

탈지 유채박 중 표면활성정제물의 유화특성 및 산화 안정도에 관한 연구

김산성 · 이의석 · 이기택 · 홍순택[†]

충남대학교 농업생명과학대학 식품공학과
(2016년 2월 18일 접수; 2016년 3월 14일 수정; 2016년 3월 24일 채택)

Emulsifying Properties and Oxidative Stability of Purified Surface-Active Substances from Defatted Rapeseed Cake Extract

San-Seong Kim · Eui-Seok Lee · Ki-Teak Lee · Soon-Taek Hong[†]

*Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Science,
Chungnam National University*

(Received February 18, 2016; Revised March 14, 2016; Accepted March 24, 2016)

Abstract : Surface-active substances in defatted rapeseed cake were obtained using a supercritical fluid extraction method. Then, it was purified by removing sinapine in the extract through a series of steps using a mixed solvent: diethyl ether and ethyl acetate (1:1, v/v). Emulsifying properties of purified surface-active substances were investigated, including fat globule size, zeta potentials and creaming stability and its antioxidant activity in emulsion systems were also studied by peroxide value and ¹H-NMR spectrum. It was found that fat globules in emulsions with purified surface-active substances were much smaller than ones with the unpurified. In addition, as pH of the emulsion lowered and with increasing NaCl concentration in the emulsion, they were observed to increase, which led to worse creaming stability. These properties were reflected in changes of zeta potentials of emulsions. The oxidative stability was better in emulsions with purified surface-active substances than ones with Tween 20 or commercial lecithin, possibly resulted from the existence of sinapic acid in the extract. It was concluded that purified surface-active substances from defatted rapeseed cake could be simultaneously used as emulsifier and antioxidant agent in emulsion system.

Keywords : rapeseed, purified surface-active substances, supercritical fluid extraction, antioxidant, sinapic acid

[†]Corresponding author
(E-mail: hongst@cnu.ac.kr)

1. 서론

식품 에멀션은 일반적으로 서로 섞이지 않는 두 개의 액체(예: 물과 기름)로 이루어진 시스템으로 유화제 및 안정제 등의 도움을 받아 하나의 액체가 작은 입자의 형태로 다른 하나의 액체에 분산되어 존재한다. 이 때 사용된 유화제는 물/기름 사이의 계면장력을 낮추고 계면막을 형성하여 에멀션에 안정성을 부여하며, 안정제는 주로 연속상의 점도를 증가시켜 에멀션의 크리밍 속도(creaming velocity)를 낮추며 조직감(texture)을 개선시킨다[1]. 식품 유화에 사용되는 유화제는 저분자량의 합성유화제 및 인지질, 고분자량의 단백질 및 복합당류 등이 있으며, 이 중 인지질은 천연유화제로써 식품 및 제약 산업에 폭넓게 이용되고 있다[2].

인지질은 레시틴(lecithin)을 구성하는 물질로써 대두 등의 천연소재로부터 손쉽게 구할 수 있으며 구조적으로 친수성과 소수성 작용기를 한 분자 내에 동시에 가지고 있어 식품 에멀션 제조에 널리 사용되고 있다[3]. 또한, 인지질은 인체의 세포막을 구성하는 주요 물질로써 피부 칙투성이 뛰어나며 다양한 생리활성(예: 콜레스테롤 저하, 동맥경화치료제, 정맥지방유화제)을 갖고 있어 의약품, 화장품 산업 등 그 활용도가 매우 높다[4,5]. 일반적으로 레시틴은 대두로부터 얻으며 이외에도 옥수수 배아, 면실, 해바라기, 유채 등으로부터 얻을 수 있다[6]. 이 중, 유채(*Brassica napus*)는 십자화과의 1년생 초본식물로서 국내에서는 남해안지역 및 제주도에서 재배되고 있다[7]. 유채 종자로부터 기름을 추출하고 남은 유채박은 주로 단백질(35~40%), 탄수화물(14~15%), 섬유질(10~12%), 수분(6~8%), 무기질 및 비타민(1~1.5%), sinapine(1~1.5%) 등을 함유하고 있다[8]. 또한, 초임계 CO₂ 유체를 이용하여 유채박으로부터 표면활성물질을 추출한 Kim(2014)의 보고에 의하면[9], 추출물은 중성지질(4~29%), 당지질(8~30%), 인지질(42~80%) 및 sinapine 등으로 구성되어 있어 유채박 중 인지질 함량이 상당한 것을 알 수 있다.

유채에 소량 함유되어 있는 sinapine은 sinapic acid와 콜린(choline)이 에스테르 결합한 알칼로이드(alkaloid) 화합물로[10] 식물체에서 리그닌과 플라보노이드를 합성하는데 중요한 역할을 한다[11]. 그러나 sinapine은 짠맛과 쓴맛을 나타내는 성분인 동시에 단백질과 복합체를 형성하여

에너지의 소비를 저해시키는 항영양 물질로 알려져 있어서 이의 제거가 요구된다[12,13]. 한편, sinapic acid는 hydroxycinnamic acid 계열의 페놀화합물로서 산화물질인 peroxyinitite(ONOO⁻)의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있어 기름의 산패를 저해 시키는 항산화능을 갖는다[14,15]. 또한, sinapic acid는 세포구성 물질인 단백질, 지질, DNA의 산화를 지연시킬 수 있는데 이를 통하여 알츠하이머병, 류머티즘성 관절염, 아테롬성 동맥 경화증, 암 등과 같은 질병의 발병 원인을 억제 시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다[16,17].

따라서 본 연구는 이전 연구[18]에 이어서 탈지 유채박으로부터 초임계 CO₂ 유체 추출법을 통해 얻은 추출물 중 sinapine을 제거시킨 'sinapic acid 함유 표면활성물질(정제표면활성물질)'의 유화특성 및 이를 이용하여 제조한 에멀션의 산화안정성을 조사하는데 그 목적이 있다.

2. 실험

2.1. 실험재료

본 실험에 사용된 유채박은 국립식량과학원(농촌진흥청 바이오에너지작물센터)에서 기름을 추출하고 남은 2011년산 잡종 유채박을 사용하였다. 수상으로 bis-tris(Sigma-aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 수용액에 미생물 생육 저해를 위하여 sodium azide(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)를 첨가·사용하였으며, 유상으로 사용된 카놀라유(Ottogi Co., Pyeongtaek, Korea)는 시중에서 구입하여 Jeong[19]의 방법에 따라 토코페롤을 제거하였다. 에멀션의 산화안정도 실험을 위해 대조군 유화제로 polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20, Sigma-aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 및 상업용 레시틴(Ilshinwells Co., Cheongwon, Korea)을 사용하고, ¹H-NMR 실험에 chloroform-D (CDCl₃, Sigma-aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 및 그 밖에 실험에 사용한 모든 시약은 일급 이상의 등급을 사용하였다.

