



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

큰열매모자반(*Sargassum macrocarpum*) 추출물의
나노에멀전 제조공정 최적화 및 안정성평가



2021년 2월

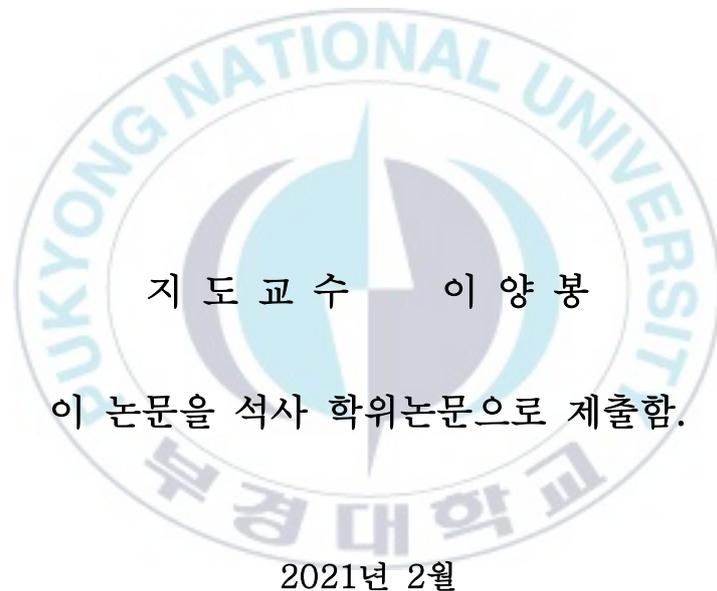
부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

고 지 윤

공 학 석 사 학 위 논 문

큰열매모자반(*Sargassum macrocarpum*) 추출물의
나노에멀전 제조공정 최적화 및 안정성평가



부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

고 지 윤

고지윤의 공학석사 학위논문을 인준함.

2021년 2월 19일



위원장 농학박사 김선봉 (인)

위원 농학박사 조승목 (인)

위원 농학박사 이양봉 (인)

목차

List of Figure	iv
List of Table	v
Abstract	vi
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	5
1. 실험재료.....	5
2. 실험방법.....	5
2.1. 나노에멀전 제조.....	5
2.2. 실험설계.....	6
2.3. 나노에멀전 물리적 특성.....	9
2.3.1. 입자크기 및 다분자지수(Polydispersity index).....	9
2.3.2. 제타전위(ζ -Potential).....	9
2.3.3. 미세구조 분석.....	9

2.4. 나노에멀전의 안정성 평가	10
2.4.1. 열처리에 따른 안정성 평가	10
2.4.2. 저장 안정성 평가	10
2.5. Sargahydroquinolic acid, sargachromenol와 sargaquinolic acid 함량 분석	10
2.6. 통계처리	12
Ⅲ. 결과 및 고찰	13
1. 반응표면의 적합성 판단	13
2. 반응표면분석	19
2.1. 입자크기	19
2.2. 다분자지수(Polydispersity index)	21
2.3. 제타전위 (ζ -Potential)	22
2.4. 최적 제조 조건 예측 및 검증	25
3. 미세구조 분석	27
4. MES-NE 안정성 평가	29

4.1. 열처리에 따른 안정성 평가.....	29
4.2. 저장 안정성 평가.....	33
4.3. Sargahydroquionicoic acid, sargachromenol와 sargaquinoic acid 함량 분석.....	38
IV. 결론.....	40
V. 참고문헌.....	41
VI. 감사의 글.....	52



List of Figure

Fig. 1.	The chemical structures of sargahydroquinic acid, sargaquinic acid and sargachromanol	4
Fig. 2.	Comparison of predicted and actual values plot for MES-NE manufacturing process	18
Fig. 3.	Response surface and contour plots of the physical properties of MES-NE. X_1 : Tween 80 concentration(% w/v), X_2 : Temperature ($^{\circ}$ C), X_3 : Stirring speed (rpm)	24
Fig. 4.	TEM image of an optimizes MES-NE showing some oil droplets in the nanometer range and particle distribution	28
Fig. 5.	Effect of thermal treatment (60, 100, 120 $^{\circ}$ C) on the particle size of MES-NE	30
Fig. 6.	Effect of thermal treatment (60, 100, 120 $^{\circ}$ C) on polydispersity index of MES-NE	31
Fig. 7.	Effect of thermal treatment (60, 100, 120 $^{\circ}$ C) on ζ -Potential of MES-NE	32
Fig. 8.	Changes in particle size of MES-NE stored for 28 days at 4 $^{\circ}$ C and 25 $^{\circ}$ C	35
Fig. 9.	Changes in polydispersity index of MES-NE stored for 28 days at 4 $^{\circ}$ C and 25 $^{\circ}$ C	36
Fig. 10.	Changes in ζ -Potential of MES-NE stored for 28 days at 4 $^{\circ}$ C and 25 $^{\circ}$ C	37

List of Table

Table 1.	Experimental range and values of the independent variables in the CCD for MES-NE manufacturing process	7
Table 2.	CCD for the optimization of MES-NE manufacturing process	8
Table 3.	Observed value of the response variable as a function of the independent variable in the CCD.....	15
Table 4.	Response surface model equation to optimize the effect of manufacturing conditions on physical properties of MES-NE	16
Table 5.	The ANOVA of response surface model equations for monitoring the effects of preparation conditions on the physical properties	17
Table 6.	Optimum values of process variables for the predicted and observed responses	26
Table 7.	Identification and quantification of three major antioxidants from MES-NE.....	39

Optimization and Stability Evaluation of Manufacturing Process of
Nanoemulsion Containing *Sargassum macrocarpum* Extracts

Ji Yun Ko

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University,
Busan 48513, Korea

Abstract

Sargassum macrocarpum, known as a kind of seaweed, contains lots of functional compounds. Especially, the functional compounds such as sargahydroquinic acid, sargachromanol, and sargaquinoic acid are difficult to apply to food and medicinal products because they exhibit fat-soluble properties. The objective of this study is to optimize nanoemulsion with the extracts of *Sargassum macrocarpum* and to evaluate the stabilities of the optimized nanoemulsion as environmental factors of heat treatments and storage temperatures. The optimization process was investigated by selecting several factors that affect nanoemulsion manufacturing. They are Tween 80 concentration, stirring temperature, and stirring speed. In the design of response surface methodology (RSM), independent variables were Tween 80 concentration (X_1 , 2.5–4.5%, w/v), stirring temperature (X_2 , 28–61 °C), and stirring speed (X_3 , 4,700–18,200rpm. Its dependent variables are particle size (Y_1 , nm), polydispersity index (Y_2), and ζ -Potential (Y_3 , mV). The optimal condition obtained through RSM is 2.62% Tween 80, 47.1 °C stirring temperature, and 10,927 rpm stirring speed. In stability tests of nanoemulsion on heat treatment at 60, 100, 120 °C, all the samples were relatively stable. The nanoemulsion samples during their storage at 4 °C and

25° C for 28 days show relatively good stability. Optimized process and stability test of the nanoemulsion containing extracts of *Sargassum macrocarpum* show a good Potential to apply it to functional food products and medicines.



I. 서론

경제성장과 더불어 생명공학 기술의 발달로 현재 평균 수명이 점차 증가하고 있으며, 그에 따라 노화 억제와 건강 유지와 같은 노년기 질환의 치료 또는 개선을 위한 기능성 생리활성물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[1]. 이러한 이유로 천연으로부터 유래된 기능성 물질에 주목을 받고 있으며 최근에 해양식물로부터 기능성 물질을 찾으려는 관심이 증가하고 있는 추세이다[2-4]. 특히 해조류는 육상식물과는 달리 빛이나 산화에 더 강한 저항성이 있으며 특이적인 생물학적 능력이 확인되고 있다[5]. 이와 같은 해조류의 유효 활성 성분을 추출하여 생리활성 물질이 확인되고 있으며, 기능성 성분에 대한 가공 및 개발로 확대 됨으로써 기능성 식품 및 의약품개발에 기여할 수 있다.

모자반과에 속하는 모자반속은 갈조류의 하나로 현재 400여종이 알려져 있으며 한국과 중국에서 약물로써 오랫동안 사용되어왔다[6]. 모자반은 한국 등 아시아지역을 광범위하게 서식하고 있지만[7], 식용으로 이용되지 않고 방치되고 있었다. 하지만 최근 활발한 연구를 통해 항균, 항산화, 항암, 항염증 활성을 지닌 기능성 물질이 다량 함유되어 있어 의약품 및 기능성 식품의 소재로 활용할 수 있는 가능성을 보이고 있다 [8-9]. 이러한 활성을 나타내는 성분은 주로 meroterpenoid 화합물이며 모자반속에 풍

부하게 함유되어있다. 그중 큰열매모자반에 Sargahydroquinoic acid (SHQA), Sargachromenol (SCM), Sargaquinoic acid (SQA)와 같은 meroterpenoid가 고농도로 함유되어 있으며, 주요 기능성 물질로 확인할 수 있다[10]. 하지만 이와 같은 성분은 불포화도가 높기 때문에 산화 반응에 민감하여 저장 및 유통 중에 변질이 쉽게 일어난다는 단점을 갖고 있다. 또한 긴 소수성 사슬로 인해 유기용매 및 오일에 녹는 용해되는 지용성 성질을 갖고 있어 이에 대한 활용이 미약한 실정이다. 지용성 생리활성 물질은 빛이나 열 등에 민감하고, 물에 대한 낮은 용해도 때문에 산업적 이용성이 낮은 실정이며 식품에서의 적용도 제한적이다[11]. 이러한 한계를 극복하기 위하여 식품가공 및 개발분야에서 나노기술이 사용되고 있으며 큰 관심을 받고 있다.

식품에서 나노기술을 접목시키면 식감, 맛, 가공성 및 저장성 등과 같은 안정성을 증진시킬 수 있다. 또한, 기능성화합물의 친수성 용해도, 열 안정성 및 생체 이용률을 개선할 수 있기 때문에 화장품 및 제약 산업 발달에 기여할 것으로 기대된다[12].

