



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.

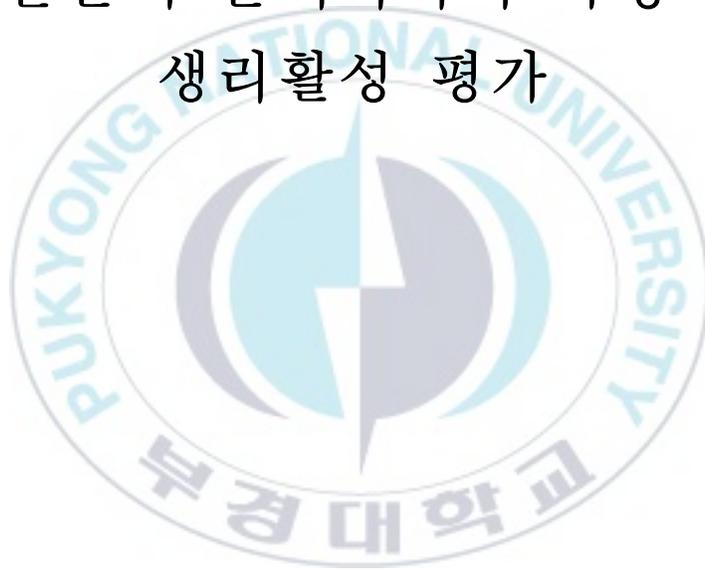
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

아임계 수 및 초임계 이산화탄소로
처리된 진주담치 (*Mytilus edulis*)
추출물의 물리화학적 특성 및
생리활성 평가



2020년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

정 유 린

공 학 석 사 학 위 논 문

아임계 수 및 초임계 이산화탄소로
처리된 진주담치 (*Mytilus edulis*)
추출물의 물리화학적 특성 및
생리활성 평가

지 도 교 수 전 병 수

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2020년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

정 유 린

정유린의 공학석사 학위논문을 인준함.

2020년 8월 28일



위원장 농학박사 안동현



위원 농학박사 조승목



위원 공학박사 전병수



Contents

Abstract	ix
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. 재료 및 시약	8
2. 실험 방법	
2.1. 일반성분 분석	8
2.2. 초임계 이산화탄소 추출	10
2.3. 유기용매 (Hexane) 추출	11
2.4. 오일의 안정성 평가	
2.4.1. 산가(Acid value)	13
2.4.2. 과산화물가(Peroxide value)	13
2.5. 오일의 지방산 조성 분석	14
2.6. 오일의 색도 측정	17
2.7. 오일의 항산화 활성	
2.7.1. DPPH radical 소거능	17

2.7.2. ABTS radical 소거능	18
2.8. 오일의 아스타잔틴 (Astaxanthin) 함량 분석	19
2.9. 오일의 열중량측정 (Thermal Gravimetric analysis; TGA) ·	19
2.10. 아임계 수 가수분해	21
2.11. 마이야르 반응 생성물 (Millard reaction products; MRPs)	23
2.12. 가수분해물의 물리적 특징	
2.12.1. pH	23
2.12.2. 색도	23
2.13. 가수분해물의 항산화 활성	
2.13.1. DPPH radical 소거능	23
2.13.2. ABTS radical 소거능	24
2.13.3. 철 이온 환원력 (Ferric reducing antioxidant power; FRAP)	24
2.14. 가수분해물의 페놀류 함량 분석	
2.14.1. 총 페놀 함량 (Total Phenolic content)	25
2.14.2. 총 플라보노이드 함량 (Total Flavonoid content)	25
2.15. 가수분해물의 당 함량 분석	
2.15.1. 총 당 함량 (Total Glucose content)	26
2.15.2. 환원당 함량 (Reducing Sugar content)	26

2.16. 가수분해물의 수용성 단백질 함량 분석	27
2.17. 가수분해물의 겔 전기영동 (SDS-PAGE)	28
2.18. 가수분해물의 아미노산 조성	
2.18.1. 구성아미노산	28
2.18.2. 유리아미노산	29
2.19. 가수분해물의 타우린 분석	29
2.20. 가수분해물의 항고혈압 활성 측정	32
2.21. 통계처리	33

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 일반성분 분석	34
2. 오일의 추출 수율	36
3. 오일의 안정성 평가	38
4. 오일의 지방산 조성 분석	40
5. 오일의 색도	42
6. 오일의 항산화 활성	45
7. 오일의 아스타잔틴 (Astaxanthin) 함량	48
8. 오일의 열중량측정 (Thermal Gravimetric analysis; TGA)	51
9. 가수분해 효율성 및 마이야르 반응 생성물 (MRPs)	54

10. 가수분해물의 물리적 특성	
10.1. pH	56
10.2. 색도	58
11. 가수분해물의 항산화 활성	
11.1. DPPH radical 소거능	61
11.2. ABTS radical 소거능	63
11.3. 철 이온 환원력 (FRAP)	65
12. 가수분해물의 페놀류 함량 분석	
12.1. 총 페놀 함량 (Total phenolic content; TPC)	67
12.2. 총 플라보노이드 함량 (Total flavonoid content; TFC)	69
13. 항산화 활성과 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과의 상관관계 분석	71
14. 가수분해물의 당 함량 분석	
14.1. 총 당 함량 (Total glucose content)	73
14.2. 환원당 함량 (Reducing sugar content)	73
15. 가수분해물의 수용성 단백질 함량	76
16. 가수분해물의 겔 전기 영동 (SDS-PAGE)	78
17. 가수분해물의 아미노산 분석	80
18. 가수분해물의 타우린 함량	84

19. 가수분해물의 항고혈압 활성	87
IV. 결론	89
V. 참고문헌	93
감사의 글	104



List of Figures

Fig. 1. The main species of Mussel (a: <i>Mytilus edulis</i> ; b: <i>M. coruscus</i> ; C: <i>Perna canaliculus</i>).	2
Fig. 2. Phase diagram of water and carbon dioxide (CO ₂).	6
Fig. 3. Dielectric constant of different solvents at room temperature.	7
Fig. 4. A schematic diagram of the supercritical carbon dioxide extraction process (J. S. Park et al., 2019).	12
Fig. 5. A schematic diagram of the subcritical water hydrolysis apparatus.	22
Fig. 6. Photograph of <i>M. edulis</i> oil.	44
Fig. 7. DPPH radical scavenging properties of <i>M. edulis</i> oil obtained by SC-CO ₂ and organic solvent (Hexane) extraction (A: 45°C, 20 MPa; B: 45°C, 30 MPa; C: 55°C, 20 MPa; D: 55°C, 30 MPa; E: Hexane).	46
Fig. 8. ABTS radical scavenging properties of <i>M. edulis</i> oil obtained by SC-CO ₂ and organic solvent (Hexane) extraction (A: 45°C, 20 MPa; B: 45°C, 30 MPa; C: 55°C, 20 MPa; D: 55°C, 30 MPa; E: Hexane).	47
Fig. 9. Chromatogram of astaxanthin (standard; 40 ppm) detected at 470 nm.	50
Fig. 10. Thermo gravimetric analysis (TGA) graph of <i>M. edulis</i> oil obtained by SC-CO ₂ and organic solvent (Hexane) extraction.	52
Fig. 11. Derivative Thermo Gravimetry (DTG) graph of <i>M. edulis</i> oil obtained by SC-CO ₂ and organic solvent (Hexane) extraction.	53
Fig. 12. Photograph of <i>M. edulis</i> hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).	60
Fig. 13. Comparison of DPPH radical scavenging properties for <i>M. edulis</i> hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).	62

Fig. 14. Comparison of ABTS radical scavenging properties for <i>M. edulis</i> hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).	64
Fig. 15. Comparison of FRAP properties for <i>M. edulis</i> hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).	66
Fig. 16. Comparison of total phenolic content for <i>M. edulis</i> hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).	68
Fig. 17. Comparison of total flavonoid content for <i>M. edulis</i> hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).	70
Fig. 18. Comparison of total glucose content for <i>M. edulis</i> hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).	74
Fig. 19. Comparison of reducing sugar content for <i>M. edulis</i> hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).	75
Fig. 20. Comparison of total protein content for <i>M. edulis</i> hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).	77
Fig. 21. The results of SDS-PAGE pattern of <i>M. edulis</i> hydrolysates at different temperatures (M: Marker; 1: Ethanol extracts; 2 - 6: hydrolysates at 120, 150, 180, 210, 240°C, respectively).	79
Fig. 22. Chromatogram of taurine (standard; 1000 ppm) detected at 360 nm.	86
Fig. 23. Antihypertensive activity of <i>M. edulis</i> hydrolysates at different temperatures (ETE : Ethanol extracts).	88

List of Tables

Table 1. Gas chromatography (GC) operating conditions for fatty acids analysis of <i>M. edulis</i> oil	16
Table 2. High performance Liquid Chromatography (HPLC) operating conditions for astaxanthin content of <i>M. edulis</i> oil	20
Table 3. High performance Liquid Chromatography (HPLC) operating conditions for taurine content of <i>M. edulis</i> hydrolysates	31
Table 4. Proximate composition of freeze-dried <i>M.edulis</i> powder ..	35
Table 5. Oil yield of <i>M. edulis</i> oil obtained by SC-CO ₂ and organic solvent (Hexane) extraction	37
Table 6. Oxidation stability properties of <i>M. edulis</i> oil obtained by SC-CO ₂ and organic solvent (Hexane) extraction	39
Table 7. Fatty acids composition of <i>M. edulis</i> oil obtained by SC-CO ₂ and organic solvent (Hexane) extraction	41
Table 8. Color properties of <i>M. edulis</i> oil obtained by SC-CO ₂ and organic solvent (Hexane) extraction	43
Table 9. Astaxanthin (ASX) content of <i>M. edulis</i> oil obtained by SC-CO ₂ and organic solvent (Hexane) extraction	49
Table 10. Hydrolysis efficiency and maillard reaction products (MRPs) of <i>M. edulis</i> hydrolysates	55
Table 11. pH of <i>M. edulis</i> hydrolysates	57
Table 12. Color parameters of <i>M. edulis</i> hydrolysates	59
Table 13. Pearson's product moment correlation coefficients analysis between antioxidant radical activity and total phenolic and total flavonoid content	72
Table 14. Total amino acid profile of de-oiled <i>M. edulis</i> powder ..	82
Table 15. Free amino acid profile of de-oiled <i>M. edulis</i> powder and hydrolysates	83
Table 16. Taurine content of <i>M. edulis</i> hydrolysates	85

Evaluation on Physicochemical Properties and Biological Activity of Blue Mussel (*Mytilus edulis*) Extracts Treated with Subcritical Water and Supercritical Carbon Dioxide

Yu-Rin Jeong

Department of Food Science and Technology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Blue mussel (*Mytilus edulis*), which is a shellfish belonging to the mussel family, is one of the important edible bivalves attached to the coastal reef areas using a byssus of highly adhesive proteinaceous fiber bundles. *M. edulis* is native to Europe and the Mediterranean, but is currently farmed in coastal areas of Korea, and is mainly used as a minor ingredient for soup or boiled foods. Due to its high protein content, *M. edulis* are effective in preventing coronary heart disease (CHD) and hypertension disease, and the amino acid composition of the protein contains glutamic acid and glycine, including a high content of taurine, which regulates the liver's function and causes of Alzheimer's disease. In addition, although the lipid content is relatively low, it is generally well known that it is effective for antioxidant capacity, arthritis, and inflammation by high content of astaxanthin and ω -3 fatty acids. For this reason, it is believed that *M. edulis* have high potential for commercial development of functional foods or dietary supplements. Recently, there is an increasing number in the feasibility studies of new emerging green technologies since the conventional extraction techniques use a high amount of toxic solvents which compromise the safety of extracts, requiring extra-purification steps for their removal to avoid health risks

they may cause upon ingestion. Therefore, in this study, supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) and subcritical water hydrolysis (SWH) process, which are eco-friendly technologies, were applied to extract physiological active substances.

Carbon dioxide (CO₂), which is widely used as a supercritical fluid, has characteristics of relatively low critical temperature (31.10°C) and pressure (7.39 MPa) compared to other fluids, and is widely used for separation and purification of heat-sensitive natural materials. In addition, CO₂ is colorless, non-toxic, and non-flammable, so there is no residual solvent after extraction and can be reused. Since the extract is easy to separate from the solvent, it has high selectivity with excellent sample recovery. The extraction conditions conducted for SC-CO₂ varied for pressure (20, 30 MPa) and temperature (45, 55°C), while the flow rate was kept constant during the experiment (27 g/min). The extracted *M. edulis* oil analyzed the extraction yield, oil stability (acid value and peroxide value), fatty acid composition, antioxidant activity (DPPH and ABTS), color and TGA. The lipid-free residue extracted by supercritical carbon dioxide was hydrolyzed through a subcritical water hydrolysis process. Subcritical water is one of the chemical reactions generated due to changes in physical properties including dielectric constant depending on temperature or pressure. These properties result in a hydrolysis reaction capable of decomposing peptide bonds, ester bonds and glycosidic bonds without a catalyst. SWH was used for the purpose of enhancing the food functionality and improve yield as well as safety, economics and environmental friendliness. Applied temperatures ranged from 120 to 240°C with the pressure and reaction time fixed at 30 bar and 30 min, respectively. The obtained *M. edulis* hydrolysates measured hydrolysis efficiency, pH, color, antioxidant capacity (ABTS, DPPH and FRAP), total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), total protein, amino acid composition, taurine content and anti-hypertensive activity.

As a results, the best extraction yield condition of *M. edulis* oil extracted by

SC-CO₂ indicated at 55°C/30 MPa, resulting in the highest yield of 6.02±0.79%. The best conditions of oil stability and antioxidant capacity of *M. edulis* oil was obtained at 55°C/30 MPa and 45°C/20 MPa, respectively. The oils were characterized for their fatty acid (FAs) composition using gas chromatography, while it was revealed that the major FAs were Palmitic acid, Palmitoleic acid, Electroosapentaenoic acid (EPA), and Docosahexaenoic acid (DHA). Astaxanthin content increased with increasing extraction pressure, it showed the highest content at 45°C/30 MPa with 9.88±0.33 mg ASX/g oil. In addition, the hydrolysis efficiency of *M. edulis* hydrolysates increased continuously with increasing temperature, showed the highest value of 90.65±0.11% at 240°C. DPPH, ABTS, FRAP, TFC also indicated maximum activity at 240°C with 12.79±0.01 mg TE/g dried sample, 9.52±0.02 mg TE/g dried sample, 4.68±0.08 mg TE/g dried sample, 15.66±0.06 mg QE/g dried sample, respectively, while TPC showed the highest content at 210°C with 7.18±0.20 mg GAE/g dried sample. The total protein content and anti-hypertensive activity reached the highest values at 180°C with 52.87±0.16 g BSA/100 g dried sample and 95.38±0.20%, respectively.

From the obtained results, *M. edulis* extracts recovered using SC-CO₂ and SWH is a effective techniques for producing physiological substances and will have important influence in food industry, and is considered to be highly utilized as basic data for use as a material that can be used in various fields.

I. 서 론

홍합 (Mussel)은 홍합속, 홍합과에 속하는 패류로, 짜지 않은 수산물이라 하여 담치라고도 불린다. 홍합은 접착성이 강한 단백질성 섬유 다발인 족사를 이용하여 연안의 암초 지대에 부착하여 생활하고 있으며, 우리나라의 전 연안 및 남해안을 비롯하여 전 세계에 널리 분포하고 있다. 홍합의 주요 종으로는 진주담치 (blue mussel, *Mytilus edulis*), 참담치 (hard-shelled mussel, *M. coruscus*), 외국종으로 뉴질랜드에서 생산되고 있는 초록입홍합 (green lipped mussel, *Perna canaliculus*)으로 분류할 수 있다 (Fig. 1). 진주담치 및 참담치는 국내종으로, 진주담치는 유럽 및 지중해가 원산지였으나 현재 양식하고 있으며, 껍질은 흑청색의 각피로 덮여 있고 광택이 나매 껍데기 안쪽이 푸른색을 띠고 있어 참담치와 구별이 가능하다 (Kim S. G. et al., 2013). 진주담치는 전 세계적으로 매우 인기 있는 조개류이며, 생물, 냉동 또는 가공형태의 해산물로 판매되고 있다 (Fernandez A. et al., 2015). 2019년 통계청 자료에 의하면, 국내에서 51,560톤의 홍합을 양식하여 생산하였으며, 주로 국이나 조림의 부재료로 많이 이용되고 있다 (통계청; 어업생산동향조사, 2019).

홍합은 많은 양의 단백질 함량을 가지고 있어 영양이 풍부한 해산물로 알려져 있으며, 철이 풍부하여 빈혈 예방, 셀레늄과 같은 미네랄 성분으로 인한 항노화 개선, 특히 관절염 및 항고혈압 예방에 효과적이다 (Xu Z. et al., 2019). 뿐만 아니라, 진주담치는 Glutamine, Asparagine, Glycine, Lysine, Leucine, Arginine 등의 풍부한 아미노산을 함유하고 있으며, 특히 다량의 타우린 (2-amino-ethanesulfonic acid, Taurine, MW 125.14) 함량을 가지고 있다 (Varaltzis P. K. and I. Undeland, 2012).



Fig. 1. The main species of Mussel (a: *Mytilus edulis*; b: *M. coruscus*; C: *Perna canaliculus*).

타우린은 cysteine으로부터 유래된 황아미노산으로, 술폰산기가 붙어 있어 구성아미노산으로 작용하지 못하여 단백질 합성에 관여하지 않으며, 대부분 동물조직과 생체 내에서 유리아미노산의 형태로 존재하고 있다 (Yoon J. A. et al., 2015; Kim E. et al., 1999). 타우린의 주요 공급원은 동물성 단백질이며, 특히 어패류나 해조류 등 해양생물에 많이 함유되어 있다 (Huxtable R., 1992). 높은 함량의 타우린으로 인하여 동맥경화의 원인이 되는 콜레스테롤 수치를 낮추고 체내의 염증 감소, 해독작용, 당대사 촉진 및 세포막 안정성 등 광범위한 기능을 지니고 있다 (Sebring L. and R. Hyxtable, 1985; J. G. Jacobsen and L. smith, 1968). 또한, 홍합은 지질 함량이 비교적 적지만, Eicosapentanoic acid (EPA; C20:5n3) 및 Docosahexanoic acid (DHA; C22:6n3)와 같은 ω -3 지방산이 풍부하여 인체에 유익하고 영양적으로 우수한 생리활성물질로서 작용을 한다 (Pleissner D. et al., 2012). ω -3 지방산은 심장 질환 및 뇌졸중 예방에 효과적인 다중 불포화 지방산 (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)으로, 건강상의 이점으로는 관상 동맥 심장 질환 (CHD), 류마티스 관절염, 당뇨병, 알츠하이머 고혈압 예방 등 뇌 조직과 신경계 관련하여 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 건강기능식품 소재로 널리 이용되고 있다 (Buddhachat K. et al., 2017; Correa A. P. A. et al., 2008; Yashodhara B. et al., 2009; Su K. P. et al., 2008; Haq M. and B. S. Chun, 2018). 또한, 카로티노이드계 색소인 아스타잔틴 (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione, Astaxanthin, MW 596.84)은 강력한 항산화 활성을 가지고 있으며, 항당뇨, 항암 효과 및 심장 관련 질병을 예방하고 간 기능을 향상시키는 이점을 지니고 있다 (Haq. M et al., 2018). ω -3 지방산 및 아스타잔틴은 열에 매우 불안정하고 특히 고온에서 산소와 접촉하면 쉽게 산화되는 경향이 있어 영양가 손실 및 불쾌취 생성을 초래하기 때문에 품질을 유지하기 위한 기술이 필요하다 (Haq M. and B. S. Chun, 2018).

홍합에 대한 연구로는 초록입홍합에 함유되어 있는 ‘리프리놀’ 성분이 항염증에 효과적임을 입증하였으며, 홍합 단백질을 이용한 접착제, 국내에서는 통조림 또는 양념젓갈 등의 가공식품 개발이 보고되어왔다 (Whitehouse M. et al., 1997; C. Fan C. et al., 2016; Park T. H. et al., 2012; Park J. S., 2011). 하지만 기능성 이용에 대한 연구는 여전히 미비하기 때문에, 국내에서 쉽게 접할 수 있는 진주담치의 기능성 물질 추출을 통하여 식품학적 소재로서의 활용가치를 높이고 부가가치 증진에 대한 연구를 비롯하여 기능성 소재를 얻기 위한 안전성이 우수한 친환경 기술의 적용 연구 또한 필요하다. 현재 산업적으로 이용되고 있는 기존의 추출법으로는 유기용매, 화학적 및 효소처리, 증류법 등이 있으나, 이는 환경오염을 유발하고 복잡하거나 가혹한 조건에서 진행되기 때문에 공정의 효율성이 저하되고 비경제적이다 (Park J. S. et al., 2019). 뿐만 아니라, 잔존 용매의 위험성과 열을 가하는 공정이 있으므로 성분의 변성 및 산화로 인하여 경쟁력의 한계성을 지니고 있다 (Park J. S. et al., 2019). 이러한 문제점을 보완할 수 있는 청정 기술인 초임계 이산화탄소 추출 및 아임계 수 가수분해 공정이 최근 주목받고 있다.

