

기능성 친환경 감귤발효제품 개발
(Development of Korean fermented mandarin products)

감귤주 개발 연구 (제1세부)
(Development of mandarin wine)

감귤 발효유 개발 연구 (제2세부)
(Development of mandarin yoghurt)

친환경 감귤발효제품의 간기능 개선 연구 (제3세부)
(Study on anti-liver disease activities of fermented mandarin products)

기능성 향상 친환경 감귤 발효주(와인)의 제조공정
개발 및 실용화 (위탁기관)
(Development of functional mandarin wine)

한국식품연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기능성 친환경 감귤발효제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 6 월 24 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원
주관연구책임자 : 최 인 욱
세부연구책임자 : 박 용 곤
세부연구책임자 : 임 상 동
연 구 원 : 최 희 돈
연 구 원 : 김 윤 숙
연 구 원 : 박 호 영
연 구 원 : 엄 효 진
위탁연구기관명 : 계 명 대 학 교
위탁연구책임자 : 정 용 진
연 구 원 : 우 승 미
연 구 원 : 장 세 영
연 구 원 : 신 경 아
참 여 기 업 : (주) 일 해

요 약 문

I. 제 목

기능성 친환경 감귤발효제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 과수생산량은 2.5백만톤 규모이며 이중 25%를 감귤이 차지하고 있을 만큼 감귤은 가장 중요한 국내과수품목이다. 감귤에는 비타민, 무기질, 섬유질 등이 풍부하게 함유되어 있어 대표적인 건강과일로 인식되어지고 있으며 감귤에 풍부한 limonoids류나 bioflavonoids 류 등은 항암, 혈압저하 작용 등 다양한 생리활성을 지닌다고 보고되고 있다. 특히 감귤의 과피에는 flavonoids가 다량 함유되어 있으며 주로 naringin, hesperidin, narirutin, nobiletin 등으로 구성되어 있다. 감귤가공품(주로 주스)제조 시 막대한 양이 가공부산물로 매년 8천여톤이 생산되어 폐기처분되는 실정이며 이의 활용성에 대한 필요성이 꾸준히 대두되어 왔다. 따라서 감귤이 지닌 건강기능적인 요소가 강조된 새로운 형태의 가공제품의 개발은 한미 FTA체결에 따라 위기를 맞고 있는 감귤생산 및 소비에 새로운 활력원이 될 수 있을 것으로 기대될 뿐 아니라 폐자원의 고부가가치화와 환경오염 방지를 위해 산업화가 시급하다. 친환경 감귤을 껍질째 발효(알코올발효와 유산발효)시켜 감귤껍질에 풍부한 flavonoids의 생물전환을 유도하여 간기능 개선효능 및 기호성이 우수한 감귤발효제품 개발을 통하여 향후 FTA체결로 인하여 막대한 타격을 입게 될 국내 감귤산업의 새로운 대안제시 및 국민건강 증진에 기여코자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 감귤껍질의 배당체 flavonoid화합물의 비배당체(aglycones)로의 전이를 위한 최적 알콜 및 유산발효조건 설정
- 감귤껍질째 발효시 비배당체 flavonoid 생성 및 용출을 최대화시킬 수 있는 전처리 조건 설정
- 기능성과 기호성이 우수한 감귤주 및 감귤발효유 제조공정 설정
- 동물실험을 통한 감귤주 및 감귤발효유의 간기능 저해 억제 기능 연구
- 감귤주 및 감귤발효유의 산업화 기술개발

IV. 연구개발결과

제주도에서 친환경적인 방법(무농약, 저농약, 유기농 등)으로 재배된 감귤(*Citrus unshiu*)의 플라보노이드 구성에 대해 연구하였다. narirutin과 hesperidin은 감귤과 감귤박에 존재하는 주요 플라보노이드이며, 친환경 재배에 의해 그 함량은 증가하였다. 특히 수용성의 narirutin이 가공제품에 적용하기 용이할 것으로 간주되어 물리적인 압착공정을 거친 감귤 부산물로부터 narirutin의 분리를 시도하였으나, 당분, 펙틴 등의 함량이 높아 정제공정이 까다로웠으며, 참여업체인 (주)일해에서 감귤부산물 중 감귤과피만 분리할 수 있는 공정의 산업화하는 방안을 고려중에 있어서 건조 감귤과피로부터 narirutin을 정제하는 방법을 설정하기로 하였다. 또한 narirutin에 대한 연구는 hesperidin과는 달리 많이 이루어져 있지 않아 narirutin의 기능성 식품 소재화에 초점을 맞추기로 하였다.

Narirutin은 먼저 건조된 감귤박 분쇄 시료로부터 70% 에탄올을 추출용매로 이용하여 초음파추출법(Ultra-sonication extraction)을 통해 추출하였고 연속적으로 n-hexan을 이용해 현탁물질을 제거 후 농축하였으며 이 중 물에 가용성인 성분을 획득하였다. 이렇게 얻은 narirutin 물추출물은 SD rat에 장기간 에탄올을 투여하여 지방간을 유도한 모델에 적용하여 알콜성 지방간 억제효능을 확인하였다. 실험환경에 적응시킨 rat 중 지방간 유도군은 6주 동안 매일 2.87 mL의 에탄올을 투여하였으며, narirutin 투여군은 동량의 에탄올과 함께 초음파추출을 통해 얻은 narirutin을 20, 40mg을 각각 동시 투여하였다. 에탄올의 섭취는 SD rat의 혈청 내 total cholesterol(TC)과 triglyceride(TG)의 함량을 증가시켰지만 narirutin 추출물의 투여

로 TC와 TG를 모두 저감하는 효과를 나타내었다. 에탄올의 섭취에 의한 또 다른 영향으로 간지질 함량이 227.0mg/g liver으로 증가하였으나 narirutin 고식이군(40mg/rat/day)에 있어서는 186.9mg/g liver으로 에탄올 섭취군에 비해 감소하였다. 간 내 지방산 조성을 분석한 결과에서는 narirutin 섭취에 의해 oleic acid의 TG로의 conjugation이 억제된다는 것을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 narirutin 추출물의 알코올성 지방간 억제용 식품소재로 이용가능성을 증명하였다.

Narirutin 조추출물은 ethyl acetate을 이용한 분획추출을 통해 순도 약 75%에 도달하는 narirutin을 얻을 수 있었고, 고순도 narirutin을 이용하여 알코올성 간질환에 대한 효능을 연구하였다. 우선 알코올의 섭취에 의해 간 지방증과 피사를 야기할 수 있는 염증발생에 대한 억제 실험은 Raw 264.7 세포를 이용하여 실험을 수행하였다. LPS 처리에 의해 생성된 산화질소(NO)는 narirutin에 의해 감소하였으며, 이는 narirutin이 NOS-2 발현을 억제하는 것으로 예상되어진다.

세포실험에서 확인한 narirutin의 항염증 기작을 검증하기 위해 ICR mouse를 이용한 동물실험을 수행하였다. 에탄올을 섭취시키지 않은 정상군과 40% 에탄올을 투여한 에탄올 투여군으로 구분하였으며, 에탄올 투여군은 에탄올 대조군과 narirutin 저식이군(150mg/kg/day), narirutin 고식이군(300mg/kg/day)으로 구분하였다. 8주간의 장기투여 후, 에탄올 대조군의 간 조직 내 TG 함량은 증가하였으나 narirutin 식이군은 농도의존적으로 TG가 감소되었다. 반면, TC의 함량은 변화되지 않음이 관찰되었다. 혈청 내 GOT와 GPT를 분석한 결과 narirutin 식이군이 에탄올 투여군에 비해 낮은 측정치를 나타내었는데, 이는 narirutin이 만성적인 알코올 섭취에 의한 간조직 손상을 억제시킨다고 추론할 수 있다. 비록 혈청에서의 endotoxin 생성량에는 큰 차이가 없었지만, 간조직 내 NF- κ B의 발현 역시 narirutin 식이에 의해 억제됨이 관찰되었다. 간섬유화 및 세포피사의 억제 등의 결과와 더불어 감귤박으로 얻은 narirutin은 알코올성 간질환을 억제할 수 있는 소재로써 가능성을 확인할 수 있었다.

친환경 감귤 농축액을 원료로 한 과실주의 플라보노이드 및 알코올 발효능에 대한 최적 효모 및 효소제 조건을 조사한 결과, cellulase를 0.5%(w/v) 첨가하여 50°C에서 약 1시간 처리가 적합한 것으로 나타났다. 기능성이 향상된 감귤 과실주를 개발하기 위해 감귤 가수분해물의 알코올 발효특성을 조사한 결과, 감귤 과실주의 최적 제조조건은 친환경 감귤전과, 효모 *S. bayanus* EC-1118, 초기당도 24 °Brix(설탕) 및 초기산도 0.2%로 나타났다. 상기의 최적 조건으로 제조된 자가제조 감귤와인(A)과 시판 감귤와인(B, C) 2종의 품질특성을 조사한 결과, 자가제조 감귤와인

(A)이 fusel oil류 및 비배당체 플라보노이드 함량이 높았고 관능적 기호도(감귤맛 및 전반적 기호도)도 높게 나타나 시판 감귤와인(B, C)과 비교하였을 때 품질면에서 우수한 것으로 나타났다.

감귤추출물을 첨가한 요구르트 개발은 발효 유제품의 알코올성 간질환 억제 활성을 확인하였다. narirutin 조추출물에 다른 조성물을 ABT-D 배양조건에서 혼합하여 발효시키면 narirutin은 rhamnosidase의 작용에 의해 naringenin-7-O-glucoside로 변환된다. 품미의 향상을 위해 narirutin 강화 요구르트의 최적 제조 공정을 추적하였다. narirutin 조추출물의 ABT-D 배양조건에서의 발효는 발효전보다 기호도가 증가함을 확인할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구의 결과는 국외 SCI논문을 포함하여 3건의 학술논문이 게재되었거나 게재승인 되었으며 향후 금년 말까지 1건 더 투고할 예정이며 감귤과피로부터 narirutin 추출법과 이들의 알콜성 간기능 저하 억제를 위한 감귤와인과 감귤발효유 개발과 관련된 특허를 금년 하반기에 출원할 예정이다. 또한 친환경 감귤원료를 첨가하여 제조된 친환경 감귤와인과 감귤발효주 시제품 제조가 완료되었다. 참여기업으로의 기술이전은 참여기업인 농업회사법인 (주)일해에서 감귤과피를 산업적으로 생산할 수 있는 공정을 2012년에 완공예정이어서 감귤과피로부터 narirutin 추출에 관한 기술이전을 2012년 초에 진행할 예정이다. 그 외에 감귤와인과 감귤발효주에 관한 활발한 홍보활동을 통하여 빠른 시일안에 타 기업으로의 기술이전도 추진할 예정이다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of Korean fermented mandarin products

II. R&D Purposes and Necessities

Total amounts of domestic fruits produced annually are about 2.5 million tons. Among them, citrus fruits take 25% of the amounts. Citrus fruits are famous for richness in vitamins, minerals, and fibers. Phytochemicals in citrus fruits such as limonoids and flavonoids are known to have various functional properties such as anti-cancer and blood pressure lowering activities. Citrus peels are especially rich for flavonoids. The main flavonoids in citrus peels are naringin, hesperidin, neohesperidin, narirutin, rutin, and etc. As consumption of processed citrus products are gradually increased, their waste products that are mainly composed of citrus peels are produced more than ever and can cause severe environmental problems. The ways of value addition on these waste products have been suggested. Most of them, however, are failed to be applied. Therefore, it is important to develop piratical ways to value add to the citrus waste products. In this project, we try to find various ways to extract bio-functional ingredients from eco-frendly cultivated citrus fruits and utilize them for development of functional food for preventing alcoholic liver diseases.

III. Details and Scope of R&D

- Development of optimal fermentation conditions of flavonoids extracts from eco-frendly cultivated citrus fruits for producing converted flavonoids from glycosylated flavonoids to their aglycons which are more bioavailable.

- Optimization of condition for flavonoids extraction from citrus fruits.
- Development of fermenting procedures for citrus wine and yoghurt of having bio-functionalities and favorable tastes
- Studies on anti-alcoholic liver diseases of narirutin extracts through animal experiments
- Development of citrus fermented products for industrial application

IV. Results of R&D

Citrus fruits(*Citrus unshiu*) that were eco-friendly cultivated in Jeju-Do were investigated for their flavonoids composition. Narirutin and hesperidin were two major flavonoids in citrus fresh and peel, and eco-friendly cultivation caused more flavonoids found in them. Since there were difficulties in purifying flavonoids from physically pressed citrus products, it was decided to utilize dried citrus peels for flavonoids purification. Although narirutin is bitter than hesperidin and water-soluble and less investigation has been focused on it, we finally decided to purify narirutin from citrus peels and investigate its functional properties.

Narirutin was practically extracted from citrus peel through the ultra-sonication extraction method followed by washing with hexane and water. This crude narirutin extract was investigated for its anti-alcoholic fatty liver through chronic oral administration to Sprague Dawley (SD) rats. Crude narirutin extract, which was prepared by ultrasound-assisted extraction (UAE), was co-supplemented with ethanol (2.87ml/rat/day) at low and high dosages (20 and 40mg/rat/day, respectively) for 6 weeks. Ethanol consumption significantly elevated both total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) concentrations in the serum of SD rats otherwise co-administration of crude narirutin extract lowered both serum TG and TC levels. Ethanol consumption caused hepatic lipid content of 227.0mg/g liver after 6 weeks whereas co-administration of crude narirutin extract, especially at high dosage, significantly reduced it to 186.9mg/g liver. Analysis of hepatic fatty acids revealed that crude narirutin extract suppressed

conjugation of oleic acid into TG. These results support probable application of crude narirutin extract as an anti-alcoholic fatty liver agent.

Narirutin was further purified from crude extract by extracting with ethyl acetate. Purity of narirutin reached to 75%. This purified narirutin was further investigated for its anti-alcoholic liver disease. Since inflammation in hepatic tissues that are caused by endotoxin produced by ethanol consumption plays key role in initiating alcoholic liver disease such as liver steatosis and necrosis, anti-inflammation activities of narirutin were examined by using Raw cells. Addition of narirutin significantly suppressed production of nitric oxide that was caused by stimulation from LPS. This suppressive activities of narirutin seemed to come from suppressive action of narirutin against expression of NOS-2.

To verify such anti-inflammation activities of narirutin, animal experiment was performed. Animal used for this experiment was ICR mouse and they were fed with either normal diet or 40% ethanol. The ethanol fed group was further divided to low narirutin fed group(150mg/kg/day) and high narirutin fed group(300mg/kg/day). After 8 week feeding, ethanol fed group significantly increased in hepatic TG while no difference in hepatic TC was observed. EtOH + narirutin fed groups showed decreased hepatic TG values in feeding amounts-dependent manner. According to serum GOT and GPT analysis, EtOH + narirutin fed groups exhibited lower GOT and GPT value than EtOH fed group indicating that feeding narirutin suppressed hepatic tissue damage that was caused by chronic alcohol consumption. Expression of NF- κ B in hepatic tissues was decreased by oral administration of narirutin. Hepatic necrosis and fibrosis were significantly suppressed by administration of narirutin indicating that narirutin from citrus peels can be used as a potent anti-alcoholic liver disease ingredient.

Citrus wine was produced by fermenting eco-friendly cultivated citrus fruits. The optimum enzyme treatment condition for citrus wine hydrolyzed by cellulase was enzyme concentration of 0.5%(w/v), enzyme treatment temperature of 50°C and enzyme treatment time of 1 hr. The present study investigated the alcohol fermentation characteristics of citrus hydrolysates for the development of citrus wine with enhanced functionality. As a result, optimum manufactural condition

of citrus wine was whole citrus, yeast of *S. bayanus* EC-1118, initial sugar content of 24 °Brix (sucrose) and initial acidity of 0.2%. A quality comparison among DIY citrus wine (A) and two commercial citrus wines (B, C) was conducted in this study. As a result, DIY citrus wine (A) was shown to have superior fusel oils, flavonoid aglycone contents and sensory acceptability (citrus taste and overall acceptability), and to have superior quality compared to two commercial citrus wines.

Citrus extract fortified yoghurt was processed to develop fermented dairy products with anti-alcoholic liver disease activities. When crude narirutin extract was added with other components before fermentation by ABT-D culture, narirutin was found to be converted to naringenin-7-*O*-glucoside by action of rhamnosidase. Sensory evaluation was performed to select the optimal process condition for citrus extract fortified yoghurt. It was found that adding crude narirutin extract after fermentation by ABT-D culture was more favorable than adding it before fermentation.

V. Research outcome & utilization plan

The results of this study have been published or approved for publication in three scientific papers. One more research paper will be submitted to SCI journals by the end of this year. The information on extracting narirutin from citrus peel and its application on processing citrus wine and citrus yoghurt will be applied for domestic patent. The technologies involved with narirutin extraction from citrus peels are expected to transfer to Ilhae Ltd., in early 2012 when mass production of citrus peels can be practically operated.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Summary	7
Contents	11
Chap. 1. Outline of research project	19
1. Objective	19
2. Significance	19
3. Scope	21
Chap. 2. Present state	22
Chap. 3. Methods and Results of Project	23
A. Methods	23
1. Development of narirutin as a functional ingredient	23
a) Extraction of narirutin (distillation)	23
b) Extration of narirutin (ultra-sonication)	24
c) Functional properties of narirutin	24
2. Anti-alcoholic fatty liver activities of narirutin (animal experiment)	26
a) Animals and diets	26
b) Changes in body weights and sampling of serums	28
c) Analysis of serum lipids and bio-markers	28
d) Histological observation of hepatic tissues	29
e) Analysis of hepatic lipids	29
e) Statistical analysis	29
3. Anti-alcoholic liver disease activities of narirutin (animal experiment)	29
a) Animals and diets	29

b)	Changes in body weights and sampling of serums	30
c)	Analysis of serum lipids and bio-markers	30
d)	Histological observation of hepatic tissues	32
4.	Development of eco-friendly cultivated citrus products	32
a)	Basic research for developing fermented citrus beverage	32
b)	Optimum condition for alcohol fermentation	37
c)	Quality comparison between developed citrus wine and commercial one ..	41
B.	Results	45
1.	Development of narirutin as a functional ingredient	45
a)	Extraction of narirutin	45
2.	Development of narirutin as a functional ingredient	51
a)	Optimal extraction condition	51
b)	Production of narirutin with industrial scale	56
3.	Anti-alcoholic fatty liver activities of narirutin (animal experiment)	61
a)	Effect of narirutin on changes in body weights	61
b)	Effect of narirutin on changes in serum lipids	62
c)	Effect of narirutin on changes in hepatic lipid	64
d)	Analysis of fatty liver by histological observation	66
4.	Anti-alcoholic liver disease activities of narirutin (animal experiment)	68
a)	Anti-inflammation activities of narirutin	68
b)	Effect of narirutin on changes in body weights	76
c)	Effect of narirutin on changes in serum lipids	77
d)	Effect of narirutin on changes in hepatic lipide	79
e)	Histological observation of hepatic tissues	83
5.	Development of eco-friendly cultivated citrus products	88
a)	Basic research for developing fermented citrus wine	89
b)	Development of citrus wine	93
c)	Development of citrus brand	107
d)	Quality comparison between developed products and commercial ones ..	108
e)	Optimum process condition for citrus wine	116

f) Quality standardization of citrus wine	119
6. Development of citrus yoghurt	125
a) Selecting optimal LAB	125
b) Development of eco-friendly cultivated citrus yoghurt	127
Chap. 4. Attainment and Contribution	136
Chap. 5. Achievements and Proposal for Application	138
Chap. 6. Information from Abroad Related to This Project	139
Chap. 7. References	140

목 차

요약문	3
Summary	7
Contents	11
제 1 장 연구개발과제의 개요	19
제 1 절 연구개발의 목적	19
제 2 절 연구개발의 필요성	19
제 3 절 연구의 범위	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	22
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	23
제 1 절 연구수행방법	23
1. 친환경 감귤과피 기능성 소재화 연구	23
가. 친환경 감귤과피로부터 narirutin 분리(환류추출법)	23
나. 친환경 감귤과피로부터 narirutin 분리(초음파추출법)	24
다. Narirutin의 추출물의 항산화 특성	24
2. Narirutin 추출물의 알콜성 지방간 억제 효능(동물실험)	26
가. 실험동물 및 식이	26
나. 체중 증가량 측정과 혈청 및 조직 시료 채취	28
다. 혈청 지방 및 지방간 주요 표지자(biomarkers) 분석	28
라. 간 조직 사진촬영을 통한 지방간 분석(hepatic histology)	29
마. 간 지질의 추출 및 간 조직의 α -tocopherol과 총 cholesterol 측정	29
바. 통계처리 및 결과 처리	29

3. Narirutin 추출물의 알콜성 간질환 억제 효능(동물실험)	29
가. 실험동물 및 식이	29
나. 체중 증가량 측정과 혈청 및 조직 시료 채취	30
다. 혈청 지방 및 지방간 주요 표지자(biomarkers) 분석	30
라. 간 조직 사진촬영을 통한 지방간 분석(hepatic histology)	32
4. 친환경 감귤발효제품 개발	32
가. 친환경 감귤 발효주 개발을 위한 기초 연구	32
나. 감귤 가수분해물의 알코올발효 조건 설정	37
다. 가수분해물을 이용한 감귤와인과 시판감귤와인의 품질비교	41
제 2 절 연구 수행 결과	45
1. 친환경 감귤과피의 기능성 소재화 연구	45
가. 친환경 감귤과피로부터 narirutin 추출	45
2. 감귤과피로부터 narirutin 기능성 소재화	51
가. 감귤과피로부터 최적 narirutin 추출조건 설정	51
나. Narirutin 추출물의 산업화공정 개발	56
3. Narirutin 추출물의 알콜성 지방간 억제 효능(동물실험)	61
가. Narirutin 투여가 체중증가량에 미치는 영향	61
나. Narirutin의 공급이 혈액 지방 농도에 미치는 영향	62
다. Narirutin 공급이 간조직의 지방 함량 변화에 미치는 영향	64
라. 간 조직 사진촬영을 통한 지방간 분석(hepatic histology)	66
4. Narirutin 추출물의 알콜성 간질환 억제 효능(동물실험)	68
가. Narirutin의 항염증 작용(Cell 실험)	68
나. Narirutin 투여가 체중 및 간 조직 증가량에 미치는 영향	76
다. Narirutin의 공급이 혈액 지방 농도에 미치는 영향	77
라. Narirutin 공급이 간조직의 지방 함량 변화에 미치는 영향	79
마. 간 조직 사진촬영을 통한 지방간 분석(hepatic histology)	83
5. 친환경 감귤발효제품 개발	88
가. 친환경 감귤 발효제품 개발을 위한 기초 연구	89
나. 친환경 감귤와인 제조 및 품질특성	93

다. 감귤 브랜드 제조 및 품질특성	107
라. 가수분해물을 이용한 감귤와인과 시판감귤와인의 품질비교	108
마. 친환경 기능성 강화 감귤와인 제조공정 확립	116
바. 최종 제품 품질 규격화	119
6. 친환경 감귤발효유 개발	125
가. 최적 유산균 선별	125
나. 친환경 감귤추출물을 함유한 발효유제품 개발	127
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	136
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	138
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	139
제 7 장 참고문헌	140

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

친환경 감귤껍질에 풍부하게 함유된 bio-flavonoids를 이용하여 이들의 산업적 생산 공정을 확보하고 이들의 알콜성 간손상 억제 효능과 같은 생리활성을 구명하며 이러한 생리활성을 특징으로 하는 친환경 감귤 발효주 및 발효유를 개발함

제 2 절 연구개발의 필요성

국내 과수생산량은 2.5백만톤 규모이며 이중 25%를 감귤이 차지하고 있을 만큼 감귤은 가장 중요한 국내과수품목이다. 감귤은 대부분 생과형태로 소비되며 일부만이 주스 또는 초콜릿 등의 가공품으로 생산되고 있다. 제주도의 생명산업인 감귤이 지난해 한미 FTA타결로 치명타를 입게 될 처지에 있으며 정부가 한미 FTA 체결에 따른 감귤생산액 감소 추정치에 따르면 한미 FTA가 발표된 후 5년 동안 연간 457억원에 이어 15년차에는 연간 658억원으로 추정된다고 밝혔다. 이에 따라 FTA 발효 첫해부터 5년 동안 감귤 피해액은 연간 평균 275억원에서, 6년에서 10년까지 635억원으로 확대된 후 11년에서 15년에는 연간 658억원이라고 발표한 바 있다. 이와 같이 한미 FTA 타협에 대비하여 제주감귤의 특색을 살려 품종개선 및 다양한 가공품 개발을 통한 소비를 육성하는 것이 FTA의 위기를 극복하는 유일한 대비책이 될 것이다.

감귤에는 비타민, 무기질, 섬유질 등이 풍부하게 함유되어 있어 대표적인 건강과일로 인식되어지고 있으며 감귤에 풍부한 limonoids류나 bioflavonoids 류 등은 항암, 혈압저하 작용 등 다양한 생리활성을 지닌다고 보고되고 있다. 특히 감귤의 과피에는 flavonoids가 다량 함유되어 있으며 주로 naringin, hesperidin, neohesperidin, rutin, naringenin, hesperetin, narirutin, nobiletin 등으로 구성되어 있다. 예로부터 감귤과피를 말린 것을 진피라 하여 한약재로 사용되어왔으나 감귤가공품(주로 주스)제조 시 막대한 양이 가공부산물로 생성되어 폐기처분되어 이의 활용성에 대한 필요성이 대두되고 있다. 따라서 감귤이 지닌 건강기능적인 요소가 강조된 새로운 형태의 가공제품의 개발은 한미 FTA체결에 따라 위기를 맞고 있는

감귤생산 및 소비에 새로운 활력원이 될 수 있을 것으로 기대된다.

현대인들은 생활이나 업무에서 받는 스트레스를 습관적인 음주나 흡연 등으로 해소하는 경향이 강하며, 특히 지나친 음주나 지속적으로 과식, 폭식하는 습관으로 인하여 지방간 형성 등의 간장 관련 질환의 발병율이 점차 증가하고 있다. 간은 모든 영양대사의 중심부로 체내 항상성 유지를 담당하며, 완충역할을 수행하는 중요 핵심 기관이며 간에 축적되는 지방은 음식으로부터 섭취되거나 지방 조직으로부터 간으로 유입되며, 간자체에서 합성되는 지방에서 유래되기도 하며 많은 양의 술을 단기간에 마시는 경우는 주로 지방 조직에서부터 지방이 간으로 유입되고 만성적으로 음주를 하는 경우는 간 자체에서 합성되는 지방으로 인해 지방간이 발생하게 된다. 지방간이 있을 경우 만성 피로, 권태감, 식욕부진, 소화불량, 심해지는 숙취 등의 증상이 나타나는데 알코올성 지방간이 심해지면 심한 숙취, 음주 후 극심한 피로 등이 발생할 수 있다. Flavonoids 등 간기능 개선에 유용한 성분이 풍부한 감귤을 껍질째 발효시키면 발효과정 중 생성되는 대사물로 인해 이들의 간기능 개선 효과가 더욱 증진된 가공제품을 개발할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 친환경 감귤을 껍질째 발효(알코올발효와 유산발효)시켜 감귤껍질에 풍부한 flavonoids의 비배당체화를 유도하여 간기능 개선효능 및 기호성이 우수한 감귤발효제품 개발을 통하여 향후 FTA체결로 인하여 막대한 타격을 입게 될 국내 감귤산업의 새로운 대안제시 및 국민건강 증진에 기여하고자 한다.

제 3 절 연구의 범위

감귤주와 관련하여 감귤와인의 생산 및 판매가 국내적으로 소량 이루어지고 있으나, 감귤와인의 기능성 향상 및 품질 고급화를 위해서는 감귤과피에 풍부한 flavonoid의 함량증대 및 이를 활용하기 위해 우수한 효소의 선별, 알코올 적합한 효모의 선별, 발효특성에 대한 연구가 필요하며 감귤을 이용한 발효유의 개발은 상품화된 예가 없다. 또한 감귤가공 시 발생하는 감귤과피는 매년 6천톤 이상 생산되어 국내최대 가공부산물이거나 이를 활용하여 건강기능성 소재화 시켜 산업화 된 바는 아직 없으며, 특히 친환경 재배를 통하여 얻어진 감귤의 가공 중 발생하는 부산물인 감귤과피는 잔류농약에 대한 두려움 없이 기능성 신소재개발을 위한 최적의 재료가 될 수 있다. 따라서 본 과제를 통하여 알콜성 간기능 개선 효능을 가진 감귤주 및 부산물인 감귤과피로부터 제조된 narirutin 첨가물을 함유한 발효유의 개발은 친환경 감귤가공품의 다양화와 소비촉진 및 부산물의 고부가가치화에 큰 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

구체적인 연구범위는 다음과 같다.

- 감귤껍질의 배당체 flavonoid화합물의 비배당체(aglycones)로의 전이를 위한 최적 알콜 및 유산발효조건 설정
- 감귤껍질째 발효시 비배당체 flavonoid 생성 및 용출을 최대화시킬 수 있는 전처리 조건 설정
- 기능성과 기호성이 우수한 감귤주 및 감귤발효유 제조공정 설정
- 동물실험을 통한 감귤주 및 감귤발효유의 간기능 저해 억제 기능 연구
- 감귤주 및 감귤발효유의 산업화 기술개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

친환경 감귤을 이용한 가공제품은 현재 제주대학교 생명과학 기술혁신 센터에서 제조하여 어린이 급식용으로 “껍질째 마시는 제주느낌”이라는 주스가 제조되고 있으며, 감귤을 이용한 와인이 농촌진흥청 난지농업연구소에서 개발된 적은 있으나 감귤과육의 착즙액을 이용하여 제조하였다. 따라서 본 연구에서 이루고자 하는 간 기능개선을 위하여 유기농 감귤을 이용하여 껍질째 가공한 감귤발효주나 감귤발효유는 국내에서 아직 개발되지 않고 있다.

국외에서는 예전에는 감귤껍질째 가공하여 주스를 제조하였으나 현재에는 국내에서와 마찬가지로 과육만 분리하여 착즙한 제품이 거의 대부분이다.

감귤 flavonoids의 생물전환과 관련한 기존 논문은 감귤 flavonoids를 효소를 이용하여 aglycon화 시키거나 대두 isoflavone의 aglycon화에 치중되어 있음으로 본 연구에서와 같이 narirutin을 이용하여 이들을 생물전환시켜 기능성소재로 활용한 연구 및 제품은 아직 없다.

국내 및 국외시장 분석결과 감귤주와 관련하여 감귤와인의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 감귤와인의 기능성 향상 및 품질 고급화를 위해서는 감귤과피에 풍부한 flavonoid의 함량증대 및 이를 활용하기 위해 우수한 효소의 선별, 알코올 적합한 효모의 선별, 발효특성에 대한 연구가 필요하며 감귤을 이용한 발효유의 개발은 상품화된 예가 아직은 없다.

본 과제를 통하여 개발하고자 하는 감귤주와 감귤발효유는 감귤껍질에 풍부하게 함유된 flavonoids를 전처리 및 발효과정을 통해 활성 flavonoids으로 유도하여 이들의 간 기능개선 효능을 극대화 시킨 제품으로서 이들을 활용하여 기호적으로 우수한 감귤주가 개발된다면 알콜섭취에 의한 간 기능 악화를 최소화 시킬 수 있다는 의미에서 술 선택의 폭을 넓히며 음주 소비층에게 기능성을 가진 술로서 많은 관심을 받을 것으로 기대됨. 또한 감귤발효유도 음주 후 간의 피로를 최소화 시킬 수 있을 것이라는 기대감을 가진 소비층의 강력한 구매욕을 자극시킬 수 있으리라 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행방법

1. 친환경 감귤과피 기능성 소재화 연구

가. 친환경 감귤과피로부터 narirutin 분리(환류추출법)

무농약 감귤을 (주)일해를 통하여 구입하여 과피를 분리한 후, 과피는 50℃ dry oven에서 건조하여 grinder로 분쇄하였으며 실험에 이용될 때까지 -20℃이하에서 보존하였다. 건조한 감귤과피 분말에 20배 용량(w/v)의 70% ethanol을 첨가하여 80℃에서 3시간 동안 환류 추출하였다. 추출 후 원심분리(8000rpm, 10분)하여 고형분과 상등액을 분리하였으며, 추출액에 동량의 hexane을 첨가하여 carotenoids 등 지용성 성분을 제거하였다. 지용성 성분이 제거된 잔사는 20배의 물로 추출하여 수용성의 narirutin을 용출하였으며 다시 ethyl acetate를 첨가하여 ethyl acetate층과 물층을 분리하였다. 얻어진 ethyl acetate층의 용매를 감압농축기로 제거하여 narirutin 추출물을 얻었다. HPLC를 이용한 각 분획의 narirutin 분석조건은 표 1과 같다.

표 1. 감귤 Narirutin HPLC 분석 조건

Instrument	Waters Photodiode Array Detector 2998 Waters Quaternary Gradient Module 2545 Empower Chromatography Software
Column	Waters sunfire C18
Flow rate	0.7 mL/min.
UV detector	PDA
Solvent	A ; 0.1% phosphoric acid B ; Methanol
Gradient	0~8min, 20~25% solvent B; 8~10min, 25~35% solvent B; 10~15min, 30~35% solvent B; 15~30min 35~70% solvent B, 30~35min 70~75% solvent B; 35~40min 75~80%

나. 친환경 감귤과피로부터 narirutin 분리(초음파추출법)

기존의 환류추출법보다 에너지 효율적인 추출방법으로 개선하고자 단시간, 낮은 온도, 낮은 에너지소비가 기대되는 초음파 기기(probe type)를 이용하여 narirutin과 hesperidin 두 가지 flavonoid를 감귤 껍질로부터 추출하였다. 초음파 기기의 제원은 다음과 같다.

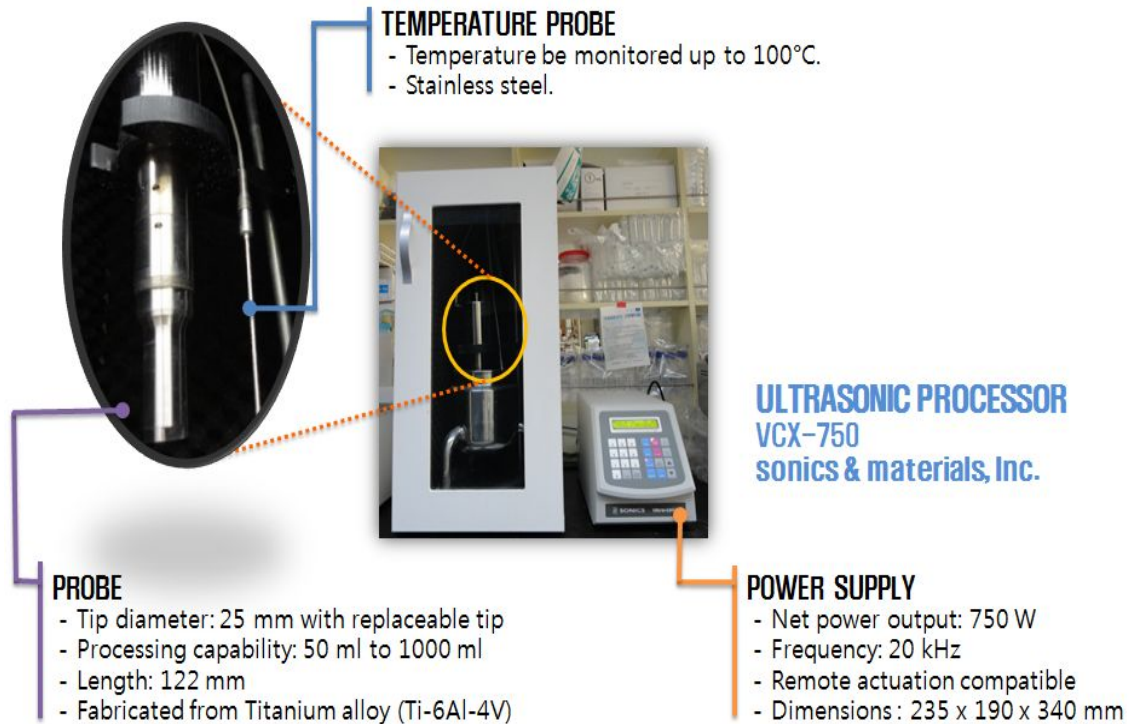


그림 1. 초음파 기기 구성

다. Narirutin 추출물의 항산화특성

1) DPPH radical 소거 활성

Narirutin 추출물의 DPPH radical에 대한 소거 활성은 99% methanol에 농도별로 희석한 시료액을 96well plate에 20 μ L씩 분주하고, 200 μ M DPPH 용액 180 μ L를 가하여 15분간 암실에서 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 radical 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료 농도를 IC₅₀ (50% inhibition concentration)으로 나타내었다. 이때 상대적인 활성 비교를 위하여 positive control로 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

(A₀ : Absorbance of control / A₁ : Absorbance of sample)

2) ABTS radical 소거 활성

7mM ABTS solution(containing of 2.45mM potassium persulfate)은 734nm에서 0.7±0.02의 흡광도를 나타내도록 5mM PBS에 희석한 후 10μL의 농도별 추출액에 990μL의 희석된 ABTS solution을 첨가하여 vortexing한 후 10분 반응 후에 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거능은 다음과 같이 계산하였으며, 각 추출물의 IC₅₀ 값은 농도에 따른 곡선식에 의해 산출하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity(\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

(A₀ : Absorbance of control / A₁ : Absorbance of sample)

3) Raw 264.7세포를 이용한 세포독성실험

세포독성을 측정하기 위한 방법으로 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 실시하였다. 대사과정이 온전한 정상세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium이 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는데, 540nm 흡광도를 측정함으로써 살아있는 정상세포 생존비율을 알 수 있다.

96well plate에 세포를 seeding하여 overnight 후, 이튿날 배지를 제거하고 FBS가 포함되지 않은 free media 50μl와 sample 50μl를 넣고 24시간 배양한다. 배지를 제거하고 MTT시약100μl처리하여 4시간 배양 후, DMSO 100μl를 처리하여 ELISA 540nm에서 측정하였다.

4) Raw 264.7세포를 이용한 NO측정실험

FBS가 포함된 DMEM배지를 이용해 96well plate에 1.5×10⁵/well로 세포를 seeding하여 37℃에서 6시간동안 incubation시켰다. 상등액을 제거한 후 sample을 농도별로 처리하고, LPS(lipopolysaccharide)를 1μg/well로 처리하고 18시간동안 incubation하였다. 상등액 100μl와 Griess reagent 100μl를 1:1로 반응시켜 ELISA 540nm에서 측정하였다. 표준곡선으로는 NaNO₂(μM)를 사용하였다.

5) Raw 264.7세포를 이용한 NOS-2 western blot

FBS가 포함된 DMEM배지를 이용해 96well plate에 1.5×10^5 /well로 세포를 seeding하여 37°C에서 6시간동안 incubation시켰다. 상등액을 제거한 후 sample을 농도별로 처리하고, LPS(lipopolysaccharide)를 $1 \mu\text{g}/\text{well}$ 로 처리하고 18시간동안 incubation하였다. RIPA buffer를 처리하여 1시간 냉동보관 후, scrapper를 이용하여 cell을 모은 후, 4°C에서 13,000rpm으로 30분 원심분리한다. BCA protein assay kit를 이용하여 단백질 정량을 시행 후, western blot을 시행하였다.

2. Narirutin 추출물의 알콜성 지방간 억제 효능(동물실험)

가. 실험동물 및 식이

동물실험에 사용된 식이는 미국영양학회(American Institute of Nutrition, AIN)가 추천하는 액체형 지방간 유도 식이[중앙실험동물(주)]를 사용하였다. 이 Lieber-DeCarli 식이는 지방간을 효과적으로 유도하기 위해서 corn oil를 첨가하여 지방의 함량이 상향 조정되었다. 이 액체식은 기본적으로 1kcal/mL 농도로 열량을 함유하며, 이 열량은 41.36%가 지방에서 나오며, 4.8%가 탄수화물, 18.07%가 단백질 그리고 실험군의 경우, 36%가 ethanol에서 공급하도록 조성되었다. 각 실험군에 대하여 최종적으로 조성된 식이표는 표 2와 같다.

