

최 종
연구보고서

고추냉이 부산물로부터 고기능성물질 추출
및 고부가가치화

Extraction of functional material from Japanese
horseradish and higher-valued products

고 려 대 학 교

(참여기업: 바이오코트 주식회사)

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고추냉이 부산물로부터 고기능성물질 추출 및 고부가가치화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 04 월 24 일

주관연구기관명 : 고 려 대 학 교

총괄연구책임자 : 박 현 진 (고려대학교)

연 구 원 : 장 정 화 (고려대학교)

연 구 원 : 전 지 영 (고려대학교)

협동연구책임자 : 신 일 식 (강릉대학교)

연 구 원 : 송 옥 자 (강릉대학교)

연 구 원 : 백 장 미 (강릉대학교)

연 구 원 : 김 용 수 (강릉대학교)

연 구 원 : 노 상 미 (강릉대학교)

참여연구기관명 : 바이오코트 주식회사

참여연구책임자 : 차 동 수

참여기업연구원 : 한 명 규

참여기업연구원 : 김 미 혜

요 약 문

I. 제 목

고추냉이 부산물로부터 고기능성물질 추출 및 고부가가치화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

과학기술의 눈부신 발전은 각 국의 식생활에 큰 변화를 일으키고 있으며, 우리나라도 국민소득의 증대에 따라 육류의 소비가 증가하는 등 식생활패턴이 달라지면서 고혈압, 동맥경화 등 순환기 계통의 질병 및 암의 발생률이 증가하고 있으며, 이러한 질병의 발생은 식품 혹은 식생활과 밀접한 관계가 있는 것이 역학적 연구로부터 지적되고 있다. 최근 건강 요구형 식품의 수요가 증가하고 있으며, 식품산업에서는 천연 기능성물질들이 주목을 받고 있으며 그 수요도 날로 급증하고 있는 추세이다. 그 중에서도 생선 어패류를 생식하는 식습관을 가지고 있는 우리나라와 일본의 경우, 공통적으로 사용되는 향신료로서 고추냉이(일본명, 와사비; Japanese horseradish, Wasabi, *Wasabia japonica* Matsumura)가 있다. 고추냉이는 코를 자극하는 독특한 향미성분(alkyl isothiocyanate류)이 생선의 비린내를 없애줌과 동시에 그 맛을 상승시키는 작용을 가지고 있으며, 또한 식욕증진, 비타민B₁ 합성증강, 베타아밀라제 활성 촉진, 항산화활성, 항균활성 등의 효과가 있어 건강식품으로도 각광을 받고 있기 때문에, 우리나라와 일본에서는 생선회나 생선초밥과 같이 먹는 것이 일상 생활화 되어 있다. 또한 고추냉이는 위궤양, 위암과 관련이 있다고 알려진 세균 *Helicobacter pylori*에 대한 항균활성의 경우 잎이 뿌리보다 더 강한 것으로 나타났다.

일본의 참 고추냉이의 생산량은 1993년 1,325톤(총생산액, 35억엔)에서 1998년에는 총생산량이 4,101톤(총생산액, 106억엔; 약 1,100억원)으로 약 3배의 신장률을 나타내고 있다(日本 林野廳, 1998). 우리나라에서 참 고추냉이의 재배는

1995년을 기준으로 전북 무주, 경북 금릉, 전주, 순창, 용인(식물원), 횡성 등지에서 밭 재배가, 춘천(도원), 철원, 평창, 울릉도, 단양 등지에서 물재배가 약 5ha정도 이루어지고 있으며, 보통 12~18개월이 지나면 수확이 이뤄지는데 현재 시중 가격(5만~8만/kg)대로라면 3 백평당 6천~8 천만원의 고소득을 올릴 수 있어 생육 조건이 잘 맞는 지역은 고소득 작물로 부각될 가능성이 높다. 그러나 현재 상황은 고추냉이 뿌리만 일부 특급호텔과 고급 일식 요리집에 판매되고, 줄기와 잎은 일본과 달리 이용방법이 개발되어 있지 않아 대부분 폐기되고 있는 상태로 많은 경제적 손실을 초래하고 있다.

이런 관점에서 볼 때, 참 고추냉이의 다양한 기능성은 건강보조식품으로서의 역할뿐만 아니라, 이를 이용한 새로운 천연첨가물의 개발에 무한한 가능성을 제시하고 있다. 특히 그 중에서도 폐기되고 있는 고추냉이 잎과 줄기의 기능성 성분을 이용한 마이크로캡슐 제조는 폐기자원의 유효이용과 식품의 부가가치 향상으로 재배농가의 소득을 상승시키는 측면에서도 반드시 이루어져야 할 분야이다. 그리고 참 고추냉이 추출물은 빠른 시간 내에 공기 중의 산소와 반응하여 변질되기 때문에 추출물을 산소로부터 완벽하게 차단되는 것이 필요하다. 다양한 참 고추냉이 추출물로 부터 고부가가치제품을 만들기 위해서는 산소차단성이 우수한 생물고분자막으로 마이크로캡슐의 제조가 필수적이다. 생물고분자를 이용하여 산소차단성이 뛰어난 다양한 기능성 필름이나 마이크로캡슐을 제조할 수 있고 이들의 산업적, 의학적 응용 범위는 광범위하다.

따라서 우리나라에서 생산되는 참 고추냉이의 뿌리, 줄기, 잎의 성분을 분석하고, 현재 폐기되고 있는 잎과 줄기의 기능성 성분을 추출한 후, 산소차단이 우수한 생물고분자로 마이크로캡슐을 제조하는 기술의 확보는 매우 필수적이다. 참 고추냉이 성분이 들어있는 마이크로캡슐은 천연항산화제 및 천연식품보존료, 다양한 가공식품으로의 응용에 사용하는 것은 폐기자원의 유효이용 뿐만 아니라 첨가물 관련 산업의 발전과 국내 식품산업의 해외 진출에도 기여할 수 있을 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 고추냉이의 생리 활성 성분 최적 추출 기술을 개발하기 위해 증류추출 및 유기용매추출 방법을 비교 평가하고, 추출장치를 디자인해 활성성분의 농도와 수율을 고려한 최적추출 조건을 확립한다. 고추냉이 추출물의 항균활성 측정을 위해 병원성, 부패성 미생물 및 발효식품관련 유산균에 대한 항균활성 측정하고, 수용액상 및 기체상에서의 최소저해농도를 평가한다. 고추냉이 추출물의 주성분인 Allyl isothiocyanate(AIT)를 생물고분자로 코팅하여 마이크로캡슐로 만들어 그 효율을 분석한 후, 최적의 캡슐 조건을 확립한다. 저장과정을 통해서 마이크로캡슐로부터 AIT의 방출효과를 평가한다. 그리고 고추냉이 추출물만을 이용한 응용 제품 탐색하여, 기존 제품과 비교해 그 우수성을 검증하고, 고추냉이 추출물 미세 캡슐 비드의 적용 식품을 탐색한다. 그 후 응용 가능한 제품을 선정하고, 기존 상품화 제품과 차이점을 분석한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제는 고추냉이 부산물로부터 고기능성물질 추출 및 고부가가치화하는 것이다. 연구의 주요 관점은 고추냉이의 생리 활성 성분 최적 추출 기술을 개발하고 고추냉이 추출물의 항균활성 측정한 후 고추냉이 추출물의 주성분인 Allyl isothiocyanate(AIT)를 생물고분자로 코팅하여 마이크로캡슐로 만들어 그 효율을 분석한 후, 최적의 캡슐 조건을 확립하는 것이다.

Horseradish 뿌리분말 200 g과 증류수 550 mL를 혼합한 후, 40°C에서 효소반응을 시켰을 때, 혼합액의 AIT 농도가 가장 높았다. 효소반응이 끝난 혼합액을 각 온도에서 30, 60, 90, 120, 150, 180분간 추출한 후, 이를 원심분리 하여 하층에 가라앉은 essential oil을 주사기를 사용하여 원심관으로부터 분리하고 그 농도를 측정된 결과, 120°C에서 120분간 가열하였을 때, AIT의 농도가 가장 높았다. ITC의 항균활성을 측정하였을 때 ITC는 그람 양성균과 음성균 모두에 대하여 항균활성이 있었으며, 특히 충치균인 *Streptococcus mutans*와 병원성대장균 O157, 그리고 수산식품에서 문제가 되고 있는 장염비브리오균과 비브리오

패혈증균에 특히 강한 항균활성을 나타내었다. 그리고 생균수, 화학적 평가, 물리적 평가, 관능적 평가 결과를 종합하면, 200ppm과 300ppm의 ITCs를 첨가한 두부의 shelf-life가 각각 최소 4일, 6일 연장됨을 알 수 있었다. ITCs를 첨가한 PE patch의 경우 식빵과 생선포장에 있어 shelf-life 연장효과가 있는 것을 알 수 있었다. Horseradish로부터 추출한 ITCs 용액을 캡슐화하여 agar well method로 그 항균효과를 측정한 결과, ITCs 함유 캡슐은 positive control(ITCs 원액)보다는 항균효과가 낮게 나타났으며, 병원성 대장균 O157(*E. coli* O157:H7, clear zone, 1.5 cm)보다 비브리오 패혈증균(*V. vulnificus*, clear zone, 2.0 cm)에 대하여 강한 항균효과를 나타내었다. Horseradish로부터 추출한 ITCs를 캡슐화하여 gel type의 비누에 첨가한 항균 액체비누 시제품의 병원성대장균 O157과 비브리오 패혈증균에 대한 항균효과를 측정한 결과, ITCs 캡슐을 함유한 비누로 손을 세척한 그룹의 경우, 5% 첨가구부터 균의 감소가 나타나기 시작하여 10% 첨가구에서는 1명을 제외한 모두에서 균이 검출되지 않았으며, 비브리오 패혈증균에 대한 살균효과가 병원성대장균 O157보다 약간 강하게 나타났다. 여드름균(*Propionibacterium acnes*)에 대한 ITCs의 항균활성은 ITCs를 1,000 ppm, 1,500 ppm 및 2,000 ppm을 처리한 실험구에서 강한 항균 활성을 나타내었다. 또한, 고추냉이 추출물이 in vitro 실험에서 항염활성을 가지는 것을 알 수 있었다.

Allyl isothiocyanate(AIT)의 마이크로캡슐 실험에서 첫 번째 코팅물질로서 alginates는 물리적 특성과 캡슐의 효율을 분석한 결과 산소차단성이 우수하지만 캡슐 제조 과정의 문제점과 alginate와 고추냉이 추출물인 AIT 사이의 화학적인 상호작용이 약하기 때문에 고추냉이 추출물이 캡슐 제조 과정 중에 쉽게 휘발되고 결국 alginate는 마이크로캡슐에 적합하지 않다는 결론을 내리게 되었다. 그래서 두 번째 코팅물질은 향기물질 마이크로캡슐에 많이 쓰이는 Gum arabic(GA)을 사용하였고 분무건조 방법으로 마이크로캡슐을 제조하였다. GA와 AIT의 비율과 emulsifier첨가가 마이크로캡슐 효율과 AIT의 방출에 영향을 주었다. 그 결과는 GA와 AIT를 3:1의 비율로 하고 tween20 0.5% 첨가하는 하는 것이 적은 양의 GA를 사용하면서 많은 양의 AIT를 캡슐화할 수 있었다. 그리고 이 비율로 만들어진 AIT 마이크로캡슐은 25℃, 상대습도 50%의 저장 조건에서 1/2이상의 AIT가 285.13일 동안 보존되는 것으로 보아, 장기간 보존이 가능하기 때문에 최적의 마이크로캡슐의 조건이라고 할 수 있다. 그리고 방

출실험을 통해 얻어진 각 캡슐의 반감기는 참 고추냉이 추출물을 적용시킬 수 있는 산업에 유용한 자료로 이용될 것으로 생각된다.

AIT 마이크로캡슐을 항균제품 제작에 있어서, 고추냉이의 항균활성성분 AIT를 함유한 patch로 김을 보관 할 경우 처리하지 않은 시료에 비하여 미생물의 억제 등 항균력을 보였다. 이와 같은 patch를 포장 현장적용 기술에 접목시킬 경우 식품의 포장에 사용되고 있는 기본의 세균 또는 미생물 번식 등을 완화시킬 수 있을 것이라 판단된다. 그리고 AIT추출액 마이크로캡슐을 이용한 항균 제품을 성공적으로 제작하였다. 이러한 결과들은 AIT 마이크로캡슐이 산업에 적용될 수 있다는 가능성을 제시한 것이다.

본 연구를 통해서 항균활성이 뛰어난 국내산 참 고추냉이를 대량으로 추출하여 마이크로캡슐화한다면 장기간 보존이 가능하므로 제품으로서 다양한 분야에 적용 될 수 있을 거라고 기대된다.

SUMMARY

Recently, the demand of health functional food is increasing and in food industry, nature functional materials are paid attention and it is a tendency where the demand of that is also increasing rapidly at day. In our country and Japan, as the seasoning which is used commonly, there is a horseradish (Japanese horseradish, Wasabi, *Wasabia japonica* Matsumura). The unique flavor materials (Allyl isothiocyanate) of horseradish, which stimulate the nose, have the effect on the appetite increasing, vitamin B1 synthesis increasing, beta-amylase activation promotion, anti-oxidation activation, anti-microbial activation. Also horseradish is related to protect from the stomach cancer and stomach ulcer. Because of those properties, it is valuable and important that horseradish would be used for functional foods as well as for natural additives. However, in Korea, presently, the roots of horseradish are only used in partial hotels and Japanese restaurants. Because the utilization method for the stem and leaf of horseradish was not developed, the stems and leaves of horseradish are discarded so that it brings out big economic loss. Also, the volatile characteristics of flavors (Allyl isothiocyanates) extracted from horseradish is a big limitation in that horseradish would be applied to functional food industry and natural additives. Therefore, the functional materials (AIT) from stems and leaves of horseradish, which are discarded now, must be largely extracted and then micro-encapsulation for that functional materials(AIT) must be developed. After microencapsulation of functional material(AIT), it can be applied to various food industry. As a result, the value of horseradish will be increased so that the income of horseradish farmers will be increased.

In extraction experiment among this researches, when 200g of powders from horseradish roots and distilled water 550ml were mixed and then

the mixture was reacted with enzyme at 40°C, AIT concentration in the mixture was highest. After enzyme reaction, the mixture was extracted for various times at various temperature, and then was centrifuged. After that, essential oil of bottom layer was separated from centrifuged mixture and then concentration of that was analyzed. As a result, when heating at 120°C for 120min, the concentration of AIT was highest. In anti-microbial test of ITCs, ITCs had anti-microbial activity for gram-positive bacteria as well as gram-negative bacteria. Especially, it showed strong anti-microbial activity for teeth bacteria, *Streptococcus mutans* and pathogenic bacteria, O157 and enteritis vibrio bacteria, septicemia vibrio bacteria which has some trouble in fish market. Also, after adding ITCs into soybean curd, shelf life of soybean curd was extended over at least 4days or 6days. In case for adding ITCs into patch, the shelf life of bread and fish, which was packaged by ITCs patch, was extended. Alginate capsule containing ITCs extracted from horseradish had strong anti-microbial activities for septicemia vibrio bacteria rather than pathogenic bacteria. The liquid type-soaps containing ITCs alginate capsules had a strong effect on sterilization for septicemia vibrio bacteria rather than pathogenic bacteria O157. Also, when 1,000 ppm, 1,500 ppm, and 2,000 ppm of ITCs were treated, The strong anti-microbial activity was showed on pimple bacteria, *Propionibacterium acnes*. Finally, in vitro test, horseradish extracts also had anti-salty activity.

In microencapsulation research of allyl isothiocyanate(AIT), sodium alginate was used as first coating materials. However, the most amounts of AIT were volatilized from capsules, because of high pressure during air-atomizing and weak interaction of AIT and alginate. In order to overcome several problems of alginate microcapsules, Gum arabic(GA) was used as second coating materials of AIT, and by spray-drying, microcapsules were prepared. The ratio of GA and AIT, as well as addition of emulsifiers, had a effect on microencapsulation efficiency

and release of AIT from microcapsules. As a result, when emulsifiers, tween20 0.5% was added at 3:1 of GA:AIT, microencapsulation efficiency is the highest in other capsules. In other words, a large amount of AIT can be entrapped in microcapsules by using small amount of AIT so that it was economically valuable and important. The microcapsules, adding tween 20 0.5% at 3:1 of GA:AIT, can store AIT for the longest time, at 25°C, 50% relative humidity. In other words, the half amount of AIT can be remained for 285.13days in that microcapsules so that the addition of tween 20 0.5% at 3:1 of GA:AIT was the optimum ratio and the microcapsules prepared at this ratio will show the high efficiency and can extend shelf life of AIT. Finally, the half time of each capsules will be useful in food industry.

In the anti-microbial production of AIT microcapsules, when the lavers were packaged by the patch containing AIT, it showed to inhibit the growth of bacteria, compared with that by the patch not containing AIT. Successfully, The anti-microbial shampoo, were produced by adding AIT microcapsules. From these results, it is possible that AIT microcapsules can be applied to industry.

Through our research, AIT, which has strong anti-microbial activity, can be mass-extracted from horseradish. Also, by using microencapsulation technique of AIT, the shelf life of AIT can be extended so that AIT can be applied to industry.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the report on development of research	16
1. Technical aspects	16
2. Economical and industrial aspects	17
3. Social and cultural aspects	17
Chapter 2. Status of the development of techniques domestically and at overseas	19
Chapter 3. Contents and products of the development of research	22
Part I. Establishment of optimal extraction system and condition for Isothiocyanates (ITCs) extraction from horseradish and its extraction anti-microbial activity analysis	22
Introduction	22
Materials and methods	28
1. Investigation of optimal extraction condition of ITCs from horseradish	28
2. Anti-microbial activity test of ITCs extraction	29
3. The effect of ITCs extraction on shelf-life prolongation in foods	32
4. The sterilizing effect of anti-microbial soap with ITCs extraction	38
5. The anti-salt activity of ITCs extraction	41
Results and discussion	43
1. Investigation of optimal extraction condition of ITCs from horseradish	43
2. Pilot system for mass extraction of ITCs	48

3. Anti-microbial activity test of ITCs extraction	48
4. The effect of ITCs extraction on shelf-life prolongation in foods	51
5. The sterilizing effect of anti-microbial soap with ITCs extraction	70
6. The anti-salt activity of ITCs extraction	72
Conclusion	76

Part II. Developments of microencapsulation for Allyl isothiocyanate (AIT)and Release characteristics of AIT from microcapsules during storage	81
Introduction	81
Materials and methods	86
1. The preparation of horseradish extracts-alginate microcapsules & the physical properties of Alginate capsules	86
2. The preparation of AIT-Gum arabic microcapsules	89
3. Analysis for efficiency of AIT microcapsule & release test of AIT from microcapsules during storage	91
4. The measurement of physical properties for AIT microcapsule	94
Results and discussion	95
1. The characteristics of horseradish extracts-alginate microcapsuels & the physical properties of alginate capsuels	95
2. The optimal condition of AIT-Gum arabic microencapsulation	104
3. Physical properties of AIT-Guma arabic microcapsules	113
4. Controlled release effect of AIT from microcapsules during storage	118
Conclusion	125

Part III. Storage of Laver and manufacture of anti-microbial products using AIT microcapsule from horseradish extraction ..	127
Introduction	127
Materials and methods	130
1. Manufacturing of anti-microbial Patch with AIT extracted solution	130
2. Storage of Laver using anti-microbial Patch	131
3. Manufacturing anti-microbial products with AIT microcapsule from AIT extracted solution	132
Results and discussion	136
1. Manufacture of anti-microbial Patch for Storage of Laver ..	136
2. Manufacturing anti-microbial products with AIT microcapsules from AIT extracted solution	138
Conclusion	140
Chapter 4. Achievements and contribution of the studies on the related fields	141
Chapter 5. Plans for the application of the research	147
Chapter 6. Information on scientific techniques from overseas	149
Chapter 7. References	151

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	16
1. 기술적 측면	16
2. 경제·산업적 측면	17
3. 사회·문화적 측면	17
 제 2 장 국내의 기술개발 현황	 19
 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	 22
제 1 절 고추냉이로부터 isothiocyanate류 추출을 위한 최적 추출 시스템 및 조건 확립과 고추냉이 추출물의 항균 활성 분석	22
서론	22
재료 및 방법	28
1. Horseradish로부터 Isothiocyanates(ITCs)의 최적추출조건 조사	28
2. 추출한 ITCs의 항균활성 측정	29
3. 추출한 ITCs의 식품의 Shelf-life 연장효과 측정	32
4. 추출한 ITCs를 첨가한 항균비누의 살균효과 측정	38
5. 추출한 ITCs의 항염활성 측정	41
결과 및 고찰	43
1. Horseradish로부터 Isothiocyanates(ITCs)의 최적추출조건 조사	43
2. ITCs 대량추출을 위한 Pilot system	48
3. 추출한 ITCs의 항균활성 측정	48
4. 추출한 ITCs의 식품의 Shelf-life 연장효과 측정	51
5. 추출한 ITCs를 첨가한 항균비누의 살균효과 측정	70
6. 추출한 ITCs의 항염활성 측정	72
결론	76

제 2 절 고추냉이 추출물인 Allyl isothiocyanates(AIT)의 마이크로캡슐화 기술개발 및 저장기간 동안 캡슐로부터 방출효과 분석	81
서론	81
재료 및 방법	86
1. 고추냉이 추출물-alginate 마이크로캡슐 제조 및 alginate의 물성 분석	86
2. AIT-Gum arabic(GA) 마이크로캡슐 제조	89
3. AIT 마이크로캡슐의 효율 분석 및 저장기간동안 방출 실험	91
4. AIT 마이크로캡슐의 물리적 특징 측정	94
결과 및 고찰	95
1. 고추냉이 추출물-alginate 마이크로캡슐 특징 및 alginate의 물성 분석	95
2. AIT-Gum arabic(GA) 마이크로캡슐의 최적 조건	104
3. AIT-Gum arabic(GA) 마이크로캡슐의 물리적 특징	113
4. 저장기간 동안 마이크로캡슐로부터 AIT의 방출 제어 효과	118
결론	125
제 3 절 고추냉이 추출물 미세 캡슐 비드를 이용한 김의 저장 및 항균 제품 제작	127
서론	127
재료 및 방법	130
1. AIT추출액을 이용한 항균 Patch 제작	130
2. 항균 patch를 이용한 김의 저장	131
3. AIT추출액 마이크로캡슐을 이용한 항균 제품제작	132
결과 및 고찰	136
1. AIT추출액을 이용한 항균 Patch 제작 및 이를 이용한 김의 저장	136
2. AIT추출액 마이크로캡슐을이용한 항균 제품제작	138
결론	140
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	141

제 5 장 연구개발결과의 활용계획	147
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	149
제 7 장 참고문헌	151

제 1 장 연구개발 과제의 개요

1. 기술적 측면

우리나라에서 생산되는 참고추냉이의 뿌리만이 향신료로서 고가로 사용되고 있을 뿐, 성분이 비슷한 줄기와 잎 성분은 전량 폐기되고 있는 실정이다. 생선 어패류를 생식하는 식습관을 가지고 있는 우리나라와 일본의 경우, 공통적으로 사용되는 향신료로서 고추냉이(일본명, 와사비; Japanese horseradish, Wasabi, *Wasabia japonica* Matsumura)가 있다. 고추냉이는 코를 자극하는 독특한 향미 성분(alkyl isothiocyanate류)이 생선의 비린내를 없애줌과 동시에 그 맛을 상승시키는 작용을 가지고 있으며, 또한 식욕증진, 비타민B₁ 합성증강, 베타아밀라제 활성 촉진, 항산화활성, 항균활성 등의 효과가 있어 건강식품으로도 각광을 받고있기 때문에, 우리나라와 일본에서는 생선회나 생선초밥과 같이 먹는 것이 일상생활화 되어 있다. 또한 고추냉이는 위궤양, 위암과 관련이 있다고 알려진 세균 *Helicobacter pylori*에 대한 항균활성의 경우 잎이 뿌리보다 더 강한 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과들에 의하면 한국산 참고추냉이를 이용하여 다양한 가공식품, 건강식품 및 항산화제, 천연보존료를 개발할 수 있으며, 이것은 재배농가의 안정적인 소득향상과 직결된다고 할 수 있겠다.

참고추냉이 추출물은 빠른 시간 내에 공기중의 산소와 반응하여 변질되기 때문에 추출물을 산소로부터 완벽하게 차단되는 것이 필요하다. 다양한 참고추냉이 추출물로 부터 고부가가치제품을 만들기 위해서는 산소차단성이 우수한 생물고분자막으로 마이크로캡슐의 제조가 필수적이다. 생물고분자를 이용하여 산소차단성이 뛰어난 다양한 기능성 필름이나 마이크로캡슐을 제조할 수 있고 이들의 산업적, 의학적 응용 범위는 광범위하다.

따라서 우리나라에서 생산되는 참고추냉이의 뿌리, 줄기, 잎의 성분을 분석하고, 현재 폐기되고 있는 잎과 줄기의 기능성 성분을 추출한 후, 산소차단이 우수한 생물고분자로 마이크로캡슐을 제조하는 기술의 확보는 매우 필수적이다. 참고추냉이 성분이 들어있는 마이크로캡슐은 천연항산화제 및 천연식품보존료, 다양한 가공식품으로의 응용에 사용하는 것은 폐기자원의 유효이용 뿐만 아니

라 첨가물 관련 산업의 발전과 국내 식품산업의 해외 진출에도 기여할 수 있을 것이다.

2. 경제·산업적 측면

일본의 참고추냉이의 생산량은 1993년 1,325톤(총생산액, 35억엔)에서 1998년에는 총생산량이 4,101톤(총생산액, 106억엔; 약 1,100억원)으로 약 3배의 신장률을 나타내고 있다(日本 林野廳, 1998).

우리나라에서 참고추냉이의 재배는 1995년을 기준으로 전북 무주, 경북 금릉, 전주, 순창, 용인(식물원), 황성 등지에서 밭재배가, 춘천(도원), 철원, 평창, 울릉도, 단양 등지에서 물재배가 약 5 ha정도 이루어지고 있으며, 보통 12~18개월이 지나면 수확이 이뤄지는데 현재 시중 가격(5만~8만/kg)대로라면 3백평당 6천~8천만원의 고소득을 올릴 수 있어 생육 조건이 잘 맞는 지역은 고소득 작물로 부각될 가능성이 높다. 현재 상황은 고추냉이 뿌리만 일부 특급호텔과 고급 일식 요리집에 판매되고, 줄기와 잎은 일본과 달리 이용방법이 개발되어 있지 않아 대부분 폐기되고 있는 상태로 많은 경제적 손실을 초래하고 있다.

이런 관점에서 볼 때, 참고추냉이의 다양한 기능성은 건강보조식품으로서의 역할뿐만 아니라, 이를 이용한 새로운 천연첨가물의 개발에 무한한 가능성을 제시하고 있다. 특히 그 중에서도 폐기되고 있는 고추냉이 잎과 줄기의 기능성 성분을 이용한 마이크로캡슐 제조는 폐기자원의 유효이용과 식품의 부가가치 향상으로 재배농가의 소득을 상승시키는 측면에서도 반드시 이루어져야 할 분야이다.

3. 사회·문화적 측면

과학기술의 눈부신 발전은 각국의 식생활에 큰 변화를 일으키고 있으며, 우리나라도 국민소득의 증대에 따라 육류의 소비가 증가하는 등 식생활패턴이 달라지면서 고혈압, 동맥경화 등 순환기 계통의 질병 및 암의 발생률이 증가하고 있으며, 이러한 질병의 발생은 식품 혹은 식생활과 밀접한 관계가 있는 것이 역학적 연구로부터 지적되고 있다. 최근 건강 요구형 식품의 수요가 증가하고 있으며, 식품산업에서는 천연 기능성물질들이 주목을 받고 있으며 그 수요도

날로 급증하고 있는 추세이다. 따라서 버려지는 참고추냉이의 줄기 및 잎등의 폐자원으로부터 고기능성 추출물을 생산하여, 장기간 보관이 가능하며 다양한 식품산업에 사용될 수 있는 마이크로캡슐제품의 생산은 시대적 요구사항이다.

제 2 장 국내외 개솔개발 현황

고추냉이 특유의 자극성의 원인물질은 Allyl isothiocyanate(AIT)를 비롯한 isothiocyanate (ITC)류이다. 고추냉이를 갈지 않으면 자극성 물질은 생기지 않는데, 이것은 ITC류가 효소반응에 의해서 생기기 때문이다. 고추냉이의 세포 중에는 isothiocyanate 배당체와 분해효소인 myrosinase가 존재하고 있다. 고추냉이를 갈면, 세포가 파괴되고, myrosinase에 의하여 ITC 배당체로부터 ITC가 유리되는 가수분해반응이 일어난다. 가수분해에 필요한 H₂O는 고추냉이에 풍부히 함유되어 있다.(수분함량 80%).

한편, 고추냉이에는 레몬에 필적할 정도의 Vitamin C가 풍부히 함유되어 있으나, 매운 맛 때문에 많이 먹지 못하기 때문에 Vitamin C의 공급원으로서는 부적절하다. 그러나, Vitamin C가 myrosinase를 활성화시키기 때문에 고추냉이의 辛味에는 필수 불가결한 성분이다. 그 예로서 辛味가 없어진 고추냉이에 Vitamin C 용액을 첨가하면 다시 辛味가 발생하는데, 이것은 실활된 myrosinase Vitamin C에 의하여 활성화되어 다시 일련의 가수분해 반응이 일어나기 때문이다. Sinigrin으로부터 생산되는 ITC의 주성분은 allyl isothiocyanate (AIT)이며, 향균작용의 주성분도 바로 AIT이지만, 배당체의 R기의 종류에 따라 여러 종의 isothiocyanate가 동시에 생성된다.

1) 국외의 연구현황

1-1) 고추냉이

고추냉이의 AIT가 식중독세균, 병원성효모, 곰팡이 등에 대하여 강한 항균활성을 가지는 것은 많은 연구자들에 의하여 이미 밝혀져 있으며, 또한 항산화활성, 혈소판응집의 억제활성, 항변이원활성, 항암활성도 있는 것이 보고되었다. AIT 성분의 식품에의 응용에 관한 연구로는 고추냉이 분말을 고착화시킨 향균 sheet, AIT의 증기를 polyethylene film속에 넣어서 식품의 보존제로 개발한 향균 film 등이 개발되어 있다.

AIT는 뿌리에 가장 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 줄기와 잎에는 거의 비슷한 농도로 함유되어 있다. 또한 뿌리와 잎에 많이 함유되어 있는 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate는 간장에서 화학적 스트레스나 종양형성 초기단계에서 이들의 형성을 억제하는 효소인 Glutathione S-transferase와 quinone reductase의 활성을 상승시키는 작용도 있는 것으로 밝혀졌다. 한편 고추냉이무에는 함유되어 있지 않는 6-Methylthiohexyl isothiocyanate (6-MeS-NCS)가 참고추냉이에는 많이 함유되어 있으며, 이 성분이 greenish note (녹색식물의 청아한 향기)라고 하는 고추냉이 특유의 풍미를 가지게 한다. 6-MeS-NCS는 줄기에 가장 많이 함유되어 있기 때문에 일본에서는 줄기를 이용한 여러 가공식품(고추냉이차, 고추냉이 소시지, 고추냉이 아이스크림, 고추냉이 마요네즈, 고추냉이 비스킷, 고추냉이 된장 등)이 개발 판매되고 있으며, 이 greenish note 성분을 첨가한 입욕제, 샴푸, 린스도 판매되고 있다.

한편, 고추냉이로부터 isothiocyanate류의 추출방법으로는 ethanol을 이용하는 방법, ether 또는 hexane을 이용하는 방법 등 유기용매로 추출하는 방법이 일반화 되어 있다. 그러나 유기용매의 경우 산업화에 적용하였을 때 자극성으로 인한 인체에 대한 위험성과 환경오염의 문제가 있어 물을 이용한 증류추출이 안전성과 환경친화적인 측면에서 바람직한 것으로 생각되나 이에 관한 연구는 미비한 실정이다.

1-2) 마이크로캡슐레이션

식품산업에서의 마이크로캡슐화기술은 향료, 영양성분 등의 불안정한 물질을 빛, 산소, 수분 등의 외부환경으로부터 보호하고, 반응성이 큰 물질을 격리시키고, 냄새 및 맛을 마스킹시키며, 내용물의 용출속도를 조절하는 등의 목적으로 사용되고 있다. 식품산업에서 마이크로캡슐화 기술은 산, 염기, 아미노산, 색소, 효소, 미생물, 향기성분, 유지, 비타민 등이 있다. 특히 마이크로캡슐에 이용되는 향기 성분은 민트향, 양파 및 마늘향, 올레오레신류, 조미향 등이 있으며 피복물질로는 당류, 전분류, 검류등이 주로 사용되고 있다.

마이크로캡슐화기술은 그동안 에멀전 시스템을 통한 연구가 주로 진행되었으나, 최근 다양한 액체시스템에서 사용이 가능한 생물고분자를 이용한 마이크로 캐리어 개발에 박차를 가하고 있다.

2) 국내의 연구현황

2-1) 고추냉이

고추냉이의 주산지가 일본인 관계로 고추냉이에 대한 연구는 대부분은 일본의 연구자에 의하여 이루어졌으며 우리나라의 경우, 본 연구자가 발표한 한국산 고추냉이의 항균성 및 항변이원성에 관한 논문, 위궤양, 위암과 관련이 있다고 알려진 세균 *Helicobacter pylori*에 대한 항균활성에 대한 논문이외에는 거의 없는 실정이다. 더구나 추출방법에 관한 연구는 전무한 실정이다.

2-2) 마이크로캡슐화 기술

식품산업에서의 마이크로캡슐화 기술 연구는 1990년대에 시작되어 토코페롤 미세캡슐화, 향기성분 미세 캡슐화, 생리활성 물질의 저장안정성 향상을 위한 미세캡슐화에 대한 연구가 진행된 적이있으며, 최근 생물고분자를 이용한 마이크로캐리어 개발에 대한 연구는 시작단계이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 고추냉이로부터 Isothiocyanate류 추출을 위한 최적 추출 시스템 및 조건 확립과 고추냉이 추출물의 항 균 활성 분석 (협동과제 : 강릉대학교 신일식)

서 론

최근 식품 관련 연구의 발전에 따라 식품에 존재하는 기능성 성분들이 속속 밝혀지고 있다. 미국에서는 이른바 식품성분과 건강과의 관계를 나타내는 Health Claim을 인정하고 있으며, 일본에서도 식품의 기능성에 대한 연구가 활발히 이루어져 특정보건용 식품제도가 도입되었다. 여러 식품 성분 중에서 영양 가치 이외에 여러 가지 기능성(항산화활성, 항균활성, 항변이원활성, 항암활성, 면역증강활성, 항혈전활성, 혈압강화활성, 칼슘흡수촉진활성, 항콜레스테롤활성 등)을 나타내는 것이 밝혀짐에 따라 선진국에서는 암예방식품(미국)이나 특정보건용 식품(일본)이 새로운 식품으로 등장하고 있다. 이에 국내에서도 기능성 식품 및 물질을 확인하는 연구가 최근에 이루어지고 있으며, 香辛料는 그 대표적인 식품으로 식품의 맛을 향상시킬 뿐 아니라 소화촉진, 항균, 항산화, 항암작용 등도 겸비하고 있는 것으로 알려져 있다. 향신료의 문화는 주로 유럽을 중심으로 한 육식문화권에서 발달되었으며, 우리나라의 경우 구미제국처럼 다종다양한 향신료를 이용하고 있지는 않지만 옛날부터 고추, 마늘, 생강 등의 향신료가 이용되어 왔으며, 최근 이들 향신료의 생리활성기능에 대한 연구가 활발하게 이루어져 왔다.

생선 어패류를 생식하는 식습관을 가지고 있는 우리나라와 일본의 경우, 공통적으로 사용되는 향신료로서 고추냉이(일본명, 와사비)가 있다. 고추냉이는 十字花科에 속하는 식물로 일본이 원산지이다(일설에 의하면 고추냉이는 우리나라의 울릉도가 원산지라고 하는 견해도 있다)(1). 고추냉이는 코를 자극하는 독특한 辛味成分(alkyl isothiocyanate류)이 생선의 비린내를 없애줌과 동시에 그

맛을 상승시키는 작용을 가지고 있으며, 또한 식욕증진, 비타민B₁ 합성증강, 베타아밀라제 활성 촉진(2), 항산화활성(3), 항균활성 등의 효과가 있어 건강식품으로도 각광 받고 있기 때문에, 우리나라와 일본에서는 생선회나 생선초밥을 먹을 때, 고추냉이와 같이 먹는 것이 일상생활화 되어 있다.

고추냉이가 등장하는 가장 오래된 문헌은 平安時代의 책 [本草和名(918)]에 “잎이 쑥과 비슷하여, 山葵로 명명, 깊은 산에 자란다”라고 적혀 있다. 재배가 시작된 시기는 江戸(에도)時代에 들어서부터이며, 徳川家康이 상당히 좋아하여 門外不出의 궁중식품으로 지정하였다고 알려져 있다. 생선초밥에 고추냉이를 사용하기 시작한 것은 江戸時代의 華屋与兵衛라고 하는 생선초밥점으로, 고추냉이의 코를 쏘는 독특한 자극이 생선의 비린내를 없애주는 것이 그 당시의 폭발적인 히트의 요인으로 전하여지고 있다(4).

고추냉이는 일본산 고추냉이(*Wasabia japonica* Matsumura, 이하 Wasabi)와 서양산 고추냉이(고추냉이무, Horseradish, *Cochlearia armoracia* L., 이하 Horseradish)로 분류할 수 있으며, Wasabi의 경우, 일본에서는 혼와사비(한국명, 참고추냉이)로 부르고 있으며(Table 1, Fig. 1), 주로 뿌리가 향신료로서 판매되고 있다. 그러나 우리나라의 경우, 시중에서 판매되고 있는 튜브 고추냉이 또는 생선 횃집에서 제공되는 고추냉이의 대부분은 Wasabi가 아니라 Horseradish 뿌리의 건조분말을 염료로서 녹색으로 착색시켜 조미료와 겨자 분을 첨가한 제품들이 고추냉이를 대신하고 있으며 대부분의 고추냉이 제품은 일본의 수입품에 의존하고 있다. Wasabi 뿌리의 가격이 6~8만원/kg인데 비하여 Horseradish 뿌리는 3~5천원/kg으로 그 가격이 훨씬 싸기 때문에 일반음식점에서는 Horseradish를 많이 사용하고 있다.

