J. Fd Hyg. Safety 12(1), 39-46(1997)

밀감과피의 식이섬유 및 Bioflavonoid 정제 중 Phenthoate 잔류분의 제거

권영주 · 이미경 · 이서래†
이화여자대학교 식품영양학과

Removal of Phenthoate Residues During the Preparation of Dietary Fiber and Bioflavonoid from Mandarin Peels

Young-Joo Kwon, Mi-Gyung Lee and Su-Rae Lee†
Department of Food and Nutrition, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT—Mandarin orange fruits were artificially contaminated with an organophosphorus insecticide phenthoate by dipping and the residue level of phenthoate was investigated during the purification steps of dietary fiber or bioflavonoid. The removal rate of phenthoate at 8 and 0.5 ppm levels was 98% in the total dietary fiber, 99% in the insoluble dietary fiber and 99.8% in the soluble dietary fiber preparations. During the preparation of bioflavonoid from peels at a 5 ppm pesticide level, the removal rate was 90% in the intermediate extract and 99.9% in the final extract. In conclusion, phenthoate residues in the peels of mandarin orange were mostly removed during the preparation processes of dietary fiber or bioflavonoid and its residue level would not raise any problem in safety aspects of the purified products.

Key words □ Phenthoate residue, Removal, Mandarin peels

식품의 1차적인 기능은 영양소를 제공하는 것이고 2차적인 기능은 기호성을 부여하는 것이지만 이제는 질병을 예방하고 건강에 도움을 줄 수 있는 3차적인 기능까지도 기대하고 있다. 이러한 요구에 따라 현재까지 상용(常用)해온 과일, 채소는 물론 예전에 기호적 차원에서만 섭취하던 차, 향신료, 약용식물 등이 기능성 효과를 나타내는 식품소재로 주목받게 되었다. 이러한 성분들은 대부분 비영양소이면서 항산화 효과, 항암효과, 콜레스테롤 억제효과, 항바이러스 효과 등의 질병 예방효과를 기대할 수 있는 이른 바 non-nutrient health-promoting factor로 알려져 있다.[1,2]

한국인은 1인당 1일 감귤 17 g을 섭취하며 과일 가운데 사과 다음으로 많이 소비한다.[3] 국내에서 감귤은 년간 60여만톤이 생산되고 있으며 대부분이 생과(生果) 그대로 소비되고 약 8만톤만이 가공된 상태로 소비되고 있다. 그런데 식품으로 소비할 때는 감귤의 과육만이 이용될 뿐 막대한 양의 과피가 부산물로 나오게 되며 지금까지 이들의 일부만이 한약방에서 진피(陳皮)라는 이름으로 사용되고 있는 실정이다. 그러나 최근들어 감귤에서 추출한 pectin, limonoid와 bioflavonoid 등이 항암성과 관련하여 체내에서 기능성을 나타낸다고 보고되고 있고[4,5] 감귤과피에서도 이러한 성분들이 발견되고 있어[6,7] 폐기되고 있는 감귤과피의 이용 가능성을 시사해 주고 있다.

한편, 국내에서 감귤 재배 시에는 병해충 방제를 위하여 fenitrothion, omethoate, phenthoate 등 유기인계 18종과 benomyl, thiophanate-methyl 등 카바메이트계 5종의 농약이 사용되고 있다. 이들 농약 성분은 국내에서 소비량이 비교적 많은 농약일 뿐만 아니라 과실에서 그 잔류분의 대부분이 과피에 잔류하는 것으로 보고되고 있다.[8,9] 따라서 감귤과피를 식품이나 의약품용으로 이용하는데 있어서는 과피에서 추출한 성분들의 기능성뿐만 아니라 그 제품의 안전성 측면에서도 검토되어야 한다. 농산물 중의 잔류농약은 수세, 데치기, 가열 등의 조리 및 가공 과정에서 많은 양이 제거되는 것으로 알려져 있다.[10-16] 그러므로 감귤과피에서의 잔류량과 그로부터 정제된 제품에서의 잔류량과는 큰 차이가 있으며 안전성 측면에서 농약 잔류분의 제거율을 알 필요가 있다.

유기인계 농약은 세계적으로 그의 사용량이 증가하고 있고 그 중 phenthoate는 살충제로 벼, 채소, 과수 등에 광범

† Author to whom correspondence should be addressed.

위하게 사용되고 있으며 보건복지부에서 1989년에 처음으로 농산물 중 농약잔류 허용기준을 설정하여 적용한 16종의 농약품목에 들어간 주요 농약이다.[17] FAO 및 WHO에서 설정한 phenthoate의 1인당 1일 섭취 허용량(ADI값)은 0.003 mg/kg body weight이며 우리나라 식품위생법에 근거한 잔류 허용기준은 감귤류의 경우 과실 전체 기준으로 0.2 mg/kg이다.[17]

본 연구는 밀감과피에서 기능성 성분으로의 정제 과정 중 농약잔류분의 제거에 대한 연구의 일환으로 착수되었다. 그리하여 밀감 재배시 많이 사용되는 농약인 phenthoate에 대하여 밀감과피로부터 식이섬유와 bioflavonoid 제품으로의 정제 과정 중 그 잔류분의 제거효과를 알아보고자 실험하였다.

