

콜로이드 계면 기술을 이용한 organo-sulfur compounds의 나노구조 미립자 소재화 기술 개발
(Development of nano structured microparticles of organo-sulfur compounds by colloid interfacial technology)

Organo-sulfur compounds의 추출 및 안정화 기술 개발(제1세부)

(Development of extraction and stabilization of organo-sulfur compounds)

NSM system에 의한 유효성분 포집 기술 개발(제2세부)
(Development of Encapsulation of functional materials by NSM system)

유효성분 함유 NSM system의 기능성 평가시스템 개발(제3세부)

(Evaluation system for functionality of NSM system)

한국식품연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “콜로이드 계면 기술을 이용한 organo-sulfur compounds의 나노구조 미립자 소재화 기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 6 월 24 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 김범근

세부연구책임자 : 김범근, 박동준, 조장원

연 구 원 : 김명호, 정진웅, 정승원

박기재, 임정호, 김종찬

박찬은, 이은지

참 여 기 업 : (주)아로마에프아이

요 약 문

I. 제 목

콜로이드 계면 기술을 이용한 organo-sulfur compounds의 나노구조 미립자 소재화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

의약품, 비타민, 향균물질, 향산화제, 향기성분, 보존제 등의 기능성 성분은 약품, 건강보호제품, 화장품, 농약, 식품 등 다양한 분야에 존재하는 필수적인 성분이다. 이러한 기능성 성분은 분자적 및 물리적 형태, 즉 극성도, 분자량, 물리적 상태 등에 따라 다양하게 존재한다. 그러나 이러한 기능성 성분은 천연상태로는 생체 내에서 직접 이용하기 어려운 경우가 많기 때문에 전달시스템을 이용하여 포집된 상태로 이용되어야 한다.

전달시스템의 역할은 크게 4가지로 나눌 수 있다. 첫째로, 기능성 성분을 원하는 부위까지 운반하는 역할이 있으며, 둘째는, 운반하는 도중에 외부 환경에 대해서 보호하는 역할을 하며, 셋째로는, 운반한 기능성 성분의 용출을 제어할 수 있어야 하며, 마지막으로 시스템 내의 다른 성분과도 잘 용화될 수 있어야 한다.

이러한 전달시스템 중의 대표적인 방법이 에멀전을 이용한 방법이다. 일반적으로 에멀전 방법의 경우 분무건조, 균질화, 고주파처리 등 극한 환경에서 이루어지는 방법과는 달리 단순한 조건에서 실험이 가능하다는 점에서 큰 장점으로 부각되어 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 이러한 에멀전 방법의 경우에도 가열, 동결, 건조, 극한 pH, 고농도의 미네랄 등 극한 환경에 존재할 경우 물리적인 안정성이 낮은 단점이 있다. 또한, 입자의 크기가 작기 때문에 용출 제어를 목표로 함에도 불구하고 droplet으로부터의 용출 시간이 짧은 단점이 있다.

이러한 문제점을 보완하기 위하여 개발된 신기술로서 nano-structured micro-particle (NSM-particle) 시스템을 들 수 있다. 이 시스템은 (i)나노크기의 oil droplet 내에 존재하는 지질의 용해 성상 (melting profile)의 변화에 따른 encapsulation 및 용출의 제어, (ii)다층막의 제조(layer-by-layer deposition)에 의한 에멀전의 안정성 증가, (iii)고분자 혼합물의 열역학적 불안정성 (thermodynamic incompatibility)을 이용한 상변화 기법에 의한 용출 제어 등 3가지 특징을 나타낸다.

본 연구과제에서는 nano-structured microparticle (NSM-particle)의 제조를 통하여 일반적인 에멀전 시스템이 가지고 있는 단점을 보완한 새로운 다기능성 전달시스템 (multifunctional delivery system)을 개발하여 마늘 내 존재하는 황화합물의 안정성을 증대시키고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

<Organo-sulfur compounds의 추출 및 안정화 기술 개발>

- 유효성분의 추출 및 안정화 기술 개발
- 원료의 전처리 및 유효성분의 분리/추출
- 유효성분의 추출공정 최적화
- 유효성분의 실활 방지 및 대량 추출 공정 개발
- 산업재산권 출원 및 개발 소재 특성별 응용실험

<NSM 시스템에 의한 유효 성분의 포집 기술 개발>

- NSM의 시스템의 개발
- NSM의 물리화학적 특성 분석
- 유효성분의 포집 및 안정성 부여
- 페이스트 제품의 개발 및 응용
- 분말제품의 개발 및 응용
- 산업재산권 출원 및 개발 소재 특성별 응용실험

<유효성분 함유 NSM 시스템의 기능성 평가시스템 개발>

- 기능성 평가 기준 확립 및 평가
- 유효성분의 기능성 평가
- 유효성분의 기능성 유지, 저장 안정성 분석 및 평가
- 산업재산권 출원 및 개발 소재 특성별 응용실험

IV. 연구개발결과

1. Organo-sulfur compounds의 추출 및 안정화 기술 개발

가. Organo-sulfur compounds의 분석

Allin의 경우 물과 메탄올이 혼합되어 있는 용매를 사용하였을 때 그 함량이 높아지는 반면, S-Allylcysteine의 경우 물의 함량이 감소할수록 점차적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 추출 용매로서 아세톤을 사용하여 얻은 물질의 황화합물을 분석한 결과, 아세톤의 함량이 증가할수록 alliin 함량이 점차적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 메탄올 추출물과 비교하였을 때 전체적으로 황화합물의 함량이 감소한 것을 확인할 수 있다. 에탄올 추출물의 경우 아세톤 추출물의 경우에 비하여 alliin 함량이 약간 높은 값을 나타내는 것을 확인하였다.

추출시간을 2, 3, 4시간으로 고정한 후 추출용매(에탄올)의 함량 및 추출온도(60, 70, 80℃)를 변화시킨 후 추출물의 alliin 함량을 분석한 결과, 모든 추출시간에서 추출용매인 에탄올의 함량이 70%가 될 때까지 추출물 내의 SAC 함량이 증가하다가 100%가 된 순간 급격히 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 또한 모든 추출시간에서 추출온도가 증가할수록 SAC의 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

나. 추출물의 생리활성 평가

추출물의 항균활성 시험 결과, 4가지 균주(*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*)에 대해 항균성이 나타났다.

메탄올의 경우 그 함량이 증가할수록 전자공여능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 아세톤 추출구의 경우 50% 추출구에서 가장 높은 전자공여능을 나타내었으며, 30% 이하 추출구에서는 거의 활성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

추출 조건으로서 온도 및 시간을 달리하여 얻은 추출물(추출용매는 에탄올을 사용함)에 대한 전자공여능을 분석한 결과, 물 추출물의 경우 추출온도가 증가할수록 전자공여능이 크게 감소하는 것을 확인하였으나, 에탄올 함량에 따른 변화는 크게 나타나지 않았다. 추출시간에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았으며, 에탄올 함량이 약 50-70%인 경우 가장 높은 활성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

삶기 전과 후의 마늘을 동결 건조한 후 에탄올의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정된 결과, 에탄올 함량이 증가할수록 삶은 것에 비해 삶지 않은 시료에서 더

높은 활성을 나타낸 것을 확인하였다. 특히 에탄올 함량이 적은 시료구에서 그 차이가 현격하게 나타나는 것을 알 수 있다. 삶은 마늘을 추출 온도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과, 추출 온도가 증가할수록 더 높은 활성을 보였으며, 에탄올의 함량이 증가할수록 높은 활성을 나타내었다. 추출 시간이 증가할수록 높은 활성을 보였으며, 추출 온도가 높을수록 높은 전자공여능을 보였다.

동결 건조한 마늘을 메탄올의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 SOD 유사 활성을 측정한 결과, 메탄올 추출구의 경우 30% 메탄올 함유 추출구가 가장 높은 SOD 유사 활성을 나타내었다. 동결 건조한 마늘을 아세톤의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 SOD 유사 활성을 측정한 결과, 아세톤 추출구의 경우 50% 추출구에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 100% 아세톤 추출구에서 가장 낮은 값을 나타내었다. 동결 건조한 마늘을 에탄올의 온도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 SOD 유사 활성을 측정한 결과, SOD 유사 활성의 경우 대체적으로 에탄올 추출구에서 활성이 낮게 나타났고, 온도의 경우 80℃에서 활성이 가장 낮게 나타났으며, 대조구인 ascorbic acid보다 SOD 유사 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 동결 건조한 마늘을 에탄올의 시간을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 SOD 유사 활성을 측정한 결과는 그림 과 같다. 추출시간의 경우 2시간보다는 3시간 내지 4시간 추출한 시료에서 그 활성이 높게 나타난 것으로 보아, 최적의 추출 조건을 위해서는 3시간 이상의 추출 시간이 필요한 것으로 판단된다.

동결 건조한 마늘을 메탄올의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 총 폴리페놀을 측정한 결과, 메탄올의 농도가 증가할수록 총 폴리페놀 함량은 감소하는 것으로 나타났다. 동결 건조한 마늘을 아세톤의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 총 폴리페놀을 측정한 결과, 아세톤의 농도가 100%일 경우 총 폴리페놀 함량이 가장 낮게 나타났으며, 아세톤의 농도가 증가할수록 총 폴리페놀은 감소하는 결과를 보였다.

동결 건조한 마늘을 에탄올의 온도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 총 폴리페놀을 측정한 결과, 추출 온도가 증가할수록 총 폴리페놀 함량은 높게 측정되었으며, 에탄올의 함량이 증가할수록 총 폴리페놀 함량은 낮게 나타났다. 동결 건조한 마늘을 에탄올의 시간을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 총 폴리페놀을 측정한 결과, 추출 시간이 증가함에 따라 별 다른 차이를 보이지 않았다.

마늘을 삶기 전, 후에 동결건조를 한 다음 추출용매(에탄올) 함량을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 아질산염 소거 작용에 대한 결과, 일반적으로 알려진 바와 같이, pH가 증가할수록 그 활성은 감소하는 경향을 나타내었으며, 삶은 시료의 경우 삶지 않은 것에 비해서 활성이 약간 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

마늘을 삶기 전, 후에 동결건조를 한 다음 추출용매(에탄올) 조성을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 ACE 저해 활성에 대한 결과, 삶은 시료의 경우 에탄올 함량이 증가할수록 ACE

저해 활성이 비슷하거나 약간 증가하는 경향을 나타내었으나, 삶지 않은 시료의 경우 에탄올 함량이 증가할수록 점차적으로 감소하다가 다시 증가하는 양상을 나타내어, 에탄올 50% 추출구에서 가장 낮은 활성을 띄었다.

마늘을 삶기 전, 후에 동결건조를 한 다음 추출용매(에탄올) 조성을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 FRAP assay에 대한 결과, 삶지 않은 시료의 경우 삶은 시료에 비해서 전체적으로 높은 활성을 나타낸 반면, 에탄올 함량이 증가함에 따라 점차적으로 활성이 감소하는 경향을 보였다. 반면, 삶은 시료의 경우 에탄올 30% 추출구에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 그리고 에탄올 100% 추출구의 경우 두 시료 모두 거의 활성을 나타내지 않았다. 삶은 마늘을 동결건조 한 다음 추출용매(에탄올)와 온도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 FRAP assay에 대한 결과, 추출 온도가 증가할수록 FRAP 활성은 감소하는 것으로 나타났으며, 에탄올의 함량이 증가할수록 FRAP 활성 또한 감소하는 것으로 나타났다. 삶은 마늘을 동결건조 한 다음 추출용매(에탄올)와 시간을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 FRAP assay에 대한 결과, 추출 시간이 증가할수록 FRAP 활성은 감소하였으며, 에탄올의 함량이 증가할수록 FRAP 활성 또한 감소하는 것으로 나타났다.

2. NSM system에 의한 유효성분 포집 기술 개발

가. 공정 변수에 따른 NSM system의 최적 조건 도출

(1) Chitosan을 이용한 o/w 에멀전 제조

0.1% 키토산용액과 soybean oil을 이용하여 제조한 O/W 에멀전에 있어서 계면활성제로 pluronic F-68의 농도를 달리하여 제조한 후 평균입도를 측정된 결과 pluronic F-68의 농도가 증가할수록 평균입도가 증가하는 것을 확인하였다. Tween 80을 사용하였을 때 그 함량에 따른 에멀전 droplet의 평균입도를 조사한 결과 농도를 달리하여도 큰 차이를 보이지 않았다.

(2) 다층막 (W/O/W) 용액 제조

농도를 달리하여 alginate 용액을 이용한 W/O/W 에멀전은 내부 수용액 층으로 alginate 용액을 사용하였고, organic phase로서 1% span 80을 포함하는 soybean oil을, 외부 수용액 층으로 ι-carrageenan, 1% κ-carrageenan, 1% λ-carrageenan, 1% alginate, 1% gum, 1% WPI

을 이용하여 다층막을 제조한 결과 상분리가 발생하지 않았으며, 평균입도의 경우 약 1-3 μm 수준을 나타내었다.

(3) β -lactoglobulin에 의한 O/W/W 용액의 안정성 측정

Pectin과 β -lactoglobulin (1 : 9)을 이용하여 O/W/W 에멀전은 1일 지난 후에도 에멀전이 파괴되지 않고 유지되는 것을 확인하였다. β -lactoglobulin을 이용하여 O/W/W 에멀전을 제조하여 입도 및 제타전위를 측정한 결과 pH가 높을수록 입도가 낮은 값을 나타내었다. 제타전위의 경우에도 pH가 높은 것이 제타전위 값이 낮게 나타났다.

Pectin과 β -lactoglobulin (1 : 50)을 이용하여 O/W/W 에멀전 또한 에멀전이 파괴되지 않고 유지되는 것을 확인하였다. 가열처리 한 β -lactoglobulin을 O/W/W 에멀전으로 제조하여 입도 및 제타전위를 측정한 결과 입도의 경우 1 : 9의 비율로 제조한 에멀전보다 낮은 평균입도를 보였다. 제타전위의 경우에는 1 : 9의 비율로 제조한 에멀전과 비슷한 수치를 보였으며, pH가 높은 것이 더 안정한 것으로 나타났다.

Pectin과 젤라틴을 이용하여 제조한 O/W/W 에멀전의 입도 및 제타전위를 측정한 결과 입도의 경우 펙틴 농도가 높아질수록 점차적으로 증가하는 추세를 나타내었으며, 제타전위의 경우 펙틴이 첨가될수록 음의 값으로 변화하였다.

나. Homogenization에 의한 O/W emulsion 제조

(1) 실험적 변수에 따른 입도 측정 및 특성 평가

① 2% gelatin 용액

2% gelatin 용액을 aqueous phase로 사용하여 oil 종류 및 계면활성제를 달리하여 제조한 에멀전의 입도를 나타내는 결과 계면활성제로서 Span 20을 사용할 경우 가장 작은 입도를 나타내었으며, Tween 80 과 Tween 20을 비교하였을 때에는 큰 차이를 나타내지 않았다.

② 2% pluronic-F68

2% pluronic-F68을 사용하고 oil 종류 및 계면활성제를 달리하여 제조한 에멀전의 입도 측정 결과 pluronic F-68을 사용하였을 때에는 organic phase로서 카놀라유를 사용할 경우 Span 20에서 가장 낮은 입도를 나타내었다.

③ Oil 종류 및 비율을 달리한 에멀전

Oil의 종류 및 비율을 달리하여 제조한 에멀전의 입도를 측정한 결과 Oil의 종류와 O : W 비율에 따른 결과에서는 옥수수유를 사용하여 10 : 5 : 1일 경우 가장 낮은 입도를 나타내었다.

④ PGMS 이용

Oil 상의 계면활성제로서 PGMS를 사용하여 제조한 에멀전의 입도를 측정한 결과 농도를 10% 범위에서 사용할 경우 매우 낮은 입도를 나타내었다.

(2) 물성 측정

PGMS와 PGPR을 이용하고 그 함량을 변화시켜 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄특성을 측정한 결과 w (frequency) 값이 증가할수록 G' 과 G'' 이 증가하고 있어 각 주파수에 의존적인 것을 확인할 수 있었다. 그리고 일정 frequency 이상의 값에서는 G' 이 G'' 에 비해서 훨씬 높은 값을 나타내어 에멀전의 점성적 성질을 나타낸다고 할 수 있다.

Oil의 함량을 변화시켜 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄특성을 측정한 결과 Oil 함량에 따라서 그래프의 형태는 약간 달랐으나, 위에서 언급한 바와 마찬가지로 w (frequency) 값이 증가할수록 G' 과 G'' 이 증가하고 있어 각 주파수에 의존적인 것을 확인할 수 있었다.

다. 초고압균질기에 의한 O/W emulsion 제조

(1) 실험적 변수에 따른 입도 측정 및 특성 평가

Tween 80과 lecithin을 이용하여 제조한 에멀전을 초고압 균질기로 300 bar의 압력 조건에 의해 얻은 시료와 그 평균입도를 비교한 결과 초고압균질기를 사용할 경우 평균입도가 감소되었으며, 계면활성제 함량이 증가될수록, oil 함량이 감소할수록 작은 입도를 나타내었다.

Oil 함량을 달리하여 제조한 에멀전의 입도를 나타낸 결과 PGMS의 경우 oil 함량에 따라서 크게 영향을 받지 않았으나, PGPR의 경우 oil 함량이 증가할수록 평균 입도가 안정되는 것을 확인할 수 있었다.

(2) 물성 측정

PGMS 및 PGPR을 사용하고 초고압 균질기 (300 bar)를 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄 특성을 나타낸 결과 일반적으로 homogenization에 의해서 제조된 O/W 에멀전에 비해서 초고압 균질기를 사용한 경우 대체적으로 더 넓은 frequency 구간에서 점성적 특성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

Oil의 함량을 달리하고 초고압 균질기 (300 bar)를 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄특성을 측정된 결과 초고압 균질기를 사용하지 않은 시료와 마찬가지로 oil 함량에 따라서 그래프의 형태는 약간 달랐으나, 위에서 언급한 바와 마찬가지로 $w(\text{frequency})$ 값이 증가할수록 G' 과 G'' 이 증가하고 있어 각 주파수에 의존적인 것을 확인할 수 있었다.

라. 키토산과 알긴산을 이용한 에멀전 제조

(1) 키토산을 이용한 O/W 에멀전 제조

pH 2.0 키토산의 농도를 달리하여 제조한 O/W 에멀전은 0.1% 키토산의 경우 1% PGMS를 사용하였을 때 O : W의 비율과는 상관없이 비슷한 입도를 보였으나 반면 제타전위의 경우에는 1 : 10의 비율이 3 : 10의 비율보다 높은 제타전위 값을 나타내었다. 0.5% 키토산의 경우에는 0.5% PGMS를 이용하였을 때 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 평균입도는 4.02 μm 로 나타났으며, 제타전위는 43.19 mV로 나타났다. 1% 키토산을 이용한 O/W 에멀전은 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 2-4 μm 의 평균 입도를 보였으며, 제타전위는 비슷한 값을 보였다. 반면 3 : 10의 O/W 에멀전의 경우에는 2% PGMS를 이용한 경우 0.137 μm 로 나타났고, 제타전위는 14.77mV로 측정되었다. 비율별로 비교하였을 때 3 : 10의 O/W 에멀전이 입도와 제타전위 값이 낮게 측정되었다.

pH 3.0 키토산의 농도를 달리하여 제조한 O/W 에멀전은 0.5% 키토산의 경우 1% PGMS를 이용한 O/W 에멀전은 3 μm 정도의 입도를 보였으며, 제타전위 값은 O : W의 비율이 1 : 10인 경우가 3 : 10보다 더 높게 측정되었다. 1% 키토산은 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 입도는 3 μm 정도로 나타났으며, 제타전위는 PGMS의 농도가 높아질수록 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타났다.

pH 4.0 키토산의 농도를 달리하여 제조한 O/W 에멀전 결과 0.5% 키토산은 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 1% PGMS를 이용한 O/W 에멀전이 가장 낮은 입도를 보였으며, 제타전위는 가장 높게 나타났다. O : W의 비율이 3 : 10인 경우 0.5% PGMS를 이용한 O/W 에멀전은

3.63 μm 의 입도를 보였으며, 37.01 mV의 제타전위 값을 나타내었다. 1% 키토산의 경우에는 O : W의 비율에 상관없이 비슷한 입도를 보였으나, 제타전위의 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값 또한 다소 증가하는 것으로 나타났다.

(2) 키토산과 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전 제조

(가) pH 2.0 키토산과 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전

0.1% 키토산(pH 2.0)와 알긴산의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전을 측정된 결과 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전은 PGMS의 농도가 증가함에 따라 입도가 감소하였으며, 2% 알긴산을 이용한 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 입도도 다소 증가하였다. 제타전위의 경우 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전보다 낮은 제타전위를 보여 알긴산의 함량이 높을수록 더 안정한 결과를 나타내었다. O : W가 3 : 10의 비율인 경우 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전은 PGMS의 농도가 증가할수록 각각 4.08, 3.73과 3.97 μm 의 입도를 보였으며, 2% 알긴산을 이용한 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 입도도 다소 감소하는 것으로 나타났다. 제타전위의 경우에는 O : W의 비율이 1 : 10인 에멀전과 마찬가지로 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전보다 낮은 제타전위를 보여 알긴산의 함량이 높을수록 더 안정한 결과를 알 수 있었다.

0.5% 키토산(pH 2.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전을 측정된 결과 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 0.5%와 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전은 PGMS의 농도가 증가함에 따라 입도가 감소하는 것으로 나타난 반면 2% 알긴산을 이용한 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 입도가 증가하는 것으로 나타났다. 제타전위의 경우 0.5%와 1% PGMS의 경우 각각 비슷한 제타전위 값을 보였으나 2% PGMS의 경우에는 0.5% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 높은 값을 보였고, 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 값을 나타내었다. 따라서 2% PGMS의 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 안정한 것으로 나타났다. O : W가 3 : 10의 비율인 경우, 0.5% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전을 제외한 나머지에멀전은 PGMS의 농도가 증가할수록 입도가 증가하는 것으로 나타났다. 제타전위의 경우에는 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전은 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 감소하는 경향을 나타내어 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 안정한 것으로 나타났다.

1% 키토산(pH 2.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전을 측정된 결과 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 2% 알긴산에 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 입도로

나타났으며, 1%와 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 제타전위가 일정하게 나타나 안정된 것으로 측정되었다. O : W가 3 : 10의 비율인 경우, PGMS의 농도가 증가할수록 입도가 감소하는 것으로 나타났다. 제타전위의 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 증가하는 것으로 나타났다.

(나) pH 3.0 키토산과 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전

0.1% 키토산(pH 3.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전 측정 결과 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 0.5% 알긴산과 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전의 경우 비슷한 입도를 보였으나 2% 알긴산의 경우에는 PGMS의 농도가 증가함에 따라 입도도 증가하는 것으로 나타났다. 제타전위를 측정한 결과 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전은 PGMS가 증가할수록 점차 감소하는 것으로 나타났으나 0.5%와 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전은 1% PGMS를 사용하였을 때 점차 증가하다가 2% PGMS를 사용하였을 때 다시 감소하는 것으로 나타났다. O : W가 3 : 10의 비율인 경우, 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전의 경우 PGMS의 농도가 증가할수록 비슷한 입도를 보였으며, 제타전위의 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타나 PGMS의 농도가 증가할수록 O/W/W 에멀전이 더 안정된 것으로 나타났다.

0.5% 키토산(pH 3.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전의 경우 O : W의 비율이 1 : 10이었을 때 입도와 제타전위는 1% 알긴산의 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 입도가 가장 낮게 측정되었으며, 제타전위도 가장 낮게 측정되어 가장 안정한 것으로 나타났다. O : W가 3 : 10이었을 때 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전의 경우 PGMS의 농도가 증가할수록 입도가 감소하였으며, 제타전위의 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 증가하는 것으로 나타나 1% PGMS의 O/W/W 에멀전이 더 안정된 것으로 나타났다.

1% 키토산(pH 3.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전을 측정한 결과 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전의 경우에는 PGMS의 농도가 증가함에 따라서 입도가 감소하는 것을 알 수 있었다. 제타전위를 측정한 결과 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타나 PGMS 농도가 제타전위의 영향을 주는 것으로 나타났다. O : W가 3 : 10의 비율인 경우, 0.5% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전은 PGMS의 농도가 증가할수록 입도가 점차 증가하는 것으로 나타났으나 1%와 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전의 경우에는 PGMS 농도가 증가할수록 입도는 감소하는 것으로 나타났다. 제타전위를 측정한 결과 2% 알긴산의 1% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 제타전위 값으로 나타나 안정된 O/W/W 에멀전인 것을 알 수 있었다.

(다) pH 4.0 키토산과 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전

0.1% 키토산(pH 4.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 입도를 측정된 결과 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전보다 높은 입도로 나타났다. 제타전위를 측정된 결과 1% 알긴산의 경우 PGMS의 농도가 증가함에 따라 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타났다. 반면 2% 알긴산의 경우 1% PGMS가 가장 높은 제타전위 값을 보였다. O : W가 3 : 10의 비율인 경우, 입도를 측정된 결과 1% 알긴산은 비슷한 입도와 제타전위를 보였으나 2% 알긴산의 경우 PGMS 농도가 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 제타전위를 측정된 결과 2% 알긴산의 경우 PGMS 농도가 증가함에 따라 감소하였다.

0.5% 키토산(pH 4.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 0.1% 알긴산의 1% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 입도를 보였으며, 제타전위를 측정된 결과 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮게 나타나 안정된 것을 알 수 있었다. O : W가 3 : 10의 비율인 경우, 2% 알긴산의 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 입도로 측정되었으며, 0.5% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전은 비슷한 입도를 보였다. 제타전위를 측정된 결과, 2% 알긴산의 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 제타전위 값을 보였다.

1% 키토산(pH 4.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전의 경우 O : W의 비율이 1 : 10이었을 때 입도 측정 결과 0.5% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮게 나타났으며, PGMS의 농도에 따라 입도가 변화하는 것으로 나타났다. 제타전위를 측정된 결과 알긴산의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타났으며, 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 값을 보여 가장 안정된 것으로 나타났다. O : W가 3 : 10의 비율인 경우 입도 측정 결과 PGMS의 농도가 증가할수록 입도도 점차 증가하는 것으로 나타났으며, 1% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 입도를 보였다. 제타전위의 경우 O : W의 비율이 1 : 10일 때와 마찬가지로 알긴산의 농도가 증가할수록 낮은 제타전위 값을 보였으며, 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 값을 나타내었다.

마. 유효성분의 포집 기술 개발

(1) 키토산과 TPP를 이용한 나노입자 제조

키토산 용매의 농도별 pH와 제타전위를 측정된 결과 키토산 용매의 농도가 증가할수록 pH는 점차 증가하는 것으로 나타났으며, 제타전위 측정 결과 키토산 용매의 농도가 증가할수록 제타전위 값도 증가하였는 것으로 나타났다. 키토산과 TPP를 이용한 용매의 평균 입도와 제타전위를 측정된 결과 키토산의 용매가 증가할수록 입도가 증가하는 것으로 나타났지만 2.5% 키토산 용매의 경우 다소 감소된 입도를 보였다. 제타전위도 마찬가지로 키토산의 용매가 증가할수록 제타전위 값도 증가하였지만 2.5% 키토산 용매의 경우 가장 낮은 제타전위 값을 보였다.

Low molecular weight 키토산 용액의 농도별 pH와 제타전위를 측정된 결과 Low molecular weight 키토산 용매의 농도가 증가할수록 pH의 수치는 비슷하게 나타났다. 제타전위 측정 결과 Low molecular weight 키토산 용매의 농도가 증가할수록 제타전위 값도 증가하다가 2.5% Low molecular weight 키토산 용매부터 감소하는 것으로 나타났다. low molecular weight 키토산과 TPP를 이용한 용매의 평균 입도와 제타전위를 측정된 결과 0.5%에서 1.5% Low molecular weight 키토산의 용매가 비슷하게 나타났으나 2% Low molecular weight 키토산 용매부터 입도가 크게 증가하였다. 제타전위를 측정된 결과 Low molecular weight 키토산 용매에 따라 각각 다른 제타전위 값을 보였다.

Medium molecular weight 키토산 용액의 농도별 pH와 제타전위를 측정된 결과 Medium molecular weight 키토산 용매의 농도가 증가할수록 pH는 비슷한 것으로 나타났다. 제타전위 측정 결과 Medium molecular weight 키토산 용매의 농도가 증가할수록 제타전위 값도 증가하는 것으로 나타났다. Medium molecular weight 키토산과 TPP를 이용한 용매의 평균 입도와 제타전위를 측정된 결과 medium molecular weight 키토산과 TPP를 이용한 용매의 입도 측정 결과 0.5%에서 1.5% Medium molecular weight 키토산의 용매로 증가할수록 입도가 감소하는 것으로 나타났으나 2% Medium molecular weight 키토산 용매부터는 입도가 크게 증가하였다. 제타전위의 경우 Medium molecular weight 키토산 용매가 증가할수록 제타전위 값도 증가하는 것으로 나타났다.

High molecular weight 키토산 용액의 농도별 pH와 제타전위를 측정된 결과 High molecular weight 키토산 용매의 농도가 증가할수록 pH는 비슷한 것으로 나타났으며, 제타전위 측정 결과 High molecular weight 키토산 용매의 농도가 증가할수록 제타전위 값도 증가하였다. High molecular weight 키토산과 TPP를 이용한 용매의 평균 입도와 제타전위를 측정된 결과 high molecular weight 키토산과 TPP를 이용한 용매의 입도 측정 결과 High molecular weight 키토산의 용매가 증가할수록 입도도 증가하는 것으로 나타났으며, 2.5% High molecular weight 키토산 용매에서 입도가 크게 증가하였다. 제타전위를 측정된 결과 키토산 용매가 1.5% High molecular weight 키토산 용매까지 증가하였으나, 1.5% High molecular weight 키토산 용

때부터는 키토산 용매가 증가할수록 제타전위 값이 유지되는 것으로 나타났다.

1% 키토산의 종류를 달리하여 TPP와의 비율을 3 : 1로 하여 나노입자를 제조하여 그 입자를 SEM으로 관찰한 결과 키토산의 분자량이 증가할수록 입자의 크기가 증가하는 경향을 보이며, 키토산의 분자량이 작을수록 키토산 사슬간의 엉킴이 증가하는 것으로 나타났다.

(2) 키토산-TPP 담체의 평균입도, 캡슐화효율 및 용출특성

분말 제형 개발을 위해서 분산상 용매, 가교제 (TPP)의 농도 등을 공정변수로 설정하여 실험한 결과 80% 이상의 캡슐화효율을 나타내었으며, Dichloromethane 만을 사용하였을 때보다 acetone 혹은 ethanol을 혼합한 경우 평균입도가 낮게 나타났으나, 캡슐화 효율의 경우 dichloromethane 만을 사용한 조건에서 높은 값을 나타내었다.

핵물질 (core material)인 allicin의 경우 물에 대한 용해도가 낮은 관계로 DCM만을 용매로 사용하였을 때, 가장 높은 캡슐화효율 값을 나타내었다.

또한 TPP 함량을 변수로 하였을 때, 90% 수준까지 캡슐화 효율이 증가함을 확인하였으며, 에멀전 : TPP의 비율이 5 : 3일 경우 평균입도도 낮게 나타났다.

키토산 함량에 따른 용출시험 결과 단순 확산 (Fickian Diffusion)에 의한 용출 양상을 나타내었다.

(3) Alliin-loaded PCL 나노입자의 제조 및 용출 시험

PCL을 벽물질로 이용하여 제조한 후 그 입자를 AFM으로 관찰한 결과 키토산에 비해 입자의 크기가 균일한 것으로 나타났다.

분산상 용매의 조정을 달리하여 제조한 PCL 나노입자의 입도와 제타전위를 측정된 결과 dichloromethane만 사용하였을 때 에탄올과 아세톤을 혼합한 경우보다 입도가 크게 측정되었다. 캡슐화 효율의 경우에도 dichloromethane만을 사용한 조건에서 높은 값을 나타내었다.

분자량에 따른 PCL 나노입자의 입도와 제타전위를 측정된 결과는 분자량이 증가할수록 입도가 크게 측정되었으며, 제타전위의 경우 분자량이 증가할수록 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타났다. 캡슐화 효율의 경우에는 분자량이 증가할수록 높은 값을 나타내었다.

PCL과 DCM을 이용한 Allin의 용출 시험 결과 pH가 높을수록 용출되는 시간이 빨랐으며, PCL의 분자량이 낮을수록 빨리 용출되는 것을 알 수 있었다.

3. 유효성분 함유 NSM system의 기능성 평가시스템 개발

가. 유효성분 함유 NSM system의 저장 안정성 평가

(1) 초고압균질기에 의한 O/W emulsion 제조

(가) 계면활성제로 Tween 80과 Lecithin 이용

① 1% Tween 80 이용

1% Tween 80 이용하여 Aqueous phase : Surfactant : oil을 10 : 1 : 1 및 10 : 1 : 3으로 고정하고 oil phase로서 corn oil을 사용하여 제조한 에멀전의 저장기간에 따른 입도변화를 분석한 결과 23일이 지난 후 입도가 크게 변화하지 않고 안정된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 계면활성제인 Tween 80이 1%인 경우 oil의 비율에 따라서 큰 입도차이를 나타내지 않았으며, 이 경우 초고압 균질기 사용 여부에 따라서도 입도 차이를 나타내지 않았다.

② 2% Tween 80 이용

2% Tween 80 이용하여 계면활성제인 Tween 80의 농도를 2%로 증가시켜서 Aqueous phase : Surfactant : oil을 10 : 2 : 1 및 10 : 2 : 3으로 고정하고 oil phase로서 corn oil을 사용하여 제조한 에멀전의 저장기간에 따른 입도변화를 분석한 결과 23일이 지난 후 입도가 크게 변화하지 않고 안정된 것을 확인할 수 있었으며, 계면활성제가 낮은 (1%)인 경우에 비해서 초고압 균질기 사용 여부에 따른 입도 차이가 발생한 것을 알 수 있었다. Oil의 함량의 경우 낮은 (1%)인 경우 높은 (3%) 경우에 비해서 균질기에 의한 안정성이 확연하게 나타난 것을 확인하였다.

③ Tween 80과 Lecithin 이용한 O/W 에멀전의 표면 사진

계면활성제로 Tween 80과 Lecithin을 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간에 따라 사진으로 관찰한 결과 초고압 균질기에 의해서 에멀전의 안정성이 크게 증대되는 것을 알 수 있었다.

(나) 계면활성제로 PGMS와 PGPR 이용

① 계면활성제 (PGMS 및 PGPR)의 비율을 달리한 에멀전의 제조 및 저장안정성

○ 상온에서의 저장안정성

PGMS 및 PGPR을 사용하고 그 비율을 달리하여 초고압균질기로 균질화 시킨 에멀전의 상온에서의 저장기간에 따른 안정성 평가를 위해 입도를 측정된 결과 약 2주간 상온에서의 저장 안정성 시험을 해 본 결과 PGPR에 비해서 PGMS의 경우 높은 안정성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. PGMS를 사용하였을 때 2주간 상분리가 발생하지 않은 반면, PGPR의 경우 2주 정도 지나서 상분리가 발생하는 것을 확인할 수 있었다.

○ 냉장조건에서의 저장안정성

PGMS 및 PGPR을 사용하고 그 비율을 달리하여 초고압균질기로 균질화 시킨 에멀전의 냉장 조건에서의 저장기간에 따른 안정성 평가를 위해 입도를 측정된 결과 초고압 균질기를 사용한 경우 저장기간 (약 30일)이 지남에 따라 입도가 일정하게 유지되는 것으로 볼 때, 일반적인 에멀전에 비해서 초고압균질기를 사용할 경우 그 안정성이 크게 증대되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 PGMS에 비해서 PGPR의 경우 작은 입도를 나타내었으며, PGPR에 비하여 PGMS의 경우 1% 이상 사용할 경우 그 입도의 안정성이 크게 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

○ 냉동/해동 (Freeze & Thaw) 반복에 따른 안정성 평가

PGPR과 PGMS를 이용하여 제조한 에멀전에 대하여 냉동 및 해동을 반복함에 따른 에멀전의 변화를 관찰한 결과 PGPR을 이용하여 제조한 에멀전의 경우 냉동/해동을 반복함에 따라서 에멀전의 상분리가 발생하는 것을 확인하였다. 반면 PGMS를 계면활성제로 사용하였을 때 냉동/해동을 3번 반복하여도 사진상으로 상분리가 발생하지 않는 것을 알 수 있었고, 입도 역시 크게 증가하지 않는 것으로 나타났다. 이에 PGMS가 본 시스템에서의 에멀전 제조에 적합한 것으로 나타났다.

② Oil의 비율을 달리하여 제조한 에멀전의 저장 기간에 따른 안정성 평가

Oil의 비율을 달리하여 PGMS 및 PGPR을 사용하고 초고압균질기를 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 시간에 따른 입도 변화를 관찰한 결과 약 2주 동안 저장 안정성을 관찰하였을 때 두 가지 계면활성제 모두 입도 변화가 크게 나타나지 않은 것을 확인하였으며, 특히 PGMS의 경우 oil의 비율이 낮을수록 입도가 더 낮게 나타났으며, 그 변화도 훨씬 적게 나타났다.

③ 키토산을 이용한 O/W 에멀전의 제조

Aqueous phase wall material로서 키토산 (1%)를 사용하여 O/W 에멀전을 제조한 후 계면활성제의 종류 및 농도, O : W 비율 등에 따라서 입도 및 제타전위를 측정된 결과 제타전위의 경우 약 50 mV 수준의 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 매우 안정된 값을 나타낸다.

○ 키토산을 이용한 o/w 에멀전의 저장안정성

키토산을 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간(상온 및 냉장)에 따른 표면을 관찰한 결과 상온에서 저장기간 10일 동안 PGMS와 PGPR 모두 상분리가 발생하지 않았고, 또한 O : W 비율이 증가하더라도 큰 차이를 나타내지 않았다. 냉장조건에서 10일 동안 안정성시험을 한 결과, PGMS의 경우 O : W 비율이 높은 시료구(5 : 10)에서 상분리가 발생하였으나, PGPR을 사용한 경우 큰 변화를 나타내지 않았다.

④ 키토산과 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전의 제조

키토산과 알긴산을 이용하여 제조한 O/W/W 에멀전의 입도 및 제타전위를 나타낸 결과 키토산만을 사용한 것과는 달리 알긴산의 음의 전하로 인해 제타전위 값이 -20mV 수준으로 감소한 것을 확인할 수 있었다.

⑤ O/W/W 에멀전의 점도 측정

O/W/W 에멀전의 점도를 측정한 결과 고분자를 사용하지 않은 경우보다 고분자를 사용할 경우 점도 값이 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 알긴산을 추가적으로 사용하였을 때 점도 값이 크게 증가하는 것을 확인하였다.

(2) 마늘 추출물을 이용한 에멀전의 안정성 평가

(가) 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전 제조

① 저장기간 동안 마늘 추출물과 에멀전의 전자공여능

○ 에탄올의 농도를 달리한 마늘 추출물의 저장안정성

저장기간 (약 21일) 동안 에탄올의 농도별로 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 약 3주간 동안 에탄올의 농도를 달리하여 냉장, 상온 및 40℃에 저장한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 같은 추출물은 온도를 달리하였을 경우에도 비슷한 전자공여능을 보였으며, 4일째에 가장 높은 활성을 보였다.

○ 온도를 달리한 마늘 추출물의 저장안정성

저장기간 (약 21일) 동안 온도를 달리하여 에탄올의 농도별로 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 100% 에탄올 추출구에서 가장 높은 전자공여능을 보였으며, 0% 에탄올 추출구에서 가장 낮은 전자공여능을 보였다. 또한 온도를 달리하여 저장하였을 경우에도 비슷한 전자공여능을 나타내었으며, 저장기간 7일에 전자공여능이 가장 낮아지는 것으로 나타났다.

○ 에탄올의 농도를 달리한 마늘 추출물 에멀전의 저장안정성

저장기간 동안 (약 21일) 에탄올의 농도별로 제조한 마늘 추출물 에멀전의 전자공여능을 측정한 결과 마늘 추출물 에멀전을 저장기간 (약 21일)이 지남에 따라 전자공여능은 점차 감소하는 것으로 나타났으며, 40℃에서 저장한 마늘 추출물 에멀전이 가장 크게 변화한 것으로 나타났다. 입도를 측정한 결과 초고압 균질기를 사용한 경우 저장기간 (약 21일)이 지남에 따라 입도가 일정하게 유지되는 것으로 나타났고, 마늘 추출물의 농도와는 상관없이 입도가 비슷하게 유지되는 것으로 나타났다.

○ 온도를 달리한 마늘 추출물 에멀전의 저장안정성

저장기간 동안 온도를 달리하여 에탄올의 농도별로 제조한 마늘 추출물 에멀전의 전자공여능을 측정한 결과 냉장 보관을 하였을 때 시간이 지날수록 전자공여능 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 상온 보관하였을 경우에는 50% 마늘 추출물 에멀전은 저장기간이 지남에 따라 전자공여능이 증가하는 것으로 나타났다. 40℃에 보관하였을 경우, 저장기간이 지남에 따라 전자공여능이 점차 감소하다가 11일이 경과한 후부터 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 냉동 보관 시에는 0%와 50% 마늘 추출물 에멀전의 경우 전자공여능이 감소하였으나 100% 마늘 추출물 에멀전은 전자공여능이 증가하는 것으로 나타났다. 입도를 측정한 결과 50%와 100% 마늘 추출물 에멀전은 온도에 영향을 받아도 저장기간이 지남에 따라 입도가 비슷하게 유지되는 것

으로 나타나 50%와 100% 마늘 추출물 에멀전이 크게 안정성이 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

② 저장기간 동안의 마늘 추출물과 에멀전의 평균 입도 측정

○ 에탄올의 농도를 달리한 마늘 추출물 에멀전의 저장안정성

0.5% 키토산을 이용하여 계면활성제인 PGPR (2%)을 사용하고 초고압균질기로 균질화시킨 W/W/O/W 에멀전의 저장기간에 따른 입도와 제타전위를 측정된 결과 냉장, 상온 및 40℃에서 보관하였을 때 입도는 3-4 um으로 비슷하게 측정되었다. 제타전위는 냉장 보관 시 저장기간 9일에 제타전위 값이 가장 낮게 측정되었으며, 상온 보관 시 저장기간 6일에 가장 낮은 제타전위 값을 나타내었다. 40℃에서 보관하였을 경우 저장기간이 증가함에 따라 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타났다.

○ 온도를 달리한 마늘 추출물 에멀전의 저장안정성

0.5% 알긴산을 이용하여 계면활성제인 PGPR (2%)을 사용하고 초고압균질기로 균질화시킨 W/W/O/W 에멀전의 저장기간에 따른 입도와 제타전위를 측정된 결과 0%와 50% 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전의 경우 입도는 비슷하게 측정되었다. 제타전위의 경우 0% 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전이 좀 더 낮은 값을 보였다. 0.5% 알긴산에 100% 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전의 경우에는 바로 상분리가 나타났다. 0.5% 알긴산을 이용한 W/W/O/W 에멀전의 경우에는 냉동, 냉장, 상온 및 40℃ 저장하여 1일이 지난 후 바로 상분리가 나타나 알긴산에 비해 키토산의 안정성이 크게 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 특허출원

- 본 연구결과의 산업재산권 확보차원에서 “chitosan-TPP 나노입자 및 그의 제조방법 (출원번호 : 10-2010-0054787, 2010.06.10)”과 “항산화 활성이 유지된 조성물 및 이의 제조방법 (출원번호 : 10-2011-0031834, 2011.04.06)”을 특허출원하였다. 이 외에 “생물고분자를 이용하여 안정성이 증대된 마늘추출물의 제조방법” 관련 특허출원을 신청한 상태이다. 이 특허들이 등록된 이후, 다양한 용도를 갖는 마늘 미립자 소재의 실용화를 위한 자료 및 기술이전의 근거로 활용될 수 있게 될 것으로 기대된다.

나. 논문발표

- 본 연구결과를 바탕으로 SCI급 해외 저명 학술지에 논문을 게재하였으며 (Preparation of Acetylated Chitosan sponges, Journal of Applied Polymer Science, 117, 1618-1623(2010)), 이 외에 2편의 논문을 Food Science and Biotechnology에 투고 준비 중에 있다.

다. 학술대회 발표

- 마늘 내 유기황화합물의 추출 및 생리활성 분석 (2009 한국식품영양과학회)
- Nano-Structured Microparticle (NSM) system의 저장기간에 따른 특성 평가 (2010 한국식품과학회)
- 추출조건에 따른 마늘 내 활성물질의 분석 (2010 한국식품과학회)
- Antioxidant activities of garlic extracted with different extraction solvents (2010 International Congress on Food Technology, Turkey)
- Preparation of o/w/w emulsion using biopolymers as stabilizing materials (2011 한국식품과학회)

2. 성과활용 계획

- 개발된 황화합물 미립자 소재의 분말 및 액상 제품의 특허 등록 및 업체와의 협의를 통하여 기술 이전할 계획임
- 본 연구 결과를 토대로 해외 특허 출원 및 유명 SCI급 저널에 추가적으로 투고할 예정임

SUMMARY

I. Title of Research

Development of nano structured microparticles of organo-sulfur compounds by colloid interfacial technology

II. The Objectives and Importance of Research

The overall objective of this project is to develop novel multifunctional delivery systems, based entirely on agricultural products, which can be used to carry, protect and release functional food and agricultural components, such as bioactive lipids, antioxidants, antimicrobials, and flavors. Nanotechnology would be used to structure the delivery systems so that they could release functional components at a controlled rate in response to specific changes in environmental conditions (e.g., pH, ionic strength, temperature). These nano-structured delivery systems would have advantages over many existing technologies because they are relatively inexpensive, biodegradable, biocompatible, and provide novel encapsulation properties.

Functional ingredients (such as drugs, vitamins, antimicrobials, antioxidants, flavors, colors and preservatives) are essential components of a wide range of industrial products, including pharmaceuticals, health care products, cosmetics, agrochemicals and foods (Karsa and Stephenson 1993, Risch and Reineccius 1995, Forster and Rybinski 1998, Goddard and Gruber 1999, Wise 2000, Shefer and Shefer 2003). These functional ingredients come in a variety of different molecular and physical forms, e.g., polarities (polar, non-polar, amphiphilic), molecular weights (low to high), and physical states (solid, liquid, gas). Functional ingredients can rarely be utilized directly in their pure form. Instead, they have to be incorporated into some form of delivery system. A delivery system must perform a number of different roles. Firstly, it serves as a vehicle for carrying the functional ingredient to the desired site of action. Secondly, it may have to protect the functional

ingredient from chemical degradation (e.g. oxidation) during storage and utilization so that it remains in its active state. Thirdly, it may have to be capable of controlling the release of the functional ingredient, e.g., the release rate or the specific environmental conditions that trigger release (e.g., pH, ionic strength or temperature). Fourthly, it has to be compatible with the other components in the system. The characteristics of the delivery system are one of the most important factors influencing the efficacy of functional ingredients in many industrial products. A wide variety of different types of delivery system have been developed to encapsulate functional ingredients, including simple solutions, association colloids, emulsions, biopolymer matrices, etc. Each type of delivery system has its own specific advantages and disadvantages for encapsulation, protection and delivery of functional ingredients, as well as in its cost, regulatory status, ease of use, biodegradability, biocompatibility etc.

III. The Scope and Contents of Research

1. Development of extracting process of the functional ingredients

- Material selection
- Development of high-efficiency extracting process
- Maintaining the activity of functional materials
- Optimization of extracting process
- Analysis of changes in functional ingredients during extracting process

2. Development of Encapsulation of functional materials by Nano-Structured Microparticles (NSM) system

- Preparation of NSM system
- Analysis of changes in physicochemical properties of NSM at different processes
- Encapsulation of functional materials and improvement of encapsulation efficiency
- Stability evaluation during storage

3. Development of powdered/paste products

- Preparation of powdered/paste products by NSM system
- Improvement of physicochemical properties of powdered/paste products
- Material balance and economical analysis
- Patent and publication

4. Application tests and scale-up plan

- Search for use of high value added functional materials
- Storage induced changes and analysis by processing steps
- Material balance and economical analysis
- Patent and publication
- Additional test for technology transfer and industrialization

IV. Results

1. Development of extraction and stabilization of organo-sulfur compounds

1) Analysis of organo-sulfur compounds

Three types of organo-sulfur compounds, such as alliin, S-allylcysteine, allicin were analyzed, in which methanol, acetone, ethanol, and deionized water were used as extracting solvents.

Alliin contents increased when DW and methanol were used as extracting solvents, while S-allylcysteine contents increased as DW decreased. When it comes to acetone as an extracting solvent, alliin content decreased as acetone increased. Higher content of alliin was obtained in ethanol than in acetone.

In order to optimize extracting efficiency, 3 types of conditions, such as, time (2, 3, and 4 hours), solvent type and ratio, temperature (60, 70, and 80°C) were used as extracting parameters. There were few differences in alliin contents regardless of temperature and time, except for 100% ethanol condition, in which alliin content decreased rapidly. The largest amount of SAC was extracted at 70% ethanol concentrations.

2) Physiological evaluation of garlic extracts

Garlic extracts showed antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*.

Electron donating ability increased as methanol concentration, while the highest activity were shown at 50% acetone concentration. As extracting temperature increased, EDA value decreased, while there were no differences in EDA value with extracting times. In order to inhibit the allinase activity, garlic was boiled, in which higher activities were shown at higher temperatures.

SOD-like activities increased as DW content increased when methanol and acetone were used as extracting solvents. Ethanol extracts produced lower SOD-like activities at 8 0°C than other temperatures, in which activities increased as extracting time increased, indicating more than 3 hours are required in order to produce the optimum SOD-like activities.

Total polyphenol content increased as methanol and acetone content increased. In case of ethanol extracts, the higher the extracting temperature and the higher ethanol content, total polyphenol content increased.

The nitrite scavenging ability was pH-dependant, highest at pH 1.2, and lowest at pH 6.0, and boiled garlic showed lower nitrite scavenging ability than non-boiled garlic.

There were no significant differences in ACE-inhibition rate with ethanol content and the lowest rate were shown at 50% ethanol extracts.

Boiled garlic showed lower FRAP value than non-boiled garlic, and it decreased as ethanol content increased.

2. Development of Encapsulation of functional materials by NSM system

1) Optimization of processing parameters in NSM system

○ Preparation of O/W emulsion using chitosan solution

Puluronic F-68 and Tween 80 were used as emulsion stabilizers. Pluroni F-68 produced unstable emulsions, while Tween 80 produced stable emulsions.

○ Preparation of Multi-layered emulsion (W/O/W)

In order to prepare w/o/w multi-layered emulsions, alginate solution was used as inner wall materials, and ι-carrageenan, 1% κ-carrageenan, 1% λ-carrageenan, 1% alginate, 1% gum, and 1% WPI were used as outer wall materials, in which there were no phase separation and droplet particles size was 1-3 μm.

○ Preparation of O/W/W emulsion using pectin and β-lactoglobulin

The ratio of pectin:β-lactoglobulin were 1 : 9 and 1 : 50, in which lower mean particle sized emulsions were prepared at higher pH. As concentration of pectin increased, mean particle size of emulsion increased and showed negative value of zeta potential.

2) Preparation of O/W emulsion by homogenization

○ Effect of processing parameters on the characteristics of emulsions

In case of aqueous phase emulsion stabilizer, Span 20 produced low mean particle sized emulsion when 2% gelatin solution was used as an aqueous phase emulsion stabilizer. There were no differences in mean size when using Tween 80 and Tween 20 as aqueous phase emulsion stabilizers. The lowest mean sized emulsions were obtained when pluronic F-68 was used as an aqueous phase emulsion stabilizer.

In case of oil phase, when corn oil was used, the lowest mean particle sized emulsions were obtained.

In case of oil phase emulsion stabilizers, PGMS produced the lowest mean particle sized emulsions.

In case of o/w emulsion prepared by PGMS and PGPR as emulsion stabilizers, as ω (frequency) increased, G' and G'' increased and higher G' values were obtained than G'' at higher frequency, indicating viscous properties of emulsions.

3) Preparation of O/W emulsion by high-pressure homogenization

- Effect of processing parameters on the characteristics of emulsions

High-pressure homogenization produced much lower sized emulsions than conventional homogenization system. High-pressure homogenized O/W emulsions prepared by Tween 80 and lecithin as emulsion stabilizers, mean size decreased as emulsion stabilizer content increased and oil content decreased.

O/W emulsion prepared by high pressure homogenization (300 bar) showed viscous property in broader frequency range than that prepared by conventional homogenization process. Emulsions were also frequency-dependant, in which as frequency increased, G' and G'' increased.

4) Chitosan/alginate-induced emulsions

- O/W emulsion using chitosan

Chitosan emulsions showed high zeta potential regardless of pH, and O : W ratio had an effect on the mean size of the emulsions.

- O/W/W emulsion using chitosan and alginate

Oil in water in water emulsions prepared with chitosan and alginate as wall materials, were also affected by concentration of emulsion stabilizer, in which negative zeta potentials were obtained, due to the negative charge of alginate solution.

2) Encapsulation of functional materials

- Chitosan-TPP nanoparticles

High encapsulation efficiency (above 80%) was obtained using chitosan-TPP nanoparticles, in which dichloromethane was used as dispersed phase solvents. When TPP

content was varied, much higher encapsulation efficiencies (90%) were obtained. Chitosan-TPP nanoparticles showed Fickian diffusion in release profiles.

○ Alliin-loaded PCL nanoparticles

In case of poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles, as molecular weight increased, mean particle size and encapsulation efficiency increased. When dichloromethane was used as dispersed phase solvents, mean particles size was higher than those of ethanol and acetone, and the highest encapsulation efficiency was obtained with dichloromethane.

In release profile, the lower the molecular weight of PCL, release rate was much rapid than that of higher molecular weight.

3. Evaluation system for functionality of NSM system

1) High-pressure homogenization

There were few changes in mean particles size of O/W emulsion prepared with 1% and 2% of Tween 80 solution as emulsion stabilizer during 23 days of storage, in which oil content has few effect on the stability of emulsions. When lecithin was added to Tween 80 solution as an emulsion stabilizer, stability increased.

2) Storage at ambient temperature

PGMS and PGPR produced O/W emulsion with high stability, in which there were no phase separation with PGMS, while phase separation was recognized in 2 weeks of storage at ambient temperature.

3) Storage at cold temperature

PGMS and PGPR produced O/W emulsion with high stability, in which there were no phase separation in both emulsion stabilizers during 1 month of storage at cold

temperature, while mean particle size slightly increased with PGMS. When PGMS was used above 1%, emulsion stability was improved highly.

4) Freeze/Thawing test

In case of PGMS, there were no phase separation were shown with 3 cycles of freeze/thawing. However, there were phase separation with PGPR as emulsion stabilizer, indicating PGMS is optimum emulsion stabilizer.

5) Chitosan Emulsion

When chitosan was used as wall materials, stability of O/W emulsion was maintained during storage of 10 days at ambient and cold temperatures. In addition, o:w ratio had no effect on the stability of emulsions.

In case of W/W/O/W emulsions prepared with 0.5% chitosan and 2% PGPR using homogenization, mean particles size were around 3-4 um regardless of storage temperatures. Zeta potential of W/W/O/W emulsions were decreased during storage at 4 0°C.

6) Alginate emulsion

Oil in water in water emulsion was prepared with chitosan and alginate as wall materials, in which negative zeta potential values (-20 mV) were obtained due to the negative charge of alginate solution. In comparison with chitosan emulsion, viscosity increased largely.

In case of W/W/O/W emulsions prepared with 0.5% alginate and 2% PGPR using homogenization, phase was separated during storage at higher temperature.

7) Storage stability of emulsion containing garlic extracts

Electron donating ability of emulsion was measured, in which the higher the ethanol concentration, the higher EDA values were obtained. During storage, EDA values decreased

rapidly at 40°C. However, in case of emulsions prepared using high-pressure homogenization, there were few differences in EDA values during storage regardless of the concentration of garlic extracts.

V. Application of the Results and Future Plan

1. Application of the Results

- Patent

- Chitosan-TPP nanoparticle and Process for preparing the same (10-2010-0054787, 2010.06.10)
- Composition for maintaining antioxidant activity and method of manufacturing the same (10-2011-0031834, 2011.04.06)

- Publication

- Preparation of Acetylated Chitosan sponges, Journal of Applied Polymer Science, 117, 1618-1623 (2010)

2. Future Plan

- Patent and Publication

- Additional test for technology transfer and industrialization

Contents

Chapter 1 Introduction of the project	40
Chapter 2 Technical Trends	42
Chapter 3 Contents of research and scope	43
Section 1 Materials and methods	43
1. Materials	43
2. Methods	43
A. Extraction and stabilization of organo-sulfur compounds	43
(1) Analysis of organo-sulfur compounds (Alliin, SAC, Allicin)	43
(2) Physiological properties	43
(A) Antimicrobial property	43
(B) Electron Donating Abilities	44
(C) Superoxide Dismutase (SOD) like activity	45
(D) Total polyphenol content	45
(E) Nitrite scavenging activity	45
(F) Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibition	46
(G) Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay	47
B. Encapsulation of functional materials by NSM system	47
(1) Preparation of emulsions	47
(A) O/W emulsion	47
(B) W/O/W emulsion	48
(C) O/W/W emulsion	48
(D) Microemulsion	49
(E) Biopolymer emulsion	49
(2) Encapsulation of functional materials	50
(A) Chitosan-TPP Nanoparticles	50

(B) Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) Nanoparticles	51
C. Evaluation system for functionality of NSM system	51
(1) O/W emulsion by High-pressure homogenization	51
(2) O/W/W emulsion containing garlic extracts	52
(3) W/W/O/W emulsion containing garlic extracts	52
(4) Storage of emulsion	52
D. Analysis of functional materials	53
(1) Mean particle size	53
(2) Zeta potential	53
(3) Viscoelastic property	53
(4) pH	53
(5) Scanning Electron Microscope	53
(6) Atomic Force Microscope	53

Section 2 Results and discussion54

1. Extraction and stabilization of organo-sulfur compounds	54
A. Material Selection	54
B. Moisture content	54
C. Analysis of organo-sulfur compounds	54
(1) Analysis of organo-sulfur compounds at different extracting solvent	58
(A) Methanol extraction	58
(B) Acetone extraction	59
(C) Ethanol extraction	60
(2) Analysis of organo-sulfur compounds at other processing conditions	60
(A) Extracting temperature	60
(B) Extracting time	62
D. Physiological properties	63
(1) Antimicrobial property	63
(2) Electron Donating Abilities	64
(3) Superoxide Dismutase (SOD) like activity	72
(4) Total polyphenol content	78
(5) Nitrite scavenging activity	82

(6) Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibition	83
(7) Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay	84
2. Encapsulation of functional materials by NSM system	88
A. Preparation of emulsions	88
(1) O/W emulsion	88
(2) W/O/W emulsion	90
(3) O/W/W emulsion	92
(4) Microemulsion by Homogenization	99
(5) Microemulsion by High-Pressure Homogenization	109
(6) Biopolymer emulsion	115
B. Encapsulation of functional materials	138
(1) Chitosan-TPP Nanoparticles	138
(2) Poly (ε-caprolactone) (PCL) Nanoparticles	144
3. Evaluation system for functionality of NSM system	153
A. O/W emulsion by High-pressure homogenization	153
B. O/W/W emulsion containing garlic extracts	164
C. W/W/O/W emulsion containing garlic extracts	171
4. Development of paste/powdered products	176
Chapter 4 Accomplishment of objects and contribution for the related fields	178
Chapter 5 Outcomes and applications of the results	181
Chapter 6 Accumulated informations of foreign scientific technology	184
Chapter 7 References	188

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	40
제 1 절 연구개발의 목적	40
제 2 절 연구개발의 필요성	40
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	42
제 1 절 세계적 수준	42
제 2 절 국내수준	42
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	43
제 1 절 재료 및 방법	43
1. 실험재료	43
2. 실험방법	43
가. Organo-sulfur compounds의 추출 및 안정화 기술 개발	43
(1) HPLC를 이용한 organo-sulfur compounds (Alliin, SAC, Allicin)의 분석	43
(2) 마늘 내 생리활성 측정에 따른 추출효과 분석	43
(가) 항균 실험	43
(나) 전자공여능 (Electron Donating Abilities, EDA)	44
(다) Superoxide Dismutase (SOD) 유사 활성	45
(라) 총 폴리페놀의 함량 측정	45
(마) 아질산염 소거 작용	45
(바) Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 저해 활성	46
(사) Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay	47
나. NSM system에 의한 유효성분 포집 기술 개발	47
(1) 공정 변수에 따른 NSM system의 최적 조건 도출	47
(가) O/W 용액 제조	47
(나) W/O/W 용액 제조	48
(다) O/W/W 용액의 안정성 측정	48

(라) Microemulsion 제조	49
(마) Chitosan과 alginate를 이용한 에멀전 제조	49
(2) 유효성분의 포집 기술 개발	50
(가) Chitosan-TPP 담체의 제조 및 용출 시험	50
(나) 용매회발법에 의한 Poly (ε-caprolactone) (PCL) 나노담체의 제조 및 용출 시험	51
다. 유효성분 함유 NSM system의 기능성 평가 시스템 개발	51
(1) 초고압균질기에 의한 O/W emulsion 제조	51
(2) 마늘 추출물을 이용한 O/W/W 에멀전 제조	52
(3) 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전 제조	52
(4) 에멀전의 저장기간에 따른 안정성 평가	52
라. NSM system에 의한 유효성분 분석	53
(1) 입도 측정	53
(2) 제타전위 측정	53
(3) 동적 점탄 특성 측정	53
(4) pH 측정	53
(5) 주사전자현미경 (SEM) 관찰	53
(6) Atomic Force Microscopy (AFM)에 의한 나노담체의 표면 관찰	53
제 2 절 결과 및 고찰	54
1. Organo-sulfur compounds의 추출 및 안정화 기술 개발	54
가. 마늘의 전처리	54
나. 수분함량 측정	54
다. 마늘 내 황화합물의 분석	54
(1) 추출 용매에 따른 황화합물의 분석	58
(가) 메탄올 추출물의 황화합물 분석	58
(나) 아세톤 추출물의 황화합물 분석	59
(다) 에탄올 추출물의 황화합물 분석	60
(2) 추출 조건 (온도, 용매 비율 및 시간)에 따른 에탄올 추출물의 황화합물의 분석	60
(가) 온도에 따른 alliin과 SAC 함량 분석	60
(나) 시간에 따른 SAC 함량 분석	62
라. 마늘 내 생리활성 측정에 따른 추출효과 분석	63

(1) 항균 실험	63
(2) 전자공여능 (Electron Donating Abilities, EDA)	64
(가) 메탄올 추출물의 전자공여능	64
(나) 아세톤 추출물의 전자공여능	65
(다) 에탄올 추출물의 전자공여능	66
(3) Superoxide Dismutase (SOD) 유사 활성	72
(가) 메탄올 추출물의 SOD 유사 활성	72
(나) 아세톤 추출물의 SOD 유사 활성	73
(다) 에탄올 추출물의 SOD 유사 활성	74
(4) 총 폴리페놀의 함량 측정	78
(가) 메탄올 추출물의 총 폴리페놀	78
(나) 아세톤 추출물의 총 폴리페놀	79
(다) 에탄올 추출물의 총 폴리페놀	80
(5) 아질산염 소거 작용	82
(6) Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해 활성	83
(7) Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay	84
(가) 삶기 전, 후의 FRAP assay	84
(나) 삶은 마늘의 추출 온도에 따른 FRAP assay	85
(다) 삶은 마늘의 추출 시간에 따른 FRAP assay	87
2. NSM system에 의한 유효성분 포집 기술 개발	88
가. 공정 변수에 따른 NSM system의 최적 조건 도출	88
(1) Chitosan 용액 제조	88
(가) pluronic F-68 이용	88
(나) Tween 80 이용	88
(2) 다층막(W/O/W) 에멀전 제조	90
(가) Internal aqueous phase로서 alginate 용액 제조	90
① 농도를 달리한 alginate 용액 제조	90
② 균질화 속도를 달리한 alginate 용액 제조	92
(3) β -lactoglobulin에 의한 O/W/W 에멀전의 안정성 측정	92
(가) Pectin과 β -lactoglobulin을 이용한 O/W/W 용액 제조	93
(나) Pectin과 gelatin 용액 제조	97
(4) Homogenization에 의한 O/W emulsion 제조	99

(가) 실험적 변수에 따른 입도 측정에 의한 특성 평가	99
① 2% gelatin 용액 이용	99
② 2% pluronic-F68 용액 이용	101
③ Oil 종류 및 비율을 달리한 에멀전	102
④ PGMS 이용	103
(나) 물성 측정	104
① 계면활성제 (PGMS 및 PGPR)의 비율에 따른 동적 점탄 특성	104
② Oil의 비율에 따른 동적 점탄 특성	107
(5) 초고압균질기에 의한 O/W emulsion 제조	109
(가) 실험적 변수에 따른 입도 측정에 의한 특성 평가	109
① 계면활성제로 Tween 80과 lecithin 이용	109
② Oil의 비율을 달리한 에멀전의 제조	110
(나) 물성 측정	111
① 계면활성제 (PGMS 및 PGPR)의 비율에 따른 동적 점탄 특성	111
② Oil의 비율에 따른 동적 점탄 특성	113
(6) Chitosan과 alginate를 이용한 에멀전 제조	115
(가) Chitosan을 이용한 O/W 에멀전 제조	115
(나) Chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전 제조	121
나. 유효성분의 포집 기술 개발	138
(1) chitosan과 TPP를 이용한 나노입자 제조	138
(가) Chitosan 용매의 농도별 나노입자 제조	138
(나) Low molecular weight chitosan을 이용한 나노입자 제조	139
(다) Medium molecular weight chitosan을 이용한 나노입자 제조	141
(라) High molecular weight chitosan을 이용한 나노입자 제조	142
(마) Chitosan과 TPP를 이용한 나노입자 사진	143
(2) Chitosan-TPP 담체의 제조 및 용출 시험	144
(가) 벽물질 (Wall material)로서 chitosan의 이용	144
(나) Chitosan-TPP 담체의 평균입도 및 캡슐화효율	146
(다) Allicin을 이용한 담체의 용출 시험	147
(3) Alliin-loaded PCL 나노입자의 제조 및 용출 시험	148
(가) 벽물질로서 PCL의 이용	148
(나) 분산상 용매 조정을 달리하여 제조한 PCL 나노입자 분석	149

(다) 분자량에 따른 PCL 나노입자 분석	150
(라) Alliin-loaded PCL 나노입자의 용출 시험	151
3. 유효성분 함유 NSM system의 기능성 평가 시스템 개발	153
가. 유효성분 함유 NSM system의 저장 안정성 평가	153
(1) 초고압균질기에 의한 O/W emulsion 제조	153
(가) 계면활성제로 Tween 80과 lecithin 이용	153
① 계면활성제 (Tween 80과 lecithin) 및 oil의 비율을 달리한 에멀전의 제조 ..	153
㉠ 1% Tween 80 이용	153
㉡ 2% Tween 80 이용	154
㉢ Tween 80과 lecithin 이용한 O/W 에멀전의 표면 사진	155
(나) 계면활성제로 PGMS와 PGPR 이용	156
① 계면활성제 (PGMS 및 PGPR)의 비율을 달리한 에멀전의 제조 및 저장안정성 ..	156
㉠ 상온에서의 저장안정성	156
㉡ 냉장조건에서의 저장안정성	157
㉢ 냉동/해동 (Freeze & Thaw) 반복에 따른 안정성 평가	158
② Oil의 비율을 달리하여 제조한 에멀전의 저장 기간에 따른 안정성 평가	159
③ Chitosan을 이용한 O/W 에멀전의 제조	161
④ Chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전의 제조	163
⑤ O/W/W 에멀전의 점도 측정	163
(2) 마늘 추출물을 이용한 에멀전의 안정성 평가	164
(가) 마늘 추출물을 이용한 W/O/W 에멀전 제조	164
① 저장기간 동안 마늘 추출물과 W/O/W 에멀전의 전자공여능	164
㉠ 에탄올의 농도를 달리한 마늘 추출물의 저장안정성	164
㉡ 온도를 달리한 마늘 추출물의 저장안정성	165
㉢ 에탄올의 농도를 달리한 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 저장안정성	166
㉣ 온도를 달리한 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 저장안정성	168
② 저장기간 동안의 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 평균 입도 측정	169
㉠ 에탄올의 농도를 달리한 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 저장안정성	169
㉡ 온도를 달리한 마늘 추출물 에멀전의 저장안정성	170
(나) Chitosan과 alginate의 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전의 안정성 평가 ..	171

① 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전 제조	171
② 0.5% chitosan을 이용한 W/W/O/W 에멀전의 저장안정성	172
③ 0.5% alginate를 이용한 W/W/O/W 에멀전의 저장안정성	173
4. 페이스트/분말 제품 개발	176
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	178
제 5 장 연구개발 성과 및 성과 활용 계획	181
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	184
제 7 장 참고문헌	188

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구에서는 콜로이드 계면기술을 이용하여 마늘 내 존재하는 기능성 황화합물 함유 나노미립자를 제조하고 이를 이용한 기능성 분말/액상 제품을 개발하고자 하였으며 세부 연구 목적을 다음과 같이 정하였다.

- 마늘 내 존재하는 기능성 황화합물의 추출 공정 최적화를 통한 유효성분의 실활 방지 및 성분 변화를 분석하고자 함
- 나노미립자의 공정단계별 물리화학적 특성 변화를 분석하고 기능성 물질의 포집 및 포집 효율 증대를 통한 효과적인 bioactive delivery system을 구축하고자 함.
- 나노미립자의 페이스트화/분말화를 통하여 고품질 수출용 마늘 가공제품 개발하여 기술이전을 통한 산업화를 추진하고자 함

제 2 절 연구개발의 필요성

- 마늘은 우리나라 농가에 대한 기여도가 매우 큰 중요한 채소임에도 불구하고 셰이프가드 해제 이후 저가의 중국산 마늘의 유입으로 인해 우리 농가 소득에 위협을 가하고 있음.
- 마늘 가공제품은 가공 중 녹변/갈변 등의 변색, 고유의 자극적인 냄새로 인한 문제를 안고 있어 마늘의 우수한 생리활성인 항암, 항균, 고혈압강하, 항혈전, 혈중 콜레스테롤 저하, 중금속 해독 작용 등 다양한 효능에도 불구하고, 가치에 대한 평가절하가 되고 있어 효과적인 활용방안 마련이 시급하다.
- 마늘 및 양파의 가공은 주로 분말 및 페이스트 형태로 가공되어 식품의 중간 소재로 이용되고 있으나, 변색이나 자극성 냄새 등의 문제가 있다.

- 한국인의 식생활에 중요한 마늘은 생체기능을 조절하는 성분을 함유한 건강 유지에 유용한 식품인데 반해 현재 마늘의 소비 형태는 주로 향신료로만 사용되고 있는 실정이다.
- 최근 마늘의 가공제품으로 마늘음료, 식초, 마늘 추출물을 이용한 캡슐, 정제 등 건강보조식품이 출시되고 있으나, 취식성, 기호성이 낮아 상품성에 미흡하다.
- 따라서, 적절한 가공방법으로 우수한 생리활성을 그대로 보존시키며 취식성, 기호성을 증대시킬 수 있는 건강기능성 식품으로의 제품 개발이 필요한 실정이다.
- 또한 우리나라 농산물을 이용하여 농가 소득에 기여할 뿐 아니라 세계인들이 선호할 수 있는 새로운 제품을 개발하는 것이 필요함
- 이를 통해서 부가적으로 국내 신세대의 내수확대도 가능할 것으로 생각됨
- 유효성분의 안정성을 증대시키기 위한 대표적인 방법 중의 하나가 나노기술의 적용이다.
- 나노기술은 크기, 에너지 소비 등을 최소화하면서도 상대적으로 높은 성능을 구현할 수 있기 때문에 가격 경쟁력이 큰 제품개발이 가능하다.
- 나노기술은 원자 혹은 분자 수준에서 물질을 물리적으로 혹은 화학적으로 제어하여 유용한 구조와 기능을 발현시키는 기술이며 이를 통해 종래와는 전혀 다른 원리의 디바이스 구축을 가능하게 하는 기술로서 활용 가능성이 무궁무진할 것으로 기대된다.
- 식품소재에 적용 가능한 기술은 의약품, 화장품, 소재, 화학, 환경 등 인접분야로의 접목 및 기술 확산 가능성이 매우 크다.
- 식품분야에 있어서도 새로운 경제 환경 변화흐름에 맞추어 새로운 성장엔진을 발굴하고 산업 구조를 재편하는 데 있어 나노기술의 활용은 핵심적인 내용이다.
- 현재 거의 모든 첨단산업분야에 나노기술이 활용되고 있어 향후 시장잠재력은 매우 크다고 평가되며 식품 관련분야 역시 그 파급효과가 지대할 것으로 예측된다.

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

제 1 절 세계적 수준

- NSM 시스템과 같은 다층막 시스템의 제조는 선진국에서도 개발 초기 단계이며, 메사추세츠 대학교 식품공학과와 McClements 교수 연구팀을 중심으로 이러한 연구가 진행되고 있음
- 최근의 연구는 웰빙 시대 소비자들의 요구에 부합하기 위해 기존 미세 캡슐 제조에 사용되었던 화학물질을 사용하지 않고 안전성이 확보되는 GRAS한 천연 원료를 중심으로 진행되고 있음
- NSM 시스템과 같은 다층 계면막 시스템을 이용하여 안정성이 확보된 nutraceutical compounds에 대한 전달물질로서 뿐만 아니라 기능성 식품 소재를 개발하는데 이용되고 있음

제 2 절 국내수준

- 국내에서 마늘 및 양파의 냄새 제거에 관해서 연구가 진행되고 있으나, 그 적용 및 유효성분의 안정성 증대에 있어서 추가적인 연구가 필요한 실정임
- 생리활성물질의 포집 시스템으로서 일반적인 에멀전 시스템에 의한 미세캡슐화에 관한 연구는 많이 진행되어 왔으나, 유해한 용매를 사용하는 등의 문제점을 안고 있음
- 일반적인 에멀전 시스템이 가지고 있는 문제점을 보완할 수 있는 Nano-Structured Microparticle (NSM) 시스템을 이용한 연구가 필요함

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 재료 및 방법

1. 실험재료

마늘은 2008년도와 2009년 경북 의성에서 생산된 것을 구입하여 사용하였다. 마늘은 오븐 건조, 동결건조 시킨 시료와 10분 동안 삶은 후 동결건조 시킨 시료를 믹서를 이용하여 조분쇄 한 후 용매별 (methanol, acetone, ethanol), 온도별 (60°C, 70°C, 80°C), 시간별 (2시간, 3시간, 4시간)로 변화시켜서 추출공정을 수행하였다.

2. 실험방법

가. Organo-sulfur compounds의 추출 및 안정화 기술 개발

(1) HPLC를 이용한 organo-sulfur compounds (Alliin, SAC, Allicin)의 분석

마늘추출물 중의 organo-sulfur compounds의 조성 분석을 위해 사용된 기기는 Jasco (Tokyo, Japan) HPLC로 degasser가 장비된 PU-2089 Plus gradient pump, AS-2075 Plus autosampler, 그리고 UV-2075 Plus UV-vis detector로 구성되었다. 분석 컬럼은 YMC-Pack Pro C₁₈ (4.6 × 150 mm i.d., 5 μm, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)을 사용하였고, 시료주입량은 20 μL, 유속은 0.6 mL/min, 컬럼온도는 30°C, 자외선검출기 흡광파장은 208 nm로 설정하여 분석하였다. 이동상으로는 (A) 20 mM sodium dihydrogenphosphate + 10 mM heptanesulfonic acid, pH 2.1 (85% orthophosphoric acid로 조절)과, (B) acetonitrile - 20 mM sodium dihydrogen-phosphate + 10 mM heptanesulfonic acid, pH 2.1 (50:50, v/v)를 초음파 세척기로 탈기하여 사용하였고, 기울기 용리조건 (gradient system)을 이용하여 분석하였다(표 1).

(2) 마늘 내 생리활성 측정에 따른 추출효과 분석

(가) 항균 실험

본 실험에 사용한 균주는 Gram 양성균 중 *Listeria monocytogenes*와 *Staphylococcus aureus*를, Gram 음성균 중 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*를 한국식품연구원에서

분양받아 사용하였다.

시료의 항균활성은 Paper disk agar diffusion method (Yoo *et al.*, 2005)를 응용하여 측정하였다. 즉, 항균성 시험용 평판배지는 각각의 생육배지를 멸균된 기능용 배지로서 petri dish에 15 mL씩 분주하여 응고시킨다. 그 후 이 균주 1 mL (37°C nutrient broth에서 24시간 동안 키운 것을 사용)과 중층용 배지 (18% nutrient agar) 10 mL를 잘 혼합한 것을 고르게 퍼 지도록 도포한 뒤 응고시켜 이중의 균 접종 평판배지를 만들어 사용하였다. 그리고 시료를 지름 8 mm의 멸균된 filter paper disc (Advantec, Yoyo Roshi Co., Japan)에 50 uL씩 흡수시킨 후, 37°C에서 24-48시간 동안 배양하여 disc 주변의 clear zone의 직경 (mm)을 측정하였다.

