

Eugenolchitosan 함유 유중수적형 유화 형성 조건 최적화

김제중* · 장판식¹ · 정병옥¹ · 박동기²

진국대학교 생명과학과, ¹서울산업대학교 식품공학과, ²진국대학교 응용생물화학과

Optimization of Conditions for the Preparation of W/O Emulsion Containing Eugenolchitosan

Je-Jung Kim*, Pahn-Shick Chang¹, Byung-Ok Jung¹ and Dong-Ki Park²

Department of Life Science, Konkuk University

¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

²Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University

Stabilities of W/O emulsions containing eugenolchitosan (EuCs) prepared from chitosan and eugenol were compared to determine the optimal conditions for the ratio of water (core phase) to corn oil (continuous phase), the concentration of EuCs, storage temperature, and the extent of homo-mixing. The optimal ratio of water to corn oil was 2 : 3 (w/w). The effects of EuC concentrations, and singular vs. binary system of emulsifiers on the storage stability of the emulsion were investigated with EuCs and polyoxyethylene sorbitan monolaurate. The emulsion was stable, showing more than 95% emulsion stability index (ESI) value, when the concentration of EuCs was more than 0.18% (w/v). ESI value of binary emulsifier system was almost equal to that of singular emulsifier system at the concentration of 0.18% (w/v). At this singular emulsifier system, the W/O emulsion formed by EuCs had ESI value of 100%. The optimal concentration of EuCs was determined as 0.18% (w/v). The highest stability of the emulsion was obtained from the homo-mixing at 11,000 rpm for 10 sec and the storage temperature ranging 25~65°C. EuCs produced from this study was mutagenicity-negative on Ames test and contained no heavy metal ions.

Key words: chitosan, eugenolchitosan, emulsion stability index

서 론

20세기 들어서면서 대량생산 되기 시작한 유화제는 2차대전 이후부터 현재까지 생산량뿐만 아니라 생산기술, 사용영역 등에서 비약적인 발전을 거듭해왔다. 최근 연구보고에 의하면 유화제의 용도는 섬유공업, 고무, 플라스틱공업, 토목건축, 식품, 의약품, 화장품, 금속, 광업, 펄프제지, 농림업등 유화제가 거의 사용되지 않는 곳이 없을 정도로 각종 산업에 중요한 역할을 하고 있다⁽¹⁾.

유화제는 한 분자내에 친수성 부분과 친유성 부분이 동시에 존재하여 서로 다른 두 상간에 형성된 계면에 흡착되어 계면의 물성을 크게 변화시키거나 구조적인 특성으로 인하여 용액내에서 특정 형태의 회합체를 형성한다. 형성되는 회합체의 모양과 크기는 유화제의 종류, 농도, 염의 존재유무,

온도, 수용액의 경우 pH등에 따라 구형 미셀, 실린더형 미셀, 육각형 미셀(hexagonal micelle), 박막(lamellar) 구조 또는 소포(vesicle) 등이 형성된다^(2,3).

유화제의 물리화학적 성질을 이용하여 수중유적형(oil in water, O/W 형) 및 유중수적형(water in oil, W/O형) emulsion을 제조하는 방법은 이제까지 많은 연구가 진행되어 왔으며, 충돌분쇄기(collide mill), 균질기(homogenizer), 초음파 유화기(ultrasonic emulsifier)와 같은 유화액 제조장치도 지속적으로 연구개발 및 개선되어 유화제의 개발에 박차를 가하고 있다^(4,6).

최근에는 천연소재의 유화제 혹은 체내에서의 안전성이 확보되거나 생리활성 기능이 있는 식품유화제 개발에 관심이 집중되고 있는데, 이러한 목적에 적합한 예로서 chitosan이 부각되고 있다⁽⁷⁾. 즉, chitosan은 항균성, 흡착성, 항암성 등의 여러 가지 생리활성이 알려진 장점들이 보고되었다. 그러나, 물에 대한 용해도가 매우 낮은 결정적인 단점이 지적되어 왔다.

따라서 본 논문에서는 chitosan이 약산과 특수한 용매에만 용해되어 식품산업에의 적용에 많은 제약이 있는 단점을 극복하기 위하여, chitosan에 eugenol group을 첨가·합성함으로써 수용성이 증대된 eugenolchitosan(EuCs)을 제조하였으며,

*Corresponding author : Je-Jung Kim, Department. of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, 172 Kongeung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
Tel: 82-2-970-6732
Fax: 82-2-976-6460
E-mail: jejung@snut.ac.kr

