

ZnO 나노입자와 자몽씨추출물을 첨가한 아가복합필름의 자외선차단 및 항균특성

김연호 · 방영주 · 윤기선 · 임종환*

경희대학교 식품영양학과

UV Barrier and Antimicrobial Activity of Agar-based Composite Films Incorporated with ZnO Nanoparticles and Grapefruit Seeds Extract

Yeon Ho Kim, Yeong-Ju Bang, Ki Sun Yoon, and Jong-Whan Rhim*

Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, 26 Kyungheedae-ro, Dongdaemun-gu,
Seoul 02447, Republic of Korea

Abstract Agar-based nanocomposite films were prepared by incorporation of zinc oxide nanoparticles (ZnONP) and grapefruit seed extract (GSE). The composite films were characterized using FT-IR, UV-visible spectroscopy and thermalgravimetric analysis (TGA). The composite films showed light absorption peaks at 220 and 380 nm, characteristic for GSE and ZnONP, respectively. The UV-light transmittance of the agar film was markedly reduced from $54.4 \pm 1.3\%$ to $5.8 \pm 2.5\%$ with little sacrifice of transparency when 3 wt% ZnONP and 5 wt% GSE were added. The mechanical and water vapor barrier properties increased slightly though they were not significant statistically by the addition of ZnONP and GSE. The nanocomposite films showed stronger antibacterial activity against *L. monocytogenes* than *E. coli* O157: H7 and the antibacterial activity was affected by bacterial types as well as concentrations of ZnONP and GSE. The nanocomposite film incorporated with 3 wt% of ZnONP and 5 wt% of GSE exhibited strong antibacterial activity against *Listeria monocytogenes* and *E. coli* O157: H7. The results indicate that 3 wt% of ZnONP and 5 wt% of GSE are the optimal concentrations for producing functional agar/ZnONP/GSE composite films.

Keywords Agar, Grapefruit seed extract, ZnO nanoparticle, Nanocomposite film, Antimicrobial, UV barrier

서 론

최근 1~2인 가구의 증가와 고령화가 가속됨에 따라 편리성을 추구하는 식생활로 변화되면서 대형마트, 편의점, 식품매장 등에서 즉석섭취식품류(Ready-to-eat food: RTE food)의 판매와 소비가 점차 증가하고 있다¹⁾. RTE 식품은 즉석섭취식품으로 구매 후 특별한 조리과정 없이 섭취가 가능한 식품이다. 신선식품의 수요 증가에 따라 최소한의 가공 처리와 합성 첨가물을 사용하여 식품의 안전과 품질 유지가 필연적으로 식품산업에서의 큰 관심을 보이고 있다²⁻³⁾.

따라서 Fresh-food, RTE 식품은 과거에 비해 포장의 중요성이 높아지고 있으며, 항균, 항산화, 광 차단성 등의 기능성 포장지(Active packaging)가 식품의 유통기한을 연장시키는데 중요한 역할을 하고 있다⁴⁾.

기능성 포장지는 사용하는 폴리머에 따라서 그 기능 특성이 달라질 수 있다⁵⁾. 또한 최근 플라스틱에 대한 환경적 문제가 대두되면서 플라스틱을 대체할 수 있는 생분해성 포장재의 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 생분해성 폴리머로 아가⁶⁾, PLA⁷⁾, 젤라틴⁸⁾, 키토산⁹⁾ 등이 사용되고 있다. 또한 이러한 생분해성 포장재에 다양한 기능성 물질을 첨가하여 항균, 항산화, 자외선차단성 등의 기능성을 갖는 포장재가 개발되고 있다. Kanmani와 Rhim (2014)은 아가, 카라기난 CMC에 같은 양의 ZnO 나노 입자를 첨가하여 특성을 비교하였는데, 광 차단성이 모두 유의적으로 차이가 있었으며, 효과는 agar, CMC, carrageenan 순으로 유의적으

*Corresponding Author : Jong-Whan Rhim
Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea
Tel : +82-2-961-961-2350
E-mail : jwrhim@khu.ac.kr

로 높은 효과를 보였다¹⁰⁾. 그 중에서도 아가포장 필름은 생분해성 필름으로 널리 사용되며 플라스틱을 대체할 포장재로 주목받고 있다^{11,12)}. 기능성을 부여하기 위해 폴리머에 Ag¹³⁾, ZnO¹⁴⁾, CuO¹⁵⁾ 등과 같은 금속나노입자나 산화금속나노입자를 사용하거나 melanin¹⁶⁾, sulfur¹⁷⁾, cellulose¹⁸⁾ 등의 비금속형 나노 입자를 첨가하여 항산화성, 항균성, 광차단성 및 기계적 강도를 증가시키는 연구가 이루어졌다. 그 중 ZnO는 친환경적일뿐만 아니라 항균성이 강하고, 인체에 대한 독성이 약하며 뛰어난 열안정성과 다른 금속에 비해 값이 저렴한 장점이 있다¹⁹⁾. 또한 ZnO는 국내 식품공전에서 안전성을 인정 받아, 식품첨가물로서 사용이 가능하여 활용도가 더욱 넓어질 것으로 예상된다²⁰⁾. Shankar 등의 연구에 의하면 broth에서 2.5%의 ZnO 나노 입자가 첨가된 젤라틴필름은 *Listeria monocytogenes*를 12시간 후에 5 log CFU/mL를 감소시켰으며, 동일한 조건에서 *E. coli* O157: H7을 약 2 log CFU/mL를 감소시켰다¹⁴⁾. ZnO 나노 입자의 항균작용은 박테리아의 세포벽 파괴에 기인하는 것으로 알려져 있으며, 그람음성균보다 그람양성균에 더 강한 항균성을 가지고 있다^{21,22)}.

최근 essential oil, 식물성 추출물과 같은 천연 항균물질에 대한 관심과 사용이 증가하고 있는데^{23,24)} 그 중 하나인 자몽씨추출물(grapefruit seed extract, GSE)는 항균, 항바이러스, 항진, 항기생충의 특성이 높은 것으로 알려져 있다²⁵⁻²⁷⁾. GSE는 다양한 polyphenol compound를 함유하고 있으며, flavonoids (naringin), tocopherol, limonoid, catechins 및 epicatechin 등으로 구성되어있으며^{28,29)}, polyphenol이 항균작용과 항산화, 자외선 차단성 등의 기능성을 갖는다²⁵⁾. GSE의 항균성은 그람양성균, 그람음성균, 효모, 곰팡이 모두에게 나타났으며, 항균작용은 세포벽을 파괴시키는 것으로 알려져 있다^{25,27)}. 이러한 효과로 인해 GSE는 식품포장, 식품첨가물, 화장품 산업 등 여러 분야에서 활용되고 있다³⁰⁻³²⁾.