식품에 적용할 나노기술은 나노에멀전(Nanoemulsion)이며 기능성 유효 성분을 갖고 있는 친유성 화합물의 전달체로 작용할 수 있는 흥미로운 응용분야이다. 하지만 나노에멀전 제조 시에 다양한 매개변수들이 영향을 주기 때문에 모든 변수를 최적화하기 위한 기존 실험 설계에는 시간과 노력

이 많이 소비된다. 그리하여 나노에멀전 제조 공정의 효율을 증가시키기 위해 반응표면분석법 (Response Surface Methodology, RSM)을 활용하였다. 반응표면분석법은 여러 개의 변수가 복합적으로 작용할 때, 최적화를 통해 얻고자 하는 결과에 근거하여 최적점을 찾는 통계학적 방법 중 하나이다[13].

따라서 본 연구에서는 큰얼매모자반에 함유된 기능성 물질을 식품 소재로 활용하기 위해 반응표면분석법 중 중심합성계획모델(Central Composite Design Model, CCD)을 이용하여 안정성이 뛰어난 나노에멀전을 제조하고자 한다. 제조공정에서 Tween 80의 농도, 제조 온도, 균질화 속도를 변수로 설정하였으며, 이에 따른 나노에멀전의 입자크기, 다분자지수(Polydispersity index), 제타전위(ζ -Potential)을 모니터링하여 최적조건을 도출하였다. 최적 조건에서 예측값과 실제값을 비교하였으며, 외부요인에 의한 안정성 평가를 진행하여 식품 산업에 적용 가능성을 연구하고자 한다.

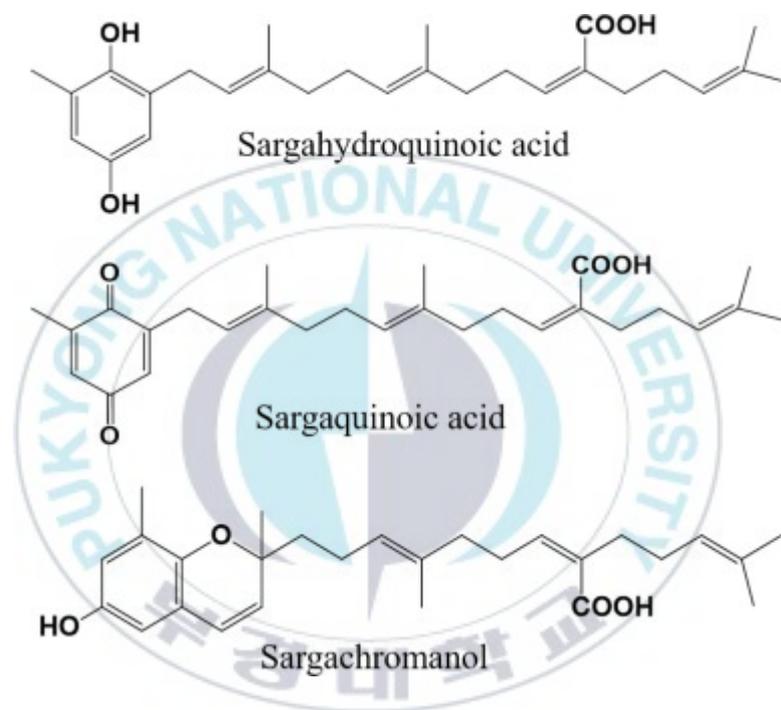


Fig. 1. The chemical structures of sargahydroquinoic acid, sargaquinoic acid and sargachromanol

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 큰열매모자반(*Sargassum macrocarpum*)은 부산 연안에서 채취하였다. 건조된 큰열매모자반은 Azam et al.(2017)의 연구에 따라 추출하였다. 70% Ethanol로 70℃에서 3시간 동안 추출하여 주정추출물(MES)을 얻은 후 사용하였다[14].

2. 실험방법

2.1. 나노에멀전 제조

Oil in water(O/W) 형태의 나노에멀전 제조하기 위해 aqueous phase, ethanol phase, oil phase를 혼합하였다. 먼저 MES 0.5g을 ethanol 2mL를 혼합하여 ethanol phase를 준비하였다. Oil phase는 MCT oil(1mL), Tween 80(2.0-4.0%, w/v)로 구성되어 있으며 aqueous phase는 10mM phosphate buffer(pH 7.4)를 사용하였다. 먼저 ethanol phase 와 oil phase를 vortexing 30초 동안 가하여 혼합하고 aqueous phase와 함께

water bath에 30분간 방치하였다. Water bath 내에서 aqueous phase에 Ultraturrax homogenizer(IKA, T18B, Werke, Germany)를 이용하여 균질화를 하고 있는 상태에서 ethanol phase와 oil phase의 혼합물을 피펫을 이용하여 한 방울씩 떨어트리 천천히 균일하게 분산시키는 방법으로 제조하였다(MES-NE).

2.2. 실험설계

나노에멀전 제조공정에 대한 독립변수의 영향을 알기 위해 반응표면분석법인 중심합성계획(Central Composite Design, CCD) 방법을 이용하여 실험을 설계하였다. 최적의 제조조건을 구하기 위해 세 가지 독립변수를 결정했다. 독립변수는 Tween 80 농도(X_1 , 2.0-4.5%, w/v), 온도 (X_2 , 28-62°C), 균질화 속도(X_3 , 4,800-18,200 rpm)로 설정하였으며, 이에 대한 종속 변수는 입자크기(Y_1 , nm), 다분자지수(Y_2), 제타전위(Y_3 , mV)를 설정하였다. 실험 범위에 따라 다섯 단계로 부호화하여 설계하여 Table 1 에 나타내었다. 본 연구는 8개의 factorial points, 6개의 axial points, 3개의 center points를 포함한 17개의 실험구를 설정하였다(Table 2).

Table 1. Experimental range and values of the independent variables in the CCD for MES–NE manufacturing process

Independent variables	Symbol	Level				
		-1.68	-1	0	+1	+1.68
Tween 80 Concentration (% _{w/v})	X_1	2.0	2.5	3.25	4.0	4.5
Temperature(°C)	X_2	28	35	45	55	62
Stirring Speeds(rpm)	X_3	4,800	7,500	11,500	15,500	18,200

Table 2. CCD for the optimization of MES–NE manufacturing process.

Run No.	Independent variables						
	Coded values			Uncoded values			
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	
Factorial portions	1	-1.00	-1.00	-1.00	2.5	35	7,500
	2	1.00	-1.00	-1.00	4.0	35	7,500
	3	-1.00	1.00	-1.00	2.5	55	7,500
	4	1.00	1.00	-1.00	4.0	55	7,500
	5	-1.00	-1.00	1.00	2.5	35	15,500
	6	1.00	-1.00	1.00	4.0	35	15,500
	7	-1.00	1.00	1.00	2.5	55	15,500
	8	1.00	1.00	1.00	4.0	55	15,500
Axial portions	9	-1.68	0.00	0.00	2.0	45	11,500
	10	1.68	0.00	0.00	4.5	45	11,500
	11	0.00	-1.68	0.00	3.25	28	11,500
	12	0.00	1.68	0.00	3.25	62	11,500
	13	0.00	0.00	-1.68	3.25	45	4,800
	14	0.00	0.00	1.68	3.25	45	18,200
Center points	15	0.00	0.00	0.00	3.25	45	11,500
	16	0.00	0.00	0.00	3.25	45	11,500
	17	0.00	0.00	0.00	3.25	45	11,500

X_1 : Tween 80 concentration(% w/v), X_2 : Temperature(°C), X_3 : Stirring speed(rpm).

2.3. 나노에멀전의 물리적 특성

2.3.1. 입자크기와 다분자지수 (Polydispersity index, PDI)

입자크기 및 Polydispersity (PDI)는 동적광산란법을 원리로 하는 Electrophoretic Light Scattering Spectrophotometer (ELS-8000, OTSUKA Electronics, Potal, Osaka, Japan)을 이용하여 측정하였다.

2.3.2. 제타전위 (ζ -Potential) 측정

제타전위는 zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK)을 이용하였으며, 시료는 희석하지 않고 Disposable folded capillary cells (DTS 1060)에 주입하여 25°C에서 측정하였다.

2.3.3. 미세구조 분석

최적화 조건으로 제조한 MES-NE의 입자 형태를 자세히 관찰하기 위해 Direct negative staining 방법으로 전처리를 하였다. 탄소로 코팅된 200-mesh 그리드에 시료를 한 방울 떨어뜨린 후 1% phosphotungstic acid로 음성 염색을 하였다. 1분간 방치한 후 여과지로 여액을 제거하고 상온에서 완전히 건조한 후 투과전자현미경 (Hitachi H-7500, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

2.4. 나노에멀전 안정성 평가

2.4.1. 열처리에 따른 안정성 평가

10mL의 MES-NE를 시험관에 옮겨 호일로 감싼 뒤 water bath(60℃)와 autoclave(100℃, 120℃)에 30분 동안 방치하였다. 입자크기, PDI와 제타전위의 변화를 분석하기 위해 상온에서 24시간 동안 방치한 후 측정하였다.

2.4.2. 저장 안정성 평가

MES-NE의 저장 안정성을 평가하기 위해 4℃와 25℃에서 4주 동안 저장하여 7일 간격으로 입자크기, PDI와 제타전위를 측정하였다.

