

초임계 CO₂ 유체 추출법으로 얻은 탈지 유채박 중 표면활성 물질의 유화 성질 연구

김정원¹ · 정용선¹ · 이의석¹ · 길나영¹ · 김산성¹ · 김현효³
김태영³ · 이영화² · 장영석² · 이기택¹ · 홍순택^{1†}

충남대학교 식품공학과¹, 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터²,
(주)일신오토클레이브³
(2013년 12월 9일 접수; 2013년 12월 30일 수정; 2013년 12월 30일 채택)

Emulsifying Properties of Surface-Active Substances from Defatted Rapeseed Cake by Supercritical Carbon Dioxide Extraction

Jeong-Won Kim¹ · Yong-Seon Jeong¹ · Eui-Seok Lee¹ · Na-Young Gil¹
San-Seong Kim¹ · Hyun-Hyo Kim³ · Tae Young Kim³ · Yong-Hwa Lee²
Young-Seok Jang² · Ki-Teak Lee¹ · Soon-Taek Hong^{1†}

¹Department of Food Science & Technology, Chungnam National University,

²Bioenergy Crop Research Center, National Institute of Crop Science, RDA, Muan, 534-833, Korea

³ILSHINAYTOCLAVE CO., LTD, 835 Taplipdong, Yuseonggu, Daejeon, 305-510, Korea

(Received December 9, 2013 ; Revised December 30, 2013 ; Accepted December 30, 2013)

Abstract : This study was carried out to investigate the emulsifying properties of surface-active substances from defatted rapeseed cake by supercritical CO₂ extraction. Based on the interfacial tension data, a supercritical fluid extract (SFE) with the lowest value of 14.16 mN/m was chosen for evaluation which was obtained from No. 2 extraction condition (150 bar, 65°C, 250 g). For emulsions with SFE, some physicochemical properties (i.e., fat globule size, creaming stability, zeta potential etc) were investigated according to changes in SFE concentration, pH, and NaCl addition in an emulsion. It was found that fat globule size was decreased with increasing SFE concentration in emulsion, with showing a critical value at 0.5 wt%, thereby resulting in less susceptibility to creaming behavior. The SFE emulsion also showed instability at acidic conditions (pH<7.0) as well as by NaCl addition. This was coincided with zeta potential data of emulsion. In addition, SSL (sodium stearoyl lactylate) found to be suitable as a co-surfactant, as it helped considerably in decreasing fat globule size in emulsions and its optimum concentration to be over 0.03 wt%, based on 0.1 wt% SFE in emulsion.

Keywords : supercritical carbon dioxide, natural surface-active substances, phospholipids, creaming stability, zeta-potential

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

1. 서 론

레시틴(lecithin)은 인지질(phospholipids)을 주요 구성성분으로 하는 천연계면활성제로 식품, 약품, 화장품 제조 등 산업적으로 폭넓게 이용되고 있다[1, 2, 3]. 일반적으로 레시틴은 난황 및 대두 등으로부터 얻는데, 난황 레시틴은 열, pH 변화에 안정한 장점이 있지만 값이 비싼 단점으로 인하여 식품 산업에서 이용하는데 제한이 있으며, 따라서 식품산업에서는 대두로부터 기름을 추출하여 정제과정 중 생산되는 대두 레시틴을 주로 이용하고 있다[4]. 레시틴은 난황이나 대두 이외에도 옥수수 배아, 면실, 해바라기, 유채 등으로부터 얻을 수 있으며[5] 특히, 유채(*Brassica napus* L.)는 인지질 함량이 1.5~3.6 wt%로 대두의 1.1~3.2 wt%와 거의 유사한 함량을 보유하여 레시틴 생산을 위한 식물성 공급원으로 활용이 가능하다[6]. 레시틴은 주로 인지질의 화학명인 phosphatidylcholine(이하 PC)과 phosphatidylethanolamine(이하 PE)으로 구성되어 있으며, 이 중 PC의 함량이 높을수록 다양한 pH 범위에서 안정한 유화능(emulsifying capacity)을 나타내며 수중유적형(oil-in-water, O/W)의 유화액 제조에 적합한 것으로 알려져 있다[7]. 또한, 인지질은 세포막을 구성하는 주요 물질로서 피부에 대한 침투성이 뛰어나고, 콜레스테롤 저하와 같은 다양한 생리활성을 갖고 있어 동맥경화치료제 등 의약용으로도 많이 이용되어 지고 있다[8].

식품 유화액(food emulsion)은 서로 섞이지 않는 두 가지 이상의 물질들이 균일하게 분산되어 있는 열역학적으로 불안정한 시스템이다. 따라서 시간이 경과와 더불어 크리밍, 지방구 응집, 합일 등과 같은 유화 불안정화 현상이 나타나게 되며[9], 이러한 현상을 최소화하기 위해서 유화액 제조 시 적절한 유화제를 선택하여 첨가할 필요가 있다. 현재 국내 유화식품제조에 있어서 첨가물로서 허가된 유화제로는 글리세롤 지방산 에스테르(glycerol fatty acid esters), 자당 지방산 에스테르(sucrose fatty acid esters), 프로필렌 글리콜 지방산 에스테르(propylene glycol fatty acid esters), 소르비탄 지방산 에스테르(sorbitan fatty acid esters), 레시틴(lecithin) 등이 있으며[10], 이 중 레시틴은 유일하게 천연에서 추출한 유화제로서 식품산업에 폭넓게 이용되고 있다.

이전 연구에 따르면 유채 중 존재하는 인지질 성분의 추출을 위한 시도가 여러 연구자들에 의해 수행되었다. Temelli F는 초임계 CO₂ 유체를 이용하여 유채 중 인지질 추출을 위한 추출조건들의 상관관계를 제시하였으며[11], Kim 등은 초임계 CO₂ 유체 및 에탄올을 이용하여 탈지 유채박 중 표면활성물질의 추출을 위한 최적 조건을 도출하고, 추출 조건에 따른 추출물 중 인지질, 당지질 및 증성지질 분획의 함량을 조사하였다[12].

최근에 유채유는 카놀라유의 이름으로 국내에서 다량 소비되고 있으며, 또한 국산 유채는 바이오디젤 생산용 원료로서 재배 면적 및 그 용도가 확대되고 있다[13]. 이러한 추세와 더불어 유채의 이용성 증대 측면에서 유채로부터 인지질을 효율적으로 추출분리한다면 대두 이외의 레시틴 공급원으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 전술한 바와 같이 유채 중 함유되어 있는 인지질을 포함한 표면활성물질 추출에 관한 연구는 수행된 바가 있지만, 이 물질의 유화 성질에 대한 연구는 수행되지 않은 것으로 조사 되었다. 따라서 본 연구는 이전 연구[12]에 이어서 탈지 유채박을 시료로 하여 초임계 CO₂ 유체 추출법을 통해 표면활성물질을 얻고, 이의 유화성질을 심층 조사하는 데 그 목적이 있다.