본 연구에서는 아가필름에 ZnO 나노 입자와 GSE를 복합적으로 사용하여 항균성과 자외선 차단성이 증진된 나노 복합포장재를 제조하여 생분해성의 기능성 포장재를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

폴리머에 사용한 agar는 Fine Agar Co., Ltd. (Damyang, Jeonnam, Korea)에서 구매하였고, 자몽씨 추출물 (GSE, DF-100)은 Komiphahram International Co., Ltd. (Seoul, Korea)에서 구매하였다. Glycerol과 zinc acetate는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서, KOH와 NaOH 시약은 Duksan Pure Chemicals Co., Ltd. (Ansan, Gyeonggi-do, Korea)에서 구매하였다. 미생물 배지로 brain heart infusion

broth (BHI), tryptic soy broth (TSB)과 agar 분말은 Duksan Pure chemicals Co., Ltd (Ansan, Gyeonggi-do, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 시험균주(*Escherichia coli* O157: H7 ATCC 43859, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313)는 대한중균협회(the Korean Collection for Type Culture, KTCC, Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2. ZnO 나노 입자의 제조

ZnONP은 Shankar 등 방법에 따라 zinc acetate를 이용하여 합성하였다³³⁾. 농도가 1 mM인 1000 mL의 zinc acetate 용액을 70°C가 되도록 가열하고, 1 M NaOH 또는 1 M KOH 용액을 가하여 pH가 8부근이 되도록 한 후, 30분 동안 교반하면서 가열한 후, 하룻동안 침전 시키고 상등액을 제거하여 증류수로 4-5회, 에탄올로 2-3회 세척 후, 원심분리하여 침전물을 24시간 동안 150°C 오븐에서 건조시켜 사용하였다.

3. 아가/GSE/ZnONP 필름 제조

기능성 아가필름은 solution casting 방법을 사용하여 제조하였다. 증류수 150 mL에 ZnO 나노입자를 0.04, 0.08, 0.12 g을 각각 첨가하며 12시간 동안 sonicator (FS 140 Ultra Cleaner, Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA)를 이용하여 분산시켰다. GSE 용액은 GSE 10 g에 증류수 10 mL를 상온에서 10분간 교반하여 만든 후, 각 ZnONP 용액에 0.9 g의 glycerol과 80, 120, 200 µL의 GSE 용액을 각각 첨가하여 90°C 온도에서 30분간 magnetic stirrer를 이용하여 혼합시켰다. 필름 용액은 테플론 필름(Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA)을 코팅한 유리판 (24 cm × 30 cm) 위에 캐스팅한 후 실온(22-25°C)에서 2일 동안 건조시켰다. 건조된 필름을 떼어낸 뒤, 25°C, 50% RH로 조성된 챔버 (model FX 1077, Jeio Tech Co. Ltd., Ansan, Korea)에서 48시간 동안 수분함량을 조절한 후 실험에 사용하였다. 비교를 위해 GSE와 ZnONP을 제외고 제조한 아가필름을 대조군으로 사용하였다.

4. 필름의 표면형태분석 (Scanning Electron Microscopy)과 광학적 특성 분석

전자주사현미경 (scanning electron microscopy; SEM)을 사용하여 필름 표면의 미세구조를 관찰하였다. 필름을 작게 잘라내어 SEM 시료 홀더에 부착시킨 후 5.0 kV의 가속전압을 가하여 FE-SEM (S-4800, Hitachi Co., Ltd., Matsuda, Tokyo, Japan)을 사용하여 분석하였다.

필름의 광학특성을 빛의 흡광도를 통해 측정하여 조사하였다. 일정한 크기로 자른필름 시료를 분광광도계의 magnetic cells 사이에 놓고 UV-visible spectrophotometer (Mecasys Optizen POP Series UV/Vis, Seoul, Korea)를 사용하여 흡

광도를 200-700 nm 사이에서 측정하였다.

5. FT-IR 분석

필름 FT-IR 분석을 FT-IR spectroscopy (TENSOR 37 spectrophotometer with OPUS 6.0 software, Billerica, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 필름을 일정 크기(5×5 cm)로 자르고, 4000-500 cm⁻¹ 에서 측정하였으며, 이때 FT-IR은 4 cm⁻¹로 분해되어 32 scan으로 기록하였다.

6. 열 안정성 분석

필름의 열 안정성은 thermogravimetric analyzer (Hi-res TGA 2950, TA Instrument, New Castle, DE, USA)를 이용하여 측정하였다. 알루미늄 팬에 필름을 놓고 10°C/min 가열속도로 질소가스를 50 mL/min으로 흘려보내면서 30°C에서 600°C까지 가열하였다.

7. 필름의 색도와 Light transmittance 분석

필름의 색도는 Chroma meter (Minolta, CR-200, Tokyo, Japan)을 사용하여 Hunter color 값 (L^* , a^* , b^*)을 측정하였다. 필름의 배경으로 표준백색판 ($L^*=97.75$, $a^*=-0.49$, $b^*=1.96$)을 사용하였으며, 필름의 5군데를 임의로 측정하여 평균을 계산하였다. 총색차(ΔE)는 다음 식에 따라 계산하였다:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

여기에서 ΔL^* , Δa^* , Δb^* 는 필름 샘플과 표준백색판의 차이를 나타낸다.

필름의 광투과도는 UV-visible spectrophotometer를 사용하여 UV 파장범위인 280 nm (T_{280})와 가시광선 파장범위인 660 nm (T_{660})에서 각각 측정하여 각각 필름의 자외선 차단성과 투명성의 지표로 사용하였다.

8. 필름의 두께와 기계적 특성 분석

필름의 두께는 digital micrometer (Digimatic Micrometer, QuantuMike IP 65, Mitutoyo, Tokyo, Japan)를 사용하여 임의로 5군데를 측정한 후 그 평균값을 사용하였다.

필름의 기계적특성을 조사하기 위해 double blade cutter (model LB.02/A, Metrotec, S.A., San Sebastian, Spain)를 사용하여 필름시료를 2.54 cm × 15 cm 크기로 절단한 후 Instron Universal Testing Machine (Model 5565, Instron Engineering Corporation, Canton, MA, USA)를 사용하여 인장강도(tensile strength; TS), 연신율(elongation at break; EB), 탄성률(elastic modulus; EM)을 측정하였다. 기계는 tensile mode로 설정하고 initial grip separation와 cross-head speed를 각각 50 mm와 50 mm/min으로 설정하였다³⁴⁾.

TS는 maximum load (N)을 필름의 initial cross-sectional area (m²)로 나누어 계산하고 단위는 MPa로 표시하였다. EAB(%)는 필름이 끊어질 때의 길이를 필름의 초기 길이 (50 mm)로 나눈 후 100을 곱한 값으로 나눈 값으로 결정하였고, EM(MPa)은 초기의 stress-strain 곡선의 기울기 값으로부터 결정하였다.

