 높다고 판단된다.

#### 다. *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994를 이용한 유자 정유성분의 변화:

실험결과 *Pseudomonas* sp.에 의해 유자 정유에 존재하는 이중결합의 화합물을 hydroxylation 시켜 유자 정유의 향기성분 변화와 관능적 차이를 알아보기 위해 *Pseudomonas* sp.을 배양한 후 세포를 sonication한 뒤 각각의 조건에 따라 반응하여 GC/MS 분석 및 관능평가를 실시하였으나 유의적인 변화를 볼 수 없었다. 향후 실험에서는 hydroxylation 반응 시 NADH를 첨가하여 반응 여부를 알아보는 실험을 계획 중에 있으며, cell을 sonication하지 않고 배양도중에 유자 정유를 첨가하여 균체로부터 Microbial transformation을 유도하는 실험을 계획 중에 있다.

#### 라. (FAB I)를 이용한 유자 정유성분의 변화:

NADH-의존성 Enoyl-acyl carrier protein reductase인 FAB I 환원효소에 의하여 유자로부터 추출한 정유에 이중결합을 제거하여 관능적 특성 및 향기성분 변화를 알아보기 위한 실험을 하였다. 먼저 *Pseudomonas aeruginosa* genomic DNA에서 얻은 FabI gene PCR을 통해서 증폭한 뒤 재조합 plasmid를 heat-shock 방법을 이용하여 *Escherichia coli* BL21 (DE3)에 transformation, over expression하였다. 그런 다음 세포를 sonication한 뒤 gel-filtration chromatography를 이용하여 정제 단계를 통해 1L당 1g의 FabI 단백질을 확보했다.

확보된 단백질을 이용하여 유자 정유와 각각의 조건에서 반응시킨 뒤 GC분석 결과 유자 정유와 FAB I 간에 일반적인 반응에서는 별다른 변화를 보이지 않았다.

#### 마. 유자의 미생물/효소 전처리 조건에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석:

세종대로부터 분양 받은 3종의 곰팡이의 발육 속도, 집락의 표면 및 뒷면의 색조를 관찰한 결과 발육속도는 yuzu 12, yuzu 2, yuzu 2-1의 순서로 성장하였으며, 집락의 표면과 뒷면의 색상은 각각 yuzu 2에서 청녹색과 진 노란색, yuzu 2-1에서는 회색과 밝은 노란색, yuzu 12에서는 회색과 아이보리색에 가까운 색의 특징이 관찰되었다. 또한 각각의 곰팡이를 100ml의 PDB 액체배지에 22°C, 150rpm에서 3일간 배양시킨 후 건조중량은 Yuzu 2의 중량이 4.17~4.20 g/L로 가장 높았고 나머지 균의 중량이 각각 Yuzu 2-1: 3.89~3.93 g/L, Yuzu 12: 2.00~2.11 g/L 순으로 나타났다. 유자 시료에 곰팡이를 접종한 뒤 22°C, 습도80~90%, 10~20일간 배양시킨 후 essential oil의 추출 수율은 소폭 증가 하였으며, 이는 곰팡이에 의한 세포벽의 분해로 보여진다. 이들의 향기성분의 변화를 관찰한 결과 배양전의 시료와 큰 차이를 보이지 않았고 주요 성분으로는 limonene의 함량이 가장 높았으며 다음으로 gamma-terpinene, sabinene, myrcene, beta-pinene, alpha-pinene 순으로 나타났다. 한편 곰팡이를 배양시킨 시료에서 시간이 경과함에 따라 limonene의 함량이 보존되는 경향을 보였다.

#### 바. 저장 온도 및 기간에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석:

저장 온도와 기간에 따른 유자 정유의 향기성분의 변화로는 limonene의 온도별 평균 함량이 70.42%, 70.15%, 69%로 소폭 줄어드는 경향을 보였으며, cymene, bicyclogermacrene 등 모노테르펜 등의 종류는 감소하였다. 반면에 spathulenol, thymol 등의 함량은 증가하는 경향을 보였다. 또한 4°C에 보관한 시료에서 gamma-lactone의 성분이 다량으로 발견되었고 함량은 각각 30일 9.41%, 60일 1.71%, 90일과 120일 시료에서 각각 0.21%, 0.07%의 함량으로 저장기간이 증가할수록 빠르게 감소하는 경향을 보였다. ethyl ester 함량 또한 30, 60, 90일 시료에서 각각 1.37%, 0.29%, 0.09%로 확인되었고 120일의 시료에서는 검출되지 않았다.

#### 사. 항산화제 첨가에 따른 유자 정유의 저장 조건별 Flavor Profile 분석:

BHA(butylated hydroxyanisole), PG(propyl gallate), Tocopherol의 항산화제를 이용한 저장 조건별 유자 정유의 향기 성분을 분석한 결과 3종에 시료에서 공통적으로 bicyclogermacrene, gamma-Terpinene이 저장 온도와 기간이 증가할수록 함량이 낮아지는 경향을 보였다. 반면에 spathulenol의 경우 저장온도와 기간이 증가할수록 함량이 증가하는 모습을 보였다. 반면 3종의 항산화제를 첨가한 시료에서 첨가하지 않은 시료보다 향기성분의 변화 정도가 낮아지는 것을 확인하고 향후 항산화제 첨가 함량과 저장 기간을 증가시켜 유자 정유의 향기성분의 변화를 관찰함으로써 저장 및 유통과정에서 발생할 수 있는 유자 정유의 향기성분 변성을 방지하여 양질의 제품으로 산업전반에 응용 가능성을 보여주었다.

## 제 2 절 유자 정유의 Flavor Profile Analysis 및 생물전환기술을 이용한 정유의 Flavor 특성극대화 기술 개발

### 1. 유자 정유의 Flavor Profile Analysis 분석 및 미량 방향성분 정성/정량 GC-MS 성분 분석

#### 가. 서론:

식품은 다양한 형태로 가공되기 때문에 공정상에서 본래의 맛과 향이 변질 될 수밖에 없다. 따라서 보다 천연적인 이미지를 상승시키고 기호성을 증대시키기 위해서는 천연의 flavor가 각광받고 있다. 하지만 국내 방향 자생식물을 이용한 천연향료소재의 생산량 한계가 있어 시장성 확대가 어렵다. 이를 해결하기 위하여 Flavor Profile Analysis를 통해 천연향료 소재 생산과 더불어 일정한 생산량에 향취의 Intensity가 강하시키는 기술개발이 시도되고 있다. 이를 위하여 천연 방향식물의 미생물/효소를 이용한 전처리 기술 개발과 함께, Impact chemical의 동정과 함께, Flavor Profile을 최적화 및 천연향료의 향의 강도를 증가할 수 있도록 Key-compound 생산을 위해 미생물/효소를 이용한 Biotrasformaion 기술개발을 통하여 고품질의 천연향료 생산을 통해 생산량의 한계를 극복하고자 하였다. 이를 위해 유자의 수확시기별에 따른 정유의 방향 성분을 분석하고, GC-MS 분석에 따라 향기 성분의 변화에 따른 flavor profile analysis를 실시하였으며, 성분 변화에 따른 유자 정유 향의 변화를 분석하고 관능평가를 통해서 Flavor development의 연관성 분석을 실시하였다(그림 2-1).

#### ❖ 차별성

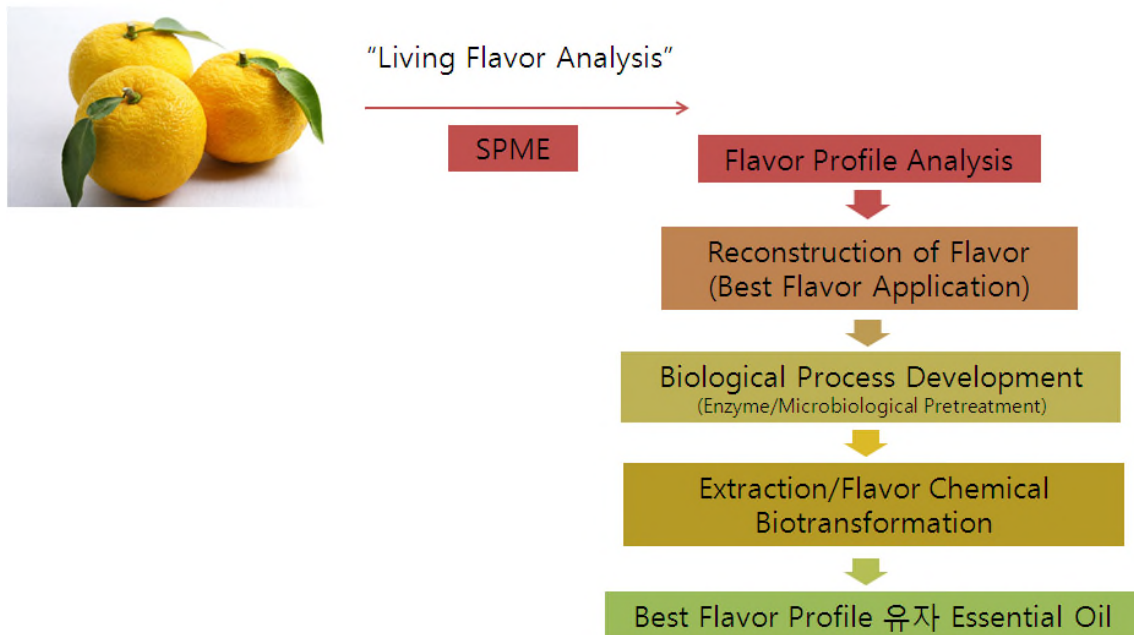


그림 2-1. 유자 정유의 향기 성분 분석

## 나. 연구개발의 내용 및 방법

### (1) 유자 시료 구입:

유자는 유자 특성에 따라 초겨울 완숙에 의해 수확되지만, 2012년 한국의 유자 생산 및 수확은 잦은 태풍에 의한 피해를 받아 생산량 및 수확량의 한계를 가져 지역별 및 수확시기에 따른 유자 정유의 추출 및 특성분석이 제한되었다. 고흥지역의 유자생산 시기에 맞추어 2012년과 2013년도에 각각 100 kg과 60 kg의 유자를 고흥군 NH 풍향농협과 세일 식품을 통해 구매하였다. 구매한 유자는 냉장보관을 통해 신선도를 유지하여 보관하였다. 유자는 농산물인 만큼 정유의 aroma profile에 매년 차이를 보이게 된다. 따라서 유자 정유의 aroma의 표준화 및 향상을 위해서는 aroma에 중요한 역할을 하는 impact chemical의 동정이 중요하다. 따라서 2012년과 2013년 유자의 aroma profile을 분석을 다음과 같이 실시하였다.

### (2) Cold-pressed 유자 정유 추출:

2012년 유자의 과즙(27.56g), whole fruit extract(32.17g)과 peel extract(31.63g)은 conical tube에 담아 원심분리를 10,800 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 각각 상등액의 1mL를 microtube에 담았으며, peel extract(껍질 추출물)은 점성도가 강해서 물로 1:1로 희석하였다. 시료를 다시 원심분리기(eppendorf 5415c, eppendorf, USA)에서 10,000rpm으로 30분간 처리하고 상등액을 SmartPor syringe filter, 25mm, 0.2 $\mu$ m(Woongki Science Co., Ltd., Seoul, South Korea)으로 여과하여 screw cap vial에 옮겼다. 또한 유자 20 kg을 6 등분하여 껍질만 모아 albedo 부분을 칼로 제거한 후, 손으로 껍질을 하나씩 구부리며 정유를 pipette을 이용해 amber vial에 담았다. 유자 정유에 wax가 많아 원심분리기로 10,800 rpm, 20 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리한 후, 위 wax 부분을 제거하고 SmartPor syringe filter(0.2  $\mu$ m, 25 mm)로 여과하였다. 추출된 hand-pressed 유자 정유는 screw cap vial에 담아 사용 전까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다(그림 2-2).

### (3) Distilled 유자 정유 추출:

2012년 유자 정유를 다음과 같은 증류 방식으로 추출 공정을 실시하였다. Hurom Juicer SJ-200B (Hurom Group Corporation, Gimhae, South Korea)를 이용하여 통 유자 40 kg과 albedo를 제거한 유자 껍질 40 kg의 섬유질 부분을 뺀 liquid slurry를 준비하였다. 또한 albedo를 제거하지 않은 유자 껍질 20 kg도 실험용 블렌더 (Waring, New York, USA)로 처리하여 준비하였다. 3가지 sample을 각각 still pot에 넣어 Heating Mantle C405 (Misung Scientific Co., Gyeonggi-do, South Korea)과 속도 4로 맞춰진 Mechanical Lab Overhead Stirrer RZR-2000 (Heidolph, Schwabach, Germany)를 사용해 증류하였다. Slurry를 증류한 후 상층의 유자 정유 layer를 모아 screw cap vial에 담아 사용 전까지 -20  $^{\circ}$ C에서 보관하였다(그림 2-3).

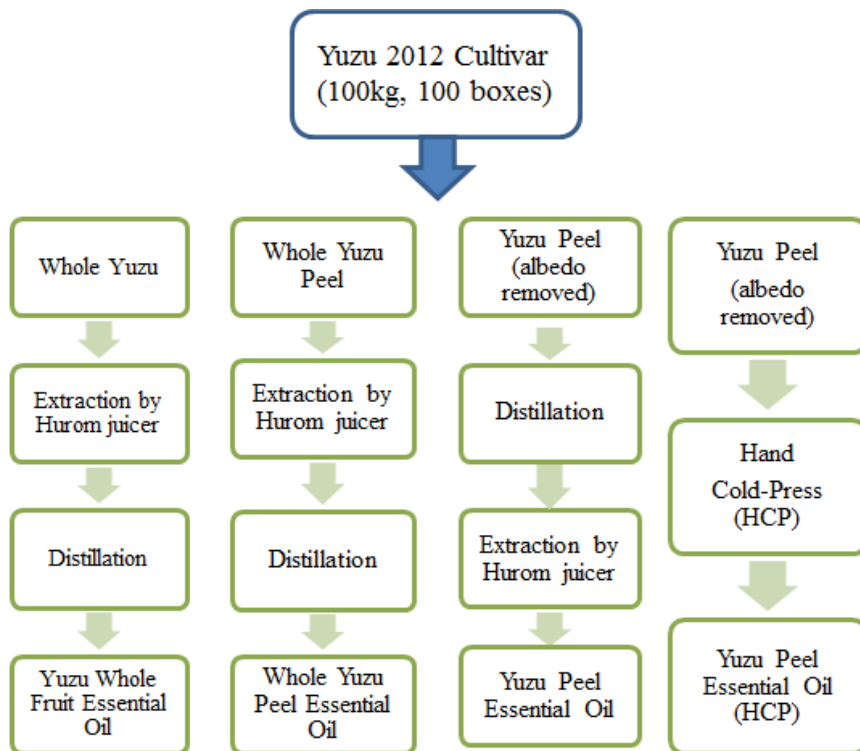


그림 2-2. 유자 부위별 정유 추출 공정



그림 2-3. 유자 정유 증류 추출 공정

**(4) 유자의 living flavor 추출:**

유자 정유 향의 기본이 되는 chemical을 알아내어 synthetic flavor 합성에 사용하기 위해 2012년과 2013년도 유자의 living flavor 분석을 세종대학교 대기환경분석 실험실(김기현 교수님)에서 실시하였다. 우선 -20℃에서 보관했던 10.9g의 2012년 유자 껍질을 해동시켜 1 L PEA bag에 담아 direct injection (DI)으로 sorbent tube에 흡착시키는 방법과 N<sub>2</sub> 가스를 사용하여 (100mL/min and 1min) side injection (SI)으로 sorbent tube에 흡착시키는 방법으로 유자 living flavor의 GC-MS 분석을 실행하였다. 같은 방식으로 2013년 유자 껍질 21.1g도 SI 방법으로 GC-MS 분석을 실행하였다(그림 2-4, 표 2-1).



그림 2-4. 유자껍질을 SI 방법으로 living flavor를 분석하는 모습

표 2-1. GC-MS<sup>a</sup> operation conditions at Atmospheric Environment Laboratory

GC (SHIMADZU GC-2010, Japan), MSD (SHIMADZU GCMS-QP2010, Japan)

Column: CP Wax (diameter: 0.25 mm, Length: 60 m, film thickness: 2.5 mm)

Oven Temp	40℃
Oven rate	5℃
Max Oven Temp	180℃
Total Time	30 min
Carrier gas	He (99.999%)
Ionization mode	EI (70 eV)
Ion source temp	230℃
Interface temp	230℃
TIC scan range	35~300 m/z

Thermal desorber (Unity, Markes, UK)		
Cold trap	Carbopack C + Carbopack B	
Split ratio	1:20	
Split flow	20 mL/min	
Trap hold time	10 min	
Trap low/high	5/320°C	
Flow path temperature	180°C	
Sampling tube		
Absorbent	TenaxTA + Carbopack B + Carbopack X	
	(in quartz)	
Desorb time	5 min	
Temp.	300°C	

(5) 유자 정유 GC-MS 분석 조건:

2012년 유자 정유(cold-pressed & distilled)를 다음과 같은 분석 조건으로 분석하였다(표 2-2).

표 2-2. 유자 정유의 GC 분석 조건

7890A/5975C, Agilent Technologies					
Column	Stationary phase	Oven temperature program	Injector Temp.	Detector Temp.	Sampling method
DB-WAX	Polyethylene glycol (30 m x 0.25 mm x 0.25 $\mu$ m, Agilent)	45°C -3°C/min-100°C(2 min)-3°C/min-175°C(2 min)-3°C/min-246°C(2 min)	250°C	280°C	1 $\mu$ l Direct injection

<sup>a</sup>GC-MS (MSD): carrier gas, 99.999% He (1 mL/min); splitless, ionization voltage, 70 eV, ion source temp., 230°C, scan mode (m/z), 35-550



## 다. 연구 결과 및 고찰

### (1) 유자부위별 Cold-pressed 유자 정유의 관능평가:

고흥에서 구매한 2012년도 유자를 부위별로 essential oil을 추출하여 관능평가를 실시하였다. 또한 가장 향이 좋은 걸로 평가된 2008년 압착 추출 유자정유(표준)과 2012년 압착추출 유자정유를 비교 평가하였다.

표 2-3. 2012 고흥 유자 부위별 essential oil 관능적 특성

유자 부위별 Essential Oil	Description - Sensory Evaluation
Yuzu essential oil 12 - Hand Press	파인애플, 단향, 에스터, 과일향, 레몬 (자극적인 향이 거의 없음)
Yuzu essential oil 12 - Whole Fruit	단향, 무거운, 발효된, 카라멜화 된 & 뚝은
Yuzu essential oil 12 - Skin	레몬, 신향, 에스터, 알코올 & 파인애플
Yuzu essential oil 12 - Fruit	신향, 침이 고이는, 레몬, 에스터 & 약향

유자의 특징적 향은 크게 5가지로 나눌 수 있음: 즙이 많은/침이 고이는(juicy/salivation), 약향(medicinal), 뚝은향(pungent), 단향(sweet) & 꽃향(floral). 2012년 부위별 유자 essential oil을 보면 hand-pressed와 Fruit(유자 과육 추출물)의 essential oil은 에스터향이 강하고, 특히 Hand Press는 여러 과일향과 단향이 강했다. 특히 Hand Press의 essential oil은 즙이 많은 향(신향이 강한), medicinal image, 뚝은향과 같은 자극적인 향이 거의 없는 반면 꽃향과 단향은 진한 전체적으로 호감 가는 향이었다 (표 2-3, 그림 2-5).

2008년 냉압착 유자 정유를 기준(golden standard)으로 비교했을 시 hand-pressed를 뺀 3가지 cold-pressed 유자 추출물에서 호감도가 높은 aroma 특징인 "즙이 많은/침이 고이는"과 유자 특유의 medicinal image와 뚝은 향의 강도가 낮은 것을 알 수 있었다 (그림 2-5).

일반적으로 시장에서 유자 정유는 손으로 압착하여 추출한 것(hand-pressed)을 최상의 품질로 평가받고 있으나, 오랜 시간과 노동을 필요로 하는 작업이기에 상업화되기에는 어려운 점이 있다. 따라서 다른 공정 과정을 통하여 hand-pressed 정유의 품질과 대등하거나 더 월등한 정유를 얻기 위한 연구를 진행하였다.

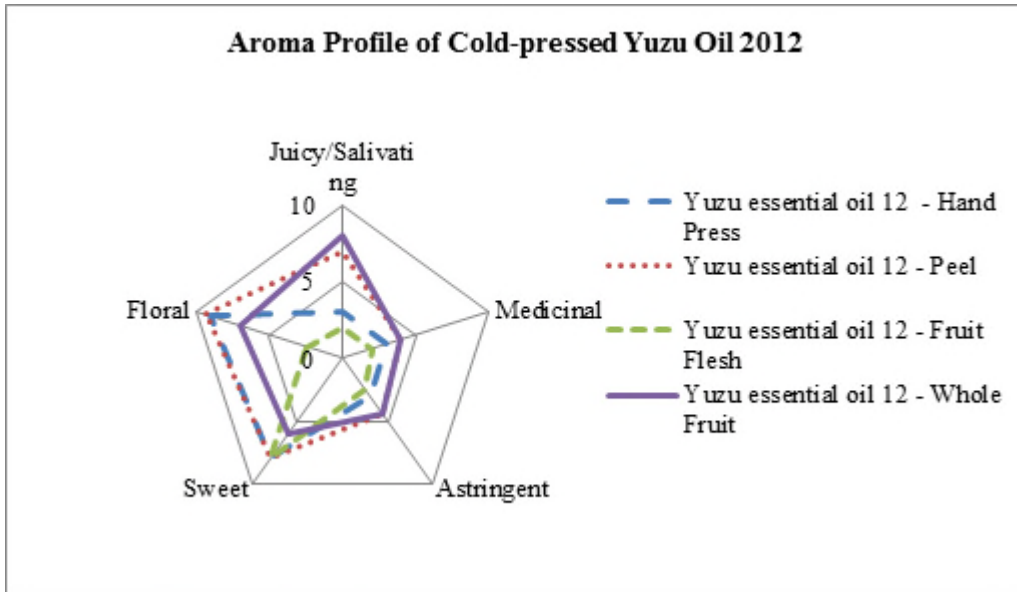


그림 2-5. Cold-pressed 유자 정유 2012의 aroma profile

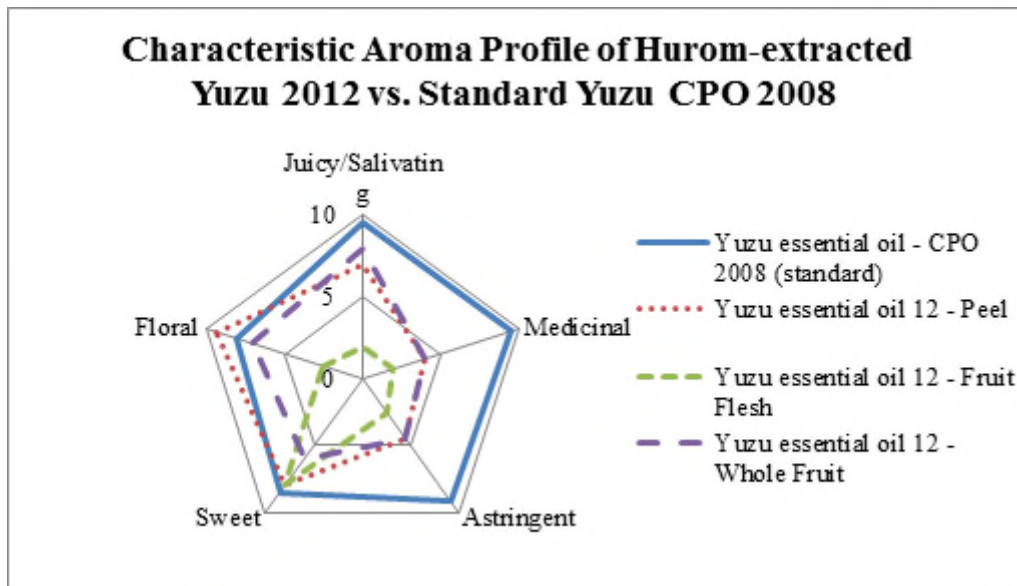


그림 2-6. Cold-pressed 3가지 유자 정유 2012와 냉압착 유자 정유 2008의 aroma profile

**(2) Distilled 유자 정유의 성분 분석:**

통 유자, albedo를 제거하거나 제거하지 않은 껍질을 사용하여 3가지 증류 유자 정유를 얻었다(그림 2-7). Albedo를 제거한 유자 정유가 가장 투명한 반면, 통 유자의 정유는 노란 빛을 띄고 유자 껍질(whole peel - albedo 제거하지 않은)은 검정색이었다. albedo를 제거한 유자 껍질 slurry는 fiber가 적었지만 albedo를 제거하지 않은 껍질 slurry나 통 유자는 fiber가 많아 증류과정 중 pot에서 껍질이 원활히 섞이지 못해 pot 안쪽에 달라붙어 타버린 것으로 생각된다. 통 유자 slurry는 과즙에서 나온 물이 많아 통 껍질보다 덜 탄 것으로 판단된다.

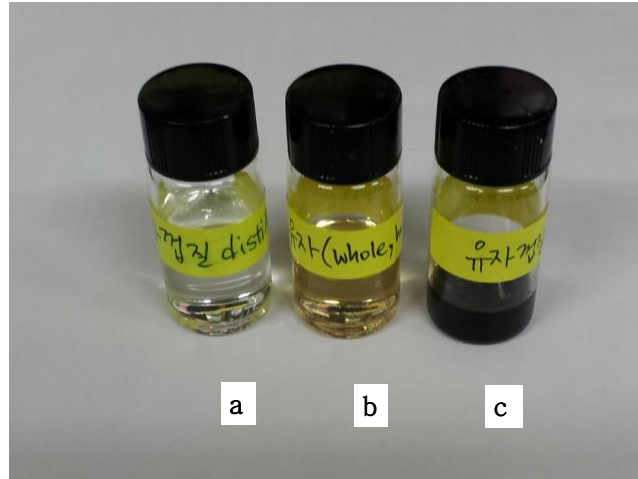


그림 2-7. Distilled yuzu essential oil 2012

a	b	c
Yuzu essential oil 12 - Skin Distillation	Yuzu essential oil 12 - Whole Fruit Distillation	Yuzu essential oil 12 - Whole Skin Distillation

**(3) Distilled 유자 정유의 관능평가:**

2012년도 고흥 유자를 통째, 그리고 albedo를 제거하거나 제거하지 않은 껍질에서 얻어진 증류 유자 정유의 관능평가를 실시하였다. Albedo를 제거하지 않은 껍질의 정유는 탄내가 아주 심해서 정확한 관능평가를 실시하기 어려웠다. 통 껍질을 이용하여 얻은 정유 역시 약간 탄내가 있어서 정확한 평가가 어려웠으나, 유자 특유의 달콤한 꽃향을 감지할 수 있었다. Albedo를 제거한 껍질로 얻은 정유는 탄내가 없고 가장 fruity하고 floral한 달콤한 향이었다. 더불어 유자 특유의 뚝은 향과 medicinal image도 적절히 갖고 있는 것을 알 수 있었다(그림 2-7).

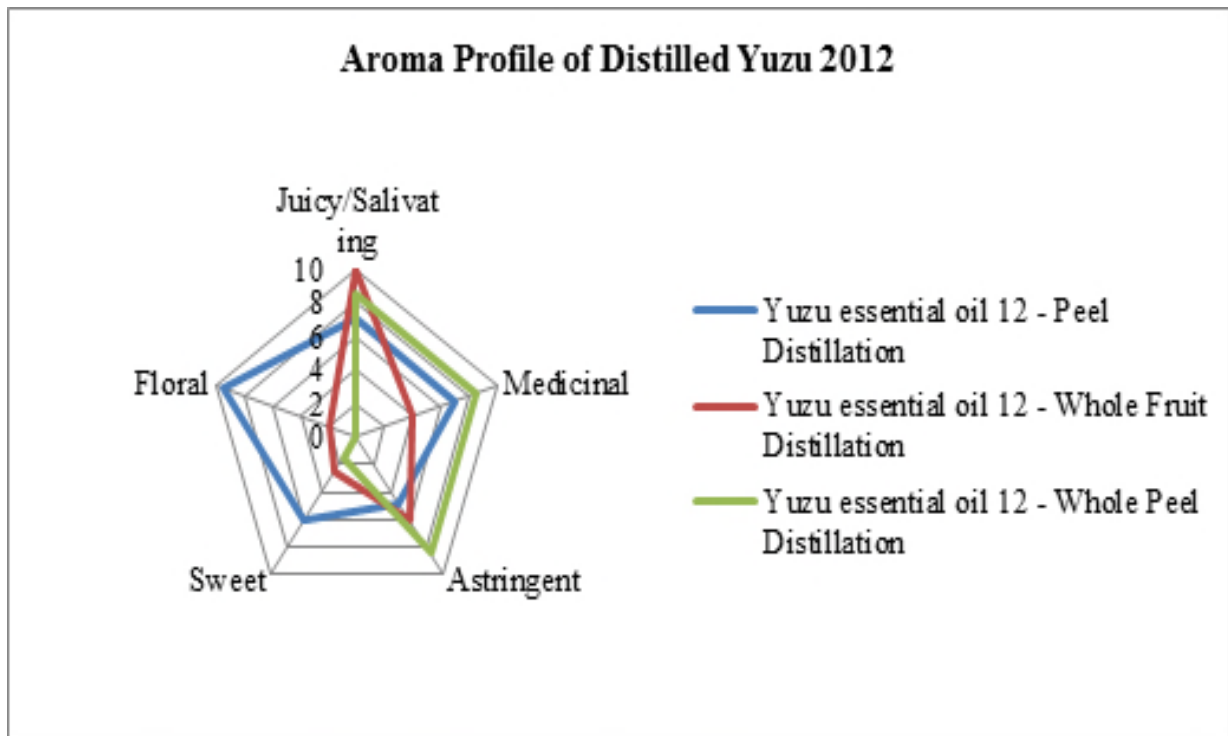

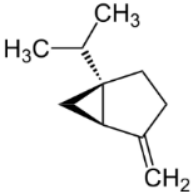
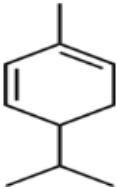
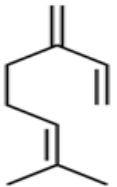
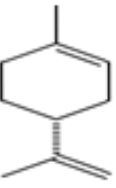
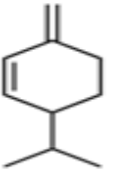
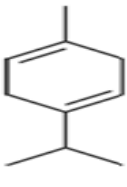


그림 2-8. Distilled 유자 정유 2012의 Aroma Profile

#### (4) 유자 정유의 GC-MS 분석:

재배 년도별로 유자 정유의 차이를 알아보기 위해 2008, 2010, 2012년도 냉압착 유자 정유와 증류 유자 정유의 GC-MS 분석을 실시하였다. GC-MS 분석 결과, 세 가지 정유에는 대부분 같은 물질이 나왔지만  $\alpha$ -phellandrene은 2010년 유자에만 있었고 2008년이나 2012년 유자에는 없는 것으로 나왔다(표 2-4). 더불어 같은 물질을 함유하고 있다고 해도 년도 마다 물질의 양이 차이가 많이 나는걸 알 수 있었다. 예를 들어  $\beta$ -phellandrene은 2008, 2010, 2012년도에 각각 1.37, 4.57, 3.21(area %)를 함유되어 있었다. 이와 같이 농산물인 유자는 aroma profile이 재배년도에 따라 달라진다는 것을 알 수 있었다. 따라서 일정한 aroma profile의 유자 정유를 지속적으로 생산하기 위해서는 microbial biotransformation을 통해 유자 향을 보완하거나 향상시킬 수 있는 천연 향료 물질을 합성하는 것이 매우 중요하다고 사료된다.

표 2-4. 냉압착 유자 정유(2008, 2010, 2012년)의 chemical component

Chemical Name	Chemical Structure	Aroma Characteristics	2008	2010	2012
			Area %	Area %	Area %
$\alpha$ -pinene		rosin	4.62	2.92	4.72
sabinene		warm, and oily-peppery	3.67	0.48	0.81
$\alpha$ -phellandrene		peppery	-	0.84	-
Myrcene		citrusy, but warm-balsamic and ethereal sweet	6.98	2.39	-
d-limonene		fresh, light and sweet citrusy	43.45	65.40	45.10
$\beta$ -phellandrene		peppery-minty, refreshing and slightly citrusy	1.37	4.57	3.21
$\gamma$ -terpinene		herbaceous-citrusy	13.26	11.16	13.02

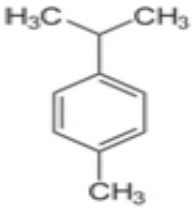
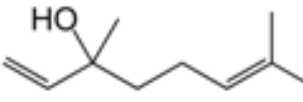
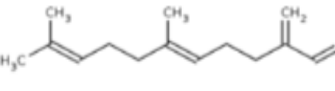
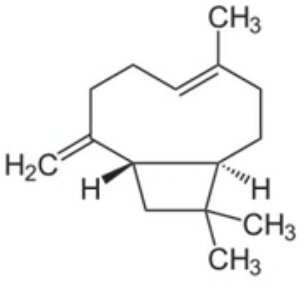
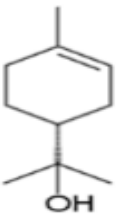
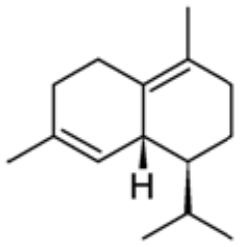
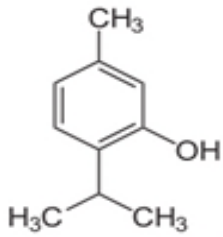

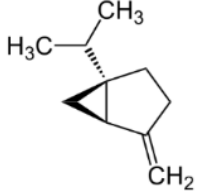
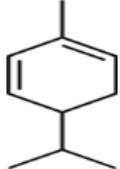
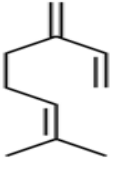
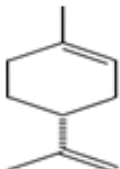
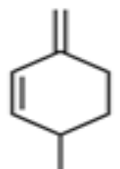
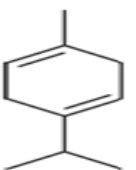
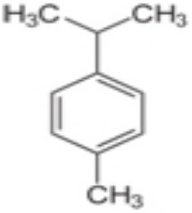
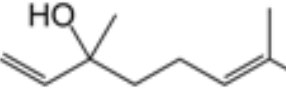
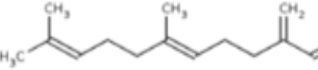
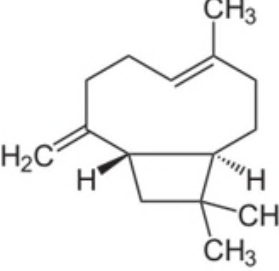
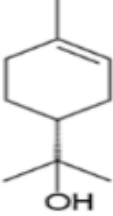
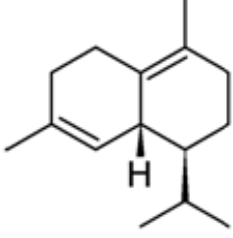
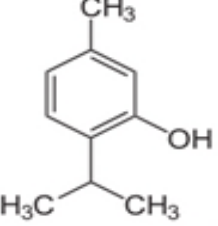
p-cymene		gassy-kerosene-like	-	1.62	1.84
linalool		light and refreshing, and floral-woody	4.74	2.77	4.20
trans-β-farnesene		very mild, sweet, and warm	2.40	1.02	1.21
β-caryophyllene		woody-spicy, dry, and tenacious odor	0.94	0.30	0.54
α-terpineol		soft and pleasant, sweet, and almost floral odor	0.54	0.23	0.41
δ-cadinene		mild, dry-woody, and slightly medicinal-tarry odor	0.45	0.11	0.29
thymol		powerful, sweet-medicinal, herbaceous, and warm odor	0.74	0.28	0.56

표 2-5. 증류 유자 정유의 chemical component

Chemical Name	Chemical Structure	Aroma Characteristics	Whole yuzu	Yuzu peel
			Area %	Area %
$\alpha$ -pinene		rosin	4.48	2.64
sabinene		warm, and oily-peppery	0.29	0.20
$\alpha$ -phellandrene		peppery	-	-
Myrcene		citrusy, but warm-balsamic and ethereal sweet	5.73	5.04
d-limonene		fresh, light and sweet citrusy	51.81	52.89
$\beta$ -phellandrene		peppery-minty, refreshing and slightly citrusy	-	-
$\gamma$ -terpinene		herbaceous-citrusy	12.05	11.68

p-cymene		gassy-kerosene-like	0.12	0.14
linalool		light and refreshing, and floral-woody	4.23	3.88
trans-β-farnesene		very mild, sweet, and warm	1.49	1.17
β-caryophyllene		woody-spicy, dry, and tenacious odor	0.49	0.38
α-terpineol		soft and pleasant, sweet, and almost floral odor	0.70	-
δ-cadinene		mild, dry-woody, and slightly medicinal-tarry odor	0.01	0.34
thymol		powerful, sweet-medicinal, herbaceous, and warm odor	0.01	0.44



**(5) 유자의 GC-MS living flavor 분석:**

유자껍질의 living flavor을 GC-MS로 분석하였다. 2012년과 2013년에 재배된 유자껍질의 living flavor GC-MS 실시하였으나, 기기의 분석 한계로 인해 area 값이 큰 peak만이 감지되었다 (그림 2-9, 2-10). 분석결과 2012년과 2013년의 유자에서  $\gamma$ -Terpinene, limonene, p-Cymene을 제외한 나머지 물질들이 모두 차이를 보여, 두 년도에서 유자 aroma chemical composition가 상당히 차이를 보였다(표 2-6, 2-7).