초임계 유체란, 임계점 근방 또는 그 이상의 온도 및 압력 하에 존재하며 (Fig. 2), 초임계 유체 추출법은 유체의 특이적 성질을 이용하여 유용물질을 추출함에 있어 적합한 공정이다. 초임계 유체로 많이 사용되고 있는 이산화탄소는 다른 유체들에 비해 비교적 낮은 임계 온도 (31.10°C) 및 압력 (7.39 MPa)의 특징을 가지고 있어 열에 민감한 천연 물질의 분리 및 정제에 널리 사용되고 있다. 뿐만 아니라, 무색, 무독성, 비가연성이며, 저가의 비용으로 인하여 많은 이점을 제공하며, 짧은 추출시간 및 우수한 샘플 회수량을 지님으로써 높은 선택성을 가진다 (Turner C. et al., 2001). 초임계 이산화탄소를 이용한 추출법은 천연물질로부터 비극성 기능성 물질을 추출하는데 널리 사용되고 있으며, 추출 후 잔류 용매가 없으며, 용매 제거 과정 중 휘발성 성분의 손실이 적고, 용매의 재사용이 가능한 장점을 가지고 있을 뿐만 아니라 추출 중

반응이 생성되지 않아 안정성과 안정성이 우수한 공정이다.

물은 식품 가공 공정에 있어서 가장 안전한 용매이며, 물의 끓는점 (100°C, 0.1 MPa)과 임계점 (374°C, 22 MPa) 사이의 액체 상태인 아임계 수를 가압 및 가열하면 가수분해를 일으킨다 (Fig 2). 이를 이용한 공정은 단순성, 추출 시간 단축, 추출물의 고품질, 비용 절감 및 환경 친화적인 장점이 있다 (Geteahew A. T. et al., 2018). 아임계 상태의 물은 온도가 증가함에 따라 수소결합과 극성의 정도를 나타내는 유전상수와 관련이 있다. 아임계 수의 유전상수 (Dielectric constant; ϵ)는 상온 및 상압 (25°C, 1 bar)의 조건에서 약 $\epsilon = 80$ 이며, 200°C로 증가하였을 때 약 $\epsilon = 38$ 로, 온도가 증가함에 따라 유전상수는 감소하여 메탄올, 에탄올 및 헥산 등의 비극성 용매와 비슷한 성질을 가지며 (Fig. 3), 이는 물 분자 사이의 수소결합이 파괴됨으로써 유전상수에 영향을 미친다 (Tromp R. et al., 1994). 게다가, 보통 상태의 물에는 용해되지 않는 유기물을 용해시킬 수 있는 우수한 용매로서의 작용과 강력한 가수분해력으로 유용물질의 추출 및 저분자화가 가능하다. 이와 관련해서 초임계 이산화탄소 추출 및 아임계 수 가수분해 공정은 진주담치에 함유되어 있는 기능성 물질을 추출함에 있어 적합한 방법이다.

따라서, 본 연구에서는 기능성 소재로서 활용하기 위한 기초 자료를 제공하기 위하여 다양한 조건에서의 초임계 이산화탄소 추출 및 아임계 수 가수분해 공정을 이용하여 진주담치 추출물을 얻었다. 본 추출물의 물리화학적 및 생체 기능적 특성 연구를 통하여 해양에서의 생리활성 물질의 공급원으로서의 이용에 대한 잠재적인 가능성을 확인하였다.

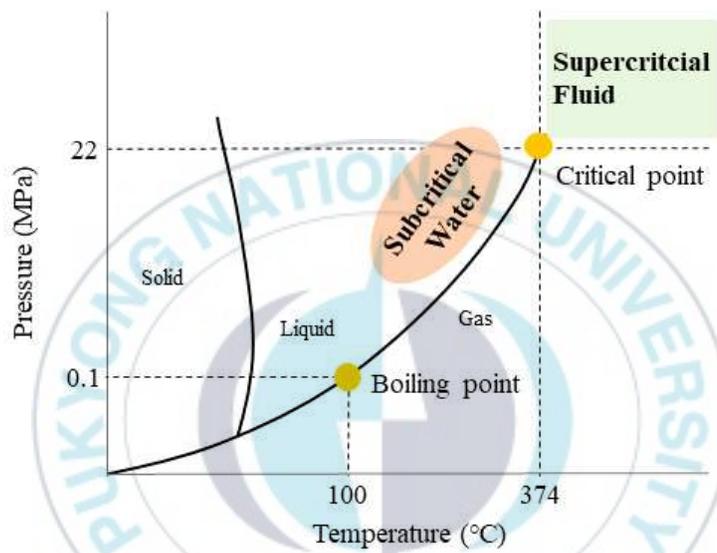


Fig. 2. Phase diagram of water and carbon dioxide (CO₂).

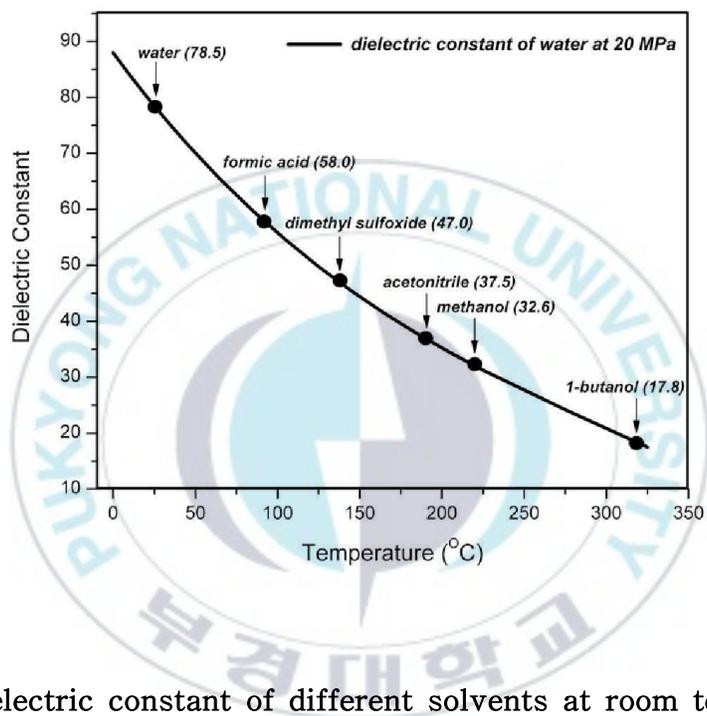


Fig. 3. Dielectric constant of different solvents at room temperature.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 진주담치 (*Mytilus edulis*)는 경상남도 통영시 앞바다에서 채취하여 껍질을 제거하여 판매하고 있는 것을 부산광역시 사하구에 소재한 (주)동원해사랑에서 구입하였다. 이물질 제거를 위하여 증류수로 2~3번 세척한 후 동결건조기 (HyperCOOL HC8080, BMS Co., Ltd., Korea)를 이용하여 -80°C에서 72시간 동안 건조시켰다. 건조가 끝난 시료는 블렌더 (HMF-3260S, HANIL Co., Ltd., Korea)를 이용하여 분쇄한 후 710 μm 이하 크기의 체로 분말화한 다음, -40°C 암소에 보관하여 실험에 사용하였다. 초임계 이산화탄소, 아임계 수 가수분해 및 가스크로마토그래피 장치에서 사용된 가스는 KOSEM (Yangsan, Korea)에서 공급받았으며, 표준물질 및 분석에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)에서 구입하였고 High performance liquid chromatography (HPLC) 등급을 사용하였다.

2. 실험 방법

2.1. 일반성분 분석

동결건조한 분말시료의 일반성분은 AOAC (2000) 표준분석법을 참고하여

분석하였다 (AOAC, 2000). 수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet 법, 조단백질은 micro-Kjedahl 법 및 조회분은 건식회화법으로 측정하였다. 탄수화물은 전체 함량 100에서 나머지 (수분, 조지방, 조단백질 및 조회분)를 뺀 값으로 나타내었다.

수분은 분말시료 3.00±0.01 g를 칭량한 다음 수분분석기 (MB27, OHAUS, China)를 이용하여 수분 증발 속도가 0.01%/min 이하가 되면 측정이 끝나는 조건으로 하였다.

조지방은 Soxhlet 법을 이용하여 분석하였다. 분말시료 5 g를 담은 원통여과지 (ADVANTEC, No. 84)에 시료가 흘러나오지 않게 탈지면으로 덮은 후 추출관에 넣는다. Soxhlet 추출장치 (Premium Analog Multi Heating Mantles, DAIHAN-Scientific, Korea)에 장착하여 Hexane를 용매로 하여 24 시간 동안 추출을 진행하였다. 수기는 105°C의 건조기에 30분 동안 건조시킨 후 테시케이터로 옮겨 30분 동안 방치한 다음 무게를 측정하였다. 추출이 끝난 용매는 수기로 옮겨 회전증발농축기 (Eyela N-110, Rikakikai, China)를 이용하여 용매를 제거한 다음 테시케이터에서 30분 동안 방치한 후 무게를 측정하였다. 조지방 함량은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, %로 나타내었다.

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

여기서 W_1 은 조지방 추출 후 수기의 중량 (g), W_0 은 조지방 추출 후 수기의 중량 (g), S는 시료 채취량 (g)이다.

조단백질은 micro-Kjedahl 법을 이용하여 분석하였다. 1 g의 분말시료와 진한 황산 20 mL 및 분해촉진제 ($\text{CuSO}_4:\text{K}_2\text{SO}_4$, 1:4)를 킬달 플라스크에 넣고 분해 장치 (Digestion unit K-425, Buchi)를 이용하여 분해 과정을 거쳤다. 분해가 끝나면 증류 장치 (Kjelflex K-360, Buchi) 및 적정 장치 (848 Titrino

plus Metrohm, Buchi)를 이용하여 분석한 후 나온 결과 값에서 질소계수 6.25를 곱하여 조단백질 함량 (%)을 산출하였다.

조회분은 550~600°C에서 직접 가열하는 건식회화법을 이용하여 측정하였다. 1 g의 분말시료를 넣은 도가니를 550°C로 예열된 회화로에 넣고 회백색의 무기물 (회분)이 얻어질 때까지 가열하였다. 200°C 이하로 냉각시킨 후 데시케이터에서 30분간 방치하여 칭량하였다. 조회분 함량은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, %로 나타내었다.

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

여기서 W_1 은 건조 후 도가니와 시료의 무게 (g), W_0 은 도가니의 무게 (g), S 는 시료 채취량 (g)이다.

2.2. 초임계 이산화탄소 추출

동결건조된 시료의 오일을 추출하기 위하여 초임계 이산화탄소 추출 장비를 이용하였다 (Fig. 4). 운전 조건은 온도 (45, 55°C) 및 압력 (20, 30 MPa)을 조절하여 수행하였으며, Lee H. J. (2017)의 최적 조건에 근거하여 약간의 변형을 통해 적용하였다 (Lee H. J. et al., 2017). 50 g의 동결건조 시료를 스테인리스-스틸로 제작된 추출용기에 넣고 유체의 흐름으로 인한 시료의 이탈을 방지하기 위하여 탈지면을 추출용기 내부의 상단과 하단에 고정한 후 밀봉하였다. 이산화탄소 (CO_2) 가스를 주입하여 냉각기 (-20°C)를 통해 액화시킨 후 펌프 (Jasco, PU-2088-CO₂ Plus)로부터 목표 압력까지 도달시킨다. 초임계 이산화탄소 (SC-CO₂)는 추출기로 유입되어 추출기 내의 시료로부터 정유 성분

을 추출한 뒤 분리조에서 대기압 상태가 되어 용제와 용매가 분리하였다. CO₂의 유량은 27 g/min이며, 추출 시간은 2시간으로 하였다. 추출된 오일은 분석에 사용될 때까지 -40°C 압소에 보관하였다.

2.3. 유기용매 (Hexane) 추출

초임계 이산화탄소 추출 오일과 비교를 위하여, 유기용매를 이용하여 오일을 추출하였다. 50 g의 동결건조 시료와 유기용매 (Hexane) 500 mL를 비커에 넣고 자력교반기 (MS-20D, Daihan Scientific Co. Ltd., South Korea)를 이용하여 40°C, 400 rpm의 속도로 24시간동안 추출을 진행하였다. Filter paper (CHMLAB GROUP, F1091-110)를 사용하여 여과한 다음 회전감압농축기 (EYELA N-1000, Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C에서 유기용매를 증발시켜 오일을 회수하였다. 회수된 오일은 분석에 사용될 때까지 -40°C 압소에 보관하였다. 오일의 추출 수율은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, %로 나타내었다.

$$Oil\ Yield(\%) = \frac{S_1}{S} \times 100$$

여기서, S₁은 회수된 오일의 양 (g), S는 시료 채취량 (g)이다.

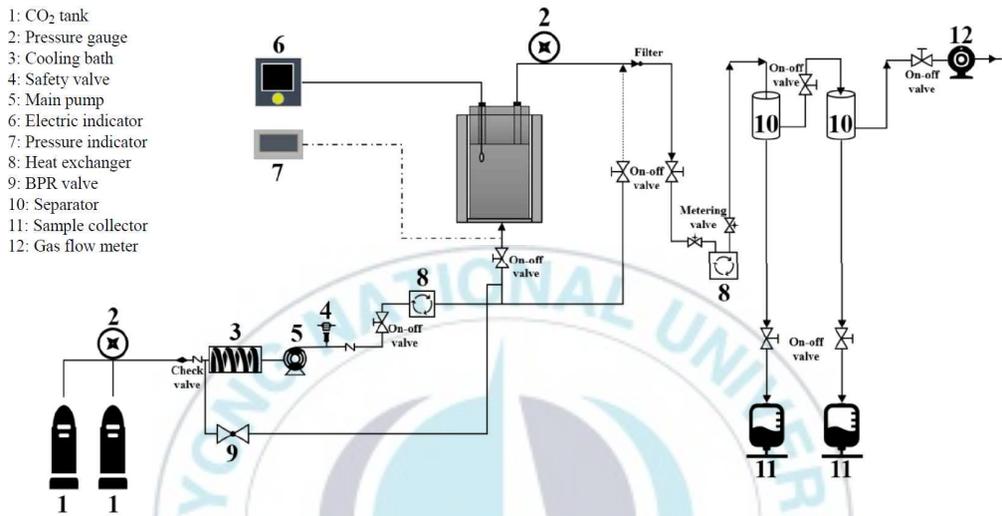


Fig. 4. A schematic diagram of the supercritical carbon dioxide extraction process (J. S. Park et al., 2019).

2.4. 오일의 안정성 평가

2.4.1. 산가 (Acid value)

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 오일의 산가 (Acid value)는 AOCS, official method Cd 3d-63 (2009)의 방법을 이용하여 측정하였다 (AOCS, 2009). 적정액은 0.1 N KOH-ethanol (potassium hydroxide-ethanol) 용액을 조제하여 사용하였으며, 200 mL 삼각플라스크에 0.1 g의 오일을 취하고 에탄올:에테르 (1:2, v/v) 혼합용액 100 mL를 넣어 오일을 완전히 녹여준다. 1% 페놀프탈레인 지시약 2-3 방울을 첨가한 후 뷰렛을 이용하여 플라스크를 흔들면서 0.1 N KOH-ethanol 용액을 한 방울씩 떨어뜨려 연분홍색을 30 초간 유지하였을 때 종말점으로 하였다. 같은 방법으로 증류수를 이용하여 공시험을 진행하였다. 산가는 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, mg KOH/g으로 나타내었다.

$$\text{산가 (mg KOH/g)} = \frac{5.611 \times (a - b) \times f}{S}$$

여기서 a는 본시험 적정에 사용된 0.1 N KOH-ethanol 용액의 부피 (mL), b는 공시험 적정에 사용된 0.1 N KOH-ethanol 용액의 부피 (mL), f는 0.1 N KOH-ethanol 용액의 역가, S는 시료채취량 (g)이다.

2.4.2. 과산화물가 (Peroxide value)

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 오일의 과산화물가 (Peroxide value)는 AOCS, official method Cd 8-53 (2009)의 방법을 이용하여 측정하였다 (AOCS, 2009). 적정액은 0.01 N Na₂S₂O₃ (sodium thiosulfate) 용액을 조제하여 사용하였으며, 250 mL 삼각플라스크에 0.1 g의 오일을 취하

고 초산:클로로포름 (3:2, v/v) 혼합용액 25 mL를 넣어 오일을 완전히 녹여준다. KI 포화용액 1 mL를 넣고 10분간 암소에 보관한 다음 증류수 30 mL와 1% 전분용액 1 mL를 넣고 잘 흔들어 준 후 청남색의 변화를 확인한다. 그 후 뷰렛을 이용하여 플라스크를 흔들면서 0.01 N Na₂S₂O₃ 용액을 한 방울씩 떨어뜨려 무색으로 변하여 30 초간 유지하였을 때 종말점으로 하였다. 같은 방법으로 증류수를 이용하여 공시험을 진행하였다. 과산화물가는 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, meq/kg으로 나타내었다.

$$\text{과산화물가 (meq/kg)} = \frac{(a - b) \times 10 \times f}{S}$$

여기서 a는 본시험 적정에 사용된 0.01 N Na₂S₂O₃ 용액의 부피 (mL), b는 공시험 적정에 사용된 0.01 N Na₂S₂O₃ 용액의 부피 (mL), f는 0.01 N Na₂S₂O₃ 용액의 역가, S는 시료채취량 (g)이다.

2.5. 오일의 지방산 조성 분석

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 오일의 지방산 조성 분석은 가스 크로마토그래피 (Gas Chromatography; GC) 장비를 이용하여 수행하였다. 오일은 AOCS, official method Ce 2-66 (1998)의 방법 및 권장 방법에 따라 지방산 메틸에스테르화 (Fatty Acid Methyl Esters; FAMES) 과정을 거쳐 준비하였으며, GC의 운전조건은 Table 1에 나타내었다 (AOCS, 1998). FAMES는 0.05 g의 오일을 50 mL vial에 취하여 C₁₇ (heptodexanoid acid) 0.1% hexane 용액 2 mL와 0.5 N NaOH-methanol 용액 3 mL를 넣고 30초간 vortex한 후 75°C에서 45분 동안 가열하였다. 이후 상온에서 10분 동안 식힌

다음 Boron trifluoride (BF_3) 3 mL를 넣고 30초간 vortex하여 동일한 온도에서 20분간 추가로 가열한 후 상온에서 10분 동안 방치하였다. HPLC용 hexane 3 mL와 10% NaCl 1 mL를 넣은 후 상등액을 취하여 0.45 μm hydrophobic syringe filter를 이용하여 여과하였다. 표준 지방산 메틸 에스테르 혼합물과의 체류 시간을 비교함으로써 오일의 지방산 조성을 확인하였다.



Table 1. Gas chromatography (GC) operating conditions for fatty acids analysis of *M. edulis* oil

Parameter	Conditions
Instrument	Agilent 6890N GC System
Split	Splitless
Inject Temperature	250°C
Carrier Gas & Flow Rate	He, 0.5 mL/min
Oven Condition	140°C (5 min) → 4 °C/min for 25 min → 240°C (17 min)
Detect Temperature	260°C
Column	Supelco sp 2560, capillary column Fused silica Capillary 100 m × 250 μm × 0.2 μm film thickness

2.6. 오일의 색도 측정

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 오일의 색도는 색차계 (Lovibond RT series, The Tintometer Ltd, Amesbury, UK)를 이용하여 L, a*, b* 색 공간으로 표현되는 3차원 좌표 값으로 측정하였다. 여기서 L은 명도 (0-100), a*는 빨강 (+a*)과 녹색 (-a*)의 정도, b*는 황색 (+b*)과 파랑 (-b*)의 정도를 나타낸다.

