

발간등록번호

11-1541000-001330-01

보안과제(), 일반과제(○)

가공적성이 개선된 고도불포화 기능성지질소재 및 식품 생산

A study on microencapsulation technology for the production of functional lipids containing large amount of polyunsaturated fatty acids

연구기관
한국식품연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “가공적성이 개선된 고도불포화 기능성지질소재 및 식품 생산” 과제의
보고서로 제출합니다.

2012년 4월 5일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 윤 석 후

세부연구책임자 : 윤 석 후

연 구 원 : 성 미 정

위탁연구책임자 : 정 문 응

위탁연구책임자 : 장 판 식

협동연구기관명 : 우석대학교

협동연구책임자 : 오 찬 호

위탁연구책임자 : 송 영 옥

협동연구기관명 : (주) 농심

협동연구책임자 : 김 훈 중

위탁연구책임자 : 최 은 옥

연 구 원 : 정 라 나

요 약 문

I. 제 목

가공적성이 개선된 고도불포화 기능성지질소재 및 식품 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 식생활 습관, 환경 변화, 수명의 연장 등 사회적 변화에 따라 적절한 영양소 섭취와 함께 만성 질환 예방에 효과가 있는 기능성 웰빙 식품이나 편의식품의 수요가 급증하고 있으며 FTA 체결 등 급변하는 농업 환경에서 우리 농산물의 소비 증대 방안 마련이 시급히 요구되고 있음.
- 예방의학차원의 건강식품에 대한 관심 고조 기조, 기능성 식품에 대한 신뢰성 제고, 건강식품의 질적 개선 등에 대해 소비자의 요구에도 불구하고 현재 건강기능 식품은 성분/구성의 차별화가 되어있지 못한 점이 문제로 향후 고령화 사회 진입, 국민소득증가 및 예방의학 관심고조에 따라 차별되고 과학적으로 구체적인 효과가 입증된 안정화된 성분을 가진 건강식품의 등장이 필요할 것으로 예상됨.
- 들깨는 국산 종실로서 다른 판매목적 노지 작물에 비해 가장 많은 농가가 경작하고 있으며 경작 면적에 있어서도 가장 넓은 면적에서 재배되고 있는 유종으로 거의 독점적으로 국내에서만 소비되고 있는 국제적으로 경쟁력을 갖는 종실로, 오메가-3 지방산 함량이 높은 식물유지 중 하나이나, 기능성 푸드 제조를 위한 들깨 유래 기능성식품은 찾아 볼 수 없으며 들깨 및 들깨유 소재의 고급화가 절실히 필요함. 또한 들깨 및 들깨유의 국내 소비 진작 및 해외로의 수출가능성을 증가시키기 위해 다양한 형태의 고부가가치 식품 개발이 더욱 필요함.
- 그 동안 들깨유의 산업적 이용에 큰 제한점이었던 산화안정성 개선과 가공적성이 뛰어난 분체형 고도불포화 지질소재의 개발은 관련 산업체의 숙원이었음. 들깨는 국산 유량종실로써 가장 많은 농가가 가장 넓은 경작면적에서 재배하고 있는 유종이며 거의 독점적으로 국내에서만 소비되고 있기 때문에 FTA체결에 따른 농가 손실을 보전할 수 있는 최적의 국산 종실로 산화안정성이 향상된 분체형 들깨유의 상업적 개발에 대한 연구의 절실한 필요성이 대두되었음.
- 본 연구는 리놀렌산 함량이 높은 국산 종실유를 이용하여 면역조절능, 항동맥경화, 항고혈압, 항비만, 항암, 인지능력 향상 등의 기능이 있으며, 산화안정성이 높고, 식품가공공정에 적용성이 높은 분체형 기능성지질소재를 생산하고, 노인식, 영유아식, 청소년 식품 등에 적용할 수 있는 **다기능 상업용 건강기능식품을 생산하는 기술을 개발하는 것을 목표로 하였음.**

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 본 연구는 산화안정성이 향상된 분체형 들깨유의 상업적 적용을 위하여 분체형 들깨유의 최적 생산조건 및 기능성 확인에 중점을 두어 제조조건 설정 및 가공처리 방법에 따른 품질특성을 비교 검토하여 제조공정을 확립하고, 시제품을 제조하여 현장적용시험 및 경제적 타당성, 관능검사 등을 실시하였음.
- 본 연구에서는 들깨유로부터 맞춤형 재구성지질을 생산하는 기술을 개발하고, 들깨유의 최적합 향산화시스템 개발을 통하여 산화안정성을 향상시키고 고도로 불포화도가 높은 이들 유지의 식품가공공정에 적용성이 뛰어난 소재로 만들기 위하여 최적합 분체유지 제조용 미세캡슐화 (microencapsulation) 기술을 개발하였음. 또한 미세캡슐을 이용하여 만든 들깨유 소재를 이용하여 식품을 제조하고 이의 생리기능성을 확인하기 위한 실증 실험을 수행하고 이들 소재를 이용하여 상업용 제품을 생산하기 위하여 소비자 조사, 제품 최적화 실험 등을 수행하였음.
- 본 연구는 1. 기능성지질소재 생산기술 개발, 2. 기능성지질소재의 기능성 실증 실험, 3. 기능성지질소재를 이용한 상업용 제품의 생산기술 개발의 3개의 과제로 구성되었음.

○ 제 1 세부과제 : 고도불포화 기능성지질소재의 생산, 안정화, 및 미세캡슐화 기술 개발

- ① 가공, 저장 조건 하에서 들깨와 들깨유의 산화안정성
- ② 고도불포화지방산을 반응물로 하는 재구성지질 생산
- ③ 전처리 조건 및 추출방법에 따른 들깨유의 기능성분 함량 및 산화안정성 규명
- ④ 들깨유의 미세캡슐화 수율 극대화를 위한 최적 조건의 확립

○ 제 1 협동과제 : 기능성지질소재의 기능성 실증 실험

- ① 들깨 추출물 (powder fat, 주성분)의 항암·면역조절 활성 평가 (in vitro)
- ② 들깨 추출물 및 제품에 대한 항암·면역조절 활성평가 (in vivo)
- ③ 들깨 추출물의 지질저하 및 항동맥경화 효과 평가

○ 제 2 협동과제 : 기능성지질 상업용 제품 생산기술

- ① 들깨 관련제품의 시장과 소비자 조사
- ② 들깨, 들깨유 소재를 이용한 편의 식품의 산업화
- ③ 들깨, 들깨유를 이용한 편의 식품 개발

Ⅳ. 연구개발결과

- 본 연구는 3개의 세부과제로 구성되었음. 제 1 세부과제는 기능성지질소재 생산기술 개발, 제 1 협동과제는 기능성지질소재의 기능성 실증 실험, 제 2 협동과제는 기능성지질소재를 이용한 상업용 제품의 생산기술 개발이 주요 내용임.
- 제 1 세부과제 : 고도불포화 기능성지질소재의 생산, 안정화, 및 미세캡슐화 기술 개발
 - ① 가공, 저장 조건 하에서 들깨와 들깨유의 산화안정성

- 들깨의 총지질 함량은 건물대비 (dry basis) $35.31 \pm 1.24\%$ 이었으며 94.3%가 중성지질, 5.6%가 인지질, 그리고 당지질은 1% 미만이었으며, 리놀렌산이 가장 많이 함유되어 있었으며 ($66.78 \pm 0.17\%$), 올레산 ($12.80 \pm 0.10\%$), 리놀레산 ($11.80 \pm 0.02\%$), 팔미트산 ($7.15 \pm 0.13\%$), 스테아르산($1.50 \pm 0.08\%$)의 순서이었음. 총 토크페롤의 양은 731.98 ± 17.96 ppm, 폴리페놀 함량은 30.9 ppm 이었고phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine이 각각 112.02 ± 3.34 , 105.33 ± 1.05 ppm 함유되어 있었음.
 - 들깨유의 지방산 조성은 들깨와 비슷하였고 토크페롤의 총 함량은 641.15 ppm이었고 폴리페놀의 함량은 80.56 ppm 이었음. 폴리페놀은 특히 토크페롤의 산화를 억제함으로써 들깨유의 초기 자동산화 억제에 크게 기여하였음.
 - 들깨유의 자동산화 활성화 에너지는 약 24 kcal/mol이었고 빛과 온도 증가는 들깨와 들깨유의 산화를 촉진시켰음.
 - 들깨죽 제조 시 클로로필의 첨가는 들깨 유지 산화에 유의한 영향을 미치지 않았으나 베타카로텐의 첨가는 들깨 유지의 산화를 감소시켰다. 또한 이들 모두 들깨에 존재한 토크페롤의 분해를 억제시켜 들깨 유지의 산화 안정성에 긍정적인 영향을 주었음.
 - 들깨유 에멀전에 첨가된 클로로필은 빛 존재 하에서 들깨유의 산화 및 토크페롤과 폴리페놀 분해를 유의하게 촉진시켰으며 빛이 존재하지 않은 경우에는 들깨유의 산화에 유의한 영향을 미치지 않았음.
- ② 고도불포화지방산을 반응물로 하는 재구성지질 생산
- 리놀렌산이 sn-1, 2, 3 위치에서 공히 모두 주요 지방산으로 밝혀졌다. 각 위치에서의 함량은 각각 62.1%, 51.9%, 45%였다.
 - 들깨의 총지질함량은 45.6%였으며, 총지질의 지방산조성은 리놀렌산 (53%), 올레산 (20.9%), 리놀레산 (15.4%), 팔미트산 (7.3%), 스테아르산 (2.5%) 이었다.
 - Group I 효소로써 Lipase CC, Group II로써 Lipase RM, Group III로써 Lipase AP를 대상으로 들깨유 interesterification용 효소를 선발하였다. *Rhizomucor miehei* 리파제가 가장 높은 triglycerides 합성 활성을 보여 반응효소로 선발되었다.
 - 들깨유의 interesterification을 위한 유기용매로는 공업적으로는 hexane이, 실험용으로는 isooctane이 가장 적합한 것으로 나타났다.
 - 들깨유의 transesterification 결과, 재구성 들깨유의 입체특이적 지방산조성은 원료 들깨유의 지방산조성과 큰 차이를 보이지 않았다.
 - Hexane 내에서 들깨유와 리놀렌산의 interesterification 반응 결과, sn-2 위치에서의 리놀렌산 함량 변화는 거의 없었다. Solvent-free interesterification 반응에서도 sn-2 위치에서의 리놀렌산 함량 변화는 거의 없었다.
- ③ (위탁과제 1) 전처리 조건 및 추출방법에 따른 들깨유의 기능성분 함량 및 산화안정성 규명
- 볶음시간을 8, 10, 12, 및 14분 처리하여 얻은 들깨로부터 압착 착유한 들기름의 착유량, 색도, 지방산조성, 피토스테롤, 토크페롤, 폴리코사놀 함량을 분석하여, 볶음정도에 따른 기능성 성분의 차이를 확인하였다. 지방산 조성 및 피토스테롤함량은 볶음정도에 따라 큰차이를 나타내지 않은 반면, 착유량과 색도는 볶음 정도에 따라 증가하였다. 그리고 압착들기름의 토크페롤 및 폴리코사놀 함량은 볶음정도

가 강할 수록 감소하는 경향을 보였다.

- 볶음정도를 달리하여 착유한 들기름의 자동산화안정성 및 광산화안정성을 연구한 결과, 볶음정도가 강할 수록 압착 착유 들기름의 자동산화안정성은 증가하였으며, 볶음 시간 후반부에 특히 그 효과가 매우 크게 나타났다. 반면 볶음정도가 증가하여도 광산화안정성은 증가하지 않았다.
- 볶음시간을 8, 10, 12, 및 14분 처리하여 얻은 들깨로부터 용매로 착유한 들기름의 착유량, 색도, 지방산조성, 피토스테롤, 토코페롤, 폴리코사놀 함량을 분석하였다. 용매 추출 들기름의 경우에도 지방산 조성 및 색도 모두 볶음정도에 차이를 나타내지 않았다. 용매추출의 경우에도 들기름의 착유량은 볶음정도가 증가할수록 증가하였다. 용매착유 들기름의 토코페롤 및 폴리코사놀 함량은 볶음정도가 강할수록 감소하는 경향을 보였다.
- 초임계 유체추출법을 이용한 들기름을 착유하는 연구를 수행하였으며, 추출조의 압력이 증가할 수록 착유량은 증가하였으나, 추출조의 온도는 착유량에 큰 영향을 미치지 못하였다. 착유조건에 따른 초임계유체추출 들기름의 지방산, 피토스테롤, 토코페롤, 폴리코사놀 함량을 특정하였다. 추출조의 압력이 증가할 수록, 토코페롤 및 폴리코사놀 함량은 현저히 감소하는 경향을 보였다. 초임계 유체추출 방법으로 착유한 들기름에 폴리코사놀 함량이 현저히 높았다.
- 추출방법을 달리하여 얻은 들기름의 자동산화 안정성 및 광산화안정성을 측정된 결과, 착유방법에 따라 들기름의 자동산화안정성은 큰 차이를 보였다. 특히 초임계 유체 추출법으로 착유한 들기름의 자동산화 안정성은 크게 낮게 나타났다. 그러나 광산화안정성은 착유방법에 따라 큰 차이를 나타내지 않았다.
- 추출방법을 달리하여 얻은 들기름의 휘발성 향기성분을 SPME법으로 분석하였다. 압착착유 들기름이 가장 피라진함량이 높았으며, 초임계 추출장치로 착유한 들기름 그리고 용매추출들기름의 순으로 감소하였다.
- 들기름중에 함유된 폴리코사놀함량을 측정하기 위한 새로운 GC-MS/MS 분석법을 성공적으로 개발하였다.

④ (위탁과제 2) 들깨유의 미세캡슐화 수율 극대화를 위한 최적 조건의 확립

- 고 안정성의 emulsion 형성을 위한 유화제를 탐색하고, 체내 방출제어 가능한 피복물질을 선정함(유화제: PSMS, 피복물질: gelatinized SPS)
- 미세캡슐 분말화 공정을 위해 피복물질에 당알콜을 첨가하고 동결건조함으로써 미세캡슐 분말을 제조함(당알콜: isomalt)
- 내부표준물질(Oil red O, 최대흡수파장 510 nm)을 이용하여 광학적으로정량할 수 있는 미세캡슐화 수율분석법을 확립함
- 미세캡슐 공정의 유효 반응변수를 선정하고, 반응표면분석법을 이용하여 반응조건을 최적화 함([중심물질]/[피복물질] 조성비: 0.34, 유화제 첨가량: 221.7 μ mole, 분산매 온도 13.3 $^{\circ}$ C)
- 들깨유 함유 미세캡슐의 형상 및 내부구조를 관찰하기 위해 CLSM 및 FIB combined FE-SEM 분석을 수행함
- 미세캡슐의 저장안정성을 확인함 (pH 2-12 구간에서 30일 동안 89.9%이상의 안정

성을 나타냈으며, 60°C를 제외한 냉장 및 상온에서 높은 저장안정성을 나타냄)

- *In-vitro* 소화모델을 이용하여 미세캡슐의 체내 방출특성을 규명하였음 (대조군 및 위 조건에서 상대적으로 안정하였으며, 소장의 소화모델에서 점진적으로 중심물질을 방출하여 4시간 내에 방출률이 65.6%에 도달함)

● 제 1 협동과제 : 기능성지질소재의 기능성 실증 실험

- 들깨유의 항암효과를 MTT assay로 측정한 결과, 정상 293T(신장상피세포)세포에서의 세포상해효과는 들깨유와 대조군인 해바라기유에서 모두 관찰되지 않았다 -정상세포에서는 세포독성이 관찰되지 않음.
- U937 및 THP-1백혈병세포주를 이용한 항암효과를 관찰한 결과, 대조군인 해바라기유보다 들깨유 첨가시에 농도의존적으로 세포독성을 나타내어 항암효과가 인정되었다.
- RT-PCR으로 확인한 결과, 들깨유는 p53(암억제유전자) 및 Bcl-2 (apoptosis 유도 유전자)의 발현은 증강시켰고, Bcl-xL (apoptosis 억제유전자)의 발현을 감소시킴을 확인하였다.
- THP-1 백혈병세포주에서 다른 oil에 비해 특히 분체들깨유 처리군에서 세포 생존율 억제효과가 보였다(40 μ g/ml-약50% 억제).
- B16F10 melanoma 세포주에서 해바라기유에 비해 분체들깨유에서 우수한 세포생존율 억제효과가 있었다.(1 μ g/ml-약 60%, 20 μ g/ml-90%이상 세포독성효과)
- THP-1세포주에 분체들깨유 처리한 결과, p53(tumor suppressor gene)유전자는 10 μ g/ml에서 대조군보다 1.5배 증가하였으며, Bax (pro-apoptosis gene)는 10 μ g/ml에서 거의 2배 증가하였다.
- THP-1세포주 분체들깨유 처리군에서 p53은 대조군보다 약 3배 증가(10 μ g/ml처리군), Bax는 농도의존적으로 증가하여 암세포의 apoptosis를 유도하는 효과를 관찰하였다.
- BALB/c생쥐에 4주간 투여한 결과, 분체들깨유 투여군의 비장에서 B세포-11.6%, total T세포-21.1%, T_H-19.1%, T_c-31.8% 증가하였고, 흉선에서는 T_H-9.8%, T_c-31.6% 증가하여 면역력 개선효과를 관찰하였다.
- C57BL/6N 생쥐에 B16F10 melanoma 세포를 8 \times 10⁵cells/mice 농도로정맥투여(*i.v*) 하고 각 oil을 2주간 경구투여한 결과, 해바라기유 투여군은 폐로의 전이를 약 65% 억제하였으며, 분체들깨유 투여군은 약 90%의 전이억제가 관찰되었다.
- MOLT-4, THP-1, HL60, U937 백혈병세포에 들깨유, 유화유지, 시제품을 처리한 결과, 특히 MOLT-4에서 시제품(PP)이 농도의존적으로 백혈병세포의 생존율을 억제하였다.
- BALB/c 생쥐에 4주간 투여한 결과, 유화유지 투여군에서 비장의 B세포가 약 50% 증가하여 면역세포 활성이 증강되었다.
- 시제품 투여군에서 비장의 B세포가 약 60%증가되었고, Tc세포가 약 20% 증가하는 면역활성 증강효과를 보였다.
- BALB/c 생쥐의 혈중 lymphokine은 IL-2는 시제품 투여군에서 약 55%, 유화유지 투여군에서 약 5배 증가하였으며, IL-4는 유화유지 투여군에서 약 1/3로 감소하여

면역력 개선효과를 보였다.

- Apoptosis 관련 유전자(Bcl-2, Bax, PCNA)의 발현양상을 확인한 결과, 유효유지에 비해 시제품 처리군에서 apoptosis억제유전자인 Bcl-2유전자는 감소하였고, 촉진유전자인 Bax유전자는 증가하였다.
- Apoptosis 관련 단백질(Bcl-2, Bax, PCNA)의 발현양상을 확인한 결과, 시제품 처리군에서 Bcl-2단백질은 유의적으로 감소하였으며, Bax단백질은 증가하여 상기의 유전자 발현양상과 동일한 결과를 보였다.

① (위탁과제 1) 들깨 추출물의 지질저하 및 항동맥경화 효과 평가

- 들깨유, 참기름, 해바라기유 및 각 메탄올 추출물의 유리기 소거활성을 알아본 결과, 식용 유지 및 메탄올 추출물의 DPPH 소거능은 참기름에서 가장 높게 나타났다 ($p<0.05$). 또한 메탄올 추출물의 superoxide anion 소거능은 들깨유에서 가장 높게 나타난 반면, hydroxyl radical 소거능은 참기름과 해바라기유 메탄올 추출물에서 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다 ($p<0.05$).
- 혈액 및 조직 중의 지질농도 측정, 동맥궁의 지방병변 생성 정도, 혈관부착인자(ICAM-1, VCAM-1) 및 NO 생성 효소 발현, 혈장 euglobulin fraction의 피브린 분해능 및 지질과산화물 생성 정도를 확인하였다.
- Apo E KO 마우스에서는 식이에 의해 혈중 지질 농도에 차이를 보인 반면, wild type 마우스에서는 식이에 관계없이 정상적인 혈중 지질 농도를 유지하는 것을 확인할 수 있었다. Apo E KO 마우스에서 식이에 따른 혈중 지질의 농도를 비교하였을 때, 들깨유 섭취 군이 라드 섭취 군에 비해 TG 농도는 29.23% 감소되었고, TC와 LDL-C 농도는 각각 27.37%, 27.40% 감소되었다 ($p<0.05$). 이에 따라 들깨유군의 동맥경화 지수가 라드 군에 비해 50% 감소되어 ($p<0.05$) 들깨유의 섭취가 동맥경화의 위험성을 유의적으로 낮춰줄 것이라 예상할 수 있었다.
- Wild type 마우스에 비해 apo E KO 마우스의 혈전 용해능은 현저히 감소되었다 ($p<0.05$). 그리고 apo E KO 마우스에서, 들깨유군의 혈전 용해능이 라드 군에 비해 3.6배 증가되었다 ($p<0.05$).
- Apo E KO 마우스의 대동맥에서 ICAM-1과 VCAM-1의 발현 정도는 들깨유군이 라드군에 비해 각각 47% 와 17% 감소되었다 ($p<0.05$). 들깨유군의 iNOS 활성은 21% 감소하였고 eNOS 활성은 37% 유의적으로 증가되었다($p<0.05$).
- Apo E KO 마우스의 동맥궁에 형성된 지방 병변의 면적은 라드 군에 비해 들깨유군의 병변 형성이 47% 감소됨을 확인할 수 있었다 ($p<0.05$). 간의 TG 농도는 WPE의 TG 농도는 WLD에 비해 45.29% ($p<0.05$) 감소하였다.
- 들깨유는 apo E ko 마우스의 중성지방 저하 효과는 없었다. 그러나 간 TC 농도는 라드군에 비해 35.76% 감소하였다($p<0.05$). Wild type mice에서는 들깨유군의 간 TC 농도는 라드군에 비해 30.60% 감소하였으나 유의적인 차이를 보이지 않았다. 뇌 조직 중 TG 함량은 ALD>WLD>APE>WPE 순으로 나타났다. WPE의 뇌 TG 함량은 WLD에 비해 43%의 유의적인 감소를 보였으며, APE의 TG 함량은 ALD에 비하여 유의적으로 17% 감소하여 지질 축적 저하 효과가 관찰되었다. 뇌 조직 중 TC 농도는 APE에 비해 ALD에 비하여 7%의 유의적인 감소를 보였다.

- 뇌 조직에 축적된 지질 과산화물은 ALD, WLD, APE, WPE 순으로 높았다. APE의 TBARS 농도는 ALD에 비하여 20.8%의 유의적인 감소를 보여, WLD 및 WPE의 TBARS 농도와 유의적인 차이가 없었다. 지질 축적 및 지질과산화로 인한 뇌 손상 정도를 실험 동물 별로 비교해 보면 WLD의 해마 조직학적 손상이 WPE에 비하여 약 27% 높았으나, 유의적이지 않았다. 그러나 APE는 ALD에 비하여 35%의 유의적인 손상 감소를 보였다 ($p < 0.05$).
 - 유태들깨유의 혈중 지질 저하 효과는 들깨유와 유사하였다.
 - 유태들깨유를 섭취한 군은 Lard군에 비해 혈전용해능이 유의적으로 증가하였다.
 - 동맥궁 내의 지질침착 정도 역시 들깨유군과 유태들깨유군에서 Lard군 보다 낮았다.
 - 임상 실험을 위하여 20명의 피험자를 무작위로 나누어서 동일한 칼로리로 제조된 흰죽과 들깨죽을 30일간 아침으로 섭취시켰다. 이때 반찬은 배추김치 또는 깍두기로 제한하여 부식에 의한 영향을 최소화 하였다.
 - 흰죽 (n=10) 및 들깨죽 (n=10)을 30일 간 아침 식사로 섭취하였을 때 AST와 ALT 수치에 변화가 관찰되지 않아 개발 제품에 의한 이상 증상은 없음을 확인하였다.
 - 들깨죽군, 흰죽군의 공복 혈당 농도는 각각 4.79%, 9.36% 상승하였으나 유의적인 차이는 없었다.
 - 죽 섭취에 따른 혈중 중성지방 변화는 들깨죽군이 흰죽군보다 유의적으로 낮았다.
 - 총 콜레스테롤, LDL-C, HDL-C 및 동맥경화 지수의 변화는 두군간에 유의적인 차이는 없었다.
 - 개발된 들깨죽은 시판되고 있는 기존의 죽(흑임자죽)과 비교하였을 때 외관상으로는 별 차이가 없으나, 향미, 맛, 전반적인 기호도는 유의적으로 높았다.
- 제 2 협동과제 : 기능성지질 상업용 제품 생산기술
 - 내용 분석(content analysis)을 실시하고 들깨 활용 업계 및 편의 식품 제조업체 전문가 10명을 대상으로 in-depth interview를 실시한 결과, 기름을 덕용으로 사용하는 제품에 사용할 경우 들기름의 높은 리놀렌산의 함량 및 맛과 향의 특성으로 인해 건강기능성과 flavor 측면에서 제품의 품질과 소비자인식이 향상될 것으로 분석되었음.
 - 또한 분체형 기능성 지질을 스프 type제품 개발에 사용함으로써 스프 type 제품의 기름의 첨가로 인해 발생하는 제품에서의 기름분리현상을 최소화시켜 제품의 품질력이 향상될 것으로 분석되어 들깨유 이용을 위한 시장다변화가 제품의 개발 방향으로 결정되었음.
 - 본 연구에서는 무작위 표본추출(random sampling)한 일반 소비자 250명을 대상으로 2009년 10월 1일부터 10월 31일까지 설문조사를 실시하였음.
 - 전반적인 들깨와 들깨를 이용한 음식의 선호도는 5점 중 3.50와 3.56으로, 들기름과 들기름을 이용한 음식의 선호도는 3.64와 3.67으로 조사되었음.
 - 들깨류의 구매 형태는 들깨가루(45.1%), 들기름(35.9%), 생들깨(5.2%)의 순으로 나타났고, 구입 시 고려요인을 살펴본 결과 들깨(87명; 36.4%)와 들기름(83명;34.7%) 모두 원산지(국내사/수입산)를 가장 많이 고려하였음.

- 들깨 및 들기름 이용 편의 식품 유형은 간단 조리 후 먹는 음식(ready to end-cook) 유형에 대한 요구도가 가장 높았음.
 - 들깨 및 들깨 이용 식품의 적정 관능 품질 조건을 제시하기 위하여 들기름 7종에 대한 교차문화적 묘사분석(cross-cultural descriptive analysis)을 실시하였음.
 - 한국인(10명)은 향미 특성 18개를 도출하였고, 이 중에 14개 용어들에서 유의적인 차이가 나타났으며($p < 0.05$), 중국인(8명)은 향미 특성 12개를 도출하였고, 8개 용어들에서 유의적인 차이가 나타났음($p < 0.05$). 마지막으로 미국인(9명)은 향미 특성 16개를 도출하였고, 이 중에 14개 용어들에서 유의적인 차이가 나타났음($p < 0.05$).
 - 비교적 들기름이 익숙한 한국인들이 가장 다양한 용어들을 도출하였고, 들기름에 대한 경험이 없는 미국인들은 다양한 용어들을 도출하긴 하였으나, 비식품 용어들을 많이 도출한 것을 확인 할 수 있었음.
 - 들깨 및 들깨 이용 식품의 적정 관능 품질 조건을 제시하기 위하여 한국인(10명)과 중국인(9명)을 대상으로 8가지 들깨죽에 대한 묘사분석(descriptive analysis)을 하고, 소비자 기호도(consumer acceptability test)를 조사(한국인 87명, 중국인 63명)하여, PLSR분석을 실시한 결과, 두 나라 모두 RSPO(Roasted perilla oil porridge) 시료에 대한 기호도가 높게 나타났음.
 - 한국인의 경우 윤기 있는 표면, 짠맛, 감칠맛 등의 특성이 기호도를 높이는 주요한 요인으로 작용하였고, 중국인의 경우 윤기있는 표면, 참기름 향미, 밝은 외관 등의 특성이 기호도를 높이는 주요한 요인으로 작용함. 반면에 회색, 지저분한, 거친 외관 등의 특성은 양 국가에 모두 기호도를 낮추는 요인으로 작용하는 것으로 나타났음.
 - 들깨유는 유용성으로 식품산업에서 식품가공시 유지와 수분층과의 분리현상, 여러 가지 원료의 혼합공정에서 분산성이 떨어지는 현상이 발생함.
 - 들깨유를 식품산업에서의 사용상의 효율성을 높이기 위해 들깨유를 수용화하여 식품소재화 하였음.
 - 분말들깨유는 들깨유를 coating 소재인 cyclodextrin, HPMC를 활용하여 고체화하여 분말상태로 제조하였으며 이는 식품산업에서 고체-고체배합공정에 사용이 가능함. 분말들깨유의 배합비와 공정을 최적화 하였으며, 대량생산공정을 확립함. 이때 수용액 상태에서 분말들깨유의 oil drop size는 514nm로 최소화 하였으며 이때의 수율은 최대 95% 였음.
 - 수용성 나노들깨유는 페이스트 형태로 식품가공 공정 중 액체-액체배합에 사용목적으로 개발하였음. 올리고당과 유화제, 들깨유의 함량비 및 공정조건을 최적화 하였고 이를 대량생산하였음. 이때의 수용성 나노들깨유는 수용액 상태에서 oil drop size는 200nm 이하였음.
 - 레토르트 들깨죽의 SWOT-AHP분석을 통해 40대 이상의 건강에 관심이 높은 성인층과 노년층을 대상으로 마케팅 전략을 수립을 통해 향후 레토르트 들깨죽을 상업화할 기반을 마련함.
- ① (위탁과제 1) 들깨, 들깨유를 이용한 편의 식품 개발
- 들깨유, 분말들깨유 수용성 나노들깨유를 활용하여 편의식품을 개발함. 들깨유는

비빔 type의 덕용기름으로 그 배합비를 개발하였고 이때 ω -3 지방산함량, 산화안정성, 관능특성을 고려하여 들기름 10%를 첨가한 덕용기름을 개발함. 또한 토크페롤 400ppm 첨가에 따라 덕용기름의 안정성 확보하였음.

- 분말들깨유를 활용한 편의식품은 스프침가 들깨죽 type으로 개발하였음. 이는 (주)농심에서 직접 제조할 것을 고려하였음. 또한 분말들깨유의 안정성 확보를 위해 토크페롤을 500ppm 첨가 하였음.
- 수용성 나노들깨유를 활용하여 레토로트 들깨죽을 개발하였음. 레토로트 들깨죽은 멥쌀, 찰쌀, 땅콩, 들깨가루, 수용성 나노들깨유, 소금, 설탕등을 넣고 마쇄한 후 일정온도에서 호화시킨 후 레토로트 공정을 거침.
- 레토로트 들깨죽은 360kg 단위로 대량생산 하여 시제품을 제조하였고, 이때의 품질안정성은 들깨의 첨가에 따른 산화안정성을 품질저해요인으로 선정하였음. 유통기한 12개월확보를 위해 가속실험을 진행한 결과 산화안정성 지표인 과산화물값 및 관능특성 중 이취, 산패취는 저장기간 동안 큰 변화를 나타내지 않음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 2012년 3월 현재 SCI 논문 발표 5편, 비 SCI 논문 3편이 출판되었고 논문 게재 확정 후 출판 중인 SCI 논문 3편, SCI 논문에 심사 중인 논문 3편으로 목표값을 달성하였음. 또한 특허 출원 3건으로 목표값 달성하였으며 현재 비공개기간임.
- 참여기업인 농심과 협동연구를 통해 결과를 얻은 것으로 실질적인 기술이전이 이루어졌다고 보이며, 참여업체이기에 유상기술이전은 어려움. 개발 기술을 활용한 레토로트 들깨죽을 시생산하였으며 수용성 나노들깨유를 일반 가공식품에 첨가하여 건강기능성이 향상된 가공식품 개발하고 실용화할 계획임.
- 식물성 오메가 지방산을 다량 함유한 들깨유의 지질저하 및 항동맥경화 건강기능성을 과학적인 근거로 대외적으로 홍보하고 교육 자료로 활용할 계획임.
- 들깨유의 항동맥경화 예방 효과, 유화들깨유의 지질 저하 기능성 확인 및 이를 이용한 들깨죽 제품의 혈중 지질 저하 효과에 관한 논문 투고 중임.
- 항알러지, 항산화에 대한 추가 기능성 및 들깨유가 혈관 확장에 미치는 영향에 대한 ex-vivo 연구를 계획 중임.

SUMMARY

- Powdered perilla oil with improved oxidative stability and functionality was developed for further application to the commercial products, based on the analyses of chemical characteristics and its oxidation behavior related with various processings. The study consisted of 3 main parts; 1. Technology for the production of functional lipid materials, 2. Verification of the functionality of the functional lipid materials, and 3. Commercial application of the functional lipid materials.

- Main results obtained from the study are as follows;
 - Perilla seeds contained total lipids at $35.31 \pm 1.24\%$ mostly with neutral lipids (94.3%), and the lipid consisted of linolenic($66.78 \pm 0.17\%$), oleic($12.80 \pm 0.10\%$), linoleic($11.80 \pm 0.02\%$), palmitic($7.15 \pm 0.13\%$), and stearic($1.50 \pm 0.08\%$) acids. Contents of tocopherols and polyphenols were 731.98 and 30.9 ppm, respectively.
 - Activation energy of the perilla oil oxidation was estimated to be approximately 24 kcal/mol, and light and temperature increase accelerated the oxidation.
 - Chlorophyll and carotenoids added to perilla seeds porridge inhibited degradation of tocopherols, resulting in improvement of its lipid autoxidative stability.
 - Chlorophyll addition to perilla oil emulsion increased the oil oxidation and degradation of tocopherols and polyphenols under light, but did not affect significantly in the dark.
 - Linolenic acid was the major fatty acid in the sn-1, 2 and 3 positions. The percentage composition of fatty acids in the all positions showed the same pattern as in total fatty acid composition; however, the concentration at each stereospecific position was slightly different.
 - Lipase CC (Group I), Lipase RM (Group II), and Lipase AP (Group III) were used for selection process. Lipase from *Rhizomucor miehei* was finally selected for enzymatic esterification process of perilla oil
 - Lipase had high thermal stability over 60°C. The optimal lyophilization pH to dehydrate the lipase coincides with the optimal buffer solution pH for hydrolysis.
 - For interesterification, the hexane was shown to be suitable for industrial practice whereas the isooctane was shown to be convenient for laboratory uses.
 - The results obtained from the transesterification in solvent and solvent-free systems implied that the fatty acid compositions at sn-2 position of structured perilla oils were not significantly different from that of original perilla oil used as a substrate oil.
 - Roasting conditions of perilla seeds did not affect fatty acid composition and phytosterol contents, however, oil extraction and color increased and tocopherol and

polycosanols in the oil were decreased with roasting time.

- The autoxidative stability of perilla oil increased with roasting, while there was no significant effects on photooxidation by roasting.
- Supercritical fluid extraction of the perilla oil increased polycosanols contents, but the autoxidative stability was significantly decreased in the oil by supercritical fluid extraction.
- Volatile compounds were significantly affected by the oil extraction methods; pyrazine contents were the highest in the expressed oil followed by the oils extracted with supercritical fluids and the organic solvents.
- Gelatinized SPS and PSMS were found to be suitable coating materials and emulsifiers for the production of emulsion with high oxidative stability, and microencapsulation was performed by freeze-drying after addition of isomalt to the coating materials.
- Microencapsulation was optimized by RSM; [core materials]/[coating materials]=0.34, addition level of emulsifier= 221.7 μ mole, temperature= 13.3°C
- Microcapsule of perilla oil was stable (>89.9%) upto 30 days at pH 2-12 at room temperature and refrigeration temperature.
- The microcapsule of perilla oil was stable in a stomach condition and its releasing ratio reached 65.6% within 4 h in an *in-vitro* digestive model system.
- Treatment of both perilla seed oil(PO) and sunflower oil have not observed cytotoxic effect on the 293T normal kidney epithelial cells.
- PO showed significantly higher anti-cancer activity than sunflower oils on the U937 and THP-1 leukemia cells in a dose-dependent manner.
- PO treatment up-regulated p53(tumor suppressor gene) and Bax (pro-apoptosis gene) gene, while down-regulated Bcl-2 (apoptosis-inhibiting gene) gene expression in a dose-dependent manner.
- Powdered perilla oil showed significantly higher anti-proliferation activity than other tested edible oils on the THP-1 human monocytic lymphoma cells.
- Powdered perilla oils showed significantly higher anti-proliferation activity than sunflower oils on the B16F10 melanoma cells.
- Powdered perilla oil up-regulated p53(tumor suppressor gene) and Bax (pro-apoptosis gene) gene expression on the THP-1 leukemia cells.
- Oral administration of powdered perilla oil significantly increased both B, T, Th and Tc lymphocyte subpopulations as measured with a flow cytometer.
- Powdered perilla oil effectively suppressed the formation of metastatic tumor nodules in the lung of C57BL/6 mice.
- Perilla oil porridge (POP) inhibited cell viability of MOLT-4 leukemia cells in a dose-dependent manner.
- Oral administration of microcapsule of perilla oil enhanced (up to 50%) the mouse splenic B lymphocytes.

- Oral administration of POP increased the mouse splenic B and T lymphocytes subpopulation.
- Oral administration of POP and microcapsule of perilla oil increased significantly IL-2 concentration but microcapsule of perilla oil decreased IL-4 concentration in mice serum.
- Treatment of POP up-regulated Bax gene and down-regulated Bcl-2 gene expression.
- Treatment of POP up-regulated Bax protein but down-regulated Bcl-2 protein expression.
- Superoxide anion scavenging activity of perilla oil was greater than other tested oils. But DPPH and hydroxy radical scavenging activities of sesame and sunflower oil were greater than perilla oil.
- In animal study with apo E ko mice and its wild type mice, serum TG, TC and LDL-C were decreased by 29.23, 27.23, and 27.40 %, respectively. The serum lipid lowering effect of perilla oil in apo E ko mice were significant ($p < 0.05$).
- Protein expression of ICAM and VCAM-1 on endothelium of apo E ko mice were suppressed by 47 and 17 %, respectively, compared with lard group fed mice ($p < 0.05$). eNOS activity was elevated by 37% while that for iNOS was decreased by 21 % than those of lard group, respectively ($p < 0.05$).
- Perilla oil reduced the lesion size of fatty streak by 47% than lard group. Take the results in consideration, perilla oil seems to inhibit atherosclerosis in hypercholesterolemia induced animals.
- Beneficial effects of perilla oil were found in brain demonstrated that less brain damage (-35 %, $p < 0.05$) occurred with suppressed TC and TG accumulation in the brain than lard fed mice, although lipid peroxidation was enhanced in perilla oil group.
- Antiatherogenic effects of emulsified perilla oil were confirmed in apo E ko mice model and its effects were comparable with perilla oil
- TG concentration of subjects (n=10) consumed rice porridge containing emulsified perilla oil (RPEPO) for 30 days as a breakfast was significantly decreased compared with subjects (n=10) consumed rice porridge. Calorie provided to the two groups was same.
- However, cholesterol suppression effect of RPEPO was not observed.
- AST and ALT level of both subjects were in the normal range after consuming RP and RPEPO. Preference for RPEPO was higher than rice porridge with black sesame in 9 scale sensory evaluation.
- Perilla oil was powdered in a mass production to give good mixing property with other food components by use of cyclodextrin and HPMC; the optimal oil drop size of powdered perilla oil in the aqueous solution (aqueous nano perilla oil; ANP) was 514 nm for solid-solid mixing system with maximum yield of 95%.

- ANP was modified to a paste form with oil drop size of less than 200 nm for liquid-liquid mixing system.
 - Convenient type of oil having 10% perilla oil for *bibimmyon* was commercially developed and its oxidative stability was guaranteed by addition of tocopherol at 400 ppm.
 - Perilla oil porridge (POP) was commercially developed with ANP added with tocopherol at 500 ppm. POP, in a retort type, consisted of rice, peanuts, ANP, perilla seed powder, salt, sugar, etc, and 12 month of shelf-life was guaranteed on the basis of peroxide value, off-flavor, and rancid flavor.
 - Marketing strategy through the analysis of SWOT-AHP was established for retort type POP to population over 40 as a target market.
 - In-depth interview among perilla-related industry workers and professionals showed positive response on the use of perilla seeds and oils in a convenient type of oil due to high content of linolenic acid and flavor.
 - Overall preferences for dishes of perilla seeds and perilla oil were 3.53 and 3.65 out of 5.
 - The most preferred convenience food with perilla seeds/ perilla oil was a ready to end-cook type in a survey with 250 random panels.
 - In a cross-cultural descriptive analysis, Koreans, Chinese, and Americans draw 18, 12, and 16 terminologies, respectively, to express the flavor characteristics of perilla oil.
 - Koreans and Chinese showed high preference on the roasted perilla oil porridge among foods with perilla seeds and perilla oil from the descriptive analysis and consumer acceptability test. Glossy appearance, savory flavor, and salty taste were main factors for its preference for Koreans, and glossy appearance, flavor, and whiteness were for Chinese. On the other hand, greyness, dirty appearance, and rough mouthfeel lowered the preference for both peoples.
- Upon carrying out the project, 10 papers were published (SCI list 4, KSCI list 3) and in press (SCI list 3) at present time, and 3 paper were under review. Three patents were applied and reviewed for registration.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction (Purpose and Scope of the Study)	21
Chapter 2. Overview of Domestic and Aboard Technology	25
Chapter 3. Experimentals (Methods and Results)	27
Chapter 4. Degree of Goal Achievement and Contribution to the Related Area	226
Chapter 5. Outcomes and Future Plan for use of the Results	230
Chapter 6. Abroad Information and Technology Acquired during the Study	233
Chapter 7. References	234

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황	25
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	27
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	226
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	230
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	233
제 7 장	참고문헌	234

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 필요성

- 노인인구가 빠르게 급증하면서 고령화 사회로 진입하고 있고 항암, 항비만, 면역활성 강화, 두뇌기능 향상 등 현대 영유아, 청소년, 노인 등에 맞게 설계된 바이오 기능성 식품의 개발 필요성이 절실히 요구되고 있음.
- 식생활 습관, 환경 변화, 수명의 연장 등으로 인해 암은 세계적으로 감염성 질환, 심혈관계 질환에 이어 사망원인 3위(750만명 이상, 사망율 12%)를 차지하며 향후 25년 내에 암발생 인구가 매년 약 3000만명으로 늘어나고 2000만명이 암으로 사망할 것으로 예상됨. 우리나라도 인구 5명당 1명이 암으로 사망하고 해마다 현저히 증가추세임.
- 우리나라 65세 이상 노인의 90%가 만성 질환 한 가지 이상을 앓고 있으며 노인층의 1/3 이상이 대부분의 영양소에 대해 권장량의 75%에도 미치지 못하는 섭취량을 보이고 있음. 따라서 적절한 영양소 섭취와 함께 만성 질환 예방에 효과가 있는 기능성 웰빙 식품이나 편의식품의 수요가 급증하고 있음. 또한 농업 강국인 미국과의 FTA 체결이 예상되는 등 급변하는 농업 환경에서 우리 농산물의 소비 증대 방안 마련이 시급히 요구되고 있음.
- 세계 건강기능식품 시장은 약 2,900억 달러로 추정되고 있으며 미국의 경우 노년층과 음식섭취에 장애를 가진 사람들을 대상으로 한 Natural & Organic Foods는 2003년 이후 13% 대의 높은 성장을 보이고 있음. 뿐만 아니라 Personal Care 제품도 8~10%대의 성장률을 보이면서 꾸준히 성장하고 있음.
- 일본의 경우 2006년도 일본의 건강식품 시장규모는 1조 3000억엔으로 추정되며, 이중 특정보건용 식품은 고령화 사회의 본격화와 더불어 그 판매량이 급증하고 있다. 식생활 밸런스 유지향상과 안심, 안전시대에 즉시 대응할 수 있는 식품으로서 향후 판매량과 더불어 종류가 늘어날 것으로 전망됨.
- 국내 건강기능식품은 80년대에 도입기를 거쳐 90년대 IMF 시기에 잠시 마이너스 성장을 보였으나 이후 지속적으로 성장을 거듭하여 2006년 이미 2조5천억원 시장규모로 성장하였고, 3~4년 이후에는 성숙기로 진입할 것이 예측되며 (식품과학과 산업 2007. 6월)
- 건강기능식품은 크게 기능성, 비타민류 및 차류의 건강성, 새로운 원료 차용 등으로 시장이 형성되어 있으며, 소비자들은 예방의학차원의 건강식품에 대한 관심 고조 기조, 기능성 식품에 대한 신뢰성 제고, 건강식품의 질적개선 등을 원하고 있으나 현재 건강기능 식품은 성분/구성의 차별화가 되어있지 못한 점이 문제임.
- 건강기능 식품은 향후에도 고령화 사회 진입, 국민소득증가 및 예방의학 관심고조에 따라 지속적으로 증가할 것이며, 차별되고 과학적으로 구체적인 효과가 입증된 안정화된 성분을 가진 건강식품의 등장이 필요할 것으로 예상됨.
- 세계 기능성 식품 시장은 2000년 약 1,000억에서 2006년에는 1,800억 달러로 연평균 11%의 고성장을 예상함 (Nutrition business journal). 미국 기능성 식품 시장은 세계시

장의 약 36%를 차지하고 있으며 비타민 (34%), 허브 (21%), 식사대용제품 (11%), 스포츠 강화식품 (10%), 미네랄 (9%) 순임(식품과학과 산업 2007). 일본 건강식품 시장은 2005년 12,000억엔 이상으로 특정보건용 식품시장의 성장이 주목되며, 중국 건강식품 시장은 현재 1,800억 위안으로 연 15%정도의 성장률을 보이며, 만성질환 유병율의 상승과 고령화 사회의 대응책으로 국가에서 전폭적으로 지원하고 있는 산업임 (식품과학과 산업 2007).

- 들깨는 국산 종실로서 다른 판매목적 노지 작물에 비해 가장 많은 농가(80,169가구)가 경작하고 있으며 경작면적에 있어서도 6,869 ha로 가장 넓은 면적에서 재배되고 있는 유종으로 거의 독점적으로 국내에서만 소비되고 있는 국제적으로 경쟁력을 갖는 종실임. 따라서 FTA체결에 따른 농가 손실을 보전할 수 있는 최적의 국산 종실임.
- 들깨유에는 60%에 가까운 리놀렌산이 포함되어 있어 가장 오메가-3 지방산 함량이 높은 식물유지 중 하나이며혈중 콜레스테롤 함량 감소, 체지방 감소, 두뇌기능 향상, 심혈관질환으로 부터의 보호 및 항알러지 효과등이 보고된 필수지방산임. 또한 동물실험에서 유방암 및 대장암의 증식 억제 (Park and Kim, 2002), 학습능력을 향상 (Yamamoto et al., 1988; Yoshida et al., 1997), 혈소판응집인자 억제 및 심혈관질환의 예방효과 (Ho-hashi et al., 1997; 서화중, 2001), 항비만효과 (Okuno et al., 1997) 및 항알레르기 효과 (Watanabe et al., 1994)등의 다양한 기능성이 있음이 밝혀져 있음.
- 해외의 들깨 관련 가공 식품으로는 일본의 아지프로사에 의한 들깨유와 전두유를 혼합한 ‘에고마豆腐드레싱’과 들깨잎이 함유되어 있는 seasoning인 ‘Shioso Fumi Furikake’ (일본, JFC)와 ‘Shiso Kombu’ (일본, Nishimoto trading Co., LTD)가 있는 정도임(식품음료신문 2004년 기사).
- 하지만 기능성 푸드 제조를 위한 들깨 유래 기능성식품은 찾아 볼 수 없으며 들깨 및 들깨유 소재의 고급화가 절실히 필요함. 또한 들깨 및 들깨유의 국내 소비 진작 및 해외로의 수출가능성을 증가시키기 위해 다양한 형태의 고부가가치 식품 개발이 더욱 필요함.
- 그 동안 들깨유의 산업적 이용에 큰 제한점이었던 산화안정성 개선과 가공적성이 뛰어난 분체형 고도불포화 지질소재의 개발은 관련 산업체의 숙원이었음. 들깨는 국산 유량종실로써 가장 많은 농가가 가장 넓은 경작면적에서 재배하고 있는 유종이며 거의 독점적으로 국내에서만 소비되고 있기 때문에 FTA체결에 따른 농가 손실을 보전할 수 있는 최적의 국산 종실로 산화안정성이 향상된 분체형 들깨유의 상업적 개발에 대한 연구의 절실한 필요성이 대두되었음.
- 본 연구는 산화안정성이 향상된 분체형 들깨유의 상업적 개발에 대한 체계적인 연구로 최초 시행되었으며 3년간 최적 생산조건 및 기능성 확인에 중점을 두어 제조조건 설정 및 가공처리 방법에 따른 품질특성을 비교 검토하여 제조공정을 확립하고, 시제품을 제조하여 현장적용시험 및 경제적 타당성, 관능검사 등을 실시하였음.

2. 목적

- 본 연구는 리놀렌산 함량이 높은 국산 종실유를 이용하여 면역조절능, 항동맥경화, 항고혈압, 항비만, 항암, 인지능력 향상 등의 기능이 있으며, 산화안정성이 높고, 식품가

공공정에 적용성이 높은 분체형 기능성지질소재를 생산하고, 노인식, 영유아식, 청소년 식품 등에 적용할 수 있는 **다기능 상업용 건강기능식품을 생산**하는 기술을 개발하는데 최종 목표가 있었음.

제 2 절. 연구의 범위

- 본 연구에서는 들깨유로부터 맞춤형 재구성지질을 생산하는 기술을 개발하고, 들깨유의 최적항산화시스템 개발을 통하여 **산화안정성을 향상**시키고, 불포화도가 높은 이들 유지의 식품가공공정에 적용성이 뛰어난 소재로 만들기 위하여 **최적합 분체유지 제조용 미세캡슐화 (microencapsulation) 기술**을 개발하고자 하였음. 미세캡슐을 이용하여 만든 들깨유와 리놀렌산, 들깨유 탈지박 등의 소재를 이용하여 식품을 제조하고 이의 **생리기능성을 확인하기 위한 실증 실험**을 수행하고, 이들 소재를 이용하여 **상업용 제품**을 생산하기 위하여 소비자 조사, 제품 최적화 실험 등을 수행하는 것이 본 연구의 주요 내용이었음.
- 본 연구는 3개의 세부과제로 구성되었음. 제 1 세부과제는 기능성지질소재 생산기술 개발, 제 1 협동과제는 기능성지질소재의 기능성 실증 실험, 제 2 협동과제는 기능성지질소재를 이용한 상업용 제품의 생산기술 개발이 주요 내용임.
- 제 1 세부과제 : 고도불포화 기능성지질소재의 생산, 안정화, 및 미세캡슐화 기술 개발
 - ① 가공, 저장 조건 하에서 들깨와 들깨유의 산화안정성
 - 들깨와 들기름의 성분 분석 및 주요 미량 성분이 산화에 미치는 영향
 - 온도, 압력 및 광선의 존재에 따른 들깨 및 들깨유의 산화안정성
 - 들깨 및 들깨유 함유 편의식품에 첨가된 식품 재료가 들깨 및 들기름 산화안정성에 미치는 영향 연구
 - 일부 식품 재료를 첨가한 들깨 또는 들기름 함유 emulsion 식품의 산화안정성 평가
 - ② 고도불포화지방산을 반응물로 하는 재구성지질 생산
 - 들깨유의 입체특이적 지방산 조성 분석
 - 들깨유의 효소적 재구성지질 생산을 위한 효소의 선발
 - 효소적 interesterification, solvent 또는 solvent-free reaction 공정 최적화
 - ③ (위탁과제 1) 전처리 조건 및 추출방법에 따른 들깨유의 기능성분 함량 및 산화안정성 규명
 - 배전조건, 압착, 용매/초임계유체추출 등에 따른 들깨유의 기능성 성분
 - 토코페롤, 지방산 분석
 - Policosanol 프로파일 및 함량 분석
 - 추출전처리에 따른 들깨유의 자동산화 및 광산화 안정성 측정
 - ④ (위탁과제 2) 들깨유의 미세캡슐화 수율 극대화를 위한 최적 조건의 확립
 - 반응표면분석법을 이용한 실험설계
 - 오메가-3 지방산이 다량 함유된 들깨유의 미세캡슐화
 - 미세캡슐화 수율의 측정
 - 미세캡슐화에 따른 이취제거 정도 측정

- 미세캡슐 파우더화 및 pH 및 온도변화에 대한 저장안정성 확인 (들깨유 미세캡슐 분산액의 파우더화)
(저장온도 및 저장 pH에 따른 들깨유 미세캡슐의 안정성 측정)

○ 제 1 협동과제 : 기능성지질소재의 기능성 실증 실험

- ① 들깨 추출물 (powder fat, 주성분)의 항암·면역조절 활성 평가 (in vitro)
 - 들깨 추출물(powder fat, 주성분)의 항암·면역조절 활성 평가 (암세포의 증식에 미치는 효과, 암세포의 apoptosis유도에 미치는 효과, RT-PCR, Western Blot, 면역세포 활성화)
- ② 들깨 추출물 및 제품에 대한 항암·면역조절 활성평가 (in vivo)
 - 정상생쥐(BALB/c)의 면역세포 활성화, Nude mouse에 암이식 후 이식된 암 진행 및 전이활성, 복강대식세포 활성화 평가, Cytokine 분비활성, In vivo angiogenesis assay)
- ③ (위탁과제 1) 들깨 추출물의 지질저하 및 항동맥경화 효과 평가
 - In vitro에서 유리기 소거작용을 통한 산화스트레스 개선 효과 확인 (DPPH scavenging activity 와 hydroxyl, superoxide, peroxynitric radical 소거능 측정, 혈전용해능 측정 등)
 - Apo E knockout mice에서 항동맥경화 효과 확인 (동맥경화 유발을 위해 형질 변경한 apoE KO 마우스 사용, 지질농도측정, 동맥궁의 지질침착정도 측정, 혈관부착인자 발현, NO 생성 효소발현 확인 등)
 - 개발제품의 임상실험을 통한 지질저하 효과 (임상실험 승인을 득한 후 혈중 지질농도, 피브리노분해능, 간독성 관련 효소 활성 측정 등)

○ 제 2 협동과제 : 기능성지질 상업용 제품 생산기술

- ① 들깨 관련제품의 시장과 소비자 조사
 - 시장 다변화 가능성 탐색, 소비자 인지도 및 요구도 분석, 들깨 적정 관능품질 조건 조사
 - Content analysis와 들깨 활용 업계 및 관계자 대상의 in-depth interview를 통해 자료를 조사·분석하여 들깨 제품의 시장 다변화 가능성을 탐색함. 들깨 식품에 대한 소비자의 인지도 및 요구도를 조사 분석하여 편의식품 개발 시 소비자의 기호도를 반영한 제품 유형을 결정함. 또한 Cross-cultural descriptive analysis를 통하여 국내·외 소비자들에게 들깨에서 감지되는 관능적 특성을 출현 순서에 따라 질적 및 양적으로 평가함.
- ② 들깨, 들깨유 소재를 이용한 편의 식품의 산업화
 - 대량 생산 공정 개발, 시제품 생산, 마케팅 전략 제시
 - Pilot 제품의 up-scale 생산 시 발생한 품질 저해 요인을 규명하고 해결 방안을 도출하여 대량 생산 공정을 확립함. 들깨류 이용 편의 식품을 시생산하며, SWOT-AHP analysis를 이용하여 환경적 강점, 약점, 기회, 위협 요인을 파악하고 우선순위를 도출하여 세분시장에 따른 마케팅 전략을 수립함.
- ③ (위탁과제 1) 들깨, 들깨유를 이용한 편의 식품 개발
 - 시제품 개발, 품질 평가 및 전문가 대상 관능 평가
 - 들깨 및 들깨유를 이용한 국, 소스, 드레싱 등과 같은 액상 제품과 분말 스프, 조미료 등과 같은 분말 제품의 제품 유형 및 배합비를 개발함. 이화학적 분석 및 산화안정성 분석을 통하여 들깨 이용 편의 식품의 품질을 평가하고 품질 관리 기준 설정 근거를 마련함. 전문가 대상 관능 평가를 통하여 제품의 관능적 기호도를 제고함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 본 과제 대상인 들깨 또는 들깨기름과 관련된 연구는 대부분 국내에서 이루어졌으며, 본 과제의 중점 기술인 microencapsulation은 산화안정성이 낮은 어유를 대상으로 한 논문들이 대부분이며 들깨기름에의 적용 논문은 검색되지 않았음.
- 들깨기름을 이용한 면역개선, 항암, 심혈관계기능 개선에 대한 발표 논문은 존재하였으나 microencapsulation을 통한 powder 들깨기름의 산화안정성 개선 및 면역개선, 항알러지, 항암 활성에 대한 논문은 검색되지 않았음.
- 들깨유 특허 중 주식회사 엘지화학에서 등록한 들깨유를 주원료로 한 성인병 억제용 캡슐 조성물이 microencapsulation을 포함하는 특허로 분류가 가능하나 이는 건강기능식품이며 일반 식품에의 적용은 아님.
- 들깨 또는 들깨기름의 생리활성에 대한 선행 논문들은 매우 광범위하게 존재하였으나, 들깨 또는 들깨기름 뿐만 아니라 들깨잎, 들깨줄기 등 들깨 전반에 걸쳐 검색되어 들깨 또는 들깨기름 자체에 대한 생리활성을 포함하는 논문은 상대적으로 적었으며, 들깨기름 혼합식이 또는 들깨기름만을 식이로 했을 때의 심혈관계 개선기능, 면역기능, 항돌연변이, 항동맥경화 기능을 보인 논문이 있었음.
- 유지의 microencapsulation에 대한 연구는 대부분 어유를 원료로 하였으며 들깨/들깨기름을 포함하는 연구는 매우 적었음. 특허 또한 edible oil 전반에 걸쳐서 원료로 포함하였으며 원료를 들깨, 들기름, 들깨 추출물을 직접적으로 포함하지 않았고 들깨유/ 들깨추출물을 함께 포함하는 특허는 거의 존재하지 않았음.
- 들깨기름의 산화안정성에 대한 연구는 매우 광범위하였으나, 들깨/들깨기름에 포함되어 산화를 방지해주는 산화방지제에 대한 연구는 상대적으로 적었으며 대부분 들깨기름에서 산화방지물질의 용매 추출이나 탈지박의 용매추출에 의한 산화방지제 추출 및 효능에 대한 연구이었음.
- 본 과제 대상인 들깨와 관련된 특허는 대부분 국내 특허이었으며, 본 과제의 중점 기술인 microencapsulation은 최근 미국, 유럽, 이스라엘 등을 중심으로 활발히 적용되는 기술이지만 들깨기름(TAG)에의 적용 기술 등록 특허는 현재까지 없음.
- 들깨의 생리활성 물질에 대한 연구는 건강기능성 식품을 포함한 식품분야에 대한 연구가 미비하였으며, 들깨잎, 추출물을 이용한 인지기능장애예방, 소취제, 비만예방치료제, 피부노화방지 및 치료용 화장품 조성물, 들깨기름을 유효 성분으로 하는 항암제, 혈액 지방강하제 등에 대한 특허가 있었음.
- 따라서 최적합 분체유지 제조용 미세캡슐화 (microencapsulation) 기술과 최적합 항산화시스템 개발을 통하여 산화안정성을 개선시키고 식품가공공정에 적용성이 뛰어난 소재로서의 들깨 및 들깨기름을 이용하여 식품을 제조하고 이의 생리기능성을 확인한 실증 실험과 소비자 조사, 제품 최적화 실험 등을 수행하여 상업용 제품을 생산에 적용한 체계적인 연구는 본 과제가 최초임.
- 본 연구의 수행을 통해 성취한 연구 결과 및 기술 수준은 다음과 같이 목표값을 모두 달성한 것으로 자체 평가함.

개발기술명	관련기술 최고보유국	기술개발 목표수준 (%)	달성수준 (%)	목표 대비 달성수준 (%)	비고
microencapsulation	미국	95	95	100	체내 방출제어형 미세캡슐화
재구성지질 합성기술	미국	95	95	100	반응기술 자체는 최고 수준
산화안정성 개선	미국	100	100	100	powder 들깨기름 함유 편의식품 산 화안정성 개선
항암, 면역조절활성 평가	미국	80	80	100	들깨유의 활성 평 가는 최고 수준
지질저하 및 항동맥경화 효과	미국	80	90	100	powder 들깨유 이용 상업용 시제 품의 활성 평가; 세계 최초, 최고 기술

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절. 고도불포화 기능성지질소재의 생산, 안정화 및 미세캡슐화 기술 개발 (제 1 세부과제)

1. 가공 및 저장 조건 하에서 들깨 및 들깨유의 산화안정성

가. 들깨 및 들기름의 성분 분석

(1) 방법

들깨는 전라남도 순천에서 재배된 것을 인천광역시의 재래시장에서 구입하였고, 170-180°C에서 20분간 볶은 후 압착하여 들깨유를 얻은 후 지질 및 지방산 조성, 토코페롤, 폴리페놀, 인지질 등의 성분을 분석하였다.

들깨의 지질 조성은 메탄올의 혼합 용매(2:1, v/v)를 이용한 Folch법을 이용하여 들깨로부터 총지질을 추출하고 크로마토그래피법(TLC)에 의해 지질 조성을 평가하였다. 즉, Pre-coated Kieselgel 60F₂₅₄ TLC plate (Merck Co., Darmstadt, Germany)를 사용하여 디에틸에테르 : 아세트산 : 메탄올 (90:1:1, v/v/v)의 용매로 전개한 후 5% 황산용액에 담가 풍건한 후 200°C에서 1분간 가열하여 확인하고 imaging densitometer (Model GS-700 Biorad, Hercules, Calif., U.S.A.)를 사용하여 정량하였다.

들깨유의 지방산 조성은 들깨유를 14% BF₃-메탄올로 에스테르화시킨 후 헥산으로 추출하여 GC에 의해 분석하였다. 이때 분석기기는 Supelcowax 10 capillary column (30 m × 0.53 mm, 1.0 μm thick; Bellefonte, Pa, U.S.A.)과 flame ionization detector가 장착된 Younglin M600L gas chromatograph이었고, oven, injector, and detector의 온도는 각각 230, 280, 280°C이었다. 질소의 속도는 분당 5 mL이었다. 토코페롤 함량은 고속액체크로마토그래피 (High performance liquid chromatography, HPLC)를 사용하여 구하였다 (Lee and Choe 2003). 들깨유 0.1g을 n-헥산 1ml에 녹이고 hydrophobic 0.2um membrane filter로 여과한 후, 20ul를 HPLC (Younglin 9100 HPLC System, Seoul)에 주입하였다. 컬럼은 u-Porasil (3.9 x 300mm, 10um ID, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고, 이동상으로는 n-헥산 : 이소프로판올의 혼합용액 (99.8 : 0.2, v/v)를 사용하여 분당 2.0ml의 속도로 용출시켰다. 이때 형광검출기 (G1321A, Agilent 110 series, Germany)의 파장은 excitation 290nm, emission 330nm이었다. 들깨유의 토코페롤 함량은 표준 토코페롤 검량곡선을 이용하여 구하였다. 인지질 함량은 Nzai와 Proctor의 방법을 이용하여 얇은막크로마토그래피법 (Thin layer chromatography)과 덴시토미터법 (Densitometry)을 사용하여 구하였다. 들깨유를 클로로포름 : 메탄올 (95 : 5, v/v)의 혼합용액에 완전히 녹인 후 0.1ml를 취하여 실리카 겔이 코팅된 TLC판에 점적한 후, 클로로포름 : 메탄올 : 물 (75 : 25 : 3, v/v/v)의 혼합용매로 5번 TLC chamber에서 전개시켰다. 전개 후 2g의 요오드로 1시간 동안 5시킨 chamber에서 5분간 발색시키고, 다시 5% 황산용액에 10초간 담근 후 풍건하여 100°C 오븐에서 5분간 구워 발색시켰다. 인지질 함량은 덴시토미터 (Model GS-700 Imaging densitometer, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) 를 사용하여, 표준품 PC와 PE의 검량곡선으로부터 정량하였다. 폴리페놀 함량은 Lee 등의 방법을 변형하여 구하였다.

들깨유 3g을 n-헥산 10ml에 완전히 녹인 후 메탄올 : 물 (60 : 40, v/v)의 혼합용매 6ml를 넣었다. 30초 동안 섞어 준 후 원심분리기로 10,000rpm, 4°C 녹인 후 5분 동안 시료를 분리하였다. 하층액의 3ml를 취하여 5ml volumetric flask에 증류수로 희석하고, 희석액의 1ml를 5ml volumetric flask에 취하였다. Folin's Ciocaltau 시약 0.3ml를 넣고 3분간 정치시킨 후 Na₂CO₃ 포화 용액 0.5ml를 넣고 증류수로 5ml까지 맞추었다. 1시간 동안 정치시킨 후 UV-Visible spectrophotometer로 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 폴리페놀 함량은 표준 caffeic acid의 검량곡선을 이용하여 구하였다.

(2) 결과

(가) 들깨의 조성

클로로포름과 메탄올의 혼합 용매(2:1, v/v)를 이용한 Folch법에 의해 들깨로부터 추출한 총지질 함량은 건물대비 (dry basis) 35.31±1.24%이었으며 94.3%가 중성지질, 5.6%가 인지질, 그리고 당지질은 1% 미만이었다. 총지질의 지방산 조성은 리놀렌산이 가장 많이 함유되어 있었으며 (66.78±0.17%), 올레산 (12.80±0.10%), 리놀레산 (11.80±0.02%), 팔미트산 (7.15±0.13%)가 그 뒤를 이었고 스테아르산의 함량은 매우 적었다 (1.50±0.08%).

Folch법으로 추출한 들깨 지질에 함유된 총 토코페롤의 양은 731.98±17.96 ppm으로, α-, γ-, δ-토코페롤이 각각 5.96%, 91.97%, 이었다. 폴리페놀 함량은 30.9 ppm 이었다. 들깨에는 phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine이 각각 112.02±3.34, 105.33±1.05 ppm 함유되어 있었다.

(나) 들깨유의 조성

들깨유는 팔미트산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산으로 구성되어 있었으며, 이중 리놀렌산이 가장 많이 함유되어 있었다 (Table 1). 토코페롤의 총 함량은 641.15 ppm이었고 α-, γ-, δ-isomer가 존재하였으며, 폴리페놀의 함량은 80.56 ppm 이었다.

Table 1. Chemical characteristics of perilla oil

	16:0	7.38±0.23
	18:0	1.93±0.10
Fatty acid composition (relative %)	18:1	16.70±0.42
	18:2	14.91±0.20
	18:3	59.08±0.95
Tocopherols (ppm)	α-	51.65±2.32
	γ-	568.99±12.93
	δ-	20.59±2.11
	Total	641.15±17.36
Polyphenols (as caffeic acid, ppm)		80.56±1.79

나. 온도, 압력 및 광선의 존재에 따른 들깨 및 들깨유의 산화안정성

(1) 방법

저장 및 가공 과정에서 흔하게 접할 수 있는 조건인 온도와 광선의 의한 들깨 및 들깨유의 산화안정성은 시료병에 시료를 넣어 연구하였다. 들깨유 (10 g)를 20 mL 시료병에 넣고 한지와 고무줄로 막아 공기가 유입되도록 하였고 이들 시료병들을 1,700 lux의 light box에 넣어 산화시켰다. 또한 시료병을 알루미늄 호일로 싸서 일부 시료병은 빛을 차단하였다. 들깨유의 산화조건은 20, 40, 60, 80 °C에서 각각 50, 40, 15, 6일 동안 실시하였다. 들깨는 들깨유의 실험을 토대로, 들깨 (18 g)를 시료병에 넣고 rubber septa와 aluminum cap으로 막고 40, 60 °C에서 각각 28, 12일 동안 빛을 차단하거나 또는 광선 존재 하에서 산화시켰다. 산화 정도는 들깨유의 경우 과산화물값과 공액이중산값, 들깨의 경우 gas chromatography에 의한 headspace oxygen content로 분석하였다. 들깨유에 대한 control 기름으로는 불포화지방산 함량이 들깨유와 비슷한 정제 옥수수수를 사용하였다. 옥수수수의 지방산조성은 팔미트산 (12.12%), 스테아르산 (2.73%), 올레산 (33.17%), 리놀레산 (50.94%), 리놀렌산 (1.04%)으로, 불포화지방산 함량이 85.15%를 차지하였다. 옥수수수의 토코페롤 함량은 671.24 ppm으로 α -, γ -, δ -토코페롤이 각각 32.2%, 61.7%, 6.1%를 차지하였다. 폴리페놀은 옥수수수에서 검출되지 않았다.



Figure 1. Oxidation of perilla seeds

(2) 결과

(가) 들깨유의 산화안정성

① 온도와 자동산화

들깨유는 온도 증가에 따라 CDA값과 POV가 모두 증가하여 온도 증가에 따라 산화가 증가함을 나타내었다. 특히 온도 증가에 따라 들깨유의 자동산화 유도기간은 줄어드는 것을 알 수 있었다 (Figure). 들깨유는 대조군인 옥수수수와 비교할 때(Figure) 유도기간은 짧아 옥수수수에 비해 oxidation sensitivity가 높음을 보여주었다. 그러나 유도기간이 지난 후 산화속도는 오히려 들깨유에서 낮아 유도기간 이후의 산화안정성은 들깨유에서 더 높았다.

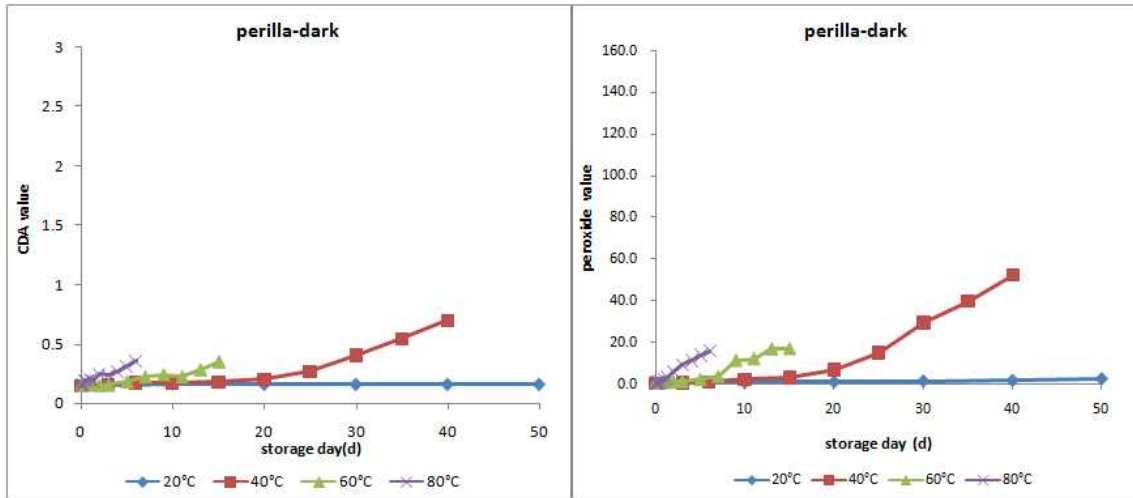


Figure 2. Conjugated dienoic acid contents and peroxide values of perilla oil during oxidation in the dark at 20, 40, 60, and 80 °C

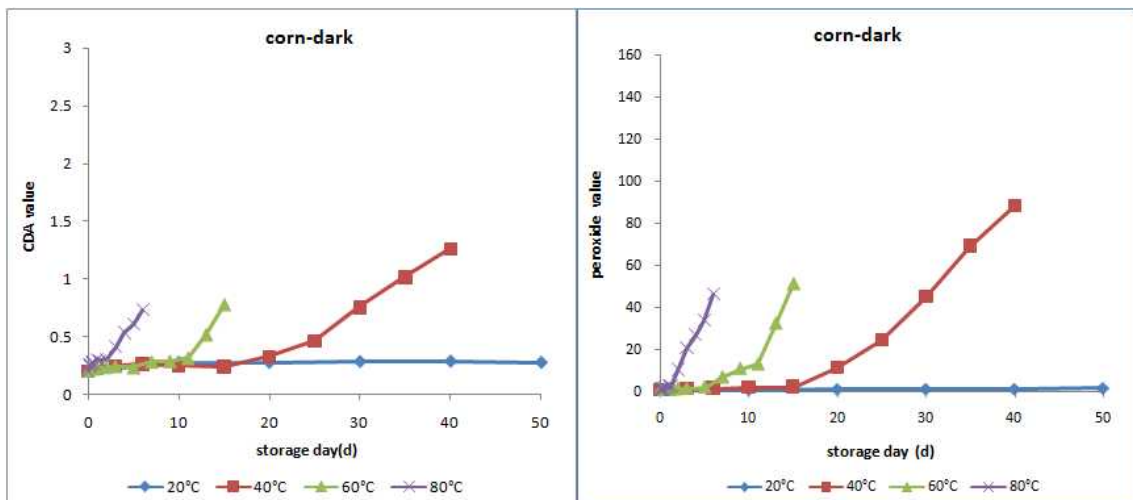


Figure 3. Conjugated dienoic acid contents and peroxide values of corn oil during oxidation in the dark at 20, 40, 60, and 80 °C

② 옥수수유와 비교한 들깨유의 oxidative sensitivity, 온도의존성, 안정성 비교

과산화물값변화로 구한 들깨유와 옥수수유의 40, 60, 80°C에서의 자동산화 유도기간은 20.97, 4.61, 0.26일(들깨유), 18.65, 10.82, 1.02일(옥수수유)이었으며 자동산화에 대한 활성화 에너지는 각각 23.94, 15.75kcal/mol이었다. 또한 CDA값변화로 구한 들깨유와 옥수수유의 40, 60, 80°C에서의 자동산화 유도기간은 22.91, 4.86, 0.27일(들깨유), 19.60, 11.41, 1.98일(옥수수유)이었으며 자동산화에 대한 활성화에너지는 각각 24.22, 12.45kcal/mol이었다. 또한 20°C에서는 과산화물값과 CDA값의 증가가 매우 느렸으나 옥수수유가 들깨유보다 낮은 값을 보였다. 이 결과는 들깨유가 옥수수유에 비해 온도의존성이 높음을 의미하며 옥수수유보다는 들깨유의 산화에 온도 조절이 더 중요함을 의미한다.

자동산화에 있어서 옥수수유에 비해 들깨유의 긴 유도기간은 옥수수유의 oxidative sensitivity가 들깨유보다 낮음을 의미하였다. 그러나 40, 60, 80°C에서 유도기간 이후의 POV값의 증가 비율은 2.43, 1.60, 0.11 meq/ kg/ day (들깨유), 3.96, 9.40, 0.35 meq/kg/day (옥수수유), CDA값의 증가 비율은 0.028, 0.015, 0.001%/day (들깨유), 0.049, 0.129, 0.004%/day (옥수수유)로 들깨유의 산화안정성이 높게 나타났다. 또한 광산화에서도 들깨유가 옥수수유에 비해 높은 산화안정성을 보였는데, 들깨유의 높은 산화안정성은 사용한 들깨유의 특성과 관련있을 것으로 생각된다. 즉, 옥수수유에서는 검출되지 않았던 폴리페놀이 들깨유에는 80.56 ppm 함유되어 있었으며 또한 이와 함께 들깨유 제조 공정에서 들깨유 볶음 과정 중 생성되는 MRP (Maillard reaction products)의 산화방지 작용과 관련된 것으로 생각된다.

③ 빛과 유지의 산화

빛은 들깨유의 산화를 증가시켰으며, 온도가 증가할수록 빛의 존재에 따른 들깨유가 산화된 정도의 차이가 감소하였다. 또한 모든 온도에서 들깨유의 광산화는 자동산화와는 달리 본 실험조건하에서 유도기간을 보이지 않았다. 또한 특이하게 옥수수유에 비해 들깨유의 광산화안정성이 높게 나타났다.

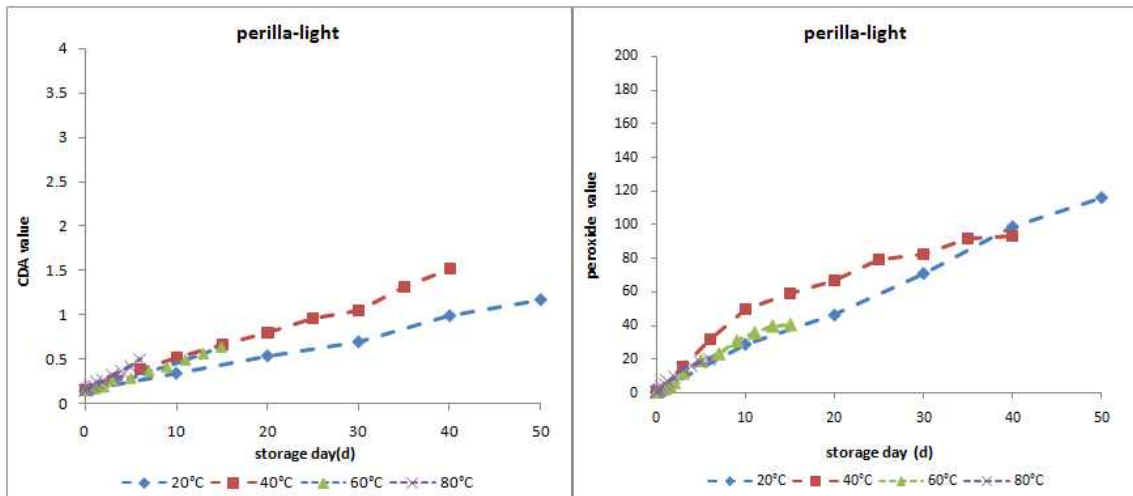


Figure 4. Conjugated dienoic acid contents and peroxide values of perilla oil during oxidation under light at 20, 40, 60, and 80 °C

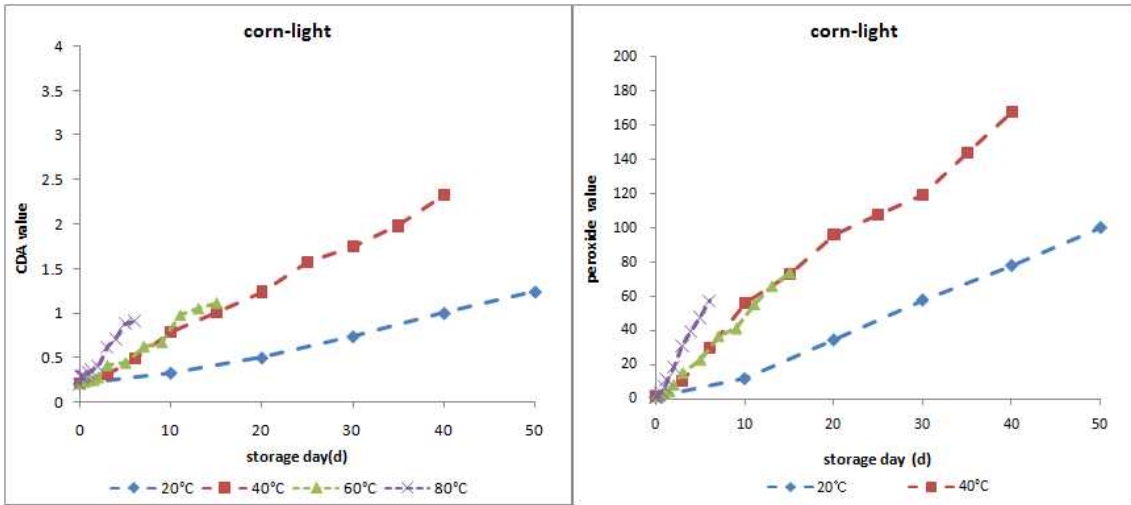


Figure 5. Conjugated dienoic acid contents and peroxide values of corn oil during oxidation under light at 20, 40, 60, and 80 °C

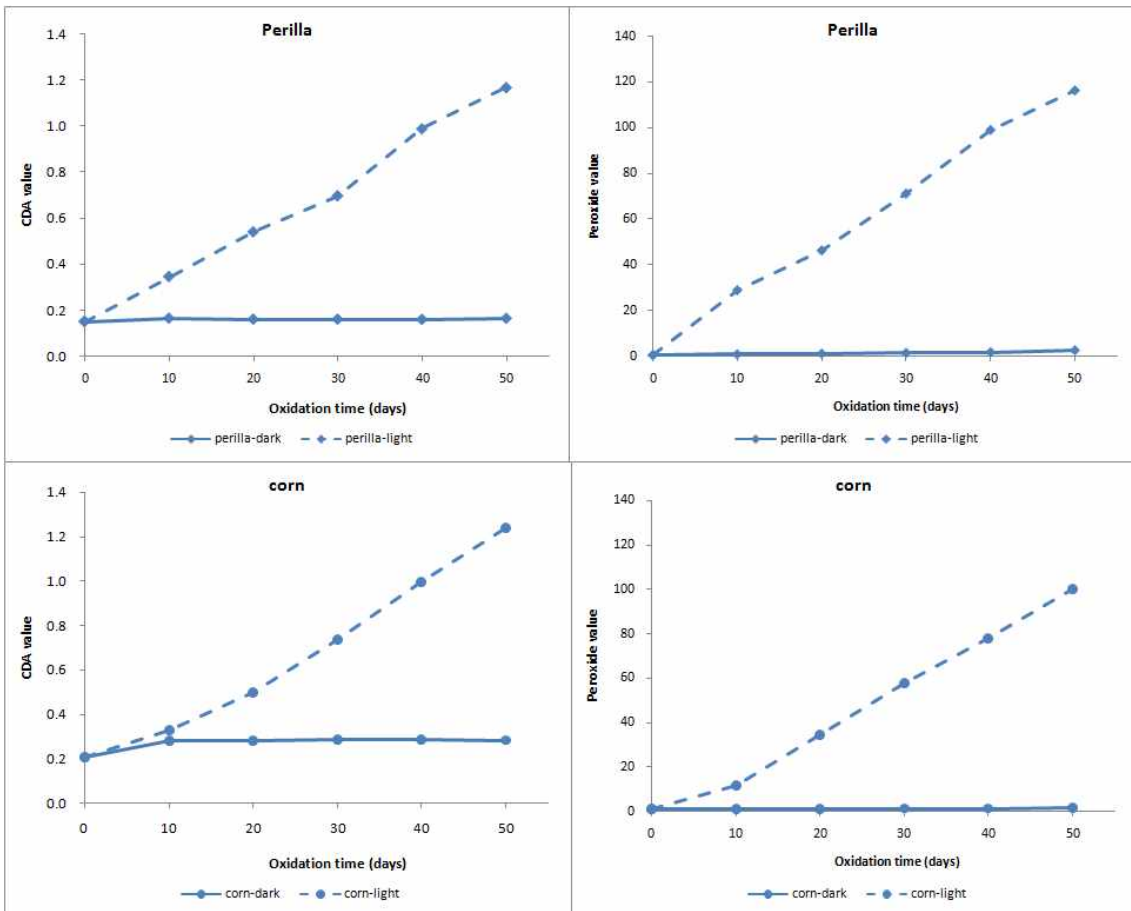


Figure 6. Conjugated dienoic acid contents and peroxide values of perilla and corn oils during oxidation at 20 °C affected by light

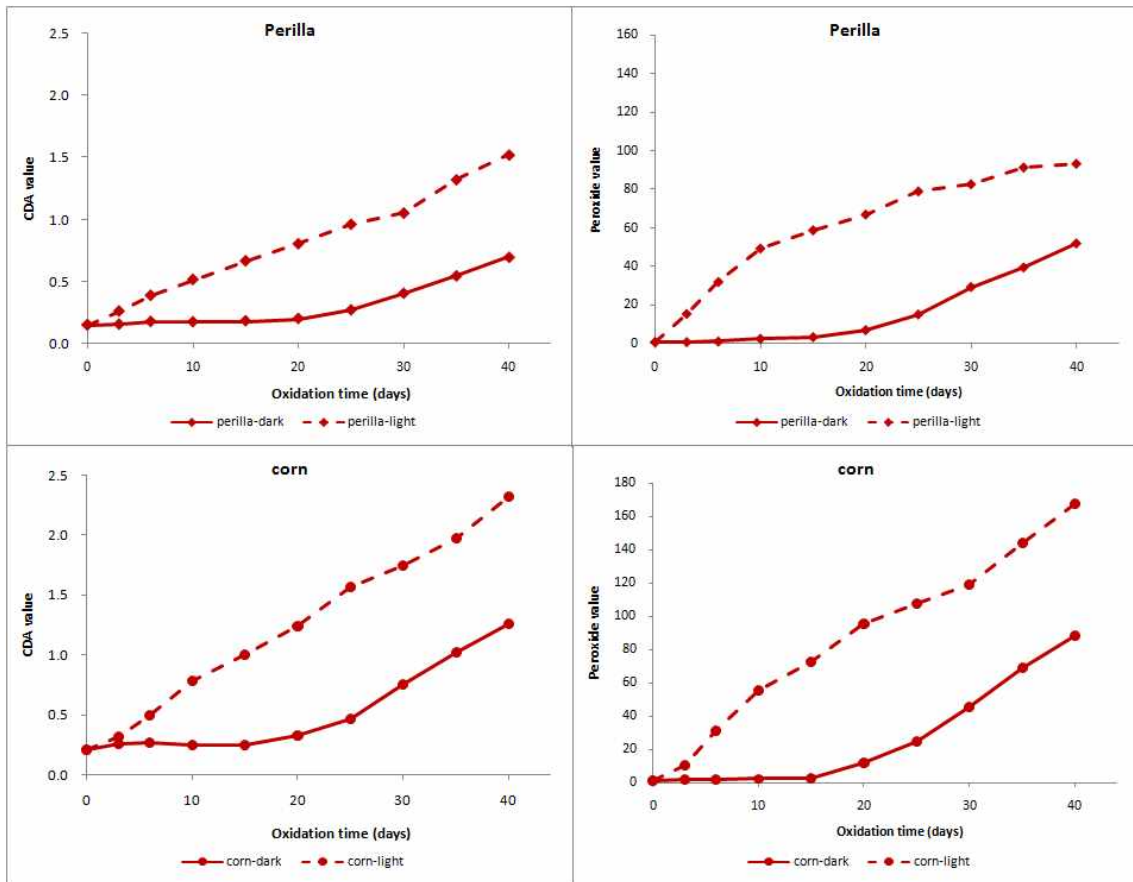


Figure 7. Conjugated dienoic acid contents and peroxide values of perilla and corn oils during oxidation at 40 °C affected by light

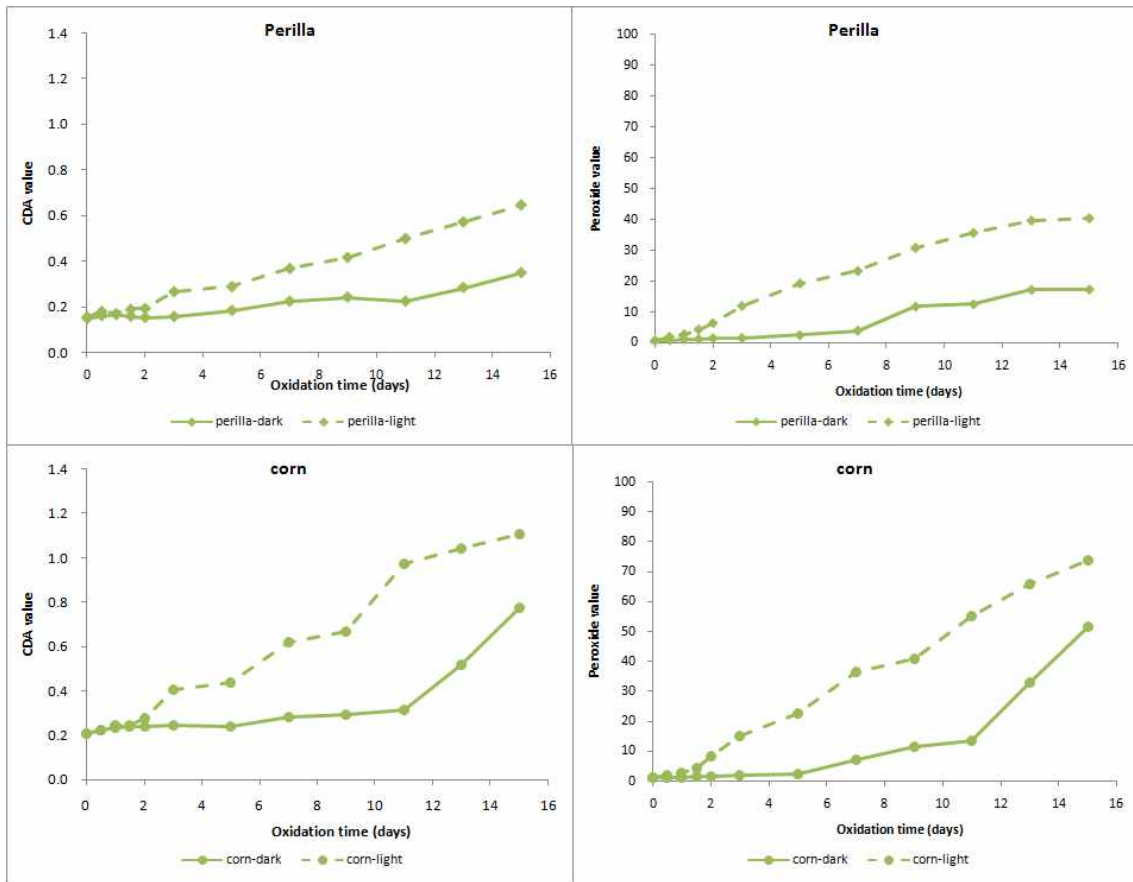


Figure 8. Conjugated dienoic acid contents and peroxide values of perilla and corn oils during oxidation at 60 °C affected by light

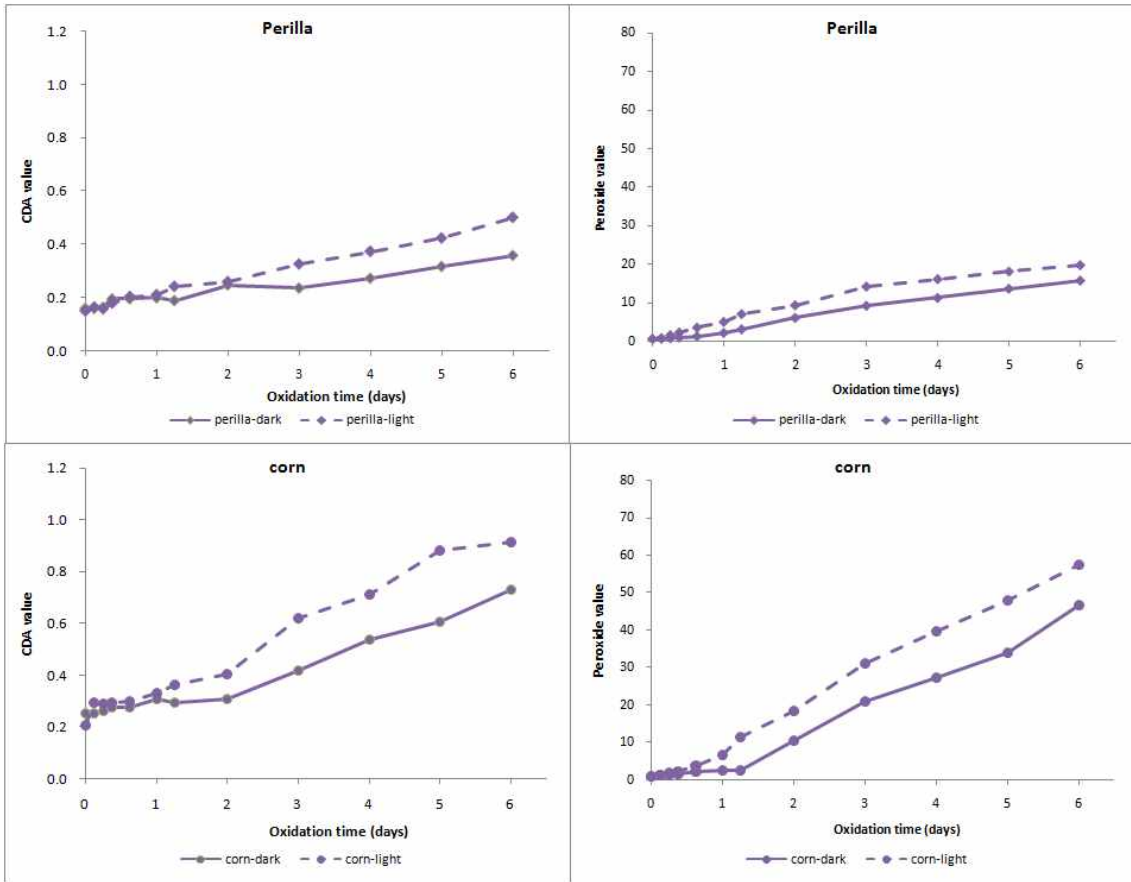


Figure 9. Conjugated dienoic acid contents and peroxide values of perilla and corn oils during oxidation at 80 °C affected by light

(나) 들깨의 산화안정성

① 온도와 자동산화

60 °C에서 저장한 들깨는 40 °C 저장에 비해서 headspace oxygen content가 감소하여 높은 온도가 낮은 온도보다 들깨의 유지산화를 촉진시키고 있음을 나타내었다 (Figure). 그리고 저장 초기에 headspace oxygen의 급격한 감소가 있는 후 큰 변화는 보이지 않았다. 볶지 않은 들깨에 비해 볶은 들깨의 headspace oxygen 소모가 적어 들깨의 볶음이 들깨 자체의 저장성을 개선시킴을 알 수 있었다.

