

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0097353

(43) 공개일자 2023년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08L 101/16 (2006.01) C08J 5/18 (2006.01)

C08K 11/00 (2006.01) C08K 5/09 (2006.01)

C08L 29/04 (2006.01) C08L 5/08 (2006.01)

C08L 67/04 (2006.01) C08L 89/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C08L 101/16 (2013.01)

C08J 5/18 (2021.05)

(21) 출원번호 10-2021-0186760

(22) 출원일자 2021년12월24일

심사청구일자 2021년12월24일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

주식회사 허밍웨이

경상남도 김해시 김해대로2662번길 13-13 (지내동)

(72) 발명자

전병수

부산 해운대구 반여로 67

박진석

부산 사하구 사하로 80

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김중석

전체 청구항 수 : 총 10 항

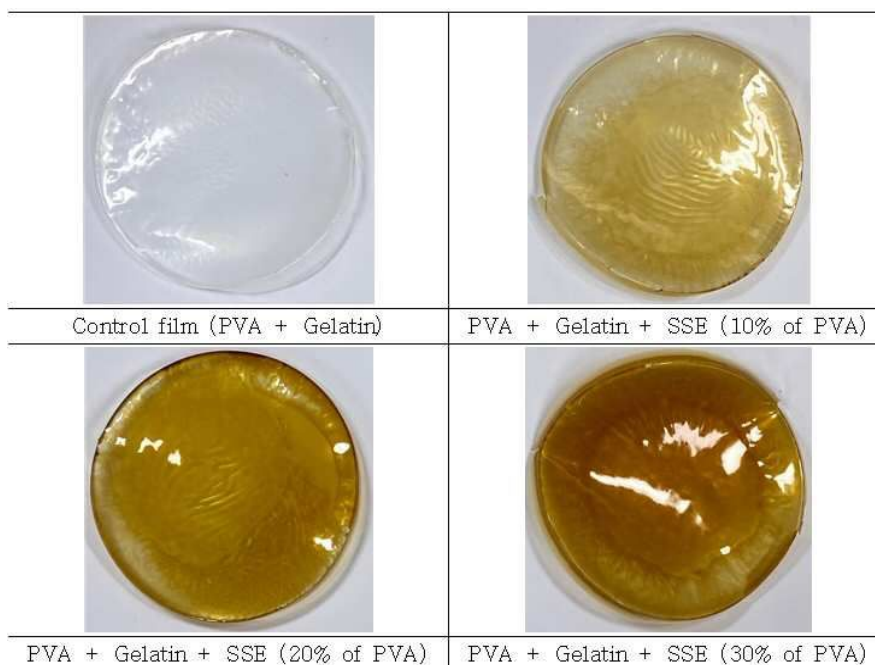
(54) 발명의 명칭 지층이 추출물을 포함하는 항균 필름 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 지층이(*Sargassum thunbergii*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항균 필름 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 폴리비닐알콜(poly vinyl alcohol, PVA) 폴리락트산(poly(lactic acid), PLA), 폴리카프로락톤(poly(caprolactone), PCL) 및 폴리글리콜산(poly(glycolic acid), PGA)으로 이루어진 군에서 선

(뒷면에 계속)

대표도 - 도5



택되는 하나 이상의 제1 생분해성 고분자; 젤라틴, 콜라겐, 키틴, 키토산, 풀루란(pullulan), 및 셀룰로오스(cellulose)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제2 생분해성 고분자; 및 지충이(*Sargassum thunbergii*) 추출물;을 유효성분으로 포함하는 항균 필름용 조성물 및 이의 제조방법을 제공한다.

본 발명은 해양 생물로부터 분리된 유용물질을 생분해성 고분자를 이용하여 제조된 바이오 필름에 적용함으로써, 기존 플라스틱의 환경 문제 및 안전성 문제를 해결할 수 있고, 바이오 플라스틱의 물성적 한계를 극복한 항균 필름을 제조할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C08K 11/00 (2013.01)
C08K 5/09 (2013.01)
C08L 29/04 (2013.01)
C08L 5/08 (2013.01)
C08L 67/04 (2013.01)
C08L 89/00 (2013.01)
C08L 2201/06 (2013.01)

한정호

부산 연제구 거제천로 233

(72) 발명자

한지민

부산 연제구 거제천로 233

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345332606
과제번호	LINCPLUS-2021-51
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	산학연협력고도화지원(R&D)
연구과제명	사회맞춤형산학협력선도대학(LINC+)육성(0.5)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

폴리비닐알콜(poly vinyl alcohol, PVA) 폴리락트산(poly(lactic acid), PLA), 폴리카프로락톤(poly(caprolactone), PCL) 및 폴리글리콜산(poly(glycolic acid), PGA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제1 생분해성 고분자;

젤라틴, 콜라겐, 키틴, 키토산, 풀루란(pullulan), 및 셀룰로오스(cellulose)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제2 생분해성 고분자; 및

지충이(*Sargassum thunbergii*) 추출물;을 유효성분으로 포함하는 향균 필름용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 지충이 추출물은,

120 내지 240℃ 온도에서 아임계 수 가수분해로 수득된 것을 특징으로 하는, 향균 필름용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 지충이 추출물은,

갈산(gallic acid), 피로갈롤(pyrogallol), 프로토크테추산(protocatechuic acid), 클로로젠산(chlorogenic acid), 시링산(syringic acid) 및 p-쿠마린산(p-coumaric acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 페놀 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 향균 필름용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 지충이 추출물은,

항산화 활성 또는 향균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는, 향균 필름용 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 지충이 추출물은,

상기 제1 생분해성 고분자 100 중량부에 대하여, 1 내지 50 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는, 향균 필름용 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 항균 필름용 조성물은,

상기 제1 생분해성 고분자 및 제2 생분해성 고분자가 1 : (1 내지 5)의 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는, 항균 필름용 조성물.

청구항 7

폴리비닐알콜(poly vinyl alcohol, PVA) 폴리락트산(poly(lactic acid), PLA), 폴리카프로락톤(poly(caprolactone), PCL) 및 폴리글리콜산(poly(glycolic acid), PGA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제1 생분해성 고분자; 및 젤라틴, 콜라겐, 키틴, 키토산, 풀루란(pullulan), 및 셀룰로오스(cellulose)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제2 생분해성 고분자;를 증류수에서 넣어 고분자 혼합물을 제조하는 단계;

지충이(*Sargassum thunbergii*) 추출물을 제조하여 상기 고분자 혼합물에 첨가하는 단계; 및

상기 지충이 추출물이 첨가된 고분자 혼합물을 캐스팅한 후 건조시켜 필름을 제조하는 단계;를 포함하는 항균 필름의 제조방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 지충이 추출물은,

120 내지 240℃ 온도에서 아임계 수 가수분해로 제조되는 것을 특징으로 하는, 항균 필름의 제조방법.

청구항 9

제 7 항 또는 제 8 항에 따라 제조된 항균 필름.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 항균 필름은,

기계적 물성 또는 수분 저항성이 향상된 것을 특징으로 하는, 항균 필름.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 지충이(*Sargassum thunbergii*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항균 필름 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 범용적으로 사용되는 석유계 유래 플라스틱 필름은 저렴한 가격, 높은 강도, 내구성을 지녀 식품 포장재뿐만 아니라 광범위한 분야에 다양하게 사용되고 있다. 이러한 석유계 필름의 경우 용도를 다하면 대부분 매립 처리되는데, 이는 화학적·생물학적 안정성 때문에 거의 분해되지 않고 축적되어 토양 및 대기 오염의 원인이 될 뿐만 아니라 미세플라스틱 등으로 생태계 파괴의 주범으로 여겨지고 있다.

[0003] 이러한 문제들의 해결 방안으로 생분해성의 바이오 플라스틱(bio plastic)이 등장하였으나, 물성이 기존 플라스틱 제품에 미치지 못하고 가격이 상대적으로 고가여서 상업적으로 사용이 미비한 실정이다.

[0004] 하지만, 플라스틱 폐기물에 대한 규제 강화가 증가되고 있고 국민의 환경의식 수준이 높아짐에 따라 바이오 플라스틱에 대한 수요는 산화 생분해 및 바이오 베이스 플라스틱을 중심으로 큰 폭으로 수요가 증가할 것으로 전망되고 있다.

[0005] 이에, 바이오 플라스틱의 물성 향상을 위한 다양한 처리기술의 개발이 필요하며, 기존에 사용되는 합성, 유·무기계 첨가제 같은 경우 소재화 과정에서 안전성 문제가 야기되는 경우가 있는 바, 보다 안전하고 효과적인 소재에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2013-0010515호 (2013년01월29일 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 항균성이 우수한 천연 소재를 함유한 필름, 및 이의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 폴리비닐알콜(poly vinyl alcohol, PVA) 폴리락트산(poly(lactic acid), PLA), 폴리카프로락톤(poly(caprolactone), PCL) 및 폴리글리콜산(poly(glycolic acid), PGA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제1 생분해성 고분자; 젤라틴, 콜라겐, 키틴, 키토산, 풀루란(pullulan), 및 셀룰로오스(cellulose)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제2 생분해성 고분자; 및 지충이(*Sargassum thunbergii*) 추출물;을 유효성분으로 포함하는 항균 필름용 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 지충이 추출물은, 120 내지 240℃ 온도에서 아임계 수 가수분해로 수득된 것일 수 있다.