2.7. 오일의 항산화 활성

2.7.1. DPPH radical 소거능

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 오일의 DPPH radical 소거능은 Haq M. (2017)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다 (Haq M. et al., 2017). 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액은 0.1 mM의 농도로 조제하여 사용하였다. 100 μ L의 가수분해물과 0.1 mM DPPH 용액 3.9 mL를 혼합하여 30초간 Vortex한 후, 30분간 암실에서 반응시킨다. 분광광도계 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 517 nm의 파장에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; trolox (Sigma-Aldrich Co., USA)를 0.05 mg/mL로 하여 사용하였으며, 오일의 항산화 활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, %로 나타내었다.

$$DPPH \text{ radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_s/A_c)] \times 100$$

여기서, A_s 는 517nm에서 오일의 흡광도, A_c 은 517nm에서 Control (Methanol)의 흡광도이다.

2.7.2. ABTS radical 소거능

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 오일의 ABTS radical 소거능은 Haq M. (2017)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다 (Haq M. et al., 2017). ABTS 용액은 HPLC용 Water 10 mL에 0.0394 g의 ABTS를 녹인 7.4 mM ABTS 수용액과 HPLC용 Water 10mL에 0.00662 g의 Potassium persulfate를 녹인 2.4 mM Potassium persulfate 수용액을 혼합하여 암실에서 12시간동안 반응시켰다. 이후 분광광도계를 이용하여 흡광도가 0.7 ± 0.02 가 되도록 메탄올에 희석하여 사용하였다. 100 μ L의 가수분해물과 ABTS 용액 3.9 mL를 혼합하여 30초간 Vortex한 후, 6분간 암실에서 반응시킨다. 분광광도계를 이용하여 734 nm의 파장에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 Trolox (Sigma-Aldrich Co., USA)를 0.05 mg/mL로 하여 사용하였으며, 오일의 항산화 활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, %로 나타내었다.

$$ABTS \text{ radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_s/A_c)] \times 100$$

여기서, A_s 는 734nm에서 오일의 흡광도, A_c 은 734nm에서 Control (Methanol)의 흡광도이다.

2.8. 오일의 아스타잔틴 (Astaxanthin) 함량 분석

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 오일의 아스타잔틴 함량은 Roy V. C. (2020)가 기술한 방법을 이용하여 분석하였다 (Roy V. C. et al., 2020). 일정량의 오일을 이동상 용매와 혼합한 후 0.20 μm hydrophilic membrane filter를 사용하여 여과한 후 HPLC를 이용하여 470 nm에서 분석한다. HPLC 분석 조건은 Table 2에 제시하였다. 분석을 위하여 사용된 이동상 용매는 HPLC용 ethanol, acetonitrile 및 dichloromethane을 850:50:100 (v/v)의 비율로 하여 사용하였으며, 이는 0.45 μm hydrophilic membrane filter로 filtering한 후 5분간 degas 과정을 거쳤다. 본 실험의 표준물질로 Astaxanthine (ASX)을 사용하여 검량선을 작성하였으며, 추출된 오일의 아스타잔틴 함량은 mg ASX/g oil로 나타내었다.

2.9. 오일의 열중량측정 (Thermal Gravimetric analysis; TGA)

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 오일의 열중량 분석 (TGA)은 시료의 열 안정성을 분석하기 위해 수행되었으며, Saravana P. S. (2016)의 방법을 약간 변형하여 진행하였다 (Saravana P. S. et al., 2016). TGA는 Perkin-Elmer TGA7 (Perkin Elmer, USA)을 이용하여 분석되었으며, 약 10-13 mg의 시료를 50°C에서부터 700°C까지 10 °C/min의 속도로 가열하여 진행하였다. 산화 공정에 적합한 환경을 촉진하기 위해, N₂ 가스를 사용하였다.

Table 2. High performance liquid chromatography (HPLC) operating conditions for astaxanthin content of *M. edulis* oil

Parameter	Conditions
	Jasco HPLC system
Instrument	Pump (PU-2089 Plus), Detector (UV-2075 Plus), Column oven (CO-2060 Plus)
UV absorbance	470 nm
Inject Volume	20 μ L
Flow rate	1 mL/min
Column	Capcell Pak C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)

2.10. 아임계 수 가수분해

진주담치 가수분해물을 얻기 위하여, Hastelloy C276 특수금속으로 제작된 1000 cm³ 부피의 고온, 고압용 반응기와 전열기, 교반기 등이 장착된 아임계 수 가수분해 장치를 이용하였다 (Fig. 5). 시료는 초임계 이산화탄소 추출 후 지질이 제거된 상태의 시료를 준비하여 사용하였다. 먼저 시료 30 g와 pH 7.04로 맞춰진 증류수 600 mL (1:20, w/v)를 반응기에 넣고 밀봉한 후 질소가스를 이용하여 초기 압력 30 bar를 주입하고 교반기는 200 rpm의 속도를 유지하였다. 전열기를 이용하여 예열한 다음 실험온도 (120-240°C)에 도달하였을 때 30분간 반응을 진행하였다. 그 후 반응이 완료된 가수분해물을 수득하여 filter paper (CHMLAB GROUP, F1091-110)를 이용하여 필터링한 다음 4°C에 보관하였으며, 분석을 위하여 동결건조를 진행하였다. 필터링하여 얻은 잔존물은 55°C에서 12시간 건조시킨 후 무게를 측정하여 아래의 식을 이용하여 가수분해 효율성을 계산하였으며, %로 나타내었다.

$$\text{Hydrolysis efficiency (\%)} = \frac{S - S_1}{S} \times 100$$

여기서 S는 실험에 사용된 시료의 양(g), S₁은 가수분해 후 잔존물의 양(g)이다.

진주담치 가수분해물과의 비교 실험을 위하여, 30 g의 시료와 99.99% 에탄올 용매 600 mL (1:20, w/v)을 혼합한 후 자력교반기 (MS-20D, Daihan Scientific Co. Ltd., South Korea)를 이용하여 25°C에서 200 rpm의 속도로 24 시간동안 교반시켜 실험을 진행하였다. Filter paper (CHMLAB GROUP, F1091-110)를 이용하여 필터링 한 다음 분석에 사용될 때까지 4°C에 보관하였다.

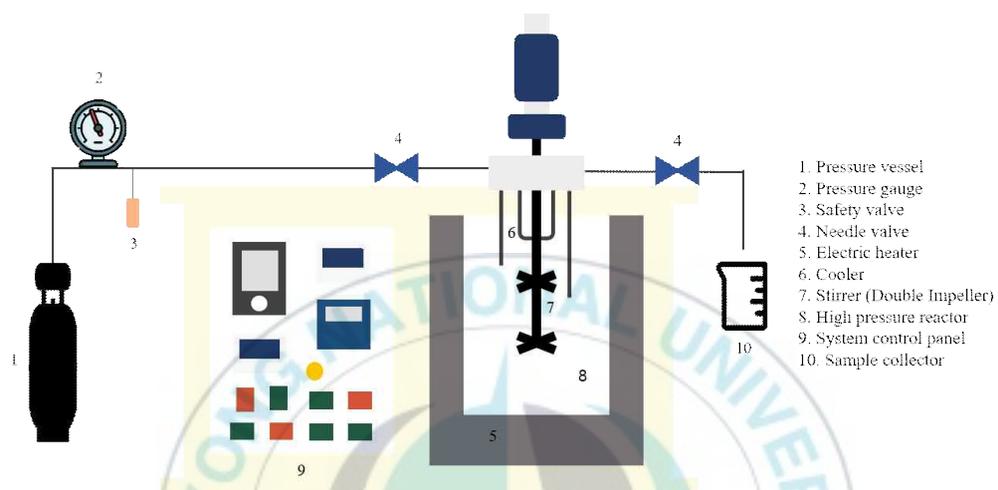


Fig. 5. Schematic diagram of the subcritical water hydrolysis apparatus.

2.11. 마이야르 반응 생성물 (Millard reaction products; MRPs)

미야르 반응 생성물은 Saravana P. S. (2016)의 방법을 이용하여 측정하였다 (Saravana P. S. et al., 2016). 진주담치 가수분해물의 갈변 정도는 아임계 수 가수분해를 완료 후 필터링한 가수분해물을 즉시 UV-Spectrometer (UV mini-1240)를 이용하여 420 nm의 파장에서 측정하였으며, 흡광도 단위 (A. U.)로 나타내었다.

2.12. 가수분해물의 물리적 특성

2.12.1. pH

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 pH 측정은 pH meter (Thermo Scientific, ORION STAR A211)를 이용하여 측정하였다. 측정 전 pH 완충 용액 (pH 4, pH 7 및 pH 10)으로 보정하여 표준 값을 설정한 후 진행하였다.

2.12.2. 색도

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 색도는 2.6에 제시된 방법과 동일하게 진행하였다.

2.13. 가수분해물의 항산화 활성

2.13.1. DPPH radical 소거능

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능은 Khanam

U. K. S. (2012)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다 (Khanam U. K. S. et al., 2012). DPPH 용액은 0.1 mM의 농도로 조제하여 사용하였다. 100 μ L의 추출물과 0.1 mM DPPH 용액 3.9 mL를 혼합하여 30초간 Vortex한 후, 30분간 암실에서 반응시킨다. 분광광도계를 이용하여 517 nm의 파장에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 Trolox (Sigma-Aldrich Co., USA)을 사용하여 작성하였으며, 가수분해물의 항산화 활성 함량을 mg Trolox equivalent (TE)/g dried sample로 나타내었다.

2.13.2. ABTS radical 소거능

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 ABTS radical 소거능은 Khanam U. K. S (2012)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다 (Khanam U. K. S et al., 2012). ABTS 용액은 HPLC용 Water 10 mL에 0.0394 g의 ABTS를 녹인 7.4 mM ABTS 수용액과 HPLC용 Water 10 mL에 0.00662 g의 Potassium persulfate를 녹인 2.4 mM Potassium persulfate 수용액을 혼합하여 암실에서 12시간동안 반응시켰다. 이후 분광광도계를 이용하여 흡광도가 0.7 ± 0.02 가 되도록 메탄올에 희석하여 사용하였다. 100 μ L의 추출물과 ABTS 용액 3.9 mL를 혼합하여 30초간 Vortex한 후, 6분간 암실에서 반응시킨다. 분광광도계 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 734 nm의 파장에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 Trolox (Sigma-Aldrich Co., USA)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 가수분해물의 항산화 활성 함량을 mg TE/g dried sample로 나타내었다.

2.13.3. 철 이온 환원력(Ferric reducing antioxidant power; FRAP)

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 철 이온 환원력은 Belwal T. (2016)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다 (Belwal T. et al., 2016). Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 용액은 300 mM acetate buffer (pH

3.6):TPZ용액:FeCl₃·6H₂O용액을 10:1:1 (v/v)의 비율로 제조하여 사용하였다. 0.3 mL의 추출물과 FRAP reagent 3 mL를 혼합하여 3초간 Vortex한 후, 4분간 암실에서 반응시켰다. 분광광도계를 이용하여 593 nm의 파장에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 Trolox (Sigma-Aldrich Co., USA)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 가수분해물의 항산화 활성 함량을 mg TE/g dried sample로 나타내었다.

2.14. 가수분해물의 페놀류 함량 분석

2.14.1. 총 페놀 함량 (Total Phenolic content)

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 총 페놀 함량은 노란색의 Folin-Ciocalteu (FC) reagent가 알칼리 조건에서 추출물의 polyphenol성 화합물에 의해 청색의 환원물을 생성하는 원리를 이용하였으며, Gereniu C. R. N. (2017)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다 (Gereniu C. R. N. et al., 2017). FC reagent 용액은 HPLC용 water를 1:10의 비율로 혼합하였고, 알칼리 조건 형성을 위하여 7.5% Sodium carbonate 용액을 제조하여 사용하였다. 1 mL의 가수분해물에 FC reagent 1 mL와 7.5% Sodium carbonate 용액 0.8 mL를 혼합하여 10초간 Vortex한 후, 2시간 동안 암실에서 반응시킨다. 분광광도계를 이용하여 765 nm의 파장에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 Gallic acid (Sigma-Aldrich Co., USA)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 가수분해물의 총 페놀 함량을 mg Gallic acid equivalent (GAE)/g dried sample로 나타내었다.

2.14.2. 총 플라보노이드 함량 (Total flavonoid content)

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Ozsoy

N. (2008)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다 (Ozsoy N. et al., 2008). 125 μL 의 가수분해물과 7.5% Sodium Nitrite 용액 75 μL 을 혼합하여 30초간 Voltex한 후, 6분간 방치한다. 150 μL 의 40% Aluminium chloride 용액을 넣고 5분간 방치한다. 이후 1 M Sodium hydroxide 용액 750 μL 과 증류수를 넣어 최종 부피 2.5 mL가 되도록 만든 후, 15분간 반응시킨다. 분광광도계를 이용하여 510 nm의 파장에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 Quercethin (QE) (Sigma-Aldrich Co., USA)을 사용하여 검량선을 작성하였으며, 가수분해물의 총 플라보노이드 함량을 mg QE/g dried sample로 나타내었다.

2.15. 가수분해물의 당 함량 분석

2.15.1. 총 당 함량 (Total Glucose content)

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 총 당 함량은 Meillisa A. (2015)의 방법을 이용하여 측정하였다 (Meillisa A. et al., 2015). 0.75 mL의 가수분해물에 진한 황산 2.25 mL과 40% Phenol 0.45 mL을 넣고 잘 섞어준다. 그 후 96°C에서 5분간 반응시키고 상온에서 식힌다. 분광광도계를 이용하여 490 nm에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 Glucose (GE) (Sigma-Aldrich Co., USA)을 사용하여 검량선을 작성하였으며, 가수분해물의 총 당 함량은 g GE/100 g dried sample로 나타내었다.

2.15.2. 환원당 함량 (Reducing Sugar content)

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 환원당 함량은 Saqib A. A. N. (2011)의 방법을 이용하여 3, 5-dinitrosalicylic (DNS) 비색정량법으로 측정하였다 (Saqib A. A. N. et al., 2011). DNS 용액은 1 g dinitrosalicylic acid와

30 g Sodium potassium tartrate (Rochelle salt)를 0.5 N NaOH 80 mL에 녹인 후 증류수를 넣어 최종 부피 100 mL가 되도록 제조하여 사용하였다. 1 mL의 가수분해물과 4 mL의 DNS 용액을 넣고 10초간 Vortex한다. 그 후, 96°C에서 5분간 반응시키고 실온이 될 때까지 방치한다. 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 Glucose (Sigma-Aldrich Co., USA)을 사용하여 검량선을 작성하였으며, 가수분해물의 환원당 함량은 g GE/100 g dried sample로 나타내었다.

2.16. 가수분해물의 수용성 단백질 함량 분석

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 수용성 단백질 함량은 Lowry (1951)의 방법을 이용하여 측정하였다 (Lowry O. H. et al., 1951). 1 N Folin-Ciocalteu (FC) reagent 용액은 2 N FC reagent와 HPLC용 Water를 1:1 비율로 혼합하고, Lowry 용액은 용액 1과 용액 2를 50:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. 용액 1은 10 g의 Na_2CO_3 과 2 g의 NaOH를 증류수 400 mL에 완전히 녹인 다음 최종 부피 500 mL가 되도록 만들고, 용액 2는 50 mg의 Cupric sulfate와 0.1 g의 Potassium sodium-tartrate를 증류수 8 mL에 완전히 녹인 다음 최종 부피 10 mL가 되도록 만든다. 0.2 mL의 가수분해물과 Lowry 용액 1 mL를 섞고 2초간 Vortex한 후, 20분 동안 암실에서 반응시킨다. 그 후, FC reagent 100 μL 를 넣고 2초간 Vortex한 후, 35분 동안 암실에서 반응시킨다. 분광광도계를 이용하여 750 nm에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 Bovin serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich Co., USA)을 사용하여 검량선을 작성하였으며, 가수분해물의 수용성 단백질 함량은 g BSA/100 g dried sample로 나타내었다.

2.17. 가수분해물의 겔 전기영동 (SDS-PAGE)

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 SDS-PAGE는 단백질 분자량을 확인하기 위하여 수행되었으며, 이전에 연구된 방법을 약간 변형하였다 (Asaduzzaman A. et al., 2020). 본 실험에서는 12 % resolving gel과 5 % stocking gel을 사용하였다. 샘플 용액은 먼저 동결 건조 시료 (3 mg)를 5 mL의 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 7.2)에 희석하였다. 그 다음, 5 mL의 sample buffer와 혼합하여 90°C에서 5분 동안 가열하였다. 10 μ L의 샘플 용액을 Tris-glycine-SDS buffer (Noble Bio, TGS buffer 10)에 담겨진 Mini-PROTEIN Tetra cell (cat. #1658004)에 로딩하여 120 V에서 2시간 동안 처리하였다. 표준물질로써 단백질 마커 (cat. #161-0732)를 사용하여 분자량을 측정하였으며, 이는 첫 레인에 로딩하였다.

2.18. 가수분해물의 아미노산 조성

2.18.1. 구성아미노산

지질이 제거된 상태의 진주담치 파우더에 함유되어 있는 구성아미노산의 정량을 위하여 Henderson J. W. (2000)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다 (Henderson J. W. et al., 2000). 균질화된 시료 2 g을 6 N HCl 30 mL에 혼합하여 130 °C에서 24시간 동안 분해시킨다. 이후 초순수로 희석하여 0.45 μ m hydrophilic syringe filter를 이용하여 여과하고 NaOH로 중화한 다음 3차 증류수로 희석시켜 HPLC로 분석한다. HPLC는 FL detector 1260FL (Agilent, USA)가 장착된 Ultimate 300 (pump, auto-sampler, oven and UV; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) system을 이용하였다. 샘플은 Inno C18 Column (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m / YoungJin biochrom, Korea)을 통해 분리하였으

며, 분석 시간은 35분, column과 sample 온도는 각각 40°C 및 20°C를 유지하였고, 샘플은 0.5 μ L을 주입하였다. 이동상 용매 A는 40 mM sodium phosphate (pH 7)와 용매 B는 3차 증류수:Acetonitrile:Mehtanol (10:45:45, v/v%)을 사용하였다. FL detector의 경우 OPA (o-phthalaldehyde)는 Emission 450 nm, Exctitaion 340 nm, Fmoc (fluorenylmethyloxycarbonyl chloride)는 Emission 305 nm, Excitation 266 nm로 검출하였다. UV detector는 338 nm로 구성아미노산을 검출하였다. 본 실험의 표준물질은 0.1 N HCl에 희석하여 진행하였으며, 진주담치 파우더의 구성아미노산 함량은 mg/g으로 나타내었다.

2.18.2. 유리아미노산

진주담치의 de-oiled 분말 및 가수분해물의 유리아미노산 정량은 Henderson J. W. (2000)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다 (Henderson J. W. et al., 2000). 유리아미노산 추출을 위하여 먼저 샘플 2 g을 30 mL의 70% ethanol에 혼합하여 1시간동안 ultrasound 처리한 다음 상온에서 24시간동안 방치한 후 0.20 μ m hydrophilic sylinge filter로 filtering 후 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석은 구성아미노산과 동일한 조건으로 진행하였으며, 진주담치 파우더 및 가수분해물의 유리아미노산 함량은 mg/g 및 mg/L로 나타내었다.

2.19. 가수분해물의 타우린 분석

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 타우린 함량은 Orth. D. L. (2001)의 방법을 이용하여 분석하였다 (Orth D. L., 2001). 시료는 동결건조된 가수분해물과 HPLC용 water를 1%의 농도로 희석하여 사용하였다. 타우린의 유도체화를 위하여 1 mL의 가수분해물과 0.01 M Carbonate buffer (pH 9.0) 2

mL와 dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.5 mL, 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)를 넣어 잘 섞이도록 30초간 vortex한 후, 40°C에서 15분간 반응시킨다. 이후, 6.5 mL의 0.01 M Phosphate buffer (pH 6.0)를 넣어 잘 혼합한 후, 0.2 μ m hydrophilic membrane filter를 이용하여 필터링 후 빛으로부터 보호하여 보관 후 HPLC를 이용하여 360 nm에서 분석한다. HPLC의 분석 조건은 Table 3에 나타내었다. 분석을 위하여 사용된 이동상 용매 A는 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0), 용매 B는 HPLC 등급의 acetonitrile을 사용하였으며, 두 용매 모두 0.45 μ m로 filtering한 후 5분간 degas 과정을 거쳤다. 본 실험의 표준물질로 Taurine을 사용하여 검량선을 작성하였으며, 가수분해물의 타우린 함량은 mg taurine/100 g dried sample로 나타내었다.