재료 및 방법

밀감 시료 및 시약

실험에 사용한 밀감은 제주도 서귀포에서 하우스 재배한 것(효돈 농업협동조합)으로 매 분석 시마다 필요량 만큼씩 신선한 것을 구입하여 사용하였다. 부착실험용 농약은 파프유제(이화명나방약, 삼공주식회사 제품)로 유효 성분인 S-α-ethoxycarbonyl benzyl O, O-dimethyl phosphorodithioate를 47.5% 함유한 것을 사용하였다. 정량 분석에 사용한 phenthoate 표준용액은 표준품(Chem Service, USA, purity 98%)을 구입하여 잔류농약 시험용 n-hexane(Junsei Chemical, Japan)으로 희석하여 만들었다.

시료로부터 식이섬유의 정제에 사용된 효소제인 α-amylase(Sigma A3403), protease(Sigma P5380), amyloglucosidase(Sigma A9913)는 모두 Sigma사로부터 구입하였다. 식이섬유 및 bioflavonoid의 정제 과정에서 사용된 ethanol, acetone, n-hexane, n-butanol 등의 용매는 1등급 시약을 사용하였다.

잔류농약을 추출 정제하기 위한 용매는 분석용 특급 시약을 사용하였고 GC에 주입하기 위한 최종 용액은 GC용 acetone(Merk, Germany)에 용해시켰다. Column chromatography에 사용된 흡착제는 alumina(70-120 mesh, Merk, Germany)로 연속 13시간 동안 130°C에서 가열하여 활성화시키고 desiccator에서 방냉(放冷)시킨 다음 다시 8% 무게의 물을 가하고 회전감압증발기에서 1시간 동안 equilibration하여 활성도를 낮춘 것이었다.

기구 및 측정 기기

잔류농약 분석 및 식이섬유, bioflavonoid의 정제에 사용된 기구로는 homogenizer(PCU11, Brinkman, Switzerland), Kuderna-Danish(K-D) 농축기, chromatography용 column (1.2 cm×32 cm 유리관에 glass wool을 1 cm 높이로 깔고 그 위에 8% 함수 alumina 10 g, 무수황산나트륨 5 g을 차례로 채운 것), 회전감압증발기(Eyela, Tokyo Rikakikai, Japan) 등이었다. 농약의 잔류량 분석에는 gas chromatograph(HP 5890 Series II Plus, Hewlett Packard, USA)와 integrator(D 5208, Young-In, Korea)를 사용하였다.

농약의 부착

밀감 12개를 파프 유제(유효성분 47.5%) 1,000배 희석액과 100,000배 희석액에 20초간 침지한 다음 꺼내어 3시간 가량 표면에 물기가 없도록 풍건하였다. 이것을 알루미늄 호일에 싸서 하룻밤 냉장 보관한 후 다시 바람이 통하는 곳에 펼쳐 놓아 3시간 동안 건조시킨 다음 껍질만을 벗기어 식이섬유 및 bioflavonoid 정제에 사용하였다.

밀감과피로부터 식이섬유의 정제

총 식이섬유(total dietary fiber, TDF)의 정제—밀감 과일에서 얻은 껍질로부터 식이섬유의 추출 및 정제는 Prosky 등[18-20]의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 두가지 다른 농도로 농약을 부착시킨 껍질 100 g에 0.05M phosphate buffer(pH 6.0) 500 m*l*를 가하고 blender를 사용하여 3분간씩 5회 마쇄하였다. 이것을 5 *l* beaker에 옮기고 0.275 N NaOH로 pH를 6.0으로 조정하여 α-amylase 3 m*l*를 넣고 95°C의 물에서 1시간 동안 반응시켰다. 이것을 실온으로 냉각시킨 후 0.171 N NaOH 100 m*l*를 가하고 pH를 7.5로 조정하여 protease 150 mg을 넣고 60°C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 이것을 다시 실온으로 냉각시키고 0.205 M H_3PO_4 100 m*l*를 가하고 pH를 4.5로 조정하여 amyloglucosidase 9 m*l*를 넣고 60°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 60°C의 95% ethanol 2.8 *l*를 가하여 78% ethanol 농도가 되도록 한 후 1시간 동안 침전되도록 방치하였다. Ethanol 침전물을 büchner funnel에서 흡인 여과한 다음 여과지 위의 침전물을 78% ethanol 200 m*l*로 2회 씻어 주고 95% ethanol과 acetone 각각 200 m*l*로 건조시킨 다음 알루미늄 호일에 펼쳐 실온에서 건조하여 총 식이섬유 제품을 얻었다. 위와 같이 얻은 TDF 중 4 g은 농약 분석에 사용하였고 나머지 시료 약 12 g은 불용성 식이섬유 정제에 사용하였다.

불용성 식이섬유(insoluble dietary fiber, IDF)의 정제—위에서 얻은 TDF 12 g에 360 m*l*의 물을 가하고 magnetic stirrer를 이용하여 1시간 동안 저어 주었다. 이것을 원심분리관에 옮겨 4000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상징액을 따른 뒤 침전물에 다시 물 300 m*l*를 가하고 저어 준 후 같

은 조건으로 원심분리하였다. 침전물을 95% ethanol 200 m*l*, acetone 200 m*l*로 각각 2회씩 씻어 준 다음 알루미늄 호일에 펼쳐 실온에서 건조하여 불용성 식이섬유 제품을 얻었다.