표 2. 각 실험군에 Lieber-DeCarli 식이조성표^{1,2}

Ingredient	Amount (g/L)			
	Control	Ethanol	Narirutin1	Narirutin2
Casein	41.4	41.4	41.4	41.4
L-Cystine	0.5	0.5	0.5	0.5
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn oil	15.7	15.7	15.7	15.7
Olive oil	28.4	28.4	28.4	28.4
Safflower oil	2.7	2.7	2.7	2.7
Maltose dextrin	99.2	8.7	8.7	8.7
Cellulose	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral mix	8.8	8.8	8.8	8.8
Vitamin mix	2.5	2.5	2.5	2.5
Choline Bitartrate	0.5	0.5	0.5	0.5
Xanthan gum	3.0	3.0	3.0	3.0
Ethanol(mL)	-	41	41	41
Narirutin	-	-	14.3 mL	28.6 mL

¹Basal diet was formulated and supplied from Dyets, Bethlehem, PA, according to the recommendations of the AIN.

실험에 사용된 동물은 8주령(체중 $279.2 \pm 6.9\text{g}$) male Sprague-Dawley rat(Harlan Sprague Dawley, Inc, (주)중앙실험동물)를 구입하여 6주 동안 동물사육실(실내온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 12 h light-dark cycle)에서 개인별 cage로 자유롭게 공급된 증류수와 표준식으로 Lieber-DeCarli 액체식이 공급 시까지 사육을 하였다. 충분한 사육실 적응기간을 가진 후, 체중에 따른 난피법으로 9마리씩 4군으로 나누어, 약 7일 동안 Lieber-DeCarli 액체 표준식에 적응시켰다. Lieber-DeCarli 액체 표준식에만 공급받는 동물군을 대조군(control)으로 하였으며, 대조군 표준식의 탄수화물(maltose dextrin) 대신에 에탄올에 의한 열량 보충으로 대조군과 열량적으로 같은 액체식을 공급받는 동물군을 에탄올군(ethanol), narirutin 물 추출물(narirutin 순도 2%)이 마리당 1 mL가 포함된 액체식을 공급받는 동물군을 저농도 narirutin 물 추출물군(low dose narirutin), narirutin 물추출물이 마리당 2 mL가 포함된 액체식을 공급받는 동물군을 고농도 narirutin 물 추출물군(high dose narirutin)으로 하였다. 이러한 조건 하에서

Lieber-DeCarli 액체식이가 매일 70 mL씩 6주 동안 모든 동물군에 실험이 끝날 때까지 공급되었다.

나. 체중 증가량 측정과 혈청 및 조직 시료 채취

동물의 체중 변화량을 측정하기 위해서 매주 각 동물의 체중을 정해진 시간에 6 주에 걸쳐 측정하였다. 그리고 혈액의 각종 지방의 변화를 측정하기 위해서 안구혈액채취법 (retroorbital sinus bleeding)을 이용, Lieber-DeCarli 액체식이가 공급하기 직전(0 주)에, 그리고 3 주 째, 그리고 마지막으로 동물을 희생시키면서 6 주 째 시점에서 혈액을 모든 동물에서 채취하였다. 채취된 혈액은 혈액응고 시간을 가진 후에 원심분리기(2,000 x g for 10 min)를 이용, 혈청시료를 분리하였다. 분리된 혈청으로 즉각 HDL-cholesterol을 분석하였으며, 나머지 혈청은 기타 성분 분석 시까지 -70°C 에 보관하였다. 혈액 채취 시에는 약 12시간 절식되었으며, 이때 물만 공급되었다. 6주 째, 혈액 채취 직후, narirutin 투여가 장기 무게에 미치는 영향을 측정하기 위해서 각 동물의 주요 장기를 적출하였다.

다. 혈청 지방 및 지방간 주요 표지자(biomarkers) 분석

혈청의 HDL-cholesterol 및 total cholesterol 농도는 효소비색법(아산제약)으로 측정하였다. 혈청 HDL-cholesterol은 먼저 HDL fraction을 분리, 침전시킨 후, 상기한 효소비색법(아산제약)을 이용, 측정하였다. total cholesterol의 경우, 혈청 시료 0.10 mL에 조제한 반응시약 3 mL 씩을 첨가하여 흡광도(550 nm)를 측정하고 콜레스테롤 표준용액을 이용하여 시료와 동일한 조건에서 발색시켜 흡광도를 측정, 농도를 계산하였다. 혈청의 중성지방(triglycerides) 농도는 효소비색법을 이용한 kit(아산제약)을 사용해서, 발색을 시킨 후에 500 nm에서 흡광도를 측정, 양을 계산하였다. Non HDL-cholesterol 계산은 총 콜레스테롤에서 HDL-콜레스테롤을 뺀 값으로 계산되었다. 혈청 중에 존재하는 GOT와 GPT의 농도 측정은 효소비색법(Reitman-Frankel법)을 이용한 kit((주)아산제약)을 이용, 혈청시료 0.10 mL에 조제한 반응시약을 첨가하여 흡광도를 측정하였으며, 표준 GOT 또는 GPT 농도는 표준곡선용 시액을 이용하여 시료와 동일한 조건에서 발색시켜 흡광도를 측정, 농도를 계산하였다(아산제약 Manual, (주)아산제약).

라. 간 조직 사진촬영을 통한 분석(hepatic histology)

지방간 증상 정도 측정을 위한 간조직 사진촬영은 영남대학교 의과대학 해부학실에서 이루어졌다. 6주째 각 동물군에서 평균 체중에 가장 근접한 한 동물의 간을 조직 분석에 이용되었다. 간조직은 먼저 급동결된 후 약 5-10 μm 두께로 절편되었다. 절편된 조각은 hepatoxylin, eosin, Oil Red O 시약으로 염색하였다.

마. 간 지질의 추출 및 간 조직의 α -tocopherol과 총 cholesterol 측정

간 지질은 약 500 mg 균질화된 간 시료로부터 chloroform: methanol(v/v, BHT 151.3 μmol /L) 혼합 유기용매 방법으로 추출하였으며, 유기용매 제거 후 (N-EVAPTTM 111, Organomation Associates Inc., MA, USA), 총지방량(total lipid)을 측정하였다. 추출된 간조직 지방을 직접 이용, 질소농축기로 40°C의 조건에서 유기용매를 증발시키고 chloroform/methanol mixture(1:5, v/v) 500 μL 를 넣어 균질화 시킨 후 HPLC 분석하였다. 사용된 HPLC column은 40°C로 유지된 역상 column(Alltima C18, 5 μm , 4.6 x 150 mm, Alltech Associates, Inc., IL, USA)으로, Beckman System Gold software(Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA)을 겸비한 장치에 연결되었다. 이동상은 100% methanol(2 mL/min)이었고 UV 295 nm에서 분석되었다.

바. 통계처리 및 결과 처리

실험의 결과들은 평균치와 표준편차(means \pm SD)로 나타내었고, SPSS package program software를 이용하여 ANOVA로 검증한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 비교, 분석하였다.

3. Narirutin 추출물의 알콜성 간질환 억제 효능(동물실험)

가. 실험동물 및 식이

실험동물은 ICR mouse로 무게가 28g(\pm 1.0) 되는 흰쥐 60마리를 중앙실험동물(주)에서 구입하여 사용하였다. 구입 후 표준사료와 탈이온수를 완전 자유급식으로 1주간 공급하여 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였으며, stainless steel cage에 3마리씩 분리 사육하였다.

실험식이는 정상식이군(34% maltodextrin)과 에탄올식이군(40% EtOH), 에탄올 + 150mg/kg/day narirutin첨가군, 에탄올 + 300mg/kg/day narirutin첨가군으로 각각

15마리씩 나누어 매일 250 μ l씩 동일한 양을 8주간 공급한 후 희생시켜 혈액과 간을 수집하여 분석에 사용하였다. 체중은 매주 한 번씩 측정하였다.

나. 체중 증가량 측정과 혈청 및 조직 시료 채취

실험동물은 희생시키기 전 12시간동안 금식시키고, mouse 눈에서 혈액을 채취하였다. 혈청은 7000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액만 취해 분석 전까지 -70 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하며 사용하였다. 간은 혈액을 채취한 즉시 적출하여 차가운 생리식염수에 세척한 후 여과지로 여분의 물기를 제거하여 무게를 측정하고 액체질소로 급속 냉동시킨 후 -70 $^{\circ}$ C에 냉동 보관했다가 실험에 사용하였다. 약 0.1g의 간을 잘게 다진 후 ice-cold homogenizing media (154mM KCl, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA buffer, pH 7.4)를 1.5ml 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 homogenizer로 균질화한 다음 4 $^{\circ}$ C, 15,000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 세포조각들을 제거하고 지방이 들어가지 않도록 조심하여 상층액을 모아 액체질소로 급속 냉동한 다음 냉동보관(-70 $^{\circ}$ C)하였고, SOD활성도를 측정하였다.

다. 혈청 지방 및 지방간 주요 표지자(biomarkers) 분석

1) 체중 측정법

대조군과 실험군의 체중을 1주 간격으로 8주간 측정하였다.

2) 간 중량 측정법

Mouse의 간 중량 측정을 위하여 8주 후 눈에서 혈액을 채취하였고, 흉강을 열어 간을 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 수분을 제거하고 chemical balance를 이용하여 측정하였다.

3) Serum의 TG(triglyceride), TC(total cholesterol) 측정

혈청의 TG측정은 lipase-glycerol phosphate방법을 이용한 아산제약 kit를 사용하였고, TC 측정 역시 아산제약 kit를 이용하여 측정하였다.

4) Serum의 GOT, GPT 측정

혈청의 glutamate-oxaloacetate transaminase(GOT)와 glutamate-pyruvate transaminase(GPT) 측정은 아산제약 kit를 이용하여 측정하였다.

5) Serum의 endotoxin 측정

혈액 중 endotoxin의 양은 limulus amebocyte lysate endotoxin kit (Lonza, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 내재하는 endotoxin inhibitor를 제거하기 위해 70°C에서 혈액을 10분간 가열하였다. 50 µl의 혈액과 limulus amebocyte lysate를 10분간 반응시킨후에 substrate용액을 넣고 6분간 추가로 반응시켰다. 10 % SDS 용액을 넣어 반응을 정지시킨 후에 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 간조직 중 total cholesterol과 triglyceride 측정

적출한 간조직 중 일부를 취하여 RIPA buffer에 넣고 분쇄하여 균질액을 만든 후 kit(Asan Pharm. Co., Seoul, Korea)를 이용하여 TC, TG농도를 측정하였다.

7) Superoxide Dismutase(SOD)활성도

간조직의 cytosol을 -70°C의 deep freezer에서 보관하면서 실험에 사용하였으며, 단백질 정량은 BCA protein assay kit를 이용하였다. SOD활성도는 SOD assay kit를 이용하여 450nm 흡광도를 측정 후 SOD 활성도를 계산하였다.

8) Western Blot

실험쥐에서 적출한 간에 RIPA buffer 1.0ml 처리하여 homogenizer로 분쇄한 후, BCA protein assay kit를 이용하여 단백질 정량을 시행하였다. Vertical slab gel unit에 running gel(12%)과 stacking gel을 굳혔다. 가열로 변성시킨 sample을 loading 후 electrophoresis하였다. SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 사용하였다. SDS-PAGE가 끝난 후 transfer buffer(25mM Tris-HCl pH8.6, 190mM glycine, 20% methanol)에 gel상의 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 100V, 200mA로 2시간 electroblotting시켰다. Ponceou S 용액에 10분간 shaking하여 band를 확인 후, 증류수로 washing하였다. Tris buffer saline(TBS; 0.2M Tris base, 1.37M NaCl, pH7.6)에 0.1% Tween 20을 넣은 용액(TBS-T)에 5번 씻은 후, 5% skim milk를 첨가한 blocking buffer에 1시간 shaking하였다. Blocking buffer를 버리고 TBS-T로 세 번 washing후, primary antibody를 넣은 blocking buffer로 4°C에서 overnight하였다. Primary antibody는 NF-κB(1:200), TNF-α(1:200), IL-1β(1:200), NOS-2(1:200), β-actin(1:1000)을 사용하였다. TBS-T로 5분간 다섯 번 세척하여 남아 있는 primary antibody를 제거하고, secondary antibody를 넣은 blocking buffer에 넣어 실온에서 1시간동안 추가로

반응시켰다. 그리고 다시 TBS-T로 5분간 다섯 번 씻어주고 ECL substrate를 사용하여 band를 확인하였다.

라. 간 조직 사진촬영을 통한 지방간 분석(hepatic histology)

Formalin에 고정된 간을 자르고, 이를 slide에 부착하여 16시간 정도 건조하여 고정한 다음 100% propylene glycerol에 2분정도 담가 둔 다음 0.5% Oil red O 용액에 1시간 정도 염색하였다. Slide를 85% propylene glycerol 용액에 1분정도 씻은 다음 deionized water에 두 번 정도 간단히 씻고 cover glass를 덮어 영상을 구하였다.



4. 친환경 감귤발효제품 개발

가. 친환경 감귤 발효주 개발을 위한 기초 연구

1) 유기농감귤 농축액 제조

유기농감귤 발효제품은 유기농감귤 농축액을 사용하여 제조하였으며 제주대학교 생명과학기술혁신센터의 시제품 제조 장치를 이용하여 농축액을 만들어 사용하였다. 농축액 제조공정은 우선 감귤을 선별하고, 세척한 후 감귤을 껍질체로 스크류분쇄기를 이용하여 분쇄하여 screw press로 착즙하였다. 착즙한 착즙액은 400 μ m기준으로 여과하였다. 과피체 착즙한 경우, 착즙액의 당도는 12.4 brix였으며 껍질에 함유된 oily flavor를 제거하기 위하여 이들 과즙을 33.4 brix로 감압 농축하여 농축액을 제조하였다.

표 3. 유기농 감귤 농축액 제조공정

공정 순서	공정 기기 및 방법	
1. 검수		
유기농 감귤 원과를 검수 및 선별		
2. 세척		<p>세척기 (한성분체기계; 680×700×800m m(H) 후방경)</p>
세척기 이용하여 세척		

공정 순서	공정 기기 및 방법	
3. 분쇄	 <p>2007/03/17 12:18</p>	<p>습식분쇄- 스크류프레스 라인 (Chopper-Hi Screw Juice Line;한성분체기 계, #HCM-12500, #HSI-10500-2)</p>
	<p>분쇄기를 이용하여 원과를 겉질째 파쇄</p>	
4. 추출	 <p>2007/03/17 12:21</p>	<p>농축기 (concentrator;진 영기공; 용량:500L)</p>
	<p>추출기를 이용하여 추출 20℃에서 30분 동안 효소(pectinase)처리</p>	

공정 순서	공정 기기 및 방법	
5. 착즙		<p>추출농축기 (Steam Extract & Concentrate System; 일성기계; 용량: 1500L)</p>
<p>착즙기(screw press)를 이용하여 착즙 400μm 기준으로 여과 수율 70%</p>		
6. 농축		<p>농축기 (concentrator; 진영기공; 용량: 500L)</p>
<p>농축기를 이용하여 60$^{\circ}$C에서 30brix기준으로 농축 수율 28%</p>		

2) 감귤 발효주

가) 최적 효모 선별

유기농감귤 농축액을 이용한 알코올발효에 사용된 균주는 Lalvin EC-1118 (Canada)(E), Fermivin (France)(F), Lalvin ICV D47(Canada)(I), Enoferm M2(Denmark)(N), Lalvin RC 212(Canada)(R) 및 Lalvin K1-V1116(Canada)(V) 등

6종으로 Wine Kit Korea에서 구입하여 냉동보관하면서 사용하였다.

감귤 농축액을 24 °Brix가 되도록 음용수로 희석한 후 건조효모 (E), (F), (I), (N), (R) 및 (V)를 각각 0.02%(w/v) 접종하여 항온 배양기(HB-103-2H, Hanbeak Scientific Co., Korea)에서 30℃, 91시간동안 정치배양 시켰으며 발효 종료 후 부직포로 1차 여과한 다음 13,000 rpm으로 5분간 원심분리 시킨 상등액을 분석시료로 사용하였다.

나) 최적 효소 선별

효소제 Sankolase(acid cellulase)(A), cellulase(80,000 unit)(C), Rapidase® C80 MAX (pectinase)(P), Sumizyme(S)는 (주)이앤바이오텍(E&Bio tech Co., Ltd., Korea)에서 KFEN 2(K)는 (주)계명푸드텍(KMFoodex. Co., Ltd. Korea)에서 구입하여 사용하였다.

감귤 농축액을 24° Brix가 되도록 음용수로 희석한 후 효소제 (A), (C), (P), (S) 및 (K)를 각각 0.1, 0.3 및 0.5%(w/v, v/v) 첨가하여 60℃ 진탕수욕조에서 100 rpm으로 3시간 반응시켜 가수분해하였다. 방냉시킨 가수분해물에 Fermivin®을 0.02%(w/v) 접종하여 항온 배양기(HB-103-2H, Hanbeak Scientific Co., Korea)에서 30℃, 91시간동안 정치배양 시켰으며 발효 종료 후 부직포로 1차 여과한 다음 13,000 rpm으로 5분간 원심분리 시킨 상등액을 분석시료로 사용하였다.

다) 감귤 발효주의 품질 특성

(1) 적정산도 및 pH

적정산도는 0.1 N-NaOH용액으로 중화 적정하여 acetic acid로 환산하였고, pH는 pH meter(Metrohm 691, Switzerland)로 실온에서 측정하였다.

(2) 당도

당도는 digital refractometer(PR-101, ATAGO Co, Japan)를 사용하여 측정하였다.

(3) 탁도 및 색도

탁도 및 색도는 UV-visible spectrophotometer(UV-1601, Shimazu Co., Japan)를 이용하였다(16). 탁도는 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 색도는 명도(L), 적색도(a) 황색도(b)값을 측정하여 Hunter's color value로 나타내었으며, 이때 대조구는 증류수(L=99.99, a=0.06, b=-0.10)를 사용하였다.

(4) 알코올함량

발효액의 알코올함량은 시료 100 mL 취하여 증류한 다음 주정계를 이용하여 측정하였으며 Gay Luccac Table을 이용하여 15°C로 보정하였다.

나. 감귤 가수분해물의 알코올발효 조건 설정

1) 재료

본 실험에 사용된 감귤은 제주특별자치도 서귀포시에서 2009년 수확된 감귤 (*Citrus aurantium* var.)을 할인마트에서 구입하여 사용하였으며, 당도는 12 °Brix, 산도는 0.65%였다. 감귤 알코올 발효에 사용된 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* RC 212, *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116, *Saccharomyces cerevisiae* ICV D47, *Saccharomyces bayanus* EC-1118(Lalvin, Lallemand, Inc., Montreal, Canada)과 *Saccharomyces cerevisiae* Fermivin(DSM Food Specialties, Seclin, France) 5종을 구입하여 사용하였다. 보산을 위해 혼합산을 와인킷 코리아(Wine Kit Korea Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 효소제는 cellulase(80,000 unit/g, Nippon Chemical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

2) Starter 및 주모 배양

Starter는 *S. cerevisiae* Fermivin을 YPD 배지(yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%, pH 6.0)에 0.02%(w/v) 접종한 후 30°C 항온배양기(HB-103-2H, Hanbaek Scientific Co., Bucheon, Korea)에서 24시간 배양하여 사용하였다. 감귤을 마쇄하여 착즙한 후 200%(v/w) 가수하여 설탕으로 10 °Brix로 보당하였다. 121°C에서 15분 동안 멸균한 후 starter를 5%(v/v) 접종하여 항온배양기(HB-103-2H, Hanbaek Scientific Co.)에서 30°C, 24시간 배양하여 주모로 사용하였다.

3) 감귤 가수분해물 제조

감귤 가수분해물은 감귤을 마쇄하고 정제수로 200%(v/w)를 가수한 후 cellulase를 0.5%(w/v) 첨가하여 50°C 진탕배양기(HB 205SWM, Hanbaek Scientific Co.)에서 100 rpm으로 1시간 동안 반응시켜 제조하였다.

4) 감귤 가수분해물의 알코올 발효 조건 설정

가) 전처리 조건에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효 특성

전처리 조건에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효 특성을 조사하기 위해 감귤 전과(A)와 과피를 제거한 과육(B)으로 감귤 가수분해물을 제조하였다. 각각의 감귤 가수분해물을 24 °Brix가 되도록 설탕으로 보당한 후 주모 5%(v/v)를 접종하여 30°C 향온배양기(HB-103-2H, Hanbaek Scientific Co.)에서 6일 동안 알코올 발효시켰다. 발효 종료 후 부직포로 여과한 다음 13,000 rpm으로 5분 동안 원심분리 시킨 상등액을 분석시료로 사용하였다.

나) 효모 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효 특성

감귤 전과로 감귤 가수분해물을 제조하여 설탕으로 24 °Brix로 보당한 후 *S. cerevisiae* RC 212, *S. cerevisiae* K1-V1116, *S. cerevisiae* ICV D47, *S. bayanus* EC-1118 및 *S. cerevisiae* Fermivin으로 제조한 주모를 각각 5%(v/v) 접종하여 30°C 향온배양기(HB-103-2H, Hanbaek Scientific Co.)에서 6일 동안 알코올 발효시켜 효모 종류에 따른 알코올 발효 특성을 조사하였다.

다) 초기산도 및 초기당도에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효 특성

감귤 전과로 제조한 감귤 가수분해물(설탕 보당 24 °Brix)에 혼합산으로 초기산도를 0.2, 0.3 및 0.4%로 조정하여 *S. bayanus* EC-1118 주모 5%(v/v)를 접종하여 30°C 향온배양기(HB-103-2H, Hanbaek Scientific Co.)에서 6일 동안 발효시켜 초기산도에 따른 알코올 발효 특성을 조사하였으며, 감귤 가수분해물(초기산도 0.2%)에 설탕으로 각각 22, 24, 26 및 28 °Brix로 보당하여 초기당도에 따른 알코올 발효 특성을 조사하였다.

라) 당 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효 특성

감귤 전과로 감귤 가수분해물을 제조하여 설탕, 꿀, 과당, 및 프락토올리고당으로 24 °Brix가 되도록 각각 보당한 후 *S. bayanus* EC-1118 주모 5%(v/v)를 접종하여 30°C 향온배양기(HB-103-2H, Hanbaek Scientific Co.)에서 6일 동안 발효시켜 당 종류에 따른 알코올 발효 특성 및 관능적 기호도를 조사하였다.

5) 감귤 브랜드 제조 및 품질특성

가) 감귤와인의 증류조건 설정

상기의 조건으로 설정된 감귤 와인을 부직포로 1차 여과한 다음 circulating aspirator (sibata WJ-15, Japan)로 2차 여과하여 병입 후 15°C에서 저장한 것을 증류 시료로 사용하였다. 증류는 상압 단식증류기를 이용하여 시료의 온도를 95°C 이상 가열하면서 냉각기를 통해 초류(10%), 중류(80%), 후류(10%)로 나누어 분취하였다. 분취한 시료를 membrane filter(pore size 0.45 μm , Advantec MFS, Japan)로 여과한 뒤 gas chromatography(Hewlett packard-6980, Hewlett packard Co., Palo Alto, USA)를 이용하여 알코올 성분 중 메탄올 함량을 분석하였다.

나) 감귤 브랜드 제조조건

상압 단식증류기를 이용하여 분취한 초류(10%)와 중류(80%)를 혼합하여 알코올 도수 40%의 감귤 브랜드를 제조하였으며, membrane filter(pore size 0.45 μm , Advantec MFS, Japan)로 여과한 뒤 gas chromatography(Hewlett packard-6980, Hewlett packard Co., Palo Alto, USA)를 이용하여 알코올 성분을 분석하였다.

6) 분석항목

가) 알코올 함량 및 당도

알코올 함량은 시료 100 mL를 증류한 다음 주정계를 이용하여 측정 후 Gay Luccac Table을 이용하여 15°C로 보정하여 측정하였다. 당도는 digital refractometer(PR-101, ATAGO Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

나) 적정산도 및 pH

적정산도는 0.1 N NaOH로 중화 적정하여 citric acid(%)로 환산하였고, pH는 pH meter(Metrohm 691, Metrohm. UK Ltd., Herisau, Switzerland)로 측정하였다.

다) 갈색도 및 색도

갈색도 및 색도는 UV-visible spectrophotometer(UV-1601, Shimazu Co., Japan)를 이용하였다. 갈색도는 420 nm에서 흡광도를 측정하였고, 색도는 명도(L), 적색도(a) 황색도(b)값을 측정하여 Hunter's color value로 나타내었으며, 이때 대조구는 증류수 (L=99.99, a=0.06, b=-0.10)를 사용하였다.

라) Flavonoids 함량

감귤 알코올 발효액을 다공성 흡착 수지인 Amberlite XAD7HP(BORN CHEMICAL Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 당 성분을 제거한 후 high performance liquid chromatography(LC-2000 Plus HPLC system, Jasco International Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 flavonoids의 함량과 조성을 조사하였다. Column은 Agilent Eclipse XDB-C18(4.6 mm × 12.5 mm, Agilent Co., Ltd., Santa Clara, California)을 사용하였으며, 이동상 용매로는 50 mM phosphoric acid(solvent A)와 methanol(solvent B)를 사용하였다. Gradient elution은 0~8 min; 20~25% B, 8~10 min; 25~35% B, 10~15 min; 30~35% B, 15~30 min; 35~70% B, 30~35 min; 70~75% B, 35~40 min; 75~80% B로 하였다. Flow rate를 0.7 mL/min로 하여 UV detector로 280 nm에서 검출하였다.

마) 유리당 및 유기산 함량

유리당 및 유기산은 알코올 발효액을 Sep-pak C18 cartridge에 통과시킨 다음 0.45µm membrane filter로 여과하여 High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Waters 2487, Waters Co., USA)로 분석하였다(21). 이때 유리당 분석 column은 carbohydrate analysis column(4.6×250 mm, Waters Co.), mobile phase는 75% acetonitrile(Fisher Co.)을 사용하였고 flow rate는 1.0ml/min, injection volume은 20 µL, detector는 RI(Waters 2414, M410 RI) detector를 사용하였다. 유기산 분석 column은 Atlantis™ dC18(3.9×150 mm, Waters Co.), mobile phase는 20 mM NaH₂PO₄(pH 2.7)를 사용하였고 flow rate는 1.0mL/min, injection volume은 20 µL, detector는 UV(Waters 2487, 210 nm)를 사용하였다.

바) 관능검사

당 종류에 따른 감귤 가수분해물 알코올 발효의 관능적 특성을 조사하기 위하여 계명대학교 식품가공학과 발효공학실 학부생 및 대학원생에게 관능검사에 필요한 훈련과정을 거치게 한 후 신뢰성과 실험에 대한 관심도 등을 고려해 10명의 검사요원을 선발하여 관능검사를 실시하였다. 관능검사는 오후 4시에 실시하였으며 시료를 똑같은 잔에 각각 담아서 제공하였다. 평가방법은 맛, 향, 색, 전반적인 기호도를 7점 채점법을 이용하여 실시하였고, 관능검사 항목에 대하여 매우 좋다; 7점, 좋다; 6점, 약간 좋다; 5점, 보통이다; 4점, 약간 싫다; 3점, 싫다; 2점, 매우 싫다; 1점으로 평가하였다. 관능검사 결과는 SAS(Statistical Analysis System) 통계 프로그램을

이용하여 각각 일원배치분산분석(One-way ANOVA Test)을 하고 Duncan's multiple range test(DMRT)로 평균간의 다중비교를 실시하였다.

사) 알코올 성분

알코올 성분 분석은 국제청 주류분석규정에 따라 gas chromatography(Hewlett packard-6980, Hewlett packard Co., Palo Alto, USA)로 분석하였으며, 표준물질로 무수알코올(99.9%)을 사용하여 각각의 알코올 성분을 일정량(0~200 ppm) 첨가하여 작성한 standard curve를 이용하여 정량하였다. 이때 사용한 column은 fused silica capillary column(30 m×0.25 mm)이었으며, detector는 FID, injector temperature는 250oC, detector temperature는 260oC, carrier gas는 N2(30 mL/min)를 사용하였다.

아) 통계처리

본 연구의 실험결과는 3회 반복하여 실험군당 평균과 표준편차로 나타내었다. 관능검사 결과는 SAS(Statistical analysis system) 통계 프로그램을 이용하여 분산분석과 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다.

다. 가수분해물을 이용한 감귤와인과 시판감귤와인의 품질비교

1) 재료

본 실험에 사용된 감귤은 제주특별자치도 서귀포시에서 2010년 수확된 감귤 (*Citrus aurantium var.*)을 할인마트에서 구입하였으며, 당도는 10 °Brix, 산도는 0.70%였다. 감귤 알코올발효에 사용된 효모 *Saccharomyces bayanus* EC-1118 (Lalvin, Lallemand, Inc., Montreal, Canada)는 와인킷 코리아(Wine Kit Korea Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 효소제는 cellulase(80,000 unit/g, Nippon Chemical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 시판와인인 제주감귤주 꿀한잔(100% 제주산감귤 원액함량 30%)은 대형할인매장에서 구입하였으며, 골드비크(Gold beak, 제주산 감귤과실 100%)는 인터넷으로 구입하여 품질 비교 시료로 사용하였다.



2) Starter 및 주모 배양

Starter는 *S. bayanus* EC-1118을 YPD 배지(yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%, pH 6.0)에 0.02%(w/v) 접종한 후 30°C 항온배양기(HB-103-2H, Hanbaek Scientific Co., Bucheon, Korea)에서 24시간 배양하여 사용하였다. 감귤을 마쇄하여 착즙한 후 200%(v/w) 가수하여 설탕으로 10 °Brix로 보당하였다. 121°C에서 15분 동안 멸균한 후 starter를 5%(v/v) 접종하여 항온배양기(HB-103-2H, Hanbaek Scientific Co.)에서 30°C, 24시간 배양하여 주모로 사용하였다.

3) 감귤 가수분해물을 이용한 감귤와인 제조

감귤 가수분해물은 감귤 전과 20 kg을 마쇄하고 정제수로 200%(v/w)를 가수한 후 설탕을 첨가하여 24 °Brix로 보당한 다음 cellulase를 0.5%(w/v) 첨가하여 50°C 진탕배양기(HB 205SWM, Hanbaek Scientific Co.)에서 100 rpm으로 1시간 동안 가수분해 시켰다. 제조된 가수분해물(당도 3.4 °Brix, 적정산도는 0.39%, pH 3.22)에 주모(*S. bayanus* Lalvin EC-1118) 5%(v/v)를 접종하여 항온배양기(HB-103-2H, Hanbaek Scientific Co., Korea)에서 30°C로 14일 동안 정치배양하여 최종 당도를 11~12 °Brix로 맞춰 sweet type으로 발효시켰다. 알코올발효 종료 후 부직포로 1차 여과한 다음 membrane filter(pore size 0.45 µm, Advantec MFS, Japan)로 2차 여과하여 감귤와인을 제조하였다. 제조된 감귤와인(A)은 시판와인(B, C)과 품질비교를 실시하였다.

4) 시판와인과의 품질비교 분석항목

가) 알코올 함량 및 당도

알코올 함량은 시료 100 mL를 증류한 다음 주정계를 이용하여 측정된 후 Gay Luccac Table을 이용하여 15°C로 보정하여 측정하였다. 당도는 digital

refractometer (PR-101, ATAGO Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

나) 적정산도 및 pH

pH는 pH meter (Metrohm 691, Switzerland)로 실온에서 측정하였고, 적정산도는 일정량의 시료를 취하여 1% phenolphthalein 지시약을 2~3방울 떨어뜨린 다음 0.1 N NaOH로 중화 적정하였으며 citric acid(%)로 환산하였다.

$$\text{적정산도(\%)} = \frac{V \times F \times A \times \text{회석배수}}{S} \times 100$$

V : 0.1 N NaOH의 적정치 소비량(mL)

F : 0.1 N NaOH의 factor

A : 0.1 N NaOH 1 mL에 상당하는 유기산의 양

S : 시료 채취량

다) 갈색도 및 색도

갈색도 및 색도는 UV-visible spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu Co., Japan)를 이용하였다. 갈색도는 420 nm에서 흡광도를 측정하였고, 색도는 명도(L), 적색도(a) 황색도(b)값을 측정하여 Hunter's color value로 나타내었으며, 이때 대조구는 증류수(L=99.99, a=0.06, b=-0.10)를 사용하였다.

라) 유리당 및 유기산 함량

유리당 및 유기산은 알코올발효액을 Sep-pak C18 cartridge에 통과시키고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC (Water 1515, Waters Co., USA)로 분석하였다. 이때 유리당 분석 column은 carbohydrate analysis column(3.9 \times 300 mm, Waters Co.), mobile phase는 75% acetonitrile (Fisher Co.)을 사용하였고, flow rate는 1.0 mL/min, injection volume은 20 μl , detector는 RI (M410 RI) detector를 사용하였다. 유기산 분석 column은 AtlantisTM dC₁₈(3.9 \times 150 mm, Waters Co.), mobile phase는 20 mM NaH₂PO₄(pH 2.7)를 사용하였고, flow rate는 1.0 mL/min, injection volume은 20 μl , detector는 UV detector(210 nm)를 사용하였다.

마) 알코올성분

알코올 성분 분석은 국제청 주류분석규정에 따라 gas chromatography (Hewlett packard-6980, Hewlett packard Co., Palo Alto, USA)로 분석하였으며, 표준물질로 무수알코올(99.9%)을 사용하여 각각의 알코올 성분을 일정량(0~200 ppm) 첨가하여 작성한 standard curve를 이용하여 정량하였다. 이때 사용한 column은 fused silica capillary column(30 m×0.25 mm)이었으며, detector는 FID, injector temperature는 250℃, detector temperature는 260℃, carrier gas는 N₂(30 mL/min)를 사용하였다.

바) 플라보노이드 조성 및 함량 비교

감귤와인을 다공성 흡착 수지인 Amberlite XAD7HP (BORN CHEMICAL Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 당 성분을 제거한 후 high performance liquid chromatography (LC-2000 Plus HPLC system, Jasco International Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 flavonoids의 함량과 조성을 조사하였다. Column은 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm × 12.5 mm, Agilent Co., Ltd., Santa Clara, California)을 사용하였으며, 이동상 용매로는 50 mM phosphoric acid (solvent A) 와 methanol (solvent B)를 사용하였다. Gradient elution은 0~8 min; 20~25% B, 8~10 min; 25~35% B, 10~15 min; 30~35% B, 15~30 min; 35~70% B, 30~35 min; 70~75% B, 35~40 min; 75~80% B로 하였다. Flow rate를 0.7 mL/min로 하여 UV detector (Jasco UV-2075 plus Detector, France)로 280 nm에서 검출하였다.

사) 관능검사

자가제조 감귤와인(A)과 시판 감귤와인(B, C) 2종의 관능적 특성을 조사하였다. 훈련된 20~30대 성인 10명의 관능요원을 선발하여 반복된 랜덤화 완전 블록 계획(replicated randomized complete block design)에 따라 색, 향, 맛(단맛, 쓴맛, 감귤 맛) 및 전반적 기호도를 7점 평점법으로 평가하였다.

아) 통계처리

본 연구의 실험결과는 3회 반복하여 실험군당 평균과 표준편차로 나타내었으며, 관능검사 결과는 SAS (Statistical Analysis System) 통계 프로그램을 이용하여 각각 일원배치분산분석(One-way ANOVA Test)을 하고 Duncan's multiple range test (DMRT)로 평균간의 다중비교를 실시하였다.

제 2 절 연구 수행 결과

1. 친환경 감귤과피의 기능성 소재화 연구

가. 친환경 감귤과피로부터 narirutin 추출

1) 친환경 감귤 flavonoids 추출 및 동정

일반적인 감귤의 flavonoids 조성을 관찰하기 위하여 감귤과육을 수동착즙기를 착즙한 착즙액의 flavonoids 조성을 HPLC로 분석한 결과, 주요한 A, B 두 개의 peak를 관찰할 수 있었다(그림 2). 뒤쪽의 낮은 B peak는 분석결과 hesperidin인 것을 확인 할 수 있었고 앞의 A peak는 naringin일 것으로 추측하였으나 표준품과의 spiking 결과 retention time이 일치하지 않았다. Naringin을 naringinase로 가수분해 처리하면 neohesperidose에서 rhamnose가 가수분해되고 생성되는 naringenin-7-glucose가 생성되는데, hesperidinase로 처리할 경우에는 분해되지 않는 특징이 있다. A peak를 hesperidinase로 처리하면 naringenin-7-glucose와 retention time이 정확히 일치하는 반응물이 생성되므로 이 flavonoid는 glucose와 rhamnose가 α -1,6 결합을 갖는 hesperidose를 가진 narirutin으로 추정할 수 있었으며, 감귤 과피 추출물을 LC-MS로 분석하여 본 결과, 분자량 580.5의 narirutin인 것으로 확인되었다(그림 3). Peak B는 hesperidin 표준품과 retention time이 일치하여 hesperidin으로 간주 하였으며 LC/MS분석을 통하여 확인하였다(그림 4).

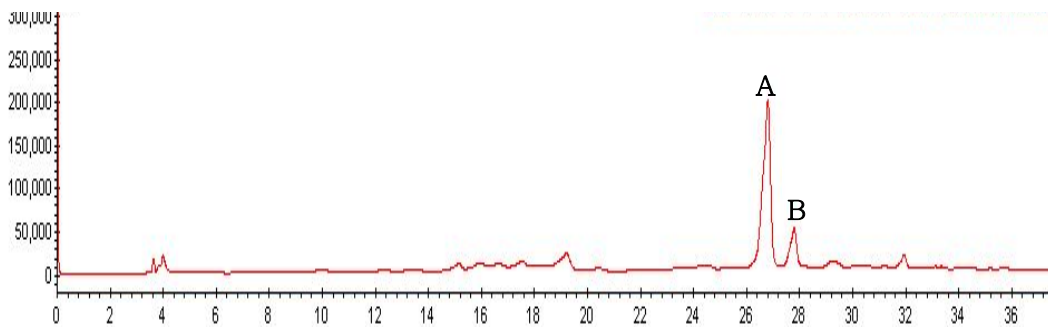


그림 2. 감귤 착즙액의 flavonoids 조성

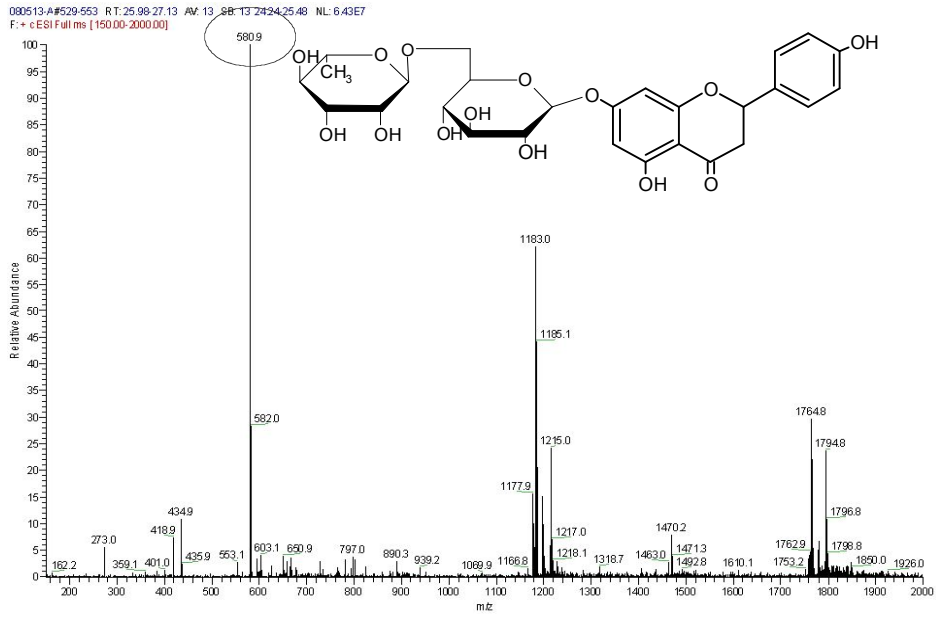


그림 3. 감귤 flavonoids 중 A(narirutin)의 LC-MS chromatogram

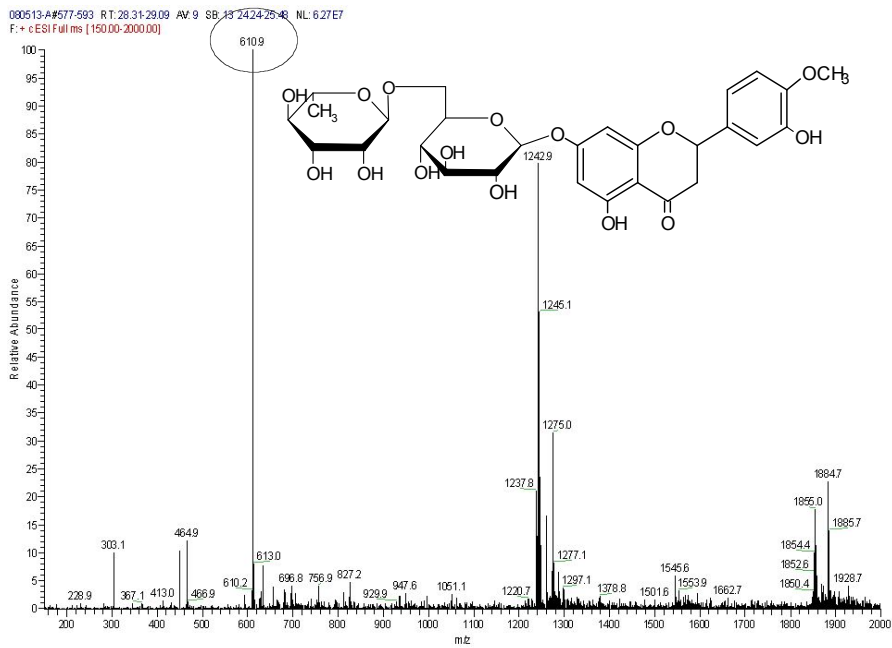


그림 4. 감귤 flavonoids 중 B(hesperidin)의 LC-MS chromatogram

국내 감귤관련 연구보고에서 대부분 naringin이 주 flavonoids라고 보고하고 있으나 본 실험을 통하여 naringenin이 아닌 narirutin이 제주산 감귤의 주 flavonoids임을 확인할 수 있었다.