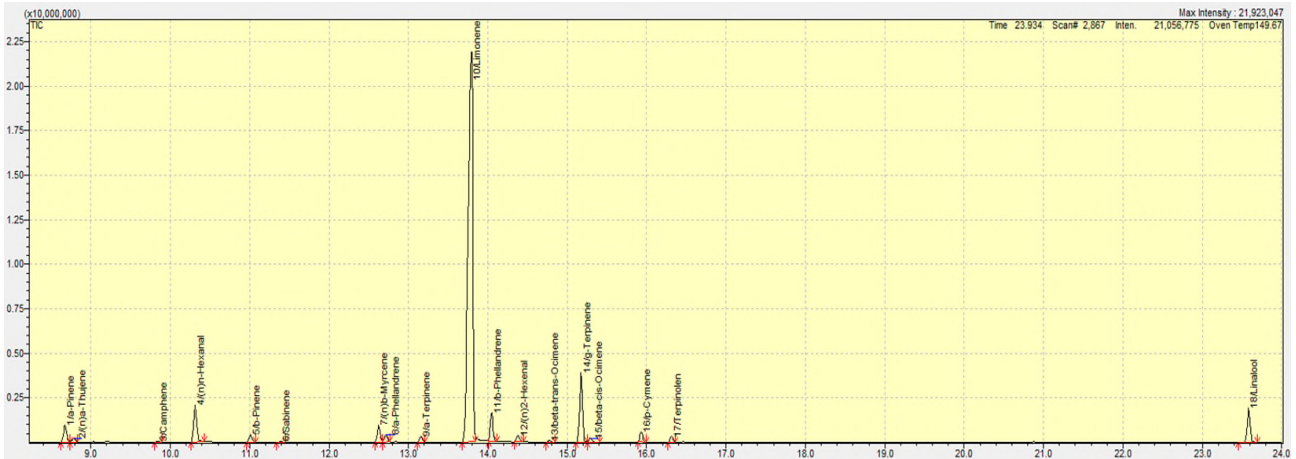


그림 2-9. GC-MS chromatogram of yuzu peel 2012

표 2-6. Components in yuzu peel 2012 detected by GC-MS

Order	Compound name	Peak area
1	(+)- $\alpha$ -Pinene	2,493,148
2	Camphene	83,552
3	(+)- $\beta$ -Pinene	1,073,478
4	$\alpha$ -Phellandrene	998,350
5	$\alpha$ -Terpinene	791,028
6	(R)-(+)-Limonene	89,755,430
7	$\gamma$ -Terpinene	926,965
8	p-Cymene	1,422,403

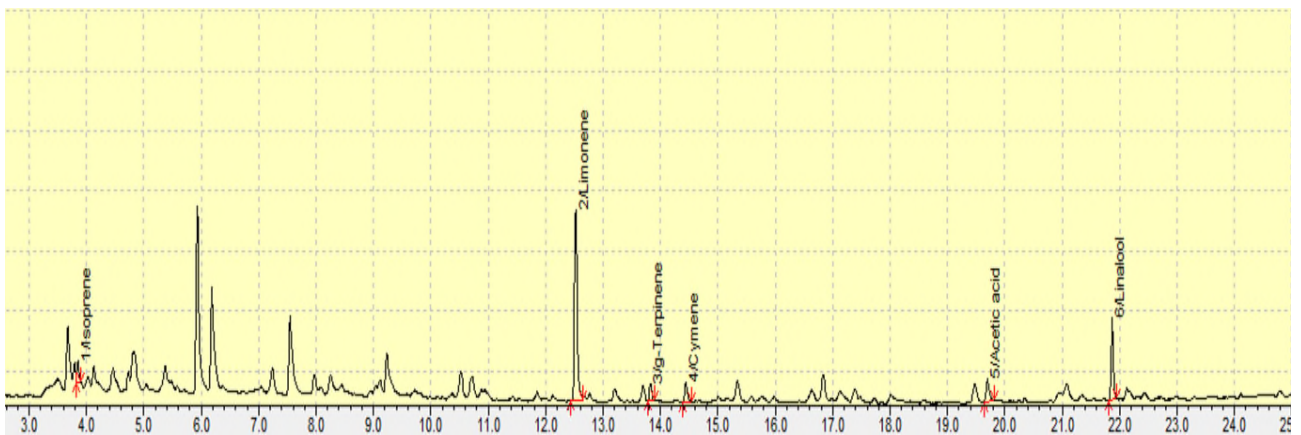


그림 2-10. GC-MS chromatogram of yuzu peel 2013

표 2-7. Components in yuzu peel 2013 detected by GC-MS

Order	Compound name	Peak area
1	Isoprene	84,366
2	(R)-(+)-Limonene	1,041,830
3	$\gamma$ -Terpinene	8,236
4	p-Cymene	104,589
5	Acetic acid	153,355
6	Linalool	356,287

## 2. Flavor Profile Analysis를 통한 유자정유 부향 향기성분의 동정

### 가. 연구개발의 내용 및 방법

#### (1) 기존 유자 Essential Oil의 Flavor Profile Analysis:

정유 성분 변화에 따른 유자 정유 향의 변화를 Flavor Development와의 연관성을 분석하고, 관능평가 결과에 따른 향기의 변화를 줄 수 있는 부향 성분을 분류하여 gas chromatography 분석 결과를 토대로 유자 정유의 미량/특유 성분을 분석하였다

#### (2) 관능평가를 통한 미량/특유 정유 성분의 방향 특성 확인:

유자 정유의 관능평가를 위해 연도별, 추출방법별로 생산된 유자 정유 2008년(압착), 2008년(증류), 2010년(압착), 2010년(증류)을 서로 비교 평가하였다. 관능평가를 위해 다음과 같은 관능적 묘사 언어와 관능평가 항목을 사용하였다.(표 2-8, 2-9)

#### (3) 부향 향기 성분과 정유 성분의 최적 혼합비율 기준 설정:

유자 Essential Oil의 관능 특성을 향상시킬 수 있는 부향성분을 관능평가를 통하여 동정하였다. 유자의 중요한 유효성분으로 알려진 Citral, Linalool, Thymol 중, Thymol과 Nonanal을 유자 정유에 첨가하여 관능적 특성 변화를 비교하였다. 유자 추출물을 0.1%(v/v)로 희석한 base에 유자 향의 key compound로 선정된 Thymol과 강한 과일향 또는 꽃향을 부여하기 위해 Flavors와 Perfume의 소재로 많이 사용되는 Nonanal을 농도별로 첨가하였을 때 변화하는 향미 프로필을 관능검사를 통해 알아보았다. 증류수 10ml에 2010년 냉압착 유자 추출물 10 $\mu$ l를 넣은 후 Thymol과 Nonanal을 각각0.001%, 0.002%, 0.005%, 그리고 0.01%를 넣고 잘 섞어 관능검사 시료로 사용하였다. 훈련된 패널 5명에게 주어진 시료를 blotting paper에 묻혀 코를 가까이(일정 거리를 유지)하며 3~4회 일정 속도로 짧게 들이마시며 느껴지는 향미 특성을 순서대로 적도록 하였다(관능평가 Evaluation Sheet). 용어의 표준화를 위하여 Aroma and Flavor Lexicon for Sensory Evaluation(Gail Vanc civile and Brenda G. Lyon, 2001)의 표준 용어를 참고하여 사용하였다(표 2-8).

표 2-8. General Citrus의 관능 묘사 용어

General Citrus Descriptors			
Alcohol	알코올의	Juicy, Fresh	생과일의 과즙향의
Artificial	인위적인	Juicy / Salivating	즙이 많은/침이 고이는
Astringent	뽀은	Medicinal	약의
Bitter	쓴	Metallic	쇠의
Buttery / Diacetyl	버터향의	Moldy	곰팡이향의
Caramelized	카라멜향의	Peel Oil	과피 유
Cardboardy	박스향의	Peel Oil, Folded	접은 과피 유
Chemical	화학적인	Peely	과피의
Deteriorated / Rotten	썩은	Seedy	씨앗의
Earthy	모래향의, 지면의	Soapy / Aldehydic	비누의
Estery	에테르향의	Sour	신
Ethetal	약한	Sulfur, Fresh	신선한 황의
Fermented	발효향의	Sweet	단
Floral, Perfumy	꽃향의, 향수의	Terpeny	터펜향의
Foxy	여우모피향의	Top-Note	가벼운 첫 향
Fresh	신선한	Woody	나무의
Grassy	잔디향의	Woody / Green	잎이 무성한 나무의
Honey	꿀향의	Woody / Hulls / Skins	나무껍질의

표 2-9. 관능평가 Evaluation Sheet

날짜:

평가 방법: 4개의 sample을 묻힌 blotting paper의 향을 맡고 연상되는 단어를 최대한 많이 써주세요.

Sample \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

Sample \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

Sample \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

Sample \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

## 나. 연구결과 및 고찰

### (1) GC/GC-MS를 통하여 flavor Profile Analysis:

2008년의 추출된 증류 방식 정유시료와 냉압착 방식으로 추출된 유자 정유의 GC 분석해보니, 2008년 시료가 2010에 비해 peak의 수에 차이가 보였다. 특히 향을 맡았을 때 4가지 시료 중에서 가장 호감가는 aroma를 갖고 있다고 생각한 냉압착 유자 정유시료를 2010년 두개의 정유 시료와 비교 시 성분피크가 상대적으로 적었다. 2010년도 두 개의 정유 시료는 상대적으로 무겁고 짙은 향이 강하였는데 아마도 여러 가지 향 물질이 존재하기 때문이라고 추측된다.

### (2) 관능평가를 통한 미량/특유 정유 성분의 방향 특성 확인:

유자 정유의 관능평가를 위해 연도별, 추출방법별로 생산된 유자 정유 2008년(압착), 2008년(증류), 2010년(압착), 2010년(증류)을 서로 비교 평가하였다. Standard sample 4가지의 aroma description profile은 다음과 같다.

표 2-10. 관능평가를 통한 유자정유의 방향 특성 확인

유자 Essential Oil	Description - Sensory Evaluation
Yuzu essential oil(distillation), 2008	cold medicine-like, stings at the end, bitter, tangent, licorice, grape, ginger and honey
Yuzu essential oil(distillation), 2010	acid(citric acid), tangent, bitter, licorice, honey, medicinal, melon, fermented and alcohol
Yuzu essential oil(cold-pressed), 2008	fruity, sweet, sour, medicinal, pineapple, apple, melon, lemon, grapefruit, tangent and astringent
Yuzu essential oil(cold-pressed), 2010	rotten, heavy, dull, chemical, tangent, rubber, lemon, sour and pineapple

2008년도와 2010년도의 증류 방식으로 얻은 유자 정유는 짝싸래하면서도 달콤하고 고무 bottom note를 지니고 있었다. 그리고 2008년도 냉압착 유자 정유는 4가지 정유 중 가장 향기롭다고 생각되는 aroma profile이라고 평가되었다. 냉압착 유자 정유는 특히 가벼운 꽃향기와 시원한 사과, 레몬 향, 그리고 짝싸름한 bottom note를 갖는 특징이 있었다. 마지막으로 2010년도 냉압착 유자 정유는 가장 비호감의 향을 갖고 있었다. 대체적으로 짙은 음식의 향과 같은 sour 향과 묵직한 고무향을 맡을 수 있었다.

### (3) 부향성분의 동정:

유자 Essential Oil의 관능 특성을 향상시킬 수 있는 부향성분을 관능평가를 통하여 동정함. 유자 Essential Oil의 관능평가를 통해 유자 Essential Oil의 관능적 특성을 향상 시킬 수 있는 부향성분은 Citral / Linanool / Tymol / Nonanal등의 성분이 확인되었다. 부향성분 중 천연 Citral과 Linanool은 Citrus oil의 생산과정 중 부산물로 공급되어 상대적으로 가격이 저렴하여 Flavor House가 쉽게 사용할 수 있어 Biotransformation에 의한 생산 공정의 개발이 필요하지

않아 시장에 판매되고 있지 않은 천연 Thymol과 Nonanal의 Biotransformation공정 개발을 위한 특성평가를 실시하였다.

**(4) Thymol과 Nonanal 첨가 시 유자 향미 프로파일 변화:**

유자의 중요한 유효성분으로 알려진 Citral, Linalool, Thymol 중 유자 정유의 질적 향상을 위한 미생물 생물전환 공정을 위해 생산될 target compound의 선정을 위해 시장 조사를 통해 가격 경쟁력을 비교하였다(표 2-11). 강한 과일향 또는 꽃향을 부여하기 위하여 Flavors와 Perfume의 소재로 많이 사용되는 Nonanal을 추가로 평가에 사용하였다. Citral과 Linalool은 Natural 또는 Synthetic 사이의 가격 편차가 크지 않고 상대적으로 저렴한 반면, Thymol과 Nonanal은 단지 Synthetic만이 시장에 판매되고 있으며 가격 경쟁력 또한 우수하다. 따라서 본 연구에서는 Nonanal과 Thymol을 유자 정유에 첨가하여 관능적 특성 변화를 비교하였다.

**표 2-11. 유자 key compounds의 가격 경쟁력 비교**

unit: dollar(\$)

Compounds	Price (per kg)
Linalool Natural (Synthetic)	33 (33)
Citral Natural (Synthetic)	43 (33)
Thymol Synthetic	48
Nonanal synthetic	45

*Sigma Aldrich Flavors and Fragrances 2003-2004*

**(5) Tymol과 Nonanal에 의한 유자 Essential Oil의 관능적 특성의 향상:**

Thymol을 첨가한 시료는 전반적으로 thymol 고유의 탄내가 top-note에 강했으나, middle-note에는 신내와 꽃향 그리고 단내가 났다. 그러나 농도가 높아질수록 thymol 고유의 탄내로 인해 약냄새를 포함한 화학적 냄새가 두드러지게 나타났다(표 2-12). Nonanal의 경우, top-note에 신내와 꽃향 그리고 비누향이 났으며 middle-note에는 뚝은 느낌을 주고 나무향이 났으며 bottom-note에는 곰팡이향이 났다. 농도가 증가함에 따라 꽃향과 신냄새가 증가하였으나, 0.005%부터 인위적이고 화학적인 느낌을 주었다(표 2-12). 이러한 결과로 보아, 소량의 thymol은 middle-note에서 그리고 nonanal의 경우는 top-note에서 유자 고유의 신내와 꽃향 단내를 부가하여 유자향의 지속성을 높여 줄 것이라 기대된다(그림 2-11). 따라서 thymol과 nonanal을 미생물 생물전환에 의해 천연 합성하여 유자 정유에 첨가한다면 현재 보다 부가가치가 높은 천연 향료제품으로 개발이 가능하다. 뿐만 아니라, 현재 synthetic에 의존하는 thymol과 nonanal 시장에 천연 향료로서의 경쟁력과 기호성(상품성)이 있다.

표 2-12. 0.1%(v/v) 유자 착즙액 base에 Thymol의 첨가에 따른 Flavor Profile 변화

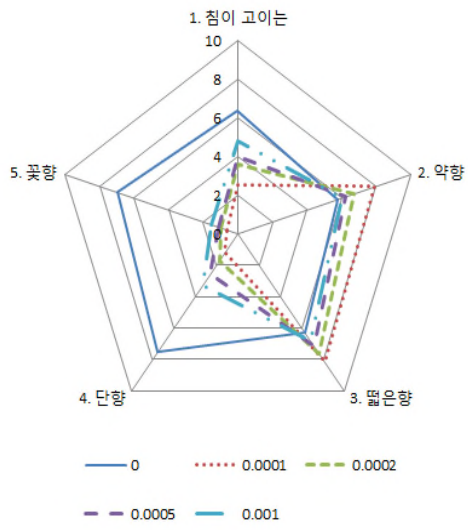
Thymol Conc. (% , v/v)	0.0001	0.002	0.005	0.01
Descriptive Profile	1. 탄	1. 휘발유향	1. 휘발유향	1. 툽 쏘는
	2. 스모키 향	2. 툽 쏘는	2. 툽 쏘는	2. 휘발유향
	3. 휘발유 향	3. 고무의	3. 고무의	3. 고무의
	4. 툽 쏘는	4. 아스팔트	4. 아스팔트	4. 아스팔트
	5. 고무의	5. 탄	5. 탄	5. 화학적인
	6. 신	6. 인위적인	6. 신	6. 약의
	7. 나무의	7. 약의	7. 단	7. 신
	8. 꽃향의	8. 신선한 황의	8. 약의	8. 단
	9. 단	9. 신	9. 쓴	9. 쓴
	10. 박스향의	10. 꽃향, 향수의	10. 화학적인	10. 신선한 황의
	11. 과피의	11. 쓴	11. 나무의	11. 꽃향
	12. 짧은	12. 화학적인	12. 에테르향	12. 나무의
	13. 약의	13. 잔디향의	13. 과피유	13. 에테르향의
	14. 화학적인	14. 나무의	14. 짧은	14. 과피유
	15. 에테르향의	15. 박스향의	15. 침이 고이는	15. 접은 과피유
	16. 알코올	16. 단	16. 신선한 황의	16. 잔디향의
	17. 과피유	17. 과피의	17. 꽃향	17. 인위적인
	18. 인위적인	18. 과피유	18. 발효향의	18. 짧은
	19. 짙은	19. 접은 과피유	19. 짙은	19. 발효향의
	20. 곰팡이향의	20. 알코올의	20. 박스향의	20. 꿀향의
	21. 쓴	21. 에테르향의	21. 잔디향의	21. 카레멜향의
	22. 꿀향의	22. 짧은	22. 인위적인	22. 즙이 많은
	23. 카라멜향의	23. 약한	23. 나무의	23. 감초
	24. 잔디향의		24. 씨앗의	
	25. 씨앗의		25. 약한	
	26. 약한			
	27. 침이 고이는			

표 2-13 0.1%(v/v) 유자 착즙액 base에 Nonanal의 첨가에 따른 Flavor Profile 변화

Nonanal Conc. (% v/v)	0.0001	0.002	0.005	0.01
Descriptive Profile	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 인위적인</li> <li>2. 잔디의</li> <li>3. 신선한 황의</li> <li>4. 비누의</li> <li>5. 침이 고이는</li> <li>6. 단</li> <li>7. 과피유</li> <li>8. 짙은 과피유</li> <li>9. 과피의</li> <li>10. 뚝은</li> <li>11. 신</li> <li>12. 곰팡이향의</li> <li>13. 나무의</li> <li>14. 꽃향의</li> <li>15. 화학적인</li> <li>16. 쓴</li> <li>17. 약의</li> <li>18. 박스향의</li> <li>19. 알코올의</li> <li>20. 에테르향의</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 신</li> <li>2. 비누의</li> <li>3. 인위적인</li> <li>4. 신선한 황의</li> <li>5. 뚝은</li> <li>6. 단</li> <li>7. 짙은 과피유</li> <li>8. 과피의</li> <li>9. 즙이 많은</li> <li>10. 꽃향</li> <li>11. 잔디의</li> <li>12. 나무의</li> <li>13. 지면의</li> <li>14. 화학적인</li> <li>15. 박스향의</li> <li>16. 에테르향의</li> <li>17. 약의</li> <li>18. 곰팡이향의</li> <li>19. 버터향의</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 꽃향</li> <li>2. 비누의</li> <li>3. 신</li> <li>4. 나무의</li> <li>5. 침이 고이는</li> <li>6. 단</li> <li>7. 화학적인</li> <li>8. 인위적인</li> <li>9. 신선한</li> <li>10. 신선한 황의</li> <li>11. 과피유</li> <li>12. 과피의</li> <li>13. 뚝은</li> <li>14. 쇠의</li> <li>15. 약한</li> <li>16. 지면의</li> <li>17. 에테르향의</li> <li>18. 박스향의</li> <li>19. 곰팡이향의</li> <li>20. 버터향의</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 신</li> <li>2. 비누의</li> <li>3. 꽃향</li> <li>4. 단</li> <li>5. 뚝은</li> <li>6. 인위적인</li> <li>7. 화학적인</li> <li>8. 과피의</li> <li>9. 신선한</li> <li>10. 잔디의</li> <li>11. 박스향의</li> <li>12. 버터향의</li> </ol>



a) Thymol 첨가



b) Nonanal 첨가

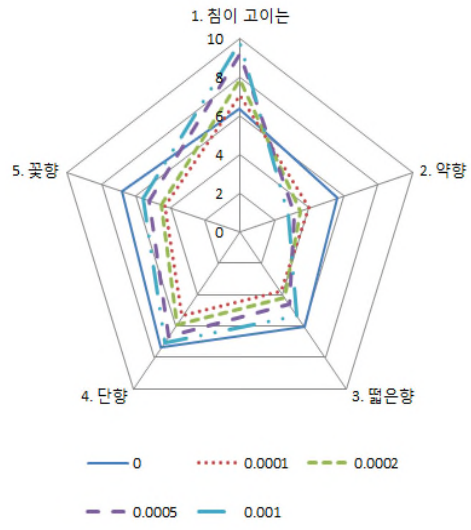


그림 2-11. Thymol과 Nonanal 첨가시 유자 향미 프로파일 변화

### 3. 유자 정유 부향 향기성분의 천연합성을 위한 생물전환기술(Biotransformation) 개발

#### 가. 서론

기존에 보고된 자료와 유자 essential oil의 관능평가를 통해, 유자 essential oil의 관능적 특성을 영향을 주는 부향 성분으로 Citral / Limanool / Tymol / Nonanal 등을 확인하였다. 부향성분 중 천연 Citral과 Linanool은 Citrus oil에 많이 함유된 성분 중 하나로, 시장에서 비교적 저렴한 가격에 판매되고 있어, 천연향료로 시장에서 판매되고 있지 않는 Thymol과 Nonanal을 중심으로 Biotransformation 공정 개발을 실시하였다. Thymol은 Citral과 limonene을 backbone으로 생합성되는 flavor compound이다(그림 2-12).

Nonanal은 유자 정유의 중요한 impact chemical의 하나로 계절 및 수확년도에 따라 Nonanal의 함량의 차이가 있어, 정유의 품질에 영향을 미치는 성분이다. 따라서 천연 Nonanal 생합성을 위한 microbial biotransformation process로 개발한다면 유자 정유의 품질 표준화와 유자 정유 flavor profile을 향상하는데 중요한 Chemical이다. 특히 천연 Nonanal은 상대적으로 정유내 함량이 적어, 상업적으로 천연 Nonanal을 생산하는건 제한적이다. 이에 따라 상대적으로 가격이 낮으며 상업적으로 판매가 가능한 천연 Nonanol을 미생물을 이용하여 생산한다면 상업적인 가치가 클 것으로 판단된다.

일반적으로 Alcohol을 이용하여 Acid를 생성하는 oxido-reductase는 Gluconobacter / Acetobacter sp.에서 알려져 있으나, oxido-reductase는 alcohol dehydrogenase 및 aldehyde dehydrogenase activity를 동시에 가지고 있는 것으로 추정되고 있어 alcohol oxidation의 중간생성물인 aldehyde의 축적이 제한되고 있다. 또한 중간 생성물인 aldehyde는 상대적으로 alcohol 및 acid보다도 독성이 많은 것으로 알려져있어, aldehyde 생산공정의 microbial biotransformation 개발은 상대적으로 어려움이 있다(그림 2-13)(독성; Acid < Alcohol < Aldehyde)

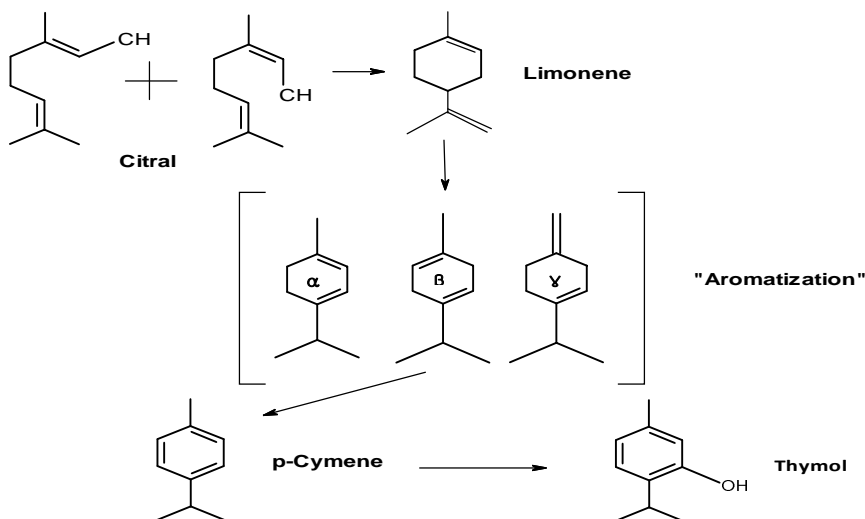


그림 2-12. Citral과 limonene이 thymol로 전환되는 chemical pathway

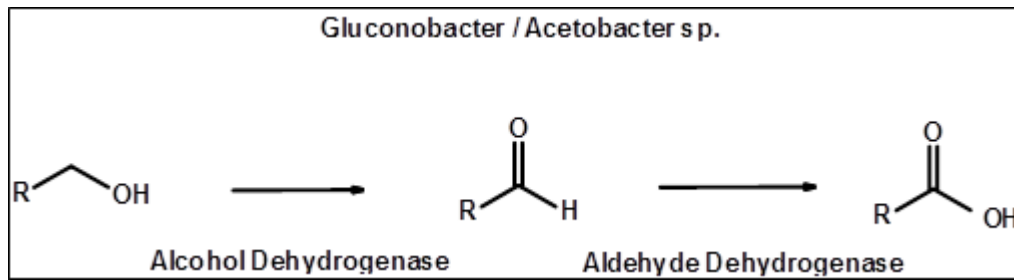


그림 2-13. Nonaol이 Nonanal로 전환되는 chemical pathway

#### 나. 연구개발의 내용 및 방법

##### (1) Limonene/citral을 기질로 Impact chemical Microbial Biotransformation 공정 개발

###### (가) 생물공정에 사용할 미생물 균주 선발:

총 83종의 *Pseudomonas*, *Gluconobacter*, *Acetobacter* 종 중 growing medium에 자라지 않은 4 종을 제외한 79 종을 13 세트로 나눠 균주 선발에 사용하였다(빨간색 표시된 미생물임, 표 2-14 & 15). Cryovial에 담겨져서 보관되었던 *Pseudomonas* sp.를  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에서 꺼내 얼음이 담긴 용기에서 천천히 해동되었다. 해동된 후, Nutrient Agar(Nutrient broth: acumedia, Michigan, USA; Agar powder: Showa Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)에 일회용 백금이를 이용해 도말 평판법으로 접종하였다. 접종된 Nutrient Agar plate는 shaking incubator(KSI-200L, Koencon, 하남시, 대한민국)를 이용해  $26^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 pre-culture 하였다. Nutrient Agar에 배양된 균의 colony는 각각 500ml flask에 담긴 100ml의 Nutrient Broth(acumedia, USA)에 옮겨졌다. 배양된 균은 각각 두개의 500mL flask에 담긴 100mL의 screening medium(yeast extract 1.0g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0g/L, NaCl 0.25g/L,  $\text{MgCl}_2$  0.25g/L & 50% glucose 1.0mL/100mL)에 옮겨졌다. 그리고 24시간  $26^{\circ}\text{C}$ 에서 배양되었다.

*Gluconobacter*와 *Acetobacter* sp.의 growing medium은 yeast extract (1.0 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (1.5g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (1.5g/L),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.25g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.0g/L), NaCl(0.25g/L), 그리고 glucose(0.5g/100mL)을 screening medium은 glycerol (25 g/L) and yeast extract (10 g/L)을 사용해 만들었다. Screening medium은  $\text{H}_2\text{SO}_4$  을 이용해 pH를 5.0으로 맞추었다.

표 2-14. Limonene/Citral Biotransformation을 위한 균주 선별에 사용한 첫 번째 미생물 목록

	1 <sup>st</sup> set	2 <sup>nd</sup> set	3 <sup>rd</sup> set	4 <sup>th</sup> set	5 <sup>th</sup> set
1	<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973, NRRL B-25	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 795	<i>Pseudomonas Stutzeri</i> KCTC 22466	<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 2406	<i>Pseudomonas Abikonensis</i> KCTC 2864*
2	<i>Pseudomonas putida</i> KCTC 2198	<i>Pseudomonas</i> sp. KCTC 2407	<i>Pseudomonas</i> sp. KCTC 2697	<i>Pseudomonas kilonensis</i> KCTC 12937	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 12842
3	<i>Ochrobactrum anthropic</i> (재분류된 <i>Pseudomonas</i> sp.) ATCC 19286	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 14150	<i>Pseudomonas</i> sp. KCTC 2482	<i>Pseudomonas</i> sp. KCTC 1452	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2450
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 17513	<i>Pseudomonas putida</i> KCTC 1134	<i>Pseudomonas</i> sp. KCTC 2523	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> ATCC 35792	
5	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> ATCC 17415	<i>Pseudomonas chloroaphis</i> ATCC 17811	<i>Pseudomonas mephitica</i> ATCC 33665	KCTC 1067	
6	<i>Pseudomonas synomtha</i> ATCC 9890, NRRL B-780	<i>Pseudomonas putida</i> KCTC 1768	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 11253 NRRL B-1244	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 11172	
7	<i>Pseudomonas migula</i> ATCC 17926	<i>Pseudomonas</i> sp. KCTC 2404	<i>Pseudomonas chloroaphis</i> NRRL B-2075 ATCC 17813	<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 12282	
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 4683	<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC 25416	<i>Pseudomonas</i> sp. KCTC 2403	<i>Pseudomonas</i> sp. KCTC 12301	
9	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KFRI 00194		<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 11496		
10	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC 13985				

표 2-15. Limonene/Citral Biotransformation을 위한 균주 선별에 사용한 미생물 목록

	6 <sup>th</sup> set	7 <sup>th</sup> set	8 <sup>th</sup> set	9 <sup>th</sup> set	10 <sup>th</sup> set	11 <sup>th</sup> set	12 <sup>th</sup> set
1	<i>Pseudomonas chloroaphis</i> ATCC 9446	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> ATCC 13985	<i>Pseudomonas testosteroni</i> ATCC 11996	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 795	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835	<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 23652	<i>Pseudomonas cruciviae</i> ATCC 21283
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NRRL B-2994	<i>Pseudomonas chloroaphis</i> ATCC 17414	<i>Pseudomonas Septica</i> ATCC 14545	<i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 23377	<i>Pseudomonas reptiovora</i> NRRL B-1098	<i>Acetobacter pasteurianus</i> ATCC 23746	<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC 55792
3		<i>Pseudomonas papaveris</i> ATCC 13041	<i>Pseudomonas chloroaphis</i> ATCC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 4683	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9721	<i>Gluconobacter</i> sp, ATCC 7831	<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 23652
4		<i>Pseudomonas syringaipvaceris</i> ATCC 10853		<i>Pseudomonas migula</i> ATCC 17926	<i>Pseudomonas reptiovora</i> ATCC 11252	<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 23773	<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 23777
5		<i>Burkholderia cepacia</i> ( <i>Pseudomonas multivorans</i> ) ATCC 17460		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17434		<i>Gluconobacter cerinus</i> ATCC 19441	<i>Gluconobacter</i> sp. ATCC 43983
6		<i>Pseudomonas chloraphi</i> ATCC 17411		<i>Pseudomonas citronellolis</i> ATCC 13674		<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 14960	<i>Gluconobacter rubiginosus</i> IFO 3244
7				<i>Pseudomonas diminuta</i> ATCC 4335		<i>Gluconobacter melanogenus</i> IFO 3294	<i>Acetobacter pasteurianus</i> ATCC 23746
8				<i>Pseudomonas chloroaphis</i> ATCC 17814		<i>Gluconobacter frateurii</i> IFO 3264	<i>Acetobacter pasteurianus</i> ATCC 7839
9				<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 9004		<i>Gluconobacter oxydans</i> IFO 3293	<i>Acetobacter pasteurianus</i> ATCC 9432
10				<i>Pseudomonas chloroaphis</i> ATCC 9446		<i>Gluconobacter dioxyaceticus</i> s IFO 3272	<i>Acetobacter acetii</i> ATCC 15973

**(나) 미생물의 천연합성을 위한 최적 공정 조건:**

Limonene/citral의 biotransformation screening 단계에서 선출한 21종의 균들의 공정 조건 중 효율적인 생물전환을 위한 기질의 농도를 알아보았다. 우선 screening 단계에서 만들어 둔 미생물 stock을 -80°C 냉동고에서 꺼내 얼음이 담긴 용기에서 천천히 해동한 후 growing medium에 접종하여 shaking incubator를 이용해 26°C에서 24시간 배양한 후 새로운 growing medium에 1 mL 옮기고 24시간 배양하였다. 그 다음 growing medium의 1 mL를 flask 2개에 담긴 screening media 에 각각 접종 하였다(2 가지 기질에서 모두 생물전환을 보인 2가지 미생물은 4개의 screening media에 접종 하였다). 24 시간 배양 후, 각 미생물 마다 생물전환을 보인 기질 citral 혹은 limonene을 0.2 mL/100 mL 와 0.8 mL/100 mL를 넣고 24 시간 배양하였다. 그런 후 screening media 전체를 separatory funnel에 담아 100 mL ethyl acetate(EA)를 넣어 잘 섞어준 후 upper layer 는 screw cap 유리 용기에 담고 lower layer는 다시 separatory funnel에 담아 50 mL EA를 넣어 섞은 후 또 다시 upper layer는 유리 용기에 담는 과정을 한번 더 하였다. 그리고 Eyela Rotary Vacuum Evaporator N-1000SW, Digital water bath SB-1000, 그리고 aspirator A-3S (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 EA를 증발시켰다. EA를 증발시키고 남은 샘플은 insert가 담긴 screw cap vial에 넣어 GC와 GC-MS 분석에 사용되었다(표 2-16, 17).

**(다) 천연합성된 물질의 Gas Chromatography 분석:**

24시간 배양 후, screening media가 담긴 flask 2개에 각각 (R)-(+)-Limonene (Sigma-Aldrich, New York, USA) 혹은 Citral(주식회사 켐코스, 용인시, 대한민국)을 0.2mL/100mL 넣고 24시간 배양하였다. 배양 후, 각 flask에서 2mL를 vial에 샘플링한 후, 1mL Ethyl acetate와 30% HCl 1방울을 넣어주고 vortexing 해주었다. 5분후 상등액 1mL 싹 microtube에 옮기고 원심분리기(ependorf 5415c, ependorf, USA)를 이용해 8000 rpm으로 10분 처리해 주었다. Microtube의 상등액은 insert를 넣은 screw cap vial에 옮겼다(0 hr). 시료는 배양 0시간, 24시간 시료를 준비하여 비교 분석하였다. Screw cap vial에 담긴 시료는 DS 6200 Gas Chromatograph(Donam Instruments Inc., 성남시, 대한민국)를 이용해 autosampler로 분석하였다.

**표 2-16. GC 분석조건<sup>a</sup>**

DS 6200 Gas Chromatograph, Donam Instruments Inc.					
Column	Stationary phase	Oven temperature	Injector Temp.	Detector Temp.	Sampling method
Stabilwax	Polyethylene glycol (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm, Restek)	80°C-5°C /min-200°C (6 min)	220°C	240°C	1μl Direct injection

<sup>a</sup>carrier gas, 99.999% He (1 mL/min); splitless

표 2-17. GC-MS<sup>a</sup> operation conditions at Aromaline Co., Ltd.

7890A/5975C, Agilent Technologies					
Column	Stationary phase	Oven temperature program	Injector Temp.	Detector Temp.	Sampling method
DB-WAX	Polyethylene glycol (30 m x 0.25 mm x 0.25 $\mu$ m, Agilent)	45°C-3°C/min-100°C (2 min)-3°C/min-17 5°C(2 min)-3°C /min-246°C(2 min)	250°C	280°C	1 $\mu$ l Direct injection

**(라) Flavor Profile Analysis 및 관능평가를 통한 천연 유자 정유 Creation :**

미생물을 이용해 만들어진 6-methyl-5-hepten-2-one, carveol, 그리고 carvone을 유자 정유에 첨가했을 시 최적 향미 향상 효과를 내는 혼합비율을 알아보았다. 가장 우수한 aroma 품질을 갖고 있는 증류 유자 정유 2012를 증류수 10 mL에 10 uL 넣은 후 1 uL의 물질을 첨가하여 잘 섞어주어 0.01% 농도의 유자 정유 향료를 만들었다. 훈련된 패널 12명에게 시료를 perfumer's stick에 묻혀 코를 가까이(일정 거리를 유지)하며 3~4회 일정 속도로 짧게 들이마시며 느껴지는 5가지 향미 특성의 강도를 aroma evaluation sheet에 표시하여 평가하였다.