2. 실 험

2.1. 실험재료

본 실험에 사용된 유채박은 압착기를 이용하여 유채유를 추출하고 남은 2011년산 잡종 착유박으로 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물 센터에서 공급받아 -20°C 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다. 카놀라유는 (주)오투기(Pyeong Teak, Korea)제품을 시중에서 구입하여 사용하였다. 친수성 유화제 SSL(sodium stearyl lactylate)과 Tween 20 (polyoxyethylene monolaurate, purity>99%) 및 친유성 유화제 GMS(glycerly monostearate)는 Sigma사(st. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 이외에 실험에 사용된 모든 시약은 일급 이상의 등급을 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 표면활성물질의 추출

탈지 유채박 중 표면활성 물질의 추출은 이전 연구[12]를 통해 최대수율 및 표면활성 물질의 최대 함량을 유도하는 조건을 선별하여 추출을 진행하였다(Table 1). 즉, 최대수율을 유도하는 추출조건 No. 3 조건 (350 bar, 65°C, 250g)과 높은 인지질 함량을 유도하는 No. 1 및 2의 추출조건(350 bar, 49°C, 150 g 및 150 bar, 65°C, 250g)을 이용하여 초임계 추출물을 획득하였다. 이때, CO₂의 유속은 6 L/min으로 조정하였으며, 1회 추출에 사용된 탈지 유채박은 50 g으로 하였다. 추출 종료 후 분리조에 포집된 추출물은 Rotary evaporator(EYELA, Sunil Instrument co., Ltd., Korea)를 이용하여 에탄올을 완전히 제거하였으며, 이를 -20°C에서 냉동 보관하며 시료로 사용하였다.

2.2.2. 표면활성물질의 계면장력 측정

추출조건에 따른 3 종류의 초임계 추출물(표면활성물질)에 대하여 oil-water의 계면에서 Du Nouy Ring 방법으로 계면장력을 측정하였다. 초임계 추출물을 수상(0.1 wt% 초임계 추출물, 5 mM bis-tris, pH 7.0)에 용해하였으며 *n*-tetradecane을 유상으로 하여 계면 형성 30분 후에 표면장력계(Sigma 700, Biolin Scientific Inc., Stockholm, Sweden)를 이용하여 계면장력을 측정하였다[14].

2.2.3. 유화액 제조 및 지방구 크기 측정

유화액은 Yun & Hong의 방법을 변형하여 제조하였다[14]. 수상(aqueous phase)으로 초임계 추출물을 농도별(0.1~0.9 wt%)로 20 mM bis-tris buffer(pH 7.0)에 용해한 후 이를 유상(oil phase)인 카놀라유(canola oil)와 혼합(기름함량: 10 wt%)하고, 실험실용 Silverson 균질기(L4RT, Silverson Machines Ltd., Chesham, UK)를 이용하여 5,000 rpm에서 5분간 예비 균질하여 pre-mix를 제조하였다. 이 pre-mix는 실험실용 고압균질기(M-110Y, Microfluidics, MA, USA)를 이용하여 3,000 psi에서 2회, 500 psi에서 1회 균질하여 최종 유화액을 제조하였다. 유화액 중의 지방구 크기는 입도분석기(Mastersizer S, Malvern Instrument, Worcestershire, UK)를 이용하여 측정하였으며,

결과는 volume surface mean diameter(d_{32}) 및 weight mean diameter(d_{43})로 표현하였다.

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

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

2.2.4. 유화 성질 평가

유화 성질은 Chuahan 등의 방법을 변형하여 측정하였다[15]. 전술한 유화 공정을 이용하여 제조한 유화액(0.1~0.9 wt% 초임계 추출물, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris)에 대하여 pH 및 NaCl 첨가 농도 변화에 따른 유화액 중 지방구 크기 변화, 광학현미경(Olympus CX21, Olympus Optical Co., Ltd., JPN)을 이용한 평가, 제타포텐셜(Nanosizer ZS, Malver co., UK) 변화 및 Turbiscan (Turbiscan Lab., Formulacion, l'Union, France)을 이용한 크리밍 안정도 등 유화성질 변화를 조사하였다[16].

2.2.4.1. pH 변화에 따른 영향

유화액 10 mL를 test tube에 옮긴 후 0.5 M NaOH 혹은 0.5 M HCl을 이용하여 pH(pH 3.5, 4.5, 6.0, 7.0, 8.0)를 변화시키고, 이를 25°C에서 하루 동안 방치한 후 pH 변화에 따른 유화액의 성질 변화를 조사하였다.

2.2.4.2. NaCl 농도의 변화에 따른 영향

유화액 10 mL를 test tube에 옮긴 후 NaCl을 농도별(0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 M)로 첨가·용해시킨 다음 이를 25°C에서 하루 동안 방치한 후, NaCl 첨가 농도 변화에 따른 유화액의 성질 변화를 조사하였다.

2.2.5. 크리밍 안정도 측정

유화액 중 초임계 추출물 농도 변화에 따른 유화액(0.1~0.7 wt% 초임계 추출물, 10 wt% oil: 20 mM bis-tris, pH 7.0)의 크리밍 안정도는 light scattering 방법을 이용하여 측정하였다[17]. 시료 유화액 30 mL를 시료병(dia: 27.5 mm, height: 50 mm)에 충전하고 이를 크리밍 측정장치(Turbiscan Lab., Formulacion, l'Union, France)에 넣어 25°C에서 72시간동안 유화액의 크리밍 특성을 조사하였다. 결과는 유화액 높이에

대한 backscattering intensity로 표현하였다.

2.2.6. 제타포텐셜 측정

제타포텐셜(zeta-potential)은 액체에 부유하는 콜로이드 입자의 표면 전기적 특성으로서 유화 안정도를 평가하는 하나의 척도로서 이용될 수 있다[18]. 본 실험은 유화액의 pH 변화와 co-surfactant 종류 및 첨가 농도에 따른 유화액 중 지방구 입자의 제타포텐셜 변화를 조사하였다. 먼저 시료 유화액을 20 mM bis-tris 완충액을 이용하여 1500배 희석한 후 측정 용기 cell(folded capillary cell, Malvern co., UK)에 충전하고, 제타포텐셜 기기(Nanosizer ZS, Malvern co., UK)를 이용하여 측정하였다[18].

2.2.7. Co-surfactant 선정

본 실험은 초임계 추출물에 적합한 co-surfactant를 선정하기 위하여 수행하였다. 검토한 co-surfactant는 친수성 유화제 SSL(sodium stearoyl lactylate) 및 Tween 20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate)과 친유성 유화제 GMS(glyceryl monostearate) 등 이었다. Lee 등의 방법[19]에 따라 초임계 추출물에 co-surfactant를 각각 0.07 wt% 첨가한 후 전술한 공정을 통해 유화액(초임계 추출물 0.1 wt%, co-surfactant 0.07 wt%, 20 mM bis-tris, pH 7.0)을 제조하였으며, 이 후 입도분석기, 광학현미경 및 제타포텐셜 기기를 이용하여 유화액 중 분산된 지방구 크기, 상태 변화 및 제타포텐셜을 측정하였다. 또한, 선정된 co-surfactant의 최적 농도를 검토하고자 초임계 추출물에 선정된 co-surfactant를 농도별로 첨가하여 유화액(초임계 추출물 0.1 wt%, co-surfactant 0.001~0.1 wt%, 20 mM bis-tris, pH 7.0)을 제조한 후 이에 따른 유화액의 지방구 크기 변화를 측정하여 co-surfactant의 적정 첨가 농도를 결정하였다.