2.5. Sargahydroquinoic acid, sargachromenol와 Sargaquinoic acid 함량 분석

MES-NE 내의 meroterpenoid 화합물인 Sargahydroquinoic acid(SHQA), sargachromenol(SCM)와 argaquinoic acid(SQA) 함량을 분석하기 위해 고성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석하기 전에 MES-NE로부터 SHQA, SCM과 SQA를 추출하기 위해 Shu et al.(2016)의 방법을 통해 전처리를 하였다[15]. MES-NE 0.2mL와 ethanol 3.8mL

를 2분간 vortexing 하여 혼합했다. 그 후 ultrasonication (VC100, Sonics and Materials, CT, USA)을 이용하여 20분 동안 추출하였다. 그 후 30분 동안 상온에서 방치한 후 membrane filter(Pore size 0.2 μ m)를 사용하여 여과를 한 후 Lim et al.(2017) 조건에 따라 HPLC 분석을 진행하였다. Pump(Shimadzu LC-6AD), photodiode array detector(PAD-detector, Shimadzu SPD-M20A), online degasser (Shimadzu DUG-20A3), auto sampler(SIL-20A), system controller(CBM-20A)와 Shimadzu LC solution(ver. 1.22sp)가 장착된 HPLC를 이용하여 MES-NE를 분석하였다. Phenomenex Luna RP-18 (2) column [Luna C18(2), 3 μ m particle size, 150 \times 3.0 mm I.D.]를 이용하여 성분을 분리하였다. 크로마토그래피의 이동상 A 용액은 0.1% formic acid가 함유된 메탄올이 사용되었고, B 용액은 0.1% formic acid 수용액을 사용하였다. A/B(90/10) - A/B(94/6)의 농도로 33분간, A/B(94/6) - A/B(100/0)의 농도로 2분간, A/B (100/0)으로 10분간 세척한 후에 A/B(90/10)의 농도로 10분간 칼럼을 평형화하였다. 유속은 0.34ml/min으로 진행하였고, 270nm에서 피크를 확인하였다. 각 화합물은 retention time으로 확인하였으며, 화합물의 함량은 linear regression equation을 이용해 계산하였다[16].

2.6. 통계처리

나노에멀전 제조의 최적 조건 확립을 위한 3개의 변수에 대한 2차 회귀방정식은 다음과 같다 (1).

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

Y는 예측된 종속변수, X_i 는 독립변수, β_0 는 상수, β_i , β_{ii} , β_{ij} 는 회귀계수이다. Design Expert 9.0 software (Stat-Ease, Minneapolis, USA)을 통해 다음 식(1)과 같이 이차 회귀모형으로 가정하여 반응변수의 곡면을 나타낼 수 있었다[17]. 종속변수에 대한 목표값을 최솟값으로 설정하여 MES를 함유한 나노에멀전 제조의 최적 조건 예측하였으며, 각 인자에 대한 종속변수의 반응표면 값을 3차원 그래프로 나타낼 수 있었다[18]. 실험은 3회 반복 측정하였으며 평균값을 회귀분석에 대한 모델식을 예측하여 이에 대한 결과를 바탕으로 MES를 함유한 나노에멀전 제조 조건의 최적화 조건을 결정하였다. 실험 결과의 통계적 유의성($P < 0.05$)은 ANOVA 분석으로 검증하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 반응표면의 적합성 판단

본 연구에서 MES를 함유한 나노에멀전 제조 공정의 최적화 조건을 설정하기 위해 Tween 80 농도(X_1 , 2.0–4.5%, w/v), 온도(X_2 , 28–62°C), 균질화 속도(X_3 , 4,800–18,200 rpm)를 독립변수로 설정하여 실험을 진행하였다. Central composite design에 의해 설계된 제조 조건에 따라 수행한 결과로 종속변수인 입자크기 (Y_1 , nm), 다분자지수(Y_2), 제타전위(Y_3 , mV)의 결과는 다음과 같다(Table 3). 17개의 회귀분석을 통해서 얻어진 독립변수와 종속변수 사이의 상관관계를 2차 회귀방정식과 이에 대한 결정계수(R^2)는 Table 4에 나타내었다. 도출한 2차 회귀방정식들의 결정계수(R^2)는 모든 독립변수에 대해 1에 가까운 값이므로 독립변수와 종속변수 사이의 관계가 신뢰할 만한 수준임을 알 수 있다. CCD로부터 도출된 모델의 적합성을 판단하기 위한 ANOVA(Analysis of variance analysis) 결과를 Table 5에 나타내었다. P -value 값은 다항 방정식의 각 회귀 계수에 대한 유의성을 검증하며 0.05보다 작으면 실험은 타당한 것으로 판단한다[19]. Table 5에서 모델의 종속변수에 대한 P -value 값은 각 0.007(Y_1), 0.0009(Y_2),

0.0016(Y_3)으로 유의수준 0.05보다 낮으므로 유의성이 인정되었다. 일차항, 교차항 및 이차항에 대한 유의성을 판단해본 결과, 입자크기(Y_1)의 경우 일차항(X_1, X_2), 교차항(X_1X_2), 이차항 (X_1^2, X_3^2)이 인정되었으며, 다분자지수(Y_2)의 경우 일차항(X_1, X_2), 교차항(X_1X_2), 이차항(X_1^2, X_2^2)이 인정되었다. 제타전위(Y_3)의 경우 일차항(X_1), 교차항(X_1X_3) 이차항 (X_1^2, X_2^2, X_3^2)이 5% 이내에서 유의성을 나타내었다. 모델의 적합성을 판단하는 적합성 결여 검증(lack of fit) [20]은 종속변수 Y_1, Y_3 의 P -value 값이 0.05보다 작으므로 유의수준 5% 이내에서 회귀 모델은 입자크기(Y_1) 및 제타전위(Y_3)에 대한 예측에 부적합하였으며, Y_2 의 P -value 값은 0.0869로 유의수준 5%이내에서 회귀 모델은 다분자지수(Y_2)에 대한 예측에 적합하였다.

예측된 모델과 실제 결과값에 대한 적합성은 Fig.2 에 나타내었다. Fig. 2에서 나타난 것과 같이 예측값을 나타내는 선과 실제값이 근접한 것으로 보아 비교적 일치한다는 것으로 나타났다. 도출된 방정식 및 최적화 모델을 통해 큰열매모자반 추출물을 함유한 나노에멀전(MES-NE)의 제조공정을 최적화하는데 적합한 것으로 판단된다.

Table 3. Observed value of the response variable as a function of the independent variable in the CCD.

Run No,	Independent variables			Dependent variables			
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	
Factorial portions	1	2.5	35	7,500	161.8	0.31	-20.1
	2	4.0	35	7,500	207.1	0.65	-13.2
	3	2.5	55	7,500	45.6	0.31	-17.7
	4	4.0	55	7,500	218.5	0.51	-13.4
	5	2.5	35	15,500	177.4	0.33	-17.6
	6	4.0	35	15,500	190.5	0.64	-14.6
	7	2.5	55	15,500	44.4	0.31	-17.2
	8	4.0	55	15,500	161.3	0.44	-14.0
Axial portions	9	2.0	45	11,500	135.5	0.37	-18.7
	10	4.5	45	11,500	298.7	0.67	-13.3
	11	3.25	28	11,500	68.3	0.62	-17.1
	12	3.25	62	11,500	67.1	0.31	-15.8
	13	3.25	45	4,800	213.2	0.29	-14.6
	14	3.25	45	18,200	139.6	0.38	-17.1
Center points	15	3.25	45	11,500	43.6	0.35	-18.4
	16	3.25	45	11,500	41	0.37	-18.1
	17	3.25	45	11,500	43.7	0.38	-18.2

X_1 : Tween 80 concentration(% w/v), X_2 : Temperature($^{\circ}$ C), X_3 : Stirring speed(rpm).

Y_1 : Particle size(nm), Y_2 : Polydispersity Index, Y_3 : ζ -Potential(mV).

Table 4. Response surface model equation to optimize the effect of manufacturing conditions on physical properties of MES-NE.

Quadratic polynomial model equations	R^2
$Y_1 = 44.75 + 45.75X_1 - 19.85X_2 - 12.95X_3 + 60.11X_1^2 + 5.31X_2^2 + 44.40X_3^2 + 28.93X_1X_2 - 11.02X_1X_3 - 7.18X_2X_3$	0.954
$Y_2 = 0.37 + 0.11X_1 - 0.063X_2 - 0.0066X_3 + 0.054X_1^2 + 0.034X_2^2 - 0.013X_3^2 - 0.040X_1X_2 - 0.012X_1X_3 - 0.01X_2X_3$	0.950
$Y_3 = -18.24 + 1.95X_1 + 0.42X_2 - 0.23X_3 + 0.80X_1^2 + 0.65X_2^2 + 0.83X_3^2 - 0.30X_1X_2 - 0.62X_1X_3 - 0.154X_2X_3$	0.941

X_1 : Tween 80 concentration (% w/v), X_2 : Temperature (°C), X_3 : Stirring speed (rpm).

Y_1 : Particle size (mm), Y_2 : Polydispersity Index, Y_3 : ζ -Potential(mV).

Table 5. ANOVA of response surface model equations for monitoring the effects of preparation conditions on the physical properties

Source	Y ₁			Y ₂			Y ₃		
	SS	F-value	P-value	SS	F-value	P-value	SS	F-value	P-value
Model	97346.5	15.94	0.0007	0.28	14.81	0.0009	70.88	12.45	0.0016
X ₁	28375.7	41.83	0.0003	0.16	76.01	<0.0001	51.42	81.25	<0.0001
X ₂	5279.4	7.78	0.0269	0.054	25.38	0.0015	2.41	3.80	0.0922
X ₃	2297.6	3.39	0.1083	0.0006	0.28	0.6145	0.70	1.11	0.3273
X ₁ X ₂	6693.3	9.87	0.0164	0.013	6.02	0.0439	0.72	1.14	0.3215
X ₁ X ₃	972.4	1.43	0.2702	0.0012	0.59	0.4683	3.12	4.94	0.0617
X ₂ X ₃	411.8	0.61	0.4614	0.0008	0.38	0.5590	0.18	0.28	0.6103
X ₁ ²	39782.2	58.65	0.0001	0.032	14.89	0.0062	6.96	11.00	0.0128
X ₂ ²	301.18	0.44	0.5265	0.013	5.90	0.0455	4.54	7.17	0.0317
X ₃ ²	22630.8	33.36	0.0007	0.0018	0.88	0.3795	7.95	12.56	0.0094
Lack of fit	4743.76	404.87	0.0025	0.014	12.35	0.0766	4.38	37.57	0.0261

SS(Sum of square)

X₁: Tween 80 concentration(% w/v), X₂: Temperature(°C), X₃: Stirring speed(rpm).