2.2. 표면활성물질의 추출 및 정제

탈지 유채박에 존재하는 표면활성물질의 추출은 초임계 이산화탄소를 이용하는 초임계 추출장치를 사용하였으며, 추출 조건은 Kim[9]의 연구

를 참고하여 보조용매(에탄올) 250 g, 추출 압력 15 MPa, 추출 온도 65°C로 설정하여 추출하였다. 즉, 탈지 유채박 및 보조용매를 정량하여 추출조에 주입시킨 뒤 1시간 동안 침지시켰으며, 온도 및 압력은 침지가 진행되는 동안 추출조건을 유지시켰다. 침지시간이 경과한 후, 2시간 동안 추출조 내부의 용매를 CO₂와 함께 분리조로 이동시켰다. 이 때, 가압펌프를 이용하여 추출조 압력을 15 MPa로 유지시켰으며, CO₂의 유속은 6 L/min으로 하였다. 추출 종료 후 분리조로부터 추출물을 회수하였으며, 회수한 추출물 중 존재하는 보조용매는 감압농축장치를 사용하여 제거하였다.

표면활성물질의 정제는 Lee 등[18]의 방법에 의거 수행하였다. 즉, 일정량의 표면활성추출물을 증류수에 분산시킨 후 여기에 혼합용매(diehtylether:ethyl acetate=1:1, v/v)를 넣어 혼합하고 포화 염화나트륨 수용액을 적량 첨가한 후 원심분리 하여 상등액 및 잔유물을 얻었다. 상등액은 질소를 이용하여 용매를 완전히 제거하였으며(1차 ppt), 잔유물은 수분을 제거한 후 에탄올을 소량 첨가하여 용해·원심분리 하여 상등액을 취하고(에탄올 증), 이를 제거하여 2차 ppt를 얻었다. 1, 2차 ppt는 상기의 과정을 2회 반복하여 순도를 높였으며, 이를 통해 얻은 ppt를 합하여 본 실험의 '표면활성정제물질' 시료로 하였다.

2.3. 에멀션 제조

수상으로 200 ppm sodium azide를 함유하고 있는 20 mM bis-tris (pH 7) 용액에 정제된 표면활성물질을 농도별(0.1~1.0 wt%, 에멀션 기준)로 용해시켜 사용하였다. 카놀라유를 유상으로 하여 에멀션 무게 대비 10 %가 되도록 수상에 첨가한 후 이 혼합물을 5000 rpm에서 5분 동안 예비균질(L4RT, Silverson Machine Ltd., Chesham, UK)하고, 이를 다시 고압균질기(M-110Y, Microfluidics, MA, USA)를 이용하여 총 3번 통과(20 MPa: 2번, 5 MPa: 1번)시켜 최종 에멀션을 제조하였다.

2.4. 지방구 크기 변화 및 크리밍 안정도

정제표면활성물질을 농도별(0.1~1.0 wt%)로 첨가하여 제조한 에멀션에 대하여 저장기간에 따른 지방구의 크기 변화를 조사하였다. 에멀션을 상온에서 15일 동안 저장하면서 0, 3, 7, 15일

후 일정량의 에멀션 시료를 취하여 입도분석기(Malvern Master Sizer S, Malvern Co., Worcestershire, UK)를 이용하여 지방구 크기를 측정하고 결과는 d_{32} , d_{43} 로 표시하였다[20].

$$d_{32} = \frac{\sum d_i^3 n_i}{\sum d_i^2 n_i} \quad (n_i: \text{입자의 개수}, d_i: \text{직경}) \quad \dots\dots\dots [1]$$

$$d_{43} = \frac{\sum d_i^4 n_i}{\sum d_i^3 n_i} \quad (n_i: \text{입자의 개수}, d_i: \text{직경}) \quad \dots\dots\dots [2]$$

정제표면활성물질의 농도에 따른 에멀션의 크리밍 안정도 평가는 gravity creaming test 방법을 사용하였다[21]. 각 농도별로 제조된 에멀션을 test tube(dimeter: 8mm, length: 250mm)에 20 mL 취하여 상온 저장하였다. 크리밍 안정도 평가는 저장일로부터 3, 7, 15일이 지난 에멀션의 수상층(serum layer) 높이를 측정하였으며, 결과는 식 [3]에 의해 산출된 값으로 나타내었다.

$$\text{Creaming index}(\%) = \frac{H_S}{H_E} \times 100 \quad \dots\dots\dots [3]$$

여기서 H_S 는 수상층의 높이; H_E 는 전체 높이이다.

2.4.1. NaCl 첨가에 따른 지방구 크기

정제표면활성물질을 0.5 wt% 함유하는 에멀션 30 mL를 5개의 test tube에 각각 충전 한 후, NaCl을 각 test tube 마다 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 M 농도로 첨가·용해시켰다. 이를 상온에서 24시간 방치하여 NaCl 첨가에 따른 지방구 크기를 조사하였다.

2.4.2. pH 변화에 따른 지방구 크기 및 제타전위

정제표면활성물질을 0.5 wt% 함유하는 에멀션 30 mL를 5개의 test tube에 각각 충전 한 후, 0.1 N HCl 혹은 0.1 N NaOH를 이용하여 pH를 3, 5, 7, 8로 변화시켰다. 이를 상온에서 24시간 방치 하여 pH 변화에 따른 지방구 크기를 조사하였다.

정제표면활성물질을 0.5 wt% 함유하는 에멀션을 대상으로 pH를 조절한(pH 3, 5, 7, 8) 에멀션 중 지방구 입자의 제타전위를 조사하였다. 먼

저 각 시료를 동일한 pH의 bis-tris용액에 1000 배 희석 시킨 후 측정용 cell (folded capillary cell, Malvern co., Worcestershire, UK)에 충전하여 제타전위 측정기기(Nanosizer ZS, Malvern co., Worcestershire, UK)를 이용하여 측정하였다.