수용성 식이섬유(soluble dietary fiber, SDF)의 정제—TDF 12 g으로부터 위에서와 같이 원심분리에 의하여 IDF를 분리하고 남은 상징액에 2.4 *l*의 95% ethanol을 가하고 1시간 동안 수용성 식이섬유를 침전시켰다. 이것을 원심분리관에 옮겨 4000 rpm에서 30분간 원심분리를 한 후 상징액은 따라 버리고 침전물은 95% ethanol 50 m*l*, acetone 50 m*l*로 각각 2회씩 씻어 주었다. 그런 다음 미리 무게를 측정한 알루미늄 호일에 펼쳐 실온에서 건조하여 수용성 식이섬유 제품을 얻었다. 이와같이 얻은 SDF는 무게만을 측정하여 보관하였다.

밀감과피로부터 bioflavonoid의 정제

밀감과피로부터 bioflavonoid 성분의 정제는 Matsubara 등,[21] 강[22]의 방법을 변형하여 다음과 같이 행하였다. 즉 파프 유제 1000배 희석액에 20초간 침지하여 농약이 부착된 밀감 과피 500 g에 Celite-545 200 g, 60°C의 물 1.2 *l*를 가하고 blender를 사용하여 균질화시킨 다음 끓는물에서 95°C가 되도록 하여 30분간 보존하였다. 이것을 실온으로 냉각시키고 büchner funnel에서 흡인 여과하여 bioflavonoid 추출액을 얻었다. 그 다음 잔사에 60°C의 물 1 *l*를 가하고 균질화시킨 후 같은 방법으로 추출하고 실온에서 냉각시켜 흡인 여과한 것을 먼저의 여과액과 합하는 절차를 두번 더 반복하였다. Bioflavonoid 추출액을 회전감압증발기에서 소량으로 감압 농축한 후 600 m*l*의 ethanol을 가하고 5°C에서 하룻밤 방치한 다음 흡인 여과하였다. 이 여과액을 감압 농축하여 나온 시럽(intermediate extract)의 무게를 재었다. 이 중간추출물을 물로 희석하여 100 m*l*가 되도록 하고 이중 20 m*l*는 phenthoate 농약 분석에 사용하였다.

농약 분석에 사용하고 남은 80 m*l*를 250 m*l* 분액 깔대기에 취하고 hexane 80 m*l*로 7회 추출 분액하여 hexane 층은 버리고 물 층은 butanol 80 m*l*로 7회 추출 분액하였다. 추출한 butanol 층을 감압 농축하여 물 250 m*l*, 포화 lead subacetate 용액 30 m*l*을 가하고 5°C 이하에서 하룻밤 방치하였다. 이것을 büchner funnel에서 흡인 여과하고 잔사에 포화 sodium bicarbonate 용액 10 m*l*을 가하여 1시간 동안 magnetic stirrer를 이용하여 저어 주었다. 여기에서 흰색 침전물을 제거하고 6 N HCl로 pH를 5.3으로 조정한 뒤 250 m*l* 분액 깔대기에 옮기고 butanol 80 m*l*로 5회 추출 분액하였다. Butanol 추출액을 감압 농축한 다음 무게를 재었으며 이 최종농축물(final extract)의 phenthoate 잔류분을 분석하였다.

Phenthoate 잔류량의 분석

밀감과피 시료[23]—밀감과피 20 g을 잘게 잘라 20 m*l*의 물을 넣어 습윤시킨 후 methanol 40 m*l*를 가하여 homogenizer로 추출하고 büchner funnel에서 흡인 여과하였다. 그런 다음 잔사에 methanol/H_2O(4:1) 120 m*l* 그리고 30 m*l*를 가하여 추출 여과하고 먼저의 여과액과 합하였다. Phenthoate 추출액을 500 m*l* 분액 깔대기에 옮겨 물 100 m*l*, 포화 NaCl 용액 16 m*l*를 가하고 chloroform 40 m*l*로 2회 추출 분액하였다. 추출한 chloroform 층을 무수황산나트륨으로 탈수하고 Kuderna-Danish(K-D) 농축기로 45°C에서 감압 농축하였다. 농축액을 질소 가스로 건조시키고 n-hexane/benzene(1:1) 3 m*l*에 용해시킨 다음 8% 함수 alumina로 충진된 column에 넣은 후 n-hexane/benzene(1:1)로 80 m*l*를 용출시켰다. 이 용출액을 K-D농축기로 감압 농축하고 질소 가스로 건조시킨 다음 n-hexane 30 mL에 용해하여 acetonitrile 30 m*l*로 2회 추출 분액하였다. 여기에서 얻은 acetonitrile 추출액에 다시 n-hexane 30 m*l*를 가하여 추출 분액한 것을 K-D농축기로 감압 농축하고 질소 가스로 건조시켰다. 그 다음 acetone으로 용해하여 높은 농도로 농약을 오염시킨 경우 5 m*l*로, 낮은 농도로 오염시킨 경우 2 m*l*로 하고 GC 분석을 하였다.

