



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.


저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

제주감귤을 이용한 발효주 개발과
바이오에탄올 생산



제주대학교 대학원

생명공학과

김 종 현

2010년 8월

제주감귤을 이용한 발효주 개발과 바이오 에탄올 생산

지도교수 김 재 훈

김 종 현

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2010년 8월

김종현의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장

류 기 동



위 원

김 재 훈



위 원

김 소 미



제주대학교 대학원

2010년 8월

Development of Wine with Jeju-Citrus and Ethanol production from Citrus peel Waste

Jong Hyun Kim

(Supervised by Professor Jae Hoon Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
For the degree of Master of Biotechnology

August, 2010

This thesis has been examined and approved.

Key Zung Riu

Chairperson of the Supervising committee

Professor Key Zung Riu, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University

Somi Kim Cho

Professor So Mi K. Cho, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University

Jae Hoon Kim

Professor Jae Hoon Kim, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University

Department of Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

CONTENTS

CONTENTS	i
LIST OF FIGURES	iii
LIST OF TABLES	v
 PART I. Development of Wine with Jeju-Citrus	
1. Abstract	1
2. Introduction	2
3. Materials and Methods	4
3.1. Materials	4
3.2. Fermentation test of determination yeasts	4
3.3. Citrus wine-making	5
3.4. Analytical methods	5
3.5. Flavonoids of citrus wine added with hesperidin	6
3.6. Determination of vitamin C	8
3.7. Determination of total phenolics	8
3.8. Determination of DPPH radical scavenging Activity	8
4. Result	9
4.1. Chemical compositions and physical properties	9
4.2. Fermentation test of selected yeasts	9
4.3. Added with hesperidin during fermentation of properties	10
4.4. Change of vitamin C content	15
4.5. Change of total polyphenol	15
4.6. Change of DPPH radical scavenging Activity	17

4.7. Sensory attribute	18
5. CONCLUSION	19

PART II. Ethanol Production from Citrus Peel Waste

1. Abstract	21
2. Introduction	22
3. Theory	24
3.1. Cellulase	24
3.2. Pectinase	24
3.3. Beta-glucosidase	25
4. Materials and Methods	26
4.1. Materials	26
4.2. Enzyme hydrolysis	26
4.3. Enzymatic saccharification of citrus peel waste	27
5. Results	30
5.1. Enzymatic hydrolysis with different pectinase loading	30
5.2. Enzymatic hydrolysis with different cellulase loading	31
5.3. Enzymatic hydrolysis with different enzymes cocktail loading	32
6. CONCLUSION	36
PROCESS	37
REFERENCES	38
ACKNOWLEDGEMENT	46

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Typical time courses of alcohol fermentation of citrus wine according to hesperidin addition.	11
Fig. 2. Change of total polyphenol content of citrus wine during fermentation.	16
Fig. 3. Change of DPPH radical scavenging activity from citrus wine during fermentation.	17
Fig. 4. Cellulose and Pectin Specificities.	24
Fig. 5. Function of cellulose and β -glucosidase.	25
Fig. 6. IC chromatogram of standard sugar.	29
Fig. 7. IC chromatogram of standard galacturonic acid.	29
Fig. 8. Carbohydrate and total sugar production after enzymatic hydrolysis with different pectinase loading.	30
Fig. 9. Carbohydrate and total sugar production after enzymatic hydrolysis with different cellulase loading.	31
Fig. 10. Carbohydrate and total sugar production after enzymatic hydrolysis with different enzymes cocktail loading.	33

Fig. 11. Galacturonic acid production after enzymatic hydrolysis
with different enzymes loading. 34



LIST OF TABLES

Table 1. Strains used in this study.	4
Table 2. YM medium composition.	5
Table 3. Operation conditions of UPLC-MS/MS for flavonoids analysis. ...	7
Table 4. Chemical compositions and physical properties of citrus juice, juice concentrate.	9
Table 5. Fermentation test of selected yeasts for citrus wine making. ...	10
Table 6. Flavonoids of citrus wine added with hesperidin during fermentation.	13
Table 7. Total flavonoids contents of citrus wine fermented in different fermentation period.	12
Table 8. Change in vitamin C contents of citrus wine during fermentation with different concentration of hesperidin contents for 30 days at room temperature(°C).	15
Table 9. Sensory quality of citrus wine.	18
Table 10. Enzymes properties used in this study.	26

Table 11. Enzymatic hydrolysis with enzymes loading condition. 27

Table 12. Ion-Chromatography conditions for fermentable sugars and acid analysis. 28

Table 13. Sugar yields for enzymatic hydrolysates of citrus peel waste (1%). 35

Table 14. Sugar yields for enzymatic hydrolysates of citrus peel waste (10%). 35



PART I. Development of Wine with Jeju-Citrus

1. Abstract

Various yeast strains were tested, and the sterilization methods of citrus juice and citrus juice concentrate were optimized for making citrus wine. In addition, changes in the physicochemical characteristics of the wine during its fermentation were analysed. Citrus juice contained 10.53/100g vitamin C and 0.53% titratable acidities. In citrus extract, Concentrations of vitamin C (14.01mg/100g) and titratable acidities (0.60%) were higher than in citrus juice

The yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* WY30 was selected for the fermentation of citrus extract. To find suitable conditions for alcohol fermentation, we attempted various conditions such as sugar concentration, nitrogen source and hesperidin concentration. The sugar concentration of citrus concentrate 10% was adjusted to 25% with sucrose, and 0.1% of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ was added for a nitrogen source. 10-500 $\mu\text{g/mL}$ of hesperidin was added to increase the antioxidant activity and to make healthful wine. Hesperidin is a flavanone glycoside found abundantly in citrus fruits and acts as an antioxidant.

After 30 days of fermentation at room temperature($^{\circ}\text{C}$), the concentration of alcohol was 14.8-15.1% in citrus wine. During fermentation, sugar concentration was decreased to 8.4-8.5%. Vitamin C, total phenol compound content and DPPH radical scavenging activity of citrus wine significantly increased with increasing hesperidin content.

2. Introduction

술은 인류의 기원과 함께 발전해왔다. 특히 포도를 이용한 와인은 크로마농인들이 라스코(Lascaux)동굴 벽화에 그린 포도 그림을 통해 3~4만 년 전으로 추정하고 있다. 포도 열매를 다 먹지 못하여 남은 포도를 초기에는 건포도 형태로 먹다가 추후 음료 형태로, 그리고 껍질의 효모(Yeast)에 의해 발효된 형태로 먹기 시작하였을 것이라고 추측하며, 포도씨가 모여 있는 유물을 통해 고고학자들은 BC 9000년 경 신석기 시대부터 포도를 활용한 인류 최초의 술을 먹기 시작했다고 보고 있다.(1) 제주의 술 역사 또한 1520년 조선 중종 때 김정(金淨)이 쓴 '제주풍토록(濟州風土錄)'에 '쌀이 매우 적어 청주는 귀하고 소주를 쓴다' 고 하여 제주의 술에 대한 기록이 남아 있으며(2), 제주 감귤주에 대한 기록은 1932년에 일본인 北川左人이 저술한 '조선고유색사전'에 남아있다. 이 책에서는 귤자(橘子)에 대해 소개하면서 '예전부터 전라남도 제주도에 재배되고 있다. 귤은 꿀 또는 설탕을 넣어 찌서 귤떡을 하거나, 귤주(橘酒)를 빚는 일도 있다.' 여기서 감귤주가 어떤 형태를 띠고 있는지는 알 수 없지만, 일제시대에도 감귤주를 제조했다는 사실만은 확인할 수 있었다.(3)

제주도의 생명산업이라 불리우는 감귤재배는 1960년대부터 40년 이상을 발전해 오면서 주로 생산성에만 의존했던 과거와 달리 고품질감귤에 대한 관심과 그로 인한 감귤가공산업 또한 발전필요성이 증가되고 있다. 감귤재배는 총 생산량의 16%, 농가소득의 약 51%를 차지하고 있으며, 감귤유통명령 및 품질향상과 생산량 조절로 인한 연간 50~60만톤이 생산되고 있다. 특히 1997년 7월부터 본격 시행된 WTO에 의한 농산물 수입자유화로 제주의 감귤산업은 수입오렌지와 국내의 타 과일과의 경쟁이 심화되었을 뿐만 아니라, 세계 경제 침체로 소비 위축으로 이어지고 있다. 현재 주로 재배되고 있는 홍진조생 및 궁천조생의 과잉생산체제로 인한 구조적인 한계에 직면하고 있는 실정이다. 따라서 감귤산업의 안정적인 발전을 위한 새 수용창출이 필요한 시점으로 제주 감귤의 이용기술개발로 새로운 감귤 품종의 다양화 및 산업화가 절실한 상황이다.(2)(4)

제주 감귤류에 다량 함유되어있다고 알려진 polyphenol류는 두 개 이상의 벤젠

고리에 수산기가 결합된 화학구조를 갖는 성분으로 flavonoid, phenolic acid, conmarins, lignans 등에 속하는 화합물이다.(5) 특히 감귤에 다량 함유되어 있다고 알려진 flavonoid는 현재까지 약 60여종이 분리되었으며, 새로운 생리활성 성분이 발견되고 있다.(6)(7) flavonoids는 심장 순환기계 질환 및 항암, 항산화, 항염증에 대한 개선효과가 있는 것으로 알려져 있으며(8), 특히 감귤의 narngin은 항균작용이, hesperidin은 혈압저하 효과 있다고 보고되었다(9).

감귤을 이용한 감귤주는 1989년에 고(10) 등에 의해 연구되었고, 1996년부터는 제주감귤시험장에서 감귤주를 개발하여 산업체가 판매하고 있는 실정이다. 하지만 지금까지의 감귤주는 감귤 착즙액을 원료로 하여 감귤 착즙 방법으로 인한 발효 후의 여과 문제와 감귤의 많은 양의 유기산으로 인한 발효저해에 관련 연구는 보고되고 있다. 하지만 감귤발효주의 기능성 성분 분석에 대한 연구는 미비한 상태이다. 그리고 제주감귤의 고부가가치 창출 및 이용성 증진을 위한 새 소득원 발굴과 더불어 다양한 품종 개발과 천연성, 차별성, 기능성 등 웰빙인식의 확산으로 현대인의 생활패턴에 부응하는 가공상품의 개발과 이용기술에 대한 연구가 필요하다고 여겨진다.(11) 그래서 선행 연구의 애로점을 개선하기 위해 본 연구에서는 감귤 농축액을 이용한 우수효모 선발과 선발된 효모를 이용한 감귤 발효주에 hesperidin을 10~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가하여 발효하였으며 감귤발효주의 비타민 C와 flavonoids의 변화를 살펴보았다. 그리고 총 페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거활성을 통해 항산화 효과를 확인하고자 하였다.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

2009년 제주도지방개방공사의 제2감귤복합처리공장(서귀포시 남원읍 한남리)에서 제공받은 감귤농축액과 제주대학교 아열대원예연구소에서 재배된 온주밀감을

이용한 착즙액을 냉동 보관하여 제주도 지하수로 희석하여 사용하였다.