2.2.8. 통계처리

실험을 통하여 얻어진 결과는 SAS package (Statistic Analysis System, ver.9.2 SAS Institute Inc.)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며, 각 변수에 대해 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 사후검정으로는 Duncan's multiple range test를 적용하여 통계적으로 유의적 차이를 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 표면활성 물질의 계면장력 특성

3종류의 초임계 CO₂ 유체 추출(No. 1, 2, 3 실험구)을 통해 얻은 초임계 추출물(표면활성 물질)의 지질 조성 및 oil-water 계면에서 계면장력 값을 각각 Table 1과 Table 2에 제시하였다. Table 2에 의하면 초임계 추출물의 계면장력은 No. 2 실험구(150 bar, 65°C, 250 g) 추출물이 14.16 mN/m로 가장 낮았으며, 최대 추출 수율을 나타낸 No. 3 실험구(350 bar, 65°C, 250 g) 추출물이 22.31 mN/m로 가장 높은 계면장력 값을 나타내었다. 이는 추출물을 구성하고 있는 지질성분의 차이에 기인한 것으로(Table 1) No. 2 실험구의 경우 인지질 분획의 함량이 약 79.20%였으며, 반면 최대 수율을 나타낸 No. 3 실험구의 수율은 66.67%로 나타나 약 13% 인지질 분획의 함량 차이를 보였다. 따라서 이 결과를 근거로 유화성질 평가를 위한 이후 실험은 No. 2 실험구를 통해 획득한 초임계 추출물을 이용하였다.

3.2. 표면활성 물질의 유화특성

3.2.1. 지방구 크기의 변화

유화액 중 초임계 추출물(No. 2 실험구)의 첨가농도(0.1~0.9 wt%)에 따른 지방구 크기 변화(d_{32} , d_{43})를 조사하였다(Fig. 1). Fig. 1에 의하면, 초임계 추출물 농도의 증가와 더불어 지방구 크기는 작아졌으며(d_{32} : 0.90 μm (0.1 wt%) \rightarrow d_{32} : 0.47 μm (0.9 wt%)), 0.5 wt% 이상 첨가할 경우 유화액 중 지방구 크기는 큰 변화를 보이지 않았다. 유화과정 중 첨가되는 유화제는 물/기름의 계면장력을 낮추며 이로 인해 지방구는 작아지게 된다[20]. 또한, 유화액 중 유화제의 농도가 일정 농도 이상이 되면 첨가한 유화제는 분산된 지방구 입자에 흡착되지 못하거나 계면에서 double layer를 형성하게 되며, 이 경우 지방구의 크기는 더 이상 작아지지 않게 된다(임계 지방구 크기)[21]. 본 실험에서 유화액 제조에 사용된 초임계 추출물은 Table 2에서 보는 바와 같이 물/기름 계면에 계면장력을 효율적으로 낮추었으며, 지방구 크기 또한 초임계 추출물 농도의 증가와 비례하여 지방구 크기가 작아지는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 초임계 추출물의 농도가 0.5 wt% 이상부터는 유화액 중 지방구 크기의 변화가 일정하게 됨으로써 임계 지방구 크기(critical

Table 1. Extraction Yield and Lipid Composition in SFE Extracts According to Extraction Conditions

No.	Extraction conditions			Yield (%)	lipid composition in SFE extracts		
	Pressure (bar)	Temperature (°C)	Co-solvent (g)		Neutral lipids (%)	Phospholipids (%)	Glycolipids (%)
1	350	49	150	4.40±0.064 ^{1)b}	3.87±0.03 ^b	76.40±0.02 ^b	18.67±0.14 ^a
2	150	65	250	3.72±0.071 ^{c2)}	6.13±0.11 ^a	79.20±0.12 ^a	13.20±0.12 ^c
3	350	65	250	6.86±0.057 ^a	4.13±0.21 ^b	66.67±0.04 ^c	16.40±0.12 ^b

¹⁾ Values are Mean±SD(n=3).

²⁾ a-d values followed by different letter in the same column are significantly different (p<0.05).

Table 2. Interfacial Tension at the Interface between *n*-Tetradecane and Water Containing the SFE Extracts(5 mM bis-tris, pH 7.0, 25°C)

Treatment No.	Extraction conditions			Interfacial tension (mN/m)
	Pressure (bar)	Temperature (°C)	Co-solvent (g)	
1	350	49	150	16.98±0.24 ^{1)b}
2	150	65	250	14.16±0.27 ^{c2)}
3	350	65	250	21.35±0.24 ^a

¹⁾ Values are Mean±SD(n=3).

²⁾ a-c values followed by different letter in the same column are significantly different (p<0.05).

globule size)를 형성한 것으로 사료된다.

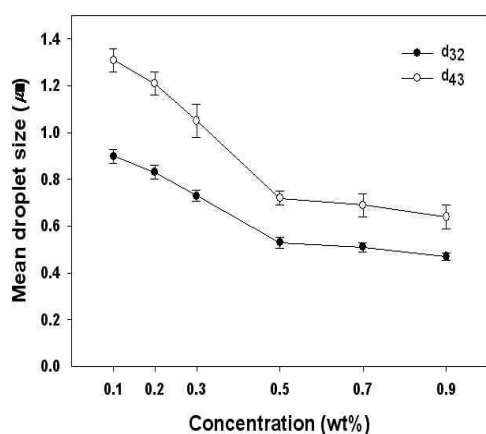


Fig. 1. Changes in mean droplet size (d_{32} , d_{43}) of emulsions (0.1~0.9 wt% SFE extracts, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0) as a function of supercritical fluid extract(SFE) concentration.