9. 필름의 water vapor permeability (WVP)와 water contact angle (WCA) 측정

필름의 투습도(water vapor permeability; WVP)는 ASTM E96-95 표준 방법을 사용하여 Gennadios 등³⁵⁾의 방법에 따라 계산하였다. 이를 위해 각 필름 시료를 정사각형 (7.5 cm × 7.5 cm) 크기로 자른 후, 높이 2.5 cm, 지름 6.8 cm인 WVP 컵 안에 증류수 18 mL를 채운 후 필름으로 덮고 밀봉하였다. 조립된 WVP 컵들은 25°C, 50% RH, 풍속 198 m/min으로 조정된 humidity chamber (model FX 1077, Jeio Tech Co., Ansan, Korea)에 넣어 8시간 동안 보관하였다. 보관 중 1시간 마다 컵의 무게를 측정하였다. Water vapor transmission rate (WVTR)은 시간에 따른 컵의 무게 감소량의 기울기로 계산하였으며, 필름의 WVP는 아래 식에 의하여 계산하였다:

$$WVP = \frac{WVTR \times L}{\Delta p}$$

WVTR: water vapor transmission rate (g/m²s) through a film

L: thickness of the film (m)

Δp : water vapor pressure difference (Pa) across the film

필름 표면의 친수성/소수성 여부를 판단하기 위해 water contact angle analyzer (model phoenix 150, surface Electro-optics Co., Ltd., Kunpo, Korea)를 사용하여 수분접촉각(water contact angle; WCA)를 측정하였다. 필름을 3 cm × 10 cm로 자른 후 black Teflon coated steel (7 cm × 11 cm)에 올려놓고 WCA analyzer에 고정시켰다. 마이크로 시린지를 사용하여 10 μ L의 물을 필름 표면에 떨어뜨리고, 물방울의 접촉각을 임의의 5군데에서 측정하여 평균 값을 사용하였다.

10. 항균성 실험

필름의 항균성을 그람 양성균 *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313)과 그람 음성균 *E. coli* O157: H7 (NCTC 12079)을 사용하여 조사하였으며, 항균성실험은 Shankar 등의 방법을 변형하여 사용하였다³⁴⁾. *L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7는 각각 20% glycerol이 첨가된 BHI와 TSB 용액에 담아 -80°C에 보관하여 사용하였다. 삼각플라스크에 10%의 BHI와 TSB를 각각 10 mL를 넣고 상온에

서 해동된 *L. monocytogenes*는 BHI에, *E. coli* O157: H7은 TSB에 10 μ L를 접종한 후, shaking incubator (VS9480SR, Vision, Seoul, Korea)를 사용하여 36°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 각 균주는 멸균된 0.1% peptone water에 10진 희석법으로 5 log CFU/mL가 되도록 희석하고 50 mL BHI와 TSB에 다시 접종하였다. 접종된 균액에 100 mg의 필름을 넣고 36°C shaking incubator에서 배양하면서 0, 3, 6, 9, 12시간에 *L. monocytogenes*는 TSA에 0.2% yeast가 첨가된 배지에, *E. coli* O157: H7는 TSA배지에 도달한 후, 36°C 배양기(VS-1203P4S, Vision, Seoul, Korea)에 24시간 배양한 후 균락을 집계하였다.

결과 및 고찰

1. 필름의 표면형태분석(Scanning Electron Microscopy)과 광학적 특성 분석

모든 필름은 표면이 부드럽고 외관상의 결함이 없는 유연한 필름이 제조되었다. 필름 표면의 미세구조는 FE-SEM

을 사용하여 관찰한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 대조구 아가필름에서는 깨끗한 표면을 보였으며, ZnONP를 첨가한 경우 ZnONP의 농도가 높아질수록 표면에 흰색의 ZnONP이 많이 관찰되었으며, ZnONP의 입자는 균일하게 분산되어 있는 것을 확인하였다.

필름의 광학적 특성은 200-700 nm 파장의 빛을 필름에 투과시켜 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 2에 보인 바와 같다. 대조구인 아가필름에서는 조사한 파장에서 peak가 없었으나 GSE와 ZnONP를 첨가한 필름에서는 220 nm와 380 nm에서 두 개의 흡광 peak가 나타났는데, 220 nm의 peak는 GSE의 페놀화합물에 기인하는 peak이며³⁶⁾, 380 nm에서의 peak는 ZnONP에 기인하는 peak이다³⁷⁾.

2. FT-IR 분석

각 필름의 FT-IR 분석은 4000-500 cm^{-1} 구간에서 측정한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. FT-IR 분석 결과, 모든 필름은 FT-IR 패턴의 변화가 없이 동일한 peak를 나타내어, GSE와 ZnONP의 첨가가 아가필름의 구조에 영향을 미치