이렇게 생산된 EuCs를 식품유화제로 사용하여 안정한 W/O형 유화계를 형성시키고자 하였다. 이때, W/O형 유화계의 안정성을 극대화하기 위한 제반조건을 확립하기 위하여 수분층과 기름층의 혼합비율, EuCs의 첨가량, 유화액의 저장온도, 균질화 정도 등의 변화가 유화안정성에 미치는 영향과 EuCs의 다른 유화제를 첨가함으로써 유화계의 안정화지수에 미치는 상승효과를 측정하였고, 돌연변이원성⁽⁸⁾ 및 유해성 금속 정량분석^(9,10)을 수행함으로써 식품산업에 이용할 수 있는 유화제로서의 활용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 chitosan은 chitin에서 유래한 탈아세틸화도 98%이상의 제품을 (주)CNC(양주, 경기도)에서 구입하여 사용하였으며, 유화안정성 상승 작용 확인 실험시 공동 유화제로 사용한 polyoxyethylene sorbitan monolaurate은 HLB (hydrophilic lipophilic balance) 값이 16.7인 (주)일신유화(서울) 제품을 사용하였다. 그리고 W/O형 유화계 형성시 연속 상으로 사용한 기름층 유지는 시중에서 구입한 옥배유로서 (주)영미산업(용인, 경기도) 제품을 사용하였다.

시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 methylene blue, nitric acid, methanol, ethanol, acetone, N₂가스등의 제품으로서 99.0%이상의 순도를 갖는 일급시약을 구입하여 정제없이 그대로 사용하였다. 유화액 제조시 사용한 물은 2차증류수(distilled and deionized water, pH 7.0±0.2)를 사용하였다.

이외의 기구로는 항온순환장치, 저온순환조, 교반기, 반응조, 냉각관, 진공건조기, 쪽실텐장치, 항온수조를 사용하였다.

EuCs의 합성 및 구조확인

수용성이 증대된 chitosan인 EuCs의 합성은 Fig. 1에서와 같이 chitosan을 0.5 N acetic acid 용액에 녹여 반응플라스크에 넣고 N₂가스 및 냉각수 기류하에 40°C의 항온수조에서 eugenol(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 60분간 반응 시킨 후 ceric ammonium nitrate(Sigma Chemical Co.) 촉매를 넣고 180분간 반응시켰으며, acetone으로 석출 후 진공건조하고, 쪽실텐장치에 methanol을 사용하여 미반응물을 제거하여 최종산물을 얻었다. Chitosan과 수용성이 증대된 chitosan인 EuCs의 구조확인을 위하여 IR spectrometer(FT/IR-620, Jasco Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

점도 및 분자량 측정

점도평균분자량측정을 위하여 0.2 M acetic acid, 0.1 M NaCl, 4 M urea를 각각 1:1:1(v/v/v)로 혼합하여 EuCs를 일정농도로 용해시킨 후 희석하여 -4°C의 냉암소에 3일간 방치하였다. 25°C의 온도가 일정하게 유지되는 항온수조에서 점도측정장치(Schott, Schott-Geraete GmbH, Postfach 1130, Germany)에 Ubbelohod 점도계를 사용하여 평균 점도를 측정하되, 측정용액이 모세관을 통과하는 시간을 5회 반복 측정하였으며 통과시간의 평균값을 식(1)에 대입하여 점도평균분

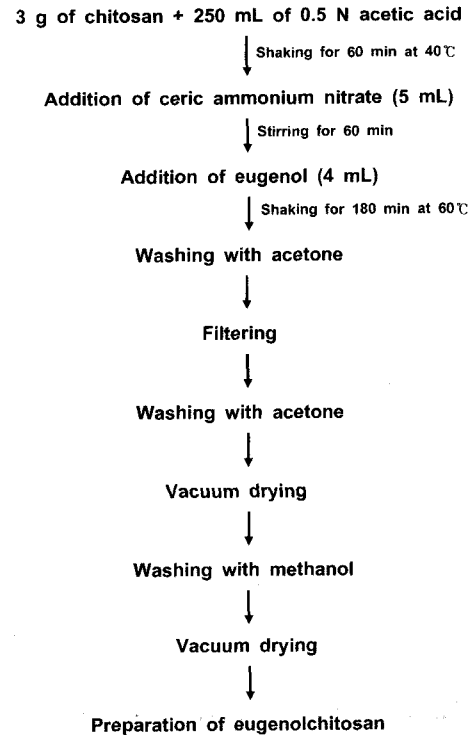


Fig. 1. Schematic procedure for the preparation of eugenolchitosan.

자량^(11,12)을 계산하였다.

$$\overline{M}_v = \left(\frac{[\eta]}{K} \right)^{\frac{1}{a}} \quad (1)$$

여기서, η : 극한점도(intrinsic viscosity)

\overline{M}_v : 점도평균분자량

K: 상수(= 8.93×10^{-4})

a: 상수(= 0.71)

유화액의 제조

W/O형 유화액을 제조하기 위하여 온도를 65°C로 일정하게 유지시키면서 증류수-유화제-옥배유가 포함된 용액을 균질기(Ultra turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen, Germany)를 사용하여 11,000 rpm의 속도로 10초간 강하게 교반하여 유화액을 제조하였다. 이때 실험에 사용된 옥배유와 methylene blue에 염색된 증류수는 항온수조에 65°C로 유지하여 미리 준비하였다.