3.2. Fermentation test of determination yeasts

미국 및 캐나다에서 판매되는 활성 건조효모 7종을(Table 1) YM broth, Difco Co. USA(Table 2)에 30℃, 48시간 전배양하여, 감귤 농축액과 착즙액 10%에 설탕으로 25%로 보당한 후 전배양액 5%(v/v)를 주모로 접종하고 30℃에서 10일간 발효한 후 알콜 함량, 잔당 및 pH를 측정하여 결과를 토대로 우수한 균주를 선발하였다.

Table 1. Strains used in this study.

Strain	Trade name of other designation	Species	country
WY30	Pasteur, Wyeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	U.S.A
C.D.B	Cote des Blancs, Red Star	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	U.S.A
Mont.	Montrachet, Red Star	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	U.S.A
PC	Premier Cuvee, Red Star	<i>Saccharomyces bayanus</i>	U.S.A
D47	ICV D-47, LALVIN	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	U.S.A
1118	EC-1118, LALVIN	<i>Saccharomyces bayanus</i>	CANADA
V1116	K1-V1116, LALVIN	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CANADA

Table 2. YM medium composition.

Medium	composition (g / L)	
YM Broth	Yeast extract	3.0
	Malt extract	3.0
	Peptone	5.0
	Dextrose	10.0

3.3. Citrus wine-making

감귤농축액 10%에 설탕으로 25% 보당한 후, 잡균방지를 위해 Potassium metabisulfite($K_2 S_2 O_5$) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하고(12) 우수균주로 선발된 WY30 (Pasteur, Wyeast, *Saccharomyces cerevisiae*-U.S.A) 을 5% 접종하여 실온에서(15~22°C) 20일 동안 1차 발효시킨 후 벤토나이트 5% 처리하여 30일까지 후 발효 시켰다. 발효시작 때 pH 보정을 위해 CaCO_3 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가하였고, 원활한 발효를 위해 질소원으로 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 을 0.1%를 첨가하였다.(13)

3.4. Analytical methods

자동당산분석기 (NH-2000, HORIBA, Japan)를 통해 잔당과 총산을 측정하였고, 총산은 0.1 N NaOH로 적정하여 보정하였다. pH는 pH meter (Mettler toledo-8690-Switzerland)로 측정하였고 알콜 함량은 증류법에 의해 정량하였다. 즉, 시료 100 mL과 증류수 100 mL 넣고 heating mantle에서 가열하여 얻은 증류액 70-80 mL를 메스실린더에 취한 후 증류수를 가하여 100 mL 정용한 후, 주정계로 측정하여 15°C 에서의 주정도로 환산하였다.

3.5. Flavonoids of citrus wine added with hesperidin

발효 우수 선발된 효모를 이용한 감귤발효주에 hesperidin (Sigma Co. USA)을 10-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 첨가하여 발효하였다. Hesperidin 농도별로 처리되어진 시료들을 발효기간별로 보관하여, UPLC-MS (Waters Co. U.S.A) (Table 3) 를 통해 감귤에 함유되어있다고 알려진 hesperidin 외 10종 flavonoids를 측정하였다.



Table 3. Operation conditions of UPLC-MS/MS for flavonoids analysis.

Model	Quattro Micro TM , Waters Co. U.S.A			
Column	ACQUITY UPLC [®] BEH C18 1.7 μ m (2.1 \times 50mm) column			
Mobile phase	A : 0.1% Formic acid in water B : 0.1% Formic acid in acetonitrile			
Flow rate	0.2ml/min			
Injection volume	2 μ l			
	Time (min)	A %	B %	Curve
	0	80	20	6
	0.63	80	20	6
	1.25	60	40	6
	2.71	60	40	6
Mobile phase	3.33	40	60	6
	4.59	40	60	6
	5.21	10	90	6
	5.84	10	90	6
	6.04	90	10	6
	7.30	90	10	6

- ES Mode : ES+ (Positive mode)

Capillary (kV)	3.50	Source Temp. (°C)	120
Cone voltage (V)	33.0	Desolvation Temp. (°C)	240
Extractor (V)	3.0	Cone GAs Flow (L/Hr)	50
RF Lens (V)	1.0	Desolvation GAs Flow (L/Hr)	850

3.6. Determination of vitamin C

비타민 C는 감귤발효주 1 mL을 5% metaphosphoric acid를 이용해 희석한 후, 여과지로(Whatman NO. 2) 여과하여 hydrazine 비색법에 따라 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품은 ascorbic acid (Sigma Co. USA)를 사용하였다.(14)

3.7. Determination of total phenolics

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약을 이용한 방법(15)을 사용하였다. 즉 농도에 맞게 희석한 발효주 1 mL 과 50% Folin-Ciocalteu reagent 1 mL 을 가하여 실온에 5분 동안 방치하여 반응시킨 후, 10% Na₂ CO₃ 1 mL 을 가한 후 충분히 혼합한 후 암조건에서 실온에 1시간 반응시킨 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(Sigma Chemical Co.)를 표준품으로 하여 검량선에 따라 계산하였다.

3.8. Determination of DPPH radical scavenging Activity

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성은 Nanjo 등의 방법으로 측정하였다. PBS에 용해된 각 sample(또는 control로서 PBS) 30 μ L에 에탄올에 용해된 DPPH(60 μ M) 30 μ L을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 50 μ L Teflon capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 Electron Spin Resonance(ESR) spectrophotometer로 측정하였다. 측정조건은 Central field 3475G, Modulation frequency 100kHz, Modulation amplitude 2G, Microwave power 5mW, Gain 6.3×10^5 , 온도 297K 이며, 감귤발효주의 라디칼 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.(16)

$$\text{Radical scavenging activity(\%)} = [(h_0 - h_x) / h_0] \times 100$$

(h_0 , h_x : 발효주의 유무에 따른 sample의 ESR signal intensities)

4. Results

4.1. Chemical compositions and physical properties

감귤 발효주 제조에 있어 감귤착즙액과 감귤농축액을 성분분석 하였다. 감귤착즙액의 경우 감귤 적정 생산시기인 12월부터 다음해 2월까지 생산된 감귤과 유의한 결과를 보였고, 농축액과 동일하게 25% 로 설탕으로 보당하였다. (Table 4)

Table 4. Chemical compositions and physical properties of citrus juice, juice concentrate

Part	Sugar conc. (%)	acidity (%)	Vitamin C (mg/100g)	pH	Flavonoids ($\mu\text{g/mL}$) ¹⁾				
					HP	NG	NHP	NR	RT
Juice	25	0.84	10.53	3.31	23.7	20.3	24.6	15.7	27.1
juice concentrate	25	1.10	14.01	3.22	35.3	117.9	36.2	106.9	28.4

¹⁾ HP: hesperidin, NG: naringin, NHP: neohesperidin, NR: narirutin, RT: rutin

이 결과는 다른 연구에서 발효주 재료로 이용되었던 딸기의 당도 9.3~9.8%에서 25% 설탕으로 보당한 비슷한 양상을 보였다.(17) 하지만 pH에서 다른 과즙과 달리 낮은 편으로 CaCO_3 를 처리하여 pH를 보정이 필요할 것이라 예상되어졌다. 이는 pH가 낮으면 세균으로 인한 잡균번식으로 알코올 발효에 영향을 주기 때문이다. (18)

4.2. Fermentation test of selected yeasts

감귤 발효주를 제조하기 위해 감귤착즙액과 감귤농축액 10%에 25%로 보당하

고 CaCO₃ 500 µg/mL 처리한 후, 7종 건조효모를 YM배지에서 전배양시켜, 5%(v/v)를 주모로 접종한 후 30°C에서 7일간 배양시킨 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Fermentation test of selected yeasts for citrus wine making.¹⁾

Yeast		WY30	C.D.B	Mont.	PC	D47	1118	V1116
	Sugar conc. (%)	7.1	7.5	7.7	7.7	8.3	8.1	7.9
Juice	pH	3.25	3.46	3.26	3.33	3.43	3.35	3.43
	Alcohol contents (%)	14.1	14.4	13.5	13.6	13.2	13.6	12.3
juice	Sugar conc. (%)	8.1	8.3	8.5	8.5	8.4	8.4	8.3
concentrate	pH	3.37	3.42	3.31	3.3	3.43	3.3	3.34
	Alcohol contents (%)	13.2	12.6	11.9	12.1	12.6	12.2	12.2

¹⁾ Initial sugar concentration was 25%, fermentation was carried out at 30°C for 10 days.

건조효모를 활성화시켜 우수효모 선발에서 시험에서, 전체적으로는 착즙액을 이용한 그룹에서 알코올이 12.3 ~ 14.4% 생성되어 잔당 함량도 적은 것을 알 수 있었다. 하지만 선행 연구되어진 결과를 살펴보면, 착즙공정의 애로사항 및 발효가 끝난 후 좋은 청징 효과를 기대할 수 없다고 하였다.(10) 그래서 본 연구에서는 감귤 농축액을 이용한 우수효모 선발시험에서 *Saccharomyces cerevisiae* 계통의 WY30 건조효모가 알코올 함량이 가장 높은 13.2%를 나타내었으며, pH 또한 3.37로서 감귤주 발효에 적절하다고 판단하여, 이 후 실험은 감귤 농축액과 10%에 25% 로 보당하여 WY30 효모 균주를 사용하여 수행하였다.

4.3. Added with hesperidin during fermentation of properties

감귤 발효주에 hesperidin 을 10-500 µg/mL 처리한 후, 30일간 발효기간별

잔당과 총산, pH 그리고 알코올 함량을 측정하였다, 그 결과는 Fig. 1. 에 나타냈으며, hesperidin 함량이 높을수록 발효진행이 빨라 당도는 떨어지고 알코올 함량은 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 특히 hesperidin 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서는 발효 8일째 13.8% 알코올 함량을 나타내며, 정상적인 1차 발효가 끝났음을 확인 하였다. 총산 역시 CaCO_3 으로 보정이 후, 0.60 ~ 0.85% 로 안정적인 산도를 나타냈다.



Fig. 1. Typical time courses of alcohol fermentation of citrus wine according to hesperidin addition. Initial sugar concentration was 25%, fermentation was carried out at room temp.($^{\circ}\text{C}$) for 30 days.

The wine were supplemented with control (●), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (○), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (▼), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (△), 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (■) of hesperidin.