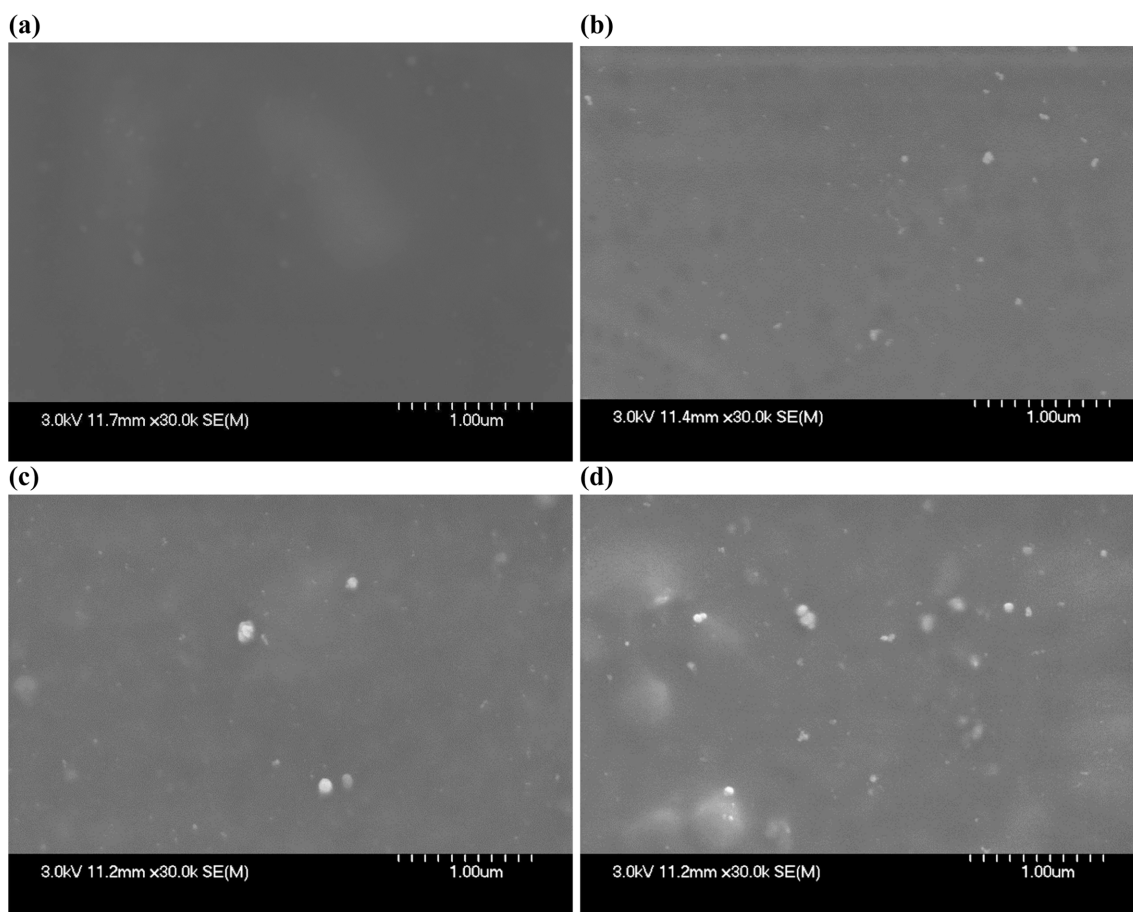


Fig. 1. FE-SEM micrograph of surface of the composite films.
(a)agar, (b)agar/ZnONP^{1%}/GSE^{2%}, (c)agar/ZnONP^{2%}/GSE^{3%}, (d)agar/ZnONP^{3%}/GSE^{5%}

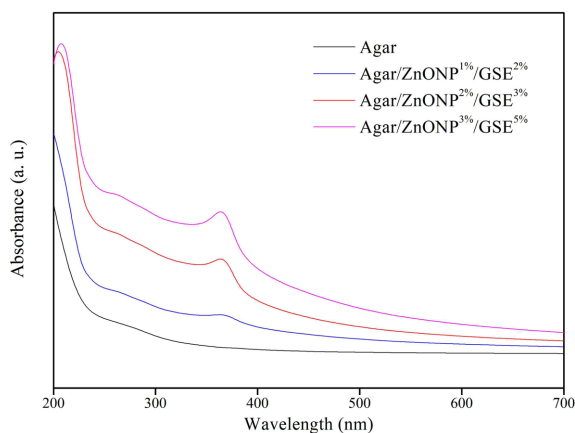


Fig. 2. UV-visible spectra of composite films.

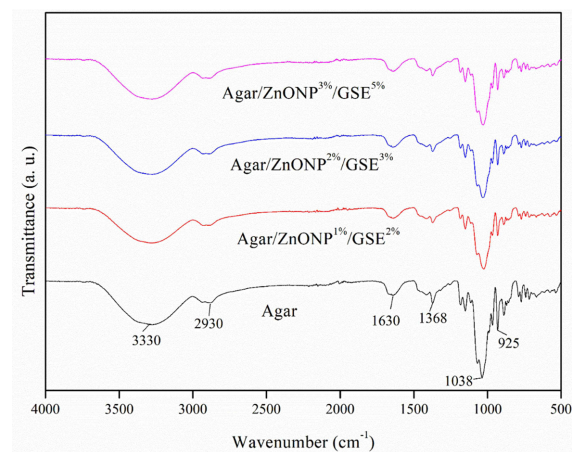


Fig. 3. FT-IR analysis of composite films.

지 않았음을 알 수 있다. 필름은 3330 cm^{-1} 와 2933 cm^{-1} 에서 peak가 형성되었는데, 이는 각각 hydroxyl group (O-H), methane (C-H)에 의함을 알 수 있다¹³⁾. 1630 cm^{-1} 에서의 peak는 펩타이드 결합에서의 amine (NH_2)과 아가의 acetone group에 기인 한 것이다^{6,38)}. 1368 cm^{-1} 의 peak는 ester sulfate group에 기인한다³⁹⁾. 1038 cm^{-1} 과 925 cm^{-1} 에서의 peak는 3,6-anhydrogalactose의 C=O group으로 인해 형성된 것이다⁶⁾.

3. 열 안정성 분석

각 필름의 TGA와 DTG의 결과는 Fig. 4에 보인 바와 같다. TGA 그래프는 온도 증가에 따라 각 필름들의 무게 감소를 나타내고 있으며, DTG 그래프는 단계별로 각 물질들의 변화가 일어나는 온도범위 및 최대온도를 알 수 있다. 대조구인 아가필름과 GSE, ZnONP를 첨가한 필름에서는 열 안정성에서 뚜렷한 차이가 없었다. 이는 아가필름에 GSE 첨가할 경우 필름의 열 안정성을 낮추어주고³⁶⁾, ZnONP의 첨가는 필름의 열 안정성을 높여 준다고 알려져 있는데³⁷⁾,

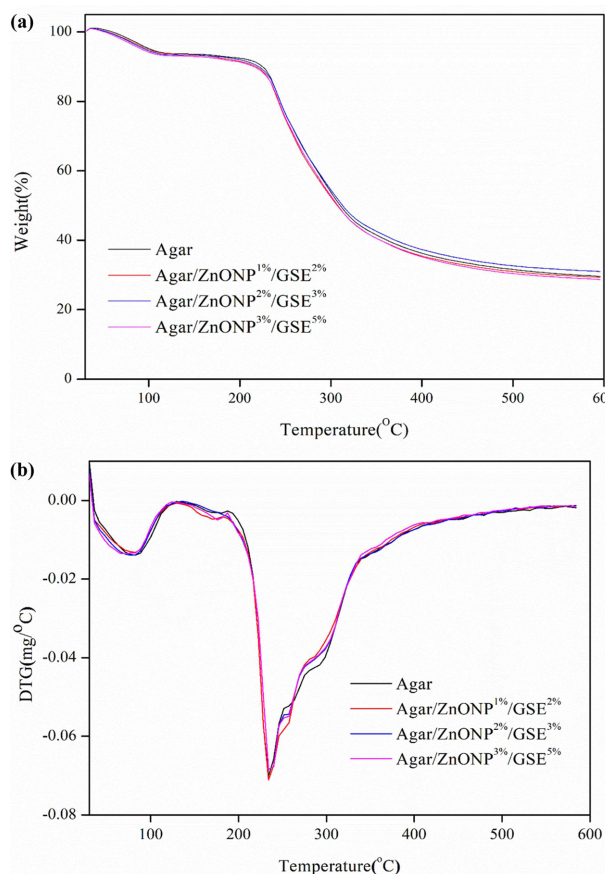


Fig. 4. (a) TGA and (b) DTG thermograms of agar-based composite films.