2.4.3. pH 변화에 따른 Turbiscan 크리밍 안정도

크리밍 안정도는 시간경과에 따른 분산상(지방구)의 농도 차이를 민감하게 측정할 수 있는 Turbiscan (Turbiscan Lab., Formulation, l'Union, France) 장치를 사용하여 측정하였다 [22]. 측정은 조사된 빛(880 nm)이 여러 개의 입자들과 산란을 일으켜 되돌아오는 빛의 강도 변화 즉 후방산란강도의 변화(Δ backscattering intensity, Δ BS)를 조사하는 다중산란(multiple light scattering) 현상을 이용하였으며[23], 이를 통하여 시간 경과에 따른 에멀션의 물리적 상태 변화 즉, 안정도 특성 변화를 알 수 있게 된다. 전술한 방법에 의하여 pH를 조절한 에멀션 20 mL를 시료병에 취하여 측정기기에 넣고 상온에서 300분 동안 조사하였으며, 결과는 측정기기의 소프트웨어(Turbisoft, Fomulation)에 의하여 '시료병 높이에 따른 Δ BS'의 그래프로 표현하였다.

2.6. 에멀션의 산화안정성

0.5 wt% 정제표면활성물질을 함유하는 에멀션의 산화안정성을 조사하기 위해 비이온성 유화제인 Tween 20과 정제표면활성물질 중 대부분을 차지하고 있는 인지질을 주성분으로 하는 상업용 레시틴을 대조군으로 하여 0.3 wt% Tween 20 에멀션, 0.5 wt% 상업용 레시틴 에멀션을 상기 방법과 동일하게 제조하였다. 제조된 각 에멀션은 40°C에 100일 동안 저장하였으며, 아래 방법과 같이 과산화물가(peroxide value, POV), $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정·비교하였다.

과산화물가 측정은 Mei 등[24]의 방법을 참고하였다. 먼저 20 μL 에멀션을 3 mL 메탄올/에탄올(2:1, v/v) 혼합 용액에 섞은 후 3.9 M ammonium thiocyanate 15 μL 을 첨가하였다. 이 후, 0.1 M BaCl_2 (0.4 M HCl에서 제조)와 0.1 M FeSO_4 를 1:1(v/v)로 혼합시키고 원심분리하여 얻은 상등액 15 μL 를 넣어 발색시켰다. 발색은 상온에서 20분간 진행하였으며 발색이 완료된 후, 510 nm에서 UV-spectrophotometer

(Optizen 2120UV plus, Mecasys Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 사전에 만들어 놓은 표준곡선(x축: H_2O_2 농도, y축: 흡광도)을 이용하여 농도(mg $\text{H}_2\text{O}_2/\text{mL}$ emulsion)로 환산하였다.

저장기간에 따른 2차 산화물(aldehydes)의 변화를 분석하기 위해 $^1\text{H-NMR}$ (BRUKER AVANCE III 600, Bruker, Germany)을 이용하였다. 각 에멀션을 클로로포름과 1:5(w/w)로 혼합하였으며 원심분리 후 하등액을 취하여 황산나트륨(Na_2SO_4) column에 통과시켰다. 통과된 액체는 질소 처리하여 최종적으로 기름을 얻었다. NMR tube (Norell, USA)에 각 에멀션으로 부터 회수한 기름 50 mg을 CDCl_3 700 μL 와 희석시켜 분석 시료로 사용하였다. 분석 결과는 Goicoechea와 Guillen[25]의 연구를 참고하여 $^1\text{H-NMR}$ 의 peak 면적을 계산하여 2차 산화물의 결과를 mmol/L emulsion으로 환산하여 표시하였다[19,26].

2.7. Sinapic acid 분석

정제 전 또는 정제 후 표면활성물질 중 sinapic acid 함량을 Lee 등[18]의 방법에 의거 HPLC를 이용하여 분석하였다. 즉, 시료 10 mg을 phosphoric acid(0.1%, v/v)가 함유된 10% 메탄올을 1 mL에 첨가하여 shaking bath(37°C, 3 시간)에서 추출하여 원심분리(14,000 \times g, 10°C, 10분)하였다. 상등액을 취해 0.45 μm syringe filter로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였고 분석조건은 Table 1에 나타내었다.

2.8. 통계처리

본 실험은 3회 반복 측정하여 평균값과 표준편차로 나타냈고, 평균값 간의 유의성 검정은 SAS ver. 9.4을 이용하여 ANOVA 분석 후 $p < 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test로 실시하였다.

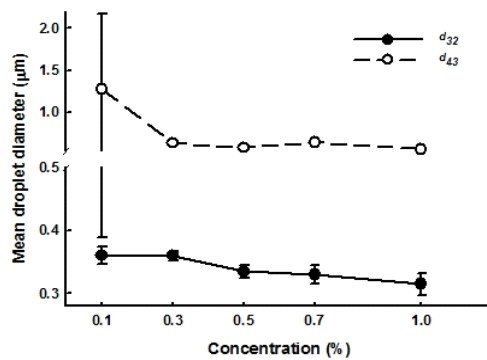
3. 결과 및 고찰

3.1. 지방구 크기 변화

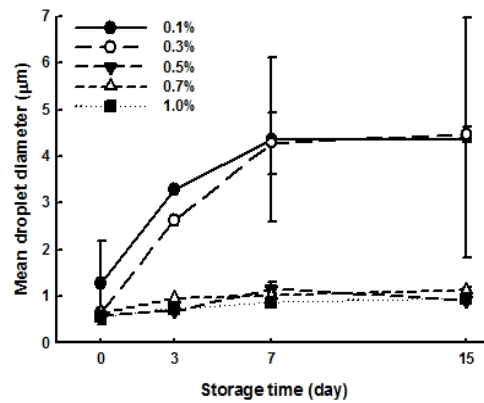
정제표면활성물질의 첨가 농도(0.1~1.0 wt%)에 따른 에멀션(0.1~1.0 wt% 정제표면활성물질, 10% oil, 20 mM bis-tris, pH 7)의 지방구 크기를 Fig. 1에 나타내었다. 지방구 크기(d_2)는 정제 표면활성물질 농도의 증가와 더불어 감소하였으

Table 1. Operating conditions of HPLC for the analysis of sinapic acid contents in not-purified and purified-surface active substances

Instrument	Agilent Technologies 1200 series
Column	Capcell PAK C18 column (4.6 × 250 mm, 5 μm; Shiseido, Tokyo, Japan)
Wavelength	350 nm
Injection volume	10 μL
Oven temperature	40°C
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	Solvent A MeOH:water:acetic acid = 5:92.5:2.5, (v/v/v)
Gradient condition	Solvent B MeOH:water:acetic acid = 95:2.5:2.5, (v/v/v)
	0.1 min, solvent B 0%
	10.0 min, solvent B 20%
	15.0 min, solvent B 40%
	20.0 min, solvent B 40%
	25.0 min, solvent B 50%
	28.0 min, solvent B 50%
	30.0 min, solvent B 100%

Fig. 1. Mean droplet diameters (d_{32} , d_{43}) of emulsions (10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7) stabilized by purified surface-active substances added at various concentrations (0.1~1.0 wt%).