3.2.2. pH의 영향

pH 변화(pH 3.5~8.0)에 따른 유화액(0.5 wt% 초임계 추출물, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris)의 지방구 크기(d_{32} , d_{43})의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에 의하면, pH의 변화에 따른 d_{32} 값은 큰 변화를 보이지 않았지만(pH 3.5~8.0≒0.63±0.07 µm), d_{43} 값은 pH가 감소(pH<7.0)할수록 지방구 크기가 급격히 증가하는 경향을 나타내었다(pH 7.0: 0.86 µm → pH 3.5: 1.46 µm). 또한, 광학현미경을 이용하여 pH의 변화에 따른 지방구 입자를 관찰한 결과(Fig. 3), 전술한 지방구 크기의 변화와 일치하였다. pH 7.0에서 지방구는 가장 작았으며, 응집된 지방구(flocculated fat globules)가 없이 안정한 상태를 나타내었다. 그러나 pH가 낮아짐에 따라 지방구 간 응집 현상이 관찰되었고, 일부는 합일이 되어 큰 지방구 입자가 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 부분적으로 산성의 pH 조건에서 인지질의 수화로 인한 팽윤이 발생하여 인지질의 표면활성이 저하되어 나타난 것으로 추정되며

[22], 또한, Fig. 4에서 관찰된 유화액의 pH 감소에 따른 제타포텐셜 값의 변화와도 관련이 있는 것으로 사료되었다. Fig. 4에 의하면 제타포텐셜 값은 pH의 감소(pH 8.0 → 3.5)와 더불어 감소하였는데[-81.0 mV (pH 8.0) → -31.1 mV (pH 3.5)], Shaw DO & Schulman JH은 레시틴 유화액에 있어서 pH가 감소하면 지방구에 흡착된 레시틴 분자의 인산기가 중화되고 이 결과 지방구간의 정전기적 반발력(electrostatic repulsive force)이 낮아진다고 보고하여 본 실험 결과를 뒷받침하고 있다[23]. 따라서 본 실험의 낮은 pH 조건에서 발생한 지방구 간의 응집 및 합일 현상은 인지질의 표면활성 저하 및 낮아진 유화 지방구간의 반발력 저하에 기인한 것으로 사료되었다.

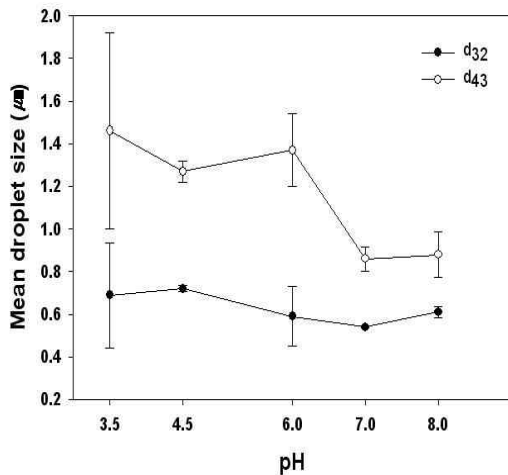


Fig. 2. Effect of pH on the mean droplet size (d_{32} , d_{43}) of emulsions (0.5 wt% SFE extract, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 3.5–8.0).

3.2.3. NaCl 첨가에 따른 영향

NaCl 첨가에 따른 유화액(0.5 wt% 초임계 추출물, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0) 중 지방구 크기(d_{32} , d_{43})의 변화를 알아보기 위하여 유화액에 NaCl을 농도별로 첨가하고(0.1~1.0 M) 지방구 크기 변화를 측정하였다(Fig. 5). 지방구의 크기는 유화액 중 NaCl 농도의 증가와 더불어 증가하였으며[d_{32} : 1.43 μm , d_{43} : 2.80 μm (0.1 M) → d_{32} : 1.93 μm , d_{43} : 191.94 μm (1.0 M)], 특히 NaCl 농도가 0.7 M 이상에서 지방구 크기가 급격히 증가하였다. 이러한 결과는 광학현

미경을 이용하여 유화액 중 지방구의 변화를 살펴본 Fig. 6에도 잘 나타나 있다. NaCl의 농도가 0.1 M일 경우, 유화액 중 지방구간의 응집(flocculation)이 다소 발생하는 것을 관찰할 수 있었으며, NaCl의 농도가 점차 증가함에 따라 지방구간의 합일(coalescence)이 일어나 지방구 크기가 상당히 증가하였다. 본 실험에서 유화제로 이용된 초임계 추출물 중 유화능(emulsifying capacity)을 나타내는 phosphatidylcholine(PC)과 phosphatidylethanolamine(PE)은 지방구의 표면에 흡착되어 음의 전하를 나타내며(Fig. 4), 이로 인해 유도된 지방구 입자 간의 정전기적 반발력(electrostatic repulsive force)으로 인하여 안정한 유화액이 형성된다[24]. 그러나 NaCl 농도의 증가와 더불어 지방구 입자간의 정전기적 반발력은 가림 효과(screening effect)에 의해 낮아지고 지방구의 응집 및 합일을 촉진시킴으로써 Fig. 6에서 관찰한 바와 같이 유화 불안정성이 증가하게 된다[25].

3.2.4. 크리밍 안정도 측정

유화액의 성질평가는 안정도 검토, 유변학적 검토 등 여러 가지 분야로 나누어 진행할 수 있으며, 특히 안정도 특성은 소비자 측면에서 유화 식품의 외형 등 구매 결정에 있어서 중요한 판단 요소가 된다. 본 실험에서는 유화액의 크리밍 안정도를 측정하기 위하여 light scattering 법을 사용하였다. Fig. 7은 초임계 추출물의 농도를 달리하여 제조한 유화액(0.1~0.7 wt% 초임계 추출물, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0)의 크리밍 안정도를 72시간 동안 측정하여 얻은 산란강도(delta backscattering intensity, Y축)를 시료 병 높이(X축)에 대한 크리밍 프로파일 형태로 나타낸 결과이다. Fig 7에 의하면, 유화액 중 초임계 추출물의 농도가 낮을 경우(0.1~0.3 wt%), 시료 하부의 산란강도 값이 X축 방향으로 폭넓게 감소하였으며, 농도가 증가하면(0.5~0.6 wt%) 시료를 통과하는 음의 산란강도의 감소 폭(X축 방향)이 좁아지는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 음의 산란강도 값의 변화는 크리밍에 따른 serum층의 형성과 관계가 있는 것으로[17], 유화액 중 초임계 추출물의 농도가 증가할수록 크리밍에 의한 serum층 형성이 억제됨을 알 수 있다(크리밍 안정도 증가). 또한, 이러한 결과는 측정기기의 소프트웨어(Turbisoft, Formulation)에 의하여 측정된 지방구의 평균이동속도(V_m)의