2) 친환경 감귤 flavonoids 조성

감귤의 과육을 벗겨 과육만을 착즙한 것과 과피가 있는 그대로 착즙한 경우의 flavonoids 조성 및 함량을 조사해보았다. HPLC 결과 두 가지 착즙액의 flavonoids의 조성은 같았지만 함량은 차이를 보이는 것으로 나타났다(그림 5, 표 4). 감귤 과육만을 착즙했을 경우보다는 과육과 과피를 같이 추출했을 경우 narirutin은 약 36%(72 μ M)정도 증가하는 것으로 나타났으며 naringenin 또한 약 5 μ M 정도 많은 것으로 나타났다. 그러나 hesperidin은 과육만 착즙한 것이 5 μ M 정도 약간 많은 것으로 나타났다.

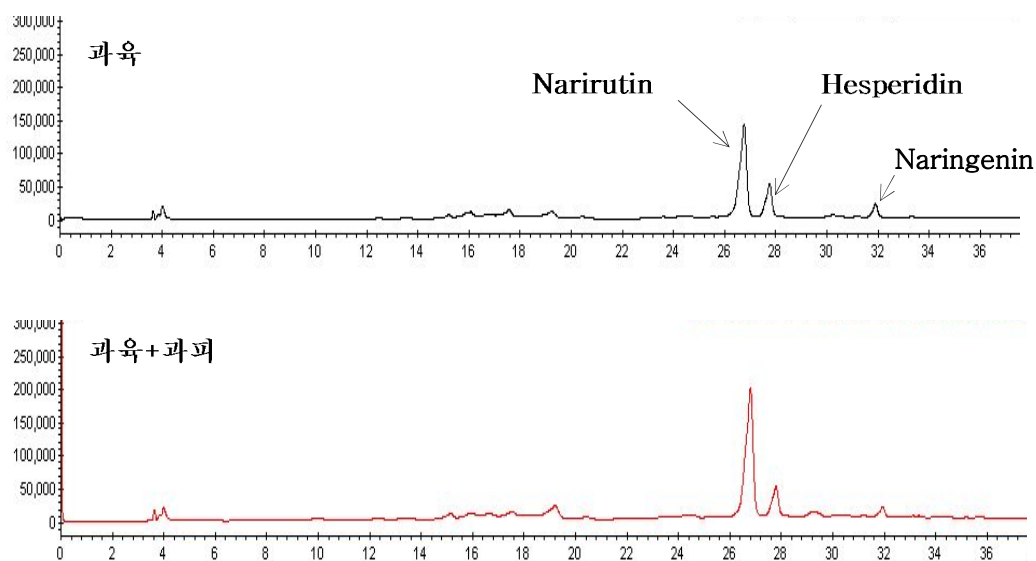


그림 5. 감귤 과육과 과육+과피 착즙액의 flavonoids 조성 비교

표 4. 감귤 과육과 과육+과피 착즙액의 flavonoids 함량 비교

	Mole농도(μM)		
	Narirutin	Hesperidin	Naringenin
과육	199.05	4.52	21.61
과육+과피	281.31	3.89	16.66

농약으로 재배한 일반감귤과 친환경감귤의 flavonoids 조성을 비교한 결과, 유기농 재배의 경우 일반 감귤에 비해 hesperidin과 naringenin 함량은 거의 비슷했으나 narirutin이 일반 감귤 narirutin 함량에 비해 약 29%정도 적은 것으로 나타났다 (그림 6, 표 5). 무농약 감귤은 narirutin이 일반 감귤에 비해 약 45% 정도 많은 것으로 나타났다. 무농약 재배할 경우 외부 병충해에 의한 스트레스를 극복하기 위해 과피도 두꺼워지며 narirutin의 생성량도 증가한 것으로 추측된다.

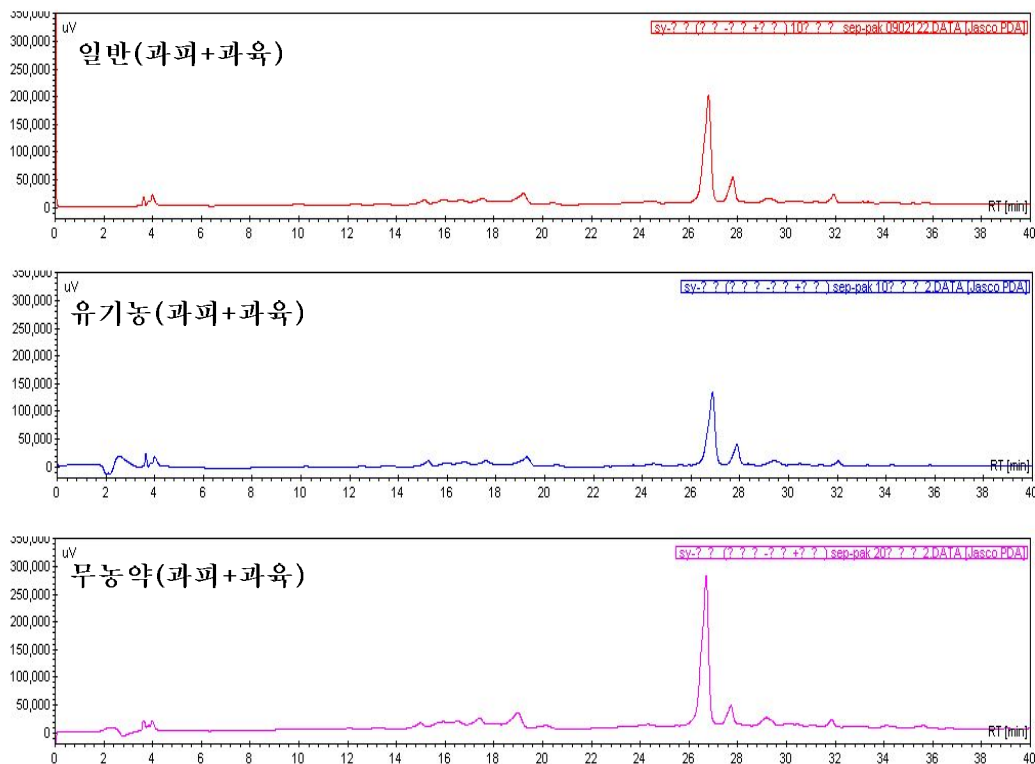


그림 6. 감귤 재배 농법별 착즙액의 flavonoids 조성 비교

표 5. 감귤 재배 농법별 착즙액의 flavonoids 함량 비교

	Mole농도(μM)		
	Narirutin	Hesperidin	Naringenin
일반(과육+과피)	281.31	3.89	16.66
유기농(과육+과피)	209.06	4.25	17.27
무농약(과육+과피)	395.68	2.82	16.95

이상의 결과에서 친환경 감귤, 특히 무농약 감귤착즙액에는 narirutin의 함량이 기타 감귤에 비해 월등히 높았으나, 감귤생과를 착즙하였을 때 추출되는 narirutin의 양과 착즙액 중의 당질, 섬유소 등의 제거에 필요한 공정 등을 감안하면 감귤생과를 착즙하여 소재화하기에는 어려움이 많을 것으로 판단되었다. 다만, 친환경 감귤을 껍질째 착즙하였을 때, 일반감귤보다 narirutin 등의 flavonoids가 비교적 많이 추출되어서 이들을 이용하여 가공제품을 개발하면 의미가 있을 것으로 사료되어진다.

3) Narirutin추출물의 aglycone화

Narirutin의 체내흡수를 높이기 위해 narirutin 추출물에 cellulase를 처리하여 aglycon화 되는 정도를 조사하였다. Cellulase 처리 후 모든 narirutin과 hesperidin이 aglycon화 되어 naringenin과 hesperetin으로 전환되었다(그림 7).

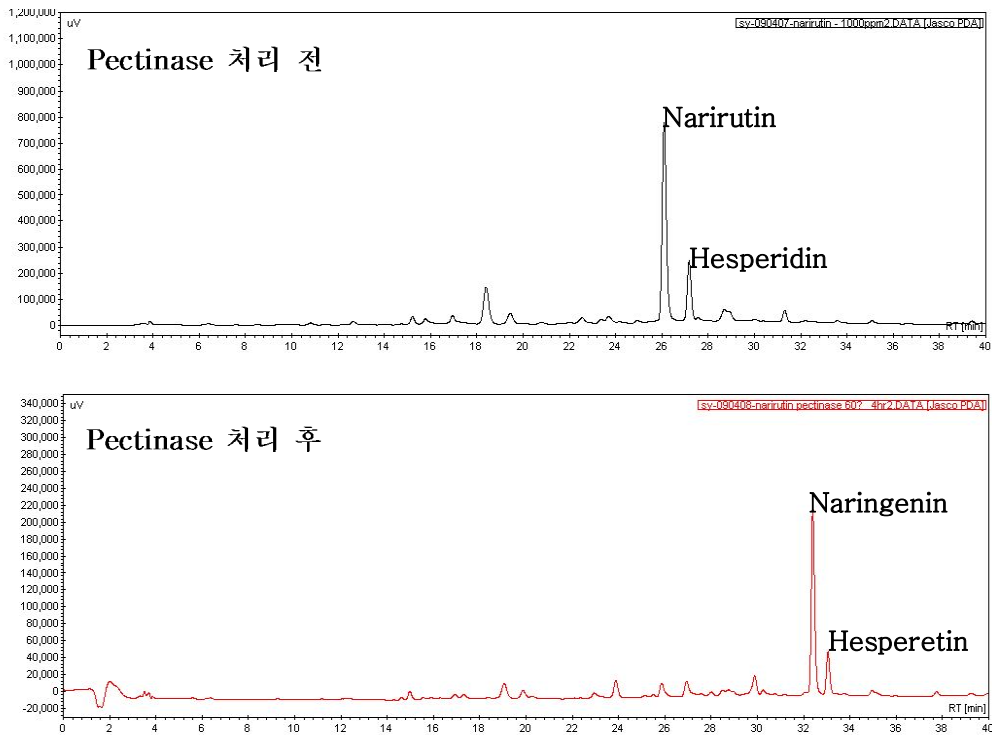


그림 7. 감귤 narirutin 추출물의 pectinase 처리 전후 flavonoids 조성 비교

특히, aglycon화 되면서 쓴맛의 강도도 크게 감소하여 관능검사를 통한 쓴맛 정도 측정에서 효소처리 전 7점에서 효소처리 후 4점으로 크게 감소하여 narirutin 추출물을 첨가한 발효제품을 개발할 때 cellulase를 처리하여 aglycon화시키는 공정이 필요하리라 사료된다(표 6)

표 6. Narirutin 추출물의 pectinase 처리 전후의 쓴맛 정도 비교 관능검사
(9점 척도 1점:매우 낮음, 5점:보통, 9점:매우 높음)

	Cellulase처리 전	Cellulase 처리 후
쓴맛 정도	7	4

2. 감귤과피로부터 narirutin 기능성 소재화

가. 감귤과피로부터 최적 narirutin 추출조건 설정

친환경감귤을 이용한 가공제품의 개발 및 상품화 노력이 어린이 급식용 주스 등을 통하여 현재 지속적으로 증가추세에 있음을 고려하여, 가공 시 부산물로 발생하는 감귤과피를 이용하여 narirutin을 소재화 하는 기술을 개발하고자 하였다. 특히 잔류농약에 대한 우려가 없는 친환경 감귤과피를 이용할 수 있기 때문에 일반감귤에 비해 narirutin 소재화에 유리한 점이 있으며 참여기업인 (주)일해에서도 소재화 기술개발에 지대한 관심을 가지고 있는 상황이다. 또한 narirutin이 수용성의 flavonoid이기 때문에 분리공정을 성공적으로 개발할 수 있으면 기능성원료로서의 적용성에도 큰 장점이 있을 것으로 간주된다.

Narirutin이 고농도로 함유된 추출물을 제조하고 이들을 발효제품에 첨가하기 위하여 과육과 과피를 동시에 착즙할 경우, narirutin의 수율은 증가할 수 있으나, 특히 과육에 다량 함유된 당을 제거하는데 어려움이 많아 감귤가공품 제조 시 생성되는 감귤박을 활용하기로 하였다. 감귤박의 대부분은 감귤과피로 구성되어있기 때문에 감귤 과피로 부터 narirutin을 추출하는 공정을 검토하였다. 무농약 감귤과피를 EtOH로 분획, hexane층 제거, 건고 및 물추출 등의 공정을 통하여 narirutin 물추출물을 제조하였다. Narirutin의 순도를 높이기 위하여 XAD-7 column으로 처리하였으며 이러한 공정들을 거쳐 총 polyphenol 함량이 약 70%인 narirutin 추출물을 얻었다(그림 8).

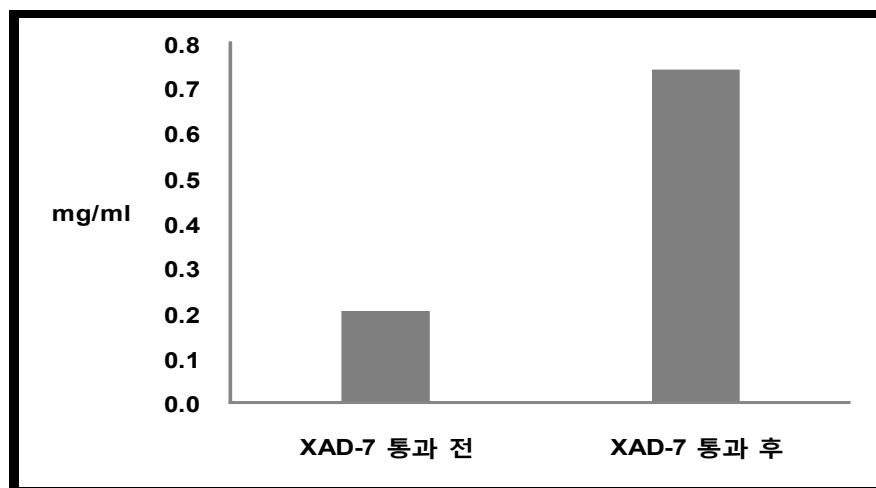


그림 8. 감귤 narirutin 추출물 XAD-7 통과 전 후 flavonoids 함량 비교

Narirutin 추출물의 대부분은 narirutin(30%)과 hesperidin(10%)으로 구성되어있었으나, 컬럼의 사용은 향후에 산업화의 걸림돌이 될 수 있기 때문에 column을 사용하지 않고 물추출물을 활용하여 용매추출하는 공정을 시도하였다. 감귤과피로부터 narirutin을 추출하기위한 여러 조건을 검토한 결과, 건조감귤의 30배의 무게에 해당하는 70% EtOH로 80℃에서 180분간 환류추출하였을 때 narirutin과 hesperidin의 회수율(narirutin 5.1%, hesperidin 13.1%)이 가장 우수하였으며 감귤과육과 과피를 동시에 착즙할 때보다 과피를 건조 후 착즙하였을 때 월등히 높은 이들 flavonoids 함량을 얻을 수 있었다. 이와 같은 결과는 과피가 건조되지 않은 상황에서는 물리적 착즙을 통하여 flavonoids를 추출하는 데는 상당히 한계가 있음을 알려주고 있으며 narirutin의 기능성 소재화를 위하여서는 건조과피를 이용하는 것이 가장 합리적이라는 사실을 알려주고 있다. 또한 건조 감귤과피를 이용하여 용매추출시 감귤압착추출물과는 달리 hesperidin이 고농도로 용출됨을 알 수 있었다.

추출과정에서 에너지를 절감할 수 있는 추출법을 개발하고자 초음파기기를 이용하여 다양한 종류의 추출용매와 추출시간, 온도 등을 조사한 결과, 70% EtOH을 감귤박의 30배 투입하여 10분 동안 추출하였을 때, 환류추출공정과 narirutin의 추출수율과 순도가 거의 유사하게 나왔으며 에너지 사용량은 환류추출법의 약 40%선에 그치지 않는 에너지 저감형 초음파 추출공정을 개발하였다(표 7).

초음파 처리한 감귤과피추출액을 감귤착즙액에서 적용한 narirutin추출공정을 활용하여 그림 9와 같은 공정을 통하여 narirutin 물추출물을 얻고, 마지막으로 ethyl acetate로 추출하여 narirutin의 순도가 75%인 narirutin 추출물을 얻었다(그림 9, 그림 10). 현재 시약급으로 사용되고 있는 narirutin(순도 80%) 5mg의 국내시판가가 약 70만원에 육박하는 것을 고려할 때, 본 과제를 통하여 비교적 간단하고 경제적인 방법으로 순도 75% 이상의 narirutin을 얻을 수 있음은 국내산 폐자원의 고부가가치화 측면에서 상당히 의의가 있는 연구결과라 사료된다.

표 7. 건조 감귤과피로부터 환류추출법(CSE)과 초음파추출법(UAE)에 의한 flavonoids 추출효율 비교

	Solvent		Time (min)	Temp. (°C)	Yield (%)	Flavonoids Content (%)			
	% EtOH	Volume ^c				Narirutin	Hesperidin		
UAE ^a	U-EtOH-A	0%	20x	10	30	39.80	4.0	4.7	
	U-EtOH-B	35%	20x	10	30	35.71	4.6	4.4	
	U-EtOH-C	70%	20x	10	30	37.02	5.3	8.5	
	U-EtOH-D	95%	20x	10	30	20.59	5.1	10.0	
	U-time-A	70%	20x	10	30	37.02	5.3	8.5	
	U-time-B	70%	20x	20	30	38.45	5.3	8.1	
	U-time-C	70%	20x	30	30	38.91	6.4	8.5	
	U-time-D	70%	20x	60	30	40.21	5.4	7.4	
	U-Sol-A	70%	10x	10	30	27.24	5.5	6.3	
	U-Sol-B	70%	20x	10	30	37.02	5.3	8.5	
	U-Sol-C	70%	30x	10	30	44.32	5.4	9.7	
	U-Sol-D	70%	40x	10	30	45.12	5.2	10.4	
	CSE ^b	CSE	70%	30x	180	80	43.96	5.1	13.2

UAE: Ultrasound-Assisted Extraction, ^b CSE: Conventional Solvent Extraction, ^c Volume: added volume of solvent expressed as times of sample amounts (v/w).

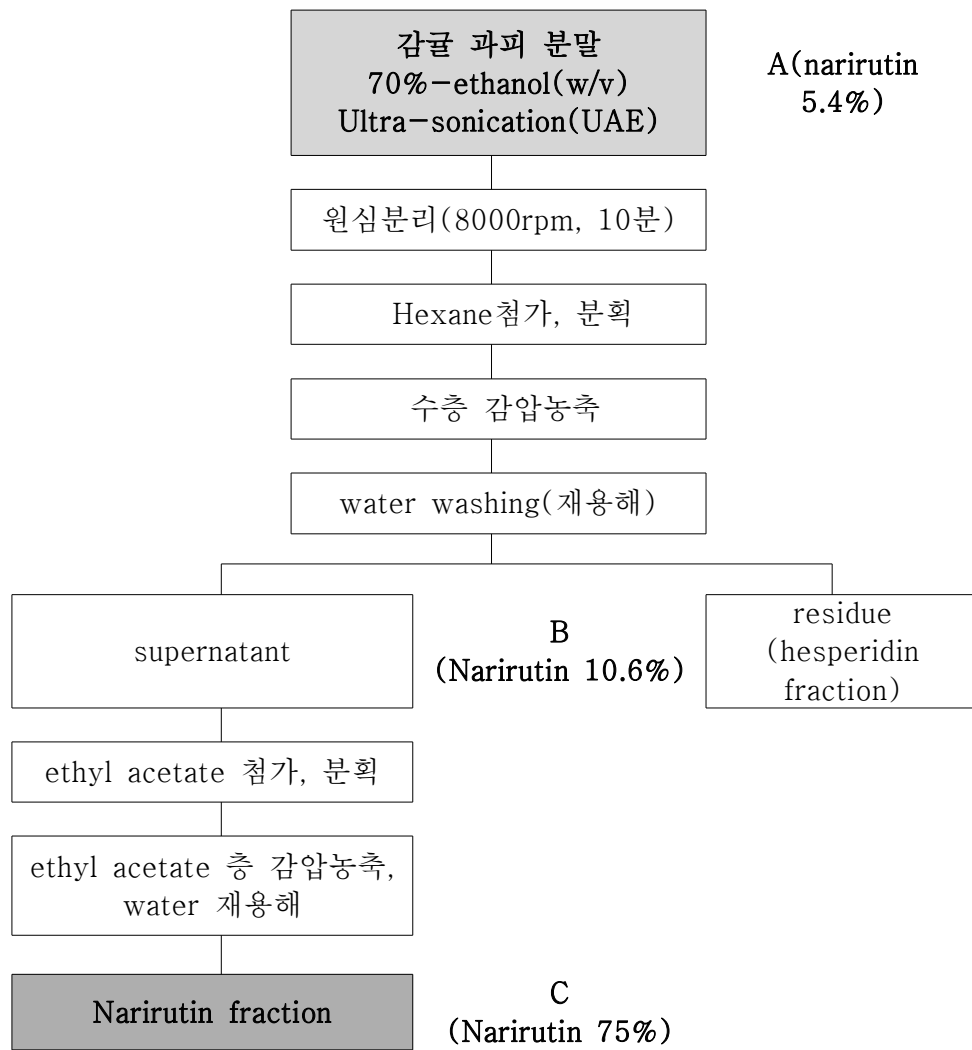


그림 9. 무농약 재배 감귤과피로부터 narirutin 추출 공정도

그림 10은 각 공정에서의 flavonoids 조성변화를 나타내고 있다.

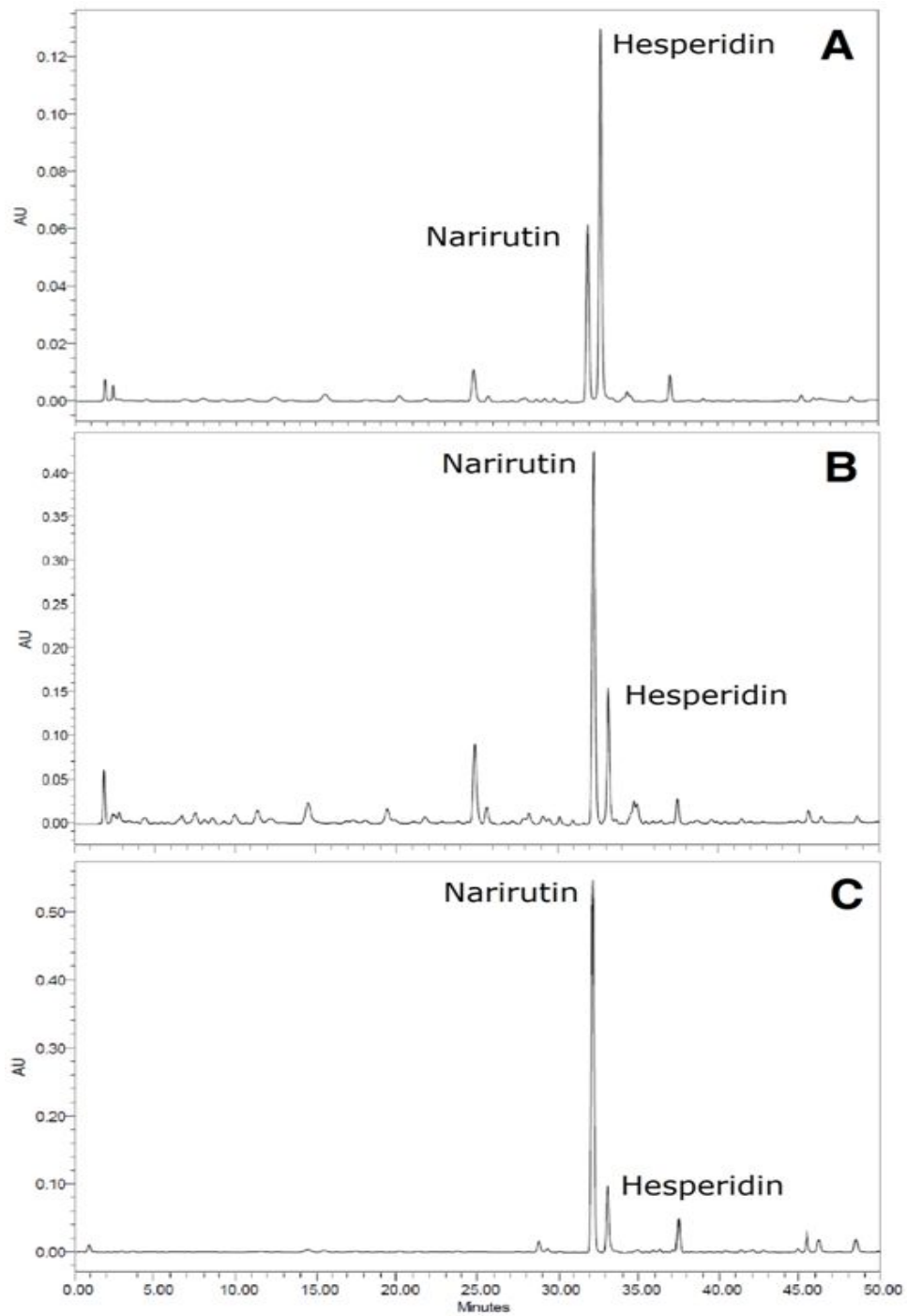


그림 10. 감귤과피로부터 narirutin 추출과정의 flavonoids 조성 비교. A: 초음파추출물, B: narirutin 물추출물, C: narirutin 추출물

본 과제를 통하여 개발한 narirutin추출공정은 공정이 단순하고 비교적 경제적이어서 산업화가 가능할 것으로 간주되어진다.

나. Narirutin 추출물의 산업화공정 개발

현재 제주도에 소재한 감귤가공공장에서 감귤부산물을 활용하고자 산업적 생산을 위한 설비를 갖추기 위하여 준비하고 있다. 감귤과피를 원료로 사용하여 유효성분을 추출하기 위해서는 무엇보다도 건조 감귤과피를 대량생산할 수 있는 시설을 갖추는 것이 가장 중요하다. 본 과제의 참여기업인 (주)일해에서는 감귤가공 시 박피공정을 따로 진행하기 때문에 건조 감귤과피를 대량으로 생산할 수 있는 system을 준비하고 있다(그림 11). (주)일해에서 고려하고 있는 부산물처리규모는 연간 약 3,200ton 규모이다.

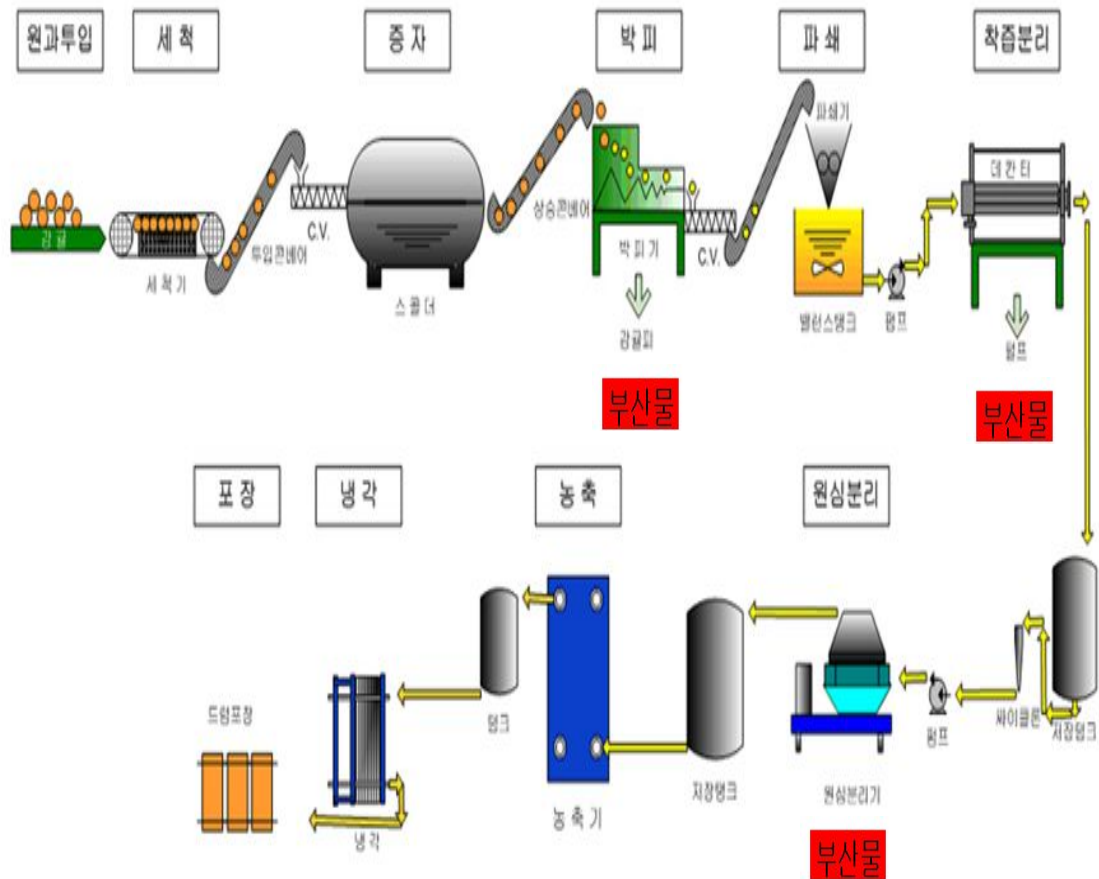


그림 11. (주)일해의 감귤가공 공정 및 부산물 생산

생산된 부산물은 감귤과피와 감귤과육 착즙박으로 나누어지며 감귤과피만 수거하여 그림 12와 같은 공정을 통하여 건조 분쇄된 감귤과피를 대량생산해 낼 수 있다.

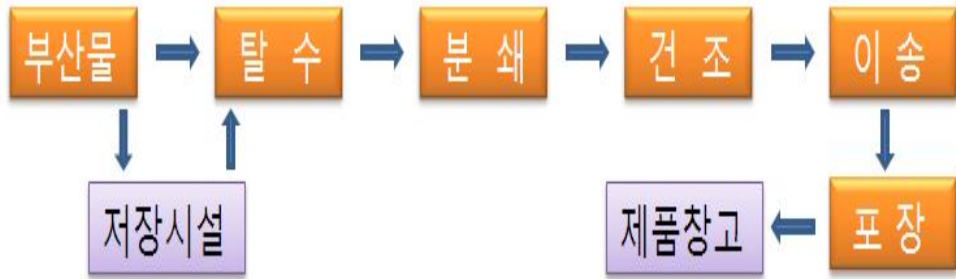


그림 12. 감귤부산물 건조공정

(주)일해에서는 감압건조기를 설치하여 건조감귤부산물을 생산할 계획이며 현재 준비작업 중이다.



한편, 또 다른 감귤가공회사인 제주개발공사에서는 감귤가공 시 과피를 분리하지 않고 껍질채 착즙함으로써 생성되는 부산물에서 과피를 분리할 수 없었으며, 현재 과육과 과피를 혼합한 부산물을 시운전을 통하여 pellet형식으로 생산하고 있다.

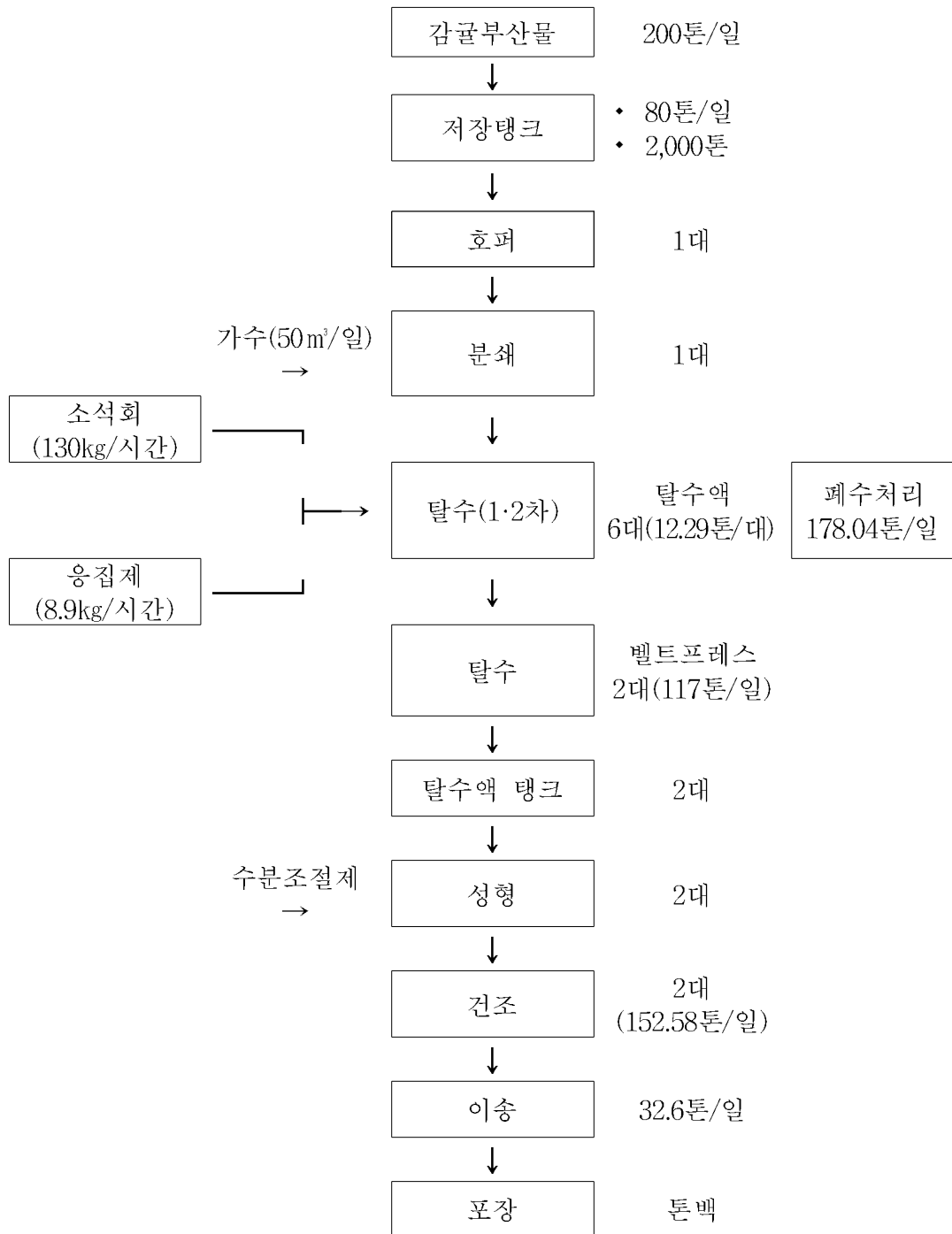


그림 13. 제주개발공사의 감귤부산물 생산공정

이와 같이 어떠한 감귤가공 공정을 사용하느냐에 따라 생성되는 부산물의 형태가 달라질 수 있으며 본 과제의 목적하는 바 고순도의 narirutin을 얻기 위하여서는 (주)일해에서 진행하고 있는 부산물처리방식이 narirutin의 산업적 생산을 위하여 적합하다고 사료된다. 표 8과 그림 14는 각각의 처리방식에 의해 시생산된 감귤부산물에 함유된 narirutin과 hesperidin조성을 비교한 결과이다. 제주개발공사로부터 제공받은 감귤부산물로부터 얻은 추출물의 플라보노이드 함량을 감귤박 추출물과 비교해보면 narirutin과 hesperidin은 실험실에서 초음파추출공정을 통하여 얻어진 추출물의 각각 7%, 15%에 해당하는 flavonoids가 추출되었다. 반면, (주)일해로부터 제공받은 감귤과피로부터 얻은 추출물의 플라보노이드 함량을 실험실에서 감귤과피로부터 추출한 결과와 비교해보면 부산물을 건조시킨 시료의 경우 narirutin과 hesperidin은 각각 28.4%, 14.4%를 함유하였고, 부산물을 동결 후 건조시킨 시료의 경우 각각 38.6% 14.8%를 함유하여 (주)일해에서 생성된 감귤박(과피 부분)이 narirutin 추출시료로 활용가능성이 높음을 알 수 있었다.

표 8. 각 산업화 공정에 의해 생산된 감귤부산물의 flavonoids 조성

		Flavonoid 함량(%)	
		Narirutin	Hesperidin
감귤박(실험실)		5.4	9.4
부산물	제주개발공사	0.4	1.4
	(주)일해 (건조)	1.5	1.4
	(주)일해 (동결 후 건조)	2.1	1.4

이와 같은 결과를 통하여 감귤과피를 산업적으로 생산할 수 있는 공정이 설정된다면 원하는 기업에서 이들을 원료로 하여 순도 75% 이상의 narirutin을 용이하게 대량생산하는 기술을 확보할 수 있으며, 궁극적으로 narirutin을 지표성분으로 하는 기능성 개별인정품목으로의 활용도 충분히 가능하리라 사료된다.