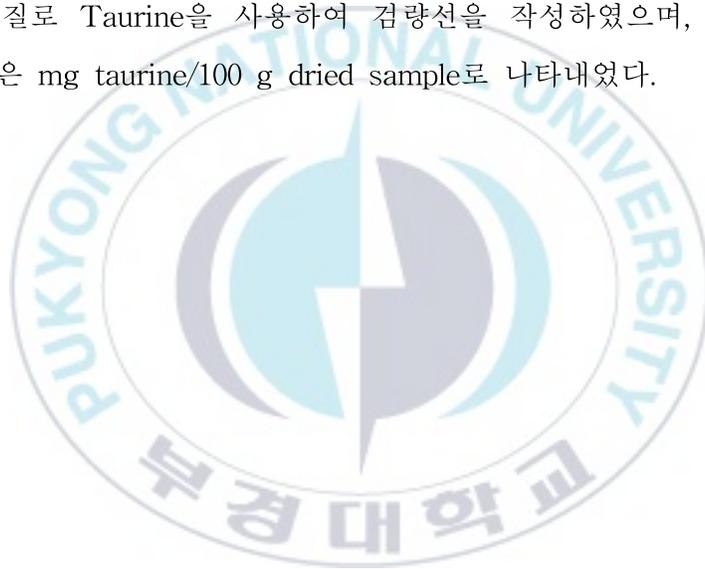


Table 3. High performance liquid chromatography (HPLC) operating conditions for taurine content of *M. edulis* hydrolysates

Parameter	Conditions
	Jasco HPLC system
Instrument	Pump (PU-2089 Plus), Detector (UV-2075 Plus), Column oven (CO-2060 Plus)
UV absorbance	360 nm
Inject Volume	20 μ L
Flow rate	1 mL/min
Gradient program	10% of solvent B \rightarrow 25% (~10 min) \rightarrow 50% (15~19 min) \rightarrow 10%
Column	Capcell Pak C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)

2.20. 가수분해물의 항고혈압 활성 측정

진주담치 가수분해물 및 에탄올 추출물의 항고혈압 활성은 Dojindo사의 ACE Kit - WST를 구입하여 해당 매뉴얼에 따라 측정하였다. 동결 건조 샘플은 HPLC용 water에 희석해서 1% 용액으로 제조하였다. Enzyme working solution은 먼저 Enzyme B를 2 mL의 HPLC용 Water에 용해시켜 Enzyme B 용액을 만든 후 1.5 mL를 채취하여 Enzyme A에 주입하여 제조하였으며, Indicator working solution은 Enzyme C와 Coenzyme에 HPLC용 Water 3 mL씩 넣어 용해시킨 다음 2.8 mL씩 채취하여 Indicator working solution에 주입하여 사용하였다. 96-well plate에 20 μ L의 샘플 용액을 첨가하고 blank 1 과 blank 2 well에 초순수 20 μ L를 넣었다, 그 다음 시료, blank1 및 blank2 well에 20 μ L의 기질 완충액 (substrate buffer)을 넣고 blank2 well에는 초순수 20 μ L을, 시료 및 blank1엔 enzyme working solution 20 μ L를 추가하여 37°C에서 1시간동안 incubator에서 배양하였다. 모든 well에 indicator working solution 200 μ L를 넣고 실온에서 10분 동안 방치한 다음 분광광도계 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 표준물질로 Captopril (1%, w/v)을 사용하였으며, 고혈압 저해 활성은 아래의 식을 이용하여 %로 나타내었다.

$$\text{Inhibitory activity (\%)} = \frac{A_{\text{blank1}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank2}}} \times 100$$

2.21. 통계처리

본 실험의 모든 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 Turkey의 다중비교로 $p < 0.05$ 의 유의 수준에서 유의차 검정을 실시하였다. 상관관계는 Pearson's correlation analysis를 통하여 분석하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

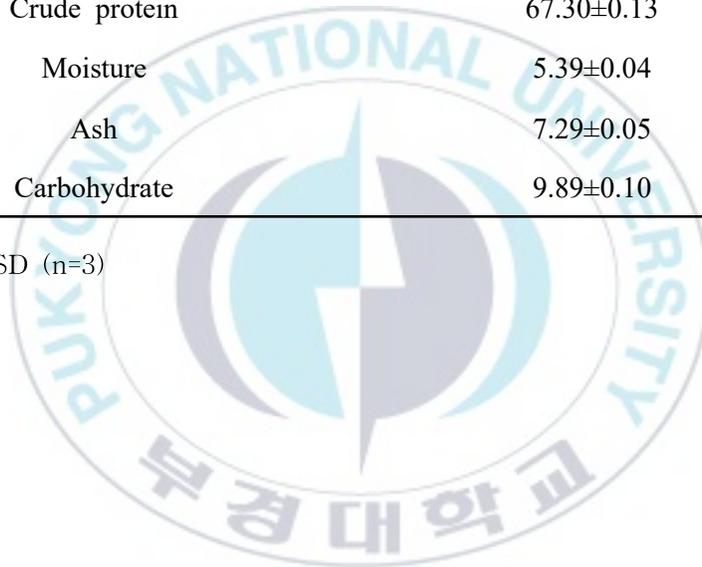
1. 일반성분 분석

동결건조된 진주담치의 일반성분은 Table 4에 나타내었다. 진주담치 분말의 일반성분 분석 결과, 수분은 $5.39 \pm 0.04\%$, 회분은 $7.29 \pm 0.05\%$, 지질은 $10.13 \pm 0.12\%$, 탄수화물은 $9.89 \pm 0.10\%$, 단백질은 $67.30 \pm 0.13\%$ 로 단백질이 가장 높은 함량을 차지하였다. 해산물 중 일부는 단백질 함량이 높아 필수 아미노산이 풍부하여 다양한 건강상의 이점을 제공한다 (Mohammad S. H. et al., 2016; Nguyen T. T. et al., 2017; Hyung J. H. et al., 2018). 단백질은 관상동맥 심장 질환 (CHD), 고혈압 질병 등의 발병 위험 감소와 관련이 있다 (Tahergorabi R. et al., 2016). 따라서, 본 연구를 통하여 진주담치 (*M. edulis*)는 고단백 식품소재로서의 이용이 가능성에 대해 확인하였다.

Table 4. Proximate composition of lyophilized *M. edulis* powder

composition	Content (%)
	<i>M. edulis</i>
Crude lipid	10.13±0.12
Crude protein	67.30±0.13
Moisture	5.39±0.04
Ash	7.29±0.05
Carbohydrate	9.89±0.10

1) Mean±SD (n=3)



2. 오일의 추출 수율

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 진주담치 오일의 수율은 Table 5에 나타내었다. 기존의 추출법인 유기용매를 이용한 추출 오일의 경우 $6.40 \pm 0.11\%$ 의 수율을 나타내었고, 초임계 이산화탄소를 이용한 추출은 55°C , 30 MPa 조건에서 $6.02 \pm 0.79\%$ 로 최대의 수율을, 45°C , 20 MPa 조건에서 최저의 수율을 확인하였다. 본 실험에서 유기용매 추출 수율이 초임계 이산화탄소 추출 수율보다 높았으나, 유독성분인 용매 제거와 같은 후처리 공정이 필요 없다는 점을 통하여 초임계 이산화탄소 추출법이 더 우수하다고 사료된다. 초임계 이산화탄소는 유기용매인 Hexane과 달리 인지질과 같은 비극성 화합물 및 양극성 물질을 추출하는데 매우 효과적이며, 초임계 이산화탄소 추출 온도 및 압력의 증가는 용해력을 증가시키고 더 높은 수율을 초래하였다 (M. Haq et al., 2017; Lee H. J. et al., 2017). 뿐만 아니라, 추출 시간에 있어서 초임계 이산화탄소 추출법은 유기용매 추출법에 비해 12배 정도 단축됨을 확인함으로써 초임계 이산화탄소 추출법은 진주담치 오일을 추출하기 위한 우수한 친환경 공정임을 확인하였다.

Table 5. Oil yield of *M. edulis* oil obtained by SC-CO₂ and organic solvent (Hexane) extraction

	Conditions	Yield (%)
SC-CO ₂	45°C, 20 MPa	5.03±0.61 ^c
	45°C, 30 MPa	5.06±0.31 ^c
	55°C, 20 MPa	5.51±0.38 ^{b,c}
	55°C, 30 MPa	6.02±0.79 ^{a,b}
Organic solvent	Hexane	6.40±0.11 ^a

1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

3. 오일의 안정성 평가

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 진주담치 오일의 품질 유지를 위한 안정성 평가는 산가 및 과산화물가를 측정하여 진행하였으며, 이는 Table 6에 나타내었다.

산가는 유리지방산의 존재로 인한 어유의 산도 지표로써, 고도 불포화 지방산 함량이 많은 어유는 저장 조건 및 지방산 조성에 따라 산화되는 속도가 빨라짐으로써 열에 불안정하다 (Lee S. M. et al., 2011). 오일의 산가는 오일에 함유된 성분, 추출 공정 및 원료의 신선도 등 여러 요인에 따라 달라진다 (Wrolstad, R. E. et al, 2005). 초임계 이산화탄소 추출 오일의 산가는 $6.36 \pm 0.02 \sim 7.61 \pm 0.09$ mg KOH/g으로, 가장 높은 온도 및 압력 조건인 55°C , 30 MPa이 가장 낮은 함량을 나타내었다. 반면에, 유기용매 추출 오일은 9.00 ± 0.02 mg KOH/g으로 허용 가능한 한계치 (7~8 mg KOH/g)를 초과하는 산가를 나타내었다. 이는 장시간 열의 적용으로 인한 것으로 사료되며, 초임계 이산화탄소 추출법이 오일의 품질 유지를 위한 효과적인 공정임을 확인하였다.

과산화물가는 과산화물 측정을 기본으로 하는 지표로써, 지질 산화 또는 열산화 공정에 의해 생성된 1차 산화도를 평가하는데 이용된다 (Lee S. M. et al., 2011). 초임계 이산화탄소 추출 오일의 과산화물가는 $3.71 \pm 0.05 \sim 4.59 \pm 0.02$ meq/kg으로, 가장 높은 온도 및 압력 조건인 55°C , 30 MPa이 가장 낮은 함량을 나타내었으며, 산가와 비슷한 양상을 보인 것을 확인하였다. 반면에, 유기용매 추출 오일은 5.13 ± 0.04 meq/kg으로 초임계 이산화탄소 추출 오일과 유의적인 차이가 없었으며, 허용 가능한 한계치 (≤ 5 meq/kg)를 초과하는 값을 나타내었다.

Table 6. Oxidation stability properties of *M. edulis* oil obtained by SC-CO₂ and organic solvent (Hexane) extraction

	Conditions	Acid value (mg KOH/g)	Peroxide value (meq/kg)
SC-CO ₂	45°C, 20 MPa	7.61±0.09 ^b	4.02±0.33 ^c
	45°C, 30 MPa	7.46±0.07 ^b	3.75±0.16 ^c
	55°C, 20 MPa	6.82±0.18 ^c	4.59±0.02 ^b
	55°C, 30 MPa	6.36±0.02 ^d	3.71±0.05 ^c
Organic solvent	Hexane	9.00±0.02 ^a	5.13±0.04 ^a

1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

4. 오일의 지방산 조성 분석

초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 진주담치 오일의 지방산 조성은 Table 7에 나타내었다. 진주담치 오일의 주요 지방산은 포화 지방산인 Palmitic acid (C16:0), 불포화 지방산인 Palmitoleic acid (C16:1), ω -3 지방산인 Eicosapentanoic acid (EPA; C20:5n3) 및 Docosahexanoic acid (DHA; C22:6n3) 등으로 나타났다. 이 중 Palmitic acid가 20.12~36.96%로 가장 높았으며, 두 번째로는 EPA가 16.79~21.75%로 높은 함량을 나타내었다. 포화정도에 따라서는 불포화 지방산 (47.22~61.29%)이 포화지방산 (41.91~53.54%) 보다 많이 함유되어 있었다. EPA 및 DHA의 총 합은 22.58~27.52%로 나타났는데, 이 중 55°C, 30 MPa 조건에서 27.52%로 가장 많이 함유하였다. 또한, 유기용매를 이용한 추출법보다 초임계 이산화탄소를 이용한 추출법이 더 우수한 함량을 보였으며, 이를 통하여 초임계 이산화탄소 추출법을 이용하여 추출된 진주담치 오일은 기능성 소재로서의 활용이 충분할 것으로 여겨진다. 뿐만 아니라, 이전에 연구에 따르면 ω -3 지방산은 동맥경화증 예방에 효과적임을 입증하였으며, 신진대사의 다양한 측면 통제에 있어 국소 호르몬으로서의 중요한 역할을 한다고 알려져있다 (Dyerberg J. et al., 1978; Back M., 2017).

Table 7. Fatty acids composition of *M. edulis* oil obtained by SC-CO₂ and organic solvent (Hexane) extraction

SI	Name	SC-CO ₂				Organic solvent
		45 °C, 20 MPa	45 °C, 30 MPa	55 °C, 20 MPa	55 °C, 30 MPa	Hexane
		Area (%)	Area (%)	Area (%)	Area (%)	Area (%)
1	Lauric acid (C12:0)	ND	0.12	ND	ND	10.87
2	Myristic acid (C14:0)	5.96	8.97	5.05	8.59	4.00
3	Palmitic acid (C16:0)	25.47	36.96	24.56	36.28	20.12
4	Palmitoleic acid (C16:1)	17.76	23.56	17.17	23.26	11.92
5	Heptadecanoic acid (C17:0)	10.57	2.13	9.75	2.13	13.14
6	Stearic acid (C18:0)	3.09	4.42	2.46	4.45	3.75
7	Eleic acid (C18:1n9c)	2.94	3.28	3.47	3.69	3.32
8	Linoleic acid (C18:2)	1.07	1.49	1.35	1.45	0.79
9	Arachidic acid (C20:0)	1.14	1.07	0.16	1.11	0.91
10	cis-11-Eicosenoic acid (C20:1)	1.95	3.10	1.64	2.67	2.14
11	cis-11,14 Eicosadienoic acid (C20:2)	2.53	1.54	2.99	1.64	1.74
12	Arachidonic acid (C20:4n6)	1.36	0.72	1.57	0.77	1.77
13	cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	2.04	0.27	1.56	0.28	2.94
14	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentanoic acid (C20:5n3) / EPA	18.66	19.13	20.33	21.75	16.79
15	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexanoic acid (C22:6n3) / DHA	5.46	5.36	6.94	5.77	5.79
	ΣEPA + DHA	24.12	24.49	27.27	27.52	22.58
	Σω-6 PUFAs	4.38	5.31	4.56	4.90	4.70
	ΣSFAs	46.23	53.54	41.97	52.57	41.91
	ΣUFAs	53.77	58.46	57.03	61.29	47.22

ND: Not detected

* Σω-6 PUFAs: Total omega-6 polyunsaturated fatty acids.

SFAs: Saturated fatty acids

UFAs: Unsaturated fatty acids

5. 오일의 색도

일반적으로 어유 및 식물유 등의 제품을 구매 시 가장 먼저 고려되는 사항은 색으로, 소비자들은 밝은 색의 오일을 선호하며 품질을 결정하는 요소 중 하나이다 (Ohgami K. et al., 2003). 진주담치 오일은 카로티노이드계 색소인 아스타잔틴이 함유되어 있어 진홍빛의 색상을 가지고 있다 (Fig. 6). 추출 조건에 따른 진주담치 오일의 색도를 측정된 결과는 Table 8에 나타내었다. 명도인 L^* value는 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출된 오일의 경우 23.69 ± 0.19 에서 25.42 ± 0.19 의 범위였으며, 유기용매를 이용하여 추출된 오일의 경우 22.19 ± 0.10 으로 나타났다. 초임계 이산화탄소 추출에 의해 얻어진 오일의 색상이 더 밝은 것으로 알려져 있으며, 본 실험 또한 유기용매 추출 오일 보다 초임계 이산화탄소 추출 오일이 더 밝은 색상을 가지고 있음을 확인하였다 (Friedrich, J. P. and G. R. List, 1982). 어유 정제공정에 있어서 오일의 색상 및 밝기 등의 요소는 비용을 결정하는데 중요한 역할을 한다 (Noriega-Rodriguez, J. et al., 2009). 추출된 오일을 제품화하기 전 어두운 색의 오일은 허용 가능한 밝은 색상을 얻기 위한 고가의 가공이 필요하기 때문에, 필요 요소 측면에 있어서 초임계 이산화탄소 추출 오일이 유기용매 추출 오일보다 이점을 가질 것으로 여겨진다.

Table 8. Color properties of *M. edulis* oil obtained by SC-CO₂ and organic solvent (Hexane) extraction

Conditions		L*	a*	b*
SC-CO ₂	45 °C, 20 MPa	25.42±0.19 ^a	3.20±0.19 ^b	3.39±0.22 ^a
	45 °C, 30 MPa	24.03±0.21 ^c	1.63±0.05 ^c	1.66±0.08 ^c
	55 °C, 20 MPa	24.73±0.22 ^b	4.01±0.52 ^a	2.38±0.43 ^b
	55 °C, 30 MPa	23.69±0.19 ^d	0.33±0.02 ^d	-0.68±0.02 ^e
Organic solvent	Hexane	22.19±0.10 ^e	0.16±0.03 ^d	-0.09±0.02 ^d

1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

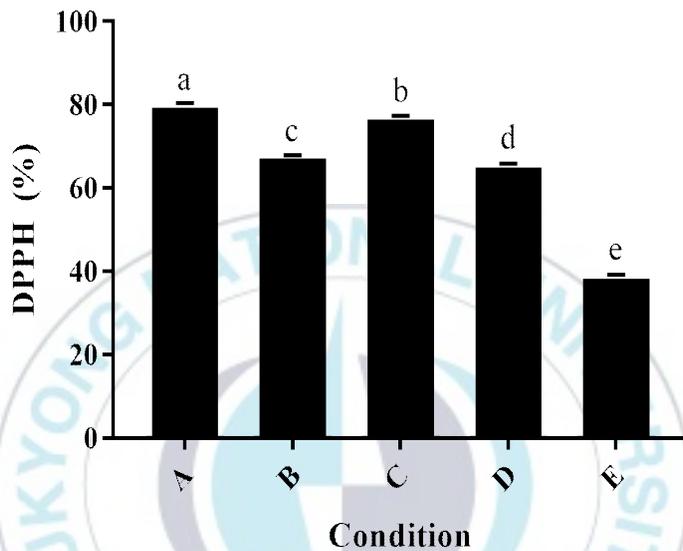


45 °C 20 MPa 45 °C 30 MPa 55 °C 20 MPa 55 °C 30 MPa Hexane

Fig. 6. Photograph of *M. edulis* oil.

6. 오일의 항산화 활성

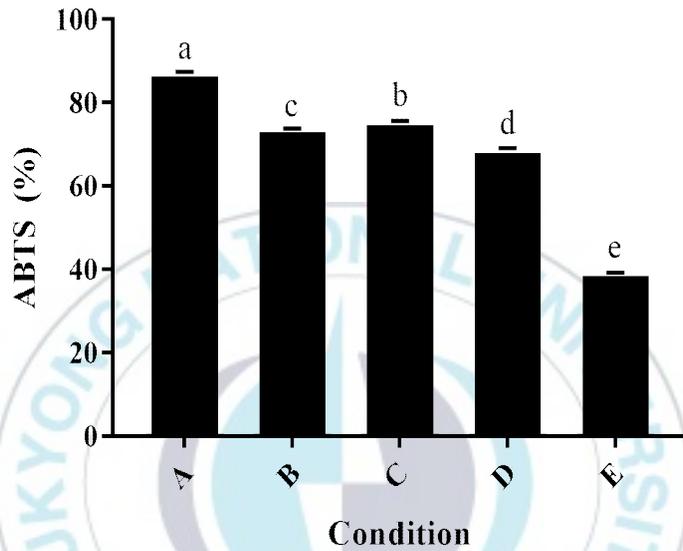
본 실험에서는 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 이용하여 초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 진주담치 오일의 항산화 활성 (Antioxidant activity)을 평가하였으며, 그 결과 Fig. 7 및 Fig. 8에 나타내었다. 초임계 이산화탄소 추출 오일의 DPPH 및 ABTS radical 소거능은 추출 온도 및 압력 조건에 따라 유의적인 차이가 있는 것을 확인하였으며, 온도 및 압력 조건이 낮을수록 항산화 활성이 높은 것으로 보아 그 이하의 조건에서의 항산화 활성을 측정이 필요할 것으로 여겨진다. 45°C, 20 MPa의 조건에서의 DPPH 및 ABTS radical 소거능은 각각 79.97 ± 0.49 및 $87.04 \pm 0.42\%$ 로 최대의 활성을 나타내었으며, 55°C, 30 MPa의 조건에서는 각각 65.65 ± 0.26 및 $68.75 \pm 0.37\%$ 로 가장 낮은 활성을 확인하였다. 유기용매 추출 오일의 DPPH 및 ABTS radical 소거능은 각각 38.94 ± 0.26 및 $39.04 \pm 0.16\%$ 로 초임계 이산화탄소 추출 오일에 비해 현저히 낮은 활성을 나타내었다. 이전 연구에 따르면, 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출된 오일은 유기용매인 Hexane을 이용하여 추출된 오일보다 항산화 활성이 높게 나타났다고 보고하였다 (Jung G. W. et al, 2012).