총 식이섬유(TDF) 시료—밀감과피에서 얻은 TDF 약 4 g에 물 36 m*l*를 넣어 습윤시킨 후 methanol 80 m*l*를 가하고 homogenizer로 추출 여과하였다. 위의 잔사에 methanol/H_2O(4:1) 용액 120 m*l* 그리고 30 m*l*를 가하여 추출 여과하고 여과액을 먼저의 여과액과 합하였다. Phenthoate 추출액을 1 *l* 분액 깔대기에 옮겨 물 200 m*l*, 포화 NaCl 용액 30 m*l*를 가하고 chloroform 80 m*l*로 2회 추출 분액하였고 이하의 과정은 과피에서의 분석 방법과 동일하였다. 단, GC 분석을 위한 최종 용액의 부피는 높은 농도로 오염시킨 경우 3 m*l*로, 낮은 농도로 오염시킨 경우 1 m*l*로 하였다.

불용성 식이섬유(IDF) 시료—높은 농도로 농약을 오염시킨 경우 IDF 약 5 g에 물 45 m*l*를 넣어 습윤시킨 후 methanol 100 m*l*, methanol/H_2O(4:1) 용액 150 m*l*+40 m*l*로 추출 여과하였다. 이 추출액을 1 *l* 분액 깔대기에 옮겨 물 250 m*l*, 포화 NaCl 용액 40 m*l*를 가하고 chloroform 100 m*l*로 2회 추출 분액하였다. 이하의 과정은 과피에서의 분석 방법과 같았으며 최종 용액의 부피는 1 m*l*로 하여 GC분석을 실시하였다. 낮은 농도로 오염시킨 경우 농약 잔류량 분석에 사용한 IDF의 양은 약 8 g이었으며 물 70 m*l*를 넣어 습윤시킨 후 methanol 150 m*l*, methanol/H_2O(4:1) 용액 150

Table 1. Operating conditions for gas chromatographic analysis

Column	HP-1701 capillary column(HP Part No. 19091U-413), 14% cyanopropyl-phenylmethyl-polysiloxane (length 30 m, internal diameter 0.32 mm, film thickness 0.25 m)
Carrier gas	N_2, 2 ml/min
Oven temp.	230°C
Injection port	Split ratio (24:1, but 10:1 for low residue level),
Detector	1 μl injection; inlet temp. 240°C NPD, 250°C

ml+40 ml로 추출 여과하였다. 이하의 과정은 위의 방법과 동일하였고 GC 분석을 위한 최종 용액의 부피는 1 ml로 하였다.

Bioflavonoid 시료—농약이 부착된 밀감과피(500 g)로부터 bioflavonoid 정제 과정 중의 두 시료용액(intermediate extract와 final extract) 일정량을 500 ml 분액 깔대기에 옮기고 물 100 ml, 포화 NaCl 용액 20 ml를 가한 다음 chloroform 50 ml로 2회 추출 분액하였다. 이하의 과정은 밀감과피에서와 동일하였고 GC분석을 위한 최종 용액의 부피는 중간추출물의 경우 5 ml로, 최종추출물의 경우 1 ml로 하였다.

회수율 시험—GC의 조작조건은 Table 1과 같으며 phenthoate 농약성분의 retention time은 4.3분 이었다. Gas chromatogram에서의 phenthoate 정량은 peak area를 측정한 다음 표준용액으로 작성한 보정곡선으로부터 그 함량을 구하였다.

본 실험에서 수행한 phenthoate 분석방법을 검증하기 위하여 밀감과피 10 g에 phenthoate 표준용액을 2 ppm 농도로 오염시키고 밀감과피 시료의 분석 절차에 따라서 회수율을 시험하였다. 3회 반복하여 회수율을 시험한 결과는 89.4±1.3% 이었으며 이 결과는 비교적 만족할 수 있는 수준으로 판단되어 실험 데이타를 보정(補正)하지는 않았다.

결과 및 고찰

식이섬유 정제 과정 중 Phenthoate 잔류분의 제거

높은 농도(8 ppm 수준)로 농약이 부착된 밀감과피로부터 식이섬유로 정제되면서 농약 잔류분이 제거되는 과정은 Table 2와 같다. 신선한 밀감과피로부터 얻은 풍건물 상태의 총 식이섬유(TDF), 불용성 식이섬유(IDF), 수용성 식이섬유(SDF)의 수득율은 각각 16.6%, 14.1%, 1.6%였다.

인위적으로 농약을 오염시킨 밀감과피에서의 phenthoate 잔류분을 100%로 하였을 때 균질화, 효소처리, 여과,

Table 2. Removal of phenthoate residues during the dietary fiber preparation from the peels of mandarin orange contaminated with high pesticide level*[1]

Sample	Residue concn(μg/g)	Sample quantity(g)	Total residue(μg)*[2]	% of residue*[2]
Peel	7.70±1.26*[3]	100.0	770 ±126	100.0
TDF*[4]	0.64±0.19	16.6±0.3	11 ±3	1.4
IDF*[4]	0.31±0.14	14.1±1.6	4.3±1.4	0.6
SDF*[4,5]	<0.31	1.6	<0.50	<0.06

*[1]Data were calculated for 100 g of peels.

