

발 간 등 록 번 호
11-1541000-001221-01

수출용 유자 및 가공품 개발과 부산물 활용기술 개발
(Development of Processed Citron Products for
Export and By-product Application Technology)

연구 기관
동국대학교

농림수산식품자료실



0004585

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수출용 유자 및 가공품 개발과 부산물 활용기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 3 월 2 일

주관연구기관명 : 동국대학교

주관연구책임자 : 이 광 근

세부연구책임자 : 이 광 근

협동연구기관명 : 동국대학교

협동연구책임자 : 이 승 주

협동연구기관명 : 동국대학교

협동연구책임자 : 박 장 서

협동연구기관명 : 한국식품연구원

협동연구책임자 : 정 진 응

협동연구기관명 : 세종대학교

협동연구책임자 : 고 상 훈

요 약 문

I. 제 목

수출용 유자 및 가공품 개발과 부산물 활용기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

유자(*Citrus junos*) 및 유자차는 현재 연간 2,500만불 이상 수출되고 있고 2013년까지 5,500만불 이상 수출 목표인 농림수산물식품부의 수출전략품목이다. 효자 수출품이자 영양과 기호성이 뛰어난 국산 유자 및 가공품의 수출을 강화하기 위해 다음 5가지 연구목표를 두고 사업을 진행하였다.

1. 수출용 유자의 위해 모니터링 및 제어시스템 구축: 농약독성 및 잔류량 평가에 중점을 두어 수출용 유자의 친환경 생산기술 최적화 연구를 수행하였다. 이를 위해 고흥군을 중심으로 생산된 유자에 대한 농약 잔류실태 모니터링을 실시하여 위해평가를 실시하였다. 3년간 260시료를 대상으로 8종의 농약 모니터링을 실시하고 위해평가를 시행하였다.
2. 수출용 유자의 저장유통 기술 개발: 저장유통 중 발생할 수 있는 갈변, 신선도 저하 등을 방지할 수 있는 기술과, 가공 현장의 위해를 예방하기 위한 시스템을 개발하였다. 이를 위해 수출용 유자의 저장유통을 위한 multicomponent 식용 코팅기술을 개발하고 유자가공의 위생관리시스템 구축하였다.
3. 유자의 기능성 화장품 개발: 고흥산 유자의 과피, 씨앗 및 과육 부위별 활성 성분 분석 및 피부기초효능 조사하여 발효가공 및 생물전환기술을 이용한 신규 기능성 화장품 소재개발 및 개발된 화장품 소재를 이용한 화장품 브랜드 개발 및 관련 화장품 사업화를 실시하였다.
4. 유자의 미생물학적 안전성 확보 및 위생적 품질유지를 위한 실용화 기술 개발: 수출용 유자 등 국내산 과채류의 초기품질 유지(초기 미생물 제거 및 갈변 등의 억제)를 위한 방안으로 살균력이 우수하고 유효염소 화합물 함량을 최소화할 수 있는 살균소독수 제조시스템(전기분해수 및 이산화염소수)을 활용한 살균 및 세척 등의 전처리 기술을 개발·적용할 수 있도록 하여 수출용 유자의 잔류농약, 이물질, 중금속 및 미생물 제거 등 비가열식품의 미생물학적 안전성 확보 및 위생적 품질유지를 위한 실용화 기술을 개발하였다.

5. 유자의 고기능성 소재화 및 가공품 개발 :고기능성 유자 소재 개발을 위한 친환경적 천연공법(효소적 및 물리적)을 확립하고 이를 통하여 얻어진 유자 소재의 물리적 특성, 가공적성 분석, 및 식품 응용성 평가를 위한 모델시스템을 구축하였다. 또한 캡슐화기술(encapsulation)을 이용하여 유자 기능성물질의 방출특성을 조절하고 안정성과 생체이용률을 향상시킬 수 있는 고기능 소재를 개발하였다. 이를 통하여 유자가 가진 고유의 생리활성이 극대화된 고부가가치 기능성 유자 가공 제품을 개발하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 최종 목표는 연간 2,500만불 이상 수출되는 효자 수출품이자 영양적으로 우수한 유자의 수출을 강화하기 위해 1) 살균공정기술, 신선도유지기술, 갈변억제기술 등의 유자의 가공/저장/유통 기술 개발, 2) 유자 및 유자폐기물을 이용한 기능성 식품/향장 소재 개발 및 다양한 고부가가치 유자가공 제품을 개발하는 것이다. 이를 통하여 수출용 유자 원료 및 고부가가치 가공품을 생산하고 유자 및 유자 부산물의 활용성 증대할 수 있다. 이러한 목표를 달성하기 위한 개별 세부목표 및 내용은 아래와 같다.

1. 1세부 : 농약독성 및 잔류평가 기술 개발 및 운용

가. 1차년도 내용 및 범위

시료전처리 최적화 및 회수율 실험을 실시하였고 8종 농약(Chlorpyrifos, Phosalone, Prothiofos, Deltamethrin, Spirodiclofen, Acequinocyl, Benomyl, Thiophante-methyl)을 대상으로 100시료에 대한 잔류실태를 조사하였다.

나. 2차년도 내용 및 범위

1차년도에서 확립된 최적화 분석조건으로 유자의 잔류농약 모니터링을 실시하였다. 고흥군의 유자 재배 농가 중 무작위로 선정한 농가에서 2009년 산 일반재배 유자 50종과 친환경 재배 유자 30종에 대한 8종 농약의 잔류실태를 조사하였고, 1차년도 연구를 통하여 최적화된 분석 방법을 이용하여 한성푸드에서 생산된 2010년 산 유자차 25종을 분석 하였다.

다. 3차년도 내용 및 범위

1차년도에서 확립된 최적화 분석조건으로 유자의 잔류농약 모니터링을 실시하였다. 고흥군의 유자 재배 농가 중 무작위로 선정한 농가에서 2010년 산 일반재배 유자 50종과 친환경 재배 유자 30종에 대한 8종 농약의 잔류실태를 조사하였고, 한성푸드에서 생산된 2011년 산 유자차 25종을 분석 하였다. 1차년도, 2차년도, 3차년도 잔류실태를 바탕으로 국내 생산 유자와 유자차에 대한 위해도 평가를 실시하였다.

2. 2세부: 수출용 유자의 저장유통을 위한 multicomponent 식용 코팅 기술 개발 및 유자가공의 위생관리 시스템 구축

가. 1차년도 내용 및 범위

수용성계/지용성계 target 물질을 함유한 multilayer 코팅 모델계를 분석한 결과, multicomponent 코팅이 더 실용적으로 나타났다. Citrus계 식용 코팅제로부터 레몬의 저장에 최적인 multicomponent 식용 코팅을 개발하였다 (국내 유자는 11월 경에 수확되어서 할 수 없이 레몬을 사용하였음).

나. 2차년도 내용 및 범위

1차년도 레몬실험으로부터의 결과를 유자에 적용하여 역시 최적의 식용코팅 물질 조성을 선발하였다. 또한 Kinetics 모델개발 및 저장수명과 품질예측과 코팅 유자의 포장 및 수송환경 조건을 표준화하였다.

다. 3차년도 내용 및 범위

유자 가공현장을 분석하여 유자 가공의 SSOP를 구축하였고 위해분석, CCP의 선정 CCP plan 구축, CCP plan 관리 및 점검기록, 위해 개선 검증의 HACCP plan을 구축하였다.

3. 3세부: 유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품 개발 및 사업화를 위한 기술 개발

가. 1차년도 내용 및 범위

유자 부위별 추출조건을 확립하고 Hesperidin, Limonoid, total polyphenol 분석하였으며 향노화 효능 평가와 타이로시나제 저해효능을 측정하였다. 유자에 함유되어 있는 성분 별 추출물에 대한 생물학적 rapid screening기법 구축 및 기능성 분획물 선발 하였다. 유자 추출물의 항자외선 생물학적 활성에 대

해 자외선 손상을 입은 세포의 손상 완화에 대한 효과를 확인하였다.

나. 2차년도 내용 및 범위

유자추출물의 미생물 발효조건 확립과 발효과정 분석 및 HPLC에 의한 변화를 추적하였다. 발효 후 hesperitin 및 limonoid 함량 변화 분석을 실시하였다. 유자발효물의 피부생리활성을 단순 추출물과 비교분석하였고, 유자 기능성 작용에 대한 메커니즘 규명 및 화장품 소재 기능성을 평가 하였다. 연구결과 유자추출물 및 발효물에서 항노화, 미백, 보습기능을 비롯하여 UVA 및 UVB에 의한 손상으로부터 피부를 보호할 수 있는 효능을 확인하였다.

다. 3차년도 내용 및 범위

유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품개발 및 사업화를 위한 기술개발을 실시하였다. 피부세포의 사멸에 대한 완화 효과에 대한 신호전달기전을 규명하고, 이를 바탕으로 유자 화장품의 기능성을 규명하였다. 2차 년도에 이어 추가적으로 새로운 피부생리활성으로 지질세포분화억제 효능이 유자 과피의 물 추출물에서 확인하였으며 이를 활용한 화장품제형 개발과 시제품을 완성하였다.

4. 4세부: 살균소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 수출용 유자의 통합형 세척/살균/물기제거 시스템 개발

가. 1차년도 내용 및 범위

수출용 유자의 살균 및 세척시스템을 위한 요소기술을 개발하여 이산화염소수 및 전기분해수 최적 생성 조건 설정 및 물리화학적 특성을 분석하였고 구형 type 표면/세척 및 물기 제거시스템 설계 및 성능을 평가하였다.

나. 2차년도 내용 및 범위

처리수를 활용한 통합형 세척/살균/물기 제거 시스템 개발을 하여 세정·살균수로서의 활용을 위한 살균소독수의 효과를 규명하였으며 시작품 제작 및 성능평가를 분석하였다.

다. 3차년도 내용 및 범위

통합형 세척/살균/물기 제거시스템의 현장적용을 위한 실증 시험을 거쳤으며 수출용 유자 등 구형 type 품목의 품질유지 성능 검증하고 실용화를 위한 제품의 사양 확정 및 표준 설계 제작을 하였다.

5. 5세부 : 수출용 고부가가치 유자가공제품 개발

가. 1차년도 내용 및 범위

유자 및 폐기물을 이용하여 기능성 물질을 추출하고 마이크로·나노캡슐 소재화를 하였으며, 유자의 식이섬유(펙틴 등) 추출을 위한 효소적/물리적 복합처리 천연공법기술을 최적화하였다.

나. 2차년도 내용 및 범위

1차년도에서 추출한 유자 oleoresin 및 유자 주스를 이용하여 피로회복용 유자젤 식품을 개발하였고, 추출된 유자 펙틴 분말의 이화학적 특성, 유변학적 유동특성, 식품 성분들과의 상호작용을 평가하였다.

다. 3차년도 내용 및 범위

본 연구에서 추출을 통해 얻은 유자 펙틴과 유자 분말로 펙틴필름을 제조하여 기능성 성분의 용출특성과 시스템의 안정성을 평가하였으며, 유자 펙틴을 지방 대체 소재로서 활용한 저지방, 저칼로리 제품을 제조하고 이화학적 특성 및 텍스처 분석을 통한 식품학적 품질을 평가하였다.

IV. 연구개발결과

1세부 : 농약독성 및 잔류평가 기술 개발 및 운용

1. 일반재배유자 및 친환경재배유자 분석 결과

분석시료는 고흥군의 16개 재배 단위에서 생산된 일반유자 50시료와 친환경재배 유자 30시료를 매년 샘플링하여 분석하였다.

가. 2009년 일반재배유자 및 친환경재배유자 분석 결과

Table 1-1. Ratio of pesticide-detected yuza produced in 2009 to total samples and their concentrations

Pesticide	Detected in Conventional Culture Yuza ¹	Pesticide Concentration (ppm)	Detected in Environment ally-Friendly Culture Yuza	Concentration (ppm)
Chlorpyrifos	0/50	N.D. ²	0/30	N.D.
Prothiofos	0/50	N.D.	0/30	N.D.
Phosalone	0/50	N.D.	0/30	N.D.
Deltamethrin	0/50	N.D.	0/30	N.D.
Acequinocyl	0/50	N.D.	0/30	N.D.
Spirodiclofen	16/50	N.D. $\sim 1.889 \pm 0.923$	8/30	N.D. $\sim 0.801 \pm 0.485$
Carbendazim	36/50	N.D. $\sim 5.148 \pm 1.152$	13/30	N.D. $\sim 2.910 \pm 0.887$

¹Higher than LOQ

²N.D.: value at or below the limit of detection

나. 2010년 일반재배유자 및 친환경재배유자 분석 결과

Table 1-2 Number of detected sample and concentrations of pesticides in Yuza produced in 2010

Pesticide	Detected in Conventional Culture Yuza ¹	Pesticide Concentration (ppm)	Detected in Environment ally-Friendly Culture Yuza	Concentration (ppm)
Chlorpyrifos	0/50	N.D.	0/30	N.D.
Prothiofos	0/50	N.D.	0/30	N.D.
Phosalone	0/50	N.D.	3/30	N.D.
Deltamethrin	0/50	N.D.	0/30	N.D.
Acequinocyl	0/50	N.D.	0/30	N.D.
Spirodiclofen	16/50	N.D. $\sim 1.889 \pm 0.932$	0/30	N.D.
Carbendazim	36/50	N.D. $\sim 5.148 \pm 1.152$	8/30	N.D. $\sim 0.340 \pm 0.011$

¹Higher than LOQ

²N.D.: value at or below the limit of detection

2. 국내유통 및 수출용 유자차 분석 결과

가. 2009년 국내유통 및 수출용 유자차 분석 결과

Table 1-3. Number of detected sample and concentrations of pesticides in Yuza tea produced in 2009

Pesticide	Ratio of the number of detected samples and total samples ¹	Concentration (ppm)
Chlorpyrifos	0/50	N.D. ²
Prothiofos	0/50	N.D.
Phosalone	0/50	N.D.
Deltamethrin	0/50	N.D.
Acequinocyl	2/50	N.D. ~ 0.525 ± 0.226
Spirodiclofen	0/50	N.D.
Carbendazim	12/50	N.D. ~0.537 ± 0.501

¹Higher than LOQ

²N.D.: value at or below the limit of detection

나. 2010년 국내유통 및 수출용 유자차 분석 결과

Table 1-4. Number of detected sample and concentrations of pesticides in Yuza tea produced in 2010

Pesticide	Ratio of the number of detected Yuza Tea and total samples ¹	Concentration (ppm)
Chlorpyrifos	0/25	N.D. ²
Prothiofos	0/25	N.D.
Phosalone	0/25	N.D.
Deltamethrin	0/25	N.D.
Acequinocyl	0/25	N.D.
Spirodiclofen	0/25	N.D.
Carbendazim	8/25	N.D. ~0.078 ± 0.135

¹Higher than LOQ

²N.D.: value at or below the limit of detection

다. 2011년 국내유통 및 수출용 유자차 분석 결과

Table 1-5. Number of detected sample and concentrations of pesticides in Yuza tea produced in 2011

Pesticide	Ratio of the number of detected Yuza Tea and total samples ¹	Concentration (ppm)
Chlorpyrifos	0/25	N.D. ²
Prothiofos	0/25	N.D.
Phosalone	0/25	N.D.
Deltamethrin	0/25	N.D.
Acequinocyl	0/25	N.D.
Spirodiclofen	0/25	N.D.
Carbendazim	4/25	N.D. $\sim 0.062 \pm 0.036$

¹Higher than LOQ

²N.D.: value at or below the limit of detection

라. 국내유통 및 수출용 유자차 분석 결과 비교

Table 1-6. Pesticide concentrations in yuza tea and detected ratio in 3 years (2009-2011)

Pesticide	1st year(2009)		2nd year(2010)		3rd year(2011)	
	Range(ug/ml)	Ratio	Range(ug/ml)	Ratio	Range(ug/ml)	Ratio
Chlorpyrifos	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Prothiofos	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Phosalone	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Deltamethrin	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Acequinocyl	N.D. ~ 0.525 ± 0.226	2/50	N.D.	0/25	N.D.	3/25
Spirodiclofen	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Carbendazim	N.D. ~ 0.537 ± 0.501	12/50	N.D. ~ 0.078 ± 0.135	8/25	N.D. ~ 0.062 ± 0.036	4/25

¹Higher than LOQ

²N.D.: value at or below the limit of detection

Acequinocyl의 유자차에 대한 국내 잔류 허용량은 3.0ppm으로 분석결과 0.26~1.05ppm수준의 검출량은 위해에 전혀 영향을 주지 않는다고 판단된다. Spirodiclofen과

Carbendazim 또한 유자에 대한 국내 잔류 허용량은 각각 2ppm과 7ppm으로 문제가 되지 않지만 EU의 잔류 허용량은 각각 0.5ppm으로 2009년도산 유자차의 경우에 cabendazim의 잔류량이 기준 허용치를 초과 한다. 그러나 2010년도산과 2011년도산의 유자차에는 개선된 점을 보이고 있어 향후 농약 분석의 관리를 철저히 시행한다면 유럽 수출에 지장을 없을 것이다. 2009년도산 유자차의 검출 수에 비해 2010년도산과 2011년도산 유자차 검출 수는 감소하여 줄어든 경향을 보였다. Acequinocyl은 2건 검출되었지만 2010년과 2011년에 생산된 유자차에서는 전혀 검출되지 않아 유자의 재배 시에 농약 사용량이 감소되었다.

3. 위해도 평가

고흥군에서 생산된 국내 생산 유자에 대한 위해도가 어느 정도인지 알아보기 위하여 잔류농약 모니터링 결과에 대한 노출 평가를 실시하였다. 식품 섭취에 대한 농약 잔류량의 안전 평가의 경우, 위해도 평가 지표에서 ADI(acceptable daily intake, 인체에 평생 누적 시에도 건강에 영향을 미치지 않는 1일 섭취 허용량)를 바탕으로 EDI(estimated daily intake, 1일 추정섭취량)를 계산하고 국민 1일 평균 식품섭취량과 국민평균체중(55kg)을 고려하여 몇 %에 해당하는 농약을 섭취하게 되는지 계산하였다. 2009년에서 2011년 사이에 생산된 유자차 제품의 분석 결과를 바탕으로 국민유자섭취량을 고려하여 1일 섭취허용량 등 위해도 평가지표를 산출해 내었다. 노출평가를 실시한 결과, 1일 추정섭취량은 각각 0.446mg, 0.258mg, 0.26mg이었으며 1인 1일 허용섭취량(ADE) 대비 추정섭취량(EDI)을 계산한 결과 각각 0.353, 0.312, 0.236이 나왔다. 그러므로 ADI에 대한 EDI의 값의 비율이 1을 넘지 않아 유자와 유자차의 섭취가 안전하다고 판단된다.

Table 1-7. Risk assessment of Yuza tea based on 3 year monitoring data.

Pesticide	ALD (mg/kg)	EDI (mg/day)	EDI/ADE
Acequinocyl	0.525	0.446	0.353
Spirodiclofen	0.303	0.258	0.312
Carbendazim	0.300	0.260	0.236

ALD: average level of detection, ADI: acceptable daily intake. ADE (acceptable dietary exposure, mg/person/day)=ADI (mg/kg)×Korean average adult weight (55 kg). ADI=(EDI/ADE)

2세부: 수출용 유자의 저장유통을 위한 multicomponent 식용 코팅 기술 개발

및 유자가공의 위생관리 시스템 구축

이중층으로 구성 된 multicomponent 코팅은 방출 속도를 제한하여 결국 multicomponent 코팅이 더 실용적인 것으로 나타났다. 1차년도에는 유자의 수확기를 이미 지나 그 대체물로 레몬을 대상을 multicoating 실험을 하였다. 2차년도에는 레몬에서 수행되었던 결과를 유자에 적용하여 결과적으로 carnaubawax - Shellac - locust bean gum multicomponent 코팅제가 유자의 저장성 향상에 가장 적합한 물질로 선발되었다. 수출용 유자의 저장기간을 예측할 수 있는 모델을 개발하였다. 즉, closed system method 조건에서 O₂와 CO₂ 농도를 가지고 enzyme kinetics를 기반으로 한 Michaelis Menten 식과 온도의존성 Arrhenius 식으로 호흡률 모델을 개발하였다. 또한 수출용 유자의 저장성 개선을 위한 골판지 포장 상자의 모양 확립 및 적재 조건을 최적화하였다. 대부분 소규모인 유자차 제조회사의 위생적인 관리를 위하여 HACCP plan 및 SSOP를 개발하였다.

3세부: 유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품 개발 및 사업화를 위한 기술 개발

유자청 제조 시 폐기되는 부산물이 항산화, 항노화 및 미백 화장품 소재로서의 활성과 효능을 갖는지 알아보기 위하여 Total phenol assay, MTT(자외선에 의한 세포 손상 회복), 항염(TNF- α), 신생 Collagen 합성, MMPs 발현 억제 효과, 분비된 멜라닌 억제 및 타이로시나아제 저해 효과에 대해 알아보았다. 부위별, 용매별 추출물에서 60°C 에탄올 추출물의 생리활성 효과가 가장 우수하였으며, 지표 물질로 설정한 hesperidin, hesperetin, limonin의 효과는 미미하였다. 이는 유자 부산물 내 다른 성분 활성에 의한 것으로 예측할 수 있다. 항산화 효과를 측정하기 위한 total phenolic assay에서 유자 부산물 중 과피 추출물은 30.53 ± 0.37 (mg G.A equivalents/g d.w)의 높은 phenolic compound 함유량을 나타내었다. 항염 효과 측정에서 부산물 모두 UV-induced pro-inflammatory cytokines 인 TNF- α 를 40% 이상 줄여주어 항염증에 효능이 있음을 보였으며, 자외선에 의한 세포 손상에 대해 강력한 회복 효과가 있음을 보였다. 과피 추출물은 각 농도별로 투여한 모든 범위에서 자외선 처리로 감소한 Collagen 합성량을 증가시켜주고, MMPs의 발현을 감소시켜주어 항노화 효과가 증가됨을 확인하였다. 또한, 과피 및 씨 추출물은 세포 내에서 분비되는 melanin의 양과 tyrosinase의 양을 줄여주는 효과를 보였다. 유자 추출물의 인간 각질세포에 대한 자외선 손상 완화 효과는 세포 주기의 arrest에 대한 조절과 이와 관련된 세포 내 신호전달기전의 활성화를 통해 세포사멸 완화가 이루어짐을 확인하였다.

생물전환기술 및 복합발효공정을 통해 flavonoid glycoside를 aglycon 형태로 변환하여 활성의 증가를 본 연구는 균주의 간접적인 β -glycosidase 효과는 볼 수 있었으나 발효에 의한 aglycon화를 확인 할 수 없었다. 하지만 발효 및 직접적인 효소처리에 의해 라디칼 소거능, 콜라겐 합성능, 피부장벽 복원능이 향상되어 가능성을 확인하였다.

이상의 결과들은 유자청 가공 부산물의 항산화, 항노화 및 미백 효과를 확인하였다. 특히, 유자 부산물 중 과피 추출물은 항산화, 항노화 및 미백 효과 모두 활성이 우수한 것으로 판단되며 Lipid accumulation 감소효과도 있어 부산물을 이용한 기능성 화장품 소재 및 beauty-food 로서의 사용 가치가 기대 된다.

유자브랜드 화장품의 주요 원료로는 유자 과피의 항노화 및 미백효능 (실용성), 유자과피 추출성분의 피부진정 효과 및 자외선 손상 방지 (기능강화)의 유자과피추출물이 가지는 항노화, 미백 복합기능 극대화 할 수 있는 기존 제품과 차별화된 유자브랜드 화장품 개발 concept을 확립하였다.

4세부: 살균소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 수출용 유자의 통합형 세척/살균/물기제거 시스템 개발

1. 살균소독수 생성시스템 개발 및 생성조건 확립

신선/신선편이 농산물 생산공정의 미생물학적 위생성 향상을 위해 광범위하게 사용되고 있는 염소계 살균소독제 대체 물질로 주목받고 있는 이산화염소수를 아염-염소가스($\text{NaClO}_2\text{-Cl}_{2(g)}$) 방식의 기기장치로 생성할 수 있는 생성장치를 제작하였다. 이산화염소수 발생 최적조건을 검토하기 위하여 생성원료인 NaClO_2 농도(0.01~0.1%)와 Cl_2 gas 투입량(100~1,000 g/hr)에 따른 chlorite, chlorate, FAC 및 chlorine dioxide의 생성량을 조사하였다. Chlorate, FAC 및 chloride dioxide 생성량은 NaClO_2 및 Cl_2 투입량이 증가할수록 생성량이 증가하는 경향을 나타내었다. NaClO_2 농도 및 Cl_2 gas 투입량에 따른 수율은 chlorite 및 chlorate와 생성량이 직접적인 영향을 미치므로 chlorite와 chlorate의 생성량이 낮았던 NaClO_2 및 Cl_2 의 투입농도범위에서 높은 값을 나타내었다. 즉, 0.01% NaClO_2 에서는 200~600 g/hr Cl_2 gas에서 95% 수준, 0.05% NaClO_2 에서는 400 g/hr의 Cl_2 gas에서 97%를, 그리고 0.1% NaClO_2 에서는 500~1,000 g/hr에서 96% 이상의 수율을 나타내었다. 0.01% NaClO_2 에서는 200, 300, 400, 600 및 1,000 g/hr Cl_2 gas에서 93% 수준을, 0.05% NaClO_2 에서는 900 g/hr Cl_2 gas에서 94.0%, 그리고 0.1% NaClO_2 에서는 800과 900 g/hr Cl_2 gas에서 95.0%의 최대 순도를 나타내었다. 30 ppm 이산화염소수의 5°C 및 10°C에서의 경시적인 변화를 검토한 결과 ClO_2 및 Cl_2 는 140분 경과시까지 그다지 크지 않았던

반면 25°C에서는 초기 30.6 ppm에서 30분 경과시 7.6 ppm 수준으로 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

NaCl 농도를 달리하면서 생성한 중성전기분해수의 물성을 측정한 결과 HClO 함량은 전해액인 NaCl 농도가 높아질수록, 그리고 분해시간이 증가할수록 대체적으로 함량이 증가하는 뚜렷한 경향을 나타내었다. 0.01% NaCl 전해액에서는 분해 30분후 11.4 ppm으로 최대값을, 0.02% 전해액에서는 분해 30분후 49.6 ppm으로 최대값을 나타내었다. 생성수의 pH는 NaCl의 양이 증가하고 분해시간이 길어질수록 대체적으로 상승하여 pH 7~9 범위를 나타내었다.

2. 세척처리가 유자의 항산화 화합물 및 잔류농약에 미치는 효과

세척처리에 의한 유자(*Citrus junos Sieb ex Tanaka*)의 잔류 농약 및 미생물의 제거 효과와 세척 처리 과정 중 항산화 화합물 양의 변화를 조사하였다. 세척 처리는 기계세척(MW), 강산성 전해수에 10분 침지한 후 기계세척(MW+SACeW), 증류수 세척(DW)으로 하였고 수도수 세척(TW)을 대조구로 하였다. MW와 MW+SACeW 처리구에서의 총균수는 각각 3.71 log CFU/g, 2.66 log CFU/g 수준으로 나타났다. 5.77 log CFU/g 수준인 수도수 세척보다 기계세척과 전해수에 침지한 후 기계세척한 처리구에서 미생물 감소율이 더 크게 나타났다. 잔류농약은 전해수 침지 후 기계세척한 처리구에서 70.5~98.1%로 농약의 종류에 관계없이 가장 높은 제거효과를 나타냈다. 비타민 C와 hesperidin 함량은 각각 346.27~464.14 mg%, 814.76~869.76 mg%로 처리구 간에 현저한 차이는 없었다. 또한 처리 방법에 의한 DPPH 라디칼 소거능도 20.36~21.27%로 차이를 나타내지 않았다. 그러므로 유자를 전해수 침지 후 기계세척 할 경우 유자 품질을 유지하면서 잔류 농약을 효과적으로 제거할 수 있는 세척 방법인 것으로 나타났다.

3. 표면 세척 시스템에 의한 유자의 미생물 및 잔류농약의 제거효과

표면 세척 시스템을 이용하여 유자의 미생물과 잔류농약 제거 효과를 살펴보았다. 선행 연구로 오징어 먹물을 제거 효과를 보기 위해 스프레이 회전 속도 0.11, 0.42, 0.73 m/s, 수압 0.6, 0.9, 1.2 MPa과 컨베이어 속도 0.046, 0.092, 0.138 m/s로 세척 조건을 달리하였다. 오징어 먹물 제거 실험 결과 먹물 제거 효율은 컨베이어 속도와 분사 노즐 회전수와는 높은 상관관계를 나타내었으며 수압의 조건에서는 반응표면 분석 결과 0.9 MPa에서 가장 제거율이 높게 분석되었다. 이에 미생물과 잔류농약 제거를 실험의 위해 세척 조건으로 수압을 0.9 MPa로 고정하였으며 스프레이 회전 속도(0.11, 0.42, 0.73 m/s)와 컨베이어 속도(0.046, 0.092, 0.138 m/s)를 달리하여 수행하였다. 미생물은 컨베이어 속도 2.76 m/min 일 때 스프레이 회전속도 0.43과 0.73 m/s에서 각각 2.20, 2.05 log CFU/g 수준

감소하여 가장 높은 감소율을 나타내었다. 또한 스프레이 회전속도 0.11 m /s와 컨베이어 속도 0.138 m/min을 제외한 모든 처리구의 미생물 제거효과는 수도수 처리보다 높았다. 잔류농약 실험 결과 컨베이어 속도가 느릴수록, 분사노즐 회전수가 많을수록 제거효과가 높았으나 spirodichlofen, deltamethrin, benomyl, thiophanate-methyl과 acequinocyl 의 경우 컨베이어 속도 0.046 m/s에서 분사노즐 0.42 m/s이상에서 처리구들 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. Benomyl과 thiophanate-methyl 의 잔류 농약은 컨베이어 속도 0.092 m/s 이하의 조건에서 90% 이상 제거되었다. 이상의 결과에서 표면 세척 시스템의 조건을 컨베이어 속도 0.092 m/min 이하, 노즐 회전수 0.043 m/s 이상에서 세척 시 유자의 미생물과 잔류농약을 효율적으로 제거할 수 있을 것으로 판단된다.

5세부 : 수출용 고부가가치 유자가공제품 개발

유자 부산물로부터 유용성분인 펙틴을 화학적 처리없이 분리해 낼 수 있는 물리적-효소적 복합처리 공법을 개발하였다. 개발된 천연공법을 통하여 7.3%의 수율로 55%의 galacturonic acid 를 함유한 펙틴을 분리하여 기존의 화학적 처리를 통한 펙틴 분리 방법을 대체할 수 있는 천연 공법을 확립하였다. 천연 공법을 통하여 얻어진 펙틴을 지방대체 소재로 식품에 적용하여 지방을 10, 20, 30% 대체하여 제품을 제조하였고 특히, 10% 대체 제품의 경우 기존의 제품과 비교하여 동등함 품질 특성을 보여주었다. 이로부터 젤화제, 점증제 등으로 이용되어진 펙틴을 지방대체소재로서 활용하여 저지방, 저칼로리 제품을 제조함으로써 새로운 고부가 식품 소재로서의 가능성을 제시하였다.

유자 부산물로부터 얻어진 펙틴과 유자 분말을 이용하여 스킨케어 제품인 겔 형태의 마스크 팩을 개발하기 위한 모델시스템과 안정성을 구축하였다. 식물성 천연소재인 유자 펙틴을 이용하여 겔형 마스크 팩을 제조함으로써 환경 친화적이며 보습효과와 기존의 유자 착즙액에 함유되어 있는 플라보노이드계의 성분으로 뛰어난 미백효과를 가지는 겔 마스크 팩 개발 가능성을 제시 하였다.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과

1세부 : 농약독성 및 잔류평가 기술 개발 및 운용

- 가. 수출용 및 시중에 유통되는 유자와 유자차의 잔류농약 분석을 통해 재배자의 농약 적정사용을 유도함.
- 나. 수출용 및 시중에 유통되는 유자와 유자차의 잔류농약 분석을 통하여 위해도 평가
- 다. 유자의 잔류농약 분석 전처리법 최적화
- 라. 유자의 잔류농약 분석 기기분석법 최적화
- 마. 시중에 유통되는 유자와 유자차의 잔류농약 모니터링 실시
- 바. 유자의 안전성 평가자료 및 농약 잔류기준 설정 기초자료 수립

2세부: 수출용 유자의 저장유통을 위한 multicomponent 식용 코팅 기술 개발 및 유자가공의 위생관리 시스템 구축

- 가. 수출용 유자의 저장성 개선을 위한 최적의 식용 코팅제 개발
- 나. 유자의 호흡률을 측정하여 품질을 예측하는 kinetics 모델 개발
- 다. 수출용 유자의 포장 조건 확립
- 라. 유자차 제조 공정의 HACCP plan 개발

3세부: 유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품 개발 및 사업화를 위한 기술 개발

- 가. 우수한 생리활성을 갖는 유자 부산물 추출 조건 확립
- 나. 유자 추출물의 Flavonoids 및 Limonoids 동시 분석 조건 확립
- 다. 유자 추출물의 항산화 평가
- 라. 유자 추출물의 항노화 평가
- 마. 유자 추출물의 미백 평가
- 바. 유자 추출물의 피부복원 효능평가
- 사. 유자 추출물의 피부지질 함량 감소 효능 평가
- 아. 생물전환 기술을 통한 유자 추출물의 효능 증대 가능성 확인
- 자. 산화적 손상에 대해 보호효과를 나타내는 최적의 유자가공추출물을 선별했고, 유자에 함유 되어있는 생리활성물질을 선별
- 차. 인간세포학적 수준에서 항산화능을 나타내는 기작을 구명하여 인체 친화능적인 유자의 화장품소재로서의 개발 근거 확립
- 카. 유자 브랜드의 화장품 개발 concept 확립

**4세부: 살균소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 수출용 유자의
통합형 세척/살균/물기제거 시스템 개발**

- 가. 살균소독수 생성시스템 개발 및 생성조건 확립
- 나. 세척처리가 유자의 항산화 화합물 및 잔류농약에 미치는 효능 평가
- 다. 표면 세척 시스템을 이용하여 유자의 미생물과 잔류농약 제거 효능 평가

5세부 : 수출용 고부가가치 유자가공제품 개발

- 가. 유자부산물로부터 기능성물질의 추출 및 캡슐화기술을 이용한 향장소재의 특성분석
- 나. 유자 추출물을 첨가하여 제조된 유자 영양젤리의 이화학적 특성 분석
- 다. 농산부산물로부터 천연 펙틴을 추출할 수 있는 새로운 천연공법 확립
- 라. 추출방법에 따른 유자펙틴의 이화학적 특성 분석
- 마. 유자 펙틴의 지방대체소재로서의 활용하여 새로운 가공 기능성 제시

2. 성과활용 계획

1세부 : 농약독성 및 잔류평가 기술 개발 및 운용

- 가. 합리적이고 객관적인 유자 농약 적정사용 가이드라인을 제안하여 안전하고 고품질의 친환경 유자가 유통될 수 있도록 하여 농가소득 및 유자가공업체의 기업매출 증진.
- 나. 친환경 유자의 농약 잔류기준 설정 시 기초 자료로 활용함으로써 내수용 유자의 잔류농약에 대한 안전성을 확보할 뿐 아니라 선진국의 생산 이력제에 대응하는 수출용 유자의 안전성 확보에도 기여함.

2세부: 수출용 유자의 저장유통을 위한 multicomponent 식용 코팅 기술 개발 및 유자가공의 위생관리 시스템 구축

- 가. 유자 뿐 아니라 citrus계 과일에 식용 코팅제를 응용 및 활용할 계획임.
- 나. 본 연구를 통하여 최적화 된 식용 코팅제를 대량 생산 하여 과일에 적용 할 자동화 공정에 대한 추가 연구가 필요.
- 다. HACCP 시스템을 구축하기 어려운 소규모 유자차 회사의 HACCP 품질 경영 메뉴얼을 제공할 수 있게 되어 소규모 업체에서도 HACCP 시스템을 적

용할 수 있는 자료로 활용가능.

3세부: 유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품 개발 및 사업화를 위한 기술개발

- 가. 유자 과피의 항노화 및 미백효능 (실용성), 유자과피 추출성분의 피부진정 효과 및 자외선 손상 방지 (기능강화)의 유자과피추출물이 가지는 항산화, 항노화, 미백 복합기능 근거자료 확립
- 나. 유자과피추출물이 가지는 항노화, 미백 복합기능 극대화 할 수 있는 기존 제품과 차별화된 유자브랜드 화장품 concept 확립

4세부: 살균소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 수출용 유자의 통합형 세척/살균/물기제거 시스템 개발

- 가. 향후 전기분해수의 식품가공에의 다양하게 적용함으로써 공정 단축 및 개선
- 나. 위생적 고품질의 신선편의 최소가공식품의 다양화
- 다. HACCP system에 근거한 합리적인 위생관리 체계 확립 방안 제시

5세부 : 수출용 고부가가치 유자가공제품 개발

- 가. 유자 추출물의 캡슐화를 통한 식품 및 향장품을 위한 소재의 개발
- 나. 유자 추출물이 첨가된 고부가가치의 기능성 유자 영양젤리의 개발
- 다. 펙틴과 유자 추출물을 이용한 기능성 마스크팩의 개발
- 라. 유자펙틴을 활용한 새로운 저지방, 저칼로리 제과 및 제빵 제품 개발
- 마. 현재 전량 수입되고 있는 펙틴의 수입대체 효과 기대
- 바. 산처리를 통한 화학적 펙틴 추출 공정을 대체 가능한 천연 공법 확립으로 친환경적 녹색 기술의 식품 산업의 도입 가능
- 사. 젤화제, 점증제로 사용되는 펙틴을 지방 대체 소재로 활용하여 새로운 가공 기능성을 부여함으로써 고부가가치 신소재로서 틈새 시장 개척

SUMMARY

I. Title

Development of Processed Citron Products for Export and By-product Application Technology.

II. Objectives and necessities of the research

Yuza(*Citrus junos*) and Yuza tea is being exported more than \$25 million in 2011 and Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries increases its goal to the amount of export to 5,500 million in 2013. To enhance the export of domestic Yuza and processed goods that contributes greatly to the exporting business, the research was aimed based on these five studies.

1. Risk Monitoring and risk assessment for Yuza and Yuza tea: Eco-friendly production technique of exporting Yuza based on pesticide toxicity and evaluation of pesticide residues was performed. In order to conduct this study, monitoring of pesticide residues for Yuza produced in Goheung and Risk Assessment were carried out. Monitoring and Risk Assessment of 8 kinds of pesticides for 260 samples were conducted for three years.
2. Development of the technologies for storage and distribution of exporting Yuza: Technologies to prevent browning that can occur during storage distribution, degradation freshness and system for prevention of hazard of processing site were developed. Therefore, development of multiplayer coating technologies for storage and distribution of exporting Yuza and Sanitation Management System for Yuza process were established.
3. Development of functional cosmetic of Yuza: Analysis of bio-active components about yuza pericarps, seeds, freshes and research for skin basis efficacy was carried out. Additionally, new functional cosmetic material by utilizing fermented process and bioconversion technologies were developed and it was implemented to evaluate efficacy of yuza extracts and develop cosmetics and industrialization.
4. Development of sterilizing water manufacturing system: Development of sterilizing water manufacturing system: As measures of maintaining the

initial quality of export Yuza and fruit vegetables technologies which is effective sterilization for safety as a way to minimize the amount of chlorine compounds system developed and applied.

5. Development of value-added processed yuza products for export : For development high performance Yuza material, an eco-friendly way(enzymatic and physical) was established and the Model system for physical properties, processing analysis and food application evaluation of Yuza material obtained through the method were conducted. By utilizing encapsulation technology, characteristic of narigin release of Yuza was controlled and high performance to enhance stability and bioavailability. Through this technique, indigenous physiological activity of Yuza were developed as maximum processing product.

III. The contents and range of the research

Ultimate objective of this study is to reinforce export of Yuza that contributes greatly to the exporting business 1) Development of Process/Storage/Distribution technologies of Sterilization processes, and freshness technology, browning control Technology for Yuza 2) Development of a variety of a high value Yuza processed food ,functional food and materials of cosmetics. Through which Producing high value materials and processed products can increase utilization of by-products. To achieve these goals, objectives and content are as follows.

1. Monitoring and Risk Assessment of Pesiticide Residues

A. For the 1st year

Optimization of sample preparation and recovery experiments were carried out 8 types of pesticides (Chlorpyrifos, Phosalone, Prothiofos, Deltamethrin, Spirodicolofen, Acequinocyl, Benomyl, Thiophante-methyl) and 130 samples of Yuza for the target residues were investigated.

B. For the 2nd year

The monitoring of pesticide residues of Yuza was conducted by analytical condition established in the 1st year. The randomly selected farm in the Goheng at the 2009 annual general planting 50 species of Yuza and the 2009 annual environment-friendly planting 30 species of

Yuza for 8 types of pesticide residue were investigated. Also through the first year's study by using an optimized analytical method Han-Sung food produced in the 25 species of Yuza tea in 2010 were analyzed.

C. For the 3rd year

Analytical conditions established to optimize the analysis in the 1st year was conducted to monitor 8 types of pesticide residues in Yuza. The randomly selected farm in the Goheng at the 2010 annual general planting 50 species of Yuza and the 2010 annual environment-friendly planting 30 species of Yuza for 8 types of pesticide residue were investigated. Also through the first year's study by using an optimized analytical method Han-Sung food produced in the 25 species of Yuza tea in 2011 were analyzed. The risk assessment of Yuza tea based on three years of pesticide residues was conducted.

2. Development of multicomponent edible coating for exporting Yuja and HACCP for processing Yuja

A. For the 1st year

A multilayer coating with water and fat soluble materials was applied and analyzed. The coating materials were selected from those already used in citrus edible coating. Lemon was used as an alternative for the research, because fresh Yuja was not available due to its harvest time around November.

B. For the 2nd year

The multilayer coating was applied to Yuja in the same manner as to lemon done in the 1st year. From the analyses for the surface micro-structure, respiration, firmness, weight loss, and the other quality factors, the CarW-Shellac-LBG coating was found to be the most effective multilayer extending Yuja shelf life. Also, the kinetics and prediction model of shelf-life were developed and a desirable packaging system was suggested.

C. For the 3rd year

For the safety of Yuja processing, SSOP was developed, and HACCP plan including hazard analysis, CCP decision, monitoring, and management

was established.

3. Analysis of bio-active components about yuza pericarps, seeds, freshes and research for skin basis efficacy

A. For the 1st year

Establishment of the condition of extraction for each part of yuza and analysis of Hesperidin, Limonoid, and total polyphenol. This is done in order to measure anti-aging effect and tyrosinase inhibition effect. The biological rapid screening method and fuctional ingredient were chosen for each yuza extracts. Effects of yuaz extracts on attenuation of cellular damage induced by ultra violet were identified.

B. For the 2nd year

It was aimed to establish fermentation conditions, analyze the process of fermentation. The skin physiological activities of fermented yuza extracts and other Yuza samples extracted by different extraction conditions were determined and potentials as cosmetic functional ingredients and mechanism of yuza extracts functional action was evaluated.

C. For the 3rd year

Cellular signal transduction pathways of yuza extracts involved in restoration of damaged skin cells were identified and its functionality in cosmetics development was characterized. It was implemented to evaluate efficacy of yuza extracts and develop cosmetics for commercialization.

4. Development of integrated surface washing system(washing/sterilization/dry) on Yuza(*Citrus junos Sieb ex Tanaka*)

A. For the 1st year

Optimum concentration of NaClO₂ solution and amount of gaseous Cl₂ was investigated for production of aqueous ClO₂ with high yield and purity using gaseous chlorine-chlorite ClO₂ generator which can produce lower concentrations of chlorine dioxide applicable for direct-use in food processing as cleaner/sanitizer.

B. For the 2nd year

The removal efficiency of pesticide residues and microorganisms, and changes of the amount of antioxidant compounds on the citrus fruit yuza (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) by various washing methods

C. For the 3rd year

To assess the effects of the removal of pesticide residues and microorganisms from yuza using a surface washing system, under the various conditions.

5. Development of value-added processed yuza products for export

A. For the 1st year

The aim of this study was to expand the utilization of unavailable citron pomace. The oleoresins of unavailable citron pomace were extracted and encapsulated to develop as functional ingredients for food and cosmetic applications. In addition, yuza pomace was utilized to extract pectin component by the combined physical/enzymatic treatments.

B. For the 2nd year

Nutritive yuza jelly was developed using the yuza oleoresin, yuza juice and other ingredients, and its texture and stageability were studied over time. The eco-friendly extracted pectin was compared with chemically-extracted pectin; physicochemical, structural, and rheological properties of the pectins were studied and the interactions with other food ingredients were also analyzed.

C. For the 3rd year

Yuza mask-pack was developed using pectin, model naringin, and other ingredients and the characteristic of naringin release from the mask-pack was evaluated. In addition, the naringin release and the stability of mask-pack were investigated. The yuza pectins were applied as a fat replacer for food products with low fat and calorie. The quality attributes were characterized in terms of physicochemical and textural properties.

IV. The result in research and development

1. Monitoring and Risk Assessment of Pesticide Residues

A. Results of detected sample of pesticides in Yuza Cultivated by Ordinary Culture and Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture

The samples of 50 Yuzas Cultivated by Ordinary Culture and 30 Yuzas Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in Goheung, 16 cultivated area, were detected every year.

1) Results of pesticides levels detected in Yuza cultivated by ordinary culture and Yuza cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2009

Table 1-1. Number of detected sample and concentrations of pesticides in Yuza produced in 2009

Pesticide	Detected Ordinary Culture Yuza		Concentration (ppm)	Detected Environmentally-Friendly Culture Yuza		Concentration (ppm)
	Detected	Concentration (ppm)		Detected	Concentration (ppm)	
Chlorpyrifos	0/50	N.D.		0/30	N.D.	
Prothiofos	0/50	N.D.		0/30	N.D.	
Phosalone	0/50	N.D.		0/30	N.D.	
Deltamethrin	0/50	N.D.		0/30	N.D.	
Acequinocyl	3/50	N.D. ~ 0.158 ± 0.250		1/30	N.D. ~ 0.138 ± 0.029	
Spirodiclofen	26/50	N.D. ~ 1.889 ± 0.923		12/30	N.D. ~ 0.801 ± 0.485	
Carbendazim	37/50	N.D. ~ 5.148 ± 1.152		15/30	N.D. ~ 2.910 ± 0.887	

N.D.: value at or below the limit of detection

2) Results of pesticides levels detected in Yuza cultivated by ordinary culture and Yuza cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2010

Table 1-2. Number of detected sample and concentrations of pesticides in Yuza produced in 2010

Pesticide	Detected Ordinary Culture Yuza	Concentration (ppm)	Detected Environment ally-Friendly Culture Yuza	Concentration (ppm)
Chlorpyrifos	3/50	N.D.~0.025±0.011	0/30	N.D.
Prothiofos	2/50	N.D.~0.021±0.002	0/30	N.D.
Phosalone	18/50	N.D.~0.060±0.004	3/30	N.D.~0.056±0.002
Deltamethrin	0/50	N.D.	0/30	N.D.
Acequinocyl	2/50	N.D. ~ 0.197± 0.007	0/30	N.D.
Spirodiclofen	27/50	N.D. ~0.192 ± 0.031	6/30	N.D. ~0.089 ± 0.009
Carbendazim	37/50	N.D. ~0.597 ± 0.092	9/30	N.D. ~0.210 ± 0.024

N.D.: value at or below the limit of detection

B. Analysis Yuza tea of domestic distribution and export

- 1) The result of analysis Yuza tea of domestic distribution and export in 2009

Table 1-3. Number of detected sample and concentrations of pesticides in Yuza tea produced in 2009

Pesticide	Ratio of the number of detected samples and total samples	Concentration (ppm)
Chlorpyrifos	0/50	N.D.
Prothiofos	0/50	N.D.
Phosalone	0/50	N.D.
Deltamethrin	0/50	N.D.
Acequinocyl	9/50	N.D. $\sim 0.525 \pm 0.226$
Spirodiclofen	10/50	N.D. $\sim 0.303 \pm 0.483$
Carbendazim	14/50	N.D. $\sim 0.537 \pm 0.501$

N.D.: value at or below the limit of detection

2) The result of analysis Yuza tea of domestic distribution and export in 2010

Table 1-4. Number of detected sample and concentrations of pesticides in Yuza tea produced in 2010

Pesticide	Ratio of the number of detected Yuza Tea and total samples	Concentration (ppm)
Chlorpyrifos	0/25	N.D.
Prothiofos	0/25	N.D.
Phosalone	0/25	N.D.
Deltamethrin	0/25	N.D.
Acequinocyl	0/25	N.D.
Spirodiclofen	0/25	N.D.
Carbendazim	8/25	N.D. $\sim 0.078 \pm 0.135$

N.D.: value at or below the limit of detection

3) The result of analysis Yuza tea of domestic distribution and export in 2011

Table 1-5. Number of detected sample and concentrations of pesticides in Yuza tea produced in 2011

Pesticide	Ratio of the number of detected Yuza Tea and total samples	Concentration (ppm)
Chlorpyrifos	0/25	N.D.
Prothiofos	0/25	N.D.
Phosalone	0/25	N.D.
Deltamethrin	0/25	N.D.
Acequinocyl	0/25	N.D.
Spirodiclofen	0/25	N.D.
Carbendazim	4/25	N.D. $\sim 0.062 \pm 0.036$

N.D.: value at or below the limit of detection

4) Comparison of the result of analysis Yuza tea of domestic distribution and export during 2009 and 2011

Table 1-6. Ratio of the number of detected Yuza tea and concentration of pesticides

Pesticide	1st year		2nd year		3rd year	
	Range(ug/ml)	The number of detect	Range(ug/ml)	The number of detect	Range(ug/ml)	The number of detect
Chlorpyrifos	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Prothiofos	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Phosalone	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Deltamethrin	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Acequinocyl	N.D. ~ 0.525 ± 0.226	9/50	N.D.	0/25	N.D.	3/25
Spirodiclofen	N.D. ~ 0.303 ± 0.483	10/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Carbendazim	N.D. ~ 0.537 ± 0.501	14/50	N.D. ~ 0.078 ± 0.135	8/25	N.D. ~ 0.062 ± 0.036	4/25

N.D.: value at or below the limit of detection

According to MRL(Maximum Residue Level) of Acequinocyl in Yuza tea is 3ppm, the value of Acequinocyl in the result was 0.26~1.05ppm which had no significantly effect on human health. For Spirodiclofen and Carbendazim, as internal MRL of them is 2ppm and 7ppm respectively, there is no influence on residue level. In

case of Yuza tea in 2009, MRL of Cabendazim exceeded the standard that is the value of EU is 0.5ppm. However, pesticide residues of Yuza tea produced in 2010 and 2011 had improved on 2009, and it would be no problem with import to EU, if the system of detect pesticides is implemented.

The detecting number of Yuza tea produced in 2010 and 2011 was dwindled compared to Yuza tea produced in 2009. Moreover, the detecting number of Cabendazim had tended to be reduced from 13 cases to 8 cases and from 8 cases to 4 cases each year. Although Acequinocyl and Spirodiclofen of Yuza tea produced in 2009 were detected 7 samples and 5 samples, the detecting number of them was dropped in 2010 and 2011.

C. Risk assessment

Exposure evaluation was conducted based on monitoring results of pesticide residue in order to figure out the degree of risk by detected pesticide residues in sample. Risk assessments were performed using EDI(estimated daily intake) and ADI(acceptable daily intake). The EDI were calculated from the average consumption of person per day and pesticide residues data.

We investigated the comparison between EDI and ADI how much percentage do we were exposed pesticides. The ratio of EDI to ADI was calculated and ADE(acceptable dietary exposure) was calculated as $ADI(mg/kg) \times \text{Korean average adult weight}(55kg)$.

The results of human exposure to pesticides by Yuza tea intake were shown in Table1-7. The EDI of Acequinocyl, Spirodiclofen and Carbendazim were 0.446, 0.258 and 0.260, respectively. The ratio of EDI to ADI of Acequinocyl, Spirodiclofen and Carbendazim was 0.353, 0.312 and 0.236, respectively. If the result exceeds 1, people may have risk potential. It has not effected on human health because the value was relatively low. Therefore, the result of this research was evaluated that detected pesticides do not harmful human beings.

Table 1-7. Risk assessment of Yuza tea

Pesticide	ALD (mg/kg)	EDI (mg/day)	EDI/ADE
-----------	----------------	-----------------	---------

Acequinocyl	0.525	0.446	0.353
Spirodiclofen	0.303	0.258	0.312
Carbendazim	0.300	0.260	0.236

ALD: average level of detection, ADI: acceptable daily intake. ADE (acceptable dietary exposure, mg/person/day)=ADI (mg/kg)×Korean average adult weight (55 kg). ADI=(EDI/ADE)

2. Development of multicomponent edible coating for exporting Yuja and HACCP for processing Yuja

Multilayer coating was found to hardly release the embedded components, and then multicomponent coating was employed for the further studies. Carnaubawax-Shellac-locust bean gum was the most effective multicomponent coating for maintaining the freshness of Yuja during storage. The kinetic models of O₂ and CO₂ changes in respiration of Yuja during storage were determined in terms of Michaelis Menten and Arrhenius relations. They could be used to predict the shelf-life of Yuja during shipping or storage. An optimal condition of packaging box and piling configurations was established for exporting Yuja requiring longer shelf life.

HACCP and SSOP were developed for the safety of Yuja processing.

3. Skin physiological activities of yuja and development of cosmetics for commercialization

Total phenolic content, cell viability assay by MTT, anti-inflammation(TNF- α) activity, collagen and MMP assays, assay for secreted melanin and tyrosinase inhibition assay were performed and the results showed that antiaging, antioxidation and whitening activities of

yuza extracts were revealed. Yuza EtOH extract was the best with respect of skin physiological efficacies such as antioxidant and antiinflammation activities, which was even better than that of hesperidin, hesperetin, and limonin, the known phytochemicals of Yuza and Citron. From this, it is expected something different in yuza might has a activating ingredient. The pericarp extracts of yuza extracts was analyzed to have high content of phenolic compound (30.53 ± 0.37 mg G.A equivalents/g d.w). Anti-inflammation activity was analyzed by measuring, UV-induced pro-inflammatory cytokines, TNF- α . TNF- α was decreased by over 40% indicating that it has strong anti inflammatory effect. In addition, the pericarp extract stimulated synthesis of collagen and decreased the production of MMPs after irradiation of UVB. Furthermore, the pericarp and seed extracts significantly inhibited secreted melanin and suppressed the tyrosinase expression. Inhibitory effects of yuza extract and its ingredients were mediated by attenuation of apoptosis of human keratinocytes by regulation of cell cycle arrest and activation of cellular signaling pathways.

Through bio conversion technology and complex fermentation process, overall skin physiological activities of Yuza extracts were enhanced probably by conversion of flavonoid glycosides into aglycons. In detail, radical scavenging activity, ability to synthesize collagen and skin barrier function were improved by the fermentation process or direct enzyme treatment.

All of the result revealed that yuza extracts have anti-oxidation, anti-aging and whitening effects. Especially, the pericarp of all yuza by-products could be good candidate to have anti-oxidation, anti-aging, and whitening. Even more, inhibition of lipid production by Yuza extract was confirmed by using adipocytes. The result suggest that Yuza extract could be applied for cosmetic formulations for acne care and slimming cosmetics. Eventually Yuza extract could be developed into a beauty-food products.

4. Development of integrated surface washing system(washing/sterilization/dry) on Yuza(*Citrus junos Sieb ex Tanaka*)

A. Development of sterilizing water manufacturing system

Optimum concentration of NaClO₂ solution and amount of gaseous Cl₂

was investigated for production of aqueous ClO₂ with high yield and purity using gaseous chlorine-chlorite ClO₂ generator which can produce lower concentrations of chlorine dioxide applicable for direct-use in food processing as cleaner/sanitizer. Concentration of NaClO₂ solution and amount of gaseous Cl₂ was varied from 0.01~0.1% and 100~1,000 g/hr respectively. Produced concentrations of chlorite, chlorate, FAC(free available chlorine) and chlorine dioxide were increased by increasing of supplied concentration of NaClO₂ solution and amount of gaseous Cl₂. Optimum concentration of NaClO₂ solution and amount of gaseous Cl₂ was 0.1% and 900 g/hr respectively. (At this concentration, produced) ClO₂ and FAC produced at these concentrations were 882.0 ppm and 8.0 ppm, and chlorite and chlorate were not detected. The yield and purity of ClO₂ were 97.0% and 96.0% respectively.

Changes in concentration of ClO₂ and Cl₂ of ACD at 5°C and 10°C were not significantly decreased up to 140 min. However concentration of ClO₂ at 25°C was decreased from 30.6 ppm to 7.6 ppm after 30 min.

Concentration of hypochlorous acid of neutral electrolyzed water produced by circulation electrolyzation of NaCl was increased with NaCl concentration and electrolyzation time. Concentration of hypochlorous acid of electrolyzed water produced by 0.01% NaCl electrolyte reached to 11.4 ppm after 30 min of electrolyzation, and those reached to 49.6 ppm in 0.02% NaCl electrolyte. pH of produced electrolyzed water was increased by NaCl concentration and electrolyzation time to pH 7~9.

B. Effect of Washing Treatments on Pesticide Residues and Antioxidant Compounds in Yuja (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka)

This study investigated the removal efficiency of pesticide residues and microorganisms, and changes of the amount of antioxidant compounds on the citrus fruit yuja (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) by various washing methods. The washing methods were mechanical washing(MW), mechanical washing after soaking in SAcEW, strong acidic electrolyzed water for 10min(MW+SAcEW) and soaking detergent solution for 10min(DW), with a tap water washing(TW) as the control. After treatment of MW and SAcEW+MW, the microbial count were 3.71 and

2.66 logcfu/g, respectively. Compared with the TW treatment(5.77logcfu/g), MW and SAcEW+MW treatments showed a higher reduction. As a result of pesticide residue, the SAcEW+MW removed 70.5~98.1% and was the most effective, regardless of the pesticides. The vitamin C and hesperidin contents of treatments were in the range of 346.27~464.14 mg% and 814.76~869.76 mg% respectively. But among the treatments, there was not a significantly different. Antioxidant activities, as measured by DHHP radical, ranged from 20.36 to 21.27% and there was no significant difference from the washing methods. The results of this study demonstrated that the SAcEW+MW was the most effective method for removing residual pesticides without affecting the quality of the yuja.

C. Removal Efficiency of Microorganism and Pesticide Residues by a Using Surface Washing System on Yuja (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka)

This study was conducted to assess the effects of the removal of pesticide residues and microorganisms from yuja using a surface washing system, under the following washing conditions: 0.11, 0.42, and 0.73 m/s spray rotation speeds; 0.6, 0.9, and 1.2 MPa water pressure and 0.046, 0.092, and 0.138 m/s conveying speeds. Tap-water treatment was used as the control. The washing efficiency when using squid ink was highly correlated with the conveying speed and the spray rotation speed. In addition, the highest washing efficiency was achieved when the water pressure was 0.9 MPa. The microorganisms were reduced to 0.40 log CFU/g for the tap-water treatment, and all the treatments, except those at the conveying speed of 0.138 m/s and the spray rotation speed of 0.11 rpm (6.07 log CFU/g), produced higher removal efficiencies compared with the tap-water treatment. Reductions of 2.20 and 2.05 log CFU/g were achieved at the spray rotation speeds of 0.42 and 0.73, respectively. The largest reductions were observed when the conveying speed was 0.046 m/s. Higher pesticide residue removal efficiency values were obtained at slower conveying speeds and higher spray rotation speeds. Higher than 50% removal efficiency was achieved when the

spray rotation speed was 0.046 m/s for spirodichlofen, deltamethrin, benomyl, thiophanate-methyl, and acequinocyl. Especially, the removal efficiency for benomyl and thiophanate-methyl was more than 90%. It can thus be concluded that the pesticide residues in yuja can be effectively reduced by washing the latter with a less-than-0.092-m/s conveying speed and a higher-than-0.42-m/s spray rotation speed.

5. Development of value-added processed yuja products for export

Yuza emulsion, spray-dried powder, and porous starch powder which improved stability of yuja oleoresin can be applied various food materials and products. The development of foods and cosmetics based on yuja will be able to enhance the utilizability of yuja pomace.

The nutritive yuja jelly fortified vitamins and minerals was prepared using oleoresin which extracted from yuja pomace. Physicochemical properties of yuja jelly prepared by various conditions (oleoresin content, concentrations and type of sweetener) was studied. The yuja jelly is able to encourage the food industry to develop high value-added food products with low sugar and functionality.

Yuza pectin was extracted by combined physical/enzymatic treatments without any use of acidic chemicals. The eco-friendly extraction produced pectin with 55% of galaturonic acid and the extraction yield was 7.3%.

The yuja pectins were incorporated into the cookie formulations by replacing shortening (10, 20, and 30%). Especially, the incorporation of pectin into the cakes formulation up to 10% appeared to be effective in making cakes as equal as the control without any significant quality loss. Thus, the yuja pectin as a fat replacer can encourage the food industry to develop high value-added food products with low fat and calorie.

Yuza mask-pack was developed with major ingredients of yuja pectin and yuja powder. The naringin release from the mask-pack was investigated over time. The yuja mask-pack product has potential to expand the utilization of yuja extract and yuja pomace instead of fresh fruit.

V. Achievement and its application plan

A. Achievement

1. Monitoring and Risk Assessment of Pesticide Residues

- a. Through the analysis of the pesticide for Yuza and Yuza tea of domestic distribution and export encourage effective use of appropriate pesticides.
- b. Risk assessment of the analysis of the pesticide for Yuza and Yuza tea of domestic distribution and export
- c. Optimization for preparation of analysis of pesticide residues of Yuza
- d. Optimization for instrumental analytical method of analysis of pesticide residues of Yuza
- e. Monitoring of pesticide residues in Yuza and Yuza tea of domestic distribution
- f. Establishment of evaluation of safety/tolerance for pesticide residue and fundamental information about Yuza

2. Development of the relevant technologies for storage and distribution of exporting Yuza

- a. A multicomponent edible coating for exporting Yuja was developed.
- b. A kinetic model based on respiration rate was developed to predict the shelf life of Yuja during storage.
- c. An optimal packaging condition for exporting Yuja was established.
- d. HACCP and SSOP were developed for the safety of Yuja processing.

3. The development and commercialization of cosmetics using skin activity effects of Yuza

- a. Establishment of extraction conditions of Yuza byproduct that has excellent physiological activity
- b. Establishment of simultaneous determination analysis condition of flavonoids and limonoids of Yuza extracts
- c. Antioxidant activity of Yuza extract

- d. Anti-aging activity of Yuza extract
- e. Whitening activity of Yuza extract
- f. Skin barrier recovery activity evaluation of Yuza extract
- g. Inhibition of lipid production of Yuza extract
- h. Establishment of molecular mechanisms behind UVA induced skin damage
- i. Confirm the probability of increasing efficacy about Yuza extracts by bioconversion technology
- j. Select the processed optimal Yu-za extracts that have protection effects against oxidative damage and select the physiological active materials in Yu-za
- k. Establishment of concepts of cosmetic formulations developed based on functionalities of Yu-za extracts

4. Development of integrated surface washing system(washing/sterilization/dry) on Yuza(*Citrus junos Sieb ex Tanaka*)

- a. Development the number of sterilization generation system and foundation generation condition
- b. Evaluation of Washing Treatments on pesticide residues and antioxidant compounds in Yuza
- c. Evaluation of removal efficiency of microorganism and pesticide residues by a using Surface Washing System on Yuza

5. Development of value-added processed yuza products for export

- a. Encapsulation of yuza oleoresin and investigation of its powdery properties
- b. Development of nutritive yuza jelly and study of its physico-chemical properties of yuza jelly
- c. Establishment of novel green processing for pectin extraction from yuza pomace
- d. Analysis of physicochemical and thermo-mechanical properties of yuza pectin
- e. Utilization of pectin in cake-baking as a fat replacer
- f. Development of yuza mask-pack for cosmetic application

B. Application plan

1. Monitoring and Risk Assessment of Pesticide Residues

- a. Reasonable and appropriate pesticide usage guidelines proposed. The distribution to be environmentally friendly and high quality Yuza increases companies and farmer's income.
- b. As a basis for setting standards monitoring and risk assessment of pesticide Residues can ensure a safety and for export to developed countries it contributes to secure the safety

2. Development of multicomponent edible coating for exporting Yuza and HACCP for processing Yuza

- a. The results could be applied for exporting Yuza.
- b. The developed multicomponent coating could also be applied to citrus fruits and others in the same family.
- c. It would be required to equip the coating process with a automatic control system in the field.
- d. The developed HACCP plan and SSOP would be beneficial to the small Yuza processing companies in need of the expenses required for safety management.

3. The development and commercialization of cosmetics using skin activity effects of Yuza

Establishment of source material about complex function that contains anti-aging, whitening effects(practicality), soothing and protection effect by UV damage(functional intention) of pericarp extract of Yuza

4. Development of integrated surface washing system(washing/sterilization/dry) on Yuza(*Citrus junos Sieb ex Tanaka*)

- a. Improve process by application electrolyzation to various processing food
- b. Diversification of sanitary high quality of fresh comfortable minimum processing food

- c. Suggestion for foundation of reasonable sanitation system based on HACCP system

5. Development of value-added processed Yuza products for export

- a. Development of yuza extracts and their encapsulated materials for foods and cosmetics
- b. Development of high value-added nutritional yuza jelly
- c. Development of eco-friendly yuza pectin
- d. Development of reduced-fat foods with yuza pectin
- e. Development of yuza mask-pack
- f. Import substitution of pectin with yuza pectin
- g. Introduction of green technology to the food industry through eco-friendly processing for pectin extraction without any use of chemicals
- h. Development of a niche market with high value-added pectin as a fat replacer beyond its traditional use of gelling and thickening agents.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the project of research and development	1
Part 1. Objective of the research and development.....	1
Part 2. Necessity of the research and development.....	2
Part 3. Contents and scope of research and development.....	9
Chapter 2. Status of technical development in Korea and overseas	22
Part 1. Domestic status.....	22
Part 2. Foreign status	25
Chapter 3. Contents and results of the performance of research and development	32
Part 1. results of the performance of research.....	32
1. Section 1 : Monitoring and Risk Assessment of Pesticide Residues.....	32
2. Section 2 : Development of multicomponent edible coating for exporting Yuja and HACCP for processing Yuja	98
3. Section 3 : Analysis of bio-active components about yuja pericarps, seeds, freshes and research for skin basis efficacy.....	178
4. Section 4 : Development of integrated surface washing system(washing/sterilization/dry) on Yuza(<i>Citrus junos Sieb ex Tanaka</i>)	227
5. Section 5 : Development of value-added processed yuja products for export.....	355

Chapter 4. Attainment and contribution for the related fields.....	355
Chapter 5. Achievement and its application plan.....	360
Part 1. Results of research and development.....	360
Part 2. Plans for application of research and development	363
Chapter 6. The overseas scientific and thechnical information during reseach and development process.....	365
Chapter 7. Reference.....	377

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 1 절	연구개발의 목적	1
제 2 절	연구개발의 필요성	2
제 3 절	연구개발의 내용 및 범위	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	22
제 1 절	국내 현황	22
제 2 절	국외 현황	25
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	32
제 1 절	세부과제별 연구개발수행 내용 및 결과	32
1. 1세부	: 농약독성 및 잔류평가 기술 개발 및 운용	32
2. 2세부	: 수출용 유자의 저장유통을 위한 multilayer 식용 코팅 기술 개발 및 유자가공의 위생관리 시스템 구축	92
3. 3세부	: 유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품 개발 및 사업화	178
4. 4세부	: 살균소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 수출용 유자의 통합형 세척/살균/물기제거 시스템 개발	227
5. 5세부	: 수출용 유자 및 가공품 개발과 부산물 활용기술 개발	305

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	355
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	360
제 1 절	연구개발 성과.....	360
제 2 절	연구개발 결과 활용 계획.....	363
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	365
제 7 장	참고문헌.....	377

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

- 본 연구의 최종 목표는 연간 2,500만 달러 이상 수출되는 효자 수출품이자 영양적으로 우수한 유자의 수출을 강화하기 위하여 1) 농약독성 및 잔류평가 기술 개발 및 운영 2) 수출용 유자의 저장유통을 위한 multiplayer 식용 코팅 기술 개발 및 유자가공의 위생관리 시스템 구축 3) 유자의 피부활성 효능 평가 및 이를 이용한 화장품 개발 사업화를 위한 기술개발 4) 살균 소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 수출용 유자의 통합형 세척/살균/물기제거 시스템 개발 5) 수출용 고부가가치 유자가공제품 개발을 하는 것이다. 이를 통하여 수출용 유자원료 및 고부가가치 가공품을 생산하고 유자 및 유자 부산물의 활용성 증대할 수 있다.
- 본 연구에서는 수출용 유자의 위해 모니터링 및 제어시스템을 구축하는데 있어 농약독성 및 잔류량 평가에 중점을 두고 수출용 유자의 친환경 생산 기술 최적화 연구를 수행하였다. 이를 위해 고흡균을 중심으로 생산된 유자(친환경제품과 일반생산제품 각 연 50시료)에 대한 농약 잔류실태 모니터링을 실시하여 위해평가를 실시하였다. 농약은 유자에 빈번하게 사용되는 8종을 대상으로 하되 유자생과와 더불어 참여업체에서 생산되는 유자차와 유자청 각 25건 (연간)에 대해서도 분석을 실시하였다. 농약에 대한 분석결과는 국민유자섭취량을 고려하여 1일섭취허용량 등 위해도 평가지표를 산출하였다. 이는 친환경 유자 생산을 위한 기초자료를 생산하여 활용하며, 친환경인증, 품질인증 및 GAP(Good Agricultural Practices) 인증을 위한자료로도 사용될 예정이다.
- 또한 대표적인 과일 저장유통기술에는 화학 처리(훈증 포함), 방사선 조사, 식용 코팅법, CA저장법이 있는데, 수출용은 선박에서 장기간의 저장을 요하므로 훈증 또는 방사선 조사가 적당하나 아직 안정성에 의문이 남아있다. 유자 농가는 현재 수확의 대부분이 유자차 제조업체에 공급되고 있어 유자 농가의 소득이 적은편이고 우수한 품질의 국내 유자를 수출을 통해 유자 농가의 높은 소득원으로 작용 할 수 있다. “Multilayer 식용 코팅 처리법”은 이에 대한 최적의 대안으로 활용될 수 있고 아직 국제적으로 도입기에 있으므로 국내의 해당 기술의 우위를 갖출 수 있는 기회가 될 수 있다. 산업적으로는 국내 유자차 제조업체는 대부분 소규모업체로써 HACCP 관리를 구축하기 어려운 실정이고소규모 업체에 적용 가능 한 HACCP

plan을 개발 필요하다. 또한 유자가공의 위생관리시스템을 가동함으로써 최근 부상되고 있는 위생문제가 없는 수출용 유자 제품의 국제적 인지도를 높일 수 있다. 아울러 유자가공의 진보된 SSOP를 기반으로 한 HACCP를 구축함으로써 다른 과채류에도 그 모델을 활용할 수 있다.

- 기능성 화장품 개발을 위한 고품산 유자의 과피, 씨앗 및 과육 부위별 활성 성분 분석 및 피부기초효능 조사하여 발효가공 및 생물전환기술을 이용한 신규 기능성 화장품 소재개발 및 개발된 화장품 소재를 이용한 화장품 브랜드개발을 할 수 있다.
- 또한 수출용 유자 등 국내산 과채류의 초기품질 유지(초기 미생물 제거 및 갈변 등의 억제)를 위한 방안으로 살균력이 우수하고 유효염소 화합물 함량을 최소화할 수 있는 살균소독수 제조시스템(전기분해수 및 이산화염소수)을 활용한 살균 및 세척 등의 전처리 기술을 개발·적용할 수 있도록 하여 수출용 유자의 잔류농약, 이물질, 중금속 및 미생물 제거 등 비가열식품의 미생물학적 안전성 확보 및 위생적 품질유지를 위한 실용화 기술을 확립하고자 함에 있다. 처리기술을 과채류 생산단지 및 가공 유통업체 등에 보급, 활용하여 국내산 과채류의 위생 및 품질 고급화로 국제 경제력 제고 및 생산농가의 소득증대에 기여하고자 함에 있다.
- 마지막으로 고기능성 유자 소재 개발을 위한 친환경적 천연공법(효소적 및 물리적)을 확립하고 이를 통하여 얻어진 유자 소재의 물리적 특성, 가공적성 분석, 및 식품 응용성 평가를위한 모델시스템을 구축하여 고부가가치 유자 가공 제품을 개발하고자 하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

- 국내산 유자는 예로부터 향과 맛이 우수하며 풍부한 비타민C와 무기질을 함유한 알칼리성 건강식품으로, 경남 거제 및 남해, 전남 고흥 및 완도지역 등 남해안 일대에서 주로 생산되고 있으며 최근 들어 재배면적이 크게 증가한 실정에 대한 해결방안으로 유자에 대한 연구가 많이 진행되면서 고품질의 착즙원액 제조 및 다양한 가공제품이 개발되고 있다.
- 국내 친환경농산물 시장은 수급 규모의 증가에 따라 2000년대 초반까지 매년 두 배 이상의 급증세를 보였고, 최근 5년 동안 증가율이 다소 둔화되었지만 여전히 높은 증가추세를 보이고 있다. 한국농촌경제원의 2010년 국내·

의 친환경농산물의 생산실태 및 전망에 따르면 2010년 친환경시장규모는 전년대비 7% 정도 증가한 3조 6,506억원으로 추정된다. 또한 전체경지면적 중 친환경농업 인증면적의 비중은 2000년에 0.11%였으나 2005년 2.7%, 2009년 11.6%로 지속적으로 확대되고 있다. 이러한 추세는 세계적으로도 확산되어 친환경농산물의 생산과 수요가 지속적으로 증가하고 있다. 특히 소득수준이 높은 미국과 유럽 등 선진국을 중심으로 2000년 이후 매년 20%내외의 지속적인 성장세를 보이고 있고 중국은 정부의 적극적인 녹색 식품 육성전략에 힘입어 면적 기준으로 1998년 이후 매년 21.4% 증가하였으며, 특히 일본은 유기농산물 인증물량은 해외인증이 국내인증 물량의 약 35.8배이고 전체 유기농인 증 물량의 97.3%를 차지한다.

- 2002년까지만 해도 마땅한 소비처를 찾지 못해 수확철이면 가격폭락으로 농업인의 애를 태우던 유자가 유자차로 가공되어 일본과 중국시장에서 선풍적인 인기를 얻으면서 한국 수출농식품 중 최고의 히트상품으로 떠오르고 있다. 특히, 중국시장에서는 유자차가 비타민 C가 풍부하고 미용에 좋다는 인식이 확산되어 2002년 16만 달러에 불과하던 수출이 2006년에는 530만 달러에 이를 정도로 큰 인기를 얻고 있다. 이에 따라 2006년 유자가격은 31,550원/10kg으로 2001년(16,284원/10kg)보다 거의 2배 가까이 상승하였으며, 폐원을 정상과원으로 전환하는 농가도 증가하고 있다.

Table 1. 유자 재배면적 및 생산량 (단위 : ha, 톤)

구 분	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
면적(ha)	3,335	2,441	1,789	1,696	1,508	1,327	1,301	1,240
생산량(톤)	12,559	13,534	10,879	9,266	7,379	11,601	12,077	11,357

(자료 : 농림수산식품부)

- 유자 가공 및 이용 면에 있어서는 전체 생산량의 약 50%는 생과로 판매하여 주로 가정서 유자차를 담거나 또는 관상용으로 이용되며, 최근 들어 생산자단체나 소규모 영세업체서 단순가공을 통한 유자차 등 가공제품 생산에 그치고 있는 실정이다.

Table 2. 유자차 수출실적
천불)

(단위 : 톤,

	2004		2005		2006	
	물 량	금 액	물 량	금 액	물 량	금 액
합 계	5,878	14,695	9,957	24,834	10,284	30,830
일 본	1,732	5,365	3,727	11,656	3,935	13,159
중 국	458	1,052	1,412	3,173	1,985	5,289
홍 콩	1,802	3,561	1,714	3,875	1,663	4,307
대 만	705	1,767	2,061	3,362	1,402	3,902
미 국	367	1,079	422	1,451	600	2,229
기 타	814	1,871	621	1,317	699	1,944

(자료 : 농수산물유통공사)

- 우리나라에서 친환경농산물의 종류는 친환경농업육성법에 따라 유기합성농약과 화학비료를 일체 사용하지 않고 재배하는 경우 유기농산물, 유기합성농약은 일체 사용하지 않고 화학비료는 권장 시비량의 1/3이내 사용한 경우, 무농약농산물, 화학비료는 권장시비량의 1/2이내 사용하고 농약살포 횟수는 농약안전사용기준의 1/2 이하를 사용하여 재배한 경우, 저농약농산물 등 세 가지로 분류하고 있다. 미국과 일본을 비롯하여 독일, 오스트리아, 스위스 등 대부분의 유럽국가에서는 유기농산물만을 대상으로 인증 제도를 실시하고 있다.

Table 3. 연도별 국내생산 친환경농산물 인증실적 변화추이 (단위 : 호, ha, 톤, %)

구분		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	연평균 증가율	전국 비중
유기 농산물	농가수	353	442	1,505	2,748	3,283	5,403	7,167	65.2	0.56
	면 적	296	450	1,601	3,327	4,622	6,095	8,559	75.2	0.47
	인증량	6,538	10,671	21,114	33,287	36,746	68,091	95,405	56.3	0.30
무농약 농산물	농가수	1,060	1,645	4,084	7,426	9,776	15,278	21,656	65.3	1.70
	면 적	876	1,293	3,727	6,756	8,440	13,803	18,066	65.6	0.99
	인증량	15,694	32,274	76,828	120,358	167,033	242,068	320,309	65.3	0.99
저농약 농산물	농가수	1,035	2,591	6,303	13,127	15,892	32,797	50,812	91.4	3.99
	면 적	867	2,811	5,911	12,155	15,154	29,909	48,371	95.5	2.65
	인증량	13,174	44,334	102,432	211,558	256,956	487,588	712,380	94.5	2.21
계	농가수	2,448	4,678	11,892	23,301	28,951	53,478	79,635	78.7	6.26
	면 적	2,039	4,554	11,239	22,238	28,216	49,807	74,995	82.4	4.11
	인증량	35,406	87,279	200,374	365,203	460,735	797,747	1,128,093	78.1	4.69

(자료 : 국립농산물품질관리원)

- 농약을 분석하기 위한 방법은, 1990년대 이후 분석 장비의 급속한 발달로 식품중의 잔류농약 검출한계가 낮아지면서 농약 단성분 분석법만 아니라 동시 다성분 분석법의 혁신적 개선이 뒤따랐으며, 식품의약품안전청 (KFDA)에서도 동시 다성분 분석법을 이용하여 225종의 농약에 대해 수입 농산물 및 유통농산물에 대한 농약 잔류량 검사를 시행하고 있다. 농약 잔류량은 작물체의 형태, 재배방법, 성장속도 등 다양한 요인에 의해 결정되는데 특히 농약이 살포되어 부착되는 작물체 표면의 특성과 비표면적 및 증체율 등은 농약의 작물잔류성에 영향을 미치는 중요한 요인들인데, 이들에 대한 연구자료는 부족한 실정이다. 따라서 유자의 농약잔류성에 미치는 주요 인자를 찾아내어 안전한 유자 생산을 위한 기초자료를 생산하여 활용할 필요성이 있다.
- 최근 들어 유자와 같은 신선 과채류를 그대로 또는 착즙하여 음용하는 형태의 소비가 급함으로써 유통물량의 증대와 더불어 영양, 위생, 안전, 기호, 편의성 등의 소비구조가 양적인 측면보다는 질적인 측면으로 전환되는 경향이 두드러지고 있다. 특히, 신선 과채류는 세정 후 그대로 식용하는 기회

가 증가함에 따라 최소가공(minimal processing)된 과채류의 유통이 콜드체인 형태로 전환되고 있으나 과채류 표면에 오염되어 있는 대부분의 위해 요소들은 간단한 세척과정으로 거의 제거되지 않기 때문에 식용 시 국민건강 측면에서 문제를 야기시킬 수 있어 가시적인 살균효과를 부여할 수 있는 방법이 필요한 실정이다.

- 그러나 과채류와 같은 신선식품은 제품 특성상 가열살균을 비롯한 가혹조건에서의 살균처리가 어렵고, 기존의 살균제 이용은 소비자의 기피 및 인체 유해성 등으로 사용범위에 많은 제한을 안고 있다. 지금까지는 과채류 표면살균에는 주로 염소계 등 화학제재를 사용하였으나 그 대체수단으로서 이미 선진 외국에서는 선도에 영향을 미치지 않고 인체에 무해한 살균효과를 가지는 살균처리 기술의 개발에 주력하고 있다.
- 과채류의 표면에 오염되어 있는 대부분의 위해 요소들은 수도수를 이용한 간단한 세척과정으로는 거의 제거되지 않기 때문에 현재 대부분의 급식소에서는 생채소류의 초기 미생물의 오염을 최소화하기 위한 방안으로 100~200 ppm의 고농도 염소수를 사용하고 있다. 염소 용액의 항균작용은 광범위성이거나 속효성에서 인정받고 있으나 독성 때문에 너무 높은 농도나 장시간 사용시 이미, 이취에 의한 관능적 품질의 저하, 과채류의 손상 및 잔류 염소에 의한 2차적 위해요소의 큰 문제점을 초래할 수 있으므로 반듯이 여러 번의 행균 과정을 거쳐 염소농도를 식수와 동일한 수준으로 낮추어야만 한다. 미국 CDC 및 EPA의 경우는 과채류의 세척에 있어서 50~200ppm 염소용액을 사용할 것을 권장하고 있다.
- 국내의 경우도 소비자의 편의성 및 고품질 안전농산물의 요구, 단체급식의 증가, 소비지에서의 폐기물 문제 등으로 개발된 기술의 적용은 급증할 것으로 추정된다. 특히 국내 신선농산물의 경우 수확후 미생물(총균수, 대장균) 오염은 10^5 내외로 식자재 형태로 가공되거나 신선편의식품 형태로 가공 유통될 경우 세정 및 표면살균의 필요성은 매우 크며 최근 들어 소비자의 식품선택기준은 안전성이 큰 비중을 차지하고 있다.
- 현재 국내에서도 식품 안전성 문제의 발생 빈도는 여전히 줄어들지 않고 있으며, 열처리가 불가능한 생식 식품에 대한 살균 및 세척을 위하여 halogen 화합물, oxidizer, alcohol 등을 이용하거나 방사선 및 자외선 조사, 염소 등을 사용하고 있다. 상용화된 표면 살균처리방법으로는 오존수 처리, 전기분해수 처리, peroxyacetate 처리, 염소수처리, 과산화수소수 처리, ethanol vapor 처리 등이 있다. 또한 nisin 등의 천연물 유래의 항균성 peptide는 특이성이 높아 항균 스펙트럼에 제약이 따르고 여러 나라에서

식품보존제로서 사용되어 왔으나 세균에 비해 곰팡이, 효모 등에 대해서는 살균력이 없다는 단점이 있다.

- 그러나 식품보존제 첨가와 같은 화학적 방법으로는 안전성만을 확보할 뿐, 소비자의 기호를 충족시키지 못하며 일부 잔류된 화학보존제는 인체에 악영향을 미칠뿐아니라 환경문제를 유발하며, 처리소요시간이 보통 30~60분의 장기살균이 필요한 문제점을 지니고 있다.
- 최근, 식품안전성 확보를 위한 새로운 물리적방법으로 초고압(high hydrostatic pressure), 고전압펄스전기장(high voltage pulsed electric fields), 진동자기장(oscillating magnetic fields), 방사선 조사법(radiation), 광펄스(high-intensity pulsed light), 초음파(ultrasonic), 오존(O₃) 등이 소개되고 있으며, 화학적 방법으로는 이산화탄소, 박테리오신, 양이온 다중 고분자(polycationic polymer)와 같은 화학물질, 세포벽 분해효소(lytic enzyme)등을 이용하거나, 이러한 물리·화학적 처리를 조합하여 다단계로 처리하는 hurdle technology가 있다.
- 각각의 비가열 살균방법은 대상 식품에 따라 그 응용 가능성이 다르며 고유의 장점과 한계점을 지닌다. 예를 들면 초고압, 진동자기장, antimicrobial, 광펄스, hurdle technology는 약체 및 고체 식품에 적용이 가능한 반면, 고전압 펄스 자기장을 액체식품에, 그리고 방사선조사법은 고체식품에 이용이 가능하며, 광펄스, 방사선조사법, 진동 자기장을 포장 후의 2차 오염의 위험을 줄일 수 있다는 장점이 있지만 이러한 방법은 초기 설비투자비가 많이 드는 문제가 있다.
- 현재까지 이와 같은 비가열 살균기술은 가열살균과 비교하여 볼 때 살균력 자체가 미흡하며, 현재 식품 생산업체는 대부분 열처리 생산 설비를 갖추고 있기 때문에 다양한 비가열 살균기술의 효과가 입증되어도 고가의 설비비 문제로 인하여 산업화에 어려움을 겪고 있어 실용화까지에는 많은 문제점들을 안고 있다.
- 이미 선진 외국에서는 선도에 영향을 미치지 않고 인체에 무해한 살균효과를 가지는 살균기술의 개발에 주력하고 있고, 일부는 식품산업과 청과물 유통에 부분적으로 적용되어 품질의 고급화를 도모하고 있는 실정을 감안할 때, 세척시의 표면살균 및 식품가공예의 적용도 가능한 이산화염소수 및 전기분해수와 같은 식품산업 전반에 다양하게 활용할 수 있는 기능수의 개발 필요성은 매우 절실하다고 볼 수 있다.

- 따라서 국내 우수 과채류의 해외 수출과 장기 저장을 위해서는 우선적으로 신선 과채류의 위해미생물 및 잔류농약 등으로부터 안전한 제품의 유통을 위한 세척 및 살균처리기술, 변색 억제 및 조직연화 방지를 목적으로 고품질 유지기술, 그리고 유통기간의 연장 및 경제성을 고려하여 살균력이 우수하고 유효염소 화합물 함량을 최소화할 수 있는 살균소독수 제조시스템(전기분해수 및 이산화염소수 등)을 활용한 위생적 전처리 기술에 대한 연구가 필수적으로 시급한 실정이다.
- 국산 유자의 생산과잉 및 홍수출하로 새로운 소비방안의 대전환이 시급히 요구되고 있으며, 대량소비 방안으로 새로운 유자 수요 창출 및 새로운 유자 제품의 개발이 절실하다. 현재 유자 가공 제품은 주로 유자 청(차)에 한정되어 유자하면 유자청으로 소비자에게 브랜드 인지가 되어 다양한 신수요 창출을 위한 고부가가치 유자 제품의 개발이 절실하며 과학화되고 국제규격에 적합한 제조기법 및 품질 고급화 기술개발이 필요하다.
- 고부가가치 가공 기술은 유자 가공품에 새로운 물성, 식감, 기능성을 부여해 줌으로써 유자의 소비를 증진시킬 것으로 예상되며, 최근 트렌드인 건강 지향 사회에 맞춘 제품의 제조가 필요하며 버려지는 유자폐기물로부터 유용물질들을 생산하여 새로운 부가가치를 창출할 수 있다.
- 현재까지 유자를 이용한 식품의 적용 사례를 보면, 단순한 유자의 첨가에 따른 식품학적 특성 분석에 초점을 맞추고 있고, 유자를 이용한 저지방, 저칼로리 등의 특수 기능성 식품에 대한 사례는 보고되고 있지 않다. 그러므로 이러한 유자를 이용한 특수 기능성 식품을 생산하기 위한 가공 기술 개발이 절실히 요구된다.
- 현대 식품 산업에서 사용되고 있는 다양한 식품 가공 기술 중에서도 환경 및 인간 친화적인 가공 기술에 대한 요구가 절실한 실정이다. 특히, Nactory 는 Natural 과 Factory 의 합성어로 천연 공정을 뜻하는 말로, 최근에 웰빙(well-being) 열풍과 함께 천연공정이 여러 산업의 키워드로 떠오르고 있다. 따라서 화학원료를 사용하거나 화학 생성물을 발생시키는 공정을 줄이거나 제거하여 친환경적이고, 친인간적인 Green processing의 개념에서 식품을 가공, 생산하는 시도가 많은 주목을 받고 있고 이는 식품 산업에서도 예외가 아닐 수 없다.

제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

■ 1세부 : 농약독성 및 잔류평가 기술 개발 및 운용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	농약독성 및 잔 류평가 기술 개 발 및 운용	<ul style="list-style-type: none"> - 시료 전처리 최적화 및 회수율 시험 실시 - 8종 농약을 대상으로 130 시료에 대한 잔류 실태 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 실험은 유자 재배 시 사 용 가능한 농약 8종에 대해서 실시함. 각 표준품의 표준용액 (stock solution)은 100 µg/mL 의 농도로 acetone(methanol) 에 녹여 조제하여 -20℃에서 냉동보관함. 각 표준품의 표준 용액은 검출기와 column 등의 기기 분석 조건에 따라 작업군 으로 나누어 질수 있으며, acetone (methanol)에 1~10 µg/mL의 농도로 희석하여 사 용함. ○ 회수율 실험과 검출한계 측정 ○ 기기분석 조건 : 동시 다성 분 분석 가능 농약을 GC/MS 를 이용하여 스크리닝을 실시 하며, 검출된 농약에 대해서는 NPD가 장착된 GC 또는 HPLC-PDA를 이용하여 정량 함. ○ 시료 : 조사대상 시료는 일 반재배 유자(50), 친환경 재배 유자(30), 유자차(50)를 연간 샘플링을 시행함. 수확기의 유자 를 과수농원당 1~2 kg씩 2~3 회 구매하여 잔류농약을 분석 하며 구입 즉시 신속하게 운반 하여 24시간 이내에 최적화된 전처리 과정을 수행함.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	농약독성 및 잔 류평가 기술 개 발 및 운용	<ul style="list-style-type: none"> - 2009년산 일반재배 유자(50), 친환경 재배 유자(30)에 대한 8종 농약의 잔류실태 조사 - 2010년 생산 유자차(25제 품)에 대한 8종 농약의 잔 류실태 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수확기(2009년산)의 유자를 과수농원당 1~2 kg씩 2~3회 구매하여 잔류농약을 분석하며 구입 즉시 신속하게 운반함 ○ 8종 농약의 분석은 분석 질 관리(QA: Quality Assurance)에 의거하여 매 분석시 표준곡선 작성, 회수율 측정을 실시함 ○ 기기분석 조건 : 동시 다성 분 분석 가능 농약을 GC/MS, GC-NPD, 또는 HPLC-PDA를 이용하여 정량함. ○ 생산된 유자차를 LOT번호 별로 샘플 지정하여 1차년도에 확립한 분석방법을 통해 전처 리 실행

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011)	농약독성 및 잔 류평가 기술 개 발 및 운용	<ul style="list-style-type: none"> - 2011년 생산 유자차(25제품)에 대한 8종 농약의 잔류실태 조사 - 국내 생산 유자에 대한 위해도 평가 실시 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생산된 유자차를 LOT번호별로 샘플 지정하여 1차년도에 확립한 분석방법을 통해 전처리 실행 ○ 기기분석 조건 : 동시 다성분 분석 가능 농약을 GC/MS, GC-NPD, 또는 HPLC-PDA를 이용하여 정량함. ○ 유자 2009년과 2010년 생산 유자의 8종 농약 분석을 통한 비교 연구 시행 ○ 유자차(2009년, 2010년 2011년 생산) 제품의 분석결과를 바탕으로 국민유자섭취량을 고려하여 1일 섭취허용량 등 위해도 평가지표 산출

■ 2세부 : 수출용 유자의 저장유통을 위한 multilayer 식용 코팅 기술 개발 및 유자가공의 위생관리 시스템 구축

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	수출용 유자의 저장유통위한 multilayer 식용 코팅 기술 개발 및 유자가공의 위생관리 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 수용성계/지용성계 target 물질함유한 multicomponent 모델계의 분석 - Citrus계 식용 코팅제로부터 선별된 물질의 multicomponent 를 제조하고, multicomponent 레몬의 저장 중 이화학적 변화 및 최적의 multicomponent 물질 조성 선별 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Multicomponent 시스템은 이중층으로 수용계인 agar/agar, 지용계인 wax/wax로 구성하였으며 유용물질은 외층에 첨가된 수용성 또는 지용성 색소를 사용, 물 또는 식용유를 유용물질의 수용체로 가정한 모델계를 구축 ○ Multicomponent의 층 물질은 citrus 에 성공적으로 적용된 formulation으로부터 선별하였으며 이중층을 구성하여 외층에 유용물질로서 항산화제인 vit-C 및 E를 첨가하였고 내층은 유용 물질을 포함하지 않고 외층과 동일한 물질로 조성 ○ 선별 된 multicomponent를 레몬에 코팅하여 그 저장성을 비교 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	수출용 유자의 저장유통위한 multilayer 식용 코팅 기술 개발 및 유자가공의 위생관리 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 1차년도 레몬실험으로부터 선발된 식용코팅을 유자에 적용하고 저장 중 이화학적 변화 및 최적의 식용코팅 물 질 조성 선발 - Kinetics 모델개발 및 저장 수명과 품질예측 - 코팅 유자의 포장 및 수송 환경 조건의 표준화 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Multicomponent 코팅을 적용 한 유자의 저장성을 비교 분석 ○ O₂와 CO₂ 농도를 가지고 Enzyme kinetics를 기반으로 한 Michaelis Menten 식과 온 도의존성 Arrhenius 식으로 호 흡률 모델 개발 ○ 포장의 상자 조건 확립
3차 연도 (2011)	수출용 유자의 저장유통위한 multilayer 식용 코팅 기술 개발 및 유자가공의 위생관리 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 유자 가공의 위생관리 시 스템 구축 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유자차 제조 공정의 HA(위 해 분석) ○ 유자차 제조 공정의 CCP plan 완성

■ 3세부 : 유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품 개발 및 사업화를 위한 기술개발 위생관리 시스템 구축

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품개발 및 사업화를 위한 기술개발	<p>-고흥산 유자의 과피, 씨앗 및 과육 부위별 활성 성분 분석 및 피부기초효능 조사</p> <p>-기능성 성분 스크리닝 및 멀티기능성 분석</p> <p>-세포실험을 통한 항암, 항비만, 항산화 작용 등 평가</p>	<p>○유자 부위별 추출조건 확립 및 시료제조</p> <p>○Hesperidin, Limonoid, total polyphenol 분석</p> <p>○Radical scavnging activity 분석</p> <p>○항노화 효능 평가 TNF-α, IL-1α ELISA 분석</p> <p>○타이로시나제 저해효능 측정</p> <p>○유자에 함유되어 있는 성분별 추출물에 대한 생물학적 rapid screening기법 구축 및 기능성 분획물 선별</p> <p>○세포실험을 통한 항산화 및 피부세포 활성화 기전 분석-의학적 효능 평가지표 발굴</p> <p>○분석된 성분을 세포적 수준에서 고찰</p> <p>○Multicomponent의 층 물질은 citrus 에 성공적으로 적용된 formulation으로부터 선별하였으며 이중층을 구성하여 외층에 유용물질로서 항산화제인 vit-C 및 E를 첨가하였고 내층은 유용 물질을 포함하지 않고 외층과 동일한 물질로 조성</p> <p>○선발 된multicomponent를 레몬에 코팅하여 그 저장성을 비교 분석</p>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품개발 및 사업화를 위한 기술개발	발효 가공 및 생물전환기술을 이용한 신규 기능성 화장품 소재개발 멀티기능성 성분의 전임상 테스트	<ul style="list-style-type: none"> ○유자 과피 추출물의 발효조건 확립 발효과정 분석 및 HPLC에 의한 변화추적 및 함량 변화 분석 ○발효물의 피부생리활성 단순 추출물과의 비교분석 (항노화, 미백, 항염증 및 피부장벽기능 강화효능) ○발효 가공소재의 Spec.결정 및 대량생산공정 확립 ○유자 발효가공 소재의 화장품 제형 확립 ○유자 브랜드의 화장품 개발 동물실험을 통한 멀티 기능성 성분의 전임상 테스트(인체효능시험대체)
3차 연도 (2011)	유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품개발 및 사업화를 위한 기술개발	-시제품 연구 및 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○생리활성 성분의 분리정제 및 이를 활용한 여드름, 건선 및 아토피 전용 약용화장품 개발 ○부산물인 수용성 섬유질과 콜레스테롤 및 지질분해성분 추출물을 이용한 다이어트 Beauty Food 개발 및 사업화 추진 ○시제품 개발 및 인체 친화능 평가: 화장품 소재 및 기능성 벽지 소재 시제품화

■ 4세부 : 살균소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 수출용 유자의 통합형 세척/ 살균/물기제거 시스템 개발

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	수출용 유자의 살균 및 세척 시스템을 위한 요소기술 개발	이산화염소수의 최적 생성 조건 설정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 이산화염소 농도별에 따른 chlorine dioxide, chlorite, chlorate 및 유효 염소량 비교 분석, 순도 및 수율 분석 ○ 위해성 및 품질열화 미생물별 살균력 평가 ○ 세척방법별 잔류농약 제거효과 분석
		전기분해 조건에 따른 생성수의 물리화학적 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전기분해수 종류별/농도별 available chlorine, chlorite, chlorate 및 유효 염소량 비교 분석, 순도 및 수율 분석 ○ 위해성 및 품질열화 미생물별 살균력 평가 ○ 세척방법별 잔류농약 제거효과 분석
		살균효능 향상을 위한 복합 살균 소독 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식염 및 유기산 종류를 달리 하여 이산화염소수 및 전기분해수로 제조한 절임용 처리수의 물성을 분석 ○ 위해성 및 품질열화 미생물별 살균력 평가 ○ 염소계 화합물 분석 ○ 세척방법별 잔류농약 제거효과 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	살균소독수(전기 분해수 및 이산 화염소수)를 활 용한 유자의 통 합형 세척/살균 /물기제거 등 단위요소 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 표면 세척 방법 및 처리수 조건 설정 	<ul style="list-style-type: none"> - 염소계 살균소독수 처리의 의한 잔류농약 제거능 분석 - 세척방법별 비교 시험 - 세척 처리수별 비교 시험 - 세척 처리수 온도별 비교 시험 - 마이크로 버블과 일반 와류버블 과의 비교 시험 - 마이크로 버블을 이용한 세척 시간별 비교 시험 - 평가항목 : 이물, 총균수 및 대장균 등 유 해미생물, 잔류농약 등
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 통합 방식(세척/살균/ 물기 제거)에 따른 유자 의 가공특성 및 저장중 품질 특성 변화 	<ul style="list-style-type: none"> - 세척/살균/물기 제거에 따른 유 자의 미생물 및 잔류농약 제거율 검토시험 - 통합 방식의 전처리에 따른 유 자차의 저장중 품질특성 검토 - 평가항목 : pH, 산도, 색도 등 이화학적 분석 및 관능평가
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 통합형 세척/살균/물 기 제거시스템의 예비 설계 	<ul style="list-style-type: none"> - 시작기의 단위 공정조건별 비교 평가 시험 : 컨베이어 벨트 속도, 노즐 회전 수, 수압 등 - 평가항목: 세척율, 잔류농약 및 미생물 제거율 - 단위요소 시스템에 대한 세부 사양 및 개략도 작성

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구범위
3차 년도 (2011)	살균소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 유자의 통합형 세척/살균/물기 제거 시스템 개발	○ 통합형 세척/살균/물기 제거시스템의 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> - 2년차 연구에 대한 보완 시험 : 단위요소 시스템에 대한 세부 사양 결정 작성 및 관련업체와 협의하여 단위 기계 수정 보완, - 실용화를 위한 제품의 사양 확정, 표준 설계도면 작성 및 시제품 제작
		○ 시제품에 의한 품질 유효성 평가 확인	<ul style="list-style-type: none"> - 표면 세척·살균력 유효성 평가 : 함수율, 총균수 및 대장균 등 유해미생물, 잔류농약 중금속 등 - 전처리에 따른 유자의 품질 특성 : 갈변 억제능, 조직감, 일반성분 변화 등 - 가공처리에 따른 유자의 품질 특성 : 유자차에 의한 품질 비교 - 처리조건별 저온저장중의 품질 비교 : 미생물학적 변화량, 이화학적·관능적 특성 변화 검토
		○ 시제품의 현장실증시험 및 산업화 방안 도출	<ul style="list-style-type: none"> - 유자 등 구형 type 품목 가공처리 업체 및 생산자단체에 실용화를 위한 현장시험 실시

■ 5세부 : 수출용 고부가가치 유자가공제품 개발

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	수출용 고부 가가치 유자가 공제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 유자 및 폐기물을 이용한 기능성 식품/향장소재 개발 - 유자의 유용성분 추출을 위한 천연 공법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 폐유자박의 조건에 따른 건조 ○ 건조유자박으로부터 oleoresin 의 추출 ○ 유자 oleoresin이 첨가된 O/W 유화액의 제조 ○ 유자 oleoresin의 캡슐화 ○ 화학적 유기용매 혹은 산처리 등의 화학적 방법이 배제된 천 연공법을 통한 유자 유용성분 (식이섬유 등)의 추출 전처리 공 정 확립 ○ 유자 유용성분 강화를 위한 효소적/물리적 복합처리기술 최 적화

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	수출용 고부가 가치 유자가공 제품 개발	<p>-피로회복용 유자젤 식품 개발</p> <p>- 천연공법을 통한 기능성 유자 소재 제조 및 식품 소재로서의 유효성 평가</p>	<p>○유자영양젤리의 제조</p> <p>○유자영양젤리의 물성 연구</p> <p>○유자영양젤리의 저장성 연구</p> <p>○개발된 유자소재의 이화학적 특성 분석</p> <p>○유변학적 성질 분석을 통한 유변학적 예측 모델 구축</p> <p>○다른 식품 성분/첨가물과의 상호작용 분석</p>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011)	<p>-유자착즙액을 이용한 기능성 스킨케어 제품 개발 (마스크 팩 제조)</p> <p>-수출용 고부가가치 유자가 공제품 개발</p>	<p>-유자착즙액에 함유되어 있는 기능성 성분의 분석과 함유량 측정</p> <p>- 상업용 펙틴과 나린진을 이용하여 펙틴필름 제조 후 기능성 성분의 용출특성 평가를 위하여 모델 시스템 구축</p> <p>-상업용 펙틴과 유자 분말을 이용하여 펙틴필름 제조 후 기능성 성분의 용출특성 평가</p> <p>-유자부산물로부터 얻어진 유자 펙틴과 유자 분말을 이용하여 펙틴필름 제조 후 기능성 성분의 용출특성 평가 및 안전성 확립</p> <p>-개발된 유자 소재를 이용한 고기능성 식품 개발</p> <p>- 천연공법을 통한 기능성 유자 소재 제조 및 식품 소재로서의 유효성 평가</p>	<p>○기능성 성분 분석 : HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 를 이용하여 285nm에서 성분 분석 후 표준물질을 이용하여 표준곡선 그린 후 유자착즙액에 함유되어 있는 기능성 성분 정량함.</p> <p>○모델 시스템 구축 : 상업용 펙틴(DE:30%)과 나린진을 이용하여 펙틴 필름 제조.</p> <p>○용출특성 평가 : HPLC를 이용하여 펙틴필름에서 용출된 정도를 측정하고 %로 나타냄.</p> <p>○유자분말 제조 : -80℃로 냉동시킨 유자착즙액을 동결건조 후 액상의 유자 착즙액을 고체상태로 제조.</p> <p>○ 유자 분말을 이용한 펙틴필름 제조 : 건조된 유자분말을 이용하여 위 연구에서 확립한 모델 시스템에 적용.</p> <p>○용출 특성 평가 : 유자착즙액에 함유된 기능성 성분의 용출 정도를 HPLC로 측정하고 %로 나타냄.</p> <p>○최종 모델 시스템 적용 및 안전성 확립 : 유자부산물로부터 얻어진 유자펙틴과 유자분말을 이용하여 펙틴 필름 제조</p> <p>○지방 대체재로서의 유효성 평가를 위한 모델시스템 구축 및 저지방, 저칼로리 식품 제조</p> <p>○개발된 유자 가공 제품의 물리적 특성 및 텍스처 평가를 통한 식품학적 품질 평가</p>

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 현황

○ 유자의 생산 및 수출

유자는 고흥, 완도, 남해, 거제 지역에서 생산되고 있으나 고흥 지역이 전국 재배면적의 27%를 점유하고 있는 제1의 산지이다. 고흥군은 친환경 인증을 통해 상품 차별화를 적극 추진하고 있으며, 2007년에는 정부로부터 수출전문단지로 지정되어 있다.

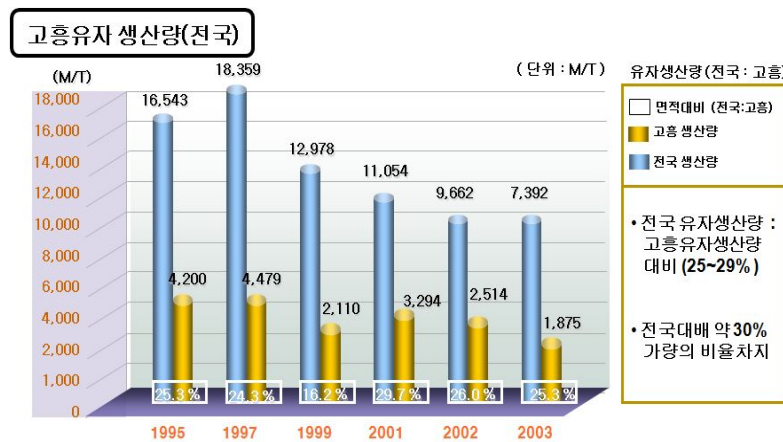


Fig 1. 고흥유자 생산량

유자는 대부분 유자차로 가공되고 있으며, 유자차에 대한 국내 수요가 적기 때문에 생산량의 대부분이 수출되고 있다. 구체적으로 고흥 관내 한성푸드 중심으로 한 생산업체의 2007년 수출 실적은 총 145억원으로 우리나라 전체 유자차 수출의 60%이상을 차지하고 있다.

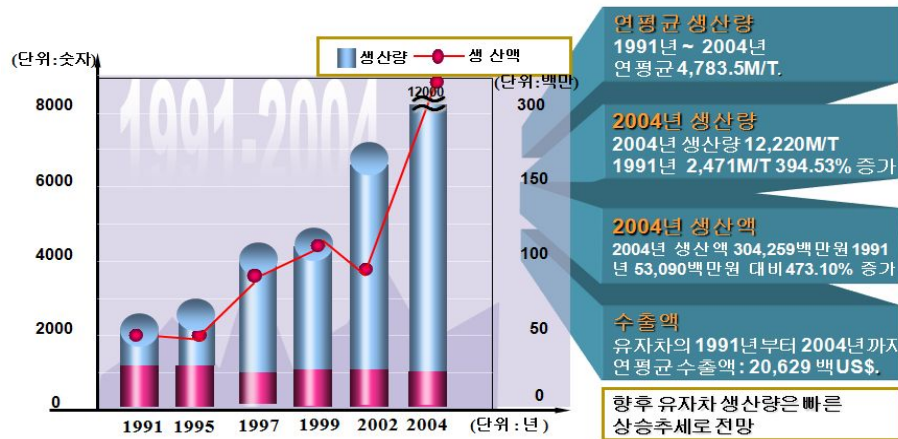


Fig 2. 2007년 수출실적 : 한성푸드 110억원(일본 45%, 홍콩 40%, 기타 15%)

이밖에도 군소업체 상품으로 인터넷 검색에서 유자AHA밀키로션, 유자입욕제, 유자소르베 등의 상품이 2007년에 출시되어 있다. 그러나 대기업(CJ 등)은 제품화에 대한 타당성을 검토하고 있는 상태이다. 이러한 내수 소비용 유자 및 유자차의 품질개선을 위해서 잔류농약검사 등이 확대되고 있으나, 부족하게 진행되고 있는 실정이며 유자 및 유자차에 대한 위해도 평가 연구가 시급한 상황이다.

○ 과채류 살균 및 세척 기술

국내 농산물의 주된 유통방법 및 형태는 산지에서 수확된 후 아무런 전처리 과정 없이 농산물의 특성에 따라서 산물 또는 규격 포장 상자를 이용하여 대부분 원형상태로 도심지에 운반된다. 국내 채소의 생산품목 중 생산량이 많은 무, 배추, 파 등의 경우 생산지에서 수확된 원형 그대로의 생물상태로 대부분 5~6단계의 복잡한 유통 단계를 거쳐 생산자에서 소비자에게로 공급되고 있다. 이러한 결과 소비지로 운반된 채소류는 도시의 도매상에서 소매상으로 유통되는 과정에서 많은 폐기물과 흙 등 환경오염 물질을 발생시켜 도시환경 오염의 주요 원인이 되고 있다. 배추의 경우 원료 폐기물로 소비지에서의 감모율이 20~30% 정도로 매우 심각한 수준에 이르고 있다. 이러한 유통형태는 도시로의 농산물 폐기물 유입과 외관의 불량 그리고 부적합한 유통조건으로 선도 하락 등 상품가치를 저하시키고 소비자의 구매력을 감소시키므로 농가의 소득 감소 현상을 일으키는 주원인이 되고 있다. 이러한 측면에서 볼 때, 신선 과채류는 처리 공정상 토양 및 전처리 라인으로부터의 미생물 오염은 피할 수 없으며, 저장기간에 따른

채소 자체의 품질저하와 더불어 위해성 오염 미생물의 혼입과 이에 따른 위해 가능성은 항상 상존하고 있다. “국내산 유자의 가공이용 및 저장성 증대를 위한 기술개발” 연구보고서(97. 6. 한국식품개발연구원)에 의하면 ‘94년산 유자를 대상으로 고독성인 메치온유제(methidathion, 스푸라사이드), 오메톤액제(omethoate, 호리마트), 파라치온유제(parathion-ethyl, 파라치온), 아진포수화제(azinphos-methyl, 구사치온)에 대하여 수세척 후의 잔류량을 분석한 결과, 생과에 있어서는 고흥산 유자가 타 지역(거제산 및 제주산)에 비해 양호한 편으로 나타났으나, 허용범위(식품위생법, 국내산 밀감 기준에 준한 것임)보다 다소 높게 검출되었으며, 유자를 가공한 유자청과 착즙액에서 잔류농약 함량에 대해 살펴보면, 껍질을 원료로 하는 유자청에서는 오메톤 액제가 허용기준치보다 약 8.5배, 메치온 유제는 약 5배, 파라치온 유제는 약 8배로 높게 분석되었으나, 아진포수화제는 검출되지 않았으며, 또한, 세척시 침지식 보다는 분사식이, 세척후 물기를 제거하는 수단, 그리고 세척시 가정용 세제를 첨가하는 것이 잔류농약 제거에 상당히 효과가 있음을 확인하였다.

○ 이산화염소수

국내의 이산화염소 관련 기술은 1999년 환경부가 먹는물 관리법에서 살균 소독제로 1 ppm이하 사용을 승인하였으며, 현재 방류수에 대해 소독력 및 COD 제거 등에 관한 하수처리장에서 도입 검토단계이다. 시판 발행장치의 생성 이산화염소 농도는 대략 500~5,000 ppm 수준이나 이산화염소 살균소독 유효성 평가자료에 대한 자료의 미진으로 처리장의 실제 적용 기준 설정이 매우 어려운 실정이다. 국내 주요 생산 판매업체의 제조방식은 아염산소다와 염산을 이용한 방식, 염소가스와 아염을 이용한 방식, NaOCl과 HCl 반응에 의한 공법, 대용량 설비에서는 염소 가스와 아염산소다를 사용하는 2핵 방식, 소형용량에서는 아염과 소금물을 이용한 전기분해방식이 있으며 기기생산업체는 주로 정수장, 하수처리장 등에만 적용하고 있고 식품가공공장의 위해미생물 저감 및 억제에 대한 살균소독에 있어서는 pilot plant 적용단계로 개발하고 있다.

이산화염소에 대한 연구는 수처리 분야를 제외하고는 양식넙치에 대한 살균력과 급성독성실험, 밀의 살균에 대한 연구 등 극히 일부에 지나지 않으며 식품분야의 활용연구는 거의 없는 실정이다.

○ 전기분해수

국내에서도 최근에 Bacillus sp. Staphylococcus sp.와 효모 등을 대상으로 전해산화수의 노출시간에 따른 살균력을 검토하여 의료용 기구의 살균 및

소독제로서의 적용가능성 확인한 바 있으며, 전해산화수의 식품가공 분야 응용가능성을 확인하고자 미생물에 대한 실험적 살균효과와 배추, 양배추, 케일 및 상치를 대상으로 표면살균 효과를 검토한 보고가 있다. 비열살균 식품인 김치의 제조시 원부재료의 세정 및 제균 매체로서의 적용 가능성을 검토하였으며, 돈육 및 육계의 표면미생물 살균을 통한 저장성 연장 등 산업화 응용 가능성 검토, 본 연구팀은 염장처리한 단무지의 탈염 및 세정, 조미 공정에서의 살균효과와 전기분해수 처리에 의한 탈염 공정에서의 단무지 품질 특성을 조사한 결과, 단무지 제조공정의 축소 및 시간 단축을 위한 염장단무지의 탈염/세정공정 동시 적용 방안과 장기 보존 및 비열 살균을 위한 전기분해수 적용 조미액 제조 방안의 가능성을 확인하였는바, 향후 전기분해수의 식품가공에의 다양하게 적용함으로서 공정 단축 및 개선에 크게 이바지할 것으로 판단된다. 우리나라는 전기분해에 의한 차아염소산수 생성장치(이온수기)를 약사법 제2조 규정에 따라 사람 또는 동물의 질병의 치료예방 등의 목적에 사용되는 「의료용물질생성기」로 지정하고 있는 실정이며 특히, 학교 단체급식소 및 식품산업 전반에 걸쳐 많이 보급되어 있다. 생성기기는 주로 일본 및 미국 기술 도입에 의한 전기분해 방식을 이용한 제품 생산 체제이며 격막식 및 무격막식의 가정용 이온수기 및 상업용 강산성이온수기, 약알칼리성 살균기능수 생성장치, 중성 살균기능수 생성장치를 제조 판매하고 있다.

제 2 절 국외 현황

○ 세계적으로도 웰빙 트렌드의 확산으로 유기농산물과 친환경재배 농산물의 생산과 수요가 지속적으로 증가하고 있다. 소득수준이 높은 북미와 유럽지역을 중심으로 1990년 이후 매년 10% 이상의 지속적인 성장세를 보이고 있으며, 아시아권에서 중국은 녹색식품과 유기식품을 전략적 수출 농산물로 육성하고 있어 친환경농업이 큰 폭으로 성장하고 있다. 2002년까지만 해도 마땅한 소비처를 찾지 못해 수확철이면 가격폭락으로 농업인의 애를 태우던 유자차 유자차가 가공되어 일본과 중국시장에서 선풍적인 인기를 얻으면서 한국 수출 농식품 중 최고의 히트상품으로 떠오르고 있다. 특히, 중국시장에서는 유자차가 비타민 C가 풍부하고 미용에 좋다는 인식이 확산되어 2002년 16만불에 불과하던 수출이 2006년에는 530만불에 이를 정도로 큰 인기를 얻고 있다. 한편 전통식품의 세계화 기반을 마련하기 위해서 정부는 지난해 코덱스 아시아조정위원회에 유자차(Yujacha)에 대한 국제식품규격안을 제안해 놓은 상태이고, 이 안이 국제식품규격으로 확정되

면 유자차는 세계인의 식품으로 저변을 확대할 계기가 된다. 이에 대응하여 수출용 유자의 품질개선을 위해서 잔류농약검사 확대와 친환경재배에 대한 연구가 진행되고 있으나 현재까지 정보와 기초연구자료가 부족한 실태이다.

○ 과채류 살균 및 세척 기술

일반적으로 납품받은 채소 및 과일 원재료가 흙, 진흙, 모래 등으로 덮여 있다면 가공공정을 거치기 전에 우선 조심스럽게 이물질들을 닦아내야 하며, 대부분의 경우 박피 또는 절단 과정 후에 2차 세척이 이루어진다. 예를 들어, 배추나 양배추는 절단 과정 후 반듯이 세척해야 하지만 당근은 절단하기 전에 미리 세척해야 한다. 이러한 박피나 절단 후의 세척과정은 미생물 및 세포 조직액을 제거하여 가공 이후의 저장과정중에서 미생물 생육과 효소적 산화를 감소시키는 역할을 한다. 특히 농산물을 세척할 때는 단순히 물에 담가두는 것보다 흐르는 물 또는 기포 발생장치를 사용하는 것이 더 좋으며, 이에 사용되는 세척수는 미생물 오염문제가 없어야 하고 관능적인 품질도 우수해야 하며 가능하다면 5℃이하로 수온이 낮아야 한다. 일반적으로 세척수의 양은 박피 및 절단 전에는 5-10 l/kg, 후에는 3 l/kg을 사용하도록 권장하고 있다(Ahvenainen and Hurme, 1994). 또한, 초기 미생물 수를 줄이고 효소활성을 떨어뜨려 신선 상품의 유통 기한과 관능적 품질을 향상시키기 위해서 세척수에 보존제를 첨가하여 사용할 수도 있다. 일부 문헌에는 과채류의 최소가공에 사용할 수 있는 여러 보존제가 소개된 바 있으나, 그 중 일부만이 현재 상업적으로 사용되고 있으며 다른 보존제의 효율성에 대해서는 정보가 부족한 형편이다. 더욱이 일부 국가에서는 염소제재와 같은 보존제의 사용을 허용하지 않고 있다. 여러 연구자들에 의하면 박피 및 절단 전후에 세척액 1 l 당 100-200 mg의 염소나 구연산을 첨가하는 것이 제품의 유통기한을 연장하는데 효과적이라고 한다. 그러나 염소제재를 사용할 경우 채소류 제품은 반듯이 헹굼과정을 거쳐 염소 농도를 식수와 동일한 수준으로 낮추어줌으로서 관능적 품질을 향상시켜야 할 것이다. 특히 염소 처리효과는 pH가 낮고, 세척액의 온도가 높으며, 불순물이 적은 물로 정확한 접촉시간을 지킬 때에 더욱 효과적일 수 있다. Kabir(1994)에 의하면 염소농도가 70 mg/l 일 경우 최적 접촉시간은 12~13초라고 한다. 염소화합물이 수용액이나 가공장비의 오염 미생물을 불활성화시키는데에는 매우 효과적임에도 불구하고, 신선한 과일이나 채소에서 발견되는 미생물에 동일한 효과가 있는지에 대해서는 상반된 견해가 있다 (Brackett, 1994). 예를 들어 염소 화합물이 상추와 같은 몇몇 엽채류에서는 호기성 미생물수를 줄이는 것으로 나타났지만, 근채류나 양배추에서는 반

드시 그렇지 않은 않았다. 이에 반해 Torriani와 Massa(1994)는 절단된 당근을 염소수(20 mg free chlorine/ℓ)로 세척했을 때 coliform은 현저하게 줄지만 호기성 세균수는 그다지 영향받지 않음을 확인하였다. 결과적으로 염소 화합물의 처리 효과는 대상 품목과 처리 농도에 따라서 미생물 감균 효과가 다른 것으로 이해되며, 실제로 저자들의 실험결과에서도 양파나 파 등의 일부 채소류는 염소수 처리에 의한 저온성 세균 및 호기성 미생물 등의 감소를 기대하기 어려웠고 설혹 초기 감균효과가 인정되더라도 저장 중의 품질과는 반드시 일치하지 않는 경향을 나타내기도 하였다. 최소가공 처리된 채소류를 100 mg/ℓ의 농도로 염소를 함유한 세척수에 조심스럽게 수세하고 그 후 다시 행귀내는 과정은 관능적인 측면에서 제품의 유통기한을 최소 며칠에서 7~8일까지 증대시킬 수 있는 것으로 나타났다. 특히 원재료 상태의 당근을 박피한 후에 구연산이나 염소수 용액에 세척한다면 최종 박피 당근제품의 관능적인 유통기간도 현저하게 연장된다. 물론 세척 과정은 박피 당근, 세절 배추, 박피 감자 등의 비타민(vitamin C와 carotene) 함량을 유의적으로 감소시키지는 않았으며, 이들의 주요 감소요인은 저장시간에 의해 좌우된다(Hagg 등, 1995). 한편, 세척후 제품에 잔존하는 물기를 제거할 때는 가능한 한 조심해서 다루어야 한다. 현재까지는 원심분리가 가장 좋은 방법으로 알려져 있으나, 제품에 따라 원심분리 시간과 속도를 신중하게 결정해야 한다. Ohta와 Sugawara(1987)는 세절한 양상추를 basket 타입(직경 52 cm, 1000 rpm)의 원심분리기에서 30초간 건조했을 때 최대의 유통기간을 얻을 수 있었다고 한다.

○ 이산화염소수

이산화염소에 대해서는 선진국에서 수처리분야를 중심으로 이미 다양한 연구가 이루어져 왔으며 1990년대 이후에는 식품산업에 활용할 수 있는 기술에 대한 연구가 지속적으로 이루어져 오고 있다. 대표적으로 미국의 경우, EPA는 음용수의 정수 처리시 발암물질인 THMs 및 HAAs 등을 생성치 않기 때문에 안전한 살균 소독제로 권장하고 있고, FDA는 과일이나 야채, 식품용기 등의 세척에 사용할 수 있는 것으로 규정하고 있으며(CAS Reg. No. 10049-04-4), WHO는 이산화염소의 안전성을 식품첨가물중 가장 안전한 기준인 A-1등급으로 분류하고 있다. 이산화염소는 염소산나트륨(NaClO_3)로부터 생성될 수도 있지만 대부분의 소규모 발생장치는 전구 화학물질로 아염소산나트륨(NaClO_2)을 사용하며 염소-아염소산염, 산-차아염소산염-아염소산염, 산-아염소산염법 등으로 생성하는 시스템이 개발되어 있다. 발생기별로는 크게 화학적 생성과 전기분해방식으로 나뉜다. 미국뿐만 아니라 유럽에서도 이미 오래전부터 이산화염소를 수처리분야에 이용해 왔으며, 안전성에 대한 연구 또한 지속적으로 이루어져 GRAS로 인식되어

있다. 이미 가금육에 대해서는 냉각수에서 일반 염소와 비교하여 최소 7배 이상의 효과 있는 것으로 보고되어 있고, 높은 지속성을 가진 것으로 알려져 있다. White 등에 따르면 2.7ppm의 이산화염소를 대장균과 30초 접촉했을 때 98.9%가 감소되었고 10.8ppm의 이산화염소를 접촉시켰을 때에는 107 CFU의 감균효과가 있었다고 보고하였다. 식품분야에서의 활용 연구로 새우 등의 수산물과 가금육 등의 도체에 대한 적용연구, 사과와 같은 과채류에 대한 병원성 미생물의 살균효과, 과채류의 재배에 있어서의 살균효과, *Bacillus subtilis*의 spore에 대한 살균기작에 대한 연구, hepatitis A virus의 불활성화에 대한 연구, 사과의 *Alicyclobacillus acidoterrestris*의 제어를 위한 연구 등 다양한 연구가 진행되고 있으며 활용도 제고를 위한 노력도 급속히 이루어지고 있는 실정이다. 미국 FDA에서 승인한 이산화염소의 식품활용 사례를 보면 소독액으로서는 100~200ppm, 절단 및 박피하지 않는 과채류에는 5ppm, 외피를 벗기지 않은 완두콩에는 5ppm 이하, 옥수수 및 절단, 박피한 감자에는 1ppm 이하, 가금육에는 3ppm 이하, 가금육의 가공용수로서는 50~1,200ppm, 육가공용 도체에는 500~200ppm, 해산물 저장용 용수 및 얼음에는 40~50ppm으로 승인하고 있다.