1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different ($p < 0.05$)

Fig. 7. DPPH radical scavenging properties of *M. edulis* oil obtained by SC-CO₂ and organic solvent (Hexane) extraction (A: 45°C, 20 MPa; B: 45°C, 30 MPa; C: 55°C, 20 MPa; D: 55°C, 30 MPa; E: Hexane).



1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different ($p < 0.05$)

Fig. 8. ABTS radical scavenging properties of *M. edulis* oil obtained by SC-CO₂ and organic solvent (Hexane) extraction (A: 45°C, 20 MPa; B: 45°C, 30 MPa; C: 55°C, 20 MPa; D: 55°C, 30 MPa; E: Hexane).

7. 오일의 아스타잔틴 (Astaxanthin) 함량

아스타잔틴은 해양 유래 항산화제 중 하나인 카로티노이드계 색소로, 높은 항산화 활성으로 인해 인체에 유익한 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Panayotova V. et al., 2019). 초임계 이산화탄소 및 유기용매에 의해 추출된 진주담치 오일의 아스타잔틴 함량은 표준물질로써 Astaxanthin (ASX)을 사용하여 470 nm에서 검출하였으며, 그 결과 Table 9에 나타내었다 (Fig. 9). 초임계 이산화탄소 추출 오일의 아스타잔틴 함량은 45°C에서 추출된 오일의 경우, 20 MPa 및 30 MPa의 조건에서 각각 0.64 ± 0.04 및 9.88 ± 0.33 mg ASX/g oil 이었으며, 55°C에서 추출된 오일의 경우, 20 MPa 및 30 MPa의 조건에서 각각 2.47 ± 0.07 및 4.93 ± 0.26 mg ASX/g oil의 함량을 나타내었다. 즉, 추출 압력이 증가할수록 진주담치 오일의 아스타잔틴 함량 또한 증가하는 것을 확인하였다. 이전의 연구에 따르면, 압력의 증가는 초임계 유체의 밀도 증가 및 확산 계수의 감소시킴으로써 아스타잔틴 함량에 영향을 준다고 보고하였다 (Ali-Nehari et al., 2012). 유기용매 추출 오일의 경우, 아스타잔틴이 검출되지 않았으며, 이를 통하여 초임계 이산화탄소 추출법은 유기용매 추출법에 비해 아스타잔틴을 추출하기 위한 효율적인 공정인 것으로 여겨진다.

Table 9. Astaxanthin (ASX) content of *M. edulis* oil obtained by SC-CO₂ and organic solvent (Hexane) extraction

	Conditions	Astaxanthin mg ASX/g oil
SC-CO ₂	45°C, 20 MPa	0.64±0.04 ^d
	45°C, 30 MPa	9.88±0.33 ^a
	55°C, 20 MPa	2.47±0.07 ^c
	55°C, 30 MPa	4.93±0.26 ^b
Organic solvent	Hexane	ND

1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

* ND : Not Detected

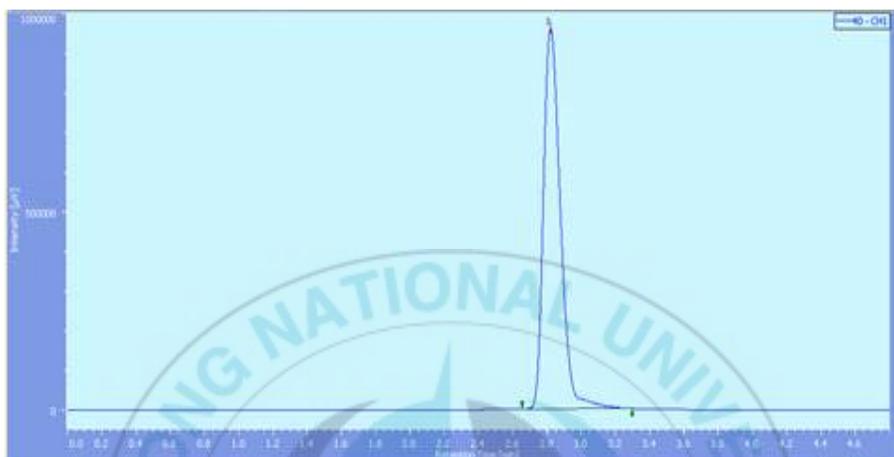


Fig. 9. Chromatogram of astaxanthin (standard; 40 ppm) detected at 470 nm.

8. 오일의 열중량측정 (Thermal Gravimetric analysis; TGA)

열중량측정 (Thermo gravimetric analysis; TGA)은 시료의 구성 성분을 결정하거나, 열적 안정성을 검사하는 데 사용된다. TGA 곡선은 수분 및 잔류용매 제거 구간 ($< 180^{\circ}\text{C}$), 유기물질 분해 구간 ($180\text{--}540^{\circ}\text{C}$), 잔류 탄소 물질 분해 구간 ($> 540^{\circ}\text{C}$)으로 구분된다 (Marcilla A. et al., 2009; Rai A. et al., 2016). 초임계 이산화탄소 및 유기용매를 이용하여 추출된 진주담치 오일의 TGA 결과 그래프는 Fig. 10에 나타내었다. 중량이 98%로 감소하기 시작하는 초기 분해 온도는 초임계 이산화탄소를 통해 추출된 오일의 경우 45°C , 20 MPa는 169°C , 45°C , 30 MPa는 157°C , 55°C , 20 MPa는 161°C 그리고 55°C , 30 MPa는 178°C 로 나타났으며, Hexane 추출 오일은 108°C 로 매우 낮은 온도에서 분해가 시작되었다. 특히, Hexane 추출 오일의 경우 180°C 에서 7.23% (wt%)의 중량이 감소되었으며, 이는 오일에 잔류된 Hexane이 제거되어 중량이 감소하는 것으로 사료된다. 또한, 540°C 이후의 구간에서 10% (wt%) 정도가 분해되지 않는 것을 확인하였는데, 이는 Hexane 추출 오일에 무기물이 잔존하는 것으로 여겨진다.

TGA 그래프가 급격하게 감소하는 부분은 열분해가 시작되는 구간으로, TGA 그래프를 미분한 DTG (Derivative Thermo Gravimetry) 그래프의 피크점을 통해 열분해온도를 파악하고 추출 오일의 열 안정성을 비교할 수 있으며, 이는 Fig. 11에 나타내었다. 추출된 오일은 각 조건에 따라 $210\text{--}240^{\circ}\text{C}$ 에서 첫 번째 분해가 일어나고, $350\text{--}400^{\circ}\text{C}$ 의 온도 범위에서 두 번째 분해가 일어난다. 높은 열분해 온도 포인트는 일반적으로 식품의 소재로서 이용가치가 충분하다고 여겨진다.

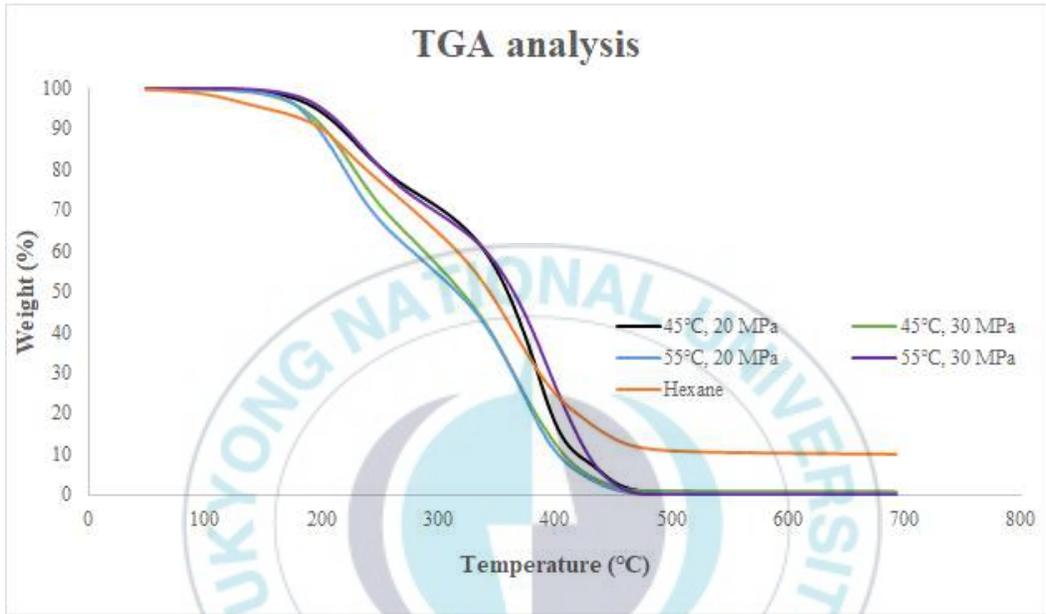


Fig. 10. Thermo gravimetric analysis (TGA) graph of *M. edulis* oil obtained by SC-CO₂ and organic solvent (Hexane) extraction.

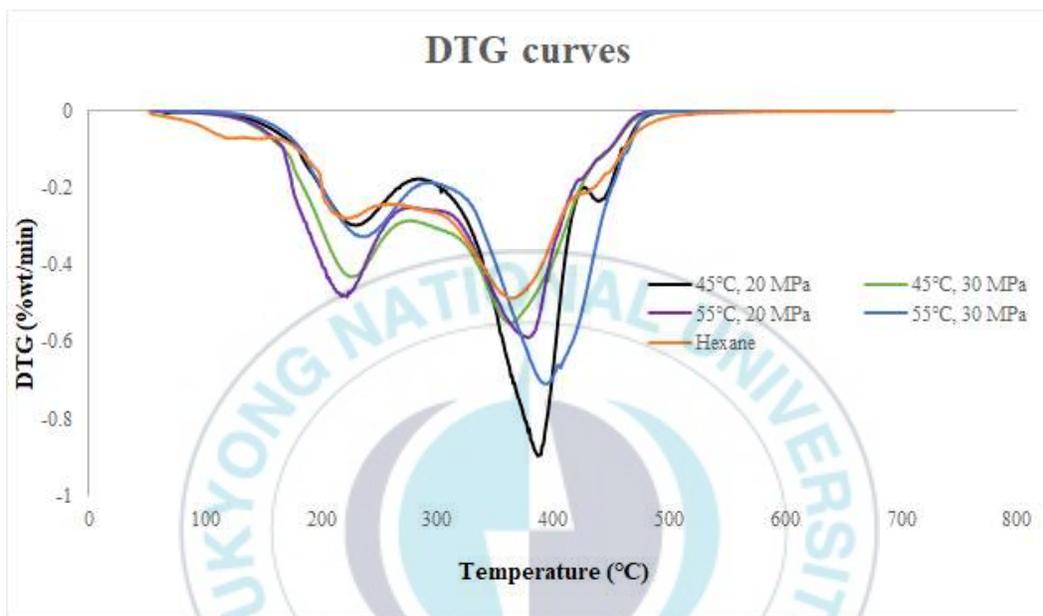


Fig. 11. Derivative Thermo Gravimetry (DTG) graph of *M. edulis* oil obtained by SC-CO₂ and organic solvent (Hexane) extraction.

9. 가수분해 효율성 및 마이야르 반응 생성물 (MRPs)

Table 10는 온도 변화에 따른 진주담치 가수분해물의 가수분해 효율성을 나타낸 것이다. 가수분해 효율성은 온도가 증가함에 따라 진주담치 가수분해의 효율성은 증가하였으며, 240°C에서 $90.65 \pm 0.16\%$ 로, 가장 높은 결과 값을 나타내었다. 이는 이전에 연구했던 굴을 이용한 아임계 수 가수분해의 결과와 유사한 값을 나타냄을 확인하였다 (Lee H. J. et al., 2018). 추출 온도가 증가하면서 용매의 점도 및 표면장력이 감소하고, 용매가 샘플의 구조에 쉽게 침투하여 용매와 시료의 표면 접촉을 증가시켜 용매로의 물질 전달 속도를 향상시킨 것을 알 수 있다 (Herrero M. et al., 2015).

마이야르 반응은 단백질의 아미노기와 당의 카보닐기가 열에 의해 생성되는 화학 반응이다. 진주담치 가수분해물의 갈변 정도를 확인하기 위한 마이야르 반응 생성물 (MRPs)은 420 nm의 흡광도에서 측정되었다. Table 10에서 볼 수 있듯이, 가수분해물의 MRPs는 온도가 증가함에 따라 증가하였으며, 210°C에서 3.17 ± 0.00 A.U.로 최대의 함량을 나타내었다. 아임계 수 가수분해 시 물의 이온화 상수 (K_w)의 증가로 인하여 MRPs가 증가하였으며, 가열 강도에도 영향을 받는다 (Lee, J. H. et al., 2018). 이후 MRPs의 감소는 고온에서 환원당과 아미노산 분해로 인한 것으로 사료된다.

Table 10. Hydrolysis efficiency and maillard reaction products (MRPs) of *M. edulis* hydrolysates

Temperature (°C)	Hydrolysis efficiency (%)	MRPs (420 nm)
120	45.96±0.54 ^c	2.21±0.02 ^d
150	56.77±1.32 ^d	2.77±0.00 ^c
180	72.42±0.70 ^c	2.95±0.07 ^b
210	84.30±0.81 ^b	3.17±0.00 ^a
240	90.65±0.11 ^a	2.95±0.07 ^b

1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

10. 가수분해물의 물리적 특성

10.1. pH

온도 변화에 따른 진주담치 가수분해물의 pH는 Table 11에 나타내었다. 가수분해 온도가 증가함에 따라 가수분해물의 pH는 감소하다 증가하는 경향을 보였으며, 180°C에서 5.34 ± 0.01 로 가장 낮아졌다 240°C에서 7.56 ± 0.01 로 가장 높은 값을 나타내었다. 이는 고온에서 가수분해 시 arginine과 같은 염기성 아미노산이 당과 결합하여 maillard 반응에 의해 산성 물질이 생성됨에 따라 pH가 낮아진다는 보고와도 관련이 있다 (Lee J. M. et al., 2015). 이전의 연구에 따르면, 고온에서 가열 시 갈변반응으로 인하여 생성된 환원당이 유기산으로 분해되어 pH를 낮추는데 기여하였으며, 염의 형성 및 페놀성 화합물과 같은 산성 물질의 존재에 의한 것일 수도 있다고 보고하였다 (Getachew A. T. et al., 2017; Sasaki M. et al., 1998).

Table 11. pH of *M. edulis* hydrolysates

Conditions	pH
ETE	6.04±0.01 ^c
	120
	150
Subcritical water hydrolysis (°C)	5.55±0.00 ^d
	180
	210
	240
	5.36±0.01 ^e
	5.34±0.01 ^f
	6.49±0.00 ^b
	7.56±0.01 ^a

1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

* ETE : Ethanol extracts

10.2. 색도

Table 12는 온도에 따른 진주담치 가수분해물의 색도에 대한 결과이다. 식품 산업에 있어서 색은 소비자들의 관심을 이끄는 중요한 품질 매개 변수이며, 명도는 색소 및 흡습성 물질의 존재에 영향을 받기 때문에 가열 시 빛의 복제 능력을 증가시켜 반응을 유도한다 (Bueno-Solano C. et al., 2009). 본 실험에서 진주담치 가수분해물은 온도가 증가함에 따라 명도인 L^* value는 감소하고 색이 진해지는 것을 확인하였으며, a^* 와 b^* value는 증가하다 감소하는 것을 경향을 나타내었다 (Fig. 12). 특히, 180°C 에서의 L^* , a^* , b^* value는 각각 33.38 ± 0.38 , 5.36 ± 0.06 , 3.35 ± 0.06 으로 급격히 감소하였는데, 이는 가수분해 과정에서 carotenoid계 색소가 추출되었거나 거대 분자의 전환 및 갈변반응에 의한 것으로 예상된다. 또한, saravana는 높은 온도에서의 낮은 명도 값은 시료에서 발생할 수 있는 높은 브라우닝 반응과 관련될 수 있다고 보고하였다 (Saravana P. S. et al., 2016).

Table 12. Color parameters of *M. edulis* hydrolysates

Conditions	L*	a*	b*
ETE	36.20±0.31 ^c	0.37±0.04 ^e	8.94±0.22 ^c
	120	43.68±0.04 ^a	4.66±0.11 ^c
	150	41.23±0.13 ^b	8.17±0.18 ^a
Subcritical water hydrolysis (°C)	180	33.38±0.38 ^d	5.36±0.06 ^b
	210	29.99±0.17 ^e	0.75±0.08 ^d
	240	29.75±0.04 ^e	0.64±0.07 ^d

1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

* ETE : Ethanol extracts

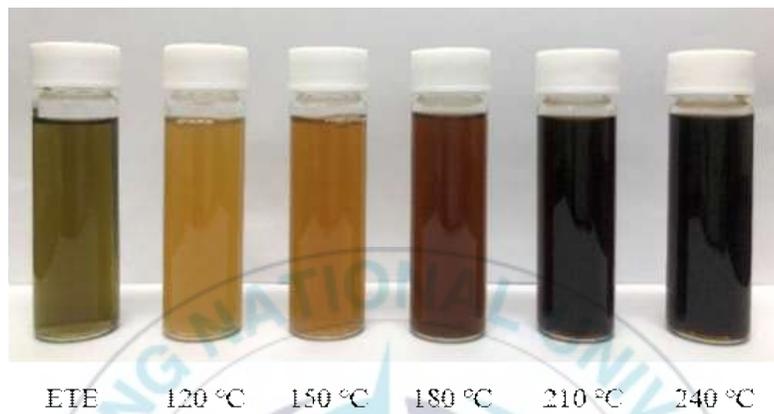
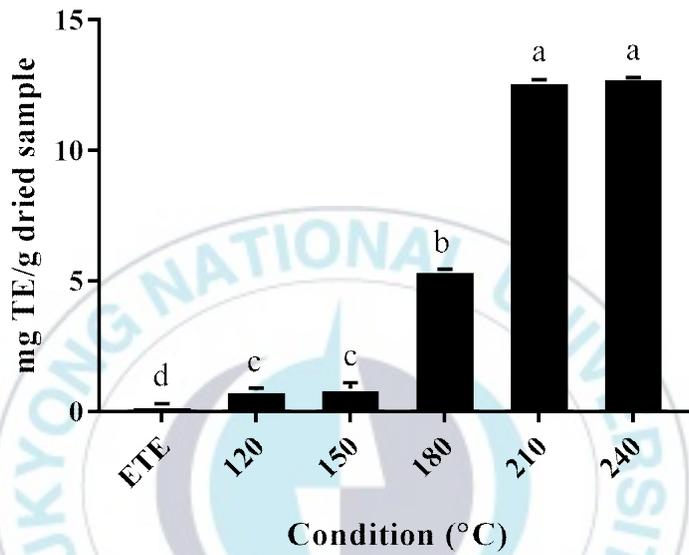


Fig. 12. Photograph of *M. edulis* hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).

11. 가수분해물의 항산화 활성

11.1. DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능 활성은 유리 라디칼 분자 형성을 방지하는 물질의 능력을 측정하는 것으로, 진주담치 가수분해물의 DPPH radical 소거능 결과는 Fig. 13에 나타내었다. 온도가 증가함에 따라 가수분해물의 DPPH radical 소거능은 180°C에서 급격히 증가하였으며, 240°C에서 12.79 ± 0.01 mg TE/g dried sample로 가장 강한 항산화 활성을 나타내었다. 추출 온도가 증가할수록 아임계 수의 유전상수 감소로 인해 유용물질의 추출율이 증가하여 항산화 활성 또한 증가한 것으로 보이며, 소수성 아미노산의 함량과도 관련이 있다 (Mlyuka E. et al., 2016; Li Y. et al., 2008). 반면에 에탄올 추출물은 이전에 연구한 김의 에탄올 추출물과 유사한 결과 값을 보였으며, 아임계 수 가수분해에 비해 낮은 활성을 나타내었다 (Park J. S. et al., 2019). 이는 아임계 수 가수분해가 진주담치의 유용물질을 추출함에 있어 더 나은 공정임을 알 수 있다.