표 1. HPLC 시스템의 이동상 조성

Time(min)	Composition of mobile phase (%)	
	A	B
0	100	0
5	70	30
25	46	54
26	0	100
28	0	100
30	100	0
40	100	0

A: 20 mM sodium dihydrogenphosphate + 10 mM heptanesulfonic acid, pH 2.1 (adjusted with orthophosphoric acid 85%)

B: acetonitrile - 20 mM sodium dihydrogenphosphate + 10 mM heptanesulfonic acid, pH 2.1 (50 : 50, v/v)

(나) 전자공여능 (Electron Donating Abilities, EDA)

전자공여능은 Blois MS (1958)의 방법을 이용하여 각각의 추출물에 대한 α, α -diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH)의 전자공여 효과로 각 시료의 환원력을 측정하였다. 4×10^{-4} M DPPH 용액 0.8 mL에 에탄올 3-4 mL을 가하여 흡광도 값이 0.95-0.99가 되도록 에탄올의 양을 조정한다. 그 다음 추출물 0.2 mL에 4×10^{-4} M DPPH 용액 (99.9% EtOH에 용해) 0.8 mL를 가하여 총액의 부피가 1 mL이 되도록 한 후 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 한 다음 분광광도계 (V-570, Jasco, Japan)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Electron donating ability (\%)} = \frac{B-A}{B} \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

(다) Superoxide Dismutase (SOD) 유사 활성

SOD 유사 활성은 Marklund & Marklund (1974)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 각 추출물을 감압 농축한 후 tris-HCl buffer (50 mM tris[hydroxymethyl]amino- methane + 10 mM EDTA, pH 8.5)를 이용하여 pH 8.5로 조절된 시료액을 만들었다. 각 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer (50 mM tris[hydroxymethyl] amino-methane + 10 mM EDTA, pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치하였다. 1 N HCl 0.2 mL로 반응을 정지시킨 후 엘라이저 (spectramax M2, Molecular Devices, USA)를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료 첨가 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = \frac{B-A}{B} \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

단, A, B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임

(라) 총 폴리페놀의 함량 측정

총 폴리페놀의 함량은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis 방법으로 측정하였다. 즉, 시료 0.5 mL에 1 N Folin reagent 0.5 mL을 가한 후 3분간 정지한 다음 2% Na₂CO₃ 용액을 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 정지 한 후 분광광도계 (UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하고 tannic acid를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

(마) 아질산염 소거 작용

아질산염 소거 작용은 Gray & Dugan (1975)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 1 mM

아질산나트륨 용액 1 mL에 각각의 추출물을 2 mL를 가하고 여기에 0.1 N HCl (pH 1.2) 및 구연산 완충용액 (pH 3.0, 4.2 및 6.0)을 7 mL 가하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0으로 맞추고 반응용액의 부피를 10 mL로 하였다. 이를 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 반응액을 1 mL씩 취하고 여기에 2% 초산 5 mL, Griess 시약 (acetic acid에 1% sulfanylic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것으로 사용직전에 제조) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에서 방치시킨 후 엘라이저 (spectramax M2, Molecular Devices, USA) 를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 그리고 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염 소거능은 추출액 첨가 전후의 아질산염 백분율 (%)로 표기하였다.

$$\text{Nitrite scavenging ability (\%)} = \frac{B-(A-C)}{B} \times 100$$

N: 아질산염 소거율

A: 1 mM NaNO₂ 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B: 1 mM NaNO₂ 용액에 시료 대신 증류수를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

C: 시료 추출물 자체의 흡광도

(바) Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 저해 활성

ACE 저해 효과는 Chushman & Cheung (1973)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 침출액 50 uL에 450 mM NaCl을 함유하는 100 mM sodium borate buffer (pH 8.3) 100 uL를 가하고, 5 mM hippuryl-histidyl-leucine (300 mM NaCl을 함유하는 100 mM sodium borate buffer(pH 8.3)에 용해) 50 uL를 가한 후 37°C에서 10분간 미리 반응시켰다. 이 반응액에 ACE 조효소액 50 uL를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1.75 N HCl 100 uL를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 1 mL를 가하여 진탕 후 상등액 1 mL를 취하고 100°C에서 1시간가량 건조시킨 후 증류수 1 mL를 가하여 용해시켜 분광광도계 (V-570, Jasco, Japan)를 사용하여 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

공시험은 침출액 대신 증류수 50 uL를 가하였고, 대조구는 1.75 N HCl 100 uL를 가한 후 ACE 조효소액 50 uL를 첨가하여 반응시켰다.

$$\text{ACE inhibition rate (\%)} = \frac{B-A}{B} \times 100$$

A: 추출물 첨가구의 흡광도

B: 추출물 무첨가구의 흡광도

단, A, B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임

(사) Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay

시료의 FRAP assay는 Benzie & Strain (1996)의 방법을 이용하여 측정하였다. 300 mM Acetate buffer 25 mL, TPTZ 2.5 mL와 20 mM FeCl₃ · H₂O 2.5 mL를 10 : 1 : 1의 비율로 혼합하여 FRAP reagent (WFR)를 제조하였다. 37°C에서 3 mL WFR을 취하여 593 nm에서 blank 값을 측정한 후 WFR 용액과 100 uL시료, 300 uL 증류수를 혼합하고 4분간 반응시켰다. 반응 종료 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 FeSO₄ · 7H₂O (100-1000 uM)를 사용하였다.

나. NSM system에 의한 유효성분 포집 기술 개발

(1) 공정 변수에 따른 NSM system의 최적 조건 도출

(가) O/W 용액 제조

① Chitosan 용액 제조

Chitosan, lactic acid, Tween 80, pluronic F-68은 Sigma 시약을, 대두유는 CJ 제일제당(주)를 마트에서 구입하여 사용하였다. 1% lactic acid 용액을 제조한 후 여기에 chitosan을 첨가하여 chitosan 용액 (0.1-0.5%)이 되도록 제조한다. 그 다음 2%, 4%, 6%의 Tween 80과 pluronic F-68을 넣고 1시간 동안 용해시킨 후 대두유와 chitosan 용액을 1 : 20, 5 : 20 (w/w)의 비율로 혼합하여 균질기를 이용하여 제조하였다 (15,000 rpm, 1-2 min).

(나) W/O/W 용액 제조

① Alginate 용액 제조

Alginate, Span 80, Tween 80, gum arabic은 Sigma 시약을 사용하였고, Whey protein isolate (MILEI, Germany), ι -carrageenan, κ -carrageenan, λ -carrageenan은 Korea Carrageen Co., LTD 시약을 사용하였다. 대두유는 CJ 제일제당(주) 제품을 마트에서 구입하여 사용하였다. 0.5-2% alginate를 제조하고, span 80을 1% 농도가 되도록 대두유에 넣어 제조한 후 0.5-2% alginate 1 g에 대두유 (1% span 80) 100 g을 균질화 시킨다 (10,000-12,000 rpm, 5 min). 그 다음 균질화 시킨 W/O 에멀전 1 ml에 ι -carrageenan, 1% κ -carrageenan, 1% λ -carrageenan, 1% alginate, 1% gum, 1% WPI 50 g에 각각의 시료에 1% Tween 80을 넣고 균질화시킨다 (10,000-12,000 rpm, 5 min).

(다) O/W/W 용액의 안정성 측정

① Pectin 용액 제조

㉠ β -lactoglobulin의 이용

β -lactoglobulin, pectin, sodium dihydrogen phosphate는 Sigma 시약을, 대두유는 CJ 제일제당(주)를 마트에서 구입하여 사용하였다. 5 mM phosphate buffer (pH 3.0, 4.5, 7.0)를 제조한 후 각각의 pH 용액에 0.01, 0.02, 0.04, 0.07, 0.1% (v/v) pectin을 각각 제조하고, 5 mM phosphate buffer (pH 3.0, 4.5, 7.0)에 β -lactoglobulin 용해시킨다 (0.5%, w/v). 그 다음 대두유와 각각의 0.5% β -lactoglobulin 용액 (pH 3.0, 4.5, 7.0)을 1 : 9, 1 : 50의 비율로 균질화시키고 (12,000 rpm, 4-5min), waterbath에서 가열처리한다 (80°C, 20 min). 균질화 시킨 용액에 0.01, 0.02, 0.04, 0.07, 0.1% (v/v) pectin을 1 : 9와 1 : 50의 비율로 넣고 균질화시킨다 (12,000 rpm, 4-5 min).

㉡ Gelatin의 이용

Gelatin, pectin, sodium dihydrogen phosphate는 Sigma 시약을 사용하였고, 대두유는 CJ 제일제당(주)를 마트에서 구입하여 사용하였다. 5 mM phosphate buffer (pH 3.0, 4.5, 7.0)를 제조한 후 각각의 pH 용액에 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.07, 0.1% (v/v) pectin을 각각 제조하고, 5 mM phosphate buffer (pH 3.0, 4.5, 7.0)에 gelatin을 용해시킨다 (0.5%, w/v). 그 후 대두유와 각각의 0.5% gelatin 용액 (pH 3.0, 4.5, 7.0)을 1 : 50의 비율로 균질화시키고 (12,000 rpm,

5 min), waterbath에서 가열처리한다 (80°C, 20 min). 균질화 시킨 용액에 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.07, 0.1% (v/v) pectin을 1 : 50의 비율로 넣고 20분 동안 혼합한다.

(라) Microemulsion 제조

Gelatin, pluronic F-68은 Sigma 시약을 사용하였고, Tween 20, Tween 80, Span 20, lecithin은 Junsei 시약을 사용하였다. 옥수수유는 해표와 청정원에서 나온 제품을 구매하여 사용하였으며, 포도씨유, 카놀라유는 백설에서 나온 제품을 마트에서 구입하여 사용하였다. EO (Ethyl oleate)은 Wako, IPM (Isopropyl myristate)은 Dae Jung 시약을 사용하였다. 2% gelatin과 pluronic F-68을 만든 후 2% gelatin과 pluronic F-68을 각각의 0.3% Tween 80, Tween 20, Span 20의 비율로 만든 후 50°C waterbath에서 방치한다. Aqueous phase : Surfactant : Oil의 비율을 10 : 5 : 1과 10 : 1 : 0.3로 혼합하여 균질기를 이용하여 제조하였다 (10,000 rpm, 2min).

(마) Chitosan과 alginate를 이용한 에멀전 제조

① Chitosan을 이용한 O/W 에멀전 제조

Chitosan은 Sigma 시약을 사용하였고, PGMS (Propylene glycol monostearate)는 일신웰스에서 구매하여 사용하였으며, 옥수수유는 청정원에서 나온 제품을 마트에서 구입하여 사용하였다. PGMS를 농도별 (0.5, 1, 2%)로 제조하였으며, chitosan은 농도 (0.1, 0.5, 1%)와 pH (2.0, 3.0, 4.0)를 달리하여 제조한 다음 각각 Oil : Aqueous phase의 비율을 1 : 10, 3 : 10으로 제조하여 12,000 rpm에서 1분간 균질화한 후 초고압 균질기를 이용하여 제조하였다 (300 bar, 2 cycle).

② Chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전 제조

Chitosan과 alginate는 Sigma 시약을 사용하였고, PGMS (Propylene glycol monostearate)는 일신웰스에서 구매하여 사용하였으며, 옥수수유는 청정원에서 나온 제품을 마트에서 구입하여 사용하였다. PGMS는 농도별 (0.5, 1, 2%)로 제조하였으며, chitosan은 농도 (0.1, 0.5, 1%)와 pH (2.0, 3.0, 4.0)를 달리하여 제조한 다음 각각 Oil : Aqueous phase의 비율을 1 : 10, 3 : 10으로 제조하였다. Alginate는 농도 (0.1, 0.5, 1, 2%)를 달리하여 제조한 다음 Oil : Aqueous phase (chitosan)와 Aqueous phase (alginate)의 비율을 1 : 2로 제조하여 12,000 rpm에서 1분간 균질화한 후 초고압 균질기를 이용하여 제조하였다 (300 bar, 2 cycle).

(2) 유효성분의 포집 기술 개발

(가) Chitosan-TPP 담체의 제조 및 용출 시험

① Chitosan-TPP 담체의 제조

㉞ Chitosan 및 TPP 용액의 제조

Chitosan의 경우 1% lactic acid를 증류수에 녹인 뒤 1% 농도가 되도록 chitosan을 기계적 교반기를 이용하여 녹인다. TPP의 경우 4 mg/ml이 되도록 증류수에 녹여서 제조하였다.

㉟ Chitosan-TPP 담체의 제조

위에서 제조된 chitosan 용액 (1%)과 TPP (4 mg/ml) 용액 간의 비율이 20 : 4, 20 : 8, 20 : 12 되도록 취하여 TPP 용액을 chitosan 용액에 30분간 자석 교반을 하면서 넣어준다. 이 때 발생하는 탁한 물질이 chitosan-TPP 나노파티클이다.

㊱ Chitosan과 TPP를 이용한 나노입자 제조

Chitosan과 TPP는 Sigma 시약을 사용하였고, lactic acid는 Junsei 시약을 사용하였다. 키토산은 농도 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/mL)와 종류 (low, medium, high)를 달리하여 0.5 mg/mL TPP 용액과 3 : 1의 비율로 제조하여 500 rpm에서 30분간 교반시켜 제조하였다.

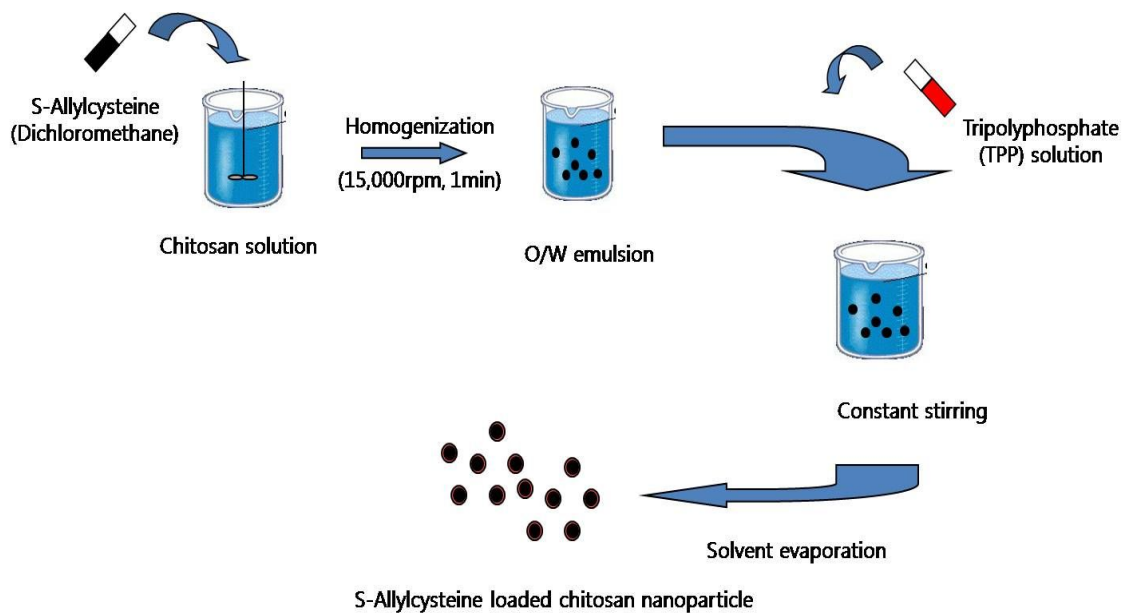


그림 1. S-Allylcysteine 함유 키토산 담체의 제조

㉔ 용출 시험

S-Allylcysteine이 포집된 chitosan-TPP 나노입자 일정량을 용출 media에 넣어 용출 시험장치 (vision elite 8, Hanson, USA)를 이용하여 시간에 따라 시료 채취를 한 후 HPLC (Jasco, Tokyo, Japan)를 이용하여 alliin 함량을 측정하였다. 용출 media는 HCl solution (pH 1.2), PBS buffer (pH 7.4)을 이용하였으며, 온도는 37°C, 교반속도는 100 rpm을 유지하였다.

(나) 용매회발법에 의한 Poly (ε-caprolactone) (PCL) 나노담체의 제조 및 용출 시험

① PCL 나노입자의 제조

분자량이 각각 10,000, 65,000, 80,000인 PCL을 각각 0.5 g을 Dichloromethane (DCM) 4 ml에 녹인다. 이 고분자 용액에 alliin solution (25 mg/ml Allin + 1 ml D.W + 1 ml EtOH)을 0.5 ml 넣고 충분히 녹인다. 그 후 2% Tween 80 용액을 제조하여 고분자 및 alliin 용액 : Tween 80 용액의 비율이 1 : 20이 되도록 혼합한 다음 15,000 rpm으로 1분간 균질화한 후 1 시간 동안 교반시켜 용매를 휘발시킨다. 이때 발생하는 탁한 물질이 alliin-loaded PCL 나노파티클이다.

② Alliin-loaded PCL 나노입자의 용출시험

Alliin이 포집된 PCL 나노입자 일정량을 용출 media에 넣어 용출시험장치 (vision elite 8, Hanson, USA)를 이용하여 시간에 따라 시료 채취를 한 후 HPLC (Jasco, Tokyo, Japan)를 이용하여 alliin 함량을 측정하였다. 용출 media는 HCl solution (pH 1.2), PBS buffer (pH 7.4)을 이용하였으며, 온도는 37°C, 교반속도는 100 rpm을 유지하였다.

다. 유효성분 함유 NSM system의 기능성 평가 시스템 개발

(1) 초고압균질기에 의한 O/W emulsion 제조

(가) Tween 80과 lecithin 이용

Tween 80, lecithin은 Junsei 시약을 사용하였고, 옥수수유는 청정원에서 나온 제품을 마트에서 구입하여 사용하였다. Tween 80에 lecithin을 0.3%의 비율로 만든 후 각각 Aqueous phase : Surfactant : Oil의 비율을 10 : 1 : 1, 10 : 1 : 3, 10 : 2 : 3, 10 : 2 : 1로 제조한 다음 12,000 rpm에서 1분간 균질화한 후 초고압 균질기를 이용하여 제조하였다 (300 bar).

(나) PGMS와 PGPR 이용

PGMS (Propylene glycol monostearate)와 PGPR (Polyglycerol polyricinoleate)은 일신웰스에서 구매하여 사용하였고, 옥수수유는 청정원에서 나온 제품을 마트에서 구입하여 사용하였다. PGMS와 PGPR을 각각 Aqueous phase : Surfactant : Oil의 비율을 10 : 0.05 : 1, 10 : 0.1 : 1, 10 : 0.2 : 1, 10 : 0.2 : 0.5, 10 : 0.2 : 3, 10 : 0.2 : 5로 제조한 다음 12,000 rpm에서 1분간 균질화한 후 초고압 균질기를 이용하여 제조하였다 (300 bar).

(2) 마늘 추출물을 이용한 O/W/W 에멀전 제조

PGPR (Polyglycerol polyricinoleate)은 일신웰스에서 구매하여 사용하였고, 옥수수유는 청정원에서 나온 제품을 마트에서 구입하여 사용하였다. Surfactant : Oil을 0.2 : 1의 비율로 제조하여 마늘 추출물과 1 : 10의 비율로 제조한 후 10,000 rpm에서 1분 동안 균질화 시킨 다음 Aqueous phase와 1 : 10의 비율로 제조하여 12,000 rpm에서 1분 동안 균질화한 후 초고압 균질기를 이용하여 제조하였다 (300 bar, 5 cycle).

(3) 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전 제조

Chitosan과 alginate는 Sigma 시약을 사용하였으며, PGPR(Polyglycerol polyricinoleate)은 일신웰스에서 구매하여 사용하였고 옥수수유는 청정원에서 나온 제품을 마트에서 구입하여 사용하였다. 마늘추출물과 각각의 0.5% chitosan과 0.5% alginate를 1 : 1의 비율로 넣은 후 교반 시킨 다음 Surfactant : Oil을 0.2 : 1의 비율로 제조하여 10,000 rpm에서 1분 동안 균질화 시킨다. 그 후 Aqueous phase와 1 : 10의 비율로 제조한 다음 12,000 rpm에서 2분 동안 균질화한 후 초고압균질기를 이용하여 제조하였다 (300 bar, 5 cycle).

(4) 에멀전의 저장기간에 따른 안정성 평가

에멀전의 저장기간에 따른 안정성을 평가하기 위하여 저장 조건(냉/해동 반복, 냉장, 상온 및 40℃)을 달리하여 일정기간동안 저장하면서 입도, 제타전위 등을 측정하였다.

라. NSM system에 의한 유효성분 분석

(1) 입도 측정

입도 분석기 (Microtrac nanotrac 250, Microtrac Inc., USA)를 이용하여 에멀전 droplet의 평균입도를 측정하였다.

(2) 제타전위 측정

제타전위 분석기 (Zetaplus, Brookhaven Instruments corporation, USA)를 이용하여 제타전위를 측정하였다.

(3) 동적 점탄 특성 측정

동적 점탄 특성은 20℃로 설정된 rheometer (AP1000, TA Instruments, New Castle, DE, USA)의 plate-plate system (직경: 4 cm, 간격: 500 μm)을 이용하여 3% strain에서 진동수 (frequency, ω) 1-10 Hz범위에서 저장 탄성률 (storage modulus, G'), 손실 탄성률 (loss modulus, G''), 복소 점도 (complex viscosity, η^*) 및 $\tan \delta$ 등을 측정하였다.

(4) pH 측정

pH meter (520A, Orion, USA)를 이용하여 pH를 측정하였다.

(5) 주사전자현미경 (SEM) 관찰

주사전자현미경 (Scanning electron microscope, SEM, S-2380N, Hitachi Ltd., Japan)으로 관찰하였다.

(6) Atomic Force Microscopy (AFM)에 의한 나노담체의 표면 관찰

XE-150 (PSIA, Korea)를 이용하여 나노파티클의 표면을 관찰하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

1. Organo-sulfur compounds의 추출 및 안정화 기술 개발

가. 마늘의 전처리

마늘의 경우 경상북도 의성에서 제조한 통마늘을 구입하여 박피, 세척 등의 공정을 거친 후 선별하여 이후의 실험재료로 사용하였다 (그림 2).



그림 2. 마늘 사진

나. 수분함량 측정

마늘의 수분함량은 표 2와 같았으며, 오븐 건조한 마늘의 경우 수분함량이 약 42%를 나타내었다.

표 2. 마늘의 수분함량

	수분함량(%)
마늘	41.84

다. 마늘 내 황화합물의 분석

마늘 내 생리활성 물질 중 대표적인 것으로 alliin, S-allyl cysteine, allicin을 분석하고자 하였으며, 3가지 물질에 대한 표준곡선을 나타내었으며 (그림 3), sample 내 황화합물의 분석한 결과는 그림 4와 같다.

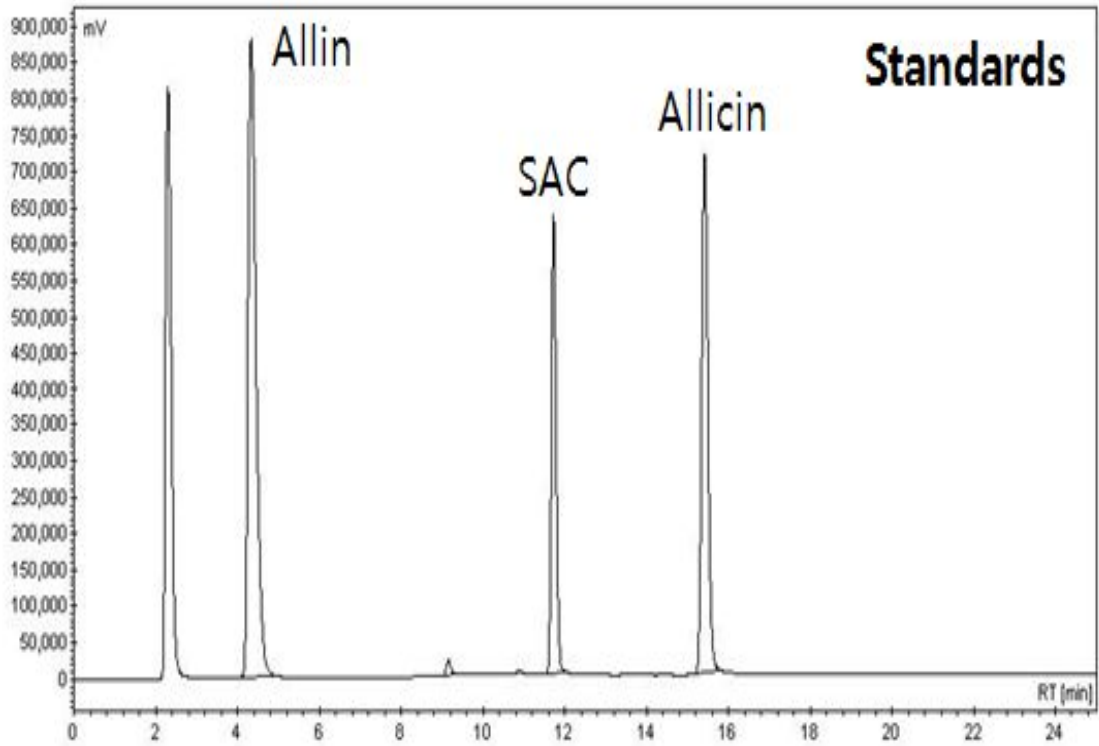


그림 3. alliin, S-allylcysteine 및 allicin의 표준곡선

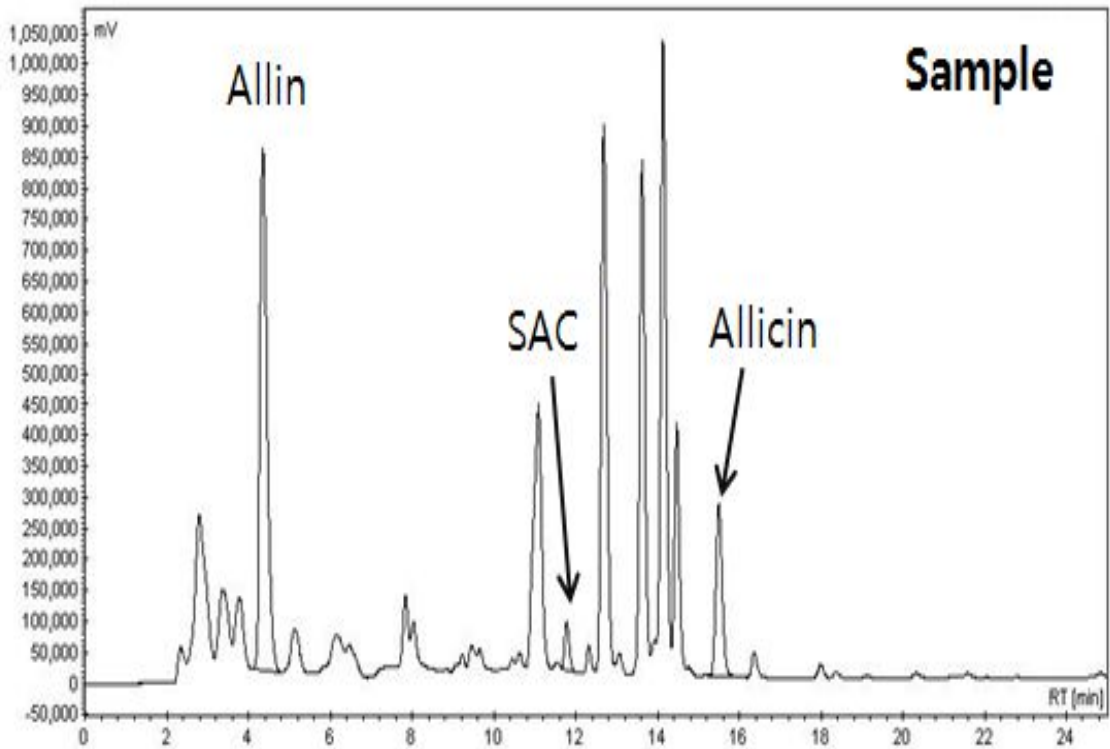


그림 4. Sample 내 황화합물의 분석

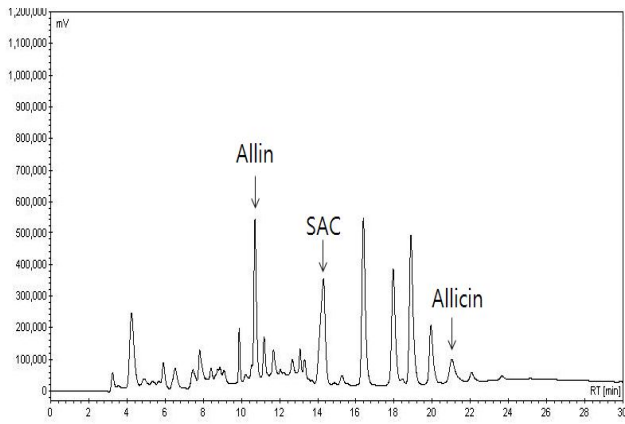
마늘은 독특한 향미와 우수한 생리활성을 지니고 있어 식품공업에서는 절임류 및 향신료로 이용되었지만 최근에는 마늘의 항균작용, 암세포 성장억제작용, 항혈전작용 등의 생리적 활성을 이용한 기능성 식품 및 의약품 원료로도 사용되고 있다 (Lee *et al.*, 2007). 마늘의 유효성분은 alliin, 즉 결정성 아미노산인 S-ally-L-cysteine sulfoxide라고 알려져 있으며, 마늘 특유의 휘발성 향기성분은 마늘 조직이 파괴될 때 자체효소인 allinase에 의하여 alliin이 분해되어 생성된 allicin이 다시 diallyl thiosulfinate와 diallyl disulphide 및 저급의 sulphide류로 분해되어 발생된다고 보고되고 있다 (Stoll and Seebeck, 1949).

일반적으로 alliin과 allicin의 경우 마늘 내에 존재하는 대표적인 생리활성 물질이며, SAC의 경우 마늘의 전처리 공정 중 transglutaminase에 의해 합성되는 물질이다. 이는 수용성 물질로서 부작용이 적고 저온 조건에서 합성이 가능한 것으로 알려져 있다.

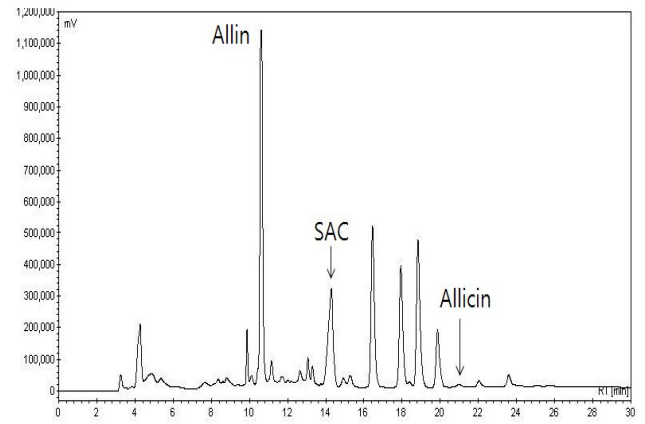
본래 마늘에는 alliin이 함유되어 있으며 alliin은 allicin의 전구물질로서 마늘 중에 함유되어 있는 효소인 allinase에 의해서 allicin으로 분해되고 allicin은 화학적으로 매우 불안정함으로 인해 열에 의해 용이하게 분해되어 주 분해산물인 diallyl disulfide로 변한다. Alliin은 아무런 냄새가 없으나 분해화합물인 allicin은 불쾌한 냄새를 갖고 있으며 결국 마늘 냄새는 allicin에 기인한다. 마늘은 썰거나 분쇄되기 전에는 냄새가 극히 적거나 거의 없는 원인이 이러한 이유 때문인 것이다 (Kwon, 2003).

본 실험에 사용된 마늘은 추출 전 고온으로 삶는 전처리를 통해 allinase를 불활성화하였으므로 대표적 황화합물 중 allicin을 제외한 alliin 및 S-Allylcysteine (SAC)의 함량만을 분석하였다.

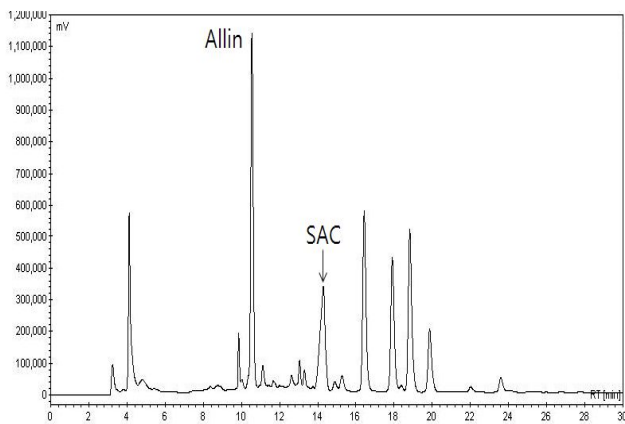
오븐 건조한 마늘을 에탄올의 함량을 달리하여 제조한 마늘 추출물로부터 황화합물 (alliin, SAC, allicin)을 분석한 결과는 그림 5와 같다. 추출 용매로서 에탄올 함량을 증가시킴에 따라서 추출 효율이 약간 증가하는 것을 볼 수 있었으나, 에탄올이 100%인 경우에는 추출 효율이 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 수용성 물질인 SAC의 경우 에탄올 100% 조건에서 거의 추출되지 않았다.



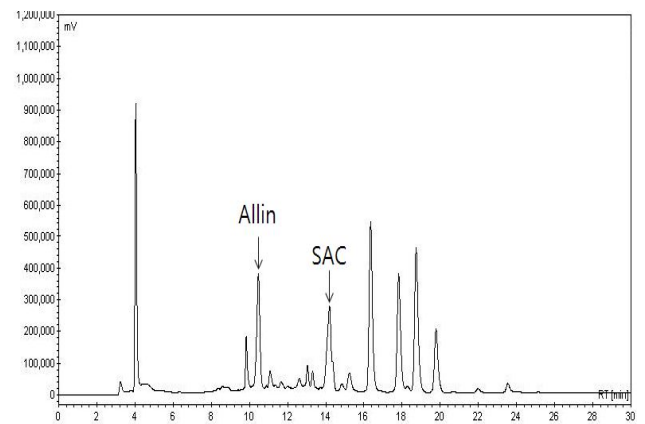
A



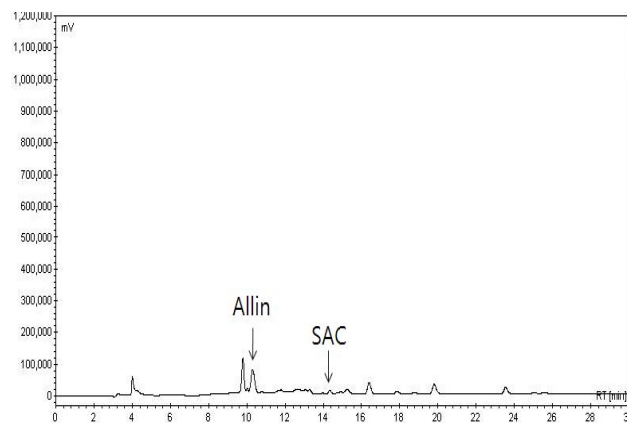
B



C



D



E

그림 5. 추출 조건을 달리하여 제조한 마늘 추출물 (오븐건조)의 황화합물 분석 (A: 0% EtOH, B: 30% EtOH, C: 50% EtOH, D: 70% EtOH, E: 100% EtOH)

(1) 추출 용매에 따른 황화합물의 분석

(가) 메탄올 추출물의 황화합물 분석

동결 건조한 마늘을 추출 용매로서 메탄올을 사용하여 얻은 물질의 황화합물을 분석한 결과는 그림 6과 같다. Alliin의 경우 물과 메탄올이 혼합되어 있는 용매를 사용하였을 때 그 함량이 높아지는 반면, S-Allylcysteine의 경우 물의 함량이 감소할수록 점차적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 동결건조는 건조하고자 하는 원료를 동결시킨 다음 높은 진공장치 내에서 승화에 의하여 수분이 제거되기 때문에 건조된 제품은 가벼운 형태의 다공성 구조를 가지며, 원래 상태를 유지하고 있어 물을 가하면 급속히 복원이 될 뿐만 아니라 식품의 조직이나 향미, 비타민 등의 영양소와 색을 가장 잘 보존하는 건조방법이다. 특히, 마늘 등의 향신료는 향미가 가장 중요한 품질특성이므로 동결 건조 중 휘발성분 보유력에 관한 연구가 주로 수행되어 왔으며, 동결 건조된 시료는 향기가 비교적 온후하고 향기성분의 보존특성이 우수한 것으로 보고된 바 있다 (Kim *et al.*, 2005).

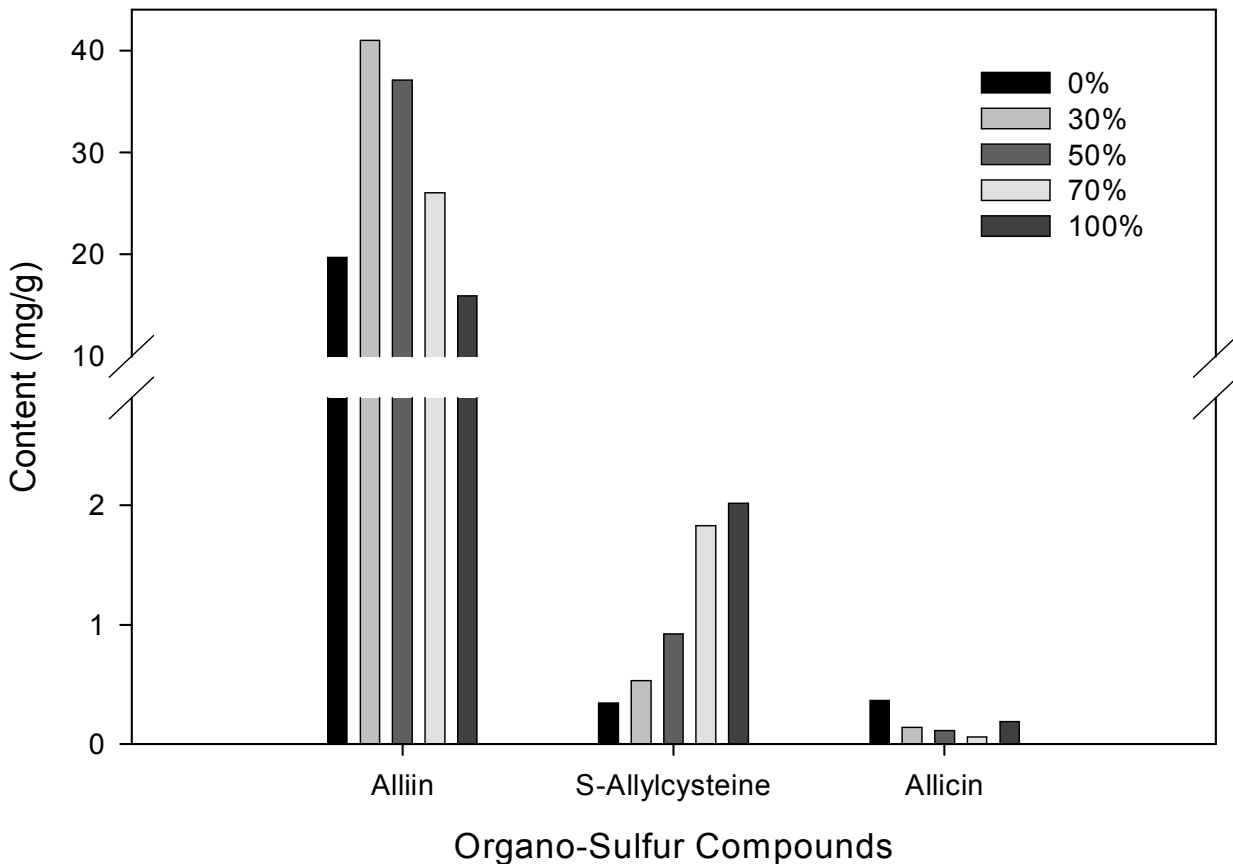


그림 6. 메탄올 추출물의 황화합물 분석 (70°C, 3hr)

(나) 아세톤 추출물의 황화합물 분석

동결 건조한 마늘을 추출 용매로서 아세톤을 사용하여 얻은 물질의 황화합물을 분석한 결과는 그림 7과 같으며, 아세톤의 함량이 증가할수록 alliin 함량이 점차적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 메탄올 추출물과 비교하였을 때 전체적으로 황화합물의 함량이 감소한 것을 확인할 수 있다.

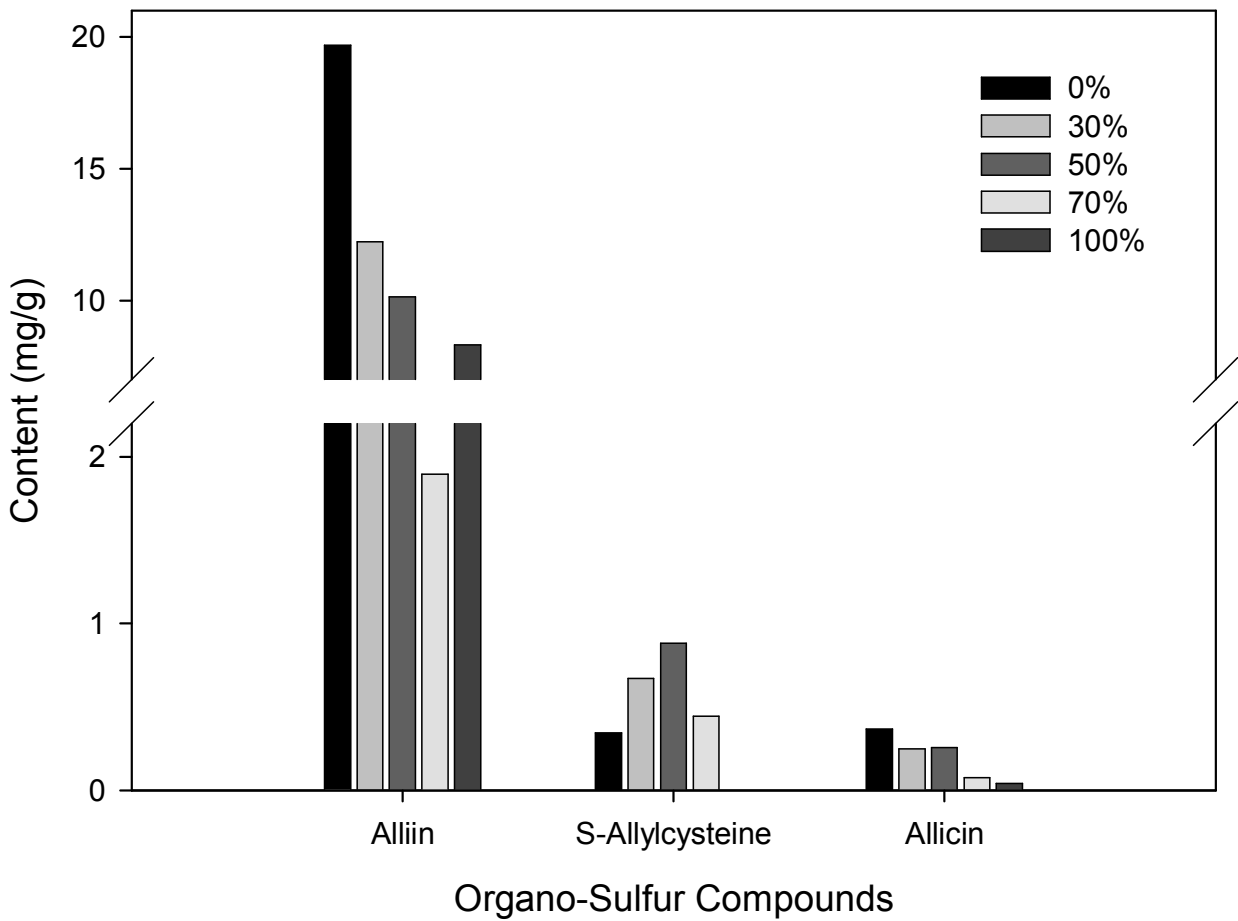


그림 7. 아세톤 추출물의 황화합물 분석 (70°C, 3hr)

(다) 에탄올 추출물의 황화합물 분석

동결 건조한 마늘을 추출 용매로서 에탄올을 사용하여 얻은 물질의 황화합물을 분석한 결과는 그림 8과 같으며, 에탄올 추출물의 경우 아세톤 추출물의 경우에 비하여 alliin 함량이 약간 높은 값을 나타내는 것을 확인하였다.

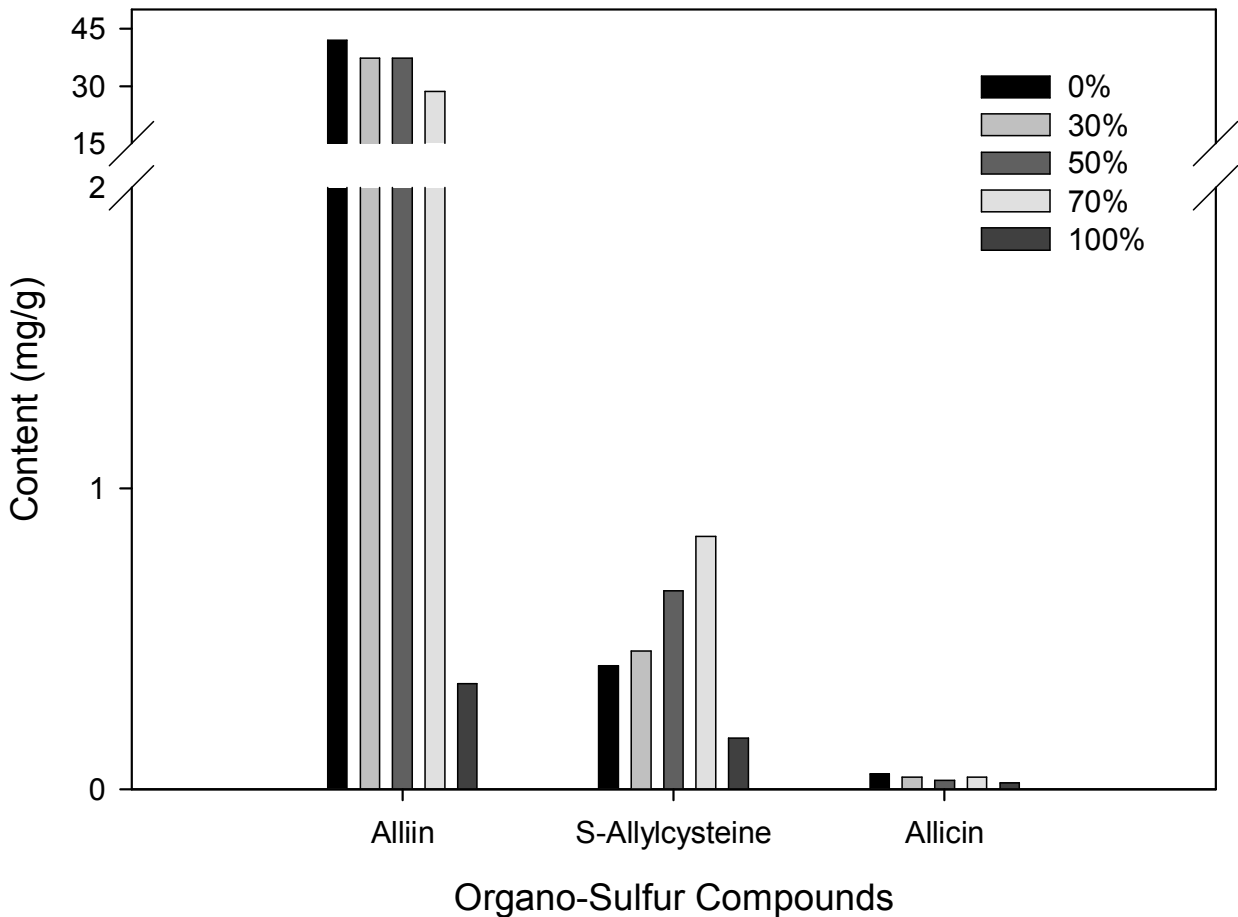


그림 8. 에탄올 추출물의 황화합물 분석 (70°C, 3hr)

(2) 추출 조건 (온도, 용매 비율 및 시간)에 따른 에탄올 추출물의 황화합물의 분석

추출 조건으로서 온도 및 시간을 달리하여 얻은 추출물 (추출용매는 에탄올을 사용함)에 대한 황화합물 (alliin 및 SAC)을 분석한 결과를 아래에 나타내었다.

(가) 온도에 따른 alliin과 SAC 함량 분석

동결 건조한 마늘을 60°C에서 추출한 에탄올 추출물의 alliin 함량을 분석한 결과를 그림 9와 같으며, 동결 건조한 마늘을 70°C와 80°C에서 추출한 에탄올 추출물의 SAC 함량을 분석한 결과를 그림 10과 같이 나타내었다.

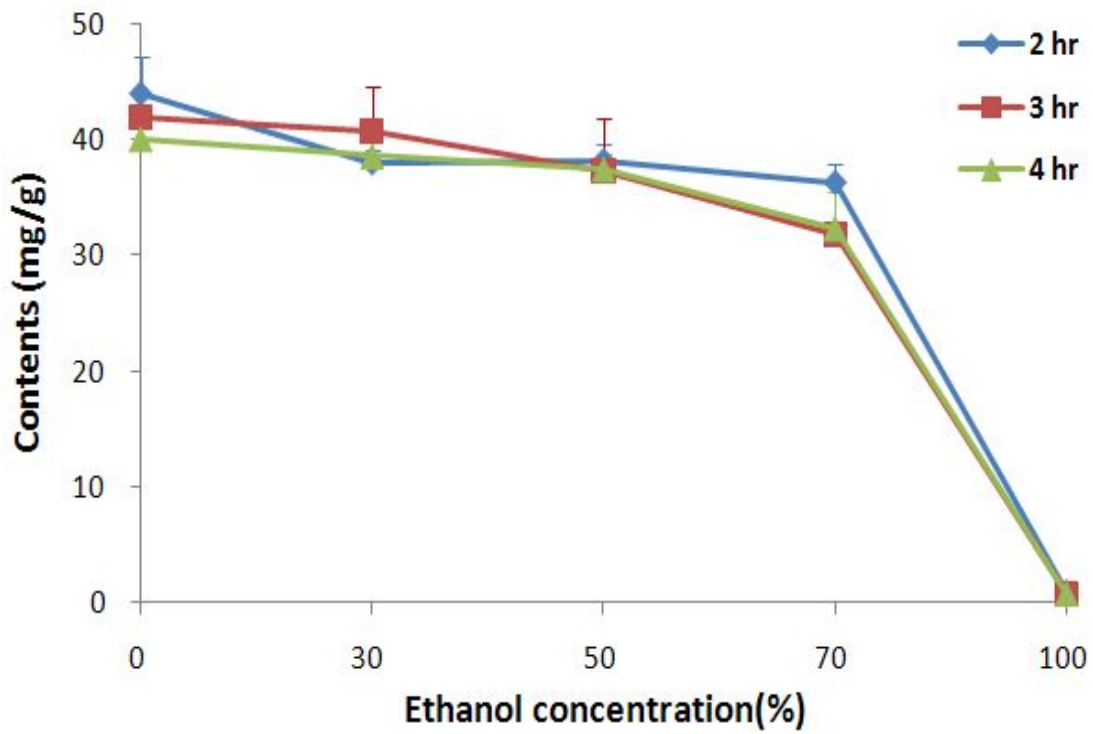


그림 9. 추출 용매농도 및 시간을 달리하여 60°C에서 추출한 에탄올 추출물의 alliin 함량 분석

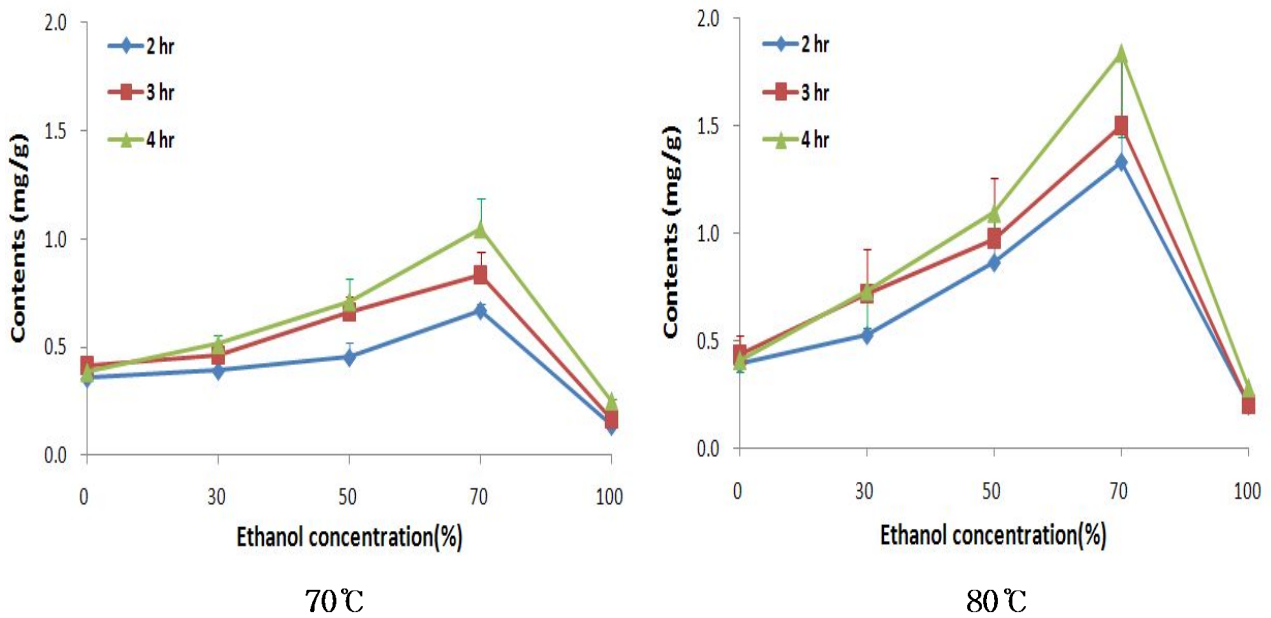


그림 10. 온도별 추출 용매의 농도 및 시간을 달리하여 추출한 에탄올 추출물의 SAC 함량 분석

(나) 시간에 따른 SAC 함량 분석

추출 용매농도 및 온도를 달리하여 시간별로 추출한 에탄올 추출물의 SAC 함량 분석 결과는 그림 11과 같다. 추출물 내의 SAC의 함량은 모든 온도 조건에서 시간이 증가할수록 증가하였는데 이는 SAC의 구조적 안정성에 기인하는 것으로 사료되었다. 따라서 SAC의 경우 추출온도 및 시간이 증가함에 따라 추출수율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

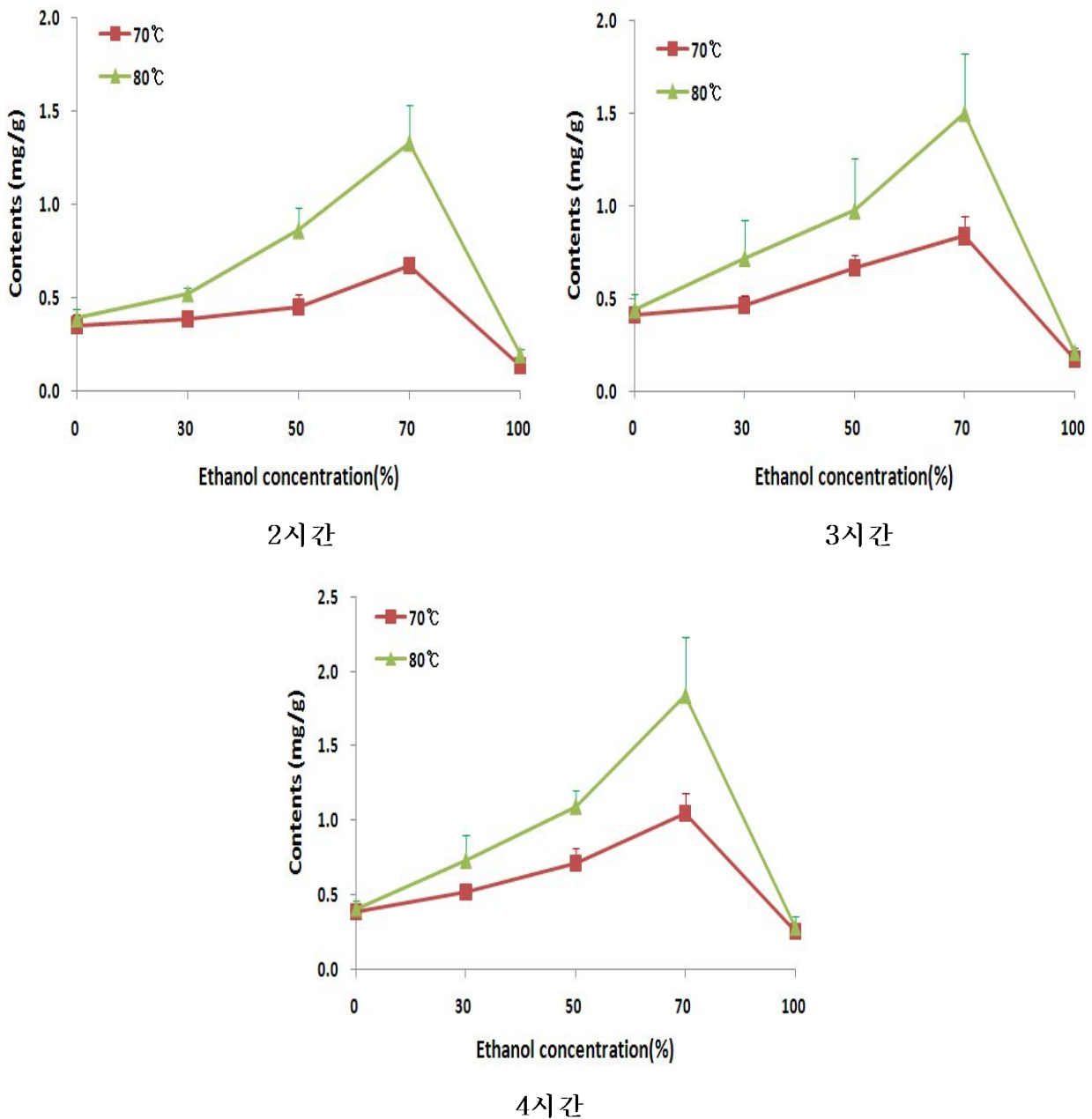


그림 11. 추출 용매농도 및 온도를 달리하여 시간별로 추출한 에탄올 추출물의 SAC 함량 분석

라. 마늘 내 생리활성 측정에 따른 추출효과 분석

(1) 항균 실험

동결 건조한 후 추출용매 조성을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 항균활성에 대한 결과는 표 3과 같다.

표 3. 마늘(동결건조)의 항균활성

	Strains	Clear Zone on Plate (mm)				
		0%	30%	50%	70%	100%
Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.5	1.00	0.9	0.95	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	0.5	1.00	-	-
Gram (-)	<i>Salmonella typhimurium</i>	2.00	1.00	1.00	3.67	3.83
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3.33	3.17	1.25	0.95	5.17

Values represents the mean±standard deviation for triplicate experiments

¹⁾ Diameter

²⁾ No clear zone was formed

미생물에 의한 식품의 부패와 변질 및 각종 사고를 예방하기 위하여 여러 종류의 합성 보존료를 사용하고 있으나 이들의 안전성 문제로 인하여 소비자들은 안전한 천연물의 사용을 희망하고 있다. 따라서 천연물의 항균 작용에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으며, 녹차 (Park CS 1998, Yoon *et al.*, 2005)를 비롯하여 밤잎 (Choi *et al.*, 1999), 허브 (Yoo *et al.*, 2005), 연잎 (Lee *et al.*, 2006), 마늘 (Kim *et al.*, 2005), 메밀 (Do *et al.*, 2006), 솔잎 (Park CS 2000) 등 다양한 식용식물이 각종 세균에 대하여 항균활성이 있는 것으로 보고되고 있다. 마늘의 항균작용은 마늘에 들어 있는 일종의 비단백성 함유아미노산인 알린이 allinase 효소에 의해 분해되어 생성되는 알리신 때문이 것으로 알려져 있다.

결과에 나타난 바와 같이, 4 가지 균주에 대해서 항산화 활성을 나타내었으며, 특히 에탄올 함량이 높아질수록 그 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 마늘 성분의 각종 균에 대한 생육억제 차원에서의 항균성을 고찰한 결과, 각종 균에 대하여 항균성을 달리하는 것을 알 수 있었으며, 이것은 그 성분이 각종 균에 대하여 특이적으로 반응한 결과라고 판단된다 (Wi, 2003). 따라서 균에 대한 특이적인 억제물질로서의 마늘 성분 중 선택적인 항균물질의 개발이 요구된다. 또한 유해세균에 대한 항균작용의 특성은 마늘 추출물이 장내 유산균에 대한 증식인자가

된다는 보고와 견주어 볼 때 항균성 이상의 가치를 제고해 볼 수 있을 것으로 생각되며, 마늘 추출물은 미생물의 발육저지력이 강하고 확실하며, 지속적이며, 인체에 무해하고 장기적으로 사용하여도 해가 없으므로 보존료로 개발하는 것도 바람직할 것으로 판단된다.

(2) 전자공여능 (Electron Donating Abilities, EDA)

(가) 메탄올 추출물의 전자공여능

동결 건조한 마늘을 메탄올의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정 한 결과는 그림 12와 같다. 메탄올의 경우 그 함량이 증가할수록 전자공여능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 폴리페놀 함량이 증가하면 전자공여능도 증가하는 것으로 알려져 있으나, 본 실험에서는 메탄올 함량이 증가하면 할수록 폴리페놀 함량은 감소하였음에도 전자공여능이 증가하는 경향을 보여주었다. 이와 같은 결과는 추출 용매에 따라 폴리페놀 이외에 다른 전자공여물질이 동시에 추출되었기 때문으로 판단된다 (Cha *et al.*, 2001).

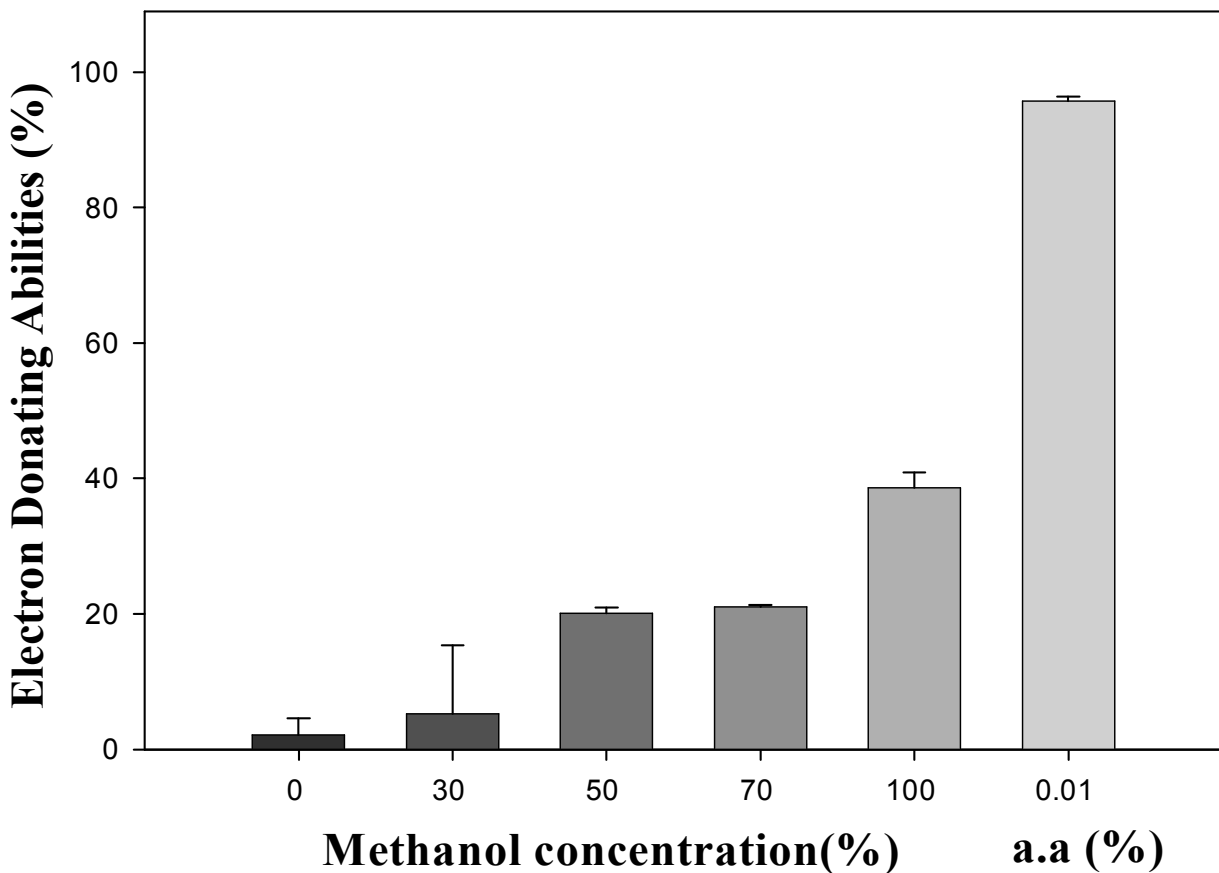


그림 12. 메탄올 추출물의 전자공여능(70°C, 3hr)

(나) 아세톤 추출물의 전자공여능

동결 건조한 마늘을 아세톤의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과는 그림 13과 같았으며, 아세톤 추출구의 경우 50% 추출구에서 가장 높은 전자공여능을 나타내었으며, 30% 이하 추출구에서는 거의 활성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

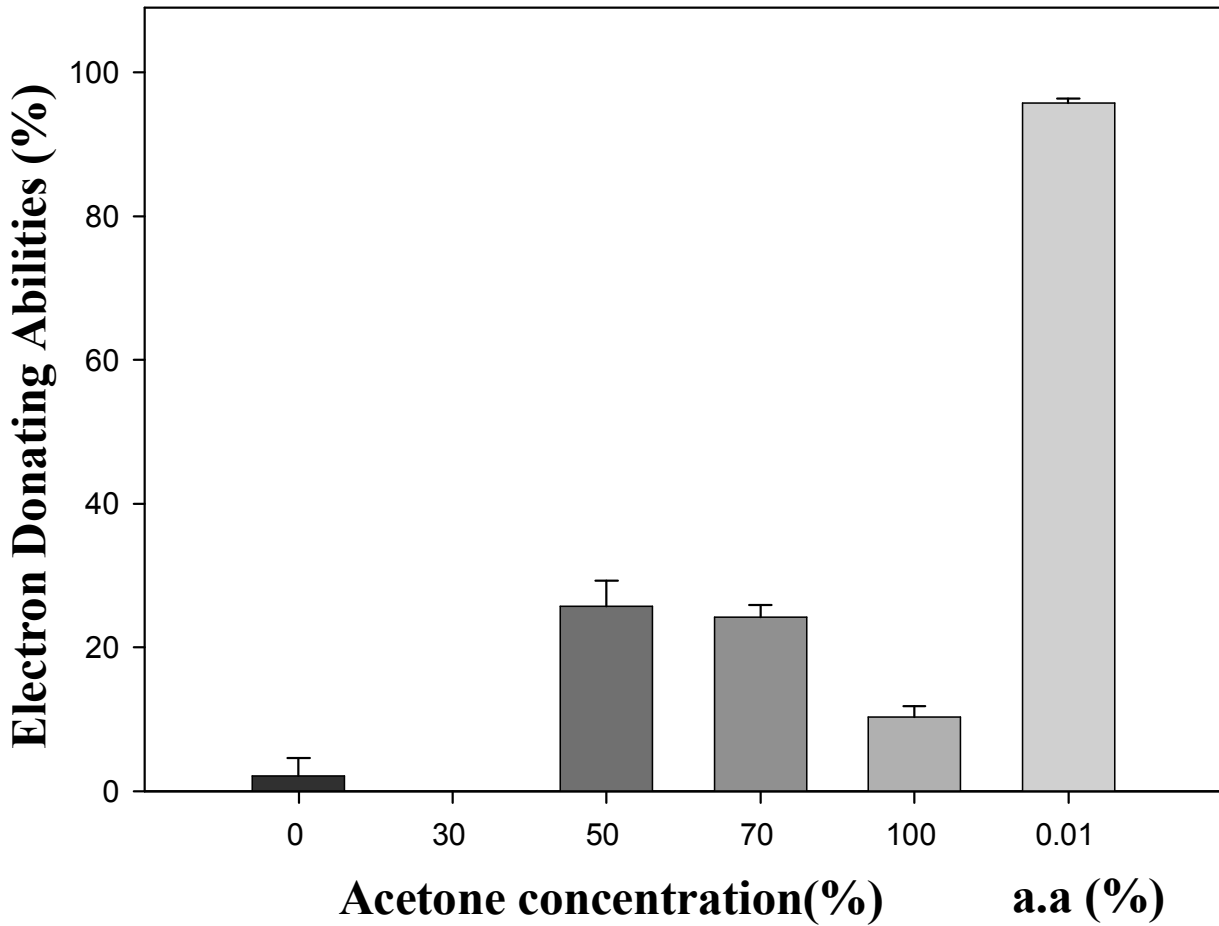


그림 13. 아세톤 추출물의 전자공여능(70°C, 3hr)

(다) 에탄올 추출물의 전자공여능

① 추출 조건(온도 및 시간)에 따른 전자공여능

추출 조건으로서 온도 및 시간을 달리하여 얻은 추출물 (추출용매는 에탄올을 사용함)에 대한 전자공여능을 분석한 결과를 아래에 나타내었다.

㉔ 추출 온도에 따른 전자공여능

동결 건조한 마늘을 에탄올의 온도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과는 그림 14와 같다.

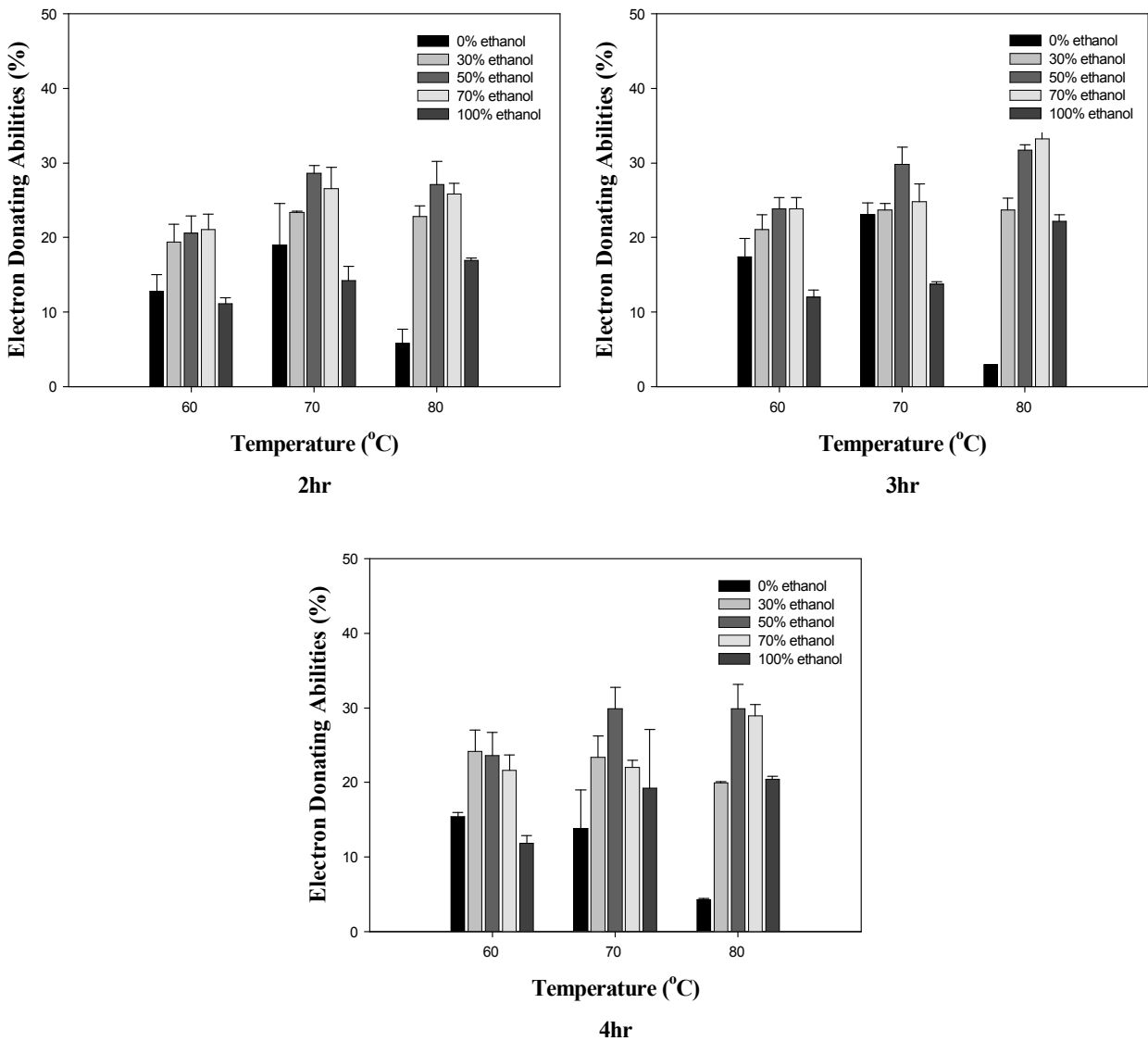


그림 14. 온도를 달리한 에탄올 추출물의 전자공여능

물 추출물의 경우 추출온도가 증가할수록 전자공여능이 크게 감소하는 것을 확인하였으나, 에탄올 함량에 따른 변화는 크게 나타나지 않았다.

일반적으로 항산화 물질은 지질의 산화 과정 중 생성되는 유리 라디칼 ($R\cdot$, $ROO\cdot$ 등)에 전자를 주어 산화의 진행을 방지하게 된다고 알려져 있다 (Jayaprakasha *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008). 항산화활성은 다양한 방법에 의해 측정될 수 있으나 DPPH에 의한 전자공여능은 비교적 간단하게 측정할 수 있고 항산화활성과 높은 유연관계를 가지며 특히 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제하는 활성을 정량함으로써 노화 억제 작용의 척도로도 사용될 수 있다 (Yoon *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2010). 또한 최근 산화적 스트레스에 의해 기인한 많은 종류의 질병이 발생되고 있으며 (Yagi, 1987), 이와 관련하여 우수한 항산화 활성을 갖는 물질에 대한 탐색연구가 활발히 진행되고 있다 (Heo *et al.*, 2008). 현재 널리 사용되고 있는 항산화제는 BHA (butylated hydroxy hydroxyanisole)와 TBHQ (2-tert-butyl hydroquinone)과 같은 합성 물질인데, 이들을 50 mg/kg/day 이상의 고용량으로 장기간 복용 시 지질대사의 불균형과 암을 유발시킬 수 있기 때문에 이들의 사용을 제한하고 있는 실정이다 (Brane, 1975). 그러므로 이러한 합성 산화제를 대체시킬 수 있는 우수한 천연항산화제의 개발이 시급하게 요구되고 있다는 점에서 DPPH 라디칼 소거능이 높게 나타난 마늘 추출물은 천연항산화제 개발을 위한 자원가치 뿐만 아니라 식용 시 항산화효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

㉔ 추출 시간에 따른 전자공여능

동결 건조한 마늘을 에탄올의 시간을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정된 결과는 그림 15와 같다.

추출시간에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았으며, 에탄올 함량이 약 50-70%인 경우 가장 높은 활성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

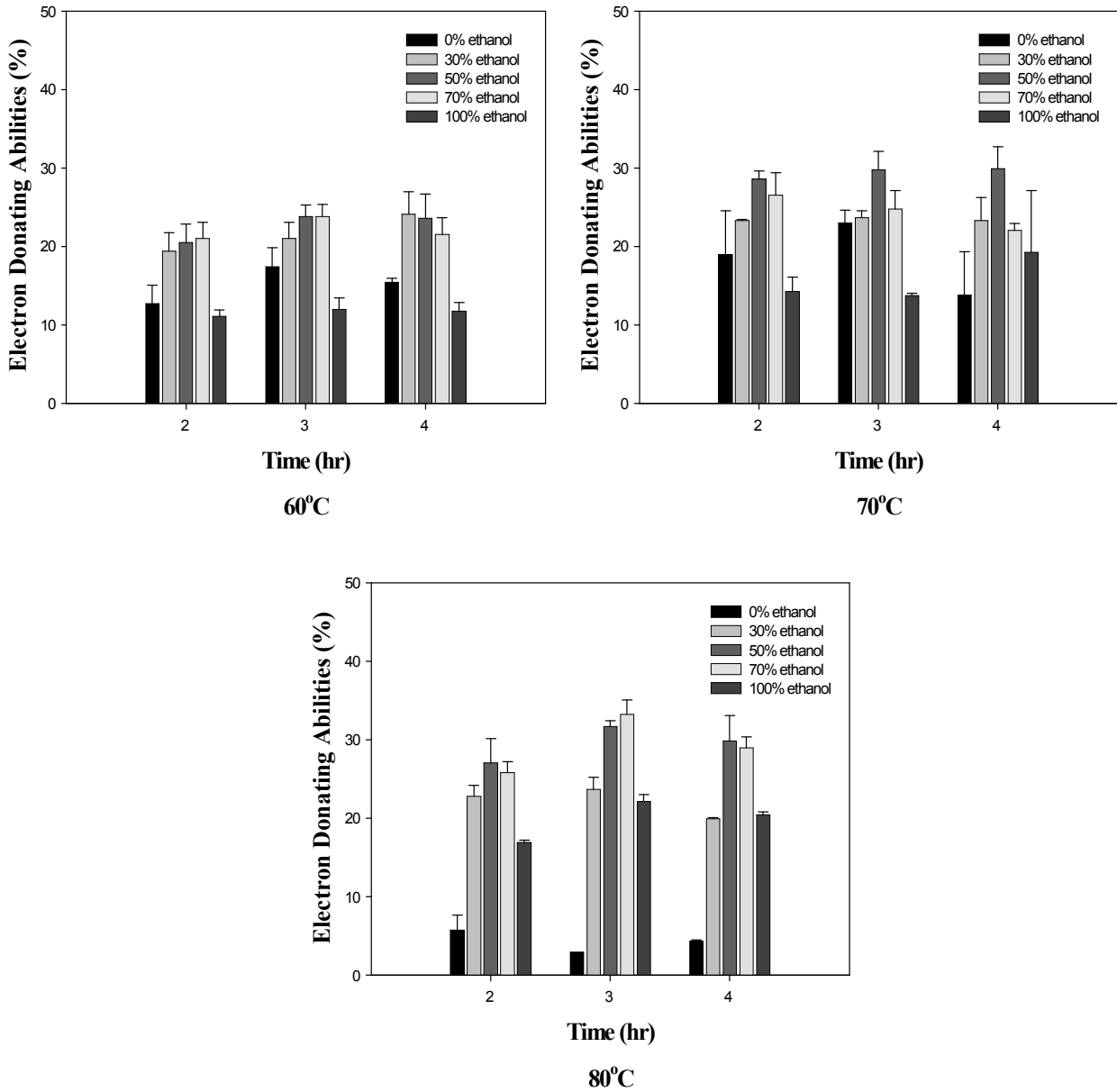


그림 15. 시간을 달리한 에탄올 추출물의 전자공여능

② 삶기 전, 후의 전자공여능

아래 그림은 삶기 전과 후의 마늘을 동결 건조한 후 에탄올의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과는 그림 16과 같았으며, 에탄올 함량이 50-70% 수준에서 높은 전자공여능을 나타내었으며, 삶지 않은 시료(allinase 활성 유지)가 삶은 시료(allinase 활성 저해) 더 높은 값을 나타내었다. 이 결과를 통하여 alliin보다 allicin이 전자공여능에 더 큰 영향을 주는 것으로 판단된다.