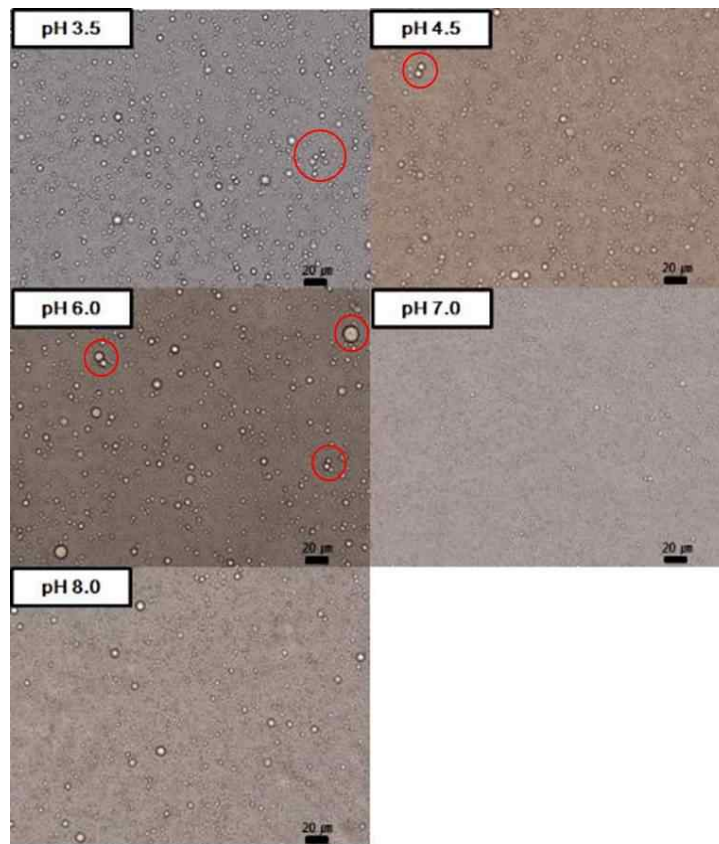


Fig. 3. Microscopic images of 0.5 wt% SFE extract oil-in-water emulsions at different pH values($\times 400$).

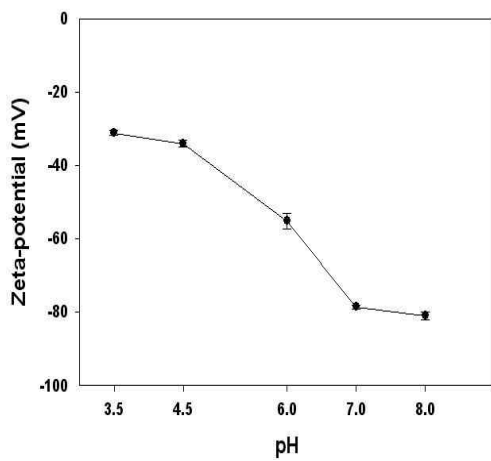


Fig. 4. Changes in the zeta potential of emulsions(0.5 wt% SFE extract, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris) as a function of pH.

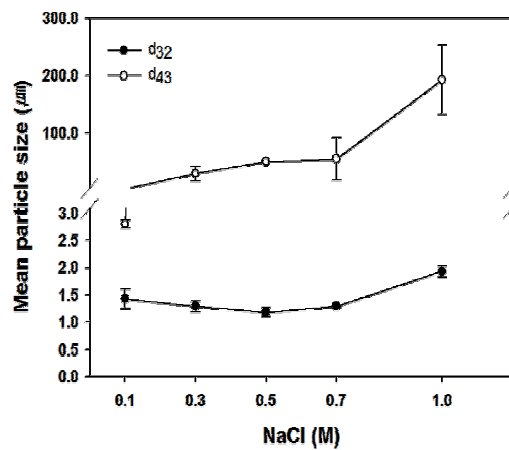


Fig. 5. Effect of NaCl addition on the mean droplet size (d_{32} , d_{43}) of emulsions(0.5 wt% SFE extract, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0).

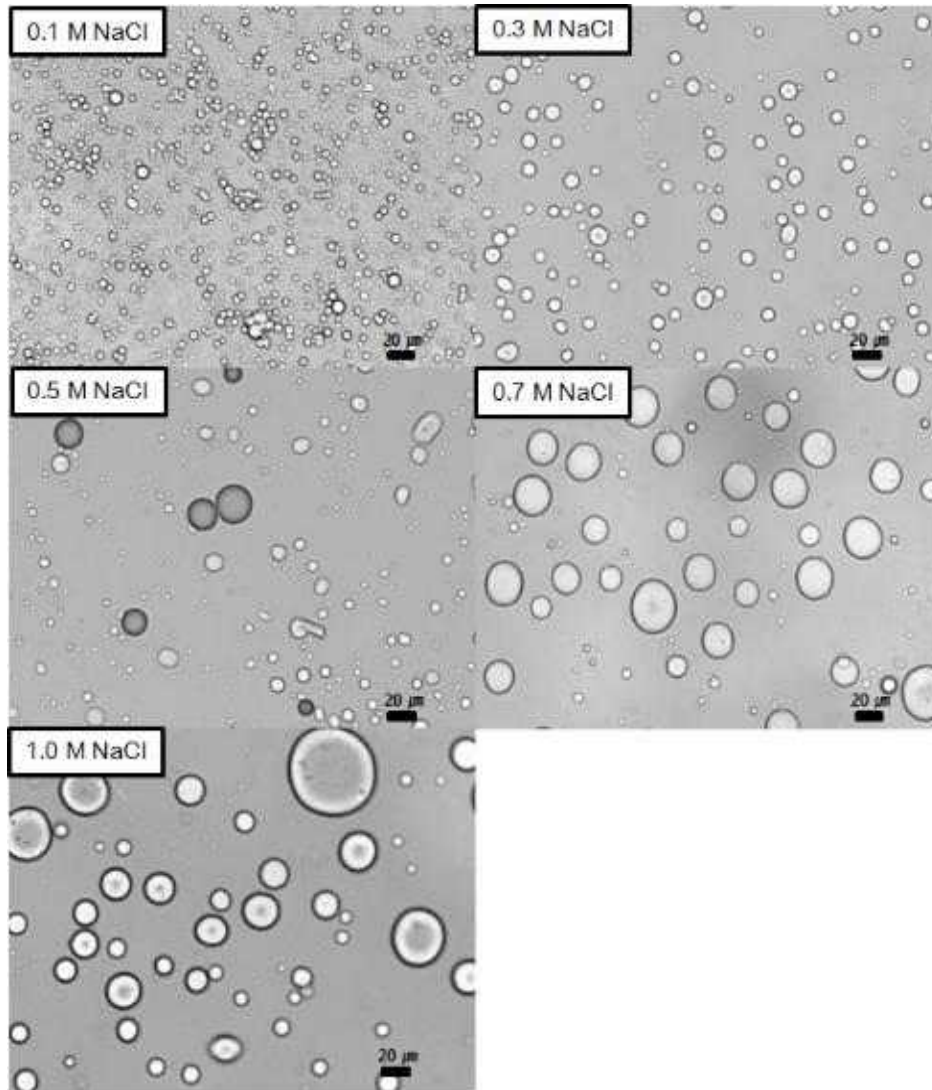


Fig. 6. Microscopy images of 0.5 wt% SFE extract oil-in-water emulsions containing various NaCl concentrations($\times 400$).