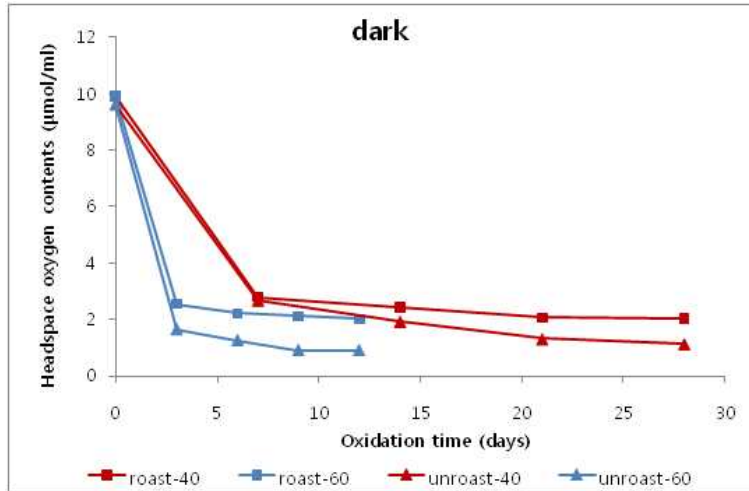


Figure 1. Headspace oxygen consumption of the roasted/ unroasted perilla seeds during storage at 40 and 60 °C in the dark

② 빛과 들깨 유지 산화

빛의 존재는 저장 중인 들깨의 산소소모량에 유의한 영향을 끼치지 않았으며, 이러한 빛의 영향은 들깨의 볶음과 상관없이 비슷하였다. 따라서 빛은 들깨 자체의 산화안정성에 주요 인자는 아닌 것을 의미하였다.

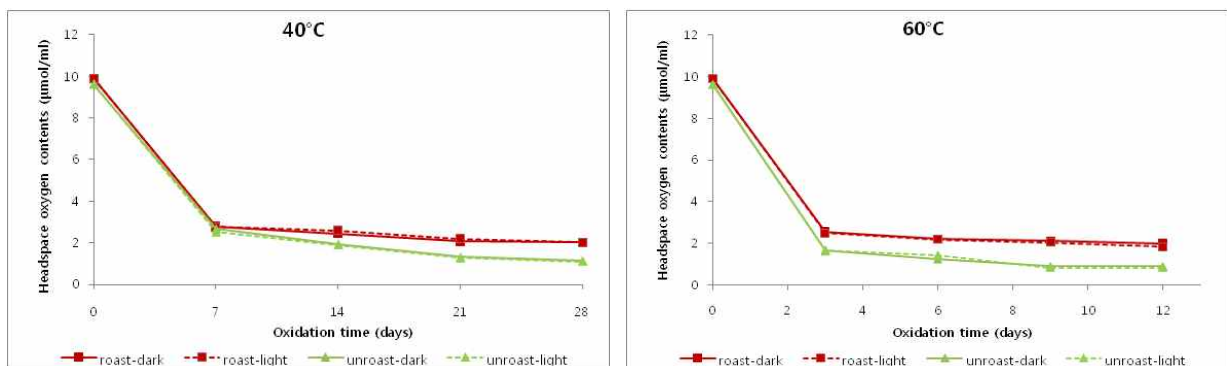


Figure 2. Headspace oxygen consumption of the roasted/ unroasted perilla seeds during storage at 40 and 60 °C affected by light

다. 들깨 및 들깨유의 주요 미량 성분이 산화에 미치는 영향

(1) 방법

들깨는 전라남도 순천에서 재배된 것을 인천광역시의 재래시장에서 구입하였고, 180°C에서 20분간 볶아 볶은 들깨로 사용하거나 또는 이를 압착하여 들깨유를 얻은 후 시료로 사용하였다. 시료는 볶은 들깨 (18 g) 또는 들깨유 (10 g)를 20 mL 시료병에 넣고 한지와 고무줄로 막아 공기가 유입되도록 하였고 이들 시료병들을 40 또는 60 °C의 light box (1,700 lux)에 넣어 각각 28, 12일간 산화시켰다. 또한 시료병을 알루미늄 호일로 싸서 일부 시료병

은 빛을 차단하였다.

산화 정도는 과산화물값과 headspace oxygen consumption으로 분석하였다. 과산화물값은 과산화물값(Peroxide value, POV)은 AOCS법 (Cd 8-53; AOCS법 1998)을 변형한 Crowe and White (2001)의 방법으로 구하였으며, headspace oxygen consumption은 headspace에서의 산소량을 GC법으로 구하여 평가하였다. 즉, 시료병의 headspace gas (0.5 mL)를 2.5 mL gas tight syringe (Hamilton Co. Reno NV, U.S.A.)로 thermal conductivity detector와 80/100 mesh molecular sieve 13X 가 충전된 컬럼(1.83 m x 0.32 cm; Altech, Deerfield, Ill., U.S.A.)이 장착된 Younglin M600D GC (Younglin Co., Ltd., Anyang, Korea)에 주입하였다. 이때 운반기체로는 헬륨을 사용하였고 오븐, 주입구, 검출기의 온도는 각각 35°C, 100°C, 140°C이었다. 피크면적으로부터 9.35의 환산계수를 이용하여 산소의 양 ($\mu\text{mole O}_2 / 1 \text{ mL headspace}$)을 구하였다.

시료의 지방산 조성, 토크페놀, 폴리페놀은 각각 GC, HPLC, spectrophotometry에 의해 분석하였다. 시료의 지방산 조성은 들깨 또는 들깨로부터 헥산으로 추출한 들깨지질을 14% BF₃-메탄올로 에스테르화시킨 후 헥산으로 추출하여 GC에 의해 분석하였다. 이때 분석기기는 Supelcowax 10 capillary column (30 m × 0.53 mm, 1.0 μm thick; Bellefonte, Pa, U.S.A.)과 flame ionization detector가 장착된 Younglin M600L gas chromatograph이었고, oven, injector, and detector의 온도는 각각 230, 280, 280°C이었다. 질소의 속도는 분당 5 mL이었다. 토크페놀 함량은 고속액체크로마토그래피 (High performance liquid chromatography, HPLC)를 사용하여 구하였다. 들깨 또는 들깨로부터 헥산으로 추출한 들깨지질 0.1g을 n-헥산 1ml에 녹이고 hydrophobic 0.2 μm membrane filter로 여과한 후, 20 μL 를 HPLC (Younglin 9100 HPLC System, Seoul)에 주입하였다. 컬럼은 μ -Porasil (3.9 x 300mm, 10 μm ID, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고, 이동상으로는 n-헥산 : 이소프로판올의 혼합용액 (99.8 : 0.2, v/v)를 사용하여 분당 2.0ml의 속도로 용출시켰다. 이때 형광검출기 (G1321A, Agilent 110 series, Germany)의 파장은 excitation 290 nm, emission 330 nm이었다. 폴리페놀 함량은 Lee 등의 방법을 변형하여 구하였다. 들깨 또는 들깨로부터 헥산으로 추출한 들깨지질 3 g을 n-헥산 10ml에 완전히 녹인 후 메탄올 : 물 (60 : 40, v/v)의 혼합용매 6ml를 넣었다. 30초 동안 섞어 준 후 원심분리기로 10,000 rpm, 4°C에서 분리하였다. 하층액의 3 mL를 취하여 5 mL volumetric flask에 증류수로 희석하고, 희석액의 1 mL를 5 mL volumetric flask에 취하였다. Folin's Ciocaltau 시약 0.3ml를 넣고 3분간 정치시킨 후 Na₂CO₃ 포화 용액 0.5 mL를 넣고 증류수로 5 mL까지 맞추었다. 1시간 동안 정치시킨 후 UV-Visible spectrophotometer로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 폴리페놀 함량은 표준 caffeic acid의 검량곡선을 이용하여 구하였다.

(2) 결과

(가) 볶은 들깨의 산화와 미량성분 변화

빛, 온도, 기간 등 산화조건에 따른 볶은 들깨의 과산화물값과 headspace oxygen content는 Figure 1과 같이 40°C보다는 60°C에서, 또한 산화기간이 길어짐에 따라 과산화물값은 증가하고 headspace oxygen content는 감소하였다. 이에 비해 빛의 존재는 과산화물값과 headspace oxygen content에 미치는 영향이 매우 적었다.

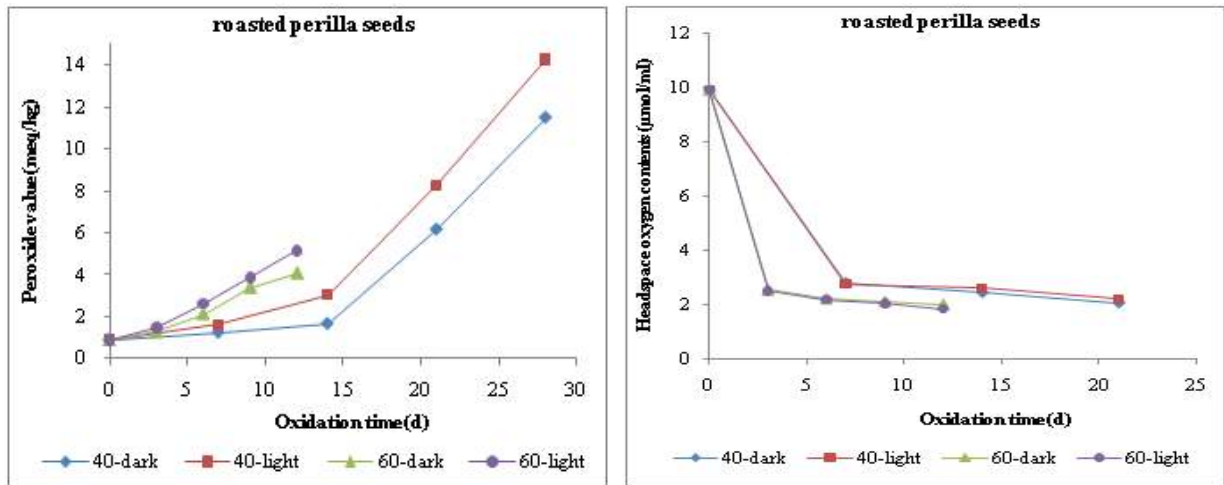


Figure 1. Peroxide values and headspace oxygen contents of roasted perilla seeds during oxidation in the dark or light, and at 40 or 60°C

이에 반해 볶은 들깨의 지방산 조성은 Figure 2와 같이 40°C에서 28일 또는 60°C에서 12 일간의 산화에 의해 큰 변화를 보이지 않았다.

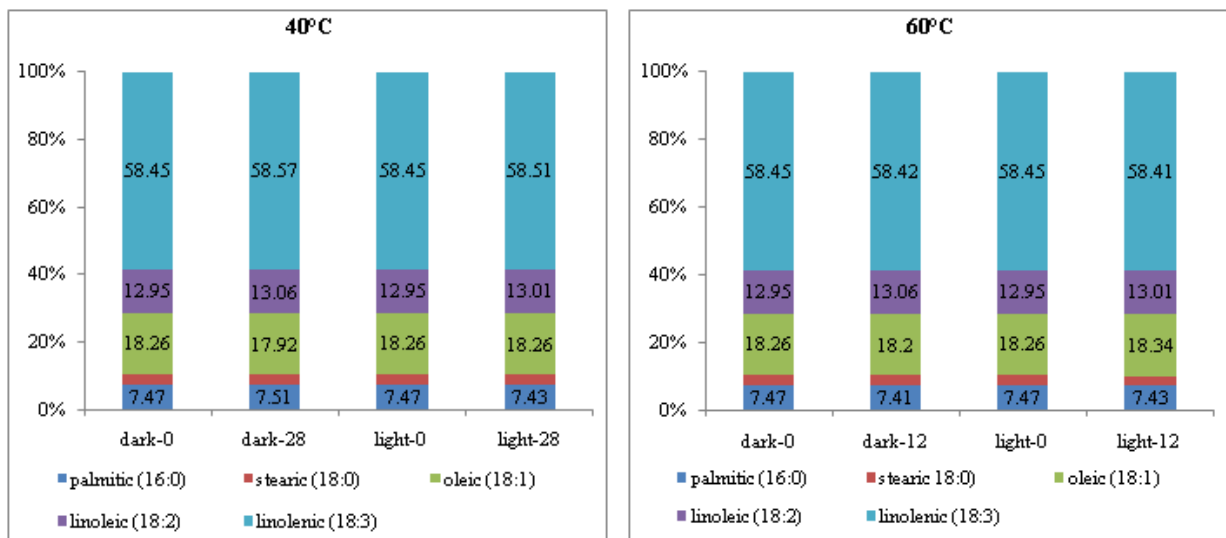


Figure 2. Fatty acid composition (%) changes of roasted perilla seeds after oxidation in the dark and under light at 40 and 60°C for 28 and 12 days, respectively

한편, 볶은 들깨의 토코페롤과 폴리페놀 함량은 들깨가 산화되는 동안 함께 감소하였다. 폴리페놀은 산화 전 6.91 ppm이었던 것이 40°C 어두운 곳에서 28일 산화 후 49%, 40°C 빛에서 68%, 60°C 어두운 곳에서 28일 산화 후 46%, 60°C 빛에서 68가 감소하여 산화온도에 따른 폴리페놀 함량 변화는 거의 없었다 (Figure 3). 그러나 빛의 존재는 폴리페놀의 감소를 뚜렷이 증가시켰다.

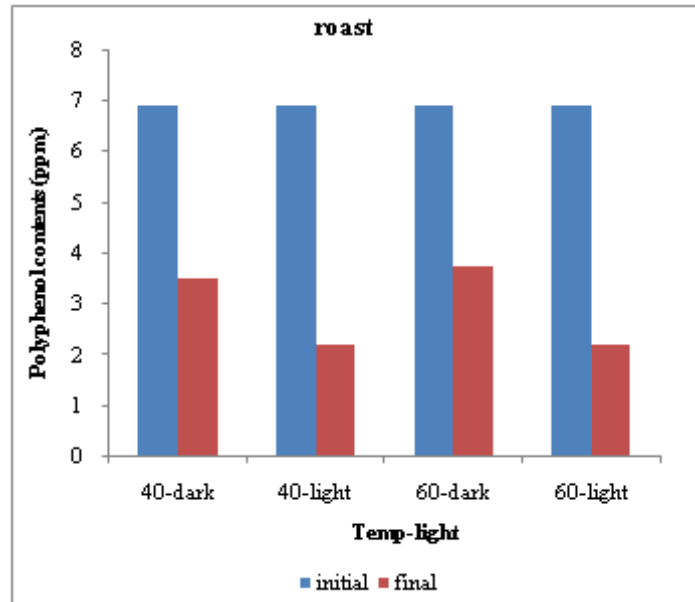


Figure 3. Polyphenol contents (ppm) changes of roasted perilla seeds after oxidation in the dark and under light at 40 and 60°C for 28 and 12 days, respectively

들깨에는 α -, γ -, δ -토코페롤이 함유되어 있었으며 이들 역시 들깨유의 산화동안 그 양이 감소하였다 (Figure 4).

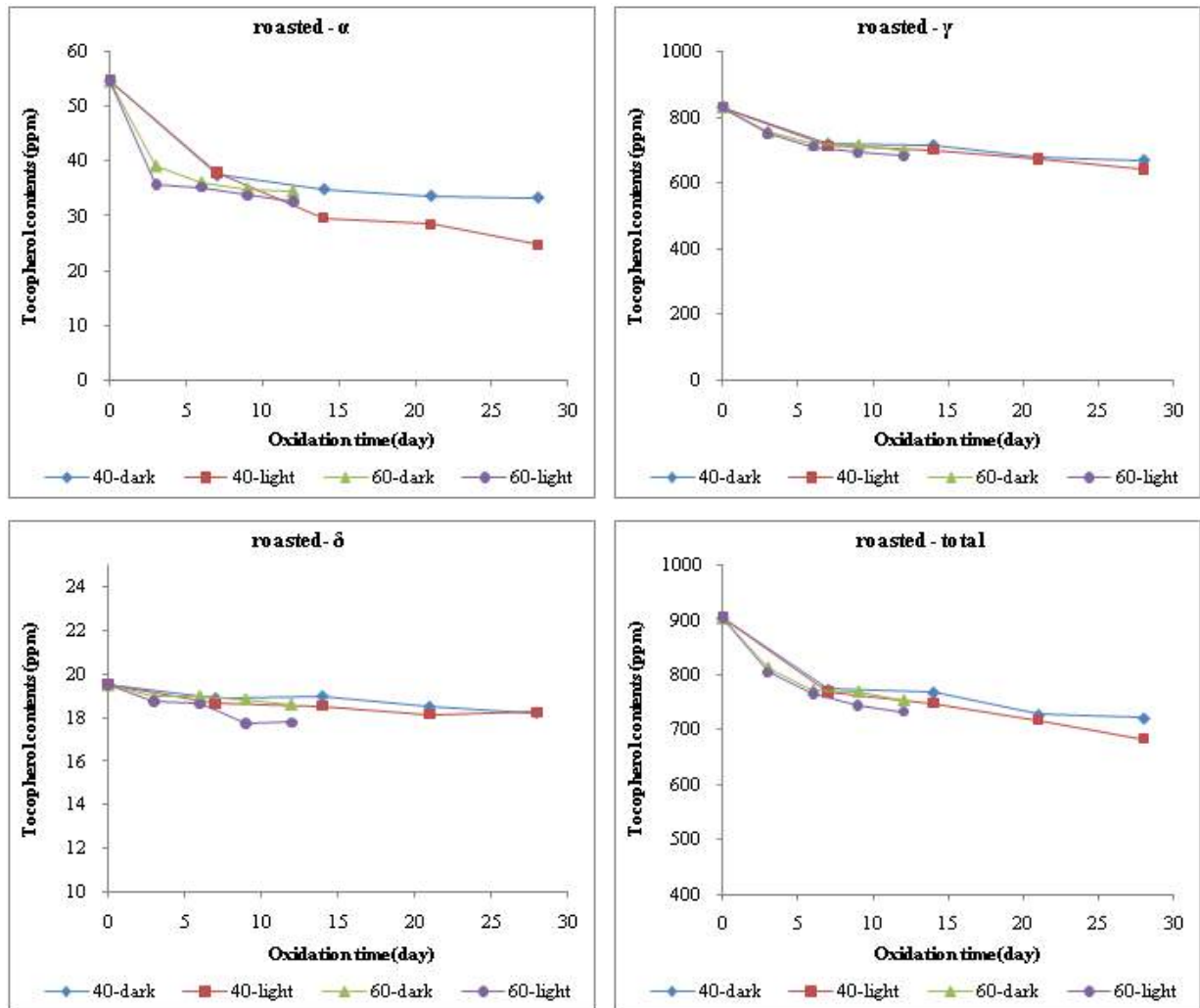


Figure 4. Tocopherol contents (ppm) changes of roasted perilla seeds during oxidation in the dark and under light at 40 and 60°C for 28 and 12 days, respectively

볶은 들깨유가 산화되는 동안 토코페롤의 분해는 isomer 종류에 따라 그 속도가 달랐는데 빛, 또는 온도에 관계없이 α - > γ - > δ -토코페롤 순으로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Regression analysis between tocopherol retention (%) and time during oxidation of roasted perilla seeds in the dark and under light at 40 and 60°C for 28 and 12 days, respectively

Temperature (°C)	Tocopherols	Regression parameter ¹⁾			
		a	b	r ²	
40	Dark	α	-1.214	87.963	0.6634
		γ	-0.624	95.687	0.7924
		δ	-0.218	99.58	0.9136
		total	-0.651	95.304	0.7814
	Light	α	-1.811	89.519	0.8397
		γ	-0.712	95.723	0.8404
		δ	-0.222	98.63	0.8074
		total	-0.768	95.411	0.8443
60	Dark	α	-2.719	89.371	0.6998
		γ	-0.978	96.082	0.641
		δ	-0.336	99.27	0.8383
		total	-1.070	95.745	0.6558
	light	α	-2.721	86.839	0.6059
		γ	-1.425	96.841	0.8676
		δ	-0.717	99.182	0.8734
		total	-1.488	96.287	0.8435

¹⁾Tocopherol retention (%) = a x oxidation time (day) + b

(나) 들깨유의 산화와 미량성분 변화

① 산화

빛, 온도, 기간 등 산화조건에 따른 들깨유의 과산화물값과 CDA는 Figure 5와 같이 들깨와 마찬가지로 40°C보다는 60°C에서, 또한 산화기간이 길어짐에 따라 과산화물값과 CDA는 증가하였다. 또한 빛의 존재도 들깨유의 과산화물값과 CDA 값을 증가시켰다.

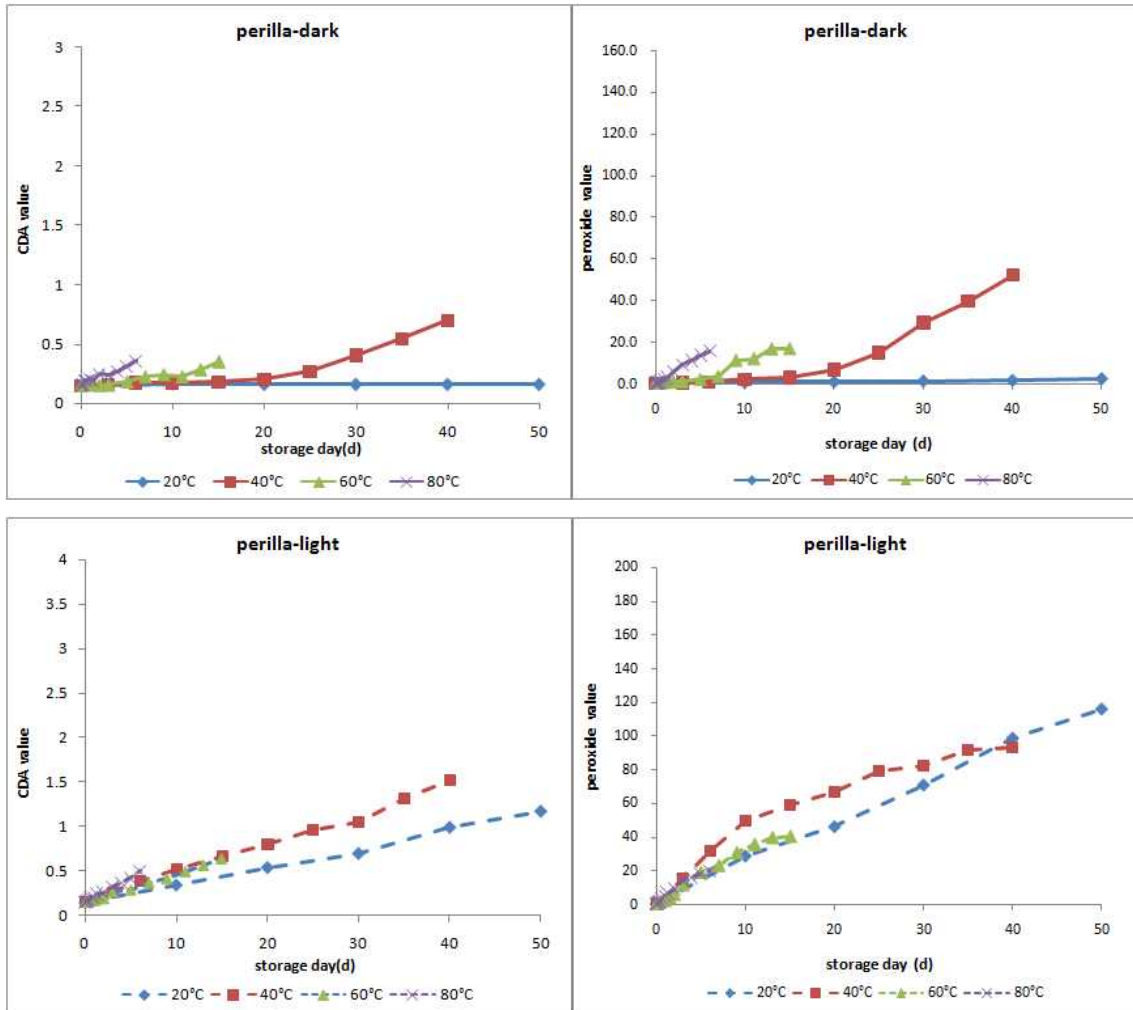


Figure 5. Peroxide values and CDA contents of roasted perilla oil during oxidation in the dark or light

② 폴리페놀

빛의 존재 유무와 여러 온도에서 들깨유를 산화시킬때 폴리페놀 화합물함량은 감소하였으며, 분해 정도는 빛이 존재할 때 더 높았다(Figure 6). 이는 각 조건에서의 들깨유의 산화와 관련되어 빛이 존재할 때 또한 온도가 높을수록 산화방지 작용이 증가하여 폴리페놀 함량이 줄었을 것으로 생각된다.

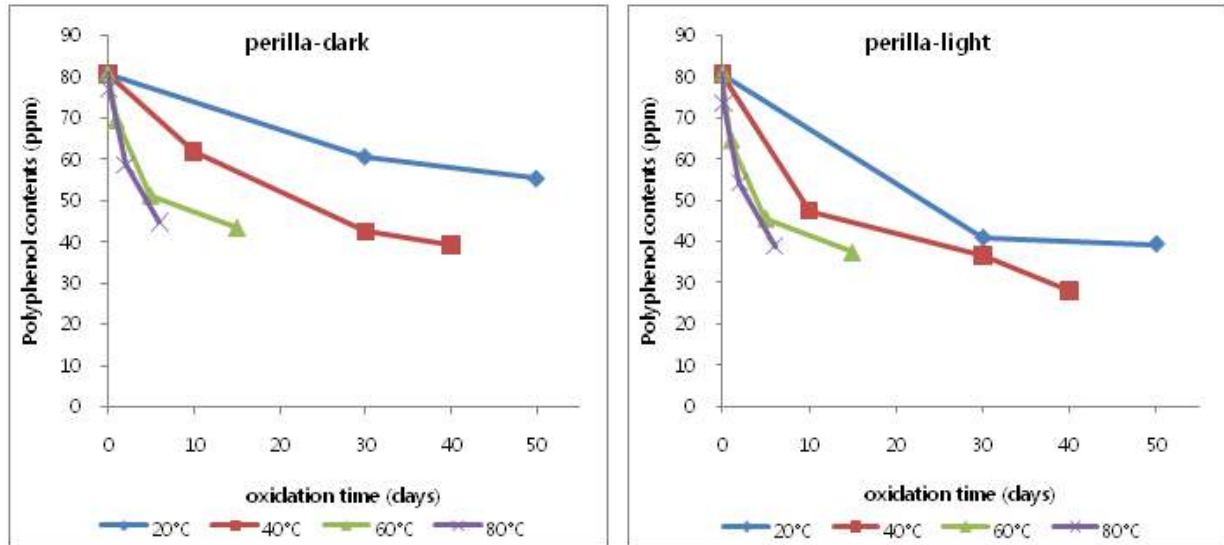


Figure 6. Polyphenol contents of roasted perilla oil during oxidation in the dark or light

③ 토코페롤

빛의 존재 유무와 여러 온도에서 들깨유를 산화시킬 때 토코페롤 함량은 감소하였으며, 분해 정도는 빛이 존재할 때 더 높았다(Table 2, Table 3). 이는 각 조건에서의 들깨유의 산화와 관련되어 빛이 존재할 때 또한 온도가 높을수록 산화방지 작용이 증가하여 토코페롤 함량이 줄었을 것으로 생각된다.

Table 2. Tocopherol contents (ppm) of perilla oil during oxidation in the dark at various temperature

Temp (°C)	Time (day)	Tocopherols							
		α-tocopherol		γ-tocopherol		δ-tocopherol		total	
20	0	51.65±2.32	(100)	568.99±12.93	(100)	20.59±2.11	(100)	641.15±17.36	(100)
	30	50.84±9.52	(98.6)	543.46±11.01	(95.5)	18.39±1.62	(89.3)	612.69±3.12	(95.6)
	50	48.31±4.12	(93.7)	541.92±2.03	(95.2)	17.87±1.00	(86.8)	608.10±7.15	(94.8)
40	0	51.65±2.32	(100)	568.99±12.93	(100)	20.59±2.11	(100)	641.15±17.36	(100)
	10	47.40±2.10	(91.9)	558.30±2.20	(98.1)	18.20±1.44	(88.4)	623.89±5.75	(97.3)
	20	44.18±3.00	(85.7)	544.30±2.04	(95.7)	17.52±1.27	(85.1)	606.03±6.31	(94.5)
	30	40.01±4.28	(77.6)	472.76±3.20	(83.1)	17.08±0.50	(83.0)	526.86±7.98	(82.6)
	40	9.35±1.93	(18.1)	407.35±6.56	(71.6)	16.83±0.43	(81.7)	433.52±8.92	(67.6)
60	0	51.65±2.32	(100)	568.99±12.93	(100)	20.59±2.11	(100)	641.15±17.36	(100)
	3	44.52±0.24	(86.3)	541.92±3.21	(95.2)	19.04±0.51	(92.4)	605.48±3.96	(94.4)
	7	44.39±2.32	(86.1)	544.15±14.44	(95.6)	19.50±0.05	(94.7)	608.03±16.81	(94.8)
	11	41.88±2.61	(81.2)	523.82±8.20	(92.1)	19.37±0.17	(94.0)	585.07±10.64	(91.3)
	15	39.12±1.15	(75.9)	499.87±5.34	(87.9)	17.56±0.01	(85.3)	556.54±4.18	(86.8)
80	0	51.65±2.32	(100)	568.99±12.93	(100)	20.59±2.11	(100)	641.15±17.36	(100)
	1	47.82±0.88	(92.7)	572.52±8.68	(100.6)	18.93±0.29	(91.9)	639.27±9.85	(99.7)
	2	47.38±2.25	(91.9)	561.05±0.03	(98.6)	18.62±1.08	(90.4)	627.05±3.30	(97.8)
	4	41.51±1.38	(80.5)	551.25±3.86	(96.9)	17.23±0.39	(83.7)	609.99±2.87	(95.1)
	6	36.85±2.98	(71.5)	506.88±0.05	(89.1)	16.04±0.31	(77.9)	559.76±2.62	(87.3)

Table 3. Tocopherol contents (ppm) of perilla oil during oxidation under light. at various temperature

Temp (°C)	Time (day)	Tocopherols			
		α -tocopherol	γ -tocopherol	δ -tocopherol	total
20	0	51.56±2.32 (100)	568.99±12.93 (100)	20.59±2.11 (100)	641.15±17.36 (100)
	30	46.43±0.45 (90.0)	350.05±7.53 (61.7)	19.69±0.06 (95.6)	417.07±7.93 (65.1)
	50	41.46±1.00 (80.4)	153.11±3.78 (26.9)	16.78±0.23 (81.5)	211.24±3.01 (33.0)
40	0	51.56±2.32 (100)	568.99±12.93 (100)	20.59±2.11 (100)	641.15±17.36 (100)
	10	47.99±0.51 (93.1)	470.44±45.30 (82.7)	20.48±0.38 (99.4)	538.91±45.43 (84.1)
	20	43.86±1.70 (85.1)	291.82±12.71 (51.3)	18.49±0.21 (89.8)	354.16±14.20 (55.2)
	30	35.83±1.66 (69.5)	178.43±10.59 (31.4)	16.02±0.83 (77.8)	230.28±11.41 (35.9)
	40	11.95±0.52 (23.2)	76.33±9.02 (13.4)	14.50±0.31 (70.4)	102.78±9.84 (16.0)
60	0	51.56±2.32 (100)	568.99±12.93 (100)	20.59±2.11 (100)	641.15±17.36 (100)
	3	36.74±1.24 (71.2)	547.51±0.65 (96.2)	20.16±0.90 (97.9)	604.40±1.00 (94.3)
	7	28.76±1.13 (55.8)	522.28±0.21 (91.8)	19.21±0.27 (93.3)	570.26±1.07 (88.9)
	11	13.57±0.33 (26.3)	478.83±6.44 (84.2)	19.07±0.31 (92.6)	511.48±6.42 (79.8)
	15	6.91±0.65 (13.4)	381.54±16.09 (67.1)	16.29±0.90 (79.1)	404.74±17.64 (63.1)
80	0	51.56±2.32 (100)	568.99±12.93 (100)	20.59±2.11 (100)	641.15±17.36 (100)
	1	44.45±0.45 (86.2)	545.80±11.43 (95.9)	19.64±0.40 (95.4)	609.89±11.49 (95.1)
	2	43.04±2.23 (83.5)	536.81±9.63 (94.3)	18.51±0.47 (89.9)	598.36±12.33 (93.3)
	4	37.90±0.05 (73.5)	507.55±5.42 (89.2)	16.83±0.44 (81.7)	562.28±4.93 (87.7)
	6	24.61±3.82 (47.7)	464.95±12.13 (81.7)	15.68±0.04 (76.2)	505.25±15.98 (78.8)

라. 들깨 및 들깨유 함유 편의식품에 첨가된 식품재료가 들깨 및 들깨유 산화안정성에 미치는 영향

(1) 방법

편의식품 유형 중 들깨의 산업적 적용이 가장 쉬운 죽을 택하여, 이와 함께 첨가될 수 있는 채소로부터 유래하는 클로로필과 카로테노이드에 의한 들깨죽 제조 공정 중 들깨 및 들깨유 산화안정성 영향을 평가하였다. 들깨죽은 쌀 45 g, 들깨 (강원도 화천군 간동면에서 2009년 5월에 수확된 국산 들깨로 품종은 남천 2호를 180°C에서 20분 동안 Gene Café coffee bean roaster(Genesis Co. Ltd., Suwon, Korea)로 볶은 후 갈아서 사용) 30 g, 물 225 g, chlorophyll a (Sigma-Aldrich 사, 99.9%) 0.1 mg 또는 베타-카로텐(Sigma-Aldrich 사, 99.9%) 1, 3, 또는 6 mg의 비율로 배합하여 15 g씩 50 mL 시료병에 넣은 후 한지와 고무줄로 막아 공기가 유입되도록 하였고 100°C 항온수조에서 10분, 30분, 1시간, 2시간 간격으로 가열하여 제조한 후, chloroform을 사용하여 들깨죽의 지방질을 추출하였다. 이때 대조군으로는 클로로필이나 베타카로텐을 첨가하지 않은 시료로 삼았다.

들깨죽 제조를 위한 가열시 산화 정도는 과산화물값과 공액이중산값(CDA)을 각각 AOCS 법 (Cd 8-53; AOCS법 1998)을 변형한 Crowe and White (2001)의 방법과 AOCS법(Ti la-64; AOCS 1998)으로 평가하였다. 지방산 조성, 토코페롤, 폴리페놀 분석 방법은 앞과 동일하였다

클로로필과 카로티노이드는 모두 HPLC법에 의해 분석하였다. 즉, 들깨죽 0.1 g을 다이클로로메탄 1 mL로 녹이고 hydrophobic 0.2 µm membrane filter로 여과한 후, 20 µL를 고속액체크로마토그래프 (HPLC; Younglin SP 930D, Anyang, Korea)에 주입하였다. 컬럼은 symmetry C18 (5.0 µm, 4.6 x 150 mm, Waters, Milford, MA, USA) 을 사용하였고 이동상으로는 에틸아세테이트:메탄올: 물의 혼합용액 (50:37.5:12.5, v/v/v)을 사용하여 분당 1.5 mL의 속도로 용출시켰다. 이때 UV 검출기 파장은 438 nm였다. 클로로필 정량은 표준 클로로필 a을 이용하여 구하였다. 페오피틴은 Redfearn 과 Friend (1962)의 방법에 따라 클로로필에 0.01 M 염산을 가하여 제조하였으며 검량선 식은 $y(\text{피크 면적, mFU.s})=117.35x(\text{페오피틴 b 함량, mg/kg})+1.0233$ ($r^2=0.999$)이었다.

들깨죽의 카로티노이드 함량은 AOAC 970.64법 (AOAC, 1995)으로 시료를 비누화 시킨 후 2 g을 n-헥산:아세톤: 에탄올:톨루엔 (10:7:6:7, v/v/v/v)의 혼합용매를 넣어 PTFE syringe filter (0.2 µm x 13 mm; Tokyo, Japan)로 여과한 후 고속액체-크로마토그래프 (YL9100, Younglin, Anyang, Korea)에 20 µL 를 자동시료주입기 (YL6100 Autosampler, Younglin, Anyang, Korea)를 이용하여 주입하였다. 컬럼은 µ-PorasilTMcolumn(3.9x300mm,10µm ID, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고, 이동상으로는 n-헥산:이소프로판올의 혼합용매 (97:3, v/v)를 사용하였으며, 분당 1 mL 의 속도로 용출시켰으며, UV 검출기 파장은 436 nm 로 하였다. 카로티노이드 동정 및 정량은 표준 β-카로텐, 루테인을 이용하여 구하였으며 검량선은 각각 $y(\text{피크 면적, mFU.s}) =52.308x(\beta\text{-카로텐 함량, mg/kg})+0.3336$ ($r^2=0.999$), $y(\text{피크면적, mFU.s})=261.88x(\text{루테인 함량, mg/kg})+0.0452$ ($r^2=0.999$)이었다.

(2) 결과

(가) Chlorophyll 첨가에 의한 영향

들깨죽 제조를 위한 가열에 따른 들깨죽으로부터 클로로포름으로 추출된 지방질의 양은 5.05~9.05%로 가열시간이 길수록 적었다 (Figure 7). 이는 가열에 따른 쌀전분이 호화되고 지방이 쌀전분의 아밀로오스와 포집화합물을 이루어 클로로포름으로 추출되는 정도가 줄었던 것으로 생각된다.

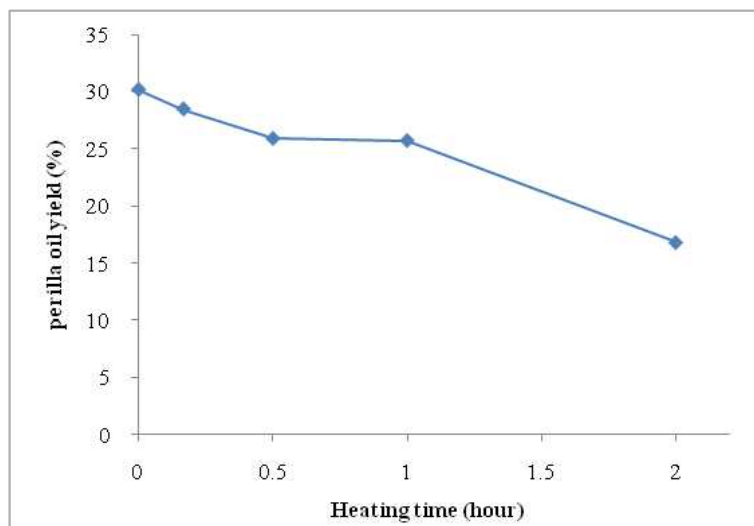


Figure 1. Lipid yield (%) from perilla porridge after heating at 100°C

① 지방질 산화

들깨죽 제조를 위하여 들깨와 쌀, 물의혼합물을 가열할 때 가열시간에 따라 지방질이 산화되어 과산화물값과 공액이중산값이 증가하였으나 클로로필 첨가에 따른 큰 차이는 보이지 않았다 (Figure 8).

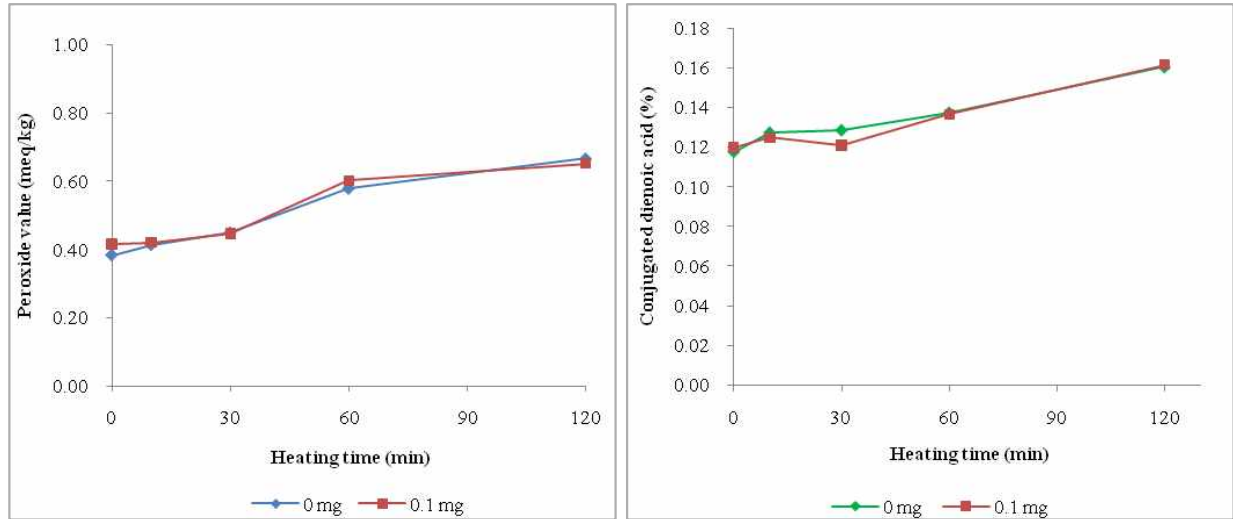


Figure 2. Peroxide value (meq/kg) and conjugated dienoic acid content (%) changes during heating at 100°C for perilla seed porridge-manufacturing affected by chlorophyll a addition

② 지방산조성 변화

들깨죽 제조를 위하여 들깨와 쌀, 물의혼합물을 가열할 때 클로로필 첨가 여부 또는 가열시간에 따른 지방산 조성은 크게 변화하지 않았으며 특히 유용한 오메가-3 지방산인 리놀렌산의 비중 또한 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 4).

Table 1. Fatty acid composition changes during heating at 100°C for perilla seed porridge-manufacturing affected by chlorophyll a addition

Addition level (mg) of chlorophyll a	Heating time (min)	Fatty acid (relative %)					
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	U/S
0	0	6.43±0.06	2.32±0.03	17.62±0.15	14.34±0.12	59.29±0.36	10.43
	10	6.41±0.04	2.39±0.00	17.68±0.03	14.22±0.09	59.30±0.08	10.36
	30	6.36±0.08	2.53±0.21	17.63±0.07	14.23±0.01	59.25±0.05	10.25
	60	6.41±0.03	2.47±0.10	17.68±0.11	14.33±0.05	59.11±0.09	10.25
	120	6.48±0.01	2.44±0.05	17.69±0.11	14.32±0.05	59.07±0.09	10.22
0.1	0	6.34±0.02	2.25±0.02	17.46±0.15	14.06±0.02	59.89±0.04	10.65
	10	6.36±0.04	2.33±0.02	17.63±0.08	14.10±0.05	59.58±0.16	10.51
	30	6.31±0.05	2.32±0.00	17.51±0.02	14.02±0.08	59.84±0.10	10.59
	60	6.33±0.05	2.38±0.01	17.53±0.05	14.19±0.05	59.56±0.16	10.47
	120	6.27±0.00	2.40±0.01	17.58±0.04	14.07±0.08	59.68±0.03	10.53

③ Chlorophyll 변화

들깨죽 제조를 위하여 들깨와 쌀, 물의혼합물을 가열할 때 첨가한 클로로필과 들깨가 가지고 있던 클로로필은 분해되어 그 양이 감소하였다 (Table 5). 분해속도는 클로로필을 첨가한 시료에서 더 낮았다.

Table 2. Chlorophylls contents (mg/kg oil) changes during heating at 100°C for perilla seed porridge-manufacturing affected by chlorophyll a addition

Addition level (mg) of chlorophyll a	Heating time (min)	Chlorophylls contents (mg/kg oil)
0	0	0.31±0.00
	10	0.06±0.01
	30	0.00±0.00
	60	0.00±0.00
	120	0.00±0.00
0.1	0	0.52±0.01
	10	0.37±0.01
	30	0.13±0.00
	60	0.02±0.01
	120	0.00±0.00

④ Tocopherols

들깨죽 제조를 위하여 들깨와 쌀, 물의혼합물을 가열할 때 토코페롤은 분해되었으며 (Table 6), 클로로필이 첨가된 시료에서 그 분해 속도가 낮았다 (Table 7). 이것은 클로로필이 빛이 존재하지 않는 조건에서 유지의산화를 억제하는 작용과 일부 관련있을 것으로 보인다. 즉, 클로로필의 산화방지 작용으로 들깨 유지의 산화방지 작용으로 인한 토코페롤의 분해를 감소시켰을(sparing action) 것으로 생각된다.

Table 3. Tocopherol contents (ppm) changes during heating at 100°C for making perilla seed porridge affected by chlorophyll addition

Addition level (mg) of chlorophyll	Heating time (min)	Tocopherol			
		α	γ	δ	total
0	0	50.38±1.44 (100) ¹⁾	347.95±3.40 (100)	23.65±0.24 (100)	421.98±5.09 (100)
	10	35.80±0.04 (71.0)	317.44±7.08 (91.2)	22.80±0.14 (96.4)	376.04±7.26 (89.1)
	30	30.83±0.13 (61.2)	308.45±0.89 (88.7)	22.42±0.29 (94.8)	361.70±1.04 (85.1)
	60	29.72±0.28 (59.0)	290.49±2.35 (83.5)	21.97±0.01 (92.9)	342.18±1.64 (81.1)
	120	27.97±0.05 (55.5)	270.60±1.46 (77.8)	21.22±0.23 (89.7)	319.78±1.64 (75.8)
0.1	0	50.72±1.16 (100) ¹⁾	346.7±3.69 (100)	23.52±0.28 (100)	420.98±2.81 (100)
	10	36.62±0.39 (72.2)	326.26± 3.36 (94.1)	23.18±0.14 (98.6)	386.07±3.89 (91.7)
	30	31.21±0.02 (61.5)	320.32±1.99 (92.4)	22.58±0.64 (96.0)	374.11±2.61 (88.9)
	60	30.75±0.23 (60.6)	306.52±2.92 (88.4)	22.06±0.13 (93.8)	359.33±3.28 (85.4)
	120	28.81±0.45 (56.8)	281.23±0.86 (81.1)	21.25±0.22 (90.3)	331.30±0.63 (78.7)

¹⁾Retention (%) based on the content of zero day

Table 4. Regression analysis between tocopherol retention (%) and time during heating at 100°C for 2 h to make perilla seed porridge

Addition level (mg) of chlorophyll	Tocopherols	Regression parameter ¹⁾		
		a	b	r ²
0	α	-0.269	81.200	0.5168
	γ	-0.161	95.293	0.8595
	δ	-0.075	98.075	0.8913
	total	-0.169	93.766	0.7956
0.1	α	-0.261	81.699	0.5112
	γ	-0.141	97.399	0.9407
	δ	-0.078	99.185	0.9634
	total	-0.152	95.607	0.8677

¹⁾Tocopherol retention (%) = a x heating time (min) + b

⑤ 폴리페놀 화합물

들깨죽 제조를 위하여 들깨와 쌀, 물의혼합물을 가열할 때 가열시간에 따라 폴리페놀화합물 함량이 증가하였는데 (Figur 9) 이는 들깨에서 유래한 폴리페놀 화합물 이외에 쌀에서 유래한 폴리페놀화합물에 의한 영향으로 보여진다. 쌀에는 오리자놀 등 다양한 종류의 폴리페놀화합물이 존재한다. 특히 클로로필이 첨가된 시료에서 폴리페놀화합물 함량 증가가 컸는데 빛이 존재하지 않을때 클로로필의 산화방지작용과도 일부 관련 있을 것으로 보인다. 즉, 들깨 유지의 산화에 중요한 역할을 하는 폴리페놀이 유지산화방지 작용으로 분해되는데 클로로필이 대신 산화방지 작용을 함으로써(sparing action) 쌀과 들깨에서 유래한 폴리페놀의 분해를 억제하여 함량 증가가 컸을 것으로 생각한다.

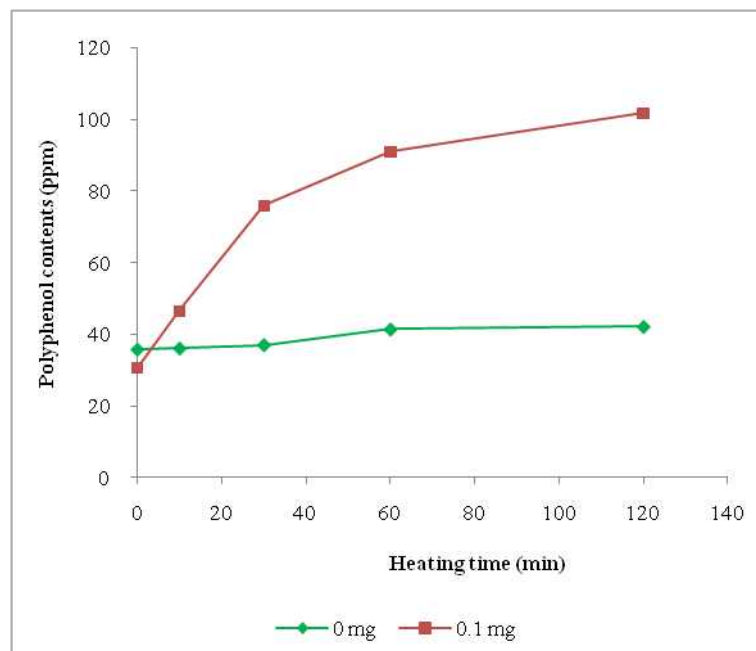


Figure 3. Polyphenol compounds contents (ppm) changes during heating at 100°C for making perilla seed porridge affected by chlorophyll addition

(나) 베타-카로틴 첨가에 의한 영향

① 지방질산화

들깨죽 제조를 위하여 들깨와 쌀, 물의혼합물을 가열할 때 가열시간에 따라 지방질이 산화되어 과산화물값과 공액이중산값이 증가하였으며 베타카로틴 첨가량이 증가할수록 그 값은 작아, 베타카로틴이 들깨죽 제조시 가열 과정에서 들깨 지방질의 산화를 억제함을 알 수 있었다(Figure 10).

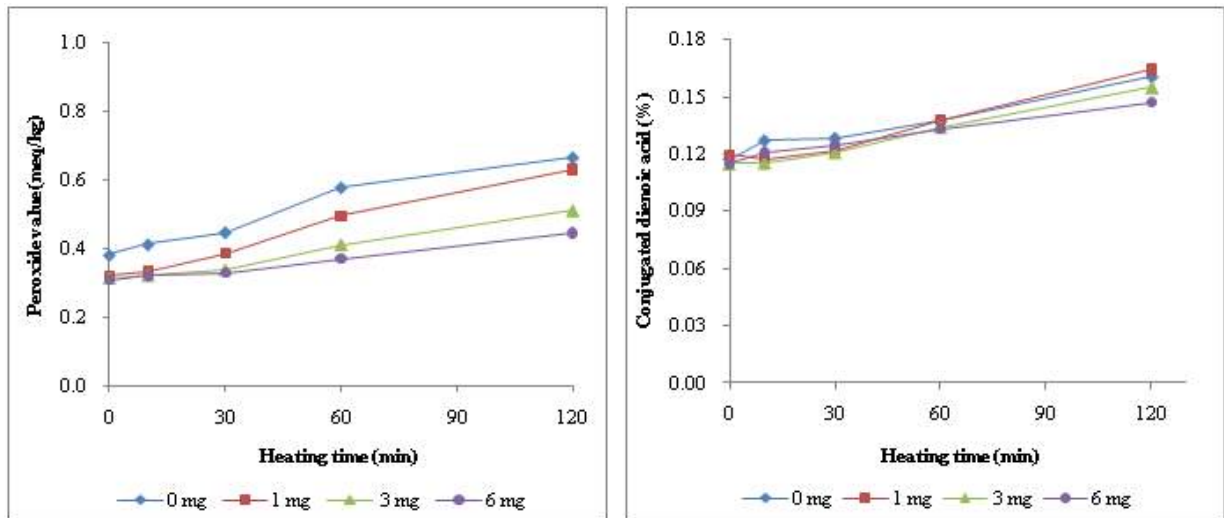


Figure 4. Lipid oxidation during heating at 100 °C for perilla porridge-making affected by addition of β -carotene

② 지방산조성

들깨죽 제조를 위하여 들깨와 쌀, 물의혼합물을 가열할 때 가열시간에 따라 지방산 조성은 크게 변화하지 않았으며 특히 유용한 오메가-3 지방산인 리놀렌산의 비중 또한 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 8).

Table 5. Fatty acid composition changes during heating at 100 oC for perilla porridge-making affected by addition of β -carotene

Addition level of β -carotene	Heating time (min)	Fatty acid composition (%)					U/S ¹⁾
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	
0 mg	0	6.43±0.06	2.32±0.03	17.62±0.15	14.34±0.12	59.29±0.36	10.43
	10	6.41±0.04	2.39±0.00	17.68±0.03	14.22±0.09	59.30±0.08	10.36
	30	6.36±0.08	2.53±0.21	17.63±0.07	14.23±0.01	59.25±0.05	10.25
	60	6.41±0.03	2.47±0.10	17.68±0.11	14.33±0.05	59.11±0.09	10.25
	120	6.48±0.01	2.44±0.05	17.69±0.11	14.32±0.05	59.07±0.09	10.22
1 mg	0	6.33±0.08	2.32±0.10	17.40±0.01	13.63±0.10	60.33±0.13	10.57
	10	6.47±0.13	2.33±0.05	17.87±0.22	14.01±0.06	59.32±0.46	10.36
	30	6.59±0.38	2.30±0.02	17.87±0.01	14.08±0.04	59.16±0.43	10.24
	60	6.55±0.32	2.29±0.01	17.86±0.03	14.31±0.22	59.00±0.57	10.32
	120	6.46±0.07	2.32±0.02	17.87±0.26	14.12±0.05	59.23±0.21	10.39
3 mg	0	6.65±0.06	2.27±0.01	17.75±0.24	14.17±0.03	59.20±0.27	10.27
	10	6.70±0.25	2.29±0.02	17.71±0.09	14.10±0.07	59.32±0.18	10.27
	30	6.42±0.12	2.28±0.04	17.82±0.17	14.04±0.03	59.45±0.12	10.51
	60	6.47±0.01	2.33±0.02	17.90±0.17	14.16±0.02	59.15±0.16	10.37
	120	6.36±0.01	2.35±0.00	17.81±0.10	14.11±0.10	59.32±0.06	10.42
6 mg	0	6.48±0.00	2.27±0.01	17.78±0.16	14.07±0.00	59.40±0.18	10.43
	10	6.52±0.14	2.31±0.03	17.82±0.08	14.02±0.05	59.34±0.30	10.33
	30	6.46±0.05	2.32±0.07	17.86±0.22	13.97±0.05	59.37±0.27	10.36
	60	6.49±0.12	2.31±0.01	17.85±0.23	14.17±0.01	59.18±0.36	10.36
	120	6.34±0.04	2.38±0.04	17.95±0.01	14.05±0.07	59.21±0.06	10.39

¹⁾Content ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids

③ 베타-카로틴

들깨죽 제조를 위하여 들깨와 쌀, 물의혼합물을 가열할 때 첨가한 베타카로틴과 들깨가 가지고 있던 베타카로틴과 루테인은 분해되어 그 양이 감소하였다 (Figure 11). 분해속도는 베타카로틴을 첨가한 시료에서 낮은 경향을 보였다 (Table 9).

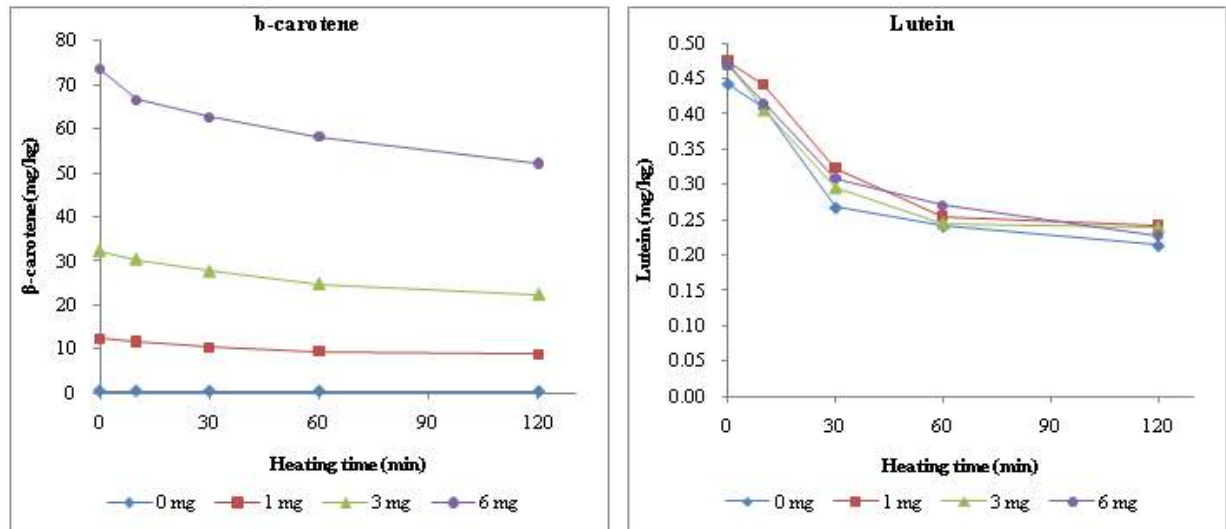


Figure 5. Carotenoids content changes during heating at 100 °C for perilla porridge-making affected by addition of β -carotene

Table 6. Regression analysis between carotenoids retention (%) and time during heating at 100°C to make perilla porridge affected by addition of β -carotene

Carotenoids	Addition level (mg) of β -carotene	Regression parameter ¹⁾		
		a	b	R ²
β -carotene	0	-0.246	98.187	0.9700
	1	-0.230	95.095	0.8525
	3	-0.247	96.067	0.9156
	6	-0.216	94.699	0.8923
Lutein	0	-0.412	89.277	0.7220
	1	-0.404	90.394	0.7556
	3	-0.383	86.977	0.7055
	6	-0.392	89.666	0.7972

¹⁾Carotenoids retention (%) = a x heating time (min) + b

④ 토크페롤

들깨죽 제조를 위하여 들깨와 쌀, 물의혼합물을 가열할 때 토크페롤은 분해되었으며 (Figure 12), 베타카로틴이 첨가된 시료에서 분해 속도가 낮은 경향을 보였다 (Table 10). 이것은 클로로필의 첨가와 마찬가지로 카로틴이 유지의 산화를 억제하는 작용과 일부 관련 있을 것으로 보인다. 즉, 카로틴의 산화방지 작용으로 들깨 유지의 산화방지 작용으로 인한 토크페롤의 분해를 감소시켰을(sparing action) 것으로 생각된다.

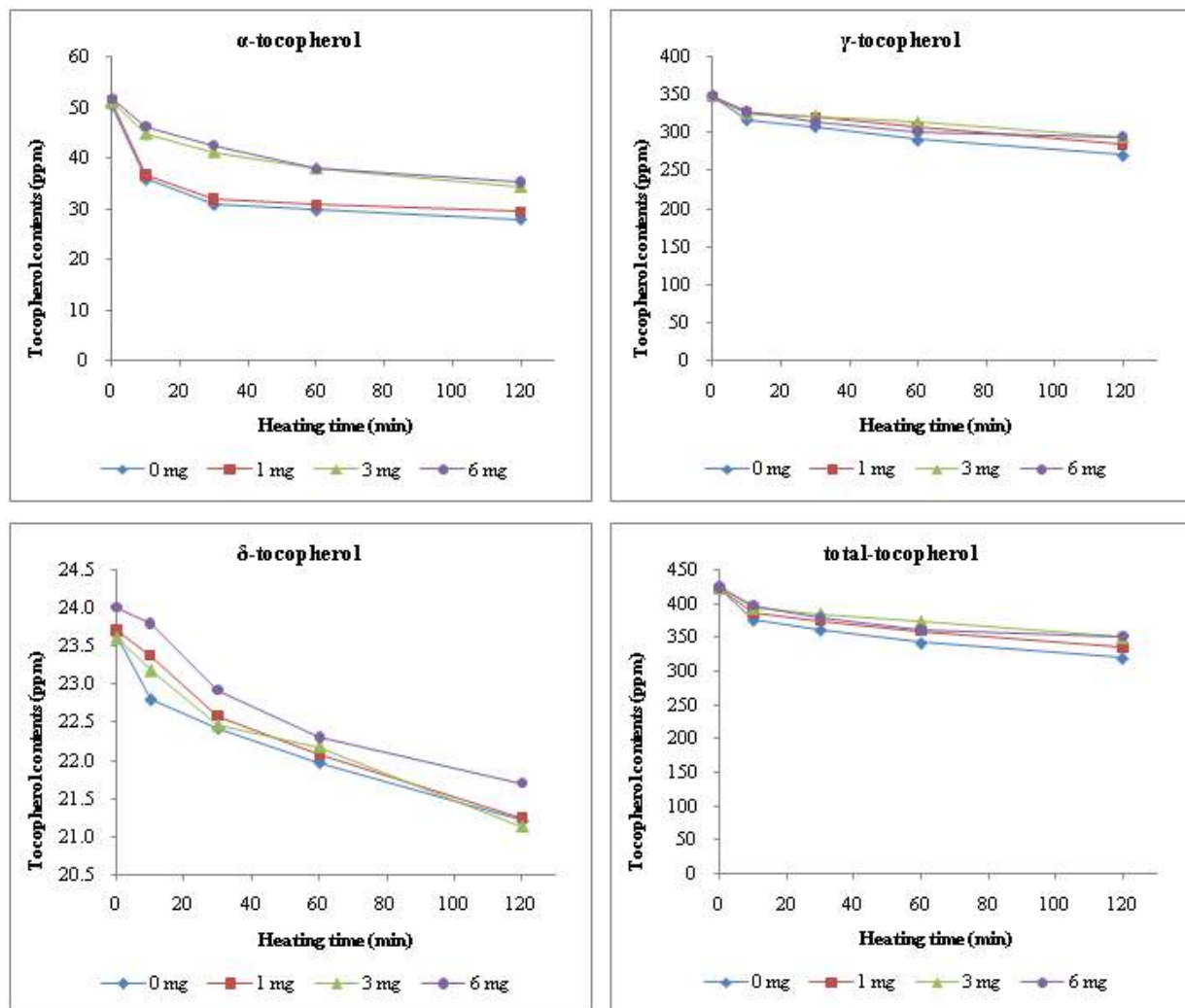


Figure 6. Tocopherol content (ppm) changes during heating at 100 °C for perilla porridge-making affected by addition of β -carotene

Table 7. Regression analysis between tocopherol retention (%) and time during heating at 100°C to make perilla porridge affected by addition of β -carotene

Addition level (mg) of β -carotene	Tocopherols	Regression parameter ¹⁾		
		a	b	r ²
0	α	-0.269	81.200	0.5168
	γ	-0.161	95.293	0.8595
	δ	-0.075	98.075	0.8913
	total	-0.169	93.766	0.7956
1	α	-0.255	81.439	0.4956
	γ	-0.134	97.257	0.9279
	δ	-0.084	99.021	0.9442
	total	-0.146	95.452	0.848
3	α	-0.238	92.436	0.8284
	γ	-0.109	96.693	0.8549
	δ	-0.082	98.958	0.9522
	total	-0.122	96.284	0.8569
6	α	-0.240	93.109	0.8328
	γ	-0.113	95.925	0.7675
	δ	-0.080	99.116	0.9129
	total	-0.127	95.721	0.7852

¹⁾Tocopherol retention % = a x heating time (min) + b

⑤ Polyphenol

들깨죽 제조를 위하여 들깨와 쌀, 물의혼합물을 가열할 때 가열시간에 따라 앞서와 마찬가지로 폴리페놀화합물 함량이 증가하였다 (Figure 13). 베타카로틴 첨가는 폴리페놀화합물 증가를 가속화시켰으나 베타카로텐의 농도에 따른 차이는 관찰되지 않았다 (Table 11).

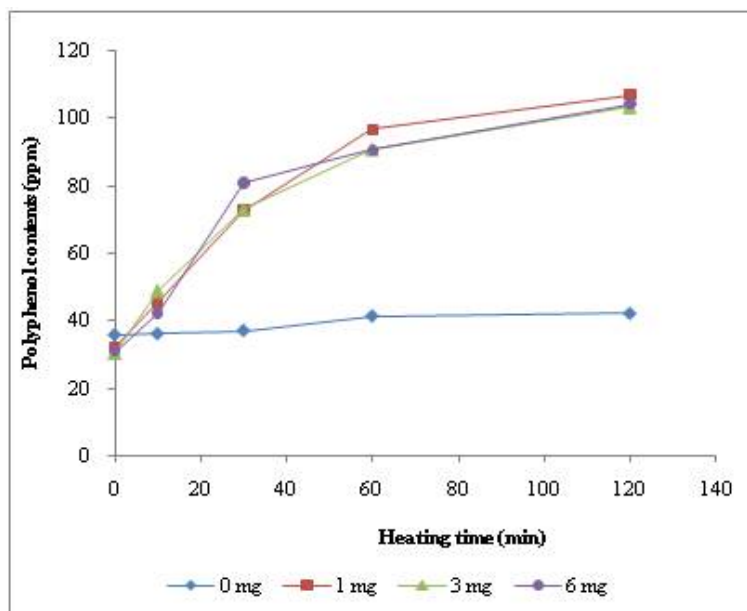


Figure 7. Polyphenol contents (ppm) changes during heating at 100 °C for perilla porridge-making affected by addition of β -carotene

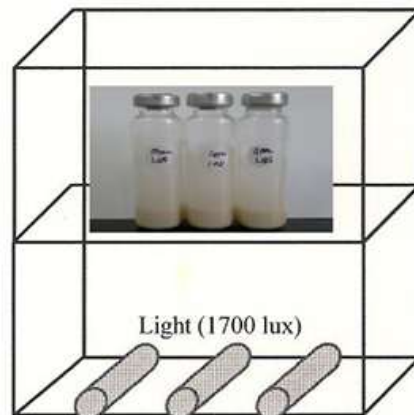
Table 8. Regression analysis between polyphenol retention (%) and time during heating of β -carotene added perilla porridge at 100°C for 2 h

Addition level (mg) of β -carotene	Regression parameter ¹⁾		
	a	b	r ²
0	0.16	100.38	0.8603
1	1.88	136.19	0.8469
3	1.85	145.36	0.8411
6	1.87	142.28	0.7932

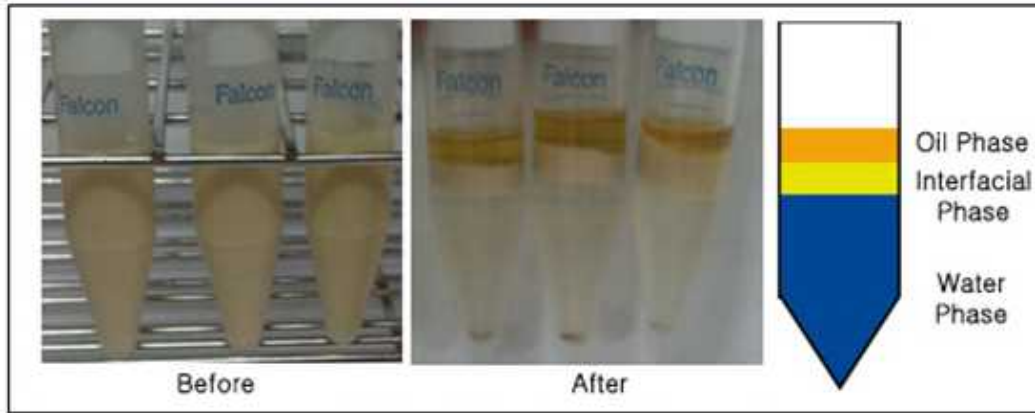
마. 일부 식품 재료를 첨가한 들기름 함유 emulsion 식품의 산화안정성 평가

(1) 방법

An과 Choe의 방법 (2011)을 따라 압착들깨유 (33.12 g), 난황가루 (0.5 g), 잔탄검 (0.15 g), 5% 아세트산 수용액 (66.23 g)의 조성으로 에멀전을 제조하였으며 여기에 클로로필 b를 0, 2, 4 mg/kg 농도로 혼합하였다. 준비된 에멀전을 4 g 씩 20 mL 시료병에 넣고 입구를 알루미늄캡과 고무 마개로 밀봉한 후 형광등 (1,700 lux)이 부착된 25 °C항온기 (LBI-250, Daihan Labtech Co., Seoul, Korea)에 넣어 48 시간 동안 산화시켰고, 0, 6, 12, 30, 48 시간에 꺼내어 분석하였다.



에멀전에서의 기름의 산화 정도는 시료병 headspace의 산소소비량과 ferric thiocyanate 법에 의한 hydroperoxide 생성으로 평가하였다 (An and Choe 2011). 클로로필, 토코페롤, 폴리페놀 함량 및 지방산 조성은 emulsion을 상분리한 후 (Lee and Choe 2011), HPLC, HPLC, visible spectrophotometry, GC법에 의해 분석하였다 (An and Choe 2011).



(2) 결과

(가) Chlorophyll 첨가에 의한 에멀전의 유지 산화

클로로필이 첨가된 들깨유 에멀전은 빛이 존재하지 않았을 때 headspace의 잔존산소량과 hydroperoxide 생성은 48시간의 산화 시간 동안 큰 변화를 보이지 않았으며 첨가된 클로로필 양에 의한 차이도 보이지 않았다. 그러나, 빛의 존재하에서는 들깨유 에멀전의 headspace의 잔존산소량은 48시간의 산화 시간 동안 유의하게 감소하였고 hydroperoxide 생성은 유의하게 증가하여 에멀전의 유지 산화를 보여주었으며 또한 첨가된 클로로필 수준이 증가함에 따라 유지 산화는 더욱 뚜렷이 증가하였다 (Table).

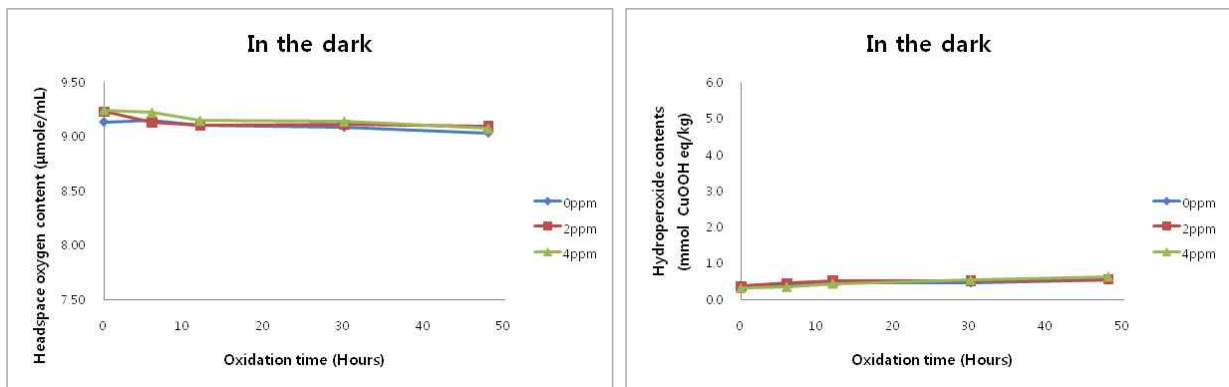


Figure 1. Effects of Chlorophyll on the Headspace oxygen content (μmole/mL) in perilla oil-emulsion during oxidation at 25°C in the dark.

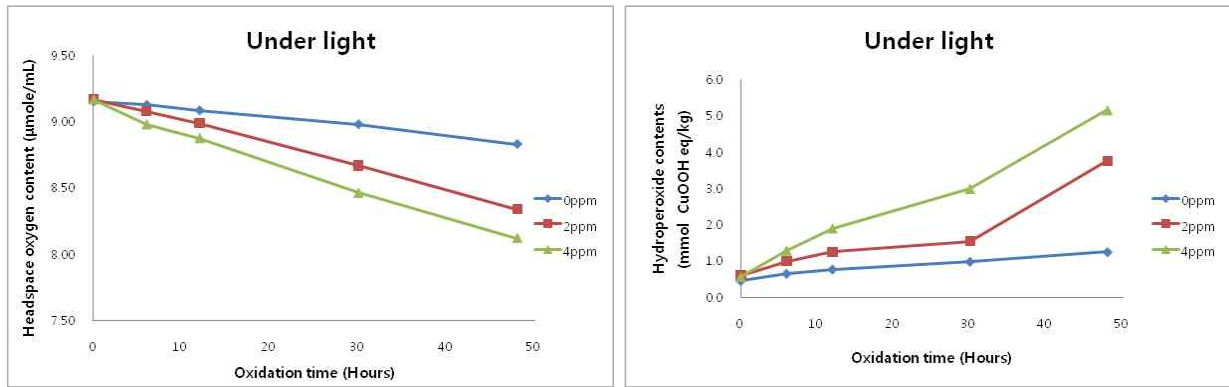


Figure 2. Effects of Chlorophyll on the Headspace oxygen content ($\mu\text{mole/mL}$) in perilla oil-emulsion during oxidation at 25°C under light.

Table 1. Regression analysis between oxidation time (h) and residual headspace oxygen contents (% based on 0h) of the perilla oil-emulsion containing chlorophyll during oxidation at 25°C in the dark and under light for 48h.

Addition level of chlorophyll (ppm)		Oxygen content			Hydroperoxides		
		a	b	r^2	a	b	r^2
In the dark	0	-0.022	100.019	0.966	1.224	115.371	0.823
	2	-0.020	99.356	0.450	0.830	113.597	0.711
	4	-0.035	99.826	0.879	2.093	104.862	0.972
Under light	0	-0.074	100.17	0.992	3.403	116.024	0.973
	2	-0.190	100.152	0.999	10.644	89.039	0.985
	4	-0.234	99.638	0.996	16.185	114.982	0.983

Residual headspace oxygen contents (% based on 0h) = a x oxidation time (h) + b, with correlation coefficient, r

Hydroperoxide contents (% based on 0h) = a x oxidation time (h) + b, with correlation coefficient, r

(나) 지방산조성 변화

클로로필이 첨가된 들깨유 에멀전은 빛의 존재 여부에 관계없이 48시간의 산화 시간 동안 지방산 조성은 크게 변화하지 않았으며 특히 유용한 오메가-3 지방산인 리놀렌산의 비중 또한 큰 차이를 보이지 않았다 (Figure).

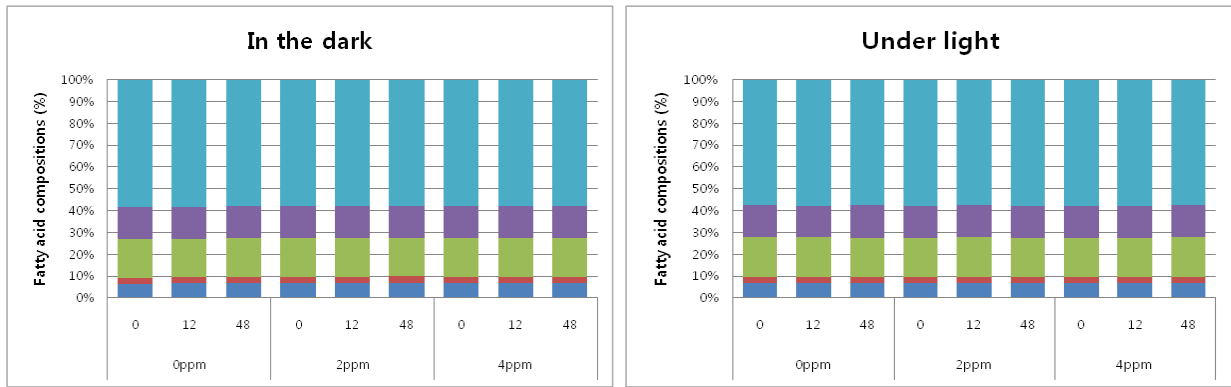


Figure 3. Fatty acid compositions(%) of perilla oil-emulsion during oxidation at 25°C under light. (■ ; palmitic acid, ■ ; stearic acid, ■ ; oleic acid, ■ ; linoleic acid, ■ ; linolenic acid)

(다) Chlorophyll 변화

들깨유 에멀전에 첨가된 클로로필은 빛이 존재하지 않을 때는 48시간 동안 유의한 변화가 없었으나, 빛이 존재할 때 그 양이 감소하였으며 (Figure), 이는 클로로필의 분해를 의미한다.

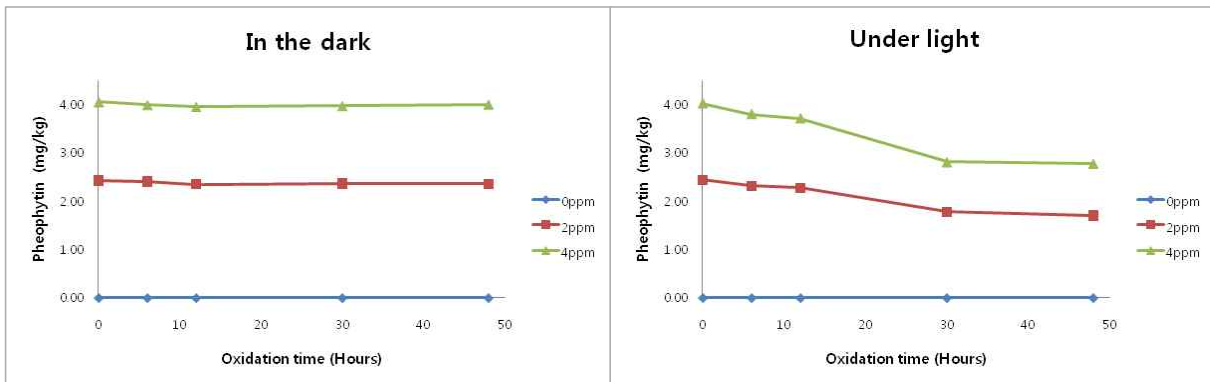


Figure 4. Change of Pheophytin contents in perilla oil-emulsion during oxidation at 25°C under light.

(라) Tocopherols 변화

클로로필이 첨가된 들깨유 에멀전에는 α -, δ -, γ -토코페롤이 각각 17.6, 123.0, 27.7 mg/kg 농도로 함유되어 있었으며 48시간의 자동 산화 시간 동안 토코페롤 함량은 큰 변화 없이 서서히 감소하여 48시간의 산화이후 95% 이상의 토코페롤이 잔존하였다 (Figure).

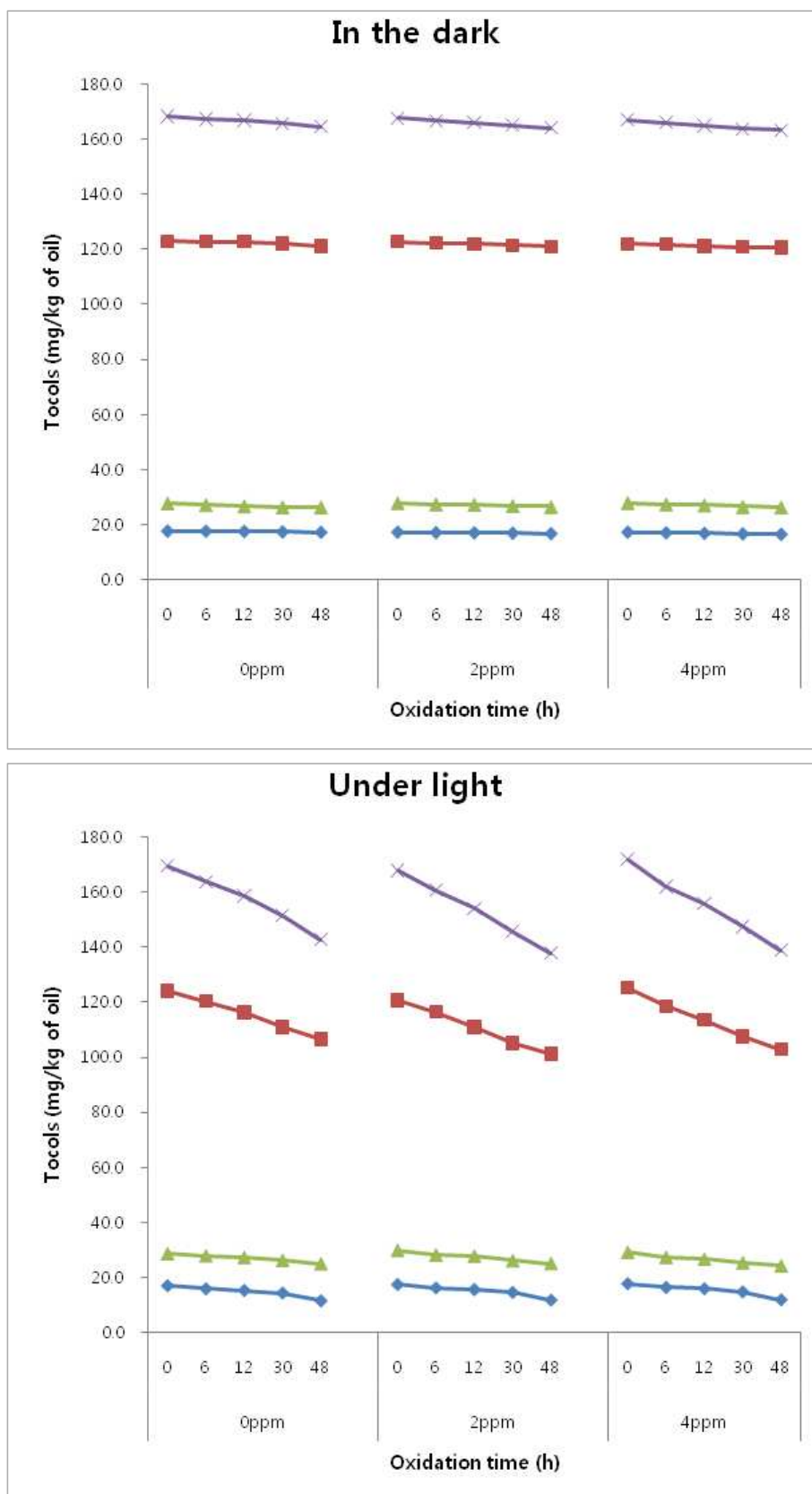


Figure 5. Change of tocopherol contents in perilla oil-emulsion during oxidation at 25°C under light.

(◆ : α-tocopherol, ▲ : δ-tocopherol, ■ : γ-tocopherol, X : total tocopherol)

그러나 빛의 존재 하에서 토코페롤의 분해는 증가하였으며 (Figure), 분해속도 또한 빛의 존재 하에서 높았다. 특히 빛이 존재하지 않은 조건에서의 산화에서는 δ -토코페롤이, 광산화에서는 α -토코페롤의 분해속도가 높았다 (Table).

Table 2. Regression analysis between oxidation time (h) and residual tocopherol contents (% based on 0h) of the perilla oil-emulsion containing chlorophyll during oxidation at 25°C in the dark and under light for 48h.