Table 1. Japanese horseradish (Wasabi) and Western horseradish (horseradish)

Origin	Common name	Scientific name
Japan	Wasabi or Japanese horseradish	<i>Wasabia japonica</i>
Western	Horseradish	<i>Cochlearia armoracia</i>



Fig. 1. Japanese horseradish (Wasabi) and horseradish.

고추냉이가 식중독세균(5-9), 병원성효모(10), 곰팡이(11) 등에 대하여 강한 항균활성을 가지는 것은 많은 연구자들에 의하여 이미 밝혀져 있으며, 또한 항산화활성(3), 혈소판응집의 억제활성(12), 항변이원활성(13), 항암활성(14,15)도 있는 것이 보고되었다. AIT 성분의 식품에의 응용에 관한 연구로는 고추냉이 분말을 고착화시킨 항균 sheet, AIT의 증기를 polyethylene film 속에 넣어서 식품의 보존제로 개발한 항균 film 등이 개발되어 있다(16).

고추냉이 특유의 자극성의 원인물질은 Allyl isothiocyanate(AIT)를 비롯한 isothiocyanate류(ITCs)이다. 고추냉이를 갈지 않으면 자극성 물질은 생기지 않는데, 이것은 ITCs가 효소반응에 의해서 생기기 때문이다. 고추냉이의 세포 중에는 isothiocyanate 배당체와 분해효소인 myrosinase가 존재하고 있다. 고추냉이를 갈면, 세포가 파괴되고, myrosinase에 의하여 ITCs 배당체로부터 ITCs가 유리되는 가수분해반응이 일어난다(Fig. 2). 가수분해에 필요한 H₂O는 고추냉이에 풍부히 함유되어 있다.(수분함량 80%).

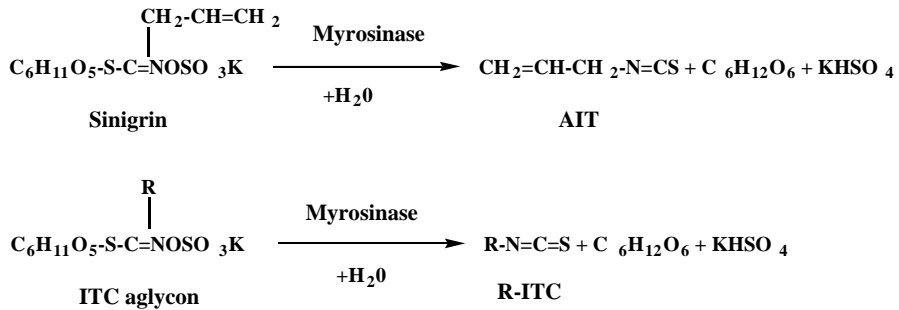


Fig. 2. Mechanism of ITCs production from sinigrin in horseradish.

Sinigrin으로부터 생산되는 ITC의 주성분은 allyl isothiocyanate(AIT)이며, 향균작용의 주성분도 바로 AIT이지만, 배당체의 R기의 종류에 따라 여러 종의 isothiocyanate가 동시에 생성된다(Fig. 2).

한편, 고추냉이에는 레몬에 필적할 정도의 Vitamin C가 풍부히 함유되어 있으나, 매운 맛 때문에 많이 먹지 못하기 때문에 Vitamin C의 공급원으로는 부적절하다. 그러나 Vitamin C가 myrosinase를 활성화시키기 때문에 고추냉이의辛味에는 필수 불가결한 성분이다. 그 예로서 辛味가 없어진 고추냉이에 Vitamin C 용액을 첨가하면 다시 辛味가 발생하는데, 이것은 실활된 myrosinase Vitamin C에 의하여 활성화되어 다시 일련의 가수분해 반응이 일어나기 때문이다.

AIT는 뿌리에 가장 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 줄기와 잎에는 거의 비슷한 농도로 함유되어 있다. 또한 뿌리와 잎에 많이 함유되어 있는 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate는 간장에서 화학적 스트레스나 종양형성 초기단계에서 이들의 형성을 억제하는 효소인 Glutathione S-transferase와 quinone reductase의 활성을 상승시키는 작용도 있는 것으로 밝혀졌다. 한편 서양산 고추냉이에는 함유되어 있지 않는 6-Methylthiohexyl isothiocyanate (6-MeS-NCS)가 참고추냉이에는 많이 함유되어 있으며, 이 성분이 greenish note (녹색식물의 청아한 향기)라고 하는 고추냉이 특유의 풍미를 가지게 한다 (Table 2).

Table 2. Isothiocyanate components in Wasabi and horseradish*

Isothiocyanate (NCS)	Wasabi			Horseradish
	Root	Stem	Leaf	Root
Allyl NCS	370.0	62.0	76.0	322.0
n-Butyl NCS	5.8	1.0	1.2	1.4
3-Butenyl NCS	6.1	0.2	0.9	2.7
4-Pentenyl NCS	13.0	2.2	2.6	3.2
5-Hexenyl NCS	3.4	1.0	1.9	0.6
β -Phenylethyl NCS	-	-	-	75.0
5-Methylthipentyl NCS	1.6	0.9	0.4	-
6-Methylthiohexyl NCS	6.3	8.8	3.8	-
7-Methylthioheptyl NCS	4.8	2.0	1.1	-
5-Methylsulfinylpentyl NCS	6.6	1.0	1.4	2.7
6-Methylsulfinylhexyl NCS	26.0	8.4	18.0	3.0
Palmitic acid	3.5	9.2	5.2	2.7
7-Methylsulfinylheptyl NCS	4.7	1.5	3.6	2.6

*The figures in the table are expressed as ratios of each peak area of the samples to the area of the internal standard (ethyl caprate, 0.3 mg in 100 g of Wasabi or Horseradish).

6-MeS-NCS는 줄기에 가장 많이 함유되어 있기 때문에 일본에서는 줄기를 이용한 여러 가공식품(고추냉이차, 고추냉이 소시지, 고추냉이 아이스크림, 고추냉이 마요네즈, 고추냉이 비스킷, 고추냉이 된장 등)이 개발 판매되고 있으며 (17), 이 greenish note 성분을 첨가한 입욕제, 샴푸, 린스도 판매되고 있다. 향신료의 향균성에 대해서는 여러 종류의 향신료에 대해서 향균효과나 향균성분을 검토한 보고가 있다. 고추냉이의 향균성에 대한 기록으로는 결핵균의 발견으로 유명한 Koch가 보고한 바 있으며(18), 또 고추냉이의 즙을 묻힌 탈지면

으로 세균을 배양한 시험관을 막으면, 콜레라균, 장티푸스균, 등의 전염병원균이 사멸하였다는 보고도 있다(19).木村(10)는 고추냉이가 *Candida*속 효모에 항균효과가 있으며, 특히 증류액이 항균활성이 강하다고 보고하였다. ITC의 항균 작용기구는 세포질, 세포막 peptide 및 단백질의 SH기 등에 반응하는 ITCs의 thiocyanate기(-N=C=S)가 작용하는 것으로 생각되어지고 있다. 金丸 등(6)은 분말고추냉이, 분말겨자의 추출액 및 AIT를 배지 중에 첨가하였을 때, *E. coli*, *Staphy. aureus* 등 5 종류의 세균에 대한 증식 저해효과를 조사하였으며, AIT 이외의 성분도 저해에 관여하고 있다는 가능성을 제시하였다.

Table 3. Antimicrobial activity of allyl isothiocyanate vapour
(Isshiki et al., 1992)

Organism	Minimum inhibitory concentration (ng/ml)
Bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i> IFO-13722	110
<i>Bacillus cereus</i> IFO-13494	90
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO-12732	110
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IFO-12993	110
<i>Escherichia coli</i> JCM-1649	34
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC-14028	54
<i>Salmonella enteritidis</i> JCM-1891	110
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> IFO-12711	54
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-13275	54
Yeasts	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NFRI-3066	22
<i>Hansenula anomala</i> NFRI-3717	37
<i>Torulaspora delbreuckii</i> NFRI-3811	18
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> NFRI-3447	16
<i>Candida tropicalis</i> NFRI-4040	22
<i>Candida albicans</i> IFO-1061	22
Moulds	
<i>Aspergillus niger</i> ATCC-6275	37
<i>Aspergillus flavus</i> NFRI-1157	37
<i>Penicillium islandicum</i> NFRI-1156	22
<i>Penicillium citrinum</i> NFRI-1019	22
<i>Pennicillium chrysogenum</i> IFO-6223	62
<i>Fusarium oxysporum</i> NFR-1011	22
<i>Fusarium graminearum</i> NFR-1233	16
<i>Fusarium solani</i> IFO-9425	34
<i>Alternaria alternata</i> IFO-4026	22

이와 같이 고추냉이는 여러 가지 생리활성을 가지고 있음에도 불구하고 주산지가 일본 또는 유럽, 중국인 관계로 고추냉이에 대한 연구는 대부분이 일본을 중심으로 이루어지고 있으며, 우리나라의 경우, 고추냉이의 생리활성에 관한 연구보고는 찾아보기 힘들다. 따라서 본 연구에서는 가격이 Wasabi에 비하여 상대적으로 싼 Horseradish로부터 고농도, 고수율의 항균성분(ITCs)을 추출하기 위한 최적추출조건, 추출한 ITCs의 항균활성, 식품의 shelf-life 연장효과, 손의 소독효과, 항염증활성에 대하여 조사하였으며 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. Horseradish로부터 Isothiocyanates(ITCs)의 최적추출조건

가. 시료

본 실험에 사용된 Horseradish 뿌리 분말은 (주)바이오코트(서울, 한국)에서 구입한 중국산 분말을 사용하였다. AIT 표준용액(>98% purity)은 Fluka Co. (Haan, Germany)로부터 구입하였으며, Hexane은 Showa Co.(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다.

나. ITCs의 최적추출조건 확립

- 1) ITCs의 최대 생성을 위한 Horseradish 뿌리 분말과 증류수의 최적 혼합비율 및 최적 효소반응 온도

Horseradish 뿌리 분말로부터 항균성분인 ITCs의 최대생성을 위한 분말 증류수의 최적 배합비율을 조사하기 위하여 분말 200 g과 증류수 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 mL를 각각 섞은 후, 35, 37, 40, 45°C에서 30, 60, 90, 120, 150, 180분간 각각 효소반응을 행하였다.

- 2) 혼합액으로부터 ITCs의 최대추출을 위한 최적 추출온도 및 시간

1)의 단계에서 ITCs 최대생성을 나타낸 배합비율(분말 200 g + 증류수 550 mL)과 효소반응조건(40°C, 120분)의 혼합액을 rotary evaporator (NE-1, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)와 oil bath (C-WHT, 창신과학, 서울, 한국)를 이용하여 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135°C에서 30, 60, 90, 120, 150, 180분간 각각 가열하여, 150 mL를 분획하고, 원심분리하여 oil층의 ITCs 농도를 측정하였다.

다. ITCs의 gas chromatography에 의한 농도 측정

1) 시료의 전처리

ITCs 추출물 각각 4 mL를 99% diethyl ether 4 mL와 혼합한 후, 90°C의 건조 열기(dry thermo bath, MG-2000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)에서 1시간 동안 가열하였다. 가열 후, 상층액의 ITCs성분을 gas chromatography로 분석하였다.

2) Gas chromatography에 의한 ITCs 농도 측정

ITCs 추출물 농도는 FID(flame ionization detector)이 부착된 gas chromatography (Clarus 500, Perkin Elmer Inc., Las Vegas, USA)를 사용하였으며 column은 HP-Innowax capillary column (30 m × 0.32 mm I.d., 0.5 μm film thickness, Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA)을 사용하였다. Injection port의 온도는 250°C로 유지하였다. Carrier gas는 helium을 사용하였고, split ratio는 1:14.2이었다. Standard는 99.8%의 AIT(Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)를 사용하였으며, ITCs의 농도는 주성분인 AIT의 농도로 나타내었다.

2. 추출한 ITCs의 항균활성 측정

가. 공시균주

1) 병원성 세균

본 실험에 사용된 병원성 세균은 Table 1과 같으며, 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC, Daejeon, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 실험 전, Table 1의 배지(30 mL)에 접종한 후, 37°C에서 24시간 동안 전 배양하여 사용하였다.

Table 1. Tested pathogenic bacteria and culture medium

Pathogenic bacteria	Culture medium
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1012	BHI ¹ broth
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 25923	BHI broth
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3569	BHI broth
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 25922	BHI broth
<i>Vibrio vulnificus</i> KCTC 2962	BHI broth + NaCl 1%
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 221001	BHI broth + NaCl 3%

¹Brain Heart Infusion (Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)

2) 부패성 세균

부패성 세균 중 rope(점질물) 생성세균으로 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, *B. cereus* KCTC 1012, *B. licheniformis* KCTC 1029를 유전자은행으로부터 분양 받아 실험에 사용하였으며 Table 2와 같다.

Table 2. Tested Putrefactive bacteria and culture medium

Putrefactive bacteria	Culture medium
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	BHI broth
<i>B. cereus</i> KCTC 1012	BHI broth
<i>B. licheniformis</i> KCTC 1029	BHI broth

3) 부패성 효모

빵의 부패성 효모로 알려져 있는 *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1200과 *Saccharomycopsis fibuligera* KCTC 7940 (Nielsen and Rios, 2000)을 유전자은행으로부터 분양받아 실험에 사용하였다(Table 3). 실험 전, Yeast Mold (YM, Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) broth에 접종한 후, 25°C에서 48시간 동안 전 배양 하여 사용하였다.

Table 3. Tested Putrefactive yeasts and culture medium

Putrefactive yeasts	Culture medium
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 1200	YM broth
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> KCTC 7940	YM broth

4) 부패성 곰팡이

빵의 부패성 곰팡이로 알려져 있는 곰팡이와 배양배지는 Table 4와 같다. *Aspergillus niger* KCTC 6985와 *Penicillium roquefortii* KCTC 6080를 유전자은행으로부터, *Rhizopus stolonifer* KCCM 35486과 *Mucor plumbeus* KCCM 60265를 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 실험 전, potato dextrose agar(PDA, Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)에 도말하여 3일 동안 25℃의 암소에서 배양한 후, 멸균한 spatula로 곰팡이의 hyphae로부터 spore를 분리하여 1%(w/v)의 NaCl을 첨가한 5%(v/v) tween #80 용액에 현탁하였다. 이 현탁액을 glass filter (pore width; 105 μ m)에 filtering 하여 곰팡이 spore 현탁액을 만들어 실험에 이용하였다.

Table 4. Tested Putrefactive molds and culture medium

Putrefactive molds	Culture medium
<i>Aspergillus niger</i> KCTC 6985	PDA
<i>Penicillium roquefortii</i> KCTC 6080	PDA
<i>Rhizopus stolonifer</i> KCCM 35486	PDA
<i>Mucor plumbeus</i> KCCM 60265	PDA

나. Paper disk method에 의한 항균활성 측정

실험 전 미생물을 각 배양배지에서 24~48시간 동안 전배양한 후, 최초 균수를

1.0×10^5 CFU/mL로 조절한 배양액을 각 agar plate에 100 μ L씩 분주하여 도말하였다. Agar plate 중앙에 8 mm filter paper disk (Whatman No. 2)를 고정하고 여기에 ITCs 추출액 50 μ L를 분주하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, clear zone의 크기를 관찰하였다.

다. 최소살균농도(Minimum Bactericidal Concentration, MBC) 측정

96-well flat-bottom microplate (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany)의 각 well에 세균과 효모는 전 배양 배지와 동일한 멸균배지, 곰팡이는 멸균한 6%(w/v) malt extract (Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) broth를 50 μ L 씩 분주하고, 각 균주의 전배양액(24~48시간, 25~37°C, 약 1.0×10^5 CFU/mL) 50 μ L 씩 분주하였다. 여기에 2배 희석법으로 희석한 ITCs 추출물을 50 μ L 씩 분주하고, 세균은 37°C에서 48시간, 효모와 곰팡이는 25°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후, 세균과 효모의 증식유무를 micro plate reader (560nm, EL 800, Bio-Tek Instrument Inc., California, USA)로 측정하였고, 곰팡이는 육안으로 균사 출현의 유무를 확인하여 증식 유무를 판단하였다.

MBC의 측정은 Bamba 등(20)의 방법을 이용하였다. MIC 측정 후 증식이 확인되지 않은 배양액을 한 백금이 취하여 세균은 plate count agar (PCA, Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) plate, 효모는 YM agar plate, 곰팡이는 PDA plate에 도말하여 증식유무를 확인하였다.

3. 추출한 ITCs의 식품의 Shelf-life 연장효과 측정

가. 포장두부의 Shelf-life 연장효과 측정

1) 시료

실험에 사용한 포장두부는 강원도 강릉시에 소재하고 있는 강릉초당두부에서 생산한 것으로 ice box (4°C)에 넣어 실험실로 운반하여 사용하였다.

2) ITCs 용액

525, 1,050, 2,100, 4,200, 6,300 ppm의 ITCs 추출액 5 mL를 100 mL의 증진수가 있는 포장두부에 주사기를 이용하여 각각 주입하였다. 이 때, 포장두부에 첨가된 ITCs의 최종 농도는 각각 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm이었으며, 이 두부를 10°C에 저장하면서 경과시간에 따른 미생물 변화 및 물리화학적 변화를 측정하였다. 대조구로는 ITCs를 첨가하지 않은 포장두부를 사용하였다.

3) 생균수 측정

두부 고형물 10 g과 증진수 10 mL를 각각 무균적으로 stomacher bag에 취하고 멸균생리식염수로 희석하였다. Stomacher M400 (Seward Co., UK)으로 균질화 하여 plate count agar에 접종, 37°C에서 48시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

4) 화학적 평가

가) pH 측정

pH는 2 g의 두부 고형물을 10 mL의 증류수와 혼합하여 균질화 한 후, Cyberscan model 500 pH meter (Euteon Instruments, Singapore)로서 측정하였다.

나) 산가 측정

5g의 두부 고형물을 20 mL의 ether:ethanol mixture(2:1)와 혼합하여 균질화 하고, pasteur pipette으로 2 방울의 1% phenolphthalein 용액을 첨가한 후, 균질액의 색깔이 완전히 분홍색으로 변할 때까지 1 N KOH · ethanol 용액을 첨가하였다. 산가는 첨가된 1 N KOH · ethanol 용액의 용량으로서 나타내었다.

5) 물리적 평가

가) 충전수의 탁도 측정

충전수의 탁도는 각 시료로부터 3 mL의 충전수를 취하여 538 nm에서 Spectrophotometer (UV 1600 PC, Shimadzu, Tokyo, Japan)로 측정하였으며, blank로는 증류수를 사용하였다.

나) 두부의 색도 측정

두부의 색도는 D25 circumferential optical sensor를 장착한 Hunterlab Model D25 Tristimulus Colorimeter (Hunter Associates Laboratory, Inc. VA, USA)로서 측정하였으며, $X = 83.24$, $Y = 85.23$ and $Z=100.92$ 의 reflectance value를 가지는 standard white tile을 reference로서 사용하였다. 두부의 색도는 Hunter L(lightness), +a(red), -a(green), +b(yellow), -b(blue)로 분류하였으며, 각 값은 5번의 반복 실험결과의 평균치로 나타내었다.

다) 관능검사

두부의 관능검사는 Kawakishi *et al.* (1)의 방법에 따라, 10명의 훈련된 panel로서 실시하였으며, ITCs를 첨가하지 않은 두부를 대조구로 사용하였다. 각 panel은 각각의 시료에 대하여 5 point system으로 채점하였다(scale: 1, very poor; 2, poor; 3, common; 4, good; 5, very good)

라) 통계처리

모든 실험결과는 각각 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (2)로 처리, 평균간의 유의성 ($P<0.05$)을 SPSS (SPSS Inc., 2004) program (Ver. 12.0)으로 검정하였다.

나. 빵의 Shelf-life 연장효과 측정

1) 항균 patch의 제작

ITCs 추출물을 이용한 천연보존료를 개발하기 위하여 항균 patch를 제작하였다(Fig. 1). Polyethylene terephthalate/aluminium/polypropylene(두께 110 μM)으로 구성된 ITCs 불투과성 필름에 1,000 ppm의 ITCs 추출액 500 μL 를 함유한 210 μM 두께의 탈지 filter paper (4×4 cm)를 부착시키고 ITCs 투과성 oriented polypropylene (PP, 두께 70 μM) 또는 polyethylene(PE, 두께 50 μM) film으로 덮은 후 heat sealing 하였다(Fig. 2). 대조구로서는 증류수 500 μL 를 분주하였다.

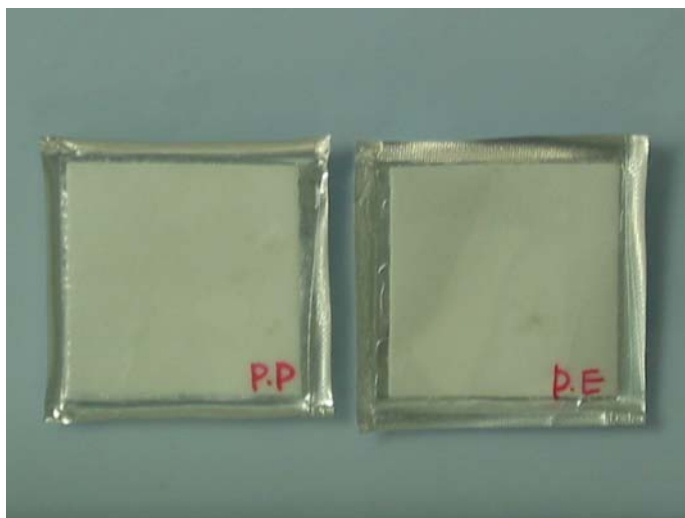


Fig. 2. Anti-microbial patch containing ITCs solution (ITCs permeable film; PP(left), PE(right)).

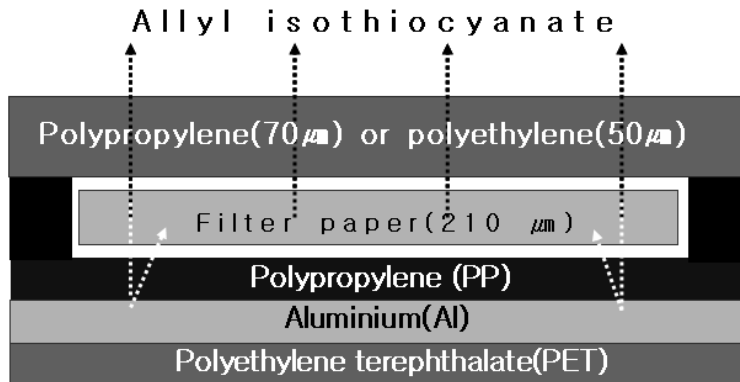


Fig. 2. Design and structure of anti-microbial patch.

2) 빵의 shelf-life 연장효과 측정

항균 patch를 1.4L glass jar의 마개 안쪽에 접착(Fig. 3)하고 jar에는 식빵 (우유식빵, 크라운베이커리(주), 서울, 한국)을 한 조각씩 넣고 밀봉한 후, 25℃ incubator에서 배양하면서 미생물의 증식을 48시간 간격으로 사진촬영 하였다.



Fig. 3. Anti-microbial patch on inside of cover of Glass jar.

나. 생선 어패류의 Shelf-life 연장효과 측정

1) 미생물학적 평가

3-나)-1에서 제작한 항균 patch를 포장된 생선 및 생선회의 포장 wrap 위에 부착하고(Fig. 4), Plate count agar (Difco Lab. Co., Detroit, USA)를 이용하여 일반세균수는 37℃에서 48시간, 저온세균수는 4℃에서 10일간 배양하여 측정하였다.

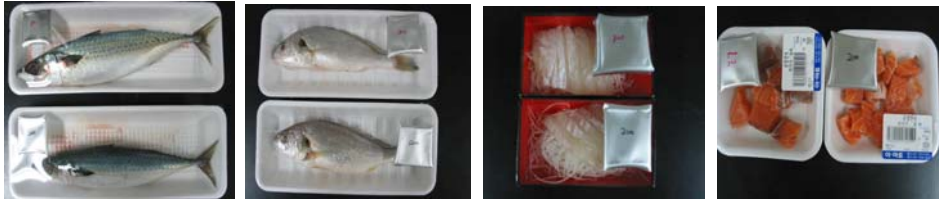


Fig. 4. Anti-microbial patch on the package wrap of fish and sashimi.

2) 화학적 평가

고등어육을 취하여 total volatile basic nitrogen (TVB-N)과 thiobarbituric acid (TBA)를 각각 Conway's microdiffusion 방법과 Turner(3)의 방법으로 측정하였다. 고등어육즙의 pH도 선도평가의 한 방법으로 측정하였다.

3) 관능 평가

저장 중 고등어의 관능성 변화는 다음의 수정된 Tasmanian Food Research Unit 방법에 따라 10인의 패널을 이용하여 평가하였다 (Table 5).

Table 5. Modified scheme of Tasmanian Food Research Unit

Parameters	Demerit points			
	0	1	2	3
Appearance	Very bright	Bright	Slightly dull	Dull
Skin	Firm	Soft		
Slime	Absent	Slightly slimy	Slimy	Very slimy
Stiffness	Pre-rigor	Rigor	Post-rigor	
Clarity of eyes	Clear	Slightly cloudy	Cloudy	
Color of gills	Characteristics	Slightly faded	Very faded	
Color of belly	Opalescent	Grayish	Some yellow	Yellow
Smell	Sharply seaweedy	Fishy	Stale	Spoilt
Firmness of belly	Firm	Soft	Sunken	Burst

Total demerit points: 0 - 22

4. 추출한 Isothiocyanates를 첨가한 향균비누의 살균효과 측정

가. 참고추냉이 추출물의 캡슐 제조

5,000 ppm의 ITCs 추출물 100 mL를 1.0% sodium alginate solution(Kanto Co., Japan) 100 mL와 혼합하여 균질화한 후 주사기(30cc, Needle Size : 23gauge ($\Phi=0.64\text{mm}$))를 이용하여 1방울씩 0.5M CaCl_2 용액에 떨어뜨려서 30분간 고형화 하여 ITCs 함유 캡슐을 제조하였다(Fig. 5).



Fig 5. Alginate capsule containing ITCs

나. ITCs 함유 캡슐의 항균효과 측정

ITCs 함유 캡슐의 항균효과는 agar well method를 이용하여 측정하였다. 멸균한 plate count agar(Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)에 *Vibrio vulnificus*(비브리오 패혈증균)와 *Escherichia coli* O157:H7(병원성 대장균 O157)를 도말한 후 직경 1 cm의 well을 만들어 ITCs 함유 캡슐을 각각 40 개씩 투여하고 37℃에서 48시간 배양한 후 clear zone의 직경을 측정하여 항균 효과를 조사하였다. 이 때, positive control은 ITCs 추출물 원액을 사용하였다.

다. ITCs 함유 캡슐 첨가 항균비누 제조

시중에서 판매하고 있는 gel type의 비누에 ITCs 함유 캡슐을 5, 7, 10%를 첨가하여 항균비누를 제조, 손에 대한 살균효과를 측정하였다(Fig. 6).



Fig. 6. Gel type soup containing ITCs capsule

라. ITCs 첨가 항균비누의 손에 대한 살균효과 측정

ITCs 추출물을 함유한 캡슐을 첨가하여 제조한 항균비누의 손에 대한 살균효과를 조사하기 위한 방법은 다음과 같다.

- ① 실험대상으로 학생을 5명씩 5 그룹(A, B, C, D, E group)으로 나눈다.
- ② 실험 대상으로 선정된 패널(5명)은 70% 알코올로 손을 살균하고 사전배양한 병원성 대장균 O157(*Escherichia coli* O157:H7)과 비브리오 패혈증균(*Vibrio vulnificus*)의 배양액에 손을 담구어 세균을 손에 묻힌다.
- ③ A 그룹은 손을 씻지 않고, B 그룹은 일반 비누로, C, D, E 그룹은 5, 7, 10%의 ITCs 추출물 캡슐이 함유된 항균비누(Fig. 7)로 각각 30초간 손을 씻는다.
- ④ 멸균 티슈페이퍼로 손을 닦은 후 준비된 배지에 손도장을 찍는다.
- ⑤ 모든 배지는 37℃에서 48시간 배양 후 균의 증식 여부를 측정하였으며 실험은 3일 간격으로 2차 반복 실시하였다.



Fig. 7. Gel type soup added capsule containing ITCs.

5. 추출한 Isothiocyanates의 항염활성 측정

가. in vitro 시험계

세포주는 RAW264.7 murine macrophage cells로 한국 세포주 은행에서 분양받은 것을 사용하였다. RAW264.7 세포주는 염증관련 시험에서 널리 사용되고 있는 세포주로서 비교할 수 있는 자료들이 풍부하므로 선택하였다. DEM(Gibco) 배양액에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)와 1% antibiotic 용액(Penicillin/ Steptomycin, Gibco)을 첨가하여 배양액으로 사용하며 포화 습도하에서 5% CO₂를 공급하여 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포는 액체질소에 냉동보존하며 시험에 사용할 세포는 해동하여 7일 이상 배양 후 사용하였다. 음성 대조물질로는 DMSO(sigma 074K0087, USA)를 사용하였고, 양성 대조물질로는 500 μ m Aspirin(sigma 030K0935, USA)를 사용하였다.

나. 항염 활성 측정

RAW264.7 세포에 PGE₂생성억제 시험을 위한 노출 농도를 결정하기 위하여

MTT 방법을 사용하여 세포독성 실험 수행하였다. 세포독성시험에서 시험물질의 최고 농도를 용매(DMSO) 처리 가능 농도(1%)를 고려하여 80 µg/mL(80 ppm)으로 하였고 공비 2로 7단계농도를 사용하였다. 세포독성시험의 결과로부터 50% 세포 치사를 보이는 시험물질의 농도(IC50)를 산출하였다. IC50 값을 활용하여 본 실험의 농도를 결정하였고 4~5단계 농도를 사용하여 3회 반복 시험을 수행하였다.

PGE₂ 생성억제 시험은 RAW264.7 세포 (5×10⁴ cells/mL)를 96 well plate에 심고 다음 날 시험물질 및 대조물질(용매대조구 DMSO와 양성대조구 aspirin)을 처리하였다. 4시간 후 LPS(1 µg/mL, *E. coli* lipopolysaccharide, Sigma)를 처리하여 PGE₂를 유도하였다. LPS 처리 16시간 후에 세포 배양액을 사용하여 PGE₂ 생성정도를 측정하였다. PGE₂ 농도는 Biotrak PGE₂ EIZ KIT(Amersham Pharmacia Biotech)로 측정하였다. Goat anti-mouse IgG가 부착되어 있는 96 well plate에 10~320 pg/well 농도의 표준액 또는 시료를 가한 후, prostaglandin E₂ conjugate와 antibody를 각각 50 µL씩 가하고 실온에서 1시간 반응시켰다. 항원-항체 복합체에 TMB substrate (3,3',5,5'-teramethylbenzidine)용액 150 µL를 가하고 실온에서 30분간 반응시키고 1M Sulfuric acid를 가하여 반응을 중단 시킨 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 표준액과 시료액의 상관관계를 다음과 같은 방법으로 계산하였다. 각 농도별로 % 억제 정도를 산출하였다.(%B/B0).

$$\%B/B0 = \frac{(\text{standard or sample OD NSB} - \text{NSB OD})}{(\text{zero standard OD} - \text{NSB OD})} \times 100$$

결과 및 고찰

1. Horseradish로부터 Isothiocyanates(ITCs)의 최적추출조건 조사

가. ITCs의 gas chromatography에 의한 농도 측정

Horseradish로부터 추출한 항균성분인 isothiocyanate(ITCs)는 그 유도체가 12개나 되며 그 중 allyl isothiocyanate(AIT)가 약 77%를 차지하고 있다. 12개의 ITC 유도체에 대한 gas chromatography(GC)의 retention time은 이미 모두 밝혀져 있다(4). 따라서 본 연구에서는 주성분인 AIT의 농도를 측정하는 것으로 ITCs 유도체 각각의 농도를 측정하는 것을 대신하였다.

Fig. 8은 본 연구에서 Horseradish 추출물의 AIT를 분석한 결과로서, 왼쪽이 Standard AIT이고, 오른쪽이 Horseradish에서 추출한 AIT의 gas chromatogram이다. Phenyl isothiocyanate(PIT)는 internal standard로서 사용하였다. AIT의 retention time은 6.04~6.21 min이었다.

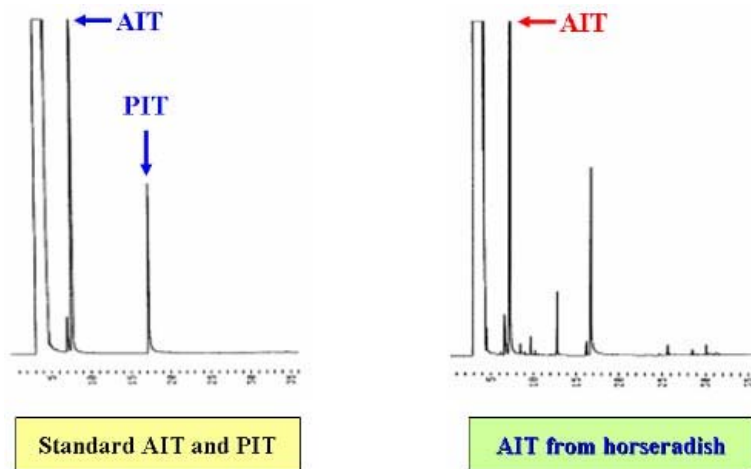


Fig. 8. Retention time of AIT in gas chromatography.

나. ITCs의 추출조건 확립

1) ITCs의 최대 생성을 위한 Horseradish 뿌리 분말과 증류수의 최적 혼합비율 및 최적 효소반응 온도

Horseradish 뿌리 분말로부터 항균성분인 ITCs의 최적추출조건 확립을 위한 1 단계로서, 분말과 증류수의 배합비율, 그리고 ITCs의 최대생성을 위한 효소반응 온도 및 시간을 조사한 결과는 Fig. 9와 같다.

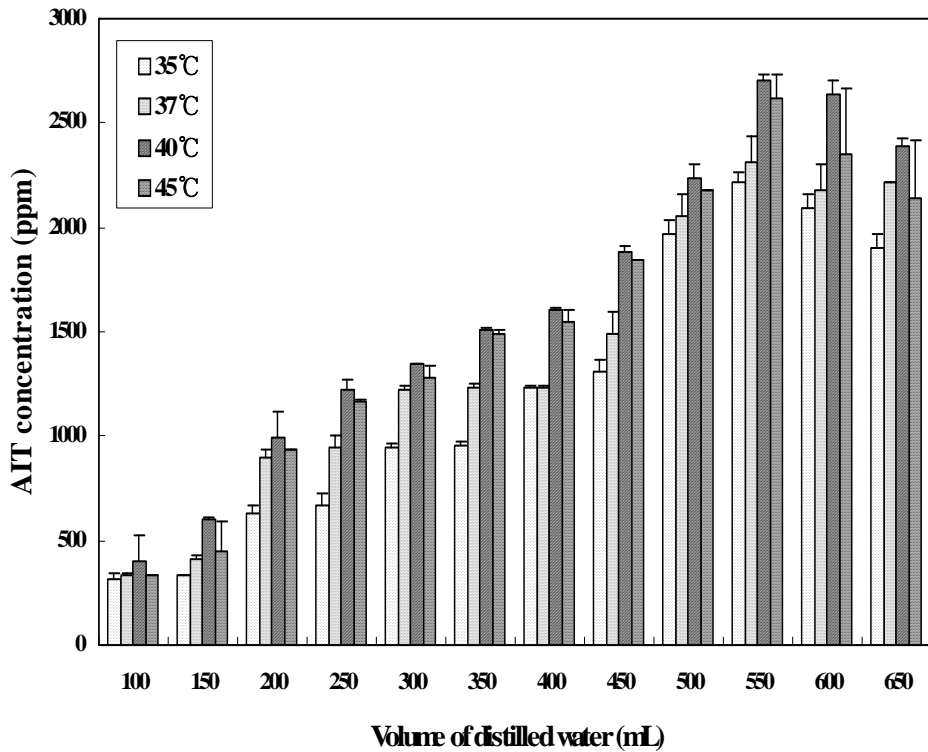


Fig. 9. Optimum mix ratio of horseradish root powder and distilled water, and optimum temperature of enzyme reaction.

Horseradish 뿌리분말 200 g과 증류수 550 mL를 혼합한 후, 40°C에서 효소반응을 시켰을 때, 혼합액의 AIT 농도가 9902.67 ± 94.84 ppm ($p < 0.05$).으로 가장 높았다.

증류수를 500mL보다 적게 혼합한 경우는 100°C 이상의 추출단계의 온도에서

분말이 유리용기에 늘어붙는 문제가 발생하여 550 mL가 추출에 가장 적절한 증류수 양이라는 것을 알 수 있었다.

2) ITCs의 최대 생성을 위한 최적 효소반응 온도 및 시간

Horseradish 뿌리분말로부터 항균성분인 ITCs를 최대 생성하기 위해서는 Horseradish에 함유되어 있는 sinigrin이 myrosinase에 의하여 가수분해 되어야 한다. 따라서 본 단계에서는 sinigrin이 myrosinase에 의하여 가수분해 되어 ITCs가 최대 생성되는 온도와 시간을 조사하였으며 그 결과는 Fig. 10과 같다.

1)의 혼합액(참고추냉이 잎/줄기 분말 200g + 증류수 550mL)을 40°C에서 120분간 가수분해하였을 때, ITCs의 농도가 9989.00±6.56 ppm으로 가장 높았다. ITCs는 참고추냉이의 주 항균성분으로 전구체인 allyl glucosinolate(sinigrin)로부터 생성되며(1,5), 참고추냉이의 세포가 파괴되었을 때, myrosinase(thioglucoside gluco- hydrolase)에 의하여 allyl glucosinolate(sinigrin)가 분해되고, AIT가 생성된다(6,7). Glucosinolate로 알려진 sinigrin (1-thio-β-D- glucopyranose-1-N-(sulfoxy)-3-buteneimide)는 특히 고추냉이에 풍부하며(8,9), myrosinase의 최적반응온도 및 시간은 37°C, 60분으로 알려져 있다(10). 그러나 본 연구에서 myrosinase의 최적반응온도 및 시간은 40°C, 120분이었는데, 이는 중심온도가 37°C로 되기 위해서는 표면온도가 40°C를 유지하여야 하며, 또한 중심온도가 37°C에 도달하는 come-up time 때문에 시간이 2배(120분)로 걸리는 것으로 사료된다.