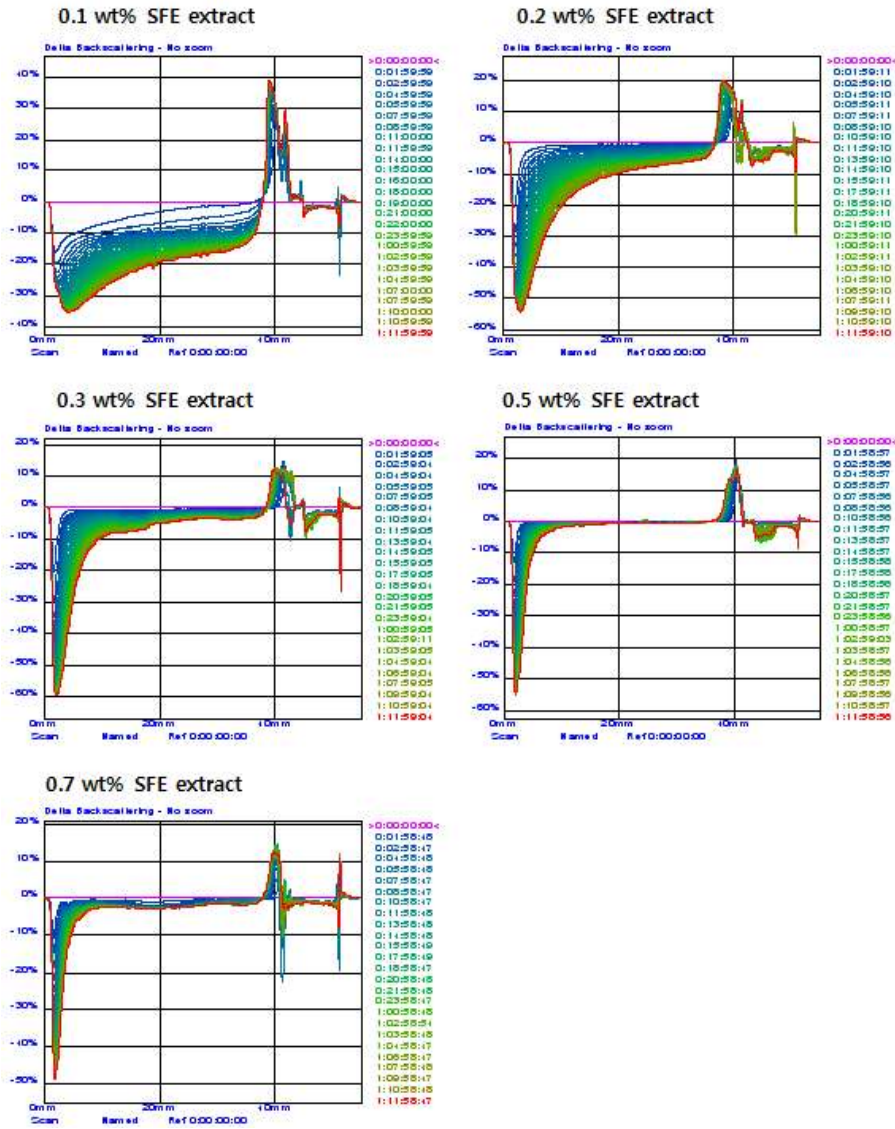


Fig. 7. Creaming profile of emulsions (0.1~0.7 wt% SFE extracts, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0). The emulsions were incubated at 25°C for creaming experiment and the results were expressed as deltabackscattering intensity versus sample height.

Table 3. Mean Migration Velocity of Fat Globules (V_m) in emulsions (0.1~0.7 wt% SFE Extracts, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0) as a Function of SFE Concentration

SFE extract (No. 17, wt%)	Mean migration velocity (V_m , $\mu\text{m min}^{-1}$)
0.1	$11.17 \pm 0.18^{1)a2)}$
0.2	2.83 ± 0.10^b
0.3	1.50 ± 0.08^c
0.5	0.83 ± 0.01^d
0.7	0.83 ± 0.03^d

Mean migration velocity (V_m) was obtained from Turbiscan Lab.

¹⁾All values are mean \pm SD (n=2).

²⁾Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

결과와도 일치하였는데(Table 3), 지방구의 평균 이동속도는 유화액 중 초임계 추출물의 농도가 0.1 wt%일 경우, $11.17 \mu\text{m}/\text{min}$ 였으며 초임계 추출물의 농도가 0.5 wt%에서는 $0.83 \mu\text{m}/\text{min}$ 로 초임계 추출물 농도의 증가와 더불어 지방구의 평균 이동속도가 급격히 감소된 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 유화액의 크리밍 속도를 추정하는데 사용되는 Stokes 법칙에 의하면 크리밍 속도는 지방구 크기의 제곱에 비례하므로[25], Fig 7 및 Table 3의 결과는 유화액 중 초임계 추출물 농도의 증가와 더불어 지방구 크기가 감소하고 ($0.90 \rightarrow 0.51 \mu\text{m}$) Stokes 법칙에 근거하여 지방구 평균 이동속도가 감소하며 따라서 크리밍 안정도가 증가하여 초래된 것으로 사료되었다.

3.2.6. Co-surfactant 첨가 효과

일반적으로 식품 유화액 제조를 위하여 복합 유화제 system을 사용하는데, 본 실험은 초임계 추출물에 적합한 co-surfactant를 선정하기 위하여 수행하였다. 검토한 co-surfactant는 SSL, Tween 20 및 GMS였으며, 이를 Lee 등의 방법 [19]에 따라 각각 첨가하여 유화액(0.1 wt% 초임계 추출물, 0.07 wt% co-surfactant, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0)을 제조한 후 이들의 지방구 크기(d_{32} , d_{43})를 측정하였다(Fig. 8). Fig. 8에 의하면, SSL을 첨가할 경우 d_{32} 값은 $0.33 \mu\text{m}$, d_{43} 값은 $1.02 \mu\text{m}$ 로 Tween 20 또는

GMS를 첨가한 경우 [d_{32} : $0.71 \mu\text{m}$, d_{43} : $0.98 \mu\text{m}$ (Tween 20), d_{32} : $1.06 \mu\text{m}$, d_{43} : $4.04 \mu\text{m}$ (GMS)]와 비교하여 지방구 크기가 더 작게 형성된 것을 확인할 수 있었다. Co-surfactant 첨가에 따른 유화액 중 지방구 입자의 변화를 좀 더 자세히 관찰하기 위하여 광학현미경을 이용하였다(Fig. 9). Fig. 9에 의하면, Tween 20과 GMS를 첨가한 유화액은 다수의 응집(flocculation) 및 합일(coalescence)된 지방구 입자가 관찰되었으며, 반면에 SSL을 첨가한 유화액은 지방구 크기가 작고 안정한 상태를 유지하는 것으로 나타났다. 이는 co-surfactant를 첨가한 유화액의 제타포텐셜 측정 결과와도 잘 일치하였다(Fig. 10). Fig. 10에 의하면, SSL을 첨가한 유화액의 제타포텐셜 값은 -83.25 mV 이었으며, Tween 20과 GMS를 첨가한 유화액의 제타포텐셜 값은 각각 -57.7 mV , -52.97 mV 로 측정되었다. 일반적으로 제타포텐셜이 낮을 경우 유화액의 불안정성이 증가하는 한 원인이 될 수 있으며, 반면에 높은 제타포텐셜 값은 입자들 간의 높은 정전기적 반발력을 유도하여 유화액은 안정한 상태를 유지하는 경향을 나타낸다[26]. 본 실험에서 초임계 추출물을 이용한 유화액 제조 시 SSL의 첨가는 Tween 20과 GMS를 첨가하였을 때 보다 더 높은 제타포텐셜 값을 유도하였으며, 이로 인하여 지방구 입자들 간의 정전기적 반발력이 증가하여 유화액의 안정도가 높아진 것으로 사료되었다.