며(d_{32} : 0.36→0.32 μm), 0.5 wt% 이상 첨가할 경우, 큰 변화를 보이지 않았다. 이는 Kim 등 [27]의 탈지 유채박으로부터 얻은 초임계 추출물의 유화 특성 결과와 비교하여 작은 측정값

Fig. 2. Changes in mean droplet diameter (d_{43}) of emulsions (10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7) stabilized by purified surface-active substances (0.1~1.0 wt%, in emulsions) with storage time.

(d_{32} : 0.90→0.47 μm)으로, 주로 추출물의 정제 과정 중에 sinapine이 제거됨에 따라 유화 성분인 인지질 함량의 상대적 증가로 인해 초래된 것으

로 판단하였다[18]. Lee 등[18]의 보고에 따르면 표면활성 정제물의 계면장력 값은 정제 전과 비교하여 현저하게 낮아졌으며, 이러한 계면장력의 감소는 유화 지방구 크기의 감소를 초래하는 것으로 보고된 바 있다[28].

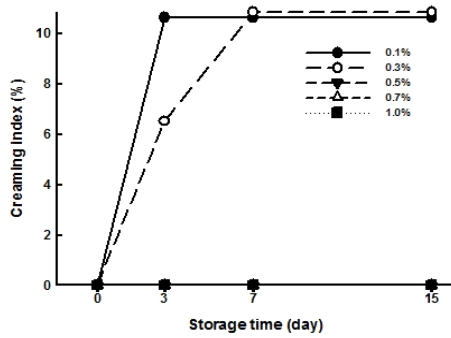


Fig. 3. Changes in creaming index of emulsions (10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7) containing the purified surface-active substances (0.1~1.0 wt%, in emulsions) with storage time.

3.1.1. NaCl 첨가에 따른 지방구 크기 변화

NaCl 첨가에 따른 에멀션(0.5 wt% 정제표면활성물질, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7)의 지방구 크기 변화를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에 의하면 지방구 크기(d_{43})는 NaCl 첨가 농도의 증가와 더불어 증가하는 경향을 보였으며(0.1 M : 0.64 μm \rightarrow 1.0 M : 8.76 μm), 이는 첨가된 NaCl에 의해 지방구 간의 응집 혹은 합일이 촉진되어 초래된 결과로 판단하였다. 본 실험에 사용된 표면활성정제물의 주요한 유화성분인 인지질[phosphatidylcholine (PC)과 phosphatidylethanolamine (PE)]은 음이온계 유화제로 이로 인해 유화 지방구 간에 정전기적 반발력(electrostatic repulsive force)이 일정 수준으로 유도되어 안정한 에멀션이 형성된다[29,30]. 그러나 NaCl을 에멀션에 첨가하면 해리된 이온(Na^+)이 지방구의 표면에서 음전하와 상호작용을 하여 정전기적 반발력의 가림효과(screening effect)를 발생시킨다. 이러한 가림효과는 지방구 응집 및 합일의 원인으로 작용하여 지방구 크기는 증가하게 된다[27].

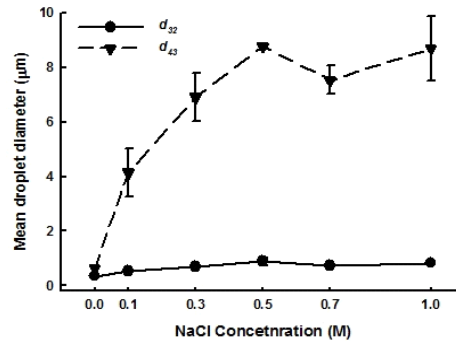


Fig. 4. Effect of NaCl addition on the mean droplet diameters (d_{32} , d_{43}) of emulsions (0.5 wt% purified surface-active substances, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7).

3.1.2. pH에 따른 지방구 크기 및 제타전위 변화

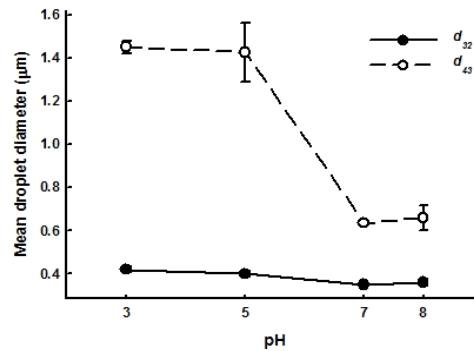


Fig. 5. Effect of pH on the mean droplet diameters (d_{32} , d_{43}) of emulsions (0.5 wt% purified surface-active substances, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris).

Fig. 5는 0.5 wt% 정제표면활성물질을 사용하여 제조한 에멀션의 pH 변화에 따른 지방구 크기 변화를 나타내고 있다. Fig. 5에 의하면, 지방구 크기(d_{43})는 pH의 증가와 더불어 감소(pH 3 : 1.45 μm \rightarrow pH 8 : 0.36 μm)하는 경향을 보였다. 이 결과를 규명하기 위해 pH 변화에 따른 유화지방구의 제타전위를 측정하였으며 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 제타전위는 측정 pH 구간에서 음(-)의 값으로 나타났으며, 그 절대값은 pH의 증가와 더불어 증가하였다. Fig. 5 및 6

에 나타난 지방구 크기 및 제타전하 측정 결과는 Kim 등[27]의 연구 결과와 유사한 경향으로 측정 pH 구간에서 음전하로 하전된 정제표면활성 물질이 산성 pH 조건에서 수소이온(H⁺)과 상호 작용하여 지방구 표면에서 음전하량이 감소되고 이로 인해 지방구간 정전기적 반발력이 감소하여 응집 또는 합일에 의한 지방구 크기가 증가한 것으로 판단하였다. 또한 인지질(PC, PE)의 pK_a 값은 매우 낮아서(PC: 0.8, PE: 0.3) 산성 지역에서 음전하를 띄게 되며[31], pH가 높아질수록 해리도가 증가하여 절대 제타전위는 증가하게 된다.