○ 전기분해수

전기분해수의 응용 분야는 이미 일본 등 선진 외국에서 병원, 의료 관계에서의 병원성균 살균, 수술용 기구의 살균 및 소독, 조리실 청소 등에 사용하고 있고, 호텔, 레스토랑 등지에서는 도마, 행주 등의 주방 세정에도 활용되고 있으며, 또한 식품가공 분야에서는 사용 기기류의 세정 및 살균 공정, 식육 햄의 살균처리 등에 관한 시험적 연구가 일부 소개되고 있다. 절단한 양배추, 오이, 사과를 대상으로 pH 2.4~2.6, ORP +1,000 mV의 전해산화수에 1~5분간 침지후 살균효과를 조사한 결과 양배추와 오이에서는 일반세균이 1/100~1/1,000수준으로 감소되었고 대장균군은 음성을 나타냈다고 보고하였으며, 상추를 pH 2.7~3.0, ORP +1,000~1,200 mV의 전해산화수에서 10⁶의 초기 세균이 1~5분간의 침지로 10¹~10² 수준으로 감소한 결과, 전해산화수의 신선채소류에 대한 세정 및 제균매체로서의 활용 가능성을 제시하였음을 보고하였다. 또한 식품 가공분야에 있어서는 곤약 제조시 충진수로서의 이용, 두부 제조에 있어서 원료 대두의 침지수로 활용하여 세정, 미생물의 살균과 포자 발아 억제 및 사멸 효과와 더불어 두부의 가공적성이 개선되었음을 보고한 바 있다. 의료분야에 있어서는 전해산화수로서 대장균, 황색포도상구균 등을 대상으로 소독효과를 검토한 결과 1분 이내에 사멸되는 것을 확인하였고, 전해산화수의 *in vitro* 항미생물효과를 검토하여 전해산화수가 매우 폭넓은 항균 스펙트럼을 가짐을 확인하였다. 치과의료 분야에서 충치균 등의 억제와 아스트린젠트 효과에서 아토피

성 피부염의 치료에 관해 연구가 되고 있으며, 임상적으로 분리된 균주에 대한 살균효과를 검토한 결과를 보고한 바 있다. 이외 농업분야에서의 과실, 화훼류의 살포, 비닐하우스 내의 세정 및 제균 효과 등에 대한 계속적인 연구가 진행되고 있다. 일본 강전해수기업협회(Strong Electrolyzed Water Association : SEWA)에 의한 전기분해수의 급성경구독성, 피부누적 자극, 눈자극성, 변이원성시험, 준급성독성, 트리할로메탄생성시험 등 안전성 시험에 있어서 양호한 성적을 얻었으며 안전성이 높다고 보고하고 있다. 식품에의 응용을 위한 안전성 확보관련 시험을 위하여 쥐에게 3개월 동안 전기분해수를 자유로이 경구투여 방식으로 음용하게 하여 일반증상, 혈액학적, 생화학적, 병리조직학적 검사 등 각각의 검사를 한 결과, 구강조직에 국소적인 상피의 반응은 나타났으나 다른 독성증상은 발견되지 않았고, 구강점막 자극성시험, 급성 독성시험에서도 이상은 발견하지 못하였다. 일본의 노동후생성 식품보건부 기준과는 강전해수제조 기업체의 제조장치에 대한 식품첨가물 지정 신청을 접수하여 심의한 결과 첨가물로서 취급함이 타당하다고 인지하고 2002년 6월 식품위생법 제6조의 규정에 의거 식품첨가물로 지정하였다. 미국에서는 차아염소산을 본질적으로 무해한 (Generally Recognized As Safe)물질로 인지하고 1998년 EPA는 강산성전해수 생성장치를 「살균제 제조장치」로 인가하였으며, 1999년 FDA는 강산성전해수를 과일이나 야채의 세정 사용인가, USDA는 1999년 생육(生肉)의 안전성 확보를 위해 장내병원균 제거 목적으로 강전해수 사용을 승인하였다. 중국 위생부는 1999년 강산성수 생성장치를 소독기계로서 위생허가를 하였다. 일본에서는 가공식품의 맛과 품질의 개선, 발효기간의 단축, 식품의 선도유지 등에 효과가 있는 것으로 소개되고 있다. 식품살균에 있어 영양소의 파괴, 유해성분 발생, 미각의 소실 등과 같은 유해요소에 대해서는 충분히 검토하였고, 전기분해수에 의한 살균 소독시는 대상 식품의 형상, 표면 상태(평활도, 오염도, 유기물 함량 등), 균의 종류 및 농도, 전기분해수 물성과 선도, 사용수량의 비율 등을 고려하여 검토한 바가 있다.

○ 국외 제품생산 및 시장 현황

세계적으로도 웰빙 트렌드의 확산으로 유기농산물의 생산과 수요가 지속적으로 증가하고 있다. 소득수준이 높은 북미와 유럽지역을 중심으로 1990년 이후 매년 10% 이상의 지속적인 성장세를 보이고 있으며, 아시아권에서 중국은 녹색식품과 유기식품을 전략적 수출농산물로 육성하고 있어 친환경 농업이 큰 폭으로 성장하고 있다. 2002년까지만 해도 마땅한 소비처를 찾지 못해 수확철이면 가격폭락으로 농업인의 애를 태우던 유자가 유자차로 가공되어 일본과 중국시장에서 선풍적인 인기를 얻으면서 한국 수출 농식품 중 최고의 히트상품으로 떠오르고 있다. 특히, 중국시장에서는 유자

차가 비타민 C가 풍부하고 미용에 좋다는 인식이 확산되어 2002년 16만불에 불과하던 수출이 2006년에는 530만 불에 이를 정도로 큰 인기를 얻고 있다. 해외 제품의 경우는 Citron 입욕제, body lotion 등이 개발 중에 있으며, Dermaxime은 오렌지 껍질 추출물을 이용하여 cellulite(피하지방)을 줄이는 화장품과 이의 생리활성 성분인 hesperidin를 함유한 주름방지 아이크림 등을 개발하여 상품화 시켰다. 일본의 하야시바라에서는 glucosyl hesperidin을 화장품 소재로 개발하여 판매하고 있다. 따라서 이를 이용한 화장품 완제품의 개발에 따른 실용화 시장은 계속 성장할 것이라 예상 된다.

○ 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
기술 1 : 유자의 저장·유통을 위한 multilayer 식용 코팅 기법	일본 (학계 및 SEWA 등 신선 농수축산물 대상)	90%	90%	100%	본 신청팀은 관련기술과 관계된 여러 연구를 수행한 경험이 있음
기술 2 : 유자의 기능성 성분 스크리닝 및 멀티 기능성 분석 기법	미국 (여러가지 Phytochemicals에 대한 기술)	90%	90%	100%	
기술 3 : 유자의 세척/살균/물기제거 통합 시스템	일본 (학계 및 생산자단체 등 신선 농산물 대상)	90%	90%	100%	본 신청팀은 관련기술과 관계된 여러 연구를 수행한 경험이 있음
기술 4 : 유자 및 유자폐기물을 이용한 기능성 식품/향장 소재 개발 기술	프랑스, 스위스 (천연물유래의 phytochemical을 이용한 화장품 소재 및 완제품개발)	80%	80%	100%	본 신청팀은 기존의 phytochemical 활용 기술에 발효기술을 접목하여 한국 고유의 소재 개발 경험보유

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 세부과제별 연구개발수행 내용 및 결과

1. 1세부 : 농약독성 및 잔류평가 기술 개발 및 운용

가. 세부과제의 목표 및 내용

전라남도 고흥군에서 생산된 수출용 및 시중에 유통되는 유자의 잔류농약분석을 통해 재배자의 농약 적정사용을 유도하여 안전한 친환경 유자가 유통될 수 있도록 함. 이는 안전성 평가자료 및 농약 잔류기준 설정 시, 기초 자료로 활용함으로써 내수용 유자의 잔류농약에 대한 안전성을 확보할 뿐 아니라 선진국의 생산이력제에 대응하는 수출용 유자의 안전성 확보에도 기여함. 아울러 수출대상국의 유자위해인자에 관한 정보를 체계적으로 수집함으로써 유자수출의 걸림돌을 제거할 수 있음.

나. 8종 농약의 분석법 확립

1) 8종 농약의 표준곡선 작성

1차년도의 8종 대상 농약(Chlorpyrifos, Phosalone, Prothiofos, Deltamethrin, Spirodiclofen, Acequinocyl, Benomyl, Thiophante-methyl)의 표준곡선은 External standard 방법으로 표준곡선을 작성하였으며 감귤류 잔류농약에 대한 논문 및 허용기준을 참고하여 표준곡선의 범위를 정하였음. 표준곡선은 선형관계($r^2=0.975-0.999$)를 보였음. Benomyl과 Thiophante-methyl은 추출과정 중에 빠른 속도로 Carbendazim으로 분해되기 때문에 유자의 잔류농약 분석시에는 Carbendazim을 정량하여 Benomyl과 Thiophante-methyl의 합산한 정량값을 구했고 표준곡선 또한 Carbendazim으로 작성하였음.

Table 1. Parameters of calibration curves of the pesticide and their recoveries.

Pesticide	validation values			LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
	Linearity				
	Equation	R^2	Recovery		
Chlorpyrifos	$Y = 18.12X - 7.467$	0.999	109.9 ± 3.9	0.02	0.08
Phosalone	$Y = 20.34X - 12.93$	0.998	96.0 ± 3.9	0.02	0.08

Prothiofos	$Y = 17.70X - 0.94$	0.999	99.4±4.2	0.03	0.10
Deltamethrin	$Y = 22180X - 7221$	0.975	103.2±5.9	0.02	0.08
Spirodiclofen	$Y = 11818X - 7.32$	0.999	93.8±6.9	0.10	0.50
Acequinocyl	$Y = 7773X + 3737$	0.999	93.2±2.7	0.08	0.27
Carbendazim	$Y = 29477X + 2956$	0.999	80.4±5.8	0.01	0.03

2) 8종 농약의 농약의 검출한계(LOD: Limit of Detection) 및 정량한계(LOQ: Limit of Quantification) 결정

8종 농약을 0.5부터 50ppm까지 제조하고 크로마토그램 상에서 신호/노이즈(Signal/Noise) 비율이 3 과 10 이상이 되는 조건을 기준으로 LOD 와 LOQ를 작성하였음. 각 농약별 LOD와 LOQ는 아래 Table 2와 같음. LOD는 0.02-0.3ppm 이었고, LOQ는 0.06-0.9였다. 국내외 다른 연구팀(Sin et al,2006; Veneziano,2004; Pizzutti ionara,2007) 에 의해 수행된 연구결과와 비교하였을 때에도 LOD와 LOQ값은 큰 차이를 보이지 않았음.

Table 2. Result of LOD, LOQ for pesticides

Pesticide	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	국내외 연구팀 연구결과	
			LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Chlorpyrifos	0.02	0.08	0.024	0.072
Prothiofos	0.03	0.10	0.010	0.030
Phosalone	0.02	0.08	0.026	0.078
Deltamethrin	0.02	0.08	0.021	0.063
Acequinocyl	0.10	0.50	0.003	0.010
Spirodiclofen	0.03	0.10	0.050	0.150
Carbendazim	0.02	0.06	0.020	0.060

3) 8종 농약의 회수율 분석

회수율은 시료에 1µg을 인위적으로 첨가하여 동일한 방법으로 시료전처리와 분석을 시행하였음. 이를 통해 분석된 각 농약물질의 양과 인위적으로 첨가된 각 농약의 양을 비교하여 %로 산출하였음. 각 실험은 3반복하여 정확도와 정밀도를 높였으며, 회수율은 87 ~ 109%로 측정되었음. 또한 회수율실험에서는 8종의 잔류 농약 분석에 대한 분석검증(validation)으로 일내정밀성(Intra-day)과 일간정밀성(Inter-day)을 수행하였음. 일내정밀성은 시료에

각 농약 1 μ g을 인위적으로 첨가하여 최적화된 분석법을 하루에 5회 반복 수행하였고, 일간정밀성은 같은 분석 방법으로 5일간 반복 수행하였다.

다. 국내 유통 및 수출용 유자 중의 잔류 농약 함량 모니터링

1) 시료 선정 및 구입

본 연구는 농약 독성 및 잔류량 평가에 중점을 두어 수출용 유자의 친환경 생산기술 최적화 연구를 수행하였다. 이를 위해 국내 주요산지인 전라남도 고흥군을 중심으로 생산된 유자에 대한 농약 잔류 실태 모니터링을 실시하였다. 분석시료는 고흥군의 동강면사무소의 협조를 얻어 2개 읍(고흥읍, 도양읍), 14개 면(풍양면, 도덕면, 금산면, 도화면, 포두면, 봉래면, 동일면, 점암면, 영남면, 과역면, 남양면, 동강면, 대서면, 두원면)의 유자재배 농가 중 무작위로 선정한 10 농가에서 생산된 일반유자와 친환경 재배 유자를 분석하였다.

2) 샘플 분석 실험방법

가) 사용된 시약

Chlorpyrifos, Prothiofos, Phosalone, Deltamethrin, Carbendazim, Acequinocyl, Spirodiclofen는 Dr. Ehrenstofer에서 구입하였다. 실험에 사용된 용매로는 석유 에테르(Burdic & Jackson, Muskegon, MI. U.S.A), 아세톤, 디클로로메탄, 헥산, 메탄올(J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ. USA) 모두 HPLC grade를 사용하였다. Florisil Cartridge(1000mg/6ml)는 (serial number 56694-2-29, Phenomenex, Inc.)에서, Amino propyl Cartridge(1000mg/6ml)는 (serial number 45370-6-28, Phenomenex, Inc.)에서, Silica Cartridge(500mg/6cc)는 (Wates Corporation Milford, Mass U.S.A)에서 구입하였다. Syringe Filter(25mm, 0.45 μ m)는 (P/N WKG4525-1, WOONGKI SCIENCE CO.,LTD)에서 구입하였다. 초산(CH₃COOH)는 순도 99.0%의 제품(DUCSAN, Korea), 염화나트륨(NaCl)은 순도 99.0%의 제품(SAMCHUN, Korea), 무수황산나트륨(DAEJUNG, Korea)의 제품을 구입하여 사용하였다.

나) 표준액 제조

① Pesticide 표준원액 제조

GC 분석물질(Chlorpyrifos, Prothiofos, Phosalone, Deltamethrin)은 100 mL Volumetric Flask에 아세톤 100mL을 넣고 EC 10mg을 분석저울을 이용하여 정밀히 달아 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되게 한다. 아세톤에 충분히 녹도록 vortex를 해 준다. 이렇게 만들어진 표준원액은 -20°C 에서 보관하며 사용하였다. LC 분석물질은(Acequinocyl, Spirodiclofen, Carbendazim)은 동일한 방법으로 아세톤 대신 메탄올을 이용하여 표준액을 제조하였다.

② Pesticide 표준 용액 제조 방법

GC 분석물질(Chlorpyrifos, Prothiofos, Phosalone, Deltamethrin)은 100 mL Volumetric Flask에 아세톤 100mL을 넣고 EC 10mg을 분석저울을 이용하여 정밀히 달아 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되게 한다. 아세톤에 충분히 녹도록 vortex를 해 준다. 이렇게 만들어진 표준원액은 -20°C 에서 보관하며 사용하였다. LC 분석물질은(Acequinocyl, Spirodiclofen, Carbendazim)은 동일한 방법으로 아세톤 대신 메탄올을 이용하여 표준액을 제조하였다. 10mL Volumetric Flask에 아세톤(메탄올) 9 mL과 EC 표준원액 1 mL을 가해 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 용액을 제조한다. 같은 방법으로 10배 희석하여 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 용액을 제조하였다.

③ 검량곡선표준액

검량곡선표준 용액은 7개 농도(0.5, 1, 3, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)이며, 각 농도에 맞게 표준원액에서 일정량을 10mL Volumetric Flask에 희석하여 표준용액을 제조하여 사용하였다. 8종 분석 농약 중 Deltamethrin은 표준 용액의 5개 농도(0.5, 1, 2, 3, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 검량곡선을 작성하였다.

3) 시료전처리방법

가) Chlorpyrifos, Prothiofos, Phosalone, Deltamethrin

준비한 유자를 저울로 20g을 취한 후 acetone 150mL, D.W. 50ml을 넣어 교반기(Omni Macro Homogenizer)로 5분간 고속균질화 한다. 이를 여지(Advantec No. 5A filter paper)가 깔려있는 부호너 깔때기에서 감압 여과한 후 separator funnel에 옮긴다. Petroleum ether : DCM (1:1) 100mL와 saturated NaCl 50mL을 separator funnel에 넣고 5분 동안 진탕한 후 정치시켜 층을 완전 분리시킨다. 둥근바닥플라스크에 깔때기를 얹고, 깔때기에 여과지(Whatman 1PS)를 놓고, 그 위에 무수황산나트륨을 적당량 두고 위층(organic layer)을 통과 시킨다. 아래층(liquid layer)

은 dichloromethane 50mL로 가하여 진탕한 후 다시 한 번 층을 분리시킨다. 아래층(organic layer)을 둥근바닥플라스크에 받는다. 이렇게 추출과정을 통해 모은 액을 evaporator한다. SPE 정제장치에 카트리지(florisil)를 올리고 카트리지(florisil의 활성을 위해 n-hexane 5mL 투입하고, 20% acetone[acetone : hexane (2:8)]5mL로 유출시킨다. 감압농축과정을 끝낸 플라스크에 100% acetone 5mL를 넣어 잔류물을 녹인 후 활성화 시킨 카트리지(florisil)에 넣어 20% acetone [acetone : hexane (2:8)] 5mL와 함께 통과 시켜 SPE tube에 함께 모은다. 이를 40℃에서 질소 농축한다. 100% acetone으로 2mL 최종mass-up하여 voltexing(or sonification)한 후 시험 용액으로 한다. GC/NPD & GC/MS로 분석한다. 분석조건은 다음 Table 3, Table 4와 같다.

Table 3. Analytical conditions of GC-NPD (Chlorpyrifos, Prothiofos, Phosalone)

Instrument	Agilent Technologies 6890
Detector	NPD
Column	DB-5 (30m x 0.25mm x 0.25um)
Injection temp.	260℃
Detector temp.	280℃
Oven temp.	120℃ 2min (10℃/min)
	220℃ 2min (7℃/min)
	250℃ 2min (7℃/min)
	280℃ 15min
Carrier gas	N2
Column flow	1.0ml/min
Split ration	Split mode 10:1
Injection volume	1ul

Table 4. Analytical conditions of GC-MS (Deltamethirin)

Instrument	Agilent Technologies 6890
Detector	Agilent Technologies 5975 MSD
Column	DB-5MS(30m x 0.25mm x 0.25um)
Injection temp.	260℃
Oven temp.	80℃ 2min (25℃/min)
	220℃ 5min (2℃/min)
	280℃ 5min
Interface temp.	300℃
Carrier gas	He
Column flow	2.0ml/min
Split ration	Split mode 10:1
Injection volume	2ul
SIM mode	181*, 253, 209, 172, 152 m/z

* Target ion

나) Acequinocyl

준비한 유자를 저울로 20g을 취한 후 acetone 150mL ,D.W. 50ml 그리고 acetic acid 0.5mL을 넣어 교반기(Omni Macro Homogenizer)로 5분간 고속 균질화 한다. 이를 여지(Advantec No. 5A filter paper)가 깔려있는 부흐너 깔때기에서 감압여과한 후 separate funnel에 옮긴다. Saturated NaCl 50mL, dichloromethane 50mL를 차례로 separate funnel에 넣고 5분 동안 진탕한 후 정치시켜 층을 완전 분리시킨다. 둥근바닥플라스크에 깔때기를 얹고, 깔때기에 여과지(Whatman 1PS)를 놓고, 그 위에 무수황산나트륨을 적당량 두고 위 층(organic layer)을 통과 시킨다. 아래층(liquid layer)은 dichloromethane 50mL로 가하여 진탕한 후 다시 한 번 층을 분리시킨다. 아래층(organic layer)을 둥근바닥플라스크에 받는다. 이렇게 추출과정을 통해 모은 액을 evaporator한다. SPE 정제장치에 카트리지(silica)를 올리고 카트리지(silica)의 활성을 위해 n-hexane 5mL 투입하고, hexane : ethyl ether(9 : 1, 초산 0.2% 함유) 10mL로 유출시킨다. 감압농축과정을 끝낸 플라스크에 hexane 5mL를 넣어 잔류물을 녹인 후 활성화 시킨 카트리지(silica)에 넣어 hexane : ethyl ether(8 : 2, 초산 0.2% 함유) 10mL와 함께 통과 시켜 SPE tube에 함께 모은다. 이를 40℃에서 질소 농축한다. acetonitrile으로 2mL 최종mass-up하여 voltexing(or sonification)한 후 시험용액으로 한다. HPLC/PDA로 분석한다. 분석조건은 다음 Table 5과 같다.

Table 5. Analytical conditions of HPLC (Acequinocyl)

Instrument	Water HPLC	
Column	Zorbax extend-C18 (4.6mm * 250mm, 5um)	
Detector	PDA detector 250nm	
Mobile phase	A : aqueous 0.1% phosphoric acid	0.1 mL/min
	B : Acetonitrile	0.7 mL/min
	isocratic elution for 30min	
Column flow	0.8ml/min	
Injection volume	20 ul	

다) Spirodiclofen, Carbendazim

준비한 유자를 저울로 20g을 취한 후 acetonitrile 100mL , D.W. 100 mL을 넣어 교반기(Omni Macro Homogenizer)로 5분간 고속균질화한다. 이를 여지(Advantec No. 5A filter paper)가 깔려있는 부호너 깔때기에서 감압여과한 후 separate funnel에 옮긴다. NaCl 15g을 separate funnel에 넣고 5분 동안 진탕한 후 정치시켜 층을 완전 분리시킨다. 둥근바닥플라스크에 깔때기를 얹고, 깔때기에 여과지(Whatman 1P S)를 놓고, 그 위에 무수황산나트륨을 적당량 두고 organic layer을 통과 시킨다. liquid layer는 acetonitrile 50mL로 가하여 진탕한 후 다시 한 번 층을 분리시킨다. organic layer를 둥근바닥플라스크에 받는다. 이렇게 추출과정을 통해 모은 액을 evaporator한다. SPE 정제장치에 카트리지(amino propyl)를 올리고 카트리지(florisil)의 활성을 위해 dichloromethane 5mL 투입하고, 3% methanol/dichloromethane 5mL로 유출시킨다. 감압농축과정을 끝낸 플라스크에 3% methanol/dichloromethane 5mL를 넣어 잔류물을 녹인 후 활성화 시킨 카트리지(amino propyl)에 넣어 3% methanol/dichloromethane 5mL와 함께 통과 시켜 SPE tube에 함께 모은다. 이를 40℃에서 질소 농축한다. acetonitrile으로 2mL 최종mass-up하여 vortexing(or sonification)한 후 시험용액으로 한다. HPLC/PDA로 분석한다. 분석조건은 다음 Table 6, Table 7와 같다.

Table 6. Analytical conditions of HPLC (Carbendazim)

Instrument	Waters HPLC		
Column	Zorbax extend-C18 (4.6mm * 250mm, 5um)		
Detector	PDA detector 279nm		
	A : H2O	B : methanol	
	Time (min)	A%	B%
Mobile phase	Initial	70	30
	15	40	60
	20	70	30
Column flow	1.0ml/min		
Injection volume	10ul		

Table 7. Analytical conditions of HPLC (Spirodiclofen)

Instrument	Waters HPLC		
Column	Zorbax extend-C18 (4.6mm * 250mm, 5um)		
Detector	PDA detector 254nm		
	A : H2O	B : Acetonitrile	
	Time (min)	A%	B%
Mobil phase	Initial	80	20
	15	20	80
	35	20	80
	40	80	20
Column flow	1.0ml/min		
Injection volume	20ul		

라. 일반재배유자 및 친환경재배유자 분석 결과

분석시료는 고흥군의 2개 읍(고흥읍, 도양읍), 14개 면(풍양면, 도덕면, 금산면, 도화면, 포두면, 봉래면, 동일면, 점암면, 영남면, 과역면, 남양면, 동강면, 대서면, 두원면)의 유자재배 농가 중 무작위로 선정한 농가에서 생산된 일반유자 50시료와 친환경 재배 유자 30시료를 본 연구를 통하여 최적화된 분석 방법을 이용하여 분석하였음. Table 8.은 일반재배유자 분석결과를 나타낸다.

Table 8. Result of analysis for Yuza Cultivated by Ordinary Culture

Pesticide	1차년도		2차년도	
	Range(ug/ml)	검출 수 ²	Range(ug/ml)	검출 수
Chlorpyrifos	N.D. ¹	0/50	N.D.	0/30
Prothiofos	N.D.	0/50	N.D.	0/30
Phosalone	N.D.	0/50	N.D.	0/30
Deltamethrin	N.D.	0/50	N.D.	0/30
Acequinocyl	N.D.	0/50	N.D.	0/30
Spirodiclofen	N.D. ~1.889 ± 0.923	16/50	N.D. ~0.718 ± 0.014	5/30
Carbendazim	N.D. ~5.148 ± 1.152	36/50	N.D. ~3.839 ± 0.922	27/30

¹N.D.: value at or below the limit of detection

²Higher than LOQ

식품의약품안전청의 식품의 농약잔류허용기준(MRLs for Pesticides in Foods)에 따르면 Acequinocyl의 유자에 대한 국내 잔류 허용량은 1ppm이고 유자차에 대한 잔류 허용량은 3ppm으로 분석결과 1차년도, 2차년도 검출량은 문제가 되지 않는다. Spirodiclofen의 국내 잔류 허용량은 2ppm으로 분석결과 1차년도, 2차년도 검출량은 문제가 되지 않는다. Carbendazim은 유자에 대한 국내 잔류 허용량 기준 설정이 완료되지 않았지만 기타감귤류의 경우 기준치가 7.0ppm이므로 문제가 되지 않지만 유자와 관련된 기준설정이 시급하다. 2009년산 일반재배유자의 검출 수에 비해 2010년산 일반재배유자의 검출 수는 대략 감소하였으며, 2010년산 유자에서 개선된 점을 보이고 있다. 친환경유자의 분석 결과는 Table. 9와 같고 1차년도는 21건의 농약이 검출 되었으며 농약잔류허용기준을 초과하지 않았다. 2차년도의 경우 8건의 농약이 검출 되었으며 농약잔류허용기준을 초과하지 않았다. 전년대비 검출 수는 감소하였지만 친환경유자의 품질개선을 위해서는 농약사용량을 줄여야 할 것으로 여겨진다.

Table 9. Result of analysis for Yuza Cultivated by Environmentally-Freindly Culture

Pesticide	1차년도		2차년도	
	Range(ug/ml)	검출 수 ²	Range(ug/ml)	검출 수
Chlorpyrifos	N.D. ¹	0/30	N.D.	0/30
Prothiofos	N.D.	0/30	N.D.	0/30
Phosalone	N.D.	0/30	N.D.	3/30
Deltamethrin	N.D.	0/30	N.D.	0/30
Acequinocyl	N.D.	0/30	N.D.	0/30
Spirodiclofen	N.D. ~0.801 ± 0.485	8/30	N.D.	0/30
Carbendazim	N.D. ~2.910 ± 0.887	13/30	N.D. ~0.340± 0.011	8/30

¹N.D.: value at or below the limit of detection

²Higher than LOQ

Table 10은 유자차 분석결과이다. Acequinocyl의 유자차에 대한 잔류 허용량은 3.0ppm으로 분석결과 0.26~1.05ppm수준의 검출량은 문제가 되지 않는다. Spirodiclofen과 Carbendazim 또한 유자에 대한 국내 잔류 허용량은 각각 2ppm과 7ppm으로 문제가 되지 않지만, EU의 잔류 허용량은 각각 0.5ppm으로 2009년도 산 유자차의 경우에 cabendazim의 잔류량이 기준 허용치를 초과

한다. 그러나 2010년산 유자차에는 개선된 점을 보이고 있다. 2009년산 유자차의 검출 수에 비해 2010년도 산 유자차 검출 수는 감소하였고, 2010년도 산 유자차에 비해 2011년도 산 유자차는 감소하였다. 그 중 Cabendazim은 줄어든 경향을 보였다. Acequinocyl은 2009년산 유자차에 각각 3건 검출되었지만 2010년과 2011년에 생산된 유자차에서는 전혀 검출되지 않아 유자의 재배 시에 농약 사용량이 줄어들었다고 간주된다.

Table 10. Result of analysis for Yuza tea

Pesticide	1차년도		2차년도		3차년도	
	Range(ug/ml)	검출 수 ²	Range(ug/ml)	검출 수	Range(ug/ml)	검출 수
Chlorpyrifos	N.D. ¹	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Prothiofos	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Phosalone	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Deltamethrin	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Acequinocyl	N.D. ~ 0.525± 0.266	3/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Spirodiclofen	N.D.	0/50	N.D.	0/25	N.D.	0/25
Carbendazim	N.D. ~0.537 ± 0.501	12/50	N.D. ~0.078 ± 0.135	8/25	N.D. ~0.062 ± 0.036	4/25

¹N.D.: value at or below the limit of detection

²Higher than LOQ

1) 2009년산 일반재배 유자 분석 결과

가) Chlorpyrifos

Table 11. Concentration of Chlorpyrifos in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2009.

Chlorpyrifos 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)		Chlorpyrifos 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)	
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	0.0250 \pm 0.0005
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	N.D.	일반재배유자28	N.D.
일반재배유자 4	0.0253 \pm 0.0003	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	N.D.	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	0.0222 \pm 0.0005	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	N.D.
일반재배유자 9	0.0321 \pm 0.0017	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	0.0245 \pm 0.0032
일반재배유자11	N.D.	일반재배유자36	0.0237 \pm 0.0015
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	N.D.
일반재배유자13	N.D.	일반재배유자38	N.D.
일반재배유자14	N.D.	일반재배유자39	N.D.
일반재배유자15	0.0223 \pm 0.0001	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	0.0267 \pm 0.0020	일반재배유자41	N.D.
일반재배유자17	N.D.	일반재배유자42	N.D.
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	0.0667 \pm 0.0027	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	N.D.
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	N.D.	일반재배유자47	N.D.
일반재배유자23	N.D.	일반재배유자48	N.D.
일반재배유자24	N.D.	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	0.0224 \pm 0.0018

N.D.: value at or below the limit of detection

N.Q.: value at or below the limit of quantitation

나) Prothifos

Table 12. Concentration of Prothiofos in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2009.

	Prothiofos 농도 (ppm: µg Prothiofos/g 시료)		Prothiofos 농도 (ppm: µg Prothiofos/g 시료)
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	N.D.
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	N.D.	일반재배유자28	N.D.
일반재배유자 4	N.D.	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	0.0046 ±0.0003	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	0.0053 ±0.0003	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	N.D.
일반재배유자 9	0.0067 ±0.0001	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	N.D.
일반재배유자11	N.D.	일반재배유자36	N.D.
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	N.D.
일반재배유자13	N.D.	일반재배유자38	N.D.
일반재배유자14	N.D.	일반재배유자39	N.D.
일반재배유자15	0.0060 ±0.0004	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	0.0056 ±0.0016
일반재배유자17	N.D.	일반재배유자42	N.D.
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	N.D.	일반재배유자44	0.0056 ±0.0018
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	0.0052 ±0.0011
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	N.D.	일반재배유자47	N.D.
일반재배유자23	N.D.	일반재배유자48	N.D.
일반재배유자24	N.D.	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

다) Phosalone

Table 13. Concentration of Phosalone in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2009.

	Phosalone 농도 (ppm: $\mu\text{g Phosalone/g 시료}$)		Phosalone 농도 (ppm: $\mu\text{g Phosalone/g 시료}$)
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	0.0342 \pm 0.0002
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	N.D.	일반재배유자28	N.D.
일반재배유자 4	0.0350 \pm 0.0032	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	0.0368 \pm 0.0013	일반재배유자30	0.0349 \pm 0.0018
일반재배유자 6	0.0354 \pm 0.0027	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	0.0340 \pm 0.0018	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	0.0369 \pm 0.0018
일반재배유자 9	N.D.	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	0.0364 \pm 0.0047
일반재배유자11	0.0359 \pm 0.0017	일반재배유자36	0.0351 \pm 0.0026
일반재배유자12	0.0359 \pm 0.0019	일반재배유자37	N.D.
일반재배유자13	0.0364 \pm 0.0004	일반재배유자38	N.D.
일반재배유자14	0.0363 \pm 0.0021	일반재배유자39	N.D.
일반재배유자15	0.0361 \pm 0.0014	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	0.0355 \pm 0.0002	일반재배유자41	N.D.
일반재배유자17	0.0356 \pm 0.0019	일반재배유자42	N.D.
일반재배유자18	0.0354 \pm 0.0019	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	0.0365 \pm 0.0014	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	0.0361 \pm 0.0005	일반재배유자45	0.0342 \pm 0.0011
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	0.0357 \pm 0.0010	일반재배유자47	0.0356 \pm 0.0010
일반재배유자23	0.0352 \pm 0.0014	일반재배유자48	0.0340 \pm 0.0011
일반재배유자24	N.D.	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

N.Q.: value at or below the limit of quantitation

라) Deltamethrin

Table 14. Concentration of Deltamethrin in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2009.

Deltamethrin 농도 (ppm: µg Deltamethrin/g 시료)		Deltamethrin 농도 (ppm: µg Deltamethrin/g 시료)	
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	N.D.
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	N.D.	일반재배유자28	N.D.
일반재배유자 4	N.D.	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	N.D.	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	N.D.	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	N.D.
일반재배유자 9	N.D.	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	N.D.
일반재배유자11	N.D.	일반재배유자36	N.D.
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	N.D.
일반재배유자13	N.D.	일반재배유자38	N.D.
일반재배유자14	N.D.	일반재배유자39	N.D.
일반재배유자15	N.D.	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	N.D.
일반재배유자17	N.D.	일반재배유자42	N.D.
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	N.D.	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	N.D.
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	N.D.	일반재배유자47	N.D.
일반재배유자23	N.D.	일반재배유자48	N.D.
일반재배유자24	N.D.	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

마) Acequinocyl

Table 15. Concentration of Acequinocyl in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2009.

	Acequinocyl 농도 (ppm: μg Acequinocyl/g 시료)		Acequinocyl 농도 (ppm: μg Acequinocyl/g 시료)
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	N.D.
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	N.D.	일반재배유자28	N.D.
일반재배유자 4	N.D.	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	N.D.	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	N.D.	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	0.130 \pm 0.020	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	N.D.
일반재배유자 9	N.D.	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	N.D.
일반재배유자11	N.D.	일반재배유자36	N.D.
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	N.D.
일반재배유자13	0.134 \pm 0.207	일반재배유자38	N.D.
일반재배유자14	0.158 \pm 0.250	일반재배유자39	N.D.
일반재배유자15	N.D.	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	N.D.
일반재배유자17	N.D.	일반재배유자42	N.D.
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	N.D.	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	N.D.
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	N.D.	일반재배유자47	N.D.
일반재배유자23	N.D.	일반재배유자48	N.D.
일반재배유자24	N.D.	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

바) Spirodiclofen

Table 16. Concentration of Spirodiclofen in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2009.

	Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Spirodiclofen/g 시료)		Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Spirodiclofen/g 시료)
일반재배유자 1	0.430 \pm 0.254	일반재배유자26	0.594 \pm 0.207
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	0.156 \pm 0.069	일반재배유자28	N.D.
일반재배유자 4	N.D.	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	0.142 \pm 0.037	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	0.368 \pm 0.100	일반재배유자31	0.260 \pm 0.059
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	0.248 \pm 0.093
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	0.489 \pm 0.245
일반재배유자 9	N.D.	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	1.889 \pm 0.923	일반재배유자35	N.D.
일반재배유자11	N.D.	일반재배유자36	0.141 \pm 0.002
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	N.D.
일반재배유자13	N.D.	일반재배유자38	0.189 \pm 0.116
일반재배유자14	1.274 \pm 0.793	일반재배유자39	1.810 \pm 0.645
일반재배유자15	0.240 \pm 0.250	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	0.063 \pm 0.032	일반재배유자41	0.225 \pm 0.089
일반재배유자17	N.D.	일반재배유자42	0.559 \pm 0.230
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	N.D.	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	0.536 \pm 0.412
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	1.000 \pm 0.405
일반재배유자22	0.391 \pm 0.234	일반재배유자47	0.344 \pm 0.165
일반재배유자23	0.299 \pm 0.180	일반재배유자48	0.554 \pm 0.241
일반재배유자24	0.109 \pm 0.071	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	0.464 \pm 0.073	일반재배유자50	0.614 \pm 0.136

N.D.: value at or below the limit of detection

사) Carbendazim

Table 17. Concentration of Carbendazim in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2009

	Carbendazim 농도 (ppm: $\mu\text{g Carbendazim/g 시료}$)		Carbendazim 농도 (ppm: $\mu\text{g Carbendazim/g 시료}$)
일반재배유자 1	3.145 \pm 0.356	일반재배유자26	1.459 \pm 0.014
일반재배유자 2	2.610 \pm 0.289	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	1.269 \pm 0.378	일반재배유자28	2.033 \pm 0.409
일반재배유자 4	2.812 \pm 0.890	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	2.869 \pm 1.112	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	2.241 \pm 0.344	일반재배유자31	2.615 \pm 1.512
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	0.821 \pm 0.300	일반재배유자33	0.272 \pm 0.069
일반재배유자 9	N.D.	일반재배유자34	2.076 \pm 0.909
일반재배유자10	2.811 \pm 0.293	일반재배유자35	0.395 \pm 1.140
일반재배유자11	0.607 \pm 0.013	일반재배유자36	1.885 \pm 0.932
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	4.075 \pm 0.461
일반재배유자13	5.148 \pm 1.152	일반재배유자38	3.557 \pm 0.956
일반재배유자14	2.433 \pm 0.257	일반재배유자39	4.187 \pm 0.552
일반재배유자15	3.456 \pm 0.334	일반재배유자40	0.113 \pm 0.054
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	0.969 \pm 0.028
일반재배유자17	3.561 \pm 0.952	일반재배유자42	0.225 \pm 0.007
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	2.558 \pm 0.550
일반재배유자19	0.667 \pm 0.054	일반재배유자44	4.585 \pm 0.386
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	2.235 \pm 0.416
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	0.507 \pm 0.125	일반재배유자47	2.137 \pm 0.674
일반재배유자23	1.093 \pm 0.498	일반재배유자48	2.293 \pm 0.129
일반재배유자24	3.154 \pm 0.221	일반재배유자49	2.595 \pm 1.081
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	3.216 \pm 0.665

N.D.: value at or below the limit of detection

1) 2009년산 친환경재배 유자 분석 결과

가) Chlorpyrifos

Table 18. Concentration of Chlorpyrifos in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2009

	Chlorpyrifos 농도 (ppm: µg Chlorpyrifos/g 시료)		Chlorpyrifos 농도 (ppm: µg Chlorpyrifos/g 시료)
친환경재배유자 1	N.D.	친환경재배유자16	N.D.
친환경재배유자 2	N.D.	친환경재배유자17	N.D.
친환경재배유자 3	N.D.	친환경재배유자18	N.D.
친환경재배유자 4	N.D.	친환경재배유자19	N.D.
친환경재배유자 5	N.D.	친환경재배유자20	N.D.
친환경재배유자 6	N.D.	친환경재배유자21	N.D.
친환경재배유자 7	N.D.	친환경재배유자22	N.D.
친환경재배유자 8	N.D.	친환경재배유자23	N.D.
친환경재배유자 9	N.D.	친환경재배유자24	N.D.
친환경재배유자10	N.D.	친환경재배유자25	N.D.
친환경재배유자11	N.D.	친환경재배유자26	N.D.
친환경재배유자12	N.D.	친환경재배유자27	N.D.
친환경재배유자13	N.D.	친환경재배유자28	N.D.
친환경재배유자14	N.D.	친환경재배유자29	N.D.
친환경재배유자15	N.D.	친환경재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

나) Prothiofos

Table 19. Concentration of Prothiofos in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2009.

	Prothiofos 농도 (ppm: µg Prothiofos/g 시료)		Prothiofos 농도 (ppm: µg Prothiofos/g 시료)
친환경재배유자 1	N.D.	친환경재배유자16	N.D.
친환경재배유자 2	N.D.	친환경재배유자17	N.D.
친환경재배유자 3	N.D.	친환경재배유자18	N.D.
친환경재배유자 4	N.D.	친환경재배유자19	N.D.
친환경재배유자 5	N.D.	친환경재배유자20	N.D.
친환경재배유자 6	N.D.	친환경재배유자21	N.D.
친환경재배유자 7	N.D.	친환경재배유자22	N.D.
친환경재배유자 8	N.D.	친환경재배유자23	N.D.
친환경재배유자 9	N.D.	친환경재배유자24	N.D.
친환경재배유자10	N.D.	친환경재배유자25	N.D.
친환경재배유자11	N.D.	친환경재배유자26	N.D.
친환경재배유자12	N.D.	친환경재배유자27	N.D.
친환경재배유자13	N.D.	친환경재배유자28	N.D.
친환경재배유자14	N.D.	친환경재배유자29	N.D.
친환경재배유자15	N.D.	친환경재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

다) Phosalone

Table 20. Concentration of Phosalone in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2009.

	Phosalone 농도 (ppm: µg Phosalone/g 시료)		Phosalone 농도 (ppm: µg Phosalone/g 시료)
친환경재배유자 1	N.D.	친환경재배유자16	N.D.
친환경재배유자 2	N.D.	친환경재배유자17	N.D.
친환경재배유자 3	N.D.	친환경재배유자18	N.D.
친환경재배유자 4	N.D.	친환경재배유자19	N.D.
친환경재배유자 5	N.D.	친환경재배유자20	N.D.
친환경재배유자 6	N.D.	친환경재배유자21	N.D.
친환경재배유자 7	N.D.	친환경재배유자22	N.D.
친환경재배유자 8	N.D.	친환경재배유자23	N.D.
친환경재배유자 9	N.D.	친환경재배유자24	N.D.
친환경재배유자10	N.D.	친환경재배유자25	N.D.
친환경재배유자11	N.D.	친환경재배유자26	N.D.
친환경재배유자12	N.D.	친환경재배유자27	N.D.
친환경재배유자13	N.D.	친환경재배유자28	N.D.
친환경재배유자14	N.D.	친환경재배유자29	N.D.
친환경재배유자15	N.D.	친환경재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

라) Deltamethrin

Table 21. Concentration of Deltamethrin in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2009

	Deltamethrin 농도 (ppm: μg Deltamethrin/g 시료)		Deltamethrin 농도 (ppm: μg Deltamethrin/g 시료)
친환경 재배유자 1	N.D.	친환경 재배유자16	N.D.
친환경 재배유자 2	N.D.	친환경 재배유자17	N.D.
친환경 재배유자 3	N.D.	친환경 재배유자18	N.D.
친환경 재배유자 4	N.D.	친환경 재배유자19	N.D.
친환경 재배유자 5	N.D.	친환경 재배유자20	N.D.
친환경 재배유자 6	N.D.	친환경 재배유자21	N.D.
친환경 재배유자 7	N.D.	친환경 재배유자22	N.D.
친환경 재배유자 8	N.D.	친환경 재배유자23	N.D.
친환경 재배유자 9	N.D.	친환경 재배유자24	N.D.
친환경 재배유자10	N.D.	친환경 재배유자25	N.D.
친환경 재배유자11	N.D.	친환경 재배유자26	N.D.
친환경 재배유자12	N.D.	친환경 재배유자27	N.D.
친환경 재배유자13	N.D.	친환경 재배유자28	N.D.
친환경 재배유자14	N.D.	친환경 재배유자29	N.D.
친환경 재배유자15	N.D.	친환경 재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

마) Acequinocyl

Table 22. Concentration of Acequinocyl in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2009

	Acequinocyl 농도 (ppm: μg Acequinocyl/g 시료)		Acequinocyl 농도 (ppm: μg Acequinocyl/g 시료)
친환경 재배유자 1	N.D.	친환경 재배유자16	N.D.
친환경 재배유자 2	N.D.	친환경 재배유자17	N.D.
친환경 재배유자 3	N.D.	친환경 재배유자18	N.D.
친환경 재배유자 4	N.D.	친환경 재배유자19	N.D.
친환경 재배유자 5	N.D.	친환경 재배유자20	N.D.
친환경 재배유자 6	N.D.	친환경 재배유자21	N.D.
친환경 재배유자 7	N.D.	친환경 재배유자22	N.D.
친환경 재배유자 8	N.D.	친환경 재배유자23	N.D.
친환경 재배유자 9	N.D.	친환경 재배유자24	N.D.
친환경 재배유자10	N.D.	친환경 재배유자25	N.D.
친환경 재배유자11	N.D.	친환경 재배유자26	N.D.
친환경 재배유자12	N.D.	친환경 재배유자27	N.D.
친환경 재배유자13	N.D.	친환경 재배유자28	N.D.
친환경 재배유자14	N.D.	친환경 재배유자29	0.138 \pm 0.030
친환경 재배유자15	N.D.	친환경 재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

바) Spirodiclofen

Table 23. Concentration of Spirodiclofen in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2009

	Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Spirodiclofen/g 시료)		Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Spirodiclofen/g 시료)
친환경 재배유자 1	0.337 \pm 0.319	친환경 재배유자16	N.D.
친환경 재배유자 2	0.412 \pm 0.096	친환경 재배유자17	N.D.
친환경 재배유자 3	0.801 \pm 0.485	친환경 재배유자18	N.D.
친환경 재배유자 4	0.211 \pm 0.118	친환경 재배유자19	N.D.
친환경 재배유자 5	0.300 \pm 0.286	친환경 재배유자20	N.D.
친환경 재배유자 6	0.257 \pm 0.079	친환경 재배유자21	N.D.
친환경 재배유자 7	0.264 \pm 0.010	친환경 재배유자22	N.D.
친환경 재배유자 8	0.225 \pm 0.072	친환경 재배유자23	0.521 \pm 0.210
친환경 재배유자 9	0.371 \pm 0.180	친환경 재배유자24	N.D.
친환경 재배유자10	0.283 \pm 0.168	친환경 재배유자25	0.665 \pm 0.091
친환경 재배유자11	N.D.	친환경 재배유자26	N.D.
친환경 재배유자12	N.D.	친환경 재배유자27	N.D.
친환경 재배유자13	N.D.	친환경 재배유자28	N.D.
친환경 재배유자14	N.D.	친환경 재배유자29	N.D.
친환경 재배유자15	N.D.	친환경 재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

사) Carbendazim

Table 24. Concentration of Carbendazim in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2009

	Carbendazim 농도 (ppm: μg Carbendazim/g 시료)		Carbendazim 농도 (ppm: μg Carbendazim/g 시료)
친환경재배유자 1	N.D.	친환경재배유자16	N.D.
친환경재배유자 2	N.D.	친환경재배유자17	N.D.
친환경재배유자 3	0.722 \pm 0.208	친환경재배유자18	0.224 \pm 0.088
친환경재배유자 4	0.029 \pm 0.0003	친환경재배유자19	0.744 \pm 0.899
친환경재배유자 5	0.189 \pm 0.113	친환경재배유자20	N.D.
친환경재배유자 6	N.D.	친환경재배유자21	2.370 \pm 0.183
친환경재배유자 7	0.089 \pm 0.060	친환경재배유자22	N.D.
친환경재배유자 8	0.039 \pm 0.007	친환경재배유자23	0.190 \pm 0.064
친환경재배유자 9	N.D.	친환경재배유자24	N.D.
친환경재배유자10	N.D.	친환경재배유자25	1.070 \pm 0.365
친환경재배유자11	N.D.	친환경재배유자26	2.531 \pm 0.944
친환경재배유자12	N.D.	친환경재배유자27	1.068 \pm 0.786
친환경재배유자13	N.D.	친환경재배유자28	N.D.
친환경재배유자14	0.085 \pm 0.003	친환경재배유자29	2.907 \pm 0.887
친환경재배유자15	N.D.	친환경재배유자30	2.339 \pm 0.227

N.D.: value at or below the limit of detection

3) 2010년산 일반재배 유자 분석 결과

가) Chlorpyrifos

Table 25. Concentration of Chlorpyrifos in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2010.

	Chlorpyrifos 농도 (ppm: µg Chlorpyrifos/g 시료)		Chlorpyrifos 농도 (ppm: µg Chlorpyrifos/g 시료)
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	N.D.
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	0.020 ±0.022	일반재배유자28	N.D.
일반재배유자 4	N.D.	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	N.D.	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	N.D.	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	N.D.
일반재배유자 9	N.D.	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	0.032 ±0.001
일반재배유자11	0.022 ±0.010	일반재배유자36	N.D.
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	N.D.
일반재배유자13	N.D.	일반재배유자38	N.D.
일반재배유자14	N.D.	일반재배유자39	N.D.
일반재배유자15	N.D.	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	N.D.
일반재배유자17	N.D.	일반재배유자42	N.D.
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	N.D.	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	N.D.
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	N.D.	일반재배유자47	N.D.
일반재배유자23	N.D.	일반재배유자48	N.D.
일반재배유자24	N.D.	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

N.Q.: value at or below the limit of quantitation

나) Prothifos

Table 26. Concentration of Prothiofos in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2010.

	Prothiofos 농도 (ppm: μg Prothiofos/g 시료)		Prothiofos 농도 (ppm: μg Prothiofos/g 시료)
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	N.D.
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	N.D.	일반재배유자28	N.D.
일반재배유자 4	N.D.	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	N.D.	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	N.D.	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	N.D.
일반재배유자 9	N.D.	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	N.D.
일반재배유자11	N.D.	일반재배유자36	N.D.
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	N.D.
일반재배유자13	N.D.	일반재배유자38	N.D.
일반재배유자14	N.D.	일반재배유자39	N.D.
일반재배유자15	N.D.	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	N.D.
일반재배유자17	N.D.	일반재배유자42	N.D.
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	N.D.	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	N.D.
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	N.D.	일반재배유자47	N.D.
일반재배유자23	0.021 \pm 0.003	일반재배유자48	N.D.
일반재배유자24	0.020 \pm 0.001	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

다) Phosalone

Table 27. Concentration of Phosalone in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2010.

	Phosalone 농도 (ppm: $\mu\text{g Phosalone/g 시료}$)		Phosalone 농도 (ppm: $\mu\text{g Phosalone/g 시료}$)
일반재배유자 1	0.058 \pm 0.001	일반재배유자26	0.058 \pm 0.003
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	N.D.	일반재배유자28	0.061 \pm 0.008
일반재배유자 4	N.D.	일반재배유자29	0.061 \pm 0.003
일반재배유자 5	N.D.	일반재배유자30	0.068 \pm 0.007
일반재배유자 6	N.D.	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	0.055 \pm 0.002	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	0.059 \pm 0.006	일반재배유자33	N.D.
일반재배유자 9	N.D.	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	0.057 \pm 0.001
일반재배유자11	N.D.	일반재배유자36	0.064 \pm 0.003
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	0.057 \pm 0.002
일반재배유자13	N.D.	일반재배유자38	N.D.
일반재배유자14	N.D.	일반재배유자39	N.D.
일반재배유자15	0.062 \pm 0.007	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	N.D.
일반재배유자17	0.059 \pm 0.002	일반재배유자42	0.053 \pm 0.002
일반재배유자18	0.063 \pm 0.005	일반재배유자43	0.057 \pm 0.009
일반재배유자19	N.D.	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	N.D.
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	N.D.	일반재배유자47	N.D.
일반재배유자23	0.071 \pm 0.012	일반재배유자48	N.D.
일반재배유자24	0.059 \pm 0.002	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	0.062 \pm 0.001	일반재배유자50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

N.Q.: value at or below the limit of quantitation

라) Deltamethrin

Table 28. Concentration of Deltamethrin in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2010.

	Deltamethrin 농도 (ppm: µg Deltamethrin/g 시료)		Deltamethrin 농도 (ppm: µg Deltamethrin/g 시료)
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	N.D.
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	N.D.	일반재배유자28	N.D.
일반재배유자 4	N.D.	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	N.D.	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	N.D.	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	N.D.
일반재배유자 9	N.D.	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	N.D.
일반재배유자11	N.D.	일반재배유자36	N.D.
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	N.D.
일반재배유자13	N.D.	일반재배유자38	N.D.
일반재배유자14	N.D.	일반재배유자39	N.D.
일반재배유자15	N.D.	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	N.D.
일반재배유자17	N.D.	일반재배유자42	N.D.
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	N.D.	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	N.D.
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	N.D.	일반재배유자47	N.D.
일반재배유자23	N.D.	일반재배유자48	N.D.
일반재배유자24	N.D.	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

마) Acequinocyl

Table 29. Concentration of Acequinocyl in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2010.

	Acequinocyl 농도 (ppm: μg Acequinocyl/g 시료)		Acequinocyl 농도 (ppm: μg Acequinocyl/g 시료)
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	N.D.
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	0.223 \pm 0.006
일반재배유자 3	N.D.	일반재배유자28	N.D.
일반재배유자 4	N.D.	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	N.D.	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	N.D.	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	0.170 \pm 0.008	일반재배유자33	N.D.
일반재배유자 9	N.D.	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	N.D.
일반재배유자11	N.D.	일반재배유자36	N.D.
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	N.D.
일반재배유자13	N.D.	일반재배유자38	N.D.
일반재배유자14	N.D.	일반재배유자39	N.D.
일반재배유자15	N.D.	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	N.D.
일반재배유자17	N.D.	일반재배유자42	N.D.
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	N.D.	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	N.D.
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	N.D.	일반재배유자47	N.D.
일반재배유자23	N.D.	일반재배유자48	N.D.
일반재배유자24	N.D.	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

바) Spirodiclofen

Table 30. Concentration of Spirodiclofen in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2010.

	Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Spirodiclofen/g 시료)		Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Spirodiclofen/g 시료)
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	0.106 \pm 0.032
일반재배유자 2	N.D.	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	N.D.	일반재배유자28	0.120 \pm 0.024
일반재배유자 4	N.D.	일반재배유자29	0.175 \pm 0.023
일반재배유자 5	N.D.	일반재배유자30	0.116 \pm 0.030
일반재배유자 6	N.D.	일반재배유자31	0.107 \pm 0.020
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	0.310 \pm 0.039
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	N.D.
일반재배유자 9	0.308 \pm 0.200	일반재배유자34	0.221 \pm 0.022
일반재배유자10	N.D.	일반재배유자35	0.198 \pm 0.010
일반재배유자11	0.100 \pm 0.014	일반재배유자36	0.294 \pm 0.031
일반재배유자12	0.082 \pm 0.011	일반재배유자37	0.219 \pm 0.038
일반재배유자13	0.154 \pm 0.019	일반재배유자38	0.159 \pm 0.064
일반재배유자14	0.137 \pm 0.031	일반재배유자39	0.066 \pm 0.009
일반재배유자15	N.D.	일반재배유자40	N.D.
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	0.076 \pm 0.041
일반재배유자17	0.051 \pm 0.005	일반재배유자42	N.D.
일반재배유자18	0.718 \pm 0.014	일반재배유자43	N.D.
일반재배유자19	0.273 \pm 0.011	일반재배유자44	N.D.
일반재배유자20	0.333 \pm 0.019	일반재배유자45	N.D.
일반재배유자21	0.126 \pm 0.014	일반재배유자46	N.D.
일반재배유자22	0.188 \pm 0.039	일반재배유자47	N.D.
일반재배유자23	0.203 \pm 0.049	일반재배유자48	0.196 \pm 0.021
일반재배유자24	N.D.	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	N.D.	일반재배유자50	0.138 \pm 0.007

N.D.: value at or below the limit of detection

사) Carbendazim

Table 31. Concentration of Carbendazim in Yuza Cultivated by Ordinary Culture in 2010

	Carbendazim 농도 (ppm: $\mu\text{g Carbendazim/g 시료}$)		Carbendazim 농도 (ppm: $\mu\text{g Carbendazim/g 시료}$)
일반재배유자 1	N.D.	일반재배유자26	0.169 \pm 0.042
일반재배유자 2	0.213 \pm 0.010	일반재배유자27	N.D.
일반재배유자 3	0.167 \pm 0.011	일반재배유자28	0.190 \pm 0.031
일반재배유자 4	0.576 \pm 0.044	일반재배유자29	N.D.
일반재배유자 5	0.173 \pm 0.009	일반재배유자30	N.D.
일반재배유자 6	N.D.	일반재배유자31	N.D.
일반재배유자 7	N.D.	일반재배유자32	N.D.
일반재배유자 8	N.D.	일반재배유자33	0.174 \pm 0.041
일반재배유자 9	3.839 \pm 0.922	일반재배유자34	N.D.
일반재배유자10	1.863 \pm 0.175	일반재배유자35	N.D.
일반재배유자11	N.D.	일반재배유자36	0.157 \pm 0.050
일반재배유자12	N.D.	일반재배유자37	0.535 \pm 0.074
일반재배유자13	N.D.	일반재배유자38	0.836 \pm 0.074
일반재배유자14	0.043 \pm 0.001	일반재배유자39	1.440 \pm 0.147
일반재배유자15	N.D.	일반재배유자40	1.112 \pm 0.095
일반재배유자16	N.D.	일반재배유자41	0.874 \pm 0.032
일반재배유자17	N.D.	일반재배유자42	0.247 \pm 0.030
일반재배유자18	N.D.	일반재배유자43	0.104 \pm 0.015
일반재배유자19	0.087 \pm 0.018	일반재배유자44	0.497 \pm 0.135
일반재배유자20	N.D.	일반재배유자45	0.228 \pm 0.006
일반재배유자21	N.D.	일반재배유자46	0.728 \pm 0.077
일반재배유자22	N.D.	일반재배유자47	0.252 \pm 0.053
일반재배유자23	0.239 \pm 0.258	일반재배유자48	0.759 \pm 0.050
일반재배유자24	0.127 \pm 0.063	일반재배유자49	N.D.
일반재배유자25	0.140 \pm 0.070	일반재배유자50	0.938 \pm 0.038

N.D.: value at or below the limit of detection

4) 2010년산 친환경재배 유자 분석 결과

가) Chlorpyrifos

Table 32. Concentration of Chlorpyrifos in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2010

	Chlorpyrifos 농도 (ppm: $\mu\text{g Chlorpyrifos/g 시료}$)		Chlorpyrifos 농도 (ppm: $\mu\text{g Chlorpyrifos/g 시료}$)	
친환경재배유자 1	N.D.	친환경재배유자16	N.D.	
친환경재배유자 2	N.D.	친환경재배유자17	N.D.	
친환경재배유자 3	N.D.	친환경재배유자18	N.D.	
친환경재배유자 4	N.D.	친환경재배유자19	N.D.	
친환경재배유자 5	N.D.	친환경재배유자20	N.D.	
친환경재배유자 6	N.D.	친환경재배유자21	N.D.	
친환경재배유자 7	N.D.	친환경재배유자22	N.D.	
친환경재배유자 8	N.D.	친환경재배유자23	N.D.	
친환경재배유자 9	N.D.	친환경재배유자24	N.D.	
친환경재배유자10	N.D.	친환경재배유자25	N.D.	
친환경재배유자11	N.D.	친환경재배유자26	N.D.	
친환경재배유자12	N.D.	친환경재배유자27	N.D.	
친환경재배유자13	N.D.	친환경재배유자28	N.D.	
친환경재배유자14	N.D.	친환경재배유자29	N.D.	
친환경재배유자15	N.D.	친환경재배유자30	N.D.	

N.D.: value at or below the limit of detection

나) Prothifos

Table 33. Concentration of Prothifos in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2010.

	Prothifos 농도 (ppm: µg Prothifos/g 시료)		Prothifos 농도 (ppm: µg Prothifos/g 시료)
친환경재배유자 1	N.D.	친환경재배유자16	N.D.
친환경재배유자 2	N.D.	친환경재배유자17	N.D.
친환경재배유자 3	N.D.	친환경재배유자18	N.D.
친환경재배유자 4	N.D.	친환경재배유자19	N.D.
친환경재배유자 5	N.D.	친환경재배유자20	N.D.
친환경재배유자 6	N.D.	친환경재배유자21	N.D.
친환경재배유자 7	N.D.	친환경재배유자22	N.D.
친환경재배유자 8	N.D.	친환경재배유자23	N.D.
친환경재배유자 9	N.D.	친환경재배유자24	N.D.
친환경재배유자10	N.D.	친환경재배유자25	N.D.
친환경재배유자11	N.D.	친환경재배유자26	N.D.
친환경재배유자12	N.D.	친환경재배유자27	N.D.
친환경재배유자13	N.D.	친환경재배유자28	N.D.
친환경재배유자14	N.D.	친환경재배유자29	N.D.
친환경재배유자15	N.D.	친환경재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

다) Phosalone

Table 34. Concentration of Phosalone in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2010.

	Phosalone 농도 (ppm: $\mu\text{g Phosalone/g 시료}$)		Phosalone 농도 (ppm: $\mu\text{g Phosalone/g 시료}$)
친환경재배유자 1	N.D.	친환경재배유자16	N.D.
친환경재배유자 2	N.D.	친환경재배유자17	0.056 \pm 0.004
친환경재배유자 3	N.D.	친환경재배유자18	0.057 \pm 0.002
친환경재배유자 4	N.D.	친환경재배유자19	N.D.
친환경재배유자 5	N.D.	친환경재배유자20	N.D.
친환경재배유자 6	N.D.	친환경재배유자21	N.D.
친환경재배유자 7	N.D.	친환경재배유자22	N.D.
친환경재배유자 8	N.D.	친환경재배유자23	N.D.
친환경재배유자 9	N.D.	친환경재배유자24	0.056 \pm 0.001
친환경재배유자10	N.D.	친환경재배유자25	N.D.
친환경재배유자11	N.D.	친환경재배유자26	N.D.
친환경재배유자12	N.D.	친환경재배유자27	N.D.
친환경재배유자13	N.D.	친환경재배유자28	N.D.
친환경재배유자14	N.D.	친환경재배유자29	N.D.
친환경재배유자15	N.D.	친환경재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

라) Deltamethrin

Table 35. Concentration of Deltamethrin in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2010

	Deltamethrin 농도 (ppm: μg Deltamethrin/g 시료)		Deltamethrin 농도 (ppm: μg Deltamethrin/g 시료)
친환경 재배유자 1	N.D.	친환경 재배유자16	N.D.
친환경 재배유자 2	N.D.	친환경 재배유자17	N.D.
친환경 재배유자 3	N.D.	친환경 재배유자18	N.D.
친환경 재배유자 4	N.D.	친환경 재배유자19	N.D.
친환경 재배유자 5	N.D.	친환경 재배유자20	N.D.
친환경 재배유자 6	N.D.	친환경 재배유자21	N.D.
친환경 재배유자 7	N.D.	친환경 재배유자22	N.D.
친환경 재배유자 8	N.D.	친환경 재배유자23	N.D.
친환경 재배유자 9	N.D.	친환경 재배유자24	N.D.
친환경 재배유자10	N.D.	친환경 재배유자25	N.D.
친환경 재배유자11	N.D.	친환경 재배유자26	N.D.
친환경 재배유자12	N.D.	친환경 재배유자27	N.D.
친환경 재배유자13	N.D.	친환경 재배유자28	N.D.
친환경 재배유자14	N.D.	친환경 재배유자29	N.D.
친환경 재배유자15	N.D.	친환경 재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

마) Acequinocyl

Table 36. Concentration of Acequinocyl in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2010

	Acequinocyl 농도 (ppm: μg Acequinocyl/g 시료)		Acequinocyl 농도 (ppm: μg Acequinocyl/g 시료)
친환경 재배유자 1	N.D.	친환경 재배유자16	N.D.
친환경 재배유자 2	N.D.	친환경 재배유자17	N.D.
친환경 재배유자 3	N.D.	친환경 재배유자18	N.D.
친환경 재배유자 4	N.D.	친환경 재배유자19	0.210 \pm 0.086
친환경 재배유자 5	N.D.	친환경 재배유자20	N.D.
친환경 재배유자 6	N.D.	친환경 재배유자21	N.D.
친환경 재배유자 7	N.D.	친환경 재배유자22	N.D.
친환경 재배유자 8	N.D.	친환경 재배유자23	N.D.
친환경 재배유자 9	N.D.	친환경 재배유자24	N.D.
친환경 재배유자10	N.D.	친환경 재배유자25	N.D.
친환경 재배유자11	N.D.	친환경 재배유자26	N.D.
친환경 재배유자12	N.D.	친환경 재배유자27	N.D.
친환경 재배유자13	N.D.	친환경 재배유자28	N.D.
친환경 재배유자14	N.D.	친환경 재배유자29	N.D.
친환경 재배유자15	N.D.	친환경 재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

바) Spirodiclofen

Table 37. Concentration of Spirodiclofen in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2010

	Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Spirodiclofen/g 시료)		Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Spirodiclofen/g 시료)
친환경 재배유자 1	0.075 \pm 0.038	친환경 재배유자16	N.D.
친환경 재배유자 2	N.D.	친환경 재배유자17	N.D.
친환경 재배유자 3	N.D.	친환경 재배유자18	N.D.
친환경 재배유자 4	0.120 \pm 0.012	친환경 재배유자19	N.D.
친환경 재배유자 5	0.123 \pm 0.017	친환경 재배유자20	N.D.
친환경 재배유자 6	N.D.	친환경 재배유자21	N.D.
친환경 재배유자 7	N.D.	친환경 재배유자22	N.D.
친환경 재배유자 8	N.D.	친환경 재배유자23	N.D.
친환경 재배유자 9	N.D.	친환경 재배유자24	N.D.
친환경 재배유자10	N.D.	친환경 재배유자25	0.032 \pm 0.0004
친환경 재배유자11	N.D.	친환경 재배유자26	0.095 \pm 0.002
친환경 재배유자12	N.D.	친환경 재배유자27	N.D.
친환경 재배유자13	N.D.	친환경 재배유자28	0.134 \pm 0.017
친환경 재배유자14	N.D.	친환경 재배유자29	0.089 \pm 0.004
친환경 재배유자15	N.D.	친환경 재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

사) Carbendazim

Table 38. Concentration of Carbendazim in Yuza Cultivated by Environmentally-Friendly Culture in 2010

	Carbendazim 농도 (ppm: μg Carbendazim/g 시료)		Carbendazim 농도 (ppm: μg Carbendazim/g 시료)
친환경재배유자 1	0.213 \pm 0.009	친환경재배유자16	N.D.
친환경재배유자 2	N.D.	친환경재배유자17	N.D.
친환경재배유자 3	0.256 \pm 0.022	친환경재배유자18	N.D.
친환경재배유자 4	0.122 \pm 0.035	친환경재배유자19	N.D.
친환경재배유자 5	0.110 \pm 0.053	친환경재배유자20	N.D.
친환경재배유자 6	0.164 \pm 0.010	친환경재배유자21	0.033 \pm 0.0004
친환경재배유자 7	0.313 \pm 0.049	친환경재배유자22	N.D.
친환경재배유자 8	N.D.	친환경재배유자23	N.D.
친환경재배유자 9	0.340 \pm 0.011	친환경재배유자24	N.D.
친환경재배유자10	0.337 \pm 0.027	친환경재배유자25	N.D.
친환경재배유자11	N.D.	친환경재배유자26	N.D.
친환경재배유자12	N.D.	친환경재배유자27	N.D.
친환경재배유자13	N.D.	친환경재배유자28	N.D.
친환경재배유자14	N.D.	친환경재배유자29	N.D.
친환경재배유자15	N.D.	친환경재배유자30	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

6) 2009년산 유자차 분석 결과

가) Chlorpyrifos

Table 39. Concentrations of Chlorpyrifos in Yuza Tea produced in 2009

Chlorpyrifos 농도 (ppm: µg Chlorpyrifos/g 시료)		Chlorpyrifos 농도 (ppm: µg Chlorpyrifos/g 시료)	
유자차 1	N.D.	유자차 26	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 27	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 28	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 29	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 30	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 31	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 32	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 33	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 34	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 35	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 36	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 37	N.D.
유자차 13	N.D.	유자차 38	N.D.
유자차 14	N.D.	유자차 39	N.D.
유자차 15	N.D.	유자차 40	N.D.
유자차 16	N.D.	유자차 41	N.D.
유자차 17	N.D.	유자차 42	N.D.
유자차 18	N.D.	유자차 43	N.D.
유자차 19	N.D.	유자차 44	N.D.
유자차 20	N.D.	유자차 45	N.D.
유자차 21	N.D.	유자차 46	N.D.
유자차 22	N.D.	유자차 47	N.D.
유자차 23	N.D.	유자차 48	N.D.
유자차 24	N.D.	유자차 49	N.D.
유자차 25	N.D.	유자차 50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

나) Prothifos

Table 40. Concentrations of Prothifos in Yuza Tea produced in 2009

	Prothifos 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)		Prothifos 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 26	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 27	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 28	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 29	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 30	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 31	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 32	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 33	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 34	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 35	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 36	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 37	N.D.
유자차 13	N.D.	유자차 38	N.D.
유자차 14	N.D.	유자차 39	N.D.
유자차 15	N.D.	유자차 40	N.D.
유자차 16	N.D.	유자차 41	N.D.
유자차 17	N.D.	유자차 42	N.D.
유자차 18	N.D.	유자차 43	N.D.
유자차 19	N.D.	유자차 44	N.D.
유자차 20	N.D.	유자차 45	N.D.
유자차 21	N.D.	유자차 46	N.D.
유자차 22	N.D.	유자차 47	N.D.
유자차 23	N.D.	유자차 48	N.D.
유자차 24	N.D.	유자차 49	N.D.
유자차 25	N.D.	유자차 50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

다) Phosalone

Table 41. Concentrations of Phosalone in Yuza Tea produced in 2009

Phosalone 농도 (ppm: µg Chlorpyrifos/g 시료)		Phosalone 농도 (ppm: µg Chlorpyrifos/g 시료)	
유자차 1	N.D.	유자차 26	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 27	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 28	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 29	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 30	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 31	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 32	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 33	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 34	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 35	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 36	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 37	N.D.
유자차 13	N.D.	유자차 38	N.D.
유자차 14	N.D.	유자차 39	N.D.
유자차 15	N.D.	유자차 40	N.D.
유자차 16	N.D.	유자차 41	N.D.
유자차 17	N.D.	유자차 42	N.D.
유자차 18	N.D.	유자차 43	N.D.
유자차 19	N.D.	유자차 44	N.D.
유자차 20	N.D.	유자차 45	N.D.
유자차 21	N.D.	유자차 46	N.D.
유자차 22	N.D.	유자차 47	N.D.
유자차 23	N.D.	유자차 48	N.D.
유자차 24	N.D.	유자차 49	N.D.
유자차 25	N.D.	유자차 50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

라) Deltamethrin

Table 42. Concentrations of Deltamethrin in Yuza Tea produced in 2009

	Deltamethrin 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)		Deltamethrin 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 26	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 27	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 28	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 29	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 30	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 31	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 32	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 33	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 34	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 35	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 36	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 37	N.D.
유자차 13	N.D.	유자차 38	N.D.
유자차 14	N.D.	유자차 39	N.D.
유자차 15	N.D.	유자차 40	N.D.
유자차 16	N.D.	유자차 41	N.D.
유자차 17	N.D.	유자차 42	N.D.
유자차 18	N.D.	유자차 43	N.D.
유자차 19	N.D.	유자차 44	N.D.
유자차 20	N.D.	유자차 45	N.D.
유자차 21	N.D.	유자차 46	N.D.
유자차 22	N.D.	유자차 47	N.D.
유자차 23	N.D.	유자차 48	N.D.
유자차 24	N.D.	유자차 49	N.D.
유자차 25	N.D.	유자차 50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

마) Acequinocyl

Table 43. Concentrations of Acequinocyl in Yuza Tea produced in 2009

	Acequinocyl 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)		Acequinocyl 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 26	N.D.
유자차 2	0.154 \pm 0.085	유자차 27	N.D.
유자차 3	0.161 \pm 0.012	유자차 28	N.D.
유자차 4	0.085 \pm 0.001	유자차 29	N.D.
유자차 5	0.137 \pm 0.023	유자차 30	N.D.
유자차 6	0.132 \pm 0.025	유자차 31	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 32	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 33	N.D.
유자차 9	N.Q.	유자차 34	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 35	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 36	N.D.
유자차 12	0.070 \pm 0.069	유자차 37	N.D.
유자차 13	N.D.	유자차 38	N.D.
유자차 14	N.D.	유자차 39	N.D.
유자차 15	N.D.	유자차 40	N.D.
유자차 16	0.141 \pm 0.139	유자차 41	N.D.
유자차 17	0.367 \pm 0.301	유자차 42	N.D.
유자차 18	0.525 \pm 0.226	유자차 43	N.D.
유자차 19	N.Q.	유자차 44	N.D.
유자차 20	N.D.	유자차 45	N.D.
유자차 21	N.D.	유자차 46	N.D.
유자차 22	N.D.	유자차 47	N.D.
유자차 23	N.D.	유자차 48	N.D.
유자차 24	N.D.	유자차 49	N.D.
유자차 25	N.D.	유자차 50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

바) Spirodiclofen

Table 44. Concentrations of Spirodiclofen in Yuza Tea produced in 2009

Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)		Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)	
유자차 1	N.D.	유자차 26	0.148 \pm 0.009
유자차 2	N.D.	유자차 27	0.042 \pm 0.039
유자차 3	N.D.	유자차 28	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 29	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 30	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 31	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 32	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 33	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 34	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 35	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 36	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 37	N.D.
유자차 13	N.D.	유자차 38	N.D.
유자차 14	0.076 \pm 0.069	유자차 39	0.026 \pm 0.004
유자차 15	0.111 \pm 0.101	유자차 40	N.D.
유자차 16	N.D.	유자차 41	N.D.
유자차 17	N.D.	유자차 42	N.D.
유자차 18	N.D.	유자차 43	N.D.
유자차 19	N.D.	유자차 44	0.033 \pm 0.006
유자차 20	N.D.	유자차 45	N.D.
유자차 21	N.D.	유자차 46	N.D.
유자차 22	N.D.	유자차 47	N.D.
유자차 23	N.D.	유자차 48	0.020 \pm 0.009
유자차 24	0.107 \pm 0.027	유자차 49	N.D.
유자차 25	0.067 \pm 0.023	유자차 50	0.303 \pm 0.483

N.D.: value at or below the limit of detection

사) Carbendazim

Table 45. Concentrations of Carbendazim in Yuza Tea produced in 2009.

	Carbendazim 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)		Carbendazim 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)
유자차 1	0.031 \pm 0.0002	유자차 26	N.D.
유자차 2	0.132 \pm 0.156	유자차 27	N.D.
유자차 3	0.050 \pm 0.048	유자차 28	0.537 \pm 0.501
유자차 4	N.D.	유자차 29	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 30	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 31	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 32	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 33	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 34	N.D.
유자차 10	0.107 \pm 0.111	유자차 35	N.D.
유자차 11	0.044 \pm 0.029	유자차 36	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 37	0.039 \pm 0.008
유자차 13	N.D.	유자차 38	0.090 \pm 0.039
유자차 14	0.025 \pm 0.016	유자차 39	N.D.
유자차 15	N.D.	유자차 40	N.D.
유자차 16	N.D.	유자차 41	N.D.
유자차 17	0.075 \pm 0.072	유자차 42	N.D.
유자차 18	N.D.	유자차 43	N.D.
유자차 19	0.045 \pm 0.044	유자차 44	N.D.
유자차 20	0.303 \pm 0.225	유자차 45	N.D.
유자차 21	0.014 \pm 0.007	유자차 46	N.D.
유자차 22	0.042 \pm 0.008	유자차 47	N.D.
유자차 23	N.D.	유자차 48	N.D.
유자차 24	N.D.	유자차 49	N.D.
유자차 25	N.D.	유자차 50	N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

7) 2010년산 유자차 분석 결과

가) Chlorpyrifos

Table 46. Concentrations of Chlorpyrifos in Yuza Tea produced in 2010.

	Chlorpyrifos 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)		Chlorpyrifos 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

나) Prothiofos

Table 47. Concentrations of Prothiofos in Yuza Tea produced in 2010.

	Prothiofos 농도 (ppm: μg Prothiofos/g 시료)		Prothiofos 농도 (ppm: μg Prothiofos/g 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

다) Phosalone

Table 48. Concentrations of Phosalone in Yuza Tea produced in 2010.

	Phosalone 농도 (ppm: µg Phosalone/g 시료)		Phosalone 농도 (ppm: µg Phosalone/g 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

라) Deltamethrin

Table 49. Concentrations of Deltamethrin in Yuza Tea produced in 2010.

Deltamethrin 농도 (ppm: μg Deltamethrin/g 시료)		Deltamethrin 농도 (ppm: μg Deltamethrin/g 시료)	
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

마) Acequinocyl

Table 50. Concentrations of Acequinocyl in Yuza Tea produced in 2010.

	Acequinocyl 농도 (ppm: μg Acequinocyl/g 시료)		Acequinocyl 농도 (ppm: μg Acequinocyl/g 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

바) Spirodiclofen

Table 51. Concentrations of Spirodiclofen in Yuza Tea produced in 2010.

Spirodiclofen 농도 (ppm: µg Spirodiclofen/g 시료)		Spirodiclofen 농도 (ppm: µg Spirodiclofen/g 시료)	
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

사) Carbendazim

Table 52. Concentrations of Carbendazim in Yuza Tea produced in 2010.

	Carbendazim 농도 (ppm: μg Carbendazim/g 시료)		Carbendazim 농도 (ppm: μg Carbendazim/g 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 14	0.030 \pm 0.052
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	0.052 \pm 0.090
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	0.078 \pm 0.135	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	0.052 \pm 0.090
유자차 9	N.D.	유자차 22	0.064 \pm 0.111
유자차 10	N.D.	유자차 23	0.066 \pm 0.114
유자차 11	N.D.	유자차 24	0.046 \pm 0.080
유자차 12	N.D.	유자차 25	0.056 \pm 0.097
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

7) 2011년산 유자차 분석 결과

가) Chlorpyrifos

Table 53. Concentrations of Chlorpyrifos in Yuza Tea produced in 2011.

	Chlorpyrifos 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)		Chlorpyrifos 농도 (ppm: μg Chlorpyrifos/g 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

나) Prothiofos

Table 54. Concentrations of Prothiofos in Yuza Tea produced in 2011.

Prothiofos 농도 (ppm: µg Prothiofos/g 시료)		Prothiofos 농도 (ppm: µg Prothiofos/g 시료)	
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

다) Phosalone

Table 55. Concentrations of Phosalone in Yuza Tea produced in 2011.

Phosalone 농도 (ppm: µg Phosalone/g 시료)		Phosalone 농도 (ppm: µg Phosalone/g 시료)	
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

라) Deltamethrin

Table 56. Concentrations of Deltamethrin in Yuza Tea produced in 2011.

Deltamethrin 농도 (ppm: μg Deltamethrin/g 시료)		Deltamethrin 농도 (ppm: μg Deltamethrin/g 시료)	
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

마) Acequinocyl

Table 57. Concentrations of Acequinocyl in Yuza Tea produced in 2011.

	Acequinocyl 농도 (ppm: $\mu\text{g Acequinocyl/g}$ 시료)		Acequinocyl 농도 (ppm: $\mu\text{g Acequinocyl/g}$ 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

바) Spirodiclofen

Table 58. Concentrations of Spirodiclofen in Yuza Tea produced in 2011.

Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Spirodiclofen/g 시료)		Spirodiclofen 농도 (ppm: μg Spirodiclofen/g 시료)	
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	N.D.	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	N.D.	유자차 20	N.D.
유자차 8	N.D.	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	N.D.	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		

N.D.: value at or below the limit of detection

사) Carbendazim

Table 59. Concentrations of Carbendazim in Yuza Tea produced in 2011.

	Carbendazim 농도 (ppm: µg Carbendazim/g 시료)		Carbendazim 농도 (ppm: µg Carbendazim/g 시료)
유자차 1	N.D.	유자차 14	N.D.
유자차 2	0.033 ±0.039	유자차 15	N.D.
유자차 3	N.D.	유자차 16	N.D.
유자차 4	N.D.	유자차 17	N.D.
유자차 5	N.D.	유자차 18	N.D.
유자차 6	N.D.	유자차 19	N.D.
유자차 7	0.044 ±0.017	유자차 20	N.D.
유자차 8	0.058 ±0.059	유자차 21	N.D.
유자차 9	N.D.	유자차 22	N.D.
유자차 10	N.D.	유자차 23	N.D.
유자차 11	0.115 ±0.025	유자차 24	N.D.
유자차 12	N.D.	유자차 25	N.D.
유자차 13	N.D.		N.D.

N.D.: value at or below the limit of detection

마. 위해도평가

식품은 사람이 일생을 통하여 매일 섭취하게 되므로 장기간을 통하여 미량이나마 농약을 계속하여 섭취하게 된다. 하지만 농약은 아주 적은 양의 잔류량이라 하여도 국민 건강에 해를 끼칠 수 있다. 본 연구에서는 고흥군에서 생산된 국내 생산 유자에 대한 위해도가 어느 정도인지 알아보기 위하여 잔류농약 모니터링 결과에 대한 노출 평가를 실시하였다. 식품 섭취에 대한 농약 잔류량의 안전 평가의 경우, 위해도 평가 지표에서 ADI(acceptable daily intake, 인체에 평생 누적 시에도 건강에 영향을 미치지 않는 1일 섭취 허용량)를 바탕으로 EDI(estimated daily intake, 1일 추정섭취량)를 계산하고 국민 1일 평균 식품섭취량과 국민평균체중(55kg)을 고려하여 몇 %에 해당하는 농약을 섭취하게 되는지 계산하였다. 2009년에서 2011년 사이에 생산된 유자차 제품의

분석 결과를 바탕으로 국민유자섭취량을 고려하여 1일 섭취허용량 등 위해도 평가지표를 산출해 내었다.

Table 60. Risk assessment of Yuza tea

Pesticide	ALD (mg/kg)	EDI (mg/day)	EDI/ADE
Acequinocyl	0.525	0.446	0.353
Spirodiclofen	0.303	0.258	0.312
Carbendazim	0.300	0.260	0.236

ALD: average level of detection, ADI: acceptable daily intake. ADE (acceptable dietary exposure, mg/person/day)=ADI (mg/kg)×Korean average adult weight (55 kg). ADI=(EDI/ADE)

국민 1일 평균 식품섭취량과 국민평균체중을 고려하여 계산한 결과는 Table 1과 같다. 총 3종의 농약 Acequinocyl, Spirodiclofen와 Carbendazim이 검출되었고 노출평가를 실시한 결과, 1일 추정섭취량은 각각 0.446mg, 0.258mg, 0.26mg이었으며 1인 1일 허용섭취량(ADE) 대비 추정섭취량(EDI)을 계산한 결과 각각 0.353, 0.312, 0.236이 나왔다. 그러므로 ADI에 대한 EDI의 값의 비율이 1을 넘지 않아 유자와 유자차의 섭취가 비교적 안전하다고 판단이 되었다. Acequinocyl이 가장 많은 양을 섭취하는 것으로 나타났으나 그 수치는 비교적 낮아 식품의 안전에는 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 고흥군에서 생산된 유자차에서 검출된 3종의 농약은 모두 인체에 위대한 영향을 미치지 않는 수준인 것으로 평가되었다.

2. 2세부 : 수출용 유자의 저장유통을 위한 multilayer 식용 코팅 기술 개발 및 유자가공의 위생관리 시스템 구축

가. 수용성계/지용성계 target 물질을 함유한 multilayer 모델계의 분석

유용물질이 함유된 multilayer 식용코팅 적용의 중요한 가정인 controlled release의 가능성을 진단하기 위하여 단순물질로 구성된 모델계 multilayer에 대하여 실험하였다. Multilayer 시스템은 이중층으로 수용계인 agar/agar, 지용계인 wax/wax로 구성하였으며, 유용물질은 외층에 첨가된 수용성 또는 지용성 색소, 과일 대신 물 또는 식용유를 유용물질의 수용체로 가정된 모델계를 구축하였다. 수용체에 release된 색소를 spectro-photometer를 이용하여 측정한 결과 시간의 경과에 따라 zero-order 반응 형태로 색소가 방출되어 단일층이 아닌 이중층을 구성함으로써 controlled release의 문제점을 극복할 수 있었다. 즉, 단일층의 코팅은 초기에 색소가 다량 방출되고 시간이 지남에 따라 그 방출량이 급속히 감소하지만, 이중층을 구성할 경우 방출속도를 제한하여 기간을 연장할 수 있었다.

1) 세부과제의 목표 및 내용

과일은 저장 및 유통 중에도 지속적으로 호흡을 하여 후숙 및 품질열화가 빠르게 된다. 대표적인 과일 저장유통기술에는 화학제 처리(훈증 포함), 방사선 조사, 식용코팅, CA(Controlled Atmosphere), MA(Modified Atmosphere) 저장법이 있다. 훈증이나 방사선 조사가 실용적인 방법으로 간주되지만 아직 식품 안전정에 대한 의문점이 여전히 남아있다. 식용코팅 및 CA, MA 저장은 호흡작용을 억제하는 공통점을 갖는다. 식용코팅은 CA나 MA 저장법과 달리 과일 개체별 처리인데 소비자들은 포장 재질의 감소와 재활용성을 가지는 높은 질과 긴 저장 수명의 식품을 원한다. 이에 따른 식용코팅기술은 생물 분해성을 가지며 이상적인 외관으로 유지 시켜주기 때문에 수확 후의 과일을 신선하게 보존하는 친환경적인 기술이다. 식용 코팅은 물질의 질량 전이의 장애를 만들어 주고 품질이 악화되는 과정을 보호해주며, 식품의 저장수명과 외관을 개선해주는 등의 잠재적인 활성을 갖는다. 신선한 과일의 수분 손실을 늦춰주고, 살균제를 이동시켜주며 외부의 대기와 식품의 기체 교환 장애를 만들어준다. 특히 기능성 코팅제의 기체투과조절에 의한 호흡률을 조절의 효과는 CA(Controlled Atmosphere) 또는 MA(Modified Atmosphere) 저장과 같은 효과를 얻을 수 있는 반면 시설비가 CA 저장에 비하면 월등하게 저렴하고 저장효과가 우수하다. 식용코팅은 과채류의 껍질 및 최근 소비가 증가하고 있는 최소가공된 과일류(minimally processes fruits)의 표면에 도포하여 주위 공기를 차단하는 기술로 그 적용이 점차 증

가되고 있다. 식용코팅제로는 셀룰로오스계, hydrocolloids, wax계, 식물성유지, gelatin, resin계 등이 다양하게 사용되고 있으며 그 성질은 수분차단, 산소차단, 탄산가스차단, 에틸렌가스차단, 광택의 성능 면으로 구분할 수 있다. 친유계 코팅제는 수분, 산소, 탄산가스 차단 및 외관 유지에 매우 효과적이거나 산소나 탄산가스를 과도하게 차단하여 혐기적 상태를 조성할 단점이 있다. 이에 비하여 친수계 코팅제는 수분, 산소, 탄산가스 차단 및 광택 면에서 친유계에 비하여 효과가 떨어지나 오히려 적절한 산소나 탄산가스를 투과하는 생명연장을 가능케 하는 장점이 있다. 그러나 특히 수분차단효과가 매우 낮아 증량감소 등의 원인이 된다. 따라서 효과적인 호흡의 제어를 위해서는 친수계와 친유계 코팅제를 혼합하여 사용할 수 있다. 식용코팅제는 주로 dipping과 spray 방법으로 도포되며 코팅제는 표면 상에 부착, 균일한 분포 및 양 그리고 이취 발생 등의 면에서 양호해야 한다. 가장 많이 사용되는 코팅제인 wax의 경우 유화능, 냄새, 도포 후 신속한 건조되는 성질, 과채류와의 무 반응성, 녹는 성질 및 점도, 부착성, 투명성 등의 성질이 만족되어야 한다. 최근 미생물에 의한 변패를 방지하기 위하여 항균성 물질을 혼합하여 적용한 예가 있다. 식용코팅은 단순히 일중층 뿐 아니라 이중층의 multilayer으로 적용된 바가 있는데, 아직 multilayer 식용코팅의 목적은 각 층의 투과성의 장점을 조합하는 수준에 머물러 있다. 한편 multilayer 코팅 기술을 제약 분야에서도 적용되고 있는데 각 층에 여러 기능을 부여하여 사용되고 있다. Multilayer는 control tie layer/matrix layer/barrier layer로 구성하는데, control tie layer는 직접 노출 또는 피부 표면에 침적되는 층, matrix layer는 유용물질을 함유하는 층, barrier layer는 겉 표면을 이루는 층이다. 각 기능으로 control tie 층은 부착능과 matrix내 물질이 유자로 확산되는 성질을 제어하며, matrix 층은 유용물질을 효과적으로 함유하며, barrier 층은 유용물질의 외부로 방출 및 기존 식용 코팅의 기능인 외기의 선택적 차단 기능을 필요로 한다. 본 연구에서는 식용코팅에 이중층의 multilayer(MTL)를 적용하여 모델계를 형성하여 monolayer(ML)와 비교분석하였다. 유용물질(target 물질)은 외층(matrix 층)에 혼합하고 내층(control tie 층)은 외층과 같은 물질로 조합하였다. 친수계 또는 친유계 유용물질이 전달되는 수용체로 물 또는 기름으로 사용하여 시간 경과에 따른 수용체로 받아들인 유용물질의 농도를 측정하여 controlled release의 양상을 분석하였다.

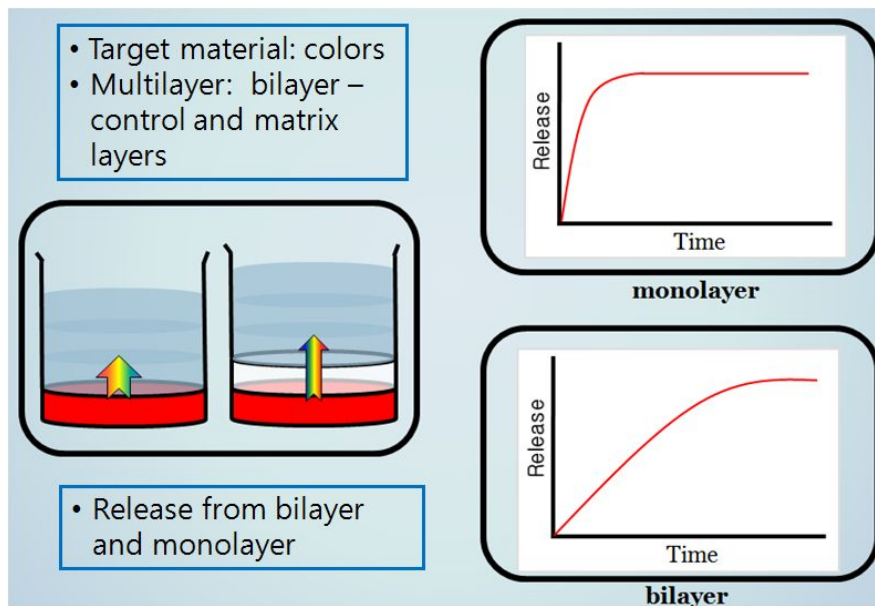


Fig. 1. Schematic diagram of a model system of monolayer and multilayer (bilayer), and their controlled release patterns.

2) 재료 및 방법

코팅제로서 친유계의 경우 wax(투명젤 왁스 MP, 비누마루, 한국)를 사용하였고, 친수계로 agar gel을 사용하였다. 친유계 및 친수계 용으로 각각 수용성 및 지용성 적색 색소(색소, 미누마루, 한국)를 용용물질로 간주하여 사용하였다. 이중층 multilayer 모델계 제조는 Wax를 60 °C 이상의 온도에서 가열하여 wax 용액을 만든다. 또한 같은 방법으로 가열된 wax에 지용성 색소를 첨가하여 색을 혼합한다. Wax 용액을 비이커에 부어서 15분간 굳혀 gel을 형성시킨 후 그 위에 색소가 첨가된 wax 용액을 다시 부어서 15분간 굳혀 이중층의 multilayer를 제조하였다. 친수형 multilayer의 제조는 agar 용액을 제조하고 wax multilayer와 같은 방법을 이중층의 multilayer를 제조하였다. 상기의 비이커에 Fig. 1과 같이 수용체인 물 또는 식용유를 부어 모델계를 완성하였다. Controlled release 측정은 분광광도계(UV/VIS spectrophotometer, Mecasys Co., 한국)를 사용하여 24 시간 간격으로 모델계의 수용체의 흡광도를 380-780 nm에서 스캔하여 측정하였다.

3) 결과 및 고찰

이중층의 multilayer(MTL)의 controlled release를 단순히 단일층으로 된 monolayer(ML)와 비교 분석하였다. 친수계 친유계 모두 MTL은 바닥에서부터 일층은 색소 gel, 이층은 gel로 이루어져 있어서 처음에는 수용체가 무색

을 띄지만 시간이 지남에 따라 점차 적으로 적색 색소가 release되는 현상을 관찰 하였다. 이에 비하여 ML은 색소 함유 gel로 단일 층으로 이루어져 있어서 같은 시간이 지나지만 적색 색소의 release가 급격하게 일어났다.

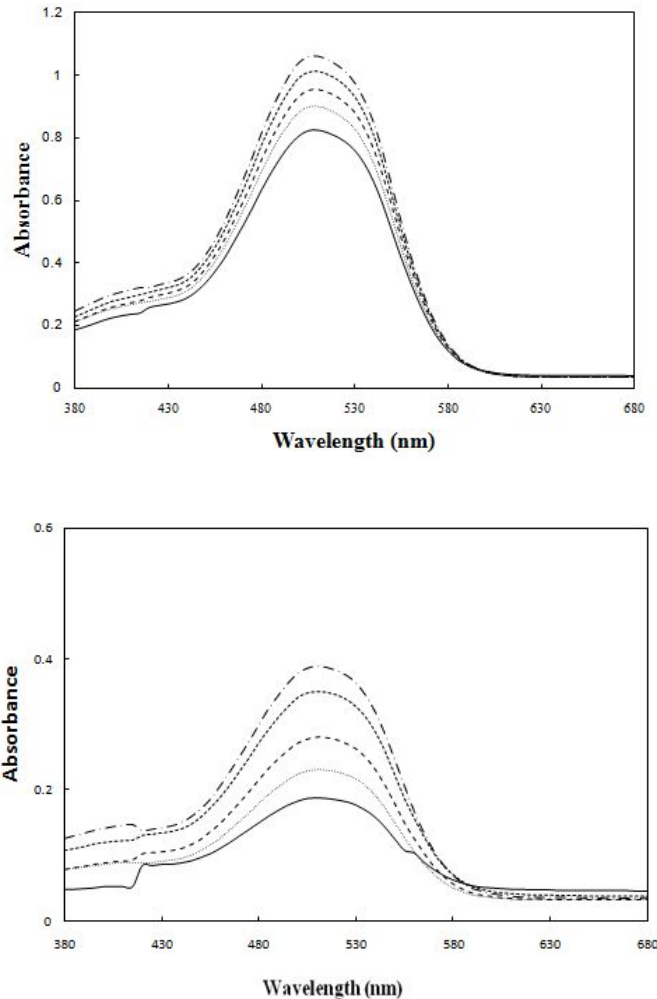


Fig. 2. Changes in absorbance of solutions with released red colors from monolayer of [agar with color] (top) and bilayer of [agar with color]-[agar] (bottom).

Agar gel의 ML은 색소의 release가 수용체에 닿는 처음에만 급격하게 일어나고 시간이 지나면서는 점차 줄어드는 형태로 일어났다. 따라서 흡광도도 처음에 급격히 증가했다가 점차 적으로 증가량이 줄어드는 양상을 보였다(Fig. 2). 하지만 agar gel의 MTL는 처음에 색소의 release가 완만히 진행되어 시간이 지날수록 일정한 양 만큼의 색소가 증가되면서 흡광도가 일정한 증가율을 나타냈다.

Wax gel의 ML은 agar gel과 같이 색소의 release가 쉽게 일어나지 않았

지만 wax gel MTL과 비교했을 때 역시 처음에 급격하게 흡광도가 증가하고 점차 시간이 지날수록 적은 증가량을 보였다(Fig. 3). Wax gel의 MTL은 2일째까지는 색소의 release 현상을 보이지 않다가 3일째부터 아주 완만하게 적색 색소를 release 시킴으로써 시간이 지남에 따라 일정한 양의 흡광도 증가율을 보였다.

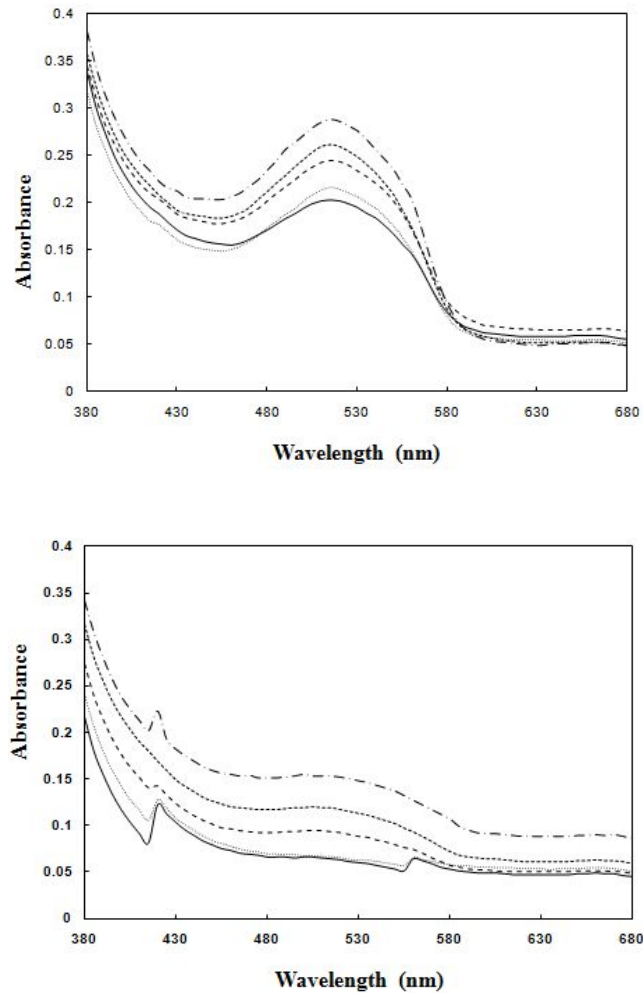


Fig. 3. Changes in absorbance of solutions with released red colors from monolayer of [wax with color] (top) and bilayer of [wax with color]-[wax] (bottom).

코팅 모델계에 색소를 혼합하여 수용체로의 색소를 직접 공급한 ML의 경우 초기에는 매우 크게 증가하고 시간에 따라 점차적으로 감소하여 바람직하지 않게 나타났다. 그러나 색소를 수용체와 접한 층에는 혼합하지 않고, 외부에 노출된 층에 혼합한 MTL에서는 초기에도 완만하게 증가하고 시간에

따라 일정한 양이 증가하여 ML과는 다르게 농도에 의존하지 않는 반응을 보였다. 즉 zero-order release에 근접한 결과를 나타내었다. 이는 과채류의 식용코팅에 적용 시 품질 및 저장성의 향상을 가져 올 것이라 사료된다.

나. Citrus 계 식용 코팅제로부터 선발된 물질의 multilayer 제조 및 유자 대체물인 multilayer 코팅 레몬의 저장 중 이화학적 변화 및 최적의 multilayer 물질 조성 선발 (논문명: Multilayer 식용코팅제 처리에 따른 레몬의 저장성)

Citrus계 식용 코팅제인 beeswax-hydroxypropyl methylcellulose(BW-HPMC), soybean oil-carboxymethyl cellulose(SBO-CMC), Carnaubawax-Shellac-locust bean gum(CW-SL-LBG)를 각각 사용하여 레몬에 먼저 1차 코팅하고 항산화제인 비타민 C와 E를 섞어 그 위에 제 2차 코팅하여 이중층의 multilayered 레몬을 제조하였다. 레몬 껍질 위에 형성된 막의 양은 CW-SL-LBG, BW-HPMC, SBO-CMC의 순으로 높게 나타났다. 가속 저장 실험 조건으로 30℃의 항온기에 12일 동안 저장하면서 유자의 중량감소율, 부패율, 경도, pH, 가용성 고형분, 적정산도, 갈변도의 변화를 측정하고 관능검사를 실시하였다. 중량감소율, 부패율, 경도, 갈변도는 CW-SL-LBG가 가장 작은 변화를 보였고, pH, 가용성 고형분, 적정산도의 변화는 SBO-CMC가 가장 작게 나타났다. 저장성의 관능검사에서는 CW-SL-LBG가 가장 양호하게 나타났다. 결과적으로 CW-SL-LBG가 비타민 C와 E를 함유한 multilayer 코팅에 가장 적합한 물질로 평가되었다.

1) 세부과제의 목표 및 내용

레몬(Citrus limonium, lemon)은 전 세계적으로 조리, 주스, 제빵 등에 향기를 내는데 많이 사용되는 과일이다. 국내에도 대량으로 수입되어 그 선호도 및 관련 웰빙 식품의 소비량이 증가되고 있다. 이에 따라 국내 농가에도 레몬을 도입의 요구가 증가되어 안정적으로 저장할 수 있는 기술이 필요한 실정이다(Kim & Lee, 2003; Hong et al, 2008). 그러나 국내 레몬에 대한 저장연구는 아직 미미한 실정이다. 과일은 수확 후에도 그 생명 현상을 계속하여 추숙(ripening), 노화(aging) 등을 나타내며, 호흡작용 및 증산작용에 의하여 산소가 소비되고 탄산가스가 생성되며 또한 호흡열이 발생하여 신선도가 저하될 수 있다. 이에 따라 저장 중 과일의 이화학적 품질인 갈변도, pH, 산도, 당도 등이 변하게 된다(No et al, 2009). 산소의 양을 함으로서 호흡작용의 진행을 조절할 수 있어 저장 기술로 포장 내 공기의 산소-탄산가스의 농도를 조절하여 저장 기간을 증가시키는 방법이 적용된다(No et al., 2009). 또한 포장 대신 식용코팅(edible coating)을 과일 표면에 함으로서 공기의 공급을 제한하여 역시 호흡작용을 제어하여 저장 중 중량감소를 방지하고 결과적으로 저장 기간을 증가시킬 수 있다(Kester & Fennema, 1986; Jiang & Li, 2001). 증산작용의 경우 레몬과 유사한 과일인 유자의 저장에서 증산작용에 의한 중량 감소 및 미생물에 의한 부패에 관하여 보고되었다(Kim et

al., 1995). 식용코팅은 레몬과 유사한 citrus의 경우 코팅제로 여러 물질이 적용되었다. Wax와 hydrocolloid의 혼합 코팅제인 Beeswax-hydroxypropyl methylcellulose(BW-HPMC)는 citrus의 품질 저하를 방지하며, 중량 및 경도 유지에 효과가 있는 것으로 나타났다(Navarro-Tarazaga et al., 2008). Carboxymethyl cellulose(CMC)가 여러 hydrophobic 물질과 함께 식용코팅으로 사용되었는데 soybean oil이 paraffin wax나 beeswax보다 중량 유지 및 저장기간의 연장에 더 효과적이었다(Hasan & Nurhan, 2004). 코팅제의 수분 및 가스 투과성이 Carnaubawax-Shellac-locust bean gum(CW-SL-LBG)에 대하여 실험된 바 산소와 탄산가스의 침투성이 특히 우수하였다(Chen & Nussinovitch, 2001). Locust bean gum(LBG)와 3가지 wax계 물질(CW, BW, SL)의 조합에서 BW-SL-LBG코팅이 중량 유지 및 광택의 면에서 가장 좋은 효과를 나타냈고 향관련 에틸알콜 함량에서도 다른 실험군에 비해 우수한 효과를 나타냈다(Rojas-Argudo et al., 2009). 이러한 식용코팅은 유용물질과 혼합하여 특유의 기능성을 추가할 수 있다. 바나나, 망고, 파파야의 경우 항산화제를 첨가한 CMC 코팅을 적용하여 숙성을 지연시킬 수 있다고 보고된 바 있다(Song & Kim, 1999; Nidperos-Carriedo & Baldwin, 1993). 식용코팅에 항균성 물질(유기산, 지방산, parabens, bacteriocins, sulfites, sucrose esters, natamycin, lactoferrin, lysozyme, lactoperoxidase)을 첨가하여 과일의 표면에서 자랄 수 있는 미생물의 생장을 억제할 수 있다(Petersen et al., 1999). SL-HPMC 코팅에 여러 합성살균제를 처리한 결과 수확 후 부패에 대한 손실을 줄일 수 있었고, 특히 sodium benzoate의 효과가 가장 좋게 나타났다(Valencia-Chamorro et al., 2009). 식용코팅에 multilayer가 적용된 바 있다. 이중층의 multilayer의 경우 과일과 닿는 제 일층은 수분투과억제 기능의 wax, 외층은 주로 광택을 내는 wax가 각각 사용되었다(Hagenmaier & Baker, 1995). 또는 내층에는 점착력이 높은 탄수화물계, 외층에는 wax계열의 코팅제가 사용되었다(Phan The et al., 2008) 한편, 제약 분야에서는 multilayer를 적용하여 controlled release를 하는 기법이 적용되고 있는데 이는 특정 층에 유용물질을 함유토록하여 시간에 따라 서서히 유용물질이 방출되도록 하는데 목적이 있다 (Charalambopoulou et al., 2001). 최근 식품분야에도 유용물질이 함유된 multilayer에 대한 연구가 시도되었다. 항균성 물질인 thymol을 zein계 물질에 섞어 multilayer를 구성하여 방출되는 속도를 분석하였다(Mastromatteo et al., 2009). 따라서 본 연구에서는 레몬의 저장성 향상을 위하여 최근 다른 과일에 시도되었던 multilayer 코팅 및 유용물질의 첨가 기술을 적용하였다. Multilayer의 층 물질은 citrus에 성공적으로 적용된 formulation으로부터 선발하였으며 이중층을 구성하여 외층에 유용물질로서 항산화제인 vit-C 및 E를 첨가하였고 내층은 유용물질을 포함하지 않고 외층과 동일한 물질로 조성하였다. Formulation에 따른 레몬의 저장성을

나타내는 여러 이화학적 성질을 분석하여 최적의 formulation을 탐색하였다.

2) 재료 및 방법

본 실험에 사용한 레몬은 미국 sunkist사의 국내 수입지정업체인 푸룻뱅크에서 구매하여 저장시험에 사용하였다. 본 실험에 사용한 수확 후 약 1개월이 지난 레몬으로서, 그 개체 평균중량이 120~140 g 정도인 신선한 것을 사용하였다. 본 실험에 사용된 식용코팅제는 citrus계에 성공적으로 적용된 바 있는 beeswax-hydroxypropyl methylcellulose(BW-HPMC), soybean oil-carboxymethyl cellulose(SBO-CMC), Carnaubawax-Shellac-locust bean gum(CW-SL-LBG)으로서 BW-HPMC 코팅제의 구성물질은 beeswax(Sigma Aldrich Co., Germany), hydroxypropyl methylcellulose(Sigma Aldrich, Co., Germany), glycerol(Daejung Co., Korea), oleic acid(Daejung Co., Korea)를 사용하였다. SBO-CMC 코팅제는 soybean oil(Daejung Co., Korea), carboxymethyl cellulose(Daejung Co., Korea), sodium oleate(Junsei, Japan)을 CW-SL-LBG 코팅제는 Carnaubawax(Sigma Aldrich, Co., Germany) Shellac(Sigma Aldrich, Co., Germany) locust bean gum(MSC. Korea) Morpholine(Junsei, Japan)을 사용하였다. 유용물질은 비타민 C(Samchun chemicals, Korea)와 비타민 E(Samchun chemicals, Korea)를 사용하였다. 내층의 BW-HPMC 코팅액은 Navarro-Tarazaga et al.(2008)의 방법을 이용하여 제조하였다. HPMC를 90℃의 물에 녹이고 가소제로 glycerol을 넣어준다. HPMC/glycerol의 비율은 1:0.5이다. BW를 90℃의 물에 녹이고 유화제로 oleic acid를 넣어준다. BW/oleic acid의 비율은 1: 0.2이다. BW-HPMC 혼합물을 homogenizer(HG15D, Daihan Co., Japan)으로 25000 rpm에서 3분간 균질화시켜준다. 그리고 나서 30 ℃이하의 항온수조(Nexus technologies Co., Ltd., Korea)에서 냉각시켜준다. 외층의 BW-HPMC 코팅액은 HPMC혼합액에 비타민 C를, BW혼합액에 비타민 E를 물의 비율을 1% 줄이고 각각 0.5%씩 첨가하여 내층의 BW-HPMC 코팅액과 똑같은 방법으로 만들어 주었다.

Table 1. Compositions of formulations

Compounds	Formulations
BW-HPMC ¹⁾	HPMC (34.7), BW (40), Glycerol (17.3), Oleic acid (8.0)
SBO-CMC ²⁾	CMC (0.4), SBO (9.0), Sodium oleate (0.7), Water (89.9)
CW-SL-LBG ³⁾	LBG (0.5), CW (10.0), SL (20.0), Oleic acid (1.8), Morpholine (2.4), Water (82.9)

¹⁾HPMC, hydroxypropyl methylcellulose; BW, beeswax. Solid contents (4 %).

²⁾CMC, carboxymethyl cellulose; SBO, soybean oil.

³⁾LBG, locust bean gum; CW, carnaubawax; SL, shellac.

내층의 SBO-CMC 코팅액은 Hasan & Nurhan(2004)의 방법에 제조하였다. CMC를 70℃의 물에 녹인다. 따로 SBO를 70℃의 물에 녹이고 유화제로 sodium oleate를 넣어준다. 그리고 혼합한 SBO-CMC 혼합물을 homogenizer으로 25000rpm에서 3분간 균질화시켜준다. 그리고 나서 30℃이하의 water bath에서 냉각시켜준다. 외층의 SBO-CMC 코팅액은 CMC혼합액에 비타민 C를, SBO혼합액에 비타민 E를 물의 비율을 1% 줄이고 각각 0.5%씩 첨가하여 내층의 SBO-CMC 코팅액과 똑같은 방법으로 만들어 주었다. 내층의 CW-SL-LBG 코팅액은 Chen & Nussinovitch(2001)의 방법을 이용하여 제조하였다. CW와 SL을 95℃의 물에 녹이고 morpholine과 유화제로 oleic acid를 넣어준 후 homogenizer으로 25000 rpm에서 3분간 균질화시켜준다. 그리고 나서 LBG를 상온에서 혼합해준다. 외층의 CW-SL-LBG 코팅액은 CW-SL혼합액에 비타민 C를, LBG혼합액에 비타민 E를 물의 비율을 1% 줄이고 각각 0.5%씩 첨가하여 내층의 SBO-CMC 코팅액과 똑같은 방법으로 만들어 주었다.

가) Multilayer 코팅 레몬 제조 및 저장 실험

상기 제조된 코팅제를 사용하여 multilayer 코팅 레몬을 다음과 같이 제조하였다. Multilayer는 이중층으로서 레몬과 직접 닿는 내층과 유용물질로서 항산화제인 비타민 C와 E가 함유된 외층으로 구성하였다. BW-HPMC 코팅액의 레몬 코팅은 BW-HPMC 코팅액에 레몬을 20초 정도 담갔다가 꺼내어 열풍건조기를 이용하여 60℃에서 방치해 두었다. 건조 후 비타민 C와 E가 함유된 BW-HPMC 코팅액에 다시 20초 정도 담갔다가 꺼내어 똑같은 방법으로 건조시켜주었다. SBO-CMC, CW-SL-LBG코팅액의 레몬 코팅도 위와 같은 방법으로 코팅해주었다. 상기 코팅된 레몬을 대조군(코팅되지 않은 레몬)과 함께 30℃의 항온기(66X76X 180cm, Labotech Co., Seoul, Korea)에 12일간 보관하면서 저장기간 별로 채취하여 실험에 사용하였다. 저장 온도를 30℃으로 정한 이유는 본 연구의 목적이 실제 저장 조건이 아닌 코팅제간 효과 비교에 있었으므로 짧은 기간 내에 가속 저장의 효과를 보기 위함이다.

나) 코팅 피막의 무게 측정

레몬에 코팅된 피막의 양을 그 무게로 간주하여, 피막 제조 중 시간 경과에 따른 그 무게 변화를 측정하였다. 먼저, 레몬의 껍질을 한 변이 1cm인 정사각형 모양으로 일정하게 잘라 외피 표면은 코팅제를 도포하고,

내쪽은 수분 증발을 막기 위하여 촛농으로 도포하였다. 코팅 피막의 무게는 먼저 측정된 레몬과 촛농의 무게를, 코팅한 후 시간 경과별 측정된 무게의 변화로부터 빼서 산출하였다. 코팅제의 종류 별로 레몬 껍질을 10조각씩 5분간 60℃ 오븐에서 방치시키면서 1분 간격으로 무게를 칭량하였다.

다) 중량감소율 및 부패율 측정

저장 기간에 따른 중량감소율은 동일한 레몬을 10개, 그리고 부패율은 30개를 사용하여 4일 간격으로 오전 9시에 측정하였다. 중량감소율은 무게 변화를 측정하여 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{중량감소율(\%)} = (\text{초기중량(g)} - \text{당일중량(g)}) / (\text{초기중량(g)}) \times 100$$

부패율은 레몬 30개중 부패한 레몬의 개수를 백분율로 나타냈다.

라) 경도 측정

레몬의 기계적 경도는 원형 그대로의 시료를 Texture Analyser(TA, TA-XT2, Stable Micro System, UK)의 시료 받침대에 올려 놓고 pin probe(diameter 2mm)을 내려오게 하여 껍질 층을 관통할 때 힘을 측정하였다. 이때 TA 측정 mode는 measure force in compression, repeat until count(5회), pre-test speed 3.0 mm/s, test speed 1.0 mm/s, post-test speed 3.0 mm/s, penetration distance 5.0 mm와 같았고, 힘-변형 곡선상 최대값을 경도로 간주하였다. 저장중 4일 간격으로 코팅별 시료를 2개씩을 취하여 평균값을 구하였다(5x2=10 반복수).

마) pH, 가용성 고형분 및 적정산도 측정

pH와 가용성 고형분은 씨를 제거한 레몬 과육을 blender(HR1350/6, Philips, Korea)로 파쇄한 후 원심분리기(combi-514R, Hanil Science Ins., Korea)로 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 pH meter(SevenMulti S47-dual meter pH, Mettler-Toledo International Inc., Korea)와 refractometer(MASTER-α, ATAGO Co., Ltd., Japan)로 각각 코팅별로 3개씩을 선별하여 3회 측정하여 평균값을 계산하였다(Song & Kim, 1999). 적정산도는 디지털뷰렛(VITLAB® continuous E/RS, VITLAB Co. Lab., Germany)을 사용하여 측정하였다. 즉, 동일한 상등액으로 20배 희석하고 20 mL를 취하여 0.1N NaOH로 적정하여 구연산 함량으로 계산하였다.

바) 갈변도 측정

갈변도는 Kim et al.(1995)의 방법을 이용하여 레몬 껍질 10 g을 2 mm

이하로 자른 다음 이를 삼각 플라스크에 담고 증류수 200 mL를 가하여 35℃ 항온기에서 2시간 방치 후 여과하였다. 이와 같이 얻은 여과액의 흡광도를 spectrophotometer(OPTIZEN 3220UV, Mecasys Co., Ltd., Korea)를 사용하여 420 nm에서 측정하였다.

사) 관능검사 및 통계처리

저장 기간별 레몬 원형에 대하여 부패도, 광택, 색, 단단함, 향기에 대하여 5점 차이식별검사를 실시하였다. 참여한 패널은 동국대학교 대학원생 10명으로 구성하여 실시하였다. 각 속성에 대한 코팅제별 평균값과 유의적 차이를 다중비교(Duncan's multiple comparison)에 의하여 산출하였다. 통계처리는 SAS 프로그램을 사용하였다(SAS Institute Inc., 2009).

3) 결과 및 고찰

가) 중량감소율

Fig. 4와 같이 중량감소율은 저장 4일 이후의 구간에서 CW-SL-LBG, BW-HPMC, SBO-CMC의 순으로 낮게 나타났다. 단 SBO-CMC의 경우는 대조구 보다 더 큰 중량감소율을 보였다. CW-SL-LBG와 BW-HPMC은 wax 계열의 혼합체로서 SBO-CMC의 코팅 보다 중량감소율이 낮은 것으로 보아 wax계가 oil계보다 중량감소의 방지에 더 효과적임을 알 수 있다. Chen et al.(2001)은 식용코팅에 wax 계열 물질의 사용은 과채류의 중량감소를 줄일 수 있는 효과적인 방법으로 보고한 바 있다. 또한 hydrocolloid계인 CW-SL-LBG가 BW-HPMC보다 중량감소율이 낮은 것으로 보아 hydrocolloid계가 cellulose계인 보다 더 효과적인 것으로 보인다. Chen et al.(2001)은 hydrocolloid(xanthan, guar, LBG)를 사용함으로써 wax계 물질이 구조가 질서화되는 것을 방해하여 가스 투과성을 적절하게 향상시킨다고 보고하였다. 그러나 셀룰로오스 계열이 혼합된 코팅제인 BW-HPMC도 중량감소를 효과적으로 억제한다는 보고도 있다 (Navarro-Tarazaga et al, 2008).

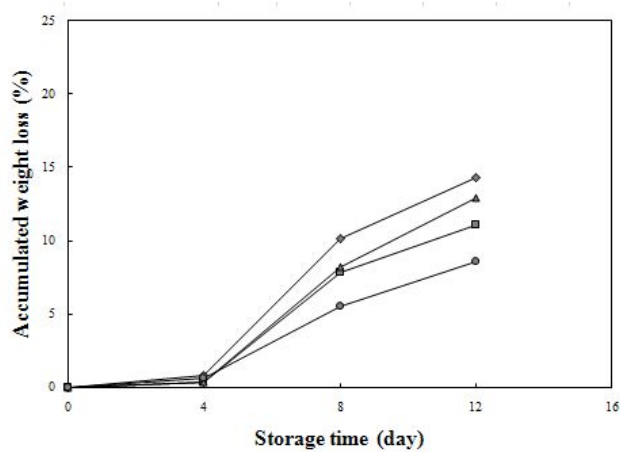


Fig. 4. Changes in the weight loss of multilayer coated lemon with several compounds. ◆: control, ■: BW-HPMC, ▲ : SBO-CMC, ● : CW-SL-LBG.

한편 Fig. 5에서 보면 코팅 피막의 양은 피막 형성 후 건조의 전 구간에 대하여 CW-SL-LBG, BW-HPMC, SBO-CMC의 순으로 크게 나타났다. 피막의 양은 간접적으로 피막이 레몬의 표면에 잘 형성된 정도를 나타는 것으로 간주하다면, CW-SL-LBG가 가장 양호하게 코팅된 것이므로 중량 감소에도 영향을 준 것으로 생각된다.

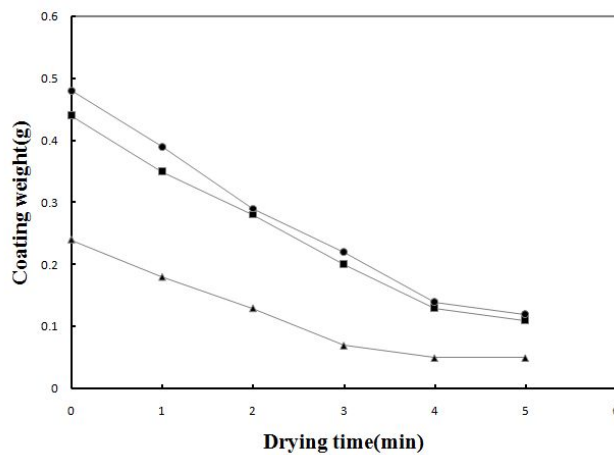


Fig. 5. Changes in the coating weight on lemon peels during drying at 60°C. ■: BW-HPMC, ▲ : SBO-CMC, ● : CW-SL-LBG.

나) 부패율

CW-SL-LBG 코팅이 다른 코팅에 비해 부패율이 낮았다(Fig. 6, 7). 이것은 Chen et al.(2001)이 보고한 바와 같이 LBG는 저장시 호흡에 의해 산소가 소비되고 생성되는 탄산가스와 에틸렌가스의 투과를 향상시켜 후숙을 억제하기 때문으로 생각된다. Wax 계열 물질은 산소와 탄산가스의 투과를 억제하여 이취발행의 단점을 가지므로(Hagenmaier & Shaw, 1992), 그 조직을 느슨하게 만들 수 있는 LBG와 같은 물질과 혼합하여 사용하는 것이 바람직함을 알 수 있다. 단, 친수계 물질을 쓸 경우에는 수분 투과도는 증가할 수 있다는 단점을 고려해야 한다. BW-HPMC와 SBO-CMC 또한 대구조에 비하여 부패율이 낮은 것으로 나타났는데, 셀룰로오스 계열 물질은 산소 및 향기 투과를 억제하는데 효과적으로 알려져 있다(Navarro-Tarazaga et al, 2008). 또한 Fig. 5에 나타난 피막의 양의 결과와 비교해 볼 때 피막 형성 정도가 부패율과 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다.

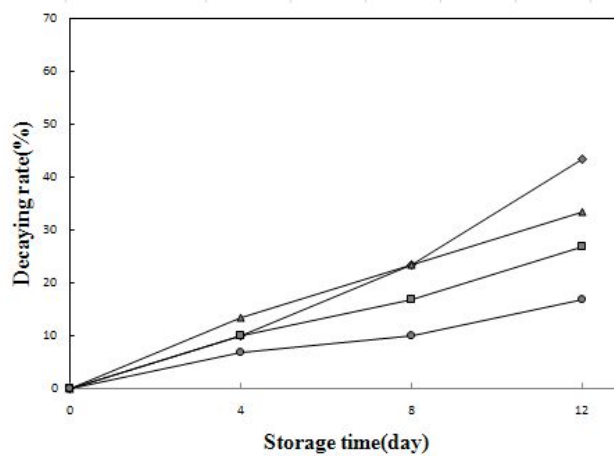


Fig. 6. Changes in the decaying rate of multilayer coated lemon with several compounds. ◆: control, ■: BW-HPMC, ▲ : SBO-CMC, ● : CW-SL-LBG.

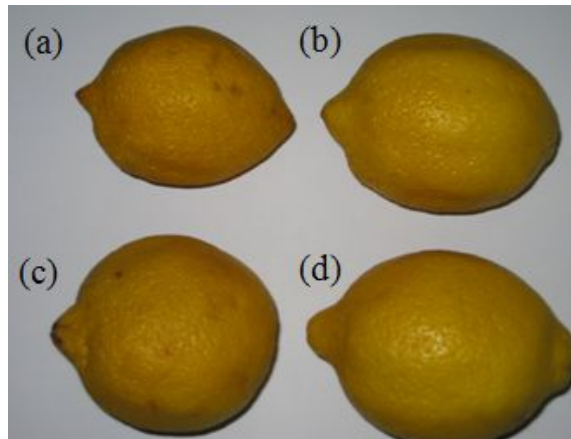


Fig. 7. Photographs of the multilayer coated lemon with several compounds after storage at 60°C for 12 days. (a): control, (b): BW-HPMC, (c): SBO-CMC, (d): CW-SL-LBG.

다) 경도 측정

Fig. 8에서와 같이 저장기간에 따라 경도는 모두 감소하였다. 그 중 CW-SL-LBG의 경도가 가장 양호하게 유지됨을 보였다. 경도의 변화는 중량감소율의 변화에 반비례하는 성질로서 이에 따라 경도의 감소는 SBO-CMC, BW-HPMC, CW-SL-LBG의 순으로 크게 나타난 것으로 생각된다. Navarro-Tarazaga et al.(2008)은 wax 계열과 함께 셀룰로오스 계열이 혼합된 코팅제인 BW-HPMC의 실험에서 경도는 감소하고 중량 감소는 증가한다는 반비례 관계를 보고하였다.

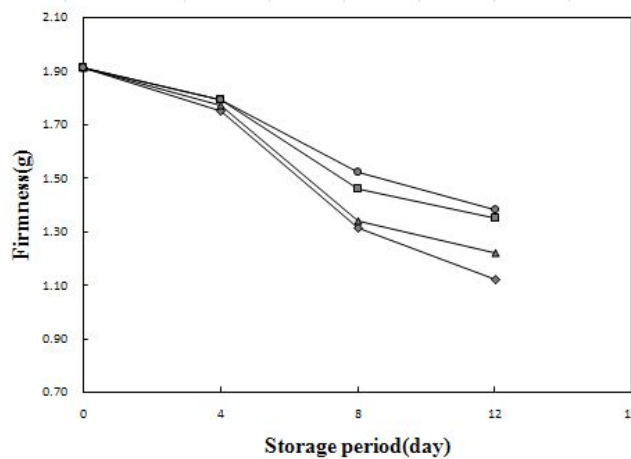


Fig. 8. Changes in the firmness of multilayer coated lemon with several compounds. ◆: control, ■: BW-HPMC, ▲ : SBO-CMC, ● : CW-SL-LBG.

라) pH, 가용성 고형분 및 적정산도 측정

pH는 모두 저장 기간에 따라 증가하였다(Fig. 9). 저장 중 pH의 증가는 호흡에 의하여 산 물질(유기산)이 분해되기 때문이다(Sawamura, 1991). pH의 변화는 코팅 처리군이 대조군이 보다 작게 나타났으며, 특히 SBO-CMC의 pH 변화가 가장 작게 나타났다. 이는 Togrul(2004)이 보고한 SBO-CMC에 의하여 pH 증가를 효과적으로 억제할 수 있다는 결과와 일치함을 알 수 있다. 또한 BW-HPMC가 CW-SL-LBG보다 우수한 이유는 LBG에 의하여 산소와 탄산가스의 투과성이 적절히 향상됨에 따른 호흡작용의 차이에 근거한다고 생각된다.