그 외 감귤에 함유되었다고 알려진 11종 플라보노이드를 측정하였다. 감귤주에는 hesperidin, naringin, neohesperidin, narirutin, rutin 등 5가지가 검출되었으며, 발효기간별 flavonoids 변화를 확인할 수 있었다 (Table 6). 이 중 모세혈관 강화작용으로 알려진 hesperidin은 발효 30일 지난 후 4.45 ~ 25.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 잔존하였는데, 이는 초기 hesperidin 처리량과 대조적인 모습을 보였는데, 불용성인 hesperidin이 발효초기에 용해되지 못하다, 발효가 진행될수록 알코올 함량의 증가로 인해 hesperidin이 증가하였지만 알코올 함량이 최대 15% 내외인 것을 감안했을 때 완전 용해는 힘든 것으로 사료된다. hesperidin 이외에도 지방대사 개선제 및 유방암 세포증식 저해작용이 우수한 naringin 등이 44.83 ~ 79.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 함유되어 있었고, 모든 플라보노이드 함량은 hesperidin 무처리군이 발효시작 1일에 175.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 비해 발효 30일에는 130.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 감소한 반면, hesperidin 처리군에서는 모두 증가하는 것을 확인하였다. (Table 7)

Table 7. Total flavonoids contents of citrus wine fermented in different fermentation period (1, 30 day)

Fermentation day	Control ¹⁾		10 $\mu\text{g}/\text{mL}$		50 $\mu\text{g}/\text{mL}$		100 $\mu\text{g}/\text{mL}$		500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	1day	30day	1day	30day	1day	30day	1day	30day	1day	30day
TFC ²⁾ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	175.9	130.7	177.7	207.9	151.4	223.4	164.4	224.5	219.8	241.6

¹⁾ Control = Non hesperidin

²⁾ Total flavonoids = hesperidin, naringin, neohesperidin, narirutin, rutin

Table 6. Flavonoids of citrus wine added with hesperidin during fermentation ($\mu\text{g/mL}$).

Hesperidin	0	1	2	3	5	8	12	16	20	30
Control	24.97	20.3	17.5	18.28	17.04	16.01	5.14	4.65	4	4.45
10ug/mL	24.97	3.27	3.63	2.83	2.61	2.69	2.67	2.36	1.88	6.15
50ug/mL	24.97	8.25	9.61	13.6	15.45	14.83	17.83	19.13	20.15	21.19
100ug/mL	24.97	16.15	21.04	20.91	22.24	24.84	22.95	23.06	25.07	25.42
500ug/mL	24.97	28.22	24.69	23.39	24.41	22.41	24.68	26.69	24.12	25.89
Naringin	0	1	2	3	5	8	12	16	20	30
Control	79.64	54.7	28.01	54.96	55.59	57.62	45.34	47.96	45.17	44.83
10ug/mL	79.64	45.31	41.16	40.23	45.92	41.57	10.04	42.01	39.6	56.62
50ug/mL	79.64	52.34	56.95	55.19	62.09	65.8	64.11	75.6	73.69	75.68
100ug/mL	79.64	54.29	54.73	64.72	62.91	68.64	67.65	72.27	76.5	76.3
500ug/mL	79.64	70.26	67.91	67.72	72.33	70.71	67.96	76.64	81.73	79.13
Neohesperidin	0	1	2	3	5	8	12	16	20	30
Control	29.02	24.9	23.59	23.35	24.29	23.08	22.31	22.48	22.41	22.94
10ug/mL	29.02	24.22	22.43	21.33	22.88	19.97	19.76	20.88	20.33	26.72
50ug/mL	29.02	22.85	25.08	24.42	26.88	26.3	28.27	28.63	29.25	29.3
100ug/mL	29.02	22.61	22.58	23.54	25.43	25.14	25.57	27.77	29.93	27.82
500ug/mL	29.02	30.94	29.86	28.73	28.93	27.92	27.34	31.88	30.03	33.4

Narirutin	0	1	2	3	5	8	12	16	20	30
Control	67.46	51.77	50.39	48.14	51.62	49.09	47.06	51.27	43.77	44.34
10ug/mL	67.46	46.66	44.91	46.81	44.48	39.64	39.91	44.2	43.91	52.64
50ug/mL	67.46	48.65	50.65	47.72	54.75	57.51	57.44	63.62	65.61	67.14
100ug/mL	67.46	47.52	49.62	55.43	55.85	57.48	59.71	60.01	66.29	65.43
500ug/mL	67.46	59.96	54.75	60.72	57.8	62.01	64.16	66.66	67.05	67.87

Rutin	0	1	2	3	5	8	12	16	20	30
Control	28.35	24.19	24.69	23.38	21.89	24.33	14.21	15.92	14.75	14.28
10ug/mL	28.35	14.81	14.53	13.8	14.51	11.71	11.72	11.8	10.57	19.28
50ug/mL	28.35	19.31	21.98	22.54	26.25	25.66	27.5	27.85	29.34	30.11
100ug/mL	28.35	23.86	25.3	23.91	24.68	27.81	27.16	27.59	31.79	29.48
500ug/mL	28.35	30.45	29.87	29.04	29.44	28.55	27.41	32.26	30.82	35.32

4.4. Change of vitamin C content

감귤의 기능성분 중 하나인 비타민 C 함량을 hydrazine 비색법(14)에 의해 정량하였다. 제주감귤의 과육에는 30~35 mg/100g 가 과피에는 150~200 mg/100g 가 함유되어 있다고 알려져 있다(13, 19). 감귤발효주에서는 발효초기 비타민 C 함량이 14.04 mg/100mL 이었고, 발효 5일까지는 비타민 C 가 다소 비슷한 양을 보이다, 발효가 진행될수록 비타민 C 가 줄어드는 양상을 보였다. 발효종료 30일째 비타민 C 는 hesperidin 500 μ g/mL 첨가구가 제일 많은 12.67 mg/100mL를 확인하였다. (Table 8)

Table 8. Change in vitamin C contents of citrus wine during fermentation with different concentration of hesperidin contents for 30 days at room temperature(°C).

mg/100g	0	1	2	3	5	8	12	16	20	30
Control	14.04	11.85	20.88	19.51	13.76	11.03	11.85	8.57	8.57	8.29
10 μ g/mL	14.04	14.04	15.13	11.58	10.75	9.39	8.57	9.39	9.66	8.29
50 μ g/mL	14.04	17.05	18.14	19.24	12.12	11.03	11.03	10.21	11.85	10.75
100 μ g/mL	14.04	18.69	18.69	11.85	12.94	11.30	12.94	10.29	11.03	10.75
500 μ g/mL	14.04	10.21	12.67	11.58	12.94	11.03	11.03	11.58	11.39	12.67

4.5. Change of total polyphenol

폴리페놀은 식물체에 함유되어 있는 기능성물질의 대표적인 성분중의 하나로서 플라보노이드, 프로시아니딘, 탄닌, 안토시아닌 및 페놀산과 같은 페놀성분들이

있다. 이 페놀성 화합물들은 항돌연변이원성, 콜레스테롤 저하작용, 정장작용, 항암 및 항산화작용 등의 다양한 항산화 생리활성 기능을 가지고 있는 phenolic hydroxyl기가 효소단백질과 거대분자들과 결합하는 성질이 있다.(20, 21)



Fig. 2. Change of total polyphenol content of citrus wine during fermentation with different concentration of hesperidin contents for 30 days at room temperature(°C).

감귤발효주의 폴리페놀함량은 Fig. 2. 과 같다. 30일간의 발효가 끝난 발효주는 hesperidin 첨가 조건에 따라 유의적으로 356.56 ~ 446.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 나타냈다. 이 결과는 hesperidin 첨가량이 폴리페놀 함량 변화에 영향을 주는 것으로 사료 되는데, 발효가 진행될수록 폴리페놀 함량이 증가되는 것을 확인하였다. 또한 단감을 이용한 와인제조 연구에서도 779 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 수용성 페놀 함량을 나타내었고,(18) 병귤과 진귤을 이용한 주정 농도에 따른 침출주에서는 주정농도가 높고 절단시료에서 403.7 ~ 543.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 함량을 보였다.(22) 하지만, 포도, 산머루 이용 와인에서는 18.12 ~ 21.87 mg/mL , 오디를 이용한 와인제조의 폴리페놀 함량이 1.28 ~ 2.58 mg/mL 인 것을 감안했을 때 적색계열의 과실을 이용한 와인에서 폴리페놀 함량이 높은 것으로 보고되었다.(23,24)

4.6. Change of DPPH radical scavenging Activity

일반적으로 특정물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법은 여러 가지가 있으나, 보편적으로 DPPH radical 소거활성은 비교적 간단하면서도 대량으로 측정이 가능한 방법이다. 이 DPPH 물질은 radical을 갖는 물질 중에서도 비교적 안정한 화합물로 에탄올 용액에서 보라색으로 발색된다. 그러나 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 항산화 활성 물질이 DPPH의 radical을 소거시켜 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있고, 지방질 산화를 억제 시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 활성 radical에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용되고 있다. (21, 25)



control 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$

Fig. 3. Change of DPPH radical scavenging activity from citrus wine during fermentation with different concentration of hesperidin contents for 30 days at room temperature($^{\circ}\text{C}$).

감귤발효주에는 35.44 ~ 51.59%의 항산화 활성도를 가졌으며, hesperin 처리에 따른 항산화 효과는 크지 않은 것으로 판단된다. 특히 발효기간이 진행될수록 약

간의 증가를 보인 폴리페놀 함량 보다는 작지만 DPPH를 통한 항산화 활성도 측정에서도 플라보노이드 함량의 변화와 마찬가지로 발효 30일째 hesperin 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리구에서 가장 높은 51.59% 항산화 활성도를 보였다. (Fig. 3.) 2006년 발표된 충북대 연구팀의 연구 결과에서도 헤스페리딘은 SOD(superoxide dismutase) 활성을 상당히 높이는 것으로 확인 하였다. 연구팀의 실험에 따르면 에탄올을 포함한 식이를 8주간 제공해 알코올에 의한 세포독성을 유발한 rats(E_8)와 에탄올을 4주 제공하고 그 후 4주는 에탄올과 헤스페리딘을 함께 제공한 rats(E_8H_4)에서의 8주 후 SOD 활성을 측정했을 때 헤스페리딘 처리한 rats에서 훨씬 높은 수치를 확인하였다.(21)(26)

4.7. Sensory attribute

기존 감귤착즙액으로 제조되어진 감귤발효주(A)와 감귤 농축액으로 제조되었으나, 제성과정을 통해 맛을 변화시킨 감귤주(B), 그리고 이번 연구로 개발되어진 감귤주(C)등 3가지로 관능평가를 하였다. 그 결과 착즙액을 이용한 감귤주에서는 색의 농도가 짙어 관능평가요원들에게 낮은 점수를 받았으며, 맛과 향에서도 농축액을 이용한 감귤주보다 우수하지 못한 결과를 보였다.(Table 9)

Table 9. Sensory quality of citrus wine

Sensory attribute ¹⁾			
	Color	Flavor	Taste
A	4.5	4.3	3.5
B	5.2	4.9	5.1
C	5.0	4.6	5.3

¹⁾ 1: dislike very much, 7: like very much.