Y₁: Particle size (nm), Y₂: Polydispersity Index, Y₃: ζ -Potential(mV).

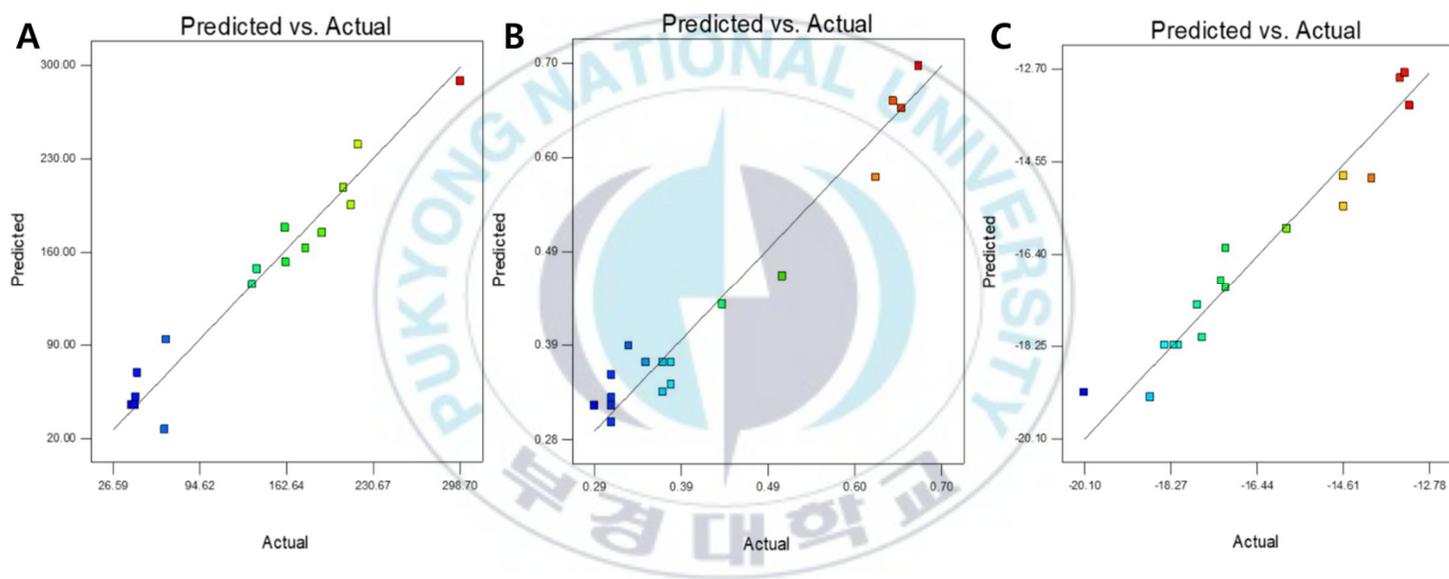


Fig. 2. Comparison of predicted and actual values plot for MES-NE manufacturing process

A: Particle size(nm), B: Polydispersity Index, C: ζ -Potential(mV)

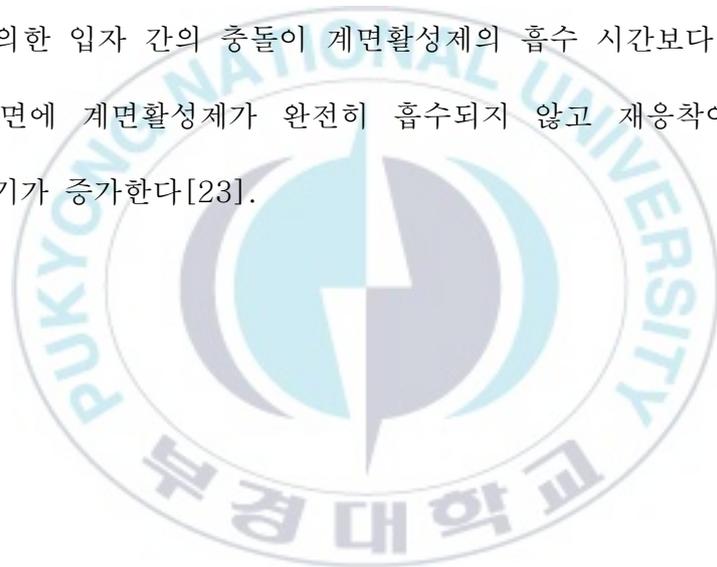
2. 반응표면분석

2.1. 입자 크기

입자크기는 나노에멀전에서 중요한 매개 변수이다. 입자가 작을수록 나노에멀전의 안정성을 증진시킬 수 있으며, 생체 이용성을 향상시킬 수 있다. 독립변수에 대한 MES-NE의 입자크기에 대한 3차원 반응 표면의 그래프는 Fig. 3A와 같이 나타났다. 먼저 Tween 80의 농도와 온도에 따른 MES-NE의 입자크기 변화에서 온도가 점차 증가할수록 입자 크기가 감소하는 것을 볼 수 있으며, Tween 80 농도에선 3.25% 보다 적거나 많을수록 입자 크기가 증가하는 것을 볼 수 있다. 이전 연구결과와 비슷한 경향을 보였다[21]. 온도가 증가함에 따라 유상의 계면장력과 점도가 감소하여 유상이 수상 안에 분산이 원활하게 되어 입도의 크기가 점차 감소하는 것을 알 수 있었다. 친수성과 친유성의 구조를 갖고 있는 계면활성제는 유상과 수상 사이의 계면장력을 약하게 하여 두 상을 연결하는 역할을 한다. 이로 인해 나노에멀전의 형성을 위한 자유에너지를 감소시킨다. 이는 Tween 80의 농도가 증가할수록 입자의 크기를 감소시킬 수 있는 것을 알 수 있다[22].

Tween 80의 농도와 균질화 속도에 따른 입자크기의 변화는 Tween 80의 함량 증가에 따라 입자크기가 감소하며 3.25% 수준에서 증가할수록

입자크기가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 균질화의 속도가 증가할수록 입자크기가 감소하지만 11,500rpm 보다 속도가 클수록 입자크기가 점차 증가하였다. 이는 이전 연구에서도 볼 수 있었다[23]. 이는 MES-NE를 제조할 때 과도한 처리로 인해 일정 수준보다 증가할수록 입자크기도 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는 입자 파괴와 입자 결합의 두개의 반대되는 공정들 간의 경쟁에 의해 새로운 입자가 생성된다. 균질화에 의한 입자 간의 충돌이 계면활성제의 흡수 시간보다 짧으며, 새 입자의 계면에 계면활성제가 완전히 흡수되지 않고 재응착이 발생하여 입자의 크기가 증가한다[23].



2.2. 다분자지수(Polydispersity index)

입자의 분산정도를 나타내는 PDI의 범위는 0에서 1사이의 값으로 나타낸다. PDI가 0.00~0.08인 경우에 단분산성, 0.7~1.0일 경우에는 다분산성을 나타낸다. Fig. 3B와 같이 PDI는 0.29~0.67값을 나타냈다.

Fig. 3B에서 Tween 80 농도가 PDI에 영향을 주는 것으로 나타났다. Tween 80 농도가 증가할수록 PDI의 값도 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는 계면활성제가 MES의 입자를 충분히 덮었음에도 불구하고 남아있는 계면활성제에 의해 점도가 높아져 유화 효율을 감소시키기 때문이다. 그 결과 입자의 크기를 더 크게 만들게 되며, 입자 크기의 분포를 증가시켜 PDI의 값이 높은 값으로 나타나게 된다[24].

온도와 균질화 속도의 따른 PDI의 변화는 균질화의 속도가 증가할수록 PDI의 값도 증가하였다. 균질화의 기계적인 응력은 입자의 응집체 형성을 촉진시켜 더욱 큰 입자가 발생하고 이에 따라 PDI가 증가할 수 있으며, 균질화 처리 과정에서 온도가 상승하여 이 현상이 더욱 활발하게 일어날 수 있다[26]. 온도가 감소할수록 PDI의 값도 감소하는 결과는 다음 연구 결과에서도 볼 수 있었다[27]. 이 연구에 따르면 Tween 80은 온도에 크게 의존한다는 사실을 확인할 수 있다. 온도가 증가할수록 Tween 80의 용해도가 증가하여 유상에서 용해가 더 잘 된다. 하지만 고온에서 Tween 80의 친수성 부분인 머리-그룹은 온도가 상승함에 따라 탈수가 진행되어

수성에서의 용해도가 감소하여 유상-수상 계면에서 Tween 80이 빠져나가 입자 사이의 응집이 발생한다[27].

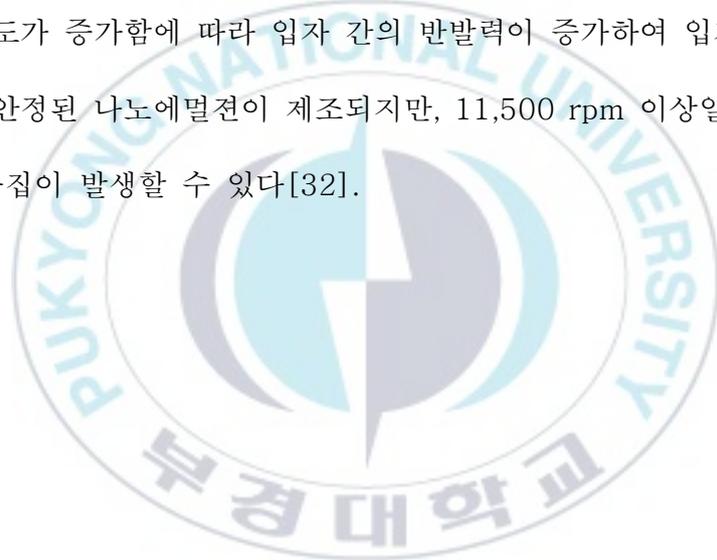
2.3. 제타전위 (ζ -Potential)

입자 표면에 전하가 존재하는데 이 전하에 의해 입자 사이의 반발이 발생하며 반발 정도를 양수 또는 음수 값의 지표로 나타내는 것을 제타전위라고 한다. 이에 대한 제타전위는 나노에멀전 입자의 안정성 평가할 때 판단하는 물리적 특성으로, 콜로이드 입자가 전기적으로 안정한 지 예측할 수 있다. Tween 80과 같은 비이온성 계면활성제는 제타전위가 음전하로 띄게 되며[28] 낮은 제타전위임에도 불구하고 유화를 안정적으로 유지하는 경향을 나타낸다[29]. 본 실험에선 MES-NE의 제타전위는 $-20.1 \sim -13.1\text{mV}$ 를 나타냈다.