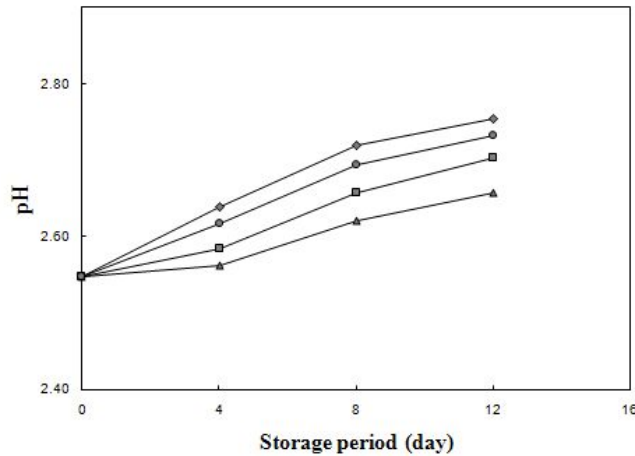


Fig. 9. Changes in the pH of multilayer coated lemon with several compounds.

◆: control, ■: BW-HPMC, ▲ : SBO-CMC, ● : CW-SL-LBG.

가용성 고형분의 변화는 모두 감소함을 보였는데, 코팅 처리군의 감소량이 대조구에 비하여 더 작았다(Fig. 10). 특히 SBO-CMC의 고형분의 변화가 가장 작았다. 이는 Togrul (2004)이 보고한 SBO-CMC에 의하여 가용성 고형분의 감소 효과적으로 억제할 수 있다는 결과와 일치함을 알 수 있다. 가용성 고형분의 감소는 호흡시 탄수화물과 펙틴의 분해, 단백질의 부분가수분해, 배당체(glycosides)의 분해에 기인되는 것으로서(Ball, 1997), 또한 알콜을 생성하는 미생물에 의한 가용성 당의 소비도 그 한 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Yaw, 1998)

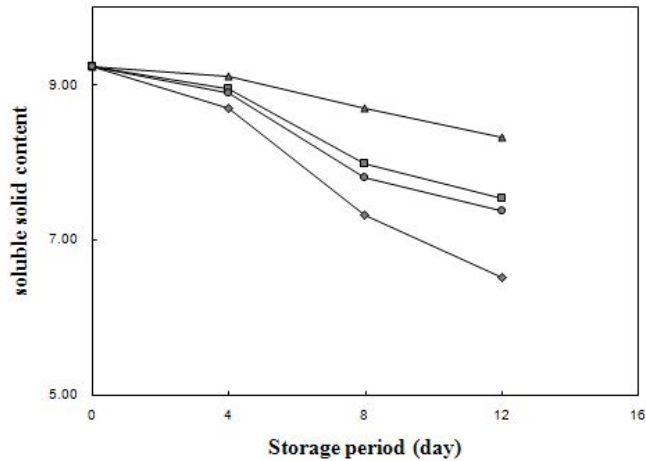


Fig. 10. Changes in the soluble solid content of multilayer coated lemon with several compounds. ◆: control, ■: BW-HPMC, ▲ : SBO-CMC, ● : CW-SL-LBG.

적정산도는 모두 감소하였는데 SBO-CMC가 가장 작은 변화량을 보였다(Fig. 11). 적정산도는 pH의 증가와 반비례하는 성질로서(Togrul, 2004), 본 연구에서 pH의 결과인 Fig. 9과 비교해 볼 때 역시 반비례하게 나타났다. Ball(1997)는 wax와 CMC의 혼합 코팅제의 실험에서 CMC의 양이 증가할수록 산소 투과도가 낮아지고 글루코스가 혐기상태에서 알콜로 변하기 때문이며 적정산도가 더 감소한다고 보고하였다. 이는 본 실험에서 사용한 셀룰로오스 계열인 SBO-CMC와 BW-HPMC에 대하여 사용된 CMC(8 g/혼합액-2000 ml) 및 HPMC(27.8 g/혼합액-2000ml)의 양과 비교해 볼 때 같은 경향임을 알 수 있다. 한편, Baldwin(1995)는 높은 탄산가스 농도에서는 오히려 carboxylic acid가 형성되어 산도가 증가할 수 있다고 보고하였다.

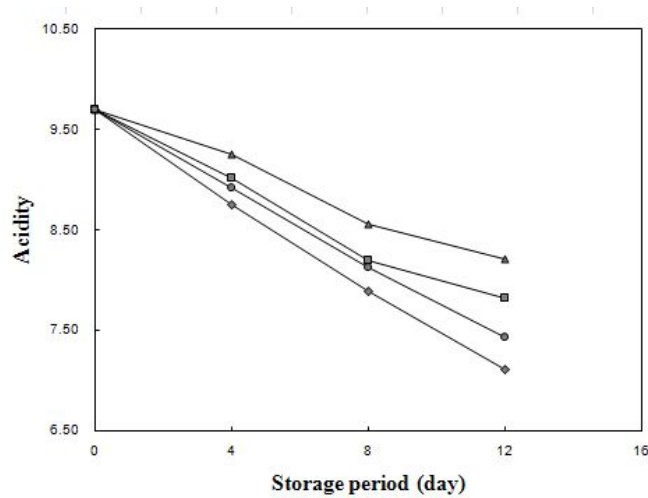


Fig. 11. Changes in the titratable acidity of multilayer coated lemon with several compounds. ◆: control, ■: BW-HPMC, ▲ : SBO-CMC, ● : CW-SL-LBG.

마) 갈변도 측정

갈변도는 저장 기간에 따라 증가하였는데, CW-SL-LBG, BW-HPMC, SBO-CMC, 대조구의 순으로 갈변도 증가가 작았다(Fig. 12). 과일은 갈변은 산화적 반응으로서(Morton & Macleod, 1982)코팅에 의한 산소의 차단과 본 실험에서 첨가된 유용물질인 비타민 C와 E에 의하여 억제되기 때문이다. 산소 차단 효과를 Fig. 5에서 피막의 양과 관련하여 볼 때는 그 결과가 일치함을 알 수 있다. 이중층의 코팅에서 외층에 함유된 항산화제는 내층을 통하여 레몬에 껍질에 확산되는데 Fig. 9에서 시간 경과에 따른 갈변도 증가율은 SBO-CMC가 크고 CW-SL-LBG와 BW-HPMC는 거의 비슷함을 보였다. Charalambopoulou et al.(2001)의 보고에 따르면 multilayer의 경우 zero-order release의 효과를 볼 수 있는데, 이는 층 내 함유된 유용물질이 초기에는 부착물에 과량 전달되어 단시간에 소진되는 것이 아니라, 초기부터 유용물질이 소량씩 전달되어 오랫동안 유용물질이 공급되는 상태를 의미한다. 이런 관점에서 볼 때 SBO-CMC의 경우에는 초기에는 항산화물질의 공급에 의하여 갈변이 억제되지만 후기에 갈수록 항산화제의 소진에 따른 갈변이 급속히 증가하며, 이에 비하여 CW-SL-LBG는 보다 항산화제가 지속적으로 공급됨으로서 후기까지도 갈변도가 억제되어 zero-order release의 효과를 볼 수 있음을 추측할 수 있다.

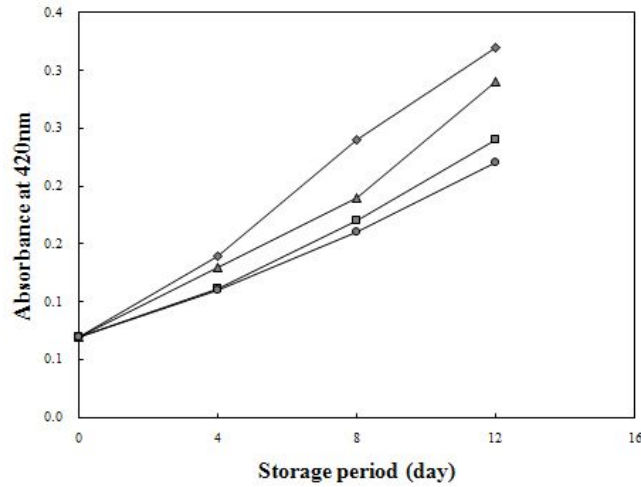


Fig. 12. Changes in the absorbance at 420 nm of multilayer coated lemon with several compounds. ◆: control, ■: BW-HPMC, ▲ : SBO-CMC, ● : CW-SL-LBG.

바) 관능검사 결과

부패도는 코팅군이 대조군에 비해 낮게 평가되었으며 코팅군끼리 비교해 볼 때 CW-SL-LBG가 다른 코팅군에 비해 덜 부패하였다고 평가되었다 (Table 2). 이 결과는 fig 6의 부패율과도 일치하였다. 광택은 BW-HPMC, CW-SL-LBG, SBO-CMC 순으로 광택 유지에 효과가 있다고 평가되었다. Wax계열 물질이 Oil계열보다 광택 유지에 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 단단한 정도와 명도에서는 CW-SL-LBG, BW-HPMC, SBO-CMC, 대조군의 순으로 평가되었는데 이것은 fig 8에 나타난 경도에 대한 결과값과 같았다. Grant & Burns(1994)는 Wax계열의 물질은 외관향상에 효과적이라고 보고하였다. 레몬의 향에 대한 관능평가에서는 코팅군이 대조군에 비해 떨어진다고 평가되었다. 이는 wax 특유의 향기 때문으로 생각되어 진다.

Table 2. Changes in the sensory measurements of multilayer coated lemon with several compounds.

Characteristics	Group	Storage time (day)			
		0	4	8	12
Decaying degree	Control	0.0	0.8b	2.7a	3.8a
	BW-HPMC	0.0	0.7b	1.9b	2.9b
	SBO-CMC	0.0	1.0a	2.2b	3.5a
	CW-SL-LBG	0.0	0.7b	1.8b	2.6b
Gloss	Control	3.0	2.7a	2.1b	1.8b
	BW-HPMC	3.0	2.9a	2.5a	2.3a
	SBO-CMC	3.0	2.8a	1.9b	1.6b
	CW-SL-LBG	3.0	2.9a	2.4a	2.1a
Firmness	Control	3.0	2.8a	2.4b	2.0c
	BW-HPMC	3.0	2.9a	2.7a	2.4b
	SBO-CMC	3.0	2.9a	2.6b	2.3b
	CW-SL-LBG	3.0	2.9a	2.8a	2.6a
Brightness	Control	3.0	3.4a	3.9a	4.3a
	BW-HPMC	3.0	3.1b	3.3b	3.6b
	SBO-CMC	3.0	3.2b	3.5b	4.1a
	CW-SL-LBG	3.0	3.1b	3.3b	3.5b
Flavor	Control	3.0	2.9a	2.3a	2.1a
	BW-HPMC	3.0	2.9a	2.5a	2.2a
	SBO-CMC	3.0	2.7ab	2.1b	1.6b
	CW-SL-LBG	3.0	2.5b	2.1b	1.7b

Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at $\alpha=5\%$.

Citrus계 식용 코팅제를 조사하여 예비실험을 통하여 코팅 형성능이 양호한 beeswax-hydroxypropyl methylcellulose(BW-HPMC), soybean oil-carboxymethyl cellulose(SBO-CMC), Carnaubawax-Shellac-locust bean gum(CW-SL-LBG)를 선발한 후 이중층의 multilayer를 레몬에 코팅하여 그 저장성을 비교 분석하였다. 먼저 레몬에 제 일층(control tie layer)을 코팅하고 유용물질인 vit-C 및 E가 함유된 이층(matrix layer)를 코팅하였다. 코팅 형성 능은 CW-SL-LBG, BW-HPMC, SBO-CMC의 순으로 높게 나타났다. 가속 실험 조건인 30°C의 항온기에 12일 동안 저장하면서 유자의 중량감소율, 부패율, 경도, pH, 가용성 고형분, 적정산도, 갈변도의 변화를 측정하였다. 중량감소율, 부패율, 경도의 유지 면에서 CW-SL-LBG가 가장 우수하였으나, 그 밖의 성질에서는 시료간 뚜렷한 차이가 없는 것으로 분석되었다. 결과적으로 CW-SL-LBG가 레몬의 vit-C 및 E 포함 multilayer 코팅에 가장 적합한 물질로 나타났다.

다. Wax계 식용코팅의 개발과 식용코팅이 저장 시간에 따라 유자 품질에 미치는 효과

Citrus계 식용 코팅제인 beeswax-hydroxypropyl methylcellulose (BW-HPMC), soybean oil-carboxymethyl cellulose(Soybean oil-CMC), carnauba wax-shellac-locust bean gum(CarW-Shellac-LBG)을 각각 사용하여 유자에 코팅하여 식용 코팅 유자를 제조하였다. SEM촬영으로 유자 과피에 코팅되어 있는 코팅제의 확인과 코팅으로 유자 표면의 호흡 구멍을 막아 호흡을 조절한다는 것을 확인하였다. 저장 실험 조건으로 20℃의 항온기에 5주 동안 저장하면서 유자의 중량감소율, 유자 내부의 호흡률(CO₂, O₂),경도, 외관, pH, 가용성 고형분, 적정산도의 변화를 측정하고 관능검사를 실시하였다. 코팅으로 인한 유자 내부의 호흡률 즉, CO₂/O₂의 변화율은 코팅하지 않은 대조군보다 크게 나타났으며, 또한 코팅 처리한 유자는 대조군보다 중량감소율, 경도, 외관의 변화율이 적은 경향을 보여 코팅의 효과를 확인하였다. 저장성의 관능검사에서는 코팅 처리한 유자가 코팅하지 않은 유자보다 양호하게 나타났다. 특히 이번 실험에서 유자에 적용된 식용 코팅 중에 CarW-Shellac-LBG 가 가장 적합한 물질로 평가되었다.

1) 세부과제의 목표 및 내용

유자(*Citrus junos*)는 한국과 일본에서 주로 재배되는 감귤류로 한국에서는 고흥을 포함한 남해안 일대와 제주에서 자생한다. 유자는 맛과 향이 강하여 과육과 과피를 모두 이용 할 수 있는 과일로 주스, 유자청, 식초, 향료, 잼 등과 같은 식품재료에 주로 사용되고 있으며 최근에는 웰빙 식품의 소비량과 품질이 좋은 국내 유자의 수출이 증가되고 있다(Shon & Park, 2006; Hong et al., 2008). 이에 따라 국내 농가에서도 유자의 저장성 향상을 위한 기술이 필요한 실정이나 유자에 대한 국내 연구로는 성분분석, 착즙방법, 유통과정의 품질변화, 유자 추출물의 연구 등이 이루어져 왔으나(Lee et al., 1994; Jeong et al., 1994; Cha et al., 1990), 식용 코팅을 통한 저장성 향상을 위한 연구는 국내뿐 아니라 국외에서도 아직 전무한 실정이다.

과일은 수확 후에도 그 생명 현상을 계속하여 추숙(ripening), 노화(aging) 등을 나타내며, 호흡작용 및 증산작용에 의하여 산소가 소비되고 탄산가스가 생성되며 또한 호흡열이 발생하여 신선도가 저하될 수 있다. 이에 따라 저장 중 과일의 이화학적 품질인 갈변도, pH, 산도, 당도 등이 변하게 된다(No et al., 2009). 기체 조성을 변경함으로써 호흡작용의 진행을 조절할 수 있어 저장 기술로 포장 내 공기의 산소-탄산가스의 농도를 조절하여 저장 기간을 증가시키는 MAP(modified atmosphere packaging)저장방법이 적용된다(No et al., 2009). 또한 포장 대신 식용코팅(edible coating)을 과일 표면

에 함으로서 공기의 공급을 제한하여 역시 호흡작용을 제어하여 저장 중 중량감소를 방지하고 결과적으로 저장 기간을 증가시킬 수 있다(Kester & Fennema, 1986; Jiang & Li, 2001). 증산작용의 경우에는 유자 저장에서 증산작용에 의한 중량 감소 및 미생물에 의한 부패에 관하여 보고되었다(Kim et al., 1995).

식용 필름과 코팅은 물질 및 성분의 이동을 조절하여 과일의 신선도를 보존시키고 품질을 향상시키는 친환경적인 기술로서 최근에 많은 관심을 받는 분야이다(Baldwin EA, 1994; Krochta JM & De Mulder-Johnston C, 1997). 식용 필름과 코팅제조에 사용되는 물질에는 지방과 다당류, 그리고 단백질 등이 있다(Kester JJ & Fennema OR, 1986). 다당류와 단백질은 필름 형성에 좋은 물질이지만 수분 조절이 어렵다. 반면 지방은 수분 조절에는 효과적이지만 낮은 기계적 무결성을 나타내고 필름 제조시 높은 온도를 필요로 한다. 이러한 이유로 코팅제는 각 물질의 장점과 단점을 보완하기 위하여 여러 가지 조합을 적용하고 있다(Callegarin F et al., 1997).

유자와 유사한 citrus의 경우 식용코팅제로 여러 물질이 적용되었다. Wax와 hydrocolloid의 혼합 코팅제인 beeswax-hydroxypropyl methylcellulose (BW-HPMC)는 citrus의 품질 저하를 방지하며, 중량 및 경도 유지에 효과가 있는 것으로 나타났다(Navarro-Tarazaga et al., 2008). Carboxymethyl cellulose(CMC)가 여러 hydrophobic 물질과 함께 식용코팅으로 사용되었는데 soybean oil이 paraffin wax나 beeswax보다 중량 유지 및 저장기간의 연장에 더 효과적이었다(Togrul & Arslan, 2004). 코팅제의 수분 및 가스 투과성이 carnauba wax-shellac-locust bean gum(CarW-Shellac-LBG)에 대하여 실험된 바 산소와 탄산가스의 침투성이 특히 우수하였다(Chen & Nussinovitch, 2001). Locust bean gum(LBG)과 3가지 wax계 물질(CarW, BW, shellac)의 조합에서 BW-Shellac-LBG코팅이 중량 유지 및 광택의 면에서 가장 좋은 효과를 나타냈고, 향 관련 에틸알콜 함량에서도 다른 실험군에 비해 우수한 효과를 나타냈다(Rojas-Argudo et al., 2009).

따라서 본 연구에서는 유자의 저장성 향상을 위하여 최근 다른 과일에 시도되었던 코팅 기술을 적용하였다. 코팅 물질은 citrus에 성공적으로 적용된 formulation으로부터 선별하였으며 Formulation에 따른 유자의 저장성을 나타내는 여러 이화학적 성질을 분석하여 최적의 formulation을 탐색하였다.

2) 재료 및 방법

본 실험에 사용한 유자는 코치(일본)에서 같은 시기에 수확된 유자를 일본 소매상을 통해 직접 구매하였다. 개체 평균중량이 120~140 g 정도로 상처가 없으며 크기와 색이 비슷한 신선한 유자만을 선별하여 저장실험에 사용하였다.

가) 코팅제의 제조

BW-HPMC 코팅제는 Navarro-Tarazaga et al.(2008)의 방법을 이용하여 제조하였다. HPMC를 90℃의 물에 녹이고 가소제로 glycerol을 1:0.5 (w/w)로 혼합하여 HPMC/glycerol의 용액을 제조하였다. BW도 90℃의 물에 녹이고 유화제로 oleic acid를 1:0.2 (w/w)로 혼합하여 BW/oleic acid의 용액을 제조하였다. HPMC/glycerol과 BW/oleic acid를 혼합하여 homogenizer(HG15D, Daihan Co., Seoul, Korea)로 25000 rpm에서 3분간 균질화시켰다. 그 후 30℃이하의 항온수조(Nexus technologies Co., Seoul, Korea)에서 냉각시켰다.

Soybean oil-CMC 코팅제는 Togrul & Arslan(2004)의 방법에 따라 제조하였다. CMC를 70℃의 물에 용해하여 CMC용액을 제조하였다. 따로 soybean oil도 70℃에서 녹인 유화제인 sodium oleate를 혼합한 후, CMC용액과 함께 stirrer(Corning PC-420, Corning, Seoul, Korea)로 70℃로 녹이고 혼합하여 Soybean oil-CMC 혼합물을 제조하였다. 그리고 Soybean oil-CMC 혼합물을 homogenizer로 25000 rpm에서 3분간 균질화시켰다. 그 후 30℃이하의 항온수조에서 냉각시켰다.

CarW-Shellac-LBG 코팅제는 Chen & Nussinovitch(2001)의 방법을 이용하여 제조하였다. CarW와 shellac을 95℃에서 녹이고 85℃의 물과 혼합하여 CarW-Shellac 용액을 제조하였다. CarW-Shellac 용액에 morpholine과 유화제로 oleic acid를 넣어준 후, homogenizer로 25000 rpm에서 3분간 균질화시켰다. 그리고 LBG를 상온에서 혼합하여 CarW-Shellac-LBG 혼합물을 제조하였다. 각 코팅제의 조성과 농도는 Table 3에 나타냈다.

Table 3. Compositions of formulations

(Unit: percent wet basis)

Compounds	Formulations
BW-HPMC ¹⁾	HPMC (1.4), BW (1.6), Glycerol (0.7), Oleic acid (0.3), Water (96.0)
Soybean oil-CMC ²⁾	CMC (0.4), Soybean oil (9.0), Sodium oleate (0.7), Water (89.9)
CarW-Shellac-LBG ³⁾	LBG (0.5), CarW (10.0), Shellac (20.0), Oleic acid (1.8), Morpholine (2.4), Water (82.9)

¹⁾HPMC, hydroxypropyl methylcellulose; BW, Beeswax.

²⁾CMC, carboxymethyl cellulose.

³⁾LBG, locust bean gum; CarW, carnaubawax.

나) 식용코팅 유자 제조 및 저장 실험

상기 제조된 코팅제를 사용하여 식용코팅 유자를 다음과 같이 제조하였다. 장갑을 착용하여 650 μ l의 코팅제를 유자에 문질러 준 후 25 $^{\circ}$ C의 air-blower로 건조시켰다(Chen and Nussinovitch 2001). 상기 코팅된 유자를 대조군(코팅되지 않은 유자)과 함께 20 $^{\circ}$ C, 85 \pm 5% RH의 항온기(66x76x180 cm, Labotech Co., Seoul, Korea)에 5주간 보관하면서, 시간에 따른 품질 변화를 측정하였다.

다) 코팅 피막의 Scanning electron microscopy(SEM)촬영

코팅된 유자의 표면을SEM(HITACHI S-3000N, HITACHI INSTRUMENTS Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 촬영하였다. 유자 과육을 제거한 껍질을 한 변이 3 mm인 정사각형 모양으로 일정하게 잘라 수분을 제거하기 위해서 -85 $^{\circ}$ C의 동결건조기(FD-5512, Daejung Co., Seoul, Korea)로 48시간동안 동결건조시켰다. 건조가 완료된 껍질을 시료대(stub)에 부착시키고 백금으로 코팅한 후 SEM으로 촬영하였다.

라) 중량감소율 측정

저장 기간에 따른 중량감소율은 코팅별로 유자를 15개씩 사용하여 일주일 간격으로 같은 시간에 무게를 측정하고, 동일한 유자에 대해서 초기 무게에 대한 무게 변화량을 백분율로 나타내었다.

마) 내부 호흡률 측정

유자 내부의 CO₂와 O₂의 농도는 thermal conductivity detector(TCD)와 Shincarbon ST 100/120 column(2m \times 1mm)이 장착된 gas chromatography(6890N, Agilent Co., Santa clara, USA)로 분석하였다(Navarro-Tarazaga et al., 2008). CO₂농도 분석조건은 다음과 같다. oven, injector, detector의 온도는 각각 230, 200, 250 $^{\circ}$ C이며, carrier gas는 22 mL \cdot min⁻¹의 flow rate로 Helium gas를 사용했다. O₂농도 분석시 oven 온도는 35 $^{\circ}$ C로 나머지 조건은 위와 동일하다. 가스 채취는 물 속에 넣은 유자에 gastight syringe(1725RN, Hamilton Co., Reno, Nevada)를 직접 주입시켜 유자 내부의 가스 sample을 취하여 gas chromatography에 주입하여 분석하였다. CO₂와 O₂의 농도는 standard gas의 peak area로부터 계산해주었다. 코팅별 시료를 15개씩을 취하여 평균값을 구하였다.

바) 경도 측정

유자의 기계적 경도는 Jha et al.(2010)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다.

원형 그대로의 시료를 Texture Analyser(TA-XT2, Stable Micro System, Godalming, UK)의 시료 받침대에 올려 놓고 pin probe(diameter 2mm)를 내려오게 하여 껍질 층을 관통할 때 힘을 측정하였다. 이때 TA 측정 mode는 measure force in compression, repeat until count(5회), pre-test speed 3.0 mm/s, test speed 1.0 mm/s, post-test speed 3.0 mm/s, penetration distance 5.0 mm와 같았고, 힘-변형 곡선 상 최대값을 정도로 간주하였다. 코팅별 시료 10개씩을 취하여 하나의 시료에서 5군데 부위를 측정하여 평균값을 구하였다.

사) 외관 촬영

외관 촬영은 유자 원형 그대로를 밀폐 된 공간에서 빛의 양은 동일한 조건을 주기 위해 조명기를 사용하여 사진기(IXY 800 IS, Canon Co., Seoul, Korea)로 촬영했다. 일주일 간격으로 코팅별 3개씩 동일한 유자의 외관 변화를 촬영하였다.

사) pH, 가용성 고형분 및 적정산도 측정

pH와 가용성 고형분은 씨를 제거한 유자 과육을 blender(HR1350/6, Philips Co., Seoul, Korea)로 파쇄한 후 원심분리기(combi-514R, Hanil Science Ins., Seoul, Korea)로 4500 g 에서 10분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 pH meter(SevenMulti S47-dual meter pH, Mettler-Toledo International Inc., Seoul, Korea)와 refractometer(MASTER-α, ATAGO Co., Tokyo, Japan)로 각각 코팅별로 5개씩을 선별하여 3회 측정하여 평균값을 계산하였다(Song & Kim, 1999). 적정산도는 디지털뷰렛(VITLAB@continuous E/RS, VITLAB Co., Muehlthal, Germany)을 사용하여 측정하였다. 즉, 동일한 상등액으로 20배 희석하고 20 mL를 취하여 0.1N NaOH로 적정하여 구연산 함량으로 계산하였다.

아) 관능검사

훈련 받은 10명의 패널들은 유자의 광택, 색, 단단함, 향, 외관에 대해 평가했다. 평가는 9점 차이식별검사를 실시하였다(1: 부패 된 유자, 9: 저장 전의 신선한 유자). 패널들에게는 각 코팅군과 대조군이 함께 제공되었다. 이 과정을 3번씩 반복하였다.

자) 통계처리

속성에 대한 코팅제별 평균값과 유의적 차이를 다중비교(Duncan's multiple comparison)에 의하여 산출하였다. 통계처리는 SAS 프로그램을 사용하였다(Lee 2008).

3) 결과 및 고찰

가) 코팅 껍질의 SEM

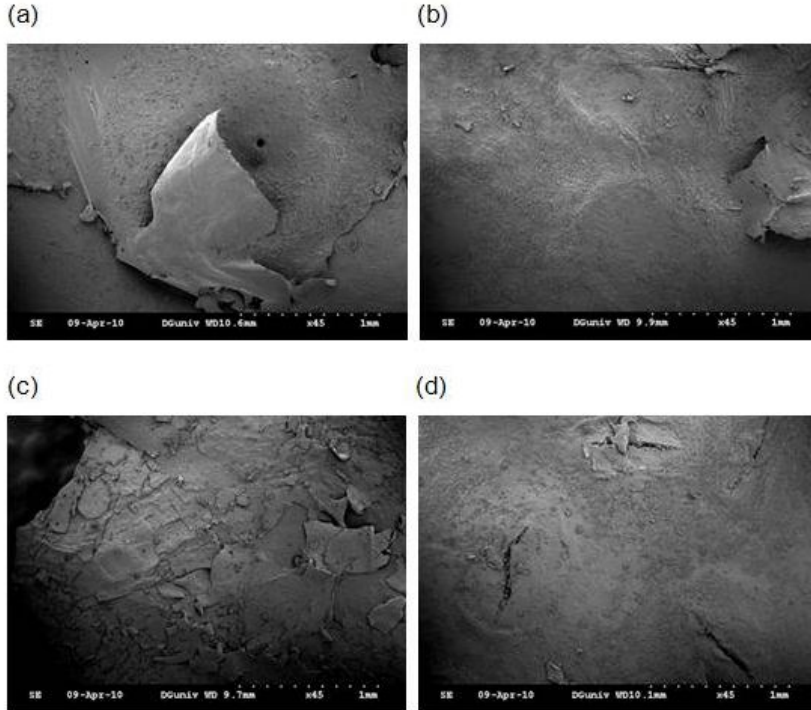


Fig. 13. SEM micrographs of Yuja peels coated by: (a) BW-HPMC; (b) Soybean oil-CMC; (c) CarW-shellac-LBG; (d) Uncoating. BW, beeswax; HPMC, hydroxypropyl methylcellulose; CMC, carboxymethyl cellulose; CarW, carnaubawax LBG, locust bean gum.

코팅 처리를 하지 않은 대조군의 사진에는 여러 기공이 보이지만 코팅 처리한 코팅군의 사진에는 코팅으로 인해 기공이 보이지 않았다(Fig. 1). 그러므로 실험에 사용한 코팅제가 유자 껍질에 효과적으로 코팅이 되었다는 것을 확인할 수 있었다. Wax 계열 코팅군은 부분적으로 여러겹으로 코팅을 형성했다[Fig. 13(a), (c)]. 반면에 oil 계열 코팅군은 전체적으로 넓게 코팅을 형성했다[Fig. 13(b)]. Hydrocolloid(LBG)가 첨가된 wax 계열 코팅군 [Fig. 13(c)]는 다른 코팅군에 비해 더 작고, 더 무질서한 코팅조각을 형성했다. 이것은 hydrocolloid를 첨가한 wax 코팅물질의 구조가 무질서했다는Chen & Nussinovitch(2001)의 실험 결과와 일치했으며 또한, Albrigo & Brown(1970)과 Ben-Yehoshua et al.(1985)은 hydrocolloid를 첨가한 코팅제는 유자 껍질에 무질서하고 더 작은 코팅조각을 형성했다고 보고한 바 있다.

나) 중량감소율

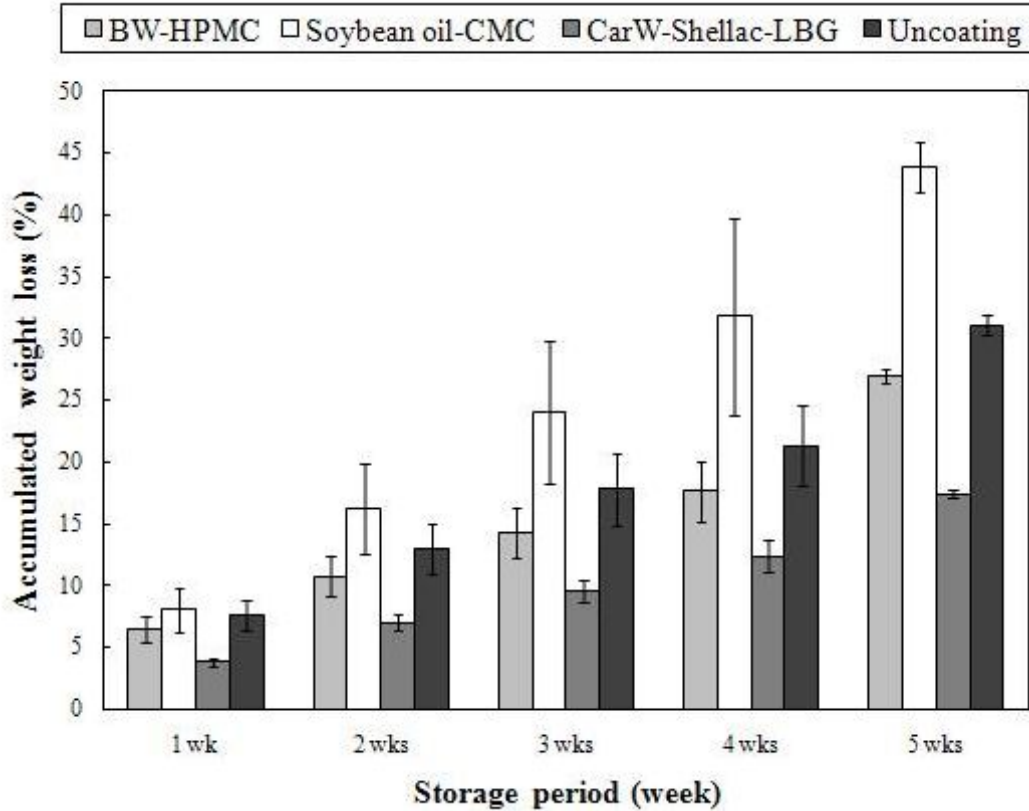


Fig. 14. Changes in the weight loss of Yuja coated by several composites during storage at 20 °C. Error bars represent standard deviation (n=15).

Fig. 14는 코팅 처리한 코팅군과 코팅 처리하지 않은 대조군을 저장 시간에 따라 중량감소율을 비교하여 코팅의 효과를 보여준 것이다. Fig. 14와 같이 중량감소율은 저장 시간에 따라 CarW-Shellac-LBG, BW-HPMC, Soybean oil-CMC의 순으로 낮게 나타났다. 단 soybean oil-CMC의 경우는 대조군보다 더 큰 중량감소율을 보였다. 이는 코팅이 moisture barrier로서의 효과를 보여준다(Perez-gago et al., 2002). CarW-Shellac-LBG와 BW-HPMC는 wax 계열의 혼합체로서 soybean oil-CMC의 코팅보다 중량감소율이 낮은 것으로 보아 wax계가 oil계보다 중량감소의 방지에 더 효과적임을 알 수 있다. 이는 Togrul & Arslan(2004)이 mandarin에 적용시킨 실험 결과와 일치한다. 그리고 Petracek et al.(1999)은 식용코팅에 wax 계열 물질의 사용은 과채류의 중량감소를 줄일 수 있는 효과적인 방법으로 보고한 바 있다. CarW-Shellac-LBG와 BW-HPMC에 사용한 유화제인 oleic acid는 시간에 따라 감소하는 무게와 부피로 인한 과일 표면의 변화에 쉽게 적응하기 쉬운 flexibility한 성질 때문에 다른 유화제보다 oleic acid를 첨가한 코팅제가 중량감소율에서 가장 효과가 있었다는 Navarro-Tarazaga et al.(2008)의 실험 결과와 일치한다. 또한 hydrocolloid계인

CarW-Shellac-LBG가 BW-HPMC보다 중량감소율이 낮은 것으로 보아 hydrocolloid계가 셀룰로오스 계열보다 더 효과적인 것으로 보인다. Chen & Nussinovitch(2001)은 hydrocolloid(xanthan, guar, LBG)를 사용함으로써 wax계 물질이 구조가 질서화되는 것을 방해하여 가스 투과성을 적절하게 향상시킨다고 보고하였다. 그러나 셀룰로오스 계열이 혼합된 코팅제인 BW-HPMC도 중량감소를 효과적으로 억제한다는 보고도 있다(Navarro-Tarazaga et al., 2008).

다) 내부호흡률

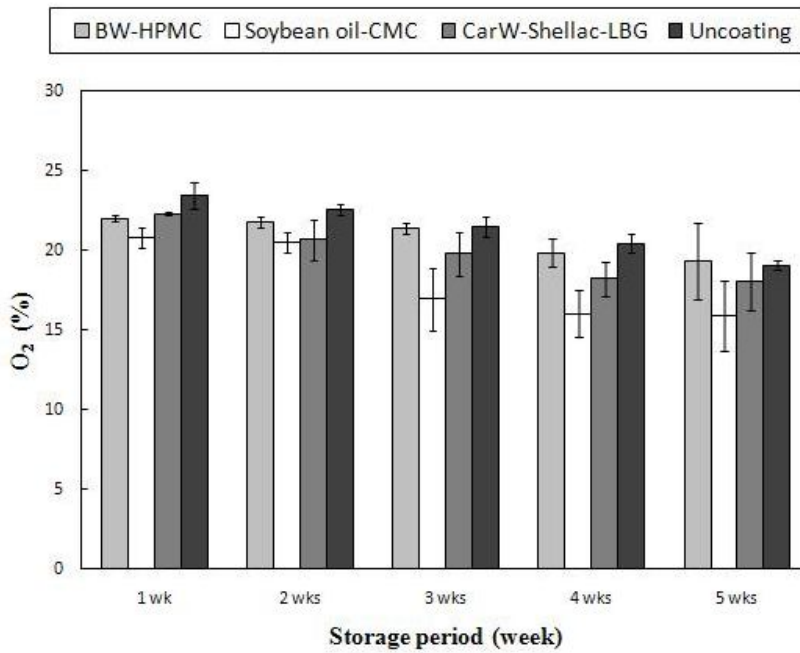


Fig. 15. Changes in internal O₂ concentration of Yuja coated by several composites during storage at 20 °C. Error bars represent standard deviation (n=15).

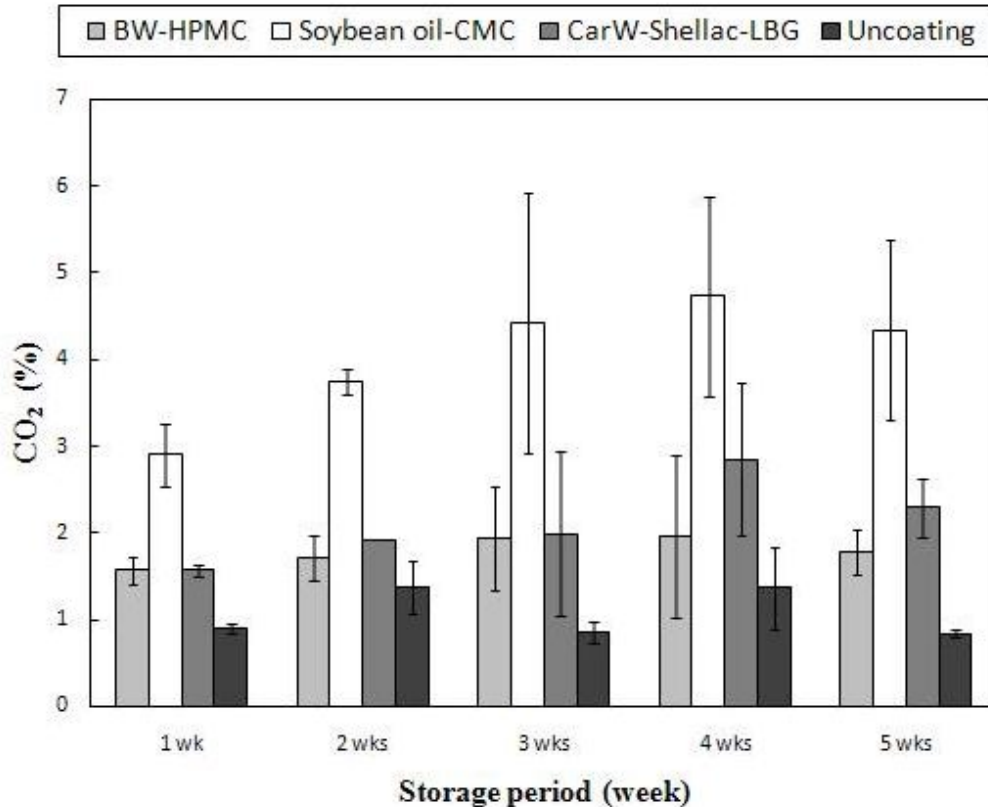


Fig. 16. Changes in the internal CO₂ concentration of Yuja coated by several composites during storage at 20 °C. Error bars represent standard deviation (n=15).

코팅을 처리한 유자는 코팅을 처리하지 않은 유자와 비교하였을 때, 대체로 internal O₂의 농도는 감소하였고, CO₂의 농도는 증가하였다(Fig 15, 16). 코팅에 의해 유자 표면의 기공이 막혀 유자 내부의 가스의 변화량이 기공이 열려있는 대조군보다 크게 나타났다고 보인다. 코팅 처리군에서는 Soybean oil-CMC가 다른 코팅군들보다 O₂의 농도는 더욱 감소하였고, CO₂의 농도는 더 많이 증가하였다. 이는 fig. 13에서 나타난 유자 표면에 형성된 코팅제의 코팅효과에 따른 결과로 생각되어진다. 표면장력이나 점도와 같은 코팅의 물리적 성질과 코팅의 flexibility는 block pores(기공 막는것)를 쉽게 형성시켜줌으로써 코팅 유자의 mass transfer에 강한 영향을 끼친다 (Hagenmaier & Baker, 1993). Fig. 13의 (b)와 같이 Soybean oil-CMC는 유자 표면 전체를 넓게 덮은 모습을 보였기에 block pores의 효과가 제일 컸다. 반면 (c)의 CarW-Shellac-LBG는 무질서하게 부분적으로 block pores가 형성되어 가스의 변화량이 가장 적은 것으로 생각된다. BW-HPMC는 soybean oil-CMC보다는 부분적이고, CarW-Shellac-LBG보다는 질서있게 코팅이 되어 가스 변화량도 이들의 변화량의 중간적인 결과를 보였다.

라) 경도

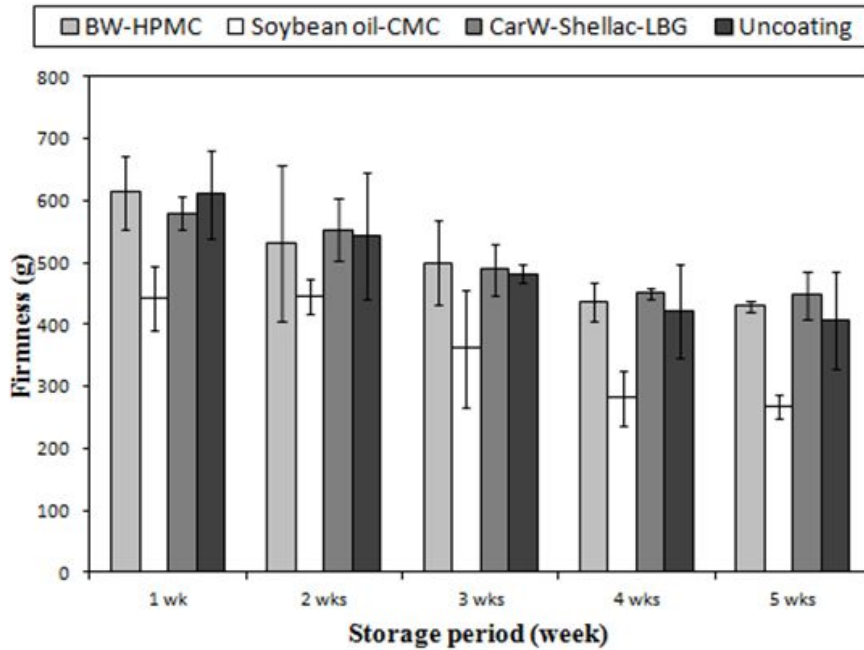


Fig. 17. Changes in the firmness of Yuja coated by several composites during storage at 20 °C. Error bars represent standard deviation (n=5 x 10).

Fig. 17에서와 같이 저장기간에 따라 경도는 모두 감소하였다. 그 중 CarW-Shellac-LBG의 경도가 가장 양호하게 유지됨을 보였다. 경도의 변화는 중량감소율의 변화에 반비례하는 성질로서 이에 따라 경도의 감소는 Soybean oil-CMC, BW-HPMC, CarW-Shellac-LBG의 순으로 크게 나타난 것으로 생각된다. Navarro-Tarazaga et al.(2008)은 wax 계열과 함께 셀룰로오스 계열이 혼합된 코팅제인 BW-HPMC의 실험에서 경도는 감소하고 중량 감소는 증가한다는 반비례 관계를 보고하였다.

마) 외관

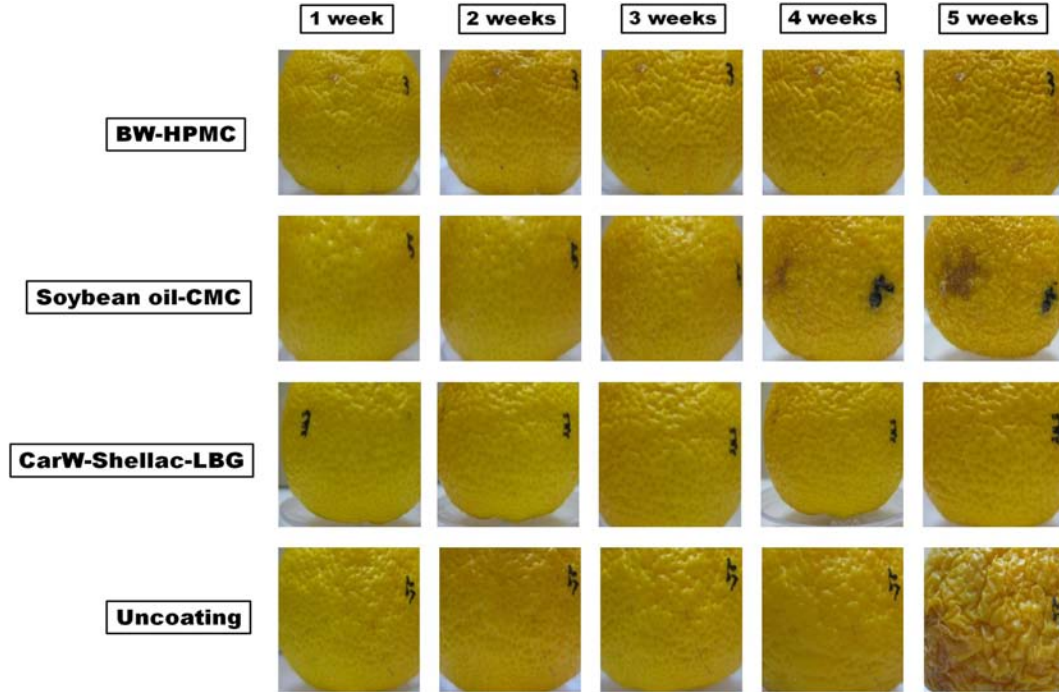


Fig. 18. Changes in the decaying degree of coated citron with several compounds during storage at 20°C.

CW-SL-LBG 코팅이 다른 코팅에 비해 부패도가 가장 낮았다(Fig. 18). 이것은 Chen & Nussinovitch(2001)이 보고한 바와 같이 LBG는 저장시 호흡에 의해 산소가 소비되고 생성되는 탄산가스와 에틸렌가스의 투과를 향상시켜 후숙을 억제하기 때문으로 생각된다. Wax 계열 물질은 산소와 탄산가스의 투과를 억제하여 이취발행의 단점을 가지므로(Hagenmaier & Shaw, 1992) 그 조식을 느슨하게 만들 수 있는 LBG와 같은 물질과 혼합하여 사용하는 것이 바람직함을 알 수 있다. 단, 친수계 물질을 쓸 경우에는 수분투과도는 증가할 수 있다는 단점을 고려해야 한다.

BW-HPMC 또한 대조군에 비하여 부패도가 낮은 것으로 나타났는데, 셀룰로오스 계열 물질은 산소 및 향기 투과를 억제하는데 효과적으로 알려져 있다(Navarro-Tarazaga et al., 2008). 또한 Fig. 1에 나타난 코팅 피막 형성 정도가 부패도와 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다.

바) pH, 가용성 고형분 및 적정산도

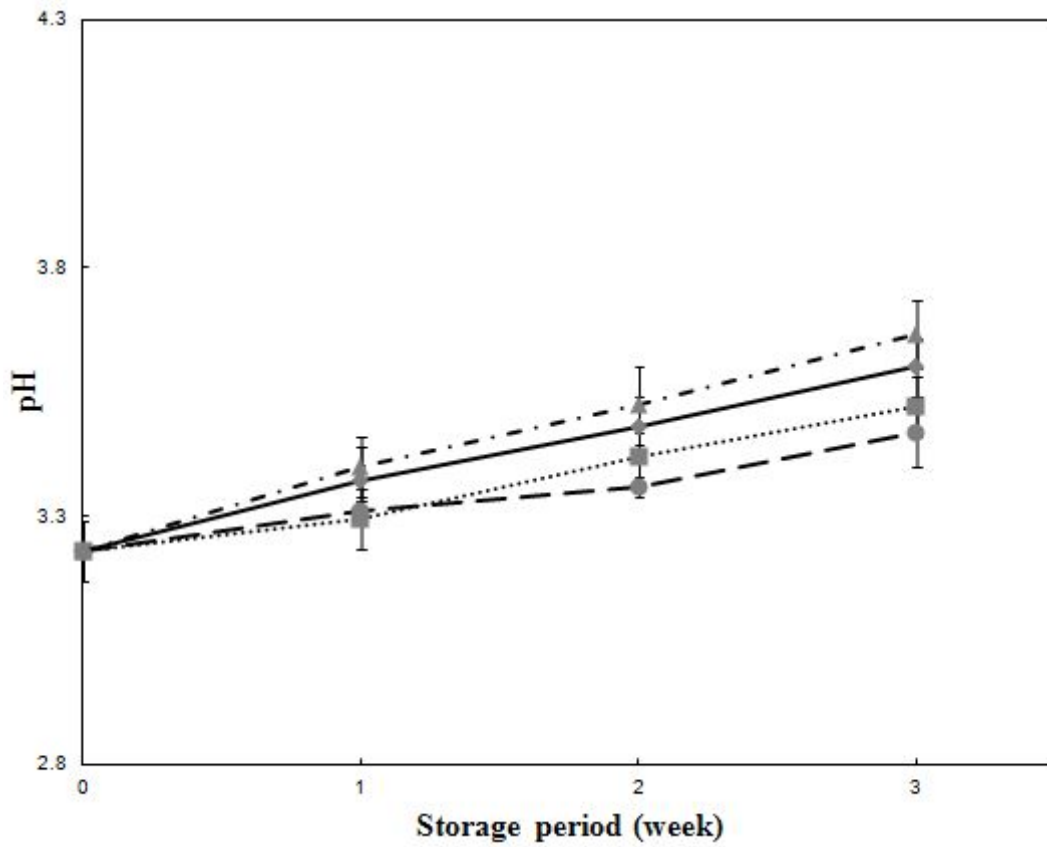


Fig. 19. Changes in the pH of Yuja coated by several composites during storage at 20 °C. - - -: control, • • • •: BW-HPMC, - · - ·: Soybean oil-CMC, - - - -: CarW-Shellac-LBG. Error bars represent standard deviation (n=5 x 3).

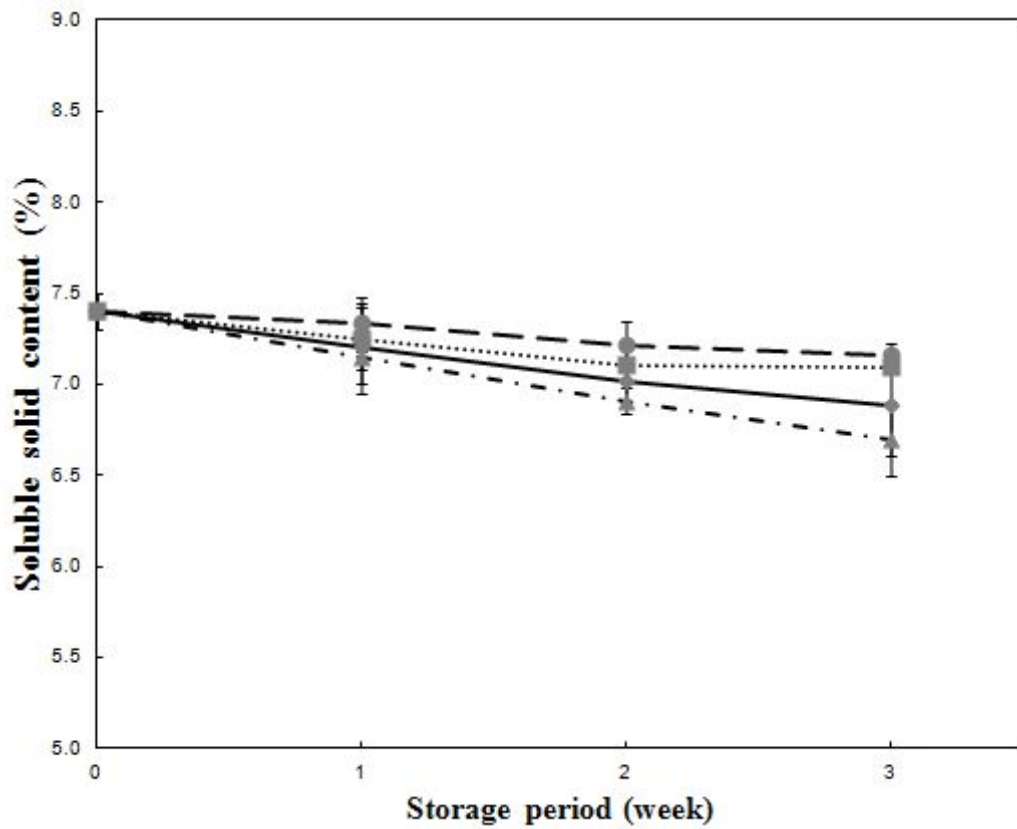


Fig. 20. Changes in the soluble solid content of Yuja coated by several composites during storage at 20 °C. - - -: control, ••••: BW-HPMC, - · - ·: Soybean oil-CMC, - - -: CarW-Shellac-LBG. Error bars represent standard deviation (n=5 x 3).

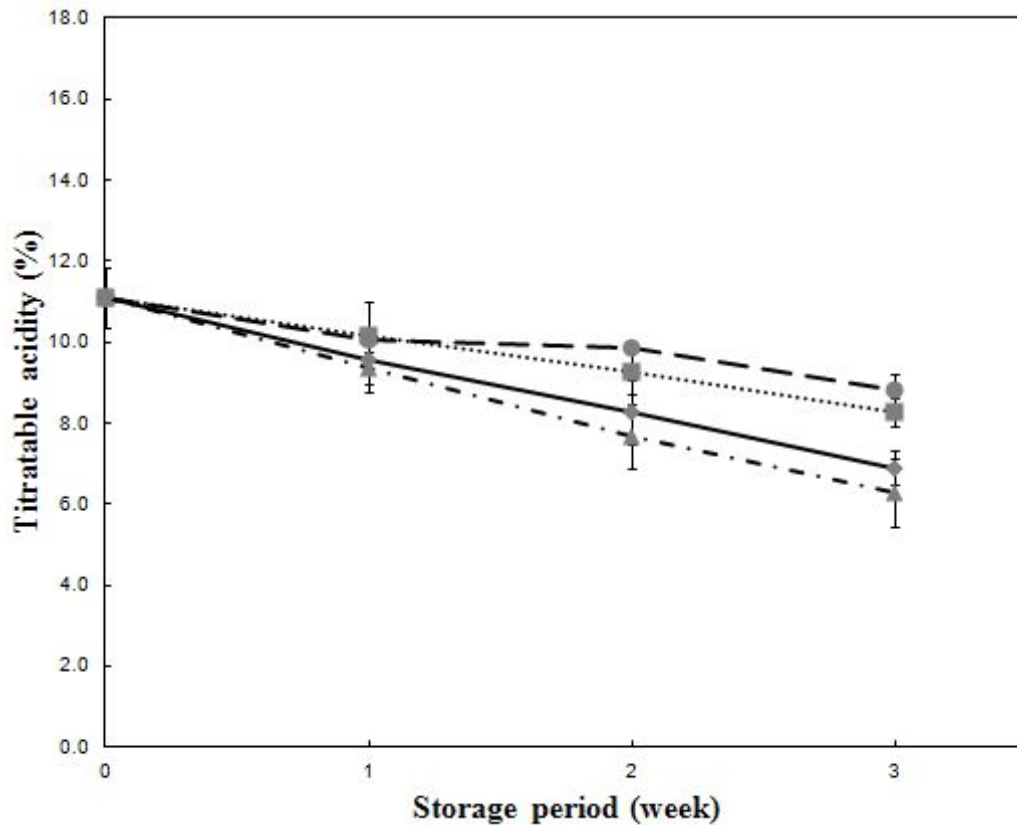


Fig. 21. Changes in the titratable acidity of Yuja coated by several composites during storage at 20 °C. ---: control, ••••: BW-HPMC, -·-·: Soybean oil-CMC, ----: CarW-Shellac-LBG. Error bars represent standard deviation (n=5 x 3).

pH는 모두 저장 기간에 따라 증가하였다(Fig. 18). 저장 중 pH의 증가는 호흡에 의하여 산 물질(유기산)이 분해되기 때문이다(Sawamura et al., 1991). 적정산도와 가용성 고형분의 변화는 모두 감소하였다(Fig. 19, 20). 가용성 고형분의 감소는 호흡시 탄수화물과 펙틴의 분해, 단백질의 부분가수 분해, 배당체(glycosides)의 분해에 기인되는 것으로서(Ball, 1997), 또한 알콜을 생성하는 미생물에 의한 가용성 당의 소비도 그 한 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Yaw et al., 1998). pH와 적정산도, 그리고 가용성 고형분은 코팅에 의하여 뚜렷한 효과를 나타내지 않아 Santerre et al. (1989)이 코팅 사과를 한 결과 숙성은 지연되었으나 pH, 적정산도 및 가용성 고형분의 함량에는 영향을 미치지 않았다고 보고한 것과 일치하는 결과를 나타냈다.

사) 관능검사

Table 4 Changes in the sensory scores of Yuja coated by several composites

Characteristics	Group	Storage time (week)					
		0	1	2	3	4	5
Gloss	Uncoating	9	8.1 ^a	6.5 ^b	5.8 ^b	4.3 ^b	3.5 ^b
	BW-HPMC	9	8.7 ^a	7.3 ^a	6.4 ^a	5.2 ^a	4.2 ^a
	Soybean oil-CMC	9	8.4 ^a	6.2 ^b	5.8 ^b	4.4 ^b	3.3 ^b
	CarW-Shellac-LBG	9	8.7 ^a	7.5 ^a	6.6 ^a	5.5 ^{ab}	4.6 ^a
Hardness	Uncoating	9	8.4 ^a	6.8 ^b	6.0 ^c	5.2 ^c	3.5 ^c
	BW-HPMC	9	8.7 ^a	7.1 ^a	6.4 ^b	5.7 ^b	4.4 ^b
	Soybean oil-CMC	9	8.7 ^a	7.0 ^b	6.3 ^b	5.5 ^b	3.8 ^c
	CarW-Shellac-LBG	9	8.8 ^a	7.3 ^a	6.7 ^a	6.0 ^a	4.9 ^a
Yellowness	Uncoating	9	8.6 ^b	7.8 ^b	6.5 ^b	5.1 ^b	4.1 ^b
	BW-HPMC	9	8.7 ^b	8.1 ^b	7.0 ^a	5.8 ^a	4.8 ^a
	Soybean oil-CMC	9	8.4 ^b	7.8 ^b	6.4 ^b	5.2 ^b	4.0 ^b
	CarW-Shellac-LBG	9	8.8 ^a	8.2 ^a	7.2 ^a	6.1 ^a	4.8 ^a
Flavor	Uncoating	9	8.7 ^a	7.1 ^b	6.1 ^b	5.0 ^b	3.7 ^b
	BW-HPMC	8.8	8.6 ^a	7.5 ^a	6.4 ^a	5.3 ^a	4.0 ^a
	Soybean oil-CMC	8.4	8.3 ^{ab}	6.6 ^c	5.6 ^c	4.3 ^c	3.1 ^c
	CarW-Shellac-LBG	8.3	8.2 ^b	6.6 ^c	5.7 ^c	4.5 ^c	3.2 ^c
Appearance	Uncoating	9	8.4 ^a	7.3 ^a	6.1 ^b	4.5 ^b	2.0 ^e
	BW-HPMC	9	8.5 ^a	8.1 ^a	7.3 ^a	6.1 ^b	4.4 ^c
	Soybean oil-CMC	9	8.4 ^a	7.8 ^a	6.9 ^b	5.2 ^b	3.5 ^d
	CarW-Shellac-LBG	9	8.6 ^a	8.3 ^a	7.5 ^a	6.6 ^b	5.2 ^b

^{a-e} Different letters in the same column mean significant differences between the averages of each sensory attribute ($P < 0.05$) in multiple comparison tests.

광택은 CarW-Shellac-LBG와BW-HPMC가 대조군과 soybean oil-CMC보다 광택 유지에 효과가 있다고 평가되었다(Table 4). Wax 계열 물질이 Oil 계열 보다 광택 유지에 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 CarW-Shellac-LBG의 Shellac은 citrus fruit에 광택을 주는데 사용되어지는데 다른 코팅군보다 광택이 뛰어난 이유로 작용했다(Petracek et al., 1998a,b). 단단한 정도와 색에

서는 CarW-Shellac-LBG, BW-HPMC, Soybean oil-CMC, 대조군의 순으로 평가되었는데 이것은 Fig. 16에 나타난 경도에 대한 결과와 유사하였다. Grant & Burns(1994)는 wax 계열의 물질은 외관향상에 효과적이라고 보고하였다. 유자의 향에 대한 관능평가에서는 BW-HPMC를 제외 한 코팅군이 대조군에 비해 떨어진다고 평가되었다. shellac은 gas permeability가 낮기 때문에 과일 내부를 anaerobiosis를 유발하여 flavor deterioration를 가져오는 fermentative compounds를 증가시키거나 superficial pitting 과 같은 physiological disorders를 야기시킨다(Petracek et al., 1998a,b). 이는 또한 wax 특유의 향기 때문으로 생각되어 진다.

코팅을 적용한 유자는 코팅하지 않은 유자보다 저장성에 더 효과적인 것으로 판명되었다. 하지만 Wax계 식용코팅은 firmulation에 따라 유자 표면에 형성되는 코팅의 모습이 달랐다. 이로 인해 중량 감소율, 내부 호흡률, 경도, 외관, pH, 적정산도, 가용성 고형분, 관능검사 등의 저장 시간에 따라 유자에 미치는 효과가 달랐다. 중량 감소율, 내부 호흡률, 경도, 외관, 관능검사에서 모두 CarW-Shellac-LBG 코팅군이 BW-HPMC, Soybean oil-CMC 코팅군보다 효과가 가장 뛰어나다고 평가되었는데 이는 유자 표면에 형성된 코팅 피막이 다른 코팅군들보다 적당하게 형성되었기 때문으로 사료된다. 그리고 코팅에 의한 pH, 적정산도, 가용성 고형분에 대한 효과는 나타나지 않았다.

라. 레몬의 호흡률 모델 개발

레몬의 저장 중 호흡률을 실험하였다. 먼저 carnauba wax-shellac-locust bean gum(CarW-Shellac-LBG)을 각각 사용하여 레몬에 코팅하여 식용 코팅 레몬을 제조하였다. 코팅한 것과 안한 것을 밀폐된 저장 용기에 넣고 여러 온도에서 시간별 산소와 이산화탄소의 양을 GC로 측정한 결과 코팅의 호흡율이 낮을 것으로 나타났다. 데이터를 사용하여 영차 반응식을 근간으로 시간에 따른 가스 량의 관계식을 모델링하였으며 호흡의 반응속도상수의 온도의존성을 아레니우스 식을 근간으로 완성하였다. 활성화에너지는 코팅 레몬이 더 높게 나타나 온도의존성이 더 높을 것으로 나타났다. 상기 완성된 모델식은 레몬의 저장 중 온도에 따른 호흡열의 산출에 필수적인 데이터로 활용된다.

1) 세부과제의 목표 및 내용

특정한 저장 온도와 가스 조성에서의 과일의 호흡률을 측정한다는 것은 많은 시간과 가스 분석을 위한 특별한 시설이 필요하다. 다양한 수학적 모델들은 산소와 탄산가스의 가스 조성과 온도와 같은 다른 저장 변수들과 호흡률의 상관관계를 보이기 위해 개발되어 왔다. Yang & Chinnan(1988)은 이차함수를 사용하여 저장 시간과 가스 농도를 가지고 토마토의 호흡률과 상관관계를 보였지만 그들의 모델은 온도의 영향을 고려하지 않았다. 하지만 이 모델은 controlled atmosphere 저장 조건에서 토마토의 호흡률을 예측하기에는 충분했기에 그들은 enzyme kinetics 이론을 호흡률 모델로 제안했다. Cameron et al. (1989)은 closed system하에서 산소의 감소율을 측정함으로써 호흡률을 계산하는 실험적 접근방법을 사용했다. Talasila et al. (1992)는 딸기의 호흡률을 예측하기 위해 온도와 가스 농도의 함수로 non-linear empirical model을 개발하였다. 하지만 이러한 대부분의 모델들은 산소, 탄산가스, 온도, 시간과 같은 의존성 요인을 모두 포함하지 않았기에 다양한 저장 조건에서의 호흡률을 예측하기에는 유연성이 떨어졌다. Lee et al. (1991)이 연구한 호흡률 모델은 enzyme kinetics를 바탕으로 한 Michaelis-Menten 식을 이용한다. 이 식은 allosteric 효소에 의해 과일 표면의 산소와 탄산가스의 용해도와 확산의 촉매반응을 조절한다. McLaughlin & O'Beirne (1999)은 세 가지 방법으로 건조시킨 coleslaw의 호흡률에 따른 탄산가스의 효과를 실험했다: uncompetitive inhibition, competitive inhibition and non-competitive inhibition. 이 가운데 uncompetitive model이 가장 실험결과에 적합했다. 하지만 이 모델 또한 독립변수인 온도를 유연하게 적용시킬 수 없었다. 그러므로 온도 의존성인 Arrhenius 식과 가스 의존성인 enzyme kinetics 이론을 바탕으로 호흡률 모델을 개발했다(Hertog et al., 1998; Mahajan & Goswami, 2001). Mahajan & Goswami(2001)은 저장 온도의 어떤 선택적 범위라도 모델 변수를 예측하기 위해서는 Arrhenius식에서

의 활성화 에너지와 pre-exponential factor가 유용하다는 사실을 실험적으로 보였다. 그러나 모델 변수들의 특이성 때문에 이러한 변수들은 과일 종류별로 확인되고 정량화 될 필요성이 있다. 또한 저장방법이 아닌 과일의 저장성 향상을 위한 연구로 식용 코팅(edible coating)을 과일 표면에 적용함으로써 산소와 탄산가스의 이동을 일차적으로 제한하여 과일의 호흡작용을 직접 제어하여 저장 기간을 증가시킬 수 있다(Jiang & Li, 2001; Choi & Lee, 2010). 식용 코팅은 직접적으로 과일 내부의 산소 농도를 낮추고 탄산가스의 농도를 높이는 효과를 보인다(Chen & Nussinovitch, 2001; Togrul & Arslan, 2004; Navarro-Tarazaga et al., 2008). 식용 코팅이 과일의 저장성에 미치는 영향은 많은 연구가 이루어진 반면 식용 코팅이 적용된 과일의 호흡률 모델을 적용하여 품질을 예측한 연구는 아직까지 수행된 적이 없었다. 그래서 본 실험의 연구 목적은 선행 연구로 시행된 최적화된 식용 코팅을 레몬에 적용시켜 저장 온도와 가스 농도 함수로 식용코팅 레몬의 호흡률을 예측하기 위한 적용 가능한 수학적 모델을 개발하는 것이다.

2) 재료 및 방법

본 실험에 사용된 식용 코팅제는 citrus계에 성공적으로 적용된 바 있는 carnauba wax-shellac-locust bean gum(CarW-Shellac-LBG)으로서 Carnauba wax(Sigma-Aldrich Co., Seoul, Korea), Shellac(Sigma-Aldrich, Co., Seoul, Korea), locust bean gum(MSC Co., Seoul, Korea), Morpholine(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. CarW-Shellac-LBG 코팅제는 Chen & Nussinovitch(2001)의 방법을 이용하여 제조하였다. Carnauba wax와 shellac을 95 °C의 물에 stirrer(Corning PC-420, Corning, Seoul, Korea)로 녹이고 morpholine과 유화제로 oleic acid를 넣어준 후 homogenizer(HG15D, Daihan Co., Seoul, Korea)로 25000 rpm에서 3분간 균질화시켰다. 그리고 LBG를 상온에서 혼합하여 CarW-Shellac-LBG 혼합물을 제조하였다. 상기 제조된 코팅제를 사용하여 식용 코팅 레몬을 Chen & Nussinovitch(2001)의 방법으로 제조하였다. 레몬 하나에 코팅제 650 μ l를 latex 장갑을 착용하여 손으로 직접 레몬 표면에 문질러 코팅을 했다. 코팅 후 레몬은 열풍건조기(GHG 630 DCE, BOSCH Co., Seoul, Korea)를 이용하여 60°C에서 3분간 건조시켰다. 과일의 산소와 탄산가스를 측정하기 위해서 closed system method는 Bhande et al. (2008)의 방법을 이용하여 제작하였다. 이 방법은 밀폐된 용기 속에서 산소와 탄산가스의 농도 변화를 직접적으로 측정하는게 가능하다. 호흡률 측정용 밀폐용기는 폴리프로필렌으로 만들어진 13 x 13 x 16 cm 사이즈를 사용하여 레몬 6개를 넣어 측정하였다. 용기 안의 가스를 주사기로 뽑아 내기 위해 용기의 뚜껑에는 silicon septum을 부착시켰다. Free volume은 용기의 총 부피에서 과일의 부피를 뺀 값이

다. 측정 방법은 water displacement method를 사용하여 구해주었다.

가) 가스분석

본 실험에 사용된 식용 코팅제는 citrus계에 성공적으로 적용된 바 있는 carnauba wax-shellac-locust bean gum(CarW-Shellac-LBG)으로서 Carnauba wax(Sigma-Aldrich Co., Seoul, Korea), Shellac(Sigma-Aldrich Co., Seoul, Korea), locust bean gum(MSC Co., Seoul, Korea), Morpholine(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다.

나) 모델링 및 데이터 분석

호흡률에 적용 한 모델식은 식 (1)과 (2)를 사용하여 계산했다(Ravindra & Goswami, 2008).

$$R_{O_2} = -\frac{d[CO_2] V_{fr}}{dt W} \quad (1)$$

$$R_{CO_2} = \frac{dG_{CO_2} V_{fr}}{dt W} \quad (2)$$

본 실험에서는 R_{O_2} 와 R_{CO_2} 를 일정한 것으로 가정하였다. 따라서 식 (1)과 (2)는 다음의 식으로 나타낼 수 있다.

3) 결과 및 고찰

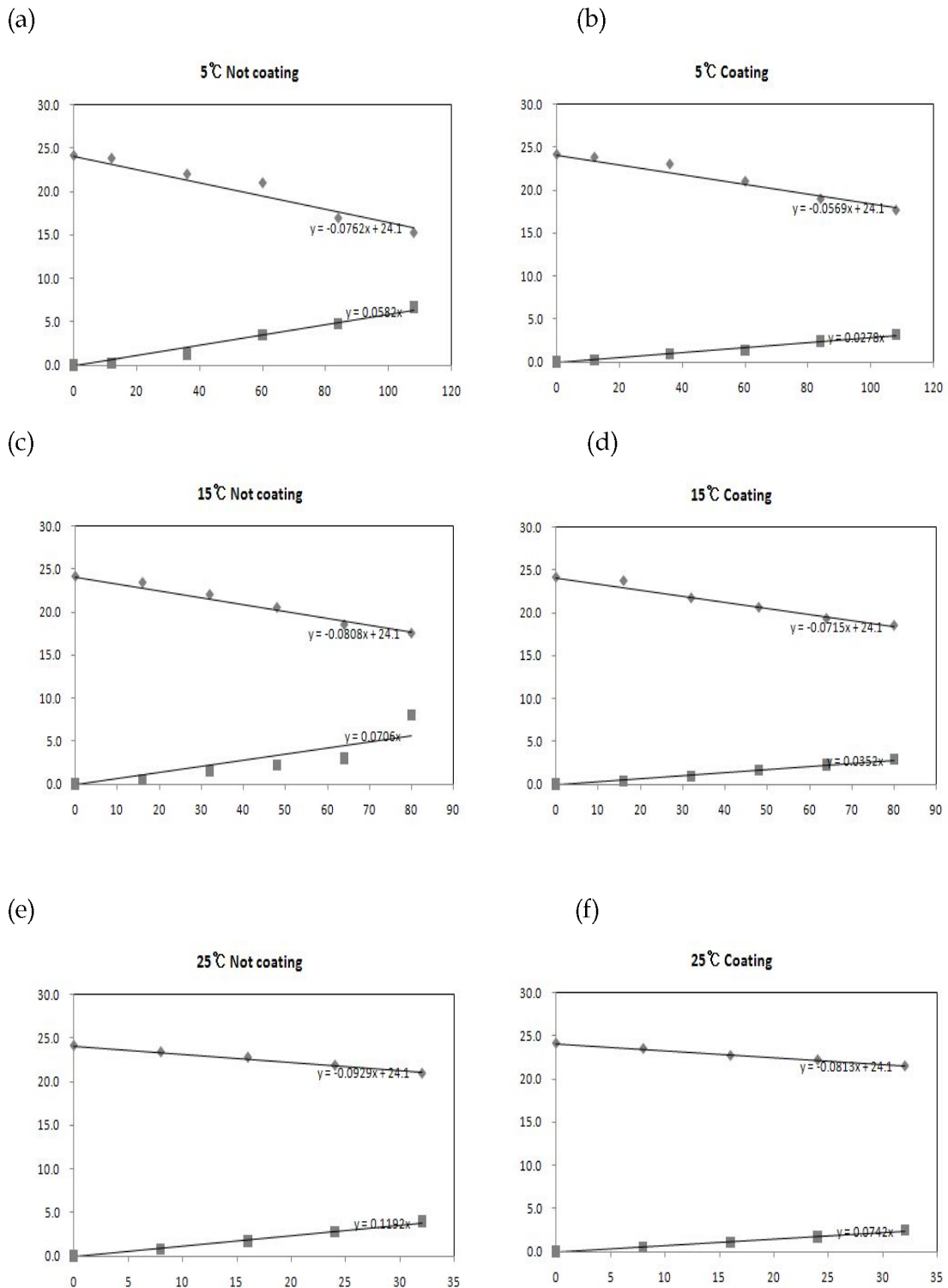


Fig. 22. Experimental data for O₂ consumption and CO₂ evolution at different temperatures; \blacklozenge , in %; \blacksquare , in %; X-axis, in hour.

여러 온도에서의 산소와 탄산가스의 농도 변화를 Fig.21.에 나타냈다. 아래의 Table 3은 이 데이터를 가지고 코팅과 온도에 따른 유자의 호흡률을 식 (1)과 (2)를 이용하여 계산한 결과값이다. 온도가 증가할수록 호흡률도 증가됨을 보였다. 이러한 경향은 온도가 호흡에 절대적인 영향을 끼치는 요인으로 작용한다(Saltveit, 2004). Nakamura et al. (2004)는 저장온도의 변화에 의해 호흡률이 매우 민감하게 반응을 보인다고 보고한 바 있다. 그리고 코팅 처리한 유자의 가스 농도는 코팅 처리하지 않은 대조군에 비해 가스 농도의 변화가 적었다. 이는 코팅의 효과로 호흡을 조절해 주는 것을 확인했다.

Table 5. predicted and experimental respiration rates

	Storage temperature, °C	R _{O₂} , mlkg ⁻¹ h ⁻¹	R _{CO₂} , mlkg ⁻¹ h ⁻¹
Not coating	5°C	0.0762	0.0582
	15°C	0.0808	0.0706
	25°C	0.0929	0.1192
Coating	5°C	0.0569	0.0278
	15°C	0.0715	0.0352
	25°C	0.0813	0.0742

호흡의 반응속도상수는 온도에 따라 다르다. 그래서 Arrhenius 식은 다른 저장 온도에 따른 모델 변수의 상관 관계를 밝히는데 사용된다. 직선형 Arrhenius 식 (7)을 통하여 다른 온도와의 관계를 그래프로 나타냈다(Fig. 22). 그리고 활성화 에너지와 pre-exponential factor 값은 각각 그래프의 기울기와 y절편값을 통해 구한다. Table 4는 활성화 에너지와 pre-exponential factor 값을 나타낸 것이다. 모델식 (7)을 사용하여 연구한 온도 범위내에서 어떠한 온도에서의 속도상수들도 예측할 수 있다. 그러므로 우리는 식 (3)과 (4)를 통해 어떠한 온도에서의 레몬의 호흡률을 계산하여 예측할 수 있다.

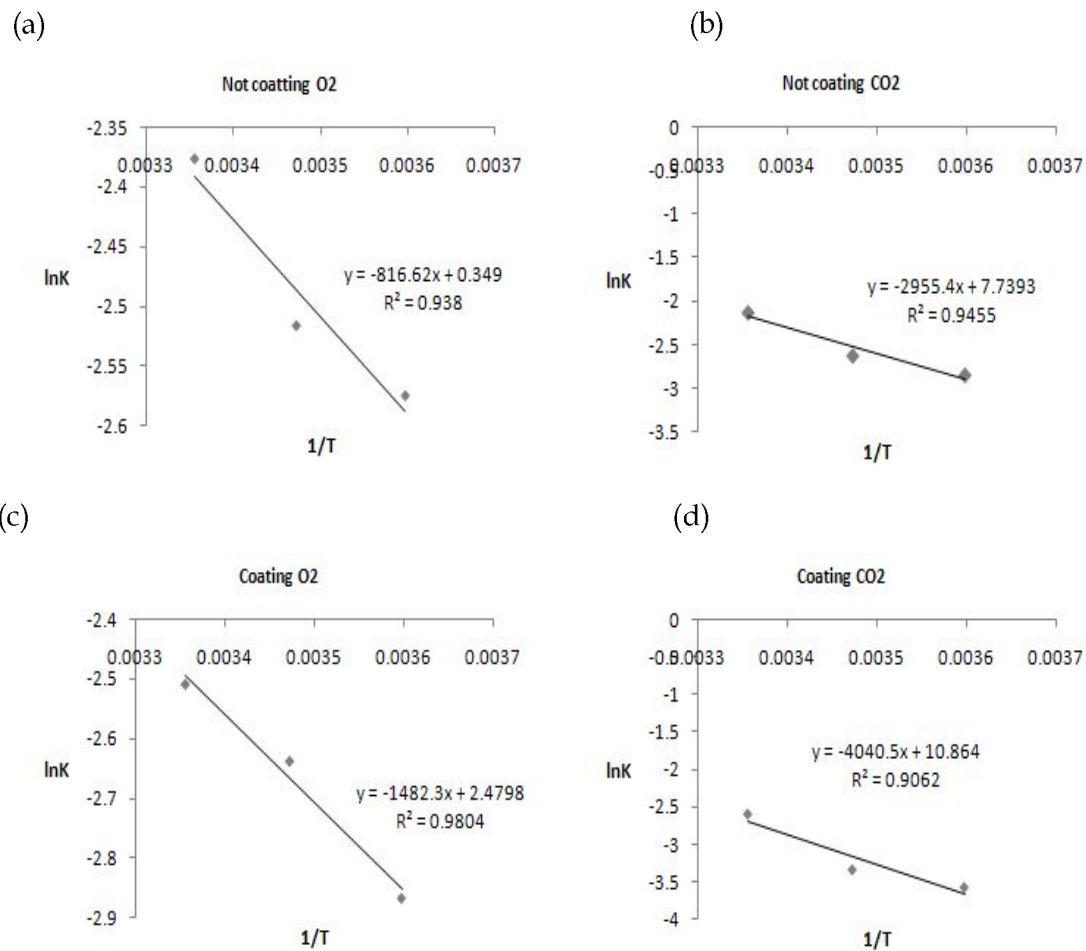


Fig. 23. Arrhenius relation for model parameters of enzyme kinetics.

Table 6. Activation energy and pre-exponential factor of Arrhenius-type equation

		$E_a, kJgmole^{-1}$	K_0	R^2
Not coating	R_{O_2}	6.789379	1.417649	0.938
	R_{CO_2}	24.5712	2296.864	0.9455
Coating	R_{O_2}	12.32384	11.93888	0.9804
	R_{CO_2}	33.59272	52260.7	0.9062

마. 수출용 유자의 포장 및 수송환경의 표준화

수출용 유자의 포장 및 수송환경의 표준화를 자료 조사를 통하여 실시하였다. KS A1531에 규격을 따른 것을 사용하여 통기구를 적용시킨 이중양면 골판지상자를 제작하였다. 수출용 유자는 선박으로 미국, 일본, 중국, 대만 등 6개국으로 수출되고 있는데 수출국까지 총 걸리는 소요일수는 대략 미국과 캐나다가 15~45일정도, 하와이가 20~30일정도, 동남아시아가 15~20일 정도, 일본과 중국은 5~15일 정도가 소요되므로 수송 시 유자의 최적 저장 온도는 3℃에서 습도를 85~90%가 되도록 유지한다. 또한 포장 조건을 최적화하기 위하여 수학적 모의실험을 레몬에 대하여 실시하였다(유자는 11월 수확 후 실험 예정). 먼저 carnauba wax-shellac-locust bean gum(CarW-Shellac-LBG)을 각각 사용하여 레몬에 코팅하여 식용 코팅 레몬을 제조하였다. 코팅한 것과 안한 것을 밀폐된 저장 용기에 넣고 포장 내 레몬의 충전된 양에 따른 냉장고에서의 냉각효과를 예측할 수 있는 수학적 모델을 완성하였다. 그 결과 냉장고에서 포장 상자 내에 충전 레몬 양과 상관없이 코팅한 레몬의 냉각 효과가 더 우수하였다. 또한 저장 중 이산화탄소 발생량을 예측한 결과 역시 코팅한 레몬의 가스 발생량이 지연되어 더 장기 보관이 가능함을 알 수 있었다.

1) 과제의 목표 및 내용

유자와 같은 과일은 수확 후에도 그 생명 현상을 계속하여 추숙(ripening), 노화(aging) 등을 나타내며, 호흡작용 및 증산작용에 의하여 산소가 소비되고 탄산가스가 생성되며 또한 호흡열이 발생하여 신선도가 저하될 수 있다(No et al., 2009). 과일의 수출은 주로 선박을 통하여 장기간 수송하는데 최소의 포장 유니트로서 골판지 상자가 있고 그 안에 유자를 넣고 상자들을 쌓게 된다. 골판지 상자의 크기 및 구조는 대기의 유통 및 유자의 호흡열의 열전달을 결정하므로 그 표준화가 중요하다. 실제 수송할 때는 선박에 따른 저장고의 규격에 따라 골판지 상자의 쌓는 구조는 매우 다양할 수 있으므로, 먼저 골판지 상자 자체에 관한 표준화가 선행되어야 한다. 그러므로 본 연구에서는 수출용 유자의 고품질 유지를 위한 골판지 상자의 종류와 모양 및 규격 표준화를 확립하고 수송 환경의 조건과 상자의 크기와 쌓는 방식에 따라 호흡열을 고려한 주위 환경과의 열전달분석을 FEM(finite element method)에 의한 수치해석을 통하여 최적의 조건을 제시하고자 한다.

2) 재료 및 방법

포장상자의 개발은 유자의 호흡열과 수출 시 포장 및 수송환경을 고려하여 수출용 유자를 위한 최적의 포장상자를 개발하였다. 유자의 품질에 영향을 미치는 호흡열의 효율적인 관리를 위해 상자내 통기구를 적용시켜 제작해 보았다. 선행 연구 된 유자의 호흡률 모델을 가지고 상자크기 및 상자 당 포장되는 유자 양에 따른 호흡열을 고려하여, 주위 환경과의 열전달분석을 FEM(finite element method)에 의한 수치해석을 통하여 저장 시간 경과에 따른 온도 분포 변화를 분석하였다. 이때 ANSYS 프로그램을 사용하여 simulation하였다. 먼저 수치해석의 열수지식은 다음과 같다.

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \right) + q \quad (1)$$

여기서 q는 호흡열로서 다음과 같은 식으로 나타내었다.

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \right) + q \quad (2)$$

$$\frac{q}{R_{CO_2}} = - \left(1 - \frac{\gamma_F}{4} \right) \Delta H_{O_2} - \left(\frac{\varepsilon}{1} - \varepsilon \right) \Delta H_B \quad (3)$$

식(3)에서 $\gamma_F=1/2$, $\varepsilon=0.55$, $\Delta H_{O_2}=-455$ kJ/mol, $\Delta H_B=25$ kJ/mol이다 (Breidenbach et al., 1997). 최종적으로 ANSYS(ANSYS, Inc) FEM(finite element analysis) 수치해석 프로그램에 q에 대한 항목을 입력하였다. 실제 수출할 때는 선박에 따른 저장고의 규격에 따라 골판지 상자의 쌓는 구조는 매우 다양하다. 그러므로 상자 크기에 따라 변화를 줄 수 있다. 상자 크기는 레몬의 층을 1, 2, 3층으로 했을 때의 온도 분포를 수치해석하였다. 상자 내 레몬의 양은 가로 세로 35 x 25 cm로 하였으며 높이는 3가지로 하여 8, 16, 24cm로 하였다. 이때 열적 물성치는 레몬의 주 성분인 물로 가정하였다. 비열은 1, 밀도 1000 kg/m³, 열전도도 0.606 W/m°C, 외부공기의 열전달계수 16.97 W/m²°C를 사용하였다. 레몬의 초기온도는 25°C, 외부공기의 온도는 3°C로서 일정하게 유지되는 것을 가정하였다. 상기 온도로부터 G_{O2}와 G_{CO2}를 계산했다.

$$- \frac{dG_{O_2}}{dt} = \frac{W}{V_{fr}} R_{O_2} \quad (4)$$

$$\frac{dG_{CO_2}}{dt} = \frac{W}{V_{fr}} R_{CO_2} \quad (5)$$

여기서 RO₂와 RCO₂는 일정하지 않다. 따라서 dynamic 조건에 해당하며, 역시 수치해석에 의하여 아래와 같이 산출하였다.

$$G_{O_2(i+1)} = G_{O_2i} + \left(\frac{dG_{O_2}}{dt}\right)\Delta t \quad (6)$$

$$G_{CO_2(i+1)} = G_{CO_2i} + \left(\frac{dG_{CO_2}}{dt}\right)\Delta t \quad (7)$$

여기서 $\frac{dG_{O_2}}{dt}$, $\frac{dG_{CO_2}}{dt}$ 는 식 (1)에서 온도에 따른 함수이다.

3) 결과 및 고찰

골판지 상자는 식품 포장의 외포장 재료로서 골판지는 KS A1502, 골판지 상자는 KS A1531에 규격을 따른 것을 사용하여 제작하였다. 골판지는 원판지와 골심지로 구성(Fig. 23)된 골판지 원지를 이용하였다. 골판지는 충격을 받았을 때 내용물을 보호하고 방수성이 뛰어난 장점을 가졌으며 특히 유자는 공업제품과 달리 호흡과 증산 작용이 있으므로 발수제를 골판지에 도포하거나 침지하여 특수 가공 처리 된 것을 사용한다.

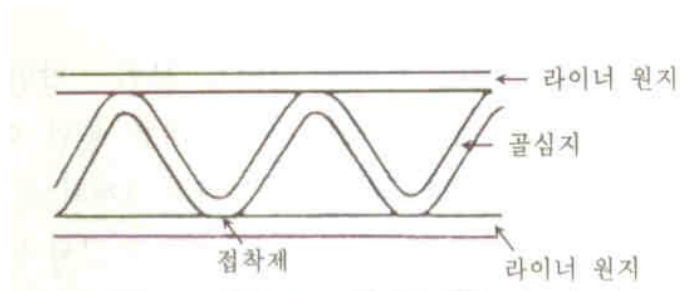


Fig 24. 골판지의 구조

KS A1531 외부 포장용 골판지 상자는 이중양면 골판지상자(Double wall, DW) 규정에 따른 것을 만들었다(Fig. 24).

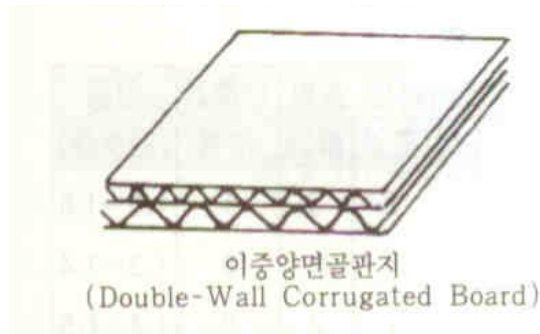


Fig 25. 이중양면 골판지 구조

골판지 상자의 설계는 유자의 특성과 유통과정에 따라 상자의 소요 강도를 안전율을 고려하여 산출하고 상자의 형식을 결정한 다음, 안치수와 가산치 그리고 여유치수에 의한 바깥치수를 구해 제작하였다(Fig. 25).

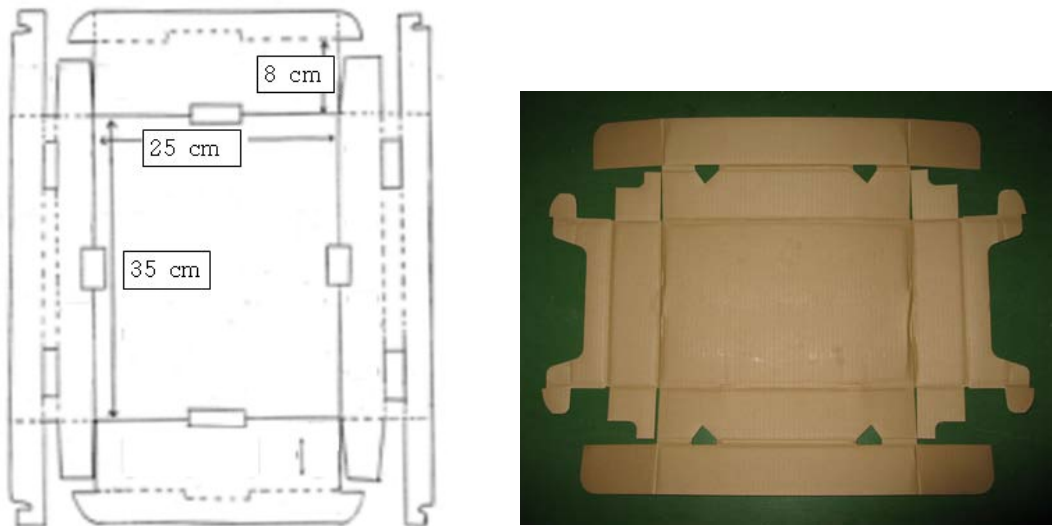


Fig 26. 수출용 유자를 위한 골판지 상자의 전개도

- 총 옆면적: $((35 \times 8) \times 2) + ((25 \times 8) \times 2) = 960 \text{ cm}^2$
- 총 부피: $35 \times 25 \times 8 = 7000 \text{ cm}^3$

특히 골판지 상자의 높이가 높아질수록 골판지 소모율은 적어지나 상자의 압축강도가 상대적으로 떨어지고 유통중에 전도, 전락이 발생하기 쉽기 때문에 이 점을 고려해주었다. 그리고 호흡열을 더욱 효과적으로 조절해 주기 위해 골판지상자에 통기구를 적용시켜 제작하였다(Fig. 26).

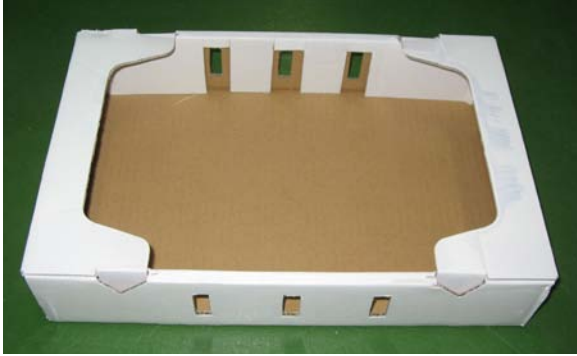
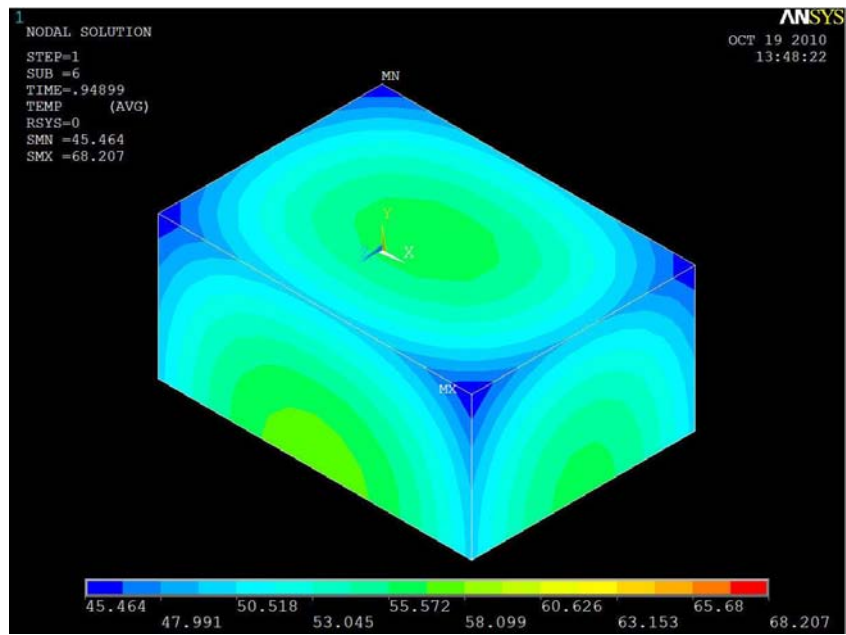
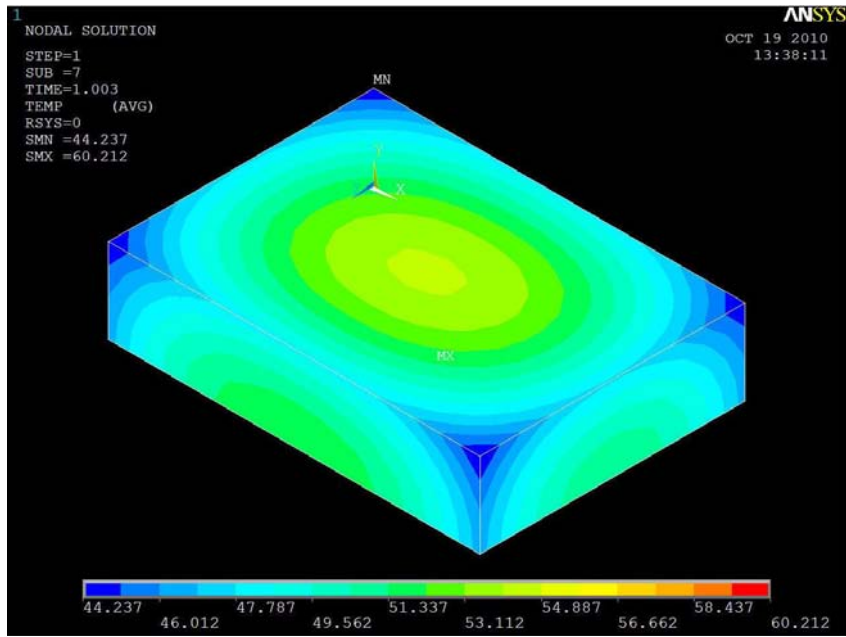


Fig. 27. 통기구를 적용시킨 골판지 상자 (내용물: 레몬)

Stimulation에서 식 (2), (3)에 대입하여 산출한 호흡열은 Table 5과 같았다.

Table 7. Heat generation from respiration at different temperatures

	Storage temperature, °C	q_{o_2}	q_{co_2}
Not coating	5°C	33.528	25.608
	15°C	35.552	31.064
	25°C	40.876	52.448
Coating	5°C	25.036	12.232
	15°C	31.46	15.488
	25°C	35.772	32.648



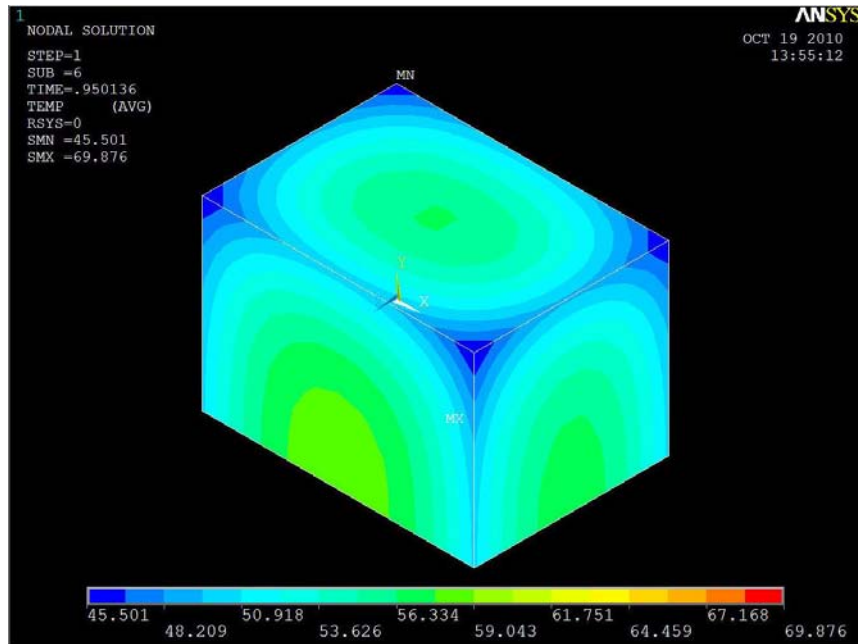


Fig 28. 상자 내 레몬의 양에 따른 온도 분포 (초기 온도 25℃의 비코팅 레몬이 3℃의 냉장온도에서 1시간 저장되었을 때).

상자 내 레몬을 1, 2, 3층 쌓기 방식으로 다른 양을 넣었을 때 저장시간에 따른 온도 분포는 비코팅 및 코팅 레몬은 공통적으로 1층 레몬 상자는 3층 레몬 상자보다 온도가 더 잘 냉각됨을 보여준다. 특히 3층 레몬 상자의 경우 내부의 온도는 두 가지 이유로 가장 늦게 변화하였다. 첫째, 가장 내부이므로 열전달이 가장 늦으며, 둘째 온도가 상대적으로 높게 유지됨에 따라 호흡률이 증가하고 또한 호흡열 발생이 증가하여 냉각 효과가 떨어지기 때문이다. 즉, 냉각 시 온도가 높은 부위는 호흡열이 더 발생하게 되며 이에 따라 열이 또 증가하고 다시 호흡열 증가를 낳게 되는 악순환의 효과가 관찰되었다. 단, 산소에 의한 열 발생은 상대적으로 매우 미미하여 이산화탄소에 의한 호흡열만 고려하였다. 냉각 시 온도가 높은 부위는 호흡열이 더 발생하게 되며 이에 따라 열이 또 증가하고 다시 호흡열 증가를 낳게 되는 악순환의 효과가 비코팅의 경우에 더 심한 것으로 나타났다.

바. 유자의 호흡률 모델 개발

특정한 저장 온도와 가스 조성에서의 과일의 호흡률을 측정한다는 것은 많은 시간과 가스 분석을 위한 특별한 시설이 필요하다. 다양한 수학적 모델들은 산소와 탄산가스의 가스 조성, 온도와 같은 다른 저장 변수들과 호흡률의 상관관계를 보이기 위해 개발되어 왔다. Yang & Chinnan(1988)은 이차함수를

사용하여 저장 시간과 가스 농도를 가지고 토마토의 호흡률과 상관관계를 보였지만 그들의 모델은 온도의 영향을 고려하지 않았다. 하지만 이 모델은 controlled atmosphere 저장 조건에서 토마토의 호흡률을 예측하기에는 충분했기에 그들은 enzyme kinetics 이론을 호흡률 모델로 제안했다. Cameron et al. (1989)은 closed system 하에서 산소의 감소율을 측정함으로써 호흡률을 계산하는 실험적 접근방법을 사용했다. Talasila et al. (1992)는 딸기의 호흡률을 예측하기 위해 온도와 가스 농도의 함수로 non-linear empirical model을 개발하였다. 하지만 이러한 대부분의 모델들은 산소, 탄산가스, 온도, 시간과 같은 의존성 요인을 모두 포함하지 않았기에 다양한 저장 조건에서의 호흡률을 예측하기에는 유연성이 떨어졌다.

1) 목표 및 내용

식용 코팅이 과일의 저장성에 미치는 영향은 많은 연구가 이루어진 반면 식용 코팅이 적용된 과일의 호흡률 모델을 적용하여 품질을 예측한 연구는 아직까지 수행된 적이 없었다. 그래서 본 실험의 연구 목적은 선행 연구로 시행된 최적화된 식용 코팅을 유자에 적용시켜 저장 온도와 가스 농도 함수로 식용코팅 레몬의 호흡률을 예측하기 위한 적용 가능한 수학적 모델을 개발하는 것이다.

2) 재료 및 방법

본 실험에 사용한 유자는 전남 고흥에서 생산된 것으로 신세계 백화점에서 구매하여 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용한 유자는 그 개체 평균중량이 120~140 g 정도인 크기와 모양이 비슷한 정도의 신선한 것을 사용하였다. 본 실험에 사용된 식용 코팅제는 citrus계에 성공적으로 적용된 바 있는 carnauba wax-shellac-locust bean gum (CarW-Shellac-LBG)으로서 Carnauba wax(Sigma-Aldrich Co., Seoul, Korea), Shellac(Sigma-Aldrich, Co., Seoul, Korea), locust bean gum(MSC Co., Seoul, Korea), Morpholine (Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 과일의 산소와 탄산가스를 측정하기 위해서 closed system method는 Bhande et al. (2008)의 방법을 이용하여 제작하였다. 이 방법은 밀폐된 용기 속에서 산소와 탄산가스의 농도 변화를 직접적으로 측정하는게 가능하다. 호흡률 측정용 밀폐용기는 폴리프로필렌으로 만들어진 13 x 13 x 16 cm 사이즈를 사용하여 유자 4개를 넣어 측정하였다. 용기 안의 가스를 주사기로 뽑아 내기 위해 용기의 뚜껑에는 silicon septum을 부착시켰다. Table 6는 용기 별 유자의 총 무게와 용기 안의 free volume을 나타냈다. Free volume은 용기의 총 부피에서 과일의 부피를 뺀 값이다. 측정 방법은 water displacement method를 사용하여 구해주었다.

Table 8. Free volume of the chamber and weight of lemons taken for the respiration study at different storage temperatures

	Storage Temperature, °C	Weight of Yujas (W), g	Free volume of chamber (V), ml
Control	5	306.86	2215
	15	301.57	2220
	25	307.00	2214
CarW-Shellac-LBG	5	284.03	2235
	15	287.32	2231
	25	268.50	2250

가스분석은 밀폐 된 용기 안의 가스를 air-tight 주사기(1725RN, Hamilton Co., Reno. Nevada)로 250 μ l 를 채취하여 thermal conductivity detector(TCD)와 Shincarbon ST 100/120 column(2m \times 1mm)이 장착 된 gas chromatography (6890N, Agilent Co., Santa clara, USA)로 분석했다 (Choi & Lee., 2010). CO₂농도 분석조건은 다음과 같다. oven, injector, detector의 온도는 각각 230, 200, 250°C이며, carrier gas는 22 mL·min⁻¹의 flow rate로 Helium gas를 사용했다. O₂농도 분석시 oven 온도는 35°C로 나머지 조건은 위와 동일하다. 가스 채취는 용기의 septum부위에 gastight syringe를 직접 주입시켜 용기의 headspace 가스를 취하여 gas chromatography에 주입하여 분석하였다. CO₂와 O₂의 농도는 standard gas의 peak area로부터 계산해주었다. 가스 채취의 시간 간격은 온도에 따라 다르다. 5°C는 12시간 마다, 15°C는 8시간마다, 25°C는 4시간마다 측정했다. 코팅별 시료를 3개씩을 취하여 평균값을 구하였다.

3) 결과 및 고찰

여러 온도에서의 산소와 탄산가스의 농도 변화를 Fig. 28에 나타냈다. 온도가 증가함에 따라 호흡량이 증가함을 보였다. 아래의 Table 7은 이 데이터를 가지고 코팅과 온도에 따른 유자의 호흡률을 식을 이용하여 계산한 결과값이다. 온도가 증가할수록 호흡률도 또한 증가됨을 보였다. 이러한 경향은 온도가 호흡에 절대적인 영향을 끼치는 요인으로 작용한다(Saltveit, 2004). Nakamura et al. (2004)는 망고의 호흡률에 대한 저장조건의 효과를 연구한 결과 저장온도의 변화에 의해 호흡률이 매우 민감하게 반응을 보인다고 보고한 바 있다. 또한, 각 온도 별 호흡량은 시간이 지남에 따라 감소함을 나

타냈다. 이러한 경향은 Fig. 28의 모든 온도 구간에서 그래프의 기울기가 서서히 감소함을 분명히 보여주고 있다. 이것은 시간이 지남에 따라 용기 안의 O_2 농도의 감소와 CO_2 농도의 증가에 의한 효과 때문이다. Ravindra & Goswami (2007) 또한 온도에 따른 용기 저장 중 망고의 가스 농도의 변화량이 우리 결과와 같음을 보였다. 그리고 Table 7에서처럼 코팅 처리한 유자의 RO_2 는 코팅 처리하지 않은 대조군에 비해 더 작았으며, RCO_2 는 코팅군이 대조군보다 더 컸다. 가스 농도의 변화가 적었다. 이는 코팅의 효과로 호흡을 조절해 주는 것을 확인했다.

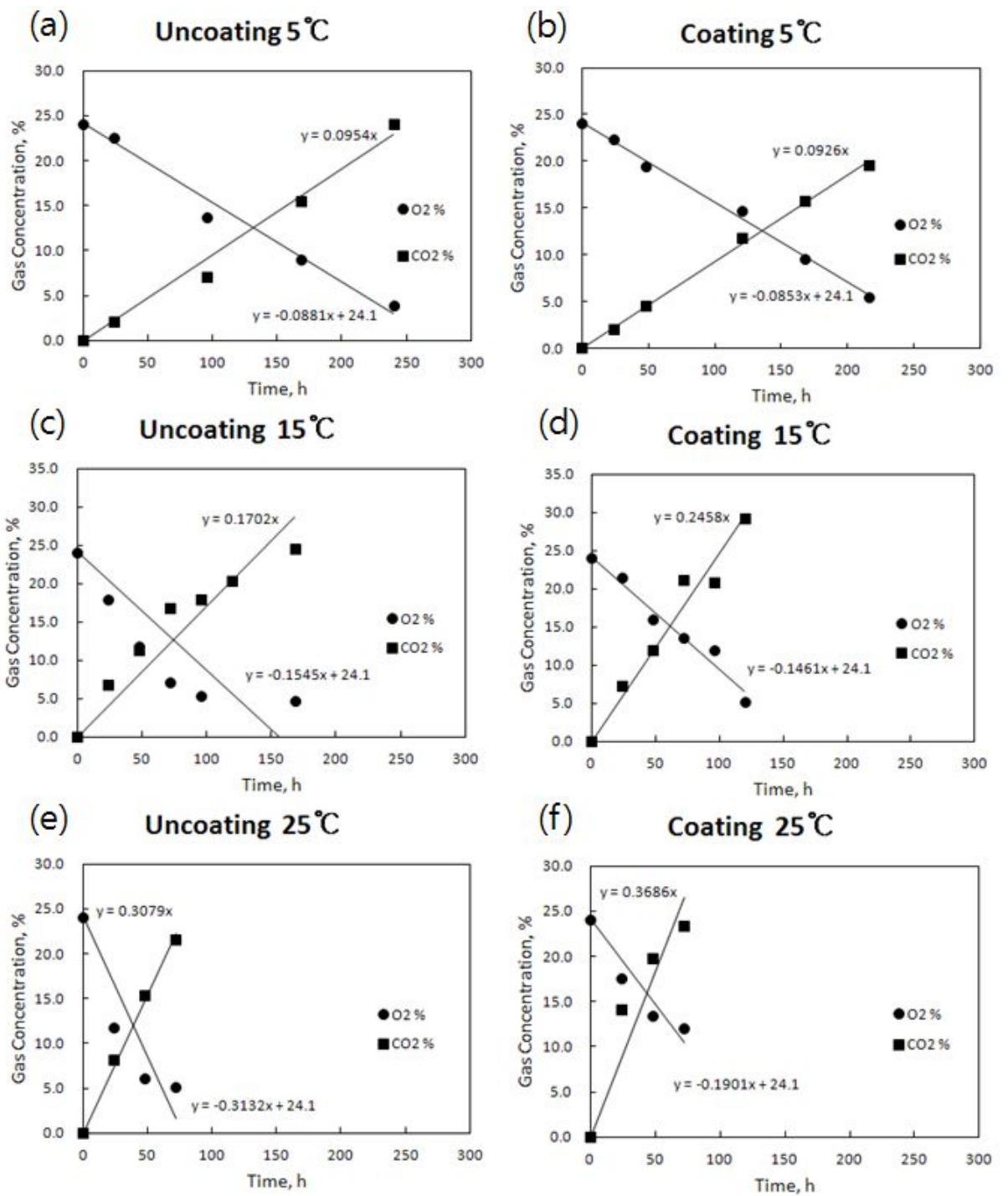


Fig 29. Experimental data for O₂ consumption and CO₂ evolution at different temperatures; ◆ , in %; ■ , in %; X-axis, in hour.

Table 9. predicted and experimental respiration rates

	S t o r a g e temperature, °C	R _{O₂} , mlkg ⁻¹ h ⁻¹	R _{CO₂} , mlkg ⁻¹ h ⁻¹
Control	5°C	8.81	9.54
	15°C	15.45	17.02
	25°C	31.32	30.79
CarW-Shellac-LBG	5°C	8.53	9.26
	15°C	14.61	24.58
	25°C	19.01	36.86

사. 유자차 제조 공정의 HACCP Plan 완성

우리나라의 유자차 품질은 세계에서 인정을 받으며 특히 일본, 중국, 홍콩, 대만 쪽에서의 우리나라 유자차의 인기는 상당하다. 그렇기 때문에 유자차 제조업들의 매출의 대부분은 수출이 담당하고 있다. 하지만 유자차 제조업은 영세한 중소기업들이 대부분을 차지하고 있다. 이는 농가와 밀접한 관계를 유지해야만 가능하기 때문이다. 즉, 유자차 제조 공장이 중소기업에 치중되어 있다 보니 대기업에 비해 위생설비와 체계적인 위생관리가 부족한 실정이다. 현재 유자차 제조업의 선두업체인 고흥의 H푸드는 150억 이상의 수출 실적과 연유자 처리량 3,500톤으로 앞으로도 유자차 제조업들의 그 성장과 세계시장에서의 그 입지는 더욱더 넓어질 것이다. 그렇기 때문에 체계적인 위생관리를 해야 할 업종임을 시사하고 있어 생산과정 중에서의 위생관리절차(SSOP)를 갖출 수 있는 HACCP 시스템 도입이 시급하다고 하겠다.

1) 세부과제의 목표 및 내용

유자차 제조업체에 HACCP 시스템이 구축하고, 정착 될 수 있도록 HACCP 관리계획을 개발한다. 일반위생관리기준(SSOP)을 개발하여 식품산업체의 위생수준을 향상지원하고 업체 내부품질감사 평가표를 개발하여 업체의 자발적 HACCP시스템을 정착지원 한다.

2) 재료 및 방법

본 연구는 2010년 12월부터 2011년 12월까지 농림수산식품부의 협조를 얻어 협력업체인 고흥의 H푸드 유자차 제조공장을 시범업체로 선정하여, 자료를 수집하기 위해 현장방문감사, 대형업체 HACCP팀 교육, 종사자 HACCP 실무교육 및 소형업체 위생교육을 실시하여 수행하였다.

3) 결과 및 고찰

HACCP 시스템은 HACCP 관리기준 독단으로 작동되는 것이 아니라 적절한 제조기준(GMP) 및 일반위생관리기준(SSOP)의 기본 여건 위에서만 효과적으로 작동되는 것이다. 즉, HACCP는 특정 공정의 중요관리점(CCP)에서 식품내에 존재하는 해당 위해요소를 예방, 제거 혹은 허용수준 이하로 감소시키는 것이고 위생은 식품취급 중 외부에서 위해요소가 유입되는 것을 방지하는 기준이다. 만약 업체가 HACCP 제도를 최신시설 구축하는 것으로 접근하여 시설을 개선하였다 하여도 일반위생관리절차서를 갖추지 않고 작업현장을 관행대로 개인에게만 맡긴다면 아무리 시설이 좋아도 HACCP 제도를 정착시킬 수 없게 된다. 작업자들이 소속 작업장에서 조직의 한 부분으로 자연스럽게 규정을 준수하면서 주어진 업무를 수행케 만드는 것이 HACCP 이행이다. HACCP는 계획을 발전시키는 것보다 지속적으로 실천하는 것이 더 중요하다. 일반위생관리절차를 갖추게 되면 규정에 명시된 대로 작업자 각자가 자기가 해야할 일을 하게 되며 일반위생관리가 자연이 이루어지게 되는 것이다. 처음 SSOP를 작업자에게 제시하게 되면 규제라 생각하여 거부감도 가지게 되나 현장에 맞게 간편하고 쉽게 절차서를 만들면 일반위생관리기준서를 갖고 있는 회사는 시간이 흐를수록 점차 일을 계획적, 체계적으로 하게 되는 것이다. HACCP 시스템 구축에 기본 여건이 되는 위생에 관련된 연구는 단체급식을 전공하는 많은 선행연구자들이 수행한 바 있으나 의식조사, 실태조사(Bryan, 1988), 교육실행조사에 관련된 연구²¹⁾나 미생물학적 품질 평가(Yoo, 1998)의 일환으로 어떤 재료, 어떤 조리법, 어떤 공정 부분의 미생물 수를 검사하고 어떻게 위생을 수행하고 조리하는 것이 생물학적 위해요소를 증가/감소 시키는가하는 관점에서만 쓴 자연과학적 연구가 대부분이고 식품안전을 위해 예상되는 위해요소를 중점적으로 관리하는 시스템을 만들어 주는 방법을 제공하기 위해서 접근한 내용은 적은 실정이며 업체에서 직접 사용할 수 있는 식품품질경영메뉴얼을 개발한 것은 거의 없다. 그러나 식품이 안전하지 못하게 되는 원인과 안전하게 하는 방법은 오랜 세월 경험과 조사로 이미 인지하고 있는 사항이다. 그러므로 SSOP는 이미 알고 있는 위생에 관한 이행 방법을 작업자가 쉽게 자기 것으로 만들어 지금까지 무심코 하던 식품을 안전하지 못하게 하는 행위를 스스로 바꿀 수 있도록 만들어 주어야 한다. 식품이 안전하지 못하게 되는 주요 원인인 부적절한 저장, 보관온도, 부적절한 조리방법, 가구 및 작업대 오염, 위생적이지 못한 공급처로부터의 식품 구입, 작업자의 비위생적인 취급습관으로 인한다는 Weingold et al. (1994), Bryan (1988) 의 조사보고서와 같이 안전한 식품을 생산하기 위해서는 위생적인 생산 절차를 만들고 작업자의 관행을 바꿀 수 있는 대책이 필요하다. 이에 본 연구자들은 일반위생관리기준에 포함되어야 할 8가지 핵심분야를 정하여 모델을 개발하였다.

[모델 1] 유자차업체의 일반위생관리절차(SSOP)

- (예시용:각 업체의 구성인원에 맞게 변형하여 사용)

1. 목적 및 범위

당 사업장에서 우수한 품질의 유자차를 생산함에 있어 오염 및 변질을 방지하기 위하여 위생교육 이행 및 감사에 대한 관련자의 책임과 권한 및 보고 계통 그리고 절차를 규명 함.

2. 책임

- 대표는 본 절차서를 승인하고 자원활용을 보장 할 책임이 있다.
- 전무이사는 본 절차서가 이행되도록 감독 할 책임이 있다.
- 공장장은 본 절차서를 관리, 유지 및 현실적으로 수정할 책임이 있다.
- 각 과장은 작업장내 청소와 살균 프로그램을 이행 할 책임이 있다.
- 공무과장은 시설관리의 책임이 있다.
- 전 종업원은 본 절차서를 준수할 책임이 있다.

3. 위생교육

- 위생교육담당 : 전무이사, 공장장 혹은 지정된 인원
- 위생교육 주기 및 시간 : 월 1회 (매월 첫째 월요일) 혹은 필요시
- 교육대상 : 전 종업원
- 교육장소 : 사무실
- 교육내용
 - 본 위생관리절차(SSOP), 감사 지적사항
 - 감독기관 지시사항, 고객의 불만 / 클레임에 대한 대책
- 교육내용기록 : 교육완료 후 그 내역을 교육/훈련 기록부(양식 1)에 작성하여 전무이사의 검토를 얻도록 한다.

4. 위생감사

- 지정된 인원은 내부 위생감사를 실시한다.
- 감사의 주기는 여건에 따라 융통성 있게 결정하나 최소 1일 2회 이상씩 전 구역을 포함 해야한다.
- 그러나 취약한 구역은 횟수에 관계없이 중점적으로 감사한다.
- 감사 중 발견된 부적합 사항을 해당 부서장에게 통보하고 즉시 시정되도록 하고, 필요시 재발방지를 위한 “시정조치요구”를 발행한다.
- 위생감사의 결과를 일일 위생 점검표(양식 2)에 기록하여 전무이사의 검토를 얻도록 한다.

5. 절차

5.1 회사는 안전한 이용수의 사용을 보장해야 한다.

- 당 사업장은 시에서 제공하는 상수도만 사용한다.(또는 음용수로 적합한 지하수)
- 공무과장은 물탱크 청소를 년 2회 이상 실시한다.
- 공무과장은 년 1회 배관에 청관제를 투여한다.
- 공무과장은 이행 결과를 공무부서의 일일작업일지에 기록하여 전무이사의 검토를 얻도록

한다.

5.2 회사는 모든 장비, 용기 및 도구는 청소가 쉬운 디자인이며, 재질은 표면이 비독성이고 청소세제와 소독약품에 잘 견디고 녹슬지 않음을 보장해야 한다.

- 전무이사, 공장장 및 지정된 인원은 위의 사항이 충족되는 제품을 교환, 구매하여야 한다.
- 공장장은 월간 시설 위생감사 때 공장의 장비, 용기 및 도구의 상태를 평가한다.
- 개발실장은 평가의 결과는 월간 위생감사 일지에 기록 유지하여 전무이사의 검토를 얻도록 한다.

5.3 회사는 모든 용기와 공정 중 식품에 접촉한 기계의 표면은 다음과 같이 청소 및 소독하여야 한다.

- 공장장이 지정한 인원은 작업지시서(청소 및 살균계획서: 모델 2-2)에 따라 청소 및 소독을 하여야 한다.
- 사용한 청소도구는 깨끗이 씻어서 지정된 장소에 소독액에 담귀서 보관한다.
- 개발실장은 결과를 일일 점검검표에 기록하여 전무이사의 검토를 얻도록 한다.

5.4 회사는 현장 작업자에게 불 투과성의 앞치마 와 장갑을 지급하여야 한다.

- 공장장 및 지정된 인원은 해당 작업자가 이 용구를 받았는지 확인하고 필요시 교체해 주어야 한다.
- 작업자는 지급된 것만 사용하고 매일 작업 후 세척 및 소독 후 지정된 장소에 보관한다.
- 개발실장은 결과를 일일 위생감사 일지에 기록하여 전무이사의 검토를 얻도록 한다.

5.5 종업원은 다음과 같이 양호한 개인위생을 유지하여야 한다.

- 매일 출근 전 샤워를 해야 한다.
- 지정된 위생복장을 착용한다. : 모자, 위생복, 앞치마, 장갑, 장화
- 작업지시서(손 씻기 방법)에 따라 손을 씻는다.
- 작업 중에는 귀걸이, 목거리, 시계, 팔찌 등 장신구를 착용할 수 없다.
- 식품구역 내에서 취식, 마시기, 흡연 및 잡담이나 뛰는 행위를 할 수 없다.
- 위생복은 매일 일과 후 깨끗이 세탁한다.
- 개인복장 및 사물을 휴게실에 보관
- 각 과장은 매일 일과 시작 전 작업장에 입장할 때 종업원의 위생상태를 확인한다.
- 개발실장은 결과를 일일 위생 점검표에 기록하여 전무이사의 검토를 얻도록 한다.

5.6 회사는 화장실은 수세식으로 설치하고 손 씻기 및 장화 소독시설을 유지하여야 한다.

- 대표는 손씻기, 손소독 및 장화소독 시설을 다음장소에 유지한다.
 - 작업장의 모든 출입구
 - 공정 라인의 시작 과 끝
 - 화장실 입구
- 각 조장은 화장실을 청결히 유지하고 알카리성의 물비누 및 일회용 타올을 비치하며 보급품이 갖추어졌는지 매 4시간 간격으로 확인한다.
- 각 조장은 작업시작 전과 작업 중 매 4시간마다 소독약의 농도가 적절하게 유지 되도록

보충한다.

- 전 종업원은 화장실 사용 후나 작업장에 입장할 때 손씻기, 손소독 및 장화 소독과 앞치마 소독을 하여야 한다.
- 개발실장은 관찰 사항을 일일 위생 점검표(양식 2)에 기록하여 전무이사의 검토를 얻도록 한다.

5.7 회사는 각종 화학제품 (청소세제, 소독제, 연료, 윤활유 등)이 식품에 오염되는 것을 방지하여야 한다.

- 각 조장은 모든 화학제품을 원래 용기에 담아 라벨을 부착하여 지정된 보관 창고에 보관한다.
- 모든 화학제품은 작업장내에 일절 보관하지 않는다.
- 각 조장은 화학제품을 사용 시 필요한 양만 작업장내로 반입한다.
- 개발실장은 관찰 사항을 일일 위생 점검표(양식 2)에 기록한다.

5.8 회사는 다음과 같은 증상이 있는 종업원은 몸이 회복되기까지 집에서 쉬도록 한다.

- 열이 남
- 설사
- 기침, 콧물
- 오심, 구토
- 배거나 데인 상처

- 공장장은 매일 일과 전 해당종업원의 건강을 확인하여 상기의 증상이 있는 종업원을 식품취급에서 제외하여 제품에 관련이 없는 작업에 배치한다.
- 개발실장은 관찰 사항을 일일 위생 점검표(양식 2)에 기록하여 전무이사의 검토를 얻도록 한다.

5.9 회사는 식품구역 내로 쥐와 해충의 침입을 방지하여야 한다.

- 전무이사는 식품구역 내 모든 창문에는 방충망을, 하수구에는 쥐 방지망을 설치하여야 한다.
- 공무과장은 매일 방충망 및 쥐 방지망을 확인하여 필요 시 보수한다.
- 전 종업원은 식품구역 내 출입문은 사용 할 때 외에는 닫아두어야 한다.
- 개발실장은 쥐와 해충의 징후를 포함한 관찰사항은 일일 위생감사일지에 기록하여 전무이사의 검토를 얻도록 한다.

[모델 2-1] 작업지시서 1

제목 : 손 씻기 방법

1. 바르게 손 씻는 방법
 - 따뜻한 물로 손을 적신다.
 - 비누를 바른다.
 - 깨끗한 손톱 세척솔을 사용한다.
 - 손을 20초 이상 비빈다.
 - 흐르는 물에 깨끗이 행군다.
 - 수돗수를 분사한다
 - 일회용 수건이나 휴지, 드라이기로 말린다.
2. 다음 일을 하고 나서 언제나 손을 씻을 것
 - 생 식품 취급
 - 머리, 얼굴 혹은 몸은 만짐
 - 채채기나 기침
 - 흡연
 - 음식 먹기 / 마시기
 - 청소
 - 쓰레기 치우기
 - 화장실 사용 후

[모델 2-2] 작업지시서 2

제목 : 청소 및 살균계획서

대상	무엇을	언제	무엇으로	누가
바닥	이물질 치우기	휴식시간, 작업 후	빗자루, 쓰레받기	생산부서장 혹은 지정된 인원
	문지르기, 세척	작업 후	고압 호스, 밀대	“
벽과 천장	텍의 먼지	주 1 회	고압호스, 수건	“
	오물	매 작업 후	세제, 수세미	“
	세척	월 1 회	고압호스, 수건	“
배관	청관제 투여	주 1 회	뜨거운 식용 양재물 통과 후 깨끗한 물로 세척	“
	분해 청소	매 3 개월	브러시, 분해 및 조립 공구, 세제	“
작업용기	이물질 치우기	휴식시간, 작업 후	수건	“
	세척	작업 후	고압 호스, 세제, 솔	“
	살균	작업 후	뜨거운 물	“
통풍기	뒹기, 녹 제거 및 그리스	매 1 회	공구, 솔, 걸레, 윤활유	“

[모델 2-3] 작업지시서 3

제목 : 제품의 보관 방법

1. 선입선출(FIFO) 원칙의 준수
 - (1) 입고 시 각 포장에 유효일자 표시
 - (2) 오래된 것이 가장 먼저 사용되도록 앞에 보관
 - (3) 정기적으로 유효일자 검사
2. 유자를 담은 박스가 바닥에 닿지 않도록 팔레트를 간다.
(최소 10Cm 이상 바닥과 떨어지게 할 것)
3. 보관조건 : 온도는 5-10℃, 상대습도는 50-60%
4. 보관장은 햇빛이 들지 않게 북쪽에 위치하고 환풍이 잘 될 것 (통풍창)
5. 쥐 등의 침입을 예방하기 위해 다음을 검사하여야 한다.
 - (1) 벽, 바닥, 천장의 구멍이나 금 간 곳을 정비
 - (2) 문, 창문, 배출구는 폐쇄되고 방충이 되어야 함
 - (3) 파이프와 배출구는 적절히 밀폐되어야 함
6. 청소도구 및 화학약품은 유자차 보관창고에 보관하지 말고 다음과 같이 관리 할 것
 - (1) 식품구역과 떨어진 곳으로서 잠금 장치가 된 창고나 캐비닛에 보관
 - (2) 원래 용기나 라벨이 부착된 용기
 - (3) 화학제가 담겼던 빈 용기에 식품을 담거나, 식품용기에 화학제를 담지 말 것

Codex 지침에 따른 HACCP 적용순서 12단계 중 앞 5단계는 HACCP 7가지 원칙을 실행 할 수 있게 하는 단계이므로 이를 HACCP의 예비단계라 한다. 본 연구자들은 영세한 유자차업체의 실정에 맞도록 HACCP 품질경영매뉴얼을 개발하여 이를 토대로 모델(3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5)을 만들어 제시하였다. 개발된 모델은 각 업체의 인원에 맞게 변형하여 쓸 수 있도록 손쉽게 만들었다. HACCP팀 편성은 인사사항이므로 경영자의 승인/날인이 있어야 한다.