농축액을 이용한 감귤주에서는 제성 과정의 영향 탓인지 향은 높은 점수를 보였으나 맛에서는 이번 연구로 개발되어진 감귤주에서 가장 높은 점수를 확인할 수 있었다.

5. CONCLUSION

제주감귤을 이용한 발효주를 제조하기 위해 7종의 활성건조효모를 이용하여 적합한 효모를 선발하여 감귤이 다량 함유하고 있다고 알려진 flavonoids 계열 중에 혈압저하효과가 있다고 알려진 hesperin을 10 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하여, 실온에서 30일간 발효시켰다. 그리고 발효진행에 따른 잔당, 알코올 함량, pH 변화를 살펴보았으며, 기능성주로서 특성을 확인하기 위해 flavonoids 함량변화, 비타민 C 함량과 폴리페놀 함량 그리고 DPPH 라디칼 소거활성에 따른 항산화 활성도를 측정하였다.

그 결과 *Saccharomyces cerevisiae* 계통의 WY30 효모가 가장 높은 13.2% 알코올 함량을 확인하였다. 이 효모를 이용하여 감귤농축액 10%에 설탕 25%로 보당하여 30일간 발효시켰다. 감귤발효주에는 hesperidin, naringin, neohesperidin, narirutin, rutin 등의 5가지 flavonoids가 측정되었으며, 전체함량의 변화 또한 발효진행에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 hesperidin 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 219.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 241.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 증가한 것을 확인하였다. 그리고 기능성 성분 분석을 위해 비타민 C, 총 폴리페놀 함량, 항산화 활성도를 측정하였다. 발효 30일째 비타민 C 는 hesperidin 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가구가 제일 많은 12.67 mg/100mL 을 확인하였으며, 녹차와 같은 음료나 야채, 과일에 많이 함유되어있는 폴리페놀 성분은 발효 초기 275.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 발효 종료 30일째는 395.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가하였다. 항산화 활성도 측정에서는 35.44 ~ 51.59%로 많진 않지만 hesperidin 첨가구에서 높은 항산화 활성도를 확인할 수 있었다. 그리고 관능평가에서도 감귤착즙액을 이용한 발효주에서 약간의 텁텁함으로 맛과 향을 조사한 항목에서 낮은 점수를 확인하였고, 색상에

서는 농축액을 이용한 발효주는 두 번의 필터처리과정 탓인지 더욱 투명하여 착즙액 발효주보다 약간의 낮은 점수를 확인할 수 있었다. 이 결과를 토대로 제주 감귤을 이용한 감귤주가 상품성으로는 충분한 가능성이 있다고 여겨지며, 기능성 주류로 확대시키기 위해서는 더 많은 기능성물질 발굴과 분석이 필요하다고 사료된다.



PART II. Ethanol Production from Citrus Peel Waste

1. Abstract

Approximately 60 thousand metric tons of citrus were processed into citrus juice from farmhouse by-product. During citrus processing, about half of the fruit is expressed as juice with the rest being citrus peel waste (CPW) consisting of peels, seeds, and segment membranes. The citrus peel waste processing residues are rich in both soluble and insoluble carbohydrates which makes them an attractive potential feedstock for biological conversion to value added products.

In this study, we measured the pre-treatment effect and different loadings of cellulase, pectinase and beta-glucosidase enzymes to hydrolyze citrus peel waste to produce sugars. When the loadings of commercial cellulase, pectinase and beta-glucosidase enzymes were 40EGU, 400PGU, 15Cbu to 1% peel dry matter with 50mM sodium acetate buffer pH 4.8 at 45°C for 24h. we can obtained the highest concentration (about 74 % of total solid) of fermentable sugar. The obtain monomeric sugar medium was used for ethanol production by fermentation using a yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Introduction

최근 고유가와 지구온난화 때문에 바이오에너지 개발과 보급의 필요성이 자주 대두되고 있는 실정이다. 이산화탄소를 비롯한 온실가스의 배출량이 증가됨에 따라 지구의 평균 기온은 꾸준히 상승하고 있다. 그래서 2007년 6월에 독일에서 개최되어진 주요국 수뇌회의에서 온난화에 대한 합의가 이루어져 2050년까지는 온난화 가스의 배출량을 현재의 50%로 줄이자는 공통적인 의견에 따라 전세계는 바이오에너지 연구에 매진하고 있다.(27) 특히 1997년에 기후변화에 따른 국제협약 “교토 의정서”가 발효되어, 회원국은 온실효과를 나타내는 가스 (greenhouse gas :GHG)의 배출감소와 배출권 거래제가 시행중이며, 우리나라는 에너지 소비 세계 10위(1999), 온실가스 배출량 세계 10위(2005), 2013년 이후 “교토 의정서” 2차 이행 기간 동안 온실가스 감축 의무국으로 지정될 것이 확실시되고 있다. 이에 대한 대책으로서 화석 에너지를 대체하여 대기오염 물질을 줄일 수 있는 바이오 에너지에 대한 관심이 증가되고 있다. 바이오 에너지 개발 및 이용은 에너지의 해외 의존도를 낮추고, 친환경적 에너지를 이용함으로써 온실가스 및 대기오염을 저감하는 효과를 기대할 수 있다. 또한 에탄올을 연료로 사용하여 발생하는 이산화탄소는 식물이 자랄 때 다시 흡수됨으로 바이오에탄올은 지구온난화 저감에 효과적인 연료라고 할 수 있다. 이와 같이 사용 연료 및 연료 형태가 다르겠지만, 바이오에탄올 사용에 따른 이산화탄소 배출저감 효과는 15~55% 가량의 이산화탄소 저감효과가 있는 것으로 보고되고 있다.(28)

현재 바이오에탄올 생산으로 가장 많이 사용되어지는 원료들은 대부분이 잉여 곡물(옥수수, 수수 등의 전분질계와 사탕수수과 사탕무의 당분질계)을 이용하고 있으며 세계 제일의 옥수수 생산국가인 미국은 2004년 바이오에탄올 1,063만 kL를 생산하였고, 세계시장의 27%를 차지하는 양이다. 그러나 국내의 사정은 다르다. 국내에서는 원료의 가격 경쟁력으로 인한 바이오에탄올 생산이 어려우며, 잉여농지가 많지 않은 우리로서는 곡물을 이용한 바이오에탄올 생산은 타당하지 않다고 보고되고 있다.(29)

제주도내 감귤 연평균 생산액은 6,000억원 규모이며, 생산량은 54만톤(2006)

으로 국내 생산 과수 중 1위를 차지하고 있으며, 감귤을 이용한 식품 및 화장품 등의 가공 원료로도 사용되어지고 있다. 2003년 감귤유통조절명령제 도입시행으로 품질향상 및 생산량 조정 등의 다각적인 노력에도 불구하고 비상품 과실이 발생하여 감귤 주스 등의 감귤 가공산업에 이용되어지고 있으며, 가공 산업의 부산물인 감귤착즙박은 매년 6만 톤가량 생성되어지고 있고, 이 중 1~2만 톤은 해양투기 되어지고 있어 새로운 처리기술 및 활용방안이 필요한 실정이다.

오래전부터 세계적으로 오렌지, 감귤을 이용한 바이오매스 연구가 진행되어지고 있는 실정이며, 조만간 산업화 수준에 도달할 것으로 알려졌다. 하지만 감귤산업에 비중이 큰 제주도에서는 바이오매스 연구가 미비한 실정이다. 특히 감귤박 자체의 탄수화물 함량이 9.91%이며, 무질소화합물이 16.94%으로 감귤박 총 함량 대하여 58.5% 비율을 차지하고 있다는 보고에 따라,(30) 이를 분해하기 위한 최적 조건을 모색한다면, 감귤로부터 바이오에탄올 생산이 충분히 가능할 것이라 여겨진다.

따라서 본 연구에서는 감귤가공과정에서 폐기되어지는 부산물인 감귤박을 활용하여, 에탄올 생산을 위한 시료 전처리 조건과 pectinase, cellulase, β -glucosidase 등의 가수분해 효소혼합으로 적정 당화조건을 통해 최대 당화효율을 확인하였다.

3. Theory

3.1. Cellulase

식물 세포벽의 기본구조 성분인 cellulose는 모든 식물계 물질의 33%를 차지하며, cellulase는 cellulose의 가수분해 반응을 촉매하는 효소로 cellulose의 β -1,4 glycoside 결합을 가수분해하여 cellobiose를 생성하게 한다. 주로 균류·세균·고등식물·연체동물 등에 많이 존재한다고 알려져 있다.(31)(32)(33)(34)(35)

3.2. Pectinase

펙틴질 성분인 pectinic acid, pectin, pectic acid 등의 α -1,4-galacturonic acid 결합을 가수분해하는 효소로 polymethylgalacturonase라고도 부른다. 펙틴 가수분해 효소의 일종이지만 총칭하여 쓰는 수도 있다. 세균, 곰팡이, 효모, 식물, 곤충 등에 널리 분포하고 있다. 효소의 작용형식에서 α -1,4결합의 안쪽에서 임의로 분해하여 올리고당을 생성하는 endo-pectinase와 말단기에서 순차로 분해하여 단당류를 생성하는 exo-pectinase로 분류할 수 있고, 전자는 액화형, 후자는 당화형 펙틴 가수분해 효소에 속한다. 전자에 작용하는 효소를 polymethylgalacturonase, 후자의 효소를 polygalacturonase로 구별하는 수도 있다.((31)(32)(33)(34)(35)