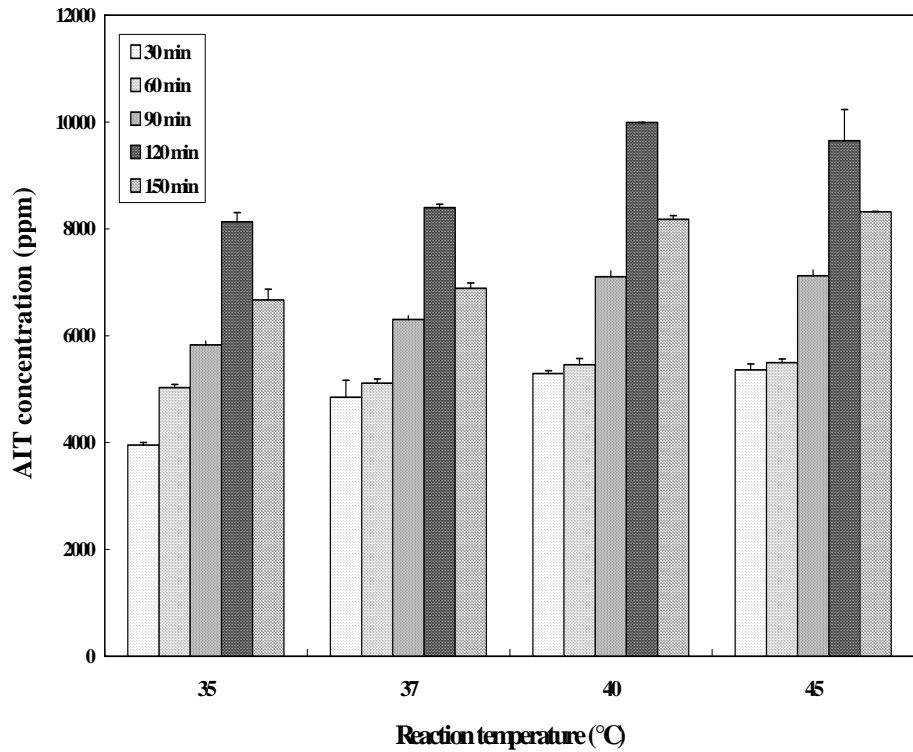


Fig. 10. Optimum reaction temperature and time for extraction of ITCs from horseradish powder.

3) 혼합액으로부터 ITCs의 최대추출을 위한 최적 추출온도 및 시간

효소반응이 끝난 혼합액으로부터 ITCs의 최대추출을 위한 최적 추출온도 및 시간을 Fig. 11에 나타내었다.

효소반응이 끝난 혼합액을 각 온도에서 30, 60, 90, 120, 150, 180분간 추출한 후, 이를 원심분리 하여 하층에 가라앉은 essential oil을 주사기를 사용하여 원심관으로부터 분리하고 그 농도를 측정 한 결과, 120°C에서 120분간 가열하였을 때, AIT의 농도가 $650,670.97 \pm 1,370.26$ ppm ($p < 0.05$)으로 가장 높았다.

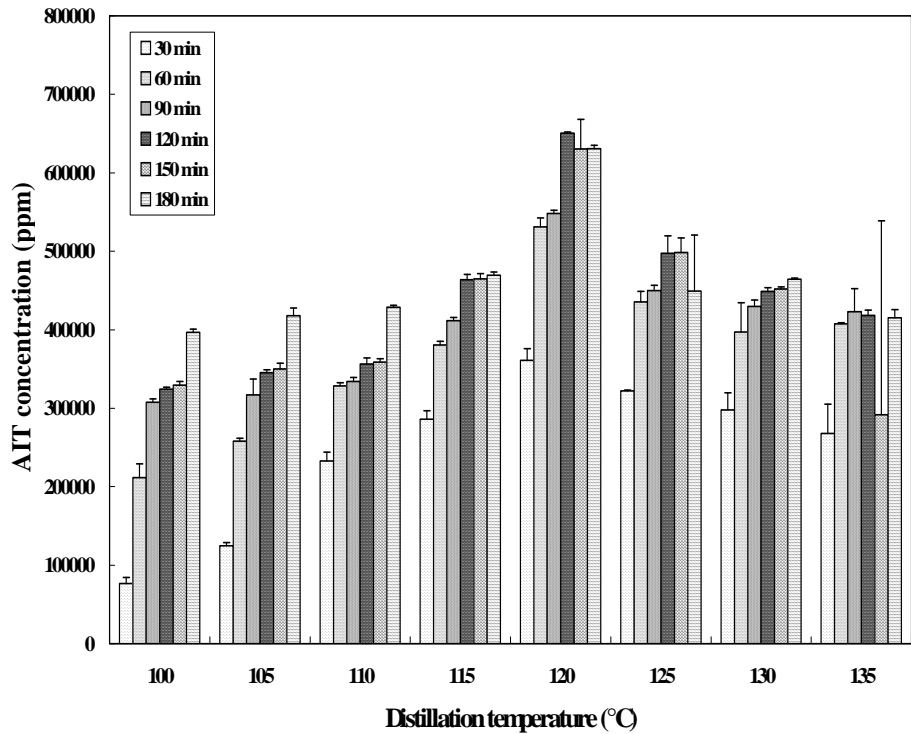


Fig. 11. Optimum distillation temperature and time for extraction of ITCs from horseradish powder.

한편, 온도 및 가열시간에 따라 분리한 essential oil의 용량은 다르게 나타났는데, ITCs의 농도가 가장 높았던 120°C, 120분의 경우, 분리한 essential oil의 용량은 2.0 mL이었다. 여기에 약 650,000 ppm(65%)의 AIT가 함유되어 있으므로, 중량으로 따지면 약 1.3 g의 AIT가 함유되어 있는 것이 된다.

Horseradish 뿌리의 수분함량은 약 64%이므로, 건조분말 200g은 원물 약 556g에 해당되며, 원물에는 약 1.0%의 AIT가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다 (11). 따라서 Horseradish 뿌리 분말 200 g(원물 556 g)에는 5.56 g의 AIT가 함유되어 있는 것이 된다.

본 연구에서는 Horseradish 뿌리 분말 200 g으로부터 1.3g의 AIT를 추출하였으므로 그 수율은 약 23.4%(1.3÷5.56)가 된다. 이렇게 수율이 낮은 이유는 ITCs가 휘발성 성분이기 때문에 반응 및 추출과정 중에 휘발된 양이 많기 때문인 것으로 사료된다.

2. ITCs 대량추출을 위한 Pilot system

Horseradish로부터 고농도, 고수율의 ITCs를 대량을 추출하기 위하여 Fig. 12와 같은 pilot system을 제작하였으며 하였다.



Fig. 12. Pilot system for extraction of high concentration and high yields of ITCs from horseradish.

실험실 규모에서의 추출방법을 기초로 하여, horseradish 뿌리 분말 1,000 g과 증류수 2800 mL를 섞고, 40℃에서 120분간 효소반응시킨 후, 120℃에서 120분간 추출한 추출액을 원심분리하여 essential oil을 분리한 결과, AIT 660,000 ppm의 ITCs 용액 15 mL를 얻을 수 있었다. 이를 중량으로 계산하면 9.9 g의 AIT를 추출한 것이 되며, horseradish 뿌리 분말 1,000 g은 원물 2,780 g이므로 여기에는 27.8g의 AIT가 함유되어 있다 따라서 pilot system으로 추출한 ITC의 수율은 35.6%(9.9÷27.8)로 실험실 규모에서의 결과보다 약 11.2% 높았다.

3. 추출한 ITCs의 항균활성

가. Paper disk methodsp 의한 항균효과

Horseradish 뿌리 분말로부터 추출한 ITCs 용액의 병원성 세균에 대한 항균 효과를 paper disk method로 측정한 결과는 Fig. 13과 같다.

ITC의 항균활성을 측정한 결과로서 ITC는 그람 양성균과 음성균 모두에 대하

여 항균활성이 있었으며, 특히 충치균인 *Streptococcus mutans*와 병원성대장균 O157, 그리고 수산식품에서 문제가 되고 있는 장염비브리오균과 비브리오 패혈증균에 특히 강한 항균활성을 나타내었다.

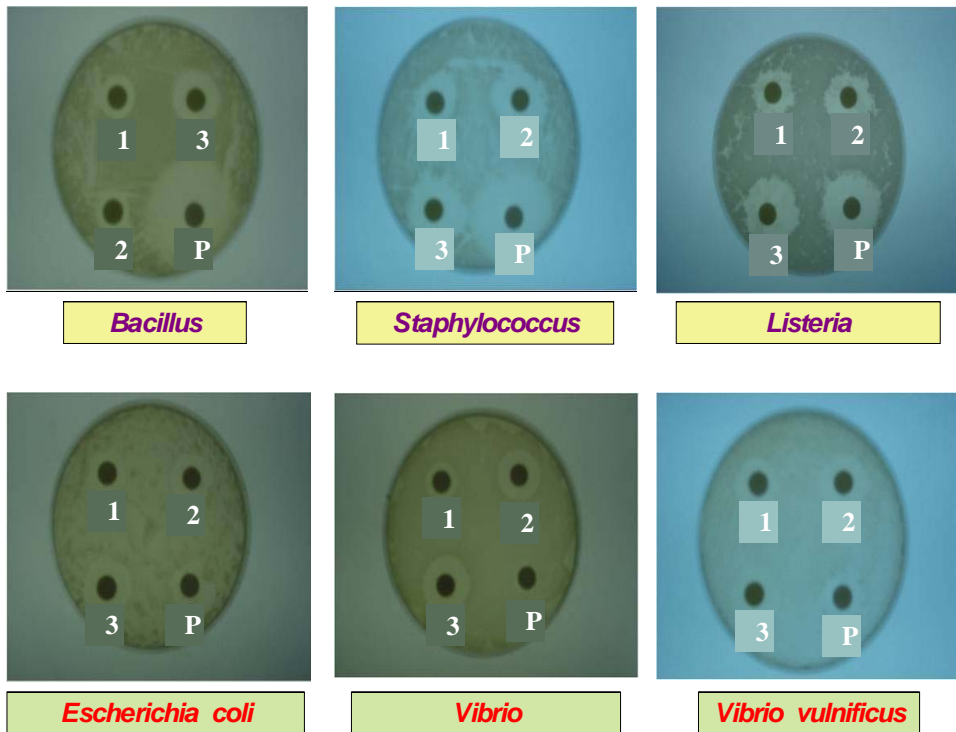


Fig. 13. Anti-bacterial activity of ITCs extracted from horseradish against food-borne bacteria. 1, 200ppm; 2, 400 ppm; 3, 800 ppm; P, Penicillin-Streptomycin.

나. 최소살균농도(MBC)

병원성 및 부패성 미생물에 대한 ITCs 추출물의 최소살균농도를 Table 6에 나타내었다. 식품유래 병원성 및 부패성 세균에 대한 ITCs의 MBC는 125~500 ppm인 것으로 나타났으며, 특히 해양성 병원성 세균인 *V.parahaemolyticus*(125 ppm)와 *V. vulnificus*(125 ppm)에 대한 항균활성이 다른 세균에 비하여 높게 나타났다. 한편 포자를 형성하는 세균인 *Bacillus* sp.에 대한 MBC가 다른 세균에 비하여 2~4배 높게(500 ppm) 나타났다. 부패성 효모인 *Saccharomyces*

*cerevisiae*와 *Saccharomycopsis fibuligera*에 대한 ITCs의 MBC는 각각 250, 500 ppm으로 세균과 비슷한 것으로 나타났다. 부패성 곰팡이에 대한 ITCs의 MBC는 125 ppm으로 *V. parahaemolyticus*(125 ppm)와 *V. vulnificus*(125 ppm)와 더불어 실험 대상 미생물 중 가장 강한 살균효과를 나타내었다.

Table 6. MBC of ITCs extracted from horseradish against food-borne bacteria

Microorganisms	Minimum bactericidal concentration (ppm)
Food-borne bacteria	
<i>Bacillus cereus</i>	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	250
<i>Streptococcus mutans</i>	250
<i>Listeria monocytogenes</i>	250
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	250
<i>Salmonella typhimurium</i>	250
<i>Vibrio vulnificus</i>	125
<i>V. parahaemolyticus</i>	125
Putrefactive bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i>	500
<i>B. cereus</i>	500
<i>B. licheniformis</i>	500
Putrefactive yeasts	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	250
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	500
Putrefactive molds	
<i>Aspergillus niger</i>	125
<i>Penicillium roquefortii</i>	125
<i>Rhizopus stolonifer</i>	125
<i>Mucor plumbeus</i>	125

4. 추출한 ITCs의 식품의 Shelf-life 연장효과

가. 포장두부의 Shelf-life 연장효과

1) 생균수

ITCs 추출액을 포장두부에 주입하고 4℃에 저장하면서 14일간 두부 고형물의 생균수의 변화를 측정된 결과는 Fig. 14와 같다.

두부의 생균수는 저장시간의 경과에 따라 증가하였으며, 대조구의 경우, 저장 8일째에 미생물학적 부패치인 1.0×10^7 CFU/g에 도달하였다. 그러나 25~100 ppm의 ITCs를 첨가한 두부는 12일째에, 200 ppm의 ITCs를 첨가한 두부는 14일째에 미생물학적 부패치에 도달하였으며, 300 ppm의 ITCs를 첨가한 두부는 14일이 지나도 미생물학적으로는 부패현상이 나타나지 않았다.

ITCs 추출액을 포장두부에 주입하고 4℃에 저장하면서 14일간 총진수의 생균수의 변화를 측정된 결과는 Fig. 15와 같다.

대조구의 경우, 저장 6일째에 미생물학적 부패치인 1.0×10^7 CFU/g에 도달하였다. 그러나 25~50 ppm의 ITCs를 첨가한 총진수는 10일째에, 100 ppm의 ITCs를 첨가한 총진수는 12일째에, 200 ppm의 ITCs를 첨가한 총진수는 14일째에 미생물학적 부패치에 도달하였으며, 300 ppm의 ITCs를 첨가한 총진수는 14일이 지나도 미생물학적으로는 부패현상이 나타나지 않았다.

두부의 부패는 일반적으로 냉장저장(5~10℃)하에서 5~8일 만에 부패한다고 알려져 있으며(12), The International Commission on Microbiological Specification for Food에 따르면 미생물학적으로 받아들일 수 있는 생균수는 1.0×10^7 CFU/g로 보고하고 있다(13).

Im *et al.* (14)는 4℃에서 저장 4일 만에 두부의 생균수가 10^7 CFU/g에 도달하였으며, 30 mg%의 basil 추출물 처리로 4일간 shelf-life를 연장하였다고 보고하였다. 본 연구에서 300 ppm의 ITCs 농도로 두부 고형물과 총진수의 세균 증식을 억제할 수 있었으며 4℃에서 두부의 shelf-life를 약 6일간 연장할 수 있었다. 이러한 결과는 horseradish로부터 추출한 ITCs가 두부의 shelf-life 연장을 위한 강력한 천연보존료이며, ITCs 단독 또는 다른 보존기술과 병용하여 사용한다면 여러 가지 식품의 shelf-life를 연장할 수 있는 천연보존료임을 의

미한다.

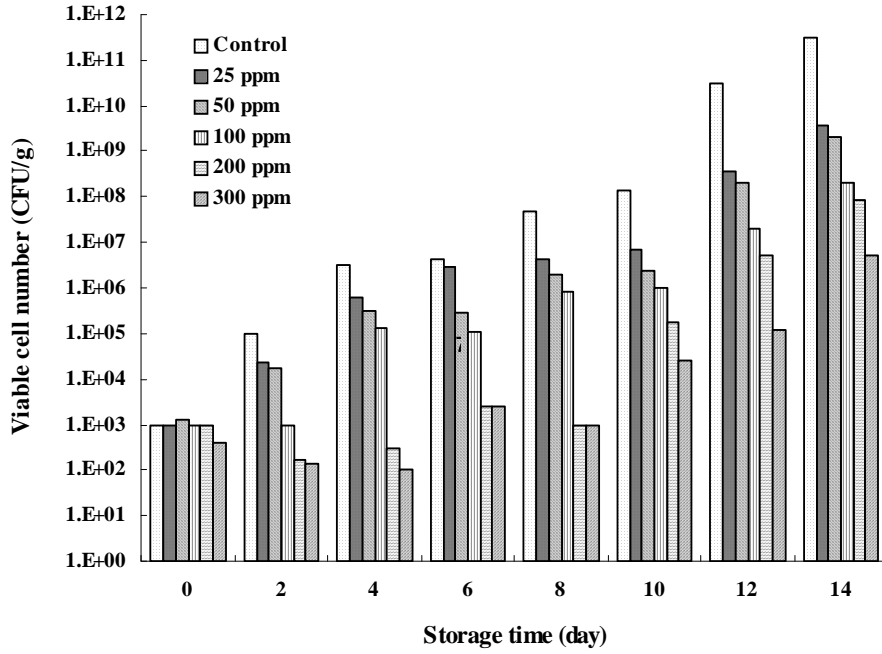


Fig. 14. Changes of viable cell number in packed tofu added with ITCs from horseradish at 4°C

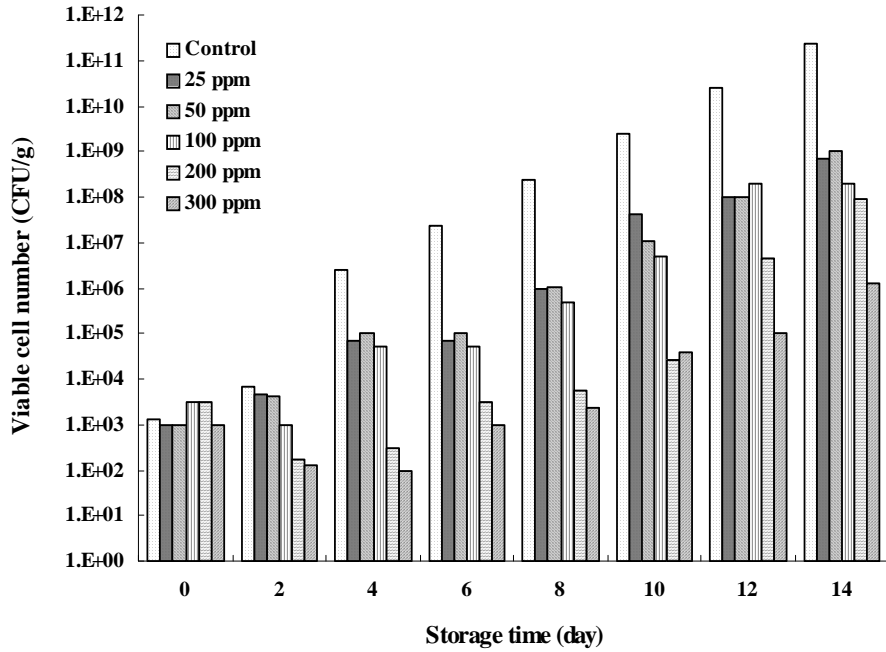


Fig. 15. Changes of viable cell number in filling water of packed tofu added with ITCs from horseradish at 4°C.

2) 화학적 변화

ITCs 추출액을 포장두부에 첨가하고 4°C에 저장하면서 14일간 두부 고형물의 pH 변화를 측정된 결과는 Table 7과 같다.

두부의 최초 pH는 6.1~6.5이었으며, 저장시간이 경과함에 따라 pH는 저하하였다. ITCs를 첨가하지 않은 대조구의 pH는 저장 10일째에 6.0 이하(5.73)로 떨어졌으며, 저장 14일째에는 4.23이었다. 그러나 25~200 ppm의 ITCs를 첨가한 두부의 경우, 저장 14일째에 pH는 5.15~5.29로 대조구보다 높았으며, 특히 300 ppm의 ITCs를 첨가한 두부의 경우 저장 10일째와 14일째에도 pH가 각각 6.64와 6.06으로 초기 pH와 큰 차이가 없었다.

Table 7. Changes of pH in ITCs-treated tofu stored at 4°C^a

Storage time (day)	Concentration of ITCs(ppm)					
	0	25	50	100	200	300
0	6.17±0.02 ^{ab}	6.19±0.01 ^{ab}	6.27±0.11 ^a	6.25±0.05 ^a	6.13±0.01 ^{ab}	6.51±0.05 ^a
2	6.11±0.01 ^{ab}	6.21±0.01 ^a	6.21±0.01 ^a	6.14±0.12 ^{ab}	6.12±0.01 ^{ab}	6.31±0.09 ^a
4	6.11±0.11 ^{ab}	6.17±0.06 ^{ab}	6.17±0.05 ^{ab}	6.24±0.05 ^{ab}	6.04±0.05 ^{abc}	6.29±0.04 ^a
6	6.14±0.08 ^{ab}	6.19±0.15 ^{ab}	6.17±0.06 ^{ab}	6.20±0.10 ^{ab}	6.09±0.01 ^{abc}	6.25±0.04 ^a
8	6.06±0.01 ^{abc}	6.19±0.02 ^{ab}	6.02±0.01 ^{abc}	6.06±0.01 ^{abc}	6.00±0.02 ^{abc}	6.10±0.01 ^{ab}
10	5.73±0.00 ^{bc}	6.09±0.00 ^{abc}	5.85±0.00 ^{bc}	5.99±0.00 ^{bc}	5.99±0.00 ^{bc}	6.64±0.00 ^a
12	4.80±0.00 ^d	5.25±0.00 ^c	5.28±0.00 ^c	5.33±0.00 ^c	5.33±0.00 ^c	6.13±0.01 ^{ab}
14	4.23±0.06 ^d	5.15±0.02 ^c	5.22±0.01 ^c	5.25±0.04 ^c	5.29±0.06 ^c	6.06±0.00 ^{abc}

^a Data were expressed as mean ± SD of three replicates experiments and the same column are not significantly different ($P > 0.05$)

ITCs 추출액을 포장두부에 첨가하고 4°C에 저장하면서 14일간 두부 고형물의 산가의 변화를 측정 한 결과는 Fig. 16과 같다.

두부의 초기 산가는 0.007 mL/g이었으며, 대조구의 경우 저장 6일째에 산가가 급격히 증가하였으며, 저장 12일째에 다시 급격히 증가, 저장 14일째의 산가는 0.25 mL/g이었다. 그러나 ITCs를 첨가한 두부의 산가는 아주 완만하게 증가하였으며, 200 ppm과 300 ppm의 ITCs를 첨가한 두부의 저장 14일째 산가는 각각 0.050 mL/g and 0.047 mL/g으로 거의 변화가 없었다.

이러한 결과는 1,000 ppm의 해조추출물을 첨가하였을 때, 저장 10일째 두부의 pH는 5.2±0.03, 산가는 0.069 mL/g이었다는 Baek *et al* (15)의 보고와 유사하며, 이는 ITCs가 미생물에 의한 두부의 탄수화물, 단백질, 지질 등의 산화를 억제하였기 때문인 것으로 사료된다.

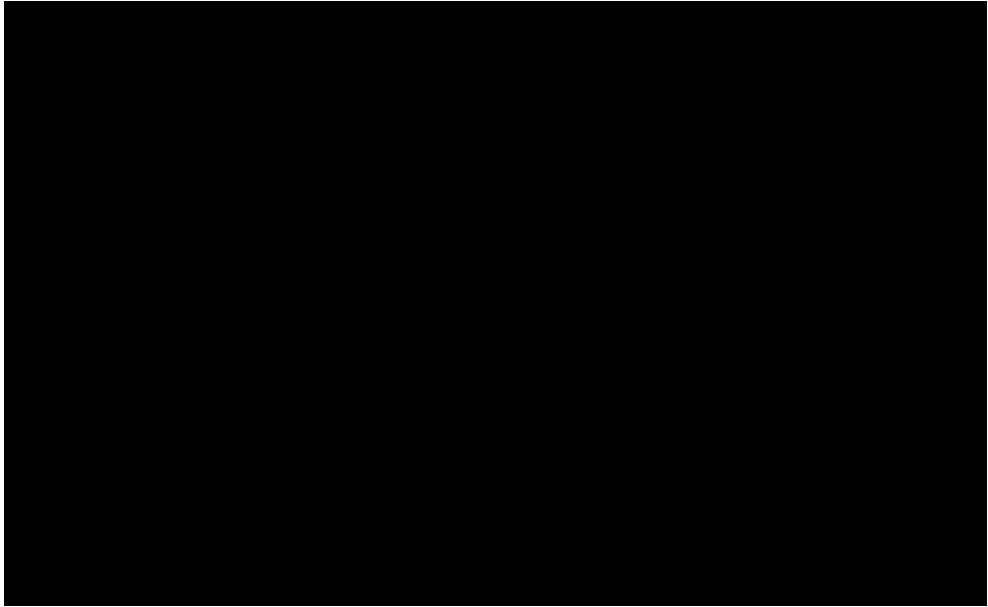


Fig. 16. Changes of total acidity of ITCs-treated tofu stored at 4°C for 14 days.

3) 물리적 변화

가) 충진수의 탁도

ITCs 추출액을 포장두부에 첨가하고 4°C에 저장하면서 14일간 충진수의 탁도 변화를 측정한 결과는 Fig. 17과 같다.

대조구의 경우, 충진수의 초기 탁도(538 nm에서의 흡광도)는 0.050이었으며, 저장 8일째에 급격하게 증가하여 2.245에 달하였으며 그 후 서서히 감소, 저장 14일째에는 1.945이었다. 그러나 200 ppm과 300 ppm의 ITCs 처리구의 경우, 저장 8일째부터 증가하기 시작하였으나, 8일째 탁도가 각각 0.051, 0.022에 불과하였으며, 저장 14일째에도 탁도는 각각 1.523, 1.384로 대조구에 비하여 훨씬 낮게 나타났다. The International Commission on Microbiological Specification for Food (13)에 의하면 받아들일 수 있는 두부 충진수의 최대 탁도는 1.000으로 알려져 있다. 이는 대조구의 경우 약 6일, 200 ppm ITCs 첨가구가 약 10일, 300 ppm ITCs 첨가구가 약 12일의 shelf-life를 가진다는 것을 의미한다.

두부 충진수의 탁도의 증가는 두부에 존재하는 미생물이 증식하면서 생성하는

점질물의 증가에 기인한다. 따라서 본 실험의 결과는 ITCs가 두부에서 점질물을 생성하는 세균의 증식을 억제하여 탁도가 증가하지 않는 것으로 사료된다.

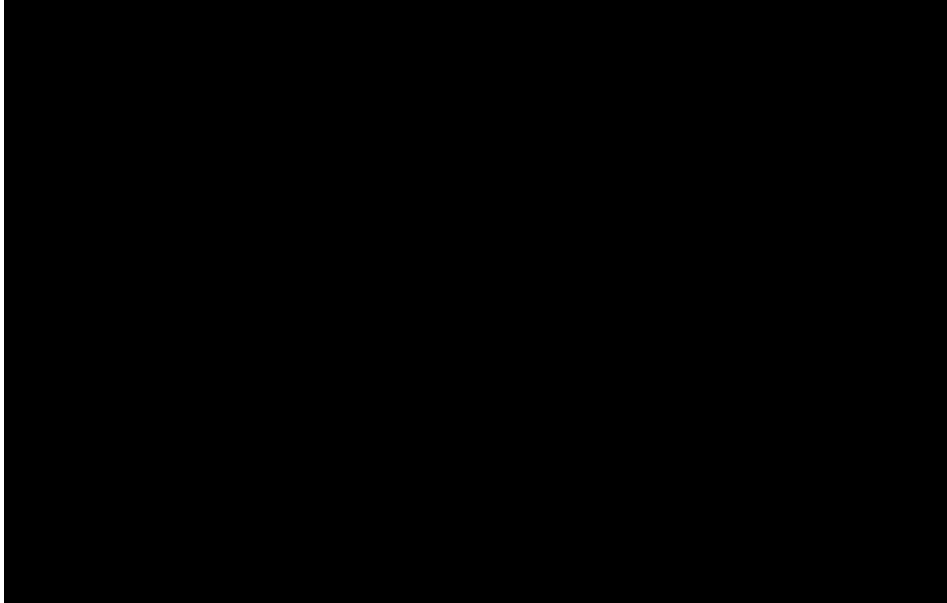


Fig. 17. Changes of turbidity of the ITCs-treated filling water in packed-tofu stored at 4°C for 14 days.

나) 두부의 색도

ITCs를 첨가한 두부고형물의 색도의 변화를 조사한 결과는 Table 8과 같다. 대조구와 25 ppm의 ITCs 첨가구의 lightness는 저장 6일째, 50, 100 ppm ITCs 첨가구는 저장 8일째 어두운 색으로 변화하였으며, 200, 300 ppm 첨가구는 14일째 약간 어두운 색을 띄었다. 'a' value(greenness)의 경우, 대조구, 25, 50, 100 ppm ITCs 첨가구는 저장 10일째 증가하였으나, 200, 300 ppm ITCs 첨가구는 큰 변화($p>0.05$)는 없었다. 'b' value는 모두 시료구에서 큰 변화는 없었다. 양질의 두부는 일반적으로 흰색, 혹은 밝은 황색(light-yellow)을 띄고 있다 (34). 본 연구에서 사용된 모든 두부는 초기단계에서는 밝은 황색(light-yellow)을 띄고 있었다. one-way analysis 값들의 변화는 ITCs가 두부의 색도변화를 억제한다는 것을 의미한다.

Table 8. Effect of ITCs treat on the color of tofu for 14 days at 4°C^a

Hunter's color value	Storage time (day)	Concentration of AIT (ppm)					
		0	25	50	100	200	300
L	0	60.92 ± 5.83 ^a	60.92 ± 5.83 ^a	60.92 ± 5.83 ^a	60.92 ± 5.83 ^a	60.92 ± 5.83 ^a	60.92 ± 5.83 ^a
	2	57.59 ± 1.45 ^{ab}	58.84 ± 0.84 ^{ab}	58.84 ± 0.84 ^{ab}	60.92 ± 5.83 ^a	60.92 ± 5.83 ^a	60.92 ± 5.83 ^a
	4	56.14 ± 0.01 ^{ab}	57.47 ± 0.81 ^{ab}	56.81 ± 1.65 ^{ab}	58.84 ± 0.84 ^{ab}	59.58 ± 1.57 ^a	60.92 ± 5.83 ^a
	6	54.73 ± 0.70 ^b	54.93 ± 1.86 ^b	55.68 ± 1.43 ^{ab}	56.59 ± 5.67 ^{ab}	58.22 ± 0.95 ^{ab}	60.96 ± 1.43 ^a
	8	53.72 ± 0.03 ^b	53.76 ± 0.54 ^b	54.46 ± 0.38 ^b	55.81 ± 0.81 ^{ab}	58.02 ± 0.41 ^{ab}	60.92 ± 5.83 ^a
	10	52.30 ± 0.46 ^b	52.60 ± 0.54 ^b	52.93 ± 0.74 ^b	54.34 ± 0.34 ^b	56.33 ± 2.78 ^{ab}	58.84 ± 0.84 ^{ab}
	12	48.51 ± 1.89 ^{bc}	49.07 ± 2.04 ^{bc}	50.36 ± 1.84 ^{bc}	52.11 ± 0.77 ^b	54.03 ± 1.98 ^{ab}	56.59 ± 5.67 ^{ab}
	14	46.56 ± 0.48 ^{bc}	47.93 ± 0.42 ^{bc}	48.69 ± 0.16 ^{bc}	50.22 ± 0.55 ^{bc}	54.08 ± 2.22 ^b	55.81 ± 0.81 ^b
a	0	-1.810 ± 0.393 ^a	-1.810 ± 0.393 ^a	-1.810 ± 0.393 ^a	-1.810 ± 0.393 ^a	-1.810 ± 0.393 ^a	-1.810 ± 0.393 ^a
	2	-1.783 ± 0.098 ^a	-1.807 ± 0.035 ^a	-1.820 ± 0.098 ^a	-1.820 ± 0.098 ^a	-1.877 ± 0.091 ^a	-1.750 ± 0.020 ^a
	4	-1.700 ± 0.046 ^a	-1.793 ± 0.111 ^a	-1.750 ± 0.079 ^a	-1.737 ± 0.040 ^a	-1.813 ± 0.110 ^a	-1.817 ± 0.064 ^a
	6	-1.650 ± 0.017 ^{ab}	-1.667 ± 0.015 ^{ab}	-1.700 ± 0.243 ^a	-1.747 ± 0.006 ^a	-1.787 ± 0.006 ^a	-1.867 ± 0.029 ^a
	8	-1.610 ± 0.000 ^{ab}	-1.650 ± 0.017 ^{ab}	-1.667 ± 0.015 ^{ab}	-1.700 ± 0.243 ^a	-1.747 ± 0.006 ^a	-1.777 ± 0.023 ^a
	10	-1.567 ± 0.025 ^b	-1.610 ± 0.000 ^{ab}	-1.650 ± 0.017 ^{ab}	-1.667 ± 0.015 ^{ab}	-1.700 ± 0.243 ^a	-1.743 ± 0.006 ^a
	12	-1.443 ± 0.021 ^b	-1.567 ± 0.025 ^b	-1.610 ± 0.000 ^{ab}	-1.650 ± 0.017 ^{ab}	-1.700 ± 0.243 ^a	-1.657 ± 0.035 ^{ab}
	14	-1.377 ± 0.012 ^{bc}	-1.443 ± 0.021 ^b	-1.567 ± 0.025 ^b	-1.613 ± 0.006 ^{ab}	-1.700 ± 0.104 ^a	-1.613 ± 0.006 ^{ab}
b	0	8.350 ± 0.095 ^a	8.190 ± 0.078 ^a	7.960 ± 0.305 ^a	8.013 ± 0.153 ^a	8.167 ± 0.085 ^a	8.227 ± 0.142 ^a
	2	7.753 ± 0.208 ^{ab}	7.963 ± 0.210 ^a	8.010 ± 0.151 ^a	7.627 ± 0.226 ^{ab}	8.117 ± 0.246 ^a	8.270 ± 0.433 ^a
	4	8.113 ± 0.170 ^a	7.757 ± 0.646 ^{ab}	8.293 ± 0.179 ^a	7.863 ± 0.405 ^{ab}	7.897 ± 0.206 ^{ab}	7.810 ± 0.061 ^{ab}
	6	7.590 ± 0.173 ^{ab}	7.550 ± 0.066 ^{ab}	7.720 ± 0.214 ^{ab}	8.030 ± 0.417 ^a	7.417 ± 0.255 ^{ab}	7.973 ± 0.067 ^{ab}
	8	7.590 ± 0.173 ^{ab}	7.550 ± 0.066 ^{ab}	7.720 ± 0.214 ^{ab}	8.030 ± 0.417 ^a	7.417 ± 0.255 ^{ab}	7.973 ± 0.067 ^{ab}
	10	7.273 ± 0.189 ^{abc}	7.320 ± 0.072 ^{ab}	7.480 ± 0.217 ^{ab}	7.740 ± 0.095 ^{ab}	7.620 ± 0.069 ^{ab}	7.693 ± 0.251 ^{ab}
	12	8.113 ± 0.170 ^a	7.757 ± 0.646 ^{ab}	8.293 ± 0.179 ^a	7.863 ± 0.405 ^{ab}	7.897 ± 0.206 ^{ab}	7.810 ± 0.061 ^{ab}
	14	8.083 ± 0.095 ^a	7.773 ± 0.437 ^{ab}	8.430 ± 0.16 ^a	7.610 ± 0.249 ^{ab}	8.393 ± 0.232 ^a	8.573 ± 0.515 ^a

^A Data were expressed as mean ± SD of three replicates experiments, and the same column are not significantly different ($P > 0.05$)

다) 관능검사

ITCs를 첨가한 시료 두부의 색깔, 맛, 냄새, 식감 등의 항목을 5점 시스템으로

평가한 결과를 Table 9에 나타내었다.

ITCs 무첨가구 두부(대조구)의 점수는 저장 6일째까지는 ITCs 첨가 두부보다 점수가 높았다. 그 이유는 첨가한 ITCs 특유의 자극성 냄새 때문이었다. 그러나 저장기간이 지남에 따라 점수는 서서히 낮아졌으며, 300 ppm의 ITCs를 첨가한 두부가 저장 12일째 4점 이하로 떨어진데 반하여 ITCs 무첨가구 두부(대조구)는 저장 8일째에 4점 이하로 떨어졌다.

생균수, 화학적 평가, 물리적 평가, 관능적 평가 결과를 종합하면, 200 ppm과 300 ppm의 ITCs를 첨가한 두부의 shelf-life가 각각 최소 4일, 6일 연장됨을 알 수 있었다.