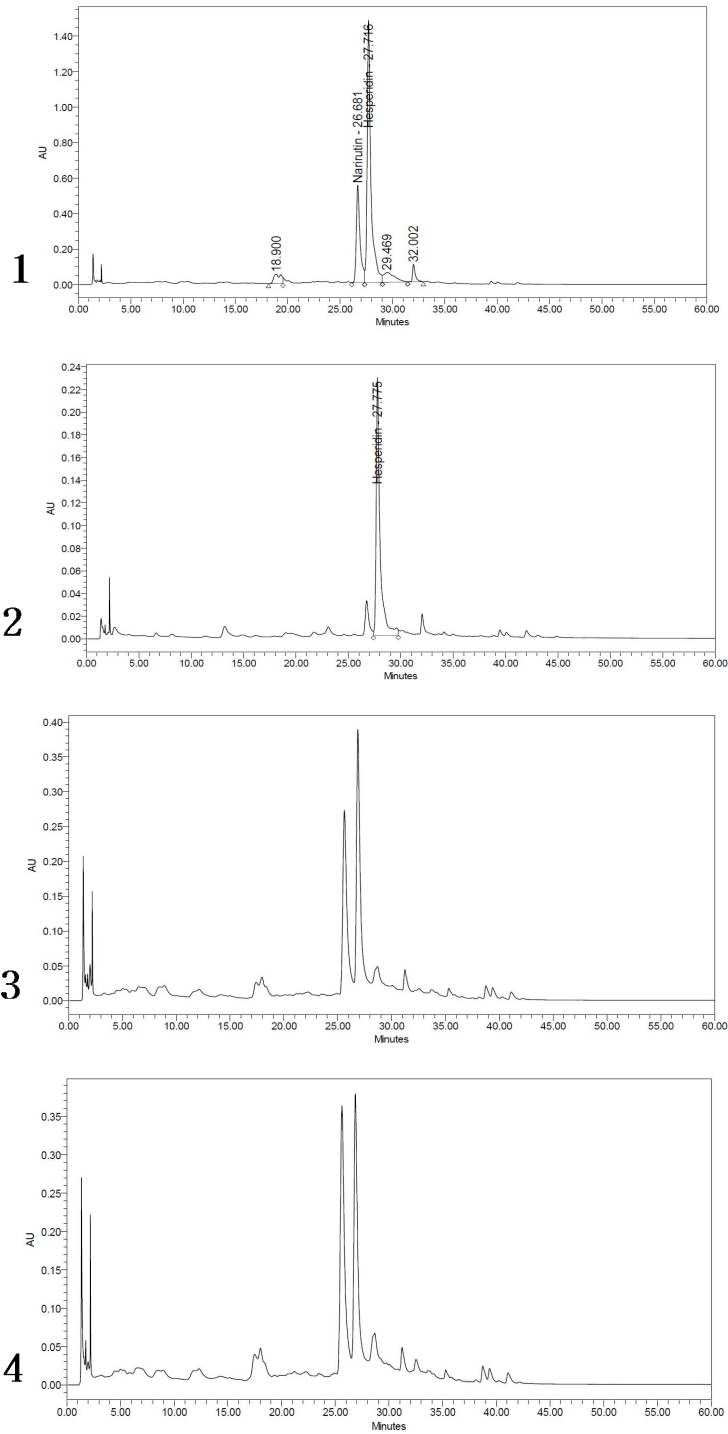


그림 14. 각 산업화 공정에 의해 생산된 감귤부산물의 flavonoids LC chromatograms. 1: 실험실 조건, 2: 제주개발공사, 3: (주)일해 (건조), 4: (주)일해(동결 후 건조)

3. Narirutin 추출물의 알콜성 지방간 억제 효능(동물실험)

가. Narirutin 투여가 체중증가량에 미치는 영향

무농약 감귤과피로부터 추출한 narirutin의 알콜성 지방간 억제효능을 연구하기 위하여 감귤과피로부터 narirutin 물추출물을 얻고 이들을 8주령의 male SD rat에 6주간 식이와 매일 70 μ L에 해당하는 ethanol을 섭취시키거나 동시에 매일 20mg(Low Narirutin) 또는 40mg(High Narirutin) narirutin/day/rat에 상당하는 narirutin추출물을 선행한 훈련을 통해 섭취할 수 있도록 하였다. Narirutin 물추출물에는 narirutin의 농도가 2%가 되게 적당량 DW로 희석하여 Lieber-DeCarli 식이에 1.4%(Low Narirutin) 또는 2.8%(High Narirutin)가 되게 첨가하였다. 6 주 동안의 실험동물의 체중 증가에 미치는 영향은 표 9 에서와 같이 비교 동물군과 실험군들과의 비교에서 각 주(wk)에서, 에탄올에 의한 영향으로 2주째부터 체중증가율이 유의적으로 감소됨을 발견할 수 있다. 같은 양의 식이공급(70 mL/day)이 6주 동안 지속되었지만, 이러한 체중증가율 감소현상은 6주 내내 감소되어 최종적으로 6주째에 비교군에 비해서 현저히 감소됨을 발견하였다. 그러나 narirutin 물추출물의 섭취가 체중에 미치는 영향은 발견되지 않았다.

표 9. Narirutin의 섭취가 6주 동안의 흰쥐 체중변화에 미치는 영향^{1,2}

(단위: g)

Week (wk)	Control	Ethanol	Low Narirutin	High Narirutin
0 wk	365.0 \pm 11.5	364.8 \pm 13.6	362.8 \pm 13.3	361.0 \pm 11.6
1 wk	345.9 \pm 11.1	342.7 \pm 12.5	346.1 \pm 11.0	345.0 \pm 11.7
2 wk	357.6 \pm 10.0 ^a	344.2 \pm 10.2 ^b	347.9 \pm 13.1 ^{ab}	351.5 \pm 11.8 ^{ab}
3 wk	374.5 \pm 10.2 ^a	354.6 \pm 10.7 ^b	360.2 \pm 12.9 ^b	358.5 \pm 14.1 ^b
4 wk	387.5 \pm 11.1 ^a	360.8 \pm 12.0 ^b	368.6 \pm 11.1 ^b	365.3 \pm 14.8 ^b
5 wk	399.3 \pm 12.5 ^a	371.0 \pm 12.7 ^b	381.3 \pm 12.3 ^b	376.2 \pm 15.9 ^b
6 wk	406.7 \pm 12.0 ^a	373.2 \pm 14.3 ^b	382.3 \pm 13.5 ^b	374.0 \pm 19.2 ^b

¹Values are means \pm SD, n = 8.

²Values in a row not sharing a common superscript differ (P < 0.05).

나. Narirutin의 공급이 혈액 지방 농도에 미치는 영향

6주 동안 narirutin의 공급이 혈액의 중성지방, 콜레스테롤, GOT, GPT 농도에 미치는 영향은 표 10과 같이 나타났다. Narirutin 추출물의 섭취가 혈액 지방의 농도를 저하시키는 효능이 관찰되었으며, 콜레스테롤의 함량도 High Narirutin 섭취군에서는 저하되는 경향을 보였다. 간 조직 손상과 관련된 지방간의 혈청 표지자인 GOT와 GPT 농도는 Control과 Ethanol군 간에도 유의적인 차이가 없었으며 이러한 결과는 본 동물실험의 ethanol 급여 농도 및 기간이 이들 GOT와 GPT가 간조직과피를 통한 혈액으로의 이행으로 나타날 정도의 손상을 입히기에는 부족하였을 것이라고 추측되어졌으며, 2차 동물실험 ethanol 농도 및 급여기간을 재조정하고 narirutin 추출물도 물추출물이 아니라 순도가 높은 ethyl acetate 추출물을 이용하여 알콜성 간질환 억제능에 대한 연구를 다시 진행하기로 하였다.

표 10. Narirutin의 6주간 공급이 혈액 지방 및 GOT, GPT 농도에 미치는 영향¹⁻³

Lipids	Control	Ethanol	Low Narirutin	High Narirutin
Triglycerides, mg/dL	1.85±14.56 ^b	5.52±22.80 ^a	41.30±14.72 ^c	20.97±6.73 ^d
Total cholesterol(C), mg/dL	63.71±5.54 ^c	94.14±13.46 ^a	90.05±10.59 ^a	77.63±9.56 ^b
HDL-C, mg/dL	36.49±2.42 ^b	51.76±9.70 ^a	51.28±6.92 ^a	42.05±7.96 ^b
non HDL-C, mg/dL	27.22±5.35 ^b	42.37±7.97 ^a	38.78±7.85 ^a	35.58±6.15 ^a
GOT, Karmen/mL	423.1±95.1	380.6±109.4	520.3±184.7	465.9±124.9
GPT, Karmen/mL	304.8±92.7	369.5±161.4	290.0±109.3	260.5±78.8

¹Values are means ± SD, n = 8.

²Values in a row not sharing a common superscript differ (P < 0.05).

³Abbreviations used: GOT, glutamate-oxaloacetate transaminase; GPT, glutamate-pyruvate transaminase.

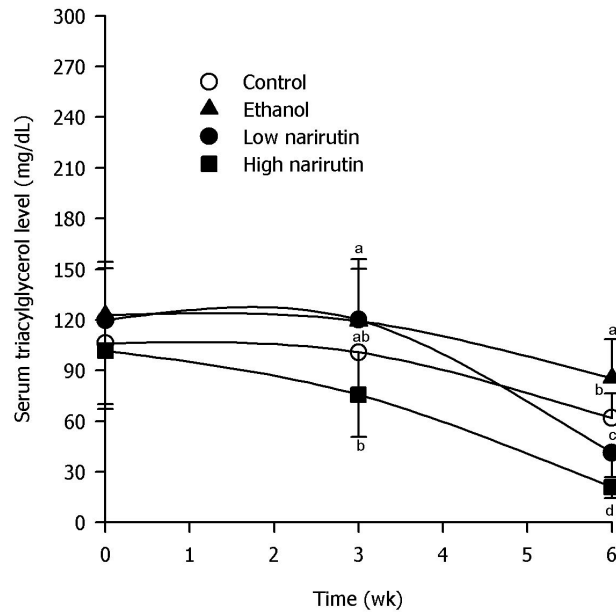


그림 15. 6주 동안의 narirutin 공급이 흰쥐의 혈액 중성지방 (triacylglycerol) 농도 변화에 미치는 영향

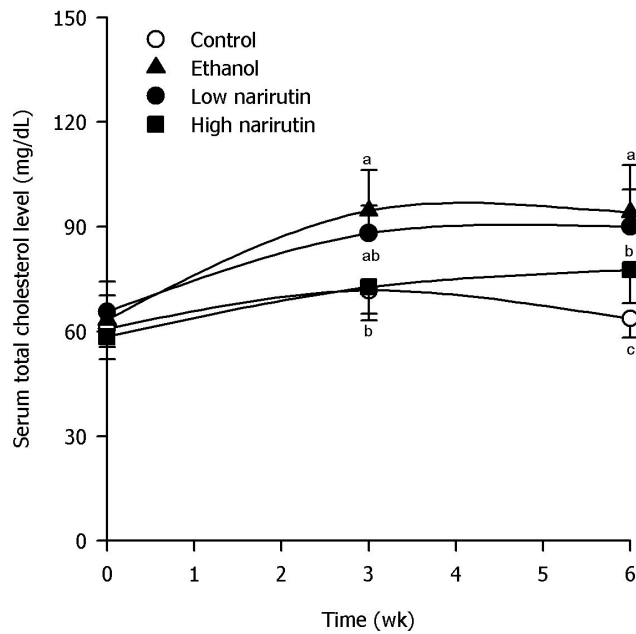


그림 16. 6주 동안의 narirutin 공급이 흰쥐의 혈액 총 콜레스테롤 (total cholesterol) 농도 변화에 미치는 영향

다. Narirutin 공급이 간조직의 지방 함량 변화에 미치는 영향

Narirutin 추출액 공급이 간 조직에 미치는 영향을 알아본 결과는 표 11과 같았다. 실험결과 대조군과 비교하였을 때 에탄올식이군의 간조직에서 α -tocopherol, total cholesterol, total lipid 함량이 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었다($P < 0.05$). 또한 에탄올과 narirutin추출물을 동시에 식이한 군과 에탄올식이군을 비교하였을 때 낮은 함량의 α -tocopherol과 total cholesterol, total lipid가 관찰되었으며 특히 고농도의 narirutin추출물 섭취군에서 유의적으로 낮은 함량을 보였다($P < 0.05$). 이전 연구에 의하면 quercetin, texifolin, isoflavon 등 flavonoid계 물질들은 지질대사와 관련되는 단백질의 발현을 조절하여 지질의 합성과 분해에 관여하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 알콜성 지방간 쥐의 식이에 flavanon계의 일종인 narirutin의 공급이 알코올로 인한 간조직의 total lipid 및 cholesterol를 관련된 질환의 발생을 완화함으로써 보호효과가 가능할 것으로 사료된다.

표 11. Narirutin 6주간 공급이 간 조직의 α -tocopherol, total cholesterol 함량 변화에 미치는 영향

	Control	Ethanol	Low Narirutin	High Narirutin
Tocopherol				
nmol/g liver	127.8 \pm 28.9	167.6 \pm 33.9	143.8 \pm 221.8	131.7 \pm 39.7
Total cholesterol				
μ mol/g liver	13.3 \pm 2.1 ^b	19.6 \pm 2.3 ^a	19.3 \pm 2.4 ^a	16.0 \pm 4.2 ^{ab}
Liver				
weight, g	10.8 \pm 0.9 ^a	10.0 \pm 0.7 ^{ab}	10.7 \pm 0.4 ^a	9.5 \pm 0.7 ^b
total lipid, mg/g	165.8 \pm 15.2 ^b	227.0 \pm 21.5 ^a	220.2 \pm 27.6 ^a	186.9 \pm 26.6 ^b

*Values are means \pm SD, n = 8.

^aValues in a row not sharing a common superscript differ ($P < 0.05$).

표 12는 간조직의 fatty acids 조성변화를 관찰한 결과인데, 간지방 함량측정 결과와 동일하게 알콜섭취군의 각 fatty acids의 함량이 다른 군에 비하여 높았다. 특히 narirutin 추출물의 섭취가 oleic acid의 TG로의 conjugation을 억제한 것을 알 수 있었으며 이러한 작용을 통하여 narirutin의 섭취가 알콜성 지방간 형성을 어느 정도 예방할 수 있었으리라 간주되어진다.

표 12. Narirutin 6주간 공급이 간 조직의 지방산 함량변화에 미치는 영향
($\mu\text{mol/g liver}$)

Lipid	Control	EtOH	EtOH + Low Narirutin	EtOH + High Narirutin
Cholesterol ester				
16:0	2.73 \pm 0.42 ^a	2.45 \pm 0.82 ^{ab}	1.96 \pm 0.24 ^{bc}	1.78 \pm 0.63 ^c
18:0	0.45 \pm 0.08 ^b	0.53 \pm 0.11 ^a	0.49 \pm 0.03 ^{ab}	0.41 \pm 0.06 ^b
18:1	5.06 \pm 1.48 ^b	10.41 \pm 3.22 ^a	10.53 \pm 2.52 ^a	7.83 \pm 2.95 ^a
18:2	1.93 \pm 0.61 ^b	3.46 \pm 0.86 ^a	3.50 \pm 0.77 ^a	2.74 \pm 1.00 ^{ab}
20:4	0.93 \pm 0.34 ^b	1.55 \pm 0.39 ^a	1.70 \pm 0.33 ^a	1.38 \pm 0.49 ^a
Triglyceride				
16:0	13.77 \pm 3.83 ^b	24.68 \pm 10.69 ^a	20.65 \pm 5.93 ^{ab}	17.83 \pm 3.85 ^{ab}
18:0	0.95 \pm 0.26 ^c	1.89 \pm 0.62 ^a	1.73 \pm 0.41 ^{ab}	1.40 \pm 0.13 ^b
18:1	28.02 \pm 8.38 ^c	58.00 \pm 22.60 ^a	50.47 \pm 14.43 ^{ab}	39.11 \pm 6.03 ^{bc}
18:2	17.36 \pm 5.55 ^b	36.50 \pm 14.02 ^a	33.23 \pm 9.40 ^a	27.48 \pm 4.01 ^a
20:4	1.71 \pm 0.57 ^b	4.61 \pm 1.55 ^a	5.42 \pm 1.57 ^a	4.56 \pm 0.60 ^a
22:6	0.15 \pm 0.05 ^b	1.09 \pm 0.40 ^a	1.29 \pm 0.44 ^a	1.19 \pm 0.19 ^a
Phospholipid				
16:0	14.57 \pm 4.53	13.85 \pm 1.08	13.68 \pm 0.71	14.69 \pm 0.61
18:0	20.08 \pm 6.18 ^b	23.58 \pm 1.24 ^{ab}	22.66 \pm 1.53 ^{ab}	24.42 \pm 1.07 ^a
18:1	1.42 \pm 0.49	1.52 \pm 0.21	1.51 \pm 0.15	1.49 \pm 0.10
18:2	7.76 \pm 5.63	7.85 \pm 0.56	6.88 \pm 0.63	6.74 \pm 0.48
20:4	24.38 \pm 7.51	25.39 \pm 1.48	25.70 \pm 2.07	26.16 \pm 2.25
22:6	3.58 \pm 1.13	4.01 \pm 0.36	3.92 \pm 0.42	4.40 \pm 0.92
Free fatty acid				
16:0	2.53 \pm 0.29 ^a	2.42 \pm 0.34 ^{ab}	2.17 \pm 0.21 ^b	2.29 \pm 0.13 ^{ab}
18:0	1.57 \pm 0.09 ^b	1.76 \pm 0.21 ^a	1.65 \pm 0.10 ^{ab}	1.73 \pm 0.09 ^a
18:1	1.21 \pm 0.28 ^{ab}	1.28 \pm 0.19 ^a	1.02 \pm 0.14 ^b	1.02 \pm 0.19 ^b
18:2	0.77 \pm 0.16 ^{ab}	0.91 \pm 0.17 ^a	0.67 \pm 0.10 ^b	0.78 \pm 0.13 ^{ab}
18:3	0.02 \pm 0.01 ^a	0.02 \pm 0.01 ^a	0.01 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.00 ^{ab}
20:4	0.27 \pm 0.07 ^c	0.52 \pm 0.07 ^b	0.48 \pm 0.09 ^b	0.68 \pm 0.08 ^a
22:6	0.03 \pm 0.01 ^c	0.08 \pm 0.01 ^b	0.08 \pm 0.02 ^b	0.11 \pm 0.02 ^a

라. 간 조직 사진촬영을 통한 지방간 분석(hepatic histology)

지방간 증상 판단을 위한 histologic 평가는 가장 직접적이고 확실한 방법으로 알려져 있다. 이 측정은 영남대학교 의학대학 해부학실에 의뢰하여, 분석자가 어떤 처리 동물군의 간조직인지를 알려주지 않고 측정을 하게 한 후, 그림 17과 같은 결과를 얻었다. 그림 17처럼 고정, 염색한 후 지방구를 육안으로 확인하기 위해서 Oil Red O 시약(붉은색 염색시약)으로 stain하였다. 그림 17-(a)에서처럼 붉게 보이는 지방구가 약이 적었으나 알코올을 6주간 공급되었을 때, 그림 17-(b)와 같이 지방구(간에 정체된 지방량)가 증가된 것을 현미경 하에서 확인할 수 있었다. 그러나 같은 알코올을 함유하는 narirutin을 저농도, 고농도로 6주간 같은 조건에서 공급하였을 때, 간조직에 축적되는 지방량이 알코올 대조군에 비해서 급격히 감소되는 것을 육안으로 확인할 수 있었다.(그림 17은 200배 확대사진; 붉은색 반점이 Oil Red에 염색된 간세포 내에 축적된 지방구를 나타냄). 지방구가 전체 간조직에서 차지하는 비율을 ImageJ software program을 이용하여 측정한 결과, narirutin을 알콜과 함께 섭취한 군에서 농도 의존적으로 알콜섭취에 의한 지방 간형성을 효율적으로 억제하는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 감귤과피로부터 경제적이고 산업화 가능한 방법을 활용하여 narirutin 물추출물(narirutin 함량 2%)을 얻고 이들의 알콜성 지방간 억제 효능을 동물실험을 통하여 확인한 결과, narirutin 물추출물의 섭취가 간에서 fatty acids의 TG로의 conjugation을 억제하고 이들 결과로부터 지방간의 형성을 억제할 수 있다는 사실을 확인하였다.

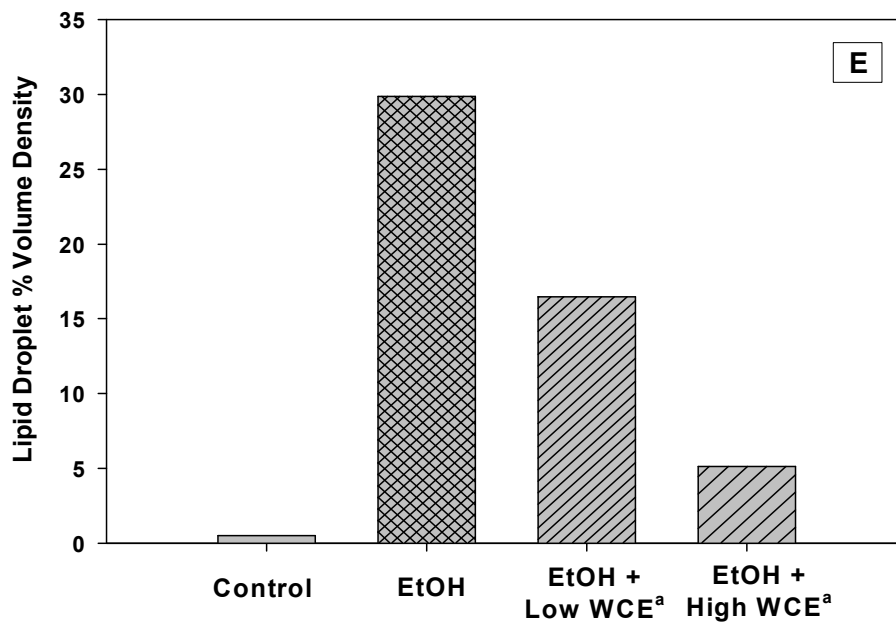
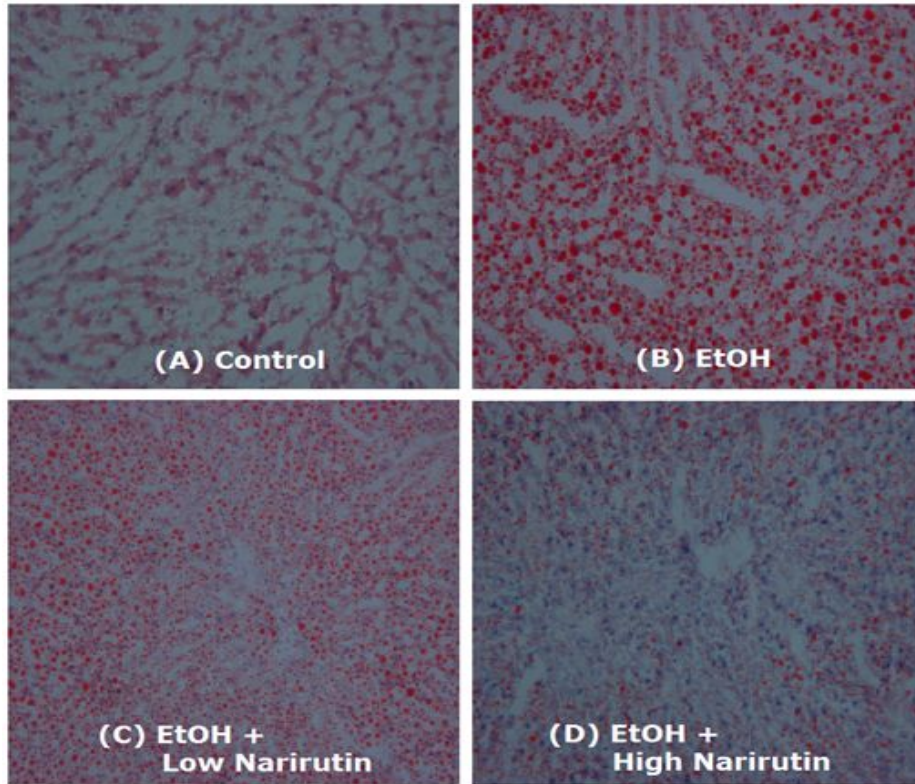


그림 17. Narirutin 추출물 투여에 따른 알콜성 지방간조직의 histological 평가

4. Narirutin 추출물의 알콜성 간질환 억제 효능(동물실험)

1차 동물실험을 통하여 감귤과피로부터 추출한 narirutin 물추출물이 알콜성 지방간의 형성을 억제하는 효능이 있음을 관찰하였다. 2차 동물실험에서는 감귤과피로부터 narirutin 추출물(순도 75%)을 얻고 이를 ICR mouse에 알콜과 함께 경구섭취시켜 알콜섭취로 유발되는 간질환에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 알콜성 간질환을 유도하기위해 1차 동물실험에 비해 알콜투여량과 투여기간을 증가시켰다.

과량의 알코올을 만성적으로 섭취하면 세포내 NADH/NAD⁺의 비율이 증가하여 탄수화물, 단백질 및 지질대사의 장애가 일어나, 간의 지방산 산화가 감소되고, 합성은 증가되어 간에 중성지방이 축적된다. 또한 알코올 분해과정의 중간생성물인 아세트알데히드의 독성에 의해 microtubule의 손상이 일어나 결국 지방간이 유발되고 더 심해지게 되면 알코올성 간염이나 간경화증이 유발될 수 있다. 만성적인 알코올 섭취 시 알코올 대사작용이 촉진되어 산소 소비량이 증가함에 따라 간조직의 부분적인 저산소증과 괴사를 초래하거나 알코올 대사 시 생성되는 유리 라디칼에 의해 지질과산화물의 반응이 촉진되어 간조직을 손상시킬 수 있다. 이러한 경우 간조직의 중성지방 및 콜레스테롤 함량이 크게 증가하고, 활성산소가 증가하여 간세포 파괴를 유발 할 수 있다. 또한 만성적인 알코올의 섭취는 간세포 내 microsome의 약물대사효소를 유도 증진하여 일상 복용하는 약물들이 중간 대사생성물인 free radical들을 과량 생성하여 독성을 유발하기도 한다.

알코올에 의해 장벽의 투과성이 증가하면 내독소(endotoxin)의 흡수가 증가되고 문맥을 통해 간으로 들어가 kupffer세포를 자극하여 TNF- α , Interleukin-1(IL-1)는 이차적으로 IL-6, IL-8, ICAM(intercellular adhesion molecule)등을 분비시키고, hepatic stellate cell(Ito cells, perisinusoidal cells, fat-storing cells, vitamine A storing cells)의 증식, vitamin A 감소, matrix 단백질 형성, α -smooth muscle actin의 증가 등 stellate cell을 활성화시켜서 간 섬유화를 발생시킬 수 있다.

가. Narirutin의 항염증 작용(Cell 실험)

Narirutin의 염증억제작용을 관찰하기 위해 우선적으로 농도별 세포 독성여부를 MTT assay를 통해 알아보았으며 결과는 그림 18에 나타났다. LPS를 처리하지 않은 대조구와 비교해 보았을 때, LPS처리구와 narirutin 농도별 처리구에서 실험에 사용된 대식세포에 대한 독성이 없는 것을 확인 할 수 있었다.

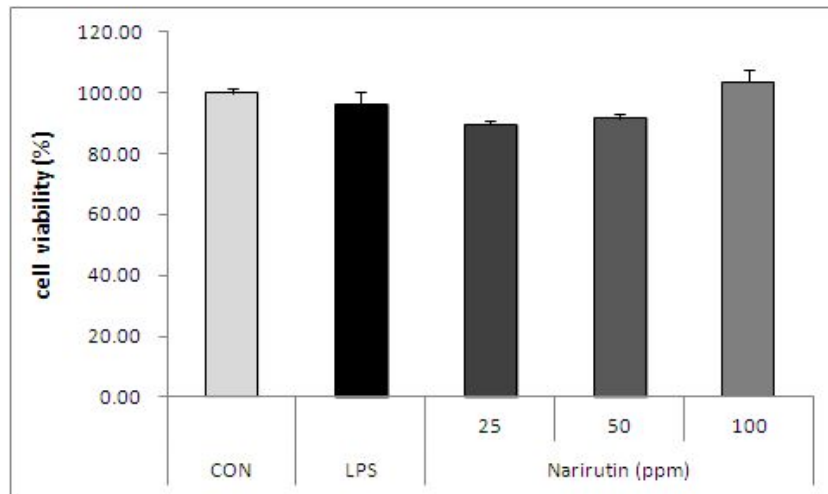


그림 18. Narirutin의 Raw 264.7 cell에 대한 생육억제 효능

대식세포(macrophage)는 염증 반응시 nitric oxide(NO)와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람음성균의 세포외막에 존재하며, Raw 264.7과 같은 대식세포 또는 단핵구에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키며, NO와 PGE2같은 염증 매개 물질을 분비하여 염증을 유발시킨다. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 알콜성 간질환은 간 면역세포인 kupffer cell을 endotoxin이 자극하여 염증반응을 일으키며 시작된다고 알려져 있다.

Narirutin 첨가가 Raw 264.7세포에서 NO 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 안정된 NO 산화물인 NO₂⁻(nitrite)의 Griess reagent 반응을 이용하여 측정하였다. FBS가 포함된 DMEM배지를 이용해 96well plate에 1.5 \times 10⁵/well로 세포를 seeding하여 37 $^{\circ}$ C에서 6시간동안 incubation시켰다. 상등액을 제거한 후 sample을 농도별로 처리하고, LPS(lipopolysaccharide)를 1 μ g/well로 처리하고 18시간동안 incubation하였다. 상등액 100 μ l와 Griess reagent 100 μ l를 1:1로 반응시켜 ELISA 540nm에서 측정하였다. 표준곡선으로는 NaNO₂(μ M)를 사용하였다. Raw 264.7 cell로부터 생성되는 NaNO₂를 측정하기 위하여 표준곡선을 작성한 결과, $y=0.0119x+0.0858$ ($R^2=0.9996$)으로 나타났다.

Raw 264.7 대식세포의 NO 생성을 유도하는 것으로 알려진 LPS만을 단독으로 처리하였을 때는 NO_2^- 농도가 $26.58\mu\text{M}$ 로 크게 증가하였지만, narirutin을 같이 처리한 군에서는 농도 의존적으로 NO 저해 활성을 보였으며 25, 50, 100ppm처리 군에서 각각 $23.89\mu\text{M}$, $19.83\mu\text{M}$, $15.88\mu\text{M}$ 으로 NO 저해활성이 높게 나타났다(그림 19).

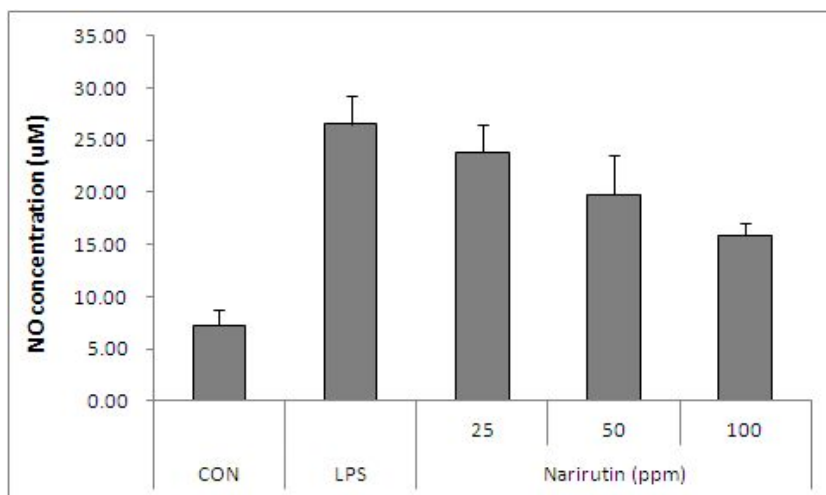


그림 19. Narirutin의 Raw 264.7세포에 대한 NO 생성 저해 효과

세포 내에서 L-arginine을 기질로 하여 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-citrullin과 함께 생성되는 nitric oxide(NO)는 신경계, 면역계, 심장혈관에 있어서 중요한 전달 물질로 신경독성 및 신경 보호성의 기능을 동시에 나타내며 쇼크와 다른 신경 퇴행성 질병의 발생에도 관여하는 것으로 알려져 있다. NOS는 세포의 종류에 따라 신경성 NOS(nNOS, NOS1), 유도성 NOS(iNOS, NOS2), 내피성(eNOS, NOS3)로 구분되며 이중 유도성 iNOS는 세포내 칼슘 농도와 외부에서 주입된 calmodulin의 자극과는 무관하게 활성화된 세포에서만 활성을 보이며 다양한 세포에서 유도되어 병리생태학에 중요한 역할을 한다. 이처럼 염증 반응에서는 iNOS에 의한 nitric oxide(NO)와 같은 염증관련 인자들이 생성된다. NO생성 단백질인 iNOS의 세포내 단백질 발현 정도를 western blot 분석법을 이용하여 관찰하였다. LPS 단독 또는 검액과 같이 18시간 동안 배양한 세포주를 채취하여 cold PBS로 2회 세척하였다. RIPA buffer를 처리하여 1시간 냉동보관 후, scrapper를 이용하여 cell lysate를 모은 후 4°C , 13,000rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 수거하

였다. 단백질 정량은 BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit를 이용하여 정량하고, 동량의 단백질 (50 μ g)은 5 \times sample buffer와 섞어 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 끓인 후 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용해 western blot을 시행하였다. 그 결과 LPS(1 μ g/ml)만을 처리한 군에서는 강하게 iNOS의 발현이 유도되었고, narirutin추출물을 50, 100ppm 농도로 처리한 실험군에서는 LPS만을 처리하였을 때보다 iNOS 발현이 농도 의존적으로 억제되는 것을 관찰하였다(그림20). iNOS 단백질은 자극을 하지 않은 안정한 상태의 대식세포에서는 거의 생합성이 되지 않았지만 LPS자극에 의하여 현저하게 증가하였다. 증가한 iNOS단백질의 생합성은 narirutin 추출물의 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다. 본 연구 결과 iNOS 단백질 저해효과와 NO생성 억제는 유사한 경향을 나타내었다. 이는 narirutin에 의한 NO의 생성 억제는 iNOS 단백질 발현의 억제에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

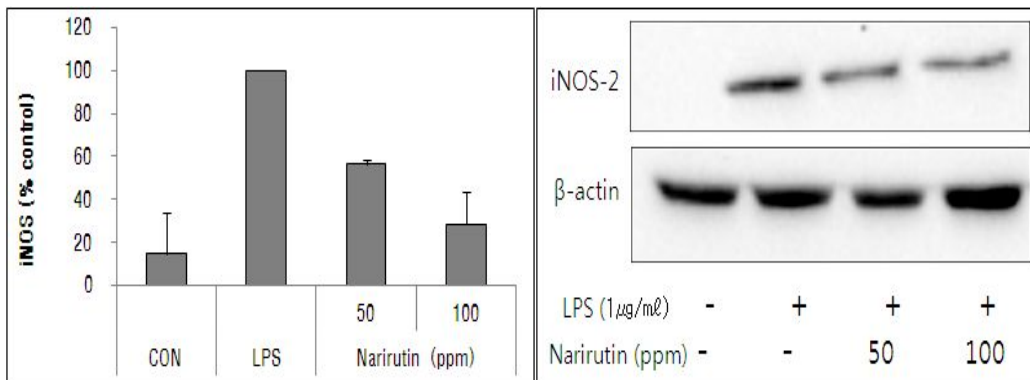


그림 20. 대식세포에 narirutin 첨가가 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

PGE2는 염증 반응을 유도하는 중요 인자로 COX-2의 발현에 의해 생성되는 것으로 알려져 있으며 COX-2에 의해 생성된 PGE2는 수지상세포, 자연살해세포 및 대식세포 등 면역관련 세포의 활성을 유도하여 염증반응을 일으키는 원인 물질이다. 따라서 PGE2와 이를 생성하는 효소인 COX-2의 발현에 대한 narirutin 추출물의 영향을 확인하였다. 먼저, PGE2 측정결과 그림 21과 같이 LPS처리군의 경우 PGE2의 양은 8.51 \pm 0.08ng/mL이었고, narirutin 추출물의 경우 25, 50, 100ppm농도에서 각각 5.75 \pm 0.32, 4.48 \pm 0.15, 4.17 \pm 0.03ng/mL로 PGE2 생성이 농도 의존적으로 감소하였다. COX-2 단백질은 자극을 하지 않은 안정 상태의 대식 세포에서는

iNOS와 같은 결과로 거의 생합성이 되지 않았으나 LPS 자극에 의하여 현저하게 생합성이 증가하였다(그림 22). 증가한 COX-2는 narirutin추출물을 처리하였을 경우 농도 의존적으로 생합성을 저해 하는 것으로 나타났다. 이와 같은 PGE2와 COX-2의 생성을 narirutin 추출물이 억제하는 효과가 있는 것으로 보아 염증 조절에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

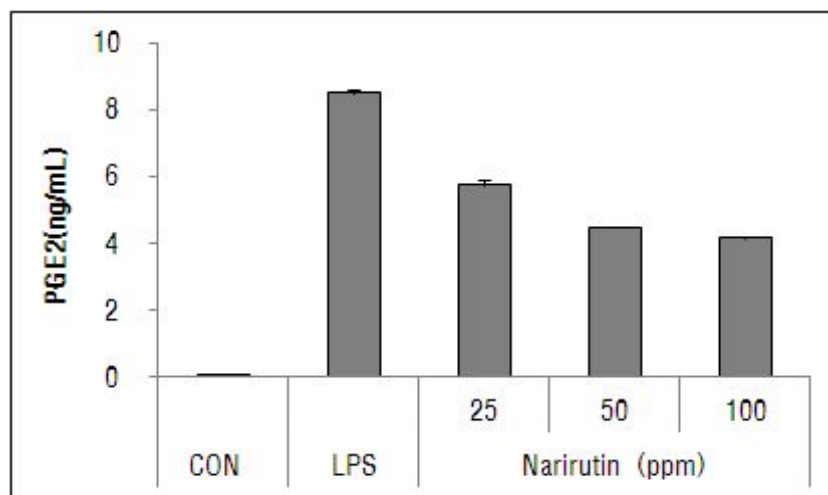


그림 21. 대식세포에서 narirutin 추출물의 PGE2 생성 억제 효과

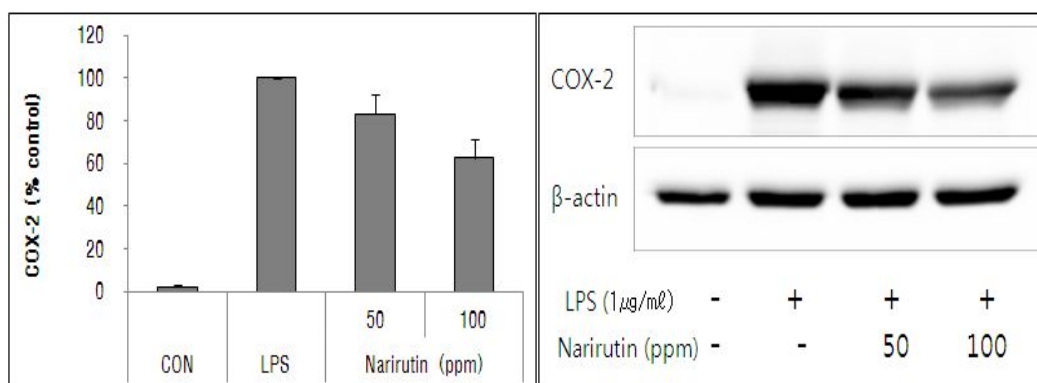


그림 22. 대식세포에 narirutin 첨가가 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

LPS는 대식세포에서 면역기능을 조절하는 IL-1 β , TNF- α 와 같은 cytokine들은 분비하도록 세포를 자극하며, 이들은 다양한 효과를 나타내지만 전반적으로 염증반

응을 증가시키는데 관여한다. LPS로 유도한 IL-1 β 와 TNF- α 의 생성에 있어서 narirutin 추출물의 억제 효과를 검증하기 위해 ELISA를 이용하여 측정하였다.

TNF- α 의 경우(그림 23) LPS를 처리하였을 때 35.95 \pm 0.47 ng/mL로 증가하는 것으로 나타났고, narirutin 추출물을 처리구에서는 50, 100ppm 농도에서 각각 20.12 \pm 2.43, 9.78 \pm 0.20 ng/mL로 측정됨으로써 TNF- α 의 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다. IL-1 β 의 경우(그림 23) LPS를 처리하였을 때 46.8 \pm 12.37 ng/mL로 증가하는 것으로 나타났고, narirutin 추출물 50, 100ppm 처리구에서는 각각 18.8 \pm 1.77, 13.5 \pm 3.54 ng/mL로 IL-1 β 의 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다.

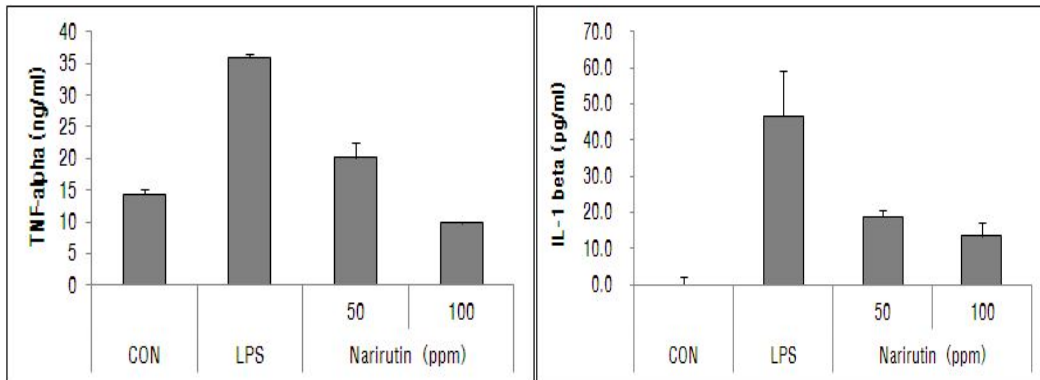


그림 23. Narirutin 추출물의 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성 억제 효과

Narirutin 추출물의 염증 매개물질 생성 억제 기전을 탐색하기 위해서 MAPKs의 경로를 조사했다(그림 24). MAPKs의 신호 경로들은 LPS로 유도되어 활성화된 대식세포에서의 iNOS 및 전염증성 세포활성물질 발현에 관여한다. MAPKs는 주로 인산화 되지 않은 불활성 상태에서는 세포질에 머물다가 인산화에 의하여 활성화되면 핵으로 이동하면서 cytokine 생성에 관여한다. 실험 결과 narirutin 추출물은 LPS로 활성화된 대식세포에서 MAPKs중 p38, ERK1/2와 JNK의 인산화를 억제하였다. 따라서 narirutin은 p38, ERK1/2와 JNK의 활성을 억제하여 대식세포에서 항염증 작용을 한다고 생각된다.