**(2) Nonanal 생산 위한 Microbial biotransformation 개발**

**(가) Microorganism screening for biotransformation of Nonanol to Nonanal:**

세종대학교 생물자원공학연구소 미생물 Culture collection 중, oxido-reductase를 가지고 있는 18 종의 Gluconoabcter / Acetobactor sp.를 중심으로 Nonanol을 nonanal로 생물전환을 할 수 있는 미생물을 screen하였다. 냉동고 보관(-80°C) Stock culture는 Glucono/acetobacter Medium (Peptone 3.0g/l, Yeast Extract 5.0g/l, Glucose 20g/l, CaCO3 10g/l)에서 접종하여 25°C에서 24hr 배양하였다. 배양된 culture는 100 ml의 screening medium (25 g/l Glycerol, 10 g/l Yeast extract, pH 5.0 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)에 접종하여(1-2% inoculum) 25°C에서 24hr 배양하였다.

**(나) GC Analysis:**

Biotransformation 후, nonanol 및 nonanal을 함유하고 있는 Neobee oil 층을 회수한 후, 동일한 부피의 ethyl acetate를 이용하여 nonanol 및 nonanal을 회수하여 GC 분석에 사용하였다. Screw cap vial에 담긴 시료는 DS 6200 Gas Chromatograph(Donam Instruments Inc., 성남 시, 대한민국)를 이용해 autosampler로 분석하였다 (참조: GC analysis section).

표 2-18. GC분석 조건\*

Oven temperature	70℃
Det temperature	220℃
Inj temperature	220℃
Ramp	5℃
Final temperature	200℃
Final time	10분
Range	0
Total time	36분

\*Nonanol, Nonanal, Nonanoic acid와 Ethanol, Acetaldehyde, Acetic acid를 분석시

**(다) Gluconobacter cerinus ATCC23777균주를 이용한 고효성 Alcohol Dehydrogenase 돌연변이 균주 선발:**

G. cerinus ATCC23777의 순수분리를 위한 희석배수를 찾기 위하여 YG Broth(Yeast Extract 10.0g/L, Glycerin 25.0g/L, adjust pH 5.0 with 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 멸균 후 CaCO<sub>3</sub> 10g/L)에 접종시켜 25℃, 150rpm, 24시간 배양시켰다. 그 후 10의 8승까지 희석시켜 YG Agar배지(Yeast extract 10.0g/L, CaCO<sub>3</sub> 20.0g/L, Agar 15g/L, 멸균 후 Ethanol 20g/L)에 접종하여 25℃에서 24시간 배양하였고, 콜로니 수가 30~300개 되는 희석배수를 찾았다.

YG 평판배지에 접종한 G. cerinus ATCC23777의 돌연변이를 만들기 위하여 YG Broth에 25℃에서 150rpm, 24시간 배양 후 YG Agar배지에 알맞은 희석배수로 균주를 Spreading하였다. 그 후 2개의 균으로 나누어 각각 1분과 2분씩 UV를 조사하여 25℃에서 3~4일 배양하였다. Control(G. cerinus ATCC23777)과 콜로니 크기를 대비, Clearing zone이 넓은 것과 작은 것을 선별하였다. 선별된 돌연변이 콜로니를 YG Broth에 접종하여 25℃에서 24시간 배양 후 Glycerin 10%를 넣어 Clyovial에 넣어 영하 70~80℃의 냉동고에 보관하였다.

**(라) Nonanal 생합성을 위한 Fermentation :**

균주 1% 100ml Broth에 접종하여, 25℃, 150rpm으로 24시간 배양한 후, 다시 한 번 100ml Broth에 균주 1% 접종하여 같은 조건에서 24시간 배양하였다. 멸균 된 1,000ml 발효기에 균주 1% 접종하여 [25℃, 0.075v/v/m, 500rpm (impeller diameter: 20mm)] 24시간 후 OD값(660nm)과 pH값 측정하였다. 배양 후 O.D값 (660nm)과 pH값을 측정하여 O.D값이 1/10배 희석 시 0.3, pH값이 4.4±0.05이 될 때 잘 섞인 Nonanol 100ml와 Neobee oil 100ml을 천천히 넣어주었다. Nonanol 주입 후 배양 조건은 표 2-12와같이 변화시켜 주었고, 주입과 동시에 시간별로 1ml의 샘플을 취하여 GC로 분석하였다. Oil로 인하여 Sample에 서로 다른 함량의 Nonanol, Nonanal의 양으로 있을 것으로 간주하여 Sample 안에 있는 각각의 함량을 Area%로 비교하였다. 분석에 필요한 샘플링이 끝나고 (20-24 시간 후) Polymerization 방지를 위해 25% NaOH로 pH 7.5로 조정해주었다. 후에 Oil을 회수하였고 각각의 회수한 Oil 1ml를 Ethyl Acetate 1ml로 추출하여 Gas chromatography 분석하였다.



표 2-19. 발효기에서의 배양 조건

Temperature	25℃
Aeration	0.075v/v/m
Agitation	500rpm (impeller diameter: 20mm)
Duration	24시간

표 2-20. Nonanol 주입 후 발효기 조건

Temperature	25℃
Aeration	0.2v/v/m
Agitation	80rpm (impeller diameter: 20mm)
Duration	20-24시간

**(마) *Gluconobacter cerinus* ATCC23777 균주의 Alcohol Dehydrogenase(ADH)와 Aldehyde Dehydrogenase(ALDH)의 활성 분석:**

*G.cerinus* ATCC23777의 Alcohol Dehydrogenase와 Aldehyde Dehydrogenase의 활성 위치를 알기 위하여 먼저 균주를 YG Broth에 접종하여 25℃, 150rpm으로 24시간 배양하고, CaCO<sub>3</sub>를 제외한 YG Broth에 같은 조건으로 배양하였다. 그리고 Whole Cell, Culture medium, Cell (with 50mM Na-Phosphate Buffer pH6.0), Sonication 후 상등액과 하등액으로 나누어 실험을 진행하였다. 각각의 실험군에 에탄올(20.0g/L)을 주입하고 일정한 시간마다 Gas Chromatography를 이용하여 아세트 알데하이드와 아세트산의 값을 측정하여 각각의 결과와 비교하였다.

**(바) *Gluconobacter cerinus* ATCC23777과 JH4, JH S3의 Alcohol Dehydrogenase (ADH)와 Aldehyde Dehydrogenase(ALDH)의 활성 비교:**

3개의 균주를 YG Broth에 접종하여 25℃, 150rpm으로 24시간 배양하고, CaCO<sub>3</sub>를 제외한 YG Broth에 같은 조건으로 배양한다. 각 배양액을 Whole Cell과 Culture Medium으로 나누어 에탄올(20.0g/L)을 주입하였고 일정 시간마다 Gas Chromatography를 이용하여 아세트 알데하이드와 아세트산의 값을 측정하여 세 균주의 ADH와 ALDH의 활성을 비교하였다.

**다. 연구결과 및 고찰**

**(1) Limonene/citral을 기질로 Impact chemical Microbial Biotransformation 공정 개발**

**(가) limonene/citral을 기질로 활용하는 미생물 균주 선발:**

GC 분석 결과, 10개의 균종에서 citral을 사용했을 때 10개의 균주에서, limonene을 사용했을 때 9개의 균주에서 피크 변화를 보였으며 2개의 균종은 citral과 limonene 모두 피크 변화를 보였다(표 2-21). *Pseudomonas* 종은 8개와 6개가 각각 citral 혹은 limonene을 전환시켰으며 특히 2개 균주가 citral과 limonene을 모두 전환시킬 수 있었다. *Gluconobacter* 종은 2개와 3개가 각각 citral 혹은 limonene을 전환할 수 있는 능력을 보였다. GC chromatogram에서 citral은 18분과 19분대에서 각각 peak 하나씩, 총 2개 나오고 limonene은 7분대에서 peak가 하나 보이는

결 알 수 있었다. 그러나 *Pseudomonas* 혹은 *Gluconobacter* 균종을 접종하고 24시간 후 다시 GC 분석을 해보았을 때 위에 나와 있는 21종이 각각 citral/limonene 혹은 두가지 모두 생물전환에 의해 새로운 물질이 형성되어 Citral 혹은 Limonene의 peak 이외의 다른 peak(s)가 검출된 것을 확인할 수 있었다.

표 2-21. Microbial Transformability of Limonene/Citral

	M/O Species	Citral Transformability	Limonene Transformability
1	<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973, NRRL B-25	✓	
2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC 13985	✓	
3	<i>Pseudomonas putida</i> KCTC 2198	✓	
4	<i>Burkholderia cepacia</i> ( <i>Pseudomonas multivorans</i> ) ATCC 17460	✓	
5	<i>Pseudomonas syringa</i> <i>pv</i> <i>aceris</i> ATCC 10853	✓	
6	<i>Pseudomonas septica</i> ATCC 14545	✓	
7	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ATCC 17434	✓	
8	<i>Pseudomonas diminuta</i> ATCC 4335	✓	
9	<i>Gluconobacter oxydans</i> IFO 3293	✓	
10	<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 23777	✓	
11	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 14150		✓
12	<i>Pseudomonas kilonensis</i> KCTC 12937		✓
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NRRL B-2994		✓
14	<i>Pseudomonas chloroaphis</i> ATCC 17414		✓
15	<i>Pseudomonas chloroaphis</i> ATCC 17810		✓
16	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 9004		✓

17	<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 23652		✓
18	<i>Gluconobacter frateurii</i> IFO 3264		✓
19	<i>Gluconobacter cerinus</i> ATCC 19441		✓
20	<i>Pseudomonas chloraphis</i> ATCC 17411	✓	✓
21	<i>Pseudomonas testosteroni</i> ATCC 11996	✓	✓

(나) 천연합성된 물질의 GC-MS분석:

GC 분석을 통해 두 가지 기질 농도에서의 미생물의 생물전환 능력을 확인해 본 결과 *Pseudomonas Putida* KCTC 2198이 800 uL에서, *Pseudomonas septica* ATCC 14545가 800 uL에서, 그리고 *Pseudomonas diminuta*가 200, 800 uL에서 peak 변화를 보이지 않았다. 이는 기질 200 uL의 전환은 가능하나 800 uL가 첨가됐을시 미생물에게 toxic한 농도가 되어 생물전환이 불가능했던 것이라 추측된다. 나머지 42가지 샘플(표 2-22)의 GC-MS 분석을 통해서 각 미생물이 citral 혹은 limonene을 이용해 생성해낸 물질이 무엇인지 확인해보았다.

표 2-22. Samples used for GC-MS analysis

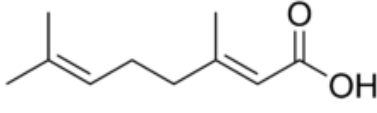
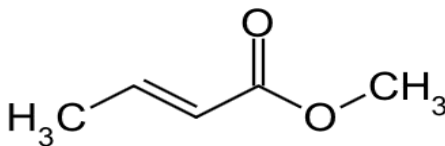
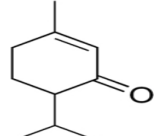
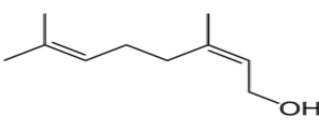
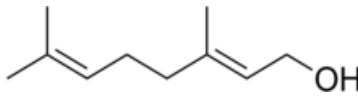
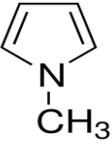
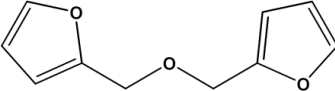
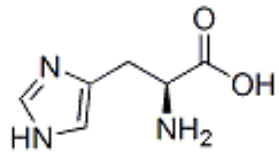
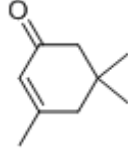
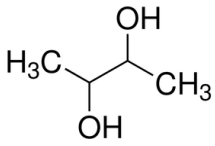
	M/O Species	Citral	Limonene	Aromaline Identification
1	ATCC 4973	200		Aroma 140303
2		800		Aroma 140303_1
3	ATCC 13985	200		Aroma 140304
4		800		Aroma 140304_1
5	KCTC 2198	200		Aroma 140305
		X		
6	ATCC17460	200		Aroma 140306
7		800		Aroma 140306_1
8	ATCC 10853	200		Aroma 140307
		X		
9	ATCC 14545	200		Aroma 140308
10		800		Aroma 140308_1
11	ATCC 17434	200		Aroma 140309
12		800		Aroma 140309_1
	ATCC 4335	X	X	
		X	X	
13	IFO 3293	200		Aroma 140310
14		800		Aroma 140310_1
15	ATCC 23777	200		Aroma 140311
16		800		Aroma 140311_1
17	ATCC 14150		200	Aroma 140312
18			800	Aroma 140312_1
19	KCTC 12937		200	Aroma 140313
20			800	Aroma 140313_1
21	NRRL B-2994		200	Aroma 140314

22			800	Aroma 140314_1
23	ATCC 17414		200	Aroma 140315
24			800	Aroma 140315_1
25	ATCC 17810		200	Aroma 140316
26			800	Aroma 140316_1
27	ATCC 9004		200	Aroma 140317
28			800	Aroma 140317_1
29	ATCC 23652		200	Aroma 140318
30			800	Aroma 140318_1
31	IFO 3264		200	Aroma 140319
32			800	Aroma 140319_1
33	ATCC 199441		200	Aroma 140320
34			800	Aroma 140320_1
35	ATCC 17411	200		Aroma 140321
36		800		Aroma 140321_1
37			200	Aroma 140321_2
38			800	Aroma 140321_3
39	ATCC 11996	200		Aroma 140322
40		800		Aroma 140322_1
41			200	Aroma 140322_2
42			800	Aroma 140322_3

**(다) 천연합성된 물질의 GC-MS 분석:**

기질을 넣고 24시간 배양된 샘플을 GC-MS를 통해 분석한 결과 200 uL 혹은 800 uL의 기질을 사용해 다음과 같은 합성 물질과 합성된 양을(area %) 얻을 수 있었다. citral을 사용했을 때 area %가 1을 넘는 물질이 26개(같은 retention time을 갖는 부분이 5군데), 그리고 limonene을 사용했을 때 area %가 1을 넘는 물질이 10개(같은 retention time을 갖는 부분이 1군데) 있었다. 표 2-23과 24에 각각 citral과 limonene을 사용했을 시 합성된 물질의 구조와 aroma 특성이 설명되어 있다. 각 물질의 area %는 해당되는 물질의 가장 큰 area % 수치를 나타낸 것이다. 즉, 물질이 한 미생물에서만 나오면 그 때의 area %를, 물질이 2 미생물 이상에서 합성되었으면 그 중 가장 큰 area %를 적은 것이다. Thymol은 선택된 21가지 미생물을 기질 citral 과/혹은 limonene을 이용했을 시 합성되지 않은 것으로 확인되었다. Yuzu essential oil의 aroma에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 6-methyl-5-hepten-2-ol의 ketone 물질인 6-methyl-5-hepten-2-one의 생산량이 많은 편이고 thymol의 aroma인 herbal, sweet의 특징을 갖고 여러 미생물을 통해 상대적으로 많은 양을 생산해 낼 수 있는 carveol과 carveone을 yuzu essential oil에 첨가하여 impact compound로서의 가능성을 확인하였다.

Table 2-23. Chemical structure and aroma characteristics of citral biotransformation compounds with area % above 1

Chemical Name	Chemical Structure	Area %	Aroma Characteristics
Geranic acid or Methyl Crotonate		37.06	Mild, green-floral, and woody
			Powerful, sharp, and green-fruity
Piperitone		26.00	Powerful, minty, fresh and camphoraceous.
Nerol		20.37	Rosy, refreshing, sweet, and "wet" seashore
Geraniol		7.78	Sweet, mild, warm and slightly dry, floral Rose.
1-Methyl pyrrole		6.41	Woody, smoky
Difurfuryl ether(3337)		5.49	None
1-Histidine(3694)		4.54	None
Isophorone(3553)		4.50	Cooling, woody, sweet, and fruity
2,3-Butanediol		3.47	Creamy, buttery, and fruity

p-Menth-1-ene-9-al (3178)		3.43	Spicy and herbal
Citronellol(2309)		2.98	Fresh rosy and sweet
Pentyl 2-furyl ketone(3418)		2.98	Sweet, fruity, green, and waxy
3-Hexanol(3351)		2.89	Alcoholic, medicinal, and ethereal
6-Methyl-5-hepten-2-one(2707)		2.87	Citrus, green, musty, lemongrass, and apple
Methyl 2-methyl-2-propenoate(4002) or Methyl crotonate		2.65	Acrylic, aromatic, and fruity
			Powerful, sharp, and green-fruity
2-Methyl-2-pentenal(3194)		1.79	Pungent, fruity, juicy, and ripe
2-Ethyl-5-methyl furan(9328) or 1,8-Octanedithiol(3514) or Pentyl 2-furyl ketone(3418)		1.71	None
			Sulfurous, meaty, and mushroom
			Sweet, fruity, green, and waxy

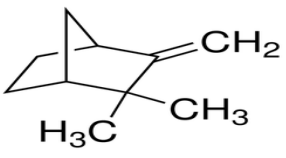
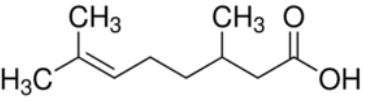
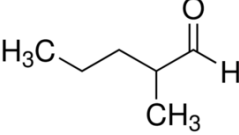
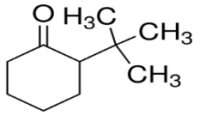
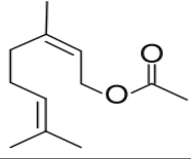
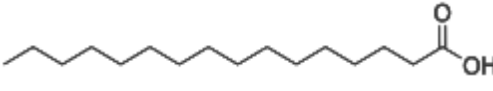
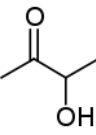
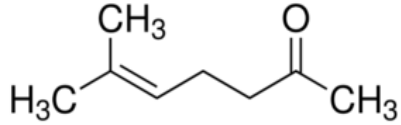
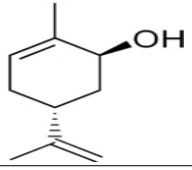
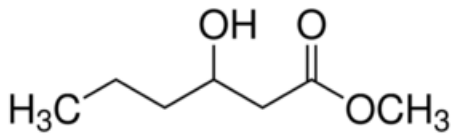
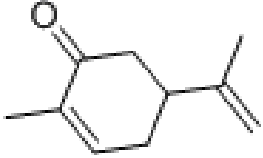
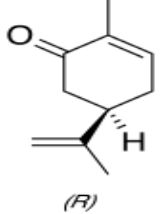
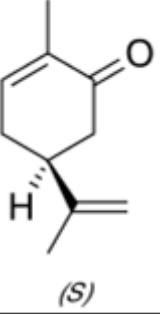
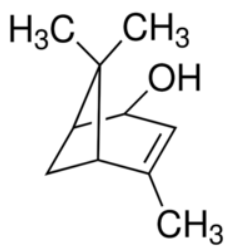
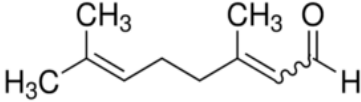
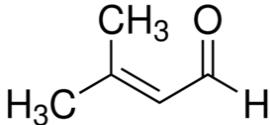

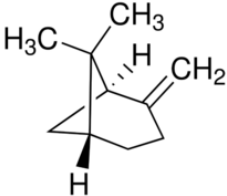
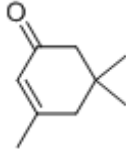
Camphene(2229)		1.57	Woody, herbal, and fir needle
3,7-Dimethyl-6-octenoic acid(3142)		1.56	Fatty, smoky, and cheesy
2-Undecanone(3093) or 2-Methyl pentanal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$	1.40	Waxy, fatty, and fruity
			Ethereal, fruity, and green
2-tert-Butyl cyclohexanone		1.28	Woody and camphor
Neryl acetate(2773)		1.26	Floral, rosy, sweet, soapy, and citrus
Palmitic acid(2832)		1.19	Heavy, waxy, creamy, and fatty
Acetoin(2008)		1.16	Sweet, buttery, creamy, dairy, milky, and fatty
2-Pentadecanone or Methyl decyl ketone	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$	1.07	fresh Jasmin and celery
	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$		Fruity, citrus, and floral

Table 2-24. Chemical structure and aroma characteristics of limonene biotransformation compounds with area % above 1

Chemical Name	Chemical Structure	Area %	Aroma Characteristics
6-Methyl-5-hepten-2-one(2707)		29.62	Citrus, green, musty, lemongrass, and apple
Carveol		13.34	Herbaceous and minty
Methyl-3-hydroxyhexanoate(3508)		8.65	Sweet, woody, overripe, and fruity
Carvone(2249); l-Carvone or d-Carvone		8.51	Minty and licorice
			Minty, sweet, spearmint, and herbal
			Spicy, bread, and caraway
Verbenol(3594)		3.43	Fresh pine
Citral(2303)		2.18	Lemon



			
3-Methyl-2-butenal (3646)		1.95	Cherry
p-Mentha-1,8-dien-7-ol (2664)		1.68	Green, linalool, terpineol and fatty
Beta-Pinene(2903)		1.24	Dry, woody, pine, and green
Isophorone(3553)		1.24	Cooling, woody, sweet, and fruity

(라) 유자 정유의 impact chemical로 사용된 합성 물질:

표 2-24, 25, 26에 각각 6-methyl-5-hepten-2-one, carveol, 그리고 carveone을 area %를 기준으로 21가지 미생물 중 가장 많이 생산한 미생물에서 가장 적게 생산하는 순서대로 나열하였다. Area %를 기준으로 한 순서이기 때문에 기질을 200 uL 넣었을 시 해당되는 물질을 가장 많이 생산한 미생물이 가장 효율적인 생물전환을 했다고 해석될 수도 있다. 6-methyl-5-hepten-2-one은 ATCC 1199에 limonene 800 uL를, carveol은 ATCC 17810에 limonene 200 uL를 사용했을 시 carveone은 KCTC 12937에 limonene 800 uL를 사용했을 시 각각 가장 높은 생산율인 29.62%, 13.34%, 그리고 8.51%(area %)를 나타내는 것을 알 수 있었다. 따라서 유자 정유의 impact chemical인 3가지 물질을 가장 많이 혹은 효율적으로 생산한 미생물을 대상으로 fermentor를 이용해 생물전환 상업적 공정을 개발이 가능할 것으로 생각된다(그림 2-13, 14).

Table 2-25. Amount of 6-Methyl-5-hepten-2-one produced in area % from most to least

Strain Identification	Amount of Citral/Limonene added ( $\mu$ l)	Area % of 6-Methyl-5-hepten-2-one produced
ATCC 11996	Lim 800	29.62
KCTC 12937	Lim 200	23.11
ATCC 14150	Lim 200	19.23
IFO 3264	Lim 800	18.82
ATCC 17414	Lim 200	17.3
ATCC 23652	Lim 200	9.3
NRRL B-2994	Lim 200	8.69
ATCC 17810	Lim 200	8.22
ATCC 17411	Lim 200	7.71
ATCC 17810	Lim 800	6.51
ATCC 11996	Lim 200	6.48
NRRL B-2994	Lim 800	5.33
ATCC 17411	Lim 800	4.94
IFO 3293	Cit 200	2.87
ATCC 23652	Lim 800	2.59
IFO 3264	Lim 200	2.58
ATCC 9004	Lim 800	2.57
ATCC 17414	Lim 800	2.16
ATCC 23777	Cit 800	1.09
ATCC 23777	Cit 200	1.03
ATCC 11996	Cit 200	0.57
ATCC 11996	Cit 800	0.31
ATCC 4973	Cit 800	0.29
ATCC 17460	Cit 200	0.15
KCTC 2198	Cit 200	0.09
IFO 3293	Cit 800	0.08
ATCC 17460	Cit 800	0.06

Table 2-26. Amount of Carveol produced in area % from most to least

Strain Identification	Amount of Citral/Limonene added ( $\mu\text{l}$ )	Area % of Carveol Produced
ATCC 17810	Lim 200	13.34
ATCC 14150	Lim 800	12.54
ATCC 9004	Lim 200	10.01
ATCC 17414	Lim 200	9.73
NRRL B-2994	Lim 200	8.97
KCTC 12937	Lim 200	7.86
KCTC 12937	Lim 800	6.50
NRRL B-2994	Lim 800	6.48
ATCC 14150	Lim 200	6.11
ATCC 11996	Lim 800	5.27
IFO 3264	Lim 800	5.20
ATCC 23652	Lim 800	4.38
ATCC 19441	Lim 800	4.32
ATCC 17411	Lim 200	4.25
ATCC 23652	Lim 200	3.01
ATCC 17411	Lim 800	2.65
ATCC 17414	Lim 800	2.53
ATCC 17810	Lim 800	2.50
ATCC 11996	Lim 200	2.47
ATCC 9004	Lim 800	2.26
IFO 3264	Lim 200	2.15
ATCC 19441	Lim 200	1.56

표 2-27. Amount of carvone produced in area % from most to least

Strain Identification	Amount of Citral/Limonene added ( $\mu\text{l}$ )	Area % of Carvone produced
KCTC 12937	Lim 800	8.51
ATCC 14150	Lim 800	6.68
KCTC 12937	Lim 200	5.59
ATCC 14150	Lim 200	5.51
NRRL B-2994	Lim 800	3.90
ATCC 19441	Lim 800	3.90
ATCC 17810	Lim 800	2.88
ATCC 17411	Lim 800	2.65
NRRL B-2994	Lim 200	2.62
IFO 3264	Lim 200	2.50
ATCC 9004	Lim 800	2.36
IFO 3264	Lim 800	1.81
ATCC 23652	Lim 200	1.58
ATCC 17414	Lim 800	1.44
ATCC 23652	Lim 800	1.37
ATCC 11996	Lim 800	0.60
ATCC 11996	Lim 200	0.58

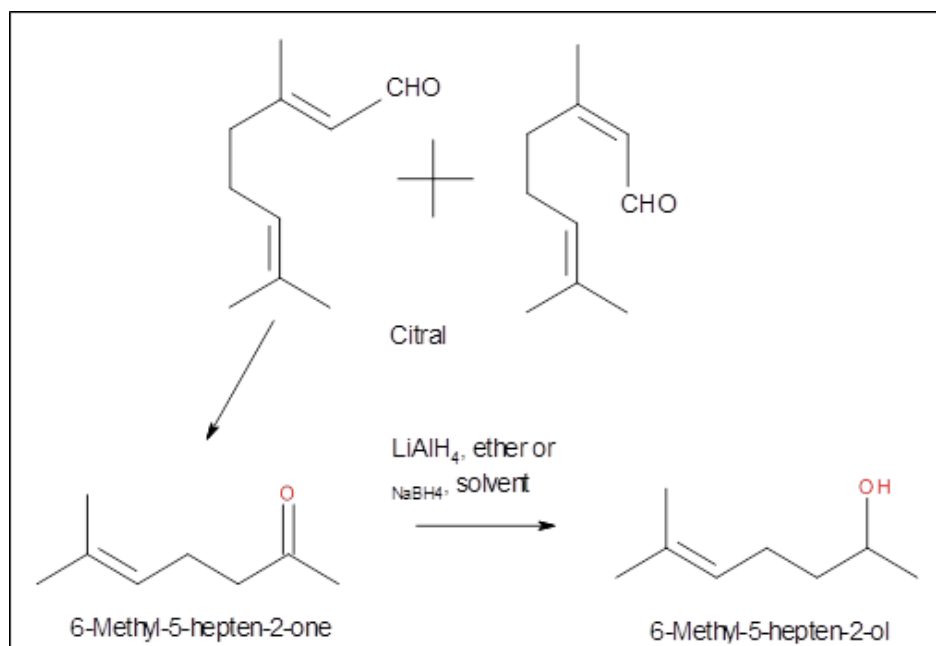


그림 2-14. Chemical pathway from citral to 6-methyl-5-hepten-2-one and 6-methyl-5-hepten-2-ol

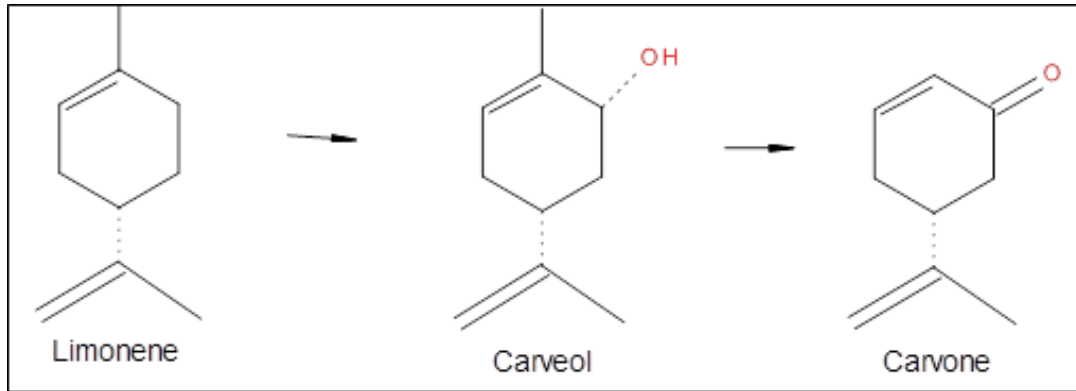


그림 2-15. Chemical pathway from limonene to carveol and carvone

**(마) Flavor Profile Analysis 및 관능평가를 통한 천연 유자 정유 Creation:**

미생물을 이용해 만들어진 6-methyl-5-hepten-2-one, carveol, 그리고 carvone을 유자 정유에 첨가했을 시 최적 향미 향상 효과를 내는 혼합비율을 알아보았다. 각 물질의 aroma 특징은 표 2-64에 나와 있다. 훈련된 패널 12명에게 시료를 perfumer's stick에 묻혀 코를 가까이(일정 거리를 유지)하며 3~4회 일정 속도로 짧게 들이마시며 느껴지는 5가지 향미 특성의 강도를 평가하였다. 또한 0.01%의 유자 정유 flavoring도 시음해보았다. 입에 머금은 후 감지되는 향을 taste evaluation sheet에 표시하였다. 더불어 최적 농도를 찾기 위해 더 낮은 농도인 0.001%와 0.005%에서도 aroma 와 taste를 평가해보았다.

표 2-28. 유자 정유의 flavor enhancer로 사용 된 물질의 aroma 특징

Compound name	Aroma description
Thymol	Phenol, medicinal, woody, and spicy
Nonanal	Citrus, floral, rose, orange, oily, and cucumber
6-methyl-5-hepten-2-ol <sup>a</sup>	Sweet, oily, green and coriander
6-methyl-5-hepten-2-one	Fruity, apple, musty, creamy, and banana
Carveol	Herbaceous, and minty
Carvone	Minty, licorice, and herbal

<sup>a</sup>유자 정유 향에 major contributor라고 알려진 물질. 이 물질의 Ketone 물질인 6-methyl-5-hepten-2-one이 flavor enhancer로 사용되었다.

관능평가 결과 0.01% 농도에서 향에선 같은 수의 패널들이 (4:4) carvone과 carveol이 들어간 유자 flavoring을 유자 정유 보다 더 호감이 간다고 표시하였다. 특히 carvone이 들어간 유자 flavoring은 sweetness가 강해지고 floral과 juiciness는 control 보다 약간 더 높아졌으며 약 향과 짙은 향이 더 강해진 것을 알 수 있었다 (그림 2-16). 맛 평가에서는 0.01%에서는 향료 물질의 향이 너무 진해 유자 특유의 향이 가려지는 경향이 있어 더 낮은 농도인 0.001%와 0.005%에서 실험을 진행하였다. 그림 2-16에서 보여 지는바와 같이, 향료 물질이 더해진

flavoring이 5가지 특성에서 control에 비해 두드러진 차이를 보였다. 특히 6-methyl-5-hepten-2-one은 control보다 깊고 무거운 맛을 갖고 있어 floral과 juiciness 면에서는 수치가 낮게 나왔다는 것을 알 수 있었다. 0.001%와 0.005%에서 실행된 taste 평가에서는 0.001%의 carvone 과 carveol이 4:3으로 가장 높은 호감도를 보였다. Base로 쓰여진 유자 정유의 달콤하고 fruity한 향에 minty하고 fresh한 향이 더해져 synergistic 효과를 보인 것으로 평가되었다(그림 2-28). 이 두가지 농도에서는 호감가는 flavor를 만들어 내지 못했으나 다른 농도, 특히 더 낮은 농도에서는 6-methyl-5-hepten-2-one의 바나나와 달콤한 과일 향이 짧은 지속성을 갖은 유자 정유의 fruity하고 floral 한 aroma profile의 향상 효과를 이끌어 낼 것으로 생각된다. 따라서 microbial biotransformation을 통해 얻을 수 있는 nonanal, 6-methyl-5-hepten-2-one, carveol과 carvone은 유자 정유에 첨가되었을 시 각각의 flavor characteristics를 부가해 유자 정유의 aroma의 표준화 및 quality를 향상시킬 수 있을 것으로 예상된다. 향후에는 6-methyl-5-hepten-2-one, carveol과 carvone의 생산에 대한 생물전환 공정 개발에 대한 후속 연구가 필요한 것으로 생각된다.

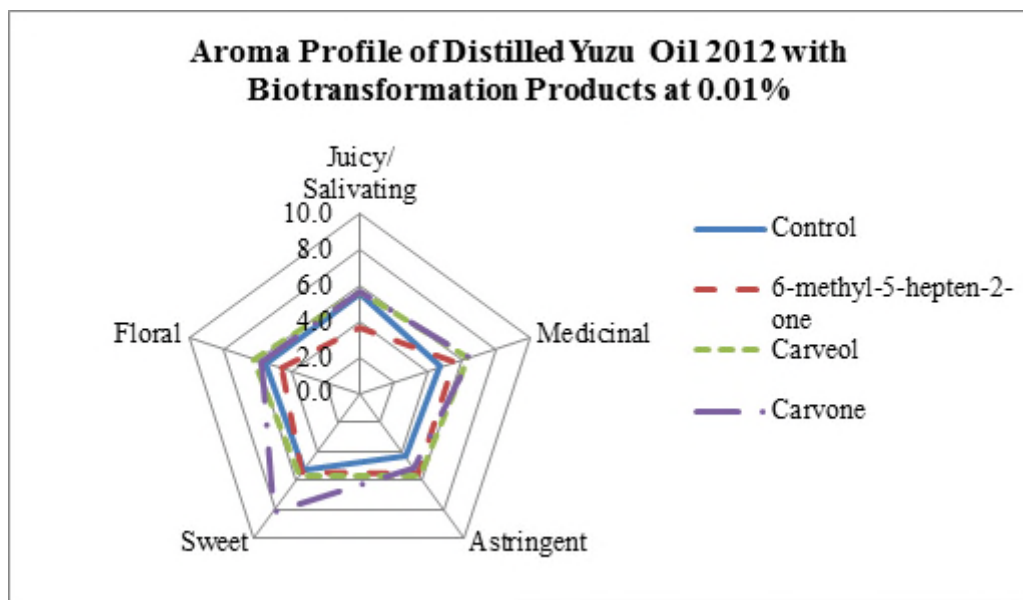


그림 2-16. Aroma profile of distilled yuzu oil 2012 with added biotransformation products at 0.01%

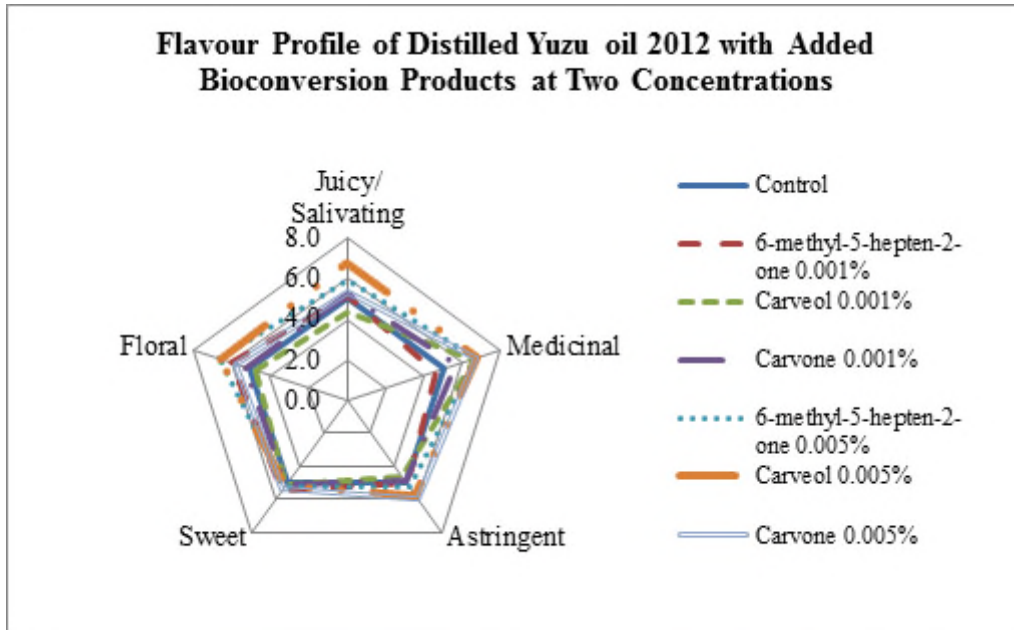


그림 2-17. Flavor profile of distilled yuzu oil 2012 with added biotransformation products at two concentrations

## (2) 유자 Impact Chemical “Nonanal” Microbial biotransformation Process

### (가) Nonanal 생성 균주의 선별:

Nonanal 생성을 위한 Microbial Biotransformation 공정 개발을 위하여 세종대학교 생물공정 연구소 보관 중인 총 18종의 *Glucono/acetobacter* sp.의 culture를 사용하여 Nonanal 생성을 확인하였다. 이중 *Gluconobacter cerinus* ATCC 23777 균주만이 Screening process 중 GC 분석 중 확인 가능한 nonanal을 생성하였다.