Addition of level of chlorophyll (ppm)	Tocopherol	Regression parameters			
		a	b	r ²	
In the dark	0	α	-0.051	99.947	0.995
		γ	-0.031	100.056	0.978
		δ	-0.092	98.652	0.738
		Total	-0.043	99.813	0.976
	2	α	-0.059	99.634	0.954
		γ	-0.028	99.829	0.942
		δ	-0.092	99.346	0.944
		Total	-0.042	99.729	0.950
	4	α	-0.088	99.322	0.922
		γ	-0.022	99.824	0.835
		δ	-0.113	99.042	0.895
		Total	-0.044	99.641	0.885
Under light	0	α	-0.620	98.855	0.958
		γ	-0.282	98.637	0.959
		δ	-0.255	99.067	0.983
		Total	-0.311	98.731	0.975
	2	α	-0.622	98.556	0.963
		γ	-0.325	98.053	0.928
		δ	-0.307	97.639	0.931
		Total	-0.352	98.031	0.953
	4	α	-0.628	98.278	0.960
		γ	-0.343	97.248	0.913
		δ	-0.314	97.047	0.905
		Total	-0.368	97.320	0.935

Residual tocopherol contents (% based on 0h) = a x oxidation time (h) + b, with correlation coefficient, r

(마) 폴리페놀 화합물

클로로필이 첨가된 들깨유 에멀전에는 폴리페놀 화합물이 19.2 mg/kg 농도로 함유되어 있었으며 48시간의 자동 산화 후에도 90% 이상이 잔존하였고 클로로필의 첨가 수준에 따른 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 광산화에서는 자동산화에 비해 많은 양의 폴리페놀

이 분해되었고 클로로필의 첨가 수준이 증가할수록 폴리페놀의 분해 또한 유의하게 증가하였다 (Figure). 들깨유 에멀전의 48시간동안 산화에서 클로로필 첨가 수준에 따른 폴리페놀의 분해 속도 또한 이와 동일한 경향을 보였다 (Table).

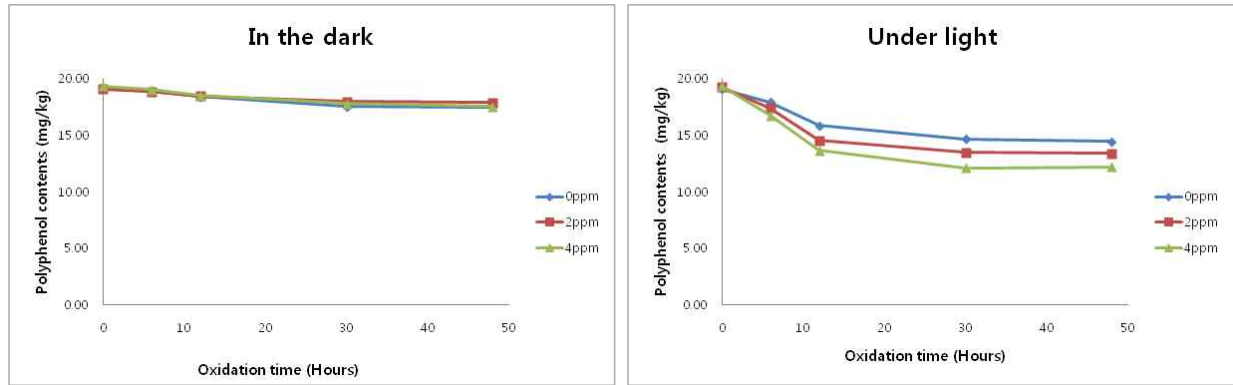


Figure 6. Change of Polyphenol compounds contents in perilla oil-emulsion during oxidation at 25°C in the dark and under light.

Table 3. Regression analysis between oxidation time (h) and residual polyphenol compounds contents (% based on 0 h) of the perilla oil-emulsion containing chlorophyll during oxidation at 25°C in the dark and under light for 48h.

Condition of Sample	Addition level of chlorophyll	Regression parameters		
		a	b	r ²
In the dark	0 ppm	-0.191	99.421	0.895
	2 ppm	-0.134	99.199	0.888
	4 ppm	-0.194	99.110	0.924
Under light	0 ppm	-0.483	95.320	0.794
	2 ppm	-0.581	92.244	0.713
	4 ppm	-0.700	90.077	0.713

Residual polyphenol compounds contents (% based on 0h) = a x oxidation time (h) + b, with correlation coefficient, r

2. 고도불포화지방산을 반응물로 하는 재구성지질 생산

가. 실험재료 및 방법

(1) 실험재료 및 시약

들깨는 전라남도 순천에서 재배된 것을 인천광역시의 재래시장에서 구입하였고, 170-180°C에서 20분간 볶은 후 압착하여 들깨유를 얻은 후 시료로 사용하였다. 지방산 및 글리세리드 분석에 쓰인 표준시료는 미국의 Sigma사 및 Supelco 사로부터 구입하였고, 모든 유기용매는 미국의 Aldrich사 제품이 사용되었다. Wakogel C-300 (230-400 mesh)은 일본 Wako Chemical 제품이었으며, 사용된 시약과 모든 용매는 시약급이나 HPLC 급이었다.

(2) 지질의 분석

들깨의 지질 조성은 메탄올의 혼합 용매(2:1, v/v)를 이용한 Folch법을 이용하여 들깨로부터 총지질을 추출하고 크로마토그래피법(TLC)에 의해 지질 조성을 평가하였다. 즉, Pre-coated Kieselgel 60F₂₅₄ TLC plate (Merck Co., Darmstadt, Germany)를 사용하여 디에틸에테르 : 아세트산 : 메탄올 (90:1:1, v/v/v)의 용매로 전개한 후 5% 황산용액에 담가 풍건한 후 200°C에서 1분간 가열하여 확인하고 imaging densitometer (Model GS-700 Biorad, Hercules, Calif., U.S.A.)를 사용하여 정량하였다. 들깨유의 지방산 조성은 들깨유를 14% BF₃-메탄올로 에스테르화시킨 후 hexane으로 추출하여 GC에 의해 분석하였다. 이때 분석 기기는 Supelcowax 10 capillary column (30 m × 0.53 mm, 1.0 μm thick; Bellefonte, Pa, U.S.A.)과 flame ionization detector가 장착된 Younglin M600L gas chromatograph이었고, oven, injector, and detector의 온도는 각각 230, 280, 280°C이었다. 질소의 속도는 분당 5 mL이었다.

(3) 지질의 입체특이적 분석

지질의 입체 특이적 (stereospecific) 지방산 조성은 지질의 전체 지방산 조성을 gas chromatography를 이용하여 분석한 후, 지질을 효소적으로 (pancreatic lipase, *Mucor miehei* lipase 등) 가수분해한 후, 유리 지방산만을 분리하여 지방산 조성을 분석하였다. 또한 모노글리세리드만을 분리하여 sn-2 특이 리파제로 가수분해하거나, 인산화시킨 후 포스포리파제 A2로 가수분해하여 지방산 조성을 분석하고 이상의 결과들을 종합하여 지질의 입체구조적 지방산 조성을 밝혔다. 들깨유를 pancreatic lipase로 가수분해하고, 반응물을 TLC에 적용하여 2-monoacyl-sn-glycerol과 diacylglycerol을 분리하였다. 2-monoacyl-sn-glycerol band를 긁어내어 sn-2 위치의 지방산 조성을 분석하였다. Diacylglycerol band를 긁어내어 anhydrous diethyl ether로 추출한 후 PPhCl₂로 phosphorylation하였다. Phosphorylated diacylglycerol를 phospholipase A2로 가수분해한 후 결과물인 1-monoacyl-sn-glycero-3-phosphatidic를 TLC에서 긁어내어 sn-1 지방산 조성을 구하였다. sn-1 위치의 지방산 조성은 $3 \times [TG] - [sn-1 + sn-2 \text{ position}]$ 식을 사용하여 계산으로 구하였다.

(4) 효소적 esterification 반응

Lipase (500 mg)를 500 mL 0.01 M phosphate buffer solution (pH 7.0)에 녹인 후 동결건조시켰다. 0.35 M linolenic acid와 0.025 M glycerol을 30 mg lyophilized lipase가 들어 있는 5 mL isooctane에 첨가하여 반응을 시작하였다. Isooctane내의 수분은 molecular sieve를 첨가하여 제거하였다. 반응 중에 생성된 수분은 0.46 g Wakogel을 첨가하여 제거하였다. 반응 vials은 5% dichlorodimethylsilane in toluene로 silanize 시켜 glycerol이 표면장력으로 인하여 dflqoraus에 붙는 것을 방지하였다. 10초간 sonication 후 reaction vial을 submerged magnetic stirrer (500 rpm, VarioMag Telemodule 20P; HTP Labortechnik, Munich, Germany)에 넣어 반응을 시작하였다. 반응온도는 25°C로 유지하였고, aliquots 내 linolenic acid, mono-, di-, and tri-linolenin의 양은 HPLC로 측정하였다.

(5) 반응조건의 최적화

Lipase를 여러 가지 buffer 내에서 동결건조시켰다. 사용된 buffer는 citrate buffer (pH 3, 4, 5), succinate buffer (pH 4, 5, 5.5), phosphate buffer (pH 6, 6.5, 7, 8), histidine buffer (pH 9)였고 buffer concentration는 0.05 M였다. 동결건조 후 acetonitrile로 효소를 닦아 glass filter 위의 salt를 제거하였다. 첨가된 효소의 양은 30 mg protein concentration (by Lowry method)로 조절하였다. 10시간 반응 후 glycerides의 양을 HPLC로 정량하였다. Synthetic activity 최적온도를 측정하기 위하여 Lipase RM을 사용하여 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C에서 10시간 반응시켰다. Isooctane을 reaction medium을 사용하였다.

10시간 반응 후 채취한 시료 800 μ l 에 chloroform 200 μ l를 가하여 용해시킨 후 PTFE Syringe Filter (13 mm 0.45 μ m, Whatman)를 통과시킨 후 분석시료로 사용하였다.

(6) Solvent-free system에서의 고도불포화지방산을 이용한 재구성지질의 생산

Solvent-free system에서의 반응 조건은 다음과 같다. 다양한 수준의 linolenic acid를 glycerol 대비 1:5.61의 비율로 반응시켰다. 반응물은 screw cap Erlenmeyer flask에 넣고, 3g of molecular sieves와 Lipase RM 5%를 가하여 반응을 시작하였다. 반응온도는 40°C, 반응시간은 12시간으로 하였다.

(7) 들깨유를 이용한 재구성지질의 생산

들깨유와 linolenic acid를 재구성지질을 생산하였다. 기질의 양을 약 5ml 정도로 하여 최적화된 조건에서 효소적으로 재구성지질을 생산하였고, 다량 생산을 위하여는 기질의 양을 10배정도 (50ml)로 scale up하여 재구성지질을 생산하였다. 들깨유와 linolenic acid의 mole ratio는 1:5로 하였으며, 반응은 40 °C에서 15시간 동안 transesterification 반응을 시켰다.

나. 결과 및 고찰

(1) 들깨유의 입체특이적 지방산 조성 분석

들깨는 건물 기준으로 최대 47.8%의 유지를 함유한다. 들깨유는 neutral lipids (more than 90%)가 주성분으로써 중성지질의 약 90%는 triacylglycerols이다. 들깨유의 특징은 높은 linolenic acid 함량에 있는데 범위는 53.6 - 64%이다. 지질의 물리적, 화학적, 생물학적인 성질은 위치특이적 지방산 조성에 따라 크게 달라진다. 들깨유의 sn-2 위치의 주요 지방산은 linolenic acid로 알려져 있다.

들깨의 총지질 함량은 45.6%로 나타났으며, 주요 지방산은 linolenic (53%), oleic (20.9%), linoleic (15.4%), palmitic (7.3%), stearic (2.5%) acids로 나타났다. Myristic acid는 minor component로써 정량화되지는 않았다 (Table 1). 총지질함량은 기존의 보고와 크게 틀리지 않았다.

Table 1. Positional fatty acid distribution of perilla oil

	Total	sn-1	sn-2	sn-3
Palmitic acid	7.3	10.3	3.6	8.2
Stearic acid	3.3	6.7	2.1	1.1
Oleic acid	20.9	13.8	26.5	22.5
Linoleic acid	15.4	7.1	16.0	23.2
Linolenic acid	53.0	62.1	51.9	45.0

들깨유의 입체특이적 지방산 조성 분석 결과는 Table 1과 같다. Linolenic acid가 sn-1, 2, 3 위치에서 공히 모두 주요 지방산이었다. 각 위치에서의 지방산 조성이나 총지질에서의 지방산 조성은 크게 다르지 않았으나 약간의 차이는 나타났다. 대부분 식물성 유지의 경우, 불포화지방산은 sn-2 position에, 포화지방산은 sn-1과 sn-3에 더 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. Palmitic acid와 stearic acid 같은 포화지방산은 sn-1과 3보다는 sn-2에 더 많이 분포하고 있었다. 일반적으로 식물성 유지에서는 palmitic acid와 stearic acids가 sn-1과 3에 많으나 들깨유에서는 sn-2 position에 많이 분포하지는 않았다.

(2) 고도불포화지방산을 반응물로 하는 재구성지질 생산을 위한 효소의 선발과 Esterification pattern

고도불포화지방산 글리세리드를 합성하기 위하여 3종의 대표적인 lipase를 isooctane 안에서 반응시킨 결과를 Table 2에 표시하였다.

Table 2. Synthetic activities of lipases for polyunsaturated glycerides production*

Lipase	Products					
	Monolinolenin		Dilinolenin		Trilinolenin	
	3	10	3	10	3	10
Lipase CC	+	++	+	+++	+	++
Lipase RM	+	++	++	++	++	++++++
Lipase AP	+	++	+	++++	+	++

*+, 0-10000; ++, 10000-20000; +++, 20000-40000; +++++, 40000-50000; ++++++, over 50000

Test한 세가지 lipase 중에서 *R. miehei* lipase가 상대적으로 좋은 활성을 보였다. 유기용매 내에서 좋은 활성을 보이는 lipase는 그 반응 pattern에 따라 세 가지로 나눌 수 있다. Group I에는 Lipase CC (*C. cylindracea*), Lipase OF-360 (originated from *C. rugosa*), Lipase AY (*C. rugosa*), Lipase MY (*C. rugosa*) 등이 속하는데 고도불포화지방산 glycerides 합성에는 좋은 활성을 보이지 않았다. Group II에는 Lipase PS (*P. aeruginosa*), Lipase CV (*Chr viscosum*), *R. miehei* lipase 등이 속하는데 trilinolenin 합성에 좋은 활성을 보였다. 처음 3시간 반응에서는 MG와 DG가 일부 생성되었으나 10시간 반응 후에는 TG가 다량 생산되었다. Group III에는 Lipase AP (*A. niger*), Lipase F-AP15 (*R. javanicus*), Lipase D (*R. delemar*) 등이 속하는데 DG 생성이 눈에 띄었다. Group I lipase는 가수분해

반응에서 nonspecific lipases로 알려져 있으며 (Fig. 1), Group II와 Group III lipases는 모두 1,3-hydrolysis-specific lipases로 알려져 있으나 유기용매 내에서 합성 pattern은 다르다고 알려져 있다. 결론적으로 Group II lipase가 고도불포화지방산 TG 합성에 제일 적합하며 (Fig. 2), DG 합성에는 Group III lipase가 적합한 것으로 나타났다 (Fig. 3).

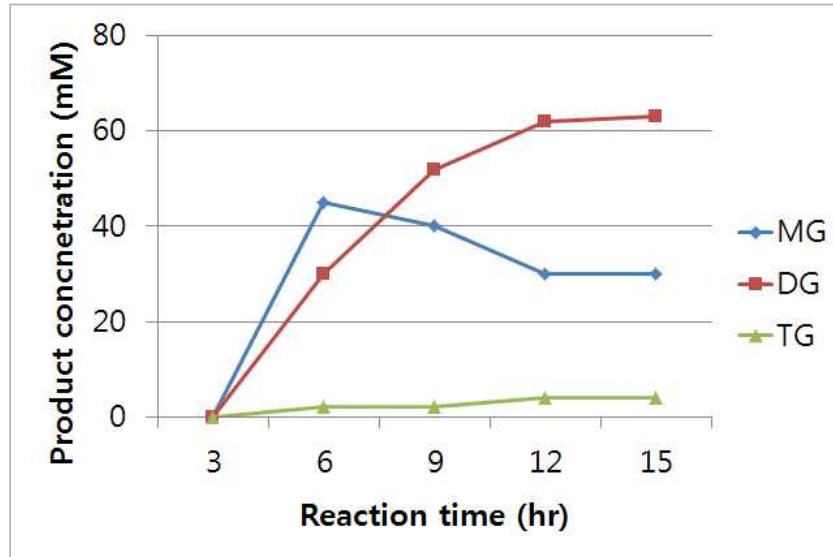


Fig. 1. Esterification pattern of Lipase CC

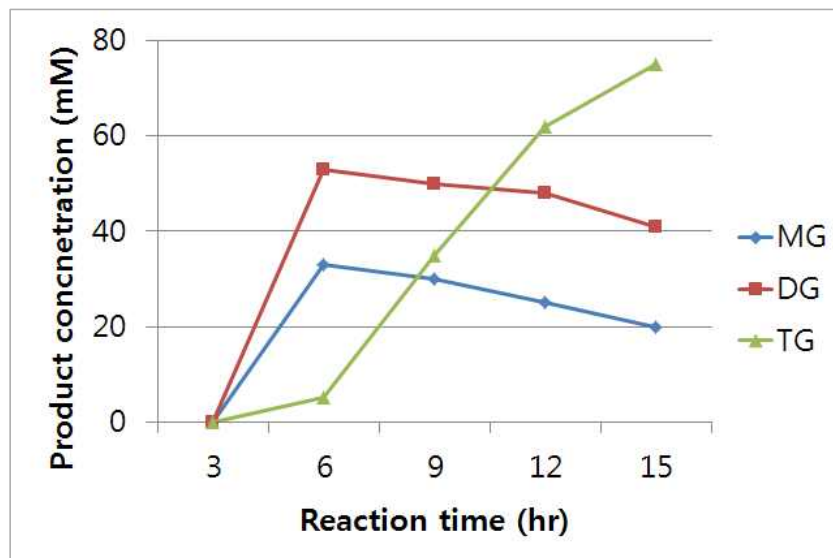


Fig. 2. Esterification pattern of Lipase RM

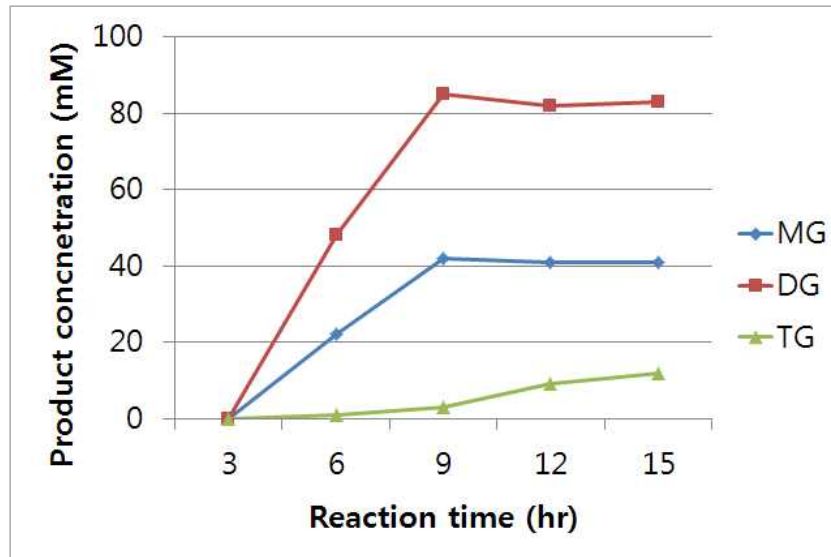


Fig. 3. Esterification pattern of Lipase AP

(3) 반응조건의 최적화

Group I, II, III에 속한 세 종류의 lipase는 최적 유기용매, 반응 pH, 반응 온도에서 유사한 특징을 보였다. 최적 유기용매를 선발하기 위하여는 Lipase CC를, pH는 Lipase RM을, 반응온도는 Lipase AP를 사용하였다. 극성에 다른 유기용매 내에서 linolenic acid의 glycerides 합성 결과 Table 2에 표시하였다.

Table 3. Product concentration by Lipase CC in various solvents

Solvent	Reaction time (hr)	Concentration (mM)		
		MG	DG	TG
Cyclohexane	3	25	60	10
	10	18	63	38
Octane	3	36	53	4
	10	25	81	13
Hexane	3	12	45	35
	10	6	33	52
Isooctane	3	36	60	3
	10	24	59	38

효소적 esterification에 최적합한 유기용매를 선발하기 위하여 4가지 water-immiscible 유기용매를 분석한 결과를 Table 3에 표시하였다. Hexane 내에서는 81%의 linolenic acid가 esterification 되어 전환율이 제일 높았다. 그 다음으로는 isooctane 내에서 73%였다. Hexane 내에서의 효율이 제일 높았으나 실험시 용매의 증발을 막기 위한 고도의 주의가 요구되어 편의상 isooctane을 실험에 사용하였다.

Lipase AP (*A. niger*)를 사용하여 적정 pH를 실험한 결과를 Fig. 4에 표시하였다.

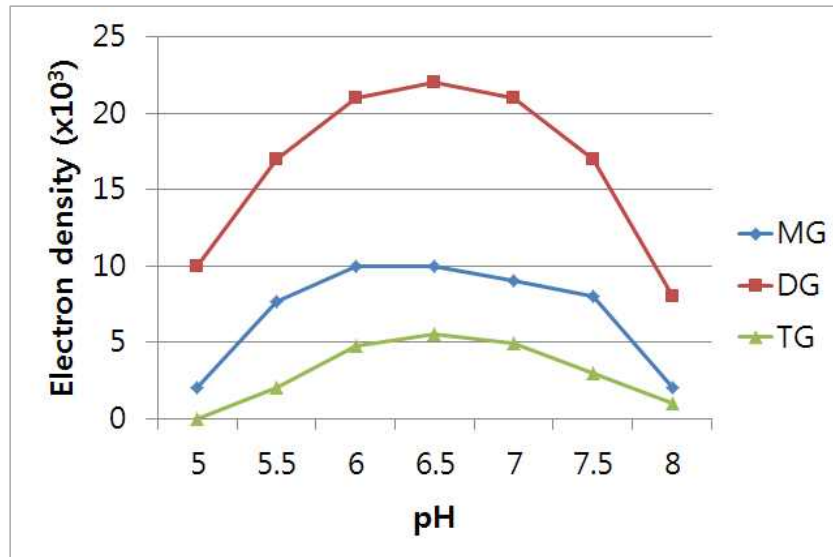


Fig. 4. Effect of lyophilization pH on synthetic activity Lipase AP

pH 3, 4, 5, 8, 9에서 동결건조된 lipase는 활성을 나타내지 않았다. Fig. 2에서처럼 pH 5.5에서 7.5 사이에 동결건조된 lipase는 활성을 보였고, pH 6.5에서 제일 높은 활성을 보였다. 이러한 결과는 가수분해시의 최적 pH와 동일한 것으로 나타났다. Lipase가 낮은 pH나 높은 pH에서 활성을 보이지 않는 것은 isoctane에서는 ion 구조가 복원되지 않기 때문인 것으로 사료된다.

효소적 esterification 반응의 최적온도를 선택하기 위하여 Lipase RM을 사용하여 실험한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

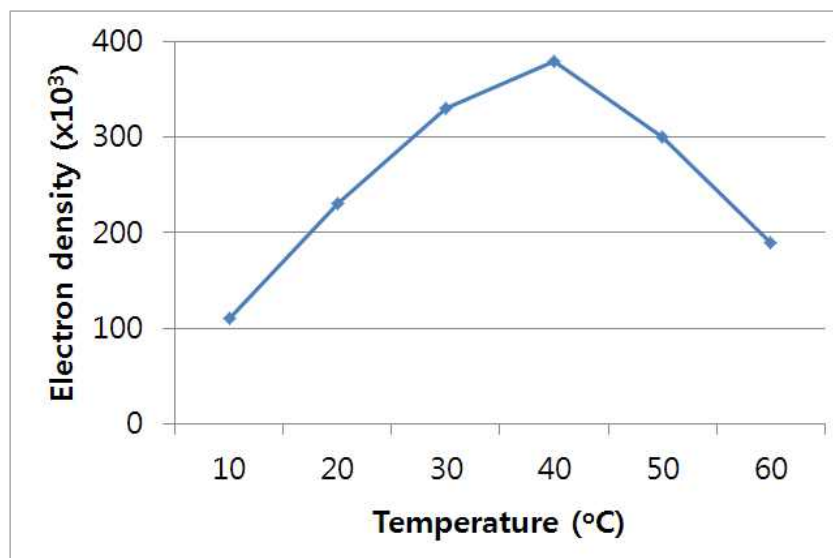


Fig. 5. Effect of reaction temperature on synthetic activity Lipase RM

대부분의 효소들은 40°C 이상에서는 활성을 잃으나 Lipase RM은 40°C에서 가장 높은 활성을 보였으며, 60°C에서도 상당한 활성을 보여 고온에서도 사용이 가능한 효소로 사료되었다.

(4) Solvent-free system에서의 고도불포화지방산을 이용한 재구성지질의 생산

예비실험 결과 linolenic acid의 비율을 높게 하는 것이 반응의 효율을 높이는 것으로 나타나 1:1, 1:2 대신 1:5.6의 고비율을 택하여 반응시킨 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

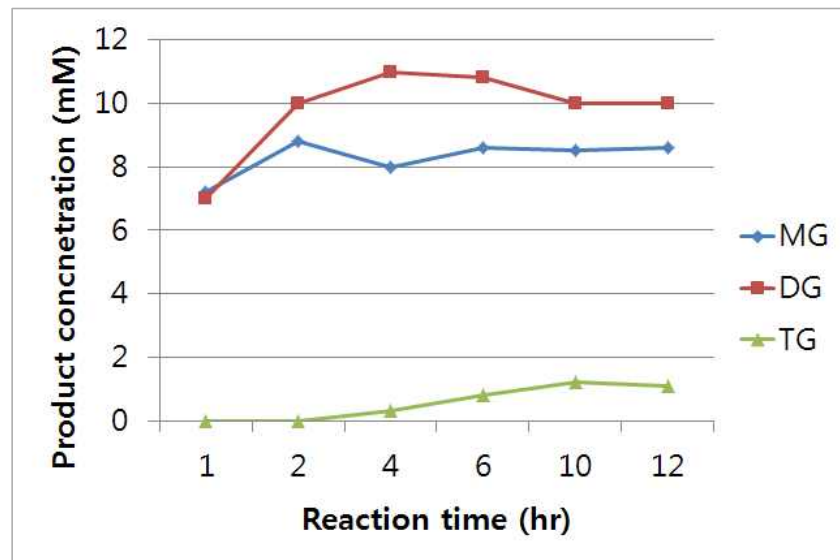


Fig. 6. Esterification pattern of Lipase RM in solvent-free system

Solvent-free system을 사용하면 product의 회수가 간편한 반면 반응 효율은 반응생성물인 수분을 효율적으로 제거해 주어야 반응 수율을 높일 수 있다. 그러나 본 실험에서 사용한 batch reactor에서는 전체적인 전환율은 유기용매 내에서의 반응보다 매우 낮아 실용화하기에는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

(5) 들깨유와 linolenic acid를 활용한 재구성지질의 합성

들깨유와 linolenic acid를 재구성지질을 생산하기 위하여 들깨유와 linolenic acid를 40°C에서 15시간 동안 transesterification 반응시킨 후 입체특이적 지방산 조성 분석을 한 결과를 Table 4에 나타내었다.

효소적 interesterification 후에도 전체 지방산 중 linolenic acid 함량은 53%에서 55%로 약간 증가하였으나 통계적인 유의차는 보이지 않았다. 특히 sn-2 위치에서의 linolenic acid 함량은 약간 증가하였으나 이 역시 통계적인 유의차는 보이지 않았다. 이는 사용한 효소가 1,3-specific한 활성을 갖기 때문인 것으로 사료되며, 결론적으로 들깨유의 linolenic acid 함량을 높이기 위하여 재구성지질을 생산하는 것은 실질적인 의미를 갖기 어려운 것으로 사료된다. 다른 고도불포화지방산의 경우도 효소의 기질 특성을 살펴볼 때 inter- 혹은 trans-esterification 반응을 통하여 incooperation 시키기는 쉽지 않을 것으로 사료된다.

Table 4. Positional fatty acid distribution of structured perilla oil

	Total	sn-1	sn-2	sn-3
Palmitic acid	6.9	10.1	3.3	7.9
Stearic acid	2.9	5.9	1.9	1.0
Oleic acid	20.1	11.9	25.5	21.2
Linoleic acid	15.1	6.9	15.8	19.7
Linolenic acid	55	65.2	53.5	50.2

3. 전처리 조건 및 추출방법에 따른 들깨유의 기능성분 함량 및 산화안정성 규명 (위탁과제 1)

가. 실험 재료 및 방법

(1) 실험재료 및 전처리

밀양에서 구입한 들깨(국산)를 실험재료로 이용하였다. 실험에 사용한 들깨는 추출 전 3번에 걸쳐 수돗물로 씻어 이물질 및 흙을 제거한 뒤 뜰채로 들깨를 건어서 물기를 충분히 뺀 후, 볶음을 행하였다.

(2) 들깨볶음 처리과정

실험에 사용한 들깨는 4kg씩 추출 전 3번에 걸쳐 수세하여 이물질 및 흙을 제거한 하고, 수세한 들깨에서 물기를 충분히 뺀 후, 볶음장치를 사용하여 240℃에서 10min, 12min, 14min, 16min 분간 볶아주었다.

(3) 압착 착유과정

볶은 들깨를 가스제거기를 사용하여 가스를 제거한 후, 압착식 착유기에 넣는다. 각각 (4kg)의 들깨를 압착식 식물성기름 착유기(풍진유압기계)의 착유통에 넣어 600kgf/cm² 까지 압력을 가하여 착유하였다.

착유기에서 나온 기름은 기름 안내함을 따라 Vacuum장치가 연결되어 있는 Filter장치로 흘러나온 뒤 면으로 구성된 Filter를 통해 필터하였다. 이렇게 얻은 들깨유를 1일간 정제한 후, 다시 커피필터를 사용하여 재여과하여 맑은 들깨기름을 얻었다.



(fig. 1) 자동볶음기



(fig. 2) 가스제거기



(fig. 3) 압착착유기

(4) 초임계 유체를 이용한 착유공정

볶은 들깨를 막자사발을 이용하여 마쇄한 후, 1.8 x1.8 mm 구멍 간격을 가진 체망을 통과한 시료를 초임계 추출용 시료로 사용하였다. 초임계 유체 추출장치의 착유조건 중 추출조의 압력에 따른 들기름의 차이를 확인하기 위해 각 150g의 마쇄한 들깨를 초임계 유체 추출장치 (Iishin, Autoclave Co., Ltd, Korea)의 착유통에 넣어 추출조온도 50℃에서 추출조의 압력을 300, 360, 420bar로 각각 달리하여 2시간 동안 추출 하였다. 이때 분리조의 압력과 온도는 각각 70bar 와 40℃ 이었다.

초임계 유체 추출장치의 착유조건 중 추출조의 온도에 따른 들기름의 추출수율의 차이를 확인하기 위해 각 150g의 들깨를 초임계 유체 추출장치의 착유통에 넣어 추출조의 압력을 360bar에서 추출조의 온도를 45℃, 50℃ 및 55℃로 각각 달리하여 2시간 동안 추출하였다. 이때 분리조의 압력과 온도는 각각 70bar 와 40℃이었다.



그림 1. 초임계 유체 추출장치



그림 2. 추출조

(5) 용매추출에 의한 착유 공정

볶음은 들깨를 50ml Centrifuge tube에 칭량하여 옮겨 넣은 후 헥산(hexane)을 첨가하고, 10분간 잘 진탕한 후, 40℃로 세팅된 Sonicator에서 1시간 동안 Sonication한 후, 원심분리기 3000RPM에서 15분간 원심분리를 실행하여 상층액인 헥산층을 회수하였다. 이러한 추출단계를 3회 더 반복하여 얻은 헥산을 증발시켜 사용하여 들기름을 얻었다.

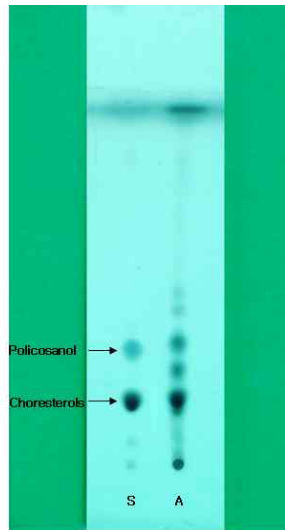
(6) 비누화반응 (Saponification)

내부표준물질을 첨가한 들깨유에 12% Ethanolic KOH(w/v)를 20mL 첨가한 후, 항온수조를 이용하여 60℃에서 1시간30분간 반응시킨 후 흐르는 물로 냉각하고, 삼차증류수 20mL 첨가하였다. 그리고 Hexane 10mL을 넣고 천천히 혼합한 후 30분간 정제 후 헥산층을 회수하였다. 추출한 헥산층은 질소로 농축한 후, Deep Freezer에 보관하면서 분석하였다.

(7) TLC (Thin-layer chromatograph)

비누화 반응으로 얻은 불검화물을 다시 헥산으로 용해하고 TLC Plate (3cm x 8cm)에 점적한 후 전개용매(40:60, hexane:ethyle ether)로 전개하였다. TLC plate를 10% Cupric

Sulfate Solution에 5초 동안 침지 후 TLC plate를 상온에서 완전히 건조하고 150°C의 Dried 에 넣어 Developed band를 확인하였다.



(fig.4) S, standard mixture of octacosanol and Cholesterol.
A, TMS from Perilla seeds oil

(8) 들깨유의 지방산 조성 분석 (Analysis of fatty acid composition)

들깨유시료를 Screw cap 이 달린 Test tube로 옮겨 넣은 후 0.25N NaOCH₃를 1mL를 가하고 Heating block에서 70°C 20min간 반응시켰다. 반응이 끝난 Sample은 포화 NaCl용액 1mL과 Hexane 1mL을 넣고 혼합하고 30min 간 정제한 후, 상등액을 뽑아 GC Bial에 보관/분석하였다. 지방산 분석조건은 다음과 같다 (Jung MY et al., 2011).

- Model = GC-2010 (Simadzu, Japan)
- Injection Volume = 10 μ L
- Injection temp(°C) = 250°C
- Detector temp(°C) = 260°C
- Split ration = 1 : 20
- Capillary column SP-2380 (100m X 0.25mm I.d., film thickness 0.25 μ m, SUPELCO Inc, Bellefonte, PA, USA)

(9) 들깨유의 토코페롤함량 측정 (Analaysis of tocopherols)

들깨유 Sample은 각각 0.2500g을 정확히 칭량하여 적정량의 Hexane으로 용해한 후, 0.45 μ m Syringe Filter를 사용하여 필터한 시료 10 μ L를 뽑아 형광 검출기 (FLD-1200, Agilent, USA)를 장착한 HPLC (HPLC 1200 series, Agilent, USA)에 주입하여 분석하였다 (Carpenter, 1979). 분석에 사용한 칼럼은 μ -Polasil column (3.9X300mm, Waters corp., Milford, MA)이었다. 이동상으로는 hexane: 2-propanol (99:1)을 사용하였고, flow rate는 1mL / min이었다.

(10) TMS화 반응 (Trimethylsilylation reaction)

Saponification 후 얻은 불검화물 시료를 1mL Hexane에 용해한 후, 시료 500 μ L vial에 옮겨 담고, 질소가스를 사용하여 용매를 증발 농축시켰다. 이곳에 다시 Na₂SO₄로 탈수한 Chloroform을 200 μ L와 BSTFA in 1% TMCS를 400 μ L를 첨가하고, 항온수조에서 80 $^{\circ}$ C에서 30분간 TMS화 반응을 시켰다.

(11) 피토스테롤 분석 (Phytosterols analysis)

TMS화 반응이 끝난 시료를 GC (GC-2010, Simadzu, Japan)에 주입하여 분석하였다. 사용한 컬럼은 Capillary column Rtx[®]-1 (30m X 0.25mm I.D., film thickness 0.25 μ m, RESTEK International, Belleford, PA, USA)이었다. 주입구 및 검출기 온도는 각각 315 $^{\circ}$ C 및 315 $^{\circ}$ C 이었다.

(12) 폴리코사놀 분석 (Policosanol analysis)

위에 기술한 방법으로 TMS화한 시료를 GC-FID 혹은 GC-MS/M를 이용하여 다음과 같은 조건에서 폴리코사놀함량을 분석한다.

Gas Chromatograph 분석조건

- Model = GC-2010 (Simadzu, Japan)
- Injection Volume = 10 μ L
- Injection temp($^{\circ}$ C) = 315 $^{\circ}$ C
- Detector temp($^{\circ}$ C) = 315 $^{\circ}$ C
- Split ration = 1 : 20
- Capillary column Rtx[®]-1 (30m X 0.25mm I.D., film thickness 0.25 μ m, RESTEK International, Belleford, PA, USA)

Gas Chromatograph-MS/MS 분석조건

- Model = GC 7890A-Triple Quadrupole 7000B (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)
- Injection Volume = 1 μ L
- Injection temp($^{\circ}$ C) = 315 $^{\circ}$ C
- Split ration = 1 : 3
- Capillary column HP-5MS (30m X 0.25mm I.D., Agilent Technologies, USA)
- Ion source temp($^{\circ}$ C) = 310 $^{\circ}$ C
- MSD transfer line temp($^{\circ}$ C) = 280 $^{\circ}$ C
- Collision induced dissociation energy(CIDE) = 30v

(13) SPME법을 이용한 피라진 분석법 (Analysis of pyrazine compounds by SPME method)

들깨유 2g을 정확히 칭량하여 15mm x 15mm크기의 magnetic bar와 함께 serum bottle에 옮겨 넣고 teflon-coated rubber septum과 aluminum cap을 이용하여 serum bottle을 완

전히 밀폐한 후, 40℃로 유지되는 교반기 위에서 20분간 교반 시켰다. 교반 후, serum bottle의 상부공극에 존재하는 휘발성 화합물을 SPME (solid phase microextraction) fiber (75um carboxenyl polydimethylsiloxane fiber, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA)를 주입하여 40℃의 교반기에서 20분간 다시 흡착 시킨 후, GC에 주입부에서 고온 탈착 주입하여 분석하였다. SPME는 270℃로 주입구 온도가 설정된 GC에 5분간 주입시켜 SPME의 fiber에 흡착된 물질이 모두 GC로 주입 될 수 있도록 하였으며, 이때 사용한 컬럼은 Capillary column wax-10 (60m X 0.25mm I.D., film thickness 0.25µm, Supco, USA)이었으며, 검출기의 온도는 280℃이었다.

(14) 자동산화 안전성 분석 (Autooxidative stability)

들깨유의 자동산화 안전성을 분석하기 위해 샘플 20g을 정확히 칭량하여 삼각플라스크에 옮겨 담은 후, 건조오븐에서 60℃의 가온조건하에 보관하였다. 이 시료는 일정한 시간마다 시료 2g을 채취하여 식용유의 산화지표를 측정하면서 자동산화 안전성을 평가하였다. 식용유의 산화정도는 AOCS법을 이용하여 과산화물가와 카보닐가를 측정하여 확인하였다 (AOCS, 1990).

(15) 광산화 안정성 분석 (Photooxidative stability)

들깨유의 광산화 안정성을 분석하기 위해 샘플 20g을 정확히 칭량하여 삼각플라스크에 옮겨 담은 후, 5000LUX의 형광등이 설치된 light box에 보관하였다. 이 시료는 일정한 시간마다 시료 2g을 채취하여 식용유의 광산화 안정성을 측정하였다. 식용유의 산화정도는 AOCS법을 이용하여 과산화물가와 카보닐가를 측정하여 확인하였다.

(16) 과산화물가 (Peroxide value, POV) 측정

들깨유 시료 1g을 삼각플라스크에 정확히 칭량한 후, acetic acid 와 iso-octane 혼합용매 (3:7, v/v) 20ml을 넣고 시료가 잘 녹어나도록 흔들어 주었다. 포화 KI용액을 0.5ml를 넣고, 정확히 1분간 흔들어 반응시킨다. 반응이 끝난 시료는 삼차증류수 30ml을 첨가하여 반응을 중지 시킨 후, 전분지시약 0.5ml 넣고 흔들어 주었다. 그리고, 0.01N Sodium thiosulfate용액을 사용하여 전분의 색이 없어질 때까지 적정하여, 이 적정값을 이용하여 과산화물가를 측정한다.

(17) Conjugated diene 함량 측정

시료 0.01g을 screw cap 시험관에 정확히 칭량한 후, hexane으로 시료를 희석하여 233nm에서 흡광도값이 0 - 1 사이가 되도록 적정수준으로 희석한다. 헥산에 희석한 샘플은 UV - Spectrophotometer를 사용하여 233nm에서 흡광도를 측정하여 들깨유의 산화지표를 측정한다.

(18) p-anisidine가 측정

들깨유 시료 0.05-0.1 g을 15 mL 시험관에 칭량하고 iso-octane 5 mL을 가하여 시험관의 들깨유를 완전히 용해시켜 주었다. iso-octane에 용해된 시료는 0.25% p-anisidine지시약

1 mL를 가하여 격렬히 희석한 후, 정확히 10분간 암실에서 정제하였다. 그런 다음 준비된 샘플은 UV/VIS - spectrophotometer (Shimazu Corp., Tokyo, Japan)를 사용하여 350nm에서 흡광도를 측정하여 p-anisidine가의 결과 값을 구하였다.

(19) L*, a*, b* color system을 이용한 들깨유의 색도 측정

들깨유의 색도 측정은 3가지 등급으로 나누어 Hunter Lab colormeter (CM-3500d, Konica Minolta holdings Inc., Tokyo, Japan)을 사용하여 측정 하였으며, 각 들깨유의 L* (명도)는 0 (dark) 에서 100 (light)까지 측정하였고, a*(적색도)와 b*(황색도)를 측정하였다.

나. 실험결과

(1) 배전 조건을 달리하여 얻은 들깨로부터 압착추출로 얻어진 들깨유의 기능성 물질 분석

(가) 압착추출 들기름의 착유량

표 1은 볶음시간을 달리하여 얻은 들깨시료를 압착추출방법으로 착유하였을 때 얻은 들기름의 수율을 나타낸 것이다. 들깨를 압착추출로 착유할 때, 볶음시간이 증가 할수록 들깨유의 착유량이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다 (표 1). 볶음 팬의 온도 240℃에서 8, 10, 12 및 14분간 볶은 들깨시료에서 각각 287.5, 299.0, 317.4 및 326.5g oil/kg seed의 들깨유를 얻을 수 있었다. 들깨의 볶음시간이 8분에서 14분으로 증가함에 따라 착유량이 현저히 증가하였으며, 14분 볶았을 때 최대 32.6%의 들기름 착유율을 나타내었다.

표 1. 볶음시간을 달리하여 압착추출법으로 얻은 들기름 수율

	Extraction rate (g oil/kg seed)			
	8min	10min	12min	14min
	287.5	299.0	317.4	326.5

(나) 압착들기름의 지방산 조성

표2은 볶음시간을 달리하여 얻은 볶음들깨 시료를 압착법으로 착유한 들깨유의 지방산조성을 나타낸 것이다. 들깨유에 함유된 리놀렌산함량은 약 61% 정도 이었으며, 볶음시간에 따른 지방산 조성의 변화는 크게 나타나지 않았다. 들기름은 포화지방함량이 8.2%에 불과하였고, 나머지 91.8%가 불포화지방산으로 구성되어있는 불포화도가 대단히 높은 식용유이다.

표 2. 볶음시간을 달리하여 압착추출법으로 얻은 들기름의 지방산 조성

Roasted time	Fatty acid composition (%)				
	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid
8min	6.0	2.1	16.9	13.6	61.4
10min	6.1	2.2	17.1	13.8	60.9
12min	6.0	2.1	17.0	13.9	61.1
14min	6.1	2.1	17.1	14.0	60.9

(다) 압착들기름의 토코페롤조성 및 함량

표 3은 각각 볶음시간을 달리하여 착유한 들기름에 함유된 토코페롤 조성 및 함량을 나타낸 것이다. 들기름유에서는 감마-토코페롤이 가장 많이 함유되어있었고, 그 다음으로 알파 및 델타-토코페롤순서로 적었다. 압착 추출시 들깨의 볶음시간을 달리하여 추출하였을 때, 볶음 시간이 증가함에 따라 12분까지는 총 토코페롤함량이 감소하는 추세를 보였으며, 8분간 볶아 착유한 들깨유의 총 토코페롤 함량은 462.8 ppm이었으며, 12분간 볶아 착유한 들깨유의 총 토코페롤 함량이 433.0 ppm으로 그 함량이 약간 감소함을 확인하였다.

표 3. 볶음시간을 달리하여 압착추출법으로 얻은 들기름의 토코페롤 함량

Roasted time	Tocopherols contents (mg/kg oil)				Total
	a-tocopherol	b-tocopherol	g-tocopherol	d-tocopherol	
8min	43.1±0.32	-	396.9±3.54	22.8±0.23	462.8 ±3.53
10min	42.7±0.23	-	395.4±2.86	22.6±0.03	460.7±3.06
12min	40.7±2.53	-	370.5±4.02	21.8±1.71	433.0±3.21
14min	40.9±0.16	-	386.9±2.35	23.1±1.10	450.9±2.62

(라) 압착들기름의 피토스테롤 조성 및 함량

표 4는 볶음시간을 달리하여 얻은 압착들기름에 함유된 피토스테롤 조성 및 함량을 나타낸 것이다. 압착 들기름에는 β-Sitosterol이 가장 많이 함유되어있었고, 그 다음으로 stigmaterol 및 campesterol의 순서로 그 함량이 적었다. 압착 추출하여 얻은 들기름의 경우에 토코페롤과는 다르게, 들깨의 볶음시간이 피토스테롤함량에는 큰 차이를 나타나지 않았다. 8분간 볶아 압착 착유한 들깨유의 총 피토스테롤 함량은 3208.3 ppm이었으며, 14분간 볶아 압착착유한 들깨유의 총 피토스테롤 함량이 3317.8 ppm으로 그 함량이 약간 증가하였으나 유의적의 차이는 없었다 (표 4).

표 4. 볶음시간을 달리하여 압착추출법으로 얻은 들기름의 피토스테롤 함량

Roasted time	Phytosterols contents (mg/kg oil)			Total
	Campesterol	Stigmasterol	b-sitosterol	
8min	275.61±2.71	310.98±3.87	2621.73±31.11	3208.32±37.68
10min	286.97±11.59	349.71±4.92	2715.06±71.83	3351.74±78.49
12min	289.50±4.45	352.56±7.77	2707.39±8.78	3349.45±21.00
14min	298.82±5.92	219.20±3.25	2799.83±85.40	3317.85±59.07

(마) GC-MS/MS를 이용한 새로운 폴리코사놀 분석법 개발

일반적으로 polcosanol의 분석은 GC-FID 또는 GC-MS를 사용하여 분석하고 있다. GC/MS (single quadrupole mass system)은 Selected Ion Monitoring (SIM)을 사용하여 혼합물 내의 여러 물질을 선택적으로 확인 할 수 있기 때문에 GC/FID보다 더 효과적인 것으로

알려져 있다. 하지만, 가끔 복잡한 matrix를 갖는 시료의 경우 GC/MS SIM방법은 분석하고자 하는 대상물질과 동일한 질량의 여러 가지 다른 간섭화합물의 존재로 인해 만족스럽지 못한 결과를 얻을 수 있다. 본 연구에서도 들기름에 함유된 폴리코사놀함량을 기존에 알려진 GC/FID 혹은 GC/MS법을 이용하여 측정하려고 시도하였으나 분석방해물질의 존재로 분석에 큰 어려움이 있었다. 이러한 분석방해물질은 policosanol은 반드시 GC분석 전에 정제 과정을 거쳐야 한다. 하지만 이 정제과정은 매우 지루한 과정이며, 상당한 시간과 노동력의 소비를 요하게 된다. 일반적으로 GC-MS/MS의 Multiple Reaction Monitoring (MRM)을 사용하면 높은 선택성, 특이성, 감도를 제공하기 때문에 이 정제과정 없이 분석할 수 있는 방법 중 하나이다. 그러나 GC-MS/MS를 이용한 폴리코사놀 분석법이 아직 개발되어 있지 않았다. 따라서 이 연구에서는 GC-MS/MS의 Multiple Reaction Monitoring (MRM)을 사용하여 초임계유체 추출장치의 착유조건을 달리한 들깨유에 함유되어있는 Policosanol(C20~C36)을 분석하기 위한 GC-MS/MS의 최적화 방법을 연구하게 되었다.

그림 2의 a와 b는 각각 standard policosanol-TMS화합물 및 들기름의 불검화물-TMS화합물의 total ion chromatogram을 나타낸 것이다. 이 그림에서 보는 바와 같이 들기름의 불검화물에는 폴리코사놀이외에 상당한 양의 혼합물이 섞여있는 것을 확인하였다.

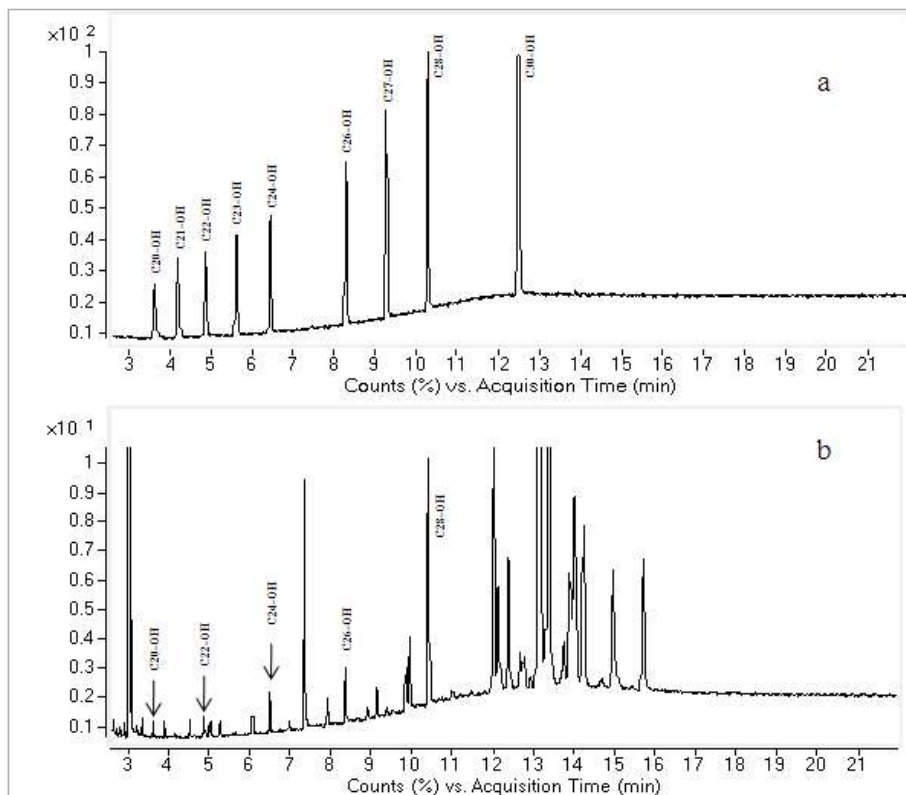


그림 2. Total ion chromatograph (TIC) of gas chromatography-single quadrupole mass spectrometry of a) authentic policosanols-TMS derivatives and b) TMS-derivatives of unsaponifiables obtained from perilla seed oil.

그림 3은 폴리코사놀 표준품의 full mass scan을 보여주는 것이다. 이 mass spectrum에 의하면 각각의 분자량에서 -CH₃가 제거된 [M-15]⁻ 이온 피크가 base peak로 나타나고 있어서 그 분자구조를 쉽게 확인할 수 있었다. 이들 각각의 폴리코사놀의 [M-15]⁻ 이온 피크를 target ion으로 정하고, 이들의 product ion 생성 패턴을 확인한 결과 모든 폴리코사놀에서 75 amu 및 57 amu를 갖는 이온 피크가 각각 가장 크고, 그 다음으로 큰 product ion임을 확인하여 표5 에서 와 같은 분석조건을 확립하였다.

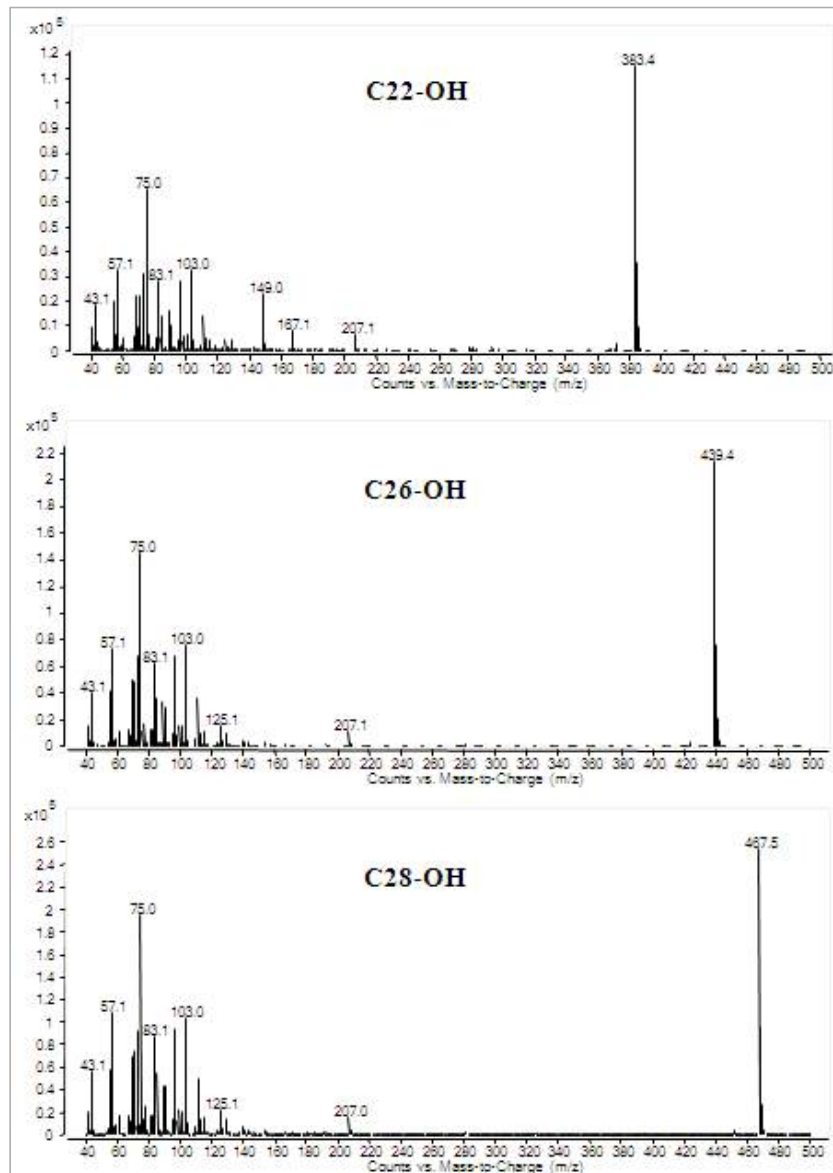


그림 3. Full scan GC-MS spectra of authentic policosanols (C22-OH, C26-OH, and C28-OH) - TMS derivatives

표 5. 폴리코사놀 각각의 머무름 시간 및 질량 분열 패턴

Retention Time And Mass Fragmentation	Retention Time (min)	Target Ion (<i>m/z</i>)	Qualitative Ion (<i>m/z</i>)	Quantitative Ion (<i>m/z</i>)	CIDE* (v)	Scan time (cycle/s)
Policosanol						
C20-OH	3.667	355	55	75	30	2.5
C21-OH	4.218	369	55	75	30	2.5
C22-OH	4.898	383	55	75	30	2.5
C23-OH	5.368	397	55	75	30	2.5
C24-OH	6.476	411	55	75	30	2.5
C25-OH	7.365	425	55	75	30	2.5
C26-OH	8.316	439	55	75	30	2.5
C27-OH	9.302	453	55	75	30	2.5
C28-OH	10.317	467.5	55	75	30	2.5
C29-OH	11.355	481.5	55	75	30	2.5
C30-OH	12.533	495.5	55	75	30	2.5
C31-OH	13.891	509.5	55	75	30	2.5
C32-OH	15.503	523.6	55	75	30	2.5
C33-OH	17.423	537.6	55	75	30	2.5
C34-OH	19.721	551.6	55	75	30	1.7
C35-OH	-	565.6	55	75	30	1.7
C36-OH	-	579.6	55	75	30	1.7

표 6는 각각의 폴리코사놀-TMS 유도체에 대한 calibration curves, 상관관계 (r^2) 및 검출 한계 (LOD)를 나타낸 것이다.. 각종 폴리코사놀-TMS 유도체의 LODs 값은 0.015 - 0.086 mg/mL 이었다. 9종의 폴리코사놀(C20-OH, C21-OH, C22-OH, C23-OH, C24-OH, C26-OH, C27-OH, C28-OH and C30-OH)에 대한 7회 반복실험에서, relative standard deviation (RSD)은 3.36% 이내로 매우 양호하였다. 또한 들기름에 표준품을 첨가한 후 행한 회수율 실험에서도 평균 recovery for heptacosanol (C27-OH) 은 102.29 % with 3.77% RSD 이었고, octacosanol (C28-OH)에 대한 평균회수율은 106.25% with 4.51% RSD이었다 (표 7). 따라서 검출한계 재연성, 및 회수율 모두에서 매우 양호한 결과를 얻어서 이번에 확립한 gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry 분석법은 들기름에 함유된 폴리코사놀의 분석에 적합한 분석기법임을 확인하였다.

표 6. Calibration curves, correlation coefficients, and limits of detection of nine authentic policosanols-TMS derivatives in the tested ranges

Policosanols	Standard curve	r^2	Test range (mg ml ⁻¹)	LOD (mg ml ⁻¹)
C20	$y = 3810.709753 x - 28.299486$	0.998	0.016-0.4	0.002
C21	$y = 4334.436872 x - 37.008333$	0.998	0.016-0.4	0.002
C22	$y = 1505.364887 x - 19.672074$	0.998	0.024-0.6	0.006
C23	$y = 1330.653554 x - 18.372692$	0.997	0.024-0.6	0.006
C24	$y = 1156.944783 x - 15.840321$	0.998	0.024-0.6	0.008
C26	$y = 995.778215 x - 23.638761$	0.997	0.04-1.0	0.01
C27	$y = 1062.117364 x - 27.295253$	0.997	0.04-1.0	0.01
C28	$y = 1131.640588 x - 49.765317$	0.996	0.06-1.5	0.012
C30	$y = 771.602858 x - 47.644732$	0.996	0.06-1.5	0.016

표 7. Analytical results for recoveries (n=3) of heptacosanol and octacosanol spiked in perilla seed oil

Trial	Heptacosanol (mg/g oil)			Octacosanol (mg/g oil)		
	Spiked (mg/g oil)	Recovered (mg/g oil)	Recovery (%)	Spiked (mg/g oil)	Recovered (mg/g oil)	Recovery (%)
1	0.16	0.170	106.25	0.080	0.081	101.25
2	0.16	0.163	101.88	0.080	0.088	110.00
3	0.16	0.158	98.75	0.080	0.086	107.50
AVERAGE	0.16	0.164	102.29	0.080	0.085	106.25
STDEV	-	0.006	3.77	-	0.004	4.51

(바) 압착 들기름의 폴리코사놀 조성 및 함량

그림 4는 새로 개발한 GC-MS/MS법에 의하여 분석한 들기름의 폴리코사놀의 TIC chromatogram을 나타낸 것이다. 보시는 바와 같이 이번에 개발한 분석법은 정제 공정없이도 들기름의 폴리코사놀분석을 가능케 하였다. 표8는 볶음시간을 달리하여 얻은 압착들기름의 폴리코사놀 함량을 나타낸 것이다. 볶음시간이 8분에서 14분 까지 증가할 수록 폴리코사놀 함량은 유의성있게 증가하였다. 볶음시간이 8, 10, 12 및 14분인 압착 착유들기름의 총 폴리코사놀함량은 각각 302, 332, 352 및 372 mg/kg oil 이었다.

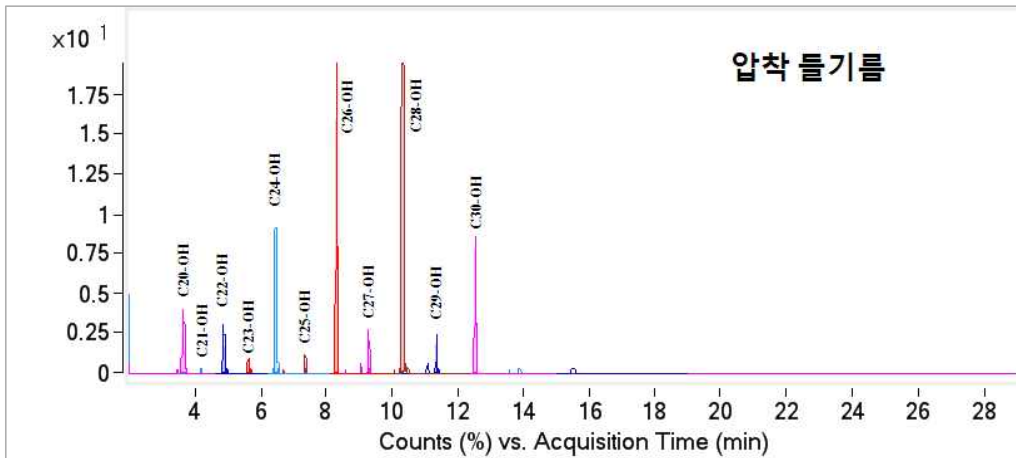


그림 4. Gas chromatography-tandem mass spectrometry for policosanols-TMS in perilla seed oils obtained from supercritical fluid extraction and hydraulic press

표 8. 볶음시간을 달리하여 압착추출법으로 얻은 들기름의 폴리코사놀 함량

Policosanols	Policosanols contents (mg/kg oil) in perilla seed oils			
	8min roasting	10min roasting	12min roasting	14min roasting
C20-OH	3.38±0.21	4.70±0.06	5.26±0.14	4.34±0.59
C21-OH	0.84±0.09	0.83±0.08	0.83±0.04	1.06±0.09
C22-OH	7.33±0.63	8.90±0.20	10.17±1.60	9.08±1.02
C23-OH	4.26±0.4	4.50±0.07	4.99±0.43	5.34±0.42
C24-OH	19.25±1.48	24.59±1.96	29.57±3.61	25.21±0.49
C25-OH	4.53±0.18	4.88±0.26	5.46±0.47	5.32±0.32
C26-OH	50.52±5.15	58.87±0.54	61.95±6.41	62.96±8.88
C27-OH	9.57±0.11	9.57±0.49	10.83±0.15	12.66±1.24
C28-OH	161.43±5.90	173.18±4.86	181.09±2.52	181.38±8.46
C29-OH	9.07±0.14	9.42±0.01	9.65±0.03	13.08±0.96
C30-OH	18.83±1.25	18.79±0.11	18.94±0.11	37.87±1.39
C31-OH	7.09±0.33	7.09±0.22	7.02±0.01	7.50±0.22
C32-OH	6.86±0.11	6.75±0.05	6.82±0.05	6.99±0.06
C33-OH	-	-	-	-
C34-OH	-	-	-	-
C35-OH	-	-	-	-
C36-OH	-	-	-	-
Total	302.98±11.60	332.06±7.29	352.58±14.86	372.78±6.77

(2) 초임계 유체추출로 얻어진 들깨유의 기능성 물질 분석

(가) 초임계 유체 추출 들기름의 착유량

표 9은 볶음장치에서 12분간 볶아서 얻은 들깨시료를 초임계 유체 추출장치에서 압력과 온도조건을 달리하여 들기름을 착유하였을 때 추출수율을 나타낸 것이다. 초임계 유체 추출조의 압력이 증가 할수록 들기름의 추출수율은 증가하였다 (표 9). 추출조의 온도를 50℃에서 추출조의 압력을 300bar, 360bar 및 420bar로 하였을 때, 각각 291.4, 358.8 및 417.07 g oil/kg seeds의 들기름을 얻을 수 있었다. 그러나 추출조의 온도를 증가 시켰을 때에는 추출 초기에는 추출 수율의 차이가 있었지만 최종 들기름의 추출 수율에는 그 차이가 미비 하였다. 초임계 유체 추출 시 추출시간을 30분 간격으로 추출수율을 확인한 결과, 추출온도가 증가 할수록 비교적 빠른 시간에 대부분의 들기름이 추출 된다는 것을 알 수 있었고 추출시간 2시간 이후에는 추출온도에 상관없이 들기름 추출수율은 거의 동일하였다 (Fig. 5). 이러한 결과는 초임계 이산화탄소에 대한 들기름의 추출수율이 이산화탄소의 밀도에 비례하여 증가 하였기 때문인데 이전의 연구에서 초임계유체 추출 시 추출수율은 이산화탄소의 밀도에 비례하여 증가하기 한다는 이전의 발표와 일치하는 결과이다.

표 9. 볶은들깨 (12 분)으로 부터 압력조건을 달리하여 초임계추출법으로 얻은 들기름 수율

Extraction rate (g oil/kg seed)					
300bar	50℃	360bar	50℃	420bar	50℃
291.4		358.8		417.07	

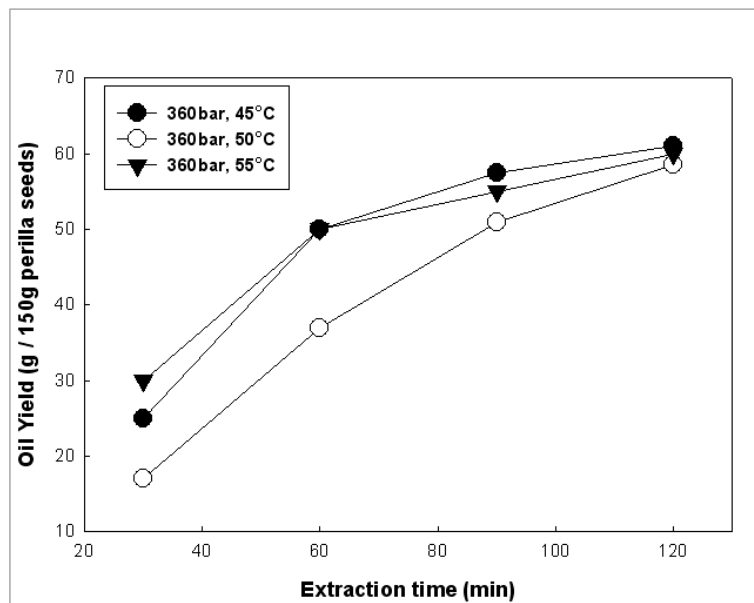


그림 5. 초임계추출 온도에 따른 시간별 들기름 추출 수율

(나) 초임계 유체 추출 들기름의 지방산 조성

표 10은 볶은들깨시료(볶음시간 12 분)로 부터 압력조건을 달리하여 초임계추출법으로

얻은 들기름의 지방산 조성을 나타낸 것이다. 초임계 추출장치의 압력조건이 달라도 착유한 들기름의 지방산 조성은 큰 변화를 나타내지 않았다. 초임계 유체추출법으로 착유한 들기름에는 리놀렌산이 약 62%로 압착 착유하여 얻은 들기름의 지방산조성과 거의 유사하였다. 또한 초임계 유체 추출 들기름의 포화지방산 및 불포화지방산의 구성도 거의 동일 하였다.

표 10. 볶은 들깨 (12 분)으로 부터 압력조건을 달리하여 초임계추출법으로 얻은 들기름의 지방산 조성

Condition	Fatty acid composition (%)				
	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid
300 bar 50°C	5.8	1.9	16.2	14.0	62.2
360bar 50°C	5.8	1.8	15.8	13.9	62.7
420bar 50°C	5.9	1.9	16.2	14.0	62.1

(다) 초임계 유체 추출 들기름의 토코페롤조성 및 함량

표 8은 볶음들깨 시료로부터 압력조건을 달리하여 초임계유체 추출법으로 착유한 들기름에 함유된 토코페롤 조성 및 함량을 나타낸 것이다. 들기름유에서는 감마-토코페롤이 가장 많이 함유되어있었고, 그 다음으로 알파 및 델타-토코페롤순서로 적었다. 초임계 추출시 추출압력이 증가할수록 착유한 들기름에 토코페롤함량은 현저히 감소하였다. 추출조 압력이 300 bar, 360 bar 및 420 bar 일때, 착유된 들기름의 총 토코페롤함량은 503, 444, 420 mg/kg oil로 큰 차이를 보였다.

표 11. 볶은 들깨 (12 분)으로 부터 압력조건을 달리하여 초임계추출법으로 얻은 들기름의 토코페롤 함량

Condition	Tocopherols contents (mg/kg oil)				
	a-tocopherol	b-tocopherol	g-tocopherol	d-tocopherol	Total
300bar 50°C	47.65±0.53	-	440.91±8.09	14.70±0.91	503.26±9.53
360bar 50°C	44.70±0.53	-	386.30±4.91	13.83±0.53	444.83±3.86
420bar 50°C	43.26±1.50	-	363.54±5.92	13.36±0.88	420.16±8.29

(라) 초임계 유체 추출 들기름의 피토스테롤조성 및 함량

표 12은 볶음들깨 시료로부터 압력조건을 달리하여 초임계유체 추출법으로 착유한 들기름에 함유된 피토스테롤 조성 및 함량을 나타낸 것이다. 초임계 추출시 추출압력이 420 bar 50oC에서 착유한 들기름이 이 보다 낮은 추출압력인 300 bar 50oC 및 360 bar 50oC에서 착유한 들기름들 보다 현저히 낮은 피토스테롤함량을 나타내었다. 초임계추출시 300 bar, 360 bar 및 420 bar의 추출계압력에서 착유한 들기름의 총 피토스테롤함량은 각각 3664, 3716 및 3462 ppm 이었다 (표 9).

표 12. 볏음들깨(12 분)로 부터 압력조건을 달리하여 초임계추출법으로 얻은 들기름의 피토스테롤 함량

Condition	Phytosterols contents (mg/kg oil)			
	Campesterol	Stigmasterol	b-sitosterol	Total
300bar 50℃	339.24±7.92	219.52±1.89	3105.28±96.43	3664.04±106.24
360bar 50℃	360.86±5.02	214.38±8.98	3141.75±71.45	3716.99±85.45
420bar 50℃	334.30±0.86	198.48±6.31	2929.98±2.37	3462.75±4.80

(마) 초임계 유체 추출 들기름의 폴리코사놀 조성 및 함량

표 13은 볏음들깨 시료로부터 압력조건을 달리하여 초임계유체 추출법으로 착유한 들기름에 함유된 폴리코사놀 조성 및 함량을 나타낸 것이다. 초임계 추출시 추출압력을 변화시킬 경우 착유되는 들기름에 함유된 폴리코사놀 함량은 상당한 차이를 보였다. 초임계 유체 추출시 추출압력이 낮을 수록 들기름에 함유된 폴리코사놀함량은 높았다. 초임계 유체 추출계의 압력이 300 bar, 360 bar 및 420 bar에서 착유한 들기름의 총 폴리코사놀함량은 각각 683, 640 및 576 ppm 이었다 (표 13).

표 13. 볶음 (12분)들깨로 부터 압력조건을 달리하여 초임계추출법으로 얻은 들기름의 폴리코사놀 함량

Policosanols	Policosanols contents (mg/kg oil) in oil obtained at different extraction pressure		
	300bar 50℃	360bar 50℃	420bar 50℃
C20-OH	10.56±0.31	9.00±0.08	8.11±1.28
C21-OH	1.70±0.30	1.44±0.18	1.58±0.19
C22-OH	19.19±0.26	17.11±0.45	15.53±0.74
C23-OH	7.97±0.25	7.57±0.39	7.76±0.79
C24-OH	46.43±1.08	45.51±4.79	60.24±8.98
C25-OH	8.81±0.94	8.17±0.29	8.18±0.17
C26-OH	98.52±1.33	86.95±3.31	62.36±3.17
C27-OH	17.34±0.17	15.62±0.16	15.20±0.74
C28-OH	362.30±1.74	338.43±7.29	305.48±1.17
C29-OH	19.59±2.08	16.40±0.45	15.91±1.30
C30-OH	70.19±19.09	61.85±1.37	49.88±6.61
C31-OH	11.74±0.24	10.04±0.08	11.22±0.41
C32-OH	9.15±3.08	10.25±0.23	10.41±0.08
C33-OH	-	-	-
C34-OH	-	-	-
C35-OH	-	-	-
C36-OH	-	-	-
Total	683.48±22.73	640.93±17.80	576.20±6.14

(3) 용매 추출로 얻어진 들깨유의 기능성 물질 분석

(가) 추출량

표 14는 들깨의 볶음시간을 달리하고, 동일한 조건으로 용매추출 하였을 때 볶음시간에 따른 들기름의 착유 수율을 나타낸 것이다. 볶음시간이 8, 10, 12 및 14분간 처리한 들깨시료에서 hexane으로 추출할 경우 각각 397.3, 413.7, 417.6 및 419.9 g oil/kg seed의 들깨유를 얻을 수 있었다. 즉, 용매추출의 경우에도 압착추출과 마찬가지로 볶음시간이 증가할수록 착유수율이 현저히 증가하였다. 이 연구결과는 들깨유의 착유량은 들깨의 볶음시간에 크게 영향을 받는다는 것을 나타낸 것이다.

표 14. 볶음시간을 달리하여 용매추출법 (hexane)으로 얻은 들기름 수율

	Extraction rate (g oil/kg seed)			
	8min	10min	12min	14min
	397.3	413.7	417.6	419.9

(나) 용매추출 들기름의 지방산 조성

표 15는 볶음시간을 달리하여 용매추출법 (hexane)으로 얻은 들기름의 지방산 조성을 나타낸 것이다. 용매추출의 경우에서도 들깨의 볶음정도에 의하여 지방산조성의 큰변화는 보이지 않았으며, 압착법에 의하여 얻은 들기름과 용매추출법에 의하여 얻은 들기름간에도 지방산조성의 차이는 크게 나타나지 않았다.

표 15. 볶음시간을 달리하여 용매추출법 (hexane)으로 얻은 들기름의 지방산 조성

Roasted time	Fatty acid composition (%)				
	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid
8min	5.9	1.9	16.1	14.2	61.9
10min	5.9	1.9	16.0	14.2	61.9
12min	5.9	1.9	15.9	14.2	62.0
14min	6.0	1.9	16.3	14.3	61.5

(다) 용매추출 들기름의 토코페롤 함량

표 16은 볶음시간을 달리하여 용매추출법으로 얻은 들깨유의 토코페롤 함량을 나타낸 것이다. 압착추출에 의하여 착유한 경우와 유사하게, 용매추출시에도 볶음시간이 증가할수록 들기름에 함유된 토코페롤의 함량이 감소하는 경향을 보였다. 볶음시간을 8, 10, 12, 및 14분 처리한 들깨시료로부터 용매추출법으로 착유한 들기름의 총 토코페롤 함량은 각각 417, 411, 403 및 397 mg/kg oil 이었다.

표 16. 볶음시간을 달리하여 용매추출법으로 얻은 들깨유의 토코페롤 함량

Roasted time	Tocopherols contents (mg/kg oil)				
	a-tocopherol	b-tocopherol	g-tocopherol	d-tocopherol	Total
8min	48.23±0.15	-	348.13±14.22	21.23±0.59	417.59±14.96
10min	46.65±1.26	-	341.82±7.01	23.15±1.54	411.62±6.72
12min	49.07±0.10	-	330.68±0.98	23.73±1.60	403.49±2.68
14min	45.67±0.23	-	329.59±2.61	22.57±0.62	397.84±3.00

(라) Phytosterols 조성 및 함량

표 17은 용매추출시 볶음시간을 달리하여 얻은 들깨유에 함유된 피토스테롤 조성 및 함량을 나타낸 것이다. 압착추출과 유사하게, 용매추출시에도 볶음시간이 에 따른 들기름의 피토스테롤함량의 차이는 거의 없었다 (표 17). 8분간 볶음처리하고 용매로 착유한 들깨유의 총 피토스테롤 함량은 3431 ppm이었으며, 14분간 볶아 압착착유한 들깨유의 총 피토스테롤 함량이 3400 ppm에 비하여, 그 함량의 유의적의 차이는 없었다 (표 17). 볶음시간을 8, 10, 12 및 14분 처리하여 용매로 착유한 들기름의 총 피토스테롤함량은 각각 3431, 3448, 3513, 및 3400 mg/kg oil 이었다.

표 17. 볶음시간을 달리하여 용매 추출법으로 얻은 들깨유의 피토스테롤 함량

Roasted time	Phytosterols contents (mg/kg oil)			
	Campesterol	Stigmasterol	b-sitosterol	Total
8min	330.53±2.52	201.78±7.32	2898.77±55.69	3431.08±60.49
10min	333.62±13.77	199.89±13.44	2915.38±55.47	3448.89±55.80
12min	343.92±17.90	191.13±10.91	2978.51±70.07	3513.56±77.05
14min	334.72±0.65	191.56±2.97	2873.99±22.32	3400.27±20.18

(마) 용매추출 들기름의 폴리코사놀 조성 및 함량

표18은 볶음시간을 달리하여 얻은 용매추출 들깨유의 폴리코사놀 함량을 나타낸 것이다. 들깨의 볶음시간이 8분에서 14분 까지 증가할수록, 용매추출 들기름의 폴리코사놀 함량도 유의성있게 증가하였다. 특이한 것은 용매추출 들기름의 경우가 압착추출들기름에 비하여 폴리코사놀 함량이 높았다. 볶음시간이 8, 10, 12 및 14분인 압착 착유들기름의 총 폴리코사놀함량은 각각 385, 436, 473 및 527 mg/kg oil 이었다.

표 18. 볶음시간을 달리하여 용매추출법으로 얻은 들기름의 폴리코사놀 함량

Policosanols	Policosanols content (mg/kg oil)			
	8min roasting	10min roasting	12min roasting	14min roasting
C20-OH	6.08±0.41	6.69±0.07	8.11±0.20	6.70±0.01
C21-OH	1.68±0.23	1.54±0.01	1.53±0.01	1.57±0.09
C22-OH	9.92±0.13	11.04±0.84	13.93±0.81	13.56±0.80
C23-OH	4.90±0.03	5.60±0.18	6.30±0.29	6.46±0.26
C24-OH	28.99±0.19	35.63±0.98	42.57±3.74	37.69±0.53
C25-OH	5.77±0.22	5.97±0.32	6.70±0.42	6.84±0.06
C26-OH	49.72±1.74	60.34±2.62	62.42±4.04	76.68±4.26
C27-OH	10.81±0.72	12.80±0.34	14.60±1.29	16.45±1.18
C28-OH	190.01±1.13	205.10±2.98	215.78±5.47	259.31±6.16
C29-OH	13.02±0.17	13.76±0.29	14.97±1.88	17.50±0.14
C30-OH	49.41±2.83	60.72±3.05	68.10±0.65	65.83±2.56
C31-OH	7.90±0.05	8.63±0.33	9.09±0.11	8.86±0.22
C32-OH	7.56±0.22	8.71±0.33	9.40±0.22	10.02±0.22
C33-OH	-	-	-	-
C34-OH	-	-	-	-
C35-OH	-	-	-	-
C36-OH	-	-	-	-
Total	385.76±4.39	436.53±12.18	473.51±8.20	527.47±3.06

(바) 볶음시간을 달리하여 얻은 압착들기름의 자동산화안정성

볶음시간에 따른 압착들기름의 자동산화 안정성을 측정하기 위하여, 볶음장치에서 동일한 볶음조건으로 8, 10, 12, 및 14분간 볶은 들깨 시료로부터 압착추출법에 의하여 착유한 들깨유 20 g을 100 ml 삼각플라스크에 옮겨 담아 60°C의 가온 조건하에서 17일간 저장하면서 유지의 산화안정성 평가에 관련되는 과산화물가 (peroxide value) 및 conjugated diene의 함량 등을 확인 하였다. 그림 5는 볶음시간이 다른 들깨로부터 압착 착유한 들깨유를 60°C의 가온 조건하에서 보관하면서 과산화물가 (peroxide value)를 측정한 결과이다. 들깨의 볶음시간이 8분에서 10, 12분으로 증가할 경우 점진적인 산화안정성의 증가를 확인할 수 있었다. 그러나 12분 이상 14분 볶음시간의 경우에 착유된 들기름의 상당한 산화안정성 증가를 보였다. 그림 6는 볶음시간이 다른 들깨로부터 압착 착유한 들깨유를 60°C의 가온 조건하에서 보관하면서 공액이중결합지방산 함량 (conjugated dienonic acid contents)를 측정한 결과이다. 공액이중결합지방산 함량은 공액이중결합이 233 nm에서 흡광하는 특성을 이용하여 spectroscopic analysis를 이용하여 233 nm로 흡광도를 분석하여 측정하였다. 가온 저장 중에 압착 착유한 들기름시료의 공액이중결합지방산 함량도 저장시간이 증가하면서 증가하였다. 공액이중결합지방산측정 결과도 과산화물가 측정결과와 매우 유사한 경향을 보였다. 즉 볶음시간이 12분에서 14분으로 증가하는 시점에서 산화안정성이 급격히 향상되는 경향을 나타내었다. 따라서 들기름의 산화안정성을 획기적으로 높이기 위해서는 산화안정성이 급격히 증가하는 볶음시간대를 확인하여 볶음시간을 조절할 필요가 있다.

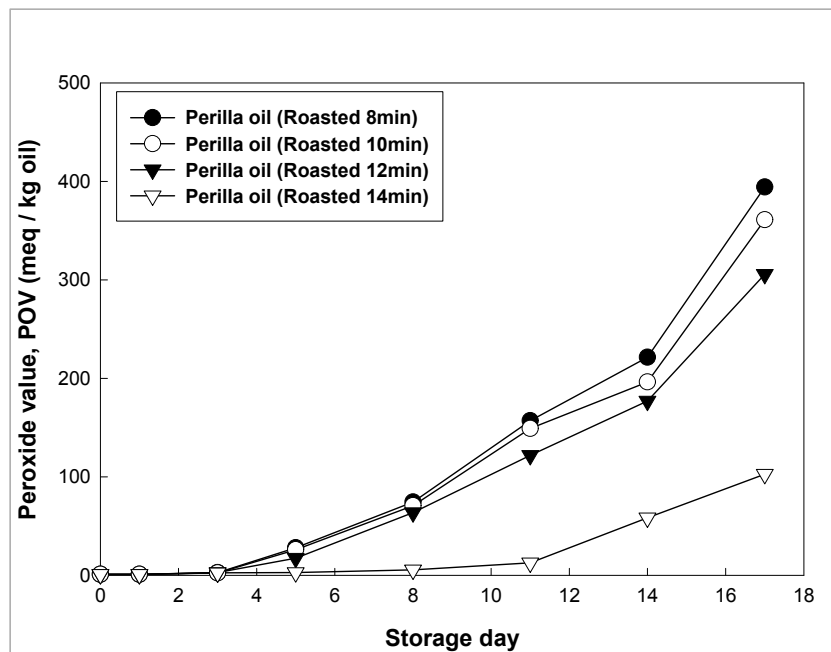


그림 5. Change of the peroxide value of press-extracted oil obtained from roasted perilla seeds with different roasting times of 8, 10, 12 and 14 min during storage at 60°C

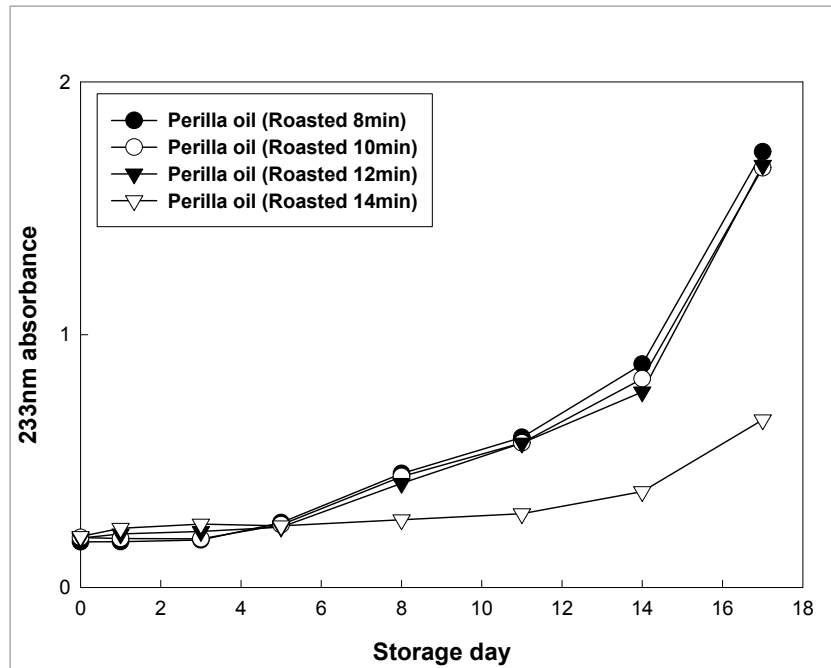


그림 6. Change of the conjugated dienoic acid contents of press-extracted oil obtained from roasted perilla seeds with different roasting times of 8, 10, 12 and 14 min during storage at 60°C

(사) 볶음시간을 달리하여 얻은 압착들기름의 광산화안정성

볶음시간에 따른 압착들기름의 광산화 안정성을 측정하기 위하여, 볶음장치에서 동일한 볶음조건으로 8, 10, 12, 및 14분간 볶은 들깨 시료로부터 압착추출법에 의하여 착유한 들깨유 20 g을 100 ml 삼각플라스크에 옮겨 담아 광선이 조사되는 조건하에서 저장하면서 유지의 산화안정성 평가에 관련되는 과산화물가 (peroxide value) 및 conjugated diene의 함량등을 확인 하였다. 그림 7는 볶음시간이 다른 들깨로부터 압착 착유한 들깨유를 광선의 조사 조건하에서 보관하면서 과산화물가 (peroxide value)를 측정한 결과이다. 자동산화의 실험결과와는 상이하게, 들깨의 볶음시간이 8분에서 14분으로 증가하여도 과산화물 생성이 감소하는 현상이 나타나지 않았다. 그림 6는 볶음시간이 다른 들깨로부터 압착 착유한 들깨유를 광선이 조사되는 조건하에서 보관하면서 공액이중결합지방산 함량 (conjugated dienoic acid contents)를 측정한 결과이다. 공액이중결합지방산측정 결과도 과산화물가 측정결과와 매우 유사한 경향을 보였다. 즉 볶음시간이 8분에서 14분으로 증가하더라도, 광산화안정성을 증가시키지 못하는 것으로 확인되었다.