유화안정지수 측정

유화계의 안정성을 결정하기 위하여 유화안정지수(emulsion stability index, ESI)⁽¹²⁾를 결정하되, 증류수-유화제-옥배유로 이루어진 유화계를 형성시킨 후 시간이 경과함에 따라 분리되는 옥배유의 부피를 측정하여 식 (2)에 대입하여 ESI 값을 산출하였다.

유화안정지수(ESI, %) =

$$\left(1 - \frac{\text{분리된 기름층의 부피}}{\text{유화액내 기름층의 총부피}} \right) \times 100 \quad (2)$$

돌연변이원성 실험

Maron과 Ames 등⁽⁸⁾의 방법에 따라 EuCs의 돌연변이원성 유무를 확인하였다. 돌연변이균주인 *Samonella typhimurium* TA99 혹은 *Samonella typhimurium* TA100을 각각 nutrient broth에서 배양($1.5\sim 3.0 \times 10^2$ cfu/mL)하여 0.1 mL를 멸균된 screw cap tube에 넣고 가볍게 흔든 후 45°C로 냉각된 top agar 2 mL 및 멸균된 biotin-histidine용액 0.2 mL를 모두 혼합하여 미리 제조된 hard agar에 골고루 분주하였다. 이때 돌연변이원성 양성대조구로서 2-nitrofluorene을 20 mg/mL의 농도로 methanol에 녹인 용액을 사용하였으며, EuCs는 증류수에 100 mg/mL의 농도로 녹여 준비하였다. 멸균된 편셋을 사용하여 직경 6 mm의 disc를 각각의 양성대조구, 음성대조구(methanol) 및 EuCs 용액내에 1분간 충분히 담그었다 꺼내어 미리 준비한 top agar 증양에 올려 놓고 37°C에서 24시간 배양 후 disc 주위에 생성된 colony를 양성대조구 및 음성대조구와 비교하여 돌연변이원성을 측정하였다.

유해성 금속의 정량분석

시료 10 g에 3 N HNO₃ 10 mL를 가하고 혼합하여 방치한 다음 서서히 가열하여 액량이 15 mL 될 때까지 증발·농축하였다. 반응이 종료되면 냉각 후 3 N H₂SO₄ 용액 5 mL를 넣고 다시 서서히 가열하였다. 내용물이 암색이 되기 시작하면 3 N HNO₃ 용액 1 mL씩을 첨가하면서 가열을 계속하여 내용물이 미황색~무색이 되었을 때 분해가 끝난 것으로 하였다. 분해액을 식힌 후 증류수 30 mL와 포화 NH₄OH 용액 10 mL를 가하여 흰 연기가 발생할 때까지 가열하고 냉각 후 증류수를 가하되 100 mL가 되게하여 시험용액으로 사용하였다. 공시험용액에 대해서도 같은 조작을 하여 시험용액을 보정하였다. 상기한 방법에 의하여 준비한 시료를 atomic absorption spectrometer(AAS, Varian, Spectr AA220FS, Hansen Way, USA)⁽⁹⁾를 이용하여 Pb, Cu, Hg, As, Sn 항목을 분석하였다.

본 분석실험에 사용된 표준용액은 Kanto Chemical 사(Kanto, Japan)의 Pb, Cu, Hg, As, Sn을 이용하여 제조한 표준원액(1,000 mg/L)이었다.

결과 및 고찰

분자량 측정 및 구조확인

Ubbelohod 점도계를 사용하여 점도평균분자량을 측정한 결과, chitosan 및 수용성인 증대된 chitosan인 EuCs의 경우 각각 1.2×10^5 Da 및 7.8×10^5 Da인 것으로 확인되었다.

EuCs의 경우, 예상보다 3~4배 정도 큰 점도평균분자량을 갖는 것으로 나타났는데, 이러한 결과는 chitosan과 eugenol이 합성된 EuCs의 자체점도가 증가하는 것에 기인하는 것으로 예측된다. 즉, chitosan 구조에 eugenol 고리구조가 첨가되어 고리구조의 함량이 증가하며 이러한 구조가 그물구조형성에 기여를 함으로써 EuCs의 자체점도가 증가하게 되며 이에 따라 점도평균분자량이 예상보다 더 크게 보이는 것으로 추측된다.