*[2]Total residue was obtained by multiplying the residue concentration by the sample quantity. The % of residue means the % ratio of total residue in each fraction as compared with the value in the peel.

*[3]Values are mean±standard deviation (n=3), but the values for SDF are mean only (n=2).

*[4]TDF, total dietary fiber; IDF, insoluble dietary fiber; SDF, soluble dietary fiber

*[5]Estimated on the assumption that the pesticide residues in TDF are partitioned in proportion to the amounts of IDF and SDF fractionated.

세척, 건조과정을 거치면서 TDF 제품에는 1.4%가 잔류하여 약 98%의 잔류분이 제거되는 결과를 보였다. 그리고 여기에서 다시 원심분리, 세척, 건조과정을 거치면서 IDF 제품이 될 때에는 불과 0.6% 만이 잔류하여 초기 잔류분의 99% 이상이 제거되는 것으로 나타났다.

본 실험에서 SDF의 잔류량은 분석하지 않았으나 비슷한 정제 과정을 거친 IDF에서의 잔류량으로부터 추정될 수 있다. SDF 정제 과정에서는 IDF 정제 과정에서 보다 ethanol에 의한 식이섬유의 침전이 이루어진 다음 원심분리에 의하여 상징액을 제거하는 과정이 더 포함된다. 따라서 실제 SDF의 농약 잔류량은 IDF에서 보다 낮을 것으로 예상되지만 IDF에서와 같은 농도로 잔류한다고 가정한 후 SDF에 있는 농약 잔류량을 추정하였다. 즉, SDF의 수득율은 1.6%이므로 IDF 중 phenthoate 잔류 농도인 0.31 ppm을 적용하면 SDF 제품에는 대부분의 농약 잔류분이 제거되고 많아야 0.06% 만이 잔류하게 된다.

Table 3은 밀감에 낮은 농도(0.5 ppm 수준)로 phenthoate를 오염시킨 후 여기에서 얻은 껍질로부터 식이섬유로 정제되면서 농약 잔류분이 제거되는 과정을 나타낸 것이다. 밀감과피에서의 오염수준 0.5 ppm은 우리나라에서의 잔류허용기준인 0.2 ppm(과실 전체 기준)에 근접한 수준이다. 밀감과피에서의 phenthoate 잔류분을 100%로 하였을 때 TDF 제품에는 1.8%만이 잔류하였고 다시 정제 과정을 거

Table 3. Removal of phenthoate residues during the dietary fiber preparation from the peels of mandarin orange contaminated with low pesticide level*[1]

Sample	Residue concn (μg/g)	Sample quantity (g)	Total residue*[2] (μg)	% of residue*[2]
Peel	0.52±0.07*[3]	100.0	50.7 ±5.9	100.0
TDF*[4]	0.060±0.028	15.3±1.1	0.92±0.38	1.8
IDF*[4]	0.020±0.009	12.9±0.8	0.26±0.12	0.5
SDF*[4,5]	<0.020	1.5	<0.030	<0.06

*[1-5]See the footnote in Table 2.

친 IDF 제품에는 0.5%가 잔류하여 TDF, IDF 제품이 되면서 각각 98%, 99% 이상이 제거되는 것으로 나타났다. SDF에서의 phenthoate 잔류량은 높은 농도에서와 마찬가지로 추정된 결과로서 이에 의하면 0.06% 만이 잔류하게 된다. 밀감과피가 높은 농도(8 ppm)로 오염되었거나 또는 이보다 훨씬 낮은 농도(0.5 ppm)로 오염되었어도 식이섬유로 정제되는 과정 중 phenthoate 잔류분의 제거율에 있어서는 같은 결과를 보였다.

밀감과피로부터 식이섬유를 정제하는 동안 농약성분이 제거되는 과정을 단계적으로 고찰하면 다음과 같다. 밀감과피에서 TDF로 정제되는 과정은 마쇄에 의한 균질화, 효소처리, 여과, ethanol과 acetone에 의한 세척 및 건조, 실온에서의 건조 과정을 포함한다. 밀감과피의 균질화 과정에서 과피는 곱게 갈리면서 표면적이 증가하게 되면 껍질 조직 내의 macromolecule과 결합된 상태의 농약 잔류분이 용출될 기회를 증가시키는 효과를 가진다. 농약이 오염될 때 일부는 농산물의 표면에 존재하여 과실이나 채소를 수세하는 동안 많은 양이 제거되지만 농약 성분의 상당량은 껍질 조직 내로 침투하여 macromolecule과 결합하여 수세에 의해 쉽게 제거되지 않는 것으로 보고되고 있다.[14]

균질화된 과피의 효소처리 과정에서는 정제에 사용된 α-amylase, protease, amyloglucosidase의 작용에 의하여 밀감과피 내의 단백질, 탄수화물은 작은 분자로 가수분해된다. 식물체에서는 결합된 농약잔류분(bound residue)이 상당량 존재하는데 이들은 nonextractable residue로서 Stratton과 Wheeler[24]는 무우를 pepsin과 0.1 N HCl, H_2SO_4로 처리하여 bound residue의 추출 효율을 증가시킬 수 있었다고 하였다. 따라서 효소의 작용으로 단백질과 탄수화물이 분해되면서 과피에 존재하는 농약 잔류분이 조직 밖으로 노출되었을 것으로 예상된다.