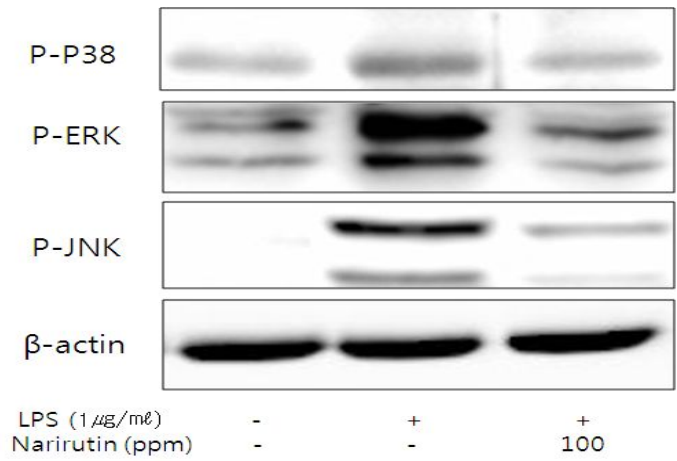


그림 24. Narirutin 추출물의 MAPKs의 활성화 저해 효과

NF-κB는 전사인자 (transcriptional factor)로서, 염증반응과 면역 반응 등 다양한 유전자의 발현에 관여하여 종양형성, 자가 면역 질환, 염증 질환에 중요한 역할을 담당한다. NF-κB는 세포질 내에서 억제분자 IκBα와 결합된 불활성형으로 존재하며 IκBα가 인산화 (phosphorylation)되고 NF-κB와 분해 (degradation)되면서 분리된 NF-κB가 핵 안으로 이동하여 NO 및 전염증성 cytokine의 생성을 유도한다. 이처럼 염증성 자극시 I-κB는 인산화를 일으켜 ubiquitin-mediated protein degradation을 유발하고 I-κB로부터 자유로워진 NF-κB는 세포핵 속으로 이동하여 여러 염증관련 인자로 알려진 iNOS, COX-2, TNF-α 등 유전자를 활성화 시킨다.

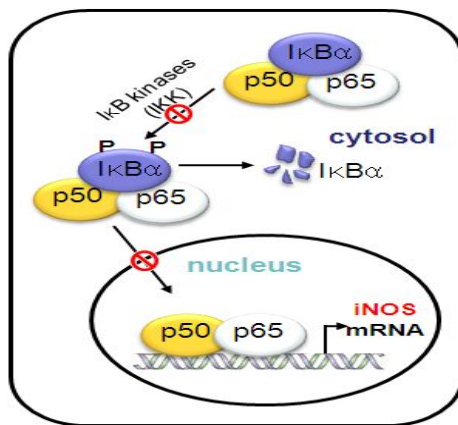


그림 25. 염증 자극 시, NF-κB 발현에 미치는 영향

LPS를 통해 염증반응이 일어나면 I κ B- α 의 분해가 시작된다. 거꾸로 생각하면 I κ B- α 의 분해를 막으면 NF- κ B의 활성화도 억제된다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 narirutin 추출물의 염증 매개물질 생성 억제 기전을 탐색하기 위해서 NF- κ B의 경로를 조사했다(그림 26). 실험 결과 세포질의 I κ B- α 의 인산화를 저해함으로써 전사 요소인 NF- κ B(p65)를 핵 속으로 유리시키는 과정을 억제하였다. 이 결과로 narirutin 추출물이 전사단계에서 저해활성을 나타낸다는 것을 보여주었다.

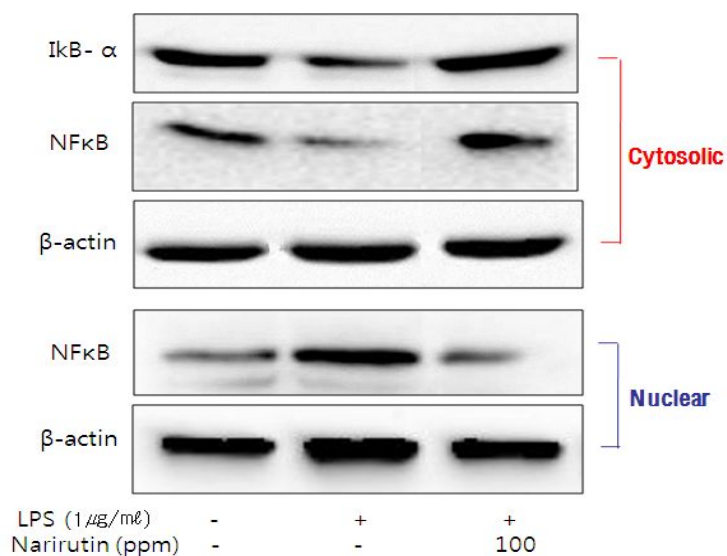


그림 26. Narirutin 추출물의 NF- κ B의 활성화 저해 효과

나. Narirutin 투여가 체중 및 간 조직 증가량에 미치는 영향

표 13. Narirutin의 섭취가 8주 동안의 흰쥐 체중변화에 미치는 영향

(단위: g)

Week (wk)	Control	Ethanol	Narirutin (150mg/kg)	Narirutin (300mg/kg)
0 wk	27.26 ± 0.11	28.23 ± 0.43	28.65 ± 0.22	27.72 ± 0.31
1 wk	36.97 ± 0.50	37.87 ± 0.35	36.90 ± 0.39	36.95 ± 0.64
2 wk	38.64 ± 0.37	37.19 ± 0.72	38.02 ± 1.04	37.09 ± 0.93
3 wk	39.72 ± 0.54	39.54 ± 0.78	39.45 ± 0.57	38.54 ± 0.65
4 wk	40.78 ± 0.52	40.22 ± 0.39	39.84 ± 0.57	40.03 ± 0.69
5 wk	41.83 ± 0.68	41.95 ± 1.07	40.82 ± 0.60	40.92 ± 0.95
6 wk	42.70 ± 0.49	42.55 ± 0.60	42.02 ± 0.60	42.35 ± 1.11
7 wk	43.97 ± 0.92	43.19 ± 0.41	42.91 ± 0.72	43.27 ± 0.13
8 wk	44.18 ± 0.95	44.50 ± 0.75	42.90 ± 0.75	42.74 ± 0.78

알코올과 narirutin을 마우스 각 군에 8주간 경구투여한 후, 1주마다 측정된 체중 증가율 및 간무게는 표 13과 같다. 체중증가량과 간 무게에서는 각 군 사이에 유의적 차이를 보이지 않았다.

실험 종료 후 실험동물의 간 무게의 경우 정상식이 섭취 군에 비해 ethanol 투여 군에서 무게가 증가하는 경향을 보였으며, ethanol과 함께 narirutin을 섭취한 mouse의 경우 정상식이 수준의 간 무게 수치를 보였다(표 14).

표 14. Narirutin의 섭취가 흰쥐의 간무게에 미치는 영향.

Treatment group	Liver weight (g)
Control	1.54 ± 0.02 ^a
Ethanol	1.59 ± 0.02 ^b
Low-narirutin	1.57 ± 0.02 ^a
High-narirutin	1.54 ± 0.03 ^a

다. Narirutin의 공급이 혈액 지방 농도에 미치는 영향

GOT 및 GPT는 간손상의 지표이다. 알코올로 인해 간세포 장애가 발생하면 GOT 및 GPT가 혈중으로 방출되고 혈장에 이들 효소의 활성이 높게 나타나면 간세포 손상이 고도로 진행된 상태임을 의미한다. Narirutin의 간보호효능을 평가하기 위해 장기적인 ethanol 투여로 유발한 알콜성 간독성 동물모델에서 혈액의 GOT, GPT 활성을 측정하였다. 정상군, 에탄올군, 에탄올+narirutin 150 mg/kg 투여군, 에탄올+narirutin 300 mg/kg 투여군의 GOT활성은 각각 24.8±5.8 U/L, 34.3±5.9 U/L, 27.5±7.7 U/L, 28.2±5.5 U/L로 나타났다(그림 27). 에탄올군의 GOT 활성이 정상군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, 에탄올+narirutin 150 mg/kg 투여군, 에탄올+narirutin 300mg/kg 투여군은 에탄올군에 비해 낮게 나타났다. 정상군, 에탄올군, 에탄올+narirutin 150 mg/kg 투여군, 에탄올+narirutin 300 mg/kg 투여군의 GPT 활성은 각각 14.8±4.8 U/L, 21.8±8.7 U/L, 14.0±3.7 U/L, 13.8±2.9 U/L,로 나타났다(그림 28). 에탄올군의 활성이 정상군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, 에탄올+narirutin 150 mg/kg 투여군, 에탄올+narirutin 300mg/kg 투여군은 에탄올군에 비해 낮게 나타났다.

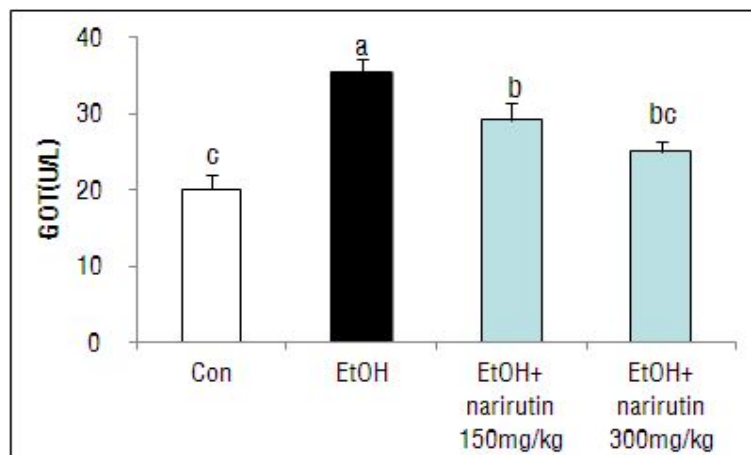


그림 27. Narirutin을 경구투여 한 mouse 혈청으로부터 GOT 활성

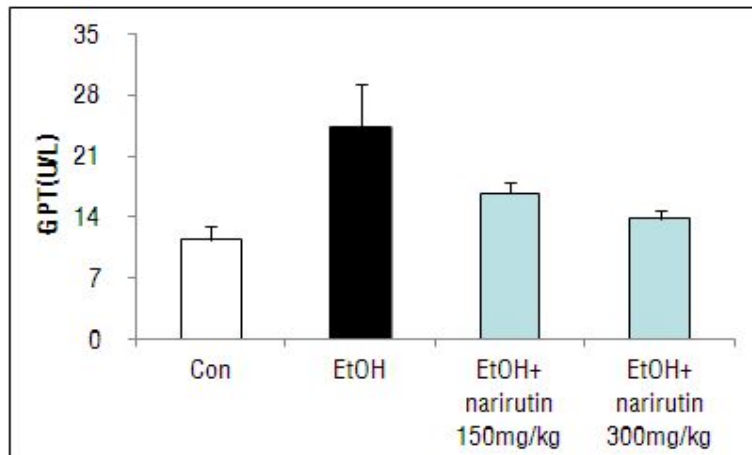


그림 28. Narirutin을 경구투여 한 mouse 혈청으로부터 GPT 활성

Endotoxin은 알콜에 의해 유도되는 간손상에서 TNF- α 생성 등과 같은 염증반응을 일으키는 중요한 인자이다. 그러나 본 연구에서는 에탄올군에서 정상군에 비해 유의적인 endotoxin 증가가 관찰되지 않았다(그림 29).

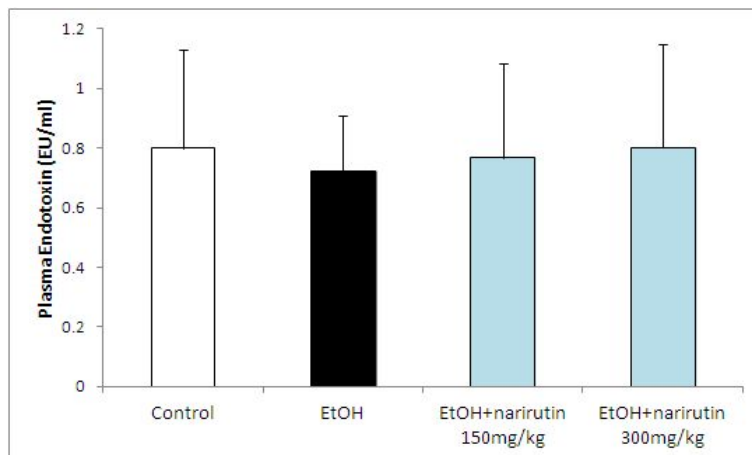


그림 29. Narirutin을 경구투여 한 mouse 혈청으로부터 Endotoxin 효과

혈액에서 총 cholestrol와 triglyceride 함량은 정상군과 에탄올군 사이에 유의적인 변화가 없었다(그림 30, 31).

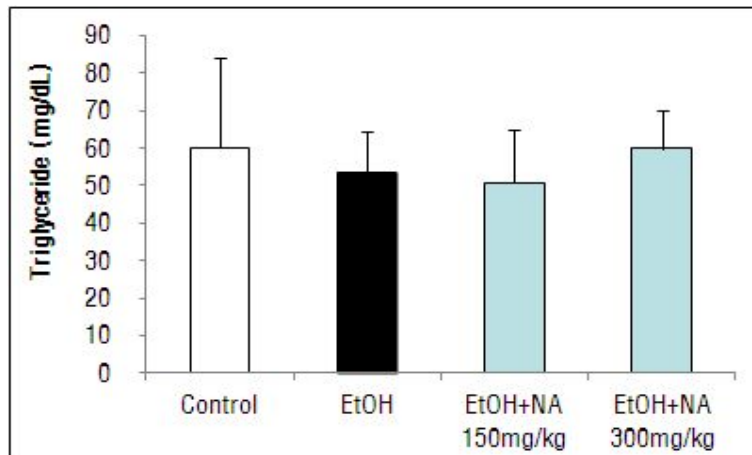


그림 30. Narirutin을 경구투여 한 mouse 혈청으로부터 Triglyceride 측정

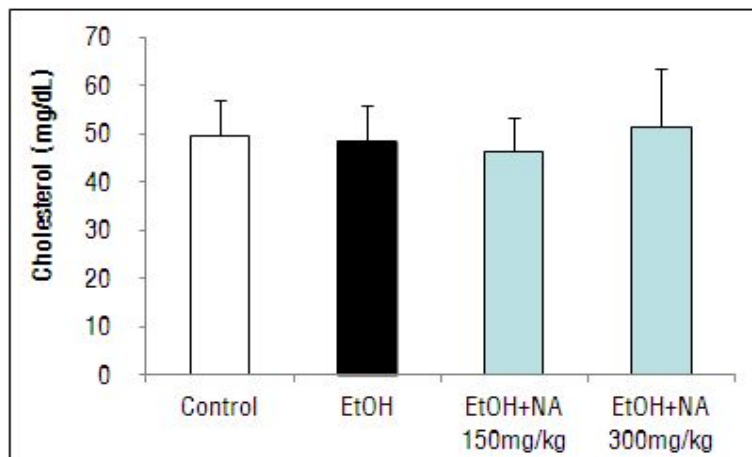


그림 31. Narirutin을 경구투여 한 mouse 혈청으로부터 Cholesterol 측정

본 실험 결과 GOT 및 GPT 모두 에탄올군의 활성이 정상군에 비해 유의적으로 높게 나타나 만성적인 알코올의 투여가 간 손상을 유발한 것으로 생각되며 에탄올 +narirutin 150 mg/kg 투여군, 에탄올+narirutin 300 mg/kg 투여군은 에탄올군에 비해 GOT 및 GPT 활성이 낮게 나타나는 것으로 보아 간 손상이 억제된 것으로 생각된다.

라. Narirutin 공급이 간조직의 지방 함량 변화에 미치는 영향

간조직에서 총 cholestrol 함량은 정상군과 에탄올군간에 차이가 없었다(그림

32). 간조직에서 triglyceride의 변화를 보면, 정상군이 70.5±24.8 mg/g인데 비하여 에탄올군은 103.1±14.5 mg/g으로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. 또한, 에탄올+narirutin 300 mg/kg 투여군에서는 78.71±30.8 mg/g으로 에탄올군에 비하여 유의적으로 triglyceride 증가가 억제되었다(그림 33).

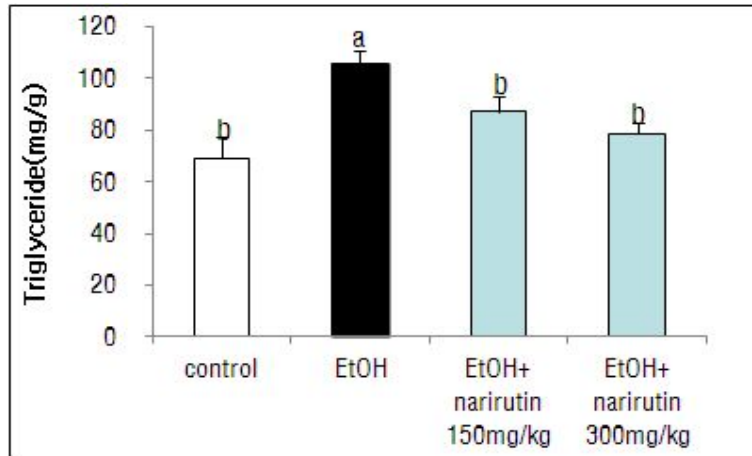


그림 32. Narirutin을 경구투여 한 mouse liver의 Triglyceride 측정

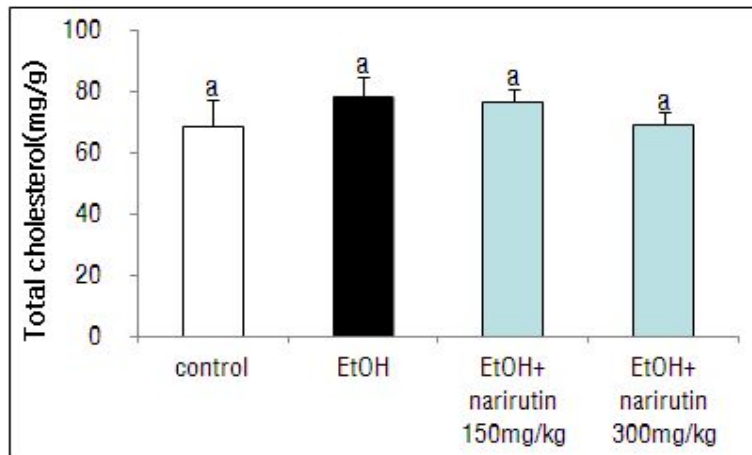


그림 33. Narirutin을 경구투여 한 mouse liver의 Total Cholesterol 측정

SOD는 metalloenzyme으로 함유한 금속이온 즉 Cu, Zn, Mn 및 Fe의 종류에 따라 구분되며, O₂가 한 개의 전자를 받아들여 불완전하게 산화된 O²⁻이온을 H₂O₂로 전환시켜 배설함으로써 산화 스트레스로부터 생체를 보호한다. Narirutin의 간 보호

효능을 평가하기 위해 알콜성 간질환 동물모델에서 narirutin 투여에 의한 SOD의 활성의 변화를 측정하였다. 실험 결과 알코올 투여군에서 SOD의 활성이 정상군에 비해 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 34). 300 mg/kg의 narirutin 처리는 ethanol로 인해 손상된 간조직에서 항산화효소인 SOD의 활성을 유의적으로 증가시켰다. 따라서 narirutin 처리는 O^{2-} 제거효소인 SOD 활성도를 유의적으로 증가시켰으며 ethanol에 의해 생성되는 산화스트레스를 감소시키므로써 간을 보호하는 것으로 생각된다.

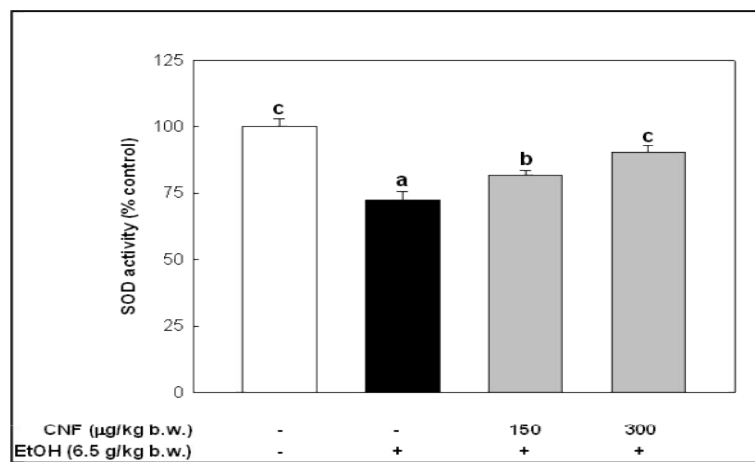


그림 34. Narirutin을 경구투여 한 mouse liver의 SOD 측정

Glutathione (GSH)은 심장병, 협심증, 동맥경화, 재확산(refer-fusion) 손상을 예방하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있고, 몸 안의 발암물질과 변형물질을 제거하고 세포내 DNA와 다른 민감한 구조물의 산화적 손상을 감소시킨다. GSH 실험결과 그림 35와 같이 에탄올군이 $12.73 \pm 1.54 \mu\text{mol/mg}$ 으로 가장 낮게 나타났고, narirutin 처리구에서는 각각 $14.28 \pm 1.65 \mu\text{mol/mg}$, $16.68 \pm 2.10 \mu\text{mol/mg}$ 으로 농도가 높아질수록 GSH 생성을 증가시킴을 알 수 있었다.

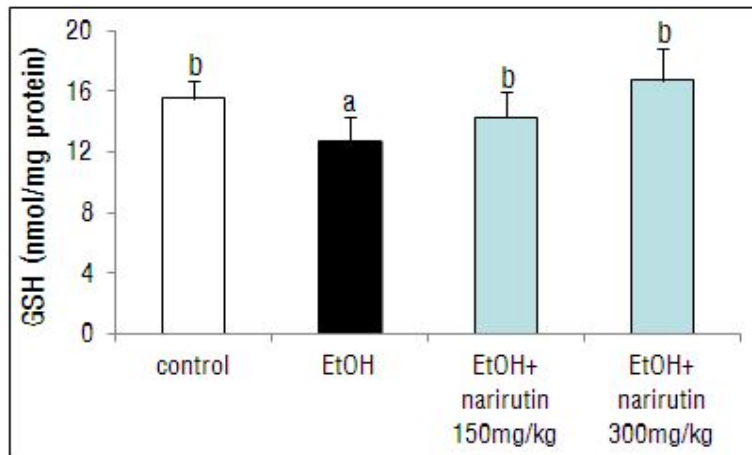


그림 35. Narirutin을 경구투여 한 mouse liver의 GSH 측정

Malondialdehyde(MDA)는 지질과산화물의 지표로 사용되는데 과산화지질은 세포막의 다중불포화지방산과 지단백질에서 유리기와 연쇄반응하여 부산물로 MDA를 생산한다. MDA 실험결과 그림 36와 같이 에탄올군이 $1.52 \pm 0.15 \mu\text{mol/mg}$ 으로 MDA 생성이 가장 높게 나타났으며 narirutin 고농도 처리군인 300mg/kg 농도에서 $1.03 \pm 0.04 \mu\text{mol/mg}$ 으로 MDA 생성을 억제시키는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 에탄올 투여로 인해 발생한 간질환에 narirutin 투여가 MDA 생성을 억제하고, GSH 생성을 늘리는 효과가 나타남을 알 수 있었다.

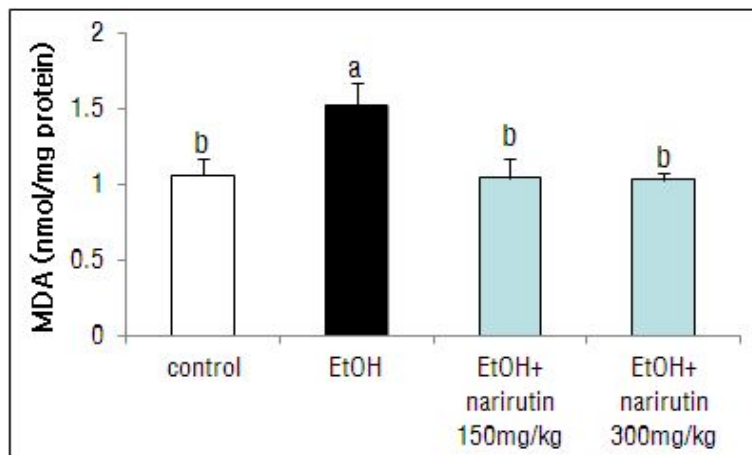


그림 36. Narirutin을 경구투여 한 mouse liver의 MDA 측정

대식세포에서 관찰한 바와 같이 간조직에서의 알콜섭취에 의한 염증인자인 NF- κ B의 발현이 뚜렷이 증가되는 것을 알 수 있었으며, narirutin의 섭취로 인하여 이들의 발현이 농도 의존적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다(그림 37). 이와 같은 결과는 narirutin의 섭취가 만성 알콜섭취 시 유발되는 간 경변, 간 섬유화, 그리고 간암 등으로 이어지는 간질환의 초기계시를 어느 정도 지연해 줄 수 있을 것이라고 간주되어진다.

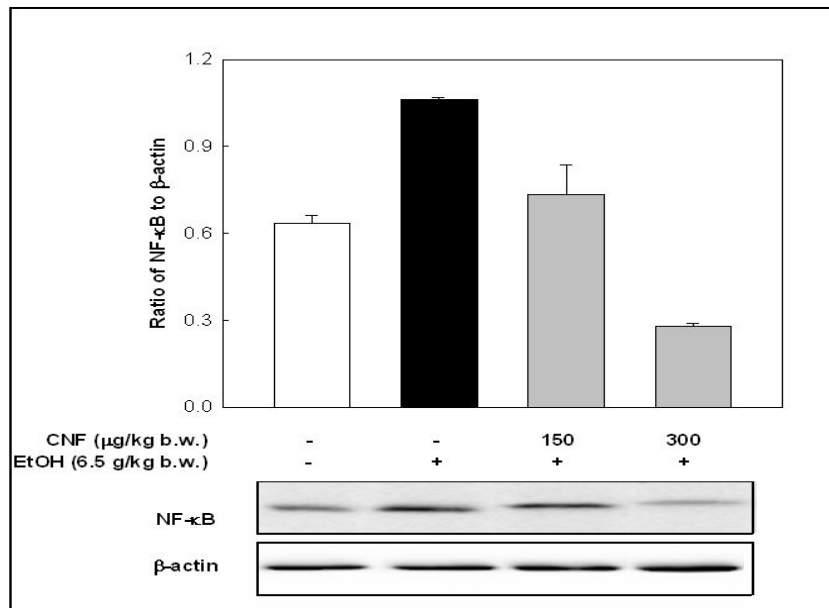


그림 37. Narirutin 첨가가 mouse liver의 NF- κ B 단백질 발현에 미치는 영향

마. 간 조직 사진 촬영을 통한 지방간 분석 (hepatic histology)

장기간 과량의 알코올 섭취시에 발생하는 알코올성 간 질환은 초기의 알코올성 지방간으로부터 시작하여 알코올성 간염과 알코올성 간경변증까지 진행될 수 있지만, 장기간 알코올 섭취에 의한 간손상이 간독성이 있는 다른 약물과 다른 양상으로 진행되기 때문에 중독성 간염과는 별개로 구분하고 있다. 알코올은 체내에 저장할 수 없고 간에서 일어나는 알코올 대사에 의해 90~98%가량의 대부분이 산화되어 배출된다. 먼저, 아연을 함유한 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH)에 의해 아세트알데히드(acetaldehyde)로 대사되고 이는 다시 알데히드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase)에 의해 아세트산(acetic acid)으로 변화됐다가 최종적으로는 이산화탄소와 물로 산화된다. 이러한 알코올의 산화과정에서 부수적으로 생성된

지방산이 간에 축적되며, 이 과정에서 나타난 아세트알데히드는 간 독성이 있어서 간세포에 직접적인 손상을 주기도 한다.

알코올성 간질환의 특징적인 소견으로 윌슨씨 병(Wilson's disease)이나 일차성 담즙성 간경변증(primary biliary cirrhosis) 등의 다른 간 질환에서도 관찰되는 말로리체(Mallory's body)를 확인할 수 있고, 이어 지방과 수분 등이 간세포에 과도하게 축적되어 팽창성 변성(ballooning degeneration)을 나타낸다. 이때의 간 상태를 지방간이라고 한다.

이후 괴사된 간세포의 debris를 제거하기 위해 간소엽 내로 백혈구들이 모이기 시작하는데 이를 염증반응이라고 한다. 원래 괴사된 간세포의 잔여물을 제거하는 역할은 간조직내에 존재하는 쿠퍼세포(Kupffer cell)가 담당하지만, 간세포의 괴사가 광범위하게 발생하기 때문에 백혈구가 동원되는 것이다. 이 때가 알코올성 간염으로 진행되는 상태로 단순히 알코올의 섭취를 중단하는 것만으로도 정상으로 회복될 수 있는 가역적인 손상의 시기이다. 그러나 이러한 간염이 오랫동안 지속되게 되면 간조직내에 섬유화(fibrosis)가 발생하고, 이 섬유화가 광범위하게 진행되면, 간조직은 정상적인 간세포 대신에 단단한 결체조직(connective tissue)으로 대체되어 최종적으로 간경변증에 이르는 것이다. 섬유화가 진행된 후부터는 비록 회복이 된다고 하더라도 완전히 정상적인 상태로 될 수는 없고, 이미 형성되었던 반흔조직(scar tissue)은 영구히 남게 되는 비가역적 간손상을 당하게 된다.

Ethanol을 장기간 투여한 mouse의 간조직의 형태학적 분석을 위하여 Hematoxylin & Eosin 및 Masson's trichrome 염색을 실시하여 관찰하였다. 그림 38에서 보는 바와 같이 간조직 내 문맥을 제외한 부분이 붉은 색으로 염색되었으며, 핵은 남색으로 나타났다.

정상군에서는 간소엽의 입체구조가 잘 유지되었고, 세포질과 원형의 핵이 모두 뚜렷하며 문맥 주위 및 중심정맥 주위의 섬유화 및 간세포 괴사나 염증반응은 관찰되지 않았으며(그림 38 A), collagen 역시 관찰되지 않았다(그림 39 A). Ethanol 투여군에서는 간소엽의 입체구조가 소실되었고 간 문맥 주위에 간세포 수종변성(hydropic degeneration)에 의한 침윤과 림프종이 증가하였으며(그림 38 B-1), 간조직의 말단 부위에 세포괴사가 관찰되었다(그림 38 B-2). 이는 지방간의 특징적인 소견으로 나타나는 지방과 수분 등이 간세포에 과도하게 축적되어 팽창성 변성(ballooning degeneration)이 나타나고, 이후 광범위하게 괴사된 간세포의 debris를 제거하기 위해 간소엽 내로 백혈구들이 증가하게 되는 것이다. 나아가 문맥주위와 중심정맥 사이로 섬유화(venous-venous fibrosis linkage)와 비교적 많은 collagen이

관찰되었는데(그림 39 B), 이후 섬유화가 광범위하게 진행되면, 간조직은 정상적인 간세포 대신에 단단한 결합조직(connective tissue)으로 대체되어 최종적으로 간경변증에 이르게 될 것으로 예상된다.

Narirutin 150 mg/kg 투여군에서는 문맥주위와 중심정맥 주위에 간세포 수종변성에 의한 침윤이 다소 관찰되었으나(그림 38 C), 간조직 전반에 걸쳐 간세포 괴사나 섬유화는 관찰되지 않았다(그림 39 C). Narirutin 300 mg/kg 투여군은 정상군과 마찬가지로 간소엽의 입체구조가 잘 유지되었으며, ethanol 장기투여에 의한 간병변 조직변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 토대로 narirutin의 섭취에 의해 간경변으로의 진행을 효과적으로 완화시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

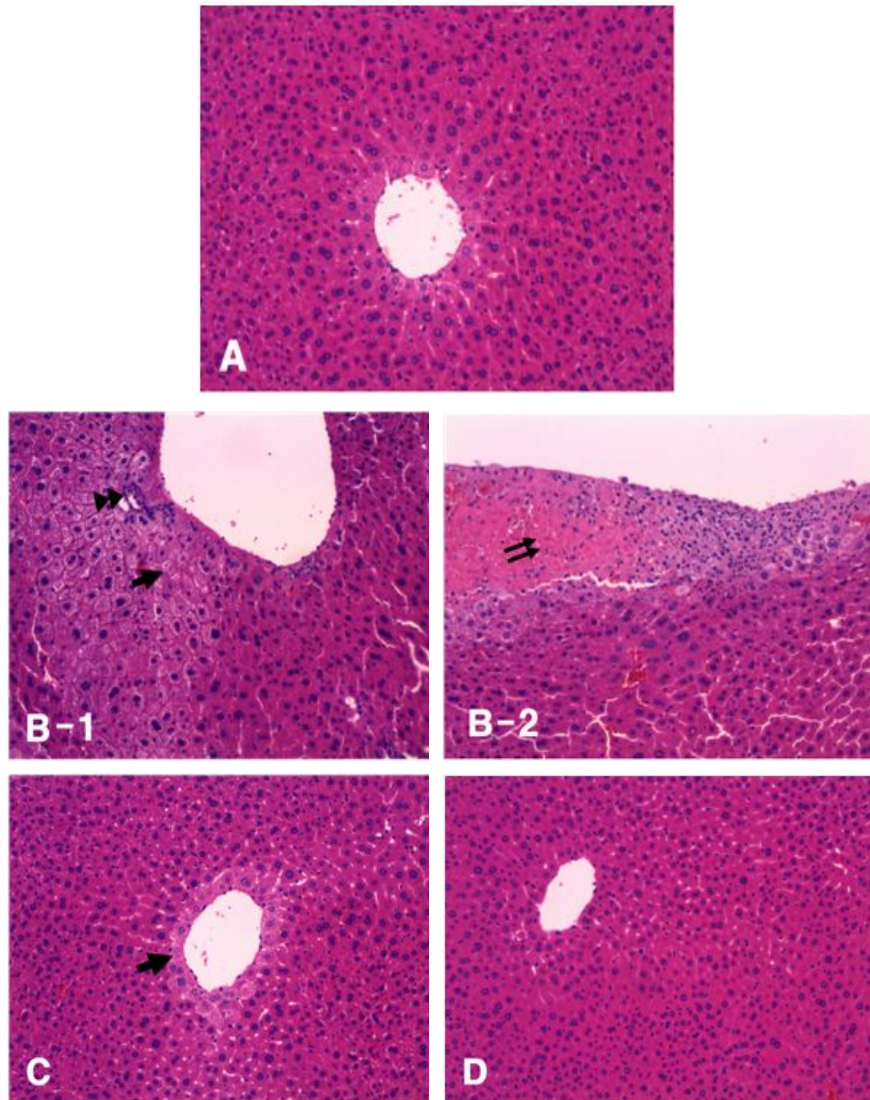


그림 38. 에탄올을 8주간 장기 투여한 mouse 간조직에서 narirutin의 간손상 억제 효과. (A) 정상군; (B-1,2) 에탄올 6.5 g/kg b.w./day 투여군; (C) narirutin 저식이군(150 mg/kg b.w.); (D) narirutin 고식이군(300 mg/kg b.w.). 에탄올 장기투여에 의한 간세포의 수종변성과(arrows) 림프종 증가(double arrow head), 세포괴사(double arrow). Hematoxylin and eosin stain; Original magnification, $\times 100$

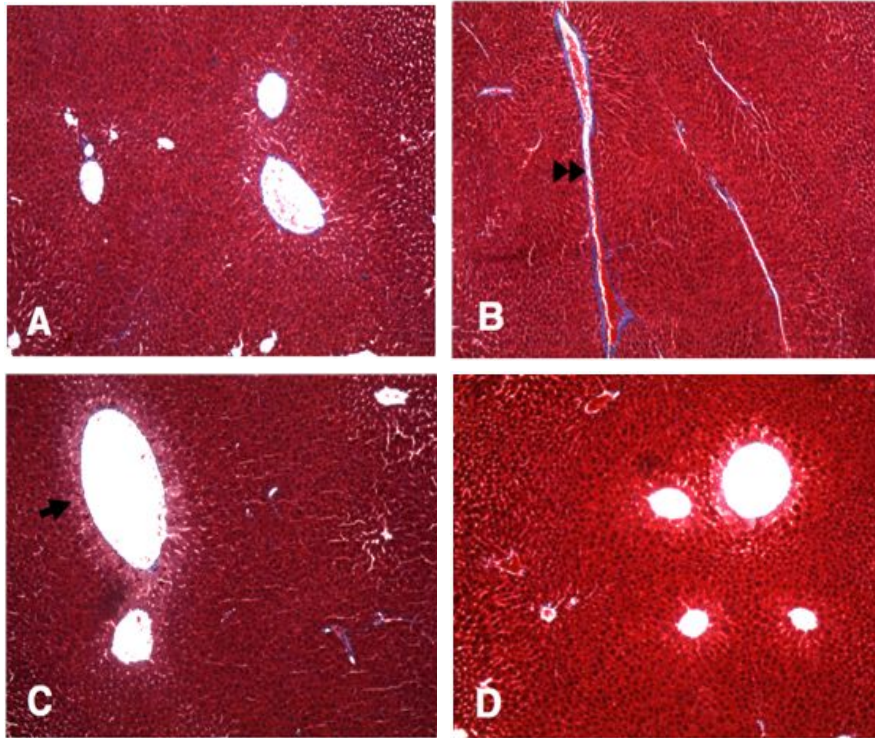


그림 39. 에탄올을 8주간 장기 투여한 mouse 간조직에서 narirutin의 섬유화 억제 효과. (A) 정상군; (B-1,2) 에탄올 6.5 g/kg b.w./day 투여군; (C) narirutin 저식이군(150 mg/kg b.w.); (D) narirutin 고식이군(300 mg/kg b.w.). 에탄올 장기투여에 의한 섬유화와(double arrow head) 수종변성(arrow). Masson's trichrome stain; Original magnification, $\times 100$

이와 같이 1차, 2차에 걸쳐 실시한 동물실험의 결과를 종합해보면, 감귤과피로부터 추출된 narirutin이 급성 또는 만성 알콜섭취로 인해 일어나는 간기능 장애를 어느 정도 예방할 수 있는 소재로 활용 가능할 것으로 사료되어지며, 향후 알콜성 간 질환 예방효능을 갖는 개별인정형 식품소재로 산업화할 수 있으리라 기대된다.

5. 친환경 감귤발효제품 개발

감귤은 기능성이나 약효 성분이 많이 함유되어 있는 과일로서 한방약이나 생약의 원료로 사용되고 있으며, 우리나라는 내한성이 강한 만다린계의 온주 밀감(蜜柑)이 주로 생산되고 있다. 감귤은 제주도의 전체 과실 생산량의 30%에 해당하며 연간 60만톤 이상이 생산되고 있으나, WTO에 의한 농산물 수입자유화가 1997년부터 시행됨에 따라 감귤산업은 수입 오렌지와 국내산 여타 과일과의 경쟁으로 전반적인 경기침체에 따른 소비위축으로 상당한 어려움에 처해있다. 감귤은 *Citrus*속 과일로 독특한 풍미와 색깔 그리고 유기산과 vitamin C 및 vitamin E가 풍부함. 또한 다양한 flavonoids가 존재하며 현재까지 약 60여종 이상의 구조가 밝혀져 있고, 주로 hesperidin, neohesperidin 및 naringin에 대한 연구가 많이 진행되었다. 감귤류의 flavonoids의 기능성으로는 항산화 작용, 고지혈증 억제작용, 충치예방효과와 naringin의 항균효과, hesperidin의 혈압강화 효과 등이 알려져 있으며, 최근 연구에서는 polyphenol flavonoids의 다양한 기능성이 많이 밝혀지고 있어 천연 식품들의 의약품 소재 및 기능성 식품으로의 가능성을 인정받고 있으며 고부가가치 식품으로 이용될 수 있다.

