

# 최종보고서

미  
세  
화

기  
술  
을

이  
용  
한

난  
용  
성

물  
질  
의

식  
품

소  
재  
화

및

제  
품  
개  
발

농  
림  
축  
산  
식  
품  
부

발간등록번호

11-1543000-000762-01

미세화 기술을 이용한 난용성 물질의  
식품 소재화 및 제품개발  
(Development of submicron technology  
for water insoluble functional  
substances and its utilization for high  
value food product)

건국대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “미세화 기술을 이용한 난용성 물질의 식품 소재화 및 제품개발”의 보고서로 제출합니다.

2015년 1 월 30일

주관연구기관명 : 건국대학교

주관연구책임자 : 민 상 기

세부연구책임자 : 정 국 훈

세부연구책임자 : 곽 해 수

세부연구책임자 : 서 형 주

위탁연구책임자 : 권 윤 중

참 여 기 업 명 : (주) 두산글로벌넷

참 여 기 업 명 : (학교법인) 건국유업

참 여 기 업 명 : (주) 케이씨피드

참 여 기 업 명 : 삼우축산

# 요 약 문

## I. 제 목

미세화 기술을 이용한 난용성 물질의 식품 소재화 및 제품개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 건강기능성 원료의 상당부분은 지용성 또는 난용성 천연추출물 소재로 이화학적으로 불안정하여 식품 산업분야에 적용성이 낮다. 이러한 난용성 물질을 가용화하기 위해서는 다양한 첨단가공기술이 요구되는데 이는 난용성 물질의 특성에 좌우된다.
- 본 연구에서는 저탄소·신가공 기술을 활용하여, 필수 미네랄 성분인 난용성 칼슘 및 고도불포화 생리활성 지방산의 미세입자화(무기나노) 및 미세캡슐화(유기나노), 난용성 콜라겐의 아임계수 추출 및 초고압효소분해 기술을 통한 특정분자량 분포를 가진 가용성 아미노산 및 콜라겐 펩타이드 제조하여 난용성 기능성 물질의 고부가가치 식품 소재화 가공기술 개발을 통해 고령화 시대에 필요한 고기능성 식품을 제조하는데 목표를 둔다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 저탄소·신가공 기술인 아임계수 추출 및 초고압효소분해 공법을 이용하여 돼지 태반 난용성 콜라겐의 가수분해화를 통한 가용성 펩타이드 추출 기술을 개발하고, 더 나아가서 초고압효소처리 기술을 활용, 혈액내로 이행 될 수 있는 특정 분자량 분포 및 특정 아미노산(활성성분(tripeptide G-X-Y, dipeptide Pro-Hyd 등)을 가진 펩타이드 제조 및 특정 활성성분 포함유 oligopeptide의 직접적인 제조 및 개발기술 최적화
- 칼슘소재원료인 굴껍질(굴각) 및 난각의 미세입자화(건식분쇄, 500 nm 미만)를 통한 무기나노 칼슘제조, 콜라겐 유래 아미노산의 칼슘 킬레이트화를 통한 미세캡슐화(유기나노) 기술을 통해 난용성 칼슘성분의 가용화 및 체내 이용률 극대화된 고부가가치 식품소재 개발
- 지질생리활성 물질인 고도불포화지방산(오메가-3-지방산, 스펡고리피드)의 미세캡슐화 기술(서브마이크로 하이드로겔, 다중코팅기술)을 통해 산패취 마스킹(masking) 및 산화 안정성이 강화된 가용성 지질 소재 개발
- 나노칼슘성분 흡수 메카니즘 규명 및 난용성 기능 물질의 가용화 소재의 체내 나노안정성 검증 및 기능성 분석(골밀도 측정, 혈행장애 개선정도 등) 및 동물실험의 검증을 통한 개별인증형 고부가가치 식품 제품 개발

#### IV. 연구개발결과

##### 1. 제1세부과제 : 초고압 기술을 활용하여 실버세대를 위한 혈액이행력 우수 고기능성 콜라겐 펩타이드 가공기술 개발

(1차 년도)

연구 내용	구체적인 내용 및 결과
돼지태반의 성분분석(단백질, 지방, 수분, 비타민, 무기물)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 삼우축산에서 제공 받은 돼지 태반을 수분, 조단백, 조지방, 조섬유, 조회분 분석을 통해 조성분 분석</li> <li>● 아미노산 조성 파악</li> </ul>
아임계수 추출 시스템 구축(현재의 초고압장치 reactor내에 가열 및 냉각장치 설치(온도, 압력센서, heater, cooler, by-pass valve))	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 1000 bar에서 300~400℃ 사이까지 조절 가능한 reactor를 구축</li> <li>● Cooler의 기본적인 설계를 완료</li> </ul>
아임계수를 이용한 돼지태반의 가수분해 공정 최적화, 콜라겐 단백질 가수분해능 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 돼지 태반의 최적의 압력과 온도 시너지 효과 확립</li> <li>● 시간에 따른 변화도와 균질에 따른 가수분해능 분석법 확립</li> </ul>
유기산 촉매제를 이용한 아임계수 가수분해 공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 유산, 초산, 구연산, 염산을 이용해 pH를 조절하는 분석법 확립</li> </ul>
아미노산 및 콜라겐 펩타이드 분획 및 정제	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 분자량 1000 미만의 물질을 분리 할 수 있는 dialysis tube을 통해서 가수분해물의 아미노산을 정제</li> </ul>

(2차 년도)

연구 내용	구체적인 내용
고압효소분해기법을 이용한 돼지 콜라겐의 가수분해능 분석 및 최적화: 단백질 분해효소 수준, 반응시간에 따른 유리아미노산, 올리고펩타이드 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>● GPC 분석 결과 대기압 보다 100~200 MPa에서 저분자 펩타이드 확인</li> <li>● 300 MPa 이상에서는 오히려 불활성 됨을 확인</li> <li>● Pepsin의 경우 다른 효소의 분해 가수분해능이 낮음</li> </ul>
고압효소분해기법을 이용한 아임계수 추출물(올리고 펩타이드)의 가수분해능 분석 및 최적화: 단백질 분해효소, 압력수준, 반응시간에 따른 유리아미노산, 올리고 펩타이드 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 가수 분해 효율이 가장 좋은 Trypsin을 이용하여 아임계수 처리 후 효소 처리와 효소 처리 후 저분자 펩타이드 확인</li> <li>● 효소반응의 실험 결과 반응 시간에 비례하여 가수분해되는 경향</li> </ul>
고압효소분해 및 아임계수 가수분해 통합 공정을 통한 돼지 태반의 가수분해능 분석 및 최적화: 최적의 고압 온도 및 효소반응시간, 아임계수 추출 온도, 시간 및 압력	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Trypsin을 200 MPa에서 반응 시켰을 때 가장 좋은 효소 활성화도 보임을 확인</li> <li>● 24 시간 효소반응 시 분자량 1000 미만의 펩타이드 제조함</li> <li>● 아임계수 처리 후 효소반응을 하였을 때 가수분해의</li> </ul>

산출	극대화됨
초고압 균질기(microfluidizer)를 이용한 콜라겐 펩타이드 추출물의 미세화	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 균질압력이 증가할수록 가수분해 된 콜라겐 펩타이드 추출물의 입자크기 비례하게 감소하는 경향을 보임</li> <li>● Zeta-potential은 압력에 따른 유의적인 차이는 보이지 않음</li> </ul>

(3차 년도)

연구 내용	구체적인 내용 및 결과
아임계수 및 아임계 에탄올을 이용한 돈피 및 돈태반의 가수분해	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 300℃, 80 bar의 아임계수로 가수분해한 결과 1000 Da이하의 가수분해물 생산</li> <li>● 아미노산 프로파일링 결과, Gly 함량이 높을 비율을 차지함</li> <li>● 유리아미노산, 분자량 분석 결과, 에탄올 농도에 따른 가수분해 증진효과 및 저해작용은 없는 것으로 확인</li> </ul>
실버세대용 기능성 유제품(아이스크림) 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 돈피 콜라겐 펩타이드 첨가 아이스크림 최적의 제조법 확립</li> <li>● 점도, 색도, 녹는 속도, 관능검사 등 다양한 아이스크림 특성변화를 관찰한 결과 콜라겐 펩타이드 농도 증가에 따라 점도는 감소함</li> </ul>
기능성 콜라겐 펩타이드 스파클링 음용수 개발(홍삼농축액 첨가 콜라겐 펩타이드 음료 제조)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 제조된 콜라겐 펩타이드 스파클링 음용수의 이화학 및 관능적 분석 결과 탄산가스 농도가 증가할 수록 거품이 발생하여 관능적 품질이 스파클링 음용수로 적절하지 않음</li> <li>● 돈피 콜라겐 펩타이드의 특유의 이취를 감소시키기 위해 홍삼농축액을 첨가하고, 최적의 콜라겐 음료의 재료조성비를 관능검사 및 물성검사를 통해 확립함</li> </ul>

## 2. 제1협동과제 : 고도 불포화 생리활성 지질류의 가용성 미세캡슐화 기술개발

(1차 년도)

연구 범위	구체적인 내용 및 결과
고도화 불포화 지방산 함유 지질의 가용화 저탄소·신가공 법을 이용한 고효율 추출기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 유기용매, 초임계 CO<sub>2</sub> 및 아임계 CO<sub>2</sub>을 이용한 고도 불포화 지질류 최적 추출 공정개발</li> <li>● 추출된 생리활성지질의 최적 정제기술 개발</li> <li>● 추출된 생리활성지질의 성분분석</li> <li>● Global sourcing 고도불포화 지방산 함유 지질의 성분분석</li> <li>● 생리활성지질의 항산화능 개선을 위한 항산화제 개발</li> </ul>
고도화 불포화 지방산의 가용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 생리활성지질의 안정화된 유화액(microemulsion) 개발</li> </ul>

미세캡슐화 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Biopolymer(WPI, Chitosan) Multiple layer-by-layer 방법을 활용한 fish oil 입자 코팅기술 개발</li> <li>● Biopolymer(WPI, Pectin)의 hydrogel 입자네 포집방법을 활용한 fish oil 입자 코팅기술 개발</li> </ul>
제품별 최적 공정 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 입자의 크기, zeta-potential 측정, 코팅효율, 산화안정성(불포화율), 이취 masking 효율 측정</li> <li>● Masking 효율증대를 위한 보조재료(레시틴) 첨가에 따른 산화안정성 연구</li> <li>● 분산매의 종류에 따른 분산정도 측정(turbidity, 가용화정도, 색 등)</li> <li>● 제품별 pilot plant type 성립 조건 기초자료 확립</li> <li>● 동물 실험을 통한 혈행장애 능력개선 검사</li> </ul>

(2차 년도)

연구 내용	구체적인 내용 및 결과
고도 불포화 생리활성 지질류 가용성 미세캡슐 공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 고도 불포화 생리활성 지질류의 가용성 미세캡슐화 공정 최적화 및 산화 안정성 증진 확인</li> </ul>
미세캡슐화 된 고도 불포화 지방산의 유리속도 및 안전성 측정	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 습식: 분산매의 종류(pH, 카페인, 염분 등)에 따른 오일 유리 속도 및 산화안전성 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 건식: 분말화 후 저장조건(온도, 습도 등)에 따른 오일 유리 속도 및 산화안전성 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 재수화 된 입자의 유리속도 및 산화안정성 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 습식/건식 캡슐의 동물 실험을 통한 혈행장애 능력개선 확인</li> </ul>

(3차 년도)

연구 내용	구체적인 내용 및 결과
가용화된 고도불포화 지방산 강화 제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 환자식, 노인식 시제품 제조 후 각 제품의 외관 특성 분석 - 색, 맛, 향기 등</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 재수화 된 입자의 유리속도 및 산화안정성 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 저장시간에 따른 시제품 안정성 특성 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시제품의 문제점 보완 및 유통기간의 안전성 검증</li> <li>- 시제품의 관능검사 및 성능 실험</li> <li>- 제품출시를 위한 계획 수립</li> </ul> </li> </ul>

3. 제2협동과제 : 난용성 칼슘제제의 가용화 기술 및 체내 흡수력이 우수한 칼슘 복합제제 개발

(1차 년도)

연구 내용	구체적인 내용 및 결과
건식 나노분말화의 공정과 제품의	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 입자크기 측정, 색도, SEM, TEM, FT-IR, ICP정량분</li> </ul>

표준화 (원재료 표준화, 공정 표준화, 완제품 표준화)	석 ● 골다공증 유발 Rat를 통한 동물실험 ● 칼슘과 인의 함량(혈중, 신장, 간, 대퇴골, 소변, 변) 생화학적검사: Alkalinephosphate, Osteocalcin, Deoxypyridinoline ● Creatinine 골대사검사: 골밀도, 골강도, 골소주, 골조직
굴껍질과 난각을 통해 얻어진 나노분말의 특성	
골다공증 치유를 위한 동물실험을 통한 굴껍질 및 난각나노분말의 생체이용성 증진 효과 검증	

(2차 년도)

연구 내용	구체적인 내용 및 결과
키 성장을 위한 동물실험	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 체중변화 측정</li> <li>● 골성장 측정(골밀도 측정)</li> <li>● 성장판 관찰(마이크로 시티 사진을 이용하여 측정)</li> <li>● ICP를 통한 칼슘과 인의 함량(혈중, 신장, 간, 대퇴골, 변)</li> <li>● 혈중 IGF-1 농도의 측정</li> </ul>
나노분말의 수용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>● PGMS의 micelle 형성분석(제타전위 이용)</li> <li>● 산성조건에서 용해도 측정(Ascorbic acid)</li> <li>● 나노분말의 분산 최적 조건 확립(PGMS 용액의 농도, 반응시간 조절)</li> </ul>

(3차 년도)

연구 내용	구체적인 내용 및 결과
나노칼슘을 첨가한 포켓밀크 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 무기/유기 나노칼슘의 환자식, 노인식 최적 영양 조성 및 물성개발, 완제품 개발</li> <li>● 제품공정의 효율성 증대</li> <li>● 제품의 가격 경제성</li> </ul>
나노칼슘을 첨가한 우유 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 나노칼슘분말을 수용성화하여 최적조건을 확립 후 시유에 첨가하여 개발</li> <li>● pH, 칼슘함량 및 관능검사를 통하여 나노칼슘분말의 최적함량을 확립</li> </ul>
나노칼슘을 첨가한 요구르트 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 나노칼슘분말을 호상요구르트에 첨가하여 개발</li> <li>● pH, 물성, 유산균 수 및 관능검사를 통하여 나노칼슘분말의 최적함량을 확립</li> </ul>
나노칼슘의 안정성 및 생체이용율	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Caco-2 cell에 나노칼슘을 가하여서 독성확인 (cytotoxicity analysis)</li> <li>● <i>In vitro</i>와 <i>In vivo</i>를 통하여 생체이용율을 확인</li> </ul>

4. 제 3협동과제 : 난용성 소재 가용화에 따른 기능성 및 안정성 평가

(1차 년도)

연구 내용	구체적인 내용 및 결과
-------	--------------

칼슘 소재의 생체 이용률 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 나노화에 따라 나노-A, 나노-B, 나노-C의 흡수율 평가 실시</li> <li>● 난소 절제로 인해 혈청과 간의 감소된 칼슘 농도를 칼슘 처치로 증가 시 칼슘 형태에 따라 정도의 차이를 보임</li> <li>● 나노칼슘은 폐각칼슘보다 증가 정도 큰 것으로 확인</li> <li>● 장에서의 흡수율을 보면 회장(pH 7.4)에서 흡수율이 높아짐</li> <li>● 분획에 따른 칼슘시료의 흡수율을 보면, 십이지장 환경에서 입자의 크기가 작을수록 흡수율이 높아짐</li> </ul>
가용화 콜라겐의 흡수율 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Protein의 함량은 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 시간이 흐를수록 콜라겐의 가수분해 시간이 많을수록 피부 투과율이 유의적으로 증가됨</li> </ul>
가용화 지방산의 흡수율 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 혈중 지방산의 농도는(특정 지방산 함량/총 지방산 함량 × 100)으로 나타내었다. DA1, DA5, NS5에 비해 DA6, NS6를 투여한 경우가 투여 후 혈 중 지방산의 농도는 4시간째 급격한 차이를 보임(DA: 국내산어유+ 향산화제, NS: 일본산어유).</li> <li>● Crude한 oil 보다는 emulsion된 oil의 장 흡수율이 높았으며, Lecithin만 처리된 DA2(NS2)보다는 Lecithin 외에 Chitosan solution이 첨가된 DA3(NS3)나 Chitosan solution과 Low methoxyl pectin solution이 첨가된 DA4(NS4)에서 유의적으로 높은 투과율을 보임</li> </ul>
가용화 콜라겐의 melanocyte를 이용한 활성평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>● HaCaT cell에 Raw collagen의 경우에는 UVB를 처리하지 않은 군에서와 같이 10 µg/mL의 농도부터 세포독성이 나타났으며, 3시간 가수분해 콜라겐과 3시간 가수분해 콜라겐을 소화효소처리 한 군의 경우 유의적인 차이는 없지만 처치 농도가 높아질수록 UVB로부터 세포를 보호하는 경향을 보임</li> <li>● 농도가 높아질수록 MMP-2의 발현이 감소하기 시작하여 농도 비례적으로 MMP-2의 발현을 저해하는 것을 확인함</li> </ul>

(2차 년도)

연구 내용	구체적인 내용 및 결과
가용화 칼슘 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 난소절제 모델 흰쥐를 이용한 폐각칼슘(OS Ca)과 나노칼슘(Nano Ca)의 체내 이용성 및 생리적 기능 평가 실시</li> <li>● 저칼슘 식이를 이용하여 칼슘 형태에 따른 체내 칼슘</li> </ul>



	<p>의 함량, ALP 및 osteocalcin 농도, DPD 배설량의 변화를 측정함으로써 확인한 칼슘 이용성은 나노칼슘 처리 시에 더 효과적으로 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 대퇴골 골밀도 및 골함량은 칼슘처리에 따라 증가되는 경향을 나타냈으며, 나노칼슘 처리 시에 가장 좋은 결과를 나타냄</li> </ul>
가용화 콜라겐의 활성 평가 실험	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Hairless mouse에 UVB 조사 후 돈태반 가수분해 콜라겐의 경투여, 경피투여, 경구 및 경피 동시 투여를 실시하여 효능평가</li> <li>● 피부수분보유량 증발량 측정결과 경구투여군에서 유의적인 효과를 나타냄. 또한 멜라닌, 홍반 측정결과 콜라겐의 미백 효과는 미미한 것으로 나타났다.</li> <li>● 육안으로 Hairless mouse의 주름을 측정한 결과 시료처리군의 주름이 UVB보다 적었으며, 특히 경피투여군의 주름이 적게 하는데 효과적임</li> </ul>
가용화 불포화지방의 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Fish oil에 Internal standard 로 Tritridecanoin 을 첨가하여 가용화시킨 fish oil과 raw fish oil 각각을 경구 투여</li> <li>● 적정시간마다 혈액을 채취하여 전처리 후 GC를 이용하여 혈액 내 조성 성분과 IS 비교 및 평가</li> </ul>

(3차 년도)

연구 내용	구체적인 내용 및 결과
칼슘 소재 급성/아급성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 폐각칼슘에 대한 독성 실험을 진행한 결과, 체중 증가량, 식이섭취의 변화에 control과 실험 평가군 사이에 유의적인 차이가 없음</li> <li>● Hematological parameters에서의 control과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없음</li> <li>● 혈액학적 지표의 경우 acute와 subacute test에서는 독성이 관찰되지 않음</li> </ul>
불포화지방산 소재 급성/아급성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 체중증가량, 식이섭취의 변화에 control과 실험 평가군 사이에 유의적인 차이가 없음</li> <li>● 전혈(whole blood)에서의 혈액지표들을 평가한 결과, 모든 Hematological parameters에서의 control과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없음</li> <li>● Acute test 결과 male group에서의 Total protein의 수치에서 DHA 실험군의 수치가 control과 유의적인 차이를 보였으나, 정상범위내의 수치이므로 독성과는 무관</li> <li>● 간, 신장, 심장, 비장 등의 무게 변화는 control과</li> </ul>

	<p>실험군 사이에 유의적인 차이는 없음</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 안전성이 확보되어 있고, Acute과 subacute test 결과 독성이 없는 것으로 사료됨</li> </ul>
가용화 콜라겐의 피부감작	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 대조군(생리식염수)과 시험군(SPE 10%) 모두에서는 부종과 홍반이 전혀 관찰되지 않음</li> <li>● Draze법에 의한 1차 피부자극지수(Primary Irritation Index, P.I.I.)를 산출한 결과 대조군은 0.08, SPE 10%군은 0.48로 모두 practically non-irritation로 나타남. SPE의 경우 10%의 고농도로 적용해도 P.I.I.가 0.48로 약간의 자극은 관찰되었으나 이는 비자극성에 해당하는 자극으로 특히 실제로 임상에서는 이보다 낮은 용량을 적용할 경우가 많을 것으로 피부안전성은 충분하다고 판단됨</li> <li>● SPE로 처리한 군의 경우 약한 홍반과 부종이 관찰되기는 하였지만 평균 감작반응이 6.67%로 생리식염수로 처리한 음성대조군과 같이 grade I으로 안전성에 문제가 없는 것으로 판단됨</li> </ul>

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 특정 아미노산함유 고순도 oligopeptide 개발 및 고도불포화 지방산의 안정성·이취저감 된 미세캡슐화를 통해 고부가가치 식품개발, 화장품 및 의료 소재 응용확대를 통한 막대한 경제적 이윤 창출
- 농축수산 폐기물의 원료 수급을 통해 저탄소·친환경 녹색성장 및 농축수산 농가의 식품산업으로 연계하고 수입에 의존했던 돼지 태반 유래 콜라겐 펩타이드의 국내산 원료 수급 대체로 180억 원의 경제이윤 창출
- 난용성 고도불포화 생리활성 지방산을 미세캡슐화 함으로써 흡수성 및 가공적성을 높였으며, 시제품 제조함으로써 고령화 시대에 필요한 고기능성 식품을 제조함
- 경제적 및 산업적 측면에서 국내 식품 시장의 활성화 도모하였으며, 농수산물 유래 고도불포화 지방산 함유 지질을 고부가가치화 함으로써 농가소득증대에 기여함
- 차후 불포화지방산의 미세캡슐제품은 실버세대를 위한 제품과, 화장품의 원료 등 다양하게 활용 가능할 것으로 기대된다.
- 체내 이용률이 극대화된 나노칼슘 제제의 골다공증 환자(노인 및 폐경기여성)를 위한 상업용 노인 대상 특수목적 식품(노인식·환자식) 개발을 통한 노령화 시대 사회적 의료비용 절감

- 추후 개별 인증된 5개 품목의 상품화를 통한 약 1000억 이상의 부가가치 창출 또한 구명된 효능을 바탕으로 한 참여기업을 통한 마케팅 전략을 통한 기능성 식품 및 미용식품 시장 확대
  
- BINT 융복합 기술의 식품산업의 적용 및 그에 따른 기술이전, 지적재산 창출

# SUMMARY

## I. Title

Development of submicron technology for water insoluble functional substances and its utilization for high value food product

## II. Objective and Significance

- Much of health functional ingredients which are derived from natural material such as animal byproducts, eggshell, essential oil (Fish oils) are fat soluble, low applicable and unstable physicochemical. Variety of state-of-the-art processing technologies are required to improve high solubility of the insoluble material.
- In this study, the essential minerals calcium and bioactive polyunsaturated fatty acids (inorganic nano) are nano- or micro-encapsulated for improving their acceptability and solubility. And specific collagen peptides and collagen amino acids are produced by using subcritical water extraction and enzyme technology. Various insoluble natural functional materials could be produced through the a low-carbon and new processing technology.
- Finally, highly functional food could be supplied the elderly who need high functional materials and food through the development of high value-added processing technology of insoluble functional food ingredients.

## III. The Results of Research and Development

### 1. Development of high functional collagen peptide processing technique by using high pressure technology for the elderly

Research subject	Results
Effects of High Pressure/High Temperature (HPHT) Processing on the Recovery and Characteristics of Porcine Placenta Hydrolysates	<ul style="list-style-type: none"><li>● Placenta was treated at 37.5 MPa of pressure combined with various temperatures (150, 170, and 200°C) or various holding times (0, 30, and 60 min at 170°C).</li><li>● Optimum formulation was 170°C and 30 min processing.</li><li>● Insoluble raw placenta collagen was partially solublized (&gt;60% solubility) by the HPHT treatment.</li><li>● Free amino group content of placenta collagen was increased from 0.1 mM/g collagen to &gt; 0.3 mM/g collagen after HPHT treatment</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Alanine (Ala), glycine (Gly), hydroxyproline (Hyp), and proline (Pro) contents increased after the HPHT treatments</li> </ul>
Effect of High Pressure on the Porcine Placental Hydrolyzing Activity of Pepsin, Trypsin and Chymotrypsin	<ul style="list-style-type: none"> <li>● In particular, the peptide bands of tryptic-digested hydrolysate were not shown regardless of applied pressure levels.</li> <li>● The peptide bands of hydrolysate treated chymotrypsin showed gradual decreases in molecular weights (Mw) with increasing pressure levels.</li> <li>● Pepsin also tend to lower the Mw of peptides, while the major bands of hydrolysates being treated at 300 MPa were observed at more than 7,000 Da.</li> <li>● High pressure could enhance the placental hydrolyzing activities of the selected proteases and the optimum pressure levels at which the maximum protease activity is around 200 MPa.</li> </ul>
Effect of Sub- and Super-critical Water Treatment on Physicochemical Properties of Porcine Skin	<ul style="list-style-type: none"> <li>● For the molecular weight distribution analysis, 1 kDa hydrolyzed porcine skin (H-PS) was produced by Super-H<sub>2</sub>O or Sub-H<sub>2</sub>O treatment.</li> <li>● The free amino acid content was 57.18 mM and 30.13 mM after Sub-H<sub>2</sub>O and Super-H<sub>2</sub>O treatment, respectively.</li> <li>● Determination of amino acid profile revealed that the content of Glu (22.5%) and Pro (30%) was higher after Super-H<sub>2</sub>O treatment than Sub-H<sub>2</sub>O treatment, whereas the content of Gly (28%) and Ala (13.1%) was higher after Sub-H<sub>2</sub>O treatment.</li> <li>● Sub-H<sub>2</sub>O and Super-H<sub>2</sub>O treatments were effective processing methods for hydrolysis of PS collagen in a short time and can be regarded as a green chemistry technology.</li> </ul>
Effect of Porcine Collagen Peptide on Rheological and Sensory Properties of Ice Cream	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Low molecular collagen peptide less than 1 kDa was obtained from sub-critical water hydrolysis with temperature of 300°C and pressure of 80 bar.</li> <li>● There was no significant color difference between all kinds of ice creams. Addition of HPS had less effect on increasing apparent viscosity and strengthening shear thinning behavior of ice cream mix.</li> <li>● At over 0.2% HPS enhanced melting resistance and 0.2% HPS showed lowest storage modulus at -20°C and second highest loss modulus at 10°C, indicating this combination</li> </ul>

	<p>of hydrocolloids produced relatively softer and creamier chocolate ice cream.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Ice cream produced by 0.2% HPS and 0.3% gelatin represented the best physicochemical properties among all the seven types of ice creams.</li> <li>● However, according to sensory evaluation, HPS showed lowest chocolate flavor score and highest off-flavor score compare with 0.5% gelatin added ice cream due to the strong off-flavor of HPS.</li> </ul>
Effect of Subcritical Ethanol Extraction for Porcine Placenta Hydrolysates	<ul style="list-style-type: none"> <li>● For the molecular weight distribution, lowest molecular weight of hydrolysates was observed at 434 Da and that peak was shifted to low molecular weight range by DW medium (low ETOH concentration) and longer time (30 min) extraction</li> <li>● In this subcritical extraction system (170°C, 10 bar), it was successfully carried out to extract below 500 Da molecular weight hydrolysates from porcine placenta but the addition of ETOH was not effective to produce lower molecular weight hydrolysates compare with pure water.</li> </ul>

## 2. Development of nano- or microencapsulation technology for physiological polyunsaturated lipids to improve their availability

Research subject	Results
Development of Efficient Extraction Techniques by New Processing Method of Solubilizing Low-Carbon Unsaturated Fatty Acid-Containing Lipid	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Optimization of optimal extraction process with highly unsaturated lipids by using organic solvents, supercritical CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (supercritical carbon dioxide extraction conditions (50°C, 25 gCO<sub>2</sub>/min)</li> <li>● Tuna eye oil was extracted with optimum condition at 50°C and 300 bar</li> <li>● Analysis of lipid active composition by extraction with optimal processing</li> <li>● Analysis of global sourcing highly unsaturated fatty acid-containing lipid composition</li> <li>● Comparative POV values of bioactive lipids (before/after antioxidant added) under 30°C, aerobic condition: 4 times better antioxidant activity</li> <li>● The improvement of physiological active lipid's antioxidant capacity</li> </ul>
Formulation Development of	<ul style="list-style-type: none"> <li>● The selected concentrations of coating materials were 1.25% Tween 20 (primary layer), 0.1% chitosan</li> </ul>

<p>Multilayered Fish oil Emulsion by Using Electrostatic Deposition of Charged Biopolymers</p>	<p>(secondary layer), and 0.2% low methoxyl pectin (tertiary layer).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● All Fish oil (FO) emulsions were physically stable resulting in small particles below 300 nm with a narrow size distribution. Furthermore, the oxidation stability of multilayered FO emulsions decreased with decreasing number of membrane layers because FO was released from layered emulsions.</li> <li>● The physical and oxidation stability of FO can be improved by using multilayered emulsions containing Tween 20, chitosan, and low methoxyl pectin.</li> </ul>
<p>Changes in Quality Characteristics of Food System Containing Multilayered Fish Oil Emulsion during Refrigerated Storage</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Multilayered FO (-primary, -secondary, -tertiary) emulsions were prepared using a layer-by-layer deposition technique with Tween 20, chitosan, and low methoxyl pectin, and were added to pork patties at the same concentration.</li> <li>● Lipid oxidation was higher in treated patties than in control patties during storage. In addition, lipid oxidation and total viable bacterial count in patties decreased as the number of coating layers increased.</li> <li>● Fish oil emulsion did not affect the texture characteristics of the fresh patties, indicating that it could be used to improve the quality of pork patties by contributing high-quality fat such as unsaturated fatty acids.</li> </ul>
<p>Production of Microcapsules in Food System Containing Polyunsaturated Fatty Acids Enhanced Solubility</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Microcapsule produced at previous study was applied into food system such as milk, yogurt, orange juice, nutrition food, coffee creamer and then Sensory evaluation scores of all foods with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids.</li> <li>● During storage, the stability of microcapsule added food was stable.</li> <li>● There were no change of appearance in all foods but fish oil microcapsule generated specific off-flavor derived from fish.</li> <li>● Therefore microcapsule affected overall preference of foods except coffee creamer.</li> </ul>

### 3. Development of calcium solubilization techniques and soluble calcium complex

Research subject	Results
Physicochemical	<ul style="list-style-type: none"> <li>● The average particle sizes of NPES and powdered</li> </ul>

<p>Properties of Nanopowdered Eggshell</p>	<p>eggshell (PES) were 202.3 28.9 nm, 113.89 nm and 79.37 nm, respectively. Zeta-potentials of NPES (15.41 mV) suggested an incipient instability of the colloidal system.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Moisture sorption analysis indicated a higher water adsorption capacity of NPES than that of PES. X-ray diffractometer (XRD) analysis confirmed the presence of calcite in both NPES and PES.</li> <li>● The chemical compositions of the NPES and PES particles were strongly associated with the presence of calcium carbonate, as determined by the Fourier transform infrared (FT-IR) spectra.</li> <li>● Eggshell nanopowder has a great potential to be utilized as a component for biomedical applications.</li> </ul>
<p>Effects of Nanopowdered Eggshell on Postmenopausal Osteoporosis: A Rat Study</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Rats fed NPES and powdered eggshell (PES) exhibited 6.6 and 2.2% greater bone mineral densities (BMD) than ovariectomized (OVX) rats.</li> <li>● Investigation of the trabecular bone in NPES fed rats revealed a 12.4% higher bone volume (BV/TV), 7.5% higher trabecular number (Tb.N.), and 14.5% lower trabecular separation (Tb.Sp.), compared with OVX rats.</li> <li>● Serum analysis demonstrated that NPES fed rats showed a significantly (<math>p &lt; 0.05</math>) higher (22.4%) osteocalcin level than OVX rats.</li> <li>● Urine analyses in NPES fed rats revealed 43.7% lower deoxypyridinoline (DPD) and 87% lower Nteleopeptide levels of type I collagen (NTX) than in OVX rats. NPES attenuated the bone loss induced by ovariectomy in rats.</li> </ul>
<p>Physicochemical, Microbial, and Sensory Properties of Nanopowdered Eggshell-Supplemented Yogurt during Storage</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● The pH and mean lactic acid bacteria counts of NPES-added (0.15~0.45%, wt/vol) yogurt ranged from 4.31 to 4.66 and from <math>6.56 \times 10^8</math> to <math>8.56 \times 10^8</math> CFU/mL, respectively, whereas these values ranged from 4.13 to 4.44 and <math>8.46 \times 10^8</math> to <math>1.39 \times 10^9</math> CFU/mL respectively, for the control samples during storage at 5°C for 16d, which indicates a prolonged shelf-life with NPES-supplemented yogurt.</li> <li>● Sensory evaluation revealed that NPES-added yogurt showed a notably less sourness score and a higher astringency score than the control. An earthy flavor was higher in 0.45% NPES-supplemented yogurt compared with the control.</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Based on the results obtained from the current study, the concentration (0.15~0.30%, wt/vol) of NPES can be used to formulate NPES-supplemented yogurt without any significant adverse effects on the physicochemical, microbial, and sensory properties.</li> </ul>
--	---

#### 4. Assessment of function, availability and safety of processed insoluble functional food ingredients

Research subject	Results
Skin Permeability of Porcine Placenta Extracts and Its Physiological Activities	<ul style="list-style-type: none"> <li>● The skin permeability and various biological activities of porcine homogenate of placenta (HP) with the highest protein contents (452.89 µg/mg).</li> <li>● The content of protein in subcritical extract of HP (SPE) was decreased from the initial content of 452.9 µg/mg to 262.7 µg/mg at 3 h subcritical extract.</li> <li>● SPE-3 showed highest skin permeation and the permeability was significantly higher than that of HP. SPE-2 also showed significantly higher permeation than HP after 4 h. As expected, increase of extraction time significantly increased skin permeability in the subcritical extract of HP (SPE).</li> <li>● In terms of cost and source availability, porcine placenta extracted with subcritical extraction has advantages over untreated PE and have potential as a cosmetic ingredient.</li> </ul>
Nano-Calcium Ameliorates Ovariectomy-Induced Bone Loss in Female Rats	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Increased body weight, which is one of the physiological effects of ovary removal, was significantly recovered by Nano-Ca treatment (p&lt;0.05).</li> <li>● The reduced calcium level in the liver in ovariectomised rat was increased significantly with OS-Ca and Nano-Ca treatment (p&lt;0.05), suggesting improved calcium bio-availability. Alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin, and deoxyypyridinoline (DPD) were analysed as biochemical markers of bone metabolism and health in the presence or absence of OS-Ca and Nano-Ca.</li> <li>● The tested calcium treatments, especially using Nano-Ca, enhanced the bioavailability or absorption of calcium and positively affected bone metabolism in ovariectomised rats</li> </ul>
Antioxidant Effect and Functional Properties of Hydrolysates Derived	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Treatment with Neutrased yielded the most α-amino groups (6.52 mg/mL). Alcalase, Flavourzyme, Protamex, and Ficin showed similar degrees of α-amino group</li> </ul>

from Egg-White Protein	<p>liberation (3.19~3.62 mg/mL).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Neutrased treatment also resulted in the highest degree of hydrolysis (23.4%). Alcalase and Ficin treatment resulted in similar degrees of hydrolysis.</li> <li>● All hydrolysates, except for the Flavourzyme hydrolysate, had greater radical scavenging activity than the control.</li> <li>● Neutrased was identified as the optimal enzyme for hydrolyzing egg-white protein to yield antioxidant peptides.</li> <li>● During Neutrased hydrolysis, the reaction rate was rapid over the first 4 h, and then subsequently declined.</li> <li>● The active peptides released from egg-white protein showed antioxidative activities on ABTS and DHHP radical. Thus, this approach may be useful for the preparation of potent antioxidant products.</li> </ul>
------------------------	--

## V. Achievements and contribution to the related fields

- Through the developed low-carbon and new processing technology, new high value-added food, cosmetics and medical materials containing low molecular collagen peptide, polyunsaturated fatty acids, or nano structured calcium could be commercialized in various industry and then enormous profit will be created.
- Highly functional food could be supplied the elderly who need high functional materials and food through the development of high value-added processing technology of insoluble functional food ingredients.
- Economic and industrial activation was achieved in terms of the domestic food market, contributing agricultural products derived from highly unsaturated fatty acid-containing lipids to increase farm income.
- Through the development of social aging times, maximize the utilization of nano calcium the body osteoporosis agents (elderly and postmenopausal women) food for special purpose commercial Elderly and reduce health care costs.
- The company that participated in this research project will have marketing strategy for expansion of functional foods and beauty foods market that create at least about 100 billion added value through the commercialization.
- BINT will be applied in the food industry that create convergence technology and consequent transfer of technology and intellectual property.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction	.....	21
Chapter 2. International and domestic trends of the technical development	.....	34
Section 1. Domestic	.....	34
Section 2. International	.....	37
Section 3. Status of papers, patents, and products	.....	39
Chapter 3. Results and discussion	.....	42
Section 1. Approach of research	.....	42
Section 2. Research results	.....	56
Chapter 4. Achievements and contribution to the related fields	.....	240
Chapter 5. Outcomes and applications	.....	249
Section 1. Outcomes	.....	249
Section 2. Applications	.....	256
Chapter 6. International techniques	.....	262
Chapter 7. References	.....	270

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	21
	제 1 절 연구개발의 필요성 .....	21
	제 2 절 연구개발의 목적 .....	33
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	34
	제 1 절 국내 기술개발현황 .....	34
	제 2 절 국외 기술개발현황 .....	37
	제 3 절 국내·외 특허, 논문 및 제품 현황 .....	39
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	42
	제 1 절 연구의 이론적, 실험적 접근방법 .....	42
	제 2 절 세부연구수행 결과 .....	56
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	241
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	249
	제1절 연구개발 성과 .....	249
	제2절 성과활용 계획 .....	256
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	262
제 7 장	참고문헌 .....	270

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 난용성 기능성 물질과 가용화기술이 필요한 이유

건강기능성 원료의 상당부분이 천연추출물이나 지용성 또는 물에 녹지 않는 난용성 물질로 매우 불안정한 상태에 있으며 우리 체내에 흡수가 매우 떨어지고 있다. 대표적으로 난용성 무기질로서는 Ca을 들 수 있고 난용성 기능성 지질은 대표적으로 오메가-3, 6 지방산이나 지질, 카로티노이드계 등이며 난용성 단백질은 대표적으로 콜라겐을 들 수 있다. 식·의약분야에서 물질전달시스템의 핵심기술군중의 하나인 기능성물질 흡수촉진기술에 속하는 난용성 물질의 가용화기술은 식·의약 신제품 개발비용을 줄일 수 있는 동시에 현재 출시되어 있는 소재 및 제품들의 부가가치를 높일 수 있는 가장 합리적인 방법으로 여겨지고 있다.

### 2. 칼슘의 중요성과 체내 낮은 흡수율

칼슘은 인체에 가장 많이 존재하는 무기질 원소로서 성인의 경우 체중의 약 2%인 1,200 g정도를 체내에 함유하고 있다. 체내 칼슘의 99%는 골격과 치아를 형성하고, 나머지 1%정도만이 근육의 수축과 이완, 규칙적 심장박동, 혈액응고, 효소의 활성화, 세포내 자극과 흥분전달과 같은 생리활성기능을 조절한다. 특히, 칼슘은 골다공증 등 골질환을 비롯하여 고콜레스테롤증, 동맥경화, 고지혈증, 고혈압 등의 만성질환의 발생을 감소시키는데 중요한 역할을 하므로, 인체내 적정량의 칼슘농도가 유지되어야 한다. 칼슘을 우유나 유제품으로 공급받을 경우 흡수율이 약 25~40%이지만, 식물성 식품일 경우 흡수율이 떨어져 시금치의 경우 약 5%에 불과하다. 채식 위주의 식사에서는 흡수율이 약 10~30%로 떨어지게 된다. 채소류에는 칼슘 흡수를 방해하는 섬유소, 수산, 피틴산과 인 등이 많이 함유되어 있기 때문이다. 특히 칼슘 흡수 방해 물질로 알려진 피틴산은 칼슘과 결합해 불용성 복합체를 형성한다. 한 의료기관이 조사한 바에 따르면 2010년, 전체 인구의 27%가 골다공증 위험군에 들어 있다. 우리나라 국민의 칼슘 섭취량은 2008년 국민건강영양조사결과 1인당 칼슘 섭취량은 475.8 mg으로 미국인에 비해 절반 정도이다. 한국영양학회는 1~5세의 경우 500~600 mg, 6~11세는 700~800 mg, 12~19세는 900~1000 mg, 그리고 20세 이상은 700~800 mg을 권장하고 있다. 다른 영양소는 권장량에 접근하고 있으나 칼슘만 턱없이 부족한 섭취를 보이고 있다. 그 이유는 우리가 주로 애용하는 식단의 구성에서 칼슘이 충분히 공급하기에는 제한된 음식으로 구성되어 있다. 칼슘의 섭취가 부족하면 뼈의 성장 및 유지, 테타니증, 구루병, 골연화증 및 골다공증의 발생 위험이 높을 뿐 아니라 순화기계 질환, 고혈압, 동맥경화 및 고지혈증 등 각종 성인병과 깊은 관련이 있는 것으로 연구되고 있다.

대표적인 상용칼슘제로는 화학적 합성품인 탄산칼슘(calcium carbonate), 인산칼슘(calcium phosphate), 등의 불용성 칼슘과, 염화칼슘(calcium chloride), 구연산칼슘(calcium citrate), 젖산칼슘(calcium lactate), 글루콘산칼슘(calcium gluconate) 등의 유기산 염의 형태로 공급되어 왔으며, 천연칼슘 소재로서는 소뼈분말, 난각분말, 굴피분말, 해조칼슘, 어골분, 갑오징어갑, 패각분,

다슬기분말 등의 분쇄 및 소성에 의한 단순가공 형태의 불용성 칼슘제가 시판되고 있다. 이는 유기산 처리에 의한 수용성 칼슘제의 형태로 이용하려는 시도가 행해지고 있다. 무기염제제로는  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$ 가 있다. 무기염제제는 위장장애를 유발하고( $\text{CaCl}_2$ ),  $\text{CaCO}_3$ 는 이론상 흡수율이 높으나 실제로는 거의 흡수가 안 되고 있다. 특히 저산증의 경우 거의 흡수가 일어나지 않으며 게다가 다량 섭취 시 알칼리증을 일으킬 수 있다. 또한 우리나라의 경우 인의 섭취량이 칼슘의 섭취량 보다 항상 높아 골형성 시 1.6대 1의 비율인 칼슘과 인의 비율을 유지하기 사실상 어렵다. 인(P)이 적당하면(칼슘:인=1:1) 칼슘에 의한 골형성이 용이하나 과잉일 경우 장내에서 과량의 칼슘과 결합하여 칼슘의 흡수를 방해하는 요인이 된다.

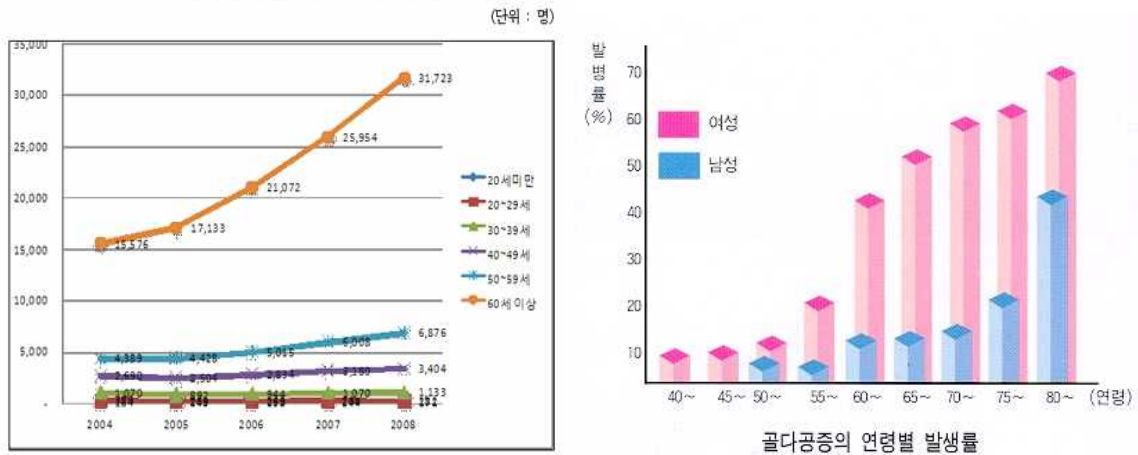


Figure 1.1.1 연도별 남성 골다공증 진료인원 추이(왼쪽)와 연령별 발생률 현황(오른쪽).

### 3. 난용성 기능성 소재인 콜라겐의 기능과 특징

신체 중의 콜라겐은 세포 바깥에 섬유상으로 존재하는 것이 특징이며 우리 몸을 만드는 단백질 성분으로서 다양한 일을 한다. 우리 몸은 60조 개 이상의 세포로 구성되어 있는데 콜라겐은 이들 세포와 세포의 간격을 메우는 세포외 매트릭스를 형성하고 있다. 콜라겐은 섬유상 또는 막상으로 구조체를 만들며 물에 녹지 않은 상태로 존재하기 때문에 우리 신체의 여러 가지 장기와 몸의 형체를 만들고 지지해 주는 중요한 기능을 한다. 연골과 뼈에서는 콜라겐이 기질단백질의 구성 성분으로서 중요한 역할을 하며 또한 피부와 근육에 함유된 유기물의 70~85%(습량기준)를 콜라겐이 점유하고 있다. 더욱이 콜라겐은 세포의 분화, 증식, 형태나 기관을 형성하는 것과 깊은 연관을 가지고 있다. 콜라겐(I형)의 구조는 분자량 10만(아미노산 잔기수 1000 정도) 정도인 polypeptide 사슬 3개가 3중 나선 구조를 이루고 있는 가느다란 막대 모양(길이 약 300 nm, 지름 약 2 nm)의 단백질이다. 이 콜라겐 fibril들이 집합하여 굵은 섬유나 막 구조를 이룬다. 각 polypeptide 사슬의 아미노산 배열은 3개의 아미노산이 반복되며 3개의 아미노산마다 글라이신이 존재하는 구조를 이루고 있기 때문에 일반적으로(glycine-X-Y)<sub>n</sub>로 나타낸다. X는 proline, Y는 proline 또는 hydroxyproline으로 된 비율이 높은 것이 특징이며, 이 2종류의 아미노산이 전체 아미노산잔기의 20~25%를 차지한다. Proline과 hydroxyproline의 구조의 비유연성이 콜라겐의 경도를 생성시킨다.

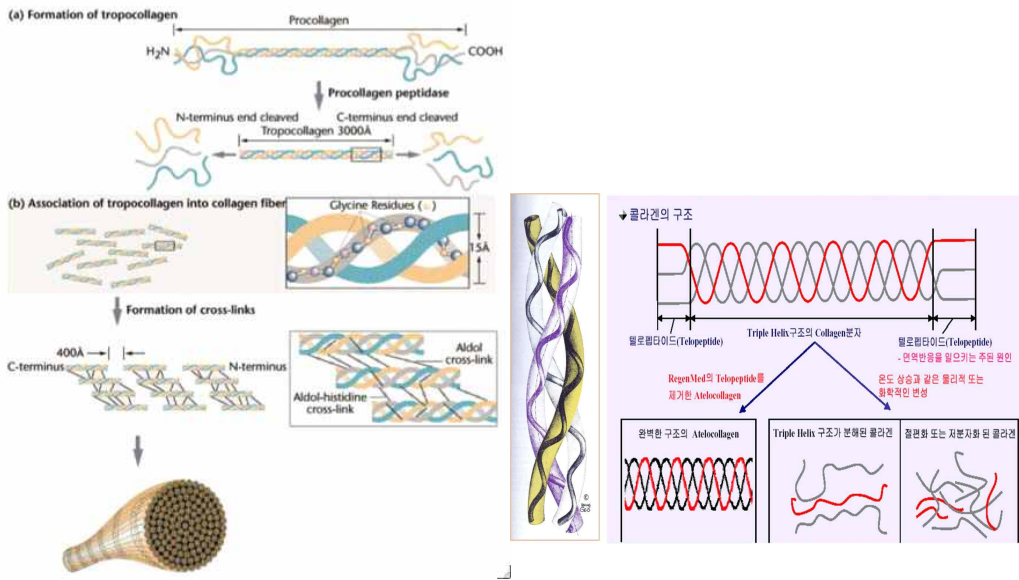


Figure 1.1.2 체내에서 콜라겐이 합성되는 과정과 콜라겐의 구조적 특징.

#### 4. 노화와 질환과의 관계에서 칼슘과 콜라겐의 역할

콜라겐의 노화와 질환과의 관계를 살펴보면 콜라겐 섬유의 인장강도는 태어난 후 나이가 들면서 증가하여 성숙되면 거의 일정해진다. 이것은 콜라겐이 강도를 유지하기 위하여 형성하는 콜라겐 분자 내 및 분자 사이의 hydroxylysine에 의한 가교(성숙가교)의 형성이 끝나기 때문이다. 한편 우리 몸에서 세포는 콜라겐을 조금씩 생산하여 분비하는 동시에 조금씩 분해하여 느리게 대사회전을 한다. 이와 같이 다른 단백질에 비하여 느린 대사회전 때문에 콜라겐의 기능성을 장시간 유지하기 위해서는 변성과 노화방지 대책이 필요하다. 골격은 골기질 (1/3을 차지) 과 골광물 (2/3을 차지) 로 구성된 복잡한 유기체이다. 골기질의 주요성분은 콜라겐이 90%이상을 차지하며 나머지가 비교원질이다. 골광물질의 주요성분은 인산칼슘하이드록시이며 인산마그네슘하이드록시도 조금 들어있다. 콜라겐의 작용은 접합작용과 지지작용이다. 체내에서 칼슘을 운송하는 작용을 하는 것은 주요하게 하이드록시프롤린(hydroxyproline)이다. 그러므로 하이드록시프롤린의 함량의 많고 적음은 칼슘흡수의 주요원인으로 된다. 따라서 콜라겐을 충족하게 섭취해야 하며 콜라겐의 대사가 정상적이 여야만이 건강한 인체가 칼슘에 대하여 정확한 수요와 섭취능력을 가질 수 있다(음식물에서 섭취).

지금까지 콜라겐은 단백질이므로 먹는 다른 단백질과 마찬가지로 아미노산으로 분해되므로 콜라겐만이 특별히 효과가 있다고 할 수는 없다는 견해가 많았지만 콜라겐은 가공방법에 따라 물성 및 소화흡수력이 크게 달라지며 체내 흡수력을 극대화하기 위해 저분자화 하는 추세이며, 체내 흡수된 콜라겐이 갖는 기능성은 면역력증강, 피부노화방지, 성장촉진 또는 골다공증예방, 혈압상승억제 등으로 보고되고 있다. 특히 콜라겐 섬유가 칼슘을 흡착하여 연골조직, 뼈성장 촉진 및 뼈에서 칼슘이탈 방지한다.

#### 5. 혈액이행능력이 우수한 콜라겐 펩타이드의 유용성 부각

2005년에 일본 경도부립대학의 연구 그룹은 펩타이드 형태의 hydroxyproline의 구조를 처음으

로 해명하였다. 이 펩타이드 형태의 대부분은 proline과 hydroxyproline이 1개 씩 결합한 di-peptide(Pro-Hyp)이며 그 이외에는 아미노산이 2~3개 결합한 oligopeptide가 몇 종류 발견되었다. 또한 사람이 섭취한 콜라겐 펩타이드는 1~2 시간 후에 Pro-Hyp로 소화되어 혈액 중으로 이행한다고 보고 하였다. 이와 같은 콜라겐의 소화효수는 일반 단백질과는 다른 측면이 있는데, 그 이유의 하나는 콜라겐이 hydroxyproline과 proline이란 인체가 가지고 있는 분해효소의 작용을 받기 어려운 아미노산을 다량 함유하고 있기 때문이라고 한다. 2009년 동 연구그룹은 di-peptide Pro-Hyp를 합성하여 배양한 피부 유래 세포에 처리하여 그 효과를 조사하였다. 그 결과 배양된 마우스의 피부를 Pro-Hyp로 처리하면 피부 조각으로부터 흘러나오는 세포의 수가 유의적으로 증가한다는 것을 밝혔다. 또한 세포를 회수하여 콜라겐젤 상에서 배양하여 이것을 Pro-Hyp로 처리하면 Pro-Hyp 농도에 의존하여 세포의 증식이 촉진되었다. 이 결과는 섭취한 콜라겐 펩타이드에 유래한 Pro-Hyp가 피부의 세포에 직접적으로 작용하는 활성인자의 하나라는 것을 시사하고 있다.

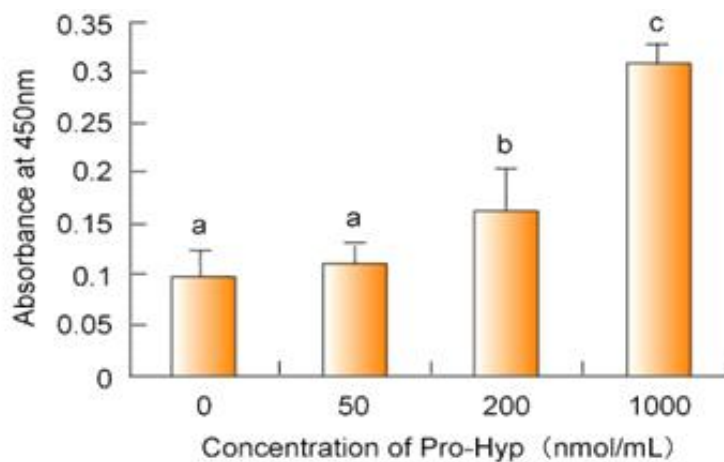


Figure 1.1.3 배양액 중에 첨가한 Pro-Hyp의 농도와 마우스 섬유아세포의 증식능.

또한 일본 (주)젤라이스는 콜라겐의 기본단위인 “G-X-Y”를 15% 이상 함유한 collagen tri-peptide(HACP)를 개발하여 관절염에 대한 효과를 연구한 결과 종래 콜라겐 펩타이드에 비해 연골의 기능성에 우수하였으며 관절염에 대하여 유효성과 안전성이 확인 되었다고 보고하였다. 콜라겐을 구성하는 아미노산의 약 1/3은 글리신으로 그 자체가 생리활성이 있는 아미노산으로 알려져 있으므로 콜라겐 펩티드의 효과의 일부가 콜라겐에 다량 함유 되어있는 글리신과 프롤린 등의 아미노산의 효과가 있을 가능성도 있으나 그 작용 메카니즘도 다양한 것으로 고찰되어진다. 일본에서 현재 약 30종류의 콜라겐함유 건강식품이 판매되고 있고 1일 섭취량은 0.1~10 g 범위이다. 판매되고 있는 제품의 종류 및 주장하는 효능에 따라 콜라겐 펩타이드 평균 분자량은 3,000정도, 900~1,100의 저분자, 800전후, 분자량 280인 저분자 tri-peptide를 15% 이상 함유한 제품 등 다양하다.

## 6. 기능성 콜라겐의 소재로서 돼지 태반의 활용가능성

태반은 임신 중의 태아를 감싸는 양막과 자궁을 연결하는 곳에 위치하고 있는 원반형태의 장기로서 잔주름, 깊은 주름, 기미, 노화방지, 색소침착, 피부재생 등의 피부미용에 탁월한 효과



가 알려져 있다. 또한 태반은 보습작용과 함께 피부 재생주기를 정상으로 돌려주는 작용을 하고 진피 층의 섬유아세포(fibroblast)를 활성화시켜 피부의 탄력과 긴장을 되찾아주고 재생을 활발하게 도와주는 것으로 알려져 있다. 인체 태반에 대한 효능은 연구자들에 의해 의학적, 화장품적 효과가 널리 알려져 있으나 윤리성에 문제가 있어서 현재 화장품의 배합금지소재로 되어 있다. 또한 소 태반은 광우병의 오염가능성이 있어서 사용상 문제가 있다. 반면 돈(돼지) 태반(porcine placenta)은 비교적 안전한 것으로 알려져 있고 인간과 면역효과가 유사한 점이 보고되고 있다. 일본에서는 일찍이 돼지 태반을 오랫동안 연구하여 식음료, 의약품 및 화장품 등 다양한 분야에 활용하고 있다. 태반은 태아의 발육, 성장에 필요한 생리기능을 가지고 있으며 미백, 갱년기 장애극복, 노화방지 등의 효능을 가지고 있다고 알려져 있다. 한편, 이러한 효능을 가진 태반 유래 제품이 오래전부터 많은 나라에서 만들어져 판매되어져오고 있으며, 2005년 현재 일본, 독일, 호주, 뉴질랜드로부터 양 태반으로 만든 제품의 국내수입 판매량은 국내 25 업체에서 183 억 원 정도이다. 현재 국내에 시판되는 한국 및 외국의 유명 화장품 회사도 돼지 태반 추출물을 사용하고 있으나 전량 일본에서 원료를 수입하고 있는 실정이다. 돈 태반의 주 성분은 매우 다양해서 라이신, 발린, 이소라이신, 트레오닌 등의 필수아미노산 외에 글라이신, 알리닌, 아르기닌 등 수십 종류의 아미노산과 각종 활성 펩타이드, 비타민 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, C, D, E 등, 당류, 핵산, 칼슘, 나트륨, 칼륨, 인, 마그네슘, 아연, 철 등의 미네랄, 그리고 수백 종의 효소 및 각종 성장인자가 포함된 것으로 알려져 있다.

우리나라 돼지 생산량을 보면 평균 95만 마리의 모돈에서 290만 마리의 자돈이 생산되어 돼지고기 생산에 기반이 되고 있다. 1마리의 자돈에서 과생되는 부산물로 돼지태반은 약 1 kg으로 보인다. 연간 부산물로 폐기되는 돼지 태반은 약 2천 900톤에 이르고 이에 대한 활용성 연구가 필요하다.

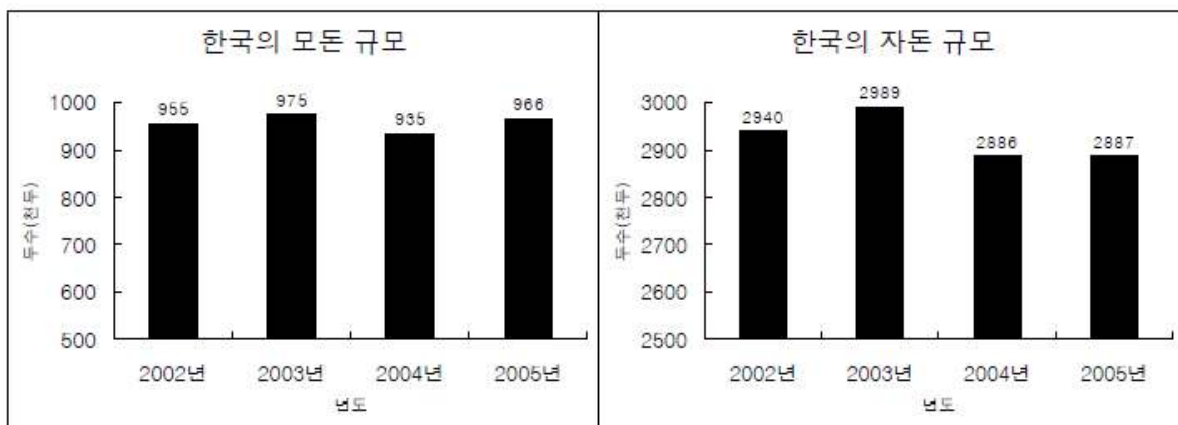


Figure 1.1.4 우리나라 모든 및 자돈생산 규모.

## 7. 난용성 기능성 지질의 특성

### 가. 국내·외 기능성 지질 생리활성 물질의 섭취요구(Bioactive Lipids and Health)

식이생리활성지질의 기능에 대한 중요성은 계속적으로 강조되어 왔다. 웰빙시대를 선호하는 현대인들에게 오메가-3-지방산과 같이 외부환경에 예민한 생리활성 물질의 보호, 전달, 코팅할

수 있는 새로운 전달 시스템 개발을 통해 기능성 식품의 섭취 강화로 건강을 유지할 수 있다. 현대인들은 과대영양 혹은 스트레스로 인한 심혈관 계통의 질병 증가로 단품의 식품을 선택할 지라도 기능성이 강화된 제품선택의 선호도가 증가되고 있는 추세이다. 현대문명인들에게 심혈관질환은 매우 심각한 질병중의 하나이다. 2007년도 미국 보고서에 따르면 심혈관질환으로 소비되는 비용이 연간 4천억 달러에 이르렀다. 불포화지방산, 특히, 오메가-3, 6-지방산은 지질대사, 심장기능, 혈관확장, 혈소판 응집과 혈액응고에 등에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 또한 1,700만 미국인이 Type II 당뇨의 질환을 지니고 있으며, 이 치료를 위해 연간 1,000억 달러가 소비되고 있다. Type II 당뇨는 insulin 과다 혹은 부족으로 생기는 신체결함으로 고혈당 혹은 고지혈증과 같은 결과를 초래할 뿐만 아니라 각종 혈관 합병증을 유발할 수 있다. 식이성 불포화 지방산은 포도당 조절 없이 세럼 triglyceride 값을 낮추는 역할을 지니고 있어 생리활성지질 섭취권장을 통해 Type II 당뇨 환자의 건강을 증진시킬 수 있다. 또한, 미국에서는 1,400만 이상의 암발병율로 연간 500억 이상의 환자가 발생하는 것으로 집계 되었다. 식이 섬유질, 오메가-3-지방산, 라이코펜, 혹은 conjugated linoleic acid(CLA)와 같은 기능성 지질 생리활성 물질이 암 예방에 탁월한 것으로 알려졌다. 이러한 생리활성물질을 기초로 한 식품섭취 습관은 이러한 질병의 증가를 줄이고 국민 건강유지에 탁월한 효과를 나타낼 뿐만 아니라 국가경제적인 측면에서도 많은 이점을 야기할 수 있다. 실질적으로 포화지방 대신 몸에 좋은 지방을 섭취하는 것이 심장질환 발병 위험을 50% 가량 줄일 수 있는 것으로 나타났다. 하버드의 대 연구팀이 밝힌 연구결과에 의하면 일부 생선과 식물성 기름 속에는 다가불포화지방산을 포화지방 대신 섭취하는 것이 심장질환 발병 위험을 50% 가량 줄이는 것으로 나타났다. 약 1만 3000명가량을 대상으로 한 과거 연구결과를 분석한 이번 연구결과 다가불포화지방산이 이 같은 포화지방을 대신 할 수 있는 훌륭한 대체제가 될 수 있는 것으로 나타났다. 연구팀은 “포화지방이 심장으로 가는 동맥을 막는 몸에 해로운 콜레스테롤을 높일 수 있는 반면 다가불포화지방산은 몸에 좋은 콜레스테롤을 높이는 반대 작용을 하는 바 다가불포화지방이 약 5% 더 섭취할 시마다 심장질환 발병 위험이 10% 가량 줄어들게 된다.” 라고 밝혔다.

국내질병 현황을 살펴보면 2007년도 1월에 발표된 통계청 자료에 의하면 2005년 사망원인 1위는 암으로 10만 명 당 134.5 명이 사망하였으며, 10대 사인 중 10년 전인 1995년에 비해 암에 의한 사망률이 가장 많이 증가한 것으로 나타났다(23.7명). 또한 국내의 경우 노령인구의 증가와 급속적인 서구화 경향으로 항암면역 치료 등에 대한 예방과 치료에 막대한 의료비가 지출되고 있다. 따라서 항암면역 조절을 위한 효과 적인 치료 방안에 대한 신약 및 신제품 개발 연구는 국내외에서 중요한 연구 개발 목표가 되고 있다.

오메가-3 지방산은 수산물의 섭취가 많은 에스키모인들의 낮은 심혈관계 질환 발병율이 보고되면서 그 기능성이 널리 탐색되었으며, 해양생물인 미세조류, 세균, 그리고 해양포유동물에게서 주로 발견되는 데 반하여 육상생물에 의해 만들어지는 다중 불포화지방산은 들깨에 많이 들어있는 리놀렌산(linolenic acid, C18:3)을 제외하고는 대개가 오메가-6 계열의 지방산이 발견되고 있음. 어유 등의 수산자원으로부터 유래된 다양한 기능성 오일류는 높은 오메가 3지방산 함량을 가지고 있는 것이 대부분이며, 현재 시장에서 다양한 기능성 식품에 적용되고 있음. 해양생물자원으로부터 획득되어진 기능성 오일은 높은 오메가-3 지방산 함량 이외에도 스펅고리피드를 베이스로 한 지질 또한 다량 함유하고 있으며, 조류, 플랑크톤, 말미잘, 불가사리, 피낭류, 연산호, 참치 등의 다양한 해양 생물종이 세라마이드를 함유된 것으로 보고되어 있다.

(단위: 인구 10만명당, 명, %)

	사망원인	1992		1998		2002		2007		2008			
		순위	사망률	순위	사망률	순위	사망률	순위	사망률	순위	사망률	사망자수	구성비
1	악성신생물(암)	1	110.7	1	108.6	1	130.7	1	137.5	1	139.5	68,912	28.0
2	뇌혈관 질환	2	80.3	2	73.6	2	77.0	2	59.6	2	56.5	27,932	11.3
3	심장 질환 <sup>1)</sup>	3	43.0	3	38.4	3	36.9	3	43.7	3	43.4	21,429	8.7
4	고의적 자해(자살)	10	9.7	7	18.4	8	17.9	4	24.8	4	26.0	12,858	5.2
5	당뇨병	7	13.5	6	21.0	4	25.1	5	22.9	5	20.7	10,234	4.2
6	만성하기도 질환	8	12.9	8	12.7	5	22.6	7	15.3	6	14.9	7,338	3.0
7	운수사고	4	34.4	4	25.6	7	19.1	6	15.5	7	14.7	7,287	3.0
8	간 질환	5	31.6	5	24.6	6	21.9	8	14.9	8	14.5	7,164	2.9
9	폐렴	-	-	-	-	-	-	10	9.3	9	11.1	5,461	2.2
10	고혈압성 질환	6	27.4	9	8.4	9	10.6	9	11.0	10	9.6	4,724	1.9
	호흡기결핵	9	9.9	10	7.1	10	6.6	-	-	-	-	-	-

1) 심장 질환에는 허혈성 심장 질환 및 기타 심장 질환이 포함

Figure 1.15 사망원인 순위추이.

최근 등푸른 생선기름의 오메가-3계 지방산인 Eicosapentaenoic acid(EPA)와 Docosahexaenoic acid(DHA)가 암과 성인병 및 기타 생리적 질병을 예방하고 학습능력향상과 수명연장효과가 크다는 것이 임상학적으로 확인되면서 제약계나 건강식품시장에서 이들 제품에 대한 판촉과 홍보로 오메가-3계 지방산 열기는 국내외를 막론하고 붐을 이루고 있는 실정이다. 오메가-3 지방산이 인체에 미치는 영향에 대한 연구는 대단히 다양하나 대체로 몇 가지 부분으로 구분해 볼 수 있다. 우선 오메가-3계 지방산의 주요한 영향은 동맥경화, 혈전증, 혈압 등의 심혈관계 질환의 예방과 치료에 매우 효과가 있는 것으로 밝혀졌으며, 이들이 영향을 미치는 기전은 혈액 중의 중성지방, 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, HDL-triglyceride 등을 감소 혹은 상승시키는 것과 오메가-3 지방산으로부터 생성되는 eicosanoid 중 항혈전 작용이 있는 물질 합성의 촉진 및 혈전생성 촉진물질의 생성억제를 통해 이들 질병의 치료 및 예방효과를 가져오는 것으로 보고된다.

한편 오메가-3계 지방산은 인체의 성장과 발달에 중요한 영향을 미치는데 특히 뇌, 망막, 기타 신경조직의 성장과 발달에 직접적인 영향을 주는 것으로 보고되고 있으며, 또한 DHA와 EPA를 포함한 오메가-3계의 다중불포화지방산은 정상적인 성장과 발육에 필수적이며, 심장 관련 질환, 고혈압, 면역이상, 당뇨병 및 유방암, 대장암의 예방과 치료에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 세계 최대의 오메가-3 지방산 공급업체의 하나로 꼽히는 노르웨이 프로노바 바이오케어(Pronova Biocare)사는 마우스를 대상으로 진행했던 연구에서 어류 유래의 오메가-3계 지방산이 지방과피 관련 유전자의 활성을 촉진시켜 체중감소에 효과가 인정된다고 보고하고 있다. 그 외에도 오메가-3계 지방산은 경부통, 요통 및 류마티스와 일부 관절염 환자에게 효과가 있음을 입증하고 있다.