[모델 3-1] HACCP팀 편성

기능	이름	직책	편성이유
팀장	○○○	전 무	·업무전반을 관장 ·유자차 제조 경력 10년
팀원	○○○	공장장	·생산 담당 ·유자차 생산 경력 10년
팀원	○○○	개발실장	·식품 공학 전공 ·제품분석, 실험 및 개발 업무 ·식품회사 10년
팀원	○○○	영업과장	·납품 및 고객관리 ·유자차 관련 업무 7년
팀원	○○○	출고과장	·주문 및 출고 담당 ·유통회사 관리 ·유자차 관련 업무 7년
팀원	○○○	공무과장	·시설, 장비의 설치, 보수 ·정비 및 유지 책임 ·공무 경력 7년

승인 : _____ 일자 : _____

[모델 3-2] HACCP의 범위 및 목적

범 위	유자차의 제공을 위한 원재료의 구매, 보관, 가공 및 운송
목 적	품질 좋고 안전한 유자차의 생산

검토 : _____ 일자 : _____

[모델 3-3] 제품기술과 사용의도/소비자 및 민감한 집단

제 품 명	유자차
성 분	유자, 설탕
보 장 방 법	살균
1 차 포 장	유리 용기
최 종 포 장	골판지 상자
저 장 조 건	냉장보관(4℃)
분 배 방 법	냉장 탑차
특별 라벨링	원산지(○○산 □□%)
소 비 자 준 비 사 항	냉장 보관할 것

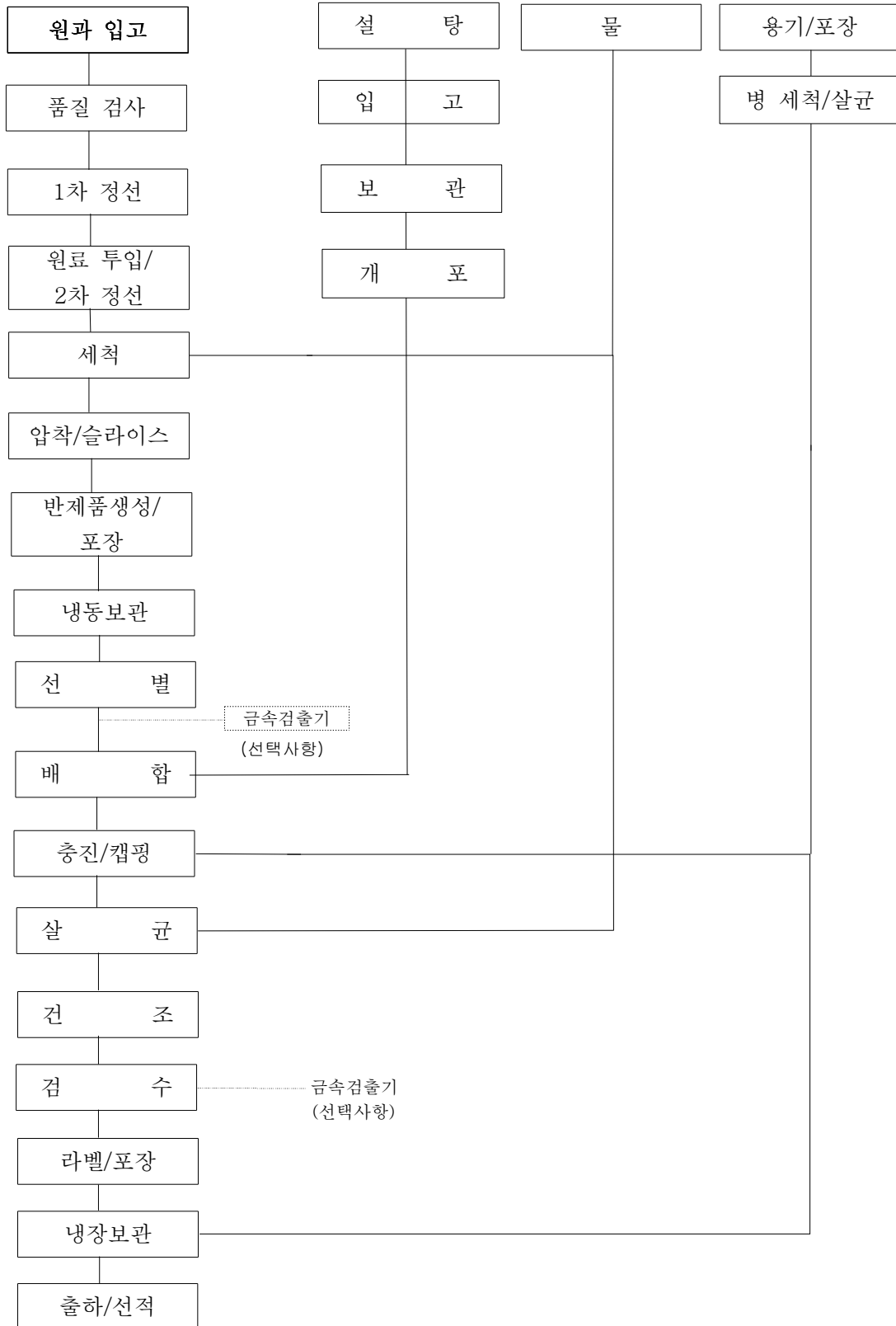
소비자 사용의도 및 / 민감한 집단

사용의도 및 소비자	일반 대중이 그대로 취식, 혹은 조리 후 취식
민감한 집단	없음

검토 : _____ 일자 : _____

[모델 3-4] 공정도

제품명 : 유자차



작성 : _____ 일자 : _____

[모델 3-5] 공정설명

유자차 제조 공정 단계 및 설명

· 제품명 : 유자차

공정단계	작업내용	비고
원과입고	50kg의 원과를 박스단위로 반입, 외관상태와 이력추적시스템에 의한 품질 확인 및 등급 결정,	
1차 정선	작업자가 제조도구(칼 등)를 사용하여 부패과 선별 및 흠집 제거, 종업원의 부주의로 식중독균의 교차오염, 사용도구에 의한 이물 등의 혼입우려로 개인위생과 작업도구 관리가 필요	
원료 투입 (2차 정선)	적정량의 원과를 컨테이너 벨트에 투입하여 작업자가 부패과 선별, 종업원에 의한 교차오염을 방지하기 위한 개인위생관리 필요	
세척	자동으로 세척조에 투입되어 20초 가량 세척 실시, 세척수 유입량 : 10~20 l/min, 세척수 교체주기 : 원료 교체시	
압착	자동으로 압착기에 유자가 투입되어 압착하여 씨앗과 내용물을 껍질과 분리, 작업자에 의한 식중독균의 교차오염과 제조설비(압착기)에 의한 이물 혼입이 발생하지 않도록 관리	
슬라이스	분리된 껍질은 자동으로 분쇄기에 투입되어 슬라이스 되어 짐, 작업자에 의한 식중독균의 교차오염과 제조설비(분쇄기)에 의한 이물 혼입이 발생하지 않도록 관리	
반제품 생성	슬라이스된 유자는 자동 설탕 투입장치에 의해 정확한 무게 비율로 혼합하여 각 규격에 맞게 비닐에 포장하여 플라스틱 박스에 보관, 개인위생관리와 혼합시 이물 혼입이 발생하지 않도록 관리 철저	
냉동보관	반제품을 냉동보관 (0℃이하), 운반시 내용물이 터지거나 찢어지는 현상 주의	
선별/금속검출기	사람이 직접 반제품 내 혼입된 씨 및 각종 이물 제거, 작업자의 부주의로 식중독균의 교차오염을 방지하기 위한 개인위생관리 철저/ 금속 검출기를 통과시 금속이 포함되어 있을 시 경고가 울리고 라인이 중지되고 작업자가 금속을 제거하면 다시 작업이 재개	금속검출기-업체 선택
배합	생산 제품의 규격 사항에 맞게 배합, 저장조에 작업자가 직접 투입하므로 개인위생관리가 필요, 수시로 손세척, 소독을 실시하여야 한다.	
병 세척	빈 병을 세척시켜 이물질을 제거	
병 살균	80℃ 이상의 고온에서의 빈 병을 살균 처리	
충진/캡핑	각 용량에 맞게 병에 충진하여 캡핑, 충진 시 작업장 내 분진이 일어나지 않는 환경에서 실시하여 이물 혼입을 방지	
살균	충진된 제품을 80℃ 이상의 고온에서 30분 살균 처리, 온도와 처리 시간을 정확히 지켜야 식중독균의 오염을 방지	
건조	바람을 이용하여 물기를 제거	
뚜껑 포장	뚜껑에 수축 필름을 포장	
검수	병 내 이물질과 불량 포장 검사/금속 검출기	금속검출기-업체 선택
라벨/포장	라벨 포장 후 완성된 완제품을 품질규격사항에 맞춰 재 선별 후 포장	
냉장보관	냉장 창고에 보관(4℃)	
출하/선적	선적 후 운송	

식품을 안전하지 못하게 하는 위해요소 평가는 자연과학적 분석 실험결과로만 할 수 있는 것은 아니다. 무엇보다도 우선할 수 있는 것은 HACCP팀의 현장 경험이나 지식이다. HACCP 시스템의 태동이 최종식품을 검사하여 이 검사 실측치의 결과를 가지고 귀납적 방법으로는 식품이 안전하지 못하다고 판정하는 것으로서는 식품의 안전성을 확보할 수 없었기에 실무자로 구성된 HACCP팀들이 자사업체의 전 공정을 꼼꼼히 분석하여 이들 공정에서 발생할 수 있는 모든 잠재적 위해요소를 팀활동으로 빠짐없이 도출해 내고 이들 위해요소 중 관리하지 않으면 소비자에게 질병이나 상해를 유발할 수 있는 발생가능성과 위해요소의 심각성을 식별하는 연역적 방법(Park & Lee, 1999)이다. 본 연구자들의 유자차 제조공정중의 위해요소 분석은 위해요소 분석작업표를 사용하여 [모델 4-1]과 같이 실시하였다.

[모델 4-1] 위해요소분석 작업표
· 제품명 : 유자차

(1) 성분/ 공정단계	(2) 이 단계에서 유입 되거나 관리되거나 늘어나는 잠재 위해의 식별	(3) 잠재 위해요 소 식품 안전 에 중대한가? (Yes, No)	(4) 3번 항에 대한 이유	(5) 중대 위해요소 를 예방하기 위해 적용할 수 있는 예방책	(6) 이 단계가 중요 관리 점인가? (Yes, No)
원과 입고	생물학적 -				
	화학적 -				
	물리적(이물질잔존)	Yes	부패과나 이물질 등이 포 함되어 있음	다음 공정인 정선에서 감소	No
설탕	생물학적 -				
	화학적(설탕투입 과량)	No	자동공정시스템관리		
	물리적 -				
물	생물학적 (병원미생물 생존)	No	수질 검사 합격한 물사용		
	화학적(중금속잔존)	No	수질검사 합격한 물 사용		
	물리적 -				
용기/ 포장재	생물학적(병원세균오염)	No	SSOP로 관리		
	화학적(중금속잔존)	No	승인된 공급자		
	물리적 -				
1차 정선	생물학적(식중독균오염)	No	SSOP로 관리		
	화학적 -				
	물리적(이물질잔존)	Yes	이물질 등이 포함되어 있음	다음 공정인 정선에서 감소	No
원료 투입 (2차 정선)	생물학적(식중독균오염)	No	SSOP로 관리		
	화학적 -				
	물리적(이물질잔존)	Yes	이물질 등이 포함되어 있음	다음 공정인 세척에서 감소	No
세척	생물학적 -				
	화학적 -				
	물리적(이물질유입)	No	SSOP로 관리		
압착	생물학적(식중독균오염)	No	SSOP로 관리		
	화학적 -				
	물리적(이물질혼입)	No	SSOP로 관리		
슬라이스	생물학적(식중독균오염)	No	SSOP로 관리		
	화학적 -				
	물리적(이물질혼입)	No	SSOP로 관리		
반제품 생성	생물학적(식중독균오염)	No	SSOP로 관리		
	화학적 -				
	물리적(이물질혼입)	No	SSOP로 관리		
냉동보관	생물학적(곰팡이증식)	No	SSOP로 관리		
	화학적 -				
	물리적 -				
선별	생물학적(식중독균오염)	No	SSOP로 관리		
	화학적 -				
	물리적(이물질혼입)	No	SSOP로 관리		
배합	생물학적(식중독균오염)	No	SSOP로 관리		
	화학적 -				
	물리적(이물질혼입)	No	SSOP로 관리		

(1) 성분/ 공정단계	(2) 이 단계에서 유입 되거나 관리되거나 늘어나는 잠재 위해의 식별	(3) 잠재 위험요 소 식품 안전 에 중대한가? (Yes, No)	(4) 3번 항에 대한 이유	(5) 중대 위험요소 를 예방하기 위해 적용할 수 있는 예방책	(6) 이 단계가 중요 관리 점인가? (Yes, No)
병 세척	생물학적 -				
	화학적 -				
	물리적 -				
병 살균	생물학적(미생물잔존)	Yes	살균 온도 시간 미달로 병원세균잔존	·공정관리 ·다음 살균처리 공정시 제거	No
	화학적 -				
	물리적 -				
충진/캡핑	생물학적 -				
	화학적 -				
	물리적(이물질유입)	No	SSOP로 관리		
살균	생물학적 (병원세균 생존)	Yes	살균 온도 시간 미달로 병원세균 생존	적절한 열처리,시간,온도 준수	Yes
	화학적 -				
	물리적 -				
건조	생물학적 -				
	화학적 -				
	물리적 -				
뚜껑 포장	생물학적 -				
	화학적 -				
	물리적 -				
검수	생물학적 -				
	화학적 -				
	물리적 -				
라벨/포장	생물학적 (병원세균 유입)	No	SSOP로 관리		
	화학적 -				
	물리적 -				
냉장보관	생물학적(곰팡이증식)	No	SSOP로 관리		
	화학적 -				
	물리적 -				

[모델 4-1]의 위험요소 분석표에서 심대한 위험요소가 있고 예방책이 있는 원과 입고, 1차정선, 원료 투입(2차 정선), 병 살균, 충진 살균을 CCP결정도표를 사용하여 위험요소를 분석한 결과는 [모델 4-2]와 같다.

[모델 4-2] CCP 결정도표 사용결과

제품명 : 유자차

공정단계 및 위해요소	Q1	Q2	Q2-1	Q3	Q4	Q5	CCP/CP	비고
	Y:CP입 N:질문2	Y:질문3 N:질문2 -1	Y:공정,제 품변경→질 문2 N:CP입	Y:CCP 입 N:질문4	Y:질문5 N:CP입	Y:CP입 N:CCP 입		
원과 입고 금속 등 이물질	No	Yes		No	Yes	Yes	CP	다음 공정인 정선공 정에서 이물질 감소
1차 정선 금속등 이물질	No	Yes		No	Yes	Yes	CP	다음 공정인 정선공 정에서 이물질 감소
원료 투입 (2차정선) 금속등 이물질	No	No/ Yes	Yes	No	Yes	Yes	CP	금속탐지기 같은 공정이 필요
병 살균 병원세균생존	No	Yes		No	Yes	Yes	CP	살균 공정에서 병원세균 감소
살균 (병원세균 증식)	No	Yes		Yes			CCP	

병 살균 공정은 다음 살균 공정에서 병원미생물이 사멸되어 허용수준이하로 감소되므로 CCP가 아니다. 그러므로 살균 공정만이 CCP가 되는 것이다. 또한 금속과 같은 이물질을 선별하기 위한 금속탐지기 등을 정선 후의 검수 과정에 설치하여 이곳을 물리적위해를 예방하는 중요관리점으로 만들어 기준에 넣을 수 있으나 1차 정선과 2차 정선, 그리고 세척과정을 거치면서 금속으로 인한 물리적 위해가 발생하는 빈도가 아주 낮기 때문에 이 부분은 업체의 자율에 맡기는 것이 좋을 듯 하다. 다만, 일정규모 이상의 대규모 업체는 매출량이 많아 발생빈도가 높으니 권장기준에 넣으면 좋을 듯 하다.

[모델 4-3-1] HACCP 계획서

- 회사명: H푸드
- 제품명: 유자차
- 주 소: 고흥
- 보관 및 유통방법: 냉장 보관 및 유통
- 사용의도 및 소비자: 일반 대중이 그대로 혹은 조리 후 취식

(1) 중요 관리점 (CCP)	(2) 중요 위해 요소	(3) 관리 한계 기준	(4) 모니터링				(5) 시정 조치	(7) 기록
			무엇을	어떻게	주기	누가		
살균	품온 및 시간 미준 수로 미생 물 잔존	살균 온도, 살균 시간 : 80-9 0℃, 30분	살균온도 및 살균시간	살균기 온도와 살균 시간을 체크	매 작업 시 마 다	공정 담당	<p>1. 살균 온도, 시간 이탈 시</p> <ul style="list-style-type: none"> -공정 담당자는 즉시 작업을 중지한다. -해당 제품은 즉시 재살균하고 CCP모니터링 일지에 기록하고 대표에게 보고한다. -해당로트 제품을 품질관리 팀장에게 공정품 검사를 의뢰한다. <p>2. 기기 고장인 경우</p> <ul style="list-style-type: none"> -즉시 작업을 중지하고 CCP 모니터링 일지에 기록하고 대표에게 보고한다. -수리완료 후 공정품은 재살균한다. -일지에 개선조치사항을 기록하고 대표에게 보고한다. -해당로트 제품을 품질관리 팀장에게 공정품 검사를 의뢰한다. 	살균 일지

승인: _____ 서명: _____ 일자: _____

※ (6) 검증절차 : 다음 장 별도 용지

[모델 4-3-2] HACCP 계획서

(6) 검증절차

1) 일지의 검토:

- 대표는 살균일지(양식 3-1)을 매일 검토한다.

2) 제품 실험:

(가) 대표는 최소 년 1회, 혹은 필요시 HACCP 계획을 확인(Validation) 하여야 한다.

(나) HACCP 계획을 확인해야 할 경우는 다음을 포함한다.

- 원재료의 변경
- 공정의 변경
- 고객 불만 / 클레임 발생
- 기타

(다) 확인은 HACCP팀이 Codex 12단계에 따라 HACCP 계획을 발전하는 방법에 의해서 한다.

(라) 확인의 결과 필요하다면 HACCP계획을 변경하며, 확인한 내용은 HACCP계획 확인기록지(양식6)에 기록, 유지한다.

3) 내부 품질 감사

(가) 대표는 최소 년 2회 HACCP 시스템의 효과성과 효율성을 평가하는 내부 품질 감사를

계획하여 이행한다.

(나) 내부 감사는 대표가 직접 하거나 외부의 인원을 지정해서 실시한다.

(다) 내부 품질 감사는 내부품질감사 점검표(양식5)에 의해 진행한다.

(라) 내부 품질 감사의 결과는 식별된 개선의 기회에 대하여 시정조치 요구서를 발의한다.

(마) 시정조치 요구서의 처리절차는 다음과 같다.

가) 시정조치요구서(양식 4)의 작성

나) 작성된 시정조치 요구서를 개발팀장에게 제출

다) 개발팀장은 일련번호를 부여하여 전무이사에게 제출

라) 전무이사는 시정조치 책임자 및 시정요구 일자 지정

마) 개발팀장은 시정조치 요구서 사본을 파일하고, 원본은 전무이사가 지정한 인원에 발송

바) 지정된 시정조치 책임자는 원인분석 후 재발을 방지하는 예방책을 조치 후 발의자에게 요구 확인

사) 발의자는 조치가 만족스러우면 시정조치 요구를 완결하고, 조치가 적절하지 못하면 시정조치 요구서를 반송

(3) 중요관리점의 한계기준 설정 근거 모델

유자차 업체에 적용할 중요관리점을 설정할 근거를 만들어 두면 작업자가 바뀌어도 HACCP 시스템 작동에 영향을 미치지 않으므로 HACCP 계획을 수립할 때 중요관리점의

한계기준을 정한 설정한 근거를 기록으로 남겨두면 연속성이 있어서 좋다. 또한 C.L을 설정할 때는 설정한 C.L이 위해요소를 관리할 수 있는지를 반드시 검사나 실험실 결과 등으로 확인하여야 한다.

[모델 4-4] C.L 설정 근거

제품명 : 유자차

공정단계 (제품명)	위해요소	C.L	C.L의 명분	확인
열처리 (포장관두부)	대장균, 황색포도상구균, 장염비브리오균, 살모넬라, 리스테리아 / 살균시 온도 및 시간 미준수로 미생물 잔존	열처리 온도: 80-90℃ 시간: 30분	80℃에서 30분간 열처리하면 품온이 75℃도달	품온 측정 및 미생물 실험

(4) 시정조치

공정의 재조정과 제품의 처리에 대한 즉시적 시정조치는 HACCP 계획에 포함되어야 한다. 예방적 시정조치는 HACCP 시스템내의 다른 절차로 규명하는 것이 좋다.

본 연구자들은 시정조치 양식을 [양식4] 시정조치 요구서와 같이 만들었다. HACCP 시스템이 작동되려면 C.L의 이탈이 발생되었을 때 시정조치 요구서의 처리 절차를 규명해두어야 한다. 사건이 발생했을 때의 처리절차를 만들어 두지 않으면 시스템이 제대로 관리될 수 없다.

(5) 검증절차 수립

검증절차는 모델 4-3-2의 HACCP 별지 양식으로 따로 개발하였다. HACCP 시스템이 작동되는지를 보기 위해 검증활동의 하나인 모니터링일지의 검토, 제품 실험, 내부 품질 감사의 절차에 대해서 명기하였다. HACCP 계획이 효과적이고 효율적인지를 보기 위해 적어도 1년에 한번은 HACCP 계획을 확인해야 한다.

본 연구자들은 [양식6]에 HACCP 계획확인 기록지를 제시하였다.

(6) 기록 및 문서화 연구결과

HACCP 계획은 우선 문서화 되어야 하기 때문에 HACCP 적용을 위한 모델개발 연구사업은 필요한 문서의 양식을 만드는 것으로서 마무리되어야 한다.

본 연구자들은 식품제조 작업 현장에 필요한 양식을 국제적으로 통용되는 양식을 변형하여 우리실정에 맞게 개발하였다. 양식의 목록은 다음과 같다.

1. 교육/훈련기록부(양식 1)
2. 일일위생 점검표(양식 2)
- ① 3. CCP 모니터링일지

- ② : 유자차 살균일지(양식 3)
- 4. 시정 조치 요구서(양식 4)
- 5. 내부 품질 감사 점검표(양식 5-1,2,3,4,5)
- ③ 7. HACCP계획 확인 기록지(양식 6)
- ④ 8. 모니터링 장비 검정/교정 일지(양식 7)

[양식 1] 교육 훈련 기록부

검 토

일자	년 월 일	시간	시 분 ~ 시 분
강사		장소	
제목			
내용			
참석자			
결과			

작성자 : _____

[양식 2] 일일위생점검표

				검 토
년 월 일				
구역	위생상태	결과		비고
		시	시	
작업장	1. 바닥	적합/부적합	적합/부적합	
	2. 벽과 천장	적합/부적합	적합/부적합	
	3. 정리정돈	적합/부적합	적합/부적합	
냉장고	1. 청소상태	적합/부적합	적합/부적합	
	2. 적재방법	적합/부적합	적합/부적합	
	3. 온도유지	적합/부적합	적합/부적합	
용기	1. 칼	적합/부적합	적합/부적합	
	2. 두부판	적합/부적합	적합/부적합	
	3. 두부면포 (압착보자기)	적합/부적합	적합/부적합	
개인위생	1. 손씻기	적합/부적합	적합/부적합	
	2. 위생복장	적합/부적합	적합/부적합	
	3. 양호한 개인위생 준수	적합/부적합	적합/부적합	
	4. 몸이 아픈 종업원	적합/부적합	적합/부적합	
기타	1. 화장실 및 손씻기 시설	적합/부적합	적합/부적합	
	2. 장화 소독조	적합/부적합	적합/부적합	
	3. 청소도구 보관	적합/부적합	적합/부적합	
	4. 냉각수의 상태	적합/부적합	적합/부적합	

감사자: _____

[양식 3] CCP 모니터링일지

유자차 살균일지

- 제품명 : 유자차
- 확인주기 : 열처리 시 30분 간격
- 확인 및 기록자 : 생산과장
- 검토자 : 공장장

2001년
월 일

검토

일자	시간	생산량	물의 온도	열처리 시간	비고

확인자: _____

【 예시 】 유자차 살균일지

- 확인주기 : 살균시작, 살균 후 30분 간격
- 확인 및 기록자 : 공장장
- 검토자 : 대표

2011년 월 일

확인자: _____

일자	제품명	생산량	냉각 온도	냉각 시작 시간	냉각 중지 시간	비고	확인자 (서명)	검토

[양 식 4] 시정조치 요구서

(5) 일련번호

(1)	발 의 자	이름 :	직책:	
	발 의 일 자	년 월 일		
	부적합 내용			
(2)	시 정 조 치 책 임 자		시정조치 요구일자	
(3)	원 인 분 석			
	재발을 방지하는 예방책	(이름: 서명:)		
(4)	발 의 자 확 인	(이름: 서명:)		

- (1) 발의자가 기록
- (2) 대표가 기록
- (3) 대표가 지정한 시정조치 책임자가 기록
- (4) 발의자가 기록
- (5) 대표가 기록

[양식 5] 내부품질감사 점검표

5-1 GMP/시설

			검 토
항목	평가 내용	결과	의견
		(O/X // N/A)	
건물 외부	1. 주변의 오염물질은 없는가?		
	2. 누수 등 파손 없이 유지되는가?		
건물 내부	1. 건물상태와 재질은 오염의 징후가 없는가?		
	2. 조명의 밝기는 제품 생산과 청소하기에 적절한가?		
	3. 쓰레기통은 누수 되지 않고, 주요 공정에서 떨어져 있는가?		
	4. 손씻기 시설은 적절한가?		
보관	1. 냉장제품은 4℃ 또는 그 이하로 유지되는가?		
	2. 포장재는 오염되지 않도록 보관, 취급되는가?		
수송	1. 제품의 상·하차 시 품질저하를 방지하는 방법으로 행하여지는가?		
	2. 운송 시 냉장고를 가동하는가?		
디자인 & 설비	1. 식품접촉표면은 흡수성이 없고 독성이 없는가?		
	2. 식품접촉표면은 깨지고, 금가고, 흠이 있는 않는가?		
	3. 식품접촉표면에 사용된 모든 화학제 /페인트는 식품등급인가?		

[양식 5] 내부품질 감사 점검표
5-2 SSOP

항목	평가 내용	결과	의견
		(O/X // N/A)	
건강 & 위생요건	1. 작업 전, 휴식 후, 화장실 사용 후에 손을 충분히 씻는가?		
	2. 손 소독 시설이 있고 사용되는가?		
	3. 위생복장은 청결하고 착용상태는 좋은가?		
	4. 작업공정 내에서 취식, 흡연 등은 하지 않는가?		
	5. 개인 사복·사물은 작업구역에서 분리되어 보관하는가?		
	6. 오염방지를 위해 방문자의 출입이 통제되고 있는가?		
	7. 작업 중인 종업원의 건강상태는 양호하고, 정기적인 건강검진은 받았는가?		
청소 프로그램	1. 문서화된 위생관리 절차서는 있는가?		
	2. 사용 중인 청소세제는 안전한가?		
	3. 청소상태는 양호한가?		
	4. 위생 점검 시 청소상태 확인을 포함하는가?		
	5. 화학제, 청소세제, 독극물은 적절한 라벨링을 하고 지정된 장소에서 보관, 사용되고 있는가?		

[양식 5] 내부품질 감사 점검표

5-3 HACCP(1)

항목	평가 내용	결과	의견
		(O/X // N/A)	
HACCP	1. HACCP 팀이 적절한 인원으로 편성되고 문서화되었는가?		
	2. HACCP 계획의 목적과 범위가 나타나 있는가?		
	3. 생산제품의 발전되고 문서화된 제품요사는 있는가?		
	4. 제품요사에 포함된 내용은 적절한가?		
	5. 고객의 사용의도와 민감한 집단을 식별하였는가?		
	6. 공정도는 시작부터 종료까지 HACCP 계획의 전 범위를 포함하는가?		
	7. HACCP 팀에 의해 공정도의 현장검증이 이루어졌는가?		
	8. 모든 잠재위해요소를 열거, 분석을 실시하고 해당 위해요소에 대한 예방책이 적절한가?		
	9. 위해분석은 검증되고 문서화 되었는가?		
	10. 중요관리점(CCP)의 식별이 정확한가?		
	11. 중요관리점(CCP)이 누락된 것은 없는가?		
	12. 각 중요관리점에서 CCP 관리의 한계기준(C.L) 설정은 정확하고 확인되었는가?		
	13. CCP 관리의 한계기준을 선택한 명분은 무엇인가?		
	14. 운영한도(O.L)의 설정은 적절한가?		
	15. 각 중요관리점에서 모니터링 시스템의 수립은 적절한가?		
	16. 지정된 모니터링 요원은 모니터링 교육을 받았는가?		
	17. 모니터링 기록은 완전하고 책임자에 의해 검토되었는가?		

[양식 5] 내부품질 감사 점검표

5-4 HACCP(2)

항목	평가 내용	결과	의견
		(O/X // N/A)	
	18. 각 중요관리점에서 편차 발생시 이를 처리하기 위한 명확한 시정조치가 있는가? 이 시정조치는 이탈된 제품의 처리를 포함하는가?		
	19. 시정조치 기록은 완전한가?		
	20. 검증절차는 HACCP 시스템의 검토와 기록, 이탈 및 제품처리의 검토, 확인(Validation)등을 포함하고, HACCP 시스템이 효과적이라는 것을 확인하기에 충분한가?		
	21. 검증절차에 내부감사를 포함하는가?		
	22. 검증절차의 기록은 완전한가?		
	23. HACCP 시스템의 HACCP Plan, 지원문서는 완전하고, 검토되었는가? (HACCP Plan, 위해분석도, CCP 결정도표, HACCP 팀 편성도)		
	24. HACCP 시스템의 모든 품질기록은 완전하고, 검토되었는가? (CCP 모니터링일지, 시정조치 일지, 위생교육 일지, 검·교정일지....)		
	25. HACCP 계획은 전문가에 의해 발전, 확인, 검증되었는가?		

[양식 5] 내부품질 감사 점검표

5-5 지원 프로그램

항목	평가 내용	결과	의견
		(O/X // N/A)	
검·교정	1. 감사, 시험 및 측정 장비는 검·교정 되어졌는가?		
	2. 검·교정 주기는 적절하고, 기록이 유지되는가?		
교육훈련	3. 교육/훈련 프로그램은 문서화되고, 교육의 기록이 완전한가?		
	4. HACCP 팀은 적절한 HACCP 교육을 받았는가?		
	5. 모니터링 요원은 모니터링 교육을 받았는가?		
	6. 전 종업원은 주기적인 위생교육을 받았는가?		
	7. 모든 교육 참가자의 기록은 유지되고 있는가?		
	8. 제품식별에 대한 절차는 문서화되고 이행되는가?		
	9. 부적합품의 식별 및 관리는 적절한가?		
	10. 모든 제품이 정확히 고객/법적 요건의 표시가 되고 있는가?		
	11. 리콜의 절차는 문서화되고, 적절한가?		
승인된 공급자	12. 승인된 공급자의 목록은 유지되고 있는가?		
	13. 승인된 공급자의 평가는 객관적이고 적절한가?		
	14. 구매사양서는 규명되고 문서화 되었는가?		

[양식 6] HACCP계획 확인 기록지

- 확인 주기 : 연 1회(매년도 1월)
- 기록자 : 대표

년 월 일	확인주기 (정기, 수시)	확인사유	확인내용	변경내용

[양식 7] 모니터링 장비 검정 / 교정일지

장비명 : _____

사용장소 : _____

일련번호 : _____

모델명 : _____

구매일자 : _____

검정/교정 일자	검정/교정 결과	검정/교정 방법	담당자

6. 관리기준 예시

가. 위생관리 기준

(1) 시설/일반사항 관리기준

1) 작업장은 오염구역과 비오염구역으로 구분/구획 되어야하고, 구획이 어려운 소규모 업체는 교차오염을 일으키지 않도록 오염구역과 비오염구역 작업자를 구분하여 작업하는 등과 같은 방법의 적절한 조치를 취해야 한다.

2) 바닥은 파여 있거나 물이 고이지 않아야 하고, 배수/청소가 용이하여야 하며 배수되는 폐수는 음용수 공급원을 오염시키지 않도록 위생적으로 관리하여야 한다.

3) 내벽, 천정, 창문, 바닥은 청소하기 용이한 내수재질이어서야 하고 이물이나 먼지가 쌓이지 않도록 주기적인 청소프로그램을 갖추어 관리하여야 한다.

4) 출입문은 내수재질로 밀폐가능 해야 하고, 작업장이 출입문 등으로 외부와 직접 통하는 구조일 경우 외부로부터 위생곤충, 쥐류의 침입을 막을 수 있는 적절한 시설을 갖추어야 한다.

5) 화장실, 탈의실 및 수세시설은 작업실과 분리된 장소에 설치되어야 하며, 작업자가 위생적으로 이용할 수 있도록 충분한 시설을 갖추어야 한다.

6) 화장실과 출입구에는 작업화 소독조를 갖추어야 하고, 화장실과 출입구 및 비오염 작업구역의 작업장에는 늘 온수가 나와야 하며, 손을 사용하지 않고 조작되는 수세시설을 갖추어야 하고 위생적인 건조시설 및 소독시설이 설치되어야 한다.

7) 환기시설은 악취, 증기 등을 환기시키는데 충분하여야 하고, 주기적인 청소 프로그램을 갖추어 청결하게 관리되어야 한다.

8) 채광과 조명은 적절한 밝기여야 하고 조명시설 등으로부터 물리적 위해요소가 유발되지 아니하도록 덮개 등이 보호장치를 하여야 한다.

9) 급수시설과 급수관은 별도의 청소프로그램을 갖추어 주기적으로 청소/살균하여야 하며 이용수가 오염되지 않도록 역류방지장치가 되어야 한다.

10) 수도물을 사용하지 않는 업체의 이용수는 수질검사에 합격한 물이어야 하고, 취수원은 오염될 우려가 있는 장소로부터 20m이상 떨어진 곳에 위치하여야 한다. 또, 지하수의 수질검사는 최소한 년 1회 이상 실시하여야 하며, 오염이 우려될 경우를 관찰하여 주기적으로 확인 관리하여야 한다.

11) 식품 구역 작업자는 위생복, 위생모, 위생화 및 위생장갑을 착용하여야 하며, 작업장에서 식품위생에 해를 끼칠 수 있는 행동을 해서는 안되며, 작업복장은 항상 위생적으로 관리하여야 한다.

12) 몸이 아픈 작업자는 식품구역에서 종사해서는 안된다.

13) 원료와 제품의 처리·가공 등에 사용되는 기구 및 용기는 용도별로 구분, 표시하여 청결하게 관리하여야 하고, 살충제 등과 같은 유독성 물질과 인화성 물질 등은 취급주의 표시를 하여 식품구역과 격리된 별도의 장소에 보관하여 안전하게 관리해야 한다.

14) 업체는 다음 각 항목의 사항이 구체적으로 기재된 위생관리 절차서를 작성/비치하고 사용하여야 한다.

① 청소장소 및 청소주기

② 청소방법과 청소에 사용하는 살균제 및 도구

- ③ 청소상태 평가방법
- ④ 소독설비와 소독약품 점검 횟수 및 점검 방법
- ⑤ 위생복장의 착용 규정
- ⑥ 작업자의 손씻기 및 소독방법
- ⑦ 작업 중 식품 오염을 초래하는 주의사항
- ⑧ 작업자의 건강상태 관리사항
- ⑨ 작업자의 위생교육 주기 및 실시상태
- ⑩ 해충의 침입여부 확인 방법
- ⑪ 이용수에 관한 사항
- ⑫ 화장실 시설 및 사용에 관한 사항
- ⑬ 기타 필요한 사항

(2) 유자차 업체의 개별위생관리 기준

- 1) 유자차의 원과 보관 창고는 온도 5-10℃, 상대습도 50-60% 정도의 직사광선이 들지 않는 환풍이 잘되는 적절한 시설이어야 하고 적절한 시설을 갖추기 어려운 소규모 업체에서는 1주일 이내에 소비될 수 있는 원재료 양만 입고 하여야 한다.
- 2) 즉시 배송하지 않는 유자차 제품은 냉장 창고에 보관되어야 하며 냉장고의 온도는 4℃ 이하가 유지되어야 한다. 다만, 냉장 설비를 갖추지 못한 소규모 업체는 배송 되기 전까지 오염을 초래하지 않는 적절한 방법으로 관리되어야 하며 최대 4시간 이내에 출하되어야 한다.
- 3) 유자차 업체는 최소 세척부터 충전까지 멸균처리 된 별도의 장소를 갖추어야 하며 세척, 살균 프로그램을 갖추어 절차대로 세척, 살균한 후 오염을 초래하지 않게끔 충전까지 실시하여야 한다.
- 4) 모든 시설은 청소, 살균 프로그램을 갖추어 매 작업 전, 후에 위생적으로 관리하여야 한다.
- 5) 유자차 제품에 사용하는 포장재, 기구, 용기 등 부자재는 승인된 공급처에서, 화학적 위해가 없는 제품을 공급받으며 업체는 공급업체로부터 검사성적서를 받는 등과는 적절한 방법으로 안전성을 확보할 수 있도록 공급업체관리를 하여야 한다.
- 6) 유자차 제품을 운반하는 차량은 위생을 유지하여야 한다.

나. HACCP 관리기준

(1) 세부관리 기준

- 1) HACCP을 적용하는 업체는 적절한 인원으로 HACCP팀을 편성하고, 문서화하여야 한다.
- 2) HACCP 팀장은 작업장의 모든 업무를 가장 잘 알고, 선임된 위치에 있는 사람이어야 하고 경영자는 HACCP 정착 의지를 구체화하여 팀 활동을 주도할 수 있는 책임과 권한을 HACCP 팀장에게 부여하여야 한다.
- 3) HACCP 계획은 HACCP을 실시하려는 목적과 범위가 구체적으로 표현되어야 한다.

- 4) HACCP 적용업체는 자사에서 생산되는 제품의 발전되고 문서화된 제품기술서를 갖추어야 하며 제품기술서에는 HACCP의 목적에 부합되는 내용이 구체적으로 규명되어야 한다.
- 5) HACCP 계획은 고객의 사용의도와 민감한 집단을 식별하여 표현되어야 한다.
- 6) 공정도는 식품의 생산 시작부터 종료까지 HACCP 계획의 전범위를 포함하여야 한다.
- 7) 공정도는 HACCP팀에 의해 현장검증 되어야 하고, 공정도에는 현장검증을 검토하였다는 내용이 기록되어야 한다.
- 8) HACCP 계획은 모든 잠재위해가 열거되고, 이를 분석/실시하여 해당 위해요소에 대한 적절한 예방책이 식별되어야 한다.
- 9) HACCP 계획에는 위해분석이 검증되고 문서화되어 있어야 한다.
- 10) HACCP 계획은 중요관리점(CCP)이 누락되지 않고 정확하게 식별되어야 하며, 쓸데없이 중요관리점을 많이 식별하여 관리가 분산되지 않도록 하여야 한다.
- 11) HACCP 계획에는 각 중요관리점에서 CCP 관리의 한계기준(C.L)의 설정이 정확하여야 하고, 실험/검사 등의 방법으로 확인되어야 한다.
- 12) HACCP의 보조문서에 한계기준(C.L)을 선택한 근거(명분)가 기술되어야 한다.
- 13) 중요관리점(CCP)을 관리하는 운용한도(O.L)의 설정은 제품의 품질에 영향을 미치지 않고 경제적으로 설정되어야 한다.
- 14) HACCP 계획은 각 중요관리점에서 적절한 모니터링 시스템이 수립되어야 하고, 이를 문서화하여야 한다.
- 15) HACCP 계획에는 모니터링 교육을 받은 적합한 모니터링 요원이 지정되어야 한다.
- 16) 모니터링 기록은 수정, 첨삭한 흔적이 없이 완전해야 하고, 책임자에 의해 검토되어야 한다.
- 17) HACCP 계획에는 각 중요관리점에서 편차가 발생할 때 이를 처리하기 위한 명확한 시정조치가 있어야 하며, 이 시정조치에는 한계기준(C.L)을 이탈한 제품의 처리가 포함되어 있어야 한다.
- 18) 시정조치의 기록은 수정, 첨삭한 흔적이 없이 완전하여야 한다.
- 19) HACCP 계획의 검증절차는 HACCP 시스템을 검토, 기록, 이탈 및 제품처리 검토, 확인등을 포함하고 HACCP 시스템이 효과적이라는 것을 확인하기에 충분하여야 한다.
- 20) 검증절차에는 내부감사내용이 포함되어야 한다.
- 21) 검증절차의 기록은 수정, 첨삭한 내용이 없이 완전해야 한다.
- 22) HACCP 시스템의 HACCP 계획, HACCP 지원 문서는 완전하고 경영자와 HACCP 팀에의해서 검토되어야 한다. (HACCP팀 편성표, HACCP 계획서, 위해분석도, CCP 결정도 표 등)
- 23) HACCP 계획은 전문가에 의해 발전되고 확인, 검증되어야 한다.

(2) HACCP 평가사항

1) 구매

① 평가내용 :

-원료 및 부재료의 입고대장기록을 관리하고 있으며, 검사관리기준에 의하여 공급업체에 대해 검사성적서를 제출요구, 또는 자체 검사로 승인된 공급처를 유지/관리하고 있는가?

-포장재, 기구 및 용기 등 부자재를 공급하는 공급업체에 대해 검사성적서 제출요구 또는 자체 검사로 승인된 공급처를 유지/관리하고 있는가?

② 관리기준 :

-원료 및 부재료 관리 기준 ; 공급업체의 제출 기록확인, 숙련자의 육안검사

-승인된 공급처 유지 ; 검사성적서 확인, 과거의 거래실적/기록확인

2) 보관

① 평가사항 :

-원료 및 부원료의 보관은 적절히 관리되고 있는가?

② 관리기준 :

-보관고의 온도/습도 ; 기록확인

-밀바닥에 그대로 적재 하였는가 확인 ; 육안검사

3) 세척

① 평가사항 :

-세척에 사용한 물은 안전한가?

-세척 온도와 시간은 적절한가?

-세척 중 이물질 혼입은 없는가?

② 관리기준 :

-이용수 관리지침 ; 확인

-숙련자의 경험 ; 온도/시간확인

-일반위생관리 ; 작업지시확인

-육안검사

4) 압착/슬라이스

① 평가사항 :

-제거된 씨와 원육은 적절히 관리하고 있는가?

-이물질 혼입은 없는가?

② 관리기준 :

-이용수 관리지침 ; 확인

-부산물 관리지침 ; 준수여부 확인

-육안검사

5) 배합/충진

① 평가사항 :

- 사용하는 첨가물은 화학적 위해요소를 함유하고 있지 않은가?
- 사용하는 첨가물은 사용기준을 지키는가?
- 충진 시 작업장 환경은 적절히 관리되고 있는가?

② 관리기준 :

- 첨가물 공급업체의 검사성적서 ; 확인
- 공정관리 ; 첨가물 사용기준 준수 확인, 작업장 관리기준 기록/육안 확인

6) 살균

① 평가사항 :

- 품은 75℃ 도달을 위해 열수온도 80℃ 확인
- 살균온도시간 30분 확인

② 관리기준 :

- 유자차살균일지(CCP 모니터링) 확인 ; 온도/시간 기록 육안확인

7) 검수

① 평가사항 :

- 금속 함유 점검을 위하여 금속 탐지기 작동 여부 확인

② 관리기준 :

- 금속탐지기작동검사 일지(CCP 모니터링일지) ; 기록/육안확인

8) 라벨/포장

① 평가사항 :

- 라벨과 상자담기 과정은 위생적으로 이루어지고 있는가?
- 사용하는 상자와 포장은 위생적인가?

② 관리기준 :

- 일반위생관리 지침 ; 준수/확인
- 포장재 위생관리 ; 공급자 검사 성적서 확인/위생관리지침 준수확인

9) 냉장보관

① 평가사항 :

- 냉장보관고의 온도는 적절하게 유지되고 있는가?
- 보관된 제품은 적당한 시간에 출고되고 있는가?

② 관리기준 :

- 냉장보관고 온도일지 ; 기록/육안확인

-제품 보관일지 ; 기록/육안확인

10) 출하/산적

① 평가사항 :

-운반차량 내부는 위생적인가?

② 관리기준 :

-일반위생관리 지침 ; 준수 확인

3. 3세부 : 유자의 피부활성효능 평가 및 이를 이용한 화장품 개발 및 사업화

가. 고흥산 유자의 과피, 씨앗 및 과육 부위별 활성 성분 분석 및 피부기초 효능 조사

1) 세부과제의 목표 및 내용

고흥산 유자의 과피, 씨앗 및 과육 부위별 활성 성분 분석 및 피부기초 효능 조사하여 발효가공 및 생물전환기술을 이용한 신규 기능성 화장품 소재 개발 및 개발된 화장품 소재를 이용한 화장품 브랜드개발 및 관련 화장품 사업화를 실시한다. 또한 유자의 성분 (limonoid, hesperidin, naringin 등)에서 항암작용, 항비만 작용 및 당뇨 억제, 항노화/항산화 작용, 항균작용 등을 평가할 표준 평가기법을 구축·적용하여 고기능성 및 고영양성 가공식품 후보성분을 탐색하고 이를 적절한 가공방법을 이용하여 그 효과를 최적화시켜 고부가가치 기능성 가공제품을 통한 수출시장 확대 및 국민건강 증진을 추구하고자 한다.

2) 재료 및 방법

가) 유자 부위별 추출 조건 확립 및 시료제조

고흥산 유자청 제조 후 냉동 상태의 부산물을 녹여 과피, 속씨, 씨앗껍질 별로 분류하였다. 분류된 부위별로 동결건조하여 건조 분말상태로 각 부위별로 -20℃에 보관하였다. 추출 시 각 분말을 유기용매, 온도별 조건을 달리하여 열수 추출하였다. 에탄올, 물을 유기용매로 사용하였으며, 60, 80℃ 온도에서 추출을 시행하였다. 추출물은 10배 농축하여 시료 제조하여 -70℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 피부 효능 평가 과정 시 세포에 대한 유기용매의 제한이 있어 동결건조 후 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide)에 녹여 실험하였다.

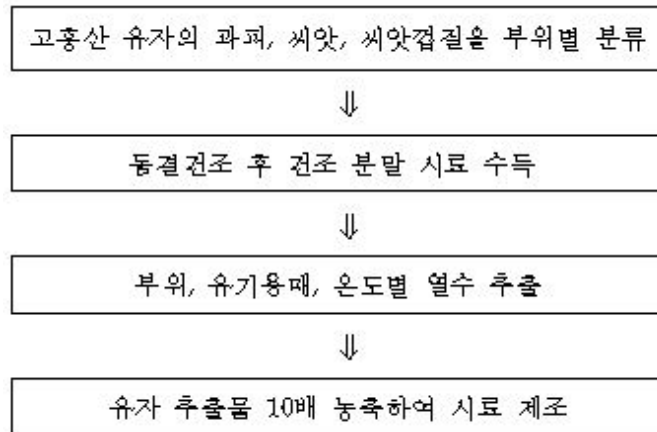


Fig1. 유자 분획물 시료 제조 과정

나) 유자 부위별 Flavonoid, Limonoid 분석 및 total polyphenol assay 분석

TLC(Thin Layer Chromatography) 및 HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 두 종류로 분석 조건을 확립하였다 (Fig. 2,3). Total Phenolic assay는 천연물 등의 원료 내 추출 성분 중 생리활성 물질을 지닌 bioflavonoids의 함량을 분석한다. 1N Folin-ciocalteau solution, 탄산나트륨 solution, 유자 분획물을 각각 1:1:1로 50분 반응시키고 원심분리 후 상등액을 분광광도계 760nm에서 측정한다. 지표 물질은 갈릭산(gallic acid)을 사용하였다.

<u>TLC 분석 조건</u>
Stationary phase ; Silica gel plate
Mobile phase ; Chloroform : Methanol : Distilled water (10:5:1)
Development reagent ; Ehrlich's solution (0.395g of p-dimethylamino-benzaldehyde+0.789g of sulfuric acid+50ml ethanol)

Fig 2. TLC 분석 조건

HPLC 분석 조건

Detection UV wavelength : 210nm

Column: YMC ODS-A,Silcagel 5µm, 250x4.6mm (C18 column)

Mobile phase : A; 3mM phosphoric acid / (H₂O 90 : acetonitrile 10)

B; 3mM phosphoric acid / (H₂O 30 : acetonitrile 70)

C; 3mM phosphoric acid / (H₂O 50 : acetonitrile 50)

Gradient

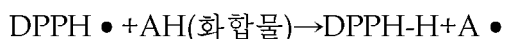
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	50	60
A	100	88	75	65	55	45	20	5	0	45	100
B	0	12	25	35	45	45	50	30	0	45	0
C	0	0	0	0	5	20	30	65	100	20	0

Flow rate : 1.2ml/min, column temperature : 30℃

Fig 3. HPLC 분석 조건

다) Radical Scavenging Activity 분석

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)은 화학적으로 안정화된 프리 라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 515nm~520nm 부근에서 최대 흡광도를 가지며, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼(DPPH)이 소멸되고 색깔이 변한다. 화학적으로 안정성 있는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical(DPPH•)은 여러 종의 항산화 성분이 내재된 추출물, 음료와 오일, 순수 페놀화합물 등의 항산화 효과를 분석할 수 있다.



유자 분획물과 250 µM DPPH를 1:1로 암실에서 20분 반응 시킨 뒤 분광광도계의 517nm에서 측정하였다.

3) 결과 및 고찰

LC 분석 결과 씨겍질 추출물에는 상대적으로 Limonin성분이 풍부하며, 과피 추출물에는 Hesperidin성분이 많이 함유되어 있다. 유자 부위 중 속씨는 추출 시 고형분 함량이 적어 추출 수율이 낮고 Radical scavenging activity 1차 screening 결과 활성이 없는 것으로 판단되어, 실험군에서 제외하였다 (Fig. 4). HPLC 분석 결과 유자 분획물의 플라보노이드와 리모노이드를 동시 분석할 수 있었고 TLC와 동일한 결과를 얻었으나 total 플라보노이드의

함량은 과피 추출물에 많이 분포함을 알 수 있었다 (Fig. 5). 유자 분획물의 phenolic compounds의 총 함량은 씨껍질 부분보다는 과피 부분에서 phenolic compounds 구조의 성분이 다량 추출되었다 (Fig. 6). 에탄올과 메탄올 용매별로는 비슷한 polyphenol 성분이 추출되는 것으로 판단되어지고, 물 분획물이 다른 용매에 비해 높은 수율을 보이지만, 분획물 제조 후 보관 시 시료가 gel화 되어 피부효능평가에 사용할 수 없었다. 이는 물 추출에 의해 유자 과피 및 씨 성분의 폴리머 구조가 추출되어 굳은 것으로 판단된다.

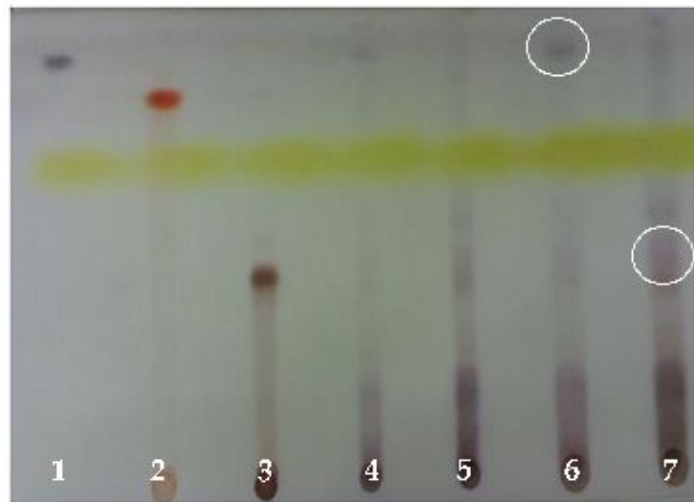
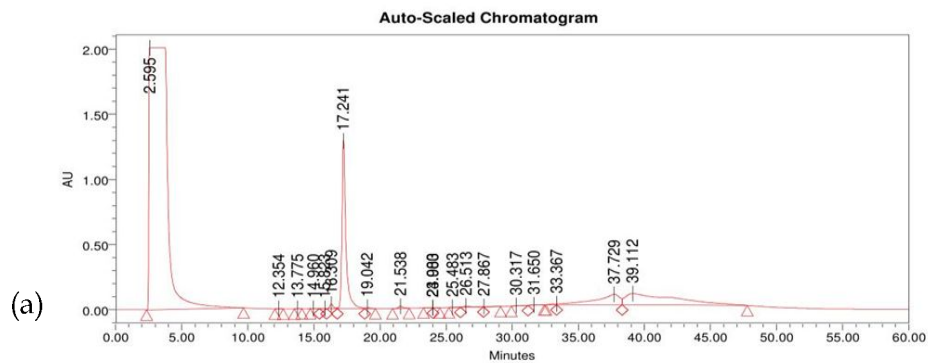


Fig.4 TLC 분석 결과

(1; 5mM Limonin 2; 5mM Hesperetin 3; 5mM Hesperidin 4; 2 μ l 씨껍질 추출물 5; 2 μ l 과피 추출물 6; 2 μ l 씨껍질 추출물 7; 5 μ l 과피 추출물)



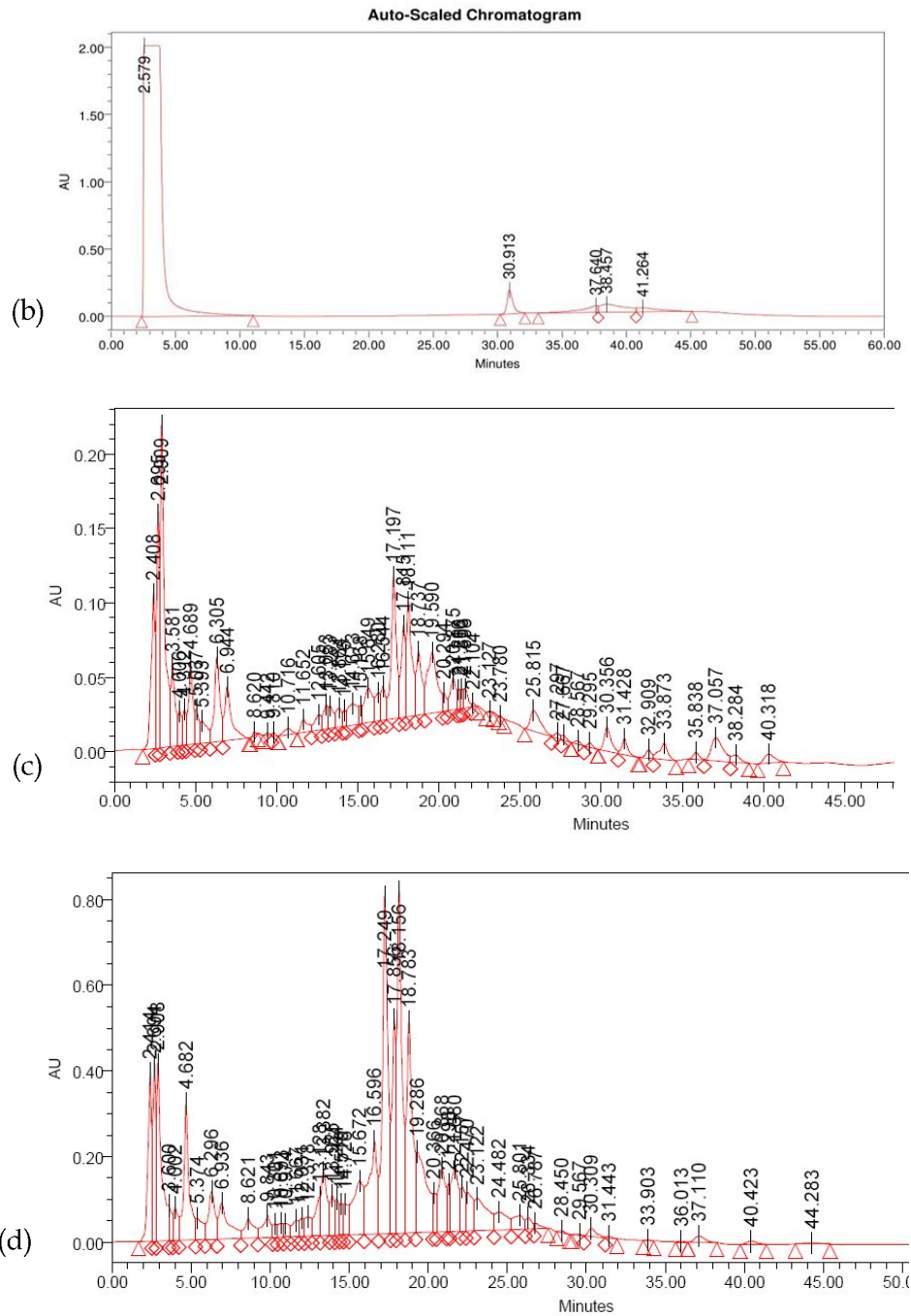
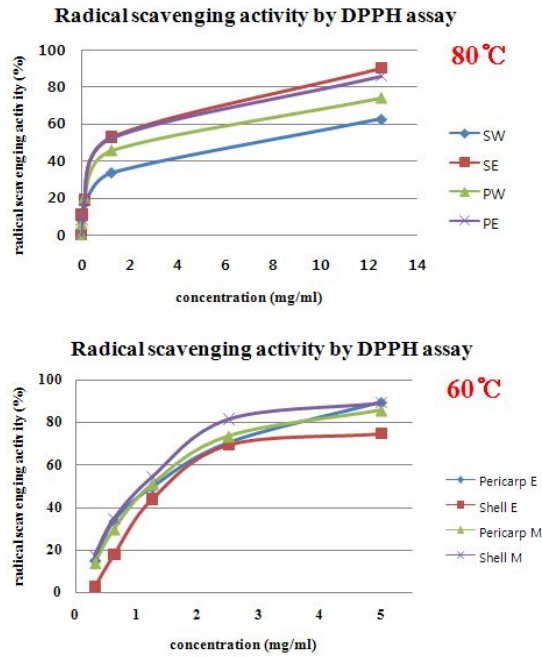


Fig 5. HPLC 분석 결과

(a; hesperidin b; limonin, c; 씨껍질 분획물 d; 과피 분획물)

유자 분획물은 라디칼 소거시키는 항산화 능력은 지표물질보다 효과가 떨어짐을 알 수 있다. 60°C, 에탄올·메탄올 분획물에서의 활성이 다른 시료에 비해 높은 것으로 판단된다 (Fig 6). 목표 물질인 hesperetin, hesperidin, limonin의 라디칼 소거활성 또한 낮았으며, data로 첨부하지 않았다. 항산화능 측정 방법 중 자유라디칼 소거활성은 낮지만 Table 1의 체내에서 생리활성을 가지는 phenol 구조의 성분의 양을 측정한 Total phenol assay는 효과

가 있음을 알 수 있다.



Antioxidant	Scavenging activity (FSC ₅₀)
	Concentration (mg/ml)
L-Ascorbic acid	0.027
Trolox	0.034
Shell water extract (80°C)	7.65
Shell EtOH extract (80°C)	1.16
Pericarp water extract (80°C)	3.03
Pericarp EtOH extract (80°C)	1.16
Pericarp EtOH extract (60°C)	1.28
Shell EtOH extract (60°C)	1.54
Pericarp MeOH extract (60°C)	1.24
Shell MeOH extract (60°C)	1.06

Fig 6. 유자 분획물의 라디칼 소거능

(SW; 씨껍질 물분획물, SE; 씨껍질 에탄올 분획물, PW; 과피 물분획물, PE; 과피 에탄올 분획물)

나. 항노화 및 미백 피부효능평가

1) 재료 및 방법

가) 항노화 피부효능 평가

① 세포독성 및 세포 성장 촉진 효과 평가

사람 섬유아세포 (normal human fibroblast), 각질세포(HaCaT Keratinocyte) 페니실린 (100 IU/mL), 스트렙토마이신 (100 g/mL), 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 넣고 37°C를 유지하며 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양하였다. 수득된 섬유아세포를 6-웰 플레이트에 각 웰당 1×10^5 개로 분주한 다음 세포배양조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후 세포에 유자 분획물을 각각의 농도로 첨가한 후 24시간 배양하였다. 세포수를 측정하여 세포사멸 정도 및 세포 성장 촉진효과를 측정하였다.

② 자외선에 의해 유발되는 염증반응 억제실험

피부각질세포 (HaCaT Keratinocyte)를 페니실린 (100 IU/mL), 스트렙토마이신 (100 g/mL), 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 넣고 37°C를 유지하며 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양하였다. 수득된 피부각질세포를 12-웰 플레이트에 각 웰당 1×10^5 개로 분주한 다음 세포배양조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후 세포에 12.5mJ/Cm²량의 자외선을 조사한 후 유자 분획물을 첨가한 후 24시간 추가 배양하였다. 배양 후 배양 상등액을 회수하여 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 분비량을 측정하였다.

③ 단백질 발현조사 항노화 실험

Normal fibroblasts를 6well plat에 well 당 2×10^5 cells을 접종하고 FBS가 첨가된 DMEM 배지로 24h 동안 배양하고 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 24h동안 starvation 시켰다. 그 후 15mJ/cm²의 UVB를 조사하고 FBS와 penol red가 포함되지 않은 DMEM 배지에 각 농도별 유자추출물을 첨가하고 72h 동안 추가 배양하였다. Normal Fibroblast의 배양이 끝난 후 배양액을 회수하여 bradford assay 방법에 따라 단백질량을 정량 한 후 SDS-PAGE를 진행하였다. 전기영동 후 단백질을 gel에서 PVDF membran으로 transfer한 뒤 1차 antibody와 2차 antibody를 이용하여 단백질을 표지하고 X-ray 필름에 감광하여 단백질 발현 정도를 분석하였다.

나) 미백 피부효능 평가

① 멜라닌 함량 조사

멜라닌 형성 세포주의 하나인 B16F1 melanoma를 1% penicillin-streptomycin 과 10% Fetal bovine serum을 포함한 Dulbecco's modified essential medium을 이용하여 37 °C, 5 % CO₂incubator에서 배양하였다. 5nM의 α -MSH (Melanocyte stimulating hormone) 와 함께 시료를 배지에 농도 별로 처리하여 48시간 동안 추가 배양하였다. Secreted melanin assay 는 Bhatnagar, V., et al.[19]의 방법을 약간 변경하여 참고하였다. 추출물을 처리하고 48시간 동안의 배양이 끝난 후 배지를 회수하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 96well plate에 옮겨 microplate reader (Perkin Elmer, USA) 를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

② 타이로시나제 발현량 조사

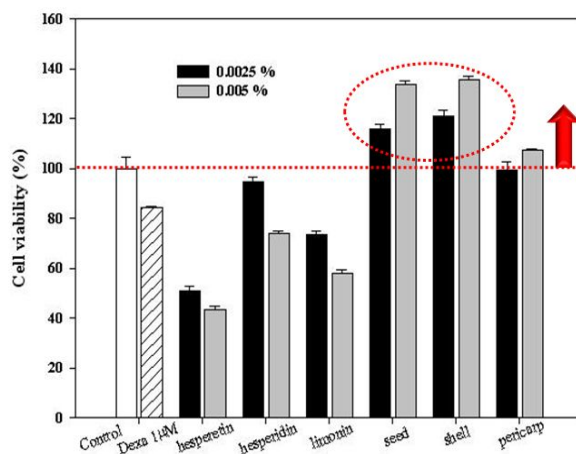
Tyrosinase zymography 는 Kim, K.S., et al.의 방법을 변형하여 참고하였다. 추출물을 처리하고 48시간 동안의 배양 후 RIPA buffer 를 이용하여 cell을 lysis 하였다. Bradford assay 를 통해 β -mercaptoethanol 을 첨가하지 않은 laemmli sample buffer를 이용해 단백질량을 모두 동일하게 보정하였다. 단백질을 가열하는 과정을 생략하고 8% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) 를 한 후에 gel을 0.1M SPB (Sodium phosphate buffer, pH 6.8) 로 30분 동안 shaking 하면서 equilibration 하였다. 한 번의 equilibration 을 추가로 반복한 후에 staining 은 5mM L-DOPA 를 SPB에 녹여 37°C 에서 약 1 시간 동안 발색이 나타날 때까지 반응시켰다.

2) 결과 및 고찰

유자 분획물 0.0025, 0.005% 농도에서 세포 독성은 없으며, 자외선에 대한 세포 성장 촉진효과를 보였다. Hesperidin을 제외한 2가지 목표 물질 25, 50 μ M 농도에서는 세포 독성을 나타내었다. 일반적으로 피부세포, 특히 표피 세포인 각질형성세포(keratinocyte)가 자외선에 조사되면 활성산소종이 형성되며 TNF- α , IL-1 α 등 염증성 사이토카인의 증가와 함께 ERK, JNK 등의 작용으로 AP-1 전사인자가 활성화되면서 일련의 피부노화과정의 진행되는 것으로 알려져 있다 (Fig 7). 따라서 배양중인 keratinocyte에 자외선을 조사하고 함께 생리활성물질을 처리하였을 때 이들 염증성 사이토카인을 감소시

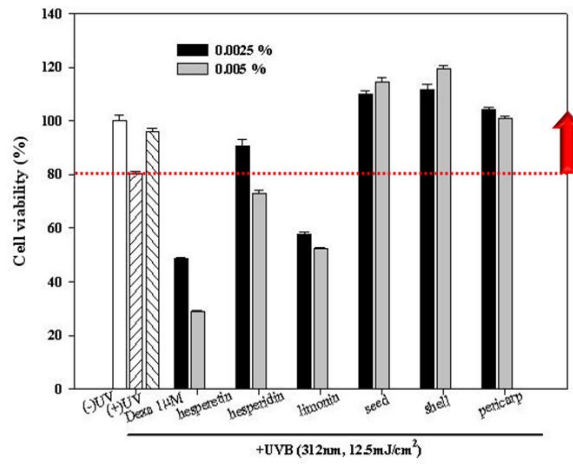
키는 것을 탐색하는 것이 1차적인 과정이다. 자외선에 의해 유발되는 염증 반응 억제실험에서 유자 분획물 0.0025, 0.005% 농도에서 자외선에 의해 분비가 증가되는 염증유발 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 TNF- α 의 분비를 줄여주는 효과가 있다 (Fig 8). MMPs는 matrix components 분해에 중요한 역할을 한다. 특히 MMP-1은 collagenase-1이라고도 하며 Collagen 분해의 주요 원인으로 알려져 있다. 그러므로 유자의 추출물이 MMP-1의 발현량을 줄여주는지 확인했다. Normal Fibroblast를 6well plate에 24h 배양하고 FBS가 포함되지 않은 DMEM으로 24h starvation을 주고 UVB를 15mJ/cm² 조사하였다. 72h 추가 배양한 뒤 배지를 회수하여 western blot 방법을 이용해 MMP-1의 발현량을 확인한 결과 유자에 다량 포함 되어 있다고 알려진 헤스페레틴과 리모닌이 5 μ M과 10 μ M에서 MMP-1의 발현량이 줄어드는 것을 볼 수 있고, 특히 헤스페레틴은 Ascorbic acid 보다 뛰어난 효과를 보였다. 마찬가지로 유자의 씨, 과피 추출물 0.0025%, 0.005%의 농도에서도 MMP-1의 발현량이 감소하는 것을 확인 할 수 있으며 특히 과피 추출물에서 뛰어난 효과를 보였다. MMP-1 발현량의 경우 씨와 과피에서 모두 효과를 보였으나 collagen 합성량의 경우 씨의 추출물에서 시료의 loading량의 차이에 의해 정확한 결과를 논의하기 어려우나 과피의 경우에는 농도가 증가함에 따라 collagen의 합성량도 증가되었다. 위의 결과를 토대로 유자 에탄올 분획물은 항노화 화장품 소재로써 활용가치가 있다고 판단된다.

MTT assay of HaCaT keratinocytes treated with citron extracts



(a)

MTT assay of HaCaT keratinocytes treated with citron extracts (+UV)



(b)

Fig 7. 세포 독성 및 성장 촉진효과
(a; -UV, b; +UV / 지표물질 농도 25, 50 μ M)

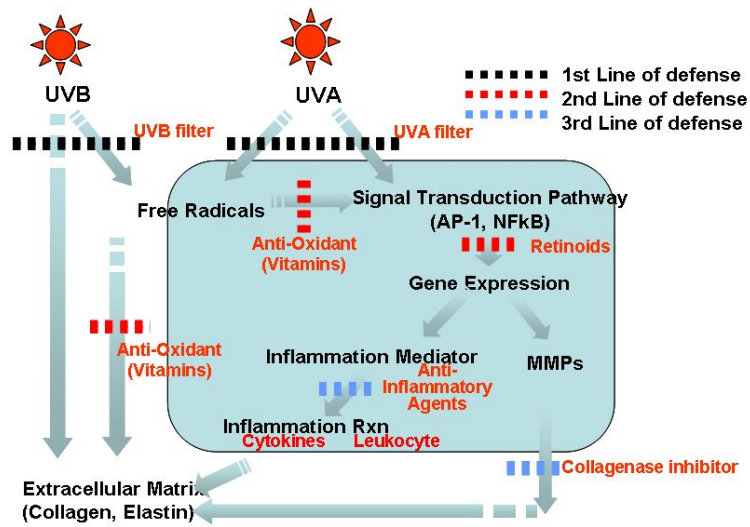


Fig 8. UV에 의한 피부세포 내 광노화 mechanism

Anti-inflammatory activity against UV-induced TNF- α

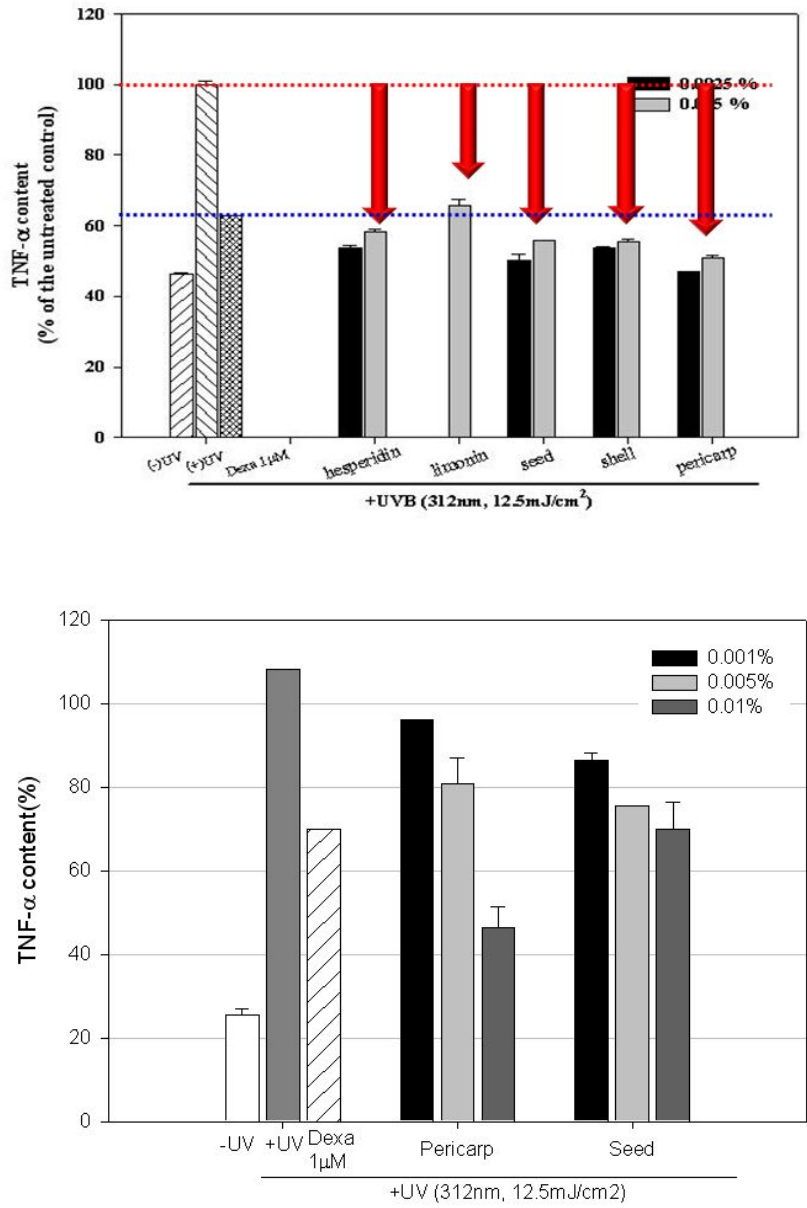


Fig 9. 자외선에 의해 유발되는 염증반응 억제실험

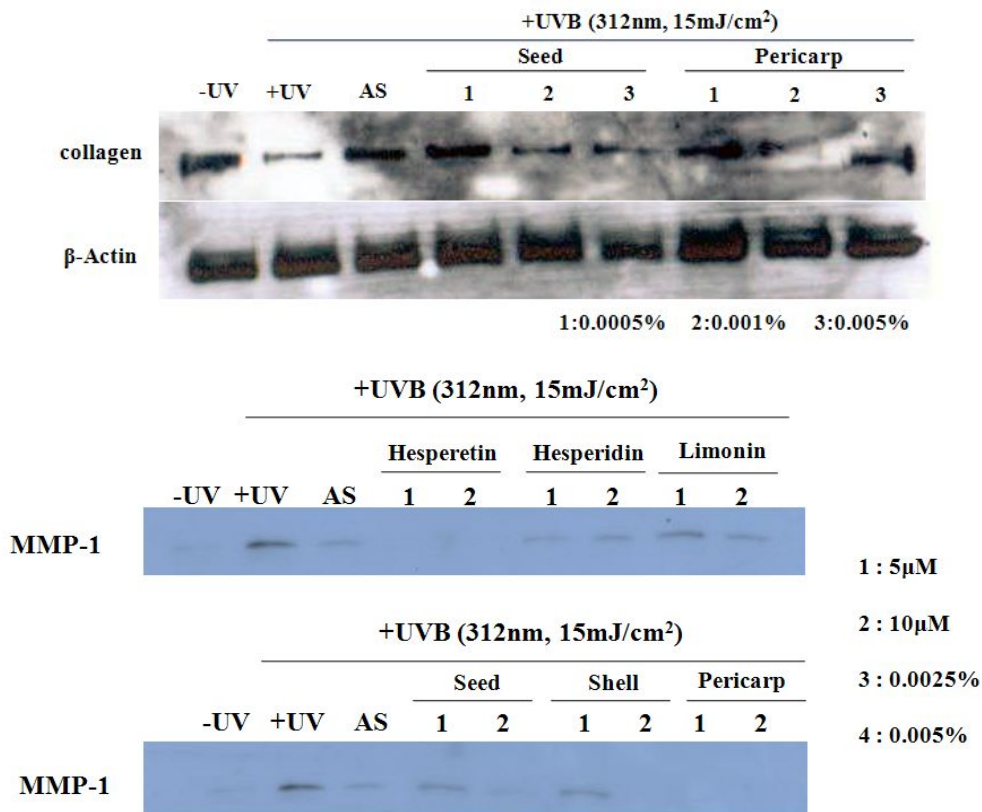


Fig 10. 콜라겐 합성 및 분해 효소 측정 항노화 실험 (Western blot)

B16F1 melanoma cell에 α -MSH와 함께 시료를 배지에 농도 별로 처리하여 48시간 동안 추가 배양하여 분비된 멜라닌 함량을 측정한 결과 유자 분획물 0.01 0.02% 농도에서 α -MSH에 의한 세포 내 분비된 양이 과피와 씨에서 감소함을 알 수 있다. 특히, 0.02%의 농도에서 표준물질인 kojic acid보다 좋은 활성을 나타내었다. 따라서 유자 부산물 중 과피와 씨의 추출물은 멜라닌 분비를 억제하는 강력한 미백활성이 있는 것으로 사료된다 (Fig 8). DS-PAGE 를 통해 gel 상에서 세포 내의 tyrosinase가 L-DOPA 와 반응하여 staining 되어 나타나는 tyrosinase zymography 결과이다. 유자 분획물을 처리한 경우 tyrosinase의 발현이 큰 폭으로 억제되었다. 따라서 유자 부산물은 자체적인 tyrosinase의 발현을 억제시키는 효과가 있음을 알 수 있다 (Fig 9). 위의 결과를 토대로 유자 에탄올 분획물은 미백 화장품 소재로서 활용가치가 있다고 판단된다.

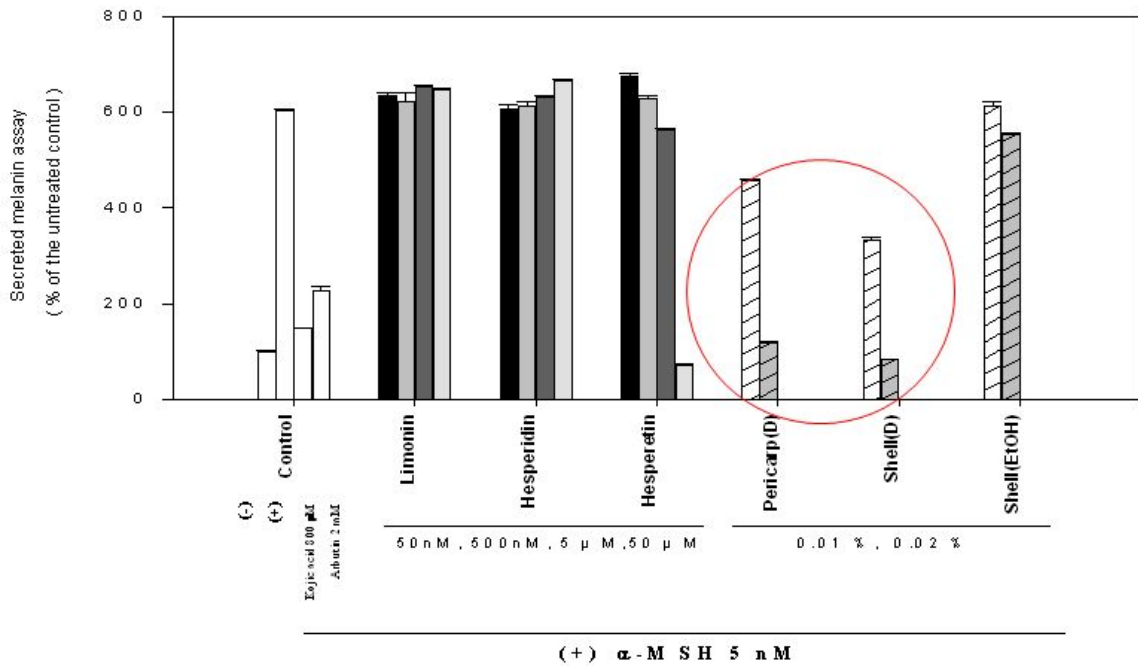


Fig 11. Secreted melanin assay 결과

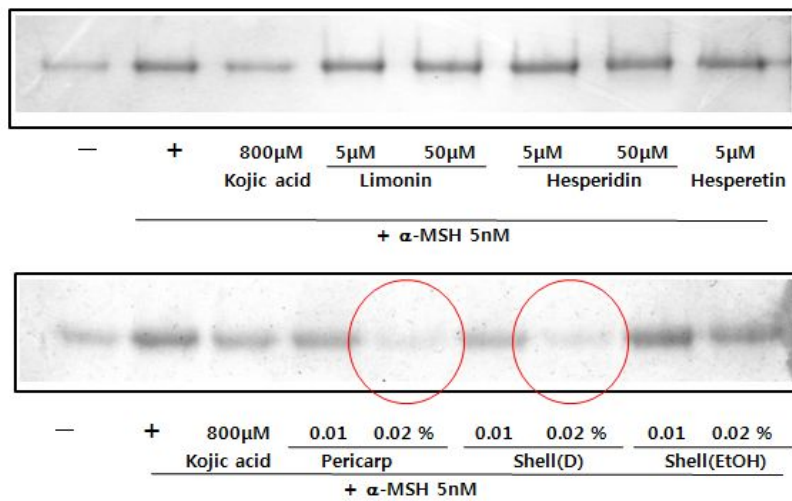


Fig 12. 타이로시나제 저해 활성 측정 결과 (L-DOPA)

다. 발효 가공 및 생물전환기술을 이용한 신규 기능성 화장품 소재개발

1) 재료 및 방법

가) 유자 과피 추출물의 발효조건 확립

유자 과피 내 플라보노이드와 테르피노이드 등 많은 phytochemical 들은 생체 내에서 배당체로서 존재한다. 이들은 섭취된 후에 인체의 장에서 장내세균에 의해 분해되어 비배당체로 전환되면서 그 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 피부에 적용하기 위해서는 배당체를 비배당체로 전환시킨 형태가 되어야 피부침투나 생체 이용률이 높아질 것으로 예상된다. 일반적으로 유산균 등을 이용한 발효과정을 통하면 유산균이 분비하는 β -glycosidase 등의 효소활성에 의해 비배당체로 전환되면서 그 생리활성이 높아지게 된다. 이에 β -glycosidase 활성을 가지는 미생물을 선별하여 발효조건을 확립하였으며 효소로 β -glycosidase 처리조건을 확립하고 이를 process화 하였다.

나) 발효과정 분석 및 HPLC에 의한 변화추적 및 함량 변화 분석

유자 과피 내 flavonoids, limonoids 분석 조건을 변형하여 지표물질의 RT값을 측정하였다. 배당체인 Naringin과 Hesperidin은 6.667, 7.598분에 측정되었고, 비배당체인 Naringenin과 Hesperetin은 41.577, 56.921분에 측정되었다.

- HPLC [Column ; J'sphere ODS-H80, Eluent ; ACN/10mM H3PO4 (20/80)
Flow rate ; 1.0ml/min , Temperature ; 37 °C, Detection ; 280nm]

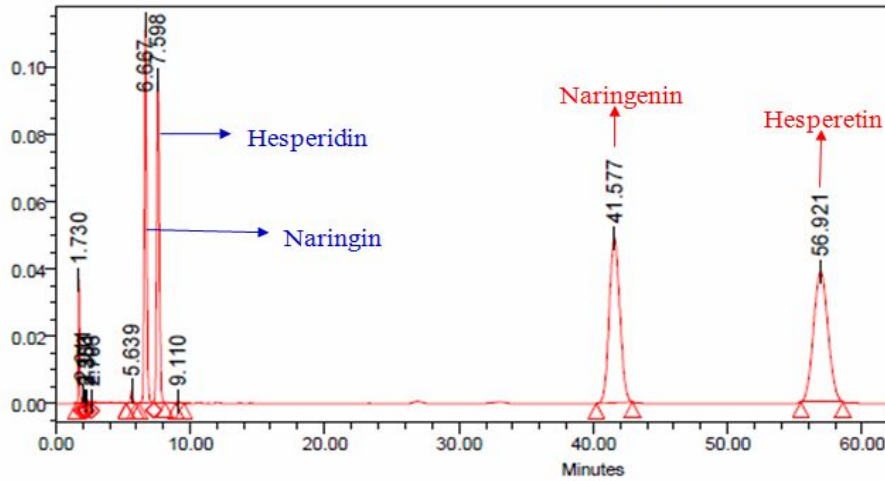


Fig 13. 유자 과피 성분의 지표물질 HPLC 측정

다) 발효물의 단순 추출물과의 피부생리활성 비교분석
항노화 효과, 미백효과와 동일함.

2) 결과 및 고찰

가) 유자 과피 추출물의 발효조건 확립

*Saccharomyces cerevisiae*를 제외한 모든 균체의 활성은 우수하였다 (Fig 14). 균체 외 배지로 활성물질을 분비하는 균주는 3종이었으며, 이 중 균체와 배지 모두에서 우수한 활성을 보인 *Lactobacillus* 1종과 *Streptococcus*를 발효균주로 선별하였다. 또한, 유산균과 효모를 동시에 발효하여 시너지효과를 가질 수 있는 혼합발효와 효소활성을 직접적으로 얻을 수 있는 효소처리 공정을 동시에 진행하였다 (Fig 15). 발효조건을 유자 과피를 사용한 배지의 농도 조건 및 균주 선별, 추출 전 사균화의 유무, 추출 후 용매의 선택의 4가지 단계로 보았다. 유자 과피를 사용한 배지의 농도가 높아질수록 발효 전 멸균 시 열에 의한 과피의 변성이 쉬웠다. 균주의 선별은 위에 언급한 3가지 균주를 선별하였으며, 추출 전 사균화는 유무는 차이점을 판단할 수 없었다. 추출 후 용매의 선택은 밑의 피부효능평가 후 선택할 예정이다. 효소 처리는 Amano社의 α, β -glycosidase 두 종류 이용하여 55 °C, pH 4.0, 2시간 반응 조건을 확립하였다.

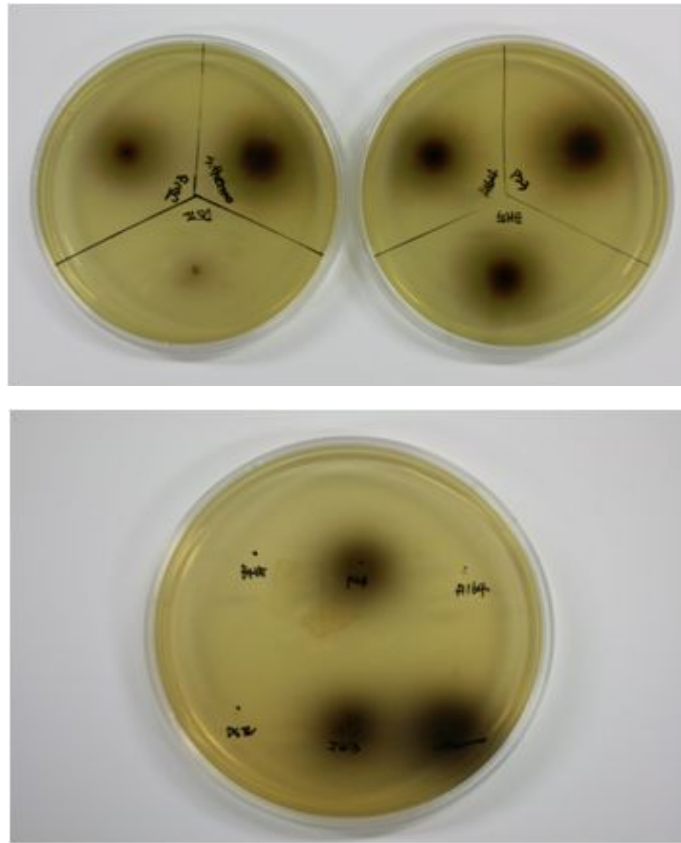


Fig 14. β -glycosidase 활성측정 (균체)

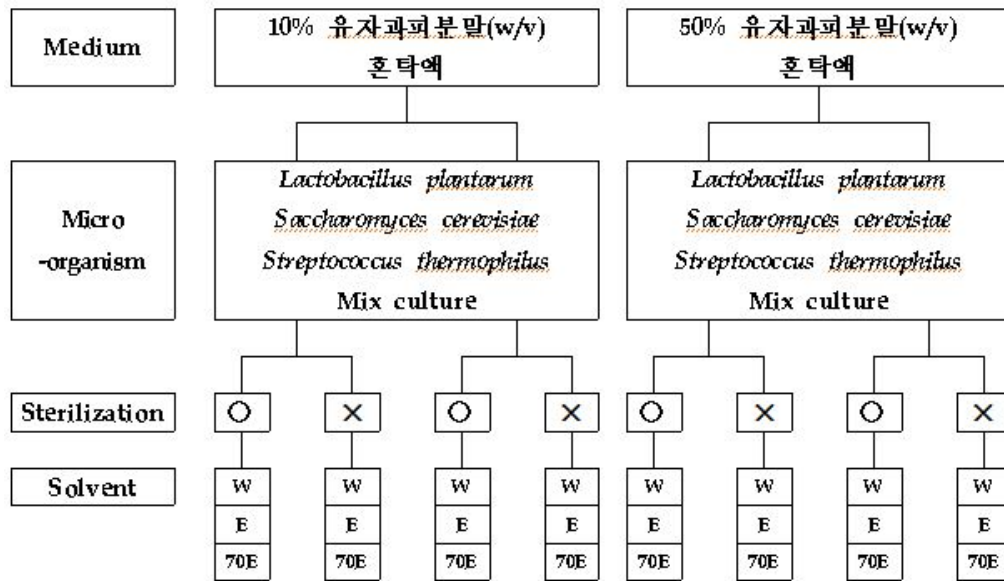


Fig 15. 발효조건 확립을 위한 과정

나) 발효과정 분석 및 HPLC에 의한 변화추적 및 함량 변화 분석

β -glycosidase 활성 평가 시 활성을 보이던 균주인 유산균 2종 및 효모에서 뚜렷한 유자 과피 발효 시 flavonoid 배당체가 비배당화 되는 큰 차이를 측정할 수 없었다 (Fig 16). 비배당화에 의한 생리활성물질 증대의 목표는 이를 수 없었지만, 미생물 발효에 의한 다른 기작으로 신규 생리활성 물질 생성을 예측하여 피부효능 평가를 실시하였다.

효소처리물의 경우 α -glycosidase에 의한 변화는 측정할 수 없었고 β -glycosidase에 의한 비배당화를 볼 수 있었다. HPLC 분석결과 전체적 비배당체로의 전환율은 17.83%였다. Naringin에서 Naringenin (74.56%), Hesperidin에서 Hesperetin (25.25%)의 전환을 보였다 (Fig 17).

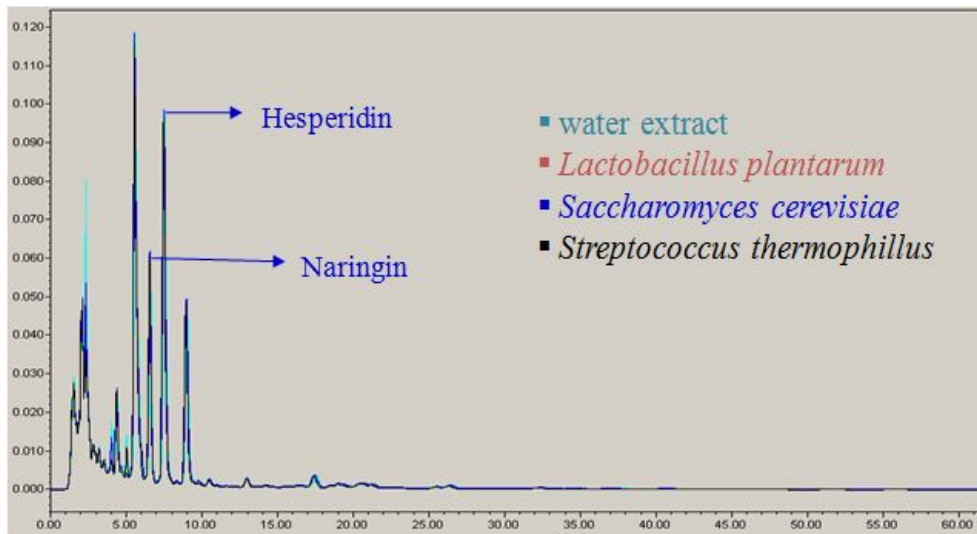


Fig 16. 유자 과피 발효물의 flavonoids 변화 측정

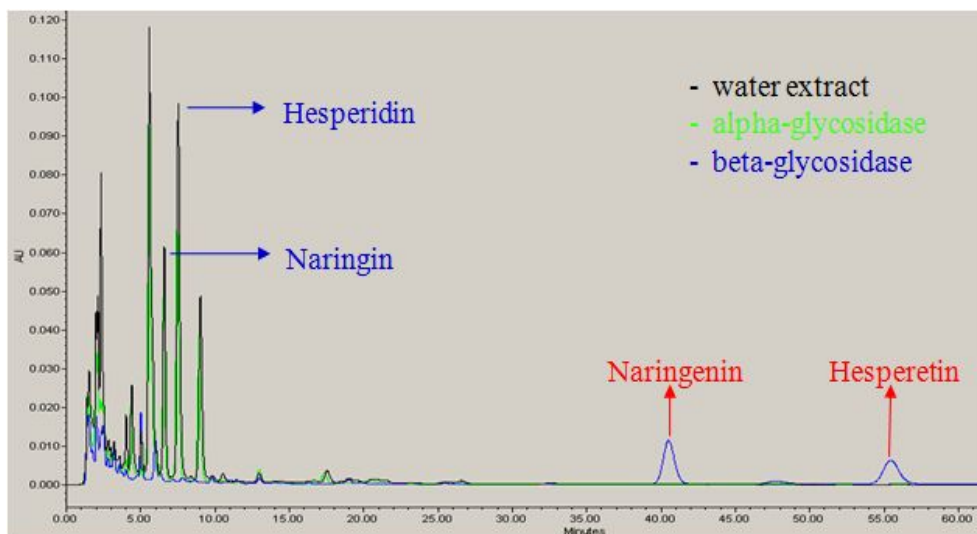


Fig 17. 유자 효소처리물의 flavonoids 변화 측정

다) 발효물의 단순 추출물과의 피부생리활성 비교분석

발효 균주별 발효물의 라디칼 소거 항산화능은 효모와 혼합발효의 경우 낮은 농도에서 유자 과피보다 활성을 증대시켜주는 효과를 보였다 (Fig 18). 이는 새로운 생리활성 물질의 효과가 작용한 것으로 판단된다.

사람 피부 내의 Matrix가 되는 항노화 지표 중 신생콜라겐 합성능 분석 결과, (Fig 19)에서와 같이 유자 과피에 비해 β -glycosidase 효소 처리물의 효과가 같은 농도 범위에서 매우 증가하였다. 이는 비배당화에 의한 생리활

성물질(비배당체)의 증대로 판단된다. α -MSH에 의한 세포 내 분비된 멜라닌의 양은 유자 과피 자체로 활성이 좋았고, 혼합발효 및 효소처리물의 경우 0.01~0.1 % 농도범위에서 유자 과피에 비해 더 좋은 활성을 보였다 (Fig 20).

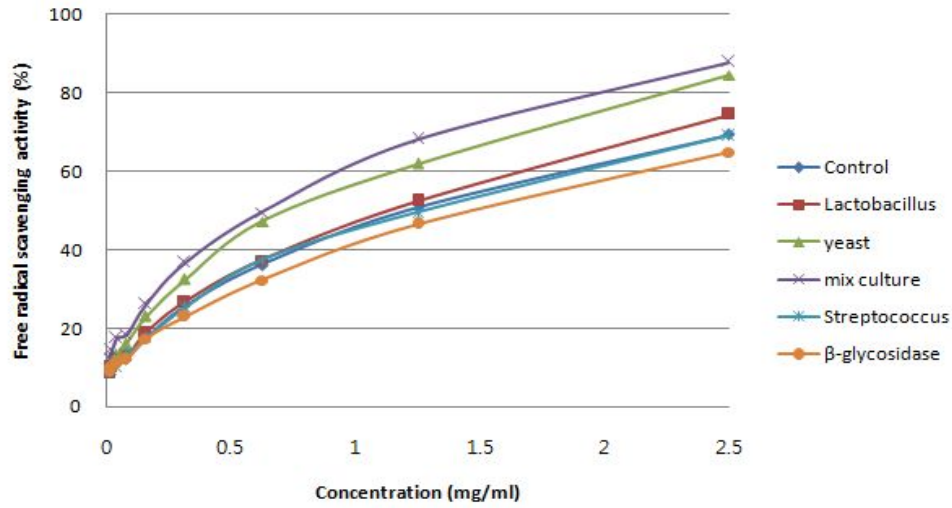
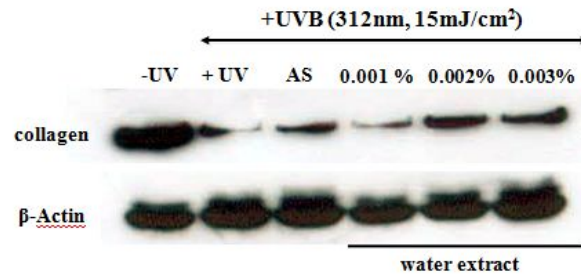
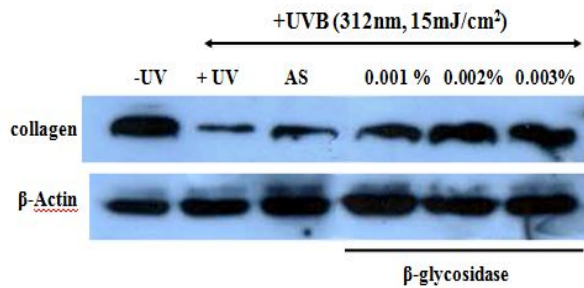


Fig 18. 유자 균주별 발효물의 라디칼 소거능



(a)



(b)

Fig 19. 신생콜라겐 합성능 (a; 유자과피 물추출물, b; 유자과피 효소처리물)

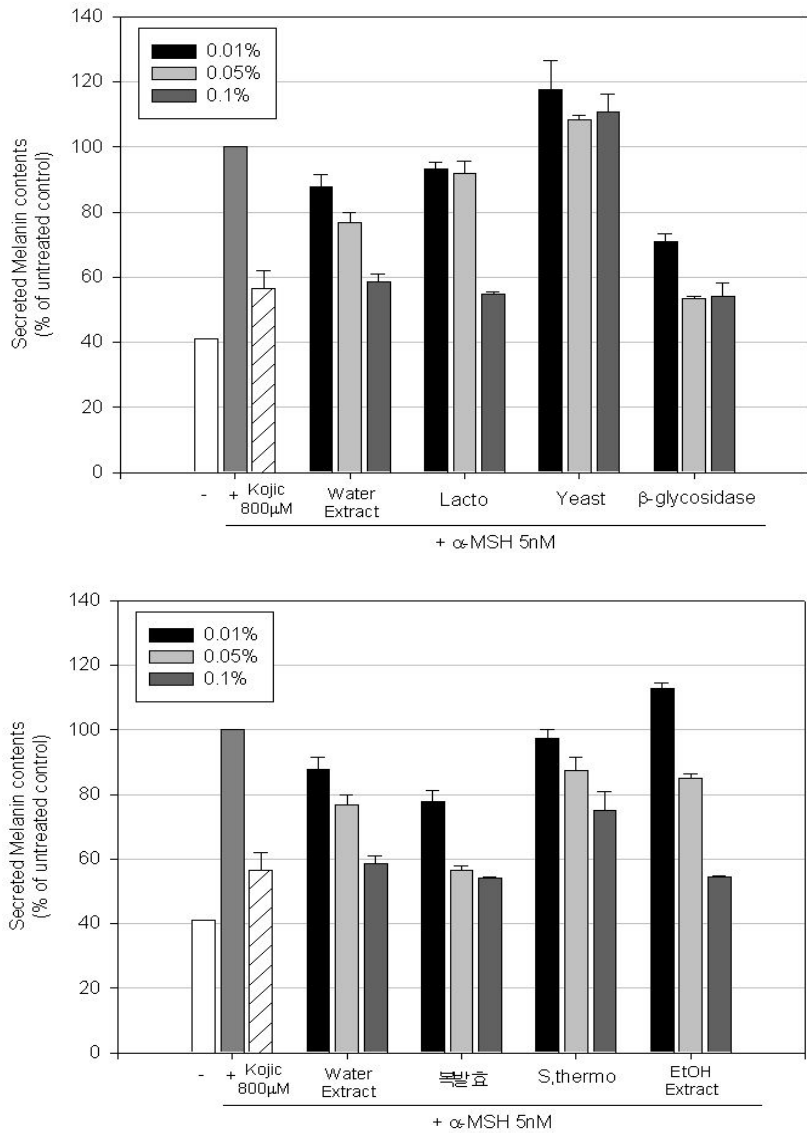


Fig 20. 생물전환기술에 의한 멜라닌 분비능

(라) 피부장벽 효과

피부장벽의 분화 marker를 통한 장벽기능 분석 결과, 유자 과피 자체에서 피부장벽기능을 향상시키는 생리활성 소재가 풍부한 것으로 판단되며 효과가 우수하였다. 생물전환기술 중 효소처리물과 혼합발효는 IVL(involucrin) marker의 분화를 촉진시키는 효과를 보였다 (Fig 21). 사람을 대상으로 Tape Striping으로 장벽기능을 손상시킨 후 유자 과피 및 생물전환기술에

의한 0.1% 시료를 처리하였다. 유자 과피에 비해 효소처리물 및 효모 발효물은 뛰어난 복원 효과를 보였다 (Fig 22).

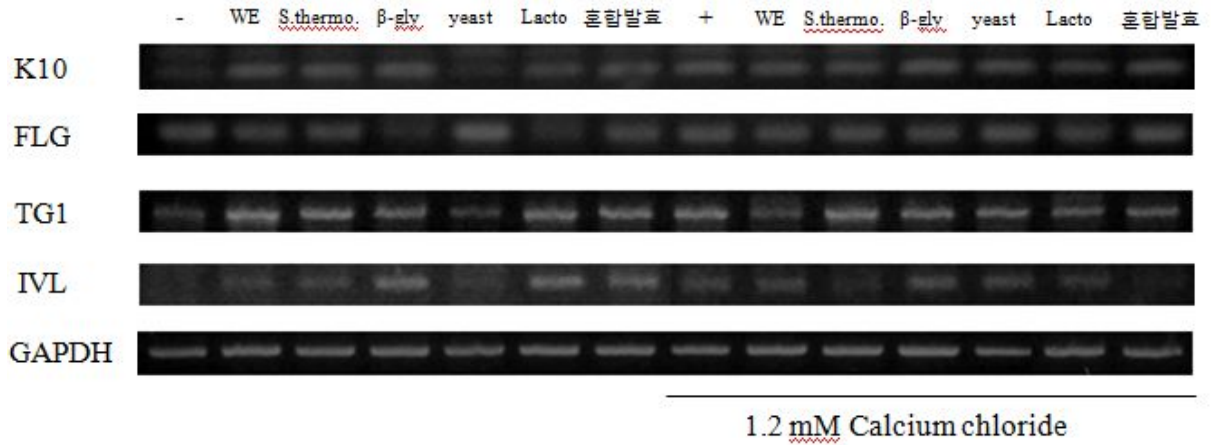
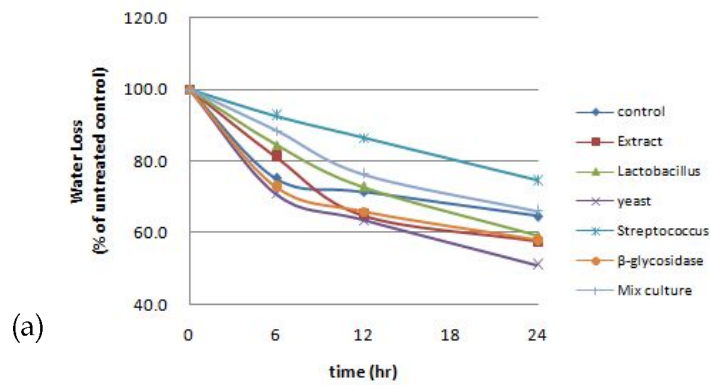
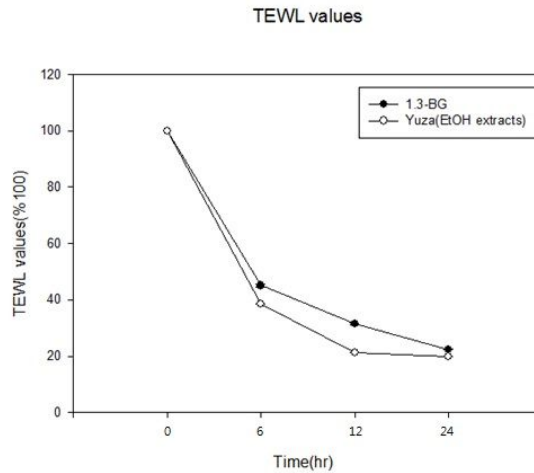


Fig 21. RT-PCR을 이용한 피부장벽 분화 Marker 분석





(b)

Fig 22. 각 시료별 피부장벽복원 효과
(human subject)

(a) 생물전환기술을 이용한 유자 추출물, (b) 유자 Ethanol 추출물

이상의 결과에서 유자 과피 추출물은 항노화 및 미백효능을 지니며, 피부장벽 회복에도 좋은 효과가 있음을 확인하였다. 또한, 비배당화는 β -glycosidase 효소의 처리에 의해서만 전환되었고 발효에 의해서 전환되지 않았다. 하지만 발효와 효소처리 공정에서 혼합발효 및 효소 처리에 의한 항산화, 항노화, 미백, 피부장벽 개선효과가 나타났으며, 이는 생물전환기술에 의한 결과로 판단되어진다.

라. 지방세포를 이용한 Lipid accumulation 감소 효능 평가

1) 재료 및 방법

가) Cell culture

MTT assay를 이용하여 지방세포에 대한 유자 분획물의 세포독성을 확인하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 세포의 환원효소(주로 미토콘드리아에 존재)에 의해 formazone의 청자색 결정을 형성함으로써 살아있는 세포의 양을 알 수 있는 유용한 방법이다. MTT assay는 유자 분획물의 처리가 끝난 2day에 실시 되었다.

나) Cytotoxicity MTT assay

MTT assay를 이용하여 지방세포에 대한 유자 분획물의 세포독성을 확인하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 세포의 환원효소(주로 미토콘드리아에 존재)에 의해 formazone의 청자색 결정을 형성함으로써 살아있는 세포의 양을 알 수 있는 유용한 방법이

다. MTT assay는 유자 분획물의 처리가 끝난 2day에 실시 되었다.

다) Oil-Red O staining

Oil-Red O staining은 용해도 차를 이용해 용매에 녹아있던 Oil-Red O가 용해도가 더 높은 지질에 녹아 들어가는 원리를 이용한 염색법이다. Oil-Red O staining은 지질의 축적이 끝난 8day에 실시 되었다. 방법은 먼저 배지를 제거 후 $\times 1$ phosphate buffered saline(PBS)로 씻어 준 다음 10% formalin에 고정 시킨다. 그 후 Oil-Red O working solution을 넣어 20분간 염색하고, 100% Isopropanol을 이용 염색된 Oil-Red O를 녹여 낸 후 520nm에서 ELISA-Reader를 이용하여 흡광도를 측정한다.

2) 결과 및 고찰

MTT assay 결과 pericarp ethanol extracts에서 0.025%까지 cytotoxicity가 없는 것으로 나타 났고, 해당 농도에서 아무런 처리도 하지 않은 성숙한 Adipocyte 대비 약 28%의 lipid accumulation 감소 효과가 있는 것으로 나타났다. pericarp water extracts의 경우에는 농도가 높아질 수록 cell viability가 증가하는 경향이 나타났지만, lipid accumulation의 감소에는 거의 영향을 끼치지 못했다. 그리고 lipid accumulation의 감소에 있어 differentiation 단계에서 Sample을 처리했을 때는 lipid가 감소하는 경향이 나타났지만, maintenace 단계에서 Sample을 처리했을 경우에는 감소하는 경향을 보이지 않았다. 따라서 pericarp ethanol extracts는 lipid accumulation 감소에 water extracts보다 효과가 더 좋으며 그 저해 방법에 있어서는 지방 세포의 differentiation 단계에서 저해하고 이에 따라 lipid accumulation을 감소 시키는 것으로 생각할 수 있다.

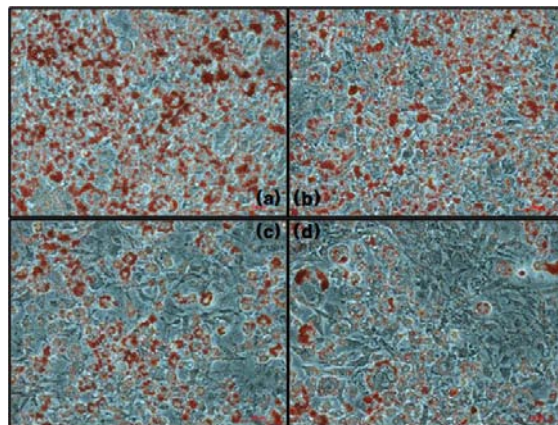


Fig 23. pericarp ethanol extracts로 처리한 지방세포의 현미경 측정 사진.($\times 200$)

<(a): matured adipocyte (b) : 0.005% ethanol extracts (c): 0.01% ethanol extracts (d) : 0.025% ethanol extracts>

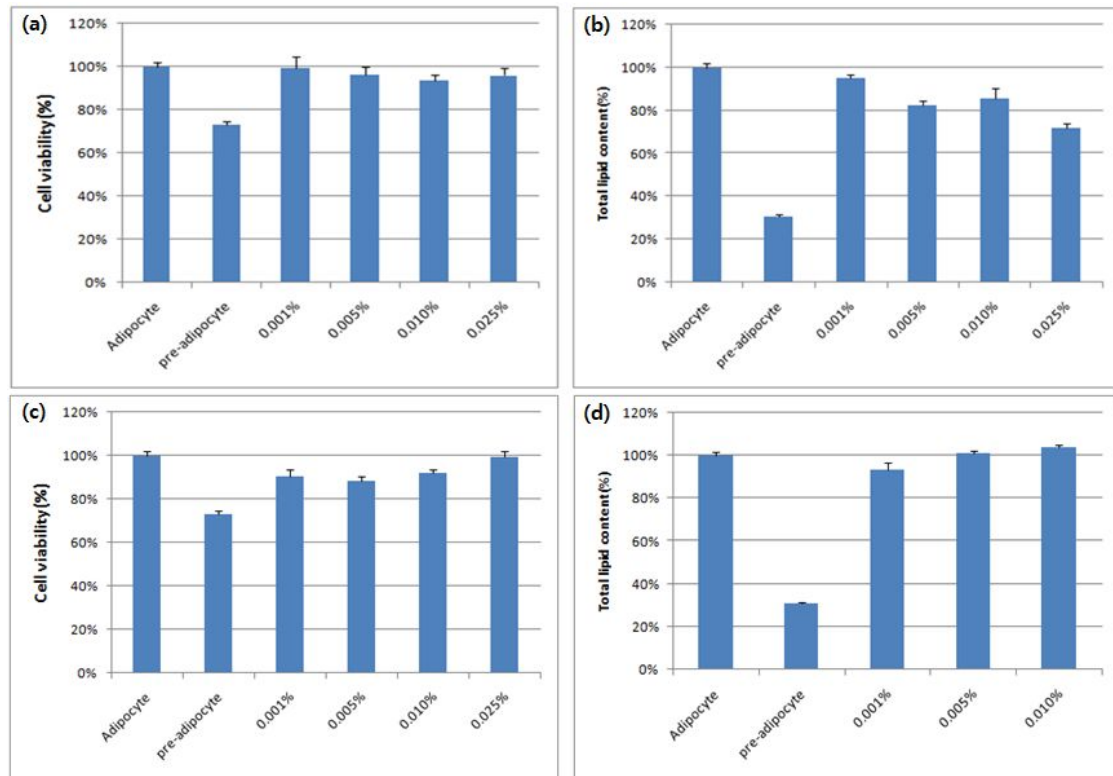


Fig 24. pericarp ethanol extracts 와 pericarp water extracts의 cytotoxicity 결과 및 Oil-Red O Optical Density(OD)측정을 통한 Total lipid content. <(a): ethanol extracts cell viability graph, (b) : ethanol extracts (c): water extracts cell viability graph, (d) : water extracts total lipid content>

마. 기능성 유자 성분의 선별 및 UV 보호효능 평가

1) 재료 및 방법

가) 기능성 유자 분획물의 선별 및 세포독성 확인

기능성 성분 rapid screening을 위해 19가지 기능성 후보 분획물을 같은 농도(각 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 직접 세포에 처리하여 UVA, UVC에 대한 광보호 효능 (UV protection)을 보이는 지 세포의 미토콘드리아 탈수소효소작용을 통해 세포의 생존율을 수치화하여 나타내주는 MTT assay를 이용해 확인하였다. 사람각질세포(HaCaT cell)를 4.0×10^3 cells/well 씩 96well에 분주하고, 각 well당 200 μL 씩 샘플을 처리하여 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한다. MTT 용액(5 mg/mL) 10 μL 를 각각의 well에 처리하여 3

시간 동안 배양한 후, MTT를 suction하여 DMSO를 200 μ L 처리하고 10 분 동안 shaking 후, O.D(optical density)값을 ELISA reader(Molecular Devices, USA)를 이용해 570nm에서 측정 한다. 분석한 결과를 토대로 11 번 (열풍건조, ethanol 50% dichloromethane 50%추출), 19번 (동결건조, ethanol 50%, dichloromethane 50%) sample을 선별하였다.

나) 유자의 분획물 및 지표물질의 세포학적 독성 확인

UVA 및 UVC 손상에 대해 세포보호를 나타냈던 유자의 분획물 및 생리활성 지표물질의 세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포핵을 염색시키는 propidium Iodide(PI) 염색으로 세포의 생존 및 세포핵의 분절현상을 확인하였다. 사람각질세포(HaCaT cell)를 glass chamber slide에 배양한 후, sesamin을 처리하여 24시간 동안 CO₂ incubation 한다. 4 % formaldehyde를 넣어 암세포를 20분간 고정시킨 후, 0.5 M glycine을 넣고 5분씩 3번 세척한다. washing한 chamber를 건조시킨 다음 2 μ g/mL DAPI를 넣고 5분 동안 incubation 시킨다. chamber 유리를 뜯어내고 DAKO®Fluorescentmountingmedium을 chamber의 각 칸마다 한 방울씩 떨어뜨린다. Coverglass로 덮고 형광현미경으로 세포핵을 관찰한다.

다) 유자의 분획물 및 지표물질이 나타내는 세포주기 변화 분석

세포의 DNA를 염색시키는 PI를 처리하여 세포분석기인 flow cytometry를 통해 정량적 cell sorting을 함으로써 세포주기를 나타낸다. 대조군과 선정된 최적의 농도가 처리된 실험군 세포를 24시간 동안 배양한 다음, PBS로 세척하고 -20 $^{\circ}$ C 에탄올로 16시간동안 고정시킨다. 다시 PBS로 세척한 다음 PI agent(0.1% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 50 μ g/mL RNase A 그리고 50 μ g/mL propidium iodide)를 첨가하여 반응시킨다. 형광은 FAC scan laser 유속세포측정기를 사용하여 측정하여, Becton Dickinson software(Lysis II, Cellfit)를 사용하여 분석한다. 이를 통해 정량화된 정상적인 세포주기와 UV 손상 입은 세포의 주기를 확인해 봄으로써 hesperetin, hesperidin, 유자 분획물이 세포주기에 미치는 영향 및 세포주기 보완에 따른 UV protection 효능을 검증하였다.

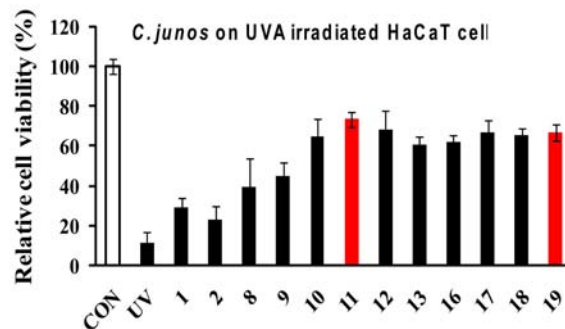
라) 세포사멸(Apoptosis)측면에서의 유자 분획물 및 지표물질이 나타내는 UV 보호 효과

Apoptosis 현상은 세포의 자발적 사멸을 유도하여 손상 입은 이상 세포의 무분별한 증식을 억제하는 세포학적 방어기작으로 손상 입은 세포의 측정 및 보호효과를 보기 위해 apoptosis assay를 수행하였다. 대조군 및 실험군 세포를 100mm 배양접시에 분주한 다음 24시간 동안 배양하고, 유

착 세포와 부유 세포를 결합시켜 산화적 스트레스 유발 시 발생하는 apoptosis를 Annexin V/PI staining을 통해 분석한다. 이 분석은 세포막에 결합하는 염색시약인 Annexin V-FITC와 세포핵과 결합하는 propidium Iodide(PI) 처리 후 apoptotic cell에서 발견되는 phosphatidylserine의 외전(surface exposure)을 검출함으로써 flow cytometry를 이용해 정량적 cell sorting을 수행함으로써 apoptosis를 측정 한다.

2) 결과 및 고찰

세포학적 수준에서 UVA, UVC에 대해 사람각질세포(HaCaT cell)에 대한 보호 효능을 보이는 sample은 UVA 손상에 대해서는 11번 (열풍건조, ethanol 50% dichloromethane 50%추출), 19번 (동결건조, ethanol 50%, dichloromethane 50%) sample이 약 70%정도로 세포생존율을 보였고, UVC 손상에 대해서도 마찬가지로 11번 (열풍건조, ethanol 50% dichloromethane 50%추출), 19번 (동결건조, ethanol 50%, dichloromethane 50%) sample이 세포보호효과가 뛰어났고, 일반세포보다 세포 보호 효과 뿐 아니라 세포활성 효능이 뛰어난 것으로 나타났다. 또한 유자의 생리활성 지표물질로 알려져 있는 hesperidin의 세포활성측정을 한 결과 세포독성은 없었고, 농도 의존적으로 세포사멸을 억제하는 결과가 나왔다. 이를 통해 유자의 선별된 분획물 및 유자의 생리활성 지표물질인 hesperidin의 세포 보호 효과를 확인 하였다.



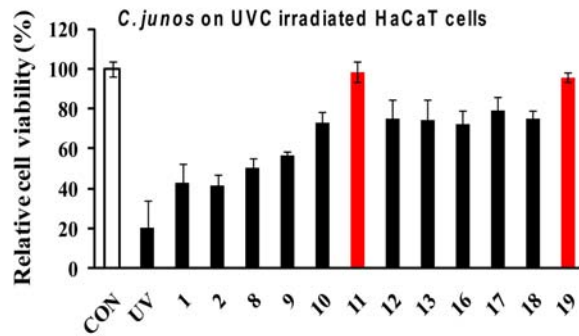


Fig 25. UVA 및 UVC에 대한 기능성 분획물의 효능

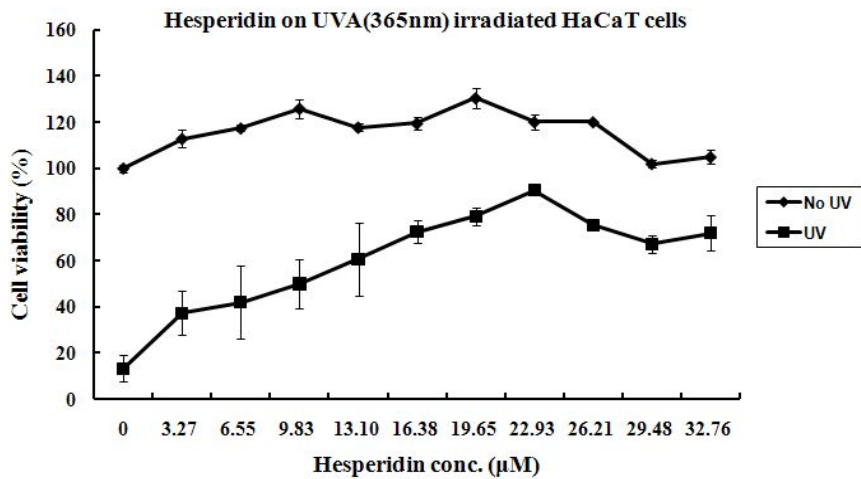


Fig 26. 항산화 지표물질 hesperidin의 농도별 UVA에 대한 세포 생존률

UVA 및 UVC 에 대한 유자의 생리활성물질인 hesperidin, hesperetin 및 유자 분획물 No. 19의 세포에 미치는 영향을 확인한 결과 UV의 손상에 의한 세포핵의 분절현상을 유자가 줄여주는 것으로 확인하였다.

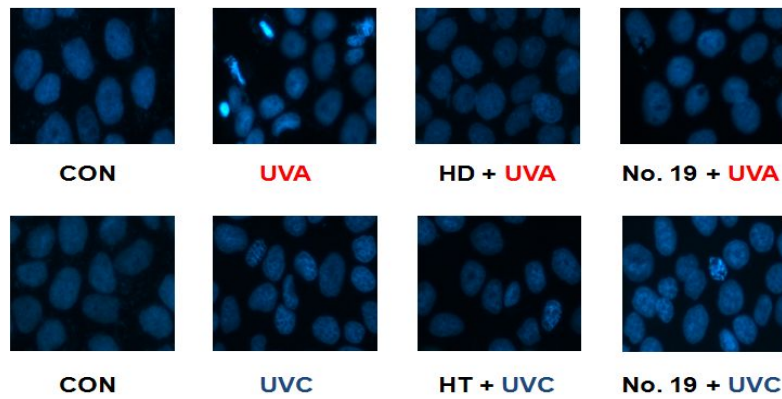


Fig 27. DAPI staining법을 통한 세포적 수준에서의 기능성 분획물의 UV protection 평가

선별된 분획물의 세포적 수준에서의 광보호 효능을 평가하기 위해 세포 주기를 분석하였다. UV 손상을 입은 세포의 주기는 S phase 축적을 매개하여 손상 입은 세포의 주기가 원활히 순환되지 않게 해 세포의 사멸을 유도한다. 이에 대한 세포사멸 억제 효과를 나타내었던 유자 분획물 및 생리활성 물질의 세포주기를 분석한 결과 UVA 손상에 대해서는 hesperidin, UVC 손상에 대해서는 hesperetin 및 유자 분획물 No. 19에서 손상 입은 세포주기를 정상세포주기로 보완하려는 것으로 확인하였다.

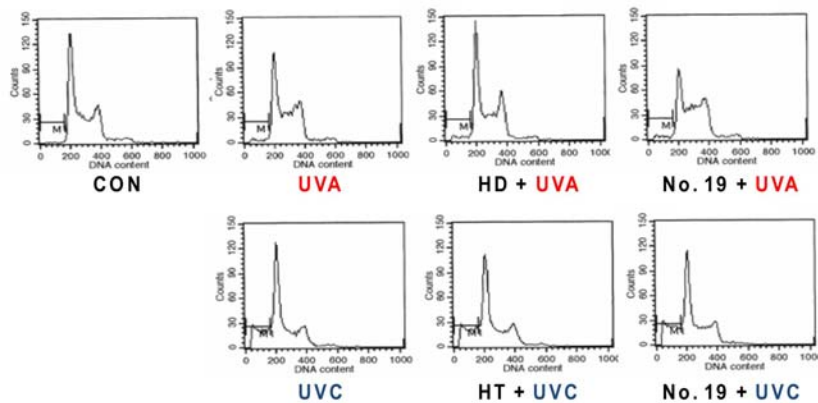


Fig 28. 세포적 수준에서의 기능성 분획물의 cell cycle 분석을 통한 UV protection 평가

Apoptosis 패턴 분석을 통한 기능성 분획물의 UV protection 평가를 한 결과 세포적 수준에서 평가된 기능성 분획물의 apoptosis 패턴 분석을 통하여 UVA와 UVC 손상에 의해 유도되는 세포사멸 완화에 유자분획추출물

No. 19 sample이 효과가 있다.