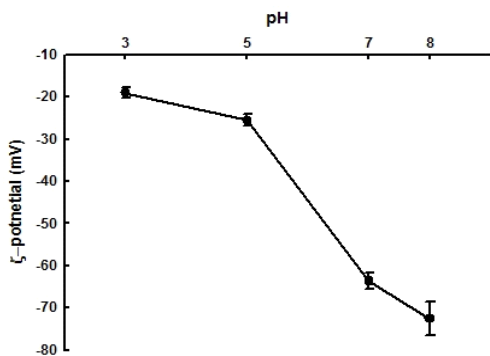


Fig. 6. Influence of pH on the zeta-potential of emulsions (0.5 wt% purified surface-active substances, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris) with pH.

3.2. 크리밍 안정도 변화

3.2.1. 농도에 따른 크리밍 안정도 변화

정제표면활성물질의 농도(0.1~1.0 wt%)에 따른 유화안정성 변화를 조사하기 위해 먼저, 저장기간에 따른 에멀션의 지방구 크기 변화를 조사하였다(d_{43}). Fig. 2는 저장기간에 따른 농도별 지방구 크기 변화를 나타낸 것으로써, 에멀션 중 정제표면활성물질 농도가 0.3 wt% 이하일 경우 저장기간의 증가와 더불어 지방구 크기(d_{43})가 현저하게 증가하는 것을 알 수 있었다.(저장 15일 후, 0.1 wt% : 1.28 → 4.39 μm, 0.3 wt% : 0.64 → 4.46 μm). 이는 유화공정 중 새롭게 생성된 지방구 표면에 유화제가 충분한 농도로 계면막을 형성하지 않아 초래된 것으로 사료되며, 첨가 유화제의 양이 충분하면 지방구 크기는 유

화제 농도에 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있다[28]. 이러한 변화 경향은 Fig. 3의 농도에 따른 에멀션의 크리밍 안정성 조사 결과와 일치하였다. 15일 동안 진행된 크리밍 안정도는 정제표면활성물질 0.3 wt% 이하 첨가 에멀션에서 저장기간과 더불어 수상층의 높이가 현저하게 증가(0.1 wt% : 10.63%, 0.3 wt% : 10.87%)하였으며, 다음의 Stokes 법칙에 의해 그 원인을 추정할 수 있다.

$$V_s = 2a^2(\rho_0 - \rho)g/9\eta_0 \dots\dots\dots [4]$$

(V_s : 크리밍 속도, a : 지방구 반지름, ρ, ρ_0 : 각각 분산질 및 분산매의 밀도, η_0 : 연속상 점도).

식 [4]에 의하면, 크리밍 속도는 지방구 반지름의 제곱에 비례하는 것을 알 수 있다. 따라서 정제표면활성물질 농도가 0.3 wt% 이하로 첨가된 에멀션의 층분리 현상(열세한 크리밍 안정도)은 지방구 크기의 현저한 증가에 기인한 것으로 보인다. 한편, 정제표면활성물질의 첨가 농도가 0.5 wt% 이상일 경우 크리밍 안정도는 우수한 것으로 나타났다.

3.2.2. pH 변화에 따른 Turbiscan 크리밍 안정도

Fig. 7은 0.5 wt% 정제표면활성물질을 사용하여 제조한 에멀션의 pH를 조절 한 후, Turbiscan 장치에 넣고 300분 동안 측정된 크리밍 프로파일이다. X축은 용기의 높이(0~45 mm), Y축은 ΔBS(-8~+30%)를 나타냈으며, 그래프의 각 선은 초기 후방산란 값을 0%로 하여 시간이 경과함에 따라 변하는 ΔBS(%)를 나타내고 있다. ΔBS는 에멀션 중의 입자 농도에 영향을 받는데 크리밍 등에 의해 시료병 하부에 수상층이 발생하면 입자 농도가 감소하여 후방산란은 음의 값을, 입자의 농도가 증가하면 양의 값을 갖는다[24]. Fig 7에 의하면, 0.5 wt% 정제표면활성물질 에멀션은 pH 5 이하에서 용기의 높이와 관계없이 음의 후방산란 값이 증가하여 수상층(크리밍)이 급격히 발생한 것으로 판단하였다. 이 현상은 낮은 pH 지역에서 에멀션의 지방구 크기 변화와 관련된 것(Fig. 5)으로 이 지역에서 관찰되는 지방구의 응집 혹은 합일의 결과에 의한 것으로 판단하였다.

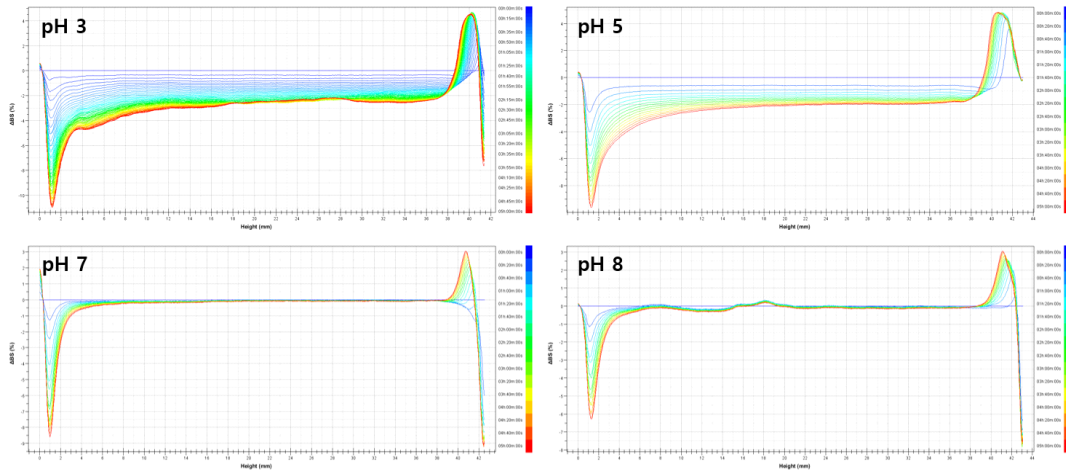


Fig. 7. Turbiscan creaming profiles of emulsions (0.5 wt% purified surface-active substances 10 wt% oil, 20 mM bis-tris) with different pH. Creaming profiles were expressed as Δ backscattering intensity versus sample height.