### (나) Mutagenesis of *G. cerinus* ATCC 23777 :

기존의 *Glucono/Acetobacter* sp. 균주는 acid형성을 중심으로 선발되었으며, aldehyde의 독성에 따라 aldehyde의 축적이 제한되어 nonanal생성을 위한 microbial biotransformation 공정 개발에 사용할 *G. cerinus* ATCC 23777 균주를 UV로 이용한 돌연변이를 통해서 Mutant을 선별하였다. 24 hr 배양한 *G. cerinus* ATCC 23777 culture를 UV처리한 후, 각각의 플레이트에서 배양시켰다. 희석배수를 10의 4승과 5승으로 하였으며 *G.cerinus* ATCC23777보다 상대적으로 Clearing zone이 작은 콜로니 4개를 선별하여 그림 2-12과 같이 각각 JH1(Acid-), JH2(Acid-), JH3(Acid-), JH4(Acid-), JH5(Acid-)로 명명하였다. 또한 Clearing zone이 큰 콜로니 4개를 선별하여 그림 2-17같이 각각 JH S1(Acid+), JH S2(Acid+), JH S3(Acid+), JH S4(Acid+)로 명명하였다.

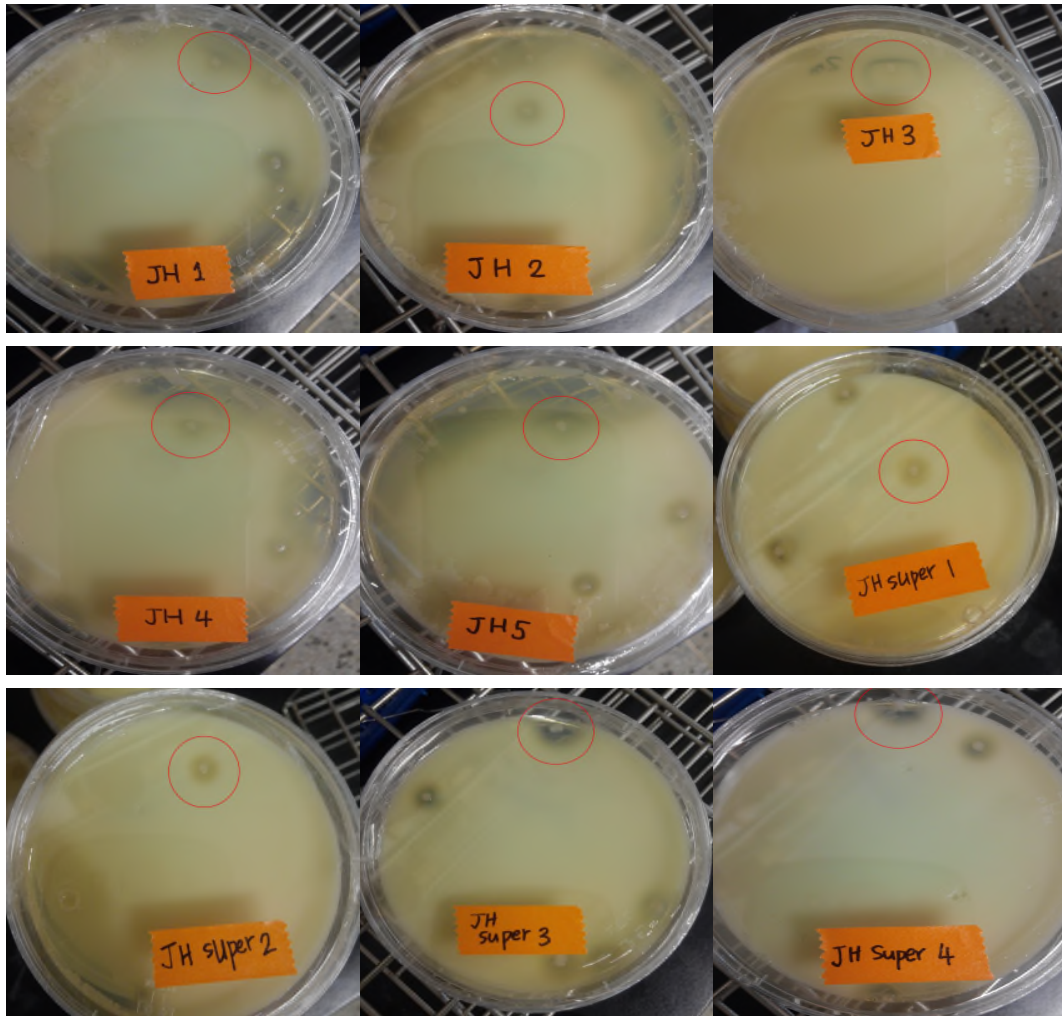


그림 2-18. UV조사 후 배양 된 돌연변이 균주

선별 된 각 균주의 콜로니를 YG Broth에 25℃, 150rpm, 24시간 배양하여 figure3.과 같이 YG Agar배지에 10의 8승까지의 희석배수로 Spreading하여 25℃, 150rpm, 24시간 배양, 콜로니와 Clearing zone의 모양을 관찰하였다.(그림2-18).



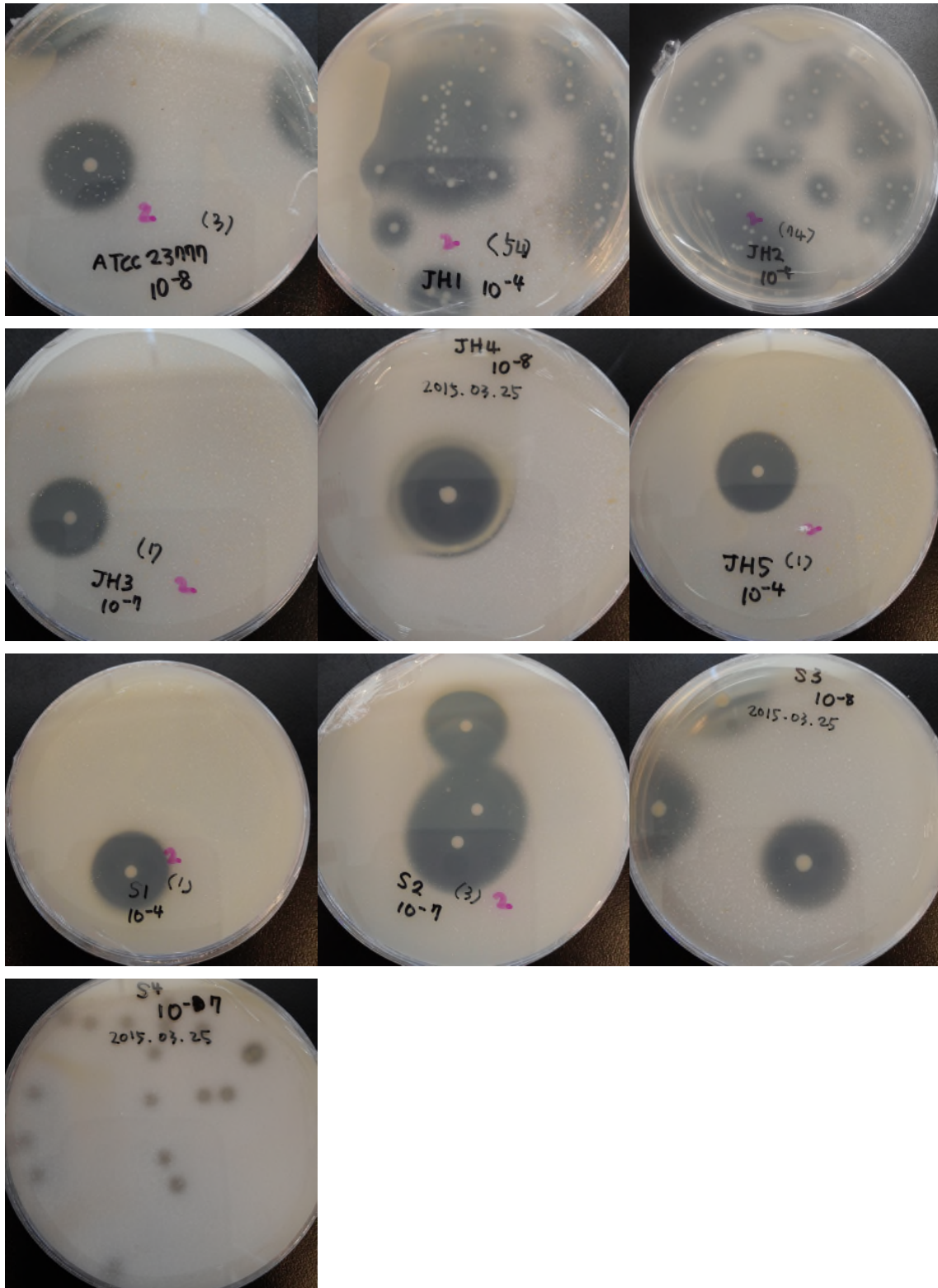


그림2-19. *Gluconobacter* ATCC23777 mutant의 clear zone

(다) *G.cerinus* ATCC23777과 돌연변이 균주의 생육 특성과 Ethanol 산화 특성조사:  
 Nonanol로부터 *Gluconobacter*를 이용하여 효율적인 Nonanal 생산을 하기 위하여 *Gluconobacter cerinus* ATCC23777의 돌연변이를 일으켜 기존의 ATCC23777과 비교, 효소의 특성을 규명하였다.

배양한 *G. cerinus* ATCC23777와 UV를 통한 돌연변이 균주를 만들어 Ethanol을 주입, Gas chromatography를 이용하여 Aldehyde와 Acid 형태의 산화된 양을 Area%로 나타내어 Alcohol과 Aldehyde dehydrogenase 활성을 비교하였다. Aldehyde의 형태인 Nonanal을 효율적으로 얻기 위해 Alcohol dehydrogenase의 활성이 높고 Aldehyde dehydrogenase의 활성이 낮은 균주를 관찰하였다. *G.cerinus* ATCC23777과 돌연변이 균주에 Ethanol 1%를 넣어주어 0시간, 5시간, 10시간, 24시간으로 나누어 균주의 특성 O.D (66nm, Spectrophotometer)와 pH (pH meter), Ethanol, Acetaldehyde와 Acetic acid의 양을 Gas chromatography를 이용하여 측정하였다(표 2-29~2-37). 각 균주의 Clear zone의 모습과 표 2-16에서 표 2-24까지의 데이터를 통하여 얻은 Acetaldehyde의 생산량 등을 조합, 비교하여 최종적으로 JH4,와 JH S3를 선발하였다.

**표 2-29. *G.cerinus* ATCC23777의 O.D값, pH, Ethanol, Acetaldehyde, Acetic acid**

	0시간	5시간	10시간	24시간
OD	0.165	0.202	0.204	0.206
pH	4.40	4.26	4.10	3.87
Ethanol	7,278,983	5,616,153	4,453,253	238,854
Acetaldehyde	0	584,307	1,014,824	1,964,246
acetic acid	0	233,429	378,848	1,008,432

**표 2-30. JH1의 O.D값, pH, Ethanol, Acetaldehyde, Acetic acid**

	0시간	5시간	10시간	24시간
OD	0.182	0.189	0.190	0.184
pH	4.23	4.02	3.97	3.74
Ethanol	7,051,247	5,933,800	4,147,132	1,410,965
Acetaldehyde	0	357,856	700,325	494,240
acetic acid	0	206,938	385,045	1,108,221

**표 2-31. JH2의 O.D값, pH, Ethanol, Acetaldehyde, Acetic acid**

	0시간	5시간	10시간	24시간
OD	0.150	0.180	0.184	0.189
pH	4.66	4.21	3.98	3.79
Ethanol	6,987,936	5,385,749	5,282,529	1,462,077
Acetaldehyde	0	0	394,947	130,821
acetic acid	0	266,703	588,193	1,458,570

**표 2-32. JH3의 O.D값, pH, Ethanol, Acetaldehyde, Acetic acid**

	0시간	5시간	10시간	24시간
OD	0.201	0.230	0.221	0.229
pH	4.28	4.11	3.98	3.79
Ethanol		6,330,990	5,163,348	1,045,578
Acetaldehyde		373,827	669,848	1,472,978
acetic acid		329,423	482,045	1,099,920

표 2-33. JH4의 O.D값, pH, Ethanol, Acetaldehyde, Acetic acid

	0시간	5시간	10시간	24시간
OD	0.171	0.191	0.183	0.175
pH	4.23	4.06	3.96	3.79
Ethanol	6,005,627	6,173,696	4,965,528	1,110,186
Acetaldehyde	193,479	323,773	768,305	1,409,387
acetic acid	503,282	183,123	334,648	840,052

표 2-34. JH S1의 O.D값, pH, Ethanol, Acetaldehyde, Acetic acid

	0시간	5시간	10시간	24시간
OD	0.160	0.157	0.156	0.169
pH	4.37		3.94	3.73
Ethanol		6,319,008	3,854,304	694,879
Acetaldehyde		572,898	682,540	1,626,254
acetic acid		259,512	437,501	994,344

표 2-35. JH S2의 O.D값, pH, Ethanol, Acetaldehyde, Acetic acid

	0시간	5시간	10시간	24시간
OD	0.170	0.185	0.174	0.174
pH	4.20	4.04	3.93	3.72
Ethanol	7,393,217	5,379,963	4,036,169	794,342
Acetaldehyde	0	501,579	669,302	1,295,071
acetic acid	0	183,962	332,414	956,754

표 2-36. JH S3의 O.D값, pH, Ethanol, Acetaldehyde, Acetic acid

	0시간	5시간	10시간	24시간
OD	0.168	0.177	0.191	0.194
pH	4.37	4.20	4.04	3.83
Ethanol	6,862,015	5,918,678	5,073,939	1,424,589
Acetaldehyde	0	268,075	478,156	1,034,791
acetic acid	0	209,268	403,489	884,177

표 2-37. JH S4의 O.D값, pH, Ethanol, Acetaldehyde, Acetic acid

	0시간	5시간	10시간	24시간
OD	0.199	0.201	0.211	0.214
pH	4.24	4.11	3.97	3.80
Ethanol		5,510,089	4,698,560	789,649
Acetaldehyde		141,912	197,471	912,288
acetic acid		398,176	427,107	887,818

(라) G.cerinus ATCC23777과 선발된 균주 JH4, JH S3를 이용한 Nonanal 생산:

YG Broth에 배양된 각 균주를 CaCO<sub>3</sub>를 제외한 1,000ml YG Broth를 발효기에서 배양하였고 G.cerinus ATCC23777(pH=4.40, O.D=0.412 1/10희석), JH(pH=4.20, O.D=0.404 1/10희석), JH S3(pH=3.95, O.D=0.452 1/10희석) 각 균주에 Nonanol과 Neobee oil을 함께 잘 섞은 후 천천히 넣어 주어 Nonanal과 Nonanoic acid의 함량을 표 2-38 부터 표 2-40, 그림 2-19부터 그림 2-21와 같이 48시간까지 측정하여 나타내었다.

G.cerinus ATCC23777과 JH4의 Alcohol dehydrogenase 활성 비교 시 JH4의 활성이 조금 낮게 나타나지만, 효율적인 Nonanol 생성에 반대하여 분해하는 Aldehyde dehydrogenase의 활성은 보다 낮은 것으로 나타났다. JH S3의 경우 Alcohol dehydrogenase와 Aldehyde dehydrogenase 모두 현저히 낮은 활성을 나타내기 때문에 G.cerinus ATCC23777과 JH4에 비해 비효율적인 성향을 나타내었다.

표 2-38. G.cerinus ATCC23777을 이용하여 48시간동안 Nonanol로부터 생산된 Nonanal과 Nonanoic acid의 Gas chromatography 값 (%Area)

[pH=4.45, O.D=0.389 (1/10 dilution)]

	Nonanol (%)	Nonanal (%)	Nonanoic acid (%)
0h	99		
2h	99.1	0.1	0.4
4h	98.6	0.2	0.8
6h	97.8	0.4	1.4
9h	96.6	0.9	2.2
20h	88.9	6.6	4.2
24h	87.8	7.8	4.1
30h	82.8	12.2	4.6
35h	82	13.1	4.7
45h	79.4	15.4	5
48h	79.5	15.1	5.4

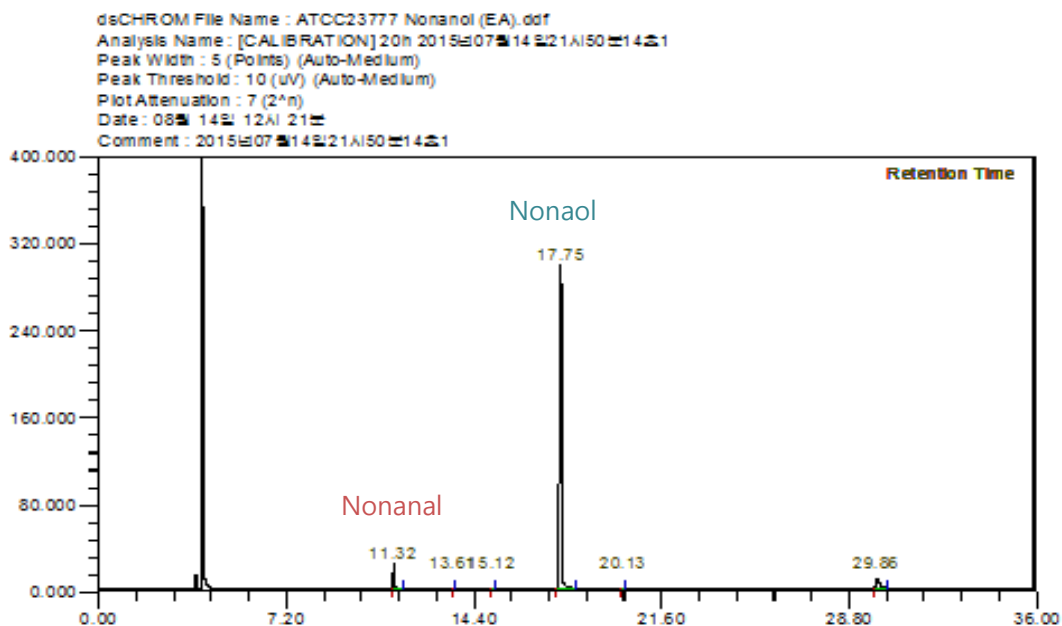


그림 2-20. G.cerinus ATCC23777을 이용하여 48시간동안 Nonanol로부터 생산된 Nonanal과 Nonanoic acid의 Gas chromatography 값

표 2-39. *Gluconobacter mutant JH4*을 이용하여 48시간동안 Nonanol로부터 생산된 Nonanal과 Nonanoic acid의 Gas chromatography 값 (%Area)

pH=4.26, O.D=0.380 (1/10 dilution)

	Nonanol (%)	Nonanal (%)	Nonanoic acid (%)
0h	99.1		
2h	99.1	0.1	0.5
4h	98.5	0.2	0.9
6h	98.3	0.3	1.1
9h	98	0.4	1.3
20h	94.4	2.6	2.6
24h	93.2	3.7	2.8
30h	91.3	5.5	2.8
35h	90.4	6.4	2.9
45h	86	11.1	2.7
48h	84.3	12.3	3.1

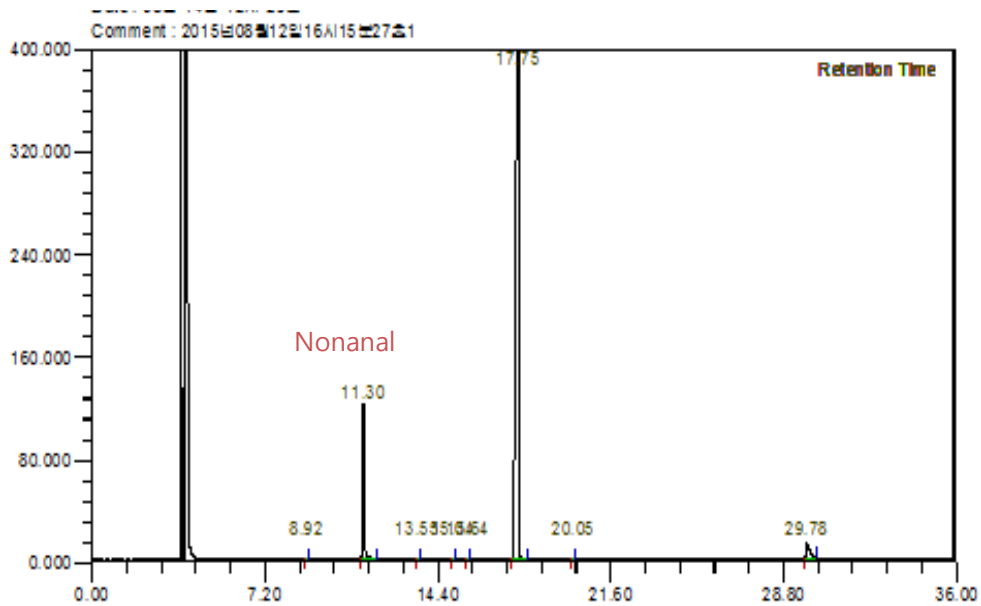


그림 2-21. *Gluconobacter mutant JH4*을 이용하여 48시간동안 Nonanol로부터 생산된 Nonanal과 Nonanoic acid의 Gas chromatography 값

표 2-40. *Gluconobacter mutant Super JH3*을 이용하여 48시간동안 Nonanol로부터 생산된 Nonanal과 Nonanoic acid의 Gas chromatography 값 (%Area)

[ pH=3.95 O.D=0.452 (1/10 dilution)]

	O.D=0.493		pH=4.22
	Nonanol	Nonanal	Nonanoic acid
0h	99.5		
2h	98.7	0.1	0.4
4h	98.7	0.2	0.7
6h	98.3	0.3	1
9h	97.5	0.3	1.8
20h	94.4	2.2	3
24h	94	2.4	3.2
30h	92.1	3.8	3.7
35h	90.8	4.9	3.9
45h	86.9	8.4	4.3
48h	86.2	8.9	4.6

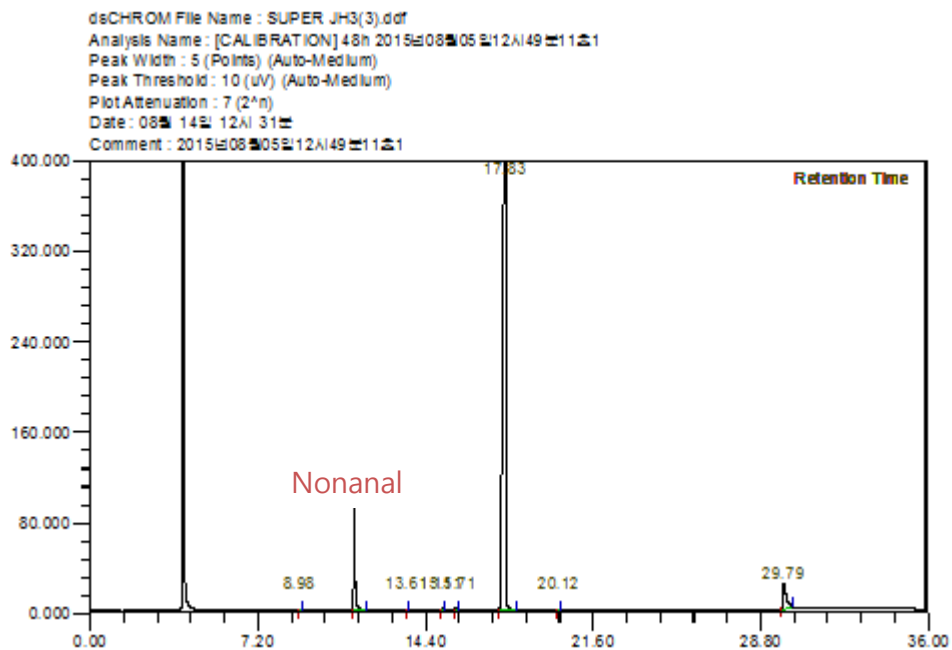


그림 2-22. *Gluconobacter mutant Super JH3*을 이용하여 48시간동안 Nonanol로부터 생산된 Nonanal과 Nonanoic acid의 Gas chromatography 값

결과적으로 Nonanal과 Nonanoic acid 모두 *G.cerinus* ATCC23777에서 가장 높은 함량의 수치를 보여주었다. 따라서 *G.cerinus* ATCC23777의 Nonanol로부터 Nonanal을 만드는 Alcohol Dehydrogenase와 Nonanal로부터 Nonanoic acid를 만드는 Aldehyde Dehydrogenase의 활성이 더 높은 것으로 나타났다. 발효가 끝나고 회수한 오일을 이용하여 최종적으로 Nonanol과 Nonanal, Nonanoic acid의 함량을 측정하여 표 2-40와 같이 나타내었다. 표 2-27와

같이 *G.cerinus* ATCC23777의 Nonanal 생산량이 가장 높게 나타났고, JH4의 Nonanal은 *G.cerinus* ATCC23777에 비해 살짝 낮은 수치를 나타냈으며, Nonanoic acid의 함량을 보아 Nonanal의 생산에 있어서 비효율적인 ALDH의 활성은 *G.cerinus* ATCC23777에 비해 상당히 낮은 활성을 보여줬다. JH S3는 ADH와 ALDH 모두 효율적인 활성도와는 거리가 멀게 나타났다.

표 2-41. 발효공정을 통해 Recovery oil에 함유된 Nonanal 함량

Recovery Oil 1ml with E.A 1ml			
	Nonanol (%)	Nonanal (%)	Nonanoic acid (%)
ATCC23777	78.8	15.4	5.4
JH4	83.7	14.2	1.8
JH S3	85.8	8.3	5

(마) *Gluconobacter cerinus* ATCC23777의 Alcohol Dehydrogenase(ADH)와 Aldehyde Dehydrogenase(ALDH)의 활성 위치 분석: *G.cerinus* ATCC23777의 ADH와 ALDH의 활성 위치를 알아보기 위하여 Whole Cell, Culture Medium, Cell, Sonication 후 상등액과 하등액에 각각 Ethanol을 넣어 Acetaldehyde와 Acetic acid를 측정하여 두 효소 ACDH와 ADDH의 활성을 나타내는 부분을 알아보았다(표 2-42).

표 2-42 *G. cerinus* ATCC23777의 위치별 ADH와 ALDH의 활성

Whole Cell			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	11,966,528	12,868	231,572
3h	11,725,999	483,816	350,694
6h	10,770,516	1,111,455	582,958
9h	9,559,314	1,611,052	656,240
12h	8,319,213	2,229,311	818,848
Culture Medium			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	17,109,576	27,958	221,063
3h	12,647,756	34,992	222,293
6h	14,163,638	54,726	145,982
9h	14,832,827	87,456	181,780
12h	15,079,677	72,418	265,185
Cell with Buffer			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	13,600,228	19,648	0
3h	13,532,230	62,023	0

6h	13,354,732	96,198	0
9h	12,619,646	158,753	0
12h	12,329,035	168,063	0
<b>Sonication 후 상등액</b>			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	12,978,932	12,408	0
3h	13,760,230	7,762	0
6h	11,754,951	14,514	0
9h	12,321,871	14,990	0
12h	14,034,070	16,563	0
<b>Sonication 후 하등액</b>			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	13,042,723	8,658	0
3h	13,561,708	25,875	0
6h	11,604,907	49,188	0
9h	12,417,919	75,646	0
12h	13,079,960	99,456	0

\*Ethanol을 주입하여 Acetaldehyde와 Acetic acid로 산화로 측정된 양

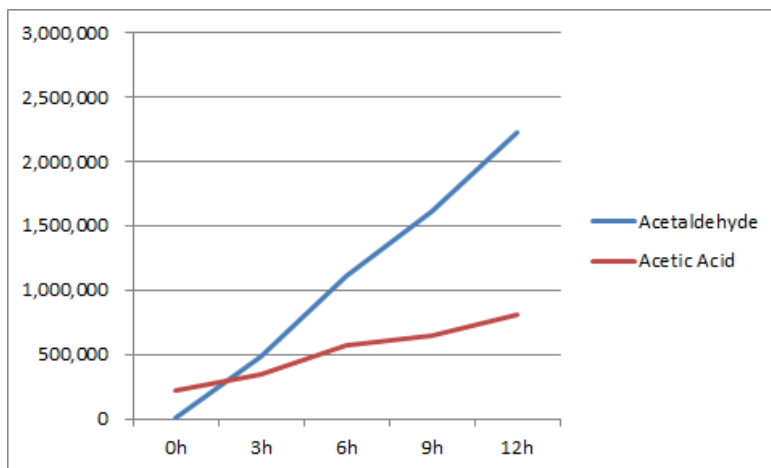


그림 2-23. *G.cerinus* ATCC23777의 Whole Cell을 이용한 에탄올로부터 생성된 아세트알데히드와 아세트산의 시간에 따른 GC 값



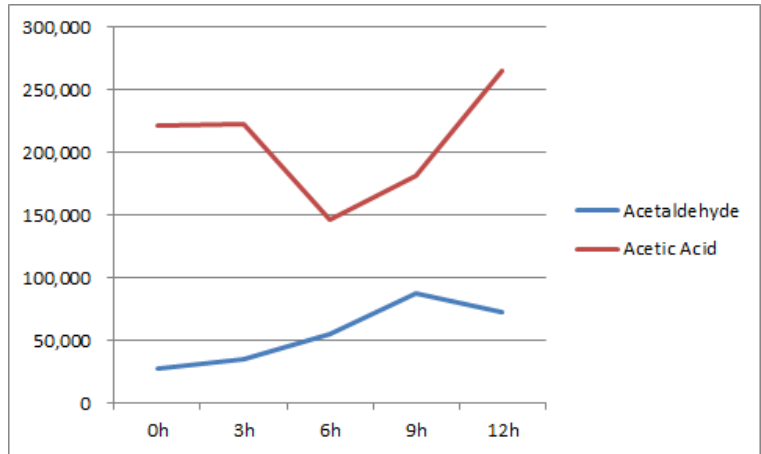


그림 2-24. *G.cerinus* ATCC23777의 Culture Medium 을 이용한 에탄올로부터 생성된 아세트알데히드와 아세트산의 시간에 따른 GC 값

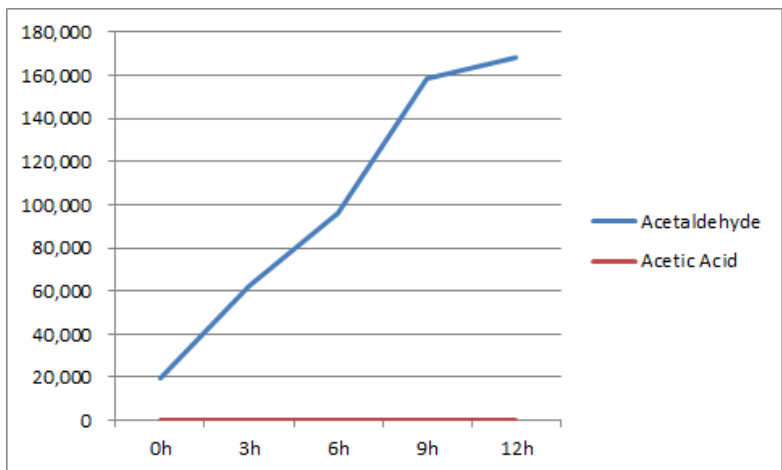


그림 2-25. *G.cerinus* ATCC23777의 Cell with Buffer 을 이용한 에탄올로부터 생성된 아세트알데히드와 아세트산의 시간에 따른 GC 값

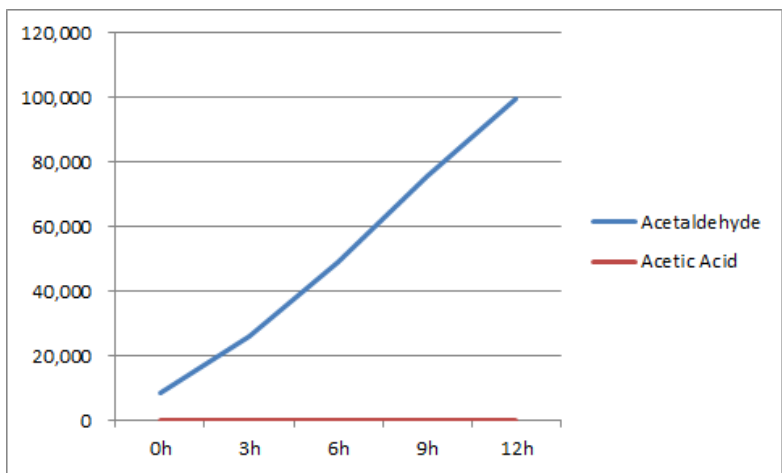


그림 2-26. *G.cerinus* ATCC23777의 Sonication 후 상등액을 이용한 에탄올로부터 생성된 아세트알데히드와 아세트산

ADH와 ALDH는 Dong-Zhi Wei(1)에 따르면 Membrane-bound된 상태라고 말했고, 또한 Matsushita(2)에 따르면 *Gluconobacter* 종은 세포질 막을 통한 수송과 시토히(세포질의 액상 부분)에서 ADH와 ALDH에 의한 산화가 존재하고, 반면에 세포막에 결합된 dehydrogenases에 의해 주변세포질에서 직접 산화되는 두 가지 다른 에탄올 산화 경로가 있다고 보고되었다. 이와 같이 그림 2-22~25 와 표 2-41에서와 같이 ADH의 활성은 Culture Medium과 Cell, Sonication 후 상등액에서 나타나 Membrane-bound 형태를 나타내었다. 하지만 ALDH는 Culture Medium에서만 활성을 나타내었고 이는 세포막 즉 분비형의 ALDH이라는 것을 보여 주었다.(Sonication 후 상등액은 그 수치가 낮고 일정한 경향을 보이지 않아 관련이 없다고 판단하여 제외하였다.)

**(마) *Gluconobacter cerinus* ATCC23777과 JH4, JH S3의 Alcohol Dehydrogenase (ADH)와 Aldehyde Dehydrogenase(ALDH)의 활성 비교:**

세 개의 균주의 Whole Cell과 culture Midium을 이용하여 Ethanol의 산화, 즉 Acetaldehyde와 Acetic acid를 측정하여 ADH와 ALDH의 활성을 비교하였다.