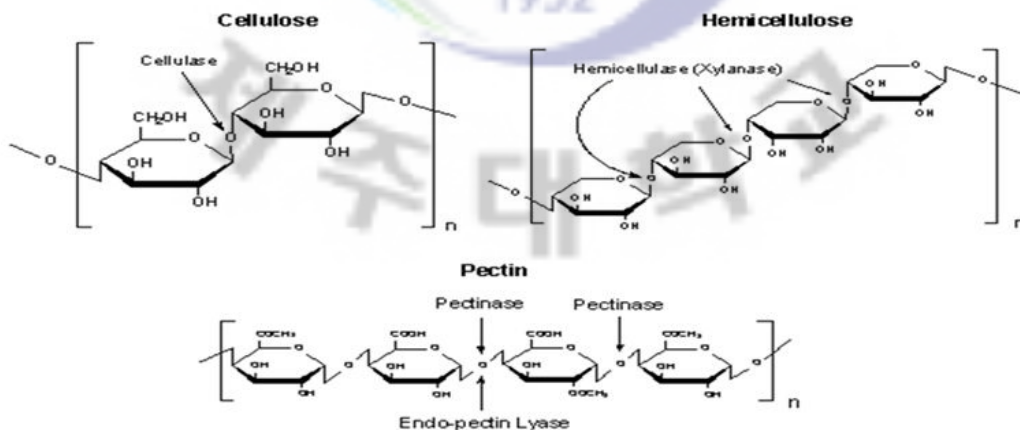


Fig. 4. Cellulose and Pectin Specificities.(31)

2-3. β -glucosidase

β 1-4 결합에 작용하는 glucosidase이며, beta-D-glucosides의 비환원성말단을 가수분해 시켜 cellulose가 cellulase에 의해 분해되면 cellobiose를 생성되는데, 이 cellobiose는 β -glucosidase에 glucose로 전환하게 된다고 알려져 있다.(31)(32)(33)(34)(35)

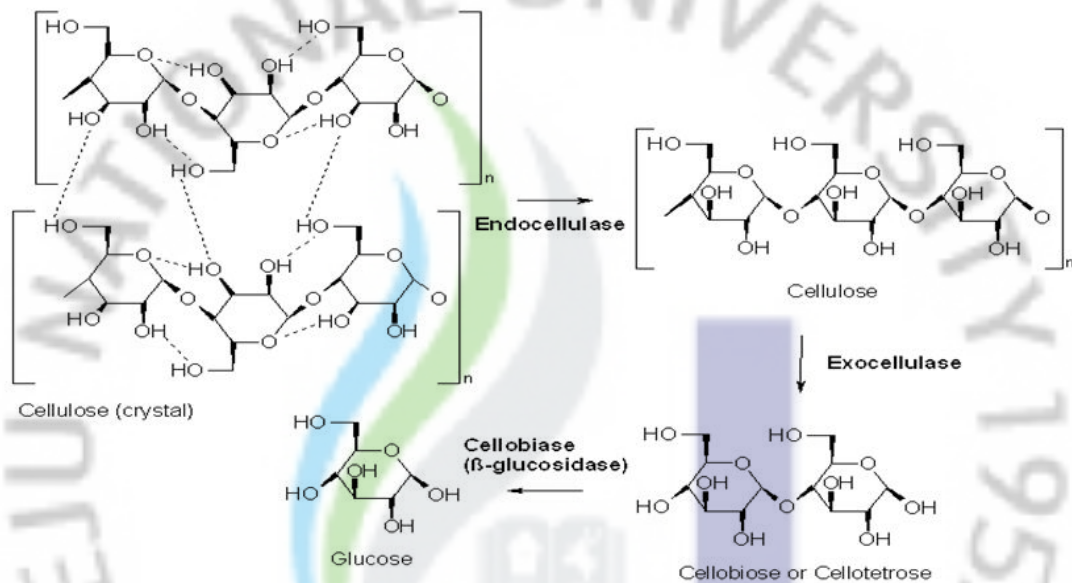


Fig. 5. Function of cellulose and β -glucosidase.(31)

4. Materials and Methods

4.1. Materials

감귤박은 2009년 제주도지방개발공사 제2감귤복합처리 가공공장(서귀포시 남원읍 한남리)에서 가공처리 후 발생하는 부산물로서, 1차와 2차 착즙가공으로 주스 생산이 이루어지는데, 본 연구는 2차 착즙박을 이용하였다. 수거 되어진 시료는 제주하이테크산업진흥원(제주시 아라동)의 동결건조기를 이용하여, 48시간동안 건조시킨 후, 분쇄기를 통한 1차 분쇄와 조분쇄기를 이용하여 직경 40mesh 이하의 시료를 준비하였다. 준비되어진 시료는 50mM Sodium acetate buffer pH 4.8에 현탁하여 가수분해에 사용하였다.(36)

4.2 enzymes hydrolysis

당화에 필요한 가수분해 효소는 cellulase, pectinase 그리고 cellobiase로써 상업용 효소를 사용하였으며, 각각 상업용 이름은 Cellulase-Celluclast 1.5L (*Trichoderma reesei*), Pectinase-Pectinex Ultra SP (*Aspergillus aculeatus*), β -Glucosidase-Novozym 188 (*Aspergillus niger*)이며, Novozym A/S (Bagsvaerd, Denmark) 에서 구입하였다. (Table 1.)

Table 10. Enzymes properties used in this study.

Product name	Type of enzyme	State	Color	Activity
Celluclast 1.5L	cellulase	liquid	brown	700 EGU/g
Pectinex Ultra SP	polygalacturonase	liquid	brown	9500 PGU/ml
Novozym 188	cellobiase	liquid	brown	250 Cbu/g

4.3. Enzymatic saccharification of citrus peel waste

감귤박 건조시료 1%와 10%를 50mM Sodium acetate buffer pH 4.8에 현탁하여, 효소반응을 극대화시키기 위해, 130°C에서 20분간 고압멸균 처리하였다. 그리고 개별 효소 및 혼합 효소처리 후 진탕 배양기에서 48°C, 10-12rpm으로 24시간동안 반응하였다. 개별 효소 처리와 혼합 효소처리 조건은 Table 2.에 나타내었다.

효소 가수분해물은 발효를 위한 멸균과 효소활성억제를 위해, 121°C에서 20분간 처리하고 5,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액을 당, 산 분석에 이용하였다. 감귤에 많은 glucose, fructose, sucrose 와 그 외 발효가능하다고 알려진 galactose, rhamose, arabinose등을 ICS-3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) 으로 분석하였다. 그리고 감귤의 pectin이 분해되면 만들어지는 galacturonic acid는 DX-500 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) 으로 분석하였다. (Table 3.)(37)

Table 11. Enzymatic hydrolysis with enzymes loading condition.

	1%	10%
Pectinase loading	100-2,000 PGU	400-4,000PGU
Cellulase loading	10-80 EGU	100-800 EGU
Cocktail	Pectinase 400 PGU BG 15 Cbu	Pectinase 2,000 PGU BG 150 Cbu
	Pectinase 400 PGU Cellulase 40 EGU	Pectinase 2,000 PGU Cellulase 400 EGU
	Pectinase 400 PGU Cellulase 40 EGU BG 15 Cbu	Pectinase 2,000 PGU Cellulase 400 EGU BG 150 Cbu

Table 12. Ion-Chromatography conditions for fermentable sugars and acid analysis.

	Sugar	Acid
Model	ICS-3000 (DIONEX)	DX-500 (DIONEX)
Column	4.6×300mm CarboPac™ PA 1	4×25mm CarboPac™ PA 1
Detector	EC Detector	EC Detector
Flow rate	1mL/min	1mL/min
Injection volume	300 μ l	100 μ l
Run time	30 min	25 min
Mobile phase	50% NaOH	100% n-heptafluorobutyric acid

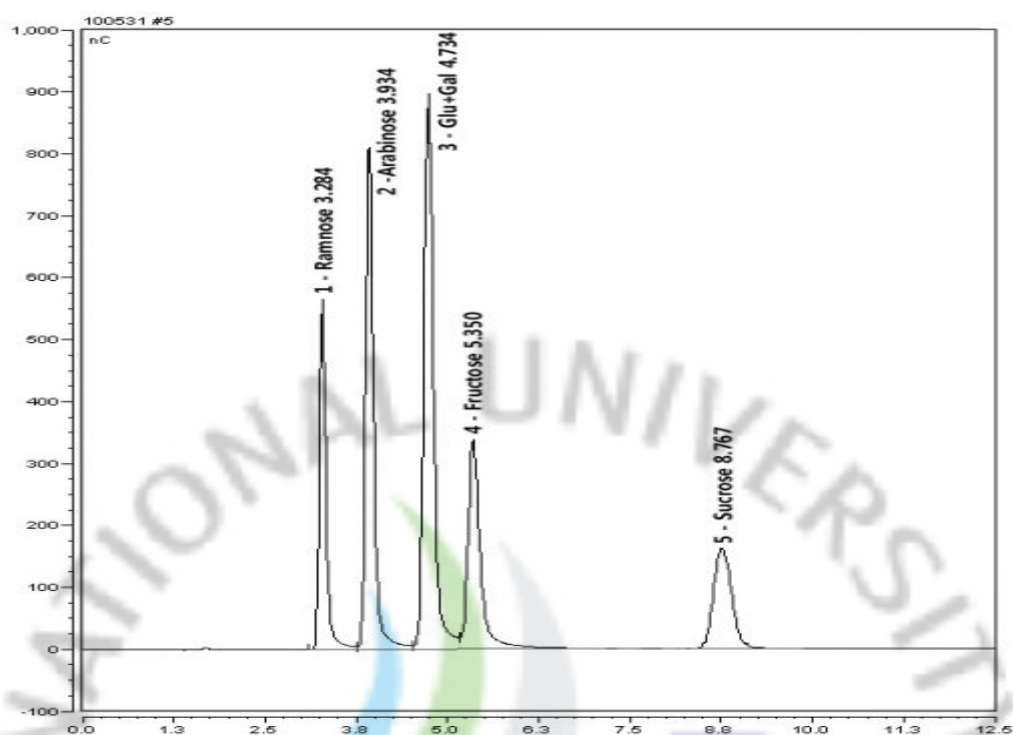


Fig. 6. IC chromatogram of standard sugar.