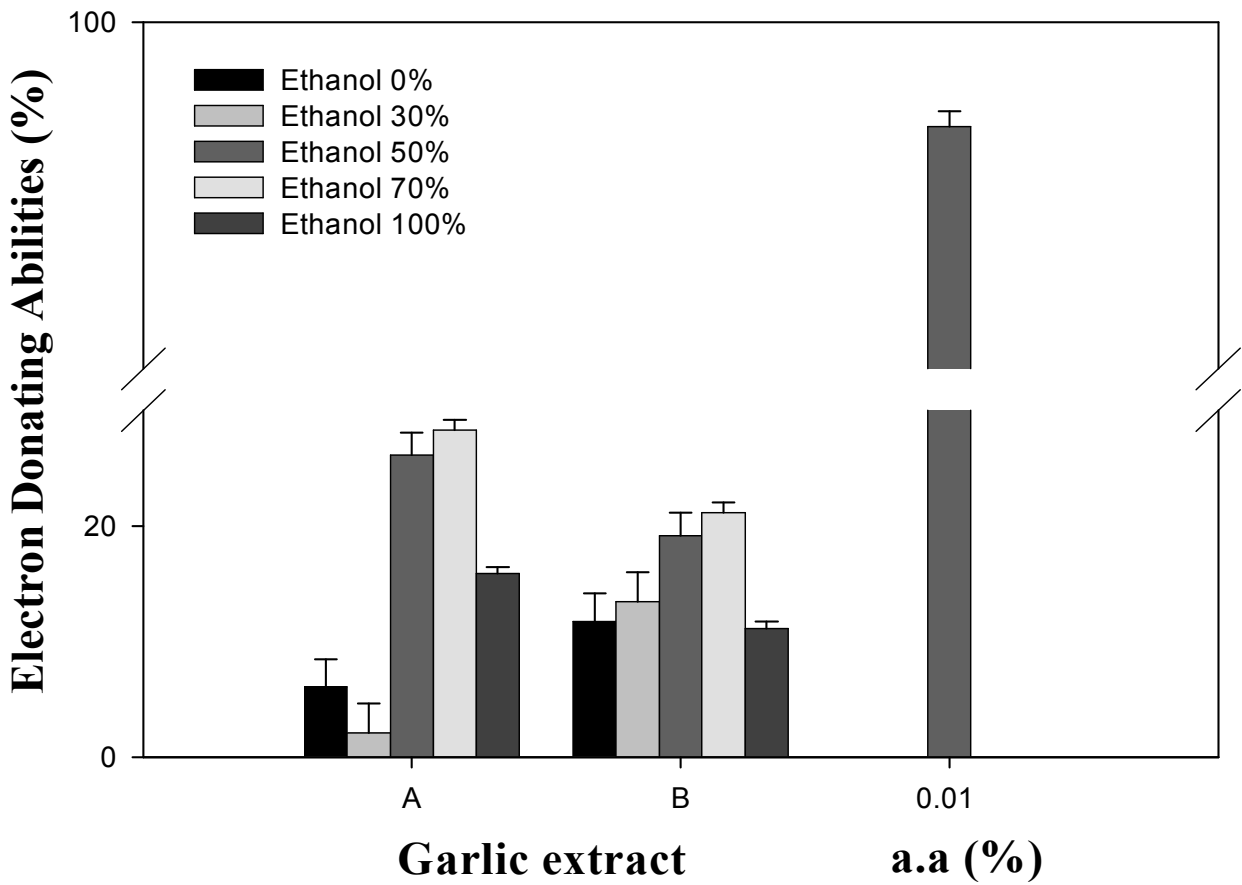


그림 16. 삶기 전(A)과 후(B)의 마늘 추출물의 전자공여능

③ 삶은 마늘의 전자공여능

㉞ 추출 온도에 따른 전자공여능

삶은 마늘을 추출 온도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과는 그림 17과 같았다.

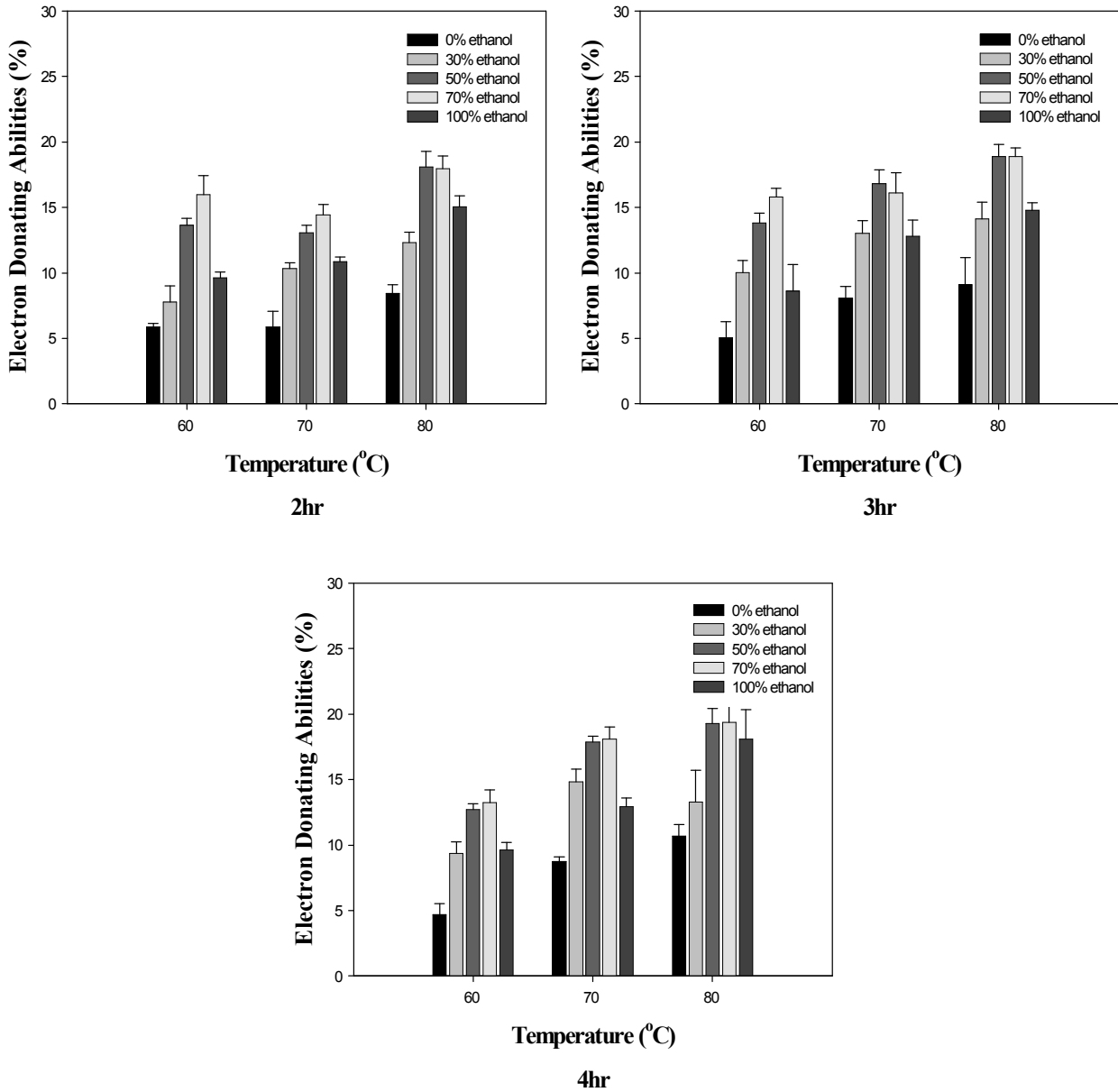


그림 17. 에탄올의 농도를 달리하여 온도별로 추출한 삶은 마늘 추출물의 전자공여능

추출 온도가 증가할수록 더 높은 활성을 보였으며, 에탄올의 함량이 증가할수록 높은 활성을 나타내었다. 페놀성 화합물은 항산화 효과를 나타내는 대표적인 화합물로 열처리에 따라 증가되고 그에 따라 항산화 활성이 증가된 것으로 판단된다 (Lee *et al.*, 2007). 열처리 온도가 증가함에 따라 항산화 활성을 갖는 Maillard 반응물의 형성에 의하여 항산화 활성이 증가되었을 것으로 생각되어진다 (Manzocco *et al.*, 2001). 이에 본 연구에서 추출 온도가 증가함에 따라 항산화 능력이 높아지는 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

㉔ 추출 시간에 따른 전자공여능

삶은 마늘을 추출 시간을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과는 그림 18과 같다.

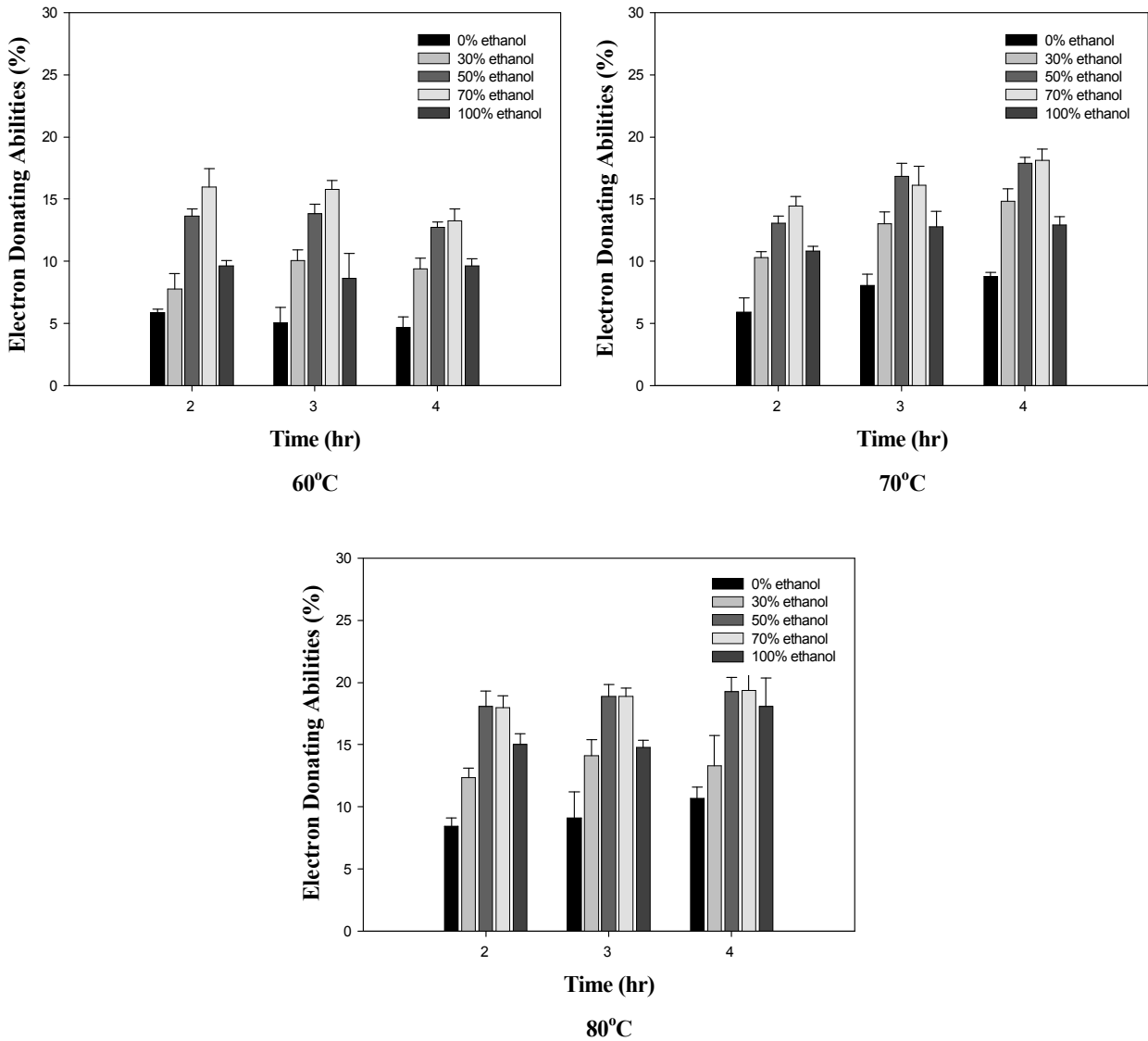


그림 18. 에탄올의 농도를 달리하여 시간별로 추출한 삶은 마늘 추출물의 전자공여능

추출 시간이 증가할수록 높은 활성을 보였으며, 추출 온도가 높을수록 높은 전자공여능을 보였다. 이는 Kim 등 (2001)의 연구에서 에탄올 추출물의 전자공여능이 우수하다는 결과와 일치하였다. Kang 등 (1996)은 전자공여능이 phenolic acid와 flavonoids 및 기타 phenol성 물질에 대한 항산화작용의 지표라고 하였으며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 하였다. 이에 추출 온도와 시간이 높은 시료구가 환원력이 큰 것을 알 수 있었다.

(3) Superoxide Dismutase (SOD) 유사 활성

아래의 그림은 동결건조한 후 추출용매 (메탄올 추출물, 아세톤 추출물, 온도 및 시간을 달리한 에탄올 추출물) 조성을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 SOD 유사 활성에 대한 결과이다.

(가) 메탄올 추출물의 SOD 유사 활성

동결 건조한 마늘을 메탄올의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 SOD 유사 활성을 측정된 결과는 그림 19와 같다.

메탄올 추출구의 경우 30% 메탄올 함유 추출구가 가장 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. Superoxide와 같은 free radical은 epinephrine의 산화, 미토콘드리아, 식세포 또는 세포질 중 xanthin oxidase나 glutathione reductase 등의 flavoenzyme에 의해 정상적인 대사과정에서 여러 가지 생물학적 반응에 의해 형성되며 전자공여작용은 이러한 산화성 생물활성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하게 된다.

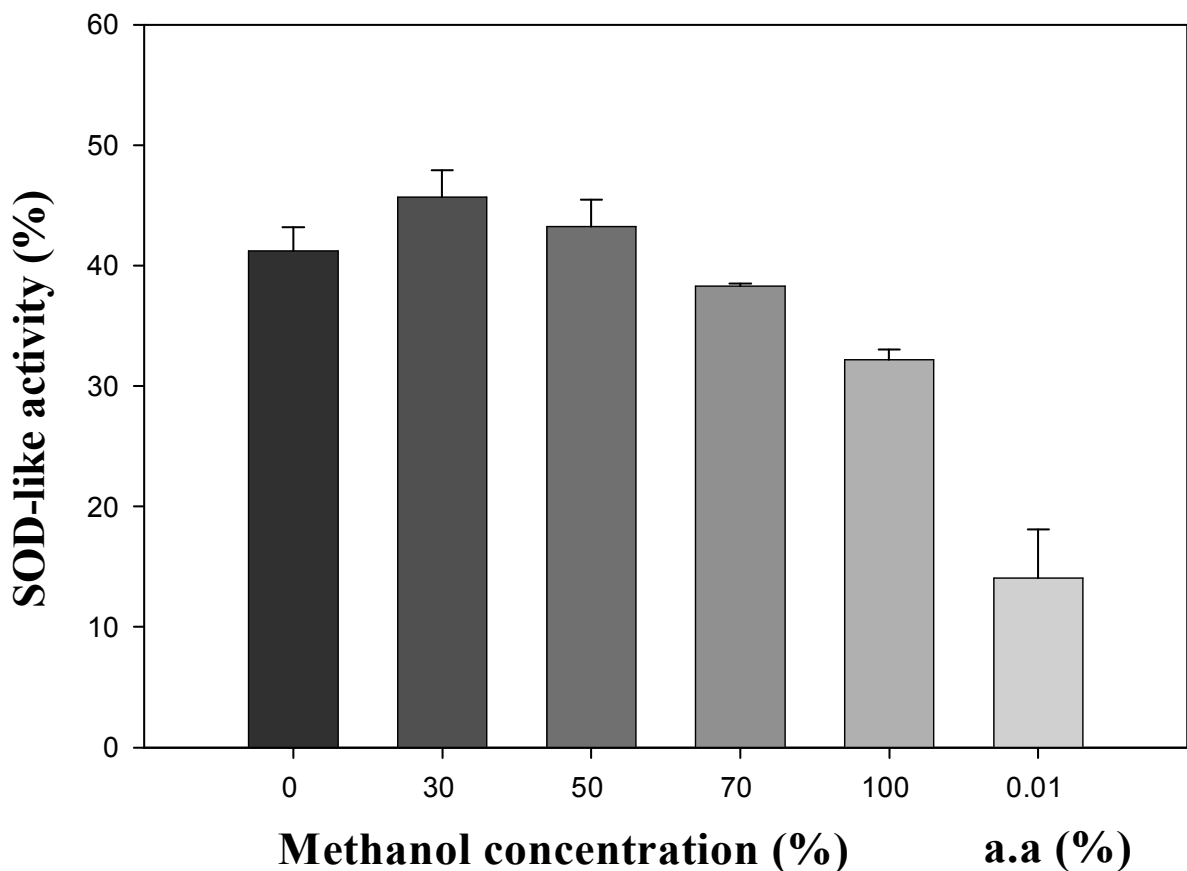


그림 19. 메탄올 추출물의 SOD 유사 활성 (70°C, 3hr)

노화와 관련되어 생체 대사과정 중 생성되는 superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$)의 경우 전자 환원으로 반응성과 파괴성이 매우 크며 세포와 조직에 해로운 독성을 일으켜 질병을 유발시키는 것으로 알려져 있다 (Halliwell and Gutteridge, 1989). $O_2^{\cdot-}$ 는 종양을 촉진하며, 암을 유발할 수 있고, 심이지장 궤양, 당뇨병, 류마티스 관절염, 알츠하이머병, 피부암, 피부염, 피부의 노화 등을 일으킬 수 있다. 인체 내에서는 $O_2^{\cdot-}$ 를 제거하기 위하여 superoxide dismutase (SOD)가 분비되어 $O_2^{\cdot-}$ 를 과산화수소와 정상상태의 산소로 전환시켜주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemical에 속하며 superoxide의 반응성을 억제하여 superoxide로부터 생체를 보호하는 것으로 보고되고 있다 (Devy and Gautier, 1990). 따라서 SOD유사활성 물질의 섭취로 인해 인체 내의 superoxide를 제거함으로써 산화적 장해를 방어하고 노화 억제의 효과를 기대할 수 있을 것으로 보고 있다 (Kuramoto, 1992).

(나) 아세톤 추출물의 SOD 유사 활성

동결 건조한 마늘을 아세톤의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 SOD 유사 활성을 측정한 결과는 그림 20과 같다. 아세톤 추출구의 경우 50% 추출구에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 100% 아세톤 추출구에서 가장 낮은 값을 나타내었다.

이는 Kim 등 (1995)의 팽이버섯, 마늘, 브로콜리, 상추의 SOD 유사 활성이 에탄올 추출보다 열수추출물이 효과가 크다는 결과와 일치하는 것으로 나타났다. Park 등 (1995)은 감잎의 ascorbic acid함량은 건조와 발효방법에 따라 차이를 나타내었으며, SOD 유사 활성은 건조방법에 따른 차이는 없었다고 하였다. SOD 유사 활성 물질은 활성산소의 시발물질이라 할 수 있으며, superoxide anion의 저해물질로는 생체 내 SOD라는 효소가 있지만 이의 일종으로 SOD와 작용기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사 활성 물질이라 부르며, 식물체를 대상으로 탐색하고 효능이 평가된 바 있다.

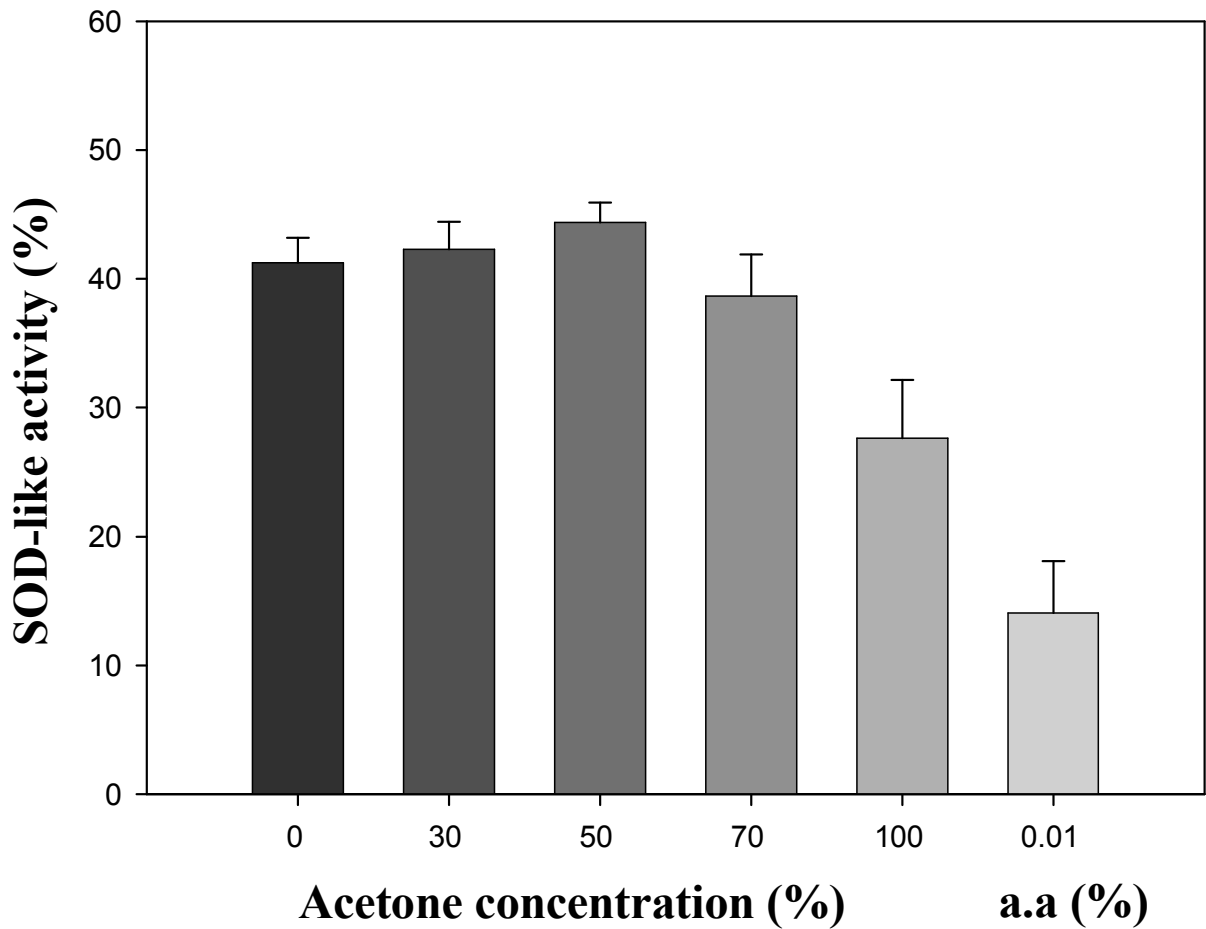


그림 20. 아세톤 추출물의 SOD 유사 활성 (70℃, 3hr)

(다) 에탄올 추출물의 SOD 유사 활성

① 추출 조건 (온도 및 시간)에 SOD 유사 활성

추출 조건으로서 온도 및 시간을 달리하여 얻은 추출물 (추출용매는 에탄올을 사용함)에 대한 SOD 유사 활성을 분석한 결과를 아래에 나타내었다.

㉠ 추출 온도에 따른 SOD 유사 활성

동결 건조한 마늘을 에탄올의 온도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 SOD 유사 활성을 측정된 결과는 그림 21과 같다. SOD 유사활성의 경우 대체적으로 수용액 추출구에서 높게 나타났으며, 에탄올을 첨가함에 따라 활성이 감소되었다. 온도의 경우 80℃에서 활성이 가장 낮게 나타났으며, 대조구인 ascorbic acid보다 SOD 유사 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

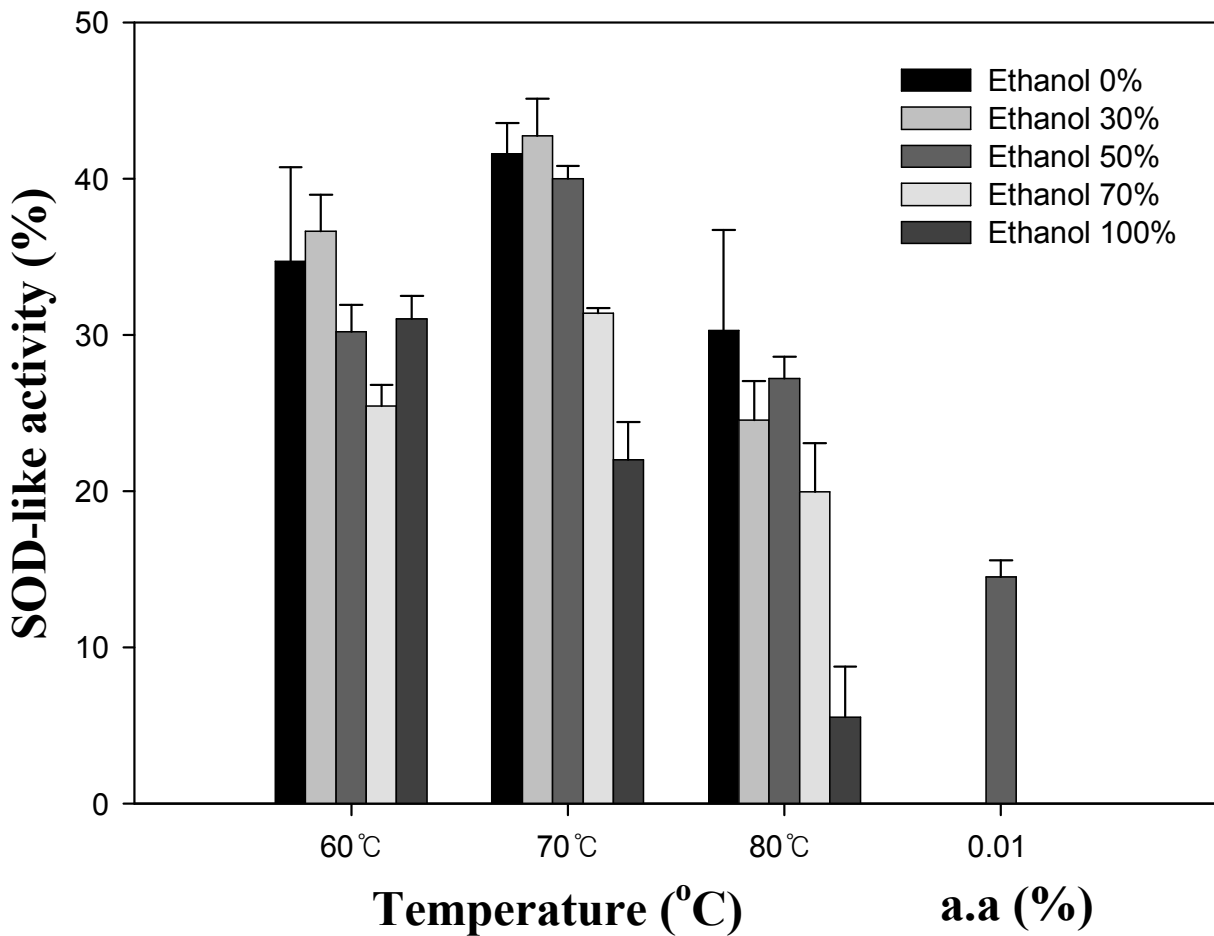


그림 21. 온도를 달리한 에탄올 추출물의 SOD 유사 활성

㉔ 추출 시간에 따른 SOD 유사 활성

동결 건조한 마늘을 에탄올의 시간을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 SOD 유사 활성을 측정된 결과는 그림 22와 같다. 추출시간에 관계없이 에탄올 함량이 증가할수록 활성이 감소하는 것을 알 수 있었다. 추출시간의 경우 2시간 및 4시간에 비해서 3시간 추출한 시료에서 활성이 가장 높게 나타난 것으로 보아, 최적의 SOD 유사활성을 나타내기 위해서 추출 시간을 조절할 필요가 있다고 판단된다. 또한 지금까지 밝혀진 바로는 ascorbic acid, catechin, glutathione과 같은 항산화성 물질이 SOD 유사 활성을 나타내며 flavonoid 중 quercetin, myricetin 등도 superoxide를 제거하는 것으로 알려져 있다 (Kang *et al.*, 1996). 본 연구에서는 2시간과 4시간의 100% 에탄올 추출구를 제외한 나머지 추출구들은 대조구인 ascorbic acid보다 높게 나타나 높은 SOD 유사 활성을 가진 것을 알 수 있었다.

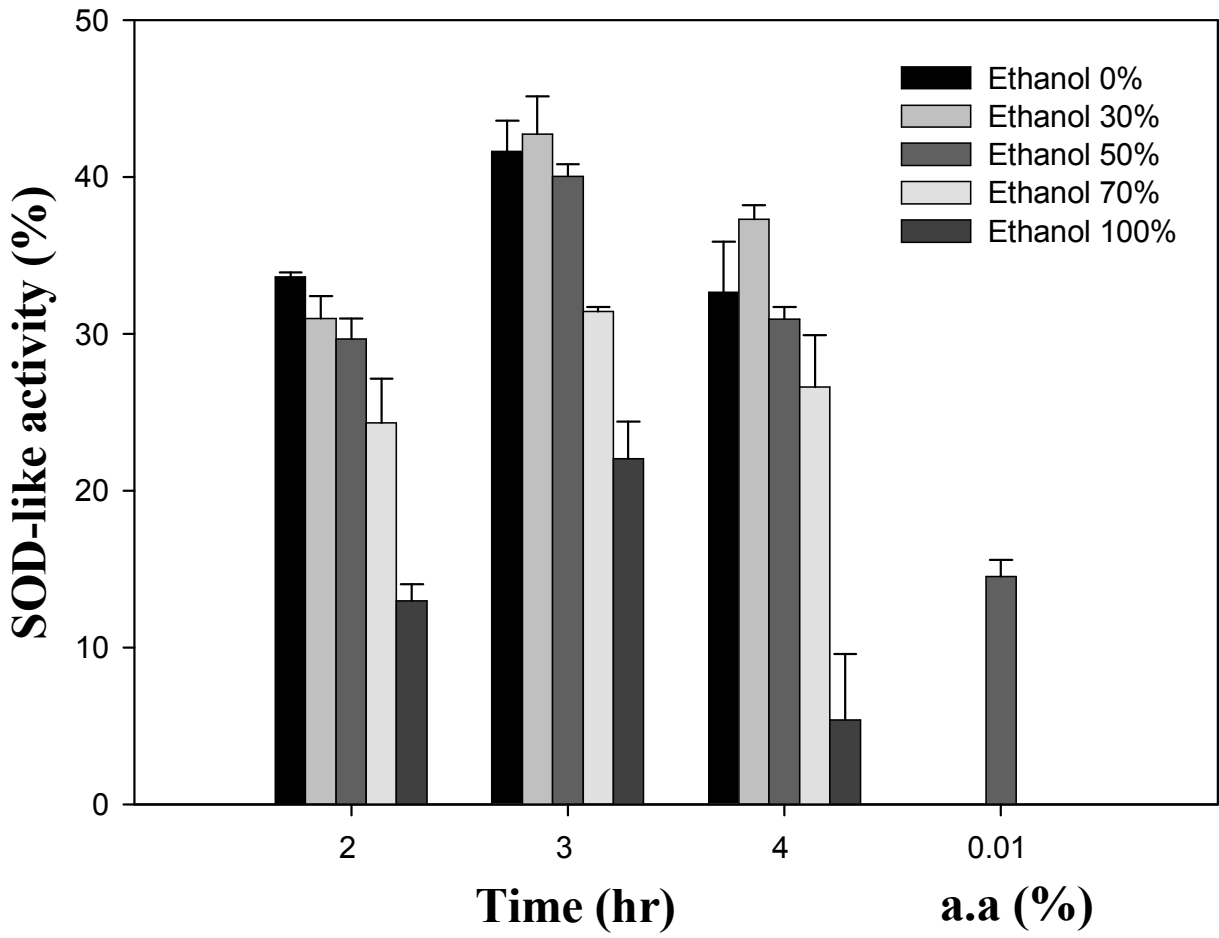


그림 22. 시간을 달리한 에탄올 추출물의 SOD 유사 활성

② 삶기 전과 후의 SOD 유사 활성

삶기 전과 삶은 후의 마늘을 에탄올의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 SOD 유사 활성을 측정한 결과는 그림 23과 같다. 효소 활성을 저해시키지 않은 시료(A)의 경우 에탄올 함량이 증가할수록 활성이 점점 감소되어 100% 에탄올 추출구에서는 활성이 매우 낮게 나타났다. 효소 활성을 저해시킨 시료(B)의 경우, 100% 에탄올 추출구에서 낮은 활성을 나타낸 것을 제외하고는 에탄올 함량에 따라 큰 차이를 나타내지 않았다. 효소 활성 저해 유무에 따라서 SOD 유사활성의 양상이 다른 것은 마늘 내 존재하는 대표적인 활성 물질인 alliin이 크게 관여하는 것으로 보여지며, 이에 대한 보완 연구가 필요하다고 판단된다.

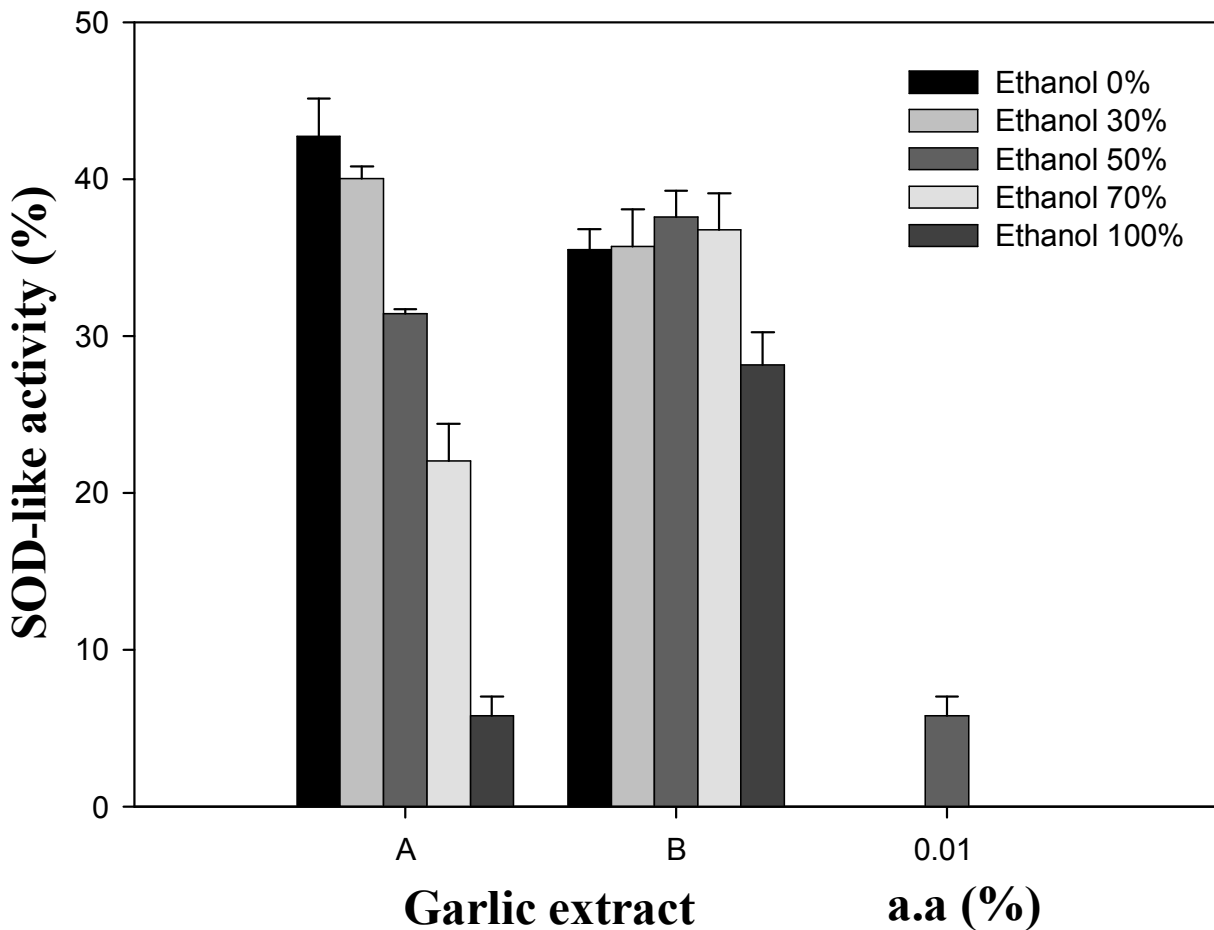


그림 23. 삶기 전(A)과 후(B)의 SOD 유사 활성

(4) 총 폴리페놀의 함량 측정

아래의 그림은 동결건조한 후 추출용매 (메탄올 추출물, 아세톤 추출물, 온도 및 시간을 달리한 에탄올 추출물) 조성을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 총 폴리페놀에 대한 결과이다.

(가) 메탄올 추출물의 총 폴리페놀

동결 건조한 마늘을 메탄올의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 총 폴리페놀을 측정한 결과는 그림 24와 같다.

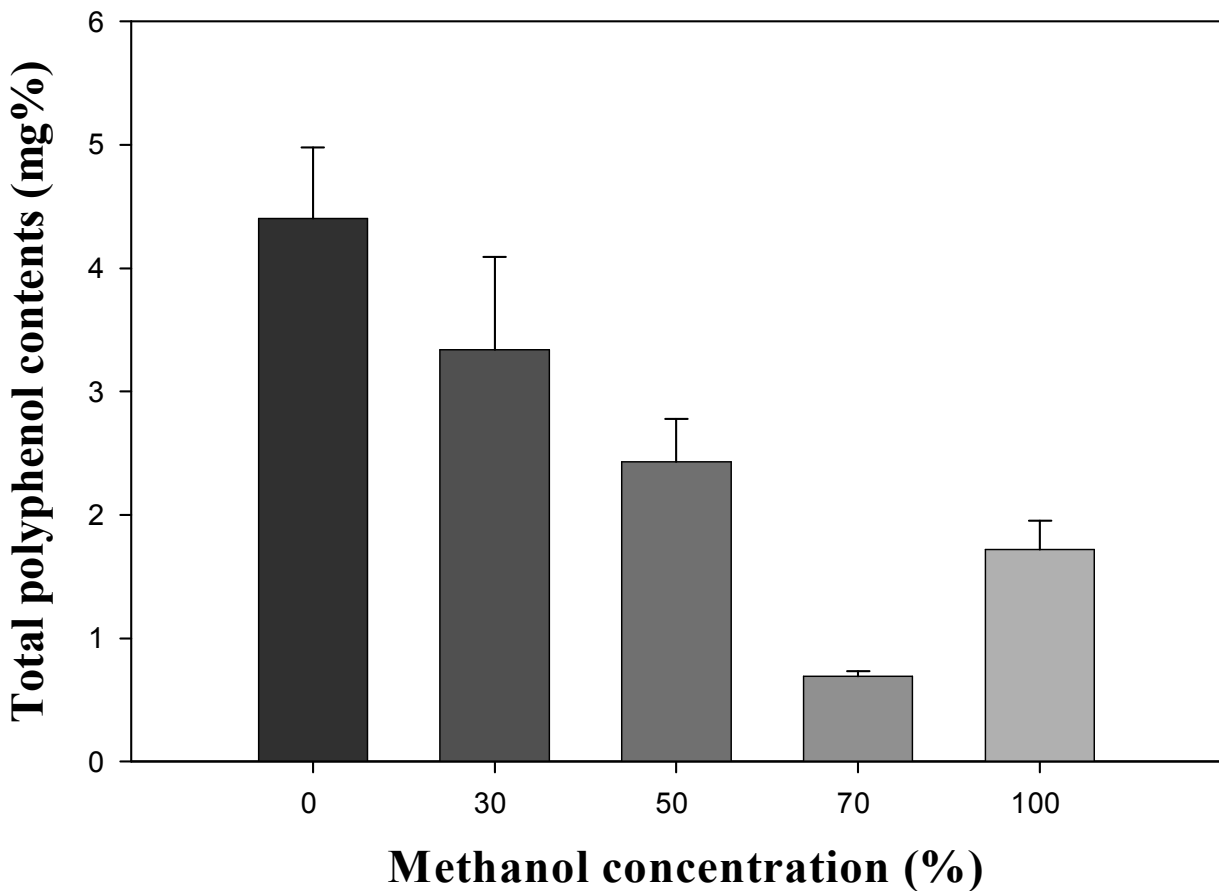


그림 24. 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 (70°C, 3hr)

일반적으로 폴리페놀 화합물들은 식물계에 널리 분포되어 2차대사산물의 하나로서 다양한 분자구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxy (OH)를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대분자들과 쉽게 결합하여 항산화, 항암 등 다양한 활성을 갖는다 (Amarowicz *et al.*, 2004). 특히 폴리페놀 화합물은 건강유지와 질병예방에 기여하는 물질로서 녹차의 카테킨, 커피의 클로벤젠산, 딸기, 가지, 파프리카, 포도 및 복분자 등의 붉은색이나 자색의 안토시아니계

색소 등이 풍부하게 함유되어있다. 이러한 폴리페놀 화합물은 생체 내의 free radical에 전자를 제공하여 산화의 진행과정을 억제시켜 생체 내의 산화물 축적이나 DNA손상을 방지하여 free radical이 생체 내에서 야기하는 각종 질병을 예방하고 노화를 지연시키는 등 많은 기능을 갖는다 (Russo *et al.*, 2000). 그러므로 마늘 추출물의 항산화에 대한 폴리페놀 함량이 중요하다. 본 연구에서는 메탄올의 농도가 증가할수록 총 폴리페놀 함량은 감소하는 것으로 나타났다.

(나) 아세톤 추출물의 총 폴리페놀

동결 건조한 마늘을 아세톤의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 총 폴리페놀을 측정한 결과는 그림 25와 같다.

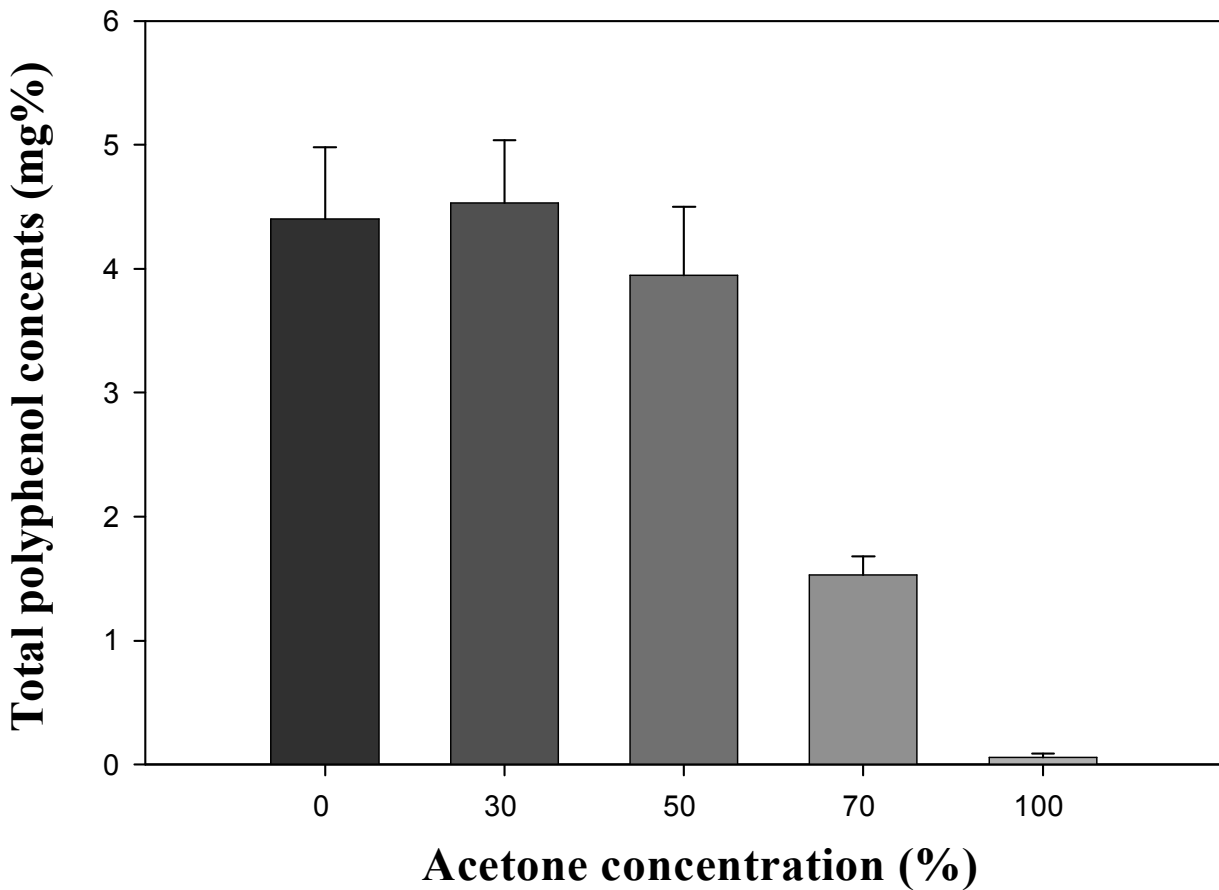


그림 25. 아세톤 추출물의 총 폴리페놀 (70°C, 3hr)

추출용매로서 아세톤을 사용한 경우, 함량이 50%까지 증가할수록 추출되는 총폴리페놀 함량은 크게 변화하지 않았으나, 70% 조건에서 크게 감소하는 경향을 보여주었으며, 100% 아세톤 조건에서는 거의 추출되지 않았다.

(다) 에탄올 추출물의 총 폴리페놀

추출 조건으로서 온도 및 시간을 달리하여 얻은 추출물 (추출용매는 에탄올을 사용함)에 대한 총 폴리페놀을 분석한 결과를 아래에 나타내었다.

① 추출 온도에 따른 총 폴리페놀

동결 건조한 마늘을 에탄올의 온도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 총 폴리페놀을 측정한 결과는 그림 26과 같다.

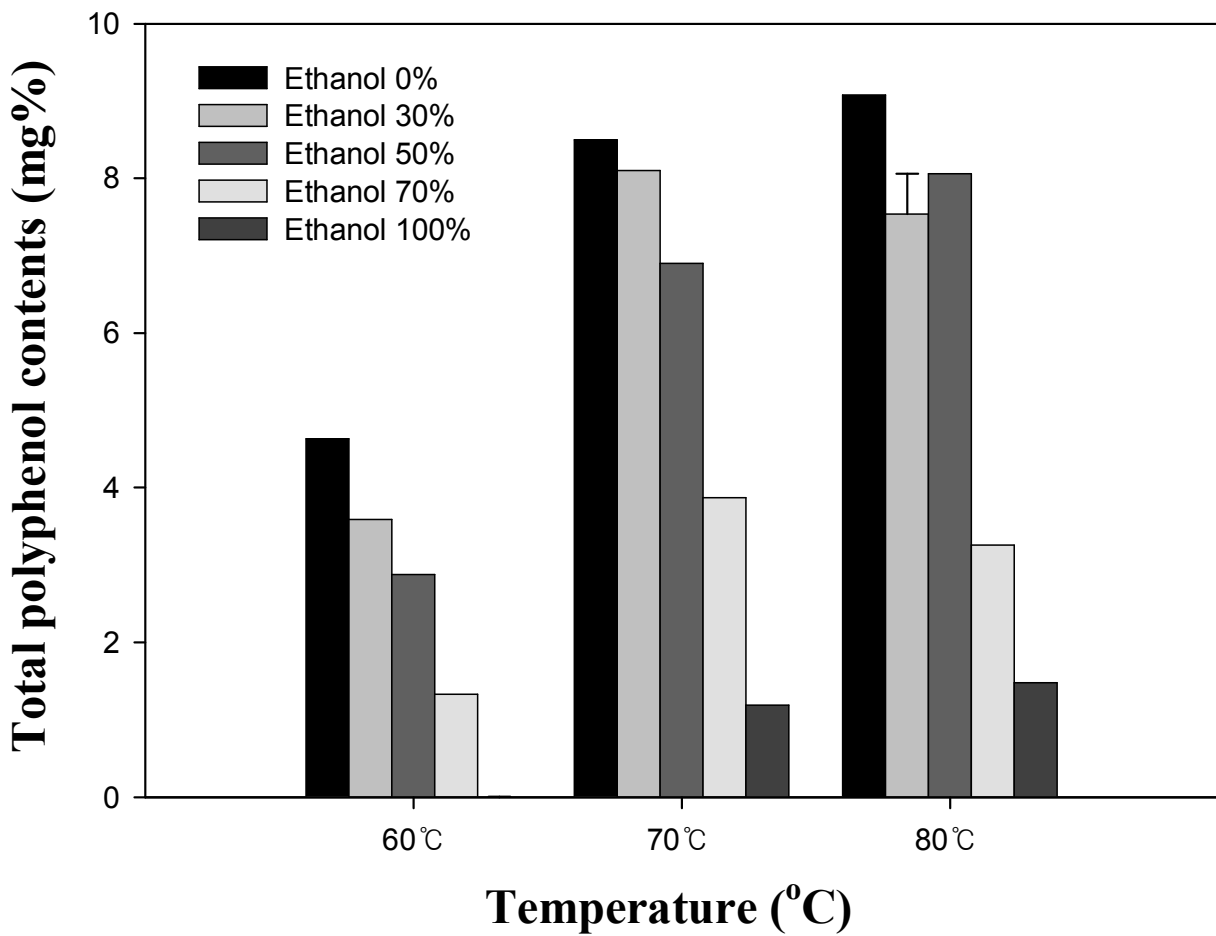


그림 26. 온도를 달리한 에탄올 추출물의 총 폴리페놀(그림 수정)

Ahn 등 (2007)에 의하면 페놀성 화합물들은 라디칼을 소거하여 산화를 억제하고 활성산소를 제거함으로써 항산화 효과를 나타낸다고 보고하였다. 추출 온도가 증가할수록 총 폴리페놀 함량은 높게 측정되었으며, 에탄올의 함량이 증가할수록 총 폴리페놀 함량은 낮게 나타났다.

② 추출 시간에 따른 총 폴리페놀

동결 건조한 마늘을 에탄올의 시간을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 총 폴리페놀을 측정한 결과는 그림 27과 같다.

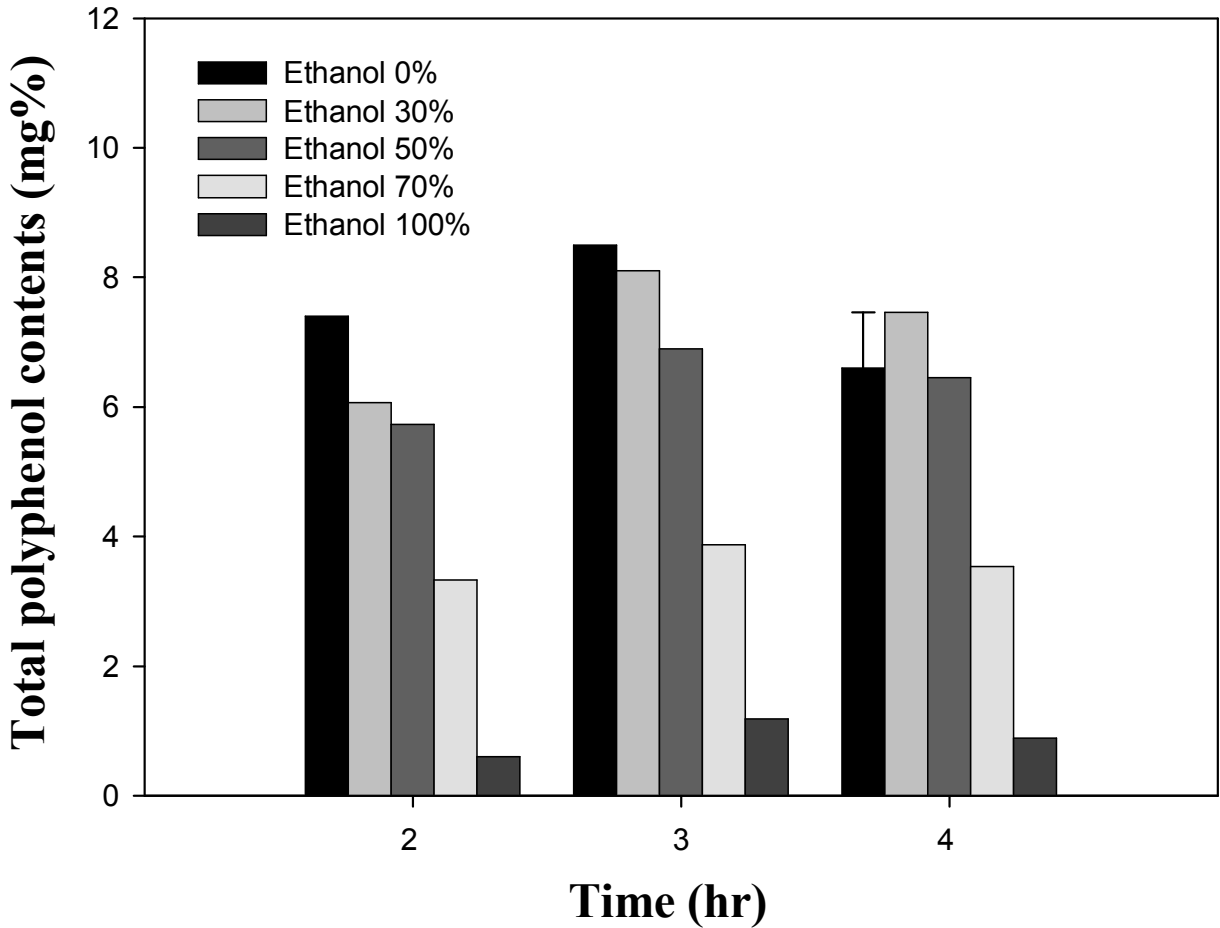


그림 27. 시간을 달리한 에탄올 추출물의 총 폴리페놀

대표적인 항산화성 물질로 인정되는 마늘은 성분 중의 flavonoids를 포함하는 페놀화합물과 diallylsulfide, trisulfide 및 allyl-cysteine과 같은 함황화합물이 항산화 기능을 지니는 주체로 보고되어 있다 (Nuttakaan *et al.*, 2006). 마늘 추출물은 추출 시간이 증가함에 따라 별다른 차이를 보이지 않았다.

(5) 아질산염 소거 작용

마늘을 삶기 전, 후에 동결건조를 한 다음 추출용매 (에탄올) 함량을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 아질산염 소거 작용에 대한 결과 그림 28과 같다.

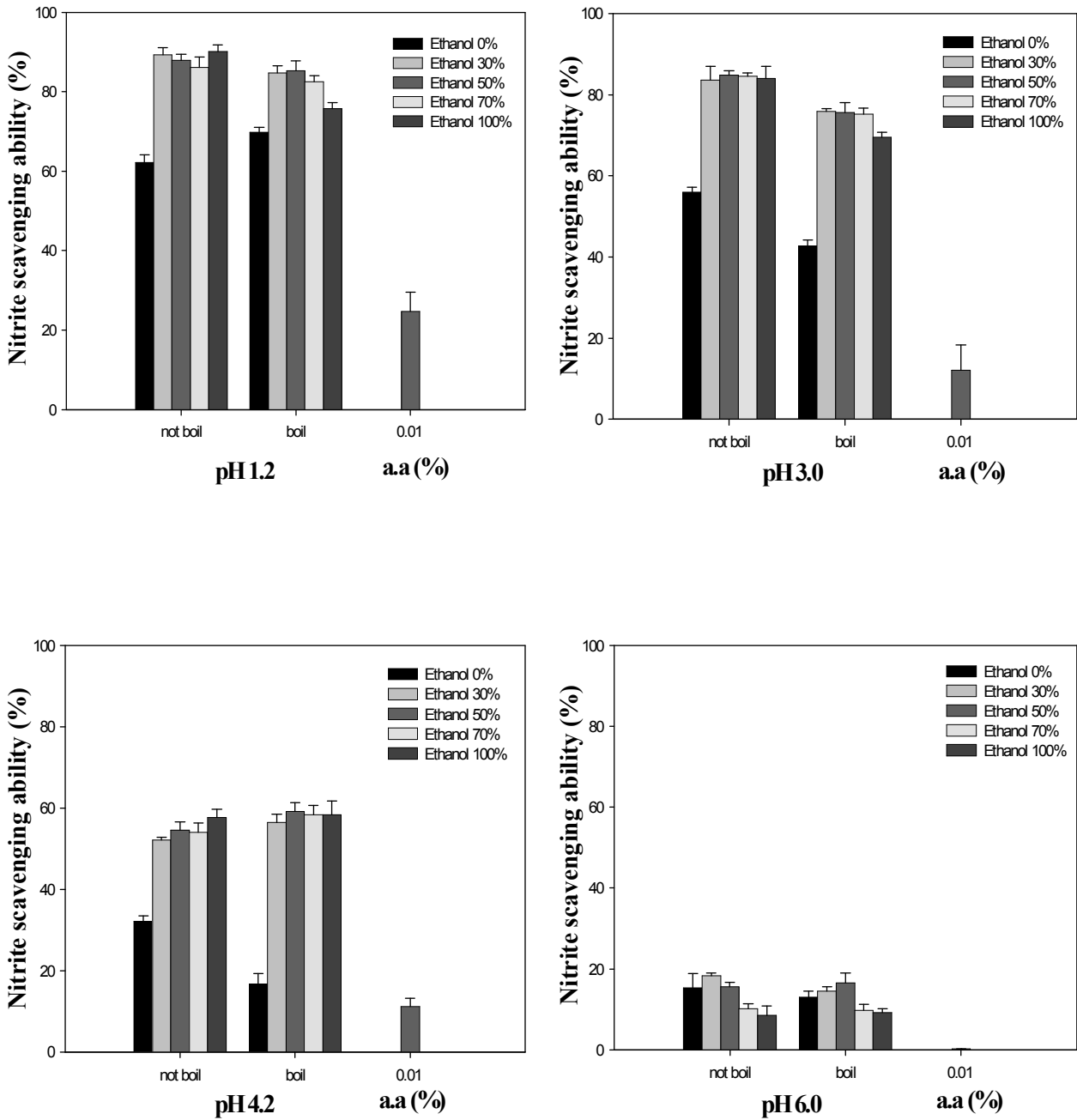


그림 28. 삶기 전(A)과 후(B)의 아질산염 소거 작용

일반적으로 알려진 바와 같이, pH가 증가할수록 그 활성은 감소하는 경향을 나타내었으며, 삶은 시료의 경우 삶지 않은 것에 비해서 활성이 약간 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

아질산염은 우리가 흔히 섭취하는 생선이나 육류 등에 발색, 풍미증진, 항균작용 및 산패 방지를 위해 첨가제로 많이 사용하고 있지만, 이러한 아질산염을 섭취했을 경우 동물이나 인체의 위 내에서 아민류와 반응하여 발암성 물질로 알려진 nitrosamine을 생성하게 된다 (Boo *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2007). 따라서 인체에 유해한 물질이라고 할 수 있는 아질산염을 효과적으로 제거할 수 있는 식물유래 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Kim 등 (2002)은 아질산염 소거능은 pH에 의존적이며, pH가 낮을수록 아질산염 소거능이 우수함을 보고하였으며, 마늘 함량이 증가할수록 그 효과는 향상된다고 하였다 (Park and Kim, 2009).

(6) Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해 활성

아래 그림은 마늘을 삶기 전, 후에 동결건조를 한 다음 추출용매 (에탄올) 조성을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 ACE 저해 활성에 대한 결과는 그림 29와 같다.

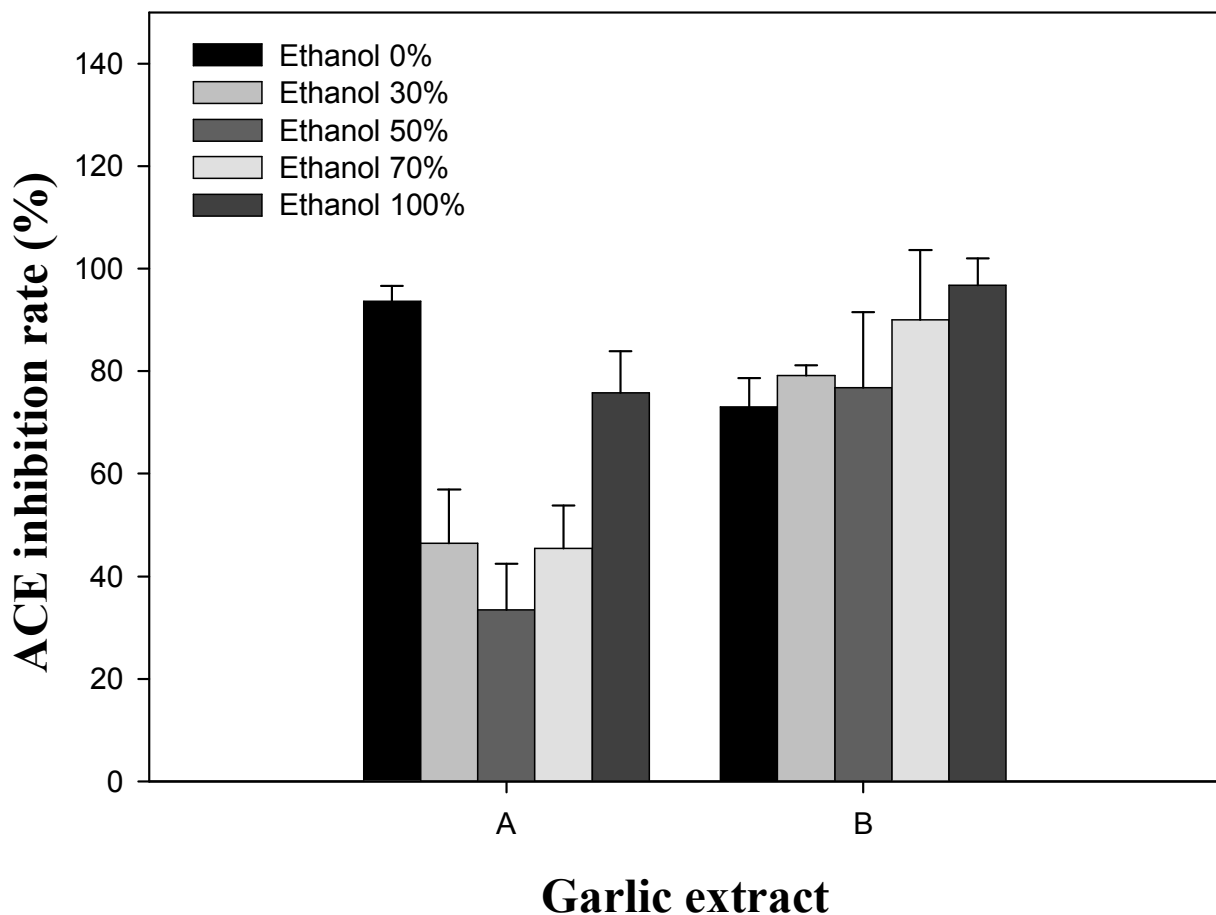


그림 29. 삶기 전 (A)과 후 (B)의 ACE 저해 활성

삶은 시료의 경우 에탄올 함량이 증가할수록 ACE 저해 활성이 비슷하거나 약간 증가하는 경향을 나타내었으나, 삶지 않은 시료의 경우 에탄올 함량이 증가할수록 점차적으로 감소하다가 다시 증가하는 양상을 나타내어, 에탄올 50% 추출구에서 가장 낮은 활성을 띄었다.

고혈압이 발생하는 기작에서 renin-angiotensin system은 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다. Angiotensin I converting enzyme (ACE)은 angiotensin I에서 angiotensin II를 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이다. Angiotensin II는 A-II 수용체와 결합하여 동맥과 소동맥을 수축시키고 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 유리를 촉진시켜 결과적으로 혈압의 증가를 가져온다. 따라서 ACE 저해물질은 ACE의 활성을 억제함으로써 고혈압을 직접적으로 억제할 수 있다 (Kim *et al.*, 2008). Angiotensin converting enzyme inhibitor는 일반적으로 고혈압 치료제로 알려져 있으나 이런 합성 약물은 높은 활성과 특이성 때문에 유의한 부작용을 나타낼 가능성을 가지고 있다 (Messerli, 1999). 이러한 문제점을 해소하기 위해 식품 단백질에서 유래하는 ACE 저해활성을 가진 peptide류들을 검색하는 연구가 다양하게 이루어지고 있으며 이들이 ACE 저해 약물들을 대신할 수 있을 것이다.

(7) Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay

(가) 삶기 전, 후의 FRAP assay

마늘을 삶기 전, 후에 동결건조를 한 다음 추출용매 (에탄올) 조성을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 FRAP assay에 대한 결과는 그림 30과 같다. 결과에 나타난 바와 같이, 삶지 않은 시료의 경우 삶은 시료에 비해서 전체적으로 높은 활성을 나타낸 반면, 에탄올 함량이 증가함에 따라 점차적으로 활성이 감소하는 경향을 보였다. 반면, 삶은 시료의 경우 에탄올 30% 추출구에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 그리고 에탄올 100% 추출구의 경우 두 시료 모두 거의 활성을 나타내지 않았다. 일반적으로 혈중 총 항산화능은 체내의 총괄적인 유해산소 중화능력을 평가하기 위해 oxygen radical absorbance capacity (ORAC), trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP) 등과 같은 방법으로 측정되고 있다 (Kwak *et al.*, 2008). 그 중 Benzie & Strain (1996)에 의해 개발된 FRAP assay는 초기에는 Ferric Reducing Ability of Plasma로 정의내려졌지만 현재는 Ferric Reducing/Antioxidant Power로 용어가 재정립되었다. 이 방법은 저렴하며, 실험조작이 간편하여 반복시행이 용이한 방법으로 혈액 뿐 아니라 식품의 항산화 활성 등을 측정하는 방법으로 이용범위가 확대되었다 (deGraft-Johnson *et al.*, 2007). FRAP 방법은 DPPH radical 소거 활성의 측정법과는 메커니즘이 다른 항산화 활성 검정법이다. DPPH 방법은 free radical을 직접

적으로 소거하는 것에 의하여 항산화 활성을 평가하는 방법이며, FRAP 방법은 산화 및 환원 반응에 의한 메카니즘이다 (Kim *et al.*, 2009). 따라서 시료 중의 주된 항산화 물질의 생화학적 특징과 방법에 따라 결과치가 상이하게 나타날 수 있다 (Lee *et al.*, 2008).

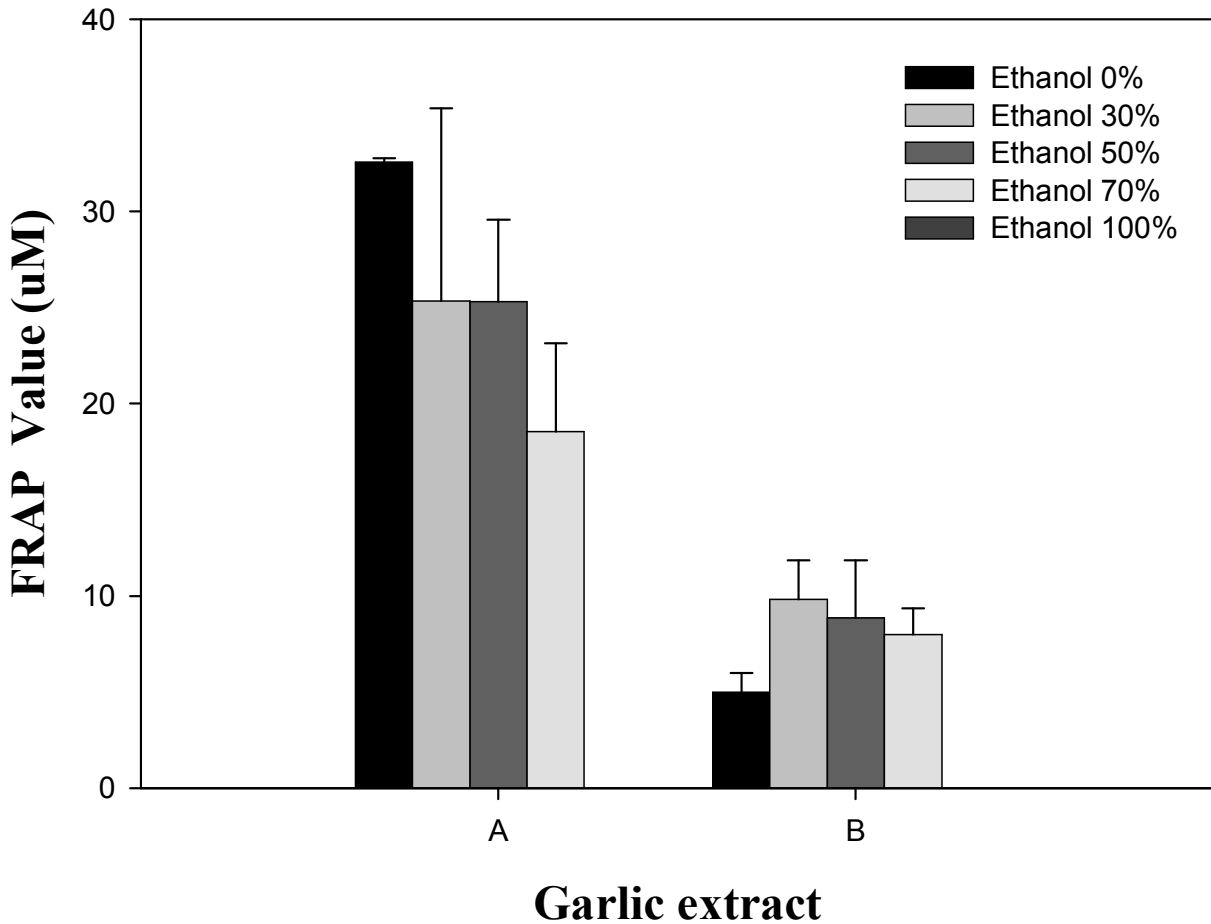


그림 30. 삶기 전(A)과 후(B)의 FRAP assay

(나) 삶은 마늘의 추출 온도에 따른 FRAP assay

삶은 마늘을 동결건조 한 다음 추출용매 (에탄올)와 온도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 FRAP assay에 대한 결과는 그림 31과 같다.

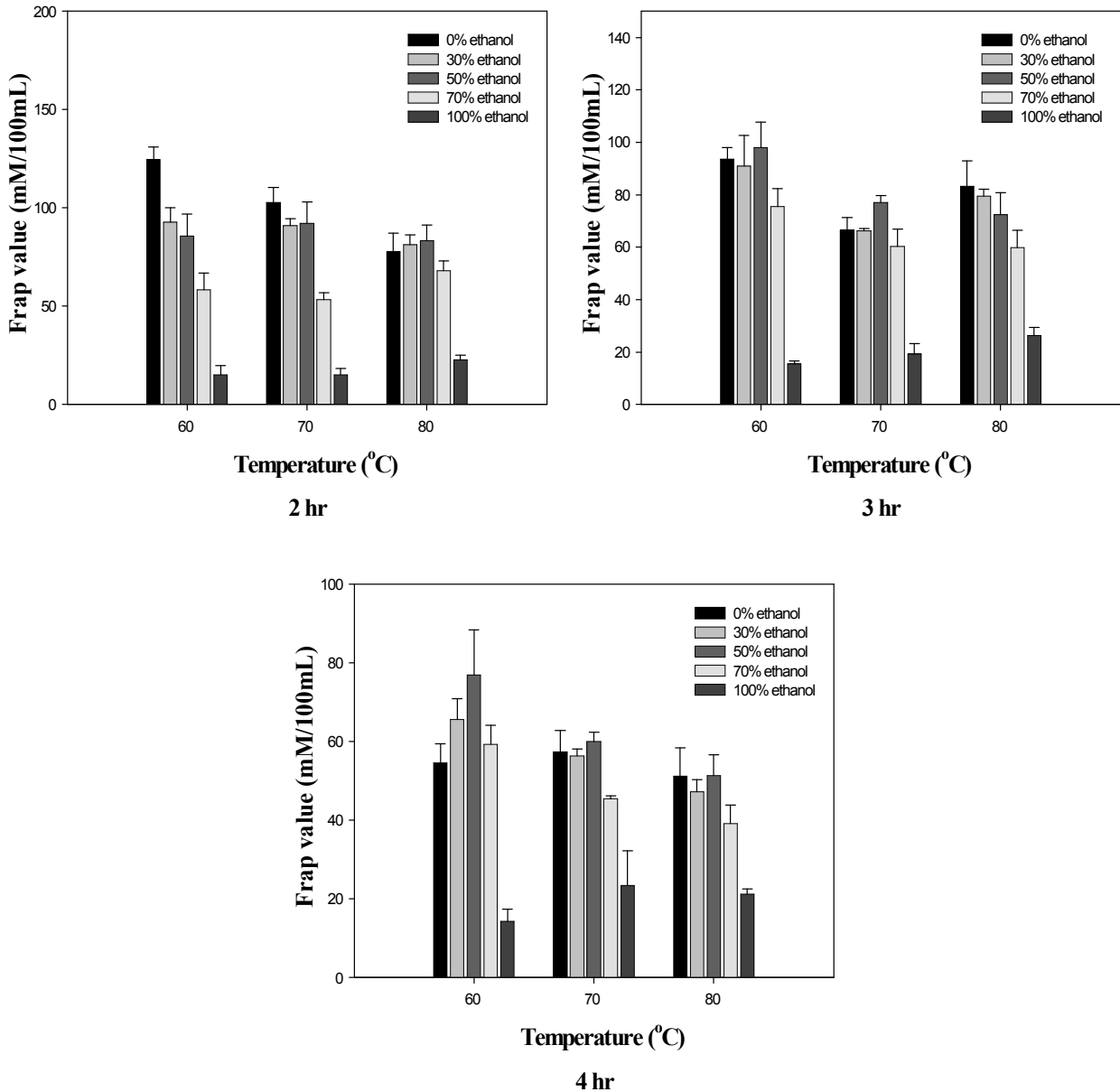


그림 31. 온도를 달리한 삶은 마늘 추출물의 FRAP assay

FRAP (ferric reducing/antioxidant power) 방법은 비교적 최근에 Benzie 등 (1996)에 의해 개발되어진 총항산화능을 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ)로 환원되는 것을 이용하여 측정한다. 이 방법은 in vivo의 총항산화능 측정에만 사용되는 것이 아니라 식품 자체의 항산화능을 비교하는 데에도 널리 사용되고 있고 (Fogliano *et al.*, 1999; Rice-evans *et al.*, 1996; Benzie and Szeto 1999), 많은 장점이 부각되고 있다. 그런데 이들 방법들은 사용하고자 하는 시료에 따라 상당히 다르게 반응하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 추출 온도

가 증가할수록 FRAP 활성은 감소하는 것으로 나타났으며, 에탄올의 함량이 증가할수록 FRAP 활성 또한 감소하는 것으로 나타났다. 이에 전자공여능과 총 폴리페놀과는 상반되는 결과를 보였다.

(다) 삶은 마늘의 추출 시간에 따른 FRAP assay

삶은 마늘을 동결건조 한 다음 추출용매 (에탄올)와 시간을 달리하여 제조한 마늘 추출물의 FRAP assay에 대한 결과는 그림 32와 같다. 추출 시간이 증가할수록 FRAP 활성은 감소하였으며, 에탄올의 함량이 증가할수록 FRAP 활성 또한 감소하는 것으로 나타났다.