두 물질을 동시에 첨가한 경우 이들 충전제의 효과가 상쇄되어 대조구 필름과 같은 정도의 열 안정성을 갖는 것으로 사료된다. 각 필름들은 총 4단계를 거쳐 물질들이 연소되었다. 첫번째 단계는 $80\text{--}120^\circ\text{C}$ 에서 관찰되었으며, 이는 필름의 수분이 증발에 기인하며⁶⁾, 230°C 에서는 glycerol의 분해가 일어났으며, $270\text{--}280^\circ\text{C}$ 에서는 GSE의 분해로 인해 peak가 형성되었고⁹⁾, 325°C 에서는 polymer의 열분해에 의한 무게의 감소가 나타났다⁴⁰⁾.

4. 필름의 색도와 광차단성

필름의 색도와 광차단성 측정 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 대조구인 아가필름은 투명하고 무색을 갈색을 띄었으며, GSE와 ZnONP를 첨가한 복합필름은 약한 황색을 나타냈으며 그첨가량이 증가할수록 색깔이 짙어졌는데, 이는 GSE에 포함된 카로티노이드 색소에 기인한다. 노란 빛으로 변화하였는데, 이는 GSE의 첨가가 원인으로 사료된다. GSE와 ZnONP에 의해 아가필름의 Hunter L^* 값과 a^* 값은 유의적으로 감소하였으며, Hunter b^* 값은 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 이는 GSE와 ZnONP의 첨가에 의해 아가필름의 밝기가 감소하고 녹색도가 증가하였으며,

Table 1. Surface color and light transmittance of agar-based composite films

Film	L^*	a^*	b^*	ΔE	T_{280} (%)	T_{660} (%)
Agar	90.9±0.4 ^a	-0.6±0.1 ^a	6.5±0.1 ^a	2.3±0.3 ^a	54.4±1.3 ^a	88.7±0.5 ^a
Agar/ZnONP ^{1%} /GSE ^{2%}	89.8±0.4 ^b	-0.8±0.1 ^b	10.7±0.9 ^b	6.5±1.0 ^b	34.8±3.9 ^b	77.7±2.3 ^b
Agar/ZnONP ^{2%} /GSE ^{3%}	88.4±0.2 ^c	-1.0±0.1 ^c	15.5±0.7 ^c	11.6±0.8 ^c	10.1±1.2 ^c	64.9±1.8 ^c
Agar/ZnONP ^{3%} /GSE ^{5%}	87.2±0.3 ^d	-1.3±0.1 ^d	20.4±0.9 ^d	16.6±0.9 ^d	5.8±2.5 ^c	55.9±2.7 ^d

The values are presented as a mean±standard deviation. Any two means in the same column followed by the same letter is not significantly ($p > 0.05$) different from Duncan's multiple range test.

황색도가 증가하였음을 의미한다. 이에 따라 총색차(ΔE) 값 역시 유의적으로 증가하였다. 생고분자 필름에 GSE와 ZnONP를 첨가하면 L^* 값을 감소시키고, GSE의 첨가는 a^* 값을 증가시키나 ZnONP의 첨가는 a^* 값을 감소시키는 경향이 있는 것으로 보고된 바 있는데^{36,37)}, 본 연구에서의 a^* 값의 감소는 GSE 보다 ZnONP에 의한 영향이 더 큰 것으로 사료된다. 반면, b^* 값은 GSE와 ZnONP의 첨가에 따라 유의적으로 증가하였는데, 이는 주로 GSE의 첨가에 의한 것으로 사료되며³⁶⁾, ZnONP의 첨가에 의해 b^* 값의 증가가 더욱 촉진된 것으로 사료된다³⁷⁾.

아가필름은 280 nm와 660 nm에서의 광투과도가 각각 54.4% 및 88.7%로서 자외선과 가시광선대란 투과도가 높은 투명한 필름이다. GSE와 ZnONP의 첨가에 따라 광투과도는 유의적으로 감소하였는데($p < 0.05$), 그 감소정도는 충전제의 농도가 증가할수록 커졌다. agar/ZnONP^{3%}/GSE^{5%}의 필름의 경우 agar 필름에 비해 가시광선의 투과도는 37%가 감소한 반면, 자외선은 89%만큼 감소하여 필름의 투명도를 다소 감소시키면서 자외선 차단효과를 크게 증진시켰음을 알 수 있다. 이는 GSE와 ZnONP를 첨가한 아가필름이 포장필름의 내용물을 들여다 볼 수 있는 자외선 차단필름 포장재로 사용이 가능함을 의미한다.

5. 필름의 기계적 특성

필름의 기계적 특성 결과를 Table 2에 나타냈다. 대조구인 아가필름의 두께는 45.4 ± 5.0 μm 이었으며, GSE와 ZnONP의 첨가에 의해 두께가 다소 감소하였으나 통계적으

로 유의적인 변화는 아니었다($p > 0.05$).

필름의 기계적 특성으로 인장강도(TS), 연신율(EB) 및 탄성계수(EM)는 각각 필름의 강도, 유연성, 단단함을 뜻하며, 이는 외부 충격 및 환경에 의한 필름의 보존성과 식품포장에서의 적용 가능성의 지표로 사용된다⁴¹⁾. GSE와 ZnONP를 첨가한 아가필름은 대조구인 아가필름에 비해 TS와 EM은 다소 증가하였으나 EB는 다소 감소하였는데, 통계적으로는 유의적인 차이를 나타내지는 않았다($p > 0.05$). Kanmani와 Rhim은 GSE(13.3 $\mu\text{g/mL}$ 농도)를 첨가한 agar 필름의 TS 값이 34.6 ± 2.7 MPa에서 5.5 ± 0.4 MPa로 GSE 첨가가 TS 값을 크게 감소시켰으며, EM 값 또한 1004.9 ± 488.4 MPa에서 979.9 ± 43.8 MPa로 GSE 첨가에 따라 감소하였으며, EB는 25.6 ± 2.9%에서 29.5 ± 3.1%로 유의적으로 증가시켰음을 보고하였다³⁶⁾. Kanmani와 Rhim의 다른 선행 연구에서 agar 필름에 ZnONP를 첨가한 복합필름을 제조하여, agar 필름의 TS는 34.6 ± 2.7 MPa에서 agar/ZnONP는 13.0 ± 1.4 MPa로 감소하였고, EM은 1007.9 ± 88.4 MPa에서 109.8 ± 21.9 MPa로 감소하여 TS와 EM 모두 ZnONP의 첨가에 따라 크게 감소하였으며, EB는 25.6 ± 2.9%에서 56.3 ± 7.0%로 유의적으로 증가 했음을 보고하였다³⁷⁾. 본 연구에서는 GSE와 ZnONP를 동시에 아가에 첨가하여 복합 필름을 제조했을 때 GSE에 함유된 글리세롤이 plasticizer의 역할을 하고 폴리페놀화합물에 의한 폴리머 매트릭스와의 결합력 증가에 의해 ZnONP의 첨가에 의한 결합력 감소를 완화시켜 대조구 필름과 같은 수준의 필름 물성을 보인 것으로 판단된다.