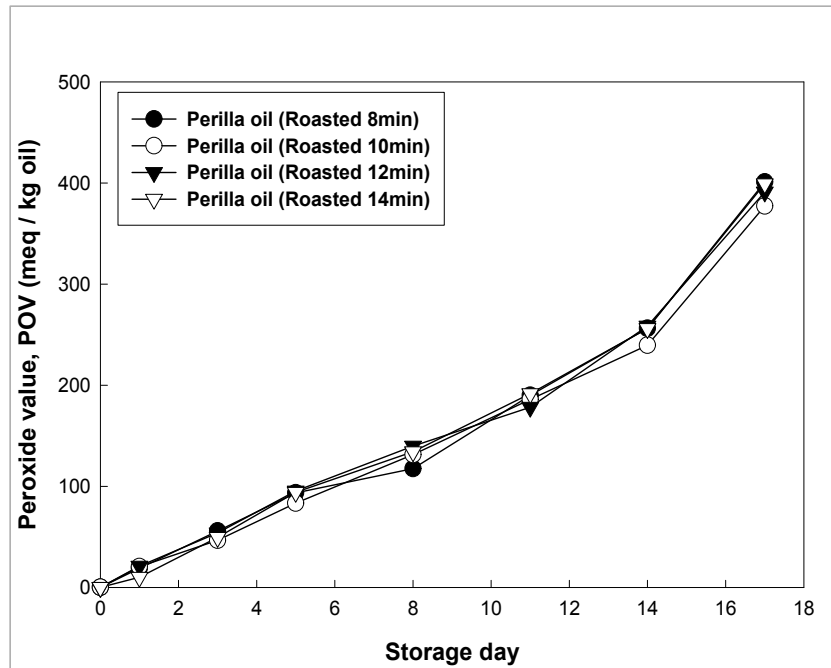


그림 7. Change of the peroxide value of press-extracted oil obtained from roasted perilla seeds with different roasting times of 8, 10, 12 and 14 min during storage under fluorescence light

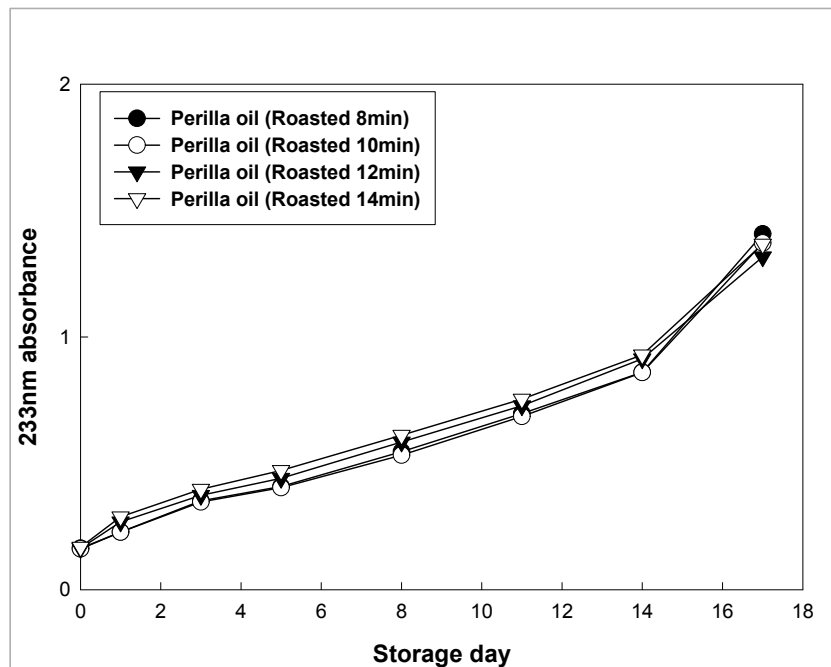


그림 8. Change of the conjugated dienoic acid contents of press-extracted oil obtained from roasted perilla seeds with different roasting times of 8, 10, 12 and 14 min during storage under fluorescence light

(아) 착유방법을 달리하여 얻은 들기름의 자동산화안정성

착유방법을 압착추출, 초임계유체추출 및 용매추출로 달리하여 추출한 들깨유 20 g을 100 ml 삼각플라스크에 옮겨 담아 60°C의 가온 조건하에서 17일간 저장하면서 유지의 산화안정성 평가에 관련되는 과산화물가 (peroxide value), p-아니시딘가 (p-anisidine) 및 conjugated diene의 함량 등을 확인 하였다. 그림 9는 착유조건이 다른 들깨유를 60°C의 가온 조건하에서 보관하면서 과산화물가 (peroxide value)를 측정된 결과로서, 압착추출, 초임계 유체추출 및 용매추출 방법 중 초임계유체를 통해 얻은 들깨유가 과산화물가 상승속도가 가장 높게 나타내었다. 또한 동일한 시료를 사용하여 실험한 아니시딘가 (p-anisidine) 및 conjugated diene를 측정된 결과에서도 초임계 유체추출법으로 착유한 들기름이 아니시딘과 공액이중결합지방산 생성속도가 가장 빠르게 상승하는 결과를 얻을 수 있었다 (그림 10). 초임계 유체 추출법으로 착유한 들기름에는 토코페롤 및 폴리코사놀함량이 가장 높은데에 반하여 자동산화안정성은 압착추출법 및 용매추출법으로 착유한 들기름에 비하여 낮은 것으로 나타나서, 이들 함량의 차이와 상반되는 결과로 이러한 기능성 물질들은 들깨유의 자동산화 과정에 영향을 미치지 못하는 것으로 사료되었다. 이전의 연구결과를 살펴보면 초임계유체 추출, 압착추출 및 용매추출을 통해 얻은 들깨유의 과산화물가 (Peroxide value, POV), tocopherol함량 및 인의 함량을 측정된 결과 초임계유체 추출방법을 이용한 들깨유가 가장 높은 산화안정성을 나타내는 것으로 발표되었다. 하지만 이러한 결과는 본 실험 및 이전의 연구결과와 상반되는 결과로써 본 실험과의 차이점으로는 초임계유체 추출 시 추출조의 온도와 압력에 차이가 있었고, 용매를 이용한 들깨유의 추출방법 또한 볶음들깨 시료에 직접 용매를 가하여 상온에서 추출한 본 실험과 이전의 연구에서는 대용량의 soxhlet장치를 이용하여 들깨유를 추출하였다. 이는 soxhlet장치 특성상 추출과정에서 장시간 동안 열을 가하게 되고 이는 soxhlet장치를 이용하여 추출한 들깨유에 직접적으로 가열 산화를 촉진시켜 들깨유의 빠른 산화를 유도시키는 결과를 유도하게 된다. 이러한 추출방법의 차이로 인한 들깨유의 상반된 산화안정성 결과 값은 본 실험 결과와는 비교하기가 어려울 것으로 판단되었다.

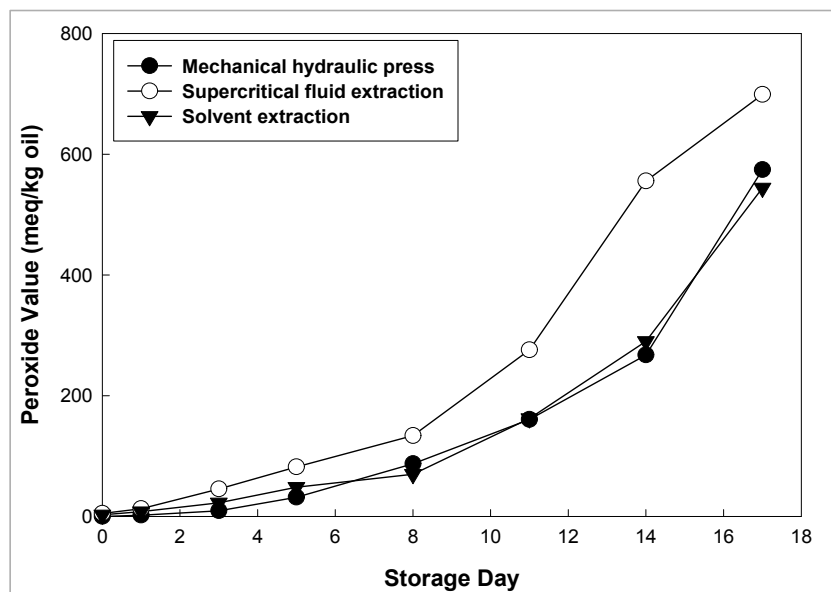


그림 9. Change of the peroxide value of the oil extracted from perilla seed with different extraction method during storage at 60°C

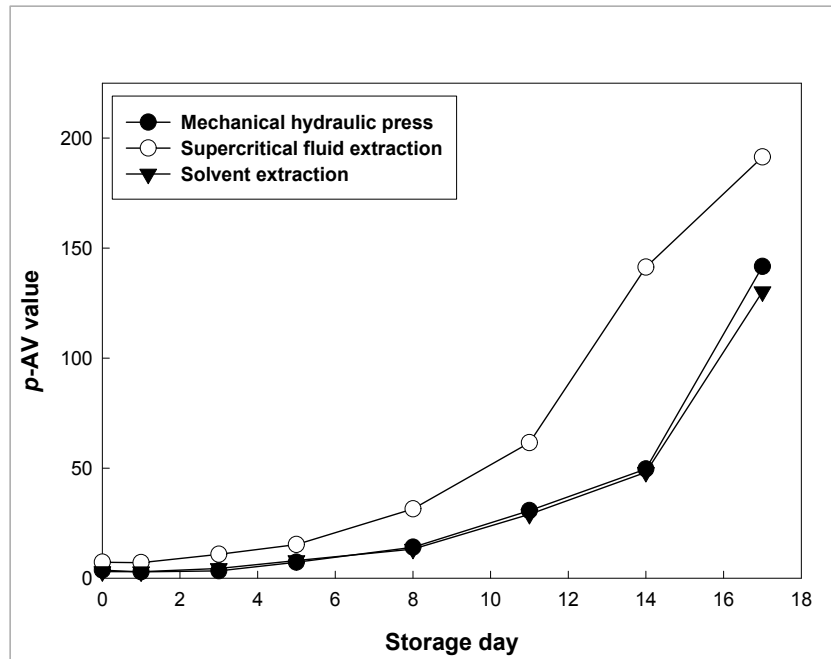


그림 10. Change of the p-anisidine value of the oil extracted from perilla seed with different extraction method during storage at 60°C

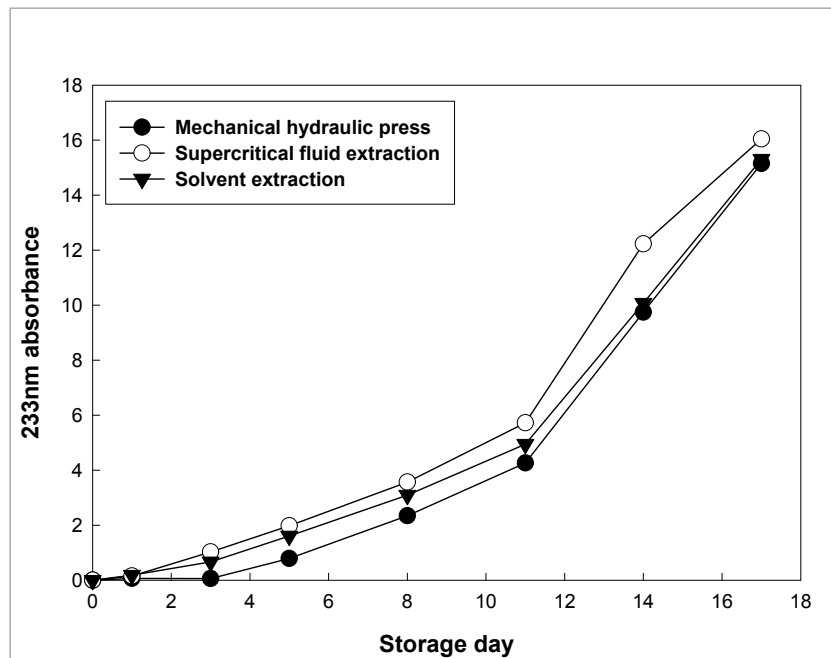


그림 11. Change of the conjugated diene value of the oil extracted from perilla seed with different extraction method during storage at 60°C

(자) 착유방법을 달리하여 얻은 들기름의 광산화안정성

착유방법을 압착추출, 초임계유체추출 및 용매추출로 달리하여 착유한 들깨유 20 g을 100 ml 삼각플라스크에 옮겨 담아, 5000 lux의 광 조사 조건하에서 17일간 보관하면서 산화안정성과 관련되는 과산화물가 (peroxide value), 아니시딘 가 (p-anisidine) 및 conjugated diene 등의 변화를 측정하였다. 그림 12는 착유조건이 다른 들깨유를 5000 lux의 광 조사 조건하에서 보관하면서 과산화물가 (peroxide value)를 측정한 결과로 자동산화와는 달리 서로 다른 착유방법을 통해 얻은 들깨유 모두 과산화물가 생성속도가 거의 유사하였다. 또한 동일한 시료를 사용하여 아니시딘가(p-anisidine) 및 conjugated diene 함량을 측정한 결과에서도 광선이 조사되는 조건하에서 저장하는 동안에 아니시딘가 와 공액이중결합지방산 생성 속도에서도 시료들간에 큰 차이를 나타내지 않았다 (그림 13, 14). 이러한 결과는 이전에 연구된 바 없는 것으로서, 들기름의 추출방법의 차이가 들기름의 광산화안정성에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 판단되었다.

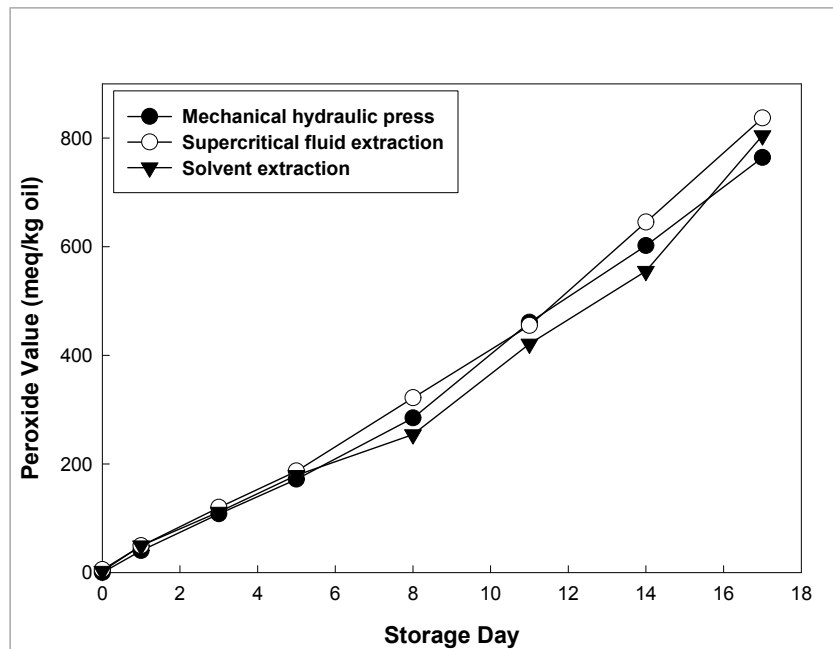


그림 12. Change of the peroxide value of the oil extracted from perilla seed with different extraction method during storage under fluorescence light at 5000 lux

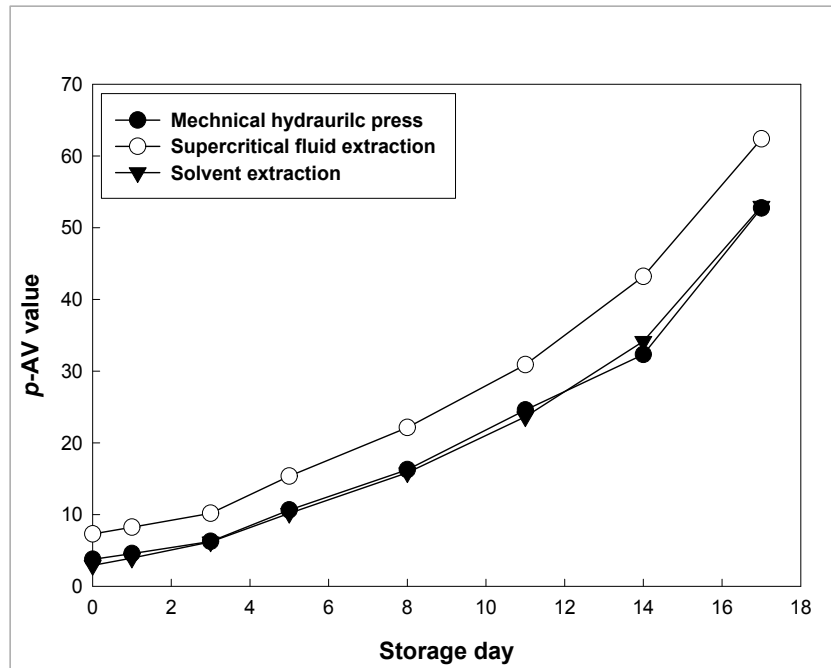


그림 13. Change of the p-anisidine value of the oil extracted from perilla seed with different extraction method during storage under fluorescence light at 5000 lux

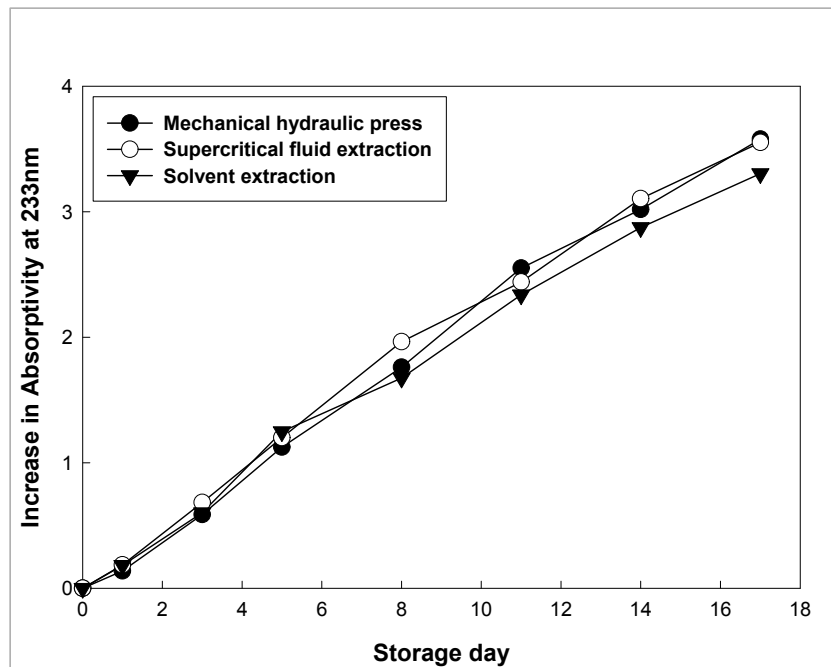


그림 14. Change of the conjugated diene value of the oil extracted from perilla seed with different extraction method during storage under fluorescence light at 5000 lux

(차) 착유방법을 달리하여 얻은 들기름의 색도 측정

볶음시간을 달리하여 얻은 들깨로부터 압착추출법으로 착유한 들기름의 색도 (Hunter's L*, a*, b*)는 표 19에 나타내었다. 표에서 보는 바와 같이 L값은 볶은 시간이 증가할수록 감소하였다. 즉 볶음시간이 증가할수록 들기름의 whiteness(흰색도)가 감소하였다. 볶은 시간이 증가할수록, a* (redness) 값이 증가하였으며, 특히 12에서 14분사이의 볶음시간에 그 변화가 가장 심하였다. 그 적색도의 증가는 볶음공정에서 일어나는 비효소적 갈변반응인 메일라드반응에 의한 것으로 판단된다. 표 20은 볶음시간을 달리하여 얻은 들깨로부터 용매추출법으로 착유한 들기름의 색도 (Hunter's L*, a*, b*)를 나타낸 것이다. 용매추출법으로 착유한 들기름의 경우에는 볶음시간에 따른 색도의 변화가 거의 없었다. 이는 추출용 용매인 hexane에 색소물질이 잘 용해되지 않아서 일어난 현상으로 판단되었다. 즉 비효소적 갈변반응으로 생성되는 색소물질이 비극성용매에 용해성이 대단히 제한적인 것임을 의미한다. 표 21은 볶은 들깨(12분)로부터 초임계추출법으로 착유한 들기름의 색도 (Hunter's L*, a*, b*)를 나타낸 것이다. 초임계추출장치의 압력이 300 bar에서 400 bar로 증가할 때, L 값 (흰색도)는 감소하고, a 값 (적색도)는 증가하였으나, 추출 압력의 변화에 따른 색도값은 매우 적은 편이었다.

표 19. 볶음시간을 달리하여 얻은 들깨로부터 압착추출법으로 착유한 들기름의 색도 (Hunter's L*, a*, b*)

Roasted time	Color value		
	L *	a *	b *
8min	87.21 ¹⁾	0.01	106.91
10min	83.27	1.67	105.42
12min	82.66	5.83	108.59
14min	58.66	30.41	97.36

표 20. 볶음시간을 달리하여 얻은 들깨로부터 용매추출법으로 착유한 들기름의 색도 (Hunter's L*, a*, b*)

Roasted time	Color value		
	L *	a *	b *
8min	92.51 ¹⁾	3.40	86.11
10min	91.80	3.39	84.71
12min	92.52	3.41	82.08
14min	91.87	3.11	82.95

표 21. 볶은들깨(12분)로부터 초임계추출법으로 착유한 들기름의 색도 (Hunter's L*, a*, b*)

Extraction Method	Condition	Color value		
		L *	a *	b *
SCE	300bar 50°C	89.18 ¹⁾	-1.22	94.64
	360bar 50°C	88.94	-0.63	103.11
	420bar 50°C	88.60	-0.12	107.13

카) 추출방법을 달리하여 착유한 들기름의 피라진 함량

볶음시간을 달리하여 얻은 들깨로부터 압착추출법으로 착유한 들기름의 피라진 함량은 표 22에 나타내었다. 표 22에서 보는 바와 같이 피라진 함량은 볶은 시간이 증가할수록 감소하였다. 특히 볶음시간이 증가할수록, tetra-methyl pyrazine의 생성이 가장 두드러졌다. 볶음시간이 비교적 짧은 8분 및 10분인 압착들기름은 2-methyl pyrazine이 가장 많이 함유된 피라진류이었으나, 볶음시간 14분인 압착들기름에는 tetra-methyl pyrazine함량이 가장 많았다. 표 23은 12분간 볶음처리를 한 들깨 시료를 용매추출법으로 착유한 들기름의 피라진 함량을 나타낸 것이다. 용매추출에 의하여 착유한 들기름에는 피라진 함량이 매우 적었다. 용매추출의 경우 추출된 hexane-들기름 micelle에서 hexane을 감압하에서 증발시키는 과정에서 향기 성분이 피라진도 함께제거되기 때문인 것으로 판단된다. 표 24은 12분간 볶음처리를 한 들깨 시료를 초임계추출법으로 착유한 들기름의 피라진 함량을 나타낸 것이다. 초임계유체추출 들기름의 경우 총 피라진함량은 용매추출에 비하여 현저히 높았으나, 압착추출들기름에 비하면 약간 낮은 편이었다. 그리고 압착추출들기름과 초임계추출들기름의 피라진 성분 구성비율도 약간 다르게 나타났다. 특히 압착추출법에의하면 2-methyl pyrazine이 높았으나, 초임계추출들기름에는 tetra-methyl pyrazine함량이 특히 높게 나타났다.

표 22. 볶음시간을 달리하여 얻은 들깨로부터 압착추출법으로 착유한 들기름의 피라진 함량

Compound name	peak areas (x 103 count)			
	8min	10min	12min	14min
Pyrazine	54.99±1.39	50.22±0.69	147.42±4.14	394.71±12.02
2-methylpyrazine	989.61±8.79	1434.60±12.08	3210.98±71.85	4325.67±128.96
2,5-dimethylpyrazine	1902.75±41.32	3903.29±19.47	3932.22±111.23	1635.55±55.46
2-ethylpyrazine	425.40±7.31	722.85±12.07	1060.33±36.83	858.75±20.46
2,3-dimethylpyrazine	78.75±2.05	117.28±1.37	147.90±2.09	111.64±4.09
2-ethyl-5-methylpyrazine	902.50±20.97	728.57±1.39	498.40±17.22	293.27±51.58
2-ethyl-5-methylpyrazine	214.96±12.77	514.49±12.83	462.09±4.98	176.52±25.76
2-ethyl-3-methylpyrazine	26.53±0.50	55.64±4.25	85.57±9.61	78.66±14.56
Trimethylpyrazine	510.74±5.68	875.84±12.90	754.98±30.42	319.63±18.88
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	241.99±8.57	513.02±10.55	513.09±2.06	341.79±7.27
2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine	41.63±1.31	83.99±0.24	90.27±1.74	58.11±0.10
Tetramethylpyrazine	-	-	3003.59±55.76	7463.51±171.61
2-isobutyl-3-methylpyrazine	-	-	257.55±0.15	313.61±9.46
Total peak areas	5389.90±103.77	8999.85±87.84	14164.46±313.34	16371.48±398.13

표 23. 볏은들깨(12분)로부터 얻은 들깨로부터 용매추출법으로 착유한 들기름의 피라진 함량

Compound name	peak areas (× 10 ³ count)
	용매추출
Pyrazine	23.95±0.86
2-methylpyrazine	703.78±2.56
2,5-dimethylpyrazine	1014.03±7.39
2-ethylpyrazine	286.55±4.88
2,3-dimethylpyrazine	43.61±0.80
2-ethyl-5-methylpyrazine	99.15±9.25
2-ethyl-5-methylpyrazine	151.35±29.52
2-ethyl-3-methylpyrazine	42.29±3.94
Trimethylpyrazine	234.70±2.68
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	202.82±25.07
2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine	21.75±0.03
Tetramethylpyrazine	-
2-isobutyl-3-methylpyrazine	-
Total peak areas	2823.99±79.03

표 24. 볏은들깨(12분)로부터 초임계추출법으로 착유한 들기름의 피라진 함량

Compound name	peak areas (× 10 ³ count)		
	300bar 50℃	360bar 50℃	420bar 50℃
Pyrazine	72.77±2.10	95.31±4.57	97.19±0.91
2-methylpyrazine	1327.03±12.58	1499.05±76.87	1440.66±44.14
2,5-dimethylpyrazine	1772.18±3.27	1913.24±129.76	1857.78±57.34
2-ethylpyrazine	456.54±10.11	485.49±48.93	461.29±11.12
2,3-dimethylpyrazine	76.72±2.89	85.03±9.05	86.68±1.41
2-ethyl-5-methylpyrazine	233.72±4.07	176.37±14.27	206.02±19.76
2-ethyl-5-methylpyrazine	203.67±6.30	201.72±6.71	192.23±5.97
2-ethyl-3-methylpyrazine	33.45±2.05	33.38±2.99	34.83±0.52
Trimethylpyrazine	362.49±9.23	360.13±27.16	367.02±3.67
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	275.46±21.07	294.50±14.82	300.09±6.71
2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine	37.11±1.34	27.54±2.90	18.88±1.40
Tetramethylpyrazine	5104.65±15.81	5613.51±171.14	5591.24±98.15
2-isobutyl-3-methylpyrazine	289.45±4.31	297.60±25.64	267.41±10.08
Total peak areas	10245.31±71.73	11082.91±529.01	10921.38±239.99

4. 들깨유의 미세캡슐화 수율 극대화를 위한 최적 조건 확립 (위탁과제 2)

가. 연구 내용 (2009년 1차년도)

- 최적 피복물질 탐색 및 제조 조건 확립
- HLB(Hydrophilic lipophilic balance) value에 따른 최적 유화제 탐색 및 선정
- Homogenization 공정 선정 및 조건 확립
- 고 안정성의 emulsion 형성을 위한 최적 반응조건의 확립 (반응표면분석)
- 미세캡슐화 수율 분석법 확립

나. 연구방법

(1) 분말 입자 형성을 위한 중심 물질 보조제 선정

- 들깨유는 고도불포화 지질로써 상온에서 액체 상태로 존재하여 분말 제조 시 다공성의 피복물질 외부로 용출되어 분말입자의 형태가 와해된다. 이를 방지하고자 극도경화 카놀라유(fully hydrogenated canola oil)를 첨가하여 중심물질의 녹는점을 상승시켜 분말입자를 제조하였다. 사용된 극도경화 카놀라유는 tristearin으로 구성되어 있으며 혈중 콜레스테롤에 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었으며(1), 본 연구의 중심물질 보조제로 선정하였다. 들깨유와 극도경화 카놀라유의 비율은 본래 중심물질의 의의를 가지며 분말입자를 형성하는 최적의 비율을 예비실험을 토대로 들깨유의 함량을 60%로 선정하였다.

(2) 최적 피복물질 탐색

- 피복물질은 단독으로 사용할 때보다 2가지 이상 혼합하여 사용할 경우 서로의 단점을 보완하며 뛰어난 캡슐능력을 보인다고 보고되었다(2). 본 연구에서 고구마 전분을 피복물질로 사용하여 가공공정의 향상을 위해 isomalt를 첨가하였다. isomalt는 단맛을 내지만 칼로리는 없는 당알콜의 한 종류이며, 흡습성이 낮고 결정화를 갖는 특성이 있으며 냉각 중 겔 형성을 억제하고 다른 당알코올보다 전분노화 지연과 저장성에 효과가 있다고 보고되었다. 이런 배경을 바탕으로 고구마 전분과 isomalt를 혼합하여 피복물질을 제조하였다.

(3) 유화안정지수의 산출

- 유화액의 유화안정성을 결정하기 위하여 유화안정지수 산출법인 volumetric method를 사용하였다. 유화안정성을 측정하기 위해 사용된 기기는 Turbiscan LAB(Formulation, France)으로 유화층에서 용출된 기름층을 측정하여 다음의 유화안정지수 식에 측정값을 대입하였다.

$$ESI(\%) = \left[1 - \frac{\text{volume of separated layer}}{\text{total volume of emulsion}} \right] \times 100$$

(4) 수중유적형 유화액 형성을 위한 homogenization 공정 개요

- 유화액을 제조하기 위해 각 실험마다 항온기의 온도를 75℃로 유지하면서 중심물질(들

깨유와 극도경화 카놀라유, Cm)을 초고속 균질기(Ultra-turrax T25, Janke & Kunkel Co., Ltd., Stuafen, Germany)로 3,000-9,000 rpm에서 60초간 재 균질화하였다. 이때, 유화액 형성에 영향을 미칠 수 있는 중심물질(Cm)과 피복물질(Wm)의 조성비, 유화제 농도 등을 반응표면분석법에 의한 실험계획에 따라 조건을 달리하면서 실험을 수행하였다.

(5) 반응표면분석법에 의한 고 안정성의 유화액 형성의 조건 최적화

(가) 독립변수 선정 및 변화 범위의 선정

① 유화제의 종류 선정

- 수중유적형 유화액의 경우, 상대적으로 높은 HLB(hydrophilic lipophilic balance) value의 유화제가 적합할 것으로 예상되어, 예비실험결과를 토대로 중심물질 (들깨유와 극도경화 카놀라유, Cm)과 피복물질(SPS와 Isomalt, Wm) 비율을 0.6(Cm/Wm, w/v)으로 고정한 조건에서 상대적으로 높은 5종의 유화제(Table 1)를 각각 200 μmol 첨가하여 1분간 homogenization 공정을 거쳐 유화계를 형성시켰다. 제조된 유화액은 75 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정된 항온기에 24시간 정치한 후 상대적인 유화안정지수를 측정하였다.

Table 1. Emulsifiers for the formation of the emulsion

HLB* value	Emulsifiers
8.6	sorbitan monolaurate(SML)
11.0	sucrose monostearate(SMS)
14.9	polyoxyethylene sorbitan monostearate(PSMS)
16.7	polyoxyethylene sorbitan monolaurate(PSML)
19.0	lecithin(Lt)

*Hydrophilic-lipophilic balance

② 유화제의 최적 첨가량 범위 설정

- ①의 실험결과에서 선정된 유화제의 최적 첨가량 범위를 설정하기 위해 100 μmol 부터 500 μmol 까지 유화제의 첨가량을 단계적으로 증가시키며 유화계를 형성시켰다. 이때, 중심물질과 피복물질의 비율은 0.6([Cm]/[Wm])으로 고정한 조건에서 수행하였으며, 유화안정지수를 측정하여 상대적인 유화안정성을 비교하였다.

③ 유화액의 조성비([Cm]/[Wm]) 범위 설정

- 유화액의 최적 조성비 범위를 설정하기 위해 유화액의 비율을 0.2에서 1.0까지 단계적으로 설정하고 ①, ②의 실험결과를 토대로 PSMS(HLB 14.9)를 200 μmol 첨가하여 유화계를 형성시킨 후 유화안정지수를 측정하였다.

④ Homogenization 공정 조건 확립

- 반응표면분석을 위한 균질화 공정의 최적 rpm 범위를 설정하기 위해 homogenization rpm 범위를 3,000 rpm에서 9,000 rpm까지 단계적으로 설정하고 ③까지의 실험결과를 토대로 유화계를 형성시켜 유화안정지수를 측정하였다.

(나) 반응표면분석법을 이용한 실험 설계

① 반응표면분석법을 위한 실험설계

- 반응표면분석을 위하여 MINITAB statistical software (version 15, Minitab Inc., State college, PA, USA)을 사용하였으며, 유화액의 형성을 위한 조건 최적화에 대한 실험계획은 중심합성계획법에 따라 설계하였다. 유화액의 형성에 영향을 미치는 변수인 유화제의 첨가량, 유화액의 조성비 및 homogenization rpm을 각각의 독립변수로 설정하고, 각 변수들을 -1.68, -1, 0, +1, +1.68의 다섯 단계로 부호화하여 중심합성계획에 따라 총 20개의 실험구간으로 설정하였다. 이들 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수는 유화안정지수로 선정하였고, 각각의 독립변수에 대한 실험영역은 예비실험 결과를 이용하여 설정하였다.

Table 2. Coded levels of independent variables used in experimental design for emulsification

Variables	Coded Xi	Coded level					ΔX
		-1.68	-1	0	+1	+1.68	
The ratio of Cm to Wm ([Cm]/[Wm])	X1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	0.2
Contents of emulsifier (μmol)	X2	100	200	300	400	500	100
The degree of homogenization (rpm)	X3	3000	4500	6000	7500	9000	1500

Table 3. Central composite design for the optimization of emulsification

Run No.	Coded variables			Process variables			Observed ESI (%)	predicted ESI (%)
	X ₁ ^a	X ₂ ^b	X ₃ ^c	X ₁ ^a	X ₂ ^b	X ₃ ^c		
1	-1	-1	-1	0.4	200	4500	32.8	24.6
2	1	-1	-1	0.8	200	4500	32.5	32.7
3	-1	1	-1	0.4	400	4500	57.8	56.1
4	1	1	-1	0.8	400	4500	73.3	72.4
5	-1	-1	1	0.4	200	7500	75.7	73.8
6	1	-1	1	0.8	200	7500	84.4	83.3
7	-1	1	1	0.4	400	7500	80.5	77.5
8	1	1	1	0.8	400	7500	90.0	95.3
9	-1.68	0	0	0.2	300	6000	58.2	65.7
10	1.68	0	0	1.0	300	6000	87.4	87.5
11	0	-1.68	0	0.6	100	6000	49.3	49.3
12	0	1.68	0	0.6	500	6000	85.9	85.9
13	0	0	-1.68	0.6	300	3000	21.3	21.3
14	0	0	1.68	0.6	300	9000	82.9	81.9
15	0	0	0	0.6	300	6000	78.7	78.3
16	0	0	0	0.6	300	6000	77.1	78.3
17	0	0	0	0.6	300	6000	84.4	78.3
18	0	0	0	0.6	300	6000	80.9	78.3
19	0	0	0	0.6	300	6000	74.1	78.3
20	0	0	0	0.6	300	6000	75.2	78.3

^athe ratio of ([Cm])/[W]

^bcontents of emulsifier

^cthe degree of homogenization

② 반응표면분석에 의한 조건 최적화

- 중심합성계획법에 따라 설계한 실험구에 의하여 도출한 결과인 유화안정지수를 RSREG(response surface regression)를 이용하여 통계분석하였고, 3차원 분석을 통하여 고안정성 유화액 형성 조건의 최적화를 실시하였다. 들깨유의 미세캡슐화 공정 최적화에 관련된 독립변수인 유화액의 조성 비율(X1), 유화제 농도(X2), 및 homogenization rpm (X3)과 종속변수인 유화안정지수에 대한 표본회귀모형식은 다음과 같다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

여기서 Y는 종속변수, Xi, Xj는 독립변수, β0는 절편, βi, βii, βij는 회귀계수이다.

(6) 미세캡슐화 수율의 분석법 확립

- 미세캡슐공정에 안정한 내부표준물질로 oil red O를 선정하였으며, 상대적인 민감도를 높이기 위해 중심물질에 1.5 mM 첨가하여 미세캡슐화 공정을 수행하였다. 미세캡슐화된 분산액으로부터 20 mL를 채취하여 비극성 유기용매인 n-hexane 10mL에 혼합하고 자석교반기를 이용하여 300 rpm으로 5분간 교반하여 30분간 정치 한 후 510 nm 파장의 흡광도를 다음의 식으로 대입하여 미세캡슐화 수율을 환산하였다.

$$Yield\ of\ microencapsulation(\%) = \frac{B-A}{B} \times 100$$

A: Absorbance of oil red O isolated from non-encapsulated layer

B: Absorbance of oil red O added in perilla oil

반응표면분석법에 의한 최적 조건으로 제조된 유화액은 spray-chilling 공정 후 미세캡슐화수율 측정법에 적용시켜 최적화된 유화액의 미세캡슐 수율 분석법을 확립하였다.

(가) 연구 결과

① 반응표면분석법에 의한 고 안정성의 유화액 형성의 조건 최적화

㉞ 독립변수 선정 및 변화 범위의 선정

i) 유화제의 종류 선정

- 고 안정성의 유화액 제조를 위해 5종의 유화제를 사용하여 유화제를 형성시킨 후 제조된 유화액의 유화안정지수를 측정하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 각각 SML(HLB8.6) 66.8±1.6%, SMS(HLB11.0) 80.5±0.1%, PSMS(HLB14.9) 92.7±2.3%, PSML(HLB 16.7) 89.4±1.5%, Lt(HLB 19.0) 69.0±4.5%의 안정성을 나타내었다. 수중유적형(O/W type)의 유화액형성에 상대적으로 높은 HLB value의 유화제가 더욱 적합할 것이라는 예상과 전반적으로 일치하는 결과를 나타낸 것이다. 하지만, HLB value가 높은 PSML(HLB16.7), Lt(HLB19.0)을 사용했을 때, PSMS(HLB14.9)를 사용한 경우보다 오히려 낮은 안정성을 보인 것은 한계이상의 고 HLB value의 유화제는 수중유적형 유화제 형성에 적합하지 않는다고 판단하였다.

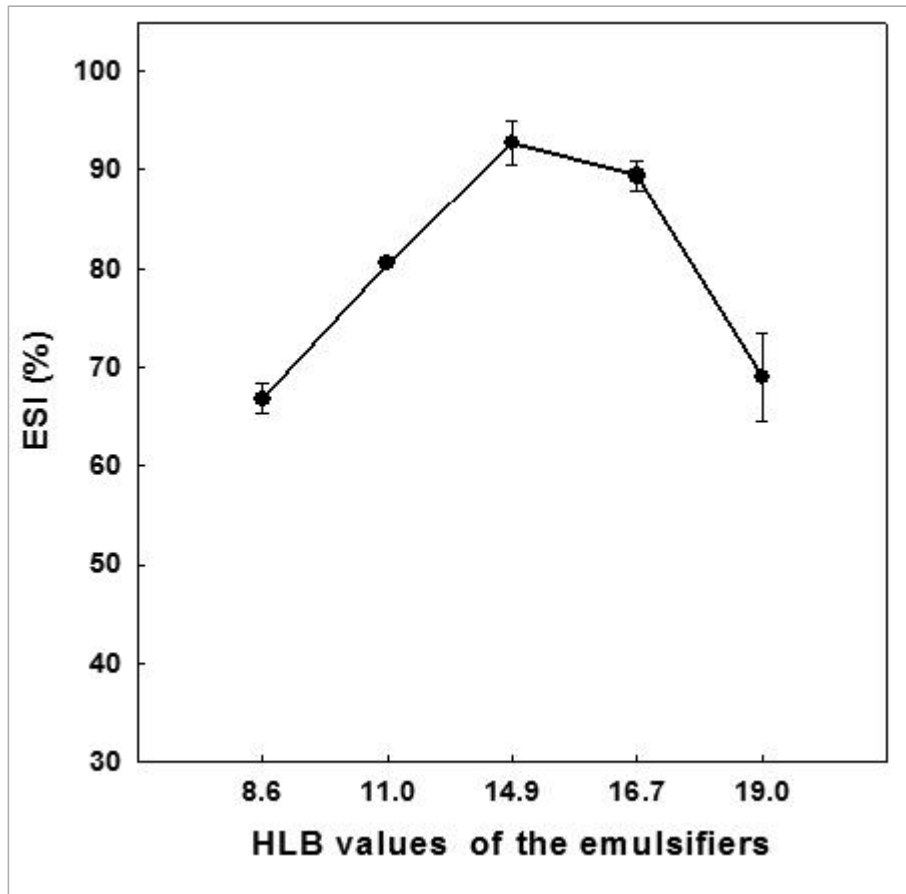


Fig. 1. Effect of HLB values of the emulsifiers on ESI (%)

ii) 유화제의 최적 첨가량 범위 설정

- 앞서 수행한 유화제 종류의 선정 실험결과를 토대로 PSMS(HLB 14.9)의 반응표면 분석을 위한 최적 첨가량 범위를 설정하기 위해 예비실험을 하였다. 그 결과 Fig. 3와 같이 100 μmol 부터 500 μmol 까지 유의적인 변화를 보였으며, 각 첨가량마다 유화액의 조성비와 homogenization rpm의 상관관계를 분석하기 위하여 독립변수의 실험영역을 100 μmol 부터 500 μmol 까지 설정하였다.

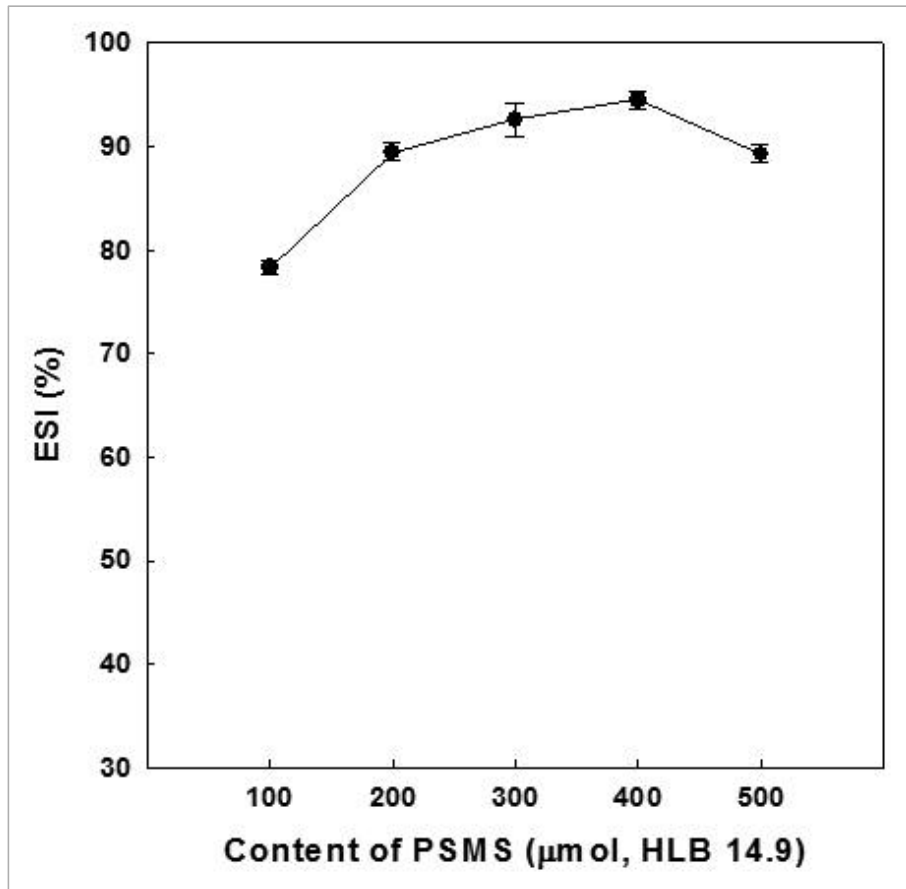


Fig. 2. Effect of PSMS content on ESI (%)

iii) 유화액의 조성비($[C_m]/[W_m]$) 범위 설정

- 반응표면분석법을 위한 유화액의 최적 조성비 범위를 설정하기 위해 중심물질과 피복물질의 비율을 0.2($[C_m]/[W_m]$)에서 1.0까지 설정하고 유화계를 형성시켜 유화안정지수를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3와 같이 각 비율은 유의적인 변화를 보였으며, 각 비율마다 유화제 첨가량 및 homogenization rpm과의 상관관계를 분석하기 위해 독립변수의 실험영역을 0.2에서 1.0까지 독립변수의 실험영역으로 설정하였다.

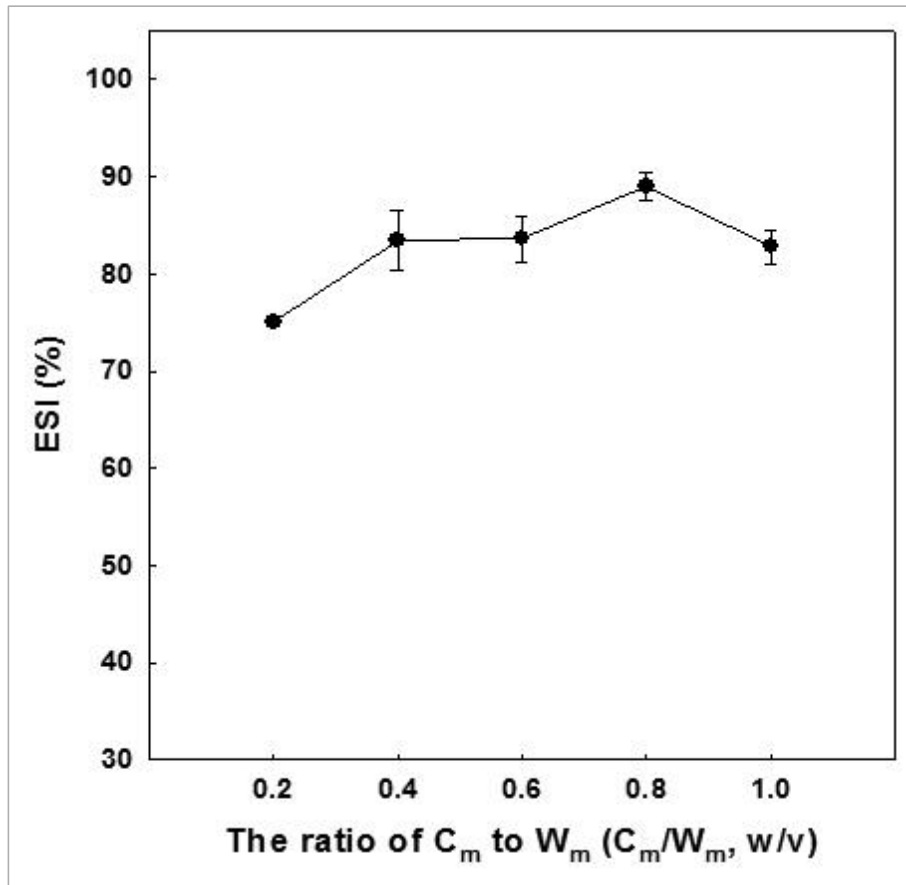


Fig. 3. Effect of the ratio of $[C_m]/[W_m]$ on ESI (%).

iv) Homogenization(균질화) rpm 범위 설정

- Homogenization rpm에 따른 유화안정지수를 Fig. 4에 나타내었으며, 그 결과 각 homogenization rpm에 따라 유의적인 변화를 보였으며, 각 homogenization rpm에 따라 유화제 첨가량 및 유화액 조성비와의 상관관계를 분석하기 위해 독립변수의 실험영역을 3,000 rpm에서 9,000 rpm까지 독립변수의 실험영역으로 설정하였다.

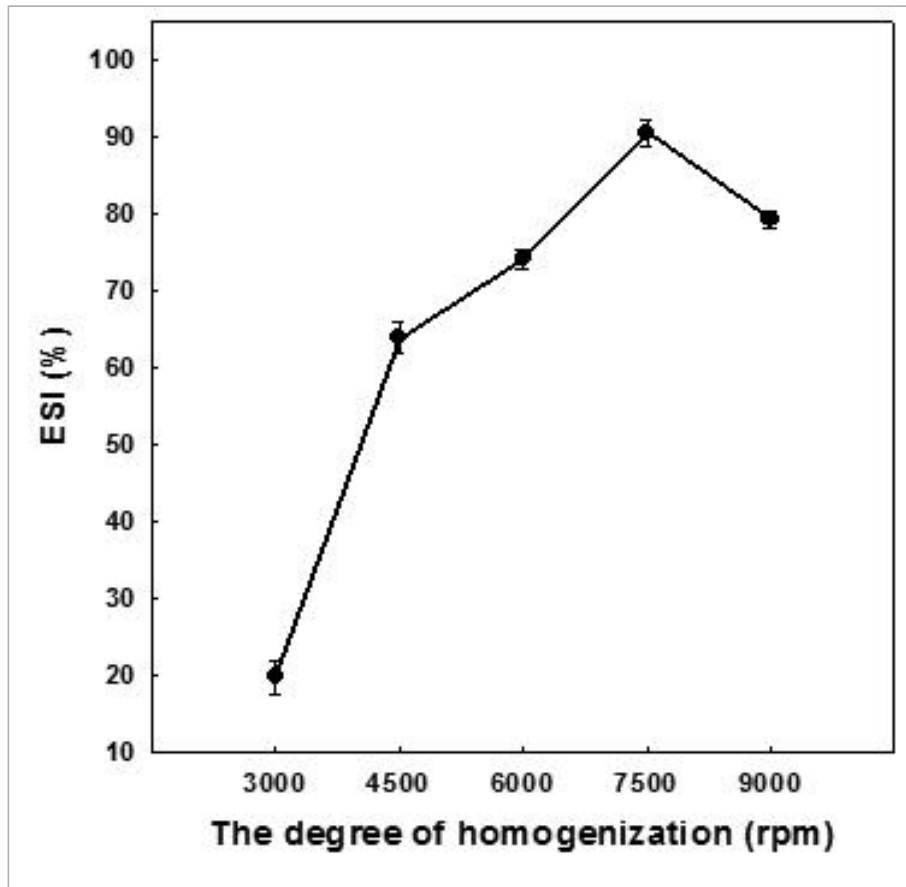


Fig. 4. Effect of the degree of homogenization (rpm) on ESI (%).

㊤ 반응표면분석법을 이용한 실험 설계

i) 반응표면분석법에 의한 유화안정지수 변수간의 관계분석

- 중심합성계획법에 의하여 설계된 20개의 실험 조건하에서 유화안정지수를 측정한 결과는 Table 3과 같다. Table 3을 바탕으로 RSREG 처리하여 나타낸 결과는 Table 4와 같으며, 3가지 독립변수가 각각 변함에 따른 미세캡슐화의 수율 Y에 대한 회귀식은 다음과 같이 표현되었다.

$$Y = 78.2867 + 6.4849X_1 + 10.8749X_2 + 18.0158X_3 - 0.6031X_1^2 - 3.7851X_2^2 - 9.4243X_3^2 + 2.0750X_1X_2 + 0.3750X_1X_3 - 6.9250X_2X_3$$

종속변수의 상수, 일차항(X_1, X_2, X_3), 이차항(X_1^2, X_2^2, X_3^2), 그리고 교차항(X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3)중에서 상수($p < 0.001$), 일차항 X_1, X_2, X_3 ($p < 0.05$), 이차항 X_2^2, X_3^2 ($p < 0.05$), 및 교차항 X_2X_3 ($p < 0.05$)이 유의성이 있는 것으로 나타났다.

분산분석의 결과는 Table 5와 같다. 상수, 일차항, 이차항, 그리고 교차항은 유의성이 있는 것으로 나타났으며($p < 0.05$) 결정계수(coefficient of determination, R^2)는 0.9648로 유의성이 5%이내의 유의수준에서 인정되었다. 또한 lack of fit값이 0.112로서 유의성이 인정되지

않으므로($p>0.05$) 모델이 반응표면을 적합 시킨 것으로 판단하였다.

각 독립변수에 따른 유화안정지수 변화의 반응표면 분석 결과는 Fig. 6에 나타내었다. (a)는 유화액의 조성비와 유화제 첨가량의 관계 그래프를 나타내었으며 각각 $0.8([C_m]/[W_m])$ 및 $400 \mu\text{mol}$ 부근에서 유화안정지수가 가장 높았다. (b)는 유화액의 조성비와 homogenization rpm의 관계 그래프를 나타내었으며 각각 $1.0([C_m]/[W_m])$ 및 7500 rpm 부근에서 유화안정지수가 가장 높았다. (c)는 유화제 첨가량과 homogenization rpm의 관계 그래프를 나타내었으며 각각 $300 \mu\text{mol}$ 및 $6,000 \text{ rpm}$ 부근에서 유화안정지수가 가장 높은 것으로 확인되었다.

Table 4. Regression coefficients of the predicted polynomial model

Parameter	Estimate	Standard error	p value
Intercept	78.2867	2.264	0.000
X_1	6.4849	1.502	0.002
X_2	10.8749	1.502	0.000
X_3	18.0158	1.502	0.000
X_1^2	-0.6031	1.462	0.689
X_2^2	-3.7851	1.462	0.027
X_3^2	-9.4243	1.462	0.000
X_1X_2	2.0750	1.963	0.315
X_1X_3	0.3750	1.963	0.852
X_2X_3	-6.9250	1.963	0.005

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) of independent variables for the second-order response surface model

Source	DF ^a	Sum of square	Mean square	F value	p value
Total model	9	8444.47	938.27	30.45	0.000
Linear	3	6622.02	2207.34	71.63	0.000
Square	3	1403.23	467.74	15.18	0.000
Interaction	3	419.22	139.74	4.53	0.030
Total error	10	308.18	30.82		
Lack of fit	5	235.42	47.08	3.24	0.112
Pure error	5	72.76	14.55		
R ²					0.9648

^aDegree of freedom

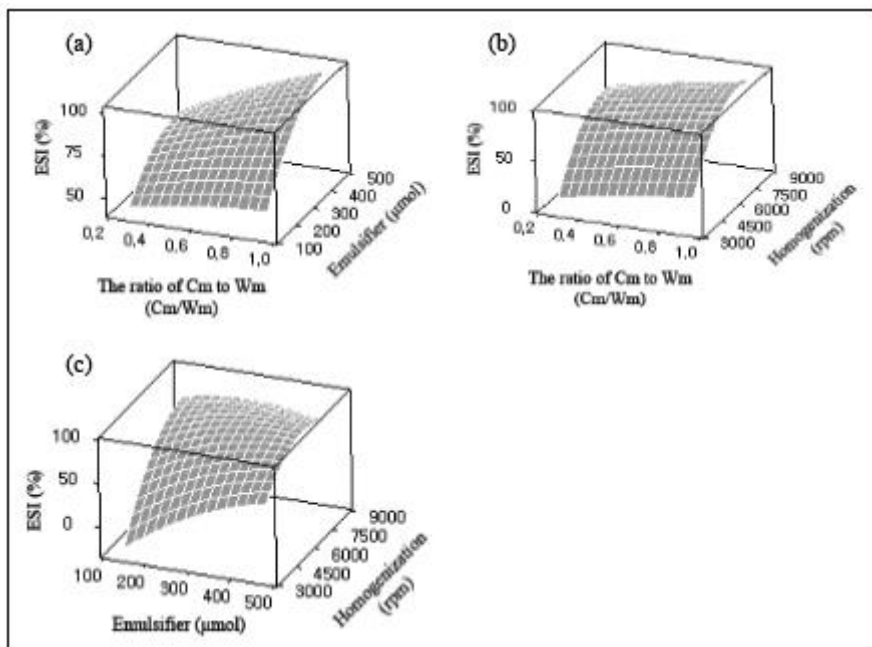


Fig. 5. Response surface plots showing the effects of variables in the ESI (%) : (a) the ratio of [Cm]/[Wm] and emulsifier (μmol); (b) the ratio of [Cm]/[Wm] and homogenization (rpm); (c) emulsifier (μmol) and homogenization (rpm).

ii) 반응표면분석에 의한 고 안정성 유화액 형성의 최적 조건 확정

- 반응 표면 분석의 통계적인 분석의 최종 단계에서 Fig. 7과 같이 선택된 결과치를 최적화하였다. Fig. 6에서 보여지는 바와 같이 곡선성을 가지는 그래프의 최적화점이 형성되었다. 최적화된 고 안정성 유화액의 형성 조건은 유화액 조성비([Cm]/[Wm])

는 0.8788, 유화제 첨가량은 302 μmol , 그리고 homogenization rpm은 7,667 rpm으로 나타났다.

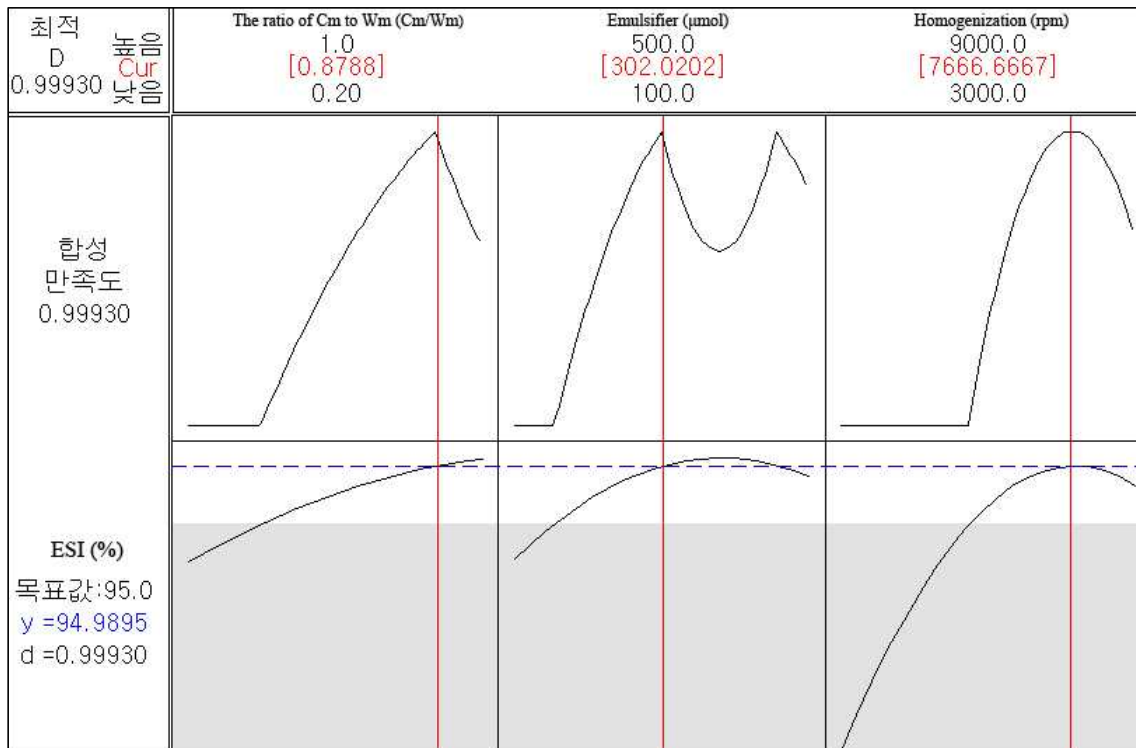


Fig. 6. Optimum conditions for ESI (%) of emulsion by response surface methodology: the ratio of $[\text{Cm}]/[\text{Wm}]$, 0.88; emulsifier, 302.02 μmol ; homogenization, 7666.7 rpm.

② 미세캡슐화 수율의 분석법 확립

- 미세캡슐화 수율을 분석하기 위해 예비실험을 수행한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. Oil red O의 흡광도는 510 nm에서의 흡광도가 358 nm에서의 흡광도 보다 더 민감하게 반응하였고 R2값이 0.9988로 적합성이 인정되어 510 nm에서의 흡광도를 측정 흡광도로 결정하여 미세캡슐화 수율 측정에 사용하였다. 미세캡슐 수율 분석법 확립을 위해 반응표면분석법에 의한 최적 조건으로 제조된 유화액의 미세캡슐화 수율은 $98.1 \pm 0.42\%$ 로 나타났다.

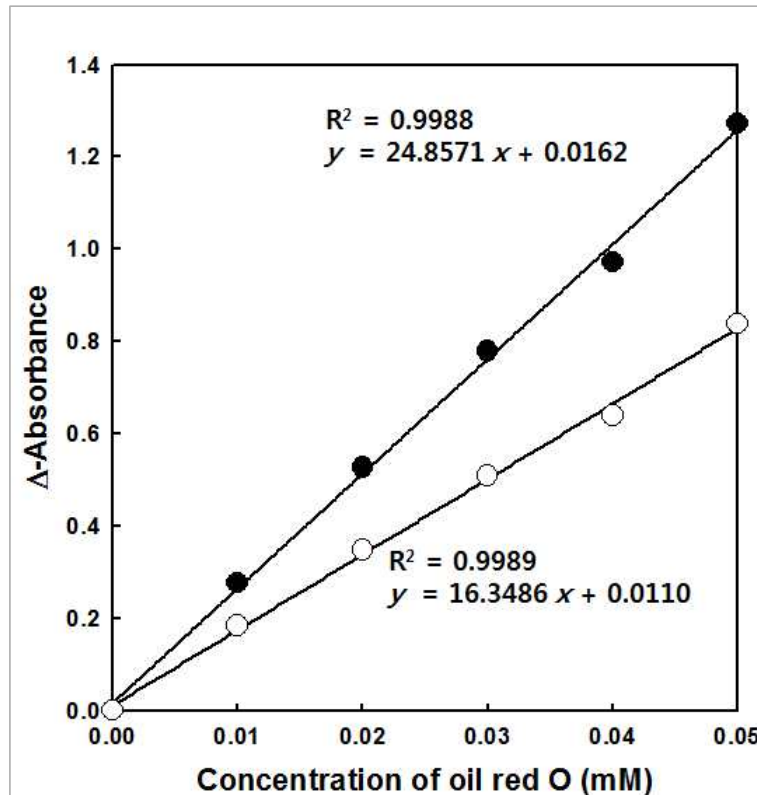


Fig. 7. Calibration curves of oil O as an internal standard isolated in n-hexane.

(○: Abs. at 512 nm, ●: Abs. at 358 nm)

③ 고 안정성 유화액 형성을 위한 최적조건에서의 미세캡슐 분말 확인

- 반응표면분석으로부터 확인된 고 안정성의 유화액 형성을 위한 최적조건(the ratio of [Cm]/[Wm], 0.88; content of emulsifier, 302 μmol; the degree of homogenization, 7667 rpm)에서 유화액을 형성한 후, spray-chilling 과 freeze-drying 공정을 통해 미세캡슐 분말을 제조하였다.



Fig. 8. Photographic representation of microcapsule powder containing perilla oil under the conditions optimized in this study.

다. 연구 내용 (2010년 2차년도)

- 분산매 선정 및 제조조건 확립
- Spray-chilling 공정 조건 확립
- 반응변수의 유효범위 선정을 위한 예비실험
- 반응표면분석법을 이용한 실험 설계 및 최적의 반응조건 확립
- 미세캡슐 수율 분석법의 적용성 확인 및 보완

라. 연구방법

(1) 들깨유 함유 미세캡슐화를 위한 spray-chilling 공정조건 확립

(가) 분산매의 제조

- Spray-chilling 공정을 위해 증류수에 0.025%(w/w)농도로 polyoxyethylene sorbitan tristearate (HLB 9.6, PSTS)를 첨가하여 용해시킨 후 미세캡슐 형성을 위한 분산매로 사용하였다.

(나) Spray-chilling 공정 조건 확립

- 본 연구에서 최적 조건으로 제조된 유화액 20 mL을 각 설정 온도로 유지된 분산매 200 mL내에 spray-gun을 사용하여 분사시킨 후 미세캡슐화 수율 분석법에 적용하였다.

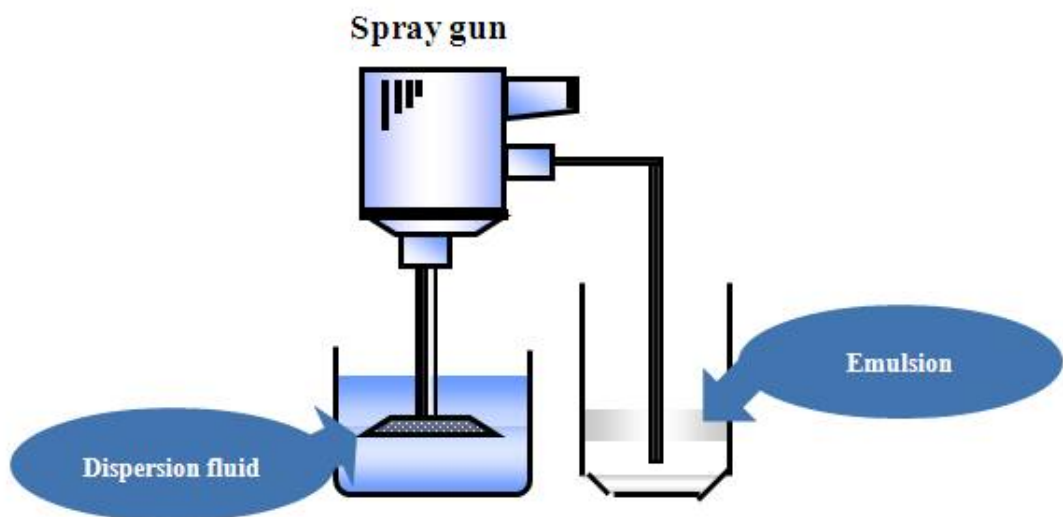
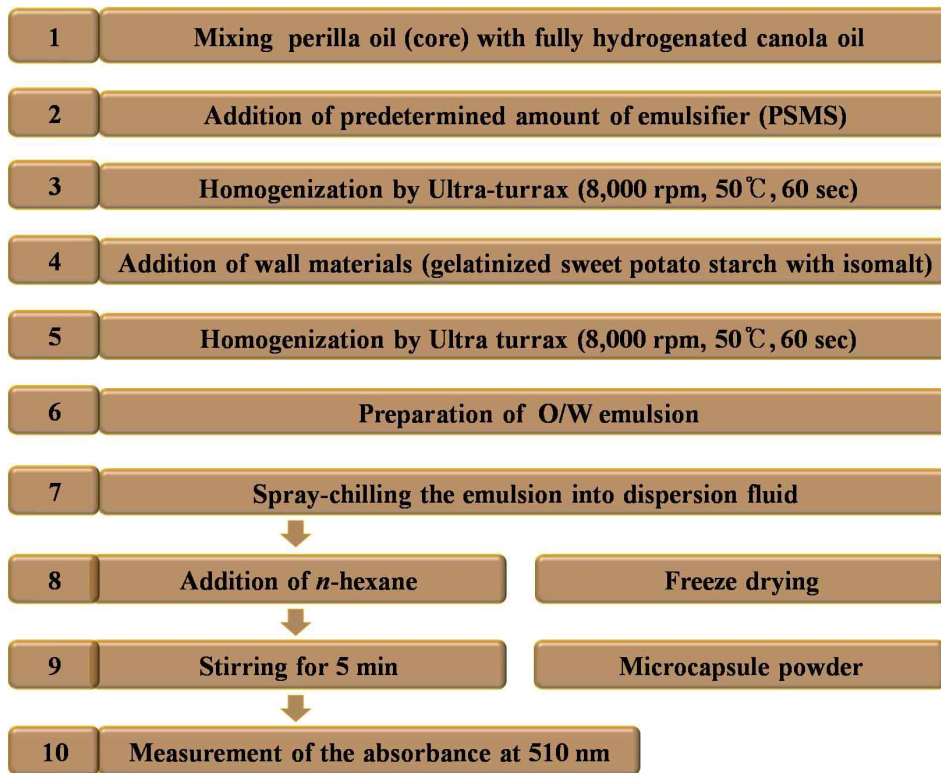


Fig. 9. Schematic diagram for the spray-chilling apparatus.

(다) 내부표준물질을 이용한 미세캡슐화 수율 분석

- 미세캡슐화 수율 분석을 위해 안정한 내부표준물질로 oil red O를 선정하였으며, 상대적인 민감도를 높이기 위해 중심물질(Cm)에 1.5 mM 농도로 첨가하여 미세캡슐화 공정을 수행하였다. 미세캡슐 공정은 다음과 같이 수행하였으며, 미세캡슐화 된 분산액으로부터 20 mL를 채취하여 비극성 유기용매인 n-hexane 10 mL에 혼합하고 자석교반기를 이용하여 200 rpm으로 5분간 교반하였다.



교반이 완료된 혼합액을 10분간 정치한 후, 상등액 2 mL을 취하여 510 nm 파장에서 측정된 흡광도를 다음의 식에 대입하여 미세캡슐화 수율을 환산하였다.

$$Yield\ of\ microencapsulation\ (\%) = \frac{B-A}{B} \times 100$$

A: Absorbance of oil red O isolated from non-encapsulated layer

B: Absorbance of oil red O added in perilla oil

(2) 미세캡슐화 공정의 유효 반응변수 선정 및 유의적인 변화범위 설정을 위한 예비실험

(가) 유화제의 최적 첨가량 범위설정

- 유화제의 최적 첨가량 범위설정을 위해 유화액의 조성비와 분산매의 온도를 각각 0.4([Cm]/[Wm]), 15°C로 고정한 후, 예비실험 결과를 토대로 polyoxyethylene sorbitan monostearate (HLB 14.9, PSMS)를 유화제로 선정하여 실험을 수행하였다. 유화제의 첨가량은 50-250 μmol의 범위에서 50 μmol 단위로 단계적으로 증가시키며 유화계를 형성시킨 후 spray-chiling 공정을 미세캡슐화 수율 측정법을 이용하여 최적 조성비를 설정하였다.

(나) 유화액의 최적 조성비([Cm]/[Wm]) 범위설정

- 유화액의 최적 조성비 범위를 설정하기 위해 예비실험결과를 토대로 유화형성의 한계 범위 내에서 0.2-0.6([Cm]/[Wm])비율로 설정하고, ■의 실험 결과를 토대로 PSMS를

150 μmol 첨가하여 유화계를 형성시킨 후 spray-chiling 공정을 거쳐 미세캡슐화 수율 측정법을 이용하여 최적 조성비 범위를 설정하였다.

(다) 분산매 온도의 최적 범위설정

- Spray-chiling 공정에 이용되는 분산매의 온도 범위설정을 위해 유화제의 첨가량과 유화액 조성비를 각각 150 μmol , 0.4([Cm]/[Wm])fh 고정시킨 후 5-25 $^{\circ}\text{C}$ 의 범위에서 5 $^{\circ}\text{C}$ 단위로 단계적으로 증가시켰다. 유화계를 형성시킨 후 spray-chiling 공정을 거쳐 미세캡슐화 수율 측정법을 이용하여 최적 분산매 온도 범위를 설정하였다.

(라) 균질화 공정 속도 범위설정

- 균질화 공정의 최적 rpm을 설정하기 위해 rpm 범위를 1,000-9,000 rpm에서 2,000 rpm 단위로 단계적으로 증가시키며 ■까지의 실험결과를 토대로 유화계를 형성시킨 후 spray-chiling 공정을 거쳐 미세캡슐화 수율 측정법을 이용하여 최적 rpm 범위를 설정하였다.

(3) 반응표면분석법을 이용한 미세캡슐화 공정의 최적화

(가) 반응표면분석법을 위한 실험설계

- 들깨유 함유 미세캡슐 공정 최적화를 위해 MINITAB statistical software (version 15, Minitab Inc., State college, PA, USA)를 사용하여 반응표면분석을 수행하였다. 반응표면분석을 위해 종속변수는 미세캡슐 수율로 선정하였으며, 독립변수는 예비실험 결과를 토대로 유화제의 첨가량, 유화액의 조성비, 그리고 분산매의 온도를 선정하였다. 선정된 독립변수의 유의적인 변화범위를 -2, -1, 0, +1, +2의 다섯 단계로 부호화하여 중심합성계획법에 따라 총 20개의 실험구간으로 설정하였다.

Table 6. Coded levels of independent variables used in experimental design for emulsification

Variables	Coded Xi	Coded level					ΔX
		-2	-1	0	+2	+2	
Content of emulsifier (μmol)	X1	50	100	150	2000	250	50
The ratio of [Cm] to [Wm]	X2	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.1
Temperature of dispersion fluid($^{\circ}\text{C}$)	X3	5	10	15	20	25	5

(나) 반응표면분석을 이용한 조건 최적화

- 중심합성계획법에 따라 설계한 실험구에 의하여 도출한 결과인 미세캡슐화 수율을 RSREG 및 ANOVA를 이용하여 통계 분석하였고, 3차원 분석을 통하여 미세캡슐화 수율 극대화를 위한 공정 최적화를 실시하였다. 들깨유 함유 미세캡슐화 공정 최적화에 관련된 독립변수인 유화제의 첨가량(μmol , X1), 유화액의 조성비([Cm]/[Wm], X2), 분산매의 온도($^{\circ}\text{C}$, X3)와 종속변수인 미세캡슐화 수율(YM, %)dp 대한 표본회귀모형

식은 다음과 같다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

여기서 Y는 종속변수, X_i, X_j는 독립변수, β₀는 절편, β_i, β_{ii}, β_{ij}는 회귀계수이다.

마. 연구결과

(1) 미세캡슐화 공정의 유효 반응변수 선정 및 유의적인 변화범위 설정을 위한 예비실험

(가) 유화제의 최적 첨가량 범위설정

- 유화제로 선정된 PSMS의 첨가량 범위선정을 위해 유화제의 조성비와 분산매의 온도를 각각 0.4([Cm]/[Wm]), 15°C로 고정시킨 후, 유화제의 첨가량을 50-250 μmol의 범위에서 50 μmol 단위로 단계적으로 증가시키며 미세캡슐 수율을 측정하였다. 그 결과, 유화제의 첨가량에 따라 각각 81.8%±0.88, 84.9%±0.78, 96.9%±0.32, 99.3%±0.14, 99.7%±0.05로 수율이 측정되었으며(Fig. 10), PSMS의 첨가량이 첨가량이 50 μmol부터 250 μmol까지 증가할수록 미세캡슐화 수율도 비례적으로 증가하여 150 μmol이상의 농도에서는 미세캡슐화 수율이 포화되는 양상을 나타내었다.

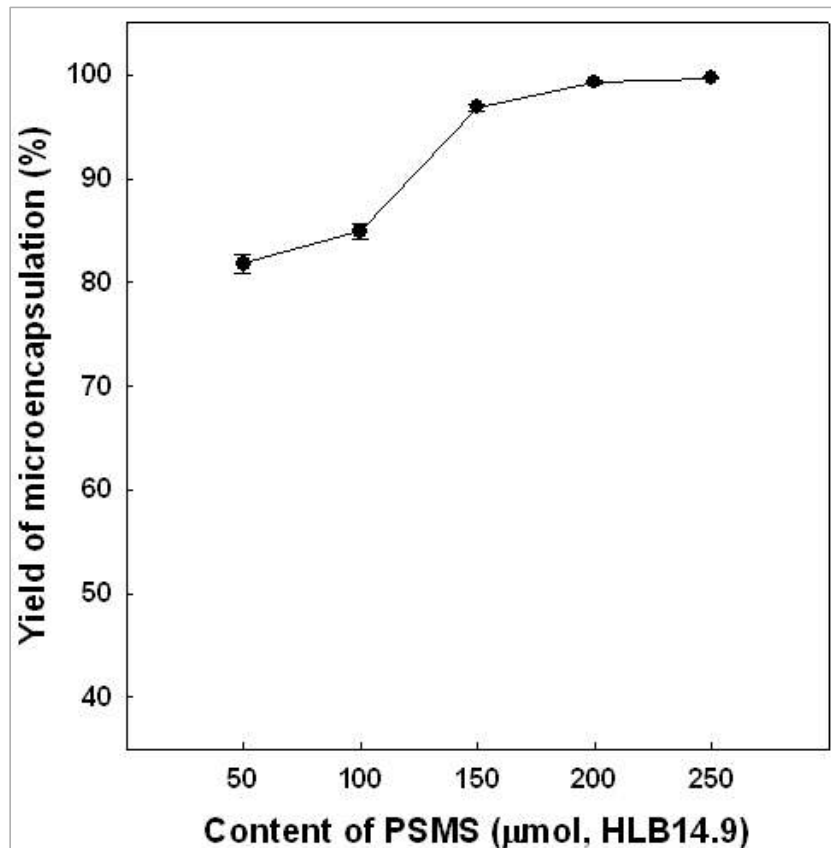


Fig. 10. Effect of PSMS content (μmol) on yield of microencapsulation (%).

(나) 유화액(O/W type)의 최적 조성비 범위설정

- 유화액의 최적 조성비 범위설정을 위해 예비실험결과를 토대로 유화제 첨가량을 150 μmol 로 고정시킨 후 유화액 조성비의 비율을 0.2([C_m]/[W_m])에서 0.6([C_m]/[W_m])까지 설정하여 미세캡슐화 수율을 측정하여 Fig. 11에 나타내었다. 유화액의 조성비에 따라 각각 99.1%±0.24, 89.1%±0.86, 82.9%±1.00, 82.9%±0.5, 85.8%±1.04로 측정되었으며 비율이 0.2에서 0.6까지 증가할수록 미세캡슐화 수율은 비례적으로 감소하는 것으로 확인되었다.

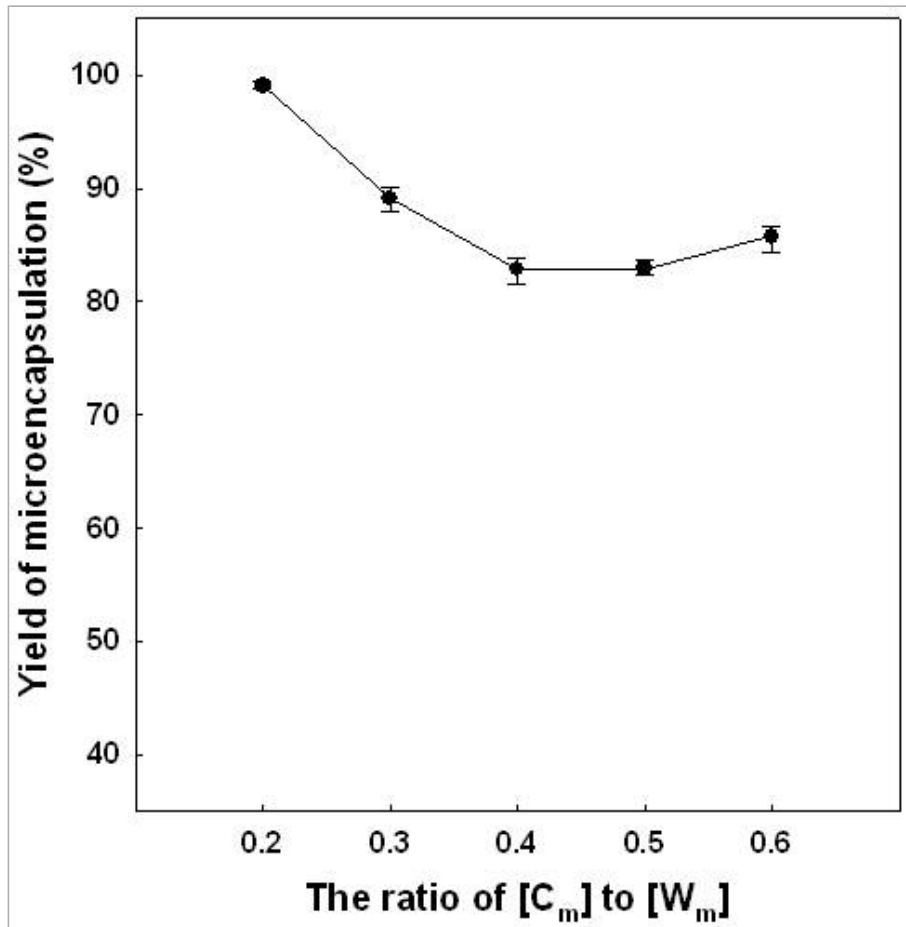


Fig. 11. Effect of the ratio of [C_m] to [W_m] on yield of microencapsulation (%).

(다) 분산매 온도 범위설정

- 분산매 온도 범위를 설정하기 위해 유화제의 첨가량과 유화액 조성비를 각각 150 μmol , 0.4([C_m]/[W_m])로 고정시킨 후 분산매의 온도를 5°C에서 25°C까지 5°C단위로 증가시켜 미세캡슐화 수율을 측정하였다(Fig. 12). 그 결과, 분산매 온도에 따라 각각 98.8%±0.62, 97.1%±1.50, 96.8%±1.96, 87.4%±1.96, 74.8%±3.37로 측정되었으며 미세캡슐화 수율은 15°C부터 25°C까지 비례적으로 감소되는 것으로 확인되었다.

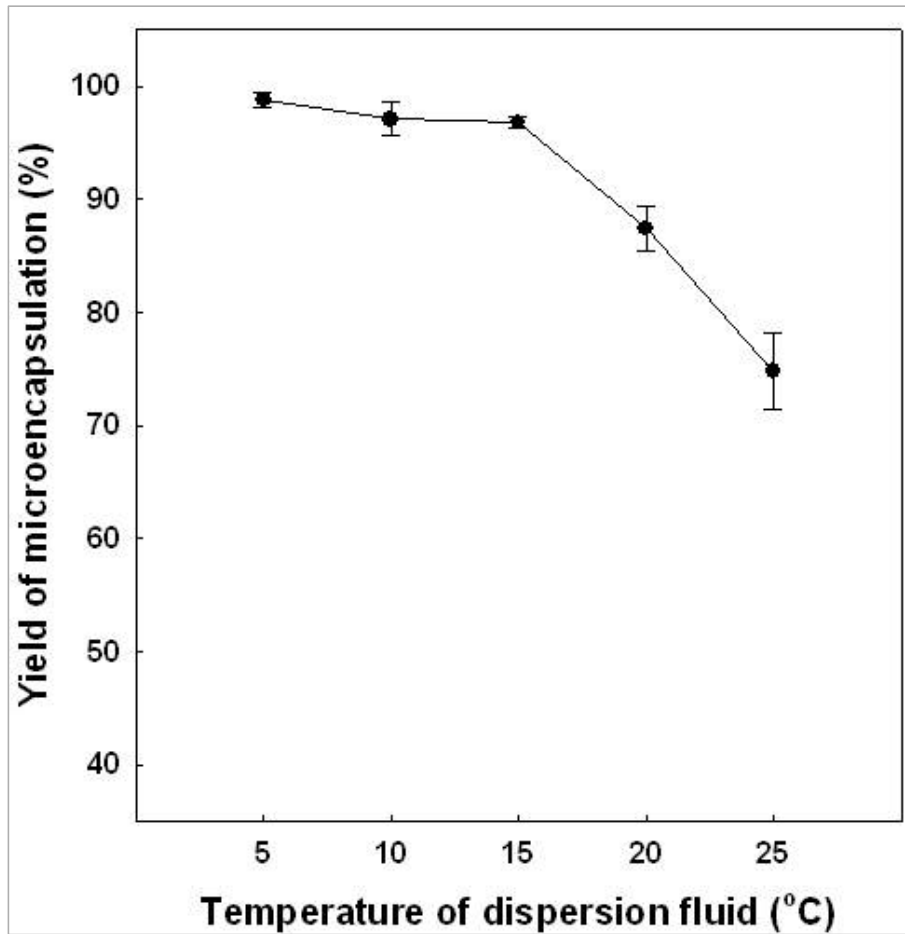


Fig. 12. Effect of temperature of dispersion fluid on yield of microencapsulation (%).

(라) 균질화의 공정 속도(homogenization rpm) 범위설정

- Homogenization rpm 범위에 따른 미세캡슐화 수율을 측정하기 위해 유화제 첨가량과 유화액 조성비를 각각 150 μmol , 0.4([Cm]/[Wm])로 고정시킨 후 rpm 범위를 1,000-9,000 rpm에서 2,000 rpm 단위로 단계적으로 증가시키며 미세캡슐화 수율을 측정하였다. 그 결과, 각각 98.1% \pm 0.45, 98.1% \pm 0.2, 97.6% \pm 0.75, 98.3% \pm 0.50, 98.3% \pm 0.01로 측정되었으나(Fig. 13), Homogenization rpm 범위에 따라 미세캡슐 수율은 유의적인 차이가 없는 것으로 판단되어 반응표면분석법의 독립변수에서 제외하였다.

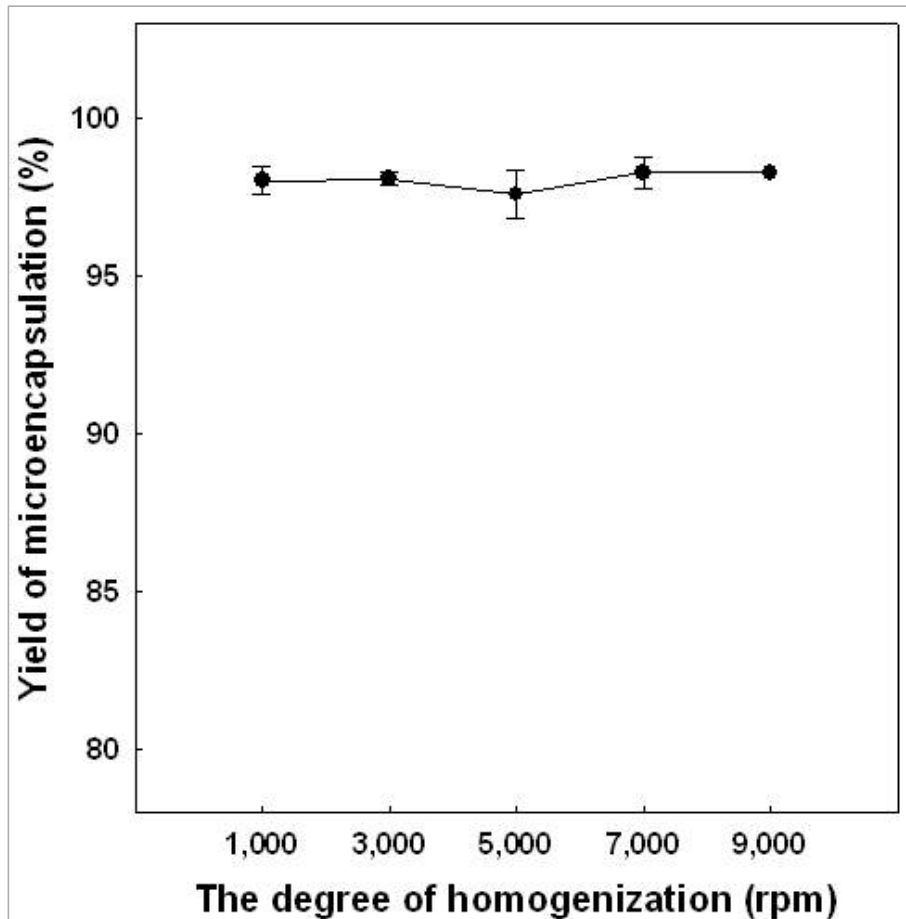


Fig. 13, Effect of the degree of homogenization on yield of microencapsulation (%).

(2) 반응표면분석법을 이용한 미세캡슐화 공정의 최적화

(가) 반응표면분석법에 의한 미세캡슐 공정 변수간의 관계분석

- 중심합성계획법에 의하여 설계된 20개의 실험 조건하에서 미세캡슐 수율을 측정된 결과는 Table 7과 같다. Table 7을 바탕으로 RSREG 통계 처리하여 나타낸 결과를 Table 8에 나타내었으며, 세가지 독립변수가 각각 변함에 따른 미세캡슐화의 수율 Y에 대한 회귀식은 다음과 같이 표현되었다.

$$Y=94.63+10.79X_1-1.63X_2-4.33X_3-3.53X_1^2-1.16X_2^2-2.90X_3^2+0.19X_1X_2-1.61X_1X_3-0.09X_2X_3$$

종속변수의 상수, 일차항(X_1, X_2, X_3), 이차항(X_1^2, X_2^2, X_3^2), 그리고 교차항(X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3) 중에서 상수($p<0.001$), 일차항 X_1, X_3 ($p<0.05$), 이차항 X_1^2, X_3^2 ($p<0.05$)이 유의성이 있는 것으로 확인되었다.