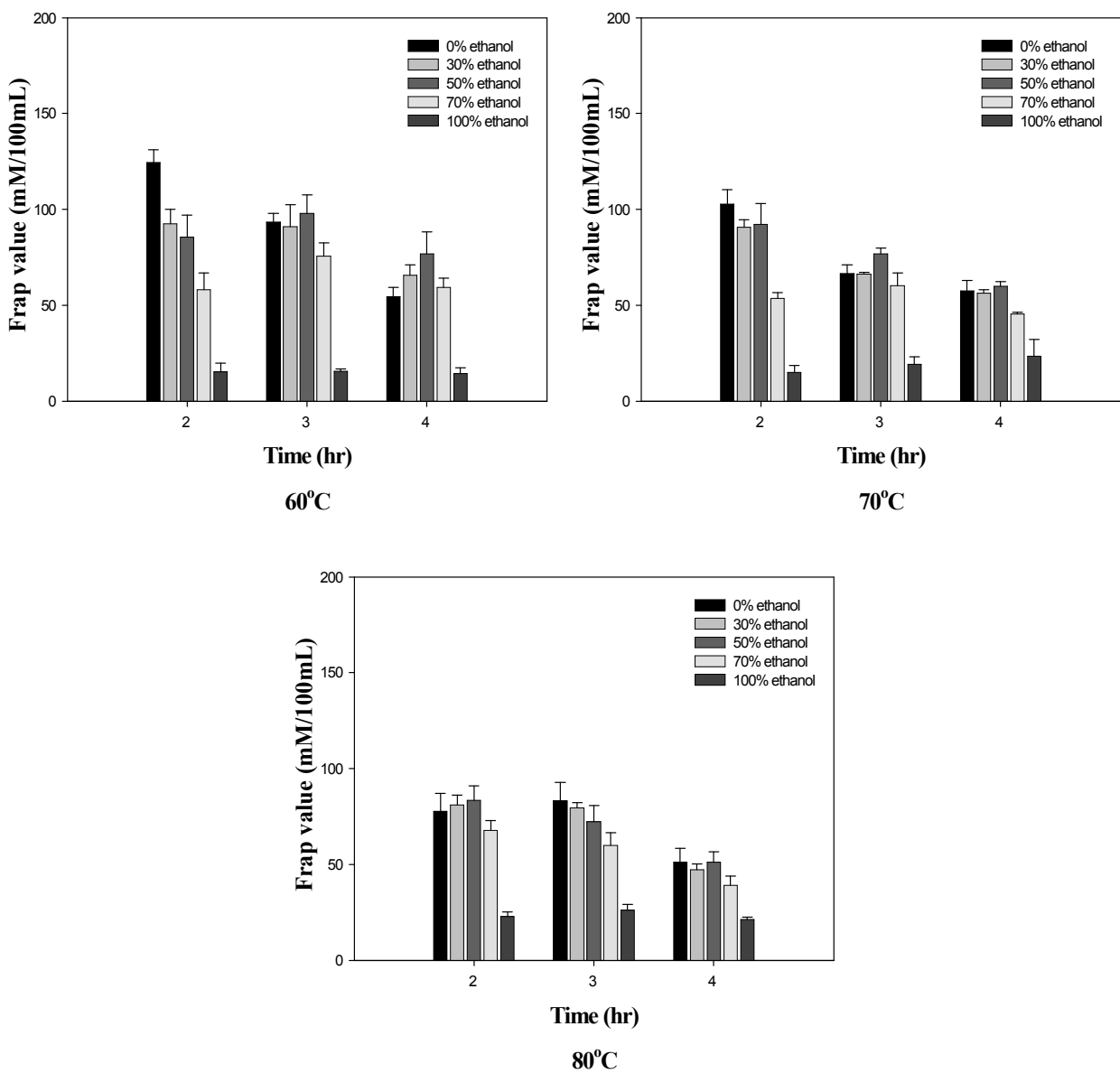


그림 32. 시간을 달리한 삶은 마늘의 FRAP assay

2. NSM system에 의한 유효성분 포집 기술 개발

가. 공정 변수에 따른 NSM system의 최적 조건 도출

(1) Chitosan 용액 제조

(가) pluronic F-68 이용

0.1% chitosan 용액과 대두유를 이용하여 제조한 O/W 에멀전에 있어서 계면활성제로 pluronic F-68의 농도를 달리하여 제조한 후 평균입도를 측정한 결과는 그림 33과 같다.

겔 및 필름 형성능력이 뛰어나며 다가의 양이온성을 가진 chitin과 chitosan은 약물의 방출을 조절할 수 있는 약물전달체로써 많은 과학자들에 의해 연구되어 왔다. 특히 아민기를 가지고 있는 chitosan은 높은 반응성으로 인해 여러 가지 기능성기로의 개질이 가능해 약물의 치료 효율을 최대화 할 수 있는 약물전달체의 제조가 가능하다는 장점을 가지고 있다. 약물전달체로써 Miyazaki 등은 indomethacin과 hydropapaverine hydrochloride와 같은 약물의 지속적인 방출을 위해 chitosan을 사용하였고 (Jang and Nah, 2008), Sawayanagi 등은 chitosan과 mannitol을 혼합하여 액상 제제로서의 가능성 등을 조사하였다 (Sawayanagi *et al.*, 1982). 또한 생체분해성 물질로 코팅된 매트릭스 형태의 약물전달체가 지속적인 약물의 방출을 위한 제제로 평가되었으나 이러한 형태의 전통적인 약물전달체는 인체 내에 독성을 나타내는 초기 burst effect와 같은 부작용을 야기하게 된다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 연구되고 있는 약물전달시스템으로써 이전까지는 고분자 매트릭스 형태로 주로 가공하여 약물 방출에 응용했으나, 근래에는 미립자구체 (microspheres), 미립자캡슐 (microcapsule), 에멀전 (emulsion), 나노입자 (nanoparticles) 등을 이용한 연구가 주로 진행되어 왔다.

결과에 나타난 바와 같이, pluronic F-68의 경우 농도가 증가할수록 평균입도가 증가하는 것을 확인하였다. 일반적으로 계면활성제의 경우 HLB value가 에멀전 droplet의 입도를 좌우한다고 알려져 있다.

(나) Tween 80 이용

아래의 그림은 계면활성제로서 Tween 80을 사용하였을 때 그 함량에 따른 에멀전 droplet의 평균입도를 조사한 결과는 그림 34와 같다. Tween 80의 경우 에멀전을 제조하였을 경우 입도 분포가 큰 것이 특징인 것을 고려하였을 때 농도를 달리하여도 큰 차이를 보이지 않는 것도 예측 가능한 결과이다.

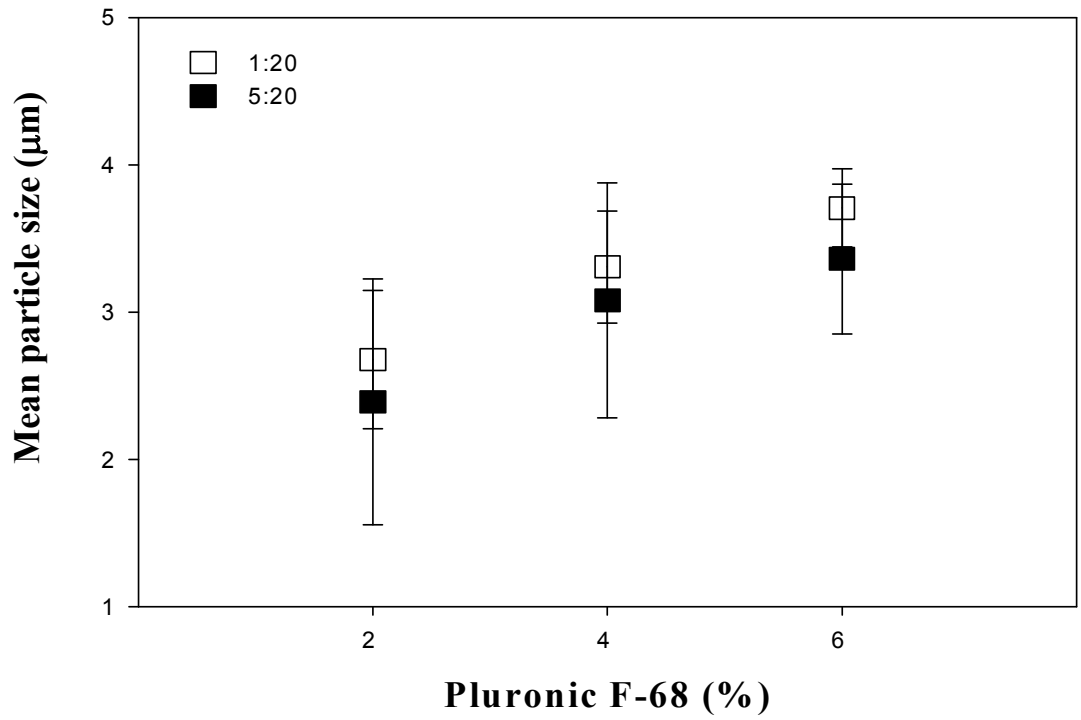


그림 33. 0.1% Chitosan 용액의 Pluronic F-68 비율에 따른 입도 측정

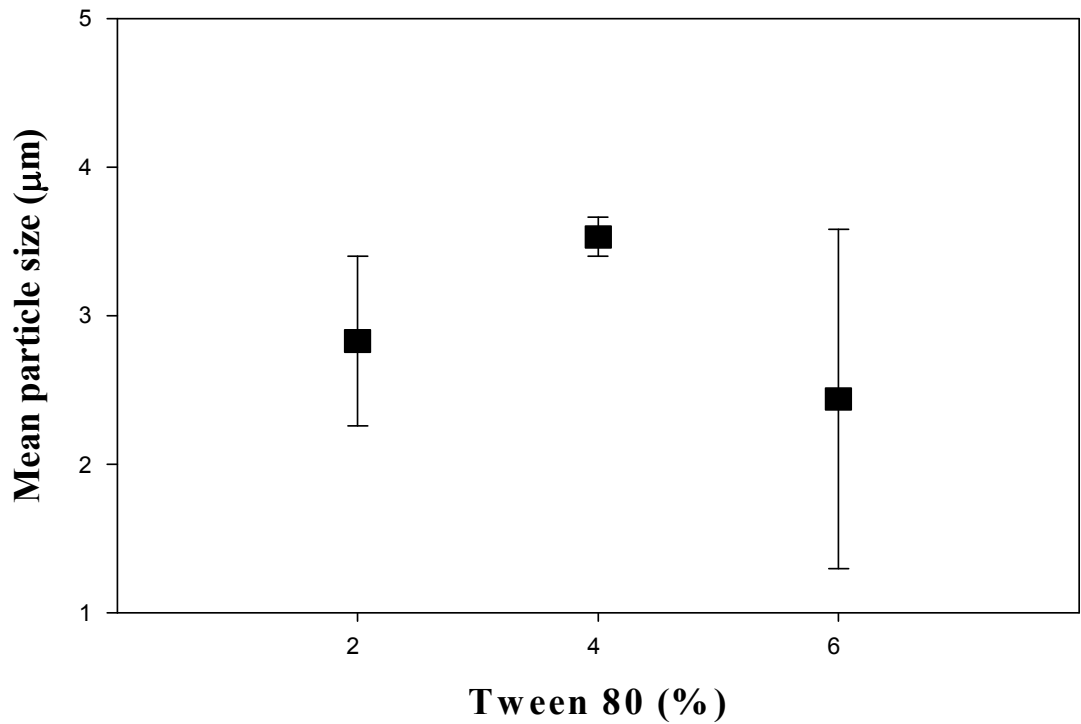


그림 34. 0.5% Chitosan 용액의 Tween 80 비율에 따른 입도 측정

(2) 다층막(W/O/W) 에멀전 제조

(가) Internal aqueous phase로서 alginate 용액 제조

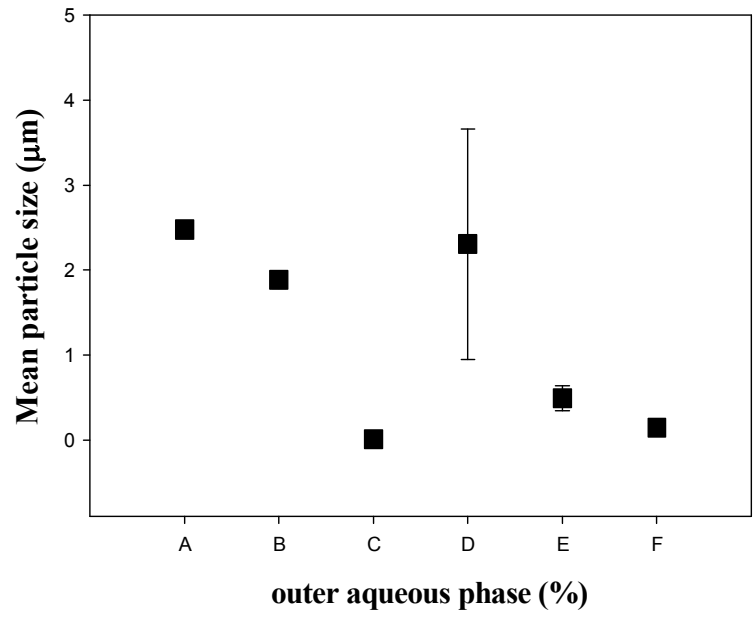
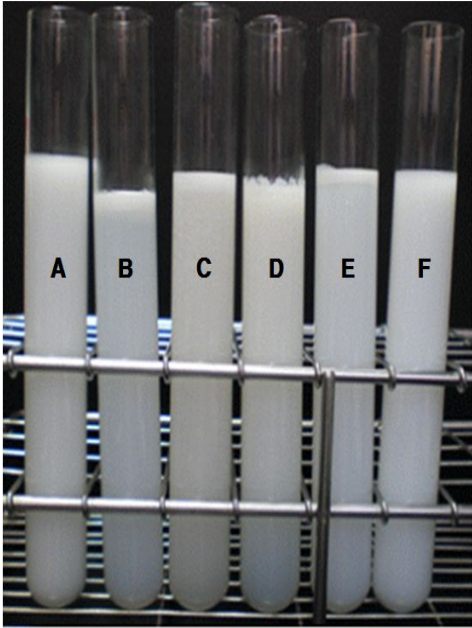
① 농도를 달리한 alginate 용액 제조

본 연구에서는 내부 수용액 층으로 alginate 용액을 사용하였고, organic phase로서 1% span 80을 포함하는 대두유를, 외부 수용액 층으로 ι -carrageenan (A), 1% κ -carrageenan (B), 1% λ -carrageenan (C), 1% alginate (D), 1% gum (E), 1% WPI (F)을 이용하여 다층막을 제조한 결과는 그림 35와 같다.

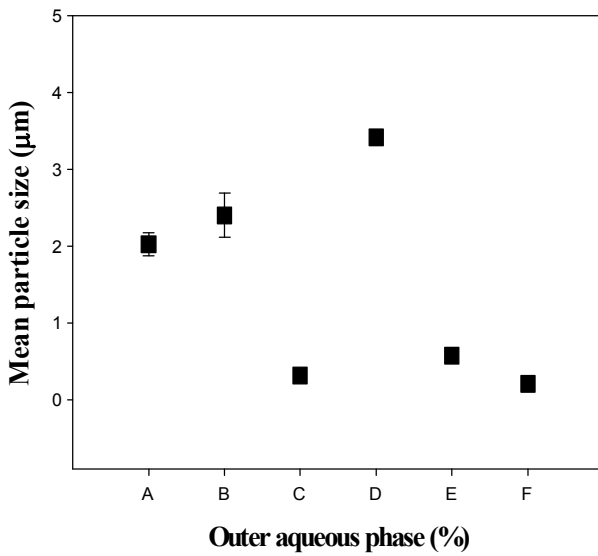
Alginate는 gluconic (G) unit와 manuronic (M) unit의 두 성분으로 이루어진 직쇄형 polysaccharide의 공중합체의 일종으로 알긴산 수화젤의 물리적 성질은 M과 G의 구성에 의해 결정되며, alginate의 M/G 비, M과 G의 사슬의 분포는 어떠한 해조류에서 추출했느냐의 여부에 따라 달라진다고 한다.

칼슘염을 이용한 알긴산 미립구는 외부 젤화법 또는 내부 젤화법에 의해 제조된다. 내부 젤화법, 즉 에멀전-내부 젤화법은 젤화제인 칼슘염을 사용하여 내부 젤화 과정을 거친 후, calcium chloride를 가하여 완전한 가교를 시행하는 것이다. 그러나, 이러한 내부 젤화법은 덩어리상의 미립구 제조와 과량의 칼슘염을 사용해서 단단한 미립구를 제조해야 하는 등의 단점이 있다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 여러 종류의 칼슘염 및 calcium chloride 외에도 glutaldehyde, iso-propyl alcohol 등의 가교제를 사용한 알긴산 미립구 제조 방법들이 보고되고 있다.

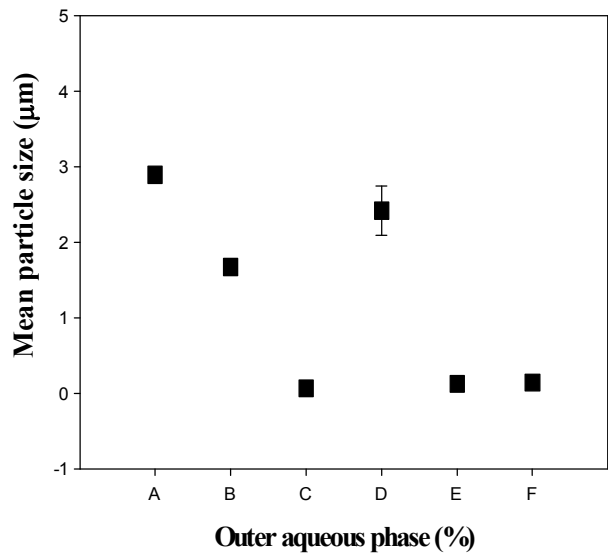
Inner aqueous phase로서 alginate를, outer aqueous phase로서 6종의 고분자를 이용하여 다층막을 제조한 결과, 상분리가 발생하지 않았으며, 평균입도의 경우 약 1-3 μm 수준을 나타내었다.



0.5% alginate



1% alginate



2% alginate

그림 35. 농도를 달리한 alginate 용액의 입도 측정

(A: 1% ι-carrageenan, B: 1% κ-carrageenan, C: 1% λ-carrageenan, D: 1% alginate, E: 1% gum, F: 1% WPI)

② 균질화 속도를 달리한 alginate 용액 제조

아래의 그림은 2% alginate 용액을 제조하여 균질화 속도를 달리한 결과는 그림 36과 같다. 에멀전 제조 시 균질화 속도로서 12,000 rpm을 사용하였을 경우 평균입도를 분석한 결과이다. 10,000 rpm에 비해서 12,000 rpm을 사용하였을 경우 입도가 안정되는 것을 확인할 수 있었다.

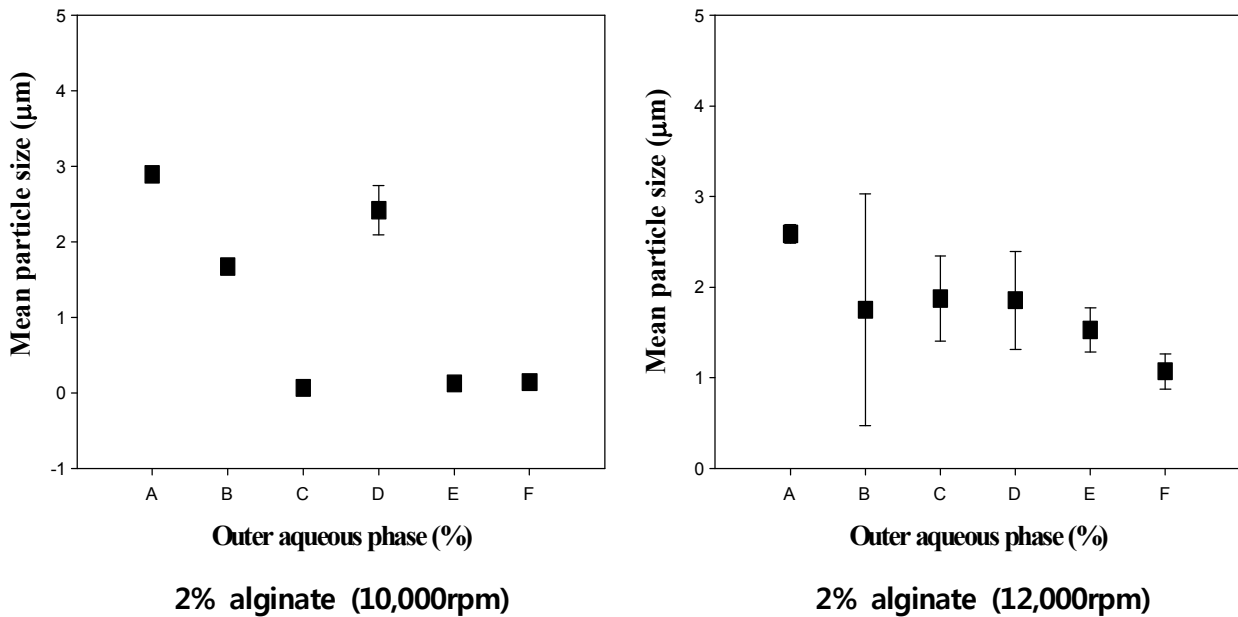


그림 36. 균질화 속도를 달리한 2% alginate 용액의 입도 측정

(A: 1% ι-carrageenan, B: 1% κ-carrageenan, C: 1% λ-carrageenan, D: 1% alginate, E: 1% gum, F: 1% WPI)

(3) β-lactoglobulin에 의한 O/W/W 에멀전의 안정성 측정

단백질을 이용한 다양한 미세입자 제조기술, 예를 들면, spray-drying 또는 coacervation 등이 기능성 유제품 제조에 이용되어 왔다. 기존의 미세입자 제조기술 공정 과정은 120-130°C의 높은 온도의 열처리 공정과 가교제로서 건강에 해가 되는 유기물질 등이 필요하기 때문에, 특히 열에 민감한 core material의 변성을 촉진시킬 뿐만 아니라, 잔류 유기물로 인한 안전성 문제도 발생시킬 수 있다.

우유 단백질 중의 하나인 유청단백질 (whey protein) 특히 β-lactoglobulin (β-Lg)은 필수 아미노산의 공급원이며, 영양학적으로 우수하고 gelation이나 emulsion 같은 물리화학적 기능성을 지니고 있고, GRAS (generally recognized as safe)하기 때문에 식품의 물리적 특성 향상과 안전성이 요구되는 food ingredients로 이용할 수 있는 잠재성을 지닌다. 유청 단백질의 주요

단백질인 β -lactoglobulin (β -lg)는 lipocalin 단백질로써, 기존에 알려진 vitamin D와 retinol 외에도 omega-3 지방산인 DHA (Zimet & Liveney), 포도에 함유된 천연 항산화제인 resveratrol (Liang 등, 2008), 녹차에 함유된 천연 항산화제 epigallocatechin gallate (EGCG)와 binding 할 수 있다고 보고 되었다 (Shpigelman 등, 2009). 또한, 유청 단백질 중 하나인 α -lactalbumin도 retinol과 palmitic acid와 binding 할 수 있음이 보고 되었다 (Considine & Flanagan, 2009).

(가) Pectin과 β -lactoglobulin을 이용한 O/W/W 용액 제조

Pectin은 사과박이나 감귤류 껍질에서 얻어지는 다양한 메칠에스터기를 함유하는 폴리갈락투론산으로 수용성 음이온계 하이드로콜로이드이다. Pectin 등의 다당류들은 단백질을 포함한 식품 시스템 내에서 증점제 및 안정제로 사용되며, 이밖에도 다당류는 겔화제, 피막제, 분산제 등의 다양한 기능성을 가지므로 많은 가공식품에 사용되고 있다. 또한 pectin을 이용한 지방대체제가 개발되는 등 pectin의 산업적인 적용성이 날로 확대되고 있다.

유청은 치즈 제조나 케이신 생산 시 분리되어 나오는 액상 부산물로서 우유의 약 90%를 차지하며 단백질, 유당, 무기질, 비타민, 미량성분 등을 함유하고 있고 물성향상, 향미 증가 등 여러 가지 영양적 가치와 물리적 기능 특성 때문에 식품첨가물 뿐만 아니라 질병 치료제로서도 널리 이용되어 왔다. 최근에는 생리적 기능으로 주목을 받게 되어 새로운 연구 및 이용 방법이 각국에서 진행되고 있다 (Kim and Ahn, 2007). 유청에는 β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovine serum albumin, immunoglobulin, lactoferrin, transferrin 및 무기질이 많이 함유되어 있다. 이 중에서 β -lactoglobulin (β -Lg)은 유청단백질의 약 50%를 차지하는 주성분으로 우유단백질의 7-12%를 차지하는 단백질이다 (Lee and Hong, 2002). β -Lg의 기능성들로는 용해성, 유화성, 표면소수성, 점성, 거품성, 겔 형성능력, retinoic acid의 결합능력 등이 보고되었고 (Yoon *et al.*, 2001), 특히 pH 4-6범위에서는 불투명하고 단단한 겔이 형성되고 pH 4 이하나 pH 6 이상에서는 탄력적인 겔이 형성된다고 보고하였다 (Lee *et al.*, 2008).

① Pectin과 β -lactoglobulin의 비율 (1 : 9)

Pectin과 β -lactoglobulin (1 : 9)을 이용하여 O/W/W 에멀전의 관찰 사진은 그림 37과 같다. 본 연구에서 pH, pectin의 농도 등에 따라서 제조한 O/W/W 에멀전을 관찰한 결과 1일 지난 후에도 에멀전이 파괴되지 않고 유지되는 것을 확인하였다.

β -lactoglobulin을 가열처리 유, 무에 따라 O/W/W 에멀전을 제조하여 입도 및 제타전위를 측정된 결과는 그림 38, 39와 같았다. 가열처리 하지 않은 시료의 경우 pH가 낮아질수록 평균입도가 증가하였고, 특히 pH 7.0 시료의 경우 pectin 농도가 증가할수록 점차적으로 평균입도가 감소하였다. 또한, 가열처리한 시료도 마찬가지로 pH 7.0의 경우 입도가 낮은 값을 나타내었

다. 따라서 O/W/W의 비율이 낮아질수록 평균입도가 작아지는 것을 확인하였다. 제타전위의 경우 pH가 높은 것이 더 안정한 결과를 나타내었으며, 이는 O/W/W의 비율과는 무관하였다.

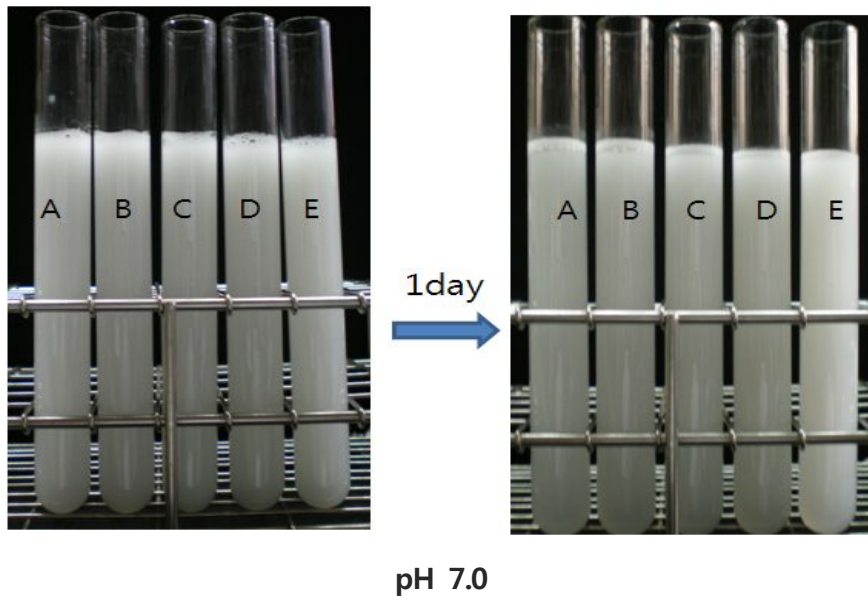
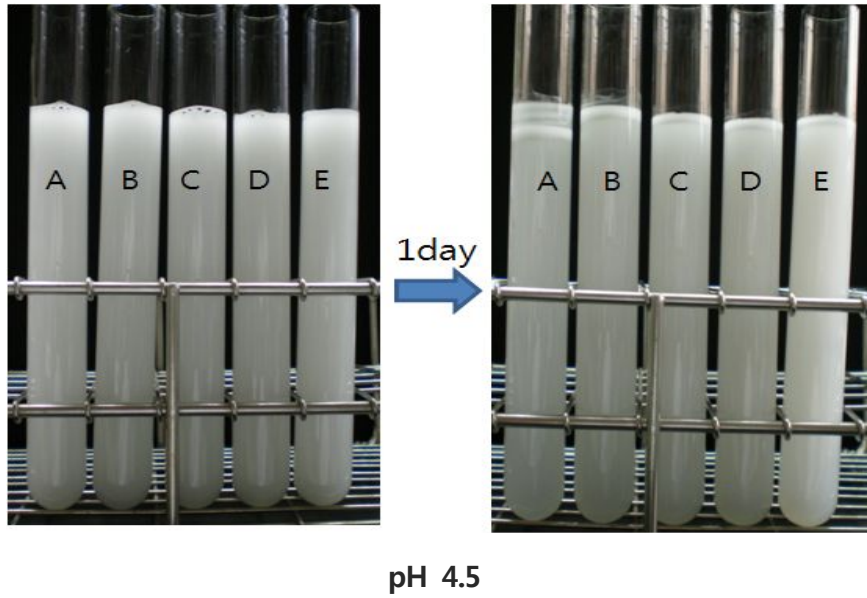


그림 37. Pectin 농도 및 pH에 따른 O/W/W 에멀전 (A: 0.01%, B: 0.02, C: 0.04%, D: 0.07%, E: 0.1%)의 관찰 사진 (O/W/W = 1 : 9)

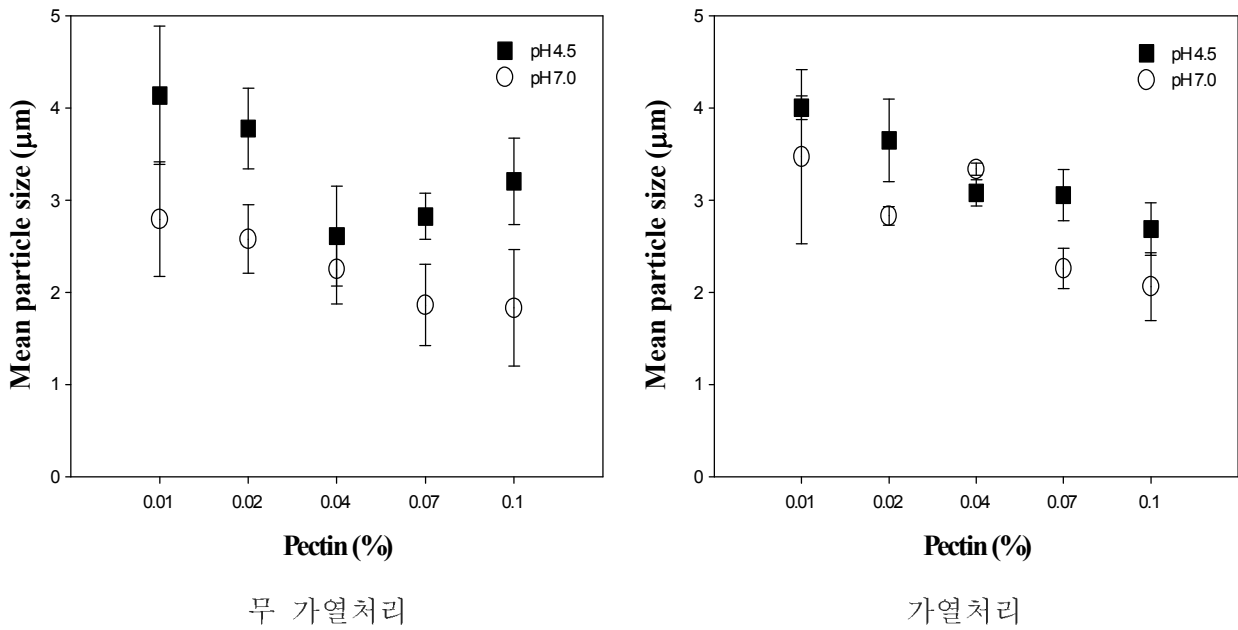


그림 38. 농도별 pectin 용액과 가열처리 유, 무에 따른 β -lactoglobulin을 이용한 O/W/W 에멀전의 입도 측정 (pectin : β -lactoglobulin = 1 : 9)

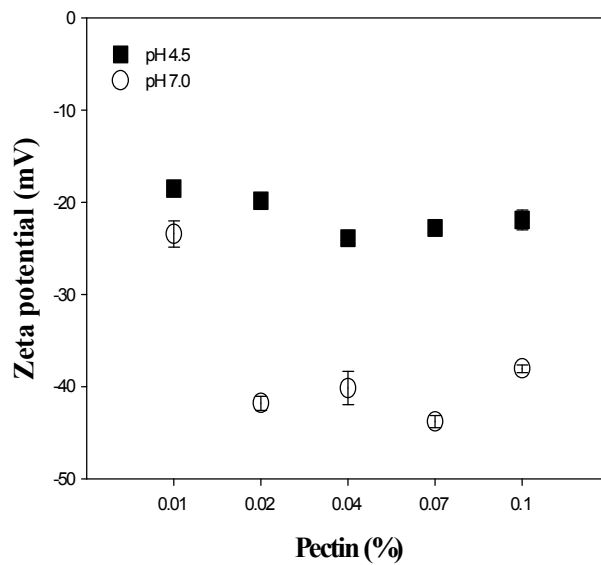


그림 39. 농도별 pectin 용액과 가열처리 한 β -lactoglobulin을 이용한 O/W/W 에멀전의 제타 전위 측정 (pectin : β -lactoglobulin = 1 : 9)

② Pectin과 β -lactoglobulin의 비율 (1 : 50)

Pectin과 β -lactoglobulin (1 : 50)을 이용하여 O/W/W 에멀전의 관찰 사진은 그림 40과 같다.

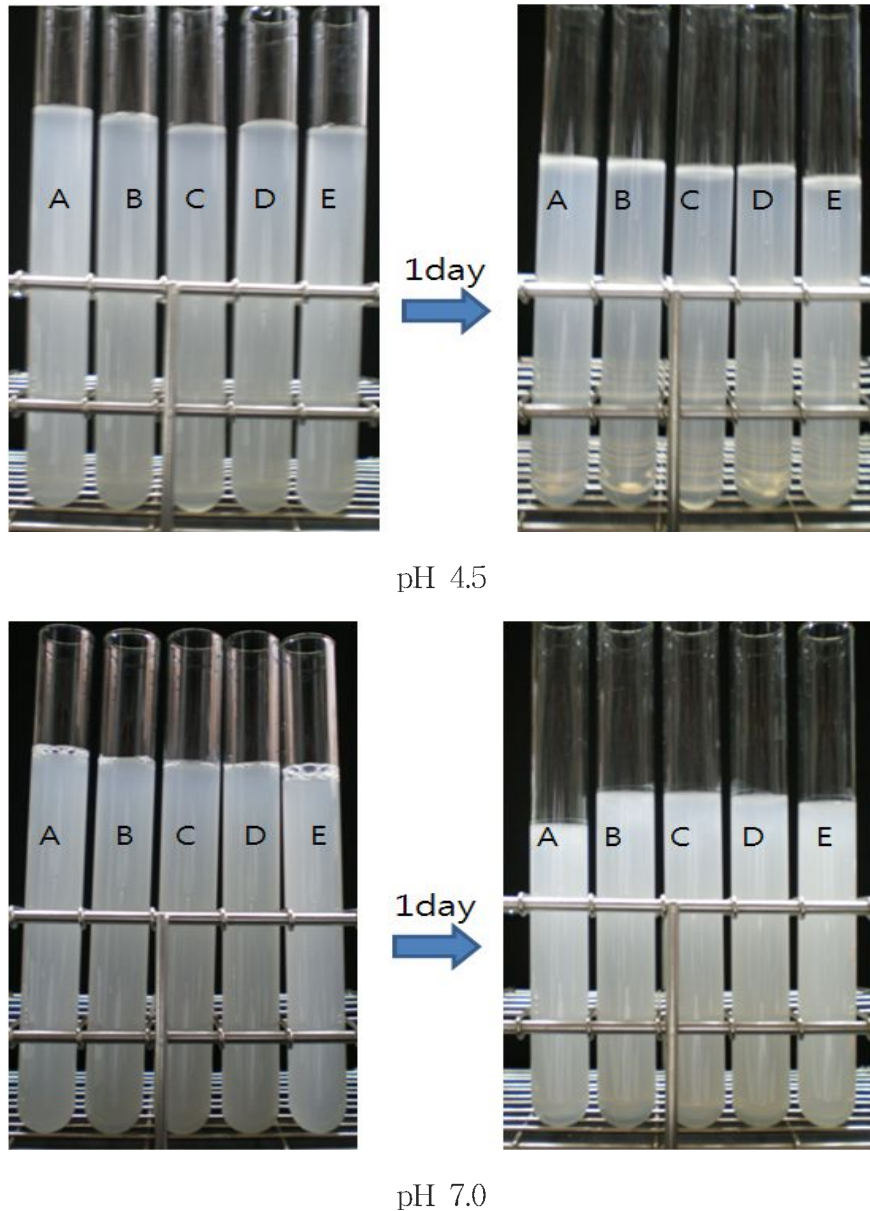


그림 40. Pectin 농도 및 pH에 따른 O/W/W 에멀전 (A: 0.01%, B: 0.02, C: 0.04%, D: 0.07%, E: 0.1%)의 관찰 사진 (O/W/W = 1 : 50)

Pectin과 β -lactoglobulin의 비율이 1 : 9 제조한 O/W/W 에멀전과 마찬가지로 1일 지난 후에도 에멀전이 파괴되지 않고 유지되는 것을 확인하였다.

가열처리 한 β -lactoglobulin을 O/W/W 에멀전으로 제조하여 입도 및 제타전위를 측정한다.

결과는 그림 41과 같았다. 입도 측정 결과 1 : 9의 비율로 제조한 에멀전보다 낮은 평균입도를 보였다. 제타전위의 경우에는 1 : 9의 비율로 제조한 에멀전과 비슷한 수치를 보였으며, pH가 높은 것이 더 안정한 것으로 나타났다.

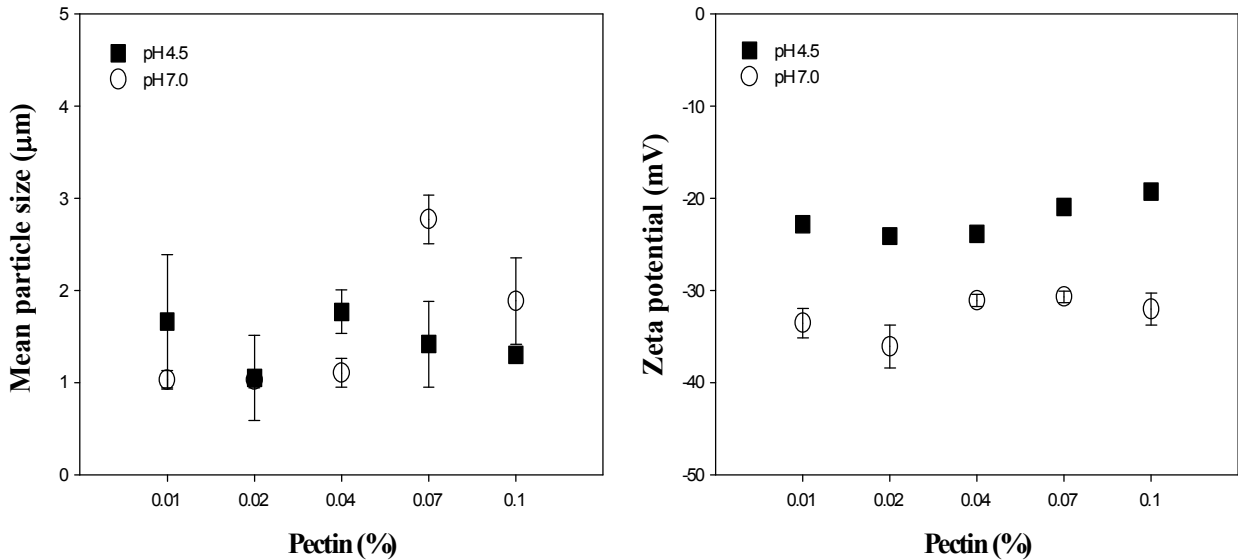


그림 41. 농도별 pectin 용액과 가열처리 한 β -lactoglobulin을 이용한 O/W/W 에멀전의 입도 및 제타 전위 측정(pectin : β -lactoglobulin = 1 : 50)

(나) Pectin과 gelatin 용액 제조

Pectin과 gelatin을 이용하여 제조한 에멀전의 입도 및 제타전위를 측정한 결과는 그림 42와 같다.

Gelatin은 동물의 뼈, 연골, 가죽 등 결합조직의 주요 단백질 성분인 콜라겐 (collagen)의 부분적인 가수분해에 의해 얻어지는 유도단백질로써 주로 식품의 단백질 겔화제 (gelling agent)로 사용되고 있다 (Clark and Ross-Murphy 1987). 식품가공에서 겔화제, 점증제 (thickening agent) 또는 안정제 (stabilising agent)로 사용될 수 있는 물질의 대부분은 다당류에 속하는 친수성 검물질 (hydrophilic gum substance)인데 반해서 gelatin은 tryptophan과 cysteine을 제외한 필수아미노산을 모두 함유하고 있어 영양적 가치가 높다 (Yoshimura *et al.*, 2000; Poppe 1997). 따라서 gelatin은 겔화제 이외에도 최근에는 건강식품으로까지 그 이용이 확대되고 있다. 또한 gelatin은 다른 단백질과 달리 넓은 범위의 농도에서 겔을 형성하여 부드러운 젤리 (jelly)에서부터 단단한 겔 과자류 (confectionary)에 이르는 다양한 제품을 만들 수 있는 특징을 가지고 있다.

입도의 경우 pectin 농도가 높아질수록 점차적으로 증가하는 추세를 나타내었으며, 제타 전위의 경우 pectin이 첨가될수록 음의 값으로 변화하였다. Pectin의 경우 β -Lg와 결합하여 에멀전의 안정성 증대에 기여한다고 알려져 있다.

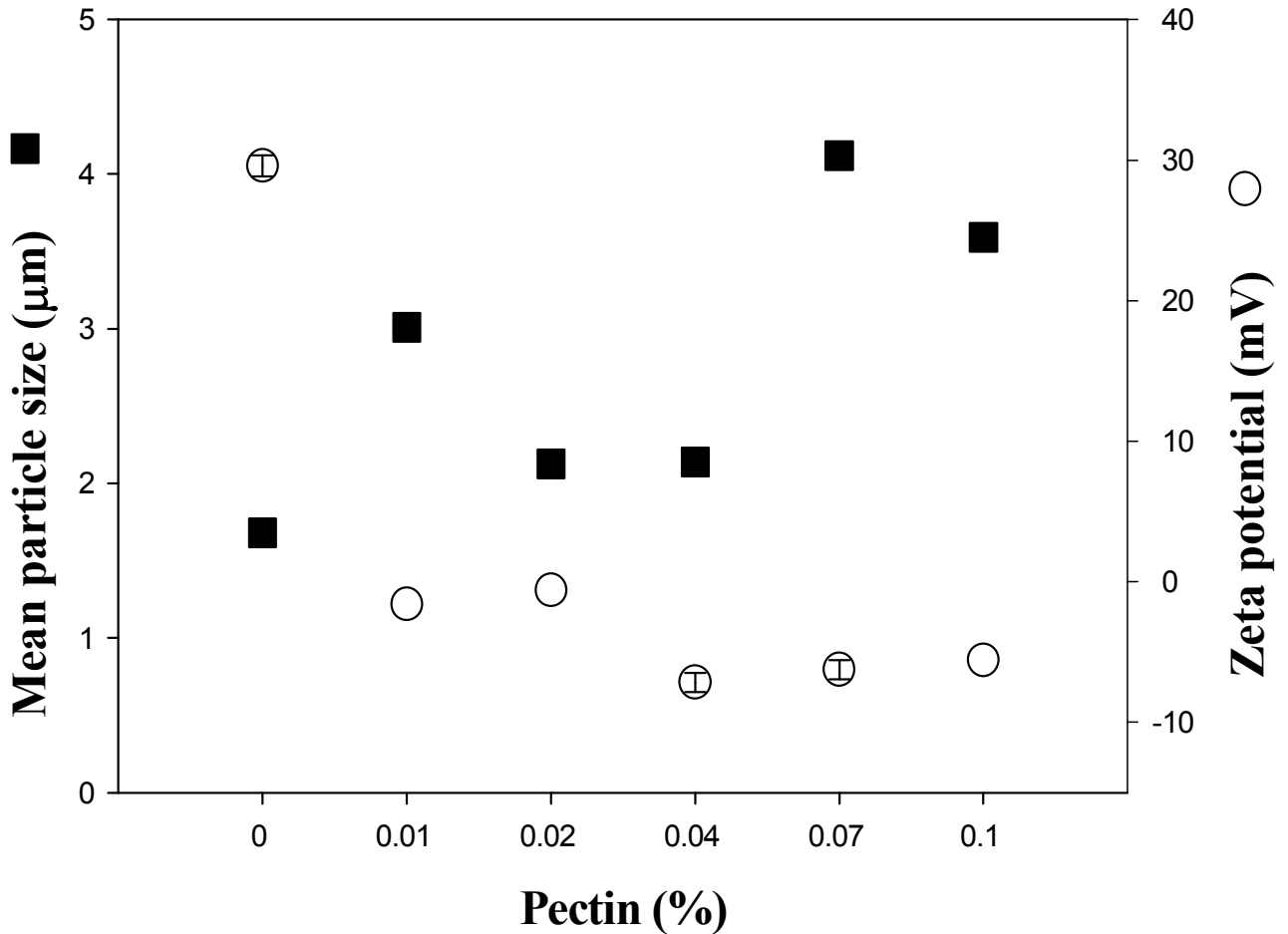


그림 42. 농도별 pectin 용액과 가열처리 한 gelatin을 이용한 O/W/W 에멀전의 입도 및 제타 전위 측정 (Pectin : β -lactoglobulin = 1 : 50)

(4) Homogenization에 의한 O/W emulsion 제조

(가) 실험적 변수에 따른 입도 측정에 의한 특성 평가

미세한 유탁액을 형성하기 위해서는, 강력한 기계적 에너지를 적용하여 붕괴 가능한 큰 방울 (droplet)들을 부수어야 한다. 식품 가공에 있어서는 전통적으로 고속 믹서기, 콜로이드 분쇄기 (mill), 또는 고압 밸브 균질기 (high pressure homogenizater)를 이용하여 이 작업을 행할 수 있다. 초고압균질기를 이용한 에멀전화 방법은 고압균질기를 이용함으로써 유화물이 높은 전단력을 받아 매우 작은 입도를 갖는 에멀전 액적 (emulsion droplet)으로 제조가 가능하다. 오일 입자가 미립화 되는 과정은 높은 압력에서 유화물이 얇고 좁은 공간을 형성하는 초고압 균질기 밸브를 통과할 때 생기는 압력변동, 캐비테이션 (cavitation), 충돌력 등으로 유화 입자를 작게 만드는 것이다. 초고압균질기를 이용한 에멀전화 방법은 다른 유화 공정들보다 더 작은 입자를 제조하는데 있어 생성효율이 우수하며, 나노에멀전을 산업적으로 대량 생산하기에 적합한 것으로 알려져 있다 (Lim *et al.*, 2010).

계면활성제는 한 분자 내에 친수성 부분과 친유성 부분이 동시에 존재하여 서로 다른 두 상간에 형성된 계면에 흡착하여 계면의 물성을 크게 변화시키거나 구조적인 특성으로 인하여 용액 내에서 특정 형태의 회합체를 형성한다. 형성되는 회합체의 모양과 크기는 계면활성제의 종류, 용도, 농도, 염의 존재유무, 온도, 수용액의 경우 pH 등에 따라 구형 미셀, 실린더형 미셀, 육각형 미셀, 박막 구조 또는 소포 등이 형성된다.

계면활성제의 주된 역할은 새로 형성된 미세 액적의 표면으로 흡착되어 이 방울 (droplet)들이 주변의 방울들과 합쳐져 더 커다란 방울로 변하는 것을 예방하는 것이다. 유화과정 동안의 일정한 에너지 손실 때문에 최종적인 droplet 크기의 분포 정도는 droplet 간의 충돌이 일어나는 평균시간에 비교하여 경계명이 계면활성제로 덮이는데 걸리는 시간에 의해 결정된다. 계면활성제가 너무 느리게 흡수되거나 너무 낮은 농도로 존재하는 경우는 유화과정의 강력한 에너지 손실 동안에 형성된 개개의 droplet 대부분이 최종 에멀전에 남아있지 않는다. 이것은 충돌하는 2개의 droplet 사이의 얇은 막이 파괴되거나 (coalescence) 두 droplet 사이의 흡착면을 공유 (bridging flocculation)하기 때문이다.

① 2% gelatin 용액 이용

본 연구에서 2% gelatin 용액을 aqueous phase로 사용하여 oil 종류 및 계면활성제를 달리하여 제조한 에멀전의 입도를 나타내는 결과는 그림 43과 같다.

계면활성제로서 Span 20을 사용할 경우 가장 작은 입도를 나타내었으며, Tween 80 과 Tween 20을 비교하였을 때에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 이는 aqueous phase의 계면활성

제만을 사용한 경우보다 oil phase 계면활성제를 추가적으로 사용함으로써 에멀전의 안정성이 증대된 것에 기인한다고 판단된다.

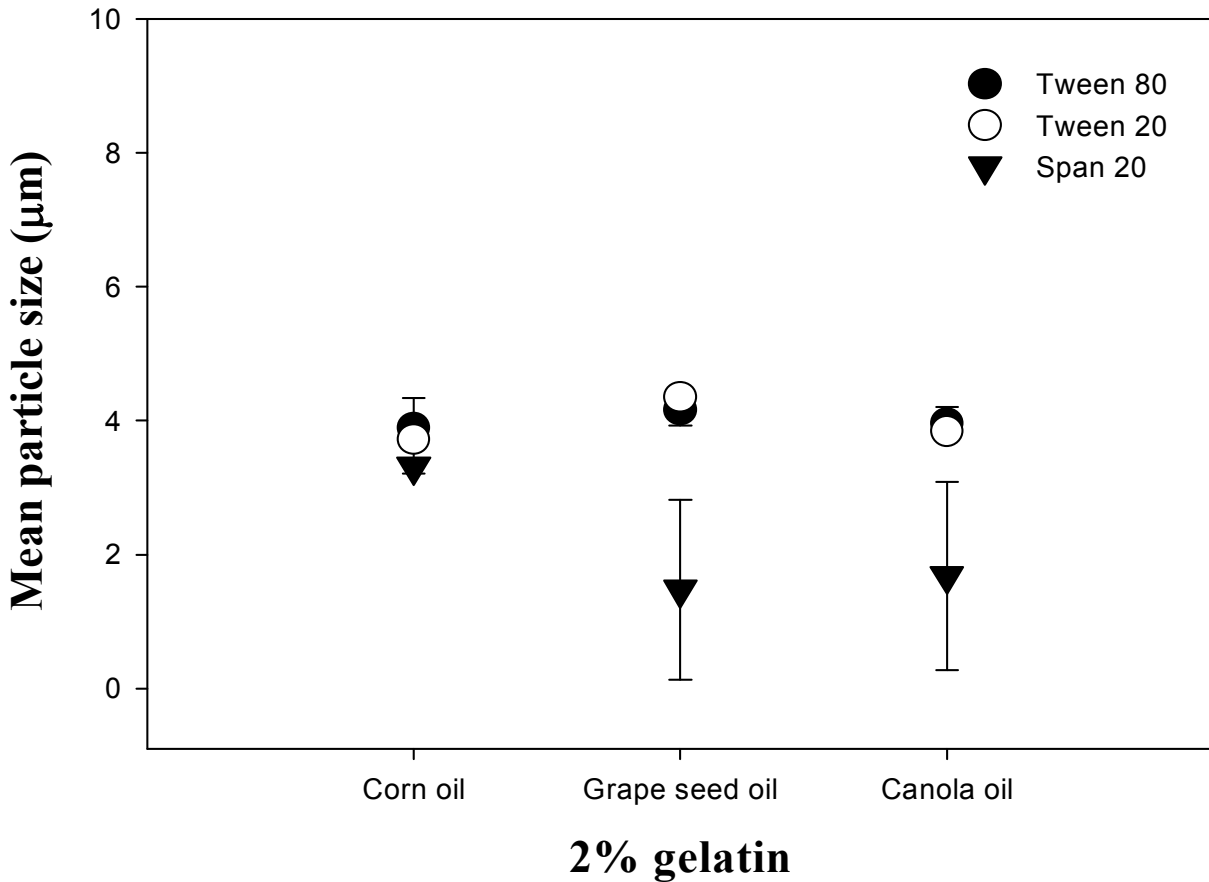


그림 43. Aqueous phase 계면활성제로 2% gelatin 용액에 Tween 80, Tween 20 및 Span 20 (oil phase 계면활성제)을 이용하고 oil의 종류를 달리하여 제조한 에멀전의 입도 측정

Gelatin은 비교적 낮은 온도와 농도에서도 점성을 부여하며, 냉각될 때 gelatin 용액은 선명하고 탄력성 있는 열가역적 겔 (thermoreversible gel)을 형성하기 시작한다 (Normand *et al.*, 2000). 이러한 과정을 겔화 (gelation)라고 한다. 그러나 대부분의 단백질은 냉각과정에서 겔화되는 gelatin과는 달리 온도가 증가됨에 따라 겔이 형성된다. Gelatin의 겔형성 과정을 살펴보면 가열 용액내에서 불규칙한 coil 형태로 용해되어 있는 gelatin은 냉각됨에 따라서 3중 나선 (triple helix)구조로 되돌아 가려는 3개의 polypeptide 사슬로부터 형성된 작은 영역들이 가교결합 (cross-linking)을 통해 접합지역 (junction zone or cross-linking site)을 형성하게 되고, 최종적으로 3차원의 network을 형성하게 된다 (Ledward 2000; Gilsenan and

Ross-Murphy 2000). 이들 접합지역은 gelatin 사슬 (chain)간의 수소결합에 의해 안정화되지만 gelatin 겔을 용해시키는 온도 (35-40°C)에서는 쉽게 분열된다. gelatine은 일반적으로 gelatin의 겔화는 온도, pH, 회분함량, 제조방법 및 농도 등에 따라 크게 영향을 받는 것으로 알려졌다 (Wu *et al.*, 2000).

② 2% pluronic-F68 용액 이용

Aqueous phase의 계면활성제로 2% pluronic-F68을 사용하고 oil 종류 및 계면활성제를 달리하여 제조한 에멀전의 입도를 측정된 결과는 그림 44와 같다.

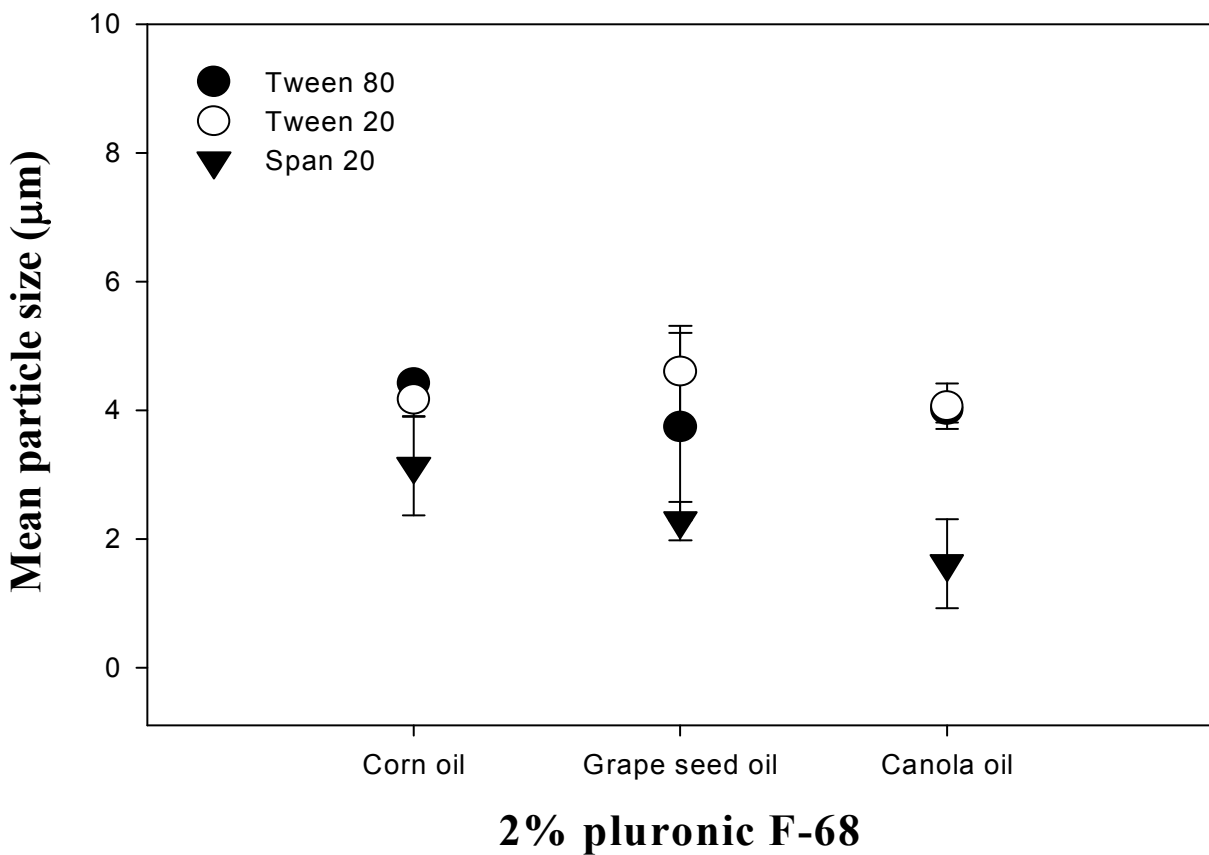


그림 44. Aqueous phase 계면활성제로 2% gelatin 용액에 Tween 80, Tween 20 및 Span 20 (oil phase 계면활성제)을 이용하고 oil의 종류를 달리하여 제조한 에멀전의 입도 측정

계면활성제로서 pluronic F-68을 사용하였을 때에는 organic phase로서 카놀라유를 사용할 경우 Span 20에서 가장 낮은 입도를 나타내었다. 이러한 결과 역시 위에서 언급한 바와 같이 aqueous phase의 계면활성제만을 사용한 경우보다 oil phase 계면활성제를 추가적으로 사

용함으로써 에멀전의 안정성이 증대된 것에 기인한다고 판단된다. Pluronic F-68의 경우 Tween 80과 함께 사용할 경우 PVA만을 사용한 경우에 비해서 입도 안정성이 증대되는 것을 보고한 바 있다 (Cohen-Sela *et al.*, 2009).

③ Oil 종류 및 비율을 달리한 에멀전

Oil의 종류 및 비율을 달리하여 제조한 에멀전의 입도를 측정된 결과는 그림 45와 같다. Oil의 종류와 O : W 비율에 따른 결과에서는 옥수수유를 사용하여 10 : 5 : 1일 경우 가장 낮은 입도를 나타내었다.

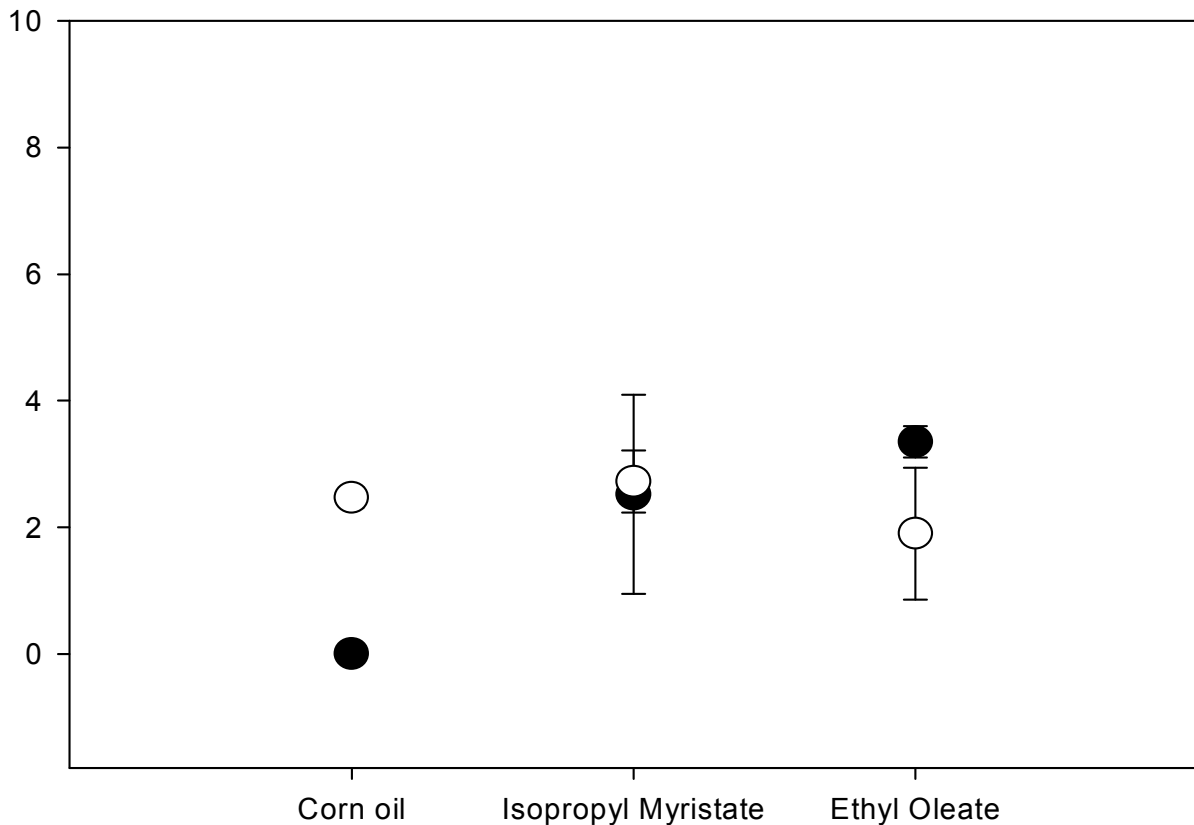


그림 45. Oil 종류 및 비율을 달리하여 제조한 에멀전의 입도 측정 (●; aqueous phase : surfactant : oil = 10 : 5 : 1, ○; aqueous phase : surfactant : oil = 10 : 1 : 0.3)

일반적으로 isopropyl myristate는 isopropyl alcohol과 myristic acid 간의 ester 결합에 의해서 생성된 물질로서, 피부로의 흡수 효과가 좋아서 cosmetic, topical medicinal preparation에 많이 사용되고 있다. 이소프로필 미리스테이트 (Isopropyl Myristate)는 미리스틴산과 이소

프로필알코올을 농황산 등의 촉매로 에스테르화 시킨 후 강압증류하여 얻는다. I.P.M의 명칭으로 널리 알려졌고, 향장품용 유성원료 중에서 고급지방산의 저급알코올에스테르로 대표적이다. 미리스틴산과 이소프로필알코올을 농황산 등의 촉매로 에스테르화 시킨 후 강압증류하여 얻는다. I.P.M의 명칭으로 널리 알려졌고, 향장품용 유성원료 중에서 고급지방산의 저급알코올에스테르로 대표적이다. 2급 알코올의 에스테르이기 때문에 융점이 낮고, 가수분해에 대해서 비교적 안정하다. 피부에 대해서 침투성이 좋으며 부드러운 감촉을 부여한다. 식품 중에는 첨가물의 형태로 사용할 수 있다 (식품첨가물공전 순번 I098).

④ PGMS 이용

Oil 상의 계면활성제로서 PGMS를 사용하여 제조한 에멀전의 입도를 측정한 결과는 그림 46과 같다. 계면활성제로서 PGMS를 사용할 경우 그 농도를 10% 범위에서 사용할 경우 매우 낮은 입도를 나타내었다.

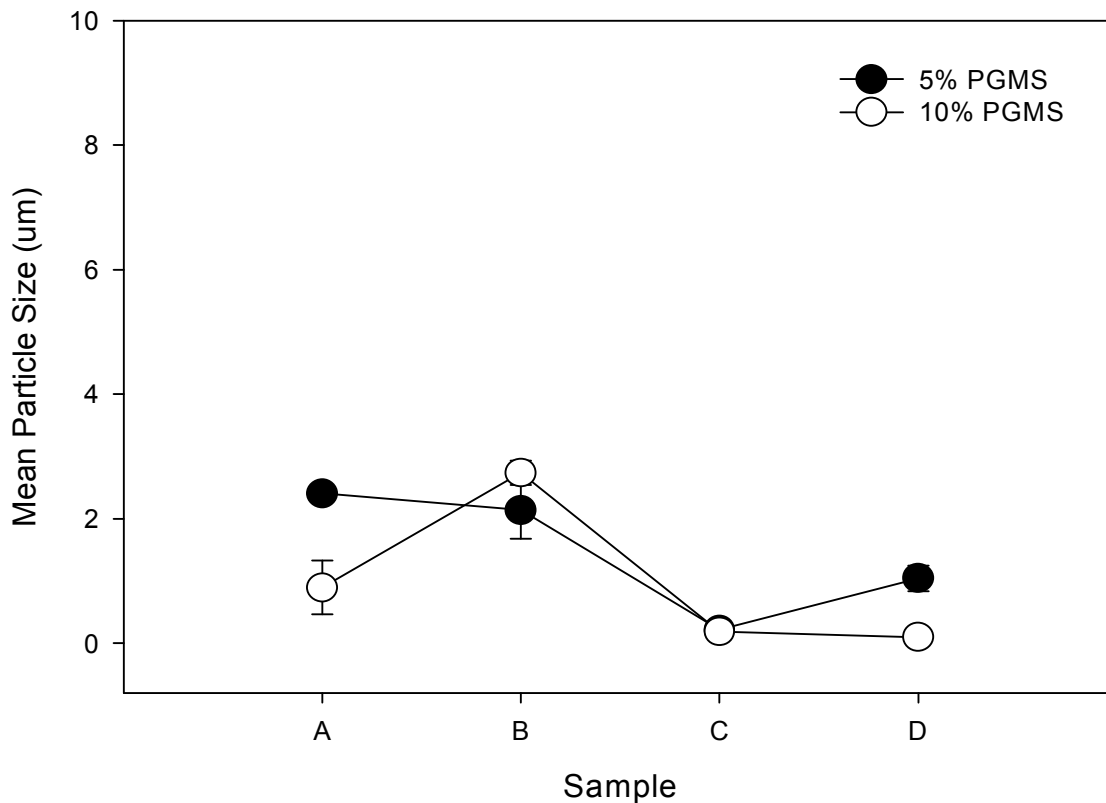


그림 46. Oil phase의 계면활성제로 PGMS를 사용하여 제조한 에멀전의 입도 측정
단, aqueous phase : aqueous surfactant (lecithin + Tween 80) : Oil 간의 비율의 경우 10 : 5
: 0.5 (A), 10 : 5 : 1 (B), 10 : 5 : 1.5 (C) 및 10 : 5 : 2 (D)로 하였음

PGMS는 Propylene glycol monostearate의 약자로 식품첨가제로 식품 중에 계면활성제로 쓰이며 실온에서 고체상태이다. 약간의 물에 소량 녹지만 완전히 녹이기 위해서는 오일과 지방을 사용한다. 유화제와 유화 안정제로 오일 또는 지방과 함께 사용하며 식품 중에서는 식품첨가물로 마가린 오일이나 케이크 쇼트닝, 아이싱, 이스트 등에 사용한다 (Processing fruits : science and technology. Diane M. Barratt).

에멀전 기술은 액상의 미립자를 수층에 분산시키는 기술로서, 화장품에서는 효능/효과를 제공하는 활성물질의 경피 흡수를 촉진하기 위한 방법으로 연구되고 있다. 대부분의 경우 lecithin/hydrogenated lecithin을 계면활성제로 사용하며 기본적인 제조 방법은 대상의 오일 함량을 제외하고는 거의 동일하다 (Kim and Park, 2002).

(나) 물성 측정

① 계면활성제 (PGMS 및 PGPR)의 비율에 따른 동적 점탄 특성

계면활성제로서 PGMS와 PGPR을 이용하고 그 함량을 변화시켜 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄특성을 측정한 결과는 그림 47, 48과 같다.

G' 값은 고체 성질이나 탄성 측정의 지표가 되며, 변형에 따른 에너지 측정을 나타내고, 반면에 G'' 값은 액체성질이나 점성 측정의 지표가 되며, 변형에 대한 손실 에너지를 의미한다 (Choi and Yoo, 2007). ω (frequency) 값이 증가할수록 G'과 G''이 증가하고 있어 각 주파수에 의존적인 것을 확인할 수 있었다. 그리고 일정 frequency 이상의 값에서는 G'이 G''에 비해서 훨씬 높은 값을 나타내어 에멀전의 점성적 성질을 나타낸다고 할 수 있다.

PGPR은 Polyglycerol Polyricinoleate의 약자로 water-in-oil 에멀전화에 가장 강력한 황색의 점성이 있는 유화제이다. 식물성 오일의 30 파트에 PGPR의 4 부분을 추가하는 것은 물의 70 파트가 오일에 확산되는 것을 가능하게 한다. 이 기능 덕분에 PGPR은 식품산업에서 초콜렛이나 캔디바 등에 유용하게 쓰이고 있다 (Wilson *et al.*, 1998).

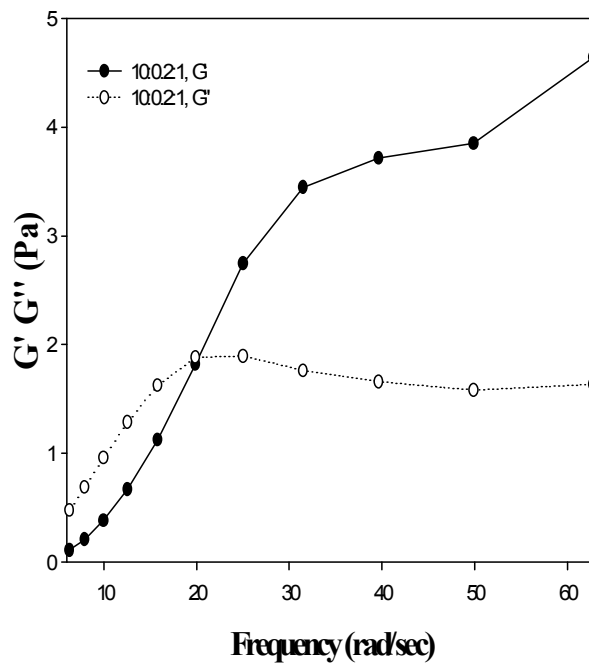
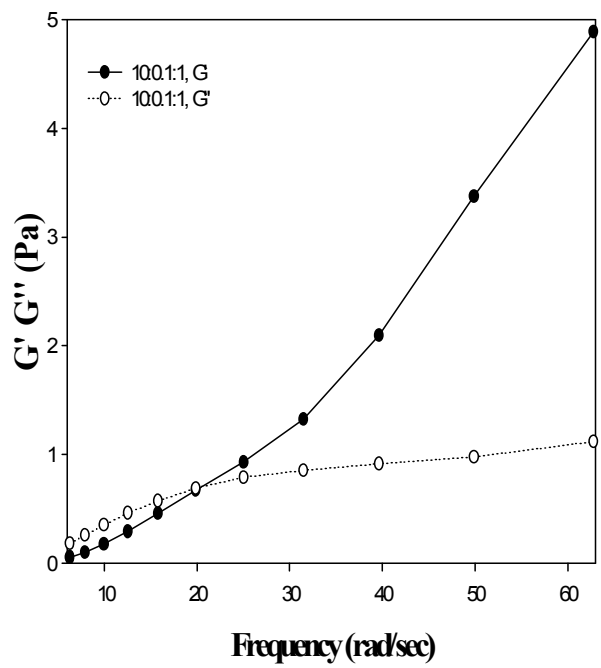
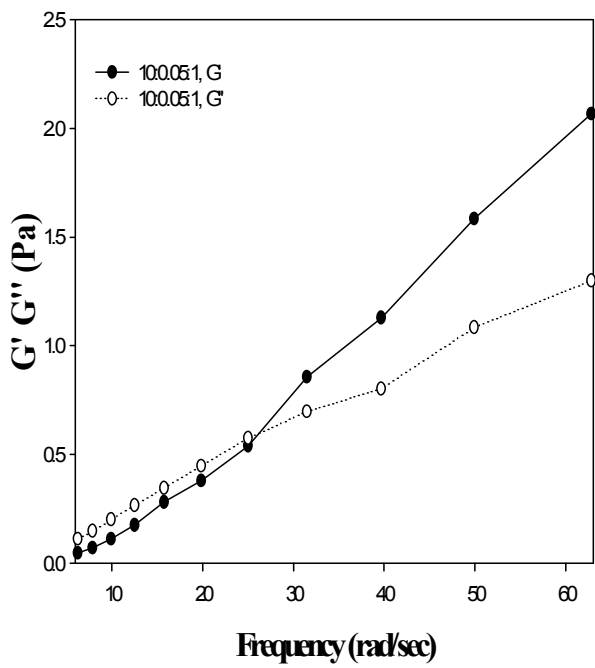


그림 47. 계면활성제로 PGMS의 비율을 달리하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄 특성

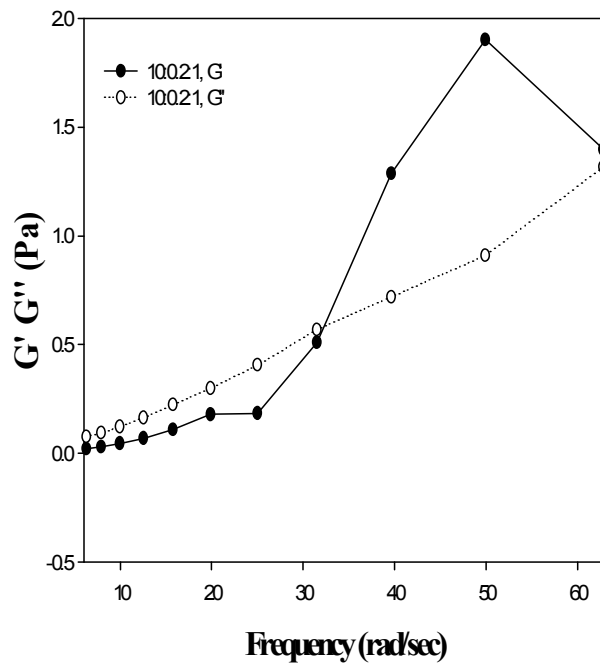
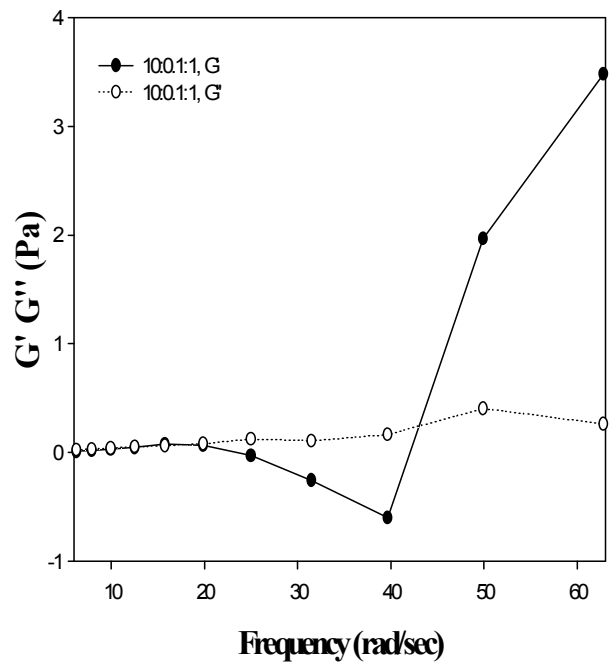
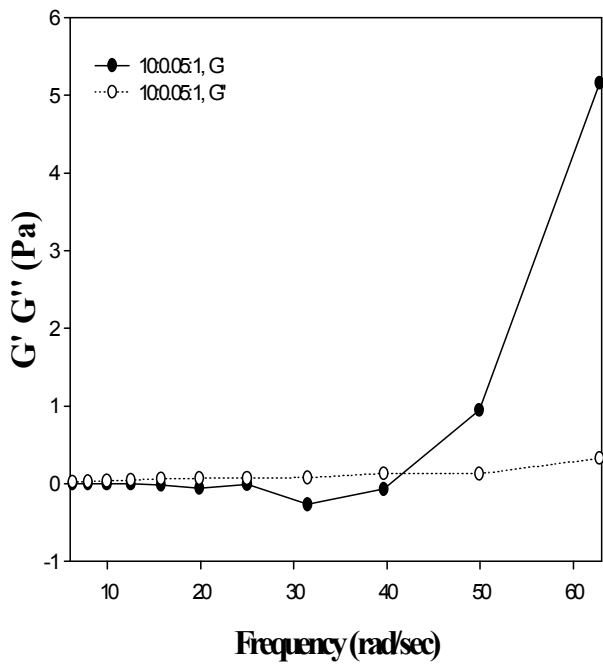


그림 48. 계면활성제로 PGPR의 비율을 달리하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄 특성

② Oil의 비율에 따른 동적 점탄 특성

Oil의 함량을 변화시켜 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄특성을 측정된 결과는 그림 49, 50과 같다.