[0010] 상기 지충이 추출물은, 갈산(gallic acid), 피로갈롤(pyrogallol), 프로토크테추산(protocatechuic acid), 클로로겐산(chlorogenic acid), 시링산(syringic acid) 및 p-쿠마린산(p-coumaric acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 페놀 화합물을 포함할 수 있다.

[0011] 상기 지충이 추출물은, 항산화 활성 또는 항균 활성을 가질 수 있다.

[0012] 상기 지충이 추출물은, 상기 제1 생분해성 고분자 100 중량부에 대하여, 1 내지 50 중량부로 포함될 수 있다.

[0013] 상기 항균 필름용 조성물은, 상기 제1 생분해성 고분자 및 제2 생분해성 고분자가 1 : (1 내지 5)의 중량비로 포함될 수 있다.

[0014] 본 발명은 폴리비닐알콜(poly vinyl alcohol, PVA) 폴리락트산(poly(lactic acid), PLA), 폴리카프로락톤(poly(caprolactone), PCL) 및 폴리글리콜산(poly(glycolic acid), PGA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제1 생분해성 고분자; 및 젤라틴, 콜라겐, 키틴, 키토산, 풀루란(pullulan), 및 셀룰로오스(cellulose)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제2 생분해성 고분자;를 증류수에서 넣어 고분자 혼합물을 제조하는 단계; 지충이(*Sargassum thunbergii*) 추출물을 제조하여 상기 고분자 혼합물에 첨가하는 단계; 및 상기 지충이 추출물이 첨가된 고분자 혼합물을 캐스팅한 후 건조시켜 필름을 제조하는 단계;를 포함하는 항균 필름의 제조방법을 제공한다.

[0015] 상기 지충이 추출물은, 120 내지 240℃ 온도에서 아임계 수 가수분해로 제조되는 것일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기의 제조방법에 따라 제조된 항균 필름을 제공한다.

[0017] 상기 항균 필름은, 기계적 물성 또는 수분 저항성이 향상된 것일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따라 친환경 청정 공정을 이용하여 해양 생물로부터 항산화, 항균 활성 등 다양한 기능성을 가진 유

용한 물질을 추출 및 분리할 수 있다.

[0019] 본 발명은 상기 해양 생물로부터 분리된 유용물질을 생분해성 고분자를 이용하여 제조된 바이오 필름에 적용함으로써, 기존 플라스틱의 환경 문제 및 안전성 문제를 해결할 수 있고, 바이오 플라스틱의 물성적 한계를 극복한 항균 필름을 제조할 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 항균 필름은 식품 포장 분야 등 고부가가치 산업에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 사용된 지충이(*Sargassum thunbergii*) 원료이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 추출 방법에 따른 지충이 추출물의 색상을 관찰한 것으로, (a)는 아임계 수 추출법, (b)는 메탄올 추출 방법으로 추출된 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 페놀 화합물 분석에 사용된 표준 페놀 화합물이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 분석한 지충이 아임계 수 추출물의 페놀 화합물 크로마토그램이다.

도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조된 바이오 필름을 나타낸 것이다.

도 6은 도 5의 바이오 필름의 수분 접촉각을 확인한 결과이다.

도 7은 도 5의 바이오 필름의 열중량 분석 결과이다.

도 8은 도 5의 바이오 필름의 항균 활성을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0025] 명세서 전체에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있음을 의미한다.

[0027] 본 발명은 생분해성 고분자 및 지충이(*Sargassum thunbergii*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균 필름용 조성물을 제공한다.

[0029] 본 명세서에서, "생분해성(biodegradable) 고분자"는 곰팡이, 박테리아 등과 같은 미생물에 의해 물과 이산화탄소, 메탄 등으로 완전히 분해되는 고분자로, 천연 고분자, 합성 고분자 또는 이들의 블렌드 등으로 구분될 수 있다.

[0030] 상기 생분해성 고분자는 화학적 합성에 의해 얻어진 제1 생분해성 고분자 및 천연 고분자인 제2 생분해성 고분자를 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0031] 보다 상세하게는, 상기 제1 생분해성 고분자는 분해성이 좋은 폴리에스터계 고분자에서 선택될 수 있고, 예를 들어, 폴리비닐알콜(poly vinyl alcohol, PVA) 폴리락트산(poly(lactic acid), PLA), 폴리카프로락톤(poly(caprolactone), PCL) 및 폴리글리콜산(poly(glycolic acid), PGA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 폴리비닐알콜(PVA)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 상기 제2 생분해성 고분자는 다당류 또는 단백질계 천연 고분자에서 선택될 수 있고, 예를 들어, 젤라틴(gelatin), 콜라겐(collagen), 키틴(chitin), 키토산(chitosan), 풀루란(pullulan), 및 셀룰로오스(cellulose)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 젤라틴일 수 있으나, 이에 제한되는 것은

아니다.

- [0033] 상기 제1 생분해성 고분자는 및 상기 제2 생분해성 고분자는 1 : (1 내지 5)의 중량비로 포함될 수 있고, 바람직하게는 1 : (1 내지 3)의 중량비로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 명세서에서, "지충이(*Sargassum thunbergii*)"는 한국의 전 연안에서 흔히 볼 수 있는 갈조식물 모자반과의 바닷말로, 조간대 하부에서부터 조하대의 바위 위에 큰 군락을 형성하며 생육한다. 식물체는 작은 반상근에서 직립하고 곧게 뻗는 중심가지와 불규칙하게 생기는 곁가지로 되어 있는데 줄기 표면에 돌기 모양의 잎이 밀생한다. 크기나 모양은 다양하며 어릴 때는 마치 동물의 꼬리를 연상하게 하는 모양을 한다. 어린 식물은 식용하나 흔히 사료로 쓰이고, 구충제로도 쓰이기도 한다.
- [0036] 상기 지충이 추출물은 물, C1 내지 C4 알콜 또는 이의 혼합물을 추출 용매로 하여 추출된 것일 수 있다.
- [0037] 바람직하게는, 상기 지충이 추출물은 120 내지 240℃ 온도에서 아임계 수 가수분해하여 수득된 것일 수 있다.
- [0038] 보다 상세하게는, 상기 지충이 건조 분말 및 증류수를 1 : (10 내지 30) 중량비, 보다 바람직하게는 1 : 20의 중량비로 혼합한 후, 120 내지 240℃ 온도에서, 보다 바람직하게는 150 내지 210℃ 온도에서 20분 내지 1시간 동안 가수분해하여 수득된 것일 수 있다.
- [0039] 상기 지충이 추출물은 상기 제1 생분해성 고분자 100 중량부에 대하여, 1 내지 50 중량부 포함될 수 있고, 바람직하게는 10 내지 30 중량부 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 지충이 추출물은 갈산(gallic acid), 피로갈롤(pyrogallol), 프로토크테추산(protocatechuic acid), 클로로겐산(chlorogenic acid), 시링산(syringic acid) 및 p-쿠마린산(p-coumaric acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 페놀 화합물을 포함할 수 있고, 우수한 항산화 활성 및 항균 활성을 가질 수 있다. 이에, 상기 지충이 추출물을 첨가하여 항균 활성이 우수한 필름을 제조할 수 있다.
- [0042] 본 발명은 생분해성 고분자 및 지충이(*Sargassum thunbergii*) 추출물을 이용한 항균 필름의 제조방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명에 따른 항균 필름의 제조방법은 폴리비닐알콜(poly vinyl alcohol, PVA) 폴리락트산(poly(lactic acid), PLA), 폴리카프로락톤(poly(caprolactone), PCL) 및 폴리글리콜산(poly(glycolic acid), PGA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제1 생분해성 고분자; 및 젤라틴, 콜라겐, 키틴, 키토산, 풀루란(pullulan), 및 셀룰로오스(cellulose)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제2 생분해성 고분자;를 증류수에서 넣어 고분자 혼합물을 제조하는 단계; 지충이 추출물을 제조하여 상기 고분자 혼합물에 첨가하는 단계; 및 상기 지충이 추출물이 첨가된 고분자 혼합물을 캐스팅한 후 건조시켜 필름을 제조하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 고분자 혼합물을 제조하는 단계는, 화학적 합성에 의해 얻어진 제1 생분해성 고분자 및 천연 고분자인 제2 생분해성 고분자를 1 : (1 내지 5)의 중량비로, 바람직하게는 1 : (1 내지 3)의 중량비로 혼합함으로써 수행될 수 있고, 상기 제1 생분해성 고분자 및 제2 생분해성 고분자 혼합물과 상기 증류수는 1 : (10 내지 30), 바람직하게는 1 : 20의 중량비로 혼합이 수행될 수 있다.
- [0045] 상기 지충이 추출물은 상기 지충이 건조 분말 및 증류수를 1 : (10 내지 30) 중량비, 보다 바람직하게는 1 : 20의 중량비로 혼합한 후, 120 내지 240℃ 온도에서, 보다 바람직하게는 150 내지 210℃ 온도에서 20분 내지 1시간 동안 가수분해하여 수득될 수 있다.
- [0046] 상기 지충이 추출물은 상기 제1 생분해성 고분자 100 중량부에 대하여, 1 내지 50 중량부, 바람직하게는 10 내지 30 중량부로 상기 고분자 혼합물에 첨가될 수 있다.
- [0047] 상기 항균 필름 조성물은 상기 유효성분 외에도 당해 기술분야에서 필름 제조에 통상적으로 사용되는 부형제 또는 첨가제를 더 포함하여 제조될 수 있다.
- [0048] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명은 상기의 제조방법에 따라 제조된 항균 필름을 제공한다.