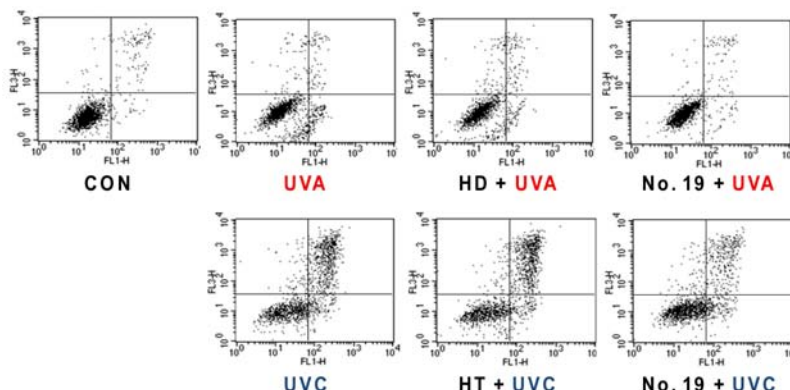


Fig 29. Apoptosis 패턴 분석을 통한 분획물의 UV protection 평가

바. 유자의 다기능성 평가 작용 확인

1) 재료 및 방법

가) 유자 함유 항산화 효능 지표물질의

라디칼 소거능 평가 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)에 의해 생성된 free radical 소거능을 측정하는 방법으로 96 well plate의 각 well당 80% EtOH에 녹인 200 μM DPPH 용액 100 μL와 시료 100 μL를 넣고, 30분간 빛을 차단하여 반응시킨 후, 492 nm에서 흡광도를 측정한다. 소거능은 다음 수식에 의거하여 계산 측정한다. DPPH 소거능(%)=[1 - {(492nm,sample - 492nm,blank - 492nm,standard)/492nm,control}]× 100. 이렇게 수치화한 생리활성물질의 라디칼 소거능을 바탕으로 DPPH 용액을 이용한 수소이온의 라디칼 소거능 활성도를 측정하여 유자생리활성물질의 항산화능을 측정한다.

나) 기능성 분획물의 세포내 항산화 효능 평가 및 고찰

쥐섬유아세포 (Mouse Embryonic Fibroblast, MEF), 사람각질세포 (HaCaT)를 대상으로 세포활성측정방법인 MTT assay를 통해 다양한 세포주에 대한 보호효과를 확인함으로써 유자의 다기능적 기능인 항산화 효능 및 항암효능의 간접적인 검증을 하였다.

2) 결과 및 고찰

2가지 다른 세포주 (MEF, HaCaT)를 이용하여 기능성 분획물의 세포내 항산화 효능 평가 시, MEF cells에 대해서는 sample 11번의 미약한 효능을 확인할 수 있었으나 HaCaT cells에 대해서는 세포내 항산화 효과를 확인할 수

없었다.

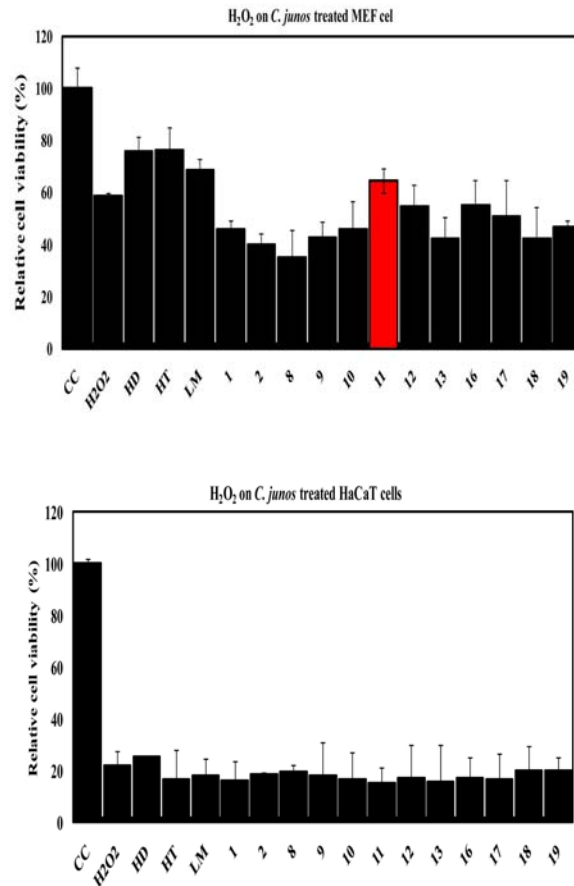


Fig 30. 기능성 분획물에 따른 세포내 항산화 효능 평가

기능성 유자 분획물의 선별을 위한 세포실험 결과로 19번 분획물 (동결 건조, ethanol 50%, dichloromethane 50%)의 항산화, UV protection 효과가 가장 우수한 것으로 선별 하였다. 세포내에서 UV 손상이 매개하는 산화적 스트레스와 세포 노화, 종양형성이 상호 관련이 있으므로 유자의 분획물은 항산화, 항노화 및 항암 효능의 멀티기능성을 가질 것으로 사료된다.

사. UV 손상에 대한 유자분획물 및 Hesperetin의 보호 기작 규명

1) 재료 및 방법

가) 유자 및 hesperetin 세포 보호 신호전달 기작 규명

세포학적 손상 신호전달기작과 연관 있는 단백질 중 p53, pJNK, pERK의 발현을 항원-항체 반응인 western blot을 이용하여 발현양을 측정하였다. 하루 동안 배양된 HaCaT cell에 UVA (20mJ/cm²) 손상을 준 다음 24 시간 동안 hesperetin 및 유자분획물을 처리한 세포에서 단백질을 추출하

였다. BCA protein assay를 이용하여 단백질을 정량한 다음 정량한 단백질을 SDS-PAGE 전기영동으로 단백질을 분리, PVDF membrane으로 transfer한다. p53, pJNK, pERK antibody를 부착 후 enhanced chemiluminescence(ECL)로 발색시켜 X-ray film으로 감광하여 시각화한다.

나) 유자분획물 및 hesperetin 총체적 세포 보호 신호전달 기작 규명

세포를 100-mm 세포배양dish에서 하루 동안 배양시킨 다음, trypsin을 처리하여 부유세포 및 부착세포를 모은 후, lysis buffer (8 M Urea, 40 mM Tris, 4%(w/v) nonidet P-40, and 0.5 mM PMSF)를 처리하여 세포의 단백질을 분리, 추출한다. 세포의 추출한 단백질을 2-D clean-up kit (Amersham Biosciences, USA)을 사용하여 정제한 다음, Immobilinetr Drystrip (pH3-10NL, 18 cm; GE Healthcare Bio-sciences AB, Sweden)을 이용해 pH별 1차적인 단백질 분리 과정을 시작한다. 1차적인 분리가 완성된 Immobilinetr Drystrip을 10% polyacrylamide gel 상에서 전기영동 ((electrophoresis system)(Bio-rad, USA))을 이용하여 단백질 크기별 분리를 한다. 그 후 2차원적으로 분리된 총체적인 단백질의 가시화를 위하여 silver staining을 하고, 나타난 단백질의 발현양상을 mageMaster 2D Platinum Software version 5.0 (GE healthcare Bio-sciences AB, Sweden)을 통해 확인하고, 그 발현양상이 구별되는 protein들을 선별하여 Peptide mass fingerprinting을 통해 동정하여 선별된 단백질의 name, Taxonomy, pH, MW(molecular weigh)을 확인하였다.

다) 세포독성 평가를 통한 전임상 테스트 동물실험 가능성 확인

세포학적 독성 알아보는 다음 방법으로 trypan blue dye exclusion cell counting assay를 수행하였다. 배양한 HaCaT cell을 6 well에 1.0×10^5 cells/ml 또는 2.0×10^5 cells/ml 씩 분주하고 24시간 동안 37 °C, 95 % air/ 5 % CO₂에서 incubation한 후 각 well을 1×PBS로 washing 하였다. 1×PBS를 제거한 후, 각 well에 적합한 UVA, UVB 그리고 UV 손상 후 유자의 분획물 및 hesperetin을 적정 농도로 처리해 주어 세포학적 수준에서의 보호기능을 확인해보도록 하였다. 각 well에 0.25% Trypsin-EDTA 250 μ l씩 처리하여 바닥에 붙은 cells을 떼어내었다. Cell이 떨어지는 것이 확인되면 6 well에 1 ml media 넣어 Trypsin-EDTA를 중화시켰고, 중화된 것을 1.5 ml tube에 각 well로부터 떼어낸 cell을 모았다. Centrifugation (4 °C/1500 rpm/5 min)을 한 후, medium을 suction하고 1×PBS 1 ml을 넣고 pipetting을 하여 cell을 완전히 resuspension 시켰다. Resuspended cell 0.1 ml과 0.1 ml의 0.4% trypan blue (1:1)를 섞은 뒤,

상온에서 5 min 동안 incubation 하였다. Hemocytometer를 사용하여 cell counting을 하였다. Trypan blue로 염색되지 않은(viable cells) 세포만을 counting하였다. 총 3번의 cell counting 을 실시하였고 아래의 식을 사용하여 1 ml당 살아있는 세포의 수를 계산하였다.

2) 결과 및 고찰

Western blot법을 통한 단백질 발현 수준에서의 기능성 분획물의 UV protection 평가 하였다. 기능성 분획물을 이용한 광보호 효능 (UV protection)을 단백질 발현 수준에서 유자분획물 및 hesperetin의 세포학적 신호전달 보호기작을 확인하였다. UVA 조사에 의한 산화적 스트레스는 조사 후 유자 추출 분획물을 농도별로 처리한 것에 따라서 p53의 단백질 발현량이 감소된 것으로 보아 분획물에 의한 광보호 효과는 p53의 발현량을 감소시킴으로써 세포의 apoptosis를 조절하는 방향으로 나타났다. 또한 hesperetin에 대한 광보호 효능은 pERK의 발현양상이 농도 의존적으로 나타난 것으로 보아 hesperetin은 ERK1/2 protein의 phosphorylation에 의한 활성화를 방해함으로써 세포학 산화손상을 줄이는 것으로 확인하였다. 이는 유자분획물과 hesperetin이 UV 손상에 대한 보호효능을 나타내지만 그 보호기작은 각각 다른 세포학적 신호전달 기작에 의한 것이라는 것을 나타내준다.

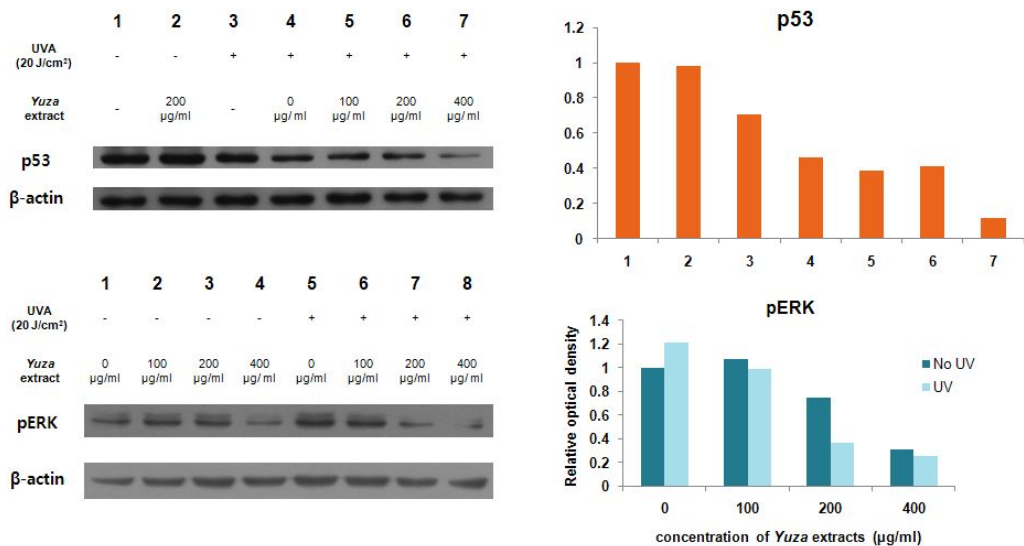


Fig 31. 단백질 발현 수준에서의 기능성 분획물의 UV protection 평가

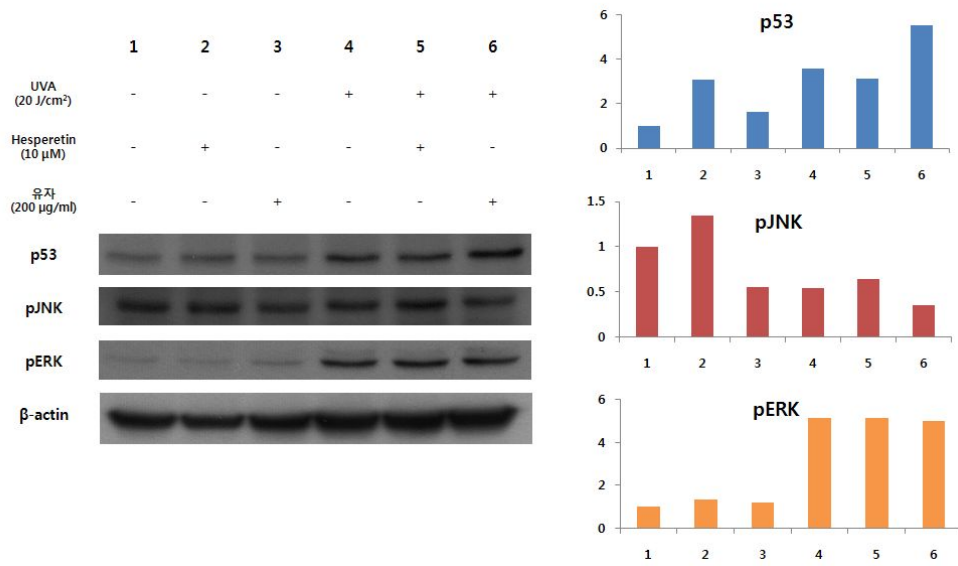


Fig 32. UVA에 대한 광보호 지표물질 hesperetin과 유자 추출 분획물의 효능

UVA 조사 후 유자 추출 분획물을 처리하였을 때 발생하는 총체적 단백질 발현양의 차이를 2D electrophoresis법을 통해 확인하였다. 세포 내 총체적 단백질 발현 패턴을 분석한 결과 다수의 단백질 발현에 있어 큰 차이가 나타나는 것을 image 분석법을 통해 확인, mass spectrometric analysis 방법을 통하여 일부를 동정한 결과 암을 유발하는 onco protein으로 알려진 protein SET과 미토콘드리아 대사 과정에 관계가 있어 보이는 gene으로부터 생성된 것으로 생각되는 protein을 검출하였으며, 세포내에서 UV 손상이 매개하는 산화적 스트레스와 세포 노화, 종양형성이 상호 관련이 있으므로 이와 같은 사실들을 근거로 유자의 분획물은 항산화, 항노화 및 항암 효능의 멀티기능성을 가질 것으로 사료된다. 또한 그 외 다수의 단백질 조절, 연관 관계를 밝힘으로써 유자 추출 분획물의 다양한 효능 효과에 대한 분자 생물학적 근거를 유추해 볼 수 있다.

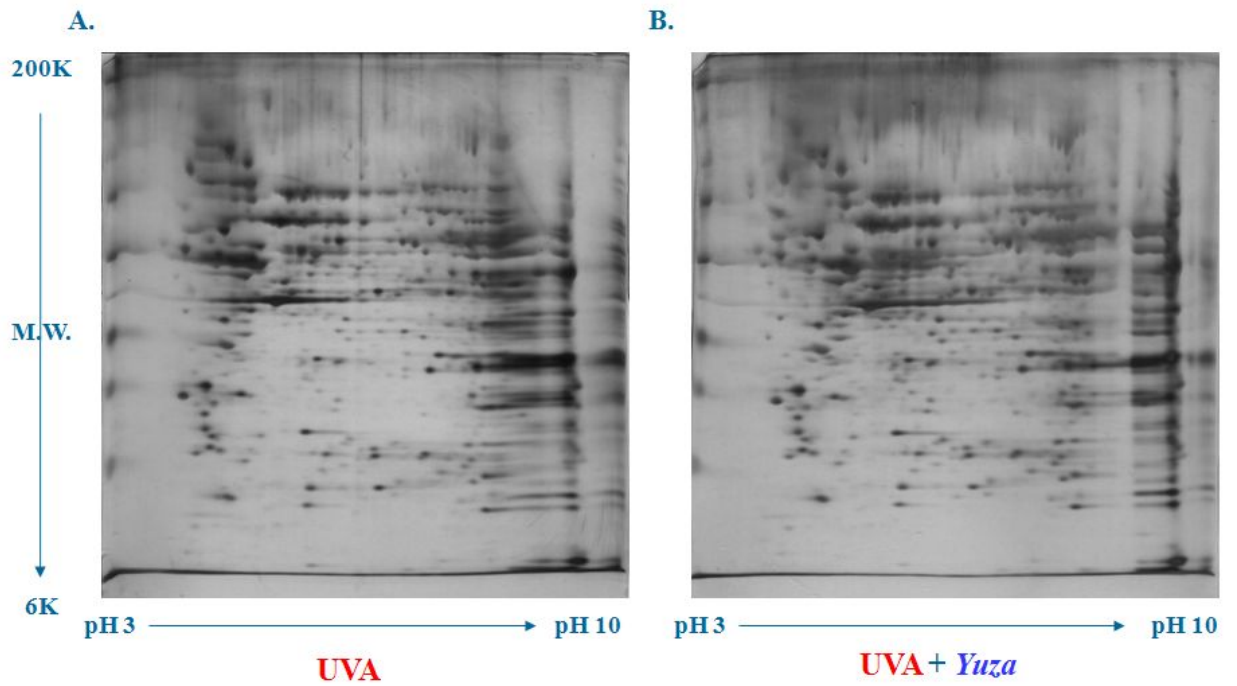


Fig 33. 2D electrophoresis법을 통한 단백질 발현 패턴 분석

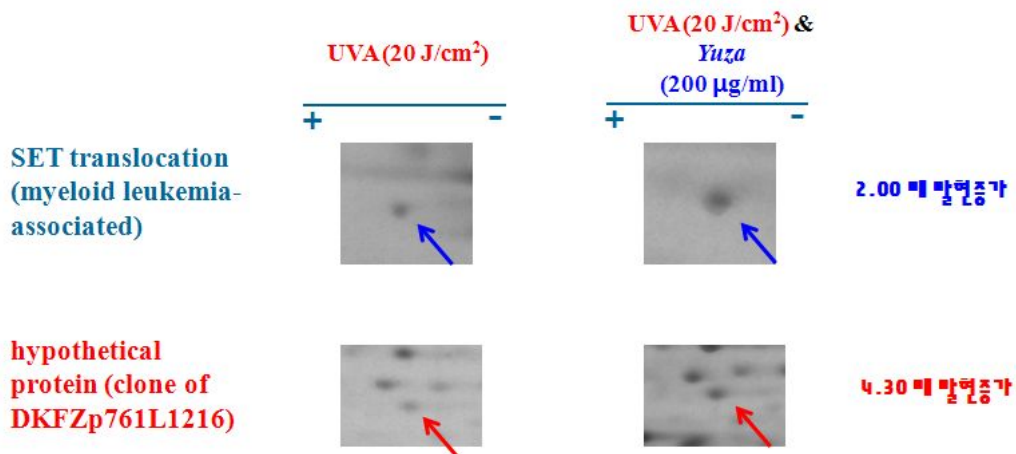


Fig 34. Image 분석 및 peptide mass fingerprinting을 통한 단백질 동정

유자 분획물 기능성 성분의 고기능성, 고영양성 및 인체안전성을 간접적으로 평가하기 위해 다양한 세포를 대상으로 유자분획추출물 및 생리활성물질의 세포독성평가를 진행하였다. 항산화 지표물질 hesperidin, hesperetin, limonin, naringenin을 이용한 광보호 효능 (UV protection)을 비교 분석한

결과 hesperetin의 UV에 대한 산화적 스트레스에서 세포 보호 효능이 가장 높게 나타났으며, 광학 현미경과 trypan blue 염색법으로 확인한 결과 세포에 대한 독성은 없는 것으로 나타났다. 이를 통해 유자 분획물 역시 사람 피부 세포에서 독성이 확인된 바 없기에 인체안정성을 간접적으로 평가하였을 뿐 아니라 동물 대상 임상 실험의 시작을 가능하게 할 것이라고 사료된다.

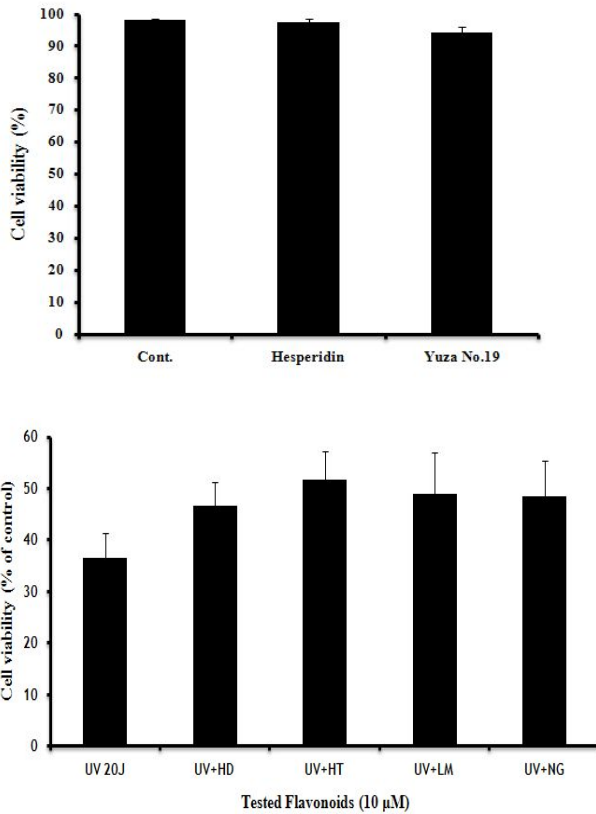


Fig 35. 유자함유 지표물질의 처리 시 상대적 세포 생존률

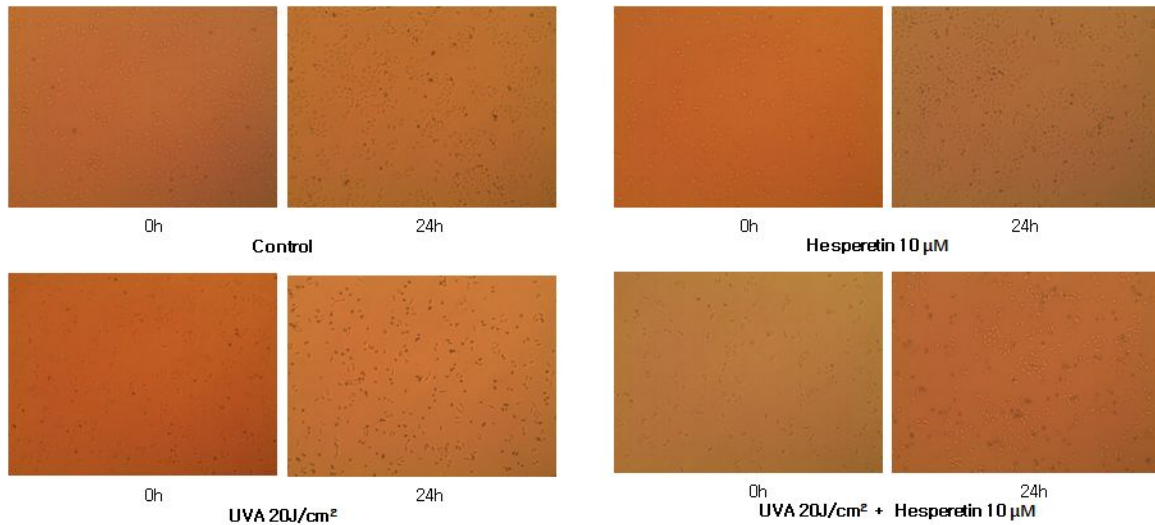


Fig 36. 지표물질인 hesperetin의 세포 독성 및 광보호 효과

아. UV 손상에 대한 유자가공추출물 및 생리활성물질의 보호 효과 확인 및 효능에 대한 기작 규명

1) 재료 및 방법

가) 다양한 유자처리물에 대한 광보호 효과 확인

UV 손상 보호효과에 최적화된 유자 가공 추출물을 얻기 위해 다양한 식품학적 공정을 적용하였으며 이에 대한 유자 가공추출물의 공정은 다음과 같다.

Table 1. 유자가공추출물의 처리공정

유자 처리 공정	처리 방법
에탄올 추출물	10% (w/v) 유자과피부산물 in EtOH 60°C overnight Extraction
물 추출물	10% (w/v) 유자과피부산물 on water 121°C, 15min Extraction
발효 추출물	10% (w/v) 유자과피부산물 in water 121°C, 15min Extraction 발효 접종으로는 0.5% (v/v) <i>Lactobacillus plantarum</i> + 0.5% (v/v) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 접종하여 30°C, 24시간 동안 반응시킴.
효소 처리물	Amano社의 α, β -glycosidase 두 종류 이용하여 pH 4.0, 2시간

2) 결과 및 고찰

고흥산 유자 및 다양한 분획추출물의 UVB에 대한 세포보호기작을 분석한 선행 연구 결과를 통해 본 연구에서는 광범위한 UV 손상에 대한 고흥산 유자의 생리활성기작을 규명하였다. 또한 유자의 기능성 flavonoid 및 유자 가공처리물의 광보호 효과를 분자세포학적 메커니즘을 통해 규명함으로써 약용화장품 개발에 근거가 되는 과학적 기초자료를 구축하였다. 유자의 기능성 성분 스크리닝을 통하여 선별된 Limonin, Naringenin, Hesperetin의 광보호 효능을 세포주기(cell cycle)와 세포사멸(apoptosis) 분석을 통해 세포수준에서 평가하였으며, 이에 대한 주요 결과는 다음과 같다.

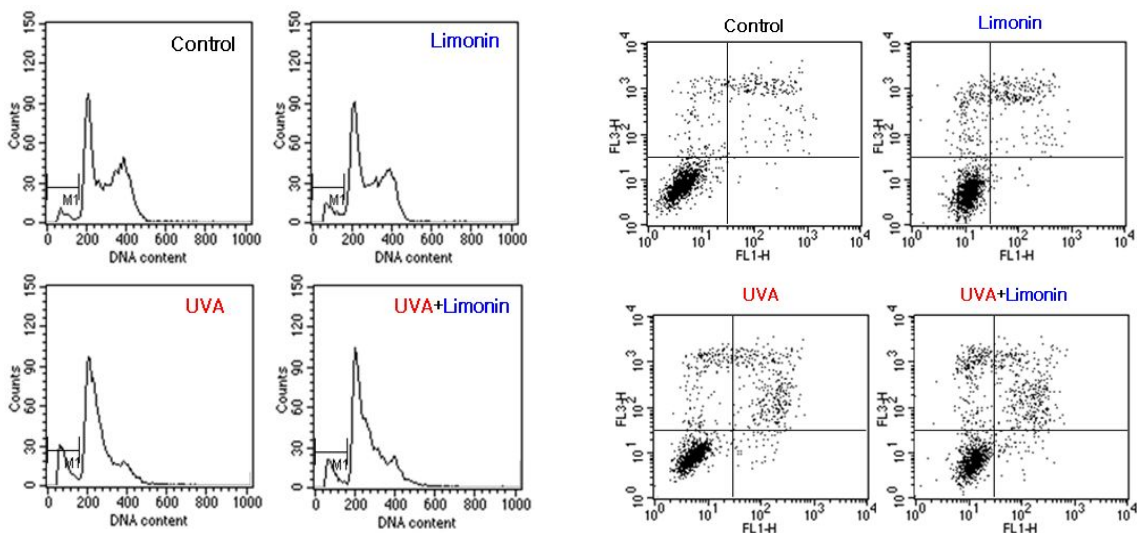


Fig 37. Limonin이 손상된 세포주기와 세포사멸에 미치는 영향

UVA에 의한 산화적 스트레스로 인하여 인간각질형성세포(Human keratinocyte : HaCaT)의 세포주기 중 G0/G1 phase가 축적되고, 그로 인해 prophase 상태가 증가하였다. Prophase 상태의 증가는 세포주기를 손상시키게 되고, 그로 인해 세포의 세포사멸과 세포괴사(necrosis)가 유도된다. Limonin 처리 시 UVA 손상으로 인해 유도되는 G0/G1 phase 축적을 완화시키는데 큰 영향을 주지 못했지만, prophase 상태를 다소 감소시킴으로써 손상된 세포주기를 회복시키는 데 영향을 미치는 것을 확인하였다. 반면, UVA에 의해 유발되는 apoptosis의 완화에는 크게 영향을 미치지 않음을 apoptosis 패턴 분석을 통해 확인하였다.

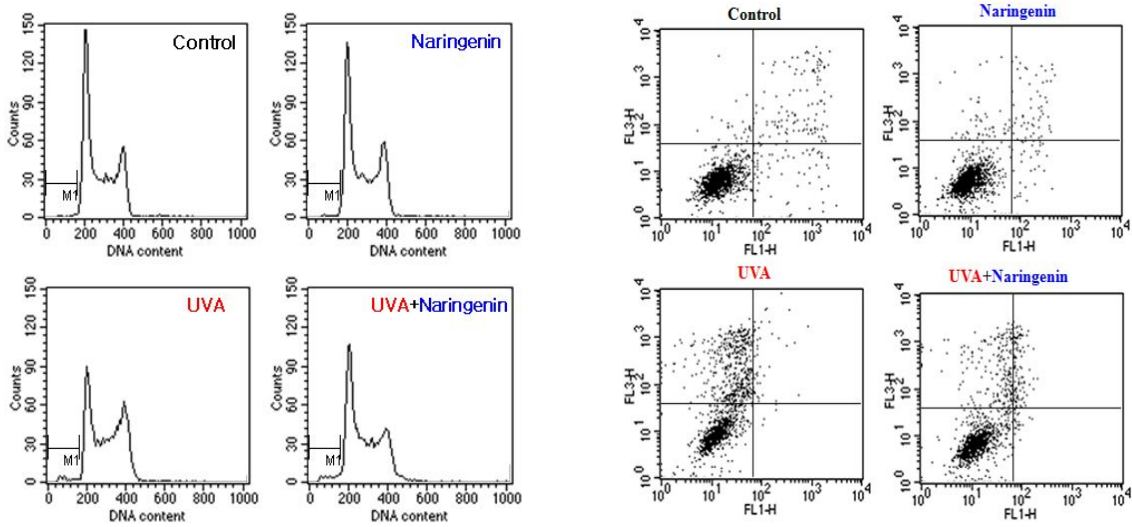


Fig 38. UVA 손상에 대한 Naringenin의 세포보호 효능 규명

UVA에 의해 G2/M phase와 prophase 상태가 축적되었고, 그로 인해 정상세포의 세포 주기가 손상되었음을 cell cycle 분석을 통해 확인하였다. Naringenin은 축적된 G2/M phase를 감소시킴으로써 UVA에 의해 손상된 세포주기를 정상 세포주기로 회복시켰으며, UVA에 의해 유도된 apoptosis가 Naringenin 처리 시 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 Naringenin이 cell cycle 및 apoptosis와 관련된 다양한 세포학적 신호전달 기작을 통하여 UVA 손상으로부터 세포를 보호함을 알 수 있다.

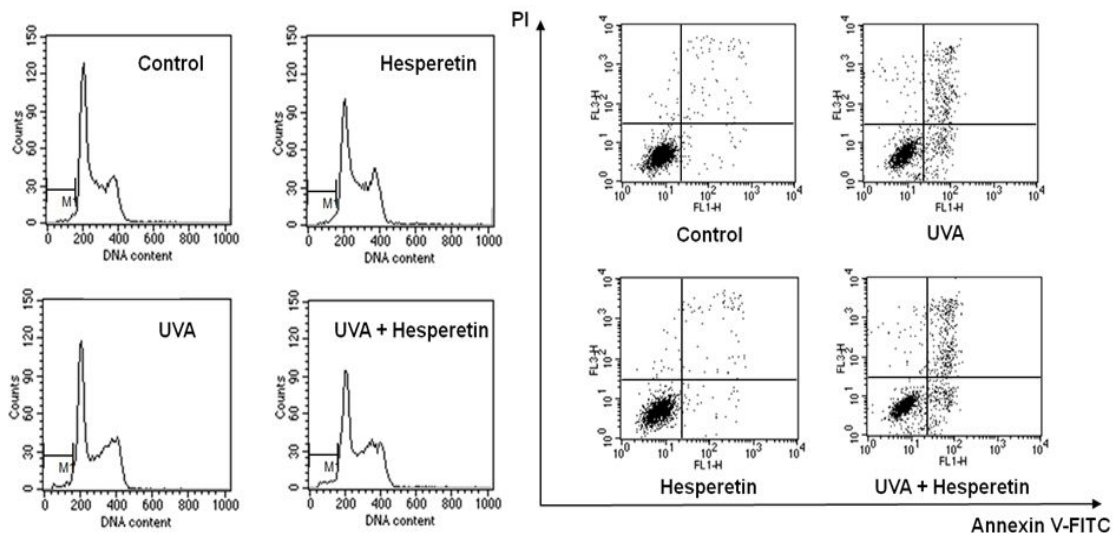


Fig 39. Hesperetin이 손상된 세포주기와 세포사멸에 미치는 영향

Apoptosis 분석을 통해 UVA에 의해 유발되는 apoptosis에 대해

hesperetin의 세포 보호 효과를 확인한 결과, Hesperetin 처리 시 apoptosis를 유발하지는 않았으나 UVA에 의해 유발되는 apoptosis를 완화시키지 못하는 것을 확인하였다. 또한 세포주기 분석을 통해 Hesperetin이 손상된 세포주기를 완화시키는데 크게 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

유자 지표물질인 Limonin, Naringenin, Hesperetin의 광보호 효능을 비교 분석을 통해 Naringenin이 UVA의 산화적 스트레스에 의해 손상된 세포주기 회복 및 UVA에 의해 유발된 세포사멸 감소에 효과가 있음을 확인하였다. 이를 통해 유자의 생리활성 지표물질 중 Naringenin이 UV 손상에 대하여 높은 세포 보호 효능을 갖고 있을 것으로 사료된다.

광범위한 UV 손상에 대한 Hesperetin의 세포보호기작을 다양한 세포학적 전달기작(cellular signaling pathway)과 연관된 단백질 발현 분석을 통해 규명하였으며 그 결과는 다음과 같다.

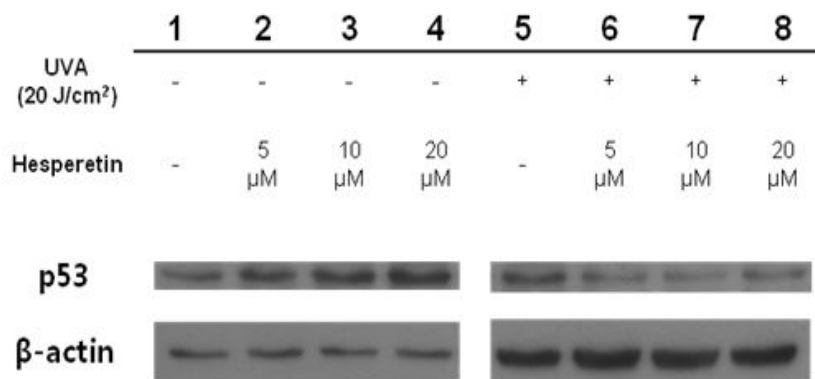


Fig 41. UVA 손상에 대한 Hesperetin의 농도별 처리군의 p53단백질 발현 분석

선행연구에서 UVA 손상에 대한 유자추출물의 세포보호기작을 규명한 바, 본 연구에서는 DNA damage와 apoptosis 등 다양한 세포학적 손상기작과 연관 있는 p53의 단백질 발현을 분석함으로써 유자의 생리활성 flavonoid로 알려진 Hesperetin의 항UV 세포보호기작을 규명하고자 하였다. UVA 손상 입은 세포에 Hesperetin을 농도별로 처리했을 시, 농도 의존적으로 p53의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 Hesperetin의 UVA에 대한 보호 기작이 p53 연관 신호전달기작임을 나타낸다.

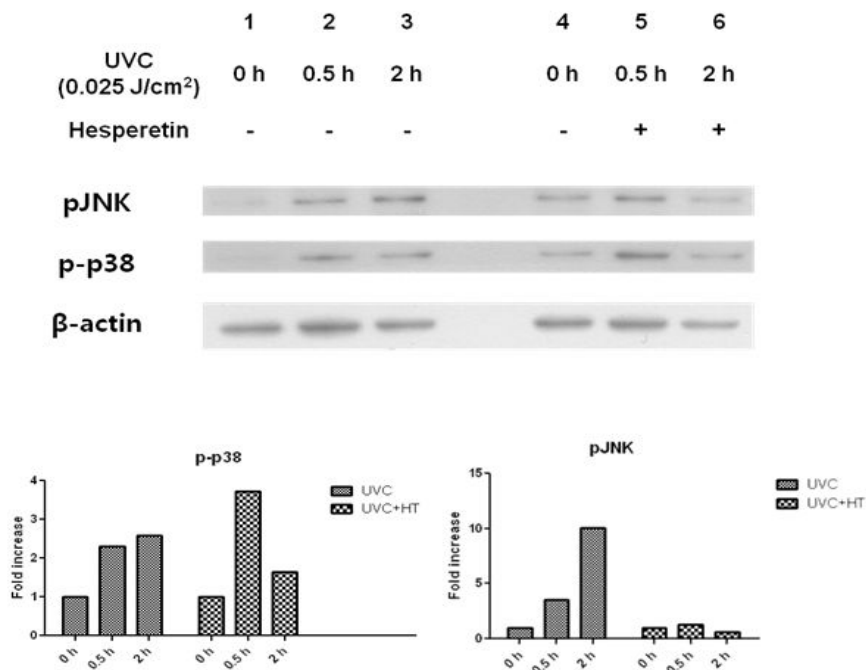


Fig 42. UVC 손상에 대한 Hesperetin의 pJNK, p-p38 단백질 발현 분석

UV에 대한 다양한 손상기작을 확인하기 위해 세포학적 신호전달기작인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 연관된 단백질인 c-Jun N-terminal kinase (JNK)와 p38의 인산화(phosphorylated) 정도를 분석하였고, 이를 통해 Hesperetin의 UVC 손상 완화 기작을 확인하였다. UVC 손상을 입은 세포에 Hesperetin 처리 시 인산화된 JNK와 p38의 발현량이 변화하였고, 이는 Hesperetin이 MAPK signaling pathway를 통해 UVC의 손상을 완화시킴을 의미한다.

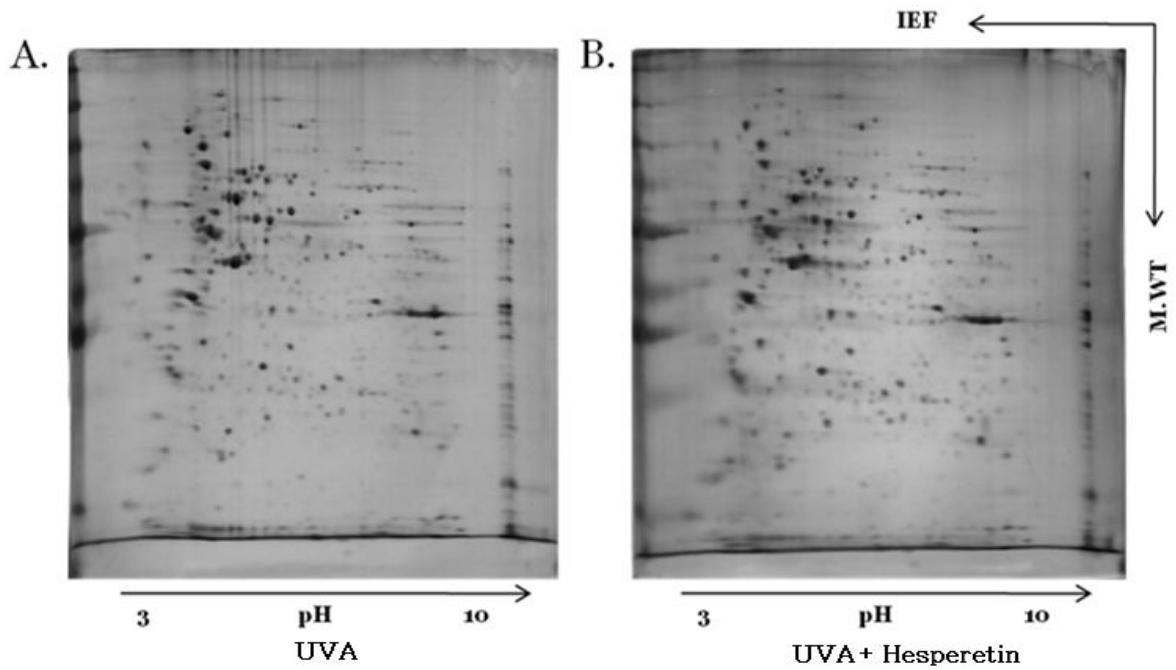


Fig 43. 총체적 단백질 발현 분석을 통한 Hesperetin의 보호기작 규명

앞선 연구에서 UVA에 대한 Hesperetin의 손상보호 기작이 다양한 세포 사멸 기작과 연관된 p53과 세포내 신호전달기작인 MAPK와 연관이 있음을 밝힌 바, 광범위한 Hesperetin의 광보호 신호전달기작을 규명하기 위해 2D electrophoresis를 통한 세포 내 총체적 단백질 발현 패턴을 분석하였다. UVA 손상에 대하여 유사 생리활성 물질인 Hesperetin의 총체적 연관 보호 기전을 밝힘으로써 약리학적 화장품 개발의 적용이 가능할 것으로 기대된다.

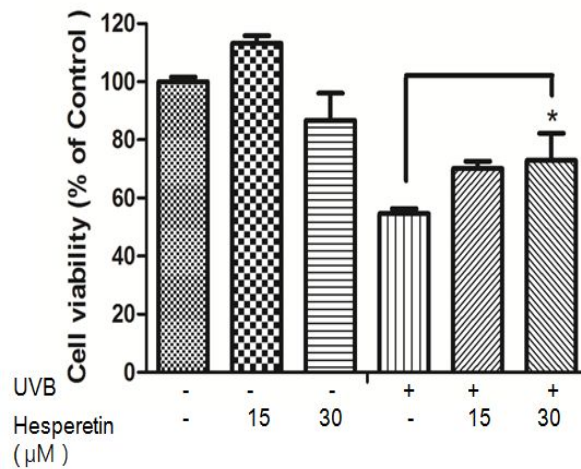


Fig 44. UVB 손상에 대한 Hesperetin의 세포사멸 억제 효과

앞선 연구에서 UVA, UVC에 대한 Hesperetin 보호기작 규명하였고, 이에 UVB에 대한 세포보호효과를 알아보기 위해 먼저 세포활성측정을 하였다. 그 결과 Hesperetin이 UVB 손상에 의해 유도되는 세포 사멸을 약 20% 억제시킴으로써 세포의 생존율을 높이는 것을 확인하였다. 이에 UVB 손상에 따른 세포주기 및 apoptosis 분석을 진행하였다.

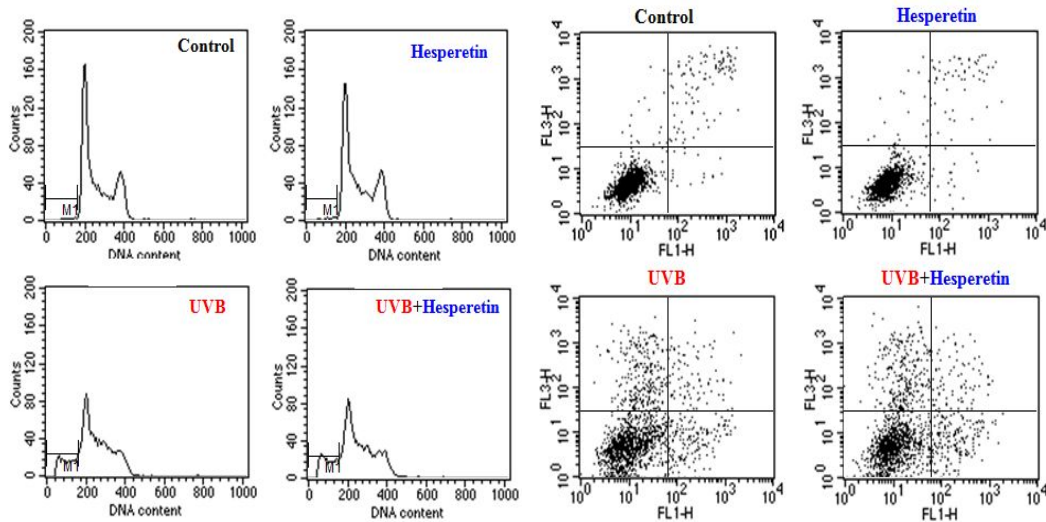


Fig 45. Hesperetin이 UVB에 의해 손상된 세포주기와 세포사멸에 미치는 영향

UVB에 의해 유발된 산화적 스트레스로 인하여 HaCaT 세포의 세포주기가 손상되고 prophase가 크게 증가함을 cell cycle analysis를 통해 확인하였다. Hesperetin 처리 시 정상 세포주기에 큰 영향을 미치지 않았으나 UVB에 의해 손상된 세포주기를 복구시키지 못하였고, 축적된 prophase 상태도 크게 완화시키지 못하는 것을 확인할 수 있었다. Apoptosis 패턴 또한 UVB에 의해 유발된 apoptosis와 necrosis가 Hesperetin 처리 시 크게 감소하지 않은 것을 통해 UVB에 대한 세포 손상에 대하여 Hesperetin의 세포보호 효과가 크지 않음을 알 수 있다.

본 연구에서는 발암억제 및 다양한 세포학적 신호전달기작과 관련된 유전자인 p53과 MAPK을 통해 UV 손상에 대한 Hesperetin의 세포학적 신호전달 기작을 규명하였고, 이를 통해 UV 손상을 보호하는 기능성 화장품의 소재로서 Hesperetin의 활용 가치를 높일 수 있는 근거 자료를 마련하였다.

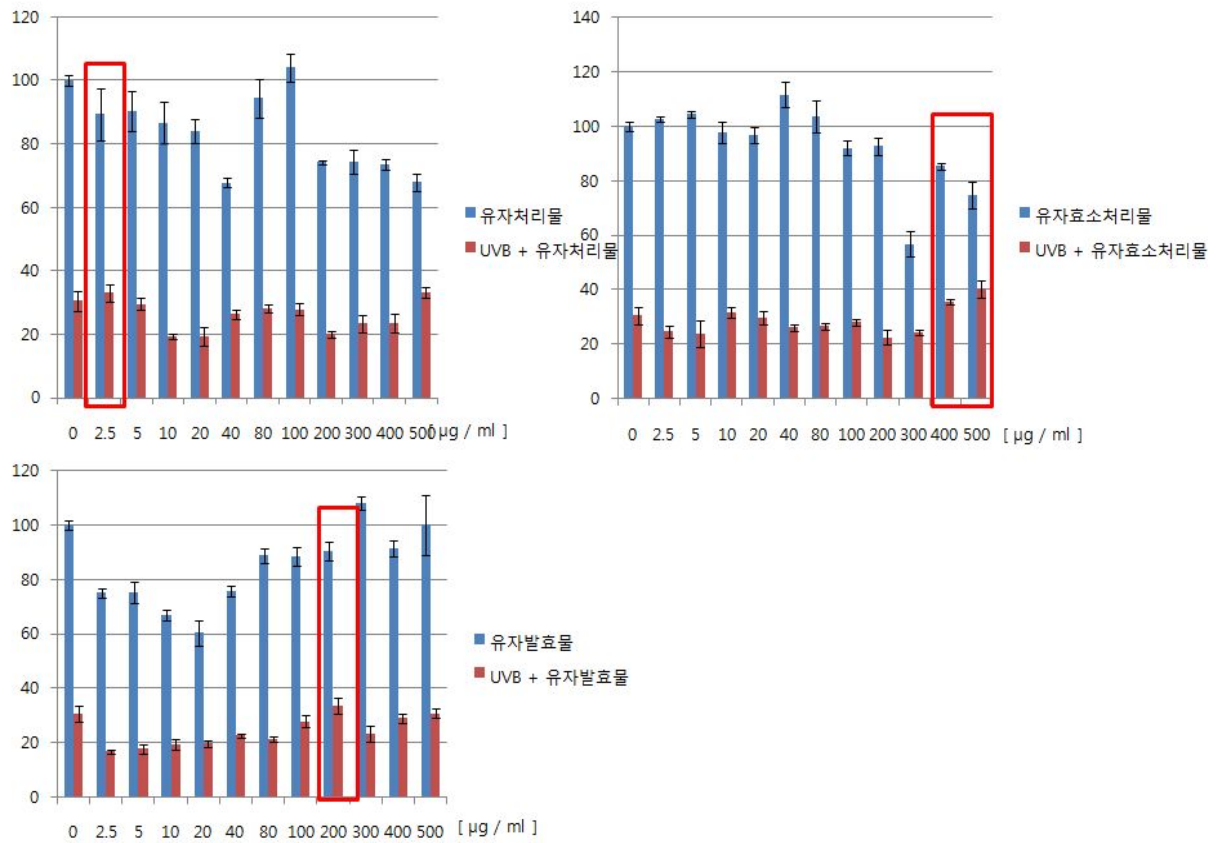


Fig 46. UVB 손상에 따른 다양한 유자가공물 처리에 대한 세포활성측정

유자추출물, 유자효소추출물 및 유자발효물을 대상으로 UVB 손상에 대한 세포활성측정 결과, 세포사멸억제효과가 농도 의존적으로 나타나지는 않지만 전반적으로 유자를 직접 처리한 것보다 유자효소추출물 처리 시 UVB 손상에 대한 세포사멸억제효과가 높게 나타났다.

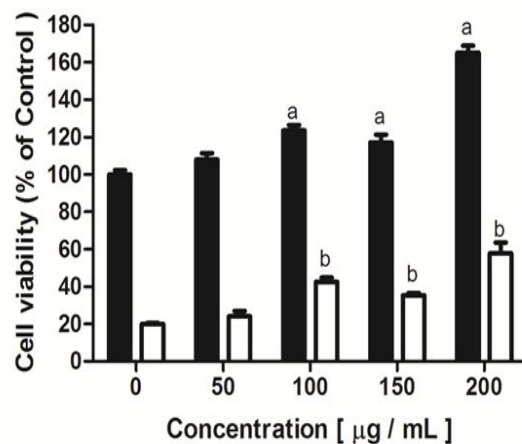


Fig 47. 유자에탄올추출물 처리 시 UVB 손상에 대한 세포활성 측정

유자의 에탄올유효성분만을 녹여 분획한 유자에탄올추출물의 UVB 손상에 대한 세포사멸억제효과를 보기 위해 세포활성을 측정하였다. 그 결과 유자에탄올추출물 처리 시 농도 의존적으로 세포활성이 증가하였고, 200 µg/ml 농도에서 UVB 처리군과 비교하여 약 40% 세포사멸을 억제하였다. 이를 통해 세포사멸과 연관된 기작인 세포사멸, 세포주기 분석을 통해 UVB 손상 보호 기작을 규명하였다.

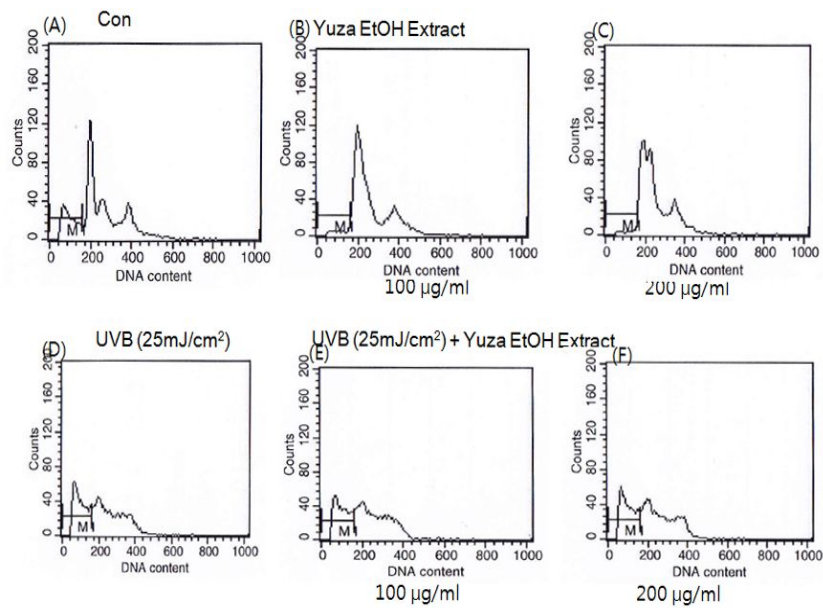


Fig 48. UVB 및 유자에탄올추출물 처리 시 세포주기 변화

UVB 손상을 입은 세포는 세포주기의 진행을 중단시킴으로써 손상된 세포의 사멸을 유도한다. UVB 손상을 입은 세포에 유자에탄올추출물 처리 시 UVB 처리군과 세포주기 패턴이 비슷하게 나타난 바, 유자에탄올추출물이 손상된 세포주기를 회복시키지 않음을 알 수 있다. 이를 통해 유자에탄올추출물의 세포사멸 억제에 대한 기작이 세포주기와 연관되어 있지 않음을 확인하였고, 이에 따라 세포사멸과 관련된 세포보호기작을 검증하고자 한다.

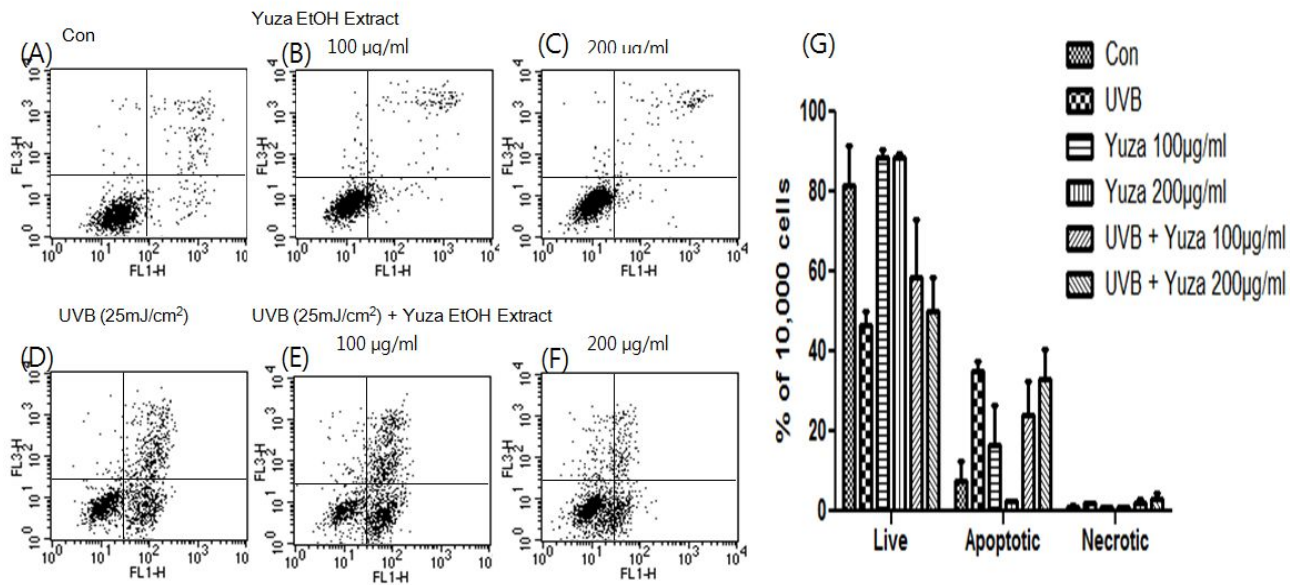


Fig 49. 세포사멸을 통한 유자에탄올추출물의 항UVB 효과 기작 확인

UVB 손상을 입은 세포의 세포사멸이 증가한 것을 세포사멸 패턴 분석을 통해 확인하였다. UVB에 대한 유자에탄올추출물의 보호 효과를 확인하기 위해 유자에탄올추출물을 처리한 결과, UVB에 대한 세포손상을 완화시킴으로써 세포사멸이 감소하였다. 이는 UVB에 대한 유자에탄올추출물의 세포학적 보호 기작이 세포사멸과 연관 있음을 확인하였고, 세포사멸 관련 단백질 발현을 통해 메커니즘을 규명하였다.

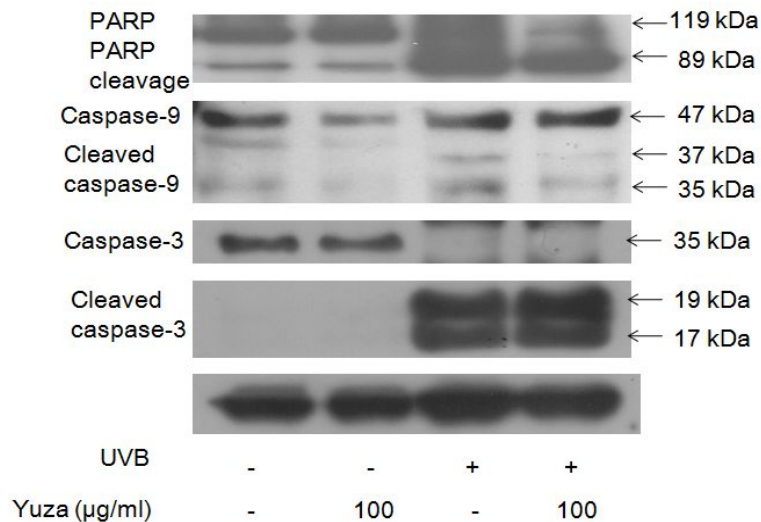


Fig 50. Caspase 관련 신호전달기작 단백질의 발현 비교

세포학적 손상으로 인한 세포사멸 유도 메커니즘 중 대표적인 세포학적 신호전달기작인 caspase-dependant signaling pathway와 관련된 단백질 발현을 비교함으로써 caspase 관련 세포사멸 메커니즘을 규명하였다. 세포가 손상을 입어 세포사멸이 유도되면 caspase 관련 단백질들이 분해되어 신호 전달기작이 활성화되는데, caspase 관련 신호전달기작의 대표적인 단백질인 caspase-9, caspase-3, PARP의 발현을 비교분석하여 메커니즘을 규명하고자 하였다.

UVB 처리 시 caspase-9, caspase-3, PARP의 활성화 발현정도를 나타내는 활성 단백질(activated form)인 cleaved protein의 발현이 모두 증가한 것을 볼 수 있다. 반면 UVB 손상을 입은 세포에 유자에탄올추출물 처리 시 caspase-9, caspase-3, PARP의 활성 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 유자에탄올추출물의 세포사멸 완화 효능이 caspase 연관 신호전달기작을 통해 이루어짐을 알 수 있었다.

다양한 UV 손상에 대한 유자가공추출물 및 생리활성물질의 보호 효능 기작을 규명함으로써 주름개선 및 피부암 발병 억제 등 다양한 약리작용에 대해 과학적인 근거 자료를 제공하였고, 이를 통해 약리작용 화장품개발의 소재로써 고품산 유자의 가치가 높아질 것으로 사료된다.

차. 유자 브랜드의 화장품 개발

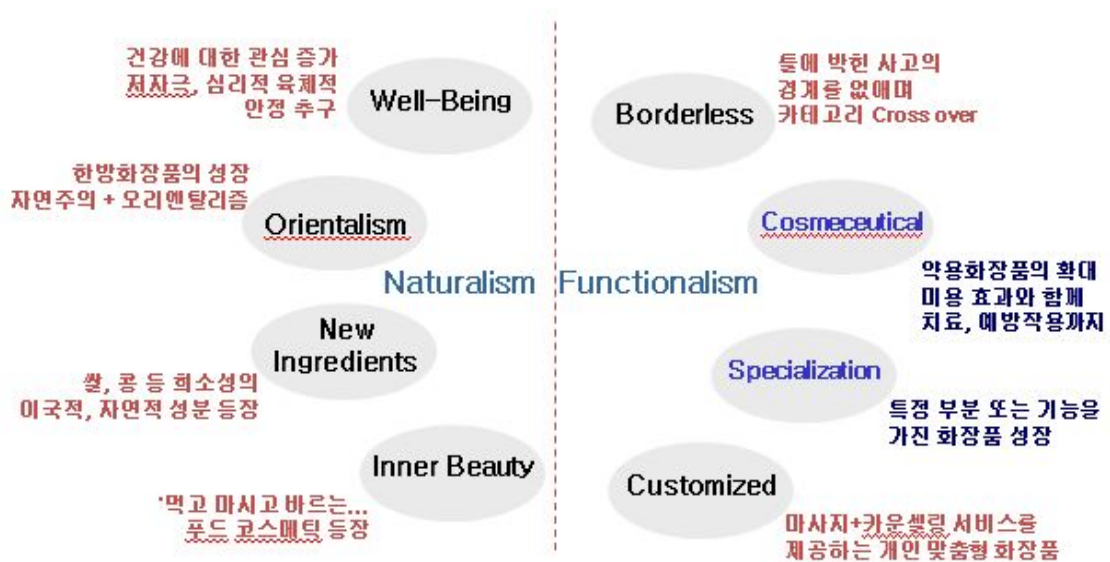


Fig 51. 화장품 시장 제품 trend

최근 화장품 시장은 웰빙 컨셉의 자연 원료를 이용한 제품들로 이루어진 “자연주의”와 더욱 세분화된 효과 중심의 “기능주의” 두 가지 큰 흐름이 있

다. 이러한 시장 상황에 맞추어 3세부에서는 피부노화와 색소침착으로 윤기를 잃어가는 30대 중반 ~ 40대 후반 또는 그 이상의 연령층 여성과 미백과 항노화 기능의 고가의 기능성 화장품을 선호하나 가격부담 때문에 사용을 하지 못했던 소비자를 대상으로한 화장품 개발에 target을 두었다. 주요 원료로는 유자 과피의 항노화 및 미백효능 (실용성), 유자과피 추출성분의 피부진정 효과 및 자외선 손상 방지 (기능강화)의 유자과피추출물이 가지는 항노화,미백 복합기능 극대화 할 수 있는 기존 제품과 차별화된 유자브랜드 화장품 개발 concept을 확립하였다. 생물전환 및 복합발효공법에 의한 원료는 물추출물에 비해 상대적으로 좋은 효과를 가지나 에탄올 추출물과 비교하였을 때 효과 및 여러단계의 공정으로 경제성이 떨어지므로 유자부산물 과피의 에탄올 추출물로 원료를 채택하였다.

시제품은 현재 제작된 상태이며, 이를 시제품 하기위한 시제품 디자인 등 초안을 구성 및 디자인 구성 단계 중이다.

시제품 디자인 위한 계획(초안)

- 현재 유자의 기능성을 강조한 광고형태의 제작물 필요
 - 유자의 미백, 항노화, 장벽 기능에 대한 간략한 원리를 설명하는 그림 필요.
(ex> 유자에서 추출된 flavonoid 성분이 피부에 흡수되며 멜라닌 색소 분비를 억제 미백 효과에 효능 등)
- Yuzu PC total care도 좋지만 뭔가 심심함. 미를 뜻하는 느낌의 글자로 브랜드 네임을 다시 정하고 위의 내용은 그 브랜드 네임 위에 표기하면 더 좋을 것으로 보임.
ex>



- 브랜드 대표 마크(유자그림) 제작 및 디자인 글씨체 선정 필요.



Fig 52 시제품 디자인을 위한 계획

시안의 예로 “유자娃”는 “유자와”의 의미로 소비자와의 친밀도를 느낄 수 있는 “함께”라는 이미지와 “예뻐娃”한문으로 표기하여 제품의 美적 효능을 간접적으로 표현하는 제품 이름 컨셉을 하였고, 항노화,미백 복합기능을 표현하는 "Yuzu PC total beauty care" 및 직접적인 설명인 “유자 娃(WA) ‘는 Whitening & Anti aging 복합 기능성 뷰티케어 화장품 입니다.” 라는 문구 및 유자를 형상화한 이미지를 첨부하여 디자인 해보았다. 현재 계속 진행 중이며, 과제 평가 시 완성품 (크림 및 에센스 2종)을 제시 하도록 한다.



Fig 53 유자 PC total care 시작품
(용기 및 디자인 前)

유자청 제조 시 폐기되는 부산물이 항산화, 항노화 및 미백 화장품 소재로서의 활성과 효능을 갖는지 알아보기 위하여 Total phenol assay, MTT(자외선에 의한 세포 손상 회복), 항염(TNF- α), 신생 Collagen 합성, MMPs 발현 억제 효과, 분비된 멜라닌 억제 및 타이로시나아제 저해 효과에 대해 알아보았다. 부위별, 용매별 추출물에서 60 $^{\circ}$ C 에탄올 추출물의 생리활성 효과가 가장 우수하였으며, 지표 물질로 설정한 hesperidin, hesperetin, limonin의 효과는 미미하였다. 이는 유자 부산물 내 다른 성분 활성에 의한 것으로 예측할 수 있다. 항산화 효과를 측정하기 위한 total phenolic assay에서 유자 부산물 중 과피 추출물은 30.53 ± 0.37 (mg G.A equivalents/g d.w)의 높은 phenolic compound 함유량을 나타내었다. 항염 효과 측정에서 부산물 모두 UV-induced pro-inflammatory cytokines인 TNF- α 를 40% 이상 줄여주어 항염증에 효능이 있음을 보였으며, 자외선에 의한 세포 손상에 대해 강력한 회복 효과가 있음을 보였다. 과피 추출물은 각 농도별로 투여한 모든 범위에서 자외선 처리로 감소한 Collagen 합성량을 증가시켜주고, MMPs의 발현을 감소시켜주어 항노화 효과가 증가됨을 확인하였다. 또한, 과피 및 씨 추출물은 세포 내에서 분비되는 melanin의 양과 tyrosinase의 양을 줄여주는 효과를 보였다. 생물전환기술 및 복합발효공정을 통해 flavonoid glycoside를 aglycon 형태로 변환하여 활성의 증가를 본 연구는 균주의 간접적인 β -glycosidase 효과는 볼 수 있었으나 발효에 의한 aglycon화를 확인 할 수 없었다. 하지만 발효 및 직접적인 효소처리에 의해 라디칼 소거능, 콜라겐 합성능, 피부장벽 복원능이 향상되어 가능성을 확인하였다. 이상의 결과들은 유자청 가공 부산물의 항산화, 항노화 및 미백 효과를 확인하였다. 특히, 유자 부산물 중 과피 추출물은 항산화, 항노화 및 미백 효과 모두 활성이 우

수한 것으로 판단되며 Lipid accumulation 감소효과도 있어 부산물을 이용한 기능성 화장품 소재 및 beauty-food 로서의 사용 가치가 기대 된다.

4. 4세부 : 살균소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 수출용 유자의 통합형 세척/살균/물기제거 시스템 개발

가. 재료

1) 이산화염소수

실험에 사용한 이산화염소수는 생성장치를 통해 발생시켜 실험에 사용하였으며 생성장치 개략도와 장치는 Figs. 1~2와 같다. 목적 농도의 산화염소수를 생성하기 위하여 원료 저장탱크에 아염산소다를 목적 농도로 소규모는 원료저장탱크에서 희석하고, 대용량은 원료탱크에서 정량펌프를 통해 희석수에 희석하여 목적하는 농도로 제조한다. 제조된 아염산소다 희석수를 가압펌프를 통해 이젝팅시켜 염소가스 진공레귤레이터와 이젝터가 연결된 배관에 차압을 형성하여 진공 레귤레이터로부터 염소가스를 공급받게 된다. 이렇게 공급된 원료는 이젝터에서 순간적인 반응을 하고 유리구슬이 함유된 반응기에서 1차반응을 하고 2차 반응기에서 일정한 반응시간을 주어 반응시키게 된다. 2차반응기는 수위 수준에 의해 제어가 되며, 수위 수준이 저수위시 가압펌프가 작동하여 이산화염소수를 생성하고, 고수위시는 작동을 멈추고 2차반응기에 저장된 이산화염소수를 소비하게 된다. 2차 반응기 구조는 저장탱크의 역할도 함으로 생성된 반응기안의 공기를 밖으로 배출하고, 발생을 멈추고 반응기 내부의 이산화염소를 사용시 공기를 안으로 들어가게 할 수 있는 구조로 되어 있다. 이때, 반응기 안의 공기를 밖으로 배출시 이산화염소가스가 배출되게 됨으로 이산화염소취가 발생된다. 이 이산화염소취를 제거하기 위하여 티오황산나트륨이 채워진 탈취장치를 부착해 이산화염소가스를 중화시켜 밖으로 배출되지 않게 하는 구조로 되어 있다. 2차 반응탱크에 저장된 이산화염소수는 목적하고자 하는 농도로 희석하기 위해 정량펌프 및 잔류 이산화염소 농도측정기를 이용하여 목적하는 농도에 맞게 희석하여 사용할 수 있게 구성되어 있다. 종래의 발생방식은, 혼합기를 통하여 이산화염소를 분사수에 희석시켜 이젝터를 통하여 분사하게 되며, 이러한 분사를 통하여 형성된 감압에 의해 염소가스가 이젝터의 측면으로 공급되게 되고 반응기에서 이산화염소의 생성반응이 일어나는 방식이나, 이러한 종래의 이산화염소 발생장치에서는 반응의 안정성은 어느 정도 유지할 수 있으나 ClO_2 , ClO_3^- 등의 부산물의 생성을 최대한 억제하여 고순도 및 고수율의 이산화염소 생성을 보장하기 힘들다. 따라서, 항상 고순도 및 고수율의 이산화염소를 일정하게 생성하기 위해서는 최적의 반응조건 및 반응시간을

유지할 수 있는 방법이 필요하게 된다. 또한, 소독처리 시스템에서 종래의 이산화염소 발생장치는 생성된 이산화염소의 일정량을 처리수에 투입함으로써, 소용량에는 본 방식의 이산화염소 소독방식의 적용이 어려웠다. 따라서, 고순도/고수율의 저농도의 이산화염소를 생성할 수 있는 발생방식의 필요하였다. 이때 사용한 수도수의 chloride(Cl⁻) 함량은 36.0 ppm이었으나 chlorite와 chlorate는 검출되지 않았다. 생성한 이산화염소수는 ClO₂ 농도 882.1 ppm, free available chlorine (FAC) 8 ppm, chlorate 43.32 ppm, excess chlorine 2 ppm, pH 2.48이었으며 chlorite는 검출되지 않았다. 본 생성장치의 이산화염소수 순도와 수율은 각각 96%와 95%였다.

2) 전기분해수

저염소 중성 전기분해수 제조장치는 중성의 물성을 갖는 전기 분해수를 생성하기 위해 무격막식 방식에서 1단 및 2단 전기분해를 동시에 적용할 수 있도록 하고, 차아염소산 함량, ORP 및 pH 등의 물성을 조절할 수 있는 가변형으로 제작하였다. 전극은 이리듐 도금 티타늄 재질 등 3종의 판형(70×140×1 mm)으로 제작하여 전극 교환이 가능한 형태로 하였다. 또한, 전해액 공급은 연속적으로 유수하는 방식으로 조절레버를 이용하여 0~20 mL/min로 조절 가능하도록 제작하였다. 무균수 생성 시스템은 염소 함량을 극소량화하기 위해 투입되는 전해액과 전기분해량을 극소화할 수 있는 분해 시스템을 구성하여 생성수의 미생물을 완전히 제거한 최소한의 물성만을 갖는 전기분해수를 제조할 수 있도록 하여 증진수로서의 적용 실험에 활용하도록 하였다. 강산성 전기분해수와 약알칼리성 전기분해수는 격막식과 무격막식 방식이 있으며 1단 및 2단 전기분해를 동시에 적용할 수 있도록 제작되었다. 전극 재질은 이리듐 도금 등 3종 판형(70×140×1 mm)로 주문 제작(Hyundai System, Buchon, Korea)하였다. 전해액은 20% NaCl으로 연속적으로 유수하는 방식이며 조절레버를 이용하여 0~10 mL/min로 조절 가능하도록 하였다(Figs. 1~2). 미산성 전기분해수는 한국코스믹라운드(주)의 염산을 원료로 한 미산성 전기분해수 생성장치(Model : BC-210)를 사용하였다.

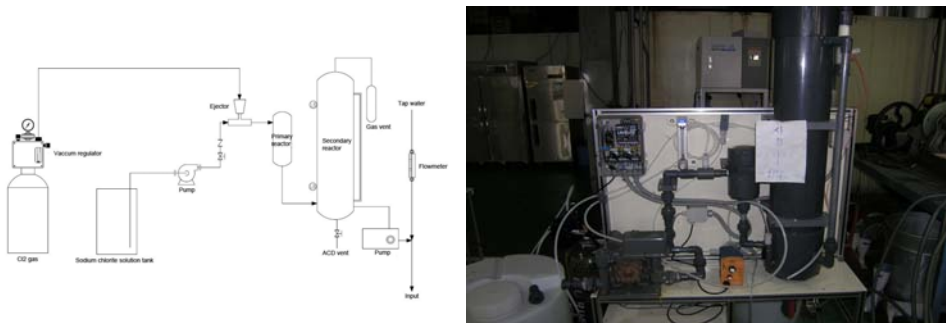


Fig. 1. Aqueous ClO₂ generator used in this experiment

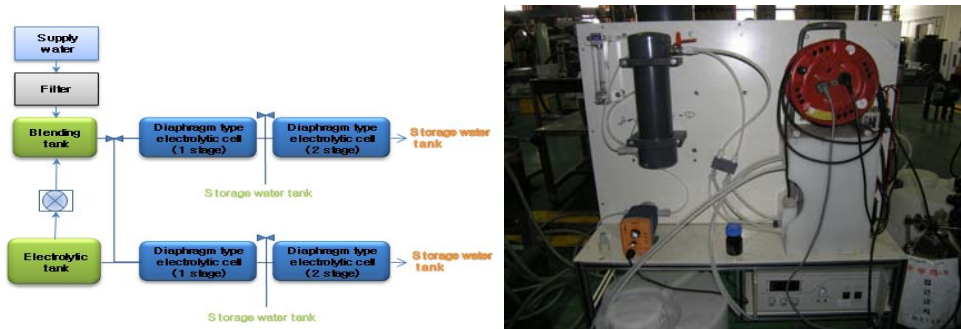


Fig. 2. Electrolyzed-water generator used in this experiment.

3) 시약 및 배지

균주의 배양에 사용한 lactobacillus MRS medium, nutrient medium, LB medium은 Difco사(Difco lab., USA)의 것을 사용하였으며, NaCl, NaClO₂-, NaClO₃-, NaH₂PO₄, NaH₂PO₄ 등의 chemicals은 Sigma사(Sigma Co., USA)의 것을, Ion chromatography에 사용한 water는 순수제조장치(model : Milli-Q plus, Millipore Corp, USA)로 생성한 18Ω 이하 탈이온수를 사용하였다(96). 조미액 제조시 사용된 식품첨가물은 대홍약품에서 구입하여 사용하였다.

3) 균주

이산화염소수의 유효성 평가에 사용한 *E. coli* ATCC 10536 및 *S. aureus* ATCC 6538는 한국생명공학연구원(KCTC)에서 분양 받은 것을, 그리고 *Aspergillus flavus* KFRI 855, *Aspergillus niger* KFRI 993, *Aspergillus niger* KFRI 466, *Bacillus subtilis* KFRI 183, *Bacillus cereus* KCCM 41293, *Bacillus cereus* KFRI 183, *Candida utilis* KFRI 556, *Candida albicans* KFRI 432, *Enterococcus casseliflavus* KCTC 3638, *Enterococcus saccharolyticus* KCTC 3643, *Enterococcus mundtii* KCTC 3630, *Enterococcus hirae* KCTC 3616, *Enterococcus faecalis* KCTC 3511, *Enterococcus durans* KCTC 3121, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* KCCM 11391, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* KCTC 1726, *Listeria monocytogenes* KFRI 799, *Listeria welshimeri* KCTC 3587, *Listeria seeligeri* KCTC 3591, *Listeria grayi* KCTC 3581, *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444, *Listeria innocua* KCTC 3586, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3733, *Lactobacillus brevis* KFRI 466, *Micrococcus luteus* KFRI 455, *Mucor rouxii* KFRI 780, *Pseudomonas aeruginosa* KFRI 190, *Pseudomonas fluorescens* KFRI 194, *Penicillium citrinum* KCTC

3733, *Rhizopus oryzae* KFRI 1007, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* KFRI 251, *Saccharomyces cerevisiae* KFRI 1014 는 각각 한국식품연구원(KFRI), 한국중균협회(KCCM) 및 한국생명공학연구원(KCTC)에서 동결건조 상태로 분양 받아 50%(v/v) glycerol stock하여 -80°C에서 냉동보관하면서 사용하였다. 균주의 배양은 분양기관의 지시서에 따라 nutrient medium, lactobacillus MRS medium 등에서 생육시켰다.

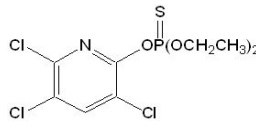
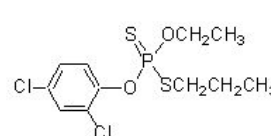
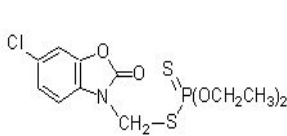
나. 방법

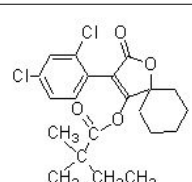
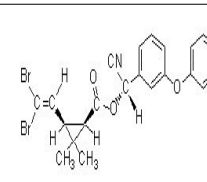
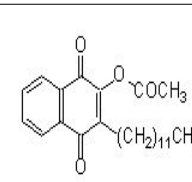
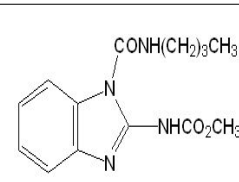
1) 잔류농약 제거효과 분석

가) 시료 및 사용 농약

시료로 사용한 오렌지는 서울소재 가락시장에서 2010년 9월에 구매하여 시료로 사용하였다. 조사 대상 농약은 우리나라 식품위생법에 잔류허용 기준에 설정되어 있는 살충제로 Chloropyrifos, prothiofos 및 phosalone이었으며 정보는 Table 1과 같다. 클로로피리포스 수화제(더스반, 동부 하이텍), 프로티오포스 유제(도쿠치온, 동부정밀화학)은 1000배 희석하여 사용하였으며 포사론(Dr. Ehrenstorfen, Germany)은 10ppm으로 희석하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 세척수의 pH, ORP 및 HClO/ClO₂ 함량은 Table 2와 같았다. 시료로 사용한 오렌지는 서울소재 가락시장에서 2010년 9월에 구매하여 시료로 사용하였다. 조사 대상 농약은 우리나라 식품위생법에 잔류허용 기준에 설정되어 있는 살충제로 Chloropyrifos, prothiofos 및 phosalone이었으며 정보는 Table 1과 같다. 클로로피리포스 수화제(더스반, 동부 하이텍), 프로티오포스 유제(도쿠치온, 동부정밀화학)은 1000배 희석하여 사용하였으며 포사론(Dr. Ehrenstorfen, Germany)은 10ppm으로 희석하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 세척수의 pH, ORP 및 HClO/ClO₂ 함량은 Table 2와 같았다.

Table 1. General information of the pesticides used in this study

Pesticide	Chloropyrifos	Prothiofos	Phosalone	
Structure				
Formula	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ O ₂ PS ₂	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	
M.W. ¹⁾	350.6	345.2	367.8	
MRS ²⁾ (mg kg ⁻¹)	0.5	0.05	2.0	

Pesticide	Spirodiclofen	Deltamethrine	Acequonocyl	Benomyl
Structure				
Formula	C ₂₁ H ₂₄ Cl ₂ O ₄	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃
M.W. ¹⁾	411.3	505.2	367.8	290.3
MRS ²⁾ (mg kg ⁻¹)	2.0	0.5	1.0	7.0

¹⁾ M.W. : molecular weight; ²⁾ MRS :maximum residue limit

Table 2. Chemical properties of the washing water

	pH	ORP(mV)	HClO (ppm)
SAEW ¹⁾	2.54	1,150	100
LAIEW ²⁾	8.4	345	70
LAcEW ³⁾	6.54	733	33
ACD ⁴⁾	-	-	50

¹⁾ Strong acidic electrolyzed water.

²⁾ Law alkaline electrolyzed water.

³⁾ Law acidic electrolyzed water.

4) Aqueous chlorine dioxide

나) 잔류농약 분석

세척처리에 따른 시료의 추출, 정제 및 잔류농약 분석은 식품공전 방법으로 하였다. 오렌지껍질을 마쇄하여 20 g을 300 mL beaker에 담고 100 mL acetonitrile 을 넣어 homogenizer로 1분간 균질화한 후 감압여과 한다. 여과액을 NaCl 10 g이 담긴 분리병에 담고 1분간 진탕한 후 층분리가 되도록 3시간 방치한다. 분리된 상층액 20 mL을 취하여 40℃이하의 수욕 조 중에서 질소가스를 통과시키면서 소량 남을 때까지 농축한 후 일정액 으로 정용한 후 활성화된 Florisil cartridge(Waters, USA)에 시료를 전개 한 후 20% aceton/hexane 으로 용출하고 농축 후 20% aceton/hexane 2 mL로 용해하여 GC에 주입하였으며 GC 분석 조건은 Table 3과 같다. LC 분석을 위해서는 감압 농축된 유기용매층을 메탄올로 녹여 사용하였다. Acequonocyl 과 benomyl의 HPLC 분석 조건은 Table 4 및 5에 나타내었다.

Table 3. GC condition for the analysis of the pesticide residue

Instrument	GC2010(Shimadzu, Japan)
Detector	ECD
Column	DB-5(30 m×0.25 mm× 0.25µm)
Injector temp.	260℃
Detector temp.	280℃
Oven temp.	120℃ 2 min(10℃ /min) 220℃ 2 min(7℃ /min) 250℃ 2 min(7℃ /min) 280℃ 15min
Carrier gas	N ₂
Column flow	1.0 mL/min
Split ration	ECD:split mode 20:1
Injection volumn	2 µL

Table 4. HPLC condition for the analysis of the acequunocyl

Instrument	UFLC (Shimadzu, Japan)
Column	Shiseido capcell pak C18 UG120 (4.6 mm×250 mm, 5μm)
Detector	UV detector 250nm
Column Temp.	40℃
Mobile phase	Aqueous 0.01% phosphoric acid : Acetonitrile = 120 : 880
Column flow	1.0 mL/min
Injection Volumn	20 μL

Table 5. HPLC condition for the analysis of the benomyl

Instrument	UFLC (Shimadzu, Japan)		
Column	Shiseido capcell pak C18 UG120 (4.6 mm×250 mm, 5μm)		
Detector	UV detector 254 nm		
Column Temp.	40℃		
Mobile phase	Time(min)	Water (%)	Acetonitrile (%)
	initial	95	5
	7	95	5
	15	80	20
	30	10	90
	40	10	90
	45	95	5
Column flow	1.0 μL/min		
Injection Volumn	10 μL		

다) 회수율 시험

무처리 오렌지 20 g에 각 농약의 표준용액 20 ppm 처리하여 잔류농약 분석을 위한 시료의 조제 방법과 동일하게 분석하여 회수율을 구하였다.

2) 이산화염소수 및 전기분해수의 물리·화학적 분석

가) pH

생성한 이산화염소수의 pH는 pH meter (model 520A, Orion research

Inc., MA, USA)로 측정하였다.

나) Chlorine dioxide (ClO₂) 및 chlorine species

이산화염소의 농도는 portable testing instrument (model DR-2800, Hach Co., Loveland, USA)를 이용하여, US EPA DPD method를 기반으로 한 UV spectrophotometric method와 DPD titmetric method를 병행하여 분석하였다.

다) FAC(free available chlorine)

FAC는 DPD ferrous titmetric method로 측정하였다.

라) Chloride (Cl⁻), chlorite (ClO₂⁻) 및 chlorate (ClO₃⁻)

Radziminski 등의 방법에 따라 125 mL 갈색병에 30 mL의 이산화염소수를 넣고 N₂ gas로 농도에 따라 10~20분 purging하여 ClO₂를 제거한 다음 ion chromatographic method로 ion chromatography(model Bio LC, Dionex Corp., CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 사용한 column, guard column 및 suppressor은 각각 IonPac AS12A (4×200 mm), IonPac AG12A를, micromembrane suppressor (model AMMS III)로 Dionex사 (Dionex Corp., IL, USA) 제품을 사용하였다. 시료의 표준물질로부터 검량선을 작성하고 peak의 높이로 시료의 chloride, chlorite 및 chlorate의 양을 정량하였다.

마) 산화-환원 전위 (ORP : oxidation-reduction potential)

전해분해수 50 mL를 비이커에 담아 시험용액으로 사용하였으며 실온에서 ORP meter (RE-12P, TOA Electronics, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

바) 차아염소산(HClO) 함량

전기분해수 50 mL에 KI 2 g, acetic acid 10 mL와 1% 전분 지시약을 한 두 방울 가하여 흑갈색이 되도록 한 후 0.1 N Na₂S₂O₃ 의 소비 mL를 다음식에 따라 환산하여 차아염소산(ppm)으로 표시하였다.

사) Trihalomethane (THMs)

이산화염소수의 THMs는 liquid-liquid extraction gas chromatographic method에 따라 분석하였다. 채취한 시료를 n-pentane으로 추출한 다음 emulsion 층을 제거하기 위해 8,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 추출액을 0.20 µm membrane filter로 여과한 다음 ECD가 장착된 GC

(Model : GC-2010, Shimazu Co., Japan)에 주입하여 분석하였다. 사용한 column은 fused silica capillary column인 BP20 (30m×0.25mm, 0.25um)이었다. 표준물질로 사용한 bromoform (CHBr₃), bromodichloromethane (BDCM), dibromochloromethane (DBCM) 및 chloroform (CHCl₃)는 Aldrich사, calibration mix는 Supelco사의 volatile organics calibration mix를 사용하였다. 내부 표준물질로서는 1,2-dibromopropane을 이용하였다. 온도 프로그램은 35°C(5 min)→70°C (10°C/min)→200°C(20°C/min)이었으며, injector의 온도는 175°C, detector는 300°C이었고 carrier gas는 1.6 ml/min의 He, makeup gas는 46 ml/min의 N₂이었다.

아) Haloacetic acids (HAAs)

HAAs의 분석은 이산화염소수 시료 30 mL를 TFE-faced septum을 갈색 polypropylene screw cap vial에 넣은 다음 surrogate standard 1 (5 uL of a solution of 2-bromopropionic acid 60 mg/L in MTBE)을 가하고 3 mL의 진한 황산(pH<0.5)를 넣은 다음 무수 황산나트륨 12 g과 3 g의 copper(II) sulfate pentahydrate 및 2 mL의 MTBE를 차례로 가하였다. Vial을 2분간 진탕한 다음 5분간 정치하고 추출액 0.9 mL를 14 mL 용량의 vial로 옮겨 2 mL의 황산과 10% 메탄올 용액을 가하고 surrogate standard 2 (1 uL of a solution of 2,3-dibromopropionic acid 60 mg/L in MTBE)를 가하였다. 50°C의 수욕에서 1시간 동안 가열한 다음 10분간 40°C로 냉각하였다. 5 mL의 copper(II) sulfate pentahydrate/anhydrous sodium 용액을 하가고 2분간 진탕하고 5분간 정치하여 liquid-liquid extraction한 다음 0.3 mL를 2 mL vial로 옮겨 1 uL를 GC에 주입하여 분석하였다. 이때 사용한 GC는 GC (Model : GC-2010, Shimazu Co., Japan)이었으며 column은 DB-1 (30m×0.32 mm, 0.25 um)의 것으로 carrier gas는 1.6 mL/min의 헬륨을, makeup gas는 46 mL/min의 질소를, 오븐 온도는 35°C(9 min)→40°C(3 min)→220°C(10 min)로 설정하였으며, injector 온도는 175°C, detector 온도는 300°C이었다.

3) Quantitative suspension test

이산화염소수의 살균력 유효성 평가는 EU CEN 1276:1997 (Quantitative suspension test)에 따라 오염조건에서 평가하였다. 사용한 경수는 MgCl₂, CaCl₂, NaHCO₃ 혼합액(600 ppm)이었으며, neutralizer는 lecithin, polysorbate 80, sodium thiosulfate, l-histidine 및 saponine의 혼합액이었다. 간섭물질로는 0.3%(w/v) bovine serum albumin을 사용하였다.

4) 구형 type 표면 세척 방법 및 시스템 성능평가

가) 시료의 전처리

시료의 전처리는 세척 시 적정 처리시간을 알아보기 위해 마이크로버블기를 이용하여 세척조에 마이크로버블수를 생성되게 한 다음 시료를 넣어 시간별로 무세척(CT), 1분(MW1), 3분(MW3), 5분(MW5)으로 각각 세척한 다음 15초간 탈수한 후 저장하였다. 세척방법에 따른 시험은 무세척(CT), 손세척(HW), 일반버블세척(GW), 마이크로버블세척(MW)을 적용하였다. 일반버블세척과 마이크로버블세척은 본 연구원에서 개발, 제작한 기계(신선채소용 세정 및 탈수 System, 한국식품연구원, 2008)를 이용해 세척하였으며, 세척조에 물을 가득 담아 물을 흘려보내며 버블을 작동시켜 충분히 생성되게 한 후 시료를 담가 처리하였고, 동일한 조건을 주기위해 손세척 방법 또한 물을 가득 담아 물을 흘려보내며 5분간 세척하였다. 현장 시험 생산은 신선편이채소류 생산 판매업체인 경기도 광주시에 위치한 (주)싱싱원에서 별도로 현장적용 시험하였다. 즉 현재 싱싱원에서는 2차 와류버블 세척을 하고 3차세척은 전해수로 세척하고 있었다. 따라서 현장기존 방식대로 시험한 처리구와 별도로 2차 세척후 마이크로버블과 염소수, 자외선살균수 등을 각각 또는 혼합처리하여 세정 및 살균효과를 살펴보았다. 세척 처리수 종류에 따라 마이크로버블을 이용해 세척한 경우 무세척, 마이크로버블, 자외선수, 전해수(100ppm), 초음파수, 차염소산수(50ppm), 일반버블로 각각 5분간 세척처리 후 15초간 탈수하여 처리구와 무처리구를 비교 관찰하였으며, 세척수 온도에 따른 적합한 온도를 설정하기 위해 무세척과 0℃, 5℃, 10℃ 처리수 온도에 따라 각각 5분간 세척처리 후 품질변화를 측정하였다. 유자의 잔류농약 제거율을 검토하기 위해 사용된 세척수로 무세척(대조구), 수도수, 강산성수(SAcEW), 약알칼리수(LAIEW), 미산성수(LAcEW), 이산화염소수(ACD) 및 오존수(Ozon)를 이용하였다. 시료는 10배의 세척수에 15분간 침지하였으며 강산성수와 약알칼리수는 유효 염소 농도 90 ppm 수준, 미산성수, 이산화염소수 농도는 30 ppm 수준이었으며 오존수는 1 ppm이었다.



그림 1-1. 농약의 제조 및 침지



그림 1-2. 침지 후 건조

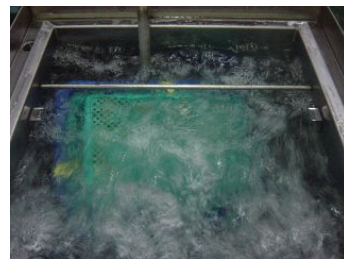
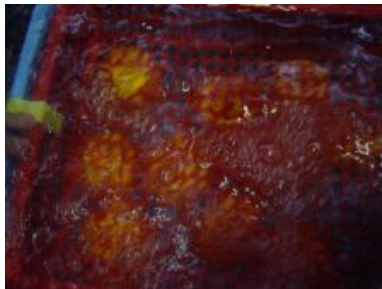


그림 1-3. 일반버블 세척

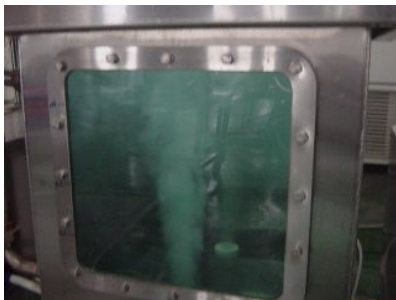


그림 1-4. 마이크로 버블 세척

나) 전해수 물성측정

전해산화수의 pH는 pHmeter(thermo scientific, ORION 3 STAR potable pH meter, USA)로 측정하였으며, 산화환원전위(oxidation-reduction potential: ORP)는 ORP meter(TOA Electronics, RM-20P, JAPAN)로 측정하였다. ppm은 전해산화수 50mL에 요오드칼륨 3g, 초산 10 mL을 가하여 흑갈색이 되도록 한 후 0.01N-Na₂S₂O₃(SAMCHUN PURE CHEMICAL, FACTOR=1.000±0.005(at. 20℃))로 용액이 투명해질 때까지 적정하였다. ppm의 값은 다음의 식에 적용하여 계산하였다.

$$\text{ppm} = 0.01\text{N-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{의 적정값} \times 7.092$$

다) 마이크로 버블크기 측정

마이크로 버블크기의 측정은 전자현미경을 이용하여 측정하였으며, 직경은 사선길이를 측정하였다.

라) 미생물 측정

미생물 총균수는 일정량의 시료를 채취하여 멸균수 10배를 가해 1분간 균질화 한 다음 단계별로 희석하여 1ml씩 배지에 도말하고 37℃에서 48시간 배양 후 colony수를 측정하였으며, log colony CFU/g으로 나타내었으며, 미생물 검출에는 총균수 측정용 배지(Petrifilm™ plate, 3M Co., USA)를 사용하였다. E.coli(대장균)의 측정은 일정량의 시료를 채취하여 멸균수 10배를 가해 1분간 균질화 한 다음 단계별로 희석하여 1ml씩 대장균 측정용 배지(Petrifilm™ plate, 3M Co., USA)에 도말하고 35℃에서 48시간 배양하여 측정하였다. *Listeria monocytogenes*의 측정은 UVM-modified Listeria 증균배지를 가해 30℃에서 24시간 증균배양 한 다음 Tryptic Soy agar에 접종하여 30℃에서 24-48시간 배양하였으며, *Salmonella*의 미생물 검정은 Rappaport-Vassiliadis 배지에 접종하여 42℃에서 24±2시간 증균배양 한 후 MacConkey 한천배지에 접종하여 35℃에서 24시간 배양하여 측정하였다. *Staphylococcus aureus* (황색포도상구균)의 미생물 검정은 10% NaCl을 첨가한 TSB배지에 가한 후 35-37℃에서 16시간 증균배양 한 다음에 난황첨가 만니톨 식염한천배지에 접종하여 37℃에서 16-24시간 배양하였다. *Bacillus cereus* 측정은 MYP 한천평판배지에 단계별 희석하여 1ml 씩 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 측정하였으며, 보통의 한천배지에 접종하여 30℃에 24시간 배양하여 확인시험 하였다.

마) 기호도 조사

기호도 조사는 패널 10명을 대상으로 실시하였으며, 9점 척도법을 이용하여 외관, 시든정도, 변색, 부패, 냄새, 씹김정도, 조직감, 전반적인 기호도에 대하여 기호도 조사를 실시하였다.

바) 잔류농약분석

세척방법에 따른 농약의 제거효과 측정을 위해 살균제 사용지침서의 사용량(1ℓ/2g)에 따라 각 제제를 증류수에 용해하여 분무기를 이용해 상추를 흠뻑 적실 정도로 동일하게 분사한 후 24시간동안 물기를 건조시킨 다음 각각의 세척방법에 따라 세척하여 농약잔류시험법에 따라 잔류농약을 측정하였다.

사) Video microscope system을 이용한 세척평가
200만화소의 이동식 Video microscope system(EGVM-358, Sometech.Co.Ltd, Korea)을 이용하여 60배율의 광학렌즈로 측정하였다.

5) 세척/살균/물기 제거에 따른 유자의 가공 특성 및 저장 중 품질 특성 변화

가) 재료

유자는 전남 고흥에서 11월에 시료로 사용하였다. 미생물 감소 효과 실험을 위해 *E. coli*(ATCC10536, 조사 대상 농약은 우리나라 식품위생법에 잔류허용 기준에 설정되어 있는 살충제로 chloropyrifos, prothiofos, spirodichlofen, deltamethrin, benomyl, thiophanate-methyl 및 acequinocyl 이었으며 정보는 table과 같다. 클로로피리포스 수화제(더스반, 동부 하이텍), 프로티오포스 유제(도쿠치온, 동부정밀화학), 스피로디클로펜 수화제(시나위, 바이엘), 델타메스린 유제(데시스, 경농), 베노밀 수화제(벤레이트, 신젠타 코리아), 티오판테이트메틸 수화제(지오판, 동부정밀화학) 및 아세퀴노실 액상수화제(가네마이트, 경농)은 1000배 희석하여 사용하였다.

나) 유자 세척 방법

미생물의 감소 효과를 실험하기 위해 유자를 *E. coli* 배양액에 10분 동안 침지한 후 실온에서 2시간 정도 건조하여 시료로 사용하였다. 잔류농약은 검출량이 소량이어서 세척에 의한 감소효과를 정확히 구명할 수 없다. 따라서 농약 분석용 시료는 인위적으로 농약 용액에 침지시켜 사용하였다. 희석된 농약용액에 껍을 10분 침지한 후 3시간 동안 말려서 저온에서 24시간 방치한 후 시료로 사용하였다. 세척방법은 시작기를 이용한 기계 세척, 강산성수에 침지 후 기계 세척, 기계세척 후 강산성수 침지, 세정제 침지 방법으로 하였으며 대조구로 수도수에 침지하였다. 기계 세척의 조건은 노즐 회전수 분당 70회, 컨베이어 벨트 이송속도 분당 2.76 m, 수압 9 Mpa이며 강산성수 물성은 ORP 1051 mV, pH 2.88, 농도 105.5 ppm이다. 세정제는 시중에 판매하는 sugar bubble(주) 슈가버블, 한국)을 구입하여 물 1 L에 세정제 5 mL를 희석하여 사용하였다. 수도수 강산성수 및 세정제 세척은 10분 동안 침지하였으며 기계 세척 시 세척라인에서 세척되는 시간은 약 45초였다.

다) 유자차 제조

유자는 세척방법을 달리한 후 유자차를 제조하였다(Fig. 3). 수도수, 기계

세척, 기계세척 후 산성수 세척, 시중에 판매되고 있는 세제를 이용한 세척으로 달리하였고 대조구로 수도수에 담군 후 유자차를 만들어 비교 실험 하였다. 유자 38g, 설탕 52g, 과당 8g, 구연산 1g, 비타민 C 0.6g, 펙틴 0.4g 비율로 유자차를 만든다. 30℃에 저장 2주일 간격으로 실험하였다.

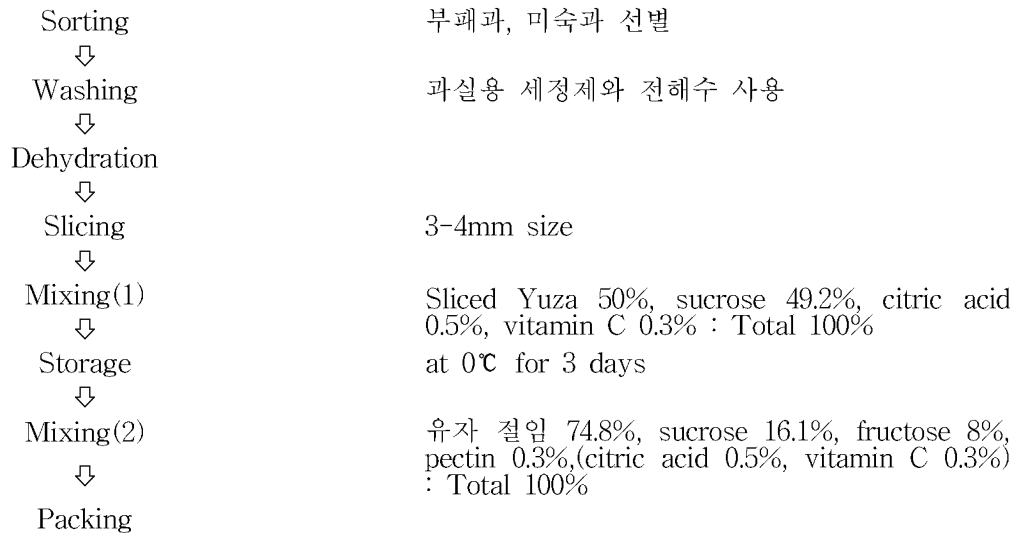


Fig. 3. Manufacture method of Yuza tea

라) 미생물 시험

유자는 껍질을 벗겨 멸균팩에 넣고 껍질의 10배의 멸균된 0.85% 생리식염수를 넣어 stomacher로 1분간 균질화 시킨 후 각각의 시료액을 1 mL씩 취하여 9 mL의 멸균된 0.85% 생리식염수로 단계별로 희석하여 페트리디쉬에 1 mL씩 넣은 후 pouring method법으로 실험하였다. 배지는 chromacult agar(Merck, germany)를 사용하였으며 배지를 부은 후 37℃에서 24시간 배양한 후 colony수를 측정하여 colony forming unit(CFU/g)으로 표시하였다.

마) 잔류농약 분석

생략(Table 3, 4, 5 참조)

바) pH 및 산도

유자청 10 g을 증류수 50 mL으로 정용하여 pH및 산도를 측정하였다. pH는 시료를 분쇄하여 cheese close로 여과한 후 여과액을 pH meter(AB15 fisher Scientific, USA)로 측정하였다. 산도는 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.3이 될 때까지 적정 소모된 mL 수로 나타내었다.

사) 환원당

시료를 50배 희석한 후 여과액 1 mL를 취하여 DNS 시약 2 mL을 첨가

해 10분 동안 끓여 냉각 후 10 mL로 정용하여 혼합한 후 흡광도 540 nm 로 측정하였으며 0.2~2.0 mg/mL 농도의 glucose로 standard curve로부터 환원당을 환산하여 glucose 농도로 계산하였다.

아) 관능평가

유자차의 관능 평가 항목은 향, 색, 맛, 씹힘성, 전반적인 기호도에 대해 평가하였다. 유자 30 g에 100 mL 물을 부어 잘 섞은 후 50°C 온도를 유지하여 제공하여 9점 평점법으로 실시하였다. 결과의 유의성 검증은 Statistic Analysis System(SAS)을 이용하여 Duncan's multiple range test 방법을 사용하여 0.05% 수준에서 유의성을 분석하였다.

6) 통합형 구형 Type 표면 세척/살균/물기 제거 시스템 설계 및 성능평가

가) 기계 세척 조건

실험에 이용된 유자는 2009년 11월 전남 고흥에서 수확된 것을 이용하였다. 유자 세척을 위해 제작된 시작기는 세척공정과 탈수공정으로 이루어져 있으며 세척공정 조건은 수압 6~12 Mpa, 노즐 회전수 0~70회/분, 컨베이어 벨트 이송속도 0~8.28 m/분으로 조절 가능하였다. 본 실험에서 세척을 실험은 수압 6, 9, 12 Mpa, 노즐 회전수 10, 40, 70회/분, 컨베이어 벨트 이송속도 2.76, 5.52, 8.28 m/분 조건으로 실시하였다.



Fig. 4. Mechanical washer system.

나) 세척율 시험

유자의 세척율을 측정하기 위해 오징어 먹물을 도포하여 세척 정도를 측정하였다. 시중에 판매하는 오징어 먹물 분말(오징어먹물추출분말, edentownfnb)을 구매하여 증류수에 10배 희석하여 유자를 침지한 후 하루 동안 실온에서 건조하여 시료로 사용하였다. 세척 후 50 mL 증류수에 잔여량을 씻어내어 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 초기 시료의 흡광도

와 비교하여 세척율을 계산하였다.

다) 세척효과 검증

사용조사 대상 농약은 우리나라 식품위생법에 잔류허용 기준에 설정되어 있는 살충제로 Chloropyrifos, spirodichlofen, prothiofos, benomyl, thiophanate-methyl 및 acequinocyl이었으며 주요 내용은 table 과 같다. 클로로피리포스 수화제(더스반, 동부 하이텍), 스피로디클로펜 수화제(시나위, 바이엘 크롭사이언스), 프로티오포스 유제(도쿠치온, 동부정밀화학), 베노밀 수화제(벤레이트, 신젠타 코리아), 티오파네이트메틸 수화제(지오판, 동부정밀화학) 및 아세퀴노실액상 수화제(가네마이트, 경농)는 1000배 희석하여 사용하였다. 희석액 2 L에 10분간 완전히 침지하여 24시간 동안 건조하여 세척수별로 세척한 다음 농약 잔류량을 분석하였다. 세척처리에 따른 시료의 추출, 정제 및 잔류농약 분석은 식품공전 방법으로 하였다. 유자껍질을 마쇄하여 20 g을 300 mL beaker에 담고 100 mL acetonitrile 을 넣어 homogenizer로 1분간 균질화한 후 감압여과 한다. 여과액을 NaCl 10 g이 담긴 분리병에 담고 1분간 진탕한 후 층분리가 되도록 3시간 방치한다. 분리된 상층액 20 mL을 취하여 40°C 이하의 수욕조 중에서 질소가스를 통과시키면서 소량 남을 때까지 농축한 후 일정액으로 정용한 후 활성화된 Florisil cartridge(Waters, USA)에 시료를 전개한 후 20% acetone/hexane 으로 용출하고 농축 후 20% acetone/hexane 2 mL로 용해하여 GC와 HPLC로 분석 하였다. 미생물은 감소 효과 실험을 위해 E.coli(ATCC10536)을 nutrient broth(Difco, USA)에 24시간 동안 배양한 후 배양액에 유자를 5분간 침지한 다음 실온에서 2시간 건조한 후 시료로 사용하였다. 세척 후 유자는 껍질을 벗겨 멸균팩에 넣고 껍질의 10배의 멸균된 0.85% 생리식염수를 넣어 stomacher로 1분간 균질화 시킨 후 각각의 시료액을 1 mL씩 취하여 9 mL의 멸균된 0.85% 생리식염수로 단계별로 희석하여 펠트리디쉬에 1 mL씩 넣은 후 pouring method으로 실험하였다. 배지는 chromacult agar(Merck, germany)를 사용하였으며 배지를 부은 후 37°C에서 24시간 배양한 후 colony수를 측정하여 colony forming unit(CFU/g)으로 표시하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 이산화염소수 최적 생성조건 실험

가) 이산화염소 농도별에 따른 chlorine dioxide, chlorite, chlorate 및 유효염소량 비교 분석

이산화염소 생성/발생 방법은 US EPA guidance manual의 발생 방식에 따라 acid-chlorite, aqueous chlorine-chlorite, recycled aqueous chlorine or "French loop", gaseous chlorine-chlorite, gaseous chlorine-solids chlorite matrix, electrochemical 및 acid/peroxide/chlorite 등으로 구분할 수 있다. 그러나 상업적인 발생기는 정수처리나 하수처리용으로서 설비규모가 크고, 운전관리가 어려우며, 대용량, 고농도(최대 약 4,000 ppm) 발생설비가 일반적이다. 또한 일본 식품업체에서 사용하고 있는 안정화 이산화염소는 낮은 순도와 높은 chlorite 잔류량으로 인해 안전성을 보장하는데 한계가 있다. 따라서 세정·살균 등의 공정에 이산화염소를 활용하기 위해서는 수용액 상태의 현장에서 직접 발생시켜 사용할 수 있는 형태의 화학적 안전성이 확보된 고수율/고순도 발생방법에 대한 검토가 이루어져야 한다. 이에 따라 유자의 세정·살균 등의 공정에 적합한 이산화염소수 발생장치를 제작하고 생성원료인 NaClO₂과 Cl₂ 가스량에 따른 생성효율을 우선적으로 분석·검토하였다. 생성장치의 최적 NaClO₂ 농도 및 Cl₂ gas 투입량을 알아보기 위하여 NaClO₂는 0.01%, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% 및 0.1%로, Cl₂ gas는 100-1,000 g/hr로 농도와 투입량을 달리하면서 ClO₂ 생성량을 분석한 결과는 Fig. 5와 같았다. 생성된 ClO₂의 농도는 대체적으로 NaClO₂의 농도 및 투입되는 Cl₂ gas의 투입량 증가에 따라 0.01% NaClO₂, 1,000 g/hr Cl₂ gas에서 36 ppm, 0.02% NaClO₂, 1,000 g/hr Cl₂ gas에서 111 ppm, 0.04% NaClO₂, 1,000 g/hr Cl₂ gas에서 262 ppm, 0.06% NaClO₂, 1,000 g/hr Cl₂ gas에서 467 ppm, 0.08% NaClO₂, 800 g/hr Cl₂ gas에서 840 ppm, 0.1% NaClO₂, 1,000 g/hr Cl₂ gas에서 1,287 ppm의 최대 생성량을 나타내었다. 생성된 이산화염소수의 free available chlorine(FAC) 함량을 측정된 결과는 Fig. 6와 같았다. 즉, FAC는 투입된 NaClO₂ 농도 및 Cl₂ gas 투입량이 증가할수록 생성량이 증가하였다. 이산화염소수 발생기에 요구되는 FAC는 통상 95% 이상의 수율에서 5% 이하이며, FAC는 발생기의 생성효율과 직접적인 관계를 가지므로 최대한으로 억제될 수 있는 조건 설정이 필요하다. 0.01% NaClO₂에서는 Cl₂ gas의 투입량 증가에 따라 2.4~4.8 ppm, 0.01% NaClO₂에서는 2.5~22.6 ppm, 0.04% NaClO₂에서는 17~75 ppm, 0.06% NaClO₂에서는 35~198 ppm, 0.08% NaClO₂에서는 90~410 ppm, 0.1% NaClO₂에서는 110~720 ppm을 나타내었다. Chlorate의 생성량 변화를 측정된 결과는

Fig. 7과 같았다. 생성량은 0.01% NaClO₂에서는 Cl₂ gas의 투입량 증가에 따라 0.0~0.45 ppm, 0.01% NaClO₂에서는 3.7~10.9 ppm, 0.04% NaClO₂에서는 0 ppm, 0.06% NaClO₂에서는 0 ppm, 0.08% NaClO₂에서는 20.42~27.7 ppm, 0.1% NaClO₂에서는 20.1~29.5 ppm을 나타내었다. Chlorate는 생성시 ClO₂⁻ : Cl₂의 비율이 과도하게 높거나, 낮은 pH 조건에서 free chlorine의 농도가 매우 높을 때 chlorate ion을 생성된다고 보고된 바 있다. 본 실험에서도 FAC의 생성량이 높았던 반응비율에서 상대적으로 chlorate의 생성량도 높게 나타났다. Inorganic byproduct인 chlorite의 생성량 변화를 측정한 결과는 Fig. 8와 같았다. 0.01% NaClO₂에서는 Cl₂ gas의 투입량 증가에 따라 0.0~18.8 ppm, 0.01% NaClO₂에서는 0.6~102.8 ppm, 0.04% NaClO₂에서는 0~472 ppm, 0.06% NaClO₂에서는 0~842 ppm, 0.08% NaClO₂에서는 3.2~4,935 ppm, 0.1% NaClO₂에서는 924~4,935 ppm을 나타내었다. 이것은 반응효율적 측면에서 NaClO₂:Cl₂ 비율에 따른 미반응 잔류물로 생각되었다.

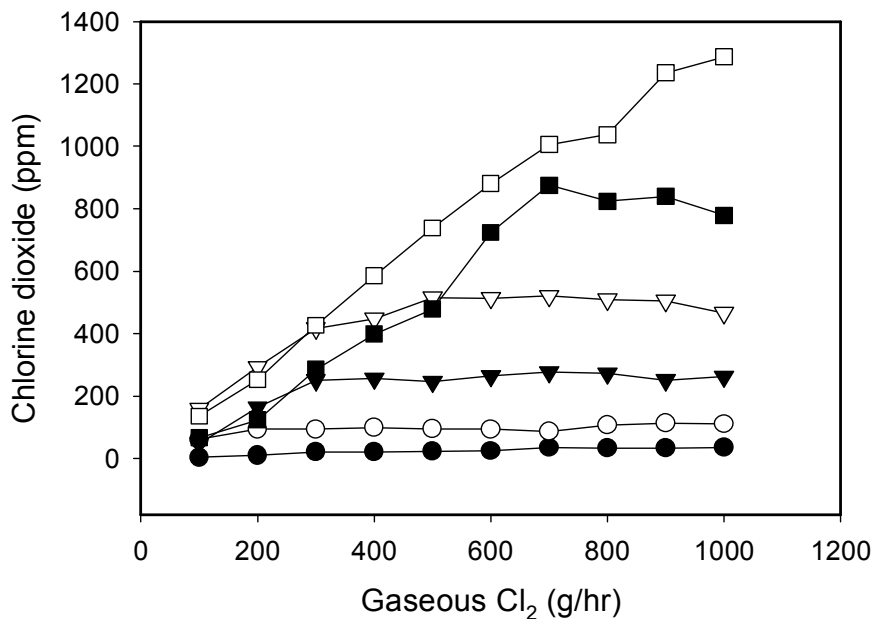


Fig 5. Changes of ClO₂ concentration generated according to concentration of NaClO₂ solution and amounts of gaseous Cl₂. NaClO₂ concentrations were 0.01% (●), 0.02% (○), 0.04% (▼), 0.06% (▽), 0.08% (■) and 0.1% (□). Data represent means of three replications.

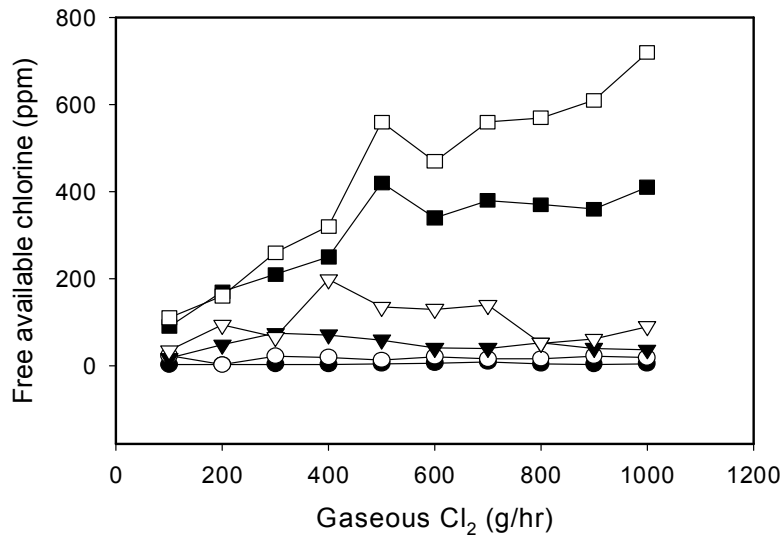


Fig 6. Changes of FAC (free available chlorine) concentration generated according to concentration of NaClO₂ solution and amounts of gaseous Cl₂. NaClO₂ concentrations were 0.01% (●), 0.02% (○), 0.04% (▼), 0.06% (▽), 0.08% (■) and 0.1% (□). Data represent means of three replications.

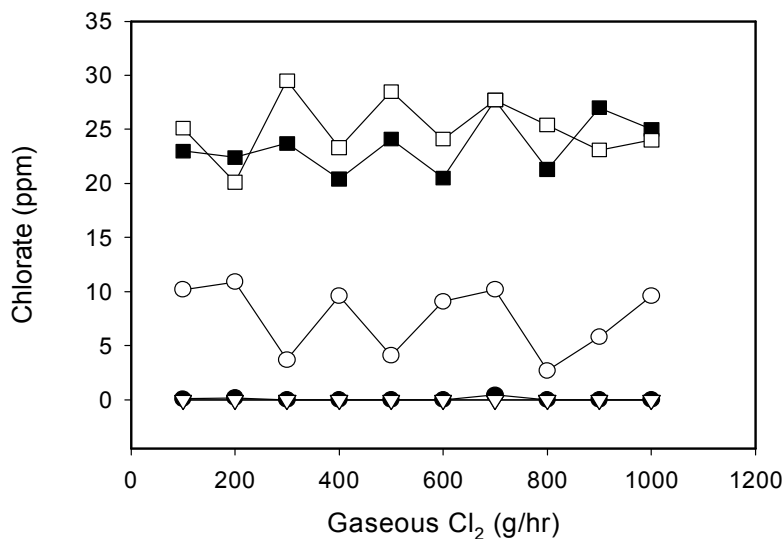


Fig 7. Changes of ClO₃⁻ concentration generated according to concentration of NaClO₂ solution and amounts of gaseous Cl₂. NaClO₂ concentrations were 0.01% (●), 0.02% (○), 0.04% (▼), 0.06% (▽), 0.08% (■) and 0.1% (□). Data represent means of three replications.

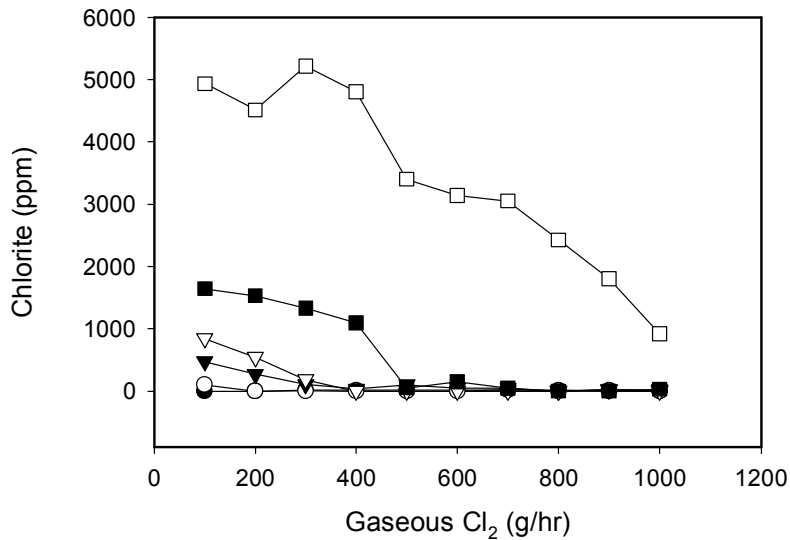


Fig 8. Changes of ClO_2^- concentration generated according to concentration of NaClO_2 solution and amounts of gaseous Cl_2 . NaClO_2 concentrations were 0.01% (●), 0.02% (○), 0.04% (▼), 0.06% (▽), 0.08% (■) and 0.1% (□). Data represent means of three replications.

NaClO_2 농도 및 Cl_2 gas 투입량에 따른 이산화염소수의 생성 순도와 수율은 Fig. 9 및 10와 같다. 수율은 chlorite 및 chlorate와 생성량이 직접적인 영향을 미치므로 chlorite와 chlorate의 생성량이 낮았던 NaClO_2 및 Cl_2 의 투입농도범위에서 높은 값을 나타내었다(Fig. 9). 즉, 0.01% NaClO_2 에서는 200~600 g/hr Cl_2 gas에서 95%수준, 그리고 0.1% NaClO_2 에서는 500~1,000 g/hr에서 96%이상의 수율을 나타내었다. 적절히 잘 설계된 시스템에서는 거의 100%수준에 이르는 매우 높은 수율을 나타내지만 생성 수율은 전환율과는 달리 실제 생성방식에 따라 acid-chlorite type은 80% 수준, aqueous chlorine-chlorite type은 약 80~92%, recycled aqueous chlorine or "French loop" type은 92~98%, gaseous chlorine-chlorite type은 95~99%(<2% excess Cl_2)인 점을 감안할 때 본 생성기로 발생시킨 ClO_2 의 수율과 순도는 적절한 수준으로 판단된다.

한편, 이산화염소수의 순도는 chlorite, chlorate 및 FAC의 생성량과 직접적인 관련을 가지므로 Fig. 10에서와 같이 chlorite, chlorate 및 FAC의 생성량이 작았던 NaClO_2 및 Cl_2 의 농도범위에서 높은 값을 나타내었다. 즉, 0.01% NaClO_2 에서는 200, 300, 400, 600 및 1,000 g/hr Cl_2 gas에서 93% 수준을, 0.05% NaClO_2 에서는 900 g/hr Cl_2 gas에서 94.0%, 그리고 0.1% NaClO_2 에서는 800과 900 g/hr Cl_2 gas에서 95.0%의 최대 순도를 나타내었다.

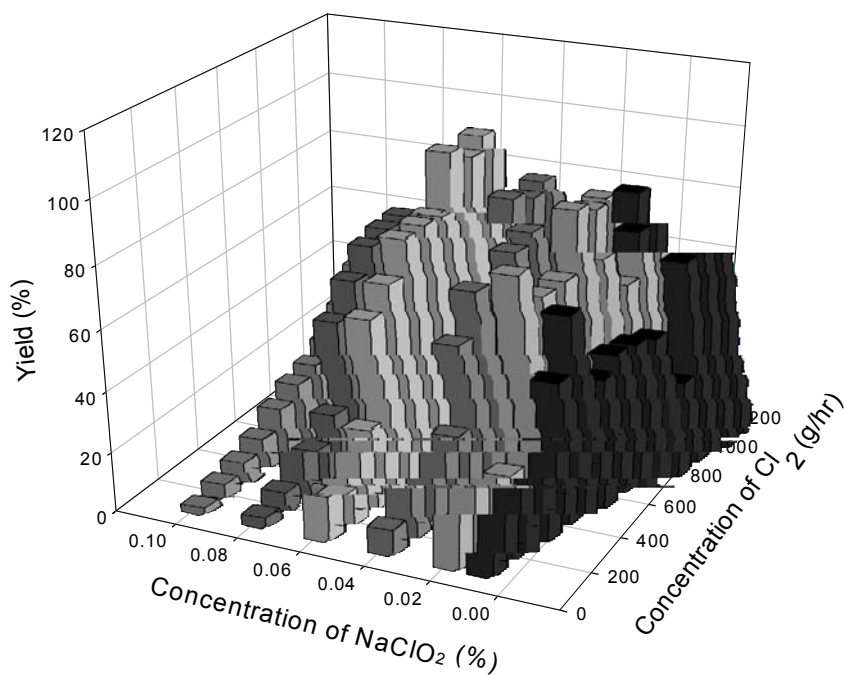


Fig 9. Changes in yield of ACD(aqueous chlorine dioxide) generated according to concentration of NaClO₂ solution and amounts of gaseous Cl₂.

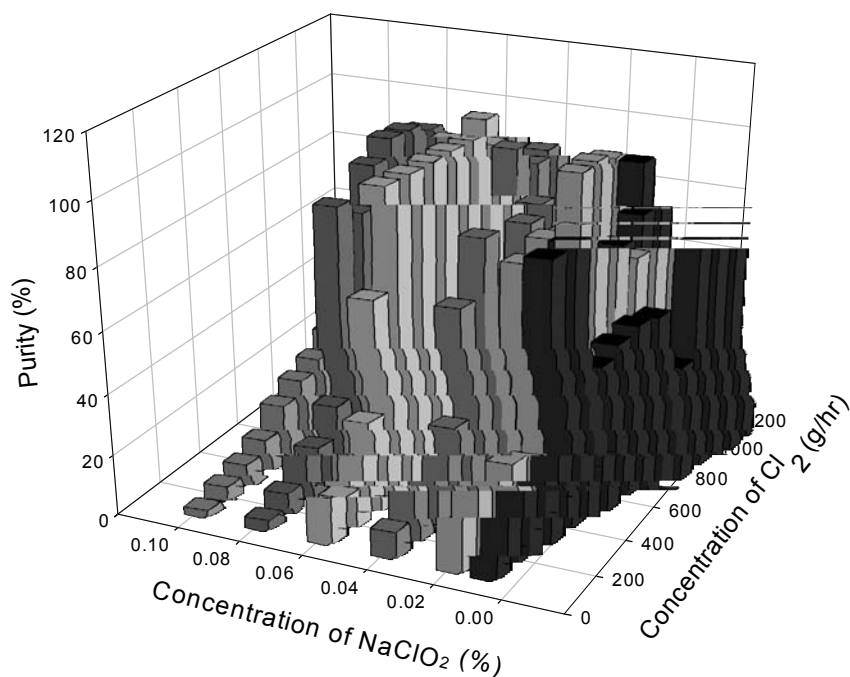


Fig 10. Changes in purity of ACD(aqueous chlorine dioxide) generated according to concentration of NaClO₂ solution and amounts of gaseous Cl₂.

나) 미생물에 대한 살균유효성 평가

Aspergillus flavus KFRI 855 등 36종의 미생물에 대한 이산화염소수의 살균 유효성을 평가한 결과는 Table 6과 같았다. 평가 대상 36종 중 *Aspergillus flavus* KFRI 855만이 30 ppm에서 6 log의 살균효과를 나타내었으며, *Aspergillus niger* KFRI 993 등 10종은 20 ppm에서, 그리고 *Aspergillus niger* 466 등 25종은 모두 10 ppm의 이산화염소 농도에서 6 log의 살균효과를 보였다.