## 나. 식품 속에서 지질 생리활성이 야기할 수 있는 문제점

지질생리활성 물질이 건강에 효과적인 장점을 지녔음에도 불구하고 실질적인 식품 응용 면에서는 굉장히 제한적이다. 그 이유로는 외부환경에 예민한 지질산화 과정으로 기능성 상실이 빈번히 이루어지고 있기 때문이다. 그중에서도 불포화지방산의 산화는 오랜 기간 동안 해결되지 않은 과제로 식품 저장 기간 동안 쉽게 발생하고, 더 나아가서는 이취발생과 같은 관능적인 부작용으로 식품의 질을 저하시킨다. 지질산패는 불포화 지방과 산소간의 유리 라디칼 체인반응으로 자동산화에 의해 이루어진다. 그러나 대부분의 식품에서는 이루어지는 산화과정은 자동촉매(자동산화)에 의한 것이 아니라 산화 강화 요소를 통해, 즉, 자외선, 철분과 같은 금속이온에 의한, 혹은 효소에 의해서 악화되는 것이 주된 요인이다. 실제로 지질산화의 주된 요인은 금속과의 반응에서 기인한 peroxides의 분해를 통한 유리라디칼 형성과정인 주를 이루고 있다. 대부분 식품은 지질은 포함하고 있으며 일정량의 철 성분과 hydroperoxides를 포함하고 있다. 따라서 모든 지질은 지질산화에 노출되어 있다고 볼 수 있다. 생리활성지질이 포함된 식품의 경우 이러한 비바람직한 산화과정을 억제할만한 대안이 필요하다.

유화형 식품의 산화는 벌크 타입의 지질식품과 달리 그 구성성분이나 구조가 달라서 산화속도가 보다 빠르고 그 경로 또한 다르다. 벌크타입의 지질식품은 공기에 직접적으로 노출되었을 때 산화가 진행되는 반면 유화형 지질식품들은 수분에 둘러싸인 계면막 자체에서도 산화작용이 발생한다. 벌크타입의 식품은 주로 소수성(친지질성) 성분을 포함하고 있고, 이에 반해 유화형 식품은 부가적인 소수성, 친수성, 혹은 양쪽성(친수 소수성을 함께 지닌) 성분이 많이 포함되어 있다. 이들은 주로 항산화(anti-oxidant) 혹은 산화촉진(pro-oxidant)의 기능을 지니고 있다. 유화형 식품에서 첨가제 역할은 주로 지방과 수용액상의 계면사이 교류역할을 하고 그들의 첨가량 혹은 위치가 산화여부의 결정적인 역할을 한다. 또한 어류 유래의 오메가-3 지방산인 DHA와 EPA의 강한 어취는 식품에의 이용을 어렵게 할 뿐만 아니라 어유의 지방산은 탄소수가 많고 불포화도가 높아 쉽게 산화가 되어 고분자의 산화물을 생성하여 음식이나 첨가물의 품질을 저하시키므로 직접적인 이용을 어렵게 하는 문제점을 가지고 있다. 따라서 이를 산업체에서 실용화를 이루기 위해서는 오메가 지방산이 많이 들어있는 지질류의 관능개선을 위한 기술개발이 중요하다. 실질적으로 이를 위한 논문이나 특허가 이미 오래전부터 진행되어 왔으나, 산업체에 활용할 수 있을 만큼 원천기술을 확보하지 못한 상태이다. 즉, 다시 말해, 이취개선 문제를 해결하여 소비자 손에 들어갈 수 있는 제품을 만들기 위한 산업체에 실용화를 위한 효율적인 전달 시스템이 현격히 부족한 실태이다.

## 8. 난용성 물질을 가용화하는 저탄소 신가공기술

### 가. 초고압기술 기반 콜라겐 가용화 기술 - 아임계수를 이용한 콜라겐 펩타이드 추출

일반적으로 물질은 고체, 액체, 기체의 3가지 상을 가진다. 하지만 물질에 가해지는 압력과 온도의 변화에 따라 이 상들 간의 차이가 구별되지 않는 상태가 되기도 하는데, 서로 다른 두 상의 물질이 동일한 밀도를 갖는 압력과 온도를 임계점이라 한다. 물의 경우에도, 임계점 이상의 압력(22.1 MPa, 218 기압)과 온도(374°C)에서는 액상의 물과 기체상의 물간의 경계가 뚜렷이 구별되지 않는데 이때의 물을 초임계수라 한다. 또한 임계점보다 낮은 근방의 영역을 아임계수라

고 부른다. 초임계수는 액상 물과 달리 표면장력이 거의 없고 점도와 밀도 또한 액상일 때보다 훨씬 낮은 특성이 있다. 그리고 극성이 매우 강한 액상 물에 비해 초임계수는 유전상수(Dielectric constant)가 낮은 관계로 수소결합이 약해져서 비극성의 성질을 띠게 되어 유기 용매와 같은 작용을 할 수 있다. 또한 초임계수의 이온강도(Ion strength)는 액상 물에 비해 월등히 높아서 수소 이온 농도가 액상 물의 30배 이상인 것으로 알려져 있다. 아임계수는 유기물의 용해 작용과 강한 가수분해 작용을 가지는 이유로서 통상의 물의 유전율의 값은 80 정도인데 대하고, 아임계수의 유전율은 20~30 정도가 되어, 기름을 녹이는 것에 사용되는 메탄올에 가깝게 되기 때문에, 기름을 녹이는 성질을 가지게 된다. 또한 임계수의 온도 영역인 250°C 정도에서는, 물이 매우 큰 이온강도를 가져, 수소이온과 수산화물 이온으로 분리하는 비율이 커지기 위해, 강한 분해력을 가지게 된다. 이를 이용한 유기물(전분이나 단백질)을, 아미노산이나 올리고펩타이드로 분해되고 고형분이 액상화 하는 기술개발이 가능해졌다.

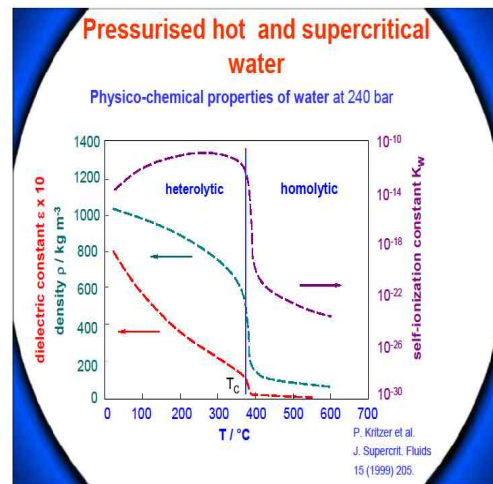
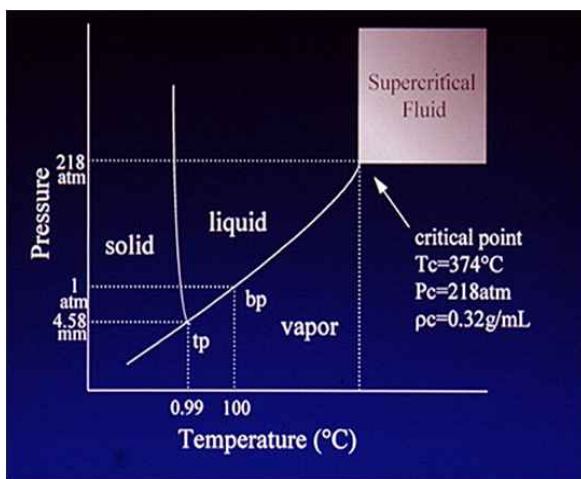


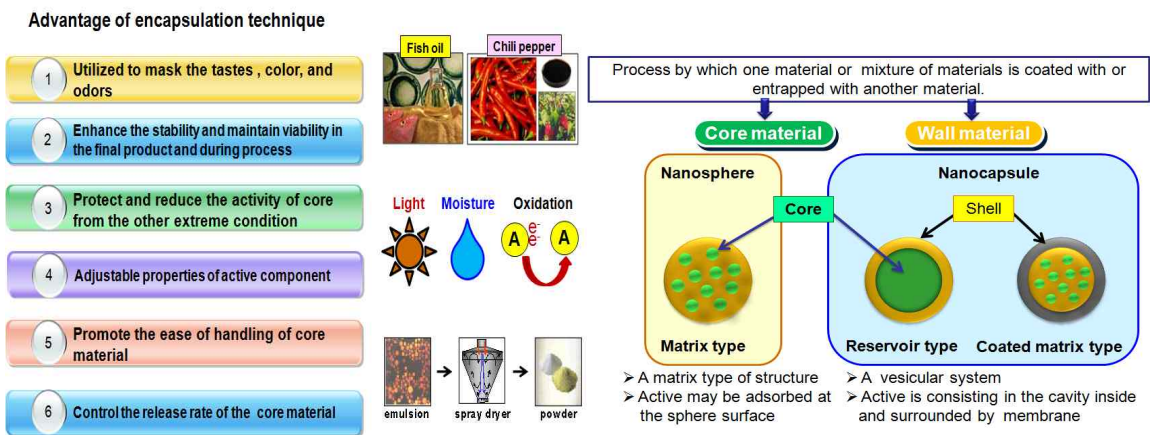
Figure 1.1.6 초임계 영역 및 초임계상태에서 초임계수의 열적 물리적 특성.

#### 나. 초고압기술 기반 콜라겐 가용화 기술 - 초고압효소기법을 이용한 가수분해

기존의 열처리에 비해 초고압 처리가 가지는 주요 장점으로는, 열처리 가공에 비해 현저히 적은 열에너지를 소비하며, 상온 또는 저온에서 실행이 가능하며, 식품천연의 맛과 향미, 색, 신선도, 및 영양성분을 유지할 수 있고, 모든 방향에서 압력이 균일하게 작용하므로, 처리정도의 차이가 존재하지 않으며, 미생물사멸 외에도 단백질의 변성 또는 변형, 효소활성화 또는 불활성화, 효소기질 특이성 변화, 탄수화물과 지방의 특성 변화 등을 유도할 수 있고, 공유결합과 수소결합에 영향을 주지 않으며, 플라스틱 필름과 같은 파우치형태의 백(bag)을 이용할 수 있어 실험을 용이하게 할 수 있다는 것 등을 들 수 있다. 효소의 반응율-제한 단계를 변화시키거나 효소의 선택성을 조절함으로써 효소의 촉매적 특성을 변화시켜서 단백질이나 조건에 따라서 효소의 행동특성을 활성화시키거나 억제할 수 있음이 밝혀졌다. 또한 다당류를 이용하여 초고압 효소처리 할 때 고분자의 다당류가 저분자화 될 수 있는 연구결과를 보여주고 있는데, 예를 들어 푸코이단의 저분자화시에 초고압 효소처리를 함으로써 저분자화되고, 항혈전 활성 및 항산화 활성이 더욱 우수한 푸코이단을 얻을 수 있는 연구결과가 있다.

## 다. 미세캡슐화를 이용한 난용성 지질 가용화 공정기술

고도불포화 지방산의 가용화 공정기술을 개발을 위해, 미세캡슐화(microencapsulation) 기술이 50년 전부터 약학 분야를 중심으로 개발되어 왔다. 미세캡슐화 기술이라 함은 고체, 액체, 기체 상의 물질을 특정 조건하에서 조절된 속도로 방출할 수 있도록 어떤 물질이나 조직 내부에 포장하는 기술이다. 미세한 포장단위를 미세캡슐이라 하며 직경이 수  $\mu\text{m}$ 에서 수  $\text{mm}$ 로 다양하다. 미세캡슐화 기술은 향료, 영양성분 등의 불안정한 물질을 빛, 산소 및 수분과 같은 외부환경으로부터 보호하여 손실을 줄이며, 반응성이 큰 물질을 격리시키고, 고형화 시켜 취급을 용이하게 하며, 유동성 개선 및 내용물의 용출속도를 조절하여 지속성, 서방성 제제로서의 이용을 위한 목적으로 사용되고 있다.



## Technical for encapsulation

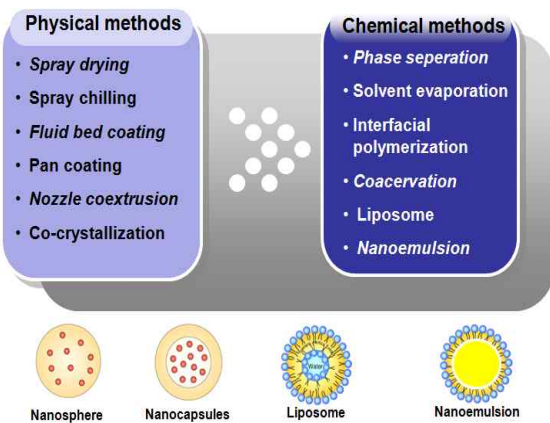


Table 1.1. Illustration of characteristics of encapsulated particle by various encapsulation processes

Encapsulation technology	Coating materials	Particle structure
Spray-drying	Biopolymers: modified starch, maltodextrin, gum, chitosan	Matrix
Coacervation	Biopolymers: gelatin, gum arabic, glucan, polysaccharide	Core/Shell
Emulsion-diffusion method	Polymer: PCL, PLGA, PEI, PMMA	Core/Shell
Nanoencapsulation	Polymer/ Biopolymer: Protein, polysaccharide	Core/Shell
Inclusion	Biopolymer: alpha/ beta/ gamma cyclodextrin	Core/Shell

Figure 1.1.7 미세코팅기술의 필요성과 미세 캡슐화 기술의 종류와 특성.

미세캡슐의 피복물질로 사용되는 물질의 종류는 Carbohydrates류(Starch, maltodextrin, corn syrup, dextran, sucrose, cyclodextrin), Gum류(gum arabic, agar, sodium alginate, carrageenan), Cellulose류(carboxy methylcellulose, methylcellulose, ethylcellulose, nitrocellulose, acethylcellulose, cellulose acetate-phthalate, cellulose acetate-butylate-phthalate), Lipids류(wax, paraffin, tristearic acid, stearic acid, monoglycerides, diglycerides, beeswax, oils, fats, hardened oils), Inorganic류(calcium sulfate, silicates, clays), Protein류(gluten, casein, gelatin, albumin, hemoglobin, peptides) 등이 있으며, 식품산업에서 사용되는 미세캡슐화 방법에는

Figure 1.1.8에 제시된 다양한 종류들이 있다. 미세캡슐화에 사용되는 물질로는 산, 염기, 아미노산, 색채물질, 효소, 미생물, 향기성분, 유지, 비타민, 미량원소, 염 및 감미료 등이 있으며, 미세캡슐화의 응용 예로서, 빙그레의 ‘닥터캡슐’, (주)비락의 캡슐우유 등이 있다. 일반적으로 지용성 물질을 수용성 환경 하에서 안정하고 장기적으로 보존하기 위해서 지용성 물질을 캡슐화하는 방법이 많이 이용하고 있다. 특히 지용성 성질 등을 지닌 미용 성분을 수용액 등에 균질하게 분포시키기 위하여 지용성 물질을 캡슐화 하는 경우, 지용성 물질을 수용액 등에 균질하게 분산시킬 수 있을 뿐만 아니라 지용성 물질을 장기간 동안 성질의 변화 없이 보존할 수 있다. 상기와 같은 캡슐을 제조하기 위하여 일반적으로 코아세르베이션을 이용한 캡슐화 방법이 많이 사용하고 있다. 그 외에, 난용성 물질의 가용화에 사용되는 나노 기술은 생체 적합성이 낮은 난용성 성분이나 다른 활성 성분을 가용화 가능한 나노사이즈로 가공하여 생체 이용율을 증진시킨 나노소재의 개발로서 난용성 활성성분의 가용화 기술과 나노 캡슐제조기술(나노에멀전, 리포솜, 나노파티클) 그리고 피부 경피 흡수 조절기술을 들 수 있다.

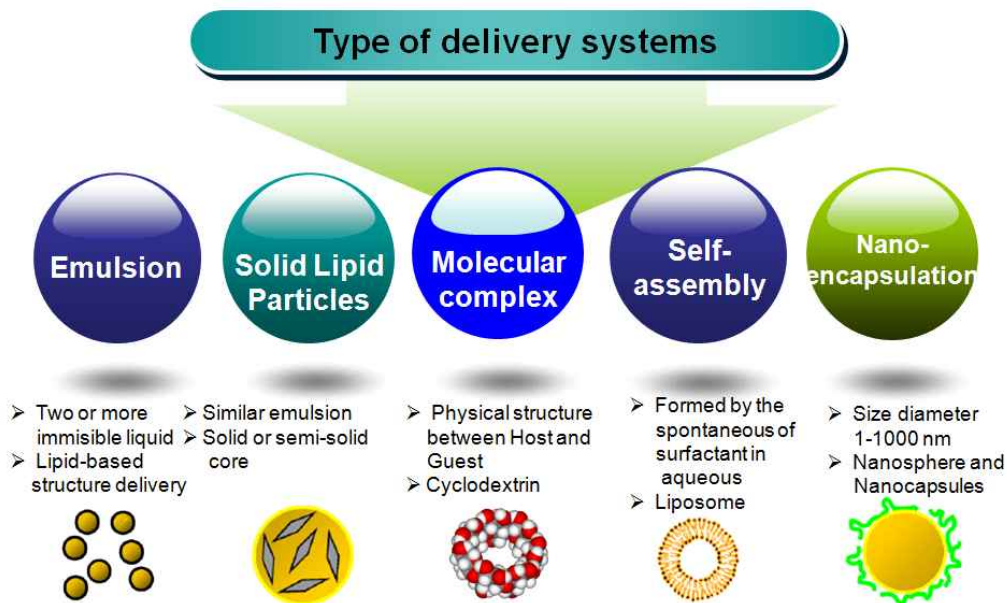


Figure 1.1.8 다양한 기능성 지질 물질 전달 체제.

#### 라. 난용성 칼슘제제의 가용화 공정기술

철분, 불포화 지방산, 비타민, 향료 등을 미세캡슐화(microencapsulation)하여 식품의 기능성을 향상시키고자 한 연구가 수행되고 있고, 유산균을 위산에 의한 파괴로부터 보호하기 위해 캡슐화한 유제품이 국내에서 시판 중이다. 캡슐화는 미립자 상태의 유용물질을 외부환경으로부터 보호하기 위해 막을 이용하여 캡슐을 만들고 따라서 자외선 차단 및 산화방지 그리고 보관성과 안정성을 향상시킨 것이다. 칼슘의 소재는 해양 유래부터(조개껍질, 생선뼈), 동물의 뼈, 광물질에 이르기까지 다양하다. 가장 많이 사용하는 방식은 top-down 방식으로 마이크로화 된 입자를 분쇄기에 넣고 분쇄시켜 분말화 한다. Top-down 방식은 건식과 습식으로 나뉘어진다. 그러나 이러한 분쇄방식에 의해서는 입도크기를 작게 하는데 한계성이 있다. 최근 국내 중소기업이 탄산칼슘입자를 500 nm 이하로 분쇄할 수 있다고 하여 분쇄기술에 대해 관심이 증폭되고

있다. 또 다른 가용화 기술은 bottom-up 방식으로 칼슘소재 물질을 산 처리하여 용해시킨 후 중화시켜 염상태로 결정화시키는 기작이다. 대표적인 염화칼슘, 구연산칼슘 등이 있다. 문제점은 이들의 용해성이 pH에 좌우된다는 것이다. 칼슘의 가용화는 top-down 방식이든 bottom-up 방식이든 입자의 크기를 작게 하여 수용액에 분산시킬 수는 있다. 문제점은 체내 흡수율이 매우 적다는 것이다. 이에 가용화뿐만 아니라 흡수율을 높이는 방식으로 아미노산과 칼슘분자간의 킬레이트화를 들 수 있다. 대표적으로 Figure 1.1.9에 제시한바와 같이 글리신 두 분자에 칼슘 한 분자가 결합하여 Ca-biglycinate를 만드는 예를 들 수 있다. 이 유기태 칼슘은 흡수력이 매우 뛰어나고 용해성도 우수하다고 볼 수 있다.

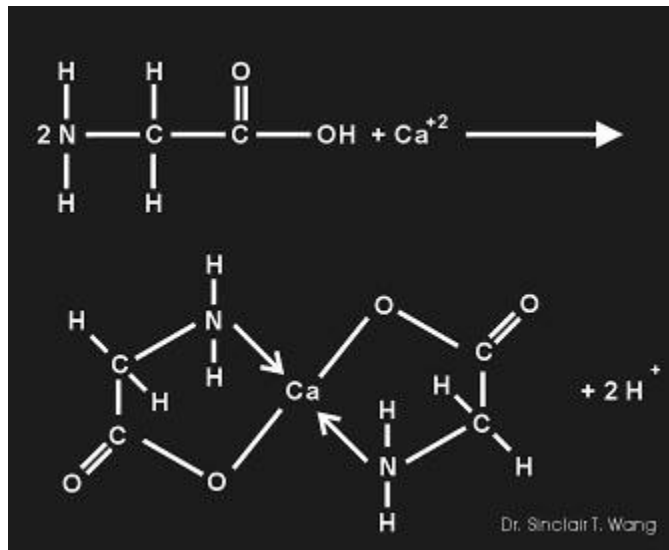


Figure 1.1.9 Ca-biglycinate의 화학적 구조형태.

## 9. 우리나라 고령화 사회에 대응한 식품산업의 문제점

우리나라는 세계에서 가장 빠른 속도로 늙어가 급속한 고령화 추세는 생산인구 감소로 인한 성장 잠재력 저하와 연금 지급 확대에 따른 재정 수지 악화 등으로 이어져서 국가 경제에 심각한 타격이 우려되고 있다. 2000년 총인구 가운데 65세 이상 노년층 비중이 7.2%를 기록, 고령화 사회(7% 이상)에 들어섰으며, 2019년에는 14.4%까지 올라가서 고령 사회(14% 이상)에 진입을 하고, 2026년에는 노년층 비중이 20.0%에 이르러서 초고령 사회(20%이상)가 될 것이라 전망하고 있다. 국회입법조사처는 현안보고서 ‘고령사회에 대응한 식품산업의 과제’에서 고령친화산업으로서 식품산업이 활성화되지 못한 문제점을 지적하고 있다. 우선 우리나라가 고령화 사회에 대응하기 위해 수립한 제1차 고령친화산업 추진계획(2006년~2010년) 시행에 나타난 식품산업의 지원 현황을 살펴보면 고령친화식품산업이 활성화되지 못한 문제점을 진단하고 있으며 실버세대를 위한 식품개발이나 산업화가 전혀 안 되고 있다. 우리나라 폐경기여성 3명 중 1명이 골다공증이고 우리나라 골다공증 유병률은 50세 이상이 19.3%로 매우 높게 나타나고 있다. 그 중 여성의 경우 골다공증 유병률이 32.6%로 미국이 비해 2배가량 높은 수치다. 더더욱 문제는 이데 대한 인지도가 낮다는 것이다. 그 예로서 저출산, 고령화 추세에 따라 빠와 관련된 제품 시장의 규모가 확대되고 있으며 우리나라 어린이 성장발육 제품시장은 연간 약 2천억 규모에 달하고 국내 골다공증 발생에 의한 사회적 비용은 연 1조 500억 원에 달함. 세계적으로 노년층 인구의 성장추세



임에 따라 골관절염·백내장·주름과 같은 생활의 질(Quality of Life)관련 치료수요가 계속적으로 증가하고 있으며, 이에 따른 노화진행에 도전하기 위한 콜라겐 관련제품의 주요시장인 눈·피부 미용·관절과 뼈 건강·인지기능 시장규모가 커지고 있다. 그러나 실버세대를 위한 식품개발은 매우 미비한 실정이다.

## 제 2 절 연구개발의 목적

본 연구에서는 저탄소 신가공기술로 각광받고 아임계수 추출 및 초고압효소분해 공법을 이용하여 돼지 태반으로부터 유래하는 콜라겐을 저분자 단위 콜라겐 펩타이드로 가수분해하는 기술을 개발하고 활성성분(tripeptide G-X-Y, dipeptide Pro-Hyd 등)으로 소화, 흡수되어 혈액으로 이행 될 수 있는 특정분자량 분포 및 아미노산 조성을 가진 펩타이드 조성물과 직접적으로 활성성분 oligopeptide의 고함유 조성물을 개발함으로써 상술한 기존 콜라겐 제품이 가진 문제점을 해결하고 이를 이용하여 실버세대를 위한 고기능성 식품을 제조하는데 있다. 칼슘소재원료를 건식으로 나노입자화 및 정제하고 수용화하여 칼슘의 이용율을 극대화한 기능성 식품을 개발하는데 목표를 둔다. 개발내용으로는 굴껍질과 난각을 칼슘소재원료로 하고 나노입자화한 굴껍질을 이화학적 처리하고 나노입자 단위에서의 생이용성 증대에 대한장내의 메카니즘을 동물 실험을 통하여 규명하고 제품화하며, 콜라겐 펩타이드를 이용하여 칼슘과 아미노산의 킬레이트화를 통해 가용화 및 흡수율이 높은 칼슘제제를 제조하는 기술을 개발한 후 다양한 식품을 제품화하는데 목표를 둔다.

본 연구에서는 모든 지질은 지질산화에 노출되어 있다고 볼 수 있고, 생리활성지질이 포함된 식품의 경우 이러한 비바람직한 산화과정을 억제할만한 대안이 필요하다. 따라서 다중불포화 지방산(오메가-3-지방산, 스펡고리피드) 코팅에 의한 강력한 항산화 효과를 기대할 수 있으며 지질산화의 속도를 현저히 줄일 수 있는 새로운 나노입자 기술 개발 및 전달체제를 개발하는데 그 의의가 있다. 또한 식품에 일반적으로 사용되는 바이오폴리머, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방을 이용하여 나노화 함과 동시에 새로운 식품구조로 다시 조합(assemble)시켜 새로운 기능성이 부과된 제품을 개발하는데 그 목적이 있다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 기술개발현황

#### 1. 콜라겐 기술 및 제품현황

콜라겐제품 국내 시장규모는 2008년에 700억 원 정도였으며 지속적으로 시장규모가 급성장하고 있다. 또한 우리나라에서도 피부의 장력을 유지해주고 관절의 통증을 개선한다고 주장하면서 인기리에 판매되고 있으며 시장 규모가 400~500억 원으로 급팽창하고 있다. 국내 유수의 제약사들을 비롯해 수십 곳의 수입 업체 및 원료가공판매업체 등이 콜라겐 제품을 내 놓고 있으며, 인터넷 쇼핑몰과 일부 방문판매 및 화장품 전문점 등을 통해 소비자들에게 판매되고 있는 것으로 조사됐다. ‘먹는 콜라겐(식품)’ 과 ‘바르는 콜라겐(화장품)’ 으로 구분되는 콜라겐 제품은 현재 국내에서 콜라겐 제품을 제조 또는 판매하고 있는 제약사는 씨트리제약(콜라겐-1000), 한미약품(뉴콜라겐), 종근당건강(콜라겐), 광동제약(콜라겐 S), 제일약품(콜라겐 100), 삼성제약(콜라겐 골드, 이상 식품) 등이며, 인터넷 쇼핑몰에서 판매되고 있는 제품에는 화장품에 라블르(프랑스 수입 콜라겐 앰플), 네이처스 뷰티(뉴질랜드 수입 콜라겐 크림), 콜라겐 모델링(국산 마스크 팩) 등과 식품에 콜라겐 엑센(일본수입), 유니콜라겐(독일수입) 등이 있다. 또한 조아제약은 돼지태반(돈태반) 추출분말과 석류농축과즙 등이 함유된 ‘에스플라센’ 을 출시했다. ‘에스플라센’ 은 20 mL의 앰플형태로 여성에게 좋은 성분들이 함유된 건강음료로 판매하고 있으며 광동제약의 ‘플라센골드’, 대웅생활건강의 ‘프라센태’, 대웅제약의 ‘플라센타액’, 보령제약의 ‘로얄프라센골드’, 종근당건강의 ‘프라센바이스’ 등이 돈태반 제품이다. 대부분 덴마크 등에서 수입한 돈태반을 원료로 사용하며 분말이나 액상형태 제품이다.

#### 2. 골다공증치료제 시장 전망

국내 골다공증치료제 시장은 골밀도측정기 보급률 상승, 고령화 진전, 신규 제제 출시 등에 힘입어 지난해부터 급격한 증가 추세를 보이고 있으며, 연평균 33.7%의 성장률을 보이고 있다. 또한 정부가 골다공증치료제에 대한 보험급여 기간을 연장하였으며, 이는 골다공증치료제 시장 확대의 또 다른 계기가 되었다. 이중 골다공증치료제를 주도하고 있는 알렌드로네이트 제제 시장은 466억원(2005년 기준)으로 알렌드로네이트 물질특허 만료에 따른 제네릭 제품 출시로 시장 규모가 더욱 커질 전망이다. 국내 알렌드로네이트 제제 시장 점유는 한국MSD ‘포사맥스’ 59.4%, 유유 ‘마밀+맥스마빌’ 17%, 환인제약 ‘아렌드’ 15.7%, 기타 7.7% 순이다.

#### 3. 상업용 환자식·노인식 시장 현황과 전망

국내 의학계에서는 환자의 영양지원의 중요성을 느끼고 있으며, 이를 부각시키기 위해 2004년 이후 의료기관 평가 항목에 영양집중지원팀(Nutrition Support Team, NST)에 의한 업무내용을 평가하는 항목을 포함시켜 전국적으로 영양집중지원팀의 결성을 자극하며 환자의 균형적인 영양지원을 위

해 노력하고 있다. 위와 같이 환자의 영양상태 회복 및 질병 치료를 목적으로 하는 식사를 포함한 모든 식품을 광의적으로 환자식이라고 할 수 있으나, 국내에서는 질병이나 수술 등으로 인해 저작(씹는 행위)이나 연하(삼키는 행위) 능력이 부족한 환자들에게 이용되는(흔히 유동식으로 일컬어지는) 경장영양식이(Enteral Nutrition Food, EN Food)를 대표하는 말로 쓰인다. 이런 경장영양식은 급식 방법에 따라 경구용 보충식(oral feeding)과 경관급식액(tube feeding)으로 나뉘지며, 또한 기존 병원이나 집에서 직접 조제하는 혼합액화식이(Blenderized formula)와 상업용으로 개발된 상업용 환자식으로 나눌 수 있다. 국내의 상업용 환자식은 1991년 정·식품에서 개발한 그린비아가 최초이다. 국내 기술에 의해 한국인 영양섭취기준을 기초로 개발된 그린비아는 당시 수입제품에 의존하던 상업용 환자식 시장을 국내 기술에 의한 국내 제품으로 바꿔 놓았으며, 낙후된 상업용 환자식 제조 기술의 발전에 크게 이바지했다. 초기의 환자의 단순한 영양보충을 위해 개발되기 시작한 국내의 상업용 환자식은 당뇨병 환자의 혈당 관리를 위해 탄수화물원을 조절한 당뇨병용 식이를 개발해 치료에 도움을 주는 식이로 전환됐다. 이후 신장질환자의 특성에 따라 저단백, 고열량의 신장질환자용 식이 등이 개발돼 있다. Figure 2.1.1은 현재 국내에서 개발돼 유통되고 있는 상업용 환자식의 종류이다. 위와 같은 상업용 환자식의 시장규모는 꾸준히 성장하고 있으며, 시장 점유율은 그린비아(정식품)가 약 30%, 제비티(한국에보트), 뉴케어(대상), 메디푸드(한국메디컬푸드)가 각각 약 20~25%씩을 점유하고 있으며, 기타 뉴트리란(영진약품), 메디웰(엠디웰아이앤씨), 케어웰(한국엔터털푸드) 등의 업체들이 총 5~7% 정도를 차지하고 있다.



Figure 2.1.1 국내 상업용 환자식 제품의 종류.

#### 4. 오메가-3 건강식품 시장

오메가-3 건강식품시장은 2008년을 기준으로 국내 시장규모가 600억(소비자가 기준으로는 1,200억 이상) 이상일 정도로 큰 규모를 형성하고 있을 뿐만 아니라 성장률도 두 자릿수를 기록하는 안정된 품목으로 기대되고 있다. 특히 올해는 건강기능식품 新 공전의 유예기간이 종료되면서 고함량 원료에 대한 관심이 폭발적으로 늘고 있다는 게 업계의 분석이다. 新공전의 내용을 보면 건강기능식품으로 인정받는 오메가-3 제품을 출시하기 위해서는 일일 섭취량을 EPA와 DHA의 합으로 500 mg~2,000 mg 수준에 맞춰야한다. 지금까지 일반적으로 사용된 DHA 18%, EPA 12% 원료로 이 규정을 맞춘다고 가정하면, 500 mg 캡셀을 기준으로 하루 4 캡셀 이상 섭취해야 한다는 결론이 나온다. 그러나 이래가지고는 상품성이 뛰어난 제품을 개발하기 어렵다. 먹는 양이 너무 많기 때문이다. 이 때문에 올해부터는 오메가-3 시장에 고함량 바람이 불어 닥칠 것이라는 예상이 많이 나온다. 많은 양을 먹어야하는 기존의 저가제품과 차별화하여 함량 높은 고급제품이 시장의 한 축을 이룰 것이라는 분석이다. 이러한 관심을 반영하듯 원료 시장에는 EPA나 DHA의 함량을 대폭 높인 고가 원료의 제품은 물론, 에스테르화 공정을 통해

공전의 기준규격을 맞춘 제품들의 출시가 많아지고 있다. 고급제품의 경우 EPA/DHA의 함량을 60% 이상으로 맞춰 1,000 mg 캡셀은 하루 1개, 500 mg 캡셀은 하루 2개 정도 섭취하는 형식이 될 가능성이 크다. 아직 이러한 원료의 거래가 활발하지는 않지만 조만간 큰 흐름이 될 것은 분명해 보인다.

표1. 국내 오메가-3 시장 현황 (단위:백만원)

구분	국내생산	수입	계
2005년	15,334	19,321	34,655
2006년	15,246	23,390	38,636
2007년	16,889	27,201	44,090
2008년	26,600	35,832	62,432

출처: 식약청

연도별 품목별 총 판매액 현황 (상위 10품목)

구분	총 판매액 (억원)				증가율 ('09/'08,%)
	2006	2007	2008	2009	
총액	7,008	7,235	8,031	9,598	△20
1 홍삼	2,469	3,284	4,184	4,995	△19
2 개별인정형	73	249	416	800	△92
3 비타민 및 무기질	636	604	531	761	△43
4 알로에	1,031	797	639	648	△1
5 인삼	364	348	413	364	▽12
6 오메가-3 지방산 함유 유지	152	142	266	334	△25
7 프로바이오틱스	168	174	190	254	△33
8 글루코사민	368	275	201	166	▽17
9 식이섬유(보충용)	207	159	145	154	△6
10 효모	184	146	179	126	▽29
11 기타품목	1,357	1,056	867	996	△15

Figure 2.1.2 국내 오메가-3 시장동향 및 연도별 품목별 현황.

### 5. 국내 유가공품 시장 현황

2006년 후부터 기능성을 강조한 우유 및 요거트 제품의 출시가 두드러졌다. 웰빙을 추구하는 소비자층을 확보하기 위해 혁신적인 신제품 출시를 위해 기업 간의 경쟁이 치열했다. 기능성을 강조한 우유는 저지방 제품을 출시하여 유제품의 소비를 증가시키고자 노력하였고, 마시는 요거트 제품에서도 유사한 경향을 보였다. 특히 기능성을 강조한 제품 중 특정 소비자층을 겨냥한 기능성 요거트의 출시가 돋보였다.

국내 웰빙 유제품 판매 현황 (2002-2006)

단위: 억원

유제품	2002	2003	2004	2005	2006
유기농	282	355	455	500	551
기능성	15,782	16,829	16,923	18,458	20,105
- 기능성 요거트	10,323	11,567	11,788	12,214	12,746
- 저당 요거트	-	-	-	45	48
저지방	2,179	2,261	2,259	2,662	2,922
- 저지방 요거트	-	-	-	45	48
두유(유제품 대체)	2,149	2,579	2,602	2,639	2,691

Figure 2.1.3 국내 유제품 판매현황 (2002-2006).

## 제 2 절 국외 기술개발현황

세계 미용식품 시장 매출 규모는 미용식품의 정의 및 분류, 시장조사기관에 따라서 15억~50억 달러로 크게 차이를 보인다. 2008년 Kline & Company의 조사에 따르면 세계 미용 식품시장 규모는 약 15억 달러이며 유럽이 가장 큰 시장을 형성하고 있으며, 그 다음이 일본시장인 것으로 나타났다. 그리고 미국은 전체시장의 3%를 차지하는 아주 미미한 시장으로 평가했으며 한국을 포함한 아시아, 남미시장은 조사에 포함되지 않았다. 일본 건강산업신문이 실시한 2010년 인기 소재 조사에서 업체들이 언급한 기능성소재는 약60종으로 2009년 조사 때보다는 20종이 감소했다. 이중 인기소재 톱10을 보면 콜라겐의 인기는 지속된 것으로 드러났다. 미니드링크에 채용되는 건수가 증가하면서 2006년부터 6년 연속 톱 자리를 지키고 있다. 2위는 글루코사민. 글루코사민이 2위에 오른 것은 2007년부터 이후 콜라겐과 함께 4년 연속 투톱의 자리를 지켜오고 있다. 두 소재 모두 '로코모티브 신드롬(운동기능저하 증후군: 일본에서는 '로코모'라고 줄여서 말한다)' 소재로서 중심적인 역할을 담당하고 있기 때문에 앞으로도 일본의 기능식품 시장을 견인해 나갈 것으로 확실시 되고 있다. 한편 3위에 랭크된 소재는 플라센타(태반)로서 2008년 8위, 2009년 5위에서 상승해 처음으로 3위 안에 진입했다. 특히 2010년에는 드링크의 수요가 급신장하면서 신제품 출시가 이어져 시장이 활성화됐다. 이와 같은 시장 분위기를 타고 대형식품회사 및 화장품업체도 관심수위를 높여 속속 진출하면서 올해는 시장을 더욱 확대해 나갈 것으로 전망되고 있다. 원료별에서는 가장 많은 유통량을 차지하는 것은 돼지콜라겐으로 높은 기능성에 힘입어 두터운 수요층을 확보하고 있다. 여러 가지 장점으로 최근 어류콜라겐의 수요가 증가하여 콜라겐 시장 확대의 일익을 담당하고 있다. 현재 돼지콜라겐과 어류콜라겐의 비율은 6대 4 정도이며, 돼지 유래제품과 어류 유래제품의 추정가격은 각각 ¥2,800~2,000 및 ¥2,700~3,500이다. 제품시장에서는 메이지제과의 '아미노콜라겐'이나 하나마이(華舞)의 '먹는 콜라겐' 등으로 대표되는 파우더타입이 시장을 견인하고 있다. 또, 과자나 일반식품에 첨가가 증가하는 등 기능성 부가가치소재로서 활용되기 시작하고 있다.

일본에서 콜라겐 음료 시장은 전쟁을 방불케 한다. 콜라겐 음료를 13년 간 판매해 온 시세이도는 해마다 매출이 신장돼 2008년 콜라겐 음료 매출액이 100억 엔을 돌파한데 이어 올해는 전년대비 약 20~30% 증가했다. 식품업체인 메이지제과 등에서도 콜라겐 음료 판매에 뛰어들었다.

일본에서 현재 약 30종류의 콜라겐함유 건강식품이 판매되고 있고 1일 섭취량은 0.1~10 g 범위이다. 판매되고 있는 제품의 종류 및 주장하는 효능에 따라 콜라겐펩타이드 평균 분자량은 3,000정도, 900~1,100의 저분자, 800전후, 분자량 280인 저분자 tripeptide를 15% 이상 함유한 제품 등 다양하다. 건강보조식품은 통신판매를 주요 채널로 하는 기업이 증가하고 있다. 점유율 1위인 산토리의 '글루코사민&콘드로이친'이 순조롭게 실적을 확대하여 통신판매 채널의 구성비는 계속해서 높아지고 있다. 이용자로부터 높은 평가를 받아 2009년에도 대폭적인 실적 확대로 1위 자리를 유지할 전망이다. 고령자층의 글루코사민 상품에 대한 잠재 수요가 기대되며 콜라겐이나 히알루론산 등 인지도가 높은 미용 성분을 부가해 차별화를 꾀하고 있다. 상품 차별화와 재구매 수요 획득의 유효한 대책이 필수적이다. 성분별로는 히알루론산 배합 상품에서 독주해온 에버라이프와 함께 큐사이가 '히알루론산 콜라겐'을 통신판매에 집약해 실적을 계속 확대해 나가고 있다. 비타민C의 수요는 기본성분으로서 뿌리 깊은 수요를 유지하고 있어 2009

년에도 200억 엔 이상을 유지하였다. (주)호로스는 드링크 전용 플라센타 엑기스 판매하고 있다. 저지방과 유기농제품이 미국 내 웰빙유제품을 대표하며 2006년 매출액은 29억 달러로 미국 유제품 전체판매액의 5%를 차지하고 있다. 저지방유제품이 웰빙유제품에 가장 많은 부분(73%)을 차지하고 있는데 이는 많은 소비자들이 체중관리를 위해 불필요한 유지방의 섭취는 줄이고 우유 내 칼슘만 섭취하기를 원하기 때문이다. 일본시장: 일본은 최초로 기능성을 강화한 요거트 제품을 출시한 나라로서 야쿠르트 혼샤사의 야쿠르트제품(Shirota 균함유)이 유명하다. 기능성 유제품 시장은 이미 포화상태로 일본 소비자들은 저지방 또는 저당 요거트제품으로 관심을 갖고 있다. 이는 칼로리에 민감한 소비자층을 겨냥한 저지방 요거트제품 판매에는 긍정적인 것으로 나타났다.

**표1. 미국 웰빙 유제품 판매 현황 (2002-2006)** 단위 : 백만USD

유제품	2002	2003	2004	2005	2006
유기농	1,526.6	1,771.6	2,087.9	2,475.5	2,882.3
기능성	1,023.9	1,104.3	1,212.7	1,323.3	1,717.2
저당	66.5	66.8	68.6	70.0	71.0
저지방	19,629.0	19,777.4	21,103.0	21,471.0	21,148.7
기타	711.8	839.3	1,146.7	1,444.3	1,495.1
두유Base	104.9	137.9	184.4	223.7	261.7
락토스프리	565.8	584.4	646.3	710.9	764.7

Figure 2.2.1 미국 유제품 판매현황 (2002~2006).

**미국 기능성 요구르트 : 액상 vs. 호상 요구르트 시장 점유율(2006)** 단위: %

구분	액상	호상	Total
요구르트-강화/기능성	33.8	66.2	100

**미국 기능성 요구르트 : 일반vs. 저지방 요구르트 시장 점유율(2006)** 단위: %

구분	저지방	일반	Total
요구르트-강화/기능성	99.5	0.5	100

Figure 2.2.2 미국 기능성 요구르트의 시장 점유율(2006).

**일본 웰빙 유제품 판매 현황 (2002-2006)** 단위 : 억 ¥

유제품	2002	2003	2004	2005	2006
유기농	13	17	21	25	28
기능성	5,055	5,144	5,205	5,157	5,151
저당	257	273	289	303	317
-저당 가공 우유	222	233	245	256	266
-저당 요거트	34	38	42	45	49
저지방	1,581	1,626	1,676	1,721	1,759
-저지방 우유	1,353	1,393	1,432	1,470	1,504
-저지방 요거트	128	136	143	147	151
두유Base	257	316	525	609	694

Figure 2.2.3 일본 유제품 판매현황 (2002~2006).

## 제 3 절 국내·외 특허, 논문 및 제품 현황

### 1. 특허

기존 특허는 해초류를 아임계수 처리하는 기술로 특허를 출원하였다. 또한 고압효소의 경우 단백질 분해효소라고만 명시되어 있지 구체적으로 어떤 효소를 활용하였는지 제시하지 못하고 있다. 또한 돼지 태반의 추출의 경우 열수추출이나 산처리 추출을 하는 경우가 있는데 막대한 시간과 비용이 부담되고 있는 실정이다. 또한 콜라겐 펩타이드를 이용한 기능성 식품의 경우 분자량을 표시한 제품이 전무한 상태이다. 주식회사 두바이오에서 출원한 특허자료에 따르면 들깨를 이용한 오메가-3 인스턴트커피 제조를 추진하였으나 입도가 크고 가용화되지 않은 것으로 보고되어 지는 것으로 보아 입도를 나노사이즈까지 변형, 가용화시켜야 한다. 또한 들깨 기름의 특성은 지방산조성으로 보아 불포화도가 높은 리놀렌산 함량이 많아 기름의 산패가 빨리 진행되어 식용유로 사용하기 위해서는 단기간만 이용할 수 있는데 향후 들깨기름의 산패억제 방법으로서 토코페롤, 레시틴, 세사민 첨가에 의한 산패억제 방법을 개발함으로써 5°C에서 최대 180일 정도 보존할 수 있는 방법을 개발 계획하여야 한다. 대다수의 자료에 의하면 오메가-3 지방산 어유를 포함하는 식품의 불쾌한 어류 냄새 및 풍미 때문에 많은 사람들 특히 어린이들은 오메가-3 지방산의 혜택이 낮은 식단을 갖는다. 어유를 포함하지만 어류 냄새 및 풍미 없는 식품을 제공하기 위한 필요성이 존재한다. 따라서 향 및 풍미를 중화시키기 위해서 향미제를 첨가하거나 수 겹의 레이어로 캡슐화를 시켜 어류 냄새 또는 풍미를 추가로 제거할 수 있었다. 식품을 제외하고도 지방 사료첨가제는 오메가-3 불포화지방산 함량을 높이고 콜레스테롤이 낮은 돼지고기를 생산할 수가 없다. 그리고 지방산염으로 된 제품의 경우 가축사료로 사용 시 제품의 용점이 높고 또한 이들 제품이 소화 흡수되기 위해서는 위의 산도에 의하여 결합된 금속성분이 재빨리 지방산과 유리되어야 하는데 실제로는 유리가 잘되지 않으므로 실제 가축의 소장에서의 흡수가 잘되지 않은 문제점이 있다. 따라서 오메가-3 지방산을 다량 함유하는 제품을 생산하기 위하여 악취 및 시안아이드(-CN) 독성이 제거된 수용성 아마씨유 함유 사료첨가제 조성물을 사료에 첨가하여 사료에 함유되어 있는 오메가-3 지방산인 리놀렌산, 에이코사펜타에노익산 및 도코사헥사에노익산 함량을 높이고 콜레스테롤 함량을 줄일 수 있어 가축 산업상 매우 유용할 것이다.

칼슘흡수 보조제 개발 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 방향으로 연구를 추진하여 칼슘의 무기나노 및 유기나노화 기술특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획이다. 강릉원주대학교에 따르면 모자반 추출물을 주요성분으로 함유하는 칼슘흡수 보조제를 개발하였는데, 단순 모자반을 건조 파쇄한 후, 여러 당류물질과 혼합 칼슘흡수 보조제를 제조하였다. 그 외, 일본의 칼슘흡수촉진조성물(1020077002699), 일본의 칼슘흡수촉진제(1020087019993) 등도 여러 칼슘결핍증과 관련된 성분과 혼합 조제하여 제약 소재를 목적으로 칼슘 혼합제를 개발하였다. 기존의 특허는 제품의 품질 향상 및 개발과 달리 단순 혼합제품에 치중되어 있으므로, 본 연구과제는 성인이 가장 많이 섭취하는 칼슘강화 커피제품 개발을 통해 출원할 계획이다. 칼슘강화 제품으로 칼슘이 코팅된 곡물(1020070133698, 1020057020875)이 다수를 이루고, 그 외 칼슘강화 마요네즈(1020070054939), 과일잼(1020060046616), 건강보조식품(1020080029417), 외국특허 과일

음료개발(1020087020407) 등이 있다. 소재면에서 칼슘강화 제품을 찾아보면, 탄산칼슘을 활용한 키토산 나노입자(1020080065279), 굴껍질 나노입자들이 그 주류를 이루고 있다.

## 2. 논문

아임계수나 초고압효소 처리에 관한 논문은 매우 적으며 아임계수의 경우 다당류 가수분해, 초임계수의 경우 산업폐기물 폐기처리기술에 집약되어 있다. 또한 기능성 소재로 활용하는 콜라겐의 경우 돈피와 생선껍질에 주로 연구소재로 활용되고 있는 실정이다. 오메가-3계 지방산의 인체에 미치는 영향에 관한 실험결과에서 관찰된 이론과 다른 측면의 연구결과도 보고되고 있다. 즉 토끼에게 무 콜레스테롤 사료와 1.5% 콜레스테롤 첨가 사료 2 mL의 정제 어유 농축물 첨가 사료를 각각 급여하여 사육한 연구에 따르면 토끼에게 어유를 급여하였을 때 오히려 혈중 콜레스테롤 함량이 증가하였는데 그러한 현상의 원인이 소화, 흡수된 어유가 체내 지단백에 혼입된 후 산화지단백이 되어 대사됨으로서 동맥경화의 진행에 영향을 주지 않았는가 추론했다. 이 실험은 동맥경화증의 발병에 있어서 그 의의를 지니며 이 연구의 결과에 비추어 볼 때 어유의 급여가 실험동물과 인체의 건강에 미치는 효과에 관한 연구가 더욱 많이 수행되어 명

오메가-3계 지방산은 인체 내에서 생성이 되지 않고 외부로부터 섭취해야 하는 필수지방산으로서 이러한 필수성은 식이로부터 섭취 부족 시 생겨나는 결핍증의 치료효과에 기인 한 다기 보다는 합성과정에 필요한 적당한 desaturase가 존재하지 않거나 효소활성이 제한되어 있기 때문에 그 필수성이 강조되는 물질로서 이 분야에 대한 관심이 더 많이 요구된다. 또한 오메가-3계 지방산이 필수지방산이므로 심혈관질환의 치료 및 예방과 관련, 어느정도 섭취해야 하며 부족 시 인체에 나쁜 영향을 막기에 충분한 양은 얼마인지에 대한 구체적 자료가 제시되어 있지 않은 실정이라 이에 대한 연구 활성화가 필요하다.

멸치가루를 활용한 칼슘강화소재개발, 레반을 이용한 칼슘흡수율 증가, PGA 보충을 이용한 골대사 관련연구, 버섯을 이용한 칼슘흡수증진, 불가사리칼슘을 이용한 체내흡수율 평가 등이 있다. 이들의 연구논문 경향은 칼슘흡수의 체내흡수율 증진을 위한 보조첨가제의 활용을 통한 칼슘대사 규명 및 골다공증에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 칼슘의 geling 기작을 통한 hydrogel입자 기술 개발이 다수 검색되어졌다. 대부분의 논문의 입자는 microcapsule의 크기로 입자조절이 어렵고, 나노입자 기술 개발은 미약한 것으로 나타났다. 칼슘입자의 유기태화 기술은 효소처리를 통해 얻어진 peptide에 칼슘이온을 붙여서 체내 흡수 이용률을 증진시키는 기술이 다수 검색되었다. 본 연구에서 개발된 초임계수를 활용한 고분자량의 단백질의 저분자화를 통한 펩타이드류에 Ca이온을 붙여 가용성 칼슘물질을 개발하고자 했다.

## 3. 제품 및 시장분석

콜라겐 소재를 이용한 제품은 다양하다. 그러나 새로이 기능성 소재로 각광받는 돼지 태반 콜라겐, 특히 콜라겐 펩타이드를 이용한 음료나 유가공품의 경우 전무하거나 일부 외국에서 수입하여 원료로 활용하고 있다. 따라서 본 연구에서는 돼지 태반 유래 콜라겐 펩타이드를 이용하여 고령화시대에 맞는 면역력이 증강되고, 칼슘흡수를 높이며, 노화를 지연시키는 콜라겐 펩타



이드 음료를 개발하고자 하며, 소재는 국내 및 해외에 수출하고자 한다. 칼슘강화 유제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 쇠퇴기에 접어들었으므로, 본 연구과제에서는 .칼슘강화 커피 및 차 개발 방향으로 연구를 추진하여 성인식 기호제품 에 주력하여 국내 및 국외에 판매할 계획임 기존의 병원에서 영양사 및 의사의 진단을 통해 공급받을 수 있었던 환자식을, 칼슘입자의 활용을 통해 노인식·환자식 제품의 상업적인 개발을 통해 일반 마켓에서도 구매할 수 있도록 범용화 한다. 올해는 건강기능식품 新 공전의 유예기간이 종료되면서 고함량 원료에 대한 관심이 폭발적으로 늘고 있다는 게 업계의 분석이다. 新공전의 내용을 보면 건강기능식품으로 인정받는 오메가-3 제품을 출시하기 위해서는 일일 섭취량을 EPA와 DHA의 합으로 500 mg~2,000 mg 수준에 맞춰야한다. 지금까지 일반적으로 사용된 DHA 18%, EPA 12% 원료로 이 규정을 맞춘다고 가정하면, 500 mg 캡셀을 기준으로 하루 4 캡셀 이상 섭취해야 한다는 결론이 나온다. 그러나 이런 실정으로는 상품성이 뛰어난 제품을 개발하기 어렵다. 먹는 양이 너무 많기 때문이다. 이 때문에 올해부터는 오메가-3 시장에 고함량 바람이 불어 닥칠 것이라는 예상이 많이 나온다. 많은 양을 먹어야하는 기존의 저가제품과 차별화하여 함량 높은 고급 제품이 시장의 한 축을 이룰 것이라는 분석이다. 이러한 관심을 반영하듯 원료시장에는 EPA나 DHA의 함량을 대폭 높인 고가 원료의 제품은 물론, 에스테르화 공정을 통해 공전의 기준규격을 맞춘 제품들의 출시가 많아지고 있다. 고급제품의 경우 EPA/DHA의 함량을 60% 이상으로 맞춰 1,000 mg 캡셀은 하루 1개, 500 mg 캡셀은 하루 2개 정도 섭취하는 형식이 될 가능성이 크다. 아직 이러한 원료의 거래가 활발하지는 않지만 조만간 큰 흐름이 될 것은 분명해 보인다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1 절 연구의 이론적, 실험적 접근방법

1. 제1세부과제 : 초고압 기술을 활용하여 실버세대를 위한 혈액이행력 우수 고기능성 콜라겐 펩타이드 가공기술 개발

(1차 년도)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
돼지태반의 성분분석(단백질, 지방, 수분, 비타민, 무기물)	단백질, 지방, 수분, 비타민, 무기물 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>삼우축산에서 제공 받은 돼지 태반을 수분, 조단백, 조지방, 조섬유, 조회분 분석을 통해 조성분 분석을 하였고, 아미노산 조성 분석을 통해 함유되어진 아미노산을 파악하였다.</li> </ul>
아임계수 추출 시스템 구축(현재의 초고압장치 reactor내에 가열 및 냉각장치 설치(온도, 압력센서, heater, cooler, by-pass valve)	온도, 압력센서, heater, cooler, by-pass valve	<ul style="list-style-type: none"> <li>1000bar에서 300~400℃ 사이까지 조절 가능한 reactor를 구축하였고, cooler의 기본적인 설계를 완료 하였다.</li> </ul>
아임계수를 이용한 돼지태반의 가수분해 공정 최적화, 콜라겐 단백질 가수분해능 분석	reactor 온도(200~400℃)와 압력(50~200 bar), 반응시간(1~20 min)에 따른 콜라겐 단백질 가수분해능 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 태반의 압력에 따라 큰 변화도는 없지만 온도와 합쳐질 때 시너지 효과를 얻을 수 있었고, 시간에 따른 변화도와 균질에 따른 가수분해능 분석을 하였다.</li> </ul>
유기산 촉매제를 이용한 아임계수 가수분해 공정 최적화	유기산 반응촉매제(유산, 초산, 구연산), pH (4.0~7.0) 변화에 따른 콜라겐 단백질의 가수분해능 분석, 올리고 펩타이드 생성 수율분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>유산, 초산, 구연산, 염산을 이용해 pH를 조절한 후 가수분해를 하였고, 기존의 가수분해능 분석 실험을 통해서 가수분해율을 파악 하였다.</li> </ul>
아미노산 및 콜라겐 펩타이드 분획 및 정제	아미노산 정량 및 콜라겐 펩타이드 분획 및 분자량 측정 glycine, di-, tri-peptide 분리	<ul style="list-style-type: none"> <li>분자량 1000 미만의 물질을 분리 할 수 있는 dialysis tube을 통해서 가수분해물의 아미노산을 정제</li> </ul>

(2차 년도)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>고압효소분해기법을 이용한 돼지 콜라겐의 가수분해능 분석 및 최적화: 단백질 분해효소 수준, 반응시간에 따른 유리아미노산, 올리고펩타이드 분석</p>	<p>단백질을 분해하는 대표적인 효소인 Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin 효소별 가수분해 정도 비교 분석하였고, 효소별로 압력에 따른 차이를 GPC, 유리아미노산, 전기영동, 아미노산 조성분을 비교 분석.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● GPC 분석 결과 대기압 보다 100~200 MPa에서 저분자 펩타이드를 구성하고 있지만 300 MPa 이상에서는 오히려 불활성 시키는 경향이 나타났으며, Pepsin의 경우 다른 효소의 분해 가수분해능이 낮은 것으로 사려 되었다.</li> </ul>
<p>고압효소분해기법을 이용한 아임계수 추출물(올리고펩타이드)의 가수분해능 분석 및 최적화: 단백질 분해효소, 압력수준, 반응시간에 따른 유리아미노산, 올리고펩타이드 분석</p>	<p>아임계수 처리와 효소 반응의 순서에 따른 가수분해 정도와 아임계수 처리 후 효소 반응시간에 따른 GPC, 전기영동을 이용하여 비교 분석.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 예비 실험을 통해 가수 분해 효율이 가장 좋은 Trypsin을 이용하여 아임계수 처리 후 효소 처리와 효소 처리 후 아임계수 처리를 비교 분석한 결과, 아임계수 처리 후 효소 처리 하였을 때 더 많은 저분자 펩타이드를 구성하였고, 효소반응의 실험 결과 반응 시간에 비례하여 가수분해 되는 경향을 보였다.</li> </ul>
<p>고압효소분해 및 아임계수 가수분해 통합 공정을 통한 돼지 태반의 가수분해능 분석 및 최적화: 최적의 고압 온도 및 효소반응시간, 아임계수 추출 온도, 시간 및 압력 산출</p>	<p>1차년도 실험을 통해 아임계수 처리가 돼지 태반 가수분해에 효과적이라는 결과를 바탕으로 돼지 태반에 적절한 효소, 압력, 농도 및 반응 시간에 따른 GPC, 아미노산 조성분, 유리아미노산, 수율, 전기영동을 통해 비교 분석 .</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 트립신을 200 MPa에서 반응 시켰을 때 가장 좋은 효소 활성도를 얻을 수 있었으며, 24 시간 효소반응 시 분자량 1000 미만의 펩타이드를 얻을 수 있었다. 또한 아임계수 처리 후 효소반응을 하였을 때 가수분해의 극대화를 시킬 수 있었다.</li> </ul>
<p>초고압 균질기(microfluidizer)를 이용한 콜라겐 펩타이드 추출물의 미세화</p>	<p>일정량 산 가수분해 된 시료를 microfluidizer를 이용하여 0.1, 500, 1000, 1500 bar의 압력에서 처리 후 particle size, zeta-potential 분석.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 압력이 증가할수록 particle size는 비례하게 감소하는 경향을 보이고 있으나, zeta-potential은 압력에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다.</li> </ul>

(3차 년도)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
아임계수를 이용한 돈피의 가수분해	안정성과 윤리적 문제로 콜라겐 펩타이드 음료 등을 개발하기 위해 돈피를 아임계수를 이용하여 가수분해를 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 300℃, 80 bar 의 아임계수로 가수분해한 결과 1000 Da이하의 가수분해물 생산이 가능했으며, 아미노산 프로파일링 결과, Gly 함량이 높은 비율을 차지했다.</li> </ul>
아임계 에탄올을 이용한 돈태반의 가수분해	다양한 농도의 에탄올을 아임계 공정의 미디엄을 사용하여 돈태반의 가수분해 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 유리아미노산, 분자량 분석 결과를 미뤄볼 때 에탄올 농도에 따른 가수분해 증진효과 및 저해작용은 없는 것으로 나타났다.</li> </ul>
실버세대용 기능성 유제품(아이스크림) 개발	다양한 농도의 콜라겐 펩타이드 첨가 요구르트 등과 같은 유제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 콜라겐 펩타이드 첨가에 따른 아이스크림의 품질변화 관찰을 통해 최적의 콜라겐 펩타이드 첨가 아이스크림 제조법 확인</li> <li>● 점도, 색도, 녹는 속도, 관능검사 등 다양한 아이스크림 특성변화를 관찰한 결과 콜라겐 펩타이드 농도 증가에 따라 점도는 감소하는 경향을 보였다.</li> </ul>

2. 제 1협동과제 : 고도 불포화 생리활성 지질류의 가용성 미세캡슐화 기술개발

(1차 년도)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
		<ul style="list-style-type: none"> <li>● Fish oil nanoemulsion 제조 유화제 종류 및 농도 선정 본 실험에서 fish oil nanoemulsion을 제조하기 위해 사용된 유화제는 Tween20과 lecithin 을 사용하였으며, 다양한 범위 (0.001~3.0)의 농도를 선택하여 에멀전을 제조하였다. 이를 바탕으로 하여 1차 에멀전을 생산하였다.</li> <li>● 제조공정 본 실험에서 사용된 fish oil의 녹는점을 확인하기 위해 DSC를 측정한 결과, 약 40</li> </ul>

<p>고도화 불포화 지방산 함유 지질의 가용화 저탄소 신가공법을 이용한 고효율 추출기술 개발 및 고도화 불포화 지방산의 가용화 미세캡슐화 기술 개발</p>	<p>Biopolymer(WPI,Pectin)의 multiple layer-by-layer 방법을 활용한 fish oil 입자 코팅기술 개발</p> <p>1. 지질입자가 코팅된 multilayer biopolymer 입자 제조</p> <p>2. 각 multilayer 코팅물질에 대한 물리화학적 특성분석</p> <p>3. 지질입자(fish oil)의 마스킹 유무 분석</p>	<p>도 부근에서 녹는점임을 확인할 수 있었다. 이에 따라 1차 에멀전의 제조는 오일, 유화제 및 증류수를 40℃로 설정한 후 실험을 시작하였다. 오일, 유화제 및 증류수는 설정된 농도 범위에서 weighing 한 후에 high speed homogenizer를 이용하여 11,000 rpm에서 3분간 교반시켰다. 1차 균질과정을 통해 얻어진 O/W emulsion을 다시 Microfluidizer를 이용하여 20,000 psi에서 2번 통과시켜 2차 균질 과정을 실시해주었다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 오일, 유화제 및 증류수는 설정된 농도 범위에서 weighing 한 후에 high speed homogenizer를 이용하여 11,000 rpm에서 3분간 교반시켰다. 1차 균질과정을 통해 얻어진 O/W emulsion을 다시 Microfluidizer를 이용하여 20,000 psi에서 2번 통과시켜 2차 균질 과정을 실시해 주었다.</li> <li>● Layered emulsion 제조 바이오폴리머 용액제조 본 실험에 사용된 바이오폴리머는 2차 layer의 경우에는 키토산, 3차 layer의 경우에는 펙틴이 이용되었다. 키토산은 0.001에서 0.5 wt%농도로 0.1M acetate buffer (pH 3)에 3시간 이상 용해시킨다. 펙틴은 0.01에서 2.0 wt%농도로 0.1M phosphate buffer (pH 7)에 3시간 이상 용해시킨다.</li> <li>● 2차 에멀전 제조과정 2차 에멀전 제조는 1차 에멀전과 키토산 용액을 1:1과 1:2 비율로 30분 동안 교반한 후 하루 보관 후 3차 에멀전 제조에 이용된다.</li> <li>● 3차 에멀전 제조과정 3차 에멀전 제조는 2차 에멀전과 펙틴 용액을 1:1과 1:2 비율로 30분 동안 교반한 후 하루 보관 후에 각 물리, 화학적 분석을 실시한다.</li> </ul>
--	---	--

		<ul style="list-style-type: none"> <li>● 입자크기 및 제타전위 측정-제조된 각각의 에멀전은 입도측정기(Zeta-sizer, Marlvern Instruments Ltd, UK)을 이용하여 입자분포도, 평균입자크기, 제타전위를 light scatter diffraction 원리를 이용하여 측정하였다. 에멀전 종류에 따라 증류수 및 buffer로 적절히 희석하여 분석을 실시하였다. 이 때 측정된 제타전위를 이용하여 사용된 유화제나 바이오폴리머의 CMC (Critical Micelle Concentration) 구간을 확인하고 이들의 최적 농도를 구할 수 있다.</li> <li>● 입자 코팅효율 측정 본 실험에서 입자의 코팅효율은 indirect methods를 이용하여 측정하였다. 제조된 각각의 에멀전과 핵산을 1:1로 잘 섞은 후, 2000rpm에서 30분간 centrifugation을 실시하였다. 이 때 모아진 상등액을 215 nm 파장에서 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 free fish oil을 측정하였다.</li> <li>● 입자코팅효율 산출 식은 다음과 같다. <math display="block">EE (\%) = \frac{[\text{Actual amount of FO content}]}{[\text{Total amount of FO content}]} \times 100</math></li> <li>● 산화안정성 측정 산화안정성 측정은 TBA (Thiobarbituric acid) value를 측정함으로써 분석하였다.</li> <li>● 제조된 에멀전과 TBA 시약을 섞은 후 100도에서 약 15분간 방치하였다. 상온에서 식힌 샘플은 3000rpm에서 20분간 원심 분리 후 상등액을 취해 흡광도를 측정하여 다음 식을 이용하여 TBA value를 계산하였다 <math display="block">TBA \text{ value} = OD * 5.88 \text{ (상수)}</math></li> <li>● 투과도 측정 제조된 에멀전을 적절히 희석한 후 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 파장 215 nm 파장에서 transmission (%) 측정 값을 기록하였다.</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>● 변성단백질 용액 제조 유청단백질 (Whey Protein Isolates; WPI) 20wt%을 완전히 녹을 때까지 증류수에 넣</li> </ul>

<p>제품별 최적 공정조건 확립</p>	<p>Biopolymer(WPI,Pectin) 의 hydrogel 입자내 포집방법을 활용한 fish oil 입자 코팅기술 개발</p> <p>1. 지질입자와 바이오폴리머와의 물리화학적 특성</p> <p>2. 지질입자가 코팅된 바이오폴리머 입자제조</p> <p>3. 지질산화 최대 억제를 위한 바이오폴리머 입자 디자인</p>	<p>고 교반시킨다. 용액이 다 녹은 후 filter paper를 이용하여 여과한 후 1N NaOH로 pH 조절한다 (pH 8). 그 다음, 단백질 용액을 80℃에서 변성시킨다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● High methoxyl pectin (HMP) 용액의 제조</li> <li>● HMP (High methoxyl pectin, Sigma. Co. Ltd. USA) 4 wt%를 증류수에 넣고 완전히 녹을 때까지 교반시킨다. 펙틴이 완전히 녹은 후 1N NaOH를 넣어주며 pH를 8로 맞춰준다.</li> <li>● Water in water emulsion (W/W) 확인 제조된 변성 단백질용액과 펙틴을 동일한 비율로 섞어 premixing 한다. 현미경 관찰 시 원형의 droplet이 보이면 다음 단계의 실험을 진행 한다</li> <li>● Oil in water emulsion 제조 Red oil과 Tween 20 0, 1% 비율을 넣은 Fish oil을 변성 단백질 용액에 넣고 1분간 교반시킨다.</li> <li>● Oil in water in water emulsion (<math>O/W_{\text{protein}}/W_{\text{polysaccharide}}</math>) 제조 완성된 (5)번 샘플을 High speed homogenizer로 5분간 10,000 rpm에서 처리한다. 1차로 얻어진 샘플에 1:1의 양의 펙틴을 넣은 후 premixing 하여 현미경 관찰한다.</li> <li>● Oil in water in water emulsion (<math>O/W_{\text{protein}}/W_{\text{polysaccharide}}</math>) 제조 완성된 (5)번 샘플을 High speed homogenizer로 5분간 13,000 rpm에서 처리한다. 1차로 얻어진 샘플에 1:1의 양의 펙틴을 넣은 후 premixing 하여 현미경 관찰한다.</li> <li>● Heating 현미경 관찰하여 원형 모양의 droplet이 형성이 되면 변성된 Protein과 pectin을 제조하여 70, 80, 90 그리고 100℃에서 10분간 중탕 처리한다.</li> <li>● Characterization 측정</li> </ul>
---------------------------	---	---

		<p>입자크기 측정 및 zeta-potential 측정 제조된 oil in water emulsion 시료의 입자 분포도, 평균입자크기, zeta-potential을 light scatter diffraction 방법을 통해 측정하였다. 시료의 종류에 따라, 증류수로 10배, 100배 희석한 후 1 mL을 취하여 Zetasizer® (Malvern Instruments, UK)로 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 현미경 관찰 W/W emulsion 형성 여부를 확인하기 위해서 광학현미경 (Olympus, Japan)에 camera를 연결시켜 image capture를 실시해서 분석하였다.</li> </ul>
--	--	---

(2차 년도)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
고도 불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐화 제조 기술 개발 및 공정 최적화	미세캡슐화 최적 조건 설정(지질함량 약 30% 이상, DHA 함량 7~8%) 및 각 제조 제형별 Surface oil 함량 측정.	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 최적 조건 설정 고도불포화 지방산 함유 지질의 심제를 최적 봉입할 수 있는 벽제의 선정 및 배합비 탐색을 위하여 124회의 캡슐 제조 스크리닝이 이루어졌으며, 심제와 벽제의 유화제형 제조를 위하여 homo-mixer 및 고압유화기를 사용하였다. 이렇게 제조한 유화제형의 미세분말화를 위하여 분무건조 방법을 채택하였다.</li> <li>● 미세캡슐 봉입효율 평가 제조한 캡슐의 봉입효율 평가를 위하여 Soxhlet 추출을 통한 Surface oil 함량 측정이 이루어졌다. Surface oil 함량 측정 시 Soxhlet 추출 방법으로 제형 제조 후 5g 채취하여 Diethyl ether로 60분간 Reflux system 이용 추출하고, 용매 휘발 후 10 5°C 건조 후 칭량하여 함량 측정하였다.</li> <li>● 산화 안정성 측정 Surface oil 함량 0.4%와 5%의 일정기간에 따른 Peroxide value 측정. 측정 시 초산과 클로로포름 3:2의 혼합용매를 사용하여 샘플을 용해하고 포화 KI 용액 첨가 후 0.01N Sodium Thiosulfate 로 적정하기 전 1분간 암소에 방치하고 증류수 첨가 후</li> </ul>
고도 불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐화 제형별, 환경별 제형 안정성 측정	Surface oil 함량 0.4%와 5%의 저장 기간에 따른 Peroxide value(POV) 측정 및 공기 노출 환경 별 일정 기간에 따른 POV 측정.	