Table 2. Tensile properties, water vapor permeability and water contact angle of agar-based composite films

Film	Thickness (μm)	TS (MPa)	EB (%)	EM (GPa)	Wvp ($\times 10^{-9}$ gm/m ² Pas)	WCA (degree)
Agar	45.4±5.0 ^a	56.2±6.2 ^a	17.4±3.7 ^a	1.7±0.3 ^a	1.3±0.2 ^a	38.1±2.7 ^a
Agar/ZnONP ^{1%} /GSE ^{2%}	40.8±6.4 ^a	56.2±5.5 ^a	17.1±4.8 ^a	1.7±0.4 ^a	1.3±0.1 ^a	42.0±2.4 ^a
Agar/ZnONP ^{2%} /GSE ^{3%}	38.6±4.6 ^a	58.7±7.7 ^a	16.4±5.7 ^a	2.0±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a	42.1±4.2 ^a
Agar/ZnONP ^{3%} /GSE ^{5%}	37.3±4.5 ^a	58.4±3.9 ^a	14.9±4.1 ^a	2.1±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a	48.6±1.3 ^b

The values are presented as a mean±standard deviation. Any two means in the same column followed by the same letter is not significantly ($p > 0.05$) different from Duncan's multiple range test.

6. 필름의 Water Vapor Permeability (WVP)와 Water Contact Angle (WCA)

필름의 투습도(WVP)와 수분접촉각(WCA)의 결과는 Table 2와 같다. 대조구 agar 필름의 WVP 값은 $(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-9} \text{ g.m/m}^2.\text{Pa.s}$ 였으며, GSE와 ZnONP의 첨가에 의해 다소 감소하여 agar/ZnONP^{3%}/GSE^{5%} 필름의 경우 $(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-9} \text{ g.m/m}^2.\text{Pa.s}$ 를 나타냈으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다($p > 0.05$). Kanmani와 Rhim 역시 agar/GSE, agar/ZnONP 필름의 WVP가 대조구 아가필름의 WVP와 유의적 차이가 없음을 보고하였다^{36,37}. 본 연구에서 agar 필름에 GSE와 ZnONP를 동시에 첨가했을 때 WVP에 대한 복합효과는 없었으며, 대조구 agar 필름과 agar/ZnONP/GSE 필름 모두 방습성이 낮았음을 알 수 있었다. 생분해성 PLA/PBAT 필름의 WVP 값이 $(2.47 \pm 0.17) \times 10^{-11} \text{ g.m/m}^2.\text{Pa.s}$ 임을 감안하면⁴², agar 필름의 방습성이 매우 낮음을 알 수 있었다. 이는 이전의 선행연구와 일치하며^{13,43}, 이는 방습성이 강한 다름 필름과 이중필름으로 활용하여 문제점을 보완하거나, 건조식품의 포장재로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

포장재 표면의 친수성이나 소수성 특성을 알 수 있는 포장재 표면에서 수분의 접촉각(WCA)을 측정하였다. 대조구인 agar 필름의 WCA 값은 $38.1 \pm 2.7^\circ$ 로서 Kanmani와 Rhim의 결과 ($43.3 \pm 2.3^\circ$) 보다 약간 낮은 값을 나타냈다¹³. GSE와 ZnONP의 첨가에 의해 아가필름의 WCA는 통계적으로 유의적인 차이를 보이지는 않았으나 다소 증가하였으며 ($p > 0.05$), agar/ZnONP^{3%}/GSE^{5%} 복합필름의 경우에는 WCA가 $48.6 \pm 1.3^\circ$ 로 control agar 필름에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). Kanmani와 Rhim은 agar/GSE와 agar/ZnONP의 WCA를 조사한 바 있는데, agar/GSE의 필름은 GSE의 농도가 높아질수록 WCA가 유의적으로 감소하였으며, 이는 친수성인 agar필름에 친수성인 GSE가 첨가되어 필름의 친수성이 더 커졌기 때문이다³⁶. 반면에 agar/ZnONP 필름의 경우는 agar 필름에 ZnONP의 첨가는 WCA의 값을 $66.5 \pm 1.4^\circ$ 에서 $68.8 \pm 0.2^\circ$ 로 유의적으로 증가시켰는데, 이는 ZnONP의 소수성에 기인한다³⁷. 즉, agar 필름에 GSE 첨가는 아가필름의 친수성을 증가시키고, ZnONP의 첨가는 필름의 소수성을 증가시켰다. agar/ZnONP^{3%}/GSE^{5%} 복합필름의 WCA이 유의적으로 증가한 것은 ZnONP의 소수성이 GSE의 친수성보다 더 크게 작용하였기 때문이다.

7. 필름의 항균성

필름의 항균특성을 조사하기 위해 그람양성균인 *L. monocytogenes*와 그람음성균인 *E. coli* O157: H7을 사용하여 시간의 경과에 따른 집락의 수를 측정한 결과는 Fig. 5에 나타난 바와 같다. 대조구인 agar 필름은 무처리구

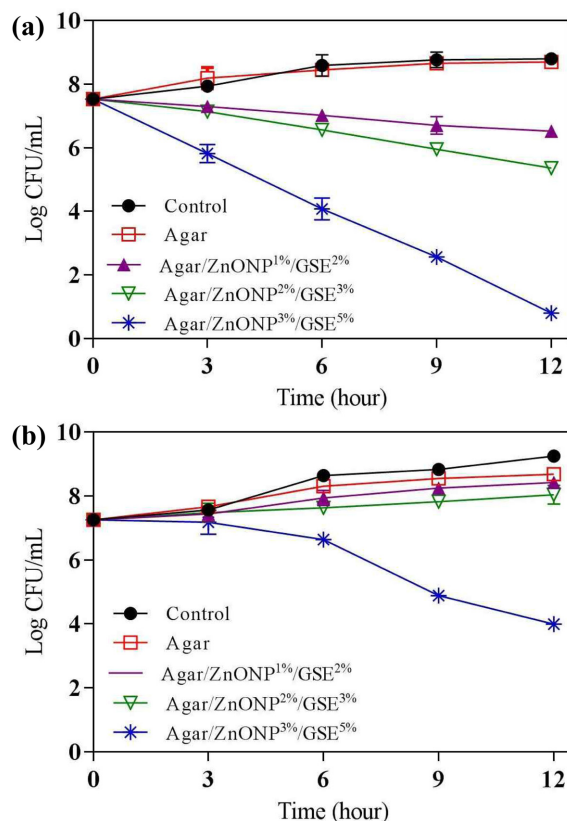


Fig. 5. Antimicrobial activity of agar-based composite films against (a) *Listeria monocytogenes* and (b) *E. coli* O157: H7.