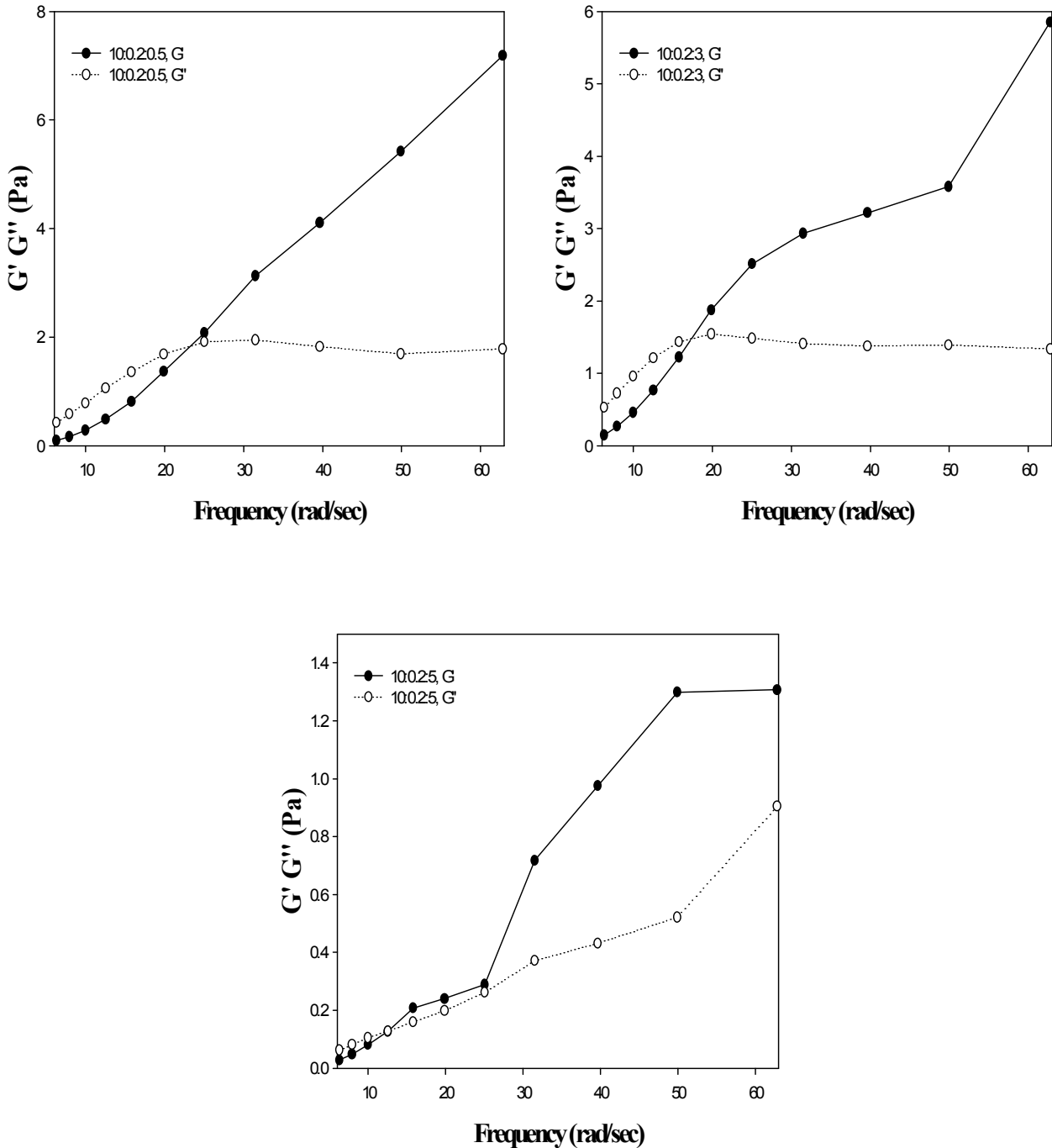


그림 49. Oil의 비율을 달리하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄 특성 (계면활성제로 PGMS를 사용함)

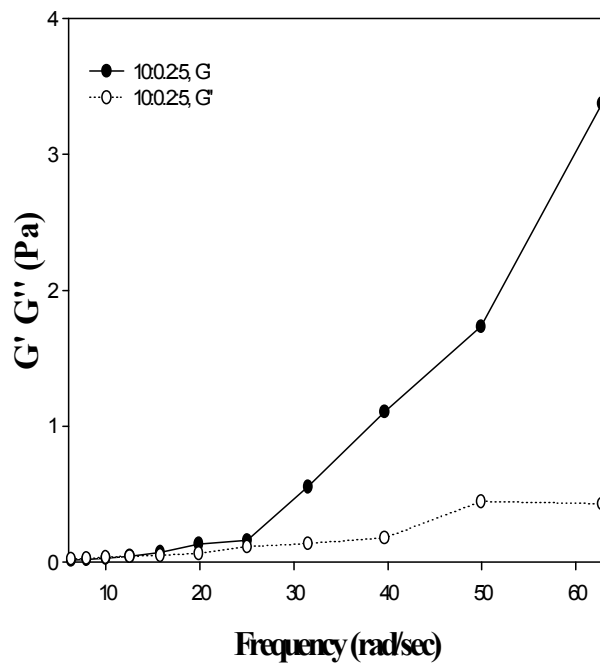
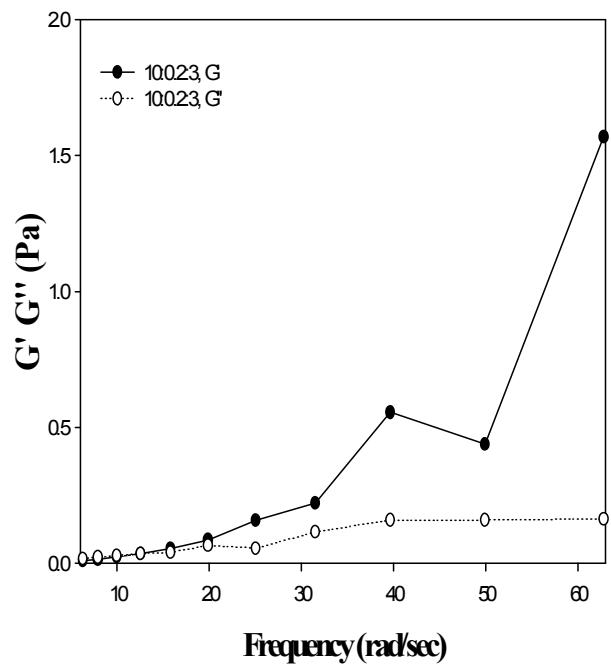
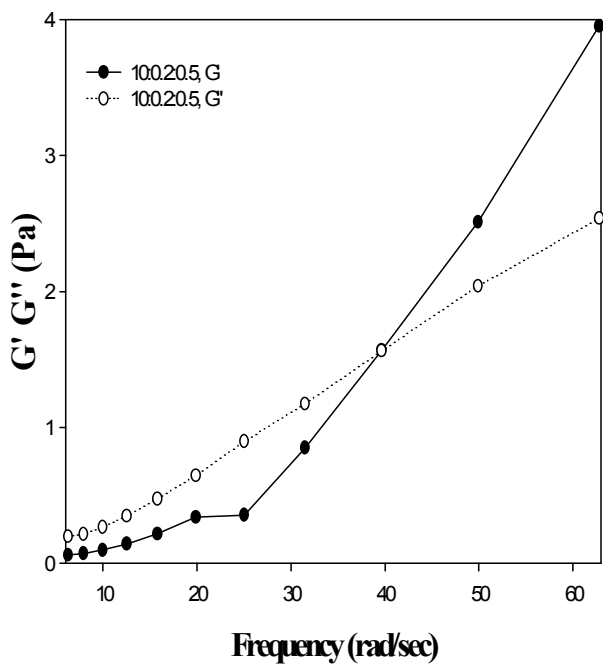


그림 50. Oil의 비율을 달리하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄 특성 (계면활성제로 PGPR를 사용함)

(5) 초고압균질기에 의한 O/W emulsion 제조

(가) 실험적 변수에 따른 입도 측정에 의한 특성 평가

① 계면활성제로 Tween 80과 lecithin 이용

Tween 80과 lecithin을 이용하여 제조한 에멀전을 초고압 균질기로 300 bar의 압력 조건에 의해 얻은 시료와 그 평균입도를 비교한 결과는 그림 51과 같이 나타내었다. 초고압균질기를 사용할 경우 평균입도가 감소되었으며, 계면활성제 함량이 증가될수록, oil 함량이 감소할수록 작은 입도를 나타내었다.

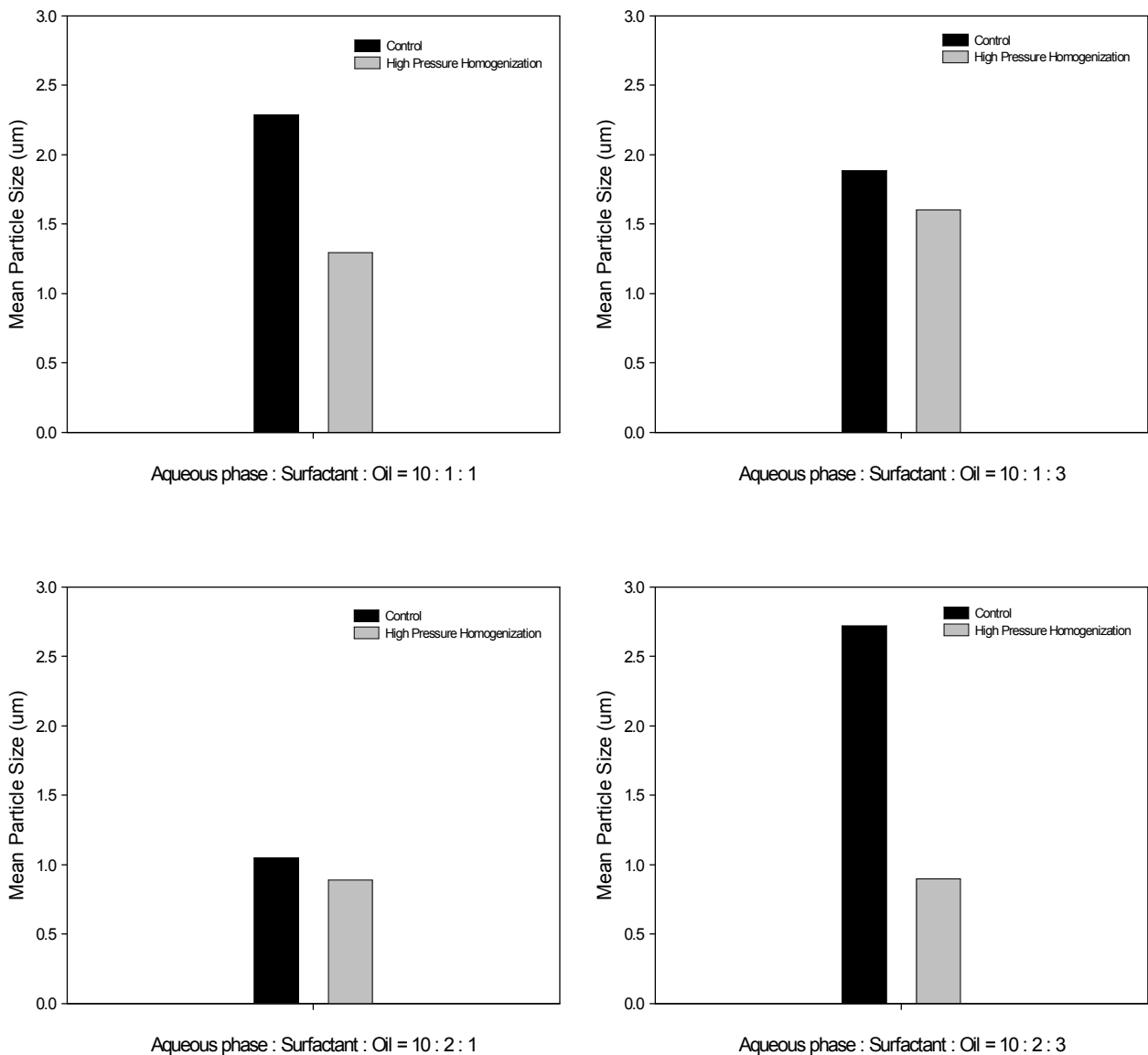


그림 51. 초고압 균질기에 의한 O/W 에멀전의 제조

② Oil의 비율을 달리한 에멀전의 제조

Oil 함량을 달리하여 제조한 에멀전의 입도를 나타낸 결과는 그림 52와 같다. PGMS의 경우 oil 함량에 따라서 크게 영향을 받지 않았으나, PGPR의 경우 oil 함량이 증가할수록 평균 입도가 안정되는 것을 확인할 수 있었다.

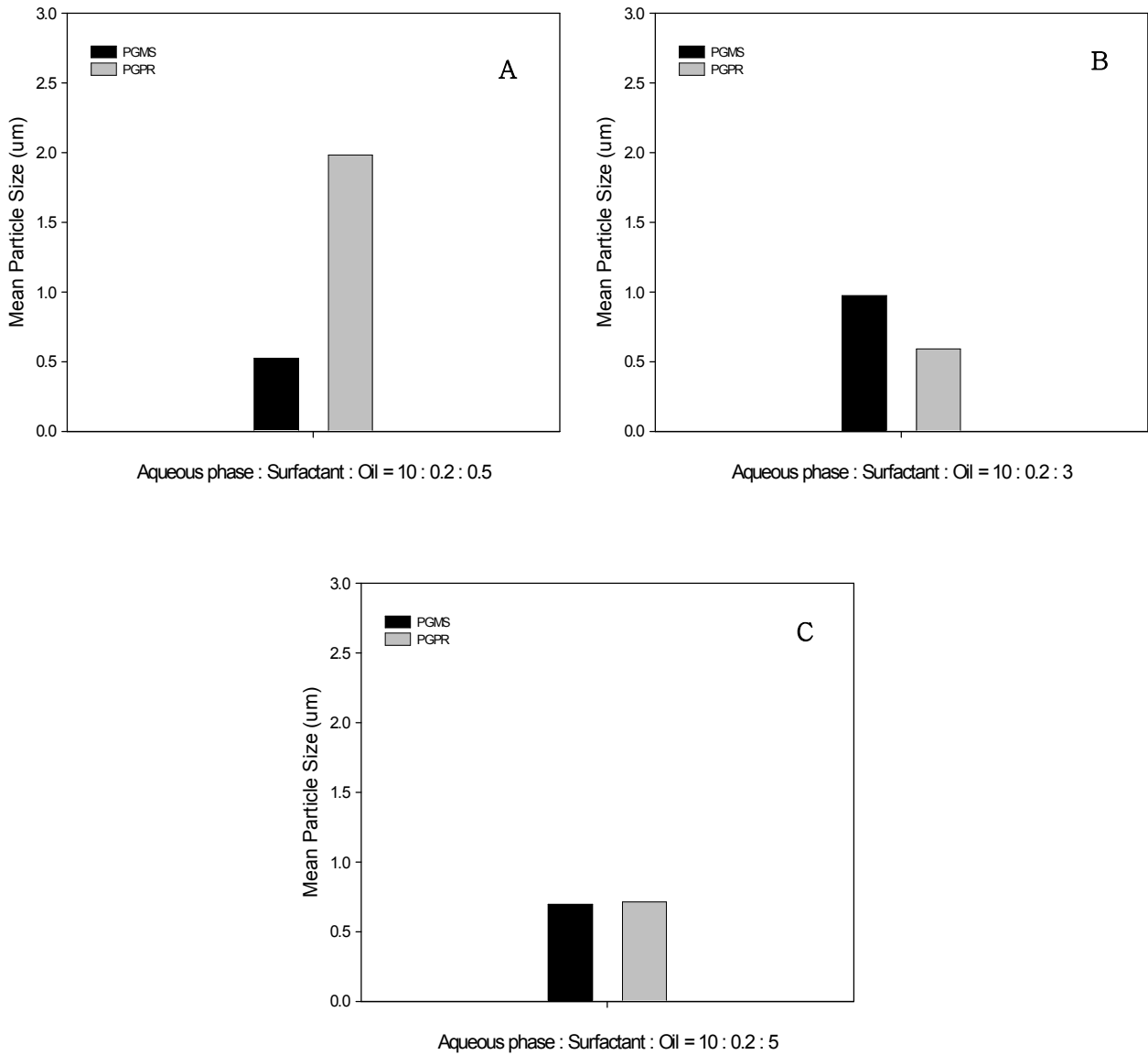


그림 52. 계면활성제의 종류 (PGMS 및 PGPR) 및 oil 함량을 달리하여 초고압 균질기를 사용한 후에 따른 O/W 에멀전의 평균입도 변화

(나) 물성 측정

① 계면활성제 (PGMS 및 PGPR)의 비율에 따른 동적 점탄 특성

PGMS 및 PGPR을 사용하고 초고압 균질기 (300 bar)를 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄 특성을 나타낸 결과는 그림 53, 54와 같다.

일반적으로 homogenization에 의해서 제조된 O/W 에멀전에 비해서 초고압 균질기를 사용한 경우 대체적으로 더 넓은 frequency 구간에서 점성적 특성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 동적 특성을 비롯한 에멀전의 물리적 특성을 평가하기 위하여 보완연구를 수행 중에 있다.

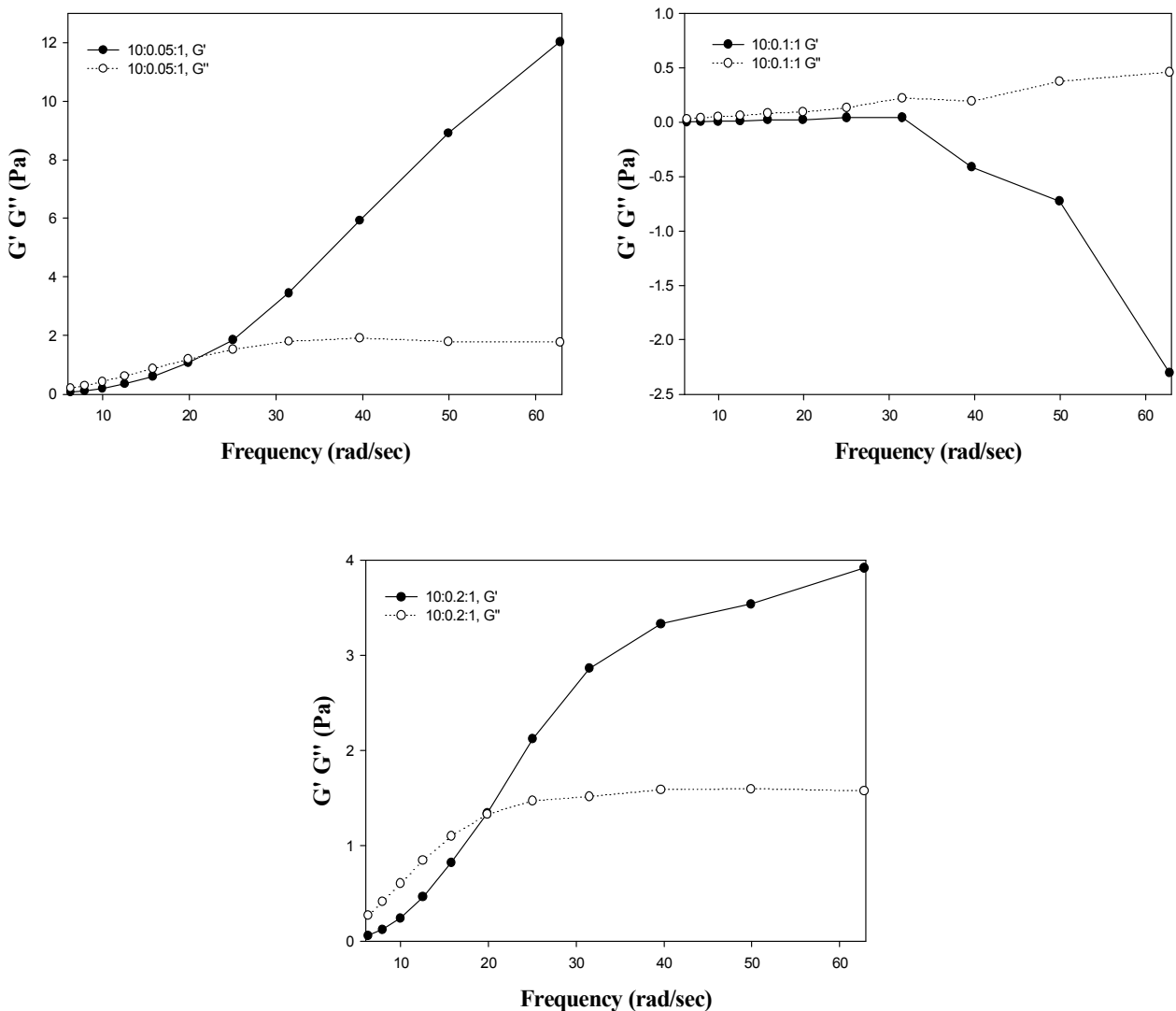


그림 53. 초고압 균질기 (300bar)를 이용하고 계면활성제로 PGMS의 비율을 달리하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄 특성

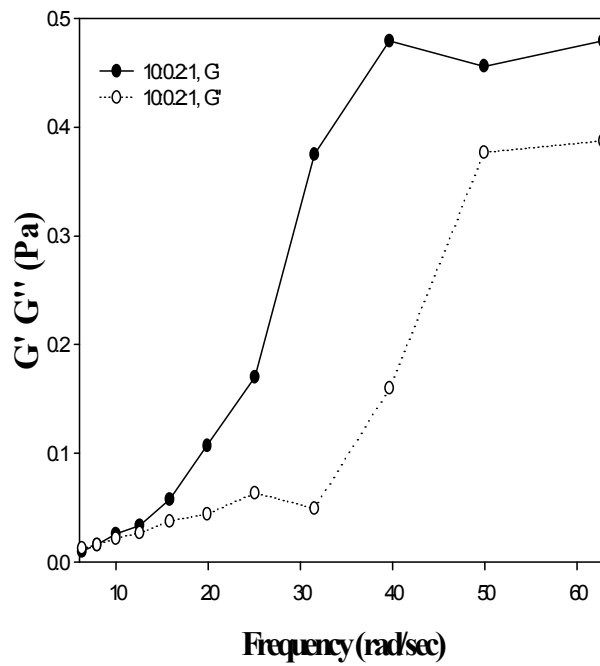
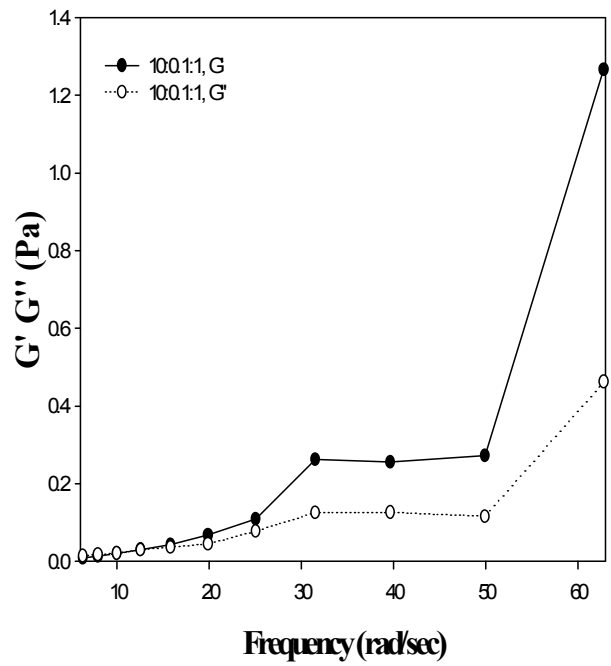
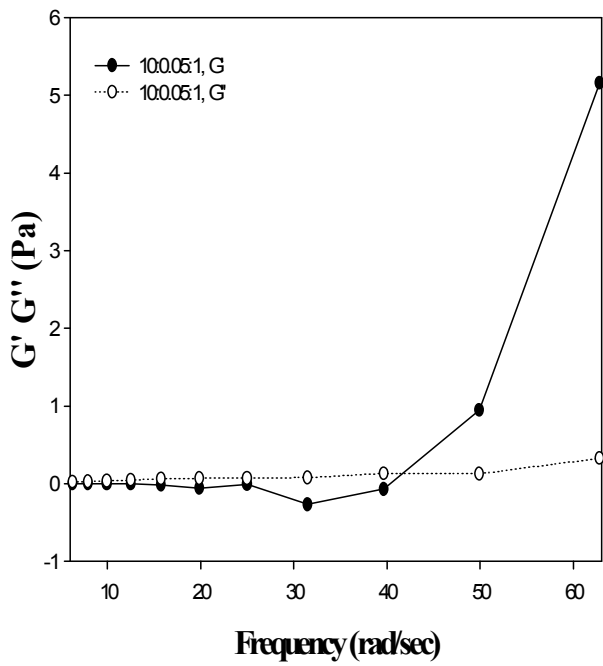


그림 54. 초고압 균질기 (300bar)를 이용하고 계면활성제로 PGPR의 비율을 달리하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄 특성

② Oil의 비율에 따른 동적 점탄 특성

Oil의 함량을 달리하고 초고압 균질기 (300 bar)를 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄특성을 측정된 결과는 그림 55, 56과 같다. 초고압 균질기를 사용하지 않은 시료와 마찬가지로 oil 함량에 따라서 그래프의 형태는 약간 달랐으나, 위에서 언급한 바와 마찬가지로 ω (frequency) 값이 증가할수록 G' 과 G'' 이 증가하고 있어 각 주파수에 의존적인 것을 확인할 수 있었다.

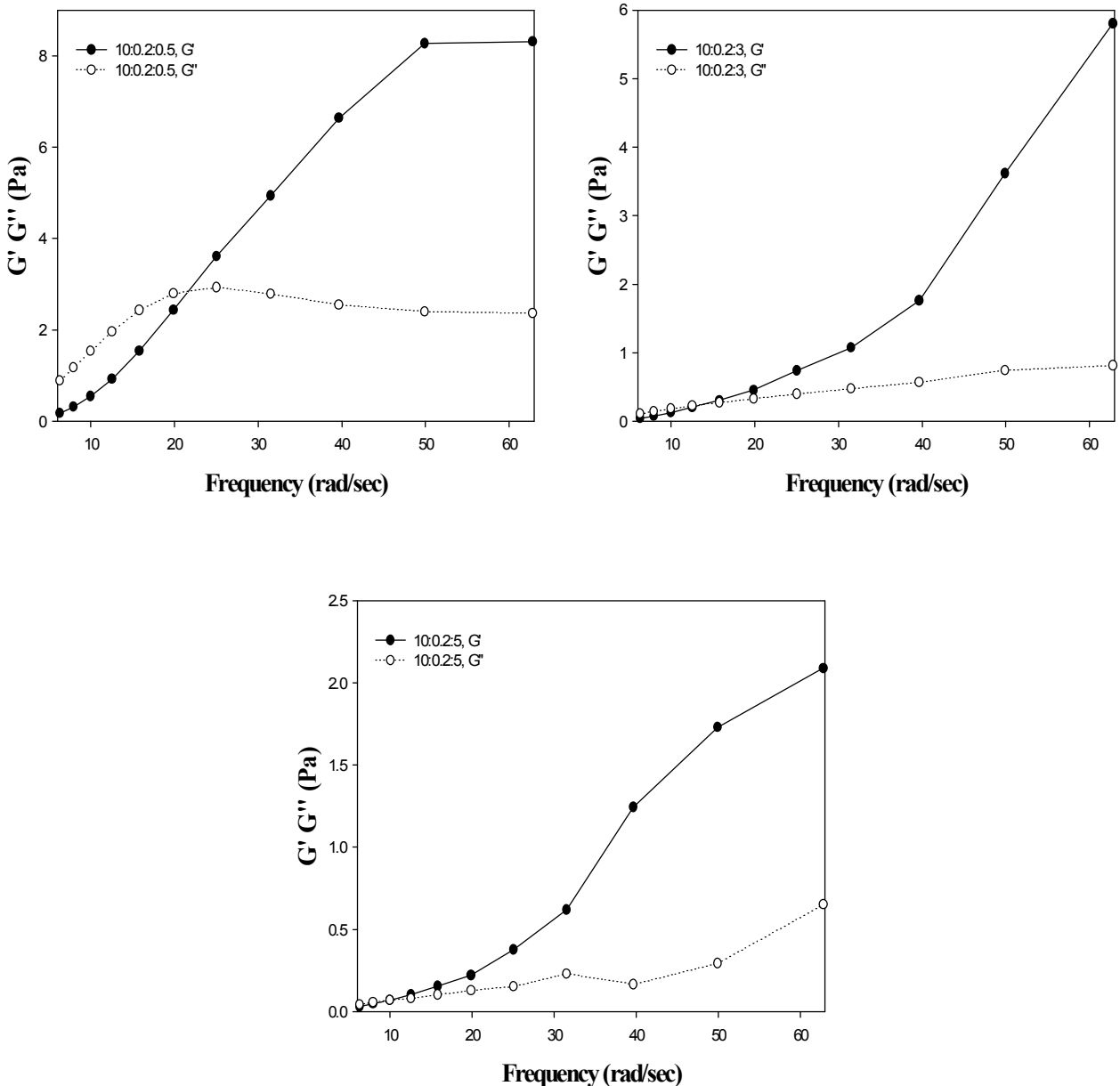


그림 55. 초고압 균질기 (300bar)를 이용하고 oil의 비율을 달리하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄 특성 (계면활성제로 PGMS를 사용함)

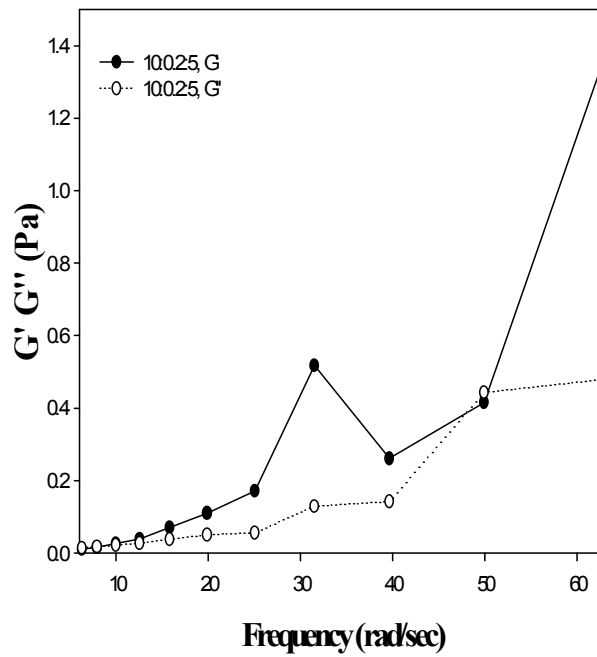
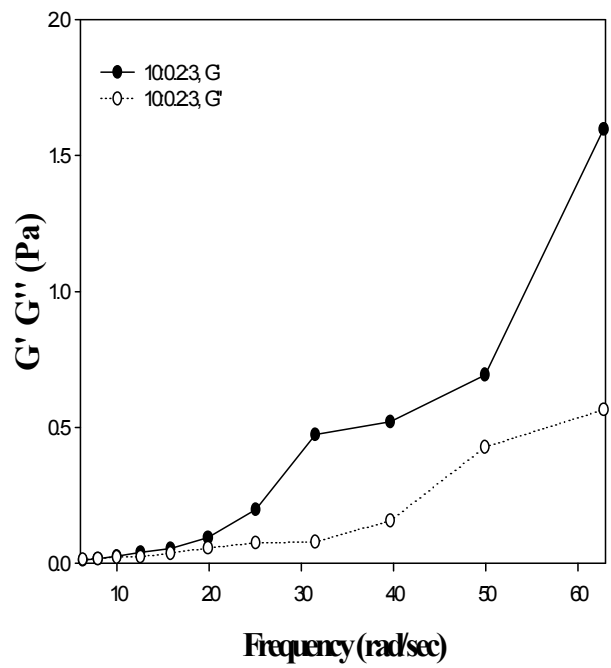
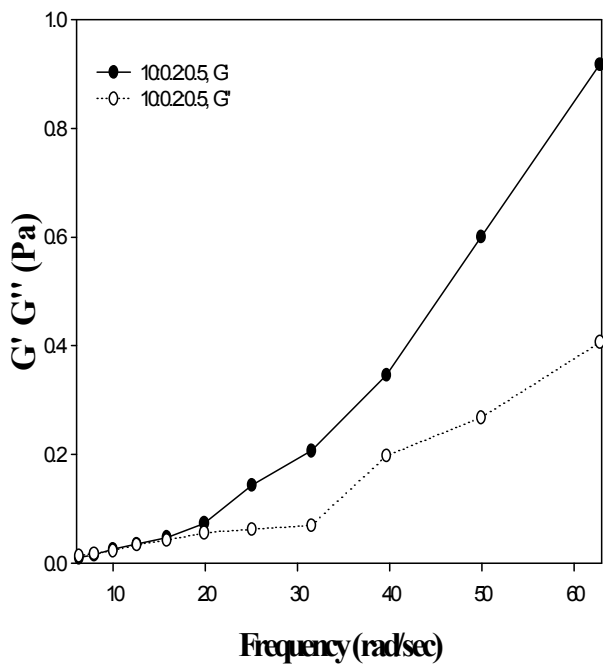


그림 56. 초고압 균질기 (300bar)를 이용하고 oil의 비율을 달리하여 제조한 O/W 에멀전의 동적 점탄 특성 (계면활성제로 PGPR을 사용함)

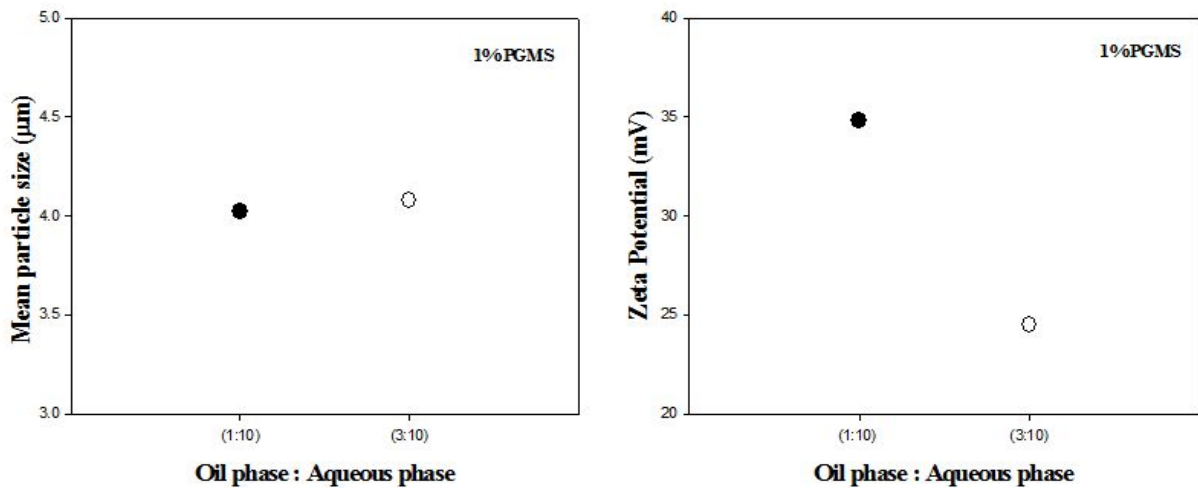
(6) Chitosan과 alginate를 이용한 에멀전 제조

(가) Chitosan을 이용한 O/W 에멀전 제조

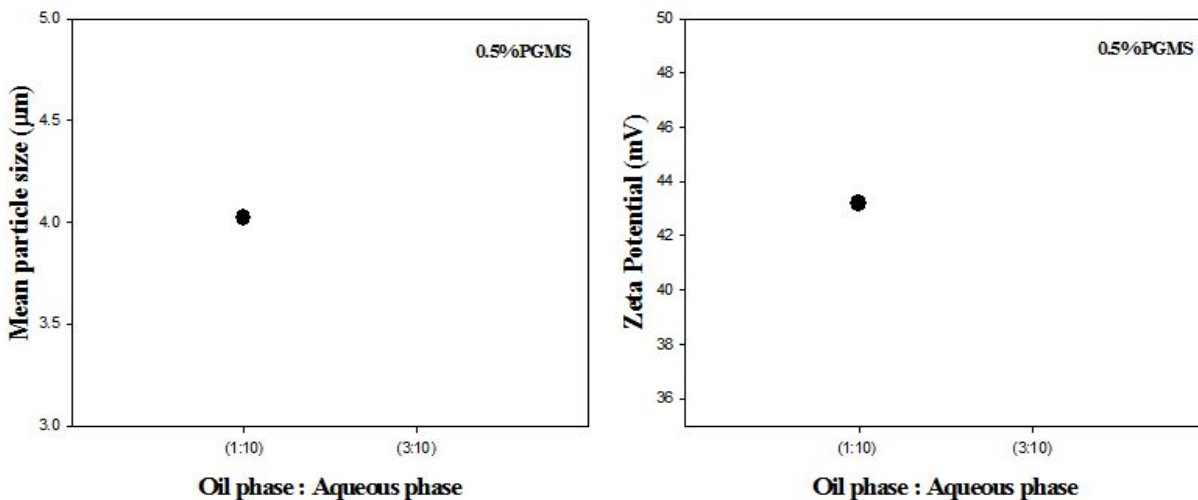
Chitosan의 pH와 농도를 달리하여 O/W 에멀전을 제조한 후 계면활성제의 농도와 O : W 비율 등에 따라서 입도 및 제타전위를 측정된 결과이다.

① pH 2.0 chitosan을 이용한 O/W 에멀전

pH 2.0 chitosan의 농도를 달리하여 제조한 O/W 에멀전은 그림 57과 같았으며, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 58과 같다.



0.1% Chitosan



0.5% Chitosan

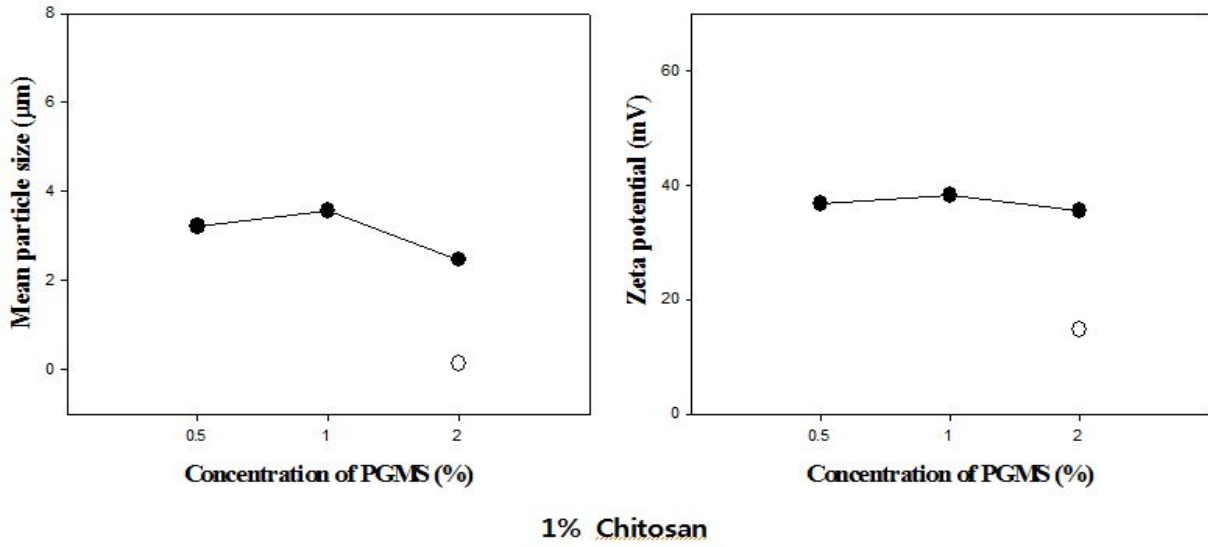


그림 57. Chitosan (pH 2.0)의 농도와 PGMS의 비율 (●: 1:10, ○: 3:10)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

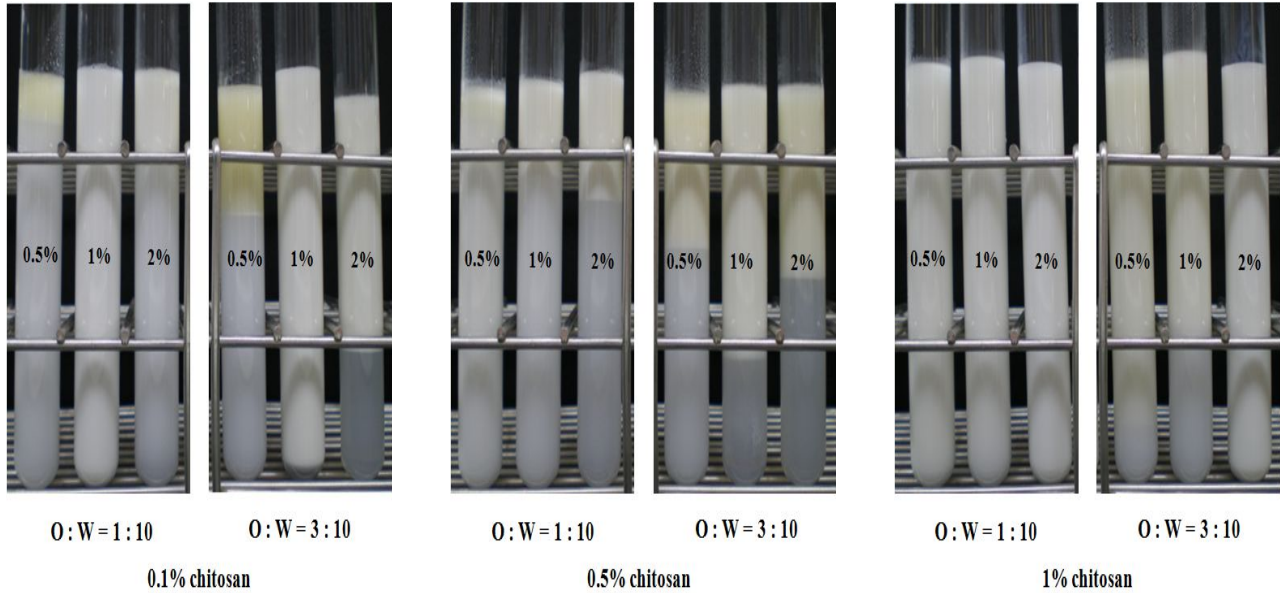


그림 58. PGMS와 chitosan의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W 에멀전 (pH 2.0)의 표면 관찰 사진

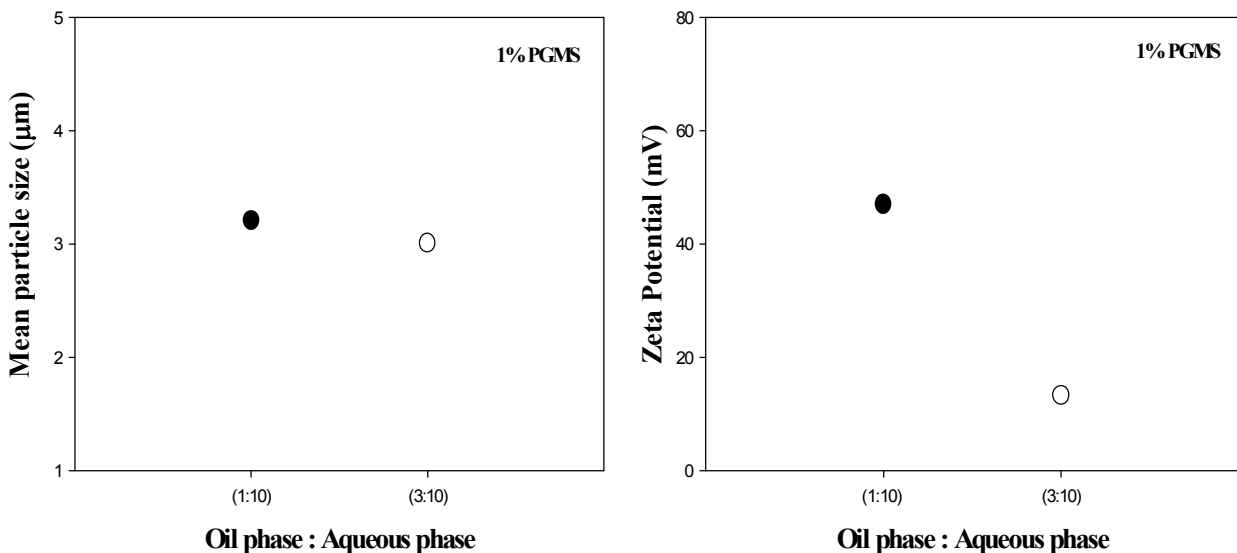
0.1% chitosan의 경우 1% PGMS를 사용하였을 때 O : W의 비율과는 상관없이 비슷한 입도를 보였으나 반면 제타전위의 경우에는 1 : 10의 비율이 3 : 10의 비율보다 높은 제타전위 값을 나타내었다. 그러나 0.5%와 2% PGMS를 이용한 O/W 에멀전의 경우 바로 상분리가 일어나는 것으로 나타났다.

0.5% chitosan의 경우에는 0.5% PGMS를 이용하였을 때 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 평균입도는 4.02 μm 로 나타났으며, 제타전위는 43.19 mV로 나타났다. 반면 1%와 2% PGMS의 경우 바로 상분리가 일어나는 것으로 나타났다.

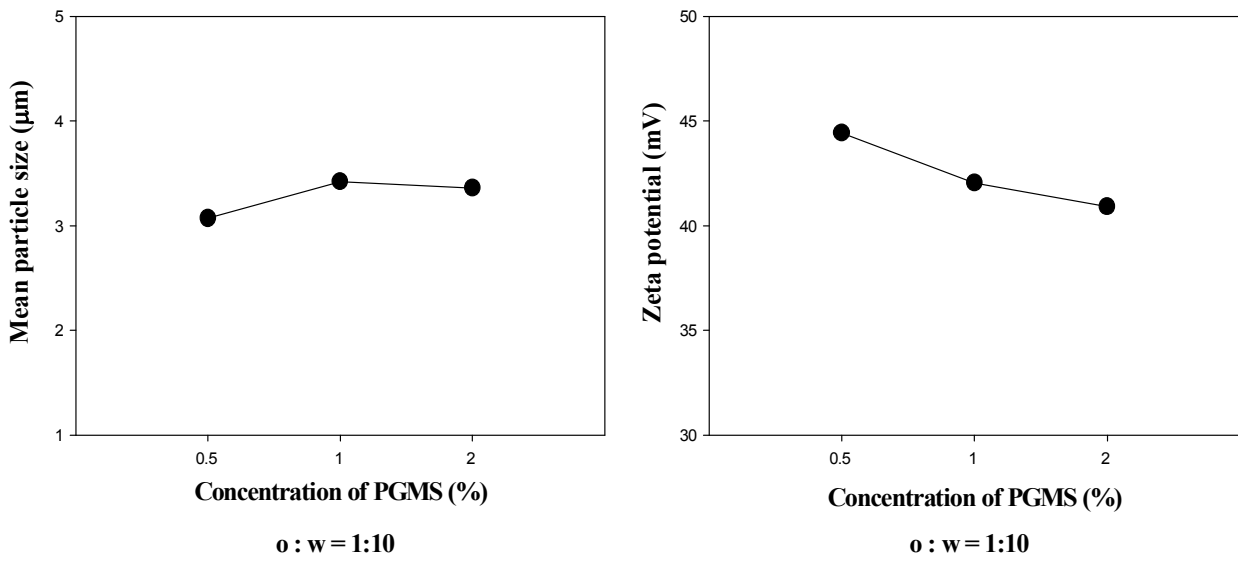
1% chitosan을 이용한 O/W 에멀전은 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 2-4 μm 의 평균 입도를 보였으며, 제타전위는 비슷한 값을 보였다. 반면 3 : 10의 O/W 에멀전의 경우에는 2% PGMS를 이용한 경우 0.137 μm 로 나타났고, 제타전위는 14.77 mV로 측정되었다. 1 : 10의 O/W 에멀전과 비교하였을 때 입도와 제타전위 값이 낮게 측정되었다. 그러나 0.5%와 1% PGMS를 이용한 O/W 에멀전의 경우 바로 상분리가 일어났다.

② pH 3.0 chitosan을 이용한 O/W 에멀전

pH 3.0 chitosan의 농도를 달리하여 제조한 O/W 에멀전은 그림 59와 같고, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 60에 나타내었다.



0.5% 키토산



1% 키토산

그림 59. Chitosan (pH 3.0)의 농도와 PGMS의 비율 (●: 1:10, ○: 3:10)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

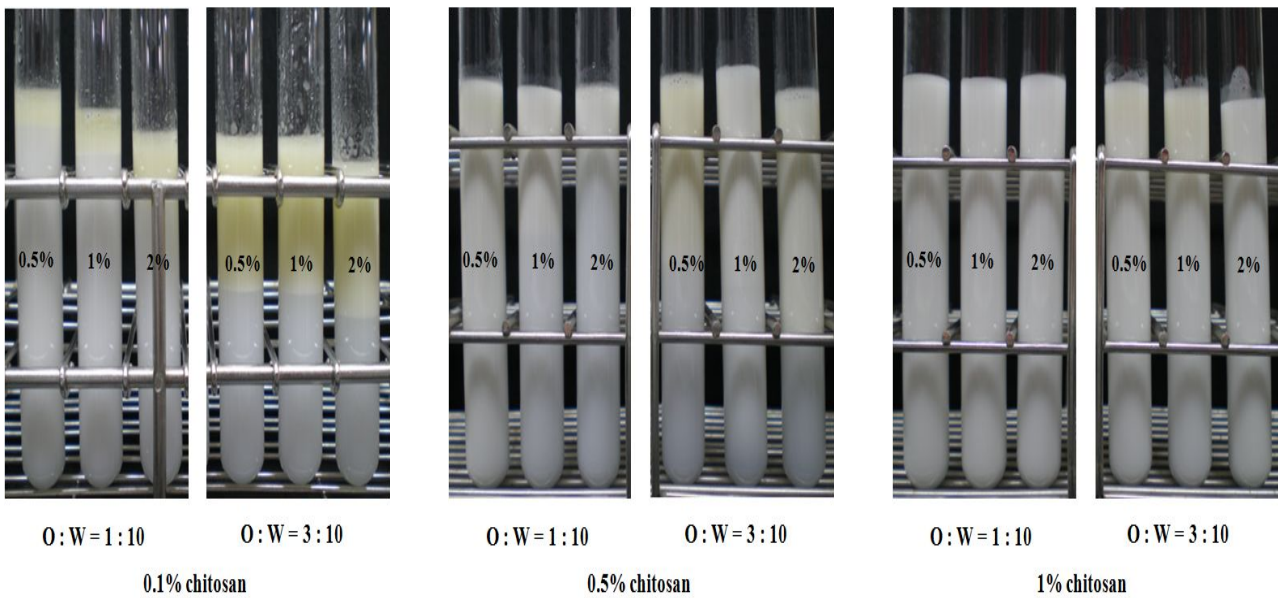


그림 60. PGMS와 chitosan의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W 에멀전 (pH 3.0)의 표면 관찰 사진

0.1% chitosan의 O/W 에멀전 경우에는 바로 상분리가 일어나는 것으로 나타났다.

0.5% chitosan의 경우 1% PGMS를 이용한 O/W 에멀전은 3 μm 정도의 입도를 보였으며, 제타전위 값은 O : W의 비율이 1 : 10인 경우가 3 : 10보다 더 높게 측정되었다. 반면 0.5%와 2%의 PGMS를 이용한 경우에는 상분리가 바로 일어나는 것으로 나타났다.

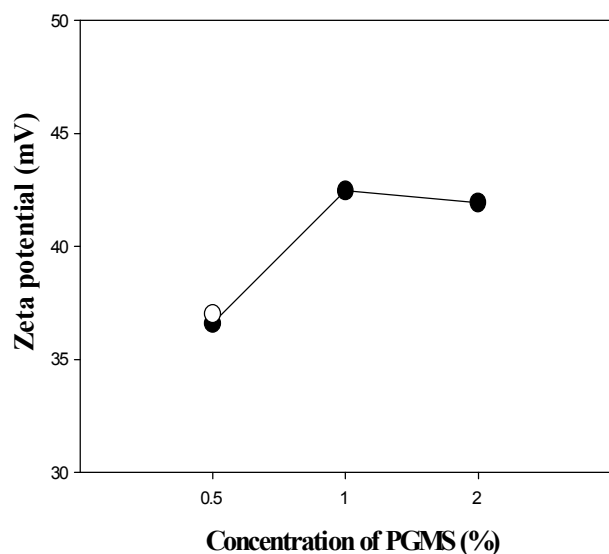
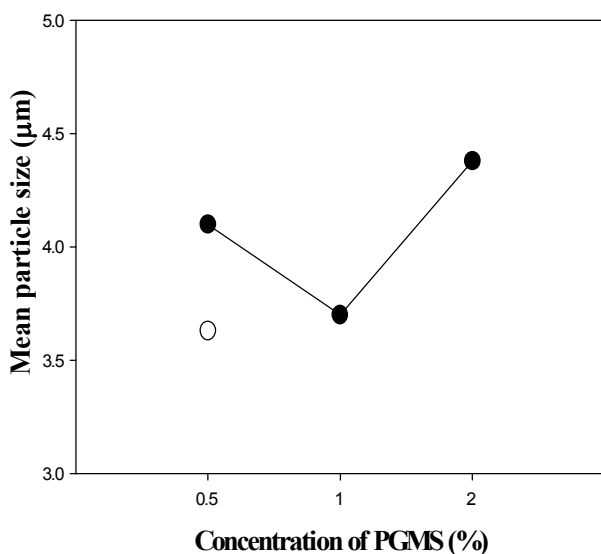
1% chitosan은 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 입도는 3 μm 정도로 나타났으며, 제타전위는 PGMS의 농도가 높아질수록 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타났다. O : W의 비율이 3 : 10인 경우에는 바로 상분리가 일어났다.

③ pH 4.0 chitosan을 이용한 O/W 에멀전

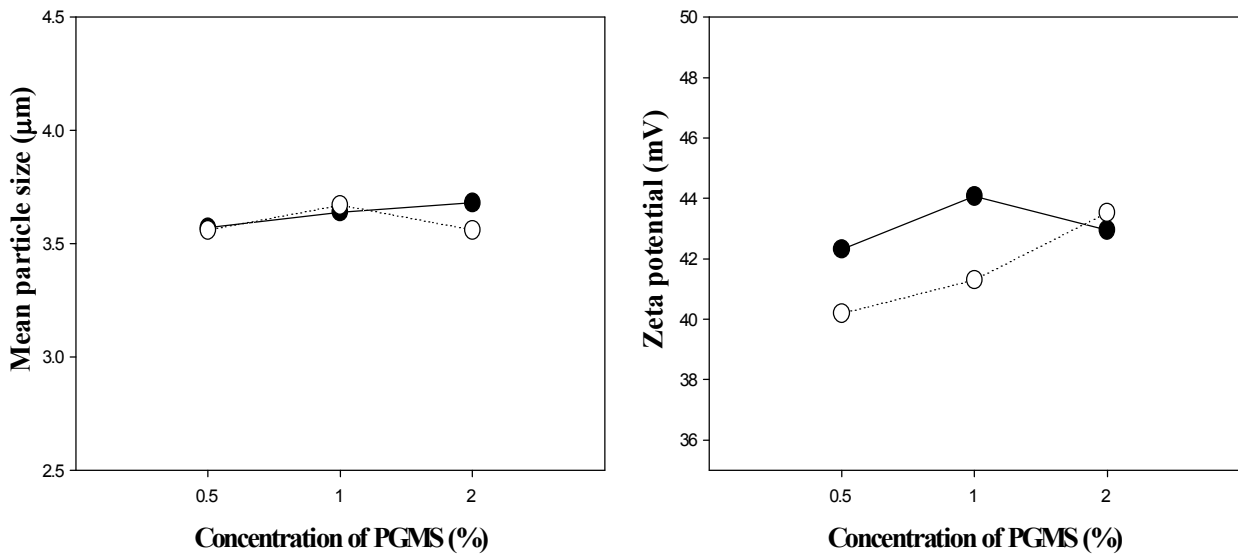
pH 4.0 chitosan의 농도를 달리하여 제조한 O/W 에멀전은 그림 61과 같았으며, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 62에 나타내었다.

0.1% chitosan의 O/W 에멀전 경우 상분리가 바로 일어나는 것으로 나타났다.

0.5% chitosan은 O : W의 비율이 1 : 10인 경우 1% PGMS를 이용한 O/W 에멀전이 가장 낮은 입도를 보였으며, 제타전위는 가장 높게 나타났다. O : W의 비율이 3 : 10인 경우 0.5% PGMS를 이용한 O/W 에멀전은 3.63 μm 의 입도를 보였으며, 37.01 mV의 제타전위 값을 나타내었다. 1 : 10인 경우에는 상분리가 일어나지 않았지만 3 : 10인 경우에는 1%와 2% PGMS를 이용한 O/W 에멀전은 바로 상분리가 일어났다.



0.5% 키토산



1% 키토산

그림 61. Chitosan (pH 4.0)의 농도와 PGMS의 비율 (●: 1:10, ○: 3:10)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

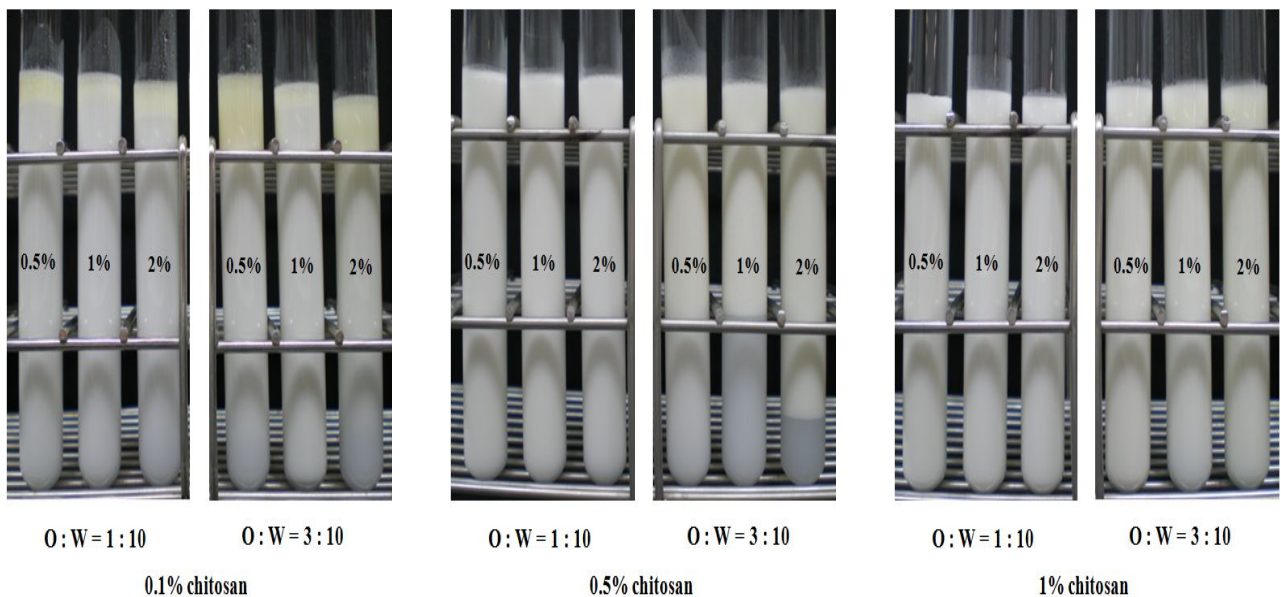


그림 62. PGMS와 chitosan의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W 에멀전 (pH 4.0)의 표면 관찰 사진

1% chitosan의 경우에는 O : W의 비율에 상관없이 비슷한 입도를 보였으나, 제타전위의 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값 또한 다소 증가하는 것으로 나타났다. 1% chitosan을 이용한 O/W 에멀전은 상분리가 일어나지 않았다.

(나) Chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전 제조

Chitosan의 pH와 농도와 alginate의 농도를 달리하여 O/W/W 에멀전을 제조한 후 계면활성제의 농도와 O : W 비율 등에 따라서 입도 및 제타전위를 측정된 결과이다.

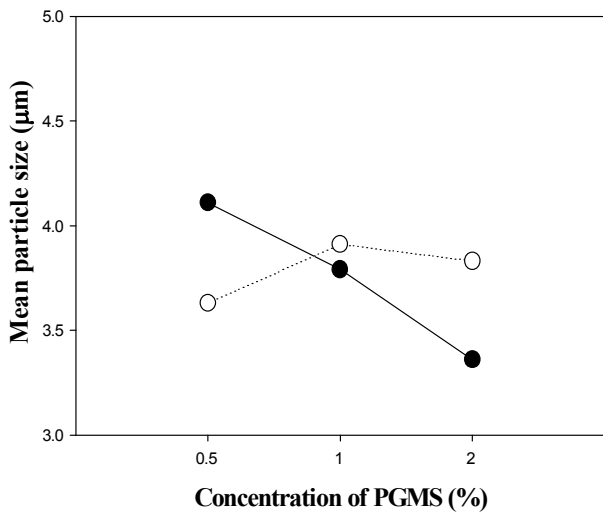
① pH 2.0 chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

㉠ 0.1% chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

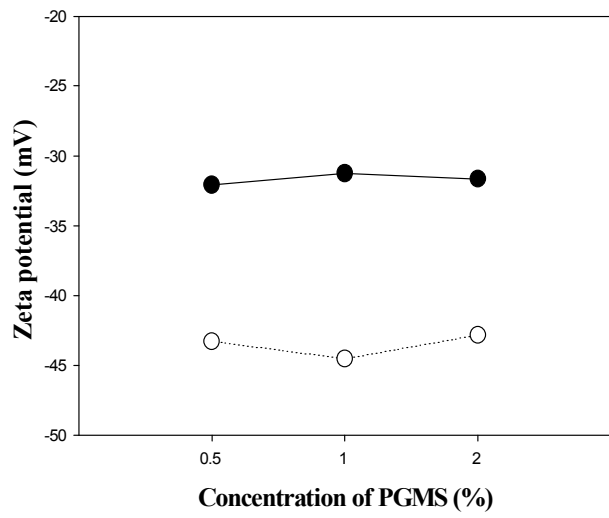
0.1% chitosan (pH 2.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 그림 63과 같았으며, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 64에 나타내었다.

0.1%와 0.5%의 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전의 경우에는 바로 상분리가 일어났으며, O : W의 비율이 1 : 10인 경우 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전은 PGMS의 농도가 증가함에 따라 입도가 감소하는 것으로 나타났다. 반면 2% alginate를 이용한 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 입도도 다소 증가하는 것으로 나타났다. 제타전위의 경우 2% 알긴산을 이용한 O/W/W 에멀전이 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전보다 낮은 제타전위를 보여 alginate의 함량이 높을수록 더 안정한 결과를 나타내었다.

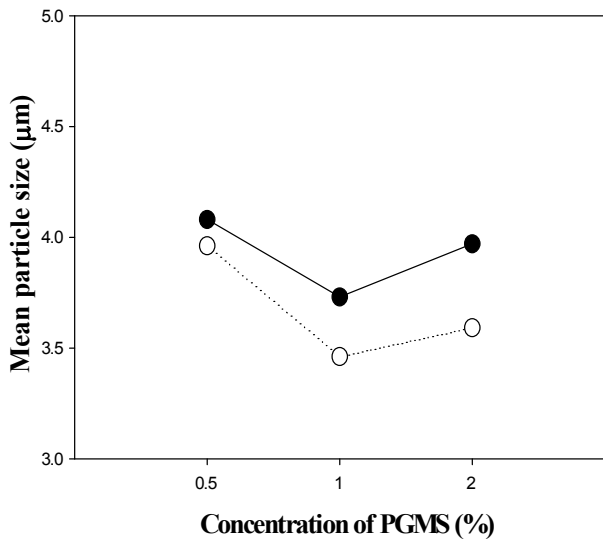
O : W가 3 : 10의 비율인 경우 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전은 PGMS의 농도가 증가할수록 각각 4.08, 3.73과 3.97 um의 입도를 보였으며, 2% alginate를 이용한 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 입도도 다소 감소하는 것으로 나타났다. 제타전위의 경우에는 O : W의 비율이 1 : 10인 에멀전과 마찬가지로 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전이 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전보다 낮은 제타전위를 보여 alginate의 함량이 높을수록 더 안정한 결과를 알 수 있었다.



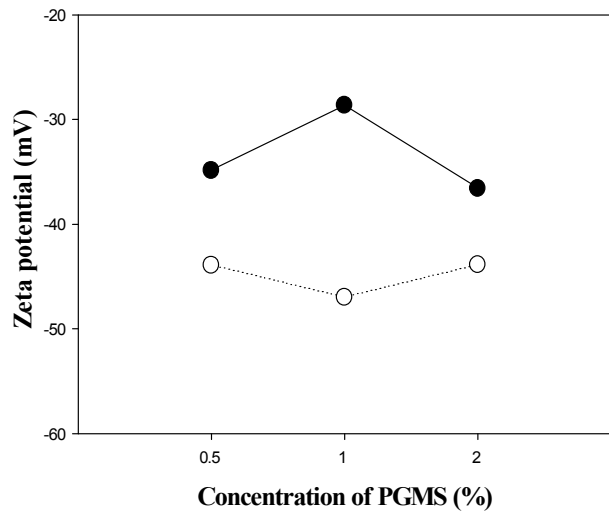
1:10



1:10



3:10



3:10

그림 63. PGMS의 비율 (●: 1% alginate, ○: 2% alginate)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W (0.1% chitosan(pH 2.0) : alginate= 1 : 2) 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

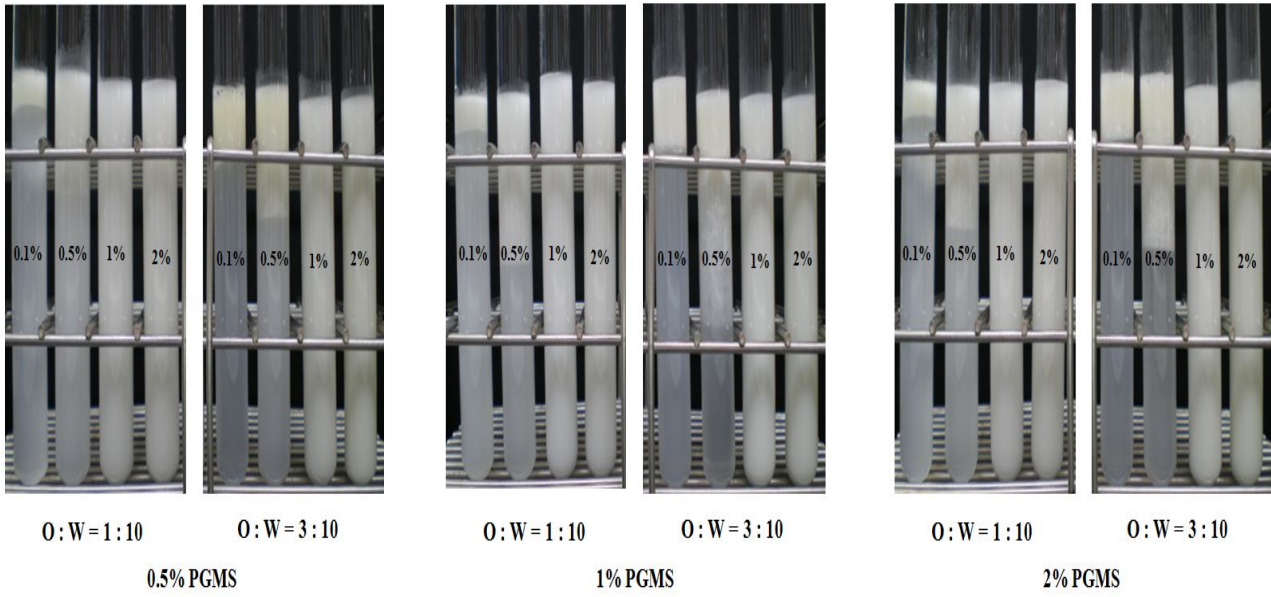
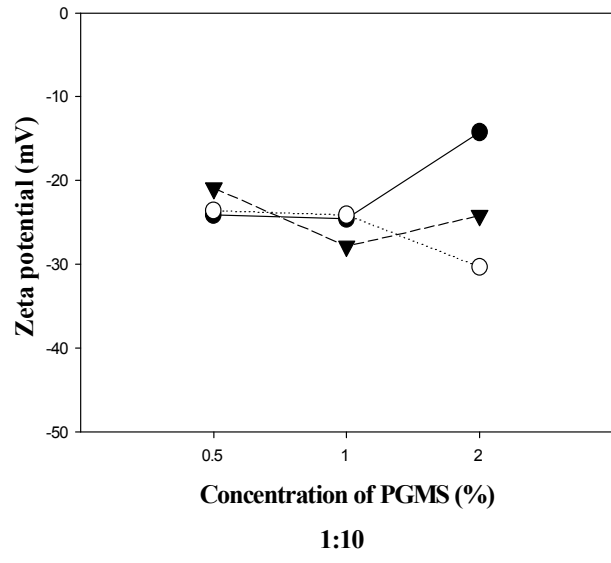
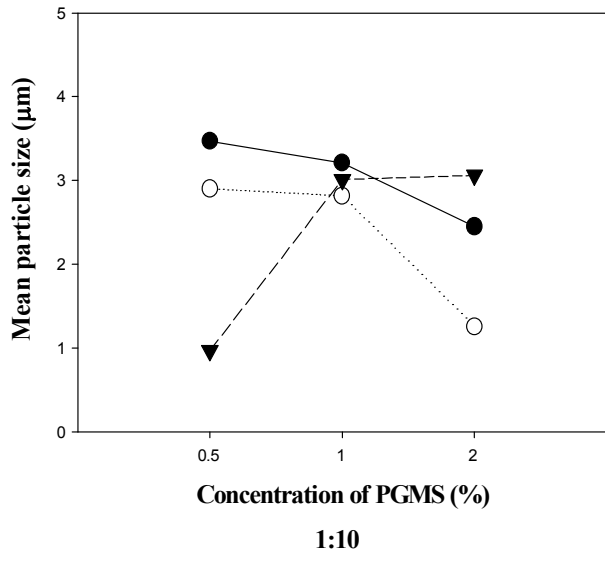


그림 64. 0.1% 키토산 (pH 2.0)에 PGMS와 알긴산의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W 에멀전의 표면 관찰 사진

⊕ 0.5% chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

0.5% chitosan (pH 2.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 그림 65와 같으며, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 66과 같다.



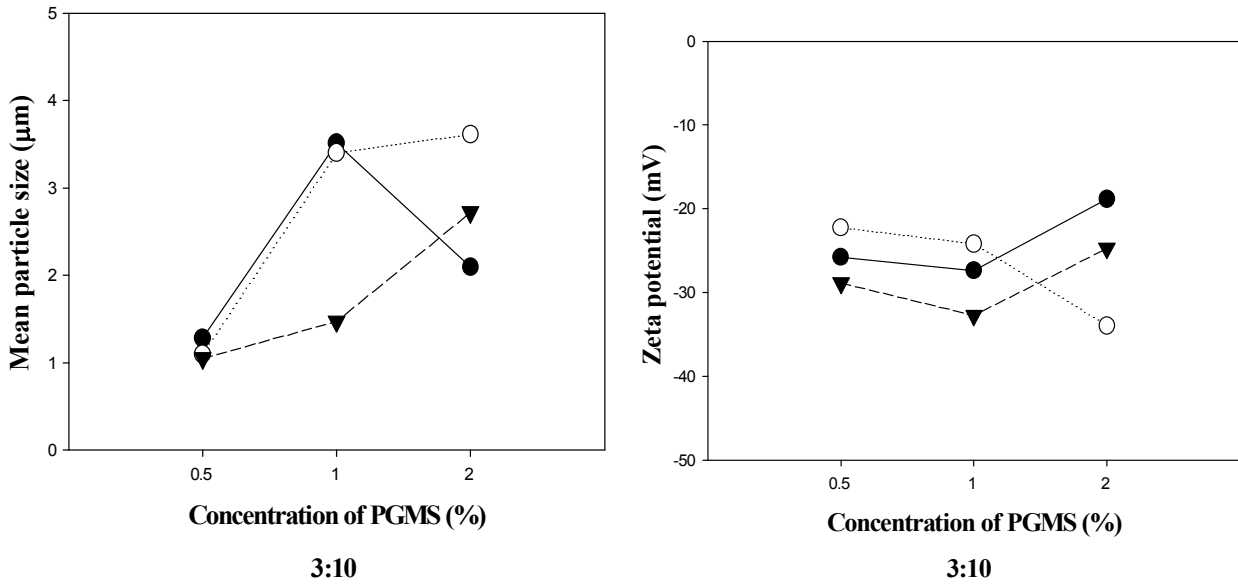


그림 65. PGMS의 비율 (●: 0.5% alginate, ○: 1% alginate, ▼: 2% alginate)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W (0.5% chitosan(pH 2.0) : alginate = 1 : 2) 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

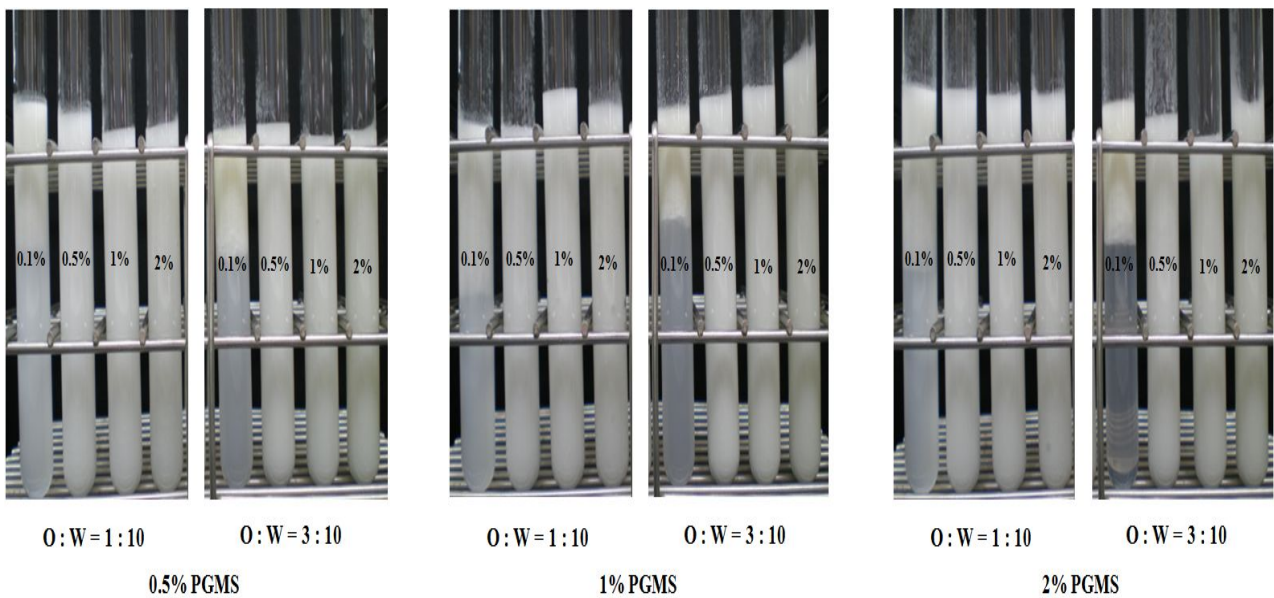


그림 66. 0.5% chitosan (pH 2.0)에 PGMS와 alginate의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W 에멀전의 표면 관찰 사진

㉔ 1% chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

1% chitosan (pH 2.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 그림 67과 같고, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 68에 나타내었다.

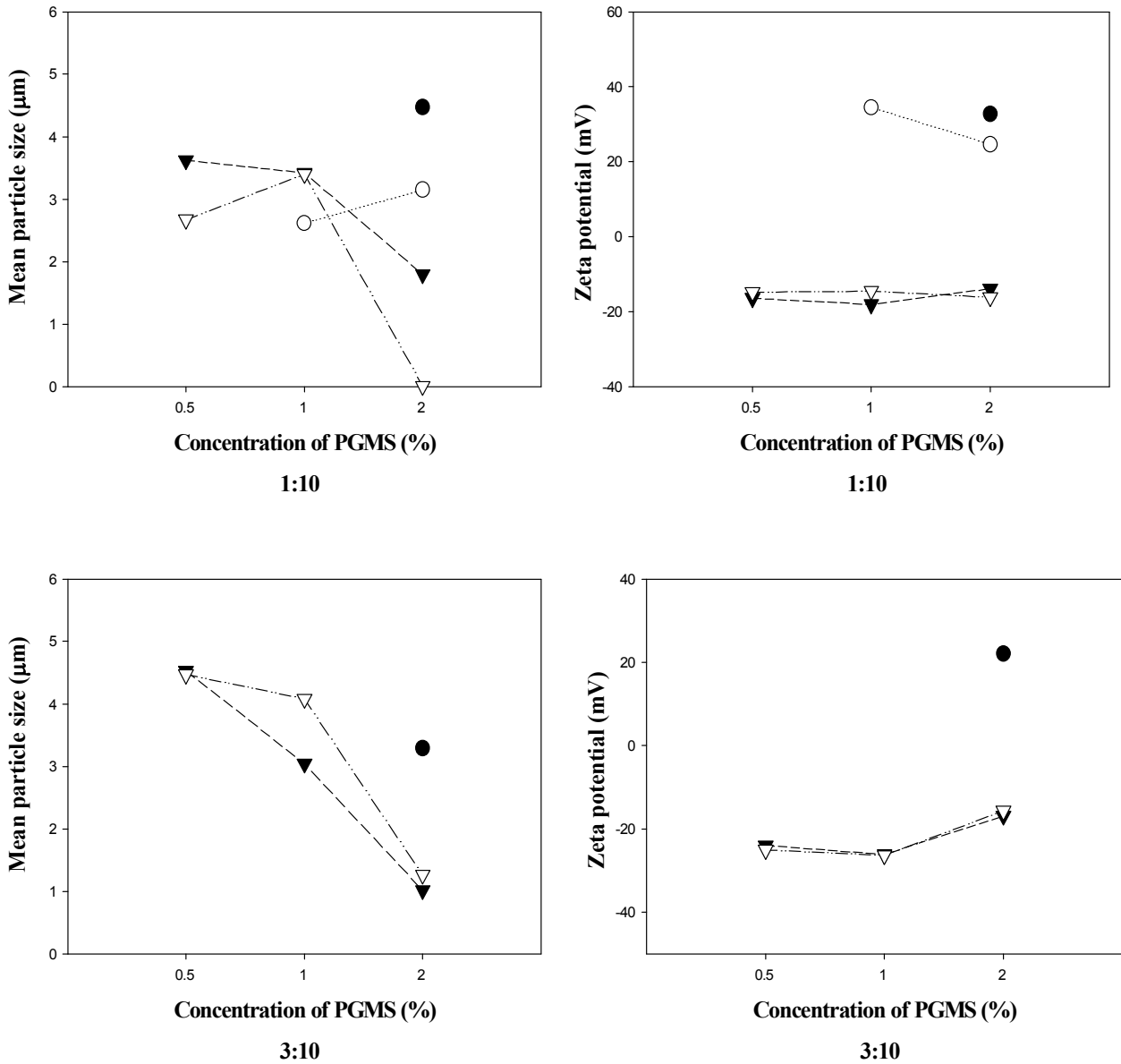


그림 67. PGMS의 비율 (●: 0.1% alginate, ○: 0.5% alginate, ▼: 1% alginate, ▽: 2% alginate)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W (1% chitosan(pH 2.0) : alginate = 1 : 2) 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

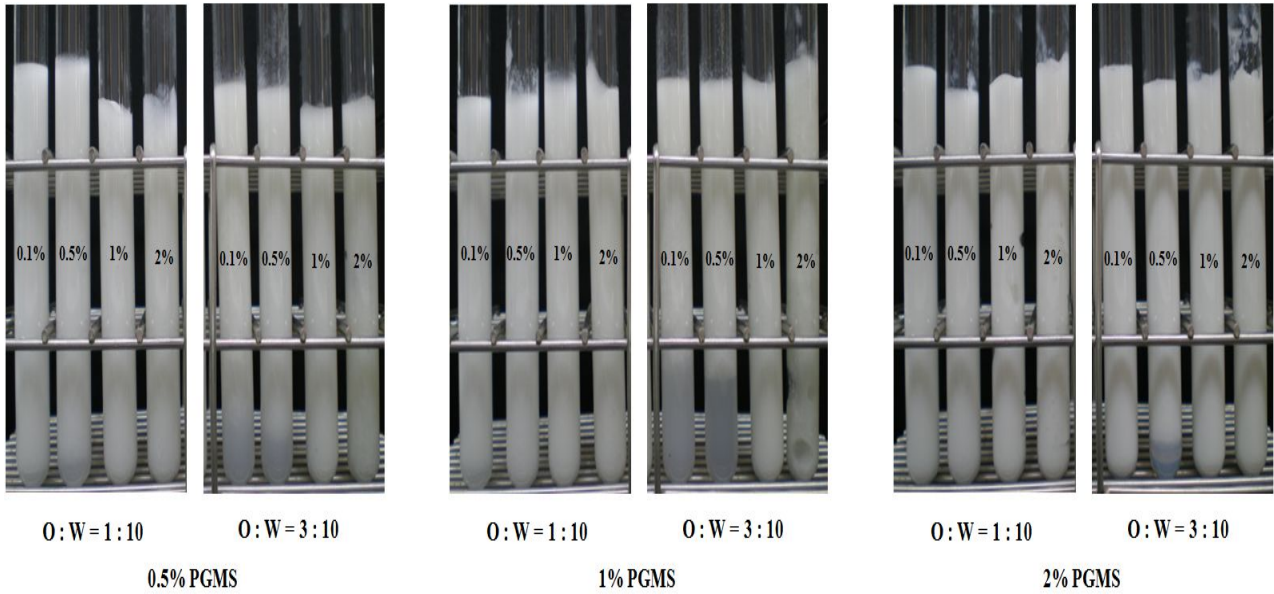


그림 68. 1% chitosan (pH 2.0)에 PGMS와 alginate의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W 에멀전의 표면 관찰 사진

O : W의 비율이 1 : 10인 경우 0.1% alginate의 0.5%와 1% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전과 0.5% alginate의 0.5% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전은 바로 상분리가 일어났다.