Tween80 농도와 온도의 변화에 따른 제타전위의 변화를 Fig. 3C에서 볼 수 있다. Tween 80 농도가 증가할수록 제타전위의 절댓값이 감소하는 것을 볼 수 있다. 이는 Ahmad et al.(2020) 연구 결과와 유사하다[30]. MCT 오일량에 비해 다량의 계면활성제를 사용할 경우 여분의 계면활성제에 의해 나노에멀전의 안정성을 방해하는 마이셀(micelle)이 생성되어 나노에멀전의 전체적인 전하를 감소시킬 수 있기 때문에 이와 같은 경향을 볼 수 있다[30]. 온도가 증가함에 따라 입자 표면의 전하가 바뀌게 되면

서 입자 내 생체 활성 성분의 분해가 발생할 수 있게 되어 제타전위의 절댓값이 감소한다[31].

균질화 속도와 Tween 80 농도 및 온도와의 상호작용에 따른 제타전위는 균질화 속도가 7,500 rpm보다 증가할수록 제타전위의 절댓값은 점차 증가하는 것을 볼 수 있으며, 11,500rpm에서 다시 감소하는 것을 볼 수 있다. 이는 Ryu et al.(2018)의 연구 결과와 비슷한 경향을 나타냈다[32]. 균질화 속도가 증가함에 따라 입자 간의 반발력이 증가하여 입자가 골고루 분산되어 안정된 나노에멀전이 제조되지만, 11,500 rpm 이상일 경우 입자들 간의 응집이 발생할 수 있다[32].



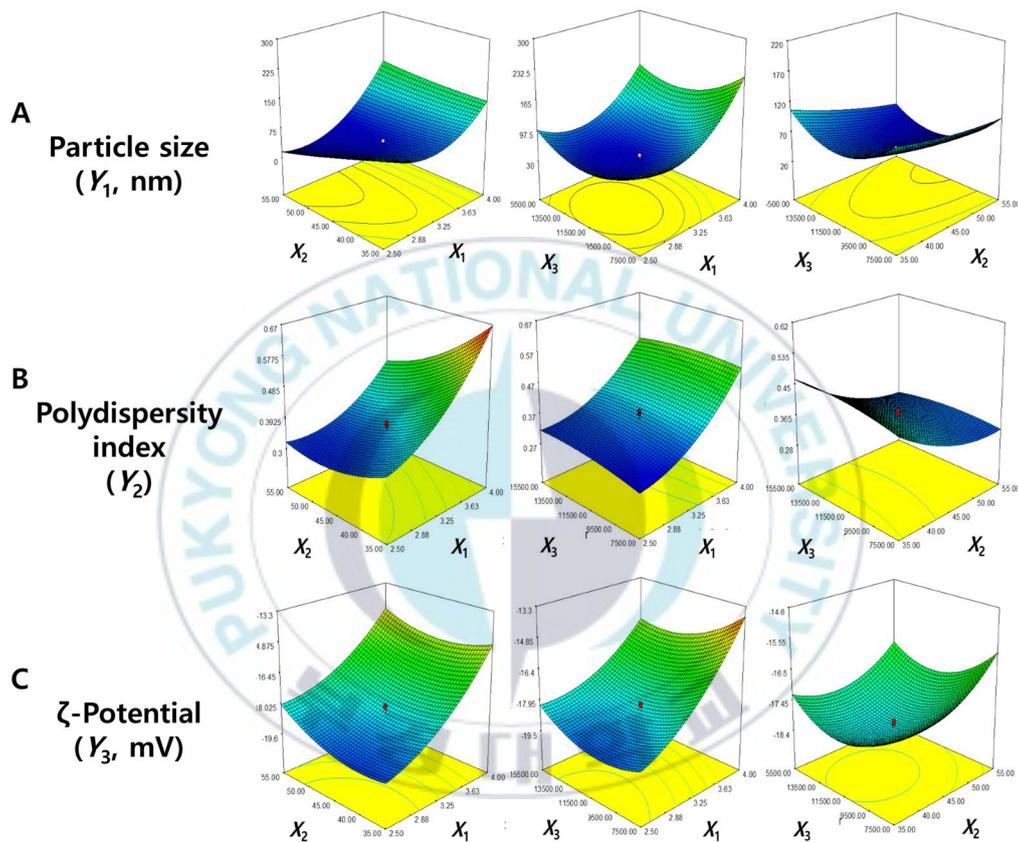


Fig. 3. Response surface and contour plots of the physical properties of MES-NE. X_1 : Tween 80 concentration(% w/v), X_2 : Temperature($^{\circ}$ C), X_3 : Stirring speed(rpm).

2.4. 최적 제조 조건 예측 및 검증

나노에멀전의 제조 조건에 영향을 미치는 독립변수는 Design-Expert 9.0 software(Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA)을 사용하여 최적 조건을 얻었으며, 이에 따른 예측된 결과값은 Table 6과 같다. RSM을 통해 얻어진 최적 조건 Tween 80 농도 2.62%, 온도 47.1°C, 균질화 속도 10,927 rpm에서 실험을 수행 하에 예측된 결과값은 입자크기 41.0nm, PDI 0.30, 제타전위 -19.2mV이다. 실험을 수행한 결과 입자크기, PDI, 제타전위가 각각 $41.2 \pm 0.92\text{nm}$, 0.30 ± 0.02 , $-19.5 \pm 0.27\text{mV}$ 인 MES-NE를 얻을 수 있었다.

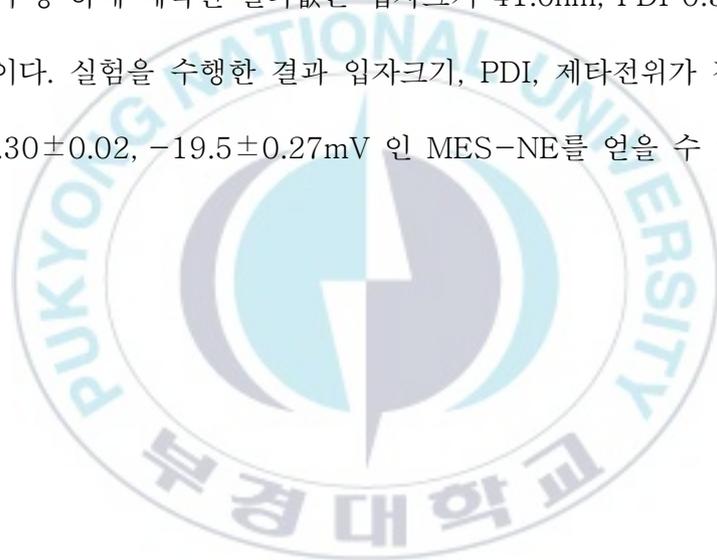


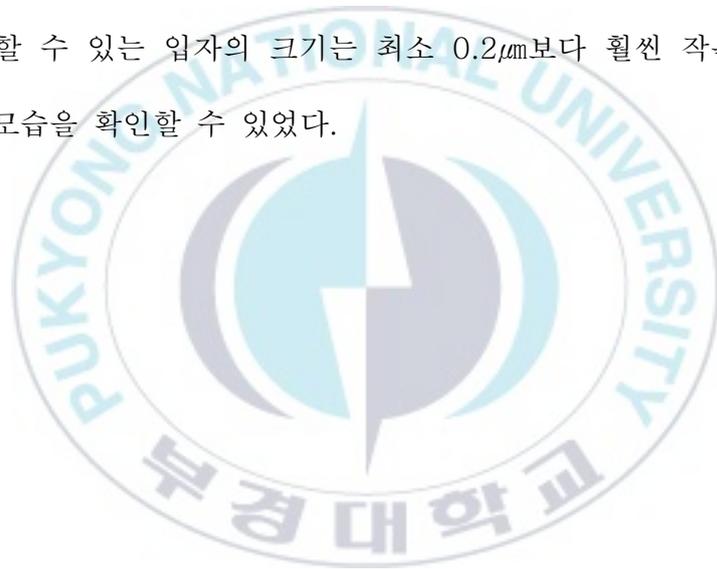
Table 6. Optimum values of process variables for the predicted and observed responses.

	Particle size (Y_1 , nm)	PDI (Y_2)	ζ - Potential (Y_2 , mv)
Predicted values	41.0	0.30	-19.2
Experimental values	41.2 ± 0.92	0.30 ± 0.02	-19.5 ± 0.27

Optimum conditions: Tween 80 Concentration = 2.62 %, w/v; Temperature = 47.1 ° C; Stirring speed = 10,927rpm.

3. 미세구조 분석

MES-NE의 입자 형태 및 분포는 투과전현미경(TEM)을 통해 관찰하였다. Fig. 4와 같이 입자의 형태는 표면이 매끈한 구형의 형태와 이중구조를 구성하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 입자크기를 확인한 결과 43.5nm이었으며 이와 함께 입자크기의 분포도를 확인하였다. TEM을 통해서 확인할 수 있는 입자의 크기는 최소 $0.2\mu\text{m}$ 보다 훨씬 작은 입자들의 분포하는 모습을 확인할 수 있었다.