1) Mean±SD (n=3)

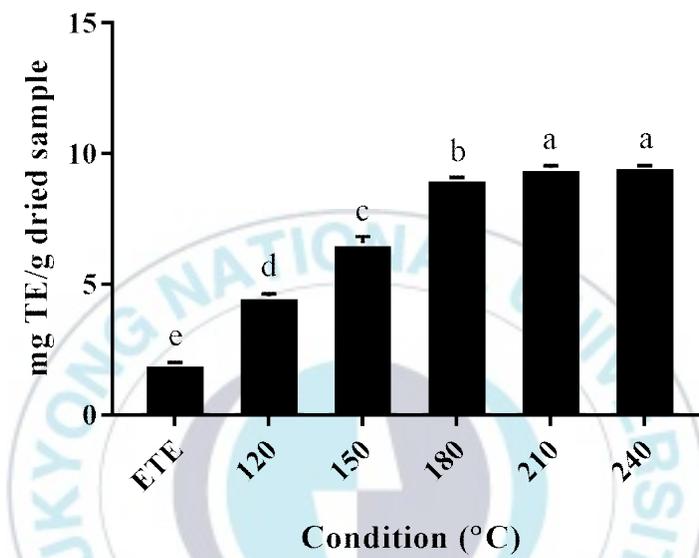
2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

Fig. 13. Comparison of DPPH radical scavenging properties for *M. edulis* hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).

11.2. ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능 활성은 양이온 유리 라디칼 수소-공여 산화 방지제와의 반응 동안 항산화능을 가진 물질에 의해 탈색되는 과정을 이용하여 측정하였다. 진주담치 가수분해물의 ABTS radical 소거능 결과는 Fig. 14에 나타내었다. 온도가 증가할수록 가수분해물의 ABTS radical 소거능은 증가하였으며, 240°C에서 9.52 ± 0.02 mg TE/g dried sample로 가장 강한 항산화 활성을 나타내었음을 확인하였다. 이는 DPPH radical 소거능과 유사한 경향을 나타내었으며, 온도가 상승할수록 강한 항산화 작용을 일으키는 것을 확인할 수 있었다. Tunicate에 따르면, 단백질 가수분해물은 Ala, Tyr 및 Leu와 같은 유리 아미노산으로 인한 펩타이드의 생성은 항산화 활성에 영향을 미친다고 보고하였다 (Hee-Jeong Lee et al., 2017).





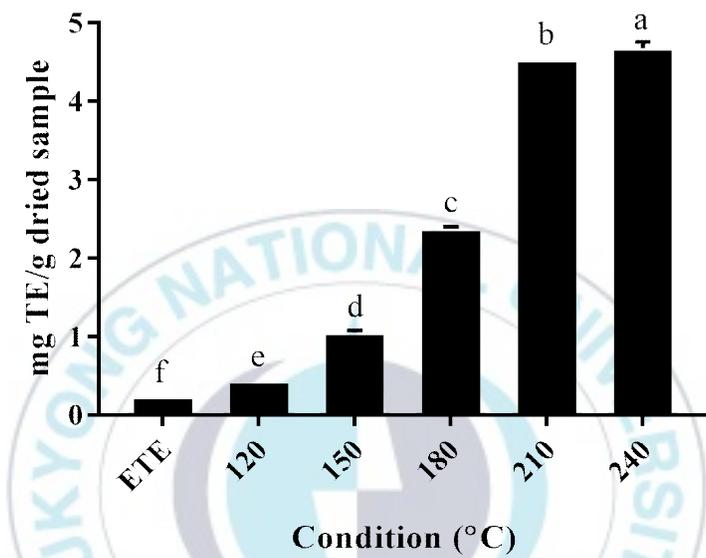
1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

Fig. 14. Comparison of ABTS radical scavenging properties for *M. edulis* hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).

11.3. 철 이온 환원력 (FRAP)

철 이온 환원력 (FRAP)은 총 항산화력을 결정하는데 측정하는 것으로, Fig. 15는 진주담치 가수분해물의 FRAP 결과를 나타낸 것이다. 앞서 언급한 DPPH와 ABTS radical 소거능 결과와 일치하였으며, 240°C에서 4.68 ± 0.08 mg TE/g dried sample로 가장 높은 활성을 나타내었다. FRAP는 일반적으로 reductone과 같은 화합물이 수소 원자를 제공함으로써 자유 라디칼 연쇄 반응의 종결자인 것으로 보고되어 있다 (Saravana P. S. et al., 2018). 이러한 결과는 대두 부산물 가수분해물에서의 항산화 활성에 대한 이전의 연구와 유사하였으며, 식물에 포함하고 있는 페놀 화합물의 산화 환원 반응이 항산화 활성에 영향을 미친 것으로 여겨진다 (Nkurunziza D. et al., 2019). 뿐만 아니라, Bougatef와 Klompong의 연구된 바, 어류의 단백질 가수분해물이 강한 FRAP를 가지고 있다는 것을 입증하였다 (Bougatef A. et al., 2009; Vilailak. Kl. et al., 2007).



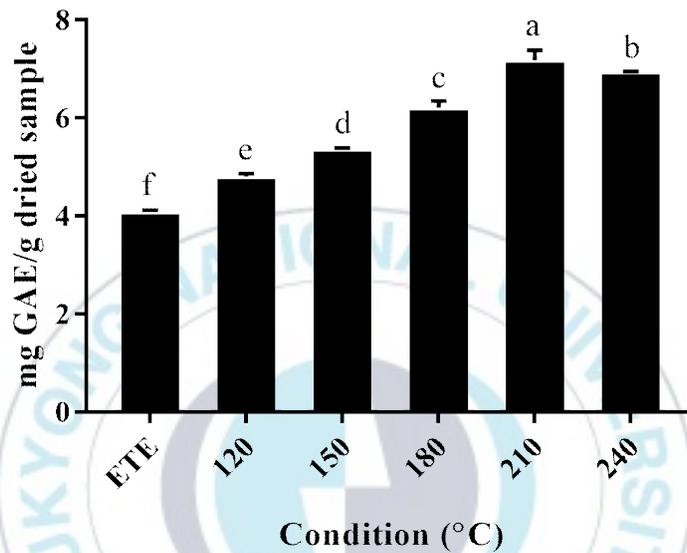
- 1) Mean±SD (n=3)
- 2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

Fig. 15. Comparison of FRAP properties for *M. edulis* hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).

12. 가수분해물의 페놀류 함량 분석

12.1. 총 페놀 함량 (Total phenolic content; TPC)

진주담치 가수분해물의 총 페놀 함량 (TPC) 결과는 Fig. 16에 나타내었다. 온도가 증가함에 따라 가수분해물의 TPC는 증가하여 210°C에서 7.18±0.20 mg GAE/g dried sample로 최대 활성을 보였으며, 이후 감소하여 6.94±0.01 mg GAE/g dried sample의 함량을 확인하였다. 이는 많은 연구자들에 의해 보고된 바와 같이, 고온에서 열에 불안정하고 페놀 화합물의 분해로 인하여 페놀 함량이 감소하였다 (Khuwijitjaru P. et al., 2014). 이전의 보고에 따르면, 페놀성 화합물은 해산물의 항산화 활성에 대한 주요 공여자임을 확인하였으며, 이를 바탕으로 진주담치 또한 훌륭한 항산화 물질의 공급원이 될 수 있을 것으로 여겨진다 (Watanabe M. et al., 2012). 또한, 페놀 화합물은 항암 및 항고혈압 등의 생리기능적 특성이 우수하다고 알려져 있어 진주담치 가수분해물에 함유되어 있는 페놀 화합물의 정성 및 정량을 통하여 각각의 기능에 대한 파악이 필요하다고 사료된다.



1) Mean±SD (n=3)

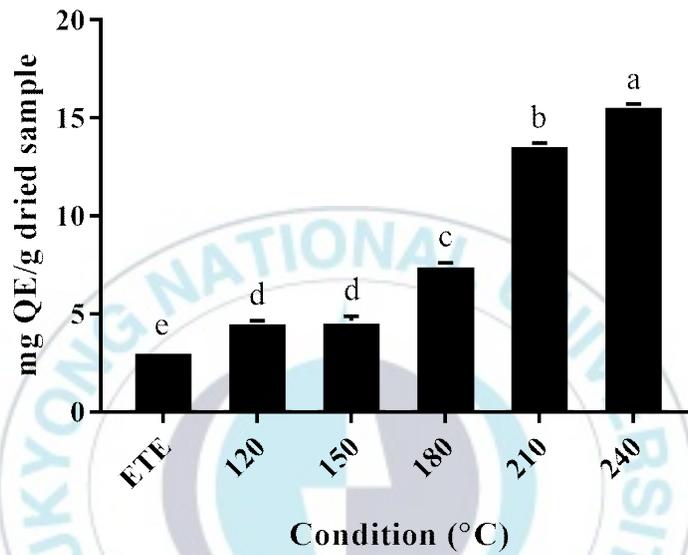
2) Means with the same letter are not significant different ($p < 0.05$)

Fig. 16. Comparison of total phenolic content for *M. edulis* hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).

12.2. 총 플라보노이드 함량 (Total flavonoid content; TFC)

플라보노이드는 식물성 색소 중 하나로 생체 내 생성되는 활성산소를 제거하는 천연 항산화물로 잘 알려져 있다. Fig. 17은 진주담치 가수분해물의 총 플라보노이드 함량 (TFC)에 대한 결과를 나타낸 것이다. 온도가 증가함에 따라 홍합 가수분해물의 TFC는 증가하였으며, 240°C에서 15.66 ± 0.06 mg QE/g dried sample으로 최고의 함량을 보였다. 플라보노이드의 경우, 항산화 활성과 비슷한 경향을 나타내었는데, 이를 통하여 플라보노이드는 항산화 물질과 연관이 있다는 것을 입증하였다.





1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different ($p < 0.05$)

Fig. 17. Comparison of total flavonoid content for *M. edulis* hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).

13. 항산화 활성과 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과의 상관관계 분석

진주담치 가수분해물의 항산화 활성과 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량과의 관계를 알아보기 위하여 상관 분석을 수행하였다. 식물의 페놀 및 색소 성분은 항산화 작용과 관련이 있으며, 이는 환원제 및 수소 공여체 등의 작용을 촉진시키는 산화 환원의 특성과도 연관이 있다고 밝혀져 있다 (Kwak C. S. and Lee M. S., 2005). Table 13에서 보듯이, 진주담치 가수분해물의 상관관계는 DPPH radical 소거능과 총 플라보노이드 함량에서 $R^2=0.984$, ABTS radical 소거능과 총 페놀 함량에서 $R^2=0.964$, 철 이온 환원력과 총 플라보노이드 함량에서 $R^2=0.985$ 로 유의한 상관관계를 보였으며, 다른 연구들에 따르면 총 페놀함량은 항산화 활성을 나타내는 DPPH, ABTS 및 FRAP 간에 높은 상관관계를 보인다고 보고하였다 (Stankovic M. S., 2011). 앞선 결과에서 가수분해 온도가 증가함에 따라 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 증가하였는데, 이는 물의 온도가 증가 시 표면 장력과 점도가 감소하여 확산속도가 빨라지고 물질의 이동이 촉진되면서 증가한 것으로 사료된다. 따라서, 진주담치 가수분해물의 항산화 활성과 페놀류 간에는 높은 상관관계가 있음을 확인하였다.

Table 13. Pearson's product moment correlation coefficients analysis between antioxidant radical activity and total phenolic and total flavonoid content

		DPPH	ABTS	FRAP	TPC	TFC
Pearson Correlation	DPPH	1	0.807**	0.991**	0.919**	0.984**
	ABTS	0.807**	1	0.874**	0.964**	0.821**
	FRAP	0.991**	0.874**	1	0.959**	0.985**
	TPC	0.919**	0.964**	0.959**	1	0.920**
	TFC	0.984**	0.821**	0.985**	0.920**	1

** Correlation is significant at the 0.01 level.

* TPC : Total phenolic content

TFC : Total flavonoid content

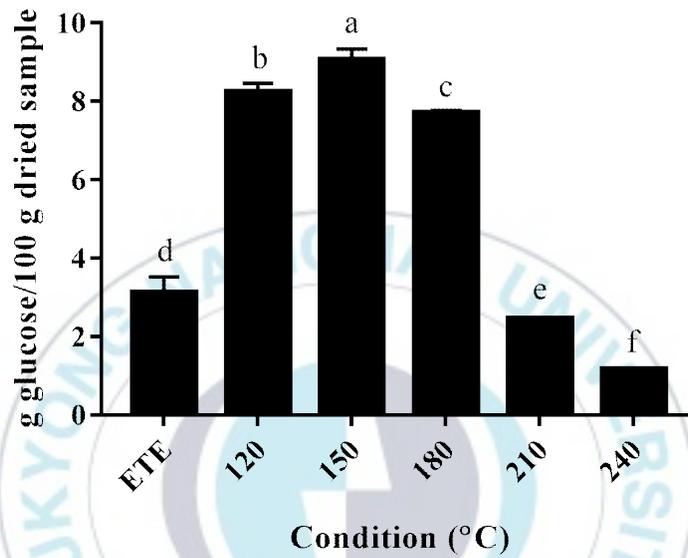
14. 가수분해물의 당 함량 분석

14.1. 총 당 함량 (Total glucose content)

총 당은 환원당과 비환원당을 합친 것으로, 페놀-황산법을 통하여 바이오 에너지로 전환이 가능한 당의 함량을 확인하였다. 진주담치 가수분해물의 총 당 함량 결과는 Fig. 18에 나타내었다. 가수분해물의 총 당 함량은 150°C에서 9.06 ± 0.28 g glucose/100 g dried sample로 가장 높았으며, 이후 온도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 확인하였다. 이는 카라멜화 및 갈변반응으로 인해 총 당 함량이 감소될 수 있다는 보고와 유사한 결과임을 확인하였다 (Jang S. and S. K. Moon, 2005).

14.2. 환원당 함량 (Reducing sugar content)

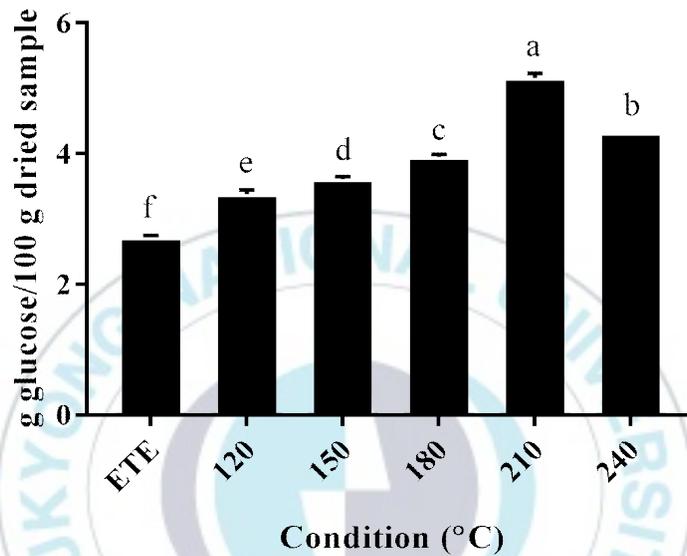
환원당이란, 카르복실산으로 산화되는 알데하이드기 (-CHO)가 포함된 당이다. -CHO기를 포함하는 당의 종류로는 glucose, mannose, galactose, arabinose 및 maltose 등이 있다. 진주담치 가수분해물의 환원당 함량 결과는 Fig. 19에 나타내었다. 온도가 증가함에 따라 가수분해물의 환원당 함량은 증가하여 210°C에서 5.16 ± 0.07 g glucose/100 g dried sample로 최대 함량을 보였으며, 이후 감소하는 경향을 나타내었다. 환원당은 가온 시 열에 약해지면서 분해되었으며, 히드록시메틸푸르푸랄 (hydroxymethyl-furfural; HMF) 및 레블린산 (levulinic acid) 등과 같은 화합물의 형태로 해중합되었을 가능성으로 사료된다 (Meillisa A. et al., 2015).



1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different ($p < 0.05$)

Fig. 18. Comparison of total glucose content for *M. edulis* hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).



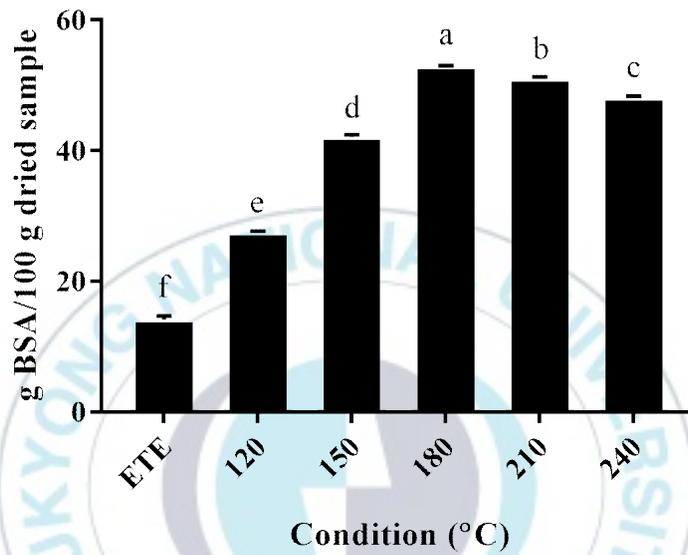
1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different ($p < 0.05$)

Fig. 19. Comparison of reducing sugar content for *M. edulis* hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).

15. 가수분해물의 수용성 단백질 함량

일반적으로, 아임계 수 가수분해에서 온도가 증가함에 따라 단백질이 증가하는 것은 아임계 상태의 영역에서 물의 극성이 변화하기 때문이다. Fig. 20은 진주담치 가수분해물의 수용성 단백질 함량에 대한 결과이다. 가수분해물의 단백질 함량은 온도가 증가함에 따라 증가하였으며, 180°C에서 52.87 ± 0.16 g BSA/100 g dried sample로 가장 높은 함량을 확인하였다. 이는 물의 이온화상수 (K_w)의 증가에 기인하며 이는 물에 탄화수소의 용해성을 용이하게 한다 (Cho Y. J. et al., 2019). 그러나 210°C 이후 단백질농도의 감소는 maillard 반응에 의한 당과의 반응 혹은 열에 의해 변성되었을 것으로 사료된다. Quитай은 펩타이드 결합이 가용성 단백질 또는 아미노산 분자로 분해되어 포름산 및 아세트산과 같은 저분자량 카복실산을 형성할 수 있다고 보고하였다 (Quитай A. T. et al., 2002).



1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different ($p < 0.05$)

Fig. 20. Comparison of total protein content for *M. edulis* hydrolysates (ETE : Ethanol extracts).

16. 가수분해물의 겔 전기 영동 (SDS-PAGE)

겔 전기 영동 (SDS-PAGE)은 진주담치 가수분해물에서 단백질의 분자량 분포를 확인하기 위하여 수행되었다. 다양한 온도에서 아임계 수 가수분해에 의한 진주담치 가수분해물의 SDS-PAGE 결과는 Fig. 21에 나타내었다. 단백질 마커는 5-180 kDa 범위의 다양한 분자량 밴드를 보였으며, 120°C에서 얻은 가수분해물은 63-75 kDa 사이의 밴드를 형성하여 가장 높은 분자량을 나타내었다. 반면에, 180°C 이상으로 가열되었을 때 5 kDa까지 감소하여 저분자량 펩타이드를 나타내었으며, 210°C 이후부터는 분자량 밴드를 확인할 수 없었다. 참치 콜라겐 가수분해물의 SDS-PAGE에서도 비슷한 결과가 보고되었으며, 이는 고온에서 단백질이 매우 작은 형태의 펩타이드로 분해되어 SDS-PAGE를 통하여 분자량 확인이 어려운 것으로 판단된다 (Ahmed R. and B. S. Chun., 2018). 또한, 5-11 kDa 사이에 형성된 밴드는 SDS-PAGE를 작동시키는 중 전기 공급이 원활하게 되지 않아 발생한 것이다.

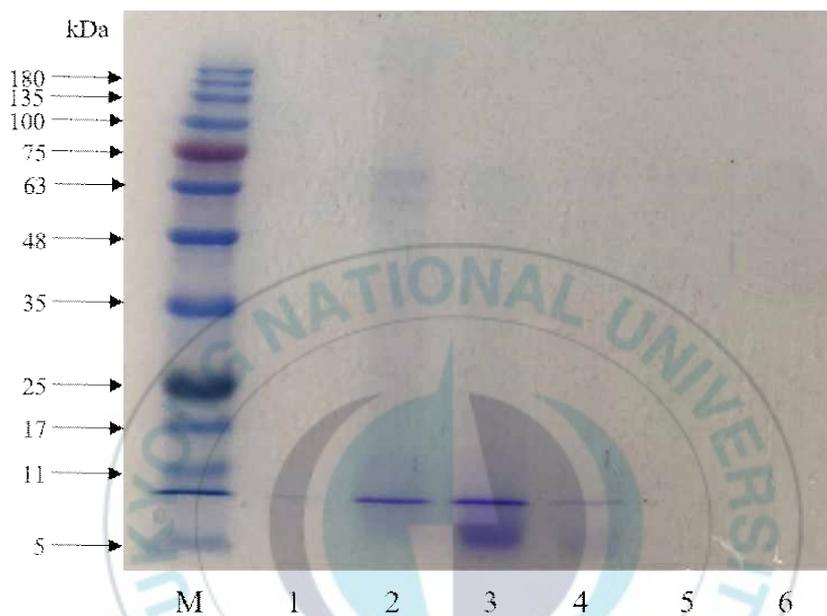


Fig. 21. The results of SDS-PAGE pattern of *M. edulis* hydrolysates at different temperatures (M: Marker; 1: Ethanol extracts; 2 - 6: hydrolysates at 120, 150, 180, 210, 240°C, respectively.).