Table 6. Evaluation results of sterilization activity of aqueous chlorine dioxide on some bacteria, fungi and yeasts in dirty condition

Microorganism(Strain No.)	ClO ₂ (ppm)			
	10	20	30	
<i>Aspergillus flavus</i> (KFRI 855)	<i>N</i> ¹⁾	2.8×10 ⁶	2.8×10 ⁶	2.8×10 ⁶
	<i>N_a</i> ²⁾	1.1×10 ³	1.8×10 ¹	ND ³⁾
<i>Aspergillus niger</i> (KFRI 993)	<i>N</i>	4.4×10 ⁷	4.4×10 ⁷	
	<i>N_a</i>	5.3×10 ²	ND	
<i>Aspergillus niger</i> (KFRI 466)	<i>N</i>	6.4×10 ⁶		
	<i>N_a</i>	ND		
<i>Bacillus subtilis</i> (KFRI 183)	<i>N</i>	3.6×10 ⁶		
	<i>N_a</i>	ND		
<i>Bacillus cereus</i> (KCCM 41293)	<i>N</i>	4.2×10 ⁷	4.2×10 ⁷	
	<i>N_a</i>	5.2×10 ¹	ND	
<i>Bacillus cereus</i> (KFRI 183)	<i>N</i>	7.9×10 ⁶		
	<i>N_a</i>	ND		
<i>Candida utilis</i> (KFRI 556)	<i>N</i>	4.3×10 ⁶		
	<i>N_a</i>	ND		
<i>Candida albicans</i> (KFRI 432)	<i>N</i>	3.8×10 ⁶		
	<i>N_a</i>	ND		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	<i>N</i>	4.1×10 ⁶		
	<i>N_a</i>	ND		
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (KCTC 3638)	<i>N</i>	6.0×10 ⁶		
	<i>N_a</i>	ND		
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> (KCTC 3643)	<i>N</i>	5.1×10 ⁶		
	<i>N_a</i>	ND		
<i>Enterococcus mundtii</i> (KCTC 3630)	<i>N</i>	3.3×10 ⁶	3.3×10 ⁶	
	<i>N_a</i>	1.0×10 ¹	ND	
<i>Enterococcus hirae</i> (KCTC 3616)	<i>N</i>	3.3×10 ⁷	3.3×10 ⁷	
	<i>N_a</i>	1.0×10 ¹	ND	
<i>Enterococcus faecalis</i> (KCTC 3511)	<i>N</i>	1.5×10 ⁶		
	<i>N_a</i>	ND		
<i>Enterococcus durans</i> (KCTC 3121)	<i>N</i>	8.1×10 ⁶		
	<i>N_a</i>	ND		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (KCCM 11391)	<i>N</i>	1.2×10 ⁷	1.2×10 ⁷	
	<i>N_a</i>	2.7×10 ¹	ND	

<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (KCCM 41285)	N	5.5×10^6	
	N_a	ND	
<i>Listeria monocytogenes</i> (KFRI 799)	N	8.6×10^6	
	N_a	ND	
<i>Listeria welshimeri</i> (KCTC 3587)	N	2.3×10^6	2.3×10^6
	N_a	5.8×10^1	ND
<i>Listeria seeligeri</i> (KCTC 3591)	N	9.3×10^6	9.3×10^6
	N_a	1.0×10^1	ND
<i>Listeria grayi</i> (KCTC 3581)	N	4.3×10^6	4.3×10^6
	N_a	1.6×10^1	ND
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> (KCTC 3444)	N	7.9×10^6	7.9×10^6
	N_a	2.7×10^1	ND
<i>Listeria innocua</i> (KCTC 3586)	N	8.3×10^6	8.3×10^6
	N_a	5.9×10^1	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (KCTC 3733)	N	7.2×10^6	7.2×10^6
	N_a	1.8×10^1	ND
<i>Lactobacillus brevis</i> (KFRI 466)	N	3.8×10^6	3.8×10^6
	N_a	1.0×10^1	ND
<i>Micrococcus luteus</i> (KFRI 455)	N	1.1×10^7	
	N_a	ND	
<i>Mucor rouxii</i> (KFRI 780)	N	1.3×10^6	
	N_a	ND	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KFRI 190)	N	3.8×10^6	
	N_a	ND	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (KFRI 194)	N	2.4×10^6	
	N_a	ND	
<i>Penicillium citrinum</i> (KCTC 3733)	N	2.5×10^6	
	N_a	ND	
<i>Rhizopus oryzae</i> (KFRI 1007)	N	5.2×10^6	
	N_a	ND	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC 6538)	N	7.0×10^7	7.0×10^7
	N_a	2.0×10^1	ND
<i>Salmonella typhimurium</i> (KFRI 251)	N	3.6×10^6	3.6×10^6
	N_a	1.6×10^1	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KFRI 1014)	N	3.0×10^6	
	N_a	ND	

1) Number of cfu/mL of the bacterial test suspension

2) Number of cfu/mL in the test mixture

3) ND : $<10^1$ CFU/mL

10~30 ppm의 농도를 달리하여 침지세정중의 오렌지의 총균수 변화는 다음의 Table 7과 같았다. 오렌지의 이산화염소수에 의한 감균효과는 이산화염소의 농도가 증가할수록 커져 침지 30분후 오렌지 껍질의 총균수는

각각 3.2 log CFU/g에서 10 ppm에서는 1.4 log CFU/g, 20 ppm에서는 1.5 log CFU/g, 30 ppm에서는 10¹ CFU/g 이하로 감소하였다.

Table 7. Viable cell count of orange peel disinfected with ACD(aqueous chlorine dioxide)

Microbial count	ACD (ppm)	Immersion time (min)			
		0	10	20	30
Viable cell count	10	3.2 (1.9) ¹	1.9 (1.0)	1.6 (0.8)	1.4 (0.9)
	20	3.2 (1.9)	1.8 (1.7)	1.2 (0.5)	1.5 (0.3)
	30	3.2 (1.9)	1.5 (1.8)	0.0 (0.2)	ND ²⁾

¹⁾ All results are presented as mean of triplicate.

²⁾ <10¹ CFU/g

다) 이산화염소수에 의한 침지세정중 염소계 화합물의 변화

오렌지의 침지세정중 염소계 화합물의 변화를 살펴본 결과, 이산화염소는 초기 10 ppm, 20 ppm 및 30 ppm에서 30분후 각각 8.9 ppm, 17.6 ppm 및 26.1 ppm으로 감소하여 초기 이산화염소의 농도가 높을수록 감소량이 큰 것으로 나타났다(Table 8). 그러나 초기농도에 대한 전반적인 감소비율은 유사하였다. Free Cl, NH₂Cl, NHCl₂, Oxi-Cl 및 Cl⁻의 함량의 전반적으로 감소하였으나 그 감소폭은 초기 함량에 비해 크지 않은 수준이었다. 한편 침지세정 살균중 대표적인 disinfection by-products(DBPs)인 chlorite와 chlorate의 농도 변화는 Fig. 11~12과 같았다. Chlorite 및 chlorate 모두 침지 시간의 경과에 따라 전반적으로 상승하였으며 초기 이산화염소의 농도가 높을수록 증가량이 큰 것으로 나타났다. DBPs는 일반적으로 살균과정에서 유기물과의 반응에 의해 생성되는 것이나 초기 농도는 생성후 실험 목적 농도로 희석하는 과정에서 산화 또는 환원에 의해 농도가 증가한 것으로 추정되었다. 이외에 이산화염소수의 pH는 100 ppm의 이산화염소수를 제외하고는 미미하게 상승하는 경향만을 나타내었으나 그 변화의 정도는 매우 작았다(Fig. 13).

Table 8. Changes in concentrations of chlorine species in 10-30 ppm of ACD(aqueous chlorine dioxide) during immersion disinfection of orange

(Unit : ppm)

ClO ₂	Chlorine species	Immersion time (min)			
		0	10	20	30
10	ClO ₂	10.0A (0.1) ¹⁾	9.8A (0.1)	9.7A (0.1)	8.9B (0.1)
	Free Cl	4.6A (0.1)	4.5A (0.0)	4.6A (0.1)	3.8B (0.0)
	NH ₂ Cl	0.4A (0.0)	0.2B (0.1)	0.3B (0.0)	0.2B (0.0)
	NHCl ₂	0.9A (0.0)	0.8B (0.0)	0.6C (0.0)	0.4D (0.0)
	Oxi-Cl	32.4A (0.6)	34.8AB (1.0)	31.4B (0.8)	27.6C (1.2)
	Cl ⁻	77.0B (1.6)	89.5A (4.0)	85.8AB (3.4)	93.8A (4.7)
20	ClO ₂	20.0A (0.1)	19.3AB (0.4)	17.9BC (0.1)	17.6C (0.6)
	Free Cl	8.1A (0.1)	7.8A (0.0)	7.5B (0.0)	7.4B (0.0)
	NH ₂ Cl	0.7A (0.0)	0.8A (0.0)	0.4B (0.0)	0.5B (0.0)
	NHCl ₂	1.1A (0.0)	0.9AB (0.0)	0.9AB (0.0)	0.7B (0.0)
	Oxi-Cl	56.0AB (1.0)	53.7AB (0.6)	56.2A (0.8)	52.3B (1.3)
	Cl ⁻	111.2A (6.6)	118.7A (2.8)	115.9A (3.2)	117.8A (4.1)
30	ClO ₂	30.1A (0.1)	27.6B (0.6)	26.6BC (0.6)	26.1C (0.1)
	Free Cl	13.2A (0.3)	12.3A (0.1)	10.5A (0.6)	10.5A (2.0)
	NH ₂ Cl	0.8B (0.0)	0.5D (0.0)	0.6C (0.0)	1.1A (0.0)
	NHCl ₂	1.5A (0.0)	1.3B (0.0)	0.9C (0.0)	1.3B (0.0)
	Oxi-Cl	94.3A (2.1)	94.7A (1.4)	97.8A (2.1)	95.7A (0.0)
	Cl ⁻	157.2A (1.4)	155.2A (1.4)	156.0A (0.3)	156.1A (0.1)

¹⁾ Data represent means(standard deviations) of three measurements. Values in the row sharing a common letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).

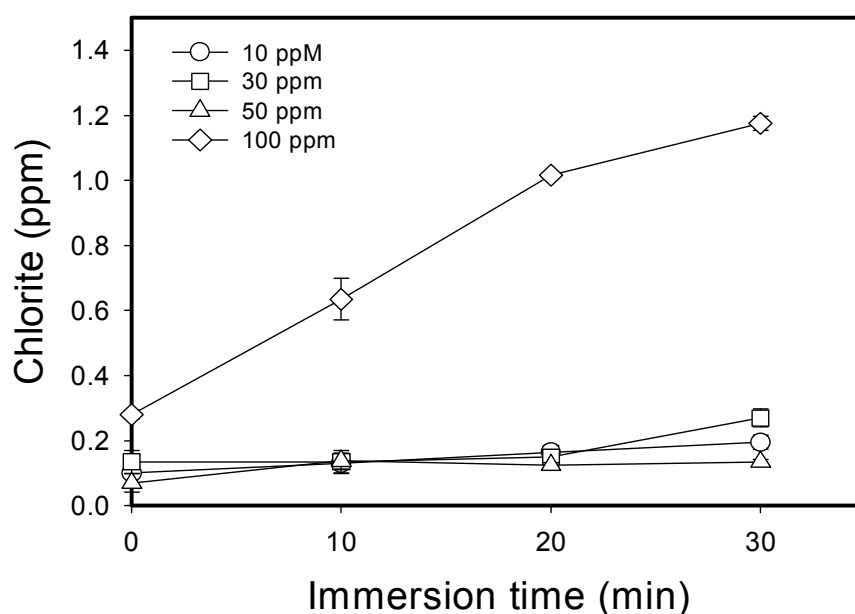


Fig 11. Changes in concentration of chlorite in ACD(aqueous chlorine dioxide) during immersion disinfection of orange. ClO₂ concentrations were 10 ppm (○),

30 ppm (□), 50 ppm (△) and 100 ppm (◇). Data represent means of three replications±standard deviations.

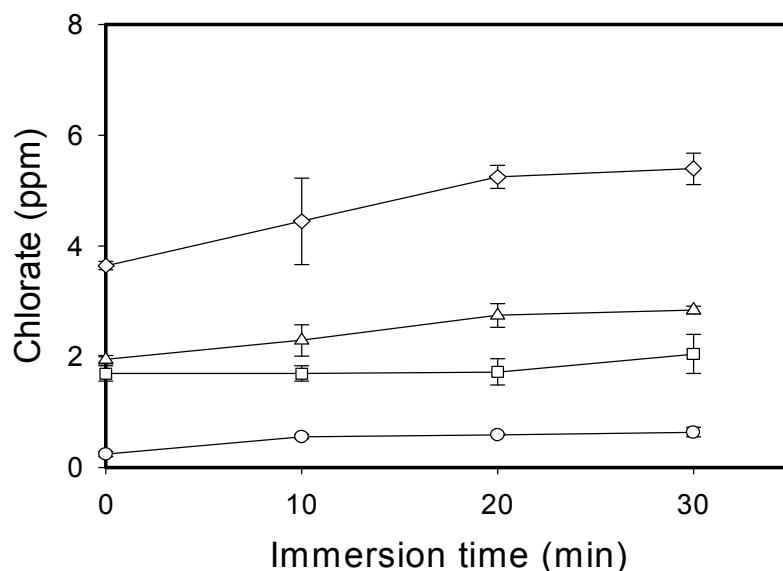


Fig 12. Changes in concentration of chlorate in ACD(aqueous chlorine dioxide) during immersion disinfection of orange. ClO₂ concentrations were 10 ppm (○), 30 ppm (□), 50 ppm (△) and 100 ppm (◇). Data represent means of three replications±standard deviations.

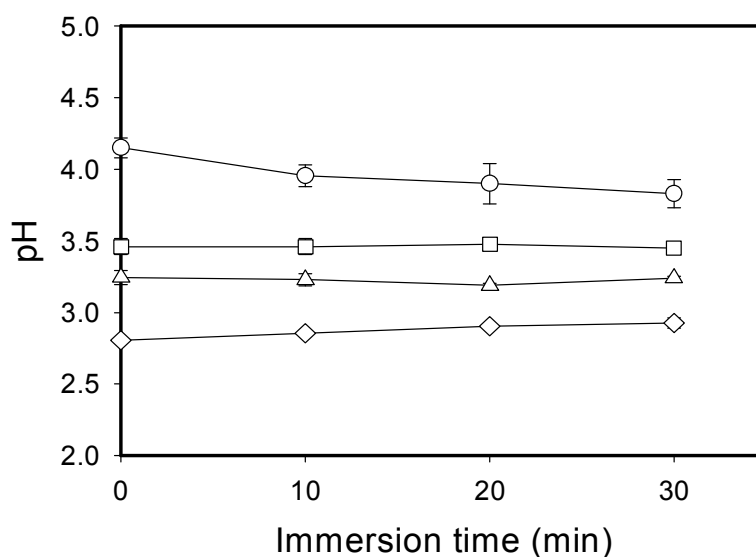


Fig 13. Changes in concentration of pH in ACD(aqueous chlorine dioxide) during immersion disinfection of orange. ClO₂ concentrations were 10 ppm (○), 30 ppm (□), 50 ppm (△) and 100 ppm (◇). Data represent means of three replications±standard deviations.

Table 9. Changes in THMs concentration in ACD (aqueous chlorine dioxide) during immersion disinfection of orange

(unit: ppb)

ACD (ppm)	Time (min)	THMs			
		Chloroform	Dichloro- brommethane	Dibromochloro- methane	Bromoform
10	0	542A ¹⁾	103A	ND ²⁾	ND
	10	455AB	105A	ND	ND
	20	472AB	90A	ND	ND
	30	418B	79A	ND	ND
30	0	524A	110A	ND	ND
	10	537A	98A	ND	ND
	20	566A	93A	ND	ND
	30	532A	94A	ND	ND
50	0	589A	96A	ND	ND
	10	509A	93A	ND	ND
	20	490A	96A	ND	ND
	30	448A	99A	ND	ND
100	0	631A	118A	ND	ND
	10	396B	89B	ND	ND
	20	510AB	107AB	ND	ND
	30	505AB	98B	ND	ND

¹⁾ Data represent means of three measurements. Values in the column sharing a common letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).

²⁾ Not detected

오렌지의 이산화염소수 침지세정중의 trihalomethanes(THMs)의 생성량을 분석한 결과는 Table 9와 같았다. 검출된 THMs은 chloroform, dichlorobromomethane이었으며 dibrochloromethane과 bromoform은 검출되지 않았다. 또한 chloroform, dichlorobromomethane도 이산화염소수의 농도 의존성 생성 패턴을 보이지는 않았다. 50 ppm의 이산화염소수 침지세정 살균중의 haloacetic acids의 생성량을 분석한 결과, BAA를 제외한 5종만이 검출되었으며 CAA, DCAA, TCAA, BCAA 및 DBAA 5종의 합계 값은 평균 416.4에서 30분후 450.9 ppb로 경시적인 증가를 나타내지 않았다(Table 10).

Table 10. Formation of haloacetic acids during immersion disinfection of orange with 50 ppm of ACD (aqueous chlorine dioxide)

(unit: ppb)

Immersion time (min)	HAAs						Sum
	CAA	BAA	DCAA	TCAA	BCAA	DBAA	
0	152.1 ¹⁾	ND ²⁾	38.6	58.0	144.9	38.7	416.4±58.3
10	142.9	ND	40.2	55.0	138.9	39.4	432.3±62.2
20	162.8	ND	42.5	56.4	132.5	40.2	434.4±62.0
30	150.5	ND	60.2	60.1	140.5	39.6	450.9±58.8

¹⁾ Data represent means of three measurements.

²⁾ Not detected

2) 전기분해 조건에 따른 생성수의 물리화학적 특성 분석

가) 전기분해조건에 따른 생성수의 물리화학적 특성 분석

강산성 및 약알칼리성 전기분해수의 생성시스템의 성능 평가를 위해 격막식 및 무격막식으로 구성된 전기분해수 생성장치의 판형 격막 간극에 따른 물성을 1단 및 2단으로 각각 운전하면서 pH, 산화환원전위 (oxidation-reduction potentials; ORP), 차아염소산 함량(available chlorine 함량으로), 전류 및 생성수량 등을 측정하였다(Table 11). 격막방식의 전기분해수 생성시스템의 최적조건은 간극 1.0 mm, 20% NaCl 첨가량 6 mL/min일 때 생성된 전기분해수의 물성치가 ORP 1,160 mV, pH 2.7, 차아염소산함량 96.3 ppm 수준으로 가장 우수하였다. 2단 격막 방식에서는 격막 간극에 관계없이 1.0 mm 조건에서 최적의 생성 조건을 나타내었다.

Table 11. Comparison of physicochemical properties of electrolyzed water generated from non-diagram and diagram type generator

Diagram type	Gap of diagram (mm)	NaCl (mL/min)	Amp.(A)	Water vol. (mL/min)	ORP(mV)	pH	Available chlorine (ppm)	
Diagram (1 stage)	0.5	4	15.2±0.6 ¹⁾	713.3±8.6	1125±3.4	3.2±0.1	49.2±2.4	
		6	15.8±0.1	720.4±15.4	1130±9.5	3.2±0.1	56.0±1.6	
	0.8	4	11.5±1.3	752.6±17.3	1154±5.3	2.8±0.1	68.2±1.0	
		6	13.4±0.9	698.0±14.2	1160±6.2	2.7±0.1	80.3±1.5	
	1.0	4	11.5±0.8	703.8±26.1	1151±17.7	2.7±0.1	65.5±6.6	
		6	15.3±0.5	722.4±6.9	1170±2.7	2.5±0.1	96.3±7.9	
	2.0	4	9.6±0.8	735.2±12.5	1124±15.4	5.6±0.8	38.5±0.5	
		6	9.9±0.3	730.9±2.8	1098±13.2	6.1±0.3	49.0±3.1	
	3.0	4	8.5±1.2	690.0±13.8	1162±7.2	3.2±0.5	60.2±0.8	
		6	9.4±0.6	682.1±4.3	1045±1.6	2.9±0.1	84.1±3.4	
	4.0	4	5.8±0.3	716.9±12.5	1062±1.8	4.6±0.1	55.3±1.7	
		6	6.1±0.8	708.5±8.7	1164±0.4	4.3±0.0	49.0±1.3	
	Diagram (2 stage)	0.5→1.0	4	24.6±1.9	760.0±9.8	1170±2.6	2.8±0.1	86.9±2.8
			6	25.4±2.1	752.6±19.3	1175±5.7	2.7±0.2	95.0±1.5
0.8→1.0		4	28.9±0.8	694.7±8.3	1174±4.3	2.5±0.1	168.4±6.4	
		6	31.2±0.9	698.0±4.7	1180±11.4	2.4±0.1	152.8±33.7	
1.0→1.0		4	23.1±1.5	725.1±6.6	1183±7.1	2.4±0.1	105.4±4.8	
		6	26.4±1.3	746.0±3.9	1164±5.6	2.3±0.1	170.0±18.0	
2.0→1.0		4	20.7±0.2	730.1±8.0	1166±1.5	2.8±0.2	85.9±6.2	
		6	18.5±0.4	740.4±14.0	1175±2.1	2.7±0.0	90.4±4.5	
3.0→1.0		4	20.8±0.9	725.0±8.7	1180±6.9	2.4±0.1	145.4±4.8	
		6	28.7±1.1	745.0±13.3	1182±20.1	2.3±0.1	146.1±3.8	
4.0→1.0		4	20.2±1.6	742.2±26.3	1171±1.6	2.4±0.1	165.2±1.2	
		6	23.5±1.5	776.6±14.5	1176±0.7	2.3±0.1	155.4±14.6	
Non-diagram (1 stage)	1.0	4	17.8±1.3	752.0±16.9	781±18.1	8.9±0.2	170.6±11.3	
		6	17.0±0.3	728.4±10.2	779±8.5	8.8±0.1	166.4±30.5	
Non-diagram (2 stage)	1.0→1.0	4	18.6±1.1	764.0±5.7	821±15.7	8.9±0.1	130.6±28.4	
		6	29.8±3.2	723.2±11.5	826±21.8	9.0±0.1	213.7±16.9	

¹⁾ Data represent means of three measurements±standard deviation.

시료중량 20배수의 약알칼리성 전기분해수와 강산성 전기분해수에 오렌지를 침지세정하면서 껍질의 총균수 변화를 분석한 결과는 다음의 Table 12와 같았다. 초기균수 3.3 log CFU/g에서 30분후 1.1 log CFU/g 수준으로 감소하였으나 약알칼리성 전기분해수와 강산성 전기분해수간의 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 12. Viable cell count of orange peel during immersion disinfection with low acidic electrolyzed water

(Unit : log₁₀ CFU/g)

Electrolyzed water	Immersion time (min)			
	0	10	20	30
Low alkaline electrolyzed water	3.3 (1.1) ¹⁾	2.1 (1.9)	1.1 (0.2)	1.1 (0.2)
Strong acidic electrolyzed water	3.3 (1.1)	1.8 (0.7)	1.2 (0.3)	1.0 (0.1)

¹⁾ All results are presented as mean of triplicate.

나) 약알칼리성 전기분해수의 침지 세정중 염소계 화합물의 변화

오렌지의 침지세정중 약알칼리성 전기분해수의 염소계 화합물의 변화를 살펴본 결과 유효염소는 초기 70.1 ppm에서 침지 10분에 59.8 ppm으로 감소한 후 30분까지는 52.1 ppm 수준으로 감소하여 초기 감소량이 상대적으로 큰 것으로 나타났다. 약알칼리성 전기분해수의 특성상 chlorite는 검출되지 않았으나 chlorate는 초기 1.2 ppm에서 2.8 ppm으로 증가하였다(Table 13). 오렌지의 침지세정중의 trihalomethanes (THMs)의 생성량을 분석한 결과는 Table 14와 같았다. 검출된 THMs은 chloroform, dichlorobromomethane, dibromochloromethane 및 bromoform이 모두 검출되었으나 침지시간의 경과에 따른 증가를 나타나지 않았다. Haloacetic acids의 생성량을 분석한 결과는 BAA를 제외한 5종만이 검출되었으며 CAA, DCAA, TCAA, BCAA 및 DBAA 5종의 sum값은 초기 평균 619.0에서 30분후 539.0 ppb로 경시적인 변화를 보이지 않았다(Table 15). 한편, 강산성 전기분해수의 침지세정중의 염소계 화합물 변화는 현재 실험 진행중이다.

Table 13. Changes in available chlorine content of low alkaline electrolyzed water during immersion disinfection of orange. (unit; ppm)

Chlorine species	Immersion time (min)			
	0	10	20	30
Available chlorine	70.1 ¹⁾	59.8	56.4	52.1
Chlorite	ND ²⁾	ND	ND	ND
Chlorate	1.2	1.3	2.4	2.8

¹⁾ Data represent means of three measurements.

²⁾ Not detected

Table 14. Formation of trihalomethanes during immersion disinfection of orange with low alkaline electrolyzed water. (unit; ppb)

Immersion time (min)	THMs				sum
	CHCl ₃	CHBrCl ₂	CHBr ₂ Cl	CHBr ₃	
0	0.20±0.04 ¹⁾	0.03±0.03	0.40±0.05	0.25±0.04	0.88±0.15
10	0.31±0.08	0.08±0.03	0.37±0.11	0.38±0.18	1.14±0.14
20	0.36±0.05	0.12±0.01	0.25±0.09	0.33±0.21	1.06±0.11
30	0.28±0.05	0.11±0.04	0.31±0.13	0.16±0.03	0.86±0.09

¹⁾ Data represent means of three measurements.

Table 15. Formation of haloacetic acids during immersion disinfection of orange with low alkaline electrolyzed water. (unit: ppb)

Immersion time (min)	HAAs						Sum
	CAA	BAA	DCAA	TCAA	BCAA	DBAA	
0	185.6 ¹⁾	ND ²⁾	98.5	113.4	213.0	8.5	619.0±87.8
10	148.1	ND	69.8	89.0	115.0	13.9	435.8±57.4
20	160.4	ND	70.4	94.5	180.2	10.0	515.5±74.7
30	181.9	ND	82.0	103.6	163.3	8.2	539.0±75.9

¹⁾ Data represent means of three measurements.

²⁾ Not detected

다) 미산성 전기분해수

① 생성수의 특성

염산을 원료로한 미산성 전기분해수 생성장치 BC-210으로 생성한 미산성 전기분해수의 특성은 다음의 Table 16과 같았다. pH는 평균 6.15 수준이었으며, 함량은 평균 29.8 ppm 수준이었다. 미생물에 대한 살균력은 *Escherichia coli* ATCC 10536 및 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538에 대해 99.999% 이상의 감균효과를 나타내었다.

② 미생물에 대한 살균유효성 평가

Aspergillus flavus KFRI 855 등 41종의 미생물에 대한 미산성 전기분해수의 살균 유효성을 평가한 결과는 Table 17과 같았다. 평가 대상이었던 박테리아, 곰팡이 및 효모에 대해 모두 99.999% 이상의 살균 유효성을 나타내었다. 시료 중량 20배수의 미산성 전기분해수와 강산성 전기분해수에 오렌지를 침지세정하면서 껍질의 총균수 변화를 분석한 결과는 다음의 Table 18과 같았다. 초기균수 3.1 log CFU/g에서 30분후 1.0 log CFU/g 수준으로 감소하였다.

Table 16. Evaluation results of low acidic electrolyzed water generated by model BC-210 according to disinfectant criteria regulated Food Sanitation Act of Korea.

Criteria	Results	
Appearance	Consistence	
Conformation test	Consistence	
pH	6.15	
Residue content after evaporation	Not detected	
Content (ppm)	29.8	
Disinfection efficacy	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	>99.999% (7 log)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	>99.999% (7 log)
	ATCC 6538	

Table 17. Disinfection efficacy of low acidic electrolyzed water on various food microorganism

Microorganism	N^1	Na^2	Disinfection efficacy(%)
□ Bacteria			
<i>Aeromonas hydrophila</i> IFO 3820	3.5×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Bacillus cereus</i> KCCM 41293	2.6×10^8	1.5×10^1	>99.999
<i>Bacillus cereus</i> KFRI 183	2.8×10^8	3.5×10^1	>99.999
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	5.2×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Bacillus subtilis</i> KFRI 183	3.9×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus casseliflavus</i> KCTC 3638	2.5×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> KCTC 3643	2.1×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus mundtii</i> KCTC 3630	1.9×10^8	2.8×10^2	>99.999
<i>Enterococcus hirae</i> KCTC 3616	2.5×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3511	2.8×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus durans</i> KCTC 3121	4.1×10^8	8.9×10^1	>99.999
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	4.7×10^8	7.4×10^1	>99.999
<i>Escherichia coli</i> KFRI 00174	1.5×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KCCM 11391	3.6×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KCCM 41285	3.9×10^8	9.1×10^2	>99.999
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KCTC 1726	1.7×10^8	8.2×10^2	>99.999
<i>Listeria grayi</i> KCTC 3581	1.0×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria innocua</i> KCTC 3586	5.1×10^8	2.3×10^2	>99.999
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> KCTC 3444	1.8×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria monocytogenes</i> KFRI 799	4.1×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria seeligeri</i> KCTC 3591	2.1×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria welshimeri</i> KCTC 3587	3.8×10^8	1.7×10^3	>99.999
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KCTC 3733	5.2×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Micrococcus luteus</i> KFRI 455	8.6×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Proteus vulgaris</i> KFRI 00249	1.1×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria welshimeri</i> KCTC 3587	7.1×10^8	3.8×10^3	>99.999

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KFRI 190	5.2×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KFRI 194	2.4×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 6538	8.9×10^8	3.7×10^1	>99.999
<i>Salmonella typhimurium</i> KFRI 251	1.4×10^8	8.0×10^1	>99.999
Fungi			
<i>Aspergillus flavus</i> KFRI 855	1.2×10^8	3.8×10^4	99.996
<i>Aspergillus niger</i> KFRI 993	2.8×10^8	2.1×10^2	>99.999
<i>Clostridium perfringens</i> KFRI 00752	2.2×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Mucor rouxii</i> KFRI 780	5.9×10^8	1.1×10^3	>99.999
<i>Penicillium citrinum</i> KCTC 3733	6.4×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
Yeast			
<i>Candida utilis</i> KFRI 556	8.0×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Candida albicans</i> KFRI 432	4.7×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Pichia polymorpha</i> KFRI 00917	1.8×10^8	8.3×10^2	>99.999
<i>Rhizopus oryzae</i> KFRI 1007	2.6×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KFRI 1014	6.0×10^8	3.0×10^2	>99.999
<i>Zagosccharomyces rouxii</i> KFRI 00214	2.6×10^8	4.6×10^2	>99.999

¹⁾ Number of CFU/mL of the bacterial test suspension

²⁾ Number of CFU/mL in the test mixture

Table 18. Viable cell count of orange peel during immersion disinfection with low acidic electrolyzed water. (Unit : \log_{10} CFU/g)

Microbial count	Immersion time (min)			
	0	10	20	30
Viable cell count	3.1 (1.3) ¹⁾	2.3 (1.6)	1.0 (0.3)	1.0 (0.1)

¹⁾ All results are presented as mean of triplicate.

라) 미산성 전기분해수의 침지 세정중 염소계 화합물의 변화

오렌지의 침지세정중 미산성 전기분해수의 염소계 화합물의 변화를 살펴본 결과 유효염소는 초기 29.6 ppm에서 침지 10분에 26.0 ppm으로 감소한 후 30분까지는 25.6 ppm 수준으로 감소하여 초기 감소량이 큰 것으로 나타났다(Table 19). 미산성 전기분해수의 특성상 chlorite는 검출되지 않았으나 chlorate는 초기 16.8 ppm에서 20.2 ppm으로 증가하였다. 오렌지의 침지세정 살균중의 trihalomethanes(THMs)의 생성량을 분석한 결과는 Table 20과 같았다. 검출된 THMs은 chloroform, dichlorobromomethane, dibrochloromethane 및 bromoform이 모두 검출되었으나 침지시간의 경과에 따른 증가를 나타나지 않았다. Haloacetic acids의 생성량을 분석한 결과는 BAA를 제외한 5종만이 검출되었으며 CAA, DCAA, TCAA, BCAA 및 DBAA 5종의 sum값은 평균 808.9에서 30분후 608.2 ppb로 경시적인 증가를 나타내지 않았다(Table 21).

Table 19. Changes in available chlorine content of low acidic electrolyzed water during immersion disinfection of orange. (Unit; ppm)

Chlorine species (ppm)	Immersion time (min)			
	0	10	20	30
Available chlorine	29.6 ¹⁾	26.0	25.6	25.6
Chlorite	ND ²⁾	ND	ND	ND
Chlorate	16.8	30.0	19.1	20.2

¹⁾ Data represent means of three measurements.

²⁾ Not detected

Table 20. Formation of trihalomethanes during immersion disinfection of orange with low acidic electrolyzed water. (Unit; ppb)

Immersion time (min)	THMs				sum
	CHCl ₃	CHBrCl ₂	CHBr ₂ Cl	CHBr ₃	
0	0.18±0.02 ¹⁾	0.08±0.02	0.20±0.03	0.52±0.07	1.00±0.19
10	0.37±0.05	0.13±0.06	0.09±0.05	0.38±0.05	0.98±0.15
20	0.39±0.02	0.09±0.02	0.09±0.01	0.33±0.04	0.92±0.16
30	0.47±0.00	0.26±0.03	0.14±0.01	0.16±0.05	1.00±0.15

¹⁾ Data represent means of three measurements.

Table 21. Formation of haloacetic acids during immersion disinfection of orange with low acidic electrolyzed water. (Unit: ppb)

Immersion time (min)	HAAs						Sum
	CAA	BAA	DCAA	TCAA	BCAA	DBAA	
0	246.1 ¹⁾	ND ²⁾	55.8	62.0	419.2	44.0	827.1±161.9
10	243.5	ND	51.9	61.5	410.3	41.6	808.9±152.8
20	269.1	ND	59.6	72.2	164.4	31.9	597.4±95.9
30	238.2	ND	63.4	76.4	159.4	71.2	608.7±81.3

¹⁾ Data represent means of three measurements.

²⁾ Not detected

마) pH에 따른 전기분해수의 살균 유효성

유자의 세척조건 설정을 위한 복합소독기술을 개발하기 위하여 염소계 살균소독제의 혼합 및 순차적인 살균소독 효능을 검토할 필요가 있다. pH 조건이 다른 전기분해수의 혼합시 적정 pH 조건 설정을 위해 3종의 전기분해수 즉, 강산성 전기분해수(strong-acidic electrolyzed water; SAEW)와 약알칼리성 전기분해수(Low alkaline electrilyzed water; LAEW1) 및 미산성 전기분해수(Low acidic electrilyzed water; LAEW2)의 pH 조건에 따른 hypochlorite ion (OCl⁻) 및 hypochlorous acid (HClO)의 함량 변화와 저농도에서의 살균 유효성을 비교하였다. 전기분해수의 pH에 따른 total chlorine과 free chlorine의 함량은 Table 22와 같았다. SAEW는 pH 5에서 total chlorine과 free chlorine 농도가 가장 높았으며,

LAEW1은 pH 9에서, 그리고 LAEW2는 pH 5에서의 농도가 가장 높았다.

Table 22. Changes of total chlorine and free chlorine contents by pH shift

Electrolyzed water	Available chlorine (ppm)	pH					
		4	5	6	7	8	9
Strong acidic electrolyzed water	Total	2.1 ¹⁾	56.3	29.5	35.1	30.0	24.5
	Free	13.1	78.0	46.2	45.0	40.3	34.1
Low alkaline electrolyzed water	Total	39.5	127.9	124.5	160.4	150.8	151.4
	Free	110.2	170.8	175.5	178.6	180.0	181.7
Low acidic electrolyzed water	Total	38.9	45.0	40.0	40.2	40.8	41.0
	Free	50.0	52.2	50.0	52.8	55.4	54.2

^aData represent means of three measurements.

전기분해수의 pH에 따른 HOCl, OCl⁻ 함량을 측정한 결과는 Table 23과 같았다. SAEW는 pH 상승에 따라 pH 9를 제외하고는 HOCl 농도는 pH 5에서 가장 높은 값을 나타내었고 pH 8까지는 전반적으로 감소하였다. 반면 OCl⁻ 농도는 pH 상승에 따라 대체적으로 증가하였다. 약알칼리성 전기분해수 LAEW1의 HOCl 농도는 pH 5에서 가장 높았으며 pH 9까지는 감소하였다. 미산성 전기분해수인 LAEW2의 HOCl 농도는 pH 5에서 98.6 ppm으로 가장 높았으며 OCl⁻ 농도는 pH 상승에 따라 13.43 ppm에서 86.43 ppm으로 지속적으로 증가하였다.

전기분해수의 pH 조건에 따른 저농도에서의 살균효과를 검토한 결과는 Table 24와 같았다. 시험균의 초기 현탁액의 균수는 5.6×10^6 CFU/mL이었으며 SAEW와 LAEW1은 pH 변화에 따른 살균효과의 변화가 크지 않았으나 미산성 전기분해수인 LAEW2는 OCl⁻ 농도보다는 HOCl의 농도가 높은 pH 4, 0.75 ppm과 1.0 ppm의 유효염소 농도에서 상대적으로 높은 살균효과를 나타내었다.

Table 23. Changes in HOCl and OCl⁻ contents by pH shift

Electrolyzed water	HOCl/OCl ⁻ (ppm)	pH					
		4	5	6	7	8	9
Strong acidic electrolyzed water	HOCl	46.5 ¹⁾	88.6	69.4	60.2	35.8	84.0
	OCl ⁻	50.6	95.3	69.2	66.5	72.9	130.0
Low alkaline electrolyzed water	HOCl	150.4	171.3	156.6	106.8	98.9	53.4
	OCl ⁻	176.1	188.6	190.4	208.8	267.1	248.1
Low acidic electrolyzed water	HOCl	84.5	99.0	93.1	89.9	70.3	62.0
	OCl ⁻	12.8	17.6	18.8	34.0	60.7	88.3

¹⁾Data represent means of three measurements.

Table 24. Disinfection efficacy of electrolyzed water by pH shift
(log reduction; Log₁₀ CFU/mL)

Electrolyzed water	Available chlorine (ppm)	pH		
		4.0	6.0	9.0
SAEW	0.25	0.92 ¹⁾	1.03	1.10
	0.50	1.11	1.16	1.06
	0.75	1.23	1.18	1.12
	1.00	1.30	1.20	1.15
LAEW1	0.25	1.09	1.10	1.06
	0.50	1.23	1.21	1.19
	0.75	1.30	1.40	1.30
	1.00	1.40	1.38	1.16
LAEW2	0.25	1.52	1.76	1.38
	0.50	3.83	3.69	1.62
	0.75	4.12	4.20	2.00
	1.00	4.27	4.62	2.52

¹⁾ Data represent means of three measurements.

3) 살균효능 향상을 위한 복합 살균 소독 기술개발

가) 염소계 살균소독수 복합처리에 의한 살균 유효성 평가

염소계 살균 소독제의 복합처리 방법을 결정하기 위하여 99.3 ppm의 알카리성 전기분해수로 30분 침지세정 살균, 29.8 ppm의 미산성 전기분해수로 30분 침지세정 살균, 100.6 ppm의 강산성 전기분해수로 30분 침지세정 살균, 30 ppm의 이산화염소수로 30분 침지세정 살균, 50 ppm의 이산화염소수로 30분 침지세정 살균, 50 ppm의 염소수로 30분 침지세정 살균, 50 ppm의 이산화염소수 15분 침지세정 살균후 30 ppm의 약알칼리성 전기분해수 15분 침지세정 살균, 50 ppm의 이산화염소수 15분 침지세정 살균후 30 ppm의 미산성 전기분해수 15분 침지세정 살균, 50 ppm의 이산화염소수 15분 침지세정 살균후 30 ppm의 강산성 전기분해수로 15분 침지세정 살균처리하여 10^4 log cycle 수준의 오렌지 표면을 처리하여 그 복합처리 효과를 살펴본 결과 Fig. 14과 같이 50 ppm의 이산화염소수 15분 침지세정 살균후 30 ppm의 약알칼리성 전기분해수 15분 침지세정 살균, 50 ppm의 이산화염소수 15분 침지세정 살균후 30 ppm의 미산성 전기분해수 15분 침지세정 살균, 50 ppm의 이산화염소수 15분 침지세정 살균후 30 ppm의 강산성 전기분해수로 15분 침지세정 살균처리가 10^1 CFU/g 수준으로의 감균효과를 보여 단독 처리에 비해 보다 효과적인 것으로 나타났다. 복합처리 살균효과 개별 살균소독수로 처리했을 때보다 낮았던 것은 초기 오염도가 상대적으로 높았기 때문인 것으로 판단되었다.

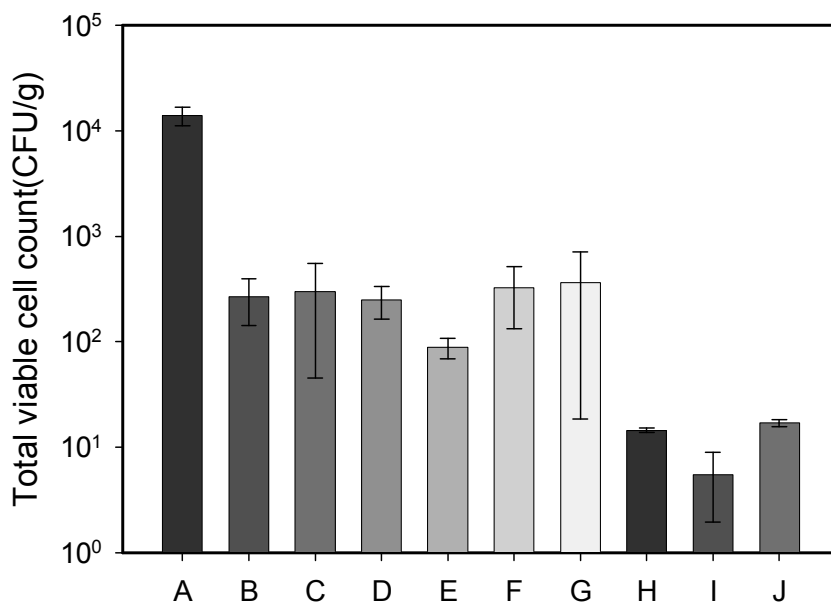


Fig. 14. Changes in total viable cell count of orange peel disinfected with

various chlorine disinfectants. A; not disinfected, B ;disinfected with low alkaline electrolyzed water(available chlorine 99.3 ppm, pH 8.4), C; disinfected with low acidic electrolyzed water(available chlorine 29.8 ppm, pH 6.5) for 30 min, D; disinfected with strong acidic electrolyzed water(available chlorine 100.6 ppm, pH 2.5) for 30 min, E; disinfected with 30 ppm aqueous chlorine dioxide for 30 min, F; disinfected with 50 ppm aqueous chlorine dioxide for 30 min, G; disinfected with 50 ppm chlorine water for 30 min, H; sequential disinfected with 50 ppm aqueous chlorine dioxide for 15 min + 30 ppm low alkaline electrolyzed water for 15 min, I; disinfected with 50 ppm aqueous chlorine dioxide for 15 min + 30 ppm low acidic electrolyzed water, J; disinfected with 50 ppm aqueous chlorine dioxide for 15 min + 30 ppm strong electrolyzed water. Data represent means of three measurements.

나) Microbubbling 처리에 의한 살균 유효성 평가

Microbubbling을 병용하여 염소계 살균소독수인 70 ppm의 약알칼리성 전기분해수, 30 ppm의 미산성 전기분해수, 100 ppm의 강산성 전기분해수 및 50 ppm의 이산화염소수로 10분간 오렌지를 침지세정 살균처리한 결과 Fig. 15에서와 같이 침지 1분후 30 ppm의 미산성 전기분해수로 처리한 오렌지의 표면미생물이 <101 CFU/g 이하로 감소하여 효과적인 상승작용을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이때 각각의 염소계 살균소독수의 염소계 화합물의 함량 변화는 Table 25에서와 같이 약알칼리성 전기분해수(LAEW1)의 유효염소는 초기 70.1 ppm에서 1분후 65.0 ppm으로 감소하였고 10분후 58.9 ppm으로 감소하였다. 미산성 전기분해수(LAEW2)의 유효염소는 초기 30.0 ppm에서 10분후 12.4 ppm으로 감소하여 약알칼리성 전기분해수에 비해 감소폭이 상대적으로 큰 것으로 나타났다. 강산성 전기분해수는 초기 100.6 ppm에서 10분후 80.5 ppm으로 감소하였고, 이산화염소수(ACD)는 초기 50.4 ppm에서 10분후 31.3 ppm으로 감소하여 미산성 전기분해수 다음으로 큰 감소량을 나타내었다. NH_2Cl , NHCl_2 , Free Cl, Oxi-Cl은 경시적으로 다소 감소하는 경향을 보였으며 염소이온(Cl-)는 초기 농도와 동일한 수준을 나타내어 변화가 없었다.

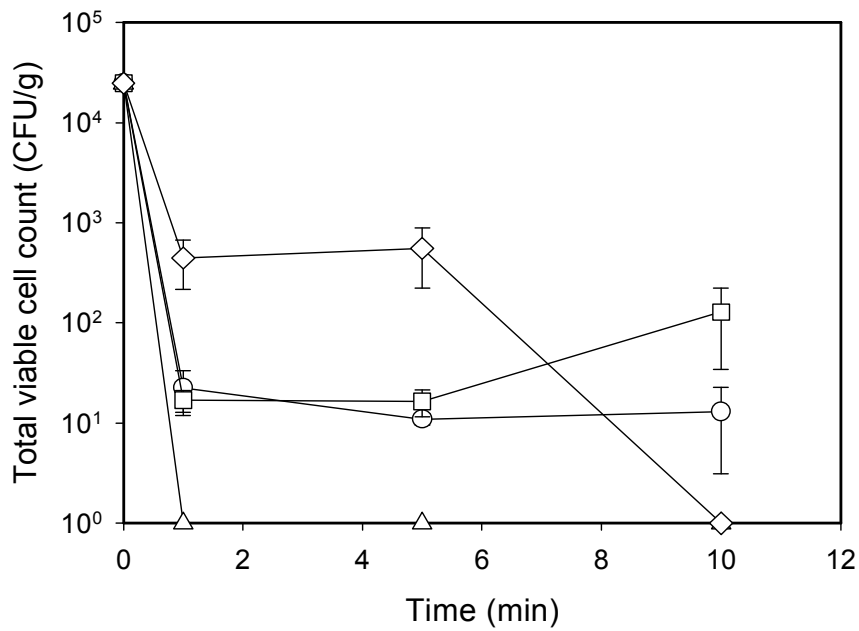


Fig 15. Changes in total viable cell count of orange peel during microbubbling immersion disinfection with various chlorine disinfectant Disinfectant were 70 ppm of low alkaline electrolyzed water (○), 30 ppm of low acidic electrolyzed water (□), 100 ppm of strong acidic electrolyzed water (△) and 50 ppm of aqueous chlorine dioxide (◇). Data represent means of three replications±standard deviations.

Table 25. Changes in concentrations of chlorine species in various chlorine disinfectant during immersion disinfectant of orange

Immersion time (min)	Chlorine species (ppm)	LAEW1	LAEW2	SAEW	ACD
0	Available chlorine/ClO ₂	70.1 ¹⁾	30.0	100.6	50.4
	Free Cl	17.0	12.4	2.8	0.4
	NH ₂ Cl	1.0	2.2	0.0	0.1
	NHCl ₂	0.9	1.1	0.1	0.1
	Oxi-Cl	76.6	65.1	26.6	173.4
	Cl ⁻	0.4	0.3	0.01	0.01
1	Available chlorine/ClO ₂	65.0	23.0	96.6	44.4
	Free Cl	16.3	12.2	2.5	0.2
	NH ₂ Cl	0.9	1.1	0.3	0.0
	NHCl ₂	0.8	1.0	0.1	0.1
	Oxi-Cl	72.8	63.8	25.6	155.5
	Cl ⁻	0.4	0.3	0.0	0.01
5	Available chlorine/ClO ₂	61.5	19.5	88.5	40.4
	Free Cl	10.2	12.1	2.5	0.2
	NH ₂ Cl	0.3	0.9	0.1	0.0
	NHCl ₂	0.3	0.8	0.1	0.0
	Oxi-Cl	57.1	62.9	25.2	142.0
	Cl ⁻	0.4	0.3	0.01	0.00
10	Available chlorine/ClO ₂	58.9	12.4	80.5	31.3
	Free Cl	2.7	11.7	1.90	0.1
	NH ₂ Cl	0.3	0.3	0.0	0.0
	NHCl ₂	0.1	0.2	0.0	0.0
	Oxi-Cl	40.3	61.3	24.3	127.1
	Cl ⁻	0.4	0.3	0.01	0.00

¹⁾ Data represent means of three measurements.

다) 세척방법별 잔류농약 제거효과 분석

① 분석법의 회수율

잔류농약의 회수율은 Table 26에서 보는 바와같이 chlorpyrifos, prothiofos 및 phosalone 각각 101.03 ± 5.62 , 98.71 ± 5.64 및 $112.75 \pm 8.20\%$ 수준으로 확인하였다. Chlorpyrifos, prothiofos 및 phosalone 표준곡선은 Fig. 2에 나타내었으며 R^2 값은 각각 0.9937, 0.9973 및 0.9935 수준이었다.

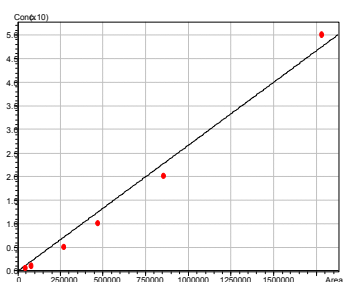
Table 26. Recovery of the analytical method

Pesticide	Recovery (%)
Chlorpyrifos	101.03 ± 5.62
Prothiofos	98.71 ± 5.64
Phosalone	112.75 ± 8.20

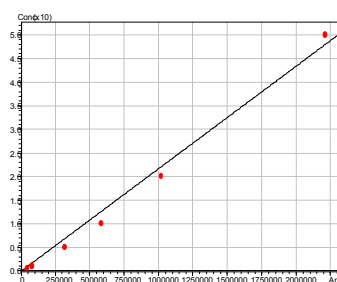
② 세척 방법에 따른 잔류농약 제거 효과

세척 방법에 따른 잔류농약 제거효과는 Fig. 16과 같다. Chlorpyrifos의 초기 농약의 수준은 7.03 ppm이며 Chlorothalonil은 2.04 ppm이다. Chlorpyrifos의 제거율은 모든 세척방법에서 85%수준 이상이였으며 chlorothalonil의 경우 버블 세척을 제외하고 80%이상을 나타내었다. 세척방법 중 마이크로버블 세척 후 chlorpyrifos와 chlorothalonil 각각 0.67ppm, 0.16ppm으로 가장 높은 제거율을 나타내었다. 마이크로버블 세척기는 마이너스 이온을 함유한 물에 0.1 mm의 거품을 대량 넣어 강한 압력을 가하여 나팔모양의 구멍을 통과시키면서 50 μm 이하의 미세한 기포를 생성하여 세척 기능에 활용된다. 생성된 마이크로 버블 크기는 Fig. 17에서 보는 바와 같다.

Chlorpyrifos



Prothiofos



phosalone

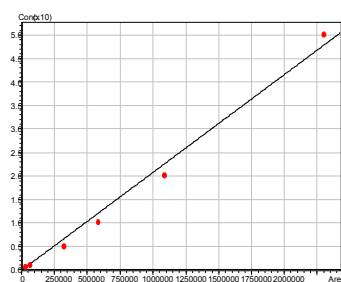


Fig. 16 Standard Curve

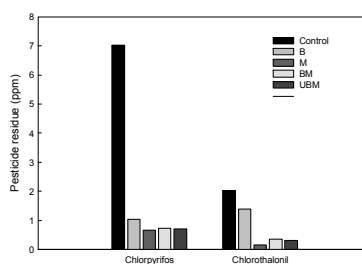


Fig. 17 Pesticide residue according to washing methods in citrus fruits.

B: Bubble cleaning(5min), M: Micro-bubble cleaning(5min), BM: Bubble cleaning(2min)+Micro-bubble cleaning(3min), UBM; Ultrasonic cleaning(1min)+Bubble cleaning(2min)+Micro-bubble cleaning(2min).



Fig. 18 Size of Micro-bubble.

③ 세척수에 따른 잔류농약 제거 효과

세척수에 의한 잔류농약 제거 효과를 알아보기 위한 세척수로 강산성수 (SAEW), 약알칼리수(LAIEW), 미산성수(LAcEW), 염소수(ACD)를 사용하였으며 세척수에 의한 오렌지의 잔류농약 chlorpyrifos, prothiofos, phosalone의 제거율은 Fig. 18, 19 및 8에 나타내었다. Chlorpyrifos의 경우 세척 1분경과 후 14.08~37.25%수준 감소하였으며 10분경과 후 50% 이상 감소 효과를 나타내었다. 세척수별 감소율은 미산성수가 세척시간에 관계없이 가장 높은 감소율을 나타내었다. 미산성수의 경우 세척 5분 후 chlorpyrifos 감소율은 68.32% 수준으로 다른 처리구들의 36.36~48.78%에 비해 현저하게 높은 감소를 보였다. 또한 prothiofos의 경우 세척 10분경과 후 미산성수가 74.91% 수준 감소하여 이산화염소수 52.45%와 약알칼리수 50.23%에 비해 높은 효과를 보였다. Phosalone의 제거율은 세척 10분경과 후 82.11~89.71% 수준으로 chlorpyrifos(53.02~75.27%)와 prothiofos(52.45~74.91%)에 비해 높았다. 미산성수의 경우 세척 1분경과 후 65.56% 감소하여 처리구간에 큰 차이를 나타냈으며 다른 농약 성분에 비해 감소율이 높게 나타났다. 모든 처리구에서 시간이 경과하면서 농약 잔류량이 감소하였으며 5분 처리 후 50%이상 감소 효과를 보였다. 농약의 종류와 세척시간에 관계없이 미산성수가 가장 효과가 높게 나타났다.

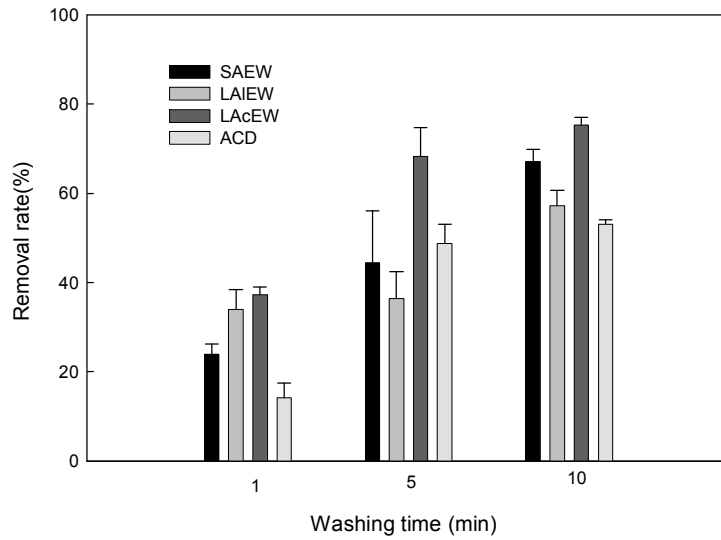


Fig 18. Removal rate of chlorpyrifos by different washing solution in citrus fruits.

SAEW: strong acidic electrolyzed water,
 LAIEW: Law alkaline electrolyzed water,
 LAcEW: Law acidic electrolyzed water,
 ACD: Aqueous chlorine dioxide

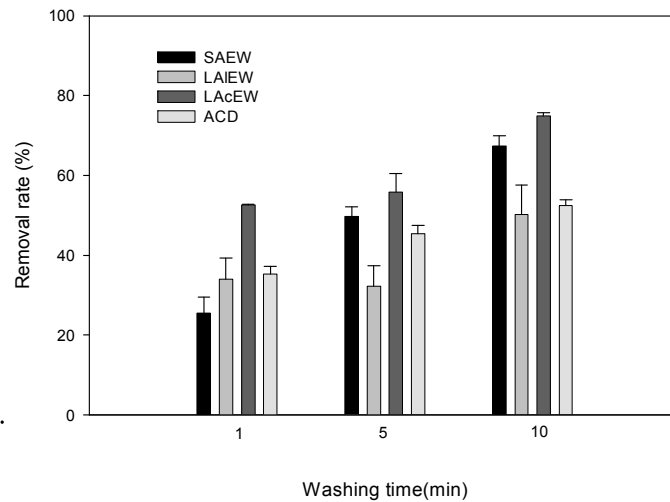


Fig 19. Removal rate of prothiofos by different washing solution in citrus fruits.

SAEW: strong acidic electrolyzed water,
 LAIEW: Law alkaline electrolyzed water,
 LAcEW: Law acidic electrolyzed water,
 ACD: Aqueous chlorine dioxide

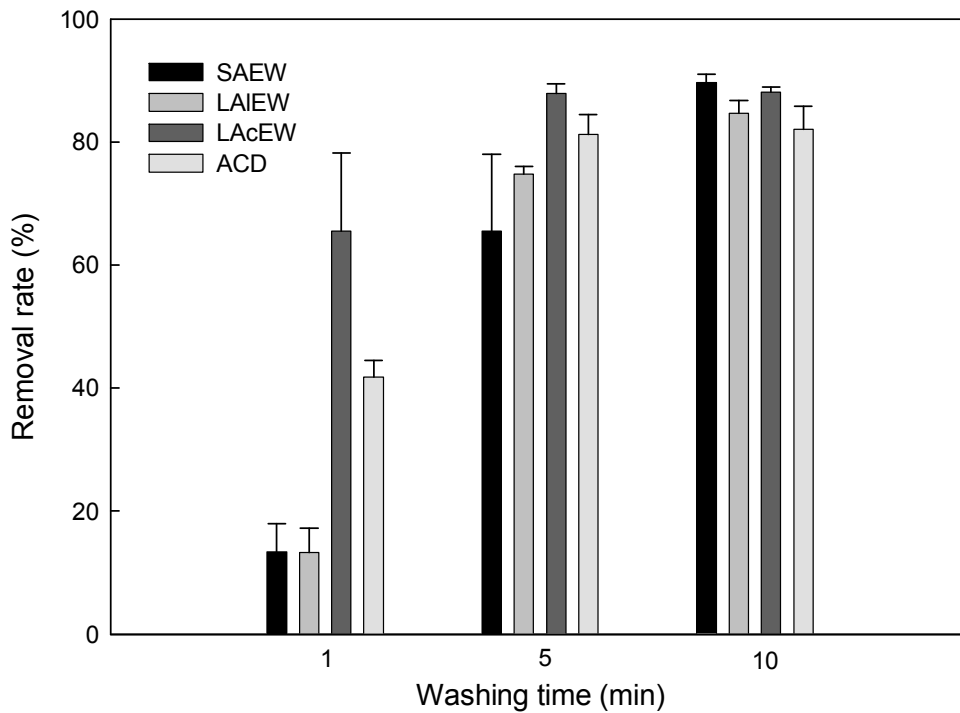


Fig 20. Removal rate of phosalone by different washing solution in citrus fruits.

SAEW: strong acidic electrolyzed water,
 LAIEW: Low alkaline electrolyzed water,
 LAcEW: Low acidic electrolyzed water,
 ACD: Aqueous chlorine dioxide

4) 염소계 살균소독수 처리의 의한 잔류농약 제거능 분석

가) 전해수 물성측정

세척에 사용된 전해수의 물성은 Table 27과 같다. 일반버블에 사용된 전해수의 ppm, ORP(mV), pH는 각각 103.1, 701, 8.54이며, 마이크로 버블세척에 사용된 전해수는 104.1, 708, 8.50이다. 일반버블 및 마이크로버블 혼용에 사용된 전해수의 ppm, ORP(mV), pH는 104.0, 710, 8.51이며, 초음파·일반 및 마이크로버블 세척시 사용된 전해수는 103.5, 704, 8.58이다.

Table 27. Change on chemical properties of the washing water

Sample ¹⁾	ppm	ORP(mV) ²⁾	pH
Control	-	-	-
B	103.1	701	8.54
M	104.1	708	8.50
BM	104.0	710	8.51
UBM	103.5	704	8.58

1) Control: no washing, B: general bubble washing for 5 min, M: micro-bubble washing for 5 min, BM: general bubble washing for 2 min + micro bubble washing for 3 min, UBM: ultrasonic washing for 1 min + general bubble washing for 2 min + micro bubble washing for 2 min

2) ORP: oxidation-reduction potential

나) 마이크로버블 크기

현미경으로 측정한 마이크로 버블의 크기는 Table 28와 Fig. 21에 나타낸 바와 같다.

Table 28. Size of micro-bubble

Index	길이(μm)
0	34.2
1	37.8
2	37.8
3	37.8
4	37.4
ave	37.0



Fig 21. Picture of micro-bubble

다) 마이크로버블 크기

세척방법에 따라 마이크로버블을 이용해 세척한 상추의 저장 중 품질변화를 살펴보기 위해 세척방법별로 5분간 세척처리 후 무세척(CT), 손세척(HW), 일반버블처리(GW), 마이크로버블처리(MW)를 비교 분석하였다. 세척처리 직후 총균수는 무세척은 10^4 /g, 손세척과 일반버블은 10^3 /g, 마이크로버블은 10^2 /g으로 다른 처리구 보다 마이크로버블(MW)구가 미생물 제거에 가장 효과적 이었다. 저장기간이 지남에 따라 모든 처리구가 증가하는 경향을 나타내었고, 마이크로버블처리구가 다른 세척구 보다 적은 변화를 보였으며, 저장 9일에 무처리구 보다 2 log CFU/g 정도 더 낮은 결과를 나타내었다(Fig 22).

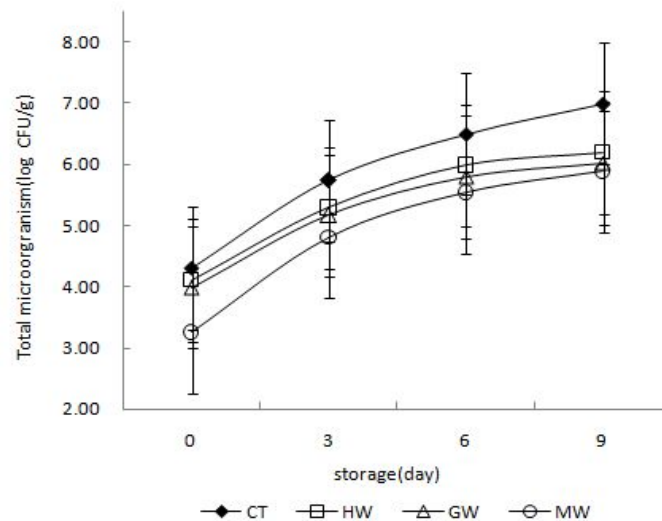


Fig. 22 Changes of total cell count on lettuce with various washing conditions. CT: no washing, HW: hand washing, GW : general bubble washing, MW: micro-bubble washing

그리고 감귤을 대상으로 세척방법에 따른 잔류농약의 효과를 조사한 결과를 Fig. 23에 나타내었다. Chlorpyrifos의 초기 농약의 수준은 7.03 mg/kg이며, Chlorothalonil은 2.04 mg/kg이다. 세척 방법 중 마이크로버블 만을 이용하여 세척한 감귤의 과피에서 초기수준에 비하여 Chlorpyrifos 90.47%, Chlorothalonil은 92.16%의 잔류농약 제거율을 나타내어, 일반버블세척이나 일반버블과 마이크로버블 혼용, 초음파 혼용세척에 비하여 가장 높은 제거율을 나타내었다(Table 29)

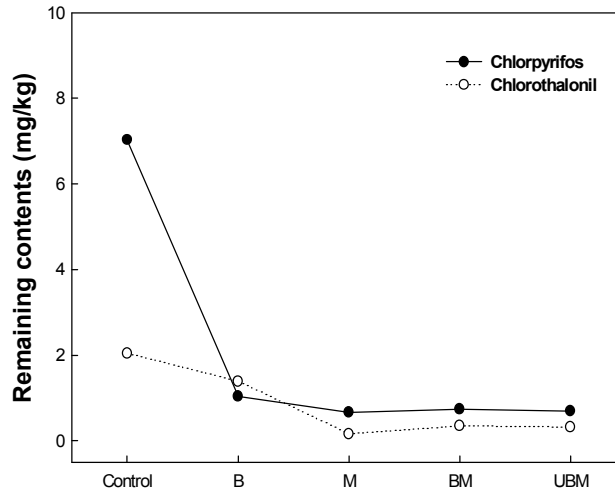


Fig. 23 Remaining contents of pesticide residue on mandarin with various washing methods.

Control: no washing, B: general bubble washing for 5 min, M: micro-bubble washing for 5 min, BM: general bubble washing for 2 min + micro bubble washing for 3 min, UBM: ultrasonic washing for 1 min + general bubble washing for 2 min + micro bubble washing for 2 min

Table 29. Removal effect of mandarin with various washing methods

Unit: mg/kg¹⁾(%)²⁾

	Control ³⁾	B	M	BM	UBM
Chlorpyrifos	7.03	1.04(85.21)	0.67(90.47)	0.74(89.47)	0.70(90.04)
Chlorothalonil	2.04	1.39(31.86)	0.16(92.16)	0.35(82.84)	0.32(84.31)

¹⁾mg/kg:content of pestcide residue after washing, ²⁾Removal rate of pesticide residue

³⁾Control: no washing, B: general bubble washing for 5 min, M: micro-bubble washing for 5 min, BM: general bubble washing for 2 min + micro-bubble washing for 3 min, UBM: ultrasonic washing for 1 min + general bubble washing for 2 min + micro-bubble washing for 2 min

라) 세척 처리수별 비교 시험

유자를 대상으로 세척시 사용한 처리수의 pH, ORP 및 HClO/ClO₂함량

변화는 Table 30과 같다. 강산성수(SAcEW), 약알칼리수(LAIEW)와 약산성수(LAcEW) 처리구의 초기 pH는 2.75, 8.86, 6.55였으며 이산화염소수(ACD) 처리구는 3.11수준이었다. 세척동안 pH 변화는 SAEW 처리구는 변화가 없었으며 그 외 처리구들은 감소하였다. 처리구중 ACD 처리구가 0.13 감소하여 가장 많이 감소하였다. HClO/ClO₂함량은 SAcEW와 LAIEW 처리구는 88.63-89.40 ppm 수준이었으며 세척동안 감소하였다. ACD 처리구의 HClO/ClO₂함량이 가장 크게 감소하여 세척 15분 후 11 ppm으로 초기에 비해 1/3 수준이었다.

Table 30. Change on chemical properties of the washing water

		Washing time(min)			
		0	5	10	15
pH	TW ¹⁾	7.55	7.40	7.43	7.34
	SAEW ²⁾	2.75	2.74	2.74	2.75
	LAIEW ³⁾	8.86	8.84	8.82	8.78
	LAcEW ⁴⁾	6.55	6.55	6.51	6.46
	ACD ⁵⁾	3.11	3.00	3.00	2.98
ORP	TW	606	456	398	364
	SAEW	1057	1052	1051	1048
	LAIEW	721	724	723	726
	LAcEW	827	730	768	788
	ACD	-	-	-	-
HClO/Cl O ₂ (ppm)	TW	-	-	-	-
	SAEW	88.63	78.70	76.93	72.67
	LAIEW	89.40	87.56	86.14	84.37
	LAcEW	26.94	25.88	25.52	24.81
	ACD	30.00	13.00	13.00	11.00

1) Tap water

2) Strong acidic electrolyzed water.

3) Law alkaline electrolyzed water.

4) Law acidic electrolyzed water.

5) Aqueous chlorine dioxide

마) 세척 처리수별 미생물 및 잔류 농약 제거 효과 비교

유자를 대상으로 세척수에 의한 잔류농약 제거 효과를 알아보기 위한 세척수로 강산성수(SAEW), 약알칼리수(LAIEW), 미산성수(LAcEW), 염소수(ACD) 및 오존수(OW)를 사용하였으며 대조구로 수도수(TW)를 사용하였다. 세척수별 유자의 미생물 제거 효과를 검정한 결과는 Fig. 5와 같다.

초기 미생물 수는 $8.08 \log_{10}$ CFU/g 수준이었으며 수도수 세척 후 $7.39 \log_{10}$ CFU/g으로 $0.69 \log_{10}$ CFU/g 감소하였으며 강산성수로 세척할 경우 $6.78 \log_{10}$ CFU/g 수준으로 가장 많이 감소되었다. 세척 후 잔류농약 제거 효과는 Fig. 24와 같다. Chlorpyrifos는 대조구의 경우 2.84 ppm이었으며 TW 처리구의 함량은 2.01 ppm으로 나타나 약 30% 수준 감소하였다. 처리수들의 chlorpyrifos 함량은 SAEW와 LAIEW가 1.57과 1.66 ppm으로 LAcEW와 ACD 1.78과 1.89 ppm에 비해 더 많이 감소되었다. 최의 연구에서 전해수, 염소수, 초산용액, 오존수에서 세척한 사과와 chlorpyrifos 제거율이 전해수와 염소수에서 높게 나타났다. Prothiofos 결과 chlorpyrifos와 유사한 경향을 보였다. SAEW 처리구가 가장 효과가 높았으며 세척 후 잔류농약이 1.69 ppm으로 대조구 2.78 ppm에 비해 40% 이상 감소 수준을 나타내었다. Chlorpyrifos와 prothiofos는 유기인계 농약은 살충제로 농산물 생산에 널리 사용되어진다. 유기인계 농약은 유기염소계 농약에 비해 독성이 높으며 분해율은 높다. 인산 결합을 가진 유기인계 살충제인 azinphosphate-methyl의 경우 산에서 안정하며 알칼리에서 분해력이 높은 것으로 알려져 있으나 본 연구에서는 SAEW와 LAIEW와 유의적인 차이를 보이지 않았다. Abuo-Arab 과 Soliman의 연구에서 acetic acid 용액과 NaCl 용액에서 세척한 토마토와 감자의 농약 감소율을 살펴본 결과 유기인계, 유기염소계 농약 용액의 종류와 관계없이 모두 같은 농도에서 비슷한 감소율을 보였으며 농도가 증가할수록 감소율 또한 증가하여 산성, 알칼리성보다 농도가 영향을 많이 끼침을 알 수 있었다. Spirodiclofen의 초기 함량은 13.47 ppm이며 TW 처리구는 30% 수준 감소하였으며 그 외 처리구들은 50% 이상 감소 효과를 나타내었다. 처리구들 중 이산화염소수의 잔류 농약 함량은 4.95 ppm으로 63% 수준 감소하여 가장 높은 감소를 보였다. 이산화염소수는 가공공정에서 사용되고 있는 식품 표면살균제로 강산 산화력을 가지며 염소와는 달리 trihalomethanes와 같은 유해물질 생성량이 없다는 장점도 있다. Benomyl과 Thiophanate-methyl은 benzimidazole계 농약의 주요 대사산물로 존재하는 살균제이다. Benomyl은 자연상태에서 불안정하여 cabendazim으로 분해되며 대부분의 살균력은 carbendazim에 기인한다. Benomyl의 초기 함량은 15.36 ppm이었으며 TW 처리구는 25% 감소한 것에 반해 강산성수는 48.5%, 약알칼리수는 49.7% 감소하였다. Thiophanate-methyl 함량은 30.27 ppm이며 SAEW 처리구가 7.76 ppm으로 대조구에 비해 75% 수준 감소하여 가장 높은 감소를 나타내었으며 LAIEW 처리구가 70% 감소하여 다음으로 높은 감소를 보였다. Acequinocyl 또한 대조구에 비해 32~36% 감소한 SAEW와 LAIEW가 가장 효과가 높았다. Ong 등의 연구에서 염소수나 오존수 처리의 경우 가장 낮은 pH에서 가장 높은 감소율을 보였으며

이는 염소수에서 생성되는 생성물 중 HOCl가 가장 강력한 산화력을 가지며 연구 결과 pH가 낮을수록 HOCl의 산화력이 가장 강력한 것으로 나타났다. 그래서 잔류농약 감소율과 chlorine 농도와의 상관관계가 높은 것으로 나타났다. Deltamethrin은 pyrethroid 계통의 농약으로 물에서의 용해도가 $0.2 \mu\text{L}$로 chlorpyrifos와 prothiofos 1.4 mg/L, 0.07 mg/L 에 비해 낮지만 수도수에서의 감소율이 58.42%로 chlorpyrifos와 prothiofos에 비해 높은 수준을 보여 농약의 수용성이 세척효과와 비례하지 않음을 알 수 있었다. 이는 김의 연구(2009)에서도 비슷한 경향을 보였으며 이는 세척에 의한 제거효율은 약제의 수용성 정도보다는 침투성 등 농산물의 특성과 세척방법 등의 영향으로 생각된다.(2008 후지사과)

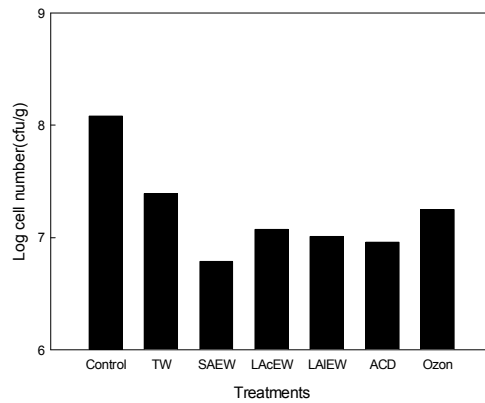


Fig 24. Microorganism residues according to washing treatment.

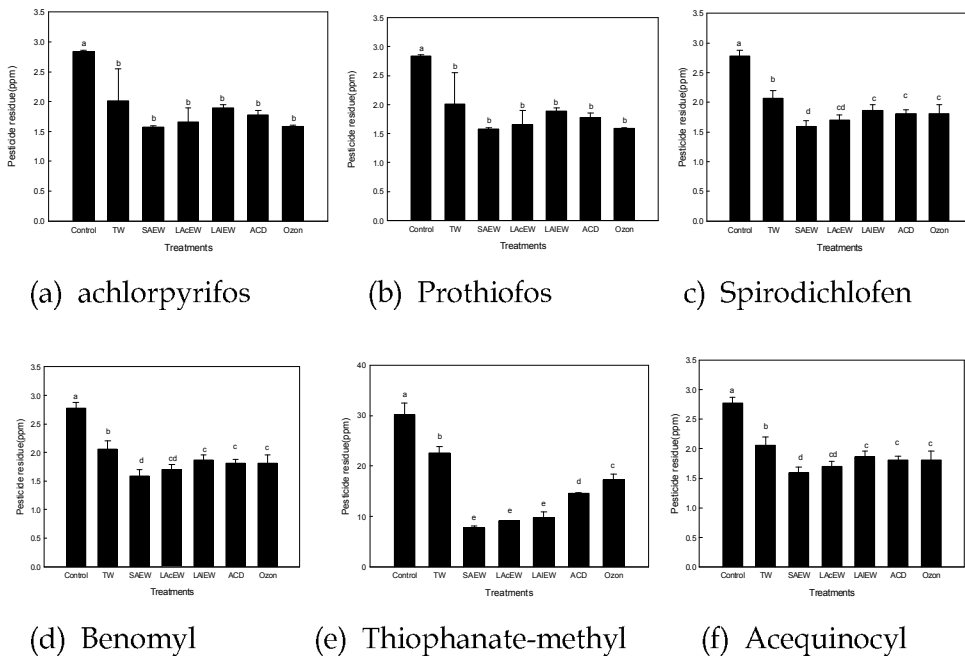
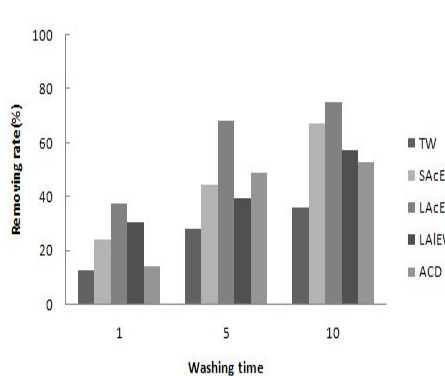


Fig 25. Remaining contents of acequinocyl by different washing solution in Yuza.

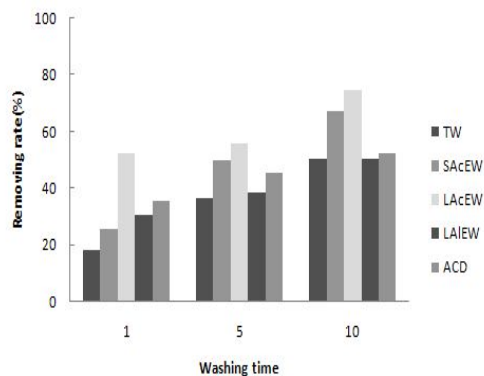
TW: Tap water; SAEW: strong acidic electrolyzed water; LAIEW: Law alkaline electrolyzed water; LAcEW: Law acidic electrolyzed water; ACD: Aqueous chlorine dioxide.

바) 마이크로버블을 이용한 잔류농약 제거 효과

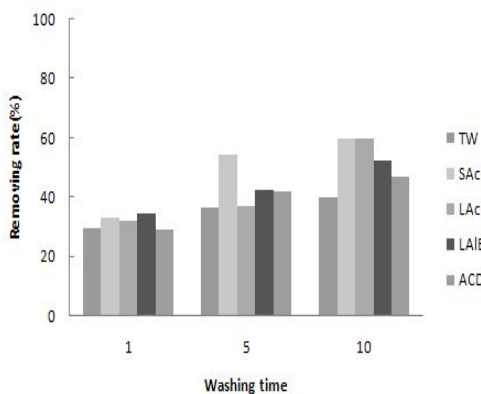
농산물의 화학적 위해 요소인 농약으로부터 안전성을 확보하기 위해 마이크로버블 세척법에 의한 잔류농약과 미생물 제거 효과를 살펴보았다. 세척수로는 강산성수(SAcEW), 약알칼리수(LAIEW), 미산성수(LAcEW), 이산화염소수(ACD)를 사용하였으며 수도수(TW)를 대조구로 하였다. 사용된 농약의 종류는 chlorpyrifos, prothiofos, spirodiclofen, acequinocyl thiophanate-methyl과 benomyl 이었으며 회수율 실험 결과 98.71 ~112.75%로 나타났다. 세척수에 의한 잔류농약 제거 효과를 알아보기 위한 세척수로 강산성수(SAEW), 약알칼리수(LAIEW), 미산성수(LAcEW), 염소수(ACD)를 사용하였으며 4가지 세척수에 의한 유자의 잔류농약 chlorpyrifos, prothiofos, phosalone의 제거율은 Fig. 26에 나타내었다. Chlorpyrifos의 경우 세척 1분 경과 후 14.08~37.25% 수준 감소하였으며 10분 경과 후 50% 이상 감소 효과를 나타내었다. 세척수별 감소율은 미산성수가 세척 시간에 관계없이 가장 높은 감소율을 나타내었다. 미산성수의 경우 세척 5분 후 chlorpyrifos 감소율은 68.32% 수준으로 다른 처리구들의 36.36~48.78%에 비해 현저하게 높은 감소를 보였다. 또한 prothiofos의 경우 세척 10분 경과 후 미산성수가 74.91% 수준 감소하여 이산화염소수 52.45%와 약알칼리수 50.23%에 비해 높은 효과를 보였다. 모든 처리구에서 시간이 경과하면서 농약 잔류량이 감소하였으며 5분 처리 후 50% 이상 감소 효과를 보였다. 농약의 종류와 세척 시간에 관계없이 미산성수가 가장 효과가 높았으며 spirodiclofen과 benomyl의 경우 강산성수도 미산성수와 비슷한 경향을 나타내었다.



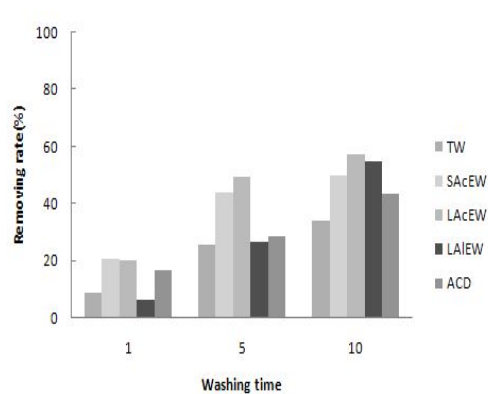
a) Chlorpyrifos



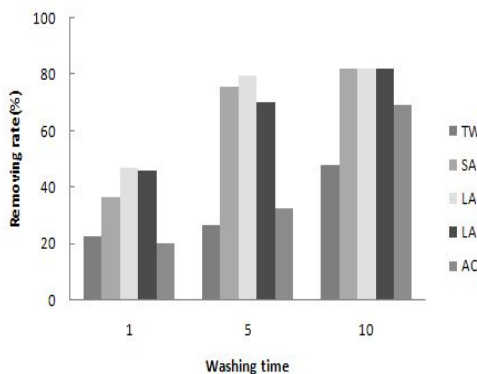
(b) Prothiofos



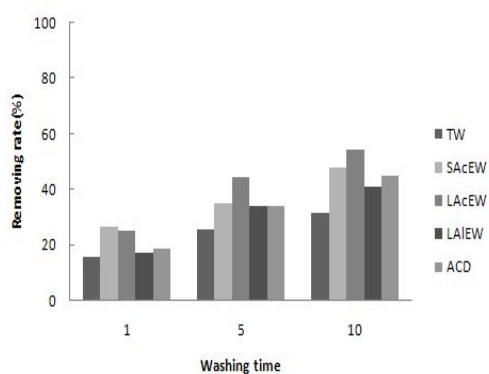
c) Spirodichlofen



(d) Benomyl



e) Thiophanate-methyl



(f) Acequinocyl

Fig 26. Removing rate of pesticides by different washing solution in Yuza.

TW: Tap water; SAcEW: strong acidic electrolyzed water; LAIEW: Law alkaline electrolyzed water; LAcEW: Law acidic electrolyzed water; ACD: Aqueous chlorine dioxide.

사) 마이크로 버블과 와류 버블에 의한 세척

마이크로버블 세척과 현재 현장에서 사용되고 있는 와류 버블 세척물의 세정효과 및 살균효과를 조사하기 위하여 경기도 광주시 오포읍 문형리에 위치한 (주)싱싱원에서 현장 예비시험을 수행하였다. 싱싱원은 유기농 채소만을 사용하기 때문에 미생물 오염에 더 노출되어 있다고 보고 있다. 따라서 본 연구진은 현장 방법대로 세척한 혼합채소 샐러드와 2차 세척후 마이크로버블을 사용한 처리구 및 자외선살균처리 및 염소수 살균처리수(50ppm)를 적용 시험하였다(Fig. 9).



Micro-bubble washing



General bubble washing

Fig. 9. Washing system

싱싱원에서 2차 세척 후 염소수와 자외선살균수, 마이크로버블을 이용해 시료를 전처리 한 다음 싱싱원에서 세척 완료된 시료와 비교하여 *Listeria*, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Bacillus cereus*를 측정하였다. 처리 직후 모든 시료가 음성으로 검출되지 않았고, 저장 6일째 A와 B 시료에서 *Bacillus cereus*가 2.0×10^1 , 10×10^1 검출되었고, C와 D 시료는 음성으로 검출되지 않아 염소수나 자외선살균수의 효과 보다는 마이크로버블 세척으로 인해 살균 효과가 증대된 것으로 판단된다(Table 31)

Table 31. Microorganism of mixed vegetable

Storage period (day)	Pathogenic bacteria	Treatment ¹⁾				Unit	Method
		A	B	C	D		
0	<i>Listeria</i>	N.D. ²⁾	N.D.	N.D.	N.D.	cfu/g	Food code (KFDA, 2008)
	<i>E.coli</i>						
	<i>Staphylococcus aureus</i>						
	<i>Salmonella</i>						
	<i>Bacillus cereus</i>						
6	<i>Listeria</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		
	<i>E.coli</i>						
	<i>Staphylococcus aureus</i>						
	<i>Salmonella</i>						
	<i>Bacillus cereus</i>						

¹⁾ A : 싱싱원제품

B : 싱싱원 2차 세척 + 염소수

C : 싱싱원 2차 세척 +마이크로버블

D : 싱싱원 2차 세척 +자외선살균수 +염소수 +마이크로버블

2) Not detected.

아) 마이크로버블을 이용한 세척 시간별 비교 시험

마이크로버블을 이용해 상추를 대상으로 1분, 3분, 5분으로 나누어 세척처리한 후 7°C에 저장하면서 무세척구와 비교해 분석 관찰하였다. 세척시간에 의한 총균수 측정 결과 처리시간에 따라 총균수의 차이를 나타내었고 5분간 세척한 경우 총균수를 감소시키는데 가장 효과적이었다. 저장기간이 지날수록 모든 처리구가 증가하는 경향을 나타냈으며, 마이크로버블 5분(MW5) 처리구가 가장 적게 증가하여 저장 7일째 무처리구 보다 2 log CFU/g 정도 더 낮게 나타났다(Fig. 26).

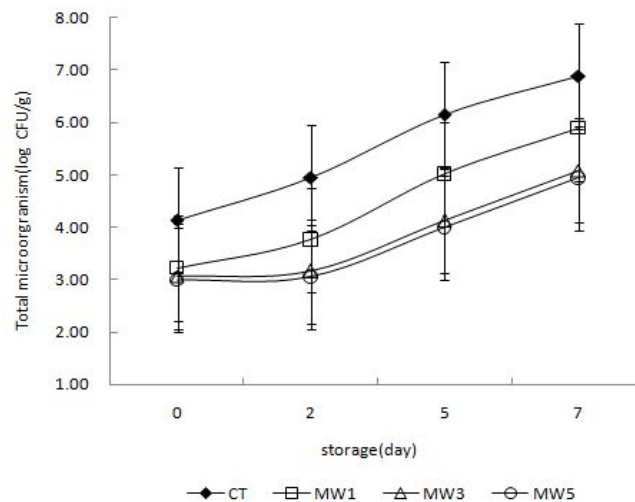


Fig 26. Changes of total cell count on lettuce

CT: no washing, MW1: washing for 1 min, MW3: washing for 3 min, MW5: washing for 5 min





MW 5

Fig 27. Picture of lettuce after washing.

CT: no washing, MW1: washing for 1 min, MW3: washing for 3 min, MW5: washing for 5 min.

자) 세척 처리수 온도별 비교 시험

마이크로버블을 이용하여 치커리를 처리수 온도 0℃, 5℃, 10℃로 각각 5분간 세척처리 후 미생물을 측정된 결과, 총균수는 처리 직후 0℃는 102/g에서 측정되었고, 5℃와 10℃에서는 103/g에서 측정되었다. 저장기간이 경과함에 따라 0℃ 처리군의 총균수가 5℃와 10℃ 처리군 보다 총균수의 증식이 적게 나타났으며, 미생물 증식 억제를 위해 5℃ 이하에서 처리함이 적합하다고 판단된다(Fig. 28).

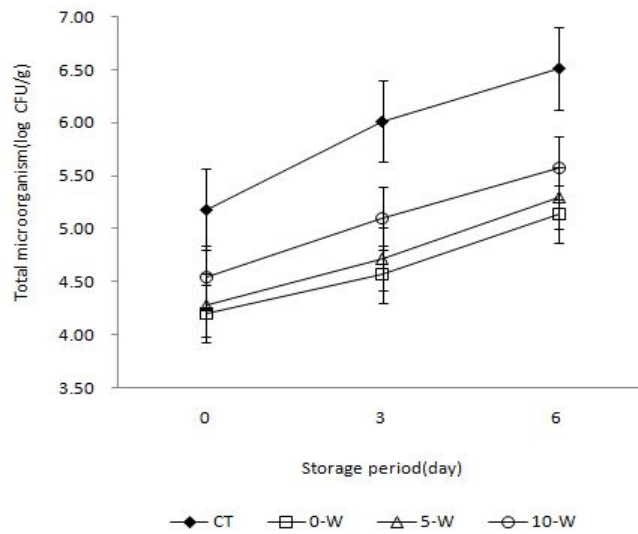


Fig 28. Changes of total cell count on chicory with various washing conditions.

CT : no washing, 0-W : washing at 0℃, 5-W : washing at 5℃, 10-W: washing at 10℃

5) 전처리에 따른 유자의 가공 특성 및 저장 중 품질 특성 변화

가) 세척 방법별에 따른 세척 효과 비교 시험

세척 방법별 유자의 미생물 감소 효과 결과는 Fig. 29와 같다. 초기 유자의 미생물 수는 6.16 log cfu/g이며 수도수 처리구 5.77 log cfu/g으로 초기와 큰 변화를 보이지 않았다. 기계 세척 후 3.71 log cfu/g로 2.45 log scale 감소하였으며 산성수 처리 후 기계세척 처리구는 2.62 log cfu/g으로 3.54 log scale 감소하여 가장 큰 감소를 보였다. 잔류농약의 감소율은 Fig. 30에 나타내었다. Chlorpyrifos의 감소율은 기계 세척 처리구는 50.85%, 강산성수 처리 후 기계 세척 처리구는 70.49%로 수도수 처리구 (24.19%)에 비해 2~3배 높은 감소를 보였다. 세정제 처리구는 41.30% 감소하여 수도수 처리에 비해 17.11% 가량 높았다. Lee 등에 따르면 농약 제거율을 정리한 결과 세제에 의한 제거율은 일반적으로 수세에 의한 것보다 평균 10% 가량 높았다고 보고하였다. Prothiofos의 경우도 chlorpyrifos와 유사하였다. 기계 세척 처리구는 수도수 처리구에 비해 1.85배 감소 효과를 보였으며 강산성수 처리 후 기계 세척 처리구의 감소율은 70.83%로 수도수 처리에 비해 2.75배 높았다. 일반적으로 chlorpyrifos와 prothiofos와 같은 유기인계 농약은 유용성이기 때문에 과일 표면의 wax층에의 흡착 침투가 일어나기 쉬워서 세척률이 낮은 것으로 알려져 있다(Yoon 등, 1997) 과일 박피에 의한 유기인계 농약의 제거 효과는 평균 92% 수준으로 효과적인 방안이지만(Lee, 1999) 유자는 과피를 활용이 높은 과일로써 유기인계 농약의 효과적인 방안이 마련되어야 한다. Spirodichlofen과 deltamethrin도 강산성수 처리 후 기계 세척 처리구가 72.02~81.80% 감소되어 처리구들 가운데 가장 효과가 높았다. 전해수는 속효성의 살균성과 잔류물이 없으며 물자체의 오염에 따른 2차 오염 가능성이 없다는 특징을 가지고 있다(Choi 등, 2008) 세척에 의한 잔류농약의 제거율은 농약 자체의 수용성 정도보다는 작물의 침투성 및 농산물의 특성에 영향을 받는다고 알려져 있는데 (Krol et al. 2000, Lee et al. 2006, Ahn et al. 2008) 본 연구에서도 수용성이 높은 chlorpyrifos(수용성, 1.4 mg/L)와 prothiofos(수용성, 0.7 mg/L)의 제거율이 수용성이 낮은 benomyl(수용성, 2.9 µg/L), 불용성인 thiophanate-methyl 의 제거율이 높게 나타나 농약의 수용성이 제거율과 비례하지 않음을 알 수 있었다. 농약별 제거 효과는 있었으며 초기에 비해 70.49~97.17% 감소를 나타내었다. 농약별 결과 deltamethrin이 가장 효과가 높았으며 강산성수 처리 후 기계 세척 처리시 97.17% 감소하여 다른 농약 70.19~72.02%에 비해 높았다.

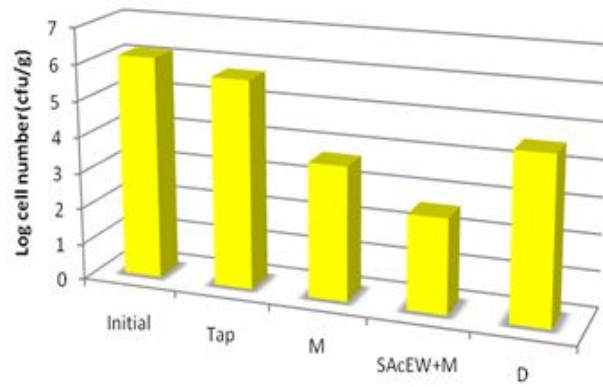
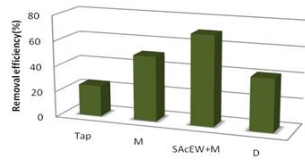


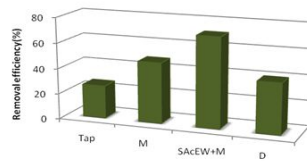
Fig 29. Effect of washing treatments on microbial counts in Yuza.

Tap : tap water, M: mechanical washing,

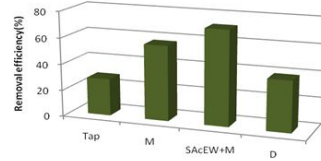
SAcEW: strong acidic electrolyzed water, D: detergent solution



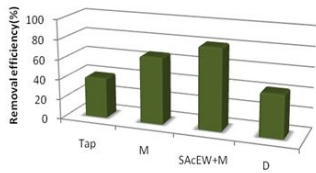
(a) Chlorpyrifos



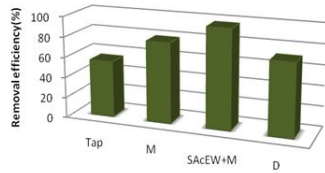
(b) Prothiofos



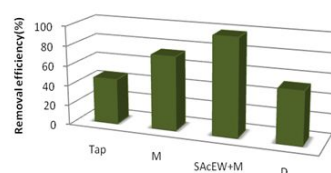
(c) Spirodichlofen



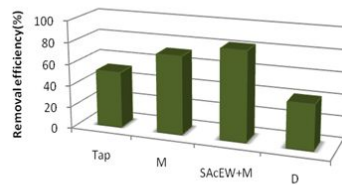
(d) Deltamenthrin



(e) Benomyl



(f) Thiophanate-methyl



(g) Acequinocyl

Fig 30. Removal efficiency (%) of acequinocyl on Yuza with different various washing methods

Tap : tap water, M: mechanical washing,

SAcEW: strong acidic electrolyzed water,

D: detergent solution

나) 세척 조건별에 따른 유자차의 저장 중 품질특성 비교

① pH 및 산도

세척별 유자로 제조된 유자차의 pH 및 산도 변화는 Fig. 31에 나타나 있다. 초기 pH는 3.46~3.52 수준으로 처리구들간에 차이를 보이지 않았다. 저장 2주째 감소하는 경향을 보이다가 4주째부터 다시 증가하였다.

저장 16주째 3.58~3.64 초기에 비해 0.06~0.13 수준 증가하였으며 시료들간에 차이는 없었다. 산도는 초기 0.62~0.77% 수준이었으며 대조구와 TW 처리구는 저장 6주째까지 증가하였으며 그 외 처리구들은 저장 8주째까지 증가하다가 그 이후 다시 감소하는 경향을 보였다. 저장 6주째 대조구의 산도는 1.17%로 다른 처리구의 산도 0.82~1.04% 수준보다 높았다. 저장 16주째 M과 M+SACeW 처리구의 산도는 0.76~0.80% 수준으로 다른 처리구보다 낮았다.

② 환원당

세척별 유자로 제조된 유자차의 환원당 변화는 Fig. 32에 나타나 있다. 초기 환원당은 6.57~7.40% 수준으로 저장기간이 경과할수록 증가하는 경향을 보였다. 저장 6주째 환원당 20.65~24.78% 수준으로 가장 높았고 그 이후에는 비슷한 수준을 유지하였다.

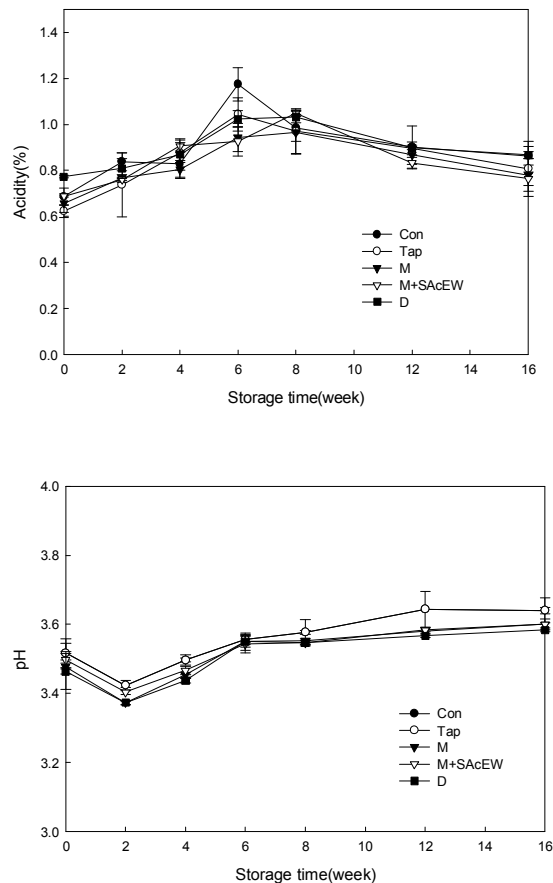


Fig 31. Acidity and pH of yuja tea with different washing methods during storage at 30°C

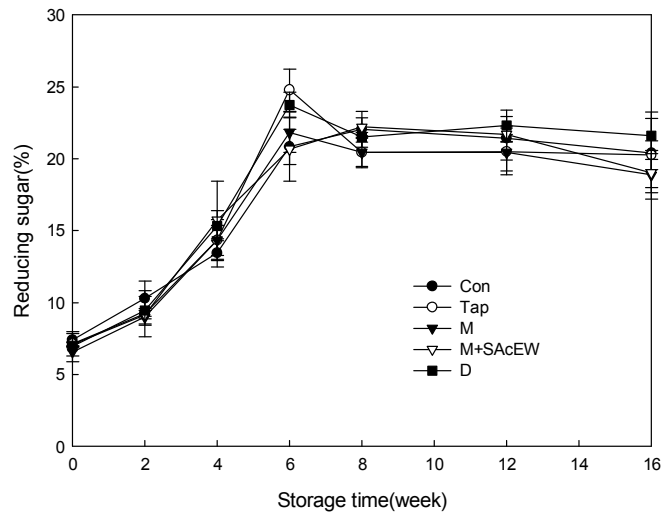


Fig 32. Reducing sugar changes of yuza tea with different washing methods during storage at 30°C

다) 관능평가

세척별 유자로 제조된 유자차의 관능평가는 T초기 색과 맛의 관능 결과 M과 M+SACeW 처리구의 선호도가 높았으며 전반적인 기호도는 M+SACeW가 가장 높았다. 저장기간이 경과할수록 기호도는 감소하였으며 저장 12주째 가장 큰 감소를 보였다. M과 M+SACeW 처리구는 저장 12주 이후에도 색과 전반적인 기호도 모두 다른 처리구에 비해 높았다.

6) 통합형 구형 Type 표면 세척/살균/물기 제거 시스템 설계 및 성능평가

가) 단위 공정조건 조건별에 따른 세척 효율 비교

유자를 대상으로 시작기의 세척을 시험을 위해 노즐 회전수 분당 10, 40, 70회, 수압 6, 9, 12 MPa 및 컨베이어 벨트 이송속도 2.76, 5.52, 8.28 m/min의 조건으로 실험하였다. 컨베이어 벨트 이송속도 2.76, 5.52, 8.28 m/min 에서 노즐 회전수와 수압에 따른 세척율을 Fig. 33에 나타내었다. 컨베이어 벨트 이송속도가 가장 느린 2.76 m/min에서의 세척율은 88.06 ~ 97.07%로 5.52 m/min 49.14~92.92%와 8.28 m/min 55.34~90.05%보다 높았다. 2.76 m/min의 경우 수압 12 MPa일 때 노즐 회전수 40, 70회에서 세척율 95.88%와 97.07%로 가장 높았으며 수압 9 MPa일 때 노즐 회전수 40, 70회에서 세척율은 95.24%와 95.25%로 수압 12 MPa과 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$). 속도 5.52 m/min의 경우 수압에 관계없이 노

줄 회전수가 많을수록 세척율을 높였으며 9, 12 MPa의 경우 노즐 회전수 40, 70회에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$). 세척율과 컨베이어 벨트 이송속도, 노즐 회전수 및 수압과의 상관관계를 Table 32에 나타내었다. 컨베이어 벨트 이송속도는 세척율과 음의 상관관계로 이송속도가 느릴수록 세척율은 높았으며 노즐 회전수와는 양의 상관관계로 분당 노즐 회전수가 많을수록 세척율은 높았다. 컨베이어 이송속도, 노즐 회전수, 수압에 대한 효율적인 조건을 예측하기 위해 RSM(respond surface methodology) 모델에 적용한 결과를 수립된 이차 모형식과 회귀계수값을 Table 33에 나타내었다. 세척율에 미치는 영향을 살펴본 결과 R^2 값이 0.7465이며 p 값은 < 0.001 로 높은 상관관계를 나타내었다. 컨베이어 벨트 이송속도 \times 노즐 회전수, 컨베이어 벨트 이송속도 \times 수압과 노즐 회전수 \times 수압과의 삼차원 그래프와 등고선을 Fig. 34, 35에 나타내었다. 분석 결과 컨베이어 벨트 이송속도 \times 노즐 회전수, 컨베이어 벨트 이송속도 \times 수압의 임계점은 안장점(saddle point)을 나타내었고 노즐 회전수 \times 수압의 경우 최고점을 나타내었다. 노즐 회전수 \times 수압의 경우 예측된 최적점은 노즐 회전수 분당 58.92회이며 수압 9.01 MPa이었다. 결과적으로 세척율은 수압과는 낮은 상관성을 나타냈으며 수압의 경우 9.01 MPa일 때 가장 높은 세척율을 나타내었다.

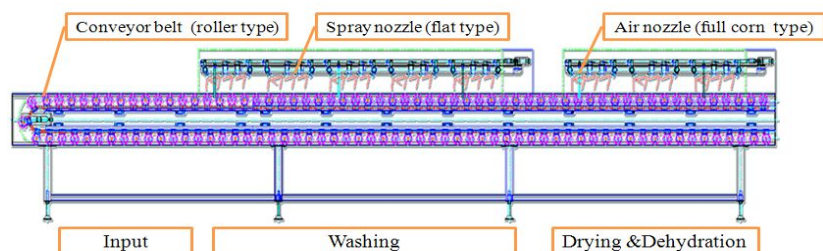
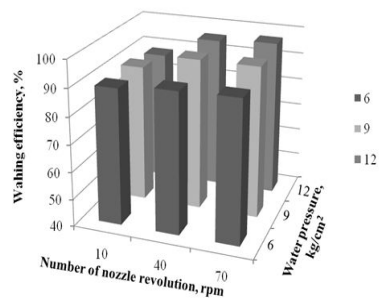
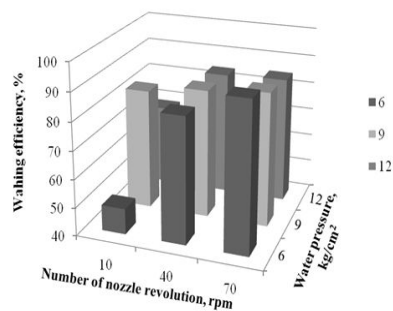


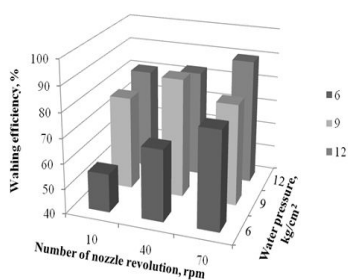
Fig 33. Schematic diagram of mechanical washing system.



(a) 2.76 m/min



(b) 5.52 m/min



(c) 8.28 m/min

Fig 34. Washing efficiency of Yuza by various washing conditions.



Control



(2.76, 10, 6)

(2.76, 40, 6)

(2.76, 70, 6)



(2.76, 10, 9)

(2.76, 40, 9)

(2.76, 70, 9)



(2.76, 10, 12)

(2.76, 40, 12)

(2.76, 70, 12)



(5.52, 10, 6)

(5.52, 40, 6)

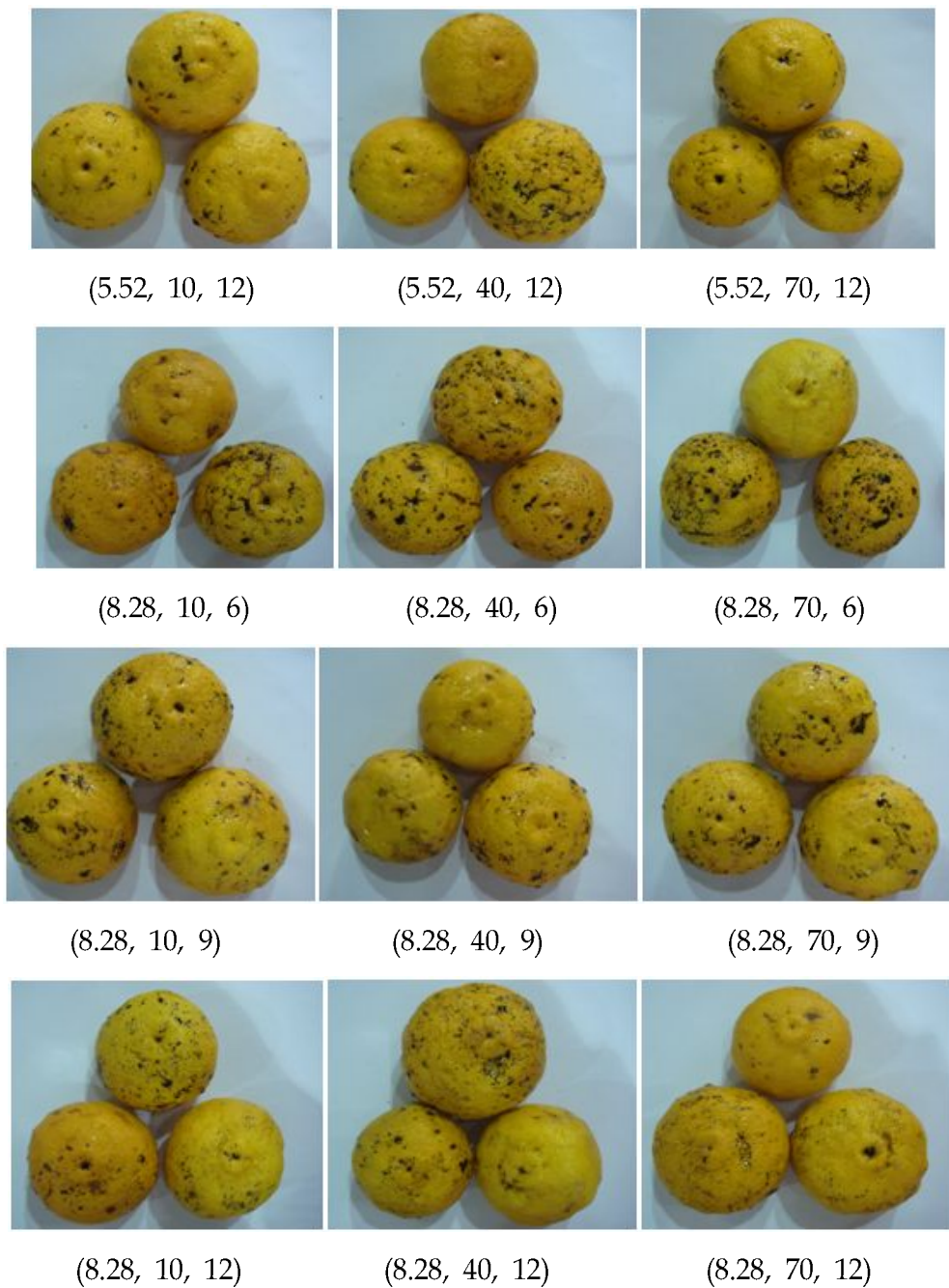
(5.52, 70, 6)



(5.52, 10, 9)

(5.52, 40, 9)

(5.52, 70, 9)



(Conveyor belt transportation speed(m/min), Number of nozzle revolution, Water pressure(MPa))

Fig 35. Picture of yuza by different washing conditions

Table 32. Correlation coefficients between washing efficiency and washing conditions

	Conveyor belt transportation speed	Number of nozzle revolution	Water pressure
Washing efficiency	-0.5495***	0.4851***	0.1392

* : p<0.05 ** : p <0.01 *** : p<0.001

Table 33. Polynomial equations calculated by RSM program

Response	Polynomial equation	R ²	F value
Washing efficiency	$Y = 65.181 - 14.339X_1 + 9.620X_2 + 0.800X_3 + 0.381X_1X_2 + 0.023X_1X_3 - 0.032X_2X_3 + 0.644X_1^2 - 0.518X_2^2 - 0.005X_3^2$	0.746	23.77***

* : p<0.05 ** : p <0.01 *** : p<0.001

X₁:conveyorbeltransportationspeed(m/min), X₂:waterpressure(MPa), X₃:numberofnozzlerevolution(permin)

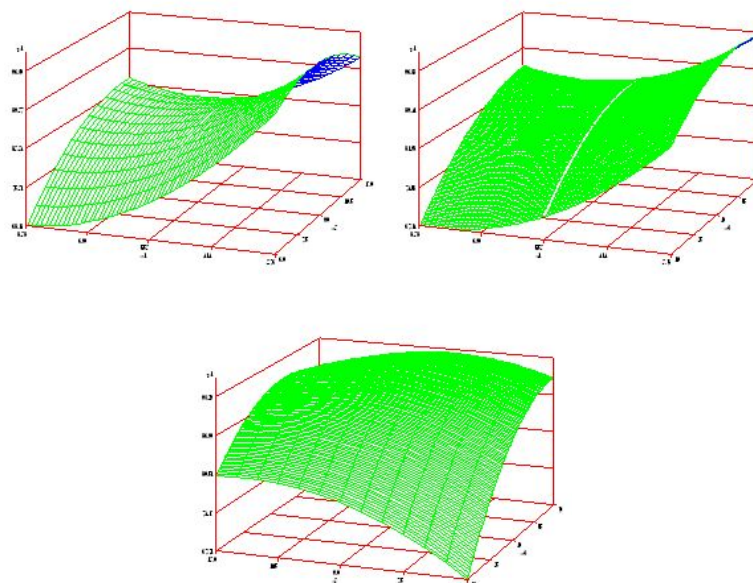


Fig 36. Response surface for conveyor belt transportation speed (X₁), water pressure(X₂) and number of nozzle revolution(X₃) on washing efficiency.

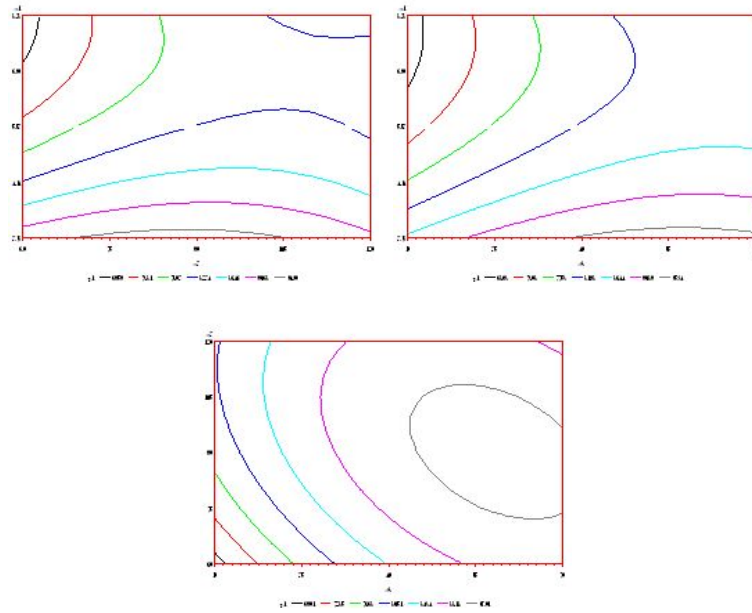


Fig 37. Contour map for conveyor belt transportation speed(X_1), number of water pressure(X_2) and number of nozzle revolution(X_3) and on washing efficiency

나) 시작품의 단위 공정조건 조건별에 따른 미생물 및 잔류농약 제거 효과

세척을 시험을 기초로 하여 잔류농약과 미생물 제거 효과를 시험하기 위한 시작품의 세척 조건은 컨베이어 벨트 속도 2.76, 5.52, 8.28 m/min 와 노즐 회전수 10, 40, 70 rpm으로 하였으며 수압은 9 Mpa로 유지하였다. 미생물 실험 결과는 Fig. 36에 나타내었다. 미생물 결과 초기 6.40 log cfu/g 수준이었으며 기계 세척시 컨베이어 벨트 이송속도가 느릴수록 노즐 회전수가 많을수록 미생물 제거 효과가 높았다. 수도수 처리는 0.40 log cfu/g수준 감소하였으며 기계 세척시 컨베이어 벨트 속도 8.28 m/min 노즐 회전수 10 rpm(6.07 log cfu/g)의 경우를 제외하고 수도수 처리구보다 높은 감소를 나타내었다. 컨베이어 벨트 속도 2.76 m/min일 때 노즐 회전수 40, 70회에서 각각 2.20, 2.05 log cfu/g수준 감소하여 처리구 가운데 가장 큰 감소를 보였다. 잔류농약 실험 결과 chlorpyrifos의 경우 수도수 처리 후 34.99% 감소하였으며 Choi et al(2008)에 따르면 사과를 수도수로 세척시 39.35% 감소하여 비슷한 제거률을 나타내었다. 컨베이어 벨트 이송속도에 관계없이 노즐 회전수 40 rpm 이상에서 42.19% 이상 감소를 나타내어 수도수보다 제거률이 높았다. 컨베이어 벨트 속도 5.52 m/min일 때 노즐 회전수 70회인 경우 62.87%로 노즐 회전수 40회인 경우 57.63% 에 비해 높았으나 유의적인 차이를 보이지 않았다. 노즐

회전수 70회일 때 컨베이어 벨트 속도 2.76 m/min의 경우 61.31% 감소하여 5.52 m/min의 경우 62.87% 와 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 37-a). Prothiofos의 경우 노즐 회전수 70 rpm 일 때 속도 2.76, 5.52 및 8.28 m/min에서의 제거율이 53.76, 52.04 및 49.48% 으로 속도가 빨라질수록 감소하였으나 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$)(Fig. 37-b). 농약은 저장기간이 길어지면 과일 표면에서 과육으로 이행하며 수용성이 클수록 이행속도가 빨라진다. Chlorpyrifos와 prothiofos는 유기인계 농약으로 성분이 과육으로 잘 이행되지 않아 주로 껍질 부위에 많이 잔류되는 특징을 가진다. 껍질을 벗기기에 의해 잔류 농약 성분을 경감시킬 수 있으나 유자의 경우 껍질을 먹는 과일이기에 효과적인 세척 방안이 필요하다. Spirodichlofen의 제거 효과가 가장 좋은 조건은 컨베이어 속도 2.76 m/min, 노즐 회전수 70 rpm 이며 이때의 제거율은 62.52%이었다(Fig. 37-c). Deltamethrin의 제거율 결과는 Fig. 37-d에 나타내었다. 속도가 느릴수록 제거율은 높았으며 노즐 회전수 10 rpm 일 때를 제외하고 수도수 처리(44.36%)보다 높은 제거율을 나타내었다. Benomyl과 thiophanate-methyl의 경우 수도수 처리 후 65% 이상 감소를 나타내었으며 기계 세척시 컨베이어 벨트 속도, 노즐 회전수에 관계없이 수도수에 비해 유의적으로 높은 감소를 나타내었다(Fig. 37-e,f). Acequinocyl의 제거율은 Fig. 37-g에 나타나 있으며 컨베이어 벨트 속도 5.52 m/min이하에서 54.57~61.40% 수준 감소하여 수도수 처리구 41.10%에 비해 유의적으로 높은 감소를 나타내었다. 컨베이어 벨트 속도 2.76과 5.52 m/min과 노즐 회전수 40, 70 rpm 에서의 제거율은 59.72~61.40%수준이었으며 처리 조건들간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p < 0.05$). 위의 결과를 토대로 컨베이어 벨트 속도는 5.52 m/min 이하로 노즐 회전수는 분당 40회 이상의 조건으로 세척시 유자의 잔류농약을 효과적으로 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다. 세척에 의한 잔류농약의 제거율은 농약 자체의 수용성 정도보다는 작물의 침투성 및 농산물의 특성에 영향을 받는다고 알려져 있다. 본 연구에서도 chlorpyrifos와 prothiofos는 다른 농약에 비해 용해도가 높으나 제거율은 높지 않았으며 Krol(2000)의 연구에서도 농약의 세척력과 용해도는 상관관계가 없다고 보고하였다. 또한 침투성 농약인 benomyl과 thiophanate-methyl의 제거율이 다른 농약에 비해 높게 나타났으며 Kwon et al의 연구(2006) 결과에서도 방울토마토 세척 시 thiophanate-methyl 제거율이 가장 높았다고 보고되었다.

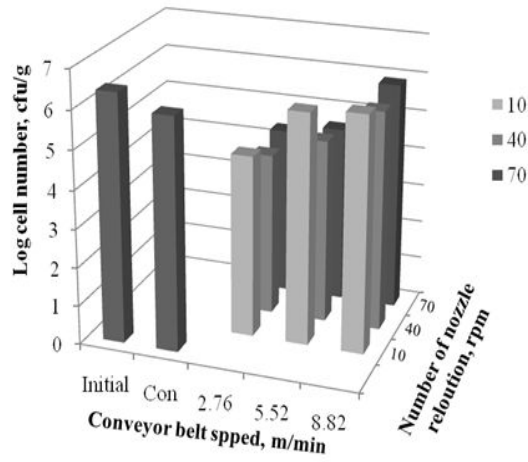
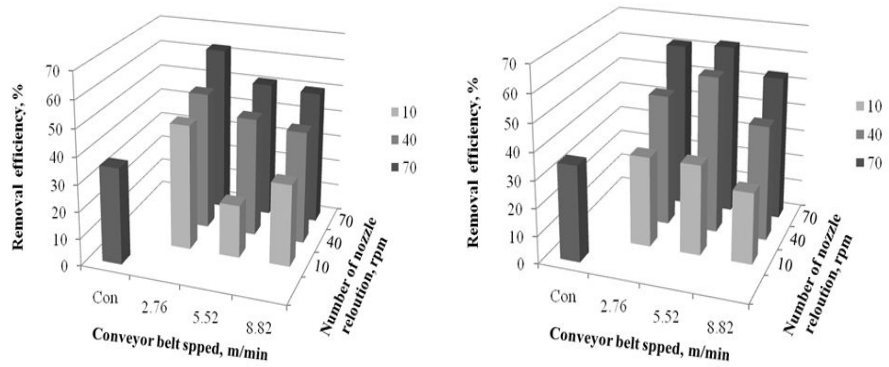
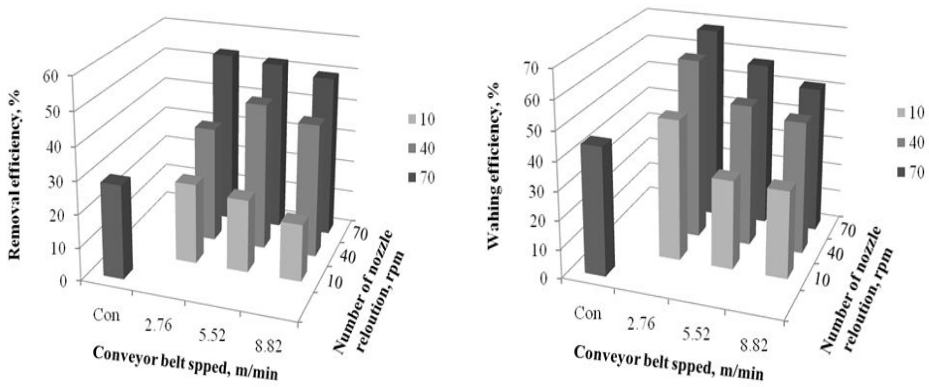


Fig. 36. Effect of washing treatments on microbial counts in Yuza.



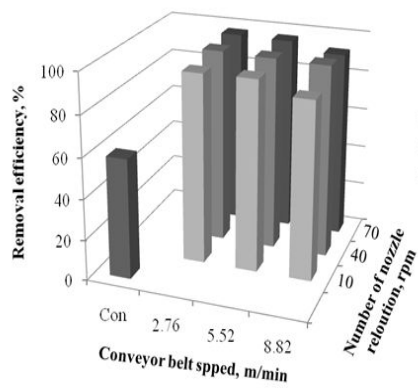
(a) Chlorpyrifos

(b) Prothiofis

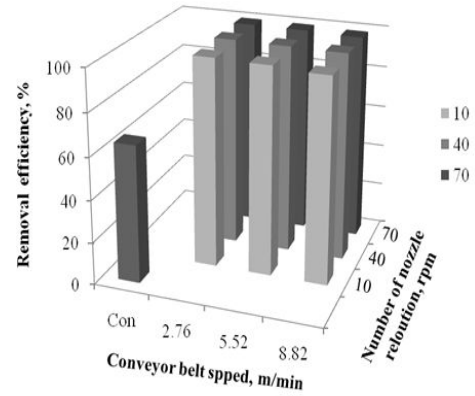


(c) Spirodiclofen

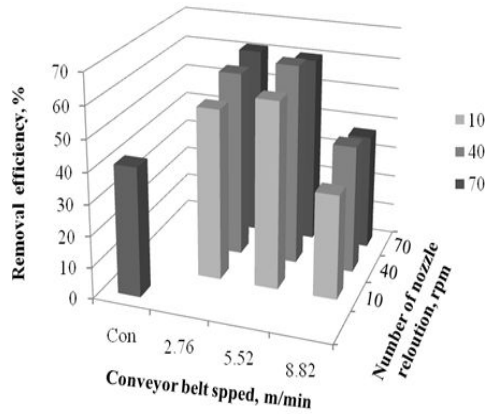
(d) Deltamethrine



(e) Spirodiclofen



(f) Thiophanate-methyl



(g) Acequinocyl

Fig 37. Removal efficiency (%) of pesticide residues on Yuza by various washing conditions.

다) 노즐 크기와 압력에 따른 잔류농약 제거율

노즐 크기와 압력에 따른 물의 용량은 Fig. 38에 나타나 있다. 직경이 1.41 mm인 노즐의 경우 압력 5 bar 기준으로 2.55 L/min의 수량을 필요로 한다. 같은 압력에서 직경 1.97 mm인 노즐은 직경 1.41 mm인 노즐의 2배인 5.09 L/min의 수량이 필요하며 직경 2.40 mm인 노즐의 경우는 3배인 7.64 L/min의 수량을 필요로 한다. 노즐에 관계없이 압력이 증가하면서 필요한 수량이 증가하는 것으로 나타났다. 노즐 크기와 압력에 따른

잔류농약 제거율은 Fig. 39에 나타나 있다. 노즐 크기는 1.41, 1.97, 2.40 mm이며 압력은 6, 10 bar 로 조건을 달리하여 잔류농약 제거율을 분석한 결과 Chlorpyrifos의 제거율은 44.38~51.33 % 제거되었으며 6 bar와 10 bar로 수압을 증가하여도 제거율은 오히려 감소하는 것으로 나타나 수압은 잔류농약 제거에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 수압 10 bar의 경우 chlorpyrifos, prothoifos, spirodichlofen의 경우 노즐의 크기가 증가할수록 증가하는 경향을 나타냈으나 deltamethrine은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 모든 농약은 조건에 관계 없이 50±5% 감소효과를 나타냈으며 사용되는 물의 용량을 감안한다면 수압과 노즐 크기가 작을수록 경제적 효율은 높을 것으로 판단된다.

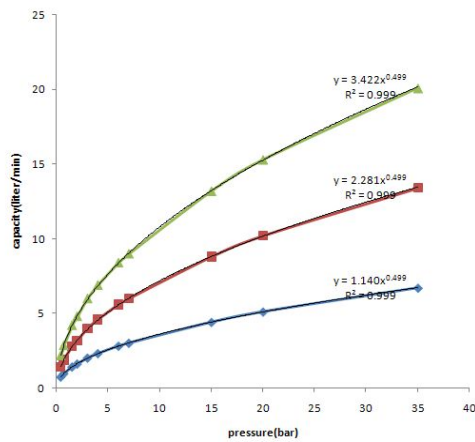
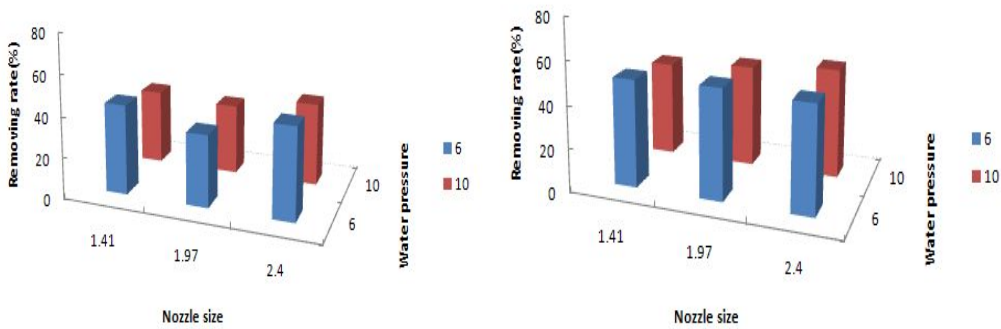
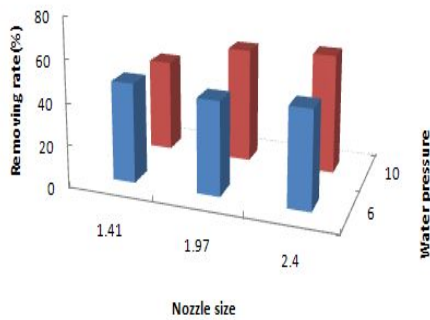


Fig 38. Water capacity with different nozzle size and water pressure.