[0051] 상기 항균 필름은 페놀 화합물을 포함하고 항산화 활성 및 항균 활성이 우수한 지층이 추출물을 첨가하여 제조함으로써, 기계적 물성 또는 수분 저항성이 향상된 것일 수 있다.

[0052] 보다 상세한 것은 하기 실험예에 의해 후술될 것이다.

[0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0056] <실시예 1> 해양생물 유래 유용물질 추출 및 이의 분석

[0057] 1. 원료 전처리

[0058] 본 실험에 사용된 해양생물 유래 유용물질 공급원으로는 모자반과에 속하는 지층이(*Sargassum thunbergii*)를 사용하였고, 지층이는 제주도에서 채취한 것을 민물로 깨끗하게 씻은 후 건조된 것을 PARAJEJU 웹사이트(<http://parajeju.com/>)에서 구입하여 사용하였다. 지층이 분말은 710 μm 체를 이용하여 균일한 입자의 분말을 얻은 후 추후 실험을 위해 -40℃에 보관하였다. 아임계 수 가수분해 압력조절을 위한 질소가스는 한국산업가스에서 구입하였고, 그 외 연구를 위한 시약 및 표준품은 특급 혹은 HPLC grade의 것을 사용하였다 (도 1).

[0060] 2. 성분 분석

[0061] 일반성분 측정은 AOAC (2000) 법에 준하여 측정하였다. 즉, 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 Kjeldahl 법, 조지방은 Soxhlet 법 및 조회분은 건식회화법으로 측정하였다. 탄수화물은 100 - (수분 + 회분 + 조단백질 + 조지방)으로 나타내었다.

[0063] 2-1. 수분 분석

[0064] 수분은 상압건조시켜 감소되는 수분량을 측정하는 방법을 사용하였다. 미리 가열하여 항량으로 한 칭량접시에 검체 5 g을 건조기 (100~105℃)에 넣어 3~5시간 건조한 후, 데시케이터 내에서 약 30분간 식히고 무게를 달고 하기의 식 1로 계산하였다.

[0065] <식 1>

$$\text{수분(\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100$$

[0067] W_1 : 칭량접시와 검체의 무게 (g)

[0068] W_2 : 건조 후 항량이 되었을 때 무게 (g)

[0069] W : 초기 샘플의 무게 (g)

[0071] 2-2. 조지방 분석

[0072] 조지방분석은 Soxhlet 방법을 이용하여 분석하였다. 검체 5 g을 n-헥산(n-Hexane)을 용매로 하여 Soxhlet 추출장치 (Premium Analog Multi Heating Mantles, DAIHAN-Scientific, KOREA)로 24시간 추출한 것을 회전증발농축기 (Eyela N-1100, Rikakikai, China)를 이용하여 용매를 제거한 후 칭량하였다. 계산식은 하기 식 2와 같다.

[0073] <식 2>

$$\text{조지방(\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

[0075] W_0 : 추출 플라스크의 무게 (g)

[0076] W_1 : 조지방을 추출하여 건조시킨 추출 플라스크의 무게 (g)

[0077] S : 검체의 채취량 (g)

[0079] 2-3. 조단백 분석

[0080] 조단백질은 Kjeldahl 법을 이용하여 분석하였다. 시료 1 g과 분해촉진제 ($\text{CuSO}_4 : \text{K}_2\text{SO}_4 = 1 : 4$), 진한 황산 20 mL을 킬달 플라스크에 넣고 킬달 분해 장치 (Digestion unit K-425, Buchi, Switzerland), 증류 장치 (Kjelflex K-360, Buchi), 적정 장치 (848 Titrino plus Metrohm, Buchi)를 연속적으로 사용하여 micro-Kjeldahl 법으로 분석한 후, 질소계수 6.25를 곱하여 시료의 조단백질 함량을 산출하였다.

[0082] 2-4. 회분 분석

[0083] 회분 분석은 시료를 500~550℃에서 태울 때 휘발되지 않고 남는 무기물을 측정하는 것으로, 백색-회백색의 회분이 얻어질 때까지 계속 가열하였다. 회화가 끝난 후, 온도가 약 200℃ 이하로 되었을 때 데시케이터에 옮겨 식힌 후 칭량하였다. 검체의 회분량(%)은 하기 식 3에 따라 산출하였다.

[0084] <식 3>

[0085]
$$\text{회분}(\%) = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

[0086] W_0 : 항량이 된 도가니의 질량 (g)

[0087] W_1 : 회화 후의 도가니와 회분의 질량 (g)

[0088] S : 검체의 채취량 (g)

[0090] 하기 표 1은 지층이 원물의 일반성분 분석 결과이다.

표 1

Compositions	Raw material (%)
Moisture	9.75±0.17
Ash	26.02±0.34
Crude Lipid	13.64±0.13
Crude Protein	1.01±0.15
Carbohydrate	49.58±0.02

[0091] - Values are expressed as Mean±SD

[0093] 상기 표 1을 참조하면, 탄수화물(Carbohydrate)은 49.58±0.02 %로 가장 풍부한 성분이었으며, 다음으로 회분(Ash)이 26.0±0.34 %로 많았다. 일반적으로 회분의 함량은 그 성분의 미네랄 함량과 관련이 있다.

[0095] **3. 아임계 수 가수분해 및 유기용매 추출**

[0096] 아임계 수 가수분해는 하스텔로이 C276 특수금속으로 제작된 1000 cm³ 부피의 고온, 고압용 반응기와 전열장치, 교반장치, 냉각장치 등을 포함하는 장치를 사용하였다. 시료 분말 30 g과 증류수 600 mL w/v 1:20의 비율로 혼합하여 반응기에 넣었다. 반응기를 잘 밀봉한 후 전열기를 켜 가열하고 질소가스를 이용하여 초기 압력 30 bar를 주입한 후 실험온도(120~240℃)에 도달하면 30분간 가수분해반응을 진행하였다. 임펠러의 회전속도는 200 rpm으로 설정하였다. 그 후 수득한 가수분해물은 필터링을 한 후 4℃에 보관하여 분석에 사용하였다. 필터지에 필터링 되지 않은 잔존물을 건조시킨 후 무게를 측정하여 가수분해 효율성을 계산하였다.

[0098] 하기 표 2는 지충이 아임계 수 추출 효율을 나타낸 것이다.

표 2

Conditions		Extraction efficiency (%)
SSE (℃)	120	41.86±0.47 ^d
	150	61.58±0.16 ^c
	180	70.33±0.11 ^b
	210	79.23±0.14 ^a
	240	78.76±0.38 ^{ab}
SME		-

- Values are expressed as Mean±SD

- Different letters indicate significant differences (p<0.05) according to Duncan's multiple range test

- SSE: *S. thunbergii* subcritical water extracts, SME: *S. thunbergii* methanol extracts

[0099]

[0101] 상기 표 2를 참조하면, 추출 효율은 온도가 증가함에 따라 크게 증가하였다. 구체적으로 120℃에서 41.86±0.47 %로 가장 낮았고, 210℃에서는 79.23±0.14 %로 가장 높았다. 240℃에서는 78.76±0.38 %로, 추가적인 증가가 나타나지 않았다.

[0102] 온도는 추출 효율에 큰 영향을 미치는 중요한 요소로, 고온에서 물은 추출 효율을 향상시키는 반데르발스의 힘, 수소 결합 및 쌍극자 인력과 같은 특성 때문에 시료의 구조를 파괴할 수 있다. 또한, 고압의 사용은 표면 장력을 감소시킴으로써 표본과의 표면 접촉을 증가시키는 데 도움이 된다.

[0104] 4. 지충이 추출물의 물리적 특성 분석

[0105] 4-1. pH

[0106] 지충이 추출물의 pH는 pH 미터를 사용하여 실온에서 측정되었다. 측정 전에 pH 2, 4, 7, 10의 완충용액을 사용하여 pH 미터를 보정하였다.

[0108] 4-2. 색도

[0109] 색도는 소비자들을 끌어들이는 중요한 품질 관련 요소 중 하나로, 지충이 추출물의 색도 분석은 색차계 (Lovibond RT series, the Tintometer Ltd, Amesbury, UK)를 사용하여 분석하였다. 결과값들은 L(lightness), a*(redness), b*(yellowness) 3차원의 좌표로 나타내었고, 표준값들은 L=94.92, a*=-1.04, b*=0.19였다. 평균 값을 계산하기 위해 3번 반복 측정하였다.