17. 가수분해물의 아미노산 분석

아미노산 정량은 단백질의 펩타이드 결합을 분해하여 생성된 유리아미노산의 함량이 가수분해 조건에 미치는 영향을 확인하기 위해 진행되었다. 단백질 가수분해물은 일반적으로 short-chain 생물 활성 펩타이드 및 유리 아미노산으로 구성되며, 인체의 영양적인 부분에서 중요한 역할을 한다 (Hyung J. H. et al., 2018). 동결건조된 진주담치 파우더의 구성아미노산 및 유리아미노산과 가수분해물의 유리아미노산 함량에 대한 결과는 Table 14 및 Table 15에 나타내었다. 먼저, 동결건조 파우더의 필수 및 비필수 구성아미노산의 함량은 580.70 ± 0.25 mg/g이었으며, 이 중 Glutamic acid, Aspartic acid 및 Glycine이 80.32 ± 0.17 , 74.05 ± 0.35 및 46.46 ± 0.31 mg/g으로 높은 함량을 나타내었다 (Table 14). Glutamic acid는 감칠맛 (우마미, Umami)의 주 성분으로 작용하며, Glycine은 단맛을 나타낸다 (이광원 et al., 2017). Aspartic acid는 인체 내에서 남성호르몬의 생성을 촉진시키는 D-aspartic acid와 단백질을 구성하는 축의 역할을 하는 L-aspartic acid로 구성된다. 또한, 동결건조 파우더의 필수 및 비필수 유리아미노산의 함량은 74.43 ± 0.23 mg/g으로, 이 중 Taurine이 29.74 ± 0.07 mg/kg, glycine이 15.27 ± 0.33 mg/kg 및 alanine이 6.24 ± 0.25 mg/kg으로 가장 풍부하게 함유하였다 (Table 15). 진주 담치 단백질의 생화학적 분석 연구를 통하여 Glutamine, Asparagine, Glycine, Lysine, Leucine, Arginine 등의 풍부한 아미노산을 확인하였다 (Varaltzis P. K. and I. Undeland, 2012).

유리아미노산 함량은 식품의 기호성 및 풍미를 결정하는데 중요한 요인으로 작용된다 (Watanabe K. et al., 2002). 진주담치 가수분해물의 필수 유리아미노산 함량은 240°C 에서 2081.37 ± 0.23 mg/L, 비필수 유리아미노산 함량은 120°C 에서 10633.28 ± 0.28 mg/L로 가장 많은 함량을 나타내었다. 또한, 필수 및 비필수 유리아미노산 총 함량을 분석한 결과, 120°C 에서 11718.94 ± 0.26

mg/L로 최대의 함량을 보였으며, 온도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 단백질이 펩타이드로, 펩타이드가 유리 아미노산으로 전환되고 유리 아미노산이 다른 생성물로의 분해됨에 따라 온도에 대한 영향을 받았다 (Cho Y. J. et al., 2019). 이 중 Taurine, Glycine 및 Alanine이 4098.52 ± 0.31 , 1939.52 ± 0.16 , 788.71 ± 0.23 mg/L로 가장 높은 함량을 차지하였다. 특히, 비필수 아미노산으로 분류되는 타우린의 경우 여러 식품을 통해 섭취하는 것이 일반적이며, 담즙산의 생성을 촉진시킴으로써 담석의 생석을 억제하여 피로 회복에 좋은 역할을 하는 아미노산으로 잘 알려진 물질이다. 가수분해 온도가 증가함에 따라 타우린 함량이 지속적으로 감소하는 것으로 보아 온도의 영향을 크게 받았으며, 추후 HPLC를 이용하여 타우린 정량 분석을 진행함으로써 더 자세한 온도구간에서의 타우린 함량 변화를 살펴볼 필요가 있다고 사료된다. 또한, Glutamic acid는 150°C 에서 180°C 로 증가하면서 maillard 반응에 의하여 296.04 ± 0.32 mg/L에서 18.32 ± 0.16 mg/L로 급격하게 감소하였다. 반면에, 에탄올 추출물은 가수분해물에 비해 유리아미노산 함량이 낮았으나, Tryptophane을 제외하고 모든 유리아미노산이 추출되었다. 이는 에탄올이 친수성 및 소수성의 특성을 모두 갖고 있기 때문에 다양한 아미노산을 추출된 것으로 여겨지며, 상온에서의 추출이 진행됨에 따라 적은 양의 아미노산 함량을 나타낸 것으로 사료된다.

요약하면, 유리아미노산의 함량은 SWH 공정에서 온도 상승에 대한 영향을 크게 받았으며, 본 연구를 통하여 진주담치에 함유되어 있는 유리아미노산을 가장 많이 수득하기 위한 온도 조건은 120°C 이다.

Table 14. Total amino acid profile of de-oiled *M. edulis* powder

Condition (mg/g)	
<i>M. edulis</i>	
Essential amino acid (EAA)	
Histidine	12.52±0.31
Isoleucine	24.91±0.18
Leucine	37.40±0.27
Lysine	30.99±0.37
Methionine	18.89±0.40
Phenylalanine	22.06±0.11
Threonine	42.43±0.28
Valine	26.55±0.13
Total	198.75±0.26
Non-essential amino acid (NEAA)	
Alanine	32.97±0.07
Arginine	45.67±0.39
Aspartic acid	74.05±0.35
Glutamic acid	80.32±0.17
Glycine	46.46±0.31
Proline	25.00±0.28
Serine	29.51±0.12
Taurine	29.10±0.20
Tyrosine	18.87±0.16
Total	381.95±0.23
EAA+NEAA	580.70±0.25

1) Mean±SD (n=3)

* ND : Not detected

Table 15. Free amino acid profile of de-oiled *M. edulis* powder and hydrolysates

	Conditions						
	mg/g	mg/L					
	<i>M. edulis</i>	ETE	120°C	150°C	180°C	210°C	240°C
	Essential amino acid (EAA)						
Histidine	1.08±0.33	33.26±0.20 ^e	129.45±0.21 ^a	110.71±0.38 ^b	97.81±0.56 ^d	105.68±0.24 ^c	129.05±0.16 ^a
Isoleucine	0.61±0.23	37.02±0.14 ^f	125.26±0.36 ^c	100.10±0.25 ^e	109.42±0.27 ^d	328.30±0.17 ^b	553.63±0.32 ^a
Leucine	0.88±0.10	47.09±0.27 ^f	161.21±0.11 ^c	134.25±0.27 ^d	112.52±0.45 ^e	204.16±0.29 ^b	378.70±0.33 ^a
Lysine	0.78±0.18	38.37±0.17 ^f	150.65±0.29 ^b	124.26±0.22 ^c	81.18±0.31 ^e	101.37±0.24 ^d	190.32±0.15 ^a
Methionine	0.24±0.22	2.03±0.10 ^f	30.93±0.16 ^e	47.46±0.25 ^d	80.66±0.45 ^c	128.33±0.12 ^a	118.33±0.30 ^b
Phenylalanine	0.44±0.19	22.58±0.12 ^f	77.57±0.10 ^c	60.13±0.31 ^d	51.64±0.26 ^c	81.26±0.23 ^b	151.98±0.38 ^a
Threonine	1.10±0.25	53.77±0.21 ^d	166.63±0.13 ^a	126.55±0.41 ^b	94.45±0.27 ^c	ND	ND
Tryptophane	0.34±0.19	ND	92.44±0.44 ^e	102.84±0.18 ^d	107.61±0.52 ^c	220.82±0.07 ^b	284.84±0.13 ^a
Valine	0.70±0.47	45.31±0.25 ^f	151.52±0.34 ^c	114.26±0.25 ^d	97.39±0.45 ^c	165.21±0.58 ^b	274.52±0.07 ^a
Total	6.17±0.24	279.43±0.18	1085.66±0.24	920.56±0.28	832.68±0.39	1335.13±0.24	2081.37±0.23
	Non-essential amino acid (NEAA)						
Alanine	6.24±0.25	232.59±0.08 ^f	788.71±0.23 ^c	640.46±0.42 ^d	549.19±0.34 ^c	865.36±0.27 ^b	1160.29±0.30 ^a
Arginine	2.91±0.14	113.31±0.24 ^e	355.32±0.49 ^a	298.27±0.16 ^b	221.84±0.35 ^c	142.42±0.28 ^d	84.40±0.22 ^f
Aspartic acid	2.08±0.16	59.51±0.45 ^f	198.94±0.37 ^c	235.37±0.45 ^b	426.30±0.39 ^a	194.32±0.19 ^d	111.93±0.15 ^e
Asparagine	0.60±0.26	22.99±0.14 ^e	39.53±0.21 ^b	49.60±0.42 ^a	22.36±0.47 ^c	ND	ND
Glutamic acid	5.35±0.09	227.72±0.51 ^c	650.72±0.21 ^a	296.04±0.32 ^b	18.32±0.16 ^f	22.01±0.39 ^e	24.98±0.29 ^d
Glutamine	1.08±0.12	48.99±0.11 ^a	ND	ND	ND	ND	ND
Glycine	15.27±0.33	670.25±0.54 ^f	1939.52±0.16 ^a	1513.24±0.24 ^b	1114.48±0.44 ^c	787.31±0.36 ^e	1046.52±0.50 ^d
Proline	2.95±0.42	127.31±0.17 ^f	296.58±0.31 ^b	195.04±0.31 ^c	210.51±0.15 ^d	248.46±0.36 ^c	316.57±0.41 ^a
Serine	1.08±0.20	58.21±0.11 ^e	167.61±0.45 ^a	151.78±0.12 ^c	164.41±0.24 ^b	122.64±0.41 ^d	46.73±0.17 ^f
Taurine	29.74±0.07	1432.67±0.31 ^d	4098.51±0.14 ^a	3074.74±0.25 ^b	2137.95±0.43 ^c	1395.56±0.51 ^e	1360.53±0.36 ^f
Trysine	0.64±0.29	26.24±0.30 ^f	97.84±0.18 ^c	83.24±0.21 ^d	79.33±0.48 ^e	110.38±0.23 ^b	179.55±0.56 ^a
Total	68.26±0.21	3019.79±0.27	10633.28±0.28	6537.78±0.29	4944.69±0.35	3888.46±0.33	4331.50±0.33
EAA+NEAA	74.43±0.23	3299.22±0.23	11718.94±0.26	7458.34±0.29	5777.37±0.37	5223.59±0.29	6412.87±0.28

1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different (p<0.05)

* ND : Not detected

18. 가수분해물의 타우린 함량

타우린 (Taurine)은 대부분의 포유동물 조직에 풍부하게 존재하는 아미노산 중 하나로, 피로회복 및 간 기능 회복 등의 효과를 지니고 있으며 일반 의약품 또는 건강기능식품의 형태로 널리 사용되고 있다 (Choi W. S. and Lee J. S., 2018). 진주담치 가수분해물의 타우린 함량은 표준물질로 Taurine을 사용하여 360 nm에서 검출하였으며, 그 결과는 Table 16에 나타내었다 (Fig. 22). 가수분해물의 타우린은 가장 낮은 가수분해 온도 조건인 120°C에서 3,615.94 mg Taurine/100 g dried sample로 가장 높은 함량을 보였으며, 이후 감소하는 경향을 확인하였다. 특히, 180°C 이후의 온도에서 434.85 mg Taurine/100 g dried sample으로 급격히 감소하였는데, 이는 고온에서 생성되는 열에 의한 타우린의 분해 혹은 180 °C 이상에서 메일라드 반응에 의해 당과의 반응함으로써 멜라노이딘 색소가 생성되어 타우린 함량이 감소한 것으로 여겨진다 (Lee H. J. et al., 2018). 뿐만 아니라, 낮은 온도 범위에서의 심층적인 분석을 통하여 효율적으로 타우린을 섭취함으로써 진주담치는 생리 기능적 특성에 많은 도움을 줄 것으로 사료된다.

Table 16. Taurine content of *M. edulis* hydrolysates

Conditions		Taurine (g Taurine/100 g dried sample)
ETE		412.58
	120	3,615.94
	150	1,704.99
Subcritical water hydrolysis (°C)	180	434.85
	210	324.55
	240	290.39

* ETE : Ethanol extracts

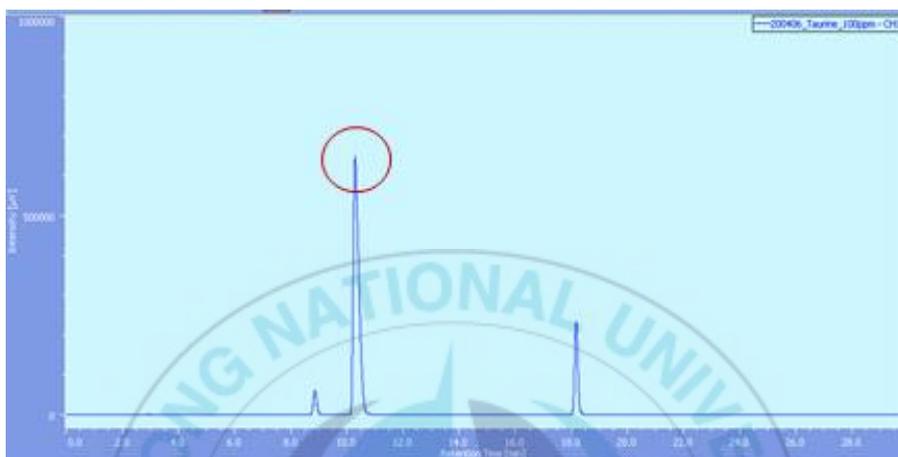
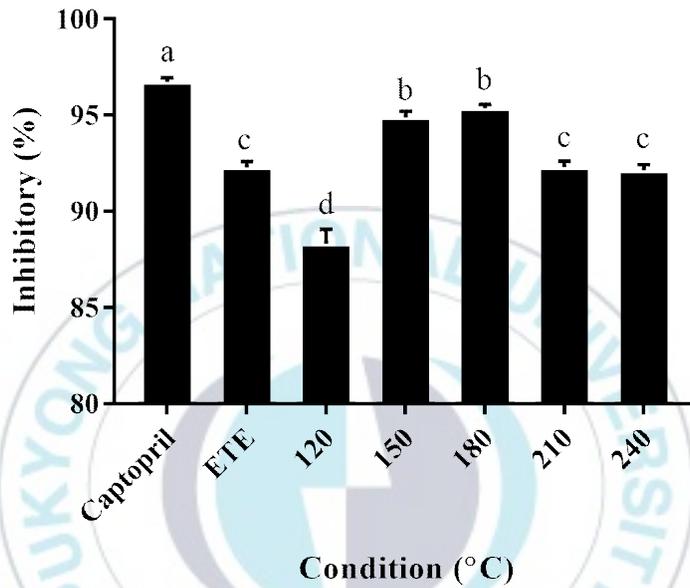


Fig. 22. Chromatogram of taurine (standard; 1000 ppm) detected at 360 nm.

19. 가수분해물의 항고혈압 활성

여러 논문에서 홍합 추출물의 항고혈압 활성에 대해 보고되었다 (Han J. K. et al., 2018; Neves A. C. et al., 2016). 진주담치 가수분해물의 항고혈압 활성은 안지오텐신 전환 효소 (Angiotensin converting enzyme)에 의한 저해율로 확인하였으며, 그 결과 Fig. 23에 나타내었다. 본 실험에서 표준물질로 사용한 Captopril (1%)은 고혈압 치료제로서 많이 사용되고 있으며, $96.74 \pm 0.22\%$ 의 활성을 나타내었다. 가수분해물의 항고혈압 활성은 온도가 증가함에 따라 증가하였으며, 180°C 에서 $95.38 \pm 0.29\%$ 로 가장 높은 활성을 나타내었다. 반면 210°C 이후의 조건에서는 항고혈압 활성이 감소하였는데, 이는 단백질 및 여러 화합물의 분해로 인한 것으로 사료된다. Powell에 따르면, 고온에서의 SWH는 에스테르 및 에테르 결합과 같은 일부 공유결합의 파괴 및 중합체 또는 펩타이드 결합의 절단으로 인한 것으로 보고하였다 (Powell T. et al., 2016). 결과적으로 적절한 온도 조건의 설정은 진주담치 가수분해물의 항고혈압 활성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.



1) Mean±SD (n=3)

2) Means with the same letter are not significant different ($p < 0.05$)

Fig. 23. Antihypertensive activity of *M. edulis* hydrolysates at different temperatures (ETE : Ethanol extracts).

IV. 결 론

본 연구는 친환경 추출 기술로 주목받고 있는 초임계 이산화탄소 및 아임계 수 가수분해 공정을 이용하여 진주담치 추출물을 얻었으며, 수득된 혼합 오일 및 가수분해물의 물리화학적 및 생리활성 분석을 수행하였다.

초임계 이산화탄소 추출 공정의 변수로는 추출 온도, 유체의 유속 및 입자 크기 등이 있으며, 아임계 수 가수분해 공정 변수로는 반응 온도, 압력 및 시간 등이 있다. 본 추출 공정에서 각 변수들을 약간 변형함으로써 초임계 이산화탄소 및 아임계 수 가수분해로부터 얻은 추출물의 특성 분석에 대한 결론은 아래와 같다.

- 1) 진주담치 오일의 안정성 평가는 산가 및 과산화물가를 측정하여 진행하였다. 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출된 진주담치 오일의 산가 및 과산화물가는 55°C, 30 MPa 조건에서 각각 6.36 ± 0.02 mg KOH/g 및 3.71 ± 0.05 meq/kg으로 가장 낮은 함량을 나타내었다.
- 2) 진주담치에 함유되어 있는 주요 지방산은 포화 지방산인 Palmitic acid (C16:0), 불포화 지방산인 Palmitoleic acid (C16:1), ω -3 지방산인 Eicosapentanoic acid (EPA; C20:5n3) 및 Docosahexanoic acid (DHA; C22:6n3) 등으로 나타났으며, 이 중 Palmitic acid가 20.12~36.96%로 가장 높았으며, 두 번째로는 EPA가 16.79~21.75%로 높은 함량을 나타내었다. 특히, 동맥경화증 예방에 효과적인 EPA 및 DHA의 총 함은 초임계 이산화탄소 추출 오일 중 55°C, 30 MPa 조건에서 가장 많은 양을 함유하였다.
- 3) 초임계 이산화탄소 추출 오일의 DPPH 및 ABTS radical 소거능은 추출 온

도 및 압력 조건에 따라 유의적인 차이가 있는 것을 확인하였으며, 45°C, 20 MPa의 조건에서의 DPPH 및 ABTS radical 소거능은 각각 79.97 ± 0.49 및 $87.04 \pm 0.42\%$ 로 최대의 활성을 나타내었으며, 55°C, 30 MPa의 조건에서는 각각 65.65 ± 0.26 및 $68.75 \pm 0.37\%$ 로 가장 낮은 활성을 확인하였다.

4) 아스타잔틴은 해양 유래 항산화제 중 하나인 카로티노이드계 색소로, 초임계 이산화탄소 추출 오일의 아스타잔틴 함량은 45°C에서 추출된 오일의 경우, 20 MPa 및 30 MPa의 조건에서 각각 0.64 ± 0.04 및 9.88 ± 0.33 mg ASX/g oil 이었으며, 55°C에서 추출된 오일의 경우, 20 MPa 및 30 MPa의 조건에서 각각 2.47 ± 0.07 및 4.93 ± 0.26 mg ASX/g oil의 함량을 나타내었다. 즉, 추출 압력이 증가할수록 진주담치 오일의 아스타잔틴 함량 또한 증가하는 것을 확인하였다.

5) 진주담치 오일의 열 안정성 검사를 위한 열중량측정 (Thermo gravimetric analysis; TGA) 그래프를 분석한 결과, 중량이 98%로 감소하기 시작하는 초기 분해 온도에 있어서 초임계 이산화탄소를 통해 추출된 오일의 경우 45°C, 20 MPa는 169°C, 45°C, 30 MPa는 157°C, 55°C, 20 MPa는 161°C 그리고 55°C, 30 MPa는 178°C로 나타났다.