Table 9. Effect of ITCs on sensory characteristics of tofu stored for 14 days at 4°C^a

Items	day	Concentration of AIT (ppm)					
		Con	25	50	100	200	300
Color	0	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a
	2	5.0±0.0 ^a	4.9±0.3 ^a	4.9±0.3 ^a	4.8±0.6 ^{ab}	4.9±0.3 ^a	4.7±0.9 ^a
	4	4.9±0.3 ^a	4.8±0.4 ^{ab}	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a
	6	4.9±0.3 ^a	4.9±0.3 ^a	5.0±0.2 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.2 ^a	5.0±0.0 ^a
	8	4.7±0.5 ^a	4.7±0.5 ^{ab}	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.2 ^a	5.0±0.0 ^a
	10	4.6±0.7 ^a	4.7±0.7 ^{ab}	4.8±0.5 ^a	5.0±0.0 ^a	4.9±0.2^a	5.0±0.0 ^a
	12	3.9±1.1 ^b	4.3±0.7 ^{bc}	4.4±1.1 ^{ab}	4.6±0.8 ^{ab}	4.2±1.1 ^b	5.0±0.2^a
	14	3.3±1.1 ^c	4.0±0.9 ^c	4.1±1.3 ^b	4.5±0.8 ^b	4.2±1.0 ^b	3.8±1.2 ^b
Taste	0	5.0±0.0 ^a	4.9±0.3 ^a	4.6±0.4 ^a	4.6±0.5 ^a	4.0±0.5 ^a	3.8±1.2 ^a
	2	4.9±0.3 ^a	4.3±0.5 ^b	4.8±1.2 ^a	4.0±0.4 ^a	3.8±0.4 ^a	3.4±1.0 ^{abc}
	4	4.2±0.4 ^b	3.9±0.6 ^c	5.0±1.6 ^a	4.0±0.7 ^a	3.5±0.5 ^{ab}	3.0±1.0 ^{abc}
	6	4.4±1.0 ^b	4.2±0.5 ^{bc}	4.8±1.2 ^a	3.9±0.7 ^a	3.4±0.7 ^{ab}	3.6±0.9 ^{ab}
	8	1.4±0.5 ^c	3.2±0.4 ^d	4.3±1.6 ^a	3.8±1.0 ^a	4.0±0.8 ^a	3.8±0.9 ^a
	10	1.0±0.0 ^c	1.4±0.5 ^e	2.6±0.6 ^b	2.6±1.1 ^b	3.6±1.2^a	4.1±1.3^a
	12	1.0±0.0 ^c	1.1±0.3 ^{ef}	2.3±0.8 ^{bc}	1.9±1.1 ^{bc}	2.9±0.7 ^b	2.6±1.3 ^{bc}
	14	1.0±0.0 ^c	1.0±0.0 ^f	1.4±0.5 ^c	1.6±1.0 ^c	2.0±0.9 ^c	2.4±1.0 ^c
Oder	0	4.8±0.4 ^a	4.3±0.5 ^a	3.9±0.9 ^a	3.8±1.2 ^a	3.4±1.1 ^{bc}	3.1±1.4 ^{bc}
	2	4.8±0.4 ^a	4.4±0.7 ^a	4.2±0.7 ^a	4.1±0.7 ^a	3.4±1.0 ^{bc}	3.7±1.0 ^{ab}
	4	4.7±0.5 ^a	4.1±0.5 ^{ab}	4.1±0.6 ^a	3.9±0.7 ^a	3.3±0.7 ^{bc}	3.5±0.8 ^{ab}
	6	4.5±0.5 ^a	3.7±0.5 ^b	4.2±0.3 ^a	3.6±0.5 ^a	3.4±0.5 ^{bc}	3.5±0.9 ^{ab}
	8	1.6±0.7 ^b	3.1±0.6 ^c	3.8±0.6 ^{ab}	3.6±1.0 ^a	3.9±0.7 ^{ab}	4.3±0.7 ^a
	10	1.4±0.5 ^{bc}	1.9±0.7 ^d	3.1±1.3 ^{bc}	2.0±1.2 ^b	4.2±0.4^a	3.7±1.1^{ab}
	12	1.0±0.0 ^c	1.4±0.5 ^e	2.6±1.2 ^{cd}	1.8±1.0 ^b	2.8±0.9 ^c	3.2±1.0 ^{bc}
	14	1.0±0.0 ^c	1.0±0.0 ^e	2.1±1.0 ^c	1.6±0.8 ^b	2.0±1.1 ^d	2.5±0.9 ^c
Chewiness	0	4.8±0.4 ^{ab}	4.7±0.5 ^a	4.8±0.4 ^a	4.7±0.5 ^a	4.6±0.5 ^a	4.6±0.5 ^a
	2	5.0±0.0 ^a	4.5±0.5 ^a	4.8±0.4 ^a	3.9±0.6 ^{ab}	3.9±0.6 ^b	4.0±0.8 ^{ab}
	4	4.3±0.5 ^{cd}	4.1±0.6 ^{ab}	4.4±0.5 ^{ab}	4.1±0.8 ^a	3.8±0.6 ^b	3.8±1.0 ^{ab}
	6	4.4±0.5 ^{bc}	4.1±0.4 ^{ab}	4.3±0.4 ^{ab}	4.1±0.8 ^a	3.7±0.7 ^{bc}	3.4±0.8 ^b
	8	3.9±0.3 ^d	3.5±0.5 ^b	3.9±0.6 ^{bc}	3.9±0.6 ^{ab}	4.0±0.5 ^{ab}	4.0±0.6 ^{ab}
	10	1.9±1.0 ^e	2.4±1.3 ^c	3.4±1.1 ^c	3.3±1.1 ^b	4.2±0.7^{ab}	3.7±1.4 ^{ab}
	12	1.1±0.3 ^f	2.0±0.8 ^{cd}	2.6±1.0 ^d	2.2±1.0 ^c	3.1±1.0 ^c	3.9±0.9^{ab}
	14	1.0±0.0 ^f	1.7±0.9 ^d	2.3±0.9 ^d	1.9±0.9 ^c	3.1±0.7 ^c	3.1±1.2 ^b
Overall acceptability	0	4.8±0.4 ^a	4.6±0.4 ^a	4.4±0.6 ^a	4.4±0.7 ^a	4.1±0.7 ^a	4.3±0.8 ^a
	2	4.7±0.5 ^a	4.5±0.4 ^a	4.3±0.3 ^a	4.0±0.6 ^a	3.9±0.6 ^a	4.1±0.7 ^a
	4	4.3±0.5 ^{ab}	4.1±0.3 ^a	4.3±0.4 ^a	4.1±0.7 ^a	3.8±0.5 ^a	4.1±0.8 ^a
	6	4.1±0.3 ^b	4.2±0.5 ^a	3.2±0.3 ^b	3.8±0.6 ^a	3.8±0.7 ^a	4.9±0.7 ^a
	8	1.4±1.3 ^d	3.4±0.5 ^b	3.0±0.4 ^b	4.1±0.5 ^a	4.3±0.8 ^a	4.3±0.7 ^a
	10	1.0±0.8 ^d	2.4±0.8 ^c	3.6±0.6 ^b	2.7±1.2 ^b	4.0±0.9^a	4.5±1.4^a
	12	1.2±0.4 ^d	1.9±0.6 ^d	2.9±0.3 ^c	2.2±0.7 ^{bc}	2.9±0.7 ^b	3.8±0.7 ^b
	14	1.0±0.0 ^d	1.2±0.4 ^e	2.4±0.5 ^d	1.7±0.5 ^c	2.2±0.8 ^c	3.3±0.5 ^b

나. 빵의 Shelf-life 연장효과

1) 빵의 shelf-life 연장효과

ITCs 투과성 플라스틱 필름으로서 polyethylene(PE)와 polypropylene(PP)를 사용하여 patch 형태의 천연보존료 시제품을 제작하고 식빵에 대한 항균효과와 저장성 향상효과를 조사하여 Fig. 18과 19에 나타내었다.

PE를 사용한 patch의 경우, 저장 6일째 대조구에서는 곰팡이의 생장이 확인되었으나 ITCs 첨가구에서는 곰팡이가 성장하지 않았으며 저장 10일째까지 곰팡이의 생장이 확인되지 않았다(Fig. 18).

한편 PP를 사용한 patch의 경우, 저장 6일째까지는 PE를 사용한 patch에서와 같은 결과를 나타내었으나 저장 10일째 ITCs 첨가구에서도 곰팡이의 생장이 확인되어 PE patch보다 보존효과가 낮은 것을 알 수 있었다(Fig. 19).

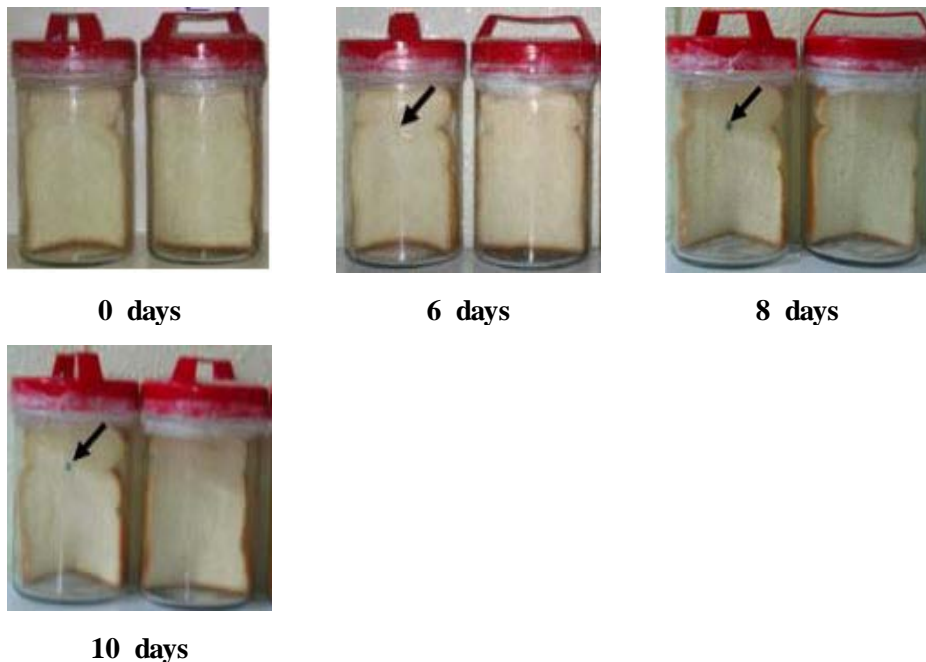


Fig. 18. Effects of PE patch of ITCs extracted from horseradish on shelf-life of bread. Left, no addition of ITCs patch; Right, addition of ITCs patch; ←, mold.

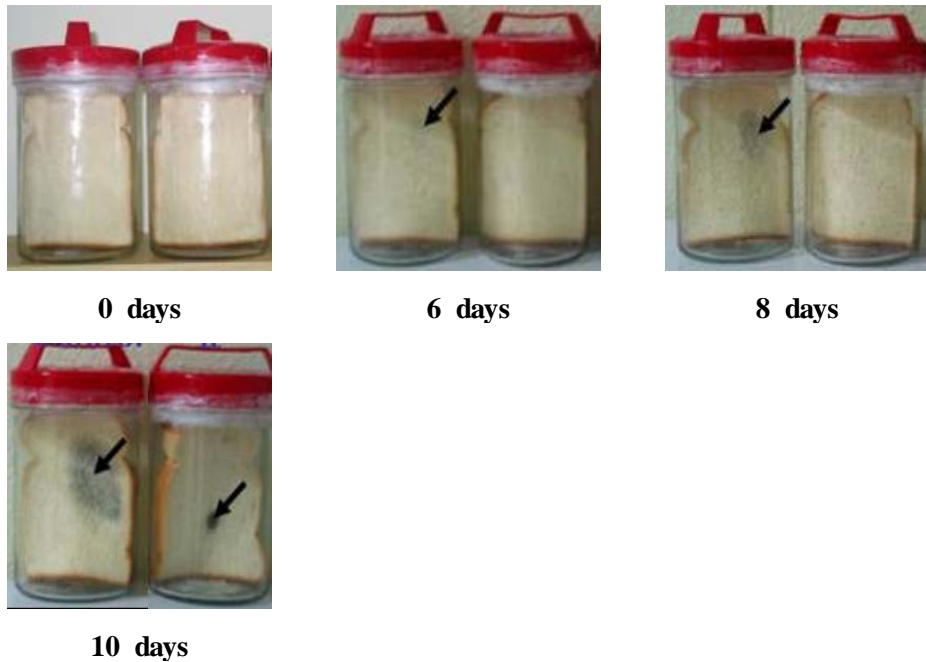


Fig. 19. Effects of PP patch of ITCs extracted from horseradish on shelf-life of bread. Left, no addition of ITCs patch; Right, addition of ITCs patch; ←, mold.

이상의 결과를 요약하면, 참고추냉이 추출물을 천연보존료로 응용하기 위한 patch를 제작할 때, PP film보다는 PE film이 효과적이며, ITCs를 첨가한 PE patch의 경우 식빵에 있어서 약 4일간의 shelf-life 연장효과가 있는 것을 알 수 있었다.

다. 생선 어패류의 Shelf-life 연장효과 측정

1) 미생물학적 평가

포장된 조기, 고등어, 광어회, 연어회에 대한 Horseradish에서 추출한 ITCs 용액을 함유한 PE patch의 항균효과와 저장성 향상효과를 조사한 결과는 Fig. 20, 21, 22, 23과 같다.

조기의 경우, 무첨가 control은 저장 2일 후에 미생물학적 부패치인 $1.0 \times 10^7/g$ 에 도달하였으나 ITCs 200 ppm 첨가 patch는 3일, 300ppm 첨가 patch는 4일 후에 $1.0 \times 10^7/g$ 에 도달하여 각각 1일, 2일의 저장성 향상효과가 있었다(Fig. 20).

고등어의 경우, 무첨가 control은 저장 4일 후에 미생물학적 부패치인 $1.0 \times 10^7/g$ 을 도달하였으나 ITCs 200 ppm, 300ppm 첨가 patch의 경우 8일이 지나도 $1.0 \times 10^7/g$ 에 도달하지 않았다(Fig. 21).

광어회와 연어회의 경우, 무첨가 control은 저장 4일 후에 미생물학적 부패치인 $1.0 \times 10^7/g$ 을 도달하였으나 ITCs 200 ppm, 300ppm 첨가 patch의 경우 저장 초기에 오히려 균수가 감소하였으며 8일이 지나도 $1.0 \times 10^7/g$ 에 도달하지 않았다(Fig. 22, 23).

이상의 결과를 요약하면, ITCs 함유 patch는 생선어패류에 대하여 살균효과가 있으며 약 2-4일 정도의 유통기한 연장효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 백색 어류보다는 적색어류에 대하여 저장성 향상효과가 높았다.

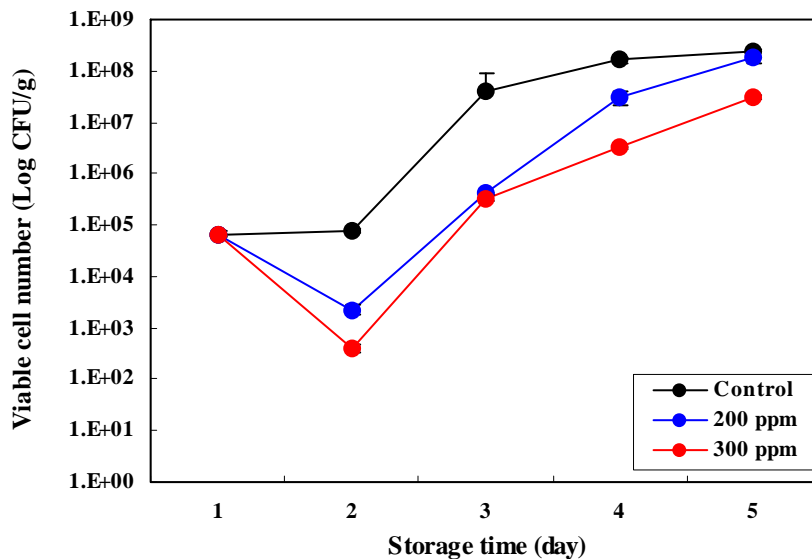


Fig. 20. Effect of ITCs PE patch on microbiological shelf-life of a croaker (white meat fish).

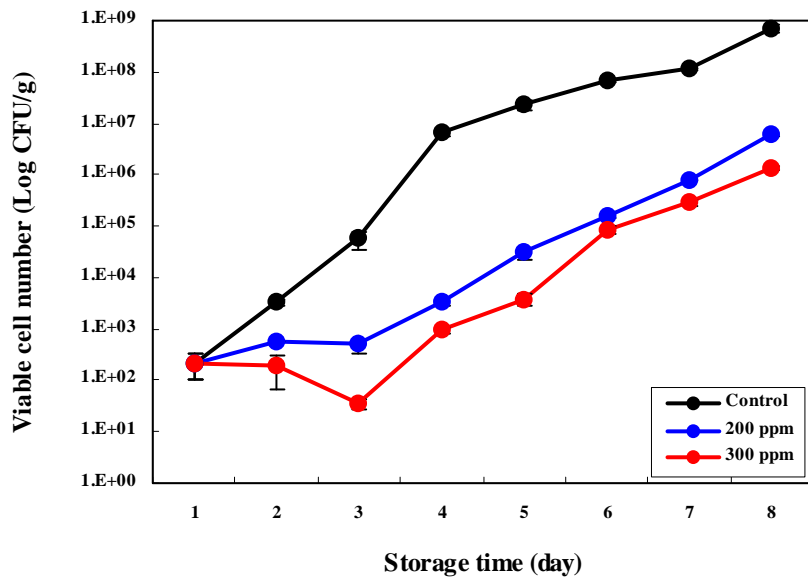


Fig. 21. Effect of ITCs PE patch on microbiological shelf-life of a mackerel (red meat fish).

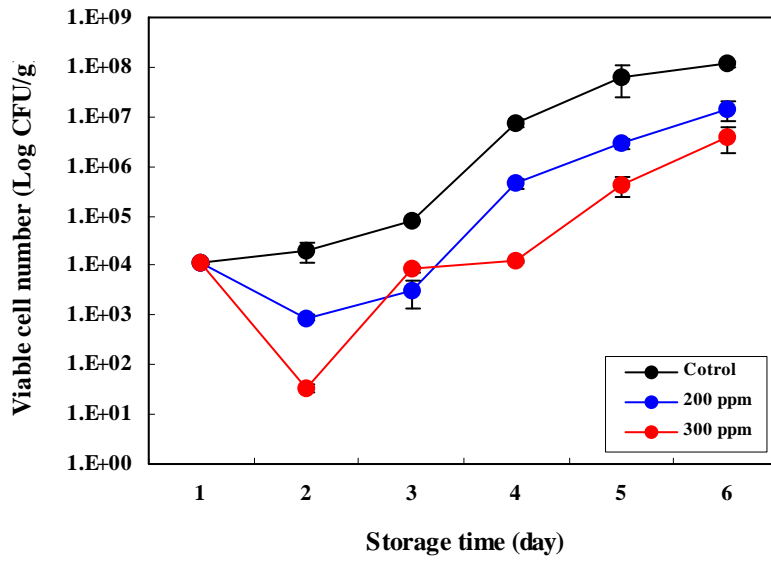


Fig. 22. Effect of ITCs PE patch on microbiological shelf-life of flounder (white meat fish) sashimi.

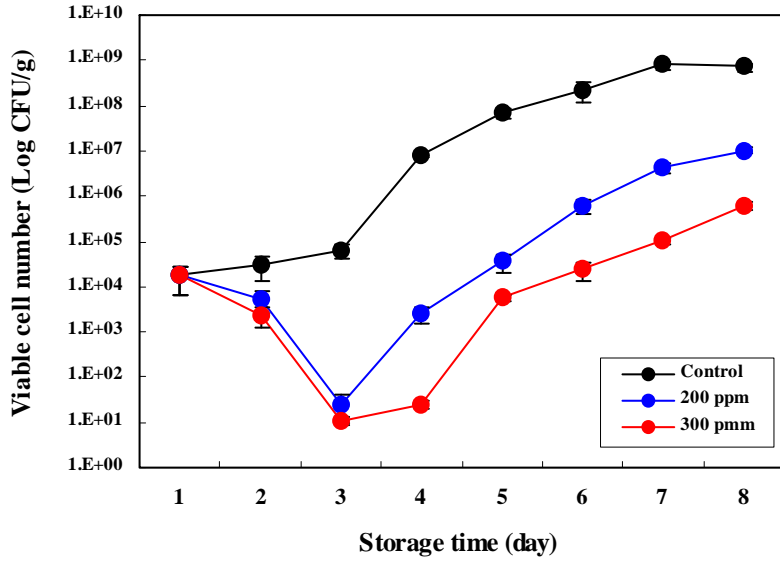


Fig. 23. Effect of ITCs PE patch on microbiological shelf-life of salmon (red meat fish) sashimi.

2) 화학적 평가

ITCs 함유 patch를 부착한 고등어 근육의 Total VBN(T-VBN)과 TBA 값을 control(ITCs 함유 patch 비부착)과 비교한 결과는 Fig 24와 같다. 저장 13일째 까지 ITCs 함유 patch 부착 시료와 ITCs 함유 patch 비부착 시료의 VBN 값은 각각 12.3과 13.7로 유의할 만한 차이는 없었다. 그러나 ITCs 함유 patch 비부착 시료의 경우, 저장 13일째 이후부터 VBN 값이 급격히 증가하여 저장 26일째에 부패초기치(30 mg/100 g)에 도달하였다. 한편 ITCs 함유 patch 부착 시료는 저장 30일이 지나도 휘발성염기질소량이 16 mg/100 g에 지나지 않았다. 이러한 결과는 ITCs가 저장 중 고등어육에서 휘발성염기질소의 생성을 억제하는 것으로 추측할 수 있는데, 휘발성염기질소는 주로 세균에 의해 어류의 근육이 분해되면서 생성된다(16). 따라서 ITCs 함유 patch 부착 실험구의 휘발성염기질소량이 낮은 것은 ITCs에 의하여 세균의 증식이 억제되었기 때문으로 사료된다. TBA 값의 경우도, 저장 13일 이후부터는 ITCs 함유 patch 비부착 실험구의 TBA 값이 급격하게 증가하여 저장 30일째에는 TBA 값이 8.1 mgMA/Kg에 달한 반면, ITCs 함유 patch 부착 실험구는 6.4 mgMA/Kg이었다. 이러한 결과는 ITCs가 고등어 근육의 지질산화를 억제하였다는 것을 의미하며, 이는 오존이나 다른 강력한 산화작용을 가진 살균제가 turbot 근육에서 TBA 반응 물질의 생성을 억제하였다는 보고(17)와 일치한다. 이는 살균작용을 가진 ITCs가 미생물에 의한 지질의 산화, 혹은 미생물에 의한 TBA 반응 화합물의 생성을 억제하기 때문인 것으로 추측된다. ITCs 함유 patch 부착 실험구와 ITCs 함유 patch 비부착 실험구의 pH 변화를 비교한 결과는 Fig 25와 같다. ITCs 함유 patch 비부착 실험구의 경우, 저장 초기의 pH 6.15에서 저장 30일째의 pH가 7.33으로 높아졌는데, 이는 어류 근육에 존재하는 alkalizing bacteria의 작용에 의한 ammonia, trimethylamine 등과 같은 알칼리 화합물의 축적에 의한 것으로 사료된다(18,19). ITCs 함유 patch 부착 실험구 역시 pH가 높아졌지만 저장 30일째의 pH가 6.65로 ITCs 함유 patch 비부착 실험구보다는 낮게 나타났다. 이는 ITCs의 살균활성(Fig. 19)과 VBN의 생성을 억제하는 활성에 의하여 알칼리화합물이 덜 축적된 것으로 사료된다(Fig. 22).

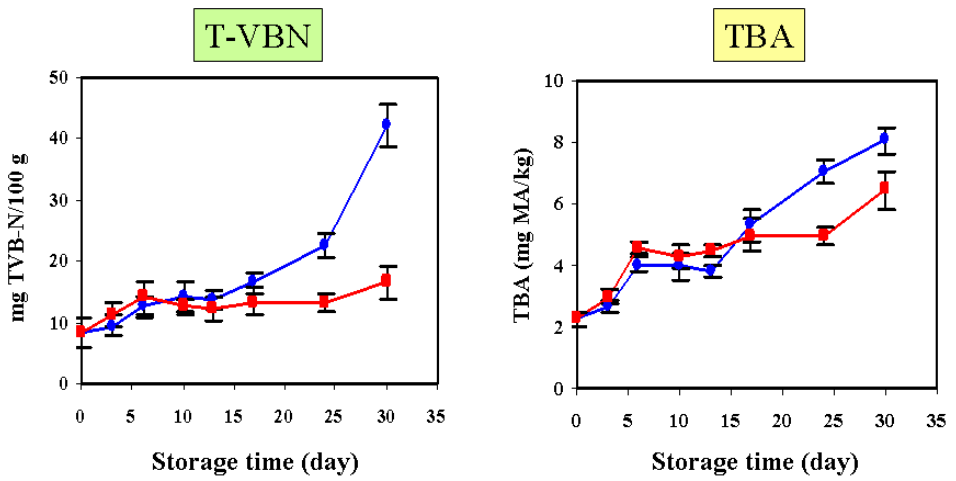


Fig. 24. Changes in the T-VBN content and TBA values of mackerel flesh during storage in either control (•) or sample added ITCs patch (■). Values are mean \pm SD, n=6.

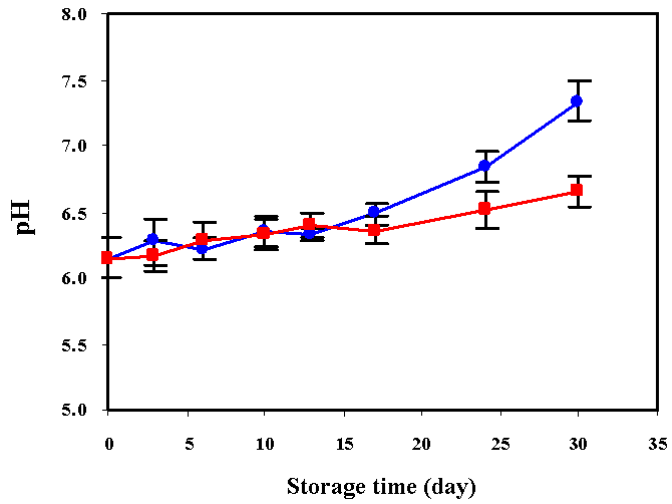


Fig. 25. Changes in pH values of mackerel flesh during refrigerated storage in either control (•) or sample added ITCs patch (■). Values are mean \pm SD, n=6.

3) 관능 평가

ITCs 함유 patch를 부착한 고등어를 4°C에 Modified Tasmanian Food Research Unit Scheme(Table 5)에 의하여 관능검사를 실시한 결과는 Fig 26과 같다. 이 관능검사에서 sensory score의 범위는 0(best)에서 22(poorest)이며 score 10이 panelist가 받아들일 수 있는 한계점수이다. 두 실험구 모두 저장시간이 경과함에 따라 sensory score도 증가하였다. 그러나 ITCs 함유 patch 비부착 실험구의 경우, 저장 10일째의 score가 9.4, 저장 13일째의 score가 12.0으로, shelf-life는 10-13일(T-VBN, TBA value, pH의 변화는 없었지만)로 사료된다. 이에 비하여 ITCs 함유 patch 부착 실험구의 경우, 저장 13일째, 8.6, 저장 17일째, 11.2로 shelf-life가 ITCs 함유 patch 비부착 실험구에 비하여 4~5일 긴 것으로 나타났다.

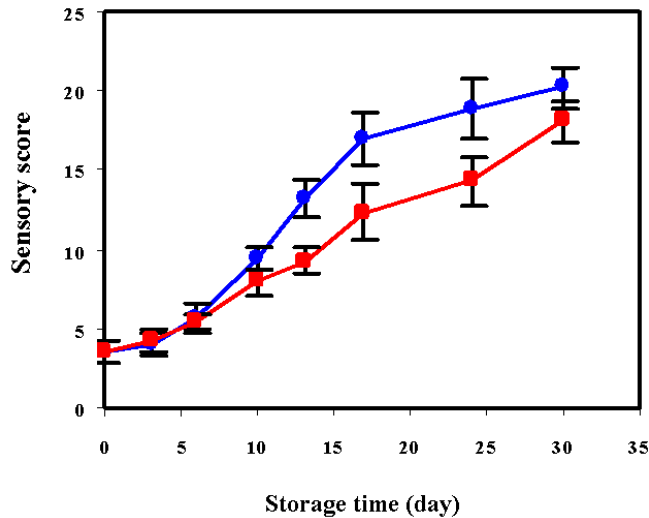


Fig. 26. Changes in sensory score of Pacific saury flesh during refrigerated storage in either control (●) or sample added ITCs patch (■). Values are mean \pm SD, n=6

5. 추출한 Isothiocyanates를 첨가한 항균비누의 살균효과

가. ITCs 함유 캡슐의 항균효과

Horseradish로부터 추출한 ITCs 용액을 캡슐화하여 agar well method로 그 항균효과를 측정하였으며 그 결과는 Fig 27과 같다.

ITCs 함유 캡슐은 positive control(ITCs 원액)보다는 항균효과가 낮게 나타났으나, 비브리오 패혈증균(*V. vulnificus*)과 병원성 대장균 O157(*E. coli* O157:H7)에 항균효과가 있었으며, 병원성 대장균 O157(*E. coli* O157:H7, clear zone, 1.5 cm)보다 비브리오 패혈증균(*V. vulnificus*, clear zone, 2.0 cm)에 대하여 강한 항균효과를 나타내었다.

ITCs 추출물을 캡슐화한 것은 추출물 원액을 비누와 바로 혼합하면 비누가 고추냉이 특유의 코를 쏘는 자극성 냄새를 가지는 단점이 있으며, 또한 ITCs 성분은 휘발성 물질이기 때문에 산소와 접촉하면 쉽게 변성되는 단점이 있어 그 유효기간이 짧아질 수 있다. 따라서 ITCs 성분을 캡슐화하는 것으로 산소와의 접촉을 방지할 수 있으며, 휘발성성분의 증발도 어느 정도 조절이 가능하며 자극성의 냄새도 최소화 할 수 있는 장점이 있다고 할 수 있다.

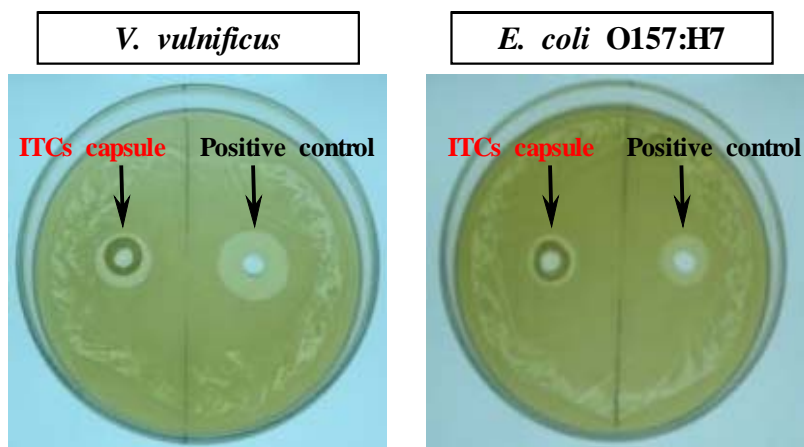


Fig. 27. Anti-bacterial activity of ITCs capsule against *V. vulnificus* and *E. coli* O157:H7.

나. ITCs 함유 캡슐 첨가 항균비누의 손에 대한 살균효과

Horseradishi로부터 추출한 ITCs를 캡슐화하여 시판 중인 gel type의 비누에 5, 7, 10% 첨가한 항균 액체비누 시제품의 병원성대장균 O157과 비브리오 패혈증균에 대한 항균효과를 측정된 결과는 Table 10 및 Fig 28, 29와 같다.

일반비누로 손을 씻은 B 그룹 5명의 손 모두에서 균이 검출되었으나, ITCs 캡슐을 함유한 비누로 손을 세척한 그룹의 경우, 5% 첨가구부터 균의 감소가 나타나기 시작하여 10% 첨가구에서는 1명을 제외한 모두에서 균이 검출되지 않았으며(Table 10), 비브리오 패혈증균에 대한 살균효과(Fig. 28)가 병원성대장균 O157(Fig. 29)보다 약간 강하게 나타났다.

Table 10. Disinfection effects of soap added ITCs capsule on hands

Group	Hand	Not wash		Soap not added ITCs		Soap not added 5% ITCs		Soap not added 7% ITCs		Soap not added 10% ITCs	
		1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
Group A	1	○	○								
	2	○	○								
	3	○	○								
	4	○	○								
	5	○	○								
Group B	1	○	○	○	○						
	2	○	○	○	○						
	3	○	○	○	○						
	4	○	○	○	○						
	5	○	○	○	○						
Group C	1	○	○			○	○				
	2	○	○			×	○				
	3	○	○			○	×				
	4	○	○			×	×				
	5	○	○			○	○				
Group D	1	○	○					○	×		
	2	○	○					×	○		
	3	○	○					○	○		
	4	○	○					×	×		
	5	○	○					×	×		
Group E	1	○	○							○	×
	2	○	○							×	×
	3	○	○							×	×
	4	○	○							×	×
	5	○	○							×	×

○, detection of bacteria; ×, No detection of bacteria

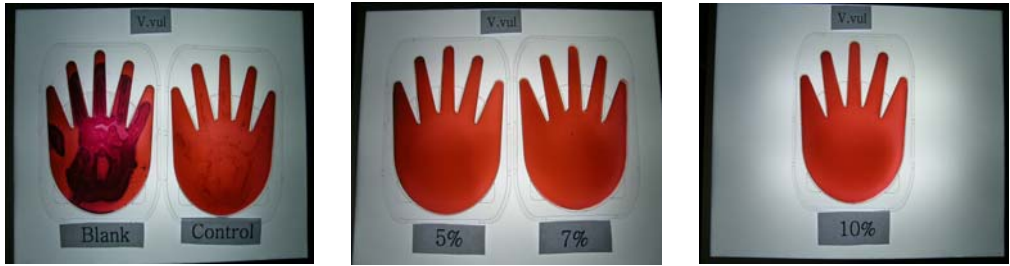


Fig. 28. Disinfection effects of soap added ITCs capsule against *V. vulnificus* contaminated on hands



Fig. 29. Disinfection effects of soap added ITCs capsule against *E. coli* O157:H7 contaminated on hands.

6. 추출한 ITCs의 항염활성 측정

가. ITCs의 여드름균(*Propionibacterium acnes*)에 대한 항균활성

여드름균(*Propionibacterium acnes*)에 대한 ITCs의 항균활성을 paper disk method로서 측정한 결과는 Fig. 30과 같다. 여드름균에 대한 항균활성이 높은 것으로 알려진 0.02 % salicylic acid를 처리한 양성대조구의 clear zone이 3.0 cm이었고, ITCs를 1,000 ppm, 1,500 ppm 및 2,000 ppm을 처리한 실험구의 clear zone이 각각 1.8 cm, 2.0 cm 및 3.4 cm로 강한 항균 활성을 나타내었다.

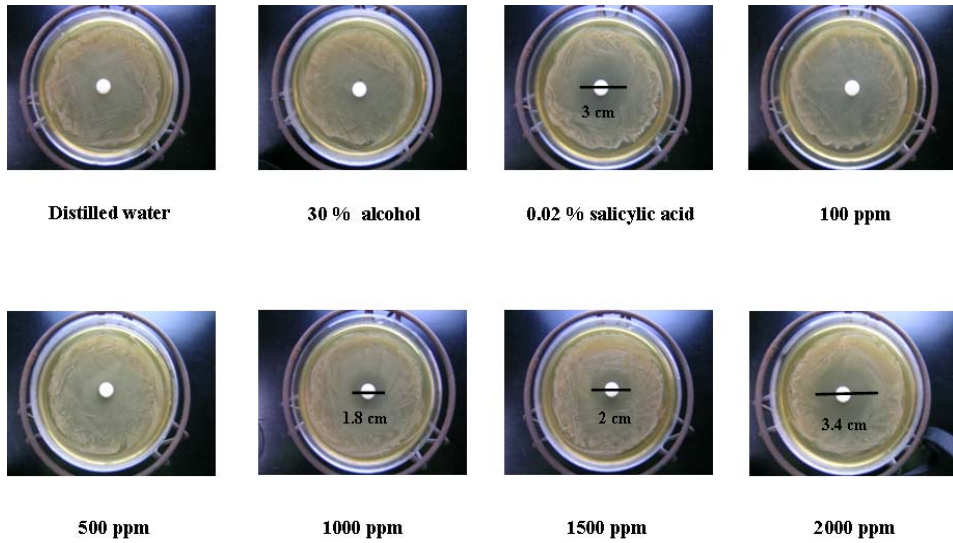


Fig. 30. Antibacterial activity of ITCs against *Propionibacterium acnes*.

나. RAW264.7 세포에 대한 ITCs의 세포 독성

세포에 대한 ITCs의 항염활성을 조사하기 위한 예비단계로 ITCs의 RAW264.7 세포에 대한 독성(IC₅₀)을 측정한 결과는 Fig. 31과 같다.

ITCs의 RAW264.7 세포에 대한 IC₅₀)는 약 6.0 ppm으로 결정되었다.

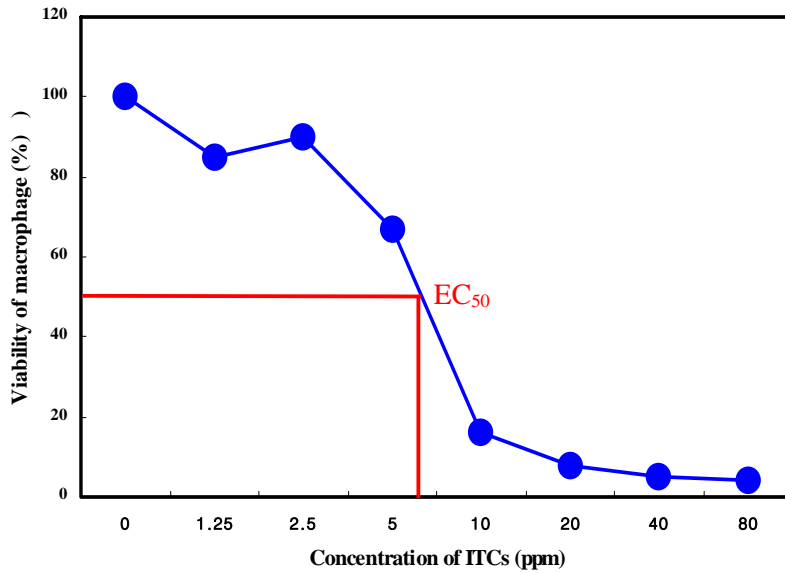


Fig. 31. Effects of ITCs on the viability of murine macrophage cells (RAW264.7).

다. RAW264.7 세포의 PGE₂ 생산에 대한 ITCs의 영향

LPS(*E. coli* lipopolysaccharide, Sigma chemical)로 PGE₂ 생성을 촉진시키고 ITCs와 대조구(용매대조 DMSO와 aspirin)의 처리에 따른 LPS에 의한 PGE₂ 생성의 억제 정도를 관찰한 결과는 Fig. 32와 같다.

세포독성시험에서 IC₅₀ 값이 6.0 ppm이었으므로 본 실험에서의 농도를 10.0, 5.0, 2.5, 1.25 ppm의 4단계 농도로 실험을 하였고, 그 결과를 Fig. 30에 제시하였다. B/B0(%) 값이 클수록 PGE₂ 생성 억제가 크다고 평가할 수 있는데, ITCs 5 ppm에서 92.92, 2.5 ppm에서 96.60%로 IC₅₀ 이하의 농도에서 PGE₂ 생성 억제 효과가 관찰되어 고추냉이 추출물이 in vitro 실험에서 항염활성을 가지는 것을 알 수 있었다.