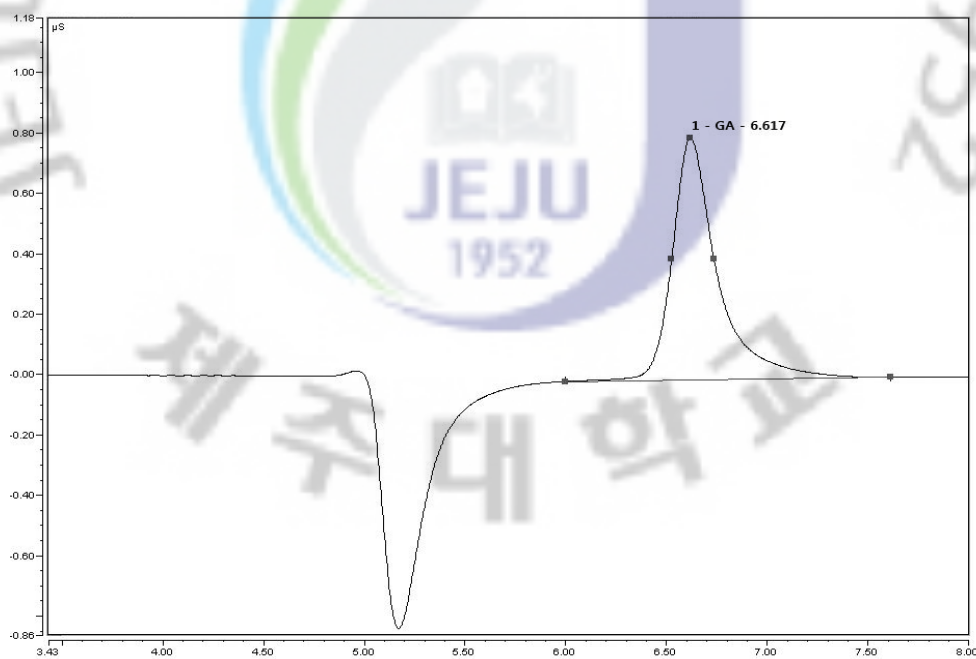


Fig. 7. IC chromatogram of standard galacturonic acid.

5. Results

5.1. Enzymatic hydrolysis with different pectinase loading

Novozyme A/S (Bagsvaerd, Denmark)에 따르면, Pectinaex Ultra SP는 9500 PGU/mL 효소활성을 가지고 있고, Celluclast 1.5L와 Novozym 188에 대해서는 700 EGU/g과 250 Cbu/g 효소활성을 가지고 있다고 하였다. 그리고 bradford method에 따라 효소의 단백질을 정량해본 결과, pectinase는 $7.08 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, cellulase와 beta-glucosidase는 각각 44.2, $43.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 단백질을 포함하고 있었다. 이에 본 연구는 이 활성도를 이용하여 수행하였다.

건조시료 1%에 Pectinase 처리할 경우 sucrose는 glucose와 fructose를 포함하는 이당류로 sucrose가 감소하는 반면에 glucose와 fructose는 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 Pectinase 100-2,000 PGU 단독처리하여 가수분해 하였을 때 400 PGU 처리 시 glucose와 galactose를 합한 값이 효소 무처리에 비해 67.5% 증가율을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 측정된 모든 당에서도 모두 효소처리효과를 보여 총당이 $55.8 \pm 0.36\%$ (of total solid)에서 $69.7 \pm 0.08\%$ (of total solid)의 증가량을 확인하였다.(Fig 1.)

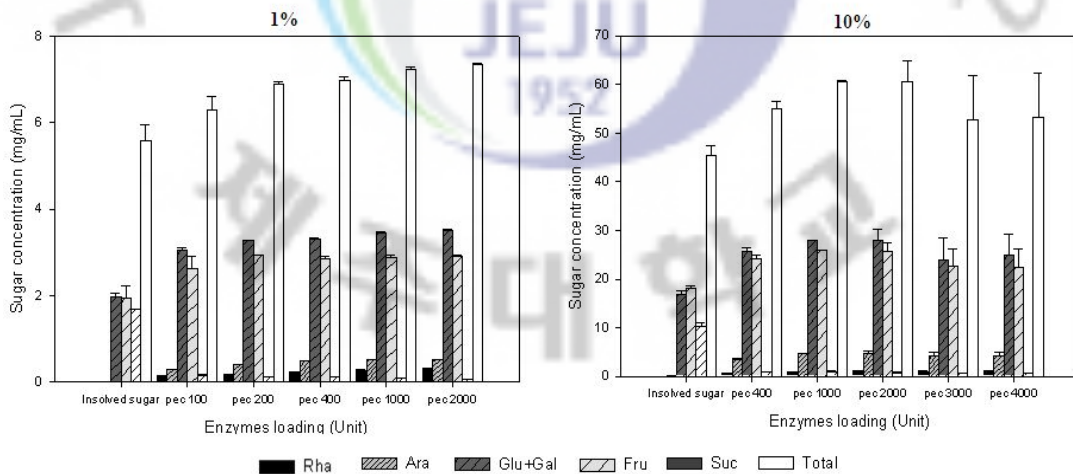


Fig. 8. Carbohydrate and total sugar production after enzymatic hydrolysis with different pectinase loading.

또한 시료 10% 처리에도 모든 당이 증가하였으며 pectinase 2,000 PGU 처리 후 $60.6 \pm 4.20\%$ (of total solid)의 총당을 보였으며 2,000 PGU 이상 처리하였을 때 총당의 증가량이 둔화되는 것을 확인 하였다.

5.2. Enzymatic hydrolysis with different cellulase loading

Cellulase를 단독처리 하였을 경우 시료 1%에는 40 EGU를 처리하여 $65.2 \pm 0.17\%$ (of total solid)를, 시료 10%에 400 EGU 처리하여 $56.9 \pm 4.67\%$ (of total solid) 총당을 얻었으며 400 EGU 이상 효소 처리하였을 때 총당이 둔화되는 것을 확인 하였다.(Fig 2.) 오렌지와 자몽을 이용한 선행 연구결과에서도(37) pectinase는 감귤 껍질에서 다양한 다당류를 분해시키는 활성을 갖는 반면에, cellulase는 한정된 활성을 갖는다고 하였다.

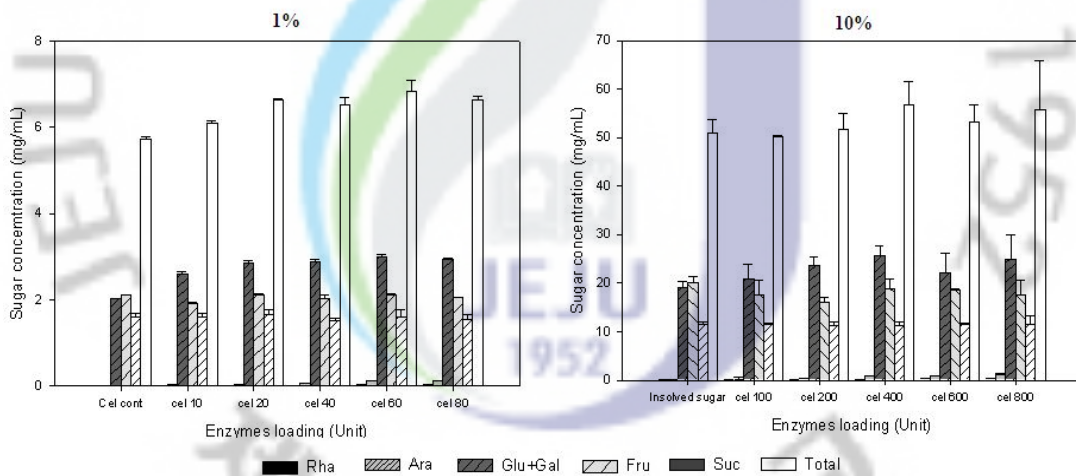


Fig. 9. Carbohydrate and total sugar production after enzymatic hydrolysis with different cellulase loading.

그리고 beta-glucosidase는 cellobiose, beta-glucose의 이당류와 cellulase에 의한 cellulose 가수분해물을 glucose로 가수분해 시킨다고 하였다.(37) cellobiose는 *Saccharomyces cerevisiae*에 의해 발효 되지 않기 때문에 반드시 에탄올 발효 전에 가수분해 되어야한다고 보고되었다.(38,39)

5.3. Enzymatic hydrolysis with different enzymes cocktail loading

Pectinase 와 cellulase loading 결과를 토대로 최대 가수분해율을 확인하기 위해 pectinase와 beta-glucosidase, cellulase와 beta-glucosidase를 혼합처리 하였다. 그 결과 시료 1% 경우 cellulase 40 EGU에 beta-glucosidase 15 Cbu 혼합처리 하였을 때 총당이 $61.1 \pm 0.01\%$ (of total solid)에 비해, pectinase 400 PGU와 beta-glucosidase 15 Cbu 혼합처리 조건의 총당이 $73.7 \pm 0.03\%$ (of total solid)로 더 높은 것을 확인하였다(Fig .3)(Table .6). 시료 10% 경우에도 pectinase와 beta-glucosidase 혼합처리 조건이 높은 것으로 확인 하였고, pectinase와 cellulase를 함께 조합하였을 때가 pectinase만 처리하였을 때보다 더 많은 glucose 증가율을 보였다. 이는 glucose 수율을 높이고 감귤박에서 다량으로 쉽게 당을 발효시키기 위해서 pectinase loading에 있어 cellulase가 필요하다 여겨진다. 그리고 효소의 처리조건에 따른 최적 효소량을 합하여 당화 분석을 해본 결과 시료 1% 경우 pectinase는 400 PGU, cellulase는 40 EGU 그리고 beta-glucosidase 15 Cbu를 혼합 처리하였을 때 가장 높은 당화 효율을 확인하였다. 당화 증가율은 효소 처리하지 않은 $55.8 \pm 0.36\%$ (of total solid)이었던 총당이 $73.7 \pm 0.48\%$ (of total solid)로 32.1%의 증가율을 확인할 수가 있었다. 또한 시료 10%에서는 pectinase 2,000 PGU, cellulase 400 EGU 그리고 beta-glucosidase 150 Cbu 의 효소조합 하였을 경우 $49.3 \pm 0.09\%$ (of total solid)이었던 총당이 $72.8 \pm 2.08\%$ (of total solid)로서 효소 가수부해 효과로 47.6%의 증가율을 확인하였다.(Fig 3., Table 7.)

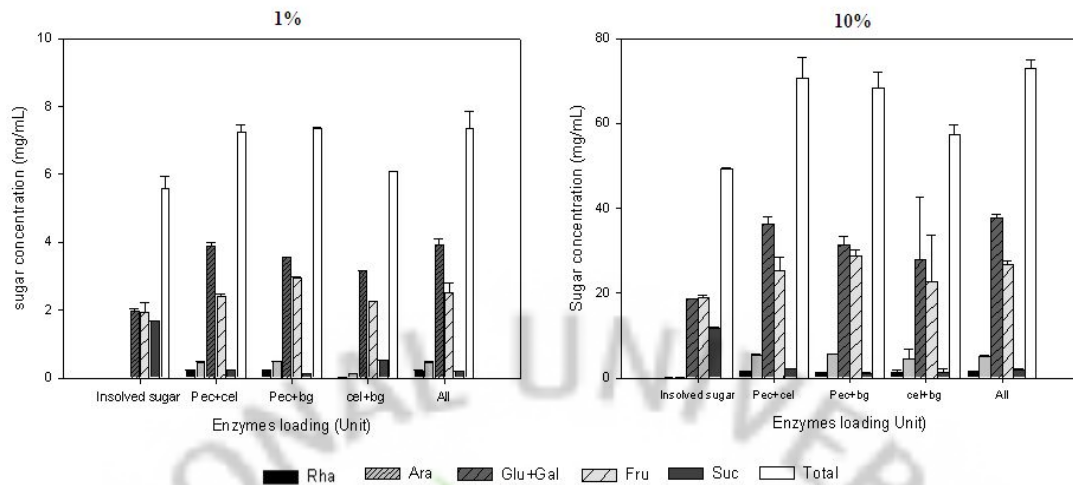


Fig. 10. Carbohydrate and total sugar production after enzymatic hydrolysis with different enzymes cocktail loading.