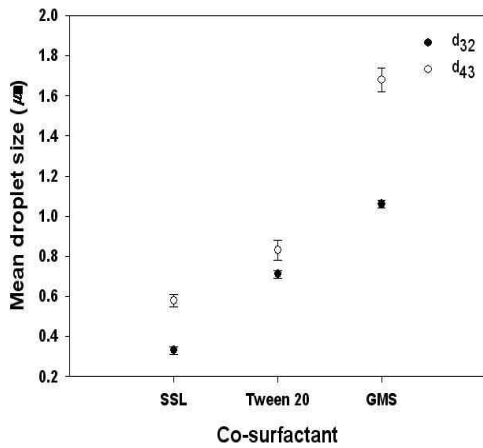


Fig. 8. Effect of co-surfactant addition on the mean droplet size (d_{32} , d_{43}) of emulsions(0.1 wt% SFE extract, 0.07 wt% co-surfactant, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7).

3.2.7. SSL의 최적농도

Co-surfactant(SSL)의 최적 첨가농도를 결정하기 위하여 0.1 wt% 초임계 추출물에 SSL의 농도를 달리하여 유화액(0.1 wt% 초임계 추출물, 0.01~0.1 wt% SSL, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0)을 제조하고 지방구 크기(d_{32} , d_{43}) 및 제타포텐셜을 측정하였다(Fig. 11 및 12). Fig. 11에 의하면 SSL의 농도가 낮을 경우(0.01 wt%) d_{32} 값은 0.57 μm , d_{43} 1.03 μm 로 다소 크게 나타났으나 높은 농도 범위(0.03~0.1 wt%)에서는 유화액 중 지방구 크기는 작아진 상태(d_{32} : 0.38 μm)에서 큰 변화를 보이지 않았다. 이러한 경향은 유화액 지방구 입자의 제타포텐셜을 측정

한 Fig. 12에서도 잘 나타나고 있다. Fig. 12에 의하면, SSL의 농도가 0.01 wt%일 경우 제타포텐셜 값은 -73.27 mV로 가장 낮았으며 SSL의 농도가 증가함에 따라 제타포텐셜 값은 증가하여(음의 값으로) 0.1 wt% SSL 농도에서 제타포텐셜 값은 -86.53 mV로 나타났다. 따라서 본 실험을 통해 유화액 중 SSL 농도가 0.03 wt% 이상의 경우 지방구 크기가 급격히 작아지는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 제타포텐셜 값도 일정 수준의 음의 값을 나타내므로 초임계 추출물의 co-surfactant로 적합한 SSL의 최적 첨가농도는 0.03 wt% 이상인 것으로 사료되었다.

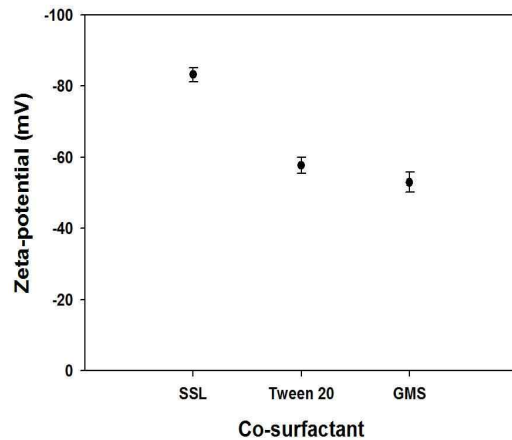


Fig. 10. Effect of co-surfactant (SSL, Tween 20, GMS) addition on the zeta potential of emulsions(0.1 wt% SFE extract, 0.07 wt% co-surfactant, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0).

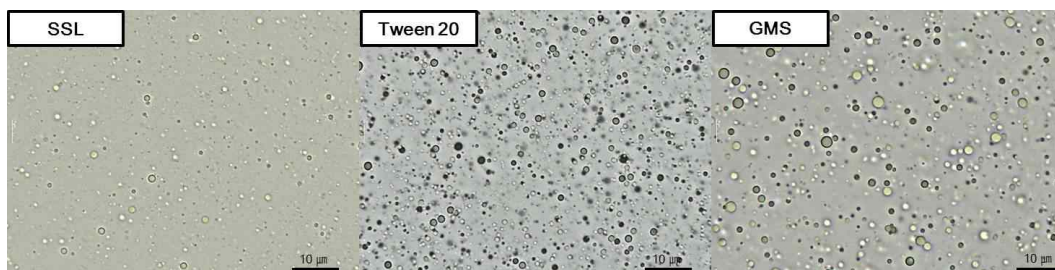


Fig. 9. Microscopic images($\times 1000$) of 0.1 wt% SFE extract oil-in-water emulsions(0.1 wt% SFE extract, 0.07 wt% co-surfactant, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7) with various co-surfactants (SSL, Tween 20, GMS).

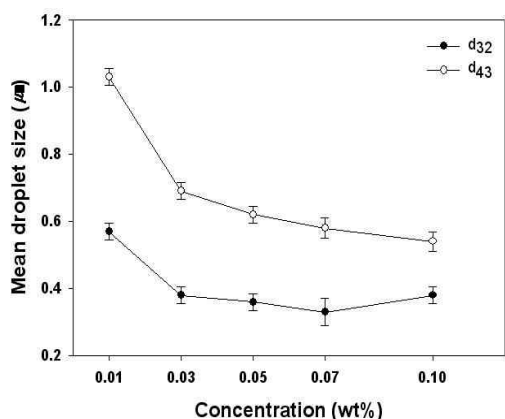


Fig. 11. Changes in mean droplet size (d_{32} , d_{43}) of emulsions (0.1 wt% SFE extract, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0) containing various concentrations of SSL.

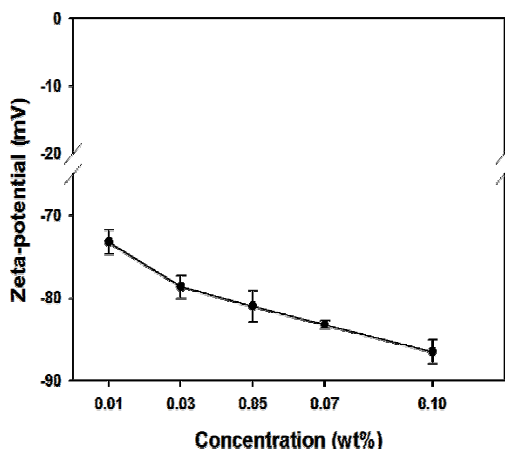


Fig. 12. Changes in zeta potential of emulsions (0.1 wt% SFE extract, 10 wt% oil, 20 mM bis-tris, pH 7.0) containing various concentrations of SSL.