[0111] 하기 표 3은 다양한 조건에서 수득한 지충이 추출물의 색상 특성 및 pH를 나타낸 것이다.

표 3

Conditions		L	a*	b*	pH
SSE (°C)	120	32.49±0.38 ^b	5.77±0.36 ^a	3.09±0.35 ^b	6.38±0.16 ^b
	150	31.01±0.07 ^f	3.26±0.11 ^b	0.77±0.02 ^d	5.71±0.23 ^d
	180	31.33±0.12 ^d	2.86±0.02 ^c	0.45±0.01 ^e	5.42±0.15 ^e
	210	32.12±0.14 ^c	3.55±0.06 ^b	1.00±0.04 ^c	5.50±0.08 ^f
	240	31.15±0.69 ^e	2.24±0.17 ^d	0.14±0.04 ^f	7.03±0.17 ^a
SME		34.56±0.20 ^a	-0.89±0.01 ^e	4.06±0.09 ^a	5.93±0.06 ^c

- Values are expressed as Mean±SD

- Different letters indicate significant differences (p<0.05) according to Duncan's multiple range test

- SSE: *S. thunbergii* subcritical water extracts, SME: *S. thunbergii* methanol extracts

[0112]

[0114] 상기 표 3 및 도 2를 참조하면, 추출 조건에 따라 지충이 추출물의 밝기(L value)가 31.01±0.07 에서 34.56±0.20 사이로 나타났다. 이러한 추출물의 밝기는 색소와 흡습성 물질에 의존하는 반면, 어두움은 고분자 물질의 저분자화와 메일라드(Maillard) 반응 생성물의 형성에 의존한다. a* (red to green)의 범위는 -0.89±0.01 에서 5.77±0.36 이었다. 메탄올 추출물의 경우 녹색도가 다른 것보다 높게 나타났으며, 이를 통해 카로테노이드 계 색소보다 엽록소계 색소가 더 많이 추출되었음을 확인할 수 있다.

[0115] pH 값은 120°C의 6.38±0.16 에서 210°C의 5.50±0.08로 감소하다 다시 240°C의 7.03±0.17로 증가하였다. 메탄올 추출물의 경우는 5.93±0.06으로 나타났다. 열처리에 의한 pH 감소는 당이 비효소적 갈변으로 인한 카보닐 화합물과 유기산의 형성 및 자가 산화에 의한 산도의 증가를 야기한다.

[0117] 5. 지충이 추출물의 항산화능 분석

[0118] 5-1. DPPH, ABTS 및 FRAP 항산화능 측정

[0119] DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능은 Cho (2019)의 방법을 약간 수정하여 측정하였으며, FRAP 환원력 분석은 Belwal (2016)의 방법을 사용하여 수행되었다.

[0120] DPPH 소거능의 경우 메탄올성 DPPH 용액을 0.1 mM 농도로 제조하여 사용하였다. 가수분해물 150 µL 및 0.1 mM DPPH 용액 2.85 mL의 혼합물을 1분간 교반하여 반응시킨 후, 암실에 30분간 보관하였다. Microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 반응액의 흡광도 값을 517 nm에서 3회 반복하여 측정하였다.

[0121] ABTS 탈색 분석(decolorization assay) 방법은 ABTS 양이온 라디칼(cation radical) (ABTS)을 생성시키기 위해 7 mM ABTS 수용액을 만든 후 과황산칼륨(potassium persulfate)을 2.45 mM이 되도록 첨가하여 암실에서 24시간 반응시켰다. ABTS 용액은 흡광도가 0.7±0.02가 되도록 메탄올에 희석하여 사용하였다. 가수분해물 20 µL과 ABTS 용액 2.88 mL을 섞어 암실에서 6분간 반응시킨 후 microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 반응액의 흡광도 값을 734 nm에서 3회 반복하여 측정하였다.

[0122] FRAP (Ferric reducing antioxidant power) 용액은 300 mM 아세트이트 버퍼(acetate buffer) (pH 3.6) : TPZ 용액 : FeCl₃·6H₂O 용액을 10:1:1 (v/v)의 비율로 제조하여 사용하였다. 0.3 mL의 추출물과 FRAP reagent 3 mL을 혼합하여 3초간 볼텍싱(vortexing) 한 후, 4분간 암실에서 반응시켰다. 분광광도계를 이용하여 593 nm의 파장에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다.

[0123] 항산화 물질 함량은 mg Trolox/g dried mass로 나타내었다.

[0125] 하기 표 4는 다양한 조건에서 수득한 지층이 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과이다.

표 4

Conditions		Antioxidant activities			
		ABTS+ radical scavenging (mg TE/g)	DPPH radical scavenging (mg TE/g)	FRAP assays (mg TE/g)	Total phlorotannin (mg PGE/g)
SSE (°C)	120	18.61±0.92 ^d	3.78±0.13 ^e	8.12±0.57 ^e	6.39±0.04 ^d
	150	41.50±0.44 ^c	9.57±0.15 ^d	19.51±0.12 ^c	9.72±0.13 ^c
	180	56.72±0.10 ^a	17.99±0.03 ^a	29.79±0.12 ^a	13.57±0.19 ^a
	210	55.17±0.76 ^a	14.13±0.07 ^b	27.84±0.35 ^b	13.43±0.16 ^a
	240	50.22±0.10 ^b	10.89±0.07 ^c	18.03±0.07 ^d	9.61±0.11 ^c
SME		1.53±0.05 ^e	0.18±0.07 ^f	1.34±0.04 ^f	1.16±0.01 ^e

- Values are expressed as Mean±SD

- Different letters indicate significant differences (p<0.05) according to Duncan' s multiple range test

- SSE: *S. thunbergii* subcritical water extracts, SME: *S. thunbergii* methanol extracts

[0126]

[0128] 상기 표 4를 참조하면, 지층이 추출물의 항산화 활성을 ABTS, DPPH 및 FRAP의 3가지 방법으로 평가한 결과, ABTS, DPPH 라디칼 소거능 및 FRAP 환원력 평가에서 180℃ 아임계 수 지층이 추출물이 각각 56.72±0.10, 17.99±0.03 및 29.79±0.11 mg TE/g으로 가장 강한 활성을 보였다. 대조적으로 메탄올 추출물은 1.53±0.05, 0.18±0.07 및 1.34±0.34 mg TE/g으로 가장 약한 활성을 보였다. 기존의 유기용매 추출법과 비교하였을 때 항산화 활성은 아임계 수 추출법에서 최소 8배에서 최대 100배까지 더 높은 것을 확인할 수 있다.

[0130] 5-2. 총 플로로탄닌 함량(Total phlorotannin content, TPC) 측정

[0131] 지층이 추출물의 총 플로로탄닌 함량은 노란색을 띄는 Folin-Ciocalteu (FC) 시약이 알칼리 조건에서 추출물의 폴리페놀 화합물에 의해 환원되어 파란색을 생성하는 것의 원리를 사용하였다.

[0132] 먼저, 10% FC 시약 0.1 mL에 추출물 0.3 mL을 첨가하고 5분 후, 10% Na₂CO₃ 2.0 mL을 첨가하였다. 그 후 30초 간 불텍싱한 후에 90분간 암실에서 반응시켰다. 762 nm에서의 흡광도를 측정하고 표준품인 플로로글루시놀 (phloroglucinol)과 비교하였다. TPC는 gram 당 mg의 플로로글루시놀의 당량 (mg PGE/g)으로 표시되었다.

[0134] 상기 표 4를 참조하면, 지층이 아임계 수 추출물의 TPC는 온도가 증가함에 따라 지속적으로 증가하여 180℃에서 13.57±0.19 mg PGE/g에 도달한 후 온도가 더 증가함에 따라서 210℃에서는 9.61±0.11 mg PGE/g으로 크게 감소하였고, 240℃에서는 1.16±0.01 mg PGE/g으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 온도는 아임계 수 추출 공정에서 수득되는 TPC에 영향을 미치는 가장 중요한 요소 중 하나이다. 페놀 화합물의 용해도는 고온에서 다당류의 분해, 물질 전달 속도 및 분자 확산에 의해 증가하지만, 특정 온도 이하에서는 분해되는 경향을 보였다.

[0136] 하기 표 5는 TPC와 항산화제의 피어슨 상관계수(Pearson' s correlation coefficient)를 나타낸 것이다.

표 5

Trait	TPC	ABTS	DPPH	FRAP
TPC	1	0.968**	0.965**	0.984**
ABTS	-	1	0.961**	0.962**
DPPH	-	-	1	0.985**
FRAP	-	-	-	1

** Correlation is significant at the 0.01 level

[0137]

[0139] 항산화 활성은 페놀 성분 및 색소 성분과 관련이 있으며, 페놀 화합물은 수소를 제공하고 안정적인 라디칼 중간체를 형성하는 능력으로 인해 라디칼 소거 능력이 있는 것으로 알려져 있다.

[0140] 본 실험에서는 지충이 추출물의 TPC와 항산화 활성 사이의 가능한 상관 관계를 확인하기 위해 Pearson 상관관계 분석이 적용되었다. 상기 표 5를 참조하면, ABTS, DPPH 및 FRAP 분석의 항산화 활성과 TPC와의 상관계수(R2)는 각각 0.968, 0.965, 0.984 ($p < 0.01$)로 강한 상관관계를 보였다.