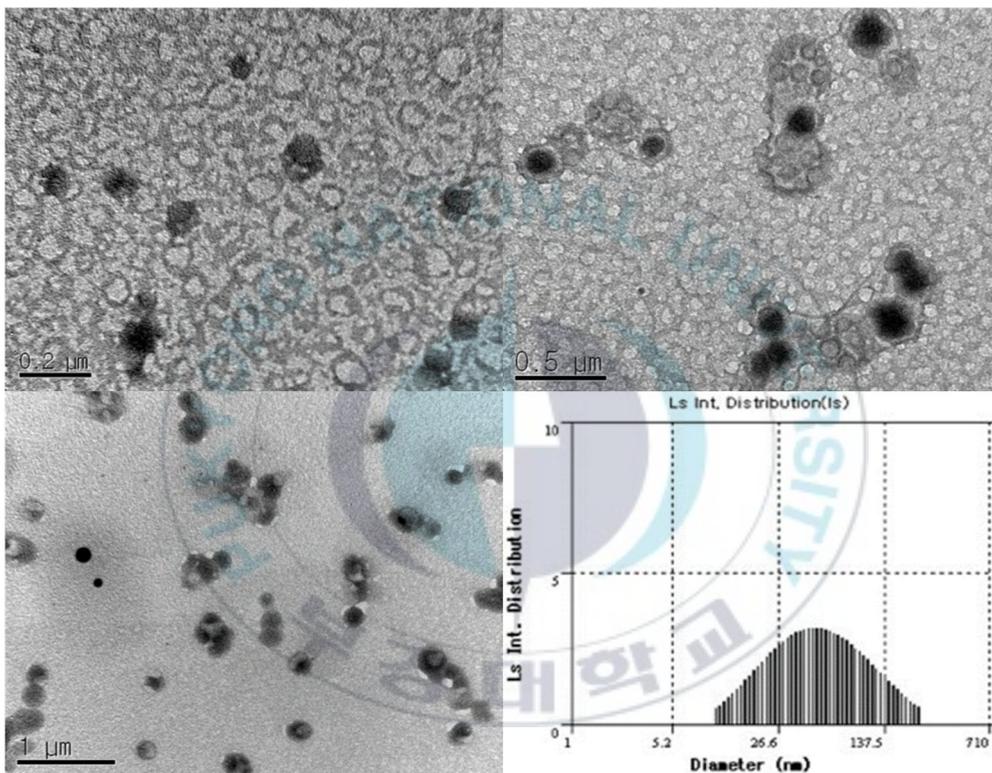


Fig. 4. TEM image of an optimized MES-NE showing some oil droplets in the nanometer range and particle distribution.

4. MES-NE 안정성 평가

4.1. 열처리에 따른 안정성 평가

MES-NE의 고온에서의 안정성을 보기 위해 60℃, 100℃와 120℃에서 30분 동안 가열하였다. 열처리된 MES-NE의 물리적 특성을 보기 위해 24시간 동안 실온에서 방치한 후 입자크기, PDI 및 제타전위를 측정하였다(Fig. 5-7). 온도가 증가할수록 입자크기, PDI와 제타전위의 절댓값이 감소하는 경향을 나타냈다. 입자크기와 PDI의 결과는 Shao et al.(2018)와 결과가 유사한 것을 볼 수 있다[33]. 입자크기와 PDI가 낮은 수준으로 나타내어 열처리 후에 입자가 좁은 범위 내에 분포되었음을 알 수 있다.

Iqbal et al.(2020)와 연구와 같이 MES-NE의 제타전위의 절댓값은 19.5mV에서 14mV으로 감소하는 것을 볼 수 있다[34]. 이는 높은 온도에 의해 계면 층이 약해져 계면에 존재한 이온이 방출하여 입자 계면의 불안정으로 이어졌다[34]. 그러나 제타전위의 절댓값이 낮은 값임에도 불구하고 열처리를 한 후의 MES-NE는 모두 투명한 상태를 유지하였으며, 층 분리, 크리밍(Creaming)과 같은 현상이 발생하지 않았으며 이를 통해 식품 가열 가공 공정 중에도 MES-NE가 안정적으로 존재할 수 있다는 결과를 도출할 수 있었다.

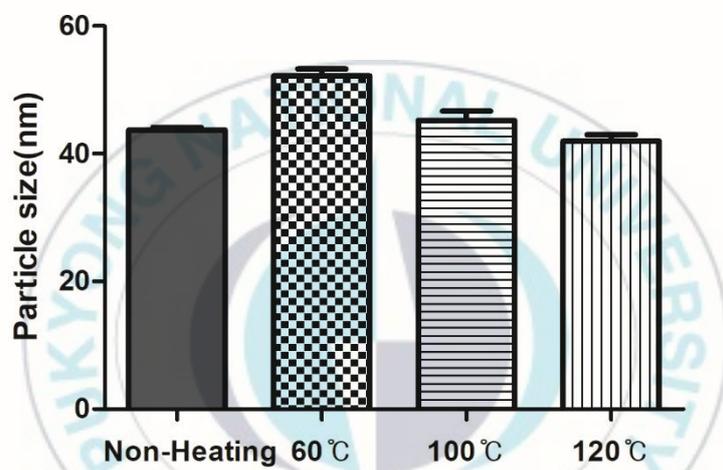


Fig. 5. Effect of thermal treatment (60, 100, 120°C) on the particle size of MES-NE

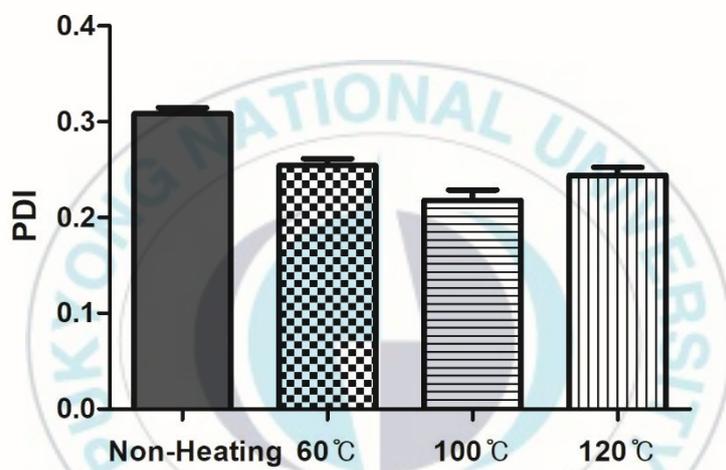


Fig. 6. Effect of thermal treatment (60, 100, 120°C) on polydispersity index(PDI) of MES-NE

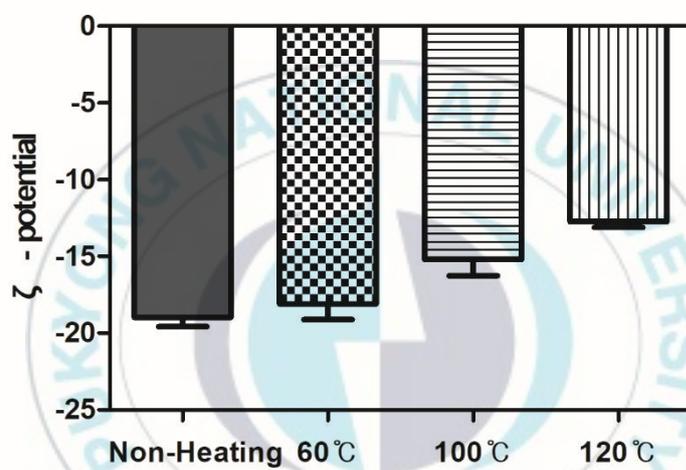


Fig. 7. Effect of thermal treatment (60, 100, 120°C) on ζ -Potential of MES-NE

4.2. 저장 안정성 평가

에멀전의 경우 열역학적으로 불안정하여 외부 요인에 의한 환경 조건에도 쉽게 불안정화될 수 있다[35]. 고온 등과 같은 영향에 의해 입자 간의 브라운운동이 가속화되어 침강 (sedimentation), 크리밍 (creaming), 응집 (aggregation) 이 발생할 수 있기 때문에[36] 실제 산업분야에서 나노에멀전은 저장 및 유통 중에 물리적으로 안정적으로 유지되는 것이 매우 중요하다. 그리하여 MES-NE 의 물리적 안정성을 평가하기 위해 4°C와 25°C에서 28 일 동안 관찰하였으며(Fig. 8-10) Nejadmansouri et al.(2016)와 Ryu et al.(2018)의 연구의 결과와 유사한 경향을 나타냈다[37-38].

MES-NE 의 입자는 두 온도에서 크기가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 4°C에서 저장한 시료는 점차 증가하는 경향을 나타냈지만 25°C에 보관한 시료는 14 일부터 급격하게 증가했다. 이는 4°C보다 높은 온도에서 입자 사이의 강한 상호작용에 의해 입자끼리 응집되어 입자 크기의 증가를 초래할 수 있다[38]. 또한 Tween 80 같은 비이온성계면활성제의 polyoxyethylene head groups 이 높은 저장 온도에서 탈수되어 계면활성제의 단층의 최적 곡률을 변경하여 입체적 반발 범위를 감소시킨다[39]. 하지만 저장 중에 입자크기가 증가했음에도 불구하고

외관으로 관찰했을 때 상 분리 및 크리밍 현상이 나타나지 않았다. 이는 식품, 의약품 및 화장품 산업에선 사용되는 나노에멀전의 크기는 50~500nm 의 범위를 갖고 있기 때문에[40] MES-NE 는 산업에 적용할 수 있음을 알 수 있으며 저장 및 유통과정 중에서 안정하게 존재할 수 있다는 것을 판단할 수 있다.