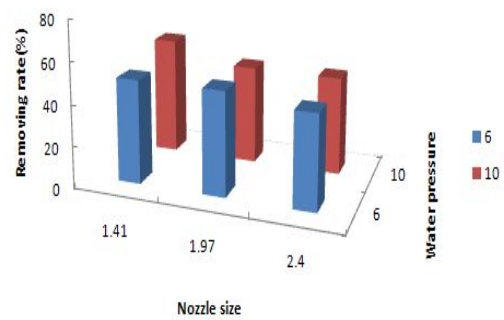


(a) Chlorpyrifos

(b) Prothiofos



(c) Spirodichlofen



(d) Deltamethrine

Fig 39. Removing rate of pesticides on yuja according to different nozzle size and water pressure.

라) 시작기의 단위요소에 대한 세부 사양 및 개략도

투입라인

설비 사양		
①	TYPE :	ROLLER TYPE
②	SIZE :	520W*1,440L-1조
③	FRAME	SUS

세척라인

설비 사양		
NOZZLE 분사		
①	TYPE :	
②	SIZE :	520W*1,842L*1330H
③	FRAME :	STS304, 양면 H/R
④	NOZZLE :	TYPE : PLATE
각도 : 65도, 분사거리 : 5cm		
⑤	PUMP :	피스톤 펌프(CDX/156)
유량 : 40L/min		

건조라인

설 비 사 양		
①	TYPE :	COMPRESS NOZZLE PYYPE
②	SIZE :	520W*2,828L*1330H
③	FRAME :	STS304, 양면 H/R
④	AIR	COMPRESS 50HP
⑤	ROLLER	ROLLER 회전

탈수라인

설 비 사 양		
①	TYPE :	RING BLOWER AIR
②	SIZE :	520W*3,342L*13300H
③	FRAME :	STS304, 양면 H/R
④	NOZZLE :	TYPE : 폴콘 TYPE 각도 : 60도, 분사거리 : 10cm
⑤	RING BLOWER	동부산업, 5HP

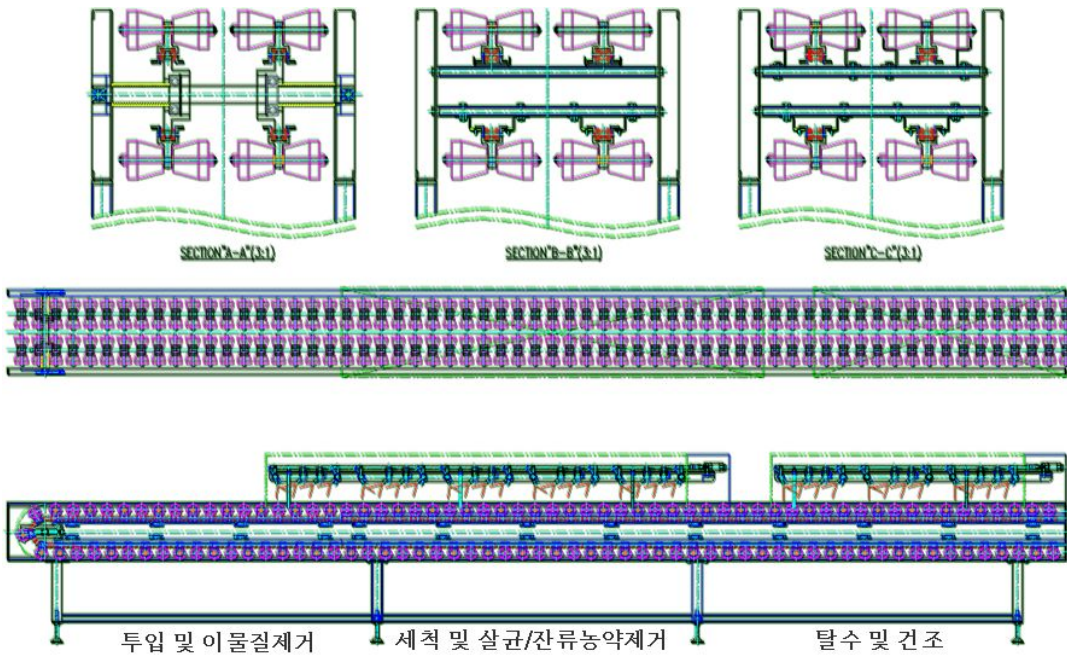


Fig. 40. Flow sheet of washing/sterilization/dehydration system on Yuzu

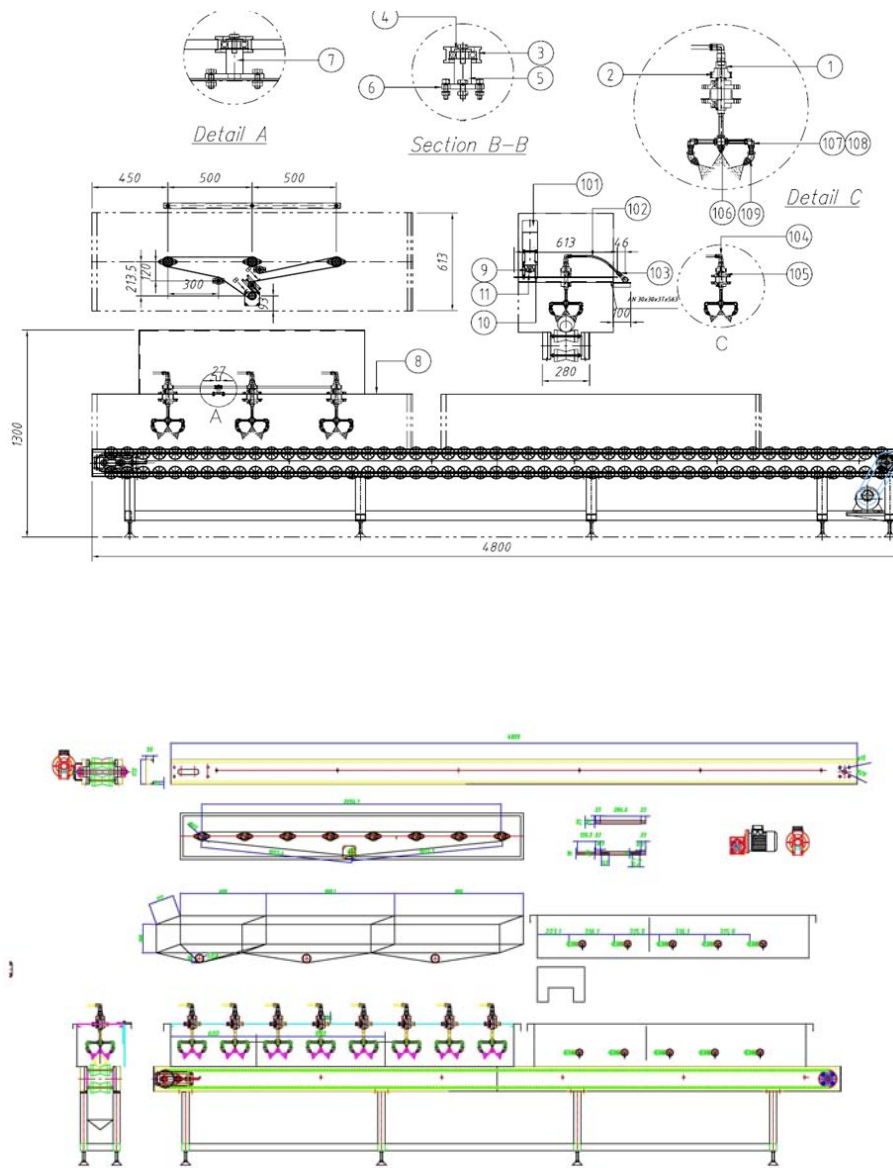


Fig 41. Detail drawing of washing/sterilization/dehydration system on Yuza



감귤 세척기 시방서

1. 설비 기본조건

1-1. 처리능력

- 1) 유자 1개당 평균 무게: 180~200 g
- 2) 시간당 최대 처리량: 0.2ton/hr
- 3) 일일최대 처리량: 2ton/day

1-2. Utility 시설 용량

- 1) 전원: 3상/380V/4선식/16KW
- 2) 급수 배관: 최고 32A PIPE
- 3) 공급수 최대 사용량: 40L, 2.4ton/hr
- 4) 배수라인(트랜치, 맨홀 2개소), 설배 전체라인 기준: 200W × 200H
- 5) 설비 공급수 물 저장 탱크 용량: 5ton*2EA
- 6) 전용 설비 면적: 25평 이상

2. 세부 사양

2.1 메인 후레임

-구조: STS304 2t 헤어라인 판과 60×40 사각파이프 용접 구조

2.2 상, 하부 커버

- 구조: STS304 2t 헤어라인 판

2.3 투입 배출 컨베이어

- 구조: 케브라코드 메쉬 벨트

2.4 전기사양

- 메인전원: AC 3상 380V 60Hz
- 제어전원: AC 380V
- 제어방식: 릴레이 제어
- 전기용량: 15.95kw

2.5 펌프 사양

- 펌프방식: 횡형 3련 플라저식
- 플란저 직경*행정: 32*34mm
- 회전수: 1200rpm
- 흡수량: 90L/min
- 압력: 30 kg/cm
- Motor: 3P 380V/60Hz, 3.7KW

2.6 BLOWER 사양

- 공기 토출량 ; 6 M3/min
- 소음 : 76 DB
- 전기 용량 : 3.7 kw

2.7 조립 시방

- 모든 조립 부자재는 부식에 강하며 일정한 강도를 갖추어야 함
- 볼트, 너트 등은 KS규격품이어야 하고 SUS304 소재를 쓴다
- 용접은 비드가 일정해야 하며 얼룩이나 자국이 나지 않도록 연마한다
- 전기배선은 필히 ks규격품을 사용하여야 한다
- 장구롤로의 소재는 식품기계에 적합하도록 마모성, 환경물질 등 모든 조건을 충족 해야 한다.

3. 특징

- 구조의 간소화에 의해 기계청소가 간단
- 균일하고 일정한 제품 세척 및 탈수 상태가 유지되어야 함
- 작동은 speed control 조정

5. 5협동 : 수출용 유자 및 가공품 개발과 부산물 활용기술 개발

가. 유자 및 폐기물을 이용한 기능성 식품/향장 소재 개발

1) 세부과제의 목표

본 연구에서는 착즙 후 남은 유자박을 열풍 또는 동결건조한 후 다양한 조성의 용매를 이용하여 oleoresin을 추출하였다. 유자의 oleoresin에는 hesperidin, limonene 등의 기능성 성분들이 함유되어 있어 다양한 식품제조에 응용할 수 있다. 식품 활용도를 증진시키기 위해서는 안정성이 낮은 oleoresin을 캡슐화할 필요가 있었으며, 이에 따라 oleoresin을 포함하는 캡슐을 다양한 제형으로 제조하고 그 특성을 연구하였다.

2) 연구수행내용

가) 건조조건에 따른 폐유자박의 건조량 비교

열풍건조와 동결건조를 이용하여 폐유자박을 건조시킨 후 그 건조량을 비교하였다.

Table 1. 열풍건조 및 동결건조 조건

열풍건조			동결건조		
조건	시간	누계시간	조건	시간	누계시간
60℃, 열풍	9	9	-37℃, 상압동결	5	5
70℃, 열풍	11	20	-30℃, 진공	1	6
80℃, 열풍	28	48	-20℃, 진공	2	8
90℃, 열풍	3	51	-10℃, 진공	2	10
			0℃, 진공	2	12
			10℃, 진공	2	14
			20℃, 진공	2	16
			30℃, 진공	2	18
			40℃, 진공	2	20
			50℃, 진공	54	74



Fig 1. 열풍건조 및 동결건조 분말

Table 2. 유자박 조건별 건조량

	열풍건조	동결건조
유자박	35.35kg	63.35kg
건조량	8.06kg	14.21kg

열풍건조와 동결건조를 하였을 때 동결건조는 색을 유지하였으나 열풍건조는 열에 의해서 갈변 현상이 일어나 색이 검게 변하였다. 건조율에서는 각각 22.8%, 22.4%로 비슷한 건조율을 보였다.

나) 건조된 유자와 용매에 따른 유자 Oleoresin의 추출연구

분쇄한 동결건조 및 열풍건조 유자 50 g에 각 용매 500 mL을 가하여 상온에서 3시간동안 추출하여 여과하였다. 이 여액에 sodium thiosulfate anhydrous를 가하여 탈수시킨 후 다시 한번 여과한 것을 감압농축기를 이용하여 40 °C에서 농축한 것을 유자 oleoresin으로 하였다.

Table 3. 건조방법과 용매의 종류에 따른 추출액

이름	건조방법 / 용매	이름	건조방법 / 용매
HM100	열풍건조 Methanol 100%	FM100	동결건조 Methanol 100%
HE100	열풍건조 Ethanol 100%	FE100	동결건조 Ethanol 100%
HD100	열풍건조 Dichloromethane 100%	FD100	동결건조 Dichloromethane 100%
HM75D	열풍건조 Methanol 75% : Dichloromethane 25%	FM75D	동결건조 Methanol 75% : Dichloromethane 25%
HM50D	열풍건조 Methanol 50% : Dichloromethane 50%	FM50D	동결건조 Methanol 50% : Dichloromethane 50%
HE75D	열풍건조 Ethanol 75% : Dichloromethane 25%	FE75D	동결건조 Ethanol 75% : Dichloromethane 25%
HE50D	열풍건조 Ethanol 50% : Dichloromethane 50%	FE50D	동결건조 Ethanol 50% : Dichloromethane 50%

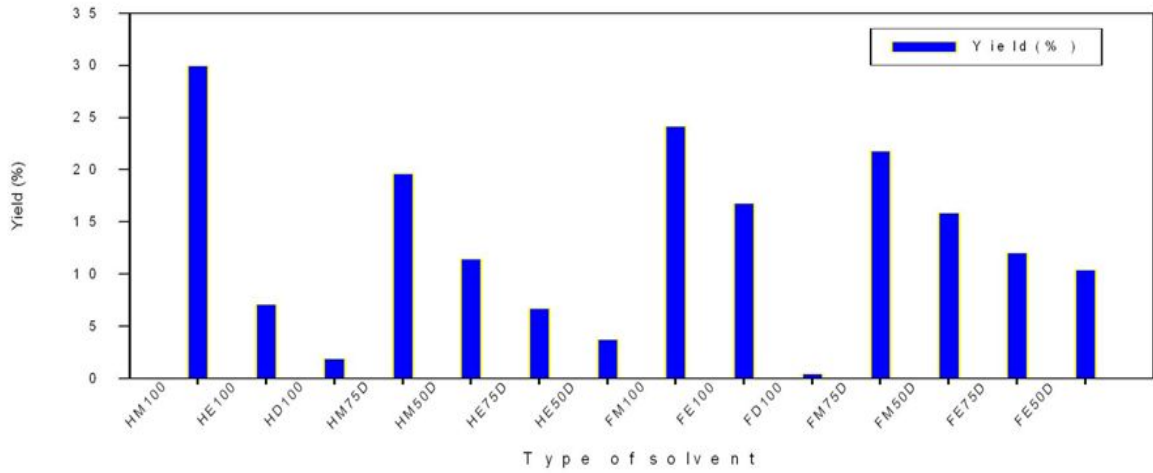


Fig 2. 유자 oleoresin의 수율 비교 그래프

Table 4. 유자 oleoresin의 수율 비교

이름	수율	이름	수율
HM100	60%	FM100	48.4%
HE100	14.2%	FE100	33.6%
HD100	3.8%	FD100	1%
HM75D	39.2%	FM75D	43.6%
HM50D	23%	FM50D	31.8%
HE75D	13.4%	FE75D	24.2%
HE50D	7.6%	FE50D	20.8%



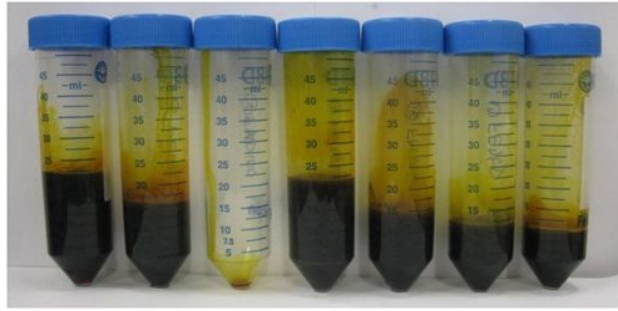


Fig. 3. 건조방법과 용매의 종류에 따른 추출액 (좌: 열풍건조, 우: 동결건조)

용매에 따른 추출 수율은 열풍건조 유자가루를 methanol로 추출하였을 때 60%로 가장 많은 수율을 보였고 동결건조 유자가루를 dichloromethane으로 추출하였을 때 1%로 가장 낮은 수율을 보였다. 건조 방법에 따른 차이로 보았을 때 동결건조 보다는 열풍건조를 하였을 때 수율이 더 좋았고 용매에 따른 차이로 보았을 때는 methanol, ethanol, dichloromethane의 순으로 나타났다. 이들의 혼합용매는 각 용매들의 혼합비율에 따라 수율과 비례하여 나타났다.

다) 유자 Oleoresin이 첨가된 유화액의 제조 및 droplet size

추출한 유자 oleoresin(HE100)을 10% 첨가, 유화제의 종류 및 비율을 달리하여 O/W 유화액을 제조하고 sonication을 가해준 시간(15, 30, 40, 50min)에 따라 그 droplet size를 측정하였다.

Table 5. 유화제의 종류 및 혼합비율 조건

유화제의 종류 및 비율	
1	Tween80 6%
2	Tween80 4% + Lecithin 2%
3	Tween80 3% + Lecithin 3%

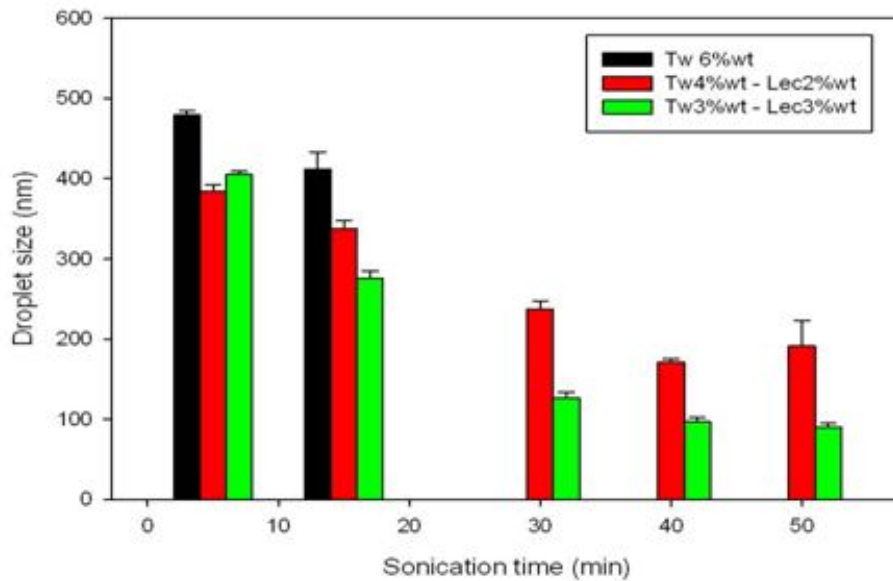


Fig. 4. 유화제의 종류 및 sonication 시간에 따른 droplet size

유화제의 종류 및 비율을 달리하여 제조된 유화액의 droplet size는 Tween 80 6%를 넣어서 제조한 유화액이 약 480 nm로 크기가 가장 컸으며 Tween 80과 lecithin을 혼합하여 사용한 것이 약 400nm로 가장 작은 크기를 보였다. sonication을 가해준 시간에 따른 droplet size는 Tween 80 3%와 lecithin 3%를 넣어 sonication을 15분 동안 가해준 유화액이 약 400 nm이고 가한 시간이 길수록 droplet의 크기가 100nm정도로 줄어드는 것을 알 수 있다.

라) 분무건조를 이용한 유자 Oleoresin (FE100)의 캡슐화

WPI를 코팅물질로 하여 추출한 유자 oleoresin(FE100)을 비율(15, 50%)을 달리하여 교반한 후 그 혼합액에 sonication을 가해준 다음 inlet과 outlet의 온도를 각각 180℃와 80℃, feeding rate를 55 mL/min으로 설정하고 분무건조를 하였다.



Fig 5. 유자 oleoresin의 혼합비율에 따른 분무건조 결과
 Oleoresin의 비율을 달리하여 분무건조 하였을 경우 15%만 넣은 것은 흰색으로 회수되었으며 50%의 경우에는 노란색을 약하게 띄었다. 분무건조 품의 경우에는 유자향이 거의 없거나 약하게 났는데 이는 유자 oleoresin이 캡슐 안에 안정적으로 캡슐화 되었기 때문이다.

마) 다공성 전분을 이용한 유자 Oleosin의 캡슐화

다공성 전분(썬크리미, Hi-cap)을 소재로 하여 유자 추출물(FE100, FE75D, FE50D)의 첨가량을 0.2 g씩 점점 증가시켜가며 섞어줌으로 캡슐화하고 Angle of repose, Carr Index, Hausner ratio등 flowability 및 cohesiveness를 측정하였다.



Fig. 6. 옥수수전분 - FE100



Fig 7. 옥수수전분 - FE75D



Fig 8. 옥수수전분 - FE50D



Fig 9. 썬크리미 - FE100



Fig 10. 썬크리미 - FE75D



Fig 11. 썬크리미 - FE50D



Fig 12. Hi-cap - FE100



Fig 13. Hi-cap - FE75D



Fig 14. Hi-cap - FE50D

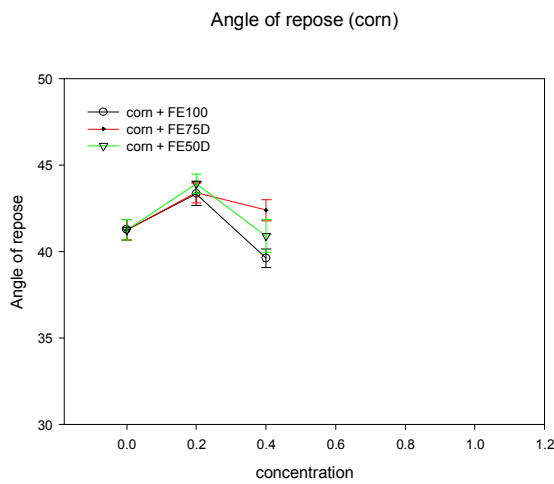


Fig 15. 옥수수전분의 안식각

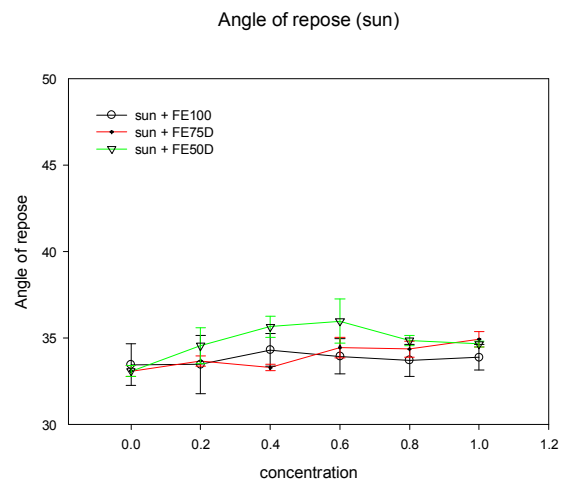


Fig 16. 썬크리미의 안식각

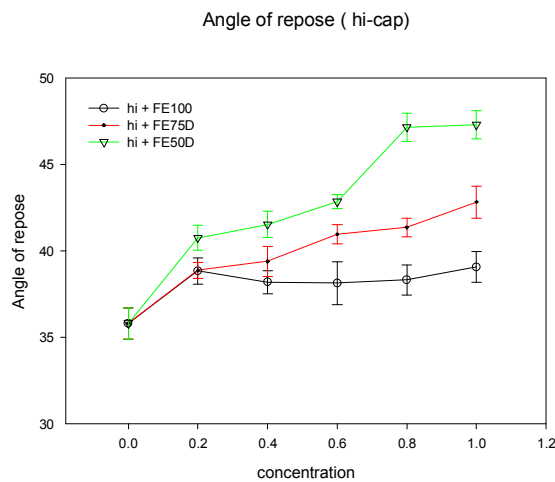


Fig 17. Hi-cap의 안식각

일반적으로 측정된 안식각이 작으면 분말의 flowability가 좋은 것으로 평가되고 있으며, 안식각이 크면 flowability가 나쁘다고 할 수 있다. 컨트

물로 설정된 옥수수전분은 안식각이 약 41°정도로 측정되는데 유자 추출 물을 섞어주면 flowability가 나빠지며 강한 caking현상으로 큰 덩어리들이 형성되었다. Hi-cap은 안식각이 약 35°정도로 일반적인 flowability를 보였지만 추출물을 첨가할수록 안식각이 급격하게 증가하는 경향을 보였다. 썬크리미도 일반적인 flowability를 가진 전분인데 추출물을 첨가하면 안식각이 조금씩 증가하다가 약 0.6 g 이상이 섞이면 둥근 작은 입자를 형성하면서 안식각이 감소하였다. 추출물의 종류에 따른 안식각의 변화를 보면 FE50D가 다른 추출물들보다 안식각이 더 많이 증가하였다.

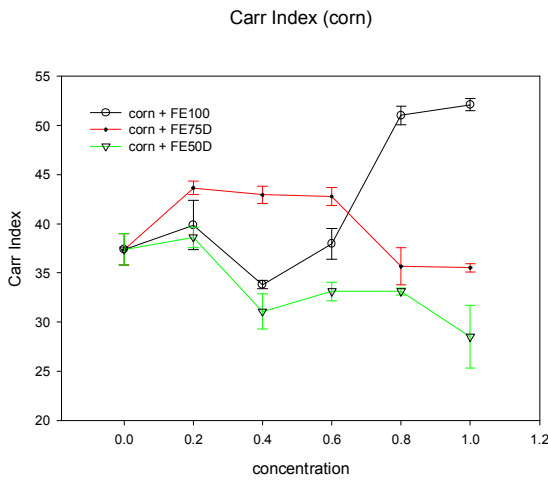


Fig 18. 옥수수전분의 Carr index

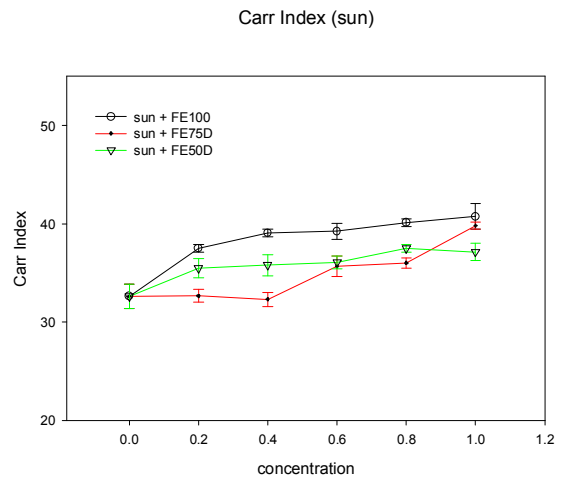


Fig 19. 썬크리미의 Carr index

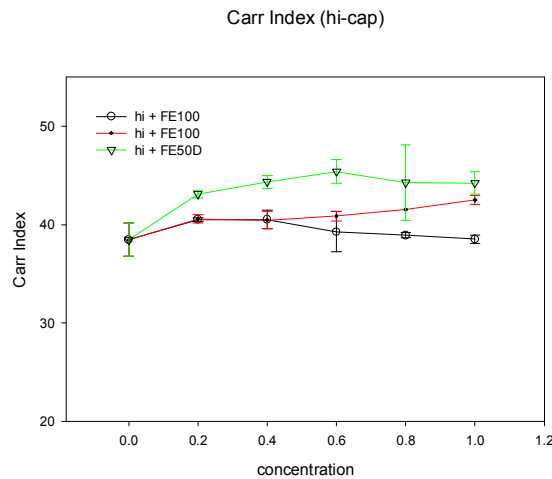


Fig 20. Hi-cap의 Carr index

Carr Index를 측정하였을 때 옥수수전분은 처음에 FE75D와 FE50D 추출 물 들 다 flowability가 증가하였다가 일정량 이후부터는 계속 감소하였으나 FE100의 경우에는 값이 계속 증가하면서 매우 좋지 않은 flowability를 보였다. 썬크리미와 Hi-cap은 서로 반대의 결과 값을 보였는데 썬크리미는 추출물 중에서 FE100을 섞었을 때 가장 좋지 않은 flowability를 보였

고 Hi-cap은 FE50D와 섞었을 때 좋지 않은 flowability를 보였다. Hausner ratio도 Carr Index와 같은 결과를 보였는데 옥수수전분은 FE100을 섞었을 때 값이 증가하면서 cohesiveness가 급격하게 높아졌다는 것을 알 수 있었다. 썬크리미와 Hi-cap은 옥수수전분과는 다르게 큰 변화를 보이지 않는 결과를 보였다. 썬크리미와 Hi-cap은 옥수수전분에 비해 추출물과 섞었을 때 측정값들의 변화가 적어 oleoresin의 캡슐화에 더 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 썬크리미는 더 나은 flowability와 cohesiveness를 보이면서 추출물과 섞었을 때도 더 안정한 상태를 유지한다는 것을 알 수 있었다.

3) 결과 및 고찰

본 연구에서 제조된 유자 oleoresin, 유자 유향액, 유자 분무건조 분말, 유자 전분분말 등은 유자 을 oleoresin의 안정성을 향상시켜 다양한 식품의 소재로 이용될 수 있다고 사료되며, 이 후의 연구에서 이들을 이용하여 유자 식품을 개발할 수 있다. 이와 같은 유자가공 식품 및 향장품의 개발을 통하여 유자의 활용성을 제고할 수 있을 것으로 생각된다.

나. 피로회복용 유자젤 식품 개발

1) 연구 목표

본 연구에서는 착즙 후 남은 유자박을 열풍 또는 동결건조한 후 다양한 조성의 용매를 이용하여 oleoresin을 추출하였다. 유자의 oleoresin에는 hesperidin, limonene 등의 기능성 성분들이 함유되어 있어 다양한 식품제조에 응용할 수 있다. 식품 활용도를 증진시키기 위해서는 안정성이 낮은 oleoresin을 캡슐화할 필요가 있었으며, 이에 따라 oleoresin을 포함하는 캡슐을 다양한 제형으로 제조하고 그 특성을 연구하였다.

2) 연구개발수행 내용

가) Oleoresin 추출

분쇄한 동결건조 유자 50g에 Ethanol 500ml을 가하여 상온에서 3시간동안 추출하여 여과하였다. 이 여액에 sodium thiosulfate anhydrous를 가하여 탈수시킨 후 다시 한번 여과한 것을 감압농축기로 40℃에서 농축한 것을 유자 oleoresin으로 하였다.

나) 유자 영양젤리의 제조공정 및 배합비 선정

유자 착즙액에 젤라틴, 당, oleoresin을 Table 5과 같이 비율을 달리하여 혼합하고 Vitamin, mineral을 증류수에 녹여 Table 6와 같은 비율이 되도록 첨가하였다. 혼합된 시료를 처음 질량의 80%가 될 때까지 중탕하고 3×3×3cm 크기의 틀에 넣어 성형한 후 4℃에서 12시간 이상 냉장하였다.

Table 5. Ingredients of yuza jelly1)

Ingredients(%)	Formulation of material					
	S50	S25	S0	OS50	OS25	OS0
Yuza juice	6	6	6	6	6	6
Gelatin	6	6	6	6	6	6
Sugar	50	25	0	50	25	0
Xylitol	0	25	50	0	25	50
Oleoresin	0	0	0	0.2	0.2	0.2
Water	38	38	38	37.8	37.8	37.8

1) S50: sugar 50%, S25: sugar 25% and xylitol 25%, S0: xylitol 50%, OS50: sugar 50% and oleoresin 0.2%, OS25: sugar 25%, xylitol 25% and oleoresin 0.2%, OS0: xylitol 50% and oleoresin 0.2%.

Table 6. Vitamins and minerals in a yuza jelly1)

Type	RDA2)	Addition amount	Type	RDA	Addition amount
Vit B1	1.2mg	0.6mg	Vit C	100mg	60mg
Vit B2	1.5mg	0.8mg	Vit D	10 μ g	5 μ g
Vit B3	16mg	8mg	Vit E	10mg	5mg
Vit B6	1.5mg	0.8mg	Zinc	9mg	4.5mg
Vit B9	0.4mg	0.2mg	Calcium	700mg	140mg
Vit B12	2.4 μ g	1.2	Magnesium	350mg	35mg

1) Size of yuza jellies are 3×3×3cm

2) Recommended daily allowance, Dietary reference intake for Koreans(Adult male standard), The Korean Nutrition Society

추출한 oleoresin을 이용하여 비타민과 미네랄이 첨가된 유자영양젤리를 제조하고, 젤리에 첨가되는 당의 영향을 연구하기 위하여 당의 원료를 설탕 100%, 자일리톨 100%, 설탕과 자일리톨을 각각 50%로 구성하여 젤리

를 제조하였다. 비타민과 미네랄의 첨가량은 식품영양학회의 한국인영양 섭취기준에 따라 성인 남성 일일권장량의 50% 수준으로 정하였고, 권장섭취량이 높은 마그네슘과 칼슘은 각각 10, 20%로 선정하였다. 철분이 첨가된 젤리에서는 Fig. 21에서처럼 저장 중에 산화에 의하여 색이 검게 변하였고, 비린 맛이 나기 때문에 첨가성분에서 제외하였다.

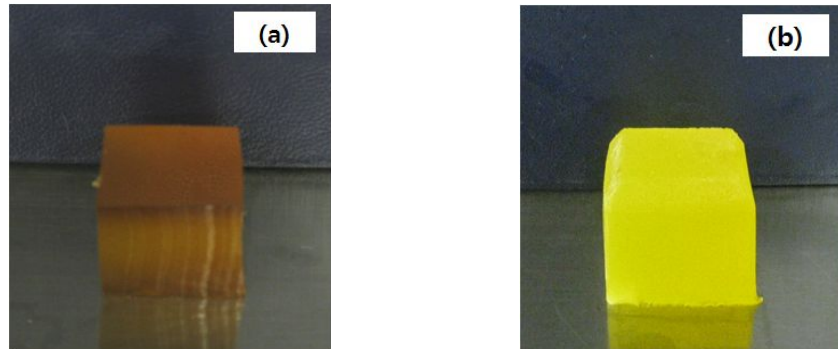
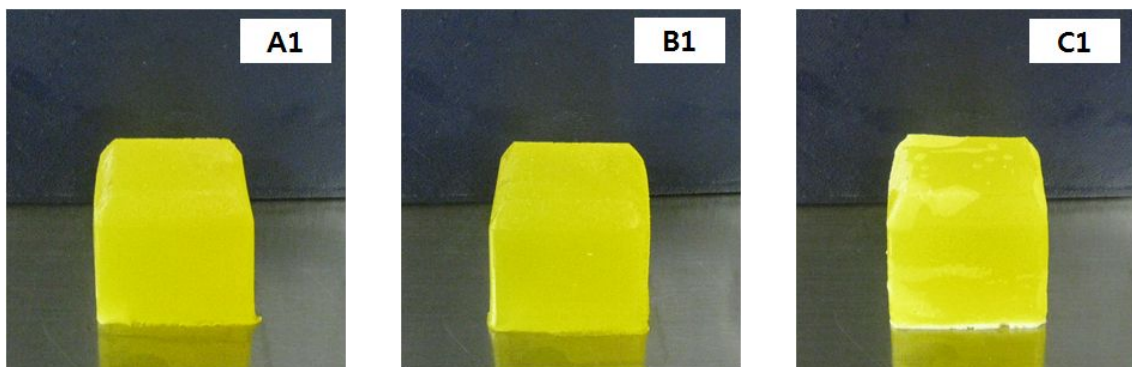


Fig 21. Yuza jelly (a) with iron and (b) without iron

다) 유자영양젤리의 제조

Table 5.과 6.에 나타난 것과 같이 선정된 배합비를 이용하여 젤리를 제조하였다. 가로, 세로, 높이 각각 3×3×3cm로 성형된 유자영양젤리를 texture profile analysis (TMS-Pro, Food Technology Co., Sterling, VA, USA)를 이용하여 물성을 측정하였다. 성형된 유자영양젤리 시료를 texture analyzer에 올려놓고 원통형 probe(4mm diameter)를 이용하여 압착실험을 2회 반복하였다. 측정조건은 preset speed 50.0 mm/min, test speed 50.0 mm.min, post test speed 50.0 mm/min, distance 15.0 mm이고 경도(hardness), 부착성(adhesiveness), 응집성(cohesiveness), 검성(gumminess)의 각 TPA 특성치를 texture export software로 분석하였다. 제조된 유자영양젤리를 색도계(CR-300, Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 명암도를 나타내는 L-value(lightness), 적색도의 정도를 나타내는 a-value(redness), 황색도의 정도를 나타내는 b-value(yellowness)를 측정하였다.



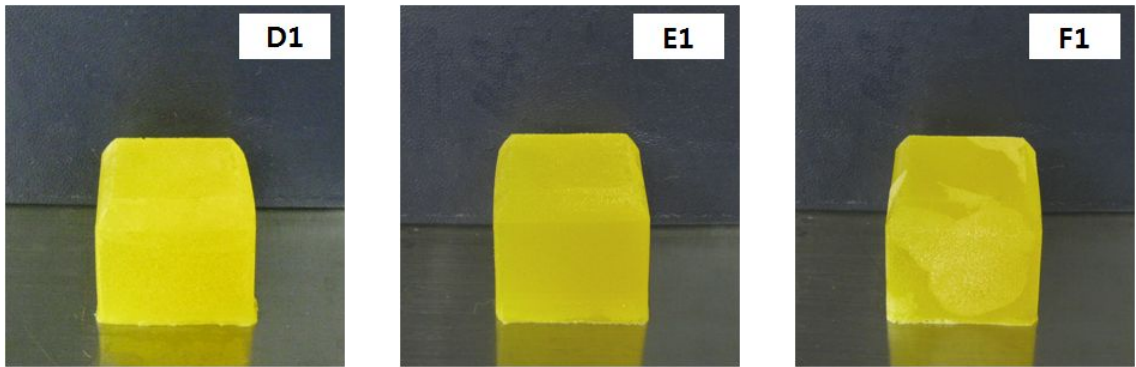


Fig 22. yuza jellies prepared with the different ratio of sugar, xylitol and oleoresin s; (A) sugar 50%, (B) sugar 25% and xylitol 25%, (C) xylitol 50%, (D) sugar 50% and oleoresin 0.2%, (E) sugar 25%, xylitol 25% and oleoresin 0.2%, (F) xylitol 50% and oleoresin 0.2%.

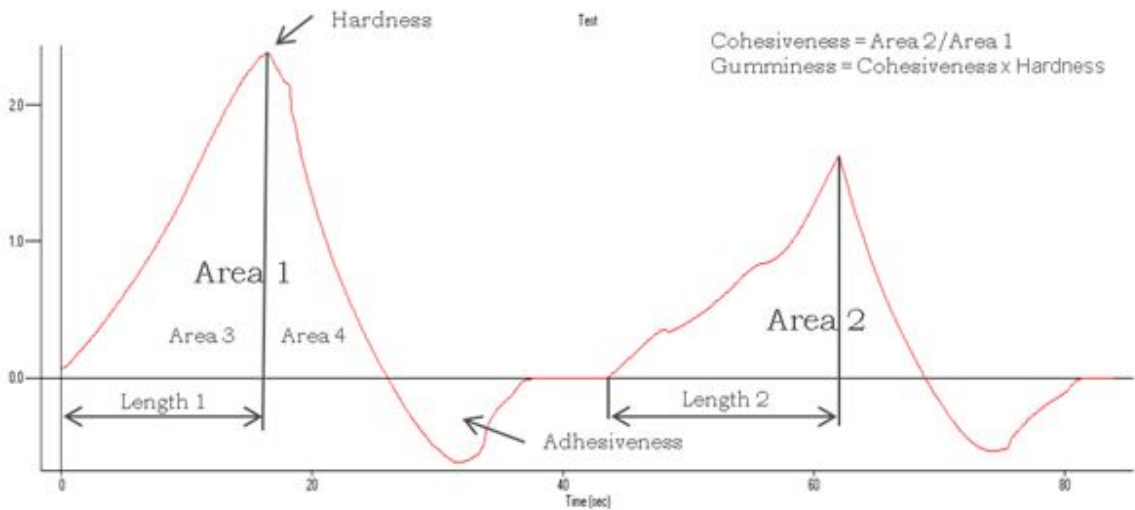


Fig 23. Typical TPA curve and its parameters

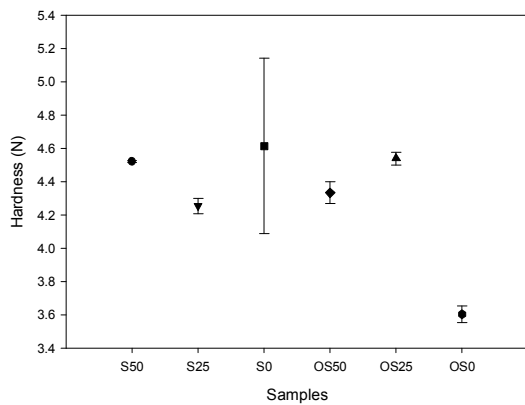


Fig 24. Hardness of yuza jellies

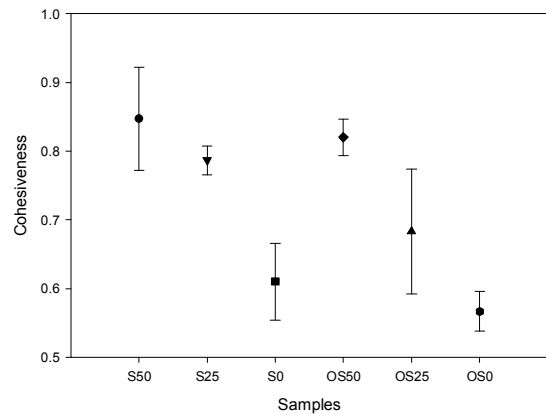


Fig 25. Cohesiveness of yuza jellies

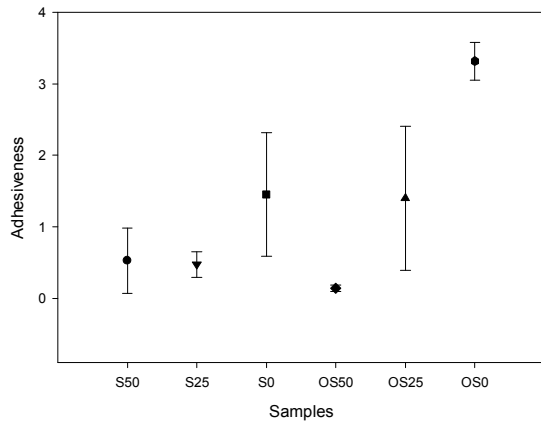


Fig 26. Adhesiveness of yuza jellies

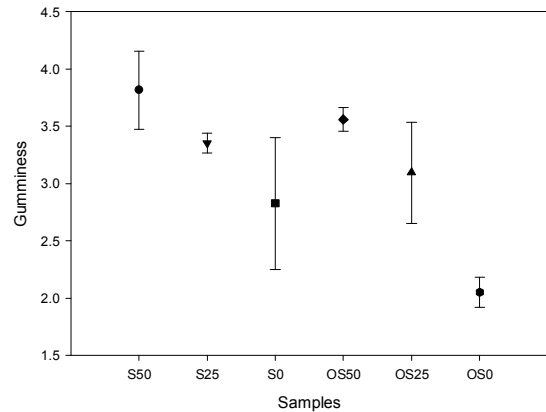


Fig 27. Gumminess of yuza jellies

전형적인 TPA 곡선과 각 특성치는 Fig 23.과 같이 나타내며 경도(Hardness)는 그래프의 첫 번째 압축과정의 maximum peak로 원하는 변형에 도달하는데 필요한 힘(N)이다. 제조된 젤리의 강도(Fig.24.)는 자일리톨만 첨가된 S0이 가장 높았고, 자일리톨과 oleoresin이 첨가된 OS0이 가장 낮은 값을 보여 상이한 결과를 보였다. Sample이 있는 그대로의 형태를 유지하려는 힘을 응집성(Cohesiveness)이라고 하며, area 2/area 1로 나타내어진다. 응집성(Fig 25.)은 자일리톨의 첨가량이 늘어날수록 그 값이 줄어드는 유의적인 결과를 보였다. Fig 23.의 첫 번째 bite에서 negative force area로 나타내어지는 부착성(Adhesiveness)은 sample과 probe가 떨어지는데 까지 필요한 힘(N·sec)을 말한다. 부착성은 자일리톨과 oleoresin이 첨가된 젤리에서 가장 높은 값을 나타냈고 그 외의 젤리는 모두 비슷한 경향을 보였다. 검성(gumminess)은 반고체 상태의 샘플을 삼킬 수 있는 상태로 만드는 성질로 경도(hardness) × 응집성(cohesiveness)로 나타내어진다. 검성은 응집성과 비슷한 경향을 보였으며, 이를 바탕으로 검성과 응집성은 연관이 있다는 것을 알 수 있었다.

제조된 유자영양젤리의 색도를 측정된 결과, 설탕을 첨가한 양이 증가할수록 L-value(Fig 28.)는 증가하였고 oleoresin을 첨가한 군은 그렇지 않은 군보다 더 낮은 값을 나타내는 유의적인 결과를 보였다. 적색도를 나타내는 a-value(Fig 29.)는 설탕이 첨가된 젤리는 L-value와 같은 경향을 보였으며, S0는 가장 낮은 수치를 나타내었다. 황색도를 나타내는 b-value(Fig 30.)는 젤리를 설탕만 첨가한 젤리와 설탕과 자일리톨을 각각 25%씩 첨가한 젤리 모두 거의 같은 값을 나타내었고, 자일리톨만 첨가한 젤리는 모두 높은 값이 측정되었다.

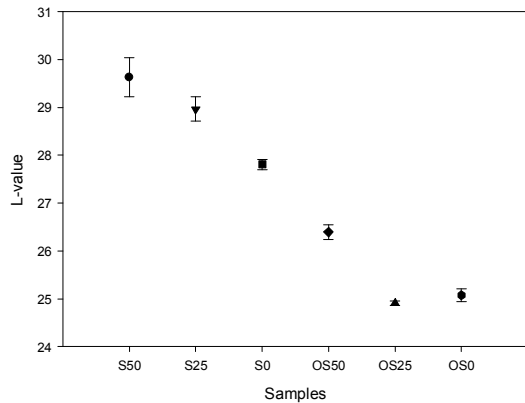


Fig 28. L-value of yuza jellies

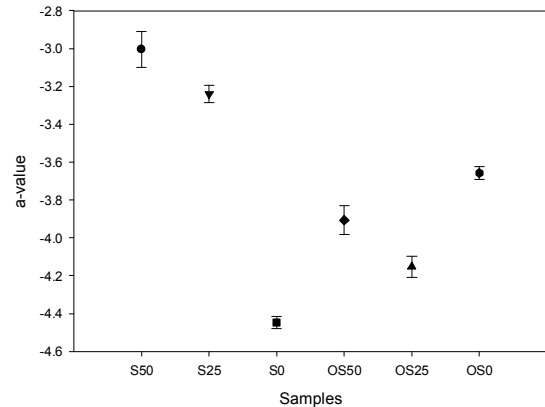


Fig 29. a-value of yuza jellies

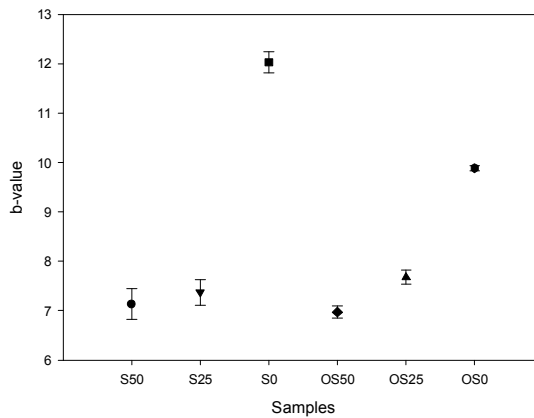


Fig. 30. b-value of yuza jellies

라) 저장기간에 EKfms 유자영양젤리의 물성 변화

제조된 유자영양젤리의 저장기간에 따른 물성의 변화를 측정하기 위하여 가로, 세로, 높이 각각 3×3×3cm로 성형된 젤리를 멸균한 petri dish에 담아 상온에서 저장하면서 0, 1, 3, 7일이 지난 후 texture profile analysis (TMS-Pro, Food Technology Co., Sterling, VA, USA)를 이용하여 실험하였다. 성형된 유자영양젤리 시료를 texture analyzer에 올려놓고 원통형 probe(4mm diameter)를 이용하여 압착실험을 2회 반복하였다. 측정조건은 preset speed 50.0 mm/min, test speed 50.0 mm.min, post test speed 50.0 mm/min, distance 15.0 mm이고 경도(hardness), 부착성(adhesiveness), 응집성(cohesiveness), 검성(gumminess)의 각 TPA 특성치를 texture export software로 분석하였다. 저장기간이 지남에 따라 당성분으로 자일리톨만을 첨가하였던 S0(Fig. 31.C)과 OS0(Fig 31.F)에서는 표면에 결정이 생성되는 변화를 보였다. 이는 설탕보다 용해도가 낮은 자일리톨이 저장기간 중 표면의 수분이 증발하면서 결정이 생성되는 것으로 생각된다.

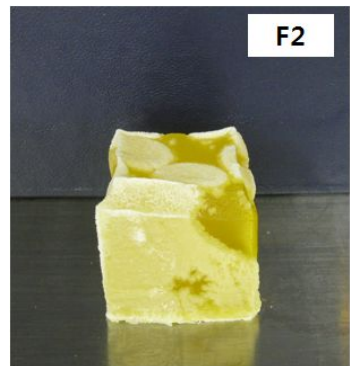
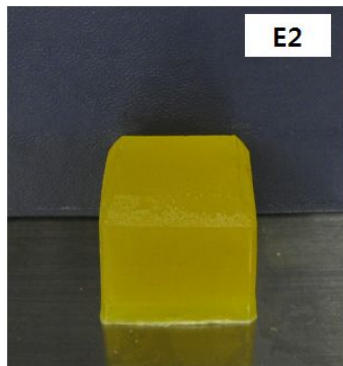
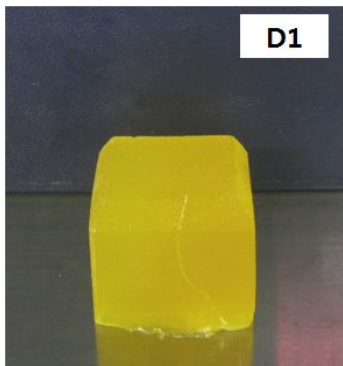
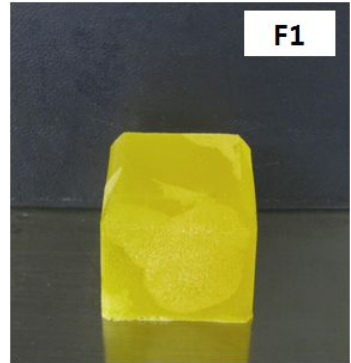
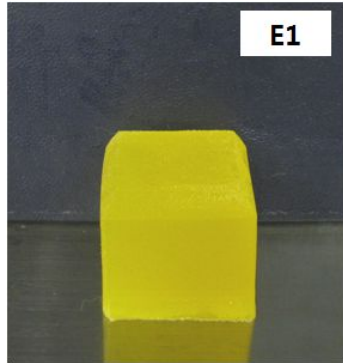
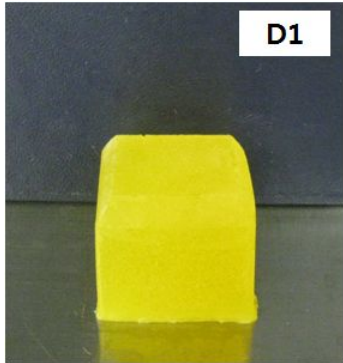
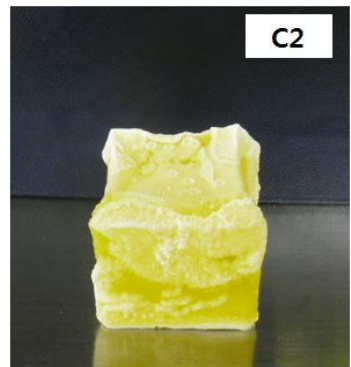
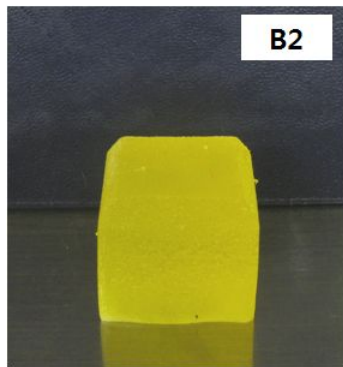
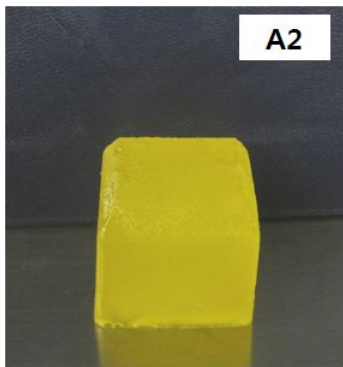
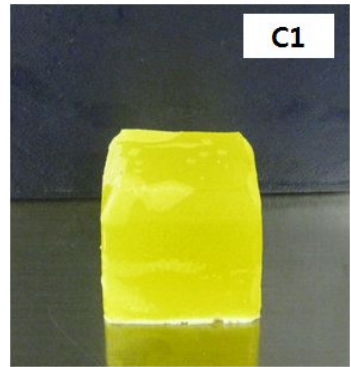
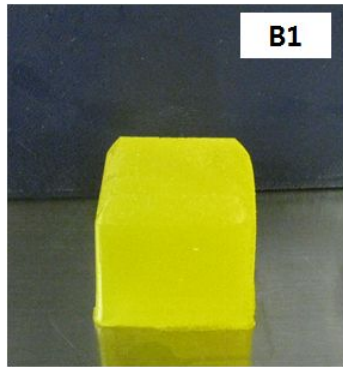
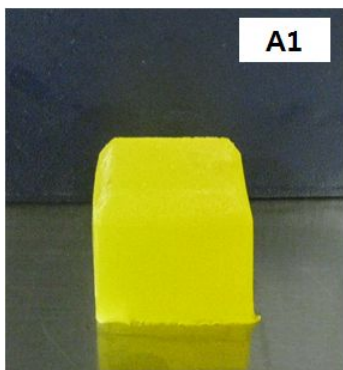


Fig. 31. Texture alteration of yuza jellies prepared with the different ratio of sugar, xylitol and oleoresin from 0 to 7days; (A) sugar 50%, (B) sugar 25% and xylitol 25%, (C) xylitol 50%, (D) sugar 50% and oleoresin 0.2%, (E) sugar 25%, xylitol 25% and oleoresin 0.2%, (F) xylitol 50% and oleoresin 0.2%.

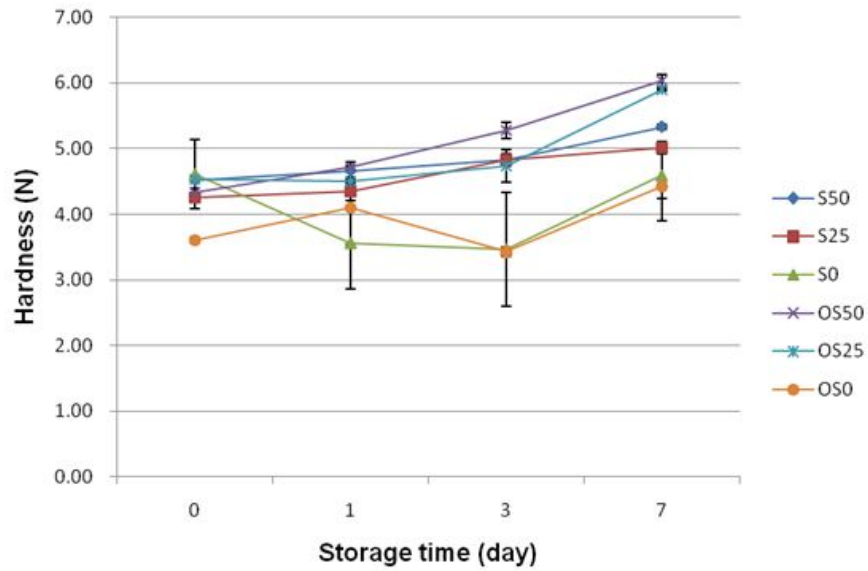


Fig.32. Change of hardness in yuza jellies during storage

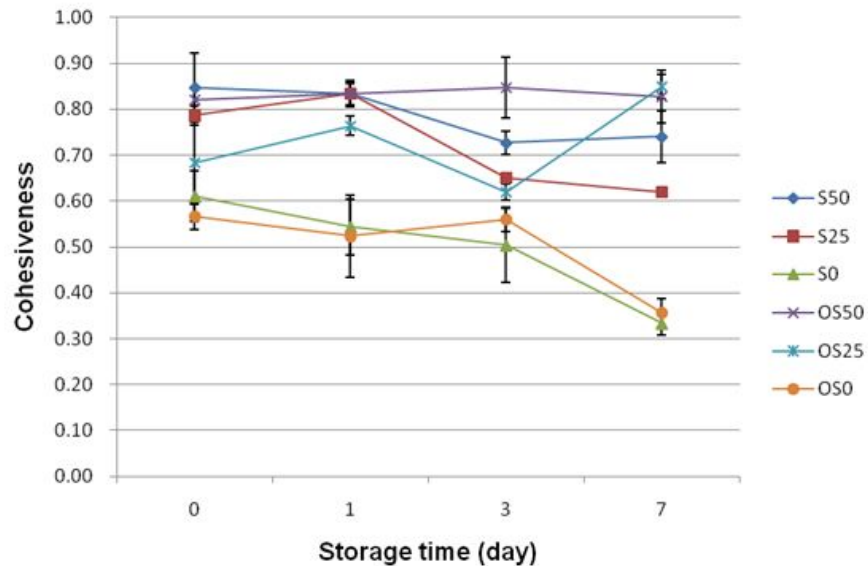


Fig. 33. Change of cohesiveness in yuza jellies during storage

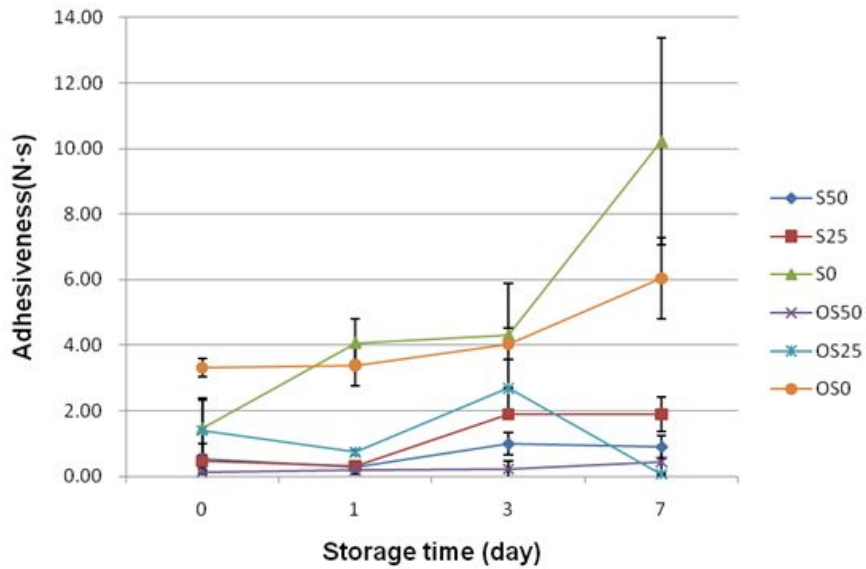


Fig 34. Change of adhesiveness in yuza jellies during storage

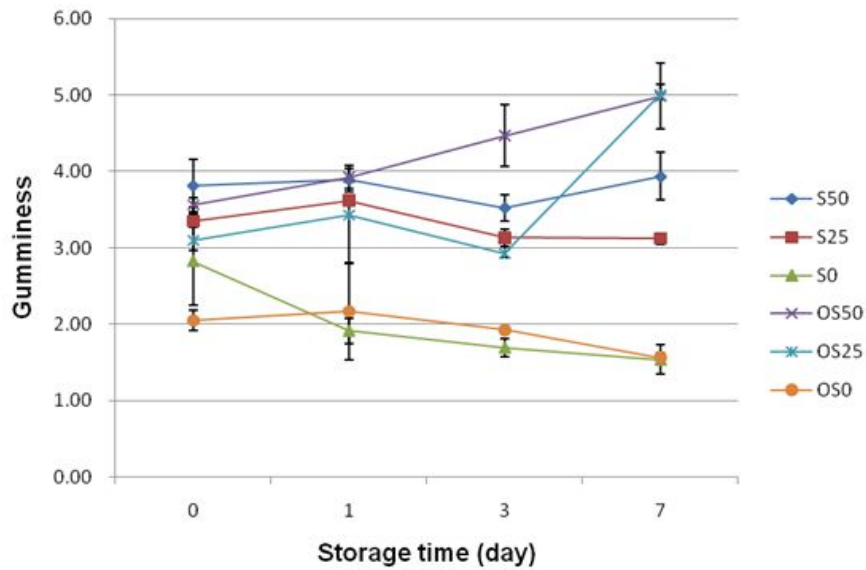


Fig 35. Change of Gumminess in yuza jellies during storage

경도(Fig 33.)의 경우, 자일리톨만 첨가한 젤리의 경도가 가장 낮았으며, 설탕만 첨가한 젤리와 설탕과 자일리톨이 각각 25%씩 혼합된 젤리는 비슷한 수준을 보였다. 저장기간이 길어질수록 경도는 모두 증가하는 경향을 보였으며, 자일리톨만 첨가한 S0과 OS0에서는 표면에 생성된 결정의 크기가 점점 커지면서 3일 후에는 경도가 급격하게 증가하는 경향을 보였다. 또한 설탕만 첨가한 젤리와 설탕과 자일리톨이 각각 25%씩 첨가한 젤리들 중, oleoresin을 첨가한 군의 경도가 더 빠르게 증가함을 알 수 있었

다. 부착성(Fig 34.)은 자일리톨만 첨가한 젤리에서 높은 수치가 나왔는데, 처음에는 천천히 증가하다가 3일 이후부터는 급격하게 증가하는 경향을 보였다. 부착성이 응집성보다 큰 경우 probe에 샘플의 일부가 묻어나오는 것을 의미하는데 자일리톨만 첨가한 젤리의 경우, 표면의 자일리톨 결정이 부서지면서 다른 젤리에 비해 더 많은 양이 묻어나와 높은 값이 측정되었다는 것을 알 수 있었다. 점성(Fig 35.)은 설탕의 첨가 유무에 따라 상이한 결과를 나타내었다. 설탕만 첨가한 젤리와 설탕과 자일리톨을 25%씩 첨가한 젤리는 점성이 증가하였고, 자일리톨만 첨가한 젤리는 유의적으로 감소하였다. 이는 자일리톨 결정이 생성된 표면이 부서짐으로 인하여 낮은 값이 나오는 것을 알 수 있었다.

마) 저장기간에 따른 유자영양젤리의 색도변화

제조된 유자영양젤리의 변화를 측정하기 위하여 젤리를 제조한 날로부터 0, 1, 3, 7일이 지난 후 색도계(CR-300, Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 명암도를 나타내는 L-value(lightness), 적색도의 정도를 나타내는 a-value(redness), 황색도의 정도를 나타내는 b-value(yellowness)로 나타내었으며, 색차(ΔE)를 계산하였다. 이때 사용한 표준 백판은 L=98.07, a=-0.18, b=1.57 이었다.

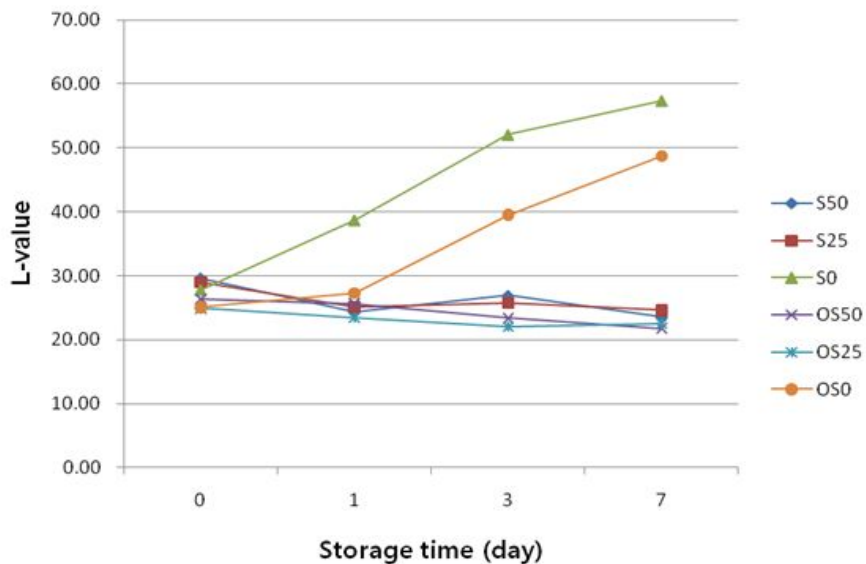


Fig. 36. Change of L-value in yuja jellies during storage

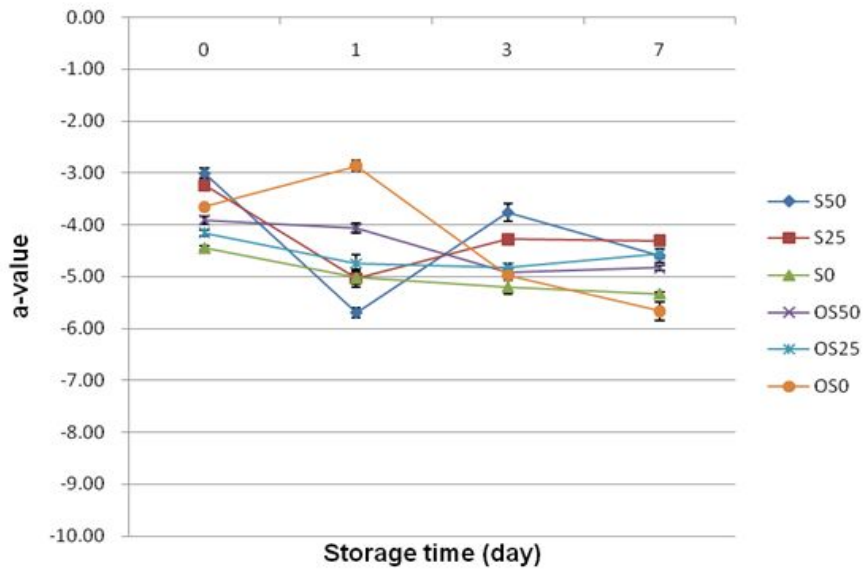


Fig. 37. Change of a-value in yuza jellies during storage

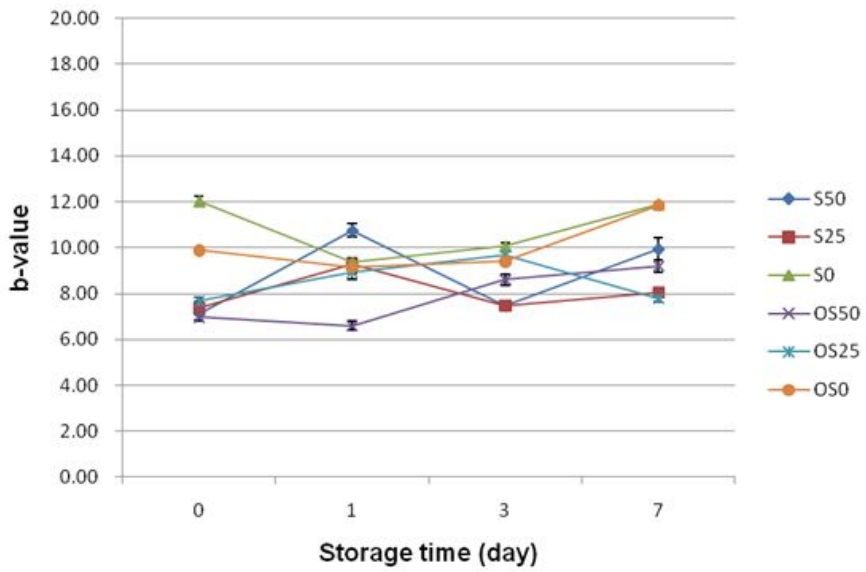


Fig. 38. Change of b-value in yuza jellies during storage

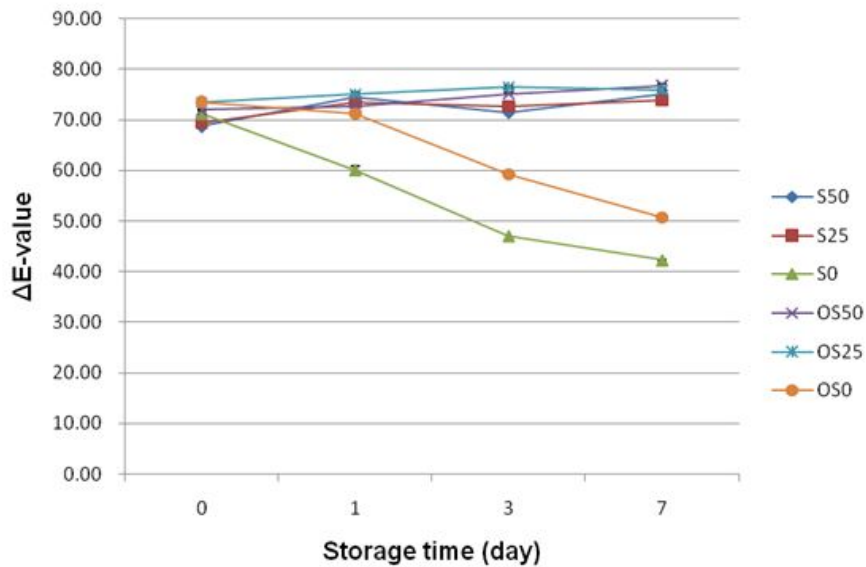


Fig. 39. Change of ΔE -value in yuza jellies during storage

제조된 유자영양젤리의 저장기간에 따른 색도를 측정된 결과, 자일리톨만 첨가한 젤리(S0, OS0)에서 L-value(Fig 36.)가 급격하게 증가하였다. 이는 젤리의 표면에 자일리톨 결정이 생성되고 저장기간이 길어질수록 그 크기가 점점 커져, 7일 이후에는 젤리 표면의 대부분을 하얀 결정이 둘러싸고 있어 L-value가 증가하였다. 하지만, 설탕과 자일리톨이 각각 25%씩 첨가된 S25와 OS25는 결정이 생성되지 않고 설탕만 첨가된 젤리와 비슷한 수치를 나타내며, 저장기간이 길어짐에 따라 점점 감소하는 유의적인 경향을 보였다. 적색도를 나타내는 a-value(Fig 37.)는 oleoresin을 첨가한 군과 자일리톨의 첨가량이 많아질수록 낮은 값을 나타내으며, 저장기간이 길어질수록 조금씩 감소하는 경향을 보였다. 황색도를 나타내는 b-value(Fig 38.)는 젤리를 설탕만 첨가한 젤리와 설탕과 자일리톨을 각각 25%씩 첨가한 젤리 모두 거의 같은 값을 나타내었고, 자일리톨만 첨가한 젤리는 높은 값이 측정되었다. 저장기간이 길어질수록 b-value는 높아졌으나 첨가량에 따른 유의적인 차이는 없었다. ΔE -value(Fig 39.)는 색차지수로써 $\Delta E = \{(L-L_0)^2 + (a-a_0)^2 + (b-b_0)^2\}^{1/2}$ 의 식으로 계산되어진 값이다. 설탕이 첨가된 S50, S25, OS50 그리고 OS25는 색도의 변화가 근소한 차이를 보였지만, 자일리톨만 첨가한 젤리는 다른 계통의 색으로 결정되어질 만큼의 색차지수를 나타내었다. 특히, S0은 결정이 생성되는 속도가 가장 빨라 급격한 색도의 변화를 알 수 있었다.

다. 유자의 유용성분 추출을 위한 천연 공법 확립

1) 연구개발수행 내용

가) 유자로부터 유용성분(펙틴 등) 추출을 위한 전처리 단위 조작 확립

① 분쇄(size reduction)를 통한 입도 크기 제어

유자즙을 채취 후 얻어진 유자 부산물을 열풍건조기 (80℃) 에 넣어 2일간 건조시킴. 건조된 유자샘플을 분쇄기를 사용하여 분쇄 후 얻어진 분말을 체 분리를 통하여 30-50 / 50-100 / 100-140 / 140-200 / <200mesh의 5가지 입도별로 분리함.

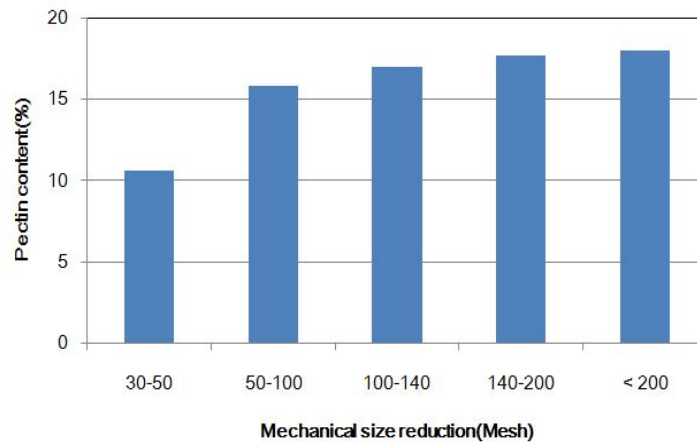


Fig 40. 유자분말의 입도별 펙틴함량

입도별로 펙틴의 함량을 galacturonic acid 분석법을 통하여 구한 결과 입도가 작아 질수록 추출되는 펙틴의 함량이 높아짐. 그러나 140-200 mesh 이상의 펙틴을 다량으로 얻는 것은 분쇄 공정뿐만 아니라 에너지 효율적인 측면에서 용이하지 않기 때문에 100 mesh를 통과한 입자를 선정함.

② 교반 시간에 따른 공정

100 mesh의 입도를 가진 유자 가루 5 g을 50 mL 증류수와 섞어 현탁액을 만들고 교반기를 이용하여 650 rpm에서 5, 15, 30, 60 min 동안 교반, 여과처리 후 여과액 및 잔류물의 펙틴함량을 측정함.

교반 시간의 차이에 따라 펙틴함량을 분석해 본 결과 시간의 차이에 따른 펙틴함량에는 큰 차이를 보이지 않아 공정시간의 단축을 고려하여 5분의 교반 시간을 선택함.

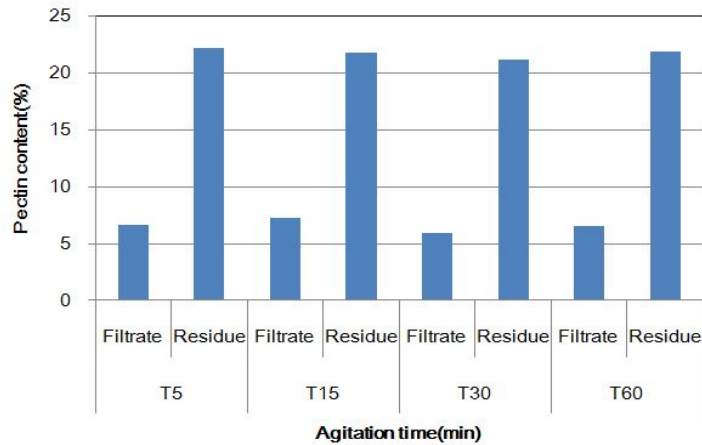


Fig 41. 교반 시간에 따른 펙틴함량

③ 기계적/물리적 처리 공정 적용

유자 가루 5 g을 50 mL 증류수와 섞어 만든 현탁액을 5분 동안 교반 후 homogenizer와 ultrasonicator를 사용하여 기계적/물리적 처리를 함. Homogenization의 경우 1, 3, 5 min 동안 처리하고, ultrasonication의 경우 20, 40, 60 min간 처리한 후 여과하고 여과액 Homogenization과 ultrasonication 처리 사이에는 펙틴함량과 수율에 있어서 현저한 차이는 나타나지 않았지만 homogenization한 것의 펙틴함량이 약간 높게 나타났고 또한, homogenization 처리 시 공정 시간이 훨씬 단축됨을 확인함. 아울러, homogenization 처리 시간에 비례하여 여과액 펙틴 함량이 증가함을 보여 5분간 처리하는 공정을 선정함.

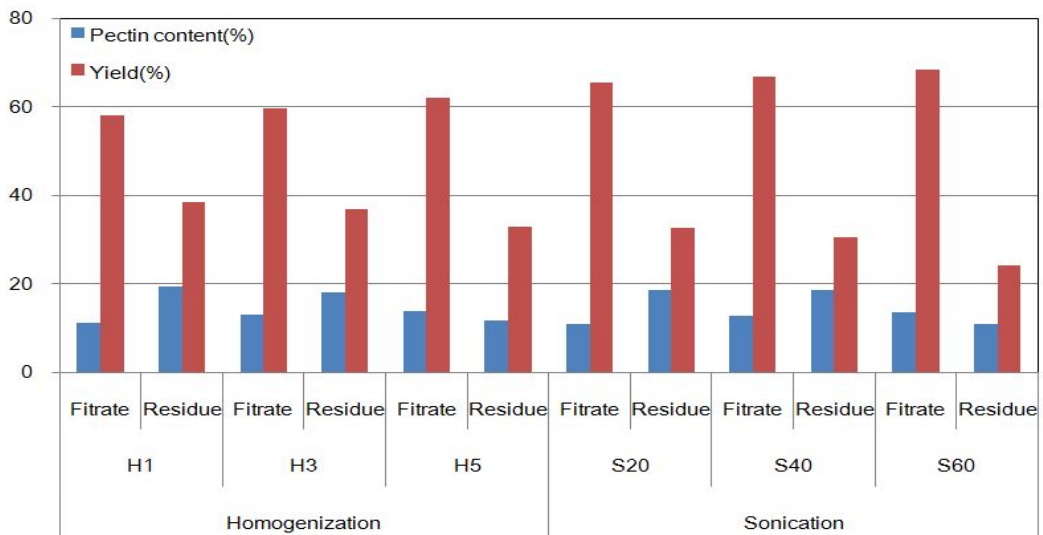


Fig 42. 물리적 처리 공정(Homogenization vs Sonication)에 따른 펙틴함량과 수율

④ 열수 추출 공정 적용

두번째 물리적 처리 공정으로 열수 추출 방법인 autoclaving과 boiling을 시도함. Autoclaving이 유자 펙틴 추출에 미치는 영향을 조사하기 위하여 유자 현탁액을 121°C에서 10, 20, 30 min 동안 autoclaving 실시함. 또한, boiling의 경우 시료를 60, 80, 100°C에서 1시간 동안 열수 추출 후 여과를 통해 얻어진 여과액과 잔류물을 동결 건조하여 펙틴함량과 수율을 측정함.

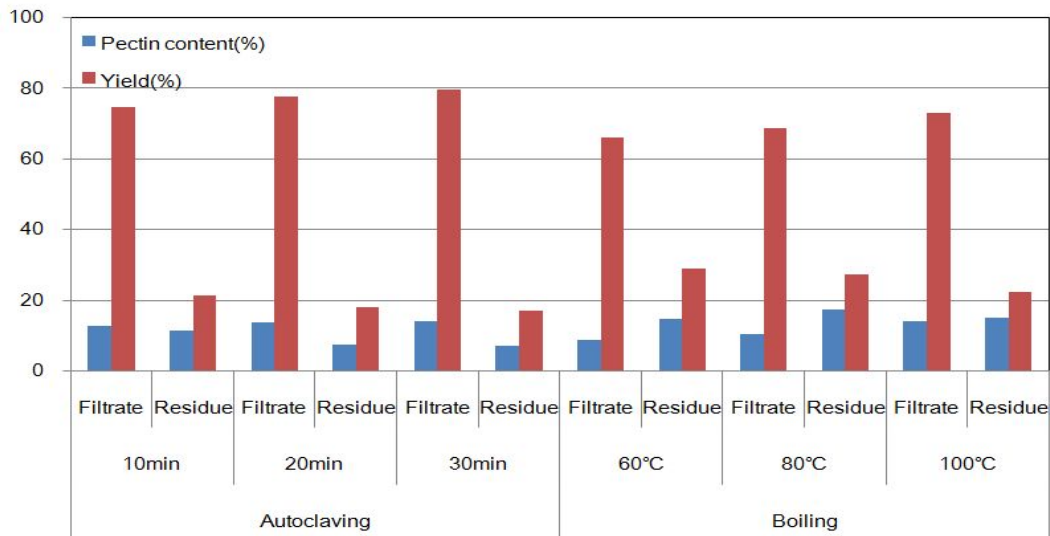


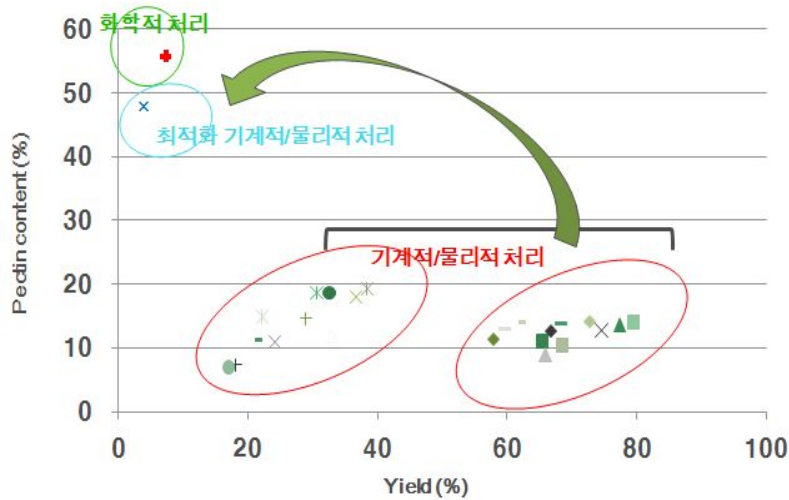
Fig 43. 열수 추출 공정 (Autoclaving vs Boiling)에 따른 펙틴함량과 수율

Autoclaving과 boiling 처리 시, 펙틴함량에 있어 현저한 차이는 나타나지 않았지만 autoclaving 적용시 여과액의 펙틴함량이 높게 나타남. 또한, autoclaving 처리 시 공정 시간을 단축 할 수 있기 때문에 펙틴함량과 수율을 고려하여 공정시간이 짧은 autoclaving을 30분간 처리하는 공정을 선택함.

⑤ 유자부산물로부터 펙틴 추출을 위한 일련의 전처리 단위 조작 확립



Fig 44. 유자 펙틴 추출 최적화를 위한 기계적/물리적 추출 공정
시도된 각 물리적 추출 공정들의 결과를 종합하여 Fig 44과 같이 유자로부터 유용 성분 추출을 위한 전처리 단위 조작을 확립하고 이를 통하여 유자부산물로부터 펙틴을 추출하여 펙틴 함량 및 수율을 분석함.



일련의 물리적처리 단위 조작에 따라 처리된 샘플의 펙틴함량과 수율을 측정된 결과, 48.64%의 펙틴이 3.71% 수율로 얻어짐. 그러나 아직까지 화학적 처리와 비교시, 펙틴의 함량과 수율과 낮기 때문에 이러한 펙틴함량과 수율의 개선을 위하여 추가공정이 필요하였고, 이에 따라 효소적 처리 방법을 적용하기로 결정함.

나) 유자 유용성분 강화를 위한 효소적/물리적 복합처리기술 최적화

① 복합효소 처리 공정

펙틴의 추출 함량 및 수율을 추가적으로 높이기 위하여 기계적/물리적 처리 후 여과를 통해 얻어진 잔사물에 효소처리 공정을 추가하였다. 사용된 효소는 세포벽을 분해하는 복합효소로서, viscozyme과 pectinex가 사용됨 (각 효소의 특성은 아래 표 참조).

Table 8. 사용된 복합 효소의 반응 조건

복합효소	최적온도	반응온도	반응시간
Viscozyme	25-55℃	40℃	1hr
Pectinex	15-55℃	40℃	1hr

② 효소 반응시간에 따른 공정

Viscozyme 과 pectinex 두 복합효소를 10% 유자현탁액에 첨가한 후 40℃에서 1, 3, 5 h 동안 반응시킨 후 여과를 통해 얻어진 여과액과 잔류물을 동결건조하여 펙틴함량과 수율을 측정함. 효소 반응시간에 따른 펙틴함량 및 수율을 측정한 결과, 1시간 이상 효소 반응시간을 증가시켜도 뚜렷한 펙틴함량과 수율의 개선효과를 얻을 수가 없어 효소 반응시간을 1시간으로 설정함. 또한, 복합효소 사이에서도 확연한 반응의 차이를 보이지 않음.

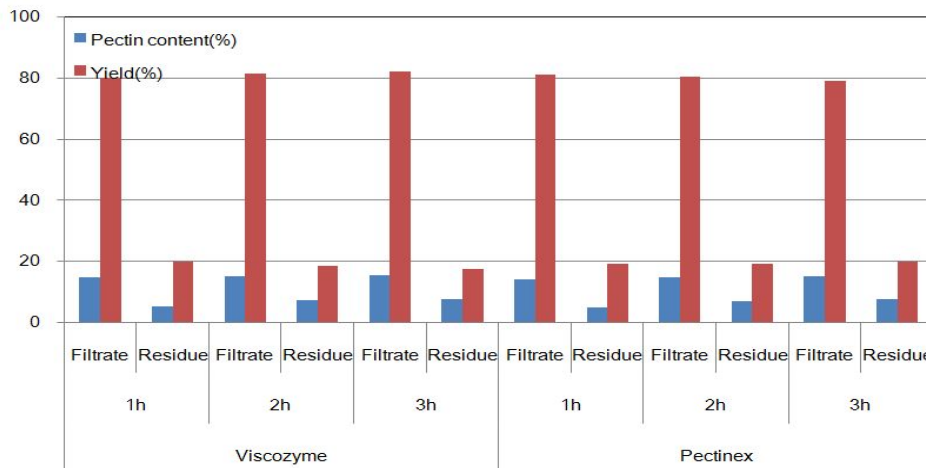


Fig 45. 효소 반응시간에 따른 펙틴함량과 수율

③ 농도별 효소처리 공정

두 복합효소를 100, 300, 500배로 희석한 후 10% 유자현탁액에 첨가 후, 1시간 동안 반응시킴. 그 후 얻어진 시료 용액을 여과하고, 여과액과 잔류물을 동결건조하여 펙틴함량과 수율을 측정함.

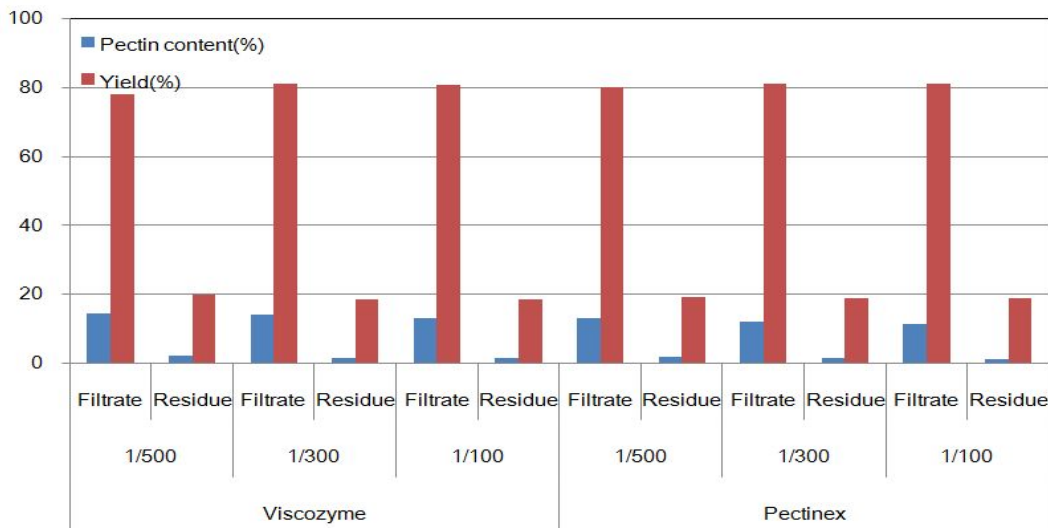


Fig 46. 농도별 효소처리에 따른 유자 펙틴함량과 수율

농도별 효소처리에 따른 펙틴함량과 수율을 측정된 결과, 농도별로 효소를 희석하였을 때 펙틴함량과 수율의 확연한 차이가 나타나지 않음. 또한, 복합효소 간에서도 뚜렷한 차이가 나타나지 않음. 따라서 공정비용을 고려하여 각 복합효소의 500배 희석 이하의 농도를 선택함.

④ 복합처리기술 최적화

기계적/물리적 처리 후 여과를 통해 얻어진 잔류물에 두 복합효소를 500/1000배 희석하여 40℃에서 1시간 동안 반응시키고, 여과 후 여과액과 잔류물을 동결건조하여 펙틴함량과 수율을 측정함.

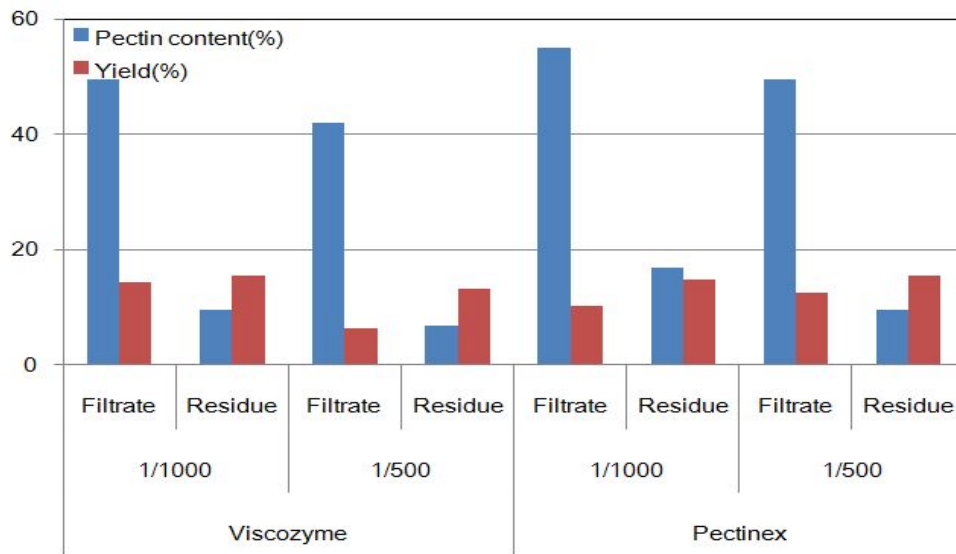


Fig 47. 복합효소 처리에 따른 유자 펙틴함량과 수율

기계적/물리적 처리 후 여과를 통해 얻어진 잔류물에 복합효소 처리를 한 후 펙틴함량과 수율을 측정 해 본 결과, 복합효소를 1000배 희석한 잔사액에서 높은 펙틴함량(55.08%)과 수율(7.30%)을 나타남. 특히, 두 복합효소 중에서 viscozyme 적용 시, 더 높은 높은 펙틴함량을 확인함.

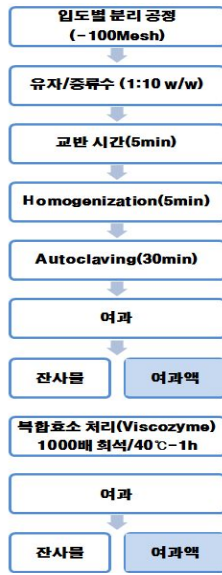


Fig 48. 유자 펙틴 추출 천연공법

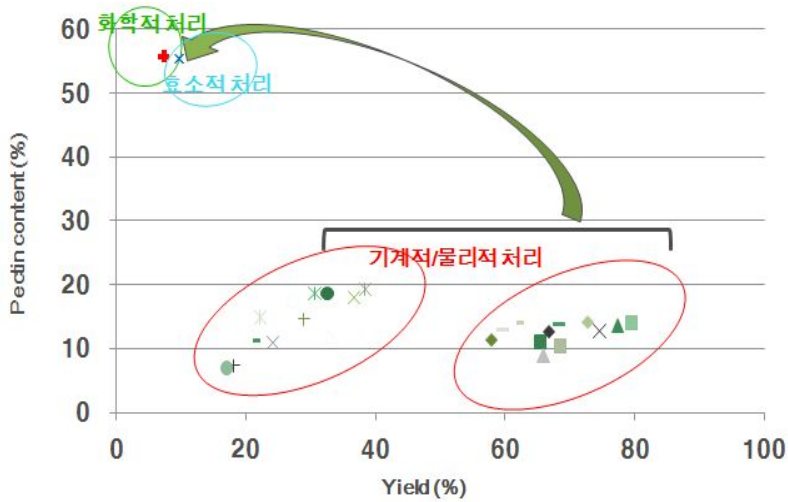


Fig 49. 화학적 방법과 천연공법간의 펙틴 함량 및 수율 비교

기존의 화학적 방법과 본 연구에서 개발된 천연공법을 이용하여 유자 부산물로부터 펙틴을 추출한 결과, 기존의 화학적 방법에 필적할 만한 펙틴함

라. 천연공법을 통한 기능성 유자 소재 제조 및 식품 소재로서의 유효성 평가

1) 연구개발수행 내용

가) 개발된 유자 펙틴 소재의 이화학적 특성 분석

① FT-IR을 이용한 천연 유자 펙틴의 구조 분석

FT-IR을 이용하여 천연공법을 통하여 얻어진 유자 펙틴 분말의 화학적 조성을 화학적 추출 방법을 통하여 얻어진 유자 펙틴 분말의 구조를 비교 분석함.

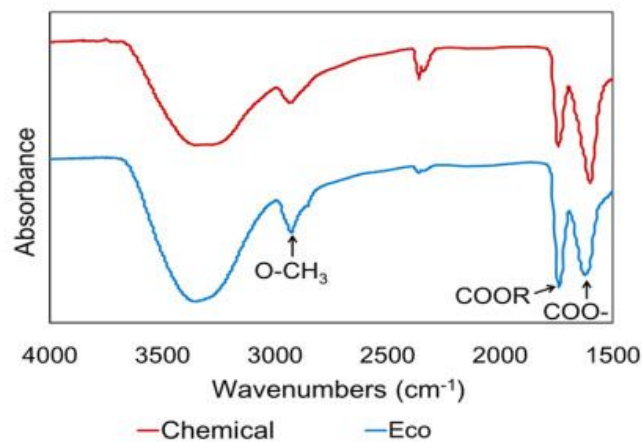


Fig 50. 천연공법 추출 유자 펙틴 분말과 화학적 추출 유자 펙틴 분말의 FT-IR spectrum

FT-IR을 이용한 유자 펙틴 분말의 화학적 조성분석 결과, 천연공법 추출 유자 펙틴 분말과 화학적 추출 유자 펙틴 분말의 유사한 형태의 spectra를 나타냄. 특히, 2931cm⁻¹ 에서 galacturonic acid의 methyl ester기의 O-CH₃ 작용기가 확인되었고, 1740cm⁻¹에서의 Ester carbonyl 기 (COOR) 작용기와 1620cm⁻¹과 1600cm⁻¹에서의 free carboxyl (COO⁻) 작용기가 확인됨.

② Bio-LC를 이용한 천연공법을 통하여 얻어진 유자 펙틴 분말의 구성당 함량 분석

천연공법을 통해 얻어진 유자 펙틴 분말과 화학적 추출 방법을 통해 얻어진 유자 펙틴 분말의 구성당 함량을 Bio-LC를 이용하여 분석함.

Table 8. 유자 펙틴 분말의 구성당 함량 측정을 위한 Bio-LC 조건

Instrument	HPAEC-PAD system, Dionex, USA
Detector	LOD (Limit of detection)
Column	CarboPac TM PA1(4 x 250mm)
Eluent	18 mM NaOH
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 μ L

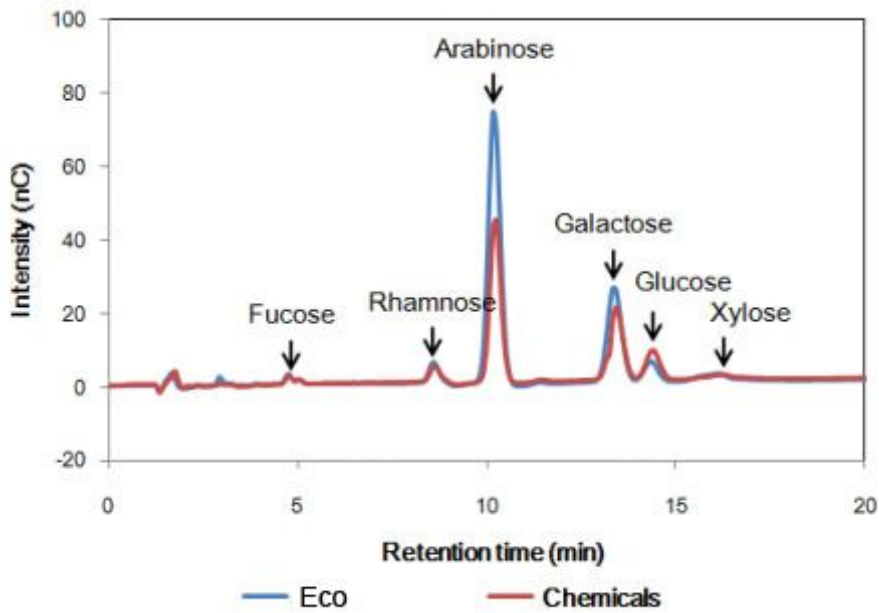


Fig 51. 유자 펙틴 분말의 구성당 조성 Chromatograms

Table 9 유자 펙틴 분말의 구성당 조성

	Eco	Chemical
Sugar composition (%)		
Fucose	0.11	0.12
Rhamnose	1.43	1.13
Arabinose	9.96	5.45
Galactose	4.28	2.92
Glucose	1.03	1.32
Xylose	0.77	0.12
Total sugar	17.58	11.06

천연공법을 통하여 얻어진 유자 펙틴 분말과 화학적 추출 방법을 통해 얻어진 유자 펙틴 분말의 구성당 종류로는 fucose, rhamnose, arabinose, galactose, glucose 및 xylose등이 검출됨. 천연공법을 통해 얻어진 유자 펙틴 분말 구성당 함량에서 화학적 추출 방법을 통해 얻어진 유자 펙틴 분말에 비해 rhamnose, arabinose, galactose 및 xylose가 높게 함유되어 있음을 확인함. 또한, 천연공법 유자 펙틴 분말이 화학적 추출 유자 펙틴 분말보다 총 구성당 함량이 높게 측정됨.

③ 유자 펙틴 분말의 분자량 측정

천연공법 유자 펙틴 분말과 화학적 추출 유자 펙틴 분말의 분자량 분포를 Gel Permeation Chromatography system을 이용하여 분석함.

Table 10. 유자 펙틴 분말의 분자량 분포 측정을 위한 GPC 조건

Instrument	Agilent 1100 series, CA, USA
Detector	RI (Refractive Index) detector
Column	Bio Sep - SEC - S2000 & S4000
Eluent	50mM sodium nitrate
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	100 μ L

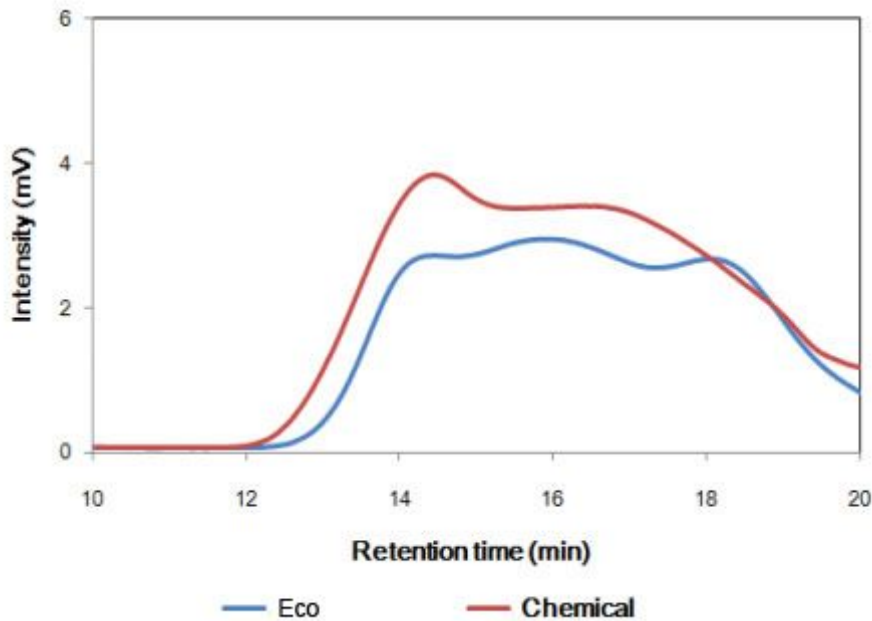


Fig 52. 유자 펙틴 분말의 분자량 분포

천연공법 유자 펙틴 분말과 화학적 추출 유자 펙틴 분말의 분자량 분포는 유사한 경향을 나타냄. 또한, 천연공법을 통해 얻어진 유자 펙틴 분말과 화학적 추출을 통해 얻어진 유자 펙틴 분말의 분자량 분포는 각각 221(KDa), 235(KDa)에서 높은 분포를 보여줌.

④ 유자 펙틴 분말의 DE값 측정

천연공법을 통하여 얻어진 유자 펙틴 분말과 화학적 추출 방법을 통하여 얻어진 유자 펙틴 분말의 펙틴구조의 methoxyl 그룹의 함유 정도를 의미하는 Degree of Esterification을 측정함.

Table 11. 유자 펙틴 분말의 DE 측정

	Eco	Chemical
DE(%)	46.3	40.93

펙틴의 여러 기능성 및 gelling power에 영향을 미치는 DE(degree of esterification)의 분석 결과, 두 펙틴 모두 DE값이 50% 보다 작아 low methoxyl pectin이 생성됨을 보여줌. 아울러, 천연공법을 통한 유자 펙틴 분말에서 화학적 추출방법을 통해 얻어진 유자 펙틴 분말에 비해 DE가 높게 측정됨.

나) 유자 펙틴 소재의 유변학적 예측모델 구축

① 유자 펙틴 현탁액의 농도 및 온도에 따른 정상 유동 특성 및 동적 점탄성 측정 천연공법 유자 펙틴 분말과 화학적 추출 유자 펙틴 분말의 현탁액을 3가지 농도 (3, 5, 7%)로 제조하여 이들의 shear rate에 따른 viscosity를 측정하고, 이들의 frequency에 따른 동적 점탄성을 측정하여 G' (탄성)과 G'' (점성)으로 나타냄. 유자펙틴 분말 현탁액의 점탄성 (G' , G'') 특성에서 구해진 G' , G'' 값을 이용하여 $\tan \delta$ 를 계산함.

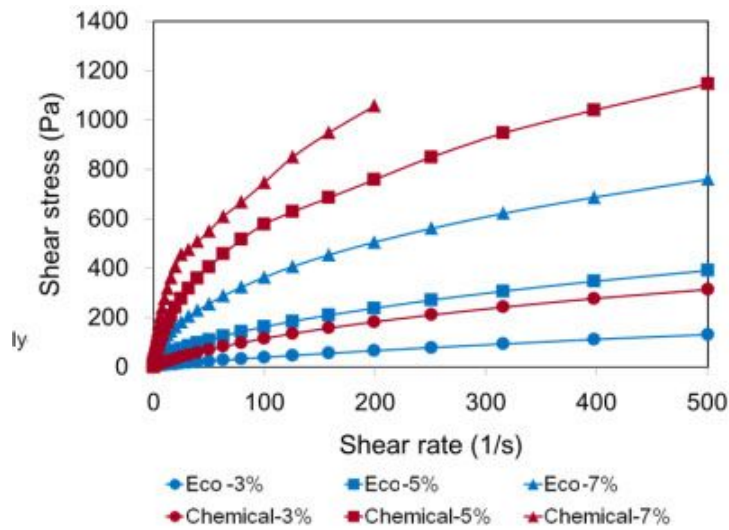


Fig 53. 유자 펙틴 분말 현탁액의 정상 유동 특이성

점도 측정 결과, 농도가 증가함에 따라서 점도가 증가함을 보였으며, 또한 농도에 상관없이 share rate이 증가함에 따라 점도가 감소하는 share-thinning 형태의 유동 특이성을 보여줌. 특히, 같은 농도에서 화학적 추출 펙틴이 천연 추출 펙틴과 비교하여 높은 점도를 나타냄.

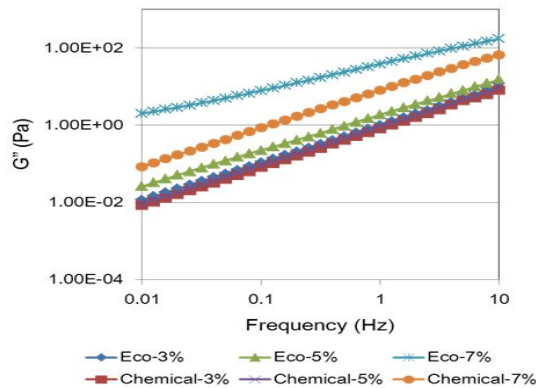


Fig 54. 천연공법 유자 펙틴 분말 현탁액의 점탄성 (G' , G'') 특성

동적 점탄성 측정 결과, 두 종류의 유자 펙틴 분말에서 농도가 증가함에 따라서 G' (탄성)과 G'' (점성)값이 모두 증가함을 보였으며, 농도에 상관없이 frequency가 증가함에 따라 점탄성이 증가하는 frequency 의존성을 나타냄. 또한, 천연 공법 추출 유자 펙틴 분말에서 화학적 추출 유자 펙틴 분말 보다 탄성적인 측면을 가지고 있음을 확인함.

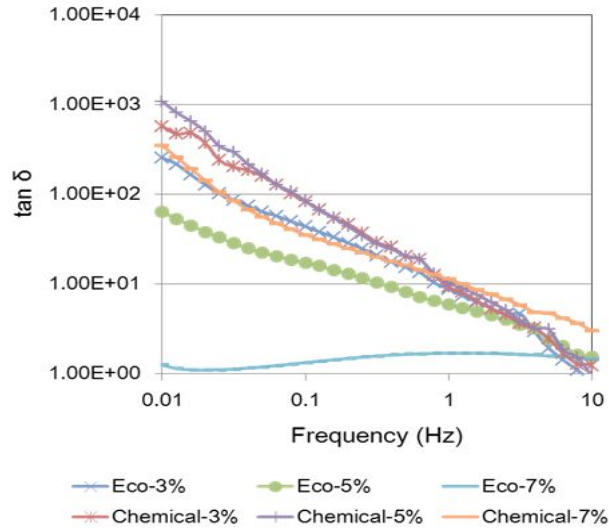


Fig 55. 유자 펙틴 분말 현탁액의 점탄성 ($\tan\delta$) 특성

유자 펙틴 분말 현탁액의 $\tan\delta$ 값을 측정한 결과 농도가 증가함에 낮아지는 경향을 보였고, 이는 농도가 높아질수록 점점 더 탄성적인 성질이 강해짐을 나타냄. 특히, 천연 추출 유자 펙틴이 화학적 추출 유자 펙틴과 비교하여 더욱 탄성적인 성질을 나타냄을 확인함.

② 유변학적 예측 모델 구축

다양한 유변예측 모델을 적용한 결과, 천연공법을 통해 얻어진 유자 펙틴 분말 현탁액의 유동 특성은 Power law model에 잘 적용됨을 보였고 ($R^2=1$), 이로부터 유자 펙틴 분말의 Power law model 변수들을 계산함.

Table 12. Power law parameters

- Power law model

$$\sigma = \kappa(\dot{\gamma})^n$$

σ : Shear stress
 κ : Consistency index
 $\dot{\gamma}$: Shear rate
 n : Flow behavior index

Extraction method	Concentration (%)	K	n	R ²
Chemical	3	5.2	0.67	1
	5	53.29	0.51	0.99
	7	92.13	0.47	0.99
Eco	3	1.23	0.75	1
	5	11.86	0.56	1
	7	39.52	0.48	1

유자 펙틴 분말의 유동특성을 Power law model에 적용하여, 이를 분석한 결과 유자 펙틴 분말의 함량이 높아질수록 k(flow consistency)가 증가하였으며 n (flow behavior index)값은 감소하는 경향을 보임. 또한 n (flow behavior index)값이 1보다 작은 범위에 모두 포함됨에 따라 shear-thinning 특성을 재확인함. 한편, 같은 농도에서는 화학적 추출 유자 펙틴 분말이 천연공법 추출 유자 펙틴 분말과 비교하여 shear-thinning 특성이 두드러짐을 확인함.

다) 다른 식품 성분/첨가물과의 상호작용 분석

① 유자 펙틴 분말의 페이스트 형성능 평가

Starch pasting cell을 이용하여 유자 펙틴 분말 현탁액의 농도를 달리 하여(0.5, 1.0, 1.5%) 밀가루와 혼합 후, 50℃에서 1분간 유지한 후 12℃/min으로 95℃까지 온도를 올리고 95℃에서 2분간 30초간 유지한 후, 다시 12℃/min으로 50℃까지 내린 후 2분간 온도를 유지하는 과정을 통하여 샘플의 점도를 측정하여 페이스트 형성능력을 평가함.

유자 펙틴 분말의 농도가 증가 할수록 페이스트 형성능 변수들이 증가

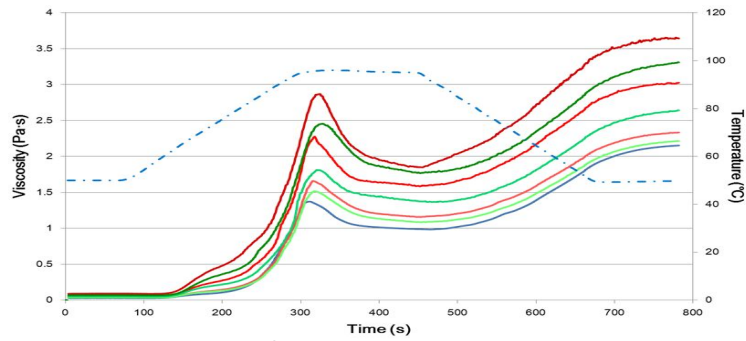


Fig 56. 유차 펙틴 분말 현탁액 농도에 따른 페이스트 형성능 분석

하는 경향을 나타냈으며, 같은 농도에서는 화학적 추출 유차 펙틴 분말이 천연공법 추출 유차 펙틴 분말과 비교하여 더욱 증가하는 경향을 보임. 또한, 유차 펙틴 분말은 물에 대한 친화력으로 인하여 전분의 호화에 필요한 available water의 양을 감소시킴에 따라, 밀가루 전분의 호화 현상을 지연시키고, 호화된 전분 사이에 펙틴 분자가 존재하여 좀더 강한 close-packed cell 구조를 형성함에 따라 점도를 증가시킨 것으로 생각됨.

Table 12. 천연공법 유차 펙틴 분말 현탁액 농도에 따른 페이스트 형성능 변수

	Peak viscosity (Pa-s)	Break down (Pa-s)	Final viscosity (Pa-s)	Setback (Pa-s)
Control	1.37 ± 0.11	0.39 ± 0.12	2.15 ± 0.21	1.17 ± 0.19
Chemical-0.5%	1.66 ± 0.17	0.50 ± 0.28	2.33 ± 0.13	1.18 ± 0.23
Chemical-1.0%	2.28 ± 0.09	0.70 ± 0.19	3.03 ± 0.35	1.44 ± 0.31
Chemical-1.5%	2.87 ± 0.21	1.02 ± 0.34	3.64 ± 0.29	1.79 ± 0.51
Eco-0.5%	1.52 ± 0.07	0.43 ± 0.08	2.22 ± 0.15	1.13 ± 0.08
Eco-1.0%	1.81 ± 0.13	0.45 ± 0.16	2.64 ± 0.11	1.28 ± 0.18
Eco-1.5%	2.46 ± 0.22	0.70 ± 0.23	3.31 ± 0.41	1.54 ± 0.35

유차 펙틴 분말의 농도가 증가 할수록 페이스트 형성능 변수들이 증가하는 경향을 나타냈으며, 같은 농도에서는 화학적 추출 유차 펙틴 분말이 천연공법 추출 유차 펙틴 분말과 비교하여 더욱 증가하는 경향을 보임. 또한, 유차 펙틴 분말은 물에 대한 친화력으로 인하여 전분의 호화에 필요한 available water의 양을 감소시킴에 따라, 밀가루 전분의 호화 현상을 지연시키고, 호화된 전분 사이에 펙틴 분자가 존재하여 좀

더 강한 close-packed cell 구조를 형성함에 따라 점도를 증가시킨 것으로 생각됨.

② 유자 펙틴 분말의 시차주사 열량계(DSC)를 이용한 호화특성 분석
 유자 펙틴 분말의 밀가루와의 호화 특성 분석하기 위하여 시차주사 열량계(Differential Scanning Calorimeter)를 사용함. Aluminum pan에 시료를 주입 후 밀봉한 다음 40 °C에서 80 °C 까지 분당 5 °C로 속도로 가열함.

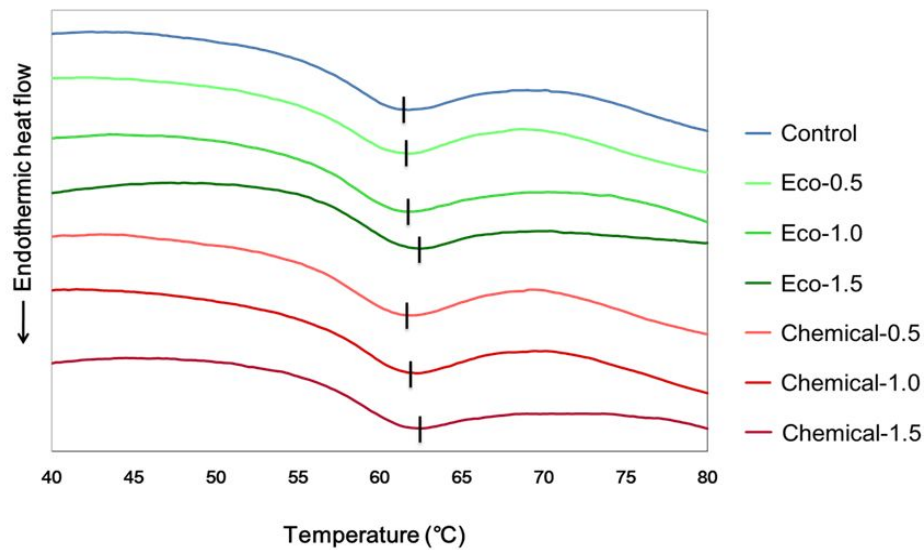


Fig 57. 유자 펙틴 분말 함량에 따른 DSC thermogram

Table 13. 유자 펙틴 분말 함량에 따른 열적 호화 특성

Concentration (%)	Control	Chemical			Eco		
		0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
Enthalpy(Jg ⁻¹)	5.13 ± 0.11	5.29 ± 0.14	5.43 ± 0.22	5.58 ± 0.17	5.21 ± 0.24	5.42 ± 0.13	5.52 ± 0.25
Peak(°C)	61.7 ± 0.03	61.9 ± 0.04	62.2 ± 0.07	62.5 ± 0.04	61.8 ± 0.05	62.1 ± 0.02	62.4 ± 0.03

DSC(시차주사열량계)를 이용한 유자 분말 펙틴의 밀가루와의 호화특성을 분석한 결과, 유자 펙틴 분말의 양이 증가할수록 peak 온도가 증가하였으며, 호화에 필요한 에너지의 양 또한 증가하는 경향을 보임. 또한, 같은 농도에서는 화학적 추출 유자 펙틴 분말이 천연공법 추출 유자 펙틴 분말 보다 조금 더 높은 peak 온도와 enthalpy 값을 나타냄.

마. 개발된 유자 소재를 이용한 고기능성 식품 개발

1) 연구개발수행 내용

가) 지방 대체재로서의 유효성 평가를 위한 모델시스템 구축 및 저지방, 저칼로리 식품 제조

① Mixolab을 이용한 유자 펙틴과 밀가루와의 반죽 안정성 평가
유자 펙틴 현탁액의 밀가루와의 반죽 형성능을 mixolab을 이용하여 측정함. 유자 펙틴 현탁액 (1%, w/w)을 밀가루와 혼합 한 후, optimal dough consistency가 1.1 Nm이 되도록 함. 30 ℃에서 8분간 유지 한 후, 4℃/min의 속도로 90 ℃까지 가열한 다음, 90 ℃에서 7분간 유지 한 후, 다시 50 ℃까지 4℃/min의 속도로 냉각하고 50 ℃에서 5분간 온도를 유지하며 반죽의 thermo-mechanical 특성을 측정함.

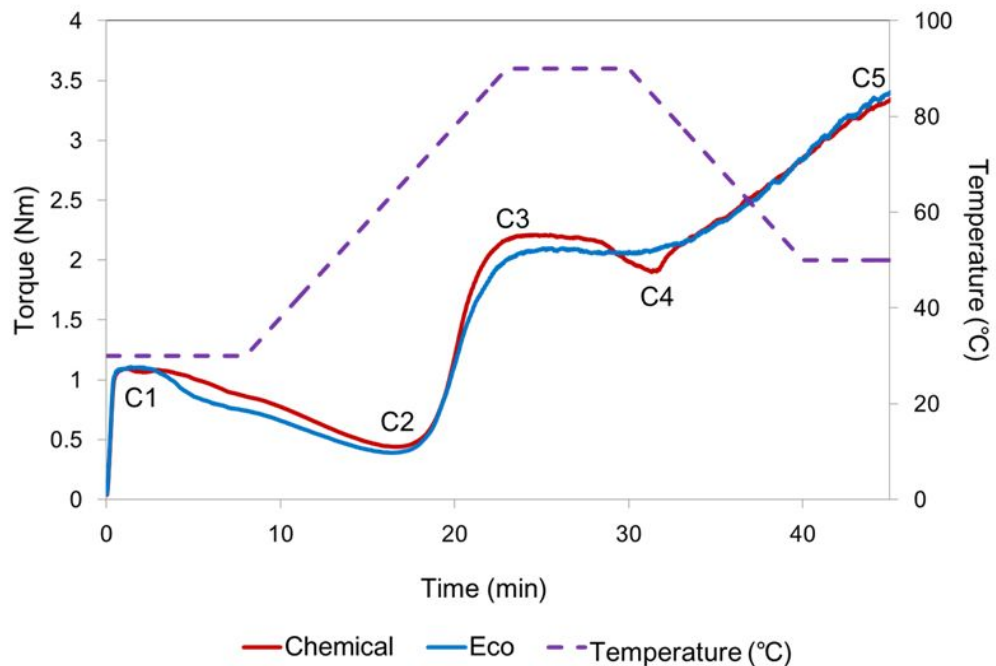


Fig 57. 유자 펙틴 현탁액을 첨가한 밀가루의 반죽 형성능

유자 펙틴 현탁액의 첨가는 밀가루 반죽의 반죽 안정성, 단백질 구조, 그리고 호화 점도의 증가를 보여줌. 또한, 화학적 추출 유자 펙틴 밀가루 반죽과 천연공법 추출 유자 펙틴은 각각 55.1%와 52.6%의 water absorption을 보였으며, 서로 다른 밀가루 반죽 형성능을 나타냄.

② 지방 대체재로서 유자 펙틴 gel을 첨가한 Cake의 제조

AACC 10-90을 토대로 하여 20%(w/w)의 농도를 가진 유자 펙틴 gel을 cake batter의 배합비에서 shortening을 무게 대비 10, 20, 30%만큼 대체하여 cake을 제조함.

Table 14. Cake batter의 배합비

Ingredients	Weight (g)
Weak flour	200
Shortening	100
Sugar	240
Water	290
Non-fat dry milk	24
Salt	6
Baking powder	8
Dried egg white	18

나) 개발된 유자 가공 제품의 물리적 특성 및 텍스처 평가를 통한 식품학적 품질 평가

① Cake batter의 정상 유동 특성 및 동적 점탄성 측정

유자 펙틴 gel (20%, w/w)을 shortening에 대한 무게 대비, 각각 10, 20, 30%를 대체하여 cake batter를 만들어 shear rate에 따른 apparent viscosity를 측정하였으며, frequency에 따른 G' (elastic modulus)와 G'' (viscous modulus)를 측정함. 또한, 유자 펙틴 gel이 대체된 cake batter의 점탄성 특성에서 측정된 G' , G'' 값에 상대적인 비(G''/G') 이용하여 계산한 $\tan \delta$ 값을 분석함.- 정상 유동 특이성(viscosity) 분석

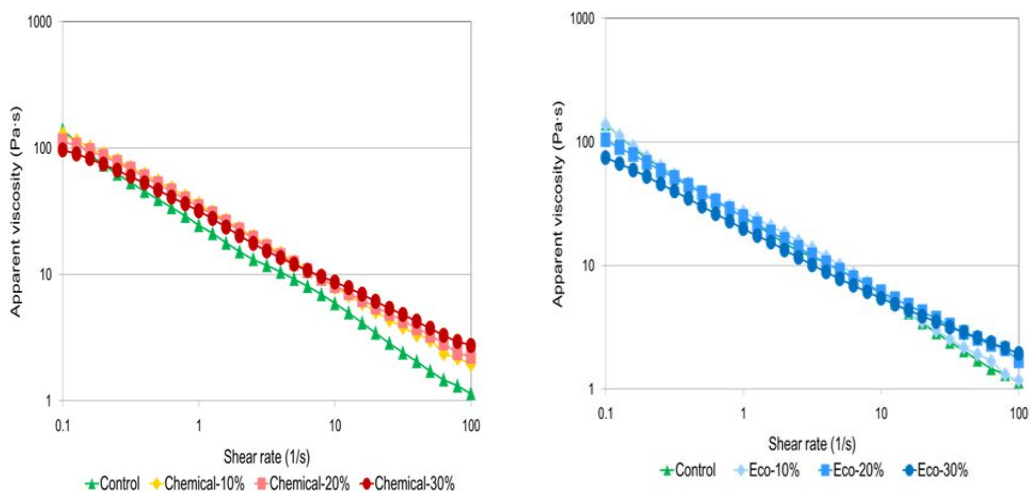


Fig 58. Cake batter의 정상 유동 특성

유자 펙틴 gel의 지방대체 함량이 증가 할수록 viscosity가 증가 하였으며, shear rate이 증가함에 따라 viscosity 감소하는 shear-thinning 형태의 유동 특이성을 보여줌. 특히, 화학적 추출 유자 펙틴 gel을 이용하여 지방 대체한 cake batter에서 천연공법 추출 유자 펙틴 gel을 이용한 지방 대체 cake batter보다 높은 apparent viscosity를 나타내었다. 또한, 유자 펙틴 gel을 이용하여 지방 대체를 한 cake batter에서 shear rate이 증가할수록 낮았던 점도가 점차적으로 증가함을 확인함.