[0142] 6. 지충이 추출물의 총당 및 환원당 분석

[0143] 6-1. 총당 함량 (Total sugar contents, TSC)

[0144] 지충이 추출물의 총당 함량은 상기 추출물 0.75 mL에 황산 2.25 mL을 혼합하고 40% 페놀 용액 0.45 mL을 첨가하여 잘 혼합한 후, 끓는 물에서 5분간 반응하고 냉각시켰다. 490 nm에서 샘플의 흡광도를 측정하고 표준시약인 글루코스(glucose)와 비교하여 그 결과는 g glucose/100 g으로 표시하였다.

[0146] 6-2. 환원당 함량 (Reducing sugar contents, RSC)

[0147] 지충이 추출물의 환원당 함량은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 색도법을 이용하여 측정되었다. DNS 용액 제조를 위해 1 g의 DNS와 30 g의 타르타르산나트륨칼륨(sodium potassium tartrate) 30 g을 80 mL의 0.5 N NaOH 용액에 녹이고 증류수를 이용하여 최종 부피를 100 mL로 조정하였다. 다음으로, 추출물 1 mL을 DNS 용액 4 mL과 혼합하고 끓는 물에서 5분간 반응 후 상온에서 냉각하였다. 540 nm에서 흡광도를 측정하고 표준시약인 글루코스과 비교하여 결과는 mg glucose/g으로 표시하였다.

[0149] 하기 표 6은 다양한 조건에서 수득한 지충이 추출물의 총당 및 환원당 함량을 측정한 결과이다.

표 6

Conditions		Chemical properties	
		Total sugar (mg Glucose/g)	Reducing sugar (mg Glucose/g)
SSE (°C)	120	46.18±1.30 ^b	13.25±0.42 ^a
	150	61.95±0.75 ^a	42.58±0.20 ^b
	180	35.54±0.59 ^c	48.51±1.40 ^a
	210	11.19±0.45 ^d	32.51±0.64 ^c
	240	4.62±1.00 ^e	21.78±0.20 ^d
SME		0.34±0.27 ^f	15.25±0.46 ^f

- Values are expressed as Mean±SD

- Different letters indicate significant differences (p<0.05) according to Duncan's multiple range test

- SSE: *S. thunbergii* subcritical water extracts, SME: *S. thunbergii* methanol extracts

[0150]

[0152]

상기 표 6을 참조하면, 지층이 추출물의 총당 및 환원당 함량을 조사한 결과, 추출 온도에 따라서 함량의 유의한 차이가 있음을 확인하였다. 지층이 아임계 수 추출물의 경우 총당은 150℃에서 61.95±0.75 mg glucose/g으로 가장 높았고, 240℃에서 4.62±0.99 mg glucose/g으로 가장 낮았다. 환원당은 180℃에서 44.51±1.04 mg glucose/g으로 가장 높았고 120℃에서 13.25±0.42 mg glucose/g으로 가장 낮았다. 지층이 메탄올 추출물에서 총당 및 환원당은 각각 0.34±0.27 및 15.24±0.46 mg glucose/g으로 아임계 수 추출법에 비해 많이 낮은 함량을 나타냈다.

[0153]

당은 카라멜화 및 마이야르 반응과 같이 추출 온도가 상승함에 따라 증가하는 갈변반응에 의해 탄수화물의 알데히드, 케톤 또는 유기산과 같은 다른 생성물로 분해되는 바, 총당 및 환원당 함량의 변화는 온도에 의존한다. 그러므로, 목적하는 성분의 함량에 맞게 추출 온도를 조절할 필요가 있다.

[0155]

7. HPLC를 이용한 지층이 추출물의 페놀 화합물 분석

[0156]

7-1. 표준품 및 추출물 전처리

[0157]

각 표준물질 1 mg을 1 mL의 HPLC용 에탄올(EtOH)에 녹였다. 분석에 사용된 표준 페놀 화합물은 갈산(gallic acid), 피로갈롤(pyrogallol), 프로토크테추산(protocatechuic acid), 클로로겐산(chlorogenic acid), 시링산(syringic acid) 및 p-쿠마린산(p-coumaric acid)을 사용하였다 (도 3). 모든 샘플은 3회 이상 분석되었으며, 표준 검량선은 선형이며, 회귀 계수는 0.99 이상이였다. 지층이 추출물은 HPLC용 Water에 10배 희석되어 0.2 μm 친수성 막을 통해 여과한 후 HPLC에 주입하였다. 결과는 mg/100g으로 표시되었다.

[0159]

7-2. HPLC 방법

[0160]

페놀 화합물은 Jasco PU-2089 펌프, Jasco UV-2075 UV/VIS 검출기, Jasco Co-2060 Column 오븐, Jasco ChromNAV software로 구성된 HPLC 장치를 사용하여 분석되었다. 분석 컬럼은 Triart C18 4mm x 3.0mm 가드 컬럼(YMC Co. Ltd, Kyoto, Japan)이 있는 YMC-Triart C18, 4.6mm x 250mm, 5 μm C18 역상 컬럼을 사용하였다,

[0162]

하기 표 7은 이동상의 조성 및 HPLC 분석 조건이다.

표 7

Time (min)	% A	% B
0	85	15
7	63	37
14	20	80
16	0	100
18	0	100
20	85	15

[0163]

[0164]

페놀 화합물의 용출을 위해 0.8 mL/min의 일정한 유속에서 구배 용출(gradient elution)을 사용하였다. 사용된 이동상은 1% phosphoric acid in water (solvent A)과 1% phosphoric acid in acetonitrile (solvent B)를 사용하였다. 검출기는 280 nm를 사용하였다.

[0166]

하기 표 8은 지충이 아임계 수 추출물의 페놀 화합물을 분석한 결과이다.

표 8

Phenolic compounds (Retention time)		Gallic acid (4.9 min)	Pyrogallol (6.9 min)	Protocatechuic acid (8.1 min)	Chlorogenic acid (8.7 min)	Syringic acid (10.3 min)	p-Coumaric acid (13.1 min)
SSE (°C)	120	49.46±1.34	N.D.	N.D.	N.D.	42.45±1.01	N.D.
	150	51.94±5.75 ^c	57.51±3.80 ^b	N.D.	N.D.	70.22±5.36 ^a	23.09±4.71 ^d
	180	66.99±7.39 ^d	1158.33±8.36 ^a	74.28±1.20 ^c	75.72±2.03 ^c	20.01±1.09 ^b	196.09±9.05 ^{bc}
	210	62.09±3.61 ^d	222.85±1.96 ^a	N.D.	102.61±5.44 ^c	1.03±0.05 ^b	105.55±5.46 ^b
	240	26.13±1.07	184.17±2.07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

- Values are expressed as Mean±SD

- Different letters indicate significant differences (p<0.05) according to Duncan's multiple range test

- SSE: *S. thunbergii* subcritical water extracts

[0167]

[0169]

상기 표 8 및 도 4를 참조하면, 120°C의 추출물에서는 정확한 피크가 검출되지 않았으나, 150°C 이상에서 주요한 페놀 화합물이 확인되었으며, 180°C에서 가장 많은 페놀 화합물이 검출되었고, 210°C에서는 감소하였다. 이러한 결과는 TPC와 유사한 패턴을 따른다. 이는 고온에서 지충이의 세포벽을 파괴함에 기인한 것으로 판단된다. 전반적으로 보았을 때 가장 풍부하게 검출된 화합물은 피로갈롤(pyrogallol)으로, 180°C에서 1158.33±8.36 mg/100g으로 검출되었다. 또한, 모든 온도에서 검출된 페놀 화합물은 갈산(gallic acid)으로, 온도가 증가함에 따라 그 농도가 증가하여 180°C에서 66.99±7.39 mg/100g으로 최대치를 나타낸 후 약간 감소하여 240°C에서 26.13±1.07 mg/100g을 나타냈다. p-쿠마린산(p-coumaric acid)은 150~210°C에서만 23.09±4.71~196.09±9.05 mg/100g로 나타났다.

[0170]

다양한 실험에서 150°C 이상의 온도는 p-쿠마린산과 같은 불용성 페놀의 농도를 증가시키는 것으로 나타났다. 240°C의 가장 높은 온도에서는 오직 갈산과 피로갈롤만이 각각 26.13±1.07 및 184.17±2.07 mg/100g 정도 검출되었다. 이러한 결과는 210°C를 넘어가는 고온에서 특정한 페놀 화합물의 불필요한 반응 또는 분해에 의한 것으로 생각된다.

[0171]

이러한 결과를 통해, 180°C에서의 지충이 추출물이 다양한 페놀 화합물을 얻기 위해 가장 적합한 온도이며, 페놀 화합물은 항산화 활성을 비롯한 다양한 생물학적 활성에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

[0173]

8. 지충이 추출물의 항균 활성 분석

[0174]

각기 다른 온도 (120, 150, 180, 210, 240°C)에서 처리된 지충이 추출물의 항균활성은 그람 음성(gram-

negative)균인 대장균(*Escherichia coli* KCTC 2314) 및 그람 양성(gram-positive)균인 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus* ATCC 14579)를 이용하여 아가 웰(Agar well) 확산법을 사용하여 분석하였다.