2% alginate에 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 입도로 나타났으며, 1%와 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전이 제타전위가 일정하게 나타나 안정된 것으로 측정되었다. O : W가 3 : 10의 비율인 경우, PGMS의 농도가 증가할수록 입도가 감소하는 것으로 나타났다. 제타전위의 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 증가하는 것으로 나타났다.

② pH 3.0 chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

㉠ 0.1% chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

0.1% chitosan (pH 3.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 그림 69와 같았으며, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 70에 나타내었다.

O : W의 비율이 1 : 10인 경우 0.1% alginate의 O/W/W 에멀전은 바로 상분리가 일어났다. 0.5% alginate와 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전의 경우 비슷한 입도를 보였으나 2% alginate의 경우에는 PGMS의 농도가 증가함에 따라 입도도 증가하는 것으로 나타났다.

제타전위를 측정된 결과 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전은 PGMS가 증가할수록 점차 감소하는 것으로 나타났으나 0.5%와 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전은 1% PGMS를 사용하였을 때 점차 증가하다가 2% PGMS를 사용하였을 때 다시 감소하는 것으로 나타났다.

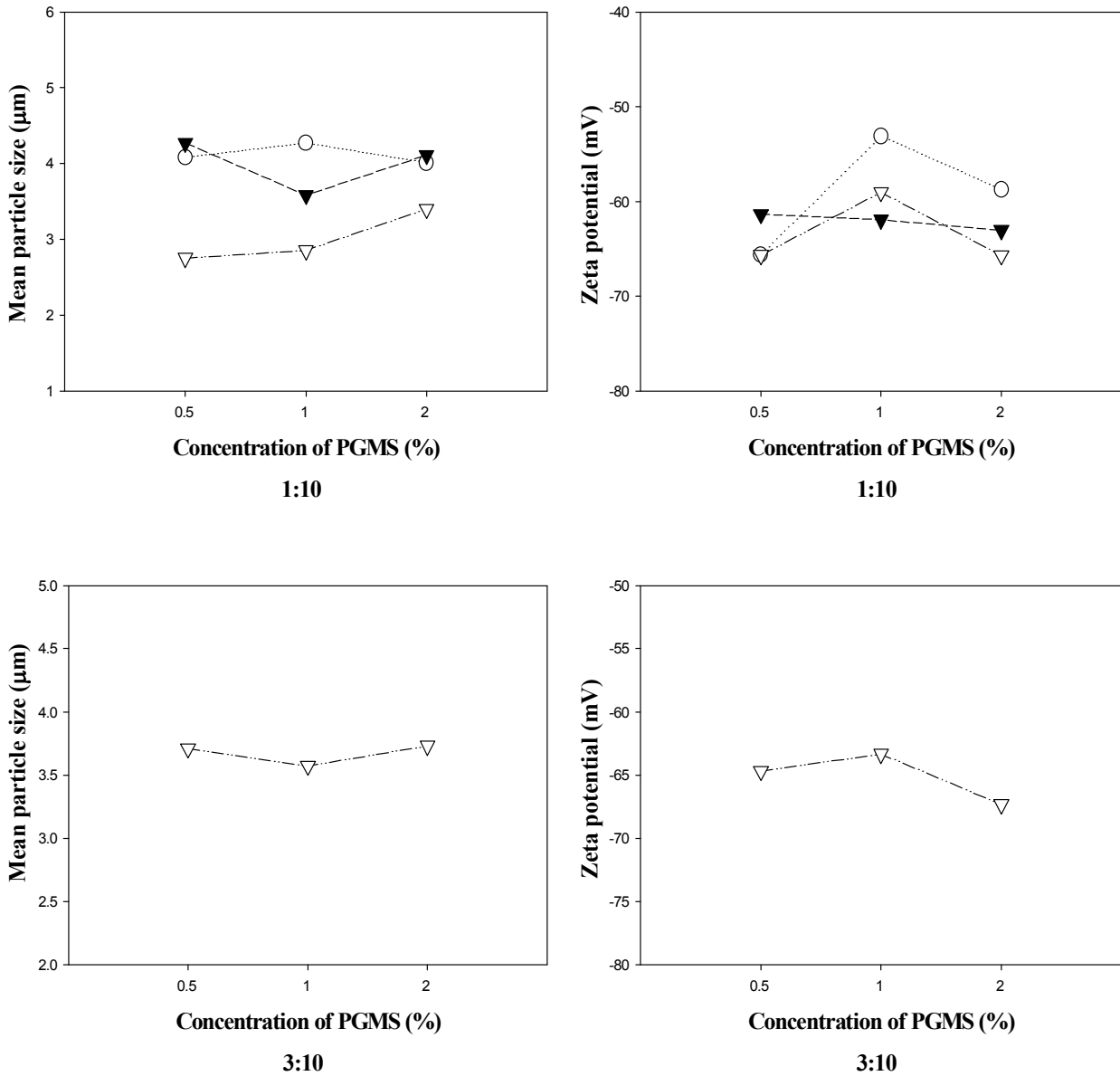


그림 69. PGMS의 비율 (○: 0.5% alginate, ▼: 1% alginate, ▽: 2% alginate)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W (0.1% chitosan(pH 3.0) : alginate = 1 : 2) 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

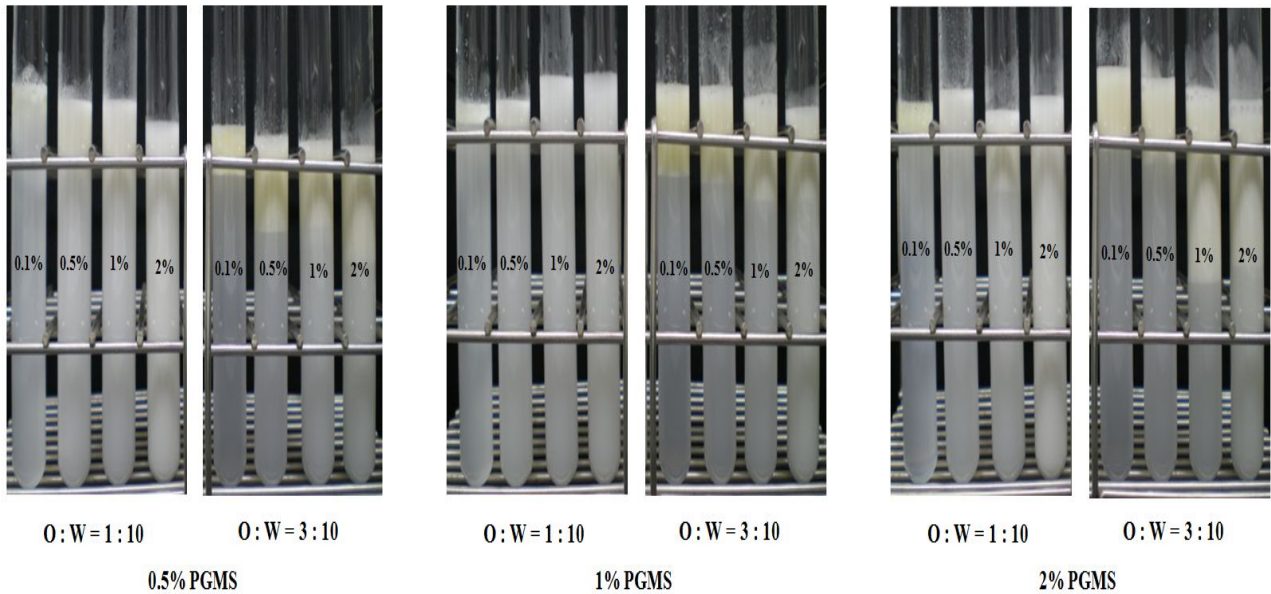


그림 70. 0.1% chitosan (pH 3.0)에 PGMS와 alginate의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W 에멀전의 표면 관찰 사진

O : W가 3 : 10의 비율인 경우, 0.1%, 0.5%와 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전은 바로 상분리가 일어난 것으로 나타났다. 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전의 경우 PGMS의 농도가 증가할수록 비슷한 입도를 보였으며, 제타전위의 경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타나 PGMS의 농도가 증가할수록 O/W/W 에멀전이 더 안정된 것으로 나타났다.

㉔ 0.5% chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

0.5% chitosan (pH 3.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 그림 71과 같고, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 72였다.

O : W의 비율이 1 : 10인 경우 0.1%와 2% alginate의 O/W/W 에멀전, 0.5% alginate의 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전과 1% alginate의 0.5%와 1% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전은 바로 상분리가 일어났다. 입도와 제타전위의 경우, 1% alginate의 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 입도가 가장 낮게 측정되었으며, 제타전위도 가장 낮게 측정되어 가장 안정한 것으로 나타났다.

O : W가 3 : 10의 비율인 경우, 0.1%, 0.5%와 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전과 2% alginate에 0.5% PGMS를 O/W/W 에멀전은 상분리가 바로 일어났다. 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전의 경우 PGMS의 농도가 증가할수록 입도가 감소하였으며, 제타전위의

경우에는 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 증가하는 것으로 나타나 1% PGMS의 O/W/W 에멀전이 더 안정된 것으로 나타났다.

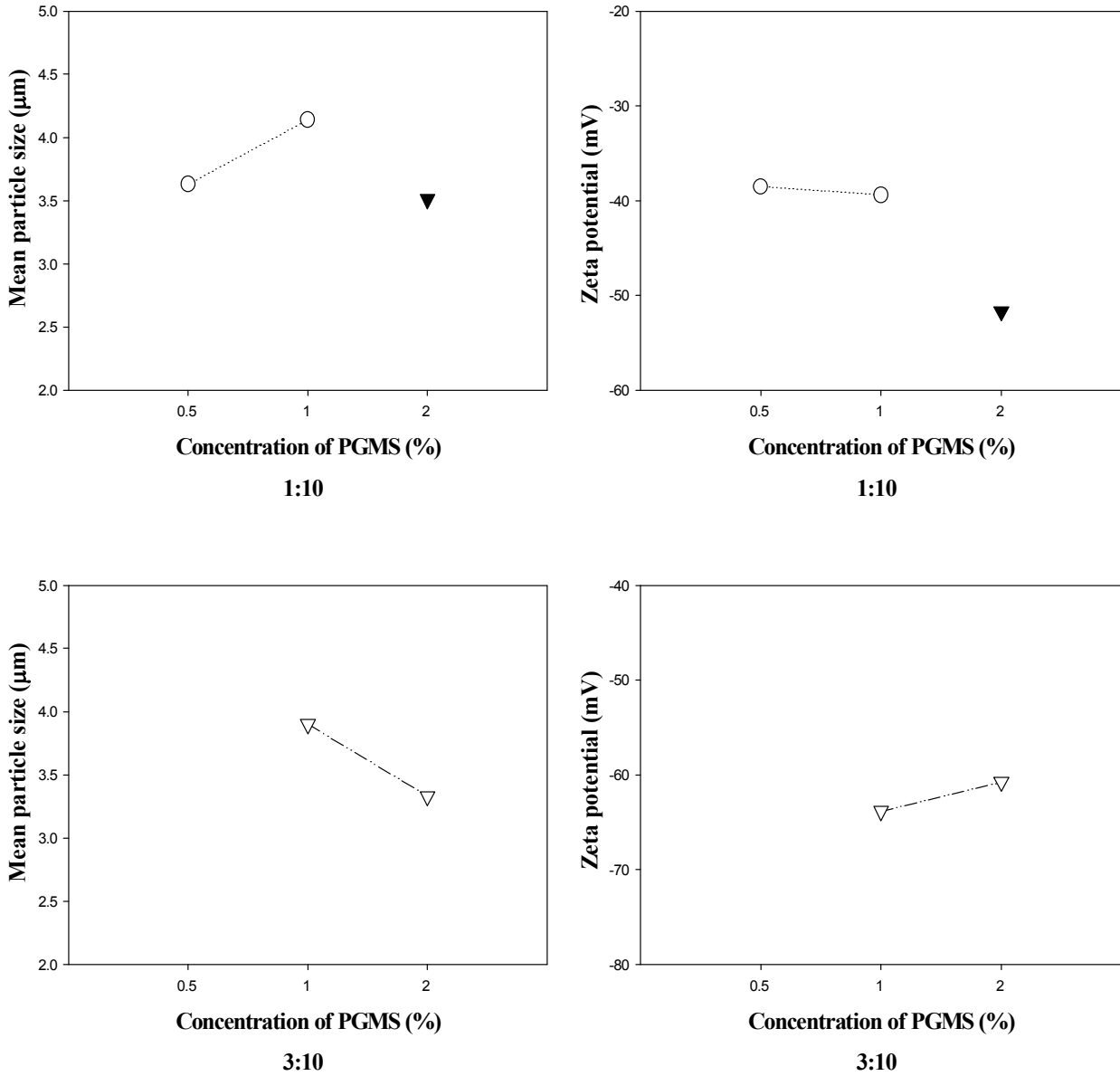


그림 71. PGMS의 비율 (○: 0.5% alginate, ▼: 1% alginate, ▽: 2% alginate)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W (0.5% chitosan(pH 3.0) : 알긴산 = 1 : 2) 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

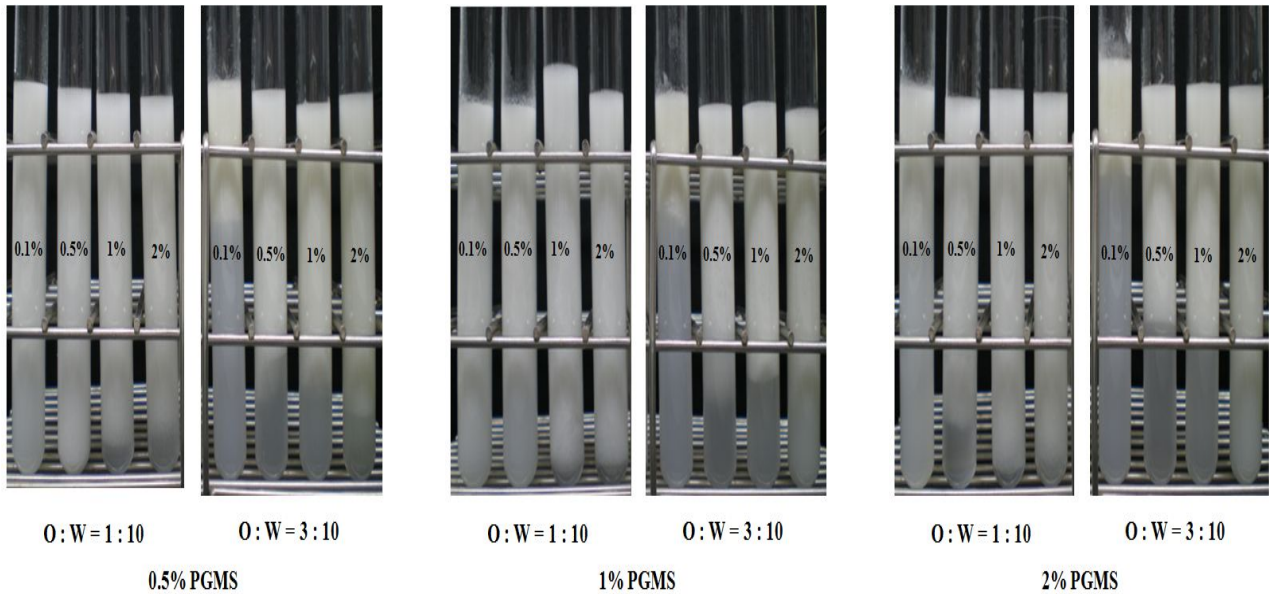


그림 72. 0.5% chitosan (pH 3.0)에 PGMS와 alginate의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W 에멀전의 표면 관찰 사진

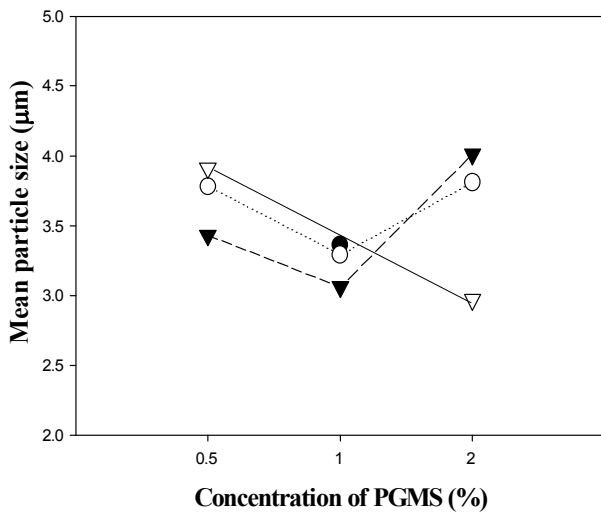
㉔ 1% chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

1% chitosan (pH 3.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 그림 73과 같고, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 74와 같이 나타내었다.

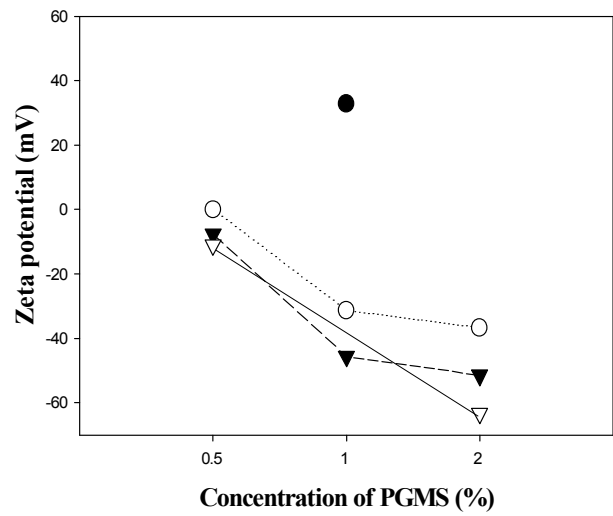
O : W의 비율이 1 : 10인 경우 0.1% alginate의 0.5%와 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전과 2% alginate의 1% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전은 바로 상분리가 일어났다.

0.5%와 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전의 경우 PGMS의 농도가 1%로 증가하였을 때 입도가 감소하였다가 2%로 증가하였을 때에는 증가하는 것으로 나타났다. 반면 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전의 경우에는 PGMS의 농도가 증가함에 따라서 입도가 감소하는 것을 알 수 있었다. 제타전위를 측정된 결과 PGMS의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타나 PGMS 농도가 제타전위의 영향을 주는 것으로 나타났다.

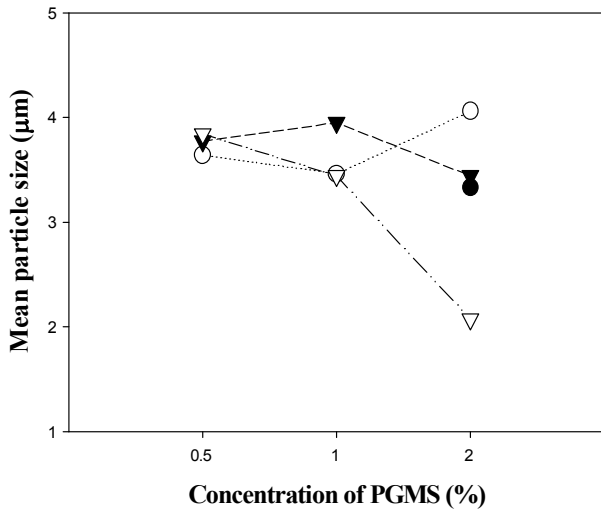
O : W가 3 : 10의 비율인 경우, 0.1% alginate의 0.5%와 1% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전은 바로 상분리가 일어난 것으로 나타났다. 0.5% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전은 PGMS의 농도가 증가할수록 입도가 점차 증가하는 것으로 나타났으나 1%와 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전의 경우에는 PGMS 농도가 증가할수록 입도는 감소하는 것으로 나타났다. 제타전위를 측정된 결과 2% alginate의 1% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 제타전위 값으로 나타나 안정된 O/W/W 에멀전인 것을 알 수 있었다.



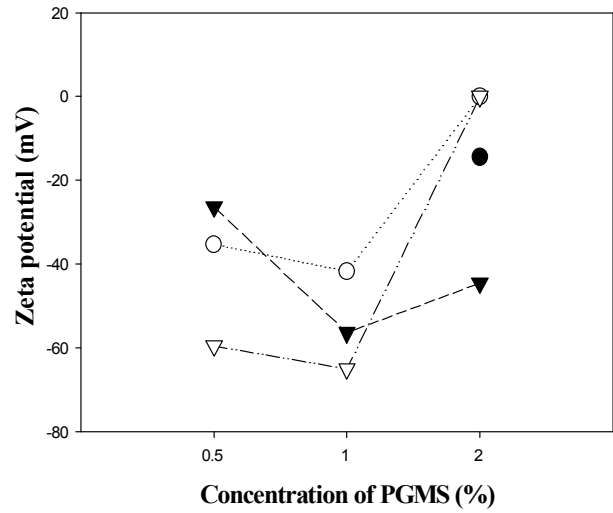
1:10



1:10



3:10



3:10

그림 73. PGMS의 비율 (●: 0.1% alginate, ○: 0.5% alginate, ▼: 1% alginate, ▽: 2% alginate)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W (1% chitosan(pH 3.0) : alginate = 1 : 2) 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

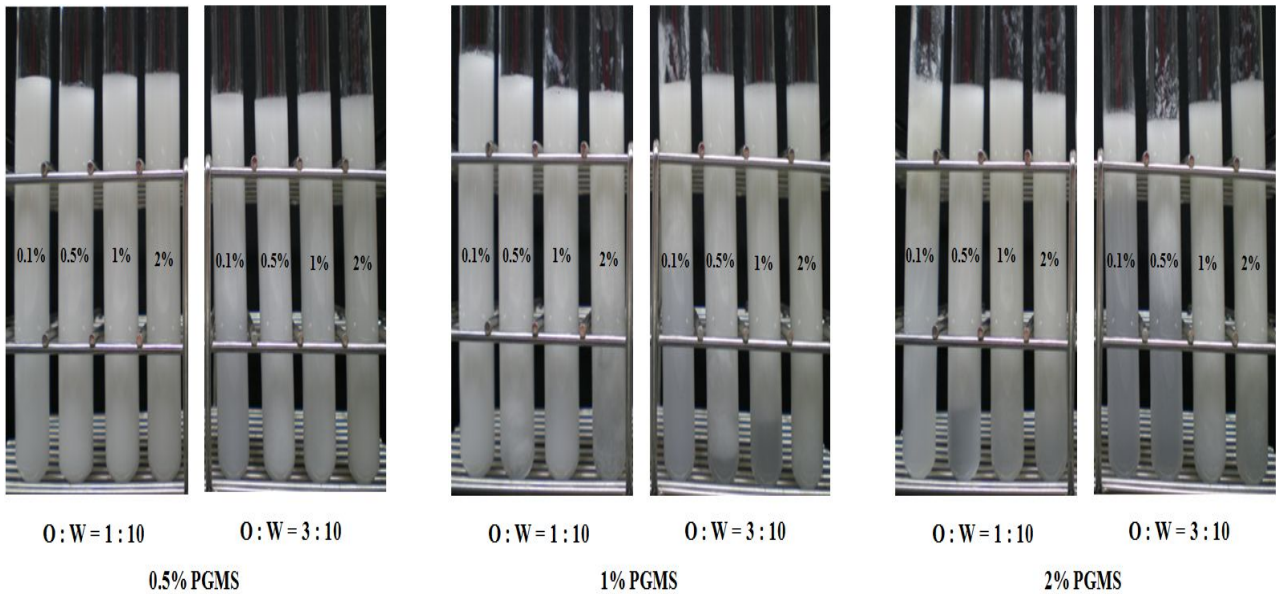


그림 74. 1% chitosan (pH 3.0)에 PGMS와 alginate의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W 에멀전의 표면 관찰 사진

③ pH 4.0 chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

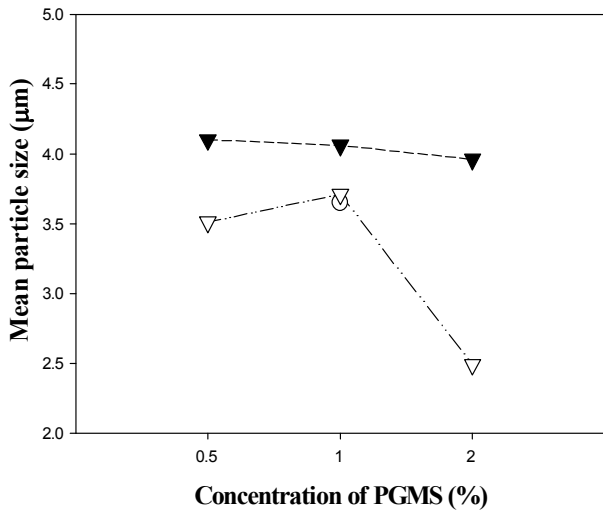
㉞ 0.1% chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

0.1% chitosan (pH 4.0)의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 그림 75와 같고, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 76이었다.

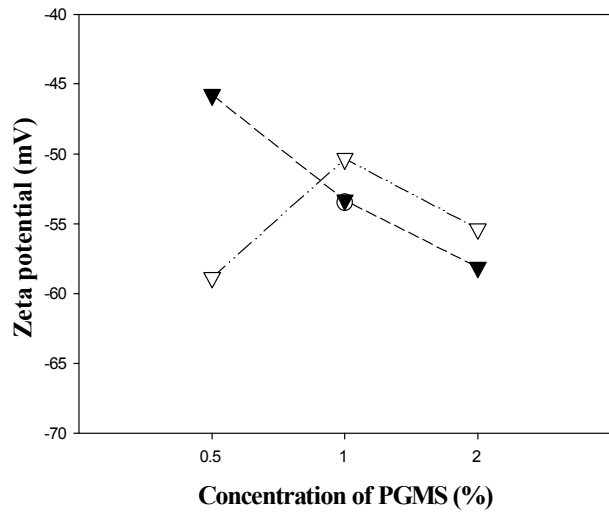
O : W의 비율이 1 : 10인 경우 0.1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전과 0.5% alginate의 0.5%, 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전은 바로 상분리가 일어났다.

입도를 측정 한 결과 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전이 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전보다 높은 입도로 나타났다. 1% alginate는 비슷한 입도를 보였나 2% alginate는 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 입도를 보였다. 제타전위를 측정 한 결과 1% alginate의 경우 PGMS의 농도가 증가함에 따라 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타났다. 반면 2% alginate의 경우 1% PGMS가 가장 높은 제타전위 값을 보였다.

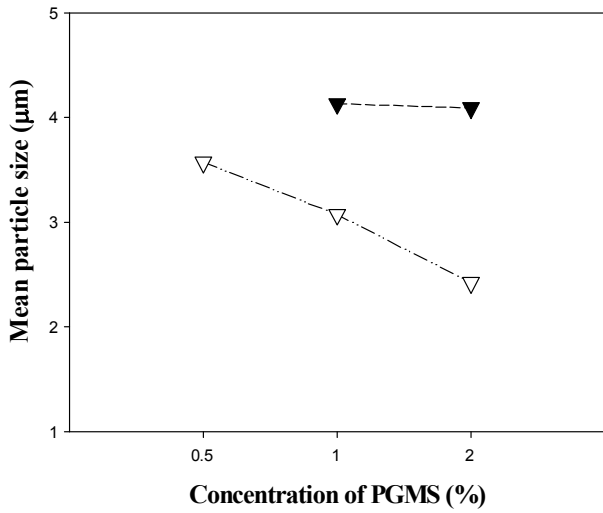
O : W가 3 : 10의 비율인 경우, 0.1%, 0.5% alginate와 1% alginate의 0.5% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전은 바로 상분리가 일어난 것으로 나타났다. 입도를 측정 한 결과 1% 알긴산은 비슷한 입도를 보였나 2% alginate의 경우 PGMS 농도가 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 제타전위를 측정 한 결과 2% alginate의 경우 PGMS 농도가 증가함에 따라 감소하였다.



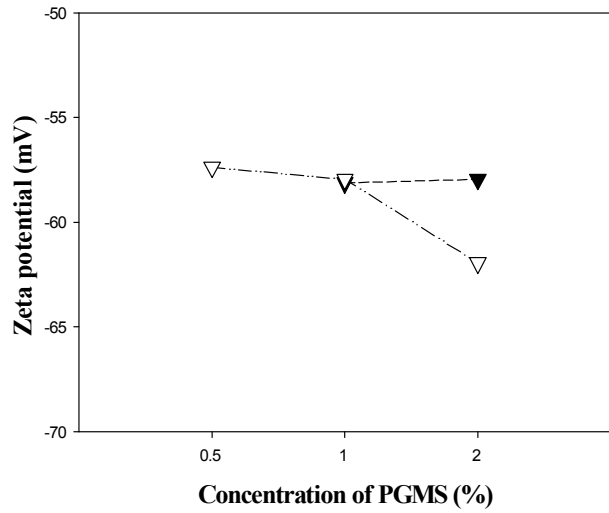
1:10



1:10



3:10



3:10

그림 75. PGMS의 비율 (○: 0.5% alginate, ▼: 1% alginate, ▽: 2% alginate)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W (0.1% chitosan(pH 4.0) : alginate = 1 : 2) 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle) (입도 3:10 그림 변경, 그림 크기 변경)

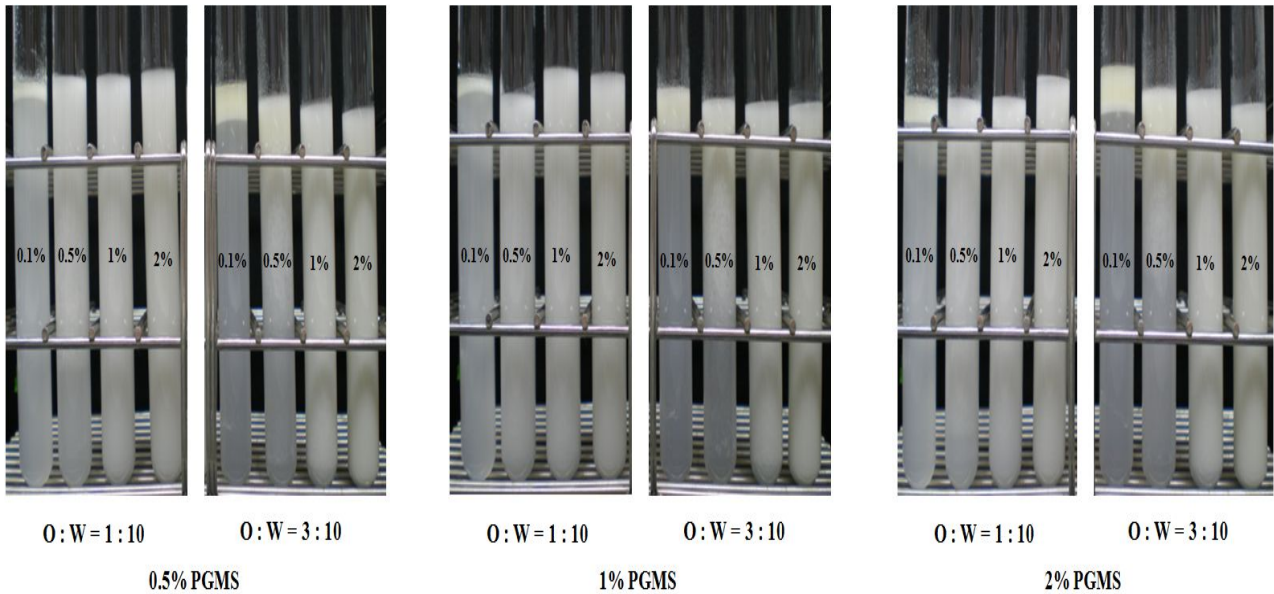


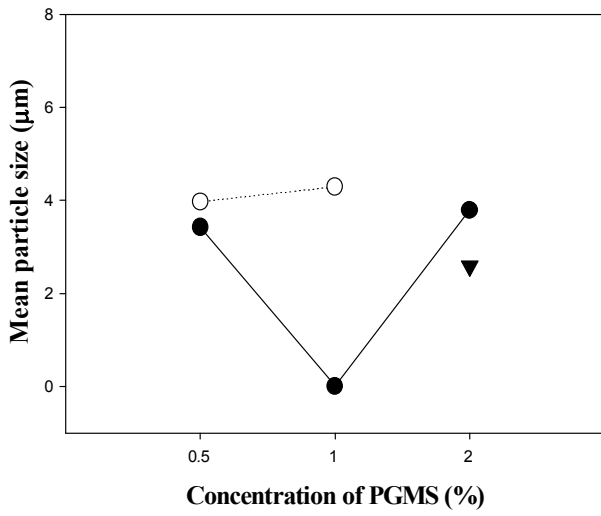
그림 76. 0.1% chitosan (pH 4.0)에 PGMS와 alginate의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W 에멀전의 표면 관찰 사진

㉞ 0.5% chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

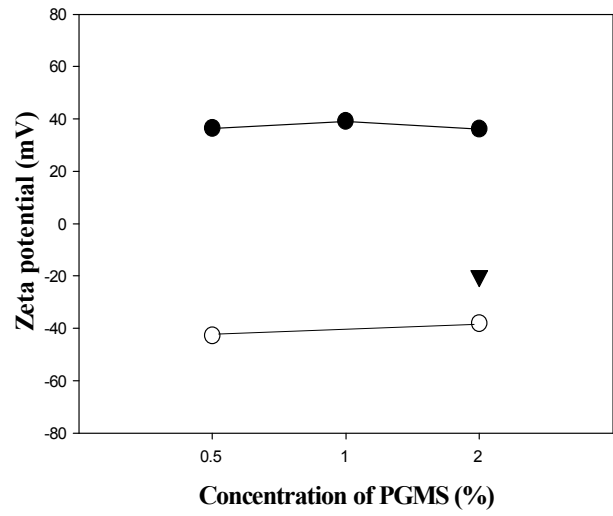
0.5% chitosan (pH 4.0)과 alginate의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 그림 77이었으며, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 78이었다.

O : W의 비율이 1 : 10인 경우 0.5% alginate의 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전, 1% alginate의 0.5%와 1% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전과 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전은 바로 상분리가 일어난 것으로 나타났다. 0.1% alginate의 1% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 입도를 보였으며, 제타전위를 측정한 결과 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮게 나타나 안정된 것을 알 수 있었다.

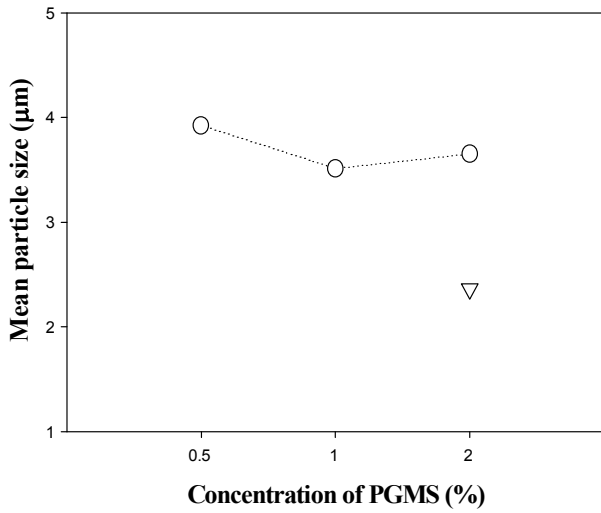
O : W가 3 : 10의 비율인 경우, 0.1%와 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전과 2% alginate의 0.5%와 1% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전은 바로 상분리가 일어난 것으로 나타났다. 2% alginate의 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 입도로 측정되었으며, 0.5% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전은 비슷한 입도를 보였다. 제타전위를 측정한 결과, 2% alginate의 2% PGMS를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 제타전위 값을 보였다.



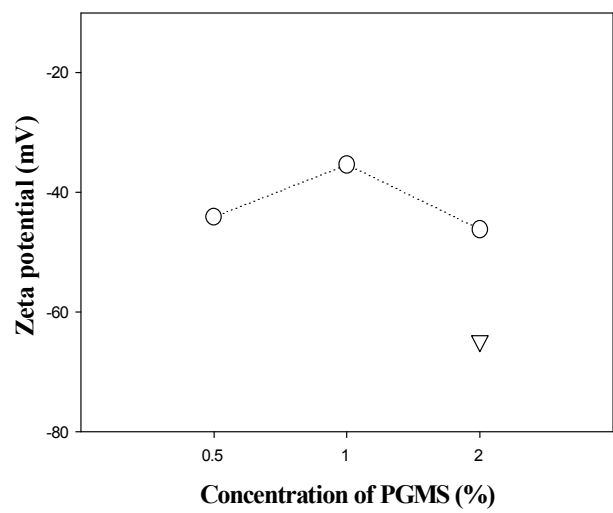
1:10



1:10



3:10



3:10

그림 77. PGMS의 비율 (●: 0.1% alginate, ○: 0.5% alginate, ▼: 1% alginate, ▽: 2% alginate)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W (0.5% chitosan(pH 4.0) : alginate = 1 : 2) 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

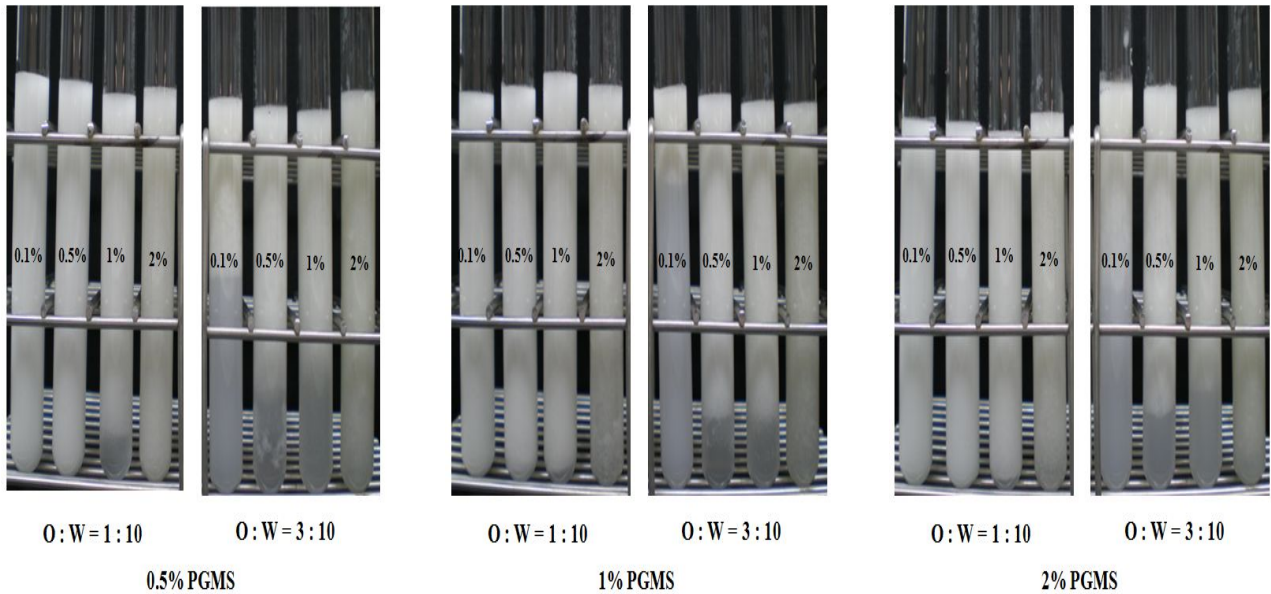


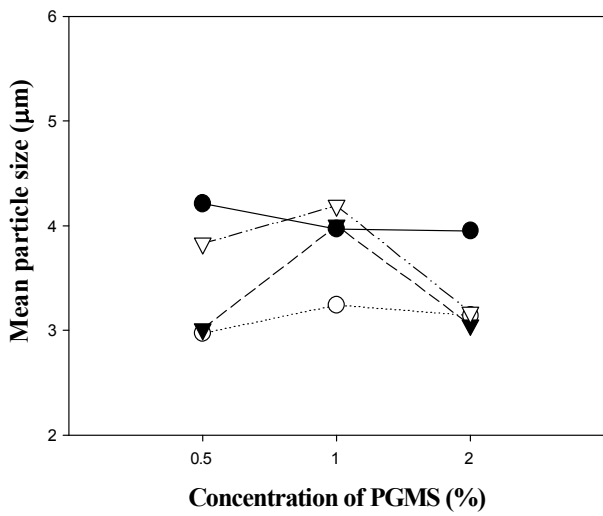
그림 78. 0.5% chitosan (pH 4.0)에 PGMS와 alginate의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W 에멀전의 표면 관찰 사진

㉔ 1% chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전

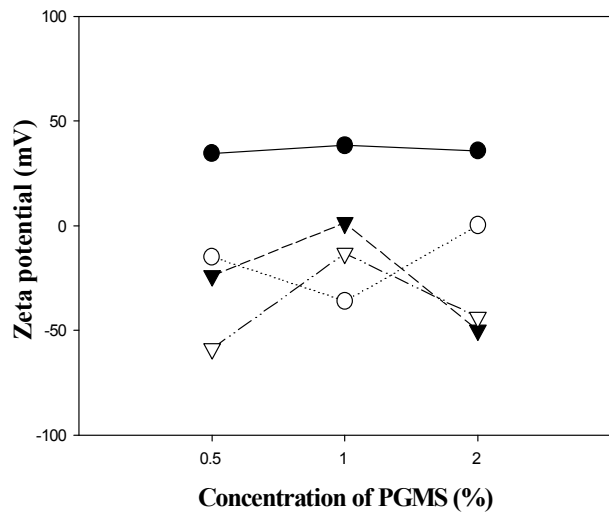
1% chitosan (pH 4.0)과 alginate의 농도를 달리하여 제조한 O/W/W 에멀전은 그림 79와 같았으며, 이에 따른 표면을 관찰한 사진은 그림 80과 같이 나타내었다.

O : W의 비율이 1 : 10인 경우 입도 측정 결과 0.5% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮게 나타났으며, PGMS의 농도에 따라 입도가 변화하는 것으로 나타났다. 제타전위를 측정한 결과 alginate의 농도가 증가할수록 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타났으며, 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 값을 보여 가장 안정된 것으로 나타났다.

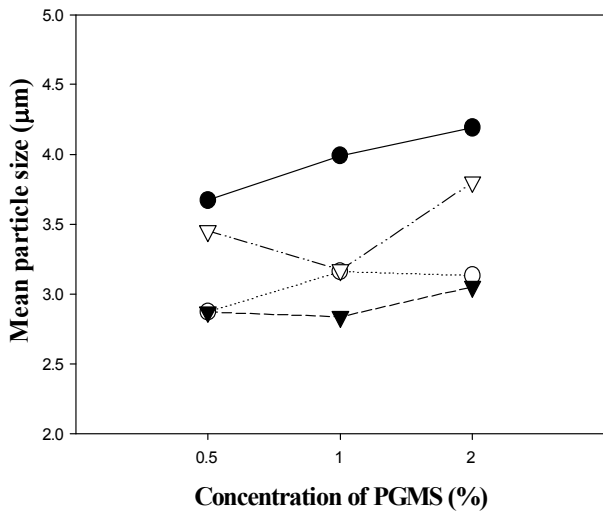
O : W가 3 : 10의 비율인 경우 입도 측정 결과 PGMS의 농도가 증가할수록 입도도 점차 증가하는 것으로 나타났으며, 1% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 입도를 보였다. 제타전위의 경우 O : W의 비율이 1 : 10일 때와 마찬가지로 alginate의 농도가 증가할수록 낮은 제타전위 값을 보였으며, 2% alginate를 이용한 O/W/W 에멀전이 가장 낮은 값을 나타내었다.



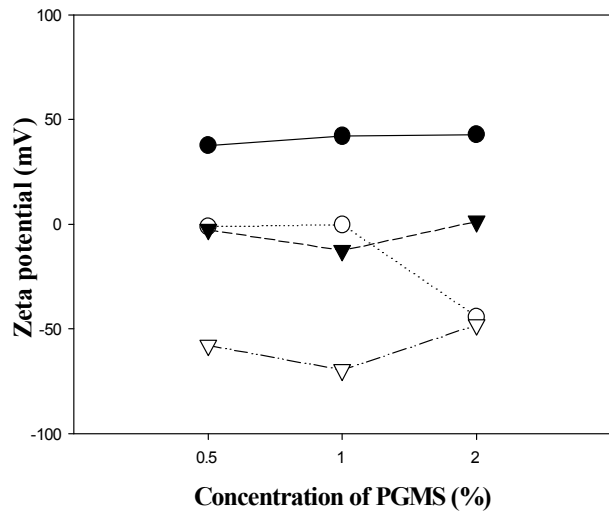
1:10



1:10



3:10



3:10

그림 79. PGMS의 비율 (●: 0.1% alginate, ○: 0.5% alginate, ▼: 1% alginate, ▽: 2% alginate)을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W (1% chitosan(pH 4.0) : alginate = 1 : 2) 에멀전의 입도 및 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300bar, 2 cycle)

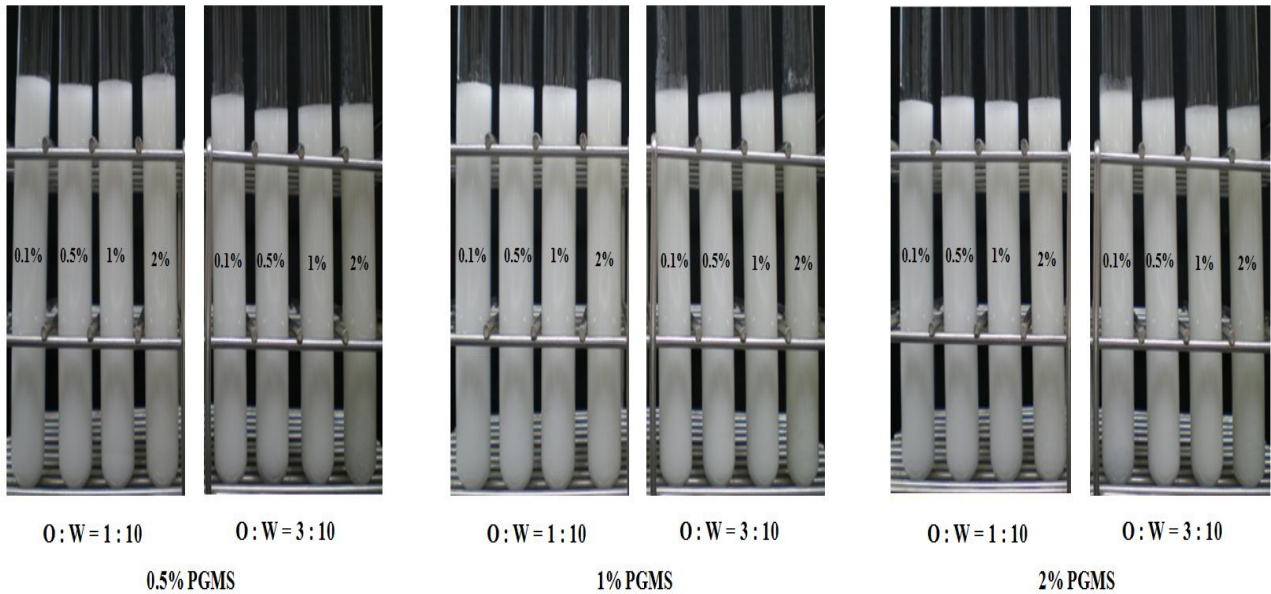


그림 80. 1% chitosan (pH 4.0)에 PGMS와 alginate의 비율을 달리하여 초고압 균질기를 이용한 O/W/W 에멀전의 표면 관찰 사진

나. 유효성분의 포집 기술 개발

(1) chitosan과 TPP를 이용한 나노입자 제조

아래 그림은 chitosan의 농도 및 종류를 달리하여 TPP와의 비율을 3 : 1로 하여 나노입자를 측정된 결과이다.

(가) Chitosan 용매의 농도별 나노입자 제조

Chitosan 용매의 농도별 pH와 제타전위를 측정된 결과는 그림 81과 같았으며, chitosan과 TPP를 이용한 용매의 평균 입도와 제타전위를 측정된 결과는 그림 82에 나타났다.

Chitosan 용매의 농도가 증가할수록 pH는 점차 증가하는 것으로 나타났으며, 제타전위 측정 결과 chitosan 용매의 농도가 증가할수록 제타전위 값도 증가하였는 것으로 나타났다.

Chitosan과 TPP를 이용한 용매의 입도 측정 결과 chitosan의 용매가 증가할수록 입도가 증가하는 것으로 나타났지만 2.5% chitosan 용매의 경우 다소 감소된 입도를 보였다. 제타전위도 마찬가지로 chitosan의 용매가 증가할수록 제타전위 값도 증가하였지만 2.5% chitosan 용매의 경우 가장 낮은 제타전위 값을 보였다.

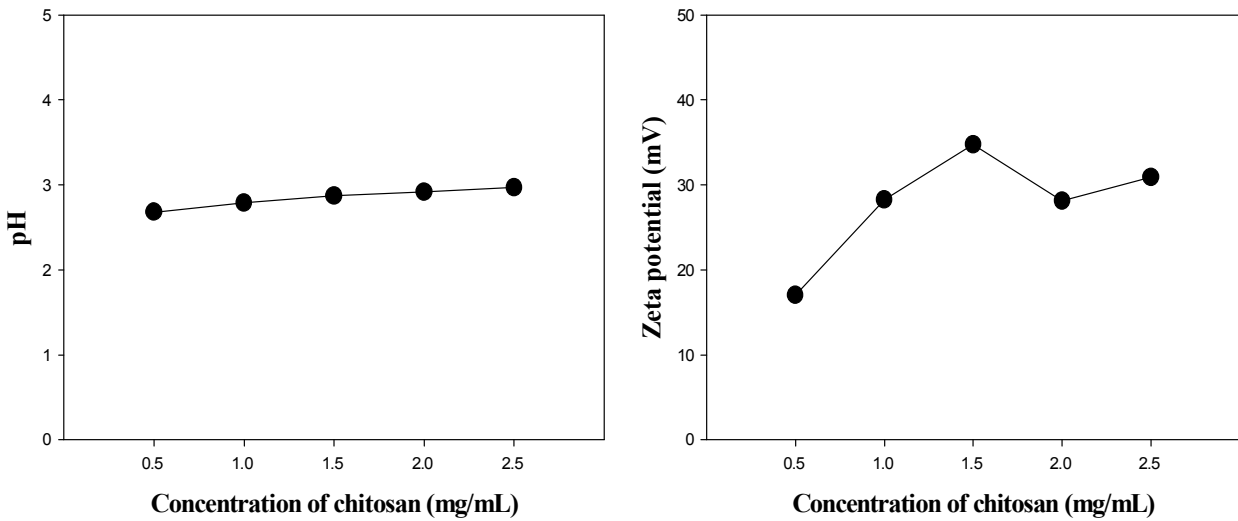


그림 81. Chitosan 용매의 농도별 pH와 제타전위

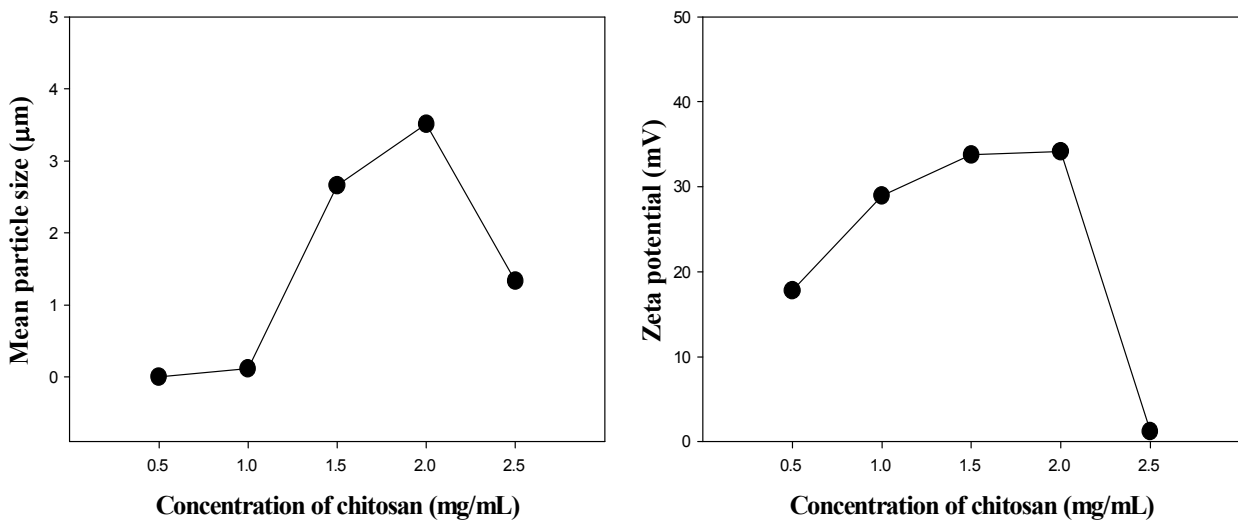


그림 82. Chitosan과 TPP를 이용한 나노입자의 평균 입도 및 제타전위

(나) Low molecular weight chitosan을 이용한 나노입자 제조

Low molecular weight chitosan 용액의 농도별 pH와 제타전위를 측정된 결과는 그림 83에 나타났으며, low molecular weight chitosan과 TPP를 이용한 용매의 평균 입도와 제타전위를 측정된 결과는 그림 84와 같다.

Low molecular weight chitosan 용매의 농도가 증가할수록 pH의 수치는 비슷하게 나타났다. 제타전위 측정 결과 low molecular weight chitosan 용매의 농도가 증가할수록 제타전위

값도 증가하다가 2.5% low molecular weight 키토산 용매부터 감소하는 것으로 나타났다.

Low molecular weight chitosan과 TPP를 이용한 용매의 입도 측정 결과 0.5%에서 1.5% low molecular weight chitosan의 용매가 비슷하게 나타났으나 2% low molecular weight chitosan 용매부터 입도가 크게 증가하였다. 제타전위를 측정 한 결과 low molecular weight chitosan 용매에 따라 각각 다른 제타전위 값을 보였다.

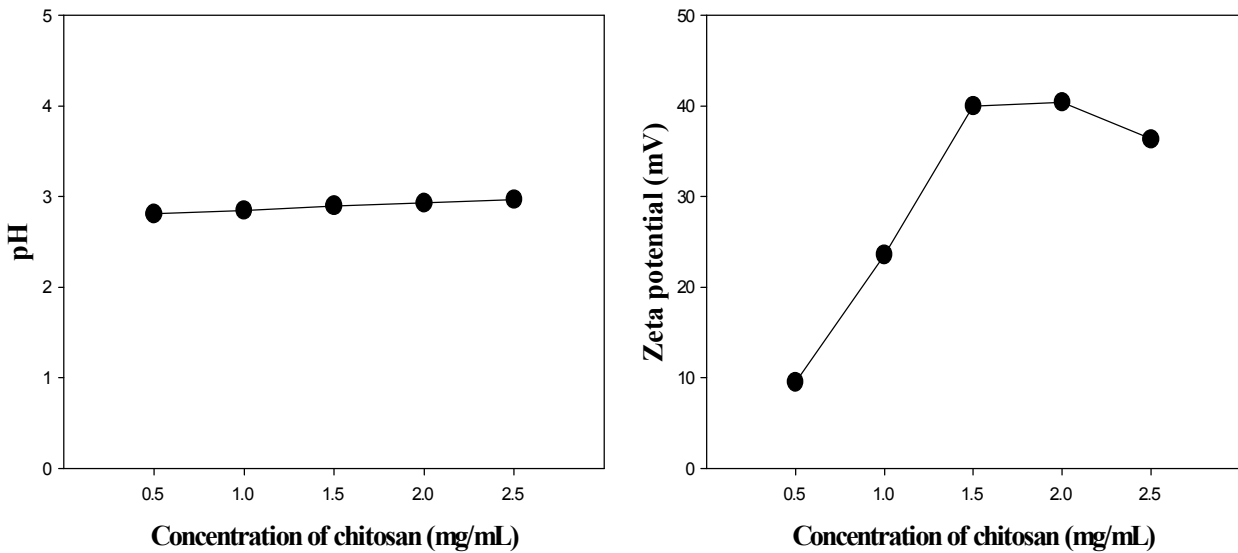


그림 83. Low molecular weight chitosan 용액의 농도별 pH와 제타전위

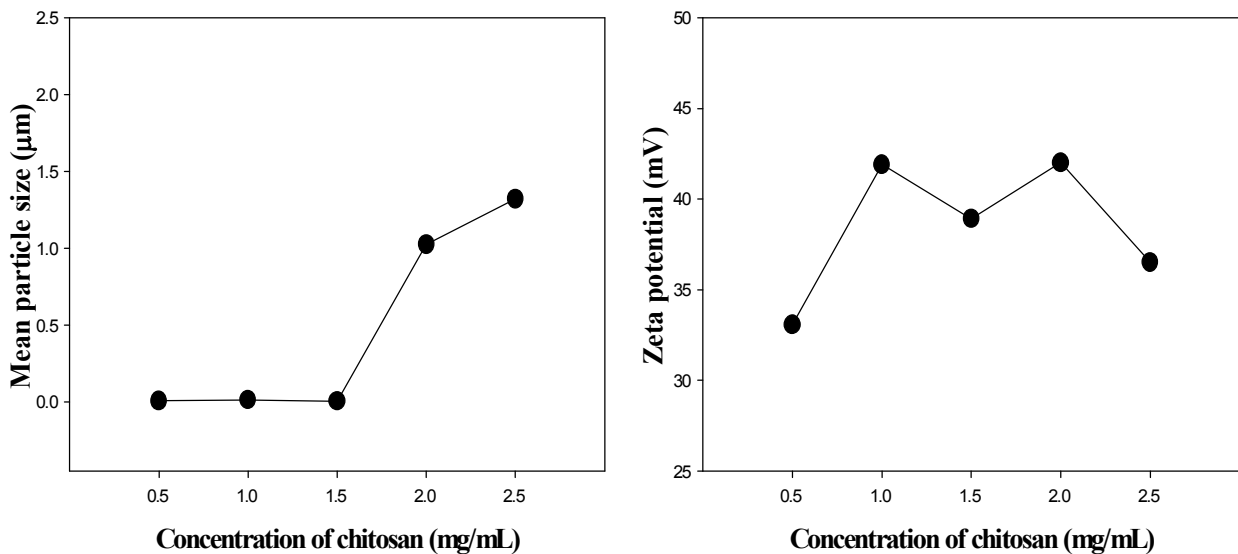


그림 84. Low molecular weight chitosan과 TPP를 이용한 나노입자의 평균 입도 및 제타전위

(다) Medium molecular weight chitosan을 이용한 나노입자 제조

Medium molecular weight chitosan 용액의 농도별 pH와 제타전위를 측정된 결과는 그림 85이며, medium molecular weight chitosan과 TPP를 이용한 용매의 평균 입도와 제타전위를 측정된 결과는 그림 86과 같았다.

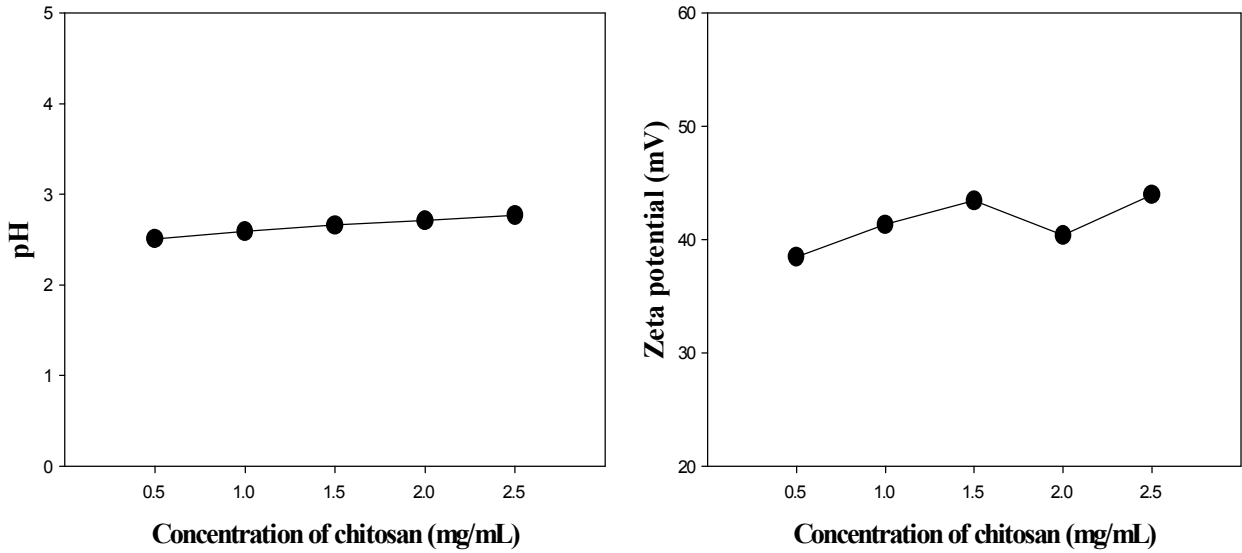


그림 85. Medium molecular weight chitosan 용액의 농도별 pH와 제타전위

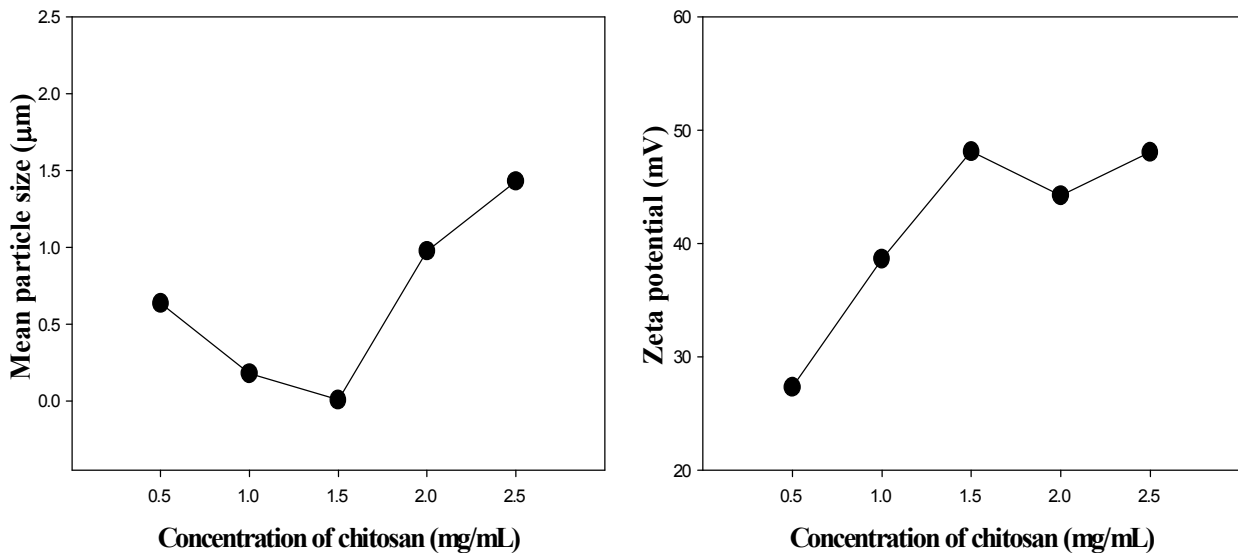


그림 86. Medium molecular weight chitosan과 TPP를 이용한 나노입자의 평균 입도 및 제타전위

Medium molecular weight chitosan 용매의 농도가 증가할수록 pH는 비슷한 것으로 나타났다. 제타전위 측정 결과 medium molecular weight chitosan 용매의 농도가 증가할수록 제타전위 값도 증가하는 것으로 나타났다.

Medium molecular weight chitosan과 TPP를 이용한 용매의 입도 측정 결과 0.5%에서 1.5% medium molecular weight chitosan의 용매로 증가할수록 입도가 감소하는 것으로 나타났으나 2% medium molecular weight chitosan 용매부터는 입도가 크게 증가하였다. 제타전위의 경우 medium molecular weight chitosan 용매가 증가할수록 제타전위 값도 증가하는 것으로 나타났다.

(라) High molecular weight chitosan을 이용한 나노입자 제조

High molecular weight chitosan 용액의 농도별 pH와 제타전위를 측정된 결과는 그림 87과 같으며, high molecular weight chitosan과 TPP를 이용한 용매의 평균 입도와 제타전위를 측정된 결과는 그림 88과 같이 나타났다.

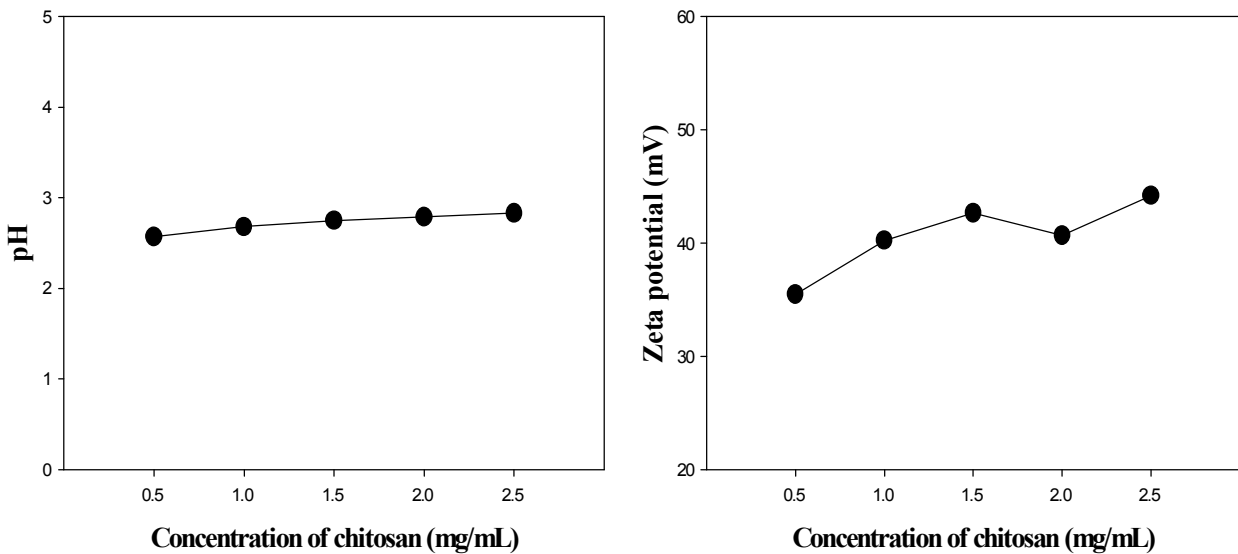


그림 87. High molecular weight chitosan 용액의 농도별 pH와 제타전위

High molecular weight chitosan 용매의 농도가 증가할수록 pH는 비슷한 것으로 나타났으며, 제타전위 측정 결과 high molecular weight chitosan 용매의 농도가 증가할수록 제타전위 값도 증가하였다.

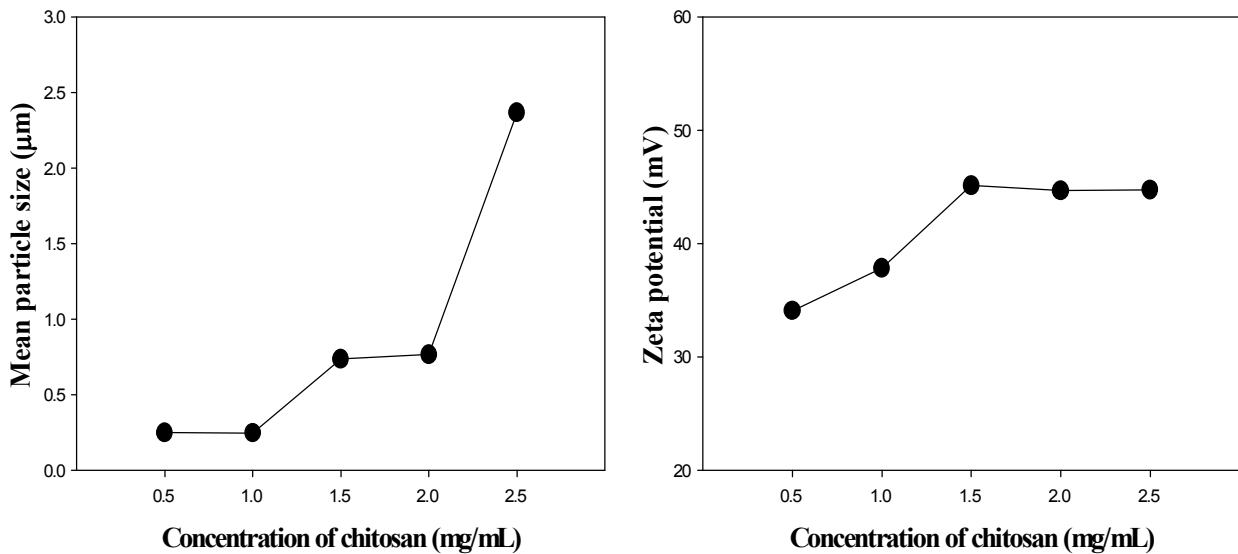


그림 88. High molecular weight chitosan과 TPP를 이용한 나노입자의 평균 입도 및 제타전위

High molecular weight chitosan과 TPP를 이용한 용매의 입도 측정 결과 high molecular weight chitosan의 용매가 증가할수록 입도도 증가하는 것으로 나타났으며, 2.5% high molecular weight chitosan 용매에서 입도가 크게 증가하였다. 제타전위를 측정한 결과 chitosan 용매가 1.5% high molecular weight chitosan 용매까지 증가하였으나, 1.5% high molecular weight chitosan 용매부터는 chitosan 용매가 증가할수록 제타전위 값이 유지되는 것으로 나타났다.

(마) Chitosan과 TPP를 이용한 나노입자 사진

아래 그림은 1% chitosan의 종류를 달리하여 TPP와의 비율을 3 : 1로 하여 나노입자를 제조하여 그 입자를 SEM으로 관찰한 사진은 그림 89와 같이 나타내었다.

SEM은 scanning electron microscopy의 약자로, 시료의 표면 상태를 가시화 해 줄 뿐만 아니라 적절한 감지기를 장비한 경우 시료 표면의 전체 또는 부분의 정량분석을 가능케 하여 준다. SEM 이미지의 명암은 측정시료의 원자 번호 및 시료 표면의 굴곡과 함수관계가 있다. SEM을 통한 시료 표면 관찰시 시료표면에서의 충전현상을 피하기 위하여 표면이 도체이어야 한다 (Han *et al.*, 1990). 이 실험에서 SEM을 찍기 위해 chitosan sample의 표면을 금으로 도금하였다.

사진에서 볼수 있듯이 chitosan의 분자량이 증가할수록 입자의 크기가 증가하는 경향을 보이며, chitosan의 분자량이 작을수록 chitosan 사슬간의 엉킴이 증가하는 것으로 나타났다.

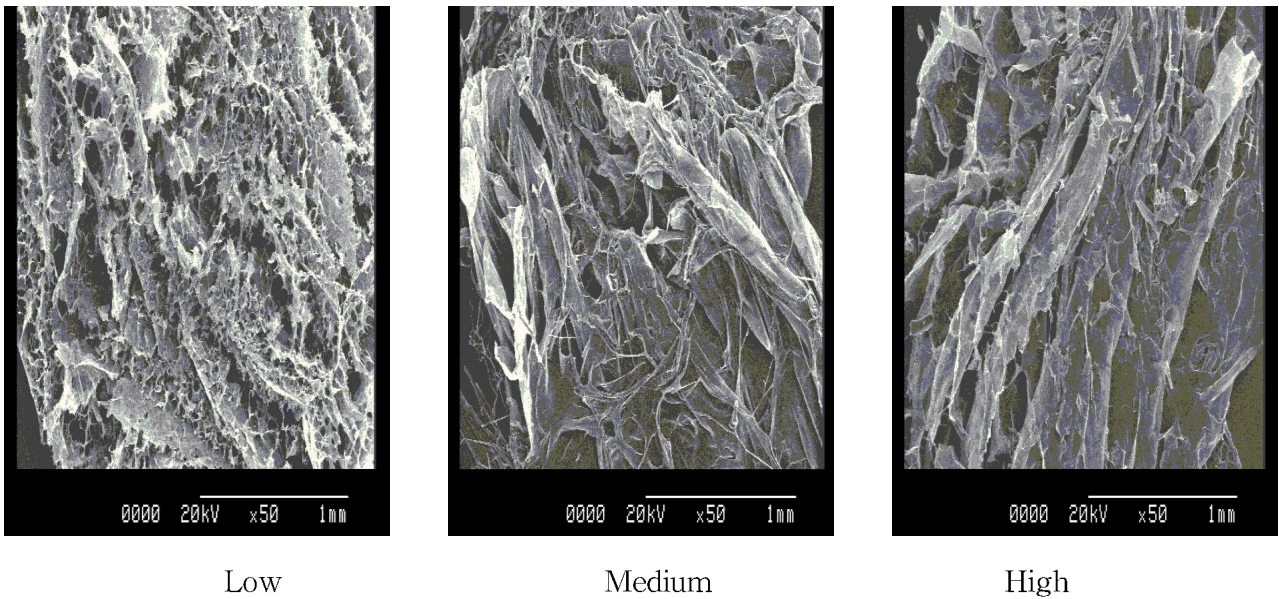


그림 89. 1% chitosan과 TPP를 이용한 나노입자의 관찰 사진

(2) Chitosan-TPP 담체의 제조 및 용출 시험

(가) 벽물질 (Wall material)로서 chitosan의 이용

Chitosan을 벽물질로 이용하여 담체를 제조한 후 그 입자를 AFM으로 관찰한 사진을 그림 90에 나타내었다.

Chitosan은 다당체의 일종으로 게나 새우 등의 갑각류와 곤충류의 각피로부터 얻을 수 있는 천연고분자인 chitin으로 쉽게 만들 수 있다. Chitin은 자연계에서 셀룰로오스 다음으로 많은 양이 존재하고 있다. 키토산은 많은 유용한 특징을 가지고 있는데 높은 화학적 저항력, 커다란 열 안정성, 염료나 금속 이온에 대한 친화성, 생체 적합성 등을 들 수 있다. 과거 20여 년 동안 이러한 특징을 화학공학, 생체의학, 폐수처리, 금속의 수거와 재생, 기능성 멤브레인, 인체에 있는 금속이온의 조정 등에 적용하는데 많은 노력을 기울여왔다 (Lee *et al.*, 2005).

Chitosan은 산성용액에 녹으며 화학적 변화에 유용한 반응성 아미노기를 가지고 있고 인체에 무해하기 때문에 chitosan으로부터 만들어진 기능성고분자는 이온교환수지 또는 흡착제로서의 역할을 가지므로 식품, 의약품에의 응용, 농약 및 중금속의 제거제, 폐수처리제 등의 그 활용가치가 크다 (Tonnesen, 2001; Mullin *et al.*, 1998). 이러한 chitosan은 그 자체로서 혈중 콜레스테롤 감소 및 지방 흡수 저해 효과, 항암 효과, 면역력 강화 효과, 항 당뇨 효과, 상처 치료 효과, 그리고 항균 활성 등의 다양한 생리활성을 가지고 있다 (Ikeda *et al.*, 1993;

Muzzarelli *et al.*, 1987). 특히 구강, 비강, 그리고 장강 등의 점액질 층에 결합하여 약물의 흡수를 촉진시키는 효과를 나타내기 때문에 단백질 약물이나 난흡수성 약물의 경구 및 여러 제형에 있어서 흡수 촉진제로의 응용이 활발하게 연구되고 있다 (Park *et al.*, 2008). 또한 수용액 하에서 양이온성을 띠기 때문에 음이온성을 띠는 유전자 물질과 복합체를 형성할 수 있고, 이를 이용하는 chitosan 또는 chitosan 유도체의 유전자 전달체로의 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 chitosan은 매우 우수한 생체 적합성을 갖는 천연고분자로 알려져 있으며, 양이온성 고분자로서 poly (L-lysine), poly (ethylene imine) 등의 고분자에 비하여 매우 낮거나 무시할 수 있는 정도의 세포독성을 나타내는 물질로 알려져 있다. 그 외에도 생체 내 효소에 의하여 단량체인 glucosamine으로 분해되는 생분해성 고분자이다. 뿐만 아니라 고분자의 단위마다 한 개의 1차 아민기를 갖고 있기 때문에 화학적 수식이 용이한 장점을 갖고 있다. 이러한 특성을 이용한 약물 전달체, 조직공학용 세포 외 기질 등 활발한 생의학적 응용이 시도되고 있다.