(control)와 마찬가지로 12시간 동안 집락 수가 계속 증가하였는데, 이는 아가필름이 *L. monocytogenes*와 *E. coli* O157: H7에 대해 항균성이 없었음을 의미한다. 반면에 GSE와 ZnONP를 첨가한 필름은 두 시험균주에 대해 뚜렷한 항균 특성을 나타냈는데, 그 항균성은 GSE와 ZnONP의 첨가농도에 비례하였으며 그람음성균 (*E. coli* O157: H7)보다는 그람양성균 (*L. monocytogenes*)에 대해 더 크게 나타났다. *L. monocytogenes*는 배양 12시간 후 agar/ZnONP1%/GSE2% 필름은 초기 집락 수보다 1 log CFU/mL 감소하였고, agar/ZnONP2%/GSE3% 필름은 2 log CFU/mL 감소하였고, 가장 높은 농도인 agar/ZnONP3%/GSE5% 필름은 6 log CFU/mL 감소시켜 항균효과가 급증하는 것을 알 수 있었다. Kanmani와 Rhim은 agar/ZnONP 필름의 항균성을 조사하여 *L. monocytogenes*가 같은 조건에서 5 log CFU/mL가 감소하였음을 보고하였다³⁷. Kanmani와 Rhim의 결과와 비교하면 *L. monocytogenes*에서의 GSE와 ZnONP를 함께 사용하였을 때 ZnONP만을 단독으로 처리한 경우보다 더 크게 증가했음을 알 수 있다. 반면에 그람음성균인 *E. coli* O157: H7에 대해서는 GSE와 ZnONP의 첨가량이 낮은 경우는 단지 정균효과만이 관찰되었는데, 이는 이들 필름이 시험균주인 *E. coli* O157: H7의 lag time의 연장과 maximum

population density를 낮추는 효과가 있음을 의미한다. 반면에 가장 높은 농도인 agar/ZnONP^{3%}/GSE^{5%} 필름은 뚜렷한 항균성을 나타내어 12시간 후에는 약 3.5 log CFU/mL 만큼 감소시켰다. 이러한 결과는 agar/ZnONP 필름이 *E. coli* O157: H7의 항균성은 12시간 후 3 log CFU/mL를 감소시켰다는 선행연구의 결과와 일치한다³⁷⁾. 선행연구의 결과와 비교하여, GSE와 ZnONP를 함께 사용했을 때는 0.5 log CFU/mL 만큼 더 감소시켰는데, 이는 GSE가 그람음성균보다 그람양성균에 대해 더 큰 항균성을 갖기 때문이다^{44,45)}. ZnONP과 GSE의 항균작용은 미생물의 membrane을 파괴시키면서 미생물을 사멸시키는 것으로 알려져 있다^{21,27)}. 그람양성균과 그람음성균은 세포벽 구성이 상이한데, 그람양성균은 peptidoglycan의 다층으로 구성된 두꺼운 세포벽을 가졌지만, 그람음성균은 membrane으로 둘러 쌓인 얇은 peptidoglycan으로 구성되어 있다⁴⁶⁾. ZnONP은 그람양성균의 외부 세포벽에 직접 부착하고 파괴하여 세포를 사멸시킨다²²⁾. 그러나 그람음성균의 membrane은 ZnONP의 부착하기 어려운 지단백질, 지질 다당류, 인지질을 함유하고 있어 ZnONP의 세포막 파괴가 용이하지 않다⁴⁷⁾. 따라서 GSE와 ZnONP를 함께 사용하여 그람양성균과 음성균에 대한 상승효과를 기대할 수 있다.

요 약

자몽씨추출물(GSE)과 ZnONP을 아가필름에 동시에 첨가하여 다기능성 복합필름을 제조하였다. Agar/GSE/ZnONP 복합필름은 특히 자외선 차단성과 항균성에 대한 시너지 효과를 나타냈다. 광 차단성은 자외선 파장범위인 280 nm와 가시광선 파장범위인 660 nm에서 유의적인 차이를 보이며 크게 나타났다. 자외선 차단성은 agar/GSE와 agar/ZnONP 필름에 비해 agar/ZnONP^{3%}/GSE^{5%} 필름에서의 크게 상승하여 GSE와 ZnONP의 시너지 효과를 확인할 수 있었다. 항균성으로는 그람양성균인 *L. monocytogenes*와 그람음성균인 *E. coli* O157: H7 모두 agar/ZnONP^{3%}/GSE^{5%} 필름에서 강한 항균성 및 시너지 효과가 있었다. 자외선 차단성과 항균성은 포장식품의 안전성을 확보하고 유통기한을 연장시키는데 필수적인 특성으로 agar/ZnONP^{3%}/GSE^{5%} 필름은 식품의 유통기한 연장 및 식품의 안전성을 위한 포장필름으로 활용 가치가 높을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Kim, S. 2018. The consumer behavior survey for food. Proceedings of Korea Rural Economic Institute Conference, 30-37.
- Kumar, S., Boro, J.C., Ray, D., Mukherjee, A. and Dutta, J. 2019. Bionanocomposite films of agar incorporated with ZnO nanoparticles as an active packaging material for shelf life extension of green grape. Heliyon. 5: e01867.
- Shanky, B. 2013. Minimal processing and preservation of fruits and vegetables by active packaging. Int. J. Herb. Med. 1: 131-138.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N. and Debevere, J. 1999. Developments in the active packaging of foods. Trends. Food Sci. Technol. 10: 77-86.
- Rooney, M. 1995. Active packaging in polymer films. In: Anonymous Active food packaging, Springer. 74-110.
- Shankar, S., Teng, X. and Rhim, J.W. 2014. Properties and characterization of agar/CuNP bionanocomposite films prepared with different copper salts and reducing agents. Carbohydr. Polym. 114: 484-492.
- Rhim, J.W., Hong, S. and Ha, C. 2009. Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. LWT-Food Sci. Technol. 42: 612-617.
- Shankar, S., Teng, X., Li, G. and Rhim, J.W. 2015. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of gelatin/ZnO nanocomposite films. Food Hydrocolloid. 45: 264-271.
- Rhim, J.W., Hong, S., Park, H. and Ng, P.K. 2006. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. J. Agric. Food Chem. 54: 5814-5822.
- Kanmani, P. and Rhim, J.W. 2014. Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. Food Chem. 148: 162-169.
- Shankar, S., Jaiswal, L., Selvakannan, P., Ham, K. and Rhim, J.W. 2016. Gelatin-based dissolvable antibacterial films reinforced with metallic nanoparticles. RSC Adv. 6: 67340-67352.
- Giménez, B., De Lacey, A.L., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M. and Montero, P. 2013. Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. Food Hydrocolloid. 30: 264-271.
- Shankar, S. and Rhim, J.W. 2015. Amino acid-mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite films. Carbohydr. Polym. 130: 353-363.
- Shankar, S., Teng, X. and Rhim, J.W. 2014. Effects of concentration of ZnO nanoparticles on mechanical, optical, thermal, and antimicrobial properties of gelatin/ZnO nanocomposite films. Korean J. Packag. Sci. Tech. 20: 41-49.
- Roy, S. and Rhim, J.W. 2019. Melanin-Mediated Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles and Preparation of Functional Agar/CuO NP Nanocomposite Films. J. Nanomater. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2840517>.
- Roy, S. and Rhim, J.W. 2019. Preparation of carrageenan-based functional nanocomposite films incorporated with melanin nanoparticles. Colloid Surface B. 176: 317-324.
- Shankar, S. and Rhim, J.W. 2018. Preparation of sulfur nanoparticle-incorporated antimicrobial chitosan films. Food Hydrocoll. 82: 116-123.
- Wang, L., Shankar, S. and Rhim, J.W. 2017. Properties of alginate-based films reinforced with cellulose fibers and cellulose nanowhiskers isolated from mulberry pulp. Food Hydrocoll. 63: 201-208.