또한, 점도평균분자량이 감소하지 않은 결과로 볼 때, 형성된 EuCs는 원래 chitosan의 β-1,4 결합 및 고리구조가 파

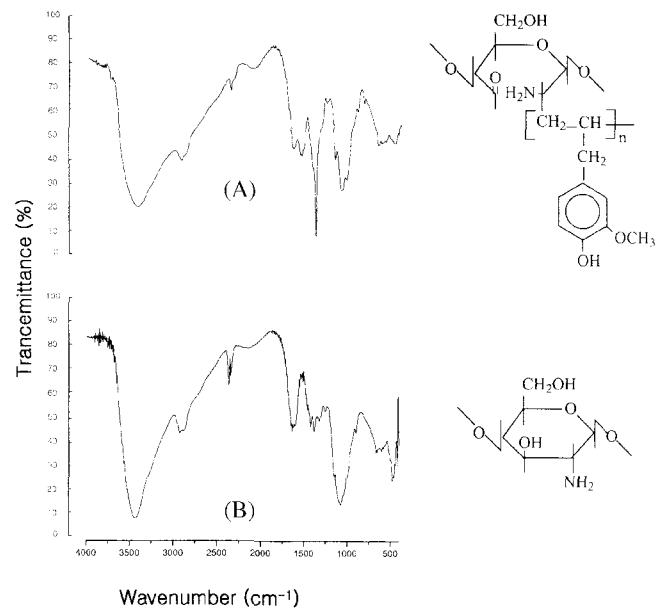


Fig. 2. IR-spectra of eugenolchitosan (A) and chitosan (B).

괴되지 않았음을 시사한다.

한편, Fig. 2에서는 chitosan과 EuCs 구조확인을 위한 IR spectrum을 나타내었다. Chitin을 탈아세틸화하여 얻은 chitosan의 경우는 chitin에서 나타나는 amide peak가 사라지고 3,500 cm⁻¹ 근처에서의 -OH 흡수띠, 2,920 cm⁻¹ 근처에서의 -C-H stretching에 기인한 흡수띠, 2,360 cm⁻¹ 근처에서의 -C-N 흡수띠, 1,630 cm⁻¹ 근처에서의 C=C stretching에 기인한 흡수띠, 1,590 cm⁻¹ 근처에서의 amine기에 기인한 흡수띠가 나타났으며, 이러한 결과로부터 탈아세틸화가 충분히 진행된 고순도의 chitosan이 제조되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 수용성이 증대된 chitosan인 EuCs의 경우, 1,543 cm⁻¹ 근처에서의 CH₂ 흡수띠(eugenol에는 존재하지만 chitosan내에는 존재하지 않음)가 나타남으로써 eugenol이 chitosan에 결합되었음을 확인할 수 있었다.

상기한 실험 및 구조분석 결과, 본 논문에서 얻어진 EuCs(친수성과 소수성을 동시에 갖게되었음)는 원래의 chitosan보다 수용성, 보습성 및 점도 증가가 예상되어 이후에서는 기능성 식품유화제로서의 응용가능성을 제시하기 위한 실험을 수행하였다.

증류수와 옥배유 혼합비율의 최적화

65°C로 일정하게 유지되는 항온수조에서 증류수와 옥배유를 넣어 65°C에 도달시킨 후 증류수와 옥배유를 1:4(㉔), 2:3(㉕), 3:2(㉖), 4:1(㉗)의 무게비율로 혼합하여 이들 각각의 시료에 EuCs를 0.18%(w/v)가 되도록 첨가하고 methylene blue를 투입하여 염색시킨 후 균질기로 균일하게 혼합하여 유화제를 형성시켰으며, 저장시간이 경과함에 따른 ESI 값의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 증류수와 옥배유의 혼합비율에 따른 유화안정성을 비교해보면 혼합비율이 1:4(w/w)인 ㉔ 및 3:2(w/w)인 ㉖의 경우, 저장시간 100분까지는 안정한 유화액 상태를 유지하다가 서서히 감소하는 경향을 나타내었으며, ㉗의 경우 처음부터 약간의 층분리가 일어나기

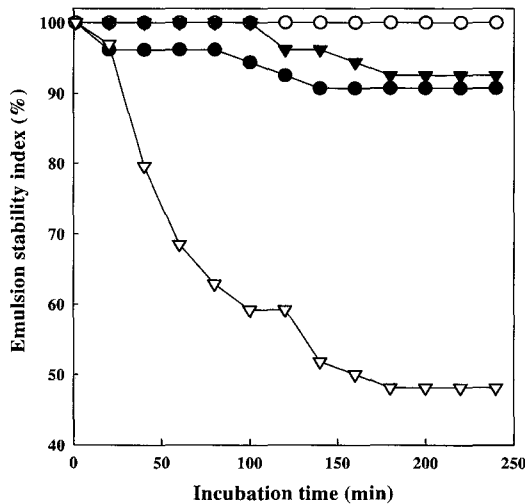


Fig. 3. Effect of the ratio of [distilled water]:[corn oil] (w/w) on the emulsion stability index.

●: [distilled water] : [corn oil] = 1 : 4 (w/w), ○: [distilled water] : [corn oil] = 2 : 3 (w/w), ▼: [distilled water] : [corn oil] = 3 : 2 (w/w), ▽: [distilled water] : [corn oil] = 4 : 1 (w/w).