본 연구에서 chitosan 담체의 AFM 관찰 사진 결과 물질의 입도가 작을수록 어두운 색을 띄고, 밝아질수록 큰 입자를 갖는다는 것을 보여주었다.

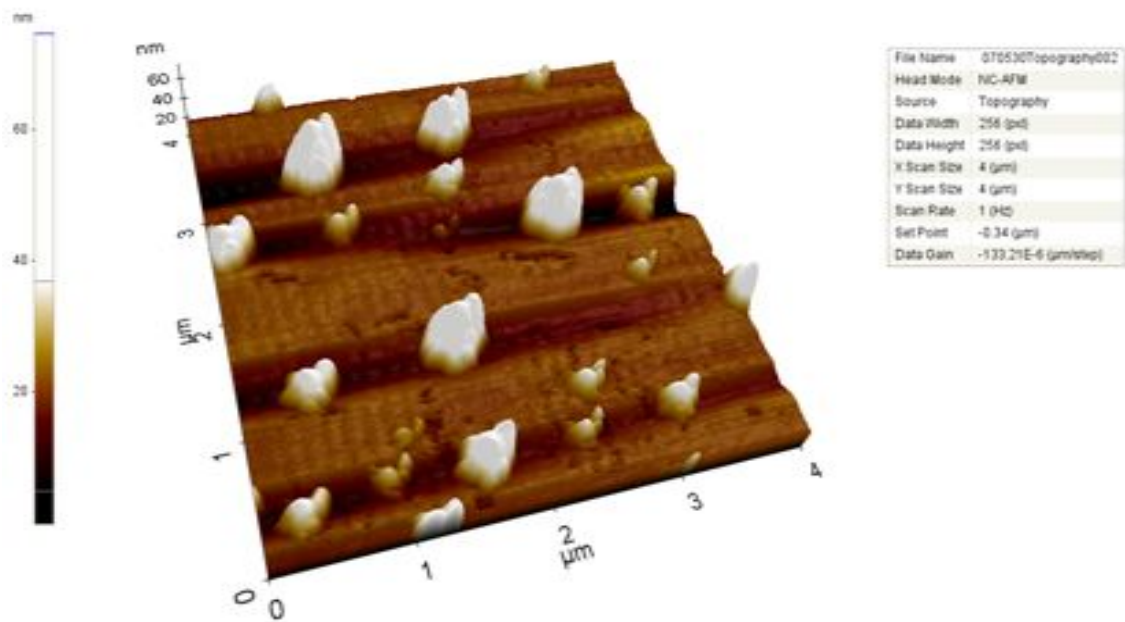


그림 90. Chitosan 담체의 AFM 관찰 사진

(나) Chitosan-TPP 담체의 평균입도 및 캡슐화효율

Chitosan-TPP 담체에 대한 평균입도 및 캡슐화효율을 측정된 결과는 표 4와 5 같이 나타내었다. 이는 분말 제형 개발을 위해서 분산상 용매, 가교제 (TPP)의 농도 등을 공정변수로 설정하여 실험한 결과를 보였으며, chitosan-TPP 나노입자의 평균입도는 약 400-700 nm 수준의 값을 나타내었다.

일반적으로 분산상 용매의 경우 물에 대한 용해도에 따라서 그 캡슐화 효율이 차이가 발생하게 된다. 본 연구에서 사용된 핵물질 (core material)인 allicin의 경우 물에 대한 용해도가 낮은 관계로 DCM만을 용매로 사용하였을 때, 가장 높은 캡슐화효율 값을 나타내었다.

또한 TPP 함량을 변수로 하였을 때, 그 함량이 증가할수록 캡슐화 효율이 약 90%까지 증가함을 확인하였다. 이는 TPP 함량이 어느 정도 증가할수록 키토산-TPP 간의 결합이 견고해짐을 나타낸다.

표 4. 분산상 용매에 따른 chitosan-TPP 나노입자의 입도 및 캡슐화 효율

분산상 용매	캡슐화 효율 (%)	평균입도 (nm)
dichloromethane	81	511.80±38.77
dichloromethane + acetone	69	488.32±16.89
dichloromethane + ethanol	62	503.44±35.19
dichloromethane + acetone + ethanol	60	495.33±33.69

표 5. 가교제(TPP) 함량에 따른 입도 및 캡슐화 효율

에멀전 : TPP 비율 (w/w)	캡슐화 효율 (%)	평균입도(nm)
5 : 0.1	48	751.66
5 : 0.5	71	789.50
5 : 1.0	81	773.00
5 : 2.0	85	673.00
5 : 3.0	90	526.00
5 : 4.0	88	550.20

(다) Allicin을 이용한 담체의 용출 시험

Allicin을 core material로 사용하여 제조한 담체로부터 용출 시험을 수행한 결과는 그림 91와 같이 나타났다.

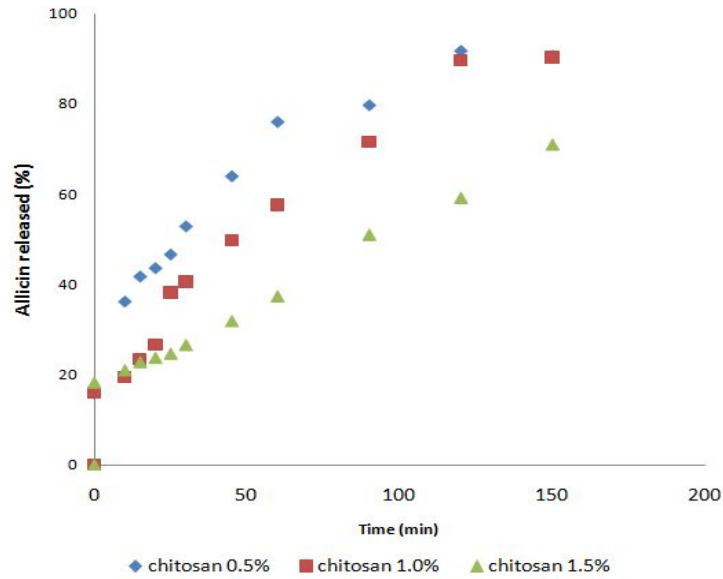


그림 91. Allicin의 용출시험

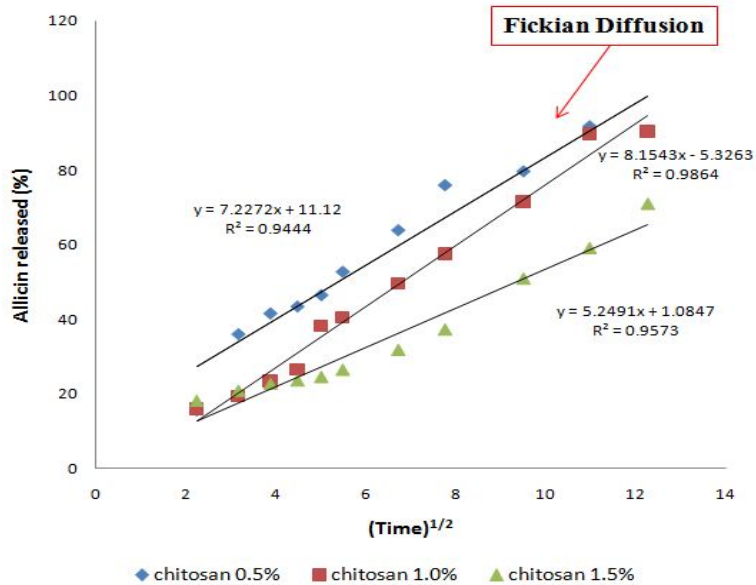


그림 92. Higuchi Ploting

용출 시험 결과 chitosan의 농도에 관계없이 약 3시간 안에 allicin이 거의 용출되어 나왔으며, chitosan 농도가 증가할수록 약간 용출 저해가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 용출 양상을 확인하기 위하여 Higuchi Plotting을 한 결과는 그림 92와 같으며, 본 chitosan-TPP 나노입자의 경우 확산에 의해서만 용출이 진행되는 것으로 나타났다.

(3) Alliin-loaded PCL 나노입자의 제조 및 용출 시험

(가) 벽물질로서 PCL의 이용

PCL을 벽물질로 이용하여 제조한 후 그 입자를 AFM으로 관찰한 사진을 그림 93에 나타내었다.

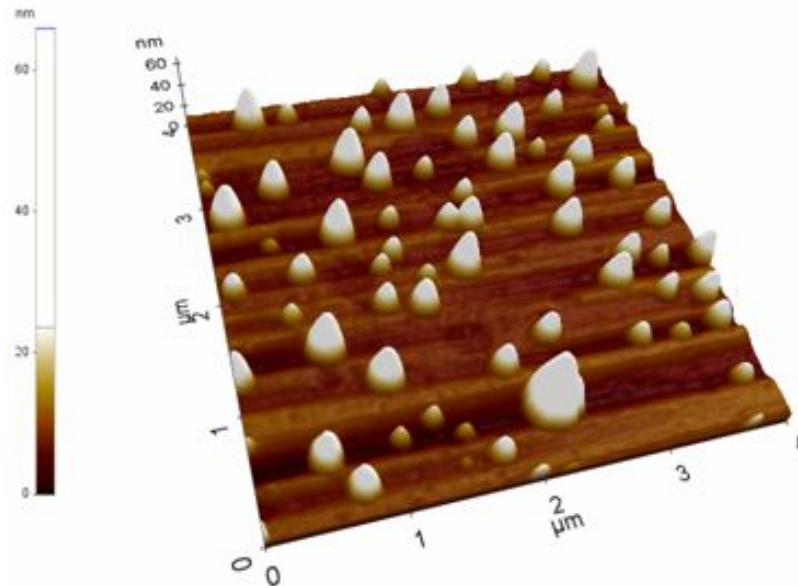


그림 93. PCL 나노입자의 AFM 관찰

폴리에스터의 일종인 polycaprolactone은 많은 고분자들과 상용성을 나타내는 장점이 있으며 (M.Dezhu *et al.*,1996), 그 자체로 완전 생분해될 수 있고 (D.Goldberg *et al.*,1995), 독성이 없으며 기계적 물성이 좋다. PCL은 캡슐화시키는데 있어서 효과적인 벽물질로 작용하여 α -tocopherol (Byun *et al.*, 2010), 단백질 (Cheng *et al.*, 2010), tyrosine kinase inhibitor (Zhang *et al.*, 2008) 등 의 loading system에 중요한 물질 중 하나이다. PCL 농도에 따른 입자 크기의 변화는 없는 것으로 알려져 있다 (Byun *et al.*, 2010).

본 연구에서 PCL 나노입자의 AFM 관찰 사진 결과 물질의 입도가 작을수록 어두운 색을 띄고, 밝아질수록 큰 입자를 갖는다는 것을 보여주었으며 chitosan에 비해 입자의 크기가 균일한 것으로 나타났다.

(나) 분산상 용매 조정을 달리하여 제조한 PCL 나노입자 분석

아래 그림은 분산상 용매의 조정을 달리하여 제조한 PCL 나노입자의 입도와 제타전위를 측정된 결과는 그림 94와 같으며, 캡슐화 효율을 측정된 결과는 그림 95와 같다.

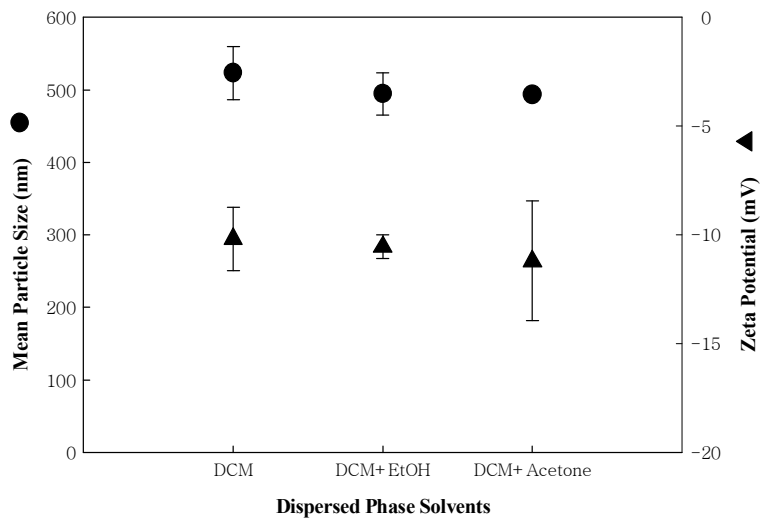


그림 94. 분산상 용매 조정을 달리하여 제조한 PCL 나노입자의 입도 및 제타전위

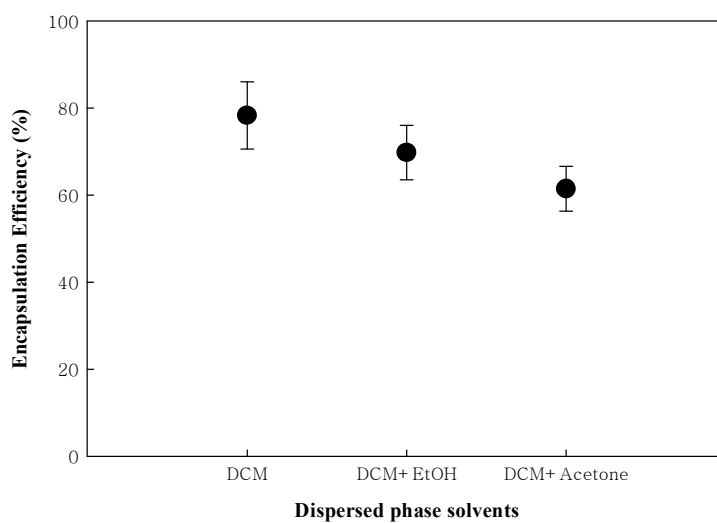


그림 95. 분산상 용매 조정을 달리하여 제조한 PCL 나노입자의 encapsulation efficiency

입도와 제타전위를 측정 결과 dichloromethane만 사용하였을 때 에탄올과 아세톤을 혼합한 경우보다 입도가 크게 측정되었다. 캡슐화 효율의 경우에도 dichloromethane만을 사용한 조건에서 높은 값을 나타내었다.

(다) 분자량에 따른 PCL 나노입자 분석

분자량에 따른 PCL 나노입자의 입도와 제타전위를 측정한 결과는 그림 96과 같았으며, 캡슐화 효율을 측정한 결과는 그림 97과 같다.

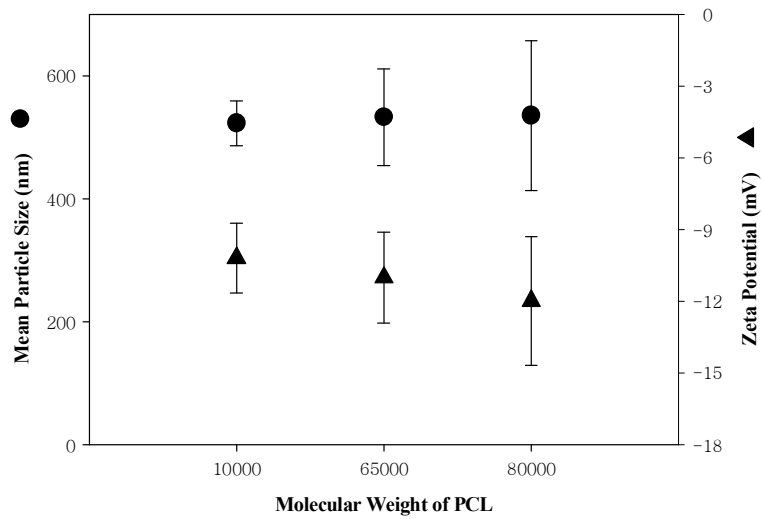


그림 96. 분자량에 따른 PCL 나노입자의 입도 및 제타전위

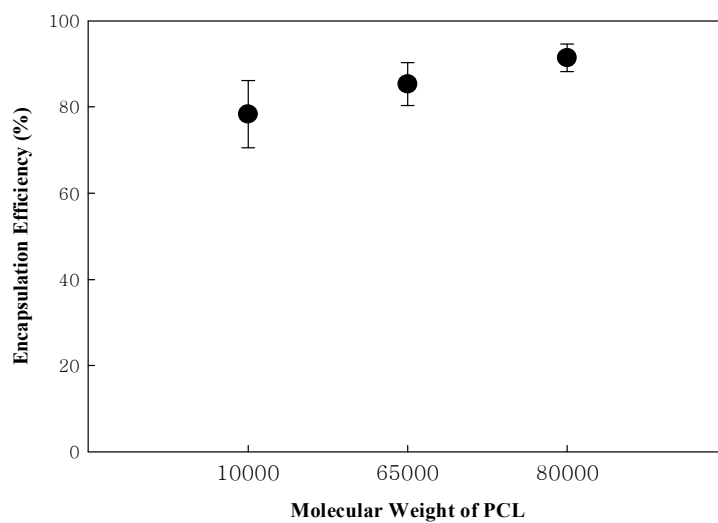
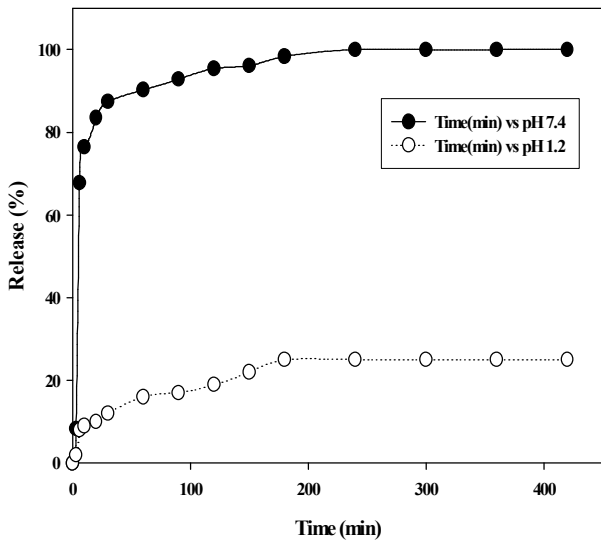


그림 97. 분자량에 따른 PCL 나노입자의 encapsulation efficiency

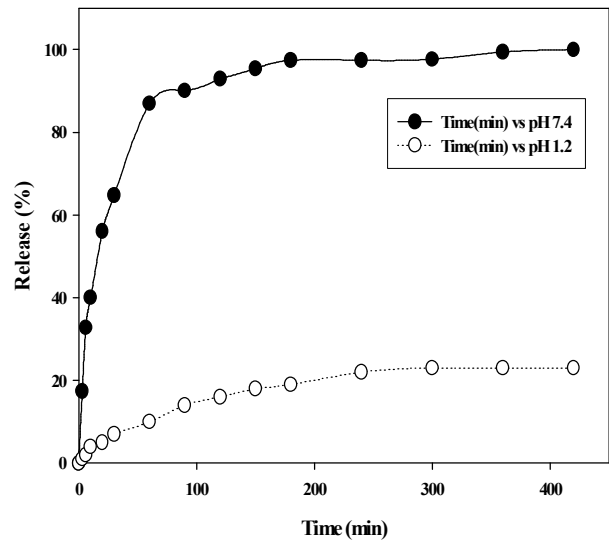
입도 측정 결과 분자량이 증가할수록 입도가 크게 측정되었으며, 제타전위의 경우 분자량이 증가할수록 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타났다. 캡슐화 효율의 경우에는 분자량이 증가할수록 높은 값을 나타내었다.

(라) Alliin-loaded PCL 나노입자의 용출 시험

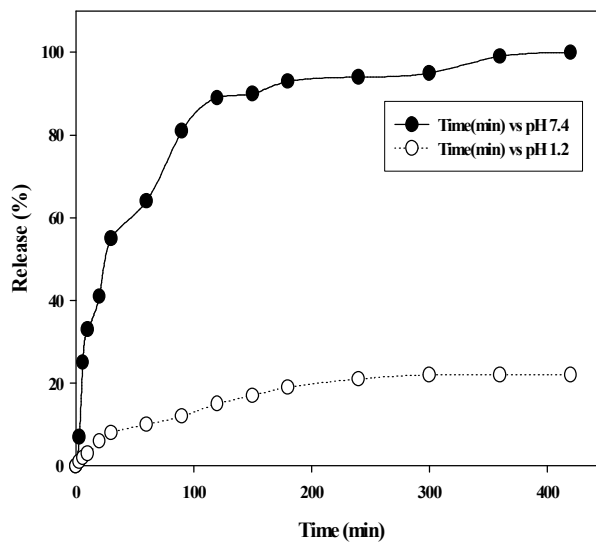
PCL과 DCM을 이용한 alliin의 용출 시험 결과는 그림 98과 같다.



PCL 분자량 10,000



PCL 분자량 65,000



PCL 분자량 80,000

그림 98. Alliin-loaded PCL particle의 용출시험

pH가 높을수록 용출되는 시간이 단축되었으며, PCL의 분자량이 낮을수록 또한 용출 시간이 단축되는 것을 알 수 있었다. 이것은 PCL의 고분자 사슬의 길이가 길어져 core material을 확실하게 감싸게 되어 보다 단단한 캡슐이 만들어지기 때문인 것으로 판단되며, 따라서 PCL의 분자량이 크면 막을 형성하는 능력이 더 좋아진다고 생각할 수 있다. 이러한 결과로 볼 때 분말제품으로의 적합성 평가시 PCL의 분자량이 큰 변수로 작용할 수 있다고 판단된다. 또한 교반속도에 따라 PCL과 DCM을 이용하여 나노입자를 만들어 용출 시험을 할 때 교반속도가 빨라짐에 따라 캡슐의 크기는 작아지며 3000 rpm이 4000이나 5000 rpm보다 더 적게 용출되었다 (Kim *et al.*, 2008).

3. 유효성분 함유 NSM system의 기능성 평가 시스템 개발

가. 유효성분 함유 NSM system의 저장 안정성 평가

(1) 초고압균질기에 의한 O/W emulsion 제조

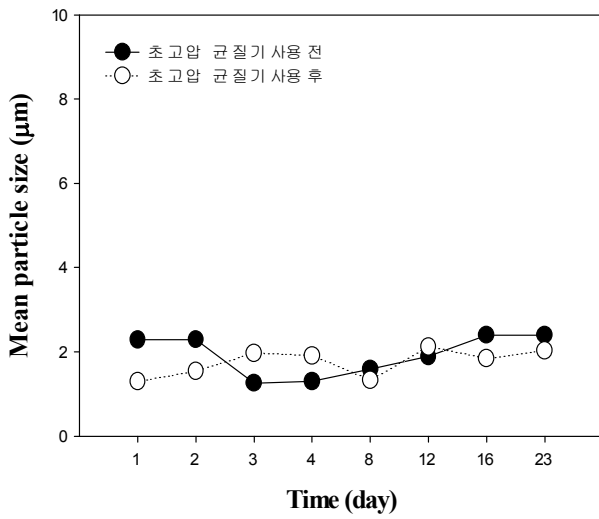
(가) 계면활성제로 Tween 80과 lecithin 이용

Lecithin은 피부 구성물질인 phospholipid의 일종으로 일반 계면활성제에 비해 안전성이 우수하여 화장품, 식품, 의약품 주사제로 사용되고 있으나 표면 및 계면 장력은 기존의 non-ionic surfactant보다 높아 사용하기가 약간 어려운 단점이 있다고 알려져 있다 (Bae and Shin, 2000). lecithin의 alkyl기에는 불포화 지방산이 많이 포함되어 있고 원료 자체의 안정성 등에 문제가 있어 수소를 첨가시킨 수첨 lecithin을 사용하는 경우가 많다. 수첨 lecithin은 lecithin보다 산화 안정성이 좋고 탈색, 탈취 효과도 있어 장기 안정성이 요구되는 화장품에서 많이 사용되고 있다고 한다 (Hara *et al.*, 1986). Tween 80은 식품 중에서, 특히 아이스크림에서 유화제로 쓰인다. Tween 80을 0.5% 이상의 농도로 가하게 되면, 아이스크림을 부드럽게 만들 수 있다. 이 물질을 넣음으로서 우유 단백질이 지방입자에 완전히 코팅되는 것을 막을 수 있다. 이것은 아이스크림이 녹는 것 같은 모양을 잡아주거나 혼합액에 공기를 포집해주는 것 등 체인과 그물로 함께 엮어져 있는 것이다 (Douglas *et al.*, 1997).

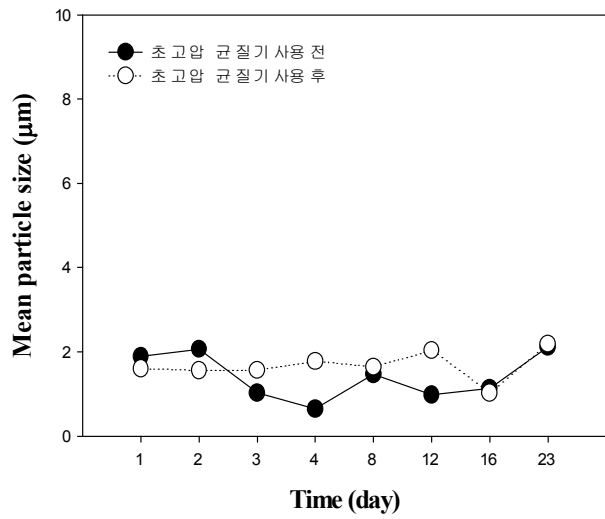
① 계면활성제 (Tween 80과 lecithin) 및 oil의 비율을 달리한 에멀전의 제조

㉠ 1% Tween 80 이용

Aqueous phase : Surfactant : Oil을 10 : 1 : 1 및 10 : 1 : 3으로 고정하고 oil phase로서 corn oil을 사용하여 제조한 에멀전의 저장기간에 따른 입도변화를 분석한 결과는 그림 99와 같으며, 23일이 지난 후 입도가 크게 변화하지 않고 안정된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 계면활성제인 Tween 80이 1%인 경우 oil의 비율에 따라서 큰 입도차이를 나타내지 않았으며, 이 경우 초고압 균질기 사용 여부에 따라서도 입도 차이를 나타내지 않았다.



10 : 1 : 1

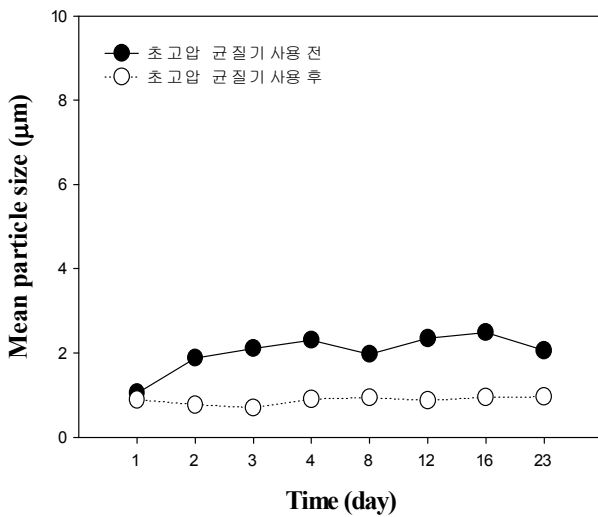


10 : 1 : 3

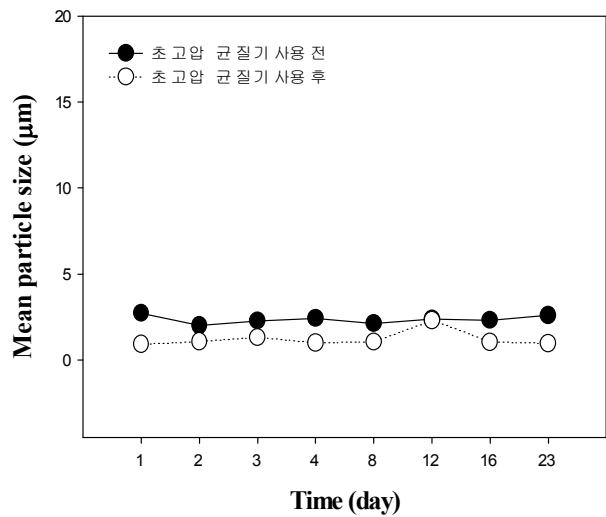
그림 99. 1% Tween 80을 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간에 따른 평균입도 변화

㉞ 2% Tween 80 이용

계면활성제인 Tween 80의 농도를 2%로 증가시켜서 Aqueous phase : Surfactant : oil을 10 : 2 : 1 및 10 : 2 : 3으로 고정하고 oil phase로서 옥수수유를 사용하여 제조한 에멀전의 저장기간에 따른 입도변화를 분석한 결과는 그림 100과 같다.



10 : 2 : 1



10 : 2 : 3

그림 100. 2% Tween 80을 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간에 따른 평균입도 변화

23일이 지난 후 입도가 크게 변화하지 않고 안정된 것을 확인할 수 있었으며, 계면활성제가 낮은 (1%)인 경우에 비해서 초고압 균질기 사용 여부에 따른 입도 차이가 발생한 것을 알 수 있었다. 이는 lecithin의 농도가 약 2%는 되어야 안정성이 높아진다고 한 연구 결과와도 일치한다 (Bae and Shin, 2000). Oil의 함량의 경우 낮은 (1%)인 경우 높은 (3%) 경우에 비해서 균질기에 의한 안정성이 확연하게 나타난 것을 확인하였다.

㉔ Tween 80과 lecithin 이용한 O/W 에멀전의 표면 사진

계면활성제로 Tween 80과 lecithin을 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간에 따라 사진으로 관찰한 결과는 그림 101과 같이 나타났다. 사진에 나타난 바와 같이, 초고압 균질기에 의해서 에멀전의 안정성이 크게 증대되는 것을 알 수 있었다.

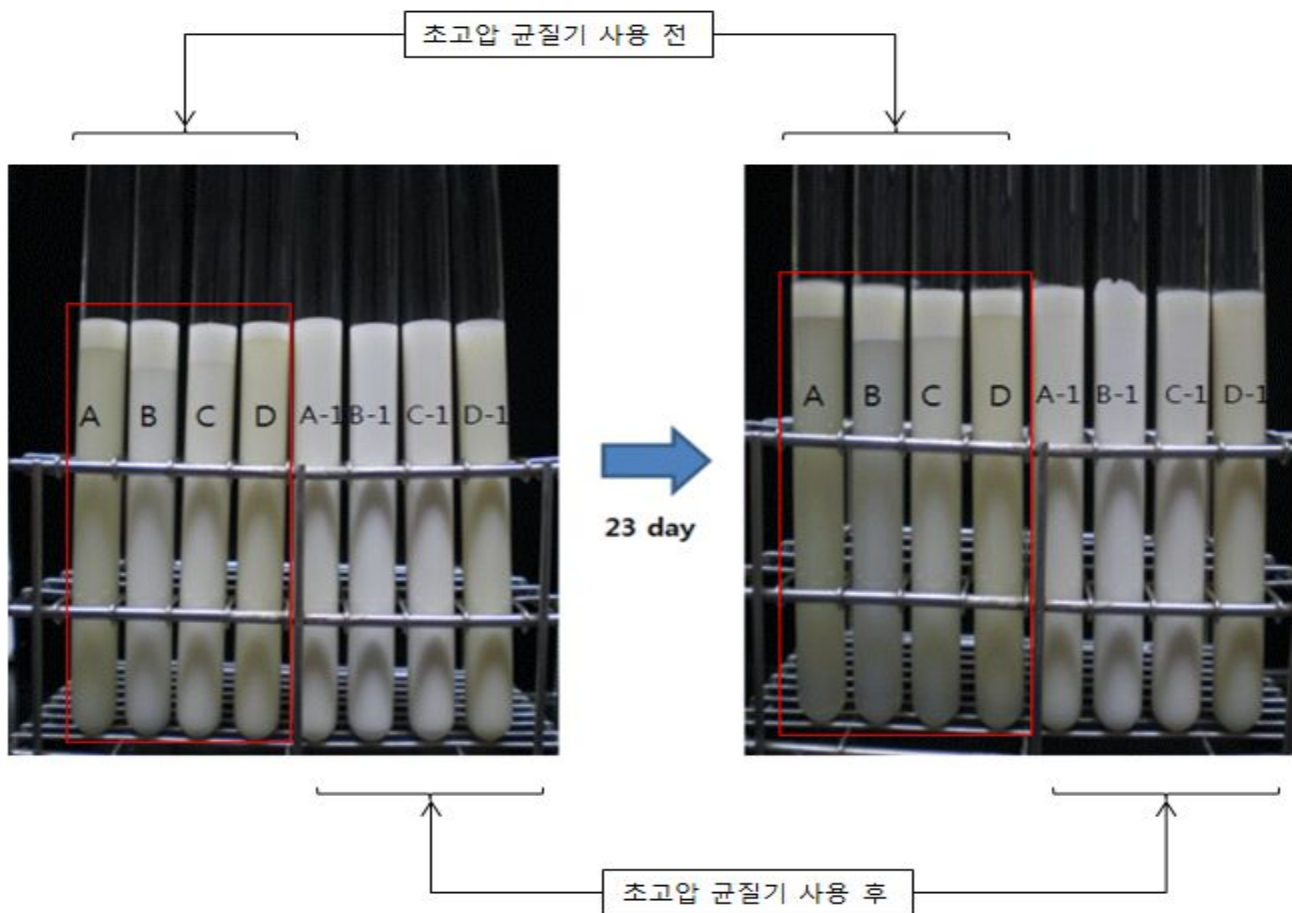


그림 101. Tween 80과 lecithin을 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간에 따른 사진 관찰 (A 및 A-1: aqueous phase : surfactant : oil = 10 : 1 : 1, B 및 B-1: aqueous phase : surfactant : oil = 10 : 1 : 3, C 및 C-1: aqueous phase : surfactant : oil = 10 : 2 : 3, D 및 D-1: aqueous phase : surfactant : oil = 10 : 2 : 1)

(나) 계면활성제로 PGMS와 PGPR 이용

① 계면활성제 (PGMS 및 PGPR)의 비율을 달리한 에멀전의 제조 및 저장안정성

㉠ 상온에서의 저장안정성

PGMS 및 PGPR을 사용하고 그 비율을 달리하여 초고압균질기로 균질화 시킨 에멀전의 상온에서의 저장기간에 따른 안정성 평가를 위해 입도를 측정 한 결과는 그림 102와 같이 나타났으며, 에멀전의 표면 사진은 그림 103과 같았다. 약 2주간 상온에서의 저장 안정성 시험을 해 본 결과 PGPR에 비해서 PGMS의 경우 높은 안정성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 위의 에멀전 관찰 사진에서 보여진 바와 같이, PGMS를 사용하였을 때 2주간 상분리가 발생하지 않은 반면, PGPR의 경우 2주 정도 지나서 상분리가 발생하는 것을 확인할 수 있었다.

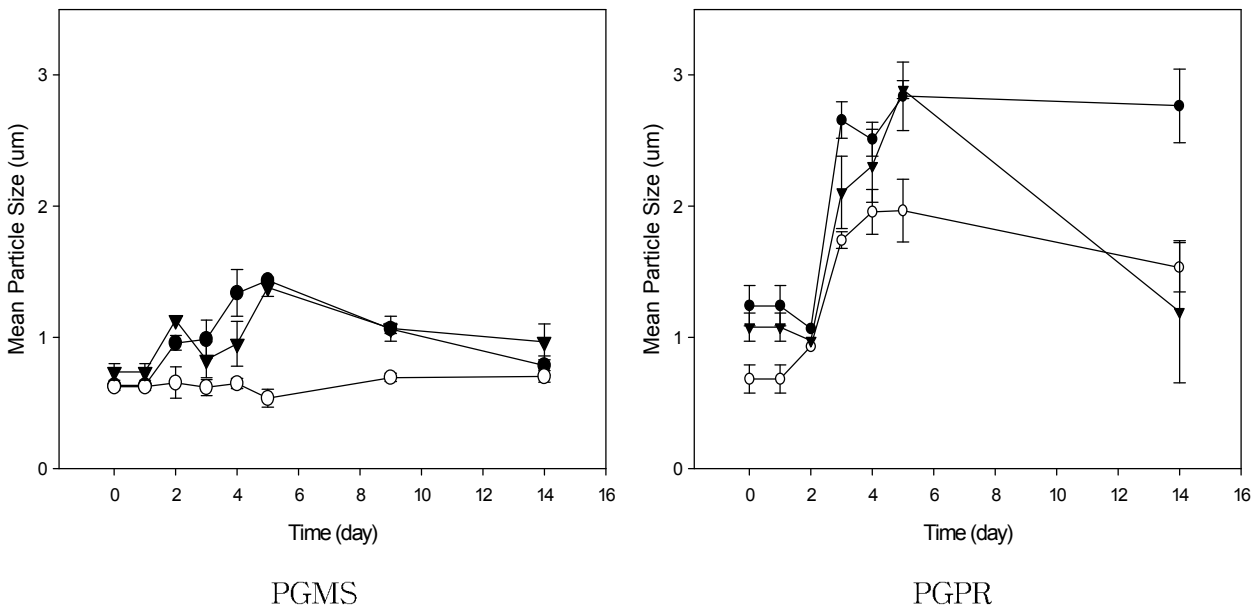


그림 102. PGMS와 PGPR의 비율 (●: 0.5%, ○: 1%, ▼: 2%)을 달리하고 초고압 균질기를 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간 (상온조건)에 따른 평균입도 변화 (초고압 균질기 압력: 300bar, O : W = 1 : 10)

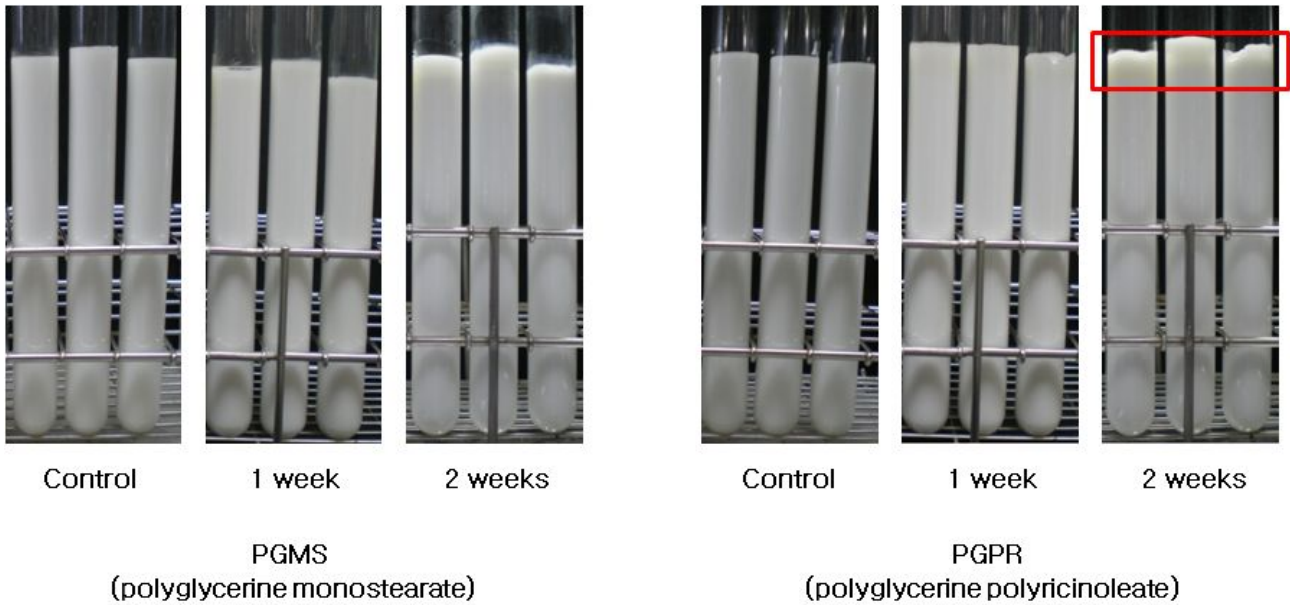


그림 103. 상온 조건에서 시간에 따른 에멀전의 표면 관찰 사진

㉔ 냉장조건에서의 저장안정성

PGMS 및 PGPR을 사용하고 그 비율을 달리하여 초고압균질기로 균질화 시킨 에멀전의 냉장 조건에서의 저장기간에 따른 안정성 평가를 위해 입도를 측정 한 결과는 그림 104와 같았다.

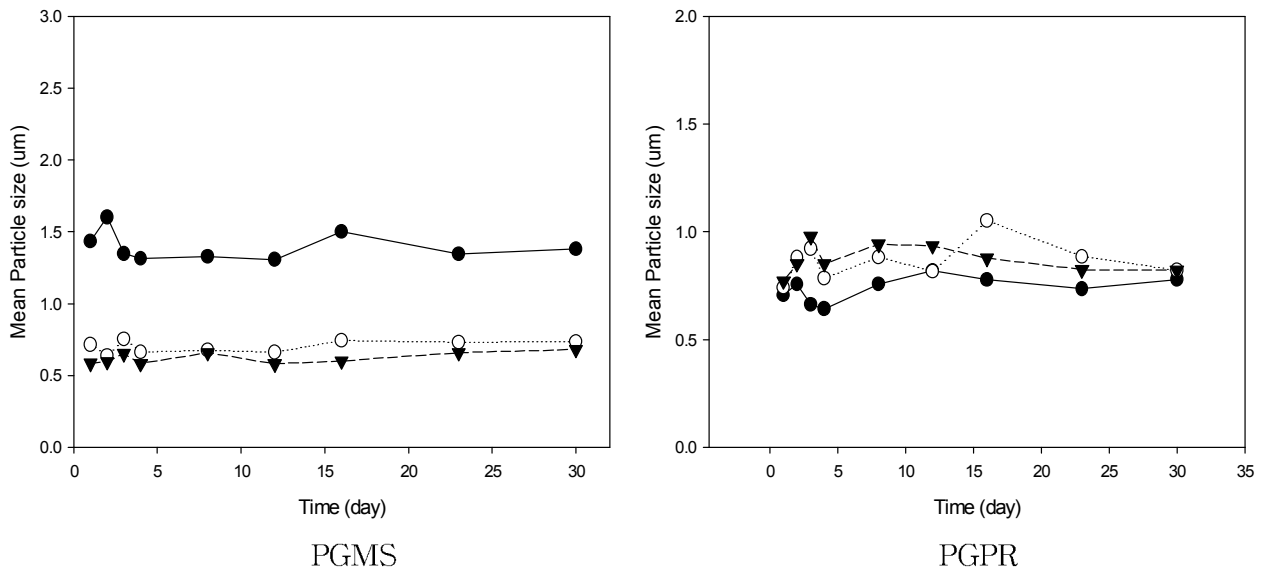


그림 104. PGMS와 PGPR의 비율 (●: 0.5%, ○: 1%, ▼: 2%)을 달리하고 초고압 균질기를 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간 (냉장조건)에 따른 평균입도 변화 (초고압 균질기 압력: 300bar, O : W = 1 : 10)

초고압 균질기를 사용한 경우 저장기간 (약 30일)이 지남에 따라 입도가 일정하게 유지되는 것으로 볼 때, 일반적인 에멀전에 비해서 초고압균질기를 사용할 경우 그 안정성이 크게 증대되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 PGMS에 비해서 PGPR의 경우 작은 입도를 나타내었으며, PGPR에 비하여 PGMS의 경우 1% 이상 사용할 경우 그 입도의 안정성이 크게 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

㉔ 냉동/해동 (Freeze & Thaw) 반복에 따른 안정성 평가

1-1) PGPR 이용

PGPR을 이용하여 제조한 에멀전에 대하여 냉동 및 해동을 반복함에 따른 에멀전의 변화를 관찰한 사진은 그림 105와 같다. 계면활성제로서 PGPR을 이용하여 제조한 에멀전의 경우 냉동/해동을 반복함에 따라서 에멀전의 상분리가 발생하는 것을 확인하였다.

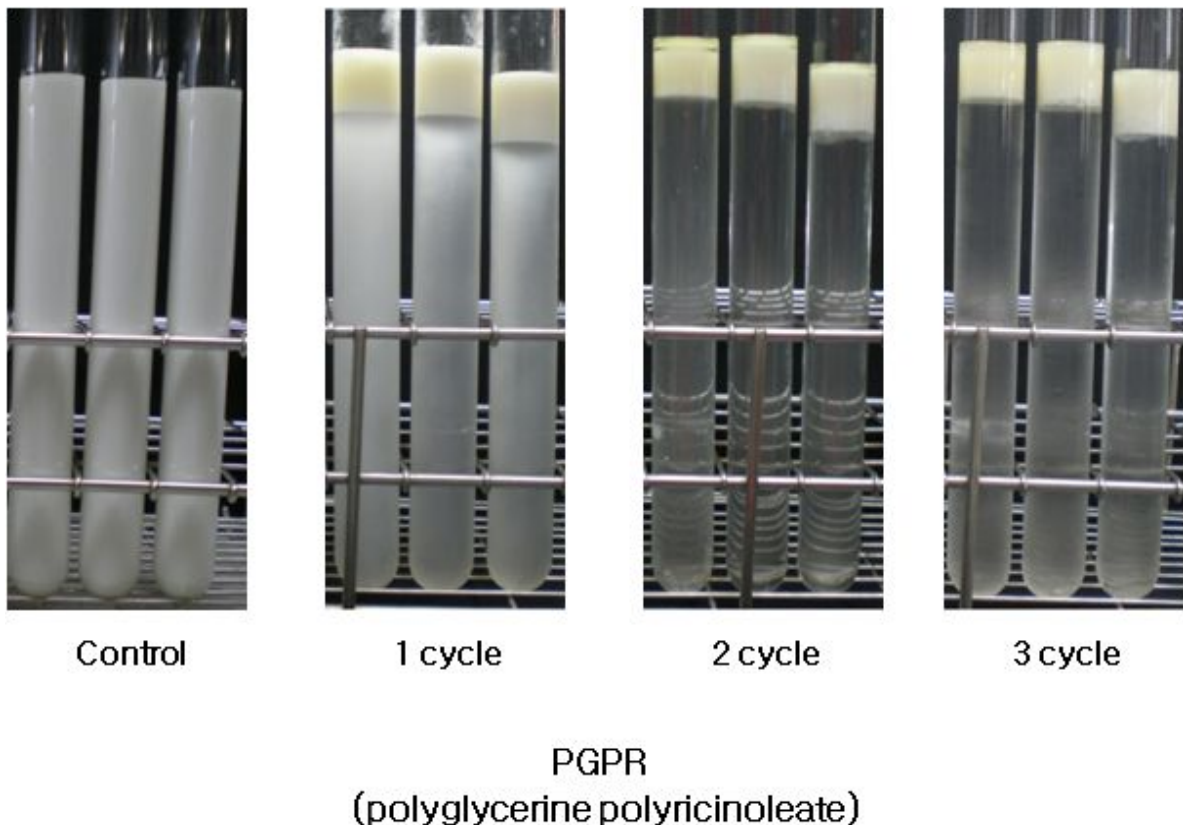


그림 105. PGPR을 이용하여 제조한 에멀전의 냉동/해동 반복에 따른 안정성 평가를 위한 관찰 사진 1-2) PGMS 이용

PGMS를 이용하여 제조한 에멀전에 대하여 냉동 및 해동을 반복함에 따른 에멀전의 변화를 관찰한 사진은 그림 106과 같이 나타났다. PGMS를 계면활성제로 사용하였을 때 냉동/해동을 3번 반복하여도 사진상으로 상분리가 발생하지 않는 것을 알 수 있었고, 입도 역시 크게 증가하지 않는 것으로 나타났다. 이에 PGMS가 본 시스템에서의 에멀전 제조에 적합함을 나타내는 결과이다.

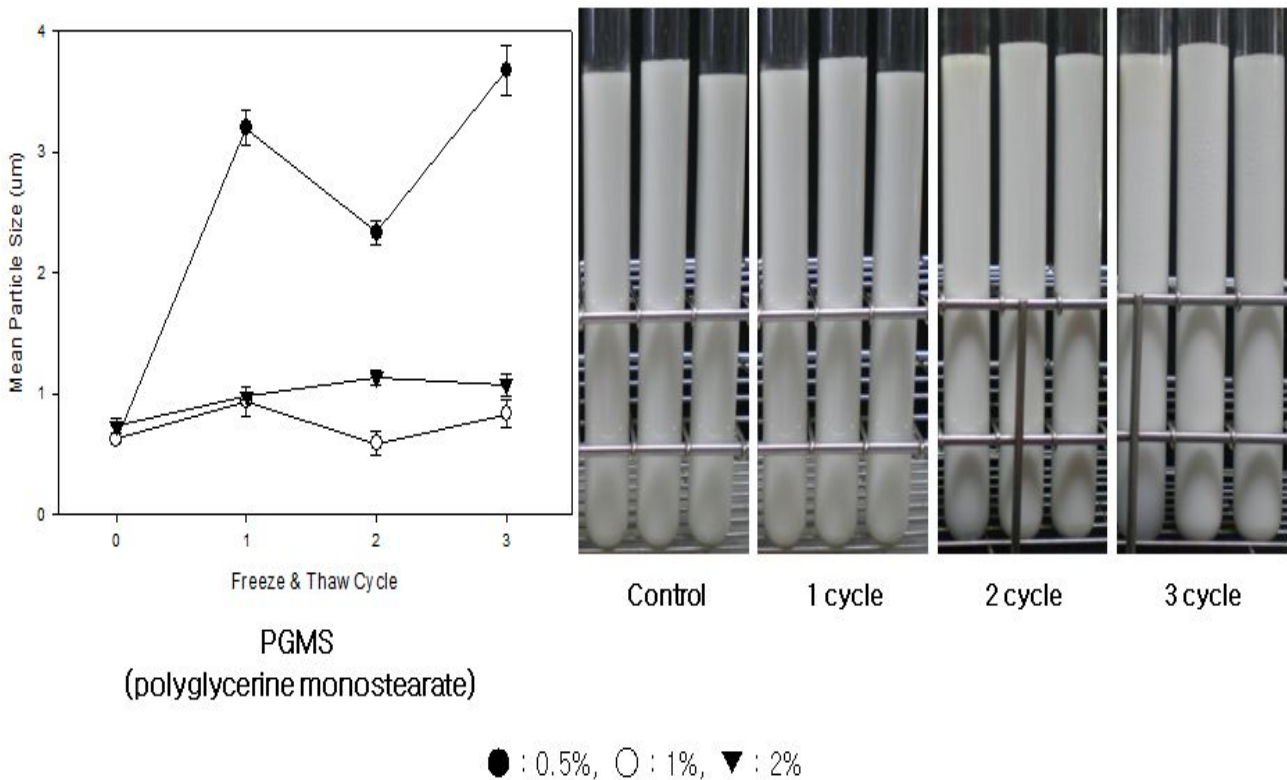
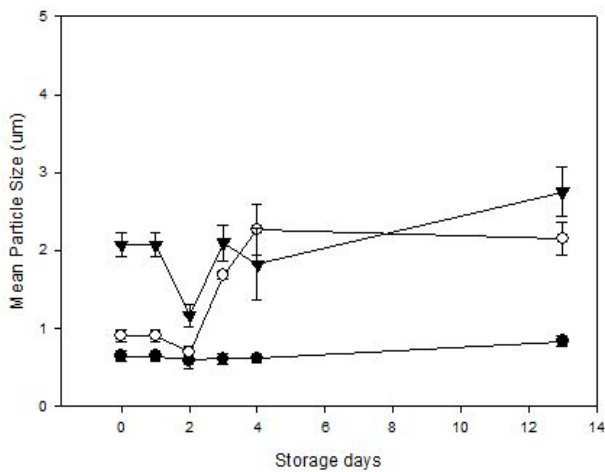


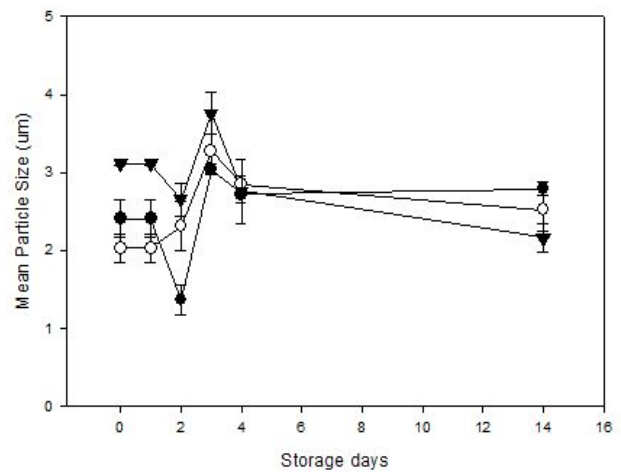
그림 106. PGMS를 이용하여 제조한 에멀전의 냉동/해동 반복에 따른 입도 변화 측정 및 안정성 평가를 위한 관찰 사진

② Oil의 비율을 달리하여 제조한 에멀전의 저장 기간에 따른 안정성 평가

PGMS 및 PGPR을 사용하고 초고압균질기를 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 시간에 따른 입도 변화를 관찰한 결과는 그림 107과 같고, 표면 관찰 사진은 그림 108과 같이 나타났다. 약 2주간 저장 안정성 시험을 한 결과, 두 가지 계면활성제 모두 입도 변화가 크게 나타나지 않은 것을 확인하였으며, 특히 PGMS의 경우 oil의 비율이 낮을수록 입도가 더 낮게 나타났으며, 그 변화도 훨씬 적게 나타났다.



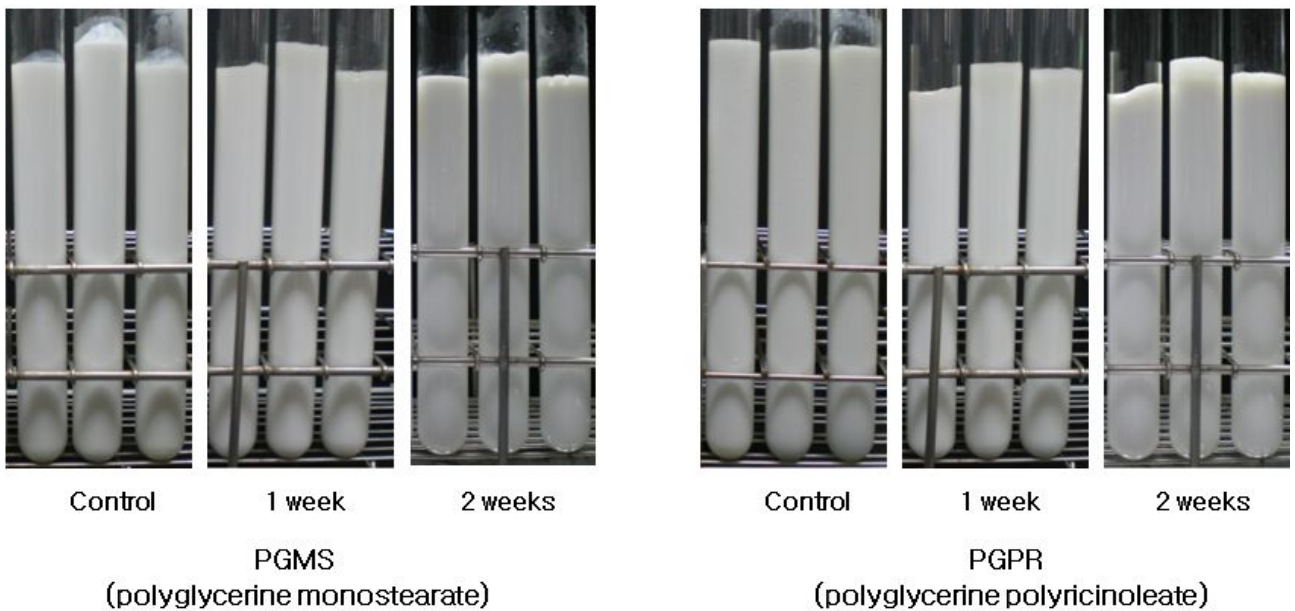
PGMS
(polyglycerine monostearate)



PGPR
(polyglycerine polyricinoleate)

● : (0.5:10), ○ : (3:10), ▼ : (5:10)

그림 107. 계면활성제 및 O : W 비율을 달리하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간 (상온)에 따른 입도 변화



Control 1 week 2 weeks

PGMS
(polyglycerine monostearate)

Control 1 week 2 weeks

PGPR
(polyglycerine polyricinoleate)

● : (0.5:10), ○ : (3:10), ▼ : (5:10)

그림 108. 계면활성제 및 O : W 비율을 달리하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간 (상온)에 따른 표면 관찰 사진

③ Chitosan을 이용한 O/W 에멀전의 제조

Aqueous phase wall material로서 chitosan (1%)를 사용하여 O/W 에멀전을 제조한 후 계면활성제의 종류 및 농도, O : W 비율 등에 따라서 입도 및 제타전위를 측정된 결과는 그림 109와 같다. 제타전위의 경우 에멀전 droplet의 안정성을 나타내는 중요한 인자 중의 하나이므로 이에 대한 측정을 통하여 안정성 여부를 확인하는데 사용 가능하다. 이에 chitosan을 이용하여 에멀전을 제조하였을 때, 약 50 mV 수준의 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 매우 안정된 값을 나타낸다.

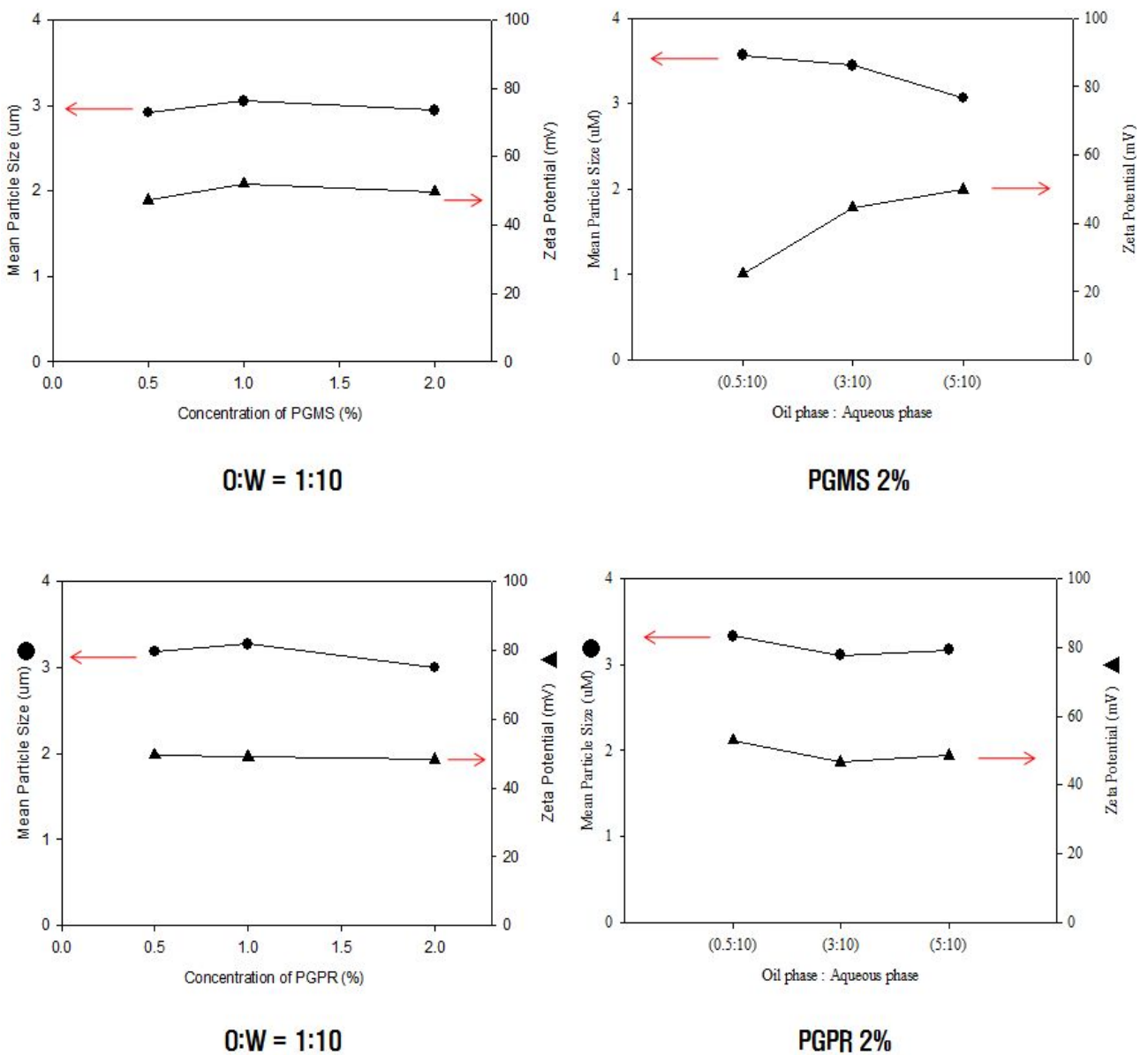


그림 109. O/W (1% chitosan) 에멀전의 입도 및 제타전위

㉔ Chitosan을 이용한 O/W 에멀전의 저장안정성

Chitosan을 이용하여 제조한 O/W 에멀전의 저장기간 (상온 및 냉장)에 따른 표면을 관찰한 결과는 각각 그림 110, 111과 같이 나타났다.

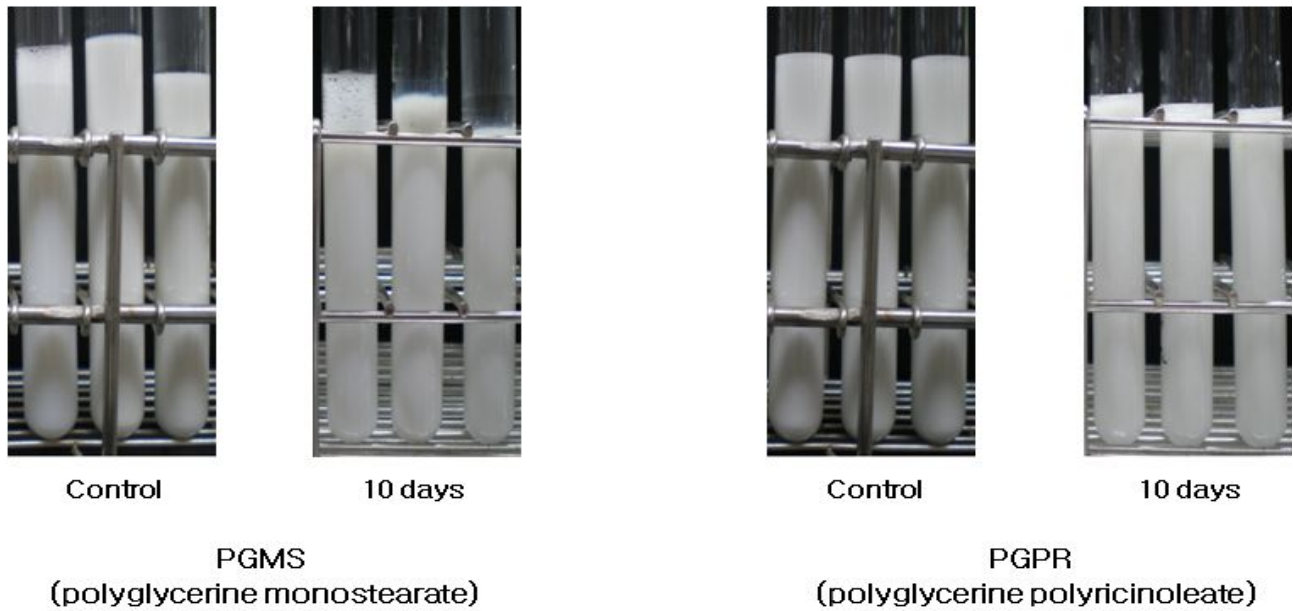


그림 110. O/W (1% chitosan) 에멀전의 저장기간 (상온)에 따른 표면 관찰 사진

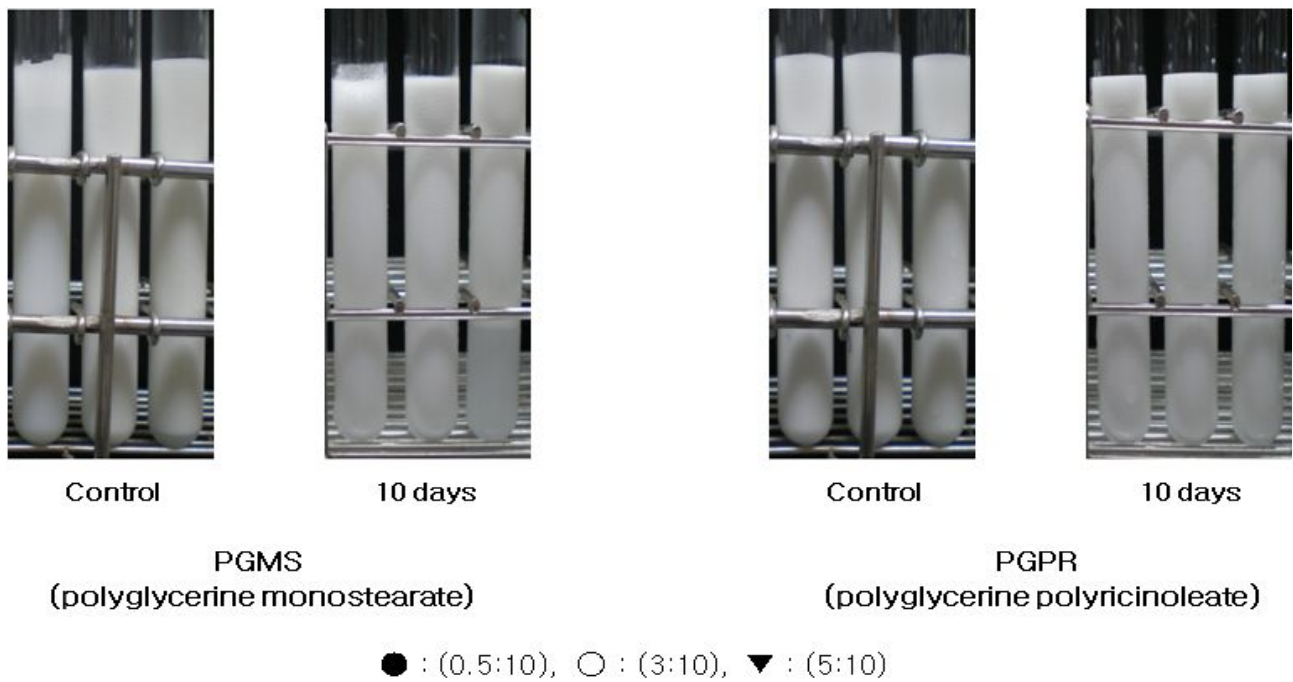


그림 111. O/W (1% chitosan) 에멀전의 저장기간 (냉장)에 따른 표면 관찰 사진

상온에서 10일 동안 안정성시험을 한 결과, PGMS와 PGPR 모두 상분리가 발생하지 않았고, 또한 O : W 비율이 증가하더라도 큰 차이를 나타내지 않았다. 냉장조건에서 10일 동안 안정성시험을 한 결과, PGMS의 경우 O : W 비율이 높은 시료구 (5 : 10)에서 상분리가 발생하였으나, PGPR을 사용한 경우 큰 변화를 나타내지 않았다.

④ Chitosan과 alginate를 이용한 O/W/W 에멀전의 제조

Chitosan과 alginate를 이용하여 제조한 O/W/W 에멀전의 입도 및 제타전위를 나타낸 결과는 그림 112와 같이 나타났다. Chitosan만을 사용한 것과는 달리 alginate의 음의 전하로 인해 제타전위 값이 -20 mV 수준으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 chitosan과 alginate의 이온결합이 발생하였으며, chitosan과 alginate의 농도차로 인해 (비율로 1 : 2를 사용하였음) 음의 값으로 전이된 것을 의미한다. 따라서 alginate의 농도를 조절함으로써 더욱 안정성 높은 O/W/W 에멀전을 제조할 수 있는 것으로 나타났다.

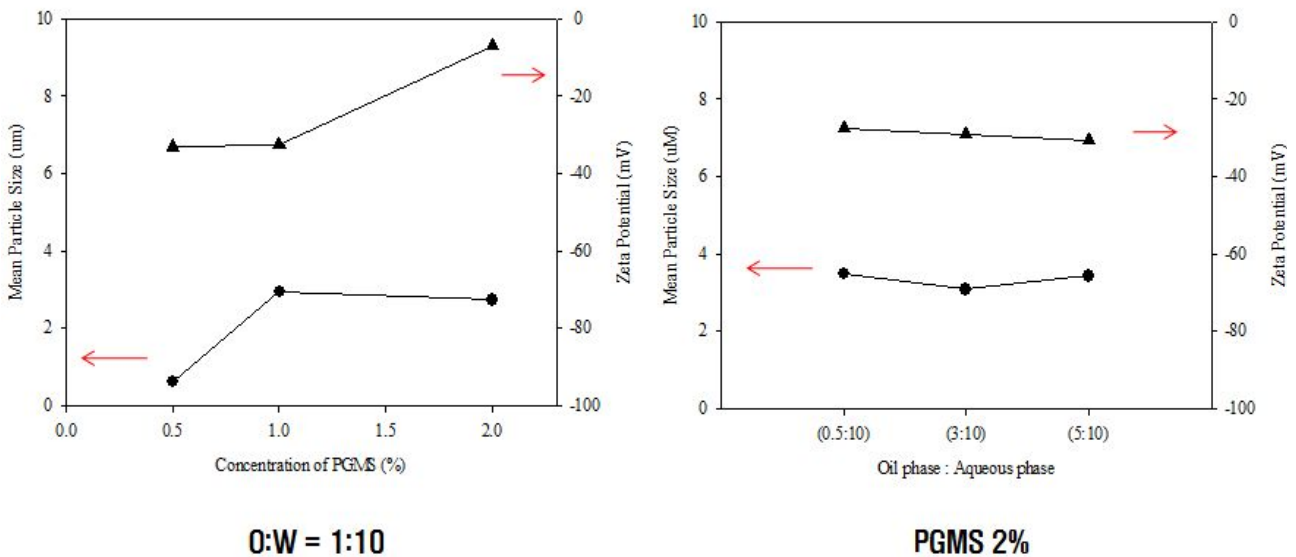


그림 112. O/W(Chitosan)/W(alginate)의 입도 및 제타전위

⑤ O/W/W 에멀전의 점도 측정

O/W/W 에멀전의 점도를 측정된 결과는 그림 113과 같이 나타났으며, 고분자를 사용하지 않은 경우보다 고분자를 사용할 경우 점도 값이 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 alginate를 추가적으로 사용하였을 때 점도 값이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 일반적으로 에멀전의 점도를 증가시킴으로써 에멀전 droplet의 상분리를 저해할 수 있는 연구결과와 일치하며, 이를 통하여 에멀전의 안정성과 점도 간의 상관성을 비교할 수 있는 결과이다.

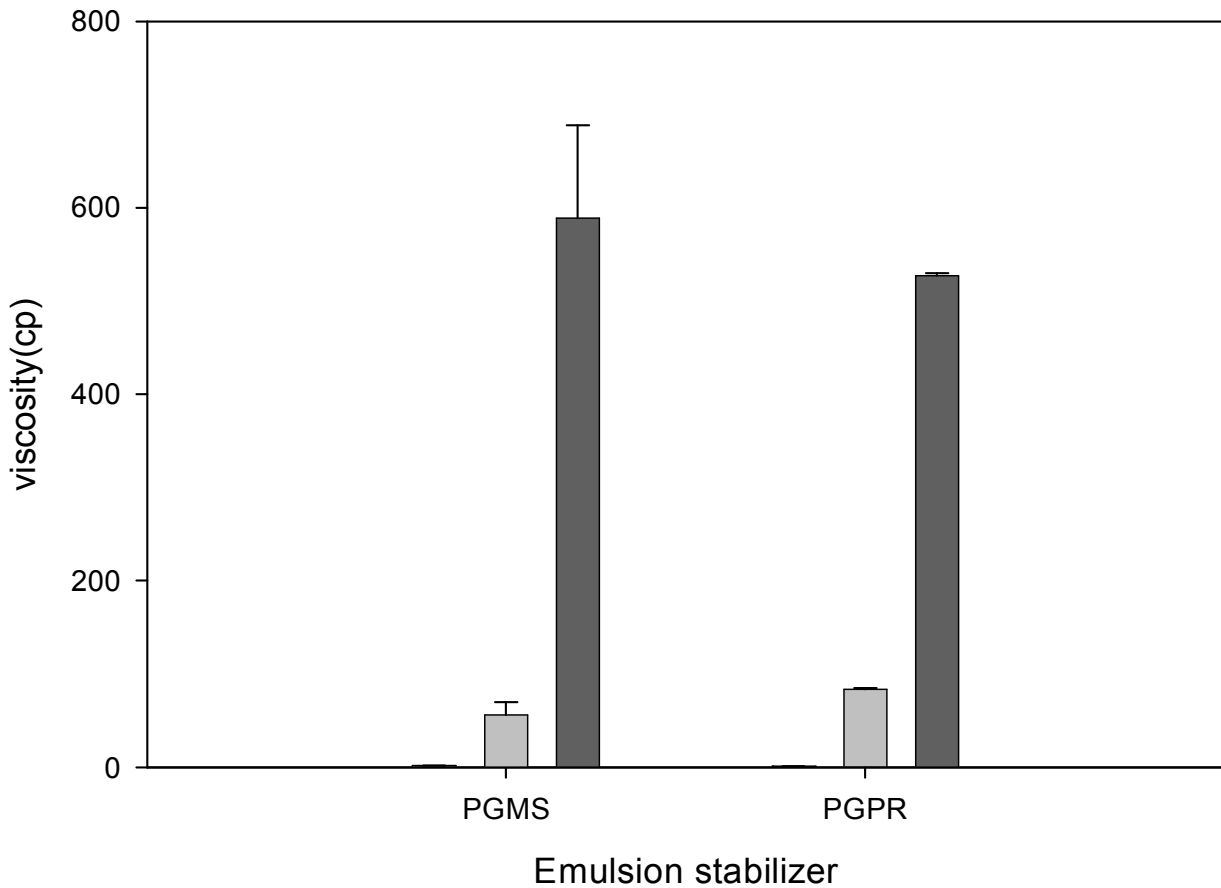


그림 113. O/W(chitosan)/W(alginate)의 점도 측정

(2) 마늘 추출물을 이용한 에멀전의 안정성 평가

(가) 마늘 추출물을 이용한 W/O/W 에멀전 제조

① 저장기간 동안 마늘 추출물과 W/O/W 에멀전의 전자공여능

㉞ 에탄올의 농도를 달리한 마늘 추출물의 저장안정성

저장기간 동안 에탄올의 농도별로 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과는 그림 114와 같이 나타났다.

약 3주간 동안 에탄올의 농도를 달리하여 냉장, 상온 및 40℃에 저장한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 같은 추출물은 온도를 달리하였을 경우에도 비슷한 전자공여능을 보

였으며, 4일째에 가장 높은 활성을 보였다.

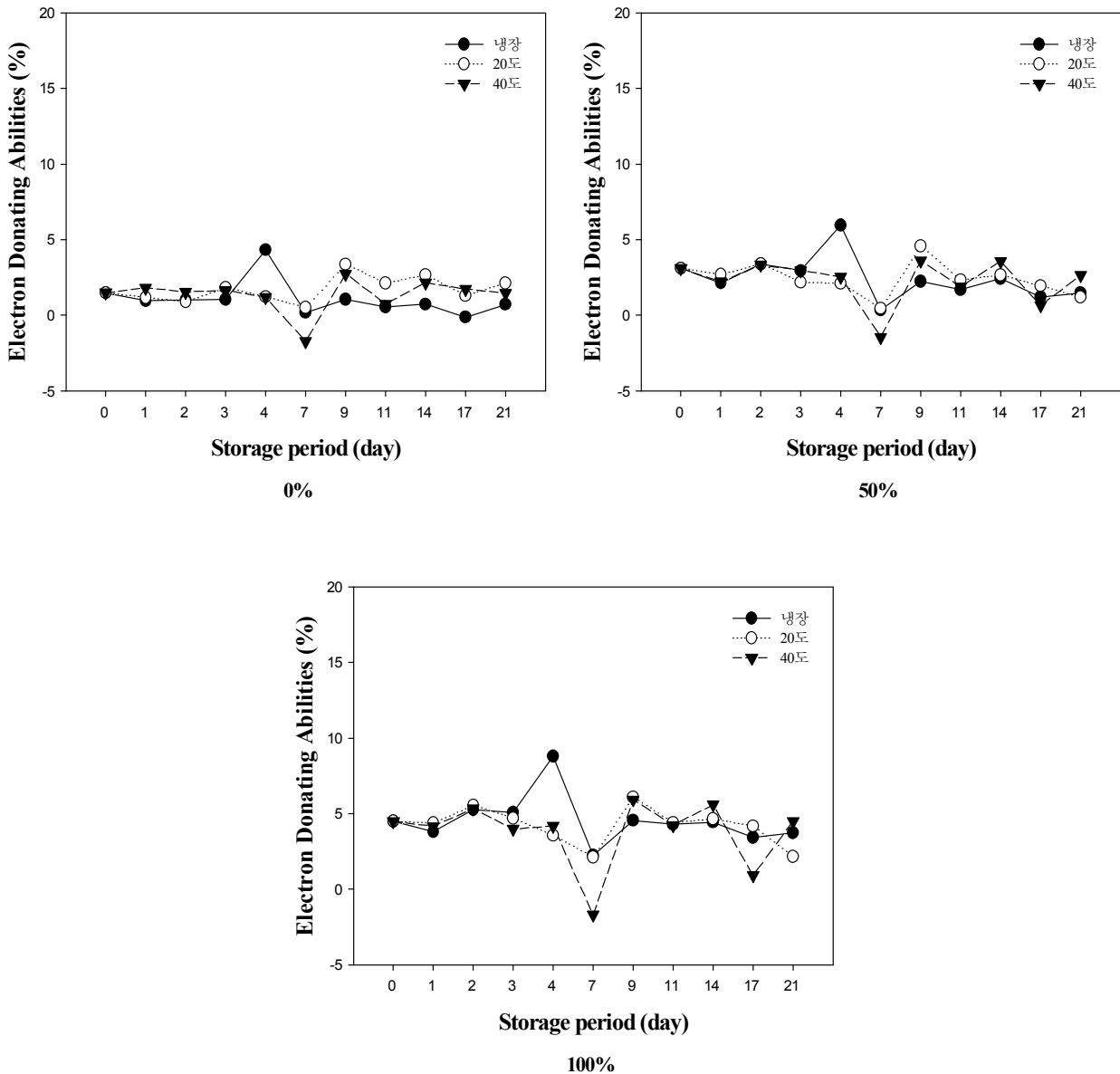


그림 114. 에탄올의 농도를 달리하여 저장한 마늘 추출물의 전자공여능

㉞ 온도를 달리한 마늘 추출물의 저장안정성

저장기간 동안 온도를 달리하여 에탄올의 농도별로 제조한 마늘 추출물의 전자공여능을 측정된 결과는 그림 115와 같다.