감귤의 껍질 부분에는 flavonoid의 일종으로 flavanone 화합물인 naringenin과 hesperetin이 다량 함유되어 있고 이들은 항산화, 소염, 항암활성 등의 생리활성이 있다고 알려져 있다. 현재 감귤은 대부분 생과 형태로 이용되고 있으며, 일부 이를 이용한 가공품으로는 감귤농축액, 신선과실음료, 농축주스음료, 감귤잼, 만감류를 이용한 차, 감귤식초, 감귤요구르트, 혼합과실음료 등이 일부 생산·소비되고 있으나, 국내산 감귤의 소비를 촉진시키기 위해서는 다양한 제품 개발 및 기능성 차별화가 요구된다. 최근 효소처리에 의해 무배당체 화합물인 naringenin과 hesperetin의 함량을 높일 수 있을 뿐만 아니라 기능성이 강화된 고품질 감귤와인 제조를 통해 차별화된 제품을 개발할 수 있다. 와인은 발효주로서 포도뿐만 아니라 과실이나 열매의 즙을 발효시켜 양조한 알코올성 음료수이며, 색상에 따라 레드, 로제, 화이트 타입으로 분류되며 이러한 와인을 증류하여 오크통에 숙성시킨 것을 브랜디라 한다.

최근 국내에서는 건강을 중시하는 '웰빙 추구형 술 소비 트렌드'로 저도주인 맥주, 와인 등의 소비가 급격히 증가. 그러나 국내 와인은 대부분이 수입산 와인이므로 연간 약 3천만 달러 이상의 막대한 외화를 낭비하고 있으나, 국산 와인 품질개선에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 효소가수분해를 통해 flavonoid 무배당체 함량이 증진된 고품질 기능성 감귤 시료를 선별하였고, 감귤 가수분해물을 이용하여 기능성 향상된 감귤 발효주를 개발하기 위해 전처리조건, 효

모종류, 초기산도, 초기당도 및 당 종류에 따른 알코올 발효조건을 조사하였으며 또한 최적조건으로 제조된 감귤와인과 시판와인 간의 품질특성을 비교하였다.

가. 친환경 감귤 발효제품 개발을 위한 기초 연구

친환경 감귤 발효제품의 제조는 감귤 착즙액(22.4° Brix)을 33.4° Brix로 농축하여 제조한 감귤 과즙 농축액을 이용하여 제조하였다. 발효제품은 가수분해 효소 처리 후 효모를 이용하여 발효시킨 알코올 발효주를 제조하였다.

1) 최적 효모 선별

감귤 농축액을 24° Brix가 되도록 음용수로 희석한 후 건조효모 (E), (F), (I), (N), (R) 및 (V)를 각각 0.02%(w/v) 접종하여 30°C에서 91시간동안 알코올 발효시켜 품질특성을 비교한 결과를 표 15에 나타내었다. 적정산도는 (V)에서 1.88%로 가장 높았고, 그 외 5종에서는 1.80% 전후로 비슷한 수치를 나타내었다. pH는 6종 모두 3.65% 전후의 수치로 효모에 따른 차이를 보이지 않았다. 당도 및 알코올 함량은 (F)에서 각각 11.2% 및 9.6%로 가장 우수한 알코올 발효능을 나타내었다. 따라서 본 실험의 균주 선별 기준에 따라 알코올 함량이 가장 높은 (F)를 최종 선별하여 본 실험의 공시 균주로 사용하였다.

표 15. 효모 종류에 따른 감귤 알코올 발효액의 품질특성

Yeast	Total acidity (%)	pH	Sugar content (°Brix)	Alcohol content (%)	Turbidity	Hunter's color		
						L	a	b
E	1.83	3.64	11.9	9.1	0.032	89.02	-8.69	41.26
F	1.81	3.65	11.2	9.6	0.037	86.44	-8.14	39.86
I	1.83	3.65	11.7	9.5	0.035	87.79	-8.48	40.90
N	1.81	3.64	11.8	9.4	0.027	87.81	-8.51	40.65
R	1.79	3.66	11.7	9.4	0.020	88.41	-8.58	40.68
V	1.88	3.63	11.6	9.5	0.030	87.84	-7.89	41.28

2) 최적 효소 선별

일반적으로 배당체 flavonoids(naringin, hesperidin 등)를 비배당화(aglycon화)시킨 비배당체 flavonoids(naringenin, hesperitin 등)가 체내흡수력(bio-availability)면에서 우수하다고 간주되고 있다. 대부분 천연물의 flavonoids는 배당체형태로 존재하는 데, 섭취시 장내 미생물이 생성한 β -glucosidase에 의해 당질부분이 분리된 aglycon 형태의 flavonoids가 대장점막을 통해 흡수된다고 알려져 있다. 따라서 flavonoids의 체내이용성은 개인별 장내세균분포에 따라 많은 영향을 받을 수 있으며 섭취전에 미리 aglycon화 시키면 flavonoids의 체내흡수를 증가시켜 체내에서 이용율을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 본 실험에서는 발효주 제조과정 중에 flavonoids를 aglycon화 시킬 수 있는 효소를 선별하여 발효과정 중에 투입하여 체내흡수가 용이한 aglycon flavonoids의 생성을 유도하고자 하였다.

친환경 감귤 농축액을 24° Brix가 되도록 음용수로 희석한 후 효소제 sumizyme 등 5 종류의 효소를 0.1%와 0.5%(w/v, v/v)씩 첨가하여 60°C 진탕수욕조에서 100 rpm으로 3시간 반응시킨 후 효모 F를 접종하여 알코올발효시켰다. 효소전처리한 감귤 발효주의 narirutin aglycon화(naringenin으로 변환) 정도를 비교해 본 결과를 표 16에 나타내었다.

표 16. 전처리 효소에 따른 친환경 감귤 발효주의 narirutin aglycon화 비교

효소처리		Mole 농도 (mM)		Naringenin/ narirutin
		Narirutin	Naringenin	
Control(무처리)		0.054	0.010	0.177
Sumizyme	0.1	0.030	0.010	0.315
	0.5	0.077	0.011	0.142
Glucoamylase	0.1	0.028	0.012	0.421
	0.5	0.030	0.015	0.505
Sankolase	0.1	0.018	0.012	0.671
	0.5	0.035	0.017	0.486
Cellulase	0.1	0.033	0.010	0.319
	0.5	0.024	0.016	0.663
Pectinase	0.5	0.024	0.013	0.544

Cellulase로 전처리한 발효주에서 농도의존적으로 narirutin의 aglycon화가 효율적으로 진행된 것으로 사료되었다. 각 효소전처리 발효주의 품질 특성을 표 17에 나타내었다.

표 17. 효소처리 친환경 발효주의 적정산도, pH, 당도, 탁도 및 색도 비교

Alcohol fermentation	Total acidity (%)	pH	Sugar content (°Brix)	Alcohol content (%)	Turbidity	Hunter's color			
						L	a	b	
Control	1.91	3.67	11.9	9.1	0.042	86.01	-7.01	39.75	
Sankolase (A)	0.1	1.79	3.70	11.8	9.1	0.013	89.10	-8.00	39.81
	0.3	1.79	3.74	11.8	9.6	0.017	88.71	-7.63	39.67
	0.5	1.78	3.74	11.8	9.4	0.029	86.17	-6.55	39.17
Cellulase (C)	0.1	1.77	3.72	11.6	9.6	0.021	88.55	-7.79	39.08
	0.3	1.78	3.73	11.8	9.5	0.021	88.10	-7.15	39.73
	0.5	1.77	3.72	12.5	9.0	0.031	86.79	-6.14	40.01
Rapidase® (P)	0.1	1.88	3.67	11.8	9.1	0.030	85.45	-6.95	38.93
	0.3	1.88	3.67	11.7	9.1	0.028	86.39	-7.12	39.61
	0.5	1.84	3.67	11.8	8.9	0.042	87.01	-7.53	39.49
Sumizyme (S)	0.1	1.72	3.73	12.0	9.2	0.012	87.58	-7.22	39.70
	0.3	1.73	3.75	12.2	8.9	0.024	87.95	-6.74	39.82
	0.5	1.76	3.74	12.2	9.0	0.039	87.84	-6.94	40.54
KFEN 2 (K)	0.1	1.76	3.72	11.9	9.1	0.026	81.50	-6.67	35.65
	0.3	1.79	3.72	11.7	9.0	0.038	85.18	-6.93	37.52
	0.5	1.75	3.73	12.0	9.1	0.044	87.38	-6.47	39.03

상기의 효소제 종류 및 농도별로 처리한 가수분해물에 Fermivin®을 0.02%(w/v) 접종하여 30°C, 91시간동안 정치배양 시킨 알코올 발효액의 품질특성을 조사한 결과, 적정산도 및 pH는 효소제 종류 및 농도에 따른 큰 차이는 없는 것으로 나타났으며 당도는 알코올 발효가 진행되면서 급격히 감소하여 (S)를 제외한 5종은 12°Brix이하로 나타났고, 알코올 함량은 (C)에서 9.5이상으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 탁도는 효소제 농도가 증가할수록 약간 탁해지는 경향으로 나타났다. 따라서 효소처리별 품질 특성에는 큰 차이가 나타나지 않아 aglycon화가 가장 효율적이었던 cellulase를 전처리효소로 사용하기로 하였다.

다음 단계로, cellulase의 처리온도 및 시간에 따른 aglycon화 및 품질특성을 조사하기 위해 감귤 농축액을 24° Brix가 되도록 음용수로 희석한 후 cellulase를 0.5%(w/v) 첨가하여 50, 60 및 70°C 진탕수욕조에서 100 rpm으로 1, 3 및 5시간 반응시킨 후, Fermivin®을 0.02%(w/v) 접종하여 30°C, 91시간동안 정치배양 시킨 발효주의 narirutin aglycon화 정도를 조사하였다(표 18). Cellulase 처리조건은 50°C에서 1시간정도면 최적의 aglycon전환조건으로 간주되며 70°C에서는 효소의 활성이 억제되는 것으로 나타났다.

표 18. Cellulase 처리 시간 및 온도에 따른 친환경 감귤 발효주의 aglycon화 비교

	효소처리시간 (hr.)	효소처리온도 (°C)	Mole 농도 (mM)		Naringenin/ narirutin
			narirutin	naringenin	
Control			2.16	0.22	0.10
Cellulase	1	50	1.50	1.01	0.67
		60	1.31	0.83	0.64
		70	2.41	0.60	0.25
	3	50	1.24	0.70	0.57
		60	1.17	0.63	0.54
		70	1.97	0.49	0.25
	5	50	1.08	0.61	0.57
		60	2.28	0.58	0.25
		70	2.27	0.33	0.15

Cellulase로 전처리하고 발효시킨 발효주의 품질특성을 조사한 결과(표 19), 적정 산도 및 pH는 효소처리 시간 및 온도에 따른 큰 차이는 없는 것으로 나타났으며 알코올 함량은 효소 3시간 처리구간에서 9.0~9.3%로 가장 높게 나타났다. 효소 1시간 처리구간에서는 50°C에서 9.0%로 높은 함량을 나타내었으며 탁도는 효소처리 시간에 따른 큰 차이는 없었으나 온도가 증가할수록 약간 탁해지는 경향으로 나타났다. 이상의 결과들을 종합하여 cellulase로 50°C에서 1시간 정도 전처리한 후 알코올발효시켰을 때, 알코올 농도나 탁도면에서 가장 우수한 제품을 제조할 수 있었다.

표 19. Cellulase 처리 시간 및 온도에 따른 친환경 감귤 발효주의 품질특성

Enzyme treatment		Total acidity (%)	pH	Sugar content (°Brix)	Alcohol content (%)	Turbidity	Hunter's color		
Time	Temp.						L	a	b
1hr	50	1.97	3.73	13.1	9.0	0.034	86.96	-5.89	41.82
	60	1.94	3.72	12.3	8.6	0.049	86.07	-5.46	41.22
	70	1.89	3.73	12.3	8.4	0.128	79.27	-2.12	38.26
3hr	50	1.97	3.72	13.3	9.0	0.034	87.31	-5.48	41.98
	60	1.94	3.69	12.9	9.3	0.048	84.86	-3.08	42.01
	70	1.85	3.74	12.2	9.3	0.126	75.87	0.53	37.27
5hr	50	1.98	3.72	13.3	8.7	0.034	86.82	-4.84	42.00
	60	1.95	3.72	12.8	8.6	0.062	82.14	0.24	41.97
	70	1.85	3.72	12.1	8.9	0.095	76.01	2.41	38.05

나. 친환경 감귤와인 제조 및 품질특성

1) 전처리 조건에 따른 알코올 발효

가) 전처리 조건에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효 특성

선행 실험은 시료의 안정적 공급을 위하여 농축액으로 전처리한 후 각 종 발효 조건을 설정하였으며, 전과를 활용하였을 때는 맛과 향, 신선도 및 가공적성이 우수한 것으로 나타나 상기실험은 제주도산 친환경 감귤시료를 사용하여 최적 감귤발효 주 제조조건을 설정하기로 하였다. 전과(A)와 과피를 제거한 과육(B)으로 감귤 가수분해물을 각각 제조하여 전처리조건에 따른 알코올 발효 특성을 조사하였다. 표 20과 같이 알코올 함량은 (B)가 10.83%로 (A) 10.13%보다 조금 더 높았으며, 발효 후 당 함량은 (A) 12.98 °Brix로 (B) 11.38 °Brix보다 조금 더 높게 나타났다. Koh 등(1)은 감귤 껍질의 방향성분인 정유가 효모의 생육을 저해하여 알코올 발효가 억제된다고 보고 한 바 있으나 전과로 제조한 감귤 가수분해물은 과육과 비교하여 알코올 발효 특성에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 적정산도는 (A) 0.54%로 (B) 0.65% 비해 조금 낮게 나타났다. pH는 발효과정 및 숙성, 저장 중 잡균의 오염과 관련하여 저장성에 큰 영향을 주는 것(2)으로 과실주 발효 또는 저장·숙성시 pH 3.2~3.5가 적절하며, pH가 3.2 이하에서는 신맛이 강해 품질이 떨어진다고 보고

(3) 된 바 있다. 발효 후 pH는 (A) pH 3.54, (B) pH 3.37로 두 구간 모두 적정 pH 범위 내에 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 전처리 조건에 따른 감귤가수분해물의 알코올 발효 특성은 큰 차이를 보이지 않아 두 구간 모두 알코올 발효가 가능할 것으로 판단된다.

표 20. 전처리 조건에 따른 감귤 가수분해물의 alcohol, sugar함량 및 titratable acidity, pH

Pre-treatment conditions ¹⁾	Alcohol content (%)	Sugar content (°Brix)	Titratable acidity (%)	pH
A	10.13±0.06 ²⁾	12.98±0.18	0.54±0.02	3.54±0.01
B	10.83±0.06	11.38±0.32	0.65±0.01	3.37±0.01

¹⁾A : Whole citrus, B : Citrus remove peel.

²⁾Values are mean ± S.D.

표 21. 전처리 조건에 따른 감귤 가수분해물의 Hunter's color value 와 brown color

Pre-treatment conditions ¹⁾	Hunter's color values			Brown color
	L	a	b	
A	89.9±0.53 ²⁾	-3.9±0.14	20.3±0.19	0.90±0.12
B	91.9±0.69	-2.0±0.08	15.7±0.41	0.88±0.04

¹⁾Refer to 표 20.

²⁾Values are mean ± S.D.

나) 전처리 조건에 따른 감귤 가수분해물 알코올 발효액의 flavonoid 함량 변화

전처리 조건에 따른 감귤 가수분해물 알코올 발효액의 flavonoids 함량을 조사한 결과는 표 22과 같다. Hesperidin, narirutin 및 naringenin 3종의 flavonoids가 검출되었으나 naringin은 검출되지 않았다. Hesperidin 함량은 두 구간에 큰 차이가 없었으나 narirutin 함량은 (A)가 281.31 µM으로 (B) 199.05 µM에 비해 매우 높게 나타났다, naringenin은 (B)가 조금 높게 나타났다. 감귤류의 주요 flavonoid는 배당

체인 narigin과 hesperidin 그리고 이들의 무배당체인 naringenin, narirutin 및 hesperetin 등이 있다(4,5). 실제 감귤에는 narigin과 hesperidin 등의 배당체 형태로 대부분이 존재하며, 이들의 무배당체 화합물이 항산화, 소염, 항암 활성이 더 높고 (6), 혈액내로의 흡수나 생리활성 면에서 더 효과적인 것으로 나타났다(7). 감귤에 당분해효소를 이용하면 배당체 형태인 flavonoid 화합물들을 무배당체 형태의 flavonoid로 전환 시킬 수 있으며, 세포벽 구성성분의 가수분해를 통한 유효 생리활성 성분을 증대시킬 수 있는 것(8)로 보고된 바 있어 감귤을 가수분해할 때 감귤전과를 이용하면 무배당체인 narirutin의 함량이 높아져 향후 기능성 차별화가 가능하여 전처리 조건으로 전과를 선정하였다.

표 22. 감귤전과와 감귤과육의 flavonoids 함량

Pre-treatment conditions ¹⁾	Flavonoids content(μM)			
	Naringin	Hesperidin	Narirutin	Naringenin
A	N.D. ²⁾	3.89	281.31	16.66
B	N.D.	4.52	199.05	21.61

¹⁾Refer to 표 20.

2) 효모 종류에 따른 알코올 발효

감귤 가수분해물에 주모를 각각 5%(v/v) 접종하여 효모 종류에 따른 알코올 발효 특성을 조사하였다. 그림 34와 같이 알코올 함량은 *S. bayanus* EC-1118에서 12.75%로 가장 높게 나타났으며, *S. cerevisiae* RC 212 12.35%, *S. cerevisiae* ICV D47 11.85%, *S. cerevisiae* Fermivin 9.95%, *S. cerevisiae* K1-V1116 8.70% 순으로 나타났다. 발효 후 당도는 알코올 도수가 높을수록 낮은 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Roh 등(9)이 포도주를 제조할 때 *S. cerevisiae* Fermivin을 포함한 효모 12종 모두 알코올 함량이 약 12% 내외로 효모 종류에 따른 큰 차이가 없었다고 보고한 것과는 다른 경향으로 *S. cerevisiae* Fermivin과 K1-V1116에서는 알코올 도수 10% 미만으로 나타났다. Koh 등(1)은 감귤의 정유성분이 효모의 생육을 저해하여 알코올 발효가 억제된다고 보고한 바 있어 감귤의 정유성분에 의해 *S. cerevisiae* Fermivin과 K1-V1116은 생육이 억제되어 알코올 함량이 낮게 나타난 것으로 생각된다. 감귤 가수분해물을 이용하여 알코올 발효할 때는 알코올 생성능이 우수한 효모가 적합할 것으로 판단되어 본 실험에서는 알코올 생성능이 가장 우수한 *S.*

bayanus EC-1118을 선별하였다. 적정산도는 0.52~0.57% 범위로 모든 효모에서 비슷한 경향으로 나타났으며, pH는 *S. cerevisiae* K1-V1116구간에서 3.19로 가장 낮게 나타났으나 다른 구간에서도 약 pH 3.50으로 큰 차이는 나타나지 않았다(그림 41).

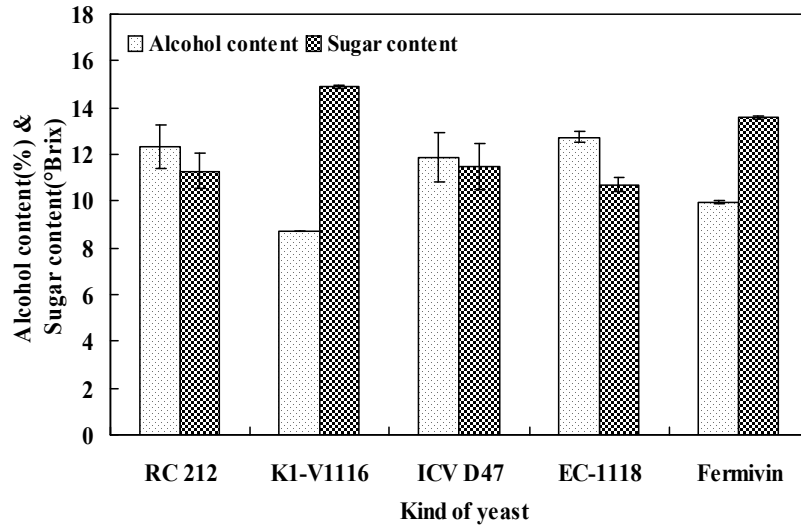


그림 40. 효모 종류에 따른 알코올 발효특성(alcohol, sugar 함량)

RC 212 : *S. cerevisiae* RC 212, K1-V1116 : *S. cerevisiae* K1-V1116, ICV D47 : *S. cerevisiae* ICV D47, EC-1118 : *S. bayanus* EC-1118, Fermivin : *S. cerevisiae* Fermivin.

Values are mean \pm S.D. (n=3).

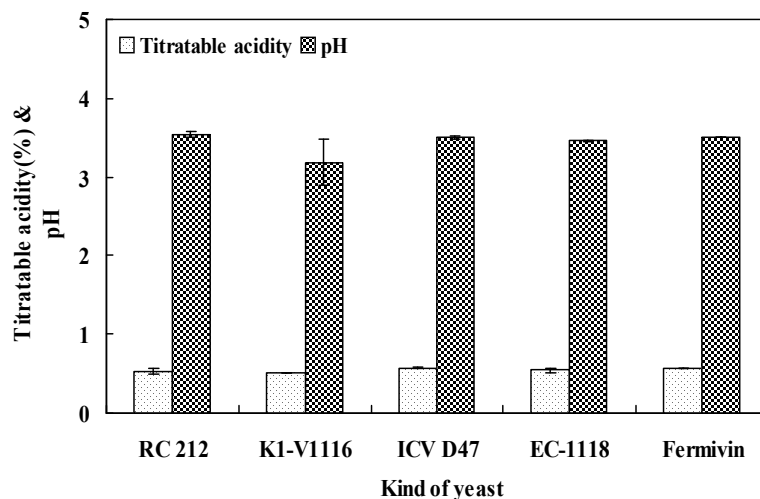


그림 41. 효모 종류에 따른 알코올 발효특성(Titratable acidity, pH)

RC 212 : *S. cerevisiae* RC 212, K1-V1116 : *S. cerevisiae* K1-V1116, ICV D47 : *S. cerevisiae* ICV D47, EC-1118 : *S. bayanus* EC-1118, Fermivin : *S. cerevisiae* Fermivin.

표 23. 효모 종류에 따른 알코올 발효물의 Hunter's color value 와 brown color

Kind of yeast	Hunter's color values			Brown color
	L	a	b	
RC 212	87.4±0.85 ¹⁾	-6.9±0.13	29.0±0.31	0.91±0.01
K1-V1116	86.6±0.01	-6.6±0.04	29.1±0.04	1.36±0.61
ICV D47	89.5±2.35	-7.3±0.38	32.6±4.00	0.89±0.03
EC-1118	88.1±2.12	-7.0±0.16	29.5±0.63	0.97±0.46
Fermivin	87.0±2.40	-7.1±0.30	28.0±0.82	0.91±0.02

¹⁾Values are mean ± S.D.

3) 초기산도 및 초기당도에 따른 알코올 발효

감귤 가수분해물의 초기산도를 0.0, 0.2, 0.3 및 0.4%로 보산한 후 *S. bayanus* EC-1118 주모를 5%(v/v) 접종하여 초기산도에 따른 알코올 발효 특성을 조사하였다. 그림 42과 같이 알코올 함량은 초기산도가 0.2%일 때 12.40%로 가장 높았으며 초기산도가 높아질수록 조금 감소하는 경향을 나타내었으며, 당도는 조금 증가하는 경향을 나타내었으나 초기산도에 따른 큰 차이는 없었다. 발효 후 적정산도는 초기산도가 높을수록 높아졌으며, pH는 낮아지는 경향으로(그림 43), 초기산도를 0.2%로 설정하였다.

감귤 가수분해물의 초기산도를 0.2%로 보산한 후 초기당도를 22, 24, 26 및 28 °Brix로 각각 보당하여 알코올 발효 특성을 조사한 결과는 그림 44와 같다. 알코올 함량은 초기당도 22 °Brix에서 11.65%, 24 °Brix에서 12.85%로 가장 높게 나타났으며, 이후 알코올 함량은 조금 감소하는 경향을 나타내었다. 초기당도를 24 °Brix로 알코올 발효할 때 알코올 함량은 오디 11.7%(10), 포도 14.7%(11), 수박 10.4%(12), 단감 13.2%(13)로 원료에 따라 알코올 함량은 다르게 나타나는 것으로 생각된다. Lee 등(14) 당농도가 높으면 당의 삼투압 작용에 의해 효모의 활성이 떨어진다고 보고한 바 있어 24 °Brix이상에서 알코올 함량이 낮아지는 것으로 생각된다. 일반적인 와인의 알코올 함량은 9%에서 14% 전후로, 알코올 함량이 12%이하가 되면 와인이 쉽게 변질되므로(13). 감귤 가수분해물을 알코올 발효의 경우 초기당도를 24 °Brix로 보당하는 것이 적합할 것으로 생각된다. 발효 후 적정산도 및 pH는 초기당도에 따른 큰 차이를 나타내지 않았다(그림 45). 이상의 결과 감귤가수분해물의 알코올 발효 특성을 조사하였으며, 향후 관능적인 쓴맛 및 기능적 특성에 미치는 영향에 관한 보완 연구가 요구되었다.

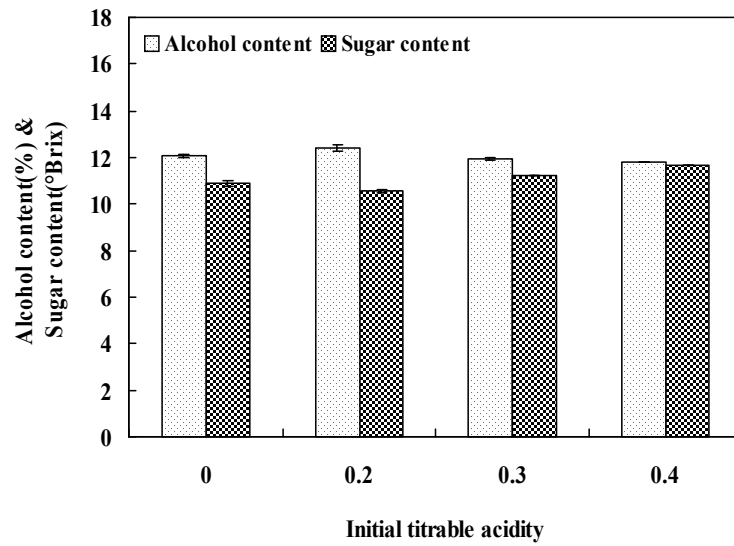


그림42. 초기산도에 따른 알코올 발효 특성(alcohol, sugar 함량)
Values are mean \pm S.D. (n=3).

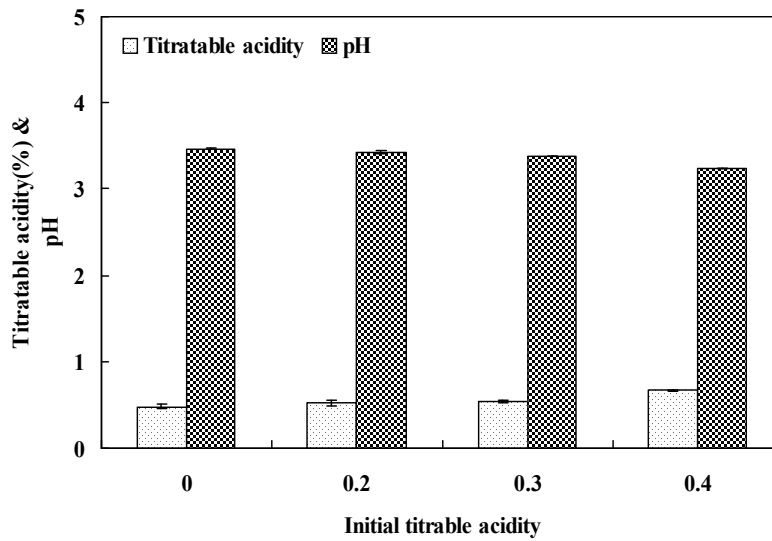


그림 43. 초기산도에 따른 알코올 발효 특성(titratable acidity, pH)
Values are mean \pm S.D. (n=3).

표 24. 초기산도에 따른 알코올 발효물의 Hunter's color value와 brown color

Initial titratable acidity (%)	Hunter's color values			Brown color
	L	a	b	
0.0	84.8±2.13 ¹⁾	-6.8±0.67	29.0±0.26	0.96±0.06
0.2	86.8±2.40	-7.4±0.71	28.3±0.22	0.93±0.01
0.3	82.0±1.65	-7.2±0.15	28.6±0.55	0.94±0.03
0.4	86.2±0.02	-7.3±0.02	28.8±0.01	0.91±0.00

¹⁾Values are mean ± S.D.

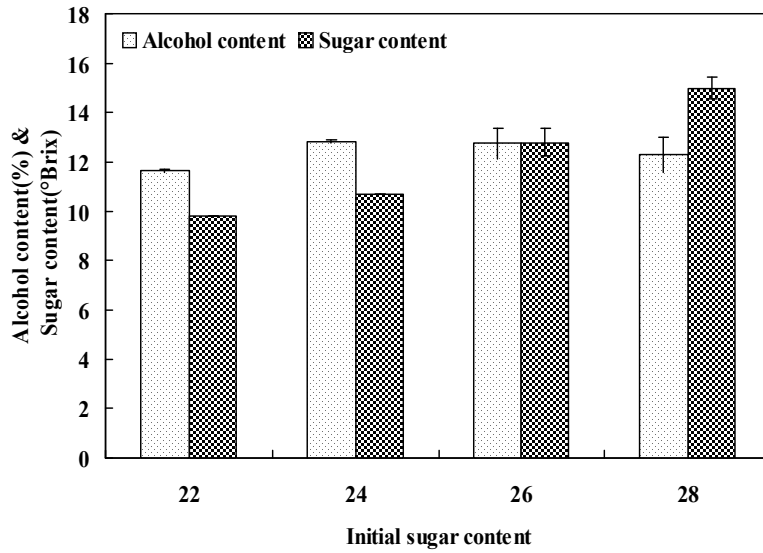


그림 44. 초기당도에 따른 알코올 발효특성 (alcohol, sugar 함량)

Values are mean ± S.D. (n=3).

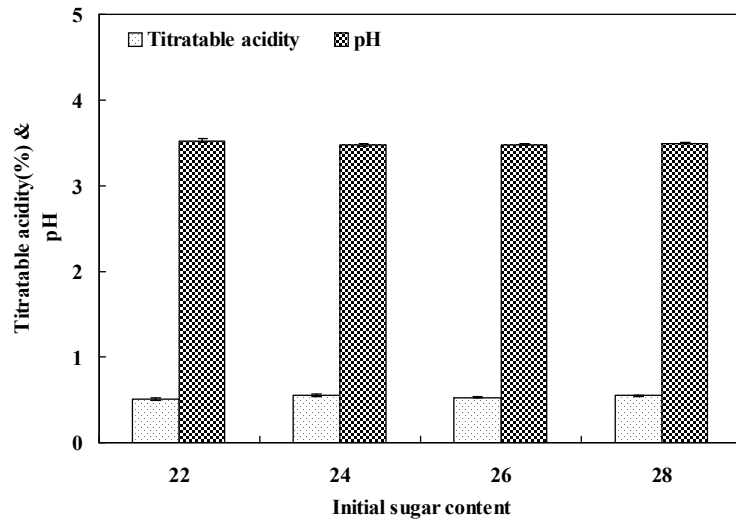


그림 45. 초기당도에 따른 알코올 발효특성 (tiratable acidity, pH)
Values are mean \pm S.D. (n=3).

표 25. 초기당도에 따른 알코올 발효물의 Hunter's color value와 brown color

Initial sugar content ($^{\circ}$ Brix)	Hunter's color values			Brown color
	L	a	b	
22	89.5 \pm 0.12 ¹⁾	-7.3 \pm 0.07	29.4 \pm 0.09	0.90 \pm 0.00
24	89.1 \pm 0.34	-7.1 \pm 0.13	29.7 \pm 0.18	0.92 \pm 0.00
26	88.8 \pm 0.41	-7.1 \pm 0.14	29.9 \pm 0.17	0.93 \pm 0.01
28	87.7 \pm 0.38	-6.9 \pm 0.03	30.1 \pm 0.06	0.95 \pm 0.01

¹⁾Values are mean \pm S.D.

4) 당 종류에 따른 알코올 발효

가) 당 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효 특성

당 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효 특성을 조사하기 위해서 설탕, 꿀, 과당, 및 프락토올리고당으로 24 $^{\circ}$ Brix로 각각 보당 한 다음 Lalvin EC-1118을 5%(v/v) 접종하여 발효시킨 결과는 그림 40 및 41과 같다. 알코올 함량은 꿀 구간에서 11.70%로 가장 높았고 프락토올리고당 11.05%, 설탕 10.75%, 과당 10.15%순으로 나타났다. 적정산도와 pH는 전반적으로 비슷한 경향을 나타내었다. 본 연구에서는 4종의 당 모두에서 알코올 발효가 우수하였으며, 알코올 함량에도 큰 차이가 없어 감귤 발효주의 관능적인 특성 및 컨셉에 맞추어 당을 선정하는 것이 적합할 것으로 생각되어 유리당과 유기산 함량 및 관능검사를 실시하였다.

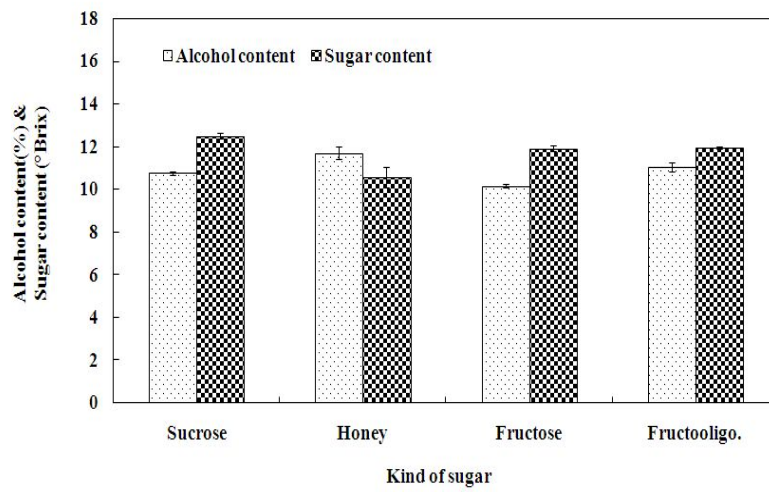


그림 46. 당 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효 특성(Alcohol, sugar함량)
 Values are mean \pm S.D. (n=3).

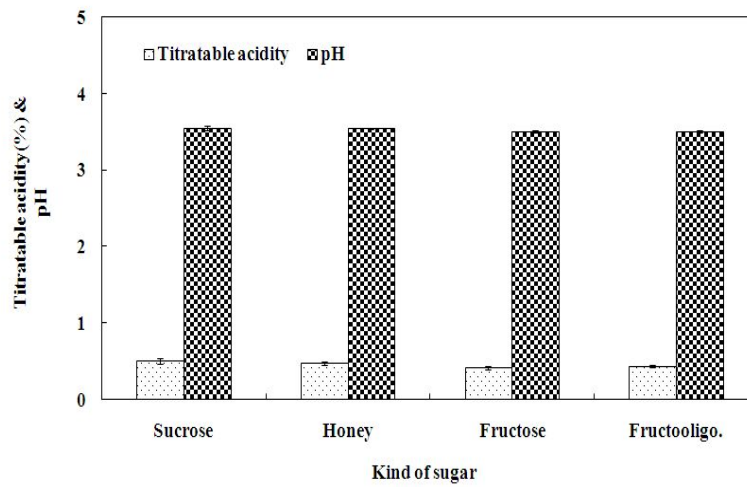


그림 47. 당 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효 특성(titratable acidity 와 pH)

표 26. 당 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효물의 Hunter's color value 와 brown color

Sugars	Hunter's color values			Brown color
	L	a	b	
Sugar	83.93±2.24 ¹⁾	-7.57±0.46	28.21±0.82	0.99±0.06
Honey	89.71±1.85	-7.04±0.53	27.99±0.22	0.97±0.06
Fructose	83.63±0.02	-7.71±0.04	27.89±0.01	0.96±0.27
Fructo- oligosaccharide	91.54±0.43	-7.70±0.24	29.49±0.12	0.92±0.02

¹⁾Values are mean ± S.D.

나) 당 종류에 따른 감귤 가수분해물 알코올 발효액의 유리당 함량

당 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효액의 유리당 함량을 조사한 결과는 표 27과 같다. 주요 유리당은 fructose, glucose, sucrose 및 maltose가 검출되었으며, 설탕 보당구간의 경우 다른 당에 비해 fructose 및 glucose의 함량이 높게 나왔다. 이는 sucrose의 가수분해에 의해 전환된 것으로 판단된다. 꿀 보당구간의 경우 다른 당에 비해 maltose의 함량이 1,930 mg%로 가장 높았다. 과당 보당구간의 경우 fructose 함량이 가장 높았으며, glucose, maltose, sucrose 순으로 나타났다. 프락토올리고당 보당구간의 경우 fructose의 함량이 가장 높았다. 이는 당 종류에 따라서 유리당 조성 및 함량에 차이가 있는 것으로 생각된다. 또한 감귤을 이용한 알코올 발효의 경우에 전반적인 유리당 함량은 fructose, glucose, sucrose순으로 높은 경향을 보이며, 이러한 결과는 꽃감주(15)와 복분자주(16) 알코올 발효 과정 중 이화학적 특성 변화에 관한 연구에서 효모의 당 이용성이 sucrose, glucose, fructose순인 것으로 보고된 것과 유사한 결과를 나타내었다.

표 27. 당 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효액의 유리당 함량

Sugars	Free sugar content(mg%)			
	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose
Sucrose	5,656±20	2,232±12	133±2	236±7
Honey	1,621±11	268±8	51±4	1,930±17
Fructose	4,677±15	1,122±8	53±6	578±11
Fructo- oligosaccharide	2,899±16	761±4	310±8	234±9

다) 당 종류에 따른 감귤 가수분해물 알코올 발효액의 유기산 함량

당 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효액의 유기산 함량을 조사한 결과는 표 28와 같다. 감귤 알코올 발효액의 유기산은 lactic acid 499~671 mg%, citric acid 136~153 mg% 및 malic acid 48~54 mg%로 검출되었고, oxalic acid, tartaric acid, acetic acid 및 succinic acid는 검출되지 않았다. 제주도산 감귤 발효주의 유기산 함량은 주로 citric acid 및 malic acid이며, 그 외 oxalic acid, lactic acid 및 succinic acid도 소량 존재하였다는 Koh 등(1)의 보고와 일부 유사하였으나 감귤품종, 수확시기, 재배환경 등에 따라서 유기산 조성 및 함량에 차이가 있는 것으로 생각된다. 와인 제조에서 citric acid와 malic acid는 맛에 중요한 성분으로 citric acid는 와인의 향에 신선함을 증가시키고, malic acid는 와인의 신맛을 부드럽게 해주지만 많은 양이 존재 할 경우 풋내를 증가시키기도 한다(17). 본 연구에서 제조된 감귤 알코올 발효액의 경우 총유기산 함량이 1%이내로 나타나 관능적으로 적합할 것으로 생각된다.

표 28. 당 종류에 따른 감귤 가수분해물 알코올 발효액의 유기산 함량

Sugars	Organic acid content(mg%)						
	Oxalic acid	Tartaric acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Citric acid	Succinic acid
Sucrose	N.D. ¹⁾	N.D.	54±5	671±2	N.D.	153±1	N.D.
Honey	N.D.	N.D.	48±1	499±6	N.D.	139±3	N.D.
Fructose	N.D.	N.D.	54±3	661±3	N.D.	143±3	N.D.
Fructo-oligosaccharide	N.D.	N.D.	52±3	643±1	N.D.	136±4	N.D.