		<p>적정. 공기노출, 질소조건, 진공조건 3가지 조건 별 일정 기간에 따른 POV측정.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 입자크기 및 제타전위 측정: 입도분석기 (Master sizer, zeta-sizer)을 이용하여 입자분포도, 평균입자크기, 제타전위를 light scatter diffraction 원리를 이용하여 측정</li> <li>● SEM 측정: 전자현미경을 통해 분말화된 파우더 제형을 확인</li> </ul>
<p>습식 분산매의 종류 (pH, 카페인, 염분 등)에 따른 오일 유리 속도 및 산화안정성 측정</p>	<p>1차년도 제조된 에멀전 입자에 관하여 오일 유리속도 및 입자 안정성, 산화안정성 측정</p>	

(3차 년도)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>고도불포화 지방산 강화 제품 개발 및 특성 분석</p>	<p>고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가한 분유, 우유, 요구르트, 오렌지 주스, 커피 분말, EN 영양식 관능검사</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 관능검사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분유 : 4종의 시료를 분말 및 10% 용액으로 맛과 냄새에 대한 관능검사를 실시하였다. Fresh한 고도불포화 지방산 함유 지질 미세캡슐 제형을 첨가한 분유를 기준으로 냄새 및 맛의 차이 정도에 따라 -4에서 4점으로 평가하였다.</li> <li>- 우유, 요구르트, 오렌지 주스, 커피 분말, EN 영양식 : 성인 남녀 25명을 대상으로 하여 외관의 기호도, 이미/이취의 정도, 종합선호도에 대한 5단계 평점법(1점은 매우 나쁘다, 2점은 나쁘다, 3점은 보통이다, 4점은 좋다, 5점은 매우 좋다)으로 평가하였다.</li> </ul> </li> <li>● 관능검사 결과에 대한 통계 SPSS(Statistical Package for Social Science)에 의한 ANOVA 및 Duncan의 다범위 검정(Duncan's multiple range test)으로 진행하였고, 5% 수준에서 각 시료간의 유의적인 차이를 검증하였다.</li> </ul>
	<p>최적의 포물레이션으로 제조된 어유에멀전을 첨가한 pork patties 제조에 따른 시제품 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 최적의 포물레이션 확립: 2차년도 연구에서 수립된 제조 조건에 따라 1, 2, 3차 에멀전을 제조하였다.</li> <li>● 어유 에멀전을 포함한 패티제조</li> <li>● 이화학분석</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>● 기간에 따른 침전 유무 및 색도 변화 여부 관찰: 각 시료 별 농도에 맞춰 고도불포화 지방산 함유 지질 미세캡슐 제형을</li> </ul>

Encapsulation시킨 고도불포화 지방산 강화 제품의 안정성 테스트	유통기한 내 고도불포화 지방산 강화 제품의 저장 안정성을 확인	첨가하고, 요구르트를 제외한 우유, 주스 및 EN 영양식은 85°C 에서 30분간 저온 살균. 이 후 우유 및 요구르트는 7일, 주스는 25일, EN 영양식은 1년 동안 냉장보관 하면서 시간 경과에 따라 침전발생 및 색도 변화 여부를 확인하였다.
--	------------------------------------	---

**3. 제 2협동과제 : 난용성 칼슘제제의 가용화 기술 및 체내 흡수력이 우수한 칼슘 복합제제 개발**

(1차 년도)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
건식 나노분말화의 공정과 제품의 표준화 (원재료 표준화, 공정 표준화, 완제품 표준화)	기능성 향상을 위한 굴껍질 및 계란껍질 나노분말의 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 입자크기 측정, 색도, SEM, TEM, FT-IR, ICP정량분석</li> <li>● 골다공증 유발 Rat를 통한 동물실험</li> </ul>
굴껍질과 난각을 통해 얻어진 나노분말의 특성	굴껍질 및 계란껍질 나노분말의 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 칼슘과 인의 함량(혈중, 신장, 간, 대퇴골, 소변, 변)</li> </ul>
골다공증 치유를 위한 동물실험을 통한 굴껍질 및 난각나노분말의 생이용성 증진 효과 검증	논문, 서적, 사전연구(제 2협동: 광해수 교수 연구팀) 등을 통한 기능성 물질 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 생화학적 검사: Alkalinephosphate, Osteocalcin, Deoxypyridinoline, Creatinin</li> <li>● 골대사검사: 골밀도, 골강도, 골소주, 골조직</li> </ul>

(2차 년도)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
키 성장을 위한 동물실험	나노분말의 생이용성 증진 효과를 검증하기 위해 키 성장을 위한 동물실험을 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 체중변화 측정</li> <li>● 골성장 측정(골밀도 측정)</li> <li>● 성장판 관찰(마이크로 시티 사진을 이용하여 측정)</li> <li>● ICP를 통한 칼슘과 인의 함량(혈중, 신장, 간, 대퇴골, 변)</li> <li>● 혈중 IGF-1 농도의 측정</li> </ul>
나노분말의 수용화	논문, 서적, 사전연구 (제 2협동: 광해수 교수 연구팀) 등을 통한 기능성 물질 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>● PGMS의 micelle 형성분석(제타전위 이용)</li> <li>● 산성조건에서 용해도 측정(ascorbic acid)</li> <li>● 나노분말의 분산 최적 조건 확립(PGMS)</li> </ul>

		용액의 농도, 반응시간 조절)
--	--	------------------

(3차 년도)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
나노칼슘을 첨가한 포켓밀크 개발	시판되고 있는 포켓밀크에 경제적이고 공정의 효율성 증대를 위한 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 무기/유기 나노칼슘의 환자식, 노인식 최적 영양 조성 및 물성개발, 완제품 개발</li> <li>● 제품공정의 효율성 증대</li> <li>● 제품의 가격 경제성</li> </ul>
나노칼슘을 첨가한 우유 개발	논문, 서적, 사전연구 (제2협동: 곽해수 교수 연구팀) 등을 통한 수용성화 최적화 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 예비 실험을 통해 가수 분해 효율이 가장 좋은 Trypsin을 이용하여 아임계수 처리 후 효소 처리와 효소 처리 후 아임계수 처리를 비교</li> <li>● 분석한 결과, 아임계수 처리 후 효소 처리 하였을 때 더 많은 저분자 펩타이드를 구성하였고, 효소반응의 실험 결과 반응 시간에 비례하여 가수분해되는 경향을 보였다.</li> </ul>
나노칼슘을 첨가한 요구르트 개발	나노칼슘을 첨가하여 최적 영양 조성 및 물성인 제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 트립신을 200 MPa에서 반응 시켰을 때 가장 좋은 효소 활성도를 얻을 수 있었으며, 24 시간 효소반응 시 분자량 1000 미만의 펩타이드를 얻을 수 있었다.</li> <li>● 또한 아임계수 처리 후 효소반응을 하였을 때 가수분해의 극대화를 시킬 수 있었다.</li> </ul>
나노칼슘의 안정성 및 생체이용률	안정성의 문제가 가장 대두되고 있는 나노칼슘의 독성확인 및 생체흡수율실험 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Caco-2 cell 에 나노칼슘을 가하여서 독성확인 (cytotoxicity analysis)</li> <li>● <i>In vitro</i>와 <i>In vivo</i>를 통하여 생체이용률 확인</li> </ul>

4. 제 3협동과제 : 난용성 소재 가용화에 따른 기능성 및 안정성 평가

(1차 년도)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
		<ul style="list-style-type: none"> <li>● 나노화에 따라 나노-A, 나노-B, 나노-C의 흡수율 평가 실시</li> <li>● 난소 절제로 인해 혈청과 간의 감소된</li> </ul>

<p>칼슘 소재의 생체이용을 평가</p>	<p>칼슘의 흡수율을 everted sac model을 이용하여 평가 및 난소젤제 모델을 이용하여 평가</p>	<p>칼슘 농도를 칼슘 처치로 증가시킬 수 있는데 이러한 경향은 칼슘 형태에 따라 정도의 차이를 보이며 나노칼슘은 패각칼슘보다 증가 정도가 큰 경향을 나타냈다</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 장에서의 흡수율을 보면 회장(pH 7.4)에서 흡수율이 높은 경향을 나타냈다. 분획에 따른 칼슘시료의 흡수율을 보면, 십이지장 환경에서 입자의 크기가 작을수록 흡수율이 높게 나타낸 것을 확인</li> </ul>
<p>가용화 콜라겐의 흡수율 평가</p>	<p>Frantz cell model을 이용하여 평가 및 Everted sac model을 이용하여 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● protein의 함량은 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 시간이 흐를수록 콜라겐의 가수분해 시간이 많을수록 피부 투과율이 유의적으로 증가함.</li> <li>● 가수분해 시간별 장내 흡수율을 보면 유의적으로 차이가 없음.</li> </ul>
<p>가용화 지방산의 흡수율 평가</p>	<p>Frantz cell model을 이용하여 평가 및 rat model을 이용하여 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 혈중 지방산의 농도는(특정 지방산 함량 / 총 지방산 함량 × 100)으로 나타내었다. DA1, DA5, NS5에 비해 DA6, NS6를 투여한 경우가 투여 후 혈 중 지방산의 농도는 4시간째 급격한 차이를 보임.</li> <li>● Crude한 oil 보다는 emulsion된 oil의 장 흡수율이 높았으며, Lecithin만 처리된 DA2(NS2)보다는 Lecithin 외에 Chitosan solution이 첨가된 DA3(NS3)나 Chitosan solution과 Low methoxyl pectin solution이 첨가된 DA4(NS4)에서 유의적으로 높은 투과율을 보임.</li> </ul>
<p>가용화 콜라겐의 melanocyte를 이용한 활성평가</p>	<p>HaCat cell에서 활성평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● HaCaT cell에 Raw collagen의 경우에는 UVB를 처리하지 않은 군에서와 같이 10 µg/mL의 농도부터 세포독성이 나타났으며, 세시간 가수분해 콜라겐과 세시간 가수분해 콜라겐을 소화효소처리한 군의 경우 유의적인 차이는 없지만 처치 농도가 높아질수록 UVB로부터 세포를 보호하는 경향을 보임.</li> <li>● 농도가 높아질수록 MMP-2의 발현이 감소하기 시작하여 농도 비례적으로</li> </ul>

		MMP-2의 발현을 저해하는 것을 확인함.
--	--	-------------------------

(2차 년도)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
가용화 칼슘 활성 평가	<p>난소절제 모델을 이용한 칼슘소재의 활성 평가</p> <p>카페인, 카테킨, 식이섬유 혼합 처치시의 가용성 칼슘의 활성 평가</p> <p>혈액분석 및 Micro-CT를 이용한 칼슘 제재로서의 활성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 난소절제 모델 흰쥐를 이용한 패각칼슘(OS Ca)과 나노칼슘(Nano Ca)의 체내 이용성 및 생리적 기능 평가 실시</li> <li>● 저칼슘 식이를 이용하여 칼슘 형태에 따른 체내 칼슘의 함량, ALP 및 osteocalcin 농도, DPD 배설량의 변화를 측정함으로써 확인한 칼슘 이용성은 나노칼슘 처리 시에 더 효과적으로 확인.</li> <li>● 대퇴골 골밀도 및 골함량은 칼슘처리에 따라 증가되는 경향을 나타냈으며, 나노칼슘 처리 시에 가장 좋은 결과를 나타냄</li> </ul>
가용화 콜라겐의 활성 평가 실험	<p>Hairless mouse에 UV조사하여 피부에 대한 활성 평가</p> <p>소재 피부처리군, 소재 식이섭취군, 소재 식이섭취/피부처리군으로 구분하여 먹고 바르는 효과 평가</p> <p>항노화, 항주름, 미백 등 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Hairless mouse에 UVB 조사 후 돈태반 가수분해 콜라겐의 경투여, 경피투여, 경구 및 경피 동시 투여를 실시하여 효능평가</li> <li>● 피부수분보유량 증발량 측정결과 경구 투여군에서 유의적인 효과를 나타냄. 또한 멜라닌, 홍반 측정결과 콜라겐의 미백 효과는 미미한 것으로 나타났다.</li> <li>● 육안으로 Hairless mouse의 주름을 측정 한 결과 시료처리군의 주름이 UVB보다 적었으며, 특히 경피투여군의 주름이 적었다.</li> </ul>
가용화 불포화지방의 활성 평가	<p>콜레스테롤 저하 효과: 콜레스테롤 과량 투여로 인한 실험모델 이용 일반식이 대조군(normal diet group; N-control), 고콜레스테롤 식이 대조군(hypercholesterole</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Fish oil에 Internal standard 로 tritridecanoil을 첨가하여 가용화시킨 fish oil과 raw fish oil 각각을 경구 투여.</li> </ul>

	mic diet group; H-control), 가용화소재군, 가용화 전소재군  혈액분석, 장기무게 및 간조직내 지질성분 분석, 분변내 지질성분 분석 및 담즙산 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 걱정시간마다 혈액을 채취하여 전처리 후 GC를 이용하여 혈액내 조성 성분과 IS 비교 및 평가.</li> </ul>
--	--	---

(3차 년도)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
칼슘 소재 급성/ 아급성 평가	<p>급성독성평가 (단회경구투여)</p> <p>아급성독성 (14일 경구투여)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 폐각칼슘에 대한 독성 실험을 진행한 결과, 체중증가량, 식이섭취의 변화에 control과 실험 평가군 사이에 유의적인 차이가 없음.</li> <li>● Hematological parameters에서의 control과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없음.</li> <li>● 모두 혈액학적 지표에서 폐각칼슘 군과 control군 사이에 유의적인 차이가 없었다. 혈액학적 지표의 경우 acute와 subacute test에서는 독성이 관찰되지 않았다.</li> </ul>
불포화지방산 소재 급성/아급성 평가	<p>급성독성평가 (단회경구투여)</p> <p>아급성독성 (14일 경구투여)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 체중증가량, 식이섭취의 변화에 control과 실험 평가군 사이에 유의적인 차이가 없음.</li> <li>● 전혈(whole blood)에서의 혈액지표들을 평가한 결과 모든 Hematological parameters에서의 control과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없음.</li> <li>● Acute test 결과 male group에서의 Total protein의 수치에서 DHA 실험군의 수치가 control과 유의적인 차이를 보였으나, 정상범위내의 수치이므로 독성과는 무관.</li> <li>● 간, 신장, 심장, 비장 등의 무게 변화는 control과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없음.</li> <li>● 안전성이 확보되어 있고, Acute과 subacute test 결과 독성이 없는 것으로</li> </ul>

<p>가용화 콜라겐의 피부감작</p>	<p>1차 피부자극실험</p> <p>피부감작성실험</p> <p>혈액 내 콜라겐 함량 측정</p>	<p>로 사료됨.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 대조군(생리식염수)과 시험군(SPE 10%) 모두에서는 부종과 홍반이 전혀 관찰되지 않음.</li> <li>● Draze법에 의한 1차 피부자극지수(primary irritation index, P.I.I.)를 산출한 결과 대조군은 0.08, SPE 10%군은 0.48로 모두 practically non-irritation로 나타남. SPE의 경우 10%의 고농도로 적용해도 P.I.I.가 0.48로 약간의 자극은 관찰되었으나 이는 비자극성에 해당하는 자극으로 특히 실제로 임상에서는 이보다 낮은 용량을 적용할 경우가 많을 것으로 피부안전성은 충분하다고 판단됨.</li> <li>● SPE로 처리한 군의 경우 약한 홍반과 부종이 관찰되기는 하였지만 평균 감작반응이 6.67%로 생리식염수로 처리한 음성대조군과 같이 grade I으로 안전성에 문제가 없는 것으로 판단됨.</li> </ul>
--------------------------	---	---

\* 연구를 수행한 연도만 기재

## 제 2 절 세부연구수행 결과

### 1. 제 1세부과제

#### 1.1. 초고압 기술을 활용하여 실버세대를 위한 혈액이행력 우수 고기능성 콜라겐 펩타이드 가공기술 개발

##### 가. 연구 개요

본 연구는 가축 폐기 자원인 돼지 태반 콜라겐을 이용한 저분자 가수분해 peptide 생산을 위한 기술 개발을 목표로 하고 있다. 1년차 연구과정을 통하여 아임계수 처리 공정(170°C 37.5 MPa)을 이용한 콜라겐 가수분해가 가능함을 보였다. 반면 아임계수 처리된 콜라겐 가수분해물은 분자량이 5,000 Da 이상으로 관찰되었고, 따라서 본 연구에서 목표로 하는 저분자량 펩타이드 생산(<5,000 Da)을 위하여 보다 높은 아임계수 처리 조건(특히 온도) 또는 가수분해 효소의 응용이 요구되었다. 이에 따른 후속 연구의 일환으로서 2년차 연구에서는 다음의 목표를 설정하였다. 특히 본 연구에서는 효소의 선택 및 기질 특이성의 확인, 통합 공정 시스템의 가능 유무 및 가수분해 펩타이드의 분리성을 중점적으로 평가하고자 하였다.

- 고압 효소 분해기법을 이용한 돼지 태반 콜라겐의 가수분해능력 분석 및 최적화
- 고압 효소 분해기법을 이용한 아임계수 추출물의 가수분해능력 분석 및 최적화
- 고압효소분해 및 아임계수 가수분해 통합 공정 개발
- 초고압 균질기를 활용한 콜라겐 펩타이드 추출물의 미세화
- 아미노산 및 콜라겐 펩타이드 분획 및 정제

3년차 연구에서는 1, 2년차에서 개발된 난용성 물질의 가용화 기술을 이용하여 생산된 저분자 콜라겐 펩타이드를 첨가한 기능성 시제품을 개발하였다. 시제품 종류로는 콜라겐 펩타이드 유제품 및 음료이며, 시제품의 관능적 및 물성학적 특성을 관찰하였다.

##### 나. 태반의 가수분해를 위해 개발된 초고압 시스템의 최적화

###### (1) 태반 가수분해를 위한 초고압 시스템의 개발

아임계 조건에서 태반의 가수분해를 위하여 초고압 시스템이 본 연구실에서 개발되었다 (Figure 3.2.1). 본 시스템은 5 L 용량의 시료 주입부와 직류형 온도조절기와 연결된 두 개의 가열 시스템을 시료주입부의 외벽과 중심부에 장착하고 있으며, 목적에 따라 하나 또는 두 개를 사용하여 온도조절을 할 수 있다. 내부의 온도는 조절장치에 의해 500°C 까지, 압력은 1000 bar 까지 조절이 가능하다.

###### (2) 초고압 시스템의 온도 조절 속도 측정 결과

초고압 시스템은 두 개의 온도조절용 히터로 가열이 가능하고, 따라서 온도가 상승하는 속도도 달라진다. 다음 그림 (Figure 3.2.1)은 하나 또는 두 개의 히터를 사용했을 때 온도상승 속도의 차이를 보여준다. 하나의 히터를 사용 시, 분당 1.3°C의 속도로 온도가 상승하는 반면 두 개



의 히터를 사용하면 그의 4.9배 정도인 분당 6.4℃ 로 온도 조절이 가능하고 따라서 1시간 내에 400℃로 가열 할 수 있다.

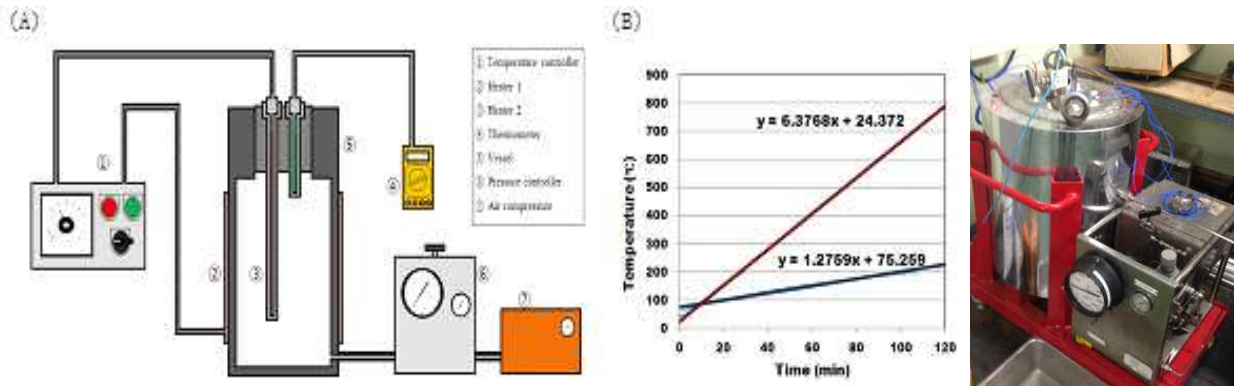


Figure 3.2.1 Schema of high presser system developed for collagen hydrolysis and increasing rate of temperature using controller.

다. 돼지 태반의 전처리 과정 최적화 및 성분 분석

(1) 돼지 태반의 전처리

돼지 태반은 삼우축산에서 제공받았으며, 이는 분만 후 바로 수거, 전처리 전 까지 동결보관 하였다. 해동 후 태변과 같은 이물질을 제거하고, 세척과 세절한 태반을 4℃ 에서 하룻밤 동안 물에 침지하여, 여분의 혈액을 제거한다. 완전히 세척한 태반은 약 두 배의 물을 넣고 균질화 과정을 거치고, 3000 rpm 으로 20분 간 원심 분리하여 침전물을 수집한다. 침전물은 따로 분리 하고 2배의 증류수를 첨가하여, 약 5%로 고형분의 함량을 조절하고 가수분해 실험에 사용한다 (Figure 3.2.2).

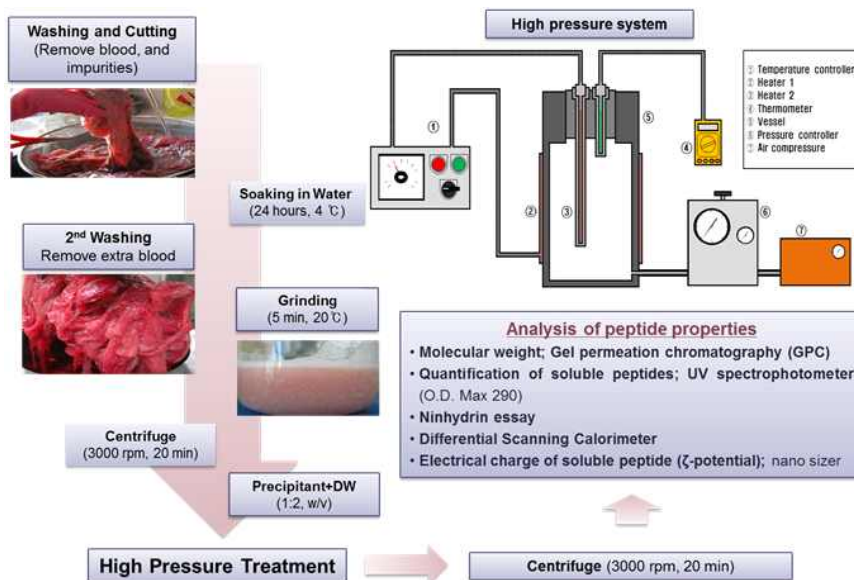


Figure 3.2.2 Preagreement of porcine placenta and hydrolysis process using high presser system.

(2) 돼지 태반의 조성분 함량 분석 결과

돼지 태반은 전처리 후 수분함량, 조단백질, 조지방, 조섬유, 무기질 등의 함량을 측정하였다 (Table 3.2.1). 전처리 하지 않은 태반의 전체 고형분의 함량은 약 20%로 이 중 단백질의 함량이 84 wt% 로 가장 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 미량의 지방 (9.07 wt%) 과 무기질 (6.94 wt%)이 함유되어 있으며, 조섬유는 거의 존재하지 않는 것으로 나타났다.

Table 3.2.1 General composition of porcine placenta from proximate analysis

Composition	Cont. (wt%)
Protein	84.00
Lipid	9.07
Fiber	0.00
Ash	6.94

라. 유기산을 이용한 태반의 가수분해

(1) 유기산의 종류에 따른 태반의 가수분해 특성 분석

○ pH와 Zeta potential의 변화

유기산의 종류와 함량이 태반 단백질의 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1 M 의 아세트산, 구연산, 유산 및 염산을 이용하여 태반용액의 pH를 4, 5로 조절하고, 5일간 가수분해 하였다. pH 4로 조절한 태반용액의 경우 가수분해가 진행되는 과정에서 유기산의 종류에 따라 pH 가 증가하는 경향을 나타내었는데, pH 5로 조절한 경우 변화는 있으나 증가하는 양상은 보이지 않았다. Zeta potential의 경우도 pH 4의 경우 1일 동안 소폭 양이온으로 변하는 현상을 보였으나 pH 5의 경우 2일 째 이후 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

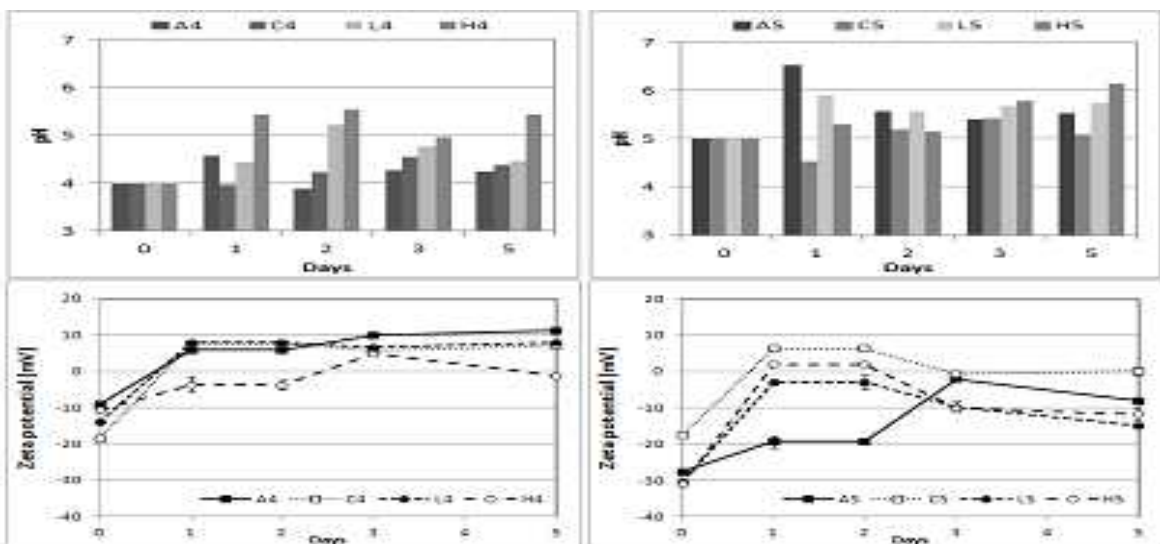


Figure 3.2.3 Effect of acid type on the pH and zeta potential during Plx hydrolysis.

○ 색도 측정 결과

가수분해가 이루어지는 동안 각 24시간 마다 시료를 채취하여 원심분리하고, 상등액을 분리, 색의 변화를 측정하였다. 가수분해가 진행되면서 전반적으로 redness는 24시간 이후부터 감소하는 경향을 보이고 있으나, yellowness와 lightness에는 유의적인 변화가 보이지 않았고, 유기산에 따른 차이도 나타나지 않았다.

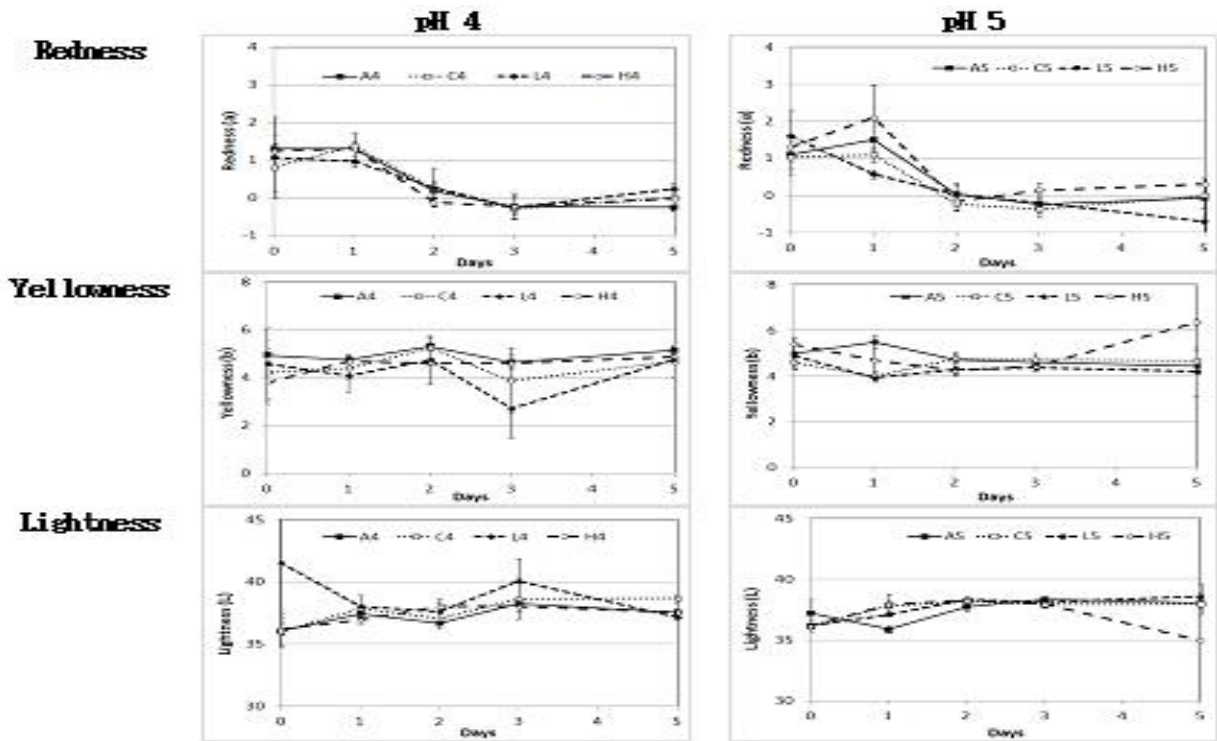


Figure 3.2.4 Color property of Plx peptides during hydrolysis depend on acid type.

○ 펩타이드 함량

펩타이드의 함량은 상등액을 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 285 nm에서의 흡광도를 측정하여 분석하였다. pH 4 용액의 경우 24시간 동안 증가하고 이후 꾸준히 함량을 유지하는 것으로 나타났지만, pH 5의 경우 아세트산 용액을 제외하고 3일 이후부터 함량이 소폭 증가하는 것으로 나타났다. 아세트산을 사용한 경우 24시간에서 가장 높은 함량을 보이다 다시 감소하는 경향을 나타내었다.

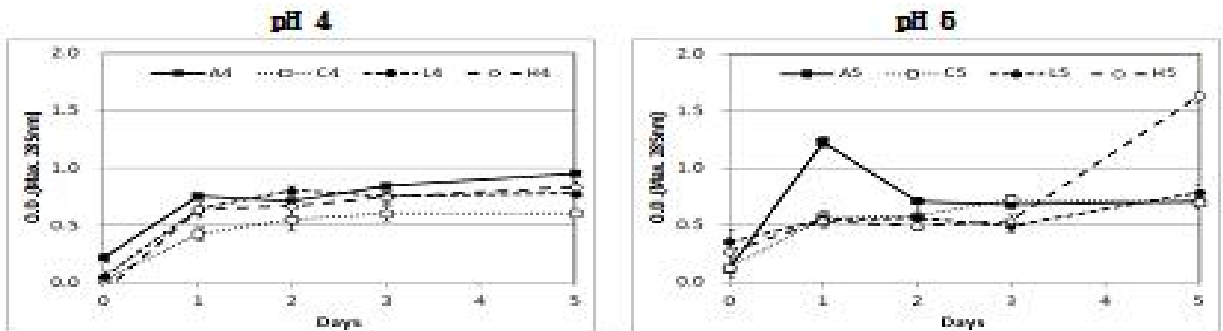


Figure 3.2.5 Effect of acid type on the peptides quantity during hydrolysis of Plx.

○ 분자량 측정결과

가수분해 된 펩타이드의 분자량을 gel permeation chromatography로 측정한 결과 분자량은 평균 1,000 kDa 정도로 나타났다. pH 4의 경우 보다 pH 5에서 가수분해가 진행될수록 분자량이 감소하는 것으로 나타났고, 염산을 사용한 경우 분자량이 18 kDa 까지 감소하였다.

Table 3.2.2 Molecular weight of Plx peptides during hydrolysis as function of acids type

pH 4	Molecular weight (Da)	Acetic acid	Citric acid	Lactic acid	Hydrochloric acid
	Mw	3,430,449	692,075	1,728,950	823,105
	Mp	110,844	48,833	55,791	18,067
pH 5	Molecular weight (Da)	Acetic acid	Citric acid	Lactic acid	Hydrochloric acid
	Mw	29,241	48,333	27,551	77,570
	Mp	35,070	25,594	20,329	12,631

○ 수율 측정결과

가수분해가 진행됨에 따라 침전물의 함량은 감소하고, 상등액의 고형분 함량은 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 아세트산과 염산을 사용할 경우 더욱 뚜렷하게 나타났고, 특히 pH 6의 경우 90% 이상이 수용성 펩타이드로 분석되었다.

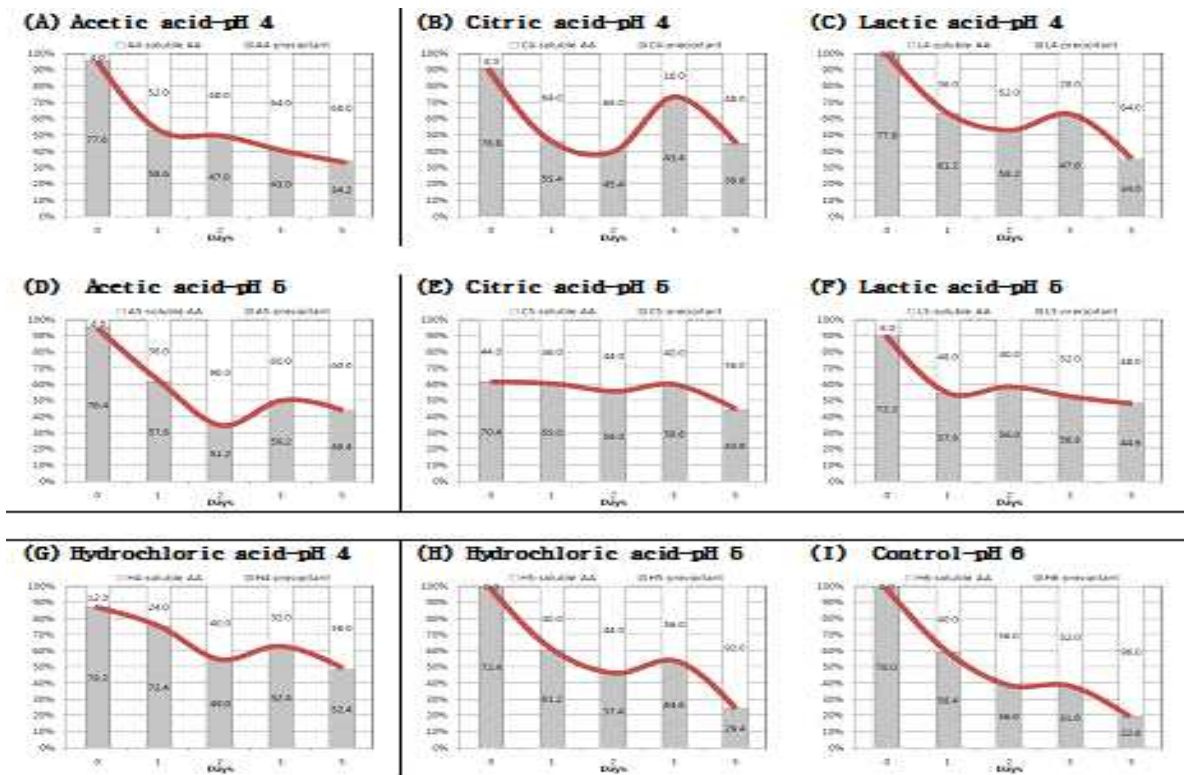


Figure 3.2.6 Yield of hydrolysis process as function of acid type and pH.

마. 초고압을 이용한 태반의 가수분해

(1) 가수분해 시간의 최적화

○ pH와 Zeta potential의 변화

초고압을 이용하여 가수분해 시간에 따른 펩타이드 수용액의 Zeta potential과 pH를 측정하였다. 30분간 온도를 유지하면서 가수분해 한 경우 가장 낮은 절대값 (-37 mV)의 Zeta 값을 보였는데, 이는 용액의 pH가 가장 높았던 결과와 일치한다.

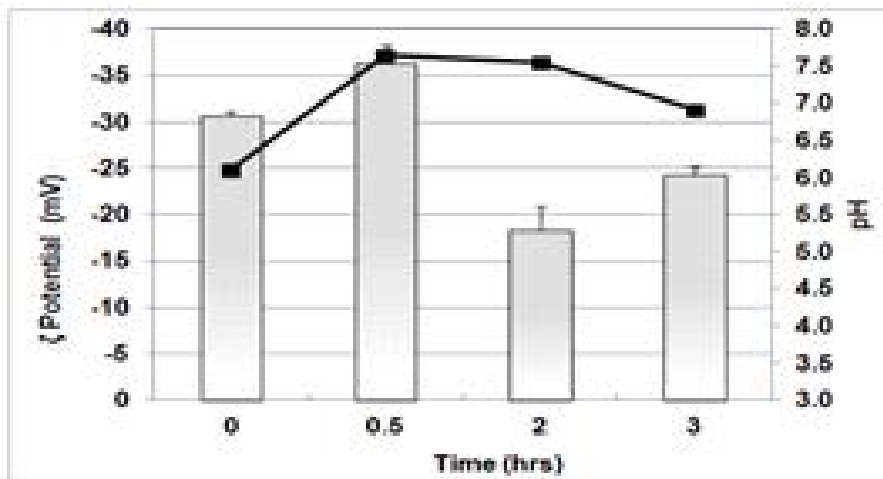


Figure 3.2.7 pH and zeta potential of Plx peptides as function of hydrolysis time.

○ 색도 측정 결과

가수분해 시간에 따른 펩타이드 용액의 색을 측정한 결과 가수분해가 진행될수록 redness는 감소하고, lightness는 증가하는 것으로 나타났다. Yellowness는 가수분해 시간에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다.

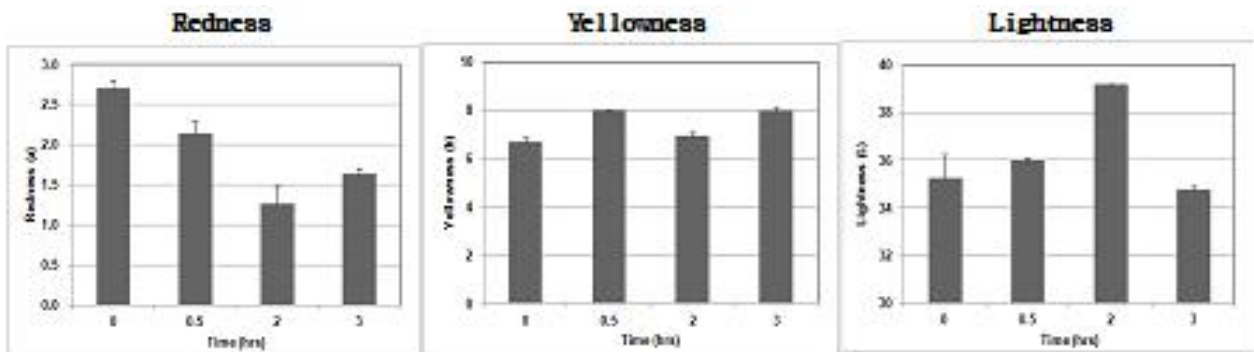


Figure 3.2.8 Color property of Plx peptides as function hydrolysis time.

○ 펩타이드 함량의 변화

펩타이드의 함량과 가수분해 시간과의 관계는 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 측정하고 산출하였다. 가수분해를 하지 않는 태반의 상등액이 가장 높은 흡광도를 보였으며, 2시간 동안 가열한 경우 가장 낮은 흡광도를 보였다.

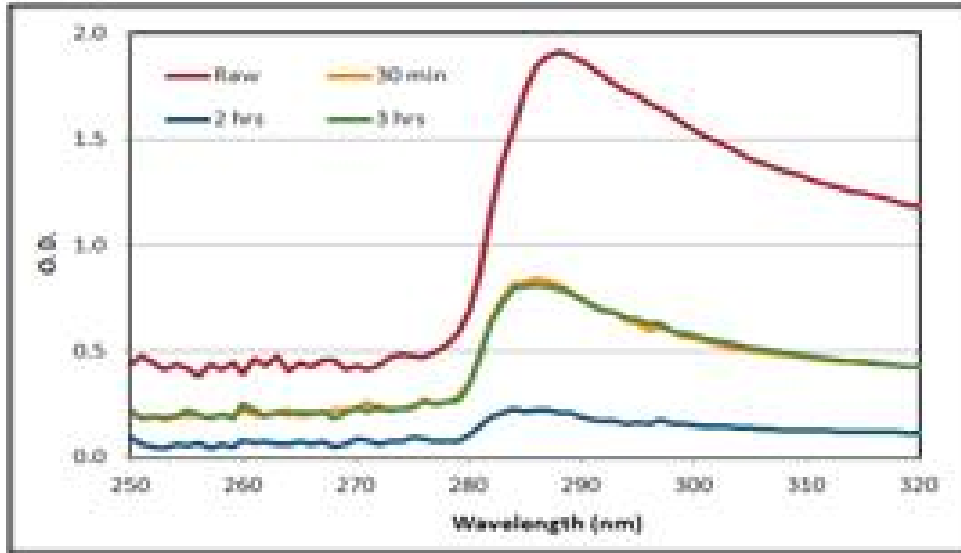


Figure 3.2.9 Soluble peptides quantity of Plx hydrolysate as function of hydrolysis time.

○ 분자량 측정결과

초고압을 이용한 가수분해 전과 후의 태반 펩타이드의 분자량을 측정한 결과 가수분해 전에는 10,465 Da 이던 펩타이드가 가수분해 후 5,996 Da로 분자량이 감소하였다.

○ 수율 측정결과

가수분해 시간에 따른 고형분의 함량을 측정한 결과 가수분해가 진행되면서 오히려 수율이 감소하는 것으로 나타났다. 30분 동안 가수분해 한 경우 고형분의 함량이 미미하지만 가장 높게 나타났다.

Table 3.2.3 Yield of hydrolysis process as function of hydrolysis time

Hydrolysis time (hr)	Dry mass (%)	Loss (%)
0	0	0
0.5	0.6	97.44
2	0.3	98.72
3	0.4	98.91

○ 형태학적 특성 관찰결과

가수분해에 의한 태반 조직의 형태학적 관찰은 Scanning Electron Microscopy(SEM)를 이용하여 이루어 졌다. 30분간 200℃에서 가수분해 한 태반의 경우 태반 조직이 열과 압력에 의하여 손상되어진 것으로 확인할 수 있었다.

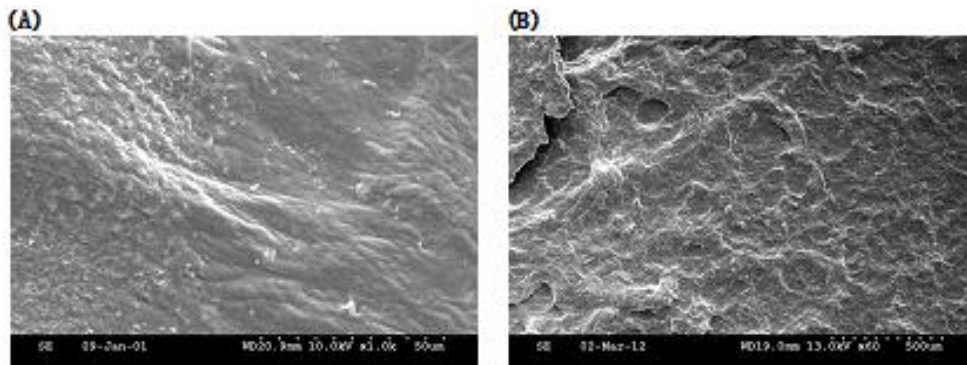


Figure 3.2.10 Morphological observation of Plx tissue (A) before hydrolysis, (B) after hydrolysis using high presser system at 200°C for 30 min.

(2) 가수분해 온도의 최적화

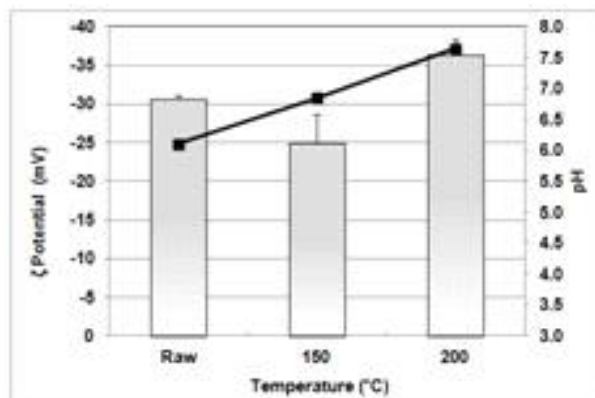


Figure 3.2.11 pH and zeta potential of peptides from Plx as function as hydrolysis temperature.

○ pH와 Zeta potential의 변화

가수분해 온도에 따른 태반 용액의 pH와 Zeta Potential 을 측정한 결과 가수분해 온도가 높을수록 Zeta potential의 절대 값이 높고, pH도 증가하는 것으로 나타났다.

○ 색도 측정 결과

가수분해 온도에 따른 태반 추출 펩타이드의 색도를 측정한 결과 redness 에서는 큰 차이가 보이지 않았으나, 150℃ 에서 가수분해 한 경우 yellowness가 상대적으로 높고, lightness 가 상대적으로 낮게 나타났다.

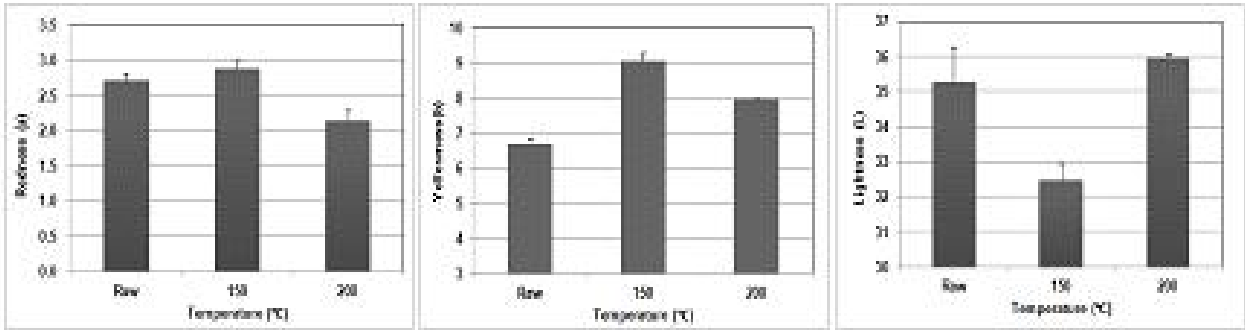


Figure 3.2.12 Color property of peptides from Plx as function as hydrolysis temperature.

○ 펩타이드 변화

아임계조건에서 태반의 가수분해 조건을 조절하기 위하여 온도에 따른 수용성 펩타이드의 함량을 측정하였다. 펩타이드의 함량은 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 285 nm에서의 흡광도를 비교하였다. 흡광도는 가수분해 하지 않는 시료에서 가장 높게 나타났고, 150°C 에서 가수분해 한 시료에서 가장 낮게 나타났다.

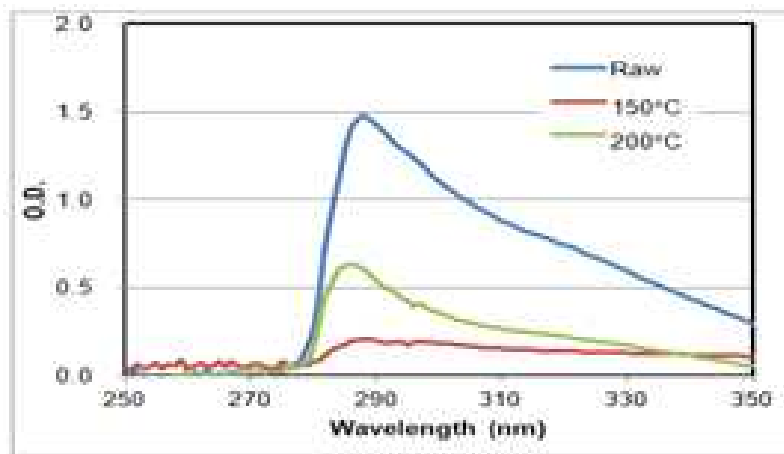


Figure 3.2.13 Soluble Peptide quantity depend on the temperature of hydrolysis process.

○ 분자량 측정결과

아임계 조건에서 가수분해 온도를 조절하면서 태반 펩타이드의 함량을 GPC를 이용하여 측정하였다. 가수분해 하지 않는 태반의 경우 초기에 42732 Da의 평균 분자량을 보이는 반면 가수분해가 150°C 에서 진행된 경우 4,266 Da로 200°C 에서 가수분해 한 것보다 10배 정도 낮은 분자량을 나타내고 있다.

Table 3.2.4 Molecular weight of Plx peptides depend on hydrolysis temperature

	Hydrolysis Temp. (°C)		
Mw (Da)	Raw	150	200
	42,732	4,266	35,001



○ 수율 측정결과

가수분해 온도에 따른 공정상의 효율을 알아보기 위하여 고형분의 함량을 측정한 결과 200℃에서 가수분해한 경우 상대적으로 높은 고형분 함량을 나타내었다.

Table 3.2.5 Yield of hydrolysis process as function of temperature of hydrolysis

Hydrolysis Temp.(℃)	Dry mass (%)	Loss (%)
Raw	0.07	99.93
150	4.57	95.45
200	6.00	94.00

(3) 균질 시간의 최적화

○ pH와 Zeta potential의 변화

균질시간이 태반의 아임계 상태에서의 가수분해율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 펩타이드 수용액의 pH와 전하량을 측정하였다. 균질 시간이 길어짐에 따라 zeta potential 절대 값은 증가하고, pH는 감소하는 것으로 나타났다.

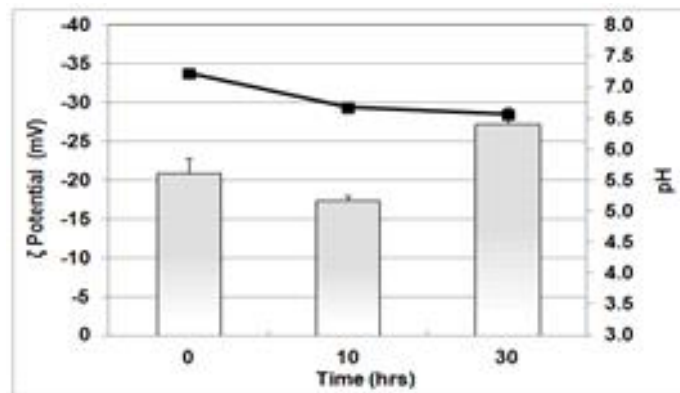


Figure 3.2.14 pH and zeta potential of peptides hydrolysed as function of grind time of Plx.

○ 색도 측정 결과

균질시간에 따른 펩타이드 수용액의 색도를 측정한 결과 균질 시간이 증가할 수록 redness는 감소하고, lightness는 미미하게 증가하였다.

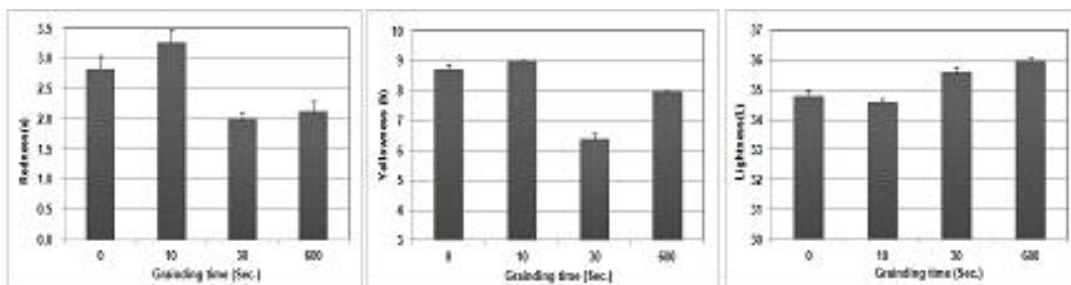


Figure 3.2.15 Color property of peptides hydrolysed as function of grind time of Plx.

○ 펩타이드 함량의 변화

균질 시간에 따른 펩타이드 함량의 변화를 285 nm에서 흡광도를 측정하여 비교한 결과 균질 시간이 감소할수록 수용액 내 펩타이드 함량은 증가하는 것으로 나타났다.

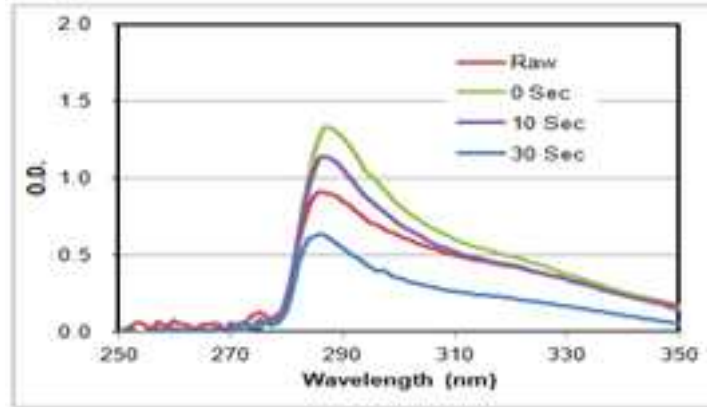


Figure 3.2.16 Quantity of soluble peptides hydrolysed as function of grind time of Plx.

○ 분자량 측정결과

태반의 가수분해 전 균질 시간은 최종 펩타이드의 분자량을 결정하는 추가적인 요인으로 작용하였다. 균질 시간을 0, 10, 30초로 조절한 결과 10초간 균질한 경우 분자량이 약 1 kDa로 가장 작은 펩타이드 단위로 가수분해 되는 것으로 나타났다.

Table 3.2.6 Molecular weight of Plx peptides depend on grind time

	Grind time (Sec.)		
	0	10	30
<b>Mw (Da)</b>	10,039	1.030	26,777

○ 수율 측정결과

균질 시간은 가수분해의 공정에 있어서도 회수되는 펩타이드의 함량에 중요한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이 전 실험에서 10분간 균질한 시료들이 가수분해 온도나 시간 조절에 의하여 1% 정도의 회수율을 보이는 반면 30초 이하로 균질 시간을 감소시킴에 따라 약 50%의 회수율을 나타내었다.

Table 3.2.7 Yield of hydrolysis process as function of temperature of hydrolysis

Grind Time (Sec.)	Dry mass in supernatant (%)	Loss (%)
0	40.11	43.64
10	60.98	3.18
30	50.35	17.46

바. 펩타이드의 분리 및 정제

(1) 태반의 가수분해 조건에 따른 펩타이드와 아미노산의 조성 및 함량

○ 태반의 아미노산 조성 분석 결과

태반의 아미노산 조성 분석 결과 다양한 종류의 아미노산이 고르게 분포되어 있는 특성을 보이고 있으며, 특히 glycine 의 함량이 다른 아미노산에 비해 두 배 정도 높은 것으로 나타났다.

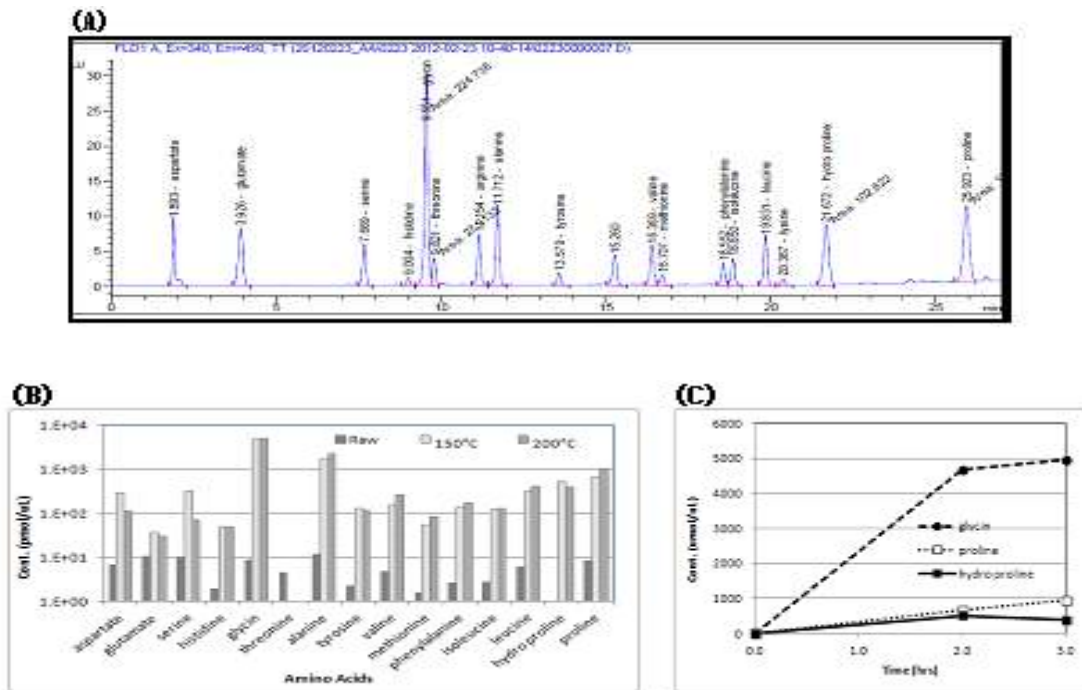


Figure 3.2.17 Amino acid composition of porcine Plx (A), effect of hydrolysis temperature on the amino acid composition and quantity (B), effect of hydrolysis time on the collagen compose amino acids (C).

○ 아미노산 함량

가수분해 한 태반의 수용성 펩타이드의 함량은 아미노산 수용액에 ninhydrin 시약을 반응시킨 후 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 580 nm에서 흡광도를 측정하고, 아미노산 스탠다드를 기준으로 산출하였다. 태반의 아미노산 함량은 유기산을 사용한 경우 1일~2일 에서 가장 높은 함량은 나타내었으나 이는 아임계 상태에서 가수분해 했을 때 보다 상대적으로 매우 낮은 수준이며, 아임계 상태에서 가수분해를 한 경우, 가수분해 시간과 온도가 증가함에 따라 아미노산 함량이 높게 나타났으며, 균질 시간이 증가하는 경우에는 아미노산 함량이 감소하는 것으로 나타났다.

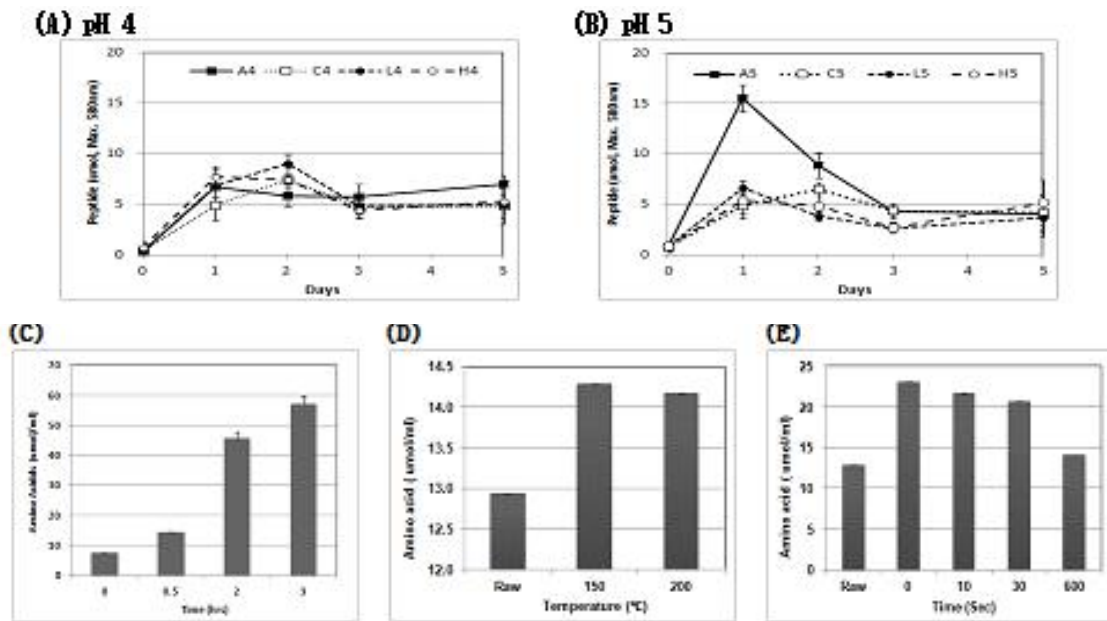


Figure 3.2.18 Amino acid quantity of soluble peptides and free amino acids as function of acid types (A, B), hydrolysis time (C), hydrolysis temperature (D), grind time (E).

○ GPC를 이용한 수용성 펩타이드의 분자량 측정

가수분해에 따른 수용성 펩타이드의 분자량의 변화를 측정된 결과 유기산을 사용한 경우 분자량은 평균 1 kDa 정도로 나타났다. pH 4의 경우 보다 pH 5에서 가수분해가 진행될수록 분자량이 감소하는 것으로 나타났고, 염산을 사용한 경우 분자량이 18 kDa 까지 감소하였다. 초고압을 이용한 가수분해 전과 후의 태반 펩타이드의 분자량을 측정된 결과 가수분해 전에는 10 kDa 이던 펩타이드가 가수분해 후 6 kDa로 분자량이 감소하였다. 태반의 가수분해 전 균질 시간은 최종 펩타이드의 분자량을 결정하는 추가적인 요인으로 작용하였다. 균질 시간을 0, 10, 30초로 조절한 결과 10초 간 균질한 경우 분자량이 약 1 kDa로 가장 작은 펩타이드 단위로 가수분해 되는 것으로 나타났다.

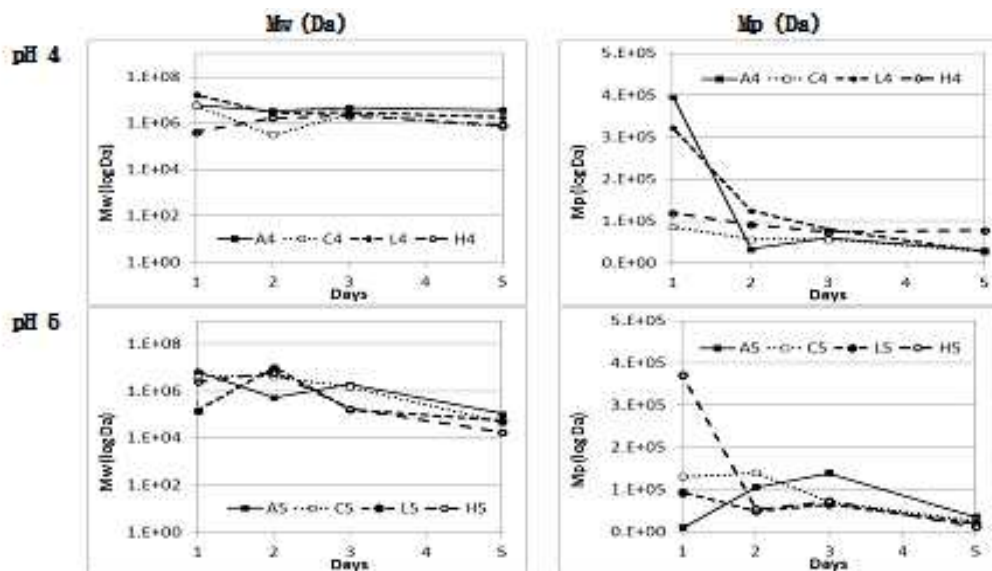


Figure 3.2.19 Molecular weight of Plx peptides as function of acid type.

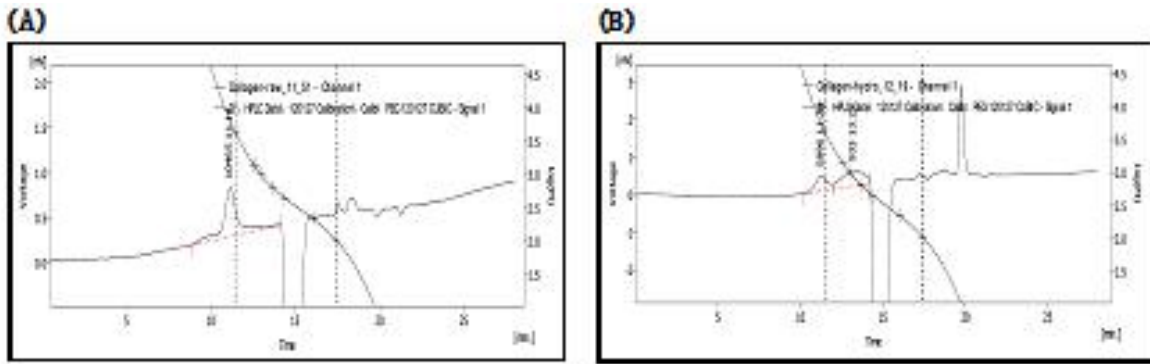


Figure 3.2.20 Molecular weight of Plx peptides before (A) 10,465 Da, and after (B); 5,996 Da hydrolysis.

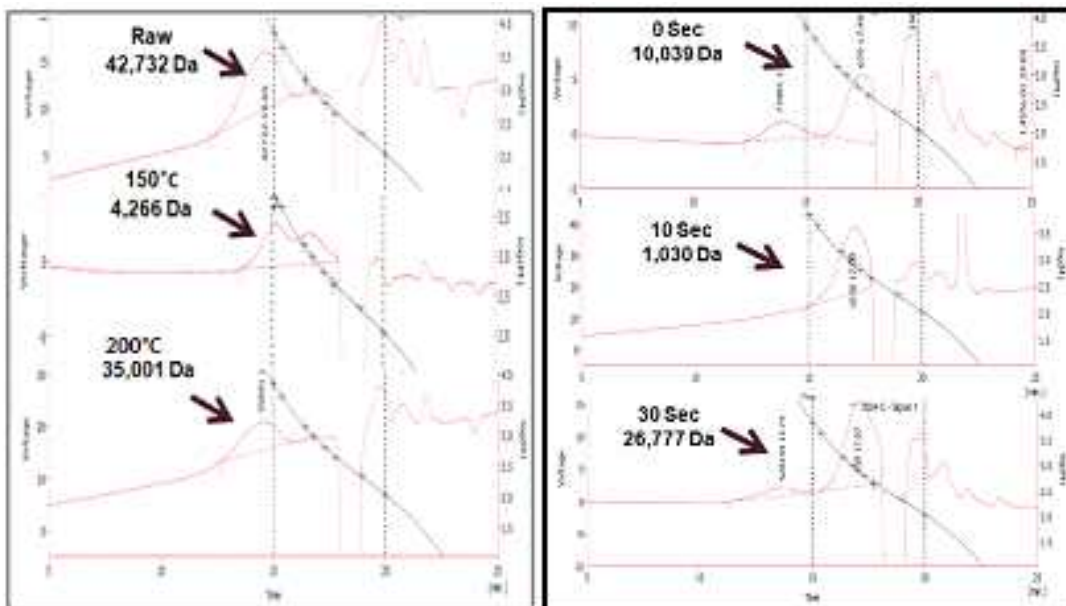


Figure 3.2.21 Molecular weight of Plx peptides as function of hydrolysis temperature (A), and grind time (B).