한편, 미생물이 생산하는 효소 특히 esterase에 의하여 농약성분이 분해되는 것으로 알려져 있는데 식이섬유 정제에 사용된 효소제들이 phenthoate를 직접 분해했다고 보기는 어렵다. 또한 효소처리 과정에서 효소반응을 위해 조절한 pH 조건은 6.0, 7.5, 4.5로 강알칼리성나 강산성의 조건은 아니었으며 더우기 유기인계 농약은 중성이나 산성 조건에서 비교적 안정하여[23] 효소처리 과정에서의 pH조건이 phenthoate에는 큰 영향을 주지 않았을 것으로 보인다.

본 실험에서는 효소반응을 촉진하기 위하여 95°C에서 1시간, 60°C에서 1시간씩 2회 유지되는 절차를 거쳤다. 김 등[10]은 쌀의 취반과정에서 가열에 의한 phenthoate 잔류분의 제거효과는 미약하다고 하였는데 이러한 결과로부터 미루어 본다면 phenthoate 성분은 비교적 열에 강하여 효소처리 과정 중의 온도, 시간조건에 의해서는 약간의 분해만이 일어났을 것으로 보인다. 취반시의 온도조건이 phenthoate의 분해에는 직접적으로 관여하지 않았겠지만 균질화된 혼합물의 움직임을 활발하게 하여 농약 잔류분의 용출을 도왔을 것으로 생각된다.

결국 균질화 과정과 효소처리 과정을 거치면서 밀감과피의 표면에 묻어 있거나 탄수화물이나 단백질과 결합되어 있던 농약잔류분이 수용액으로 용출되고 또한 일부는 분해되었다고 생각된다. 다음으로 ethanol을 가하여 식이섬유를 침전시키는 과정을 거치는데 일반적으로 에스테르계 유기인제는 alcohol과 acetone에 쉽게 녹을 수 있다.[23] 따라서 수용액으로 용출되었거나 식이섬유에 남아 있던 상당량의 농약 잔류분이 가해진 ethanol로 용출되었을 것이라 생각된다. 이와같이 ethanol로 용출되거나 분해된 phenthoate 잔류분은 여과하는 과정을 거쳐 대부분 버려지는 여과액에 들어가게 되고 소량만이 잔사(TDF)에 남아 있을 것이므로 이 과정에서 실질적으로 많은 양이 제거되었을 것으로 보인다.

밀감과피로부터 TDF를 정제하는 과정 중의 균질화, 효소처리 및 여과 과정은 Moye 등[11]의 실험에서 오렌지, 레몬의 껍질을 마쇄하고 착즙하는 과정과 비교될 수 있다. 그들은 착즙하여 얻은 착즙액(press liquor)에는 phenthoate 잔류량의 약 10%만이 이행하였고 대부분이 잔사(press residue)에 남아 있는 결과를 보였다. 이러한 결과는 본 실험에서의 2% 수준과 큰 차이가 있다고 할 수 있는데 Moye 등의 실험에서는 마쇄시에 물의 첨가나 효소작용이 없어 농약성분의 용출이 어려웠고 또한 착즙시에는 착즙액이 모두 빠져나오지 못하고 상당량이 잔사에 남아있을 수 있었기 때문이라 생각된다.

마지막으로 잔사를 ethanol로 세척하고 acetone으로 건조하는 과정에서도 농약 잔류분은 제거되었을 것으로 생각되며 TDF로부터 IDF로의 정제에서도 마찬가지로 이러한 과정을 거치면서 농약 잔류분이 제거되었다고 할 수 있다.

Iwata 등[25]은 오렌지, 자몽, 레몬 나무를 물로 수세하고 그 잎과 나무 주변의 공기에서의 농약 잔류량을 수세하기 전과 비교하였는데 수세 후에 잎에서의 잔류량이 감소한 반면 휘산(volatilization)효과로 공기 중에서의 phenthoate 량은 증가하였다고 하였다. 또한 Tsumura-Hasegawa 등[16]은 감자를 전분으로 가공하는 과정 중 농약 잔류분의 제거율을 조사한 결과 wet starch를 건조하는 과정에서 잔류량이 감소되었다고 하였다. 이러한 결과는 전분의 건조시에 물이 증발하면서 일부 농약잔류분이 분해되거나 함께 휘발되었기 때문으로 볼 수 있다. 따라서 잔사의 세척과 건조를 위해 사용된 유기용매가 직접적으로 잔사에 묻어 있는 phenthoate를 제거하는 효과를 주기도 하지만 실온에서 건조시키는 동안 잔사에 남아있던 용매가 공기 중으로 휘발되면서 일부 phenthoate도 함께 휘발시키는 효과를 준다고도 할 수 있다.

많은 경우 농약 성분들은 자연 환경에서 광분해 되기도 하는데 본 실험의 경우 TDF나 IDF를 실온에서 건조시키는 기간은 하루 정도에 불과하였으므로 잔류하는 농약 성분의 광분해 가능성은 기대하기 어려웠다.