4. 결론

본 실험에서는 초임계 CO₂ 추출법을 이용하여 탈지 유채박으로부터 표면활성 물질을 추출하고, 이 초임계 추출물(표면활성 물질)의 유화성질을 평가하였다. 유화성질 평가용 초임계 추출물은 계면장력 값에 근거하여 가장 낮은 값(14.16

mN/m)을 보인 No. 2 실험조건(150 bar, 65°C, 250 g)을 통해 얻은 초임계 추출물을 선정 하였으며, 검토한 유화성질은 선정된 추출물을 이용하여 유화액을 제조한 후 초임계 추출물의 농도, pH, NaCl 농도 변화 등에 따른 유화액 중 지방구 크기 변화, 크리밍 안정도, 제타포텐셜 등의 이화학적 성질을 조사하였다. 그 결과, 유화액 중 초임계 추출물 농도의 증가와 더불어 지방구 크기는 감소되었으며, 초임계 추출물 0.5 wt% 농도에서 임계 크기의 지방구가 형성되고 크리밍 현상이 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 초임계 추출물 유화액은 산성 조건(pH<7.0) 및 NaCl 첨가에 의해서 안정도가 낮아지는 특성을 나타내었으며 이는 제타포텐셜 측정 결과와 잘 일치하고 있다. 또한, 초임계 추출물에 적합한 co-surfactant 검토 결과, SSL(sodium stearyl lactylate)를 추가적으로 첨가할 경우에 초임계 추출물만을 이용하여 유화액을 제조할 때보다 현저하게 지방구 크기가 작아지는 것을 확인할 수 있었고, 유화액 중 초임계 추출물 0.1 wt% 기준으로 할 때 적절한 SSL 첨가 농도는 0.03 wt% 이상으로 확인되었다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ009164)의 지원의 해 이뤄진 것임.

References

1. G. L. Dashiell, "Lecithin in food processing applications. *Ch. 14 in Lecithins: Sources, Manufacture & Uses.*", 1st ed., p. 213, B. F. Szuhaj, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL (1989).
2. E. H. Sander, "Lecithin in food processing applications. *Ch. 12 in Lecithins: Sources, Manufacture & Uses.*", 1st ed., p. 197, B. F. Szuhaj, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL (1989).
3. S. H. Zeisel, "Lecithin in health and human nutrition. *Ch. 15 in Lecithins: Sources, Manufacture & Uses.*", 1st ed., p. 225, B. F. Szuhaj, American Oil Chemists' Society,

- Champaign, IL (1989).
4. J. S. Jo, "Production and use of lecithin." *Food industry*, 57, 20 (1980).
 5. C. R. Scholfield, "Lecithin in food processing applications. *Ch. 2 in Lecithins: Sources, Manufacture & Uses.*" , American Oil Chemists' Society, Champaign, IL (1985).
 6. M. Fattori, N. R. Bulley, and A. Meisen, "Fatty acid and phosphorous contents of canola seed extracts obtained with supercritical carbon dioxide." , *J Agr Food Chem*, 35(5), 739 (1987).
 7. W. Van Nieuwenhuyzen, "Lecithin production and properties." , *J Am Oil Chemists' Soc*, 53, 425 (1976).
 8. H. Betzing, U. S. Patent 4,235,793 (1980).
 9. M. Shields, R. Ellis, and B. R. Saunders, "A creaming study of weakly flocculated and depletion flocculated oil-in-water emulsions." , *Colloid Surf A*, 178(1), 265 (2001).
 10. Korea Ministry of Food and Drug Safety. Available from: <http://www.mfds.go.kr/fa/index.do>. Accessed November 24 (2013).
 11. F. Temelli, "Extraction of triglycerides and phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol." , *J Food Sci*, 57(2), 440 (1992).
 12. J. W. Kim, Y. S. Jeong, N. Y. Gil, E. S. Lee, Y. H. Lee, Y. S. Jang, G. T. Lee, and S. T. Hong, "Extraction of surface-active substances from defatted rapeseed cake (*Brassica napus* L.) by supercritical carbon dioxide." , *Korea J Food Nutr*, in press.
 13. N. H. Cho, Y. H. Kim, G. Yang, "Development of rapeseed pre-cleaner and cleaner for biodiesel production." , *J of Biosystems Eng*, 33(4), 230 (2008).
 14. S. E. Yun and S. T. Hong, "Isolation and investigation of emulsifying properties of surface-active substances from rice bran." , *Food Hydrocolloid*. 21(5), 838 (2007).
 15. J. S. Chauhan, M. K. Tyagi, P. R. Kumar, P. Tyagi, M. Singh, and S. Kumar, "Breeding for oil and seed meal quality in rapeseed-mustard in india-A review." , *Agric Rev*, 23(2), 71 (2002).
 16. S. T. Hong, "Changes in the stability properties of methylcellulose emulsions as affected by competitive adsorption between methylcellulose and Tween 20." , *J Korea Soc Food Sci Nutr*, 37(10), 1278 (2008)
 17. D. J. McClements, "Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability." , *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47(7), 611 (2007).
 18. D. J. McClements, "Food emulsion: principles, practices, and technique." , 2nd ed., p. 334, CRC Press, Boca Raton, Florida (1999).
 19. H. J. Lee, J. S. Bae, E. S. Lee, H. C. Kang, K. T. Lee, and S. T. Hong, "Emulsifying properties of surface-active substances from defatted rice bran by supercritical carbon dioxide." , *Food Eng Prog*, 16(2), 172 (2012).
 20. P. Walstra, "In Encyclopedia of emulsion technology, basic Theory" 1st ed., p. 57, Becher, Marcel Dekker, New York (1983).
 21. R. Jiménez-Flores, A. Ye, H. Singh, "Interactions of whey proteins during heat treatment of oil-in-water emulsions formed with whey protein isolate and hydroxylated lecithin." , *J Agric Food Chem*, 53(10), 4213 (2005).
 22. D. I. Comas, J. R. Wagner, and M. C. Tomás. "Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: Influence of pH on soybean protein-lecithin interaction." , *Food Hydrocolloid*, 20(7), 990 (1995).
 23. A. E. Wiacek, "Electrokinetic properties of n-tetradecane/lecithin solution emulsions." , *Colloid Surface A*, 293(1), 20 (2007).
 24. 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." , *Colloid Surfaces A*, 181(7), 247 (2001).
 25. E. Dickinson, "An Introduction to Food Colloids." , p. 43, Oxford University Press, New York (1992).

26. J. K. Lee, S. C. Kim, H. J. Kim, C. G. Lee, C. H. Joo, and R. C. Lee, "A study on the zeta potential measurement and the stability analysis of nano fluids using a particle image processing system." , *J Illass-Korea*, 8(1), 1226 (2003).