오렌지를 이용한 효소가수분해 당화효과로 인한 에탄올 생산 연구와 제주감귤을 이용한 당화효과를 비교해보면, 오렌지의 효소 가수분해 효과로 인한 총당이 67.5%(of total solid)에 비하면(40), 본 연구에서 감귤의 효소 가수분해 효과로 총당이 70%(of total solid) 넘는 것으로 확인되어, 에탄올 발효도 충분하다고 여겨진다. 또한 galacturonic acid가 pectinase 처리에 의해 증가하는데(Fig 4.) 모든 효소를 혼합하였을 경우 시료 1%에는 1.11 ± 0.39 %(of total solid), 시료 10%에는 4.15 ± 0.09 %(of total solid)의 galacturonic acid를 확인 하였다. 이는 galacturonic acid가 *E.coil* 로 발효 가능하여 *Saccharomyces cerevisiae* 로 발효 가능한 당과 함께 에탄올 전환이 가능할 것이라 여겨진다. (41,42)

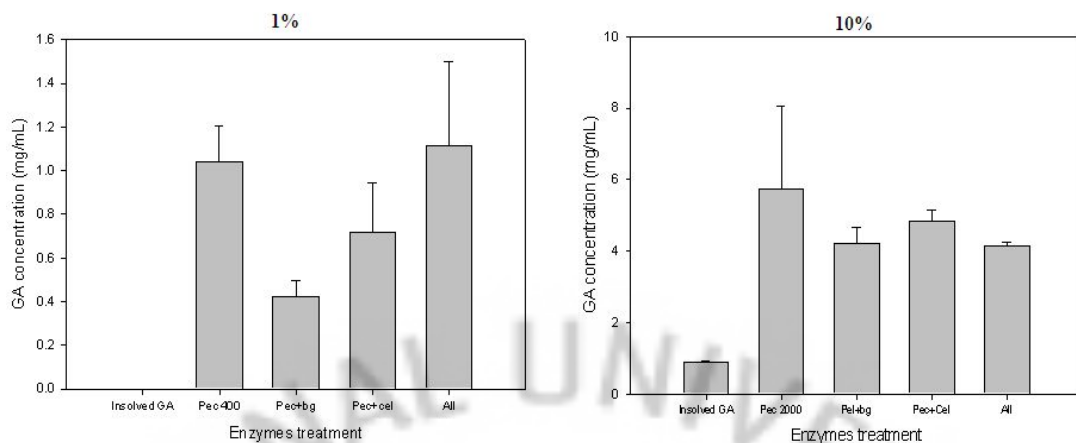


Fig. 11. Galacturonic acid production after enzymatic hydrolysis with different enzymes loading.



Table 13. Sugar yields for enzymatic hydrolysates of citrus peel waste (1%).

% (of total solid)	Rhamose	Arabinose	Glu.+Gal. ¹⁾	Fructose	Sucrose	GA ¹⁾	Total Sugar
Insolved sugar	N.D ²⁾	N.D ²⁾	19.7±0.1	19.3±0.3	16.8±0.1	N.D ²⁾	55.8
Pectinase 400PGU	2.2±0.1	4.9±0.1	33.0±0.1	28.6±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1	70.8
Cellulase 40EGU	0.1±0.1	0.7±0.1	28.9±0.1	20.4±0.1	15.2±0.1	N.D ²⁾	65.2
Pec. 400PGU +Cel. 40EGU	2.4±0.1	4.7±0.1	38.8±0.1	24.0±0.1	2.4±0.1	0.7±0.2	79.3
Pec. 400PGU +BG. 15Cbu	2.3±0.1	5.0±0.1	35.5±0.1	29.5±0.1	1.3±0.1	0.4±0.1	77.7
Cel. 40EGU +BG. 15Cbu	0.1±0.1	1.5±0.1	31.8±0.1	22.5±0.1	5.2±0.1	N.D ²⁾	61.0
All	2.2±0.1	4.8±0.1	39.3±1.8	25.2±2.8	2.2±0.1	1.1±0.4	84.7

¹⁾ Glu.+Gal.-Glucose+Galactose, GA-galacturonic acid

²⁾ N.D-Not detected

Table 14. Sugar yields for enzymatic hydrolysates of citrus peel waste (10%).

% (of total solid)	Rhamose	Arabinose	Glu.+Gal. ¹⁾	Fructose	Sucrose	GA. ¹⁾	Total sugar
Insolved sugar	0.1±0.1	0.1±0.1	19.2±1.1	20.1±1.2	11.4±0.7	0.9±0.1	59.8
Pectinase 2,000PGU	1.2±0.1	4.8±0.4	28.1±2.1	25.8±1.5	0.8±0.1	5.7±2.3	66.3
Cellulase 400EGU	0.2±0.1	0.8±0.1	25.7±2.0	18.7±1.9	11.3±0.8	N.D ²⁾	56.9
Pec. 2,000PGU +Cel. 400EGU	1.6±0.1	5.4±0.2	36.1±1.8	25.4±3.0	2.0±0.1	4.8±0.3	75.5
Pec. 2,000PGU +BG. 150Cbu	1.4±0.7	5.4±2.4	30.9±1.4	27.7±1.1	1.2±0.8	4.2±0.4	70.8
Cel. 400EGU +BG. 150Cbu	0.2±0.1	1.7±0.1	30.5±1.7	23.3±1.6	1.2±0.3	N.D ²⁾	56.9
All	1.6±0.1	5.1±0.2	37.6±0.9	26.6±1.1	1.9±0.2	4.2±0.1	77.1

¹⁾ Glu.+Gal.-Glucose+Galactose, GA-galacturonic acid

²⁾ N.D-Not detected

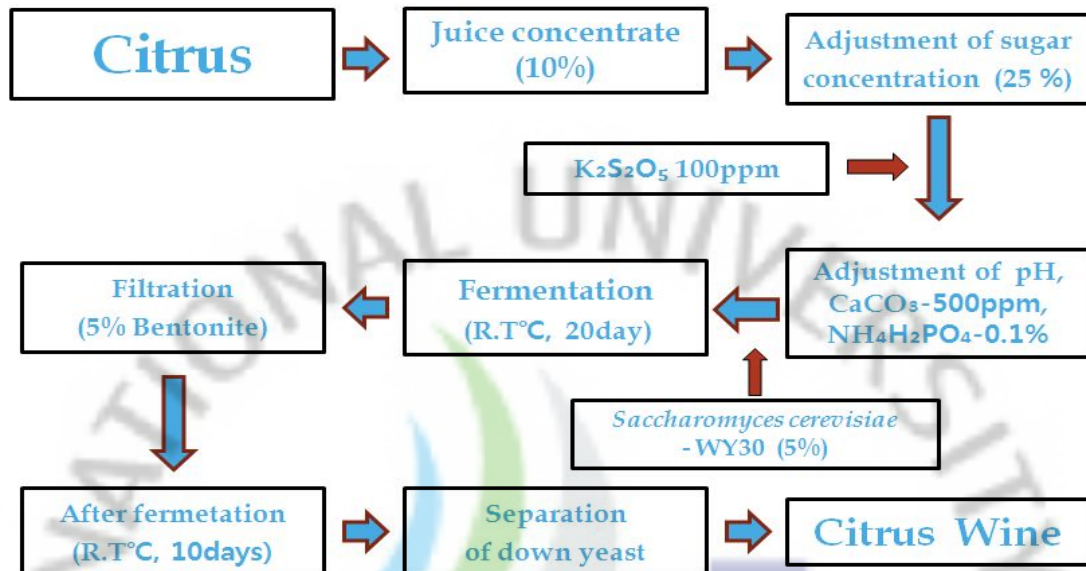
6. CONCLUSION

감귤가공공정에서 발생하는 감귤박이 연간 6만 톤가량 생성되어 그 일부는 바다에 폐기되어지고 있어 새로운 처리기술 및 활용방안이 필요한 실정이다. 감귤박은 pectin, cellulose, hemicellulose 등의 다당류로 이루어져 있으며, 다당류를 분해하여 단당류로 전환시키면 바이오매스로서의 중요한 자원이 된다고 하였다.

본 연구는 감귤에 함유되어 있는 다당류를 분해하기 위해 시중에 판매하는 효소를 사용하여 최적 조건을 확립하고자 하였다. 건조시료 1% 경우, pectinase는 100-2,000PGU를 cellulase는 10-80EGU를 처리하였다. 그 결과 효소 무처리군에서 $55.8 \pm 0.36\%$ (of total solid)이었던 총당이 pectinase 400PGU 처리하였을 경우 $69.7 \pm 0.08\%$ (of total solid)로 증가하였고, cellulase 40EGU 처리하였을 경우에는 $65.2 \pm 0.17\%$ (of total solid)로 증가하였다. 또한 건조시료 10% 경우에는 pectinase 2,000PGU를 처리 시 $60.6 \pm 4.20\%$ (of total solid)를, cellulase 400EGU 처리 시에는 $56.9 \pm 4.67\%$ (of total solid)의 총당이 측정되었고, 그 이상의 효소처리에서는 총당이 둔화되는 것이 확인되었다. 효소 혼합 조건으로는 cellulase와 beta-glucosidase의 혼합보다 pectinase와 beta-glucosidase 혼합 조건이 총당이 높은 것을 확인 하였고, pectinase와 cellulase의 혼합이 pectinase를 단독 처리하였을 때보다 더 많은 glucose 증가율을 보였다. 또한 건조시료 1%에 pectinase 400PGU, cellulase 40EGU 그리고 beta-glucosidase 15Cbu를 혼합처리 경우에는 총당이 $73.7 \pm 0.48\%$ (of total solid)로 효소 무처리군에 비해 32.1%의 증가율을 확인하였다. 그리고 건조시료 10%에 pectinase 2,000 PGU, cellulase 400 EGU 그리고 beta-glucosidase 150 Cbu 혼합 처리 하였을 때에도 총당이 $72.8 \pm 2.08\%$ (of total solid)로 증가해 가장 우수한 당화효율을 확인할 수가 있었다. 이 결과는 오렌지를 가수분해처리 하였던 67.5% (of total solid)보다 우수한 당화율이며(40), 앞으로 *Saccharomyces cerevisiae*와 *E-coil* 를 이용한 에탄올 생산 연구에도 충분히 가능할 것이라 사료된다.