시작하여 유화안정성이 서서히 감소하는 경향을 나타내었지만 그 이후에서는 안정적인 상태를 유지하였다. ㉑보다 ㉒가 전체적으로 높은 유화안정성을 나타내고 있는 반면, 혼합비율이 4:1(w/w)인 ㉒의 경우는 저장시간 120분까지는 급속하게 층분리가 일어나면서 유화안정성이 급격히 낮아지는 불안정한 유화상태를 나타내었다. 반면, 증류수와 옥배유가 2:3(w/w)의 비율로 구성된 ㉑의 경우는 저장시간에 관계없이 240분까지 안정적인 ESI 값(100%)을 갖는 안정적인 유화계를 형성하는 것으로 나타났다. 따라서, 가장 안정한 유화계 형성을 위한 증류수와 옥배유의 최적 혼합비율은 2:3(w/w)인 것으로 판명되었다.

한편, methylene blue로 염색된 증류수와 옥배유의 혼합비율이 2:3(w/w)으로 구성된 유화계의 경우 methylene blue의 색깔이 선명하게 나타나지 않고 매우 불투명한 혼탁도를 나타내었다. 이러한 현상은 수분층이 중심물질이며 연속상은 옥배유로 구성된 W/O형 유화계를 형성하였음을 의미한다.

이상의 2가지 결과로부터, 수분층-EuCs-옥배유로 구성된 유화계 형성을 위한 증류수와 옥배유의 최적 혼합비율은 2:3(w/w)이며, W/O형 유화계를 형성하는 것으로 판명되었다.

EuCs의 투입농도 변화

본 논문에서 제조한 EuCs의 첨가농도를 최적화하기 위하여 증류수와 옥배유의 최적 혼합비율인 2:3(w/w)으로 혼합한 W/O형 유화액을 유화측정용 cylinder에 옮겨 온도가 65°C로 일정하게 유지되는 항온수조에서 EuCs의 투입농도를 변화시키되 0.06~0.24%(w/v)가 되도록 첨가한 후 균질기를 사용하여 균일한 유화계를 형성시켰으며, 저장시간에 따른 유화안정성 변화를 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과, EuCs가 0.10%(w/v)의 농도까지 첨가되었을 때는 저장시간이 경과함에 따라 (저장시간 60분 범위에서) ESI 값이 서서히 감소하는 불안정한 유화상태를 나타내었으며, EuCs의 첨가

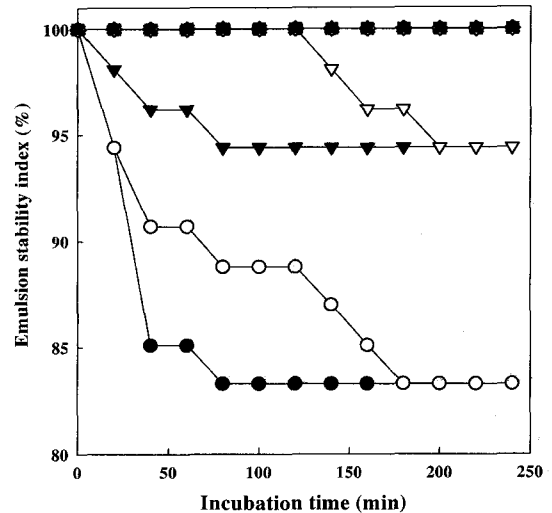


Fig. 4. Effect of EuCs concentration on the emulsion stability index.

●: 0.06% (w/v), ○: 0.08% (w/v), ▼: 0.10% (w/v), ▽: 0.12% (w/v), ■: 0.14% (w/v), □: 0.16% (w/v), ◆: 0.18% (w/v), ◇: 0.20% (w/v), ▲: 0.22% (w/v), △: 0.24% (w/v).

농도가 0.12%(w/v)일 때는 저장시간 120분까지는 안정한 유화상태를 유지하다가 그 이후부터는 유화안정성이 낮아짐을 알 수 있었다. 0.18~0.24%(w/v)의 농도로 EuCs가 첨가되면 저장시간 240분까지 농도에 관계없이 모두 100%(w/v)의 ESI 값을 유지하는 안정한 유화계를 형성하였다. 따라서, 유화안정성 뿐만 아니라 효율적인 측면을 고려할 때 EuCs의 최적 농도는 0.18%(w/v)인 것으로 판단하였으며, 이후의 유화안정성 실험에서의 최적 유화제 첨가농도로 고정하였다.