**표 2-43. JH4의 Whole Cell과 Culture Medium을 이용한 ADH와 ALDH의 활성비교**

Whole Cell			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	14,950,637	34,018	140,492
3h	13,556,806	542,689	237,905
6h	12,510,139	1,325,170	391,203
9h	11,710,598	1,786,137	522,146
12h	10,302,430	2,538,683	655,664
Culture Medium			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	14,579,988	31,380	176,555
3h	13,427,810	63,369	181,354
6h	10,653,032	83,532	170,361
9h	13,668,339	135,423	231,667
12h	13,347,100	51,827	294,909

**표 2-44. JH S3의 Whole Cell과 Culture Medium을 이용한 ADH와 ALDH의 활성비교**

Whole Cell			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	14,950,637	34,018	140,492
3h	13,556,806	542,689	237,905
6h	12,510,139	1,325,170	391,203
9h	11,710,598	1,786,137	522,146
12h	10,302,430	2,538,683	655,664

Culture Medium			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	14,579,988	31,380	176,555
3h	13,427,810	63,369	181,354
6h	10,653,032	83,532	170,361
9h	13,668,339	135,423	231,667
12h	13,347,100	51,827	294,909

Whole Cell			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	14,055,108	37,215	0
3h	12,962,291	425,360	0
6h	18,453,675	1,629,621	413,190
9h	11,515,203	1,436,249	461,371
12h	10,551,904	2,070,213	621,875

Culture Medium			
	Ethanol	Acetaldehyde	Acetic Acid
0h	13,888,818	12,291	0
3h	14,705,907	48,760	0
6h	14,129,235	50,186	0
9h	15,024,293	38,843	168,029
12h	14,564,519	22,332	143,578

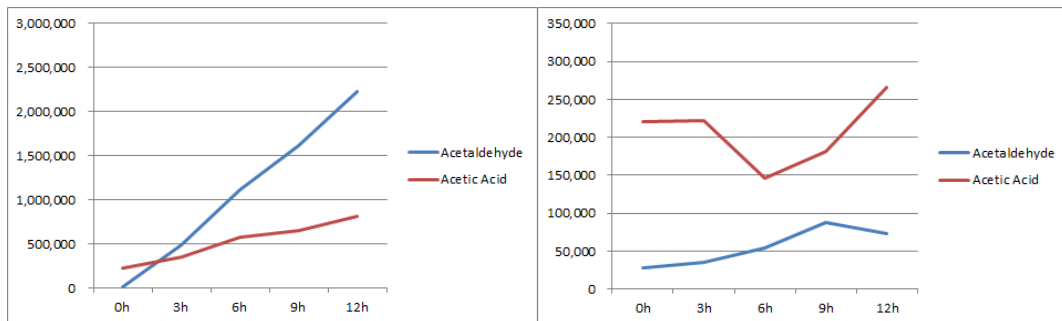


그림 2-27. ATCC23777의 Whole Cell(Left)과 Culture Medium(Right)을 이용한 에탄올로부터 생성된 아세트알데히드와 아세트산의 시간에 따른 GC 분석

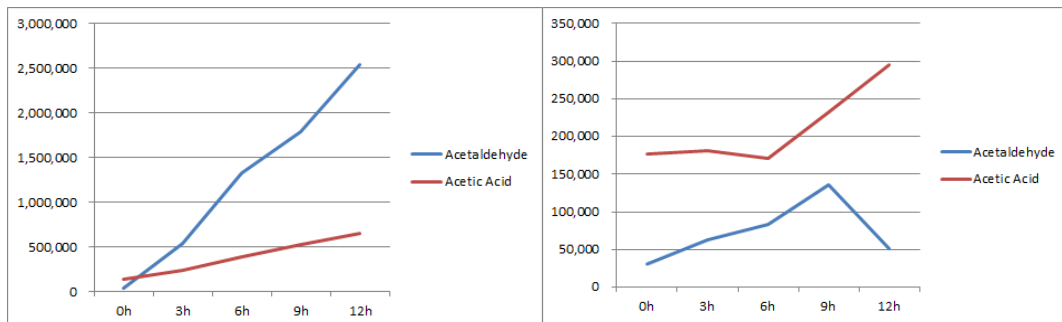


그림 2-28. JH4의 Whole Cell(Left)과 Culture Medium(Right)을 이용한 에탄올로부터 생성된 아세트알데히드와 아세트산의 시간에 따른 GC 분석

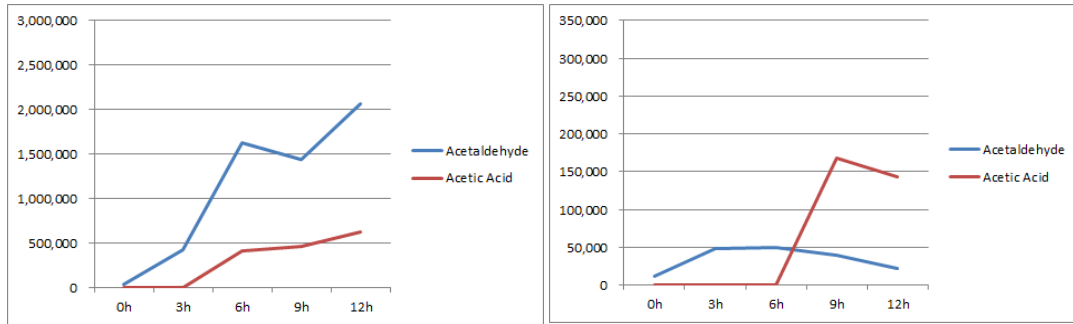


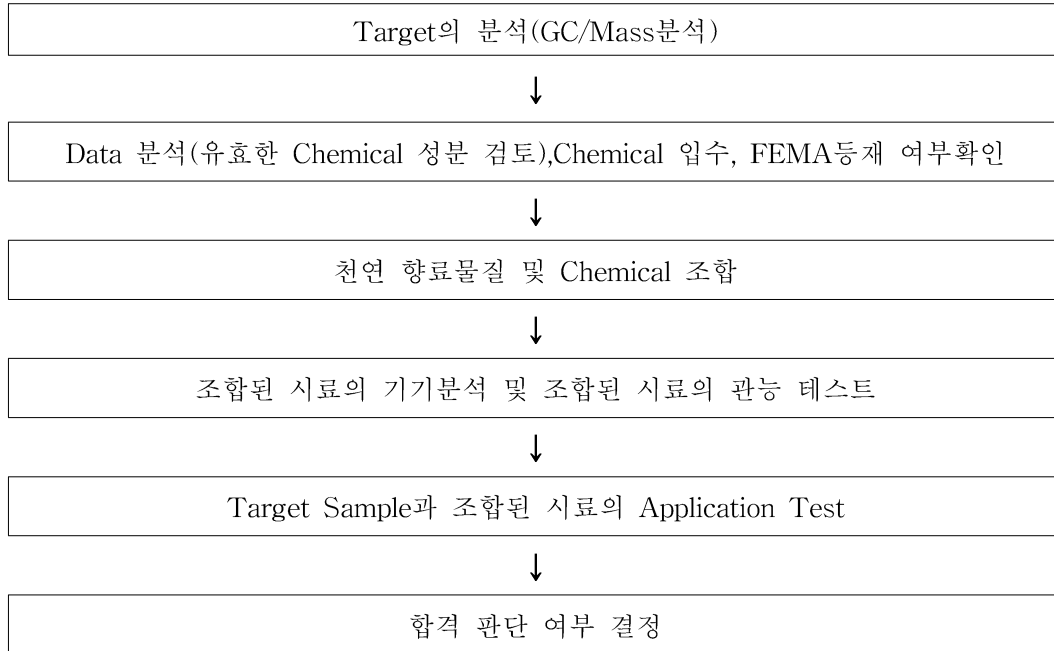
그림 2-29. JH S3의 Whole Cell(Left)과 Culture Medium(Right)을 이용한 에탄올로부터 생성된 아세트알데히드와 아세트산의 시간에 따른 GC 분석.

Dong-Zhi Wei(1)에 의하면 Membrane-bound 형태의 효소로써의 Alcohol Dehydrogenase와 Aldehyde Dehydrogenase을 보였고, 또한 Matsushita(2)에 따르면 *Gluconobacter* 종은 세포질막을 통한 수송과 시토플(세포질의 액상 부분)에서 alcohol and aldehyde dehydrogenases에 의한 산화가 존재하고, 반면에 세포막에 결합된 dehydrogenases에 의해 주변세포질에서 직접 산화되는 두 가지 다른 에탄올 산화 경로가 있다고 보고되었다.

이 연구를 통하여 *Gluconobacter* ATCC23777의 Alcohol Dehydrogenase는 세포막과 결합되어 있다는 것을 알 수 있었고, Aldehyde Dehydrogenase는 세포밖(분비형)에서 그 활성을 나타내어 위의 두 논문과는 다르게 Aldehyde Dehydrogenase는 세포밖(분비형)에 존재하는 것을 알게 되었다. 또한 세 균주의 Culture medium 실험에서 Acid 형태로 산화된 과정에서 Aldehyde Dehydrogenase가 세포밖에 존재하는 것을 나타냄과 동시에 Aldehyde의 존재로 Acid가 만들어지기 때문에 Alcohol Dehydrogenase이 Extracellular에서도 존재할 것이라는 것을 나타낸다.

# 제 3 절 천연 유자 정유의 천연향료소재제품화 및 제품화 적용기술의 개발

## 1. 천연소재로부터 향료를 개발하는 방법



### 가. 유자정유의 GC/Mass 분석에 따른 Chemical 조합

#### (1). 유자정유의 GC/Mass 분석

기기분석의 발달로 인해 천연물로부터 향기성분의 분석 수준이 많이 향상 되었지만 아직 천연소재로부터 유효성분을 추출하는 기술이 미숙하여 정확한 향료성분을 동정하는데 애로사항이 많다. 보다 정확한 data를 확보하기 위해서는 천연소재로부터 유효성분을 추출하는 기술이 무엇보다 중요하다. 그 유효성분들로부터 기기분석을 할 때 바람직한 제품을 만들 수 있는 것이다. 고려대에서 유자를 추출한 비효소처리 Essential Oil과 효소처리 Essential Oil을 GC/mass 분석을 실시하였다.

표 3-1. GC/Mass 분석조건

Model	7890A/5975C, Agilent
Inlet	250 °C, Split mode(80:1)
Oven	45 °C → 3 °C/min → 100 °C, 2min → 3 °C/min → 175 °C, 2min → 3 °C/min → 246 °C, 2min total 73min
Column	DB-WAX(30x0.25x250)
MSD	Scan mode

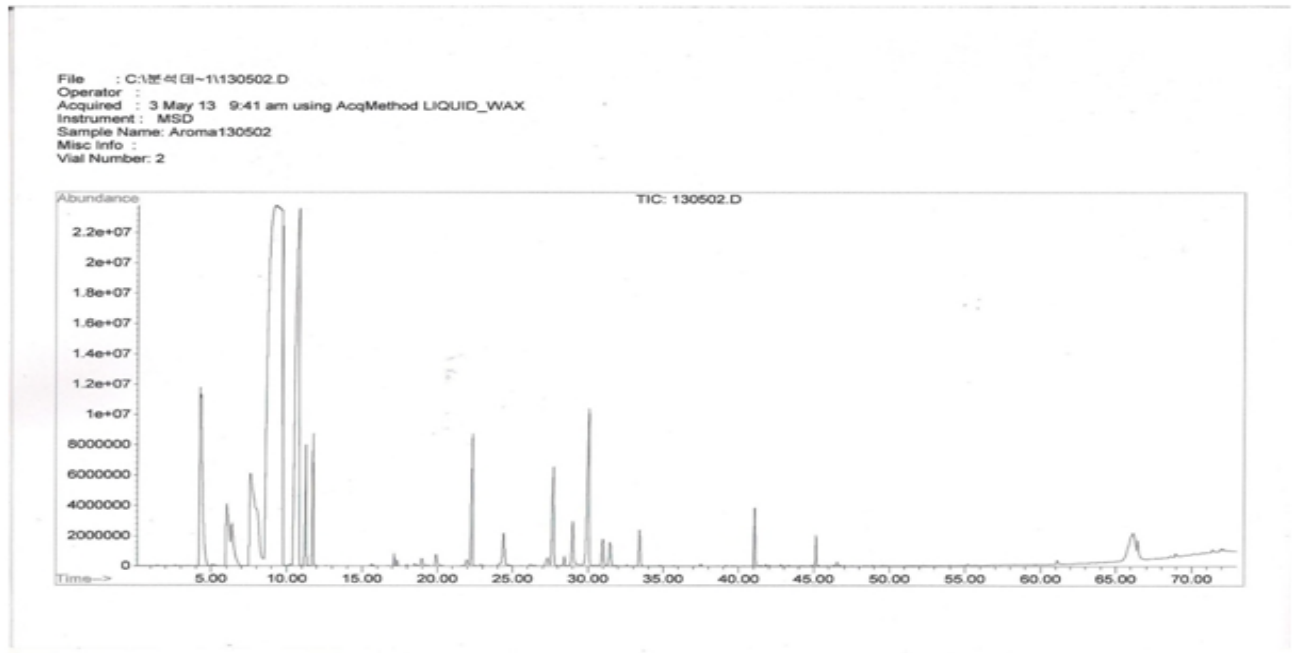


그림 3-1. 비효소처리 유자 Essential Oil GC/mass Chart

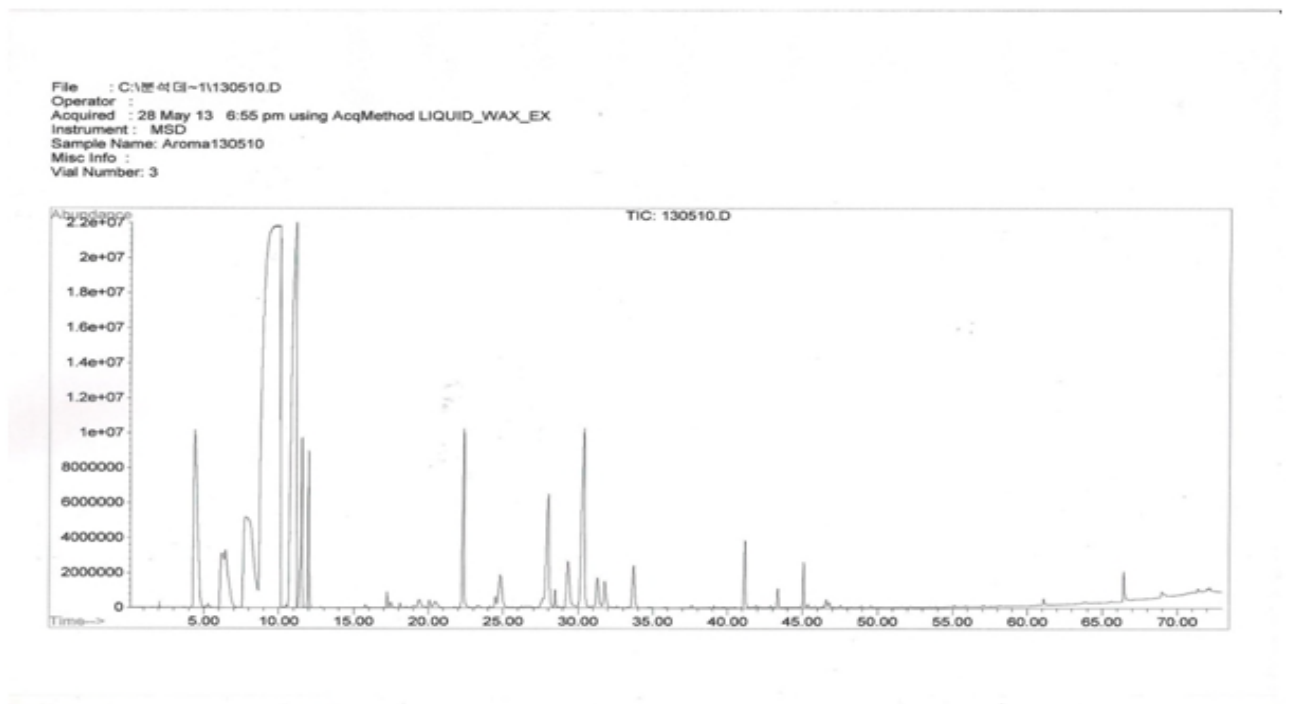


그림 3-2. 비효소처리 유자 Essential Oil GC/mass Chart

표 3-2에서 보는 바와 같이 유자의 과피로부터 향취에 기여도가 높은 성분들은  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, Myrcene, d-limonene,  $\gamma$ -terpinene,  $p$ -cymene, Terpinolene, linalool, Sabinene 등과 같이 비교적 함량이 많은 성분도 있지만 Camphene,  $\alpha$ -Terpinene,  $\beta$ -Caryophyllene, Octanal, Nonanal 등의 미량성분 등도 유효성분으로 나타났다. 그리고 그림 1과 표 1에서 보는 바와 같이 비효소처리 Essential Oil과 효소처리 Essential Oil 은 유의적인 차이가 없으며 관능적으로도 차이가 없었다.

표 3-2. 비효소처리 유자 Essential Oil과 효소처리 유자 Essential Oil GC/mass 분석 결과

No	RT	Ingredient (FEMA No.)	비효소처리 Essential Oil	효소처리 Essential Oil
			%Area	%Area
1	4.270	alpha-Pinene(2902),	1.85	2.14
2	4.322	alpha-Pinene(2902)	3.52	2.51
3	5.087	Camphene(2229)	0.03	0.02
4	5.293	Hexanal(2557)	-	0.02
5	6.034	beta-Pinene(2903)	1.9	1.77
6	6.358	Sabinene	3.34	3.47
7	7.599	Myrcene(2762),	4.9	5.74
8	8.011	Myrcene(2762),	1.77	-
9	8.270	alpha-Terpinene(3558)	-	0.04
10	9.105	d-Limonene(2633)	49.91	51.64
11	10.816	gamma-Terpinene(3559)	13.88	13.22
12	10.851	3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene(3539)	0.48	0.66
13	11.193	para-Cymene(2356)	-	1.56
14	11.751	Terpinolene(3046)	1.28	1.18
15	11.875	Octanal(2797)	0.01	0.01
16	15.663	Nonanal(2782)	0.02	0.02
17	17.139	p-alpha-Dimethyl styrene(3144)	0.13	0.11
18	17.969	2,4-Heptadien-1-ol	-	0.02
19	18.769	alpha-Terpinene(3558)	0.61	0.47
20	21.668	cis-4-Decenal,	0.01	0.01
21	21.951	1(10),4(14),5-Germacatriene	-	1.01
22	22.327	Linalool(2635)	1.87	1.25
23	22.527	Carvone(2249)	0.01	-
24	24.045	1-Methyl-3-methoxy-4-isopropylbenzene	0.01	0.01
25	24.409	beta-Caryophyllene(2252)	0.73	0.74
26	24.733	Undecanal(3092)	0.01	0.01
27	26.168	Aromadendrene	-	0.04
28	26.468	beta-Caryophyllene(2252)	0.02	0.02
29	27.321	3,7,10-Humulatriene	0.21	0.22
30	27.709	beta-Farnesene	1.97	2.19
31	28.439	alpha-Terpineol(3045)	0.11	0.07
32	28.997	1(10),4(14),5-Germacatriene	0.9	-
33	32.585	trans,trans-2,4-Decadien-1-al(3135)	0.01	0.01
34	39.603	beta-Bisabolene	0.02	0.01
35	41.373	Caprylic acid(2799)	0.01	0.01
36	42.061	Elemol	0.01	-
37	45.143	Thymol(3066)	0.32	0.23
38	45.314	Viridiflorol	0.01	0.02
39	45.949	Thymol(3066)	0.01	-
40	55.178	Lauric acid(2614)	0.02	0.03
41	61.119	Myristic acid(2764)	-	0.12
42	66.442	Palmitic acid(2832)	0.37	0.45

유자 Essential Oil로부터 향기 성분을 분석하여 비교해 보면 향기물질은 d-Limonene,

gamma-Terpinene, Myrcene, alpha-Pinene, beta-Pinene, para-Cymene, Linalool, Terpinolene 등이 순서적으로 많이 함유되어 있고, 향료의 관능표현법에서 Top Note를 이루는 가벼운 휘발성 성분 뿐만 아니라 Middle Note, Last Note의 무거운 휘발성 성분까지 다양하게 검출되었다.

terpine 계 탄화수소인 Limonene 및 gamma-Terpinene이 전체적으로 약 60~65% 정도 함유되어 있고 이 부분은 Top Note에 많이 작용하는 부분이고 유자의 신선하고 향긋한 이미지를 부여하며 단순히 Citrus계 (Orange, Lemon, Grapefruit, Mandarin 등) 의 특징을 나타내주는 향기 성분이다. 참고적으로 그 성분들은 Sweet Orange에 83~97% 있고, Mandarin 에 65~94% 정도 함유되어 있다는 보고와 비슷하다. 이는 Citrus계의 주요 향기 성분들이지만 외부 조건 중 열, 수분, 빛, pH 등의 영향을 받아 산화가 쉽게 되어 이취가 발생되기도 한다. 이러한 문제점으로 유자의 껍질에 존재하는 유자 정유 성분이 주스의 풍미에 필수적이거나 과량 존재하게 되면 이취를 생성하여 Citrus계의 제품 품질저하를 가져올 수 있기 때문에 미국에서는 정유 성분 제거기로 주스에 존재하는 정유성분을 제거(terpenless)하기도 한다. d-Limonene 및 gamma-Terpinene의 향취 특징으로서는 Citrus계의 refresh, light, pleasant의 Top Note를 이루는 구성 물질들이다.

## 2. GC/Mass분석에 따른 Chemical 조합

효소처리 유자 Essential Oil 을 분석한 데이터를 이용하여 chemical 조합을 하였다. 1차적으로 식품향료의 원료로서 적용 가능한 유효 성분만을 이용하여 향료를 조합하였다. (표 2.) 즉 FEMA (Flavor & Extract Manufacturer Association)에 등록이 되어 있는 aroma chemical은 식품향료의 원료로서 안정하다고 세계적으로 인정되는 부분입니다.

관능적으로 볼 유자정유에서 유자향기 발현에 기여도가 높은 aroma chemical은 (표 2)에서 보는 바와 같이 d-Limonene, gamma-Terpinene, alpha-Terpinene, Myrcene, alpha-Pinene, Linalool, Terpinolene, beta-Pinene, beta-Caryophyllene, Thymol 등(상기는 FEMA List 에 등재되어 있음.) 이 있다.

표 3-3. 유자 Essential Oil GC/mass 분석에 따른 1차 chemical 조합

No.	Ingredients (FEMA No.)	%Area	Contents(%)
1	alpha-Pinene (2902)	4.69	5.62
2	Camphene (2229)	0.02	0.02
3	Hexanal (2557)	0.02	0.02
4	beta-Pinene (2903),	1.77	2.12
5	Myrcene (2762)	5.74	6.88
6	alpha-Terpinene (3558)	0.04	0.05
7	d-limonene (2633)	51.64	61.89
8	gamma-Terpinene (3559)	13.22	15.84
10	p-Cymene (2356)	1.56	1.87
11	Terpinolene (3046)	1.18	1.41
12	Octanal (2797)	0.01	0.01
13	Nonanal (2782)	0.02	0.02
14	p-alpha-Dimethyl styrene (3144)	0.11	0.13
15	alpha-Terpinene (3558)	0.47	0.56
16	Linalool (2635)	1.25	1.50



18	beta-Caryophyllene (2252)	0.74	0.89
19	Undecanal (3092)	0.01	0.01
20	beta-Caryophyllene (2252)	0.02	0.02
21	alpha-Terpineol (3045)	0.07	0.08
22	trans,trans-2,4-decadien-1-al (3135)	0.01	0.01
23	Caprylic acid (2799)	0.01	0.01
24	Thymol (3066)	0.23	0.28
25	Decanoic acid (2364)	0.01	0.01
26	Lauric acid (2614)	0.03	0.04
27	Myristic acid (2764)	0.12	0.14
28	Palmitic acid (2832)	0.45	0.54
SUM		83.44	100.00

가. 조합시료의 GC/mass 분석 및 관능테스트

(1). 조합시료의 GC/mass 분석

표 2. 유자 Essential Oil GC/mass 분석에 따른 1차 chemical 조합 시료를 GC/mass 분석을 실시하였다.(그림 3-3) 실시한 결과 유자 Essential Oil 과 비교해서 chart 상으로는 비교적 비슷하기는 하지만 함량이 차이가 나는 성분들이 있어(빨간 색 표시 부분) 향취 강도 등 관능상의 유의적인 차이가 있었다.

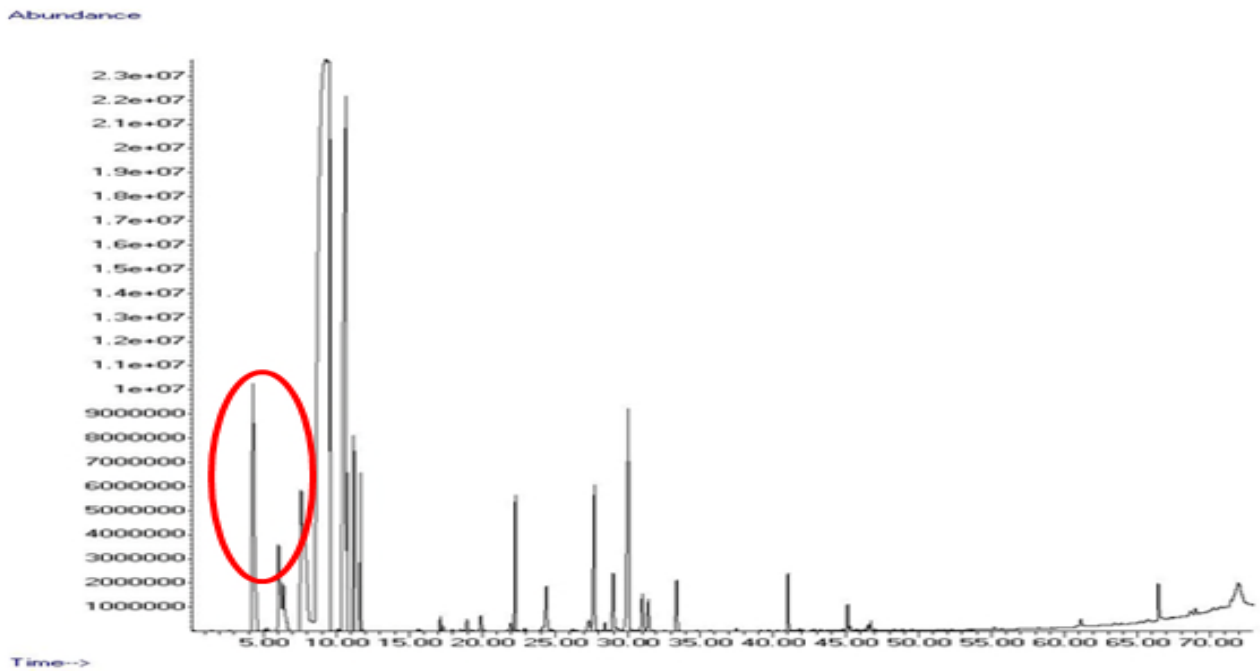


그림 3-3. 1차 chemical 조합 시료의 GC/mass Chart

표 3-4. 1차 chemical 조합 시료의 GC/MS 분석 결과

No.	Ingredients	%Area	Contents (%)
1	alpha-Pinene(2902)	5.72	6.61
2	Camphene(2229)	0.2	0.23
3	Hexanal(2557)	0.1	0.12
4	beta-Pinene(2903),	2.5	2.89
5	Myrcene(2762), Sabinene	4.8	5.55
6	alpha-Terpinene(3558)	0.1	0.12
7	d-limonene	51.64	59.71
8	gamma-Terpinene(3559)	11.22	12.97
10	p-Cymene(2356)	1.24	1.43
11	Terpinolene(3046)	1.82	2.10
12	Octanal(2797)	0.1	0.12
13	Nonanal(2782)	0.2	0.23
14	p-alpha-Dimethyl styrene(3144)	0.14	0.16
15	alpha-Terpinene(3558)	0.68	0.79
16	Linalool(2635)	1.4	1.62
18	beta-Caryophyllene(2252)	1.64	1.90
19	Undecanal(3092), Tridecanal	0.1	0.12
20	beta-Caryophyllene(2252)	0.2	0.23
21	alpha-Terpineol(3045)	0.24	0.28
22	trans,trans-2,4-decadien-1-al(3135)	0.2	0.23
23	Caprylic acid(2799)	0.15	0.17
24	Thymol(3066)	0.32	0.37
25	Decanoic acid(2364)	0.17	0.20
26	Lauric acid(2614)	0.64	0.74
27	Myristic acid(2764)	0.32	0.37
28	Palmitic acid(2832)	0.64	0.74
SUM		86.48	100.00

특히 retention time이 처음부분에서 나타나는 성분들이 비교적 유사 Essentail Oil 과 비교해서 1.2배에서 10배까지 높게 나타났다. 그래서 1차 조합시료의 배합비를 수정하여 수십번의 조합을 하고 재분석을 반복적으로 실험하였다. 재분석 결과로 (그림 3-4)와 같이 유사 Essentail Oil 의 GC/mass chart 와 최대한 유사한 결과가 나왔다.

표 3-5. 제조합 시료의 배합비

No.	Ingredients	%Area	Contents(%)
1	alpha-Pinene	3.85	4.55
2	Camphene 10% MCT	0.02	0.02
3	Hexanal 10% MCT	0.04	0.05
4	beta-Pinene	1.25	1.48
5	Myrcene	6.86	8.12
6	alpha-Terpinene	0.02	0.02
7	d-limonene	51.64	61.15
8	gamma-Terpinene	15.58	18.44
10	p-Cymene	1.96	2.32
11	Terpinolene	0.77	0.91
12	Octanal 10% MCT	0.01	0.01
13	Nonanal 10% MCT	0.02	0.02
14	p-alpha-Dimethyl styrene	0.09	0.10
15	alpha-Terpinene	0.32	0.38
16	Linalool	1.12	1.32
18	beta-Caryophyllene	0.33	0.40
19	Undecanal 10% MCT	0.01	0.01
20	beta-Caryophyllene 10% MCT	0.02	0.02
21	alpha-Terpineol	0.02	0.02
22	trans,trans-2,4-decadien-1-al 10% MCT	0.01	0.01
23	Caprylic acid 10% MCT	0.01	0.01
24	Thymol	0.17	0.20
25	Decanoic acid 10% MCT	0.01	0.01
26	Lauric acid 10% MCT	0.01	0.01
27	Myristic acid	0.05	0.05
28	Palmitic acid	0.32	0.37
	SUM	84.491	100.00

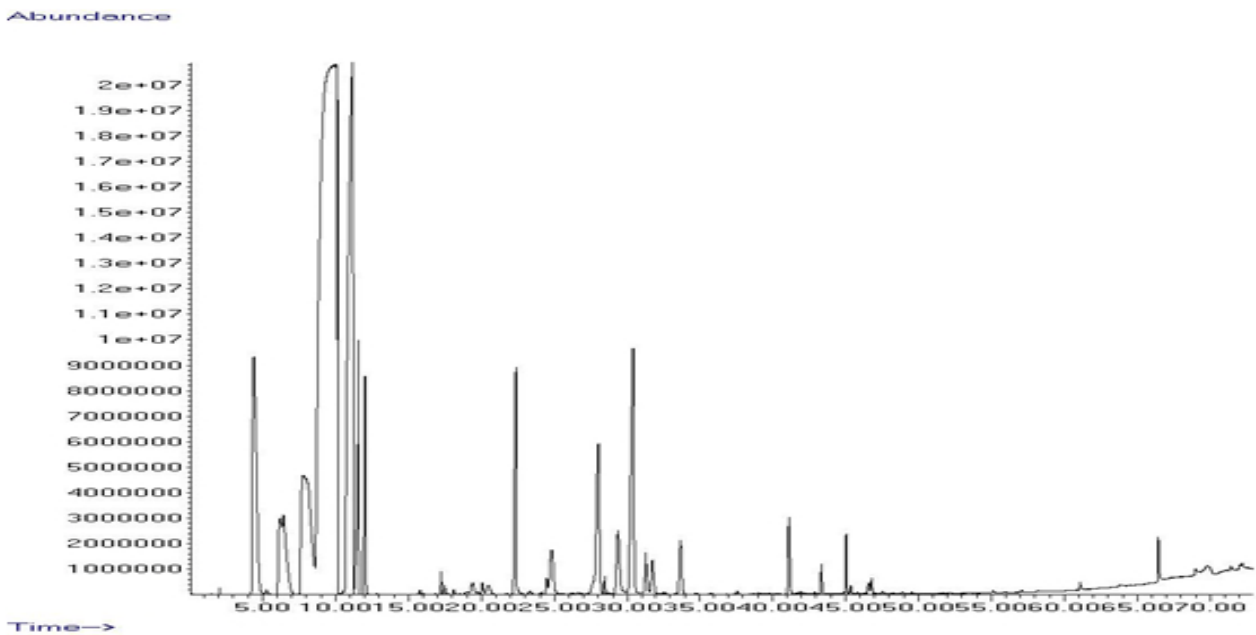


그림 3-4. 제조합 시료의 GC/mass Chart

### (3). 제조합 시료의 관능 테스트

표 4의 배합비를 기준으로 하여 유자정유에 향취를 좌우하는 미량 chemical을 조정하여 시료 5종을 제조하여 관능 테스트를 실시하였다. #1은 표 4의 배합비 이고, #2 ~5 까지는 Octanal, Nonanal, Linalool, beta-Caryophyllene, Undecanal 등의 aroma chemical를 조정하여 시료를 제조하였다. (표3-6) 시료 5종에 대한 관능 테스트 결과 시료 #3이 유자정유와 가장 유사하다고 나왔다. 하지만 과즙감이나 유자껍질의 쓴 느낌의 향취 등이 많이 차이가 났다. 천연 유자 정유의 경우는 Top Note는 굉장히 좋지만 단점으로 향취의 지속력이 약하고 시간이 경과하면 산패된다는 단점이 있다. 이에 반면 조합된 합성향료의 경우에 천연 유자정유와 반대로 Top Note는 비교적 약하지만 지속력은 좋은 편이다.

표 3-6. 관능테스트를 위한 시료 5종의 배합비

No	Ingredients	#1	#2	#3	#4	#5
		Conte nts(%)	Conte nts(%)	Conte nts(%)	Conte nts(%)	Conte nts(%)
1	alpha-Pinene	4.55	4.55	4.55	4.55	4.55
2	Camphene 10% MCT	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
3	Hexanal 10% MCT	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
4	beta-Pinene	1.48	1.48	1.48	1.48	1.48
5	Myrcene	8.12	8.12	8.12	8.12	8.12
6	alpha-Terpinene	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
7	d-limonene	61.15	61.12	60.88	60.92	61.13
8	gamma-Terpinene	18.44	18.44	18.44	18.44	18.44
10	p-Cymene	2.32	2.32	2.32	2.32	2.32
11	Terpinolene	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
12	Octanal 10% MCT	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
13	Nonanal 10% MCT	0.02	0.04	0.02	0.02	0.02
14	p-alpha-Dimethyl Styrene	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
15	alpha-Terpinene	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
16	Linalool	1.32	1.32	1.58	1.32	1.32
18	beta-Caryophyllene	0.4	0.4	0.4	0.6	0.4
19	Undecanal 10% MCT	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
20	beta-Caryophyllene 10% MCT	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
21	alpha-Terpineol	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
22	trans,trans-2,4-decadien-1-al 10% MCT	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
23	Caprylic acid 10% MCT	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
24	Thymol	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
25	Decanoic acid 10% MCT	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
26	Lauric acid 10% MCT	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
27	Myristic acid	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
28	Palmitic acid	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37
	SUM	100	100	100	100	100

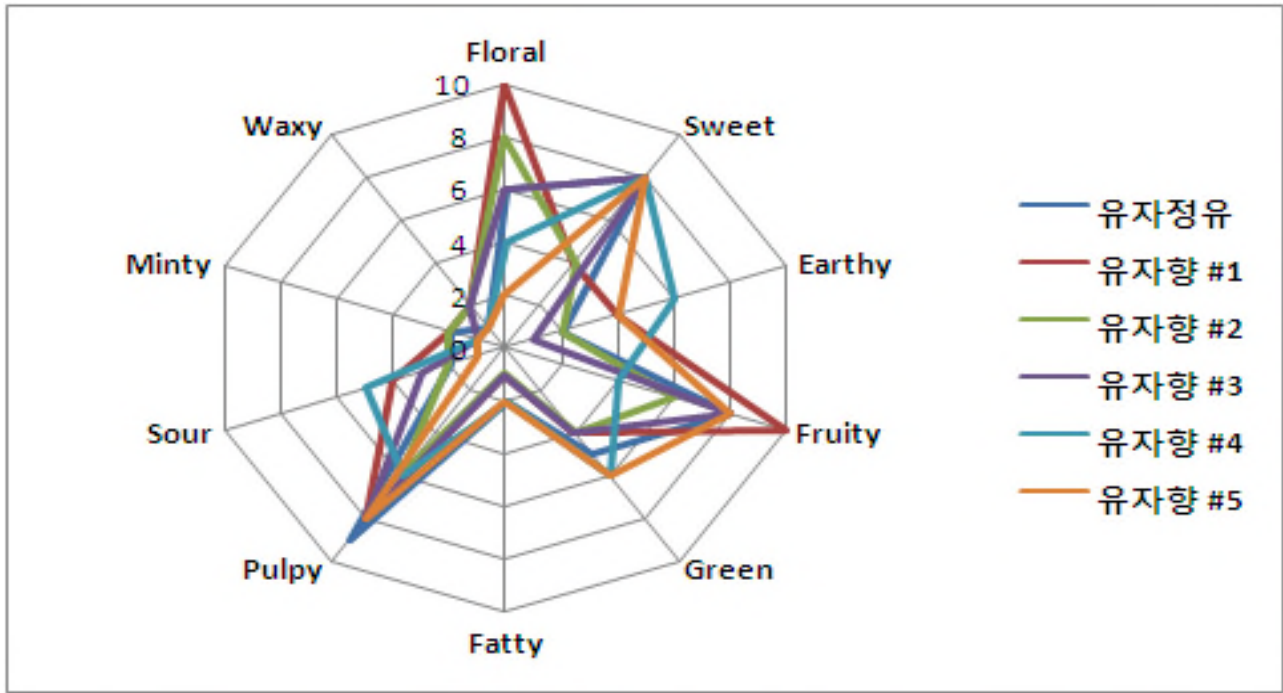


그림 3-5. 시료 5종에 대한 관능테스트 결과

#### (4). 결론

Citrus계 향료의 가장 중요한 point는 향취의 지속성과 아울러 제품 적용시의 일정한 지속성을 가지는 것이다. 즉 유자정유의 가치는 경시 변화에 따른 일정한 품질, 유자의 독특하고 강한 refresh image, 향취의 지속성이 일정하게 유지되는 것이 중요하다고 생각할 수 있다.