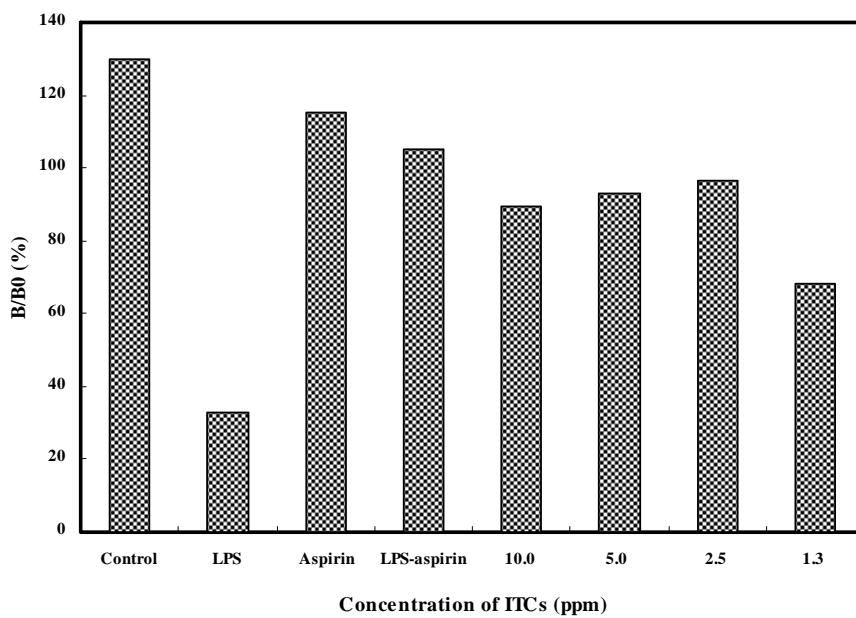


Fig. 32. Effects of ITCs on the PGE₂ production of murine macrophage cells (RAW264.7).

결 론

Horseradish로부터 고농도, 고수율의 향균성분(ITCs)을 추출하기 위한 최적추출조건, 추출한 ITCs의 향균활성, 식품의 shelf-life 연장효과, 손의 소독효과, 항염활성에 대하여 조사하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

ITCs의 농도를 측정하기 위하여 gas chromatography로 주성분인 AIT의 retention time을 측정한 결과, AIT의 retention time은 6.04~6.21 min이었다.

Horseradish 뿌리분말 200 g과 증류수 550 mL를 혼합한 후, 40°C에서 효소반응을 시켰을 때, 혼합액의 AIT 농도가 9902.67 ± 94.84 ppm ($p < 0.05$)으로 가장 높았으며 ITCs 최대생성을 위한 효소가수분해 온도 및 시간은 40°C, 120(9989.00±6.56 ppm)분이었다. 그리고 효소반응이 끝난 혼합액을 120°C에서 120분간 가열한 후, essential oil을 분리하였을 때, AIT의 농도가 $650,670.97 \pm 1,370.26$ ppm ($p < 0.05$)으로 가장 높았다.

ITC의 향균활성은 그람 양성균과 음성균 모두에 대하여 향균활성이 있었으며, 수산식품에서 문제가 되고 있는 장염비브리오균과 비브리오 패혈증균에 특히 강한 향균활성을 나타내었다.

식품유래 병원성 및 부패성 세균에 대한 ITCs의 MBC는 125~500 ppm인 것으로 나타났으며, 특히 해양성 병원성 세균인 *V. parahaemolyticus*(125 ppm)와 *V. vulnificus*(125 ppm)에 대한 향균활성이 다른 세균에 비하여 높게 나타났다. 한편 포자를 형성하는 세균인 *Bacillus* sp.에 대한 MBC가 다른 세균에 비하여 2~4배 높게(500 ppm) 나타났다.

부패성 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Saccharomycopsis fibuligera*에 대한 ITCs의 MBC는 각각 250, 500 ppm으로 세균과 비슷한 것으로 나타났다.

부패성 곰팡이에 대한 ITCs의 MBC는 125 ppm으로 *V. parahaemolyticus*(125 ppm)와 *V. vulnificus*(125 ppm)와 더불어 실험 대상 미생물 중 가장 강한 살균 효과를 나타내었다.

ITCs 추출액을 포장두부에 주입하고 4°C에 저장하면서 14일간 두부 고형물의 생균수의 변화를 측정한 결과, 대조구의 경우, 저장 8일째에 미생물학적 부패치인 1.0×10^7 CFU/g에 도달한 것에 비하여 300 ppm의 ITCs를 첨가한 두부는 14일이 지나도 미생물학적으로는 부패현상이 나타나지 않았다.

ITCs 추출액을 포장두부에 주입하고 4°C에 저장하면서 14일간 총진수의 생균

수의 변화를 측정된 결과, 대조구의 경우, 저장 6일째에 미생물학적 부패치인 1.0×10^7 CFU/g에 도달한 것에 비하여 300 ppm의 ITCs를 첨가한 충전수는 14일이 지나도 미생물학적으로는 부패현상이 나타나지 않아, 4°C에서 두부의 shelf-life를 약 6일간 연장할 수 있었다.

ITCs 추출액을 포장두부에 첨가하고 4°C에 저장하면서 14일간 두부 고형물의 pH 변화를 측정된 결과, ITCs를 첨가하지 않은 대조구의 pH는 저장 10일째에 6.0 이하(5.73)로 떨어졌으며, 저장 14일째에는 4.23이었다. 그러나 300 ppm의 ITCs를 첨가한 두부의 경우 저장 10일째와 14일째에도 pH가 각각 6.64와 6.06으로 초기 pH와 큰 차이가 없었다.

ITCs 추출액을 포장두부에 첨가하고 4°C에 저장하면서 14일간 두부 고형물의 산가의 변화를 측정된 결과, 대조구의 경우 저장 6일째에 산가가 급격히 증가하였으며, 저장 12일째에 다시 급격히 증가, 저장 14일째의 산가는 0.25 mL/g이었다. 그러나 ITCs를 첨가한 두부의 산가는 아주 완만하게 증가하였으며, 200 ppm과 300 ppm의 ITCs를 첨가한 두부의 저장 14일째 산가는 각각 0.050 mL/g and 0.047 mL/g으로 거의 변화가 없었다.

ITCs 추출액을 포장두부에 첨가하고 4°C에 저장하면서 14일간 충전수의 탁도 변화를 측정된 결과, 대조구의 경우, 충전수의 초기 탁도(538 nm에서의 흡광도)는 0.050이었으며, 저장 8일째에 급격하게 증가하여 2.245에 달하였으며 그 후 서서히 감소, 저장 14일째에는 1.945이었다. 그러나 200 ppm과 300 ppm의 ITCs 처리구의 경우, 저장 8일째부터 증가하기 시작하였으나, 8일째 탁도가 각각 0.051, 0.022에 불과하였으며, 저장 14일째에도 탁도는 각각 1.523, 1.384로 대조구에 비하여 훨씬 낮게 나타났다.

ITCs를 첨가한 두부고형물의 색도의 변화를 조사한 결과, 대조구와 25 ppm의 ITCs 첨가구의 lightness는 저장 6일째, 50, 100 ppm ITCs 첨가구는 저장 8일째 어두운 색으로 변하였으며, 200, 300 ppm 첨가구는 14일째 약간 어두운 색을 띠었다. 'a' value(greenness)의 경우, 대조구, 25, 50, 100 ppm ITCs 첨가구는 저장 10일째 증가하였으나, 200, 300 ppm ITCs 첨가구는 큰 변화($p > 0.05$)는 없었다. 'b' value는 모두 시료구에서 큰 변화는 없었다. ITCs를 첨가한 시료 두부의 색깔, 맛, 냄새, 식감 등의 항목을 5점 시스템으로 평가한 결과, 300 ppm의 ITCs를 첨가한 두부가 저장 12일째 4점 이하로 떨어지는데 반하여 ITCs 무첨가구 두부(대조구)는 저장 8일째에 4점 이하로 떨어졌다. 생균수, 화학적

평가, 물리적 평가, 관능적 평가 결과를 종합하면, 200 ppm과 300 ppm의 ITCs 를 첨가한 두부의 shelf-life가 각각 최소 4일, 6일 연장됨을 알 수 있었다.

ITCs 투과성 플라스틱 필름으로서 polyethylene(PE)와 polypropylene(PP)를 사용하여 patch 형태의 천연보존료 시제품을 제작하고 식빵에 대한 항균효과와 저장성 향상효과를 조사한 결과, PE를 사용한 patch의 경우, 저장 6일째 대조구에서는 곰팡이의 생장이 확인되었으나 ITCs 첨가구에서는 곰팡이가 생장하지 않았으며 저장 10일째까지 곰팡이의 생장이 확인되지 않았다. 한편 PP를 사용한 patch의 경우, 저장 6일째까지는 PE를 사용한 patch에서와 같은 결과를 나타내었으나 저장 10일째 ITCs 첨가구에서도 곰팡이의 생장이 확인되어 PE patch보다 보존효과가 낮은 것을 알 수 있었다.

포장된 조기, 고등어, 광어회, 연어회에 대한 Horseradish에서 추출한 ITCs 용액을 함유한 PE patch의 항균효과와 저장성 향상효과를 조사한 결과, 조기의 경우, 무첨가 control은 저장 2일 후에 미생물학적 부패치인 $1.0 \times 10^7/\text{g}$ 에 도달하였으나 ITCs 200 ppm 첨가 patch는 3일, 300ppm 첨가 patch는 4일 후에 $1.0 \times 10^7/\text{g}$ 에 도달하여 각각 1일, 2일의 저장성 향상효과가 있었다. 고등어의 경우, 무첨가 control은 저장 4일 후에 미생물학적 부패치인 $1.0 \times 10^7/\text{g}$ 을 도달하였으나 ITCs 200 ppm, 300ppm 첨가 patch의 경우 8일이 지나도 $1.0 \times 10^7/\text{g}$ 에 도달하지 않았다. 광어회와 연어회의 경우, 무첨가 control은 저장 4일 후에 미생물학적 부패치인 $1.0 \times 10^7/\text{g}$ 을 도달하였으나 ITCs 200 ppm, 300ppm 첨가 patch의 경우 저장 초기에 오히려 균수가 감소하였으며 8일이 지나도 $1.0 \times 10^7/\text{g}$ 에 도달하지 않았다.

ITCs 함유 patch를 부착한 고등어 근육의 Total VBN(T-VBN)과 TBA 값을 control(ITCs 함유 patch 비부착)과 비교한 결과, ITCs 함유 patch 비부착 시료의 경우, 저장 13일째 이후부터 VBN 값이 급격히 증가하여 저장 26일째에 부패초기치(30 mg/100 g)에 도달한 것에 비하여 ITCs 함유 patch 부착 시료는 저장 30일이 지나도 휘발성염기질소량이 16 mg/100 g에 지나지 않았다. TBA 값의 경우도, 저장 13일 이후부터는 ITCs 함유 patch 비부착 실험구의 TBA 값이 급격하게 증가하여 저장 30일째에는 TBA 값이 8.1 mgMA/Kg에 달한 반면, ITCs 함유 patch 부착 실험구는 6.4 mgMA/Kg이었다. ITCs 함유 patch 부착 실험구와 ITCs 함유 patch 비부착 실험구의 pH 변화를 비교한 결과, ITCs 함유 patch 비부착 실험구의 경우, 저장 초기의 pH 6.15에서 저장 30일째의 pH가 7.33으로 높아졌는데 비하여 ITCs 함유 patch 부착 실험구 저장 30

일체의 pH가 6.65로 ITCs 함유 patch 비부착 실험구보다는 낮게 나타났다. ITCs 함유 patch를 부착한 고등어를 4°C에 Modified Tasmanian Food Research Unit Scheme(Table 2)에 의하여 관능검사를 실시한 결과, ITCs 함유 patch 비부착 실험구의 경우, 저장 10일째의 score가 9.4, 저장 13일째의 score가 12.0으로, shelf-life는 10-13일(T-VBN, TBA value, pH의 변화는 없었지만)인데 비하여 ITCs 함유 patch 부착 실험구의 경우, 저장 13일째, 8.6, 저장 17일째, 11.2로 shelf-life가 ITCs 함유 patch 비부착 실험구에 비하여 4~5일 긴 것으로 나타났다.

Horseradish로부터 추출한 ITCs 용액을 캡슐화하여 agar well method로 그 항균효과를 측정한 결과, ITCs 함유 캡슐은 positive control(ITCs 원액)보다는 항균효과가 낮게 나타났으나, 비브리오 패혈증균(*V. vulnificus*)과 병원성 대장균 O157(*E. coli* O157:H7)에 항균효과가 있었으며, 병원성 대장균 O157(*E. coli* O157:H7, clear zone, 1.5 cm)보다 비브리오 패혈증균(*V. vulnificus*, clear zone, 2.0 cm)에 대하여 강한 항균효과를 나타내었다.

Horseradishi로부터 추출한 ITCs를 캡슐화하여 시판 중인 gel type의 비누에 5, 7, 10% 첨가한 항균 액체비누 시제품의 병원성대장균 O157과 비브리오 패혈증균에 대한 항균효과를 측정한 결과, 일반비누로 손을 씻은 B 그룹 5명의 손 모두에서 균이 검출되었으나, ITCs 캡슐을 함유한 비누로 손을 세척한 그룹의 경우, 5% 첨가구부터 균의 감소가 나타나기 시작하여 10% 첨가구에서는 1명을 제외한 모두에서 균이 검출되지 않았으며, 비브리오 패혈증균에 대한 살균효과가 병원성대장균 O157보다 약간 강하게 나타났다.

여드름균(*Propionibacterium acnes*)에 대한 ITCs의 항균활성을 paper disk method로서 측정한 결과 ITCs를 1,000 ppm, 1,500 ppm 및 2,000 ppm을 처리한 실험구의 clear zone이 각각 1.8 cm, 2.0 cm 및 3.4 cm로 강한 항균 활성을 나타내었다.

세포에 대한 ITCs의 항염활성을 조사하기 위한 예비단계로 ITCs의 RAW264.7 세포에 대한 독성(IC₅₀)을 측정한 결과는 ITCs의 RAW264.7 세포에 대한 IC₅₀는 약 6.0 ppm이었다.

LPS(*E. coli* lipopolysaccharide, Sigma chemical)로 PGE₂ 생성을 촉진시키고 ITCs와 대조구(용매대조 DMSO와 aspirin)의 처리에 따른 LPS에 의한 PGE₂ 생성의 억제 정도를 관찰한 결과, ITCs 5 ppm에서 92.92, 2.5 ppm에서 96.60%로 IC₅₀ 이하의 농도에서 PGE₂ 생성 억제 효과가 관찰되어 고추냉이 추출물이

in vitro 실험에서 항염활성을 가지는 것을 알 수 있었다.

제 2 절 고추냉이 추출물인 Allyl isothiocyanate의 마이크로캡슐화 기술개발 및 저장기간 동안 캡슐로부터 방출효과 분석 (2세부 세부과제 : 고려대학교 박현진)

서 론

고추냉이 특유의 자극성의 원인물질은 Allyl isothiocyanate(AIT)를 비롯한 isothiocyanate (ITC)류으로 알려져 있는데, 이것은 생선의 비린내를 없애줌과 동시에 그 맛을 상승시키는 작용을 가지고 있으며, 또한 식욕증진, 비타민B₁ 합성증강, 베타 아밀라제 활성 촉진, 항산화활성, 항균활성 등의 효과가 있어 한국산 참 고추냉이를 이용하여 다양한 가공식품, 건강식품 및 항산화제, 천연 보존료를 개발할 수 있으며, 이것은 재배농가의 안정적인 소득향상과 직결된다고 할 수 있겠다. 그러나 참 고추냉이 추출물인 Allyl isothiocyanate(AIT)은 강한 휘발성과 빠른 시간 내에 공기 중의 산소와 반응하여 변질하기 때문에 AIT를 산소로부터 완벽하게 차단하고 것이 필요하다. 그러므로 다양한 참 고추냉이 추출물로부터 고부가가치제품을 만들기 위해서는 산소차단성이 우수한 생물고분자막으로 마이크로캡슐의 제조가 필수적이다.

마이크로캡슐의 제조는 wall material의 얇은 보호막이 향기물질의 휘발을 막아주고 화학적 변성으로부터 물질을 보호해주는 대표적인 packaging으로 정의된다. 마이크로캡슐의 제조에 wall materials 또는 coating materials로 사용되는 생물고분자물질은 다양하다. 본 실험에 사용된 첫 번째 코팅물질인 Sodium alginate 은 1,4-linked D-mannuronic acid와 l-guluronic acid residue로 이뤄진 anionic linear polysaccharide 이다. Sodium alginate의 carboxylate anion과 칼슘 이온 같은 이가 이온과 만나면 cross linking을 이뤄 'egg-box model'이라는 gell을 형성하게 된다. (Figure 1)이러한 성질은 air-atomizing device를 사용하는 미세캡슐화 산업에 alginate 응용을 유리하도록 도와준다. air-atomizing device의 spray를 통해 입자형태로 칼슘이온과

결합하게 되면, 유해한 solvent 사용이나 유해 부산물 생성 없이도 완벽한 구형 gel bead를 형성한다. 또한 alginate는 10여 년 전부터 유산균 캡슐물질로 연구되면서 체내 생체적 친화성 (biocompatibility)를 입증해왔다. 그래서 air-atomizing device를 이용해 Sodium alginate로 AIT를 마이크로캡슐화를 시도하였다.

그리고 참 고추냉이의 추출물인 AIT와 같은 소수성의 향기물질을 코팅하기 위해서는 소수성 작용기와 친수성 작용기를 동시에 가지고 있는 양친매성 물질을 사용하는 것이 캡슐의 효율을 높이고 저장기간 동안 캡슐로부터 향기물질이 방출되는 것을 지연시킬 수 있다고 알려져 있다. 그래서 두 번째 코팅물질은 향기물질의 마이크로캡슐 제조에 많이 사용되는 Gum arabic(GA)인데, 이것은 *Acacia senegal* 와 *Acacia seyal*의 줄기와 가지에서 추출된 당단백질이다. Gum arabic은 Figure 2에서와 같이 저분자량의 다당류와 고분자량의 hydroxyproline이 풍부한 당단백질로 구성되어 있다. 그러므로 Figure 3에서와 같이 친수성의 다당류는 물과 상호작용하고 소수성의 단백질은 AIT와 상호 작용할 수 있어 에멀전 상태에서 Gum arabic이 AIT을 물과 섞일 수 있게 도와주고 AIT가 마이크로캡슐로부터 방출되는 것을 막아준다. 그리고 본 실험에서는 마이크로캡슐의 효율을 높이고 제조과정에서의 barrier property를 증가시키기 위해서 추가적으로 gum arabic과 AIT의 마이크로캡슐에 emulsifier, tween20과 span80을 첨가하였다. 그리고 향기물질 마이크로캡슐의 제조 방법들 중에서, 분무건조가 식품산업에서 가장 많이 사용하는 공정으로 1930년대부터 향기물질의 마이크로캡슐 제조 방법으로 사용되었다. 분무건조는 가장 경제 적이며 여러 가지 공정상의 변수로 인해 융통성이 뛰어나며 여러 가지의 조건과 제품에의 응용이 가능하다.

본 연구의 목적은 참 고추냉이 추출물로부터 고부가가치제품을 만들기 위해서 AIT의 휘발을 막고 장기간 보존이 가능한 AIT 마이크로캡슐을 제조하는데 있다. 이를 위하여 첫 번째로 sodium alginate의 물성을 밝혀내고 air-atomizing 방법으로 첫 번째 코팅물질인 sodium alginate를 이용해 AIT의 마이크로캡슐을 제조한 후 최적의 조건을 찾고자 한다. 두 번째는 AIT와 두 번째 코팅 물질인 Gum arabic의 비율을 조절하고 emulsifiers를 첨가하여 마이크로캡슐의 효율을 높이고 AIT의 Shelf life을 연장할 수 있는 조건을 찾고자 한다.

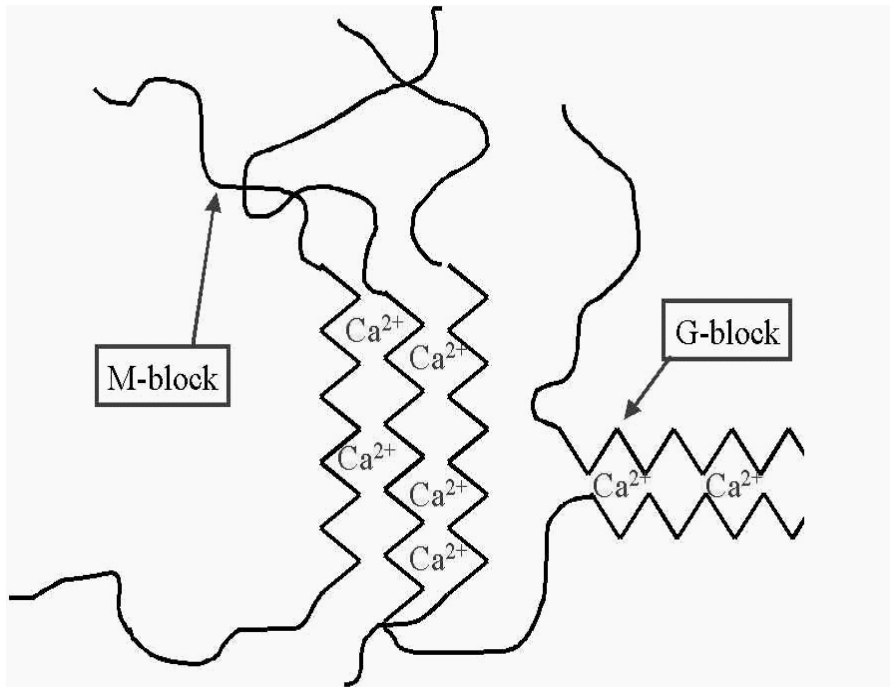


Figure 1. Alginate와 Ca^{2+} 의 cross-linking

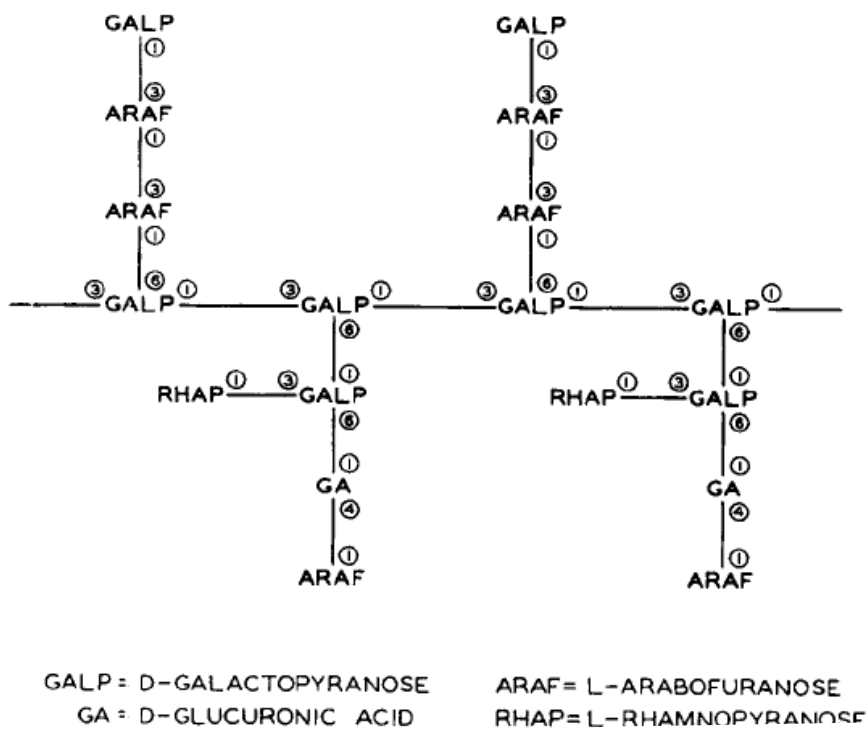


Figure 2. The structure of Gum arabic

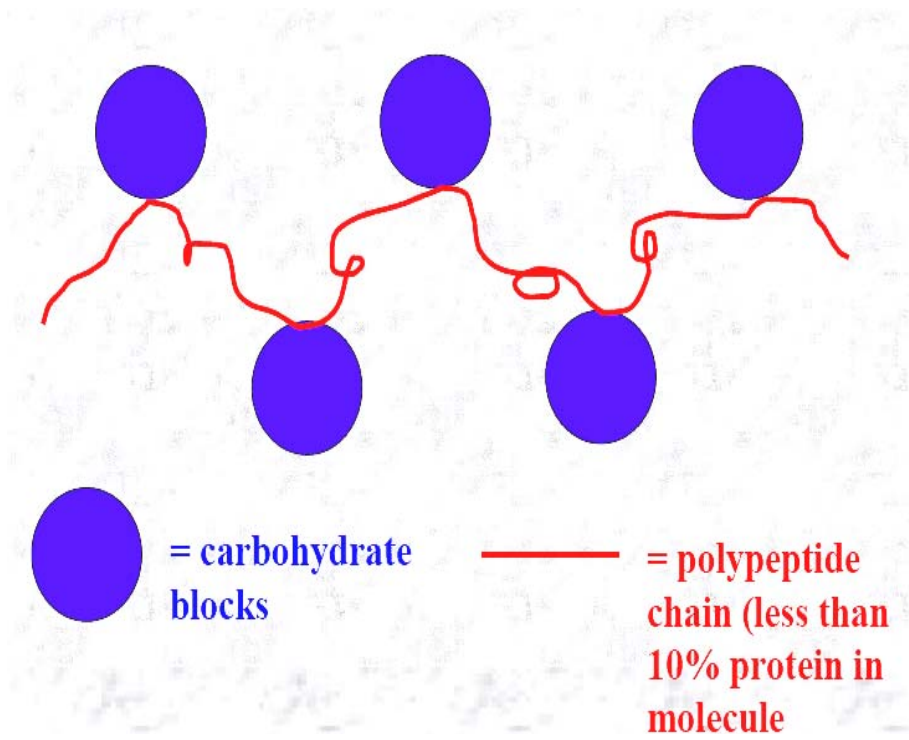


Figure 3. "Wattle blossom" structure of Gum arabic

재료 및 방법

1. 고추냉이 추출물-alginate 마이크로캡슐 제조 및 alginate의 물성 분석

가. 재료 및 기구

Alginic acid sodium salt와 xanthan gum은 SIGMA에서 구입하고 tween80와 calcium chlorid는 DUKSAN에서, glycerol은 JUNSEI에서 구입하였다. 고추냉이 추출물은 강릉대에서 제공 받았다. 마이크로 캡슐 제조를 위한 air-atomizing device는 Spray Systems Co.(Figure 4)에서 구입하였다.

Figure 4. The air-atomizing device (Spray Systems Co., Incheon, Korea)



나. Alginate 마이크로캡슐의 제조 후 사이즈 분석

Alginate의 적정 농도를 찾기 위해 Table 1의 조성으로 1.0, 1.3, 1.5, 1.8, 2.0, 2.3 % alginate 미세캡슐을 만들었다. 마이크로캡슐 제조는 J. S. Lee *et al* (2004)을 따랐으며 증류수 내 sodium alginate을 mechanical stirrer로 녹이고 glycerol, tween 80, xanthan gum 을 첨가한 후 Air-atomizing device (atom 압력 $4\text{kg}_f/\text{cm}^2$, liquid 압력 $1\text{kg}_f/\text{cm}^2$)로 캡슐을 제조하였고 캡슐 응고액으로 0.5M CaCl_2 사용하였다. 캡슐 제조 후 -70°C 에서 하루 동안 냉동한 후 동결건조를 통해 power 형태인 캡슐을 얻었다. 이것을 $500\ \mu\text{m}$ 체로 거른 후 사이즈를 분석하였다.

alginate(%)	glycerol(%)	xanthan gum(%)	tween 80(%)
1.0	5	0.15	0.1
1.3	5	0.15	0.1
1.5	5	0.15	0.1
1.8	5	0.15	0.1
2.0	5	0.15	0.1
2.3	5	0.15	0.1

Table 1. The composition of alginate capsule

다. Alginate 캡슐의 물성 분석

Table 1에서 조성 1.8%와 2.0%의 alginate의 필름 형성 능력과 가스 투과도를 알아보았다. Tensile strength와 elongation은 ASTM D 882-88 방법에 따라 Instron (Model 1125, Instron Engineering 3Corp., Canton, USA)을 이용하였

다. 수분 투과도와 산소투과도는 cup method와 OX-TRAN(Modern Control)를 이용해 측정하였다.

라. Alginate와 고추냉이 추출물의 마이크로캡슐 제조

마이크로 캡슐 제조는 J. S. Lee *et al* (2004)을 따랐으며 용액 조성은 Table 2과 같다. 증류수 내 sodium alginate을 mechanical stirrer로 녹이고 glycerol, tween 80, xanthan gum 을 첨가한 후 고추냉이 추출액을 넣고 교반한다. 캡슐 제조는 air-atomizing device을 이용하였다. spray 시 atom 압력은 4kgf/cm^2 , liquid 압력은 1kgf/cm^2 로 조정하였으며 캡슐 응고액으로 0.5M CaCl_2 사용하였다. 캡슐 제조 후 -70°C 에서 하루 동안 냉동한 후 동결건조를 통해 power 형태인 캡슐을 얻었다.

Table 2. The composition of alginate-horseradish extracts microcapsules

	Sodium alginate (w/v%)	glycerol (v/v%)	tween 80 (v/v%)	xanthan gum (v/v%)	고추냉이 추출액 (v/v%)	총
sample 1	9 g (1.8%)	25 ml (5%)	0.5 ml (0.1%)	0.75 g (0.15%)	250 ml (50%)	500 ml
sample 2	10 g (2.0%)	25 ml (5%)	0.5 ml (0.1%)	0.75 g (0.15%)	250 ml (50%)	500 ml

2. AIT-Gum arabic(GA) 마이크로캡슐 제조

가. 재료 및 기구

Gum arabic은 SAMCHUN에서 구입하고 Span80 은 SHOWA, Tween20은 YAKURI PURE 에서 구입하였다. Allyl Isothiocyanate(>98%, GC purity)는 Fluka로부터 구입하여 참 고추냉이 추출액 대신 사용하였다. 유기용매 Diethyl ether와 1-propanol은 DUKSAN PURE에서 구입하였다. 마이크로캡슐의 제조를 위한 분무건조기는 SD-05 (Figure 6)를 사용하였다.

나. AIT-Gum arabic(GA) 마이크로캡슐의 제조

Wall material (Gum arabic)을 증류수에 넣어 25% w/w mixture을 만든 후, 30분간 stirring 과정을 통하여 충분히 dispersion 시킨다. Wall material과 AIT의 비율에 따른 결과를 얻기 위해서 Gum arabic(GA)과 AIT의 비율이 3:1, 4:1, 5:1, 6:1로 되게 AIT를 각각 8.3% v/w, 6.25% v/w, 5%v/w, 4.16% v/w로 Gum arabic(GA)용액에 첨가한다. Figure 5에서와 같이 AIT와 Gum arabic의 혼합물을 Homogenizer(ULTRA TRRAX T 25 basic)를 이용하여 11000rpm에서 3분동안 균질화시켜 AIT와 Gum arabic(GA)의 에멀전을 얻게 된다.

Emulsifier (Tween20, Span80)의 농도에 따른 결과를 얻기 위해서 각각 Gum arabic(GA)용액에 Tween20과 Span80을 각각 0.3% w/w, 0.5%w/w, 0.7% w/w를 첨가한 후 AIT를 위의 비율과 동일하게 첨가하였다. 나머지는 위의 방법과 동일함

AIT와 GA의 에멀전은 Figure 6의 분무건조기를 통해서 마이크로캡슐로 만들어진다. 분무건조기의 조건은 다음과 같다. inlet air temperature : 200℃, outlet air temperature : 110~120 ℃ ,feed rate : 5ml/min, air flow rate : 73m³/hr, rotational speed of atomizer : 30,000rpm. 만들어진 마이크로캡슐 분말은 분석 때까지 밀봉상태로 -80℃에서 보관하였다. Figure 7는 균질화 과정 후에 형성된 에멀전이고 Figure 8는 분무건조 후에 형성된 파우더 형태의 마이크로캡슐이다.



Figure 5. Homogenizing



Figure 6. Spray-drying



Figure 7. Emulsion of AIT and GA



Figure 8. AIT microcapsules

3. 마이크로캡슐의 효율 분석 및 저장 기간 동안 방출 실험

가. 마이크로캡슐의 AIT 함량 분석

마이크로캡슐의 AIT함량 분석은 organic solvents extraction 방법을 수정하여 실시하였다. AIT의 마이크로캡슐 0.1g을 15ml test tube에 넣고 4ml의 증류수, 4ml의 유기용매 diethyl ether를 첨가한다. 분석과정 중에 일어날 수 있는 AIT의 손실을 보정해 주기 위해서 AIT의 internal standard인 Phenyl isothiocyanate를 0.02ml 넣어 주었다. 그 후에 vortex mixer로 3분간 강하게 섞어주어 캡슐 안의 AIT가 유기용매로 추출될 수 있게 한다. 그리고 10분동안 3000rpm에서의 원심분리를 통해서 상층의 유기층만 분리하였다. 분리된 유기층의 1ul를 gas chromatograph (Figure 9)에 주입하였다.

FID(flame ionization detector)가 부착된 gas chromatography (HP 5890 series)를 사용하였으며 column은 HP-1 crosslinked methyl siloxane column (30 m × 0.25 mm I.d., 0.25 μm film thickness, Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA)을 사용하였다. Injection port의 온도는 160°C, Detection의 온도는 250°C로 유지하였다. Carrier gas는 nitrogen을 사용하였고, split ratio는 1:30이었다.



Figure 9. Gas chromatograph (HP 5890 Series)

나. 마이크로캡슐 효율

$$\text{마이크로캡슐 효율(\%)} = \frac{\text{분무건조 후 마이크로캡슐의 AIT 함량}}{\text{분무건조 전 에멀전에 첨가된 AIT함량}}$$

다. 저장 기간동안 마이크로캡슐의 AIT 방출 효과 분석

마이크로캡슐 0.1g을 15ml test tube에 넣고 25℃, 상대습도 50%로 유지되는 항온항습기(Figure 10)에 넣고 23일, 16일, 7일, 4일 동안 저장하였다. 마이크로캡슐에 남아있는 AIT의 함량은 가의 방법과 동일하게 분석되었다. 저장기간 동안 남아있는 AIT는 다음과 같은 비율로 계산되었다.

$$\text{저장기간 동안 AIT의 함량(\%)} = \frac{\text{저장 후의 마이크로캡슐의 AIT 함량}}{\text{분무건조 후 마이크로캡슐의 AIT 함량}}$$



Figure 10. Temperature and humidity chamber

라. Avarmi's equation에 의한 AIT의 방출 효과 분석

Avarmi's equation을 통해서 저장기간 동안 AIT의 release rate constant와 release mechanism을 알 수 있다. Avarmi's equation는 다음과 같다.

$$R = \exp[-(kt)^n]$$

R : 다에서 얻어진 저장기간 동안 AIT 함량

t : 저장시간

n : release mechanism

k : release rate constant

Avarmi's equation의 양쪽 변에 상용로그를 두 번 적용하게 되면 다음과 같은 식이 얻어진다.

$$\ln(-\ln R) = n \ln k + n \ln t$$

위의 식으로부터 $\ln(-\ln R)$ vs $\ln t$ 의 그래프를 구성하게 되면 기울기로부터 n 을 구하게 되고 $\ln t = 0$ 일 때 k 를 구할 수 있다.

마. 마이크로캡슐의 AIT 반감기 ($t_{1/2}$) 분석

Cai & Corke (2000)에 따르면 저장기간 동안 남아있는 AIT 함량 대 시간의 semi log 식을 통해서 그래프의 기울기를 구할 수 있으며, 이 기울기로 AIT의 반감기($t_{1/2}$)를 계산할 수 있다.

4. AIT 마이크로캡슐의 물리적 성질 측정

가. 마이크로캡슐의 표면 관찰

마이크로캡슐 파우더를 금으로 코팅한 후에 JEOL JSM-5300 Scanning Electron Microscopy로 캡슐의 모양과 표면을 확인하였다. (Figure 11)



Figure 11. Scanning Electron Microscopy (JEOL JSM-5300)

나. 마이크로캡슐의 입자 크기 측정

마이크로캡슐을 1-propanol에 분산시킨 후에 laser light cattering 방법으로 CILAS 1064를 이용하여 캡슐의 입자 크기 분포를 측정하였다. (Figure 12)



Figure 12. Particle size analyzer (CILAS 1064)

결과 및 고찰

1. 고추냉이 추출물-alginate 마이크로캡슐의 특징 및 alginate의 물성 분석

가. Alginate 농도에 따른 alginate-capsule 크기의 변화

Figure 13에서와 같이 Alginate의 농도가 증가함에 따라 캡슐크기는 222.54um에서 138.27 μm 로 감소하였다. 최대 농도 2.3%에서 가장 작은 사이즈가 얻어졌지만, alginate 농도가 2.0% 이상으로 증가했을 때는 점도상승으로 캡슐 제조 과정에서 많은 손실이 일어났다. 또한 V. Chadramoli *et al.* (2004)는 1.8% alginate 와 2.0% alginate를 최적의 캡슐 농도로 정하였다.

캡슐 조성인 glycerol은 plasticizer로 캡슐 표면을 구형에 가깝게 만들어주며, K. Kailasapathy *et al.* (2000)의 연구에 따르면 glycerol의 첨가가 -20°C 이하의 deep freezing 동안 capsule내의 bacteria 생존률을 높여준다. Tween 80은 유화제로서 core material인 AIT와 wall material인 alginate의 혼합을 안정화해준다. Xanthan gum의 경우 capsule 표면의 수분 흡수를 변화시켜 capsule의 core 물질 보호를 높여준다.