유화제의 상승작용

W/O형과 O/W형의 유화계를 형성하는 유화제를 함께 적당한 비율로 혼합하여 사용하면 계면막을 강하게 하고 유화안정성을 상승시킨다는 장등의 보고⁽¹⁴⁾가 있었다. 본 논문에서도 W/O형 유화계를 형성하는 EuCs와 O/W형 유화계를 형성하는 polyoxyethylene sorbitan monolaurate의 혼합비율(무게비)을 각각 0.0:0.5(㉓), 0.1:0.4(㉔), 0.2:0.3(㉕), 0.25:0.25(㉖), 0.3:0.2(㉗), 0.4:0.1(㉘), 0.5:0.0(㉙)로 첨가하여 유화계를 형성시킨 후 저장시간에 따른 ESI의 값을 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. polyoxyethylene sorbitan monolaurate만을 투입한 ㉓ 경우에는 유화계를 형성시킨 후 120분까지는 안정하다가 그 후 층분리가 일어나면서 유화안정성이 급격히 감소하였으며, ㉔, ㉕, ㉖, ㉗의 경우에는 유화계를 형성시킨 후 각각 저장시간이 140분, 200분, 180분, 120분 이후부터 유화안정성이 감소하기 시작하였다. 그러나, ㉘ 및 ㉙의 경우는 유화액 저장시간 240분까지 ESI 값을 100%으로 계속 유지하는 안정적인 유화계를 형성함을 나타내었다. 이상의 결과로서, EuCs와 polyoxyethylene sorbitan monolaurate를 0.3:0.2(w/w)의 비율로 혼합한 ㉘ 실험구에서 유화안정성 측면에서의 상승작용을 한 것을 알 수 있었다. 그런데, EuCs 단독으로 사용한 ㉙ 실험구에서도 ㉘ 실험구와 동일하게 높은 유화안정성을 나타내었으며, 유화제를 혼

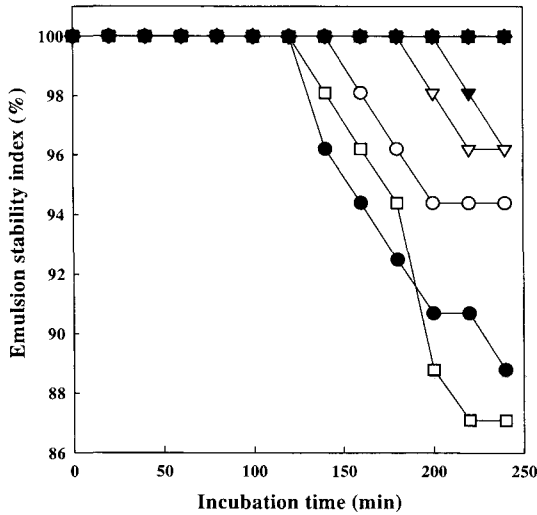


Fig. 5. Effect of the mixing ratio of eugenolchitosan and polyoxyethylene sorbitan monolaurate on the emulsion stability index.
 ●: (0.0 : 0.5, w/w), ○: (0.1 : 0.4, w/w), ▼: (0.2 : 0.3, w/w), ▽: (0.25 : 0.25, w/w), ■: (0.3 : 0.2, w/w), □: (0.4 : 0.1, w/w), ◆: (0.5 : 0.0, w/w).

함하여 사용하는 것은 경제 및 산업적으로 효용가치가 기대에 미치지 못한 것으로 판단되어, 이 후 실험에서는 EuCs를 단독으로 사용하는 ⑧ 실험구를 최적으로 선정하여 이용하였다.

저장온도에 따른 유화안정성

유화온도가 유화안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 증류수와 옥배유를 최적 혼합비율인 2:3(v/v)으로 혼합하되 EuCs의 농도를 0.18%(w/v)가 되도록 용해한 다음, 온도가 일정하게 유지되는 항온수조에서 25°C부터 10°C 간격으로 상승시켜 85°C까지 저장온도를 변화시키면서 유화계를 형성시킨 후 저장시간에 따른 ESI 값의 변화를 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 저장온도 65°C 이하의 실험구에서는 유화액 저장시간 240분까지 100%의 ESI값을 갖는 높은 유화안정성을 나타내었으나 저장온도가 75°C 및 85°C인 경우는 160분이 지나면서부터 유화안정성이 급격하게 감소하였다. 또한, 35°C 이하의 저장온도 영향 실험 결과 최소한 48시간 이상이 경과하여도 ESI 값에 큰 변화가 없는 것으로 판명되었으며(자료 제시 없음), 따라서, 본 논문에서 제조된 EuCs를 사용한 W/O형 유화액은 35°C 이하에서 유통·저장하는 것이 요구된다. 그러나, 본 실험 목적 및 효율을 고려하면 유화안정성 확인을 위한 가속화 실험의 최적 온도는 65°C인 것으로 판단되었으며, 이후의 실험에서는 저장온도를 65°C로 고정하였다.

균질화 시간의 최적화

상기한 최적조건하에서 EuCs를 단독으로 사용하여 W/O형 유화액을 제조하되, 유화계 형성의 초기단계인 균질화 단계에서 균질화 속도를 11,000 rpm(본 논문에서 사용한 균질기의 허용 최고속도)으로 고정하여 균질화 시간을 2초, 6초, 10초, 14초, 18초, 22초, 26초로 변화시킬 때 ESI값에 미치는 영향을 살펴본 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