○ Glycin, di-, tri- 펩타이드의 분리 및 정제

가수분해 후 3000 rpm 에서 20분간 원심분리로 불용성 펩타이드 침전물과 수용성 펩타이드 상등액을 분리하여, 분자량 20 kDa 이하의 펩타이드를 얻었다. 이를 다시 Mega dialysis Kit (Pur-A-Lyzer, Sigma, USA)를 이용하여 분자량 1 kDa 이하의 펩타이드만 24 시간 동안 분리 및 정제하고 GPC로 분자량을 분석하고, Ninhydrin assay 로 아미노산의 함량을 측정하는 연구가 마무리 단계에 있다.

사. 태반 가수분해를 위한 전처리 조건 확립

본 연구에서 효소의 가수분해를 위한 기질로서 태반의 처리 조건 확립을 위하여 원료 태반과 젤라틴화(열처리) 시킨 태반의 기질로서의 효율을 비교 평가하였다. 시료의 가수분해를 위하여 trypsin을 농도별로 가하였다. 본 연구에서는 25.0 µg/g을 기준으로 6.25 µg/g까지 효소 농도를

낮추어 태반과 반응시켰으며, 반응은 37°C incubator에서 24시간 실시하였다. 가수분해 효율은 SDS-PAGE(20% acrylamide gel)를 통하여 측정하였다(Figure 3.2.22a).

수율에 있어서 원료 태반은 약 10% 내외의 수율을 보인 반면, 전처리를 실시한 태반은 두 배 이상의 수율을 보였다(Figure 3.2.22b). 특히 원료 태반의 수율은 효소농도에 영향을 받지 않았지만, 전처리 태반에 있어 효소의 농도를 증가시켰을 때 일부 수율의 감소가 발생하고 있다. 이는 가수분해의 진행에 따른 peptide 및 아미노산의 분해에 기인한 것으로 판단되며, 이상의 결과는 선행 연구에서 관찰된 바와 같이 유리아미노산의 생성에 따른 조단백질 함량의 저하로 사료된다.

전처리 하지 않은 원료 태반에서는 효소에 의한 가수분해가 야기되지 않은 반면, 전처리를 통하여 젤라틴화 시킨 태반은 효소 농도에 관계없이 가수분해가 효과적으로 야기되었다. 전처리 하지 않은 태반의 조성은 대부분 불용성 콜라겐으로 구성되어 있으며, 따라서 수용성 젤라틴으로의 전환은 태반을 효소의 기질로 이용하기 위한 필수 과정으로 판단되었고, 이후 모든 연구에서는 전처리 태반을 이용하였다.

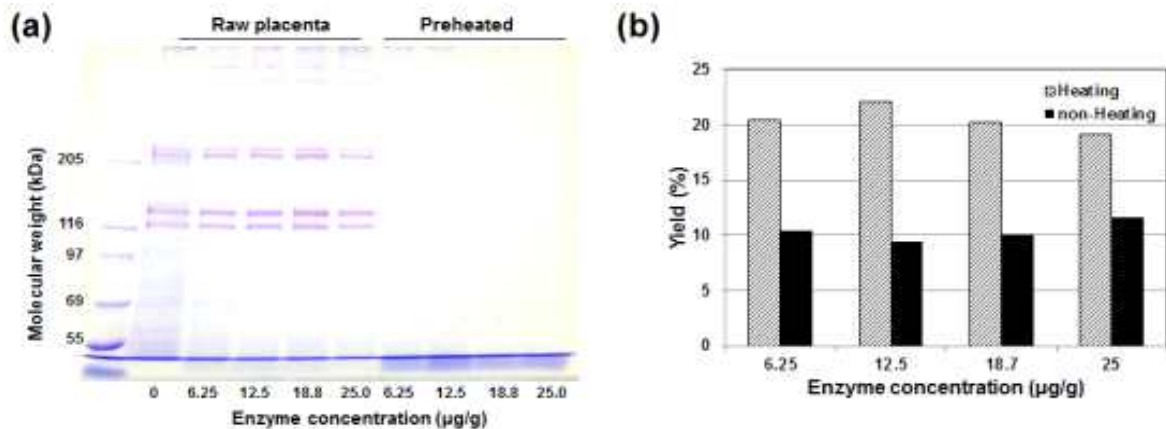


Figure 3.2.22 SDS-PAGE pattern (a) and yield (b) of raw and preheated placenta after incubation at 35°C for 24 h. Preheating was conducted at 90°C for 1 h.

### (1) 태반의 효소적 가수분해를 위한 최적 조건 확립

본 연구에서는 태반 콜라겐의 가수분해를 위하여 trypsin, chymotrypsin 및 pepsin의 효소를 젤라틴 화 된 태반 시료에 반응시켰다. 본 연구에 이용된 가수분해 효소의 특성을 Table 3.2.8에 나타내었다.

Table 3.2.8. Information and optimum activity of proteases used in this study

Enzyme	Optimum pH	Molecular weight	Activity
Trypsin	7~8	24 kDa	Unknown
Pepsin	2~3	34 kDa	3,200 unit/mg
Chymotrypsin	7~8	25 kDa	40 unit/mg

효소 반응시간에 따른 태반 콜라겐의 가수분해능 측정을 위하여 chymotrypsin과 pepsin은 40 unit/mg으로 농도를 조절하였고 trypsin은 25  $\mu\text{g/g}$ 을 태반과 반응시켰다. 효소의 농도별 가수분해능 측정은 효소를 저농도로 희석하여 태반과 24시간 반응시켰다. 본 연구에서 사용한 태반은 90°C에서 1시간 젤라틴화 시켜 사용하였고, 효소 반응은 37°C로 유지되는 배양기에서 수행되었다. 효소 처리에 의한 태반의 가수분해는 전기영동을 통하여 관찰하였고, 특히 20 kDa 미만의 저분자량 peptide의 생성 및 분자량은 gel permeation chromatography(GPC)를 통하여 측정되었다.

### ○ Trypsin

Trypsin에 의한 태반 가수분해는 배양 1시간에 모든 peptide band가 사라짐으로써 매우 빠른 가수분해 활성을 보였다. 따라서 trypsin은 태반을 가수분해 시키는데 매우 효과적인 효소로 판단된다. 이는 효소 농도를 낮추어도 유사하게 관찰되는데 효소농도를 6.25  $\mu\text{g/g}$ 으로 낮추어도 배양 24시간 이후 가수분해에 기인하여 전기영동 상에서 peptide band가 관찰되지 않았다 (Figure 3.2.23a). 저분자 peptide의 분자량 측정을 위하여 GPC 분석을 수행한 결과 배양 3시간 까지 20 kDa 이상의 peptide가 존재하고 있었지만, 배양 6시간 이후 대부분의 peptide 분자량이 20,000 Da 미만으로 분해되었다(Figure 3.2.23b). 특히 배양 12시간 이후에는 대부분의 peptide 분자량이 5,000 Da 이하로 관측되었다. 이상의 결과에 의하면 태반 콜라겐의 가수분해에 trypsin은 매우 효과적으로 사용될 수 있었고, 특히 본 연구에서 목표로 하는 분자량 5,000 Da 미만의 돼지태반 콜라겐 peptide 생산이 가능할 것으로 판단되었다.

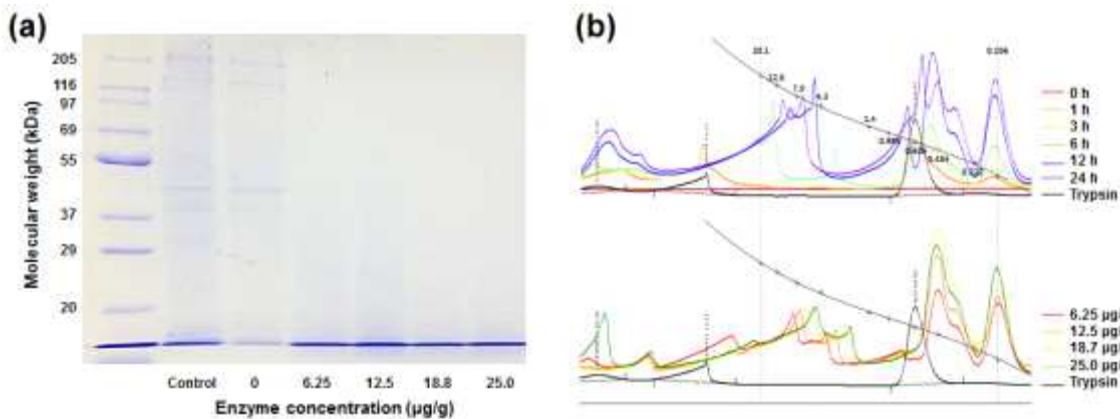


Figure 3.2.23. SDS-PAGE (12% acrylamide gel) pattern (a) and gel permeation chromatograph (b) of trypsin-treated porcine placenta.

### ○ Pepsin

Pepsin 처리에 따른 태반 콜라겐의 가수분해는 배양 6시간 동안 발생하지 않았다(Figure 3.2.24a). 반면 12시간에서 고분자 peptide의 저분자화가 관찰되었으며, 이후 24시간까지 가수분해가 연속적으로 발생함이 관찰되었다. 반면 24시간의 배양시간 이후에도 약 20.1 kDa 및 36.5 kDa band가 관찰되었다. 이는 pepsin에 의한 가수분해 속도가 매우 느린 데 기인한 것으로 판단된다. 일반적으로 pepsin의 단백질 가수분해는 산성영역(pH 2 이하)에서 최대 활성을 나타내며, 중성 및 알칼리 영역에서는 비가역적 변성에 의하여 활성을 잃어버린다고 보고되고 있다.

반면 본 연구에서 이용한 돼지 태반 현탁액은 pH 6.3의 범위를 나타내고 있으며, 이에 따라 pepsin의 변성이 야기되지 않는 반면, 가수분해 활성이 매우 미약한 것으로 판단된다.

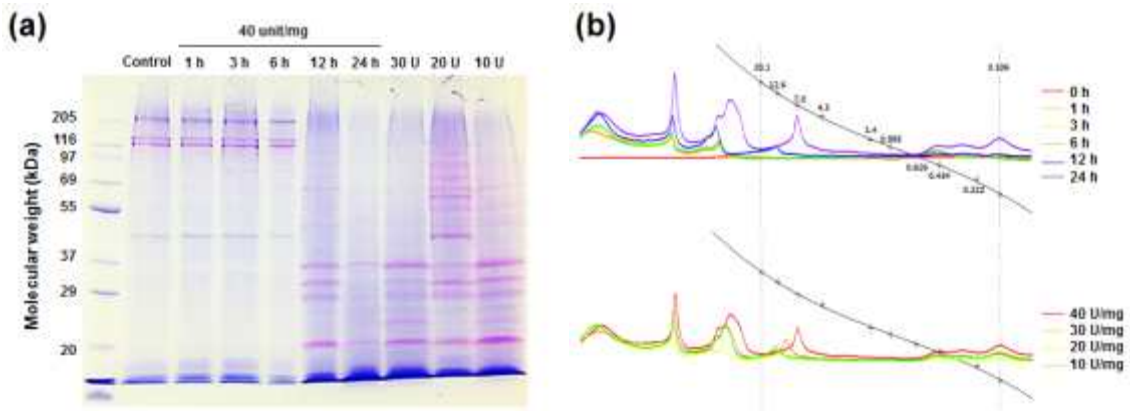


Figure 3.2.24 SDS-PAGE (12% acrylamide gel) pattern (a) and gel permeation chromatograph (b) of pepsin-treated porcine placenta.

저분자 peptide 분석에 있어서 pepsin에 의한 태반 가수분해물은 주로 20,000 Da 이상의 peptide로 구성되었다(Figure 3.2.24b). 배양 시간의 증가와 더불어 일부 분자량 peak들이 저분자 영역으로 이동하였고, 특히 배양 24시간에서 큰 폭의 분자량 저하가 관찰되었지만, 일부 peptide만이 저분자 영역으로 가수분해 되었다. 또한 저분자 영역의 가수분해물 대부분은 약 7,000 Da의 분자량을 보이고 있다. 또한 pepsin의 농도를 감소시켰을 때 peptide의 분자량이 커짐을 보였다. 따라서 pepsin에 의한 저분자 가수분해물(<5,000 Da)을 얻기 위하여 다량의 효소 첨가 및 장시간의 배양이 요구되었다. 반면 본 연구에서 사용한 pepsin의 최대 활성은 40 unit/mg이며, 따라서 효소의 농도를 증가시킬 수 없었고, 배양시간 24시간을 초과할 경우 전반적인 가수분해 공정시간 단축을 이룰 수 없기 때문에 태반 가수분해 효소로 pepsin의 활용을 위하여 초고압 처리의 응용이 요구되었다.

### ○ Chymotrypsin

Chymotrypsin에 의한 태반 가수분해는 배양 1시간에  $\beta$ -chain(~205 kDa)의 가수분해가 야기되어 band가 관찰되지 않았다(Figure 3.2.25). 또한  $\alpha$ -chain(~116 kDa)의 가수분해는 배양 3시간 까지 관찰되었지만 6시간 이후에는 모든 peptide band가 사라져 충분히 가수분해가 된 것으로 판단되었다. 배양 6시간에서 일부 peptide band가 20~37 kDa 영역에서 관찰되었고, 배양 24시간에서 모든 peptide band가 관찰되지 않았다. 따라서 chymotrypsin에 의한 태반 가수분해 속도는 pepsin에 비하여 효과적인 것으로 판단되지만 trypsin보다는 다소 느린 가수분해를 보이는 것으로 사료된다. 효소 농도에 따른 가수분해에 있어서 10~20 unit/mg의 효소 첨가는 24시간 배양 후 일부 저분자량 peptide(20~37 kDa)가 관찰된 반면 30 unit/mg 이상에서는 이들 peptide band가 관찰되지 않아 태반 가수분해를 위한 적정 효소 농도는 30 unit/mg 이상이 요구되는 것으로 판단되었다. 가수분해물의 분자량 측정에 있어서 태반의 chymotrypsin 처리는 배양 12시간까지 20,000 Da 이상 분자량 영역의 peptide가 주를 이루고 있는 반면, 배양 24시간에서 모든 peptide의 분자량이 20,000 Da 이하의 영역에 도달함을 보이고 있다. 본 효소 처리에 의



한 가수분해물의 분자량은 12,600 Da, 1,400 Da 및 626 Da 미만의 저분자 peptide가 주를 이루고 있어 trypsin과는 차이를 보이고 있다. 농도에 따른 가수분해물의 분자량에 있어서 효소 농도의 감소는 가수분해 효율을 크게 낮추는 결과를 초래하였고, 특히 현저한 가수분해 효율의 증가는 40 unit/mg에서만 관찰되었다. 이상의 결과에 의하면 chymotrypsin에 의한 태반 가수분해 peptide는 5,000 Da 이상의 영역에 머물고 있으며, 따라서 보다 작은 분자량 peptide 생산을 위하여 효소농도의 증가 또는 배양시간의 연장이 요구되었다.

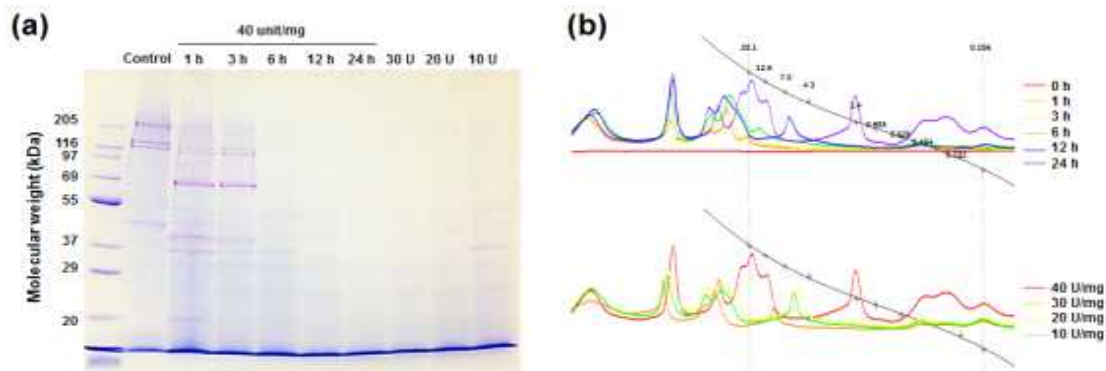


Figure 3.2.25 SDS-PAGE (12% acrylamide gel) pattern (a) and gel permeation chromatograph (b) of chymotrypsin-treated porcine placenta.

## (2) 시간 변화에 따른 고압효소 가수분해 활성 변화

본 연구에서는 상대적으로 압력 수준에서 가압 시간에 따른 효소의 태반 가수분해 활성을 평가하고자 수행되었다. 본 연구에서는 처리 압력을 100 MPa로 선정하였고, 처리시간을 1시간 및 4시간 처리하였고, 가수분해물의 분자량을 GPC를 이용하여 측정하였다(Figure 3.2.26). Trypsin 처리에 따른 태반 가수분해물의 분자량은 초고압 처리 및 배양 시간에 따라 작아지는 경향을 보였다. 반면 100 MPa의 압력 수준에 의한 효소의 가수분해 활성 강화는 현저하게 관찰되지 않았으며, 배양시간을 4시간까지 증가하였을 때, 분자량 저하는 보이는 반면, 이들 분자량은 대부분 20,000 Da 이상의 분자량 영역을 보여주었다. 결국 trypsin의 가수분해 활성을 위한 초고압 처리 수준은 200 MPa이 가장 효과적인 것으로 판단되었고, 가압 시간에 따른 가수분해 활성 변화는 그 효과가 압력 수준에 비하여 미약할 것으로 판단된다.

반면 pepsin과 반응시킨 태반은 가압 수준 및 배양시간에 따른 효과가 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 태반의 가수분해에 pepsin은 효과적으로 이용될 수 없음을 시사하고 있다. 따라서 효과적으로 pepsin을 태반 가수분해에 이용하기 위하여 산 가수분해 기법과 조합하는 경우 가수분해 효율을 향상시킬 수 있을 것으로 기대되지만 pH 조절 없이 원료 태반의 가수분해에는 적합하지 않은 것으로 결론을 내릴 수 있었다. Chymotrypsin에 의한 가수분해에서는 시간에 따른 변화는 보이지 반면, 처리 압력에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 연구문헌에 의하면 chymotrypsin은 압력 하에서 쉽게 변성됨으로써 가수분해 활성을 잃어버리는 특성을 가지고 있다. 따라서 이들 효소의 활성 강화를 위한 초고압 처리는 100 MPa의 수준에서 단기간 처리하는 것이 효과적으로 판단된다.

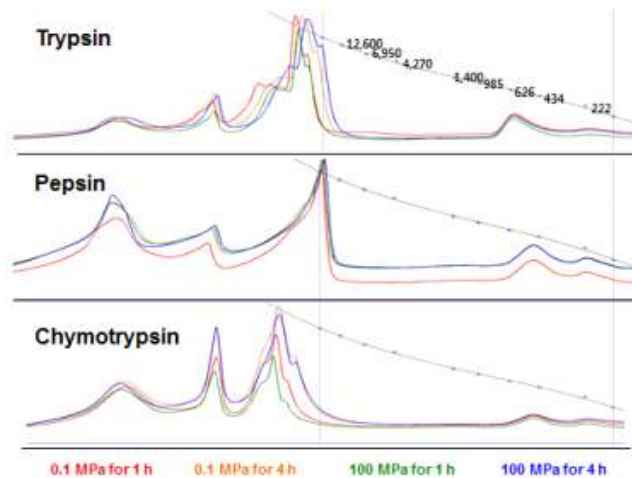


Figure 3.2.26 Effects of pressurization conditions on the protease-catalyzed hydrolyzing efficiency of porcine placenta.

이상의 결과에 의하면 효과적인 태반 가수분해를 위하여 이용할 수 있는 효소는 trypsin이 가장 이상적으로 평가된다. 또한 trypsin에 의한 태반의 가수분해 활성은 압력을 100 MPa 이상으로 증가시켰을 때 강화될 것으로 기대되었으며, 따라서 상대적으로 낮은 압력에 장기간 처리하는 것에 비하여 높은 압력 수준에서 단기간 처리를 하는 경우 보다 효과적으로 태반 가수분해물을 얻을 수 있을 것으로 기대되었다.

### (3) 압력 수준에 따른 고압 효소 활성 강화

효소 활성 강화를 위하여 본 연구에서는 젤라틴화 시킨 태반에 선정된 3가지 효소(trypsin, pepsin 및 chymotrypsin)를 반응시켜 다양한 압력 수준에서 단기간 초고압 처리를 실시하였다. 전기영동 분석에 의하면 압력 수준에 관계없이 trypsin 처리가 가장 효과적인 가수분해능을 보였고, 이에 따라 trypsin 처리 태반은 전기영동 결과 peptide band가 발견되지 않았다(Figure 3.2.27a). Chymotrypsin 처리 태반의 경우 태반 콜라겐 band(119 및 205 kDa)는 가수분해에 의하여 사라졌고 새로운 peptide band가 저분자 영역(<55 kDa)에서 관찰되었다. 반면 chymotrypsin은 압력의 수준이 증가할수록 이들 새로운 peptide의 band 강도가 증가함으로써 일부 활성 저하를 초래한 데 기인한 것으로 판단된다. Pepsin 처리 태반에서는 콜라겐의 일부 band가 여전히 관찰되고 있고, 또한 가수분해물의 분자량이 chymotrypsin에 비하여 상대적으로 높은 분자량 영역(>55 kDa)에서 관찰되었다. GPC 분석에 의하면 trypsin은 압력의 증가는 가수분해 활성을 향상시켰으며, 특히 200 MPa의 초고압 처리에 의하여 최대 활성을 보였다(Figure 3.2.27b). 반면 300 MPa에서는 대조구에 비하여 효소 활성이 저하되었고, 이는 압력에 의한 구조변화가 이들 압력 범위에서 야기하는 데 기인하는 것으로 판단되었다. 이상의 결과는 기존 연구 문헌과는 다른 양상을 보이고 있는데 이는 실험조건의 차이(pH, 기질의 종류, 처리온도 및 시간)에 기인한 것으로 판단된다. 따라서 trypsin 처리에 의한 태반 가수분해는 초고압 처리에 의하여 효율을 높일 수 있을 것으로 판단되며, 200 MPa에서 가장 효과적인 것으로 사료된다.

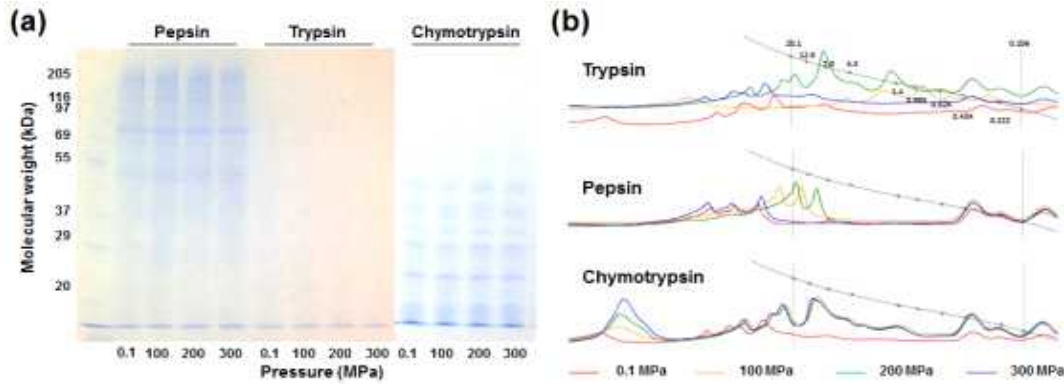


Figure 3.2.27 Effects of pressure levels on the SDS-PAGE pattern (a) and gel permeation chromatograph (b) of protease-treated porcine placenta.

Pepsin에 의한 태반 가수분해 역시 압력의 증가에 따라 효소 활성의 증가가 관찰되었다. 특히 상압 하에서 시간 및 농도와 관계없이 가수분해 활성이 낮았음을 고려하였을 때, 초고압 처리는 pepsin의 가수분해 활성 향상에 매우 효과적인 것으로 판단된다. GPC 분석결과 434 Da 미만의 일부 저분자량 peptide가 관찰되고 있지만, peptide의 대부분은 20,000 Da 이상의 분자량 영역에 존재하고 있다. 반면 100 MPa의 초고압 처리에 의해 고분자량 peptide의 약 50%가 약 12,600 Da의 분자량으로 분해되었으며, 200 MPa 처리에 따라 모든 분자량 peak가 20,000 Da 미만으로 이동되었다. 이러한 현상은 초고압 처리에 따른 electrostriction에 의한 시료의 pH 저하가 효소 활성을 강화시킨 것으로 판단된다. 반면 300 MPa에서는 가수분해 활성이 저하됨으로써 상압 대조구와 유사한 가수분해 경향을 보였다. 이는 pepsin 자체는 고압에 대한 구조적 안정성이 매우 높은 반면, 초고압 하에서 기질의 구조적 변화 및 환경변화가 효소 활성에 영향을 미치고 있는 것으로 판단된다. 따라서 pepsin에 의한 최적 처리 조건은 200 MPa로 판단된다. 그러나 pepsin 처리에 따라 다수의 고분자량 peptide가 전기영동 상에 존재함을 고려하였을 때, pepsin에 의한 태반의 가수분해는 상업적 응용에 제한적일 것으로 사료된다.

Chymotrypsin에 의한 태반 가수분해 경향은 다른 효소와는 큰 차이를 보이고 있다. 압력의 증가에 따라 20,000 Da 이상의 peptide 함량은 증가하는 경향을 보인데 반하여 20,000 Da 미만의 peptide peak는 100 MPa 이후 특정 경향을 보이지 않고 압력 간에 동일하게 관찰되었다. 이는 chymotrypsin이 작용하여 가수분해하는 영역이 trypsin이나 pepsin과는 다른 데 기인하는 것으로 판단된다. 초고압 처리에 따라 고분자량 peptide를 저분자화 시키는 효율이 증가하고 있지만, 여기서 분해된 peptide는 더 낮은 분자량 영역으로 가수분해가 연속적으로 진행되지 않기 때문에 전기영동과 GPC결과 모두 상대적으로 높은 분자량 영역(20~55 kDa)으로 가수분해가 진행된 것으로 판단된다. 태반 가수분해물의 아미노산 조성은 glycine(Gly)과 alanine(Ala)이 가장 높은 조성비를 보이고 있었으며, hydroxyproline(Hyp)과 proline(Pro)의 비율은 사용한 효소에 따라 다를 경향을 보였다(Figure 3.2.28). 이는 본 연구에서 사용된 3 효소들이 다른 위치의 peptide bond를 분해하는데 기인한다(Table 3.2.9). 처리 압력별 아미노산 조성은 trypsin과 chymotrypsin은 매우 큰 차이를 보인 데 반하여 pepsin 처리구 간에는 큰 조성 변화가 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 일반적으로 보고되는 콜라겐 가수분해물의 아미노산 조성과 유사한 것으로 관찰된다.

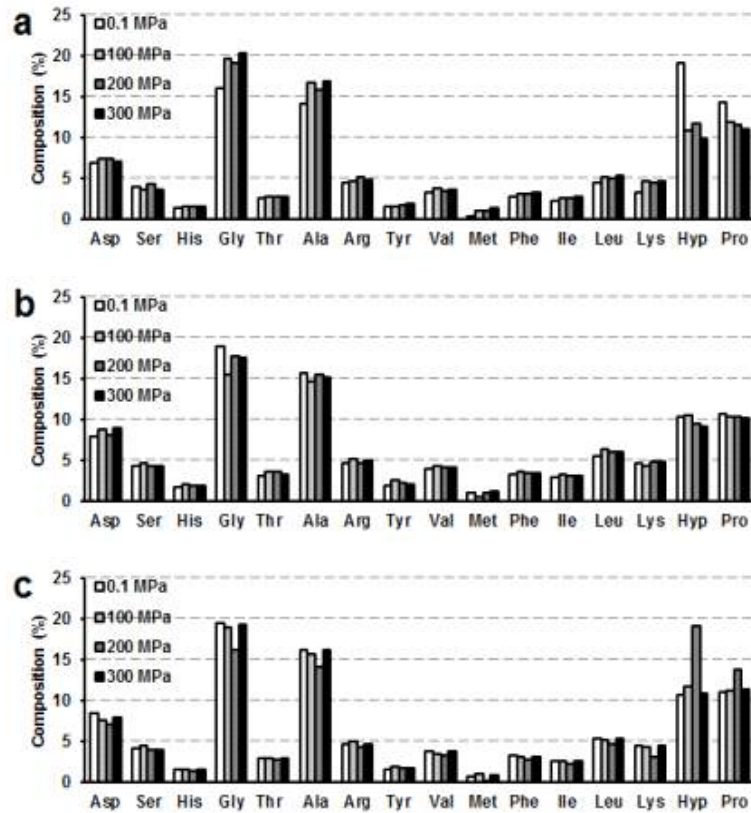


Figure 3.2.28. Effects of pressure levels on the amino acid compositions of trypsin (a), pepsin (b) and chymotrypsin (c) treated porcine placenta hydrolysates.

Table 3.2.9 Specificity of cleavage site of proteases selected in this study

Enzyme	Cleavage sites
Trypsin	Carboxyl side of the amino acids lysine or arginine
Pepsin	Between hydrophobic and aromatic amino acids
Chymotrypsin	Carboxyl side of the amide is a large hydrophobic amino acid

반면 펩타이드 회수율에 있어서 trypsin과 pepsin은 가압 수준의 증가에 따라 수율이 감소하는 경향을 보인 반면, chymotrypsin은 100 MPa의 처리 조건에서 가장 높은 수율을 보였다(Figure 3.2.29a). 이는 단백질 함량의 측정 방법에 기인한 것으로 판단되는데, 이상의 결과는 기존 연구에서도 유사하게 관찰된다. 일반적으로 가수분해가 진행되어 유리아미노산 및 이들이 분해됨으로써 조단백질 함량이 낮게 측정되는데 기인한 것으로 판단된다(Figure 3.2.29b). 반면 낮은 가수분해 효율에도 불구하고 pepsin과 chymotrypsin의 유리아미노산 함량은 trypsin에 비하여 높게 생성되었고, 이들 유리아미노산 함량은 압력 수준의 증가에 따라 증가하는 경향을 보였다. 결국 이러한 경향은 효소적 가수분해가 작용하는 위치 차이에 기인한 것으로 판단된다. 따라서 trypsin의 가수분해는 중쇄 peptide 형성에 기여하는 것으로 판단되며, chymotrypsin과 pepsin은 고분자 peptide와 일부 유리 아미노산의 생성을 야기하는 것으로 사료된다.

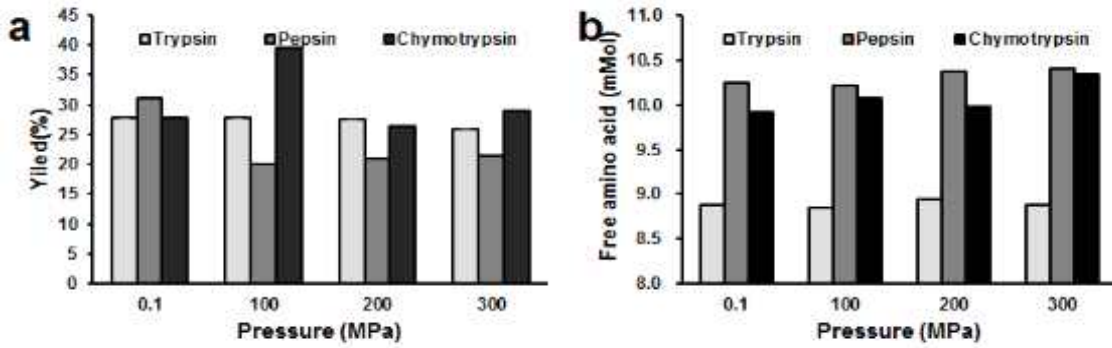


Figure 3.2.29. Effects of pressure levels on the yield (a) and free amino acid contents (b) of protease-treated porcine placenta hydrolysates.

공정 통합화를 위한 효소 선정에 있어서 trypsin은 매우 효과적인 가수분해 능력을 보인 반면, pepsin 처리된 태반은 고분자 peptide가 대부분을 차지하기 때문에 통합 공정화를 위하여 사용하기에는 효과가 미약한 것으로 판단되었다. 반면 chymotrypsin은 trypsin과 pepsin 중간의 효과를 보이는 것으로 보이며, 특히 초고압 처리에 의한 효과가 100 MPa 이상에서 보이지 않고 있다. 따라서 공정 통합화를 위한 효소 screening을 위하여 아임계수 처리 태반을 세분화된 다양한 압력 수준(50~150 MPa)으로 처리하여 가수분해 능을 비교 분석하였다(Figure 3.2.30). 전기영동 결과 압력 수준의 증가에 따른 16 kDa 영역의 band가 다소 증가하는 경향을 보였다. 이는 압력의 증가에 따른 효소 활성 저하에 기인한 것으로 판단된다. 결국 100 MPa까지 압력의 증가에 따라 chymotrypsin에 의한 고분자 peptide의 가수분해가 강화되는 경향을 보였지만 20,000 Da 미만의 peptide 가수분해는 초고압 처리에 의해 활성이 저하되는 결과를 보이고 있다. 결국 chymotrypsin은 상압 처리 조건에서는 효과적인 가수분해가 가능할 것으로 판단되었지만, 초고압에 대한 낮은 구조적 안정성에 기인하여 고압효소로서의 활용에는 다소 제약을 받을 것으로 보인다.

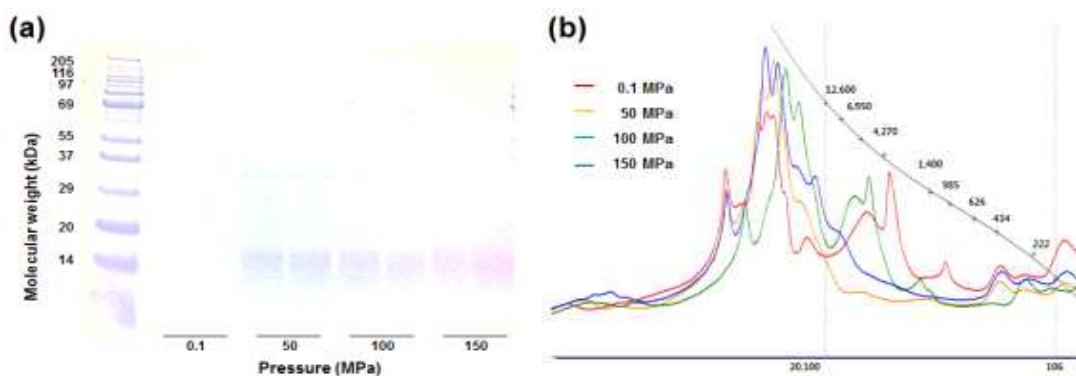


Figure 3.2.30. SDS-PAGE pattern (a) and gel permeation chromatograph (b) of porcine placenta treated-chymotrypsin under various pressure levels. Placenta was treated by subcritical water processing at 200°C and 37.5 MPa.

#### (4) 효소 가수분해 및 아임계수 처리 공정 통합화

이상의 결과에 의하면 고압 효소로 효과적으로 이용할 수 있는 효소는 trypsin으로 판명되었고, 따라서 효소적 가수분해와 아임계수 처리 공정의 통합화를 위하여 trypsin을 선정하여 연구에 사용하였다. 본 연구에서는 아임계수 처리 태반에 다양한 농도의 trypsin을 반응시켜 배양 24시간 후(37°C) 가수분해 효율을 측정하였다(Figure 3.2.31). 효소의 농도가 6.25 µg/g에서는 20,000 Da 이상의 고분자량 peptide가 다수 검출된 반면, 25.0 µg/g에서는 모든 peptide 분자량이 5,000 Da 미만의 영역에서 관찰되었다. 또한 효소의 농도를 증가시켰을 때, 가수분해 효율이 보다 극적으로 증가하였으며, 125 µg/g의 농도에서는 약 500 Da의 분자량 peak만이 관찰되었다. 분자량을 감안하였을 때, 이들 peptide는 주로 4~7개의 아미노산으로 구성된 peptide로 사료된다.

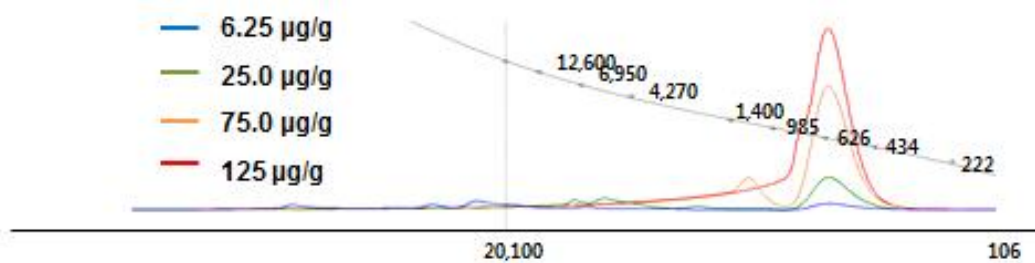


Figure 3.2.31. Gel permeation chromatograph of trypsin-treated porcine placenta. Placenta was treated by subcritical water at 37.5 MPa and 200°C and incubated with the enzyme for 24 h.

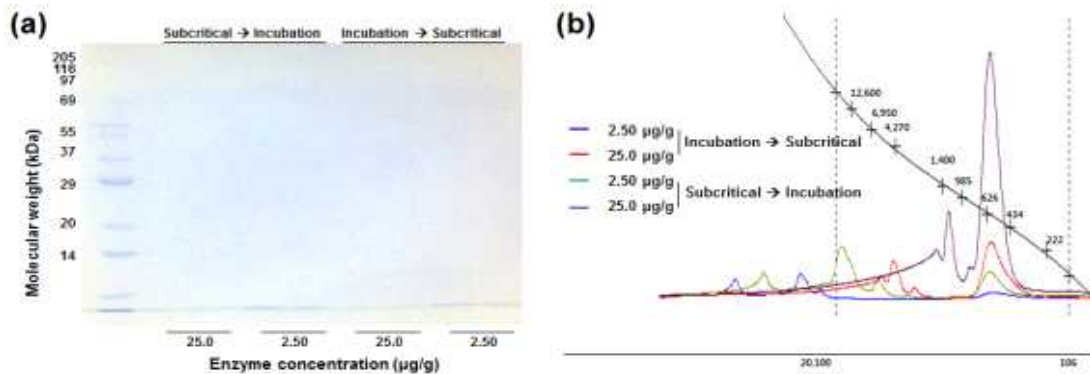


Figure 3.2.32. Effect of processing procedures on SDS-PAGE pattern (a) and gel permeation chromatograph (b) of trypsin-treated porcine placenta. Subcritical water processing was conducted at 37.5 MPa and 200°C, and incubation was at 37°C for 24 h.

반면 효소 농도의 증가에 따른 경제성을 고려하였을 때, 통합 공정(효소 가수분해 및 아임계수 처리) 기술의 도입을 통하여 효소의 사용 농도를 낮추는 것이 바람직하다고 평가되었다. 따라서 본 연구에서는 효소처리와 아임계수 처리 순서 및 효소 농도에 따른 가수분해 효율을 평가하였다(Figure 3.2.32). 공정 순서 및 사용효소 농도에 관계없이 전기영동 상에는 peptide band가 관찰되지 않았다. 따라서 대부분의 고분자 peptide의 가수분해는 효과적으로 야기된 것

으로 판단되었다. 저분자 peptide에 있어서 GPC 분석 결과 2.50  $\mu\text{g/g}$ 에서는 20,000 Da 이상의 분자량 peak들이 여전히 감지되고 있었고, 따라서 기존에 활용하던 25.0  $\mu\text{g/g}$ 의 농도가 최적 농도로 평가되었다. 공정 순서에 관계없이 25.0  $\mu\text{g/g}$  trypsin과 반응시킨 태반은 5,000 Da 미만의 저분자량 peptide로 효과적으로 분해가 이루어졌으며, 특히 아임계수 처리 후 효소 반응시켰을 때 1,000 Da 미만의 peptide로 가수분해가 효과적으로 이루어짐을 보였다.

이상의 결과를 통하여 공정 통합 측면에 있어서 원료 태반의 아임계수 처리는 효소와의 반응을 위한 젤라틴화 등의 열처리가 생략될 수 있는 장점이 있으며, 아임계수로 일부 가수분해된 콜라겐 peptide가 차후 효소적 가수분해에 의하여 저분자량 peptide로 분해됨으로써 고부가가치 저분자량 peptide 생산이 가능할 것으로 관찰되었다. 또한 효소반응 단계에 200 MPa의 압력 처리를 한다면 일부 1,000 Da 영역의 peptide를 효과적으로 500 Da 영역으로 가수분해할 수 있을 것으로 기대된다.

### (5) Microfluidizer를 통한 peptide 미세화

본 연구에서는 peptide의 저분자화를 위한 microfluidizer의 이용 가능성을 확인하기 위하여 수행되었다. 돼지 태반은 6 N HCl에서 3시간 가수분해 시킨 후 0.1(대조구), 50, 100 및 150 MPa의 압력 수준으로 microfluidizer를 통과시켰으며 이후 가수분해물의 분자량, 입자크기 및 zeta potential을 측정하여 펩타이드 미세화를 측정하였다.

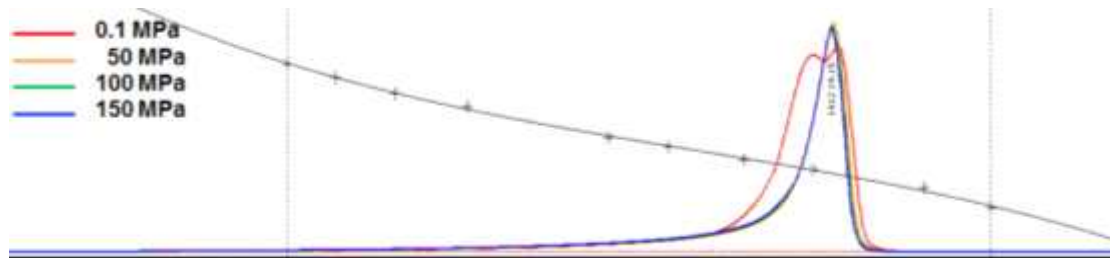


Figure 3.2.33 Gel permeation chromatograph of acid-treated porcine placenta hydrates after treatment of microfluidizer.

GPC 측정 결과 산 가수분해 직후 태반 peptide는 400 및 500 Da의 두 peak로 구성되었고, microfluidizer 처리에 의하여 500 Da peak는 관찰되지 않았다. 반면 microfluidizer 유압에 따른 분자량 peak의 변화는 보이지 않았다(Figure 3.2.33). 입자크기 및 potential에 있어서 유압의 증가는 입자 크기를 감소시켰으며, peptide의 음전하가 강화되는 경향을 보였다(Figure 3.2.34). 이상의 결과 microfluidizer에 의한 peptide 미세화가 가능함을 보이는 것으로, 일부 단백질 공유 결합에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 반면 이러한 현상에서 압력 자체에 의한 peptide 미세화가 야기되었다고 간주될 수 없다. 따라서 peptide 미세화는 microfluidizer 처리 과정에 발생하는 마찰열에 의한 일부 peptide 결합의 파괴에 기인한 것으로 예측된다. 따라서 microfluidizer에 의한 peptide 미세화는 가능하다고 판단할 수 있지만, 이를 통한 미세화 정도는 매우 미약한 것으로 판단되며, 일부 제한적으로 유리아미노산이 발생할 것으로 예측된다. 따라서 산업적 적용에 있어서 microfluidizer의 응용보다는 고온 처리를 통한 peptide 가수분해

가 보다 효과적일 것으로 판단된다.

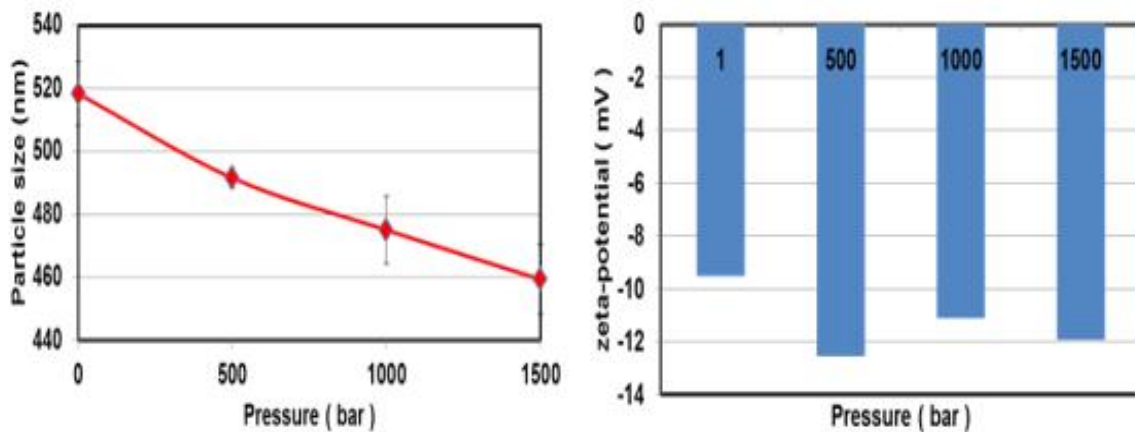


Figure 3.2.34. Effects of microfluidizing pressure on the particle size and zeta-potential of acid-treated porcine placenta hydrates.

#### (6) 아미노산 및 peptide 분획 및 정제

아미노산 및 저분자량 peptide 분획 및 정제를 위하여 1,000 Da 미만의 peptide를 선별적으로 분리하였고, 이들의 아미노산 조성을 태반의 산가수분해물(12 N HCl, 6시간 가수분해)과 비교 분석하였다(Figure 3.2.35).

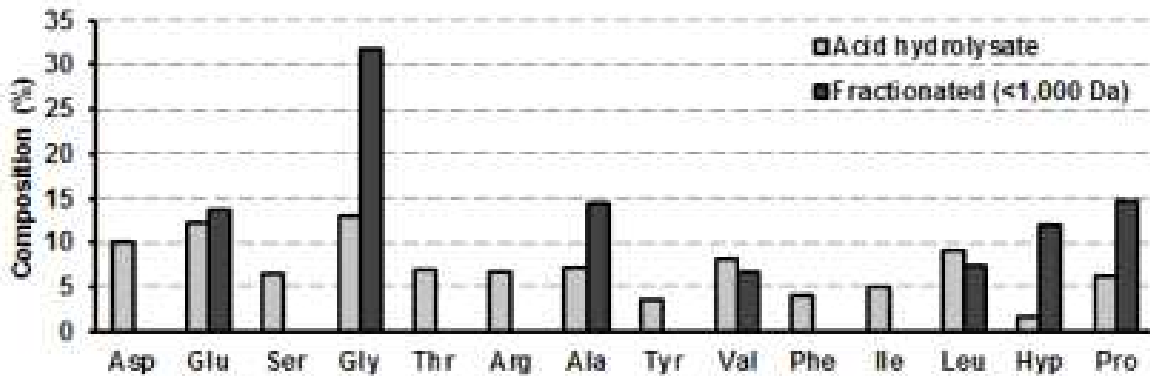


Figure 3.2.35. Amino acid compositions of acid-hydrolyzed placenta and isolated low molecular weight fraction (<1,000 Da).

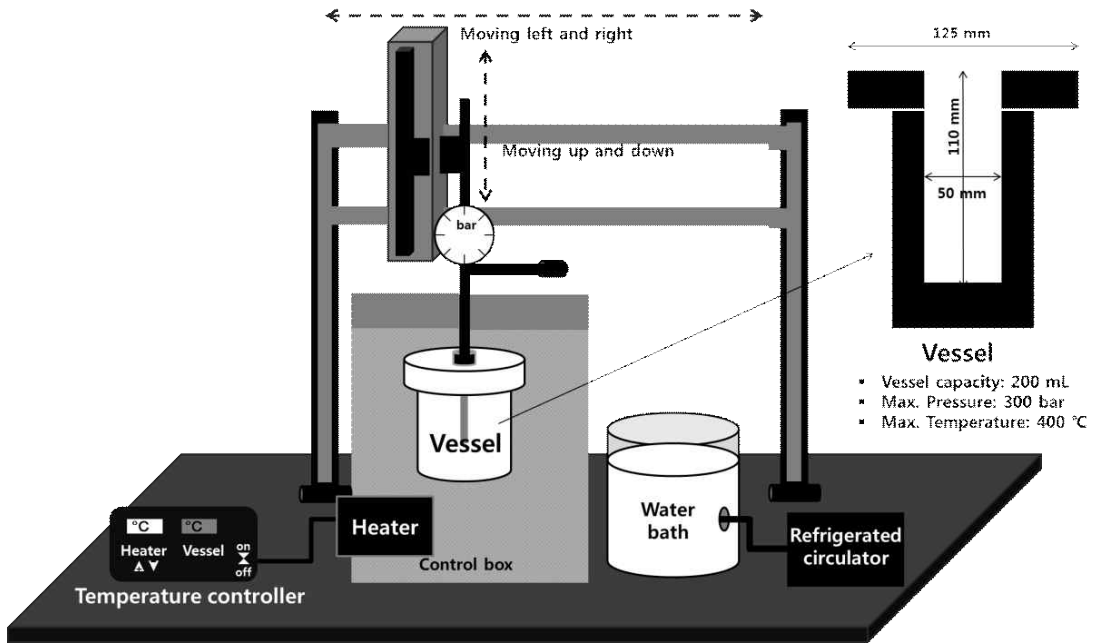
태반 산 가수분해물에서는 Gly, Glu, Asp, Val 및 Ile 등이 전체 아미노산 조성의 주를 이루고 있는 반면, 분리 정제된 저분자 펩타이드(<1,000 Da)는 Glu, Gly, Ala, Val, Leu, Hyp 및 Pro의 아미노산으로만 구성됨을 보이고 있다. 특히 높은 Gly, Hyp 및 Pro 함량은 대부분의 peptide가 Gly-X-Y의 중·단쇄 peptide로 구성되어 있으며, X와 Y위치는 기타 아미노산으로 구성되어 있기 때문으로 판단된다. 반면 peptide 회수율과 GPC 분석 결과 높은 회수율에 기인하여 결과를 얻을 수 없었다. 따라서 분획 정제된 peptide를 농축하여 이들의 구조 및 특성을 규명하기 위한 연구가 진행 중이다.



아. 초임계수 및 아임계수를 이용한 돈피의 가수분해

(1) 돈피의 전처리 및 아임계수 처리

돈피의 지방 및 잔여물을 제거하기 위해 돈피 무게의 2배 양의 70°C의 열수에서 2시간 동안 침지하였다. 그리고 0.5 × 0.5 cm로 슬라이스 된 돈피는 3배의 물과 함께 블렌딩 하였다. 초고속 균질기를 이용하여 25,000 rpm으로 5분간 균질하였다. 전처리 된 돈피는 250 mL 크기의 반응조에 돈피양의 2배의 물과 가수분해 하였다. 이때 처리 온도 및 압력은 각각 300°C, 80 bar(아임계수) 와 400°C, 280 bar(초임계수)였다.



(2) Gel permeation chromatography(GPC) 이용한 분자량 측정

가수분해물의 분자량 측정은 Gel permeation chromatography(YL 9100 high performance liquid chromatography(HPLC) system(Younglin Instrument Co. Ltd., Korea)) 이용하여 측정하였다. 1차원 결과와 유사하게 1 kDa 이하로 가수분해 되었고, 초임계수로 처리된 가수분해물은 200<Mw<300의 평균분자량을 나타냈고, 아임계수 처리된 돈피 가수분해물은 400<Mw<600의 값을 나타냈다. 초임계수처리 된 돈피가 더 작은 평균분자량으로 가분분해 되었지만, 돈피 특유의 향미가 강하게 나타나 시제품 개발을 위해서 아임계수로 처리된 돈피 가수분해물을 이용하여 유제품 및 음료를 제조하고자 하였다.

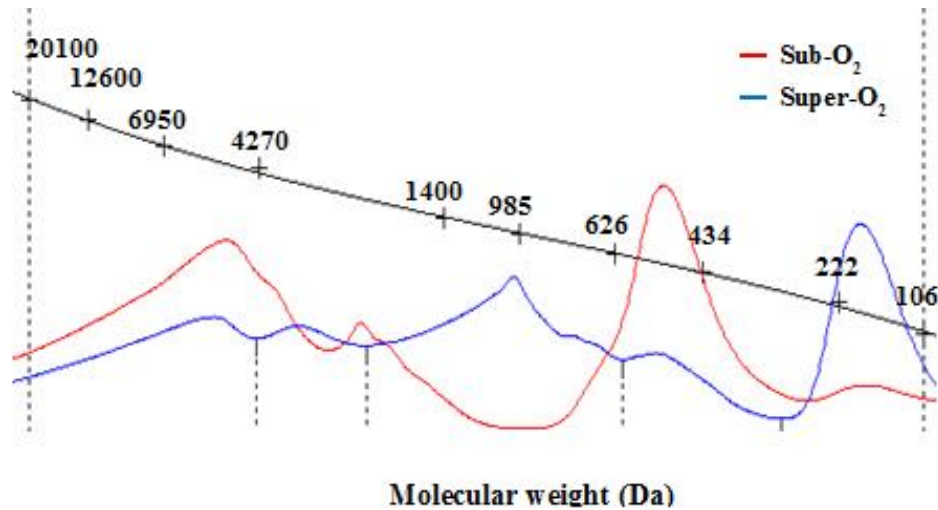


Figure 3.2.37 Gel permeation chromatograph of porcine skin treated with Sub-H<sub>2</sub>O (redline) or Super-H<sub>2</sub>O (blueline).

### (3) 유리아미노산 함량

가수분해가 되는 정도를 간접적으로 확인하기 위해 유리아미노산 함량을 측정하였다. 아임계수로 처리된 돈피의 유리아미노산 함량이 57.18 mM로 초임계수 처리된 돈피보다 높게 측정되었다. 초임계수 처리는 아임계수 처리된 돈피보다 저분자의 가수분해물을 생성하지만, 가수분해율은 아임계수 처리보다 높지 않은 것으로 사료된다.

Table 3.2.10 Effect of sub- and super-critical water treatment on free amino acid contents of hydrolyzed porcine skin

Treatment	Free amino acid (mM)
Sub-H <sub>2</sub> O	57.18±0.69
Super-H <sub>2</sub> O	30.13±0.70

### (4) 돈피 가수분해물의 수분함량 및 pH, 색도

초임계수 및 아임계수 처리된 가수분해물의 수분함량, pH, 색도를 측정한 결과 다음과 같다. 수분함량은 다양한 처리에 따라 즉, 생시료, 전처리시료, 아임계수 처리시료, 초임계수 처리 시료에 따라 유의적 차이를 보이지 않은 반면, pH는 아임계수 및 초임계수 처리에 의해 알카리 범위로 증가하는 경향을 보였다. 이는 가수분해동안 self-ionization 현상에 의해 [OH]가 증가함에 따라 일어난 현상으로 추측한다. 색도변화에서 특히 적색도와 밝기는 처리 온도의 증가에 따라 유의적으로 감소였다.

Table 3.2.11 Physicochemical properties of porcine skin before and after various treatments

Treatment	Moisture content		pH		$L^*$ -value		$a^*$ -value		$b^*$ -value	
Raw (10°C)	59.22	± 1.89	7.29	± 0.01	69.5	± 1.28	6.63	± 0.82	12.4	± 1.58
Pre-thermal treatment (70°C)	60.97	± 6.67	7.98	± 0.00	47.5	± 1.77	3.7	± 0.54	13.7	± 1.01
Sub-H <sub>2</sub> O (300°C)	57.46	± 3.89	9.22	± 0.01	33.6	± 0.05	0.59	± 0.06	11.4	± 0.06
Super-H <sub>2</sub> O (400°C)	59.23	± 0.84	9.49	± 0.01	33.7	± 0.12	1.47	± 0.02	10.8	± 0.11

(5) 아미노산 조성 분석 결과

돈피가수분해물의 아미노산 조성을 분석한 결과 특히 Gly 는 아임계수 처리된 돈피 가수분해물에서 25% 이상의 높은 조성을 보였다. Glu 및 Pro, Gly 는 두 처리구에서 높은 조성을 나타냈으며, 1 차 년도 돈 태반 가수분해물의 아미노산 조성 분석과 크게 다르지 않았다.

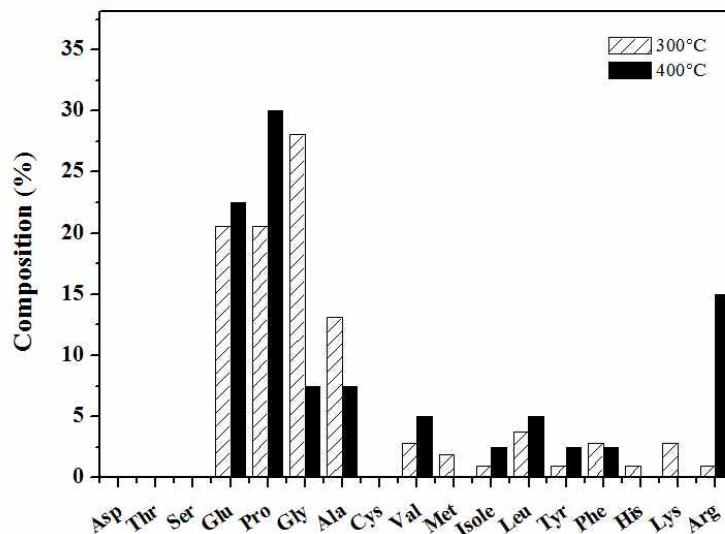


Figure 3.2.38 Amino acid profile of porcine skin hydrolyzed by Sub-H<sub>2</sub>O and Super-H<sub>2</sub>O treatment.

자. 돈피 가수분해물을 이용한 아이스크림의 제조

(1) 아이스크림의 제조

아임계수로 처리된 돈피 가수분해물(<1 kDa)을 이용하여 초콜릿 아이스크림을 제조하였다. 이 때 돈피 가수분해물은 아이스크림의 안정제 역할로 이용되었으며 아이스크림 안정제로 주로 이용되는 젤라틴과 비교하고자 하였다. 즉 저분자 돈피 콜라겐 펩타이드와 고분자 젤라틴이 첨가되었을 때 아이스크림의 물리적 특성 차이를 관찰하기 위해 0~0.5% 다양한 농도의 돈피 가수분해물을 첨가하였다. 아이스크림에 첨가되는 총 안정제량은 0.5%로 고정하였다. 돈피 가수분해물의 특유의 향미를 상쇄하기 위해 초콜릿 향을 선택하였다.

Table 3.2.12 Composition of the chocolate ice cream samples used in the present study

Sample	Gelatin (%)	HPS (%)	Milk fat (%)	MSNF (%)	Sucrose (%)	Corn syrup solids (%)	Glyceryl monosearate (%)	Cocoa powder (%)
Control	0.5	0						
HPS 0.1	0.4	0.1						
HPS 0.2	0.3	0.2						
HPS 0.25	0.25	0.25	11	10	12	4	0.2	3
HPS 0.3	0.2	0.3						
HPS 0.4	0.1	0.4						
HPS 0.5	0	0.5						

Table 3.2.13 Physical properties of porcine skin collagen extract (HPS)

	pH	Average molecular weight (Da)	Free amino acid (mM)	<i>L</i> *-value	<i>a</i> *-value	<i>b</i> *-value
<b>HPS</b>	9.22±0.01	500	57.18±0.69	33.6±0.05	0.59±0.06	11.4±0.06

(2) 아이스크림 녹는 속도 관찰

돈피 가수분해물 첨가 아이스크림 제조 후 아이스크림의 녹는 속도를 측정한 결과 돈피 가수분해물 첨가 아이스크림이 최초로 녹는 시간을 빠르나, 돈피 가수분해물 첨가량이 전체 안정제의 50%이상으로 증가할 수 록 분당 녹는 양은 감소하는 경향을 나타냈다.

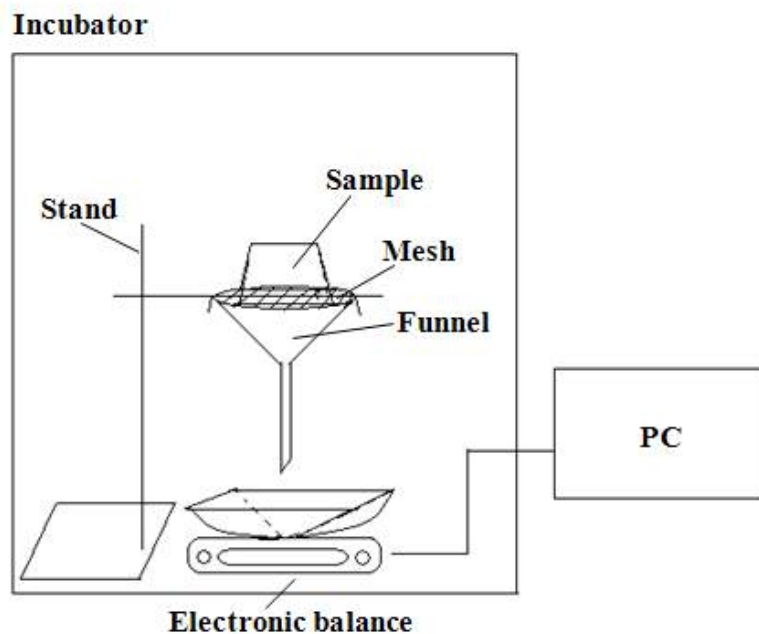


Figure 3.2.39 Schematic presentation of ice cream melting systems.

Table 3.2.14 Effect of hydrocolloids on melting quality of chocolate ice cream

Treatments	First dropping time (min)	Melting rate (g/min)
Control	35.67 ± 2.08 <sup>a</sup>	6.35 ± 0.78 <sup>a</sup>
HPS 0.1	23.33 ± 2.52 <sup>b</sup>	4.43 ± 0.16 <sup>b</sup>
HPS 0.2	17.00 ± 3.61 <sup>c</sup>	4.02 ± 0.19 <sup>bc</sup>
HPS 0.25	15.33 ± 0.58 <sup>c</sup>	3.66 ± 0.09 <sup>c</sup>
HPS 0.3	17.67 ± 1.53 <sup>c</sup>	3.55 ± 0.19 <sup>c</sup>
HPS 0.4	16.33 ± 1.15 <sup>c</sup>	3.71 ± 0.16 <sup>c</sup>
HPS 0.5	15.33 ± 1.15 <sup>c</sup>	3.69 ± 0.11 <sup>c</sup>

Mean ± SD was calculated based on at least 3 replications.

<sup>a,c</sup> Different letters in the same column are statistically different (p < 0.05).

### (3) 돈피 가수분해물 첨가 아이스크림의 점성

돈피아이스크림을 녹인 후 rheometer (Anton Paar, MCR 302, Austria)를 이용하여 아이스크림의 점성을 측정하였다. 돈피가수분해물 첨가량이 증가할수록 겔보기 점도(Kokini viscosity)와 Consistency coefficient가 감소하였으며, flow behavior index가 1이하로 측정되었다. 대조구인 0.5% 젤라틴 첨가 아이스크림이 가장 높은 점성을 나타냈고, 반대로 0.5% 돈피가수분해물 첨가물 아이스크림의 점도가 0.10 Pa·s로 가장 낮았다.

Table 3.2.15 Effect of hydrocolloids on Kokini viscosity, consistency coefficient and flow behavior index of chocolate ice cream mixes

Treatments	Kokini viscosity $\eta_{50}$ (Pa·s)	Consistency coefficient K (Pa·s <sup>n</sup> )	Flow behavior index n
Control	0.43 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.65 ± 0.31 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>d</sup>
HPS 0.1	0.28 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.23 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.04 <sup>c</sup>
HPS 0.2	0.19 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.09 <sup>bc</sup>	0.87 ± 0.03 <sup>b</sup>
HPS 0.25	0.15 ± 0.02 <sup>cd</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.88 ± 0.01 <sup>ab</sup>
HPS 0.3	0.15 ± 0.04 <sup>cd</sup>	0.24 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.89 ± 0.02 <sup>ab</sup>
HPS 0.4	0.11 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.93 ± 0.01 <sup>a</sup>
HPS 0.5	0.10 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.13 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.92 ± 0.01 <sup>ab</sup>

Mean ± SD was calculated based on at least 3 replications.

<sup>a,d</sup> Different letters in the same column are statistically different (p < 0.05).

### (5) 돈피 가수분해물 첨가 아이스크림의 색도

돈피 가수분해물 첨가량에 따른 유의적인 색의 변화는 나타나지 않았다(p > 0.05).

Table 3.2.16 Effect of hydrocolloids on lightness, redness, yellowness and total color difference of chocolate ice cream

Treatment	<i>L</i> *-value	<i>a</i> *-value	<i>b</i> *-value	DE
Control	42.53±0.41	10.71±0.23	16.84±0.23	27.25±0.47
HPS 0.1	43.03±0.17	10.74±0.18	16.94±0.22	26.76±0.16
HPS 0.2	41.64±0.85	10.32±0.11	16.93±0.44	28.01±0.77
HPS 0.25	42.39±0.32	10.37±0.30	17.25±0.27	27.24±0.39
HPS 0.3	41.67±1.68	10.31±0.32	17.38±0.30	27.92±1.53
HPS 0.4	42.34±0.25	10.65±0.19	17.31±0.19	27.34±0.29
HPS 0.5	42.32±0.26	10.32±0.13	17.12±0.26	27.32±0.25

Mean±SD was calculated based on at least 3 replications.

Values did not indicate significant difference ( $p>0.05$ ).

(6) 돈피 가수분해물 첨가 아이스크림의 관능적 특성 분석

돈피 가수분해물 첨가 아이스크림의 관능적 특성을 관찰하기 위해 돈피 가수분해물 0%(대조구), 0.2%, 0.5% 첨가시료를 선택하여 관능검사를 실시하였다. 7점 척도법을 사용하였으며, 외관, 향, 향미, 조직감 등 총 10가지 관능항목으로 평가하였다. Appearance, bitterness, creaminess, iciness, sweetness, smoothness, coarseness은 3가지 아이스크림에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 off-flavor는 돈피 가수분해물 첨가량이 증가할수록 유의적으로 강해졌다. 조직감에서는 점도측정 결과와 마찬가지로 5% 젤라틴첨가 아이스크림이 Hardness가 가장 높게 평가되었다.

Table 3.2.17 Effect of hydrocolloids on the sensory attributes of chocolate ice cream

Sensory parameters	Treatments		
	Control	HPS 0.5	HPS 0.2
Appearance	3.60±1.34 <sup>a</sup>	4.20±0.84 <sup>a</sup>	3.40±0.89 <sup>a</sup>
Chocolate flavor	4.20±1.30 <sup>a</sup>	2.60±0.89 <sup>b</sup>	2.60±0.55 <sup>b</sup>
Off-flavor	1.40±0.55 <sup>b</sup>	3.40±1.34 <sup>a</sup>	3.60±1.52 <sup>a</sup>
Bitterness	3.60±0.55 <sup>a</sup>	3.80±1.30 <sup>a</sup>	3.00±0.71 <sup>a</sup>
Creaminess	2.80±1.10 <sup>a</sup>	3.00±1.00 <sup>a</sup>	3.80±1.30 <sup>a</sup>
Iciness	2.00±1.00 <sup>a</sup>	2.00±0.71 <sup>a</sup>	1.80±0.84 <sup>a</sup>
Hardness	3.60±0.55 <sup>a</sup>	2.20±0.84 <sup>b</sup>	2.20±0.84 <sup>b</sup>
Sweetness	3.20±1.10 <sup>a</sup>	2.60±0.89 <sup>a</sup>	3.60±1.14 <sup>a</sup>
Smoothness	3.00±1.00 <sup>a</sup>	3.40±0.89 <sup>a</sup>	3.20±1.48 <sup>a</sup>
Coarseness	3.80±0.84 <sup>a</sup>	2.60±1.14 <sup>a</sup>	2.60±0.89 <sup>a</sup>

Mean±SD was calculated based on at least 5 replications.

<sup>a,b</sup> Different letters in the same row are statistically different ( $p<0.05$ ).

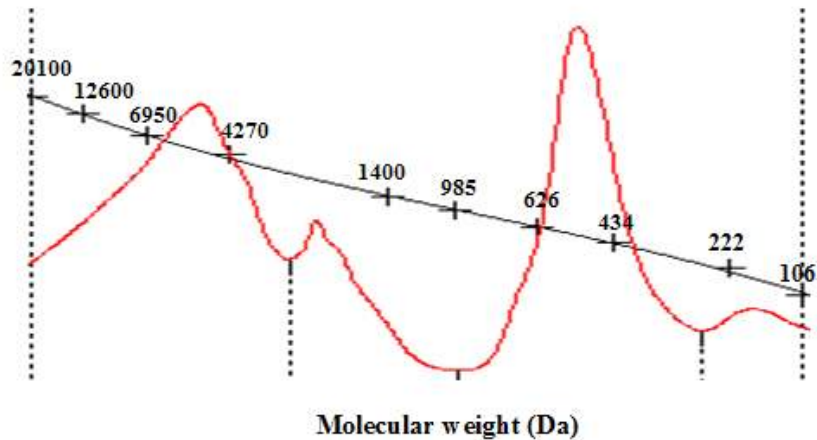


Figure 3.2.40 Gel permeation chromatography (GPC) graph about molecular weight of HPS.