PROCESS

PART I. Citrus wine processing methods.



PART II. Citrus Peel Waste Bio-Ethanol Program



REFERENCES

1. Internet Site - Doosan Corporation | EnCyber is a Doosan Corporation company.
2. Koh JS. Citrus Industry, Jeju-Munhwasa, Korea (2001)
3. Internet Site 디지털 우리 술 문화 (<http://koreanliquor.culturecontent.com>)
4. Cho MS, Koh SI. A Study on Residents' Attitude to Develop Traditional Liquor - Focused on the Development of Mandarin Wine. Kor. Academic Soc. Hosp. Ad. 13(4): 219-233 (2004)
5. Laura B. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance provides a nice overview of the nutritional significance of flavonoids as well as other types of food polyphenols. The lead review article in Nutrition Reviews. 56: 317-333 (1998)
6. Catherine F, Odile T, Christine M, Claudine M, Augustin S, Françoise R, Christine R. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver physiol. 279: G1148-G1154 (2000)
7. Mouly PPM, Arzouyan CG, Gaydou EM, Estienne JM. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. J. Agric. Food Chem. 42: 70-79 (1994)
8. Lee MH, Huh D, Jo DJ, Lee GD, Yoon SR. Flavonoids Components and

Functional Properties of Citrus Peel Hydrolysate. J Korean Soc Food Sci Nutr 36(11),1358-1364 (2007)

9. Eun JB, Jung YM, Woo GJ. Identification and Determination of Dietary Fibers and Flavonoids in Pulp and Peel of Koresa Tangerine. (Citrus aurantium var.) KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 28(2): 371-377 (1996)

10. Koh JS, Koh NK, Kang SS. Citrus wine-making from mandarin orange produced in cheju island. J. Korean Agric. Chem. Soc. 32: 416-423 (1982)

11. Lee SH. Change of major constituents by soaking of Kumquants and Citrus platymamma with ethanol solution. master of agriculture (2007)

12. Choi HS, Kim MK, Park HS, Kim YS, Shin DH. Alcoholic Fermentation of Bokbunja (Rubus coreanus Miq.) Wine. Korean J. Food Sci. Technol. 38(4): 543~547 (2006)

13. Hwang Y, Lee KK, Jung GT, Ko BR, Choi DC, Choi YG, Eun JB. Manufacturing of Wine with Watermelon. Korean J. Food Sci. Technol. 36(1): 50~57 (2004)

14. AOAC. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arington, VA, USA, chapter 44, p.1-chapter 45: 18 (1985)

15. AOAC. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arington, VA, USA, Method 914-915 (1985)

16. Kim HN, Moon JY, Kim HJ, Lee DS, Cho MJ, Choi KH, Kim YS, Ashik

Mosaddik, Kim Cho SM. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chemistry* 121: 429-436 (2010)

17. Jeong EJ, Kim YS, Jeong DY, Shin DH. Yeast Selection and Comparison of Sterilization Method for Making Strawberry Wine and Changes of Physicochemical Characteristics during Its Fermentation. *Korean J. Food SCI. Technol.* 38(5): 642-647 (2006)

18. Cho KM, Lee JB, Kahng GG, Seo WT. A Study on the Making of Sweet Persimmon (*Diospyros kaki*, T) Wine. *Korean J. Food SCI. Technol.* 38(6): 785-792 (2006)

19. Koh JS, Post-harvest Science and Technology of Jeju Citrus. *jeju-munhwa* 272-278 (2007)

20. Jeong HJ, Park SB, Kim SA, Kim HK. Total Polyphenol Content and Antioxidative Activity of Wild Grape (*vitis coignetiae*) Extracts Depending on Ethanol Concentrations. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 36(12): 1491-1496 (2007)

21. Kim YD, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. Composition of Flavonoids and Antioxidative Activity from Juice of Jeju Native Citrus Fruits during Maturation. *Korean J Nutr.* 42(3): 278-290 (2009)

22. Lee SH, Kim JH, Jeong HC, Yang YT, Koh JS. Changes of Major Constituents by Soaking of *Citrus platymamma* Peel with Spirit Solution. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50(3): 154-159 (2007)

23. Kim EJ, Kim YH, Kim JW, Lee HH, Ko YJ, Park MH, Lee JO, Kim YS, Ha YL, Ryu CH. Optimization of Fermentation Process and Quality Properties of Wild Grape Wine. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36(3): 366-370 (2007)
24. Kim HR, Kwon YH, Kim HB, Ahn BH. Cha HB, Ahn BH. of Mulb Ary Fruit and Wine with Va ieties. *J.Korean Soc. Appl. Biol. Chem* 49(3): 209-214 (2006)
25. Moon SW, Kang SH, Jin YJ, Park JG, Lee YD, Lee YK, Park DB, Kim SJ. Fermentation of Citrus unshiu Marc. and Functional Characteristics of the Fermented Products. *Korean J. Food SCI. Technol.* 36(4): 669~676 (2004)
26. KIM SJ, SEO HJ. Effect of hesperidin supplementation on lipid and antioxidant metabolism in ethanol-fed rats. *J. Food. SciNutr* 11: 289-297 (2006)
27. 김종호, 박돈희, 최병철, 김건중, 이부귀, 나숙현. 바이오에탄올 제조기술 및 활용. 전남대학교 출판부 (2008)
28. Lee JS, Lee YJ. Current Aspects and Future Prospects of Bioethanol as a Motor Fuel. *Int. J. Automotive Technol.* 10: 24-29 (2006)
29. 송부령. 셀룰로오스를 이용한 동시당화발효 공정의 모델링과 에탄올 생성에 의 응용. 석사학위논문. 서울대학교 (1994)
30. Yang YT, Kim MS, Hyun KH, Kim YC, Koh JS, Chemical Constituents and Flavonoids in Citrus Pressed Cake, *Korean J. Food Preerv*, 15(1):

94-98 (2008)

31. Internet Site, Sigma Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/korea.html>)

32. Ben-Shalom, N. Ben-Shalom, Hindrance of hemicellulose and cellulose hydrolysis by pectic substances, *J. Food Sci.* 51: 720-721,730 (1986)

33. Echeverria et al., E. Echeverria, J.K. Burns and L. Wicker, Effect of cell wall hydrolysis on brix in citrus fruit, *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 101: 150-154 (1988)

34. Marshall et al., M.R. Marshall, T.R. Graumlich, R.J. Braddock and M. Messersmith, A comparison of enzymatic and lime treatments for extraction of alcohol soluble solids from citrus peel, *J. Food Sci.* 50 :1211-1212 (1985)

35. Nishio and Nagai, N. Nishio and S. Nagai, Production of macerating enzymes of mandarin orange peel by fungal cultures, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6 :371-378 (1979)

36. M.R. Wilkins, W.W. Widmer, R.G. Cameron, Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes, *Bioresource Technology* 98: 1596-1602 (2007)

37. Grohmann and Baldwin, K. Grohmann and E.A. Baldwin, Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulase enzymes, *Biotechnol. Lett.* 14: 1169-1174 (1992)

38. Golias et al., H. Golias, G.J. Dumsday, G.A. Stanley and N.B. Pamment, Characteristics of cellulase preparations affecting the

simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol, *Biotechnol. Lett.* 22: 617–621 (2000)

39 Yoon et al., S.H. Yoon, R. Mukerjea and J.F. Robyt, Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation, *Carbohydr. Res.* 338: 1127–1132 (2003)

40. Mohammad Pourbafrani, Farid Talebnia, Claes Niklasson, Mohammad J. Taherzadeh, Protective Effect of Encapsulation in Fermentation of Limonene-contained Media and Orange Peel Hydrolyzate, *Int. J. Mol. Sci.*: 777–787 (2007)

41, Grohmann et al., K. Grohmann, E.A. Baldwin, B.S. Buslig and L.O. Ingram, Fermentation of galacturonic acid and other sugars in orange peel hydrolysates by the ethanolgenic strain of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.* 16: 281–286 (1994)

42. Grohmann et al., Grohmann, E.A. Baldwin and B.S. Buslig, Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45/46: 315–327 (1994)

43. 3 Beall et al, D.S. Beall, K. Ohta and L.O. Ingram, Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.* 38: 296–303 (1991)

44. Braddock, R.J. Braddock, *Handbook of Citrus By-products Processing Technology*, John Wiley and Sons, New York (1999)

45. Carpita and Gibeaut, N.C. Carpita and D.M. Gibeaut, Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant J.* 3: 1-30 (1993)
46. Clarke et al., A.J. Clarke, V. Sarabia, W. Keenleyside, P.R. MacLachlan and C.C. Whitfield, The compositional analysis of bacterial extracellular polysaccharides by high-performance anion-exchange chromatography, *Anal. Biochem.* 199: 68-74 (1991)
47. G. hose, Measurement of cellulase activities, *Pure Appl. Chem.* 59: 257-268 (1987)
48. Grohmann et al., K. Grohmann, R.G. Cameron and B.S. Buslig, Fermentation of sugars in orange peel hydrolysates to ethanol by recombinant *Escherichia coli* K011, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52:423-435 (1995)
49. Grohmann et al., Grohmann, R.G. Cameron and B.S. Buslig, Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis, *Bioresour. Technol.* 54: 129-141 (1995)
50. Lyons, T.R. Lyons, Ethanol around the world: rapid growth in policies, technology and production. In: K.A. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall, Editors, *The Alcohol Textbook* (fourth ed.), Nottingham University Press, Nottingham, UK: 1-8 (2004)
51. Ohta et al., K. Ohta, F. Alterthum and L.O. Ingram, Effect of environmental conditions on xylose fermentation by recombinant

Escherichia coli, Appl. Environ. Microbiol. 56: 463–465 (1990)

52. Russell, I. Russell, Understanding yeast fundamentals. In: K.A. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall, Editors, The Alcohol Textbook (fourth ed.), Nottingham University Press, Nottingham, UK: 85–110 (2003)

53. Ting and Deszyck, S.V. Ting and E.J. Deszyck, The carbohydrates in the peel of oranges and grapefruit, J. Food Sci. 26: 146–152 (1961)

54. Waffenschmidt and Jaenicke, S. Waffenschmidt and L. Jaenicke, Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchoninate, Anal. Biochem. 165 : 337–340 (1987)

55. Wilkins et al., M.R. Wilkins, W.W. Widmer, R.G. Cameron and K.G. Grohmann, Effect of seasonal variation on enzymatic hydrolysis of Valencia orange peel waste, Proc. Fla. Hort. Soc. 118:419–422 (2005)