먼저 Muller Hinton 한천 20 mL을 멸균 펠트리 접시에 붓고 굳혔다. 그다음 멸균 피펫 팁을 사용하여 웰을 만들고 멸균 면봉을 사용하여 배지 표면에 세균 배양액을 옮겼다. 다양한 농도 (10, 20, 30, 40, 50 mg/mL)의 약 50 μ L의 지충이 추출물을 10% DMSO에 용해시키고 웰에 분주한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 억제 영역(inhibition zone, mm)을 기록하고, 가장 큰 영역을 사용하여, 최소 억제 농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 및 최소 살균 농도(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)를 결정하였다. 지시약으로 레자주린(Resazurin) 염료를 사용하였다.

하기 표 9는 지충이의 아임계 수 추출물의 *E. coli* 및 *B. cereus*에 대한 *in vitro* 항균 활성을 분석한 결과이다.

표 9

Conditions		Concentration (mg/mL) (<i>E. coli</i> / <i>B. cereus</i>)				
		10	20	30	40	50
SSE (°C)	120	-	-	-	-	-
	150	-	-	12 / -	13 / 11	15 / 11
	180	11 / 11	12 / 11	15 / 14	15 / 15	17 / 16
	210	-	13 / 12	15 / 13	15 / 13	17 / 15
	240	-	12 / 12	13 / 13	15 / 14	15 / 17

- SSE: *S. thunbergii* subcritical water extracts

상기 표 9를 참조하면, TPC 등의 결과와 마찬가지로 180°C에서의 추출물이 가장 강한 항균활성을 나타내었다. 가장 높은 농도인 50 mg/mL은 *E.coli*와 *B. cereus*에 대한 항균 크기가 각각 17 mm와 16 mm로 가장 컸다.

하기 표 10은 지충이의 아임계 수 추출물의 *E. coli* 및 *B. cereus*에 대한 최소 억제 농도(MIC) 및 최소 살균 농도(MBC)를 분석한 결과이다.

표 10

Microorganism	Concentration of <i>S. thunbergii</i> extracts	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>E. coli</i>	0.625	1.25
<i>B. cereus</i>	0.312	0.625

- MIC: Minimum Inhibitory Concentration

- MBC: Minimum Bactericidal Concentration

상기 표 10을 참조하면, *E.coli*에 대한 MIC 및 MBC는 각각 0.625 mg/mL 및 1.25 mg/mL이고, *B. cereus*의 MIC 0.312 mg/mL, MBC 0.625 mg/mL 보다 더 높았다. 이는 박테리아 세포에 대한 추출물의 피토케미컬(phytochemical)의 작용 방식인 세포벽 투과성의 변화로 여겨진다. 그람 음성 박테리아는 세포벽이 더 복잡한 구조이기 때문에 그람 양성 박테리아보다 항균제에 대한 내성이 더 강하다. 이처럼 독특한 세포벽 구조는 세포에 침투하는 항균성분의 능력을 감소시킨다. 전반적으로 실험된 그람 양성 박테리아는 지충이 추출물에 대한 그

람 음성 박테리아보다 더 민감한 것을 알 수 있다.

<실시예 2> 지충이 추출물을 첨가한 바이오 필름 제조 및 특성 분석

1. 바이오 필름 제조 방법

지충이 추출물을 기능성 첨가 성분으로 한 바이오 필름을 제작하기 위해서 생분해성 고분자로 알려진 폴리 비닐 알콜(poly vinyl alcohol, PVA)과 해양생물에서 추출한 젤라틴(gelatin)을 폴리머 소재로 하여 바이오 필름을 제조하였다.

먼저, PVA 2 g과 젤라틴 3 g을 증류수(100 mL)에 넣고 80℃ 30분 250 rpm으로 완전히 녹을 때까지 교반하였다. 5가지 다양한 온도 (120~240℃) 지충이 추출물의 동결건조 분말을 PVA 기준 10 %씩 넣었고, 혼합물을 페트리디쉬(petridish)에 25 mL씩 캐스팅(casting)하여 45℃ 건조 오븐(dry oven)에서 24시간 건조하여 필름을 제조하였다.

하기 표 11은 지충이 아임계 수 추출물을 첨가하여 제조된 바이오 필름의 색상 특성을 나타낸 것이다.

표 11

Conditions	L	a*	b*
Control	90.71±0.56 ^a	2.44±0.12 ^c	-7.32±0.47 ^d
SSE 10%	79.31±3.03 ^b	1.80±1.15 ^d	26.58±5.62 ^c
SSE 20%	70.70±3.06 ^c	6.76±2.78 ^b	41.82±4.33 ^b
SSE 30%	61.82±1.73 ^d	15.74±1.45 ^a	47.85±0.60 ^a

- Values are expressed as Mean±SD

- Different letters indicate significant differences (p<0.05) according to Duncan's multiple range test

- SSE: *S. thunbergii* subcritical water extracts

상술된 실시예 1을 통해 지충이 추출물 중 가장 높은 항산화, 항균 활성 및 가장 많은 페놀 화합물 등이 추출된 180℃ 조건에서 추출된 지충이 아임계 수 추출물을 기능성 첨가 소재로 하여 필름을 제조한 결과, 상기 표 11 및 도 5에 나타난 바와 같이, PVA와 젤라틴만을 이용하여 만든 대조구(control) 필름의 경우, 명도값인 L 값이 90.71±0.56, redness인 a*가 2.44±0.12 그리고 yellowness인 b*가 -7.32±0.47로 백색에 가까운 투명한 색을 나타내지만, 지충이 추출물의 함량이 증가할수록 L 값은 낮아지면서 어두운 색을 나타내고, b* 값은 급격하게 증가하면서 yellowness한 색을 나타낸다. 특히, 추출물의 함량이 20%를 넘어가게 되면서 b* 값이 41.82±4.33의 짙은 노란색인 필름 외관이 나타나는 것으로 관찰되었다.

2. 바이오 필름의 물리적 특성 평가 - 인장강도 및 연신율

필름에 있어서 인장강도와 신장률은 매우 중요한 물리적 특성으로, 제작된 바이오 필름의 인장강도 (Tensile strenght, TS) 및 연신율 (Elongation at break, EAB)는 ASTM 법 (ASTM, 2001)을 참고하여 Brookfield CT-3 Texture Analyzer (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, Massachusetts, USA)에 의해 측정되었다. 필름은 50 mm × 10 mm 길이로 절단되고 30 mm 초기 간격으로 그립 사이에 고정되었다. trigger load는 0.067 N으로 설정하고, 필름이 끊어질 때까지 0.5 mm/s의 일정한 속도로 신장되도록 늘렸다. TS는 하식 4에 따라 계산되었다.

[0199] <식 4>

$$[0200] \quad TS = \frac{F}{L \times M}$$

[0201] F : 최대 장력 (N)

[0202] M : 필름의 두께 (mm)

[0203] L : 필름의 넓이 (mm)

[0204] 필름의 두께는 Mitutoyo micrometer (293-240-30, range 0-25 mm, accuracy $\pm 1 \mu\text{m}$, Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

[0206] 연신율은 하기 식 5와 같이, 필름이 끊어질 때 까지 늘어난 길이를 초기의 grip 간 거리에 대한 백분율로 나타냈다.

[0207] <식 5>

$$[0208] \quad EAB = \frac{H - H_0}{H_0}$$

[0209] H_0 : 필름의 초기 높이

[0210] H : 필름의 최종 높이

[0212] 하기 표 12는 상기 바이오 필름의 물리적 및 기계적 특성을 분석한 결과이다.

표 12

Conditions	Thickness (mm)	Tensile strength (Mpa)	Elongation at break (%)
Control	0.21 ± 0.04^d	5.99 ± 0.54^a	88.07 ± 10.66^a
SSE 10%	0.28 ± 0.06^b	13.55 ± 2.39^b	76.29 ± 6.43^b
SSE 20%	0.27 ± 0.02^c	22.55 ± 2.07^c	46.30 ± 4.49^d
SSE 30%	0.31 ± 0.02^a	29.90 ± 2.12^a	57.70 ± 8.51^c

- Values are expressed as Mean $\pm$ SD

- Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test

- SSE: *S. thunbergii* subcritical water extracts

[0213]

[0215] 상기 표 12를 참조하면, 대조구 필름의 인장강도는 5.99 ± 0.54 MPa이고, 지층이 추출물을 첨가함에 따라 그 인장강도도 증가하여 지층이 추출물을 30% 첨가하였을 때 29.90 ± 2.12 MPa로 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이는 젤라틴 단백질 분자에 페놀 화합물을 첨가함에 따른 소수결합 등에 의한 가교(cross-linking) 현상의 결과로 사료된다.

[0216] 신장률의 경우, 대조구 필름은 88.07 ± 10.66 %에서 지층이 추출물이 첨가됨에 따라 조금씩 감소하는 것으로 나타났다. 일반적으로 필름의 인장강도와 신장률 사이에는 반비례 관계가 있어 필름의 인장강도가 증가하게 되면 반대로 신장률이 감소하는 결과로 여겨진다.