(4) Oscillatory rheometry

Rheometer(Anton Paar, MCR 302, Austria)를 이용하여 아이스크림의 점탄성을 측정하였다.  $-10^{\circ}\text{C}$  미만의 환경에서는 저장탄성률  $G'$ 와 손실 탄성률  $G''$ 의 레벨은 얼음결정 크기 및 아이스크림의 강성에 관계가 깊고, 온도가  $0^{\circ}\text{C}$  내지  $10^{\circ}\text{C}$ 로 증가함에 따라, 얼음이 완전히 녹으며, 이때 측정되는 손실탄성률 $G''$ 은 크림성과 관계가 있다. 본 실험에서는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에선 저장탄성률,  $10^{\circ}\text{C}$ 에서 손실탄성률을 측정하였다.  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 0.2%와 0.4% 돈피 가수분해물 첨가 아이스크림은 낮은 저장탄성률을 보이므로 얼음결정성장을 억제하는 안정제로서 효과적임을 나타내다. 대조구인 5% 젤라틴 첨가 아이스크림은 높은 점성을 보였으며,  $10^{\circ}\text{C}$ 에서 높은 손실탄성률을 보임으로서 높은 크림성을 나타냈으나, 높은 저장탄성률을 가짐으로서 큰 얼음결정을 형성하는 것으로 나타났다.

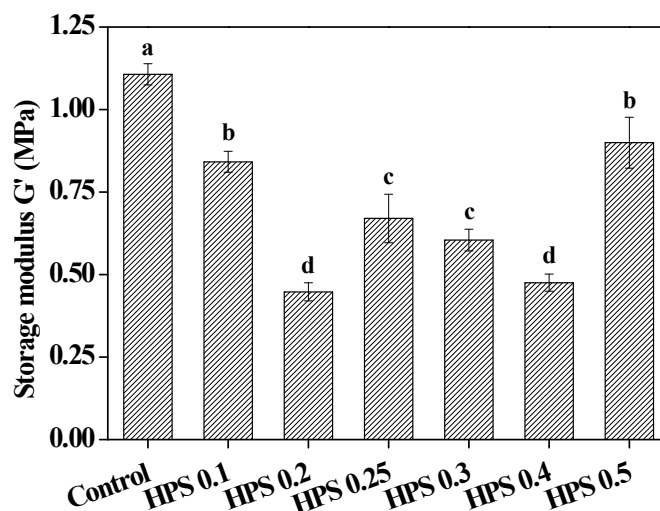


Figure 3.2.41 The influence of hydrocolloids on the ice cream storage modulus at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Control: 0.5% gelatin, HPS 0.1: 0.1% HPS+0.4% gelatin, HPS 0.2: 0.2% HPS+0.3% gelatin, HPS 0.25: 0.25% HPS+0.25% gelatin, HPS 0.3: 0.3% HPS+0.2% gelatin, HPS 0.4: 0.4% HPS+0.1% gelatin, HPS 0.5: 0.5% HPS, Mean $\pm$ SD was calculated based on at least 3 replications. <sup>a,d</sup> Different letters are statistically different ( $p < 0.05$ ).

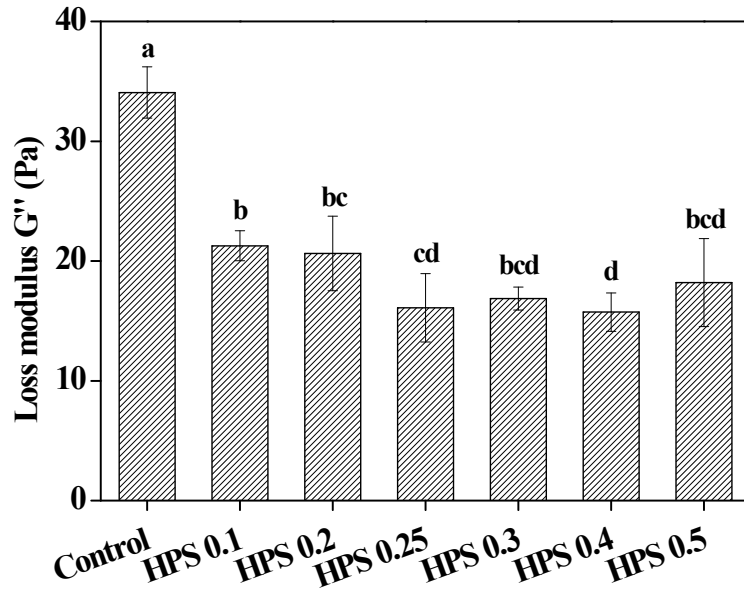


Figure 3.2.42 The influence of hydrocolloids on the ice cream loss modulus at 10°C. Control: 0.5% gelatin, HPS 0.1: 0.1% HPS+0.4% gelatin, HPS 0.2: 0.2% HPS+0.3% gelatin, HPS 0.25: 0.25% HPS+0.25% gelatin, HPS 0.3: 0.3% HPS+0.2% gelatin, HPS 0.4: 0.4% HPS+0.1% gelatin, HPS 0.5: 0.5% HPS, Mean±SD was calculated based on at least 3 replications. <sup>a,d</sup> Different letters are statistically different (p<0.05).

차. 에탄올이 첨가된 아임계수로 처리된 돈 태반 가수분해물의 특성분석

(1) 에탄올이 첨가된 아임계수 이용한 돈 태반의 가수분해

돈 태반의 가수분해물이 초임계수 및 아임계수 추출 시스템을 통해 생산되었고, 최적의 가수분해 조건도 설정되었다. 이번 연구에서는 에탄올 (ETOH)이 혼합된 아임계수에 의해 처리된 돈 태반 가수분해물의 특성과 에탄올 첨가에 따른 효과를 관찰하였다. 1차 년도에서 최적의 가수분해온도로 설정된 170°C로 돈 태반을 처리하였고 이때 압력은 10 bar 였다. 가수분해 시간은 각각 10 분과 30 분으로 설정하였으며 가수분해 미디엄으로 20% 와 50% 에탄올을 이용하였다.

(2) Gel permeation chromatography(GPC) 이용한 분자량 측정

가수분해물의 분자량 측정은 Gel permeation chromatography(YL 9100 high performance liquid chromatography (HPLC) system, Younglin Instrument Co. Ltd., Korea)) 이용하여 측정하였다. 1차년 결과와 유사하게 1 kDa 이하로 가수분해 되었고, 평균 400<Mw<600의 값을 나타냈다. 에탄올 농도가 낮을수록 높은 피크가 관찰되었고, 20,100 Da 이상의 범위에서 나타난 피크를 관찰한 결과 순수한 물을 가수분해 미디엄으로 이용했을 때 작은 분자량 범위에서 피크를 나타냈다. 또한 가수분해 시간이 증가함에 따라 높은 피크를 보였다.



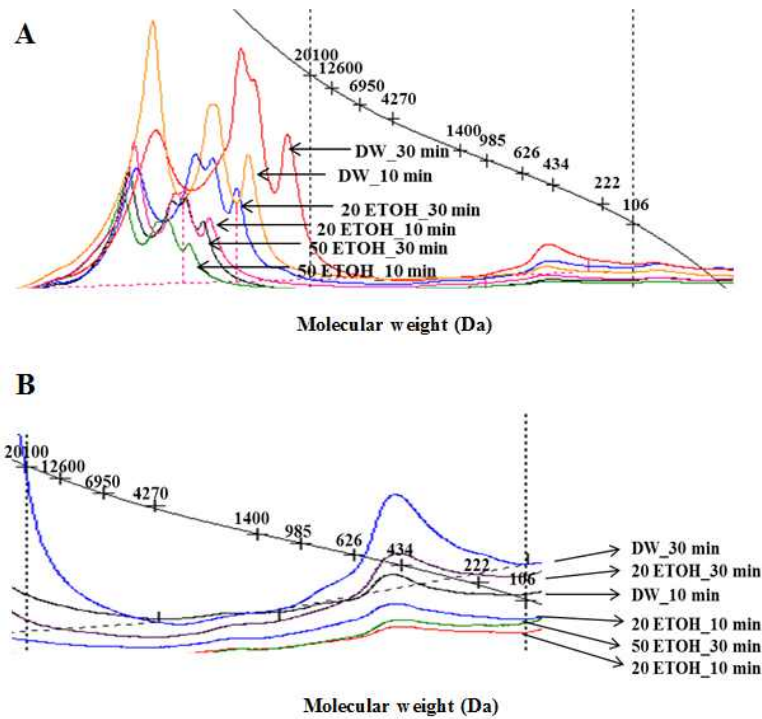


Figure 3.2.43 Gel permeation chromatograph of porcine placenta hydrolysates by various extraction medium and holding time, (A) all range of molecular weight (Da) (B) between 20100 Da and 106 Da.

### (3) 유리아미노산 함량

가수분해가 되는 정도를 간접적으로 확인하기 위해 유리아미노산 함량을 측정하였다. 높은 유리 아미노산 함량은 DW 미디움에서 30 분간 추출된 돈 태반 가수분해물에서 약 8 mM 로 측정 되었고, 유리 아미노산 추출 시간이 길어짐에 따라 증가하였다 ( $p < 0.05$ ).

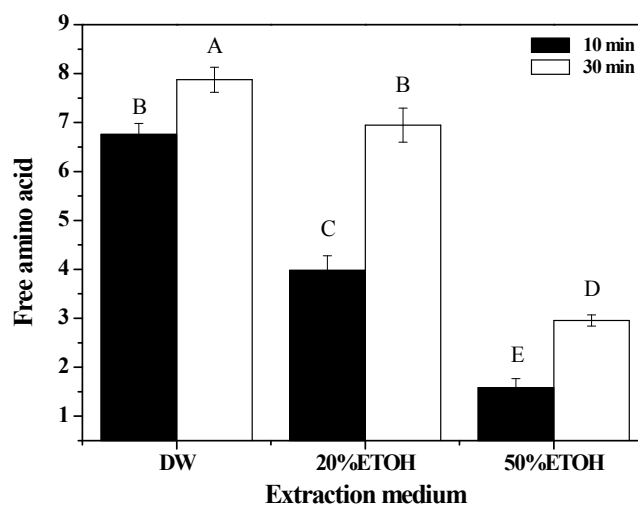


Figure 3.2.44 Free amino acid content of porcine placenta hydrolysates by various extraction medium and holding time.

#### (4) 조단백질 함량

조단백질 함량은 20% 에탄올 미디엄에서 30분간 추출했을 때 가장 높은 값을 나타냈고, 이어서 50% 에탄올 미디엄으로 추출한 가수분해물에서 높았다. 이러한 결과는 유리 아미노산 함량과 다른 경향이였다. 많은 조단백질이 에탄올과 물 혼합 미디엄에서 측정되었지만, 이들은 가수 분해 또는 아미노산으로 추출되지 않았다. 이러한 두 결과, 유리 아미노산 및 조단백질 함량은 에탄올과 물의 혼합물로 돈 태반을 가수 분해하는 것이 유효하지 않았다. 또한, 분자량 분포의 결과도 조단백질 함량결과를 뒷받침한다.

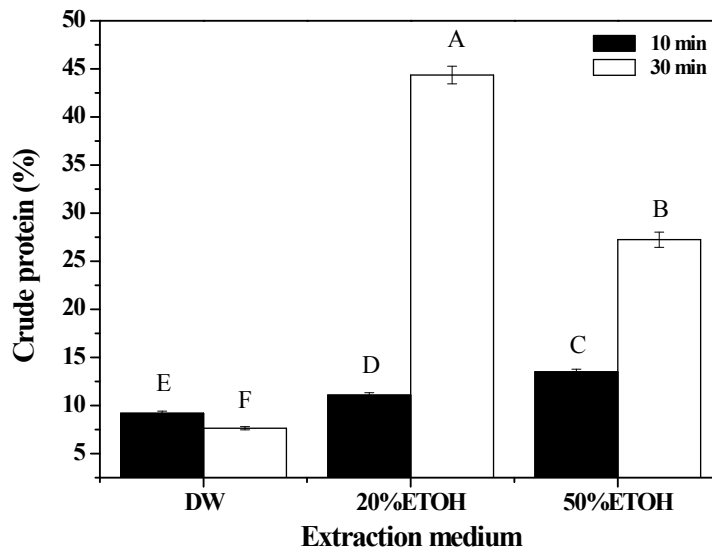


Figure 3.2.45 Crude protein of porcine placenta hydrolysates by various extraction medium and holding time.

#### (5) 돈 태반 가수분해물의 색도, 외관 및 pH

돼지 태반의 가수 분해 전과 후의 밝기, 적색도 및 황색도를 측정 하였다. 추출 시간에 따라 DW 미디엄에서는 유의적 차이가 없었으나, 20%와 50%에탄올 미디엄에서는 추출 시간에 따라 분명한 차이가 있었다( $p < 0.05$ ). 적색도와 황색도의 경우, 모든 종류의 미디엄에서 유의적으로 가수분해 시간에 따라 증가하였다( $p < 0.05$ ). 특히, 20% 에탄올에서 큰 차이를 보였다. 모든 샘플의 색차도 산출 하였다. 색차도 20% 에탄올 미디엄에서 가장 높았다. 샘플의 사진 이미지를 통해 분명히 색의 차이를 볼 수 있었다. 가수분해 된 돈 태반의 pH의 범위는 값이 물과 거의 유사 6.4~7.5였다.

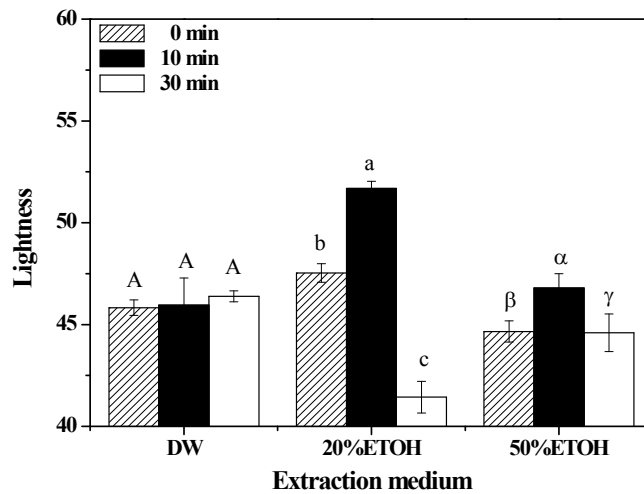


Figure 3.2.46 Lightness of porcine placenta hydrolysates by various extraction medium and holding time.

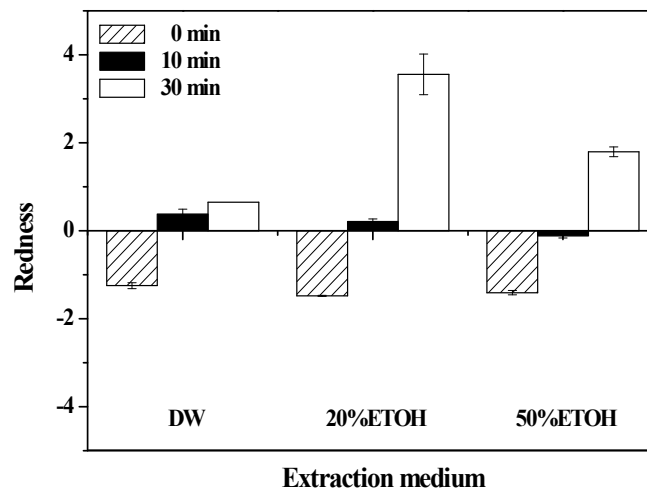


Figure 3.2.47 Redness of porcine placenta hydrolysates by various extraction medium and holding time.

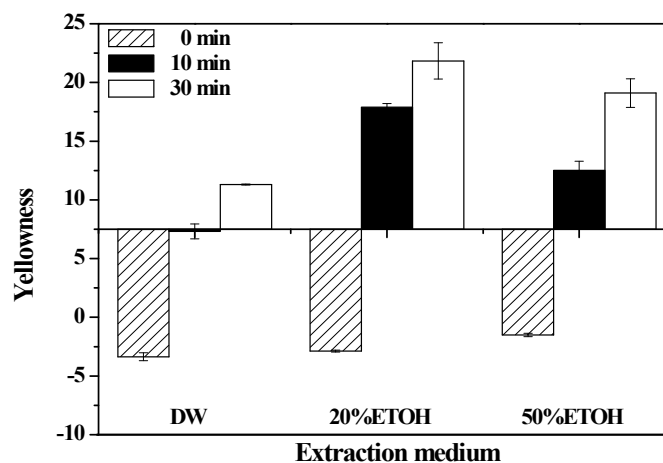


Figure 3.2.48 Yellowness of porcine placenta hydrolysates by various extraction medium and holding time.

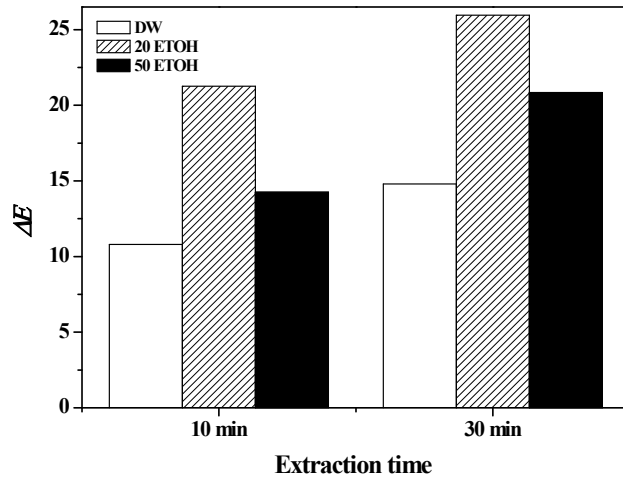


Figure 3.2.49 Total color difference of porcine placenta hydrolysates by various extraction medium and holding time.



Figure 3.2.50 Photographic image of porcine placenta hydrolysates by various extraction medium and holding time.

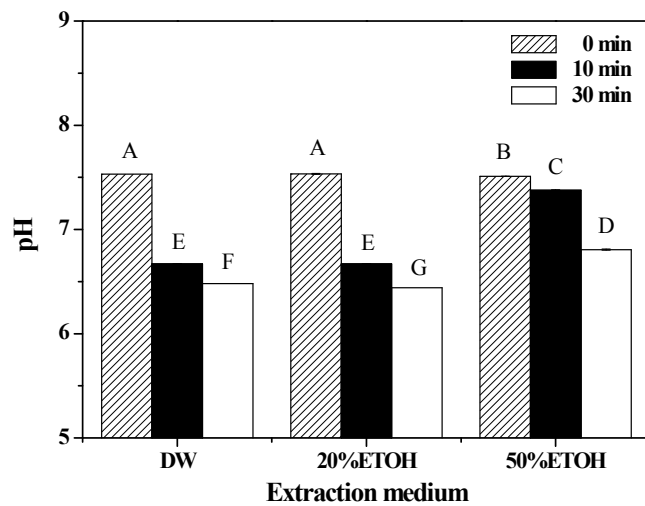


Figure 3.2.51 pH of porcine placenta hydrolysates by various extraction medium and holding time.

## 1.2. 난용성 칼슘제제의 가용화 기술 및 체내 흡수력이 우수한 칼슘복합제제 개발 (세종대학교-1,2차 년도: 제2협동, 3차 년도: 제1세부)

### 가. 건식 나노분말화의 공정과 제품의 표준화

#### (1) 난각의 전처리

나노 분말을 얻기 전에 난각의 난막을 제거 하는 것이 중요하다. 이를 위해 가열 공정을 50, 75, 100℃ 에서 20, 40, 60, 80, 100분 동안 경과 Figure 3.2.52-54에서 나타내었으며, 난막과 껍질이 따로 분리 되지는 않았지만 높은 온도에서 시간이 지나면 직접 제거 하기는 용이했다.

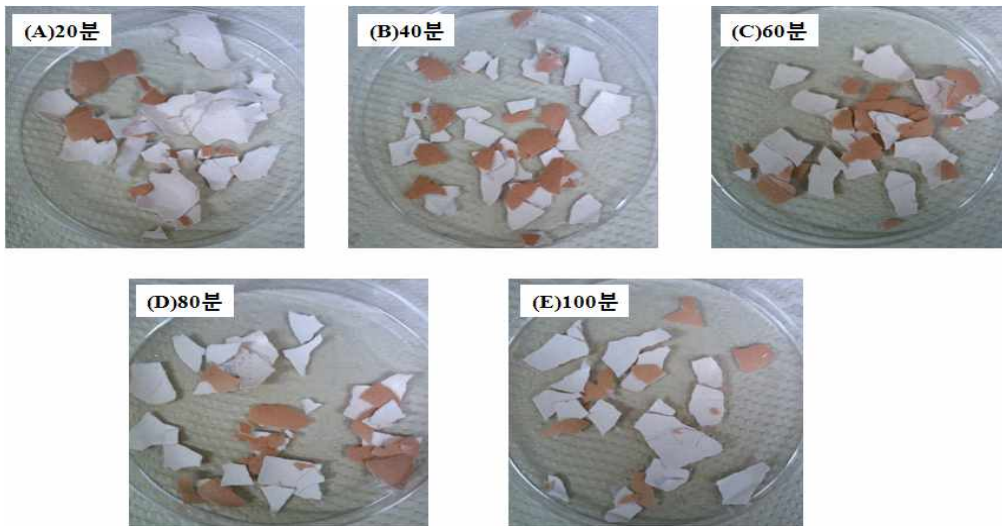


Figure 3.2.52 Processing of nanopowdered eggshell for 20, 40, 60, 80, 100 minutes at 50°C.

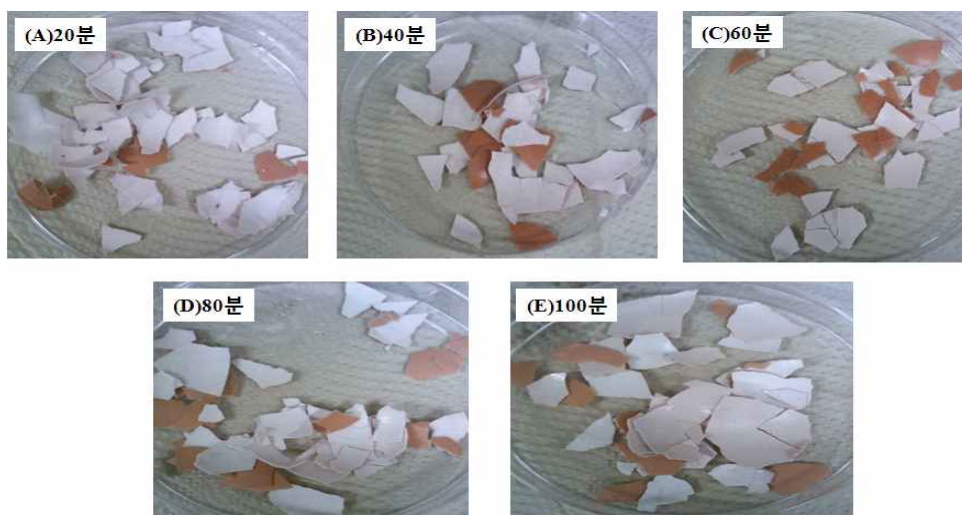


Figure 3.2.53 Processing of nanopowdered eggshell for 20, 40, 60, 80, 100 minutes at 75°C.

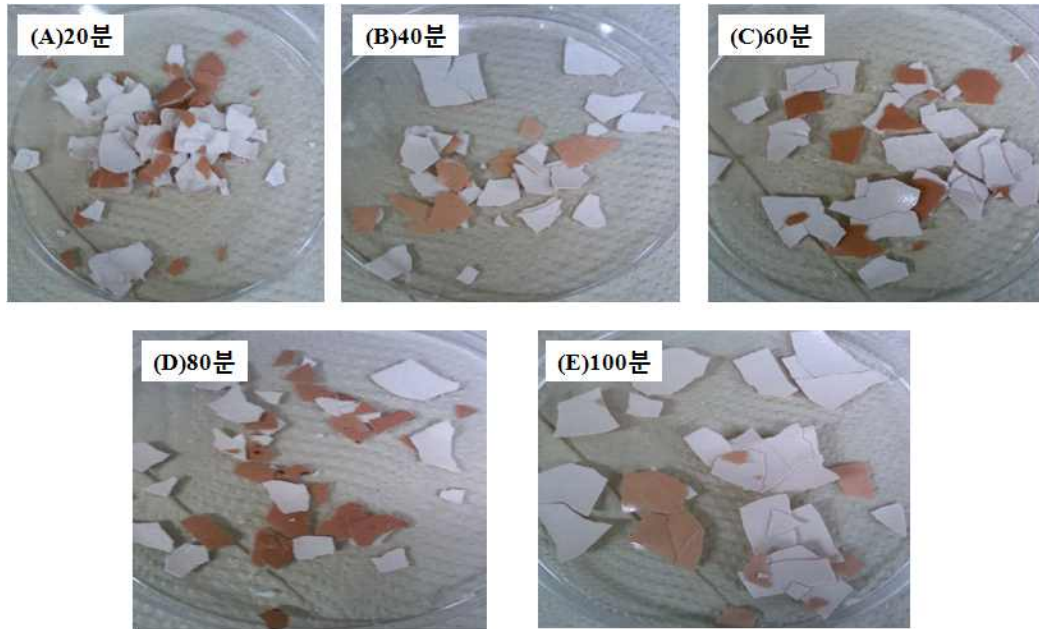


Figure 3.2.54 Processing of nanopowdered eggshell for 20, 40, 60, 80, 100 minutes at 100°C.

## (2) 나노분말화의 공정

난각분말(130~150 nm)을 나노입자별로 얻기 위해서 High Impact Planetary Mill(Pulverisette 6, Fritsch Co., Idar-Oberstein, Germany)을 300 rpm에서 6시간 동안 수행하였으나, 기기의 열 발생으로 인하여 응집이 되고 (Figure 3.2.55), 크기는 15~29  $\mu\text{m}$ 로 기대에 못 미치는 크기로 측정 이 되었다.

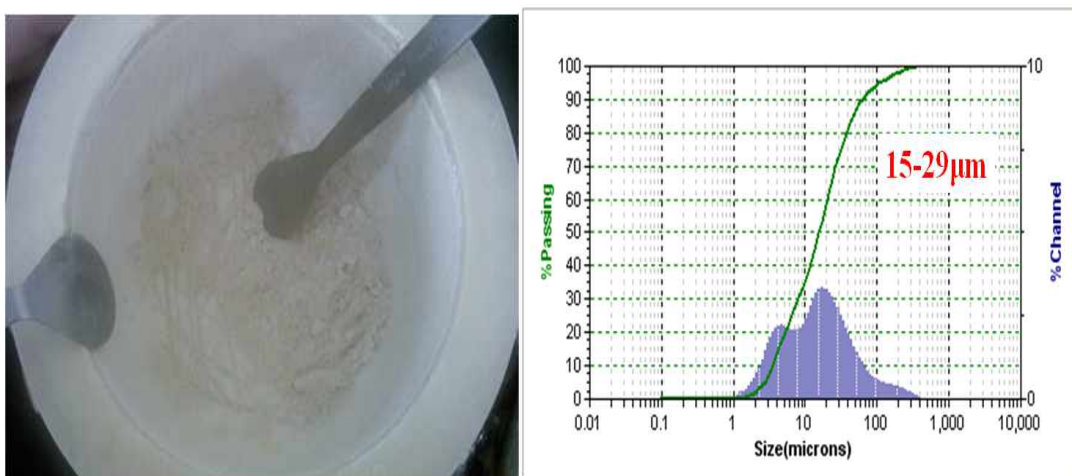


Figure 3.2.55 Milled eggshell (A) and particle size (B).

볼밀(Ball mill) 로부터 얻어진 난각과 일반난각의 색도를 측정한 결과는 Table 3.2.18 과 같다. 색차계로 측정한 Hunter value 결과, 볼밀로부터 얻어진 난각 나노분말의 밝기를 나타내는 L 값은  $87.63 \pm 0.85$ , 적색도를 나타내는 a 값은  $0.88 \pm 0.10$ , 황색도를 나타내는 b 값은  $11.79 \pm 1.79$  를 나타내며, 난각 일반분말의 L 값보다 낮게 측정되었고, a 값은 유의적 차이가 없었으며, b 값은 일반 난각분말 보다 높게 측정되어 유의적 차이를 나타냈다( $p < 0.05$ ).

Table 3.2.18 Color of Milled-eggshell and eggshell

Treatments	L	a	b
Milled-Eggshell	87.63±0.85 <sup>b</sup>	0.88±0.10 <sup>a</sup>	11.79±1.79 <sup>a</sup>
Eggshell	93.89±0.26 <sup>a</sup>	0.95±0.09 <sup>a</sup>	5.02±0.20 <sup>b</sup>



Figure 3.2.56 Appearance of Milled-eggshell and eggshell.

난각분말의 분산성을 측정된 결과를 Figure 3.2.56에서 관찰하여 보았다. 일반 난각과 볼밀을 사용하여 얻어진 난각을 증류수와 에탄올에서 24시간 동안 경과를 관찰하여 보았는데, 이때 에탄올에서의 분산성이 양호하므로, 에탄올에서 분산시켜 화학실험을 진행하여야 한다고 사료된다.



Figure 3.2.57 Dispersibility of milled eggshell and eggshell during 24 h.

### (3) 나노분말크기별 실험

#### ○ 크기 측정

굴 껍질과 계란껍질을 300, 600, 900 nm의 크기 별로 측정을 시도 하였다. 이는 Figure 3.2.57,58에서 크기 별로 측정을 하였는데, 일반 굴 껍질은 180 μm 크기로 분포하고, 크기별로 나노 입자한 굴 껍질은 700~1,000 nm로 분포되었다. 또한 계란껍질은 130 μm 크기로 분포하였으며, 크기별로 나노 입자한 계란껍질은 400~1,000 nm 크기로 분포되었다. 입자 평균 분포도는

다소 불균일한 상태를 나타내었다. 이것은 나노분말의 응집하려는 특성으로 인해 미세 증류상에서 잘 분산되지 않는 어려움으로 분체입자의 크기가 오히려 크게 측정되어 어려움을 야기하는 원인이 되고 있는 것으로 SEM사진과 TEM사진으로 확인을 해보아야 한다.

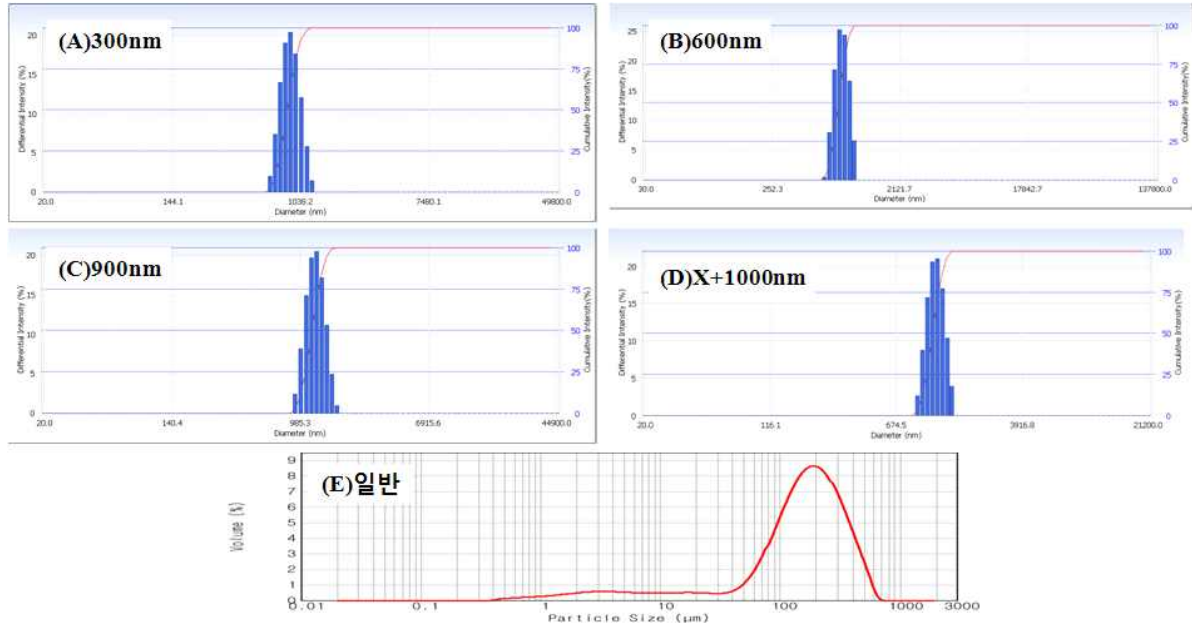


Figure 3.2.58 Particle size of nanopowdered and micropowdered oyster shell.

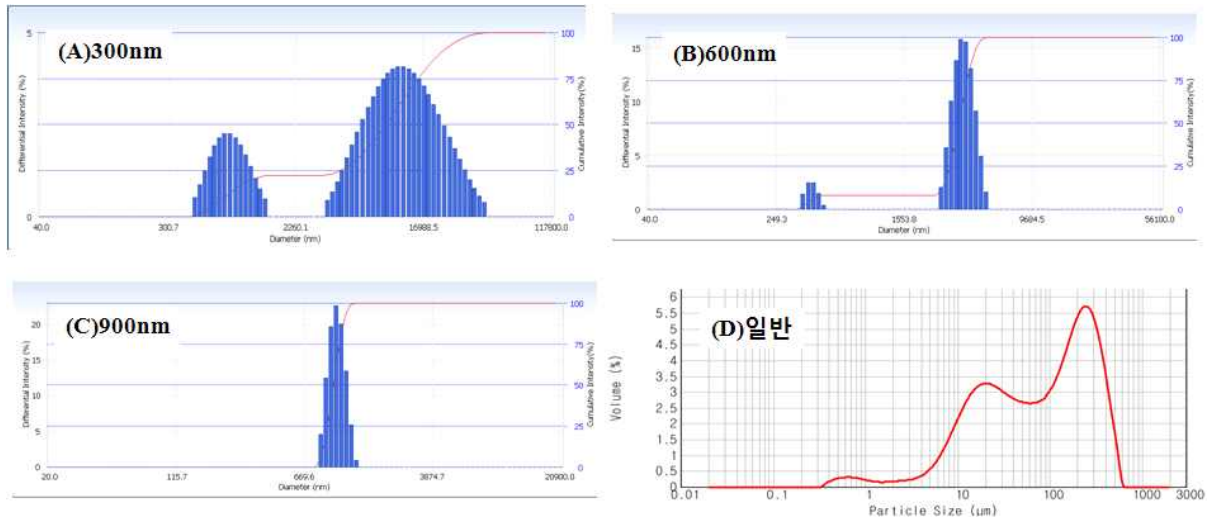


Figure 3.2.59 Particle size of nanopowdered and micropowdered eggshell.

○ SEM

굴 껍질과 계란껍질을 300, 600, 900 nm의 크기 별로 SEM사진으로 분석한 결과 Figure 3.2.60,61에서와 같다. 나노 굴 껍질은 600~1,000 nm였고, 일반 굴 껍질은 200 μm정도로 측정되었다. 또한 나노계란껍질은 400~1,000 nm였고, 일반 계란껍질은 150 μm정도로 측정되었다. 불규칙한 입자 주변에 분쇄에 의해 형성된 작은 입자들이 달라붙어 있는 미세구조를 나타내었다. 나노분말이 서로 잘 엉키어 SEM으로 측정하기에는 한계가 있어 TEM을 통하여 측정하였다.



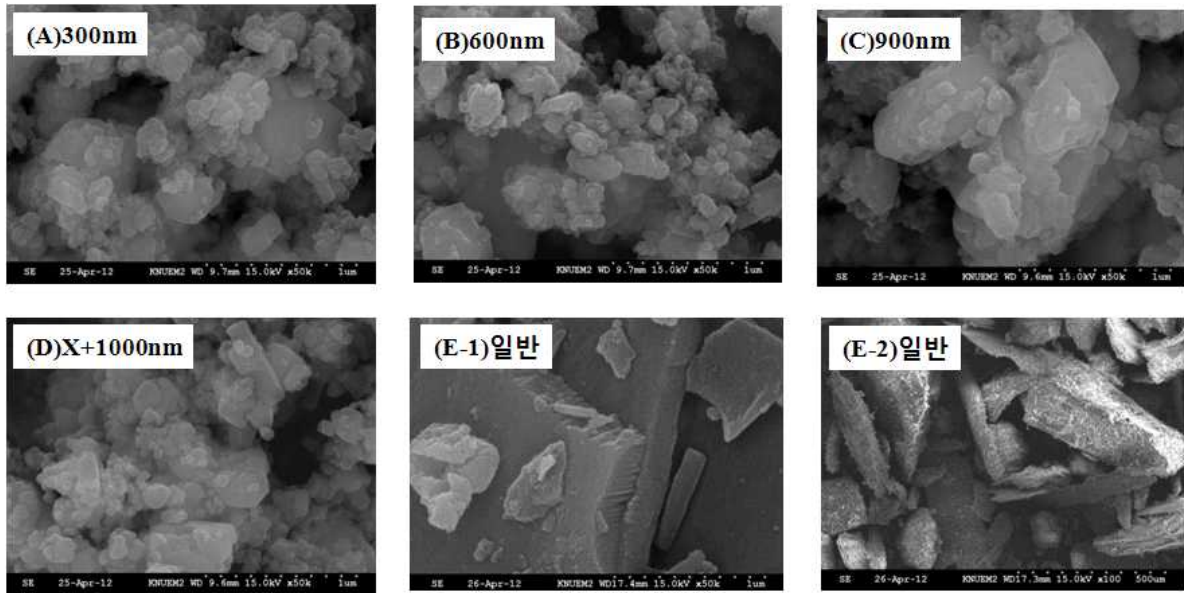


Figure 3.2.60 SEM of nanopowdered and micropowdered oyster shell.

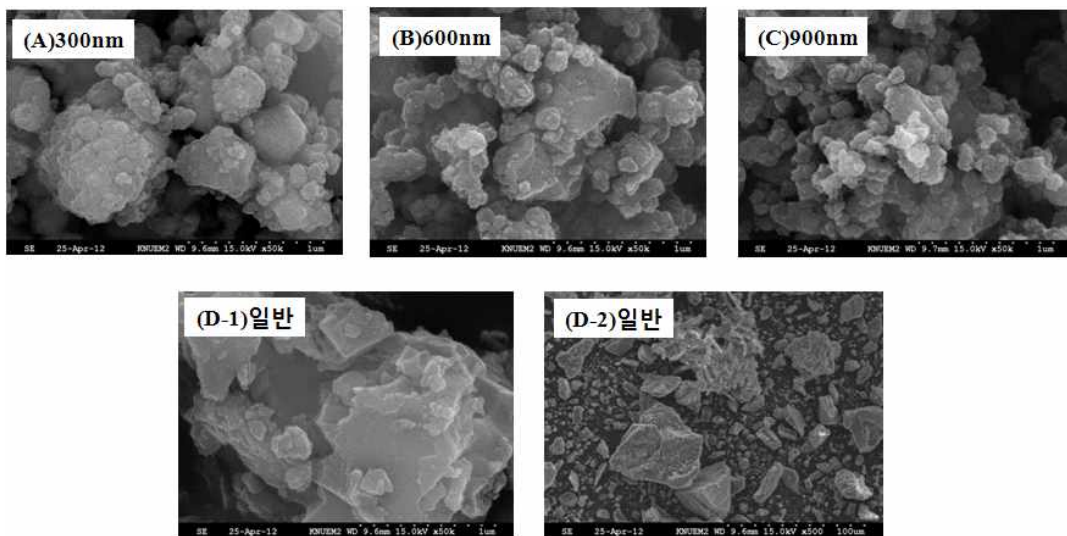


Figure 3.2.61 SEM of nanopowdered and micropowdered eggshell.

○ TEM

크기별로 잘 분리가 되었는지 확인하기 위하여 나노분말인 굴 껍질과 계란껍질을 TEM을 통하여 측정결과는 Figure 3.2.62,63에서와 같다. 이때 300, 600, 900 nm별로 나노 분말의 크기는 크게 차이가 없었으므로, 나노 크기별로 실험을 진행하지 않고, 나노분말과 일반분말로 실험을 진행하기로 하였다.

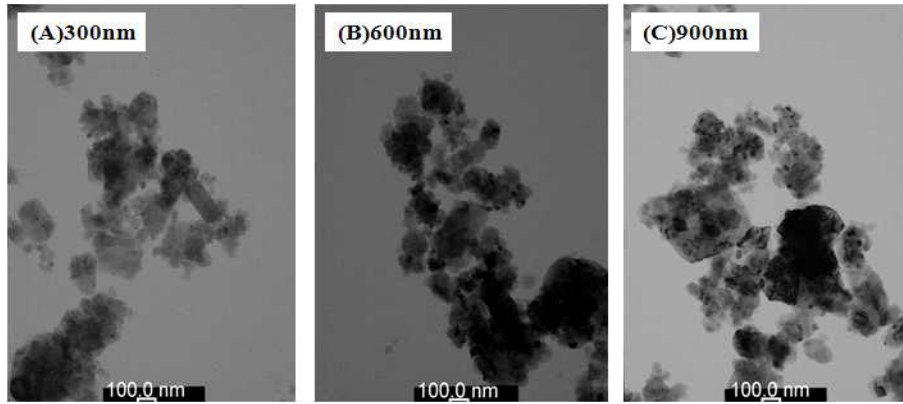


Figure 3.2.62 TEM of nanopowdered and micropowdered oyster shell.

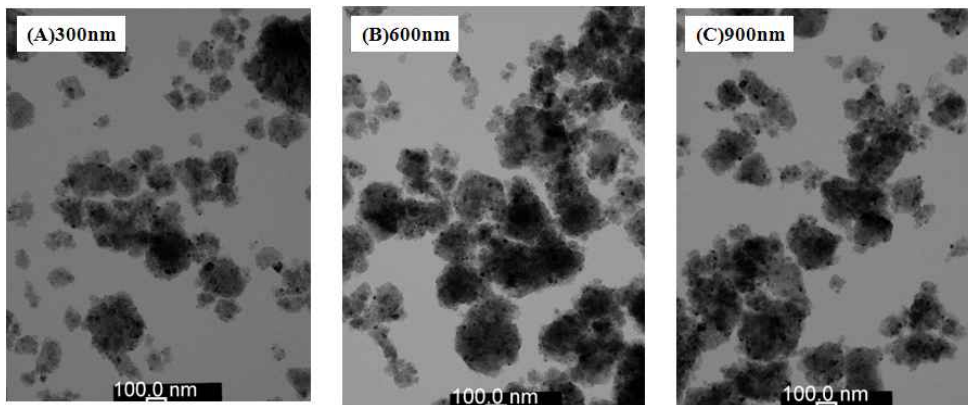


Figure 3.2.63 TEM of nanopowdered and micropowdered eggshell.

#### (4) 굴 껍질과 계란껍질 나노분말의 특징

##### ○ 크기 측정

굴 껍질과 계란껍질의 입자 크기 측정 결과는 Figure 3.2.64,65에서와 같다. 일반굴껍질은 180  $\mu\text{m}$  크기로 분포하고, 나노굴껍질은 500~800 nm로 분포되었다. 또한 계란껍질은 130  $\mu\text{m}$  크기로 분포하였으며, 나노계란껍질은 300~500 nm 크기로 분포되었다. 입자 크기 측정에서 나노분말과 일반분말의 뚜렷한 크기 차이를 관찰할 수 있었다.

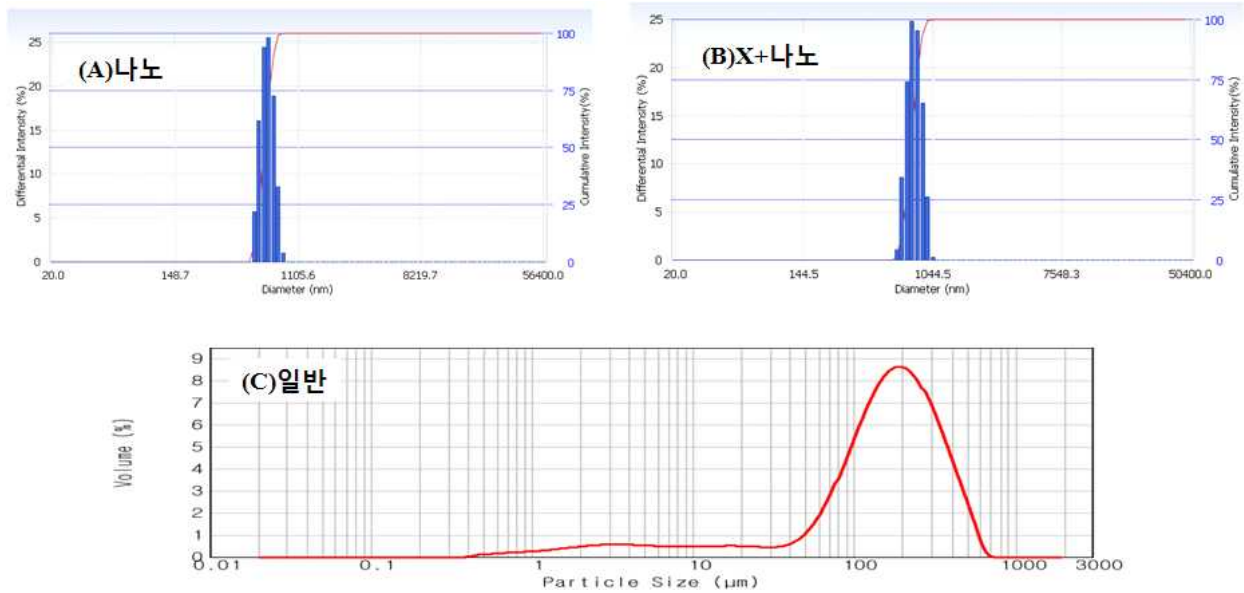


Figure 3.2.64 Particle size of nanopowdered oyster shell.

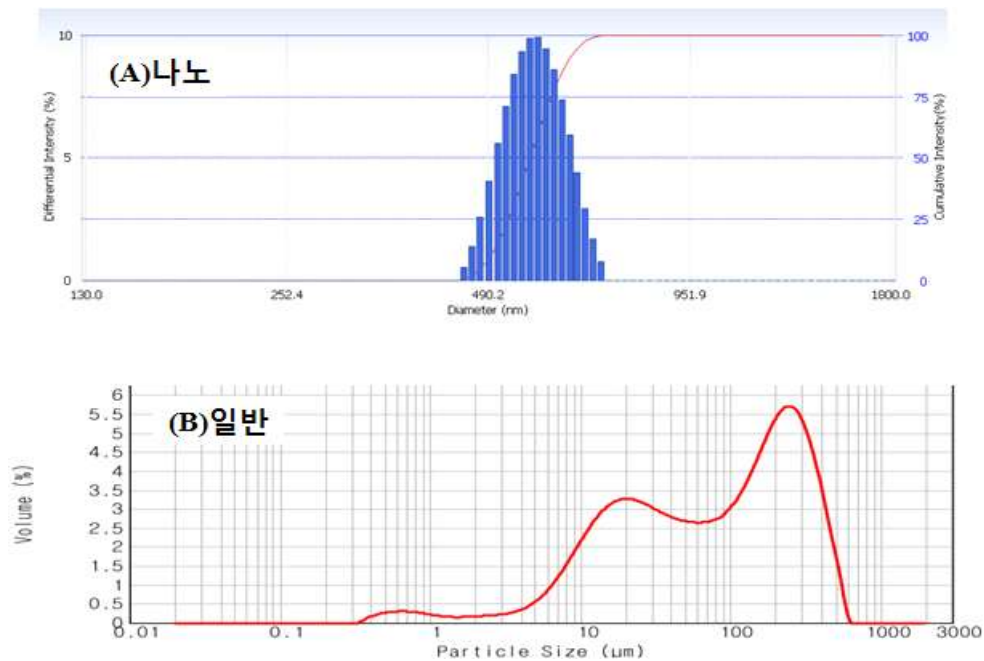


Figure 3.2.65 Particle size of nanopowdered eggshell.

○ SEM

굴 껍질과 계란껍질 나노분말의 형태학적 분석 결과는 Figure 3.2.66,67 과 같다. 굴 껍질과 계란 껍질 나노분말을 SEM 으로 측정할 입자는 불규칙한 입자 주변에 분쇄에 의해 형성된 작은 입자들이 달라붙어 있는 미세구조를 나타내었다. 조금 더 높은 배율로 분말상태의 SEM은 A-2 에 나타냈다. 나노분말이 서로 잘 엉키어 SEM으로 측정하기에는 한계가 있어 TEM을 통하여 측정하였다

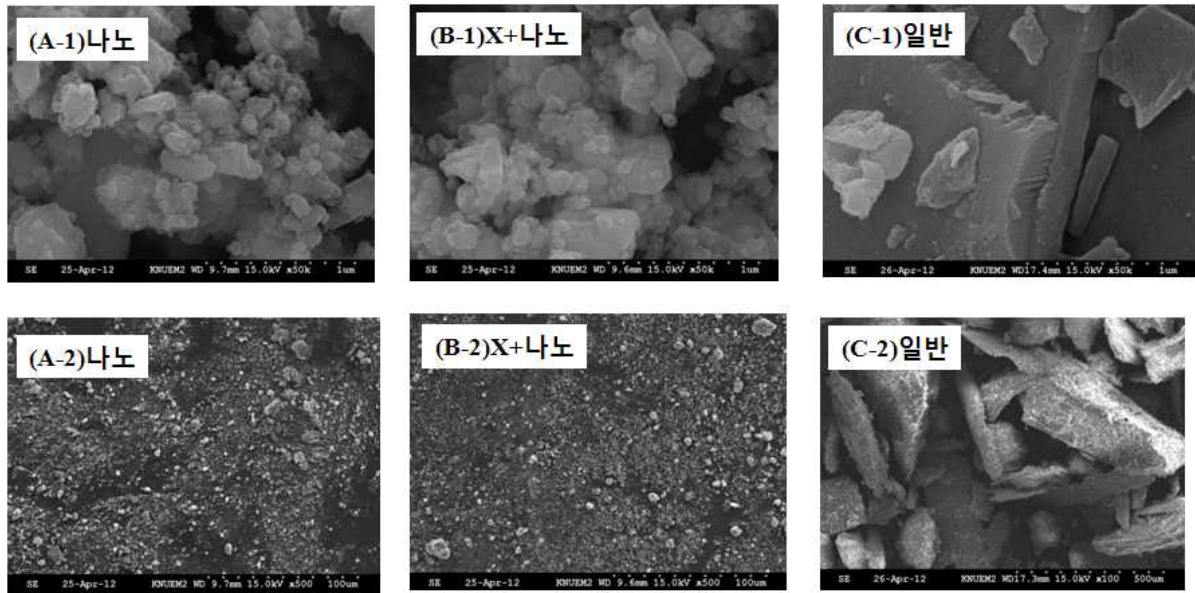


Figure 3.2.66 SEM of nanopowdered oyster shell.

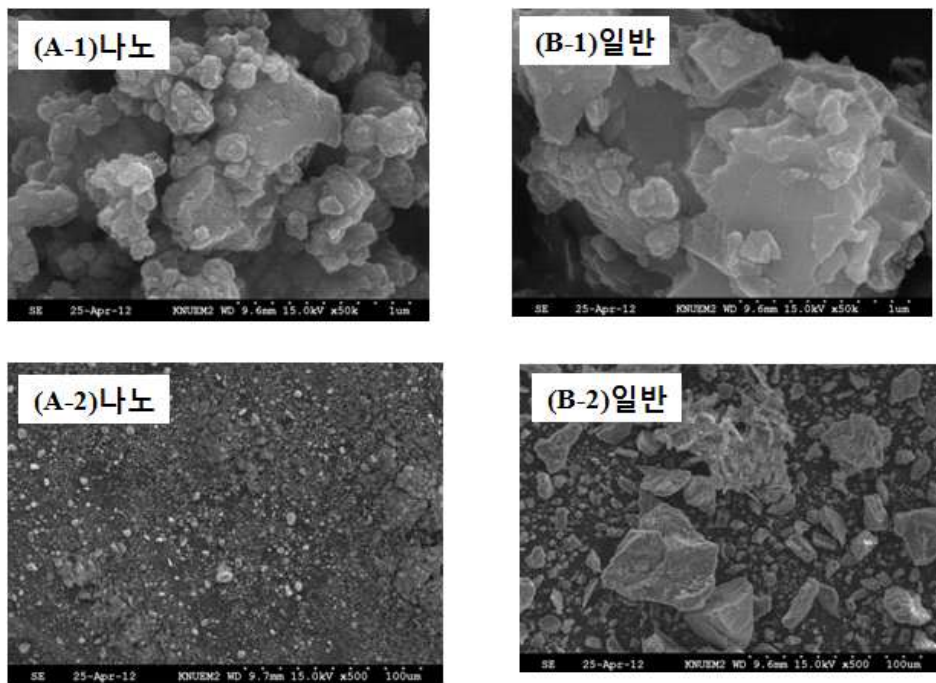


Figure 3.2.67 SEM of nanopowdered eggshell.

○ ICP분석

굴 껍질과 계란껍질에 함유된 칼슘을 측정하기 위해서 ICP분석을 하여 Table 3.2.19와 20에 나타내었다. 나노굴껍질은 39.2%, 일반굴껍질은 40.8%의 칼슘이 함유되어 있고, 굴 껍질을 아연 활성화한 물질은 칼슘이 39.1%함유되어 있고 일반 굴껍질에는 아연이 47.6% 함유되어 있는 것을 볼 수 있었다. 계란껍질은 38.7%, 일반 계란껍질은 38.6%의 칼슘이 함유되어 있다. 따라서 굴 껍질과 계란껍질에는 40% 정도의 칼슘을 함유하고 있다.

Table 3.2.19 ICP analysis of nanopowdered oyster shell

Treatments	Concentration of Ca (%)
Nano-oyster shell	39.2
Zn-activated nano-oyster shell	39.1 (Zn : 0.47)
Oyster shell	40.8

Table 3.2.20 ICP analysis of nanopowdered eggshell

Treatments	Concentration of Ca (%)
Nano-eggshell	38.7
Eggshell	38.6

○ 색도측정

굴 껍질의 색도는 Table 3.2.21와 같다. 색은 관능적 품질에 중요한 영향을 미치는 요인 중에 하나이며, 가열처리와 같은 다양한 가공공정 중에서 생성되는 갈변물질의 경우 다양한 기능성을 나타내기도 한다. 색차계로 측정된 Hunter value 결과 밝기를 나타내는 L값이 나노 굴 껍질은 96.09, 일반 굴 껍질은 75.11로 나노 굴 껍질의 백색도가 더 높았다. 적색도를 나타내는 a값은 나노 굴 껍질은 0.26, 일반 굴 껍질은 0.97을 보여 일반 굴 껍질의 적색도가 더 높았다. 황색도를 나타내는 b값은 나노 굴 껍질이 0.77, 일반 굴 껍질이 8.05를 나타내어 일반 굴 껍질의 갈색도가 더 높았다. 계란껍질의 색도는 Table 3.2.22와 같다. L값은 나노계란껍질은 95.32, 일반계란껍질은 92.34로 나노 계란껍질의 백색도가 더 높았다. 적색도를 나타내는 a값은 나노 계란껍질은 0.62, 일반 계란껍질은 2.15로 일반 계란껍질의 적색도가 더 높았으며, 황색도를 나타내는 b값은 나노 계란껍질은 5.75, 일반 계란껍질은 5.44로 갈색에 대한 영향은 없음을 나타내었다.

Table 3.2.21 Color of nanopowdered oyster shell

Treatments	L	a	b
Nano-oystershell	96.90±0.79 <sup>a</sup>	0.26±0.05 <sup>b</sup>	0.77±0.04 <sup>c</sup>
Zn-activated nano-oyster shell	96.13±0.08 <sup>a</sup>	0.19±0.04 <sup>b</sup>	1.32±0.11 <sup>b</sup>
Oyster shell	75.11±0.12 <sup>b</sup>	0.97±0.01 <sup>a</sup>	8.05±0.02 <sup>a</sup>

Table 3.2.22 Color of nanopowdered eggshell

Treatments	L	a	b
Nano-eggshell	95.32±0.11 <sup>a</sup>	0.62±0.02 <sup>b</sup>	5.75±0.29 <sup>a</sup>
Eggshell	92.34±0.04 <sup>b</sup>	2.15±0.02 <sup>a</sup>	5.44±0.05 <sup>a</sup>

○ Zeta-potential(제타전위)

굴 껍질과 계란껍질 나노분말의 전위적 특징인 제타전위의 결과는 Table 3.2.23,24에서 나타내었다. pH의 상태에서 민감한 제타전위를 측정하기 전에 분말의 pH를 먼저 측정하였다. 나노굴 껍질의 pH가 9.4, 일반 굴 껍질의 pH는 10.0이고, 나노계란껍질의 pH는 9.6, 계란껍질의 pH는 9.4였다. 나노굴껍질의 제타전위는 -6.78이고, 일반 굴 껍질의 제타 전위는 -20.88을 나타냈으며, 나노계란껍질의 제타전위는 +1.56이고, 일반계란껍질은 -19.18였다. 나노분말의 제타전위가 높은 것은 입자가 나노분말화 되면서 (-)charge가 줄어들어서 (+)charge 쪽으로 값이 크게 나타난 것이다. 또한 제타전위가 가장 안정한 범위는 30인데 굴 껍질과 계란껍질 나노분말의 제타전위가 낮은 결과는 분말이 가라앉는 성질이 강하여, 안정하게 분산되어 식품에 적용하기 위해서 수용화하여야 한다고 사료된다.

Table 3.2.23 Zeta-potential of nanopowdered oyster shell

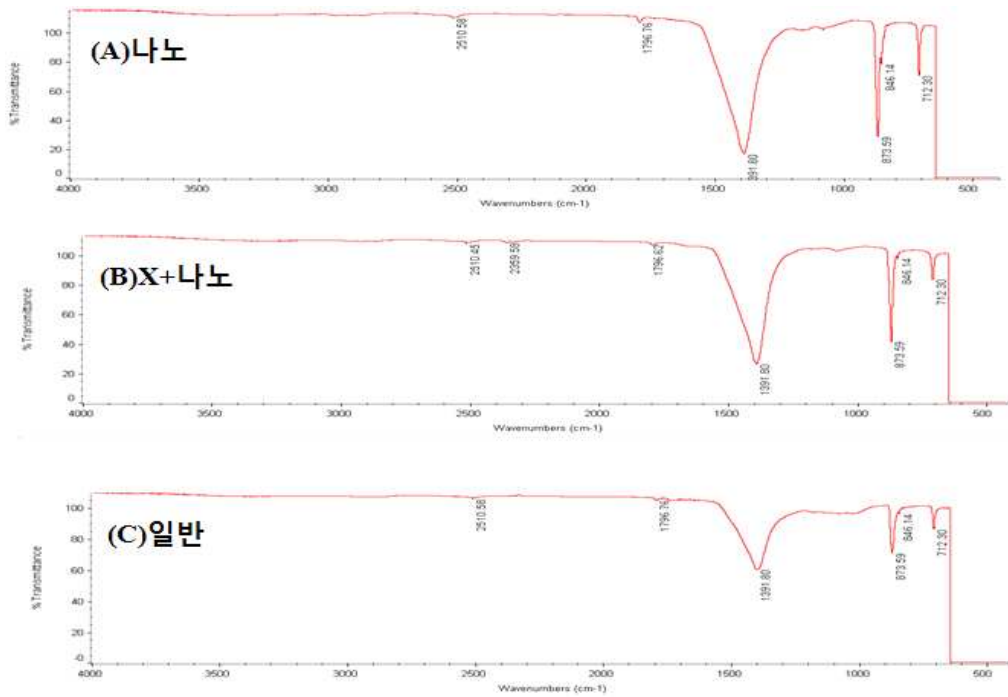
Treatments	Zeta-potential(mV)
Nano-Oyster shell	-6.78±1.22
Zn-activated nano-oyster shell	-2.82±0.22
Oyster shell	-20.88±0.89

Table 3.2.24 Zeta-potential of nanopowdered eggshell

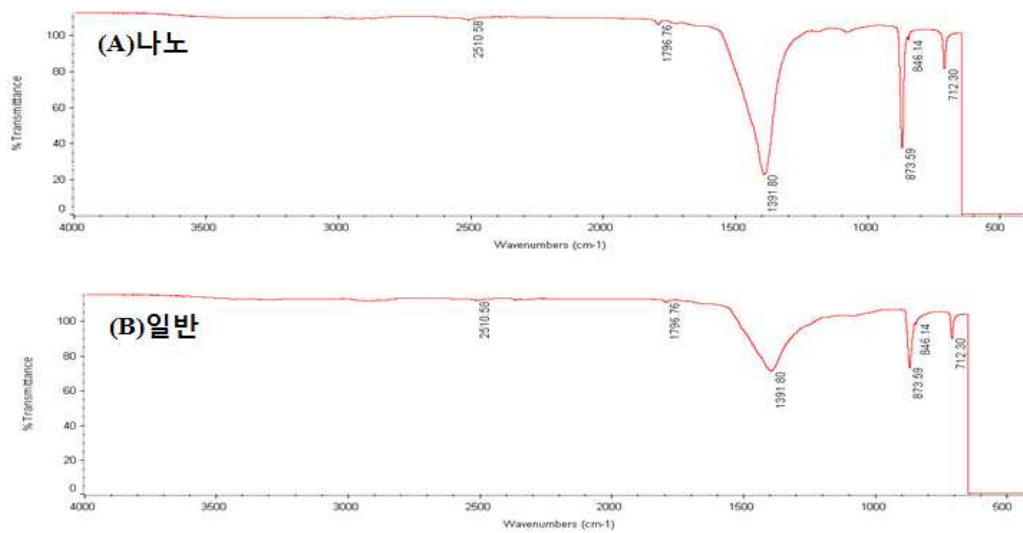
Treatments	Zeta-potential(mV)
Nano-eggshell	+1.56±0.70
Eggshell	-19.18±0.08

○ FT-IR

굴 껍질과 계란껍질의 분자량을 측정하기 위하여 FT-IR의 결과는 Figures 3.2.68,69에서 나타내었다. 화학적 결합은 적외선의 파장 내에서 각각의 특정한 흡수 구간을 나타낸다. Carboxylic acid그룹의 구간은 2,520 cm<sup>-1</sup>, 3,400에서 2,400 cm<sup>-1</sup>은 amide, 1,390 cm<sup>-1</sup>에서는 alkly group을 나타냈다. 나노분말과 일반분말은 동일한 구간에서 피크가 나타난 것을 보아 나노화 되면서 화학적 결합이 없고, 분자량의 변화가 없다고 사료된다.



Figures 3.2.68 FT-IR of nanopowdered oyster shell.



Figures 3.2.69. FT-IR of nanopowdered eggshell.

나. 골다공증 치유를 위한 동물실험을 통한 굴 껍질 및 난각 나노분말의 생이용성 증진효과 검증

(1) 난소 절제 수술

○ 실험대상

본 연구는 5주령인 Sprague-Dawley 종 암컷 흰쥐를 (주)중앙실험동물로부터 구입하여 사용하였다. 각각은 stainless steel wire cage 안에서 사육하였으며, 초기 1주일간 실험동물용 사료를 공급하며 적응하는 기간을 두었는데, 실험실의 온도는  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도는 50~60%로 하였고, 명암은 12시간 마다 주기적으로 반복하였으며, 물은 제한 없이 공급하였다.

## ○ 난소 절제 수술



Figures 3.2.70 난소 절제 수술.

6주령 흰쥐에 에테르를 이용하여 마취한 후 양 측면 부위의 털을 완전히 제거한 후, 제거된 부분을 povidone으로 소독하여 무균 조작 하에서 수술을 시행하였다. 먼저 흰쥐의 등 왼쪽 척추 뼈 하단 부위(갈비뼈와 다리뼈사이 부분)의 외 피부 조직을 실험용 안과 가위로 1.5 cm가량 자른 후, 복근 및 복막조직을 잇달아 잘랐다. 이후 난소를 꺼내어 겹자로 고정 시키고, 봉합사로 혈관을 묶은 후 난소를 완전히 제거하였다. 멸균 봉합사를 이용하여 복막, 복근, 외피를 순서대로 봉합하고, 이와 같은 과정을 반대쪽도 동일하게 시행하였다. 수술 1일 후 일정량의 항생제를 투여하였으며, 약 일주일 정도의 회복기를 가졌다.

## ○ 군 설정 및 사육방법

난소절제(ovariactomized; OVX) 수술을 실시한 흰쥐를 OVX-control 과 시료 5개로 나누어 실시하고, 난소를 절제하지 않고 동일한 실험을 진행한 흰쥐를 Sham-control로 하여 한 군당 8마리씩 진행하였다. 사육은 일반사료와 식수를 자유 급여하였으며, 실험식은 0.5% CMC에 시료를 분산시켜 매일 경구 투여하였다. 일주일에 2번씩 체중을 측정하여 총 8주 동안 사육했다.

## (2) 동물실험의 시료수집 (소변, 변, 혈액, 간, 신장, 뼈)

실험동물을 희생시키기 전에 하룻밤 동안 절식시킨 후, 다음날 에테르로 마취하여 혈액을 배대정맥으로 채혈한 후, 실험동물을 희생시켰다. 분석에 사용된 기구들과 수술용 도구들은 5% HNO<sub>3</sub> 용액에 담갔다가 3차 증류수로 3회 이상 세척하였다.

## ○ 소변 및 변

소변과 변의 실험 종료 일주일전 채취한 후, -70°C에서 냉동 보관하였다.

## ○ 혈액

혈액샘플은 실험동물을 에테르로 마취한 후, 배대정맥으로 채취하였다. 혈액은 항응고제인 heparin 처리가 되어있는 tube에 수집하였고, 이를 2,000×g에서 10분간 원심 분리하여, 상층액에 뜬 혈청을 수집하였다. 수집된 혈청은 분석할 때 까지 -70°C에서 냉동 보관하였다.



○ 간과 신장의 무게

실험 종료 후 적출한 간과 신장의 습중량을 Tables 3.2.25,26에 나타내었다. 간의 습중량은 정상쥐인 Sham-control은 7.36 g, 골다공증 유발된 OVX-control은 6.67 g이고, 나머지 굴 껍질과 계란껍질 나노분말에서는 조금씩 감소하는 것을 보였지만 유의적 차이는 나타나지 않았다. 따라서 보충된 칼슘의 체내 흡수가 간의 지질대사에 영향을 준 것으로 사료된다. 신장의 습중량은 Sham-control은 1.53 g, OVX-control은 1.55 g이고, 굴 껍질과 계란껍질 나노분말에서는 각 그룹간의 유의적 차이를 보이지 않았다 ( $p>0.05$ ). 따라서 보충한 칼슘의 수준이 신장의 과부하를 일으킬 만한 수준이 아니었기 때문에 신장의 기능에 영향이 없었던 것으로 사료된다.

Table 3.2.25 Weight of liver and kidney after nanopowdered oyster shell treatment in osteoporosis rats

Group	Liver wet wt. (g)	Kidney wet wt. (g)
Sham	7.36±0.64 <sup>ab</sup>	1.53±0.05 <sup>a</sup>
OVX	6.67±0.43 <sup>c</sup>	1.55±0.11 <sup>a</sup>
Micro-oyster shell	7.66±0.68 <sup>a</sup>	1.51±0.09 <sup>a</sup>
Nano-oyster shell	6.87±0.19 <sup>bc</sup>	1.55±0.05 <sup>a</sup>
Zn-activated nano-oyster shell	7.01±0.18 <sup>ab</sup>	1.55±0.12 <sup>a</sup>

Table 3.2.26 Weight of liver and kidney after nanopowdered eggshell treatment in osteoporosis rats

Group	Liver wet wt. (g)	Kidney wet wt. (g)
Sham	7.36±0.64 <sup>a</sup>	1.53±0.05 <sup>a</sup>
OVX	6.67±0.43 <sup>a</sup>	1.55±0.11 <sup>a</sup>
Micro-eggshell	6.70±0.21 <sup>a</sup>	1.56±0.08 <sup>a</sup>
Nano-eggshell	6.78±0.61 <sup>a</sup>	1.53±0.06 <sup>a</sup>

○ 뼈의 무게와 길이

골다공증이 유발된 쥐의 대퇴골의 길이는 Tables 3.2.27,28에 나타내었는데, 대퇴골의 길이는 굴 껍질, 계란껍질, 나노굴껍질, 나노계란껍질의 그룹 간 비교에서 유의적 차이를 나타나지 않았으며, 대퇴골의 무게는 난소 절제된 쥐에서 나노분말을 섭취한 쥐가 조금 더 무거운 것을 볼 수 있으나, 유의적 차이를 나타내지 않았다. 그러나 본 실험 결과, 일반사이즈의 칼슘제제를 첨가하는 것보다 나노분말화하여 첨가하였을 때 골 질량을 증가 시키고, 뼈를 건강하게 하는데 있어서 더 바람직 할 것으로 사료된다.