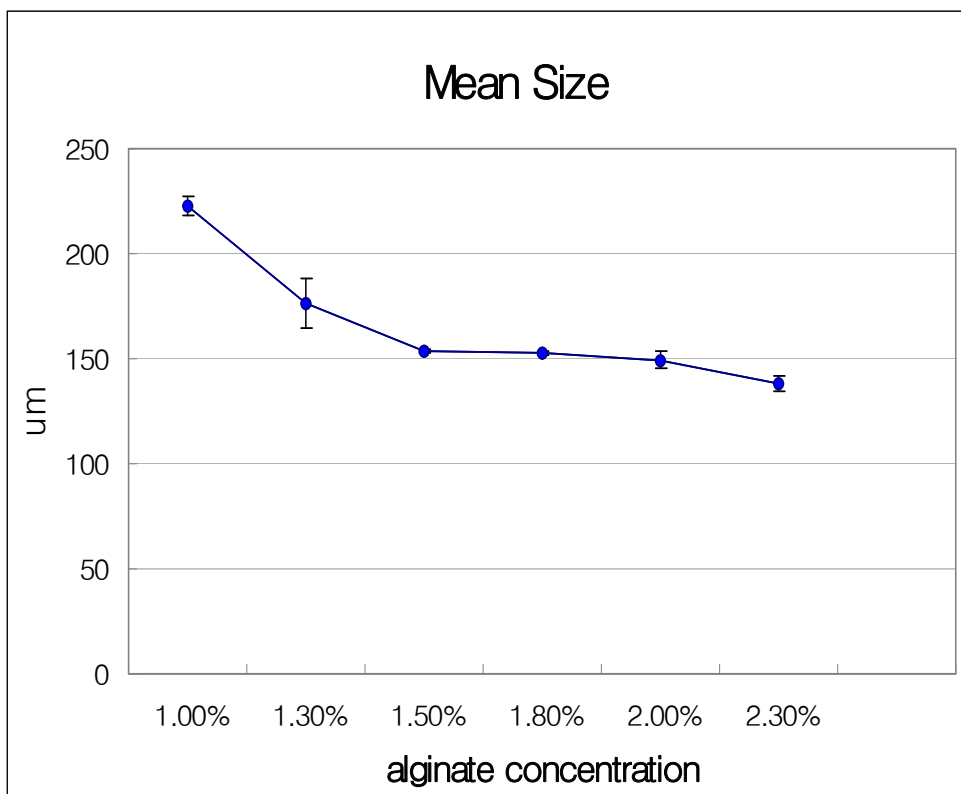


Figure 13. The capsules mean size on different concentration of alginate

나. 1.8%와 2.0% alginate-capsule의 기계적 물성과 물리적 특성

마이크로캡슐의 사이즈 분석 결과 1.8%와 2.0%의 alginate가 적절하다고 생각되어 두 가지 조성의 film을 만들어 기계적 물성을 조사하였다. 다음 table 3이 그 결과이다. Figure 14에서와 같이 Tensile strength는 1.8% alginate가 2.0% alginate 보다 낮은 것으로 보아 1.8% alginate가 기계적 강도가 약하지만, figure 16과 figure 17에서와 같이 수분투과도와 산소투과도는 1.8% alginate가 상대적으로 낮아서 1.8% alginate 캡슐이 수분과 산소를 잘 차단할 것이라고 생각된다.

Table 3 The mechanical properties of 1.8%와 2.0% alginate film

	Tensile strength (MPa)	Elongation (%)	water vapor permeability (ng/m ² sPa)	oxygen permeability ((10 ⁻¹⁵)L.m/m ² .sec.Pa)
Alginate 1.8%	69.513±3.00682	7.975±0.865	2.385±0.055	0.00565
Alginate 2.0%	84.603±3.989	9.51±0.951496	2.695±0.015	0.00666

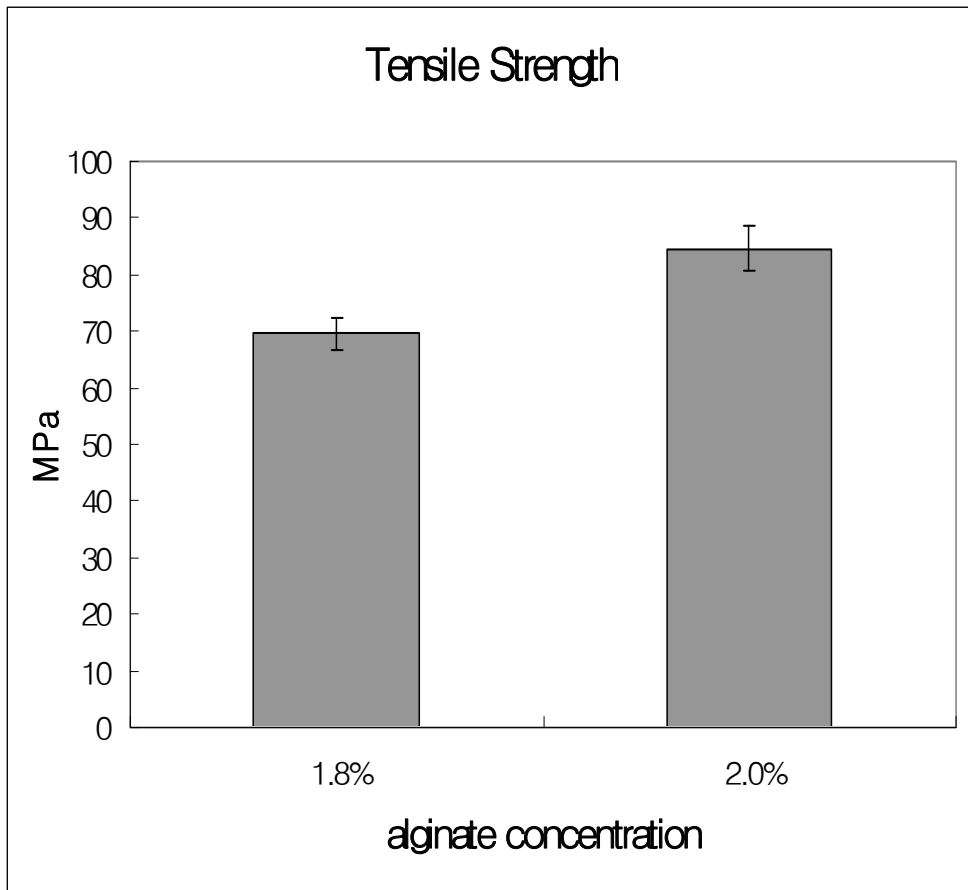


Figure 14. The tensile strength of 1.8% and 2.0% alginate film

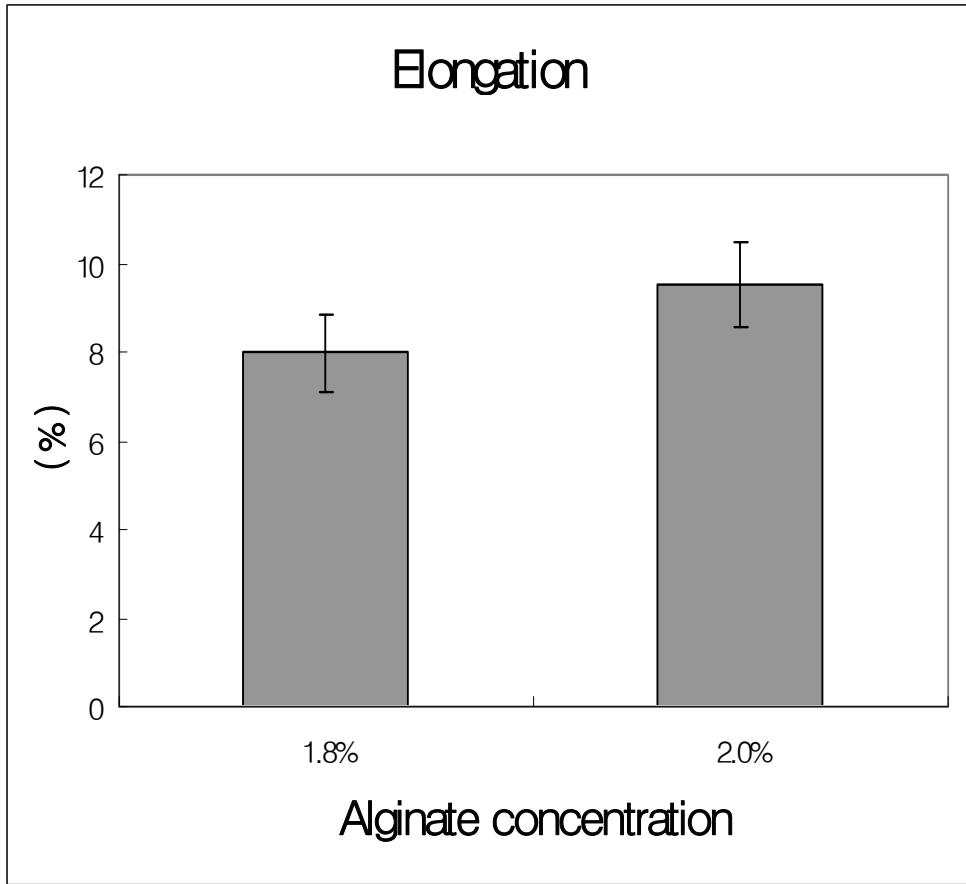


Figure 15. The elongation of 1.8% and 2.0% alginate film

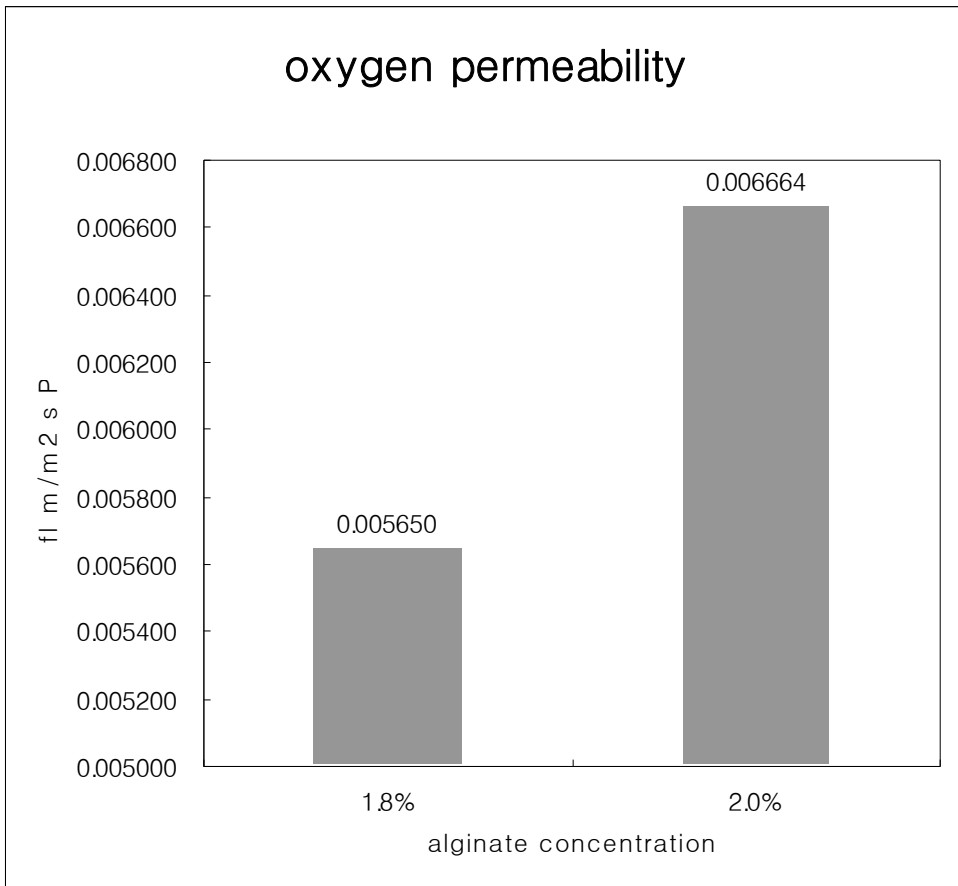


Figure 16. The oxygen permeability of 1.8% and 2.0% alginate film

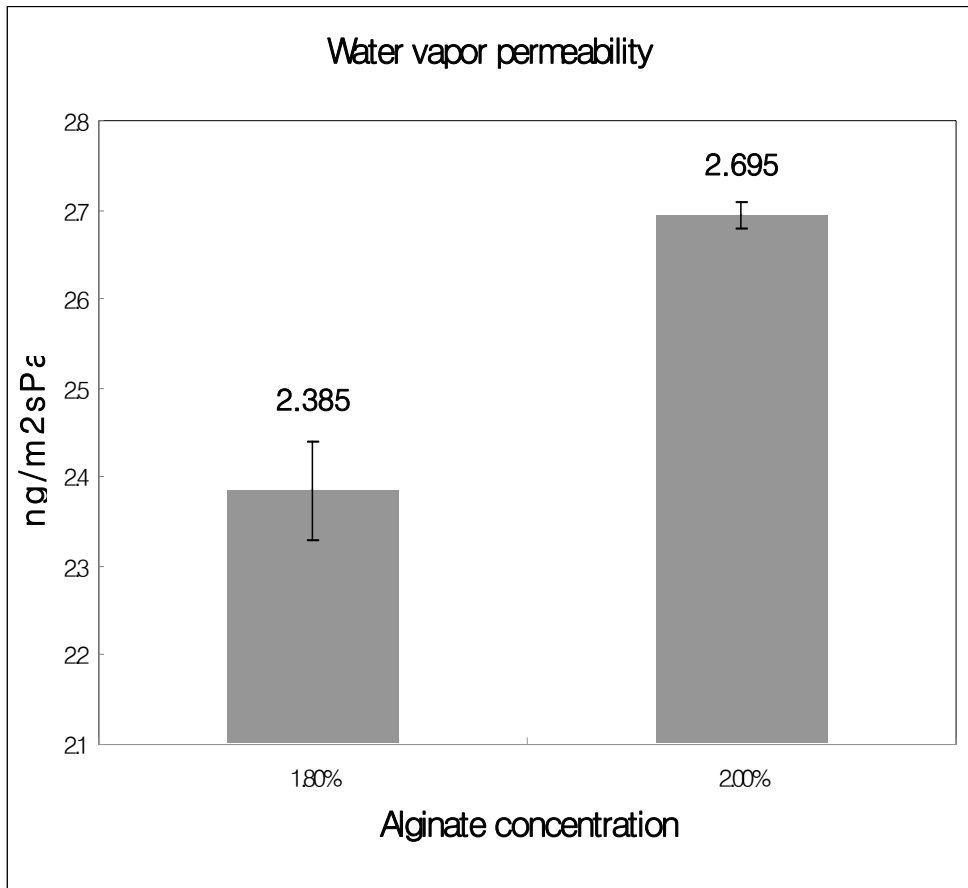


Figure 17. The water vapor permeability of 1.8% and 2.0% alginate film

다. 고추냉이 추출물의 alginate 캡슐의 형태학적 특징과 효율

사이즈가 작으면서 산소와 수분차단성이 좋았던 1.8% alginate 조성으로 만들어진 고추냉이 추출물 마이크로캡슐의 SEM 사진이 Figure 18이다. 사진에서 확인할 수 있는 것처럼 고추냉이 추출물의 alginate 캡슐은 표면이 움푹 파여진 형태로 구형을 이루지 못하고 있다. 이것은 air-atomizing device에서 캡슐이 분사될 때 고압의 압력과 캡슐 응고액 표면에 부딪히면서 모양의 변화가 일어났을 것이라고 생각된다. 1.8% alginate-고추냉이 추출물의 마이크로캡슐 효율을 분석했으나 캡슐 안에 고추냉이 추출물이 거의 존재하지 않았다. 이것은 캡슐제조 과정 중에서 건조되지 않은 상태로 고압으로 분사되면 압력에 의해 고추냉이 추출물이 쉽게 휘발되고, alginate가 고추냉이 추출물인 AIT를 화학적인 상호작용으로 코팅하는 것이 아니라 단지 필름 형성능력에 의해서 코팅하는 것이므로 동결 건조 전에 캡슐 응고액 안에서도 상당량이 휘발된 것이 원인이라고 생각된다.

라. 고추냉이 추출물의 Alginate 마이크로캡슐의 한계점

Alginate 캡슐은 산소와 수분 차단성이 우수하지만 캡슐 제조 과정의 문제점과 alginate와 고추냉이 추출물인 AIT 사이의 화학적인 상호작용이 약하기 때문에 고추냉이 추출물이 캡슐 제조 과정 중에 쉽게 휘발되고 결국 alginate는 마이크로캡슐에 적합하지 않다는 결론을 내리게 되었다.

결국, 고추냉이 추출물인 AIT와 화학적인 상호작용으로 코팅해 줄 수 있는 다른 물질을 찾아야 했고 향기물질을 마이크로캡슐화하는데 널리 이용되고 있는 물질인 Gum arabic을 이용하여 AIT-마이크로캡슐을 만들었고 효율을 높여주기 위해서 emulsifier, tween20과 span80을 첨가하였다. Tween20은 대표적인 수용성 유화제이고 span80은 대표적인 지용성 유화제인데 gum arabic과 AIT의 비율에 따라 효율을 최대화 시킬 수 있는 유화제를 선택하고 유화제의 농도를 결정할 수 있을 것이다.

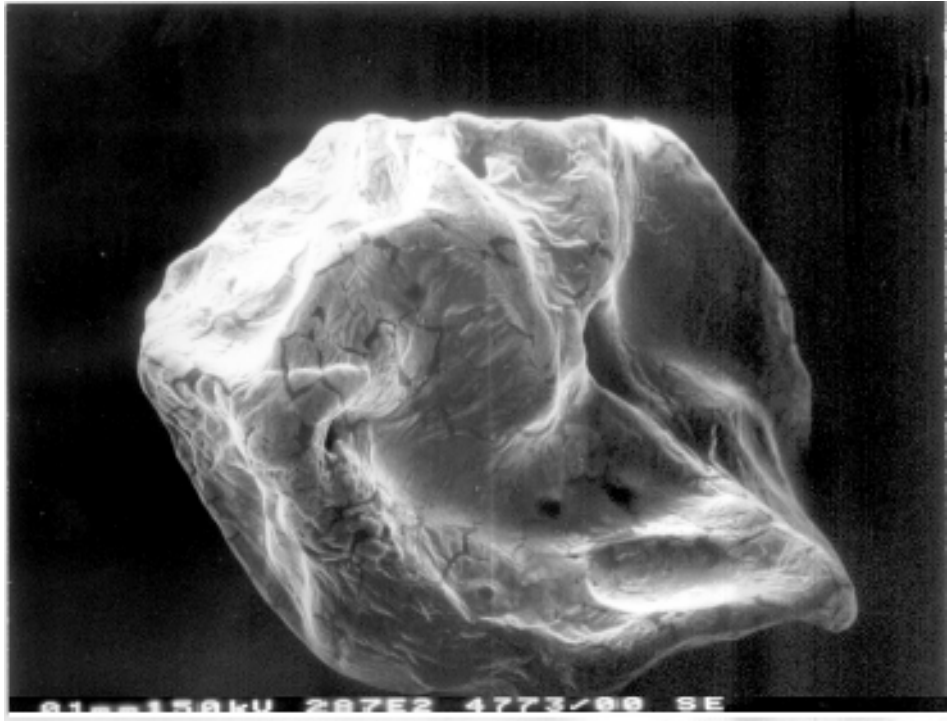


Figure 18. Scanning electron microscopy of 1.8% alginate-horseradish extract microcapsules

2. AIT-Gum arabic(GA) 마이크로캡슐의 최적 조건

가. Gum arabic(GA)과 AIT의 비율에 따른 마이크로캡슐의 효율

Gum arabic(GA)과 AIT의 비율을 3:1, 4:1, 5:1, 6:1로 하여 마이크로캡슐을 만들었을 때, 분무건조 후 마이크로캡슐에 남아있는 AIT의 양을 조사하여 마이크로캡슐의 효율(%)을 계산하였다. 그 결과는 Figure 19과 같다. GA : AIT의 비율을 3:1로 하여 마이크로캡슐을 만들었을 때, $38.944 \pm 0.658\%$ 의 AIT가 캡슐에 남아있었다. 60%이상의 AIT가 균질화 과정과 분무 건조 동안 손실되었고 이것은 캡슐 중에 가장 낮은 효율을 보여주고 있다. Gum arabic이 에멀전을 안정화시켜주는 역할을 하기 때문에 캡슐에서 GA의 비율이 낮으면 GA와 AIT의 에멀전이 불안정해지며 이것은 분무건조 전 에멀전 상태에서 AIT가 쉽게 휘발되게 하는 원인이 된다.

그리고 Figure 20는 마이크로캡슐의 입자 크기의 결과인데, 3:1의 캡슐은 $15.74 \pm 0.559\mu\text{m}$, 4:1의 캡슐은 $19.19 \pm 2.072\mu\text{m}$, 5:1의 캡슐은 $18.94 \pm 1.344\mu\text{m}$, 그리고 6:1의 캡슐은 $21.28 \pm 0.007\mu\text{m}$ 의 평균 입자 크기를 보여준다. Figure 20에서와 같이 GA의 비율이 낮으면 캡슐 입자의 크기가 작아지는 것을 볼 수 있는데 이것으로 인해 캡슐의 표면이 얇아지게 된다. 이것은 분무건조 중에 AIT가 GA의 표면으로부터 쉽게 방출이 되는 원인이 된다. 그러므로 비율이 4:1과 5:1 일 때, 효율이 각각 $53.283 \pm 0.150\%$, $48.125 \pm 0.380\%$ 로 비율 3:1 보다 10%이상 증가되었고 6:1의 비율에서는 효율이 $57.124 \pm 0.268\%$ 로 3:1 보다 20%가 증가된 결과를 보여주고 있다. 즉, GA의 비율이 높으면 에멀전이 안정화되고 캡슐 입자의 크기가 증가하면서 분무건조 중에 AIT의 방출을 막아주게 된다. 그러나 6:1이상의 캡슐화 되는 AIT에 비해 코팅물질이 너무 많이 쓰이게 되므로 경제적으로 비효율적이라고 생각된다. 즉, 적은 양의 코팅물질을 쓰면서 AIT 캡슐의 효율을 높일 수 있는 방법을 찾아야 할 것이다.

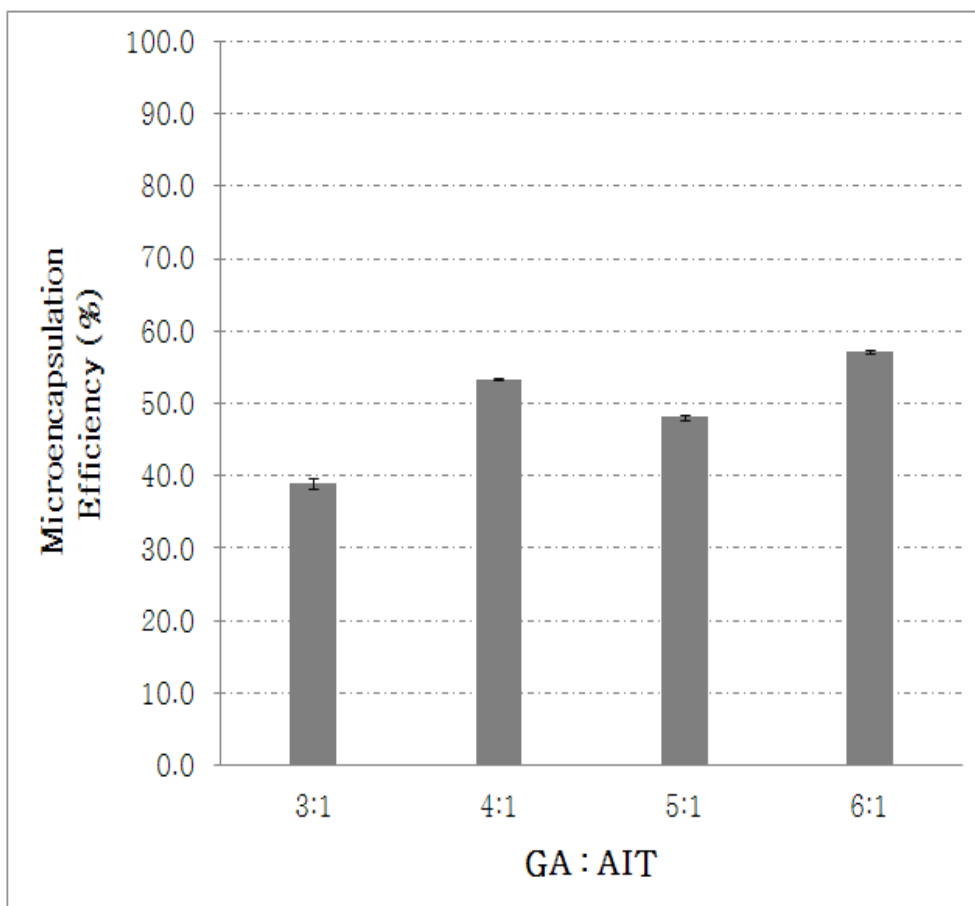


Figure 19. Encapsulation efficiency of AIT encapsulated with gum arabic on the different ratio of gum arabic and AIT

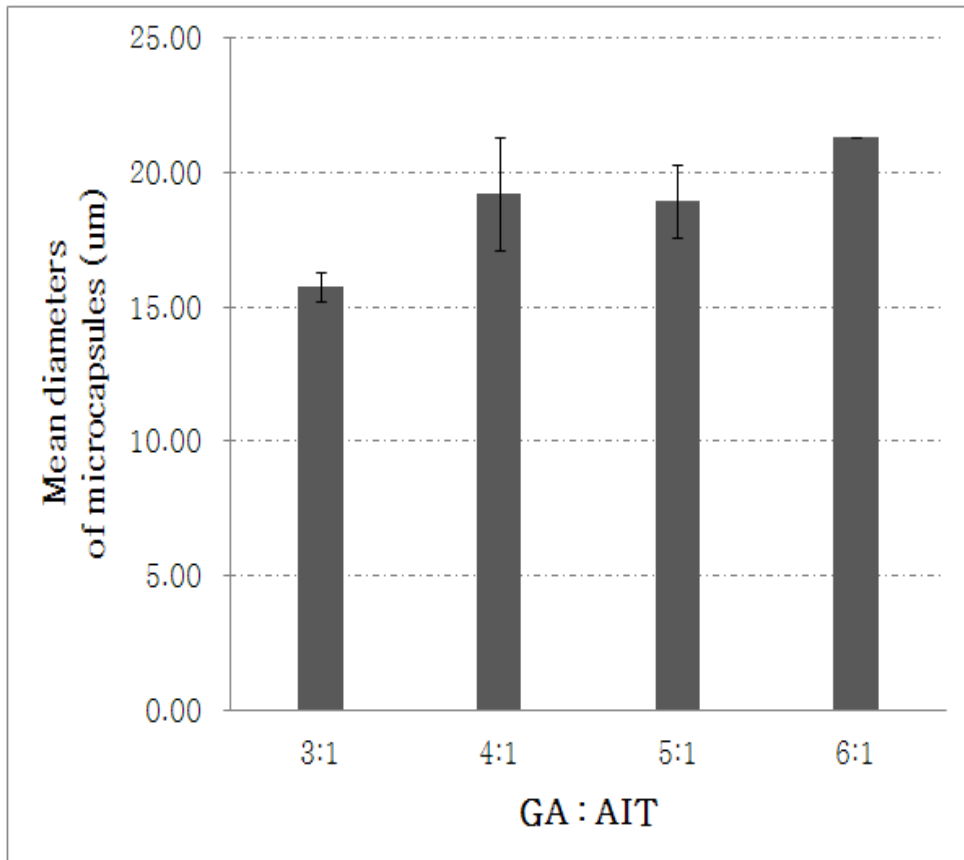


Figure 20. Mean diameters of AIT microcapsules on the different ratio of gum arabic and AIT

나. Emulsifiers의 첨가에 따른 마이크로캡슐의 효율

Emulsifiers, Tween20과 Span80의 0.5% w/w를 GA와 AIT의 에멀전에 첨가하여 마이크로캡슐의 효율을 알아보았다. 그 결과는 Figure 21과 같다. 3:1의 캡슐은 Tween20 0.5%를 첨가했을 때, $84.656 \pm 2.553\%$ 의 AIT가 캡슐에 남아있었고 Span80 0.5%를 첨가했을 때, $73.196 \pm 1.658\%$ AIT가 캡슐에 남아있었다. 이것은 Emulsifier를 첨가하지 않았을 때에 비해, 효율이 약 35%~40%가 증가한 결과를 보여준다. 4:1의 캡슐은 Tween20 0.5%를 첨가하였을 때 효율이 $68.270 \pm 2.275\%$ 였고 Span80 0.5%를 첨가하였을 때, 효율이 $71.421 \pm 3.622\%$ 으로 첨가하지 않았을 때보다 증가하였다. 또한, 5:1의 캡슐도 Tween20 0.5%를 첨가하였을 때 효율이 $65.469 \pm 4.385\%$ 였고 Span80 0.5%를 첨가하였을 때, 효율이 $72.748 \pm 1.059\%$ 으로 첨가하지 않았을 때보다 증가하였다. 마찬가지로 6:1의 캡슐은 Tween20 0.5%를 첨가하였을 때 효율이 $80.807 \pm 1.140\%$ 였고 Span80 0.5%를 첨가하였을 때, 효율이 $80.516 \pm 5.516\%$ 로 효율이 증가하였다.

Tween20과 Span80은 에멀전을 안정하게 만들어주며 plasticizer로서 캡슐의 표면을 매끄럽게 만들어주고 GA와 더불어 AIT와 상호작용하여 AIT의 휘발을 막아준다. 즉, 이것이 emulsifier를 캡슐에 첨가했을 때 효율이 증가할 수 있었던 원인일 것이다. 3:1의 캡슐에 Tween20 0.5%를 첨가했을 때와 6:1의 캡슐에 Tween20 0.5%를 첨가했을 때의 효율이 가장 높았다. 그러나 첨가하지 않은 캡슐과 비교했을 때 emulsifier 첨가의 효과가 가장 큰 것은 3:1의 캡슐이었다. 이것은 위에서 설명한 것처럼 Tween20 0.5%를 첨가하면 적은 양의 코팅물질을 사용하여 높은 효율로 많은 양의 AIT를 마이크로캡슐화 할 수 있으므로 경제적인 측면에서 의미가 있는 결과라고 생각된다.

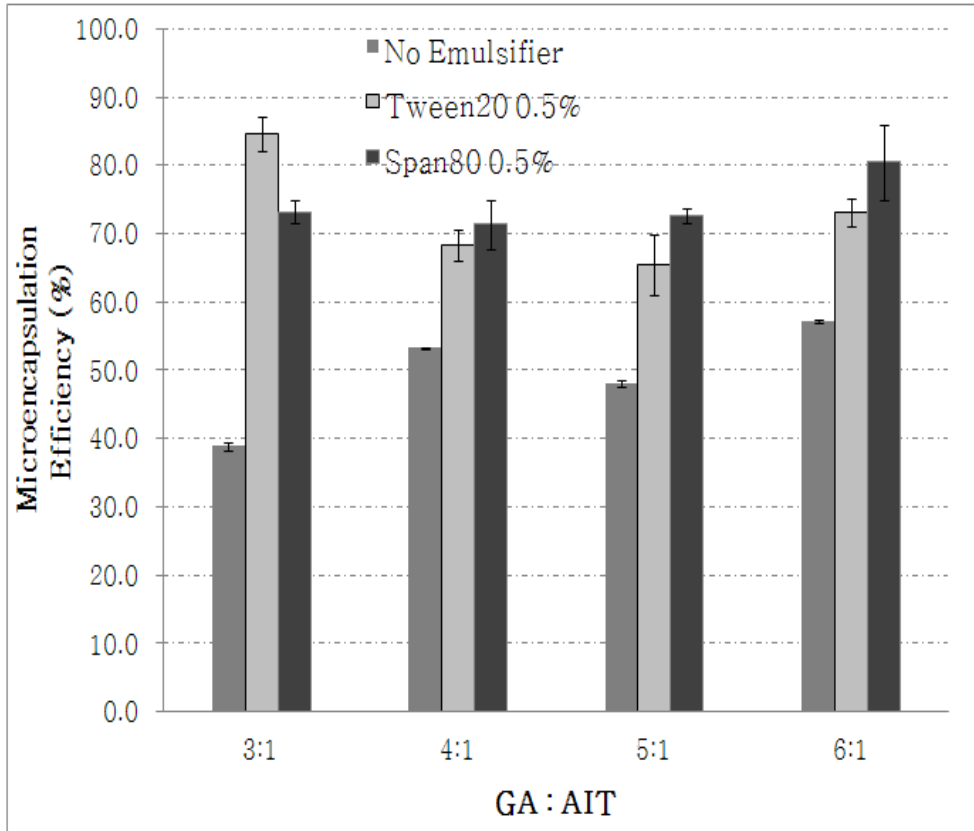


Figure 21. Effect of the emulsifiers(Tween20, Span80)addition on microen capsulation efficiency during spray drying

다. Emulsifiers 농도에 따른 마이크로캡슐의 효율

앞선 실험 결과에서 Emulsifier, Tween20과 Span80을 첨가했을 때 마이크로캡슐의 효율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 마이크로캡슐의 최적의 비율을 찾기 위해서 Tween20과 Span80의 농도를 다르게 첨가하여 그 효율을 조사하였다. Table 4은 3:1의 캡슐에 Tween20과 Span80을 각각 0.3%, 0.5%, 0.7%를 첨가했을 때의 결과이다. GA와 AIT의 비율이 3:1인 마이크로캡슐은 Tween20 0.5%나 0.7%를 첨가했을 때 각각 $84.656 \pm 2.553\%$, $83.267 \pm 0.128\%$ 로 효율이 가장 높았고, Span80 보다는 Tween20이 효율이 증가시키는 데에는 더 효과적인 emulsifier라는 것을 알 수 있었다.

Table 4. Effect of the different emulsifiers concentration on microencapsulation efficiency (GA:AIT = 3:1)

Concentration	Emulsifiers	
	Tween20	Span80
0.3%	$69.766 \pm 1.453\%$	$70.963 \pm 3.613\%$
0.5%	$84.656 \pm 2.553\%$	$73.196 \pm 1.658\%$
0.7%	$83.367 \pm 0.128\%$	$70.603 \pm 0.037\%$

Table 5는 4:1의 캡슐에 Tween20과 Span80의 농도를 다르게 첨가했을 때의 결과이다. GA와 AIT의 비율이 4:1인 마이크로캡슐은 Tween20 0.7%나 Span80 0.7%를 첨가했을 때 각각 $78.200 \pm 3.061\%$, $78.262 \pm 2.687\%$ 로 효율이 가장 높았다. Tween20을 첨가했을 때와 Span80을 첨가했을 때의 마이크로캡슐의 효율은 큰 차이 없이 비슷한 결과를 보여주고 있다. 그리고 상대적으로 3:1의 캡슐에 emulsifiers를 첨가했을 때의 결과보다는 낮은 효율을 보여주고

있다.

Table 5. Effect of the different emulsifiers concentration on microencapsulation efficiency (GA:AIT = 4:1)

Concentration	Emulsifiers	
	Tween20	Span80
0.3%	73.808 ± 3.791%	77.279 ± 5.996%
0.5%	68.270 ± 2.275%	71.421 ± 3.622%
0.7%	78.200 ± 3.061%	78.262 ± 2.687%

Table 6는 5:1의 캡슐에 Tween20과 Span80의 농도를 다르게 첨가했을 때의 결과이다. GA와 AIT의 비율이 5:1인 마이크로캡슐은 Tween20 0.3%나 Span80 0.3%를 첨가했을 때 각각 76.898 ± 4.625%, 76.081 ± 1.616%로 효율이 가장 높았다. 4:1의 캡슐은 Tween20 과 Span80을 0.7% 첨가할 때 가장 높은 효율을 보인 반면에 5:1의 캡슐은 Tween20 과 Span80을 0.3% 첨가 할 때 가장 높은 효율을 보여주었다.

Table 6. Effect of the different emulsifiers concentration on microencapsulation efficiency (GA:AIT = 5:1)

Concentration	Emulsifiers	
	Tween20	Span80
0.3%	76.898 ± 4.625%	76.081 ± 1.616%
0.5%	65.469 ± 4.385%	72.748 ± 1.059%
0.7%	73.122 ± 2.038%	71.136 ± 1.326%

Table 7는 6:1의 캡슐에 Tween20과 Span80의 농도를 다르게 첨가했을 때의 결과이다. GA와 AIT의 비율이 6:1인 마이크로캡슐은 Tween20 0.3%나 Span80 0.5%를 첨가했을 때 각각 $83.341 \pm 1.180\%$, $80.516 \pm 5.516\%$ 로 효율이 가장 높았다. Tween20과 Span80의 농도가 증가할 때 효율이 유의적으로 감소했다.

Table 7. Effect of the different emulsifiers concentration on microencapsulation efficiency (GA:AIT = 6:1)

Concentration	Emulsifiers	
	Tween20	Span80
0.3%	$83.341 \pm 1.180\%$	$80.217 \pm 5.104\%$
0.5%	$80.807 \pm 1.140\%$	$80.516 \pm 5.516\%$
0.7%	$78.765 \pm 5.594\%$	$75.898 \pm 4.414\%$

GA와 AIT의 각 비율에 따라 포함된 AIT의 함량이 다르기 때문에 마이크로캡슐의 효율을 최적화해주는 Emulsifier 종류와 농도는 다르게 결정되어진다. Table 8는 GA와 AIT의 다른 비율에 따라 효율이 가장 높았던 emulsifier의 농도를 보여주고 있다. GA와 AIT가 3:1의 비율로 만들어진 마이크로캡슐은 Tween20 0.5%를 첨가할 때가 최고의 결과를 보여줬고, 4:1의 비율로 만들어진 마이크로캡슐은 Tween20 0.7%를 첨가하는 것이 최적이었다. 5:1의 비율로 만들어진 마이크로캡슐은 Tween20 0.3%를 첨가했을 때가 최적이었으며, 6:1의 비율로 만들어진 마이크로캡슐은 Tween20 0.3%, Span80 0.5%,를 첨가했을 때, 80%이상의 효율을 보이며 최적조건으로 결정되어졌다.