- 19 Trandafilović, L.V., Božanić, D.K., Dimitrijević-Branković, S., Luyt, A. and Djoković, V. 2012. Fabrication and antibacterial properties of ZnO-alginate nanocomposites. *Carbohydr. Polym.* 88: 263-269.
- 20 MFDS. 2019. Korean Food Standards Codex. http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04_03.jsp?idx=199. Accessed 23. Aug. 2019
- 21 Nafchi, A.M., Alias, A.K., Mahmud, S. and Robal, M. 2012. Antimicrobial, rheological, and physicochemical properties of sago starch films filled with nanorod-rich zinc oxide. *J. Food Eng.* 113: 511-519.
- 22 Li, X., Feng, X., Yang, S., Fu, G., Wang, T. and Su, Z. 2010. Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydr. Polym.* 79: 493-499.
- 23 Tan, Y., Lim, S., Tay, B., Lee, M. and Thian, E. 2015. Functional chitosan-based grapefruit seed extract composite films for applications in food packaging technology. *Mater. Res. Bull.* 69: 142-146.
- 24 Ghasemlou, M., Aliheidari, N., Fahmi, R., Shojaei-Aliabadi, S., Keshavarz, B., Cran, M.J. and Khaksar, R. 2013. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydr. Polym.* 98: 1117-1126.
- 25 Reagor, L., Gusman, J., McCoy, L., Carino, E. and Heggors, J.P. 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: I. An in vitro agar assay. *J. Altern. Complementary Med.* 8: 325-332.
- 26 Tirillini, B. 2000. Grapefruit: the last decade acquisitions. *Fitoterapia*. 71: S29-S37.
- 27 Heggors, J.P., Cottingham, J., Gusman, J., Reagor, L., McCoy, L., Carino, E., Cox, R. and Zhao, J. 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and in vitro toxicity. *J. Altern. Complementary Med.* 8: 333-340.
- 28 Cho, S., Seo, I., Choi, J. and Joo, I. 1990. Antimicrobial and antioxidant activity of grapefruit and seed extract on fishery products. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 23: 289-296.
- 29 Saito, M., Hosoyama, H., Ariga, T., Kataoka, S. and Yamaji, N. 1998. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1460-1464.
- 30 Song, H.Y., Shin, Y.J. and Song, K.B. 2012. Preparation of a barley bran protein-gelatin composite film containing grapefruit seed extract and its application in salmon packaging. *J. Food Eng.* 113: 541-547.
- 31 Xu, W., Qu, W., Huang, K., Guo, F., Yang, J., Zhao, H. and Luo, Y. 2007. Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. *Postharvest Biol. and Technol.* 45: 126-133.
- 32 Wang, L. and Rhim, J.W. 2016. Grapefruit seed extract incorporated antimicrobial LDPE and PLA films: Effect of type of polymer matrix. *LWT-Food Sci.* 74: 338-345.
- 33 Shankar, S. and Rhim, J.W. 2019. Effect of Zn salts and hydrolyzing agents on the morphology and antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Environ Chem Lett.* 17: 1105-1109.
- 34 Shankar, S. and Rhim, J.W. 2016. Tocopherol-mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial PBAT/silver nanoparticles composite films. *LWT-Food Sci.* 72: 149-156.
- 35 Gennadios, A., Weller, C.L. and Gooding, C.H. 1994. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *J. Food Eng.* 21: 395-409.
- 36 Kanmani, P. and Rhim, J. 2014. Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract. *Carbohydr. Polym.* 102: 708-716.
- 37 Kanmani, P. and Rhim, J. 2014. Properties and characterization of bionanocomposite films prepared with various biopolymers and ZnO nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 106: 190-199.
- 38 Kumar, A., Negi, Y.S., Choudhary, V. and Bhardwaj, N.K. 2014. Effect of modified cellulose nanocrystals on microstructural and mechanical properties of polyvinyl alcohol/ovalbumin biocomposite scaffolds. *Mater. Lett.* 129: 61-64.
- 39 Volery, P., Besson, R. and Schaffer-Lequart, C. 2004. Characterization of commercial carrageenans by Fourier transform infrared spectroscopy using single-reflection attenuated total reflection. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7457-7463.
- 40 Martucci, J. and Ruseckaite, R. 2010. Three?layer sheets based on gelatin and poly (lactic acid), part 1: Preparation and properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 118: 3102-3110.
- 41 Yang, L. and Paulson, A. 2000. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Res. Int.* 33: 571-578.
- 42 Shankar, S. and Rhim, J.W. 2019. Effect of types of zinc oxide nanoparticles on structural, mechanical and antibacterial properties of poly (lactide)/poly (butylene adipate-co-terephthalate) composite films. *Food Packaging Shelf.* 21: 100327.
- 43 Roy, S., Rhim, J.W. and Jaiswal, L. 2019. Bioactive agar-based functional composite film incorporated with copper sulfide nanoparticles. *Food Hydrocoll.* 93: 156-166.
- 44 Ionescu, G., Kiehl, R., Wichmann-Kunz, F., Williams, C., Bauml, L. and Levine, S. 1990. Oral citrus seed extract in atopic eczema: In vitro and in vivo studies on intestinal microflora. *J. Orthomolecular Med.* 5: 155-157.
- 45 Cvetnic, Z. and Vladimir-Knezevic, S. 2004. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta. Pharm.* 54: 243-250.
- 46 Paisoonsin, S., Pornsunthorntawee, O. and Rujiravanit, R. 2013. Preparation and characterization of ZnO-deposited DBD plasma-treated PP packaging film with antibacterial activities. *Appl. Surf. Sci.* 273: 824-835.
- 47 Anitha, S., Brabu, B., Thiruvadigal, D.J., Gopalakrishnan, C. and Natarajan, T. 2012. Optical, bactericidal and water repellent properties of electrospun nano-composite membranes of cellulose acetate and ZnO. *Carbohydr. Polym.* 87: 1065-1072.

투고: 2019.09.02 / 심사완료: 2019.11.01 / 게재확정: 2019.11.04