균질화 시간 2초인 경우, 유화계를 형성시킨 직후, 6초동

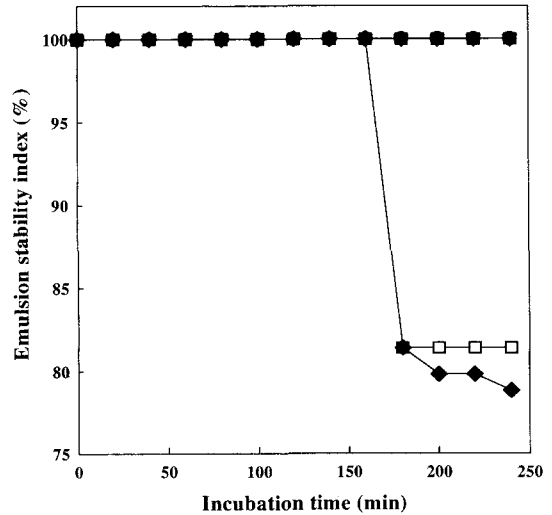


Fig. 6. Effect of storage temperature on the emulsion stability index.
 ●: 25°C, ○: 35°C, ▼: 45°C, ▽: 55°C, ■: 65°C, □: 75°C, ◆: 85°C.

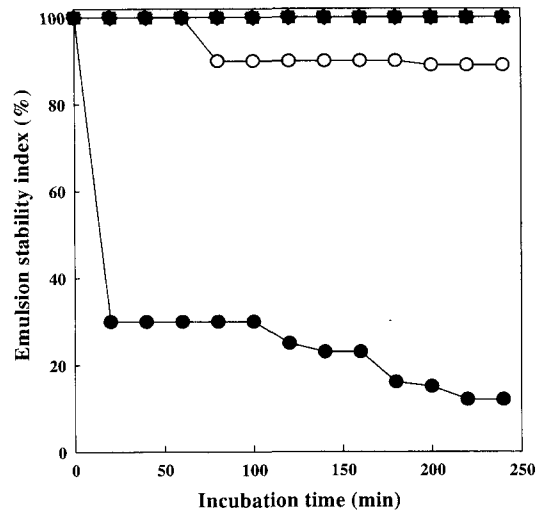


Fig. 7. Effect of homo-mixing extent on the emulsion stability index.
 ●: 2 sec at 11,000 rpm, ○: 6 sec at 11,000 rpm, ▼: 10 sec at 11,000 rpm, ▽: 14 sec at 11,000 rpm, ■: 18 sec at 11,000 rpm, □: 22 sec at 11,000 rpm, ◆: 24 sec at 11,000 rpm.

안 고속 균질화 시킨 경우에는 유화계를 형성시킨 후 저장시간 60분~80분까지 유화안정성이 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나, 10초, 14초, 18초, 22초, 26초 동안 고속균질화 시킨 경우에는 균질화 시간에 관계없이 저장시간 240분 동안 모두 높은 유화안정성(ESI = 100%)을 나타내었다. 따라서, 균질화속도 11,000 rpm에서 10초 이상 균질화 시키면 유화안정성이 우수하였음을 알 수 있었으며, 최적의 균질화 조건으로 선정하였다.

돌연변이원성 확인

EuCs를 100 mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 돌연변이원성을 검색하되 *Salmonella typhimurium* TA99 및 *Salmonella typh-*

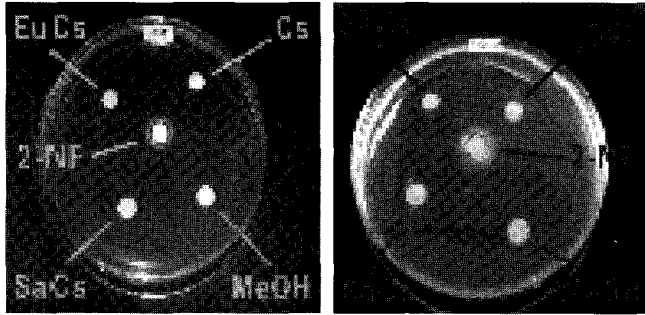


Fig. 8. Photograph for the determination of mutagenicity of eugenolchitosan, methanol and 2-nitrofluorene. Mutagenicity was analyzed by the Ames test with *Salmonella typhimurium* TA 98 (a) and TA 100 (b).

EuCs: eugenolchitosan, SaCs: safrolechitosan, Cs: chitosan, MeOH: methanol, 2-NF: 2-nitrofluorene.

imurium TA100을 사용하였다. 먼저 양성대조군으로 알려진 질소계 발암물질인 2-nitrofluorene을 methanol에 녹여 시료대신 배지에 첨가하여 실험한 결과 Fig. 9에서와 같이 24시간 배양 후 disc 주위에 변이를 일으켜 많은 균이 자란 것을 확인 할 수 있었다. 그러나, 같은 방법으로 실시한 음성 대조군으로 시료대신 methanol을 첨가하여 돌연변이원성 실험을 실시한 결과 methanol 자체에 의한 돌연변이는 발생하지 않았으며, chitosan과 EuCs를 첨가하여 돌연변이원성을 확인한 결과 음성대조군의 상태와 유사함을 확인할 수 있었으며, 따라서, 본 논문에서 제조한 EuCs는 돌연변이원성 음성인 것으로 판단하였다(음성대조군의 비교구로 safrolechitosan의 경우도 Fig. 8에 나타내었음). 또한 EuCs의 항균성 및 항산화효과가 합성된 chitosan에 비하여 우수하다는 김등의 보고^(15,16)가 있었다.