Bioflavonoid 정제 과정 중 Phenthoate 잔류분의 제거

농약이 부착된 밀감과피로부터 bioflavonoid로 정제되면서 농약잔류분이 제거되는 과정을 보면 Table 4와 같다. 밀감과피에서 phenthoate의 잔류분을 100%로 하였을 때 균질화, 열수추출, 여과과정을 거친 중간추출물에는 9.9%가 잔류하여 약 90%가 제거되는 결과를 보였다. 그리고 다시 hexane 추출, butanol 추출 등의 과정을 거친 최종 추출물에는 불과 0.01% 만이 잔류하여 대부분의 농약 잔류분이 제거되는 것으로 나타났다.

밀감과피로부터 bioflavonoid 정제과정에서도 식이섬유 정제에서와 마찬가지로 균질화 과정을 거쳤다. 그러나 식이섬유 정제 조건(밀감과피 100 g, phosphate buffer 용액 500 m*l*)에서 보다도 사용된 물의 양이 적어서(밀감과피 500 g, celite 545 200 g, 물 1.2 *l*+1 *l*) 상대적으로 점도가 높은 혼합물이 형성되었기 때문에 수용액으로의 용출량은 많지 않았을 것으로 생각된다. Moye 등[11]은 감귤류의 껍질을 물의 첨가없이 마쇄하고 착즙한 결과 착즙액에서의 phenthoate 잔류량은 과피의 10% 정도에 불과하였다고 한다. 따라서 많은 양의 phenthoate가 버려진 잔사에 포함되고 bioflavonoid 추출액으로는 소량만이 이행하였을 것으로 생각된다.

Bioflavonoid를 물로 추출하는 과정에서도 가열조작이 포함되는데 phenthoate는 열에 안정하여[10] 식이섬유 정제 과정에서와 마찬가지로 열수추출에서의 온도, 시간조건(95°C, 30분, 3회)이 phenthoate의 분해에 크게 영향을 주지는 못했을 것으로 보인다. 다음 과정으로 열수 추출액에 ethanol을 가한 후 얻어진 침전물은 버리고 여과액(intermediate extract)은 다음 정제 절차에 사용되었는데 이 때 bioflavonoid 추출액에 존재하는 상당량의 phenthoate는 ethanol로 용출될 수 있어[23] 여과액에 포함되겠지만 잔류분의 일부는 ethanol 침전물로 이행될 수 있으리라 본다. 그리하여 중간추출물에서의 잔류량은 9.9%로 감귤과피의 마쇄, 열수추출, ethanol 침전, 여과 절차에 의해 약 90%의 phenthoate가 제거되는 것으로 나타났다.

Table 4. Removal of phenthoate residues during the bioflavonoid preparation from the peels of mandarin orange contaminated with high pesticide level*[1]

Sample	Residue concn (μg/g)	Sample quantity (g)	Total residue (μg)*[2]	% of residue*[2]
Peel	5.54±1.52*[3]	100	554.0±86.1	100.0
Intermediate extract	26.19±4.25	2.1 ±0.2	55.0 ±6.2	9.9
Final extract	0.16±0.02	0.31±0.01	0.05±0.01	0.01

*[1]Data were calculated for 100 g of peels.
*[2]Total residue was obtained by multiplying the residue concentration by sample quantity. The % of residue means the % ratio of total residue in each fraction as compared with the value in the peel.
*[3]Values are mean±standard deviation (n=3).

중간추출물의 hexane 추출 과정에서는 hexane층으로 많은 양의 phenthoate가 이행하였을 것으로 예상된다. Miyahara와 Saito[13]는 대두에서 기름을 추출하고 정제하는 과정 중 사용된 용매가 hexane이었는데 dichlorvos, malathion, chlorpyrifos, captan 등 조사대상 농약성분의 전부가 조제유(crude oil)로 이행하였다고 한다. 본 실험에서도 대부분의 phenthoate 잔류분이 hexane에 의해 7회의 추출 과정을 거치면서 hexane층으로 이행한 반면 수용액 층에는 농약 잔류분의 일부만이 이행되었을 것으로 예상된다. 그리고 다음 정제 과정에서 포화 lead subacetate 용액에 의해 침전되지 않는 여과액, sodium bicarbonate에 의한 침전물, n-butanol 추출시의 수용액 층으로 잔류농약이 이행되면서 bioflavonoid 최종추출물에는 미량의 농약 성분만이 잔류하는 것으로 보인다.

감사의 글

본 논문은 1996년도 보건의료기술 개발사업비의 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사하는 바이다.

국문요약

감귤재배 시 사용되는 유기인계 살충제인 phenthoate 성분을 밀감에 인위적으로 오염시키고 그 껍질로부터 식이섬유 및 bioflavonoid로 정제하는 과정 중 중간산물과 최종산물에서의 농약 잔류량을 분석하고 그 제거율을 살펴보았다. Phenthoate가 8 ppm 및 0.5 ppm으로 오염된 밀감과피로 부터 농약잔류분의 제거율은 총 식이섬유 제품에서는 98%, 불용성 식이섬유 제품에서는 99%, 수용성 식이섬유 제품에서는 99.8%로 나타났다. Phenthoate를 5 ppm 농도로 오염시킨 밀감과피로 부터 bioflavonoid 정제 과정 중 중간추출물에서는 90%, 최종추출물에서는 99.9%가 제거되었다. 결론적으로 밀감과피에 잔류하는 농약성분은 식이섬유나 bioflavonoid로 정제되는 과정에서 그의 대부분이 제거되고 식품이나 의약품으로 이용될 수 있는 제품에는 미량의 phenthoate 만이 잔류하므로 이들 데이타는 폐과피의 이용시 기준설정 및 안전성 평가에 반영되어야 할 것이다.