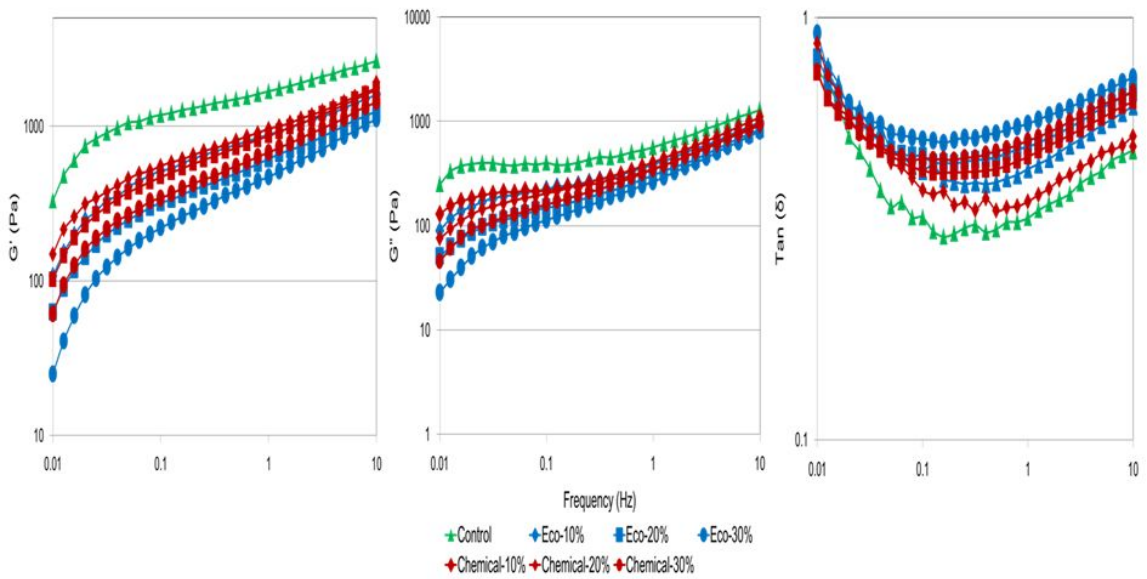


Fig 59. 천연공법 유자 펙틴 분말 현탁액의 점탄성 ($\tan\delta$) 특성

동적 점탄성 측정 결과, 지방 대체량이 증가함에 따라서 G' (탄성)과 G'' (점성)값이 모두 감소함을 보였으며, 또한 농도에 상관없이 frequency가 증가함에 따라 점탄성이 증가하는 frequency 의존성을 나타냄. 이는 유자 펙틴 gel의 water holding에서 비롯되어진 것으로 생각됨. 또한, 화학적 추출 유자 펙틴 gel을 함유한 cake batter에서 천연공법 추출 유자 펙틴 gel을 함유한 cake batter보다 높은 G' (탄성)과 G'' (점성)값을 나타냄. 그리고 cake batter의 $\tan\delta$ 값을 측정된 결과, 대체량이 증가함에 증가하는 경향을 보였고, 이는 지방 대체량이 높아질수록 점점 더 점성적인 성질이 강해짐을 보여줌.

② Cake batter의 유변학적 예측 모델 구축

다양한 유변예측 모델을 적용한 결과, 지방 대체 cake batter의 유동 특성은 Power law model에 잘 적용됨을 보였고 ($R^2=1$), 이로부터 cake batter의 Power law model 변수들을 계산함.

- Power law model

$$\sigma = \kappa(\dot{\gamma})^n$$

σ : Shear stress
 κ : Consistency index
 $\dot{\gamma}$: Shear rate
 n : Flow behavior index

지방 대체 cake batter의 유동특성을 Power law model에 적용하여, 이를 분석한 결과 유자 펙틴 gel의 지방 대체량이 높아질수록 κ (flow consistency)가 감소하였으며 n (flow behavior index)값은 증가하는 경향을 보임. 또한 n (flow behavior index)값이 1보다 작은 범위에 모두 포함됨에 따라 shear-thinning 특성을 재확인함.

③ Cake batter의 비중 측정

지방 대체 cake batter의 비중은 일정한 부피의 물과 cake batter들의 무게를 비교하여 측정함.

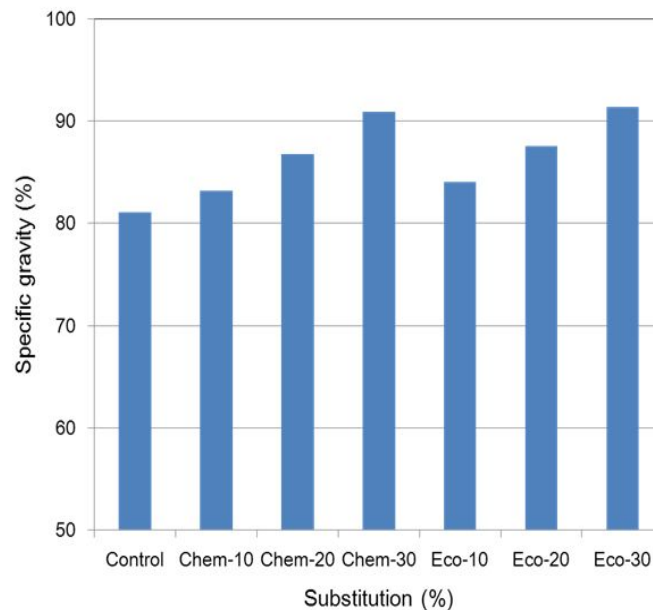


Fig 60. Cake batter의 비중

유자 펙틴 gel로 shortening을 10, 20, 30% 대체한 후, cake batter의 비중을 측정함. Cake batter의 비중을 측정한 결과, 유자 펙틴 gel의 대체량이 증가할수록, 비중이 증가하는 것을 확인함. 비중이 증가하는 것은 부피가 감소하는 것, 즉 팽창력이 감소하는 것을 의미하는데, 유자 펙틴 gel의 shortening 대체량이 증가할수록 팽창력이 점점 감소하는 것을 확인함. 하지만, 10% 정도 대체했을 때는 대조구와 크게 차이가 나지 않았음.

④ Cake의 수분 함량 측정

Cake batter의 crumb부분을 3 g씩 정량 후, 건조 oven (105℃, 1h)에 건조 시킨 후 건조 된 시료의 무게를 재어 수분함량을 측정함.

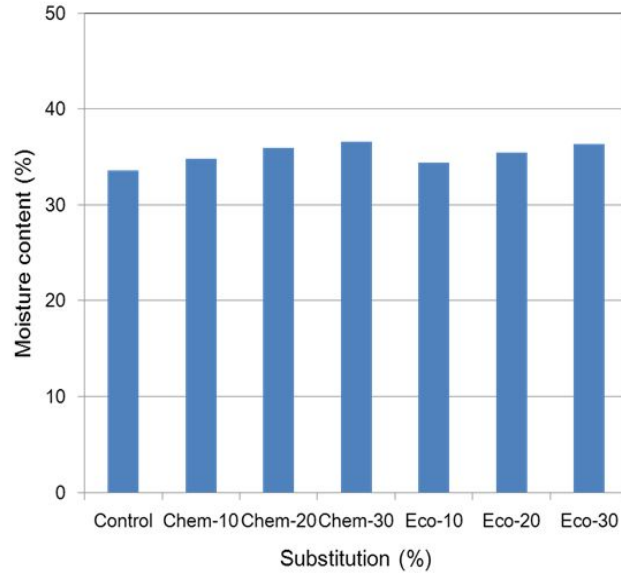


Fig 61. Cake의 수분함량

유자 펙틴 gel을 사용하여 shortening 대체 시, 지방 대체 비율이 높아 질수록 cake의 수분 함량이 증가하는 경향을 보임. 이는 유자 펙틴의 수분 보유 능력에 따른 결과로 생각됨.

⑤ Cake의 부피 측정

Cake의 부피측정은 AACC 10-91에 의거하여 실시함. Cake을 정확히 반으로 잘라 중심부의 높이와 좌우 대칭 정도를 고려하여 cake의 부피를 측정함.

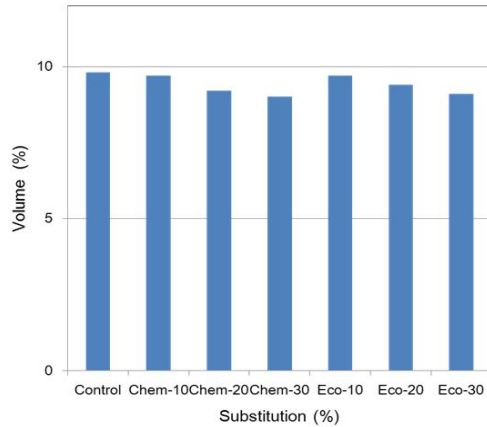


Fig 62. Cake의 부피

소비자의 제품 선호도에 매우 큰 영향을 미치는 중요한 물리적 특징인 cake의 부피를 측정된 결과, 10% 지방 대체 시, 대조구와 비교하여 부피의 변화를 보이지 않음. 하지만, 10%보다 유자 펙틴 gel의 shortening 대체 시, cake 부피가 감소하는 것을 확인함.

⑥ Cake의 색 측정

Cake의 색은 cake의 crumb와 crust부분을 색차계를 이용하여 L(lightness/darkness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)의 값으로 나타냄.

Concentration (%)		Control	Chemical			Eco		
			10	20	30	10	20	30
Crust	L*	63.59	73.08	77.54	81.19	69.15	73.37	78.08
	a*	5.90	2.49	-1.57	-3.02	2.51	-2.34	-6.21
	b*	37.39	38.70	31.56	27.39	37.90	36.75	35.33
Crumb	L*	78.09	81.06	81.40	82.19	78.17	79.57	81.63
	a*	-3.24	-3.13	-3.17	-3.20	-3.31	-3.43	-3.52
	b*	13.98	14.11	14.31	15.16	15.69	16.06	17.19

Fig 63. Cake의 색 변화

유자 펙틴 gel의 지방 대체량이 높아질수록 cake의 crust과 crumb 색의 밝기가 밝아지는 경향을 보임. 특히, 천연공법 유자 펙틴 gel을 이용한 cake에서 화학적 추출 유자 펙틴 gel을 이용한 cake보다 대체량이 증가할수록 crumb의 b값은 증가하였고 crust의 b값은 감소하는 경향 나타내었

으며, 천연추출 유자 펙틴 gel을 대체한 cake에서 낮은 b값을 나타내고 있음을 확인함.

⑦ Cake의 texture 측정

Cake의 texture는 texture analyzer를 이용하여 측정함. 25 mm의 지름을 가진 cylindrical probe를 장착하고, 60 mm/min의 속도로 TPA test를 실시함.

Concentration (%)	Control	Chemical			Eco		
		10	20	30	10	20	30
Hardness (N)	8.06	7.74	8.62	9.21	7.83	9.01	10.87
Adhesiveness (N·s)	0.26	0.21	0.28	0.33	0.24	0.29	0.35
Cohesiveness	0.62	0.52	0.59	0.60	0.58	0.62	0.64
Gumminess (N)	4.88	4.29	5.17	5.50	1.64	5.69	7.98

Fig 64. Cake의 texture 측정

유자 펙틴 gel을 사용하여 shortening 대체 시, 대조구와 비교하여 10% 지방 대체까지는 texture의 차이를 나타내지 않음. 하지만, hardness는 천연추출 유자 펙틴 gel을 이용한 cake에서 화학추출 유자 펙틴 gel을 이용한 cake보다 높게 나타남. 또한, adhesiveness, cohesiveness, 그리고 gumminess는 지방대체량이 증가할수록 증가하였지만, adhesiveness는 지방 대체 10%까지 대조구와 비교하여 차이를 나타내지 않음.

바. 기능성 유자 마스크팩의 제조

1) 연구개발수행 내용

가) 유자착즙액에 함유되어 있는 기능성 성분의 분석 및 함유량 측정

유자착즙액에 함유되어 있는 기능성 성분을 분석하고자 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분석 및 정량하였다. 유자 착즙액은 동결건조하여 분말형태로 만들어 사용하였다. 사용한 column은 HiQ sil C18W (4.6mmØ×250mm)이며 분석조건은 2% acetic acid 와 ACN(acetonitrile)을 이동상으로 사용하였고, flow rate은 1ml/1min이며 각 샘플은 20µl 주입하였다. 측정 결과, 유자착즙액에 함유되어 있는 주요 성분으로는 rutin, narirutin, hesperidin, naringin으로 확인되었고 성분 별 함량은 유자분말 1 g당 rutin 0.41 mg, narirutin

1.05 mg, hesperidin 0.77 mg, naringin 0.16 mg이었다.

Table 15. HPLC gradient

Time (min)	A (2% actic acid)	B (ACN)
0-15	100	0
15-45	100-70	0-30
45-50	70-0	30-100
50-55	0	100
55-80	0-100	100-0

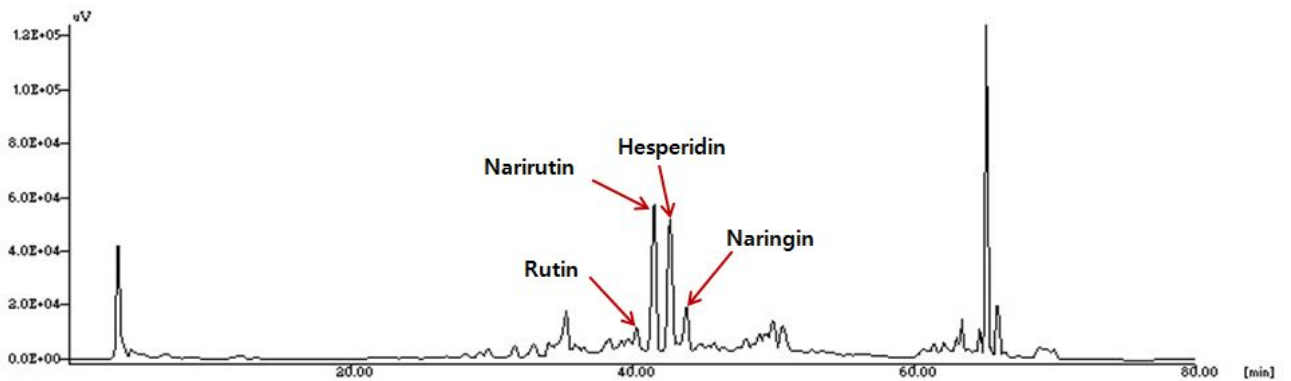


Fig 65. HPLC를 이용한 유자착즙액의 기능성 성분 분석

나) 상업용 펙틴과 나린진을 이용하여 펙틴필름 모델 시스템 구축

높은 농도의 당과 낮은 pH 조건에서 겔화되는 특성을 가진 HMP(High Methoxyl Pectin)는 필름제조 후 물리적 특성을 평가한 결과 많은 당의 첨가로 끈적한 텍스처를 가지고 있고 산성 조건에서 겔이 형성되기 때문에 피부에 직접 사용하는 마스크팩에 적용하기 어려운 단점이 있으므로 LMP (Low Methoxyl Pectin)을 사용하여 펙틴필름을 제조하였다. 펙틴필름을 만드는 공정은 <Fig 2.>를 따라 제조하였으며 1일 동안 상온에서 필름을 굳힌 후 성분을 분석하였다. 분석하기 위하여 제조한 필름에 증류수나 생리식염수를 넣고 37℃ shaking incubator에서 각 시간 별(0, 15, 30 분)로 용출된 성분을 측정하였다. 측정 결과는 <Fig 3.>에 나타내었다. pH 별로 큰 차이는 없었지만 pH 7에서 빠른 용출 특성을 나타내고 있으며, 모든 pH 조성에서 30분 동안 incubation 시 20% 정도 용출되었다.

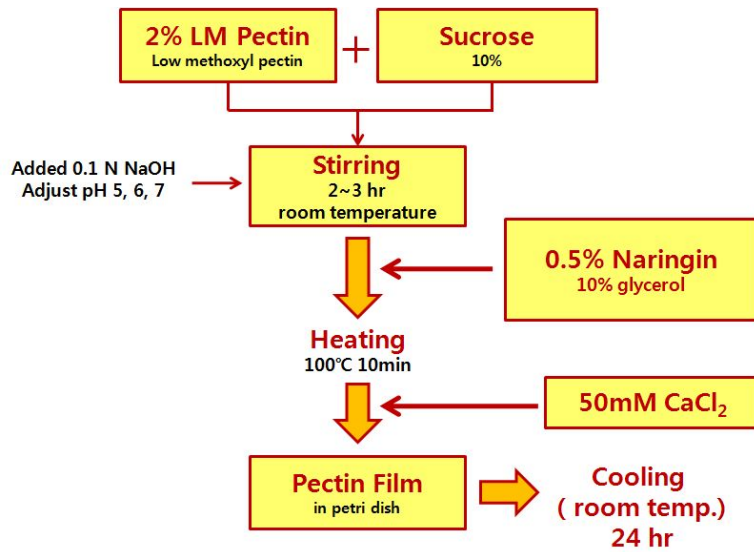


Fig 66. LMP 필름 제조 공정

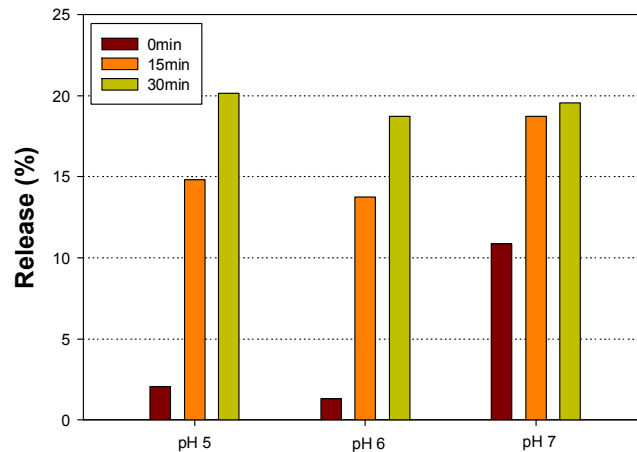


Fig 67. LMP 펙틴필름 제조 시 pH 조성에 따른 naringin 용출

상업용 펙틴과 유자 분말을 이용하여 펙틴필름을 만들었고 만드는 방법은 <Fig 4>에 나타내었다. 상업용 펙틴과 naringin을 이용하여 펙틴필름 제조 시에는 펙틴이 용출되지 않은 반면, 유자 분말을 이용하여 펙틴필름 제조 시 기능성 성분과 펙틴이 함께 용출되어 기능성 성분과 펙틴 함량을 측정하였다. pH 조성 별 펙틴 함량을 측정한 결과, pH 6에서 펙틴이 가장 많이 용출되었고, 기능성 성분 측정 시에도 pH 6에서 기능성 성분이 가장 많이 용출되어 기능성 성분 용출에 관한 결과는 pH 6 조건만 나타내었다<Fig 5>. 그 결과 시간이 증가함에 따라 용출 정도 또한 증가하는 것으로 나타났으며 30분동안 incubation시 6~12%

용출되는 것을 확인하였다.

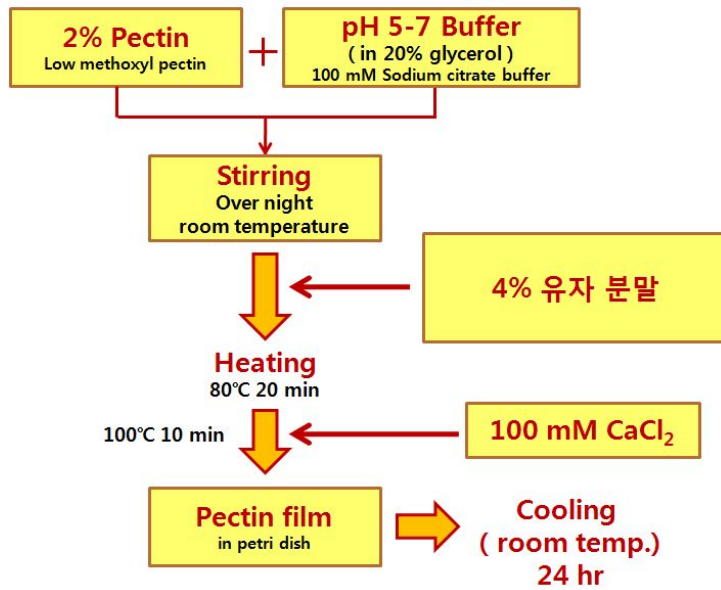


Fig 68. 유자 분말을 이용한 펙틴필름 제조 공정

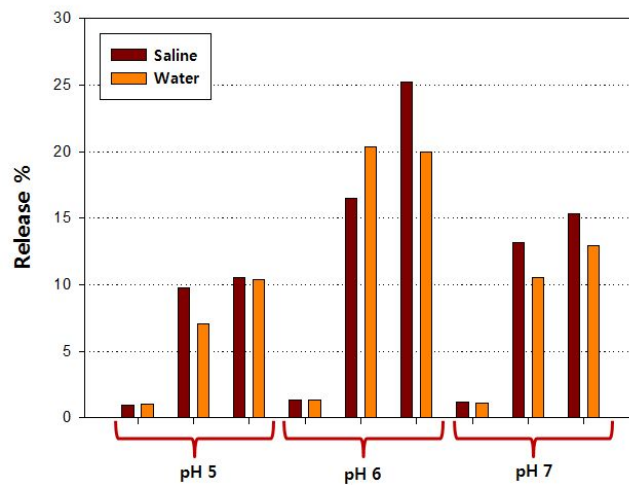


Fig 69. 유자 분말을 이용한 펙틴필름에서의 pH 조성에 따른 펙틴 용출

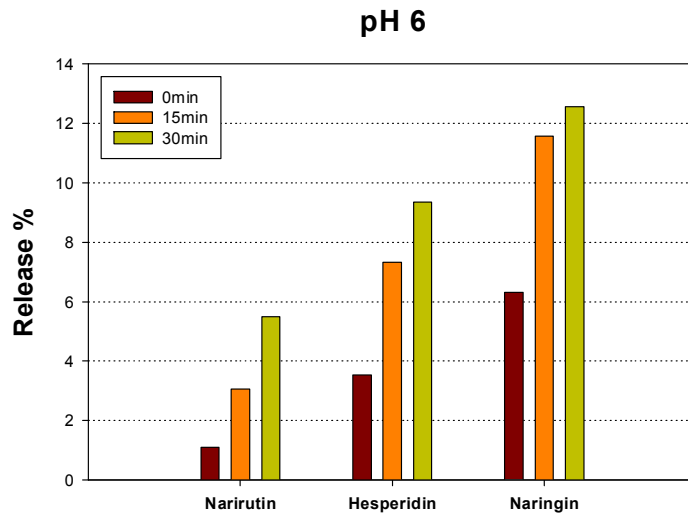
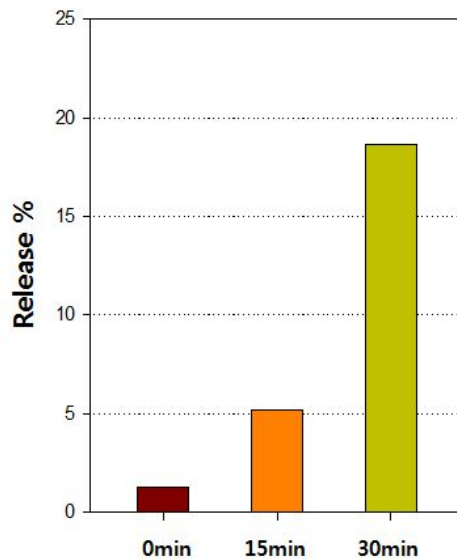


Fig 70. pH 6 조건에서 유자 분말을 이용한 펙틴필름에서의 기능성 성분 용출

다) 유자부산물로부터 얻어진 유자 펙틴과 유자 분말을 이용하여 펙틴 필름 제조 후 기능성 성분의 용출특성 평가 및 안전성 확립

유자 펙틴과 유자 분말을 이용하여 펙틴 필름 제조 후 펙틴과 기능성 물질을 측정된 결과는 아래의 그림에 나타내었다. 펙틴 함량 측정 결과 시간이 증가함에 따라 용출되는 펙틴의 양이 증가하며 기능성 성분 또한 증가하는 것으로 나타났다.



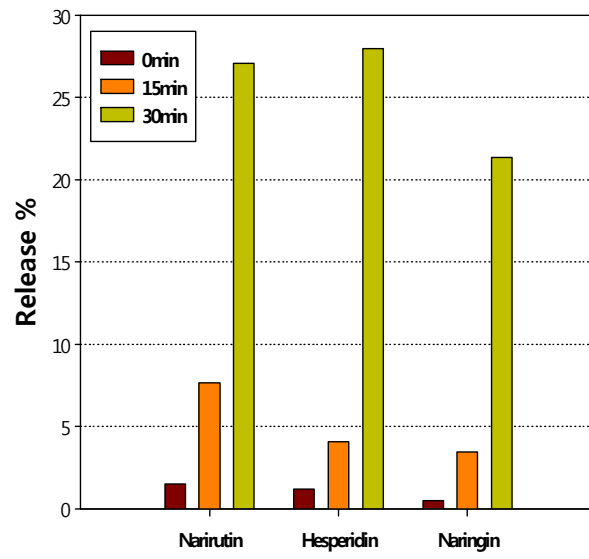


Fig 71. 시간에 따른 유자 펙틴 필름의 펙틴 및 기능성 물질의 용출 특성

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 본 연구는 수출용 및 내수용 유자와 유자차의 농약독성 및 잔류량 평가에 중점을 두어 친환경 생산기술 최적화 연구를 수행하였다. 이를 위해 고품균을 중심으로 생산된 유자에 대한 농약 잔류실태 모니터링을 실시하여 위해평가를 실시하였다. 농약에 대한 분석결과는 국민유자섭취량을 고려하여 1일섭취허용량등 위해도 평가지표를 산출하였고 이는 친환경 유자 생산을 위한 기초자료 활용할 수 있다.
- 이를 위해 시료전처리 최적화 및 회수율 시험을 실시하였고, 표준곡선작성, 회수율 분석, LOD, LOQ를 결정하였다. 또한 8종농약을 대상으로 시료에 대한 2009년산 유자차의 잔류실태를 조사하였으며 조사 대상 시료의 적절한 분석 시기를 선정하여 기기분석 조건의 최적화를 실시하였다. 확립된 최적화 분석조건으로 유자의 잔류농약 모니터링을 실시하였으며, 2009년산 일반재배 유자 50종과, 친환경 재배 유자 30종에 대한 8종 농약의 잔류실태를 조사 하였다. 또한 최적화된 분석 방법을 이용하여 한성푸드에서 생산된 2010년 산 유자차 25제품에대한 8종 농약의 잔류실태를 조사하였다.
- 유자의 잔류농약 모니터링을 실시하여, 2010년산 일반재배 유자 50종과, 친환경 재배 유자30종에 대한 8종 농약의 잔류실태를 조사하였다. 또한 1차년도 연구를 통하여 최적화된 분석방법을 이용하여 한성푸드에서 생산된 2011년산 유자차 25제품에 대한 8종 농약의 잔류실태를 조사하였다. 그리하여 유자와 유자차의 잔류농약 분석결과를 바탕으로 국내 생산 유자에 대한 위해도 평가를 실시하였다.
- 소규모 유자차 생산 업체의 작업자가 쉽게 접근 할 수 있는 HACCP Plan을 협력업체에 제공할 수 있었다. 하지만 이러한 계획서를 완전히 정착시켜 시범업체의 작업자가 관행을 바꾸어 지금보다 더 체계적이고 지속적인 위생관리가 되어야만 이 연구개발에 참여한 대외기여도를 높일 수 있을 것으로 보인다.
- 수출용 유자 등 국내산 과채류의 초기품질 유지(초기 미생물 제거 및 갈변 등의 억제)를 위한 방안으로 살균력이 우수하고 유효염소 화합물 함량을 최소화할 수 있는 살균소독수 제조시스템(전기분해수 및 이산화염소수)을 활용한 살균 및 세척, 물기 제거 등의 전처리 기술을 개발·적용할 수 있

도록 하여 수출용 유자의 잔류농약, 이물질, 중금속 및 미생물 제거 등 비가열식품의 미생물학적 안전성 확보 및 위생적 품질유지를 위한 실용화 기술을 확립하고자 수행하였다.

○ 유자부산물의 생리활성 탐색 및 최적 추출분획물 제조에 필요한 추출방법을 확립하였으며 발효공정을 응용한 최적의 추출분획물 제조공정을 확립하여 상용화의 기반을 구축하였다.

○ 유자부산물의 화장품 사업화의 과학적 피부효능 근거를 확보하였다.

- 유자부산물, 특히 유자과피로부터 유용성분을 확인하였으며 동시에 추출분획 방법에 따른 다양한 피부생리활성을 확인하였다.
- 항염증효능: 피부노화, 미백 및 아토피성 피부, 여드름 피부 등에서 공통적으로 나타나는 염증반응을 억제하는 효능을 확인하여 유자부산물이 다기능성 화장품 소재로서의 제품화될 수 있는 이론적 근거를 확보하였음. 특히 UVA에 의한 피부손상을 막아주는 효능에 대한 작용기전 등을 심도 있게 연구하여 향후 선제품을 비롯하여 광범위 항노화 기능성 화장품개발의 이론적인 바탕을 제공할 수 있게 되었다.
- 활성산소 제거효능 : DPPH 법을 사용하여 활성산소종을 제거하는 기초효능을 확인하였다. 이러한 활성산소종은 자외선조사 후에 피부에서 1차적으로 나타나는 생리작용으로 피부노화, 멜라닌합성 등을 촉진하는 시발점이 될 뿐 아니라 피부보습을 결정하는 피부장벽기능에도 손상을 초래하게 된다. 따라서 우수한 활성산소제거 효능을 유자부산물에서 확인이 된 것은 향후 화장품 뿐 아니라 기능성 식품개발에도 활용될 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.
- 멜라닌생성 억제효능 : 미백화장품은 국내 뿐 아니라 전세계적으로 기능성화장품으로 경제적 비중이 큰 제품군이다. 본 연구를 통해 특히 유자부산물의 미백효능이 우수한 것으로 확인이 되었다. 향후 유자부산물 활용에 있어서 큰 기술적 기여를 할 것으로 판단된다.
- 항노화 피부효능 : 피부노화의 지표인 진피세포의 콜라겐 생합성 능력은 자외선, 특히 UVB에 의해 크게 저해되는데 유자부산물에는 이를 회복시키는 효능이 확인이 되었다. 전세계적으로 항노화 화장품은 전체 스킨케어 제품의 60% 이상을 차지하고 있어 유자부산물을 이용한 항노화 화장품의 개발은 그 파급효과가 매우 크다고 할 수 있다.
- 피부장벽기능 강화효능 : 모든 화장품의 기초효능으로 피부보습을 향상시키는 소재는 기본적으로 사용하게 된다. 본 연구를 통해 유자부산물이 각질형성세포의 분화를 촉진하는 효능을 *in vitro*에서 확인했

을 뿐 아니라 인체효능시험인 급성장벽복원시험을 통해서도 확인이 되었다. 이는 향후 아토피성 피부개선 보습제 개발의 근거가 될 수 있다. 나아가 위의 항염증 효능, 활성산소제거 효능 등과 함께 다양한 피부질환을 개선시킬 수 있는 약용화장품 개발로 응용될 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.

- 지질세포분화 억제효능 : 사람의 지방세포를 사용한 실험에서 유자부산물인 지방세포의 분화를 억제하여 지방생성을 크게 저해하는 효능을 확인하였다. 이러한 기술적 발견은 향후 피부의 피지분비억제 효능을 기대할 수 있어 여드름의 주요생성원인인 피지억제와 위에 기술된 항염증 효능을 같이 사용하여 여드름화장품 또는 트러블피부 전용화장품으로 개발 가능성을 확인하였다. 또한 이는 향후 유자과피의 섬유질을 포함하는 유자부산물과 함께 먹는 화장품으로 개발 가능성을 제시하는 결과이다.
- 동물실험을 통한 멀티 기능성 성분의 전임상 테스트 : 과제 계획서 제출시 동물실험을 통한 피부효능을 제시하였으나 최근 동물시험이 금지되는 새로운 규약이 전세계적으로 확산되고 있어 피부장벽복원 실험 등을 자원자를 모집하여 인체효능시험으로 대체하였다.

- 2핵 방식의 식품가공/전처리용 이산화염소수 생성시스템과 염소함량을 최소화한 중성 전기분해수 생성시스템 및 생성물의 유효성에 대한 평가와 적정 농도의 결정, 유자 과실과 기구, 용기 및 설비에 대한 세정·살균수로서의 기초적인 활용기술을 동시에 개발하여 기반연구의 수행에 주력함으로써 본 활용 기술의 기술적 초기 조건을 설정·확립하였다
- 개발한 시스템으로 생성한 이산화염소수, 저염소 전기분해수를 활용한 세척 및 살균수로의 적용을 위한 제조조건의 최적화와 전처리 조건에 따른 초기 품질 특성 검토를 수행하여 통합형 세척/살균/물기 제거시스템의 실증시험을 위한 토대를 구축하였다.
- 통합형 세척/살균/물기 제거시스템의 실증시험 및 산업화 방안을 확립하고 현장 적용시험을 통한 검증으로 산업화를 조기에 완성할 수 있도록 수행하였다. 그 결과, 살균소독수 생성시스템 개발 및 생성조건 확립, 세척처리가 유자의 항산화 화합물 및 잔류농약에 미치는 영향과, 그리고 표면 세척 시스템을 이용하여 유자의 미생물과 잔류농약 제거 효과를 확인하였다.
- 국내에서도 최근에 Bacillus sp. Staphylococcus sp.와 효모 등을 대상으로

전해산화수의 노출시간에 따른 살균력을 검토하여 의료용 기구의 살균 및 소독제로서의 적용가능성 확인한 바 있으며, 전해산화수의 식품가공 분야 응용가능성을 확인하고자 미생물에 대한 실험적 살균효과와 배추, 양배추, 케일 및 상치를 대상으로 표면살균 효과를 검토한 보고가 있다. 비열살균 식품인 김치의 제조 시 원부재료의 세정 및 제균 매체로서의 적용 가능성을 검토하였으며, 돈육 및 육계의 표면미생물 살균을 통한 저장성 연장 등 산업화 응용 가능성 검토, 본 연구팀은 염장처리한 단무지의 탈염 및 세정, 조미 공정에서의 살균효과와 전기분해수 처리에 의한 탈염 공정에서의 단무지 품질 특성을 조사한 결과, 단무지 제조공정의 축소 및 시간 단축을 위한 염장단무지의 탈염/세정공정 동시 적용 방안과 장기 보존 및 비열 살균을 위한 전기분해수 적용 조미액 제조 방안의 가능성을 확인하였는바, 향후 전기분해수의 식품가공에의 다양하게 적용함으로써 공정 단축 및 개선에 크게 이바지하였다.

- 현재까지 비가열 살균기술은 가열 살균과 비교하여 볼 때 살균력은 대부분 미흡한 실정이며, 현재 식품 생산업체는 대부분 열처리 생산 설비를 갖추고 있기 때문에 다양한 비가열 살균기술의 효과가 입증되어도 고가의 설비비 문제로 인하여 산업화에 어려움을 겪고 있어 실용화까지는 많은 문제점들이 나타나고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로 인체 유해성이 없고, 넓은 항균 스펙트럼과 속효성을 나타내는 차아염소산수 및 이산화염소수 등을 생성하는 살균소독 기계장치를 국내에 소개하였을 뿐만 아니라 아울러 제도권 하에서 관리되고 있지 않아 관리에 대한 민원 질의가 급증하고 살균소독 기계장치의 수입 및 수출 시에도 관리를 받아야 하는 국내의 현실을 감안하여 기계장치에 의해 생성된 산물인 이산화염소수 및 차아염소수 등의 살균소독력, 안전성, 안정성 평가를 통한 살균소독기계 장치의 법률적 관리근거 등 종합적인 관리방안을 제시하여 본 시스템의 국내 보급에 크게 이바지하였다.
- 국내산 신선 농산물의 세정 및 살균 처리 시스템의 기반 구축
 - 고농도 염소사용 및 잔류염소에 따른 2차적 위해요소 문제 해결 가능
 - 초기 미생물 억제 및 병원성 위해 미생물의 살균에 의한 안전성 확보
 - 처리 대상물 및 용도에 따른 전해수의 적용범위 확대
- HACCP system에 근거한 합리적인 위생관리 체계 확립 방안 제시
 - 안전하고 위생적인 단체급식 관련 원부재료 및 자재의 공급
 - 안전하고 위생적인 단체급식의 공급 및 소비체계 구축을 통한 질병 발생에 따른 사회적 비용 경감 가능

- 학교급식의 위생시스템 개선으로 학교식중독 발생을 20% 감소
- 식품가공 공정에서의 적용에 따른 공정 개선, 단축 및 위생적 안전성 방안 제시
- 위생적 고품질의 신선편의 최소가공식품의 다양화
 - Ready-to-eat and ready-to-cook fruit and vegetables 등
- 비음용수 및 처리수의 재활용에 의한 수자원 부족 해소
- 기존 세정제(염소수 등)처리 대체에 의한 수질개선 및 환경오염 방지효과
- 유자 및 폐기물로부터 수용성·지용성 기능성 물질의 분리 농축하여 열풍건조 및 동결건조를 이용한 폐유자박의 건조 및 추출 용매에 따른 유자 oleoresin의 추출수율 연구하였다. 또한 기능성 유자 마이크로·나노캡슐의 제조에 미치는 영향과 유자 마이크로·나노캡슐의 특성연구, 유자 마이크로·나노캡슐의 가공/저장 안정성 연구, 유자로부터 유용성분(펙틴 등) 추출을 위한 전처리 단위 조작 확립 및 유자 유용성분 강화를 위한 효소적/물리적 복합처리기술 최적화를 성립하였다.
- 유자로 영양젤리를 제조하여 물성 연구 저장성 연구로 유자젤 식품의 저장성 향상 방법 개발하였다. 또한 개발된 유자소재의 이화학적 특성 분석과 다른 식품 성분과 첨가물과의 상호작용을 분석하여 상관관계를 규명하였다. 또한 지방 대체재로서의 유효성 평가를 위한 모델시스템 구축 및 저지방, 저칼로리 식품 제조를 하여 물리적 특성 및 텍스처 평가를 통한 식품학적 품질 평가를 하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 실용화 · 산업화(기술실시 등)

- 기술이전 : 한일종합기계(대표 정준모, 경기 하남)
 - 2011. 2. 21 협약, 기술료 19,950천원
 - 이전기술명 : 살균소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 통합형 감귤류 세척처리기술

2. 논문게재 성과

성정민, 정진웅, 권기현, 김종훈. Removal Efficiency of Microorganism and pesticides residue by a using Surface Washing System on Yuja (Citrus junos Sieb. Ex Tanaka). 한국식품저장유통학회지.18(5)

성정민, 정진웅, 권기현, 김종훈. Effect of Washing Treatments on Pesticide Residues and Antioxidant Compounds in Yuja (Citrus junos Sieb ex Tanaka). Food Science Biotechnol. 20(3)

Choi, J.W., Lee, S.J. 2010. Effect of multilayer edible coatings on the lemon quality changes during the storage. Food Engineering Progress, 14:27-34.

Effects of edible composite coatings based on wax, cellulose, hydrocolloid and oil classes on quality changes of Yuja during storage. (Food and Bioprocess Technology에서 심사중)

Modelling the respiration rate of yuja (투고중)

Jongbin Lim, George E. Inglett, and Suyong Lee. 2010. Response to

consumer demand for reduced-fat foods; Multi-functional fat replacers. Japan Journal of Food Engineering. 11(4):163-168.

Bokki Min, Jongbin Lim, Sanghoon Ko, Sung Ho Lee and Suyong Lee. 2011. Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. Bioresource Technology. 102(4):3855-3860.

Jongbin Lim, Sanghoon Ko, and Suyong Lee. 2011. Extraction and characterization of pectin from Yuza (Citrus junos) pomace: comparison of conventional-chemical and eco-friendly extractions.(투고 중)

Da Sel Kim, Dong Hyun Kim, Myoung Jin Oh, Kwang Geun Lee, Moo Chang Kook, and Chang Seo Park. Antiaging and Whitening Activities of Ethanol Extract of Yuza (Citrus junos SIEB ex TANAKA) By-product. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea Vol.36, No. 2, June 2010, 137-143

“Photoprotective effects of Korean Citrus junos and citrus polyphenolic compounds on UV mediated damage responses of human keratinocyte HaCaT cells and represses wrinkle formation against UV irradiation”(2011.12 생물공학회지 투고 예정)

2009 한국생물공학회 추계학술발표 “Anti-aging activity of Hot-Water Extract from Yuza(Citrus junos SIEB ex TANAKA) Peels & Seeds”

3. 학술 대회 발표 성과

Wax계 식용코팅의 개발과 식용코팅이 저장시간에 따라 유자 품질에 미치는 효과. 한국식품과학회 제 77차 학술대회 및 정기총회 포스터 발표, 2010년 6월 16~18일

성정민, 정진웅, 권기현 외 4명. 2010. 세척 방법별에 따른 유자의 미생물 및 잔류농약 제거효과. 한국식품과학회 제77차 학술대회

성정민, 정진웅, 권기현, 김종훈, 2010. Removal effect of pesticides residue and Microorganism by using mechanical washer on Yuza (Citrus

junos Sieb. Ex Tanaka). 30차 한국식품저장유통학회

정진웅, 성정민 외 3인. 2010. Effect of pesticide residues removal and sterilization on washing of citrus by the electrolyzed water and the aqueous chlorine dioxide. 1th International Congress on Food Technology(Turkey)

성정민, 정진웅, 박기재 외 6인. 2009. 세척방법에 따른 밀감의 잔류농약 제거효과. 30차한국식품저장유통학회

Jongbin Lim, Sanghoon Ko, and Suyong Lee. 2009. 'Green' extraction of Pectin from Citron(Citrus junos) Pomace. 한국식생활학회.

Jongbin Lim, Bockki Min, Sanghoon Ko and Suyong Lee. 2010. Green Processing for Extracting Pectins from Citron (Citrus junos) Pomace through Combined Physical and Enzymatic Treatments. 한국산업식품공학회.

정준호, 이수용, 고상훈, 이광근, 김봉준. 2009. 건조조건 및 추출용매에 따른 유자 oleoresin의 특성 연구. 한국식품과학회.

정준호, 최경옥, 이수용, 고상훈. 2010. 유자 영양젤리의 제조 및 이화학적 특성. 한국산업식품공학회.

4. 특허 성과

‘감귤류 세척장치’ 출원번호 10-2010-0088411

‘감귤류 세척방법’ 출원번호 10-2010-0068422

‘유자 유래 펙틴을 포함하는 팽창 보조제, 이를 포함하는 반죽물 및 이로부터 제조되는 빵’ 출원번호 10-2011-0123683

‘유자 부산물을 이용한 화장료 개발’(특허출원예정)

제 2 절 연구개발 결과 활용 계획

- 『농약독성 및 잔류평가 기술 개발 및 운용』 연구를 통하여 전라남도 고흥군에서 생산된 수출용 및 시중에 유통되는 유자를 대상으로 동시 다성분 분석 가능 농약 231종 및 deltamethrin, phosalone, prothiofos 등 234종의 농약을 대상으로 농약의 잔류실태를 조사고, 이를 통하여 축적된 자료를 토대로 재배자의 농약 적정사용을 유도하여 안전한 친환경 유자가 유통될 수 있도록 하며, 안전성 평가자료 및 농약 잔류기준 설정 시, 기초 자료로 활용함으로써 내수용 유자의 잔류농약에 대한 안전성을 확보할 뿐 아니라 선진국의 생산이력제에 대응하는 수출용 유자의 안전성 확보에도 기여할 것으로 기대된다.
- HACCP 시스템을 구축하기 어려운 소규모 유자차 회사의 HACCP 품질경영메뉴얼을 제공할 수 있게 되어 소규모 업체에서도 HACCP 시스템을 적용할 수 있는 자료로 활용될 것이다. 또한 HACCP 관리기준서와 일반위생관리 절차서, 위생관리 기준, HACCP평가표, 내부품질 감사 점검표등 각종 양식들을 업체에 제공하여 현장에서 활용 수 있도록 할 것이다.
- 유자에 적용 가능한 식용 코팅제 선발과 저장 중 유자의 호흡률을 통한 kinetics 모델 개발 및 저장 수명과 품질 예측이 가능해졌으며 포장의 상자 조건 확립과 적재 위치 온도의 simulation에 따른 적재 조건 표준화 실현을 하였다. 또한 실제 산업현장에서 유용하게 쓰일 수 있도록 유자차 제조공정의 HACCP plan 완성하였다.
- 다기능성 화장품 시제품에서 향후 유자 과피의 섬유질 성분과 유자부산물의 지질분해효능 그리고 항산화 효능을 묶어서 beauty food를 개발하여 사업화 및 실용화를 위한 기초효능 및 일부 인체효능 결과는 충분하게 확보되어 있다. 다만 궁극적인 산업화를 위해 기술이전을 통한 사업화 대상기업을 확보하는 것이 관건으로 생각됨. 우선적으로는 참여기업인 (주)코스맥스를 통한 산업화를 추진할 수 있을 것이며 상황에 따라서는 고흥군 소재의 새로운 기업이 전담하여 향토산업으로 발전시키는 것도 가능성 있는 추진전략으로 생각된다.
- 살균력이 우수하고 유효염소 화합물 함량을 최소화할 수 있는 살균소독수 제조시스템(이산화염소수 및 전기분해수 제조)을 개발하고, 기존의 실험실 수준에서 일부 시도되었던 탈염 및 충전수로서의 전기분해수 적용시험과는 달리 절임류의 탈염수와 충전수로서 살균소독장치 생성 염소계 biocide(이

산화염소수 및 전기분해수 제조)를 활용하여 화학적 합성품의 사용을 대체하면서 효과적으로 미생물의 증식을 억제하고 제품의 품질수명을 보장할 수 있는 종합적 실용화 적용기술과 위생적 공정 개발을 위한 원료의 전처리와 2차적 오염방지를 위한 설비관리, 작업장 관리 등에 활용할 수 있는 살균소독장치 생성 이산화염소수 활용기술을 개발하였다.

연구수행 결과, 예상 활용분야는 다음과 같다.

- 국내 고추 등 조미채소류 수확 산지, 집하장의 전처리 시설 및 유통센터
 - 저온유통 시스템 설계 및 제작업체
 - 기타 농산물 저온저장고, 물류센터, 포장센터의 저온작업장, 저온매장, 냉장 판매시설 등
 - 신선 농산물의 단체급식 시스템 구축에의 활용 : 단체급식 시설의 실정에 적합한 HACCP 관리체제 적용 수단으로 직접 활용할 수 있는 미생물학적 품질관리 지침서 및 기초자료
 - 신선 농산물 및 비열식품의 안전성 제고를 위한 위해 저감기술 활용에 대한 홍보, 교육훈련 및 시범 운영을 통한 대국민 홍보 자료로 활용
 - 개발기술의 기술이전 희망업체에 대한 기술지도 : 학교 등 단체급식업체 및 식품가공기계 제작업체 등 관련기술 적용 가능업체
- 이와 같이 초기 품질유지 방법의 개발과 고품질의 신선식품을 일정기간 유지시킬 수 있는 살균소독 전처리 기술이 개발되면 국내 식품가공업체에 본 기술을 적극 활용할 수 있을 뿐만아니라 농민 및 생산자단체를 대상으로 농수축산물 장기저장 기술지도 및 공장운영 시에 적극 활용토록 할 수 있어 절임식품의 품질과 안전성 확보를 위한 새로운 응용기술로 활용할 수 있으며, 그 외에도 식품의 안전성 향상을 위한 방안에도 적극 활용할 수 있다.
- 본 기술의 활용을 위해 절임류 제조업체뿐만 아니라 이산화염소수 및 전기분해수 제작업체 등에서 큰 관심을 보이고 있어 기술 이전할 계획이며, 아울러 관련기술의 적극적인 해외 홍보를 위해 국내외 전문 학술지 게재 및 특허 출원 등을 준비 중이다. 그리고 매년 실시되는 농민, 생산자 단체 및 협회의 유통가공 기술교육의 정규과목으로 설정할 수 있도록 추진할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해 외 출 장 보 고 서

I. 출장개요

1. 출장목적

- IFT(Institute of Food Technologists) 학회 참석 및 자료 수집

2. 출장기간 : 2010.07.17 ~ 2010.07.20. 3박 5일

3. 출장지 : 미국, 시카고

4. 출장자

- 이광근(동국대학교 총괄책임자)

수집자료

- Richard Hiserodt, Union Beach NJ, Li Chen International Flavors & Frangrances InC., LC/MS/MS method for the analysis of furocoumarins in citrus oil using electrospray ionization: LC/MS/MS의 electrospray ionization를 이용한 감귤류와 같은 천연물질에 있는 분석 물질인 furocoumarins를 분석하는 방법

- Anna Hjelmeland Alyson E. Mitchell Susan E. Ebeler Viticulture and Enology, University of California, Davis Agricultural and environmental Chemistry Graduate Group, University of California, Analysis of trichloroanisole, tetrachloroanisole, pentachloroanisole and tribromoanisole in wines using solid phase microextractino and gas chromatography triple quadrupole MS: 각각의 분석물질 trichloroanisole, tetrachloroanisole, pentachloroanisole 와 tribromoanisole의 SPME GC-MS를 이용하여 분석하였고 보다 빠르고 감도를 높이도록 method를 세운 정량분석법

해외출장보고서

I. 출장개요

1. 출장목적

- '살균소독수(전기분해수 및 이산화염소수)를 활용한 유자의 통합형 세척/살균/물기제거 시스템 개발(GA0885)'과제와 관련하여 1,2년차에 도출된 연구결과에 대한 국제학술회 발표(1st International Congress on Food Technology)

2. 출장기간 : 2010.11. 01(월) ~ 2010.11.07(일), 4박7일

3. 출장지 : 터키, 안탈리아

4. 출장자

- 정진웅(식품산업지원본부 책임연구원)

II. 주요 활동 사항

1. 학술발표

- 국제학술대회 참석 및 포스터발표 : 1st International Congress on Food Technology (THE EFFECT OF METHYL JASMONATE ON PHENOLIC PROFILES AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF BUCKWHEAT SPROUT)
- 학술회의 참석(프로그램)

1st International Congress on Food Technology
01-07 November 2010 Antalya, TURKEY

TUESDAY, NOVEMBER 02
Registration : 13⁰⁰ - 18⁰⁰
Welcome Cocktail 19⁰⁰ - 21⁰⁰

WEDNESDAY, NOVEMBER 03
Registration : 08⁰⁰ - 09⁰⁰

Opening Session : 09⁰⁰ - 10⁰⁰
-Prof. A. Kadri HALILMAN, Head of the Association of Food Technology, Turkey
-Prof. İsmail KURTÇEPNE, Rector of Akdeniz University, Turkey
-Prof. Walter SPRENG, IUFoST Representative
-Behar MEZELIC, Federation of Food and Drink Industry Associations of Turkey
-Mehmet ERER, Minister of Agriculture and Rural Affairs, Turkey (In the Event of His Honoring)
Opening Concert, Habab & Vistan

Coffee Break : 10⁰⁰ - 11⁰⁰

Technical Session 1A – 11:00 to 12:30
Functional and traditional foods, Nutrition and health
Chair:
-Prof. Mutluhan Cengel, Akdeniz University, Turkey
-Prof. Attila KISS, East-Hungary Károlyi University, Hungary
-Prof. Eugenia BEZIRTOĞLU (Invited Speaker), Democritus University of Thrace, Greece
-Prof. and the intestinal microflora over time and space
-Bang Yalabik, Atılım University, Turkey
-The use of orange fiber in snack production
-Prof. Vijay JAYASENA, Curtin University of Technology, Australia
-Lactin incorporated novel healthy foods as a solution to obesity and malnutrition
-Özlem BAYRUL, Düzce Tıp Fakültesi, Turkey
-Functional foods & health benefits

Technical Session 1B – 11:00 to 12:30
Food chemistry, Biochemistry and Physics
Chair:
-Prof. Muel SALASAN, Alaska University, USA
-Prof. Sonthawat BENJAKUL, Prince of Songkla University, Thailand

Technical Session 1C : 14⁰⁰ - 15⁰⁰
Food microbiology and biotechnology
Chair:
-Prof. Alberto MAS, Rovira i Virgili University, Spain
-Prof. Eugenia BEZIRTOĞLU, Democritus University of Thrace, Greece
-Prof. Fabian BELMER (Invited Speaker), Wageningen University, Netherlands
-How to prevent foodborne disease
-Prof. Elise HEPPENRAN, Istanbul Technical University, Turkey
-Characteristics of fungal flora after harvesting and their effects of mycotoxin contamination in dried figs (The Mucil Glycans)
-Dr. Serap KARADAYI, Ege University, Turkey
-Antimicrobial effect of ester pomegranate extract on "KISIR", A traditional appetizer
-Dr. Abd. İSÇİ, Ankara University, Turkey
-Biocontrol production potential of Turkey as an alternative fuel from agricultural residues: A review

Technical Session 1Da : 14⁰⁰ - 15⁰⁰
Regulations
Chair:
-Prof. Ferihsun ÖZDEMİR, Akdeniz University, Turkey
-Prof. Vijay JAYASENA, Curtin University of Technology, Australia
-Güler ÇELTEK, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Turkey
-Food safety in Turkey in the process of negotiations with the EU
-Dr. İsmail MEYİT, Consultant, Federation of Food and Drink Industry Associations of Turkey
-Turkish Food Regulations

Technical Session 1Db : 15⁰⁰ - 16⁰⁰
Milliard and Nanotechnology Group
Chair:
-Prof. Monika HESCHTERRHEIDER, University of Erlangen, Germany
-Prof. Yusuf GÖKMEZ, Hacettepe University, Turkey
-Dr. Richard H. STADLER, Nestlé Research Center, Switzerland
-Process-induced food contaminants: Progress in mitigation and challenges ahead
-Dr. Francisco J. MORALES, Spanish National Research Council (CSIC), Spain
-An update on Metabolite Research

Lunch Break : 12⁰⁰ - 13⁰⁰
Poster Session 01: 13⁰⁰ - 14⁰⁰
Coffee Break : 15⁰⁰ - 16⁰⁰

Prof. Hans PARLARI (Invited Speaker), Technical University Munich, Germany
-Isolation of bioactive compounds from useful food and pharmaceutical matrices using heaving selective bubble separation (TABS)
Prof. Jannah BAKAR, Putra Malaysia University, Malaysia
-The rheological and gelling behavior of Tiganu serice with added sago starch
Assoc. Prof. Abdulkadir Adem MAMUKO, Sudan University of Science & Technology, Sudan
-Preparation and characterization of gelatine from two Sudanese edible insects
Asst. Prof. Halil SAHİN, Akdeniz University, Turkey
-Techniques for detection of food aroma compounds

**Technical Session 1E : 16¹⁵ - 17⁴⁵
Food microbiology and biotechnology**

Chair:
Prof. Egehan BEUMER, Wageningen University, Netherlands
Prof. Dilek IŞERHAN, İstanbul Technical University, Turkey
Assoc. Prof. Bircan MERCANÖĞÜLÜ TABAN, Gazi University, Turkey
Ceylan GÖRÜL, Yeditepe University, Turkey
Evaluation of PCR and real time PCR methods for rapid detection of foodborne pathogens
Prof. Ebru BAYRAK, Selçuk University, Turkey
*Elimination of *Escherichia coli* in milk by plasma corona discharge technology*
Dr. B. YAMAL, Selçuk University, Turkey
Qualitative detection of genetically modified organisms in foods by real time PCR
Selin KALCAN, Gökmen University, Turkey
*Qualitative detection of genetically modified *Escherichia coli* by bacteriophage*

**Technical Session 1F : 16¹⁵ - 17⁴⁵
Mallard and Nanotechnology Group**

Chair:
Dr. Richard H. STADLER, Nestlé Research Center, Switzerland
Dr. Francisco J. MORALES, Spanish National Research Council (CSIC), Spain
Prof. Monika FISCHER-TSCHEDER, University of Erlangen, Germany
Chemistry and analysis of sugar degradation reactions
Prof. Eyal SHIMONI, Israel Institute of Technology, Israel
From molecular complexes to continuous nanostructuring of microcapsule encapsulated nutrients
Prof. Vincenzo FOSLANDO, University of Naples, Italy
Strategy for new functional products using encapsulation technology
Prof. Vural GÖMÖR, Hacettepe University, Turkey
Effects of nanocapsulated ingredients on food quality

Poster Session 02 : 17¹⁵ - 18³⁰

THURSDAY, NOVEMBER 04

**Technical Session 2A : 09⁰⁰ - 10³⁰
Food legislation**

Chair:
Prof. Aziz EKŞİ, Ankara University, Turkey
Dr. Carmen DIAZ-AMIGO, Eurofins Scientific Group, Germany
Prof. Mehmet ATAMAN (Invited Speaker), UCTEA Chamber of Food Engineers, Turkey
Food legislation approach in Turkey
Nergis ÖZBAC, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Turkey
The integration of Turkey to EFSA activities
Dr. Bert POPPINO, Eurofins Scientific Group, UK
Alergen thresholds in legislation - Is it making the food safer?
Dr. Hasan ALKAN, Gammia Pak, Turkey
Food irradiation technology, legislation and application in Turkey

**Technical Session 2E : 14¹⁵ - 15⁴⁵
Fruits and vegetable science and technology**

Chair:
Prof. Rusayy ABDUL FAHAMAN, Putra Malaysia University, Malaysia
Prof. Sedat VELİGÖLLÜ, Ankara University, Turkey
Prof. Murat BALABAN (Invited Speaker), Alaska University, USA
Dense protein-coated soybean flour emulsion powder for enhanced therapeutic benefits
Dr. Jorge E. LOZANO, Plapalá (Univ-Concordia), Argentina
Respiration rate of red delicious apples under aerobic conditions: Influence of storage temperature
Dr. Cem BALIÇIOĞLU, Middle East Technical University, Turkey
Use of potassium acetate as a preservative substitute in chive products
Mustafa ASIPARUK, MEYED, Turkey
Fruit Juice Turkey

**Technical Session 2F : 14¹⁵ - 15⁴⁵
Dairy science and technology**

Chair:
Prof. Celalattin KOÇAK, Ankara University, Turkey
Prof. Georgea MARIA, University Polytechnic of Bucharest, Romania
Dr. Zeynep USUNOL (Invited Speaker), Michigan State University, USA
Yogurt fortification with predigested, germinated whole soybean powder for enhanced therapeutic benefits
Prof. Mehmet MAYYEK, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Austria
Characterization of ECQ milk - valuable dairy product or milk with excessive food load?
Mariam ALMARDANOV, Alimaly Technological University, Kazakhstan
Manufacturing of Kazakh national dairy products
Süley ÖZCAN, BE TEBİ, Turkey
World and Turkish dairy industry: Today and future prospects

Coffee Break : 15¹⁵ - 16³⁰

**Technical Session 2G : 16¹⁵ - 17⁴⁵
Meat science and technology**

Chair:
Prof. Mikereem KAYA, Attilak University, Turkey
Prof. Serap ŞAHİN, METU, Turkey
Prof. Friedrich-Karl LÖCKE (Invited Speaker), University of Applied Sciences, Germany
Meat microbiology and the consumer - Recent developments
Ebru BAYRAK, Selçuk University, Turkey
Use of natural antioxidants in meat products
Prof. Mettem ŞERDARÖĞÜLÜ, Ege University, Turkey
Strategies of improved Redhead pig products
Melak US, National Red Meat Council, Turkey
Turkey and world meat outlook: Current situation and prospects

**Technical Session 2H : 16¹⁵ - 17⁴⁵
Lipid science and technology**

Chair:
Prof. Aziz TEKİN, Ankara University, Turkey
Dr. Assan OSPANOV, Almaty Technological University, Kazakhstan

**Technical Session 2B : 09⁰⁰ - 10³⁰
Food ingredients and additives**

Chair:
Prof. Arzu KARALI, Yeditepe University, Turkey
Prof. Suhaila MOHAMED, Putra Malaysia University, Malaysia
Prof. İbrahim YILDIR (Invited Speaker), Hacettepe University, Turkey
Food safety aspects of food colours
Prof. Nedra ABBAH HOSSEY, National Research Center, Egypt
Physicochemical, sensory and functional properties of wheat-foam fruit flour composite cakes
Meryem GÖRSEL, Erciyes University, Turkey
Production of bioactive fiber from orange albedo and using in mayonnaise as model food
Cem KOVULGÖLÜ DİM, Turkey
How can we "Health" you?

Coffee Break : 10³⁰ - 11⁰⁰

**Technical Session 2C : 11⁰⁰ - 12³⁰
Cereal science and technology**

Chair:
Prof. Faruk H. BOYACI, Hacettepe University, Turkey
Dr. Kristina KURJUKOVA, VIFP Food Research Institute, Slovak Republic
Prof. Stanley CALVAIRI (Invited Speaker), Stako Team, UK
Applications of pulsed technology for delecting health benefits
Saba KURJUKOVA, University of Helsinki, Finland
Effects of process parameters and addition of fenugreek's apical grain on the properties of barley-based extrudates
Dr. Kazuo FUJITA, National Food Research Institute, Japan
Control of the degree of fusarium mycotoxin in wheat using oxidation - emission matrix
Ali KAVHİN, URSC, Turkey
Towards a better-matched Turkey

**Technical Session 2D : 11⁰⁰ - 12³⁰
Food packaging technologies and storage**

Chair:
Prof. Tamer BAYRAL, Ege University, Turkey
Assoc. Prof. Abolghasem GHOMREH, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Iran
Assoc. Prof. Zehra AYHAN (Invited Speaker), Mustafa Kemal University, Turkey
Potential applications of nanotechnology in food packaging
Armin MOJIBAVI K., Islamic Azad University, Iran
Study on effect of salt, nitrate and storage conditions on fatty acids profile and some quality indexes of codium sea in Iran
Özgen ÜREERK, A.Ö.D., Packaging Manufacturers Association, Turkey
New trends in packaging industry
Tuba ALİM, TetraPak, Turkey
Aseptic Packaging

**Lunch Break : 12³⁰ - 13³⁰
Poster Session 03 : 13³⁰ - 14¹⁵**

Prof. Heinz-Dieter ISENGARD (Invited Speaker), University of Hohenheim, Germany
Control of the degradation of frying fats during usage
Dr. Karamollah BEZAI, Tehran University, Iran
Parameters affecting the enzyme-assisted extraction of vegetable oil
Dr. Kerem KETENÖĞÜLÜ, Ankara University, Turkey
Usage of edible nano fibers in food emulsions
Metin YILDIZGÖR, MÖMSAD, Turkey
Turkish magazine industry: From past to present

**Poster Session 04 : 17⁴⁵ - 18³⁰
Get-together Reception & Gala Dinner 19⁰⁰ - 20³⁰**

FRIDAY, NOVEMBER 05

**Technical Session 3A : 09⁰⁰ - 10³⁰
Food engineering**

Chair:
Prof. Spassanija MILANOVIC, Novi Sad University, Serbia
Prof. Junichi SUGIYAMA, National Food Research Institute, Japan
Dr. Ceylan VATAI (Invited Speaker), Corvinus University of Budapest, Hungary
Concentration of aroma and vitamin rich fruit juices by complex membrane technology
Prof. Hao FENG (Invited Speaker), University of Illinois at Urbana, USA
Ultrasound technology in food processing and preservation
Assoc. Prof. Dr. Cülgün Y. TIRYAKI, Kafkasmarasag Sığircı İnan University, Turkey
Potential applications of HES-SPME/GC in oxidized vegetable oils
Dr. Malaine MCHAMED, University Ibn Zohr, Morocco
Detection of accidental fish deboning using non-destructive ultrasonic technique

**Technical Session 3B : 09⁰⁰ - 10³⁰
Food safety**

Chair:
Prof. Sagarika ERANAYAKE, University of Sri Jayawardenapura, Sri Lanka
Dr. Elżbieta Chruszak WALCZAK, Institute of Fermentation Technology & Microbiology, Poland
Dr. Vijay JUREJA (Invited Speaker), USDA-ARS, USA
Food safety issues/challenges in the 21st century and the application of predictive microbiology
Dr. Aps MĒNARĒ, Food Safety, Animal Health and Environmental Scientific Institute, Latvia
Implementation of food safety legislation in catering establishments in Latvia
Dr. Carmen DIAZ-AMIGO, Eurofins Scientific Group, Germany
New gluten labeling - How safe are celiac sufferers?
Dr. Süley İSKANDARİ, Food & Drug Laboratory and Research Center, Iran
International trade and food safety of hormone residues in foodstuffs

Coffee Break : 10³⁰ - 11⁰⁰

**Poster Session 05 : 11⁰⁰ - 11⁴⁵
Best Poster Announcement & Closing Session : 11⁴⁵ - 12³⁰**

○ **접촉인물 : 1th International Congress on Food Technology Scientific Program** 관련 식품연구자 다수

2. 수집자료목록 (총 10점)

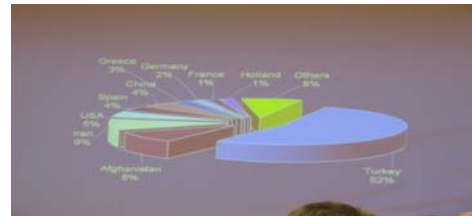
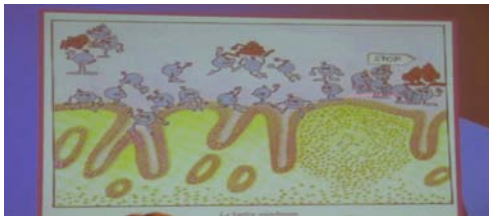
○ Program & abstract, 1th International Congress on Food Technology 2010 Antalya/Turkey 등

○ Technical session 및 Forum

Technical session은 A~G로 구분 되며 영양·기능성식품의 개발에서부터 식품화학, 식품 미생물, 나노기술, 식품첨가물, 식량과학, 식품포장 및 저장, 신선과채류 유통기술, 유제품 과학기술, 지질과학, 식품안전성 등에 대한 다양한 연구결과 및 업체들의 정보를 접할 수 있었음을 보고함



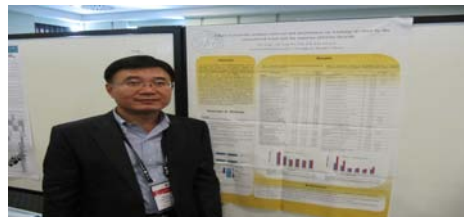
- 이번 학회 forum의 주요 주제중 하나인 식품포장의 기술동향과 관련하여 나노기술의 접목을 통해 보다 안전하고 높은 품질의 제품 유지기술에 대한 주제발표가 있었으며, 이러한 기술을 접목한 주스 및 신선채소류에 대한 다양한 정보를 제공하였음. 현행 국내의 포장 연구진행 방향과 유사한 흐름을 가지고 있으며, 타 연구영역의 공유를 통해 다양한 활용성을 증대 시키고 있음을 보고함



- technical session 중 비과과 살균(방사선조사)에 대하여 1999년에 법적인 마련을 통하여 방사선 조사가 터키에서 상업적으로 진행되고 있으며, 처리 품목을 7 group으로 구분하여 최적조건 하에서 이를 진행하도록 하고 있음을 보고함. 터키에서 방사선조사 물량은 5년 평균 3,576톤/1년 정도이며 매년 증가하는 경향을 나타내고 있으며, 향신료 및 건조제품에 대한 조사 역할이 강조되고 있음을 보고함.



- 그 외, Danone의 건강기능식품에 대한 연구 방향과 제품화에 대한 시각에 대한 보고와 인체의 미생물오염에 대한 환경 및 식품적 측면에서의 다양한 실험 결과에 대한 논의 등 다양한 시각에서의 식품기술 및 평가에 대한 기술적 관점이 있음을 보고함



첨부. 발표내용

P467 [4일(P.M. 13:30 ~ 14:15)]

Effect of pesticide residues removal and sterilization on washing of citrus by the electrolyzed water and the aqueous chlorine dioxide

J.W. Jeong*, J.M. Sung, K.J. Park, B.K. Kim, J.H. Lim
Korea Food Research Institute, 516, Bakhyun-dong, Seongnam-city,
Kyunggi-do, Korea, E-mail: jwjeong@kfri.re.kr

◆ Abstract

To solve the problem of the chemical disinfectant which is indiscreetly used during the food material washing, the electrolyzed water(EW) and aqueous chlorine dioxide(ACD) that produced by sanitizing equipment in which the sterilizing power was excellent and it minimized the available chlorine content were produced. The sterilization efficacy toward the microorganism of 42 kinds including the *Aspergillus flavus* KFRI 855, and etc. was evaluated. The EW and ACD were shown effective sterilization treatments of more than 99.999% against a bacteria and a mold and yeast. We could confirm that the surface microorganism of the orange in which it soaks and treats during 1 minute with the slightly EW(pH 6.5) of HClO content 30 ppm reduced less than 101 CFU/g. Degradation of the 6 pesticides including chlorpyrifos by EW and ACD in yuza were investigated in order to establish the effect of washing parameters. The removal ratio of pesticide residue according to the washing were the EW and ACD showed an effect more than 2~3 times in comparison with the tap water processing(25.47~31.87% level removal), and the removal ratio was exposed to be the some extend difference according to the chemical characteristic of pesticide and different washing parameters.

◆ Materials and Methods

- Yuza (*Citrus junos* Sieb. Ex Tanaka) : Harvest in Goheung on November, 2009
- Microorganism : 42 different kinds(*Aspergillus flavus* and etc.)
- Pesticide : 6 different kinds(Chlorpyrifos and etc.)
- Washing solutions
 - Strong acidic electrolyzed water(pH 2.75, ORP 1057 mV, HClO 88.63 ppm)
 - Law alkaline electrolyzed water(pH 8.86, ORP 721 mV, HClO 89.40 ppm)
 - Law acidic electrolyzed water(pH 6.55, ORP 827 mV, HClO 26.94 ppm)
 - Aqueous chlorine dioxide(pH 3.11, ClO₂ 30.00 ppm)
- Pesticide residue analysis : GC and HPLC
- Microbial analysis

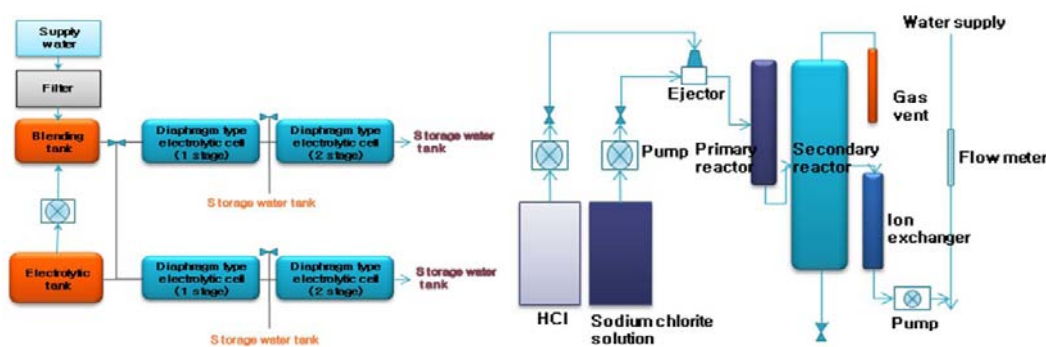


Fig. 1. Scheme diagram of electrolyzed-water and aqueous chlorine dioxide generator used in this experiment

◆ Results

Table 1. Disinfection efficacy of low acidic electrolyzed water on various food microorganism

Microorganism	N^1	Na^2	Disinfection efficacy(%)
□ Bacteria			
<i>Aeromonas hydrophila</i> IFO 3820	3.5×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Bacillus cereus</i> KCCM 41293	2.6×10^8	1.5×10^1	>99.999
<i>Bacillus cereus</i> KFRI 183	2.8×10^8	3.5×10^1	>99.999
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	5.2×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Bacillus subtilis</i> KFRI 183	3.9×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus casseliflavus</i> KCTC 3638	2.5×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> KCTC 3643	2.1×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus mundtii</i> KCTC 3630	1.9×10^8	2.8×10^2	>99.999
<i>Enterococcus hirae</i> KCTC 3616	2.5×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3511	2.8×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus durans</i> KCTC 3121	4.1×10^8	8.9×10^1	>99.999
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	4.7×10^8	7.4×10^1	>99.999
<i>Escherichia coli</i> KFRI 00174	1.5×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KCCM 11391	3.6×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KCCM 41285	3.9×10^8	9.1×10^2	>99.999
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KCTC 1726	1.7×10^8	8.2×10^2	>99.999
<i>Listeria grayi</i> KCTC 3581	1.0×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria innocua</i> KCTC 3586	5.1×10^8	2.3×10^2	>99.999
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> KCTC 3444	1.8×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria monocytogenes</i> KFRI 799	4.1×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria seeligeri</i> KCTC 3591	2.1×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria welshimeri</i> KCTC 3587	3.8×10^8	1.7×10^3	>99.999
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KCTC 3733	5.2×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Micrococcus luteus</i> KFRI 455	8.6×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999

<i>Proteus vulgaris</i> KFRI 00249	1.1×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria welshimeri</i> KCTC 3587	7.1×10^8	3.8×10^3	>99.999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KFRI 190	5.2×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KFRI 194	2.4×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 6538	8.9×10^8	3.7×10^1	>99.999
<i>Salmonella typhimurium</i> KFRI 251	1.4×10^8	8.0×10^1	>99.999
Fungi			
<i>Aspergillus flavus</i> KFRI 855	1.2×10^8	3.8×10^4	99.996
<i>Aspergillus niger</i> KFRI 993	2.8×10^8	2.1×10^2	>99.999
<i>Clostridium perfringens</i> KFRI 00752	2.2×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Mucor rouxii</i> KFRI 780	5.9×10^8	1.1×10^3	>99.999
<i>Penicillium citrinum</i> KCTC 3733	6.4×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
Yeast			
<i>Candida utilis</i> KFRI 556	8.0×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Candida albicans</i> KFRI 432	4.7×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Pichia polymorpha</i> KFRI 00917	1.8×10^8	8.3×10^2	>99.999
<i>Rhizopus oryzae</i> KFRI 1007	2.6×10^8	$<1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KFRI 1014	6.0×10^8	3.0×10^2	>99.999
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> KFRI 00214	2.6×10^8	4.6×10^2	>99.999

¹ Number of CFU/mL of the bacterial test suspension

² Number of CFU/mL in the test mixture

Table 1. Evaluation results of sterilization activity of aqueous chlorine dioxide on some bacteria, fungi and yeasts in dirty condition

Microorganism(Strain No.)	ClO ₂ (ppm)			
		10	20	30
<i>Aspergillus flavus</i> (KFRI 855)	N ¹⁾	2.8×10 ⁶	2.8×10 ⁶	2.8×10 ⁶
	N _a ²⁾	1.1×10 ³	1.8×10 ¹	ND ³⁾
<i>Aspergillus niger</i> (KFRI 993)	N	4.4×10 ⁷	4.4×10 ⁷	
	N _a	5.3×10 ²	ND	
<i>Aspergillus niger</i> (KFRI 466)	N	6.4×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Bacillus subtilis</i> (KFRI 183)	N	3.6×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Bacillus cereus</i> (KCCM 41293)	N	4.2×10 ⁷	4.2×10 ⁷	
	N _a	5.2×10 ¹	ND	
<i>Bacillus cereus</i> (KFRI 183)	N	7.9×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Candida utilis</i> (KFRI 556)	N	4.3×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Candida albicans</i> (KFRI 432)	N	3.8×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	N	4.1×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (KCTC 3638)	N	6.0×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> (KCTC 3643)	N	5.1×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Enterococcus mundtii</i> (KCTC 3630)	N	3.3×10 ⁶	3.3×10 ⁶	
	N _a	1.0×10 ¹	ND	
<i>Enterococcus hirae</i> (KCTC 3616)	N	3.3×10 ⁷	3.3×10 ⁷	
	N _a	1.0×10 ¹	ND	
<i>Enterococcus faecalis</i> (KCTC 3511)	N	1.5×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Enterococcus durans</i> (KCTC 3121)	N	8.1×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (KCCM 11391)	N	1.2×10 ⁷	1.2×10 ⁷	
	N _a	2.7×10 ¹	ND	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (KCCM 41285)	N	5.5×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Listeria monocytogenes</i> (KFRI 799)	N	8.6×10 ⁶		
	N _a	ND		
<i>Listeria welshimeri</i> (KCTC 3587)	N	2.3×10 ⁶	2.3×10 ⁶	
	N _a	5.8×10 ¹	ND	
<i>Listeria seeligeri</i> (KCTC 3591)	N	9.3×10 ⁶	9.3×10 ⁶	
	N _a	1.0×10 ¹	ND	
<i>Listeria grayi</i> (KCTC 3581)	N	4.3×10 ⁶	4.3×10 ⁶	
	N _a	1.6×10 ¹	ND	
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> (KCTC 3444)	N	7.9×10 ⁶	7.9×10 ⁶	
	N _a	2.7×10 ¹	ND	
<i>Listeria innocua</i> (KCTC 3586)	N	8.3×10 ⁶	8.3×10 ⁶	
	N _a	5.9×10 ¹	ND	

<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (KCTC 3733)	<i>N</i>	7.2×10^6	7.2×10^6
	<i>N_a</i>	1.8×10^1	ND
<i>Lactobacillus brevis</i> (KFRI 466)	<i>N</i>	3.8×10^6	3.8×10^6
	<i>N_a</i>	1.0×10^1	ND
<i>Micrococcus luteus</i> (KFRI 455)	<i>N</i>	1.1×10^7	
	<i>N_a</i>	ND	
<i>Mucor rouxii</i> (KFRI 780)	<i>N</i>	1.3×10^6	
	<i>N_a</i>	ND	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KFRI 190)	<i>N</i>	3.8×10^6	
	<i>N_a</i>	ND	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (KFRI 194)	<i>N</i>	2.4×10^6	
	<i>N_a</i>	ND	
<i>Penicillium citrinum</i> (KCTC 3733)	<i>N</i>	2.5×10^6	
	<i>N_a</i>	ND	
<i>Rhizopus oryzae</i> (KFRI 1007)	<i>N</i>	5.2×10^6	
	<i>N_a</i>	ND	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC 6538)	<i>N</i>	7.0×10^7	7.0×10^7
	<i>N_a</i>	2.0×10^1	ND
<i>Salmonella typhimurium</i> (KFRI 251)	<i>N</i>	3.6×10^6	3.6×10^6
	<i>N_a</i>	1.6×10^1	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KFRI 1014)	<i>N</i>	3.0×10^6	
	<i>N_a</i>	ND	

¹⁾ Number of cfu/mL of the bacterial test suspension

²⁾ Number of cfu/mL in the test mixture

³⁾ ND : $<10^1$ CFU/mL

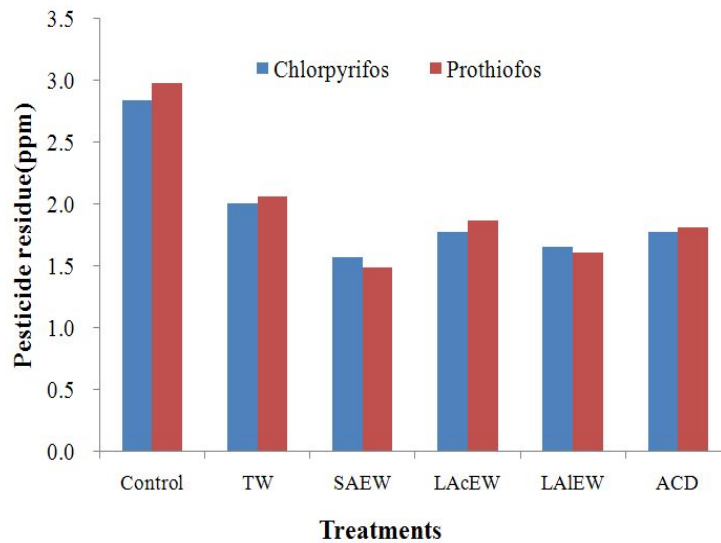


Fig. 2. Remaining contents of chlorpyrifos and prothiofos by different washing solution in yuza.

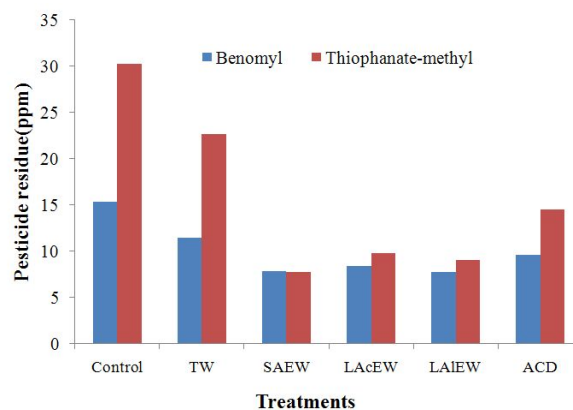


Fig. 3. Remaining contents of benomyl and thiophanate-methyl by different washing solution in yuza.

TW: Tap water; SAEW: strong acidic electrolyzed water; LAIEW: Low alkaline electrolyzed water; LAcEW: Low acidic electrolyzed water; ACD: Aqueous chlorine dioxide.

◆ References

1. Choi, H. S., H. S. Song, H. Ukeda, M. Sawamura. 2000. Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components : detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agriculture Food Chemistry* 48:4156-4161.
2. Choi, S. Y., M. A. Cho, Y. P. Hong. 2008. Effects of washing treatments with different components on removal of pesticide residues and microorganisms in 'Fuji' apple. *Korean J. Horticultural Science and Technology* 26:205-257. (In

Korean)

3. Han, K. T., H. J. Park, K. S. Lee, I. J. Kim, S. M. Cho. 2002. Pesticide residue survey and risk assessment of fruits in Deajeon, Korean J. Environmental agriculture 21:279-285. (In Korean)



Effect of pesticide residues removal and sterilization on washing of citrus by the electrolyzed water and the aqueous chlorine dioxide

J.W. Jeong*, J.M. Sung, K.J. Park, B.K. Kim, J.H. Lim

Korea Food Research Institute, Gyeonggi-do, Republic of Korea

Abstract

To solves the problem of the chemical disinfectant which is indiscreetly used during the food material washing, the electrolyzed water(EW) and aqueous chlorine dioxide(ACD) that produced by sanitizing equipment in which the sterilizing power was excellent and it minimized the available chlorine content were produced. The sterilization efficacy toward the microorganism of 42 kinds including the *Aspergillus flavus* KFRI 855, and etc. was evaluated. The EW and ACD were shown effective sterilization treatments of more than 99.999% against a bacteria and a mold and yeast. We could confirm that the surface microorganism of the orange in which it soaks and treats during 1 minute with the slightly EW(pH 6.5) of HClO content 30 ppm reduced less than 10^0 CFU/g. Degradation of the 6 pesticides including chlorpyrifos by EW and ACD in yuzu were investigate in order to establish the effect of washing parameters. The removal ratio of pesticide residue according to the washing were the EW and ACD showed an effect more than 2-3 times in comparison with the tap water processing(23.47-31.87% level removal), and the removal ratio was expected to be the some extend difference according to the chemical characteristic of pesticide and different washing parameters.

Materials & Methods

Materials

- Yuzu (*Citrus junos* Sieb. Ex Tanaka)
Harvest in Coheung on November, 2009
- Microorganism : 42 different kinds(*Aspergillus flavus* and etc.)
- Pesticide : 6 different kinds(Chlorpyrifos and etc.)

Washing solutions

- Strong acidic electrolyzed water(H 2.73, ORP 1037 mV, HClO 88.63 ppm)
- Low alkaline electrolyzed water(H 8.86, ORP 721 mV, HClO 89.40 ppm)
- Low acidic electrolyzed water(H 6.55, ORP 827 mV, HClO 26.94 ppm)
- Aqueous chlorine dioxide(pH 3.11, ClO₂ 10.00 ppm)

Methods

- Pesticide residue analysis : GC and HPLC
- Microbial analysis

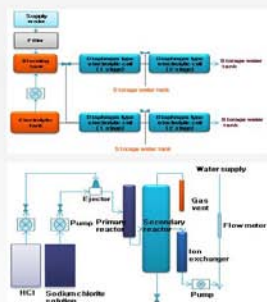


Fig. 1. Scheme diagram of electrolyzed-water and aqueous chlorine dioxide generator used in this experiment

Results

Table 1. Disinfection efficacy of low acidic electrolyzed water on various food microorganism

Microorganism	N ^a	N ^b	Disinfection efficacy (%)
Aspergillus			
<i>Aspergillus fumigatus</i> KFRI 3120	3.5×10^7	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Bacillus cereus</i> KCCM 41291	2.6×10^9	1.3×10^1	>99.999
<i>Bacillus cereus</i> KFRI 181	2.8×10^9	3.5×10^1	>99.999
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 12980	5.2×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Bacillus subtilis</i> KFRI 183	3.9×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus cerevisiae</i> KCTC 3838	2.5×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> KCTC 3849	2.1×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus mundii</i> KCTC 3658	1.9×10^9	2.3×10^1	>99.999
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3616	2.5×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3511	2.8×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Enterococcus alorum</i> KCTC 3121	4.1×10^9	8.9×10^1	>99.999
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10534	4.7×10^9	7.4×10^1	>99.999
<i>Escherichia coli</i> KFRI 00174	1.5×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Escherichia coli</i> serotype subsp. <i>paeninsulae</i> KCTC 41591	3.8×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Escherichia coli</i> serotype subsp. <i>paeninsulae</i> KCTC 41592	3.9×10^9	9.1×10^1	>99.999
<i>Escherichia coli</i> serotype subsp. <i>paeninsulae</i> KCTC 41593	1.7×10^9	8.2×10^1	>99.999
<i>Leuconostoc</i> KCTC 3581	1.0×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Leuconostoc</i> KCTC 3586	5.1×10^9	2.3×10^1	>99.999
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3444	1.8×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria monocytogenes</i> KFRI 799	4.1×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria seeligeri</i> KCTC 3591	2.1×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria weinmannii</i> KCTC 3587	3.8×10^9	1.7×10^1	>99.999
<i>Listonella</i> KCTC 3713	3.2×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Moraxella</i> KFRI 455	8.6×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Penicillium</i> KFRI 00249	1.1×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3587	7.1×10^9	3.8×10^1	>99.999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KFRI 190	5.2×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KFRI 194	2.4×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Streptococcus aureus</i> serotype <i>arnaei</i> ATCC 6538	8.9×10^9	3.7×10^1	>99.999
<i>Salmonella typhimurium</i> KFRI 251	1.4×10^9	8.9×10^1	>99.999
Yeast			
<i>Aspergillus niger</i> KFRI 893	2.8×10^9	2.1×10^1	>99.999
<i>Clostridium perfringens</i> KFRI 00732	2.2×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Mycobacterium</i> KFRI 780	5.9×10^9	1.3×10^1	>99.999
<i>Pseudomonas carolinensis</i> KCTC 3733	6.4×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
YMOI			
<i>Candida utilis</i> KFRI 256	8.0×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Candida albicans</i> KFRI 322	4.7×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Penicillium polyporum</i> KFRI 00917	1.8×10^9	8.3×10^1	>99.999
<i>Alternaria oryzae</i> KFRI 1007	2.6×10^9	$< 1.0 \times 10^1$	>99.999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KFRI 1014	6.0×10^9	3.0×10^1	>99.999
<i>Zygosaccharomyces rouzetii</i> KFRI 00214	2.6×10^9	4.8×10^1	>99.999

^a Number of CFU/mL of the bacterial test suspension
^b Number of CFU/mL in the test mixture

Table 2. Evaluation results of sterilization activity of aqueous chlorine dioxide on some bacteria, fungi and yeasts in dirty condition

Microorganism(Strain No.)	ClO ₂ (ppm)		
	10	20	30
<i>Aspergillus flavus</i> (KFRI 833)	N ^a 3.9×10^7	2.8×10^7	2.8×10^7
	N ^b 7	1.1×10^7	1.8×10^7 ND ^b
<i>Aspergillus niger</i> (KFRI 993)	N ^a 4.8×10^7	4.4×10^7	ND
	N ^b 23	3.3×10^7	ND
<i>Aspergillus niger</i> (KFRI 466)	N ^a 6.8×10^7	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Bacillus subtilis</i> (KCTC 183)	N ^a 3.6×10^8	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i> (KCCM 41293)	N ^a 4.2×10^7	4.2×10^7	ND
	N ^b 3.2×10^7	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i> (KFRI 183)	N ^a 1.9×10^8	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Candida utilis</i> (KFRI 156)	N ^a 4.3×10^7	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Candida utilis</i> (KFRI 432)	N ^a 1.8×10^7	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	N ^a 4.1×10^7	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (KCTC 3638)	N ^a 6.0×10^7	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> (KCTC 3643)	N ^a 3.1×10^7	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Enterococcus mundii</i> (KCTC 3620)	N ^a 3.3×10^7	3.3×10^7	ND
	N ^b 1.0×10^7	ND	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> (KCTC 3616)	N ^a 3.3×10^7	3.3×10^7	ND
	N ^b 1.0×10^7	ND	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> (KCTC 3511)	N ^a 1.5×10^7	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Enterococcus alorum</i> (KCTC 3121)	N ^a 8.1×10^7	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> serotype subsp. <i>paeninsulae</i> (KCTC 41591)	N ^a 1.2×10^7	1.2×10^7	ND
	N ^b 2.7×10^7	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> serotype subsp. <i>paeninsulae</i> (KCTC 41592)	N ^a 5.5×10^7	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> serotype subsp. <i>paeninsulae</i> (KCTC 41593)	N ^a 8.0×10^7	ND	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i> (KFRI 799)	N ^a 3.3×10^7	2.3×10^7	ND
	N ^b ND	ND	ND
<i>Listeria weinmannii</i> (KCTC 3587)	N ^a 1.8×10^7	9.3×10^6	ND
	N ^b 9.3×10^6	9.3×10^6	ND
<i>Listeria seeligeri</i> (KCTC 3591)	N ^a 1.0×10^7	ND	ND
	N ^b 1.0×10^7	ND	ND
<i>Listeria grayi</i> (KCTC 3581)	N ^a 4.3×10^7	4.3×10^7	ND
	N ^b 1.6×10^7	ND	ND

^a Number of cfu/mL of the bacterial test suspension
^b Number of cfu/mL in the test mixture
ND: not CFU/mL

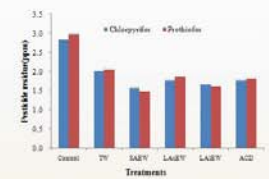


Fig. 2. Remaining content of chlorpyrifos and phthalides by different washing solutions in yuzu. TW: Tap water, SAEW: strong acidic electrolyzed water, LAEW: Low alkaline electrolyzed water, LAEW: Low acidic electrolyzed water, ACD: Aqueous chlorine dioxide.

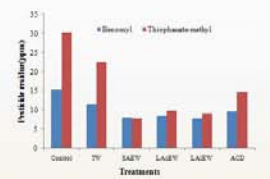


Fig. 3. Remaining content of benzoic acid and thiophan-methyl by different washing solutions in yuzu. TW: Tap water, SAEW: strong acidic electrolyzed water, LAEW: Low alkaline electrolyzed water, LAEW: Low acidic electrolyzed water, ACD: Aqueous chlorine dioxide.

References

- Choi, H. S., H. S. Song, H. Ukeida, M. Sawamura. 2000. Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components : detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. J. Agriculture Food Chemistry 48:4156-4161.
- Choi, S. Y., M. A. Cho, Y. P. Hong. 2008. Effects of washing treatments with different components on removal of pesticide residues and microorganisms in 'Fuji' apple. Korean J. Horticultural Science and Technology 26:205-257. (In Korean)
- Han, K. T., H. J. Park, K. S. Lee, I. J. Kim, S. M. Cho. 2002. Pesticide residue survey and risk assessment of fruits in Deajeon, Korean J. Environmental agriculture 21:279-285. (In Korean)

- CA(controlled atmosphere) 저장 조건에서 토마토의 가스 농도를 가지고 저장 시간 별 호흡률을 측정하여 enzyme kinetics 이론을 호흡률 모델로 적용한 바 있다(Yang CC; Chinnan MS (1988). Modelling the effect of O₂ and CO₂ on respiration and quality of stored tomatoes. Transactions of the ASAE, 30(3), 920 - 925).
- Enzyme kinetics 이론을 바탕으로 온도 의존성인 Arrhenius 식과의 관계도 호흡률 모델로 개발되었다(Hertog MLATM; Peppelenbos HW; Evelo RG; Tijskens LM (1998). A dynamic and generic model on the gas exchange of respiring produce: the effects of oxygen, carbon dioxide and temperature. Postharvest Biology and Technology, 14, 335 - 349).
- 그러나 모델 변수들의 특이성 때문에 이러한 변수들은 과일 종류별로 확인되고 정량화 될 필요성이 있다. 최근에 망고, 바나나, 사과에 호흡률 모델이 적용된 바 있다(Ravindra MR, Goswami TK (2008). Modelling the respiration rate of green mature mango under aerobic conditions. Biosystems engineering, 99:239-248; Bhande SD, Ravindra MR, Goswami Tk. 2008. Respiration rate of banana fruit under aerobic conditions at different storage temperatures. Journal of Food Engineering, 87:116-123; Mahajan, PV, Goswami, TK, 2001. Enzyme kinetics based modeling of respiration rate for apple. Journal of Agricultural Engineering Research 79:399 - 406).
- 유자는 전세계에서 아시아 지역 특이적으로 자생함으로써 우리나라를 비롯하여 일본, 중국 등지에서 많이 애용하고 있고, 연구 개발도 활발히 진행 중이다. 특히, 유자의 생리활성물질인 polyphenolic compound가 다량 함유되어 있다고 보고되어 있기 때문에 그 이용과 활용의 범위는 다양하다. 특히 일본에서 유자를 이용한 미용치료를 보면 피부 화장품 소재로서만 국한된 것에서 벗어나 헤어제품으로서 유자의 활용도를 높이고 있고, 유자의 essential oil로 aromatic 입욕제를 개발에 심신의 안정까지 피해 치료의 목적으로 개발 범위를 넓혀나가고 있고 있다. 이를 보아 우리나라 고품산 유자의 기능성 화장품 개발의 필요성과 치료적 목적의 가능성을 제시하여준다. Aromatic compound in gel form of clear oil type (국제특허분류 : A61L9/01), Bathing agent for spraying (국제특허분류 : A61K7/50), Clearing agent for hair (국제특허분류 : A61K7/075, C11D3/382).

제 7 장 참고문헌

1. D. Phan The, F. Debeaufort, D. Luu, A. Voilley, Moisture barrier, wetting and mechanical properties of shellac/agar or shellac/cassava starch bilayer bio-membrane for food applications. *Journal of Membrane Science* 325: 277 - 283 (2008)
2. Hiro Ueno, Masahiro Tanaka, Munehiro Hosino, Mitsuru Sasaki, Motonobu Goto,
Extraction of valuable compounds from the flavedo of Citrus junos using subcritical water. *Separation and Purification Technology* 62: 513 - 516 (2008)
3. Hisashi Kato-Noguchi, Yukitoshi Tanaka, Allelopathic potential of Citrus junos fruit waste from food processing industry. *Bioresource Technology* 94: 211 - 214 (2004)
4. Hee-Sun SONG, Hiroyuki UKEDA and Masayoshi SAWAMURA, Antioxidative Activities of Citrus Peel Essential Oils and Their Components against Linoleic Acid Oxidation. *Food Science Technol. Res* 7: 50 - 56 (2001)
5. Tae Hwan Kim, Sang Mi Lee, Young-Suk Kim, Kyoung Heon Kim, Sangsuk Oh, Hyong Joo Lee, Aroma dilution method using GC injector split ratio for volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction. *Food Chemistry* 83: 151 - 158 (2003)
6. Mohammad Mizanur Rahman¹, Nobumasa Nito, Shiro Isshiki, Cultivar identification of 'Yuzu' (Citrus junos Sieb. ex Tanaka) and related acid citrus by leaf isozymes, *Scientia Horticulturae* 87:191-198 (2001)
7. Hiro Uenoa, Masahiro Tanakab, Munehiro Hosinoc, Mitsuru Sasaki, Motonobu Gotoa, Extraction of valuable compounds from the flavedo of Citrus junos using subcritical water. *Separation and Purification Technology* 62: 513 - 516 (2008)
8. G.K. Jayaprakasha, Bhimanagouda S. Patil, In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry* 101: 410 - 418 (2007)
9. Minoru Higashimoto, Hirokuni Yamato, Takemi Kinouchi, Yoshinari Ohnishi, Inhibitory effects of citrus fruits on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-b-carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of ethanol. *Mutation Research* 415: 219-226 (1998)
10. Hisashi Kato-Noguchi, Yukitoshi Tanaka, Toshihumi Murakami, Shosuke Yamamura, Shinsuke Fujihara, Isolation and identification of an allelopathic substance from peel of Citrus junos. *Phytochemistry* 61: 849 - 853 (2002)
11. Hiro Ueno & Masahiro Tanaka & Siti Machmudah & Mitsuru Sasaki & Motonobu Goto, Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Valuable Compounds from Citrus junos Seed. *Food Bioprocess Technol* 1: 357 - 363 (2008)
12. Javier Hernandez-Borges, Juan Cabrera Cabrera, Miguel Angel Rodriguez Delgado, Estrella M. Hernandez-Suarez, Victor Galan Saucó, Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands. *Food Chemistry* 113: 313 - 319 (2009)

13. Milena Domotorova, Eva Matisova, Fast gas chromatography for pesticide residues analysis. *Journal of Chromatography A*, 1207: 1 - 16 (2008)
14. Marina Radišić^L, Svetlana Grujić^L, Tatjana Vasiljević^L, Mila Laušević, Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 113 : 712 - 719 (2009)
15. E. Schrecka, F. Geret, L. Gontier, M. Treilhous, Development and validation of a rapid multiresidue method for pesticide determination using gas chromatography - mass spectrometry: A realistic case in vineyard soils. *Talanta* 77: 298 - 303 (2008)
16. Stanisław Walorczyk, Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography - tandem quadrupole mass spectrometry II. Improvement and extension to new analytes. *Journal of Chromatography A*, 1208: 202 - 214 (2008)
17. Kelly L. Smalling, Kathryn M. Kuivila, Multi-residue method for the analysis of 85 current-use and legacy pesticides in bed and suspended sediments. *Journal of Chromatography A*, 1210: 8 - 18 (2008)
18. Emmanouel Karazafiris, Urania Menkissoglu-Spirodi, Andreas Thrasyvoulou, New multiresidue method using solid-phase extraction and gas chromatography - micro-electron-capture detection for pesticide residues analysis in royal jelly. *Journal of Chromatography A*, 1209: 17 - 21 (2008)
19. Jose Manuel Cortes, Ana Vazquez, Guillermo Santa-Maria, Gracia Patricia Blanch, Jesus Villen, Pesticide residue analysis by RPLC - GC in lycopene and other carotenoids obtained from tomatoes by supercritical fluid extraction. *Food Chemistry* 113: 280 - 284 (2009)
20. Elpiniki G. Amvrazi, Triantafyllos A. Albanis, Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected. *Food Chemistry* 113: 253 - 261 (2009)
21. Lidia M. Ravelo-Perez a, Javier Hernandez-Borges b, Teresa M. Borges-Miquel a, Miguel Ángel Rodríguez-Delgado, Solid-phase microextraction and sample stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of pesticide residues in red wines. *Food Chemistry* 111: 764 - 770 (2008)
22. Fujihara S, Shimizu T, Effect of peel extracts from *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka on weed growth. *Weed Research Japan* 44: 168 - 169 (1999)
23. Loveys, B.R., Milborrow, B.V., Isolation and characterization of 10-O-abscisic acid-β-D-glucopyranoside from vegetable tomato tissue. *Australian Journal of Plant Physiology* 8: 571 - 589 (1981)
24. Štajnbaher, D, & Zupancić-Kralj, L., Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1015(1): 185 - 198 (2003)
25. Klein, J., & Alder, L, Applicability of gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the simultaneous screening for about 100 pesticides in crops. *Journal of AOAC International*, 86(5): 1015 - 1037 (2003)
26. Chu, X. G., Hu, X. Z., & Yao, H. Y. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas

- chromatography - mass selective detection. *Journal of Chromatography A* 1063(1 - 2): 201 - 210 (2005)
27. Sanchez, R., Vazquez, A., Riquelme, D., & Villen, J., Direct analysis of pesticide residues in olive oil by on-line reversed phase liquid chromatography - gas chromatography using an automated through oven transfer adsorption - desorption (TOTAD) interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6098 - 6102 (2003)
 28. Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jimenez, J. J., Martin, M. T., & Bernal, J. Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1076: 90 - 96 (2005)
 29. Garcia, M. A., Oliva, J., Barba, A., Camara, M. A., Pardo, F., & Diaz-Plaza, E. M. Effect of fungicide residues on the aromatic composition of white wine inoculated with three *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1241 - 1247 (2004)
 30. Jimenez, J. J., Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Toribio, L., & Arias, E. Analysis of pesticide residues in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen - phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, 919: 147 - 156 (2001)
 31. Teixeira, M. J., Aguiar, A., Afonso, C. M. M., Alves, A., & Bastos, M. M. S. M., Comparison of pesticides levels in grape skin and in the whole grape by a new liquid chromatographic multiresidue methodology. *Analytica Chimica Acta*, 513: 333 - 340 (2004).
 32. Choi SY, Cho MA, Hong YP. Effects of washing treatments with different components on removal of pesticide residues and microorganisms in 'Fuji' apples. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* 26: 251-257(2008)
 33. Sawamura M, Wu Y, Fujiwara C, Urushibata M. Inhibitory effect of yuzu essential oil on the formation of N-nitrosodimethylamine in vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4281-4287 (2005)
 34. Yoo KM, Lee KW, Park JB, Lee HJ, Hwang IK. Variation in major total antioxidant activity of yuzu (*Citrus junos* Seib ex Tanaka) during maturation and between cultivars. *J. Agri. Food Chem.* 52: 5907-5913 (2004)
 35. Majo DD, Giammanco M, Guardia ML, Tripoli E, Giammanco S, Finotti E. Flavanones in Citrus fruit: Structure - antioxidant activity relationships. *Food Research International* 38: 1161-1166 (2005)
 36. Wang YC, Chuang YC, Ku YH. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry* 102: 1163-1171 (2007)
 37. Yoo KM, Hwang IK. In vitro effect of yuzu (*Citrus junos* Seib ex Tanaka) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 354-359 (2009)
 38. Waichman AA, Eve E, Nina N.C.S. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. *Crop Protection* 26: 576-583 (2007)
 39. Cho TS, Moon YH. Recognition of farmer and urban resident on pesticide toxicity. *The Korean J. Pesticide Sci.* 4: 48-55 (2000)

40. Lee MK. Computation of residue limit of organophosphorus pesticide in functional foods from citrus. *Korean J. Environ. Agri.* 18: 349-354 (1999)
41. Yoon CH, Park WC, Kim JE, Kim CH. Removal efficiency of pesticide on apples by ultrasonic cleaner. *Korean J. Environ. Agri.* 16: 255-258 (1997)
42. Zohair A. Behaviour of some organophosphorus and organochlorine pesticides in potatoes during soaking in different solutions. *Food and Chemistry* 39: 751-755 (2001)
43. Ong KC, Cash JN, Zabik MJ, Siddiq M, Jones AL. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. *Food Chemistry* 55: 153-160 (1995)
44. Kim DS, Kim ID, Park MZ, Lee YG. Effect of ozone water on pesticide residual contents of soybean sprouts during cultivation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 277-283 (2000)
45. Jung KH, Seo IW, Man HJ, Shun HS. Effects of ozonated water treatment on pesticide residues and catechin content in green tea leaves. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 265-270 (2008)
46. Kim KR, Song KB. Effect of aqueous chlorine dioxide treatment on the decomposition of pesticide residues. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 601-605 (2009)
47. Ahn SY, Kim KD, Lee JN, Im JS, Nam CW, Jung JC, Lee EH. Removal efficiency of pesticide residues in Chinese cabbage produced in highland by washing. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 26: 400-405 (2008)
48. Soliman KM. Changes in concentration of pesticide residues in potatoes during washing and home preparation. *Food and Chemical Toxicology* 39: 887-891 (2001)
49. Hsu SY. Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering* 66: 171-176 (2005)
50. KFDA. Korean Food and Drug Administration. Food Code. Method 4-1-2. Food and Drug Administration. Seoul, Korea (2008)
51. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 25: 1199-1200 (1958)
52. Lee MK, Shim JH, Ko HR, Chung HR. Research trends on the development of science evidence on the domestic maximum residue limits of pesticides. *Food Sci. and Ind.* 43: 41-66 (2010)
53. Abou-Arab, AAK. Behavior of pesticide in tomato during commercial and home preparation. *Food Chem.* 65: 509-514 (1999)
54. Veneziano A, Vacca C, Arana S, De Simone F, Rastrelli L. Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples imported to Italy. *Food Chemistry* 87: 383-386 (2004)
55. Papadopoulou-Mourkidou, E. Post-harvest-applied agrichemicals and their residues in fresh fruits and vegetables. *J. of the Association of official chem.* 74 :745-765 (1991)
56. Garcia Reyes JF, Ortega Barrales P, Molina Diaz A. Gel-surface enhanced fluorescence sensing system coupled to a continuous-flow assembly for simultaneous monitoring of benomyl and carbendazim. *Analytica Chimica Acta* 493: 35-45 (2003)

57. Krol WJ, Arsenault TL, Pylypiw Jr. HM, Mattina MJI. Reduction of pesticide residues on produce by rinsing. *J. Agric. Food Chem.* 48: 75-86 (2000)
58. Lee HD, You OJ, Ihm YB, Kwon HY, Jin YD, Kim JB, Kim YH, Park SS, Oh KS, Ko SL, Kim TH, Noh JG, Kyung KY. Residual characteristics of some pesticides in/on pepper fruits and leaves by different types, growing and processing conditions. *Kor. J. Pesticide Sci.* 10: 99-106 (2006)
59. Ahn SY, Kim KD, Lee JN, Im JS, Nam CW, Jung JC, Lee EH. Removal efficiency of pesticide residue in Chinese cabbage produced in Highland by washing. *Kor. J. Hor. Sci. Technol.* 26: 400-405 (2008)
60. Kim C, Hung YC, Brackett RE. Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing chemically modified water for the inactivation on food-related pathogens. *Journal of Food Protection* 63: 19-24 (2000)
61. Venkitanarayanan KS, Ezeike GO, Hung YC, Doyle MP. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4276-4279(1999)
62. Cui X, Shang Y, Shi Z, Xin H, Cao W. Physicochemical properties and bactericidal efficiency of neutral and acidic electrolyzed water under different storage conditions. *Journal of Food Engineering* 91: 582-586 (2009)
63. Liao LB, Chen WM, X. Xiao M. The generation and inactivation mechanism of oxidation - reduction potential of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering* 78: 1326-1332 (2007)
64. Huang YR, Hung YC, Hsu SY, Huang YW, Hwang DF. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* 19:329-345(2008)
65. Albrigo, L. G., & Brown, G. E. 1970. Orange peel topography as affected by a preharvest plastic spray. *Hortscience*, 5, 470-472.
66. Baldwin EA, Nisperos MO, Shaw PE, Burns JK. 1995. Effect of coatings and prolonged storage conditions on fresh orange flavor volatiles, degrees Brix, and ascorbic acid levels. *J. Agr. Food Chem.* 43: 1321-1331.
67. Baldwin, E. A. 1994. Edible coatings for fresh fruits and vegetables: past, present and future. In J. M. Krochta, E. A. Baldwin, & M. O. Nisperos-Carriedo (Eds.), *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality* (pp. 25-64). Lancaster: Technomic Publishing Inc.
68. Baldwin, E. A. 2007. Surface treatments and edible coatings in food preservation. In: M. Shafiur Rahman (Ed.), *Handbook of Food Preservation*, Vol. 2 (pp. 477-507). New York: CRC Press.
69. Ball, J. A. 1997. Evaluation of two lipid-based edible coatings for their ability to preserve post harvest quality of green bell peppers. Master Thesis, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA.
70. Ben-Yehoshua, S., Burg, S. P., & Young, R. 1985. Resistance of citrus fruit to mass transport of water vapor and other gases. *Plant Physiology*, 79, 1048-1053.
71. Bhande SD, Ravindra MR, Goswami Tk. 2008. Respiration rate of banana fruit under aerobic conditions at different storage temperatures. *Journal of Food Engineering*, 87:116-123
72. Bosquez-Molinam E., I. Guerrero-Legarreta, E.J. Vernon-Carter. 2003. Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum-candelilla

- wax based edible emulsion coatings. *Food Research International* 36: 885-893.
73. Breidenbach RW, Saxton MJ, Hansen LD, Criddle RS. 1997. Heat generation and dissipation in plants: can the alternative phosphorylation pathway serve a thermoregulatory role in plant tissues other than specialized organs. *Plant Physiol.* 114: 1137-1140.
 74. Callegarin, F., Quezada-Gallo, J. A., Debeaufort, F., & Voilley, A. 1997. Lipids and biopackaging. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1183 - 1192.
 75. Cha, Y. J., Lee, S. M., Ahn, B. J., Song, N. S., & Jeon, S. J. 1990. Substitution effect of sorbitol for sugar on the quality stability of Yuja Cheong (Citron product). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 19, 13-20.
 76. Charalambopoulou GC, Kikkinidesa ES, Papadokostakia KG, Stubos AK, Papaioannou ATh. 2001. Numerical and experimental investigation of the diffusional release of a dispersed solute from polymeric multilaminate matrices. *J. Control. Release* 70: 309-319.
 77. Chen S, Nussinovitch A. 2001. Permeability and roughness determinations of wax-hydrocolloid coatings, and their limitations in determining citrus fruit overall quality. *Food Hydrocolloid.* 15: 127-137.
 78. Chien, P.-J., F. Sheu, H.-R. Lin. 2007. Coating citrus (Mucott tanger) fruit with low molecular weight chitosan increase postharvest quality and shelf life. *Food Chem.* 11: 1160-1164.
 79. Despond, S., E. Espuche, N. Cartier, A. Domard. 2005. Barrier Properties of Paper-Chitosan and Paper-Chitosan-Carnauba Wax Films. *Journal of Applied Polymer Science* 98 : 704-710.
 80. Diaz-Mula, H. M., Serrano, M., & Valero, D. 2011. Alginate coatings preserve fruit quality and bioactive compounds during storage of sweet cherry fruit. *Food and Bioprocess Technology*, Doi:10.1007/s11947-011-0599-2.
 81. Duan, J., Wu, R., Strik, B. C., & Zhao Y. 2011. Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 71-79.
 82. FAO/WHO : Guidelines for the application of HACCP System, 1993
 83. Garcia, L. C., Pereira, L. M., Sarantopoulos, Claire I. G. L., & Hubinger, M. D. 2010. Selection of an edible starch coating for minimally processed strawberry. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 834-842.
 84. Geraldine, R.M., Nilda de Fatima Ferreira Soares, Diego Alvarenga Botrel, Leticia de Almeida Goncalves. 2008. Characterization and effect of edible coatings on minimally processed garlic quality. *Carbohydrate Polymers* 72: 403-409.
 85. Grant, L. A., & Burns, J. 1994. Application of coatings. In J. M. Krochta, E. A. Baldwin & M. Nisperos-Carriedo (Eds.), *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality* (pp. 25-64). Lancaster: Technomic Publishing Inc.
 86. Hagenmaier RD, Baker RA. 1995. Layered coatings to control weight loss and preserve gloss of citrus fruit. *HortScience* 30(2): 186-193.
 87. Hagenmaier RD, Shaw PE. 1992. Permeability of coatings made with emulsified polyethylene wax. *J. Agr. Food Chem.* 39: 1705-1708.

88. Hagger P E; Lee D S; Yam K L 1992. Application of an enzyme kinetic based respiration model to closed system experiments for fresh produce. *Journal of Food Process Engineering*, 15, 143 - 157
89. Hansen LD, Hopkin MS, Rank DR, Breidenbach RW, Criddle RS. 1994. *Planta* 194: 77-85.
90. Hertog M L A T M; Peppelenbos H W; Evelo R G; Tijskens L M 1998. A dynamic and generic model on the gas exchange of respiring produce: the effects of oxygen, carbon dioxide and temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 14, 335 - 349
91. Hong, J. S., Park, H. W., Park, R. S., Myong, C. O., Sin, M. H., Choi, Y. J., & Jyong, H. J. 2008. Fruit. In J. D. Ryu (Ed.), *Food Materials* (pp. 126-130). Seoul: Kyomoon Publishing Inc.
92. Jeong, J. W., Kwon, D. J., Hwang, J. B., & Jo, Y. J. 1994. Influence of the extraction method on quality of citron juice. *Korean Society of Food Science and Technology*, 26, 704-708.
93. Jha, S. K., Sethi, S., Srivastav, M. Dubey, A. K., Sharma, R. R., Samuel, D. V. K., & Singh, A. K. 2010. Firmness characteristics of mango hybrids under ambient storage. *Journal of Food Engineering*, 97, 208-212.
94. Jiang Y, Li Y. 2001. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chem.* 73: 139-143.
95. Kader, A.A., 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology* 40, 99 - 104.
96. Kays, S.J., 1991. *Metabolic Processes in harvested products respiration. Post Harvest Physiology of Perishable Plant Products.* Van Nostrand Reinhold Publication, NY.
97. Kester, J. J., & Fennema, O. R. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, 40, 47 - 59.
98. Kim EM, Lee HG. 2003. Development of lemon pyun by the addition of various gelling agents. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 19: 772-776.
99. Kim JY. 2009. Heat transfer analysis. Kyerim. Seoul, Korea, pp.33-70.
100. Kim, H. G., Park, M. H., Lee, Y. C., Kim, H. M., & Jang, H. G. 1995. Effects of storage temperature and blanching treatment on the storage stability of citron. *Korean Society of Food Science and Technology*, 27, 342-347.
101. Krochta, J. M. 1997. Edible composite moisture-barrier films. In B. Blakistone (Ed.), *Packaging Yearbook* (pp. 38-54). Washington: Natl food Proc Assoc.
102. Krochta, J. M., & De Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51, 61-72.
103. Lee D S; Hagger P E; Lee J; Yam K L 1991. Model for fresh produce respiration in modified atmosphere based on principles of enzyme kinetics. *Journal of Food Science*, 56(6), 1580-1585
104. Lee, C. H. 2008. A sensory test and application. In C. H. Lee, J. K. Lee, S. K. Che, K. H. Ko, & H. S. Son (Eds.), *Food Valuation and Quality Administration* (pp. 199-238). Paju: Yoorim Publishing Co.
105. Lee, Y. C., Kim, I. H., Jeong, J. W., Kim, H. K., & Park, M. H. 1994. Chemical characteristics of citron (*Citrus junos*) juices. *Korean Society of Food Science and Technology*, 26, 552-556.

106. Mahajan, P.V., Goswami, T.K., 2001. Enzyme kinetics based modeling of respiration rate for apple. *Journal of Agricultural Engineering Research* 79 (4), 399 - 406.
107. Maqbool, M., Ali, A., Ramachandran, S., Smith, D. R., & Alderson, P. G. 2010. Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating. *Crop Protection*, 29, 1136-1141.
108. Maria NT, Miguel DR, John K, Maria PG. 2008. Fatty acid effect on hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible film properties and postharvest quality of coated 'Ortanique' mandarins. *J. Agr. Food Chem.* 56: 10689-10696.
109. Mastromatteo M, Barbuzzi G, Conte A, Del Nobile MA. 2009. Controlled release of thymol from zein based film. *Innov. Food Sci. Emerg.* 10: 222 - 227.
110. McLaughlin C P; O'Beirne D 1999. Respiration rate of a dry coleslaw mix as affected by storage temperature and respiratory gas concentrations. *Journal of Food Science*, 64(1), 116-119
111. Morton ID, Macleod AJ. 1982. *Food Flavours*. Elsevier Scientific Pub. Amsterdam-Oxford-New York. p. 399.
112. Navarro-Tarazaga ML, Del Rio MA, Krochta JM, Perez-Gago MB. 2008. Fatty acid effect on hydroxypropyl methylcellulosebeeswax edible film properties and postharvest quality of coated 'Ortanique' mandarins. *J. Agr. Food Chem.* 56: 10689-10696.
113. Nidperos-Carriedo NO, Baldwin EA. 1993. Composition and method of increasing stability of fruits, vegetables or fungi. *US Patent* 5: 198-254.
114. No, B. S., Kim, S. S., Jang, P. S., Lee, H. K., Park, W. J., Song, K.B., Lee, H. S., Lee, S. B., & Hwang, K. K. 2009. *Food Processing & Preservation* (pp. 10-61). Seoul: Soohak Publishing Co.
115. No, H.K., S. P. Meyers, W. Prinyawiwatkul, Z. Xu. 2007. Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *J. Food Sci.* 72: 87-100.
116. Park, H.J. 1999. Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 254-260.
117. Perez-gago, M. B., Rojas, C., & Del Rio, M. A. 2002. Effect of lipid type and amount of edible hydroxypropyl methylcellulose-lipid composite coatings used to protect postharvest quality of mandarins cv. Fortune. *Journal of Food Science*, 67, 2903-2910.
118. Petersen K, Nielsen PV, Lawther M, Olsen MB, Nilsson NH, Mortensen G. 1999. Potential of biobased materials for food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 52-68.
119. Petracek, P. D., Dou, H. T., & Pao, S. 1998a. The influence of applied waxes on postharvest physiological behavior and pitting of grapefruit. *Postharvest Biology and Technology*. 14, 99 - 106.
120. Petracek, P. D., Montalvo, L., Dou, H. T., & Davis, C. 1998b. Postharvest pitting of 'Fallglo' tangerine. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123, 130 - 135.
121. Phan The D, Debeaufort F, Luua D, Voilley A. 2008. Moisture barrier, wetting and mechanical properties of shellac/agar or shellac/cassava starch bilayer bio-membrane for food applications. *J. Membrane Sci.* 325: 277-283
122. Rahman, M.S. 2006. *Hand book of Food Preservation*. CRC Press, pp.487.

123. Ravindra MR, Goswami TK 2008. Modelling the respiration rate of green mature mango under aerobic conditions. *Biosystems engineering*, 99: 239-248.
124. Rivero, S., M.A. Garcia, A. Pinotti. 2009. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *J. Food Eng.* 90: 531-539.
125. Rojas-Argudo, C., Del Río, M. A., & Pérez-Gago, M. B. 2009. Development and optimization of locust bean gum (LBG)-based edible coatings for postharvest storage of 'Fortune' mandarins. *Postharvest Biology and Technology*, 52, 227-234.
126. Saltveit M E 2004. Respiratory metabolism. In: *The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks*. Agriculture Handbook Number 66, USDA
127. Santerre, C. R., Leach, T. F., & Cash, J. N. 1989. The influence of the sucrose polyester, Semprefresh™, on the storage of Michigan grown McIntosh and Golden Delicious apples. *Journal of food Processing and Preservation*, 13, 293-305.
128. Sawamura M, Li ZF, Takemono K, Kusunose H. 1991. Oxygen and temperature dependence on the browning of yuzu juice. *Nippon Noegi Kagaku Kaishi* 65: 45-47.
129. Shon, M. Y., & Park, S. K. 2006. Synergistic effect of Yuza (Citrus junos) extracts and ascorvic acid on antiproliferation of human cancer cells and antioxidant activity. *The Korean Society of Food Preservation*, 13, 649-654.
130. Song, T. H., & Kim, C. J. 1999. Effect of edible coatings on softening of the stored immature plums. *The Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 42, 317-323.
131. Togrul H, Arslan N. 2004. Carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose as a hydrophilic polymer in coating of mandarin. *J. Food Eng.* 62: 271-279.
132. Valencia-Chamorro SA, Perez-Gago MB, Del Rio MA, Palou L. 2009. Curative and preventive activity of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible composite coatings containing antifungal food additives to control citrus postharvest green and blue molds. *J. Agr. Food Chem.* 57: 2770 - 2777.
133. Weingold, S. E., Guzewich, J.J., and Fudala, J.K; 1994 use of food borne disease date for HACCP risk assessment. *J. Food Prot.* 57: 820-830.
134. Yang C C; Chinnan M S 1988. Modelling the effect of O₂ and CO₂ on respiration and quality of stored tomatoes. *Transactions of the ASAE*, 30(3), 920 - 925.
135. Yaw, J. O., Marshall, M. R., Koburger, J. A., & Wei, C. I. 1998. Low pH inactivation of pectin esterase in single strength orange juice. *Journal of Food Science*, 53, 504 - 507.
136. 김청, 박근실. 2001. 식품포장의 기초와 응용. 도서출판 (주)포장산업. 서울, 한국, pp. 173-196.
137. 박완희, 이병철; 1999, 국제표준에 따른 HACCP실무, 103~104
138. 박현진 외 3인. 2000. 새로운 기능성 피막 코팅제를 이용한 주요 과수류의 저장성 향상 및 수출효율 증대. 농림부 연구보고서.
139. 식품의약품안전청 식품안전국; 1999, 두부류제조 위생관리규범, 33~38
140. 식품의약품안전청; 2010, 알기 쉬운 HACCP 관리

141. 유승연, 1998, 대학교 학교 급식시설에서의 계절별 김밥 생산과정에 따른 HACCP에 의한 미생 물적 품질 평가, 안동대학교 대학원
142. 한국농산물저장유통학회. 1999. 농산물저장유통기술 핸드북. 송현종합문화사. 대구, 한국, pp. 591-593.
143. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, and J.J Voorhees, Molecular Mechanisms of Photoaging in Human Skin In Vivo and Their Prevention by All-Trans Retinoic Acid
144. J. S. Shim, Y. Y. Kwon, J. K. Hwang, The Effects of Panduratin A Isolated from *Kaempferia Pandurata* on the Expression of Matrix Metalloproteinase-1 and Type-1 Procollagen in Human Skin Fibroblasts
145. J. H. Rabe, A. J. Mamelak, Patrick J. S. Warwick L. Morison, Daniel N. Sauder, Photoaging : Mechanisms and repair, *J Am Acad Dermatol*, 55, 1 (2006).
146. T. Ishida and I. Sakaguchi, Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of *Lithospermum erythrorhizon*, *Biol. Pharm. Bull.*, 30(5), 928 (2007).
147. M. M. Basher, M. R. Sharma, and V. P. Werth TNF-alpha production in the skin, *Arch. Dermatol. Res.*, (2008).
148. M. H. Shin, H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin in vivo, *J Invest. Dermatol.*, 125(2), 221 (2005).
149. G. J. Fisher and J. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that AP-1 regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 3(1), 61 (1998).
150. G. J. Fisher, Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang and J. J. Voorhees, Photophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *N. Engl. J. Med.*, 337(20), 1419 (1997).
151. Yokota, T., et al., The inhibitory effect of glabridin from licorice extract on melanogenesis and inflammation, *Pigment Cell Research*, 11(6), 355 (1998).
152. L. D. P. Uyen, D. H. Nguyen, and E. K. Kim, Mechanisms of skin pigmentation, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(4), 383 (2008).
153. Y. Aoki, T. Tanigawa, H. Abe, and Y. Fujiwara, Melanogenesis inhibition by an oolong tea extract in B16 mouse melanoma cells and UV-induced skin pigmentation in brownish guinea pigs, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71(8), 1879 (2007)
154. Seiberg, M., et al., Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(2), 162, (2000).
155. Kim YT. 1997. Main composition analysis of citron (*Citrus junos* Sieb.) and production of their juice and vinegar. MS Thesis. Gyeongsang National University
156. Nam HW, Hyun YH. 2003. Drying of citron juice from by-product of citron tea manufacturing. *Korean J Food Nutr* 16: 334-339.
157. Lee HY, Kim YM, Shin DH, Sun BK. 1987. Aroma components in Korean citron (*Citrus medica*). *Korean J Food Sci Technol* 19: 361-365.

158. Na Lin, Takashi Sato, Yuji Takayama, Yoshihiro Mimaki, Yutaka Sashida, Masamichi Yano, Akira Ito, Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages, *Biochemical Pharmacology*, 65, 2065, (2003).
159. Sakito Tanaka, Takashi Sato, Noriko Akimoto, Masamichi Yano, Akira Ito, Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes in vivo and in vitro, *Biochemical Pharmacology*, 68, 433, (2004).
160. Gutfinger T. 1958. Polyphenols in olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
170. Bhatnagar, V., A. Srirangam, and R. Abburi, In vitro modulation of proliferation and melanization of melanoma cells by citrate .*Molecular and Cellular Biochemistry*, 1998. 187(1-2):p.57-65.
180. Kim, K.S., et al., Inhibitory effect of piperlonguminine on melanin production in melanoma B16 cellline by downregulation of tyrosinase expression. *Pigment Cell Research*, 2006.19 (1):p.90-98.
181. Nicolay, J.F. and Paillet, C. Poluicao e Envelhecimento. Nova Classe Antioxidantes para a Pele [Pollution and aging: a new class of antioxidants for the skin]. *Cosmet. Toil.* 14:58 - 63 (2002).
182. Kohen, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - new approaches for their evaluation. *Biomed. Pharmacother.* 53: 181 - 192 (1999).
183. Corpas FJ et al. Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase: Characterization and activity regulation during natural senescence. *Plant Physiology* 121(3): 921 - 928 (1999).
184. Afag F, Mukhtar H. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J Photochem Photobiol B.* 63: 61 - 69 (2001).
185. Goihman-Yahr M. Skin Aging and Photoaging. *An Outlook Clin Dermatol.* 14: 153 - 160 (1996).
186. A. Svobodová, J. Psotová, D. Walterová. Natural phenolics in the prevention of uv-induced skin damage: a review. *Biomed. Papers* 147(2): 137 - 145 (2003).
187. Patricia Kelly Wilmsen, Dalla Santa Spada, and Mirian Salvador. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4757-4761 (2005).

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 ○○○○○사업(해당사업 표기)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 ○○○○○사업(해당사업 표기)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.