TGA 그래프를 미분한 DTG (Derivative Thermo Gravimetry) 그래프의 피크점을 통해 열분해온도를 파악한 결과, 초임계 이산화탄소 추출 오일은 45°C, 20 MPa/45°C, 30 MPa/55°C, 20 MPa/55°C, 30 MPa 조건 모두 210-240°C에서 첫 번째 분해가 일어나고, 350-400°C의 온도 범위에서 두 번째 분해가 일어났음을 확인하였다.

6) 진주담치 가수분해물은 가수분해 온도가 증가함에 따라 항산화 활성 또한 증가하였으며, DPPH, ABTS radical 소거능 및 FRAP 활성은 240°C에서

각각 12.79 ± 0.01 , 9.52 ± 0.02 및 4.68 ± 0.08 mg TE/g dried sample로 최대의 활성을 나타내었다.

진주담치 가수분해물의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 각각 210°C 및 240°C 의 조건에서 7.18 ± 0.20 mg GAE/g dried sample 및 15.66 ± 0.06 mg QE/g dried sample으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 총 페놀 함량은 최적 조건 이후 감소하는 경향을 확인하였다.

총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 항산화 활성과 밀접한 관련이 있다고 보고됨에 따라 진주담치 가수분해물의 항산화 활성과 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 간의 상관관계를 분석하였다. 그 결과, DPPH radical 소거능과 총 플라보노이드 함량에서 $R^2=0.984$, ABTS radical 소거능과 총 페놀 함량에서 $R^2=0.964$, 철 이온 환원력과 총 플라보노이드 함량에서 $R^2=0.985$ 로 가장 유의한 상관관계를 보였다. 본 결과를 통하여 진주담치 가수분해물의 항산화 활성인 DPPH, ABTS radical 소거능 및 FRAP 활성과 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 간 모두 높은 상관관계가 있음을 확인하였다.

7) 진주담치 가수분해물의 총 당 및 환원당 함량은 각각 150°C 및 210°C 에서 9.06 ± 0.28 및 5.16 ± 0.07 g glucose/100 g dried sample으로 가장 높았으며, 단백질 함량은 180°C 에서 52.87 ± 0.16 g BSA/100 g dried sample으로 최대의 함량을 나타내었다.

8) 진주담치 가수분해물의 필수 및 비필수 유리아미노산 함량은 120°C 에서 11718.94 ± 0.26 mg/L로 최대의 함량을 보였으며, 온도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 기능성 아미노산으로 불리는 타우린의 함량 또한 온도가 증가함에 따라 지속적으로 감소하였으며, HPLC를 통하여 분석한 결과 180°C 이후 급격히 감소한 것을 확인하였는데, 이는 열에 의한 분해 혹은 마이라드 반응에 의한 것으로 사료된다.

9) 기능적 특성을 지닌 항고혈압 활성은 고혈압 치료제로 많이 사용되고 있는 Captopril (1%)을 표준물질로 사용하였으며, $96.74 \pm 0.22\%$ 의 활성을 나타내었다. 진주담치 가수분해물은 온도가 증가함에 따라 증가하여 180°C 에서 $95.38 \pm 0.29\%$ 로 가장 높은 활성을 나타내었다. 반면 210°C 이후의 조건에서는 항고혈압 활성이 감소하였는데, 이는 단백질 및 여러 화합물의 분해로 인한 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구는 안전성, 경제성 및 친환경 등의 장점뿐만 아니라 식품의 기능성 강화 등으로 활용도가 높은 초임계 이산화탄소 및 아임계 수 가수분해 공정을 이용하여 산업적으로 활용하기 위하여 진주담치 오일 및 가수분해물을 수득하였으며, 이의 물리화학적 및 생리활성을 확인함으로써, 본 연구에서 사용된 원료인 진주담치는 기능성 식품 및 3D 프린팅용 소재 또는 의약품 및 화장품 등 다양한 분야에서 사용될 수 있는 소재로서의 이용에 대한 기초 자료로 활용이 높을 것으로 판단된다.

V. 참고문헌

- Ahmed, R. and B.-S. Chun (2018). "Subcritical water hydrolysis for the production of bioactive peptides from tuna skin collagen." *The Journal of Supercritical Fluids* 141: 88-96.
- Ali-Nehari, A., et al. (2012). "Characterization of oil including astaxanthin extracted from krill (*Euphausia superba*) using supercritical carbon dioxide and organic solvent as comparative method." *Korean Journal of Chemical Engineering* 29(3): 329-336.
- AOCS (1998). "AOCS official method Ce 2 66: Preparation of methyl esters of fatty acids."
- Asaduzzaman, A., et al. (2020). "Characterization of pepsin-solubilised collagen recovered from mackerel (*Scomber japonicus*) bone and skin using subcritical water hydrolysis." *International Journal of Biological Macromolecules* 148: 1290-1297.
- Bäck, M. (2017). "Omega-3 fatty acids in atherosclerosis and coronary artery disease." *Future Science OA* 3(4): FSO236.
- Belwal, T. et al. (2016). "Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM)." *Food chemistry* 207: 115-124.
- Bougatef, A., et al. (2009). "Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases." *Food chemistry*

114(4): 1198–1205.

- Buddhachat, K., et al. (2017). "Effects of different omega-3 sources, fish oil, krill oil, and green-lipped mussel against cytokine-mediated canine cartilage degradation." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 53(5): 448–457.
- Bueno-Solano, C., et al. (2009). "Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products." *Food chemistry* 112(3): 671–675.
- Cho, Y.-J., et al. (2019). "Physicochemical and biofunctional properties of shrimp (*Penaeus japonicus*) hydrolysates obtained from hot-compressed water treatment." *The Journal of Supercritical Fluids* 147: 322–328.
- Choi, W.-S. and J.-S. Lee (2018). "The Effect of Taurine Intake among Korean College Students: Serum Biochemistry and Blood Hematology." *Korean Journal of Clinical Laboratory Science* 50(3): 236–244.
- Corrêa, A. P. A., et al. (2008). "Fractionation of fish oil with supercritical carbon dioxide." *Journal of Food Engineering* 88(3): 381–387.
- Dyerberg, J., et al. (1978). "Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?" *The Lancet* 312(8081): 117–119.
- Fan, C., et al. (2016). "A mussel-inspired double-crosslinked tissue adhesive intended for internal medical use." *Acta biomaterialia* 33: 51–63.
- Fernández, A., et al. (2015). "Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland." *Food chemistry* 177: 43–52.
- Firestone, D. (2009). *Official methods and recommended practices of the AOCS, AOCS.*

- Friedrich, J. P. and G. R. List (1982). "Characterization of soybean oil extracted by supercritical carbon dioxide and hexane." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30(1): 192-193.
- Gereniu, C. R. N., et al. (2017). "Characteristics of functional materials recovered from Solomon Islands red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) using pressurized hot water extraction." *Journal of Applied Phycology* 29(3): 1609-1621.
- Getachew, A. T., et al. (2018). "Effect of pretreatments on isolation of bioactive polysaccharides from spent coffee grounds using subcritical water." *International Journal of Biological Macromolecules* 109: 711-719.
- Getachew, A. T. and B. S. Chun (2017). "Influence of pretreatment and modifiers on subcritical water liquefaction of spent coffee grounds: A green waste valorization approach." *Journal of cleaner production* 142: 3719-3727.
- Han, J.-K., et al. (2018). "Antioxidant, ACE inhibitory, and acetylcholinesterase inhibitory activities of subcritical water extract of blue mussel." *Food science and biotechnology* 27(3): 847-851.
- Haq, M., et al. (2017). "Quality properties and bio-potentiality of edible oils from atlantic salmon by-products extracted by supercritical carbon dioxide and conventional methods." *Waste and Biomass Valorization* 8(6): 1953-1967.
- Haq, M. and B.-S. Chun (2018). "Microencapsulation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and astaxanthin-rich salmon oil using particles from gas saturated solutions (PGSS) process." *LWT* 92: 523-530.
- Haq, M., et al. (2018). "Modifications of Atlantic salmon by-product oil for

- obtaining different ω -3 polyunsaturated fatty acids concentrates: An approach to comparative analysis." *Journal of Food and Drug Analysis* 26(2): 545-556.
- Henderson, J. W., et al. (2000). "Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids." *Amino acid analysis using Zorbax Eclipse-AAA columns and the Agilent 1100(1100)*: 1-10.
- Herrero, M., et al. (2015). "Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 71: 26-38.
- Howitz, W. (2000). "Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Chapter 4."
- Huxtable, R. (1992). "Physiological actions of taurine." *Physiological reviews* 72(1): 101-163.
- Hyung, J.-H., et al. (2018). "Blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate promotes mouse mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts through up-regulation of bone morphogenetic protein." *Food chemistry* 242: 156-161.
- Jacobsen, J. G. and L. Smith (1968). "Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives." *Physiological reviews* 48(2): 424-511.
- Jang, S. and S.-K. Moon (2005). "Analysis of total sugar by extraction condition and material to develop the extraction process of ginseng polysaccharide." *Korean Journal of Food Preservation* 12(4): 367-371.
- Jung, G.-W., et al. (2012). "Characterization of wheat bran oil obtained by supercritical carbon dioxide and hexane extraction." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18(1): 360-363.

- Khanam, U. K. S., et al. (2012). "Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables." *Journal of Functional Foods* 4(4): 979–987.
- Khuwijitjaru, P., et al. (2014). "Degradation kinetics of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products." *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 92(5): 810–815.
- Kim, E., et al. (1999). "Taurine contents in commercial milks, meats and seafoods." *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28(1): 16–21.
- Kim, S.-G., et al. (2013). "Food component characteristics of wild hard-shelled mussel *Mytilus coruscus* and cultured sea mussel *Mytilus edulis* in Korea." *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46(6): 717–724.
- Kwak, C.-S., et al. (2005). "The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content." *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 34(8): 1143–1150.
- Lee, H.-J., et al. (2017). "Physical and functional properties of tunicate (*Styela clava*) hydrolysate obtained from pressurized hydrothermal process." *Fisheries and aquatic sciences* 20(1): 14.
- Lee, H.-J., et al. (2017). "Omega-3 fatty acids concentrate production by enzyme-catalyzed ethanolysis of supercritical CO₂ extracted oyster oil." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 22(5): 518–528.
- Lee, H.-J., et al. (2018). "Extraction of bioactive compounds from oyster (*Crassostrea gigas*) by pressurized hot water extraction." *The Journal of Supercritical Fluids* 141: 120–127.
- Lee, J.-H., et al. (2018). "Subcritical water extraction of bioactive

- components from red ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer)." The Journal of Supercritical Fluids 133: 177-183.
- Lee, J.-M., et al. (2015). "Physicochemical properties and composition of ginsenosides in red ginseng extract as revealed by subcritical water extraction." Korean Journal of Food Science and Technology 47(6): 757-764.
- Lee, S.-M., et al. (2011). "Fatty acid composition and oxidative properties of anchovy oil extracted by supercritical carbon dioxide." Clean Technology 17(3): 266-272.
- Li, Y., et al. (2008). "Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH)." Food chemistry 106(2): 444-450.
- Lowry, O. H., et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." Journal of biological chemistry 193: 265-275.
- Marcilla, A., et al. (2009). "Characterization of microalgal species through TGA/FTIR analysis: Application to nanochloropsis sp." Thermochemica Acta 484(1-2): 41-47.
- Meillisa, A., et al. (2015). "Production of monosaccharides and bio-active compounds derived from marine polysaccharides using subcritical water hydrolysis." Food chemistry 171: 70-77.
- Mlyuka, E., et al. (2016). "Characteristics of subcritical water extraction and kinetics of pentacyclic triterpenoids from dry loquat (*Eriobotrya japonica*) leaves." International Journal of Food Engineering 12(6): 547-555.
- Mohammad, S. H. and M. S. Yusuf (2016). "Proximate Evaluation of some Economical Seafood as a Human Diet and as an Alternative Prospective Valuable of Fish Meal."

- Neves, A. C., et al. (2016). "Angiotensin Converting Enzyme and Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory, and Antioxidant Activities of a Blue Mussel (*Mytilus edulis*) Meat Protein Extract and Its Hydrolysates." *Journal of Aquatic Food Product Technology* 25(8): 1221-1233.
- Nguyen, T. T., et al. (2017). "Seasonal variations of nutritional components in cockles (*Tegillarca granosa*) processed from the Southern Coast of Korea." *Cogent Food & Agriculture* 3(1): 1360102.
- Nkurunziza, D., et al. (2019). "Subcritical water enhances hydrolytic conversions of isoflavones and recovery of phenolic antioxidants from soybean byproducts (okara)." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 80: 696-703.
- Noriega-Rodríguez, J., et al. (2009). "Oil production from sardine (*Sardinops sagax caerulea*) Producción de aceite a partir de sardina (*Sardinops sagax caerulea*)." *CyTA-Journal of Food* 7(3): 173-179.
- Ohgami, K., et al. (2003). "Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo." *Investigative ophthalmology & visual science* 44(6): 2694-2701.
- Orth, D. L. (2001). "HPLC determination of taurine in sports drinks." *Journal of chemical education* 78(6): 791.
- Ozsoy, N., et al. (2008). "Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts." *Food chemistry* 110(3): 571-583.
- Panayotova, V., et al. (2019). "Relative changes of retinol, α -tocopherol, β -carotene and astaxanthin in cooked edible mollusks from the Black Sea."
- Park, J.-S. (2011). "Physicochemical properties of salt-fermented *Mytilus edulis* added with various seasoning sauces." *Korean Journal of Food*

- Preservation 18(3): 335-340.
- Park, J.-S., et al. (2019). "Quality Properties of Conger Eel (*Conger myriaster*) Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Conventional Methods." *Clean Technology* 25(4): 275-282.
- Park, J.-S., et al. (2019). "Physiological activities and bioactive compound from laver (*Pyropia yezoensis*) hydrolysates by using subcritical water hydrolysis." *The Journal of Supercritical Fluids* 148: 130-136.
- Park, T.-H., et al. (2012). "Processing and characteristics of canned seasoned sea mussel." *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education* 24(6): 820-832.
- Pleissner, D., et al. (2012). "Biomass composition of blue mussels, *Mytilus edulis*, is affected by living site and species of ingested microalgae." *Isrn Zoology* 2012.
- Powell, T., et al. (2016). "Subcritical water processing of proteins: An alternative to enzymatic digestion?" *Analytical chemistry* 88(12): 6425-6432.
- Quitain, A. T., et al. (2002). "Low-molecular-weight carboxylic acids produced from hydrothermal treatment of organic wastes." *Journal of hazardous materials* 93(2): 209-220.
- Rai, A., et al. (2016). "Supercritical extraction of sunflower oil: A central composite design for extraction variables." *Food chemistry* 192: 647-659.
- Roy, V. C., et al. (2020). "Recovery and bio-potentialities of astaxanthin-rich oil from shrimp (*Penaeus monodon*) waste and mackerel (*Scomberomous niphonius*) skin using concurrent supercritical CO₂ extraction." *The Journal of Supercritical Fluids* 159: 104773.

- Saqib, A. A. N. and P. J. Whitney (2011). "Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars." *Biomass and bioenergy* 35(11): 4748-4750.
- Saravana, P. S., et al. (2016). "Structural, antioxidant, and emulsifying activities of fucoidan from *Saccharina japonica* using pressurized liquid extraction." *Carbohydrate Polymers* 153: 518-525.
- Saravana, P. S., et al. (2018). "Green and efficient extraction of polysaccharides from brown seaweed by adding deep eutectic solvent in subcritical water hydrolysis." *Journal of cleaner production* 198: 1474-1484.
- Saravana, P. S., et al. (2016). "Evaluation of the chemical composition of brown seaweed (*Saccharina japonica*) hydrolysate by pressurized hot water extraction." *Algal Research* 13: 246-254.
- Saravana, P. S., et al. (2016). "Optimization of phytochemicals production from the ginseng by-products using pressurized hot water: Experimental and dynamic modelling." *Biochemical engineering journal* 113: 141-151.
- Sasaki, M., et al. (1998). "Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water." *The Journal of Supercritical Fluids* 13(1-3): 261-268.
- Sebring, L. and R. Huxtable (1985). "Taurine modulation of calcium binding to cardiac sarcolemma." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 232(2): 445-451.
- Stankovic, M. S. (2011). "Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts." *Kragujevac J Sci* 33(2011): 63-72.

- Su, K.-P., et al. (2008). "Omega-3 fatty acids for major depressive disorder during pregnancy: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Journal of Clinical Psychiatry* 69(4): 644
- Tahergorabi, R. and J. Jaczynski (2016). *Seafood proteins and human health. Fish and fish oil in health and disease prevention*, Elsevier: 323-331.
- Tromp, R., et al. (1994). "Neutron diffraction studies of H₂O/D₂O at supercritical temperatures. A direct determination of g_{HH} (r), g_{OH} (r), and g_{OO} (r)." *The Journal of chemical physics* 101(7): 6210-6215.
- Turner, C., et al. (2001). "Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis." *Journal of Chromatography A* 936(1-2): 215-237.
- Vareltzis, P. K. and I. Undeland (2012). "Protein isolation from blue mussels (*Mytilus edulis*) using an acid and alkaline solubilisation technique—process characteristics and functionality of the isolates." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(15): 3055-3064.
- Vilailak, K., et al. (2007). "Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type." *Food chemistry* 102(4): 1317-1327.
- Watanabe, K. (1974). "Meat flavor." *Jpn. J. Zootech. Sci.* 45: 113-128.
- Watanabe, M., et al. (2012). "Isolation and characterization of a phenolic antioxidant from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(3): 830-835.
- Whitehouse, M., et al. (1997). "Anti-inflammatory activity of a lipid fraction (Lyprinol) from the NZ green-lipped mussel." *Inflammopharmacology*

5(3): 237-246.

Wrolstad, R. E., et al. (2005). Handbook of food analytical chemistry, volume 1: Water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates, John Wiley & Sons.

Xu, Z., et al. (2019). "Isolation and characterization of peptides from *mytilus edulis* with osteogenic activity in mouse MC3T3-E1 preosteoblast cells." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(5): 1572-1584.

Yashodhara, B., et al. (2009). "Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease." *Postgraduate medical journal* 85(1000): 84-90.

Yoon, J. A., et al. (2015). "General characteristics of taurine: a review." *The Korean Journal of Food And Nutrition* 28(3): 404-414.

이광원, et al. (2017). "글루탐산의 생체이용률과 기능성." *식품과학과 산업* 50(3): 93-104.

감사의 글

짧으면 짧고 길다면 긴 2년이라는 석사과정에 마침표를 찍었습니다. 본 논문이 완성되기까지 많은 격려와 지도를 해주시고, 늘 옆에서 응원을 아끼지 않으셨던 모든 분에게 이 글로 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저 대학원에 대한 지식이 없던 저에게 기회를 주시고 많은 가르침과 칭찬을 아끼지 않으셨던 전병수 지도교수님께 깊은 감사 인사를 드립니다. 교수님의 지도 덕분에 깊이 있는 연구뿐만 아니라 연구원으로서의 자질에 대해 많은 배움을 얻었습니다. 또한 귀한 시간 내시어 본 논문을 살펴주시고 제언해주신 안동현 교수님, 조승목 교수님께 진심으로 감사드리며, 김선봉 교수님, 양지영 교수님, 이양봉 교수님, 김영목 교수님, 심길보 교수님, 왕진호 교수님께도 감사드립니다.

정말 가족이나 다름없는 식품공학실험실 일원 연진이언니, 진석이오빠, 성렬, 승찬, 민진, 재정, 서빈 그리고 좋지 못한 영어실력으로 의사소통하기 힘들었을 외국인 친구들과 이희정 교수님께도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 현재 타지에 있는 채영, 준호에게도 감사인사를 전합니다. 그리고 가끔 안부 물어가며 응원과 공감을 아끼지 않은 친구들에게도 감사의 말을 전합니다.

마지막으로 제가 하는 일에는 늘 믿고 지켜봐주신 든든한 지원군 우리 가족 어머니, 아버지와 오빠에게 가장 감사드립니다. 저에게 주신 사랑이 헛되지 않게 꼭 효도하겠습니다. 그리고 가장 힘들었던 시기에 옆에서 항상 응원해주며 함께해준 재연이오빠에게도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 덕분에 힘낼 수 있었고 잘 견뎌낼 수 있었습니다.

앞으로 있을 사회생활이나 인생에 있어 2년 동안의 귀중한 경험을 바탕으로 꾸준히 노력해나가겠습니다. 다시 한 번 모든 분들께 감사인사 드리며, 베풀어 주신 은혜 잊지 않겠습니다. 감사합니다.