[0218] 3. 수분 특성 평가

[0219] 식품의 품질을 유지하기 위해서는 포장재 안에서 일어나는 수분의 증발이나 외부의 침투를 방지하는 것이 매우

중요하다. 지층이 추출물을 첨가한 PVA-젤라틴 바이오 필름이 가지는 수분 특성을 접촉각 측정, 팽윤도 및 용해도 측정을 통해 확인하였다.

[0221] 3-1. 접촉각 측정

[0222] 제작된 바이오 필름의 습윤성은 접촉각 측정을 통해 평가를 실시하였다.

[0223] 슬라이드 글라스에 필름 (2 cm × 4 cm)를 부착하고, 필름 표면에 증류수 (4 μL)를 떨어뜨렸다. 접촉각 측정기 (Phoenix 300 Plus, Surface Electro Optics, Suwon, Korea)를 사용하여 접촉각을 측정하였으며, Surfaceware 8 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.

[0225] 3-2. 팽윤도 분석

[0226] 제작된 바이오 필름의 팽윤도는 다음과 같은 방법을 통해 측정되었다.

[0227] 미리 칭량된 필름을 증류수에 24시간 동안 침지한 후, 여과지를 이용해 과량의 물을 제거하고 무게를 재었다. 팽윤도는 하기 식 6에 따라 계산되었다.

[0228] <식 6>

$$[0229] \text{팽윤도(Swelling property, \%)} = \frac{S_w - D_w}{D_w}$$

[0230] S_w : 팽윤 후 무게

[0231] D_w : 초기 바이오 필름의 건조 무게

[0233] 3-3. 용해도 평가

[0234] 제작된 바이오 필름의 수분 용해도는 필름 (1 cm × 1 cm)을 오븐 (105℃, 24시간)에서 건조시킨 후 무게를 잰다 (초기 무게, W_1). 각각의 필름 조각을 증류수 (20 mL)에 담그고, 24시간 동안 진탕한 다음, 용해되지 않은 필름을 다시 건조 (105℃, 24시간)시키고 칭량하였다 (최종 무게, W_2). 수분 용해도는 하기 식 7과 같이 초기 무게와 최종 무게의 차이를 통해 계산되었다.

$$[0235] \text{수분 용해도 (Water solubility, \%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1}$$

[0236] W_1 : 초기 무게

[0237] W_2 : 최종 무게

[0239] 하기 표 13은 상기 바이오 필름의 수분 특성을 평가한 결과이다.

표 13

Conditions	Water solubility (%)	Swelling property (%)
Control	70.25±0.57 ^a	96.71±0.08 ^a
SSE 10%	66.50±0.87 ^b	84.38±0.91 ^b
SSE 20%	57.56±0.59 ^c	75.94±0.55 ^c
SSE 30%	48.99±0.30 ^d	70.70±0.06 ^d

- Values are expressed as Mean±SD
- Different letters indicate significant differences ($p<0.05$) according to Duncan's multiple range test
- SSE: *S. thunbergii* subcritical water extracts

[0240]

[0242]

상기 표 13 및 도 6을 참조하면, 기능성 소재가 첨가되지 않은 대조구 필름에서는 PVA의 높은 수용성 때문에 많은 필름이 물에 녹는 것을 확인할 수 있다. 하지만 지층이 추출물의 첨가 함량이 높아짐에 따라서 수분 용해도가 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 젤라틴과 PVA가 지층이에 포함된 페놀 화합물과 결합되어 소수성을 증가시키고 수분의 방출을 방지하는 것으로 확인된다.

[0243]

또한, 수분을 흡수하는 능력인 팽윤도에 있어서도 지층이 추출물을 첨가함에 따라 대조구 필름의 $96.71\pm0.08\%$ 에서 SSE 30% 첨가시 $70.70\pm0.06\%$ 로 감소하는 것으로 나타났다.

[0244]

마지막으로, 접촉각은 필름 표면의 친수성/소수성 정도를 확인할 수 있는 값으로, 대조구 필름의 경우는 $27.89\pm1.06^\circ$ 로 매우 높은 친수성을 가지고 있으나, 지층이 추출물을 첨가함에 따라 지속적으로 증가하여 30%의 지층이 추출물을 첨가하였을 때에는 $46.47\pm2.49^\circ$ 로 소수성이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 아임계 수 추출을 진행함에 따라 낮아지는 물의 유전상수를 통해 유기용매와 같은 성질을 띠는 아임계 수가 지층이에 함유되어 있는 다양한 소수성 물질을 추출함으로써 필름에 기능성과 함께 포장재로서의 수분에 대한 저항성을 높이는 것으로 확인된다.

[0246]

4. 열적 특성 평가

[0247]

제작된 바이오 필름의 열적 특성 평가를 위해서 열중량 분석(Thermogravimetric analysis, TGA)을 이용하였다. 열중량 분석의 경우 TG-DTA8122 (Rigaku, Japan)를 이용하여 $25\sim700^\circ\text{C}$ 의 온도를 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 로 승온하였으며, 질소가스를 $20\text{ mL}/\text{min}$ 의 유량으로 유지하여 분석하였다. 온도 증가에 따른 추출물 및 필름의 질량 감소를 통해 특정 온도 영역에서의 분해율을 확인하였다.

[0249]

도 7을 참조하면, TGA를 통해 지층이 추출물을 첨가한 PVA-젤라틴 바이오 필름이 가지는 열적 특성을 확인한 결과, 지층이 아임계 수 추출물의 경우 특정한 온도에서의 무게 감소대 없이 지속적인 중량의 감소가 이루어졌다. 최종 온도인 700°C 에서 초기 무게 대비 54.17% 의 최종 무게 감소가 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 지층이 추출물을 첨가한 필름의 경우에는 지층이 추출물을 첨가하지 않은 무첨가 PVA + 젤라틴 필름이 초기 무게 대비 88.97% 를, 지층이 추출물 10% 첨가 필름이 87.89% 를, 20% 첨가 필름이 86.44% 그리고 30% 첨가 필름이 84.10% 의 최종 무게 감소가 있는 것을 확인할 수 있었다. 지층이 추출물이 첨가됨에 따라서 필름의 무게 감소율도 감소하는 것으로 나타났지만 크게 유의적인 영향을 끼친다고 보기는 어려웠다.

[0251]

5. 항균 활성 평가

[0252]

식품 포장의 주 목적은 식품의 보호이기 때문에 외부에서 침투하는 빛, 산소 등을 막아주는 것이 1차 역할이지만 거기에 항균 기능을 더하게 된다면 유통기한의 상승, 불필요한 음식물 쓰레기 처리 비용의 감소 등으로 인해 엄청난 경제적 이익이 있을 것으로 여겨진다.

[0253] 지층이 아임계 수 추출물이 첨가된 바이오 필름의 항균활성은 그람 음성균인 *Escherichia coli* KCTC 2314와 그람 양성균인 *Bacillus cereus* ATCC 14579를 이용하여 그 항균 활성을 분석하였다.

[0254] 먼저 Muller Hinton 한천 20 mL을 멸균 페트리 접시에 붓고 굳힌 다음 각 박테리아 배양액을 도포한 후 1×1 cm로 자른 필름을 그 위에 올려 37°C에서 24시간 동안 배양하여 그 항균 활성을 파악하였다.

[0256] 도 8을 참조하면, 지층이 추출물을 첨가한 PVA-젤라틴 바이오 필름이 가지는 항균 활성을 분석한 결과, 먼저 지층이 추출물을 첨가하지 않은 대조구 필름은 녹색 원에 표시되어 있으며, 빨간색 원에 있는 각 지층이 추출물 필름과의 항균 활성을 비교하였다. PVA 대비 10%의 지층이 추출물을 첨가한 필름에서는 뚜렷한 항균 활성이 나타나지는 않았지만, 20 및 30% 첨가 추출물에서는 비록 지층이 추출물의 방출이 원 모양으로 되지 않아 정확한 억제 영역을 확인하기는 어렵지만, 확실한 항균 활성이 나타나는 것으로 확인되었다.

[0257] 이는 지층이 추출물에 들어 있는 페놀 화합물의 OH 그룹과 박테리아 세포막의 상호작용으로 인해 세포질의 막 불안정성을 유도하여 궁극적으로 세포의 사멸을 초래할 수 있는 것이다.