Table 7. Central composite design for the optimization of microencapsulation

Run No.	Coded variables			Process variables			Observed YMd (%)	Predicted YM (%)
	X_1^a	X_2^b	X_3^c	X_1^a	X_2^b	X_3^c		
1	-1	-1	-1	100	0.3	10	76.6±0.90	83.9
2	1	-1	-1	200	0.3	10	99.2±0.16	101.9
3	-1	1	-1	100	0.5	10	76.3±0.69	80.5
4	1	1	-1	200	0.5	10	99.2±0.07	99.2
5	-1	-1	1	100	0.3	20	68.9±0.57	72.2
6	1	-1	1	200	0.3	20	97.5±0.09	96.4
7	-1	1	1	100	0.5	20	67.8±1.52	68.4
8	1	1	1	200	0.5	20	97.5±0.90	93.6
9	-2	0	0	50	0.4	15	64.9±1.54	58.9
10	2	0	0	250	0.4	15	99.4±0.44	102.1
11	0	-2	0	150	0.2	15	97.8±1.58	93.2
12	0	2	0	150	0.6	15	85.5±0.13	86.7
13	0	0	-2	150	0.4	5	97.1±1.32	91.7
14	0	0	2	150	0.4	25	72.3±0.88	74.4
15	0	0	0	150	0.4	15	95.6±0.67	94.6
16	0	0	0	150	0.4	15	95.3±0.27	94.6
17	0	0	0	150	0.4	15	95.0±0.49	94.6
18	0	0	0	150	0.4	15	95.3±0.08	94.6
19	0	0	0	150	0.4	15	95.2±0.08	94.6
20	0	0	0	150	0.4	15	94.7±0.28	94.6

^athe ratio of [Cm] to [Wm]

^bcontent of emulsifier (μmol)

^ctemperature of dispersion fluid ($^{\circ}\text{C}$)

^dyield of microencapsulation

Table 8. Regression coefficients of the predicted polynomial model

Parameter	Estimate	Standard error	p value
Intercept	94.6318	1.8066	0.000
X ₁	10.7938	1.1324	0.000
X ₂	-1.6313	1.1324	0.180
X ₃	-4.3312	1.1324	0.003
X ₁ ²	-3.5341	0.9033	0.003
X ₂ ²	-1.1591	0.9033	0.228
X ₃ ²	-2.8966	0.9033	0.009
X ₁ X ₂	0.1875	1.6014	0.909
X ₁ X ₃	1.6125	1.6014	0.338
X ₂ X ₃	-0.0875	1.6014	0.958

분산분석의 결과(Table 4)는 상수, 일차항, 이차항은 유의성이 있는 것으로 나타났으며 (p<0.05) 결정계수(coefficient of determination, R²)는 0.929로 유의성이 10%이내의 유의 수준에서 인정되었다.

Table 9. Analysis of variance (ANOVA) of independent variables for the second-order response surface model

Source	DF ^a	Sum of square	Mean square	F value	p value
Total model	9	2662.6	2662.6	14.42	0.000
Linear	3	2206.8	2206.8	35.85	0.000
Square	3	434.7	434.7	7.06	0.008
Interaction	3	21.1	21.1	0.34	0.795
R ²					0.929

^adegree of freedom

각 독립변수에 따른 미세캡슐 수율 변화의 반응표면 분석 결과, (a)는 유화제 첨가량과 유화액의 조성비 관계 그래프를 나타내었으며 각각 200 μmol 및 0.3([Cm]/[Wm]) 부근에서 미세캡슐 수율이 가장 높았다. (b)는 유화제 첨가량과 분산매 온도의 관계 그래프를 나타내었으며 각각 180 μmol 및 10℃ 부근에서 미세캡슐 수율이 가장 높았다. (c)는 유화액의 조성비와 분산매 온도의 관계 그래프를 나타내었으며 각각 0.3([Cm]/[Wm]) 및 10℃ 부근에서 미세캡슐 수율이 가장 높은 것으로 확인되었다(Fig. 14).

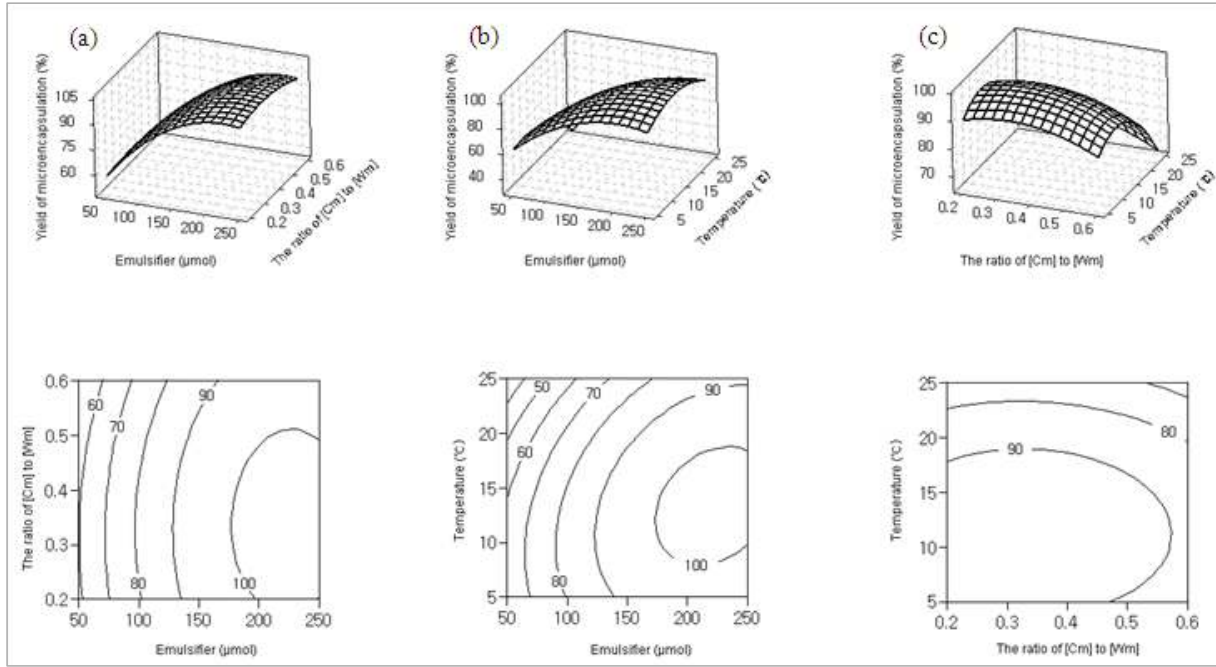


Fig. 14. Response surface plots and contour plots showing the effects of variables on the YM (%): (a), emulsifier (μmol) and and the ratio of [Cm] to [Wm]; (b), emulsifier (μmol) and temperature of dispersion fluid ($^{\circ}\text{C}$); (c), the ratio of [Cm] to [Wm] and temperature of dispersion fluid ($^{\circ}\text{C}$).

(나) 반응표면분석에 의한 미세캡슐화 공정의 최적 조건 확립

- 반응표면분석에 의한 미세캡슐화 공정의 최적 조건을 확립하기 위해 통계적 분석에서 선택된 결과를 곡선성을 가지는 그래프의 최적화점으로 표현하였다(Fig. 15). 미세캡슐 수율 극대화를 위한 최적 공정조건으로 유화제의 첨가량은 $221.7 \mu\text{mol}$, 유화액의 조성비는 $0.34([\text{Cm}]/[\text{Wm}])$, 그리고 분산매 온도는 13.3°C 로 각각 선정되었다.

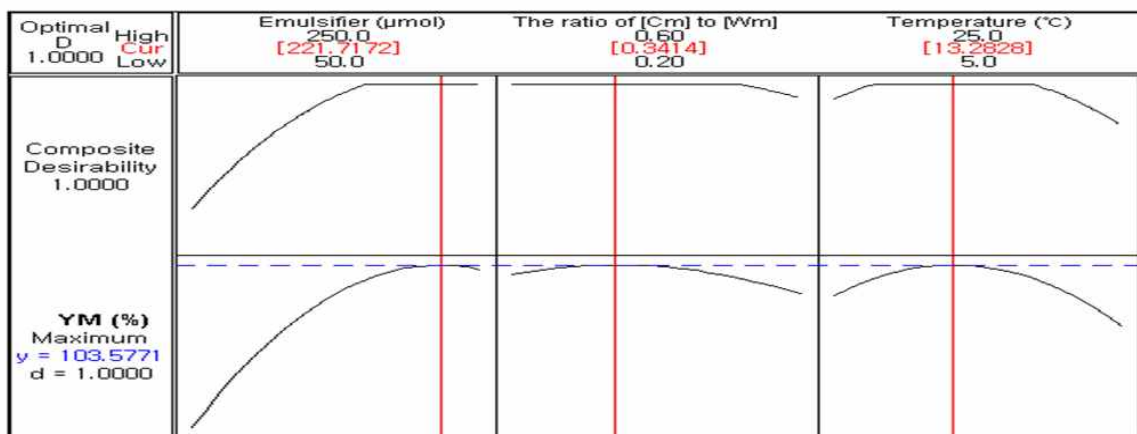


Fig. 15. Optimum conditions for the preparation of microcapsule containing perilla oil from response surface methodology.

(다) 반응표면분석법으로부터 도출된 최적조건에서 미세캡슐 수율 확인

- 반응표면분석법으로부터 도출된 최적조건(the ratio of [Cm]/[Wm], 0.34 ; content of emulsifier, 221.7 μmol ; temperature of dispersion fluid, 13.3 $^{\circ}\text{C}$)에서 spray-chilling 공정을 거쳐 미세캡슐 수율을 확인한 결과 98.5% \pm 0.17로 나타났다.

바. 연구내용 (2011년 3차년도)

- 들깨유 함유 미세캡슐의 열안정성 평가
- 들깨유 함유 미세캡슐의 pH 안정성 평가
- 미세캡슐의 in vitro 소화모델에서의 중심물질 방출유도 및 체내 방출률 측정
- 분말화 공정조건에 따른 분말입자의 특성 규명
- CLSM, FE-SEM 및 FIB를 이용한 미세캡슐 구조 분석 및 형성 관찰

사. 연구방법

(1) 들깨유 함유 미세캡슐의 저장 안정성 확인

- 들깨유 함유 미세캡슐의 저장 안정성을 확인하기 위해 반응표면분석에 의한 최적 공정 조건인 유화제의 첨가량은 221.7 μmol , 유화액의 조성비는 0.34([Cm]/[Wm]), 그리고 분산매 온도는 13.3 $^{\circ}\text{C}$ 로 선정하여 각각 미세캡슐을 제조하였다. 또한 미세캡슐의 저장 안정성을 확인하기 위해 안정한 내부표준물질로 oil red O를 선정하여 첨가하였으며, 상대적인 민감도를 높이기 위해 중심물질(Cm)dp 1.5 mM 농도로 첨가하여 미세캡슐화 공정을 수행하였다. 저장 안정성을 확인하기 위해 미세캡슐화된 분산액으로부터 20 mL를 채취하여 비극성 유기용매인 n-hexane 10 mL에 혼합하고, 자석교반기를 이용하여 200 rpm으로 5분간 교반하였다. 교반이 완료된 혼합액을 10분간 정치한 후, 상등액 2 mL을 취하여 510 nm 파장에서 측정된 흡광도를 다음의 식에 대입하여 미세캡슐화 수율을 환산하였다.

$$\text{Yield of microencapsulation}(\%) = \frac{B-A}{B} \times 100$$

A: Absorbance of oil red O isolated from non-encapsulated layer

B: Absorbance of oil red O added in perilla oil

들깨유 함유 미세캡슐의 pH에 따른 저장 안정성 및 온도에 따른 저장 안정성을 평가하기 위해 미세캡슐의 pH 범위를 2.0-12.0에서 2.5 단위로 단계적으로 증가시키며 일정한 온도(20 $^{\circ}\text{C}$)로 유지한 항온기에 정치하여 저장기간에 따른 안정성을 측정하였다. 또한 저장 온도에 따른 안정성을 평가하기 위해 미세캡슐을 pH 7.0으로 유지한 후 각각 4 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}$, 40 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정한 항온기에 정치하여 저장기간에 따른 안정성을 측정하였다.

(2) 들깨유 함유 미세캡슐의 체내방출특성 규명

- 들깨유 함유 미세캡슐의 체내방출특성을 규명하기 위해 본 연구에서는 in vitro 소화

모델을 이용하여 미세캡슐의 중심물질 방출제어 및 체내복원률을 평가하였다. 각각 위 조건, 장 조건으로 설계하였으며, 각 조건의 체내복원률을 비교하기 위해 대조군으로 증류수를 사용하였다. 위 조건의 pH는 0.4N HCl을 사용하여 $\text{pH} 2.0 \pm 0.1$ 로 조정하였으며, 장 조건의 pH는 0.4N NaOH를 사용하여 $\text{pH} 7.5 \pm 0.1$ 로 조정하였다. 각 조건에 따른 중심물질 방출률을 측정하기 위해 미세캡슐 10 mL를 분주하고, 증류수, 위액, 장액을 각각 10 mL씩 혼합한 후, 미세캡슐 수율분석을 위해 비극성 유기용매인 n-hexane 10 mL을 첨가하였다. 혼합액을 $37^\circ\text{C} \pm 0.1$ 로 설정된 항온수조에서 200 rpm으로 자석교반하며, 180분 동안 30분 간격으로 체내복원률을 측정하였다.

(3) 들깨유 함유 미세캡슐의 구조 분석

(가) 분말화 공정조건에 따른 분말입자의 특성 규명

- 들깨유 함유 미세캡슐의 분말 제조를 위해 당알코올을 2차 피복물질에 첨가하여 실험을 수행하였다. 당알코올의 종류는 식품 산업에 많이 사용되는 sorbitol, maltitol, xylitol, isomalt로 선정하였으며, 고구마전분과 당알코올을 증류수에 각각 16%, 30%로 용해시킨 후 실험을 수행하였다.

(나) CLSM을 이용한 미세캡슐 구조 분석

- 들깨유 함유 미세캡슐 분산액의 구조를 분석하기 위해 CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope)를 이용하여 관찰하였다. Wall material는 수용성에 용해되는 FITC (Fluorescein isothiocyanate)를 이용하여 100 μmol 로 염색을 하였으며, Core material에는 지용성에 용해되는 Nile red를 이용하여 100 μmol 로 염색한 후 실험을 수행하였다.

(다) FE-SEM 및 FIB를 이용한 미세캡슐 구조 분석 및 형상 관찰

- 당알코올이 첨가된 이중층 미세캡슐의 입자 구조 및 수치를 확인하기 위해 Field-Emission Scanning Electron Microscope (SUPRA 55VP, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였으며, Focused Ion Beam (Auriga, Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 내부 분말 구조를 확인하였다.

아. 연구결과

(1) 들깨유 함유 미세캡슐의 저장 안정성 확인

(가) 들깨유 함유 미세캡슐의 열안정성 평가

- 들깨유 함유 미세캡슐의 저장 온도에 따른 안정성은 4°C , 20°C 에서는 저장 후 30일까지 90% 이상의 고 안정성을 보였지만 40°C , 60°C 에서 저장된 미세캡슐의 경우 안정성이 급격히 감소되어 각각 $81.1\% \pm 0.2$, $72.5\% \pm 0.5$ 로 나타났다.

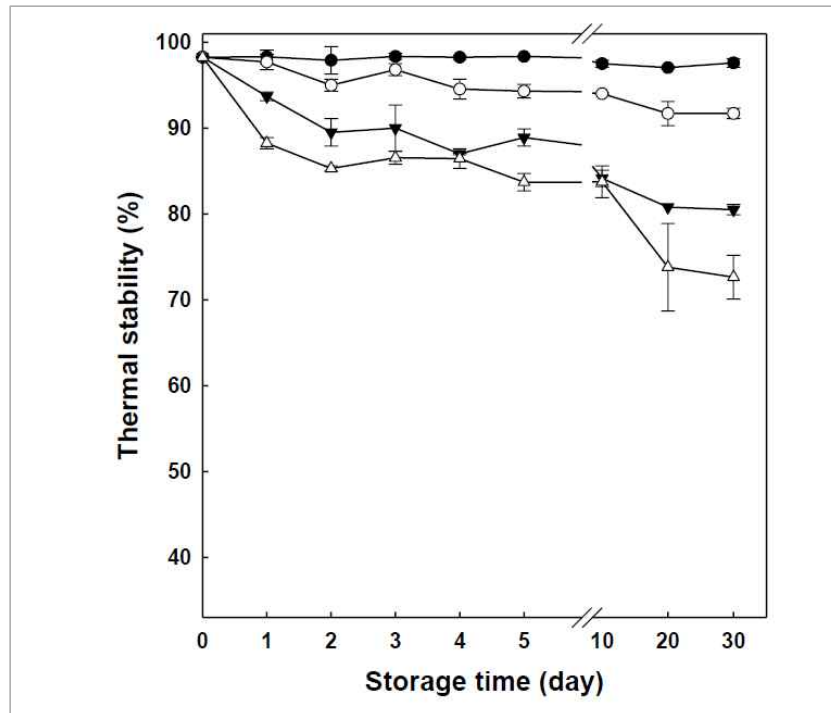


Fig. 16. Changes in yield of microencapsulation during storage time

(●: 4°C, ○: 20°C, ▼: 40°C, △: 60°C)

(나) 들깨유 함유 미세캡슐의 pH 안정성 평가

- 들깨유 함유 미세캡슐의 pH에 따른 안정성은 모든 pH조건에서 저장 후 30일까지 90% 이상으로 확인되어, pH에 따른 저장 안정성은 전 구간에서 안정한 것으로 판단하였다.

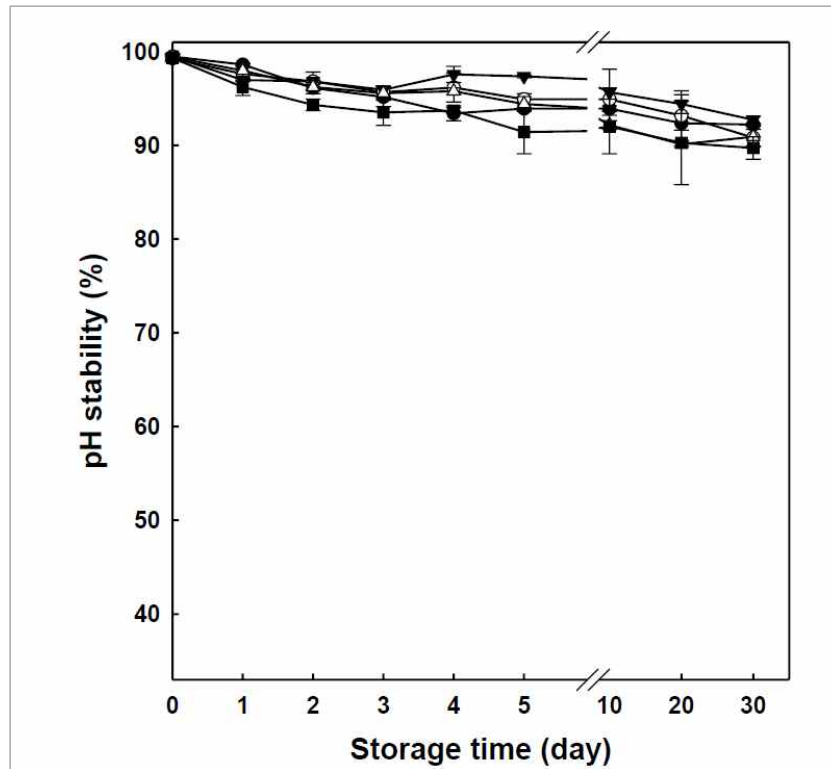


Fig. 17. Changes in yield of microencapsulation during storage time
 (●: pH2.0, ○: pH4.5, ▼: pH7.0, △: pH 9.5, ■: 12.0)

(2) 들깨유 함유 미세캡슐의 체내방출특성 규명

- 본 연구에서 *in vitro* 소화 모델을 이용한 들깨유 함유 미세캡슐의 중심물질 방출제어 및 체내복원률을 평가한 결과(Fig. 18), 위(gastric stage) 조건 및 대조군은 180분 동안 20% 이하의 중심물질 방출률을 보였으며, 장(intestinal stage) 조건은 중심물질 방출률이 점진적으로 증가되어 반응시간 4시간 내에 중심물질 방출률이 65%에 도달하는 것을 확인하였다. 경구투여를 위한 미세캡슐에서 가장 널리 이용되고 있는 소재는 poly lactic acid (PLA) 및 poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) 이지만, initial-burst release이 문제점으로 지적되고 있다(3-4). 본 연구에서 개발된 미세캡슐의 경우 initial-burst release가 없는 방출특성을 확인하였으며, 이러한 방출특성의 장점으로 다양한 생리활성 소재의 oral administration을 위한 미세캡슐에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

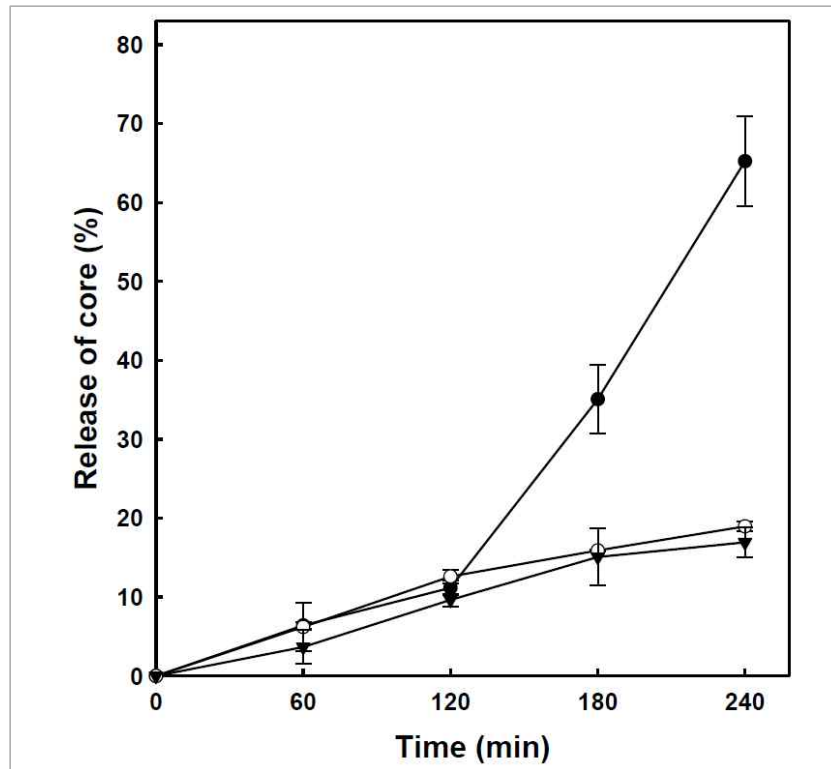


Fig. 18. Release profiles of core material from microcapsule in simulated gastric and intestinal juices (●: intestinal juice; ▲, gastric juice; ▼, DDW).

(3) 들깨유 함유 미세캡슐의 구조 분석

(가) 분말화 공정조건에 따른 분말입자의 특성 규명

- 들깨유 함유 이중층 미세캡슐의 분말 제조를 위해 maltitol, erythritol, isomalt, xylitol을 2차 피복물질에 첨가하여 실험을 수행한 결과 Fig. 19와 같이 나타났다. maltitol, erythritol, xylitol은 미세 분말입자를 형성하지 못하고 분말의 응집현상이 일어났다. isomalt는 비교적 분말입자가 고르게 나타나 FE-SEM과 FIB를 이용하여 분말입자의 특성 규명을 수행하였다.

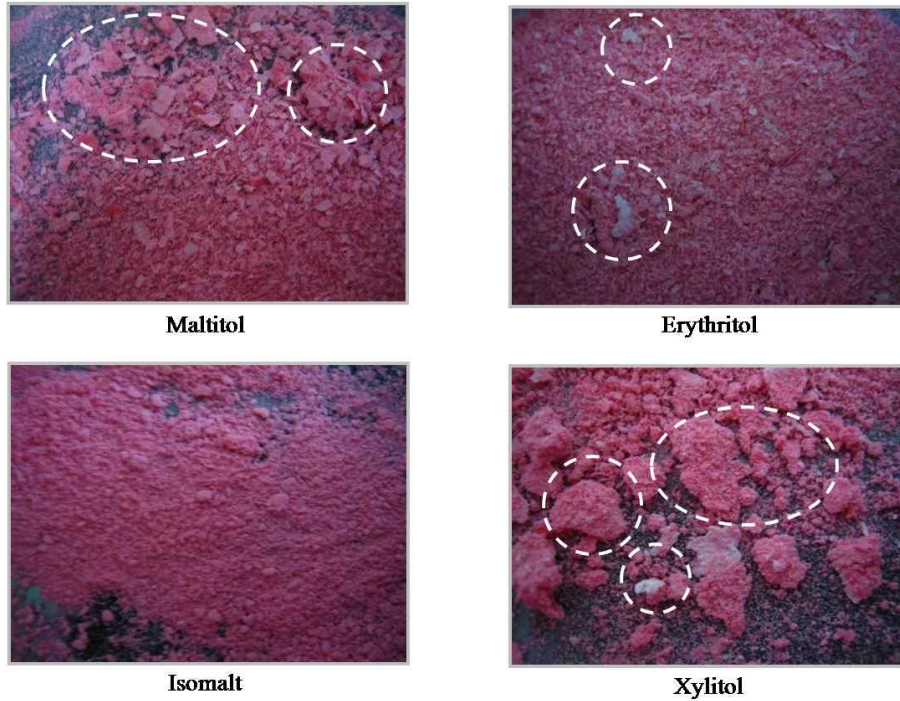


Fig. 19. Effect of various sugar alcohol to wall material on the morphology of microcapsule powder.

(나) CLSM을 이용한 미세캡슐 구조 분석

- 들깨유 함유 미세캡슐 분산액의 Cm은 Nile red로 염색되어 붉은색으로 나타났으며, 피복물질 및 분산매는 FITC에 염색되어 녹색으로 나타났다. 피복물질과 중심물질이 겹쳐진 사진에서 내부에 녹색과 붉은색이 겹쳐진 주황색이 나타나 캡슐이 형성되는 것을 알 수 있었다.

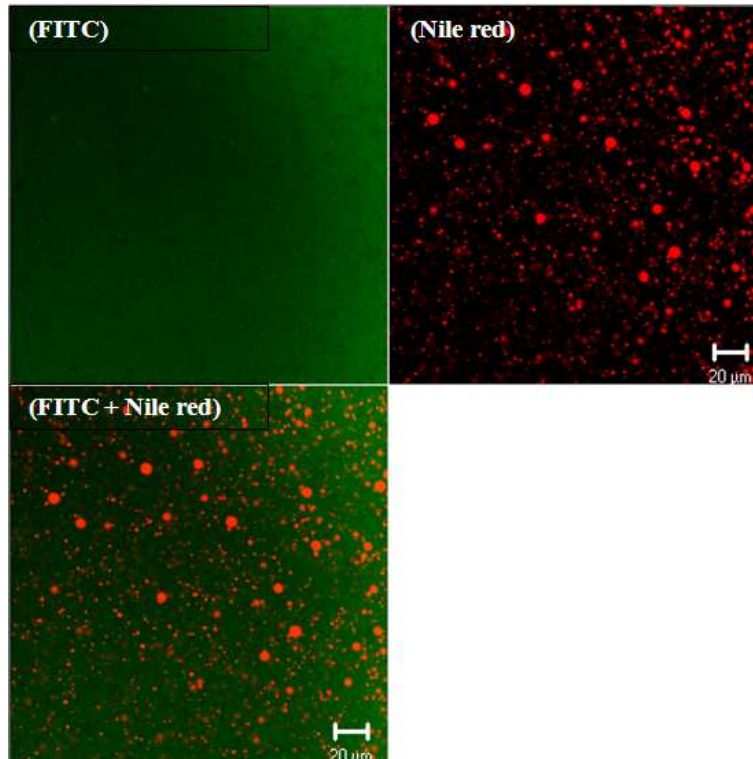


Fig. 20. CLSM images of microcapsule containing 100 μmol Nile red dissolved in perilla oil with 100 μmol FITC dissolved in wall materials (scale bar = 20 μm)

(다) FE-SEM 및 FIB를 이용한 미세캡슐 구조 분석 및 형상 관찰

- 들깨유 함유 미세캡슐 분말의 외형을 FE-SEM으로 분석한 결과 아래와 같이 나타났다. 아래 왼쪽은 분말이 제대로 형성된 형태이며, FIB를 이용하여 그 내부를 분석한 결과 오른쪽과 같이 중심물질을 확인하였다 (Fig. 21).

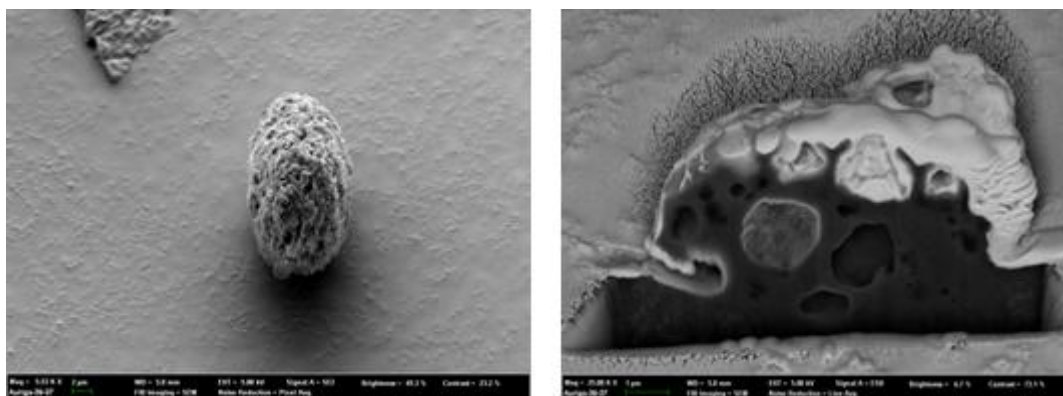


Fig. 21. Representative SEM images showing the outer morphology left and inner structure right of perilla containing microcapsules.

제 2 절. 기능성 지질 소재의 기능성 실증 실험 (제 1협동과제)

1. 들깨 추출물 (powder fat, 주성분)의 항암 면역조절활성 평가 (in vitro)

가. 1차년도

(1) 이론적, 실험적 접근방법

들깨 메탄올 추출물의 항돌연변이 활성(박동숙외, 2001), 들기름의 면역력 개선(Kweon MN et al, 1994), perilla frutescens의 apoptosis 유도효과(Lin CS et al, 2007) 등의 선행 연구결과들이 다수 보고되어져 있으나 본 연구에서 시도하고자 하는 내용과는 차별성이 있다. 본 연구에서는 *in vitro*계에서 U937세포(human histiocytic lymphoma), THP-1 (Human acute monocytic leukemia cell)세포 등 백혈병세포주를 이용하여 들깨 메탄올 추출물(들깨유)의 항암(세포상해활성) 활성을 MTTassay로 측정하고 apoptosis와 관련된 유전자 발현을 PCR assay로 검증하였다.

(2) 연구 내용

(가) 들깨추출물(들깨유)의 항암활성 검증 방법 (in vitro)

① 세포상해활성

MTT법에 의해 THP-1, U937세포 등 백혈병세포 배양계에 각 농도 (1~100 µg/ml)의 들깨추출물시료를 첨가하여 48시간 동안 37°C의 CO₂배양기 (5%-CO₂, 95%-air)내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml농도로 DPBS-A (pH 7.4)에 희석한 MTT용액 20 µl를 각 well에 첨가하고, 0.1N HCl에 녹인 10% SDS 100 µl로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다⁴⁾.

② RT-PCR (Reverse Transcription - PCR)

백혈병세포(1×10⁶세포/well)를 12well에 분주하고 들깨추출물시료를 농도별(1~100 µg/ml)로 처리하여 24시간 반응한 후, 세포로부터 Total RNA를 분리하여 p53, Bax, Bcl-xL등 항암 및 apoptosis관련 유전자를 확인하였다. Total RNA는 easy-BLUE를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다. cDNA는 Maxime RT PreMix (Oligo dT primer)를 사용하여 합성하고, Maxime RT PreMix (i-starTaq)를 이용하여 TaKaRa PCR thermocycler (DICE)에서 증폭하였다. PCR 산물은 1.3% agarose gel 상에서 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하여 확인하였다⁵⁾.

(3) 연구 결과 : 들깨 추출물(들깨유)의 항암효과 검증

들깨유 및 해바라기유의 항암효과를 검증하기 위하여 MTT assay를 이용하여 정상세포주를 배양하여 세포상해효과를 살펴본 결과, 정상세포인 293-T(신장상피세포주)세포에서의 세포상해효과는 관찰되지 않았다(Fig. 1.1). 이 결과는 들깨유 및 해바라기유가 정상세포에서는 세포독성이 없음을 의미하는 것이다.

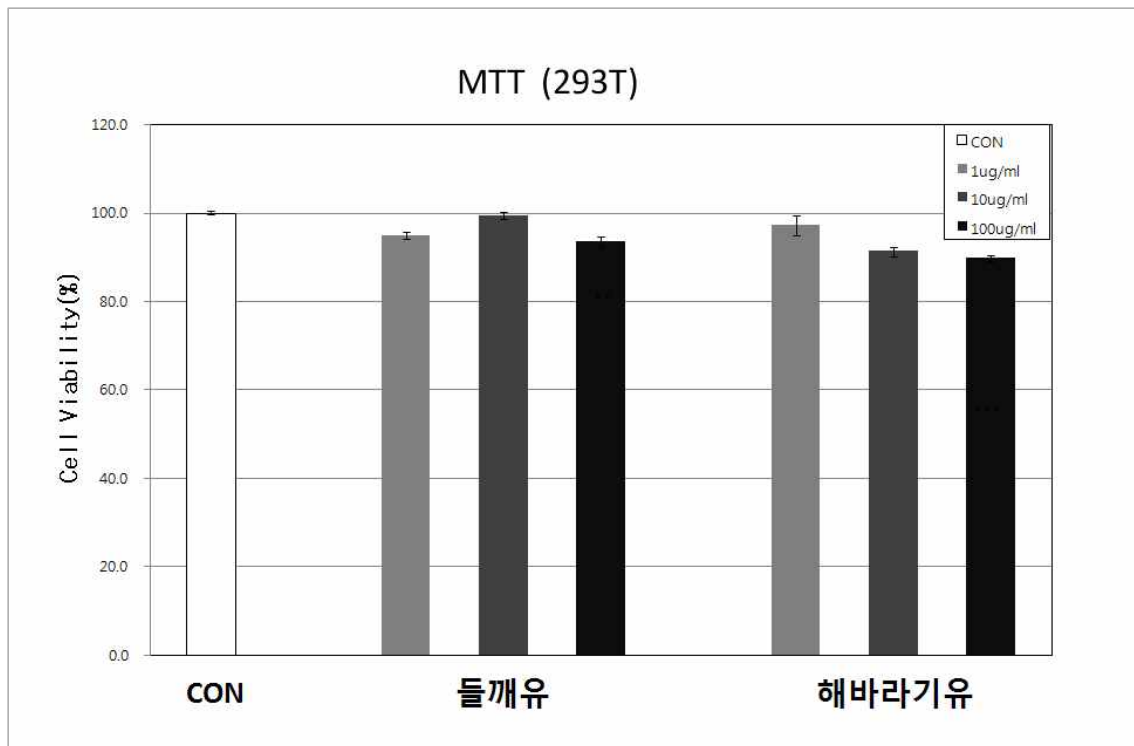
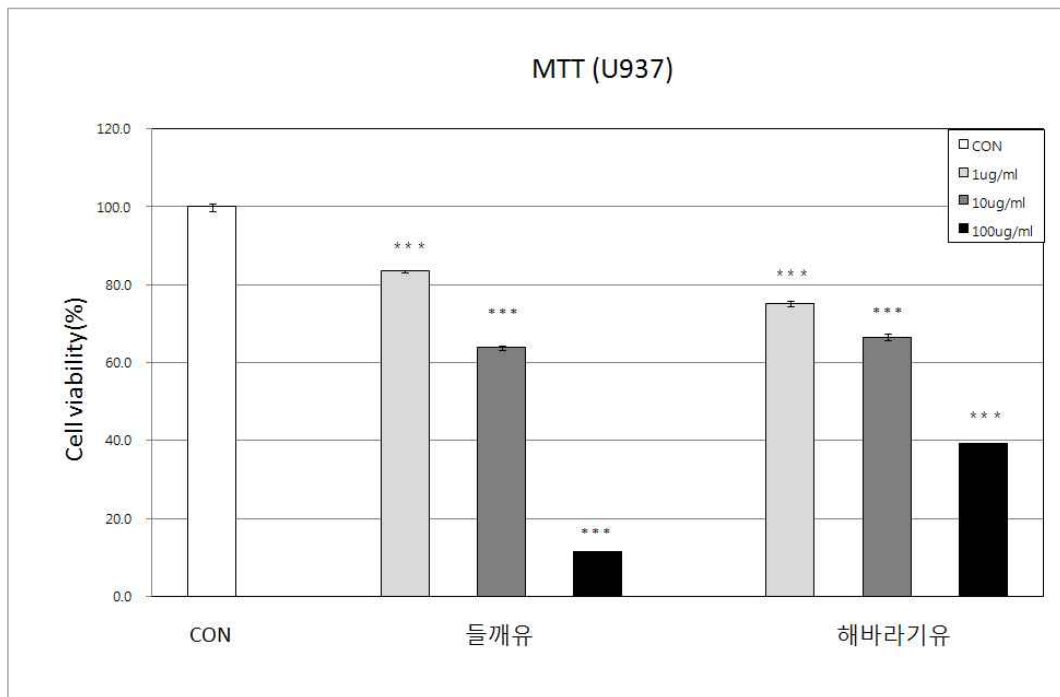


Fig.1.1 Cytotoxic effect of methanol extracts of perilla seed and sunflower oil in cultured 293-T cells

다음에는 U937(Human histiocytic lymphoma cell line)세포, THP-1 (Human acute monocytic leukemia cell line)세포 등 백혈병세포주를 이용하여 항암효과를 검증한 결과, 대조군인 해바라기유 추출물에 비하여 들깨 메탄올 추출물(들깨유)에서 농도의존적으로 세포상해작용을 나타내어 항암효과가 관찰되었다(Fig. 1.2).

(A)



(B)

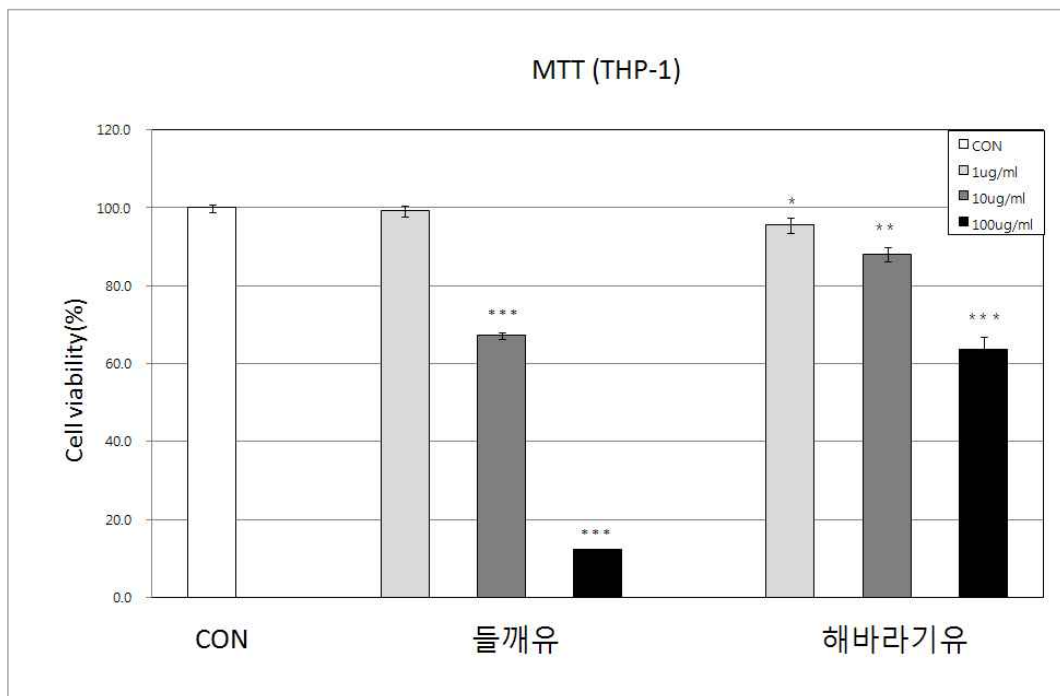


Fig.1.2 Cytotoxic effect of methanol extracts of perilla seed and sunflower oil in U937(A) and THP-1(B) leukemia cells

상기의 상해효과를 검증하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 항암 및 apoptosis관련 유전자 발현패턴으로 확인한 결과, 들깨 메탄올추출물(들깨유)이 p53(cancer inhibiting gene)과 Bax(pro-apoptosis gene)유전자의 발현을 증강시켰으며 이와 반대로 Bcl-xL(anti-apoptosis gene)유전자발현을 감소시켰다(Fig. 1.3).

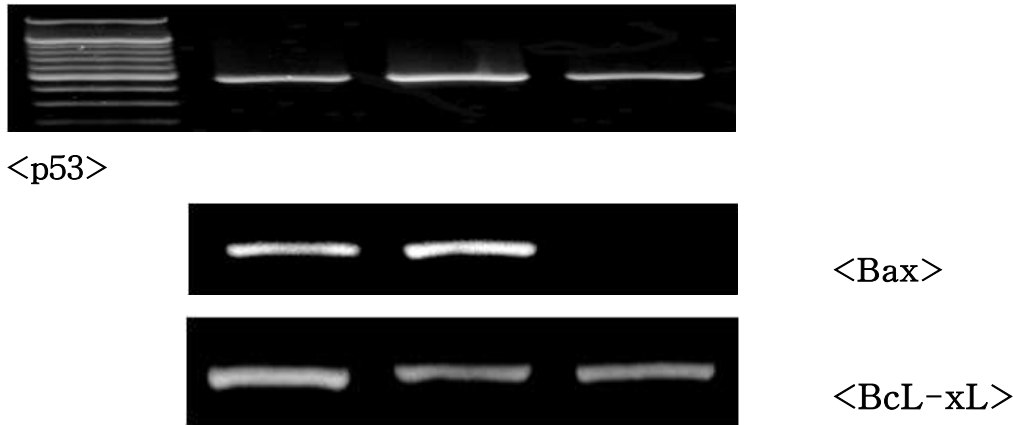


Fig.1.3 RT-PCR analysis of methanol extracts of perilla seed and sunflower oil in THP-1 leukemia cells

나. 2차년도

시료: 옥수수유(CO), 올리브유(OO), 콩기름(SBO), 해바라기유(SO), 분체들깨유(PO)

(1) 연구 내용

(가) 세포생존율(MTT assay)

계대배양중인 THP-1(human acute monocytic leukemia), B16F10 (mouse melanoma cells)세포를 96well plate에 $1 \sim 5 \times 10^4$ cells/well이 되도록 세포수를 조정함 다음, 옥수수유, 올리브유, 대두유, 해바라기유, 분체들깨유 시료($1 \sim 40 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 24시간 동안 37°C의 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 배양종료 4시간 전에 5mg/ml 농도로 PBS (pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20 μl 를 각 well에 처리하고, 0.1N HCl에 녹인 10% SDS 100 μl 로 용해시켜 18시간동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용하여 570nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다⁽⁴⁾.

(나) Apoptosis 관련 유전자 발현 (RT-PCR)

THP-1세포(3×10^6 cells/well)에 $1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시료를 첨가한 후, 24시간 동안 배양하고 RNA를 분리하였다. Total RNA 분리는 Trizol reagent를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다⁽⁵⁾. cDNA는 Prime Script™ II reverse transcriptase와 oligo dT primer로 이용하여 합성하였고, Taq DNA polymerase를 이용하여 Dice(Takara)에서 30 cycle동안 증폭하였

다. 각각의 cycle은 98°C에서 10초간 denaturation시킨 후, 55°C에서 30초간 annealing시키고, 72°C에서 30초간 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하고 LoadingSTAR(DYNE Bio Co.)로 염색하였다. PCR에 사용된 primer는 다음과 같다.: p53 sense(5'-CGC TGC TCA GAT AGC GAT GG-3'), p53 antisense(5'-TGG GGA GAG GAG CTG GTG TT-3'), Bax sense (5'-GAG TGT CTC AAG CGC ATC GG -3'), Bax antisense(5'-CAC CCA ACC ACC CTG GTC TT-3'), Bcl-2 sense(5'-ACG AGT GGG ATG CGG GAG AT-3'), Bcl-2 antisense(5'-TCC ACA GGG CGA TGT TGT CC-3').

(다) 단백질 분리 및 Western blot

THP-1세포(5×10^6 cells/well)에 $1 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 의 시료를 첨가한 후, 24시간 동안 배양하고 1% NP-40 lysis buffer를 사용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 Bradford 법을 이용해 정량한 후 well 당 $20 \mu\text{g}$ 씩 loading 한 후 10% acrylamide gel 을 통해 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동 후 PVDF membrane (0.2 μm)에 transfer를 한 다음 1시간 동안 5% skim milk로 blocking하였다. 각 1차 항체를 overnight반응(1:1000, 4°C)하고 TBS-T(0.05% Tween 20)으로 4회 세척하고 goat anti-rabbit IgG- HRP conjugated antibody(1:3000)을 1시간 동안 반응시켰다. 4회 세척 후 membrane을 ECL법을 이용해 암실에서 X-ray film에 감광시켰다⁽⁶⁾.

(라) 비장 및 흉선림프구의 아집단 변화 (in vivo)

BALB/c 생쥐에 시료를 4주간 경구투여하고 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 후, 비장 및 흉선세포 부유액을 조제하고 1×10^6 cells/well에 PE/FITC conjugated-anti B220 및 Thy1 monoclonal antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody(1:30)로 이중 염색하여 4°C에서 30분 동안 반응시키고 flow cytometer(excitation: 488nm, emission: 525nm/FITC, 575nm/PE)를 이용하여 림프구의 아집단을 측정하였다⁽⁷⁾.

(마) 전이억제 활성 (in vivo)

C57BL/6 생쥐에 B16F10 melanoma cells을 8×10^5 개/mice 로 정맥투여를 통해 주사하고, 시료를 2주간 경구투여하고 경추 탈구시켜 폐를 적출하여 4% formaldehyde 고정액에 고정시킨 후 현미경을 사용해 폐에 전이된 검은 colony의 개수를 측정하였다⁽⁸⁾.

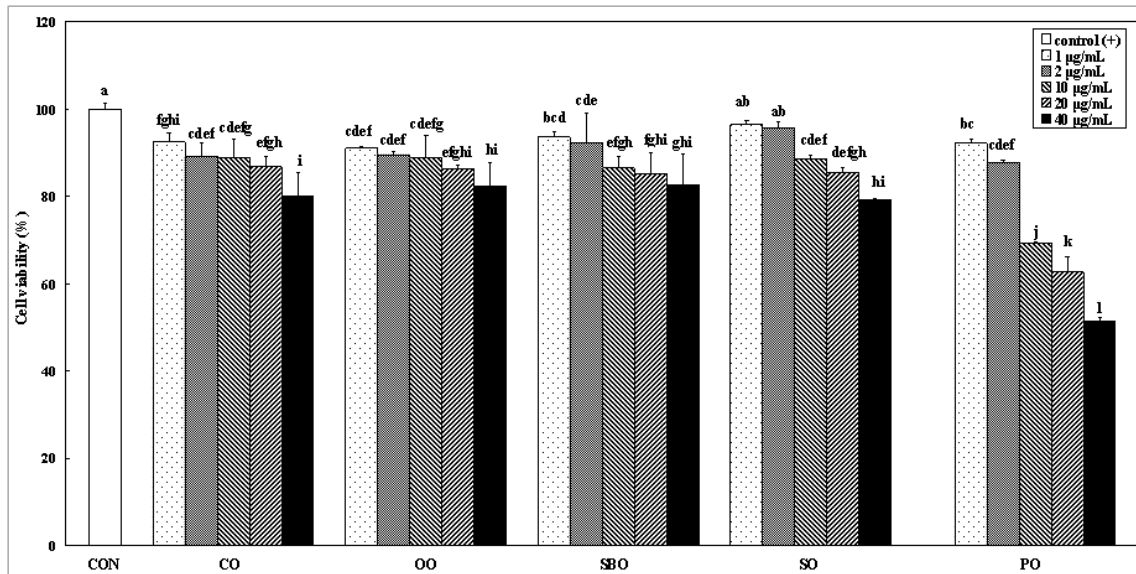
(바) 통계처리

통계처리는 student's t-test와 Duncan's test로 시행하였으며, $p < 0.05$ 이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

(2) 연구결과

(가) 세포생존율에 미치는 영향 (THP-1 cell line)

분체들깨유를 비롯해서 5가지 oil을 THP-1세포에 24시간동안 처리한 후 세포 생존율을 측정한 결과, 다른 oil에 비해 분체들깨유(PO)처리군이 유의적으로 세포생존율을 감소시켰다(Fig. 2.1).



CO; corn oil, OO; olive oil, SBO; soybean oil, SO; sunflower oil, PO; perilla oil

Fig.2.1 Effect of perilla seed oil on the cell viability in THP-1 cells

Samples(1~40µg/ml) were treated with cultured THP-1cells, and incubated for 24 hours, and the cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader.

The data represents the mean±SD of 3 experiments.

a-l; Data with different letters are significantly different with ANOVA followed by Duncan's multiple(p<0.05)

(나) 세포생존율에 미치는 영향 (B16F10 melanoma cell line)

B16F10 세포주에 해바라기유(SO)와 분체들깨유(PO)를 24시간동안 처리하고 세포생존율을 측정된 결과, SO에 비해 PO처리군이 농도의존적으로 현저하게 생존율이 감소되어 40µg/ml에서 10%이하로 감소하였다(Fig.2.2).

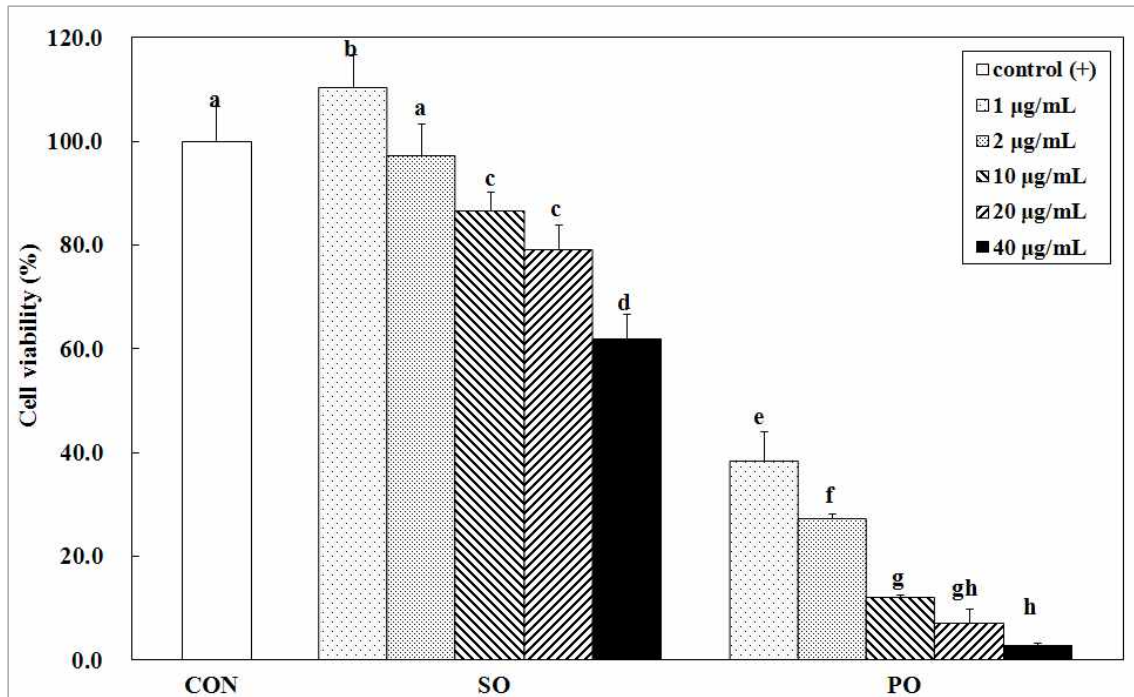


Fig. 2.2 Effect of perilla oil on the cell viability in cultured B16F10 melanoma cells
 Samples(1~40µg/ml) were treated with cultured B16F10 cells, and incubated for 24 hours, and the cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader.

The data represents the mean±SD of 3 experiments.

a-h; Data with different letters are significantly different with ANOVA followed by Duncan's multiple(p<0.05)

(다) 시료의 p53, Bcl-2, Bax 유전자발현에 미치는 영향

THP-1세포에 시료를 6시간동안 처리한 후 mRNA를 정제하고 표적 유전자를 확인한 결과, 종양억제유전자인 p53유전자는 PO 처리군에서 농도의존적으로 증가하였고, Bcl-2유전자는 농도의존적으로 감소하였으며, Bax유전자는 약하게 증가하였다(Fig. 2.3).

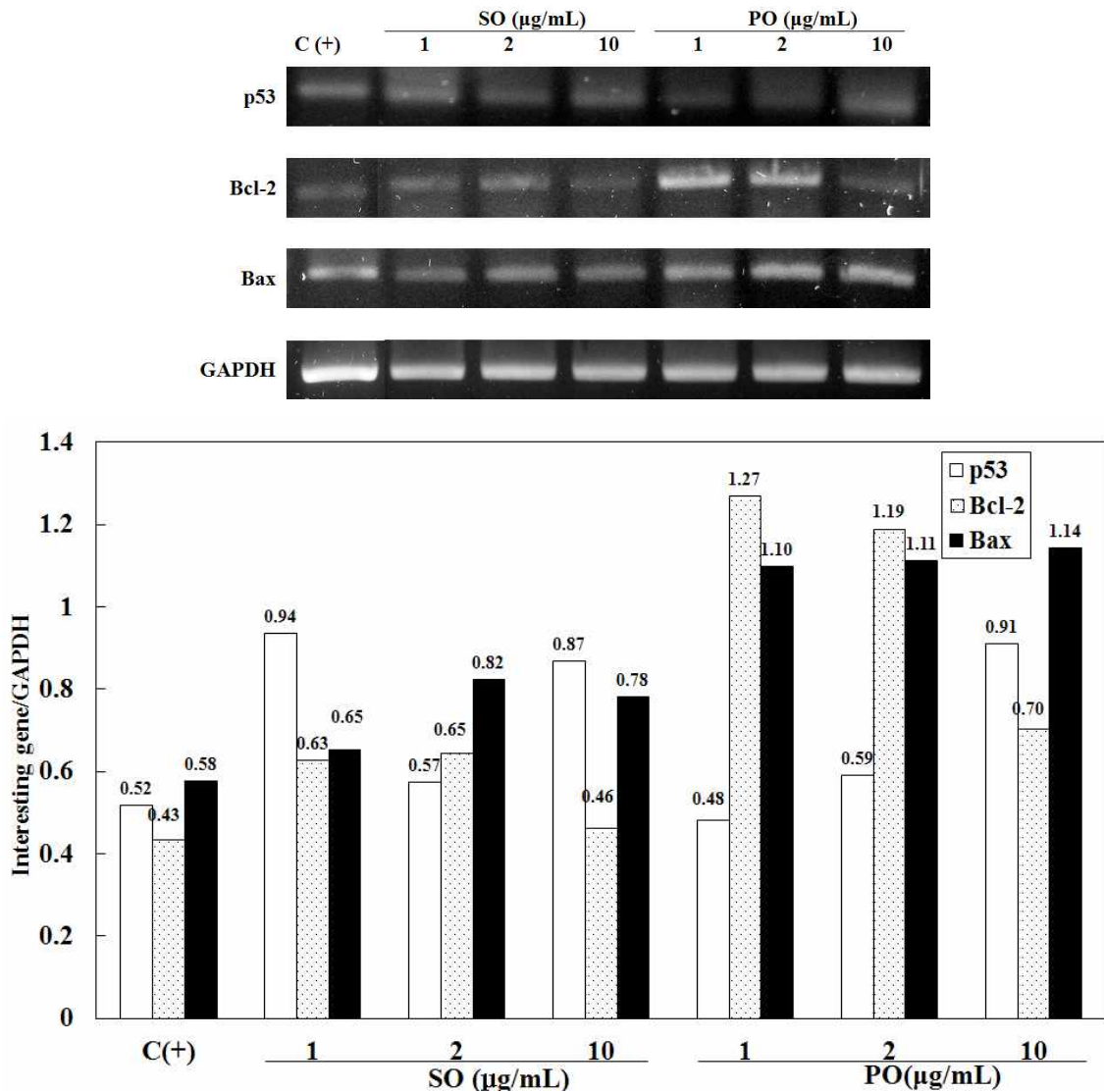


Fig. 2.3 Effect of perilla oil on p53, Bcl-2, and Bax gene expression in cultured THP-1 cells
 THP-1 cells were treated with the indicated concentration of samples for 6 hours. Total RNA was isolated, and p53, Bcl-2, Bax mRNA expression was determined by RT-PCR. (C (+) ; cell treated with 0.25% DMSO in PBS)

(라) 시료의 p53, Bcl-2, Bax 단백질에 미치는 영향

24시간동안 시료를 처리한 후 웨스턴 블로팅을 하여 apoptosis 관련 단백질을 분석한 결과, p53(tumor suppressor gene)단백질은 해바라기유(SO)처리군은 약하게 증가하였으나 분체들깨유(PO)처리군이 3배까지 증가하였다(10μg/ml). Bcl-2 (anti-apoptotic gene)유전자는 PO처리군에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보이고 Bax(pro-apoptotic gene)는 약하게 증가하였다(Fig. 2.4).

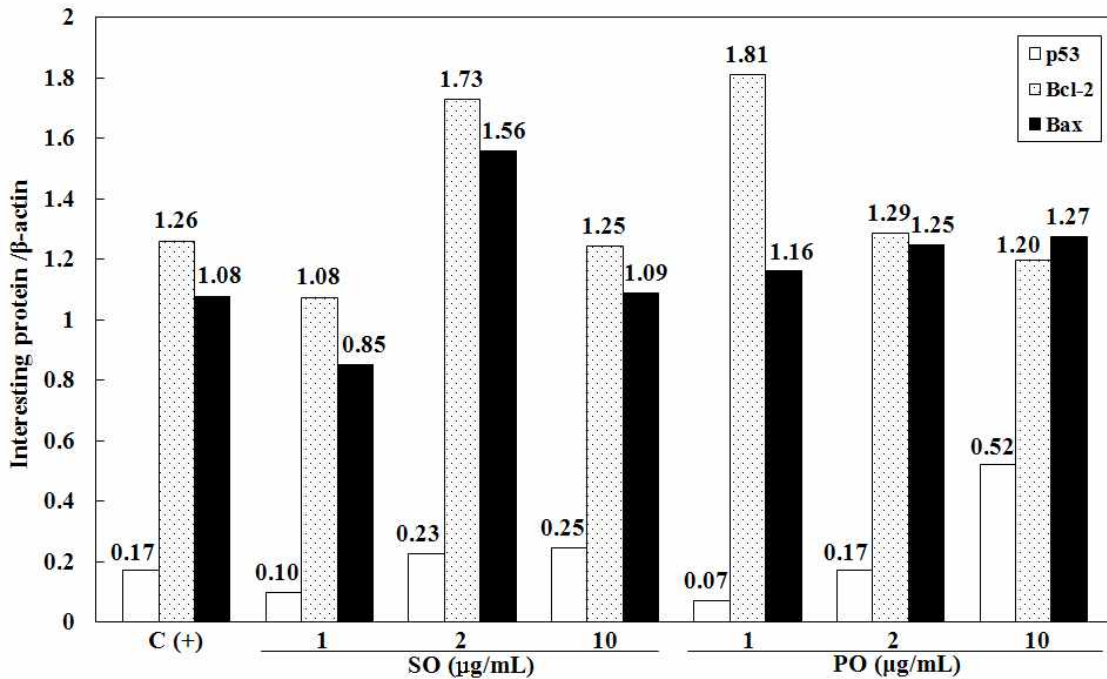
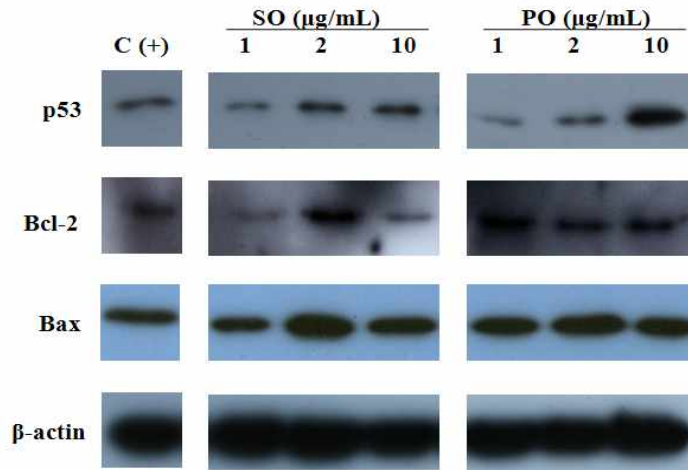
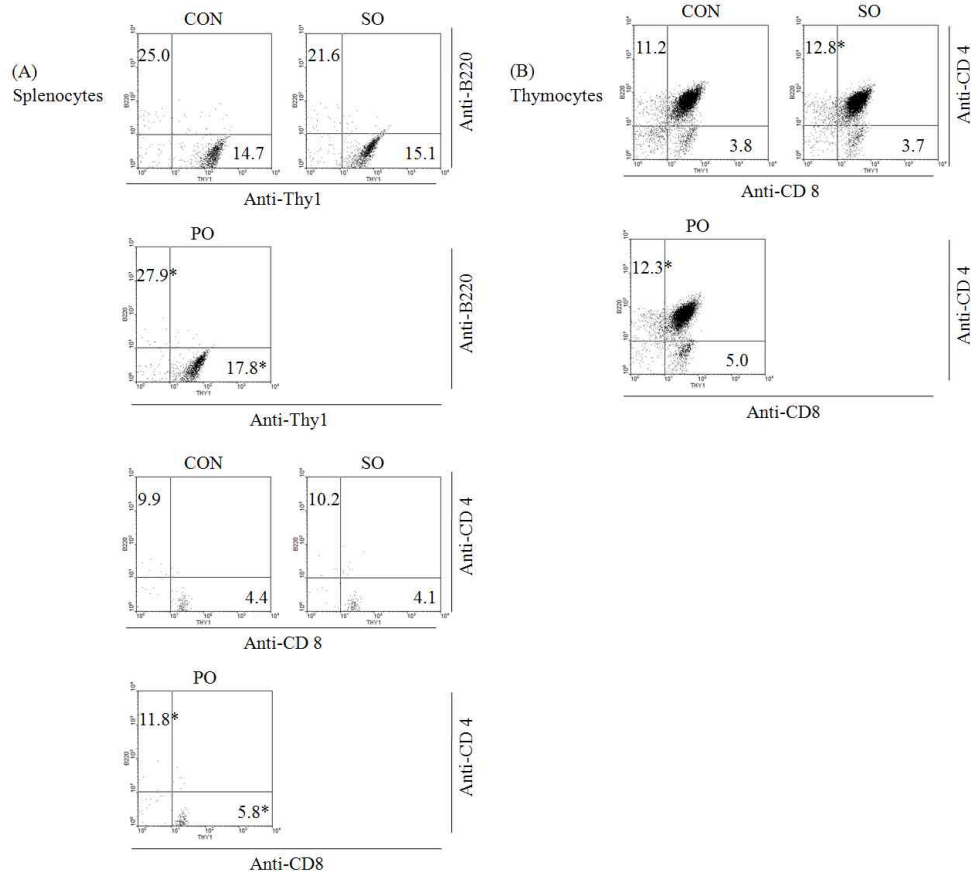


Fig. 2.4 Effect of perilla oil on p53, Bcl-2, and Bax protein expression in cultured THP-1 cells

THP-1 cells were treated with the indicated concentration of samples for 24 hours. p53, Bcl-2, Bax and β-actin were assayed by Western blotting using specific antibodies. (C (+) ; cell treated with 0.25% DMSO in PBS)

(마) 면역세포 아집단에 미치는 영향

BALB/c 생쥐에 시료를 4주간 경구투여 한 후 비장 및 흉선의 면역세포 아집단을 측정된 결과, 비장에서 B세포가 들깨유(PO)투여군에서 11.6% 증가하였고 T세포는 약 22%, 그 중에서 T_H 가 19.2%, T_C 가 31.8% 증가하였으며 흉선에서는 T_H 가 10%, T_C 세포가 31.6% 증가하였다(Fig. 2.5). 이 결과는 들깨유가 면역세포인 T(T_H , T_C), B세포의 활성을 증강시키는 효과가 있음을 의미한다.



Cell type \ Treat	Splenocytes (%)			Thymocytes(%)	
	B cells	T cells		TH cells	Tc cells
		TH cells	Tc cells		
CON	25.0±0.5	14.7±0.8		11.2±0.4	3.8±0.1
SO	21.6±0.7	9.9±0.1	4.4±0.1	12.8±0.5	3.7±0.3
PO	27.9±1.0*	10.2±0.9	4.1±0.5	12.3±0.3*	5.0±0.7
		11.8±0.2*	5.8±0.3*		

Fig. 2.5 Effects of perilla oil on the lymphocytes subpopulation change in mouse splenocytes and thymocytes *in vivo*

Oils was administered p.o. once a day for 28 days (SO, PO; 10 ml/kg/day p.o.), thereafter cells were collected and the lymphocytes subpopulation was measured by a flow cytometer staining with PE or FITC conjugated anti B220/Thy1 or anti CD4/CD8 monoclonal antibody. The data represents the mean ± SD of 3 mice.

(A) splenocytes (B) thymocytes.

*: significantly different from control group (p<0.05)

(바) 암세포 폐 전이 억제에 미치는 영향

B16F10 세포주를 미정맥주사 후 2주간 시료를 경구투여 한 후 폐조직을 절제하여 현미경

으로 관찰하면서 melanoma가 전이된 colony의 개수를 측정하였다. 그 결과, 해바라기유 (SO)도 50%이상 억제되었으나, 분체들깨유가 더 유의적으로 전이가 억제되었다(Fig. 2.6).

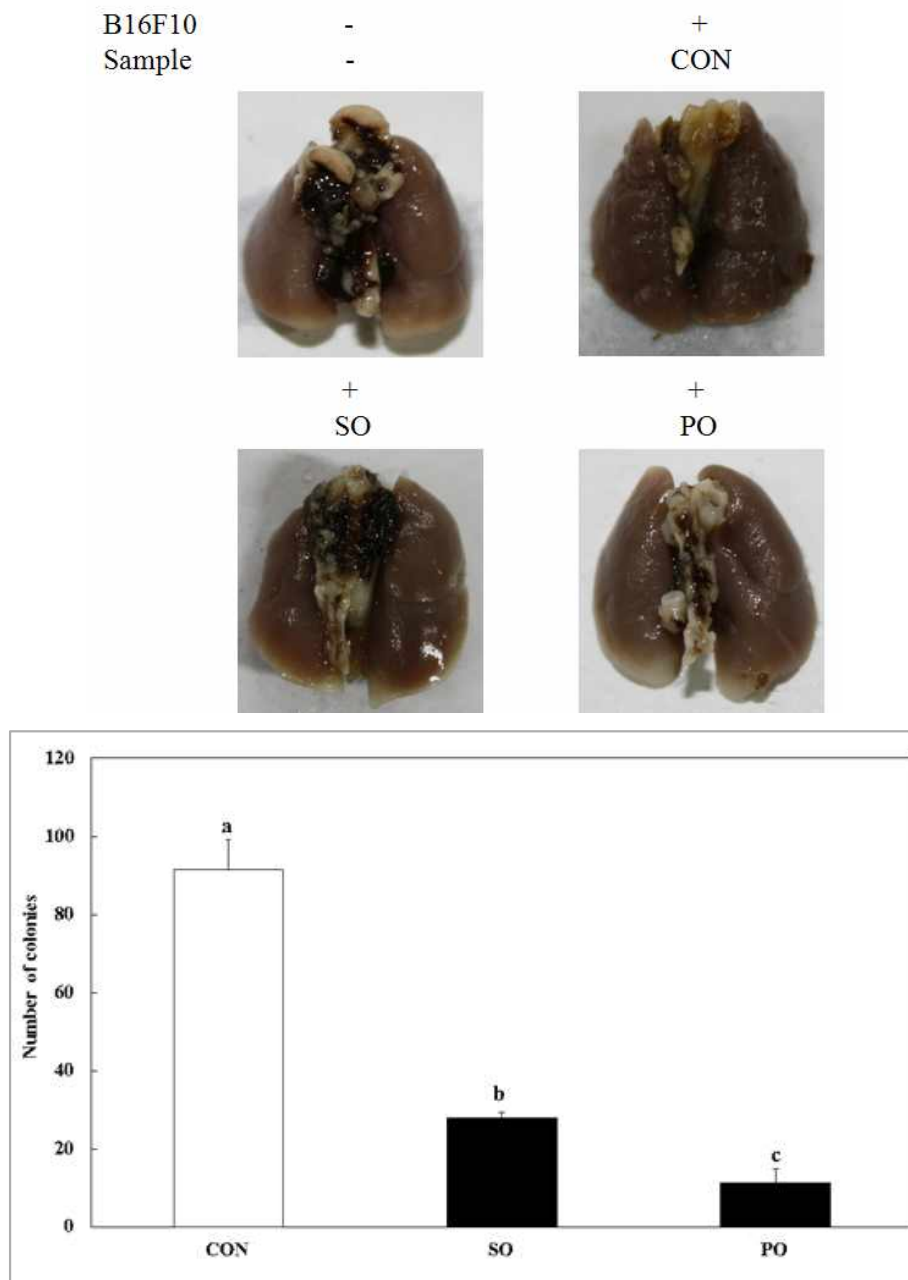


Fig. 2.6 Effects of perilla oil on lung metastasis in C57BL/6 mice

Lungs were photographed and observed for any metastasis on the 21th day after i.v. of B16F10 melanoma cells with or without oils (SO, PO; 10 ml/kg/day p.o.). a-c; Data with different letters are significantly different with ANOVA followed by Duncan's multiple ($p < 0.05$).

2. 들깨 추출물(유화유지(PE), 들깨유(PO) 및 시제품(PP)에 대한 항암 면역조절활성 평가

가. 3차년도

(1) 시료 : 들깨추출물-유화유지(PE), 들깨유(PO) 및 시제품(PP)

(2) 연구방법

(가) 세포생존율(MTT assay)

계대배양중인 MOLT-4(human acute T lymphoblastic leukemia), THP-1(human acute monocytic leukemia), HL60(human acute promyelocytic leukemia), U937(human monocyte like histiocytic lymphoma)세포를 96well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 세포수를 조정 한 다음, PE(유화유지), PP(시제품), PO(들깨유)시료(1~100 μ g/ml)를 첨가하여 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 배양종료 4시간 전에 5mg/ml 농도로 PBS (pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 처리하고, 0.1N HCl에 녹인 10% SDS 100 μ l로 용해시켜 18시간동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다⁽⁴⁾.

(나) RT-PCR(Reverse Transcription-PCR)

MOLT4세포(3×10^6 cells/well)에 1~100 μ g/ml 의 시료를 첨가한 후, 24시간 동안 배양하고 RNA를 분리하였다. Total RNA 분리는 Trizol reagent를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다⁽⁵⁾. cDNA는 Prime Script™ II reverse transcriptase와 oligo dT primer로 이용하여 합성하였고, Taq DNA polymerase를 이용하여 Dice(Takara)에서 30 cycle동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 98 $^{\circ}$ C에서 10초간 denaturation 시킨 후, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing 시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동 하고 LoadingSTAR(DYNE Bio Co.)로 염색하였다. PCR에 사용된 primer는 다음과 같다.: Bax sense (5'-GAG TGT CTC AAG CGC ATC GG -3'), Bax antisense(5'-CAC CCA ACC ACC CTG GTC TT-3'), Bcl-2 sense(5'-ACG AGT GGG ATG CGG GAG AT-3'), Bcl-2 antisense(5'-TCC ACA GGG CGA TGT TGT CC-3'), PCNA sense(5'-GTC CAG GGC TCC ATC CTC AA-3'), PCNA antisense(5'-CAG GGT GAG CTG CAC CAA AG-3').

(다) 단백질 분리 및 웨스턴 블로팅

MOLT4세포(5×10^6 cells/well)에 1~100 μ g/ml 의 시료를 첨가한 후, 24시간 동안 배양하고 1% NP-40 lysis buffer를 사용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 bradford법을 이용해 정량한 후, well 당 20 μ g씩 loading 한 후 10% acrylamide gel 을 통해 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동 후 PVDF membrane (0.2 μ m)에 transfer를 한 다음 1시간 동안 5% skim milk로 blocking하였다. 그 후 각 1차 항체를 overnight반응(1:1000, 4 $^{\circ}$ C)하고 TBS-T(0.05% Tween 20)으로 4회 세척하고 goat anti-rabbit IgG-HRP conjugated

antibody(1:3000)을 1시간 동안 반응시켰다. 4회 세척 후 membrane을 ECL법을 이용해 암실에서 X-ray film에 감광시켰다⁽⁶⁾.

(라) 비장 및 흉선림프구의 아집단의 측정

BALB/c 생쥐에 시료를 4주간 경구투여하고 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출 한 후, 비장 및 흉선세포 부유액을 조제하고 1×10^6 cells/well에 PE/FITC conjugated-anti B220 및 Thy1 monoclonal antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody(1:30 dilution)로 이중 염색하여 4°C에서 30분 동안 반응시키고 flow cytometer(excitation: 488nm, emission: 525nm/FITC, 575nm/PE)를 이용하여 림프구의 아집단을 측정하였다⁽⁷⁾.

(마) 혈청 림포카인(IL-2, IL-4)의 측정

① IL-2의 측정

IL-2의 측정은 sandwich ELISA 방법으로 혈청 내 IL-2의 농도를 측정하였다⁽⁸⁾. $4 \mu\text{g/ml}$ 농도로 0.1M phosphate buffer(pH 9.0)에 희석한 anti-mouse IFN- γ antibody를 96well microplate에 각 well당 $100 \mu\text{l}$ 씩 코팅하여 4°C에서 24 시간 동안 반응시켜 흡착시켰다. 그 후 PBS로 3회 세척하고, 1% BSA-PBS를 각 well당 $150 \mu\text{l}$ 씩 가하여 실온에서 1시간동안 blocking을 하고 PBS로 3회 세척하였다. 1% BSA-PBS로 희석한 혈청시료와 표준용액(recombinant mouse IL-2)를 각 well당 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣어 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 그 후 $2 \mu\text{g/ml}$ 농도로 1% BSA-PBS에 희석한 biotinylated anti-mouse IL-2 antibody를 각 well당 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 3회 세척하고 $2 \mu\text{g/ml}$ 농도로 희석한 streptavidin-alkaline phosphatase를 각 well당 $100 \mu\text{l}$ 가하고 다시 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 PBS로 5회 세척한 후 p-nitrophenyl phosphate용액을 각 well당 $100 \mu\text{l}$ 씩 가하고 실온 차광하에서 발색반응을 시켰다. 약 30분 후 $50 \mu\text{l}$ 의 2N H_2SO_4 용액으로 반응을 정지시키고, 30분 내에 ELISA reader로 450nm파장에서 흡광도를 측정 비교하였다.

② IL-4 의 측정

IL-4 측정은 IL-2의 측정방법에 준하였다.

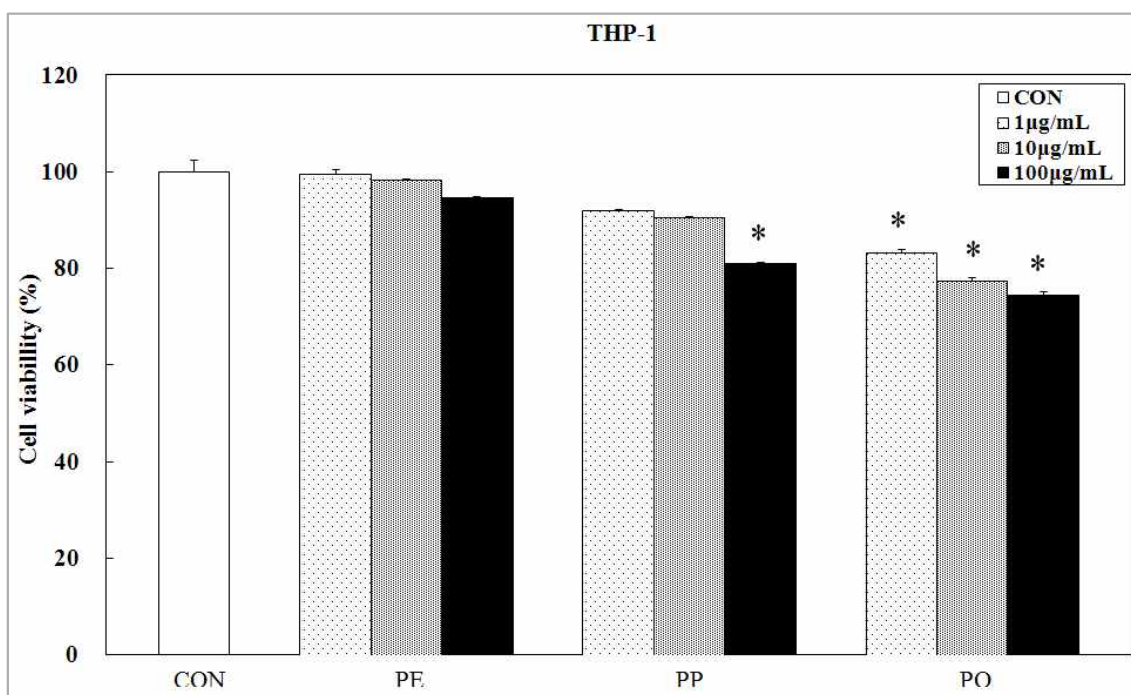
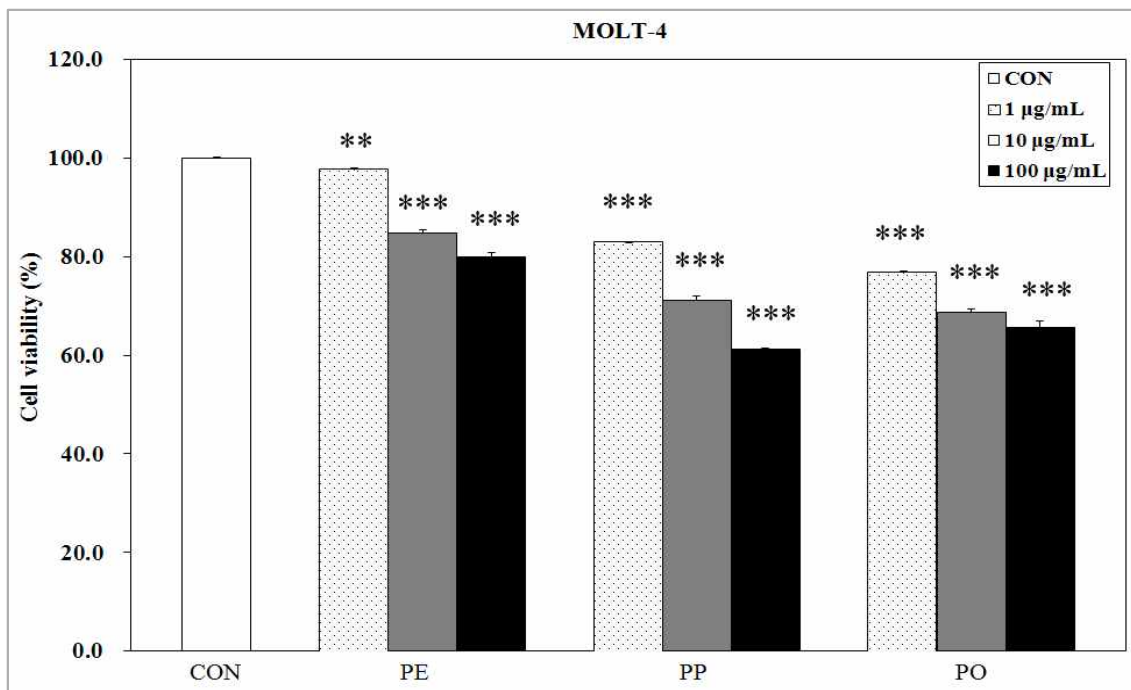
(바) 통계처리

통계처리는 student's t-test로 하였으며, $p < 0.05$ 이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

(3) 연구결과

(가) 세포생존율에 미치는 영향 (MOLT-4, THP-1, HL60, U937 cell line)

MOLT4, THP-1, HL60, U937 4가지 백혈병세포주에 시료를 여러 가지 농도($1 \sim 100 \mu\text{g/ml}$)로 처리한 결과, 전반적으로 들깨유(PO)가 가장 세포생존율을 감소효과가 우수하였으며 그 중에서 MOLT4세포에서는 들깨유와 비슷하게 시제품(PP)처리군에서도 세포생존율을 감소시켰다(Fig. 3.1).



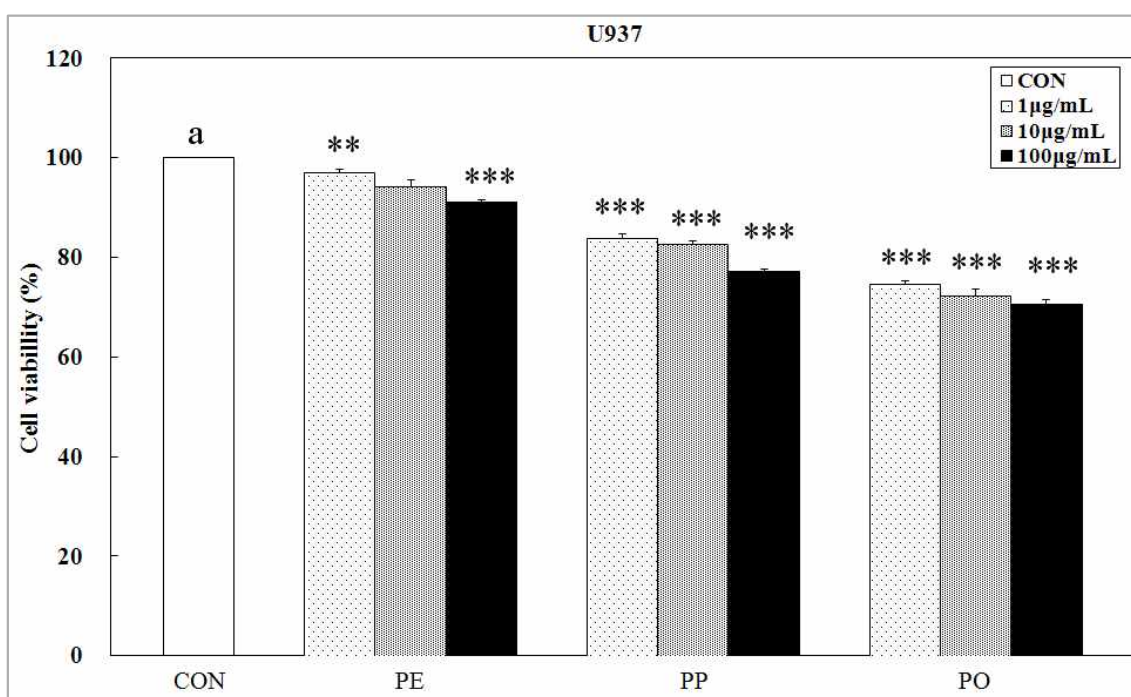
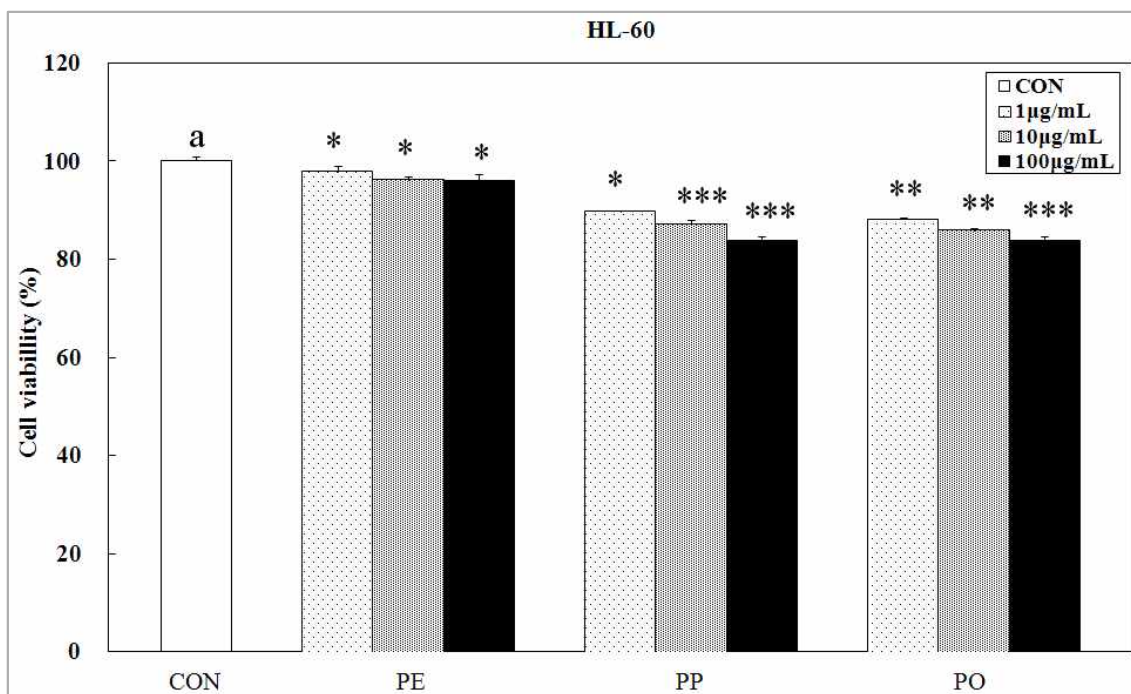


Fig. 3.1 Effect of PE and PP on the cell viability in cultured various leukemia cells. Samples (1~100 µg/ml) were treated with cultured MOLT4, THP-1, HL60, and U937 leukemia cells, and incubated for 24 hours, and the cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. The data represents the mean±SD of 3 experiments. *; Significantly different from control group (*p<0.05)

(나) apoptosis관련 유전자 발현에 미치는 영향 (Bcl-2, Bax, PCNA 유전자)

MOLT4 세포주에 시료를 각각 1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하여 apoptosis 관련 유전자의 mRNA 발현 양상을 확인한 결과, Bcl-2 (anti-apoptotic gene) 유전자는 유효유지(PE)처리군에서는 오히려 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 증가하였으나 시제품(PP)처리군에서는 농도의존적으로 감소하였고 Bax (pro-apoptotic gene) 유전자는 시제품처리군에서 2배이상(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)까지 증가하였다. PCNA 유전자는 시제품 처리군에서 농도의존적으로 감소하였으나 대조군에 비해 감소하지는 않았다(Fig. 3.2).