3.3. 산화 안정도

3.3.1. 과산화물가

에멀션의 산화안정도는 유화 식품의 유통기한 설정 등 저장 안정성과 관련하여 매우 중요하다. Fig. 8은 각 에멀션에 함유되어 있는 1차 산화물 즉, hydroperoxide의 생성량(POV)을 측정한 결과이다. 대조군으로 사용된 0.3 wt% Tween 20 에멀션 및 0.5 wt% 상업용 레시틴 에멀션의 경우 저장기간 50일까지 POV가 증가(Tween 20 에멀션: $0.98 \pm 0.01 \rightarrow 56.91 \pm 1.25$ meq/L emulsion, 상업용 레시틴 에멀션: $1.25 \pm 0.01 \rightarrow 84.89 \pm 1.92$ meq/L emulsion)한 후 감소하였다(Tween 20 에멀션: $56.91 \pm 1.25 \rightarrow 44.12 \pm 10.29$ meq/L emulsion, 상업용 레시틴 에멀션: $84.89 \pm 1.92 \rightarrow 48.36 \pm 16.29$ meq/L emulsions). 반면에, 0.5% 정제표면활성물질 에멀션은 저장 60일까지 POV가 큰 변화를 나타내지 않았다(0 일차: $0.74 \pm 0.02 \rightarrow 3.20 \pm 0.23$ meq/L emulsion). 이러한 결과는 주로 정제표면활성물질 중의 sinapic acid에 의한 것으로 판단하였는데[17,32], 실제로 정제 전의 표면활성물질 중에도 상당량의 sinapic acid가 존재하고 있었으며[Fig. 9, Table 2] 정제 과정을 거친 후 sinapic acid 함량이 약 2배 이상 증가됨을 확인할 수 있었다(정제 전 63.47 ± 0.04 mg/g \rightarrow 정제 후 123.28 ± 0.02 mg/g). 또한, Lee[26]도 유화 시스템에서 sinapic

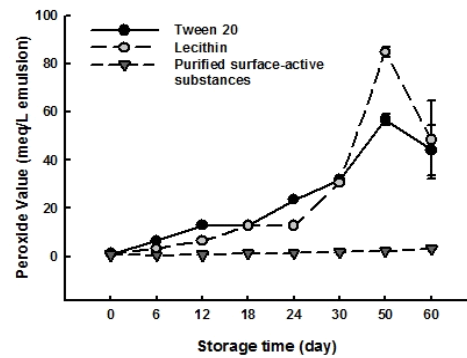


Fig. 8. Peroxide values of emulsions stabilized by 0.3 wt% Tween 20, 0.5 wt% lecithin or 0.5 wt% purified surface-active substances. The emulsions were stored at 40°C for 60 days.

acid는 카테킨(catethin)보다 항산화능이 우수한 것으로 보고되고 있어 본 실험결과를 뒷받침하고 있다. Sinapic acid는 시스템에 존재하는 hydroperoxide에게 수소 양이온을 공여하여 산화를 억제하는데[14], 특히 본 실험에서는 에멀션 형성 후에 sinapic acid를 첨가하여 보고한 Lee[26]의 실험결과보다 월등히 높은 산화안정성을 나타내었다. 이는 sinapic acid의 화학구조에 근거하여 유화공정 중 sinapic acid가 유화제와

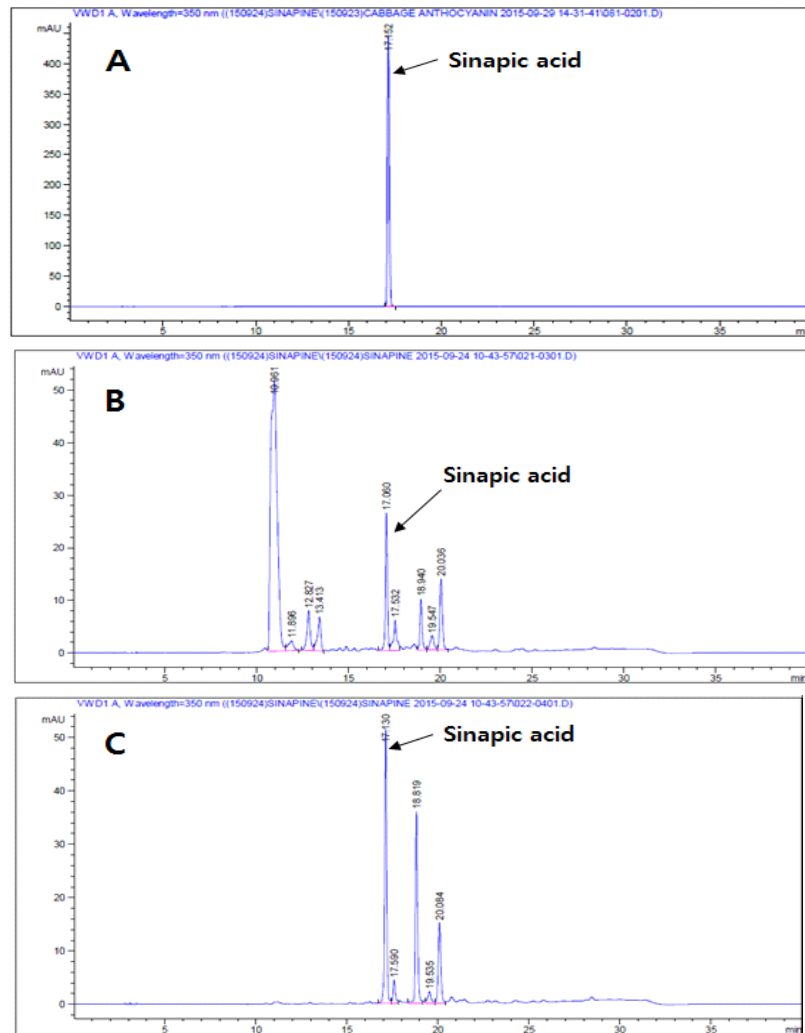


Fig. 9. HPLC Chromatogram of sinapic acid in not-purified and purified surface-active substances. (A) sinapic acid(standard); (B) not-purified surface-active substances; (C) purified surface-active substances.

Table 2. Sinapic acid contents (mg/g dry wt.) in not-purified and purified surface-active substances

Samples	Purified surface-active substances (mg/g)	Not-purified surface-active substances (mg/g)
Sinapic acid	123.28 ± 0.02 ^{1)a}	63.47 ± 0.04 ^b

¹⁾Values are mean ± SD ($n=3$).

^{a-b}Means with different letters in the same column are significantly different according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

더불어 기름-물의 계면에 동시에 흡착하여 높은 산화안정성을 나타낸 것으로 추정되며[33,34], 이를 증명하기 위하여 추가적 실험이 요구되어진다.