참고문헌

1. Caragay, A.B.: Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technol.*, **46**, 65-68 (1992).
2. Hendrich, S., Lee, K.W., Xu, X., Wang, H.J. and Murphy, P.A.: Defining food components as new nutrients. *J. Nutr.*, **124**, 1789S-1792S (1994).
3. 이미경, 이서래: 한국인의 농축산 식품 섭취량의 표준화 (1986-1990). 한국식품과학회지, **26**, 616-621 (1994).
4. Rouseff, R.L. and Nagy, S.: Health and nutritional benefits of citrus fruit components. *Food Technol.*, **48**, 125-132 (1994).
5. Middleton E. Jr. and Kandsaswami, C.: Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol.*, **48**, 115-119 (1994).
6. 문수재, 손경희, 윤선, 이명해, 이명희: 한국산 감귤류 폐과피 내의 펙틴 함량과 펙틴의 특성에 관한 연구. 한국식품과학회지, **14**, 63-66 (1982).
7. 장호남, 남경은, 허종화: 한국산 감귤과피의 효율적 이용에 관한 연구 II. 펙틴, 헤스페리딘, 나린진의 함량에 관하여. 한국식품과학회지, **9**, 251-254 (1977).
8. Nagayama, T., Kobayashi, M., Shioda, H., Ito, M. and Tamura, Y.: Relationship between pesticide residues in fruit peel and flesh. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **36**, 383-392 (1995).
9. 김순희, 정규철: 사과중 diazinon, fenitrothion, EPN의 잔류량과 저장, 박피 및 세척에 의한 잔류농약 제거에 관한 연구. 대한위생학회지, **6**, 89-108 (1991).
10. 김남형, 이미경, 이서래: 쌀의 취반 중 phenthoate 농약 잔류분의 제거. 한국식품과학회지, **28**, 490-496 (1996).
11. Moye, H.A., Brooks, R.F., and Scherer, S.J.: Residue of phenthoate (Cidial) and its oxon on grapefruit, lemons, oranges, their fractionated products, and soil. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 122-127 (1983).
12. Miyahara, M. and Saito, Y.: Pesticide removal efficiencies of soyben oil refining processes. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 731-734 (1993).
13. Miyahara, M. and Saito, Y.: Effects of the processing steps in Tofu production on pesticide residues. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 369-373 (1994).
14. Lee, M.G. and Lee, S.R.: Removal of EPN residues in washing and cooking processes of Chinese cabbage and radish. *Foods & Biotechnol.*, **4**, 207-211 (1995).
15. Lee, S.R., Mourer, C.R. and Shibamoto, T.: Analysis before and after cooking processes of a trace chlorpyrifos spiked in polished rice. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 906-908 (1991).
16. Tsumura-Hasegawa, Y., Tonogai, Y. Nakamura, Y. and Ito, Y.: Residue levels of dichlorvos, chlorpropham, and pyrethrins in postharvest-treated potatoes during storage or processing into starch. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1240-1244 (1992).
17. 이서래: 식품의 안전성 연구. 이화여대 출판부, 제 3장 (1993).
18. Prosky, L., Asp, N.G., Furda, I., DeVries, J.W., Schweizer, T.F. and Harland, B.F.: Determination of total dietary fiber in foods, food products and total diets: interlaboratory study. *J. AOAC*, **67**, 1044-1052 (1984).
19. Prosky, L., Asp, N.G., Furda, I., DeVries, J.W., Schweizer, T.F. and Harland, B.F.: Determination of total dietary fiber in foods, food products: collaborative study. *J. AOAC*, **68**, 677-679 (1985).
20. Lee, S.C., Prosky, L. and DeVries, J.W.: Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods- enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. *J. AOAC Internat'l*, **75**, 395-416 (1992).
21. Matsubara, Y., Kumamoto, A., Lizuka, Y., Murakami, T., Okamoto, K., Miyake, H. amd Yokoi, K.: Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in citrus peelings. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 909-915 (1989).

22. 강진훈: 감귤에서 분리한 bioflavonoid의 항산화 작용 및 DNA 손상 억제에 관한 연구. 고신대 보건과학연구소보, **3**, 74-81 (1993).
23. 유홍일, 이해근, 전성환: 농약잔류 분석방법. 동화기술, pp. 135-186 (1994).
24. Khan, S.U., Stratton, G.D., and Wheeler, W.B.: Characterization of bound (nonextractable) residues of dieldrin, permethrin, and carbofuran in radishes. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1189-1191 (1984).
25. Iwata, Y., Westlake, W.E., Barkley J.H., Carman G.E., and Gunther, F.A.: Behavior of phenthoate(Cidial) deposits and residues on and in grapefruits, lemons and lemon leaves, oranges and orange leaves and in the soil beneath orange trees. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 362-368 (1977).