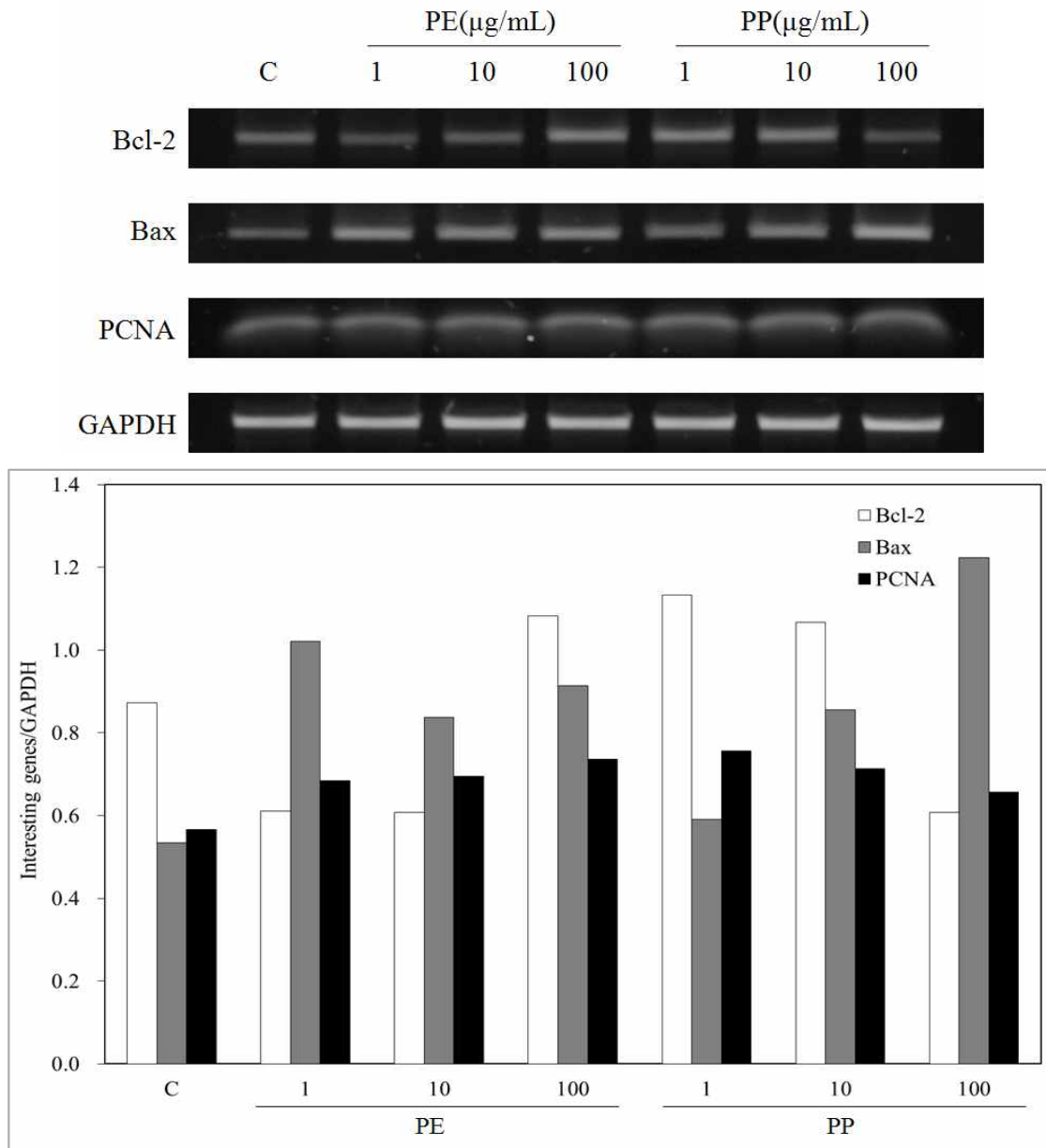


Fig. 3.2 Effect of PE and PP on the Bcl-2, Bax, and PCNA gene expression in MOLT-4 cells. MOLT4 cells were treated with the indicated concentration of samples for 24 hours. Total RNA was isolated, and Bcl-2, Bax, PCNA mRNA expression was determined by RT-PCR.

(다) 단백질발현에 미치는 영향 (Bcl-2, Bax, PCNA)

MOLT4 세포주에 시료를 각각 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 씩 24시간동안 처리하여 apoptosis 관련 단백질 발현양상을 확인한 결과, RT-PCR 결과와 동일하게 Bcl-2은 유화유지(PE)와 달리 시제품 처리군(PP)에서 농도의존적으로 감소하였고 Bax는 시제품 처리군에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 25%이상 증가하였다. 그리고 PCNA(증식세포핵항원)는 시제품 처리군에서 약간 감소하였으나 유의성을 보이지 않았다(Fig. 3.3).

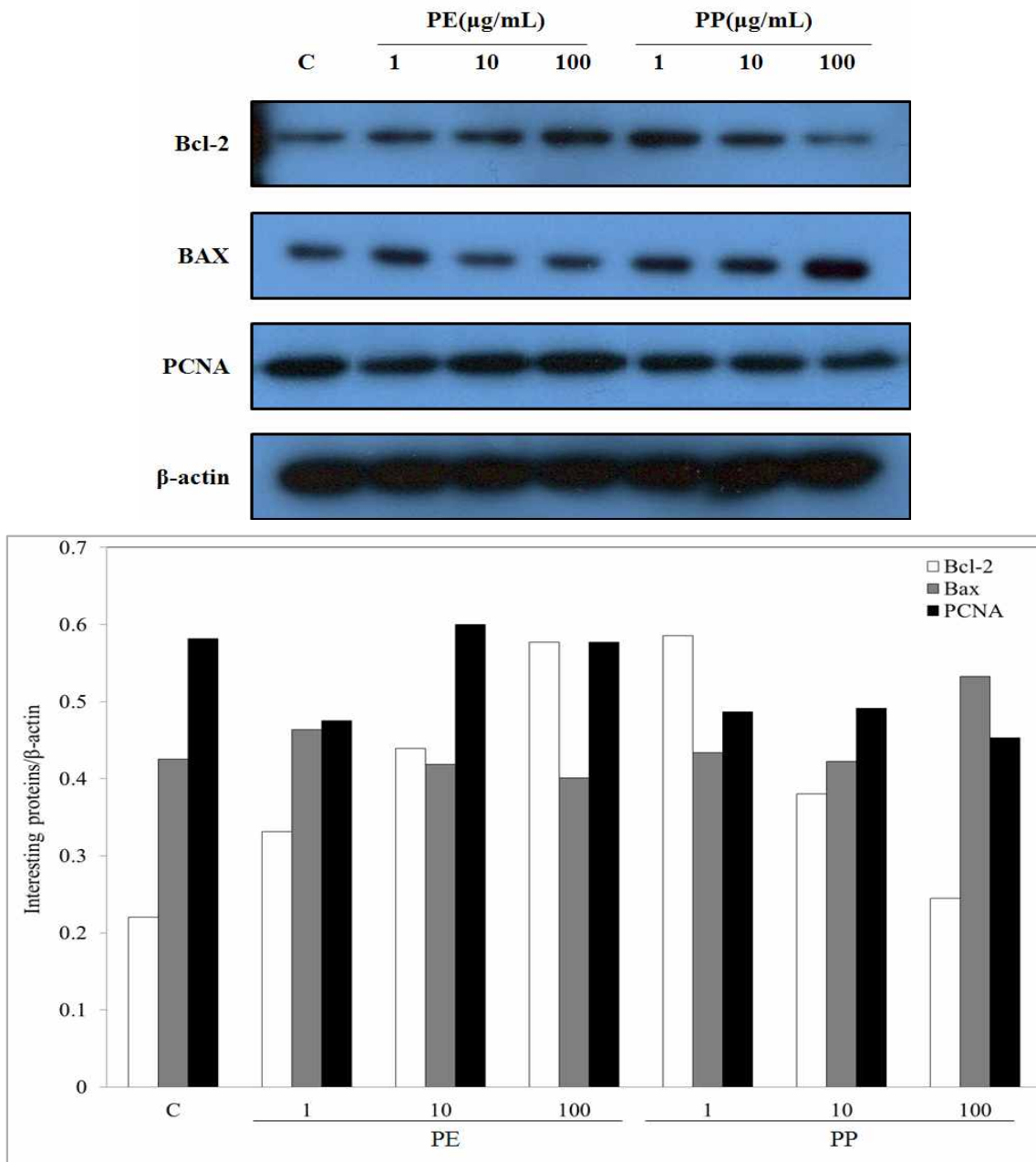


Fig. 3.3 Effect of PE and PP on the Bcl-2, Bax, and PCNA protein expression in MOLT4 cells. MOLT4 cells were treated with the indicated concentration of samples for 24 hours. Bcl-2, Bax, and PCNA protein was assayed by western blotting using specific antibodies.

(라) 면역세포 아집단에 미치는 영향

BALB/c 생쥐에 유화유지와 시제품을 4주간 경구투여 후 비장과 흉선의 면역세포 아집단을 측정 한 결과, 비장에서 B세포는 유화유지(PE)투여군이 49%, 시제품(PP)투여군에서 63% 증가하였고, T세포는 PE 투여군이 23.7 %, PP투여군이 31% 증가하였다(Table 3.1).

Table 3.1 Effect of PE and PP on the lymphocytes subpopulation change in mouse splenocytes and thymocytes (*in vivo*)

Cell type Treat	Splenocytes(%)			Thymocytes(%)	
	B cells	T cells		TH	TC
		TH	TC		
CON	20.0±0.8	11.4±2.6		7.6±0.4	5.2±0.5
		10.0±0.2	4.1±0.6		
PE	29.8±1.2*	14.1±0.9		7.5±0.3	5.3±0.1
		11.8±0.5*	5.7±0.2*		
PP	32.6±1.1*	15.0±0.5		7.7±0.5	5.6±0.7
		10.5±0.3	5.0±0.8		

Samples(500 mg/kg) were administered p.o. once a day for 28 days, thereafter the cells were collected and the subpopulation was measure by a flow cytometer staining with PE or FITC conjugated anti-B220/Thy1 or anti-CD4/CD8 monoclonal antibody.

The data represents the mean±SD of 5 mice.

*; Significantly different from control group(*p<0.05)

(마) 혈청 lymphokine(IL-2, IL-4)의 생성에 미치는 효과

BALB/c 생쥐에 유화유지와 시제품을 4주간 경구투여 후, 혈청을 분리한 후 IL-2, IL-4 생성량을 측정 한 결과, IL-2는 유화유지(PE)투여군에서 417%, 시제품(PP)투여군에서 54.5% 증가하였고, IL-4는 PE투여군이 66%감소, PP투여군이 22.4% 감소하였다(Table 3.2). 이 결과는 특히 PE가 면역력을 탁월하게 증강시키는 효과가 있음을 의미한다.

Table3.2 Lymphokine production in PE and PP administered mice serum

(unit:pg/ml)

Lymphokine Treat	IL-2	IL-4
	CON	8.8±1.2
PE	45.5±5.2*	23.2±1.8*
PP	13.6±2.3*	53.1±3.5

Samples(500mg/kg) were administered p.o. once a day for 28 days, and the collected serum was assayed lymphokine with ELISA kit.

The data represents the mean±SD of 5 mouse.

* ; Significantly different from control group (*p<0.05)

3. 들깨 추출물의 지질저하 및 항동맥경화 효과 평가 (위탁과제 1)

가. 재료 및 방법

(1) 들깨추출물의 산화스트레스개선 효과 및 혈전용해 효과 검증 (1차년도, in vitro)

In vitro에서 DPPH, Superoxide anion, Hydroxyl radical 에 대한 소거능 등을 측정하여 들깨 추출물(들기름)의 유리기 소거 작용을 통한 산화스트레스 개선 효과를 확인하고, Fibrin plate를 이용하여 들깨추출물(들깨유 추출물)의 혈전용해 활성을 검증하고자 하였다.

(가) 들깨추출물(들기름) 중의 Phenolic compound 추출

① 70% 메탄올을 이용한 페놀성분의 추출

Oil 중의 페놀성분을 추출하고자 70% methanol 을 사용하였다. 500mL hexane에 용해된 100g의 들깨유를 70% methanol로 3번에 걸쳐 진탕 추출하였다 (Fig. 1). 얻어진 70% 메탄올층은 vacuum rotary evaporator을 사용하여 40℃에서 건조시켰다. 이렇게 얻어진 메탄올 추출물은 적절한 농도로 methanol에 녹여 -20℃에서 보관하였다. 대조군으로 사용된 참기름과 해바라기유 역시 동일한 방법으로 추출하여 보관하였다 .

② 추출물 중의 총 페놀함량 측정

추출물의 총 페놀함량은 Folin-Ciocalteu법에 따라 행하였다. 즉, 1mg/mL의 들기름, 참기름, 해바라기유 메탄올 추출물 0.2mL에 2.6mL의 증류수, 0.2mL의 Folin-Ciocalteu 시약을 넣고 6분 후에 2mL의 7% Na₂CO₃를 추가하여 90분간 반응시켜 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tannic acid(Sigma, USA)를 사용하였다.

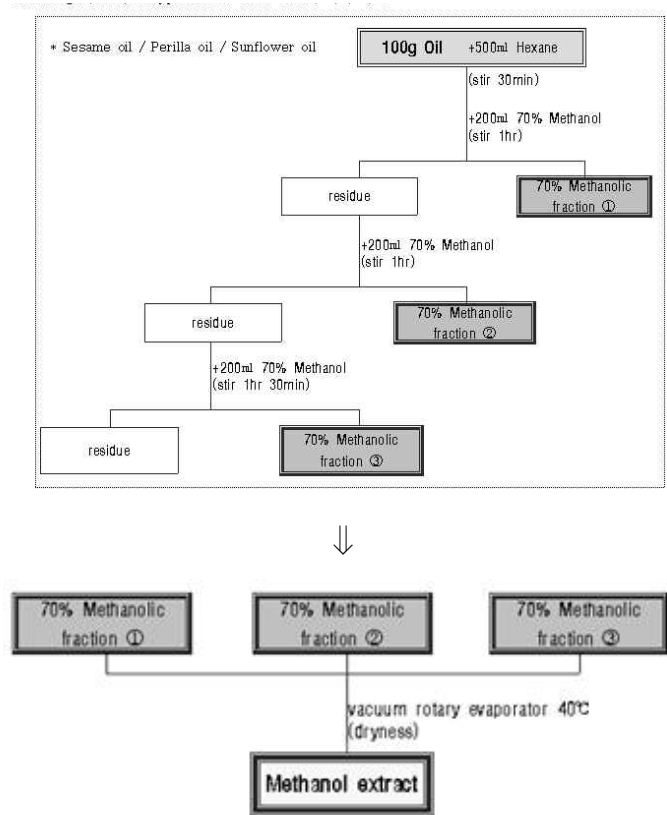


Fig. 1. Preparation of 70% methanol extract from oil.

(나) 들깨추출물의 유리기 소거 효과 검증

① Oil과 Oil 메탄올 추출물의 DPPH 소거 활성 측정

들기름 자체(Total fraction)와 메탄올 추출물(ME)의 DPPH소거능은 Hanato 등 (1989)의 방법에 따라 Microplate reader (Model 680 Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories UK Ltd)를 사용하여 측정하였고, 대조군으로 참기름과 해바라기유 및 각 기름의 메탄올 추출물을 사용하였다. 기름의 DPPH 소거능을 측정은 Iso-octane에 농도별로 용해시킨 메탄올 추출물 100 μ L와 60 μ M 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)를 96well에 넣은 후 혼합하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다 (Lee JM et al.,2007). 메탄올 추출물의 DPPH 소거능은 시료와 DPPH의 용매로 95% 메탄올을 이용하여 동일한 방법으로 수행하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 DPPH 소거능을 백분율(%)로 나타내었으며 IC50 (radical 생성을 50%로 억제하는데 필요로 하는 시료농도) 값을 계산하였다.

② Superoxide anion 소거능

메탄올 추출물 400 μ L에 100 μ M xanthine 400 μ L, 600 uM nitrobluetetrazolium (NBT) 400 μ L, 0.05 U/mL xanthine oxidase 400 μ L, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 400 μ L을 첨가하여(총 2.0mL) 37°C에서 10분간 배양하였다. 이 혼합액을 96 well plate에 넣은 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Robak J et al., 1988). 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교

하여 superoxide anion 소거효과를 백분율 (%)로 나타내었다.

③ Hydroxyl radical 소거능

메탄올 추출물을 1.4 mL에 H₂O₂가 2가 철 이온과 반응하여 수산화 라디칼을 생성하는 Fenton 반응에 따라 10 mM FeSO₄ · 7H₂O-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 200 μL에 10 mM deoxyribose solution 200 μL와 혼합한 다음, 10 mM H₂O₂ 200 mL를 첨가하여 37°C water bath에서 4시간 동안 배양하였다. 이 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid (TCA)와 1.0% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 각각 1 mL씩 첨가하여 10분간 끓인 후 냉각하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Chung SK et al., 1997). 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 hydroxyl radical 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다.

(다) 들깨 추출물의 혈전 용해 효과 검증 방법

① Fibrin 배지의 준비

Fibrin 분해활성은 Astrup 등 (1952)의 fibrin plate method(피브린 평판법)을 응용하여 사용하였다. 10mM 인산완충 용액(pH 7.8, 0.15M NaCl)으로 10mL의 0.6% human fibrinogen(Sigma)과 10mL의 2% agarose를 만들어 혼합하고, 동일한 완충용액에 녹인 100NIH thrombin 0.1mL를 이용하여 fibrinogen이 fibrin으로 서서히 굳어지게 하였다. 제조한 plate는 실온에서 30분간 방치한 후 실험에 사용하였다.

② Fibrin 분해활성 측정

각 들기름, 참기름, 해바라기유 추출물의 fibrin 분해 활성을 측정하기 위하여 미리 제조된 피브린 배지에 시료 50μl를 떨어뜨려 37°C에서 18시간동안 배양한 후 각 시료의 분해된 면적을 측정하였다. 대조구로서는 정제된 혈전용해효소인 plasmin(0.5U/mL)을 사용하였고, 각 시료의 fibrin 분해활성은 형성된 plasmin의 투명환을 100% 혈전용해 활성으로 표시하고, plasmin의 분해면적에 비례하여 plasmin에 대한 상대 활성값(%)으로 표시하였다.

(2) 분체들깨유의 동물실험을 통한 지질저하 기능성 검증 (2차년도, in vivo)

n-3계 지방산을 함유한 들깨유(perilla oil)의 지질저하, 항동맥경화 효과를 검증하고자 동맥경화 유발 형질전환 모델인 apolipoproteinE knockout(apoE ko) mice에 첨가 유지의 종류를 달리한 고콜레스테롤-고지방 동맥경화유발 식이를 10주 동안 공급하여 유지급원에 따른 차이를 알아보기로 하였다. Perilla oil에 대한 대조군으로 주요 구성 지방산이 linoleic acid(n-6)인 해바라기유와 n-9계 MUFA와 SFAs로 구성된 lard를 사용하였다. 또한 들깨유를 미세캡슐화하여 제조한 분체들깨유(Microencapsulated perilla oil, MPO)에 대한 실험군도 설정하여 새로운 지질소재의 효과를 알아보려고 하였다.

(가) 동물사육 및 식이제조

① 식이제조

본 실험의 동맥경화유발식이(Atherogenic diet, AD)는 Paigen's Atherogenic Rodent Diet (Paigen B et al., 1987)를 바탕으로 1.25% cholesterol과 16% fat을 함유하는 것을 기본으로 하였고, 이 때 첨가하는 fat의 종류에 따라 4가지 실험식이(Lard, Perilla, Sunflower, MPO)

를 제조하였다 (Table 1). 모든 실험식은 4.2 kcal/g의 열량을 가지며 carbohydrate, protein, fat으로 공급되는 열량비가 45, 20, 35% 로 구성되도록 하였다. MPO식이의 경우 분체들깨유의 formula 에 따라 식이의 기본조성을 조정하여 조성 및 에너지 함량이 동일하도록 조정하였다 (Table 2). 실험식은 일주일 간격으로 제조하여 -20℃ 에서 냉동 보관하였고 이틀마다 교체하여 신선한 식이를 공급하였다.

Table 1. Diet used for the experiment (g)

Ingredient	Lard	Perilla	Sunflower	MPO
Corn Starch	42.5	42.5	42.5	27.5
Maltodextrin				2.1
물엿, HLB10,...				12.9
Sucrose	5.3	5.3	5.3	5.3
Cellulose	9.0	9.0	9.0	9.0
Casein	7.5	7.5	7.5	6.2
Sodium Casenate				1.3
soy protein	13.0	13.0	13.0	13.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Lard	10.0			
Perilla oil		10.0		6.0
Sunflower oil			10.0	
경화유				4.0
Cocoa Butter	4.0	4.0	4.0	4.0
Coconut Oil, 76	2.0	2.0	2.0	2.0
Mineral Mix	3.5	3.5	3.5	3.3
K ₂ HPO ₄				0.2
Vitamin Mix	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline Bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	1.25	1.25	1.25	1.25
Sodium Cholic Acid	0.5	0.5	0.5	0.5
Total	100.1	100.1	100.1	100.2

* Invariant basal fat source: cocoa butter (57-64% SFAs, 29-43% MUFAs, 0-5% PUFAs), coconut oil (92.1% SFAs, 6.2% MUFAs, 1.6% PUFAs).

Table 2. Formula of microencapsulated perilla oil (MPO)

Formula	% in MPO	
Perilla oil	24.35	Fat
Hydrogenated oil	16.24	
Corn syrup	49.14	Carbohydrate
Polyglycerol HLB10	0.23	
Almax 1000	2.89	
Sodium stearoyl lactate	0.23	
Sodium caseinate	5.43	Protein
K ₂ HPO ₄	0.69	Mineral
Water	0.80	Water

② 동물 사육

C57BL/6 strain의 생후 6주령 wild type(10 마리)과 apoE ko type (41 마리)의 SPF mouse를 Japan SLC Inc. (Hamamatsu, Japan)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 실내온도 23 ± 1°C, 12 hr light-dark cycle(07:00 ~ 19:00) 조건에서 Chow diet와 물을 충분히 공급하며 일주일간 환경에 적응시켰다. 적응기를 거친 마우스는 무작위로 배치하여 군당 평균 체중이 비슷하도록 총 6군(WT 2군 + apoE ko 4군)으로 나누어 10주간 각 실험식이와 식수를 자유롭게 섭취하도록 하였다 (Table 3). 또한 실험기간 동안 일주일에 한번 같은 시간에 체중을 측정하였으며 이 때 측정 두 시간 전 식이를 제한하여 식이섭취로 인한 갑작스러운 체중증가를 막았다. The animal protocol used in this study has been reviewed by the Pusan National University - Institutional Animal Care and Use Committee (PNU-IACUC) on their ethical procedures and scientific care, and it has been approved (Approval Number PNU-2010-00031).

Table 3. Experimental group

Mouse model	Exp. diet	N	the major fatty acids
Wild type	Lard	5	
	Perilla	5	
ApoE-ko	Lard	9	Oleic acid(n-9 MUFA) 44 - 47%, SFAs 38-43%
	Perilla	9	α-linolenic acid (n-3 PUFA) 50-60%
	Sunflower	9	Linoleic acid(n-6 PUFA) 48-74%
	MPO	7	Perilla oil + hydrogenated oil, 40.59%

C57BL/6 strain (Wild type, Apolipoprotein knockout type) male mice.

③ 희생 및 시료수집

실험식이 공급 10주 후, 마우스를 12시간 절식시키고 zolazepam, tiletamine 혼합물

(Zoletil 50, 30 mg/kg)과 xylazine (Rumpun, 10 mg/kg)을 복강주사하여 마취하여 복부를 절개하여 하대정맥(inferior vena cava)에서 채혈하였다. 혈액은 3.8% tri-sodium citrate tube에 채취하여 3000 rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리였으며, 얻어진 혈장은 -80°C에 보관하였다. 채혈 후 PBS 관류하여 장기 내 혈액을 제거하였고 간, 신장, 비장, 고환, 뇌를 적출하여 여과지로 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 장기의 일부는 10% formalin 용액에 고정하여 형태학적 분석을 위한 시료로 사용하였고 나머지는 -80°C에 보관하였다.

(나) 장기에 미치는 독성 검사: Plasma AST/ALT 및 BUN-E, creatinine 측정

혈중 AST/ALT 농도는 Reitman-Frank법을 이용한 분석 kit(AM101-K, Asan pharm.)를 사용하여 측정하였으며, BUN-E 및 creatinine 농도는 Urease-Indophenol법을 이용한 kit(AM165-K, Asan pharm.) 및 Jaffe법을 이용한 labassay creatinine kit(no.290-65901, Wako Inc.)을 사용하여 측정하였다.

(다) 지질저하 효과 및 동맥경화 지수 확인

① 혈중 지질농도 분석 및 동맥경화 지수

혈장 내 total cholesterol(AM202-K), triglyceride(AM157S-K), 그리고 HDL-C(AM203-K) 농도는 효소법을 이용한 정량용 kit(Asan pharm., Korea)를 사용하여 측정하였고 (Allain CC et al.,1974; McGowan MW et al.,1983), LDL-C는 Friedwald법 [LDLC=총 콜레스테롤 - (HDL-C+중성지방/5)]에 의해 계산하였다 (Friedewald WT et al., 1972). 동맥경화 지수는 Cardiac Risk Ratio(CRR)=TC/HDL-C, Atherogenic Coefficient(AC)=(TC-HDL-C)/HDL-C, Atherogenic Index of Plasma(AIP)=log(TG/HDL-C)로 계산하였다 (Tan MH et al.,2004;Grover SA et al.,1999).

② 간 및 뇌 조직 중 TG, TC 농도 측정

간과 뇌 조직 중의 지질은 지질추출 용매(choloroform : methanol, 2:1)을 사용하여 Folch 법(1957)에 따라 추출하였으며, 이를 TG, TC 분석 kit (Asan pharm., Korea)를 사용하여 정량하였다.

(라) 간과 뇌의 지질과산화물 생성 확인: 과산화지질 농도 측정

조직 중의 과산화지질 농도는 Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)법을 이용하여 측정하였다 (Uchiyama M et al., 1978). 즉, 조직 균질액과 0.67% TBA, 0.1% phosphoric acid를 90~100°C water bath 에서 45분간 반응시킨 후 얼음에서 식히고 n-butanol을 첨가하여 3,000rpm 에서 10분간 원심분리하였다. 이 상등액의 흡광도를 540 nm에서 측정하였으며, 시료중의 TBARS의 농도는 표준곡선으로부터 MDA의 nmol로서 나타내었다.

(마) 혈액 중 혈전 용해능 (fibrinolytic activity) 측정

혈전용해능은 fibrin plate법을 이용하여 측정하였다 (Barrios M et al., 2009). 즉, 50 uL 혈장을 0.9 mL의 0.017% acetic acid와 혼합하여 20분 동안 ice에서 incubation하였다. 이것을 4°C에서 원심분리(3,000rpm, 15분)하여 상층액을 제거하고 얻은 침전물(euglobulin

fraction)을 50 uL의 0.05M Tris buffer, pH 7.4에 재부유하였다. Fibrin plate는 3-cm diameter 페트리디쉬에서 Imidazole saline buffer, pH 7.4에 용해시킨 0.1% plasminogen-rich fibrinogen 1.5mL에 75 uL bovine thrombin (10 IU/mL in 0.025 M CaCl₂)을 혼합하여 상온에서 굳혔다. 15 uL의 euglobulin 용액을 fibrin plate에 점적하고 37°C에서 24시간동안 반응시킨 후 용해된 fibrin의 양을 측정하였다. 각 시료의 활성은 plasmin의 fibrin 분해정도에 비례하여 plasmin의 활성(plasmin units/mL)으로 나타내었다.

(바) 항 동맥경화 효과 확인

① Oil red O staining을 이용한 동맥궁의 지질 침착 정도 확인

동맥궁의 지질침착 정도를 알아보기 위하여 Oil red O 염색을 한 후 지방병변의 단면적을 측정하였다. 해부 후 동맥을 관류 후 10% formalin에 고정된 심장을 OCT compound 포매하여 4 um으로 연속적으로 section하였고 제작된 슬라이드를 Oil red O를 이용하여 염색하였으며 hematoxylin을 대비염색제로 사용하였다. 염색된 지방병변은 광학현미경 (Olympus CH30, x40)으로 관찰하여 DMC advance image software를 사용하여 면적계산 하였다.

② Immunohistochemistry(IHC)를 이용한 동맥 내 단백질 발현 분석

동맥의 혈관부착인자 (ICAM-1, VCAM-1)와 nitric oxide 생성 효소 (eNOS, iNOS)의 발현은 면역조직화학 (immunohistochemistry, IHC)반응을 이용하여 확인하였다 (Leal S et al., 2006). ICAM-1의 분석에는 4 um 동결절편을, VCAM-1 및 eNOS, iNOS의 분석에는 6 um 파라핀 절편을 사용하였으며, 사용된 1차 항체는 anti-mouse ICAM-1 monoclonal antibody (ab25375, Abcam, UK), anti-VCAM-1 polyclonal antibody (sc-1504, Santa Cruz, USA), anti-iNOS monoclonal antibody (sc-7271, Santa Cruz, USA) 및 anti-eNOS monoclonal antibody (sc-654, Santa Cruz, USA)였다. 1차/2차 antibody와 반응시킨 조직절편은 diaminobenzidine (DAB substrate-chromogen solution, DAKO, USA)로 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하여 갈색으로 발색된 단백질 발현을 MIRAX MIDI slide scanner (Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 관찰하였다.

(사) 조직학적 분석을 통한 간의 지질침착 및 뇌 손상 정도 확인

① Oil red O 염색을 통한 간 조직의 steatosis 측정

간의 지방 침착의 조직학적 분석을 위해 담낭이 위치해 있는 중간 엽의 간을 시료로 사용하였다. 조직을 4 um 두께로 동결 절편하여 Oil Red O 용액으로 염색하였다. 제작한 슬라이드는 광학현미경 하에서 관찰하였으며 x100배 촬영하여 분석에 사용하였다. 침착 정도는 Photoshop 7.0.1으로 분석하여 총 면적에 대한 %로 나타내었다.

② Morphometrical analysis of the brain (hippocampus)

적출된 뇌 조직은 관상 면으로 6~7um 두께로 절삭하여 hematoxylin-eosin염색을 하여 광학전자 현미경으로 뇌손상 정도를 관찰하였다. 전방 뇌손상은 대뇌피질과 선조체에서, 후방 뇌손상은 대뇌피질, 시상, 해마부분을 관찰하였으며, 이를 Towfighi등(1991)의 방법에 의해 채점하여 합산하였다 (Table 4).

Table 4. Grading for brain damage degree

Grade	Degree of damage
0	Normal or 10% of cells are damaged
1	10~90% cells are damaged
2	More than 90% of cells are damaged

(아) Statistical analysis

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, SAS program(ver. 9.2)를 이용하여 ANOVA 시행 후 $\alpha=0.05$ 에서 Duncan's multiple range test에 의하여 실험군 평균치 간의 유의성을 검증하였다. 또한 Wild type 마우스에서 Lard와 perilla군의 유의성은 student t-test(Microsoft Excel 2007)를 이용하여 검증하였다.

(3) 유화들깨 기름의 항동맥 경화 기능성 확인 (3차년도, 동물실험)

선행 연구 결과 항동맥경화 효과가 있는 들깨유로 공동 연구팀인 농심(주)에서 제품을 개발하기 위하여 들깨유의 가공적성을 고려한 분말들깨유(encapsulated perilla oil)와 유화 들깨유 (emulsified perilla oil, EPO)를 제조하였다. 분말들깨유의 지질저하 효과를 동물실험에서 실시한 결과(2차년도) 바람직한 결과를 얻지 못하여 3차년도에 유화 들깨유를 개발하였고, 이를 본 연구팀에서 제공받아 이의 항동맥경화 효과를 Apo E KO mouse에서 검증하였다.

(가) 식이제조 및 동물사육

① 실험식이 조성 및 제조

실험에 사용한 유화들깨유의 조성은 Table 5와 같다. 본 실험의 동맥경화유발식이 (Atherogenic diet, AD)는 Paigen's Atherogenic Rodent Diet를 바탕으로 1.25% cholesterol 과 13.76% fat을 함유하는 것을 기본으로 하였고, 이 때 첨가하는 fat의 종류에 따라 3가지 실험식이(Lard, Perilla, EPO)를 제조하였다. Lard와 Perilla oil 실험식은 3.96 kcal/g의 열량을 가지며 emulsified perilla oil 실험식은 3.73 kcal/g의 열량을 가지고 carbohydrate, protein, fat으로 공급되는 열량비가 18.21, 50.27, 31.52% 로 구성되도록 하였다 (Table 6). 실험식은 일주일 간격으로 제조하여 -20℃ 에서 냉동 보관하였고 매일 교체하여 신선한 식이를 공급하였다.

② 동물 구입 및 사육

C57BL/6 strain의 apoE-ko type (18수)의 SPF mouse를 Japan SLC Inc. (Hamamatsu, Japan)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 실내온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 hr light-dark cycle(08:30 ~ 20:30) 조건에서 Chow diet와 물을 충분히 공급하며 일주일간 환경에 적응시켰다. 적응기를 거친 마우스는 무작위로 배치하여 군당 평균 체중이 비슷하도록 총 3군으로 나누었고 개별 케이지에서 10주간 실험식과 식수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 10주의 실험기간 동안 일주일에 한번 같은 시간에 체중을 측정하였다. The animal protocol used in this study has been reviewed by the Pusan National University - Institutional Animal Care and Use

Committee (PNU-IACUC) on their ethical procedures and scientific care, and it has been approved (Approval Number PNU-2011-000294).

Table 5. Formula of emulsified perilla oil

Formula	배합비 (% EPO)
Perilla oil	30
Pentaglycerol myristic acid	3.75
Oligosaccharide	48.25
Water	18

Table 6. Diet used for the experiment

Ingredient (%)	Lard	Perilla	EPO
Casein	6.45	6.45	6.45
Soy protein	11.17	11.17	11.17
DL-Methionine	0.26	0.26	0.26
Corn Starch	36.53	36.53	36.53
Sucrose	4.56	4.56	4.56
Cellulose	7.74	7.74	7.74
oligosaccharide	13.82	13.82	13.82
Lard	8.60	-	-
Perilla oil	-	8.60	8.60
Cocoa butter	3.44	3.44	3.44
Coconut oil	1.72	1.72	1.72
Mineral mix	3.01	3.01	3.01
Vitamin mix	0.86	0.86	0.86
Choline bitartrate	0.17	0.17	0.17
Cholesterol	1.25	1.25	1.25
Sodium cholic acid	0.43	0.43	0.43

③ 희생 및 시료수집

실험식이 공급 10주 후, 마우스를 12시간 절식시키고 zolazepam, tiletamine 혼합물 (Zoletil 50, 30 mg/kg)과 xylazine (Rumpun, 10 mg/kg)을 복강주사하여 마취시키고 복부를 절개하여 하대정맥(inferior vena cava)에서 채혈하였다. 혈액은 3.8% tri-sodium citrate tube에 채취하여 3000 rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리였으며, 얻어진 혈장은 -80°C에 보관하였다. 채혈 후 PBS 관류하여 장기 내 혈액을 제거하였고 간, 신장, 비장, 고환, 뇌를 적출하여 여과지로 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 심장과 동맥 일부는 10% formalin 용액에 고정하여 형태학적 분석을 위한 시료로 사용하였고 나머지는 -80°C에 보관하였다.

(나) 지질 저하 효과 및 동맥경화 지수 확인

앞선 동물실험에서 기술한 방법으로 동일하게 수행하였다.

(다) 혈장 피브리린 분해능 확인

앞선 동물실험에서 기술한 방법으로 동일하게 수행하였다.

(라) 동맥궁의 지질침착정도 측정을 통한 항동맥경화 효과 확인

앞선 동물실험에서 기술한 방법으로 동일하게 수행하였다.

(마) 간독성 검사

앞선 동물실험에서 기술한 방법으로 동일하게 수행하였다.

(바) Statistical analysis

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, PASW statistics를 이용하여 one-way ANOVA (analysis of variance) 시행 후 α=0.05 에서 Duncan's multiple range test에 의하여 실험군 평균치 간의 유의성을 검정하였다.

(4) 임상실험을 통한 들깨유 첨가 죽의 지질저하 기능성 검증 (3차년도, pilot scale human study)

앞선 동물실험에서 효과가 검증된 유화 들깨유로 제조한 들깨죽의 효과를 검증하기 위하여 20명의 건강한 피험자를 모집하여 31일간 임상 실험을 실시하였다. 즉, 시험군 10명은 들깨죽을 대조군 10명은 흰죽을 하루에 한끼 섭취하였다. 흰죽과 들깨죽로 제공된 칼로리는 동일하게 하였으며, 죽은 아침 식사로 섭취하게 하였다. 모든 피험자들이 죽 섭취 시 반찬을 최소한, 즉 배추김치와 깍두기로 제한하도록 교육을 하였다 (Table 9).

(가) 들깨죽 및 흰죽 레시피

본 연구는 공동 연구팀인 농심(주)에서 유화제조한 흰죽 및 들깨죽을 임상실험용 시료로 사용하였다. 이 두 식이의 총 칼로리는 동일하게 제조되었다 (Table 7).

Table 7. Recipe of 2 types of experimental rice porridge

Formula	rice porridge		rice porridge containing EPO	
	g/500g	kcal	g/300g	kcal
Soaked rice	39.52	137.5	13.4	46.8
Soaked glutinous rice	43.68	163.4	13.4	50.3
Perilla seed flour	-	-	26.9	145.2
Perilla oil	-	-	2.7	10.2
Peanut flour	5.42	31.8	13.4	78.9
Salt	0.80	0.0	1.1	0.0
Sugar	-	-	0.4	1.6
Water	410.58	0.0	228.6	0.0
Total (1 serving size)	500	332.7	300	333.0

(나) 임상 실험

① 임상실험 참가자 모집

임상실험의 목적과 방법에 대한 설명을 듣고 난 후 자발적으로 참여한 대학생 중에서 들깨에 거부반응이 없는 20명을 선정하고 본 연구의 취지에 동의하여 연구에 참여한다는 동의서를 작성 한 후 실험에 참가하도록 하였다. 무작위 추출법에 의해 대조군(흰죽 섭취군), 들깨죽 섭취군을 각각 10명씩 배정하였다. 실험기간 중 식생활의 변동이 오지 않도록 유의사항을 숙지시킨 후 매일 아침 흰죽군은 500g, 들깨죽군은 300g의 시료를 31일간 섭취하도록 하였다. 죽 섭취 시 영양소를 비슷하게 하기 위해 반찬은 김치와 깍두기 등 채소 반찬으로 제한하도록 하였다. 실험 전과 식생활의 변화가 있는지, 죽 섭취를 잘 하고 있는지 확인하기 위해서 실험 1주전부터 매주 주중 2일, 주말 1일 식사 기록지를 작성하도록 하였다.

② Inbody 측정 및 혈액 채취

실험 기간 동안의 변화를 알아보기 위해서 실험 시작 전 후, 신체 조성 분석기 Inbody(X-Scan Plus II, Jawon Medical, Guri, Korea) 측정과 혈액 채취를 하였다. Inbody 측정은 식사 후 약 2시간 후 공복 상태로 측정 전 수분을 제한하고 충분한 휴식을 취한 상태로 실행하였다. 또한, 두 번의 측정에서 의복에 의한 오차를 줄이기 위해 동일한 복장을 하도록 하였다. 측정 항목은 키(height), 체중(weight), 신체질량지수(body mass index: BMI), 체지방량(body fat amount), 체지방률(body fat percentage), 골격근량(skeletal muscle weight), 체지방량(fat free mass), 복부지방률(waist-hip ratio: WHR) 이다. 혈액 채취는 12시간 공복 후 전문 병리사에 의해 시행되었으며, 혈액을 EDTA tube에 채취하여 3000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하였다. 얻어진 혈장으로 Glucose, Triglyceride, Total cholesterol, HDL-C, LDL-C, AST, ALT를 측정하였다.

(다) 혈액분석

① 혈중 glucose 및 지질 농도 분석

혈장 내 triglyceride, total cholesterol, LDL-C, HDL-C, 그리고 glucose의 농도는 자동분석기를 이용하여 분석하였다.

② Plasma AST/ALT 측정

혈중 AST/ALT 농도는 Reitman-Frank법을 이용한 분석 kit(AM101-K, Asan pharm.)를 사용하여 측정하였다.

(라) 관능검사

개발제품의 선호도를 알아보기 위해 비교 관능검사를 실시하였다. 흰죽, 흑임자죽(대상 FNF, 서울), 들깨죽의 외관, 냄새, 맛, 질감 및 향미, 전반적인 기호도 등의 항목에 대한 평가를 각각 9개의 등급으로 나눈 9점 척도법을 이용하였다. 검사는 죽 시료 약 15g을 직경 6cm의 흰색 종이컵에 담아 실시하였다. 검사 도중 생수를 이용하여 죽의 뒷맛을 제거하면서 동일 조건에서 관능검사를 실시할 수 있도록 하였다. 각 항목에 대한 점수는 1점(매우 싫음), 3점(보통 싫음), 5점(좋지도 싫지도 않음), 7점(보통 좋음), 9점(매우 좋음)으로 나타내었다.

(마) Statistical analysis

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, SPSS (Statistical Package for Social Science)를 이용하여 군 안에서의 전 후 비교는 paired t-test를, 들깨죽군, 흰죽군 두 군의 유의성은 student t-test를 이용하여 검증하였다. 또한, 관능평가는 one-way ANOVA (analysis of variance) 시행 후 $\alpha=0.05$ 에서 Tukey HSD test에 의하여 실험군 평균치 간의 유의성을 검정하였다.

나. 연구결과

(1) 들깨 추출물의 산화스트레스개선 효과 및 혈전 용해 효과 검증

(가) 들깨 추출물의 유리기 소거능 측정

① Oil 메탄올 추출물의 추출수율 및 추출물 중의 총 phenol contents

추출물의 수율을 측정한 결과, 들기름, 참기름, 해바라기유의 추출 수율은 각각 0.57, 0.61, 0.30%로 나타났다. 또한 추출물 중의 phenol 함량은 1.88, 8.86, 0.51%로 나타났다 (Table 8).

Table 8. Yield for methanol extract of oils and its phenolic compounds concentration

Oil	Yields (%)	Phenolic compounds (%)
Perilla	0.57	1.88
Sesame	0.61	8.86
Sunflower	0.30	0.51

② Oil과 oil 메탄올 추출물의 DPPH 소거 활성 측정

들기름, 참기름, 해바라기유와 그 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 시료 모두 농도의존적인 소거 활성을 나타내었다(data not shown). 기름자체의 DPPH 소거 활성에 대한 IC50값은 들기름, 참기름, 해바라기유가 각각 2.12, 1.91, 3.35 mg/mL로 나타났고, 들기름, 참기름, 해바라기유 메탄올 추출물의 IC50값은 각각 0.42, 0.07, 43.11 mg/mL로 나타났다. 참기름과 들기름의 메탄올 추출물의 DPPH 소거 활성이 다른 시료에 비해 유의적으로 높음을 알 수 있었다($p<0.05$)(Table 9). 이는 Espin et al(2000)의 식용유지에 대한 연구로 볼 때 참기름과 들기름의 항 유리기 성분은 메탄올 분획에 있는 반면 해바라기유의 항 유리기 성분은 지질 분획에 있기 때문인 것으로 사료된다. 이처럼 세가지 종류의 기름(total fraction)과 이들의 메탄올추출물의 DPPH 소거능을 측정한 결과로 보았을 때 메탄올 분획(methanol fraction) 중의 페놀성 물질이 지질 분획(lipid fraction)에 있는 토코페롤과 같은 항산화 물질보다 높은 항 유리기능을 가지는 것으로 보인다.

Table 9. IC50 for DPPH radical scavenging activity by oils and its methanol extracts

	Oil ¹⁾	Methanol extract ²⁾
Perilla	2.12 ^b	0.42 ^b
Sesame	1.91 ^c	0.07 ^c
Sunflower	3.35 ^a	43.11 ^a

¹⁾Oil and DPPH were dissolved in iso-octane.

²⁾Methanol extract and DPPH were dissolved in methanol.

^{a-c}Data with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

③ Oil 메탄올 추출물의 활성 산소종(O₂⁻, -OH)에 대한 소거 활성 측정

Superoxide anion(O₂⁻)는 체내 대사 과정 중 가장 먼저 생성되는 활성산소로 H₂O₂나 -OH에 비해 반응성은 약하나 공격성이 있고 다른 활성산소종에 비해 생체 내에서 먼저 생성되어 다른 활성산소로 전환되기 때문에 그 중요성이 강조되고 있다. In vitro에서 O₂⁻의 생성을 유도하여 1mg/mL로 조제된 들기름, 참기름, 해바라기유 메탄올추출물의 O₂⁻ 소거 효과를 살펴본 결과 들기름 메탄올 추출물이 21.10 ± 2.83 %의 superoxide anion 소거 활성을 보여 참기름 메탄올 추출물(13.25, ± 2.60%)과 해바라기유 추출물(3.14 ± 1.21%)보다 1.6, 6.7배의 소거능을 가짐을 알 수 있었다. 한편, hydroxyl radical 소거능에서는 세 추출물이 모두 높은 소거능을 보였으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다 (Fig.2).

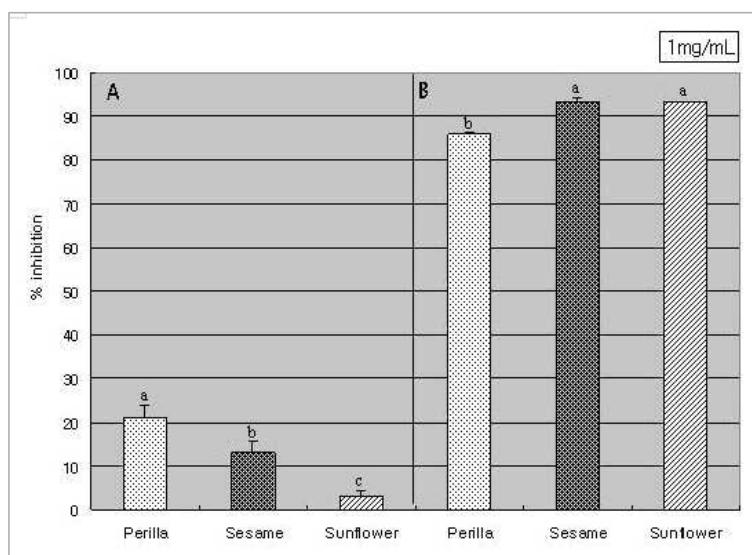


Fig. 2. Free radical scavenging activity of methanol extracts of perilla, sesame and sunflower oil against reactive oxygen species.

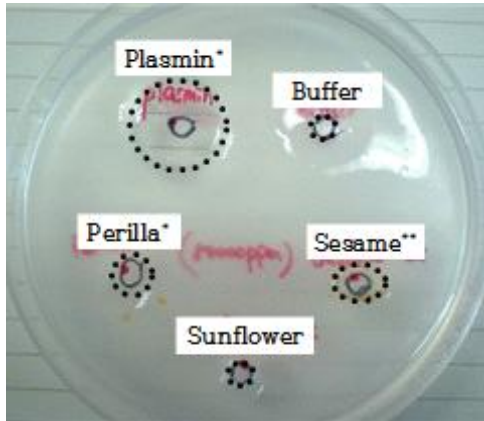
A: Superoxide anion scavenging activity of methanol extract of oils, B:

Hydroxyl radical scavenging activity of methanol extract of oils.

a-cData with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

(나) 들깨 추출물의 혈전 용해 효과 검증

3% fibrin plate를 이용한 Fibrin 분해활성 측정법으로 들기름, 참기름 및 해바라기유 메탄올 추출물의 혈전 용해 효과를 알아보았다 (Fig.3). 대표적인 혈전용해제인 plasmin을 동시에 떨어뜨려 생성된 투명환을 100%로 하였을 때 들기름 추출물과 참기름 추출물은 41.67%, 해바라기유 추출물은 33.30%의 혈전용해 활성을 나타내었다.



	ME of oil (80 mg)		
	Perilla	Sesame	Sunflower
Fibrinolysis (plasmin U)	0.21	0.21	0.17

Fig. 3. Fibrinolytic activities of Methanol extract (ME) of perilla, sesame and sunflower oil using Fibrin plate assay

Plasmin (0.5 U/mL) was used as a positive control.

(2) 동물실험을 통한 들깨유의 지질저하 기능성 검증 (2차년도, in vivo)

(가) Changes in body weight gain and relative organ weight

① 식이 중 유지급원에 따른 체중 증가량

유지 급원에 따른 마우스의 체중 증가를 살펴보았을 때 군별 초기 체중은 Wild type 마우스의 평균 체중은 22 g, Apoe ko 마우스는 평균 체중은 24 g이었다. 10주 사육 후 마우스의 체중변화량을 비교한 결과, 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 10).

Table 10. Body weight gain after 10 weeks of experiment

Mouse model	Diet	Body weight gain(g)
Wild type	Lard	6.0 ± 2.9NS
	Perilla	4.0 ± 0.8
ApoE-ko	Lard	4.7 ± 1.2NS
	Perilla	3.3 ± 2.6
	Sun	2.6 ± 2.5

Initial weight (Wild type mouse: 22g, Apoe-ko mouse: 24g)

Data are mean ± SD.

NS : Not significantly different with student t-test or one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.

② 장기무게

간, 신장 및 고환의 중량은 wilde type 그리고 apo E mice 모두에서 유지급원에 따른 군간 차이를 보이지 않았다. 반면 wild type 마우스의 비장 무게는 Perilla군이 Lard군에 비해 유의적으로 증가하였고 상대중량 역시 증가함을 볼 수 있었다($p < 0.05$). ApoE ko 마우스의 비장 절대무게는 perilla군이 다른 군에 비해 높은 경향을 보였으나 상대중량에서는 차이를 보이지 않았다 ($p < 0.05$)(Table 11).

Table 11. Organ weights of experimental group

Mouse model	Diet	Liver		Kidney	
		Weight(g)	Relative(g/100g)	Weight(g)	Relative(g/100g)
Wild type	Lard	2.13±0.31 ^{NS}	7.80±1.33 ^{NS}	0.34±0.02 ^{NS}	1.18±0.04 ^{NS}
	Perilla	2.45±0.18	9.37±1.02	0.31±0.05	1.17±0.15
ApoE-ko	Lard	2.28±0.21 ^{NS}	7.82±0.46 ^{NS}	0.31±0.02 ^{NS}	1.07±0.05 ^{NS}
	Perilla	2.58±0.58	9.19±1.61	0.32±0.03	1.17±0.14
	Sun	2.24±0.40	8.27±1.90	0.31±0.02	1.13±0.07

Mouse model	Diet	Spleen		Testicle	
		Weight(g)	Relative(g/100g)	Weight(g)	Relative(g/100g)
Wild type	Lard	0.09±0.02	0.32±0.06	0.21±0.04 ^{NS}	0.75±0.17 ^{NS}
	Perilla	0.14±0.03*	0.52±0.13*	0.19±0.03	0.71±0.10
ApoE-ko	Lard	0.15±0.06 ^{ab}	0.50±0.22 ^{NS}	0.19±0.02 ^{NS}	0.65±0.09 ^{NS}
	Perilla	0.18±0.04 ^a	0.65±0.23	0.19±0.02	0.67±0.08
	Sun	0.13±0.02 ^b	0.46±0.06	0.19±0.01	0.70±0.05

Data are mean ± SD.

NS : Not significantly different with student t-test or one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

Data between wild type and apoE-ko analyzed by student t-test are significantly different at * $p < 0.05$

^{a,b}Data with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

(나) 들깨유 섭취가 장기에 미치는 영향: AST, ALT, BUN-E, Creatinine 농도

AST와 ALT 수치는 wild type에서는 식이종류에 따른 차이를 보이지 않았으나, apoE ko type에서는 Lard군이 Perilla군이나 Sunflower군에 비해 유의적으로 높은 AST, ALT 수치를 나타내었다 ($p < 0.05$)(Table 12). BUN-E나 creatinine 수치는 군간 차이를 보이지 않았다 (Data not shown).

Table 12. Alanine aminotranferase (AST) and aspartate aminotransferase (ALT) levels of experimental group

Mouse model	Diet	AST (Karmen/ml)	ALT (Karmen/ml) ¹⁾
Wild type	Lard	53.17 ± 10.32 ^{NS}	52.99 ± 26.35 ^{NS}
	Perilla	55.54 ± 9.73	69.00 ± 35.59
ApoE-ko	Lard	1571.25 ± 156.96 ^a	482.50 ± 134.82 ^a
	Perilla	340.90 ± 118.73 ^b	155.32 ± 20.16 ^b
	Sun	648.54 ± 321.28 ^b	197.78 ± 69.17 ^b

¹⁾Karmen Unit = IU/L × 2.10

Data are mean ± SD.

NS : Not significantly different with student t-test at p<0.05.

^{a,b}Data with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.

(다) 지질저하 효과 및 동맥경화 지수 확인

① 혈중 지질농도

Wild type 마우스의 혈중지질 농도는 식이유지 급원에 따른 차이를 보이지 않았으나 apoE ko 마우스에 있어 Perilla와 Sunflower군이 Lard군에 비해 유의적으로 낮은 TG, TC 및 LDL-C 수치를 나타내었다(p<0.05)(Table 13). 또한 apoE ko 마우스에서 Perilla군은 Lard나 Sunflower군에 비해 유의적인 혈중 HDL-C 농도 증가를 보였다 (p<0.05).

Table 13. Triglyceride, total cholesterol, HDL-C and LDL-C levels in plasma of experimental group

Mouse model	Diet	(mg/dl)			
		TG	TC	HDL-C	LDL-C
Wild type	Lard	65.35±14.81 ^{NS}	180.21±26.46 ^{NS}	43.16±5.59 ^{NS}	123.99±28.99 ^{NS}
	Perilla	61.67±7.64	158.99±27.15	36.86±3.68	109.80±26.53
ApoE-ko	Lard	276.46±25.01 ^a	1460.71±166.04 ^a	2.89±0.72 ^b	1402.52±169.77 ^a
	Perilla	195.65±47.37 ^b	1061.35±76.51 ^b	4.03±0.84 ^a	1018.20±81.29 ^b
	Sun	178.94±34.01 ^b	1209.61±75.88 ^b	2.77±0.56 ^b	1171.06±73.13 ^b

Data are mean ± SD.

TG: triglyceride, TC: total cholesterol, HDL-C: HDL-Cholesterol, LDL-C: LDL-Cholesterol

NS : Not significantly different with student t-test at p<0.05.

^{a,b}Data with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.

② 동맥경화 지수 (Atherogenic index)

Wild type 마우스에서는 실험군 간에 atherogenic index에 유의적 차이가 없었다. ApoE ko 마우스에서는 sunflower군과 lard은 유의적인 차이를 보이지 않은 반면 perilla군은 lard군에 비해 유의적으로 낮은 atherogenic index를 보였다(p<0.05)(Table 14).

Table 14. Atherogenic index of plasma in experimental group

Mouse model	Diet	Atherogenic index ¹⁾		
		CRR	AC	AIP
Wild type	Lard	4.24±0.89 ^{NS}	3.24±0.89 ^{NS}	0.18±0.10 ^{NS}
	Perilla	4.31±0.61	3.31±0.61	0.22±0.09
ApoE-ko	Lard	536.68±184.04 ^a	535.68±184.04 ^a	1.99±0.10 ^a
	Perilla	278.33±89.00 ^b	277.33±89.00 ^b	1.68±0.18 ^b
	Sun	449.79±83.16 ^{ab}	448.79±83.16 ^{ab}	1.81±0.15 ^{ab}

¹⁾Atherogenic index: Cardiac Risk Ratio(CRR)=TC/HDLC, Atherogenic Coefficient(AC)=(TC-HDLC)/HDLC, Atherogenic Index of Plasma(AIP)=log(TG/HDLC). Data are mean ± SD.

NS : Not significantly different with student t-test at p<0.05.

^{a,b}Data with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.

(라) 간 및 뇌 조직의 TG, TC 농도

① Liver tissue

Wild type 마우스의 간 TG 농도는 Perilla 군이 Lard 군에 비해 유의적으로 감소하였으며 (p<0.01), 간 TC 농도도 Perilla 군이 Lard 군에 비해 유의적으로 감소하였다 (p<0.05). Apo E ko 마우스의 간 TG 농도는 식이유지 급원에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았고, 간 TC 농도는 perilla 군이 lard 군에 비해 유의적으로 감소하였다 (p<0.05)(Table 15).

② Brain tissue

Wild type 마우스의 뇌 조직 중 TG농도는 Lard 군에 비해perilla군에서 유의적으로 감소하였으며, apoE ko 마우스에 있어 perilla군이 Lard군에 비해 유의적으로 낮은 TG수치를 나타내었다 (p<0.05). Wild type 마우스의 뇌 조직 중 TC 농도는 perilla군이 lard군에 비해 감소하였으나, 식이유지급원에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. ApoE ko 마우스에 있어서는, perilla군과 sunflower군이 Lard군에 비해 유의적인 TC 농도의 감소를 보였다 (p<0.05)(Table 15).

Table 15. TG, TC concentration in liver and brain tissues (mg/g tissue)

Mouse model	Diet	Liver		Brain	
		TG	TC	TG	TC
Wild type	Lard	51.94±7.43	25.58±3.29	7.42±0.50 ^{ab}	14.44±0.99 ^c
	Perilla	28.41±9.78 ^{**}	16.61±6.17 [*]	4.23±1.53 ^c	14.11±2.20 ^c
ApoE-ko	Lard	61.67±5.56 ^{NS}	32.93±11.91 ^a	8.13±1.98 ^a	17.22±1.55 ^a
	Perilla	56.78±8.61	24.16±3.90 ^b	6.71±0.60 ^b	15.91±1.70 ^b
	Sun	58.78±3.63	32.83±3.57 ^a	7.30±1.43 ^{ab}	14.65±2.29 ^b

Data are mean ± SD.

TG: triglyceride, TC: total cholesterol

NS : Not significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.

Data between wild type and apoE-ko analyzed by student t-test are significantly different at * p<0.05, ** p<0.01.

^{a,b}Data with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.

(마) 간과 뇌의 지질과산화물 생성 확인

① 간의 과산화지질 농도

Wild type 마우스의 간의 TBARS 농도는 perilla 군이 lard 군에 비해 증가하였지만 유의적이지 않았다(p<0.05). Apo E ko 마우스의 간의 TBARS 농도는 lard 군이 perilla 군과 sunflower 군에 비해 유의적으로 감소하였다(p<0.05). (Table 16).

② 뇌의 과산화지질 농도

Wild type 마우스의 뇌 조직 중 TBARS 농도는 식이유지 급원에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 apoE ko 마우스에 있어서는 sunflower군과 lard군에 비해 perilla군에서 유의적인 감소를 보였다 (p<0.05)(Table 16).

Table 16. TBARS concentration of organ tissue

Mouse model	Diet	(nmol/g tissue)	
		Liver	Brain
Wild type	Lard	6.89±2.85 ^{NS}	26.72±4.62 ^{NS}
	Perilla	16.96±8.20	25.81±3.71
ApoE-ko	Lard	17.74±7.35 ^a	32.46±5.24 ^a
	Perilla	35.71±14.07 ^b	25.70±4.91 ^b
	Sun	41.97±19.88 ^b	31.74±3.18 ^a

Data are mean ± SD.

NS : Not significantly different with student t-test at p<0.05.

^{a,b}Data with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.

(바) 혈액 중 혈전 용해능 (fibrinolytic activity) 측정

혈장의 euglobulin fraction 내에는 응혈과 fibrinolysis에 관여하는 plasminogen activator, fibrinogen, Factor V, VIII, XI 등이 들어 있다. Euglobulin fraction에 의해 fibrin plate가 lysis되는 정도를 관찰한 결과, wild type에서는 식이에 따른 차이를 보이지 않았으나 apoE ko 마우스에서는 perilla군이 유의적으로 높은 혈전용해능을 보였다 (p<0.05)(Fig.4).

Mouse model	Diet	Lysis area (Plasmin U/mL)
Wild type	Lard	0.57±0.09 ^{NS}
	Perilla	0.55±0.16
ApoE-ko	Lard	0.11±0.03 ^b
	Perilla	0.22±0.03 ^a
	Sun	0.10±0.02 ^b

Data are mean ± SD.

NS : Not significantly different with student t-test at p<0.05.

^{a,b}Data with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.



Fig. 4. Fibrinolytic activity in euglobulin fraction of plasma

(사) Oil red O staining을 이용한 동맥궁의 지질 침착 정도 확인

Wild type 마우스의 동맥궁에서는 지질 침착을 거의 볼 수 없었으나, 동맥경화 유발모델인 apoE ko 마우스에서는 동맥궁의 지방 병변을 볼 수 있었다(Fig.5). Oil red O 염색을 통한 positive area는 lard군이나 sunflower군에 비해 peilla군이 적게 관찰되어 perilla oil 첨가가 지질 침착을 유의적으로 저하시킨 것으로 보인다 (p<0.05).

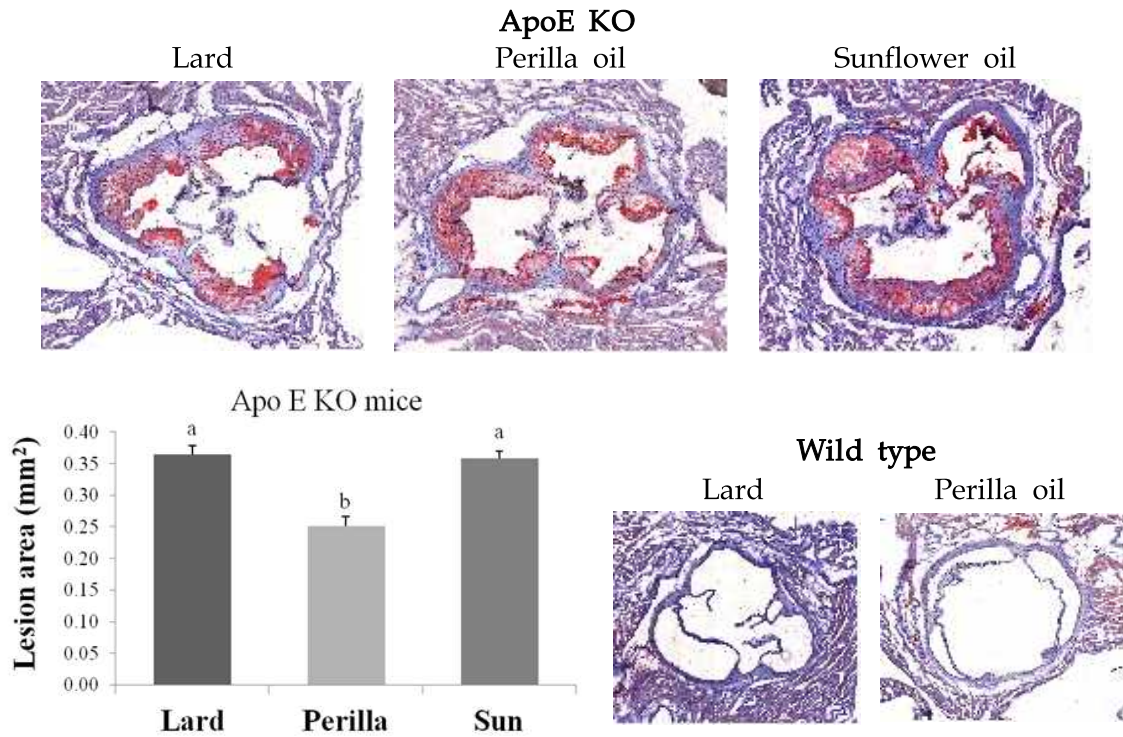


Fig. 5. Oil red O staining of atherosclerotic lesions in aortic sinus

(아) Immunohistochemistry(IHC)를 이용한 동맥 내 단백질 발현 분석

① 동맥내벽의 ICAM, VCAM 발현 확인

Apo E KO 마우스에서 동맥의 ICAM-1의 발현은 perilla oil을 섭취한 경우 lard를 섭취한 군에 비해 46.59% 감소하는 것을 보였다 (Fig.6). VCAM-1 발현은 wild type과 apo E KO 마우스 모두에서 효과를 보여 lard에 비해 perilla oil을 섭취한 군에서 각각 26.31%, 17.15% 감소하였다.

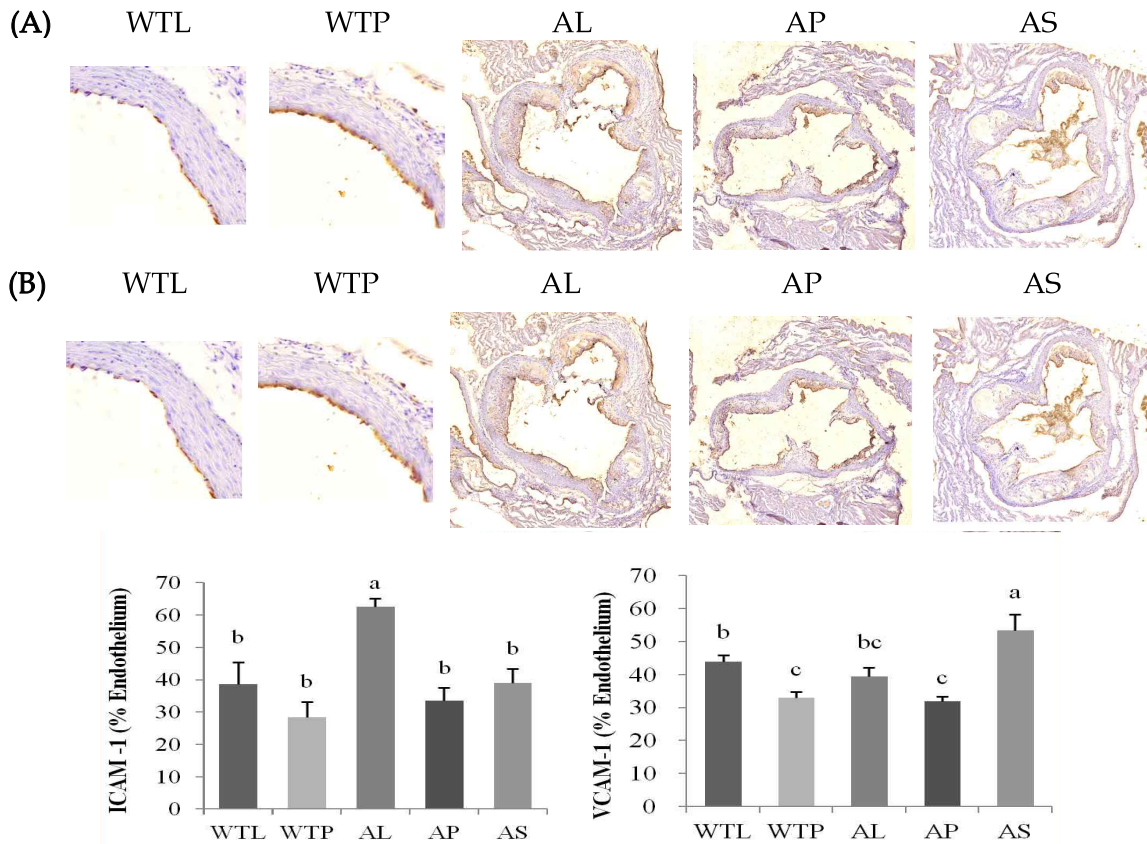


Fig. 6. Quantitative analysis of ICAM-1(A) and VCAM-1(B) expression in aortic tissue and photomicrographs of immunohistochemical staining of apoE ko mice. Data are mean \pm SD (n=5).

Abbreviations: WTL, wild type mice fed a diet containing 10% lard; WTP, wild type mice fed a diet containing 10% perilla oil; AL, apoE-/-mice fed a diet containing 10% lard; AP, apoE KO mice fed a diet containing 10% perilla oil; AS, apoE KO mice fed a diet containing 10% sunflower oil

② Nitric oxide synthases 발현 확인

eNOS 발현은 Apo E KO 마우스 중 perilla oil을 섭취한 군에서 가장 높게 나타났으며 이 정도는 wild type과 비슷한 정도였다. Wild type에서 iNOS 발현은 perilla oil 섭취 시 lard 섭취에 비해 33.6% 감소하였다. 또한 Apo E KO 마우스에서는 lard에 비해 perilla oil과 sunflower oil이 각각 20.8%, 12.5% 발현감소를 보였다(Fig.7).

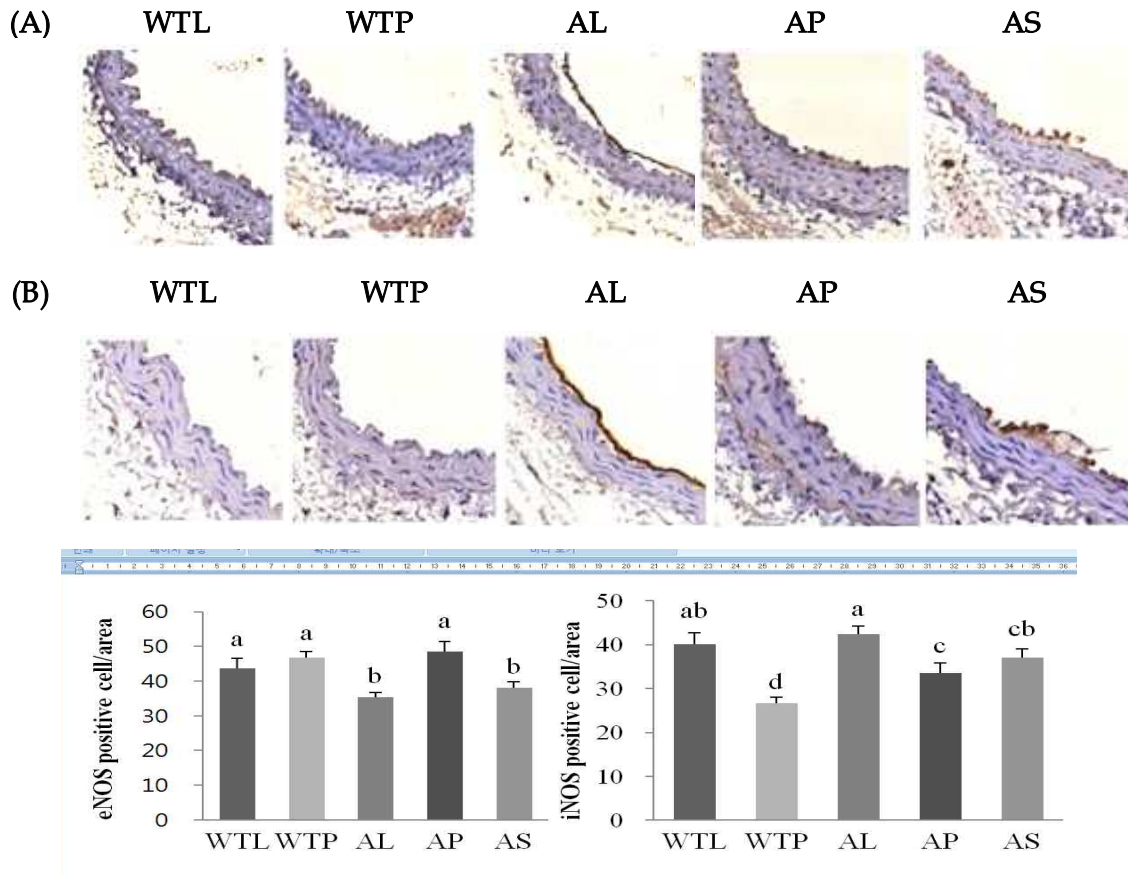


Fig. 7. Quantitative analysis of eNOS(A) and iNOS(B) expression in aortic tissue and photomicrographs of immunohistochemical staining of apoE ko mice.

Data are mean \pm SD (n=5).

WTL:wild type mice fed a diet containing 10% lard, WTP: wild type mice fed a diet containing 10% perilla oil, AL: apoE^{-/-} mice fed a diet containing 10% lard, AP: apoE KO mice fed a diet containing 10% perilla oil, AS: apoE KO mice fed a diet containing 10% sunflower oil

(자) 조직학적 분석을 통한 간의 지질침착 및 뇌 손상 정도 확인

① 간 조직 중 지질침착 정도

Wild type 마우스의 간 지질침착 정도를 관찰했을 때 perilla 군이 lard 군에 비해서 유의적으로 침착정도가 낮았다($p < 0.001$). Apo E ko 마우스의 간 지질침착 정도는 lard 군이 perilla 군과 sunflower 군에 비해 지질 침착정도가 높았다 ($p < 0.05$) (Table 17, Fig.8).

Table 17. Degree of hepatic steatosis in the mice

Mouse model	Diet	Hepatic steatosis (%)
Wild type	Lard	48.32±20.00
	Perilla	29.66±11.50*
ApoE-ko	Lard	57.44±16.33 ^a
	Perilla	42.32±10.27 ^b
	Sun	45.23±10.50 ^b

Data are mean ± SD.

Data between wild type and apoE-ko analyzed by student t-test are significantly different at * p<0.05.

^{a,b}Data with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.

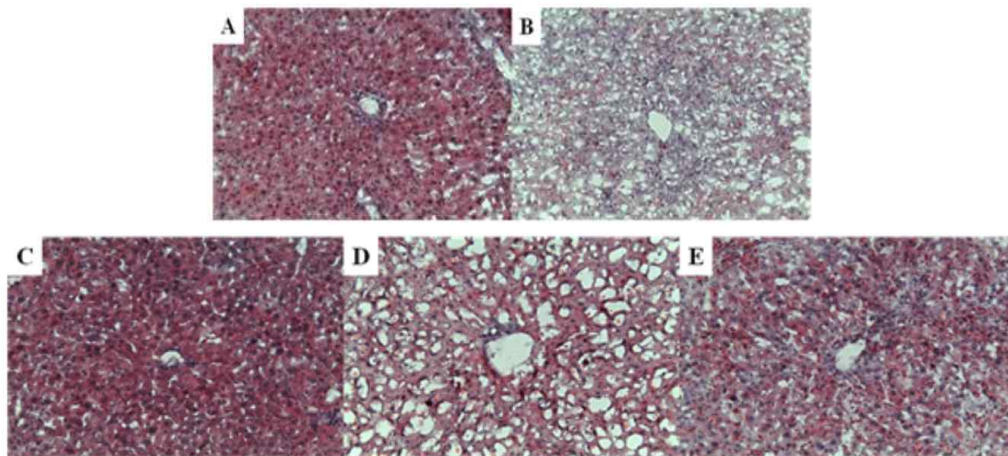


Fig. 8. Degree of hepatic steatosis in the mice fed high cholesterol diet containing different oils for 10 weeks.

(A) WT.Lard (B) WT.Perilla (C) Apo.Lard (D) Apo.Perilla (E) Apo.Sunflower

② 뇌세포 손상 정도: Morphometrical analysis of the brain (hippocampus)

Wild type 마우스의 해마부분의 조직학적 손상은 식이유지 급원에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았으나, perilla군이 lard군에 비해 손상정도가 27% 감소했다. Apo E ko 마우스에 있어서는 sunflower군과 lard군에 비해 perilla군에서 35%의 유의적인 조직학적 손상의 감소를 보였다(p<0.05)(Table 18). 또한 Apo E KO 마우스 간에 식이종류에 따른 조직학적 변화를 비교해 보면, Lard와 Sunflower oil 군에서는 핵이 소실되어 세포윤곽만 남아있는 세포 및 핵이 점진적으로 수축하고 염색질이 농축되어 쭈글쭈글한 덩어리로 보이는 세포가 많이 보였다. 따라서 조직학적 손상이 많이 진행되었음을 알 수 있었다. 반면, Perilla oil을 섭취한 군에서는 핵이 소실되지 않은 세포가 많으며 핵 농축이 다른 군보다 덜 일어난 것을 볼 수 있었다 (Fig.9).

Table 18. Degree of brain cell damage

Mouse model	Diet	Brain histological damage
Wild type	Lard	9.25±2.38 ^{bc}
	Perilla	6.60±1.74 ^c
ApoE-ko	Lard	14.75±2.28 ^a
	Perilla	9.60±2.24 ^{bc}
	Sun	12.40±2.58 ^{ab}

Data are mean ± SD.

^{a-c}Data with different letters are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.

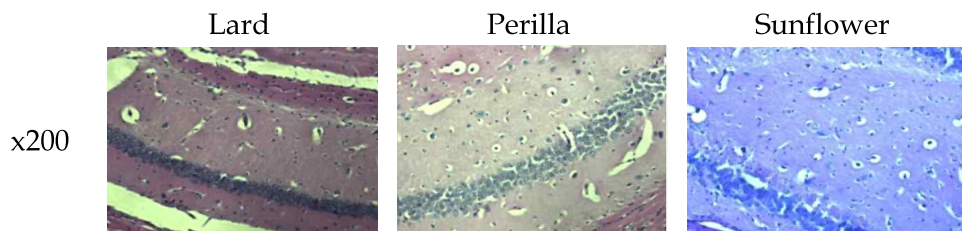


Fig. 9. Histological analysis of the brain in apoE ko mice.

(3) 분체들깨유(microencapsulated perilla oil)가 첨가된 고콜레스테롤 식이를 섭취한 ApoE-ko mice의 혈중 지질 농도 및 간, 뇌조직 손상에 대한 보호효과

(가) 체중 및 조직 무게의 변화

① 식이 중 유지급원에 따른 체중 증가량

ApoE ko 마우스의 군별 initial weight는 평균 24g으로 구성되도록 하였다. 마우스의 10주간 체중변화를 측정한 결과 MPO 군이 lard 군과 perilla 군에 비해 유의적으로 감소하였다 (p<0.05). MPO 군은 10주 동안 체중의 증가를 거의 보이지 않아 유지대체물질로 사용하였을 시에 체중감소 효과가 있을 것으로 예상된다 (Table 19).

Table 19. Effect of dietary supplement MPO on body weight in apoE-ko mice

Diet	Body weight gain (g)
Lard	4.7 ± 1.2 ^a
Perilla	3.3 ± 2.6 ^a
MPO	0.2 ± 2.8 ^b

Data are mean ± SD.

^{a,b}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05

② 장기무게

ApoE ko 마우스의 간, 비장, 고환의 중량에는 군간 차이를 보이지 않았다 (Table 20). 신

장의 절대무게는 perilla 군이 MPO 군에 비해 상대적으로 높은 경향을 보였지만(p<0.05) 상대증량에는 차이를 보이지 않았다.

Table 20. Effect of dietary supplement MPO on organ weight in apoE-ko mice

Diet	Liver		Kidney	
	Weight (g)	Relative(g/100g) ¹⁾	Weight (g)	Relative(g/100g)
Lard	2.28±0.21 ^{NS}	7.82±0.46 ^{NS}	0.31±0.02 ^{ab}	1.07±0.05 ^{NS}
Perilla	2.58±0.58	9.19±1.61	0.32±0.03 ^b	1.17±0.14
MPO	2.18±0.35	9.12±2.65	0.28±0.02 ^a	1.16±0.18

Diet	Spleen		Testicle	
	Weight (g)	Relative(g/100g)	Weight (g)	Relative(g/100g)
Lard	0.15±0.06 ^{NS}	0.50±0.22 ^{NS}	0.19±0.02 ^{NS}	0.65±0.09 ^{NS}
Perilla	0.18±0.04	0.65±0.23	0.19±0.02	0.67±0.08
MPO	0.15±0.06	0.64±0.24	0.18±0.03	0.74±0.18

¹⁾Relative organ weight, 체중 100 g당 장기의 상대증량 = (organ weight / body weight) × 100
Data are mean ± SD.

^{NS}Data in the column are not significantly different.

^{a,b}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05

(나) 혈중 지질농도 및 동맥경화 지수

① 혈중 지질 농도

ApoE ko 마우스에 있어 TG 농도는 MPO 군은 lard 군이나 perilla 군에 비해 유의적으로 감소하였고, TC와 LDL-C 농도는 lard 군이 비해 유의적으로 감소하여 perilla 군과 비슷한 수치를 나타내었다 (Table 21). HDL-C 농도에 있어서 lard 군과 perilla 군과 유의적인 차이가 없었다(p<0.05).

Table 21. Effect of dietary supplement MPO on plasma lipids in apoE-ko mice

Diet	TG	TC	HDL-C	LDL-C*
Lard	276.46±25.01 ^a	1460.71±166.04 ^a	2.89±0.72 ^{NS}	1402.52±169.77 ^a
Perilla	195.65±47.37 ^b	1061.35±76.51 ^b	4.03±0.84	1018.20± 81.29 ^b
MPO	126.99± 3.50 ^c	1072.50±188.46 ^b	5.79±0.69	1041.32±188.53 ^b

Data are mean ± SD.

TG: triglyceride, TC: total cholesterol, HDL-C: HDL-Cholesterol, LDL-C: LDL-Cholesterol.

^{NS}Data in the column are not significantly different.

^{a,b}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05

② 동맥경화 지수(Atherogenic index)

MPO 군은 lard 군에 비해 유의적으로 낮은 atherogenic index를 보였으며, perilla 군 유사한 수준의 항동맥경화 효과를 나타내었다($p < 0.05$) (Table 22). TG에 대한 HDL-C의 비를 이용한 AIP에서는 MPO 군은 perilla 군보다도 유의적으로 낮은 수치를 보였다 ($p < 0.05$).

Table 22. Effect of dietary supplement MPO on Atherogenic index in apoE-ko mice

Diet	Atherogenic index		
	CRR	AC	AIP
Lard	536.68 ± 184.04 ^a	535.68 ± 184.04 ^a	1.99 ± 0.10 ^a
Perilla	278.33 ± 89.00 ^b	277.33 ± 89.00 ^b	1.68 ± 0.18 ^b
MPO	187.85 ± 40.62 ^b	186.85 ± 40.62 ^b	1.34 ± 0.06 ^c

CRR: Cardiac Risk Ratio (TC/HDLC), AC: Atherogenic Coefficient[(TC-HDLC)/HDLC], AIP: Atherogenic Index of Plasma [log(TG/HDLC)]

Data are mean ± SD.

^{a-c}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$

(다) 조직 중 TG, TC 농도 측정

① Liver tissue

ApoE ko 마우스에서 MPO 군의 간 TG 농도는 lard 군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 간 조직 중 TC 농도는 MPO 군과 perilla 군이 lard 군보다 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$)(Table 23).

② Brain tissue

ApoE ko 마우스에서 MPO 군과 perilla 군의 뇌 TG농도는 lard 군에 비해 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), 뇌 조직 중 TC 농도는 MPO 군이 perilla 군에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$)(Table 23).

Table 23. TG, TC concentration in liver and brain tissues of apo E ko mice

Diet	(mg/g tissue)			
	Liver		Brain	
	TG	TC	TG	TC
Lard	61.67±5.56 ^b	37.23±9.86 ^b	8.13±1.98 ^a	17.22±1.55 ^a
Perilla	56.78±8.61 ^{ab}	23.94±4.16 ^a	6.71±0.60 ^b	15.91±1.70 ^b
MPO	47.64±9.01 ^a	26.17±8.18 ^a	7.23±0.90 ^b	16.81±2.83 ^a

Data are mean ± SD.

TG: triglyceride, TC: total cholesterol

^{a,b}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$

(라) 조직 중 TBARS 농도

① Liver tissue

ApoE ko 마우스에서 간 TBARS 농도는 식이급원에 따른 군별 유의적 차이가 나타나지 않았다(P<0.05).

② Brain tissue

ApoE ko 마우스에서 뇌 TBARS 농도는 MPO 군이 lard 군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 그 효과는 Perilla 군과 유사하였다(p<0.05).

(마) 간에 미치는 영향 : AST/ALT

AST 수치는 MPO 군이 lard 군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타냈고(P<0.05), ALT 수치는 MPO 군과 perilla 군이 lard 군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다(Table 24). AST/ALT 수치에서는 식이급원에 따른 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다(p<0.05).

Table 24. Effect of dietary supplement MPO on AST and ALT levels

Diet	AST (Karmen/ml)	ALT (Karmen/ml) ¹⁾
Lard	1571.25 ± 156.96 ^a	482.50 ± 134.82 ^a
Perilla	340.90 ± 118.73 ^c	155.32 ± 20.16 ^b
MPO	790.00 ± 251.87 ^b	147.56 ± 44.58 ^b

¹⁾Karmen Unit = IU/L × 2.10

Data are mean ± SD.

^{a-c}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05

(4) 유화 들깨유(Emulsified perilla oil, EPO)의 기능성을 Apo E KO mouse에서 확인 (3차년도, in vivo)

(가) 체중 및 장기 무게 변화

① 식이 중 유지급원에 따른 체중 증가량

10주 사육 후 마우스의 체중변화량을 비교한 결과, 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 25).

Table 25. Body weight gain after 10 weeks of experiment

Group	Body weight gain(g)
Lard	3.4 ± 1.4 ^{NS}
Perilla	2.6 ± 2.9
Emulsified	1.3 ± 1.0

Data are mean ± SD (n=6).

^{NS}Data in the column are not significantly different.

② 장기무게

고환의 상대중량은 Emulsified군이 Lard군에 비해 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있었다 (p<0.05). 간, 신장, 비장 및 고환의 절대무게는 Emulsified군에서 증가하였지만 유의적인 차이를 보이지는 않았다 (Table 26).

Table 26. Organ weights of experimental group

Group	Liver		Kidney	
	Weight(g)	Relative(g/100g) ¹⁾	Weight(g)	Relative(g/100g)
Lard	2.64±0.32 ^{NS}	10.72±0.81 ^{NS}	0.30±0.03 ^{NS}	1.23±0.07 ^{NS}
Perilla	2.47±0.45	10.72±1.10	0.30±0.03	1.29±0.11
Emulsified	2.51±0.38	11.22±1.23	0.29±0.02	1.32±0.10

Group	Spleen		Testicle	
	Weight(g)	Relative(g/100g)	Weight(g)	Relative(g/100g)
Lard	0.13±0.03 ^{NS}	0.54±0.11 ^{NS}	0.17±0.01 ^{NS}	0.69±0.05 ^b
Perilla	0.11±0.02	0.48±0.55	0.18±0.01	0.78±0.10 ^{ab}
Emulsified	0.14±0.03	0.64±0.18	0.19±0.02	0.84±0.05 ^a

¹⁾Relative organ weight=(organ weight / body weight) x 100

Data are mean ± SD (n=6).

^{NS}Data in the column are not significantly different.

^{a,b}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05.

(나) 지질 저하 효과 및 동맥경화 지수 확인

Perilla와 Emulsified군이 Lard군에 비해 유의적으로 낮은 TG, TC 및 LDL-C 수치를 나타내었다(p<0.05)(Table 27). HDL-C 농도의 경우는 Perilla군이 Lard군에 비해 유의적으로 증가하였지만, Emulsified군은 Lard군에 비해 유의적인 증가를 보이지 않았다 (p<0.05). 동맥경화지수는 Lard군에 비해 perilla군이 유의적으로 낮았으며 (p<0.05), emulsified군은 perilla군과 같이 Lard군에 비해 유의적으로 낮은 동맥경화지수를 보였다 (p<0.05, Table 28).

Table 27. Triglyceride, total cholesterol, HDL-C and LDL-C levels in plasma

Group	(mg/dl)			
	TG	TC	HDL-C	LDL-C
Lard	109.91±15.56 ^a	1782.51±338.94 ^a	2.66±1.48 ^b	1757.87±336.18 ^a
Perilla	84.13±13.76 ^b	1398.79±201.23 ^b	7.81±2.37 ^a	1374.16±199.08 ^b
Emulsified	84.81±18.42 ^b	1424.52±194.08 ^b	4.23±1.09 ^b	1403.33±196.57 ^b

Data are mean ± SD (n=6).

TG: triglyceride, TC: total cholesterol, HDL-C: HDL-Cholesterol, LDL-C: LDL-Cholesterol.

^{a,b}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05

Table 28. Atherogenic indexes of the experimental groups

Group	AI	TC/HDL-C	LDL-C/HDL-C
Lard	841.36 ± 408.46 ^a	842.36 ± 408.4 ^a	830.80 ± 403.14 ^a
Perilla	190.87 ± 61.32 ^b	191.87 ± 61.32 ^b	188.55 ± 60.58 ^b
Emulsified	351.10 ± 83.61 ^b	352.10 ± 83.61 ^b	346.96 ± 83.47 ^b

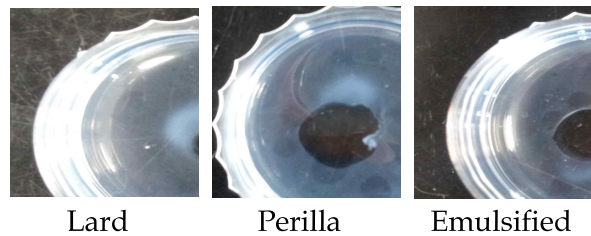
Data are mean ± SD (n=6).

TG: triglyceride, TC: total cholesterol, HDL-C: HDL-Cholesterol, LDL-C: LDL-Cholesterol.

^{a,b}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05

(다) 혈중 피브린 분해능 확인

혈장의 euglobulin fraction 내에는 응혈과 fibrinolysis에 관여하는 plasminogen activator, fibrinogen, Factor V, VIII, XI 등이 들어 있다. Euglobulin fraction에 의해 fibrin plate가 lysis되는 정도를 관찰한 결과, perilla군과 emulsified군이 lard군에 비해 유의적으로 높은 혈전용해능을 보였다 (p<0.05)(Fig.10).



Group	Lysis area (Plasmin U/mL)
Lard	0.019±0.010 ^b
Perilla	0.074±0.024 ^a
Emulsified	0.073±0.016 ^a

Data are mean ± SD (n=6).

^{a,b}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05

Fig. 10. Fibrinolytic activity in euglobulin fraction of plasma

(라) 동맥궁의 지질침착정도 측정을 통한 항동맥경화 효과 확인

Oil red O 염색을 통한 positive area는 Lard군에 비해 Perilla군과 Emulsified군에서 적게 관찰되어 perilla oil의 첨가가 지질 침착을 유의적으로 저하시키며, Emulsified군 역시 Perilla군과 비슷한 효과를 보였다(p<0.05) (Fig.11).