Table 8. The Optimum concentration of emulsifiers

GA : AIT	Conc. of emulsifiers	Efficiency(%)
3:1	Tween20 0.5%	84.656 ± 2.553
4:1	Tween20 0.7%	78.200 ± 3.061
5:1	Tween20 0.3%	76.898 ± 4.625
6:1	Tween20 0.3%	83.341 ± 1.180
	Span80 0.5%	80.516 ± 5.516

3. AIT-Gum arabic(GA) 마이크로캡슐의 물리적 특성

가. AIT-Gum arabic(GA)마이크로캡슐의 크기

AIT 캡슐이 마이크로캡슐로 만들어졌는지 확인하기 위해서 입자의 크기를 측정해야한다. 다음 Table 9은 AIT 마이크로캡슐의 평균 크기의 결과이다. Gum arabic의 비율이 증가할수록 입자의 크기가 $15.74\pm 0.56\mu\text{m}$ 에서 $21.28\pm 0.007\mu\text{m}$ 로 증가하였고, emulsifier를 첨가했을 때 입자의 크기가 증가하는 결과를 보였다. 그러나 emulsifier의 농도에 따라서 입자의 크기가 경향성 있게 변하지 않았다. 전체적으로 AIT의 마이크로캡슐의 크기는 $20\mu\text{m}$ 에서 $40\mu\text{m}$ 로 만들어졌다. 일반적으로 alginate로 만들어진 캡슐은 $100\mu\text{m}$ 이상의 크기로 만들어지는데 이것과 비교했을 때 상당히 작은 크기로 만들어진다는 것을 확인할 수 있었다. 즉, AIT 마이크로캡슐이 $50\mu\text{m}$ 이하의 크기로 만들어진다는 것은 식품산업에 다양하게 적용이 될 수 있다는 것을 의미한다.

Table 9. The mean diameter of AIT-Gum arabic microcapsules

Concentration of Emulsifiers	GA : AIT				
	3:1	4:1	5:1	6:1	
No addition (0%)	15.74±0.56um	19.19±2.072um	18.94±1.344um	21.28±0.007um	
Tween20	0.3%	21.02±0.85um	30.38±8.76um	22.30±0.870um	19.75±0.17um
	0.5%	21.48±0.134um	37.95±6.265um	19.78±1.87um	28.98±5.52um
	0.7%	20.06±3.85um	19.66±0.54um	23.62±1.51um	22.53±0.35um
Span80	0.3%	23.02±0.66um	21.18±0.30um	24.43±0.61um	19.90±0.09um
	0.5%	37.68±3.75um	23.21±0.09um	34.47±5.42um	20.71±0.11um
	0.7%	22.48±0.98um	22.88±1.63um	25.85±1.77um	21.91±0.16um

나. SEM 결과

아래의 Figure 22는 GA와 AIT의 비율을 다르게 하여 제조한 마이크로캡슐의 Scanning electron micrograph 결과이다. 그리고 Figure 22는 Emulsifiers를 첨가했을 때 효율이 가장 높았던 마이크로캡슐 샘플의 Scanning electron micrograph 결과이다.

Figure 22에서 GA와 AIT의 마이크로캡슐의 모양이 전체적으로 구형의 형태보다는 표면이 움푹 파여져서 매끄럽지 못한 형태를 많이 발견할 수 있다. 이것은 분무건조 중에 고온의 공기에 의해 건조되면서 캡슐 안을 차지하고 있던 수분이나 일부 AIT가 휘발되면서 형성되었을 것이다. 그러나 emulsifier를 첨가하게 되면, Figure 23와 같이 표면이 매끄러운 구형의 캡슐을 좀 더 많이 발견할 수 있다. 이것은 분무건조 중에 emulsifier가 AIT의 휘발을 막아주고 plasticizer로서 표면을 매끄럽게 만들어 주기 때문이다. 이러한 표면이 매끄러운 구형의 캡슐은 실질적인 표면적이 작기 때문에 저장기간 동안 AIT의 방출을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 생각되어진다.

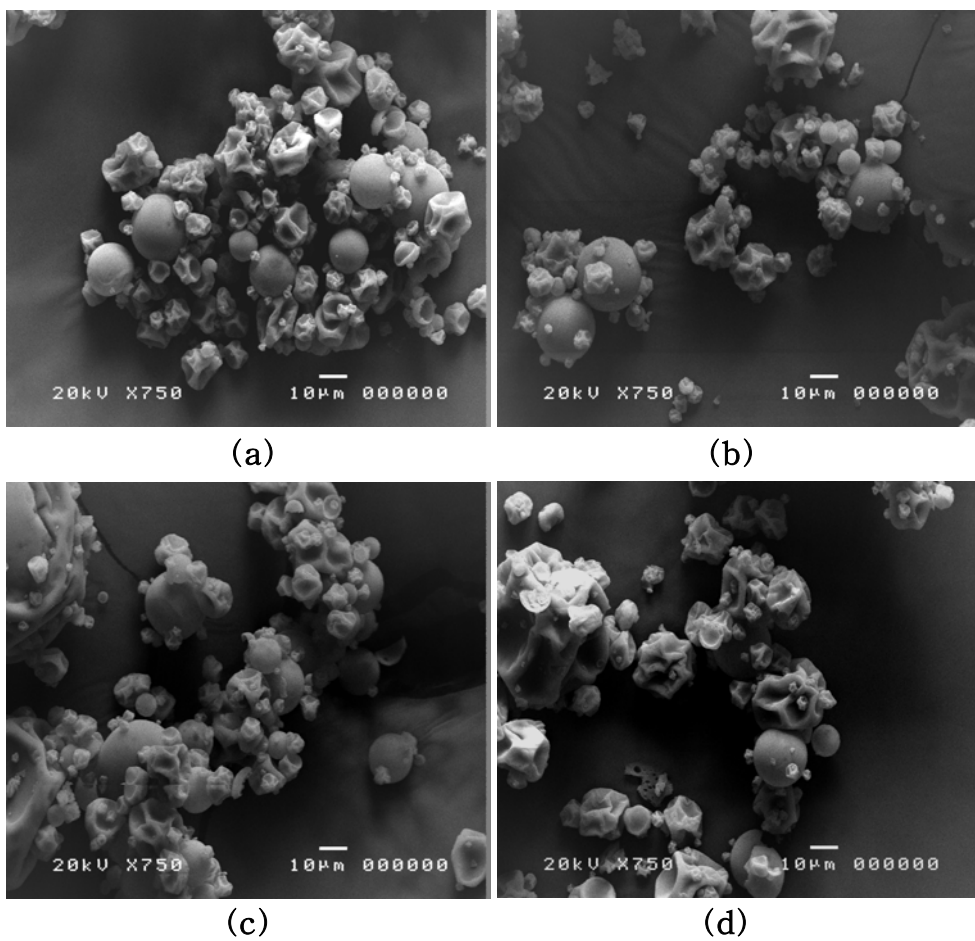


Figure 22. Scanning electron micrograph of microcapsules prepared at the different ratio of GA and AIT (a) GA:AIT = 3:1 (b) GA:AIT = 4:1 (c) GA:AIT = 5:1 (d) GA:AIT = 6:1

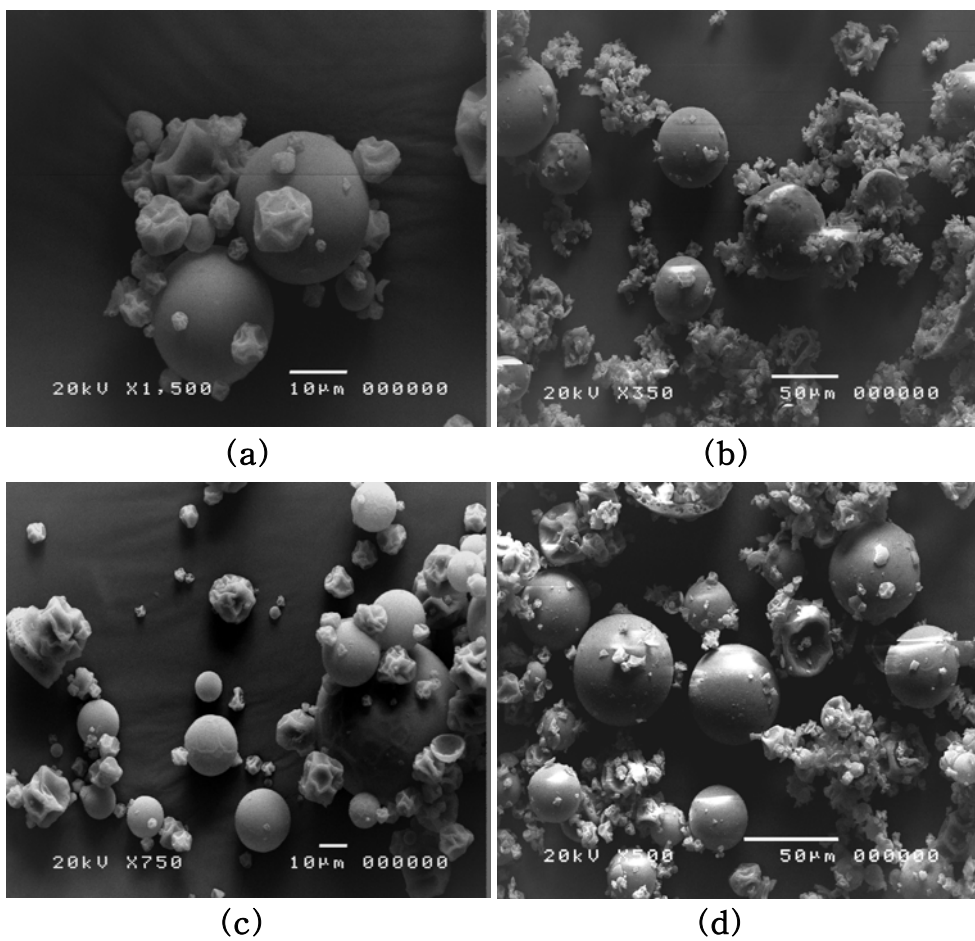


Figure 23. Scanning electron micrograph of microcapsules prepared by adding emulsifiers (a) GA:AIT = 3:1, Tween20 0.5% (b) GA:AIT = 4:1, Tween20 0.7% (c) GA:AIT = 5:1, Tween20 0.3% (d) GA:AIT = 6:1, Tween20 0.3%

4. 저장기간 동안 마이크로캡슐로부터 AIT의 방출 제어 효과

가. 25℃, 상대습도 50%의 저장조건에서 마이크로캡슐로부터 AIT의 방출 특징

25℃, 상대습도 50%에서 20일 이상 AIT 마이크로캡슐을 저장했을 때, AIT가 남아있는 양을 분석하여 AIT의 방출 특징을 알아보았다. 앞선 실험에서 마이크로캡슐 효율이 높았던 캡슐 5 종류를 선택하여 실험을 진행하였다. 즉, GA와 AIT 비율 3:1의 캡슐에 tween20 0.5%를 첨가한 것, 4:1의 캡슐에 tween20 0.7%를 첨가한 것, 5:1의 캡슐에 tween20 0.3%를 첨가한 것, 그리고 6:1의 캡슐에 각각 tween20 0.3%와 span80 0.5%를 첨가한 것을 AIT 방출실험에 적용하였다. 이 다섯 가지 종류의 캡슐은 마이크로캡슐 효율이 75%이상이었으며, 캡슐의 모양도 구형의 매끄러운 표면을 형성하였기 때문에 AIT 방출 실험에 적합하다고 생각한다. 그래서 저장기간 동안 마이크로캡슐에 남아있는 AIT양을 분석하여 Figure 24과 같은 그래프를 얻을 수 있었다.

실험에 적용된 캡슐 모두 25℃, 상대습도 50%에서 23일 동안 75%이상의 AIT가 남아있는 것을 확인할 수 있었다. Tween20 0.7%가 첨가된 4:1 캡슐의 경우, 23일 동안 89.5%의 AIT가 캡슐에 남아있었고, Tween 20 0.3%가 첨가된 6:1 캡슐의 경우, 76.0%의 AIT가 캡슐에 남아있었다.

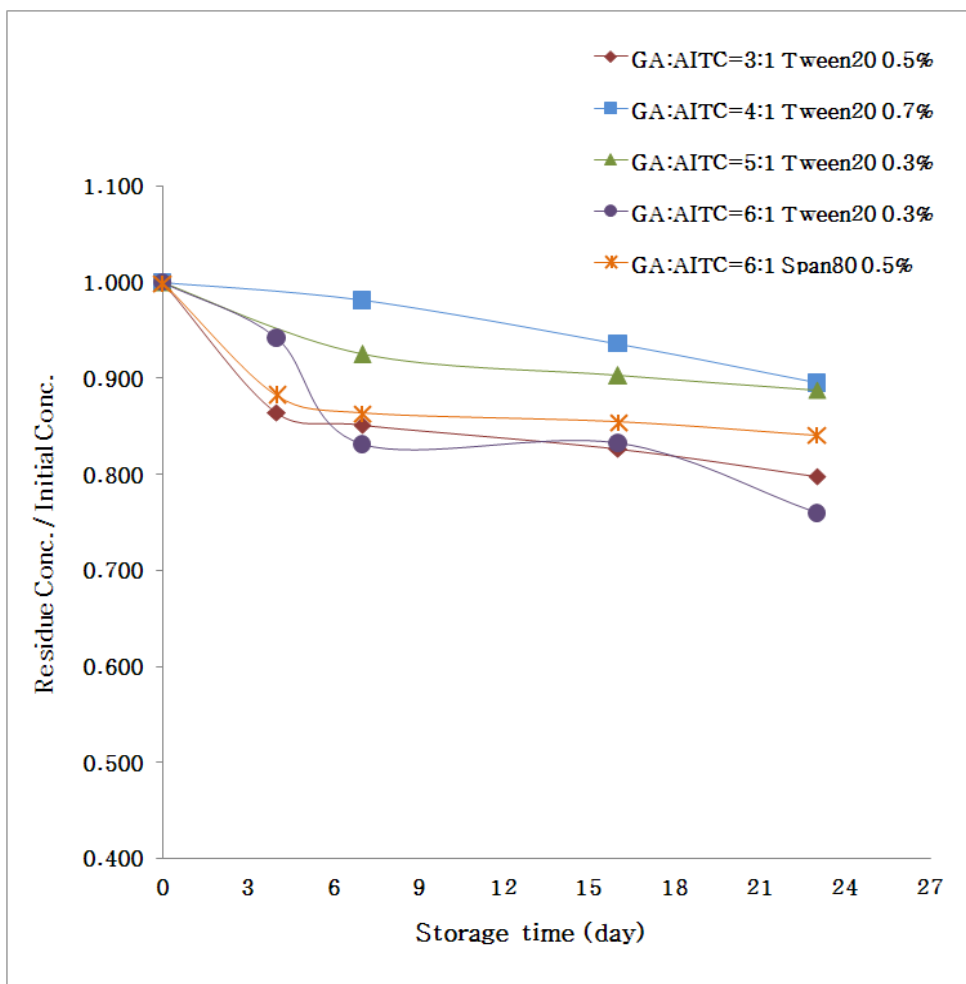


Figure 24. Release time-course of encapsulated AITCs in spray dried powder stored at 25 °C and 50%RH

그런데 AIT의 방출 특징을 알아보고 AIT의 방출을 예측하기 위해서는 그래프의 변형이 필요하다. 그래서 Figure 24의 그래프를 방법에서 설명했던 Avrami equation에 적용을 하게 되면 Figure 25과 같은 그래프를 얻을 수 있다. 캡슐 안에 남아 있는 AIT 비율의 상용로그 값과 시간의 상용로그 값으로 그래프를 그리면 기울기가 release mechanism(n)이고 기울기를 통해서 release rate constant를 구할 수 있다. $n < 1$ 이면 확산의 방법으로 AIT가 방출되고 $n \geq 1$ 이면 1차 반응으로 방출된다고 알려져 있다. Figure 25의 그래프를 통해서 Table 10과 같은 release rate constant와 n (release mechanism)를 얻었고 이 결과를 마이크로캡슐 효율과 비교하였다.

Table 10에서 5 종류의 마이크로캡슐 $n < 1$ 이므로 AIT의 release mechanism이 확산이라는 것을 알 수 있었다. AIT의 방출속도상수는 tween20 0.5%를 첨가한 3:1 캡슐과 Span80 0.5%첨가한 6:1 캡슐이 각각 1.76798×10^{-5} , 3.02602×10^{-8} 로 가장 낮은 값을 나타내고 있다. 즉, 이것은 가장 방출이 느리게 된다는 것을 의미한다. 또한, 이 두 종류의 AIT 마이크로캡슐은 80%이상의 마이크로캡슐 효율을 보여준다. 그러므로 높은 효율로 AIT를 마이크로 캡슐화하고 장기간 보존하기 위해서는 GA와 AIT의 비율을 3:1로 하고 tween20을 0.5% 첨가하거나 GA와 AIT의 비율을 6:1로 하고 Span80을 0.5% 첨가하는 것이 적절할 것이다. 그러나 경제적인 측면에서, GA와 AIT를 3:1의 비율로 하고 tween20 0.5% 첨가하는 하는 것이 적은 양의 GA를 사용하면서 많은 양의 AIT를 캡슐화할 수 있고 장기간 보존이 가능하기 때문에 최적의 마이크로캡슐의 조건이라고 할 수 있다.

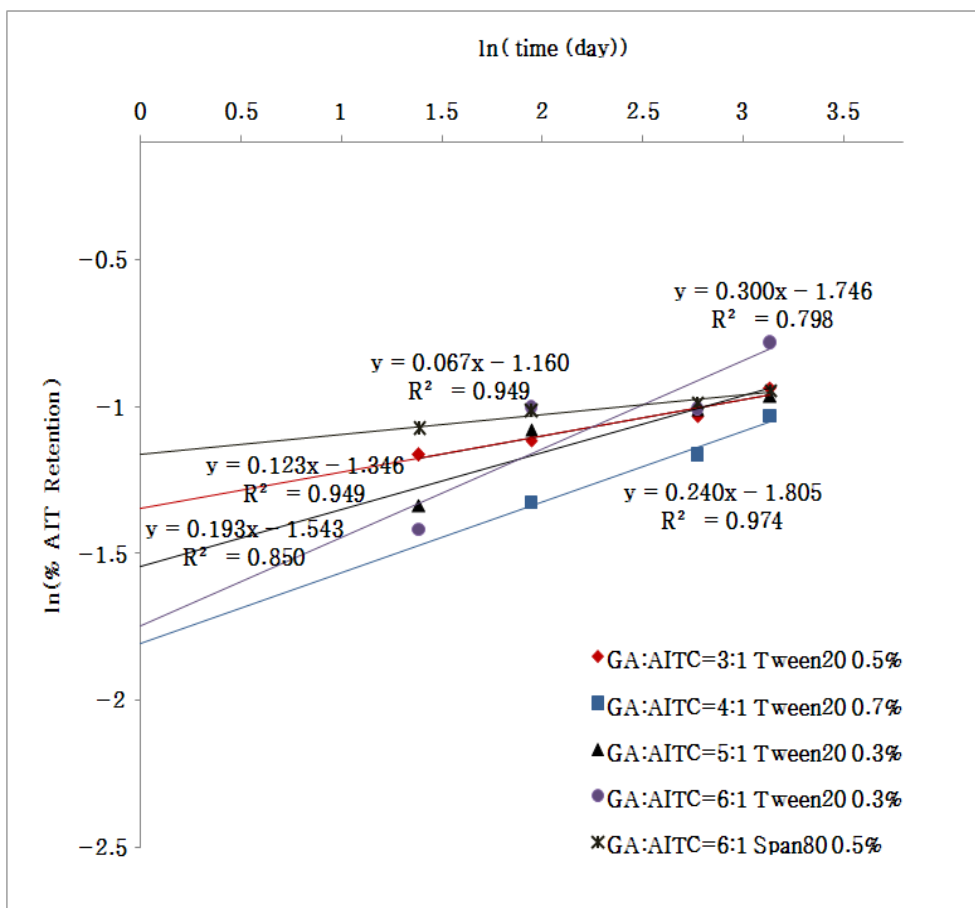


Figure 25. Release kinetics obtained by Avrami's equation

Table 10. Values of Efficiency, Release rate constant, and n on release of AIT from micaocapsules

GA : AIT	Conc. of emulsifiers	Efficiency(%)	Release rate constant	n
3:1	Tween20 0.5%	84.656±2.553	1.76798×10^{-5}	0.123
4:1	Tween20 0.7%	78.200±3.061	5.41681×10^{-4}	0.240
5:1	Tween20 0.3%	76.898±4.625	3.37205×10^{-4}	0.193
6:1	Tween20 0.3%	83.341±1.180	2.967605×10^{-3}	0.300
	Span80 0.5%	80.516±5.516	3.02602×10^{-8}	0.067

나. 25℃, 상대습도 50% 의 저장조건에서 마이크로캡슐의 AIT 반감기

식품산업에 AIT 마이크로캡슐을 적용하기 위해서는 마이크로캡슐 안에서 AIT의 반감기를 구하는 것이 중요하다. Cai & Corke(2000)에 따르면 저장기간 동안 캡슐 안에 남아있는 AIT의 양의 상용로그 값을 취하고 이것을 시간에 따른 semi-log 그래프로 그리게 되면 Figure 26과 같은 결과를 얻게 된다. 이 그래프를 통해서 캡슐의 AIT가 1/2로 줄어드는데 걸리는 시간을 알아 낼 수 있다. 아래의 Table 11은 Figure 26의 그래프를 통해서 구해진 regression equation 와 반감기($t_{1/2}$) 를 보여주고 있다. 아래 5가지 종류 각각의 반감기는 Table 10에서의 release rate constant와 동일한 결과를 보여준다. 즉, 83%의 효율을 보여주고 있는 tween20 0.3%를 첨가한 6:1 캡슐은 반감기가 78.6일로 효율은 높지만 장기간 저장하기에는 어려울 것으로 생각된다. 반면에 release rate constant가 가장 작았던 Span 80 0.5%를 첨가한 6:1 캡슐의 반감기는 285.13일로 40주 동안은 적어도 1/2이상의 AIT가 캡슐 안에 남아있을 것으로 예상된다. 그리고 85%의 마이크로캡슐 효율을 보여주는 Tween20 0.5%를 첨가한 3:1의 캡슐은 140.75일의 반감기를 보여주고 있다. 20주 동안은 적어도1/2이상의 AIT가 캡슐 안에 남아있을 것으로 예상된다. Table 11에 보여주는 각 캡슐의 반감기는 참 고추냉이 추출물을 적용시킬 수 있는 산업에서 유용한 자료로 이용될 것으로 생각된다.

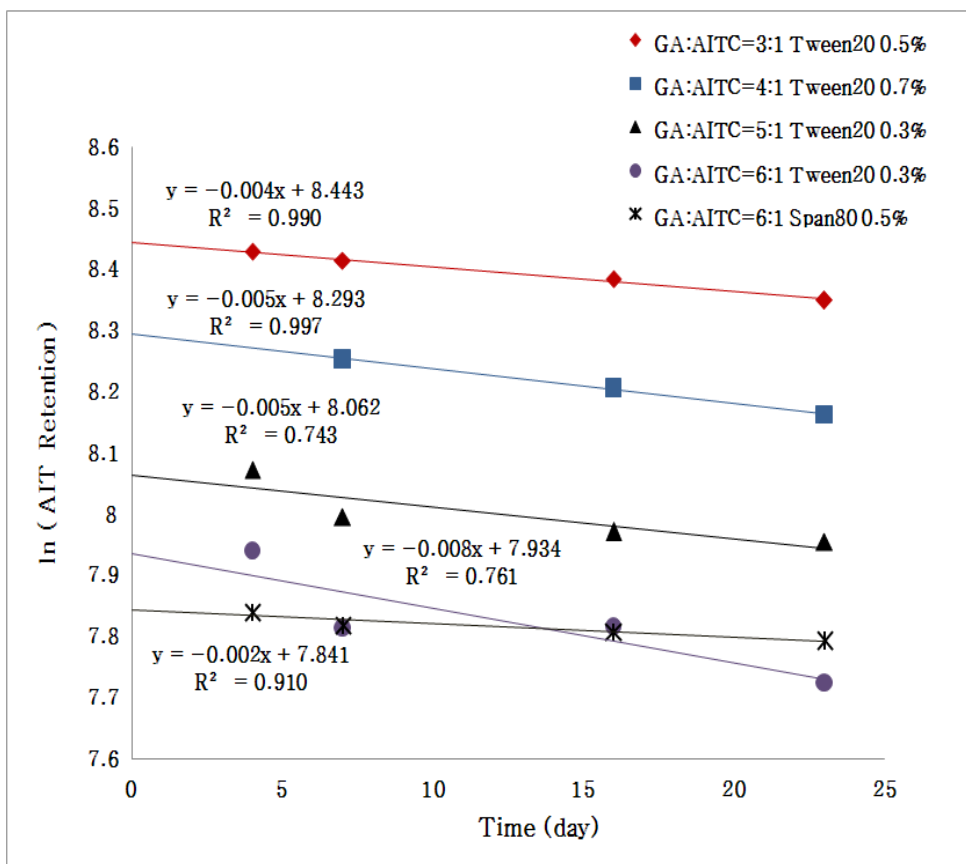


Figure 26. The release kinetics according to Cai & Corke (2000)

Table 11. Values of Efficiency, regression equation, and $t_{1/2}$ on release of AIT from micaocapsules

GA:AIT	Conc. of Emulsifiers	Efficiency (%)	Regression equation	$t_{1/2}$ (days)
3:1	Tween20 0.5%	84.656±2.553	Y=-0.004X+8.4438 R ² =0.99	140.75
4:1	Tween20 0.7%	78.200±3.061	Y=-0.0057X+802935 R ² =0.997	142.98
5:1	Tween20 0.3%	76.898±4.625	Y=-0.0052X+8.0628 R ² =0.744	136.58
6:1	Tween20 0.3%	83.341±1.180	Y=-0.0089X+7.9342 R ² =0.761	78.6
	Span80 0.5%	80.516±5.516	Y=-0.0022X+7.8416 R ² =0.91	285.13

결 론

본 연구의 목적은 참 고추냉이 추출물로부터 고부가가치제품을 만들기 위해서 Allyl Isothiocyanate의 휘발을 막고 장기간 보존이 가능한 AIT 마이크로캡슐을 제조하는데 있다. 이를 위하여 첫 번째 코팅물질인 Alginate를 이용하여 고추냉이 추출물을 캡슐화 하였다. Alginate 캡슐의 크기는 1.8%와 2.0%의 농도에서 적당했으며, 1.8%와 2.0%의 alginate로 만든 필름에서는 1.8% alginate 필름이 인장강도 낮았으나 산소와 수분 투과도가 낮아서 산소와 수분을 차단하는데 적당한 조성으로 선택되었다. 그러므로 1.8%의 Alginate로 만든 캡슐은 산소차단성이 우수하지만 캡슐 제조 과정의 문제점과 alginate와 고추냉이 추출물인 AIT 사이의 화학적인 상호작용이 약하기 때문에 고추냉이 추출물이 캡슐 제조 과정 중에 쉽게 휘발되고 결국 alginate는 마이크로캡슐에 적합하지 않다는 결론을 내리게 되었다.

이를 위하여 AIT와 두 번째 코팅 물질인 Gum arabic의 비율을 조절하고 emulsifiers를 첨가하여 마이크로캡슐의 효율을 높이고 AIT의 Shelf life을 연장할 수 있는 조건을 찾는 것이다. GA와 AIT의 각 비율에 따라 포함된 AIT의 함량이 다르기 때문에 마이크로캡슐의 효율을 최적화해주는 Emulsifier 종류와 농도는 다르게 결정되어진다. GA와 AIT가 3:1의 비율로 만들어진 마이크로캡슐은 Tween20 0.5%를 첨가할 때가 최고의 결과를 보여줬고, 4:1의 비율로 만들어진 마이크로캡슐은 Tween20 0.7%를 첨가하는 것이 최적이었다. 5:1의 비율로 만들어진 마이크로캡슐은 Tween20 0.3%를 첨가했을 때가 최적이었으며, 6:1의 비율로 만들어진 마이크로캡슐은 Tween20 0.3%, Span80 0.5%,를 첨가했을 때, 80%이상의 효율을 보이며 최적조건으로 결정되어졌다.

저장기간 동안 AIT의 방출 특징을 알아본 결과, 높은 효율로 AIT를 마이크로캡슐화하고 장기간 보존하기 위해서는 GA와 AIT의 비율을 3:1로 하고 Tween20을 0.5% 첨가하거나 GA와 AIT의 비율을 6:1로 하고 Span80을 0.5% 첨가하는 것이 적절할 것이다. 캡슐에서의 AIT의 반감기를 계산해본 결과, Span 80 0.5%를 첨가한 6:1 캡슐의 반감기는 285.13일로 40주 동안은 적어도 1/2이상의 AIT가 캡슐 안에 남아있을 것으로 예상된다. 그리고 Tween20 0.5%를 첨가한 3:1의 캡슐은 140.75일의 반감기를 보여주고 있다. 그러나 경제적인

측면에서, GA와 AIT를 3:1의 비율로 하고 tween20 0.5% 첨가하는 하는 것이 적은 양의 GA를 사용하면서 많은 양의 AIT를 캡슐화할 수 있고 장기간 보존이 가능하기 때문에 최적의 마이크로캡슐의 조건이라고 할 수 있다. 그리고 table 11에 보여주는 각 캡슐의 반감기는 참 고추냉이 추출물을 적용시킬 수 있는 산업에 유용한 자료로 이용될 것으로 생각된다.

제 3 절 고추냉이 추출물 마이크크로캡슐을 이용한 김의 저장 및 항균제품 제작 (3세부 위탁과제: (주)바이오코트)

서 론

국민 수준이 향상되고 사회구조가 다양하게 변화함에 따라 우리의 식생활양식도 변화하여 간편성을 추구하게 되면서 편의식품 등의 인기는 높아져간다. 이러한 추세에 따라 유통구조가 단순화, 전문화됨에 따라 체인점을 가지고 있는 식품전문담당업체의 수도 날로 증가하고 있으며 체인점을 중심으로 그 판로가 확대되고 있다. 그 중 대표적인 즉석조리식품(ready-to-eat-cook food)인 김밥은 영양을 고루 갖춘 도시락 또는 간식으로써 일상에서 쉽게 구입하여 섭취하는 것이 일반화되어 있기 때문에 그 공급과 수요가 증가되고 있다.

김밥 제조 시 필요한 재료 중 건조 김의 경우 해수, 공기 및 제조과정 중의 2차 오염 등에 의하여 10^6 CFU/g 내외의 미생물이 분포하는데 이는 김을 굽는 과정에서도 사멸되지 않아 위생상 문제가 되고 있다. 김은 높은 영양가와 독특한 풍미를 함유하고 있는 대표적인 해조가공품이다. 그러나 생산시기, 장소, 제조방법 및 저장조건에 따라 품질이 매우 다양하지만, 그 중 저장유통 조건 등이 적당하지 않으면 품질이 쉽게 변색되어 색택이나 향미 등이 나쁘게 되고, 내용물에 서식, 기생하는 세균류 및 미생물의 서식으로 인해 품질이 저하된다. 따라서 김의 저장에 있어 무엇보다도 세균류 및 미생물의 서식, 기생을 억제하는 것이 중요하다. 이와 같은 문제를 해결하기 위한 기존연구의 결과, 색소 함량을 낮추기 위해 열처리 온도를 낮추거나 색소변화 방지를 위해 항산화제를 처리하는 연구가 있었다. 그러나 상기와 같은 연구에서는 건조 김의 일정기간 저장 중 품질특성에 따른 결과를 찾아 볼 수 없었다.

그러므로 본 연구에서는 우리나라 즉석식품 대표 격인 김밥의 주재료인 건조 김의 미생물학적 안전성과 유통보존성의 향상을 위해 항균스펙트럼이 넓은 고추냉이 추출물을 이용하였다. 고추냉이는 십자화과(十字花科)에 속하는 식물로

일본산 고추냉이(*Wasabia japonica*)와 서양산 고추냉이(*Cochlearia armoracia*)로 분류된다. 일본산 고추냉이는 와사비(한국명, 참 고추냉이)로도 명명되고 주로 그 뿌리가 향신료로서 사용되고 있다. 고추냉이의 활성은 세포 내에 존재하는 iosthiocyanate 배당체 Sinigrin이 파쇄 될 때 가수분해효소인 myrosinase에 의하여 가수 분해되어 생산되는 iosthiocyanate류에 기인한다. 특히, 고추냉이의 항균활성은 주로 휘발성 성분인 Allylthiocyanate (AIT)를 주성분으로 하는 iosthiocyanate(R-N=C=S)에 의하여 발휘된다. 상기 AIT 이외에도 배당체의 R기가 서로 다른 여러 가지 iosthiocyanate 존재하는데, 주로 고추냉이의 뿌리와 잎에 많이 함유되어 있는 6-methylsulphyhexyl iosthiocyanate(6-MeS-NCS)는 간장에서 화학적 스트레스를 억제하거나 종양 형성 초기단계에서 이들의 형성을 억제하는 효소인 Glutathione S-transferase와 quinone reductase의 활성을 상승시키는 작용도 있는 것으로 밝혀져 있다.

이러한 다양한 생리활성으로 인하여 고추냉이는 신선도나 보존성을 개선하기 위한 목적으로 식품에 주로 적용되어 왔다. 예를 들면, 대한민국 공개특허 제 2002-26929호에서는 고추냉이 추출물을 함유하는 육류의 신선도 유지제가 개시되어 있으며, 대한민국 공개특허 제 2003-94194호에는 김치의 보존성을 향상시키기 위하여 김치의 주원료와 양념이외에 고추냉이를 첨가하여 제조한 와사비 김치가 개시되어 있다. 또한, 고추냉이는 식품 이외에도 비누나 치약 등에 적용되고 있다. 예를 들어, 대한민국 공개특허 제 2003-46545호에는 고추냉이 추출물을 함유하는 향균 비누가 개시되어 있으며, 대한민국 공개특허 제 2003-64902호에는 고추냉이 추출물을 함유하는 향균 치약이 개시되어 있다.

고추냉이의 항균활성성분 Allylthiocyanate (AIT)는 콜레라균, 장티푸스균과 같은 식중독 세균, 기타 식품의 산패와 관련된 병원성 효모 등의 부패균, 위염 또는 위궤양의 원인균으로 알려져 있는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 등에 대하여 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히, 식품의 빵, 떡 등의 부패하는 방부제 역할을 할 수 있을 뿐만 아니라, 고추냉이 잎, 줄기를 김치와 버무려 담가두면 김치의 신맛을 막아준다. 해충의 박멸에 이용할 수 있으며, 비린내 나는 생선에 넣어두면 파리가 날아오지 않고 오징어 쇠고기 등의 육류의 신선도를 오래 유지할 수 있다. 고추냉이는 음식을 오래 보관하

면 특 쏘는 매운맛(Sinigrin) 성분으로 미생물의 억제력을 막아 음식을 오래 보관할 수 있고, 일반농가에 보급하여 농가 소득증대 사업 작물로 각광을 받고 있다.

우리나라와 일본에서는 생선회나 생선초밥과 함께 섭취하는 것이 일반화되어 있다. 특히, 일본의 경우 줄기를 이용한 여러 가공식품(차, 소시지, 아이스크림, 마요네즈, 비스킷, 된장 등)이 개발되어 판매되고 있다. 현재까지 고추냉이의 각종 유효 효능성에 대한 연구가 많이 보고되어 왔기 때문에 앞으로 이들 소재에 대한 수요가 급증할 것으로 예상된다. 그러나 고추냉이 추출물의 주요 성분인 AIT는 항균력은 강하나 휘발성이기 때문에 그 효능의 지속성이 떨어지며 특정 포장상태에서 그 효력을 나타내는 단점을 갖고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 고추냉이 추출물을 알긴산으로 코팅하여 온도나 pH에 따른 AIT의 전이속도도 조절하기 위하여 미세비드를 제조하였으며 이를 이용한 항균 patch를 제조하여 김의 포장지 내에 부착시켜 김의 미생물생육억제를 통한 색깔의 변화 및 이취발생을 억제하였다 이는 국내에서 이들 소재의 경쟁적인 제품 개발 및 고부가가치의 제품을 개발함으로써, 외국의 제품과 상품경쟁력을 갖출 수 있으리라 기대된다.

재료 및 방법

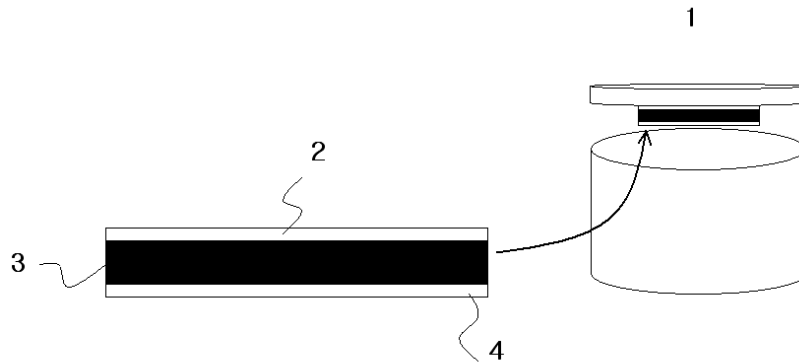
1. AIT추출액을 이용한 항균 Patch 제작

가. 재료

AIT(Allyl isothiocyanate) 추출 농축액, PE(폴리에틸렌)필름, 접착제, LDPE(저밀도폴리에틸렌)필름을 사용하였다.

나. 방법

PE(폴리에틸렌)필름과 LDPE(저밀도폴리에틸렌)필름 사이에 고추냉이의 항균 성분 중의 하나인 AIT 추출 농축액 100 μ l를 40mm의 지물이나 부직포에 흡착시킨다. 이를 외포하여 김이 직접 접촉되는 포장지 내면을 PE(폴리에틸렌)필름 상부에 부착시켜 구조를 형성하였다.



- 1 : 향균 patch를 뚜껑에 부착한 식품용기
- 2 : PE(폴리에틸렌)필름, 접착제
- 3 : AIT(Allyl isothiocyanate) 수 추출 농축액
- 4 : LDPE(저밀도폴리에틸렌)필름

그림 1. 고추냉이 추출물을 포함 한 향균 patch와 용기의 모식도

2. 향균 patch를 이용한 김의 저장

가. 재료

원료 김은 전남 완도산 김을 사용하였고, 외 포장지는 PE(폴리에틸렌)필름, patch 포장은, PE(폴리에틸렌)필름, LDPE(저밀도폴리에틸렌)필름을 사용하였다. patch의 향균 성분은 AIT(Allyl isothiocyanate) 추출 농축액이다.