¹⁾Not detected

라) 당 종류에 따른 감귤 가수분해물 알코올 발효액의 관능적 특성

당 종류에 따른 감귤 가수분해물의 알코올 발효액의 관능적 기호도를 조사한 결과는 표 29와 그림 48과 같다. 관능적 기호도 항목 중 색은 설탕 보당구간이 5.8로 가장 높았고 꿀, 과당, 프락토올리고당 보당 순으로 높게 나타났다. 향은 설탕 보당구간이 5.1로 가장 높았고 과당 및 프락토올리고당 보당구간에서 4.8, 꿀 보당구간에서 4.2로 나타났으나 시료들간에 유의적인 차이는 없었다. 설탕 보당구간은 최종 알코올 함량이 낮고 부드러운 향을 나타내기 때문에 가장 선호하는 것으로 생각되며 꿀 보당구간은 단백질이 함유되어 가수분해 과정에서 열에 따른 불쾌취가 원인인 것으로 생각된다(18). 맛은 설탕 보당구간이 5.3으로 가장 높았고 꿀 및 과당 보당구간이 각각 5.0 및 4.6으로 낮게 나타났으나 시료 간에 유의적인 차이는 없었다. 또한 프락토올리고당 보당구간에서는 3.7로 가장 낮았으며 평균이하로 평가되었다. 전반적 기호도에서는 모든 시료들 간에 유의적인 차이를 보였으며 설탕 보당구간이 5.7로 가장 높았고 프락토올리고당 보당구간이 3.9로 가장 낮은 기호도를 나타냈다. 따라서 관능검사에 참여한 20대 대부분이 저알코올 및 단맛을 선호하는 것으로 생각된다. 또한 설탕 이외에 꿀이 알코올 발효 및 관능적 특성에서도 적합한 것으로 나타나 향후 복합당을 이용하여 알코올 발효를 실시할 경우 품질개선 및 관능적 기호도를 향상 시킬 수 있을 것으로 기대된다.

표 29. 당 종류에 따른 감귤 가수분해물 알코올 발효액의 관능적 특성

Sugars	Attributes ¹⁾			
	Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
Sucrose	5.8±0.1 ^{a2)}	5.1±0.3 ^a	5.3±0.5 ^a	5.7±0.4 ^a
Honey	5.3±0.4 ^b	4.2±0.5 ^a	5.0±0.5 ^a	5.0±0.5 ^{ab}
Fructose	5.0±0.1 ^b	4.8±0.3 ^a	4.6±0.3 ^a	4.4±0.1 ^{bc}
Fructo-oligosaccharid e	4.4±0.2 ^c	4.8±0.1 ^a	3.7±0.2 ^b	3.9±0.2 ^c

^{abc}Values with different superscripts indicate significant difference from each other($p < 0.05$).

¹⁾Attributes is represented 7-point hedonic scale

²⁾Values are mean ± S.D.

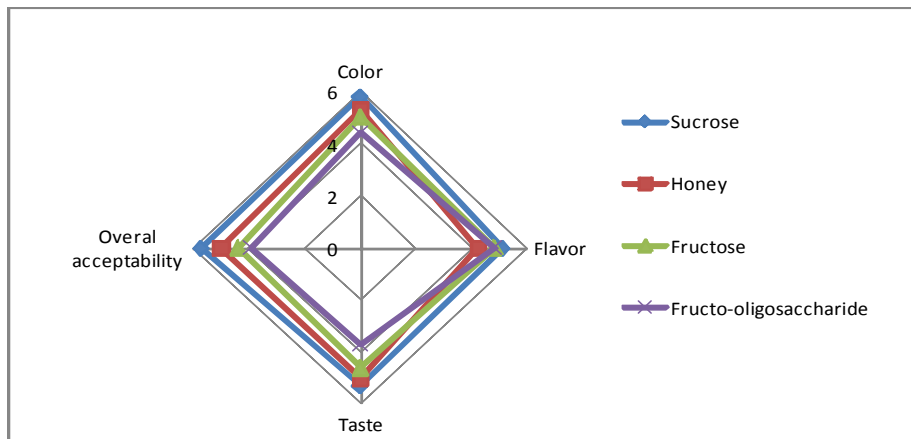
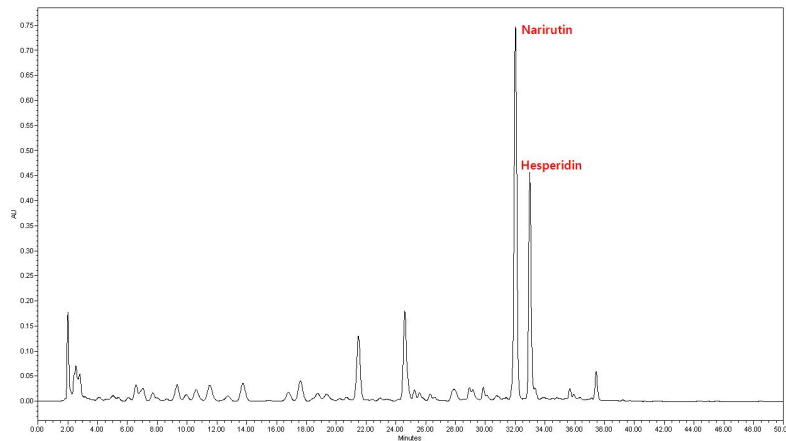


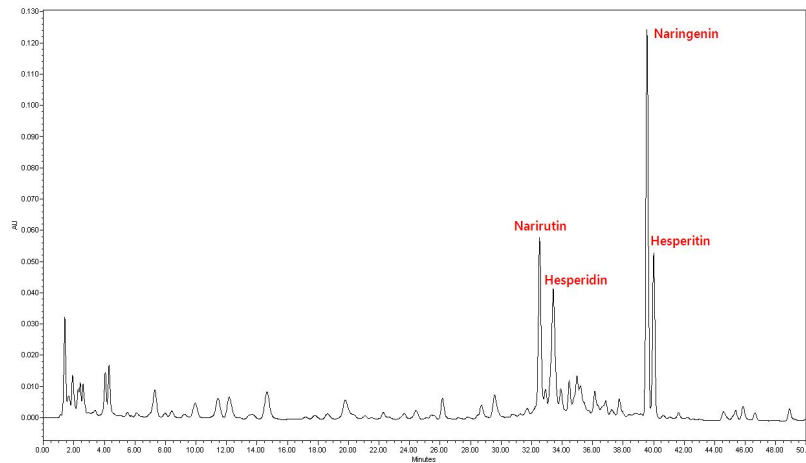
그림 48. 당 종류에 따른 감귤 가수분해물 알코올 발효액의 관능적 특성

5) 감귤발효주 flavonoids 변화

최적조건에서 제조된 감귤발효주의 flavonoids 발효전후의 조성변화를 비교하였다 (그림 49). 발효 전에는 narirutin과 hesperidin이 flavonoids의 대부분을 차지하고 있었으나, 발효 후에는 이들 중 많은 부분이 narigenin과 hesperitin으로 전이됨을 알 수 있었으며 이러한 결과는 발효 전 cellulase처리를 통하여 일어났음을 짐작할 수 있었다.



발효 전



발효 후

그림 49. 감귤발효주의 발효에 따른 flavonoid 조성변화 비교(HPLC chromatogram)

감귤발효주에 narirutin 첨가효과를 조사하기 위하여 narirutin 물추출물을 1.0%까지 발효전후로 첨가하여 관능검사를 실시한 결과, narirutin 첨가로 쓴맛이 증가하여 기호도가 유의적으로 감소됨으로 발효주에 narirutin의 첨가는 고려하지 않기로 하였다. 실질적으로 발효주에는 narirutin과 hesperidin 등이 400 ppm이상 함유되어있으며 특히 narirutin의 알코올성 간손상 억제 효능이 본 연구를 통해 증명된다면 감귤발효주 자체로서도 포도주에 못지않은 ‘건강 술’로서의 이미지를 가질 수 있을 것으로 기대된다.

다. 감귤 브랜디 제조 및 품질특성

1) 증류조건 설정

알코올 발효 종료 후 감귤 와인을 부직포로 1차 여과한 다음 circulating aspirator(sibata WJ-15, Japan)로 2차 여과하여 병입 후 15℃에서 저장한 것을 증류 시료로 사용하였다. 증류는 상압단식증류기를 이용하여 시료의 온도를 95℃ 이상 가열하여 증류되어 나온 것을 초류(10%), 중류(80%), 후류(10%)로 나누어 분취하였다. 분취한 시료를 membrane filter(pore size 0.45 µm, Advantec MFS, Japan)로 여과한 뒤 Gas chromatography(Hewlett packard 5980, USA)를 이용하여 알코올 성분 중 methanol 함량을 분석하였다. 표 30과 같이 감귤 와인의 methanol 함량은 603.6 ppm으로 나타났다. 주세법에서 와인의 methanol 함량은 1,000 ppm 이하로 규정하고 있어 감귤 와인은 주세법 기준에 적합하였다. 감귤 와인을 증류한 결과 초류의 알코올 함량은 72.5%, 본류 33.5%, 후류 4.9%로 증류가 진행되면서 알코올 함량은 점차 감소하였다. Methanol 함량은 초류의 경우 1,136.7 ppm으로 높게 나타났으며, 본류와 후류로 갈수록 methanol 함량은 감소하였다. 주세법에서 브랜디 methanol 함량은 1,000 ppm 이하로 규정하고 있어 감귤로 브랜디를 제조하기 위해서는 초류와 본류를 적절한 비율로 브랜딩 하여 methanol 함량 저하 및 관능적인 특성을 향상시켜야 한다.

표 30. 상압증류에 따른 감귤와인의 alcohol과 methanol함량

	Citrus wine	Fore shot	Potable spirit	Tailing
Alcohol content(%)	13.9	72.5	33.5	4.9
Methanol content(ppm)	603.6	1,136.7	1,607.5	605.5

2) 감귤 브랜디 품질특성

상압 증류기를 이용하여 분취한 초류(10%)와 본류(80%)를 혼합하여 알코올 도수 40%의 감귤 브랜디를 제조하여 알코올 성분을 조사한 결과 표 31과 같다. n-Propanol, Isobutanol, Isoamylalcohol 등 fusel oil들은 각각 171, 286, 478 ppm으로 나타났다. 이 fusel oil들은 알코올 발효의 부산물로써 얻는 고급 알코올류의 혼합물이며 주류의 품질에 중요한 요인(19)이 된다. N-Butanol, N-amylalcohol은 검출되지 않았고, acetaldehyde는 128 ppm이 검출되어 주세법 상 브랜디 성분 규격 (acetaldehyde 700 ppm 이하)에 적합한 것으로 나타났다. Methanol은 1,059 ppm이

검출되어 1,000 ppm이하의 브랜디 성분 규격을 초과하였다. 이는 술의 원료인 과실류에는 펙틴(pectin)이 함유되어있으며, 이 펙틴은 알코올 발효과정에서 분해되며 methanol을 생성시킨다고 알려져 있다(20). 과실류의 펙틴 함량을 조사한 결과, 감귤은 약 2.5%로 나타났으며(21), 포도 0.19~0.22%(22), 수박 1.2~1.4% 및 참외 1.3~1.6%(23)의 함량을 나타내어 감귤을 원료로 과실주 및 브랜디를 제조할 경우 methanol 함량이 가장 높을 것으로 판단된다. 따라서 향후 methanol 함량 감소를 위한 전처리 연구가 요구된다.

표 31. 감귤 브랜디의 알코올 성분을 조사

Alcohol components (ppm)	Citrus brandy
Acetaldehyde	128
Methanol	1,059
N-Propanol	171
Isobutanol	286
N-Butanol	N.D. ¹⁾
Isoamylalcohol	478
N-amylalcohol	N.D.

¹⁾Not detected.

라. 가수분해물을 이용한 감귤와인과 시판감귤와인의 품질비교

1) 알코올 함량, 당도, 적정산도 및 pH

자가제조 감귤와인(A)과 시판 감귤와인(B, C) 2종의 알코올 함량, 당도, 적정산도 및 pH를 분석한 결과는 그림 50과 같다. 알코올 함량은 (B)가 13%로 가장 높았고 (A)는 12%, C는 11%로 나타났다. 일반적으로 시판와인의 알코올 함량은 9~14%로 다양하며, 알코올 함량이 12% 이하가 되면 와인이 쉽게 변질되는 경향이 있다(13). 당도는 (B)가 14.1 °Brix로 가장 높게 나타났고 (A)와 (C)는 각각 11.9 및 10.0 °Brix였다. 적정산도 및 pH는 각각 0.53~0.63% 및 3.22~3.42로 제품간의 큰 차이가 없었다. Kim 등(24)은 시중에서 판매되고 있는 와인의 적정산도가 0.57~0.71%라고 보고하였으며, 이는 자가제조 감귤와인이 시판 감귤와인 뿐만 아니라 포도주의 적정산도와도 비슷한 수준임을 알 수 있었다. 또한 와인의 pH는 와인의 발효, 숙성 및 맛에 영향을 미치는데 pH가 3.6 이상이면 저장 중 잡균이 발생할 가능성이 높고, 반대로 pH가 3.2 이하이면 지나치게 신맛이 강하여 관능적으로 부정적인 영

향을 준다고 알려져 있어(25), 자가제조 감귤와인과 시판 감귤와인 2종 모두 와인으로서 적절한 수준으로 나타났다. 따라서 시판와인 (B)는 very sweet타입의 높은 알코올 함량을 가진 제품이고 시판와인(C)는 medium타입의 당과 알코올 함량을 가진 제품이며, 자가제조 감귤와인(A)은 (B)와 (C)의 중간으로 medium-sweet타입의 medium(+) 알코올 함량을 가진 제품이라 판단된다.

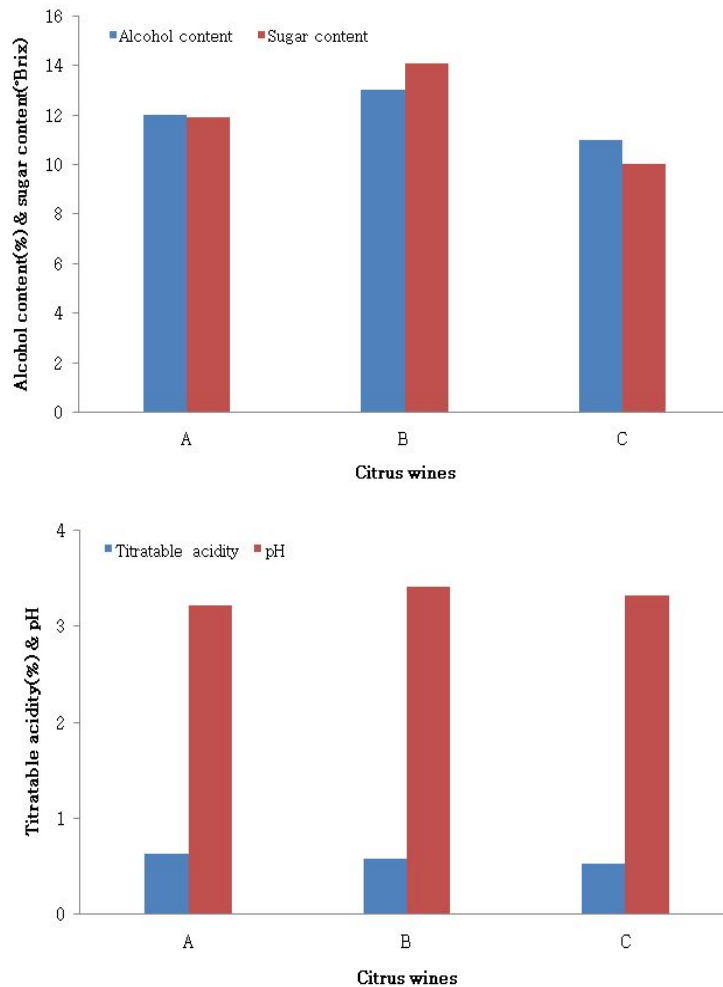


그림 50. 자가제조 감귤와인과 시판감귤와인의 품질특성 비교(alcohol content, sugar content, titratable acidity, pH)

A : DIY wine(citrus wine), B : Commercial wine(citrus one shot), C : Commercial wine(gold beak).

Values are mean \pm SD (n=3).

2) 색도

자가제조 감귤와인(A)과 시판 감귤와인(B, C) 2종의 색도 및 갈색도를 분석한 결과는 표 32와 같다. 색도의 L값(명도)은 (A) 98.87, (B) 98.15, (C) 97.39로 비슷한 수치를 나타내었고, a값(적색도)은 (A) -5.19, (B) -1.97, (C) -1.83으로 시판 감귤와인에서 약 4이상 높게 나타나 주황빛이 강하였다. b값(황색도)은 (A) 14.32, (B) 7.73, (C) 8.19로 자가제조 감귤와인에서 약 6이상 높아 노란빛이 강하게 나타났고, 갈색도는 (A) 0.36, (B) 0.13, (C) 0.15로 나타나 황색도와 유사한 경향을 보였다. 일반적인 시판 감귤주의 제조에서 감귤의 과피는 정유성분 및 섬유질 등의 성분이 다량 함유되어 있어 양조과정 중 쓴맛 및 혼탁 등의 문제를 야기하기 때문에 이를 제거한 뒤 과육만을 이용하여 발효에 이용된다(26). 그러나 감귤의 과피에는 항암 및 항산화 작용물질인 narirutin 및 hesperidin 등의 flavonoid성분을 비롯한 다양한 기능성 물질을 함유하고 있다(27). 따라서 본 연구에서는 이러한 기능성 물질을 활용하고자 감귤 과피를 포함한 전과 가수분해물을 이용하여 감귤와인을 제조하였으며, 이는 과육만을 원료로 제조한 시판 감귤와인과 비교하였을 때 색도 차이의 원인인 것으로 판단된다.

표 32. 자가제조 감귤와인과 시판감귤와인의 품질특성 비교(Hunter's color value, brown color)

Colors		Sample ¹⁾		
		A	B	C
Hunter's color value	L	98.87±0.06 ²⁾	98.15±0.01	97.39±0.01
	a	-5.91±0.01	-1.97±0.02	-1.83±0.00
	b	14.32±0.00	7.73±0.00	8.19±0.01
Brown color		0.36±0.00	0.13±0.00	0.15±0.00

¹⁾Refer to Fig. 1.

²⁾Values are mean ± SD (n=3).

3) 유리당 함량

자가제조 감귤와인(A)과 시판 감귤와인(B, C) 2종의 유리당 함량을 분석한 결과는 표 33과 같다. 모든 제품에서 fructose 및 glucose로 총 2종이 검출되었다. 잔당의 총량은 (B)가 5,855 mg%로 가장 높았고 (A)는 4,189 mg%, (C)는 3,927 mg%로 나타나 당도 결과와 같은 경향이었다. Song 등(28)은 감귤 원과에서 sucrose,

glucose, fructose순으로 검출되었으며 모든 품종에 있어서 전체 유리당 중 sucrose가 약 50% 함유되어 가장 많았고, glucose 및 fructose가 15.7~25.7% 및 17.5~30.1%로 비슷한 함량이었다고 보고하였다. 3종의 감귤와인은 알코올 발효 과정 중 가수분해 효소에 의해 sucrose가 fructose 및 glucose로 전환되었기 때문에 원과에서 가장 많은 함량을 차지하였던 sucrose가 모두 소모되어 발효 종료 후에는 검출되지 않은 것으로 생각된다(10).

표 33. 자가제조 감귤와인과 시판감귤와인의 유리당 함량 비교

Free sugar (mg%)	Sample ¹⁾		
	A	B	C
Fructose	3,380±36 ²⁾	4,028±25	2,333±232
Glucose	809±34	1,827±15	1,594±99
Sucrose	N.D. ³⁾	N.D.	N.D.
Maltose	N.D.	N.D.	N.D.

¹⁾Refer to Fig. 1.

²⁾Values are mean ± SD (n=3).

4) 유기산 함량

자가제조 감귤와인(A)과 시판 감귤와인(B, C) 2종의 유기산 함량을 분석한 결과는 표 34와 같다. 주요 유기산은 citric acid로서 (A)가 414 mg%로 가장 높았고, (B)는 274 mg%, (C)는 291 mg%로 나타났으며, 그 외 succinic acid가 검출되었다. (A)에서는 citric acid 및 succinic acid 2종만 검출되었고, (B)는 lactic acid, citric acid 및 succinic acid 3종이 검출되었으며, (C)는 lactic acid, citric acid, succinic acid 외 자극성 신맛의 malic acid와 식초의 주성분으로 강한 신맛을 나타내는 acetic acid를 포함하여 총 5종이 검출되었다. 감귤와인의 유기산 함량을 분석한 Kim 등(29)의 보고에서는 citric acid의 함량이 가장 높게 나타나 본 결과와 유사하였으나 알코올 발효 중 lactic acid를 생성한다는 결과는 자가제조 감귤와인(A)과는 상이하게 나타났다. 따라서 자가제조 감귤와인(A)과 시판 감귤와인(B, C)의 유기산 함량 차이는 원료 및 발효조건 등에 따른 것으로 생각된다.

표 34. 자가제조 감귤와인과 시판감귤와인의 유기산 함량 비교

Organic acid (mg%)	Sample ¹⁾		
	A	B	C
Oxalic acid	N.D. ²⁾	N.D.	N.D.
Tartaric acid	N.D.	N.D.	N.D.
Malic acid	N.D.	N.D.	28±0
Lactic acid	N.D.	191±3	115±3
Acetic acid	TR ³⁾	N.D.	102±2
Citric acid	414±2 ⁴⁾	274±2	291±1
Succinic acid	145±1	59±0	46±1

¹⁾Refer to Table 1 for letters.

²⁾Not detected.

³⁾Trace

⁴⁾Values are mean ± SD (n=3).

5) 알코올 성분

자가제조 감귤와인(A)과 시판 감귤와인(B, C) 2종의 알코올 성분을 분석한 결과는 표 35와 같다. 주유 알코올 성분으로는 acetaldehyde, methanol, 1-propanol, 2-methyl-1-propanol 및 isoamylalcohol 등 5종이 검출되었다. (A)의 경우 acetaldehyde 및 methanol 함량이 각각 8 ppm, 10 ppm으로 미량 검출되었으며 (B) 및 (C)보다 매우 낮은 수준이었다. Methanol은 숙취 원인물질로 섭취 후 두통을 유발하므로 국내 식품공전 규격(30)에서 과실주의 methanol 함량을 1,000 ppm 이하로 규정하였으며, 모든 제품이 규격에 적합하였다. Isoamylalcohol, 1-propanol, 2-methyl-1-propanol 등 fusel oil류 총량에서는 (A)가 300 ppm으로 가장 높았고, (B)는 197 ppm, (C)는 188 ppm으로 나타나 자가제조 감귤와인이 시판 감귤와인보다 100 ppm이상 높게 나타났다. 주류의 fusel oil은 방향미를 부여하는데 원료 및 효모에 따라 그 함량이 달라지며 미량 존재할 경우에는 주류의 맛과 향을 높여 품질에 결정적인 영향을 미치는 중요한 요인이다(31, 32).

표 35. 자가제조 감귤와인과 시판감귤와인의 알코올 성분 비교

Alcohol component (ppm)	Sample ¹⁾		
	A	B	C
Acetaldehyde	8±1 ²⁾	185±54	60±26
Methanol	10±1	58±4	36±19
2-propanol	N.D ³⁾	N.D	N.D
isoamylalcohol	205±9	156±1	147±10
1-propanol	59±4	19±0	21±2
2-methyl-1-propanol	36±11	22±1	20±2
1-butanol	N.D	N.D	N.D
1-pentanol	N.D	N.D	N.D

¹⁾Refer to Fig. 1.

²⁾Values are mean ± SD (n=3).

³⁾Not detected.

6) 플라보노이드 함량

자가제조 감귤와인의 원료인 감귤전과(Whole citrus), 자가제조 감귤와인(A) 및 시판 감귤와인(B, C) 2종의 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 표 36 및 그림 51과 같다. 감귤전과의 경우 narirutin 및 hesperidin이 각각 162.3 및 85.8 ppm 검출되었으나 비배당체 플라보노이드는 검출되지 않았다. (A)의 경우 배당체인 narirutin 및 hesperidin이 각각 55.1 및 49.9 ppm이었고, 비배당체인 naringenin 및 hesperetin이 각각 107.1 및 35.9 ppm으로 나타나 감귤 가수분해 및 알코올발효 과정을 거치면서 narirutin과 hesperidin이 aglycon화 되어 naringenin과 hesperetin으로 상당부분 전환되었음을 알 수 있었다. 또한, 감귤전과와 총 플라보노이드를 비교해 본 결과 함량은 거의 일치하였다. 시판 감귤와인(B)와 (C)의 경우 narirutin은 각각 50.1 및 51.8 ppm이었고 hesperidin은 각각 32.3 및 31.8 ppm로 나타났으며, 비배당체 플라보노이드는 두 제품 모두 검출되지 않았다. 따라서 자가제조 감귤와인(A)은 감귤전과를 원료로 제조하였기 때문에 감귤 과육을 원료로한 시판 감귤와인(B, C)에 비하여 총 플라보노이드 함량이 약 3배 높게 나타났고, 가수분해에 의해 배당체 플라보노이드의 57% 이상이 비배당체 플라보노이드로 전환되어 쓴맛의 감소 및 항산화, 소염, 항암활성 등 기능적 특성이 더욱 향상될 것으로 기대된다.

표 36. 자가제조 감귤와인과 시판감귤와인의 flavonoid 함량 비교

Sample ¹⁾ (unit: ppm)	Narirutin equivalent		Hesperidin equivalent	
	Narirutin	Naringenin	Hesperidin	Hesperetin
Whole citrus	162.3 (100%)	0.0 (0%)	85.8 (100%)	0.0 (0%)
A	55.1 (34.0%)	107.1 (66.0%)	49.9 (58.1%)	35.9 (41.9%)
B	50.1 (100%)	0.0 (0%)	32.3 (100%)	0.0 (0%)
C	51.8 (100%)	0.0 (0%)	31.8 (100%)	0.0 (0%)

¹⁾Refer to Fig. 1.

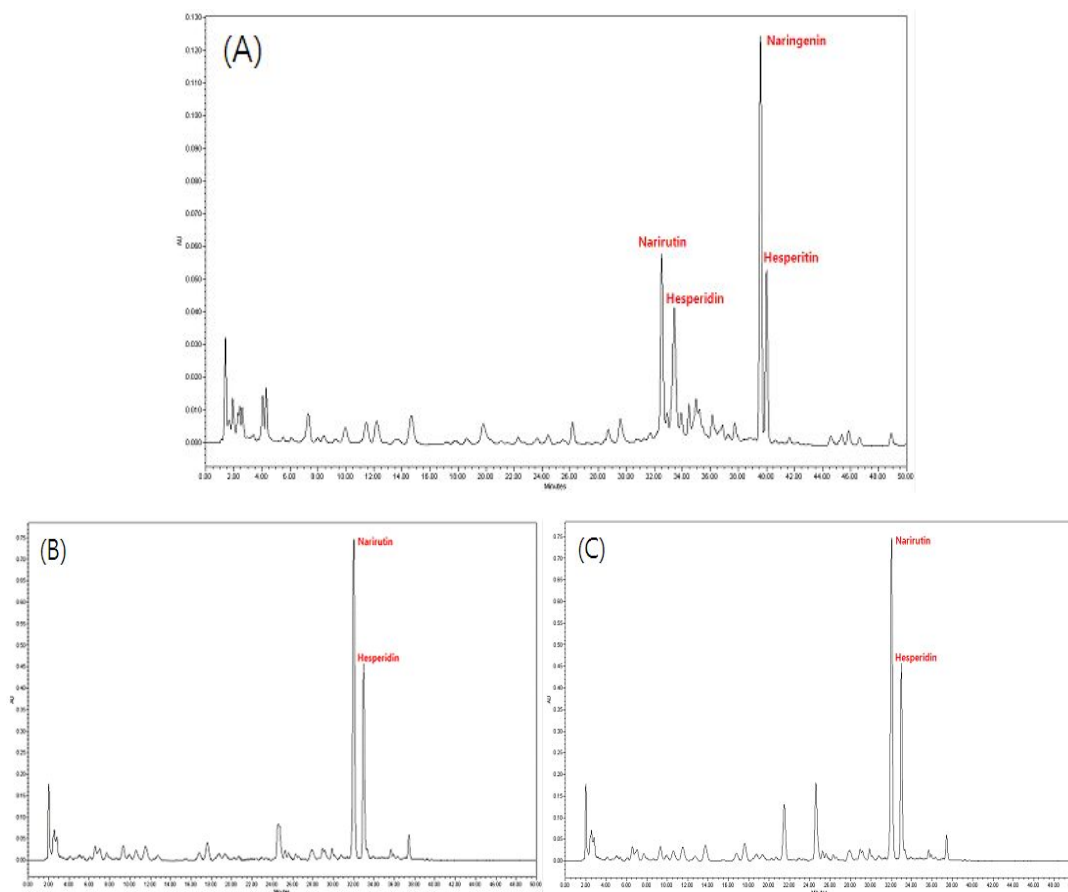


그림 51. 자가제조 감귤와인과 시판감귤와인의 flavonoid chromatogram

A~C: Refer to Fig. 1

7) 관능적 품질특성

자가제조 감귤와인(A)과 시판 감귤와인(B, C) 2종에 대하여 색, 향, 맛(단맛, 쓴맛, 감귤맛)의 특성강도 및 전반적인 관능적 기호도를 조사한 결과는 표 37과 같다. 색은 (A)에서 5.18로 가장 진한 것으로 나타났고, (C) 3.36, (B) 2.73이었다. 향 또한 (A)에서 5.36으로 가장 진했으며, (B) 3.73, (C) 2.91로 나타났다. 이는 감귤 과피에 의해 색과 향이 더욱 진해져 시료간의 유의적인 차이를 보인 것으로 판단된다. 맛 중 단맛은 (B)에서 4.73으로 가장 높았고, (A) 4.45, (C) 3.55로 나타나 당도와 같은 결과를 보였다. 쓴맛은 (B)에서 3.91로 가장 높았고, (A) 3.64, (C) 2.18로 나타나 자가제조 감귤와인(A)이 시판 감귤와인(C)에 비하여 쓴맛에 대한 특성강도가 조금 높았으나 모든시료에서 평균이하의 점수를 보여 전반적으로 쓴맛에 대한 특성강도가 약한 것으로 판단된다. 감귤맛 및 전반적 기호도는 (A)에서 각각 5.36 및 5.27로 가장 높았고, (B), (C)순으로 나타났으며 자가제조 감귤와인(A)과 시판 감귤와인(B, C) 2종간의 유의적인 차이를 보였다. 따라서 감귤전과 가수분해물을 이용하여 감귤 와인을 제조할 경우 쓴맛은 감소시키면서 감귤 특유의 색, 향 및 맛이 강한 와인 개발이 가능할 것으로 판단된다.

표 37. 자가제조 감귤와인과 시판감귤와인의 관능평가

Sample ¹⁾	Attributes ²⁾					
	Color	Flavor	Taste			Overall acceptability
			Sweet	Bitter	Citrus	
A	5.18±0.42 ^{a3}	5.36±0.67 ^a	4.45±0.69 _a	3.64±0.67 _a	5.36±1.03 _a	5.27±0.47 ^a
B	2.73±0.47 ^c	3.73±0.47 _b	4.73±0.65 _a	3.91±1.04 _a	3.64±0.50 _b	3.73±0.47 ^b
C	3.36±0.47 ^b	2.91±0.87 ^c	3.55±0.52 _b	2.18±0.67 _b	3.45±0.50 _b	3.64±0.69 ^b

^{abc)}Values with different superscripts indicate significant difference from each other(p<0.05).

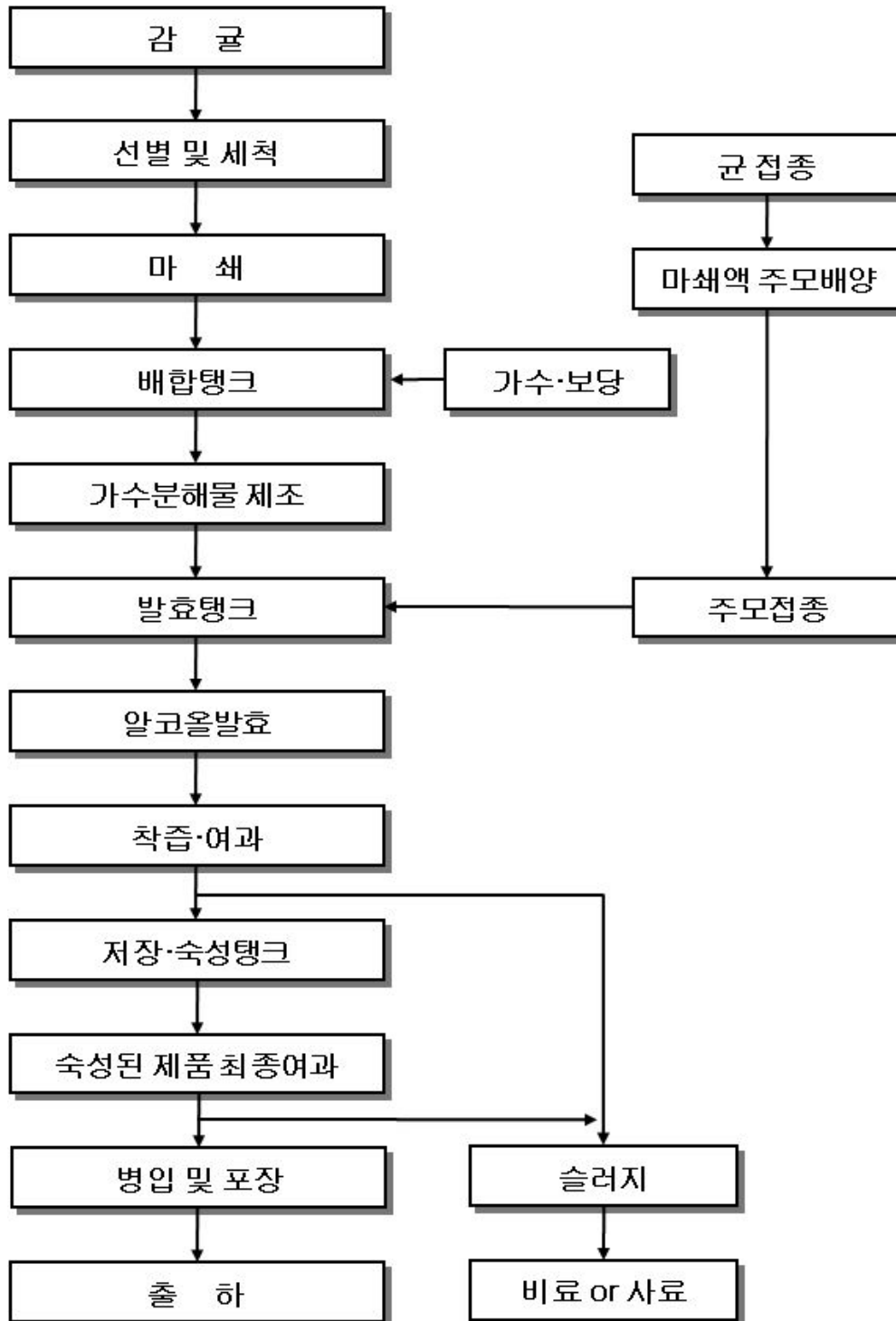
¹⁾Refer to Fig. 1.

²⁾Attributes is represented 7-point hedonic scale.

³⁾Values are mean ± S.D. (n=10).

마. 친환경 기능성 강화 감귤와인 제조공정 확립

1) 감귤와인 제품 생산공정도



2) 제품 생산공정 단계별 설명

가) 감귤

친환경 감귤을 사용하는 것을 원칙으로 함

나) 선별 및 세척

감귤 사용하며 썩은 감귤은 발효시 미생물 오염원이 되므로 선별하여 제거한 후 깨끗이 세척하고 꼭지부분을 제거.

다) 마쇄 및 가수

세척 및 이물질 제거된 감귤을 입자의 크기를 약 20 mesh 망을 통과할 수 있도록 작게 마쇄하여 조직내에 포함되어 있는 당분의 용출이 용이하도록 해줌으로써 가수분해 및 발효과정을 원활하게 하기 위한 공정. 마쇄기로 마쇄 후 원료대비 200%(v/w) 가수.

라) 보당 공정

감귤 자체의 당함량은 °Brix 당도계로 약 10~12 °Brix 측정되는데 이는 발효과정상 문제점이 야기되고 또한 최종 알코올 함량이 너무 낮은 관계로 당을 보충하여 발효 공정상의 문제점을 해결하고자 하는 공정. 담금되는 원료의 당함량이 24 °Brix가 되도록 설탕 또는 과즙 농축액을 첨가하는 공정.

마) 가수분해

cellulase를 0.5%(w/v) 첨가하여 50°C 진탕배양기에서 100 rpm으로 1시간 동안 가수분해물을 제조하는 공정.

바) 주모배양

감귤 알코올발효 조건에서 선별 배양된 우량 효모를 대량으로 배양하기 위한 공정으로 발효탱크에 사입되는 원료 대비 약 5%의 주모가 필요. 1차적으로 실험실의 삼각플라스크에서 배양된 효모를 주모탱크에 접종하여 18~20°C에서 1~2일간 배양하여 이상이 없을 경우 발효탱크에 사용.

사) 발효

제조된 감귤 가수분해물 원료를 발효탱크로 이송한 후 원료의 온도를 최적 발효 온도인 15~25℃로 한 후 주모탱크에서 적절히 배양된 주모를 원료 대비 약 5% 접종하여 알코올발효를 진행하는 공정으로 발효기간은 30℃에서 하루에 2~3번 교반 하면서 14일간 정도 소요되며 주변 환경조건에 따라 가감될 수 있음.

아) 정치 및 여과

발효 완료된 후 정치시켜 상등액을 UF System 및 마이크로 필터 여과기를 사용하여 여과한 후 저장숙성탱크로 이송하고, 하부의 슬러지를 착즙 여과기를 사용하여 슬러지를 제거한 여액을 저장숙성탱크로 이송.

자) 저장숙성탱크

1차 여과된 제품을 저장숙성탱크에서 15℃로 저장하면서 산화되지 않도록 밀봉하여 3~6개월간 숙성.

차) 숙성된 제품 최종 여과

병입하기 전 제품의 침전물을 마이크로 필터 여과기를 사용하여 여과한 후 병입.

카) 병입 및 포장

타) 출하

파) 기타

(1) 폐수 및 슬러지 처리

원료의 세척, 기기 세척 및 생산 공정 전반에서 발생하는 폐수는 달성농공공단 하수종말처리장으로 유입하여 폐수처리.

여과공정에서 발생된 슬러지는 균체 단백질이 다량 함유되어 부가가치를 창출할 수 있는 제품이므로 사료 및 비료로 활용.

(2) 세척수 및 chiller water

식품 위생법상 먹는 물로 이상이 없는 공인검사 기관의 검사를 통과한 생수를 자체 물탱크에 운반하여 사용.

마. 최종 제품 품질 규격화

1) 감귤와인



- ◆ 제품명 : 감귤와인
- ◆ 주류종류 : 과실주
- ◆ 원료명 : 제주산감귤(전과) 원액함량 33%
- ◆ 첨가물 : 무수아황산(산화방지제) 100 ppm이하
- ◆ 용량 및 규격 : 375, 750 mL, 당도 11~12 °Brix, 알코올도수 12%

2) 감귤와인 제조방법 설명서

(가) 제품명 : 감귤와인

(나) 주류종류 : 과일주

(다) 원재료 성분 및 배합비율

: 제주산 친환경 감귤(전과) 원액함량 33%, 무수아황산, 설탕

(라) 제조방법

- 감귤 선별 : 감귤은 검수·검량한 다음 이물질을 선별·제거한다.
- 감귤 세척 : 지하수로 원료를 3회 이상 세척한다.
- 감귤 전처리 : 감귤은 꼭지를 제거한 후 마쇄한다.
- 가수·보당 : 감귤 마쇄액에 정제수로 200%(v/w)를 가수한 후 설탕을 첨가하여 24 °Brix로 보당한다.
- 가수분해 : Cellulase를 0.5%(w/v) 첨가하여 50℃ 진탕배양기에서 100 rpm으로 1시간 동안 가수분해한다.
- 알코올발효 : 감귤 가수분해물에 주모를 5% 접종한 후 30℃에서 14일 동안 발효시킨다.
- 여과 : Φ 0.45 μm 로 여과한다.
- 병입 : 와인병에 병입 및 밀봉한다.
- 병숙성 : 병입 후 일정기간 숙성한다.
- 라벨링, 포장 : 라벨을 부착한 후 포장기로 포장한다.
- 포장검사 : 포장된 제품을 자체 검사하여 합격한 제품만을 포장 단위별로 일정량으로 박스포장 후 출고한다.
- 완제품

3) 제품규격

(가) 색상

고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없어야 함.

(나) 유통기한

제조일로부터 3년

(다) 규격

- 에탄올(v/v%) : 주세법의 규정에 의한다.
- 메탄올(mg/mL) : 1.0 이하
- 보존료(g/L) : 다음에서 정하는 것 이외의 보존료가 검출되어서는 아니된다.