유해성 금속성분 분석

식품공전에 명시된 유해성 금속인 Pb, Cu, Hg, As, Sn 등이 EuCs 및 원래의 chitosan내에 함유된 정도를 확인한 결과 EuCs와 chitosan에 대하여 모든 항목에서 유해성 금속이 전혀 검출되지 않았으며, 식품 유화제로서의 안전성이 높은 것으로 확인되었다.

요 약

신소제로 각광 받고 있는 chitosan의 낮은 수용성을 극복하기 위하여 chitosan 유도체인 eugenolchitosan(EuCs)을 제조하여 식품유화제로서의 적용을 위한 최적조건을 탐색하였다. 증류수와 옥배유의 혼합비율이 2:3(v/v)일 때 W/O형 유화제를 형성하였으며 유화안정성이 가장 높았다. 유화제로 사용한 EuCs는 단독으로 투입하였을 경우 첨가 농도가 0.18% (w/v)일 때 유화제가 가장 효율적으로 안정하였으며, 2종류 유화제(EuCs/polyoxyethylene sorbitan monolaurate)에 의한 유화안정성 상승효과를 확인할 수 있었지만 EuCs 단독사용 실험구와 유사한 ESI 값을 갖는 것으로 확인되었다. 저장온도에 따른 유화안정성 변화를 살펴본 결과, 25~65°C에서는 유

화제가 매우 안정하였지만 75°C 이상의 저장온도에서 160분이 경과하면서 유화안정성이 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다. 한편, 균질화 정도는 균질화 속도 11,000 rpm에서 10초 이상인 경우에 유화안정성이 최고에 도달하는 것으로 판명되었다. 또한, 본 논문에서 제조하여 유화액 제조시 사용한 EuCs의 돌연변이원성은 음성으로 나타났으며, 유해성 금속은 검출되지 않았다. 따라서, EuCs는 W/O형 유화제 형성에 적합하면서도 안전성이 확보된 식품유화제로서의 적용 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구내용은 2002년도 한국학술진흥재단 협동연구지원사업 (KRF-2002-042-F00017) 연구비 지원에 의하여 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Krog, N. Functions of emulsifiers in food systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54: 124-130 (1977)
2. Segal, D. *Chemical Synthesis of Advanced Ceramic Materials*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK (1989)
3. Rosen, M.J. Relationship of structure to properties in surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51: 461-469 (1974)
4. Vanderhoff, J.W. Mechanical methodology for the preparation of food emulsifier. U.S. Patent 4,177,177 (1979)
5. Merkel, M.P., Dimonie, V.L., Aasser, M.S. and Vanderhoff, J.W. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 25: 1219-1226 (1987)
6. Mittal, K.L. Conceptual clarification of the terms used to describe emulsion behavior. *J. Cosmet. Chem.* 22: 815-821 (1971)
7. Jung, B.O., Chung, S. J. and Lee, G. W. Effect of molecular weight of chitosan on its antimicrobial activity. *J. Chitin and Chitosan* 8: 231-236 (2002)
8. Chang, P.S. Determination of emulsion stability index in W/O emulsion. *Anal. Sci. Technol.* 7: 233-236 (1994)
9. JAOP. *Sanitary Methods of Experimental Works*. Japanese Association of Official Pharmaceutists, Tokyo, Japan (1998)
10. Korea Food and Drug Administration. *Korean Food Additive Code*. Ministry of Health and Welfare, Seoul, Korea (2002)
11. Cho, S.K., Jung, B.O., Kim, J.J., Choi, K.S. and Lee, Y.M. Effect of wastewater treatment of partially deacetylated chitosan. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 5: 899-903 (1994)
12. Rutherford, F.A. and Austin, P.R. *Chitin/Chitosan*. Birkhauser Verlag, Boston, USA (1978)
13. Maron, D.M. and Ames, B.N. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mut. Res.* 113: 173-215 (1983)
14. Chang, P.S. and Cho, G.B. Optimization of conditions for O/W emulsion containing ω 3 polyunsaturated fatty acid. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1114-1119 (1998)
15. Kim, J.J., Jung, B.O., Ryoo, H.J. and Park, D.K. Antimicrobial Activity of Safrolechitosan and Eugenolchitosan. *J. Chitin and Chitosan* 8: 45-51 (2003)
16. Kim, J.J., Jung, B.O., Chang, P.S. and Park, D.K. Antioxidative activities of safrolechitosan and eugenolchitosan. *Food Sci. Ind.* 35: 41-47 (2002)

(2003년 4월 9일 접수; 2003년 5월 21일 채택)