Table 3.2.27 Effects of nanopowdered oyster shell on weights and length in femur during 7 weeks

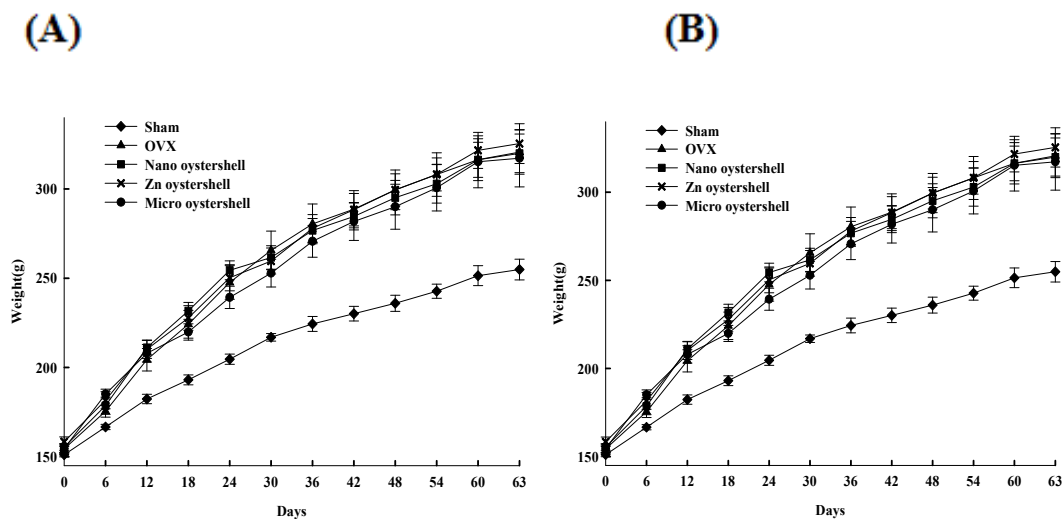
Group	Femur wet wt. (g)	Femur length (mm)
Sham	0.90±0.07 <sup>a</sup>	35.58±0.42 <sup>a</sup>
OVX	0.91±0.03 <sup>a</sup>	35.99±1.05 <sup>a</sup>
Micro-oyster shell	0.85±0.03 <sup>ab</sup>	35.60±0.34 <sup>a</sup>
Nano-oyster shell	0.83±0.04 <sup>b</sup>	35.66±1.07 <sup>a</sup>
Zn-activated nano-oyster shell	0.87±0.04 <sup>ab</sup>	35.52±1.42 <sup>a</sup>

Table 3.2.28 Effects of nanopowdered eggshell on weights and length in femur during 7 weeks

Group	Femur wet wt. (g)	Femur length (mm)
Sham	0.90±0.07 <sup>a</sup>	35.58±0.42 <sup>a</sup>
OVX	0.91±0.03 <sup>a</sup>	35.99±1.05 <sup>a</sup>
Micro-eggshell	0.85±0.03 <sup>a</sup>	36.27±0.99 <sup>a</sup>
Nano-eggshell	0.86±0.03 <sup>a</sup>	36.12±0.84 <sup>a</sup>

○ 체중 성장률 측정

체중은 난소 제거 수술 전까지 측정하여 Figures 3.2.71 에 나타냈다. 실험 초기 체중은 군들 간에 유의적 차이가 없었으나, 실험 종료 시 체중은 난소 절제한 쥐의 체중이 증가하는 것을 볼 수 있었다.



Figures 3.2.71 Change of body weight of nanopowdered oyster shell treated rats (A) and nanopowdered eggshell treated rats (B).

○ 칼슘과 인의 함량 (혈중, 신장, 간, 대퇴골, 소변, 변)

혈중 Ca은 정적인 상태가 아니라 동적인 상태로 내외적 변화에 대응하여 항상성을 유지 하는 것으로 알려져 있다. 실험 8주 후의 혈중 Ca의 함량을 Tables 3.2.29,30에 나타내었다. 정상 쥐인 Sham-control은 9.70 mg/dL, 골다공증 유발된 OVX-control은 9.80 mg/dL이며, 나노굴껍질은 10.57 mg/dL, 아연활성 나노굴껍질은 10.80 mg/dL, 일반굴껍질은 10.57 mg/dL이며, 나노계란껍질은 10.73 mg/dL, 일반계란껍질은 10.03 mg/dL 함유하여 약간 증가하는 것을 보였지만, 모두 정상수준 (7.2~13.0 mg/dL)을 나타내었다. 기간별 혈중 P의 함량도 Table 3.2.30,31에 나타내었다. 실험기간 동안 혈중 P의 함량은 각 군별 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았고 ( $p>0.05$ ), 전체적으로 기간이 경과함에 따라 다소 감소하는 경향을 보였지만, 모두 정상수준 (3.11~11.9 mg/dL)을 나타내었다.

실험 종료 직전 수집한 소변의 Ca과 P의 함량을 Tables 3.2.31,32에 나타내었다. 소변 중의 P의 함량은 10.03~11.80 mg/dL의 수치를 보였으며, 그룹간의 유의적인 차이는 없었다. Ca의 함량은 정상쥐인 Sham-control은 10.60 mg/dL, 골다공증 유발된 OVX-control은 10.90 mg/dL이고, 나노굴껍질은 12.83 mg/dL, 아연활성화나노굴껍질은 11.53 mg/dL, 일반 굴 껍질은 12.80 mg/dL이었으며, 나노계란껍질은 15.00 mg/dL, 일반계란껍질은 15.50 mg/dL 으로 칼슘을 먹인 쥐의 소변 중 Ca함량이 많았으나 유의적 차이는 나타나지 않았다 ( $p>0.05$ ). 이는 칼슘 섭취시 뇨로 배출할 수 있다고 사료된다.

Table 3.2.29 The contents of Ca and P in serum after nanopowdered oyster shell treatment in osteoporosis rats

Group	Ca(mg/dL)	P(mg/dL)
Sham	9.70±0.44 <sup>a</sup>	8.53±0.45 <sup>a</sup>
OVX	9.80±0.70 <sup>a</sup>	8.57±0.23 <sup>a</sup>
Micro-oyster shell	10.40±0.51 <sup>a</sup>	9.17±0.36 <sup>a</sup>
Nano-oyster shell	10.57±0.31 <sup>a</sup>	9.27±0.58 <sup>a</sup>
Zn-activated nano-oyster shell	10.80±0.20 <sup>a</sup>	9.35±0.36 <sup>a</sup>

Table 3.2.30 The contents of Ca and P in serum after nanopowdered eggshell treatment in osteoporosis rats

Group	Ca(mg/dL)	P(mg/dL)
Sham	9.70±0.44 <sup>a</sup>	8.53±0.45 <sup>a</sup>
OVX	9.80±0.70 <sup>a</sup>	8.57±0.23 <sup>a</sup>
Micro-eggshell	10.03±0.15 <sup>a</sup>	8.47±0.81 <sup>a</sup>
Nano-eggshell	10.73±0.60 <sup>a</sup>	9.33±0.82 <sup>a</sup>

Table 3.2.31 The contents of Ca and P in urine after nanopowdered oyster shell treatment in osteoporosis rats

Group	Ca(mg/dL)	P(mg/dL)
Sham	10.60±0.70 <sup>a</sup>	10.03±0.27 <sup>a</sup>
OVX	10.90±0.46 <sup>a</sup>	10.13±0.51 <sup>a</sup>
Micro-oyster shell	12.83±0.88 <sup>a</sup>	10.13±0.23 <sup>a</sup>
Nano-oyster shell	12.83±0.69 <sup>a</sup>	10.13±0.23 <sup>a</sup>
Zn-activated nano-oyster shell	11.53±0.81 <sup>a</sup>	10.10±0.26 <sup>a</sup>

Table 3.2.32 The contents of Ca and P in urine after nanopowdered eggshell treatment in osteoporosis rats

Group	Ca(mg/dL)	P(mg/dL)
Sham	10.60±0.70 <sup>b</sup>	10.03±0.27 <sup>a</sup>
OVX	10.90±0.46 <sup>b</sup>	10.13±0.51 <sup>a</sup>
Micro-eggshell	15.50±0.60 <sup>a</sup>	11.80±0.31 <sup>a</sup>
Nano-eggshell	15.00±0.29 <sup>a</sup>	11.33±0.53 <sup>a</sup>

### (3) 생화학적 검사

#### ○ Alkaline phosphatase(ALP)

이는 골아세포에서 분비되는 당단백질이고, 임상에서 가장 많이 이용되는 골 형성 지표로서 골연화증, 파렛병, 신성 골이영양증, 일차성 부갑상선 기능 항진증 등의 진단과 치료경과 추적에 유용한 검사로 50년 이상 널리 사용되어왔다. 혈중 ALP의 농도는 폐경 후 골다공증환자에서 높게 관찰되며, 호르몬 요법이나 골 흡수 억제제를 사용하는 경우 다시 감소되는 경향을 보인다. 본 실험에서 혈중 ALP의 농도는 Figure 3.2.72 에서 나타내었다. 정상쥐인 Sham-control은 301.86 U/L, 골다공증 유발된 OVX-control 325.69 U/L이며, 나노굴껍질과 아연 활성화한 나노굴껍질은 320.51 U/L로 조금 낮아 졌고, 나노계란껍질은 330.02 U/L이었고, 일반굴껍질과 계란껍질은 352.12~357.61 U/L로 높은 수치를 보였다. 따라서 나노분말을 섭취한 쥐가 골다공증에 개선이 되고 있는 것을 볼 수 있다.

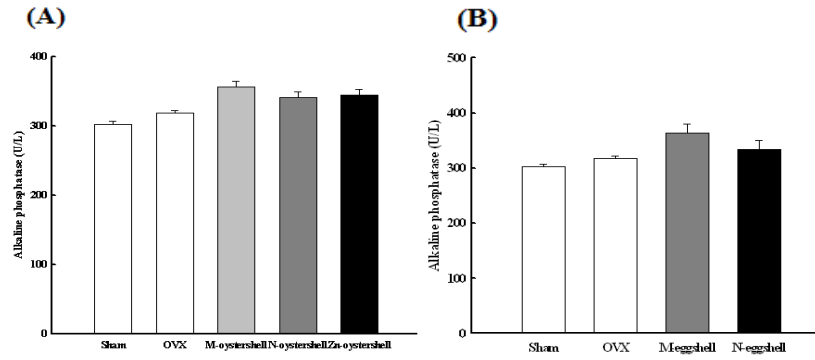


Figure 3.2.72 ALP in serum of nanopowdered oyster shell treatment in osteoporosis rats (A) and nanopowdered eggshell treatment in osteoporosis rats (B).

○ Creatinine의 양

노중 creatinine의 양이 많아지면 골다공증이 유발되었다는 것을 의미한다. 이러한 creatinine 함량을 Figure 3.2.73에 나타냈다. 정상 쥐인 Sham-control은 0.35 mg/dL, 골다공증 유발된 OVX-control 0.45 mg/dL이며, 나노굴껍질과 아연나노굴껍질은 0.39~0.40 mg/dL, 나노계란껍질은 0.40 mg/dL로 감소하였고, 일반굴껍질과 일반계란껍질은 0.45 mg/dL이고 나노계란껍질은 0.39 mg/dL로 감소하였다. 따라서 본 실험의 결과, 나노분말화 한 것을 섭취한 골다공증쥐가 점점 나아지고 있다고 볼 수 있다.

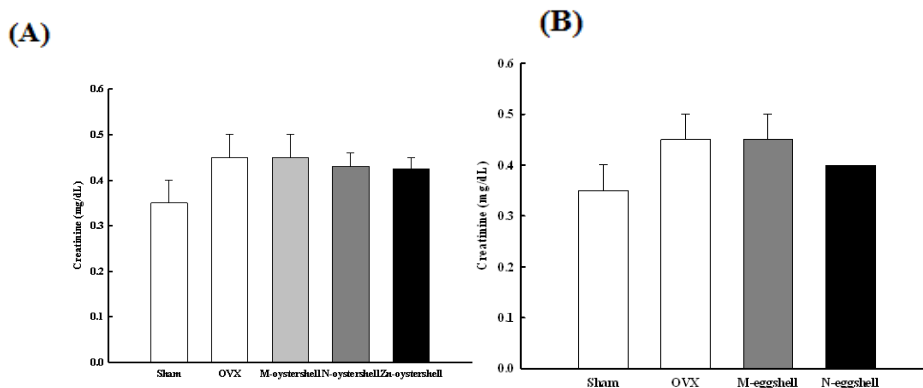


Figure 3.2.73 Creatinine in serum of nanopowdered oyster shell treatment in osteoporosis rats (A) and nanopowdered eggshell treatment in osteoporosis rats (B).

(4) 골대사 검사

○ 골밀도

골밀도 검사는 랫드의 왼쪽 대퇴골을 사용하였고, 그 결과는 Figures 3.2.74,75에 제시하였다. 정상적인 Sham-control은 1.25 g/cm<sup>3</sup>, 골다공증 유발된 OVX-control은 1.18 g/cm<sup>3</sup> 이었으며, 나노굴껍질, 아연활성 나노굴껍질, 일반굴껍질, 나노계란껍질, 일반계란껍질은 1.12~1.20 g/cm<sup>3</sup>으로 유의적 차이를 보이지 않았다 (p>0.05).

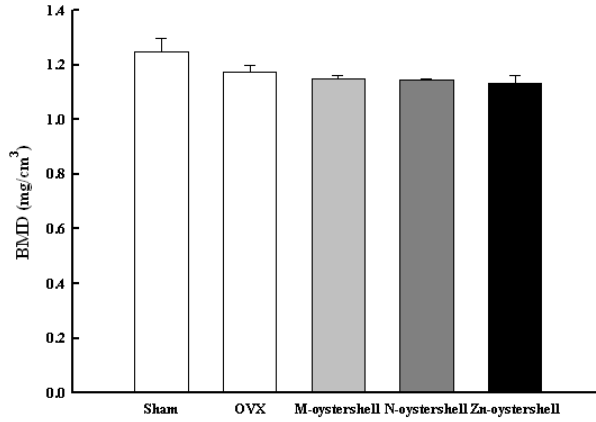


Figure 3.2.74 Analysis of bone mineral density (BMD) of femur after nanopowdered oyster shell treatment in osteoporosis rats.

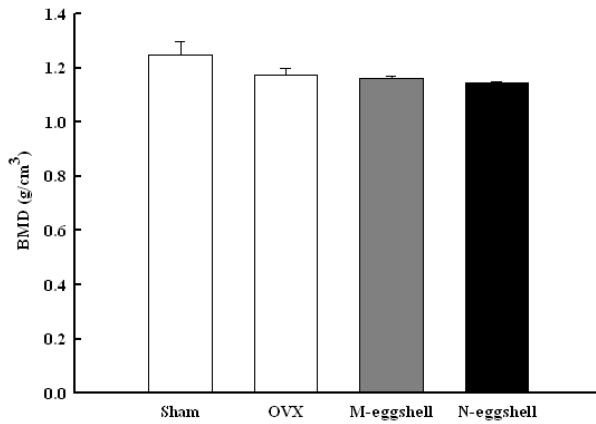


Figure 3.2.75 Analysis of bone mineral density (BMD) of femur after nanopowdered eggshell treatment in osteoporosis rats.

○ 골강도

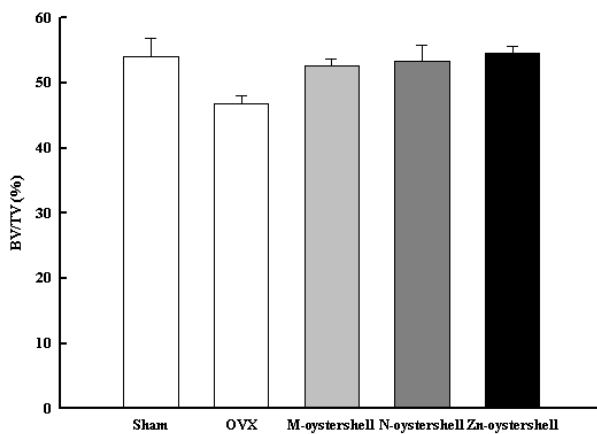


Figure 3.2.76 Bone stiffness of femur after nanopowdered oyster shell treatment in osteoporosis rats.

랫드의 왼쪽 대퇴골을 이용하여 골강도를 측정하기 위하여 골체적비를 측정하여 Figures 3.2.76,77에 제시하였다. 이때 골체적비의 값이 감소하면 골강도도 감소한다. 본 실험의 결과값을 보면 정상적인 Sham-control은 54%, 골다공증 유발된 OVX-control은 골다공증이 유발된 쥐로 45%로 감소하였다. 실험군인 나노굴껍질은 53%, 아연활성 나노굴껍질은 55%, 일반굴껍질은 51%를 나타냈고, 나노계란껍질은 53.8%, 일반계란껍질은 50.7%를 나타내었다. 따라서 모든 그룹에서 나노분말을 섭취한 쥐의 골강도가 골다공증이 유발되지 않은 쥐와 유사한 강도를 가지고 있으므로 골다공증이 점차적으로 치유되고 있다고 사료된다.

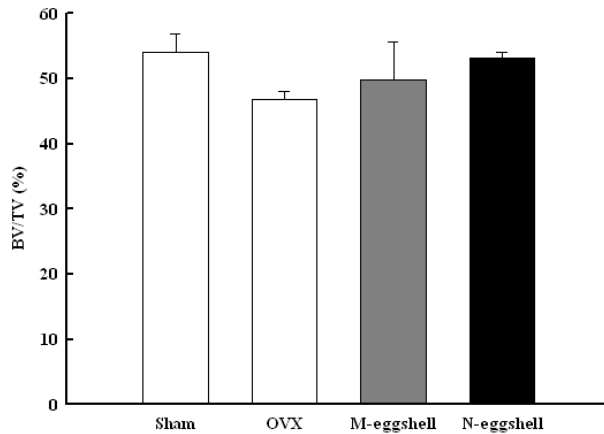


Figure 3.2.77 Bone stiffness of femur after nanopowdered eggshell treatment in osteoporosis rats.

○ 골소주

랫드의 왼쪽 대퇴골을 이용하여 골소주의 두께를 측정하여, 그 결과를 Figures 3.2.78,79에 나타내었다. 골다공증에 걸리지 않은 정상쥐인 Sham-control은 0.36 mm, 골다공증이 유발된 OVX-control은 0.30 mm이었다. 실험군에 사용한 나노굴껍질과 아연활성 나노굴껍질은 각각 0.36, 0.38 mm였고, 일반 굴껍질은 0.33 mm이며, 나노계란껍질은 0.35 mm, 일반계란껍질은 0.33 mm로 측정되었다. 그룹간의 유의적인 차이가 없었지만, 나노분말을 섭취한 쥐에서 골소주의 두께가 더 두꺼워지는 것을 볼 수 있었다. 이는 나노칼슘분말의 보충은 폐경 후 estrogen의 부족으로 인한 골소주의 손실을 방지하고, 골질량과 강도를 높이는데 효과적인 것으로 사료된다.

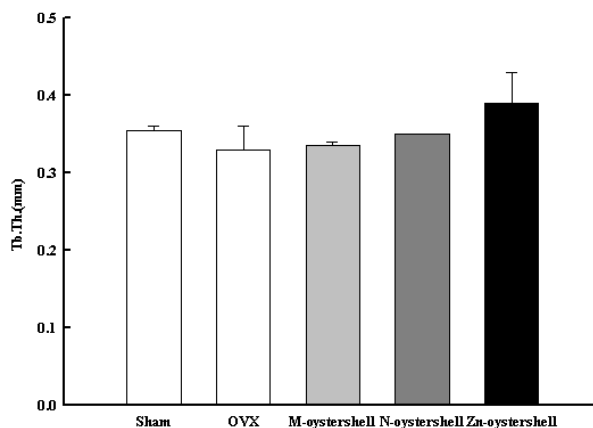


Figure 3.2.78 Trabecular thickness of femur after nanopowdered oyster shell treatment in osteoporosis rats.

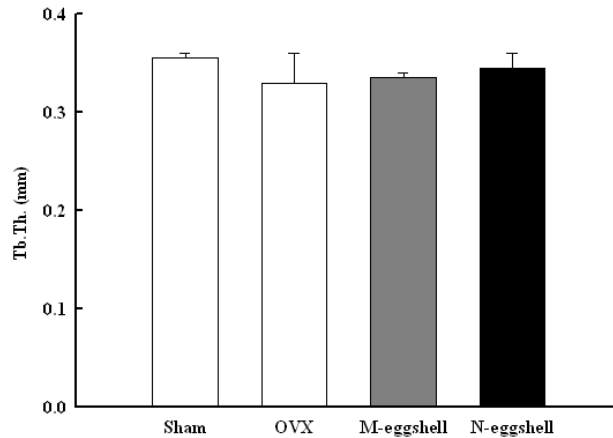


Figure 3.2.79 Trabecular thickness of femur after nanopowdered eggshell treatment in osteoporosis rats.

○ 골조직

랫드의 왼쪽 대퇴부를 이용하여 골조직을 Micro-CT를 이용하여 찍은 결과를 Figure 3.2.80,81에 나타내었다. 골조직 사진을 통하여 골다공증이 얼마나 완화가 되고 있는지 알 수 있었다. 벌집모양처럼 하얀 골피질이 많이 있는 것이 Sham-control로 정상적인 상태이며, 골피질이 거의 보이지 않는 것은 골다공증이 유발된 OVX-control이다. 일반굴껍질을 섭취 하였을 때는 10%정도 완화되었지만, 나노굴껍질을 섭취한 쥐는 30%, 아연활성 나노굴껍질을 섭취한 쥐는 50%이상의 완화도를 볼 수 있었다. 또한, 일반계란껍질에서는 10%, 나노계란껍질에서는 20% 정도의 완화도를 볼 수 있으므로, 나노분말을 섭취한 쥐에서 골다공증의 완화가 빠르다고 사료되며, 일반 나노분말보다 아연을 활성화 시키면 흡수력을 높혀 골다공증 치유에 더욱 효과적이라고 사료된다.

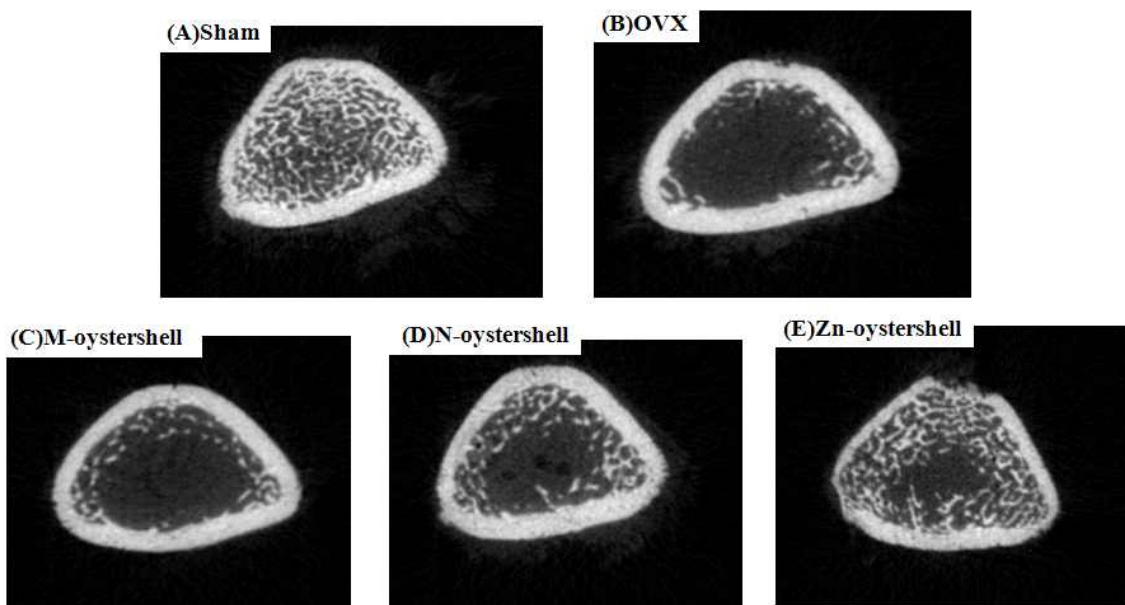


Figure 3.2.80 Micro-CT of femur after nanopowdered oyster shell treatment in osteoporosis rats.



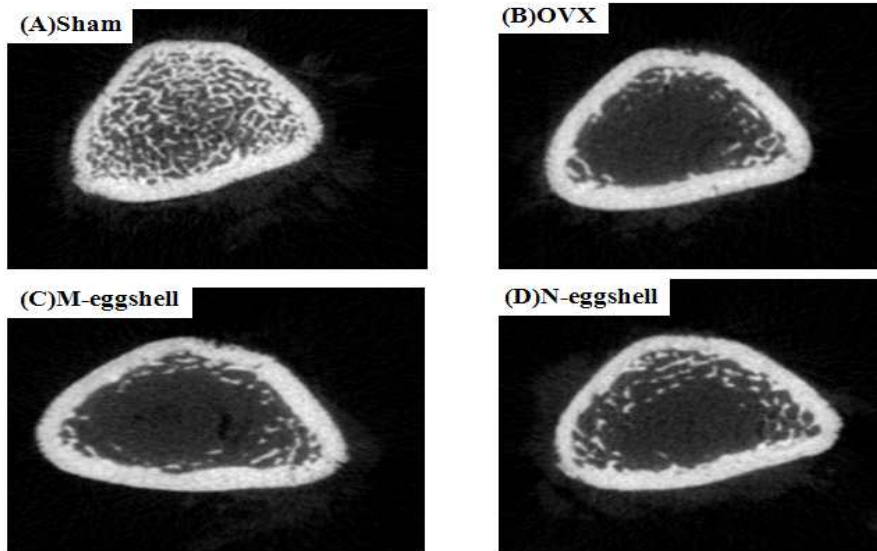


Figure 3.2.81 Micro-CT of femur after nanopowdered eggshell treatment in osteoporosis rats.

다. 키 성장을 위한 동물실험에서 굴껍질과 난각 나노분말의 생 이용성 증진 효과 검증

#### (1) 동물실험 준비

##### ○ 실험대상

본 연구는 3주령인 Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐를 (주)중앙실험동물로부터 구입하여 사용하였다. 각각은 stainless steel wire cage 안에서 사육하였으며, 초기 1주일간 실험동물용 사료를 공급하며 적응하는 기간을 두었으며, 사육의 온도는  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는 50~60%로 하였고, 명암은 12시간 마다 주기적으로 반복하였으며, 물은 제한 없이 공급하였다.

##### ○ 군 설정 및 사육방법

일반 흰쥐와 시료인 굴껍질, 나노굴껍질, 아연활성화 나노굴껍질, 계란껍질, 나노계란껍질, 아연 첨가한 계란껍질, 아연 첨가한 나노계란껍질 7개로 나누어 실시하고, 한 군당 8마리씩 진행하였다. 사육은 일반사료와 식수를 자유 급여하였으며, 실험 식이는 0.5% CMC에 시료를 분산시켜 매일 경구투여 하였다. 일주일에 2번씩 체중을 측정하여 총 6주 동안 사육했다.

##### ○ 시료수집 (혈액, 변, 간, 신장, 대퇴골)

실험동물을 희생시키기 전에 하룻밤 동안 절식시킨 후, 다음날 에테르로 마취하여 혈액을 배대정맥으로 채혈한 후, 희생시켰다. 분석에 사용된 기구들과 수술용 도구들은 5% HNO<sub>3</sub> 용액에 담갔다가 3차 증류수로 3회 이상 세척하였다.

실험종료 일주일전 변을 채취한 후,  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다. 혈액은 에테르로 마취한 후, 배대정맥으로 채취하였다. 혈액은 항응고제인 heparin 처리가 되어있는 tube에 수집되었고, 이를  $2,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여, 상층액에 뜬 혈청을 수집하였다. 수집된 혈청은 분석 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다.

○ 간과 신장의 무게

실험종료 후 적출한 간과 신장의 중량을 Tables 3.2.33,34에 나타내었다. 간의 중량은 정상 쥐인 control은 11.40 g, 굴껍질과 계란껍질과 나노분말에서는 조금씩 감소하는 것을 보였지만 유의적 차이를 나타나지 않았다 ( $p>0.05$ ). 따라서 보충된 칼슘의 체내 흡수가 간의 지질대사에 영향을 준 것으로 사료된다. 신장의 중량은 control은 1.47 g였고, 굴껍질과 계란껍질과 나노분말과 아연을 처리한 각 그룹간의 유의적 차이를 보이지 않았다 ( $p>0.05$ ). 따라서 보충한 칼슘의 수준이 신장의 과부하를 일으킬 만한 수준이 아니었기 때문에 신장의 기능에 영향이 없었던 것으로 사료된다.

○ 체중변화 측정

체중은 실험 종료까지 일주에 2번씩 측정을 하여 Figures 3.2.82,83에 나타냈다. 실험초기부터 실험 종료 때까지 유의적 차이가 없었다( $p>0.05$ ).

Table 3.2.33 Weight of liver and kidney after nanopowdered oyster shell treatment in rats

Group	Liver wet wt. (g)	Kidney wet wt. (g)
Control	11.40±0.17 <sup>a</sup>	1.47±0.12 <sup>a</sup>
Powdered oyster shell	10.43±0.06 <sup>a</sup>	1.27±0.06 <sup>a</sup>
Nanopowdered oyster shell	10.83±0.58 <sup>a</sup>	1.33±0.15 <sup>a</sup>
Zn-activated nanopowdered oyster shell	11.00±0.78 <sup>a</sup>	1.27±0.06 <sup>a</sup>

Table 3.2.34 Weight of liver and kidney after nanopowdered eggshell treatment in rats

Group	Liver wet wt. (g)	Kidney wet wt. (g)
Control	11.40±0.17 <sup>a</sup>	1.47±0.12 <sup>a</sup>
Powdered eggshell	10.93±0.55 <sup>a</sup>	1.43±0.06 <sup>ab</sup>
Nanopowdered eggshell	10.17±0.15 <sup>a</sup>	1.27±0.06 <sup>ab</sup>
Zn-added powdered eggshell	10.53±1.01 <sup>a</sup>	1.30±0.10 <sup>ab</sup>
Zn-added nanopowdered eggshell	10.50±0.78 <sup>a</sup>	1.30±0.10 <sup>ab</sup>

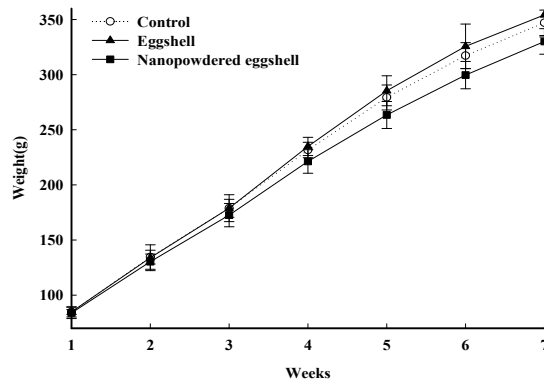


Figure 3.2.82 Change of body weight of nanopowdered oyster shell treatment in rats.

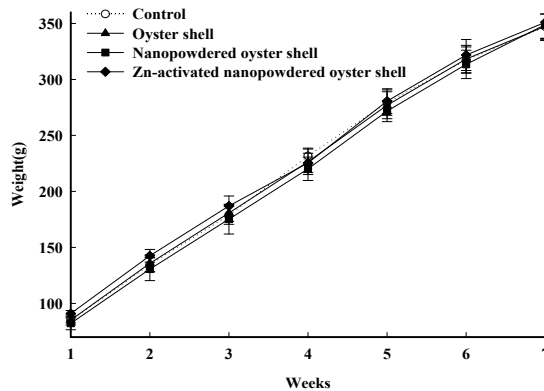


Figure 3.2.83 Change of body weight of nanopowdered eggshell treatment in rats.

## (2) 골성장 측정 (골밀도)

골밀도 검사는 rat의 왼쪽 대퇴골을 사용하였고, 그 결과는 Figures 3.2.84,85에 제시하였다. 정상적인 control은 1,300 mg/cm<sup>3</sup>이었으며, 굴껍질, 아연 활성화한 나노굴껍질, 일반굴껍질은 Figure 3.2.84에서 나타내듯이 control에 비하여 증가하였지만, 유의적 차이를 보이지 않았다 ( $p>0.05$ ). 나노계란껍질, 아연 첨가한 계란껍질, 아연 첨가한 나노계란껍질, 나노계란껍질은 Figure 3.2.85에서 볼 수 있는데 마찬가지로 실험군의 골밀도 (BMD)가 증가하는 것을 볼 수 있다.

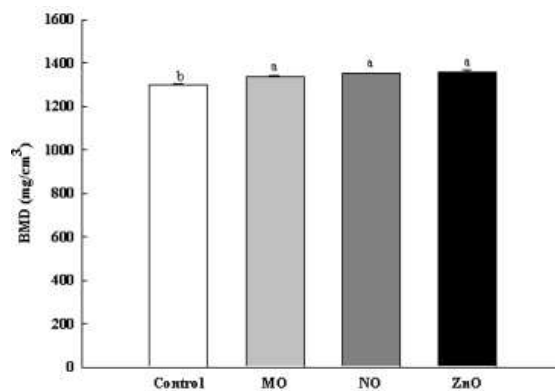


Figure 3.2.84 Analysis of bone mineral density (BMD) of femur after nanopowdered oyster shell treatment in rats.

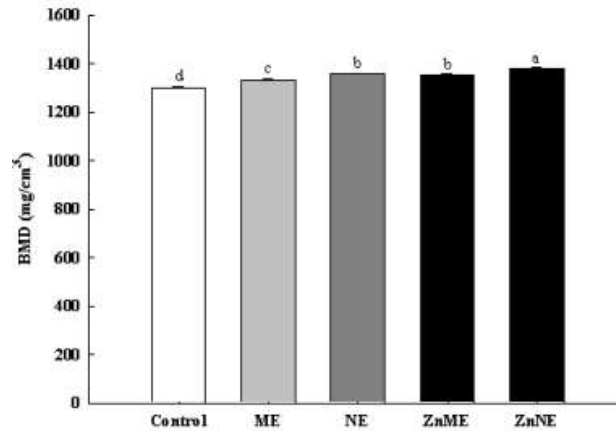


Figure 3.2.85 Analysis of bone mineral density (BMD) of femur after nanopowdered eggshell treatment in rats.

### (3) 성장판 관찰

#### ○ 마이크로시티 (Micro-CT)

Rat의 왼쪽 대퇴부를 이용하여 골조직의 성장판을 Micro-CT를 이용하여 결과를 Figures 3.2.86,87에 나타내었다. 골조직 사진을 통하여 실험군이 얼마나 성장이 되고 있는지 알 수 있었다. 빨간색으로 표시한 부분이 성장판을 나타내는 것인데 control을 포함하여 실험 7군이 정상적으로 성장을 하고 있는 것을 볼 수 있었다. 이때 하얀 부분 사이의 빈부분이 있는 것이 성장판이 열린 것이며, 모든 실험군의 성장판이 열려있으며, 나노분말과 아연활성화 한 것이 control에 비하여 성장판이 10%정도 더 열려있는 것을 확인 할 수 있었다. 이 사진으로 정확하게 확인이 불가능하므로 골성장 측정인 골밀도 측정을 진행하여 Figure 3.2.86에 제시 하듯이 골밀도가 증가하는 것을 볼 수 있었다.

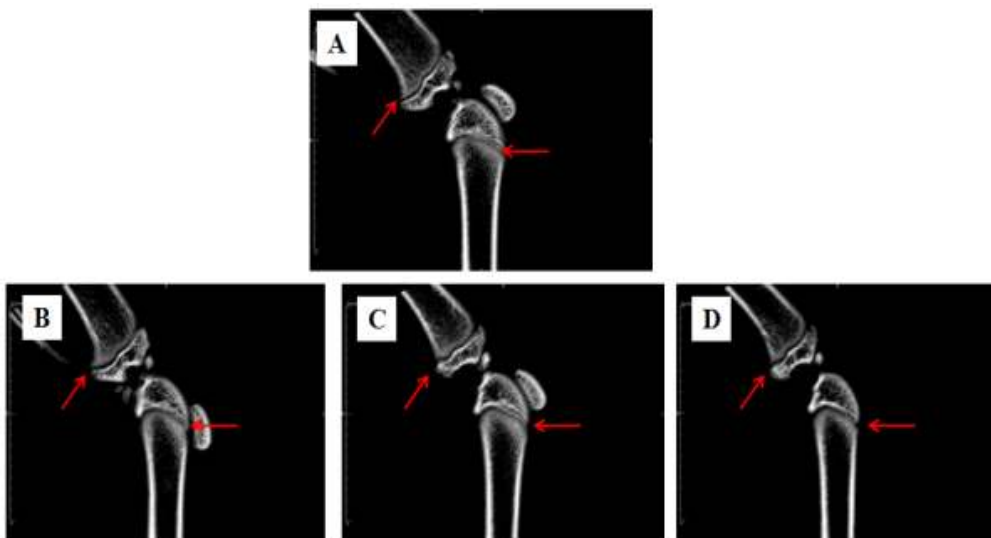


Figure 3.2.86 Micro-CT of femur after nanopowdered oyster shell treatment in rats. (A: control, B: micropowdered oyster shell, C: nanopowdered oyster shell, D: Zn-activation nanopowdered oyster shell).

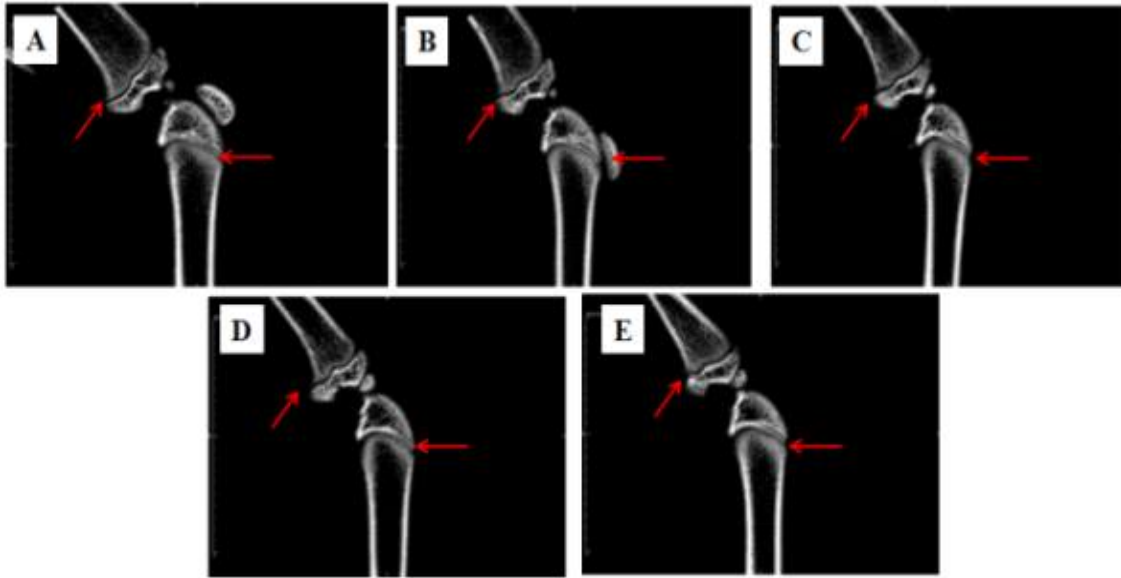


Figure 3.2.87 Micro-CT of femur after nanopowdered eggshell treatment in rats. (A: control, B: micropowdered eggshell, C: nanopowdered eggshell, D: Zn-added micropowdered eggshell, E: Zn-added nanopowdered eggshell).

○ 칼슘과 인의 함량

혈액은 혈액분석기 Fuji Dri-Chem 3500 을 이용하여 Ca, P 을 분석하였고, 분변, 신장, 간, 대퇴골은 다음과 같이 시료의 유기물질을 제거한 후 Ca, P, Zn 분석을 ICP를 통하여 진행 하였다. ICP분석을 위하여 시료 0.5 g을 5 mL의 질산과 50  $\mu$ l 과산화수소수를 첨가하여 110°C 에서 8시간 정도 분해를 한 후, 10분간 실온 방치 후 3차 증류수로 100배 희석하여 ICP분석 을 진행하였다.

○ 혈액에서 칼슘과 인의 함량

혈중 Ca은 정적인 상태가 아니라 동적인 상태로 내외적 변화에 대응하여 항상성을 유지하는 것으로 알려져 있다. 실험 6주 후의 혈중 Ca의 함량은 Tables 3.2.35,36에 나타내었다. 정상쥐인 control은 9.6 mg/L이며, 나노굴껍질은 10.9 mg/L, 아연 활성화한 나노굴껍질은 12.7 mg/L, 굴껍질은 10.35 mg/L로 나노화한 것이 혈중에서 칼슘함량이 높은 경향을 보였으며, 아연 활성화 할수록 흡수율을 높여 혈중 칼슘 함량이 높은 결과를 볼 수 있었다 (Table 3.2.35). 마찬가지로 나노계란껍질은 10.9 mg/L, 아연 첨가한 나노계란껍질은 12.8 mg/L, 아연첨가한 계란껍질은 11.75 mg/L, 계란껍질은 10.35 mg/L로 아연 첨가한 것이 흡수율을 높여 칼슘함량이 증가하는 것을 보였지만, 모두 정상수준 7.2~13.0 mg/L을 나타내었다 (Table3.2.36). 혈중 P의 함량도 실험기간동안 각 군별 간의 유의적 차이를 나타내지 않았고, 전체적으로 기간이 경과함에 따라 다소 감소하는 경향을 보였지만, 모두 정상수준을 나타내었다.

Table 3.2.35 The contents of Ca and P in serum after nanopowdered oyster shell treatment in rats

	Blood (mg/L)	
	Ca	P
<b>Control</b>	<b>9.60±0.14<sup>b</sup></b>	<b>18.50±2.12<sup>b</sup></b>
<b>Powdered oyster shell</b>	<b>10.35±0.07<sup>b</sup></b>	<b>16.50±0.71<sup>ab</sup></b>
<b>Nanopowdered oyster shell</b>	<b>10.90±0.14<sup>b</sup></b>	<b>14.00±1.41<sup>b</sup></b>
<b>Zn-activated nanopowdered oyster shell</b>	<b>12.7±0.99<sup>a</sup></b>	<b>12.50±1.40<sup>b</sup></b>

Table 3.2.36 The contents of Ca and P in serum after nanopowdered eggshell treatment in rats

	Blood (mg/L)	
	Ca	P
<b>Control</b>	<b>9.60±0.14<sup>e</sup></b>	<b>18.50±2.12<sup>a</sup></b>
<b>Powdered eggshell</b>	<b>10.35±0.07<sup>d</sup></b>	<b>17.75±1.77<sup>ab</sup></b>
<b>Nanopowdered eggshell</b>	<b>10.90±0.14<sup>c</sup></b>	<b>14.75±1.77<sup>bc</sup></b>
<b>Zn-added powdered eggshell</b>	<b>11.75±0.07<sup>b</sup></b>	<b>13.25±1.76<sup>c</sup></b>
<b>Zn-added nanopowdered eggshell</b>	<b>12.80±0.28<sup>a</sup></b>	<b>12.75±1.06<sup>c</sup></b>

○ 분변에서 칼슘, 인, 아연의 함량

실험종료 직전 수집한 변의 Ca, P와 Zn의 함량을 Tables 3.2.37,38에 나타내었다. 분변 중의 Ca의 함량은 정상쥐인 control은 1,412.7 mg/L, 나노굴껍질은 2,624.5 mg/L, 아연활성화한 나노굴껍질은 3,525.4 mg/L, 굴껍질은 1,937.8 mg/L으로 실험 식이를 한 쥐의 변에서 칼슘의 함량이 증가하는 것을 볼 수 있다 (Table 3.2.37). 나노계란껍질은 2,170.5 mg/L, 아연 첨가한 나노계란껍질은 3,561.0 mg/L, 아연을 첨가한 계란껍질은 3,061.1 mg/L, 계란껍질은 2,170.5 mg/L를 나타내며 (Table 3.2.38), 이것도 마찬가지로 실험 식이를 한 쥐의 변에서 칼슘의 함량이 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 아연을 활성화하고 첨가한 군에서 흡수율이 높아 대사가 활발이 진행하여 칼슘의 함량이 높다고 사료된다. 분변에서 P의 함량은 전체적으로 847~1,339 mg/L의 수치를 보였으며, 식이를 한 군에서 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 또한, 아연을 활성화한 굴껍질과 아연을 첨가한 계란껍질을 식이 하였기 때문에 Zn의 함량도 측정을 하였는데, 이때 아연을 첨가하고 활성화한 군에서 증가하는 경향을 볼 수 있었다.

Table 3.2.37 The contents of Ca, Zn and P in fecal after nanopowdered oyster shell treatment in rats

	Fecal(mg/L)		
	Ca	P	Zn
Control	1412.7±1.9 <sup>e</sup>	1339.1±1.4 <sup>d</sup>	27.6±1.6 <sup>d</sup>
Powdered eggshell	2170.5±1.1 <sup>d</sup>	1184.4±0.4 <sup>c</sup>	44.4±1.4 <sup>c</sup>
Nanopowdered eggshell	2802.9±1.5 <sup>c</sup>	1083.9±1.7 <sup>bc</sup>	52.5±1.3 <sup>c</sup>
Zn-added powdered eggshell	3061.1±1.7 <sup>b</sup>	1000.8±1.9 <sup>b</sup>	63.6±1.8 <sup>b</sup>
Zn-added nanopowdered eggshell	3561.0±0.3 <sup>a</sup>	847.3±1.1 <sup>a</sup>	72.1±1.2 <sup>a</sup>

Table 3.2.38 The contents of Ca, Zn and P in fecal after nanopowdered eggshell treatment in rats

	Fecal(mg/L)		
	Ca	P	Zn
Control	1412.7±1.9 <sup>e</sup>	1339.1±1.4 <sup>d</sup>	27.6±1.6 <sup>d</sup>
Powdered eggshell	2170.5±1.1 <sup>d</sup>	1184.4±0.4 <sup>c</sup>	44.4±1.4 <sup>c</sup>
Nanopowdered eggshell	2802.9±1.5 <sup>c</sup>	1083.9±1.7 <sup>bc</sup>	52.5±1.3 <sup>c</sup>
Zn-added powdered eggshell	3061.1±1.7 <sup>b</sup>	1000.8±1.9 <sup>b</sup>	63.6±1.8 <sup>b</sup>
Zn-added nanopowdered eggshell	3561.0±0.3 <sup>a</sup>	847.3±1.1 <sup>a</sup>	72.1±1.2 <sup>a</sup>

○ 간과 신장에서 칼슘, 인, 아연의 함량

간과 신장의 Ca, P, Zn의 함량은 Tables 3.2.39,40에 나타내었다. 간의 Ca 함량은 정상쥐인 control에서 17.6 mg/L, 나노굴껍질을 식이한 군은 24.85 mg/L, 아연 활성화한 나노굴껍질은 31.9 mg/L, 굴껍질은 23.5 mg/L으로 실험 식이를 한 쥐의 간에서 칼슘의 함량이 증가하는 것을 볼 수 있다 (Table 3.2.39). 나노계란껍질은 22.2 mg/L, 아연 첨가한 나노계란껍질은 31.6 mg/L, 아연 첨가한 계란껍질은 22.3 mg/L, 계란껍질은 20.3 mg/L으로 간에서 칼슘의 함량이 증가하는 것을 볼 수 있었다 (Table 3.2.40). 간에서 P의 함량은 전체적으로 식이를 한 군에서 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 또한, 아연을 활성화한 굴껍질과 아연을 첨가한 계란껍질을 식이 하였기 때문에 Zn의 함량도 측정을 하였는데, 이때 아연을 첨가하고 활성화한 군에서 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 신장에서의 Ca의 함량도 간에서의 결과와 마찬가지로의 경향을 보였다. 정상쥐인 control에서 21.9 mg/L, 나노굴껍질을 식이한 군은 39.2 mg/L, 아연 활성화한 나노굴껍질은 59.9 mg/L, 굴껍질은 27.2 mg/L으로 아연 활성화한 식이가 칼슘함량이 높아지는 것을 볼 수 있었으며, 전체적으로 식이를 한 군에서 칼슘의 함량이 증가하는 경향

을 볼 수 있다 (Table 3.2.39). 나노계란껍질은 37.6 mg/L, 아연 첨가한 나노계란껍질은 57 mg/L, 아연 첨가한 계란껍질은 48.6 mg/L, 계란껍질은 28.7 mg/L으로 식이를 한 군에서 신장의 칼슘함량이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Table 3.2.40). 신장에서 P의 함량은 간에서와 마찬가지로 감소하는 경향을 보여주고 있으며, Zn의 함량은 아연을 식이한 군에서 높아지는 것 경향을 나타내고 있다.

Table 3.2.39 The contents of Ca, Zn and P in liver and kidney after nanopowdered oyster shell treatment in rats

	Liver(mg/L)			Kidney(mg/L)		
	Ca	P	Zn	Ca	P	Zn
Control	17.6±2.3 <sup>d</sup>	844.5±0.7 <sup>a</sup>	6.5±1.3 <sup>d</sup>	21.9±0.2 <sup>c</sup>	1131.5±1.5 <sup>a</sup>	4.7±1.8 <sup>d</sup>
Powdered oyster shell	23.5±0.9 <sup>c</sup>	751.7±1.1 <sup>b</sup>	8.9±0.8 <sup>c</sup>	27.2±0.9 <sup>c</sup>	841.5±1.6 <sup>b</sup>	6.9±0.3 <sup>c</sup>
Nanopowdered oyster shell	24.8±1.1 <sup>b</sup>	667.9±1.1 <sup>c</sup>	8.9±2.9 <sup>b</sup>	39.2±1.6 <sup>b</sup>	787.1±1.6 <sup>c</sup>	11.3±2.6 <sup>b</sup>
Zn-activated nanopowdered oyster shell	31.9±1.6 <sup>a</sup>	486.3±0.9 <sup>d</sup>	9.5±1.9 <sup>a</sup>	59.9±1.0 <sup>a</sup>	438.3±1.5 <sup>d</sup>	21.8±2.4 <sup>a</sup>

Table 3.2.40 The contents of Ca, Zn and P in liver and kidney after nanopowdered eggshell treatment in rats

	Liver(mg/L)			Kidney(mg/L)		
	Ca	P	Zn	Ca	P	Zn
Control	17.6±2.3 <sup>c</sup>	844.5±0.7 <sup>a</sup>	6.5±1.3 <sup>d</sup>	21.9±0.2 <sup>c</sup>	1131.5±1.5 <sup>e</sup>	4.7±1.8 <sup>c</sup>
Powdered eggshell	20.3±1.8 <sup>b</sup>	789.5±0.8 <sup>b</sup>	6.9±1.4 <sup>d</sup>	28.7±0.9 <sup>d</sup>	887.7±1.5 <sup>d</sup>	7.4±0.6 <sup>d</sup>
Nanopowdered eggshell	22.2±1.4 <sup>b</sup>	670.6±0.9 <sup>c</sup>	7.7±1.8 <sup>c</sup>	37.6±1.8 <sup>c</sup>	693.9±0.7 <sup>c</sup>	9.7±1.4 <sup>c</sup>
Zn-added powdered eggshell	22.3±1.8 <sup>b</sup>	537.2±2.2 <sup>d</sup>	9.1±2.0 <sup>b</sup>	48.6±0.8 <sup>b</sup>	480.3±0.7 <sup>b</sup>	10.6±1.8 <sup>b</sup>
Zn-added nanopowdered eggshell	31.6±1.4 <sup>a</sup>	477.3±1.2 <sup>e</sup>	11.3±0.6 <sup>a</sup>	57.0±1.1 <sup>a</sup>	356.8±0.7 <sup>a</sup>	15.6±1.8 <sup>a</sup>

○ 대퇴골의 칼슘, 인, 아연의 함량

실험 종료 후 적출한 대퇴골의 Ca, P, Zn의 함량을 Tables 3.2.41,42에 나타내었다. 대퇴골의 Ca 함량은 정상쥐인 control에서 2,0013 mg/L, 나노굴껍질을 식이한 군은 3,2211.5 mg/L, 아연 활성화한 나노굴껍질은 3,6508.5 mg/L, 굴껍질은 2,8995 mg/L (Table 3.2.41), 나노계란껍질은 3,1969 mg/L, 아연첨가한 나노계란껍질은 3,6363.5 mg/L, 아연 첨가한 계란껍질은 3,5280.5 mg/L, 계란껍질은 2,8326.5 mg/L 실험 식이를 한 쥐의 대퇴골에서 칼슘의 함량이 증가하여 유의적 차이를 나타내는 것으로 보아 칼슘인자가 성장을 촉진시키는 것으로 사료되며, 아연을 활성화 할수록 칼슘의 흡수율을 증가시켜 성장을 촉진시키는데 더욱 영향을 끼친다고 사



료된다(Table 3.2.42). P의 함량은 여러 장기들과 마찬가지로 식이를 한 군에서 감소하는 것을 볼 수 있었으며, Zn의 함량은 아연 인자를 활성화하고 첨가한 군에서 유의적으로 증가하는 것을 보였다.

Table 3.2.41 The contents of Ca, Zn and P in femur after nanopowdered oyster shell treatment in rats

	Femur (mg/dL)		
	Ca	P	Zn
Control	20013.0±0.59 <sup>d</sup>	19712.5±0.63 <sup>d</sup>	25.75±1.09 <sup>c</sup>
Powdered oyster shell	28995.0±0.99 <sup>c</sup>	18921.0±1.52 <sup>c</sup>	36.75±1.65 <sup>b</sup>
Nanopowdered oyster shell	32211.5±0.43 <sup>b</sup>	16820.5±0.45 <sup>b</sup>	38.10±2.36 <sup>b</sup>
Zn-activated nanopowdered oyster shell	36508.5±0.82 <sup>a</sup>	10062.0±0.89 <sup>a</sup>	41.30±0.63 <sup>a</sup>

Table 3.2.42 The contents of Ca, Zn and P in femur after nanopowdered eggshell treatment in rats

	Femur (mg/dL)		
	Ca	P	Zn
Control	20013.0±0.59 <sup>e</sup>	19712.5±0.63 <sup>e</sup>	25.75±1.09 <sup>c</sup>
Powdered eggshell	28326.5±1.34 <sup>d</sup>	18788.0±1.59 <sup>d</sup>	33.00±2.34 <sup>b</sup>
Nanopowdered eggshell	31969.0±1.5 <sup>c</sup>	16545.0±0.71 <sup>c</sup>	34.10±2.69 <sup>b</sup>
Zn-added powdered eggshell	35280.5±0.58 <sup>b</sup>	14552.0±0.80 <sup>b</sup>	40.35±2.73 <sup>a</sup>
Zn-added nanopowdered eggshell	36363.5±0.76 <sup>a</sup>	10058.0±0.89 <sup>a</sup>	42.85±0.68 <sup>a</sup>

(4) 혈중 Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) 농도의 측정

성장호르몬이 뇌하수체에서 분비되면 이에 따라 간에서 IGF-1이 생성된다. 이렇게 분비된 IGF-1은 인체의 혈액을 따라 전신에 분포되어 뼈, 근육, 신경 조직들을 형성하는 역할을 하기 때문에 이를 혈액에서 측정하여 Figure 3.2.88.89에 나타내었다. 정상쥐에서 혈중 IGF의 수치는 380 ng/mL이었으며, 실험 식이를 한 7군에서는 점점 증가하였다. 특히 나노분말과 아연을 활성화하고 첨가한 군에서는 500 ng/mL정도로 유의적으로 증가하는 것으로 보아 칼슘 제제인 굴껍질과 계란껍질이 뼈를 형성하여 키 성장에 도움을 주는 것으로 사료된다.

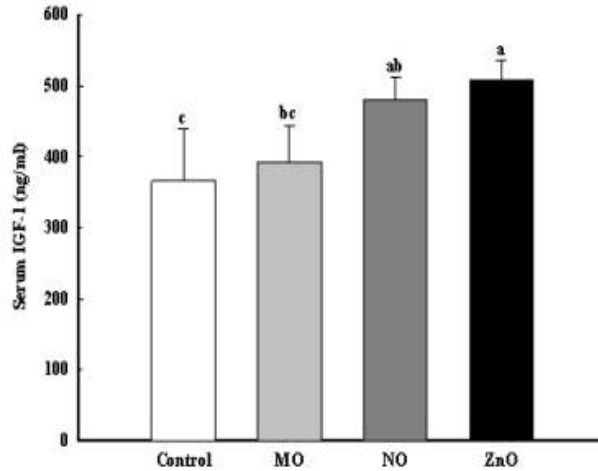


Figure 3.2.88 The contents of IGF-1 in serum after nanopowdered oyster shell treatment in rats. Control: non-samples supplemented rats, MO: micropowdered oyster shell supplemented rats, NO: nanopowdered oyster shell supplemented rats, ZnO: Zn-activated nanopowdered oyster shell supplemented rats.

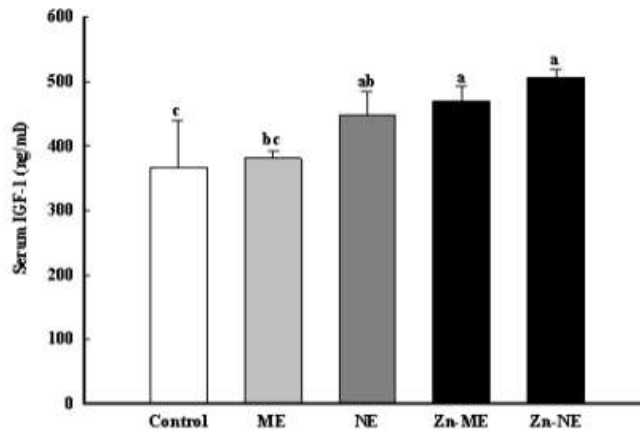


Figure 3.2.89 The contents of IGF-1 in serum after nanopowdered eggshell treatment in rats. Control: non-samples supplemented rats, ME: micropowdered eggshell supplemented rats, NE: nanopowdered eggshell supplemented rats, Zn-ME: Zn-added micropowdered eggshell supplemented rats, Zn-NE: Zn-added nanopowdered eggshell supplemented rats.

### 라. 나노분말의 수용화-나노분말칼슘의 유기태를 통한 가용화 기술 개발 (2차년도)

#### (1) 산에 분산한 나노분말의 제타전위

산성조건에서 나노분말의 분산을 측정하기 위해 제타전위를 이용하여 Table 3.2.43에 나타냈다. Ascorbic acid에 분산했을때에 나노굴겍질은 -8.59 mV, 아연 활성화한 나노굴겍질은 -6.46 mV, 굴겍질은 -42.39 mV를 나타냈는데 산성물질을 사용하지 않았을 때에는 나노굴겍질은 -15.73 mV, 아연 활성화한 나노굴겍질은 -13.7 mV, 굴겍질은 -18.57 mV로 산성조건에 분산하였을 때보다 안정한 분산력을 갖는 것을 볼 수 있었다. 따라서 산성조건을 사용하지 않고 분산시켰을 때 제타전위가 안정하였고, 경제적이라고 사료되어 산성조건에 분산시키지 않고 나노분말을 유화제만을 이용하여 분산시켜 실험을 진행하였다.

Table 3.2.43 Zeta-potential of acid condition on dispersible nanopowdered oyster shell

	Non-acid(-mV)	Ascorbic acid(-mV)
Nano-oyster shell	-15.73	-8.59
X+Nano-oyster shell	-13.7	-6.46
Oyster shell	-18.57	-42.39

(2) Micelle 형성 분석

나노칼슘분말을 안정적으로 분산하기 위해 유화제를 이용하여 분산한 결과를 Figure 3.2.90에서 나타냈다. 유화제를 넣지 않았을 때 제타전위는 나노분말에서 -7 mV로 불안정했고, PSML에 24시간 분산시켰을 때에도 유화제를 넣지 않았을 때와 비슷한 결과를 얻었지만, PGMS에 24시간 분산시켰을 때에는 -17 mV로 안정한 제타전위가 나타났다. 따라서 PGMS에 분산시켰을 때 나노칼슘분말이 micelle 형성하여 골고루 분산되는 것이라 사료된다.

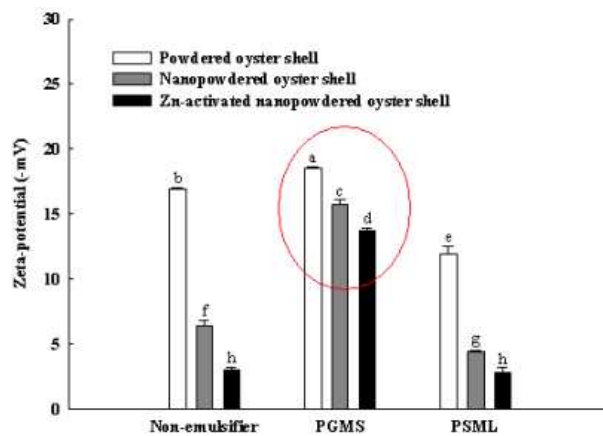


Figure 3.2.90 Effects of emulsifier on dispersible nanopowdered oyster shell.

PGMS: Polyglycerol monostearate PSML: Polyoxyethylene sorbitan monolaurate

(3) 나노분말의 분산 최적조건 확립

○ PGMS 용액의 농도

유화제별로 측정을 하였을 때 정해진 PGMS를 가지고 PGMS를 어느 정도 넣었을때 나노칼슘분말이 안정하게 분산이 되나 확인하기 위해 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00%의 농도로 분산을 하여 Figure 3.2.91에 나타내었다. PGMS를 넣지 않고 24시간 교반시켜 분산시켰을 때에는 -7 mV로 불안정했고, 유화제의 농도를 높일수록 -17 mV로 안정해지는 것을 볼 수 있었다. 그러나 PGMS의 농도가 0.5%이상인 0.75와 1.00%에서는 0.5%와 유의적 차이를 나타내지 않았으므로 경제성을 고려하여 PGMS의 농도는 0.5%가 적당하다고 사료된다.

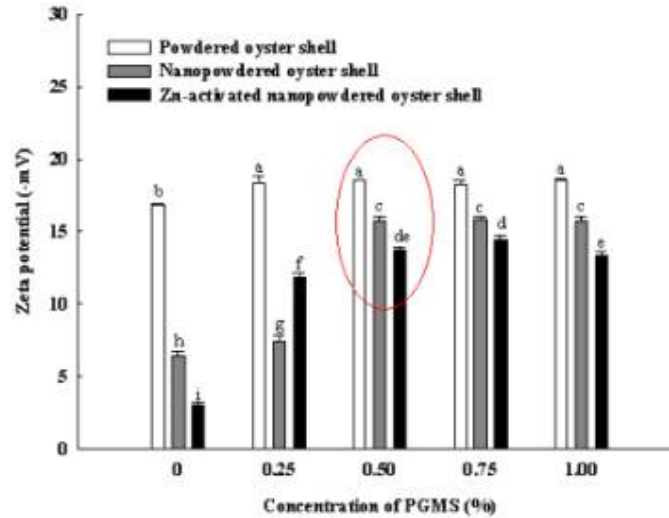


Figure 3.2.91 Effects of PGMS concentration on dispersible nanopowdered oyster shell.

○ 반응시간별 제타전위

20%의 나노칼슘분말에 멸균수를 넣고 2시간 교반 후 0.5%의 PGMS를 첨가하여 상온에서 800 rpm에서 교반시간을 0, 12, 24, 36시간 동안 진행하여 Figure 3.2.92에 나타냈다. 교반시간을 가하지 않았을 때에는 유화제와 결합을 할 수가 없어서 유화제를 넣지 않았을 때와 마찬가지로 -7 mV로 분산되지 않고 가라앉는 결과를 볼 수 있었으며 시간이 지날수록 분산이 잘 되었지만 24시간 교반하였을 때 -18 mV로 안정적인 결과를 얻을 수 있었다. 24시간 이후에는 유의적인 차이가 없었으므로 교반시간은 24시간이 최적이라 사료된다.

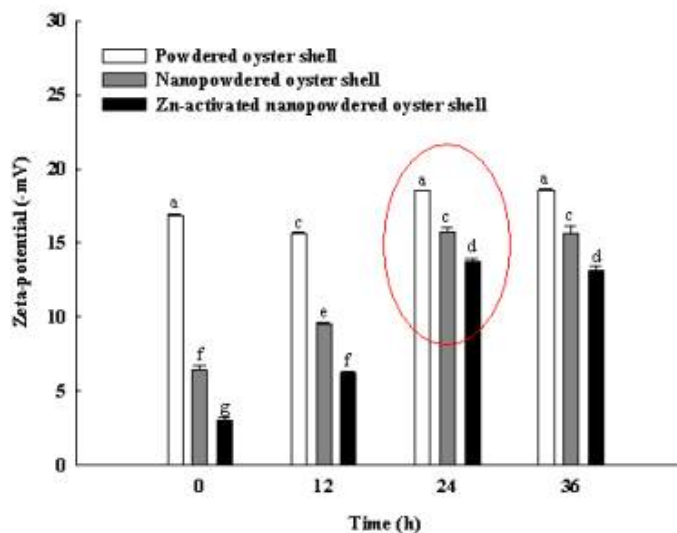


Figure 3.2.92 Effects of mixing time on dispersible nanopowdered oyster shell with PGMS.

마. 나노칼슘을 이용한 식품개발 및 유기태 칼슘제조.

(1) 시제품 개발

○ 포켓밀크제조

간편하게 휴대하면서 우유를 섭취하며 칼슘의 섭취도 충족시키고 칼슘의 생체이용율을 증가시키기 위해 나노칼슘분말을 이용하여 포켓밀크를 개발하였으며, 이의 제조공정을 Figure 3.2.93에 나타냈으며, 만들어진 포켓밀크는 Figure 3.2.94에 나타내었다.

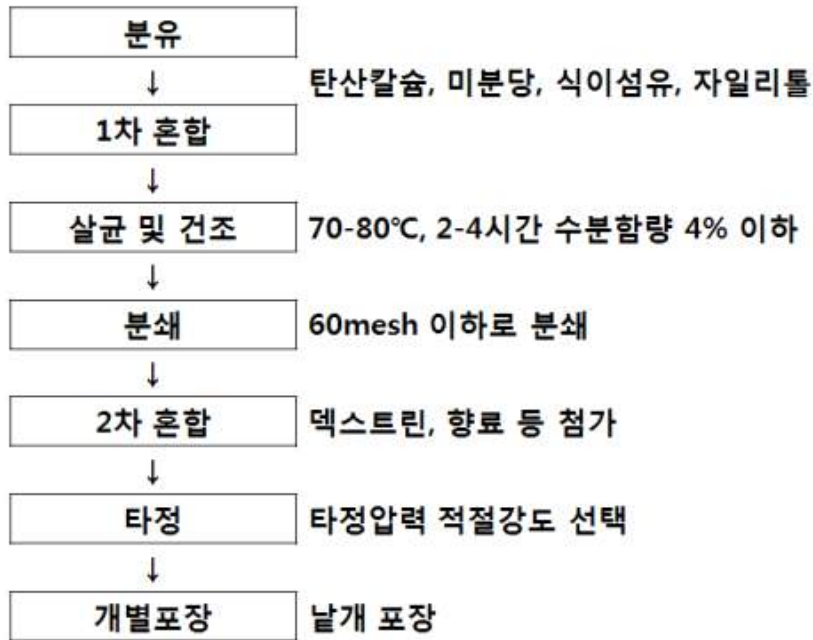


Figure 3.2.93 Flow chart of manufacturing of nanopowdered eggshell and oyster shell added tablet milk.



Figure 3.2.94 Shape of tablet milk A: control tablet milk, B: nanopowdered eggshell supplemented tablet milk, C: Zn-added nanopowdered eggshell supplemented tablet milk, D: nanopowdered oyster shell supplemented tablet milk, E: Zn-activated nanopowdered oyster shell supplemented tablet milk

(2) 포켓밀크의 이화학적실험

○ pH와 칼슘함량

포켓밀크의 pH와 칼슘, 아연, 인의 함량은 Table 3.2.44에 나타내었다. 시판되고 있는 포켓밀크는 7.29의 pH로 중성을 띠었으며, 나노계란껍질과 나노굴껍질을 첨가한 포켓밀크도 7.36으로 유의적 차이를 나타내지 않았다 ( $p > 0.05$ ).

포켓밀크에서 미네랄함량을 측정하기 위하여 시료 0.5 mL 를  $\text{HNO}_3$  5 mL에 가하여 10분간

방치한 후 50℃에서 가열하면서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μm를 천천히 가한 후 온도를 150℃까지 올리면서 8~10시간 동안 농축하여 갈색 연기가 나지 않고 맑은 색 연기가 나면 시료의 분해가 완료되어, 분해된 시료는 10분간 방냉한 후 3차 증류수를 가하여 10배 희석하여 ICP(inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES, OPTIMA 7300 DV, Perkinelmer INC, Waltham, MA, USA)로 칼슘의 함량을 측정하였다. 칼슘함량은 시판되고 있는 포켓밀크보다 칼슘제제인 계란껍질과 굴껍질을 첨가하였을 때 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으며 (p<0.05), 아연을 첨가한 나노계란껍질에는 60.8 g/kg, 아연활성화한 굴껍질에서는 67.74 g/kg으로 시판되고 있는 포켓밀크 34.85 g/kg보다 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다 (p<0.05). 이는 아연이 칼슘의 함량을 증진시킨다고 사료된다. 아연함량은 나노화한 칼슘제제에서 조금 증가하였지만 유의적 차이를 나타내지 않았으며 (p>0.05), 칼슘의 흡수력을 증가시키기 위해 아연을 첨가한 칼슘제제에서 증가하는 것을 볼 수 있었다. 인의 함량의 경우는 나노계란껍질과 나노굴껍질을 첨가하여 만든 포켓밀크에서 감소하였다. 따라서 나노입자를 첨가한 포켓밀크의 칼슘함량이 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 더 나아가 아연을 함유하는 나노입자가 칼슘의 함량을 더욱 극대화 시켰다. 이를 확인하기 위해서 생체이용을 실험을 진행하였다.