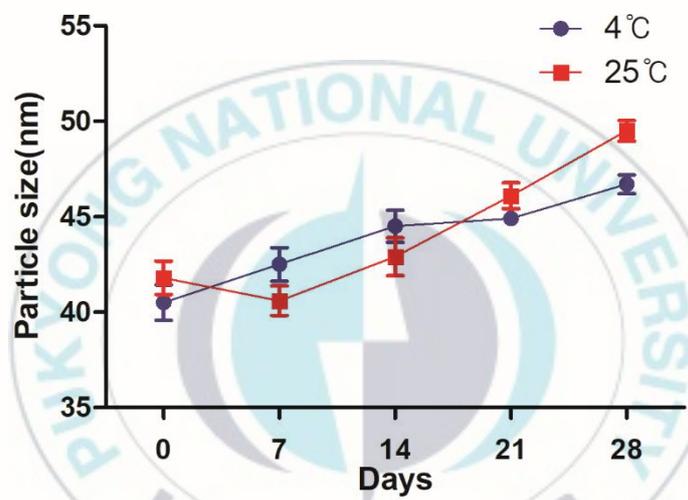


Fig. 8. Changes in particle size of MES-NE stored for 28 days at 4°C and 25°C

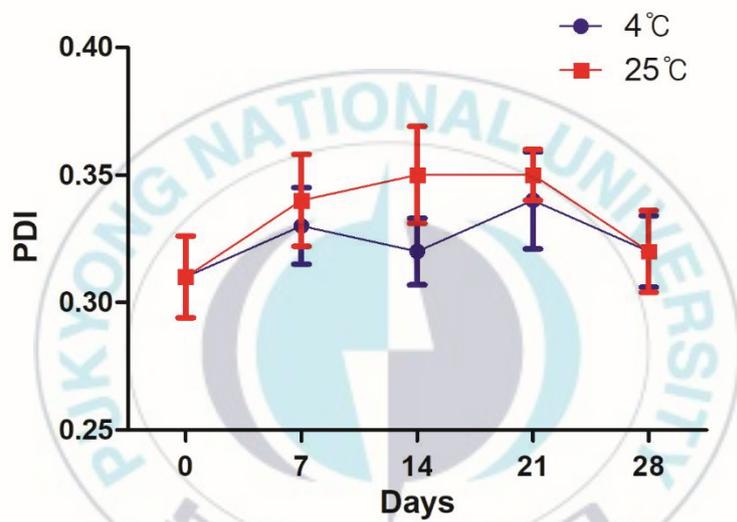


Fig. 9. Changes in polydispersity index of MES-NE stored for 28 days at 4°C and 25°C

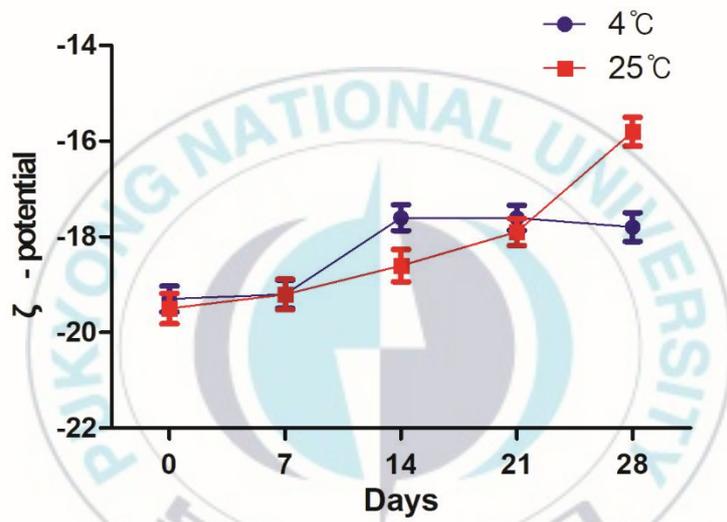


Fig. 10. Changes in ζ -Potential of MES-NE stored for 28 days at 4°C and 25°C

5. Sargahydroquinoic acid, sargachromenol와

Sargaquinoic acid 함량 분석

MES-NE 내 함유된 기능성 물질인 Sargahydroquinoic acid(SHQA), sargachromenol(SCM)와 Sargaquinoic acid(SQA) 함량을 분석하기 위해 HPLC 를 이용하였다. 3 가지의 화합물의 함량은 다음 Table 7 과 같다. 세 가지의 총 함량은 338 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 인 것을 확인하였으며 다량의 활성 성분을 함유하고 있음을 나타냈다. MES-NE 내 SHQA 는 24 $\mu\text{g}/\text{mg}$, SCM 은 214 $\mu\text{g}/\text{mg}$, SQA 는 101 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 가 함유되어 있음을 확인하였다. SCM 은 광노화 억제 (anti-photoaging), 신경 생성 촉진 (neurogenesis-promoting)과 같은 활성이 보고되었다[41-42]. 큰열매모자반에서 분리된 SQA 는 강한 항염증을 나타내는 것을 보고되었으며[43-44], 잔가시모자반의 SHQA 는 뇌 기저동맥의 확장을 유도하여 대뇌의 혈액 흐름을 원활하게 하는 것이 보고되었다[45]. 왜모자반의 분리된 SQA 와 SHQA 는 인슐린감수성을 높여주는 효과를 나타내는 것으로 보고되었다[46].

Table 7. Identification and quantification of the major three components from MES-NE

Components	Concentrations ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Sargahydroquinoic acid	24
Sargachromanol	124
Sargaquinoic acid	101
Total amount	249

IV. 결론

본 연구는 큰열매모자반 (*Sargassum macrocarpum*) 을 식품소재화하기 위해 반응표면분석법을 이용하여 나노에멀전 제조공정을 최적화하였으며 안정성 평가를 수행하였다. 제조 공정에 영향을 미치는 계면활성제, 온도, 균질화 속도의 조건을 설정하였으며 나노에멀전의 물리적 특성인 입자 크기, PDI, 제타전위를 종속변수로 설정하였다. 연구를 통해 Tween 80의 농도가 큰열매모자반의 추출물이 함유된 나노에멀전(MES-NE)의 물리적 특성에 영향을 미치는 중요한 변수임을 알 수 있었다. Tween 80의 농도가 증가할수록 MES-NE의 입자크기, PDI, 제타전위가 증가하는 것을 확인하였다. 물리적 특성의 목표점을 최소(minimize)로 설정하여 최적 조건을 도출하였으며 입자크기 $41 \pm 0.92 \text{nm}$, PDI 0.30 ± 0.02 제타전위 $-19.5 \pm 0.27 \text{mV}$ 인 MES-NE를 얻을 수 있었다. 최적 조건으로 제조된 MES-NE의 안정성을 평가하기 위해 열처리 및 저장 조건에 따른 안정성 평가를 한 결과 모두 우수한 안정성을 나타내었다. HPLC를 이용하여 MES-NE 내 기능성 물질인 sargahydroquinoic acid, sargachromanol와 sargaquinoic acid가 함유되어 있다는 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 제조된 MES-NE는 향후 식품, 화장품 및 제약 등 다양한 분야에서 기능을 갖는 물질로 활용될 것으로 기대된다.

V. 참고문헌

- [1] Lee YJ, Kim WS, Jeon YJ and Kim YT. (2020). Physicochemical properties and antioxidant activity of Yanggaeng containing *Hizikia fusiformis* powder. *The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science*, 53(4), 588–596.
- [2] Cho SH, Cho JY, Kang SE, Hong YK, and Ahn DH. (2008). Antioxidant activity of mojabanchromanol, a novel chromene, isolated from blown alga *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Environmental Biology*, 29(4), 479–484.
- [3] Mabeau, S. and J. Fleurence. (1993). Seaweed in food products: Biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 4(4), 103–107.
- [4] Kim YM, Kim DS and Choi YS. (2004). Anticoagulant activities of brown seaweed extracts in Korea. *The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry*, 36(6), 1008–1013.
- [5] Kang MC, Lee WW, Oh JY, Kim HS, Lee HG and Jeon YJ. (2017). Thermostability of *Ecklonia cava* extract on antioxidant activity. *The Korean Society for Marine Biotechnology*, 9(2), 43–48.

- [6] Liu, L., Heinrich, M., Myers, S., and Dworjanyn, S. A. (2012). Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3), 591–619.
- [7] Ko SJ, Kim YK, Hong SW, Kang MS, Hwang EK and Lee YD, Application of reproductive allocation index to the analysis of growth and maturation patterns of *Sargassum macrocarpum* C. Agardh in Jeju Island. *Korean Journal of Environmental Biology*, 37(4), 672–681.
- [8] Choi MW, Jung CG, Kim HR, and Kim JI. (2017). Effect of *Sargassum serratifolium* extracts on β -amyloid production, *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(1),085–091.
- [9] Ale, M. T., and Meyer, A. S. (2012). Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation, *RSC Advances*, 3, 8131–8141.