3.3.2. $^1\text{H-NMR}$

$^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 저장기간에 따른 2차산화물 즉, 알데하이드류(aldehydes)의 생성량을 측정 한 결과는 Fig. 10과 같으며, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 Fig. 11과 같다. 0.3 wt% Tween 20과 0.5 wt% 상업용 레시틴 에멀션으로부터 추출한 기름의 경우, 저장기간 30일차에서 2차산화물이 나타나 100일차에는 각각 2.47 ± 0.31 , 1.80 ± 0.26 mmol/L emulsion로 측정되었다. 반면, 0.5 wt% 정제표면활성물질 에멀션으로부터 추출한 기름의 경우, 저장기간 100일차에서 비로서 소량의 2차산화물이 측정되었다(0.45 ± 0.05 mmol/L emulsion). 이러한 원인은 전술한 바와 같이 정제 표면활성물질 중 일부 함유되어 있는 sinapic acid가 항산화력을 가지고 있어 에멀션 시스템에서 기름의 산화를 효과적으로 억제시키기 때문으로 판단하였다[17, 26].

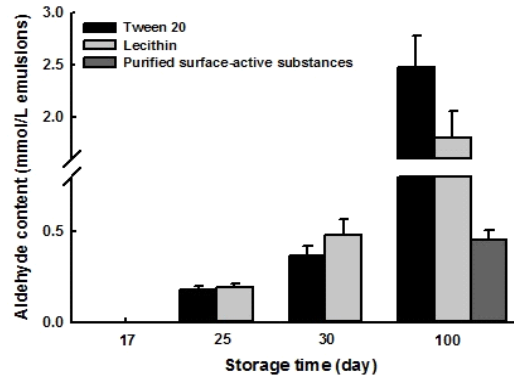


Fig. 10. Amounts of the secondary oxidative products in emulsions stabilized by 0.3 wt% Tween 20, 0.5 wt% lecithin or 0.5 wt% purified surface-active substances with storage time. The emulsions were stored at 40°C for 100 days.

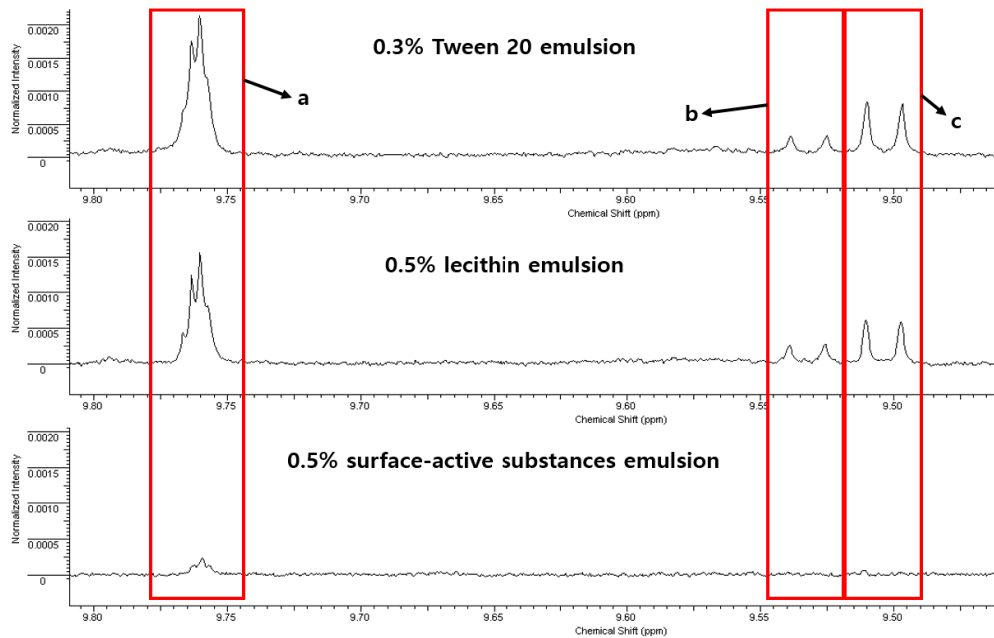


Fig. 11. $^1\text{H-NMR}$ spectrums of aldehydes in oil extracted from emulsions after 100 day of storage. (a) n-alkanals, (b) (E,E)-2,4-alkadienals, (c) (E)-2-alkenals.

4. 결론

본 연구는 탈지 유채박으로부터 초임계 추출 후 이를 정제한 표면활성물질의 유화특성 및 에멀션 시스템에서 산화안정도를 조사하기 위해 수행하였다. 유화특성은 정제표면활성물질의 농도, pH 변화, NaCl 첨가에 따른 에멀션의 지방구 크기, 제타전위, 크리밍 안정도 변화 등 이화학적 성질을 조사하였으며, 에멀션 시스템에서 정제표면활성물질의 산화안정도는 과산화물가 및 $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, 정제표면활성물질을 함유한 에멀션의 지방구는 정제하지 않은 경우보다 작았으며, 정제표면활성물질 농도의 증가와 더불어 지방구 크기는 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한, 에멀션의 pH가 낮을수록, NaCl의 첨가량이 많을수록 지방구 크기는 증가하는 경향을 보였는데 이는 지방구 표면전하(제타전위)의 변화로 인한 것으로 판단하였다. 에멀션 시스템에서 정제표면활성물질은 대조군인 Tween 20 및 상업용 레시틴 보다 항산화능이 매우 우수한 것으로 나타났는데 이는 정제표면활성물질에 함유되어 있는 sinapic acid에 기인한 것으로 추정하였다. 따라서 본 연구의 정제표면활성물질은 단독으로 유화제 및 항산화제 역할을 동시에 수행 할 수 있을 것으로 판단하였다.

감사의 글

본 논문은 충남대학교 학술연구과제(관리번호 2014-2083)의 지원에 의해 이루어진 것이며, turbiscan 기기를 지원해주신 린온테크(Leon Tech)에 감사드립니다.