천연향료의 분석을 통한 결과에서 유자향료의 품질을 결정할 수 있는 Middle, Last note를 구성하는 보다 무거운 휘발성 향기성분에 대해서 집중적으로 연구를 하여 chemical을 이용하여 천연향에 가까운 향료의 개발과 이 향료를 이용한 제품개발에 주력하여 하면 더 좋은 제품을 만들 수 있을 것이라 사료된다.

### 3. 유자정유를 이용한 천연향의 제조 및 경제성 분석

#### 가. 음료용 천연향 제조

음료용 천연향 제조를 위해, 고려대학교에서 추출한 유자 Essential oil의 비율을 조정하여 추출을 하였다. 실험에 사용된 Essential oil, Ethyl alcohol 및 Water의 비율은 표 1.과 같다.

표 3-7. 조합비

	#1	#2	#3
유자 Essential oil	10	20	30
Ethyl alcohol	120	120	120
Water	80	80	80
Total	210	220	230

조합비를 다르게 하여 원료를 혼합한 다음 혼합액을 상온(20±2℃)에서 1 시간 안 homomixing을 하였다. Homomixing을 한 혼합액을 0~5℃에서 12시간 정치하였다. 12시간이 지난 후 정치시킨 혼합액의 부산유를 제거하고 추출액을 회수하였다. 그 결과는 표 3-9와 같다.

**표 3-8. Oil층 분리에 따른 회수량**

	#1	#2	#3
부산유	13.2	22.8	33.1
회수액	189.5	195.2	194.6
Loss	7.3	2.0	2.3
Total	210	220	230

부산유를 제거한 추출액을 여과지를 이용하여 자연여과 하였으며 그 결과는 표 3.과 같다.

**표 3-9. 여과지를 이용한 자연여과에 따른 회수량**

	#1	#2	#3
Loss	5.1	4.4	4.6
여액	184.4	190.8	190.0
Total	189.5	195.2	194.6

원료를 혼합하여 추출 후 여과한 결과 #1은 회수율이 92.2%로 가장 낮았으며 #2의 회수율은 95.4%, #3의 회수율은 95%로 비슷한 결과를 보였다. 그리고 향취 또한 #1은 강도가 가장 약하고 #2와 #3은 강도가 거의 비슷한 편이었다. 그래서 가격적인 측면에서 Essential oil이 적게 사용되고 향의 강도에서도 우수한 #2가 음료용 천연향을 제조하기에 가장 적합한 배합비임을 알 수 있었다.

#### 나. 껌용 천연향 제조

껌용 천연향을 제조하기 위하여 Essential oil과 대두유를 50:50의 비율로 조정하여 제품을 개발하였으며 제품에 사용된 유자 Essential oil에 다른 citrus계열의 Essential oil을 첨가하여 관능 test를 실시하였다. 개발된 제품의 Essential oil의 비율은 표 4.와 같다.

**표 3-10. 껌용 천연향 제조에 사용된 Essential oil의 조합비**

	Yuzu essential oil	Citrus essential oil	Total
#A	50	0	50
#B	45	Lemon essential oil (5)	50
#C	45	Orange essential oil (5)	50
#D	45	Grapefruit essential oil (5)	50
#E	45	Lime essential oil (5)	50

5가지 유용성 천연향을 껌에 적용하여 관능평가를 진행하였다. 관능평가에 사용된 껌의 조합비는 표 3-11.와 같다.

**표 3-11. 껌의 조합비**

Ingredients	Recipe (%)
Sugar powder	55
Gum base	23
Triacetin	0.5
Glycerine	0.5
Glucose	12
HFCS	8
Flavor	1
Total	100

유자 essential oil에 citrus계열의 essential oil을 첨가한 천연향 제품을 껌에 적용하여 업체에 제시한 결과 #A, #B 및 #D가 가장 선호도가 높았으며 #C와 #E는 유자의 특징적인 맛과 향을 가려 선호도가 좋지 않았다. 이러한 결과를 반영하여 #A, #B 및 #D를 업체에 제시 하였다.

**4. 장기간 보관 중 유분리 등에 대한 문제점 해결을 위한 균질조건 확립(유화향료)**

다음은 유자 유화 향료 제조방법에 대해서 서술하고자 한다. 이 제조 방법은 무엇보다 공정이 아주 중요하며 각 제조공정에서 유화 정도를 check하여야 한다. 유화 상태가 잘못될 경우 음료제조 과정 또는 유통과정에 ring이 형성되어 claim소지가 많기 때문에 특별히 주의를 기울여서 실험에 임하여야 한다. 조합향료를 유화제와 안정제를 사용해서, 물에 유화 분산시키는 것으로 essence보다 top note의 향이 약하지만, essence보다 열에 강하고, 향의 보유성이 좋다. 또한 탁도를 부여하는 효과가 있기 때문에 과즙음료, 빙과류에 많이 이용된다.

기능성 음료에서 사용된 유자 에센스는 일반적인 향료로서 oil을 수용화 시키는 한가지 방법으로서 추출하여 사용되는 향료이다. 하지만 oil 성분의 풍부하고 보다 천연감이 느껴지게 하는 방법으로서 oil의 고기술의 유화 향료(Emulsion)가 많이 이용된다.

표 3-12.은 유자 Emulsion를 제조하는데 필요한 조합비 이며 제조방법은 다음과 같다.

- ① Essential oil과 SAIB를 혼합하고 60~70℃에서 가열 용해
- ② ESP-26과 Glycerine(50)을 혼합하고 70~80℃에서 가열 용해
- ③ ②에 ①을 투입하여 15분 이상 Homomixing
- ④ Homomixing이 완료된 ③에 Glycerine(20)과 Water를 투입 후 15분이상 homomixing
- ⑤ Homomixing을 완료한 ④을 여과
- ⑥ 수용화 상태를 확인
- ⑦ 포장

표 3-12. 유자 oil base 조합비

		OB-1	OB-2	OB-3
Essential oil	Yuzu oil	10	9	9
	Grapefruit oil	-	1	-
	Lemon oil	-	-	1
SAIB		3	3	3
ESP-26(유화제)		2	2	2
Glycerine		70	70	70
Water		20	20	20
Total		105	105	105



그림 3-6. 유자 Emulsion

## 5. 천연향의 제품 저장에 따른 관능평가

### 가. 음료용 천연향의 저장 조건에 따른 관능평가

음료용 천연 유자향 #2의 경시변화의 관찰을 위해 단기실험을 2014.04.28(초기값)부터 2014.05.15(최종값)까지 3주간 진행 하였으며 주 2회, 총 6회 측정하였다. 음료용 천연향 샘플을 냉장(4℃), 실온 및 오븐(50℃) 세 가지 조건으로 보관하였으며 주 2회 향취 및 성상을 관능 테스트를 통해 확인하였다. 또한 UV-vis Spectrophotometer를 이용하여 가시광선영역의 peak 형태의 변화를 비교하였고, GC/MSD 분석을 실행하여 TIC 및 동일 peak의 변화를 비교하였다. UV-vis Spectrophotometer 및 GC/MSD의 기기 조건은 표 3-13, 표 3-14.과 같다.



표 3-13. UV-vis Spectrophotometer 기기조건

모델	U-2900, HITACHI
베이스라인	완제품 용매 (Ethyl alcohol : Water)
측정	800 ~ 200nm 범위 Scan, 흡광도 측정

표 3-14. GC/MSD 기기조건

모델	7890A/5975C, Agilent
Inlet	250°C, Split mode 80:1, 1µL injection
Oven	45°C→3°C/min→100°C (100°C : 2min holding) 100°C→3°C/min→175°C (175°C : 2min holding) 175°C→3°C/min→246°C (246°C : 2min holding)
Column	Total 73min DB-WAX (30x0.25x250)
MSD	Scan mode

그림 3-7은 베이스라인의 흡광도로 400nm 이하 범위의 불규칙한 peak는 용매(Ethyl alcohol : Water)의 특성으로 추정된다.

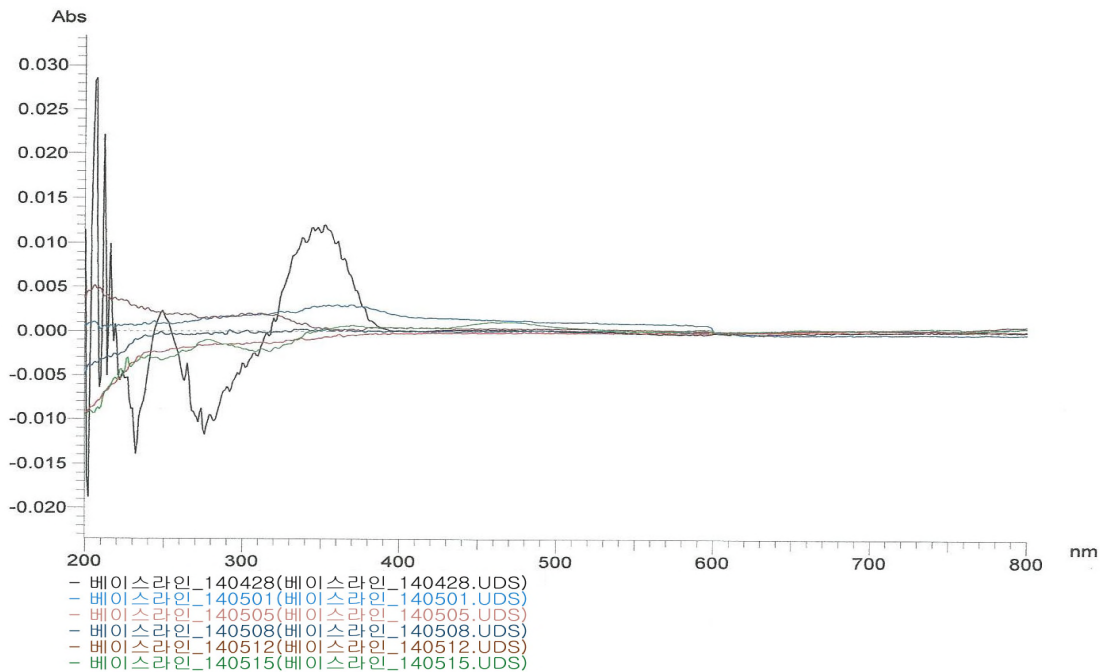


그림 3-7. 베이스라인의 흡광도

천연 유자향을 저장 조건을 다르게 하여 저장한 후 향취를 관능 test한 결과는 표 3-15와 같다.

**표 3-15. 저장 조건별 향취 비교**

분류	2014.04.28	2014.05.01	2014.05.05	2014.05.08	2014.05.12	2014.05.15
실온 (25℃)		큰 변화	큰 변화	큰 변화	큰 변화	약간 강도
냉장 (4℃)	천연유자	없음	없음	없음	없음	약해짐
오븐 (50℃)	특유의 향취	큰 변화	큰 변화	약간 강도	절인	큰 변화
		없음	없음	약해짐	유자의 향	없음 절인 유자의 향, 강도 약함

천연 유자향을 저장 조건을 다르게 하여 저장한 후 성상을 관능 test한 결과 저장 기간이 길어짐에 따라 미세하게 색이 진해졌다. 오븐(50℃)에서 저장했을 시 색의 변화가 가장 컸으며, 그 다음은 실온(25℃), 가장 색의 변화가 적은 조건은 냉장(4℃)보관 이었다 (그림 3-15).

저장조건에 따른 천연 유자향의 흡광도 측정은 전체적으로 변화가 거의 없었으며 오븐(50℃) 보관 샘플만 미약한 흡광도 변화를 보였으나 전체적인 패턴은 동일했다(그림3-8). 각 보관 조건 별 천연 유자향의 시간경과에 따른 흡광도 변화는 그림3-9~12와 같다.

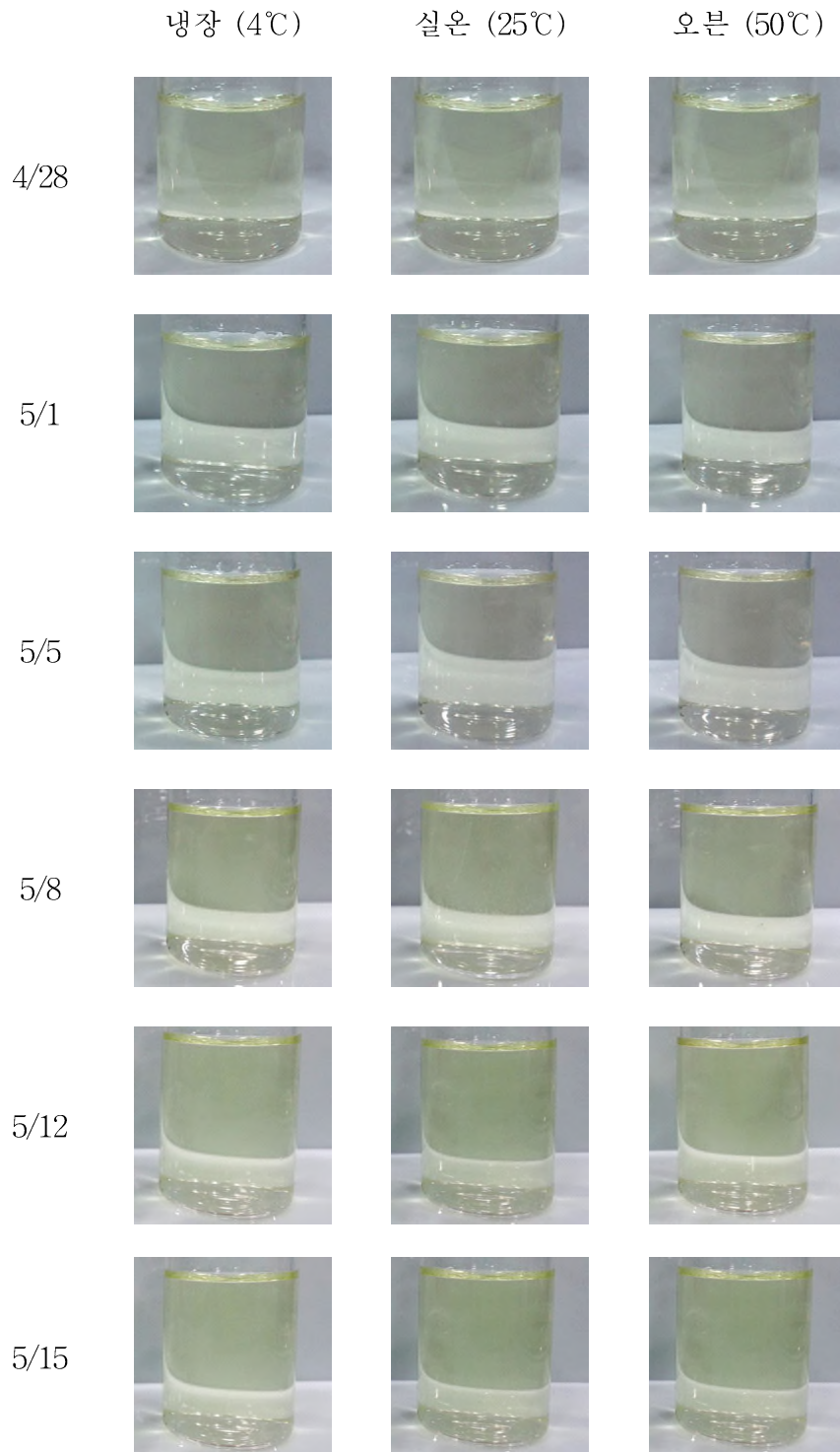


그림 3-8. 저장 조건 별 천연 유자향의 정상 비교

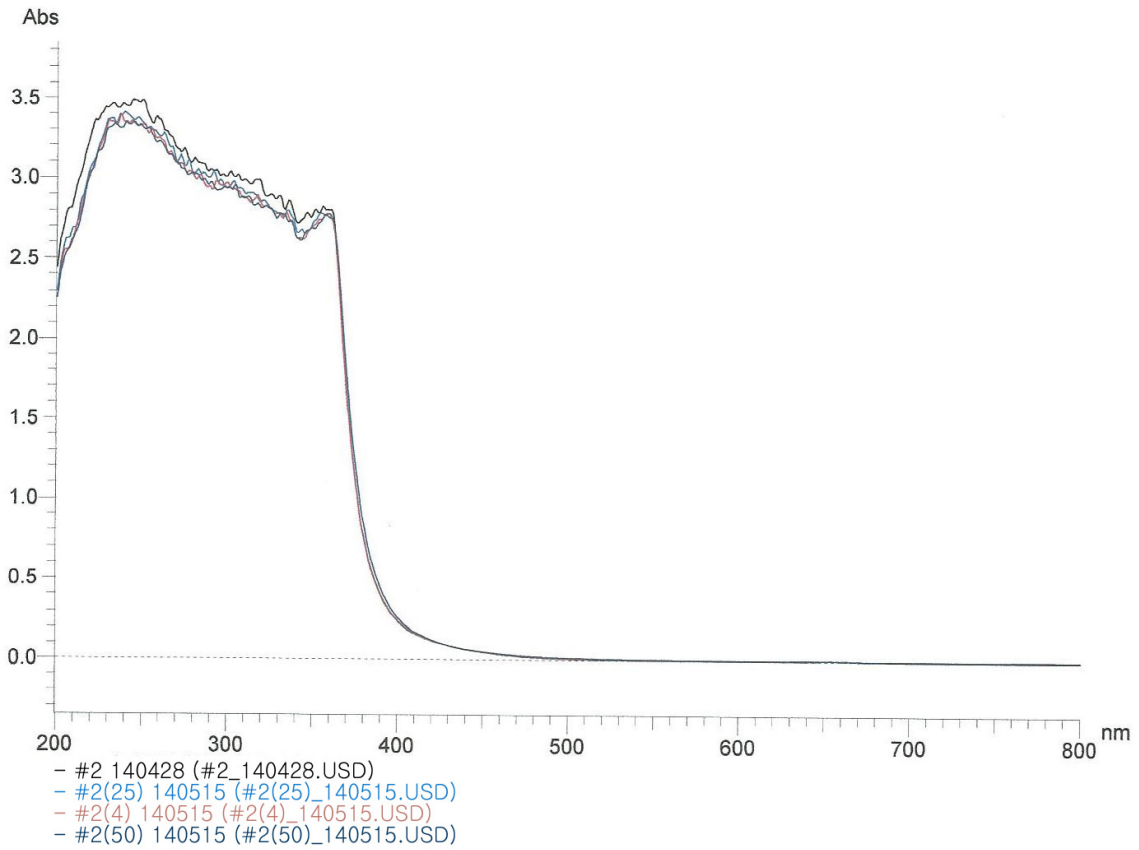


그림 3-9. 각 저장 조건 별 천연 유자향의 초기 값과 최종 값 흡광도 비교

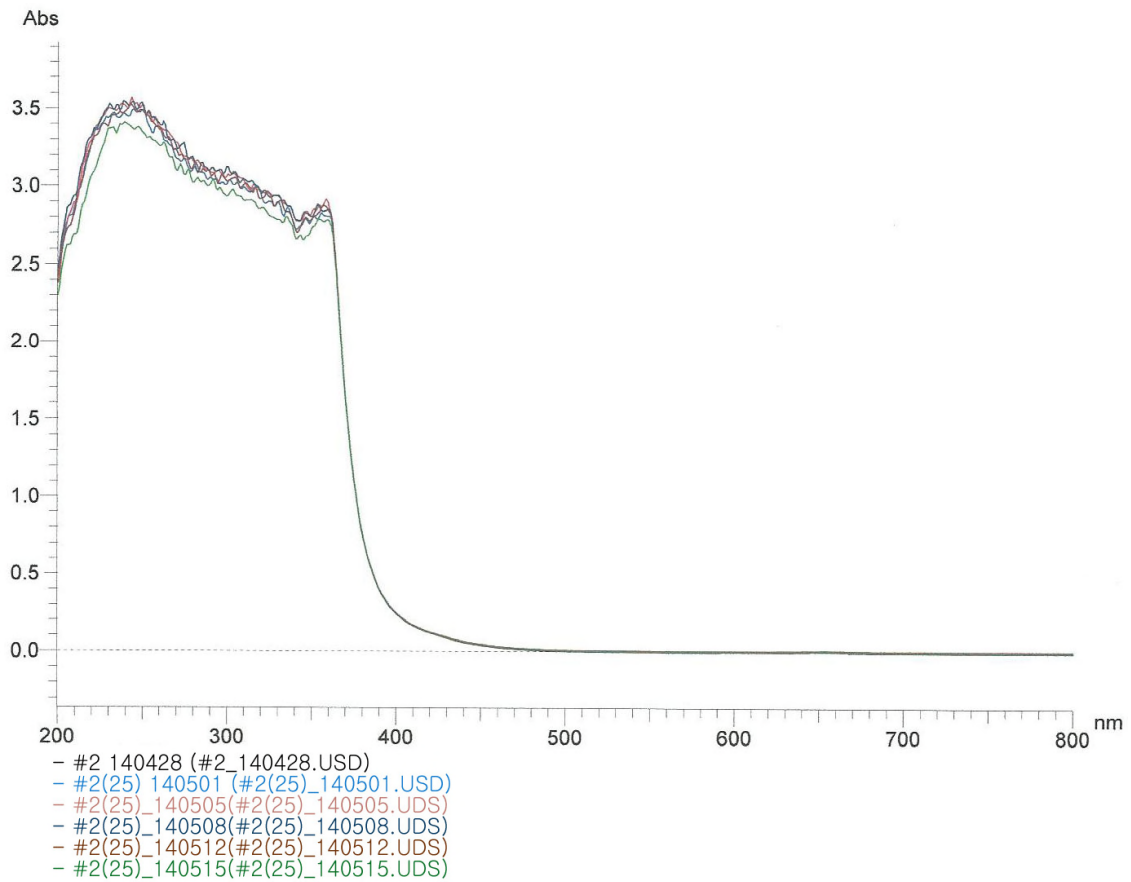


그림 3-10. 저장 기간에 따른 실온(25°C) 보관 천연 유자향의 흡광도 변화

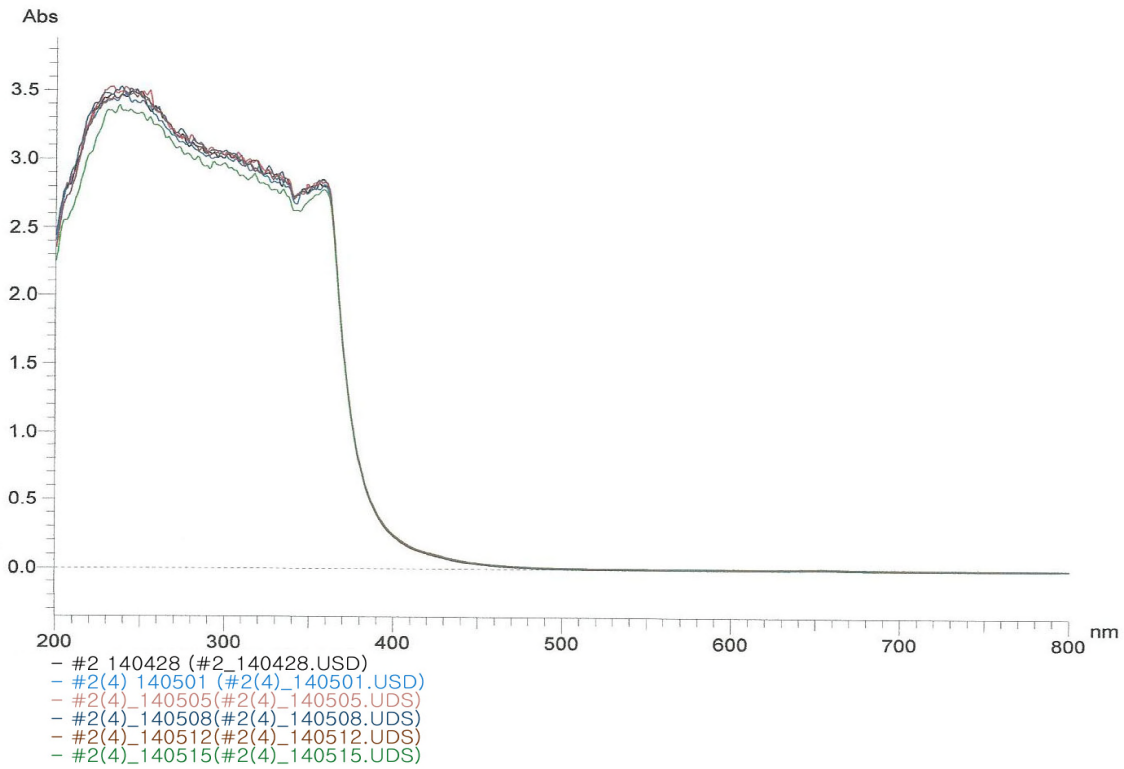


그림 3-11. 저장 기간에 따른 냉장(4℃) 보관 천연 유자향의 흡광도 변화

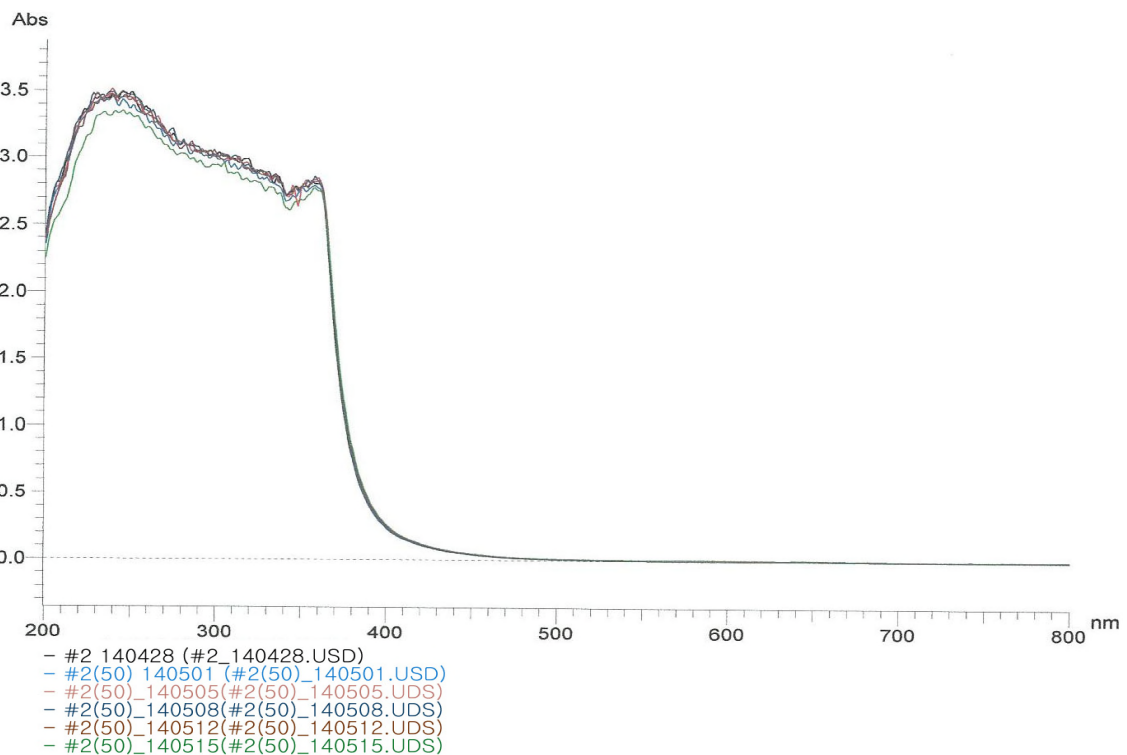


그림 3-12. 저장 기간에 따른 오븐(50℃) 보관 천연 유자향의 흡광도 변화

저장조건에 따른 천연 유자향의 GC/MSD분석 결과 몇몇 Peak에서 미세한 높낮이 변화를 보였으나 전체적으로 큰 변화는 없었다(그림 3-8). 각 보관 조건 별 천연 유자향의 시간경과에 따른 GC/MSD 분석 결과는 그림 3-13~16과 같다.