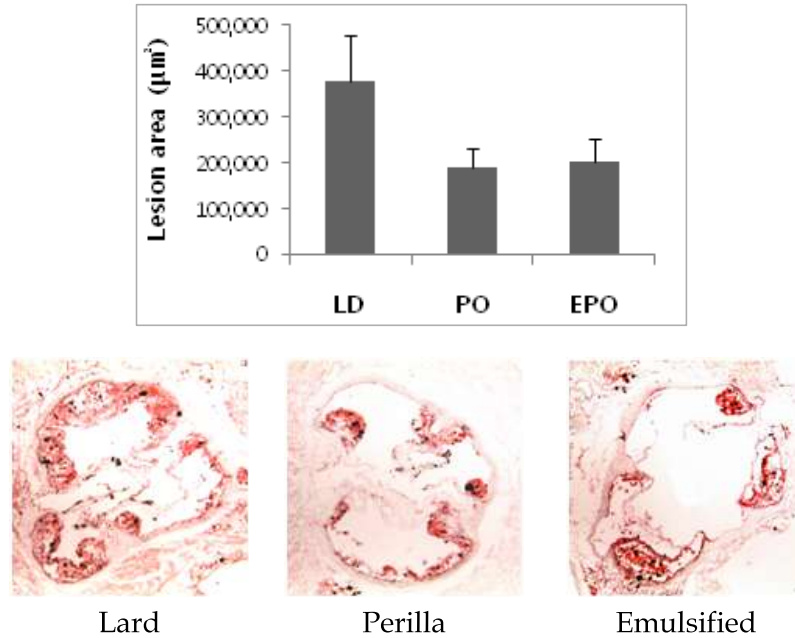


Fig. 11. Oil red O staining of atherosclerotic lesions in aortic sinus

(마) 간독성 검사: AST, ALT 농도

AST와 ALT 수치는 Lard군이 Perilla군이나 Emulsified군에 비해 유의적으로 높았다 (Table 29).

Table 29. AST and ALT level of experimental group

Group	AST (Karmen/ml)	ALT (Karmen/ml) ¹⁾
Lard	156.09 ± 30.71 ^a	129.87 ± 14.35 ^a
Perilla	117.61 ± 18.40 ^b	90.67 ± 16.03 ^b
Emulsified	119.83 ± 14.17 ^b	103.88 ± 24.70 ^b

¹⁾Karmen Unit = IU/L × 2.10

Data are mean ± SD (n=6).

^{a,b}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at p<0.05

(5) 임상실험을 통한 들깨유 첨가죽의 지질저하기능성 검증 (3차년도, in human)

(가) 신체 조성

실험 전 참가자 20명의 평균 나이는 25.4±2.6살, 키는 162.4±3.8cm, 체중은 56.2±5.7kg로 들깨죽군(Rice porridge with emulsified perilla oil, RPEPO), 흰죽군(Rice porridge, RP) 간의 유의적인 차이는 없었다(Table 30). 또한, 각 군별 실험 전 후 열량 섭취와 신체 조성 항목의 유의적인 변화는 없었다(Table 31).

Table 30. General characteristics of the subjects before and after clinical trial

Types of porridge	Age (years old)	Height (cm)	Weight (kg)
RPEPO	25.4 ± 3.0 ^{NS}	163.4 ± 3.9 ^{NS}	58.3 ± 5.1 ^{NS}
RP	25.4 ± 2.3	161.3 ± 3.6	54.0 ± 5.7

Data are mean ± SD.

RPEPO: rice porridge with emulsified perilla oil, RP: rice porridge

^{NS}Data in the column analyzed by student t-test are not significantly different at p<0.05.

Table 31. Food intake and body composition of the subjects before and after clinical trial

		RPEPO	RP
Calorie (kcal)	Baseline	2178.8 ± 316.5 ^{ns}	1887.3 ± 396.2 ^{ns}
	Post-test	2074.5 ± 211.1	1971.2 ± 181.8
BMI (kg/m ²)	Baseline	21.9 ± 1.7	20.8 ± 2.1
	Post-test	21.7 ± 1.8	21.0 ± 2.3
Body fat amount (kg)	Baseline	15.6 ± 3.0	14.0 ± 3.1
	Post-test	15.9 ± 3.1	14.5 ± 3.6
Body fat percentage (%)	Baseline	26.6 ± 3.0	25.7 ± 3.2
	Post-test	27.1 ± 3.2	26.3 ± 3.9
Fat free mass (kg)	Baseline	42.7 ± 2.4	40.0 ± 3.0
	Post-test	42.1 ± 2.4	40.1 ± 3.0
Skeletal muscle weight (kg)	Baseline	18.6 ± 3.0	16.0 ± 3.8
	Post-test	17.0 ± 2.7	15.9 ± 3.3
Waist/Hip ratio	Baseline	0.76 ± 0.33	0.75 ± 0.41
	Post-test	0.76 ± 0.27	0.76 ± 0.36

Data are mean ± SD.

RPEPO: rice porridge with emulsified perilla oil, RP: rice porridge

^{NS}Data in the column analyzed by student t-test are not significantly different at p<0.05.

(나) 혈중 glucose 농도

들깨죽군과 흰죽군의 공복 혈당 농도는 각각 4.79%, 9.36% 상승하였다. 두 군의 변화율을 비교하면, 들깨죽군이 더 적게 상승하였으나 유의적인 차이는 없었다(Table 32).

Table 32. Changes in fasting blood glucose (FBG) concentration after 30days of porridge consumption

Types of porridge	FBG (mg/dL)		
	Baseline	Post-test	△Change
RPEPO	77.30 ± 6.57	81.00 ± 4.69	3.78 ± 5.04 ^{ns}
RP	76.90 ± 5.63	84.10 ± 6.57	6.67 ± 5.31

Data are mean ± SD.

RPEPO: rice porridge with emulsified perilla oil, RP: rice porridge

^{NS}Data in the column analyzed by student t-test are not significantly different at p<0.05.

(다) 혈중 지질농도 및 동맥경화 지수 확인

① 혈중 지질농도

들깨죽군과 흰죽군의 Triglyceride의 변화율은 두 군 간에 유의적인 차이가 있었다 (p<0.05, Table 33). 그러나, 혈중 Total cholesterol, HDL-C, LDL-C는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 34). 이러한 차이는 매일 아침 식사를 챙겨먹지 않던 참가자들이 아침 식사를 규칙적으로 먹게 됨으로써 중성 지질이 상승하였으나 유의적인 변화는 아니었고 이러한 변화율이 들깨죽군이 유의적으로 적은 것으로 보아 혈중 지질 저하 효과가 있다는 것을 나타낸다.

Table 33. Changes in Triglyceride (TG) concentration after 30days of porridge consumption

Types of porridge	TG (mg/dL)		
	Baseline	Post-test	△Change
RPEPO	45.63 ± 18.28	61.00 ± 13.35	13.00 ± 10.82 ^a
RP	58.63 ± 15.45	93.00 ± 15.28	32.00 ± 20.72 ^b

Data are mean ± SD.

RPEPO: rice porridge with emulsified perilla oil, RP: rice porridge

^{a,b}Data with different letters in the column analyzed by student t-test are significantly different at p<0.05.

Table 34. Comparison of serum cholesterol of the subjects after 30days of porridge consumption

Types of porridge	(mg/dL)					
	TC (mg/dL)		LDL-C (mg/dL)		HDL-C (mg/dL)	
	Baseline	Post-test	Baseline	Post-test	Baseline	Post-test
RPEPO	180.22 ± 22.00	183.00 ± 18.12 ^{ns}	99.78 ± 29.85	106.22 ± 27.39 ^{ns}	72.67 ± 11.87	73.89 ± 11.21 ^{ns}
RP	169.11 ± 21.60	174.11 ± 30.38	95.11 ± 20.90	100.44 ± 26.87	62.67 ± 9.58	64.22 ± 7.60

Data are mean ± SD.

RPEPO: rice porridge with emulsified perilla oil, RP: rice porridge, TC: total cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol

^{ns}Data in the column analyzed by student t-test are not significantly different at p<0.05.

② 동맥경화 지수 (Atherogenic index)

참가자들의 실험 전 후의 atherogenic index에는 유의적 차이가 없었다(Table 35). 하지만 흰죽균이 실험 전보다 동맥경화지수가 감소한 것에 반해 흰죽균은 더 상승한 결과를 보였다.

Table 35. Atherogenic index¹⁾ of plasma in experimental group

Types of porridge	AI	
	Baseline	Post-test
RPEPO	1.58 ± 0.62	1.57 ± 0.52 ^{ns}
RP	1.79 ± 0.53	1.88 ± 0.64 ^{ns}

¹⁾Atherogenic index: (TC-HDL-C)/HDL-C

Data are mean ± SD.

RPEPO: rice porridge with emulsified perilla oil, RP: rice porridge

^{ns}Data in the row and column analyzed by student t-test are not significantly different at p<0.05, respectively.

(라) Plasma AST/ALT 농도 측정을 통한 안전성 검증

AST와 ALT의 수치 상승은 간과 관련된 질환과 관련이 있다. AST, ALT 수치의 정상 범위는 각각 8~40 Karmen, 5~30 Karmen이다. AST, ALT 수치의 실험 전후 차이는 보이지 않았다(Table 36). 이로써, 개발 제품에 간독성이 없음을 확인할 수 있었다.

Table 36. AST and ALT levels of experimental group

Types of porridge	AST (Karmen unit/mL)		ALT (Karmen unit/mL)	
	Baseline	Post-test	Baseline	Post-test
RPEPO	26.90 ± 4.58	26.90 ± 2.96 ^{NS}	11.80 ± 3.05	15.50 ± 1.72 ^{NS}
RP	27.30 ± 4.08	26.40 ± 5.00	10.60 ± 4.62	15.80 ± 3.19 ^{NS}

Data are mean ± SD.

RPEPO: rice porridge with emulsified perilla oil, RP: rice porridge

^{NS}Data in the row analyzed by student t-test are not significantly different at p<0.05.

(마) 들깨죽의 비교 관능 검사

들깨죽, 흰죽, 흑임자죽 3가지 시료를 이용하여 비교 관능 검사한 결과, 외관은 군 간의 유의적인 차이가 없었다. 향미는 들깨죽이 다른 두 군에 비해서 선호도가 높았다. 맛은 들깨죽과 흰죽이 유의적인 차이가 없었고, 흑임자죽에 비해 선호도가 높았다. 점성은 흰죽이 가장 높았고, 들깨죽과 흑임자죽은 유의적인 차이가 없었다. 전반적인 기호도는 들깨죽과 흰죽이 유의적인 차이가 없었지만 흑임자죽에 비해 높은 기호도를 보였다(Table 37). 따라서, 들깨죽은 기존 시판된 죽과 비교하였을 때 외관상으로는 별 차이가 없었고, 향미, 맛, 전반적인 기호도가 높음을 알 수 있었다.

Table 37. Comparison of the means of the sensory characteristics

Types of porridge	Appearance	Flavor	Taste	Viscosity	Overall preference
RPEPO	5.80 ± 1.90 ^{NS}	6.15 ± 1.50 ^b	6.20 ± 1.61 ^a	4.60 ± 1.64 ^a	6.20 ± 1.65 ^a
RP	5.20 ± 1.20	5.20 ± 1.05 ^a	5.65 ± 1.22 ^a	6.25 ± 1.11 ^b	5.80 ± 1.15 ^a
BSP	3.90 ± 2.10	4.10 ± 1.71 ^a	4.30 ± 2.22 ^b	4.35 ± 1.57 ^a	4.45 ± 2.01 ^b

Data are mean±SD

RPEPO: rice porridge with emulsified perilla oil, RP: rice porridge, BSP: black sesame porridge

^{a,b}Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Tukey HSD test at p<0.05.

^{NS}Data in the column are not significantly different by one-way ANOVA.

제 3 절. 기능성지질 상업용 제품생산 기술 (제 2 협동과제)

본 과제에서는 리놀렌산 함량이 높은 국산 종실인 들깨 및 들깨유의 식품으로써의 소비 실태와 선호도 및 요구도, 상업적 실현 가능성을 분석하여 실현가능성이 높은 편의 식품의 유형을 선정하였다. 또한 식품가공 공정에 적용성이 높은 분체형 기능성지질소재인 들깨유의 식품소재 가능성을 탐색하고, 들깨를 이용한 다기능 상업용 편의식품을 개발하였다.

1. 들깨관련 제품의 시장 및 소비자 조사

가. 들깨 및 들깨유 이용 식품의 시장 다변화 가능성 탐색

문헌 및 연구 보고서, 관련 학회지에 대한 내용 분석(content analysis)을 실시하고 들깨 활용 업계 및 편의 식품 제조업체 전문가 10명을 대상으로 in-depth interview를 실시한 결과, 기름을 덕용으로 사용하는 제품에 사용할 경우 들기름의 높은 리놀렌산의 함량 및 맛과 향의 특성으로 인해 건강기능성과 flavor 측면에서 제품의 품질과 소비자인식이 향상될 것으로 분석되었다. 또한 분체형 기능성 지질을 스프 type제품 개발에 사용함으로써 스프 type 제품의 기름의 첨가로 인해 발생하는 제품에서의 기름분리현상을 최소화시켜 제품의 품질력이 향상될 것으로 분석되어 들깨유 이용을 위한 시장다변화가 제품의 개발 방향으로 결정되었다.

나. 들깨 및 들깨유 이용 식품에 대한 소비자 선호도 및 요구도 조사

본 연구에서는 무작위 표본추출(random sampling)한 일반 소비자 250명 (남자 85명, 여자 153명; 21~30세 119명, 31~40세 57명, 41~50세 37명)을 조사대상으로 하여 2009년 10월 1일부터 10월 31일까지 설문조사를 실시하고 SPSS WIN 17.0을 이용한 기술통계분석, x2 test, ANOVA, 요인분석 등을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 전반적인 들깨와 들깨를 이용한 음식의 선호도는 5점 중 3.50와 3.56으로, 들기름과 들기름을 이용한 음식의 선호도는 3.64와 3.67으로 조사되었다. 으며 남녀에 따른 차이는 크지 않았다. 연령별로는 들깨의 경우 51세 이상(3.86)과 20세 이하(3.83)의 연령층에서, 들기름의 경우 20세 이하(4.08)의 연령층에서 선호도가 높은 경향을 보였다.
- 들깨류의 구매 형태는 들깨가루(45.1%), 들기름(35.9%), 생들깨(5.2%)의 순으로 나타나 응답자의 대부분이 전처리가 되어있어 조리하기 쉬운 들깨 가루의 형태로 주로 구매하는 것으로 나타났다(Figure). 구입 시 고려요인을 살펴본 결과 들깨(87명; 36.4%)와 들기름(83명;34.7%) 모두 원산지(국내사/수입산)를 가장 많이 고려하고 있었으며, 이어서 맛, 신선도, 생산지(브랜드명) 등도 고려하는 것으로 조사되었다.

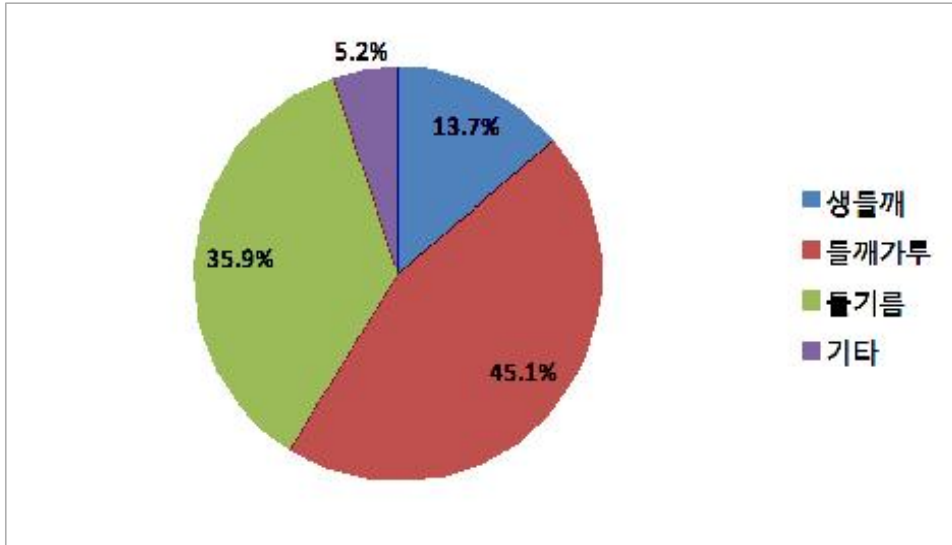


Figure. 들깨 구매 형태

- 들깨 및 들기름의 소비 성향을 분석한 결과, 들깨의 섭취빈도는 6개월에 1~2회(86명; 36.0%), 한달에 1~2회(86명; 36.0%), 한달에 3~4회(33명; 13.8%)의 순으로 나타났으며, 들기름은 6개월에 1~2회(76명; 31.8%), 한달에 1~2회(65명; 27.2%), 1주일에 2회 이상(47명; 19.7%), 한달에 3~4회(36명; 15.1%)의 순으로 나타나 들깨 보다는 들기름의 섭취 빈도가 높은 경향으로 나타났다. 들깨 이용 음식 섭취 형태는 반찬류(나물, 볶음 등)(113명; 47.3%)의 형태로 가장 많이 섭취하고 있었으며, 그 다음으로 국류 및 찌개류(76명; 31.8%), 조미식품(18명; 7.5%)로 조사되었으며, 들기름 이용 음식 섭취 형태는 반찬류(나물, 볶음 등)(161명; 67.4%), 조미식품(31명; 13.0%), 국류 및 찌개류(15명; 6.3%)의 순으로 조사되었다. 들깨 이용 음식 평가 항목은 맛이 155명(64.9%)로 가장 높았으며, 들기름 이용음식 평가 항목으로는 향이 121명(50.6%)으로 가장 높게 나타났다.
- 들깨 및 들기름 이용 제품 개발을 위해 소비자의 요구도를 조사한 결과, 들깨(148명; 61.9%) 및 들기름(183명; 76.6%) 이용 메뉴 유형으로는 가정용 메뉴를 가장 많이 요구하고 있었다. 들깨 이용 식품 형태는 반찬류(80명; 33.5%), 국류 및 찌개류(57명; 23.8%), 후식류(32명; 13.4%), 죽류(27명; 11.3%)의 순으로 조사되었으며, 들기름 이용 식품 형태는 반찬류(153명; 64.0%), 조미식품(28명; 11.7%), 국류 및 찌개류(16명; 6.7%)의 순으로 요구도가 높았다.
- 들깨 및 들기름 이용 편의 식품 유형은 간단 조리 후 먹는 음식(ready to end-cook) 유형(들깨:32.6%, 들기름:33.9%)에 대한 요구도가 가장 높았으며, 조리 후 먹는 음식(ready to cook) 유형(들깨:30.1%, 들기름:31.4%)에 대한 요구도 높았다. 들깨 이용 편의 식품 형태는 분말형(114명; 47.7%), 용기 분말형(44명; 18.4%), 용기 액상형(24명; 10.0%) 순으로 요구도가 높게 조사되었으며, 들기름 이용 편의 식품 형태는 액상을 병

에 넣은 형태(110명; 46.0%), 용기 액상형(58명; 24.3%)의 순으로 요구도가 높게 조사되었다.

- 들깨 이용 제품 개발을 위해 소비자의 요구도에 대한 남녀간의 차이를 살펴보면, 남녀간의 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 들깨 이용 식품 형태의 경우 남녀 모두 반찬류에 대한 요구도가 가장 높았으며, 들깨 이용 편의 식품의 유형 또한 남녀 모두 간단 조리 후 먹는 음식(ready to end-cook), 조리 후 먹는 음식(ready to cook)의 순으로 요구도가 높았다. 들깨 이용 편의 식품 형태도 남녀간의 차이 없이 분말형의 요구도가 가장 높았다.
- 들기름 이용 제품 개발을 위해 소비자의 요구도에 대한 남녀간의 차이를 조사한 결과, 들기름 이용 식품 형태의 경우 남녀 모두 반찬류에 대한 요구도가 가장 높았으며, 들기름 이용 편의 식품 유형은 남녀간의 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았으나 남자는 간단 조리 후 먹는 음식(ready to end-cook)을 여자는 조리 후 먹는 음식(ready to cook)에 대한 요구도가 가장 높았다. 들기름 이용 편의 식품 형태에 대한 남녀간의 차이를 분석한 결과 남자는 용기 액상형을 여자는 액상을 병에 넣은 형태에 대한 요구도가 가장 높은 것으로 나타났다.
- 연령에 따른 들깨, 들기름 이용 제품에 대한 요구도를 분석한 결과, 식품 형태는 연령에 따른 차이 없이 모두 연령에서 반찬류에 대한 요구도가 높았으며, 들깨, 들기름 이용 편의 식품유형은 연령에 따른 유의한 차이가 없었다. 편의 식품 형태 또한 연령에 따른 유의한 차이는 없었다.

다. 들기름의 관능적 특성 도출 및 특성강도 평가

들깨 및 들깨 이용 식품의 적정 관능 품질 조건을 제시하기 위하여 한국인(10명), 중국인(8명)과 미국인(9명)을 대상으로 들기름에 대한 묘사분석(cross-cultural descriptive analysis)을 실시하였다. 실험에 사용된 들기름은 기름 추출 전처리 단계에서 들깨를 가열처리한 들기름 4종과 가열처리하지 않은 들기름 3종의 제품을 사용하였다. 향/냄새 특성을 측정하기 위해서 시료를 각각 20 mL씩 50 mL vial에 담아 실온의 온도로 제시하였으며, 맛/향미 특성을 측정하기 위해서 각각 5 mL 시료를 30 g의 조랭떡에 버무려 뚜껑이 있는 직경 4 cm에 높이 3 cm의 하얀 플라스틱 컵에 담아 검사원에게 제시하였다.

들기름 시료들의 관능적 특성에 대해서 시료들 간의 유의적 차이를 알아보기 위하여 분산분석(analysis of variance, ANOVA)를 수행하였으며, 그 결과에 따라 Duncan's multiple range test를 수행하였다. 또한 각 시료의 주요한 관능적 특성을 요약하여 나타내기 위하여 각 특성의 평균값을 적용하여 다중 요인분석(Multiple Factor Analysis; MFA)을 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

Table 1. F-ratios, ρ -values and mean intensity values of 18 attributes for the 7 perilla oil samples evaluated by the Korean panel

	TMPO	HPO	HRPO	DPO	ORPO	JPO	JRPO	F-ratio	ρ -value
Flavor									
Burnt	9.6 ^a	2.7 ^d	7.2 ^c	3.2 ^d	7.6 ^b	3.5 ^d	5.3 ^c	42.736	<0.001
Nurungji	6.9 ^a	2.9 ^{cd}	5.1 ^b	2.1 ^d	5.3 ^b	3.0 ^{cd}	3.9 ^c	18.642	<0.001
Sesame	10.3 ^a	4.3 ^d	9.0 ^b	3.1 ^d	8.3 ^b	4.2 ^d	6.4 ^c	42.724	<0.001
Briny	9.1 ^a	3.0 ^d	7.2 ^b	3.1 ^d	6.0 ^c	3.3 ^d	4.9 ^c	38.758	<0.001
Petroleum	2.9 ^c	3.9 ^b	2.6 ^c	7.0 ^a	2.7 ^c	4.7 ^b	2.8 ^c	20.131	<0.001
Acetone	1.9 ^d	3.3 ^c	1.7 ^d	6.6 ^a	2.1 ^d	4.2 ^b	2.5 ^d	40.053	<0.001
Sour	2.7 ^{bc}	3.6 ^b	2.1 ^c	6.1 ^a	2.1 ^c	3.6 ^b	2.7 ^{bc}	14.576	<0.001
PerillaL	5.8 ^a	4.2 ^b	5.4 ^{ab}	5.3 ^{ab}	5.7 ^a	4.1 ^b	4.7 ^{ab}	2.598	0.020
Fishys	3.3 ^b	3.3 ^b	3.7 ^b	3.7 ^b	3.1 ^b	2.8 ^b	4.9 ^a	4.148	0.001
DrdGreen	4.3 ^{ns}	3.7 ^{ns}	3.8 ^{ns}	4.6 ^{ns}	4.2 ^{ns}	4.0 ^{ns}	3.9 ^{ns}	1.017	0.417
Piner	2.8 ^b	3.6 ^{ab}	2.8 ^b	4.1 ^a	3.2 ^{ab}	3.0 ^b	2.9 ^b	2.025	0.066
Iron	2.6 ^c	3.0 ^{bc}	2.4 ^c	4.5 ^a	2.8 ^{bc}	3.7 ^{ab}	3.1 ^{bc}	4.860	<0.001
Detergent	1.9 ^d	3.1 ^c	2.3 ^{cd}	6.8 ^a	2.8 ^{cd}	4.5 ^b	2.9 ^{cd}	22.424	<0.001
Cookie	3.5 ^a	1.9 ^b	3.9 ^a	1.9 ^b	3.4 ^a	2.8 ^{ab}	3.0 ^a	4.401	<0.001
Sweet	3.3 ^{ab}	2.2 ^b	3.4 ^a	2.6 ^{ab}	3.2 ^{ab}	3.1 ^{ab}	3.3 ^{ab}	1.485	0.187
Alcohol	1.7 ^d	2.9 ^{bc}	1.8 ^d	5.2 ^a	2.1 ^d	3.5 ^b	2.2 ^{cd}	26.959	<0.001
Rancid	4.0 ^{ns}	3.4 ^{ns}	3.8 ^{ns}	4.5 ^{ns}	3.6 ^{ns}	3.9 ^{ns}	3.7 ^{ns}	1.020	0.415
Gmeat	5.2 ^a	2.3 ^d	4.8 ^{ab}	2.3 ^d	4.3 ^b	2.6 ^{cd}	3.4 ^c	19.053	<0.001

¹) Mean values within the same row with the same alphabet superscripts do not differ significantly ($\rho < 0.05$)

²) ns: not significant

Table 2. F-ratios, ρ -values and mean intensity values of 12 attributes for the 7 perilla oil samples evaluated by the Chinese panel

	TMPO	HPO	HRPO	DPO	ORPO	JPO	JRPO	F-ratio	ρ -value
Flavor									
Sesame	12.5 ^a	3.8 ^d	10.5 ^b	2.5 ^d	11.9 ^{ab}	3.2 ^d	6.7 ^c	61.165	<0.001
Greent	3.5 ^b	7.2 ^a	4.1 ^b	8.4 ^a	5.1 ^b	5.3 ^b	5.1 ^b	8.566	<0.001
Cpepper	4.3 ^{ab}	2.5 ^d	4.0 ^{abc}	3.2 ^{cd}	4.5 ^a	2.6 ^d	3.3 ^{bcd}	4.782	<0.001
Fish	4.4 ^{ns}	4.4 ^{ns}	5.5 ^{ns}	4.6 ^{ns}	5.1 ^{ns}	4.7 ^{ns}	5.3 ^{ns}	0.849	0.535
Apple	2.4 ^{cd}	5.2 ^a	1.8 ^d	5.8 ^a	2.9 ^{cd}	5.0 ^{ab}	3.8 ^{bc}	9.759	<0.001
Citron	2.2 ^e	4.0 ^{abc}	2.4 ^{de}	4.8 ^a	3.0 ^{cde}	4.3 ^{ab}	3.5 ^{bcd}	6.224	<0.001
Alcohol	2.0 ^b	2.3 ^b	2.2 ^b	4.3 ^a	2.5 ^b	2.5 ^b	2.8 ^b	4.259	0.001
Oil	4.5 ^{ns}	4.7 ^{ns}	5.0 ^{ns}	4.8 ^{ns}	5.4 ^{ns}	4.7 ^{ns}	5.4 ^{ns}	0.964	0.453
Coconut	2.3 ^{ns}	3.1 ^{ns}	2.5 ^{ns}	2.9 ^{ns}	2.7 ^{ns}	2.8 ^{ns}	2.8 ^{ns}	0.586	0.741
Beany	4.3 ^{ns}	3.8 ^{ns}	4.5 ^{ns}	4.0 ^{ns}	3.9 ^{ns}	3.6 ^{ns}	4.5 ^{ns}	1.089	0.373
Persimmon	2.9 ^{cd}	3.8 ^{bc}	2.4 ^d	4.3 ^b	2.7 ^{cd}	6.7 ^a	3.4 ^{bcd}	12.843	<0.001
Fleaf	2.6 ^c	4.4 ^{ab}	2.8 ^c	4.8 ^a	2.7 ^c	3.2 ^c	3.5 ^{bc}	4.739	<0.001

¹) Mean values within the same row with the same alphabet superscripts do not differ significantly ($\rho < 0.05$)

²) ns not significant

Table 3. F-ratios, ρ -values and mean intensity values of 16 attributes for the 7 perilla oil samples evaluated by the American panel

	TMPO	HPO	HRPO	DPO	ORPO	JPO	JRPO	F-ratio	ρ -value
Flavor									
Pumpkin	1.6 ^e	3.0 ^{bcd}	2.6 ^{cde}	3.8 ^{ab}	2.1 ^{de}	4.6 ^a	3.5 ^{abc}	7.886	<0.001
Greent	1.5 ^d	5.3 ^a	3.9 ^{bc}	4.7 ^{ab}	2.7 ^{cd}	5.3 ^a	4.4 ^{ab}	9.881	<0.001
Musty	3.1 ^{ab}	1.7 ^c	3.3 ^a	2.6 ^{ab}	2.7 ^{ab}	2.4 ^{bc}	2.8 ^{ab}	3.953	0.001
Salty	3.7 ^a	1.7 ^c	2.9 ^{ab}	2.0 ^{bc}	2.8 ^{abc}	2.0 ^{bc}	2.3 ^{bc}	3.837	0.002
Nuts	5.1 ^a	2.1 ^c	2.1 ^c	1.9 ^c	3.7 ^b	2.0 ^c	2.1 ^c	12.111	<0.001
Fish	3.6 ^a	2.3 ^b	3.1 ^{ab}	2.3 ^b	3.3 ^{ab}	2.2 ^b	3.3 ^{ab}	2.587	0.021
Premover	1.0 ^{ns}	1.4 ^{ns}	1.3 ^{ns}	1.4 ^{ns}	1.1 ^{ns}	1.4 ^{ns}	1.6 ^{ns}	0.819	0.557
Tofu	1.6 ^{ns}	2.5 ^{ns}	1.5 ^{ns}	2.0 ^{ns}	1.6 ^{ns}	2.5 ^{ns}	2.2 ^{ns}	1.844	0.096
Rwine	1.3 ^b	1.6 ^{ab}	1.6 ^{ab}	1.9 ^{ab}	2.2 ^a	1.6 ^{ab}	1.8 ^{ab}	1.459	0.197
Flower	1.1 ^d	2.7 ^{ab}	1.9 ^{bc}	2.8 ^a	1.4 ^{cd}	2.5 ^{ab}	2.6 ^{ab}	7.240	<0.001
Grass	1.3 ^c	2.0 ^{ab}	1.7 ^{abc}	1.7 ^{abc}	1.3 ^{bc}	2.3 ^a	2.1 ^a	3.155	0.006
Ssweet	1.6 ^{ns}	1.9 ^{ns}	1.4 ^{ns}	1.9 ^{ns}	1.3 ^{ns}	1.9 ^{ns}	1.4 ^{ns}	1.340	0.244
Rcorn	5.5 ^a	2.0 ^d	3.9 ^{bc}	2.0 ^d	4.5 ^{ab}	2.1 ^d	3.0 ^{cd}	10.899	<0.001
Sesame	7.6 ^a	2.6 ^c	4.9 ^b	2.3 ^c	5.9 ^b	2.1 ^c	3.2 ^c	28.387	<0.001
Dsocks	2.2 ^a	1.3 ^b	2.3 ^a	1.1 ^b	2.2 ^a	1.0 ^b	1.5 ^b	8.428	<0.001
Sour	1.5 ^b	1.7 ^b	2.4 ^a	2.6 ^a	1.4 ^b	1.4 ^b	1.6 ^b	5.008	<0.001

¹⁾Mean values within the same row with the same alphabet superscripts do not differ significantly ($\rho < 0.05$)

²⁾ns: not significant

■ 한국인을 대상으로 한 들기름 7종에 대한 묘사분석을 실시한 결과 탄내(burnt), 누룽지(roasted rice), 참깨(toasted sesame), 짠내(briny), 석유(petroleum), 아세톤(acetone), 신내(sour), 깻잎(sesame leaf), 비린내(fishy smell), 시래기(dried radish greens), 송진(pine resin), 쇠냄새(iron), 세제(detergent), 과자(cookie), 단내(sweet), 알코올(alcohol), 산패유(rancid oil), 구운고기(grilled meat) 등 향미 특성 18개가 도출이 되었고, 이 중에 시래기, 송진, 단내, 산패유를 제외한 14개 용어들에서 유의적인 차이가 나타났다($\rho < 0.05$).

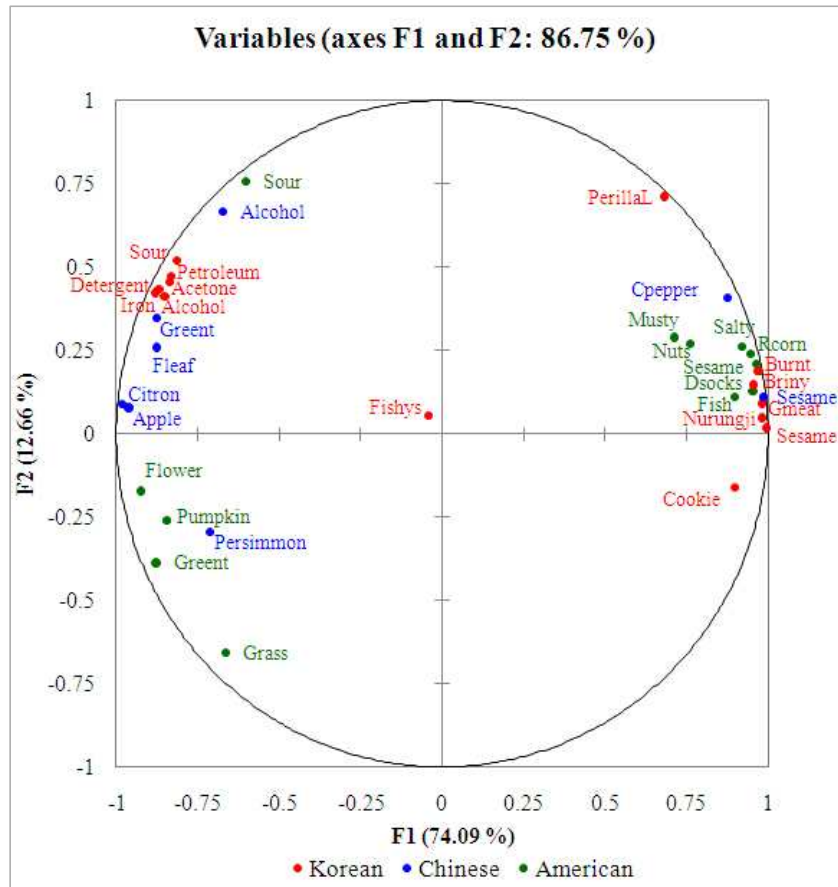
■ 중국인을 대상으로 한 실험에서는 香油(참기름; sesame oil), 綠茶(녹차; green tea), 花椒(산초; Japanese pepper), 魚肝油(어유; fish oil), 青蘋果(풋사과; apple), 柚子(유자; citron), 酒精(알코올; alcohol), 菜仔油(채종유; oil), 椰子(야자; conut oil), 生豆(콩; beany), 柿子(감; persimmon), 樹叶(나뭇잎; fallen leaf) 향미 특성 12개가 도출 되었으며, 이 중 어유, 채종유, 야자, 콩 비린내를 제외한 8개 용어들에서 유의적이 차이가 나타났다($\rho < 0.05$).

■ 마지막으로 미국인을 대상으로 한 실험에서는 호박(pumpkin), 녹차(green tea), 곰팡이 냄새(Musty), 짠내(salty), 견과류 고소한 냄새(nuts), 생선 비린내(fish smell), 페인트

리무버(Paint remover), 두부(tofu), 레드와인(red wine), 꽃향기(flower), 잔디 꽃내(grass), 단내(soft sweet), 구운 옥수수(roasted corn), 참깨(sesame seed), 더러운 양말냄새(dirty socks), 신내(sour) 등의 향미 특성 16개가 도출되었고, 이 중에 페인트 리무버, 두부, 레드와인, 단내를 제외한 14개 용어들에서 모두 유의적인 차이가 나타났다 ($p < 0.05$).

- 비교적 들기름이 익숙한 한국인들이 가장 다양한 용어들을 도출하였고, 들기름에 대한 경험이 없는 미국인들은 다양한 용어들을 도출 하긴 하였으나, 페인트 리무버, 곰팡이냄새, 잔디 꽃내, 더러운 양말냄새 등과 같은 비식품 용어들을 많이 도출 한 것을 확인할 수 있었다.

(a)



(b)

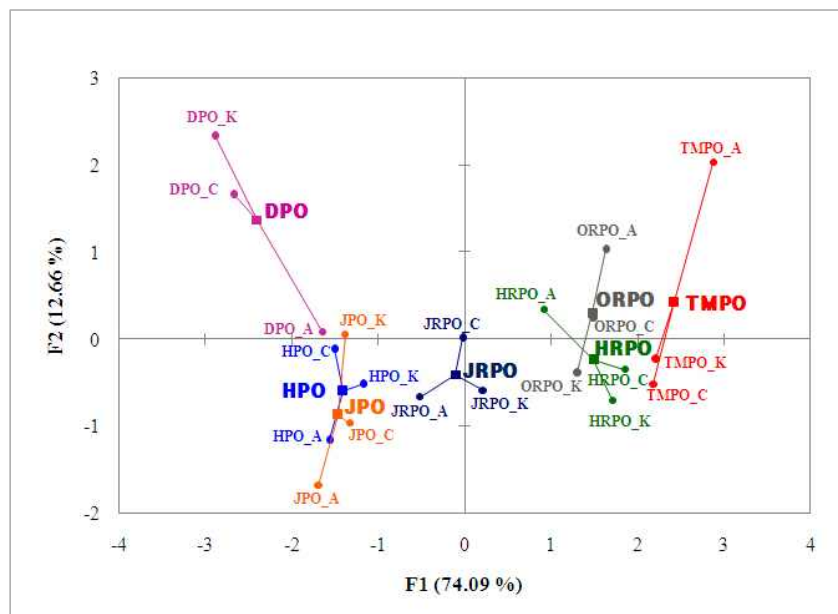


Fig 1. Multiple factor analysis of a variable correlation circle obtained using descriptive terms by Korean, Chinese, and American panels (a) and individual product plots using descriptive sensory profiles (b).

■ 한국, 중국, 미국인들이 평가한 7가지 들기름 시료의 특성 강도에 대해서 각 시료의 평균값을 적용하여 다중 요인 분석을 실시 한 결과, 제 1 요인 (F1)과 제 2 요인(F2)이 각각 총 변동의 74.9%, 12.7%를 설명하여 총 변동의 86.76%를 설명하였다(Figure 1). F1(X축)에 대해 양의 방향으로 부하된 JRPO, HRPO, ORPO, TMPO는 탄내, 누룽지, 참깨, 구운고기, 탄맛 등이 높게 나타났고, 반대방향에 위치한 HPO, JPO, DPO는 이러한 특성들이 낮게 나타났다. F2에 대해 양의 방향으로 부하된 JPO, HPO는 석유, 세제 등이 높게 나타났고 TMPO는 참깨 등의 특성이 높게 나타났다. 이 중 JRPO 시료는 다른 볶음 들기름 시료들과는 달리 좀 더 생 들기름의 특성에 가깝게 배치된 것을 확인 할 수 있었는데(특히 중국인들과 미국인들 에게서 극명하게 나타남), 이는 JRPO시료의 낮은 볶음 온도 및 짧은 볶음시간과 큰 관련이 있는 것으로 사료된다.

라. 들깨죽의 묘사분석 및 소비자 기호도 검사

들깨 및 들깨 이용 식품의 적정 관능 품질 조건을 제시하기 위하여 한국인(10명)과 중국인(9명)을 대상으로 들깨죽에 대한 묘사분석(descriptive analysis)을 실시하고, 87명 한국인과 63명의 중국인을 대상으로 소비자 기호도 조사 (consumer acceptability test)를 실시하였다. 실험에 사용된 들깨죽은 기름 추출 전처리 단계에서 들깨를 가열처리한 볶음 들기름 1종, 가열처리하지 않은 생 들기름 1종, 볶은 뒤 껍질을 벗겨 가루를 낸 들깨가루 1종, 껍질을 벗기지 않고 가루를 낸 들깨가루 1종, 볶은 통 들깨, 가공처리 하여 시즈닝이 된 들깨 가루 1종을 흰 죽에 섞어 만든 들깨죽 6종과, 크림스프 타입으로 걸쭉하게 끓인 들깨죽 및 밀크티 타입의 묽은 들깨죽 등의 총 8 종류의 들깨죽 시료를 사용하였다. 시료는 온도를 유지하기 위해 조리된 후 곧바로 전기밥솥에 보관하였으며, 실험 시작하기 바로 전에 뚜껑이 있는 직경 5 cm에 높이 3.5 cm의 하얀 플라스틱 컵에 담아 곧바로 검사원에게 제시하였다. 시료는 라틴스퀘어 디자인에 따라 한 시료씩 랜덤하게 제시되었다.

들깨죽 시료들의 관능적 특성에 대해서 시료들 간의 유의적 차이를 알아보기 위하여 분산분석(analysis of variance, ANOVA)를 수행하였으며, 그 결과에 따라 Duncan's multiple range test를 수행하였다. 또한 묘사분석의 결과로 각 시료의 주요한 관능적 특성을 요약하여 나타내기 위하여 각 특성의 평균값을 적용한 주성분 분석 (Principle Component Analysis; PCA)을 실시하였으며, 소비자 기호도 검사 결과 분석 시 partial least squares regression (PLSR)를 실시하여 시료 각각의 관능적 특성들과, 기호도의 상관관계를 살펴보았다. 결과는 다음과 같다.

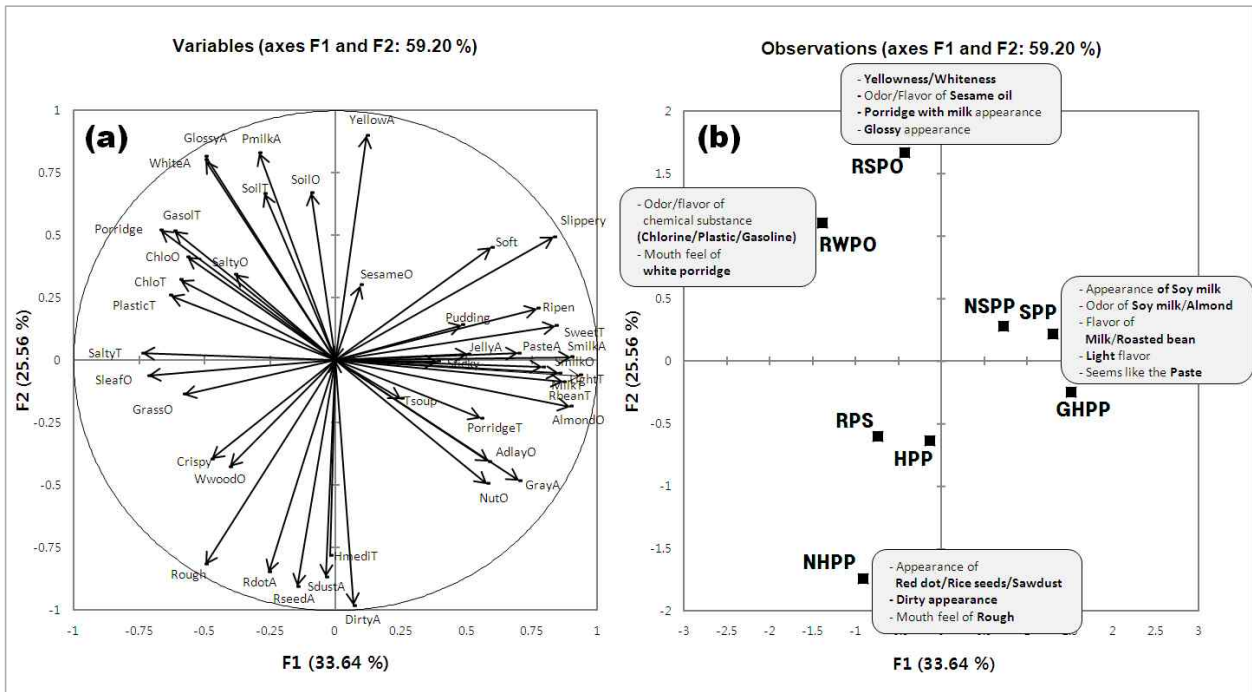


Fig 3. The PC loadings of the sensory attributes (a) and the scores of the perilla porridge sample loadings (b) evaluated by the Chinese panel. RSPO; Roasted perilla oil porridge, RWPO; Raw perilla oil porridge, HPP; Husked perilla powder porridge, NHPP; Non husked perilla powder porridge, RPS; Roasted perilla seeds porridge, NSPP; Husked perilla seasoning powder porridge by NongShim, TPP; Milky tea type perilla porridge.

■ 중국인들이 평가한 8가지 들깨죽의 특성 강도에 대해서 각 시료의 평균값을 적용하여 주성분 분석을 실시 한 결과, 제 1 요인(F1)과 제 2 요인(F2)이 각각 총 변동의 33.64%, 25.56%를 설명하여 총 변동의 61.71%를 설명하였다(Figure 3). F1(X축)에 대해 양의 방향으로 부하된 NSPP, SPP, GHPP는 두유와 같은 외관의 특성, 두유, 아몬드, 우유, 볶은 콩 등의 향미 특성 및 걸죽한 외관 특성이 높게 나타났고, 반대방향에 위치한 RWPO, RPS는 이러한 특성들이 낮게 나타났다. F2에 대해 양의 방향으로 부하된 RSPO, RWPO 시료는 노란색, 흰색 등의 외관특성과 참기름 향미 특성이 높게 나타났고, 반대 방향으로 부하된 NHPP시료는 톱밥, 지저분한 외관과 거친 입안 감촉 특성이 높게 나타났다.

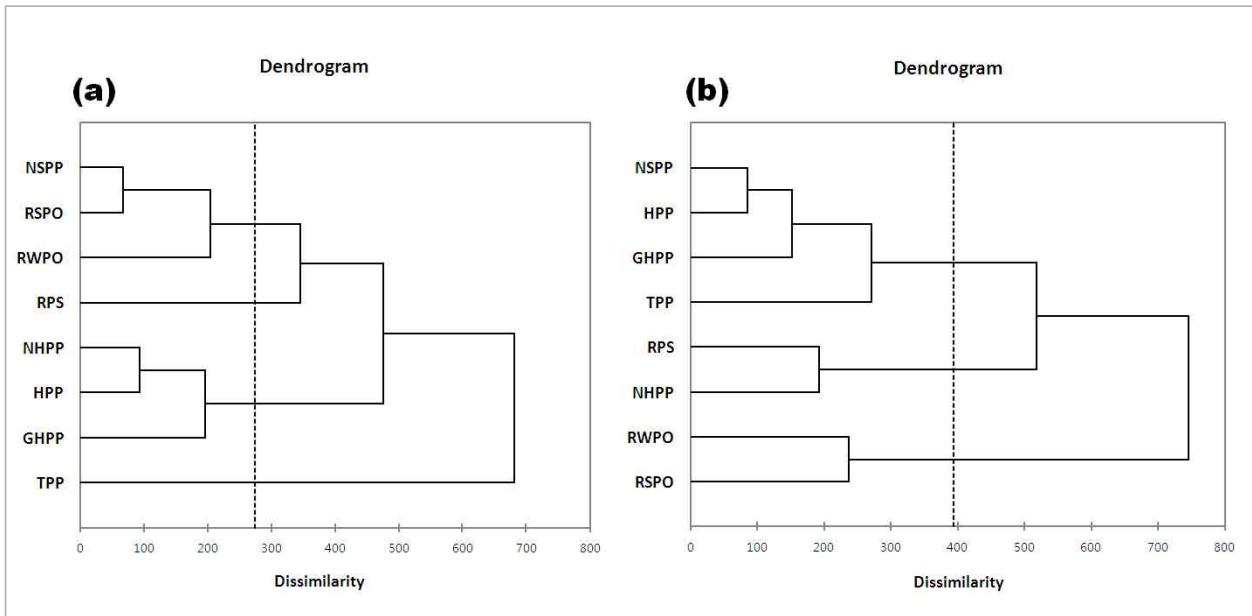


Fig 4. A hierarchical cluster analysis dendrogram of the 8 perilla porridge samples evaluated by the Korean (a) and Chinese panels (b). RSPO; Roasted perilla oil porridge, RWPO; Raw perilla oil porridge, HPP; Husked perilla powder porridge, NHPP; Non husked perilla powder porridge, RPS; Roasted perilla seeds porridge, NSPP; Husked perilla seasoning powder porridge by NongShim, TPP; Milky tea type perilla porridge.

- 한국인의 들깨죽에 대한 묘사분석을 군집분석한 결과, NSPP, RSPO, RPS를 동일 군집으로 분류하고, NHPP, HPP, GHPP를 한 군집, TPP를 또 다른 군집으로 분류하였으며(Figure 4a), 중국인들은 NSPP, HPP, GHPP, TPP, RPS, NHPP를 동일 군집으로 분류하고, RWPO, RSPO를 또 다른 군집으로 분류하여(Figure 4b) 기름base인지, 가루base인지 또 죽 자체의 입자의 크기에도 영향을 받는 것으로 나타났다.

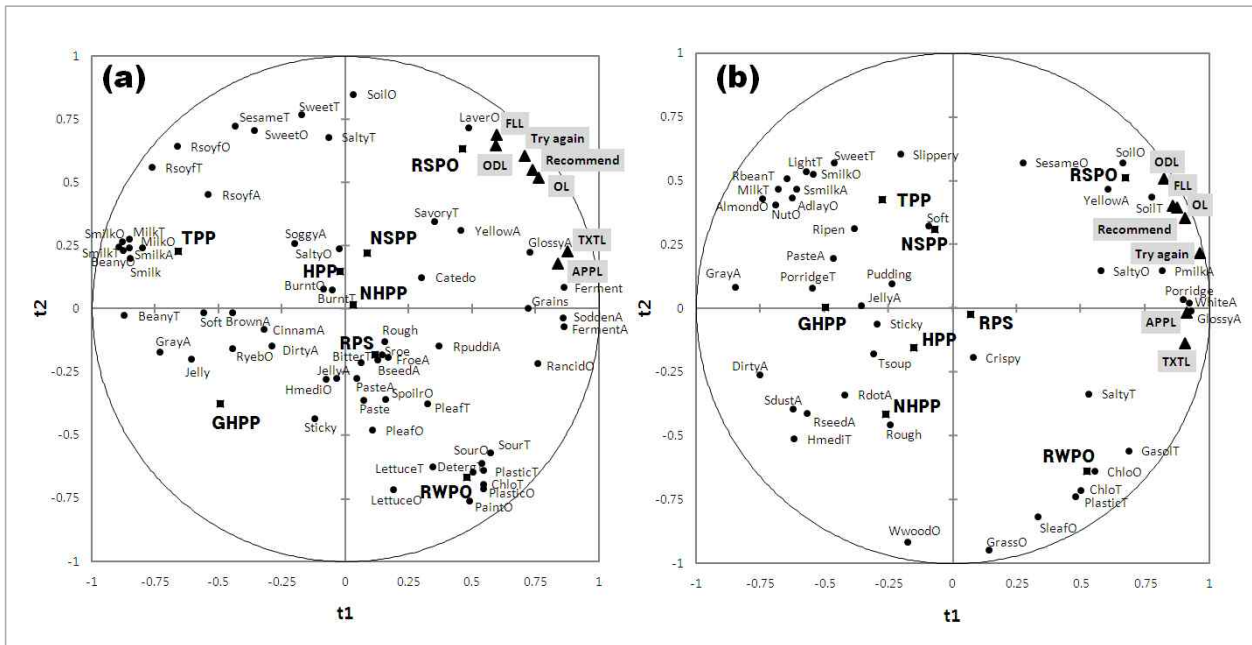


Fig 5. The PLSR result indicated a relationship between the sensory characteristics of the 8 perilla porridge samples and consumer acceptability as evaluated by Korean (a) and Chinese panels (b). RSPO; Roasted perilla oil porridge, RWPO; Raw perilla oil porridge, HPP; Husked perilla powder porridge, NHPP; Non husked perilla powder porridge, RPS; Roasted perilla seeds porridge, NSPP; Husked perilla seasoning powder porridge by NongShim, TPP; Milky tea type perilla porridge.

■ 한국인과 중국인의 들깨죽에 대한 묘사분석 결과와 소비자 기호도 조사 결과를 바탕으로 PLSR분석을 실시한 결과, 두 나라 모두 RSPO 시료에 대한 기호도가 높게 나타났다. 한국인의 경우 윤기 있는 표면, 짠맛, 감칠맛 등의 특성이 기호도를 높이는 주요한 요인으로 작용하였고, 중국인의 경우 윤기있는 표면, 참기름 향미, 밝은 외관 등의 특성이 기호도를 높이는 주요한 요인으로 작용함을 볼 수 있었다. 반면에 회색, 지저분한, 거친 외관 등의 특성은 양 국가에 모두 기호도를 낮추는 요인으로 작용하는 것으로 나타났다.

2. 들깨, 들깨유 소재를 이용한 편의 식품의 산업화

가. 분체형 들깨유의 소재화

분체형 식품의 식품가공과정에서 고체-고체원료의 균일한 혼합여부는 제품의 고유한 맛에 영향을 주며 원료의 혼합공정은 각각의 투입 원료의 물리적 특성에 영향을 받는다. 분체의 물성특성은 쌓임각 (angel of reose), 겉보기 밀도 (aereated bulk density) 를 분체물성측정장치 (Model PT-R, Hosokawa Midron Co. 일본)로 측정하였다. 또한 분체형 편의식품에 분체형 지질을 적용하였을 때 제품의 안정성 측정을 위하여 분체형 지질의 용해도 및 유화 안정성을 측정하였다. 용해도는 원료를 1% 첨가한 후 천천히 가온하면서 완전히 녹는 온도

및 분산되는 온도를 측정하였고 유화안정성은 근적외선 laser sediometer (Turbiscan Lab, France)로 60°C, 1시간 동안의 안정성으로 평가하였다.

(1) 분체형 들깨유의 가공특성 설정

(가) 분체형 기능성 지질 소재의 물리 화학적 특성 조사

- 당사 제품의 스프윈료에 안식각은 각이 작을수록 흐름성 (flowability)이 좋다고 말할 수 있다. 쌓임각이 40 미만일 때 분체는 free-flowing 특성을 가지며 55 이상일 경우에는 흐름성 (flowability)에 문제를 가진다고 보기도 한다.
- 안식각은 입자의 형태, 크기, 다공성, 응집도, 유동성 (fluidity), 표면적 등의 간접적인 지표가 되기도 한다. 따라서 당사제품의 안식각 품질기준 기준은 50~55° 선정하였고 분체형 지질소재 (시중품 1, 2)의 안식각은 50~55°를 나타내었다.
- 가사비중 역시 분체 식품의 유동성을 보기위한 지표로 분체형 지질소재의 품질 기준 0.35~0.50 (g/cc)를 선정하였다 (Table 1). 분체형 지질 소재 시중품 1, 2를 분석해 본 결과 안식각은 각각 45, 52°이었고 가사비중은 0.36, 0.50 이었다.
- 분체형 식품의 용해도는 대부분 실온~50°C에서 용해되었으며 기능성 지질 소재는 실온에서 용해되었다. 따라서 분체형 지질 소재의 용해도의 품질기준은 50°C이하에서 용해되는 것으로 선정하였다.

Table1. 가공조건, 원료종류에 따른 분체식품의 물리, 화학적 특성

	물리적 특성		화학적특성
	안식각 (°)	가사비중 (g/cc)	용해도 (°C)
스프윈료 1 (spray dry)	58.9	0.35	실온~40
스프윈료 2 (spray dry)	52.2	0.44	실온~50
스프윈료 3 (drum dry)	52.0	0.48	실온~40
스프윈료 4 (drum dry)	46.0	0.58	실온~50
스프윈료 5 (과립형)	49.0	0.63	실온~40
평균 (품질지표 기준값 설정)	51.62	0.49	-
기능성 지질 소재 (시중품1)	52	0.36	실온
기능성 지질 소재 (시중품2)	45	0.50	실온

(나) 분체 지질의 가공 및 배합조건에 따른 물리화학적 특성 조사

■ 분체형 지질 A는 55%의 지방함량을 가지고 있으며 wall material 로는 감자전분, 당알콜을 사용하여 제조한 후 freeze dry하여 제조한 제품이며, B는 40%의 지방함량을 가지고 있으며 wall material 로는 베타 사이클로덱스트린, 덱스트린을 사용하여 제조한 후 spray dry 하여 제조하였다. 분체형 지질 C 는 시중 제품을 구매하여 비교 하였으며 약 30%의 지방을 함유하고 있고, starch syrup 을 wall material로 하여 제조한후 spray dry 하여 제조한 제품이었다.

■ Table 2에서 보는 것과 같이 spray dryer에서 제조한 B, C 제품은 안식각, 가사비중은 분체형 지질소재의 품질기준 안식각 기준 50~55°,가사비중 기준 0.35~0.50 (g/cc)를 만족하였으나 시료 A는 caking으로 인해 안식각, 가사비중의 측정이 불가능 하였다. 시료 B는 100°C의 온도에서도 용해되지 않았으며, 시료 A, C는 60, 25°C에서 용해되었다. 각 시료의 유화안정성은 Figure 1에서 보는 것과 같이 시료 A, B는 60°C, 1시간동안의 유화안정성을 만족하지 못하였으나 시료 C는 60°C, 1시간 동안의 유화안정성을 만족하였다.

Table 2. 가공조건 및 원료에 따른 분체형 지질의 물리화학적 특성

		A	B	C
분체특성	안식각 (°)	Not detected	52.2°	50~55°
	가사비중 (g/cc)	Not detected	0.35	0.55~0.60g/cc
용해특성	용해온도(°C)	60°C이상	-	실온
	유화안정성	-	-	+

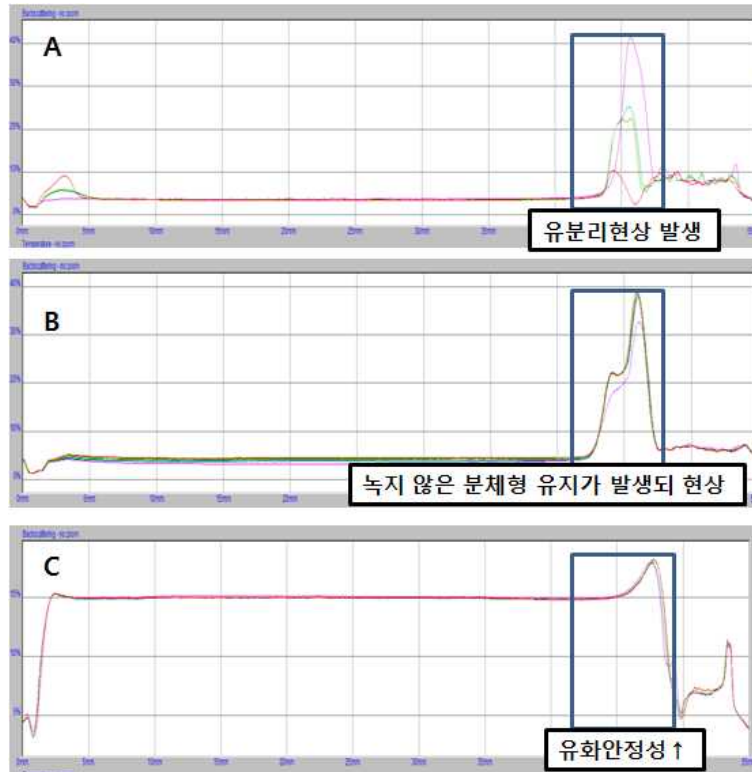


Figure 1. 가공조건 및 원료에 따른 분체형 지질의 유화안정성

(2) 분체형 들깨유의 가공조건 설정

분체형 들깨유는 당사에서 사용될 스프용 (라면, 죽), 스낵용 (시즈닝; 토핑효과)을 target 으로 개발하기 위해 wall material 선정, 유화제 배합비 선정을 최적화 하였다.

(가). 분체형 들깨유의 wall material 선정

- 분체형 들깨유는 분말기준으로 들깨유 40%를 캡슐화 할 수 있는 wall material을 선정하였다. 각각의 wall material에 따라 들깨유의 캡슐화 정도가 다르다. 분체형 들깨유의 선정기준은 당사 분체특성 물성 특성을 기준인 안식각 50~55°, 가사비중 0.35~0.50(g/cc) 으로 선정하였다.
- 분체의 물성특성은 쌓임각 (angel of reose), 겉보기 밀도 (aereated bulk density) 를 분체물성측정장치 (Model PT-R, Hosokawa Midron Co. 일본)로 측정하였다.
- Table 3에서 보는 것과 같이 분체형 들깨유의 가사비중과 안식각의 기준에 맞는 wall material 로는 cyclodextrin 과 HPMC이 적합하였다.

Table 3. Wall material에 따른 분체형 들깨유의 안식각 및 가사비중

	안식각	가사비중	장점	단점
Cyclodextrin	52	0.35	- Capture capacity ↑ - 분체적성 ↑	- 맛 ↓ (단맛)
HPMC ¹⁾	50	0.40	- Capture capacity ↑ - 분체적성 ↑ - 맛 (wall material 자체의 맛이 없음)	- 제조공정 최적화 어려움. - 수율 ↓
Hi-cap	60	0.55	Capture capacity △	분체물성 ↓
Arabic gum	58	0.58	- 맛에 영향이 적음.	- Capture capacity ↓ - 분체물성 ↓
Corn syrup	65	0.60	- 들깨향이 capsulation 되지 않는 특성이 있음.	- Capture capacity ↓ - 분체물성 ↓
Dextrin	58	0.60	들깨향이 capsulation 되지 않는 특성이 있음.	- Capture capacity ↓ - 분체물성 ↓

¹⁾HPMC : Hydroxy Propyl methyl cellulose

(나) 분체형 들깨유의 배합비 선정

- 분체형 들깨유의 wall material에 따른 최적 배합비 선정을 위해 cyclodextrin, hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC)에 따른 유화제 및 기타 부형제의 최적 배합비를 선정하였다. 선정된 유화제의 최적 배합비율은 유화안정성은 근적외선 laser sedimentometer (Turbiscan Lab, France)로 측정하였고, 60°C, 1시간 동안의 안정성을 turbiscan stability index로 평가하였다.
- 분체형 들깨유 A, B는 각각 유화제 및 기타 부형제의 최적화 시험을 turbiscan stability index로 평가한 결과 분체형 들깨유 A (cyclodextrin)는 pentaglycerol mono stearate를 분말기준 1.2% 첨가하였을 때 최적의 유화안정성을 나타내었고, 분체형 들깨유 B (HPMC)는 lecithin를 1.6% 첨가하였을 때 최적의 유화안정성을 나타내었다 (Table 4).
- 따라서 Type A 분체형 들깨유는 들깨유 40%, pentaglycerol mono stearate 1.2%, sodium caseinate 27%, cyclodextrin 31.1%, polyphosphate 0.7%로 최적화 하였고 Type B 분체형 들깨유는 들깨유 40%, lecithin 1.6%, corn syrup 9.3%, maltodextrin 12.3%, hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) 36.5%, polyphosphate 0.7%로 최적화 하였다 (Table 5).

Table 4. 유화제 첨가에 따른 만든 분체형 들깨유의 유화안정성 (A type : cyclodextrin)

	1	2	3	4	5	6
Perilla oil	40	40	40	40	40	40
Pentaglycerol mono stearate	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
Sodium caseinate	27	27	27	27	27	27
Cyclodextrin	32.3	31.9	31.5	31.1	30.7	30.3
Polyphosphate	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Turbiscan stability index ¹⁾	3.13	2.88	2.67	1.56	1.59	1.58

¹⁾ Turbiscan stability index : 시간에 따라 유화안정성이 변하는 정도

Table 5. 유화제 첨가에 따른 만든 분체형 들깨유의 유화안정성 (B type : HPMC)

	1	2	3	4	5	6
Perilla oil	40	40	40	40	40	40
Lecithin	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
corn syrup	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3
Maltodextrin	13.5	13.1	12.7	12.3	11.9	11.5
HPMC	36.5	36.5	36.5	36.5	36.5	36.5
Polyphosphate	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Turbiscan stability index ¹⁾	3.02	2.78	2.56	2.04	1.76	1.75

¹⁾ Turbiscan stability index : 시간에 따라 유화안정성이 변하는 정도

(3) 분체형 들깨유의 최적 가공공정 확립

(가) 분체형 기능성 지질 소재 복원성 향상을 위한 가공조건 설정 (Type A)

- 분체형 들깨유의 제조는 최적배합비의 가공조건을 최적화하였다. 가공조건으로는 homoxing 속도 (rpm), homogenization 압력 (psi) 및 시간 (times) 으로 선정하였다.
- Homoxing 속도 (rpm), homogenization 압력 (psi) 및 시간 (times)는 spray dry 전 o/w 형 유화상태에서의 유화물을 Mastersizer 2000을 이용하여 유적의 크기를 측정하여 최적화 하였다. 유화물의 유적크기가 작고 균일한 정도에 따라 복원성이 향상에 영향을 미친다 (Table 6).

■ Homomixing 속도는 6,000~9,000 rpm, homogenization 압력 3,000~6,000psi, homogenization 시간 1~3 times 범위에서 실험하였고 homomixing 온도는 Type A의 sodium caseinate 가 녹는 온도 80°C로 고정하여 oil drop size를 최소화 하였다. 각 가공조건의 최적화는 Minitab 15를 사용하여 주효과도 분석 후 최적조건을 선정하였다.

Table 6. 가공조건에 따른 Type A의 분체형 들깨유의 oil drop size

Homomixing 속도 (rpm)	Homogenization 압력 (psi)	Homogenization 시간 (times)	Oil drop size (nm)
6,000	3,000	1	1,500
6,000	3,000	3	952
6,000	6,000	1	1,254
6,000	6,000	3	576
9,000	3,000	1	1454
9,000	3,000	3	932
9,000	6,000	1	1153
9,000	6,000	3	554

* Homomixing 온도 : 80°C

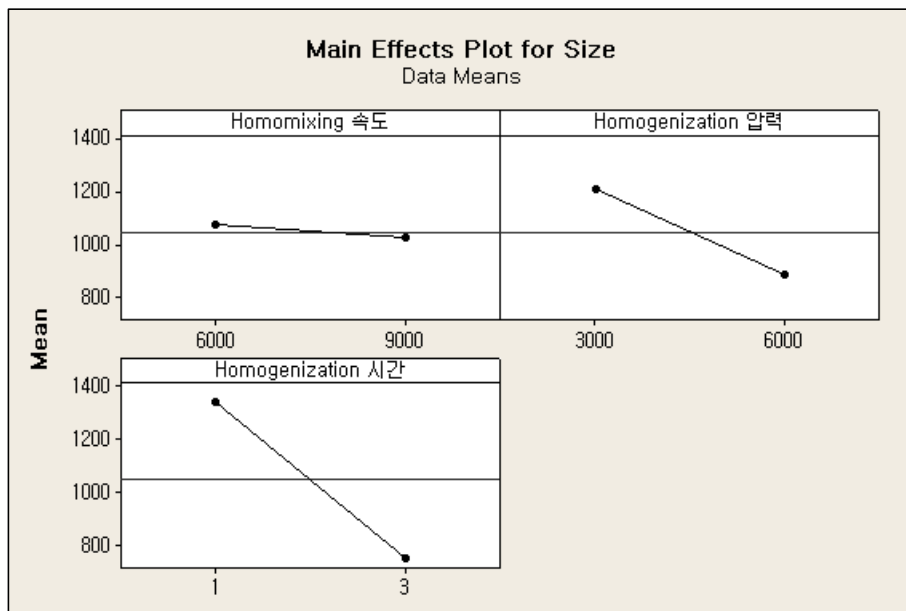


Figure 2. 가공조건에 따른 Type A 분체형 들깨유의 oil drop size 주영향도

Figure 2에서 보듯이 Type A의 분체형 유지는 homomixing 속도 (rpm)은 큰 영향을 미치지 않으나 homogenization 압력 (psi) 및 시간 (times)는 6,000psi, 3 times에서 가장 oil

size가 적었다. 분체형 유지를 만들기 전 o/w형의 유화물의 oil size는 작을수록 안정한 분체형 들깨유를 나타낸다. 따라서 homomixing 속도 (rpm) 6,000, homogenization 압력 (psi) 6,000, homogenization 시간 (times) 3이 최적 가공조건으로 선정하였다.

(나) 분체형 기능성 지질 소재 복원성 향상을 위한 가공조건 설정 (Type B)

■ 분체형 들깨유의 제조는 최적배합비의 가공조건을 최적화하였다. 가공조건으로는 homomixing 속도 (rpm), homogenization 압력 (psi) 및 시간 (times) 으로 선정하였다. Homomixing 속도 (rpm), homogenization 압력 (psi) 및 시간 (times)는 spray dry 전 o/w 형 유화상태에서의 유화물을 Mastersizer 2000을 이용하여 유적의 크기를 측정하여 최적화 하였다 (Table 7).

■ Homomixing 속도는 6,000~9,000 rpm, homogenization 압력 3,000~6,000psi, homogenization 시간 1~3 times 범위에서 실험하였고 homomixing 온도는 Type B의 HPMC의 특성에 따라 30°C로 고정하여 oil drop size를 최소화 하였다. 각 가공조건의 최적화는 Minitab 15를 사용하여 주효과도 분석 후 최적조건을 선정하였다.

Table 7. 가공조건에 따른 Type B의 분체형 들깨유의 oil drop size

Homomixing 속도 (rpm)	Homogenization 압력 (psi)	Homogenization 시간 (times)	Oil drop size (nm)
6,000	3,000	1	1,500
6,000	3,000	3	1,056
6,000	6,000	1	1,243
6,000	6,000	3	912
9,000	3,000	1	998
9,000	3,000	3	732
9,000	6,000	1	798
9,000	6,000	3	543

* Homomixing 온도 : 30°C

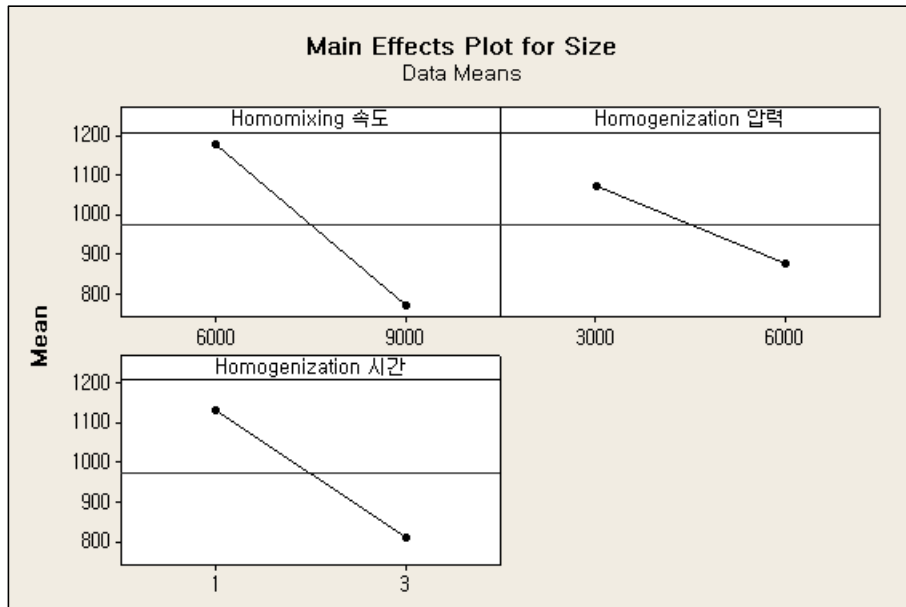


Figure 3. 가공조건에 따른 Type B 분체형 들깨유의 oil drop size 주영향도

- Figure 3에서 보듯이 Type B의 분체형 유지는 homomixing 속도 (rpm), homogenization 압력 (psi) 및 시간 (times)에 영향을 받으며 9,000rpm, 6,000psi, 3 times에서 가장 oil size가 적었다.
- 분체형 유지를 만들기 전 o/w형의 유화물의 oil size는 작을수록 안정한 분체형 들깨유를 나타낸다. 따라서 homomixing 속도 (rpm) 9,000, homogenization 압력 (psi) 6,000, homogenization 시간 (times) 3이 최적 가공조건으로 선정하였다.

(4) 분체형 들깨유의 대량생산 공정 확립

분체형 들깨유의 최적배합비, 최적가공공정을 정하였고 대량으로 분무건조시 최적조건을 설정하였다.

(가) 분체형 기능성 지질 소재의 품질 저해 요인 규명

- 분체형 들깨유는 들깨유 type A를 o/w 상태로 유화시킨 후 분무건조기 (spray dryer)를 이용하여 건조하였다 건조공정은 대량으로 건조함에 따라 유화물이 들어가는 feeding 속도(mL/min), automize 속도 (Hz), 분무건조기 inlet 온도, outlet 온도 등에 영향을 받는다.
- 따라서 feeding 속도 10~30 (mL/min), automizer 속도 10~20Hz, 분무건조 inlet 온도 150~170°C, 분무건조 outlet 온도 100~110°C의 요인 중 품질 저해요인을 규명하였다. 품질저해요인은 수율로 평가하였으며 Mintab 15 프로그램을 활용하여 품질저해요인을 선정하였다. 유화물은 고휘분 함량을 20%로 하여 분무건조를 시행하였다 (Table 8).

Table 8. 분무건조 가공조건에 따른 수율변화

Feeding 속도 (mL/min)	Automizer 속도 (Hz)	Spray dryer inlet 온도 (°C)	Spray dryer outlet 온도 (°C)	수율 (%)
10	10	150	100	90.8
30	10	150	110	83.2
10	20	150	110	92.5
30	20	150	100	85.3
10	10	170	110	91.3
30	10	170	100	82.2
10	20	170	100	95.5
30	20	170	110	85.4

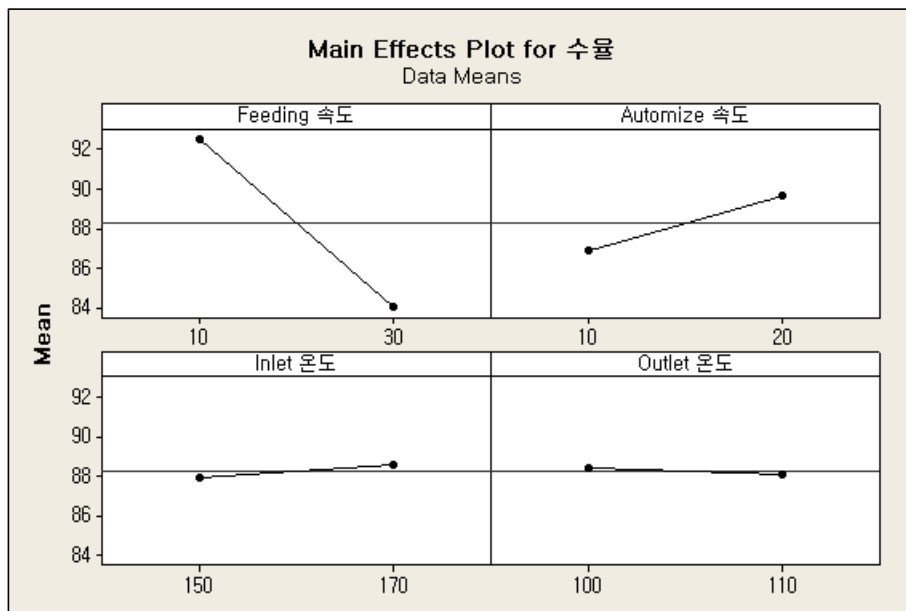


Figure 4. 가공조건에 따른 분체형 들깨유의 수율의 영향도

■ Minitab의 주효과도 분석에 의하면 들깨 유화물의 feeding 속도에 가장 큰 영향을 받으며 그다음으로 automizer 속도에 영향을 받는다 ($P < 0.05$). spray dryer inlet, outlet은 수율에 유의적인 ($P > 0.05$)을 주지 않았다. 따라서 분무건조기의 feeding 속도, automizer 속도가 수율에 주요 품질저해 요인임을 알 수 있었다(Figure 4).

(나) 분체형 기능성 지질 소재의 대량 생산 공정 확립

분체형 들깨유는 o/w 상태로 고형분 함량 20%로 유화시킨 후 분무건조기 (spray dryer)를 이용하여 건조하였다 건조공정의 수율에 영향을 미치는 요인으로 feeding 속도 (mL/min),

및 automizer 속도 (Hz)로 나타났으며 그 외 분무건조기의 inlet, outlet 온도(°C)는 큰 영향을 미치지 않았다. 따라서 분무건조기의 inlet, outlet 온도를 170°C, 110°C로 고정시키고 feeding 속도와 automizer 속도를 최적화 하였다. 최적화 과정은 Mintab 15 프로그램을 활용하여 시행하였다 (Table 9).

Table 9. 수율향상을 위한 분체형 들깨유의 최적화 공정

Feeding	Atomizer	수율 (%)
20	15	92.8
30	20	81.9
20	20	84.5
20	15	86.7
30	15	83.5
10	15	93.2
30	10	85.4
20	10	84.3
10	10	91.8
10	20	95.8

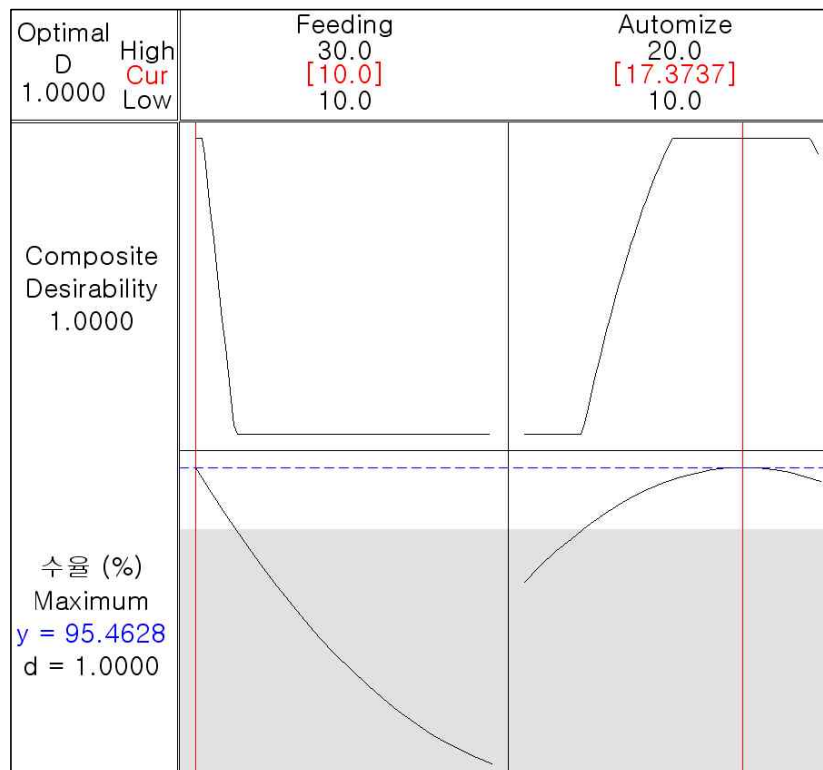


Figure 5. 수율향상을 위한 분체형 들깨유의 최적화조건

- 20%로 유화시킨 분체형 들깨유 유화물은 건조공정의 수율에 영향을 미치는 요인 feeding 속도 (mL/min), 및 automizer 속도 (Hz)를 10mL/min, 17.4 Hz일때 최대로 나타났다.
- 따라서 분체형 들깨유의 최적화 공정은 분무건조 조건 feeding 속도 10mL/min, automizer 속도 20Hz, 분무건조기 inlet 온도 170°C, 분무건조기 outlet 온도 110°C일 때 최대수율 95.5%로 나왔다 (Figure 5).

나. 수용성 나노들깨유의 소재화

수용성 나노들깨유는 들깨유의 가공적성을 개선하여 O/W 형의 유화유지로 제조하였다. 제조된 용성 나노들깨유 향후 면 또는 스낵 기지에 첨가하여 사용할 수 있는 형태로 제조하였다.

(1) 나노들깨유의 가공특성 선정

(가) 수용성 나노들깨유의 물리 화학적 특성 조사

- 당사 제품의 스낵 및 면의 배합수에 첨가될 수용성 나노들깨유는 O/W 형 유화유지로 유분리가 일어나지 않아야 한다. 따라서 60°C에서 30일 동안 저장하였을 때 들깨유와 water phase의 유분리가 발생되지 않아야 한다.
- 수용성 나노들깨유는 물에 첨가하였을 때 일정시간동안 유분리가 일어나지 않아야 하며 oil drop size가 200nm이하 이어야 수용액 상태에서 oil drop size가 일정시간 동안 유지할 수 있는 조건이다.

(나) 수용성 나노들깨유의 배합조건에 따른 물리화학적 특성

- 수용성 나노들깨유의 배합비는 유화제, water phase, 들깨유의 함량으로 선정하였다. 선정된 수용성 나노들깨유의 배합비는 유적크기(oil drop size), 유화안정성 (turbiscan stability index)으로 선정하였다. 유적크기 (oil drop size)는 Mastersizer 2000을 이용하여 유적의 크기를 측정하였고, 유화안정성은 근적외선 laser sediomentometer (Turbiscan Lab, France)로 60°C, 1시간 동안 평가한 것을 turbiscan stability index로 나타내었다 (Table 10).
- 수용성 나노들깨유는 들깨유 30~50%를 O/W 형태로 제조하였을 때 수용성 나노들깨유의 최적배합비를 선정하였다. 수용성 나노들깨유의 배합비는 Design Expert 7.0 프로그램을 이용하여 최적화 하였다.

Table 10. 수용성 나노들깨유의 배합비에 따른 유적의 크기 및 유화안정성

유화제 (Pentaglycerol monostearate) (%)	들깨유 (%)	올리고당 (%)	물 (%)	Oil drop size (nm)	Turbiscan stability index
1.50	30.00	50.50	18	620	0.92
1.50	30.00	50.50	18	495	0.89
1.99	39.76	40.25	18	788	1.98
2.25	30.00	49.75	18	481	0.82
2.25	30.00	49.75	18	399	0.87
2.36	34.74	44.91	18	512	0.89
2.47	44.50	35.03	18	753	2.78
2.48	49.52	30.00	18	862	3.12
2.48	49.52	30.00	18	533	1.05
2.94	39.19	39.88	18	397	0.85
3.05	43.92	35.03	18	446	1.00
3.05	48.95	30.00	18	472	0.98
3.63	48.37	30.00	18	496	0.88
3.63	48.37	30.00	18	402	0.75

1) Turbiscan stability index : 시간에 따라 유화안정성이 변하는 정도

- 수용성 나노들깨유의 유적크기는 Design expert 7.0 프로그램을 활용하여 최적화 한 결과 유적크기, turbiscan stability index를 최소화 하는 조건을 선정한 결과 유지대비 유화제의 함량이 0.075일 때 유적의 크기 및 turbiscan stability index가 최소화 되었다.
- 따라서 수용성 나노들깨유는 들깨유 30%, 올리고당 49.7%, pentaglycerol monostearate 2.3%, water 18%를 배합비로 선정하였다 (Figure 6).

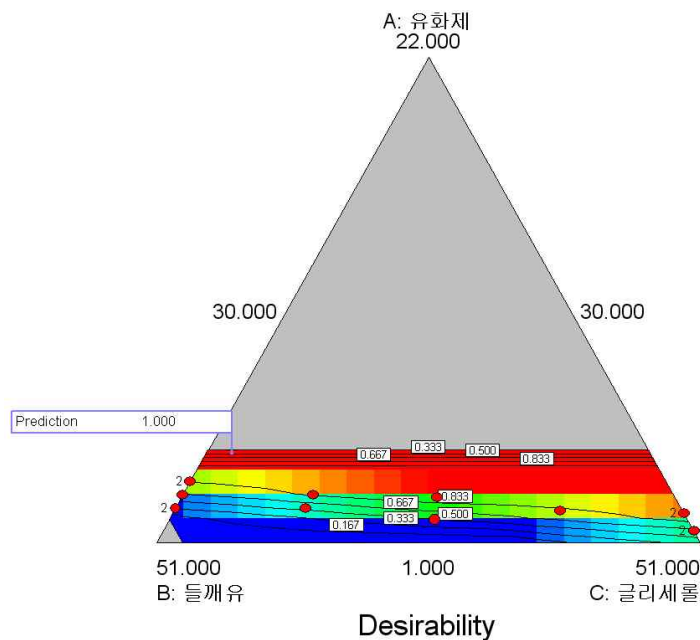


Figure 6. 유적크기, turbiscan stability가 최소화된 수용성 나노 들깨유의 최적배합비

(2) 수용성 나노들깨의 가공조건 설정

■ 수용성 나노들깨의 제조는 최적배합비의 가공조건을 최적화하였다. 가공조건으로는 homomixing 온도 (°C), homogenization 압력 (psi) 및 시간 (times) 으로 선정하였다.

■ Homoxing 온도 (°C), homogenization 압력 (psi) 및 시간 (times)는 O/W 형 유화상태에서의 유화물을 Mastersizer 2000을 이용하여 유적의 크기를 측정하여 최적화 하였다 (Table 11).

■ 유화물의 oil size는 oil size가 작을수록 분산상태가 매우 우수하여 유화안정성이 향상된다.

Homomixing 온도는 60~90°C, homogenization 압력 3,000~6,000psi, homogenization 시간 1~3 times 범위에서 실험하였고 이를 통해 oil drop size를 최소화 하였다.

Table 11. 가공조건에 따른 수용성 나노들깨유의 oil drop size

Homomixing 온도 (°C)	Homogenization 압력 (psi)	Homogenization 시간 (times)	Oil drop size (nm)
60	3,000	1	512
60	3,000	3	321
60	6,000	1	421
60	6,000	3	319
90	3,000	1	403
90	3,000	3	309
90	6,000	1	321
90	6,000	3	192

* Homoxing 속도 : 5,000rpm

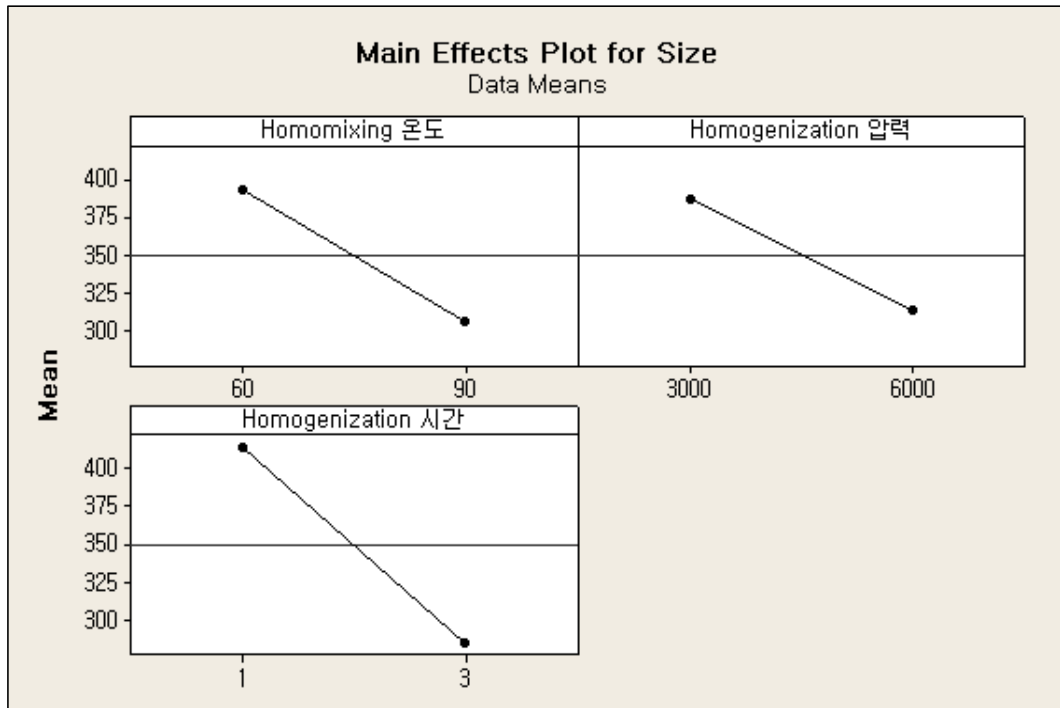


Figure 7. 가공조건에 따른 수용성 나노들깨유의 oil drop size 주영향도

- Figure 7에서 보듯이 수용성 나노들깨유는 homomixing 온도 (°C), homogenization 압력 (psi) 및 시간 (times)에 영향을 받으며 90°C, 6,000psi, 3 times에서 가장 oil size가 적었다. 수용성 나노들깨유는 oil size는 작을수록 안정한 수용성 나노들깨유를 나타낸다. 따라서 homomixing 온도 (°C) 90, homogenization 압력 (psi) 6,000, homogenization 시간 (times) 3이 최적 가공조건으로 선정하였다. 이 조건에서의 수용성 나노들깨유의 oil drop size는 200nm 이하여였다.