References

1. E. Dickinson, "An Introduction to Food Colloids", eds., p. 1-29, Oxford University Press, Oxford, UK(1992).
2. G. L. Dashiell, Lecithin in food processing applications. In *Lecithins: Sources Manufacture & Users*. Szuhaj BF, eds., p. 213-224, American Oil Chemists Society, IL, USA(1989).
3. D. J. McClements, "*Food emulsions: principles, practices, and techniques*", 2nd ed., p 137, CRC Press, Boca Raton, FL, USA(2004).
4. H. Betzing, Process to obtain oily, highly purified phosphatidylcholines. *US Patent* 05/899,525 (1980).
5. P. M. Scocca, Utilization of lecithin, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**(6), 428(1976).
6. M. Faergemand, N. Krog, Using emulsifiers to improve food texture. In *Texture in Food*. McKenna B, eds., vol I, p 216-250, CRC Press, Boca Raton, FL, USA(2003).
7. J. S. Lee, H. S. Kim, C. H. Kim, Y. H. Jung, Y. J. Kang, Physicochemical and functional properties of rapeseed protein upon purification conditions, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **20**(6), 551(1991).
8. J. S. Chauhan, M. K. Tyagi, P. R. Kumar, P. Tyagi, M. Singh, S. Kumar, Breeding for oil and seed meal quality in rapeseed-mustard in India-A review, *Agricultural Review*, **23**(2), 71(2002).
9. J. W. Kim, Isolation of naturally-occurring surface-active substances in defatted rapeseed cake using a supercritical CO₂ and their characterization in emulsion system, *MS Thesis.*, p 1-2, Chungnam National University, Daejeon, Korea(2014).
10. A. Tzagoloff, Metabolism of sinapine in mustard plants. I. Degradation of sinapine into sinapic acid & choline, *Plant physiology*, **38**(2), 202(1963).
11. A. Neish, Biosynthetic pathways of aromatic compounds, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **11**, 55(1960).
12. C. A. Barth, Rapeseed for human nutrition-present knowledge and future options, Proceedings of the 12th international rapeseed congress. Wuhan, China. vol 5, p 3-5, (2007).
13. K. ClauB, E. Roepenack-Lahaye, C. Böttcher, M. R. Roth, R. Welti, A. Erban, J. Kopka, D. Scheel, C. Milkowski, D. Strack, Over expression of sinapine esterase BnSCE3 in oilseed rape seeds

- triggers global changes in seed metabolism, *Plant Physiology*, **155**(3), 1127(2011).
14. S. S. Pekkarinen, H. Stöckmann, K. Schwarz, I. M. Heinonen, Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate, *J. Agric. Food Chem.*, **47**(8), 3036(1999).
 15. H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, H. Taniguchi, Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(7), 2161(2002).
 16. U. Thiyam, H. Stöckmann, K. Schwarz, Antioxidant activity of rapeseed phenolics and their interactions with tocopherols during lipid oxidation, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **83**(6), 523(2006).
 17. Y. Zou, A. R. Kim, J. E. Kim, J. S. Choi, H. Y. Chung, Peroxynitrite scavenging activity of sinapic acid(3, 5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) isolated from *Brassica juncea*, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(21), 5884(2002).
 18. E. S. Lee, S. S. Kim, J. A. Shin, J. H. Chun, S. J. Kim, K. T. Lee, S. T. Hong, Studies on sinapine removal in surface-active substances extracted from defatted rapeseed cake, *Food Eng. Prog.*, **19**(4), 408(2015).
 19. S. H. Jeong, Evaluation of oxidative stabilities of 4-vinylguaiacol decarboxylated from ferulic acid and rice bran extract in oil and emulsion, *MS Thesis.*, p 11, p 33-51, Chungnam National University, Daejeon, Korea(2015).
 20. D. J. McClements, “*Food emulsions: principles, practices, and techniques*”, 3rd ed., p 8-18, CRC Press, Boca Raton, FL, USA(2015).
 21. E. Keowmaneechai, D. J. McClements, Influence of EDTA and citrate physicochemical properties of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions containing CaCl₂, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(24), 7145(2002).
 22. D. J. McClements, Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **47**(7), 611(2007).
 23. O. Mengual, G. Meunier, I. Cayre, K. Puech, P. Snabre, Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000, *Colloids Surf. A*, **152**(1-2), 111(1999).
 24. L. Mei, D. J. McClements, E. A. Decker, Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets, *J. Agric. Food Chem.*, **47**(6), 2267(1999).
 25. E. Goicoechea, M. D. Guillen, Analysis of hydroperoxides, aldehydes and epoxides by ¹H Nuclear magnetic resonance in sunflower oil oxidized at 70 and 100°C, *J. Agric. Food Chem.*, **58**(10) 6234(2010).
 26. M. Y. Lee, Study on the enzymatic synthesis of enriched linolenic acid DAG and oxidative stability by sinapic acid and emulsion properties of O/W emulsion. *Ph. D. thesis.*, p 47-79, Chungnam National University, Daejeon, Korea(2014).
 27. J. W. Kim, Y. S. Jeong, E. S. Lee, N. Y. Gil, S. S. Kim, H. H. Kim, T. Y. Kim, Y. H. Lee, Y. S. Jang, K. T. Lee, S. T. Hong, Emulsifying properties of surface-active substances from defatted rapeseed cake by supercritical carbon dioxide extraction, *J. of Korean Oil Chemist. Soc.* **30**(4), 635(2013).
 28. D. J. McClements, “*Food emulsions: principles, practices, and techniques*”, 2nd ed., p 262-263, CRC Press, Boca Raton, FL, USA(2004).
 29. R. C. Tolman, The effect of droplet size on surface tension. *J. Chem. Phys.*, **17**(3), 333(1949).
 30. M. W. Jeong, S. G. Oh, Y. C. Kim, Effects of amine and amine oxide compounds on the zeta-potential of emulsion droplets stabilized by Phosphatidylcholine, *Colloids Surfaces A*, **181**(7), 247(2001).

31. M. R. Moncelli, L. Becucci, R. Guidelli, The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes, *Biophys. J.*, **66**(6), 1969(1994).
32. A. D. M. Sørensen, J. Friel, J. K. Winkler-Moser, C. Jacobsen, D. Huidrom, N. Reddy, U. Thiyam-Holländer, Impact of endogenous canola phenolics on the oxidative stability of oil-in-water emulsions, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **115**(5), 501(2013).
33. A. Panya, M. Laguerre, C. Bayrasy, J. Lecomte, P. Villeneuve, D. J. McClements, E. A. Decker, An investigation of the versatile antioxidant mechanisms of action of rosmarinate alkyl esters in oil-in-water emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **60**(10), 2192(2012).
34. A. D. M. Sørensen, A. M. Haahr, E. M. Becker, L. H. Skibsted, B. Bergenståhl, L. Nilsson, C. Jacobsen, Interactions between Iron, phenolic compounds, emulsifiers, and pH in Omega-3-enriched oil-in-water emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **56**(5), 1740(2008).