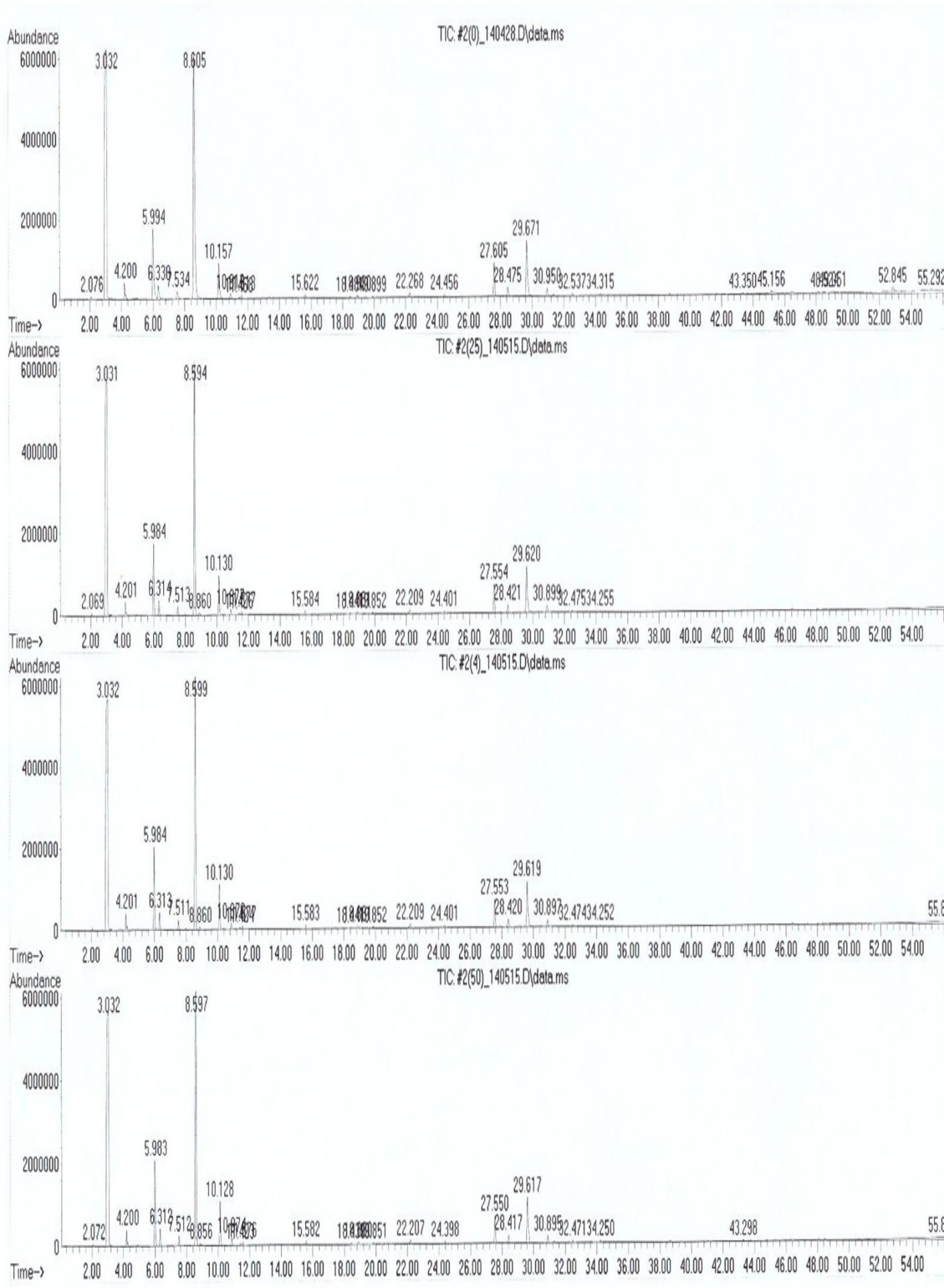


그림 3-13. 각 저장 조건 별 천연 유자향의 초기 및 최종 TIC비교



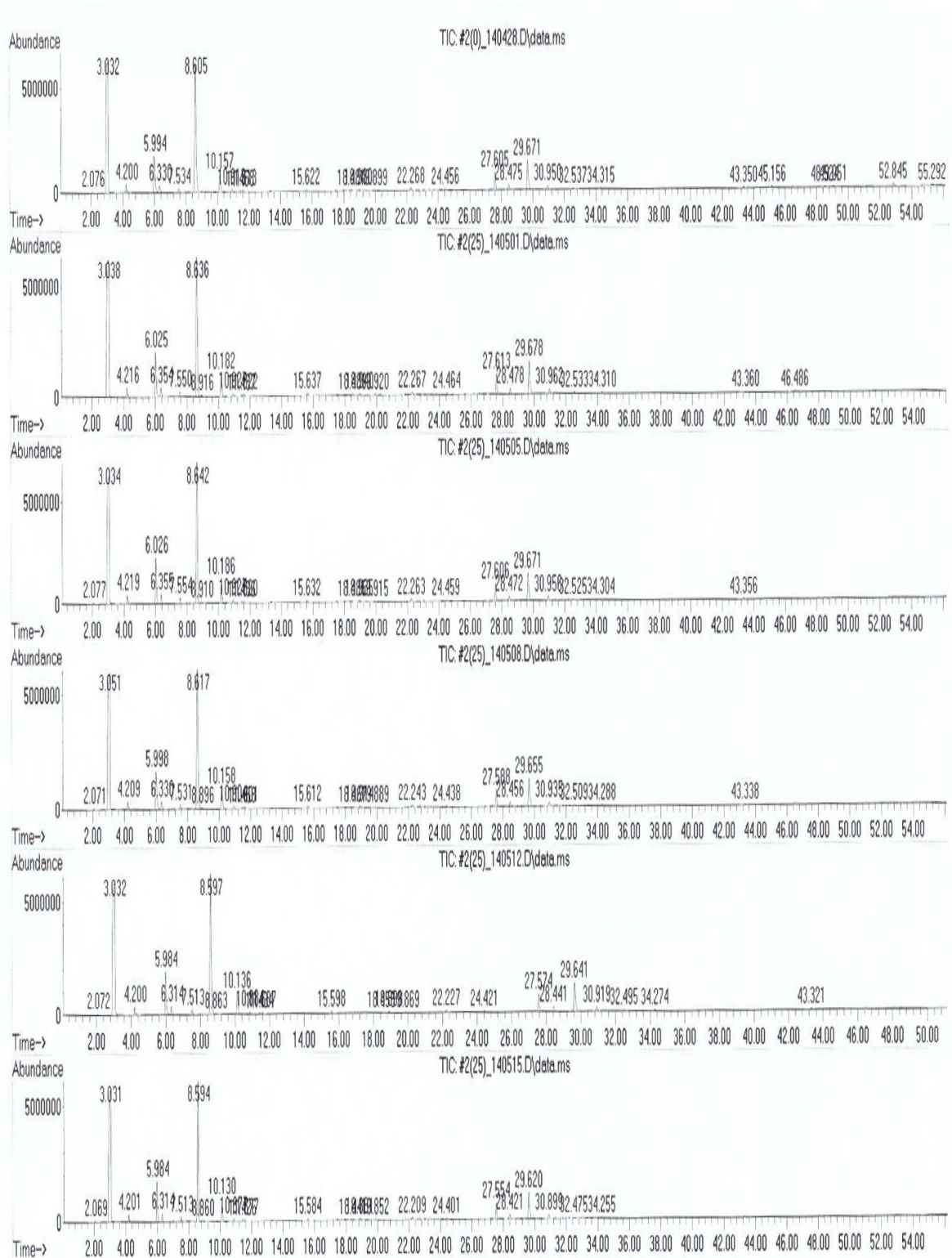


그림 3-14. 저장 기간에 따른 실온(25°C) 보관 천연 유자향의 TIC 변화

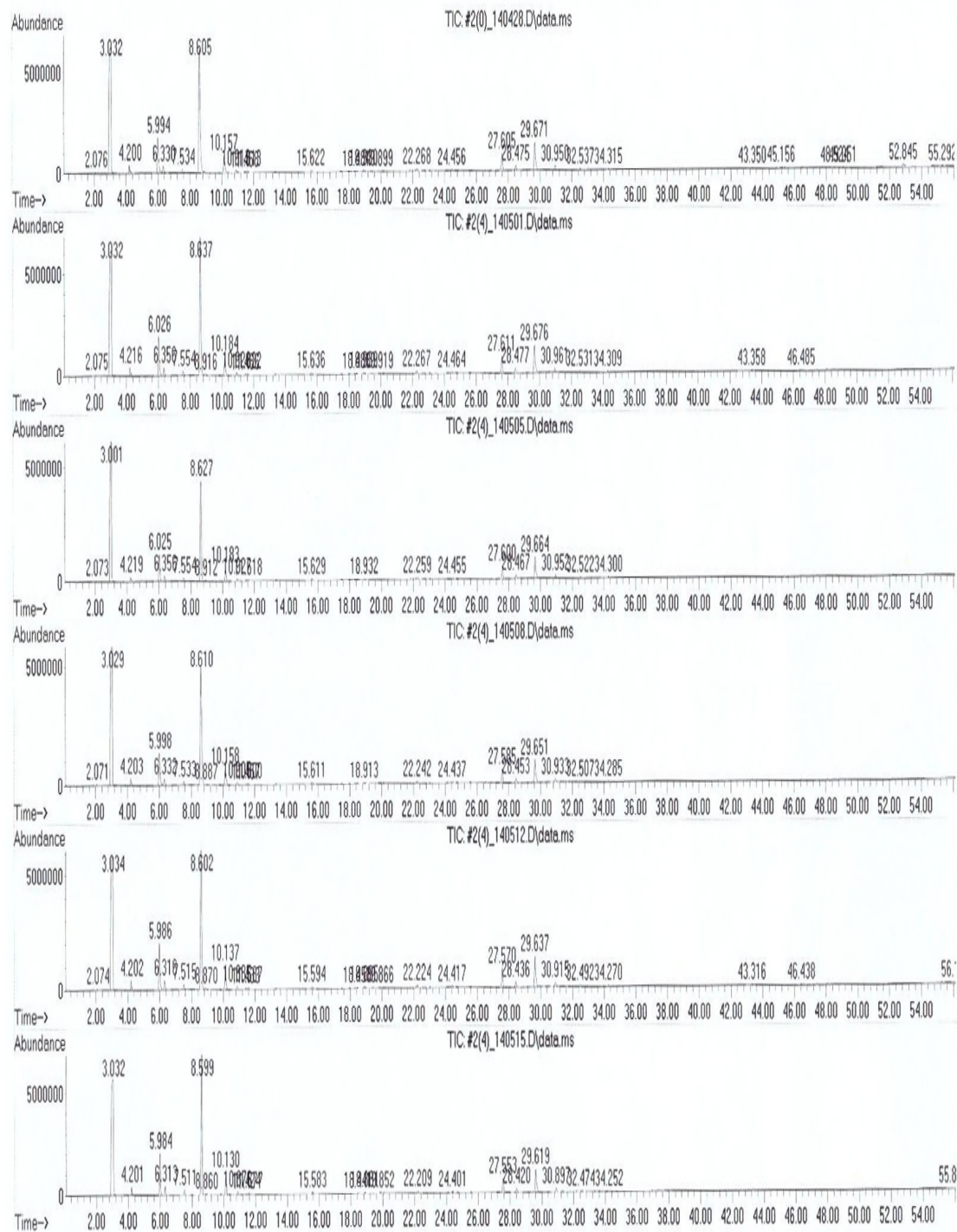


그림 3-15. 저장 기간에 따른 냉장(4°C) 보관 천연 유자향의 TIC 변화



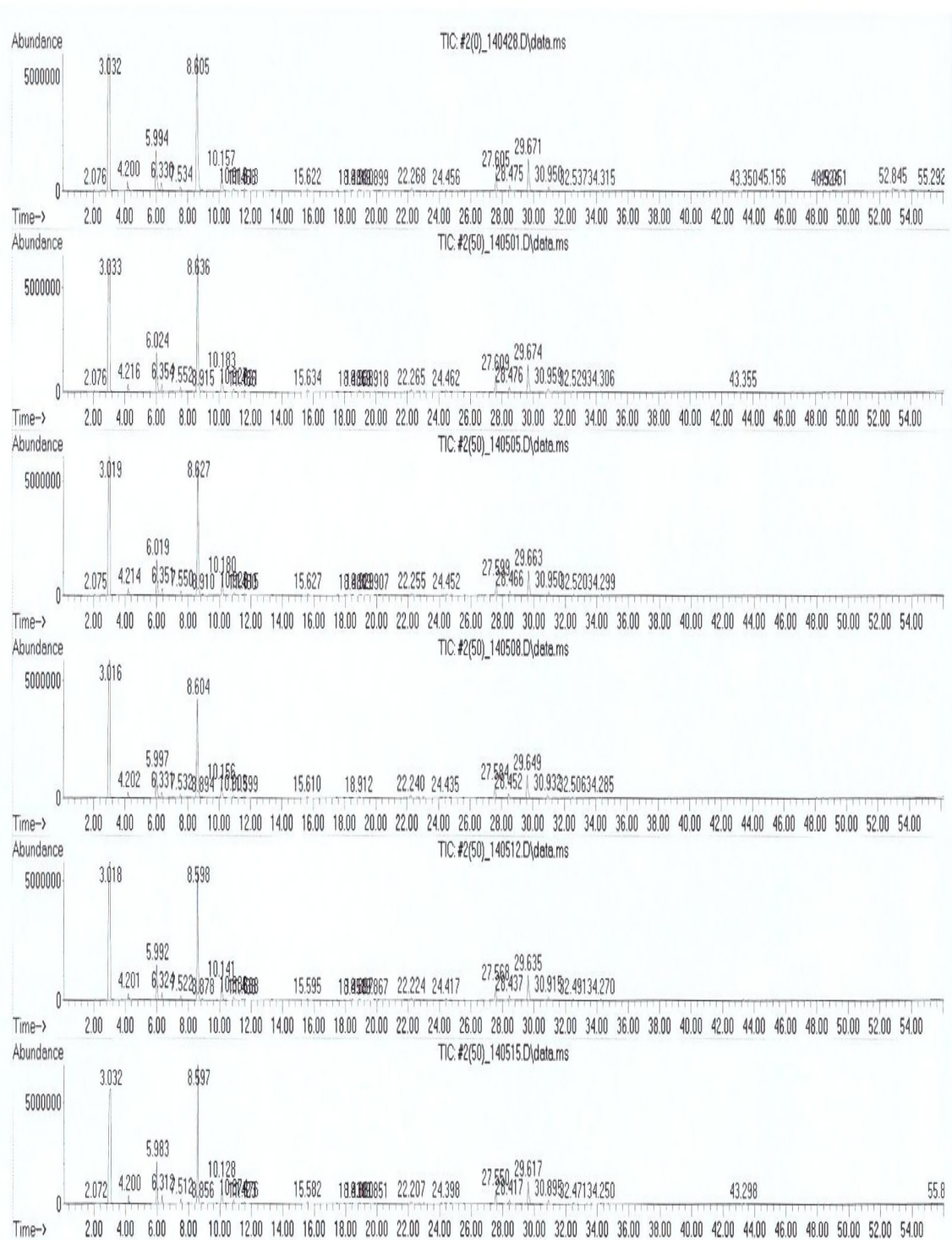


그림 3-16. 저장 기간에 따른 오븐(50°C) 보관 천연 유자향의 TIC 변화

3주간의 실험 결과 세 조건 모두 점성에 대한 변화는 없으며 성상은 조금 진해졌으나 육안상 큰 차이가 없는 미세한 변화였다. 향취 또한 저장 기간이 길어질수록 약간 강도가 약해지거나, 오븐 보관 조건 경우 절인 유자 향취가 조금 나타났으나 전체적으로 큰 변화가 없음을 확인하였다. 흡광도와 TIC는 모든 천연 유자향에서 동일한 패턴을 보였으며 시간이 지남에 따른 약간의 강도차이 만을 나타내었다.

결과를 종합해보면 천연 유자향의 성상, 향취 모두 안정성이 뛰어난 것을 알 수 있었다. 또한 실온 보관에 이상이 없으며 장기 보관이 필요한 경우 냉장 보관을 통해 품질 유지가 가능한 것으로 보인다.

또한 수입산 제품과의 품질을 비교하기 위해 GC/MSD 분석을 실행하여 수입 제품과 비교 분석 하였다(그림 3-17).

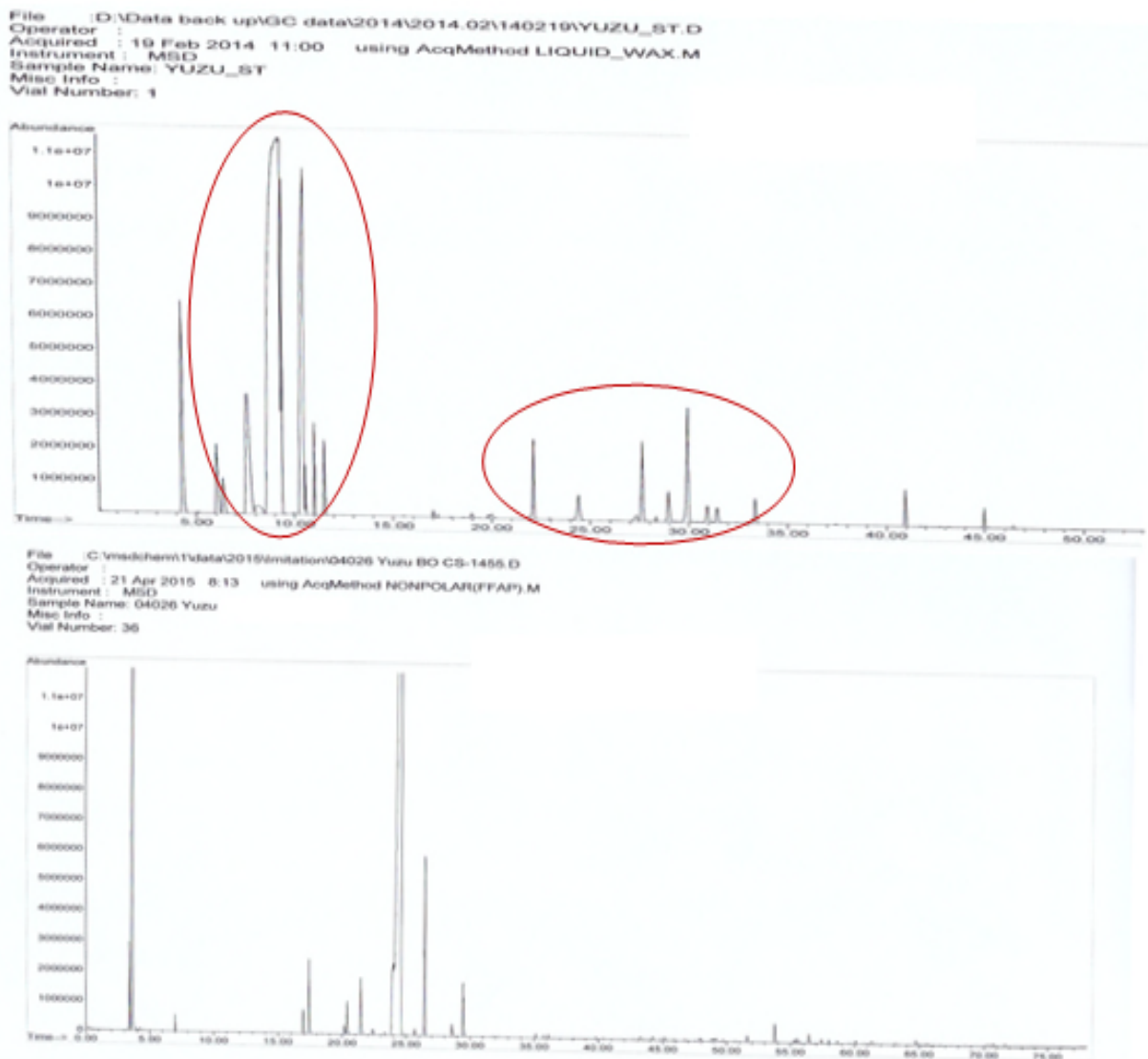


그림 3-17. 효소 전처리 방법으로 추출된 유자 에센셜 오일(위), 수입 유자 에센셜 오일(일본)(아래)

분석결과 전반적으로 수입 유자 에센셜 오일보다 효소 전처리 방법으로 추출된 유자 에센셜 오일의 향기성분이 유의적으로 높게 나타났다. Limonene의 함량차이는 비교적 비슷하였으나 유자의 특징적인 향기성분인 gamma-terpinene 및, p-cymene, myrcene, linalool, beta-farnesene, bicyclogermacrene 등의 함량이 유의적으로 낮게 분석되었다. 관능적인 차이역시 수입 에센셜 오일 보다는 효소 전처리된 에센셜 오일이 좀더 자연적인 유자의 특유의 향을 느낄수 있었다.

#### 나. 껌용 천연향의 저장 조건에 따른 관능평가

껌용 천연 유자향의 경시변화의 관찰을 위해 단기실험을 2014. 06. 02(초기값)부터 2014. 06. 20(최종값)까지 3주간 진행 하였으며, 주 2회총 6회 측정 하였다. 업체에 제시한 5가지 껌용 천연 유자향 중 가장 선호도가 좋았던 #A, #B 및 #D 를 이용하여 경시변화 실험을 진행한 결과 유의적인 차이가 없었다.

### 6. 천연 유자 정유의 천연향료소재 제품화 및 제품화 적용기술의 개발

천연 유자 정유를 기반으로 한 식품 제형별 천연 유자향 및 Compound Flavor를 바탕으로 식품 및 향장품으로서 적용 가능여부를 위하여 Application test를 진행하였다.

#### 가. 식품 소재 개발 가능성 확인

##### (1). 유자 음료

음료는 청량감이 있으며 갈증해소, refresh 감을 느낄 수 있게 하는 것이 중요한 요소이다. 음료를 구성하는 성분 중 특히 flavor가 가지고 있는 역할은 상당히 중요하며 음료는 사회 환경과 기호의 변화에 따라 많은 새로운 제품들이 개발되고 있다. 음료에 있어서 flavor의 역할은 그 음료가 가지고 있는 concept, image를 만드는데 있어 매우 중요하다. 음료용 향료로는 수용성type의 essence와 유화향료가 주로 사용된다. 투명 음료에는 향료가 음료base에 투명하게 용해되는 것이 필요하지만, 탁도가 있는 음료에서는 cloudy의 역할을 가진 유화향료와 essence를 병용해 사용하는 경우가 많다. 특히 유자 향료는 원료의 천연 정유가 oil성이기 때문에 물에 강제적으로 분산시키기 위해서 유화향료의 형태를 만들어서 사용하기도 한다.

Cola, lemon, lemon-lime, cider, orange, grape등 비교적 기호성이 높은 제품이 오랜 세월 동안 시장을 형성해 오고 있다. 음료의 부향에는 citrus flavor의 사용이 압도적으로 많다. 특히 cola, cider 제품에도 향료의 소재로써 citrus계가 많이 사용된다. Citrus계의 flavor가 청량감이 있어 음료에 가장 적당하기 때문이다.

유자는 달콤하고 상큼한 과즙적 분위기가 강하여 탁도가 있는 음료에 잘 어울리며, 유자 음료에 가벼운 aldehyde류를 강조시키면 top note의 향취가 매우 좋게 된다. Flavor는 청량감과 상쾌감 뿐만 아니라, 어느 정도의 과즙감을 나타내어야 한다. 또 Top note에 나타나는 성분이 적기 때문에 lemon 및 lime등의 citrus계 향료로 향취를 보강하는 경우 더욱 더 과즙감이 느껴진다. Citrus계의 essence속에는 citrus oil 성분으로 terpene 탄화수소류가 함유되어 있는데, 이것은 물에 난용성이기 때문에 이 terpene 탄화수소를 많이 함유한 essence를 사용하면 음료가 유색으로 혼탁해진다. 이 같은 essence는 투명 음료에는 사용할 수 없지만 음료에 탁도가 있는 경우에 이 같은 essence를 사용할 수 있다. Citrus계 essence속의 terpene 탄화수소는 fresh한

peel감을 부여하는 요소이기 때문에 flavor중에는 어느 정도 필요한 성분이다.

유자 과즙 음료는 당, 산, vitamin 및 mineral등의 함유로 영양가가 높은 음료이다. 과즙이 가진 건강지향적인 image와 그 효용과 기능에는 여러 가지의 것이 있다. 유자의 일반성분 중 다른 과일에 비해 칼슘이 많고 사과, 바나나 등보다 10배 이상 많다. 유자는 주로 과피를 이용하기 때문에 섬유질 및 회분이 많고 비타민C 함량이 일반 감귤류에 비해 3배 정도 많다. 비타민 B1은 사과, 복숭아의 10배, 단감이나 바나나의 3배정도가 들어 있다. 유자에 함유된 유기산은 8종 정도가 되는데 가장 함유량이 많은 것은 구연산(Citric acid)으로 총 유기산의 60%내외를 차지한다.

하지만 음료를 개발하는 데 있어 기능성 측면이 좋아도, 관능적으로 풍미가 우수하지 않으면 그 효과는 반감하게 된다. 그렇기 때문에 과실음료용 향료 역할이 매우 중요하다고 할 수 있다. 과실음료에 대한 향료의 역할을 보면 과실음료가 다른 음료와 다른 점은 천연소재로부터 착즙한 원료를 주재료로 사용하고 있는 것이다. 여기에서 과실음료 제조에 사용되는 향료는 다음과 같은 역할을 한다.

- 1) 과즙 농축시의 휘발성 성분의 loss를 보강하고, 신선함을 나타내는 역할.
- 2) 살균에 의해 생기는 가열 취를 masking하는 역할.
- 3) 과즙의 경시변화에 따른 향미 변화를 cover하고, 상품으로서의 안정성을 높이는 역할.
- 4) 과즙이 가진 쓴맛, 신맛, 떼은맛, 입 안쪽의 산뜻하지 못한 맛 등을 완화하는 역할.
- 5) 과즙이 가진 개성과 상품가치를 높이고 보다 기호성이 좋게 하는 역할.

향료에서 요구되어지는 조건

- 1) 청량감이 느껴져야 하기 때문에 음용 후 오랜 시간 동안 입안에서 향이 남아있어서는 안된다.
- 2) 향취, 풍미가 일정한 품질을 가져야 한다.
- 3) 과실음료는 비교적 pH가 낮기 때문에 사용하는 향료는 산에 대해서 안정한 것이라야 한다.

과실음료는 과즙의 함량 등에 의해 다음과 같이 분류된다.

- 1) 천연과즙 - 과즙 100% 음료로 juice라고 부른다. 인공적인 향료를 사용하지 않고 농축 과즙 시에 포집시킨 recovery flavor를 부향한다.
- 2) 과즙음료 - 과즙함량 50% 이상의 음료로 orange, apple, grape가 있다. 100% 과즙과 비교할 때 천연과즙이 적기 때문에 살균에 의한 노화의 영향이 비교적 적고 향료 사용이 가능하기 때문에 경제성과 기호성이 높은 제품을 만들 수 있다.
- 3) 과즙이 들어있는 청량음료 - 과즙함량 10% 이상 50% 미만의 음료로 비교적 과즙 함량이 적지만 과즙의 풍미를 느낄 수 있으며 색조를 기대할 수 없으므로, 착색료, cloudy등이 이용되어진다. 과즙음료에 비해서 과즙함량이 낮기 때문에 이용하는 향료는 과즙감이 있는 body note가 강한 것을 사용하는 것이 좋다.
- 4) 과립이 들어있는 청량음료 - 과즙이 들어있는 청량음료에 과립을 넣은 것으로 과실분 15% 이상, 과립분 5% 이상 30% 이하의 음료이다.  
과립 10~20%, 과즙 함량 10~20%의 과실분 20~40%가

마시기에 좋다. 과립의 경시변화에 견딜 수 있는 강도가 강한 향료를 사용하는 것이 좋다.

유자향 향기성분은 과피의 표층부에 있는 유세포로부터 분비되어지는 peel oil과, 과육 속의 과즙세포에서 생성되는 essence oil로 크게 나눌 수 있다. Peel oil의 주성분으로서 90%이상은 terpene계 탄화수소이지만 향취의 특징을 가지고 있는 것은 oil속의 몇 %를 차지하고 있는 합산소 화합물이다. 이러한 합산소 화합물을 많이 함유하는 terpeneless oil이 과실음료에 많이 이용되고 있다.

또 terpene계 탄화수소가 많으면 혀를 자극시키기 때문에 주의하여 음료에 적용해야 한다. Essence oil은 일반적으로 합산소 화합물이 많고 이 향취는 peel oil과 유사하지만 fresh한 과즙 flavor를 갖고 있어 최근에는 이 type에 대한 관심이 고조되어 이용도 또한 매우 높다. 유자를 함유하는 citrus계 음료용 향료는 essence, essence oil, recovery flavor, terpeneless oil등 원료 소재가 풍부하여 조향하는 데 있어서 폭넓게 이용 할 수 있다.

국내 flavor의 향료시장은 음료류 38%, 빙과류 25%, 캔디류 17%, 껌류 18%, 기타 2% 정도로서 향료 시장에서 음료가 차지하는 비중이 가장 크다고 할 수 있다. 특히 유자는 가장 대중적인 제품의 형태가 유자 음료이기도 하다. 그러나 현재까지 유자음료의 형태는 단순히 당침법을 이용한 음료의 형태로서 주로 가정에서 소비되는 측면이 있어 음료산업에서의 유자의 소비는 미비하다고 할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 유자농축액 및 유자과즙 유자 향을 이용하여 음료 제품으로서 적용 가능성을 확인하기 위하여 다음과 같은 배합비로 음료 제품을 개발하였으며 배합비는 표 3-16과 같다.

표 3-16. 유자 음료 배합비

원재료	#505	#523	#548
유자농축액	3	3	2.5
유자과즙	2	2	2.5
정제수	82.986	82.427	82.956
액상과당	10.5	11	10.5
덱스트린	0.5	0.5	0.5
사과농축액	0.5	0.5	0.5
비타민C	0.05	0.05	0.05
유자향	0.1	0.15	0.12
수크랄로스	0.006	0.005	0.006
함수구연산	0.14	0.15	0.15
구연산삼나트륨	0.1	0.1	0.1
젖산칼슘	0.1	0.1	0.1
베타카로틴(2%)	0.018	0.018	0.018
합계	100	100	100



그림 3-18. 유자 음료

## (2). 유자 아이스크림

국내 flavor의 향료시장에서 빙과류가 차지하는 비중은 25%로서 음료류 다음으로 높은 비중을 차지하고 있는 반면 감귤류를 이용한 빙과류의 종류는 한정되어 있다. 또한 빙과는 어린이부터 성인까지 폭넓게 좋아하는 기호성이 높은 식품이다. 여러 식품중에서 구매의욕을 고취시키기 위해서는 무엇보다도 기호도를 좌우하는 flavor의 역할이 매우 중요하다. 남자보다 여성들이, 고연령보다 나이가 어릴수록 빙과류를 많이 먹는 것으로 알려져 있기 때문에 기호층의 선호도가 있는 refresh, acidic type의 유자향을 사용하여 소비자의 고급감 즉 natural감을 부여, 천연지향감과 저칼로리로 건강지향적인 제품을 개발 하고자 하였다.

### 1) 빙과용 향료의 형태

#### 가) 수용성향료

물에 잘 용해되기 때문에 저온에서도 향취가 좋은 특징을 가지고 있어 많이 이용된다.

#### 나) 유화향료

물에 용해되지 않는 향료base를 arabic gum등의 천연점을 이용하여 O/W형의 유화상태로 만든 것으로 essence보다 내열성이 우수하고 독특한 정미감을 부여한다.

### 2) 빙과용 향료의 특징

빙과용 향료는 다음 같은 특징을 가진 향료가 바람직하다.

가) 유제품, 식물성 oil등의 향미에 대한 결점을 masking하고 잘 조화 될 수 있는 것이 중요하다.

나) 유성분과 과육, 과즙 등의 향미를 enhance하는 효과가 있는 것이 좋으며, 샤베트의 경우는 과즙과의 조화가 매우 중요하다.

다) 저온에서 먹기 때문에, 저온시 향의 balance가 좋은 type를 선택해야 된다.

라) Aging할 때(일반적으로 +5℃ 전후) 첨가하는 경우가 많기 때문에 균일하게 분산, 용해되어야 한다.

유자향은 다른 citrus계 flavor와 마찬가지로 청량감이 있고, 산미와 잘 어울리기 때문에 샤베트, ice candy등의 개발이 가능하다. 또 유자의 과육, 과즙을 사용해서 고급화 할 수 있다. 유자향은 과즙, 과육에 잘 어울리고, 과즙의 off-flavor를 masking하며 fresh한 과즙감이 느껴지는 향료이다. 유자향은 천연정유를 Essence화한 것도 있지만, juicy감이 강한 유화향료를 개발 사용 하기도 한다. 본 연구에서는 개발된 유자 향료 및 유자 과즙을 이용하여 소비자의 고급감, natural 지향적으로 fresh하고 유자의 과즙감을 사용하여 여러 기능성을 부각시킴으로서 건강지향적인 제품개발 및 다양성을 요구하는 소비자들의 욕구를 충족시킬 수 있을 것으로 사료된다. 본 실험에서는 유자향과 유자 과즙을 이용하여 아이스크림 제품에 응용가능성을 확인하기 위하여 다음과 같이 제조하였으며 배합비는 표 3-17과 같다.

표 3-17. 유자 아이스크림 배합비

원재료	#1001	#1009	#1013
정백당	14	14	14
물엿	4	4	4
말티톨	1.5	1.5	1.5
탈지분유	4.0	4.0	4.0
버터	2.3	2.3	2.3
유청분말	2.0	2.0	2.0
유화제	0.2	0.2	0.2
안정제	0.2	0.2	0.2
정제염	0.05	0.05	0.05
바닐린	0.05	0.05	0.05
유자향	0.15	0.10	0.05
유자과즙	1	2	3
정제수	70.55	69.6	68.65
합계	100	100	100

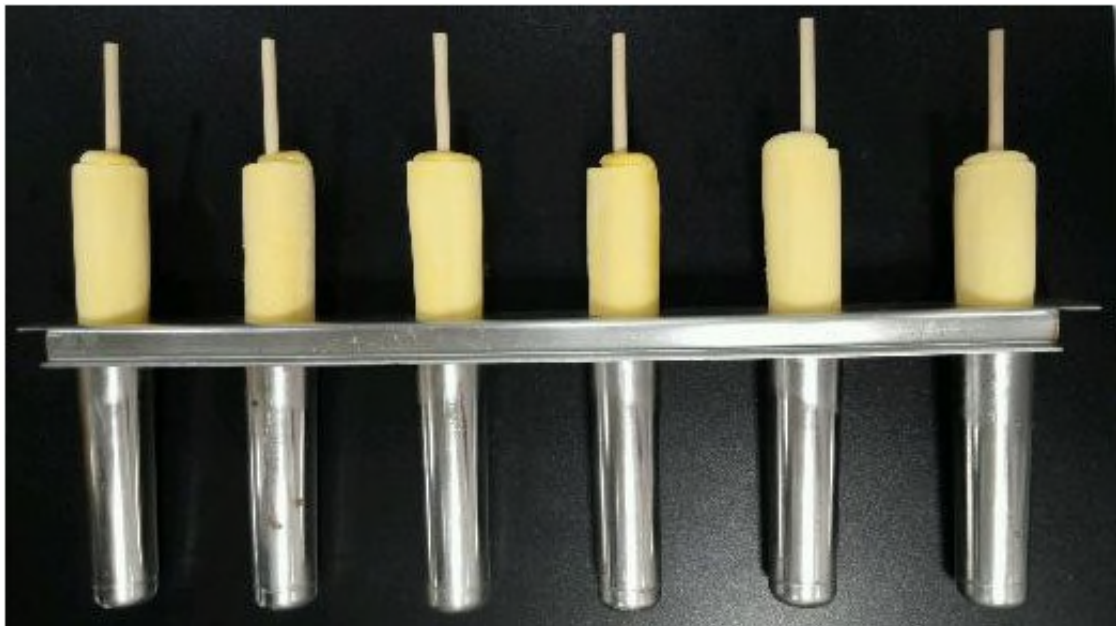


그림 3-19. 유자 아이스크림



### (3). 유자 요거트

유자 소재를 이용한 제품의 다양성 및 유자의 기능성을 부여하여 건강기능식품의 개발의 필요성이 요구되어지고 있다. 따라서 본 실험에서는 조합된 유자향 과 유자과즙 및 유자 농축액을 이용하여 유제품에 응용 가능성을 확인하기 위하여 유자 요거트 제품에 적용하였으며, 배합비는 표 3-18과 같다.

표 3-18. 유자 요거트 배합비

원재료	#607	#618	#626
원유	52.76	52.76	52.76
탈지분유	4.46	4.46	4.46
펙틴	0.74	0.74	0.74
정제수	17.02	17.02	17.02
유산균 배양액	0.01	0.01	0.01
유자과즙	15	12.5	10
유자 농축액	10	12.5	15
유자향	0.1	0.1	0.1
합계	100	100	100



그림 3-20. 유자 요거트

#### (4). 유자 젤리

조합된 유자향 및 유자 과즙액을 이용하여 젤리 제품에 응용 가능성을 확인하기 위하여 다음과 같이 제조하였으며 배합비는 표 3-19과 같다.

표 3-19. 유자 젤리 배합비

원재료	#715	#721	#738
액상과당	10	11	11
정제수	70.51	61.91	60.91
결정과당	10.00	11.00	10.00
가라기난	0.85	0.85	0.85
L B G	0.15	0.15	0.15
구연산삼나트륨	0.10	0.10	0.10
유자농축과즙액	8.00	7.00	9.00
함수구연산	0.15	0.15	0.15
비타민C	0.10	0.10	0.10
베타카로틴(2%)	0.04	0.04	0.04
유자향	0.10	0.10	0.10
합계	100	100	100



그림 3-21. 유자 젤리

### (5) 유자 껌

Gum에 응용하기 위해서 물성 및 지속성(long lasting)이 중요한 요소이다. 유자는 감귤류의 특성상 향의 지속성이 떨어진다는 단점을 가지고 있다. 본 실험에서는 유자 향기성분의 지속성을 늘리기 위하여 유자향의 조합조건을 달리하여 지속가능한 유자향을 개발하였다. 조합된 유자향을 이용하여 껌 제품으로서 응용가능성을 확인하기 위하여 다음과 같이 제조 하였으며 배합비는 표 3-20과 같다.

표 3-20. 유자 껌 배합비

원재료	#1021	#1027	#1034
Sugar powder (분당)	52.41	52.41	52.41
껌베이스	27.5	27.5	27.5
Triacetine	0.5	0.25	0.25
Glycerine	0.5	0.5	0.25
포도당	10	10	10
물엿	8	8	8
수크랄로스	0.03	0.03	0.03
유자향	1.0	1.25	1.5
베타카로틴(2%)	0.06	0.06	0.06
합계	100	100	100



그림 3-22. 유자 껌

## 나. 향장품 소재 개발 가능성 확인

유자의 기능성 물질로는 비타민 P의 기능을 갖는 헤스페리딘을 들 수 있으며, 생리기능은 모세혈관 보호와 혈압을 조절하고 간에서 생성되는 지질 과산화물의 형성을 억제시켜준다. 또한 나린진(naringin)은 항산화 작용과 항균작용을 한다고 보고되고 있다. 또한 유자에 함유된 비타민B와 단백질, 유기산이 풍부해 노화지연에 많은 도움을 준다. 유자속에 들어있는 펙틴질은 항염증작용을 해 화상이나 피부염에도 도움을 발휘한다고 한다고 보고되고 있다. 이처럼 유자는 피부미백에 효과가 입증되어 이미 일본에서는 유자를 소재로 한 화장품이나 입욕제등을 만들어 즐기고 있다. 특히 유자의 에센셜 오일은 심신 안정과 진정, 불안과 우울감을 해소시키는데 우수한 효과를 가지므로 화장료뿐만 아니라 방향제, 탈취제등으로 유용하게 이용될 수 있다. 본 연구에서는 위와 같은 유자의 기능성을 부여한 향장품 소재 개발의 가능성을 확인하기 위하여 다음과 같은 향장품을 개발하였다.

### (1). 유자 세안제

유자향을 소재로 하여 세안제로서의 적용 가능성을 확인하기 위하여 다음과 같이 제조하였으며, 배합비는 표 3-21과 같다.

표 3-21. 유자 세안제 배합표

원재료	#804	#811	#818
라우릴산	4.5	4.0	3.5
미리스틱산	3.5	4.0	4.5
코카미도DEA	3.5	3.5	3
코카미도프로필바민	3.0	3.0	3.5
코코안호초산나트륨	3.2	3.2	3.2
트리에탄올아민	5.7	6	5.6
글리세린	2.0	2.0	2.0
메틸파라벤	0.2	0.2	0.2
펄화제	7.5	7.2	7.4
유자향	0.2	0.3	0.3
정제수	66.8	66.6	66.8
합계	100	100	100



그림 3-23. 유자 세안제

(2). 유자 비누



그림 3-24. 유자 비누

(3). 유자 입욕제



그림 3-25. 유자 입욕제

(4). 유자 향초



그림 3-26. 유자 향초

## 다. 폐유자박을 활용한 동물 사료소재로서 개발 가능성 확인

### (1). 유자박 사료

천연 유자 Essential oil 및 유자 가공품을 생산한 후 발생하는 유자부산물을 이용하여 동물성 사료로서의 가능성을 확인하기 위한 실험을 진행 하였다. 유자에는 여러 가지 다당류, 지방산, 비타민류 등이 함유되어 있고, 생리활성 물질인 naringin, hesperidine 등의 flavonoid류가 다량 함유되어 있다고 보고되고 있다. 특히 flavonoid류는 항산화, 항균, 항돌연변이, 항염증, 항알러지, 항바이러스 작용 및 순환기계 질병예방과 모세혈관 강화 등의 약리효과가 높은 것으로 보고되고 있다. 따라서 이러한 고기능성 성분을 다량 함유하고 있는 유자 부산물을 이용하여 동물성 사료 소재로서의 가능성을 확인하여 동물에 질병예방과 면역력 증가를 기대할 수 있을 것이라 생각되어 사료제품에 소재로서 응용하였으며, 배합비는 표 3-22와 같다.