나. 방법

김은 220mmx170mm 크기로 세절하고, patch는 PE(폴리에틸렌)필름과 LDPE(저밀도폴리에틸렌)필름 사이에 고추냉이의 향균 성분 중의 하나인 AIT 추출

농축액 함량별 100~1,000 μ l를 40mm의 지물이나 부직포에 흡착시킨다. 김은 외 포장지 PE(폴리에틸렌)필름에 넣고, patch는 포장지 내면상부에 부착시켜 저장 구조를 형성하였다.



그림 2. 고추냉이 추출물 patch를 이용한 김의 항균포장

3. AIT추출액비드를 이용한 항균 제품제작

가. 항균 비누

1) 재료

비누베이스(Aqua, Soap, Glycerine, Sorbitol, Sodium Laury Sulfate, Sodium Chloride, Stearic Acid, E.D.T.A, Calming Oil, MMP)와 AIT(Allyl isothiocyanate)와 AIT(Allyl isothiocyanate) 추출 농축액을 사용하였다.

2) 방법

가) 배합 및 용해

Mixing Tanker기에 비누베이스(Aqua 20.0~22.0%, Soap 40.0~45.0%, Glycerine

11.0~14.0%, Sorbitol 9.5~10.2%, Sodium Laury Sulfate 7.0~7.8%, Sodium Chloride 0.5%, Stearic Acid 1.5~1.8%, E.D.T.A 0.1%, Calming Oil 0.5%, MMP(0.5%)와 AIT(Allyl isothiocyanate) 추출 농축액 0.24~0.74%를 배합(65℃)하고, 용해(85℃)하였다.

나) 원액 주입 및 경화

Bar cylinder set기에 주입(주입온도 60℃±1℃)하고, 20℃±7℃에서 24h±10h 경화시켰다.

다) Bar 분리

Extrusion machine기에 압축력 5Kg에서 변형이 없도록 하여 Bar와 비누를 분리하였다.

라) 성형 및 포장

Cutting machine기로 성형 중량 500g±3g 외형을 유지, Wrap cutter기로 절단 후 진공포장하였다.

나. 향균 치약

1) 재료

치약베이스(글리세롤인산칼슘, 비타민 B6, 염산파라독신), 일불소인산나트륨, 침강탄산칼슘과 AIT(Allyl isothiocyanate) 추출 농축액을 사용하였다.

2) 방법

가) 원료수입검사

치약 완제품 구입 (LG화학)

나) 용해 및 배합

호바트믹서에 치약베이스(글리세롤인산칼슘, 비타민 B6, 염산파라독신), 일불소인산나트륨, 침강탄산칼슘을 50℃에서 용해시킨 후, AIT(Allyl isothiocyanate) 추출 농축액 0.5~3%를 투입하여 5min간 교반하였다.

다) 포장

일반적인 합성수지나 알루미늄 등의 튜브형 용기에 일정량을 포장하였다.

다. 향균 핸드크림

1) 재료

크림베이스(Diwater, Glycerin, Disodium EDTA, Methyl Paraben, Cetanol, Glyceryl Stearate, Mineral Oil, Jojoba Oil, Caprylic/Capric Triglyceride, Palm Oil, Tocopheryl Acetate, Cetyl Octanoate, Propylparaben, Polysorbate 60, Sorbitan Stearate, Glyceryl Stearate SE, Sodium Acrylate, Acryloyldimethyl taurate copolymer, Isohexadecane, Polysorbate 80, Sodium hyaluronate(1%)) 와AIT(Allyl isothiocyanate) 추출 농축액을 사용하였다.

2) 방법

가) 1차 계량 및 유화

Glycerin 3.0~6.0%, Disodium EDTA 0.02%, Methyl Paraben 2.0%를 계량하여 70~80℃로 가온시켜, Homogenizer기로 5min 1차 유화시킨다.

나) 1차 계량, 용해 및 유화

Mineral Oil 3.0~6.0%, Caprylic/Capric Triglyceride 2.0~5.0%, Jojoba Oil 2.0~5.0%, Cetyl Octanoate 2.0~5.0%, Palm Oil 1.0~3.0%, Polysorbate 60 1.0~2.0%, Glyceryl Stearate SE 0.5~1.5%, Sorbitan Stearate 1.0~2.0%, Tocopheryl Acetate 0.1~0.5%, Propylparaben 0.1%를 용해하여 1) 단계에 투입시킨 후 Homogenizer기로 5min 2차 유회시킨다.

다) 1차 혼합 및 교반

Homo Mixer기에 Sodium Acrylate / Acryloyldium taurate copolymer / Isohexadecane / Polysorbate 80 1.0~3.0%, Diwater 28~30%와 AIT(Allyl isothiocyanate) 추출 농축액 0.1~0.3%를 서서히 투입시키고 3,000ppm, PM 30rpm, 3min로 1차 혼합 교반하여 균일하게 분산시킨다.

라) 2차 혼합 및 교반

3) 단계에 Sodium hyaluronate(1%) %를 PM 30rpm로 2차 혼합 교반한다.

결과 및 고찰

1. AIT추출액을 이용한 항균 Patch 제작 및 이를 이용한 김의 저장

가. 건조 김의 총균수 측정

김의 미생물 억제는 Agar well diffusion법으로 측정하였다. 일반 PE 재질의 포장비닐 상부에 부착한 AIT 추출 농축액 함유(100, 500, 1,000 μ l) patch를 25 $^{\circ}$ C에서 이틀 보관 후, paper disc로CFU(Colony Forming Unit)/g 식에 따라 미생물 수를 측정하였다. 시험은 매 시험시 3회 반복하여 실시하였다. 측정 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. AIT 함량에 따른 김의 미생물 측정 (단위 : CFU/g)

Sample	Total Colony Forming Unit
A	4,300
B	6,800
C	2,200
D	2,000
E	100
F	92

A : Control (무처리)

B : H₂O 10ml Spray 용기 보관

C : AIT 추출 농축액 50 μ l 함유 patch 부착 용기 보관

D : AIT 추출 농축액 100 μ l 함유 patch 부착 용기 보관

E : AIT 추출 농축액 500 μ l 함유 patch 부착 용기 보관

F : AIT 추출 농축액 1,000 μ l 함유 patch 부착 용기 보관

전체적인 맛, 색깔, 식감에 있어서는 AIT patch 처리구와 무처리구에 있어 현

저한 차이는 볼 수 없었으나, 총균수를 감소시키는데 효과가 있었으며, 총균수의 감소경향은 AIT 처리농도에 상관관계가 있음을 알 수 있다. 총균수의 경우 무처리 김에서는 4.3×10^3 CFU/g이 검출되는데 비해 AIT 추출 농축액 1,000 μ l patch로 처리한 건조 김은 0.92×10^2 CFU/g 검출되어 균체수가 약 1/45 감소함을 알 수 있었다.

나. 수분함량에 따른 AIT 활성

AIT 항균력에는 김의 수분함량이 영향을 끼친다는 것을 알 수 있었다. AIT 추출 농축액 100 μ l을 함유한 patch에 H₂O Spray 분사량을 100 μ l, 500 μ l, 1ml, 5ml, 10ml로 정하여, 25 $^{\circ}$ C에서 이를 보관 후, 김의 수분함량에 따른 미생물 수를 측정하였다. 측정 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. 수분함량에 따른 AIT 활성 (단위 : CFU/g)

Sample	Total Colony Forming Unit
A	918
B	6,500
C	890
D	560
E	1,730
F	1,110
G	7,779

A : 마른건조

B : H₂O 10ml 용기 보관

C : H₂O 0.1ml, AIT 추출 농축액 100 μ l 함유 patch 부착 용기 보관

D : H₂O 0.5ml, AIT 추출 농축액 100 μ l 함유 patch 부착 용기 보관

E : H₂O 1ml, AIT 추출 농축액 100 μ l 함유 patch 부착 용기 보관

F : H₂O 5ml, AIT 추출 농축액 100 μ l 함유 patch 부착 용기 보관

G : H₂O 10ml, AIT 추출 농축액 100 μ l 함유 patch 부착 용기 보관

Patch에 AIT 함유량은 100 μ l로 고정시키고, 수분함량을 ~ %로 달리하여 포장하고 세균수를 측정하였다. 수분함량이 낮은 상태에서 보관하는 것이 매우 바람직한 것으로 판단되었다. 총균수의 경우 무처리 김에서는 9.18×10^2 CFU/g, H₂O 10ml 분사하여 보관한 김에서는 6.5×10^3 CFU/g이 검출된데 비해 H₂O 0.5ml, AIT 추출 농축액 100 μ l 함유 patch 보관으로 처리한 건조 김은 5.6×10^2 CFU/g 검출되어 마른건조 김보다는 균체수가 약 1/6 감소함을 알 수 있었다.

2. AIT추출액 마이크로캡슐을 이용한 향균 제품제작

가. 향균 비누



그림 4. 고추냉이 추출물을 포함한 향균 비누

나. 항균 치약



그림 5. 고추냉이 추출물을 포함 한 항균 치약

다. 항균 핸드크림



그림 6. 고추냉이 추출물을 포함 한 항균 핸드크림

결 론

식품의 저장 시 항균 patch는 기존포장재의 사양과 설비의 개조 없이 포장 공정 중에 고추냉이 추출물을 함유한 항균 patch를 포장재 상단에 부착하여 구성함으로써, 항균 성분의 증기가 LDPE(저밀도폴리에틸렌)필름 통기 구멍을 투과하여 외부 분위기중으로 유출되어, 포장의 내면 또는 식품의 내용물에 서식, 기생하는 세균류 및 미생물의 서식을 방지하여 내용물의 선도 유지 및 저장 또는 유효기간을 연장할 수 있는 등 공기 중이나 식품 표면을 포함한 실용상 높은 항균 효과와, 식품의 영양소면도 포함한 보존 성능이 얻어진다. 고추냉이의 항균활성성분 AIT를 함유한 patch로 처리할 보관 할 경우 처리하지 않은 시료에 비하여 미생물의 억제 등 항균력을 보였다. 이와 같은 patch를 포장 현장적용 기술에 접목시킬 경우 식품의 포장에 사용되고 있는 기존의 세균 또는 미생물 번식 등을 완화시킬 수 있을 것이라 판단된다.

결론적으로 종합해 보면, 고추냉이의 항균활성성분 Allyl isothiocyanate(AIT)는 식중독 세균, 부패균 등에 대하여 항균활성을 나타냈다. 또한, 식품의 부패하는 방부제 역할을 할 수 있을 뿐만 아니라, 어류의 비린내를 없애줌과 동시에 그 맛을 상승시키는 작용을 가지고 있으며, 항산화활성, 항균활성 등의 효과를 나타냈다.

최근 환경 및 사회변화와 함께 암, 성인병 등의 발생률 증가와 더불어 노령화 추세에 따라 건강 요구형 식품의 수요는 증가추세이고, 식품산업에서는 천연기능성물질들이 주목을 받고 있으며 그 수요도 날로 급증하는 추세이다. 장기간 보관이 가능하며 다양한 식품 산업에 응용할 수 있도록 고추냉이 추출물 미세캡슐 비드를 함유한 제품 개발은 시대적 요구사항이 되고, 이들의 욕구를 충족시키는 특수식품의 수요는 앞으로도 급격히 증가할 것이다.

따라서 이 같은 고추냉이 미세 캡슐 비드를 이용한 제품의 다양화를 위한 수용화 및 제품화 개발에 목적으로 두었으며, 이를 천연항산화제 및 천연식품보존료, 다양한 가공식품에 응용하고, 생산된 제품의 생리활성 및 항균기능을 구명하였다. 이는, 고추냉이 폐기자원의 유효이용으로 농가수익의 향상과 첨가물 관련 산업의 발전과 국내 식품산업의 해외 진출에도 기여할 수 있을 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	세부	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	1세부	고추냉이로 부터 isothiocyanate류 추출을 위한 최적 추출 시스템 및 조건 확립	최적 추출조건 확립
		고추냉이 추출물의 항균활성 평가	Isothiocyanate류의 정량 분석법 개발 및 확립
	2세부	천연고분자 생산 및 선정 (식물성 및 동물성 생고분자 선발, 내산성 및 물성이 우수한 소재 개발)	고산소차단 고분자 생산
		마이크로캡슐 제조	마이크로 캡슐 제조
	3세부	고추냉이 추출물 미세 캡슐 비드를 이용한 제품 공정 개발	제품공정개발
		공정 개발에 따른 다양한 형태의 소재 생산 Pilot 설계	소재 생산 pilot 설계
2차 연도	1세부	고추냉이의 항균성분 대량생산을 위한 pilot 추출 시스템 개발	대량생산을 위한 추출 모델 개발 및 정립
		고추냉이 추출물 미세 캡슐 비드를 이용한 식품 및 건강기능 식품 개발 및 생산	Film 형태의 항균 patch 시제품 제작
	2세부	마이크로 캡슐 크기 조절방법 개발	사이즈가 조절된 마이크로 캡슐 제조
		Controlled released에 영향을 주는 인자	마이크로캡슐의 포장효율 및 방출실험
	3세부	생산 제품의 효능 및 우수성 검증과 적용 가능 범위 확대	응용 제품의 우수성 검증
		개발된 제품의 상품성에 대한 평가	캡슐 비드 이용한 건강기능 식품 개발
최종 평가	1세부	고추냉이 생리활성성분 대량생산	대량생산을 위한 추출 모델 개발 및 정립
	2세부	마이크로캡슐 효율성 및 크기조절	마이크로캡슐의 포장효율 제고 및 최적화
	3세부	고추냉이 추출물 미세캡슐 시제품제작	제품 생산 공정 확립 및 pilot 생산

제 1 절 고추냉이로부터 isothiocyanate류 추출을 위한 최적 추출 시스템 및 조건 확립과 고추냉이 추출물의 항균 활성 분석 (협동과제)

연구목표 : 고추냉이 생리활성성분 대량생산

1) 고추냉이로 부터 isothiocyanate류 추출을 위한 최적 추출 시스템 및 조건 확립 Horseradish

뿌리분말 200 g과 증류수 550 mL를 혼합한 후, 40°C에서 효소반응을 시켰을 때, 혼합액의 AIT 농도가 가장 높았다. 효소반응이 끝난 혼합액을 각 온도에서 30, 60, 90, 120, 150, 180분간 추출한 후, 이를 원심분리 하여 하층에 가라앉은 essential oil을 주사기를 사용하여 원심관으로부터 분리하고 그 농도를 측정 한 결과, 120°C에서 120분간 가열하였을 때, AIT의 농도가 가장 높았다.

2) 고추냉이 추출물의 항균활성 평가

ITC의 항균활성을 측정하였을 때 ITC는 그람 양성균과 음성균 모두에 대하여 항균활성이 있었으며, 특히 충치균인 *Streptococcus mutans*와 병원성대장균 O157, 그리고 수산식품에서 문제가 되고 있는 장염비브리오균과 비브리오 패혈증균에 특히 강한 항균활성을 나타내었다. 그리고 생균수, 화학적 평가, 물리적 평가, 관능적 평가 결과를 종합하면, 200ppm과 300ppm의 ITCs를 첨가한 두부의 shelf-life가 각각 최소 4일, 6일 연장됨을 알 수 있었다. ITCs를 첨가한 PE patch의 경우 식빵과 생선포장에 있어 shelf-life 연장효과가 있는 것을 알 수 있었다.

3) 고추냉이의 항균성분 대량생산을 위한 pilot 추출 시스템 개발

Horseradish로부터 고농도, 고수율의 ITCs를 대량을 추출하기 위하여 Fig. 12와 같은 pilot system을 제작하였으며 하였다.



Fig. 12. Pilot system for extraction of high concentration and high yields of ITCs from horseradish.

실험실 규모에서의 추출방법을 기초로 하여, horseradish 뿌리 분말 1,000 g과 증류수 2800 mL를 섞고, 40℃에서 120분간 효소반응시킨 후, 120℃에서 120분간 추출한 추출액을 원심분리하여 essential oil을 분리한 결과, AIT 660,000 ppm의 ITCs 용액 15 mL를 얻을 수 있었다. 이를 중량으로 계산하면 9.9 g의 AIT를 추출한 것이 되며, horseradish 뿌리 분말 1,000 g은 원물 2,780 g이므로 여기에는 27.8g의 AIT가 함유되어 있다 따라서 pilot system으로 추출한 ITC의 수율은 35.6%(9.9÷27.8)로 실험실 규모에서의 결과보다 약 11.2% 높았다.

4) 고추냉이 추출물 미세 캡슐 비드를 이용한 식품 및 건강기능 식품 개발 및 생산

Horseradish로부터 추출한 ITCs 용액을 캡슐화하여 agar well method로 그 항균효과를 측정된 결과, ITCs 함유 캡슐은 positive control(ITCs 원액)보다는 항균효과가 낮게 나타났으며, 병원성 대장균 O157(*E. coli* O157:H7, clear zone, 1.5 cm)보다 비브리오 패혈증균(*V. vulnificus*, clear zone, 2.0 cm)에 대하여 강한 항균효과를 나타내었다. Horseradishi로부터 추출한 ITCs를 캡슐화하여 gel type의 비누에 첨가한 항균 액체비누 시제품의 병원성대장균 O157과 비브리오 패혈증균에 대한 항균효과를 측정된 결과, ITCs 캡슐을 함유한 비누로 손을 세척한 그룹의 경우, 5% 첨가구부터 균의 감소가 나타나기 시작하여 10% 첨가구에서는 1명을 제외한 모두에서 균이 검출되지 않았으며, 비브리오 패혈증균에 대한 살균효과가 병원성대장균 O157보다 약간 강하게 나타났다. 여드름

균(*Propionibacterium acnes*)에 대한 ITCs의 항균활성은 ITCs를 1,000 ppm, 1,500 ppm 및 2,000 ppm을 처리한 실험구에서 강한 항균 활성을 나타내었다. 또한, 고추냉이 추출물이 in vitro 실험에서 항염활성을 가지는 것을 알 수 있었다.

제 2 절 고추냉이 추출물인 Allyl isothiocyanate(AIT)의 마이크로캡슐화 기술 개발 및 저장기간 동안 캡슐로부터 방출효과 분석 (세부과제)

연구목표 : 마이크로캡슐 효율성 및 크기조절과 방출실험

1) 천연고분자 생산 및 선정 (식물성 및 동물성 생고분자 선별, 내산성 및 물성이 우수한 소재 개발)

첫 번째 코팅물질로서 alginates는 물리적 특성과 캡슐의 효율을 분석한 결과 산소차단성이 우수하지만 캡슐 제조 과정의 문제점과 alginate와 고추냉이 추출물인 AIT 사이의 화학적인 상호작용이 약하기 때문에 고추냉이 추출물이 캡슐 제조 과정 중에 쉽게 휘발되고 결국 alginate는 마이크로캡슐에 적합하지 않다는 결론을 내리게 되었다.

결국, 고추냉이 추출물인 AIT와 화학적인 상호작용으로 코팅해 줄 수 있는 다른 물질을 찾아야 했고 향기물질을 마이크로캡슐화하는데 널리 이용되고 있는 물질인 Gum arabic을 이용하여 AIT-마이크로캡슐을 만들었고 효율을 높여주기 위해서 emulsifier, tween20과 span80을 첨가하였다. Tween20은 대표적인 수용성 유화제이고 span80은 대표적인 지용성 유화제인데 gum arabic과 AIT의 비율에 따라 효율을 최대화 시킬 수 있는 유화제를 선택하고 유화제의 농도를 결정할 수 있을 것이다.

2) 마이크로캡슐 제조

Alginate와 Gum arabic을 이용하여 마이크로캡슐을 제조하였다. Table 9, Figure 18, 22, 23에서 확인할 수 있다.

3) 마이크로캡슐 크기 조절방법 개발

Figure 13에서와 같이 Alginate농도 조절을 통해서 마이크로캡슐의 크기를 조절했고 Table 9에서와 같이 Gum arabic과 AIT의 비율과 emulsifier, tween20과 span80의 농도 조절을 통해서 크기를 조절하였다.

4) Controlled released에 영향을 주는 인자: 마이크로캡슐의 포장효율 및 방출 실험

Alginate 캡슐은 그 효율이 매우 낮았다. 그리고 Gum arabic 캡슐의 경우, GA와 AIT의 비율과 emulsifier첨가가 마이크로캡슐 효율과 AIT의 방출에 영향을 주었다. 그 결과는 GA와 AIT를 3:1의 비율로 하고 tween20 0.5% 첨가하는 하는 것이 적은 양의 GA를 사용하면서 많은 양의 AIT를 캡슐화 할 수 있었다. 이 비율로 만들어진 AIT 마이크로캡슐은 25℃, 상대습도 50%의 저장조건에서 1/2이상의 AIT가 285.13일 동안 보존되는 것으로 보아, 장기간 보존이 가능하기 때문에 최적의 마이크로캡슐의 조건이라고 할 수 있다. 그리고 방출실험을 통해 얻어진 각 캡슐의 반감기는 참 고추냉이 추출물을 적용시킬 수 있는 산업에 유용한 자료로 이용될 것으로 생각된다.

제 3 절 고추냉이 추출물 미세 캡슐 비드를 이용한 김의 저장 및 항균 제품 제작 (위탁연구)

연구목표 : 고추냉이 추출물 미세캡슐 시제품제작

1) 고추냉이 추출물 미세 캡슐 비드를 이용한 제품 공정 개발 및 공정 개발에 따른 다양한 형태의 소재 생산 Pilot 설계

AIT추출액 마이크로캡슐을 이용한 항균 제품(항균비누, 항균치약, 항균 핸드크림)을 제작하여 제품 공정을 개발하였다. 이러한 결과들은 AIT 마이크로캡슐이 산업에 적용될 수 있다는 가능성을 제시한 것이다.

2) 생산 제품의 효능 및 우수성 검증과 적용 가능 범위 확대 및 개발된 제품의 상품성에 대한 평가

고추냉이의 항균활성성분 AIT를 함유한 patch로 김을 보관 할 경우 처리하지 않은 시료에 비하여 미생물의 억제 등 항균력을 보였다. 이와 같은 patch를 포장 현장적용 기술에 접목시킬 경우 식품의 포장에 사용되고 있는 기존의 세균 또는 미생물 번식 등을 완화시킬 수 있다는 점에서 기존의 patch보다 우수하다는 것을 검증하였다.

참 고추냉이 추출물의 항균 활성 분석을 통해서, 건강보조식품으로서의 역할뿐만 아니라, 이를 이용한 새로운 천연첨가물의 개발과 화장품, 기능성 생활용품 등의 개발에 무한한 가능성을 제시하였다. 특히 그 중에서도 폐기되고 있는 고추냉이 잎과 줄기의 기능성 성분을 다량으로 추출할 수 있는 최적의 시스템 개발과 그것의 마이크로캡슐 기술개발은 폐기자원의 유효이용과 식품의 부가가치 향상으로 재배농가의 소득을 상승시킬 수 있고 천연첨가물로서 기능성 제품에 적용 할 수 있는 가능성을 시사해 주고 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구 결과는 다음과 같이 활용될 수 있을 것이다.

제 1 절 고추냉이로부터 isothiocyanate류 추출을 위한 최적 추출 시스템 및 조건 확립과 고추냉이 추출물의 항균 활성 분석 (협동과제)

- 1) 고추냉이 추출물의 항균효과에 관한 논문투고
- 2) 고추냉이 추출물을 이용한 천연보존료 특허 출원 및 제품개발
- 3) 고추냉이 추출물의 손 살균효과에 관한 논문투고
- 4) 고추냉이 추출물을 함유한 천연항균 비누의 특허 출원 및 제품개발
- 5) 고추냉이 추출물의 항염활성에 관한 논문투고
- 6) 고추냉이 추출물을 첨가한 천연항염제의 특허 출원 및 제품개발

제 2 절 고추냉이 추출물인 Allyl isothiocyanate(AIT)의 마이크로캡슐화 기술개발 및 저장기간 동안 캡슐로부터 방출효과 분석 (세부과제)

- 1) AIT의 마이크로캡슐 기술이 식품회사의 천연보존료로서 활용되거나 기능성 화장품이나 생활용품의 개발에 반영
- 2) AIT의 마이크로캡슐 기술을 이용한 특허 출원
- 2) 연구결과의 일부는 저명 관련 학회지에 투고되어 학술 발전에 기여
- 3) 본 연구에 참여하 대학원생의 인재양성에 도움이 되고 연구결과의 일부는 논문으로 활용

제 3 절 고추냉이 추출물 미세 캡슐 비드를 이용한 김의 저장 및 항균 제품 제작 (위탁연구)

- 1) 식품의 신선도 및 보존성을 개선하기 위한 천연보존료 제품 개발 및 특허 출원
- 2) 일상생활의 위생에 널리 유용하게 사용할 수 있는 천연항균 비누, 치약 및

크림 등 제품개발 및 특허 출원

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 고추냉이로부터 isothiocyanate류 추출을 위한 최적 추출 시스템 및 조건 확립과 고추냉이 추출물의 향균 활성 분석 (협동과제)

- 1) 고추냉이에 대한 연구는 항산화활성, 향균효과 등에 대하여 많은 논문 및 연구보고가 있으나 고추냉이 추출물을 함유한 천연향균 비누의 개발 및 천연 항염제의 개발에 관한 연구는 거의 없다.
- 2) 최근에는 고추냉이 추출물 중 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate의 항암 활성에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다.

제 2 절 고추냉이 추출물인 Allyl isothiocyanate(AIT)의 마이크로캡슐화 기술개발 및 저장기간 동안 캡슐로부터 방출효과 분석 (세부과제)

- 1) Gum arabic이나 cyclodextrin을 이용한 D-limonene이나 l-menthol과 같은 향기물질에 대한 마이크로캡슐 기술 개발과 Controlled release에 대한 논문 및 연구보고가 있으나 Gum arabic을 이용한 Allyl isothiocyanate 마이크로캡슐에 대한 연구는 거의 없다.
- 2) 최근에는 Cyclodextrin을 이용한 Allyl isothiocyanate의 마이크로캡슐에 대한 논문 및 연구보고가 있다.

제 3 절 고추냉이 추출물 미세 캡슐 비드를 이용한 김의 저장 및 향균 제품 제작 (위탁연구)

- 1) 고추냉이에 대한 연구는 항산화활성, 향균효과 등에 대하여 많은 논문 및 연구보고가 있으나 고추냉이 추출물을 이용한 김, 김치의 저장 및 향균제품 개발에 관한 연구는 거의 없다.

- 2) 일본의 경우 고추냉이 줄기를 이용한 차, 소시지, 아이스크림, 마요네즈, 비스킷, 된장 등 여러 가공식품이 개발되어 판매되고 있다.
- 3) 최근에는 일본전기사업연합회에서는, 고추냉이를 이용한 에어컨의 곰팡이 발생 억제 장치가 개발되어 판매되고 있다. 에어컨 내부에 '곰팡이 스톱퍼'를 설치하여 열교환기, 실내팬, 통풍구 등 청소하기 어려운 부분에 곰팡이의 발생을 방지하였다는 것을 들 수 있다. 곰팡이 스톱퍼는 고추냉이의 매운 맛을 내는 성분을 樹脂로 감싼 후에 온도와 습도를 감지하여 이 성분의 방출을 조절하는 막으로 덮어씌운 것이다. 이는 '청결지향'을 내세우는 상품은 타사에도 있지만 곰팡이 발생 자체를 억제함으로써 고객이 에어컨을 청소하는 수고를 덜었다는 것이 가장 큰 특징이라고 언급하고 있다.

제 7 장 참고문헌

제 1 절 고추냉이로부터 isothiocyanate류 추출을 위한 최적 추출 시스템 및 조건 확립과 고추냉이 추출물의 향균 활성 분석 (협동과제)

1. Kawakishi S, Namiki M. Decomposition of allyl isothiocyanate in aqueous solution. *Agric. Biol. Chem.* 33: 452-458 (1969)
2. Dunacn DB. Multiple-range and multiple F test. *Biometrics*, 11: 1-42 (1955)
3. Doorn HEV, Kruk GCVD, Holst GV, Raaijmakers-Ruijs NCME, Postma E, Groeneweg B, Jongen WHF. Inhibitory effects on the growth of several bacteria by brown mustard. *J. Sci. Food Agric.* 78: 30 - 38 (1998)
4. 伊奈和夫, 衛藤英男. 澤ワサビの香りの本體. 月刊フードケミカル. 106~111 (1993)
5. Masuda H, Harada Y, Tanaka K, Nakajima M, Tateba H. Characteristic odorants of Wasabi, horseradish, in comparison with those of horseradish. In *Biot.* 67-78 (1996)
6. Chin HW and Lindsay RC. Volatile sulfur compounds formed in disrupted tissues of different cabbage cultivars. *J. Food Sic.* 58: 835-839, 841 (1993)

7. Shahidi F. Thigluosides of Brassica oilseeds and their process- induced chemical transformations. In Sulfur compounds in foods. 106-126 (1993)
8. Tokarska B, Karwowska K. Characteristic of Wasabi. *Nahrung* 27: 443 - 447 (1983)
9. Doorn HEV, Kruk GCVD, Holst GV, Raaijmakers-Ruijs NCME, Postma E, Groeneweg B, Jongen WHF. Inhibitory effects on the growth of several bacteria by brown mustard. *J. Sci. Food Agric.* 78: 30 - 38 (1998)
10. 野田克彦, 磯崎さとみ, 谷口春雄. スパイス類の大腸菌増殖抑制と促進効果. *日本食品工業學會誌.* 32(11): 791-796 (1985)
11. 小嶋 操. ワサビの科学[3]. *農業および園藝.* 56(7): 114-118 (1981)
12. Speck ML. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Publish Health Association, Washington DC (1976)
13. Sampling plans for soy bean products. ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Food) University of Toronto Press. Tornoto, Canada. 2: 92 - 104 (1978)
14. Im JG, Park IK and Kim SD. Quality Characteristics of Tofu Added with BasilWater Extracts. *J. SOC. Food Sci.* 20: 835-839 (2004)
15. Baek SH and Kang KH. Effect of seaweeds added in preparation of tofu. *Korea J. Food Nutr.* 9: 529-535 (1996)
16. Chytiri S, Chouliara I, Savvaidis N, Kontominas MG. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured

rainbow trout. *Food Microbiol.* 21: 157-165 (2004)

17. Campos CA, Rodríguez O', Lodada V, Aubourg SP, Barros-Velázquez J. Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *Int. J. Food Microbiol.* 103: 121-30 (2005).
18. Kyrana VR, Lougovois VP, Valsamis DS. Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 32: 339-347 (1998).
19. Rodríguez O', Losada V, Aubourg SP, Barros-Velázquez J. Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. *Food Res. Int.* 37: 749-57 (2004)

제 2 절 고추냉이 추출물인 Allyl isothiocyanate(AIT)의 마이크로캡슐화 기술개발 및 저장기간 동안 캡슐로부터 방출효과 분석 (세부과제)

1. Il Shik Shin, Hideki Masuda, Kinai Naohide. Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Food microbiology.* 94: 255-261 (2004)
2. Savitha Krishnan, Rajesh Bhosale, Rekha S. Singhal. Microencapsulation of cardamom oleoresin: evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall material. *Carbohydrate Polymer.* 61: 95-102 (2005)
3. Apinan Soottitantawat, Fanny Bigeard, Hidefumi Yoshii, Takeshi Furuta, Masaaki Ohkawara, Pekka Linko. Influence of emulsion and powder size

- on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 6: 107-114 (2005)
4. Koki Tobitsuka, Makoto Miura, Syoichi Kobayashi. Retention of a European Pear Aroma Model Mixture Using Different Types of Saccharides. *J.Agric. Food Chem.* 54: 5069-5076 (2006)
 5. Hidefumi Yoshii, Apinan Soottitantawat, Xiang-Dong Liu, Takuroh Atarashi, Takeshi Fruta, Shizuo Aishima, Masaaki Ohkawara, Pekka Linko. Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2: 55-61 (2001)
 6. Young-Hee Cho, Dong-suck Shin, Jiyong Park. Optimization of Emulsification and Spray Drying Process for the Microencapsulation of Flavor Compounds. *KOREA J. FOOD SCI. TECHNOL.* 32: 132-139 (2000)
 7. A.Soottitantawat, H.Yoshii, T.Furuta, M.Ohkawara, P.Linko. Microencapsulation by Spray Drying: Influence of Emulsion Size on the Retention of Volatile Compounds. *Journal of Food Science*. 68: 2256-2262 (2003)
 8. Madhav P.Yadav, J.Manuel Igartuburu, Youchun Yan, Eugene A.Noethnagel. Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic. *Food Hydrocolloids*.
 9. A. C.Bertolini, A. C. Siani, C. R. F.Grosso, Stability of Monoterpenes

- Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying. J.Agric. Food Chem. 49: 780-785 (2001)
10. Hirokazu Shiga, Hidefumi Yoshii, Taiji Nishiyama, Takeshi Fruta, Prikko Forssell, Kaisa Poutanen, Pekka Linko. Flavor encapsulation and release characteristics of spray-dried powder by the blended encapsulant of cyclodextrin and gum arabic. Drying Technology. 19: 1385-1395 (2001)
 11. Xiang-Dong Liu, Takuroh Atarashi, Takeshi Fruta, Hidefumi Yoshii, Shizuo Aishima, Masaaki Ohkawara, Pekka Linko. Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavors by spray drying. Drying Technology. 19: 1361-1374 (2001)
 12. Hirokazu Shiga, Hidefumi Yoshii, Hisashi Ohe, Masahumi Yasuda, Takeshi Fruta, Hiroshige Kuwahara, Masaaki Ohkawara, Pekka Linko. Encapsulation of Shiitake(*Lenthinus Edodes*) Flavors by Spray Drying. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68: 66-71 (2004)
 13. Apinan Soottitantawat, Hidefumi Yoshii, Takeshi Furuta, Masaaki Ohkawara, Prikko Forssell, Ritta Partanen, Kaisa Poutanen, Pekka Linko. Effect of Water Activity on the Release Characteristics and Oxidative Stability of D-Limonene Encapsulated by Spray Drying. J.Agric. Food Chem. 52: 1269-1276 (2004)
 14. Y.Minemoto, K.Hakamata, S.Adachi, R.Matsuno. Oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic or maltodextrin by sprat-drying. J.Microencapsulation. 19: 181-189 (2002)

15. Brian F.McNamee, E.Dolores O’Riordan, Michael O’Sullivan. Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. J.Agric. Food Chem. 46: 4551-4555 (1998)

16. Young-Hee Cho, Dong-suck Shin, Jiyong Park. A Study on Wall Material for Flavor Encapsulation. KOREA J. FOOD SCI. TECHNOL. 31: 1563-1569 (1999)

17. Apinan Soottitantawat, Kohei Takayama, Kenji Okamura, Daisuke Muranaka, Hidefumi Yoshii, Takeshi Furuta, Masaaki Ohkawara, Pekka Linko. Microencapsulation of *l*-menthol by spray drying and its release characteristics. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 6: 163-170 (2005)

18. Park, H.J., Park, J.W., Song, J.J., Kang, S.G., Vergano, P.J. and Testin, R.F. Mechanical and barrier properties of chitosan-based biopolymer film. Chitin and chitosan research. (5/1) (1999.04) (19-26)

19. Park, H.J. Development of advanced edible coatings for fruits. Trends in Food Science and Technology. (1999.10) (10, 254-260)

20. Park, H.J. and Chinnan, M.S. Gas and water vapor barrier properties of edible film from proteins and cellulosic materials. J. Food Engineering. (1995.10) (25, 497-507)

21. J. S. Lee, H. J. Park Survival of freeze-dried lactobacillus bulgaricus KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles, J. Agric. Food Chem. (2004) 52, 7300-7305

22. Susan K. Tam, L'Hocine Yahia : Physicochemical model of alginate-poly-L-lysine microcapsules defined at the micrometric/nanometric scale using ATR-FTIR, XPS and ToF-SIMS, *Biomaterials* 26 (2005) 6950-6961

23. P. Capela, N. P. Shah Effect of cryoprotectants, prebiotics and microcapsulation on survival of prociotic organism in yoghurt and freeze-dried yoghurt, *Food research International* 39 (2006) 203-211

24. S. H. Yoo, H. G. Lee Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties, *Interational Journal of Biological Macro molecules* (2006)

25. Si-shen Fenga, Guofeng Huang Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol $\text{\textcircled{O}}$) from nanospheres of biodegradable polymers *Journal of Controlled Release* 71 (2001) 53-69

26. Khalida Sultana , Georgia Godward , N. Reynolds , R. Arumugaswamy , P. Peiris , Kaila Kailasapathy Encapsulation of probiotic bacteria with alginate--starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt *International Journal of Food Microbiology* 62 (2000) 47-55

27. Y. Murat ElFin Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres *Biomateriols* 16 (1995) 1157-1161

28. K. T. Hwang, Jung Soon T, Lee, K.D., Chinnan, M.S., Park, Y.S., and Park, H. J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (50/7) (2002), (1876-1882) Controlling molecular weight and degree of deacetylation of chitosan by response surface methodology.

제 3 절 고추냉이 추출물 미세 캡슐 비드를 이용한 김의 저장 및 항균 제품 제작 (위탁과제)

1. 김영동, 김영수, 김영명, 신동화 : 건조김의 저장 중 품질특성 변화, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., Vol. 19, No. 3 (1987)
2. 박정욱, 강성국, 오시원, 박선영, 정순택, 박양균, 임종환, 함경식 : 건조김 제조 시 키토산처리가 품질에 미치는 영향, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., Vol. 31, No. 4, p. 1115~1119 (1999)
3. 조연수, 노봉수 : Metal oxide 센서를 바탕으로 한 전자코와 SAW 센서를 바탕으로 한 GC를 이용한 저장 중 김의 품질 평가, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., Vol. 34, No. 6, p. 947~953 (2002)
4. 박선영, 최지원, 연지혜, 이민정, 오덕환, 홍종해, 박경진, 우건조, 박종석, 하상도 : 김밥제조 단계에서의 김밥 주원료에 대한 위해미생물의 오염도 평가, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., Vol. 37, No. 1, p. 122~128 (2005)
5. 이나영, 조철훈, 정헌중, 강호진, 김재경, 김현수, 변명우 : 김밥의 미생물 오염원 예측 및 미생물학적 안전성 개선을 위한 감마선 조사 효과, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., Vol. 37, No. 2, p. 279~286 (2005)