- [10] Jung MS, Jang KW, Kin BR, Lee BH, Choi BW, Oh KB and Shin JH. (2008). Meroditerpenoids from the brown alga *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Natural Products*, 71(10), 1714–1719.
- [11] Park SH, Park HS, Lim SJ, Oh CW, Kim HR and Lim KT. (2020). Studies on antioxidant, anti-inflammatory, hypopigmentation and anti-wrinkle properties of nano-emulsion from *Sargassum serratifolium* extract. *Journal of Korean Society for Imaging Science & Technology*, 26(1), 25–23.
- [12] Hélder D. Silva, M. A. Cerqueira and A. Vicente. (2012). Nanoemulsions for food applications: Development and Characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 854–867.
- [13] Lee SB, Wang XZ and Hong IK. (2018). Ultrasound-assisted Extraction of Total Flavonoids from Wheat Sprout: Optimization using central composite design Method. *The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry*, 29(6), 663–669.
- [14] Azam MS, Joung EJ, Choi JK and Kim HR. (2017). Ethanolic extract from *Sargassum serratifolium* attenuates hyperpigmentation through CREB/ERK signaling pathways in α –

- MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. *Journal of Applied Phycology*, 29(4), 2089–2096.
- [15] Shu, G., Khalid, N., Tan, T. B., Zhao, Y., Neves, M. A., Kobayashi, I., and Nakajima, M (2018). In vitro bioaccessibility of ergocalciferol in nanoemulsion-based delivery system: the influence of food-grade emulsifiers with different stabilising mechanisms. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(2), 430–440.
- [16] Lim SJ, Choi AH, Kwon M, Joung EJ, Shin T, Lee SG and Kim HR. (2019). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components. *Food chemistry*, 278, 178–184.
- [17] Lee JS, Park SJ and Kim JO. (2017). Optimizing coagulation conditions of magnetic based ballast using response surface methodology. *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, 39(12), 689–697.
- [18] Oh JH, Kim HK, Yu GH, Jung KI, Kim SJ, Jung JM, Cheon JH, Fatih Karadeniz and Kong CS. (2017). Quality characteristics and optimization of fish– meat noodle formulation added with

- olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) using response surface methodology. *The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 46(11), 1,373–1,385.
- [19] Lee SB, Li Guangzong, Zuo Chengliang and Kwon HI. (2019). Emulsification of O/W emulsion using non-ionic mixed surfactant: Optimization using CCD-RSM. *The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry*, 30(5), 604–614.
- [20] Choi SH and Kim SM. (2012). Quality properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) surimi-based product manufactured with amorphophallus konjac Flour. *Korean Society of Food Science and Technology*, 44(4), 422–427.
- [21] Suk Fei T, Hamid Reza Fard M, Roghayeh Abedi K, Johnson S, Brian P. K, Mahiran B and Hamidon Bin B.(2015). Ultrasonic emulsification of parenteral valproic acid-loaded nanoemulsion with response surface methodology and evaluation of its stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 299–308.
- [22] Pongsumpun P, Iwamoto S, and Siripatrawan U. (2020). Response surface methodology for optimization of cinnamon

essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60, 104604.

- [23] Kotta S, Khan AW, Ansari SH, Sharma RK, and Ali J. (2013). Formulation of nanoemulsion: a comparison between phase inversion composition method and high-pressure homogenization method. *Drug Delivery*, 1–12.
- [24] Chong, W. T., Tan, C. P., Cheah, Y. K., B. Lajis, A. F., Habi Mat Dian, N. L., Kanagaratnam, S., and Lai, O. M. (2018). Optimization of process parameters in preparation of tocotrienol-rich red palm oil-based nanoemulsion stabilized by Tween80-Span 80 using response surface methodology. *PloS One*, 13(8), e0202771.
- [25] Zainol, S, Basri, M, Basri, H. B, Shamsuddin, A. F, Abdul-Gani, S. S, Karjiban, R. A, and Abdul-Malek, E. (2012). Formulation optimization of a palm-based nanoemulsion system containing levodopa. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 13049–13064.

- [26] Hosseinnia, M, Khaledabad, M. A and Almasi, H. (2017). Optimization of *Ziziphora clinopodiodes* essential oil microencapsulation by whey protein isolate and pectin: A comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 958–966.
- [27] Su R, Yang L, Wang Y, Yu S, Guo Y, Deng J, Zhao Q and Jin, X. (2017). Formulation, development, and optimization of a novel octyldodecanol–based nanoemulsion for transdermal delivery of ceramide III B. *International Journal of Nanomedicine*, 2017(12), 5203–5221.
- [28] Raviadaran, R., Chandran, D., Shin, L. H., & Manickam, S. (2018). Optimization of palm oil in water nano–emulsion with curcumin using microfluidizer and response surface methodology. *LWT*, 96, 58–65.
- [29] Rohan S, Daniel E, Enzo P and Ian H. (2014). Optimization and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. *Journal of Physical Science*, 25(1), 59–75.

- [30] Ahmadi O and Jafarizadeh–Malmiri H. (2020). Green approach in food nanotechnology based on subcritical water: Effects of thyme oil and saponin on characteristics of the prepared oil in water nanoemulsions. *Food Science and Biotechnology*, 1–10.
- [31] Foujdar, R., Chopra, H. K., and Bera, M. B. (2018). Optimization and production of turmeric extract-based nanoemulsion (TEBN) and its application in preservation of fatty fish fillet. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(9), e13750.
- [32] Ryu JA, Kin KJ, Nah GB and Eom TJ. (2018). Physical Properties of Handsheets with MFC–PCC Hybrid. *Journal of Korea Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, 50(3), 44–52.
- [33] Shao Y, Wu C, Wu T, Li Y, Chen S, Yuan, C and Hu, Y. (2018). Eugenol–chitosan nanoemulsions by ultrasound–mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 193, 144–152.
- [34] Iqbal R, Mehmood Z, Baig A and Khalid N. (2020). Formulation and characterization of food grade O/W nanoemulsions encapsulating quercetin and curcumin: Insights on enhancing

- solubility characteristics. *Food and Bioproducts Processing*, 123, 304–311.
- [35] Zhai X, Lin D, Liu D and Yang X. (2018). Emulsions stabilized by nanofibers from bacterial cellulose: New potential food-grade pickering emulsions. *Food Research International*, 103, 12–20.
- [36] Jo YJ, Lee SB, Lee JK and Kwon YJ. (2014). Preparation of nanoemulsions containing curcumin by high pressure homogenization. *Food Engineering Progress*, 18(4), 341–347.
- [37] Nejadmansouri, M., Hosseini, S. M. H., Niakosari, M., Yousefi, G. H., and Golmakani, M. T. (2016). Physicochemical properties and storage stability of ultrasound-mediated WPI-stabilized fish oil nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 61, 801–811.
- [38] Ryu, V., McClements, D. J., Corradini, M. G., & McLandsborough, L. (2018). Effect of ripening inhibitor type on formation, stability, and antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsion. *Food Chemistry*, 245, 104–111.
- [39] Saberi A. H, Fang Y and McClements D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle

size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 391, 95–102.

- [40] Nor Bainun, I., Alias, N. H., and Syed-Hassan, S. S. A (2015). Nanoemulsion: Formation, characterization, properties and applications – A Review. *Advanced Materials Research*, 1113, 147–152.
- [41] Kim SN, Lee W, Bae GU and Kim YK. (2012). Anti-diabetic and hypolipidemic effects of *Sargassum yezoense* in db/db mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 424, 675–680.
- [42] Tsang CK, Ina A, Goto T and Kamei Y. (2005). Sargachromenol, a novel nerve growth factor-potentiating substance isolated from *Sargassum macrocarpum*, promotes neurite outgrowth and survival via distinct signaling pathways in PC12D cells. *Neuroscience*, 132, 633–643.
- [43] Gwon WG, Lee BG, Joung EJ, Choi MW, Yoon NY, Shin TS, Oh CW and Kim HR. (2015). Sargaquinoic acid inhibits TNF- α -induced NF- κ B signaling, thereby contributing to decreased monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cells

(HUVECs). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63(41), 9053–9061.

- [44] Joung EJ, Lee B, Gwon WG, Shin T, Jung BM, Yoon NY and Kim HR. (2015). Sargaquinoic acid attenuates inflammatory responses by regulating NF- κ B and Nrf2 pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *International Immunopharmacology*, 29(2), 693–700.
- [45] Park BG, Shin WS, Um Y, Cho S, Park GM, Yeon DS, Kwon SC, Ham J, Choi BW and Lee S. (2008). Selective vasodilatation effect of sargahydroquinoic acid, an active constituent of *Sargassum micracanthum*, on the basilar arteries of rabbits. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, (18), 2624–2627.
- [46] Kim SN, Choi HY, Lee W, Park GM, Shin WS and Kim YK. (2008). Sargaquinoic acid and sargahydroquinoic acid from *Sargassum yezoense* stimulate adipocyte differentiation through PPAR α / γ activation in 3T3-L1 cells. *FEBS Lett*, 582, 3465–3472.

VI. 감사의 글

대학원을 입학한 지 엇그제 같은데 벌써 2년이라는 시간이 지나 석사과정을 마칩니다. 석사과정동안 많은 것을 가르쳐주시고 도움을 주신 분들께 감사의 마음을 전하고자합니다. 작은 것부터 가르침을 주시고 항상 웃는 모습으로 지켜봐주신 이양봉 교수님 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 가르쳐주시고 지도해주신 김선봉 교수님, 양지영 교수님, 전병수 교수님, 안동현 교수님, 김영목 교수님, 조승목 교수님, 심길보 교수님께도 깊은 감사의 마음을 전합니다. 타과 학생임에도 불구하고 저의 부족한 부분부터 가르쳐주신 김형락 교수님께도 감사드립니다.

긴 대학생활 중 큰 추억을 만들어 준 생화학실험실 가족들 덕분에 즐겁게 석사과정을 보낼 수 있었습니다. 아무것도 모른 채로 실험실에 들어온 저에게 하나부터 열까지 가르쳐준 동리오빠, 정완이오빠, 소현이언니에게 감사합니다. 언니, 오빠들의 성실함과 책임감을 보고 많은 것을 배울 수 있었습니다. 항상 친언니처럼 챙겨준 다은이언니, 성희언니, 동생이지만 항상 나를 챙겨주는 민경이도 고맙습니다. 바쁠 때 만나게 되어 잘 챙겨주지 못한 서연이, 수연이, 효림이에게 미안하고 고마운 마음을 전합니다. 그리고 다른 실험실이지만 바쁜 와중에도 저에게 많은 도움을 준 두민이와 힘들 때 서로 힘이 되어 준 소현이 덕분에 무사히 석사 과정을 마칠 수 있었습니다.

마지막으로 저를 언제나 믿어주시고 아낌없이 사랑을 주신 엄마, 오빠에게 감사의 인사를 드립니다. 무엇보다 가족들의 응원과 사랑 덕분에 힘든 상황에 굴하지 않고 이겨낼 수 있었습니다. 이런 사랑이 더욱 빛나도록 앞으로 노력하고 발전하여 자랑스러운 딸이 되겠습니다. 감사합니다.