약 3주 동안 마늘추출물의 온도를 달리하여 전자공여능을 측정된 결과, 100% 에탄올 추출구에서 가장 높은 전자공여능을 보였으며, 0% 에탄올 추출구에서 가장 낮은 전자공여능을 보였다. 냉장 보관 시 4일이 경과한 뒤에 가장 높은 전자공여능을 보였으며, 7일부터는 일정한

전자공여능을 나타내었다. 상온 보관 시에는 7일까지는 점차 전자공여능이 감소하다가 9일에 가장 높은 전자공여능을 보였으며, 그 후 다시 감소하는 것으로 나타났다. 40°C 보관 시 7일이 경과한 뒤에는 가장 낮은 전자공여능을 보였다. 냉동 보관을 하였을 경우에는 냉/해동을 반복 하였을 때 전자공여능이 증가하는 것으로 나타났다.

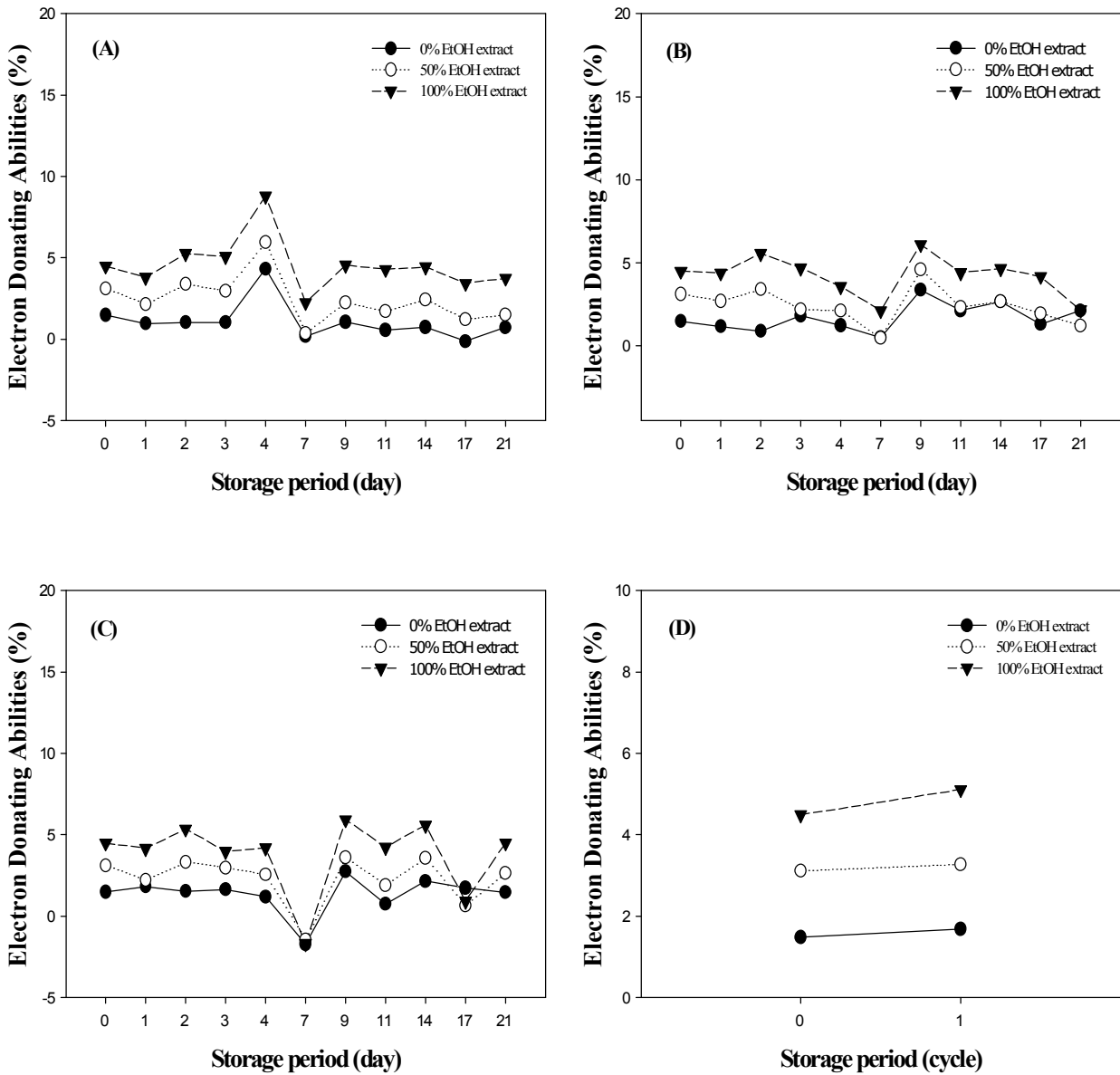


그림 115. 온도를 달리하여 저장한 마늘 추출물의 전자공여능 ((A): 냉장 보관, (B): 상온 보관, (C): 40°C 보관 (D): 냉동 보관)

㉔ 에탄올의 농도를 달리한 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 저장안정성

저장기간 동안 에탄올의 농도별로 제조한 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 전자공여능을

측정한 결과는 그림 116과 같이 나타났다.

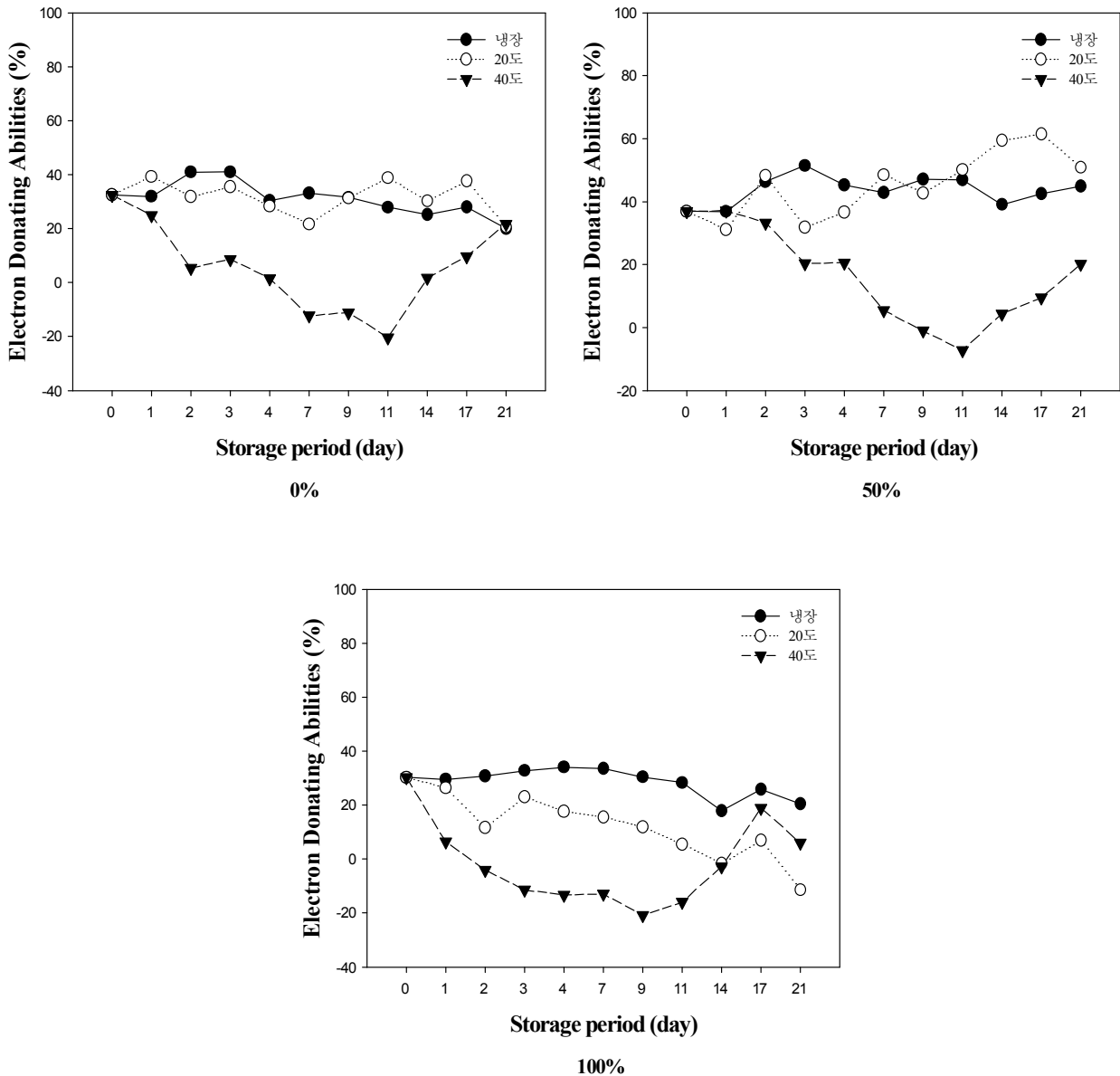


그림 116. 에탄올의 농도를 달리하여 저장한 마늘 추출물 에멀전의 전자공여능

마늘 추출물 에멀전을 저장기간 (약 21일)이 지남에 따라 전자공여능은 점차 감소하는 것으로 나타났다. 0% 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 경우 냉장과 상온 보관 시 전자공여능이 점차 감소하였으나 40°C에서 보관한 W/O/W 에멀전의 경우에는 급격히 감소하다가 11일이 경과한 후에 전자공여능이 증가하는 것으로 나타났다. 50% 마늘 추출물의 W/O/W 에멀전은 냉장과 상온 보관 시 저장기간이 지남에 따라 전자공여능이 점차 증가하는 것으로 나타났으며, 40°C에서 보관하였을 경우에는 0% 마늘 추출물 W/O/W 에멀전과 마찬가지로 감소하다가 11

일이 경과한 후에 전자공여능이 증가하는 것으로 나타났다. 100% 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 경우에는 냉장과 상온 보관 시에는 점차 전자공여능이 감소하는 것으로 나타났으며, 40°C에서 보관한 경우에는 점차 감소하다가 17일이 경과한 후에는 전자공여능이 증가하는 것으로 나타났다.

㉔ 온도를 달리한 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 저장안정성

저장기간 동안 온도를 달리하여 에탄올의 농도별로 제조한 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 전자공여능을 측정된 결과는 그림 117과 같이 나타났다.

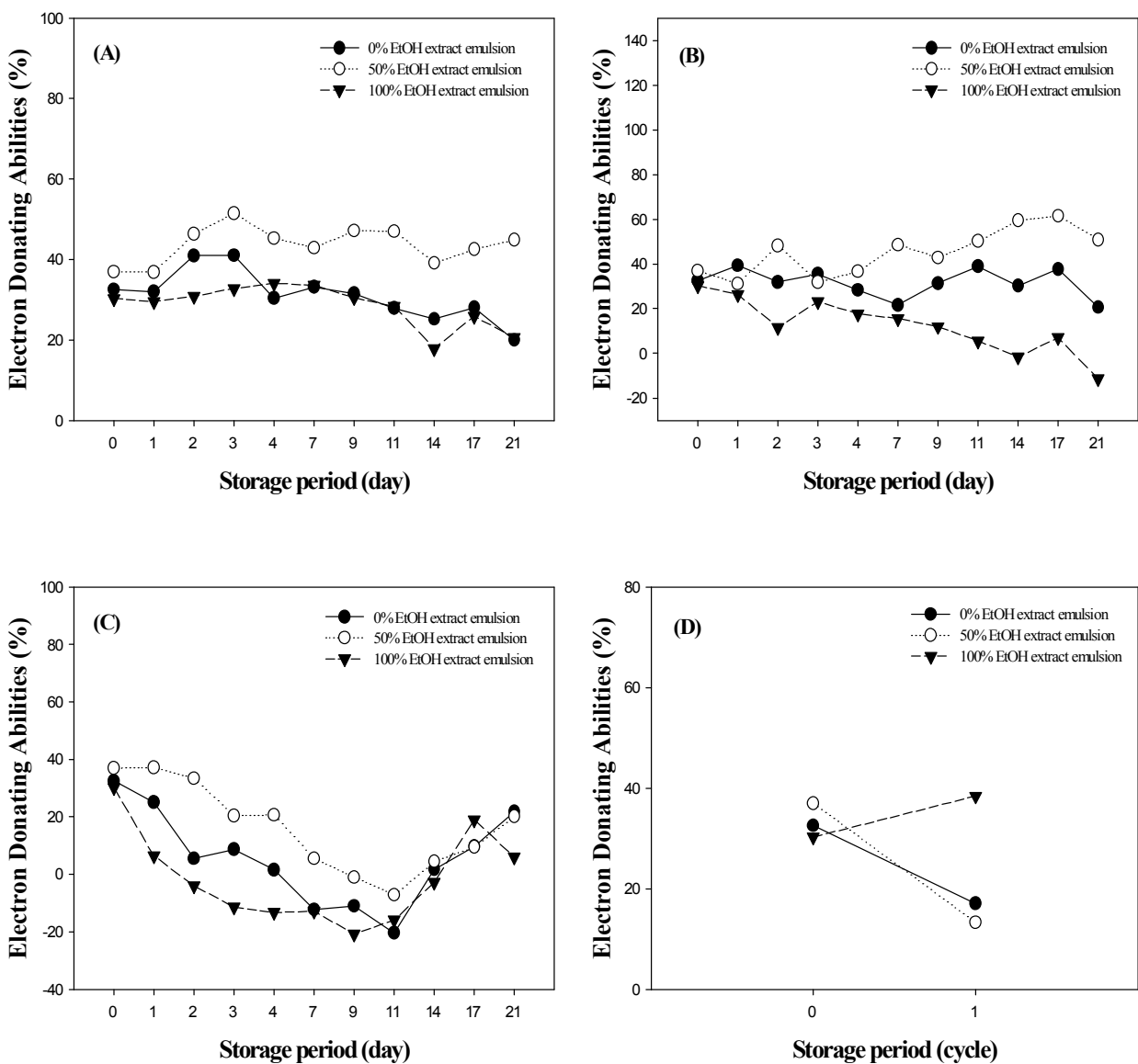


그림 117. 온도를 달리하여 저장한 마늘 추출물 에멀전의 전자공여능 ((A): 냉장 보관, (B): 상온 보관, (C): 40°C 보관 (D): 냉동 보관)

마늘 추출물 W/O/W 에멀전을 저장기간 (약 21일)이 지남에 따라 전자공여능을 측정한 결과, 냉장보관 시 시간이 지날수록 전자공여능 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 상온 보관하였을 경우에는 0% 마늘 추출물 W/O/W 에멀전은 비슷한 전자공여능을 보였으나 50% 마늘 추출물 W/O/W 에멀전은 저장기간이 지남에 따라 전자공여능이 증가하는 것으로 나타났다. 반면, 100% 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 경우에는 시간이 지남에 따라 점차 전자공여능이 감소하는 것으로 나타났다.

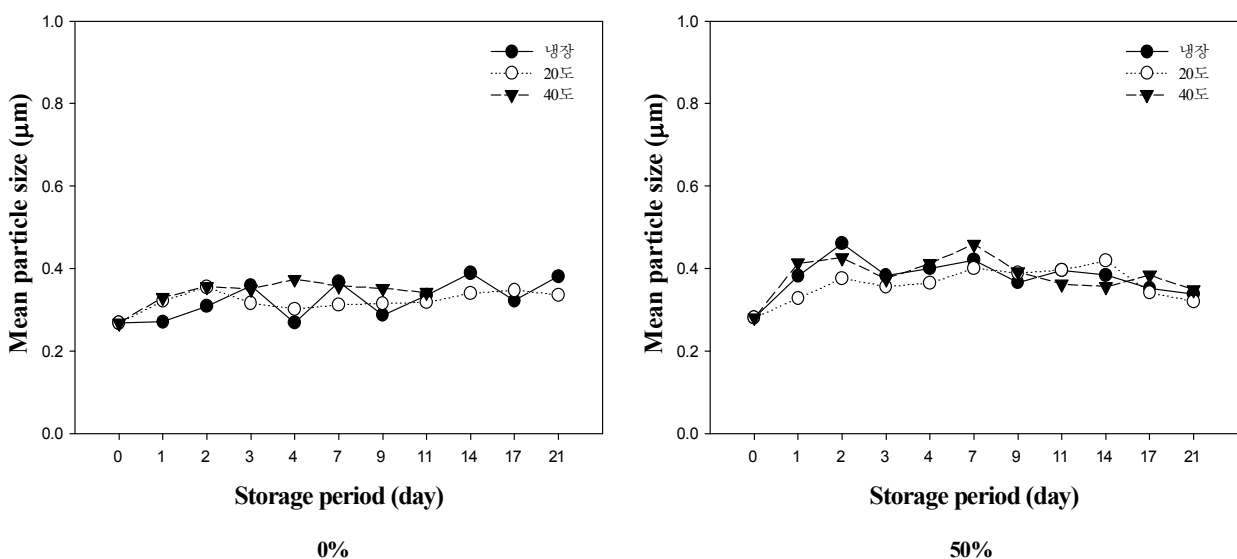
마늘 추출물 W/O/W 에멀전을 40℃에 보관하였을 경우, 저장기간이 지남에 따라 전자공여능이 점차 감소하다가 11일이 경과한 후부터 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 냉동 보관 시에는 0%와 50% 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 경우 전자공여능이 감소하였으나 100% 마늘 추출물 W/O/W 에멀전은 전자공여능이 증가하는 것으로 나타났다.

② 저장기간 동안의 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 평균 입도 측정

㉠ 에탄올의 농도를 달리한 마늘 추출물 W/O/W 에멀전의 저장안정성

마늘 추출물의 경우 에탄올의 농도를 달리하여 계면활성제로서 PGPR (2%)을 사용하고 초고압균질기로 균질화 시킨 에멀전의 저장기간에 따른 안정성 평가를 위해 입도를 측정한 결과는 그림 118과 같다.

초고압 균질기를 사용한 경우 저장기간 (약 21일)이 지남에 따라 입도가 일정하게 유지되는 것으로 나타났고, 마늘 추출물의 농도와는 상관없이 입도가 비슷하게 유지되는 것으로 나타났다.



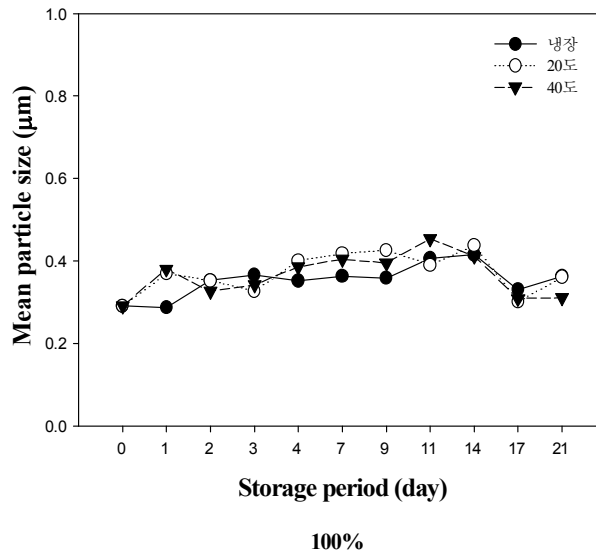


그림 118. 에탄올의 농도를 달리하여 저장한 마늘 추출물 에멀전의 평균 입도 변화 (초고압 균질기 압력: 300 bar, 5 cycle, W : O : W = 0.1 : 1 : 10)

㉔ 온도를 달리한 마늘 추출물 에멀전의 저장안정성

마늘 추출물의 경우 온도를 달리하여 계면활성제로서 PGPR (2%)을 사용하고 초고압균질기로 균질화 시킨 에멀전의 저장기간에 따른 안정성 평가를 위해 입도를 측정된 결과는 그림 119와 같다.

냉장 보관 시 초고압 균질기를 사용한 경우 저장기간 (약 21일)이 지남에 따라 입도가 비슷하게 나타났으며, 상온 보관 시에도 마찬가지로 저장기간이 지남에 따라 입도가 일정하게 유지되었으며, 이 중 100% 마늘 추출물 에멀전이 가장 일정하게 유지되어 가장 안정성이 큰 것으로 나타났다. 40°C에서 보관하였을 경우 50%와 100% 마늘 추출물 에멀전은 입도가 저장기간 (약 21일)이 지남에 따라 일정하게 유지되는 것으로 나타났다. 반면 0% 마늘 추출물 에멀전의 경우 저장기간이 11일 지남에 따라 상분리가 일어난 것으로 나타났으며, 냉동 보관 시에는 바로 상분리가 일어났다. 이에 50%와 100% 마늘 추출물 에멀전은 온도에 영향을 받아도 저장기간이 지남에 따라 입도가 비슷하게 유지되는 것으로 나타나 50%와 100% 마늘 추출물 에멀전이 크게 안정성이 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

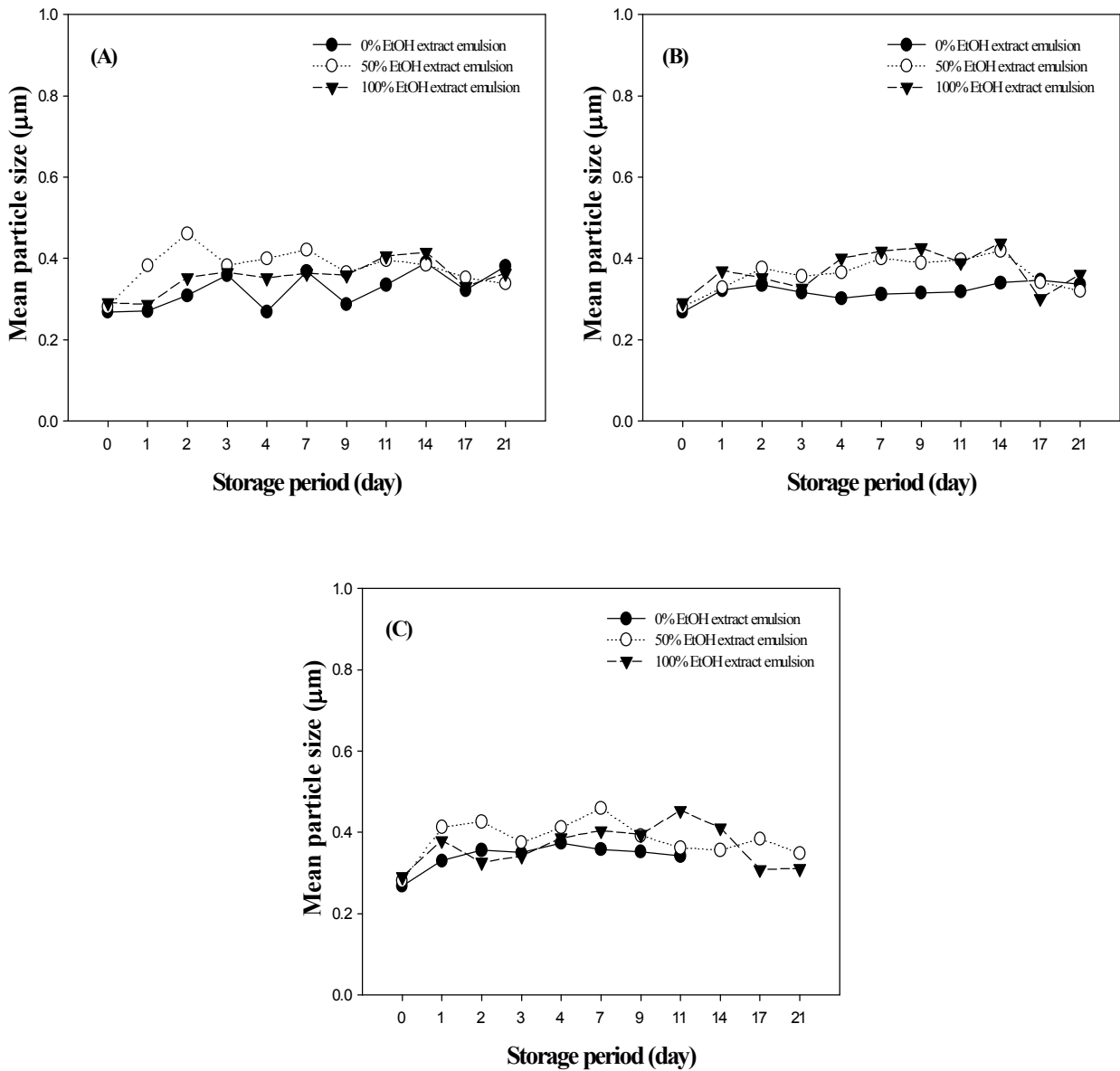


그림 119. 온도를 달리하여 저장한 마늘 추출물 에멀전의 평균 입도 변화 (초고압 균질기 압력: 300 bar, 5 cycle, W : O : W = 0.1 : 1 : 10), ((A): 냉장 보관, (B): 상온 보관, (C): 40°C 보관)

(나) Chitosan과 alginate의 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전의 안정성 평가

① 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전 제조

에멀전의 안정성을 증대시키기 위해 chitosan과 alginate를 Inner aqueous phase로 사용하여 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전을 제조하였다.

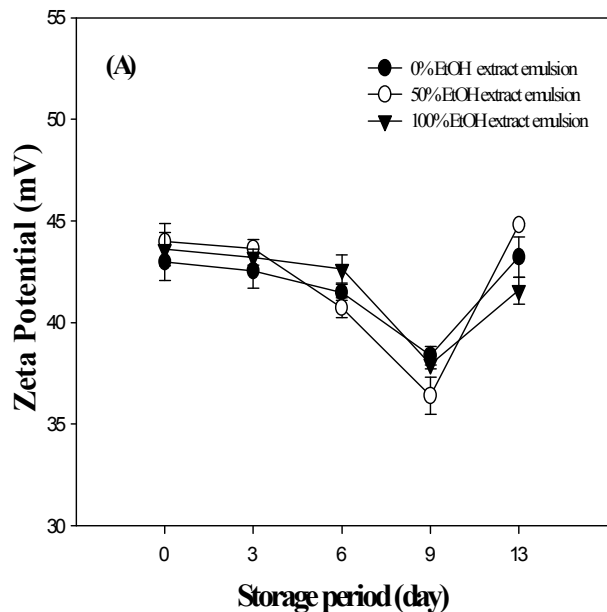
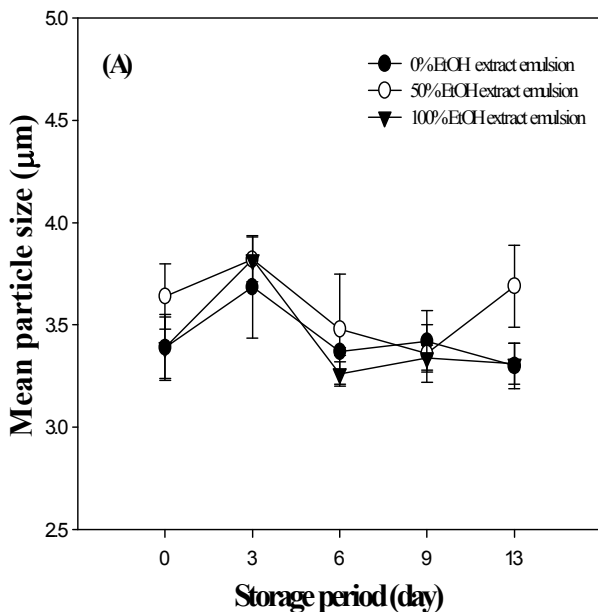
㉔ 0.5% chitosan을 이용한 W/W/O/W 에멀전의 저장안정성

아래의 그림들은 0.5% chitosan을 이용하여 계면활성제인 PGPR (2%)을 사용하고 초고압균질기로 균질화 시킨 W/W/O/W 에멀전의 저장기간에 따른 입도와 제타전위를 측정된 결과는 그림 120과 같다.

냉장 보관 시 초고압 균질기를 사용한 경우 저장기간 (약 13일)이 지남에 따라 입도가 3일에 가장 높은 입도를 보였으며, 그 후 점차 시간이 지남에 따라 입도가 감소하는 것으로 나타났다. 입도는 3-4 μm 으로 비슷하게 측정되었다. 제타전위를 측정된 결과 저장기간이 증가함에 따라 제타전위 값은 감소하는 것으로 나타났는데, 저장기간 9일에는 가장 낮은 제타전위 값을 보였다.

상온 보관 시에는 저장기간이 지남에 따라 0% 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전은 입도가 증가하였다가 감소하는 것으로 나타났으며, 50% 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전은 저장기간이 증가함에 따라 입도도 증가하는 것으로 나타났다. 또한 100% 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전은 6일부터는 비슷한 입도를 보였다. 제타전위를 측정된 결과는 저장기간 6일에 가장 낮은 제타전위 값을 나타내었다.

40°C에서 보관하였을 경우 3-4 μm 으로 비슷한 입도를 보였으며, 제타전위의 경우 저장기간이 증가함에 따라 제타전위 값이 감소하는 것으로 나타났다.



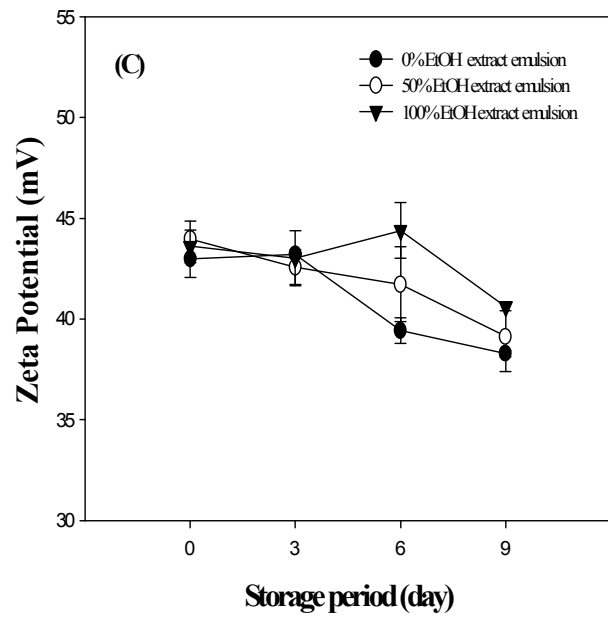
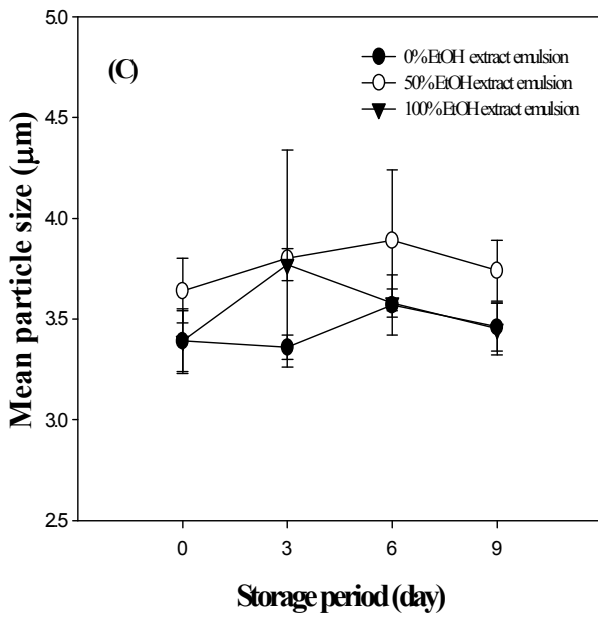
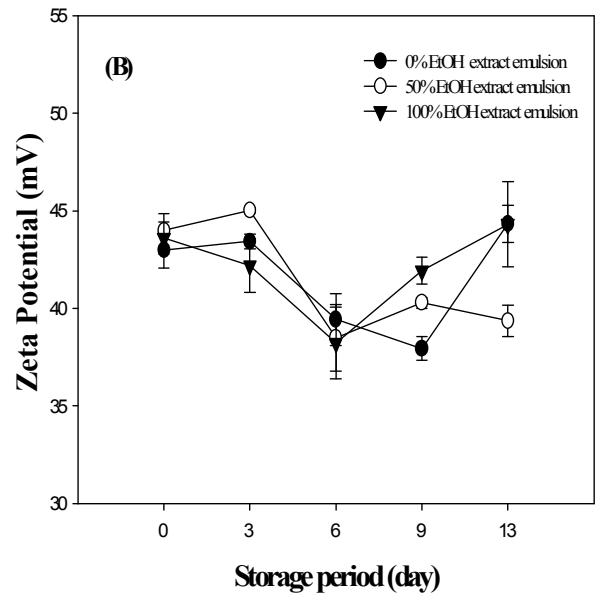
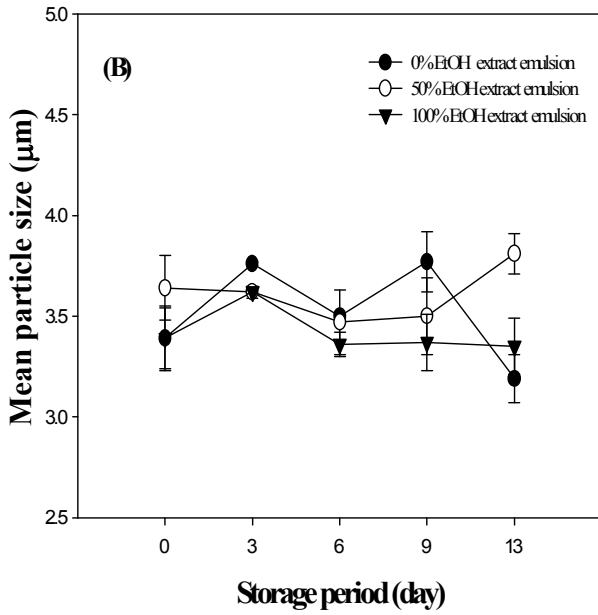


그림 120. 마늘 추출물을 이용하여 제조한 W/W/O/W 에멀전의 저장기간 (40°C)에 따른 평균 입도와 제타전위 변화 (초고압 균질기 압력: 300 bar, 5 cycle, W : W : O : W = 0.1 : 0.1 : 1 : 10)

⊕ 0.5% alginate를 이용한 W/W/O/W 에멀전의 저장안정성

0.5% alginate를 이용하여 계면활성제인 PGPR (2%)을 사용하고 초고압균질기로 균질화시킨 W/W/O/W 에멀전의 저장기간에 따른 입도와 제타전위를 측정된 결과는 그림 121과 같으며, 표면 관찰 사진은 그림 122와 같이 나타났다.

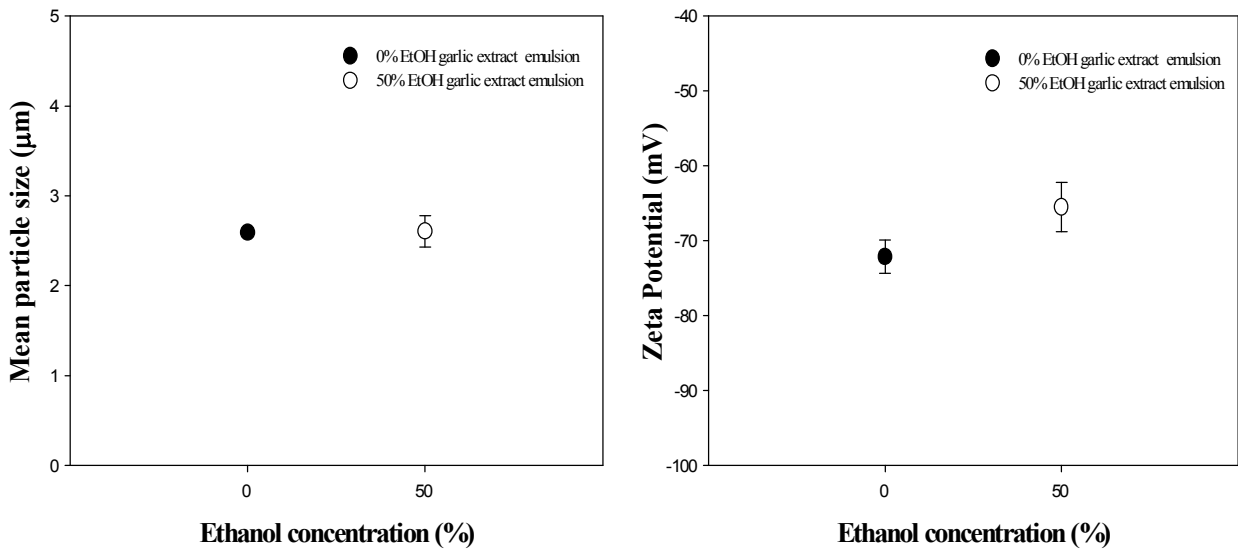


그림 121. 마늘 추출물을 이용하여 제조한 W/W/O/W 에멀전의 평균입도와 제타전위 (초고압 균질기 압력: 300 bar, 5 cycle, W : W : O : W = 0.1 : 0.1 : 1 : 10)

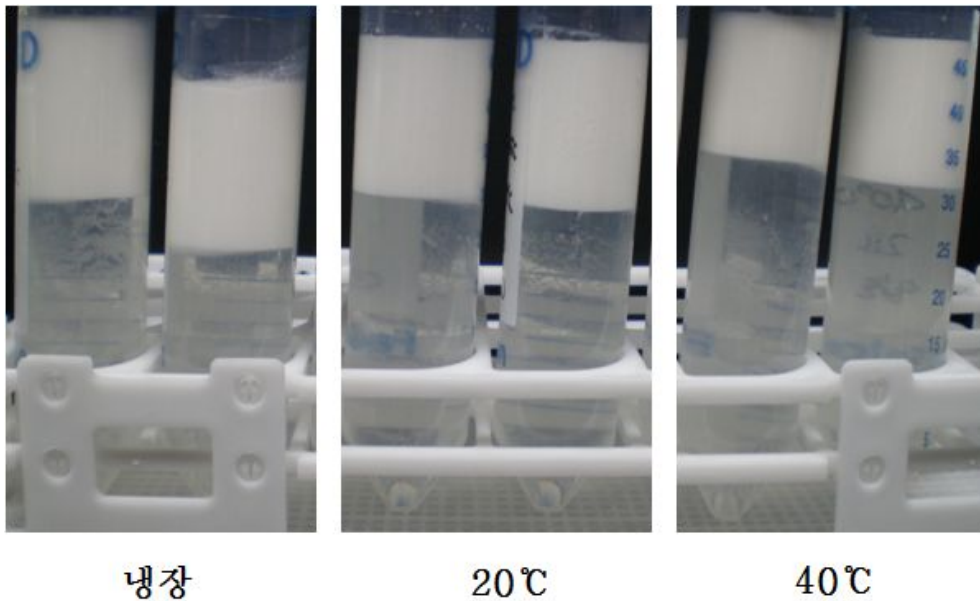


그림 122. 마늘 추출물을 이용하여 제조한 W/O/W/W 에멀전의 저장기간에 따른 표면 관찰사진

0.5% alginate에 100% 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전은 바로 상분리가 나타났으며, 0%와 50% 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전의 경우 입도는 비슷하게 측정되었다. 제타전위의 경우 0% 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전이 50% 마늘 추출물을 이용

한 W/W/O/W 에멀전보다 좀 더 낮은 값을 보여 0% 마늘 추출물을 이용한 W/W/O/W 에멀전이 안정성이 큰 것으로 나타났다. 0.5% alginate를 이용한 W/W/O/W 에멀전의 경우에는 냉동, 냉장, 상온 및 40℃ 저장 시 바로 상분리가 나타나 alginate에 비해 chitosan의 안정성이 크게 증대되는 것을 확인할 수 있었다. 상기의 결과에 나타난 바와 같이 wall materials로서 alginate를 이용한 것에 비해서 키토산만을 이용할 경우 높은 안정성을 나타내는 것으로 판단되어 최적화된 조건임을 나타낸다.

4. 페이스트/분말 제품 개발

마늘은 그냥 활용하기에는 가공 시 자극적인 냄새가 강하고 추출한 후에도 이러한 냄새로 인하여 사용하기에 용이하지 못한 단점이 있다. 이러한 냄새를 없애는 방법이 국내에서도 많이 연구되고 있으나 그 적용면에서 한계가 있는 실정이다.

본 연구과제에서는 이러한 단점을 보완하기 위하여 chitosan, alginate 등 생물고분자와 PGMS, PGPR 등 에멀전 안정제를 이용하여 페이스트/분말 제품 개발을 모색해 보았다(그림 123).

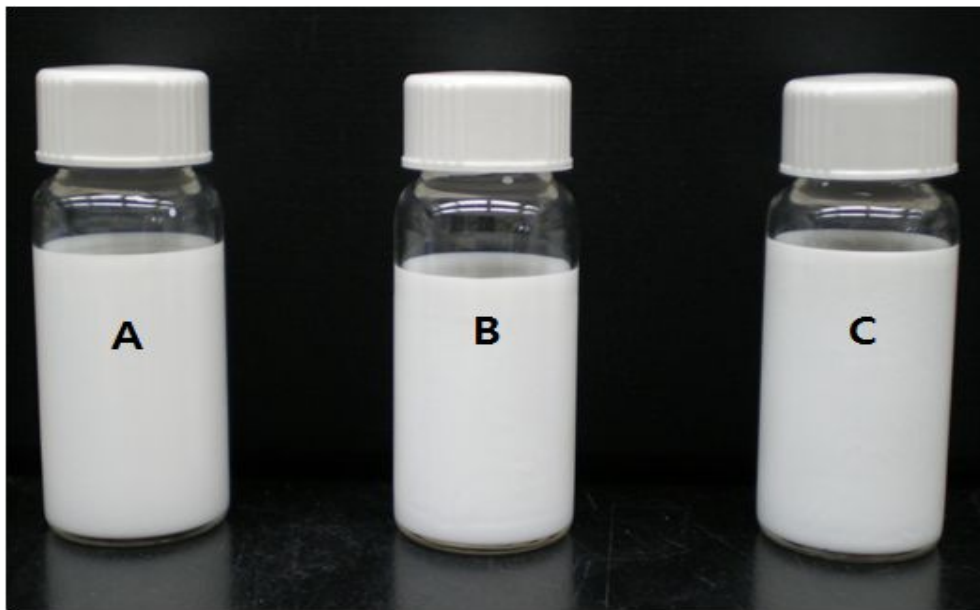


그림 123. 마늘 추출물을 이용하여 제조한 페이스트 제품 (A: 0% 마늘 추출물, B: 50% 마늘 추출물, C: 100% 마늘 추출물)

마늘 추출물을 페이스트화 할 경우 일반 추출물에 비해서 자극적인 냄새가 완전히 제거될 수 있으며, 또한 이러한 기능성 성분 함량을 조절할 수 있는 장점이 있다. 현재까지 연구 결과에 제시된 바와 같이 오랜 기간 안정성이 유지된 페이스트 제품을 개발할 경우 식품으로서의 음료, 소스 등의 제품뿐만 아니라, freeze/thaw 안정성이 매우 높은 장점을 이용할 경우 냉동제품으로도 이용이 가능할 것으로 판단된다.

Chitosan, alginate, PCL 등 생체적합성 고분자를 이용하여 약 500 nm 수준의 황화합물 함유나노미립자 소재의 경우 분말 제품으로의 소재화가 가능하다고 판단된다. 연구 결과에 제시된 바와 같이, 이러한 미립자의 경우 공정변수를 변화시킴으로 인해 입도, 제타 전위뿐만 아

니라 용출 제어가 가능하였다. 이러한 기능성 성분의 용출 제어를 통하여 식품산업 뿐 아니라 제약 산업으로의 응용도 가능할 것으로 판단된다. 에멀전 용매회발법(Emulsion solvent evaporation technique)의 경우 dichloromethane 등의 유독성 용매를 사용하기 때문에 식품산업에는 제한적인 요소로 작용하는 단점이 있는 것이 사실이다. 하지만, 주정 등과 같은 사용가능한 용매를 혼합하여 사용함으로써 이러한 단점을 극복 가능할 것으로 생각되며 이에 대한 보완적인 연구가 필요하다고 판단된다.

본 연구를 통해서 “chitosan-TPP 나노입자 및 그의 제조방법 (출원번호 : 10-2010-0054787, 2010.06.10)”과 “항산화 활성이 유지된 조성물 및 이의 제조방법 (출원번호 : 10-2011-0031834, 2011.04.06)” 등 2건의 특허 출원이 완료된 상태이다.

마늘을 이용한 제조방법으로 검색된 국외 특허는 거의 없으며, 국내 관련 특허는 약 15건 정도이고, 특히 본 과제가 목표로 하는 소재화 기술과 유사한 특허는 약 2건 정도로 볼 수 있다. 이 중 “기능성 마늘음료 조성물 및 그 제조 방법 (10-0346366)”은 마늘 엑기스를 그대로 사용하여 유효성분의 안정성 유지를 위한 연구가 필요하며, “냄새 없는 분쇄 마늘 및 이를 함유하는 마늘술의 제조 방법 (10-0491741)”은 적용에 있어서 한계가 있으며, 유효성분의 안정성 유지를 위한 연구가 필요하다.

그러나 본 연구 과제를 통해서 확보된 마늘 미립자 소재화 기술은 콜로이드 계면 기술을 이용하여 자극적인 냄새를 제거함과 동시에 마늘 내 존재하는 유효성분을 완벽하게 유지할 수 있음을 특징으로 하고 있어서 기존의 특허 출원 내용과는 전혀 특성을 달리하고 있다.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용 및 범위	목표 달성도 (%)	
1차년도	2008 - 2009	Organo-sulfur compounds의 추출 및 안정화 기술 개발	○ 원료에 대한 전처리 공정 개발	통마늘 및 간마늘의 가공 적성 평가 및 미생물학적 안정성 부여	100%
			○ 유효성분의 분리 및 추출 기술 개발	용매 추출법 등을 이용한 추출 공정 개발 및 HPLC를 이용한 황화합물의 분리/분석	100%
		NSM 시스템의 개발	○ NSM의 제조 기술 개발	키토산, 펙틴 등 생물고분자를 이용한 다층막 에멀전 제조	100%
			○ NSM의 제조 공정 단계별 물리화학적 특성 분석	안정성 시험을 위한 SEM, 입도, 제타 전위 등 측정	100%
		기능성 평가 기준 확립 및 평가	○ 추출 공정에 따른 유효 성분 변화 분석	유효성분의 정량화 및 추출 공정에 따른 성분 변화 분석함	100%
			○ NSM의 물리화학적 기능성 분석	AFM을 통한 미세구조 확인 및 NSM의 공정 변수 설정	100%

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용 및 범위	목표 달성도 (%)	
2차 년도	2009 - 2010	Organo-sulfur compounds의 추출 공정 최적화 및 대량화	○ 유효 성분의 실활 방지 및 추출 공정 최적화	추출공정별 생리활성 측정 및 최적 추출 조건 도출	100%
			○ 유효성분의 대량 추출 공정 기술 개발	통계처리를 통한 최적 조건 도출	100%
		Organo-sulfur compounds의 포집 및 안정성 부여	○ NSM 시스템에 의한 유효성분의 포집	포집 공정 단계별 물리화학적 특성 분석 및 공정변수에 따른 최적 포집 조건 도출	100%
			○ 포집에 의한 안정성 부여 및 포집 효율 증대	포집 최적화를 위한 공정변수 확립 및 시간에 따른 유효성분의 용출 제어	100%
		Organo-sulfur compounds에 대한 기능성 시험 및 평가 규격화	○ 유효성분의 관능평가 및 저장안정성 평가	에멀전의 저장기간에 따른 입도 변화 및 물성 측정	100%
			○ 용도별 소재의 규격화	microemulsion의 물성 시험을 통한 특성 평가	100%

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용 및 범위	목표 달성도 (%)	
3차 년도	2010 - 2011	페이스트 제품의 개발 및 응용	○ NSM의 페이스트화 및 기능성 부여	저장기간, 저장 온도 등에 따른 입도 및 활성 변화 분석	100%
			○ 산업재산권 출원 및 학술발표	학술대회 참가 및 발표, 특허 출원	100%
		분말 제품의 개발 및 응용	○ NSM의 분말화 및 기 능성 부여	포집 효율, 용출 양 상 등 기능성 평가	100%
			○ 산업재산권 출원 및 학술발표	학술대회 참가 및 발 표, 특허 출원, 논문 게재	100%
		제품의 기능성 유 지, 저장 안정성 분석 및 평가	○ 가속 저장실험을 통한 유통기한 설정	고온에서의 안정성 시험을 통한 저장안 정성 평가	100%
			○ 기술이전을 위한 보완 실험 및 산업화 추진	본 과제의 참여기업 과의 기술 이전 진행 중이며, 산업화를 추 진할 계획임	100%

제 5 장 연구개발 성과 및 성과 활용 계획

1. 연구개발 성과

가. 특허출원

- 김범근, 박동준, 조장원, 정진웅, 박기재, 임정호. chitosan-TPP 나노입자 및 그의 제조방법 (출원번호 10-2010-0054787호, 2010. 06.10. 대한민국)
- 김범근, 박동준, 조장원, 정진웅, 김명호, 박기재, 임정호, 박찬은. 항산화 활성이 유지된 조성물 및 이의 제조방법 (출원번호 10-2011-0031834호, 2011. 대한민국)
- 김범근, 박동준, 조장원, 정진웅, 김명호, 박기재, 임정호, 박찬은. 생리활성이 유지된 에멀전 및 이의 제조방법 (출원번호 10-2011-008139, 2011, 대한민국)
- 김범근, 박동준, 조장원, 정진웅, 김명호, 박기재, 박찬은, 이은지, Alliin이 포집된 poly(ϵ -caprolactone) 나노입자의 제조(출원중)

나. 논문발표

- Bum-Keun Kim, Jung-A Ko, Hyun-Jin Park. Preparation of acetylated chitosan sponges (chitin sponges), Journal of Applied Polymer Science, 117, 1618-1623 (2010)
- Chang-Won Cho, Chan-Eun Park, Eun-Ji Lee, Dong-June Park, Ki-Jai Park, Jeong-Ho Lim, Jin-Woong Jeong, Bum-Keun Kim, Effect of garlic extracts with extraction condition on antioxidant activity, Food Science and Biotechnology Submitted, (2011)
- Bum-Keun Kim, Chang-Won Cho, Dong-June Park, Jin-Woong Cheong, Ki-Jai Park, Chan-Eun Park, Preparation of allicin-loaded chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, Food Science and Biotechnology, To be Submitted, (2011)
- Bum-Keun Kim, Chang-Won Cho, Dong-June Park, Jin-Woong Cheong, Ki-Jai Park, Chan-Eun Park, Preparation of Alliin-loaded PCL nanoparticles by emulsion solvent evaporation technique, Food Science and Biotechnology, To Be Submitted, (2011)

다. 학술대회 발표

- 김범근, 박동준, 조장원, 박찬은, 박기재, 임정호. 마늘 내 유기황화합물의 추출 및 생리활성 분석 (2009 한국식품영양과학회)
- 박찬은, 김범근, 박동준, 조장원, 박기재, 임정호, 정진웅. Nano-Structured Microparticle

(NSM) system의 저장기간에 따른 특성 평가 (2010 한국식품과학회)

- 박찬은, 김범근, 박동준, 조장원, 박기재, 임정호, 정진용. 추출조건에 따른 마늘 내 활성물질의 분석 (2010 한국식품과학회)
- Kim BK, Cho CW, Park CE, Park DJ, Jeong JW, Park KJ, Lim JH. Antioxidant activities of garlic extracted with different extraction solvents (2010 International Congress on Food Technology, Turkey)
- Chan-Eun Park, Eun-Ji Lee, Dong-June Park, Chang-Won Cho, Ki-Jai Park, Jeong-Ho Lim, Jin-Woong Jeong, Bum-Keun Kim. Preparation of o/w/w emulsion using biopolymers as stabilizing materials. (2011 한국식품과학회)

2. 성과 활용 계획

가. 기능성 성분의 포집 및 안정화 기술

- 일반적인 환경에서 불안정한 색소, 약물, 기능성 화장품 화장품소재, 향미성분, 미량 영양성분, 조미성분 등을 생물고분자를 이용하여 포집 및 안정화시키는 기술은 용도별 업체를 선정할 이후 기술이전을 추진할 예정이다.
- 고가 미량성분의 장기간 효능을 유지시킬 수 있는 기술을 통하여 식품소재 및 화장품, 의약품 소재화에 따른 현장애로 해결 및 고부가가치 소재화 기술의 확산에 활용할 계획이다.
- 안정화 기술 및 기능성 실활 방지 기술의 실용화는 후속연구를 통하여 보완실험을 거쳐 추진할 예정이다.
- 고가의 기능성 소재의 정량적 전달체계에 가장 좋은 안정적 carrier로 활용 가능하므로 다양한 용도로의 활용방안을 모색하고 공동연구를 통한 실용화 연구를 추진할 예정이다.
- 본 연구 과제를 통하여 도출된 가공기술은 분말 및 액상형 기능성 소재의 안정화 수단으로 활용 가능하므로 해당 기능성 소재가공 기술에 대하여 기술이전 또는 공동연구를 통한 실용화를 추진할 계획이다.

○ 참여기업인 (주)아로마에프아이의 경우 주로 향기성분(flavor)을 가공하여 소재화 및 제품화를 목적으로 하는 중소기업체로서, 본 연구 과제를 통하여 개발된 기술이 이전될 경우 향후 향기성분의 포집 및 안정화를 통한 고부가가치 제품 개발이 가능할 것으로 판단되며 현재 기술이전에 대한 검토가 이루어지고 있다.

나. 나노 기술을 이용한 식품 소재 가공에 필요한 기반기술의 확산

○ 향후 고 기능성 식품소재의 가공기술이 발전하기 위해서는 나노영역의 소재가공 기술 확보가 중요한 관건이 될 것으로 예측된다.

○ 콜로이드 계면 기술을 이용한 나노미립자 가공 영역은 부가가치가 높고 여러 분야에서 공통적으로 활용할 수 있는 원천, 기반 기술적 요인이 상당히 많으므로 개발된 기술의 이용도가 상당히 높을 것으로 판단되나 식품 이외의 분야에서 개발된 기술을 도입하기 위해서는 높은 수준의 기술료가 요구될 것이므로 본 연구결과는 국내 산업계에 기술 이전될 경우 효용가치가 클 것으로 전망된다.

○ 하지만 고부가가치 기술과 농산물의 경제성 관점 측면에서는 여전히 숙제로 남아있으며, 농어촌산업화 관점에서 볼 때 이러한 기술과 파일럿 플랜트 설계 및 활용에 대한 경제성 분석이 충족될 경우 지역 농산물 발전에도 큰 기여가 될 것으로 판단된다.

○ 기존에 사용되어온 식품유래의 기술이 아닌 경우에는 식품용도에 적합한 별도의 적용시험을 거쳐야 하므로 식품을 토대로 한 소재화 기술개발이 가장 바람직하므로 본 연구결과는 미세 식품소재분야 연구자들에게 기초기술을 확산시키는데 큰 의미가 있을 것으로 사료된다.

○ 여러 분야에서 이루어지고 있는 나노기술의 발전은 여러 영역, 다학제간 연구가 필수적인 만큼 식품소재분야에서도 상당 수준의 나노영역의 기반기술을 확보하여야만 반도체, 의약분야 등에서 개발되는 첨단기술의 도입이나 공동연구의 추진 및 접목에 용이하게 된다. 따라서 식품 이외의 용도로 실용화를 추진할 때, 해당 분야의 연구진과의 협력연구를 통하여 예측가능한 문제점을 도출하고 해결해나갈 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

<에멀전 전달시스템 (Emulsion delivery systems)>

본 연구에서는 콜로이드/계면 기술 (colloid/interfacial technology)을 이용하여 기능성 식품 및 농산물의 운송, 보호, 용출을 제어할 수 있는 에멀전을 기본으로 한 전달시스템의 개발을 하고자 하였다. 에멀전을 이용한 전달시스템은 식품을 비롯하여 제약, 화장품, 석유화학 등 다양한 분야에 이용되어 왔으며, 다른 캡슐 제조 기술에 비해서 가지고 있는 장점을 요약하면 다음과 같다.

- 에멀전에는 비극성영역, 극성영역, 친양쪽성영역으로 구성되어 있기 때문에 세가지 성질을 나타내는 모든 기능성 성분을 포집할 수 있다.
- 에멀전의 계면 가공을 통해서 캡슐화 된 구성성분의 안정성 제어가 가능하다 (McClements and Decker 2000).
- 구성성분 혹은 미세구조의 제어를 통해서 점성이 강한 액상으로부터 플라스틱 페이스트 혹은 탄성 고형물에 이르기까지 각각 다른 물성을 갖는 에멀전을 만들 수 있기 때문에 특이적인 적용이 가능하도록 제조가 가능하다.
- 에멀전 자체는 액상으로 이용할 수 있을 뿐 아니라 건조시켜서 분말 혹은 과립 형태로도 제조가 가능하여 운반이나 이용에 편리하게 적용이 가능하다.
- 인지질, 단백질, 다당류, 등 천연물을 이용하여 에멀전의 제조가 가능하기 때문에, 합성물질의 대체가 가능하다.

에멀전이 가진 다양한 장점에도 불구하고, 식품 및 농업으로의 적용에 있어서 한계를 나타내고 있는 가장 큰 이유는 가열, 동결, 건조, 극한 pH, 고농도의 미네랄 등 극한 환경에 존재할 경우 물리적인 안정성이 낮다는데 있다. 또한, 입자의 크기가 작기 때문에 용출 제어를 목표로 함에도 불구하고 droplet으로부터의 용출 시간이 짧은 단점이 있다. 마지막으로, 계면활성제의 종류가 많지 않아서 계면막 (interfacial membrane) 형성이 어려운 경우를 들 수 있다.

<Nano-Structured Micro-Particles (NSM-Particles)의 제조 및 방법>

일반적인 에멀전 시스템 (conventional emulsion system)의 전형적인 단점이 보완된 Nano-Structured Microparticle (NSM-particles)의 제조 방법은 그림 124와 같다.

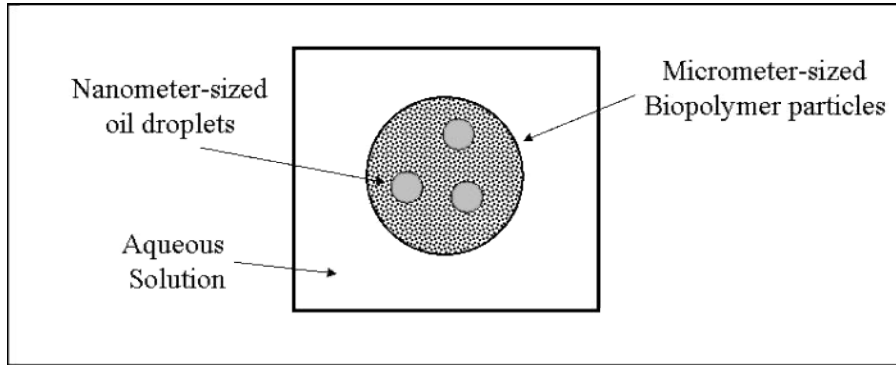


그림 124. Nano-Structured Microparticles (McClements, 2004)

NSM-particle의 경우 나노 크기의 oil droplet ($r = 100\text{--}250\text{ nm}$)이 마이크로 크기의 수용성 고분자 입자 ($r = 1\text{--}10\ \mu\text{m}$) 안으로 캡슐화 된 형태를 말한다. 이때 나노크기의 oil droplet 내에 존재하는 지질의 용해 성상 (MELTING PROFILE)에 대한 나노수준의 제어를 통해 낮은 온도에서는 캡슐화가, 높은 온도 (예; mouth temperature)에서는 용출이 발생하게 된다. 또한 다층 막 제조 기술 (LAYER-BY-LAYER DEPOSITION) (nanometer scale)을 통해 계면막이 생성되면 내부의 oil droplet의 안정성이 높아지게 되어 기능성 성분의 'Smart' delivery가 가능하게 되는 것이다. 이에 부가적으로 고분자 혼합물의 열역학적 불안정성 (THERMODYNAMIC INCOMPATIBILITY)을 이용한 상변화기법에 의해 에멀전을 제조하여 기능성 성분의 용출을 제어할 수 있게 된다.

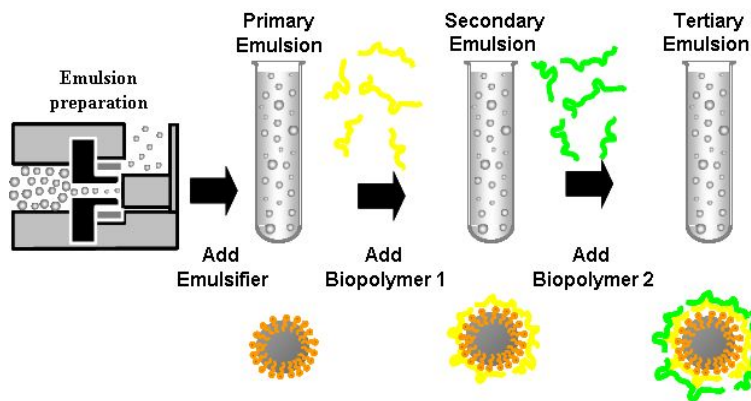


그림 125. 다층막 제조기술을 이용한 다층 에멀전 (Guzey and McClements, 2004)

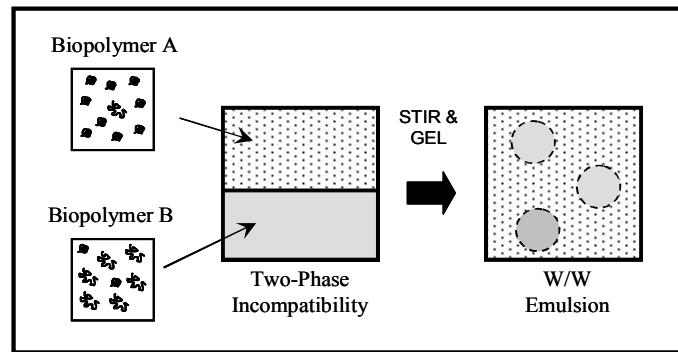


그림 126. Thermodynamic incompatibility로 인해 발생하는 상변화를 이용한 W/W 에멀전 (McClements, 2006)

앞에서 언급한 방법을 이용하여 NSM-particles를 제조하는 단계를 요약하면 다음과 같다.

- ① Oil, water, 에멀전 안정제의 균질화를 통한 O/W 에멀전의 제조. 단, 온도는 oil이 완전히 액체상태로 존재할 수 있는 온도이어야 함.
- ② 다층막 제조기술 (Layer-by-layer deposition)을 이용하여 oil droplet이 두 개 혹은 그 이상의 층에 의해 코팅되도록 한다. 이때, 계면막의 두께, 전하 등을 조절함으로써 droplet 안정성 및 용출 제어를 가능하도록 할 수 있다.
- ③ 이 에멀전을 열역학적 불안정성 (thermodynamic incompatibility)을 나타내는 두 가지의 고분자용액에 첨가하게 되면 그림에서 나타나는 바와 같이 마이크로 단위의 고분자가 생성되게 된다.
- ④ 이를 다시 고속 믹서를 이용하여 전단력을 가하게 되면 oil droplet이 고분자 입자의 안쪽에 분산되어 있는 O/W/W 에멀전이 형성된다.

이러한 방법으로 제조된 에멀전의 환경을 변화시킴으로써 젤화도 가능하며, 원심분리기를 통해 외부 수용액상에 존재하는 고분자의 제거도 가능하다. 최종적으로, 안정성, 캡슐화 효율, 용출 제어 등을 평가하게 된다.

<Nano-Structured Micro-Particles (NSM-Particles) 시스템의 장점>

일반적인 에멀전 시스템 (A)과 비교하였을 때 NSM-particle 전달시스템 (B)이 갖는 장점은 다음과 같다.

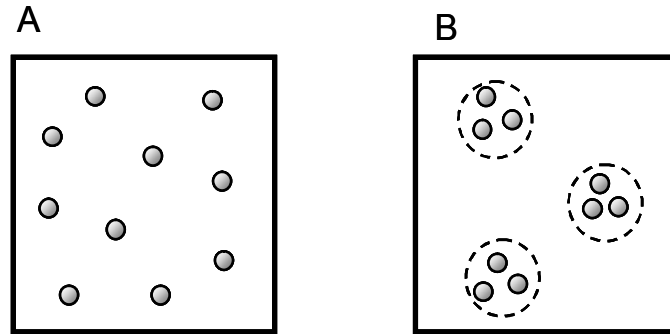


그림 128. 전형적인 에멀전 (conventional oil-in-water emulsion) (A)과 Nano-Structured Micro-Particle system (B)의 형태 비교 (Guzey and McClements 2006)

- oil droplet의 용해 정상 (melting profile) 조절을 통해 기능성 성분의 용출을 제어할 수 있게 된다 (예; 입 안에서 씹는 동안 온도변화로 인해 용출 제어가 가능하게 됨).
- 외부환경 조건, 즉 pH, 온도, 이온 세기 등을 변화시킴으로써 다양한 형태의 계면막 제조가 가능하다 (Ogawa et al 2003).
- O/W/W 에멀전이 형성되기 때문에 기존의 O/W 에멀전에 비해서 기능성 성분의 용출 제어가 용이하게 된다 (Malone et al 2000, Malone and Appleqvist 2003).
- 마이크로 단위의 입자를 생성할 수 있는 생물고분자를 사용함으로써 지용성 혹은 수용성을 나타내는 기능성 성분의 용출 속도를 제어할 수 있게 된다.
- 이러한 다층막 제조 기술 (layer-by-layer deposition)을 이용할 경우 수용성 성분은 oil droplet 과 수용액 간의 계면막을 통한 캡슐화가 가능하게 된다 (Guzey and McClements 2004).

제 7 장 참고문헌

- An BJ, Choi HJ, Son JH, Woo HS, Han HS, Park JH, Son GM, Choi C (2003) Identification of biological effect and chemical structure of polyphenol compounds from the leaves of Korean persimmon (*Diospyrus kaki* L. Folium). *Korean J Food Culture* 18: 443-456.
- AOAC (1990) Official method of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC. P 1017-1918.
- Bae DK, Choi HJ, Son JH, Park MH, Bae JH, An BJ, Bae MJ, Choi C (2000) The study of Developing and stability of functional beverage from Korean persimmon (*Diospyrus kaki* L. Folium) leaf. *Korean J Food Sci Technol* 32: 860-866.
- Benichou, A., Aserin, A.; Garti, N. Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions (2002). *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23, 93-123.
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.
- Bryant, C. and McClements, D.J. (2000). Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids*. 14, 383-390.
- Burke, S.E. and Barrett, C.J. (2003). Acid-base equilibria of weak polyelectrolytes in multilayer thin films, *Langmuir*, 19, 3297-3303.
- Burke, S.E. and Barrett, C.J. (2003). pH- responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/Hyaluronic acid surfaces, *Biomacromolecules*, 4, 1773-1783.
- Byun JO, Kim MH (2006) A study on Chlorophyll and ascorbic acid contents of Korean and Japanese green tea. *J East Asian Soc Dietary Life* 16: 107-112.
- Choi OB, Yoo GS, Park KH (1999) Antioxidative and antimicrobial effects of water extracts with *Castanea crenata* leaf tea. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1128-1131.
- Coupland, J.N. (2002). Crystallization in emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7, 445-450.
- Cushman DW, Cheung HS (1973) Inhibition of homogenous angiotension-converting enzyme inhibitor during natto fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 737-742
- Do JR, Heo IS, Back SY, Yoon HS, Jo JH, Kim YM, Kim KJ, Kim SK (2006) Antihypertensive, antimicrobial and antifungal activities of buckwheat hydrolysate. *Korean J Food Sci Technol* 38: 268-272.

- Donnelly JK, McLellan KM, Walker JL, Robinson DS (1989) Superoxide dismutase in foods: A review. *Food Chem* 33: 243-270.
- Elias, R.J., McClements, D.J and Decker, E.A. (2007) Impact of thermal processing on the antioxidant mechanisms of continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions, *Food Chemistry*, In Press,
- Erdos EG, Skidgel RA (1987) The angiotensin I converting enzyme. *Lab Invest* 56: 345-348.
- Folin O, Denis W (1915) A colorimetric method for determination of phenols (phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem* 22: 305-308.
- Friberg, S., Larsson, K. and Sjoblom, J. (2004). *Food Emulsions*, Third Edition, Marcel Dekker, New York.
- Garti, N.; Benichou, A. (2001). Double emulsions for controlled release applications - Progress and Trends. In *Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology*, Sjoblom, J., ed., Marcel Dekker, New York, pp 377-408.
- Goddard, E.D. and Gruber, J.V. (1999). *Principles of Polymer Science and Technology in Cosmetics and Personal Care*, Marcel Dekker, New York, NY.
- Gray JJ, Dugan Jr LR (1975) Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J Food Sci* 40: 981-984.
- Grinberg, V.Y. and Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11, 145-148.
- Gu, Y., Decker, E.A. McClements, D.J. (2007). Application of multi-component biopolymer layers to improve the freeze - thaw stability of oil-in-water emulsions: β -Lactoglobulin - ι -carrageenan - gelatin. *Journal of Food Engineering*, 80 (4), 1246-1254
- Gu, Y.S., Decker E.A., McClements, D.J. (2005) Influence of pH and carrageenan type on properties of β -lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19 (1), 2005, 83-91
- Guzey, D and D. McClements, D.J (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, Volumes 128-130, 21 227-248
- Haahr, A.M., Bredie, W.L.P., Stahnke, L.H., Jensen, B. and Refsgaard, H.H.F. (2000). Flavour release of aldehydes and diacetyl in oil/water systems, *Food Chemistry*, 71, 355-362.

- Hwang KA, Kim KS, Park CS, Shin SR (2003) Changes on the characteristics of *Lindera obtusiloba* BL. Leaf teas by manufacturing process. *Korean J Food Nutr* 16: 365-371.
- Jang JH, Choi HS, Cheong HS, Kang OJ (2007) A comparison of the antioxidant activity of barley leaf tea and green tea according to leaching conditions in distilled water. *Korean J Food Cookery Sci* 23: 165-172.
- Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, Sathishkumar M, Swaminathan K (2008) Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem* 109: 227-234.
- Jo KH, Pae YR, Yang EJ, Park EJ, Ma SJ, Park YS, Chung DO, Jung ST (2006) Major constituents and bioactivities of tea products by various manufacturing. *Korean J Food Preserv* 13: 596-602.
- Kim B.K and Park H.J. (2002) "Preparation and evaluation of microspheres with acrylic polymers by oil-in-oil emulsion solvent evaporation method Session 76A, Biotechnology, Annual Meeting and Food Expo - Anaheim, California
- Kim B.K. et al., (2002). Preparation and characterization of drug-loaded polymethacrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method. *Journal of microencapsulation*, 19 (6), 811-822
- Kim B.K. et al., (2005). Characteristics of felodipine-located poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of microencapsulation*, 22 (2), 193-203.
- Kim et al. (2007). Preparation of low-fat uptake frying batter composite by dry particle coating of microparticulated soybean hull. *LWT-Food Science*, 2007, In Press.
- Kim KJ, Do JR, Kim HK (2005) Antimicrobial, antihypertensive and anticancer activities of garlic extracts. *Korean J Food Sci Technol* 37(2): 228-232.
- Kim SJ, Han DS, Moon KD, Rhee JS (1995) Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 822-826.
- Korycka-Dahl M, Richardson T, Hicks CL (1979) Superoxide dismutase activity in bovine milk serum. *J Food Prot* 43: 867-871.
- Kwon EK, Kim YE, Lee CH, Kim HY (2006) Screening of nine herbs with biological activities on ACE inhibition, HMG-CoA reductase inhibition, and fibrinolysis. *Korean J Food Sci Technol* 38: 691-698.
- Leaf CD, Vecchio AJ, Roe DA, Hotchkiss JH (1987) Influence of ascorbic acid dose on N-nitrosoproline formation in humans. *Carcinogenesis* 8: 791-795.

- Lee KD, Chang HK, Kim HK (1997) Antioxidative and nitrite scavenging activities of edible mushroom. *Korean J Food Sci Technol* 29: 432-437.
- Lee KS, Oh CS, Lee KY (2006) Antimicrobial effect of the fractions extracted from a Lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35(2): 219-223.
- Lim JA, Na YS, Baek SH (2004) Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of ethanol extract from *Phyllostachys bambusoides*. *Korean J Food Sci Technol* 36: 306-310.
- Ma SJ (2000) Inhibitory effect of onion seasoning on angiotension converting enzyme. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 395-400.
- Malone, M.E. and Appelqvist, I.A.M. (2003). Gelled emulsion particles for the controlled release of lipophilic volatiles during eating, *J. Control Release* 90, 227-241
- Malone, M.E., Appelqvist, I.A.M., Goff, T.C., Homan, J.E. and Wilkins, J.P.G. (2000). A novel approach to the selective control of lipophilic flavor release in low fat foods, in *Flavor Release*, ACS Symposium Series 763, Roberts, D.D. and Taylor, A.J., Eds., American Chemical Society, Washington, DC, pp 212-227.
- Marklund S, Marklund G (1974) involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
- McClements, D.J. (1999). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- McClements, D.J. (2004). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*, 2nd Edition. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- McClements, D.J. (2006). Non-covalent interaction between protein and polysaccharides, *Biotechnology Advances*, 24, 621-625
- Mirvish SS (1975) Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, Kinetics, and in vivo occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol* 31:325-351.
- Moon SH, Park KY (2000) Antioxidative effect of persimmon leaves. *Korean J Food Nutr* 13: 53-58.
- Moreau, L. Kim, H-J. Decker E.A. and McClements, D.J. (2003). Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Droplets Stabilized by α whey protein-lactoglobulin-Pectin Membranes. *J. Agric. Food Chem.*, 51 6612-6617.
- Norton, I.T. and Frith, W.J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites, *Food Hydrocolloids*, 15, 543-553.

- Ogawa, S.; Decker, E. A.; McClements, D. J. (2003a). Influence of Environmental Conditions on Stability of O/W Emulsions Containing Droplets Stabilized by Lecithin-Chitosan Membranes. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5522–5527.
- Ogawa, S.; Decker, E. A.; McClements, D. J. (2003b). Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Cationic Droplets Stabilized by Lecithin-Chitosan Membranes. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2806–2812.
- Ogawa, S.; Decker, E. A.; McClements, D. J. (2004). Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Droplets Stabilized by Lecithin-Chitosan-Pectin Multilayered Membranes. *J. Agric. Food Chem.*, Submitted.
- Park CS (1998) Antibacterial activity of water extract of green tea against pathogenic bacteria. *Korean J Postharvest Sci Technol* 5: 286–291.
- Park CS (2000) Effect of pine needle and green tea extracts on the survival of pathogenic bacterial. *Korean J Soc Food Sci* 16: 40–46.
- Park CS (2005) Component and quality characteristics of powdered green tea cultivated in hwangae area. *Korean J Food Preser* 12: 36–42.
- Park JH, Kim JB, Kim KS (1996) Studies on the fatty acid composition of leaves in domestic tea plant. *J Korean Tea Soc* 2: 119–128.
- Park YJ, Kang MH, Kim JI, Park OJ (1995) Changes of vitamin C and superoxide dismutase (SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition. *Korean J Food Sci Technol* 27: 281–285.
- Park YS (2002) Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of medicinal herb extracts. *J East Asian Soc Dietary Life* 12: 23–31.
- Pongsawatmanit, R., Harnsilawat, T. and David J. McClements, D.J. (2006). Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 287 (1–3, 15), 59–67.
- Ramarathnan N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S (1995) The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci Technol* 6: 75–82.
- Schonhoff, M. Self-assembled polyelectrolyte multilayers, (2003). *Curr. Op. Colloid Int. Sci.*, 8, 86–95.
- Shefer, A. and Shefer, S. (2003). Novel encapsulation system provides controlled release of ingredients. *Food Technology*, 57, 40–43.

- Vermeirssena V, Camqb JV, Verstraetea W (2002) Optimization and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J Biochem Biophys Methds* 51:75-87.
- Woo HS, Choe HJ, Han HS, Park JH, Son JH, An BJ, SonGM, Choe C (2003) Isolation of polyphenol from green tea by HPLC and its physiological activities. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1199-1203.
- Woo JY, Paek NS, Kim YM (2005) Studies on antioxidative effect and lactic acid bacteria growth of persimmon leaf extracts. *Korean J Food Nutr* 18: 28-38.
- Yazdanparast R, Ardestani A (2007) In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Cyperus rotundus*. *J Med Food* 10: 667-674.
- Yoo MY, Jung YJ, Yang JY (2005) Antimicrobial activity of herb extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1130-1135.
- Yoon WH, Choi JH, Lee KH, Kim CH (2005) Antimicrobial and antitumor activities of seed extracts of *Camellia sinensis* L. *Korean J Food Sci Technol* 37: 108-112.
- 김범근, 박현진, (2002). 나노기술의 동향과 전망 (review). *식품과학과 산업*, 35 (4), 8-16.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 “콜로이드 계면 기술을 이용한 organo-sulfur compounds의 나노구조 미립자 소재화 기술 개발 사업”의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 “콜로이드 계면 기술을 이용한 organo-sulfur compounds의 나노구조 미립자 소재화 기술 개발 사업”의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.