표 3-22. 유자박 사료 배합비

원재료	#901	#914	#918
옥수수 전분	57.2	57.2	57.2
설탕	10	10	10
DL-메티오닌	0.3	0.3	0.3
미네랄 믹스	3.5	3.5	3.5
비타민 믹스	1	1	1
셀룰로스	4	2	1
카제인	18	18	18
옥수수유	5	5	5
건조 유자박	1	3	4
합계	100	100	100



그림 3-27. 유자박 사료

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도



## 제1절 연구개발 착안점 및 달성도

### 1.연구계획서의 착안점

연도	세부 연구 목표	평가의 착안점 및 척도	척도
1차년도(2012)	생물학적 전처리 방법에 의한 유자 정유의 생산성향상	- 정유의 회수율 향상(>10%)을 위한 표준화 공정 개발	20
	유자 정유의 방향성분 조성 및 조성 비율을 위한 GC-MS 분석	- 유자의 전처리 조건에 따른 정유 성분 변화에 따른 Flavor profile 변화 분석	20
	미량 및 특히 성분의 미량 정성/정량 HRGCO-MS 분석	- 유자 정유 특이의 미량 성분 확인 및 Flavor 특성 평가 - 미량 성분에 따른 Flavor profile의 변화 정도를 측정	30
	천연 유자 정유를 기반으로 한 천연 유자 향료소재의 개발	- 천연 향료물질 및 Chemical Formulation - 조합된 시료의 기기분석 및 조합된 시료의 관능 테스트	30
2차년도(2013)	유자의 생물학적 전처리를 통한 유자 정유의 Flavor Profile 향상	- 유자 정유의 Flavor의 특성을 변화시키는 미생물/효소 동정 (최소 3가지) - Flavor 향상을 위한 정유의 미생물/효소의 전처리 조건을 최적화 (온도, 시간, pH) - Flavor Profile 향상을 위한 정유의 미생물/효소 공정 조건	20
	유자 정유 및 천연 향료 물질을 이용한 Biotransformation 공정 개발	- 미생물/효소 전처리 조건에 따른 유자 정유의 부향 성분 조성 확인(최소 >3가지) - 부향 성분 향상을 위한 정유의 미생물/효소의 생물전환 공정의 개발 (온도, 시간, pH, 1개이상) - 부향 성분 향상 및 부향 성분 천연 합성을 위한 정유의 미생물/효소 공정 조건	20
	Flavor Profile Analysis를 통한 Artificial 유자 정유 Creation (flavor chemical Library)	- Artificial 유자 정유의 Creation을 위한 방향성분의 혼합비율 설정 - Artificial 유자 정유의 Creation - 혼합비율에 따른 Artificial 유자 정유의 관능평가 실시	15
	Flavor Profile Analysis를 통한 유자 정유 부향 향기 성분의 동정	- 유자 정유의 Flavor Development의 연관성을 확립 및 부향 성분을 분류 여부 - 부향 향기 성분과 정유의 최적 혼합비율 기준 설정 관능평가를 기준 확립 여부	15
	천연 유자 정유를 기반으로 한 제품 제형별 천연 유자 향 개발	- 기존 생산량에 대한 대량 생산 개량화 작업 - 유자 정유를 이용한 천연향의 제조 - 장기간 보관 중 유분리 등에 대한 문제점 해결을 위한 균질 조건 확립 - 천연향의 제품 저장에 따른 관능평가 (조향사 및 전문 패널)	30

연도	세부 연구 목표	평가의 착안점 및 척도	달성도
3차년도 (2014)	유자 정유 부향 성분조성 향상을 위한 유자 정유의 상업화 생물전환기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유자의 미생물/효소 전처리 조건에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석 여부</li> <li>- 정유의 부향 성분 확인 여부</li> <li>- Flavor 향상을 위한 미생물/효소의 전처리 조건 최적화</li> <li>- 정유의 Flavor Profile 향상을 위한 유자의 미생물/효소 처리 공정 조건 확립 여부</li> </ul>	30
	유자 정유 부향 향기성분을 천연합성을 위한 상업화 생물전환기술개발(Biotransformation)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 동정된 부향 성분의 증가를 위한 처리 미생물/효소의 선별 여부</li> <li>- 전처리 조건에 따른 부향 성분의 변화를 분석 여부</li> <li>- 부향 향기성분의 향상을 위한 미생물/효소의 전처리 조건을 최적화</li> <li>- 부향 향기성분 향상을 위한 정유의 미생물/효소 공정 조건 확립 여부</li> <li>- 부향 향기성분의 생물전환을 위한 기질 및 미생물/효소의 선별</li> <li>- 부향 향기성분 생물전환을 위한 미생물/효소 최적 조건 (온도, 시간, pH 등)</li> <li>- 생물전환을 위한 미생물/효소의 최적 공정 조건 설정</li> </ul>	30
	천연 유자 향료소재의 개별 식품 제품적용기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Essence화를 통한 기능성 drink개발</li> <li>- LDPE, HDPE에 적용하여 6month 이상의 지속성 향료 개발(기능성 포장재)</li> <li>- 고기능(long lasting 향료) Gum용 향료 개발 적용</li> <li>- 기능성 아이스크림, 요쿠르트</li> <li>- 폐유자를 이용한 기능성 Gum 및 비누 개발</li> </ul>	20

## 2. 연구수행후의 달성도

연도	세부 연구 목표	평가의 착안점 및 척도	달성도
1차년도 (2012)	생물학적 전처리 방법에 의한 유자 정유의 생산성향상	- 정유의 회수율 향상(>10%)을 위한 표준화 공정 개발	100
	유자 정유의 방향성분 조성 및 조성 비율을 위한 GC-MS 분석	- 유자의 전처리 조건에 따른 정유 성분 변화에 따른 Flavor profile 변화 분석	100
	미량 및 특히 성분의 미량 정성/정량 HRGCO-MS 분석	- 유자 정유 특이의 미량 성분 확인 및 Flavor 특성 평가 - 미량 성분에 따른 Flavor profile의 변화 정도를 측정	100
	천연 유자 정유를 기반으로 한 천연 유자 향료소재의 개발	- 천연 향료물질 및 Chemical Formulation - 조합된 시료의 기기분석 및 조합된 시료의 관능 테스트	100
2차년도 (2013)	유자의 생물학적 전처리를 통한 유자 정유의 Flavor Profile 향상	- 유자 정유의 Flavor의 특성을 변화시키는 미생물/효소 동정 (최소 3가지) - Flavor 향상을 위한 정유의 미생물/효소의 전처리 조건을 최적화 (온도, 시간, pH) - Flavor Profile 향상을 위한 정유의 미생물/효소 공정 조건	100
	유자 정유 및 천연 향료 물질을 이용한 Biotransformation 공정 개발	- 미생물/효소 전처리 조건에 따른 유자 정유의 부향 성분 조성 확인(최소 >3가지) - 부향 성분 향상을 위한 정유의 미생물/효소의 생물전환 공정의 개발 (온도, 시간, pH, 1개이상) - 부향 성분 향상 및 부향 성분 천연 합성을 위한 정유의 미생물/효소 공정 조건	100
	Flavor Profile Analysis를 통한 Artificial 유자 정유 Creation (flavor chemical Library)	- Artificial 유자 정유의 Creation을 위한 방향성분의 혼합비율 설정 - Artificial 유자 정유의 Creation - 혼합비율에 따른 Artificial 유자 정유의 관능평가 실시	100
	Flavor Profile Analysis를 통한 유자 정유 부향 향기성분의 동정	- 유자 정유의 Flavor Development의 연관성을 확립 및 부향 성분을 분류 여부 - 부향 향기 성분과 정유의 최적 혼합비율 기준 설정 - 관능평가를 기준 확립 여부	100
	천연 유자 정유를 기반으로 한 제품 제형별 천연 유자향 개발	- 기존 생산량에 대한 대량 생산 개량화 작업 - 유자 정유를 이용한 천연향의 제조 - 장기간 보관 중 유분리 등에 대한 문제점 해결을 위한 균질 조건 확립 - 천연향의 제품 저장에 따른 관능평가(조향사 및 전문 패널)	100

연도	세부 연구 목표	평가의 착안점 및 척도	달성도
3차년도 (2014)	유자 정유 부향 성분조성 향상을 위한 유자 정유의 상업화 생물전환기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유자의 미생물/효소 전처리 조건에 따른 유자 정유의 Flavor Profile 분석 여부</li> <li>- 정유의 부향 성분 확인 여부</li> <li>- Flavor 향상을 위한 미생물/효소의 전처리 조건 최적화</li> <li>- 정유의 Flavor Profile 향상을 위한 유자의 미생물/효소 처리 공정 조건 확립 여부</li> </ul>	100
	유자 정유 부향 향기성분을 천연합성을 위한 상업화 생물 전환 기술 개발 (Biotransformation)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 동정된 부향 성분의 증가를 위한 처리 미생물/효소의 선별 여부</li> <li>- 전처리 조건에 따른 부향 성분의 변화를 분석 여부</li> <li>- 부향 향기성분의 향상을 위한 미생물/효소의 전처리 조건을 최적화</li> <li>- 부향 향기성분 향상을 위한 정유의 미생물/효소 공정 조건 확립 여부</li> <li>- 부향 향기성분의 생물전환을 위한 기질 및 미생물/효소의 선별</li> <li>- 부향 향기성분 생물전환을 위한 미생물/효소 최적 조건 (온도, 시간, pH 등)</li> <li>- 생물전환을 위한 미생물/효소의 최적 공정 조건 설정</li> </ul>	100
	천연 유자 향료소재의 개별 식품 제품적용기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Essence화를 통한 기능성 drink개발</li> <li>- LDPE, HDPE에 적용하여 6month 이상의 지속성 향료 개발(기능성 포장재)</li> <li>- 고기능(long lasting 향료) Gum용 향료 개발 적용</li> <li>- 기능성 아이스크림, 요쿠르트</li> <li>- 폐유자를 이용한 기능성 Gum 및 비누 개발</li> </ul>	100

## 제2절 관련분야의 기술발전의 기여도

유자의 향기 성분을 추출하기 위한 최적화 방법을 고안하고 그의 분석을 통해서 유자의 향기 성분 중 key aroma chemical을 알아내었고, 성분 조성의 안정성을 확보함에 따라 산업적 이용에 적용이 가능하게 되었다. 뿐만 아니라 유자의 2차 가공에 따른 산업화의 어려운 부분을 기술적으로 해결하게 되어 산업화의 빈약한 부분을 기술적으로 극복할 수 있었다.

천연 유자향을 최적 조건으로 추출, 분석 한 결과 유자향의 성분조성 중 함량이 중요한 것이 아니라 성분중의 다양한 극미량의 지방산류, alcohol류, aldehyde류의 aroma chemical들이 유자의 향취미에 큰 영향을 미친다는 결과를 얻었다. 그리고 지금까지 함량의 대부분을 차지하는 terpene계가 유자의 주성분이라고 알려져 있지만 실질적으로는 그 성분들이 경시 변화에 따른 산화 반응에 의해 유자의 향취미에 바람직하지 못한 영향을 미치는 것 결과 또한 얻었다.

현재 국내 산업계에서는 천연향료를 95%정도를 수입에 의존하고 있다. 그 중에서도 특히 citrus계(Orange, Lemon, Grapefruit등)는 100% 수입을 하고 있다.

국내의 citrus계의 작목은 제주의 감귤과 남해안지역의 유자가 있다. 우리나라의 남부지역의 유자는 특히 외국 향료사에 향취미가 독특하다는 것으로 유명하고 많은 관심을 가지고 한국산 유자 향료 연구 개발에 심혈을 기울이고 있는 실정이다. 이러한 현실 속에 우리가 우리고유의 원료 즉 천연 자원을 가지고 있으면서도 그것을 개발, 연구를 못해서 세계시장 속의 선진향료사가 연구 개발을 하여 국내시장을 잠식할 형편에 놓여있다.

외국 선진향료사의 국내향료 시장 잠식의 그 예를 보면 4~5년전 국내의 나주 배를 일본 향료사가 한국 나주배향을 개발하여 국내에 많은 수출을 하여 한동안 우리 소비자가 1년 내내 배음료를 소비하였다. 국내시장을 잠식하고 있는 이때 국내 업체는 개발 보다는 외국향료사로부터 배향료 base를 수입하여 blending 하여 팔기에 급급하였다.

이러한 측면으로 볼 때 외국 향료사에 앞서 유자 천연물로부터 생물학적 전처리를 통해 유효한 향기 성분을 추출하고 또 이를 이용하여 compounding flavor 제조에 기본이 되는 중요한 data를 제공하여 천연향료뿐만 아니라 천연에 가까운 조합향료를 제조한다는 것은 향료 관련기술 발전에 아주 큰 이바지를 하였다고 사료 됩니다. 그리고 이 연구를 통해서 천연향료에 대한 많은 기술력과 조향기술을 축적하였고 무엇보다도 경제성과 안전성, 안정성이 확보된 우수한 조합 유자향료를 개발하였다는 것은 국내향료 발전사뿐만 아니라 국내 산업계에서도 아주 긍정적 측면이 있다고 또한 사료된다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제1절 연구 활용 방안

1. 유자에 함유된 향료 성분추출 기술이 확보됨. 아울러 본 연구를 통해 확보된 효소 반응 전처리 기술을 감귤류 및 여타 농산물로부터 향성분 추출에 이용할 계획이다.
2. 국내 독자적인 유자 compounding flavor의 수입대체 효과 및 수출에 따른 매출 증진 효과를 기대. 외국 전시회를 통해서 시장성, 경제성, 제품성 확인. 유자 추출 oil의 수용화 기술을 통해서 외국에 의존해 왔던 citrus계 추출 know-how 기술 축적으로 향료 산업의 수출 활성화에 긍정적인 영향을 줄 것으로 기대된다.
3. 연구를 통해서 축적된 감귤계 향료를 다양하게 응용 할 수 있게 되었기 때문에 이를 확대 실험을 진행하여 국내 유자에 관심이 많은 외국 향료사에 유자 base를 공급하고자한다. 이 과제를 통해서 축적된 know-how를 활용하여 국내 유자의 고유 image type과 juicy type, sweet type, refresh type 등 다양하게 개발 하여 공급의 확대를 추구 하고자 한다. 그리고 지금까지 천연물로부터 향기의 유효성분의 추출에 대한 애로사항이 많았지만 효소전처리 반응기술을 통해서 많은 가능성을 확인하고 국내 자원을 이용하여 국내 고유의 향료를 개발 활용할 수 있는 계기가 마련되었다고 사료 된다.
4. 본 연구를 통해 개발된 유자향료를 유자 리큐르 제품(롯데 순하리)에 적용시킴으로서 리큐르 타입의 RTS카테일(Ready To Serve: 특별한 제조 없이 잔에 담아 바로 카테일의 맛을 즐길 수 있는 형태의 술)에 적용되어 2015년 03월 출시되어 현재까지 큰 인기를 끌고 있으며, 여러 종류로 개발되어 출시되고 있는 리큐르 타입의 주류에 선도적 역할을 하였다. 이처럼 개발된 유자향 및 유자 Essential oil을 이용한 식품산업 전반에 적용되어 경쟁력 있는 상품의 제조로 다양한 상품을 요구하는 소비자의 욕구를 충족시켜줄 것이라 사료된다.

## 제2절 추가 연구의 필요성

이 연구를 진행하면서 유효 향기 성분을 보다 효율적으로 추출하기 위해서 wax성분을 제거하였다. 만약 추가 연구를 진행한다면 wax또한 향미질에 대한 많은 영향을 미치리라 사료되기 때문에 wax함량에 따른 유자 향기 및 향미에 대한 연구가 더 진행 되어야 한다고 사료 됩니다. 뿐만 아니라 유자oil 추출한 부산물의 재이용에 대한 연구 또한 함께 진행 되어야 한다고 사료된다.

또한 본 실험을 통해 천연유자정유를 국제향료협회에 등록하기위하여 유자정유의 표준화가 선행되어야 함에 따라 과제 종료 후 유자 정유를 표준화하기 위한 정유확보 및 표준화 실험을 추가적으로 실시할 계획에 있음

본 연구에서는 유자의 essential oil에 국한하여 천연향의 추출 및 분석을 실행하였으나 국내 농산물중 훌륭한 향기 성분을 함유한 작목을 선택하여 본 연구와 같은 방법으로 향기 성분을 추출 및 분석하여 그 실체를 파악 한다면 다양하면서도 경쟁력 있는 상품의 제조가 가능하리라고 사료된다.

제 3절 경제적 성과



유자 리큐르 제품 (국내 제품)



유자 리큐르 제품 (수출 제품)





## 식품 **첨가물** 품목제조 보고서

보고인	성명 : 오재순	생년월일 : 1965. 11. 16
	주소 : 경기도 성남시 중원구 갈마치로 234, SK아파트형공장 413호	전화번호 : 031-734-7744
		휴대전화 :

영업소	명칭(상호) <span style="float: right;">아로마라인(주)</span> 소재지 : 경기도 성남시 중원구 갈마치로 234, SK아파트형공장 413호
-----	---

제품정보	제품유형	혼합제제	영업신고번호- 품목번호	4-1720		
	제품명	유자향 1401314				
	유통기한	해당없음				
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	별첨	<div style="border: 2px solid purple; padding: 5px; display: inline-block;">                     품 목 번 호 20020216045-1720                      품목보고일자 2015. 01. 13                      위와같이 품목제조보고(신규)변경,중단을 하였음을                      확인 합니다.                      성남시청 보건위생과 식품위생팀 담당자                 </div>			
	용도 용법	별첨				
	보관방법 및 포장재질	별첨				
	포장방법 및 포장단위	별첨				
	성상	별첨				
고열량·저영양식품 해당 여부	[ ]에 [ ]아니오 [x]해당없음					

기타

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품첨가물 품목제조 사항을 보고합니다.

2015년 01월 13일

보고인 오재순 (서명)

성남시청 귀하

- |      |  |
|------|--|
| 첨부서류 | 1. 제조방법설명서 1부<br>2. 식품위생검사기관이 발급한 식품등의 한시적 기준 및 규격 검토서 1부<br>3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부 |
|------|--|

유의사항

1. 품목제조보고서는 생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.  
 2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.

210mmX297mm[일반용지 60g/㎡ (재활용품)]





## 식품 **첨가물** 품목제조 보고서

보고인	성명 : 오재순	생년월일 : 1965. 11. 16
	주소 : 경기도 성남시 중원구 갈마치로 234, SK아파트형공장 413호	전화번호 : 031-734-7744(113)
		휴대전화 : 010-8551-7479

영업소	명칭(상호) <span style="float: right;">아로마라인(주)</span>
	소재지 : 경기도 성남시 중원구 갈마치로 234 SK아파트형공장 413호

제품정보	제품유형	혼합제제	영업신고번호- 품목번호	20020275045-1784
	제품명	유자향 1504462		
	유통기한	해당없음		
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	별첨		
	용도 용법	별첨		
	보관방법 및 포장재질	별첨		
	포장방법 및 포장단위	별첨		
	성상	별첨		
	고열량·저염양식품 해당 여부	[ ]예 [ ]아니오 [√]해당없음		

품 목 번 호                    1784

등록보고일자            2015. 05. 06

위하일이 품목제조보고(첨가, 변경, 중단)를 하였음을  
확인 합니다.

성남시청 보건위생과 식품위생팀 담당자

기타

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품첨가물 품목제조 사항을 보고합니다.

2015년 05월 일  
오재순 (서명 또는 인)

보고인

성남시청 귀하

첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사기관이 발급한 식품등의 한시적 기준 및 규격 검토서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부
------	--

### 유의사항

1. 품목제조보고서는 생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.
2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.

1. 제 품 명: 유자향 1504462

2. 식품 유형 : 혼합제제

3. 원재료 성분 및 배합비율

신고및품목번호 :제 20020275045-1784호

원재료 및 성분명	등재번호		배합비율(%)			비고
	식품공전	FEMA.NO	-	.	⊙	
⊙ 유자향키베이스1					3	
- 리나롤(Linalool)	가-424(L007)	2635	0.50			
- 시트로네릴아세테이트(Citronellyl acetate)	가-424(C046)	2311	2.50			
- 게라니올(Geraniol)	가-424(G002)	2507	3.00			
- 시트로넬롤(Citronellol)	가-424(C044)	2309	4.50			
- 제라닐아세테이트(Geranyl acetate)	가-424(G004)	2509	4.50			
- 페닐에틸알콜(Phenethyl alcohol)	가-424(P029)	2858	5.00			
- 에틸알콜(Ethyl alcohol)	가-424(E009)	2419	80.00			
소 계			100			
⊙ 유자향키베이스2					3	
- 유자과즙(Citrus peels extract(Yuzu))	나-157-68	2318	10.00			
- 에틸알콜(Ethyl alcohol)	가-424(E009)	2419	89.60			
- 정제수(Water)	-	-	0.40			
소 계			100			
⊙ 에틸알콜(Ethyl alcohol)	가-424(E009)	2419			94	
합 계					100	

4. 제조방법 설명서

- 1) 위 원재료를 적정하여 배합비율에 따라 혼합기에 투입한다.
- 2) 혼합기에서 30분간 혼합한다.
- 3) 혼합된 제품을 여과한다.
- 4) 포장단위별로 포장 후 제품완성

(단)을 하였음을

일자 인

5. 성 상 : 미색-미황색의 불투명한액상으로서 특유의 유자향취가 있다.

6. 용도용법 및 사용기준 : 가공식품의 착향 목적으로 사용한다

7. 보관 방법 : 직사광선을 피하고 실온에 보관

8. 포장재질 및 포장방법 : H.D.P.E 말통 포장

9. 포장단위 : 1KG, 5KG, 10KG, 20KG

10. 유통기한 : 해당 없음

11. 품질유지기한 : 해당 없음

12.고열량·저영양식품 해당 여부 : [ ]예 [ ]아니오 [√]해당없음

13.기타

중단)을 하명중을  
장학 단



## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명	오재순		생년월일	1965년 11월 16일	
	주소	경기 성남시 중원구 상대원동		전화번호	031734 7744	
				휴대전화		
영업소	명칭(상호)	아로마라인(주)				
	소재지	경기도 성남시 중원구 갈매치로 234(상대원동)				
제품정보	식품의 유형	혼합제제	영업신고번호	20020275045		
	제품명	유자향 1504193				
	유통기한	해당사항 없음				
	품질유지기한	해당없음				
	원재료 또는 성분명 및 배합 비율	뒷장에 기재				
	용도 용법	뒷장에 기재				
	보관방법 및 포장재질	직사광선을 피하고 실온에 보관 H.D.P.E				
	포장방법 및 포장단위	말통포장 및 1.5,10,20kg				
	성상	미색-미황색의 불투명한 액상으로서 특유의 유자향취가 있다.				
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[ ]예 [ ]아니오 [O]해당 없음				
기타						

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2015년 06월 05일  
보고인 오재순

### 경기도 성남시장 귀하

품목보고일	200202750451796				
처리부서	복지보건국 보건위생과	처리자성명	한효순	처리일자	2015년 06월 05일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.



발급번호 : 12B9-96CT-0M90-B14H-FCRE



원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	발효주정	94%
2	유자향	3%
3	L-에탄올	89.6%
4	L-에탄올	80%
5	L-유자과즙	10%
6	L-합성착향료(Phenethyl alcohol)	5%
7	L-합성착향료(Geranyl acetate)	4.5%
8	L-합성착향료(Citronellol)	4.5%
9	L-합성착향료(Geraniol)	3%
10	L-합성착향료(Citronellyl acetate)	2.5%
11	L-합성착향료(Linalool)	0.5%
12	L-정제수	0.4%
13	유자향	3%
14	L-에탄올	89.6%
15	L-에탄올	80%
16	L-유자과즙	10%
17	L-합성착향료(Phenethyl alcohol)	5%
18	L-합성착향료(Citronellol)	4.5%
19	L-합성착향료(Geranyl acetate)	4.5%
20	L-합성착향료(Geraniol)	3%
21	L-합성착향료(Citronellyl acetate)	2.5%



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.



발급번호 : 12B9-96CT-0M90-B14H-FCRE



원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
22	L-함성착향료(Linalool)	0.5%
23	L-정제수	0.4%
용도용법		



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

## 제 4절 과학적 성과

### \* 기존 추출 방법의 문제점

추출 방법	추출 방법 및 단점	참고 자료
증류법 (distillate extraction)	열에 의한 산화와 용매에 향이 녹아 들어가 향의 강도가 약하고 자연적인 향과는 차이가 있음	출원번호 10-2007-0062002 출원번호 10-2001-0008831
초 임계 추출법 (supercritical fluid extraction by CO <sub>2</sub> )	설비와 운용비가 비싸고 대량생산공정에 한계 있음	한국생물공학회지 제17권 제2호 148-152, 2002
용매 추출법 (solvent extraction)	추출시간이 길고 열에 의한 변성과 용매의 잔존 가능성이 있음	
저온압착법 (coldpress extraction)	열에 의한 변성이 적으나 유자의 섬유질과 에멀전화 되어 수율이 낮음	출원번호 10-2000-0017543

### \* 유사 추출방법 및 특허

발명의 명칭	주요 내용	출원번호
유자분말 및 그 제조방법	유자 분말을 만들기 위해 셀룰라아제, 펙티나아제 등으로 효소 분해 후 동결 건조함	10-2001-0047274
유자주스 및 그 제조방법	유자에 셀룰라아제, 펙티나아제 등을 첨가하여 효소 분해 후 주스 제조	10-2000-0058807
효소를 사용한 신선한 감귤의 껍질 제거법	펙티나아제를 사용하여 안쪽 껍질을 분해하여 껍질을 분리하기 용이하게 함	10-1990-0005414
정유 함유 음료	셀룰로오스를 이용하여 다량의 정유를 안정적으로 분산 유지된 음료제조	10-2013-0076745

## 관인생략

# 출원번호통지서

**출원 일자** 2015.04.24  
**특기 사항** 심사청구(유) 공개신청(무)  
**출원 번호** 10-2015-0058079 (접수번호 1-1-2015-0402875-51)  
**출원인 명칭** 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)  
**대리인 성명** 한양특허법인(9-2000-100005-4)  
**발명자 성명** 지영민 최범석 오재순  
**발명의 명칭** 호소를 이용한 유자 정유 추출방법

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

특허 출원서

<http://www.kosfost.or.kr/>

# Creative FOOD SCIENCE for the FUTURE



<http://www.kosfost.or.kr/>

## 2014 Annual Meeting

Korean Society of Food Science and Technology

August 25(Mon) ~ 27(Wed), 2014

Kimdaejung Convention Center / Gwangju

DAESANG

AMOREPACIFIC

CJ CHEILJEDANG

kfri 한국식품연구원  
Korea Food Research Institute

JBF (제)전남생물산업진흥원

한국과학기술원(KAIST)생명과학연구소  
KAIST Institute of Life Science & Technology

한국과학기술단체총연합회

G<sup>2</sup>  
Gwangju Convention & Exhibition Center

KOSFOST  
Korean Society of Food Science and Technology

국제 학술 발표



### Quality Characteristics of Starch Noodle with Purple Sweet Potato Powder

Bo-Young Lee\*, Ji-Young Yoon, Young-Eun Lee<sup>1</sup>, Seung-Il Jeong

*Jeonju Biomaterials Institute, Korea, <sup>1</sup>Wankwang University, Korea*

The purple sweet potato is not only rich in vitamin, protein and starch, but dietary fiber and minerals. It contains a large amount of anthocyanin pigments in water-soluble known as one of physiologically functional materials. In this study, we conducted to evaluate the quality characteristics and antioxidative activities of starch noodles with 0-10% purple sweet potato powder (PSPP), natural pigment and  $\beta$ -cyclodextrin. When over 10% PSPP was added to starch noodle, its quality was decreased.  $\beta$ -cyclodextrin was used for stabilization of natural pigment and taste component. In color of noodles, the value of the brightness decreased significantly as the amounts of PSPP increased, otherwise yellowness and redness showed the reverse tendency (trend). The sample with 5.0% PSPP, 0.05% NPP and 0.05%  $\beta$ -cyclodextrin was the highest in antioxidative activities with 36.4% and in the consumer acceptance regarding taste and all other attributes. As a result, purple sweet potato powder added functionality noodle, it is desirable that the addition of 5.0% with  $\beta$ -cyclodextrin by considering the overall acceptability.

### Optimization on Jam Manufacture Condition of Cherry Tomato by Central Composition Design

Chang-soo Kang\*, Jong-Ho Koh<sup>1</sup>, Dae-Hyeon Baek<sup>1</sup>, Young-Shik Kim<sup>2</sup>

*Korea National College of Agriculture and Fisheries, Korea, <sup>1</sup>Department of Bio-food Analysis, Bio-campus, College of Korea Polytechnics, Korea, <sup>2</sup>Department of Plant and Food Sciences, Sangmyung University, Korea*

This study was carried out to investigate jam manufacture condition (cherry tomato juice ( $X_1$ ), grape concentrate ( $X_2$ ) and lemon extract ( $X_3$ )) of cherry tomatoes by central composition design. The optimized condition was prepared by response surface methodology. By pre-experimental design, cherry tomato juice ( $X_1$ ), grape concentrate ( $X_2$ ) and lemon extract ( $X_3$ ) were applied as each independent variable, and the obtained independent variables were determined as 300 : 25 : 10 ratio, respectively. As the result obtained by central composition experimental design, each increase amount of the independent variable was 50, 25 and 10, respectively. And the independent variables were coded as five levels (-2, -1, 0, 1, 2). The texture and organoleptic properties of 12 samples obtained by the result of this experimental design were determined. The optimized condition of dependent variables was prepared by response surface methodology using Minitab statistical software 16 version. The obtained optimized condition of independent variables ( $X_1$  :  $X_2$  :  $X_3$ ) on manufacture condition of cherry tomato-jam was 400 : 250 : 30 ratio.

### Effects of Enzyme Preprocessing for Yuzu Peel on the Extraction Yield of Essential Oil

Beom Seok Choi\*, Young Min Chi, Hyun Chul Yang<sup>1</sup>, Jae Soon Oh<sup>2</sup>

*Division of Biotechnology, College of Life Sciences, Korea University, Korea, <sup>2</sup>Aromaline, Korea*

Effects of enzyme preprocessing for whole yuzu and flavedo of yuzu peel on extraction yield of yuzu essential oil were investigated. Pectinase, cellulase and xylanase were used for the enzymic pretreatment of yuzu peel. The enzyme pretreated whole yuzu or flavedo of yuzu peel were squeezed with twin gear type extractor, and resultant juice was centrifuged for the separation of yuzu essential oil. When whole yuzu or flavedo of yuzu peel were preprocessed with enzyme, the extraction yields of essential oil were high by 9-10 times compared to that of non-preprocessed extraction. In addition, various compounds of essential oil were analyzed by gas chromatography-mass spectrum (GC-MS). Total 60 volatile compounds were detected and 35 of these ones were identified. The major volatile component of yuzu was limonene 53.25-55.63%,  $\gamma$ -terpinene 14.06-14.97%, myrcene sabinene 11.92-12.79%,  $\alpha$ -pinene 5.43-6.74%,  $\beta$ -pinene 2.04-2.54%,  $\beta$ -farnesene 2.02-2.38%.

### The Comparative Physicochemical Properties and Antioxidant Activity Fresh and Frozen Welsh Onions by Cooking Method

Bong-Yun Oh\*, You-Seok Lee, Seung-Hee Nam, Gil-Ja Kim, Sun-Kyung Lee, Hyun-Young Lee, Jong-Wan Rhim<sup>1</sup>,

Jeong-Hwa Kang, Kyung-Ju Jung, Kyong-Ju Choi  
*Jeollanamdo Agricultural Research and Extension Services, Korea, <sup>1</sup>Department of Food and Engineering, Mokpo National University, Korea*

Welsh onions (*Allium fistulosum* L.) are required of high quality, time-saving and simple ingredients with little quality changed frozen vegetables at homes, school meals, food processing companies. Fresh one and frozen were treated by boiling, steaming, microwave cooking and frying for 1, 3, and 5 min. After cooking, their physicochemical properties were analyzed with respect to moisture, ash, pH, soluble solids, hardness, DPPH and ABTS radical scavenging activity. After cooking, the weight of welsch onions was decreased in sequence the boiling, steaming, frying and microwave cooking. Fresh welsch onion had 92.11% moisture content 0.5% ash content, pH 5.79, 1.0°Bx soluble solids. Frozen welsch onions had higher contents than fresh welsch onions. Optimum cooking time of welsch onion is 3 min for boiling, 5 min for steaming. Fresh or frozen welsch onions should be cooked 3 or 5 min for microwave cooking or 3 min for frying without decreasing color difference. Frozen welsch onions had significantly higher total phenolics, ABTS and DPPH radical scavenging activity.

## 제 6 장   참고문헌

Berkarda, B., Koyuncu, H., Soybir, G., & Baykut, F. (1998). Inhibitory effect of hesperidin on tumour initiation and promotion in mouse skin. *Research in experimental medicine*, 198(2), 93–99.

Bok, S. H., Lee, S. H., Park, Y. B., Bae, K. H., Son, K. H., Jeong, T. S., & Choi, M. S. (1999). Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *The Journal of nutrition*, 129(6), 1182–1185.

Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from *Citrus* peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of food Engineering*, 90(3), 409–413.

Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A., & Berghe, D. V. (1996). Inhibition of Bacterial Mutagenesis by *EM EMTYPE*. *Planta medica*, 62(03), 222–226.

Dan A.K; *Citrus processing - Quality Control and Technology* published by Van Nostrand Reinhold (1991)

De Muynck, Cassandra Pereira et al., (2007) *The Genus Gluconobacter Oxydans: Comprehensive Overview of Biochemistry and Biotechnological Applications*, Redorbit.

(3) Lan Phi NT, Sawamura M. (2008) Characteristic aroma composition profile of mature stage *Citrus junos* (Yuzu) peel oil from different origins. *Food Science and Technology Research*, 14(4): p 359.

Galati, E. M., Trovato, A., Kirjavainen, S., Forestieri, A. M., Rossitto, A., & Monforte, M. T. (1996). Biological effects of hesperidin, a *Citrus* flavonoid.(Note III): antihypertensive and diuretic activity in rat. *Farmaco (Societa chimica italiana: 1989)*, 51(3), 219–221.

Hirota, R., Roger, N. N., Nakamura, H., Song, H. S., Sawamura, M., & Suganuma, N. (2010). Anti inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. *Journal of food science*, 75(3), H87–H92.

Hirota, R., Roger, N. N., Nakamura, H., Song, H. S., Sawamura, M., & Suganuma, N. (2010). Anti inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. *Journal of food science*, 75(3), H87–H92.

Jeong, J.W.; Lee, Y.C.; Lee, K.M.; Kim, I.H. and Lee, M.S. (1998). Manufacture condition of oleoresin using citrus peel. *Korean J. FoodSci. Technol.* 30, 139–145.

Kim, S. H., Hur, H. J., Yang, H. J., Kim, H. J., Kim, M. J., Park, J. H., ... & Hwang, J. T. (2013). Citrus junos Tanaka Peel Extract Exerts Antidiabetic Effects via AMPK and PPAR-both In Vitro and In Vivo in Mice Fed a High-Fat Diet. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

Lee, S. H., Jeong, T. S., Park, Y. B., Kwon, Y. K., Choi, M. S., & Bok, S. H. (1999). Hypocholesterolemic effect of hesperetin mediated by inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in rats fed high-cholesterol diet. Nutrition research, 19(8), 1245-1258.

Lam, L. K. T., Zhang, J., & Hasegawa, S. (1994). Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. Food technology, 48(11), 104-108.

LAN PHI, N. T., & Sawamura, M. (2008). Characteristic aroma composition profile of mature stage Citrus junos (Yuzu) peel oil from different origins. Food science and technology research, 14(4), 359-366.

Lan-Phi NT et al., (2009) Chemical and aroma profiles of yuzu (Citrus junos) peel oils of different cultivars. Food Chemistry, 115(3): p 1042-1047.

Liu-Jing Wei, Ji-Iai Zhou et al., (2012) Functions of Membrane-bound Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase in the Bio-Oxidation of Alcohols in Gluconobacter oxydans DSM 2003, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 17(6): p 1156-1164.

Miyazawa N et al.,(2009) Novel character impact compounds in Yuzu (Citrus junos Seib. ex Tanaka) Peel Oil. Journal of agricultural and Food Chemistry, 57(5): p 1990-1996.

Miyake, Y., Yamamoto, K., Tsujihara, N., & Osawa, T. (1998). Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. Lipids, 33(7), 689-695.

Monforte, M. T., Trovato, A., Kirjavainen, S., Forestieri, A. M., Galati, E. M., & Lo, C. R. (1995). Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid.(note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. Farmaco (SocietÃ chimica italiana: 1989), 50(9), 595-599.

Njoroge SM et al., (1994) Volatile components of japanese yuzu and lemon oils. Flavor and Fragrance Journal, 9(4): p 159-166.



Njoroge, S. M., Ukeda, H., & Sawamura, M. (1996). Changes in the volatile composition of yuzu (*Citrus junos* Tanaka) cold-pressed oil during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 550-556.

Njoroge, S. M., & Sawamura, M. (2004). Preparation of Citrus Essential Oils: Effects of Silica Gel Treatment on Volatile Composition of Yuzu (*Citrus junos*) Cold-pressed Peel Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 7(1), 1-8.

Park Byeong Seok. (2008-08). Studies on the flavor composition of Yuza (*Citrus junos*) using different extraction methods, Kyung Hee University.

Shin, J. H., Cho, H. S., Lee, J. Y., Lee, S. J., Jung, K. H., & Sung, N. J. (2004). Screening of effective factor to inhibition of NDMA formation in Yuza (*Citrus junos*). *Journal of Food Hygiene and Safety*.

Sawamura, M., Wu, Y., Fujiwara, C., & Urushibata, M. (2005). Inhibitory effect of yuzu essential oil on the formation of N-nitrosodimethylamine in vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4281-4287.

Song HS et al., (2000) Quantitative determination and characteristic flavor of citrus junos (yuzu) peel oil. *Flavor and Fragrance Journal* 15(4): p 245-250

Suarez, J., Herrera, M. D., & Marhuenda, E. (1996). Hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone on different experimental models of induced gastric ulcer. *Phytotherapy Research*, 10(7), 616-618.

Simon M. N.; Masayoshi S. (2004). Preparation of Citrus Essential Oils : 83 Effects of Silica Gel Treatment on Volatile Composition of Yuzu Cold press Peel Oil JEOBP (*Journal of Essential Oil Bearing Plants*). 7, 1-8

Yoo, K. M., Lee, K. W., Park, J. B., Lee, H. J., & Hwang, I. K. (2004). Variation in major antioxidants and total antioxidant activity of Yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) during maturation and between cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5907-5913.

Yang, H. J., Hwang, J. T., Kwon, D. Y., Kim, M. J., Kang, S., Moon, N. R., & Park, S. (2013). Yuzu Extract Prevents Cognitive Decline and Impaired Glucose Homeostasis in  $\beta$ -Amyloid - Infused Rats. *The Journal of nutrition*, 143(7), 1093-1099.

Yoo, K. M., Lee, K. W., Park, J. B., Lee, H. J., & Hwang, I. K. (2004). Variation in major antioxidants and total antioxidant activity of Yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) during maturation and between cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19),

5907-5913.

Yang, H. J., Hwang, J. T., Kwon, D. Y., Kim, M. J., Kang, S., Moon, N. R., & Park, S. (2013). Yuzu Extract Prevents Cognitive Decline and Impaired Glucose Homeostasis in  $\beta$ -Amyloid - Infused Rats. *The Journal of nutrition*, 143(7), 1093-1099.

김두진, 김영희, 김정숙, 배태진, 최형택, 현재석, 홍종만. (2003). 식품 가공저장학. 지구문화사. p. 15-18

김희연, & 김지혜. (2003). 착향료의 관리동향. *식품과학과 산업*, 36(2), 79-84.

박준희. (2008). Anti-diabetic and Anticancer effects of Peel of Citrus junos and Poncirus trifoliata. 동의대학교 박사학위논문.

박승국. (1991). 향 연구란 무엇이며 어떻게 하는 것인가?. *식품과학과 산업*, 24(4), 88-94.

이수정, 신정혜, 강민정, 정창호, 주종찬, & 성낙주. (2010). 산지별 유자의 이화학적 특성, 유리당 및 향기성분. *한국식품영양과학회지*, 39(1), 92-98.

이현유, 김영명, 신동화, & 선봉규. (1987). 韓國産 유자의 香氣成分. *한국식품과학회지*, 19(4), 361-365.

정진웅, 이영철, 정승원, 이경미. (1994). 착즙 방법에 따른 유자과즙의 향기성분에 관한 연구 J *Korean Food Sci Technol*. 26, 709-712.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.