(3) 수용성 나노들깨유의 대량생산 공정 확립

수용성 나노들깨유의 Lab scale 최적배합비, 최적가공공정으로 대량생산을 진행하였고 이를 통해 최적 조건을 설정하였다.

- Lab scale 최적배합비인 들깨유 30%, 올리고당 49.7%, pentaglycerol monostearate 2.3%, water 18%를 배합비로 하였다. 이때 대량생산은 1 ton 기준으로 생산하였다.
- 대량실험 가공조건은 대량실험 설비기준으로 선정하여 실험하였다 (Table 12). 이때 온도 및 hemogenization 시간에 따라서 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 대량실험 조건은 Homomixing 온도, Homogenization 시간은 각각 60°C, 1 time 선정하였다.

Table 12. 대량실험 가공조건에 따른 수용성 나노들깨유의 oil drop size

Homomixing 온도 (°C)	Homogenization 압력 (psi)	Homogenization 시간 (times)	Oil drop size (nm)
60	3,000	1	198
60	3,000	3	196
90	3,000	1	197
90	3,000	3	198

다. 수용성 나노들깨유를 활용한 레토르트 들깨죽 대량생산 공정 최적화

수용성 나노들깨유를 사용하여 레토르트 들깨죽 대량생산을 진행하였다. 레토르트 들깨죽 원료로는 멥쌀, 찹쌀, 탈피들깨가루, 땅콩가루를 사용하였다. 나노들깨유 적용 들깨죽 현장생산은 (주)선양에서 진행하였다.

(1) 레토르트 들깨죽의 현장생산

레토르트죽 제조공정은 크게 3 부분으로 나뉘는데, 첫째는 찹쌀, 멥쌀, 탈피들깨가루, 땅콩가루 등의 마쇄공정이고, 두번째 제조공정은 호화 공정으로 마쇄된 찹쌀, 멥쌀, 땅콩가루, 탈피들깨가루와 소금, 설탕, 수용성 나노들깨유 의 혼합 및 가열공정을 거쳐 레토르트 들깨죽을 완성한 후, 세번째 공정은 배출된 레토르트들깨죽을 rotary packer를 이용해 포장한 후, 레토르트 살균하는 공정으로 각각의 세부 공정은 다음과 같다. 레토르트 들깨죽은 350kg 기준으로 생산하였다.

(가) 마쇄공정

- 원료 중 멥쌀, 찹쌀을 1시간 이상 불린 후 땅콩가루, 탈피들깨가루를 투입하고 정제수를 전체 수분함량의 50%를 첨가하여 마쇄하였다.

(나) 가열 및 호화공정

- 들깨죽의 가열 및 호화공정은 현장생산 레토르트 들깨죽 제조에 가장 중요한 공정이다. 추후 공정인 레토르트 공정에서도 들깨죽이 호화되기 때문에 이 공정에서 들깨죽을 완전히 호화시키게 되면 레토르트 공저에서 점도가 높아져 상품의 가치가 떨어지게 된다.
- 따라서 호화공정 중 호화온도 80°C, 호화시간을 5~15분 설정하여 실험하였고 이때 호화된 들깨죽의 brix 및 염도가 각각 4.0~4.2, 0.17~0.18를 만족하는 수준을 설정하였다. 이때의 Brix와 염도는 레토르트 후 최적 물성을 가지는 농도이다.
- 실험결과 최적 호화온도는 80°C에서 brix 4.0~4.2, 염도 0.17~0.18.을 가지는 조건은 15분이었다.
- 따라서 대량설비를 이용한 호화공정은 들깨죽이 섞을 정도의 속도 20rpm에서 호화온

도 80°C, 15분으로 설정하여 생산하였다.

(다) 레토르트 공정

- Holding tank로 이송된 들깨죽은 자동포장기(Rotary packer)를 이용하여 레토르트 파우치에 300g씩 충전되며, 이후, 중량 및 정량을 검사, sealing 불량검사 및 금속검출기를 통과한다. 금속검출기를 통과한 들깨죽은 레토르트 살균기용 대차에 적재되어 레토르트 살균공정으로 이송된다. 파우치 포장은 300g 씩 1200식을 포장하였고, 1차 살균은 95°C에서 0.95kg/cm², 15분간 진행하였고 121°C까지 승온시킨 후 121°C, 2.00kg/cm²에서 25분간 살균하였고, 40°C 까지 냉각 및 감압 시킨 후 배출하였다.
- 레토르트 살균의 살균력은 F value를 측정하여 판단하며, 일반적으로 상업적살균(Commercial Sterilization)수준인 12D 정도의 살균력을 확보하여야 한다. 파우치포장 완료 후 일반세균수는 10²/g, 내열성균은 음성이었다. 레토르트관체 내부에 ELAB Sensor를 통하여 F값을 측정하였으며, 관체 내부의 살균력 편차를 측정하기 위하여 가장 살균력이 강한 관체 중심부 하단부위와, 가장 살균력이 떨어지는 관체 입구쪽 상단부위에 센서를 배치하여 측정하였다. Setting된 레토르트 살균공정에 따라 살균후 F value를 측정한 결과는 Table 13과 같았다.

Table 13. 레토르트 살균 후 F value 측정 결과

	관체 중심부	관체 입구
F value	20.27	19.00

- 측정결과 가장 살균력이 약한 부분인 관체 입구쪽에서 19.00의 F value를 확보하였다. F value 19.00 은 미생물수를 초기대비 10^{19.00}만큼 감소시킬수 있다는 뜻이다. 따라서, 살균전의 일반세균수인 10²/g을 모두 내열성세균이라 가정하여도 10²cfu/g →10⁻¹⁷cfu/g로 감소시킨다는 의미로 이는 곧 상업적 살균의 수준을 충족시킨다고 판단 할 수 있기 때문에, 샘플을 수거하여 식품공전상의 “16) 세균발육시험 (통병조림,레토르트식품)”을 실시하였고 그 결과 또한 모두 음성이었다.
- 호화된 들깨죽은 rotary packer를 이용해 포장한 후, 레토르트 살균하는 공정시제품 생산을 완료하였다. 이때 미생물 증식이 되지 않는 조건을 만족하기 위한 위해 95°C에서 15분, 121°C에서 25분간 살균하였고 이때 F값은 19로 미생물증식과 관련된 안전성 부분도 충족시켰으며, 상온유통으로 12개월의 유통기한을 확보하는 시제품을 생산하였다.
- 제조한 시제품은 들깨죽에 나노들깨유를 적용함으로써 들깨의 풍미를 강화시키고 활용도를 증가시킬 수 있었으며, 향후 들깨죽은 노인식이나 환자식 등의 제품 개발가능성을 높일 수 있을 것이라 예상된다.

(2) 레토르트 들깨죽의 제조공정도

레토르트 들깨죽의 현장실험을 하기 위한 배합비는 Table 14과 같았으며 생산공정은 Figure 8~9와 같이 진행하였다. 최종적으로 생산된 시제품은 Figure 10과 같았다.

Table 14. 레토르트 들깨죽 배합비

	1식 (g)	1200식 (kg)
불린멥쌀	13.4	16.08
불린찹쌀	13.4	16.08
탈피들깨가루	26.9	32.32
수용성 나노들깨유지	2.7	3.25
땅콩가루	13.4	16.08
정제염	1.1	1.36
정백당	0.4	0.49
정제수	228.6	274.33
Total	300.0	360.0

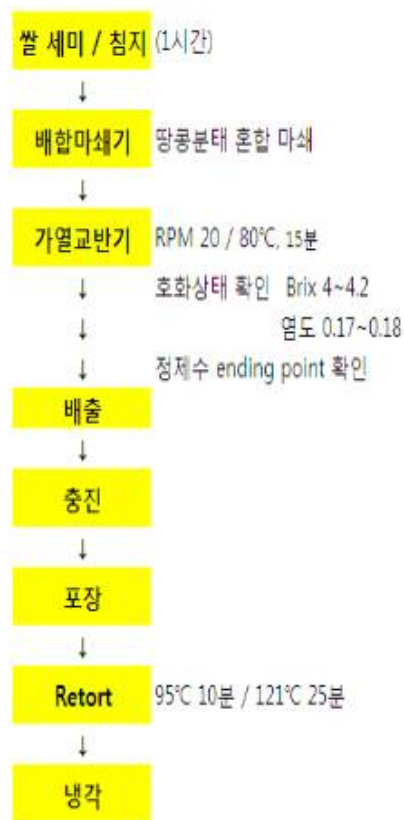


Figure 8. 레토르트 들깨죽 제조공정도



Figure. 9 레토르트 들깨죽 현장생산 공정



Figure 10. 레토르트 들깨죽 시제품

라. 레토르트 들깨죽의 마케팅 전략

(1) 내/외부 환경조사

(가) 외부환경 조사

- 노인은 65세 이후로 우리나라 10명중 1명은 65세 이상의 고령자로 2005년 9.1%에서 2018년 14.3%로 고령사회로 진입하며 초고령사회는 2026년 20.8%에 도달할 것으로 예상된다 (1).
- 고령인구는 소비실태에 따라 여유 있는 자산을 기반으로 적극적인 소비를 하는 ‘뉴시니어’ 계층과 그 외의 계층으로 구분될 수 있으며, 산업적 측면에서의 접근을 위해 현재는 건강/영양상태에 따른 구분을 사용하고 있다 (2).
- 일본과 같은 선진국의 경우 실버산업이 확장되고 있으나, 우리나라는 현재 초기단계에 있다.
- 식품산업에의 적용에 있어서는 최근 건강한 고령인구에 대한 관심이 증가되면서 Down-Aging, 건강 유지를 위한 보조식품, 건강기능식품 등이 개발되고 있으며, 이 시장은 점차 확대, 성장될 것이라 전망된다 (3).
- 또한 병원과 요양시설 등의 비건강인(환자식)을 위한 식사대용식과 제품의 물성등에 변화를 주어 섭취의 편의를 도와주는 식이보조제 등이 있다.

(나) 죽 시장 외부환경조사 (4)

- 2007년 이후 죽 시장의 감소가 둔화되면서 회복양상을 보이고 있다. 전체 죽 시장은 3,000억원으로 보고 있으며, 최근 3년간 신규 업체의 시장진입이 증가하고 있는 추세이다.
- 2000년대 전에는 죽가공식품의 주요 생산업체는 (주)오뚜기와 동원이었으나 2010년대 이후에 CJ가 죽시장에 진입하면서 M/S를 약 26% 차지하면서 죽 시장에서 2위를 차지하였다. 그 외에도 롯데삼강, 하림, 해태음료, 대상중가집등 에서 죽가공식품시장에 진입하였다.
- 2010년 전체 죽 시장은 26,698 백만원이었으며, 맛 type 에 따라 전복죽이 32%로 판매 비중이 가장 높았으며, 다음으로는 쇠고기죽 (13%), 야채죽 (13%), 호박죽 (12%), 단팔죽 (11%), 참치죽(10%) 순으로 나타났다.
- 즉석죽의 유통채널 판매비중은 37%로 편의점이 가장 높았으며, 다음으로는 할인점 (20%), 체인대형슈퍼(12%), 개인대형슈퍼(11%), 개인소형슈퍼(10%), 조합마트(8%) 순으로 나타났다.

- 할인점은 매대구성은 즉석식품카테고리 내 스프와 연결 진열되어 있었으며, 편의점은 즉석식품과 함께 매대에 진열되어 있었다. 따라서 죽은 즉석식품의 카테고리로 나뉘어져 있음을 알 수 있다.
- 죽을 먹는 연령층은 90년대 환자, 노년층, 유아층이 환자식, 유아식의 용도로 몸이 아플 때, 소화가 잘 안될 때, 자극적인 음식을 먹지 못할 때 섭취하였다.
- 그러나 2000년대에서 현재까지 접어들면서 죽은 전 연령층에서 별미식, 간식개념식으로 섭취하였고 여름에는 닭죽, 소고기죽을 보양식으로 겨울에는 호박죽, 단팥죽을 별미식으로 섭취하였다.
- 2010년 이후에는 새로운 소비 트렌드로 젊은 여성층이 다이어트 식사대용으로 섭취하는 트렌드를 형성하였다.
- 따라서 시장분석결과 단기적으로는 상품죽의 매출 성장은 어려움이 예상되나, 향후 전체 죽 시장 성장은 기대되는 것으로 분석되었다.
- 즉석 가공 죽은 간편성이라는 장점은 있지만, 품질면에서 죽 전문점에 비해 떨어짐.
- 2010년 이후에 소비자들의 식품섭취형태는 건강트렌드가 지속적으로 나타나며, 만성성 인병으로 저칼로리, 다이어트식을 선호하며, 고령화사회가 진행됨에 따라 그에 따른 대응제품이 확대될 것으로 기대된다.

(다) 내부환경조사

- 2010년 이후에는 여유있는 고령계층이 증가함에 따라 식품가공업체에서도 다양한 실버푸드개발에 집중하고 있다.
- 식품의약품안전청에서 나트륨 섭취를 제한함에 따라 저나트륨 식품, 고영양식품 개발이 증가하였다.
- 2009년도 즉석밥 시장경쟁 현황을 보면 (주) 농심의 M/S는 8.1%로 2008년 7.9% 대비 정체상태에 있다. 오뚜기, 동원 등 후발업체의 M/S확대에 따른 가격경쟁이 치열하게 전개 되고 있으며, 그에 따라 즉석밥 시장가격이 붕괴되어 저조한 매출실적을 나타내었다.
- 이러한 시장환경에서 당사 즉석밥 매출 활성화를 위한 방안으로 농심만의 특징, 그리고 시장환경에 적합한 판촉방법을 강구하였고 다양한 형태로 제품개발을 진행하고 있다. 그 중 하나로 즉석죽 제품개발을 진행하고 있다.
- (주) 농심에서는 다년간 즉석식품을 개발하였고 그 종류도, 유탕면, 건면, 냉동면, 생면등

을 개발하고 그에 맞는 소스류 개발을 진행하여 왔다.

- 국내 고령친화식품 사용현황을 서울 및 수도권의 55세 이상 남녀를 대상으로 시행한 결과 죽류의 이용현황이 가장 높았다. 전체응답자 중 약 78%가 고령친화식품의 필요성에 대해 인식하고 있었다. 건강, 편의성, 금전적인 이유 순으로 고령친화식품이 필요하다고 응답하였고, 소비자 개개인의 필요성에 부합하는 다양한 고령친화식품 개발이 요구되는 것으로 조사되었다. 특히 건강성이 강조된 제품을 가장 요구하는 것으로 나타났으며, 또한 전체응답자 중 50%이상이 반조리 상태의 고령친화식품에 대해 높은 요구도를 보였다 (2).

(2) SWOT 분석

외부환경에서 분석에서 도출한 기회/위협요소

주요 영향요인	기회 opportunity	위협 threat
죽 시장의 2010년 이후 계속 성장할 것으로 예상됨.	O	
죽 가공식품업체가 증가함.		O
노년층 인구가 증가하며 이들은 일정한 구매형태를 가지고 있음.		O
건강기능성 가공식품이 요구됨.	O	
죽 제품의 종류가 다양해짐.	O	
즉석죽가공식품 보다 죽 전문 체인점에 죽이용 선호함.		O

내부환경 분석에서 도출한 강점/약점요소

주요 영향요인	강점 strength	약점 weakness
즉석밥 라인을 이용한 다양한 죽제품 개발이 가능함	O	
즉석밥의 M/S가 가장 낮음		O
건강기능성 가공식품개발이 많지 않음		O
다양한 즉석식품 개발이 많음	O	
냉동/냉장/레토르트 등 다양한 가공기술을 가지고 있음.	O	
연령층에 따른 제품개발 process 가 없음		O

(3) SWOT-AHP 분석

SWOT 그룹	그룹 우선순위	SWOT 요인	일관성 비율	요인 우선순위	종합 우선순위
강점	0.470	즉석밥 라인을 이용한 다양한 제품 개발이 가능함	0.0000	0.323	0.152
		냉동/냉장/레토르트 등 다양한 가공기술을 가지고있음.		0.581	0.273
		다양한 즉석식품 개발이 많음		0.097	0.046
기회	0.335	죽 시장의 2010년 이후 계속 성장할 것으로 예상됨	0.0328	0.283	0.095
		건강 기능성 가공식품이 요구됨.		0.643	0.216
		죽제품의 종류가 다양해짐.		0.074	0.025
약점	0.335	즉석밥의 M/S가 가장 낮음	0.0330	0.723	0.096
		건강 기능성 가공식품 개발이 많지 않음		0.193	0.026
		연령층에 따른 제품개발 process가 없음		0.083	0.011
위협	0.062	죽 가공 식품업체가 증가함.	0.0018	0.230	0.014
		노년층 인구가증가하며 이들은 일정한 구매형태를 가지고 있음.		0.648	0.040
		즉석죽 가공식품보다 죽전문 체인점에 죽 이용 선호함.		0.122	0.008

(4) 들깨죽 마케팅 전략

SWOT분석을 통해 (주) 농심의 죽 시장 진입에 대한 강점, 약점, 기회, 위협요인을 파악하였고 AHP 분석을 통해 우선순위화 하였다. 분석 결과 (주) 농심은 다양한 가공기술 가지고 건강기능이 강화된 가공식품의 요구에 부합되는 들깨죽의 시장진입이 가능할 것으로 보여진다. 들깨죽의 마케팅 컨셉은 건강기능이 강화되며, 한끼 식사로 가능한 제품으로 설정하였다. 들깨죽의 중량은 300g이며 칼로리는 333kcal로 한끼 식사로 가능하며, 이는 노인 1일 영양권장량 1700~2000kcal로 보았을 때 아침식사형태로 가능할 것으로 보여진다. Target 시장은 60세 이상의 뉴시니어 계층과 45세 이상의 고령친화식품의 선호가 높은 계층으로 하였다. 60세 이상의 뉴시니어 계층과 45세 이상의 고령친화식품의 선호가 높은 계층은 모두 대형마트 등에서 직접 식품을 선택하고 소비할 수 있다. 따라서 60세 이상의 뉴시니어 계층의 대형마트에서의 식품선택 동선을 고려하여 매대진열 위치를 스프류와 연결하는 것으로 설정하였다. 또한 60세 이상의 뉴시니어 계층의 집에서의 조리형태도 간편하게 반조리된 형태의 식품을 선호하며 향후 이런 현상은 가속화 될 것으로 보여진다. 따라서 들깨죽은 즉석조리 식품으로 간편하게 전자렌지를 이용하여 섭취할 수 있는 강점을 마케팅 포인트 설정하였다.

3. 들깨, 들깨유를 이용한 편의 식품 개발 (제 2 협동과제 위탁과제 1)

가. 들깨유를 활용한 편의식품 개발

Target 제품의 선정은 우선적으로 들깨유의 다변화 가능성을 중심으로 문헌 및 연구 보고서, 관련학회지 및 들깨 활용 업계 및 편의 식품 제조업체 전문가 10명을 대상으로 in-depth interview를 이용하여 탐색한 후 과제 참여 기업 제품 중 기름을 덕용으로 사용하는 제품을 선정하였으며, 선정된 제품군을 토대로 전문가 대상 관능평가를 진행한 후 선정하였다. 과제 참여 기업에서 덕용기름을 사용하는 제품 중 비빔 type 제품에 개발하는 것을 우선순위화 하였으며 비빔 type 제품 중 짜장 type 제품의 덕용기름의 배합비를 개발하는 것을 목표로 하였다. 짜장 type 의 제품 중 Target 1 (유탕면 type), Target 2 (건면 type)를 선정하여 덕용기름을 개발하기로 결정하였다.

(1) 편의식품 적용성 검토 및 편의식품을 위한 배합비 개발

- 개발 대상으로 선정된 Target 제품의 덕용기름은 참여기업에서 제조한 onion flavor seasoning oil (seasoning oil A) 및 onion flavor seasoning oil과 올리브유의 혼합유 (seasoning oil B)를 기본으로 하고 과 perilla oil의 배합비를 통해 개발하였다.
- Design expert 7.0 프로그램을 이용하여 들깨유 함유 비율을 0, 5, 10, 30, 50, 70, 90, 100%으로 하였고 덕용기름의 산화안정성, 관능검사, 기능성 지질 성분인 ω -3 지방산의 함량을 기준으로 배합비를 최적화하였다.
- 산화안정성은 Rancimat를 이용하여 (AOCS Cd 12b-92) 측정하였고, 기호도 검사는 관능검사방법 중 9점 척도법을 전문가 15명을 대상으로 측정하였다. 기능성 지질 성분인 ω -3 지방산의 함량은 gas chromatography (CP 3800, Varian, USA)를 이용하여 측정 및 계산하였다.
- Target 1, 2제품의 덕용기름의 기능성 성분을 최대한 유지할 뿐 아니라 보안을 통하여 우수한 영양과 고기능성을 가지도록 하기위해 soybean lecithin, Vitamin E, Polyphenol 추출물의 단독, 복합 첨가를 고려하였으며(최대 400 ppm) 그 결과는 다음과 같다. Target 1, 2 제품의 덕용기름의 들깨유 함유 비율에 따른 덕용기름의 산화안정성 (induction period (hr)), 관능검사 (9점 척도법), 기능성 지질 성분인 ω -3 지방산 함량은 다음 Table 1,2와 같다.

Table 1. Target 1 제품 덕용기름의 배합비에 따른 특성변화 (건면 type)

	Seasoning oil A ¹⁾ (%)	Perilla oil (%)	Induction period (hr)	Sensory evaluation (Preference)	ω -3 fatty acid %
1	100	0	15.59	6.5	7.77
2	95	5	14.48	6.5	10.70
3	90	10	14.06	6.2	13.63
4	70	30	11.57	6	25.34
5	50	50	10.1	5.52	37.05
6	30	70	9.11	4.56	48.76
7	10	90	9.95	4.76	60.47
8	0	100	9.79	4.55	66.33

¹⁾ Sesoning oil = Onion flavor seasoning oil

Table 2. Target 2 제품 덕용기름의 배합비에 따른 특성변화 (유탕면 type)

	Seasoning oil B ¹⁾ (%)	Perilla oil (%)	Induction period (hr)	Sensory evaluation (Preference)	ω -3 fatty acid %
1	100	0	17.59	6.70	6.59
2	95	5	16.38	6.40	9.58
3	90	10	14.96	6.50	12.56
4	70	30	11.59	6.13	24.51
5	50	50	10.9	5.78	36.46
6	30	70	9.9	4.56	48.41
7	10	90	11.83	4.32	60.36
8	0	100	9.79	4.00	66.33

¹⁾ Sesoning oil = Onion flavor seasoning oil + olive oil

■ 이 중 산화안정성 지표로서의 100°C에서의 Rancimat에 의한 유도기간 (14시간이상), 관능검사 기호도 (최대값), 기능성 지질성분인 ω -3 지방산 함량 (최대값)을 가지는 조건을 도출한 결과 Figure에서 보는 것과 같이 Target 1, 2 모두 seasoning oil 90% 대비 10%의 들기름을 첨가하였을 때가 최적조건으로 도출되었다 (Figure 1).

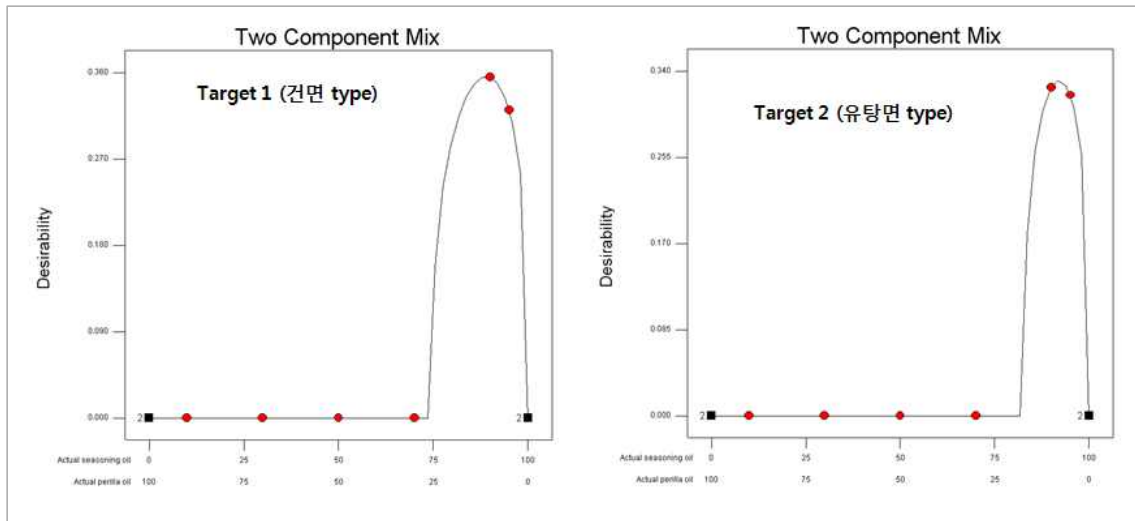


Figure 1. Target 1, 2 덕용기름의 배합비의 최적조건

■ 또한 Target 1, 2제품의 덕용기름의 제조, 유통, 저장 등의 과정동안 기능성 성분을 최대한 유지하여 우수한 영양과 고기능성을 확보하기 위해 soybean lecithin, Vitamin E, Polyphenol 추출물의 단독, 복합 첨가 실험 결과 polyphenol 추출물 400 ppm을 단독 첨가하였을 때 산화안정성 (induction period 기준)이 가장 우수하였다 (Figure 2).

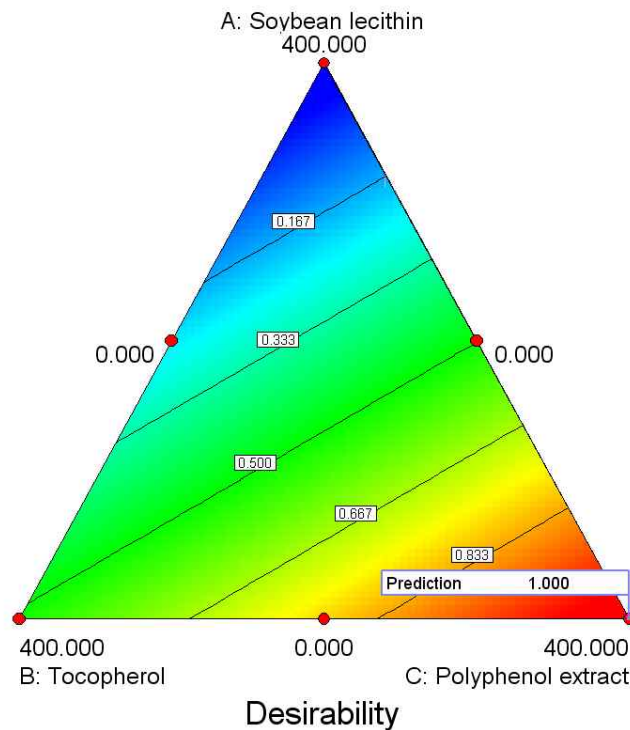


Figure 2. 덕용기름의 Soybean lecithin, tocopherol, polyphenol extract 첨가의 최적조건

(2) 편의식품의 품질 평가

- Target 1, 2 제품의 품질평가는 자동산화안정성을 기준으로 선정하였다. 산화안정성은 가속실험을 이용하여 60°C항온기에서 12일 동안 저장하면서 과산화물값 (AOCS Cd 8b-90), headspace oxygen 소비량 (gas chromatography), hexanal 생성량 (gas chromatography)으로 평가하였다. 이때 control 시료로는 들깨유가 전혀 혼합되지 않은 seasoning oil 100%를 사용하였다.
- Target 1, 2 의 기호도 평가는 각각 전문 패널 15명을 대상으로 전반적 기호도, 맛, 향을 9점 척도로 평가하였다
- 개발 제품 Target 1, 2 의 과산화물값은 Figure 3에서 보는 바와 같이 60°C에서 12일간 저장하는 동안 증가하였으나 들기름의 첨가된 개발제품은 control시료에 비해 과산화물값이 낮았다. 또한 polyphenol의 첨가는 그 값을 더욱 낮추었다.

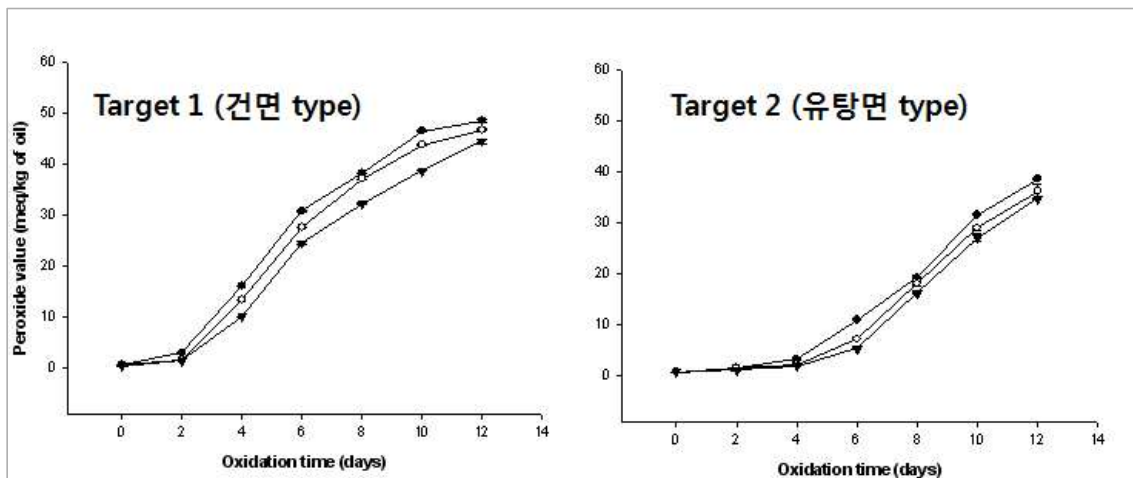


Figure 3. 60°C에서 12일간 저장하는 동안의 덕용기름의 과산화물값 (● : seasoning oil 100%, ○ : seasoning oil 90% + perilla oil 10%, ▼ : seasoning oil 90% + perilla oil 10% + polyphenol extract 400 ppm)

- 개발 제품 Target 1, 2 의 headspace oxygen 함량은 60°C에서 12일간 저장하는 동안 감소하였고 control 시료에 비해 Target 1 제품의 headspace oxygen 소모량은 적었다. polyphenol extract 첨가는 headspace oxygen 소모량을 더욱 감소시켰다. Target 2의 경우 control 시료와 큰 차이를 보이지 않았다 (Figure 4).

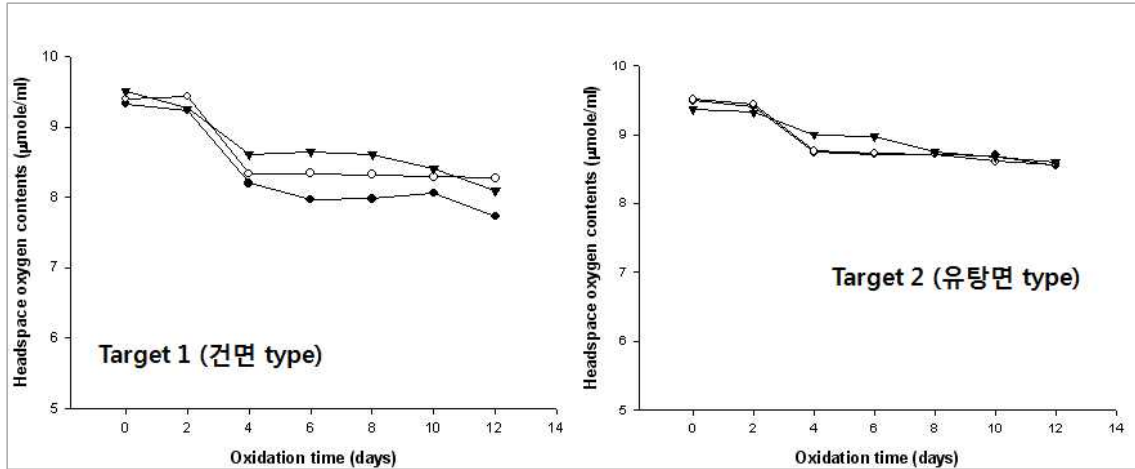


Figure 4. 60°C에서 12일간 저장하는 동안의 덕용기름의 headspace oxygen 함량 (● : seasoning oil 100%, ○ : seasoning oil 90% + perilla oil 10%, ▼ : seasoning oil 90% + perilla oil 10% + polyphenol extract 400 ppm)

■ Target 1, 2 제품을 60°C에서 12일간 저장하는 동안 hexanal 함량은 증가하였으나, control 시료에 비해 저장기간 동안 hexanal 생성이 적었다. polyphenol extract의 첨가는 hexanal 생성에 뚜렷한 효과를 나타내지 않았다 (Figure 5).

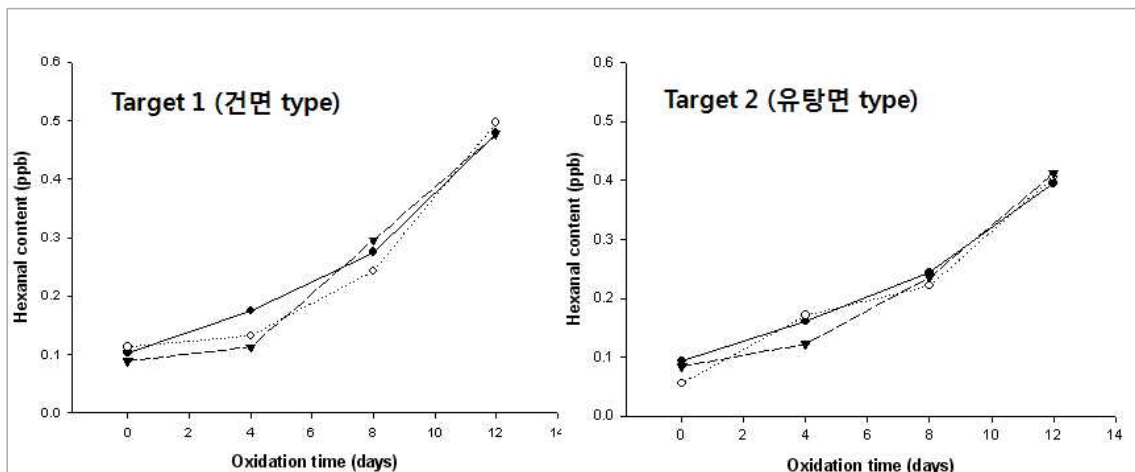


Figure 5. 60°C에서 12일간 저장하는 동안의 덕용기름의 hexanal 함량 (● : seasoning oil 100%, ○ : seasoning oil 90% + perilla oil 10%, ▼ : seasoning oil 90% + perilla oil 10% + polyphenol extract 400 ppm)

(3) 전문가 대상 관능평가

■ Target 1, 2 제품을 15명의 전문가를 대상으로 기호도를 측정된 결과 전반적인 기호도는 9점 중 각각 6.13, 6.00으로 개발 제품 Target 1, 2 모두 약간 좋아하는 경향으로 분석되었다 (Table). 맛과 향 역시 중간 수준보다 약간 좋아하는 수준으로 나타나 개발 제품의 기호도는 양호한 것으로 평가되었다. 또한 Target 1, 2 제품의 기호도는 유의한

차이는 없었으나 control 시료와 비교하여 기호도가 높은 경향을 보였다.

Table 3. 개발제품 Target 1, 2의 관능평가 결과 전반적 기호도, 맛, 향

	전반적 기호도	맛	향
Control	5.56±1.85	5.38±1.63	5.75±1.88
Target 1	6.13±1.24	5.47±1.55	6.13±1.41
Control	5.93±1.48	5.87±1.25	5.93±1.53
Target 2	6.00±1.31	5.93±0.68	5.87±1.02

나. 분체형 지질을 이용한 편의식품 배합비 개발

(1) 편의식품 type 선정

■ 개발 대상으로 선정된 들깨죽은 참여기업에서 생산 가능한 죽 생산공정을 기본으로 개발하였다. 들깨죽은 쌀죽을 기본으로 별첨스프인 분체형 들깨유, 들깨가루, 조미분 (간장분말, 설탕, 소금)을 배합하여 개발 하였다.

■ 쌀죽은 멥쌀과 찰쌀을 혼합하여 배합하였고, 수분은 6.7~20배 첨가하여 제조하였다. 쌀죽의 멥쌀, 찰쌀배합도와 수분함량정도는 전문가 10명을 대상으로 죽의 물성 및 씹힘성을 관능평가를 하였다. 들깨죽 공정은 살균공정 145℃~150℃ 에서 5sec간 8번, 취반공정에서 100~104℃의 증기로 35분간 취반하였다.

Table 4. 들깨죽의 쌀죽 배합비

	배합비 1	배합비 2	배합비 3	배합비 4	배합비 5	배합비 6
멥쌀 (g)	5	10	10	20	15	30
찰쌀 (g)	5	-	10	-	15	-
소금 (g)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
물 (g)	189.5	189.5	179.5	179.5	169.5	169.5
최종무게 (g)	200	200	200	200	200	200

■ 쌀죽에 첨가될 별첨스프인 들깨스프는 분체형 들깨유, 들깨가루, 조미분 (간장분말, 설탕, 소금)을 배합하여 제조하였고 배합비는 전문가 10명을 대상으로 관능검사를 통해 선정하였다. 들깨스프의 조미분인 간장분말은 전문가를 대상으로 간장, 된장, 멸치를 대상으로 들깨와 가장 어울리는 맛을 선정하였고 그 결과 간장맛을 가장 선호하였다.

Table 5. 들깨죽의 들깨스프 배합비

	배합비 (g)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
분체형 들깨유	3	1	5	6	5	5	5	5	5	5
볶음 들깨가루	1	3	1	1	2	2	2	2	2	2
간장분말	-	-	-	-	-	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4
소금	-	-	-	-	-	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
설탕	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.2	0.2
총계	4	4	6	7	7	7.4	7.6	7.7	7.8	7.7

■ 들깨죽의 쌀죽 배합비는 기호도 검사를 기준으로 관능검사방법 중 9점 척도법을 전문가 10명을 대상으로 측정하였다. Table 6에서 보는 것과 같이 배합비 1, 3, 5, 배합비 2, 4, 6 를 비교해 볼 결과 들깨죽의 물성 비교하여 들깨죽의 죽농도를 평가해 볼 결과 들깨죽의 물성은 배합비 5, 6에서 가장 높게 나타나 죽 농도를 배합비 5, 6으로 선정하였다.

■ 또한 들깨죽의 씹힘성을 배합비 1, 2 배합비 3, 4, 배합비 5, 6을 비교하여 들깨죽의 씹힘성을 비교한 결과 찹쌀이 섞인 것에 비해 멥쌀만 사용한 것이 더 우수한 선호도 결과를 나타내었다. 따라서 최종적으로 배합비 1~6을 비교해 본 결과 쌀죽의 배합비는 배합비 6을 선정하였다.

Table 6. 들깨죽의 쌀죽 배합에 따른 선호도

배합비	물성	씹힘성	기호도
1	3.44±0.88	4.22±0.67	4.33±0.50
2	3.00±0.87	3.89±1.17	4.00±0.87
3	3.89±0.60	4.56±0.73	4.56±0.53
4	4.00±0.71	5.00±1.12	5.00±0.87
5	5.56±1.01	4.78±1.09	5.44±1.13
6	6.33±1.00	6.11±0.93	6.11±0.60

들깨죽의 들깨스프 배합비 선호도검사는 9점 척도법으로 전문가 10명을 대상으로 실시하였다. 배합비 1~5를 통해 분체형 들깨유와 들깨의 농도 및 배합비를 선정하였다 (Table 5). 분체형 들깨유와 들깨가루는 쌀죽 200g 에 7g을 첨가하는 것이 들깨맛과 들깨향의 선호도가 가장 높았으며 분체형 들깨유와 들깨가루의 배합비는 72% : 28%가 가장 기호도가 높아 배합비 5를 분체형 들깨유와 들깨가루의 최적배합비로 선정하였다. 배합비 6~10을 통해 들깨죽의 조미성분의 배합비를 선정하였다. 간장분말, 소금, 설탕을 첨가하여 관능검사를 실시한 결과 배합비 10에서 간장맛 및 전체적 선호도가 가장 높게 나타나 배합비 10으로 들깨죽의 들깨스프의 배합비를 선정하였다 (Table 7).

Table 8. 들깨죽의 들깨스프 배합에 따른 선호도

배합비	들깨맛	들깨향	간장맛	전체적기호도
1	3.56±0.53	3.78±0.67	-	3.89±0.60
2	3.11±0.78	2.56±0.88	-	3.78±0.67
3	5.56±1.13	5.67±1.41	-	3.35±2.18
4	4.44±0.53	4.33±0.71	-	5.11±0.93
5	6.44±0.73	6.11±1.05	-	5.33±0.71
6	-	-	4.56±0.73	5.67±1.12
7	-	-	5.89±0.60	6.00±1.32
8	-	-	6.56±0.53	6.44±1.59
9	-	-	6.67±0.50	6.78±1.30
10	-	-	6.78±0.44	7.11±0.78

(2) 편의식품의 전문가 대상 관능평가

■ 분체형 들깨유를 적용한 들깨죽을 10명의 전문가를 대상으로 기호도를 측정한 결과 전반적인 기호도는 9점 중 6.33으로 약간 좋아하는 경향으로 분석되었다 (Table 8). 맛은 중간정도의 평가를 나타냈으며 향에서 약간 좋아하는 수준으로 나타나 개발제품의 기호도는 양호한 것으로 평가되었다.

Table 8. 개발제품 Target 1, 2의 관능평가 결과 전반적 기호도, 맛,

	전반적 기호도	맛	향
들깨죽	6.33±0.71	5.44±0.73	7.11±0.63

(3) 편의식품의 품질 평가

- 분체형 들깨유를 적용한 들깨죽 품질평가는 자동산화안정성을 기준으로 선정하였다. 이때 개발된 들깨스프를 기준으로 품질지표를 선정하였다.
- 또한 (주) 농심에서 스낵용 미부원료로 개발된 분체형 들깨유의 품질평가를 진행하였다.
- 들깨스프의 산화안정성은 가속실험을 이용하여 45°C 항온기에서 18일 동안 저장하면서 headspace oxygen 소비량 (gas chromatography), hexanal 생성량 (gas chromatography)으로 평가하였다.
- 들깨스프의 저장안정성 향상을 위해 토코페롤 500, 1000ppm을 첨가하여 품질평가를 평가하였다. 들깨스프의 headspace oxygen의 변화량은 Figure 6에서 보는 바와 같이 45°C에서 18일간 저장하는 동안 감소하였으며, 산화생성물은 hexanal 함량은 증가하였다. 들깨스프의 토코페롤의 첨가는 headspace oxygen의 소비를 낮추며, hexanal (ppb)의 생성량을 낮춘다. 또한 토코페롤 500, 1000ppm 첨가에 따른 headspace oxygen, hexanal 함량의 변화는 큰 차이가 없었다.

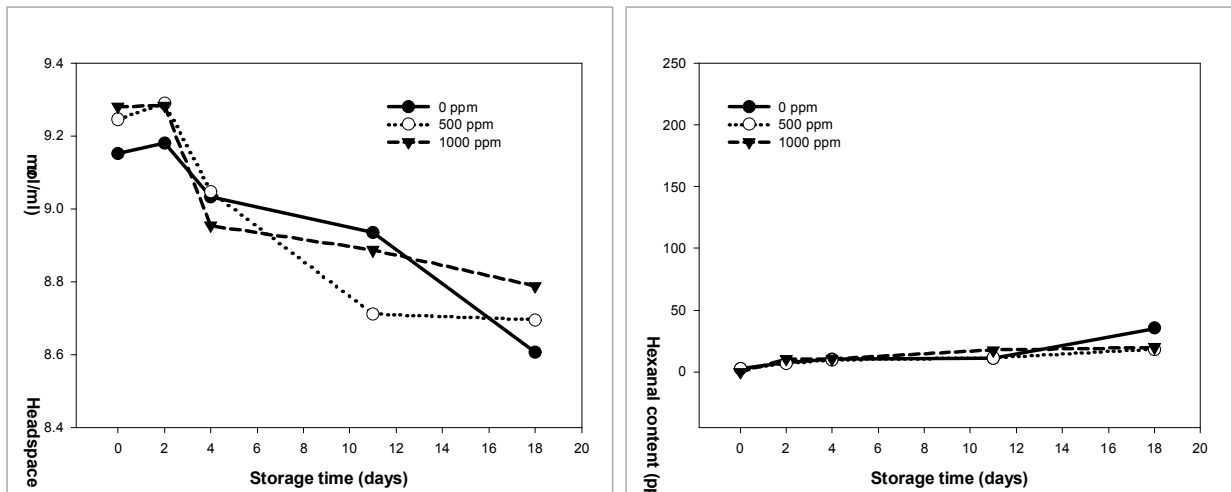


Figure 6. 45°C에서 18일간 저장하는 동안의 들깨죽용 분말들깨유 의 headspace oxygen 함량 및 hexanal 함량 변화 (● : tocopherol 0 ppm, ○ : tocopherol 500 ppm, ▼ : Tocopherol 1000 ppm)

- (주) 농심에서 개발한 스낵용 분체형 들깨유의 headspace oxygen의 변화량은 Figure 7에서 보는 바와 같이 45°C에서 18일간 저장하는 동안 감소하였으며 토코페롤 첨가에

따라 headspace oxygen 감소량은 줄어들었으며, hexanal 함량은 증가하였다. 스낵용 분체형 들깨유의 토코페롤의 첨가는 headspace oxygen의 소비를 낮추며, hexanal (ppb)의 생성량을 낮춘다. 또한 토코페롤 500, 1000ppm 첨가에 따른 headspace oxygen, hexanal 함량의 변화는 큰 차이가 없었다.

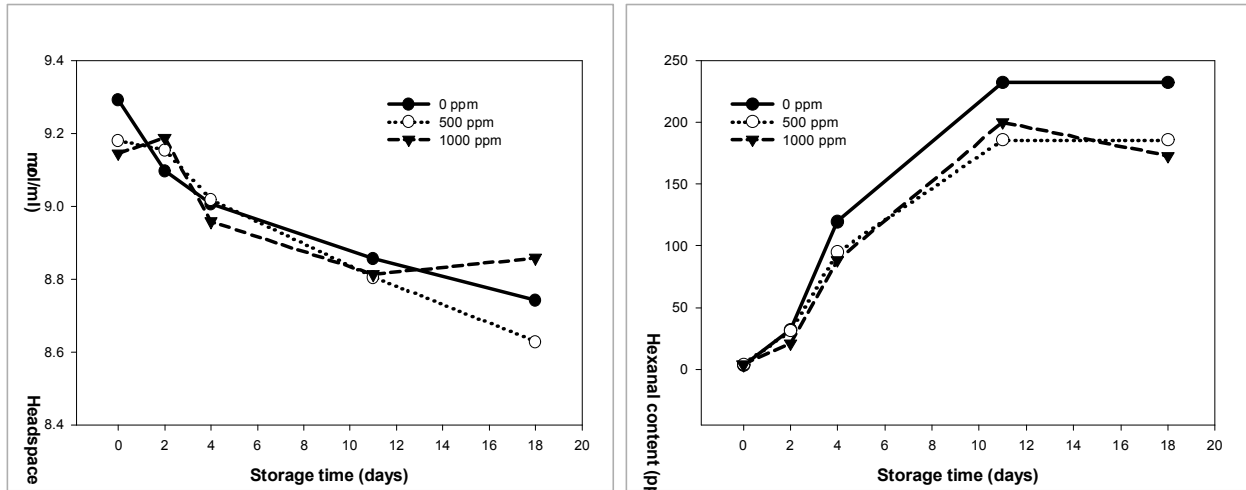


Figure 7. 45°C에서 18일간 저장하는 동안의 스낵용 분말들깨유 의 headspace oxygen 함량 및 hexanal 함량 변화 (● : tocopherol 0 ppm, ○ : tocopherol 500 ppm, ▼ : Tocopherol 1000 ppm)

다. 수용성 나노들깨유를 활용한 레토르트 들깨죽 개발

수용성 나노들깨유를 사용하여 레토르트 들깨죽 처방최적화 실험을 진행하였으며, 최적화된 처방으로 들깨죽 현장생산을 진행하였다. 레토르트 들깨죽 원료로는 멥쌀, 찹쌀, 탈피들깨가루, 땅콩가루를 사용하였다.

(1) 레토르트 들깨죽 개발

■ 수용성 나노들깨유를 적용한 들깨죽의 처방 최적화 실험을 위해 Table 9와 같은 5가지의 처방으로 들깨죽을 제조하고 전문관능평가 패널을 10명을 대상으로 관능평가를 실시하여 그 선호도 및 각 샘플에 대한 특성평가를 진행하였다.

Table 9. 레토르트 들깨죽 처방 최적화 실험

	처방 1	처방 2	처방 3	처방 4	처방 5
불린멥쌀	26.8	-	13.4	13.4	13.4
불린찹쌀	-	26.8	13.4	13.4	13.4
탈피들깨가루	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9
수용성 나노들깨유지	10	5	5		2.7
땅콩가루	-	5	5	13.4	13.4
정제엿	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
정백당	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
정제수	234.8	234.8	234.7	231.3	228.6
Total	300	300	300.0	300.0	300.0

■ 선호도 평가 결과는 처방 5번이 6점으로 가장 높은 선호도를 나타내었고, 4번이 5점으로 두번째로 높은 선호도를 나타내었다.

■ 각 처방의 특성평가 진행 결과, 처방 1은 올리고당을 베이스로 만든 수용성 나노들깨유의 함량이 높아 단맛이 크게 느껴졌으며, 처방 2는 수용성 나노들깨유의 단맛이 전체적으로 조화롭지 않으며 찹쌀 100% 사용으로 인해 점도가 높았고, 처방 3은 수용성 나노들깨유의 단맛이 전체적으로 조화롭지 않았으며, 처방 4와 처방 5는 고소한 맛이 강화되고 들깨 특유의 향미가 잘 어우러져 들깨죽의 특성이 잘 반영된 것 같다는 결과를 얻을 수 있었다.

■ 따라서 선호도 평가와 샘플의 특성 평가를 통해 처방 4와 처방 5로 스크리닝 하였으며, 각각을 분석해 본 결과 처방 4는 수용성 나노들깨유가 첨가되지 않았고 처방 5는 수용성 나노들깨유가 첨가된 샘플이었으며, 들깨유화유지 첨가에 따른 들깨죽의 개선 효과를 관능평가를 통해 평가한 결과 10명을 모두 들깨유화유지 첨가에 따른 전체적인 품질의 개선의 효과가 있다고 판단하여 처방 5를 확정하였고 이를 현장실험에 적용하였다 (Table 10).

Table 10. 들깨죽 처방 최적화 실험

	처방 1	처방 2	처방 3	처방 4	처방 5
관능평가 선호도 (9점 척도)	2	4	4	5	6

(2) 편의식품의 전문가 대상 관능평가

■ 레토르트 들깨죽을 10명의 전문가를 대상으로 기호도를 측정한 결과 전반적인 기호도는 9점 척도 평가에서 7.50 으로 좋아하는 경향으로 분석되었다 (Table 11). 맛은 약간 좋아하는 정도로 나타났으며, 향은 좋아하는 수준으로 나타나 개발제품의 기호도 높은 것으로 평가되었다.

Table 11. 개발제품 Target 1, 2의 관능평가 결과 전반적 기호도, 맛, 향

	전반적 기호도	맛	향
들깨죽	7.50±0.71	6.70±1.16	7.40±0.52

(3) 편의식품의 품질 평가

(가) 레토르트 들깨죽 내 나노들깨유의 안정성 평가

■ 나노들깨유의 유통기한 설정에 적용되는 들깨유의 Q10value를 구하기 위해 AOM의 유도기간을 측정하였으며, 이때의 Q10value는 2.38이었다(Table 12). 따라서 Q10value를 적용하여 산화안정성 검증을 위한 가속실험을 진행하였으며, 60°C에서 18일간 저장하면서 평가하였다.

Table 12. 들깨유의 Q10value

Oils	Temp(°C)	Induction period (Hours)	Activation energy (kcal/mol)	Q ₁₀ value
들깨유	90	15.47	23.3	2.38
	100	7.48		
	110	2.86		

■ 나노들깨유의 headspace vial 내에 함유되어 있는 산소의 함량을 측정함으로써 인해 나노들깨유에 함유되어 있는 들깨유의 산화안정성을 평가하였다.

■ 들깨유는 산소를 소비함에 따라 과산화물값, 휘발성 화합물(hexanal 등)이 생성되며 이의 상관관계는 매우 높은 것으로 알려져 있다.

■ 나노들깨유는 60°C저장함에 따라 산소를 소비하면서 산화하게 되는데 저장 18일 동안 산소가 소비되는 정도는 미미한 것으로 나타났다(Figure 8). 반면 산패취의 지표성분 중 하나인 hexanal 평가 결과 hexanal 함량의 한계치를 100ppb로 보았을 때 토코페롤 500ppm 첨가한 나노들깨유는 유통기한 12개월까지 안정한 결과를 나타내었다(Figure 9). 따라서 나노들깨유의 유통기한 12개월 확보를 위해 토코페롤 500ppm 을 첨가하였다.

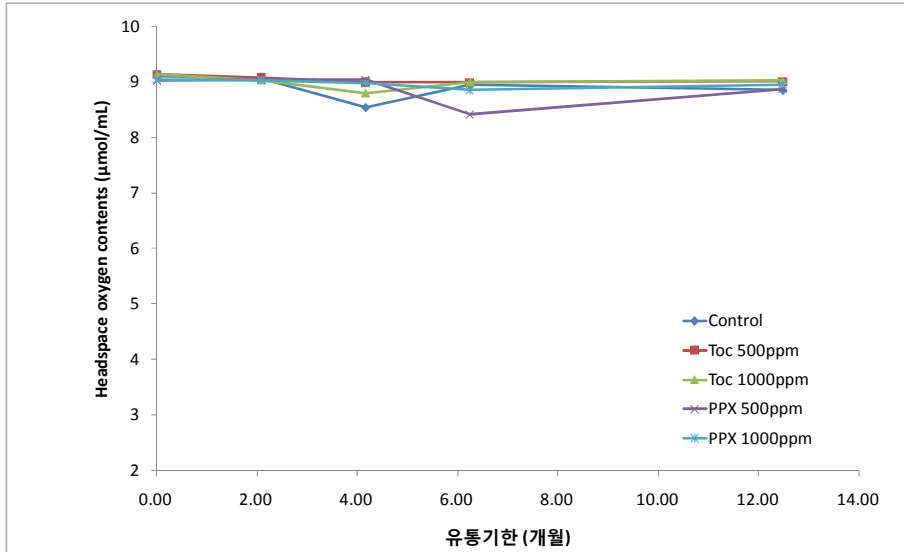


Figure. 8. 상온 저장기간에 따른 나노들깨유의 Headspace oxygen contents

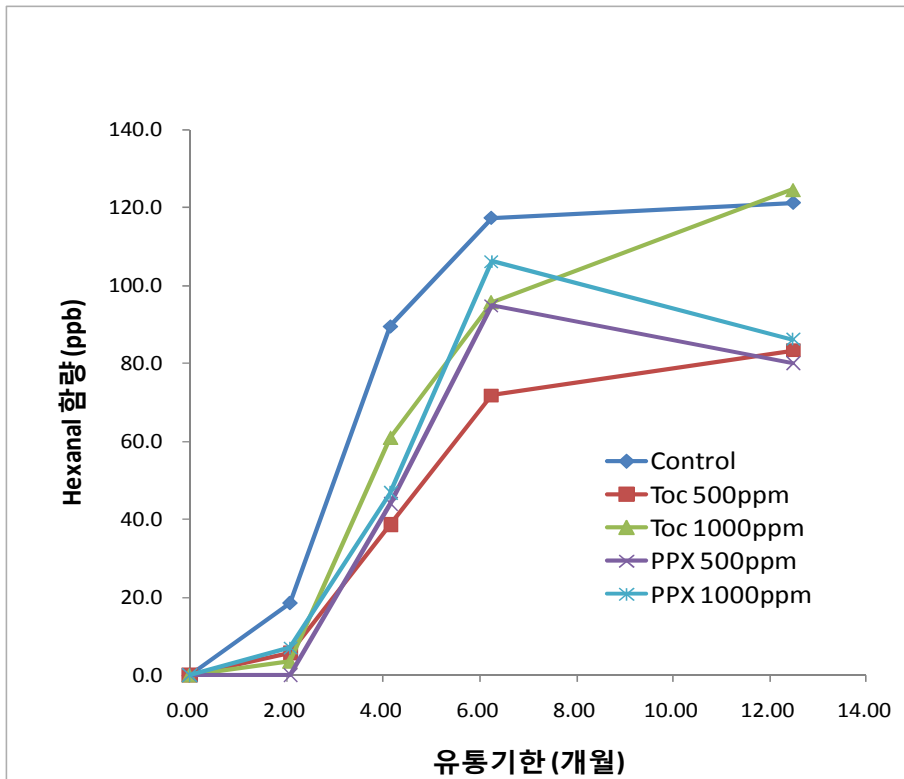


Figure. 9. 상온 저장기간에 따른 나노들깨유의 Hexanal 함량

(나) 레토르트 들깨죽 안정성 평가

- (주) 농심에서 제조한 레토르트 들깨죽은 레토르트 식품으로 세균발육 실험을 진행하였고, 그 결과는 음성이었다. 세균 발육실험은 36°C에서 10일간 저장한 후 1일간 상온에서 방치한 후 진행하였다. 또한 레토르트 들깨죽은 곡류가공품으로 일반세균수, 바실러스 세레우스, 대장균군을 검증하였고 그 결과는 음성이었다.

- 레토르트 들깨죽의 품질관리기준을 설정하기 위해 품질특성을 설정하였다. 들깨죽내 유지 함량은 식당 300g 기준 20g이며 특히 고도불포화 지방산을 많이 함유하고 있어 저장중 지방 산패에 의해 품질이 저하 될 수 있다.
- 따라서 들깨죽의 유통 중 품질 평가기준은 지질 산패의 기준은 과산화물값 관능검사로 설정하였다.
- 레토르트 들깨죽은 36°C에서 190일 동안 저장하면서 과산화물값 분석과 관능검사를 실시하였다. 이때 36°C에서 190일은 상온유통기준 13.58개월로 안정화 계수 0.9로 설정하였을 때 유통기한 12개월을 만족하는 수준이다.
- 36°C에서 190일 동안 저장하면서 과산화물값과 관능평가를 평가한 결과 과산화물값은 25°C 상온저장 기준으로 13.58개월 동안 거의 증가하지 않았다 (Table 13).
- 관능평가는 저장 전 시료와 비교하여 이미 및 이취가 느껴지는 정도를 9점척도로 평가한 결과 저장 13.58개월에 약하게 이미 및 이취가 느껴지는 정도로 나타났다 (Table 13).
- 따라서 과산화물값과 관능평가결과로 유통기한을 평가해본 결과 유통기한 12개월 동안 레토르트 들깨죽의 품질변화는 문제가 없을 것으로 판단되었다.

Table 13. 상온저장기간에 따른 레토르트 들깨죽의 과산화물값 및 관능검사

25 저장기간 (개월)	과산화물값	관능평가 점수 ¹⁾
0	1.37	1±0
2.14	1.19	1.75±0.71
4.29	1.27	2.13±0.64
6.43	1.14	2.63±0.92
8.57	1.07	3.25±0.71
10.72	1.11	3.63±0.92
12.86	1.17	4.13±0.83
13.58	1.32	4.38±0.52

1) 평가기준 9점 척도법

7-9 이취 및 이미 발생이 아주 심한 상태

5-7 이취 및 이미지를 느끼는 상태

4-5 이취 및 이미지를 약하게 느끼는 상태

1-3 이취 및 이미가 느껴지지 않는 상태

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 목표 달성도

- 세부과제 및 협동, 위탁과제 등 모든 과제의 연도별 목표 및 계획에 기술한 연구 내용은 다음 표에서 보는 바와 같이 모두 100% 달성하였음.

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도(%)
1차년도 (2009)	(제1세부) 가공 및 저장 조건 하에서 들깨 및 들깨유의 산화안정성	- 들깨 및 들기름의 성분 분석 - 온도, 압력 및 광선의 존재에 따른 들깨 및 들깨유의 산화안정성	100 100
	(위탁1) 전처리 조건 및 추출 방법에 따른 들깨유의 기능성 분 함량 및 산화안정성 규명	- 압착추출법으로 얻은 들깨유의 기능성 성분함량 및 산화안정성에 미치는 영향 - 배전조건, 압착, 초임계유체추출 등에 따른 추출 들깨유 성분 분석	100 100
	(위탁2) 들깨유의 미세캡슐화 수율 극대화를 위한 최적 조건의 확립	- 고 안정성의 emulsion 형성을 위한 반응조건 탐색(최적 피복물질 및 유화제 선정) - 미세캡슐화 수율분석법 확립	100 100
	(위탁1) 들깨 추출물의 지질저하 및 항동맥경화 효과 평가	- 들깨 추출물(powder fat, 주성분)의 항암·면역조절 활성 평가 - 암세포의 증식에 미치는 효과 - In vitro에서 유리기 소거작용을 통한 산화스트레스 개선 효과 확인 (DPPH 소거능과 hydroxyl, superoxide, peroxy radical 소거능 측정, 혈전용해능 측정 등)	100 100 100
	(제2협동) 들깨 관련제품의 시장 및 소비자 조사	- 시장 다변화 가능성 탐색, 소비자 인지도 및 요구도 분석, 적정 관능품질 조건 조사 - content analysis, 들깨 활용 업계 및 관계자 대상의 in-depth interview를 통한 시장 다변화 가능성 탐색 - 들깨 식품에 대한 소비자의 인지도 및 요구도 분석 - Cross-cultural descriptive analysis를 통한 들깨의 적정 관능 품질 조건 설정 - 분체형 기능성 지질 소재의 물리, 화학적 특성 조사 - 가공조건 및 원료의 배합비에 따른 분체형 기능성 지질 소재의 물리, 화학적 특성변화 탐색 - target consumer group에 따른 상업적 실현가능성 높은 편의식품의 유형 결정	100 100 100 100 100 100
	(위탁1) 들깨, 들깨유를 이용한 편의 식품 개발	- 들깨, 들깨유 또는 분체형 들깨유 등 기능성 지질 소재 종류에 따른 편의식품 적용성 검토 및 편의식품 (제품 1)을 위한 배합비 개발 - 편의식품 (제품 1)의 품질 평가 및 전문가 대상 관능 평가	100 100

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
2차년도 (2010)	(제1세부) 가공 및 저장 조건 하에서 들깨 및 들깨유의 산화안정성, 고도불포화유지를 반응물로 하는 재구성지질 생산	- 들깨 및 들깨유의 주요 미량 성분이 산화에 미치는 영향	100
	(위탁1) 전처리 조건 및 추출 방법에 따른 들깨유의 기능성 분 함량 및 산화안정성 규명	- 들깨 및 들깨유 함유 편의식품에 첨가된 식품 재료가 들깨 및 들기름 산화안정성에 미치는 영향 연구	100
		- 들깨유의 입체특이적 지방산 조성 분석	100
		- 배전조건, 압착, 초임계유체추출 등에 따른 추출 들깨유 성분 분석	100
	(위탁2) 들깨유의 미세캡슐화 수율 극대화를 위한 최적 조건의 확립	- 토크페롤, 지방산 분석	100
		- 추출조건에 따른 자동산화안정성	100
		- 미세캡슐화 수율극대화를 위한 반응조건의 최적화(유효 반응변수 선정 및 반응표면분석을 이용한 최적조건 탐색)	100
	(제1협동) 들깨 추출물 (powder fat, 주성분)의 항암·면역조절 활성 평가	- Spray-chilling 공정조건 확립(최적 분산매 선정 및 분산조건)	100
	(위탁1) 들깨 추출물의 지질저하 및 항동맥경화 효과 평가	- in vitro 암세포의 apoptosis유도에 미치는 효과, RT-PCR, Western Blot, 면역세포 활성 분석	100
		- Apo E knockout mice에서 항동맥경화 효과 확인	100
	(제2협동) 들깨 관련제품의 시장 및 소비자 조사	- 동맥경화 유발을 위해 형질 변경한 apoE KO 마우스 사용, 지질농도측정, 동맥궁의 지질침착정도 측정, 혈관부착인자 발현, NO 생성 효소발현 확인	100
		- Cross-cultural descriptive analysis를 통한 들깨 이용 편의식품에서 감지되는 관능적 특성의 출현 순서에 따른 평가에 의해 편의식품의 적정 관능 품질 조건 설정	100
	(위탁1) 들깨, 들깨유를 이용한 편의 식품 개발	- 각 소재의 특성에 맞는 가공조건 설정 (토폽효과를 가진 분말유지, 유화유지, 향미분말유, 라면용 기능성 분말유지 등)	100
		- 분체형 기능성 지질 소재의 복원성 및 생산성 향상을 위한 가공 조건 확립	100
- 분체형 기능성 지질 소재의 pilot up-scale 생산 시 발생 가능한 품질 저해 요인을 규명하고 해결 방안을 도출하여 대량 생산 공정을 확립함.		100	
- 기호성, 고영양, 고기능성, 고안정성 편의식품 (제품 2~)을 위한 배합비 개발		100	
	- 편의식품 (제품 2~) 의 이화학적 품질 평가 및 전문가 대상 관능 평가	100	

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
3차년도 (2011)	(제1세부)고도불포화지방산을 반응물로 하는 재구성지질 생산	- 들깨유의 효소적 재구성지질 생산을 위한 효소의 선발	100
	(위탁1) 가공 및 저장 조건 하에서 들깨 및 들깨유의 산화안정성, 들깨유의 기능성분 함량 및 산화안정성 규명	- 효소적 interesterification, solvent 또는 solvent-free reaction 공정 최적화	100
		- 일부 식품 재료를 첨가한 들깨 또는 들기름 함유 emulsion 식품의 산화안정성 평가	100
		- 전처리 조건 및 용매추출법 등 추출방법에 따른 들깨유의 기능성분 및 광산화안정성 분석	100
	(위탁2) 들깨유의 미세캡슐화수율 극대화를 위한 최적 조건의 확립	- Policosanol 프로파일 및 함량 분석	100
		- 미세캡슐의 체내 방출특성 규명(in vitro 소화모델을 이용한 중심물질 방출특성 분석)	100
		- 들깨유 미세캡슐의 저장안정성 측정(온도 및 pH)	100
		- 들깨유 미세캡슐의 형상 및 구조분석 (FE-SEM, CLSM)	100
	(제1협동) 들깨 추출물 및 제품에 대한 항암·면역조절 활성평가 (in vivo)	- 정상생쥐(BALB/c)의 면역세포 활성화, Nude mouse에 암이식후 이식된 암진행 및 전이활성, 복강대식세포 활성 평가, Cytokine분비활성(최종제품사용)	100
	(위탁1) 들깨 추출물 및 제품의 지질저하 및 항동맥경화효과 평가	- In vivo angiogenesis assay	100
		- 최종개발제품의 임상실험을 통한 지질저하 효과	100
	(제2협동) 들깨 관련제품의 시장 및 소비자 조사	- 임상실험 승인을 득한 후 혈중 지질농도, 피브리노분해능, 간독성 관련 효소 활성 측정 등	100
		- 들깨 및 들깨유를 이용한 소비층에 따른 편의식품 등을 개발함.	100
	(위탁1) 들깨, 들깨유 소재를 이용한 편의 식품의 산업화	- 들깨유 이용 편의 식품을 시생산함	100
- 들깨유 편의 식품의 SWOT-AHP analysis를 통해 환경적 강점, 약점, 기회, 위협 요인을 파악하여 세분시장에 따른 마케팅 전략을 수립함.		100	
- 편의식품의 품질 관리 기준의 설정		100	
	- 편의 식품의 품질유지기한 설정	100	

제 2 절. 관련분야의 기술발전의 기여도

- 활성화 에너지, 항산화성분의 함량 및 기능 등 들기름의 산화 관련 정보를 제공함으로써 들기름의 산화안정성을 개선시키는데 기여하여 안정성이 높은 들기름 적용 제품 기술 개발에 기여 할 수 있음.
- 볶음시간에 따른 들기름의 기능성 성분중 폴리코사놀함량에 관련된 정보를 제공하여 추후 들기름의 기능성소재로 활용하는데 기여할 수 있음.
- 추출방법에 따른 고소한 향기성분인 피라진류의 성분비율 및 총함량을 제공함으로써 고소한 맛을 갖는 들기름개발에 이용할 수 있음.
- 추출방법에 따라 들기름에 함유된 기능성성분인 토코페롤, 피토스테롤, 및 폴리코사놀의 함량변화를 밝혀내어 추후 기능성을 높인 들기름개발에 기여할 수 있음.
- 동결건조로 분말화를 할 수 있는 피복물질을 개발함으로써 열안정성이 낮은 다양한 중심물질의 미세캡슐공정에 적용할 수 있음.
- 경구투여시 생체이용률을 증대하기 위한 생체 방출제어형 미세캡슐 기술을 개발함으로써, 소장내에서 주로 소화·흡수가 일어나는 다양한 생리활성 물질의 미세캡슐화에 적용할 수 있음.
- 들깨추출물, 들깨유 및 유화유지 시료를 검체로 하여 특히 항암 및 면역조절활성에 대한 체계적이고 종합적인 기능성을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험으로 검증하여 들깨 및 들깨제품에 대한 국민건강 증진 및 노화억제를 위한 실험적 근거를 제공함.
- 들깨유의 지질저하 및 동맥경화 예방효과와 관련 기전 연구를 통해 들깨유의 건강기능성을 동물실험 및 임상실험을 통해 과학적으로 입증하였음.
- 들깨유 함유 죽 제품 생산을 위해 가공 적성을 높인 들깨유의 지질저하 효과를 확인하고, pilot scale의 임상 실험을 통해 들깨유 함유 죽의 지질 저하 기능성을 확인함으로써 관련 분야 기능성을 지닌 제품 생산의 가능성을 확인하였음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 연구개발 성과

1. 논문

- 2012년 7월 현재 SCI 논문 발표 8편, 비 SCI 논문 3편으로 논문의 목표값인 SCI 논문 7 편, 비 SCI논문 5편에 조금 미치지 못하였으나 현재 SCI 논문에 심사 중인 논문이 3편으로 2012년 내에 목표를 충분히 달성할 것으로 사료됨 (리스트 참조).

계재연도	논문명	주저자	교신저자	공동저자	학술지명	Vol. (No)	국내외 구분	SCI구분
2010	Characterization and optimization of carboxylesterase-catalyzed esterification between capric acid and glycerol for the production of 1-monocaprin in reversed micellar system	Kyung Min Park	Pahn-Shick Chang	Oh Taek Kwon, Sen Min Ahn, JaeHwan Lee	New Biotechnology	Vol. 27(1): 46-52	국외	SCI
2010	Antiradical capacities of perilla, sesame and sunflower oil	홍선희	송영욱	김미진, 오찬호, 윤석후	J. Food Science and Nutrition	Vol.15(No.1)51-58	국내	학진등재지
2010	Temperature Dependence of Autoxidation of Perilla Oil and Tocopherol Degradation	왕선영	최은옥	황현숙, 윤석후	J. Food Science	75(6):C498-505	국외	SCI
2011	A gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometric analysis of policosanols in commercial vegetable oils	Dong Min Jung	Mun Yhung Jung	Mi Jin Lee, Suk Hoo Yoon	J Food Sci	76 (6), C891-C899	국외	SCI
2011	Positional Distribution of Fatty Acids in Perilla (<i>Perilla frutescens</i> L.) Oil	Siwon Noh	Suk Hoo Yoon		J Am Oil Chem Soc	88, 157-158	국외	SCI
2011	가열에 의한 들깨의 지방질 산화와 산화방지제의 변화	왕선영	최은옥		한국식품과학회지	43(6): 711-718	국내	Scopus
2012	들깨 및 들기름의 자외선 조사 중 지방질 산화와 산화방지제의 변화	왕선영	최은옥		한국식품과학회지	44(1): 8-13	국내	Scopus
2012	Perilla oil rich in α -linolenic acid inhibits neuronal apoptosis and the expression of inflammation-mediator protein in apoE KO mice	Jeongeun Seong	Yeong Ok Song		Biocatalysis and Agricultural Biotechnology	1(2): 167-173	국외	SCIE
2012	Perilla oil rich in alpha linolenic acid suppresses hepatic SREBPs and NF- κ B expression in hypercholesterolemia-induced apolipoprotein E knockout mice	Jieun Lee	Yeong Ok Song		Food Science and Biotechnology	22(3): 807-813	국내	SCIE
2012	A Cross-Cultural Comparison of the Sensory Characteristics of Perilla Oil by American, Chinese, and Korean Panels	Jeong-Eun Yang	Lana Chung	Eunok Choe	Food Science and Biotechnology	21(2): 399-408	국내	SCIE
2012	Sensory characteristics and consumer acceptability of perilla porridges	Jeong-Eun Yang	Lana Chung	Hun-Jung Kim	Food Science and Biotechnology	21(3): 829-838	국내	SCIE
Under review	Effect of Perilla Seed Oil on the Apoptosis of Human Leukemic Cells and Anti-Metastasis of Melanoma Cells in Mice Model	Chan-Ho Oh	Mun Yhung Jung	Nam-Seok Kim, Gui-Hyun Baek, Dong-Hun Kim, Yeong-Ok Song, Suk-Hoo Yoon	Journal of Agricultural and Food Chemistry		국외	SCI
Under review	Physicochemical properties and oxidative stability of perilla oils obtained from roasted perilla seeds as affected by extraction methods	Dong Min Jung	Mun Yhung Jung	Suk Hoo Yoon	J Food Sci		국외	SCI
Under review	Double-layered Microparticles with Triggered Release for Oral Delivery of Water-soluble Drugs	Kyung Min Park	Pahn-Shick Chang	Ho Sung, Seung Jun Choi	Journal of controlled release		국외	SCI

2. 특허

- 2012년 3월 현재 특허 출원 3건으로 목표값 달성하였으나 아직 비공개기간이라 심사가 끝나지 않아 등록되지 않았음 (리스트 참조).

발명의 명칭	출원일자	출원번호	출원인명칭	발명자성명
나노 분말 들깨유	2011. 1. 27	10-2011-0008248	주식회사농심	이지연 김훈중 박수현 정성욱
발아들깨유의 제조방법	2011. 1. 27	10-2011-0008271	주식회사농심	이지연 박수현 정성욱 김훈중 오찬호
수용성 나노들깨유	2012. 3. 21	10-2012-0028548	주식회사농심	이지연 박선화 박수현 정성욱 김훈중

제 2 절. 연구성과 활용 성과 및 계획

1. 활용성과

- 기능성 유지인 들깨유를 활용하여 Omega-3 함량이 풍부한 들깨맛 짜파게티를 개발하였고 시제품을 생산하였음.



- 2012년 3월 현재 언론홍보 3건, 상품화 1건 (들깨죽; 출시 예정)임.

2. 성과 활용 계획

가. 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

- 참여기업인 농심과 협동연구를 통해 얻은 결과로써 실질적인 기술이전이 이루어 졌다고 보이며, 참여업체이기 때문에 유상기술이전은 어려운 실정임.
- 레토르트 들깨죽의 맛 type, 포장 type을 다양화 하여 개발하여 시생산함.
- 수용성 나노들깨유를 일반 가공식품에 첨가하여 건강기능성이 향상된 가공식품 개발하고 실용화함.

나. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

- 식물성 오메가 지방산을 다량 함유한 들깨유의 지질저하 및 항동맥경화 건강기능성을 과학적인 근거로 대외적으로 홍보함.
- 들깨유(ω -3지방산 다량 함유 우량 종실유) 및 들깨함유 제품에 대한 대국민 건강홍보를 활발하게 전개하는데 본 연구결과를 충분히 활용하고 국산들깨유의 검증된 기능성을 실용화하는 자료로 이용.

다. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 들깨에 대한 특허(면역, 항암활성)는 (주)농심과 공동연구를 수행해서 이미 특허출원을 마친 상태임.
- 전이억제에 대한 새로운 기능성 결과 등은 추후 취합해서 특허출원을 할 계획임.
- 들깨유의 항동맥경화 예방 효과에 관한 논문 투고 중
- 유화들깨유의 지질 저하 기능성 확인 및 이를 이용한 들깨죽 제품의 혈중 지질 저하 효과에 관한 논문 투고 중

라. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- 항알러지, 항산화에 대한 추가 기능성을 검증하고자 준비중.
- 들깨유가 혈관 확장에 미치는 영향에 대한 ex-vivo 연구를 계획 중 임
- 들깨유 함유 제품 생산 시 이의 기능성을 검증하고자 함

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- Drug delivery 분야에서 경구투여를 위한 미세캡슐의 소재로 poly lactic acid 및 poly (lactic-co glycolic acid) 등 polyelectrolyte를 널리 이용하고 있으나, 체내에서 initial-burst release로 인한 약리적 쇼크 및 독성이 문제점으로 지적되고 있음.
- 동물실험에서 유방암 및 대장암의 증식 억제 (Park and Kim, 2002), 학습능력 향상 (Yamamoto et al., 1988; Yoshida et al., 1997), 혈소판응집인자 억제 및 심혈관질환의 예방효과 (Ho-hashii et al., 1997; 서화중, 2001), 항비만효과 (Okuno et al., 1997), 항알레르기 효과 (Watanabe et al., 1994), 들기름의 면역력 개선(Kweon MN et al, 1994), perilla frutescens의 apoptosis 유도효과 (Lin CS et al, 2007) 등의 다양한 기능성 보고.
- 들깨유의 건강기능성에 관한 연구 결과들이 본 연구 팀 결과 이외에도 2011 영국 영양학회에서 다수 보고되고 있어 식물성 오메가 지방산에 대한 관심이 증대되고 있었음.
- 식물성 오메가-3 지방산 급원으로 들깨유를 수출하기 위한 유럽 시장 식용 유지에 대한 시장 조사를 실시하고 있음을 알게 되었음.
- Nanoemulsion은 현재 flavor oil의 경우 50nm 이하까지 제조하는 기술이 있음.
- Nanocapsulation기술은 식품에서는 단순히 향, 유지 등을 포집하거나 캡슐화 시키는 기술이 개발되어 있으나 의약품에서는 약물전달시스템으로 발달되어 약물이 인체내 필요한 곳에서 작용할 수 있는 시스템으로 개발되고 있음.

제 7 장 참고문헌

1. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clinical Chemistry* 1974,20,470-475.
2. Amol J. Thote et al. (2005). Reduction in the Initial-Burst Release by Surface Crosslinking of PLGA Microparticles Containing Hydrophilic or Hydrophobic Drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 31(1): 43-57
3. AOCS: 1990. Official Method and Recommended Practice of the American Oil Chemists' Society. 4th. ed. Method Cd8-53, Champaign, IL, USA
4. Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem* 1952,40,346-351.
5. Barrios M, Rodríguez - Acosta A, Gil A, Salazar AM, Taylor P, Sánchez EE, Arocha - Piñango CL, GuerrerB. Comparative haemostatic parameters in BALB/c, C57BL/6 and C3H/He mice. *Thrombosis Research* 2009,124,338-343.
6. Birch, DE., Kolmodin, L., Laird, WJ., McKinney, N., Wong, J., Young, KKY., Zangenberg, GA. and Zoccoli, MA.: Simplified Hot-Start PCR. *Nature*, 381: 445-446, 1996.
7. Brockerhoff H, Yurkowski M. 1966. Stereospecific analyses of several vegetable fats. *J Lipid Res* 7:62-4.
8. Calvo L, Cocero MJ, Diez JM. 1994. Oxidative stability of sunflower oil extracted with supercritical carbon dioxide. *J Am Oil Chem Soc* 71: 1251 - -1254
9. Carpenter AP. 1979. Determination of tocopherols in vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* 56: 668-671.
10. Chung SK, Osawa T, Kawakish S. Hydroxyl radical-scavenging effects of apices and scavengers from brown mustar (*Brassica nigra*). *Biosci Biotech Biochem* 1997,61,118-123.
11. Crowe TD, White PJ. 2003. Oxidative stability of walnut oils extracted with supercritical carbon dioxide. *J Am Oil Chem Soc* 80: 575 - -578.
12. Enavall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay III, Quantitation of specific antibodies of enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, 109:129-135, 1972
13. Espin J, Soler-Rivas C, Wichers H. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J Agric Food Chem* 2000,48,648-656.
14. Fattahi-far E, Sahari MA, Barzegar M. 2006. Interesterification of tean seed oil and its application in margarine production. *J Am Oil Chem Soc* 83:841-5.
15. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biochem* 1957,223,498-499.
16. Fomuso, L. B. and C. C. Akoh, Structured Lipids: Their Food Application And Physical

- Property Testing Methods, Food Sci. Biotechnol.6:690-698(2001)
17. Friedewald WT., Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972,18,499-502.
 18. Grover SA, Levington C, Paquet S. Identifying adults at low risk for significant hyperlipidemia: a validated clinical index. *J Clin Epidemiol* 1999,52,49 - 55.
 19. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances, VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull* 1989,37,2016-2021.
 20. Hunter JE. 2001. Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids* 36:655-68.
 21. Jung MY, Bock JY, Back, SO, Lee JH, Lee TK. 1999. Effects of roasting on the pyrazine contents and oxidative stability of red pepper seed oil prior to extraction. *J Agric Food Chem.* 47: 1700-1704.
 22. Jung MY, Choi NJ, Oh CH, Shin HK, Yoon SH. 2011. Selectively hydrogenated soybean oil exerts strong anti-prostate cancer activity. *Lipids* 46: 287-295.
 23. Kim IH, Kim MH, Kim YE, Lee CY. 1998. Oxidative stability and extraction of perilla 487 seed oil with supercritical carbon dioxide. *Food Sci. Biotech* 7:177-180.
 24. Kim M, No S, Yoon SH. 2007. Stereospecific analysis of fatty acid composition of chufa (*Cyperus esculentus* L.) tuberoil. *J Am Oil Chem Soc* 84:1079 - 80.
 25. Kim, E. J. and S.H. Yoon, Recent Progress in Enzymatic Production of Structured Lipids, *Food Sci. Biotechnol.*, 12:721-726 (2003)
 26. Kweon MN, Sakai K, Kohri T.: Effects of high fat diets on the immune responses of Peyer's patch-immunized rats. *Nutrition research*, 14(1): 59-71, 1994
 27. Latifeh Ahmadi et al. (2008). Chemical and enzymatic interesterification of tristearin/triolein-rich blends: Microstructure and polymorphism. *European journal of Lipid science and Technology* 110(11): 1025-1034
 28. Leal S, Diniz C, Sá C, Gonçalves J, Soares AS, Rocha-Pereira C, Fresco P. Semiautomated computer-assisted image analysis to quantify 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride-immunostained small tissues. *Anal Biochem* 2006,357,137-143.
 29. Lee JM, Chung H, Chang PS, Lee JH. Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chem* 2007,103,662-669.
 30. Lin CS, Kuo CL, Wang JP, Cheng JS, Huang ZW, Chen CF.: Growth inhibitory and apoptosis inducing effect of *Perilla frutescens* extract on human hepatoma HepG2 cells. 112(3): 557-567, 2007
 31. Lv HF. Cui F. Yu CH. Deng LL. Ji JJ. Lu D. Yang Y. Wang WX. and Xu YQ.: Inhibition of lung metastasis in mice by intravascular injection of dendritic cells and natural killer cells. *Biotechnol.Lett.* 31:1709-1715, 2009
 32. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for

- the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clinical Chemistry* 1983,29,538-542.
33. McNeill, G. P., D. Borowitz, and R.G. Berger, Selective Distribution of Saturated Fatty Acids into the Monoglyceride Fraction During Enzymatic Glycerolysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69:1098-1103(1992)
 34. Mosmann, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods*, 65: 55-63, 1983
 35. Myrnes, B., H. Barstad, R.L. Olsen, and E.O. Elvevoll, Solvent-Free Enzymatic Glycerolysis of Marine Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72:1339-1344(1995)
 36. Nouredini, H., X. Gao, and S. Joshi, Immobilization of *Candida rugosa* Lipase by Sol-Gel Entrapment and Its Application in the Hydrolysis of Soybean Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80:1077-1083(2003)
 37. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*1987,68,231-240.
 38. Riaz Ahmed et al. (2010). Reduction in Burst Release from Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Microparticles by Solvent Treatment. *Letters in Drug Design & Discovery* 7(10): 759-764
 39. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988,37,837-841.
 40. Sahasrabudhe MR, Chapman DG. 1961. Partial fractionation of fatty acid triglycerides on a silicic acid column. *J Am Oil Chem Soc* 38:88 - 92.
 41. Sempore G, Bezard J. 1991. Determination of molecular species of oil triglycerols by reversed-phase and chiral-phase high-performance liquid chromatography. *J Am Oil Chem Soc* 68:702-9.
 42. Shortman, K. and Backson, H.: The differentiation of T lymphocytes, I: Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells. *Cell. Immunol.*, 12: 230-246, 1974
 43. Sonntag, N.O.V., Glycerolysis of Fats and Methyl Esters-Status Review and Critique, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59:795A-802A(1982)
 44. Tan MH, Johns D, and Glazer NB. Pioglitazone Reduces Atherogenic Index of Plasma in Patients with Type 2 Diabetes. *Clinical Chemistry* 2004,50,1184 - 1188.
 45. Tarko T, Duda-Chodak A, Sroka P, Satora P, Jurasz E. Physicochemical and antioxidant properties of selected polish grape and fruit wines. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 2008,7,35-45.
 46. Torres, C. F., F. Munir, L.P. Lessard, and C.G. Hill Jr., Lipase-Mediated Acidolysis of Tristerin with CLA in a Packed-Bed Reactor: A Kinetic Study, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79:655-661(2002)
 47. Towbin H. Staehelin T. and Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Biotechnology* 24:145-149, 1992
 48. Towfighi J, Yager JY, Housman C, Vannucci RC. Neuropathology of remote

- hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta neuropathologica*, 1991, 81, 578-587.
49. T-Y. SHEU et al. (1995). Microencapsulation by Spray Drying Ethyl Caprylate in Whey Protein and Carbohydrate Wall Systems. *Journal of Food Science* 60(1) 98-103
50. Uchiyama, M., Mihara, M., 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 86,271-278.
51. Valivety, R. H., P. J. Halling, and A. R. Macrae, Reaction Rate with Suspended Lipase Catalyst Show Similar Dependence on Water Activity in Different Organic Solvents, *Biochim. Biophys. Acta* 1118:218-222(1992)
52. Yoon SH, Noh S. 2011. Positional distribution of fatty acids in perilla (*Perillafrutescens*L.) oil. *J Am Oil Chem Soc* 88:157 - 8.
53. 김근영(2007). 실버세대의 라이프스타일 유형에 따른 외식행동 및 외식메뉴 선호도 분석. 석사학위논문
54. 박동숙, 이경임, 박건영: 들깨의 식이 섬유소 함량분석과 들깨 추출물의 항돌연변이 효과. *한국식품영양과학회지*, 10: 900-905, 2001
55. 식품의약품안전청의 2011년 용역연구과제 (과제번호: 11062미래식205)
56. 통계청(2010). 2010 고령자 통계. www.kostat.go.kr 2010