[0259] 6. 통계처리

[0260] 실험결과의 통계처리는 SPSS (statistical package for social science, version 25) 프로그램을 이용하여 결과에 대한 분산분석 후 평균 및 표준편차를 구하고, 항목들 간의 유의성 검정은 Post-hoc Duncan의 다중비교로 $p < 0.05$ 유의수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

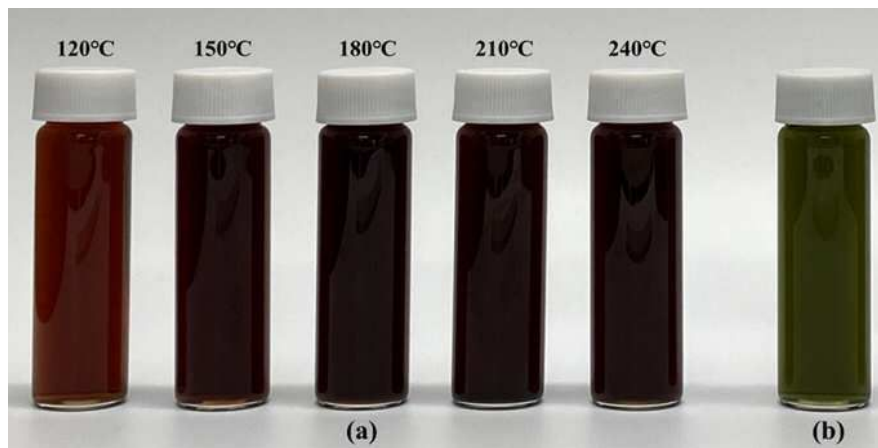
[0262] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

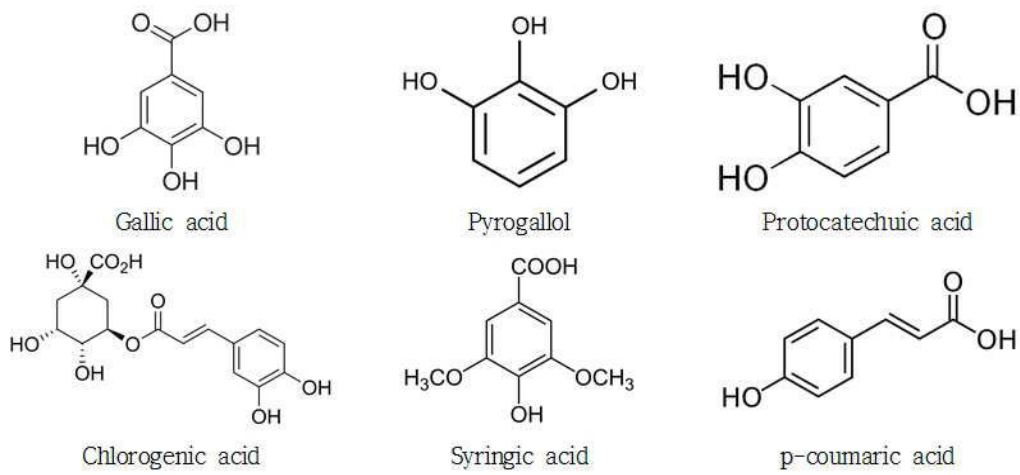
도면1



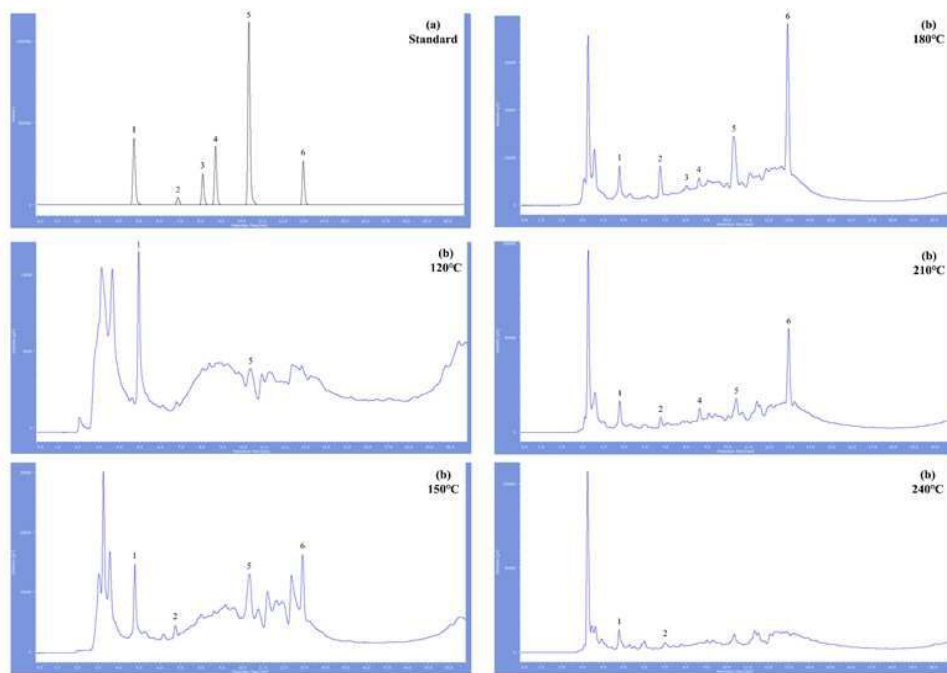
도면2



도면3



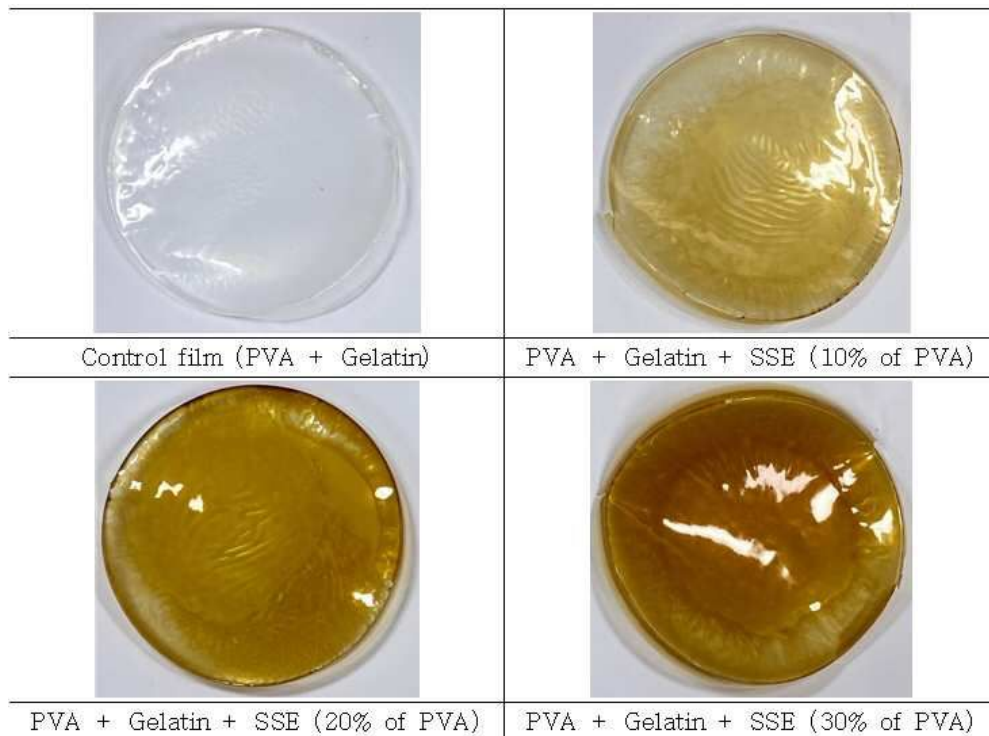
도면4



(a: Standard chromatograms, b: *S. thunbergii* subcritical water extracts)

1: Gallic acid 2: Pyrogallol 3: Protocatechuic acid 4: Chlorogenic acid 5: Syringic acid
6: p-coumaric acid

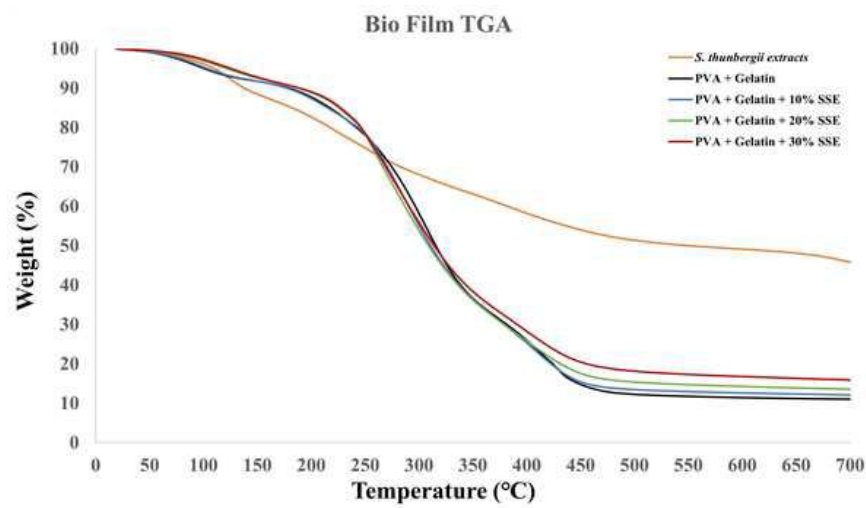
도면5



도면6

Control film (PVA + Gelatin)	PVA + Gelatin + SSE (10% of PVA)	PVA + Gelatin + SSE (20% of PVA)	PVA + Gelatin + SSE (30% of PVA)
			
27.89±1.06°	33.00±0.36°	39.37±1.08°	46.47±2.49°

도면7



도면8