소르빈산 소르빈산칼륨 소르빈산칼슘	0.2 이하(소르빈산으로서)
파라옥시안식향산부틸	0.05 이하

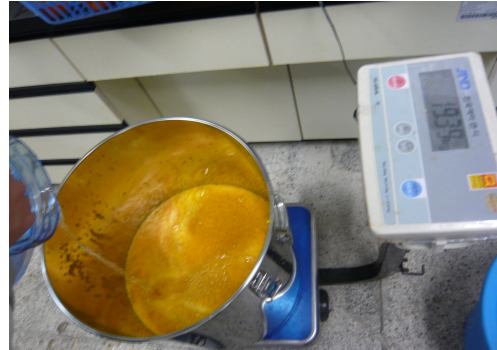
4) 친환경 감귤발효주 단계별 제조과정

▶ 감귤 가수분해물을 이용한 알코올발효

감귤



가수 및 마쇄



가수분해물 제조

알코올발효



여과

감귤와인



▶ 단식증류기를 이용한 증류과정



▶ 성분 분석

알코올함량 측정



당도 측정



적정산도 측정



pH 측정



색도 및 감색도 분석



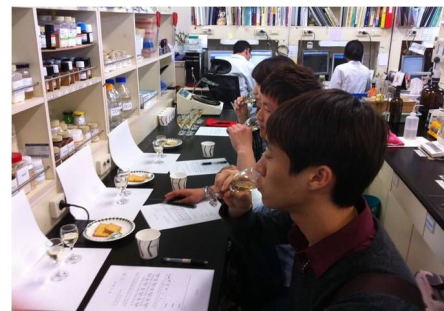
유리당 및 유기산 분석



알코올성분 분석



관능검사



6. 친환경 감귤발효유 개발

세계적으로 발효유의 소비는 증가되고 있는 추세에 있으며, 현대인의 성인병에 대한 우려로 인하여 기능성을 첨가한 발효유에 대한 관심이 더욱 고조있다. 현재 우리나라에서는 분유적체 문제를 해결하여야 하기 위하여 우유소비 증진에 많은 노력을 경주하여야 하는데, 이를 위하여 기능성 발효유를 개발할 수 있는 항암활성 젖산균의 탐색과 탐색균주를 이용한 새로운 기능성 발효유 개발에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있으며 이를 통하여 고품질 축산식품의 생산 및 축산농가의 소득증대에 기여 할 수 있을 것으로 기대된다. 각종 probiotic을 이용한 발효유산균음료의 개발은 꾸준히 진행되고 있으며 그 활용분야도 정장작용, 대장암억제, 간기능개선 등 다양해지고 있다. 본 연구에서는 현대인의 지나친 알콜섭취로 인한 간기능장애를 예방할 수 있는 narirutin이 함유된 감귤과피 추출물을 첨가한 발효유를 개발하고자 하였다.

가. 최적 유산균 선별

친환경 발효주 제조의 경우와 같이 유산균을 이용하여 친환경 감귤 발효유를 제조하고 이들의 발효 중 flavonoids 조성 변화 및 품질특성에 대한 연구를 수행하였다. 우선, 유산균 발효유의 제조를 위하여 원유(96.15%)에 탈지분유(3.85%)를 배합하여 90℃에서 30분간 살균하였으며 유기농 감귤 착즙액은 33°Brix의 농축액을 5% 첨가하였다. 유산균 균주는 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, ABT-L(혼합균주)의 3가지를 사용하여 발효시켰다. 그림 52와 표 38는 유산 발효 후 flavonoids의 조성변화를 보여주고 있으며, 특이하게도 사용된 유산균 모두에서 발효 중 narirutin이 naringenin으로 전환되지 않고 일부의 narirutin이 hesperidin으로 전이됨을 알 수 있었다.

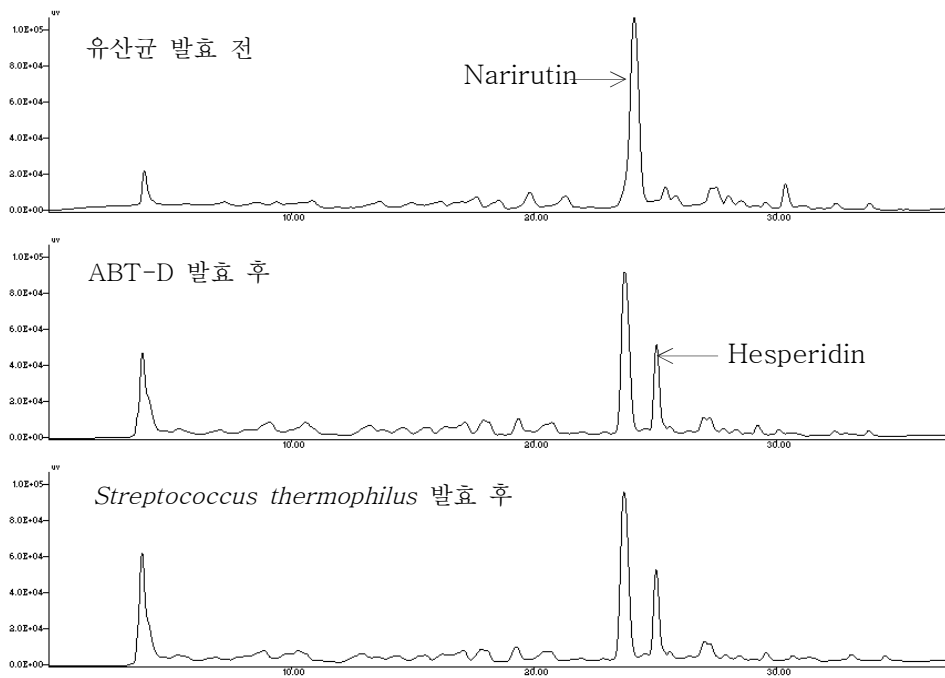


그림 52. 친환경 감귤 발효유의 HPLC chromatogram

표 38. 감귤 발효유 유산균별 flavonoids 함량

	Mole 농도 (mM)	
	Narirutin	Hesperidin
Control	0.090	0.008
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0.097	0.013
<i>Lactobacillus acidophius</i>	0.089	0.014
ABT-L(혼합균주)	0.093	0.013

친환경 감귤을 이용한 발효유의 제조를 위한 기초적 연구를 수행하였는데, 생리 활성이 기대되는 flavonoids의 함량이 친환경(특히 무농약 처리) 감귤에서 일반 감귤에 비해 높은 편이었으나 전체적으로 함량이 미미한 수준이었으며 이들 flavonoid로부터 기대되는 지방간, 알콜성 간질환 등의 예방효과를 갖는 발효식품을 제조하

기위해서는 flavonoids를 무농약 감귤의 과피로부터 추출한 후 발효제품에 첨가하는 방법이 더욱 효과적일 것으로 사료된다.

나. 친환경 감귤추출물을 함유한 발효유제품 개발

감귤 농축착즙액을 첨가하는 것보다 narirutin이 고농도 함유될 수 있도록 감귤과피로부터 추출한 narirutin 물추출물을 호상발효유 발효 전 혹은 발효 후에 첨가하여 제조하였다. 첨가한 narirutin량은 200ppm과 400ppm이 최종제품에 포함될 수 있게 첨가하였으며 표 39는 narirutin 물추출물 0.5%를 발효전과 후에 첨가하였고, 표 40은 narirutin 물추출물 1.0%를 발효전과 후에 첨가하여 배합조성비를 설정하였다.

표 39. Narirutin 물추출물 0.5% 첨가한 딸기발효유의 배합비

단위: %

sample	A	B	C	D	E	F
원유	83.27	81.27	79.27	83.27	81.27	79.27
탈지분유	3.23	3.23	3.23	3.23	3.23	3.23
올리고당	2	2	2	2	2	2
과당	5	5	5	5	5	5
딸기잼	6	8	10	6	8	10
폴라노이드추출액	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
폴라노이드추출액 첨가	발효 전			발효 후		
합계	100	100	100	100	100	100

표 40. Narirutin 물추출물 1.0% 첨가한 딸기발효유의 배합비

단위: %

sample	A	B	C	D	E	F
원유	82.77	80.77	78.77	82.77	80.77	78.77
탈지분유	3.23	3.23	3.23	3.23	3.23	3.23
올리고당	2	2	2	2	2	2
과당	5	5	5	5	5	5
딸기잼	6	8	10	6	8	10
폴라노이드추출액	1	1	1	1	1	1
폴라노이드추출액첨가	발효 전			발효 후		
합계	100	100	100	100	100	100

Narirutin 물추출물을 발효 후에 첨가하여 제조하는 경우, 원유와 탈지분유를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 180~250kgf/cm²의 압력으로 균질화하였다. 90℃에서 5분간 살균하고, 40℃로 냉각시킨 다음 상업균주(ABT-D)을 0.1 중량% 접종하여 최종 pH가 4.4로 감소할 때 까지 배양시킨 다음 교반기로 서서히 교반하면서 배양액을 15℃로 냉각하였다. 발효액에 올리고당, 액상과당, 폴라노이드추출액, 정제수를 첨가하여 혼합한 다음 교반하여 용기에 충전 및 포장하고 5℃의 온도에서 저장하였다(그림 53).

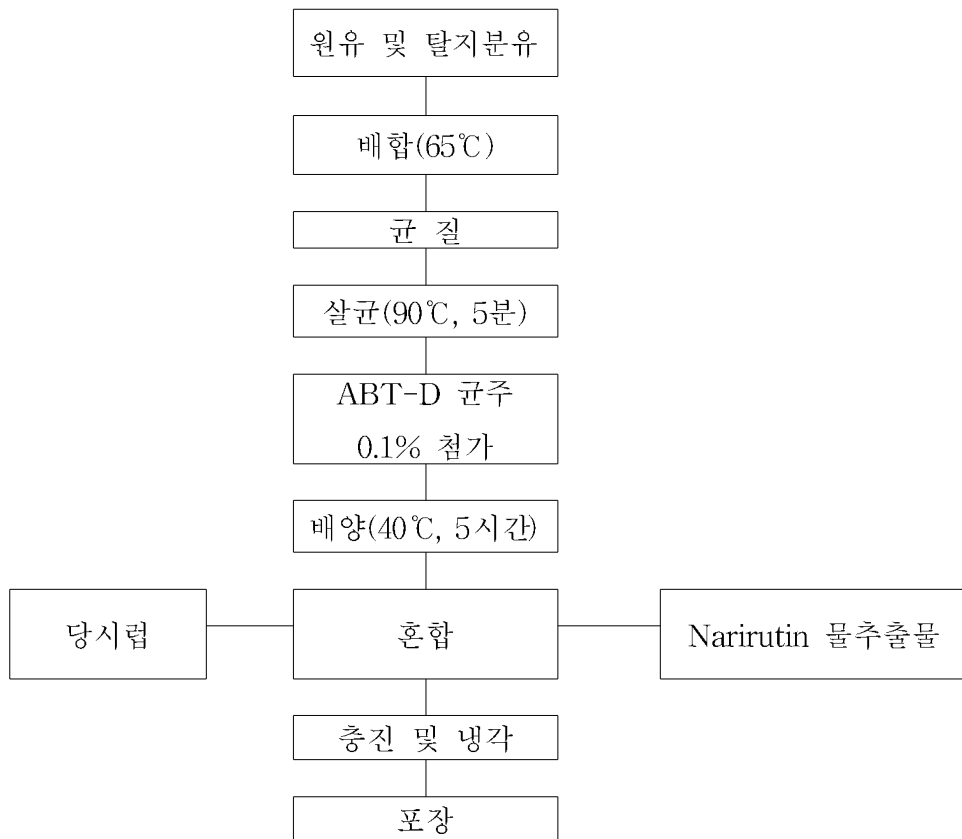


그림 53. 호상발효유의 제조공정도

*ABT-D 균주 : *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus* 로 구성된 혼합균주, Groupe Rhone-poulenc)

우유배지에 narirutin 물추출물을 함께 넣어 발효시킨 경우, 원유, 탈지분유와 플라노이드추출액을 첨가하고 65°C에서 배합하여 완전히 녹인 후 180~250kgf/cm²의 압력으로 균질화하였다. 90°C에서 5분간 살균하고, 40°C로 냉각시킨 다음 상업균주 (ABT-D)을 0.1 중량% 접종하여 최종 pH가 4.4로 감소할 때 까지 배양시킨 다음 교반기로 서서히 교반하면서 배양액을 15°C로 냉각하였다. 발효액에 올리고당, 액상 과당, 정제수를 첨가하여 혼합한 다음 교반하여 용기에 충전 및 포장하고 5°C의 온도에서 저장하였다(그림 54).

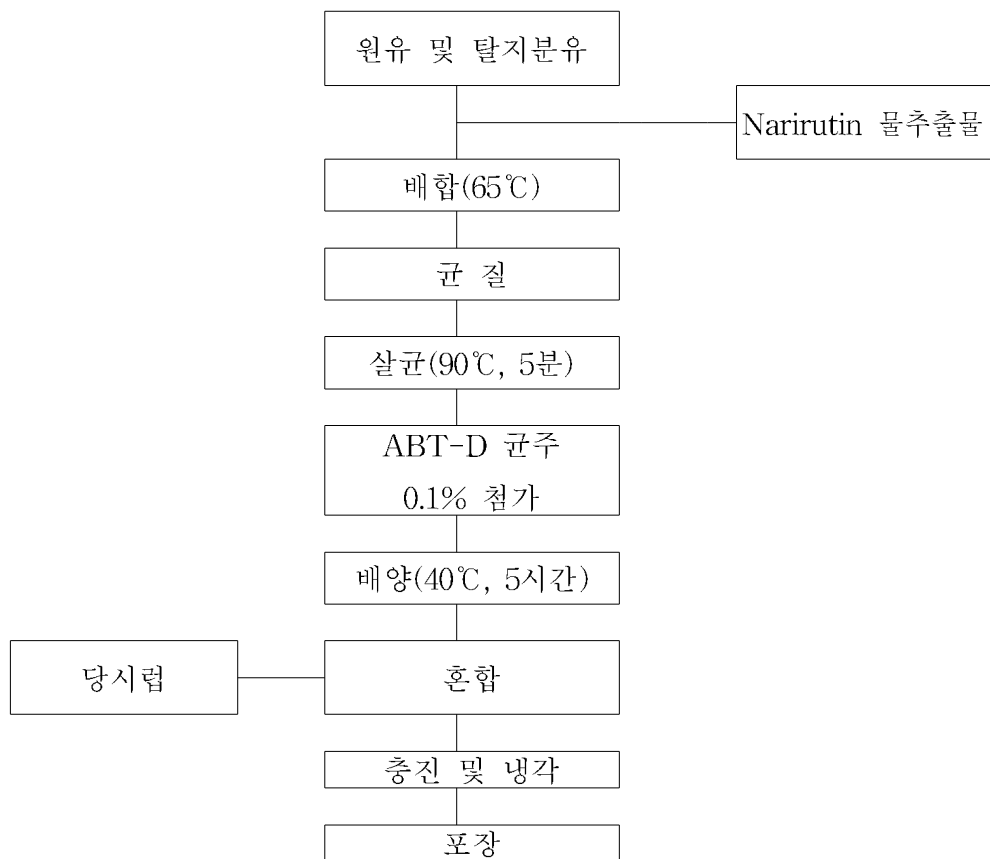


그림 54. 호상발효유의 제조공정도

시제품의 관능검사는 한국식품연구원내의 연구원들로 그림 55와 같은 검사용지를 활용하여 실시하였으며, 제품의 색, 맛, 조직감, 종합적기호도 및 구입의사를 9점 기호척도법으로 실시하여 그 결과를 통계처리에 의한 유의성 검정을 하였다.

관능검사

날짜 : 년 월 일

성명 :

본 시료는 발효유의 관능평가입니다.

본 시료를 시식하신 후 9점 만점으로 아래의 평가기준에 따라 다음 항목에 대하여 평가하여 주시기 바랍니다.

----- 채점기준 -----

관능평가기준

9점:극도로 좋다. 8점:대단히 좋다. 7점:보통으로 좋다. 6점:약간 좋다.

5점:좋지도 싫지도 않다. 4점:약간 싫다. 3점:보통으로 싫다. 2점:대단히 싫다.

1점:극도로 싫다.

시료번호	외관(색)	맛	조직감	종합적기호도	구입의사

그림 55. 친환경 발효유 관능검사 용지

표 41은 플라노이드추출액을 0.5%첨가한 딸기발효유의 관능평가 결과로서 발효 전인 A, B, C 제품보다 발효 후에 첨가한 D, E, F 제품이 우수한 결과를 보였고, 대조구인 시중 발효유와 비교하였을 때 D 제품은 플라노이드추출액의 쓴맛이 남아 있어 맛과 종합적 기호도에 영향을 미치는 것으로 나타났으나 딸기잼 함량이 높을

수록 쓴맛이 많이 masking되었고, 오히려 F제품의 경우 단맛이 강하여 E제품을 선호하는 것으로 나타났다.

표 41. Narirutin 물추출물 0.5% 첨가한 딸기발효유의 관능적 품질평가¹⁾

	외관(색)	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control ²⁾	6.00±1.73 ^{a3)}	6.00±1.00 ^{ab}	6.85±1.34 ^a	6.54±1.05 ^a	6.00±1.22 ^a
A	6.77±0.83 ^a	3.23±0.83 ^d	5.85±1.21 ^a	3.00±0.71 ^d	2.54±1.13 ^c
B	6.69±1.11 ^a	4.46±1.05 ^c	5.85±1.34 ^a	4.38±1.04 ^c	3.77±1.54 ^b
C	6.69±1.89 ^a	5.46±2.22 ^{bc}	6.31±1.97 ^a	5.31±2.39 ^{bc}	5.23±2.39 ^a
D	6.54±1.39 ^a	5.54±1.05 ^b	6.54±0.88 ^a	6.00±0.71 ^{ab}	5.31±1.18 ^a
E	6.85±1.14 ^a	6.69±1.11 ^a	6.69±1.32 ^a	7.00±1.08 ^a	6.46±1.33 ^a
F	6.69±1.44 ^a	6.62±1.33 ^a	6.69±1.38 ^a	6.46±1.51 ^a	6.31±1.44 ^a

¹⁾ 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값

²⁾ N유업 떠먹는 불가리스 딸기맛 제품

³⁾ $p > 0.05$

표 42는 플라노이드추출액을 1.0%첨가한 딸기발효유의 관능평가 결과로서 플라노이드추출액을 0.5%첨가한 제품과 비슷하게 발효 전 제품보다 발효 후에 첨가한 제품이 우수한 결과를 보였다. 다만 발효전의 C제품이 D제품보다 맛과 종합적 기호도가 높은 이유는 딸기잼 함량이 높기 때문에 쓴맛이 많이 masking되었기 때문으로 보여지며, 0.5%첨가한 제품과 달리 F제품이 가장 선호한 결과를 보인 이유는 플라노이드추출액의 쓴맛이 E제품에서도 미약하게나마 있기 때문으로 보여 진다.

표 42. Narirutin 물추출물 1.0% 첨가한 딸기발효유의 관능적 품질평가¹⁾

	외관(색)	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control ²⁾	7.23±1.74 ^{a3)}	5.61±1.04 ^b	6.23±1.17 ^a	5.46±1.27 ^{bc}	5.53±1.27 ^{abc}
A	7.31±1.03 ^a	3.46±1.20 ^c	6.15±1.34 ^a	3.85±1.21 ^d	3.46±1.39 ^d
B	7.15±1.14 ^a	4.77±1.24 ^b	6.31±1.32 ^a	5.15±1.14 ^c	4.62±1.33 ^c
C	7.31±1.03 ^a	5.46±1.27 ^b	6.54±1.05 ^a	5.46±1.27 ^{bc}	5.46±1.20 ^{abc}
D	7.00±1.47 ^a	5.23±1.36 ^b	6.23±1.17 ^a	5.15±1.21 ^c	5.15±2.03 ^{abc}
E	7.00±1.29 ^a	5.77±1.2 ^{ab}	6.62±1.04 ^a	6.23±0.93 ^{ab}	5.85±1.41 ^{ab}
F	7.38±0.87 ^a	6.69±1.03 ^a	6.69±0.95 ^a	6.77±0.83 ^a	6.54±1.05 ^a

1) 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값

2) 남양유업 떠먹는 불가리스 딸기맛 제품

3) $p > 0.05$

이러한 결과들을 바탕으로 narirutin 첨가 알콜성 간질환 예방용 발효유 시제품을 제조하였다(그림 56).



그림 56. Narirutin 첨가 알콜성 간기능 개선용 발효유 시제품

그림 57과 58은 산업적 생산을 위한 친환경 감귤발효유 생산공정(중대형 규모) 및 설비모델을 제시하였다.

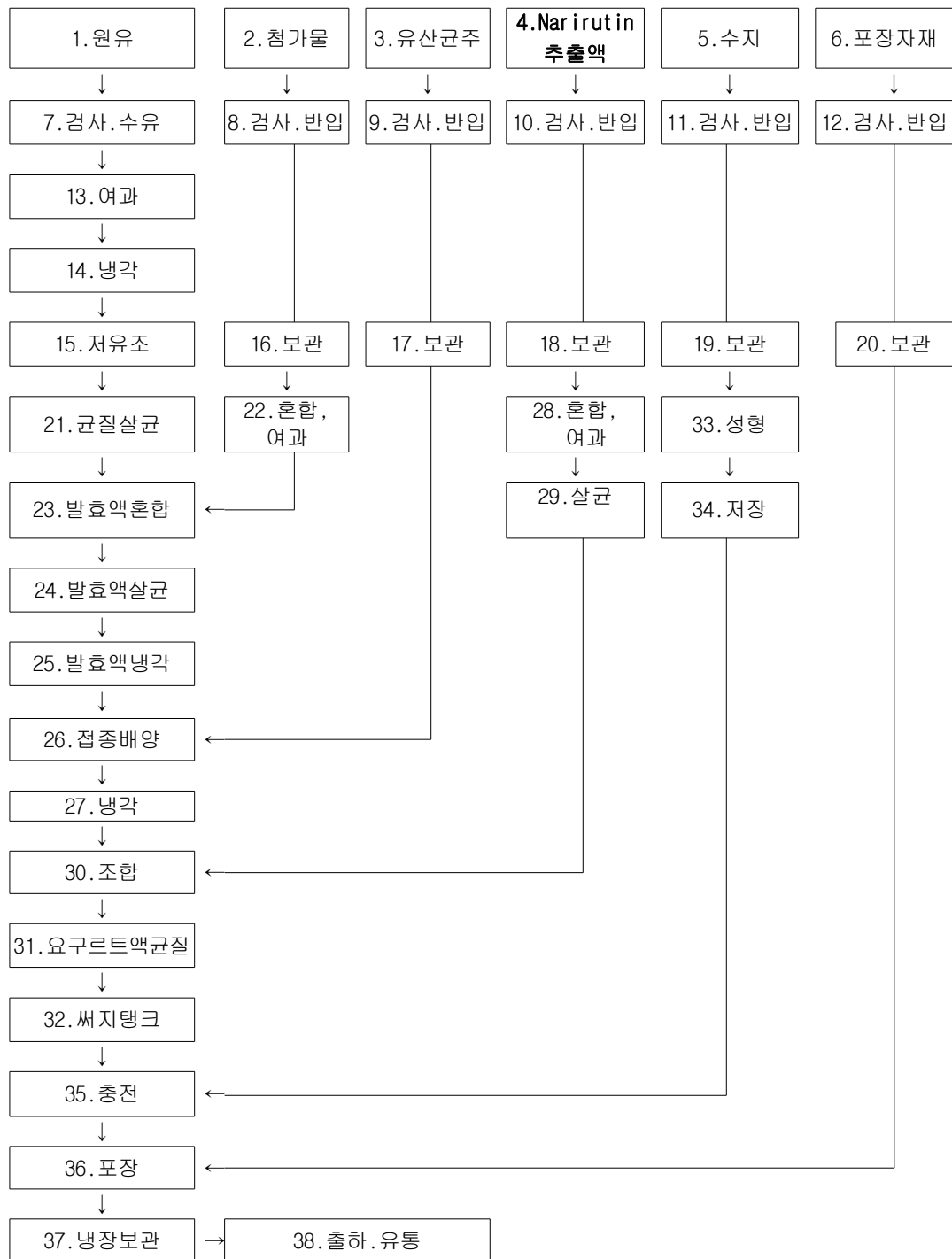


그림 57. 친환경 감귤 발효유 산업적 생산 공정도

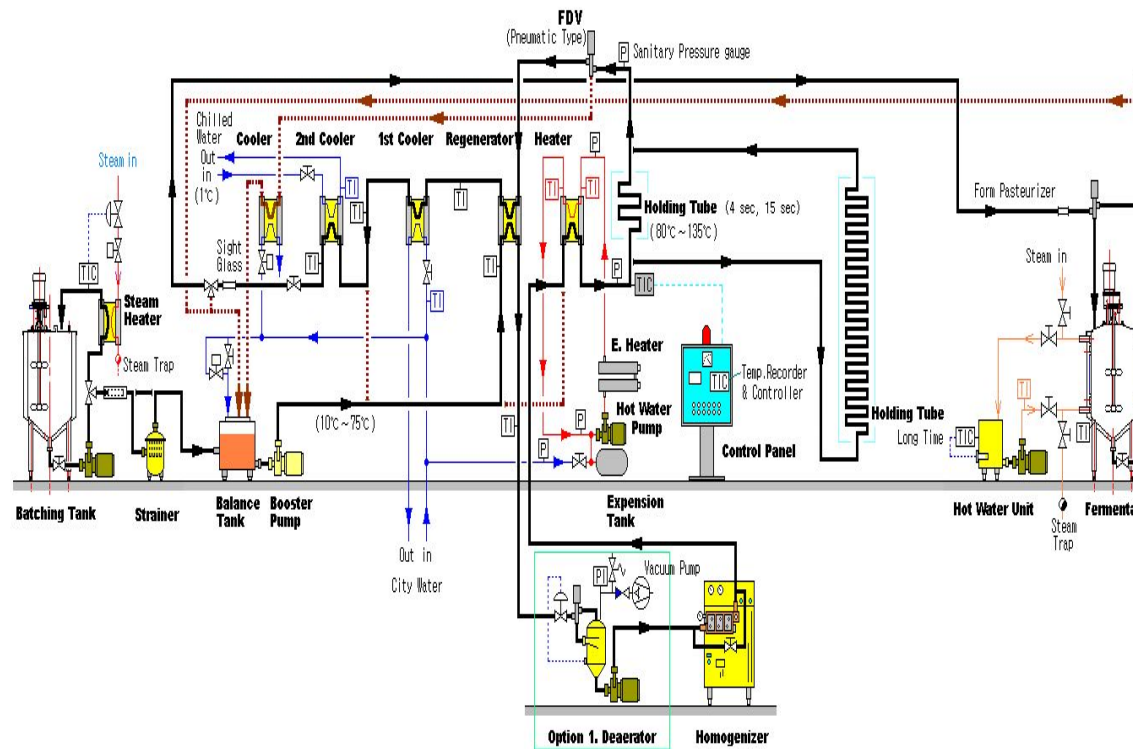


그림 58. 친환경 감귤 발효유 산업적 생산 설비모델(Plate type)

발효유 자체가 간기능 보호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 본 연구를 통하여 알려진 감귤과피 추출물의 알콜성 간손상억제 기능을 부가한 친환경 감귤발효유의 개발은 산업화공정이 용이하여 상품화가 조속한 시일안에 가능할 것으로 사료된다.

4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연도	세부연구개발 목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도		
1차 연도	2008	친환경 감귤을 껍질째 알코올발효시 최적의 전처리조건 및 최적 발효균주 선별	100	친환경 감귤농축액제조 및 이를 이용한 발효주 제조 최적 발효균주 및 flavonoid의 aglycon화를 위한 전처리효소 선정		
		친환경 감귤을 껍질째 유산발효시 최적의 전처리조건 및 최적 발효균주 선별	100	친환경 감귤 농축액 및 과육과피를 이용한 최적 발효유 제조조건 설정 유산발효 중 flavonoids의 변환에 관한 연구		
		친환경 감귤 flavonoids의 특성 연구	100	친환경 감귤 flavonoids의 동정, 조성 및 부위별 함량비교 연구	100	친환경 감귤 flavonoids의 동정, 조성 및 부위별 함량비교 연구
				발효제품에 대한 flavonoids 변환에 관한 연구		발효제품에 대한 flavonoids 변환에 관한 연구
				과피로부터 narirutin 추출물 제조		과피로부터 narirutin 추출물 제조
				감귤 flavonoids의 항산화성, HMG-CoA reductase activity 저해활성 등 조사	감귤 flavonoids의 항산화성, HMG-CoA reductase activity 저해활성 등 조사	
2차 연도 (2009)	2009	Narirutin 추출물의 친환경 감귤발효제품으로의 적용성 및 간기능 개선에 관한 동물실험	100	친환경 감귤과피로부터 최적의 narirutin 추출공정 개발 및 발효제품으로의 투입을 위한 전처리 기술 개발		
				Narirutin 추출물이 함유된 감귤발효제품의 동물실험을 통한 알콜성 간기능 개선 효능 연구	Narirutin 추출물이 함유된 감귤발효제품의 동물실험을 통한 알콜성 간기능 개선 효능 연구	
		친환경 감귤 발효주 최적 생산조건 설정	100	친환경 감귤와인 제조를 위한 최적 착즙조건, 발효조건 및 기호성 향상을 위한 배합비 등 설정	친환경 감귤와인 제조를 위한 최적 착즙조건, 발효조건 및 기호성 향상을 위한 배합비 등 설정	
				Narirutin 추출물의 최적 첨가량 설정 연구	Narirutin 추출물의 최적 첨가량 설정 연구	
		친환경 감귤 발효유 최적 생산조건 설정	100	감귤발효유 제조를 위한 최적 발효공정 및 배합비 설정	감귤발효유 제조를 위한 최적 발효공정 및 배합비 설정	
				Narirutin 추출물의 최적 첨가량 설정 연구	Narirutin 추출물의 최적 첨가량 설정 연구	

구분	연도	세부연구개발 목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
3차 연도	2010	감귤가공부산물인 과피로부터 narirutin추출물 최적 소재화 공정설정	100	친환경 감귤과피로부터 최적의 narirutin 생산공정 설정 및 산업화 원천기술 확보 Narirutin 추출물의 기능성 식품소재로서의 적용성(쓴맛 감소를 위한 당부가공정 개발 등)에 관한 연구 Narirutin 추출물(narirutin 순도 70%)의 알콜성 간질환 억제효능 연구 동물 실험)
		감귤와인 및 리큐르의 대량생산에 적합한 제조공정 확립 및 주질 표준화 방법 설정	100	친환경 기능성 강화 감귤와인 제조공정 확립 소비자 선호도에 따른 친환경 감귤와인의 최종 제품 품질규격화
		감귤발효유의 대량생산에 적합한 제조공정 확립 및 품질규격화	100	소비자 기호도 조사를 통한 최적 narirutin 첨가량 및 향미제 배합비 설정 Narirutin첨가 발효유 제조를 위한 최적 생산공정 설정 및 산업화 연구
최종		감귤껍질에 풍부하게 함유된 bio-flavonoids의 비배당화를 유도하고자 친환경 감귤을 이용하여 감귤껍질째 알코올발효 또는 유산발효시킴으로서 간 기능 개선효능을 가진 감귤주 및 감귤발효유를 제조함	100	감귤껍질로부터 narirutin의 경제적 분리·정제법 확립을 통하여 알콜성 간손상을 예방할 수 있는 건강식품소재 개발의 기초를 확립하였고 이를 이용한 감귤발효제품을 개발하여 건강식품개발 다양화 및 국민건강증진에 기여할 수 있을 것으로 기대됨

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

○ 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

본 연구를 통해 개발된 narirutin 추출물의 알콜 간손상 예방 관련 기능성 원료화를 위하여 참여기업인 (주)일해에서 친환경 감귤과피를 대량생산할 수 있는 2012년 이후에 본격적인 최적화 공정 등을 설정한 후, 기술이전 하고자 추진중이며 또한 국내 또는 국외의 기능성식품 생산업체에도 기술이전을 적극 추진하여 감귤과피 부산물의 고부가가치화를 산업적으로 실현하고자 한다.

○ 특히, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

본 연구를 통하여 개발된 narirutin 추출물 생산조건과 기능성에 대하여 Food Chemistry에 투고하여 현재 수정중이며 2차 동물실험결과도 2011년말까지 Food Chemistry에 게재될 수 있도록 논문투고를 준비하고 있다. 감귤과피로부터 flavonoids 추출과 기능성에 대하여 국내특허를 출원한 바 있으며 금년말까지 narirutin의 알콜성 간질환 예방효능에 대한 국내특허를 출원할 예정이다. 감귤발효주에 관한 연구 중 일부는 식품영양과학회에 게재되었으며, 현재 국내학술지에 1편 투고준비 중이다.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 국내외의 임상시험 결과

- 플라보노이드의 대사체는 오렌지 주스 소화 3시간 경과 후 혈액내에서 발견되어 5~7시간에 최고치에 다다랐고 24시간 경과 후에는 검출되지 않았으며, 1 L의 주스를 섭취시 0.2 mol/L의 나리루틴이 검출되었고 약 24시간 후에 뇨로 7.91%가 배출되었음(2003, European Journal of Clinical Nutrition, 57, 235-242)

2. 학술지 발표 결과

- 알러지유발 NC/Nga mice 실험에서 0.1, 1, 10 mg/kg/b.w.의 용량으로 투여했을 때, IL-4와 IgE의 증가를 감소시킴으로써 항염증 효능을 확인하였음(2007, Clinical and experimental pharmacology and physiology. 34(8), 776-770)
- 히스타민과 DNFB으로 대식세포와 피부에 각각 알러지를 유발시킨 모델에 narirutin, hesperidin, naringin, neohesperidin 4종의 감귤유래 플라보노이드를 처리한 결과 미숙과에서 얻은 플라보노이드 추출물이 숙성한 감귤에서 얻은 플라보노이드에 비해 높은 항러지 효능을 나타냈음(2004, Nat med, 58(6), 284-294)
- H1N1 Neuraminidase를 대상으로 기존 항바이러스제 및 식물대사체, 아연 및 여러 화학물질을 대상으로 항바이러스 후보물질 스크리닝을 실시한 결과 에스페리딘의 경우 ARG118, ARG152, TRP179, GLU228, GLU278, ARG368와 수소결합을 형성하고 나리루틴은 H1N1 virus의 ARG152, TRP179, and ARG368의 부분과 수소결합을 함으로써 H1N1 virus의 활성을 억제시키므로 좋은 항H1N1제재로 이용이 가능할것으로 기대함(2010, Medical chemistry research, 19(6))
- mandarin 9종, Satsume mandarin 4종, Hybrid mandarin 3종, Navel orange 7종, Common orange 2종과 Pigmented orange 등의 citrus류 펄프에 함유된 플라보노이드 함량을 satsume 그룹이 27.6 mg/100 g 의 높은 나리루틴을 함유하는 것으로 연구되었음(2008, Journal of Food Composition and Analysis, 21, 377-381)

제 7 장 참고문헌

1. Koh JS, Koh NK, Kang SS. 1989. Citrus Wine-making from mandarin orange produced in Cheju island. *J Korean Agric Chem Soc* 32: 416-423.
2. Li C, Liu J, Di D, Jiang S. 2008. Analysis of three flavonoids in *oxytropis kansuensis* bunge by RP-LC - DAD coupled with weighted least-Squares linear regression. *Chromatographia* 68: 9-10.
3. Park WM, Park HG, Rhee SJ, Lee CH, Yoon KE. 2002. Suitability of domestic grape, cultivar campbell's early for production of red wine. *Korean J Food Sci Technol* 34: 590-596.
4. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. 1999. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J Agric Food Chem* 47: 3565-3571.
5. Cha JY, Cho YS. 2001. Biofunctional activities of citrus flavonoids. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 44: 122-128.
6. Frydoonfa HR, McGrath DR, Spigelman AD. 2003. The variable effect on proliferation of a colon cancer cell line by the citrus fruit flavonoid naringenin. *Colorectal Dis* 5: 149-152.
7. Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 130: 1695-1699.
8. Ahn SC, Kim MS, Lee SY, Kang JH, Kim BH, Oh WK, Kim BY, Ahn JS. 2005. Increase of bioactive flavonoid aglycone extractable from Korean citrus peel by carbohydrate-hydrolysing enzymes. *Korean J Microbiol Biotechnol* 33: 288-294.
9. Roh HI, Chang EH, Joeng ST, Jahng KY. 2008. Characteristics of fermentation and wine quality. *Korean J Food Preserv* 15: 317-324.
10. Kim YS, Jeong DY, Shin DH. 2008. Optimum fermentation conditions and fermentation characteristics of mulberry (*Morus alba*) wine. *Korean J Food Sci Technol* 40: 63-69.
11. Kim JS, Kim SH, Han JS, Yoon BT, Yook C. 1999. Effects of sugar and yeast addition on red wine fermentation using campbell early. *Korean J*

- Food Sci Technol* 31: 516-521.
12. Hwang Y, Lee KK, Jung GT, Ko BR, Choi DC, Choi YG, Eun JB. 2004. Manufacturing of wine with watermelon. *Korean J Food Sci Technol* 36: 50-57.
 13. Cho KM, Lee JB, Kahng GG, Seo WT. 2006. A study on the making of sweet persimmon (*Diospyros kaki*, T) wine. *Korean J Food Sci Technol* 38: 785-792.
 14. Lee HB, Yang CB, Yoo TJ. 1972. Studies on the chemical composition of some fruit vegetable and fruits in Korea (I). *Korean J Food Sci Technol* 4: 36.
 15. Woo KL, Lee SH. 1994 A study on wine-making with dried persimmon produced in Korea. *Korean J Food Sci Technol* 26: 204-212.
 16. Choi HS, Kim MK, Park HS, Shin DH. 2005. Changes in physicochemical characteristics of bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wine during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 37: 574-578.
 17. Park WM, Park HG, Rhee SJ, Kang KI, Lee C.H, Yoon KE. 2004. Properties of wine from domestic grape, *vitis labrusca* cultivar. 'campbell's early', fermented by carbonic maceration vinification process. *Korean J Food Sci Technol* 36: 773-778.
 18. Rhim JW, Kim DH, Jung ST. 1997. Production of fermented honey wine. *Korean J Food Sci Technol* 29: 337-342.
 19. Nam KD. 2000. The important of processes for efficient production of alcohol. *Kor J Appl Microbiol Bioeng* 13: 57-59.
 20. 장동석, 신동화, 정덕화, 김창민, 이인선. 2002. 식품위생학. 정문각, p 133.
 21. Eun JB, Jung YM, Woo GJ. 1996. Identification and determination of dietary fibers and flaonoids in pulp and peel of korean tangerine(*Citrus aurantium* var.). *Korean J Food Sci Technol* 28: 371-377.
 22. Choi HD, Kim SS, Kim KT, Hong HD, Kim SH. 2002. Effect of pressing methods on the quality of grape juices. *Korean J Food & Nutr* 15: 203-208.
 23. Park YK, Kang YH. 2004. Characteristics of suspension containing single cells from watermelon and muskmelon treated with cell separating enzymes. *Korean J Food Sci Technol* 36: 58-63.

24. Kim EJ, Kim YH, Kim JW, Lee HH, Ko YJ, Park MH, Lee JO, Kim YS, Ha YL, Ryu CH. 2007. Optimization of fermentation process and quality properties of wild grape wine. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 366-370.
25. Iverson J. 2000. Home wine making step by step: A guide to fermenting wine grapes. 3rd ed. Stonemark publishing Co, Medford, Massachusetts. p. 155-125
26. Kang KH. 2004. Studies on the production of citrus wine and brandy using Jeju citrus. Ph D Thesis, DongA University, Pusan.
27. Yang YT, Kim MS, Hyun KH, Kim YC, Koh JS. 2008. Chemical constituents and flavonoids in citrus pressed cake. *Korean J Food Preserv* 15: 94-98.
28. Song EY, Choi YH, Kang KH, Koh JS. 1998. Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of cheju Citrus fruits according to harvest date. *Korean J Food Sci Technol* 30: 306-312.
29. Kim ML, Choi KH. Sensory characteristics of Citrus vinegar fermented by *Gluconacetobacter hansenii* CV1. *Korean J Food cookery Sci* 21: 243-249.
30. Food Code. 2002. Korea Food Industry Association, Korea. p. 202
31. Jeong YJ, Kim HI, Whang K, Lee OS, Park NY, 2002. Effects of pectinase treatment on alcohol fermentation of persimmon. *J Koran Soc Food Sci Nutr* 31: 578-582.
32. Park CS, Lee TS. 2002. Quality characteristics of Takju prepared by wheat flour *Nuruks*. *Korean J Food Sci Technol* 34: 296-302.