Table 3.2.44 Changes in pH and mineral contents (Ca, Zn, P) of tablet milk

Tablet milk <sup>2)</sup>	pH	Mineral contents		
		Ca (g/kg)	Zn (mg/kg)	P (g/kg)
Control	7.29±0.04 <sup>b1)</sup>	34.85±18.09 <sup>e</sup>	2.75±0.21 <sup>b</sup>	2.31±15.41 <sup>a</sup>
NPES	7.39±0.04 <sup>a</sup>	40.00±11.90 <sup>d</sup>	3.60±0.57 <sup>b</sup>	2.01±44.70 <sup>b</sup>
Zn-NPES	7.36±0.05 <sup>ab</sup>	60.80±21.70 <sup>b</sup>	8.65±2.47 <sup>a</sup>	1.13±31.81 <sup>d</sup>
NPOS	7.35±0.01 <sup>ab</sup>	40.43±16.81 <sup>c</sup>	4.30±0.71 <sup>b</sup>	1.43±10.89 <sup>c</sup>
Zn-NPOS	7.36±0.04 <sup>ab</sup>	67.74±36.86 <sup>a</sup>	8.40±1.84 <sup>a</sup>	1.12±24.04 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD. Means in a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-test.

<sup>2)</sup>Control: commercial tablet milk (included CaCO<sub>3</sub>)

NPES: tablet milk of nanopowdered eggshell

Zn-NPES: tablet milk of Zn-added nanopowdered eggshell

NPOS: tablet milk of nanopowdered oyster shell

Zn-NPOS: tablet milk of Zn-activated nanopowdered oyster shell

### ○ 흡습성

포켓밀크의 흡습성을 확인하기 위하여 automated gravimetric vapor sorption analyzer (DVS Intrinsic, Surface Measurement Systems, London, UK)를 사용하여 Figure 3.2.95에 나타내었다. 시판되는 포켓밀크 (control) 와 나노계란껍질 (NPES), 아연첨가한 나노계란껍질 (Zn-NPES), 나노굴껍질 (NPOS), 아연을 활성화한 나노굴껍질 (Zn-NPOS) 의 포켓밀크의 흡습성은 차이를 보이지 않았으며, 서서히 습도를 올릴수록 흡습성이 증가하는 것을 볼 수 있다. 상대습도가 80%일 때 흡습성이 20%로 급격하게 증가하는 것을 볼 수 있다. 따라서 포켓밀크는 흡습성에 민감하지 않다고 사료된다.

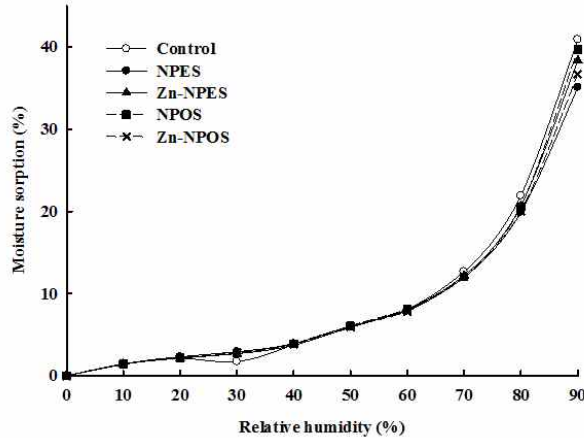


Figure 3.2.95 Change of tablet milk under isothermal vapor adsorption.

○ 물성실험

나노입자를 함유한 포켓밀크의 단단한 정도를 확인하기 위해 TMS-Pro Texture analyser (Food Technology Co., Sterling, VA, USA)를 사용하여 bending test를 하였다. 시판되는 포켓밀크와 나노계란껍질, 아연 첨가한 나노계란껍질, 나노굴껍질, 아연 활성화한 나노굴껍질을 첨가한 포켓밀크는 동일하게 52N의 결과를 얻었으며, 나노입자를 첨가하여도 물성에는 변화가 없으므로, 관능적으로 물성에 영향을 미치지 않을 거라고 사료된다(Figure 3.2.96).

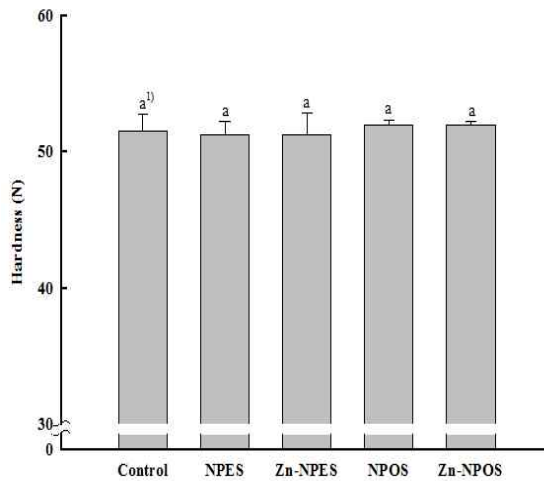


Figure 3.2.96 Texture properties of tablet milk of control, nanopowdered eggshell and oyster shell.

○ 색도

포켓밀크의 색도를 측정하여 Table 3.2.45에 나타내었다. 일반포켓밀크와 칼슘제제인 나노입자를 첨가하였을 때 밝기는 나노계란껍질, 나노굴껍질을 첨가하였을 때 조금 증가하였지만 유의적 차이를 보이지 않았으며 ( $p>0.05$ ), 적색도의 경우도 시판되는 포켓밀크와 유의적 차이를 보이지 않았다 ( $p>0.05$ ). 황색도도 마찬가지로 칼슘제제인 나노입자를 넣었을 때 증가하는 것을 보였지만 시판되는 포켓밀크와 유의적 차이를 나타내지 않았다 ( $p>0.05$ ). 따라서 나노계란껍질과 나노굴껍질을 포켓밀크에 첨가하였을 때 외관에 영향을 끼치지 않는다고 사료된다.

Table 3.2.45 Color values of tablet milk with nanopowdered oyster shell and eggshell

Color	Tablet milk <sup>2)</sup>				
	Control	NPES	Zn-NPES	NPOS	Zn-NPOS
<b>L* (lightness)</b>	90.30±0.91 <sup>a1)</sup>	91.31±1.22 <sup>a</sup>	91.28±1.91 <sup>a</sup>	91.66±0.75 <sup>a</sup>	91.39±0.99 <sup>a</sup>
<b>a* (redness)</b>	-2.52±0.27 <sup>a</sup>	-2.59±0.31 <sup>a</sup>	-2.19±0.25 <sup>a</sup>	-2.56±0.37 <sup>a</sup>	-2.49±0.31 <sup>a</sup>
<b>b* (yellowness)</b>	7.53±0.62 <sup>a</sup>	7.74±0.10 <sup>a</sup>	7.68±0.33 <sup>a</sup>	7.64±0.26 <sup>a</sup>	7.83±0.11 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean±SD. Means in a row with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-test.

<sup>2)</sup> Control: commercial tablet milk (included CaCO<sub>3</sub>)

NPES: tablet milk of nanopowdered eggshell

Zn-NPES: tablet milk of Zn-added nanopowdered eggshell

NPOS: tablet milk of nanopowdered oyster shell

Zn-NPOS: tablet milk of Zn-activated nanopowdered oyster shell

### ○ 관능평가

칼슘제제인 나노분말을 첨가한 포켓밀크의 관능검사를 위해 패널 15명을 선정하여 10점법을 실시하여 Table 3.2.46에 나타내었다. 외관상 시판되는 포켓밀크와는 유의적으로 차이를 보이지 않았으며 (p>0.05), 포켓밀크의 제조 시 들어가는 분유로 인하여 분유향은 높게 나타났으며, 흠향, 비린내는 일반포켓밀크와 차이 없이 같은 값을 나타내었다. 단맛은 나노계란껍질과 나노굴껍질을 첨가할수록 감소하는 경향을 나타냈지만, 뽀은맛과 쓴맛은 시판되는 포켓밀크와 같은 값으로 유의적 차이를 나타내지 않았다. 씹어 먹는 우유라는 것으로 물성이 중요하여 측정을 하였는데 표면의 거칠함은 나노입자를 넣을 수 록 시판되는 것에 비해 느껴졌지만 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 단단한 정도 역시 시판되는 것과 차이를 느끼지 못하였다 (p>0.05). 그리고 이물감의 경우는 나노분말을 넣은 시료에서는 이에 붙는 정도의 이물감이 있었지만 시판되는 제품과 유의적 차이를 나타내지 않았다(p>0.05). 전체적인 결과로는 시판되는 포켓밀크와 차이를 보이지 않았으며, 오히려 칼슘제제인 나노분말을 넣은 제품들을 선호하는 경향을 띄었다. 따라서 칼슘제제인 나노계란껍질과 나노굴껍질을 첨가하여도 외형, 향미, 맛, 물성에서 차이를 보이지 않았다.

Table 3.2.46 Sensory characteristics of tablet milk supplemented with nanopowdered oyster shell and eggshell

Tablet milk <sup>2)</sup>	Appear-ance	Flavour				Taste			Texture			Overall acceptability
	Whitness	Cooked	Earth	Fishy	Sweetness	Astringency	Bitterness	Surface roughness	Hardness	Adhesiveness		
<b>Control</b>	6.6±1.5 <sup>a1)</sup>	7.8±1.0 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	6.8±0.8 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	3.2±0.4 <sup>a</sup>	8.6±0.9 <sup>a</sup>	6.4±1.1 <sup>a</sup>	7.2±1.1 <sup>a</sup>	
<b>NPES</b>	6.2±1.6 <sup>a</sup>	7.4±1.5 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	6.0±0.7 <sup>ab</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	8.8±0.4 <sup>a</sup>	6.6±0.9 <sup>a</sup>	7.3±1.3 <sup>a</sup>	
<b>Zn-NPES</b>	6.0±1.7 <sup>a</sup>	7.6±1.7 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	5.6±0.5 <sup>ab</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	3.6±1.3 <sup>a</sup>	8.8±0.9 <sup>a</sup>	6.8±1.1 <sup>a</sup>	7.6±0.9 <sup>a</sup>	
<b>NPOS</b>	6.0±1.7 <sup>a</sup>	7.6±1.5 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	5.2±1.3 <sup>b</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	3.5±1.8 <sup>a</sup>	8.8±0.4 <sup>a</sup>	6.7±1.2 <sup>a</sup>	7.4±1.1 <sup>a</sup>	
<b>Zn-NPOS</b>	6.0±1.7 <sup>a</sup>	7.4±1.8 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	5.2±1.3 <sup>b</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	3.6±1.1 <sup>a</sup>	8.8±0.4 <sup>a</sup>	6.9±1.2 <sup>a</sup>	8.0±0.7 <sup>a</sup>	

<sup>1)</sup> Values are mean±SD. Means in a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-test.

<sup>2)</sup> Control: commercial tablet milk (included CaCO<sub>3</sub>)

NPES: tablet milk of nanopowdered eggshell

Zn-NPES: tablet milk of Zn-added nanopowdered eggshell

NPOS: tablet milk of nanopowdered oyster shell

Zn-NPOS: tablet milk of Zn-activated nanopowdered oyster shell



바. 칼슘 첨가 우유 개발

(1) 나노칼슘 분말의 수용성화 방법

2차 년도에 진행하였던 수용성화 실험을 예비실험으로 하여 본 실험을 진행하였다. 나노칼슘 분말의 분산을 위해 멸균수에 5~10% (w/v) 나노칼슘 분말을 첨가하여 1시간 sonication 한 후, 상온에서 1시간 나노칼슘을 멸균수에 충분히 분산시켰다. 여기에 계면활성제를 사용하지 않고 분산시킨 것과 계면활성제로서 polyglycerol monostearate (PGMS), polyoxyethylene sorbitan monolaurate (PSML), decaglycerine monolaurate (DGML), polyglycerol fatty acid ester (PGFE) 을 전체용액의 0.25, 0.50, 0.75, 1.00%(v/v) 가 되도록 첨가하여 상온에서 800 rpm으로 교반하면서 0, 12, 24, 36시간 방치하여 반응시켰다. 수용성화한 나노칼슘 분말을 제타전위의 측정을 통하여 가장 분산이 잘되어 있는 계면활성제, 사용량, 교반시간을 결정하였다.

○ 유화제별 분산성

나노칼슘을 분산하기 위해 polyglycerol monostearate (PGMS), polyoxyethylene sorbitan monolaurate (PSML), decaglycerine monolaurate (DGML), polyglycerol fatty acid ester (PGFE) 그리고 유화제를 넣지 않고 분산성인 제타전위를 측정한 것은 Figure 3.2.97 에 나타내었다. 유화제를 넣지 않고 교반만하여 측정을 하였을 때에는 15에서 3 mV의 수치로 금방 가라앉는 것을 보였다. 친수성이 강한 (HLB값이 16이상) 유화제인 PSML을 첨가하여 교반하였을 때에도 유화제를 넣지 않고 반응 시켰을 때와 비교 하였을 때 제타전위가 조금 높아 졌지만 큰 차이가 없었다. 그러나 유화제인 PGMS를 사용하여 반응 시켰을 때에는 제타전위의 수치가 20~15 mV 까지 올라가는 것을 볼 수 있었다. 이때 일반칼슘 분말이 조금 높았지만 입자가 크기 때문에 금방 가라앉는 경향을 볼 수 있었다. 또한 PGMS와 PSML 보다 친수성은 조금 약한 유화제인 DGML과 PGFE로 분산시켰을 때 PSML의 유화제와 비슷하게 분산성이 낮은 것을 볼 수 있었다. 따라서 PGMS로 분산하였을 때 가장 안정하다고 사료된다.

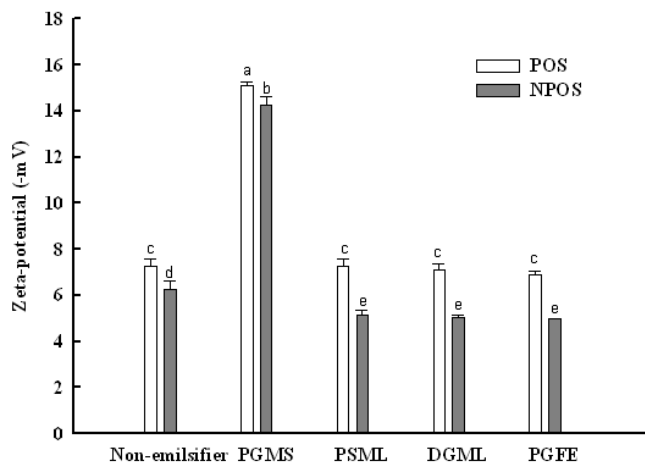


Figure 3.2.97 Effects of emulsifier on dispersible nanopowdered oyster shell. Non-emulsifier: not using emulsifier for dispersibility, PGMS: polyglycerol monostearate, PSML: polyoxyethylene sorbitan monolaurate, DGML: decaglycerine monolaurate, PGFE: polyglycerol fatty acid ester.

○ 반응시간별 분산성

나노칼슘 분말을 분산시키기 위해 유화제를 적용하여 반응 시간별로 측정을 하여 Figure 3.2.98에 나타내었다. 반응 시간이 아예 없을 때에는 유화제를 넣지 않을 때와 유사한 수치를 나타냈으며 반응 시간이 증가할수록 제타전위가 15 mV로 가깝게 측정되었다. 하지만 24시간 이후에는 큰 변화가 없었고 유의적 차이를 나타내지 않았으므로 ( $p>0.05$ ) 24시간일 때 가장 분산이 잘 됐다고 사료된다.

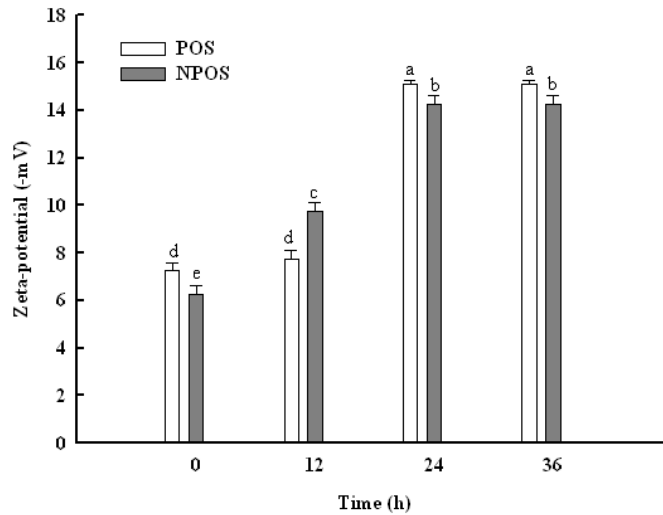


Figure 3.2.98 Effects of mixing time on dispersible nanopowdered oyster shell with PGMS.

○ 유화제 농도별 분산성

나노칼슘을 분산시키기 위해서 유화제인 polyglycerol monostearate (PGMS)를 넣고 24시간 반응을 시켜 분산성을 높였지만, 경제적인 측면을 고려 시 유화제의 양도 중요하기 때문에 유화제의 농도별로 분산성을 측정하여 Figure 3.2.99에 나타내었다. 친수성이 강한 PGMS 유화제를 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0%를 넣었을 때 나노칼슘의 분산성을 측정해 보면 아예 넣지 않았을 때에는 일정시간이 지나면 바로 가라앉았기 때문에 분산성 측정에도 조금 어려움이 있었으며, 농도가 높아질수록 제타전위의 값이 높아져서 분산성이 높아지는 것을 볼 수 있었지만, 0.5% 이상이 되었을 때에는 제타 전위의 값이 20 mV로 거의 유사하였으며 유의적 차이를 나타내지 않았다 ( $p>0.05$ ). 따라서 나노칼슘을 분산화 시키는데 최적의 농도는 0.5%로 사료되어 유화제인 PGMS를 0.5%를 넣어 24시간 동안 실온에서 교반시켜 반응 시킨 후 이를 이용하여 우유에서 분산성 정도 및 이화학적 실험과 관능검사를 실시하였다.

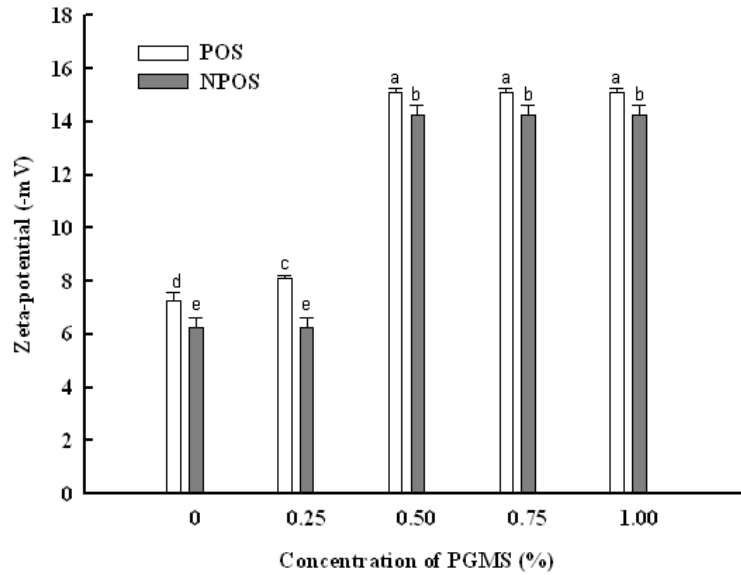


Figure 3.2.99 Effects of PGMS concentrations on dispersible nanopowdered oyster shell.

○ 우유의 제조

시유에 최적화한 수용성화한 나노칼슘을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (v/v) 의 농도로 첨가하여 4℃에서 16일간 저장하였다. 이때 시유를 개봉하지 않고, clean bench 에서 첨가물을 실린지로 주입하여 외부의 영향을 최소화 하였으며, 4일 간격 (0, 4, 8, 12, 16일) 으로 실험을 수행하였다.

(2) 저장기간 동안 우유의 이화학적 변화 측정

○ pH

수용화한 나노칼슘 분말을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%로 첨가한 우유의 저장기간 중 pH 변화를 Figure 3.2.100 에 나타내었다. pH 의 범위는 6.63~6.88 였으며, 이것은 신선한 우유의 pH 범위였다. 수용화 나노칼슘의 함량이 높을수록 pH가 약간 낮게 측정되었으며, 0.5%와 1.0%첨가한 우유는 저장기간 동안 pH가 6.7~6.68로 대조군과 비슷하거나 약간 높았다. 따라서 본 실험에서 나노칼슘을 수용성화하여 우유에 첨가 시 품질에 영향이 없었음을 알 수 있었다.

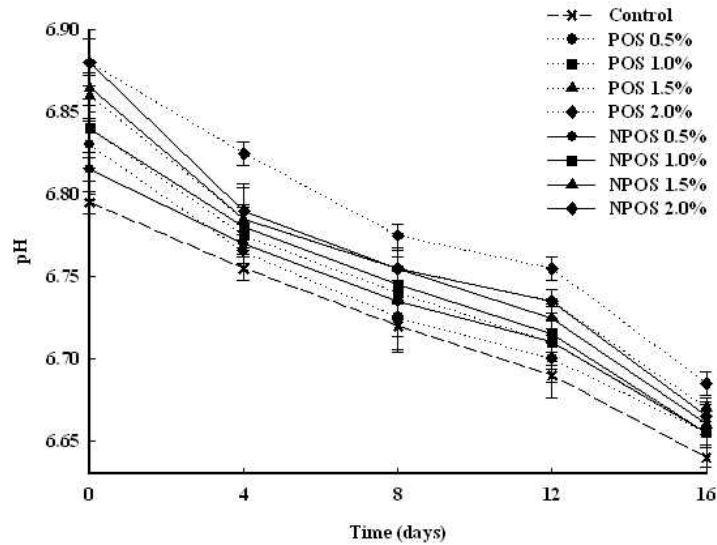


Figure 3.2.100 Change in pH of dispersible nanopowdered oyster shell-supplemented milk stored at 4°C for 16 days.

○ 저장기간 중 분산성

저장 기간 동안 수용성화한 나노칼슘을 첨가한 우유에서 얼마나 분산이 잘되는지 측정하였다. 수용성화한 나노칼슘을 2 mL 취하여 3차 증류수 20 mL에 분산시켜 100배 희석한 용액을 3회 Delsa nano C (Beckman coulter, inc., Fullerton, CA, USA)를 이용하여 측정하여 평균값의 결과 Figure 3.2.101에 나타내었다. 첨가한 분말의 함량이 높을수록 저장기간 동안의 분산성은 감소하였다. 0.5~1.0% 첨가한 우유의 나노칼슘 입자는 20~30 mV로 일반입자칼슘에 비해 안정화된 결과를 볼 수 있었다. 저장기간 12일 이후에는 20 mV이하로 분말이 서서히 가라앉는 것으로 보였다. 따라서 우유에서 수용성화한 나노칼슘분말이 저장기간 동안 안정하다고 사료된다.

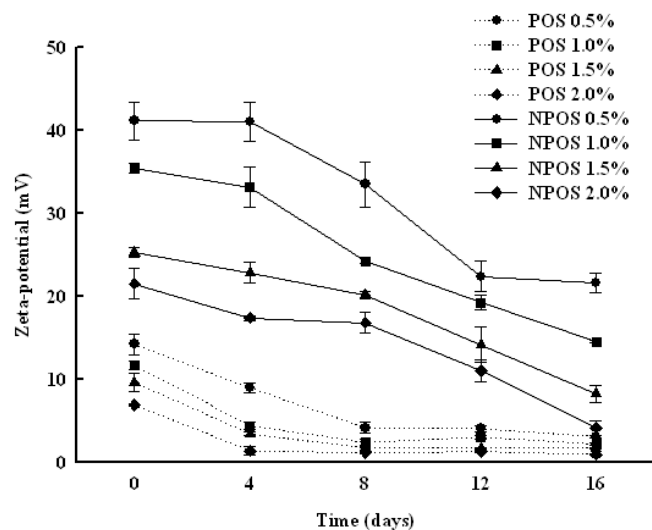


Figure 3.2.101 Change in zeta-potential of dispersible nanopowdered oyster shell-supplemented milk stored at 4°C for 16 days.

○ 저장 중 칼슘의 함량

수용성 나노칼슘을 첨가한 우유의 저장기간 동안 칼슘의 함량을 측정을 하였다. 우유 0.5 mL 을 상온화 한 후, HNO<sub>3</sub> 5 mL를 가하여 10분간 방치한 후 50℃로 가열하면서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μm를 천천히 가한 후 온도를 150℃ 까지 올리면서 8-10시간 동안 농축하여 갈색 연기가 나지 않고 맑은 색 연기가 나면 시료의 분해가 완료 되어 분해된 시료는 10분간 방냉한 후 3차 증류수를 가하여 10배 희석하여 ICP(inductively coupled plasma optical emission spectroscopy) (ICP-OES, OPTIMA 7300 DV, Perkinelmer INC, Waltham, MA, USA)로 칼슘의 함량을 측정하여 Table 3.2.47에 나타내었다. 대조군의 칼슘의 함량은 1.08 mg/L 이며 0.5~2.0%를 첨가한 우유의 함량은 대조군의 칼슘 함량에서 일정하게 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 나노칼슘이 조금 높은 양을 보였지만 유의적인 차이를 보이지 않았다 (p>0.05)

Table 3.2.47 Concentration of calcium on dispersable nanopowdered oyster shell-supplemented milk stored at 4°C for 16 days

Conc. (%, wt/vol)	Amount of calcium (mg/L)				
	0-d	4-d	8-d	12-d	16-d
<b>Control</b>	1.08±0.06 <sup>fi</sup>	1.11±0.02 <sup>f</sup>	1.10±0.04 <sup>c</sup>	1.16±0.11 <sup>f</sup>	1.16±0.09 <sup>c</sup>
<b>POS(0.5)<sup>2)</sup></b>	2.85±0.29 <sup>e</sup>	2.77±0.35 <sup>e</sup>	2.95±0.08 <sup>d</sup>	2.97±0.05 <sup>e</sup>	2.99±0.01 <sup>d</sup>
<b>POS(1.0)</b>	5.15±0.12 <sup>d</sup>	5.12±0.17 <sup>d</sup>	5.14±0.04 <sup>c</sup>	5.17±0.19 <sup>d</sup>	5.17±0.10 <sup>c</sup>
<b>POS(1.5)</b>	6.68±0.41 <sup>c</sup>	6.63±0.35 <sup>c</sup>	6.61±0.33 <sup>b</sup>	6.83±0.23 <sup>c</sup>	6.67±0.11 <sup>b</sup>
<b>POS(2.0)</b>	9.31±0.35 <sup>b</sup>	9.24±0.86 <sup>b</sup>	9.35±0.54 <sup>a</sup>	9.19±0.04 <sup>b</sup>	9.23±1.03 <sup>a</sup>
<b>NPOS(0.5)</b>	3.16±0.03 <sup>c</sup>	3.15±0.19 <sup>c</sup>	3.12±0.14 <sup>d</sup>	3.15±0.177 <sup>c</sup>	3.17±0.08 <sup>d</sup>
<b>NPOS(1.0)</b>	5.32±0.22 <sup>d</sup>	5.20±0.28 <sup>d</sup>	5.35±0.49 <sup>c</sup>	5.35±0.18 <sup>d</sup>	5.34±0.47 <sup>c</sup>
<b>NPOS(1.5)</b>	6.99±0.08 <sup>c</sup>	7.06±0.08 <sup>c</sup>	7.17±0.39 <sup>b</sup>	7.09±0.02 <sup>c</sup>	7.05±0.01 <sup>b</sup>
<b>NPOS(2.0)</b>	9.38±0.66 <sup>b</sup>	9.32±0.06 <sup>ab</sup>	9.27±0.37 <sup>a</sup>	9.37±0.37 <sup>b</sup>	9.30±0.42 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Values with different superscripts within the same column are significantly different (p<0.05). <sup>2)</sup>POS: powdered oyster shell , NPOS: nanopowdered oyster shell,

○ 색도 측정

색도는 4℃로 저장된 시료를 Hunter 색도계 (Minolta CT0310, Tokyo, Japan)를 사용하여 수용성화한 나노칼슘 분말을 우유에 첨가하여 저장기간에 따른 색의 변화를 관찰하기 위해 L-value, a-value, b-value를 측정한 결과를 Table 3.2.48 에 나타내었다. 수용성화한 나노칼슘 분말을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% 농도 별로 첨가하였을 때, 대조군과 L-값은 분말의 농도가 증가할수록 88.86±0.39 에서 88.88±0.17으로 유의적 차이를 보이지 않았다. 저장기간 동안도 마찬가지로 농도가 증가할 때와 비슷한 경향을 보여 유의적 차이를 보이지 않았다 (p>0.05). a-값은 16일 저장기간 동안과 농도별로 유의적 차이를 보이지 않았다 (p>0.05). b-값은 농도가 높을수록 증가 하였고, 저장기간 동안도 마찬가지로 증가하였으며 유의적 차이를 나타내었다 (p<0.05). 우유의 L-값은 소비자의 소비에 큰 영향을 미친다고 하는데, 본 실험에서는 저장기간 동안 크게 영향을 미치지 않았기 때문에 긍정적인 결과를 가져왔다. 따라서 본 실험에서 우유에 수용성화한 나노칼슘 분말을 첨가하였을 때 품질에 영향을 미치지 않는다고 사료된다.

Table 3.2.48 Change in color of dispersible nanopowdered oyster shell-supplemented milk stored at 4°C for 16 days

	Conc. (%)	Storage period (days)				
		0	4	8	12	16
<b>L</b> (lightness)	<b>Control</b>	88.86±0.39 <sup>1)aA2)</sup>	88.73±0.20 <sup>aA</sup>	88.83±0.21 <sup>aA</sup>	88.79±0.14 <sup>aA</sup>	88.83±0.24 <sup>aA</sup>
	POS(0.5) <sup>3)</sup>	88.69±0.35 <sup>aA</sup>	88.75±0.30 <sup>aA</sup>	88.90±0.14 <sup>aA</sup>	88.86±0.16 <sup>aA</sup>	88.87±0.17 <sup>aA</sup>
	POS(1.0)	88.87±0.25 <sup>aA</sup>	88.75±0.29 <sup>aA</sup>	88.82±0.17 <sup>aA</sup>	88.86±0.22 <sup>aA</sup>	88.82±0.19 <sup>aA</sup>
	POS(1.5)	88.87±0.28 <sup>aA</sup>	88.73±0.36 <sup>aA</sup>	88.77±0.29 <sup>aA</sup>	88.79±0.22 <sup>aA</sup>	88.80±0.16 <sup>aA</sup>
	POS(2.0)	88.90±0.15 <sup>aA</sup>	88.74±0.23 <sup>aA</sup>	88.74±0.26 <sup>aA</sup>	88.79±0.18 <sup>aA</sup>	88.83±0.18 <sup>aA</sup>
	NPOS(0.5)	88.85±0.22 <sup>aA</sup>	88.83±0.22 <sup>aA</sup>	88.80±0.21 <sup>aA</sup>	88.83±0.18 <sup>aA</sup>	88.85±0.16 <sup>aA</sup>
	NPOS(1.0)	88.82±0.23 <sup>aA</sup>	88.73±0.25 <sup>aA</sup>	88.73±0.12 <sup>aA</sup>	88.87±0.14 <sup>aA</sup>	88.85±0.17 <sup>aA</sup>
	NPOS(1.5)	88.82±0.15 <sup>aA</sup>	88.76±0.20 <sup>aA</sup>	88.73±0.24 <sup>aA</sup>	88.85±0.19 <sup>aA</sup>	88.83±0.15 <sup>aA</sup>
	NPOS(2.0)	88.79±0.31 <sup>aA</sup>	88.74±0.42 <sup>aA</sup>	88.71±0.25 <sup>aA</sup>	88.85±0.18 <sup>aA</sup>	88.85±0.15 <sup>aA</sup>
<b>a</b> (redness)	<b>Control</b>	2.57±0.07 <sup>aA</sup>	2.57±0.04 <sup>aA</sup>	2.59±0.09 <sup>aA</sup>	2.58±0.10 <sup>aA</sup>	2.56±0.06 <sup>aA</sup>
	POS(0.5)	2.55±0.09 <sup>aA</sup>	2.55±0.07 <sup>aA</sup>	2.60±0.06 <sup>aA</sup>	2.59±0.08 <sup>aA</sup>	2.58±0.08 <sup>aA</sup>
	POS(1.0)	2.52±0.10 <sup>aA</sup>	2.53±0.02 <sup>aA</sup>	2.61±0.07 <sup>aA</sup>	2.60±0.04 <sup>aA</sup>	2.58±0.04 <sup>aA</sup>
	POS(1.5)	2.52±0.10 <sup>aA</sup>	2.56±0.07 <sup>aA</sup>	2.59±0.02 <sup>aA</sup>	2.61±0.09 <sup>aA</sup>	2.58±0.07 <sup>aA</sup>
	POS(2.0)	2.53±0.08 <sup>aA</sup>	2.54±0.04 <sup>aA</sup>	2.59±0.09 <sup>aA</sup>	2.59±0.10 <sup>aA</sup>	2.59±0.05 <sup>aA</sup>
	NPOS(0.5)	2.53±0.05 <sup>aA</sup>	2.54±0.07 <sup>aA</sup>	2.59±0.09 <sup>aA</sup>	2.59±0.08 <sup>aA</sup>	2.58±0.04 <sup>aA</sup>
	NPOS(1.0)	2.54±0.06 <sup>aA</sup>	2.55±0.05 <sup>aA</sup>	2.62±0.09 <sup>aA</sup>	2.59±0.10 <sup>aA</sup>	2.60±0.06 <sup>aA</sup>
	NPOS(1.5)	2.54±0.05 <sup>aA</sup>	2.53±0.05 <sup>aA</sup>	2.61±0.08 <sup>aA</sup>	2.58±0.09 <sup>aA</sup>	2.59±0.08 <sup>aA</sup>
	NPOS(2.0)	2.53±0.05 <sup>aA</sup>	2.55±0.04 <sup>aA</sup>	2.63±0.05 <sup>aA</sup>	2.57±0.10 <sup>aA</sup>	2.61±0.09 <sup>aA</sup>
<b>b</b> (yellowness)	<b>Control</b>	2.66±0.09 <sup>aB</sup>	2.69±0.14 <sup>aB</sup>	2.81±0.17 <sup>aB</sup>	3.03±0.18 <sup>aA</sup>	3.05±0.07 <sup>aA</sup>
	POS(0.5)	2.61±0.21 <sup>aC</sup>	2.67±0.18 <sup>aC</sup>	2.82±0.11 <sup>aBC</sup>	2.99±0.14 <sup>aAB</sup>	3.03±0.10 <sup>aA</sup>
	POS(1.0)	2.59±0.11 <sup>aB</sup>	2.66±0.17 <sup>aB</sup>	2.81±0.14 <sup>aB</sup>	3.02±0.14 <sup>aA</sup>	3.04±0.13 <sup>aA</sup>
	POS(1.5)	2.62±0.18 <sup>aB</sup>	2.64±0.16 <sup>aB</sup>	2.79±0.17 <sup>aB</sup>	3.01±0.10 <sup>aA</sup>	3.02±0.08 <sup>aA</sup>
	POS(2.0)	2.59±0.13 <sup>aB</sup>	2.66±0.07 <sup>aB</sup>	2.80±0.17 <sup>aB</sup>	2.99±0.14 <sup>aA</sup>	3.03±0.12 <sup>aA</sup>
	NPOS(0.5)	2.54±0.09 <sup>aB</sup>	2.66±0.13 <sup>aB</sup>	2.76±0.14 <sup>aB</sup>	2.97±0.05 <sup>aA</sup>	3.00±0.14 <sup>aA</sup>
	NPOS(1.0)	2.54±0.11 <sup>aC</sup>	2.63±0.15 <sup>aC</sup>	2.81±0.14 <sup>aBC</sup>	2.98±0.15 <sup>aAB</sup>	3.05±0.17 <sup>aA</sup>
	NPOS(1.5)	2.56±0.10 <sup>aC</sup>	2.62±0.14 <sup>aC</sup>	2.83±0.15 <sup>aB</sup>	2.97±0.10 <sup>aAB</sup>	2.99±0.05 <sup>aA</sup>
	NPOS(2.0)	2.55±0.09 <sup>aC</sup>	2.66±0.12 <sup>aBC</sup>	2.78±0.14 <sup>aB</sup>	3.00±0.13 <sup>aA</sup>	3.02±0.10 <sup>aA</sup>

<sup>1)</sup>Mean±SD(n=8) <sup>2)</sup>Values with different superscript in a row (A-D) and column (a-c) are significant at p<0.05 by Duncan's multiple range test. <sup>3)</sup>POS: powdered oyster shell, NPOS: nanopowdered oyster shell,

### ○ 관능 평가

우유에 수용성화한 나노칼슘 분말을 첨가하여 제조한 우유를 저장기간에 따라 관능적 특성을 비교한 결과를 Table 3.2.49 에 나타내었다. 우유를 4°C 에서 16일 동안 저장한 것을 5점법으로 평가하였다. 저장기간 동안 대조군과 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% 농도 별로 첨가하였을 때, 나노입자의 경우는 분산성에서 유의적 차이를 나타내지 않았지만 (p>0.05), 일반 입자의 경우는 농도가 높을수록 분산이 되지 않고 가라앉고 있는 것을 볼 수 있었다. 하지만, 저장기간이 12일 이후부터는 나노칼슘분말도 높은 농도에서는 가라앉는 것을 확인할 수 있었으며 이 또한 유의적 차이를 보였다 (p<0.05). Earthy flavor의 경우는 일반 분말에서 조금 낮지만, 나노입자에서는 농도가 높아지면 높아 졌지만 유의적 차이를 보이지 않았다 (p>0.05). Astringency taste의 경우는 일반칼슘과 나노칼슘 둘 다 농도가 높아질수록 높아지는 경향을 보이며 유의적 차이를 나타냈지만(p<0.05), 첨가량 0.5, 1.0%에서는 크게 느껴지지 않았다. 이는 수용성화 할 때 유화제의 영향으로 사료된다. Bitterness taste의 경우는 일반칼슘 첨가하였을 때 농도가 증가할수록, 저장기간이 길어질수록 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 나노입자를 첨가한 우유의 경우는 유의적

차이를 보이지 않았다 ( $p>0.05$ ). 일반칼슘을 분산하여 첨가하였을 때와 비교해보면, 나노칼슘을 분산하였을 때 낮은 농도 0.5, 1.0%에서 저장기간 동안 분산성도 좋았을 뿐만 아니라 떫은맛과 쓴맛에서도 큰 변화가 없었다. 따라서 수용성화한 나노칼슘 분말을 첨가하였을 때 관능적인 면에서 0.5, 1.0%일 때 가장 적절하고, 품질적으로 영향을 미치지 않는다고 사료된다.

Table 3.2.49 Sensory characteristics of dispersible nanopowdered oyster shell-supplemented milk stored at 4°C for 16 days

Conc. (% wt/vol)	Appearance	Flavor	Taste	
	Dispersibility	Earthy	Astringency	Bitterness
<b>0-d storage period</b>				
Control	1.00±0.00 <sup>dl</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>
POS(0.5) <sup>2)</sup>	1.57±0.53 <sup>c</sup>	1.57±0.53 <sup>ab</sup>	1.71±0.49 <sup>bc</sup>	1.14±0.38 <sup>ab</sup>
POS(1.0)	2.29±0.49 <sup>b</sup>	1.86±0.69 <sup>a</sup>	2.14±1.07 <sup>bc</sup>	1.29±0.49 <sup>ab</sup>
POS(1.5)	2.57±0.53 <sup>ab</sup>	1.86±0.38 <sup>a</sup>	2.43±0.79 <sup>a</sup>	1.29±0.49 <sup>ab</sup>
POS(2.0)	2.71±0.49 <sup>a</sup>	1.86±0.38 <sup>a</sup>	2.71±0.95 <sup>a</sup>	1.43±0.53 <sup>a</sup>
NPOS(0.5)	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.14±0.38 <sup>bc</sup>	1.29±0.49 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>
NPOS(1.0)	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.14±0.38 <sup>bc</sup>	1.29±0.49 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>
NPOS(1.5)	1.14±0.38 <sup>d</sup>	1.29±0.49 <sup>bc</sup>	1.43±0.53 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>
NPOS(2.0)	1.14±0.38 <sup>d</sup>	1.29±0.49 <sup>bc</sup>	1.57±0.53 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>
<b>4-d storage period</b>				
Control	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
POS(0.5)	2.29±0.49 <sup>c</sup>	2.14±0.38 <sup>b</sup>	1.86±0.38 <sup>bcd</sup>	1.29±0.49 <sup>cd</sup>
POS(1.0)	3.00±0.58 <sup>b</sup>	2.29±0.76 <sup>b</sup>	2.00±0.00 <sup>bc</sup>	1.57±0.53 <sup>bc</sup>
POS(1.5)	3.29±0.49 <sup>b</sup>	2.57±0.79 <sup>b</sup>	2.14±0.38 <sup>b</sup>	1.86±0.69 <sup>b</sup>
POS(2.0)	2.71±0.49 <sup>a</sup>	1.86±0.38 <sup>a</sup>	2.71±0.49 <sup>a</sup>	3.00±1.00 <sup>a</sup>
NPOS(0.5)	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.14±0.38 <sup>c</sup>	1.43±0.53 <sup>de</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(1.0)	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.14±0.38 <sup>c</sup>	1.43±0.53 <sup>de</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(1.5)	1.14±0.38 <sup>d</sup>	1.43±0.53 <sup>c</sup>	1.57±0.53 <sup>de</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(2.0)	1.14±0.38 <sup>d</sup>	1.43±0.53 <sup>c</sup>	1.71±0.49 <sup>bcd</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
<b>8-d storage period</b>				
Control	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
POS(0.5)	3.00±0.00 <sup>c</sup>	2.43±0.53 <sup>c</sup>	2.00±0.00 <sup>bc</sup>	2.00±0.00 <sup>c</sup>
POS(1.0)	3.57±0.53 <sup>b</sup>	2.86±0.90 <sup>bc</sup>	2.00±0.00 <sup>bc</sup>	2.29±0.49 <sup>b</sup>
POS(1.5)	4.43±0.53 <sup>a</sup>	3.29±0.49 <sup>b</sup>	2.29±0.49 <sup>b</sup>	2.43±0.53 <sup>b</sup>
POS(2.0)	4.71±0.49 <sup>a</sup>	4.00±0.00 <sup>a</sup>	3.00±0.58 <sup>a</sup>	3.57±0.53 <sup>a</sup>
NPOS(0.5)	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.14±0.38 <sup>d</sup>	1.43±0.53 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(1.0)	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.14±0.38 <sup>d</sup>	1.43±0.53 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(1.5)	1.14±0.38 <sup>d</sup>	1.43±0.53 <sup>d</sup>	1.57±0.53 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(2.0)	1.14±0.38 <sup>d</sup>	1.43±0.53 <sup>d</sup>	1.71±0.49 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
<b>12-d storage period</b>				
Control	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
POS(0.5)	3.86±0.38 <sup>b</sup>	3.43±0.53 <sup>c</sup>	3.00±0.00 <sup>bc</sup>	3.00±0.00 <sup>c</sup>
POS(1.0)	5.00±0.00 <sup>a</sup>	3.86±0.90 <sup>bc</sup>	3.00±0.00 <sup>bc</sup>	3.29±0.49 <sup>b</sup>
POS(1.5)	4.86±0.38 <sup>a</sup>	4.29±0.49 <sup>b</sup>	3.29±0.49 <sup>b</sup>	3.43±0.53 <sup>b</sup>
POS(2.0)	5.00±0.00 <sup>a</sup>	5.00±0.00 <sup>a</sup>	4.00±0.58 <sup>a</sup>	4.57±0.53 <sup>a</sup>
NPOS(0.5)	2.00±0.00 <sup>d</sup>	1.14±0.38 <sup>d</sup>	2.43±0.53 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(1.0)	2.00±0.00 <sup>d</sup>	1.14±0.38 <sup>d</sup>	2.43±0.53 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(1.5)	3.14±0.38 <sup>c</sup>	1.43±0.53 <sup>d</sup>	2.43±0.53 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(2.0)	3.43±0.53 <sup>c</sup>	1.43±0.53 <sup>d</sup>	2.71±0.49 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
<b>16-d storage period</b>				
Control	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
POS(0.5)	4.43±0.53 <sup>b</sup>	4.57±0.53 <sup>a</sup>	4.00±0.00 <sup>bc</sup>	4.00±0.00 <sup>c</sup>
POS(1.0)	5.00±0.00 <sup>a</sup>	4.57±0.53 <sup>a</sup>	4.00±0.00 <sup>bc</sup>	4.29±0.49 <sup>b</sup>
POS(1.5)	5.00±0.00 <sup>a</sup>	5.00±0.00 <sup>a</sup>	4.29±0.49 <sup>b</sup>	4.43±0.53 <sup>b</sup>
POS(2.0)	5.00±0.00 <sup>a</sup>	5.00±0.00 <sup>a</sup>	4.29±0.38 <sup>a</sup>	5.00±0.00 <sup>a</sup>
NPOS(0.5)	3.00±0.00 <sup>d</sup>	1.14±0.38 <sup>b</sup>	3.43±0.53 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(1.0)	3.00±0.00 <sup>d</sup>	1.14±0.38 <sup>b</sup>	3.43±0.53 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(1.5)	4.00±0.00 <sup>c</sup>	1.43±0.53 <sup>b</sup>	3.43±0.53 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>
NPOS(2.0)	4.43±0.53 <sup>b</sup>	1.43±0.53 <sup>b</sup>	3.71±0.49 <sup>cd</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>Values with different superscripts within the same column are significantly different ( $p<0.05$ ). <sup>2)</sup>POS: powdered oyster shell, NPOS: nanopowdered oyster shell.

사. 나노칼슘 첨가 요구르트 개발

(1) 요구르트의 제조

3.7%의 skim milk powder와 0.2% pectin을 우유에 첨가한 후, 교반기(MS3040 electronic overhead stirrer, Tops Misung Scientific Co., Seoul, Korea)를 사용하여 1,600 rpm으로 10분간 혼합하였다. 그 뒤 90℃에서 10분간 열처리하고 42℃로 냉각 시켰다. 그리고 0.002% YAB 450 AB starter culture 를 접종시킨 후 42℃에서 pH가 4.5에 이를 때까지 발효시켰다. 그것을 10℃에서 하루 동안 안정화시켰으며, 발효가 완성된 요구르트에 나노난각칼슘을 0.15, 0.3, 0.45%로 첨가 한 후, 4℃에서 4, 8, 12, 16일간 저장하며 실험을 수행하였다.

(2) 요구르트의 이화학적검사

○ pH 변화 측정

나노칼슘의 농도 (0.15, 0.3, 0.45%)를 달리하여 첨가한 호상 요구르트를 4℃에서 16일간 저장 중 4일 간격 (0, 4, 8, 12, 16일) 으로 pH 변화를 측정된 결과는 Figure 3.2.102과 같다. 나노난각칼슘을 첨가한 호상 요구르트의 pH 범위는 4.1~4.7 이었으며, 나노난각칼슘 첨가량을 증가할 수록 pH 가 높게 측정되었다. 한편 저장기간에 따른 변화에서는 서서히 감소하는 경향이 관찰 되었고, 16일 저장기간 동안 pH가 완만하게 감소하여 모든 나노난각칼슘 (0.15~0.45%) 첨가군 에서 pH 4.1이상을 유지하여 품질이 계속 유지되는 것을 관찰 할 수 있었다. 따라서 나노난각칼슘을 0.15~0.45% 첨가한 호상 요구르트의 pH 저하는 대조군과 일반난각칼슘을 첨가한 호상 요구르트보다 보존효과와 영양학적 가치 및 소화율을 향상시키며, 저장 16일까지 품질의 저하가 없었음을 알 수 있었다.

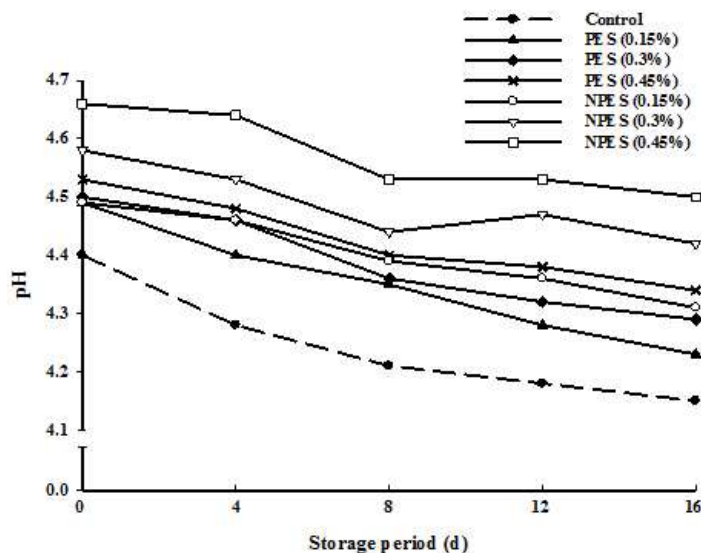


Figure 3.2.102 Change in pH of nanopowdered eggshell-supplemented yogurt stored at 4℃ for 16 days.



○ 색도 측정

나노칼슘의 농도 (0.15, 0.3, 0.45%)를 달리하여 첨가한 호상 요구르트를 4°C에서 16일간 저장 중 4일 간격 (0, 4, 8, 12, 16일) 으로 색의 변화를 관찰하기 위하여 Hunter L-, a-, b-value 를 측정된 결과는 Table 3.2.50 과 같다. 나노난각칼슘을 첨가한 호상 요구르트는 시료 첨가량에 따라 명도를 나타내는 L값의 유의적 차이는 없었고 (p>0.05), 적색도를 나타내는 a-값은 시료 첨가량이 많을수록 증가하는 경향을 나타내었으며, 황색도를 나타내는 b 값은 시료 첨가량 0.3%에서 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 또한 a 값은 나노난각칼슘을 첨가한 시료와 일반난각칼슘은 대조군과 유의적 차이를 나타내지 않았다 (p>0.05). b 값은 나노난각칼슘 분말을 첨가한 시료는 대조군과 유의적 차이를 나타내지 않았지만, 일반난각칼슘 분말을 첨가한 시료는 대조군과 유의적 차이를 나타내었으며(p<0.05), 나노난각칼슘 첨가군이 일반난각칼슘 첨가군보다 b 값이 높게 관찰되었다. 한편 저장기간에 따른 색도의 변화는 L, a, b 값에서 모두 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 본 실험의 결과 나노난각칼슘을 첨가한 호상 요구르트의 색도변화는 나노난각칼슘 0.15~0.3%을 첨가한 것이 요구르트의 색 변화에 영향을 미치지 않은 것으로 보아 나노난각칼슘 0.15~0.3%가 호상요구르트의 최적 첨가농도라고 판단된다.

Table 3.2.50 Change in color of nanopowdered egg shell-supplemented yogurt stored at 4°C for 16 days

Color	Concentration of Sample (% wt/vol)	Storage period (d)				
		0	4	8	12	16
L*	Control	87.92 <sup>b1)</sup>	87.90 <sup>b</sup>	89.09 <sup>c</sup>	90.42 <sup>a</sup>	89.41 <sup>b</sup>
	PES (0.15)	86.90 <sup>d</sup>	87.91 <sup>b</sup>	88.97 <sup>c</sup>	88.82 <sup>b</sup>	89.03 <sup>c</sup>
	PES (0.30)	88.49 <sup>a</sup>	88.83 <sup>a</sup>	89.80 <sup>a</sup>	89.07 <sup>c</sup>	89.86 <sup>a</sup>
	PES (0.45)	87.89 <sup>b</sup>	88.02 <sup>b</sup>	89.35 <sup>b</sup>	89.33 <sup>b</sup>	89.66 <sup>ab</sup>
	NPES (0.15)	88.02 <sup>b</sup>	88.71 <sup>s</sup>	89.44 <sup>b</sup>	89.05 <sup>b</sup>	89.72 <sup>a</sup>
	NPES (0.30)	87.67 <sup>c</sup>	88.03 <sup>b</sup>	88.76 <sup>d</sup>	89.92 <sup>a</sup>	89.76 <sup>a</sup>
	NPES (0.45)	87.93 <sup>b</sup>	88.76 <sup>7</sup>	89.04 <sup>c</sup>	90.36 <sup>a</sup>	89.63 <sup>ab</sup>
a*	Control	7.76 <sup>a</sup>	7.57 <sup>a</sup>	7.63 <sup>ab</sup>	7.47 <sup>a</sup>	7.72 <sup>ab</sup>
	PES (0.15)	7.20 <sup>d</sup>	7.56 <sup>a</sup>	7.68 <sup>a</sup>	7.73 <sup>b</sup>	7.66 <sup>ab</sup>
	PES (0.30)	7.50 <sup>b</sup>	7.54 <sup>ab</sup>	7.49 <sup>c</sup>	7.53 <sup>b</sup>	7.65 <sup>ab</sup>
	PES (0.45)	7.49 <sup>b</sup>	7.43 <sup>c</sup>	7.54 <sup>bc</sup>	7.58 <sup>b</sup>	7.68 <sup>ab</sup>
	NPES (0.15)	7.44 <sup>b</sup>	7.58 <sup>a</sup>	7.57 <sup>bc</sup>	7.47 <sup>b</sup>	7.73 <sup>a</sup>
	NPES (0.30)	7.31 <sup>c</sup>	7.47 <sup>bc</sup>	7.37 <sup>d</sup>	7.46 <sup>b</sup>	7.68 <sup>ab</sup>
	NPES (0.45)	7.41 <sup>b</sup>	7.62 <sup>a</sup>	7.26 <sup>e</sup>	7.44 <sup>b</sup>	7.62 <sup>b</sup>
b*	Control	10.99 <sup>a</sup>	10.29 <sup>cd</sup>	10.83 <sup>bc</sup>	10.21 <sup>b</sup>	10.80 <sup>bc</sup>
	PES (0.15)	9.64 <sup>c</sup>	10.69 <sup>bcd</sup>	11.19 <sup>a</sup>	11.68 <sup>a</sup>	10.66 <sup>c</sup>
	PES (0.30)	11.08 <sup>a</sup>	11.00 <sup>abc</sup>	11.08 <sup>ab</sup>	10.46 <sup>b</sup>	11.27 <sup>a</sup>
	PES (0.45)	10.72 <sup>ab</sup>	10.45 <sup>bcd</sup>	11.08 <sup>ab</sup>	10.39 <sup>b</sup>	11.12 <sup>ab</sup>
	NPES (0.15)	10.84 <sup>a</sup>	11.45 <sup>ab</sup>	11.34 <sup>a</sup>	10.88 <sup>b</sup>	11.42 <sup>a</sup>
	NPES (0.30)	10.41 <sup>b</sup>	9.91 <sup>d</sup>	10.53 <sup>c</sup>	10.60 <sup>b</sup>	11.49 <sup>a</sup>
	NPES (0.45)	10.72 <sup>ab</sup>	11.87 <sup>a</sup>	10.53 <sup>c</sup>	10.69 <sup>b</sup>	11.35 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean±SD. Means in a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-test.  
Control: non-supplemented yogurt  
PES: powdered eggshell supplemented yogurt  
NPES: nanopowdered eggshell supplemented yogurt

○ 점도 측정

점도는 4°C로 저장된 시료를 Brookfield-Viscometer (Model LVDV I +, Version 3.0, Stoughton, MA, USA), Spindle No. 3를 사용하여 60 rpm에서 5분에서 8분까지 1분 간격으로 측정하여 평균치로 나타내었다. 나노난각칼슘의 농도(0.15, 0.3, 0.45%)를 달리하여 첨가한 호상 요구르트를 4°C 에서 16일간 저장 중 4일 간격(0, 4, 8, 12, 16일)으로 점도 변화를 측정한 결과는 Figure 3.2.103과 같다. 나노난각칼슘을 첨가한 호상요구르트의 점도변화는 시료 첨가량이 증가할수록 높게 측정되었고, 저장기간에 따른 변화에서는 저장 0일째 나노난각칼슘을 첨가한 호상요구르트가 일반난각칼슘을 첨가한 호상요구르트보다 점도가 높은 것을 관찰 할 수 있었으며, 저장 4일째 점도의 변화는 증가하는 경향을 보았으며, 그 이후 저장 6일부터 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 본 실험에서 나노난각칼슘을 0.15, 0.3%를 첨가하였을 때 저장기간에 따라 감소되는 점도 변화가 없었음을 알 수 있었는데, 이는 요구르트에 나노난각칼슘 0.15, 0.3% 농도가 점도의 최적 함량인 것으로 판단된다.

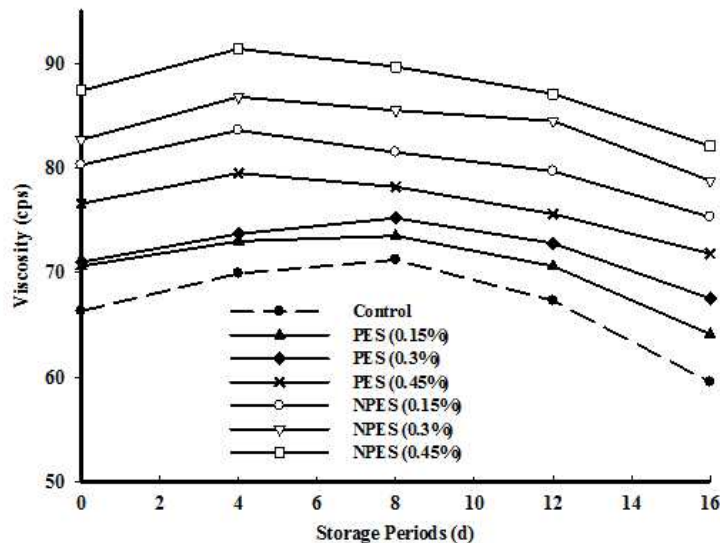


Figure 3.2.103 Change in viscosity of nanopowdered eggshell-supplemented yogurt stored at 4°C for 16 days. Control: non-samples supplemented yogurt, PES: powdered eggshell supplemented yogurt, NPES: nanopowdered eggshell supplemented yogurt

○ 유산균수의 변화 측정

시료 요구르트를 멸균 식염수에 십진희석하여 MRS agar(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 브롬페놀블루(Bromophenol blue, BPB)를 0.002% 첨가하여 37°C에서 48시간 배양하여 형성된 colony를 계측하여 CFU(colony forming unit)/mL로 나타내었다. 측정은 3회 반복 실험을 하여 평균값을 나타내었다. MRS agar는 MRS broth 5.5%, Agar 1.5~2%, BPB 0.001~0.002%를 혼합하여 제조하였으며 멸균식염수는 0.85%NaCl 농도로 사용하였다. 나노난각칼슘의 농도 (0.15, 0.3, 0.45%)를 달리하여 첨가한 호상 요구르트를 4°C 에서 16일간 저장 중 4일 간격 (0, 4, 8, 12, 16일) 으로 유산균 수를 측정한 결과는 Table 3.2.51 과 같다. 나노난각칼슘을 첨가한 호상 요구르트의 유산균 수는 나노난각칼슘의 첨가량에 따라 유산균

수가 감소하는 경향을 나타내었다. 저장 0일째 나노난각칼슘을 첨가한 요구르트의 유산균 수는  $7.30 \times 10^8$ - $6.70 \times 10^8$  CFU/mL 이었고, 일반난각칼슘을 첨가한 요구르트는  $7.46 \times 10^8$  to  $6.56 \times 10^8$  CFU/mL 이었다. 그러나 저장 4일 이후로 유산균 수가 증가하는 경향을 나타내었다 ( $p < 0.05$ ). 따라서 나노난각칼슘을 첨가한 요구르트가 일반난각칼슘을 첨가한 요구르트에 비하여 저장기간 16일 동안 저장수명을 더욱 연장시킬 것이라 사료된다.

Table 3.2.51 Change in lactic acid bacteria of nanopowdered eggshell-supplemented yogurt stored at 4°C for 16 days

Concentration of sample (% wt/vol)	Storage period (d)				
	0	4	8	12	16
Control	$8.46 \times 10^{8a}$	$8.94 \times 10^{8a}$	$9.16 \times 10^{8a}$	$1.19 \times 10^{9a}$	$1.39 \times 10^{9a}$
PES (0.15)	$7.30 \times 10^{8bc}$	$7.80 \times 10^{8b}$	$8.14 \times 10^{8b}$	$8.82 \times 10^{8b}$	$9.12 \times 10^{8b}$
PES (0.30)	$7.52 \times 10^{8b}$	$7.60 \times 10^{8c}$	$7.88 \times 10^{8c}$	$8.26 \times 10^{8bc}$	$8.70 \times 10^{8c}$
PES (0.45)	$6.70 \times 10^{8d}$	$7.08 \times 10^{8d}$	$7.38 \times 10^{8d}$	$7.72 \times 10^{8c}$	$8.20 \times 10^{8de}$
NPES (0.15)	$7.46 \times 10^{8b}$	$7.48 \times 10^{8c}$	$7.78 \times 10^{8c}$	$8.10 \times 10^{8bc}$	$8.56 \times 10^{8cd}$
NPES (0.30)	$7.20 \times 10^{8c}$	$7.54 \times 10^{8c}$	$7.82 \times 10^{8c}$	$8.00 \times 10^{8c}$	$8.20 \times 10^{8de}$
NPES (0.45)	$6.56 \times 10^{8d}$	$6.52 \times 10^{8e}$	$7.06 \times 10^{8e}$	$7.540 \times 10^{8c}$	$8.02 \times 10^{8e}$

<sup>1)</sup> Values are mean±SD. Means in a column with different superscripts are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple-test.  
 Control: non-supplemented yogurt  
 PES: powdered eggshell supplemented yogurt  
 NPES: nanopowdered eggshell supplemented yogurt

### ○ 관능검사

나노칼슘의 농도(0.15, 0.30, 0.45%)를 달리하여 첨가한 호상 요구르트를 4°C 에서 16일간 저장 중 4일 간격(0, 4, 8, 12, 16일) 으로 비교한 관능평가 결과는 Table 3.2.52 과 같다. 나노난각칼슘을 첨가한 호상요구르트는 4°C에서 저장한 것을 7점법으로 평가하였다. 나노난각칼슘을 첨가한 호상 요구르트의 whey-off는 저장기간 동안 유의적 차이는 없었고, 시료 첨가량이 증가할수록 높아지는 경향을 볼 수 있었지만 유의적인 차이를 나타내지 않았다 ( $p > 0.05$ ). Yellowness는 나노난각칼슘 첨가량에 따라 증가하였으며, 저장기간 동안 유의적 차이를 나타내지 않았다. Rancidity는 첨가량이 증가할수록 높아지며, 저장기간 동안 증가하는 것을 볼 수 있었다. Calcite는 첨가량이 증가할수록 높아지는 경향을 나타내었지만, 저장기간 동안 유의적으로 감소하는 것을 나타내었다( $p < 0.05$ ). Sourness는 첨가량이 증가하고, 저장기간이 길어짐에 따라 감소하는 경향을 나타냈으며, Astringency는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 난각칼슘에서 흔히 나타날 수 있는 Chalkiness의 경우는 나노난각칼슘을 첨가한 시료가 일반난각칼슘을 첨가한 시료 대비 감소하는 것을 볼 수 있었으나, 첨가량이 증가할수록 높아지는 경향을 나타내었다. Graininess와 firmness의 경우 첨가량과 저장기간 동안 유의적 차이를 나타내지 않았다( $p > 0.05$ ). 나노난각칼슘을 첨가한 호상 요구르트의 overall acceptability 는 나노난각칼슘 0.15~0.30%를 첨가한 요구르트에서 대조군과 비슷하게 기호도가 평가되었지만, 일반난각칼슘을 첨가한 요구르트는 대조군보다 기호도가 낮게 평가되었으며,

나노난각칼슘 첨가구가 일반난각칼슘 첨가군보다 기호도가 높은 것으로 나타났다. 한편 저장기간에 따른 overall acceptability 는 모든 군에서 감소하는 경향을 나타내었지만, 유의적 차이가 나타나지 않았다( $p>0.05$ ). 요구르트의 품질을 결정하는 중요한 요소로는 일반적으로 외관, 향미, 맛, 조직감을 들 수 있는데, 본 실험에서 평가된 바와 같이 관능 평가의 모든 항목에서 나노난각칼슘 첨가량 0.15~0.3%가 전체적인 기호도가 좋은 것으로 평가되었다.

Table 3.2.52 Sensory characteristics of nanopowdered eggshell-supplemented yogurt stored at 4°C for 16 days

Concentration of sample (% wt/vol)	Appearance		Flavor			Taste		Texture		Overall Acceptability
	Whey-off	Color	Calcite	Rancid	Sourness	Astringency	Chalky	Graininess	Firmness	
0-d storage period										
Control	4.0 <sup>a1)</sup>	4.0 <sup>ab</sup>	1.0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>b</sup>	4.0 <sup>ab</sup>	4.0 <sup>c</sup>	1.0 <sup>c</sup>	4.0 <sup>b</sup>	4.0 <sup>b</sup>	4.0 <sup>ab</sup>
PES (0.15)	4.1 <sup>a</sup>	4.1 <sup>a</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	1.1 <sup>ab</sup>	4.1 <sup>a</sup>	4.2 <sup>bc</sup>	1.1 <sup>c</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	4.2 <sup>ab</sup>	4.2 <sup>a</sup>
PES (0.30)	4.4 <sup>a</sup>	3.6 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	1.0 <sup>b</sup>	4.0 <sup>ab</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	2.0 <sup>b</sup>	4.4 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>	3.5 <sup>ab</sup>
PES (0.45)	4.5 <sup>a</sup>	3.6 <sup>ab</sup>	1.6 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	3.6 <sup>bc</sup>	4.4 <sup>ab</sup>	2.4 <sup>a</sup>	4.2 <sup>ab</sup>	4.3 <sup>a</sup>	3.3 <sup>b</sup>
NPES (0.15)	4.3 <sup>a</sup>	3.6 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>a</sup>	3.7 <sup>bc</sup>	4.2 <sup>bc</sup>	1.0 <sup>c</sup>	4.4 <sup>a</sup>	4.1 <sup>ab</sup>	3.9 <sup>ab</sup>
NPES (0.30)	4.6 <sup>a</sup>	3.5 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	3.5 <sup>c</sup>	4.2 <sup>bc</sup>	1.1 <sup>c</sup>	4.4 <sup>a</sup>	4.2 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>
NPES (0.45)	4.6 <sup>a</sup>	3.4 <sup>b</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>	3.4 <sup>c</sup>	4.5 <sup>c</sup>	1.2 <sup>c</sup>	4.5 <sup>a</sup>	4.2 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>
4-d storage period										
Control	4.0 <sup>a</sup>	4.0 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>b</sup>	4.0 <sup>a</sup>	4.0 <sup>c</sup>	1.0 <sup>c</sup>	4.0 <sup>c</sup>	4.0 <sup>d</sup>	4.0 <sup>a</sup>
PES (0.15)	4.1 <sup>a</sup>	3.9 <sup>ab</sup>	1.1 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	3.9 <sup>ab</sup>	4.2 <sup>bc</sup>	1.2 <sup>c</sup>	4.2 <sup>bc</sup>	4.2 <sup>cd</sup>	3.8 <sup>ab</sup>
PES (0.30)	4.3 <sup>a</sup>	3.7 <sup>abc</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>a</sup>	3.9 <sup>ab</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	2.1 <sup>b</sup>	4.2 <sup>bc</sup>	4.3 <sup>cd</sup>	3.6 <sup>b</sup>
PES (0.45)	4.4 <sup>a</sup>	3.6 <sup>bc</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>a</sup>	3.8 <sup>ab</sup>	4.5 <sup>ab</sup>	2.6 <sup>a</sup>	4.2 <sup>bc</sup>	4.4 <sup>bc</sup>	3.6 <sup>b</sup>
NPES (0.15)	4.4 <sup>a</sup>	3.7 <sup>abc</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	3.7 <sup>ab</sup>	4.3 <sup>abc</sup>	1.0 <sup>c</sup>	4.4 <sup>ab</sup>	4.6 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>
NPES (0.30)	4.4 <sup>a</sup>	3.5 <sup>c</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	3.7 <sup>ab</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>c</sup>	4.5 <sup>ab</sup>	4.6 <sup>ab</sup>	3.7 <sup>ab</sup>
NPES (0.45)	4.5 <sup>a</sup>	3.5 <sup>c</sup>	1.6 <sup>b</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	3.6 <sup>b</sup>	4.6 <sup>a</sup>	1.3 <sup>c</sup>	4.6 <sup>a</sup>	4.7 <sup>a</sup>	3.6 <sup>b</sup>
8-d storage period										
Control	4.0 <sup>a</sup>	4.0 <sup>ab</sup>	1.0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>b</sup>	4.0 <sup>a</sup>	4.0 <sup>c</sup>	1.0 <sup>c</sup>	4.0 <sup>b</sup>	4.0 <sup>c</sup>	4.0 <sup>a</sup>
PES (0.15%)	4.3 <sup>a</sup>	3.7 <sup>bc</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>a</sup>	3.8 <sup>ab</sup>	4.3 <sup>bc</sup>	1.3 <sup>c</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	4.3 <sup>bc</sup>	3.7 <sup>abc</sup>
PES (0.30%)	4.6 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>a</sup>	3.7 <sup>abc</sup>	4.5 <sup>ab</sup>	1.9 <sup>b</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	4.6 <sup>ab</sup>	3.6 <sup>bc</sup>
PES (0.45%)	4.4 <sup>a</sup>	3.6 <sup>cd</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>a</sup>	3.6 <sup>bcd</sup>	4.6 <sup>a</sup>	2.3 <sup>a</sup>	4.4 <sup>a</sup>	4.7 <sup>a</sup>	3.4 <sup>c</sup>
NPES (0.15%)	4.1 <sup>a</sup>	3.6 <sup>cd</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	3.6 <sup>bcd</sup>	4.2 <sup>bc</sup>	1.0 <sup>c</sup>	4.4 <sup>a</sup>	4.4 <sup>ab</sup>	3.7 <sup>abc</sup>
NPES (0.30%)	4.2 <sup>a</sup>	3.5 <sup>cd</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	3.4 <sup>cd</sup>	4.3 <sup>bc</sup>	1.3 <sup>c</sup>	4.5 <sup>a</sup>	4.5 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>
NPES (0.45%)	4.4 <sup>a</sup>	3.4 <sup>d</sup>	1.3 <sup>a</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	3.3 <sup>d</sup>	4.4 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>c</sup>	4.4 <sup>a</sup>	4.5 <sup>ab</sup>	3.6 <sup>abc</sup>
12-d storage period										
Control	4.0 <sup>a</sup>	4.0 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>b</sup>	4.2 <sup>a</sup>	3.8 <sup>d</sup>	1.0 <sup>c</sup>	3.8 <sup>a</sup>	3.8 <sup>c</sup>	4.0 <sup>a</sup>
PES (0.15)	4.1 <sup>a</sup>	3.7 <sup>abc</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>	4.2 <sup>c</sup>	1.3 <sup>c</sup>	4.1 <sup>b</sup>	4.1 <sup>b</sup>	3.6 <sup>abc</sup>
PES (0.3)	4.4 <sup>a</sup>	3.7 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	3.7 <sup>b</sup>	4.6 <sup>ab</sup>	1.7 <sup>b</sup>	4.1 <sup>b</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	3.5 <sup>bc</sup>
PES (0.45)	4.4 <sup>a</sup>	3.5 <sup>bc</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	3.6 <sup>b</sup>	4.7 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	4.1 <sup>b</sup>	4.5 <sup>a</sup>	3.3 <sup>c</sup>
NPES (0.15)	4.0 <sup>a</sup>	3.5 <sup>bc</sup>	1.3 <sup>a</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	3.5 <sup>b</sup>	4.2 <sup>bc</sup>	1.0 <sup>c</sup>	4.3 <sup>b</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>
NPES (0.3)	4.3 <sup>a</sup>	3.6 <sup>bc</sup>	1.1 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	3.4 <sup>b</sup>	4.3 <sup>abc</sup>	1.2 <sup>c</sup>	4.3 <sup>b</sup>	4.4 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>
NPES (0.45)	4.3 <sup>a</sup>	3.3 <sup>c</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	1.5 <sup>ab</sup>	3.3 <sup>b</sup>	4.5 <sup>abc</sup>	1.2 <sup>c</sup>	4.4 <sup>b</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	3.7 <sup>ab</sup>
16-d storage period										
Control	4.2 <sup>a</sup>	4.0 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>b</sup>	4.1 <sup>a</sup>	4.1 <sup>b</sup>	1.0 <sup>c</sup>	4.0 <sup>b</sup>	3.8 <sup>b</sup>	3.8 <sup>a</sup>
PES (0.15)	4.4 <sup>a</sup>	3.8 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>	4.4 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>c</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	4.1 <sup>a</sup>	3.6 <sup>ab</sup>
PES (0.3)	4.5 <sup>a</sup>	3.6 <sup>abc</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>	4.6 <sup>a</sup>	1.8 <sup>b</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	4.2 <sup>a</sup>	3.5 <sup>ab</sup>
PES (0.45)	4.6 <sup>a</sup>	3.5 <sup>bc</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	1.5 <sup>a</sup>	3.7 <sup>bc</sup>	4.7 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	4.3 <sup>a</sup>	3.4 <sup>b</sup>
NPES (0.15)	4.3 <sup>a</sup>	3.4 <sup>bc</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	3.6 <sup>bc</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	1.0 <sup>c</sup>	4.5 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>	3.8 <sup>a</sup>
NPES (0.3)	4.2 <sup>a</sup>	3.3 <sup>c</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	3.5 <sup>bc</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>c</sup>	4.5 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>	3.9 <sup>a</sup>
NPES (0.45)	4.2 <sup>a</sup>	3.2 <sup>c</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	3.4 <sup>c</sup>	4.5 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>c</sup>	4.6 <sup>a</sup>	4.4 <sup>a</sup>	3.7 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean±SD. Means in a column with different superscripts are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple-test.

Control: non-supplemented yogurt

PES: powdered eggshell supplemented yogurt

NPES: nanopowdered eggshell supplemented yogurt

아. 나노칼슘의 안정성(독성실험)

(1) Caco-2 cell에 의한 나노칼슘 독성확인(cytotoxicity analysis)

혈구계산판(Hemocytometer)를 이용하여 cell의 농도를 정한 후, MTT 염색 용액으로 염색을 한 후, 시간 별로 incubator 한 후 ELISA로 570 nm에서 측정하여 확인하여 Figure 3.2.104에 나타내었다. 4일 동안 Caco-2 cell에서 50, 100, 200 mg/mL의 농도를 정하여 일반칼슘과 나노칼슘제제의 독성평가를 하였는데, 처리하지 않은 control군과 유의적 차이를 나타내지 않았다 ( $p>0.05$ ). 또한 아연이 함유된 나노칼슘제제도 독성검사를 4일 동안 실시하였을 때, control 군과 차이를 보이지 않았다. 구래서 독성실험결과 나노칼슘에서 독성이 나타나지 않는 것으로 판단된다.

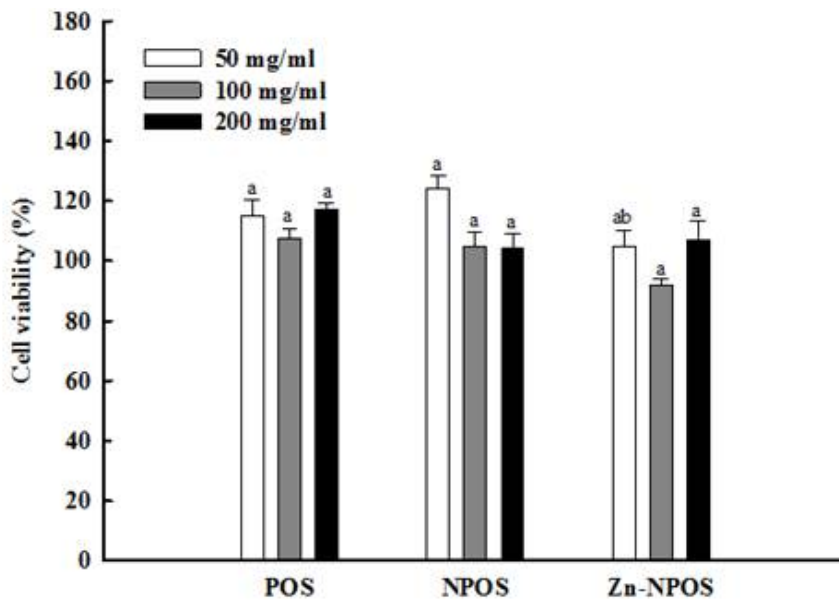


Figure 3.2.104 Change of the cell viability in caco-2 cell by MTT at 37°C in nanopowdered oyster shell during 4 day. POS: powdered oyster shell, NPOS: nanopowdered oyster shell, Zn-NPOS: Zn-activated nanopowdered oyster shell

자. 나노칼슘분말의 생체이용률

(1) 나노칼슘분말의 *In vitro* 실험

나노칼슘 분말이 인공위장과 인공소장에서 얼마나 흡수하는지 조사하여 칼슘의 함량을 정량하여 Figure 3.2.105에 나타내었다. 인공 위액에서 pH와 효소에 의한 반응 시간에 따른 땅콩나물추출물 방출량을 조사하기 위하여, 나노칼슘분말 0.3 g을 20 mL 증류수와 혼합하여, 6 M HCl으로 각각 pH 2, 4 으로 조정 한 후, 소화효소인 pepsin solution(1 g/0.1 M HCl 25 mL) 0.25 mL을 넣고, 이 용액을 체내에서의 조건과 유사한 환경에서 반응시키는 체온과 연동운동의 효과를 주기위해 shaking water bath에서 37°C, 75 rpm으로 shaking 하면서 반응시간대별로 인공 위액상 흡수되는 칼슘의 양을 ICP-OES(OPTIMA 7300 DV, Perkinelmer INC, Waltham, MA, USA)로 정량하였다. 소장에서의와 유사한 환경을 조성하기 위해, 5 N NaOH로 각각 pH 6과 8로

조정한 후, pancreatin(0.04 g)와 deoxycholic acid (bile salt, 0.25 g)을 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 10 mL에 녹인 용액을 0.3 g을 첨가하였다. 37°C 에서 100 rpm 속도로 shaking 하면서 반응시간 별로 흡수된 칼슘의 양을 ICP-OES(OPTIMA 7300 DV, Perkinelmer INC, Walthama, MA, USA)로 정량하였다.

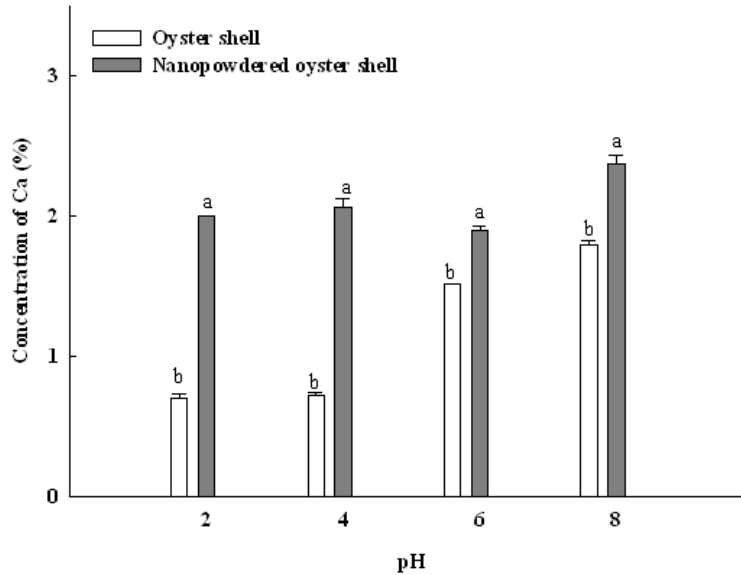


Figure 3.2.105 Solubility of nanopowdered calcium.

인공위장인 pH 2, 4에서 나노칼슘 분말에서 칼슘의 2%를 흡수하였으며, 일반칼슘의 분말은 0.7%정도의 칼슘만 흡수를 하였다. 인공소장인 pH 6과 8에서도 인공위장과 마찬가지로 나노칼슘분말이 2%이상을 흡수하고 일반칼슘분말의 2배 이상 칼슘의 함량이 흡수되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 나노칼슘의 분말이 일반칼슘 분말에 비해 흡수량이 높은 결과를 나타내었다

#### (2) 나노칼슘분말의 생체이용율(*In-vivo*)

나노칼슘분말이 실험용 쥐에서 생체이용율을 조사하여 칼슘과 인의 함량을 측정하였다. SD rat male 을 1일 정도 굶겨서 공복상태로 만들었다. Krebs-Henseleit Bicarbonate(KHB) buffer를 준비하여 냉장고에 보관하였다. KHB buffer 성분은 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 26.3 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Glucose 이다. 열기직전의 상태의 KHB buffer를 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub> 로 포화시켜 준비하였다. SD rat을 ether 마취시킨 후 회복하여 장을 적출한 후, 바로 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub> 로 포화시킨 ice-cold 상태의 KHB buffer에 넣어두었다. 주사기를 이용하여 KHB buffer로 장을 세척하였다. 위 바로 밑으로부터 10 cm 되는 지점을 실로 묶고, 묶은 지점으로부터 위쪽으로 1 cm되는 부분과 아래쪽으로 12 cm 되는 지점을 잘라냈다. 장을 뒤집어 준 후, 뒤집은 장에 KHB buffer(1 mL)을 넣었다. 처음 묶는 부분으로부터 밑으로 10 cm 되는 지점을 실로 묶었다. 50 mL conical tube 에 0.1% 시료를 넣고 KHB buffer로 30 mL을 맞춘 후 소화효소와 유사하게 37°C 에서 shaking시켜주면서 CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub> 로 포화시켰다. 이를 KHB buffer에 everted sac을 넣어주고 80~100 rpm 속도로 shaking 하고, 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>를 지속적으로 주입하면서 반응 시간별로 꺼내어서 칼슘함량을 ICP-OES(OPTIMA 7300 DV, Perkinelmer INC, Walthama, MA, USA)으로 정량하였다.

나노칼슘분말의 생체이용율은 반응시간 10분에서 250 mg/L를 60분 후에는 800 mg/L으로 흡수량이 증가하는 것을 보였으며, 일반칼슘분말의 생체이용율은 반응시간 10분에서 150 mg/L를 60분 후에는 600 mg/L으로 증가하지만, 나노칼슘 분말의 생체이용율에 비하여 칼슘의 흡수량이 떨어지는 경향을 보였다

(Figure 3.2.106). 따라서 일반칼슘분말을 이용하여 생체에 섭취하는 것보다 나노칼슘분말을 섭취하는 것이 생체의 흡수율을 증가시키므로 일반분말에 비해 나노분말을 이용하는 것이 효과적이라고 사료된다.

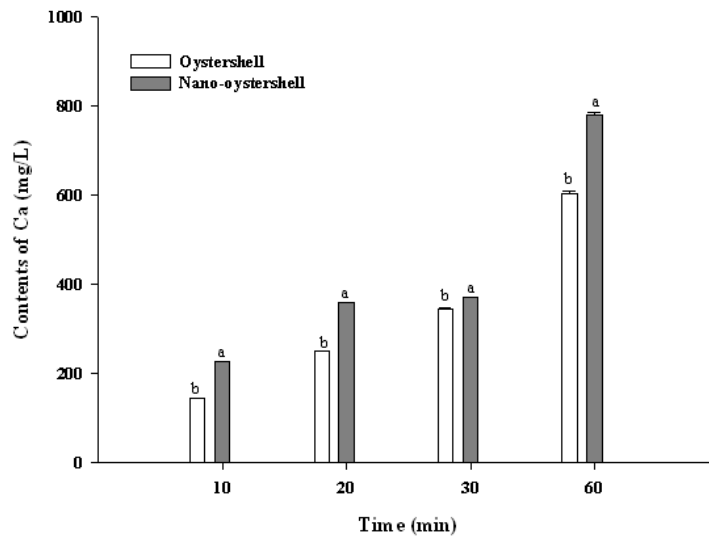


Figure 3.2.106 Bioavailability of nanopowdered calcium.

## 2. 제 1 협동과제 : 고도 불포화 생리활성 지질류의 가용성 미세캡슐화 기술개발

### 가. 참치 안구의 지방산 추출 및 함유 분석

#### (1) 원료 건조 및 분쇄

제공 받은 원료는 (주)사조로부터 제공 받았으며, 응집되어 있고 점도가 높으며 분쇄가 충분히 이루어지지 않은 상태였으므로 동결건조를 실시하고, 이후 분쇄기를 이용하여 시료를 분쇄 하였다.

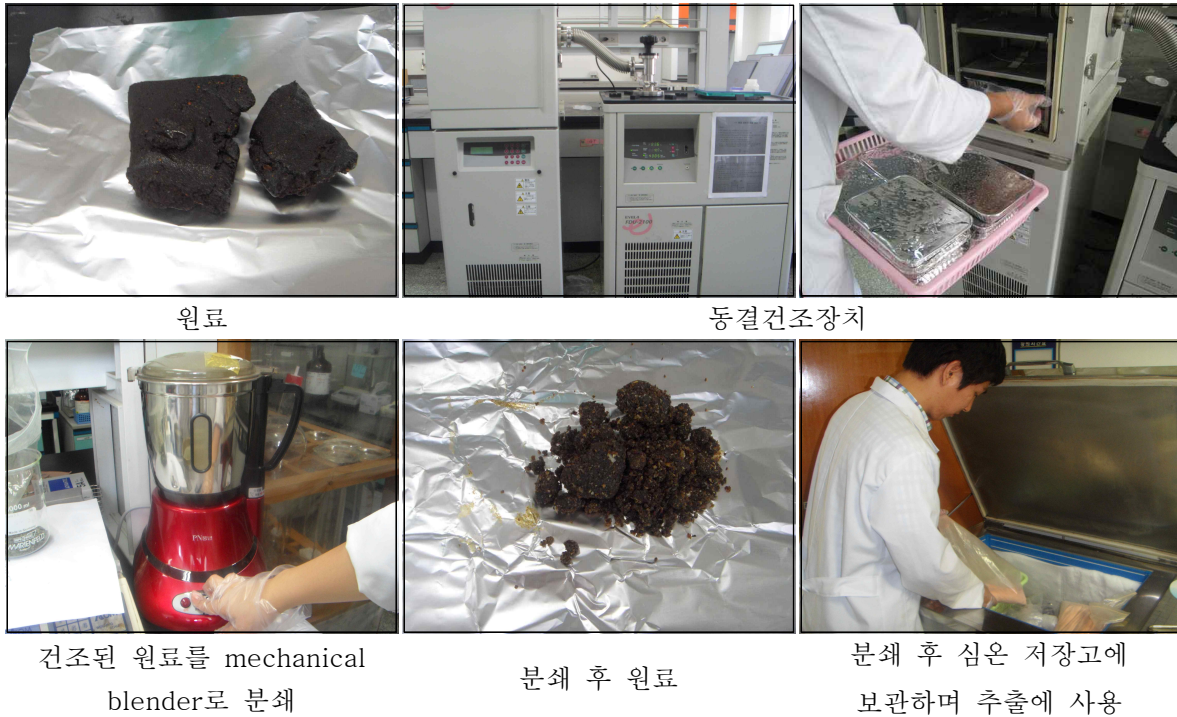


Figure 3.2.107 Freeze-drying and raw-material pulverizing.

#### (2) 초임계 이산화탄소 추출 및 지방산 분석

##### ○ 초임계 이산화탄소 추출

준비된 참치 안구 시료 40 g을 정확히 채취하여 반응기에 주입하고 10분마다 추출된 오일을 측정하였다. 초임계 이산화탄소 추출 시 사용된 이산화탄소 유량은 건식유량계를 통하여 측정하였다. 추출 온도 조건은 40, 45, 50°C 이었으며 추출 압력조건은 150, 200, 250, 300 bar로 하여 아래의 표와 같이 추출 실험을 진행 하였으며 진행되는 중 온도변화와 압력변화를 체크 하며 조절 하였다.

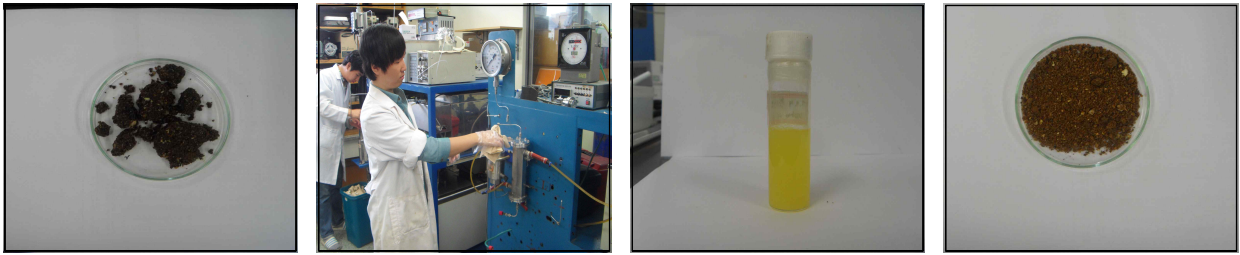
Table 3.2.53 Extraction conditions of tuna eye oil

추출온도 (°C)	40	45	50
추출압력 (Bar)	150	200	200
	250	250	250
			300



○ 지방산 조성 분석

지방산 분석은 시료를 Methylation하여 GC-FID로 Agilent 6890N 장치를 사용하여 분석하였다.



건조 후 분쇄한 원료    초임계 이산화탄소 추출    초임계 추출 오일    추출 후 참치안구 파우더

Figure 3.2.108 Tuna eye oil and raffinate from supercritical carbon dioxide extraction.

(3) 참치 안구 오일 추출 결과

다양한 조건에서 추출한 결과를 추출 유량은 25 g/min로 일정하고, 온도에 따른 압력의 변화로 분류하여 아래에 나타내었다.

○ 40°C 에서 추출결과 및 그래프 (시료 무게: 40 g, 압력: 150, 250 bar)

Table 3.2.54 Amount of oil extracted in time at 40°C and various pressure conditions

시간(min)	추출량(g)	
	40°C 150 bar	40°C 250 bar
0	0	0
10	0.18	1.28
20	0.32	2.52
30	0.52	3.73
40	0.67	5.02
50	0.83	6.10
60	1.00	7.08
70	1.20	7.90
80	1.40	8.69
90	1.57	9.32

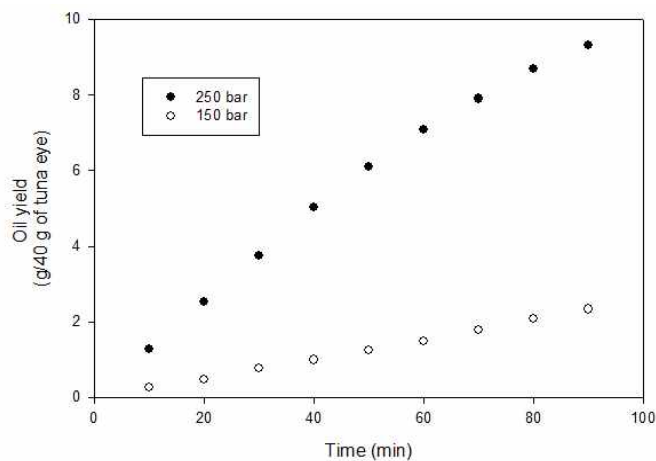


Figure 3.2.109 Yield of tuna eye oil according to supercritical carbon dioxide extraction conditions (40°C, 25 gCO<sub>2</sub>/min).

○ 45°C 에서 추출결과 및 그래프 (시료 무게: 40 g, 압력: 150, 250 bar)

Table 3.2.55 Amount of tuna eye oil extracted in time at 45°C and various pressure conditions

시간(min)	추출량(g)	
	45°C 200 bar	45°C 250 bar
0	0	0
10	1.28	1.28
20	2.52	2.52
30	3.73	3.73
40	5.02	5.02
50	6.10	6.10
60	7.08	7.08
70	7.90	7.90
80	8.69	8.69
90	9.32	9.32

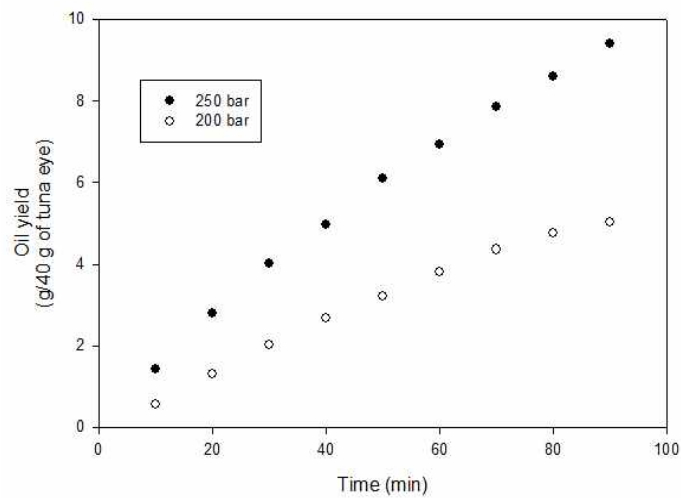


Figure 3.2.110 Yield of tuna eye oil according to supercritical carbon dioxide extraction conditions (45°C, 25 gCO<sub>2</sub>/min).

○ 50°C 에서 추출결과 및 그래프 (시료 무게: 40 g, 압력: 200, 250, 300 bar)

Table 3.2.56 Amount of tuna eye oil extracted in time at 50°C and various pressure conditions

시간(min)	추출량(g)		
	50°C 200 bar	50°C 250 bar	50°C 300 bar
0	0	0	0
10	0.58	0.84	1.73
20	1.22	2.30	3.71
30	1.89	3.43	5.51
40	2.54	4.60	7.00
50	3.02	5.69	8.29
60	3.42	6.71	9.34
70	3.82	7.73	10.12
80	4.16	8.64	11.08
90	4.51	9.46	11.75

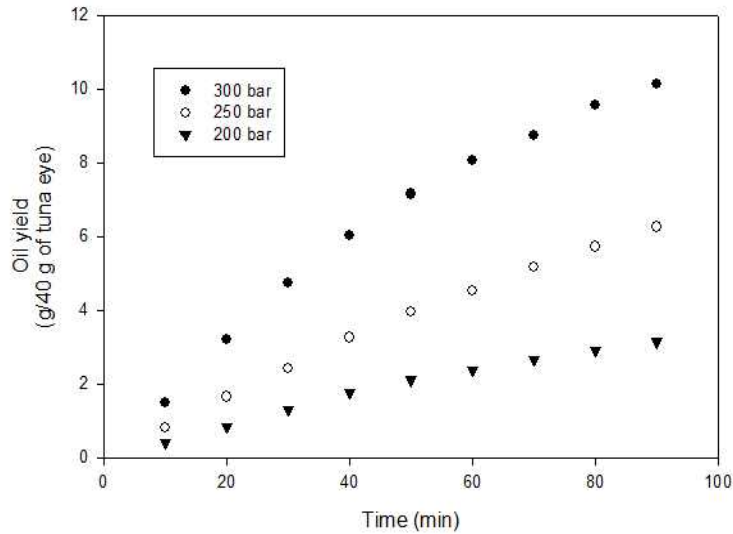


Figure 3.2.111 Yield of tuna eye oil according to supercritical carbon dioxide extraction conditions (50°C, 25 gCO<sub>2</sub>/min).

○ 온도와 압력의 증가에 따른 참치안구 오일의 용해도

Table 3.2.57 Solubility of tuna eye oil extracted at various extraction conditions

	압력(bar)	용해도(goil/gco <sub>2</sub> )
40	150	0.280
	250	2.954
45	200	1.763
	250	2.476
50	200	2.047
	250	3.235
	300	4.511

(4) 각 조건별 초임계 추출 Oil의 지방산 조성 분석

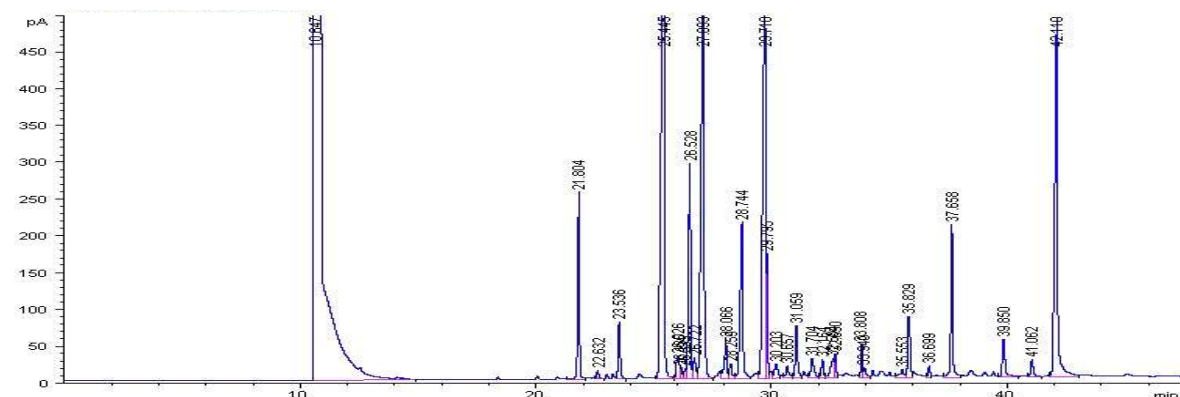


Figure 3.2.112 GC-FID chromatogram of tuna eye oil extracted at 50°C and 300 bar.

Table 3.2.58 Fatty acid compositions of tuna eye oil under the various extraction conditions

R.T	Fatty acids composition		초임계 이산화탄소 추출 조건							Soxhlet extract by hexane
			150 bar 40℃	200 bar 45℃	200 bar 50℃	250 bar 40℃	250 bar 45℃	250 bar 50℃	300 bar 50℃	
21.79	Myristic Acid	C14:0	5.78	5.69	4.89	5.83	5.09	5.59	5.30	6.73
23.52	Myristoleic Acid	C14:1	1.94	2.03	1.94	2.48	2.01	2.10	1.92	2.48
25.40	Palmitic Acid	C16:0	28.92	27.10	28.05	32.97	29.10	29.26	30.38	39.76
26.53	Palmitoleic Acid	C16:1	8.80	8.16	8.23	8.57	7.74	7.74	7.65	9.49
28.63	Stearic Acid	C18:0	5.91	6.07	6.50	7.86	6.61	6.83	7.06	9.49
29.61	Oleic Acid	C18:1n9 <sub>c</sub>	19.31	19.19	19.77	23.20	20.13	17.54	17.87	19.57
30.13	Linolelaidic Acid	C18:2n6 <sub>t</sub>	0.65	0.70	0.74	1.01	0.79	0.95	0.81	1.43
31.02	Linoleic Acid	C18:2n6 <sub>c</sub>	1.92	1.92	1.92	2.44	1.98	2.00	1.95	2.19
31.67	r-Linolenic Acid	C18:3n6	1.03	1.00	1.06	1.43	1.09	1.27	1.04	2.15
32.15	Arachidic Acid	C20:0	0.66	0.88	0.81	1.09	0.89	0.98	0.70	1.22
32.53	Linolenic Acid	C18:3n3	0.70	0.37	0.78	1.04	0.87	0.92	0.90	1.64
32.68	Eicosadienoic Acid	C20:2	1.11	1.11	1.09	1.45	0.89	0.89	0.75	0.64
33.81	Eicosatrienoic Acid	C20:3n3	1.39	1.37	1.36	0.68	0.49	0.52	0.42	0.00
31.67	Arachidonic Acid	C20:4n6	0.00	0.37	0.00	0.59	0.00	0.00	0.00	0.00
35.81	Erucic Acid	C22:1n9	2.29	2.16	2.15	2.90	2.31	1.97	1.82	0.00
32.13	Docosadienoic Acid	C22:2	0.45	1.04	0.50	0.81	0.57	0.49	0.38	0.00
37.64	EPA	C20:5n3	4.29	4.57	4.07	5.64	4.47	4.71	4.56	2.16
42.07	DHA	C22:6n3	14.86	16.26	16.13	20.36	14.98	16.23	16.51	1.08
			100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

동결 건조 처리된 참치안구 파우더로부터 지질을 분리하기 위해 초임계 이산화탄소와 헥산을 이용하였고, 추출된 지질의 지방산 조성을 분석 비교하였다. 초임계 이산화탄소 추출에서는 온도와 압력을 변화시켜 일정한 유량과 균일한 입자 크기에서 추출 효율성을 비교하였고, 각 조건에서 초임계 이산화탄소에 대한 지질 용해도를 측정하였다.

온도와 압력 변화에 따라 초임계 이산화탄소의 밀도, 점도, 확산속도 등의 이동 특성 인자가 변함과 추출 조건에 따라 용해도가 달라지므로 이산화탄소의 밀도가 증가하는 조건에서 높은 추출율을 나타냈다. 그러나 임계점 부근에서의 온도에서 압력이 매우 높은 조건에서는 높은 밀도를 유지하는 반면, 점도가 크고 확산 속도가 낮아 추출수율의 한계성에 도달 할 수 있으므로 임계점 부근의 온도보다 높은 영역에서 비교적 높은 압력 조건에서는 추출 속도가 증가한다는 보고가 있었다.

초임계 이산화탄소와 속슬렛을 이용한 노르말 헥산추출 오일의 지방산 조성은 EPA와 DHA의 함량에서 매우 다른 경향을 나타냈으며, Palmitic acid, Oleic acid의 함량이 가장 높았고, 초임계 이산화탄소 추출 오일에는 EPA와 DHA의 함량이 14%에서 20%까지 함유되어 있는 것으로

나타났다.

위의 결과로 초임계 이산화탄소의 이용이 어류 부산물로부터 고도불포화 지방산 함유 지질의 추출에는 용매추출법 보다 효과적임이 증명되었으나, 기존 시판중인 고도불포화 지방산 함유 지질에 비하여 고도불포화 지방산 함량(DHA+EPA)이 Fractionation 이전임을 감안하더라도 그 함량이 떨어지는 상태(Global하게 유통되는 oil의 경우 30%이상임)임을 확인하였다.

본 실험의 결과를 바탕으로 냉동건조 설비 및 초임계 추출에 소요되는 생산설비 금액을 유추해보면, 고도불포화 지방산 함유 지질 60 kg의 생산에 3일의 생산 작업 시간이 소요되며, 투자경비는 약 28억 원 이상으로 산출되었다. (냉동건조 설비 500 L급 기준 약 5억 원, 초임계 추출설비 200 L급 기준 23억 원)이 산출 되었다.

결과적으로, 초임계 유체를 이용한 고도불포화 지방산 함유 지질의 생산은 낮은 함량과 높은 설비투자비로 인하여, 기존에 시판되고 있는 고도불포화 지질에 비하여 경쟁력을 갖기 힘든, 현실적인 이용이 제한되는 기술이라 판단되었다. 이에 차후의 연구는 전 세계에서 현재 유통되고 있는 대표적인 고도불포화 함유 지질을 Global sourcing하여 산화안정성 증대 및 보존을 증진을 위한 제형 연구를 진행하였다.

#### 나. 고도불포화 지방산 함유 생리활성지질의 조성 분석

##### (1) 국내외 고도불포화 지방산 함유 생리활성지질류의 지방산 조성 분석

본 실험에서는 총 7개의 Global sourcing된 생리활성 지질의 지방산 조성 분석을 위하여 BF3에 의한 유리 지방산의 methyl ester화를 진행하였다. 생리활성 지질을 0.5 N NaOH를 사용하여 지방산을 유리시킨 후 유리지방산의 carboxyl기에 Methyl기를 도입시키기 위하여 methanol에 BF3를 용해한 것을 지방산에 가하고 가열하여 ester화 한 후, 생성된 지방산 ester를 iso-octane을 가하여 전용시켰다. 이렇게 전처리된 지질류의 지방산 ester를 Gas chromatography 장치(Agilent社 7890A, Supelcowax column(30 M×0.25 mm))를 사용하여 탄소수와 이중결합수에 따른 RT값 변화 원리를 활용하여 지방산 조성 분석하였다.

Table 3.2.59 Fatty acid composition of global sourced bioactive lipids

Fatty acid	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid	ARA	EPA	DHA	EPA + DHA	Total w-3
1. 스웨덴산	19.45	5.10	17.69	1.83	0.62	1.98	7.76	22.31	30.07	30.69
2. 영국산	1.31	3.64	8.39	0.75	0.00	2.69	10.31	59.82	70.13	70.13
3. 일본산	19.52	5.28	21.94	1.25	0.51	1.95	6.66	23.20	29.87	30.37
4. 호주산	23.27	6.23	17.26	1.15	0.33	1.84	4.76	25.46	30.22	30.55
5. 캐나다산	23.29	5.94	17.26	1.58	0.55	1.95	6.49	22.29	28.79	29.34
6. 국내산 (어유)	23.03	5.04	15.52	1.38	0.42	1.65	4.97	26.05	31.02	31.44
7. 국내산 (Algae)	19.83	0.88	1.23	0.50	0.00	1.01	2.04	47.72	49.76	49.76

지방산 조성 분석결과 총 오메가-3 지방산 함량은 30%~70%까지 다양하게 분석되었으며, 대표적으로 원가경쟁력을 가지는 국내산 어유 및 일본산 어유의 경우 30% 내외의 오메가-3 지방산 함량을 가지는 것으로 나타났다.

(2) 생리활성 지질의 산화안정성 확보를 위한 항산화제 개발

본 실험에서는 생리활성 지질의 산화안정성 향상을 위하여 토코페롤 외 3종의 항산화제를 선정하여 단일 혹은 조합된 상태에서 500~5,000 ppm의 범위에서 항산화활성을 측정하였고, 산화안정도의 측정방법으로는 Rancimat 743 기기를 활용한 가온산화 test와 30℃ 호기적 조건에서의 시간별(0~48시간) POV(Peroxide value)를 측정하였다.

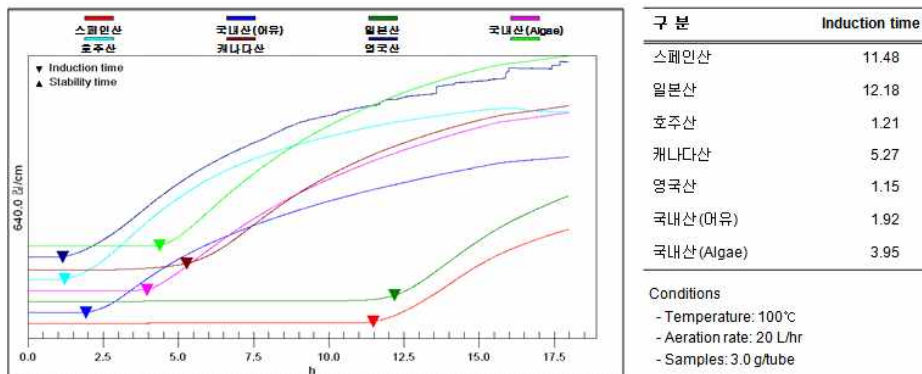


Figure 3.2.113 Stability test of bioactive lipids by accelerated oxygen method.

Rancimat 743 기기를 활용한 가온산화실험 결과 산화안정도는 일본산 oil이 가장 우수하였으며, 그 뒤로 스페인산, 캐나다산, 국내산(Algae), 국내산(어유), 호주산의 순서로 점차적으로 산화안정도가 떨어지는 것으로 나타났다. 그 중 가장 산화안정도가 우수한 일본산 oil의 경우 12시간 18분의 induction time을 가지는 것으로 나타나 국내산(어유)보다 약 6배 이상 가온산화 조건하의 안정도가 높은 것으로 나타났다. 이에 생리활성지질류의 가용화제형 제조 전 내심부의 산화안정도 증진을 위하여 항산화제 포물러를 개발하여 기존의 국내산(어유)에 혼합 후 가온산화 test 및 30℃ 호기적 교반 조건 하에서의 산화안정도를 측정하였다. 두산 독자 항산화제 포물러는 지용성 항산화제인 토코페롤 외 3종의 항산화제 조합으로써 각기 500~5,000 ppm의 범위 내에서 선정되어 test 되었으며, 그 종류 및 사용량은 기업 know-how로써 공개하지 않는다.

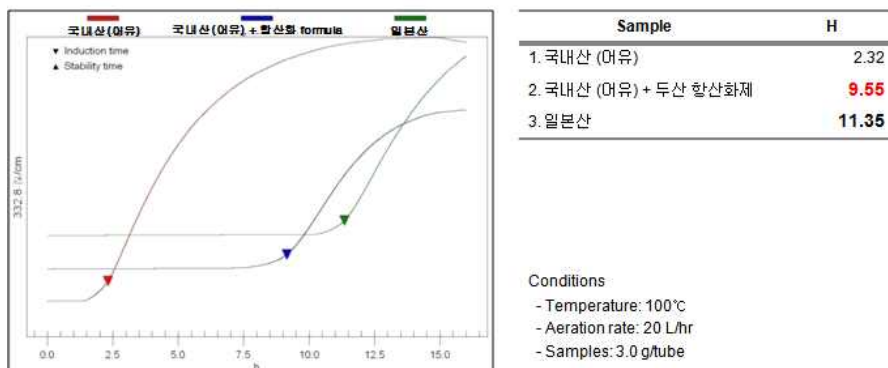


Figure 3.2.114 Comparative stability test of bioactive lipids by AOM test (before and after adding antioxidants).

항산화제 사용 후 원가경쟁력을 가지는 국내산 어유의 산화안정도는 가속산화 실험결과 사용 전에 비하여 약 4배 이상 안정화되어 일본산 어유 대비 약 85% 이상의 안정도를 확보하게 되었다.

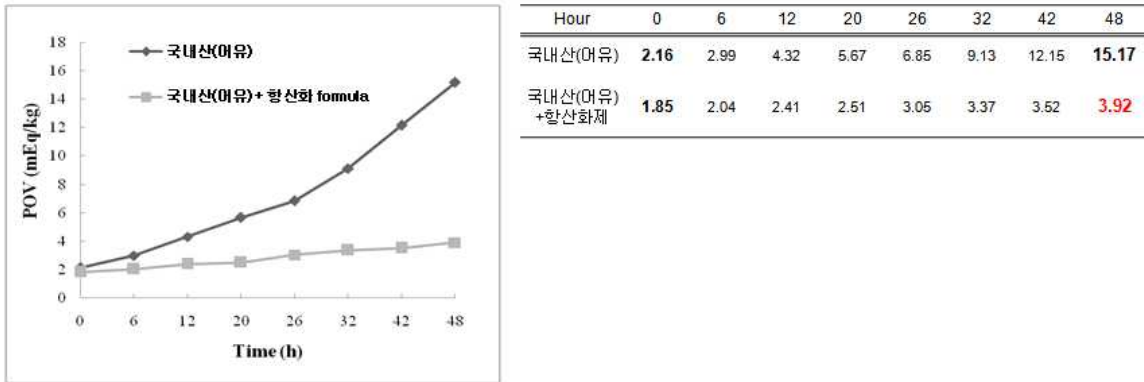


Figure 3.2.115 Comparative POV values of bioactive lipids (before/after antioxidants added) under 30°C, aerobic condition.

또한 이러한 항산화제 투입에 따른 산화안정도 증가 추이는 가속산화실험 뿐만 아니라 30°C 호기적 교반 조건 하의 POV 증가도 곡선에서도 항산화제 투입 전보다 약 3.8배 이상(48시간 기준) 안정한 것으로 나타났다. 이러한 연구결과를 바탕으로 하여 우수한 산화안정도가 확보된 국내산 어유+두산 항산화제(DA)와 일본산 어유(NS)가 미세캡슐화 기술을 이용한 가용화 제형 연구의 시료로 사용되었다.

다. Fish oil 나노에멀전의 최적화 조건설정

(1) 1차 나노에멀전 최적 조건 설정

○ Fish oil의 녹는점

본 실험에서 사용된 fish oil의 녹는점을 확인하기 위해 DSC를 측정한 결과, DA의 녹는점은 32, NS의 녹는점은 33°C임을 확인할 수 있었다(Figure 3.2.116). 이에 따라 1차 에멀전의 제조는 오일, 유화제 및 증류수를 40°C로 설정한 후 실험을 시작하였다.

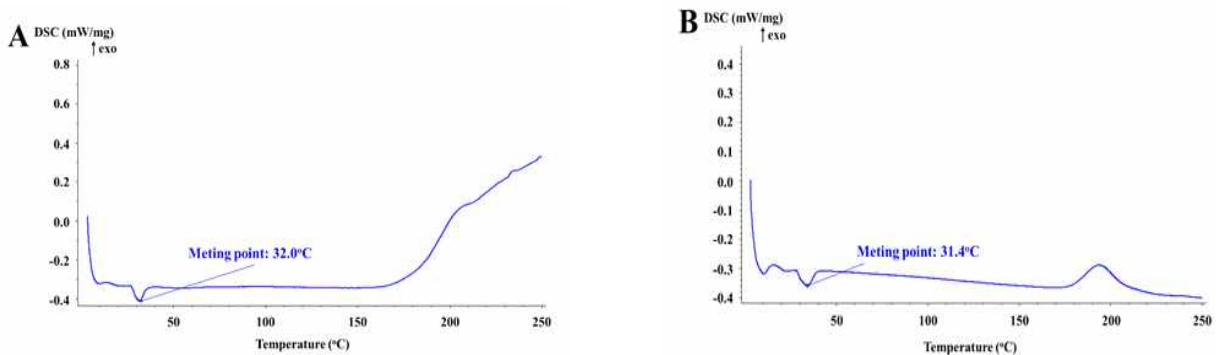


Figure 3.2.116 DSC analysis of fish oil for confirm melting point.

○ 1차 나노에멀전의 입자특성 분석

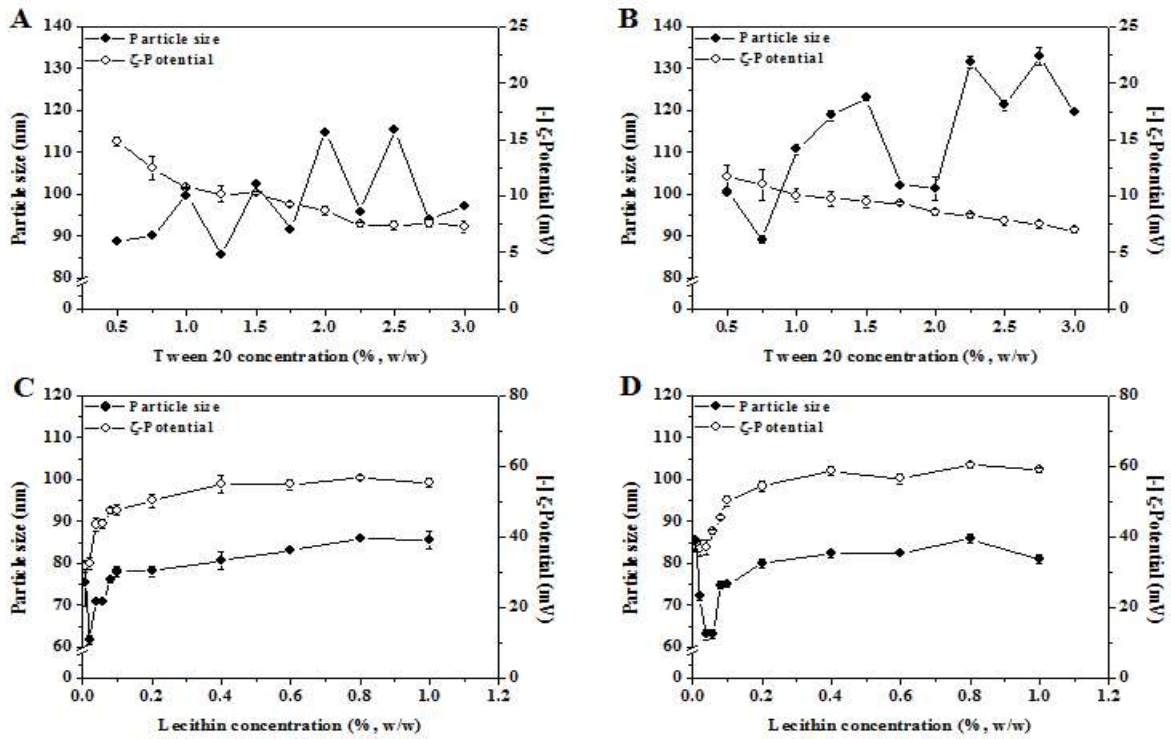


Figure. 3.2.117 Physical properties of FO nanoemulsion as primary emulsion with Tween 20 and Lecithin; (A, B) DA and (C, D) NS.

Tween20과 lecithin으로 제조된 fish oil nanoemulsion의 입자 특성 및 제타전위를 측정함으로써 최적의 유화제 농도를 선정하였다. Tween 20으로 제조된 나노에멀전의 경우 lecithin으로 제조된 나노에멀전 보다 상대적으로 제타전위값이 낮게 측정되었으므로 fish oil 나노에멀전의 1차 막으로는 lecithin이 선정되었다. 제타전위는 에멀전의 안정성을 평가하는 척도로써 사용되며, 이를 측정함으로써 오일을 감싸고 있는 유화제의 CMC를 결정지을 수 있다. 본 실험의 제타전위 측정결과, DA fish oil 에멀전의 경우, 최적의 농도는 0.1 wt% lecithin이며, NS fish oil 에멀전의 경우의 최적 CMC는 DA와 동일하게 0.1 wt% lecithin으로 나타났다. 이 때 입자크기는 75 nm(DA), 78 nm(NS)로 측정되었다. 입자분포도 측정결과, 모든 샘플에서 0.4 미만의 pdl value를 나타내었기 때문에 narrow shape의 입자 분포도를 보였다(not shown). 또한 1차 에멀전 즉, fish oil 나노에멀전의 코팅효율 측정결과를 살펴보면, 모든 샘플에서 95% 이상의 높은 코팅효율을 나타내었음을 알 수 있었다.



○ 1차 나노에멀전의 입자코팅효율

Table 3.2.60 Encapsulation efficiency (EE%) of fish oil nanoemulsion stabilized by Tween 20 and lecithin

Tween 20 (wt%)	DA	NS	Lecithin (wt%)	DA	NS
0.5	97.80±0.028	97.52±0.026	0.01	98.21±0.004	98.52±0.010
0.75	97.13±0.446	96.69±0.404	0.02	98.72±0.294	98.42±0.018
1.0	97.53±0.044	95.86±0.100	0.04	98.59±0.006	98.62±0.004
1.25	97.32±0.221	95.68±0.111	0.06	98.57±0.004	98.66±0.016
1.5	97.51±0.062	95.85±0.542	0.08	98.54±0.024	98.59±0.044
1.75	96.91±0.383	93.96±0.720	0.1	98.49±0.012	98.64±0.027
2.0	97.66±0.044	95.38±0.684	0.2	98.48±0.021	98.71±0.028
2.25	97.49±0.023	95.87±0.050	0.4	98.45±0.006	98.56±0.002
2.5	97.17±0.121	95.26±0.051	0.6	98.50±0.010	98.38±0.123
2.75	97.05±0.308	95.46±0.003	0.8	98.66±0.002	98.54±0.034
3.0	97.32±0.319	95.65±0.086	1.0	98.39±0.027	98.52±0.002

(2) Lecithin-chitosan으로 제조된 2차에멀전의 최적화 조건설정

○ 2차 에멀전의 입자특성 분석

Figure 3.2.118은 lecithin으로 제조된 1차 에멀전과 키토산용액을 각 1:1, 1:2로 섞은 후 입자크기 및 제타전위를 측정된 결과이다. 2차 에멀전에 사용된 키토산용액의 농도를 달리하여 측정된 결과, 최적의 키토산 농도는 0.01 wt%(1:2의 mixing 비율)로써 DA oil과 NS oil에서 동일하게 나타났다. 이때의 제타전위값은 DA 50.2 mV와 NS 51.0 mV로 각 각 측정되었다. 특히, mixing 비율 1:1의 샘플에서 0.02 wt%보다 낮은 농도의 경우 입자와 코팅막 사이에서 aggregation이 발생하는 현상이 나타났으며 입자크기 또한 상대적으로 매우 높게 측정되었다. 코팅효율 측정 결과를 살펴보면, 1차 에멀전의 코팅효율보다 상대적으로 낮게 측정되었다. DA oil의 경우에는 88%, NS oil의 경우에는 81%의 측정값을 보였다(Figure3.2.118).

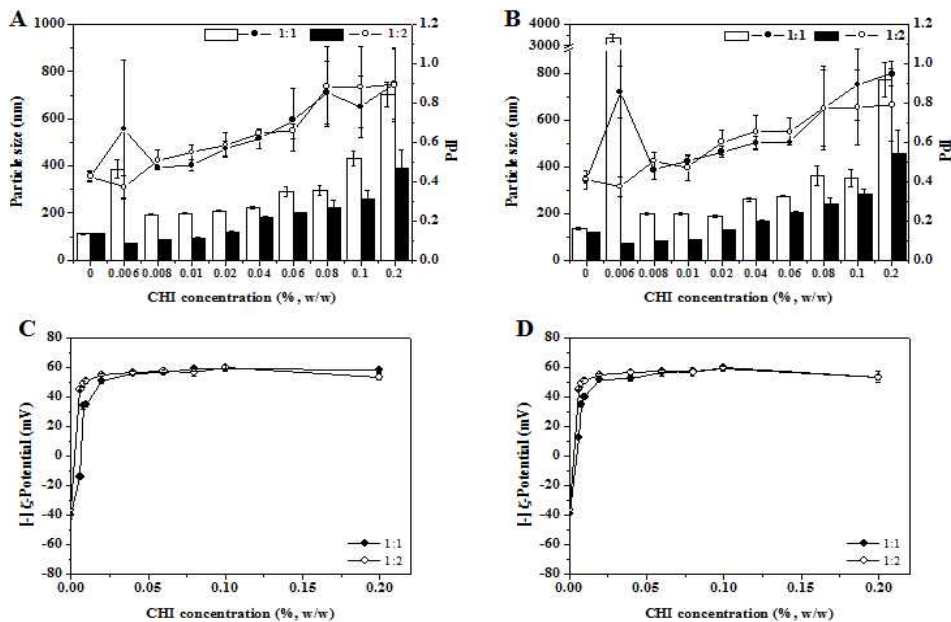


Figure. 3.2.118 Physical properties of secondary emulsion stabilized CHI; (A, C) DA and (B, D) NS.

○ 2차 에멀전의 입자코팅효율

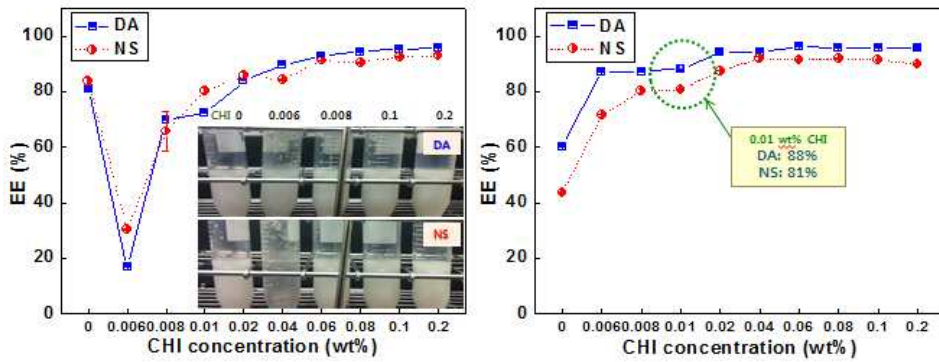


Figure. 3.2.119 Encapsulation efficiency (EE%) of secondary layered emulsion at mixing ratio of 1:1 (A) and 1:2 (B).

(3) Lecithin-chitosan-pectin으로 제조된 3차 에멀전의 최적화 조건설정

○ 3차 에멀전의 입자특성 분석

다음은 lecithin-chitosan으로 제조된 2차 에멀전과 키토산용액을 각 1:1, 1:2로 섞은 후 입자크기 및 제타전위를 측정 한 결과이다(Figure.3.2.120). 오일 입자의 3차 layer로 사용된 펙틴용액의 농도를 달리 제조하여 입자크기 및 제타전위를 측정 한 결과, DA oil의 최적화 농도는 0.2 wt%(1:1의 mixing 비율)이며, NS oil의 최적화농도는 0.15 wt%(1:1 mixing 비율)로 나타났다. 이때의 입자크기는 1,2차 에멀전과 달리 700 nm이상의 매우 높은 입자크기를 보였다. 코팅효율 측정결과를 살펴보면, DA oil의 경우 72%, NS oil의 경우 71%로써 코팅막을 입힐수록 코팅효율을 낮아지는 경향을 보였다(Figure 3.2.120).

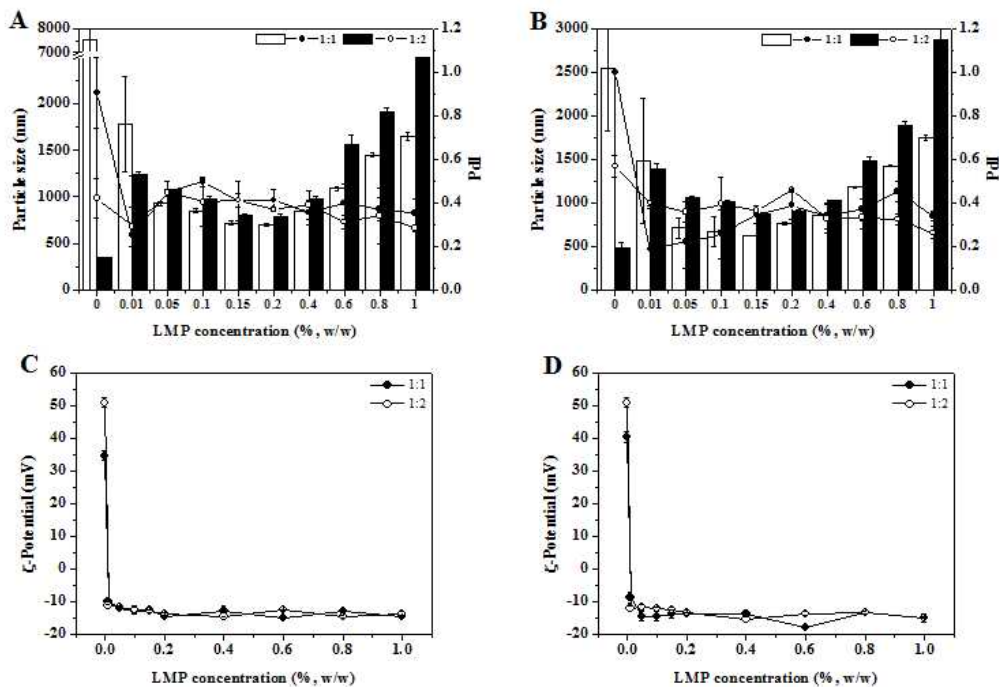


Figure 3.2.120 Physical properties of tertiary emulsion stabilized LMP; (A, C) DA and (B,D) NS.

○ 3차 에멀전의 입자코팅 효율

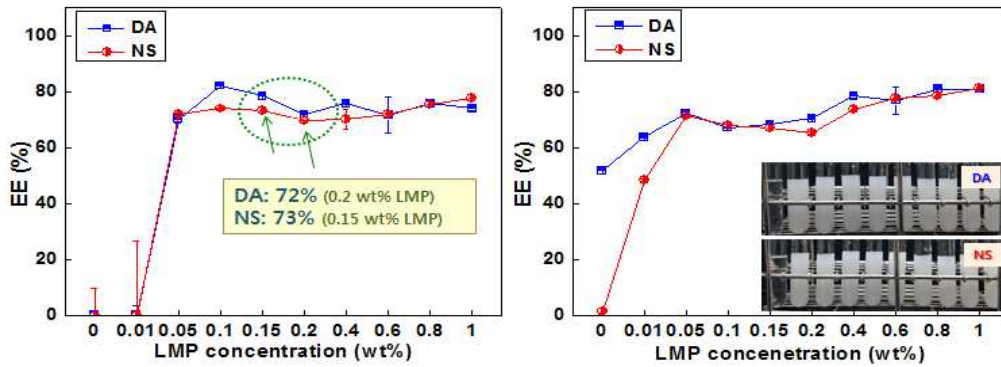


Figure 3.2.121 Encapsulation efficiency (EE%) of tertiary layered emulsion at mixing ratio of 1:1 (A) and 1:2 (B).

(4) 산화안정성 평가: TBA value 측정실험

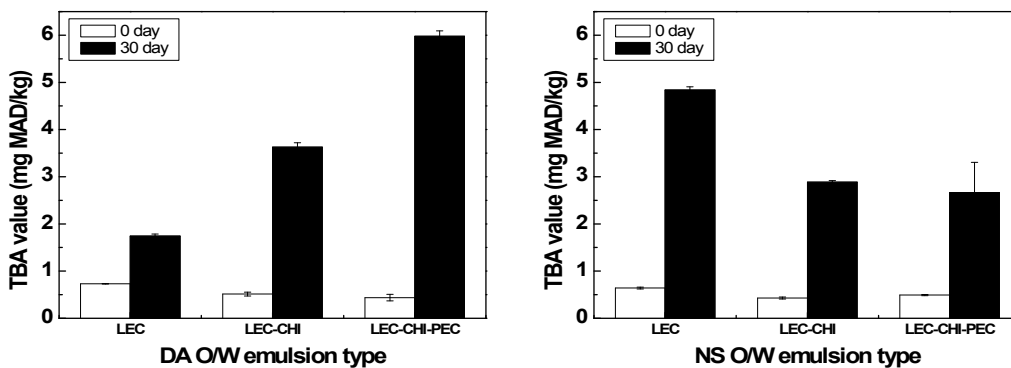


Figure 3.2.122 TBA value of multi-layered DA (A) and (B) emulsion for 30 day.

제조된 1차, 2차, 3차 에멀전을 30일 기간 동안 저장 보관 후에 TBA value를 측정하였다. 이 수치는 지방산화과정에서 지방산화 중반정도에 발생하는 산화생성물(Malonaldehyde)의 양으로 정의되고 있으며, 그 값이 높을수록 산화가 더 발생됨을 의미한다고 보고되어지고 있다. 그 실험결과, DA와 NS오일 모두 상당한 유지산화의 결과가 나타났으나, 그 경향은 DA, NS 에멀전에서 반대의 양상을 보였다. 즉, 30일 이후, DA의 경우에는 3차 에멀전에서 가장 많은 지방산화가 발생하였으나, NS의 경우에는 1차 에멀전에서 가장 많은 지방산화가 발생하였다(Figure 3.2.121,122).

(5) Turbidity 측정 결과

본 실험에서 transmission(%) 측정 실험을 통해 에멀전의 Turbidity를 확인할 수 있었다. 그 결과 1, 2, 3차 에멀전의 Turbidity는 layer 수가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었으나, 저장 기간이나 fish oil을 종류에 따른 Turbidity 수치는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Figure 3.2.123).

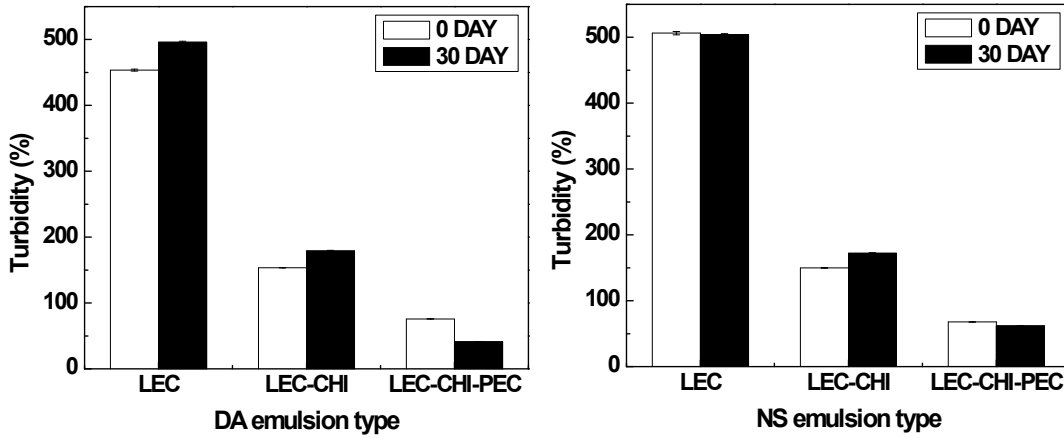


Figure 3.2.123 Turbidity test of multi-layered DA (A) and (B) emulsion for 30 day.

(6) 최적화된 1,2,3차 멀티레이어 에멀전의 릴리즈 검증

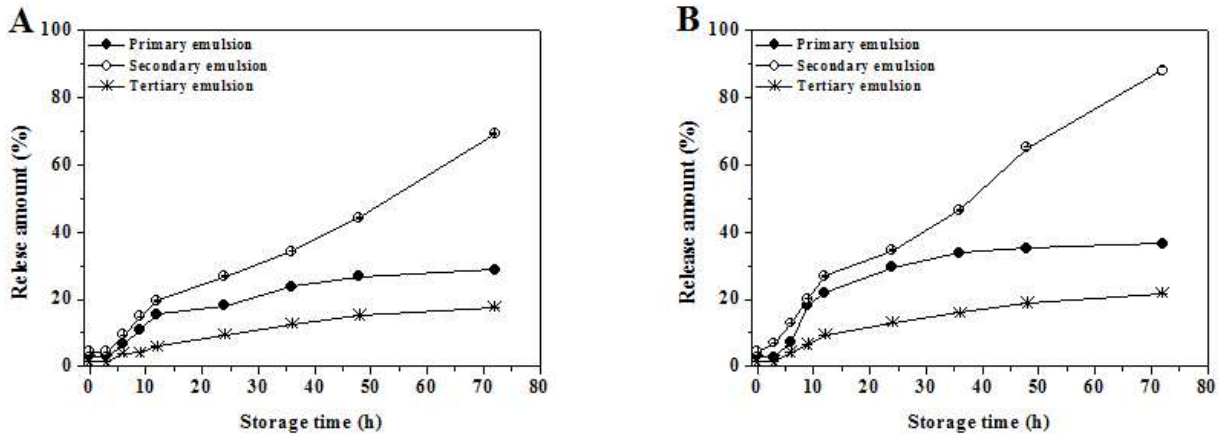


Figure. 3.2.124 Release rate of nanoemulsion prepared with DA (A) and NS (B) for 72 h at 3 7°C. The primary emulsion prepared with lecithin of 0.1% (w/w). The secondary emulsion prepared with CHI of 0.02% (w/w) at ratio of 1:2 of primary emulsion and CHI solution. The tertiary emulsion prepared with LMP of 0.15% (w/w) (DA) and 0.2% (w/w) (NS) at ratio of 1:1 of secondary emulsion and LMP solution.

본 연구는 위의 제조공정을 이용하여 최적화한 1, 2, 3차 에멀전의 릴리즈 효과를 검증한 결과이다. 제조된 에멀전은 37°C에서 3일간 보관하면서 에멀전 안에 포집되어있는 어유가 릴리즈되는 양을 계산하여 산출하였다. 본 연구 결과, DA, NS 모두 2차 에멀전 제조 시 가장 많이 릴리즈 되는 것을 알 수 있었다. 이에 반해 3차 에멀전일 경우 가장 릴리즈 되는 어유의 양이 적었으며, 3일 이후 약 20%정도 릴리즈 되었다.

(7) 최적화된 1,2,3차 멀티레이어 에멀전 입자의 저장안정성 검증

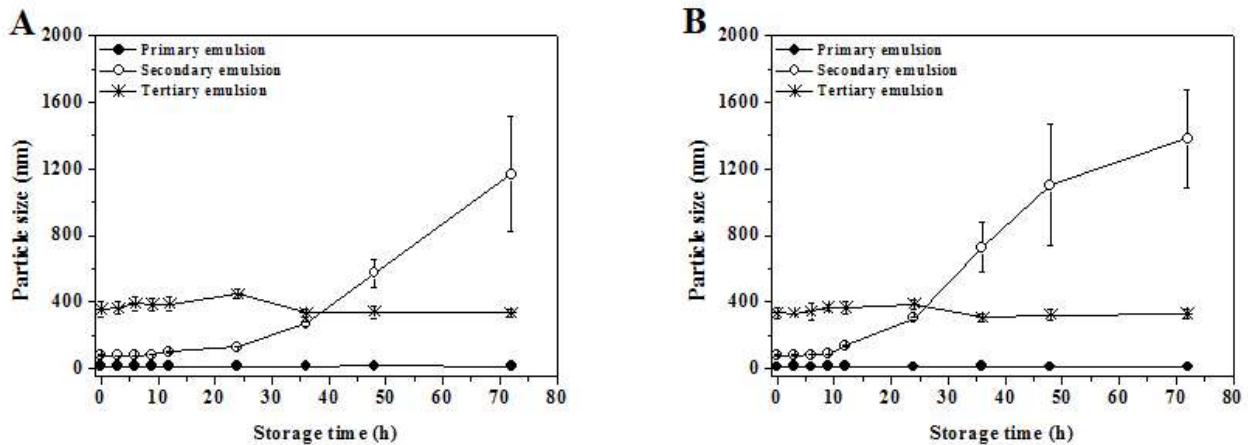


Figure 3.2.125 Droplet stability of fish oil emulsion prepared with DA (A) and NS (B) for 72 h at 37°C. The primary emulsion prepared with lecithin of 0.1% (w/w). The secondary emulsion prepared with CHI of 0.02% (w/w) at ratio of 1:2 of primary emulsion and CHI solution. The tertiary emulsion prepared with LMP of 0.15% (w/w) (DA) and 0.2% (w/w) (NS) at ratio of 1:1 of secondary emulsion and LMP solution.

본 연구는 위의 제조공정을 이용하여 최적화한 1, 2, 3 차 에멀전의 저장기간 동안 입자크기 변화를 관찰한 결과이다. 제조된 에멀전은 37°C 에서 3 일간 보관하면서 진행하였다. 본 연구 결과, DA, NS 로 제조된 1, 3 차 에멀전은 저장기간 동안 매우 안정한 상태를 유지하였으나, 2 차 에멀전의 경우에는 12 시간 이후부터 입자크기가 급격히 증가하는 경향을 나타내었다.

라. Biopolymer(WPI, Pectin)의 hydrogel 입자내 포집방법을 활용한 fish oil 입자 코팅기술 개발

(1) Water in water emulsion(W/W emulsion) 형성

Fish oil을 첨가하기 전 선택된 농도별 WPI droplet 형성여부를 광학 현미경을 통해 관찰하였다.

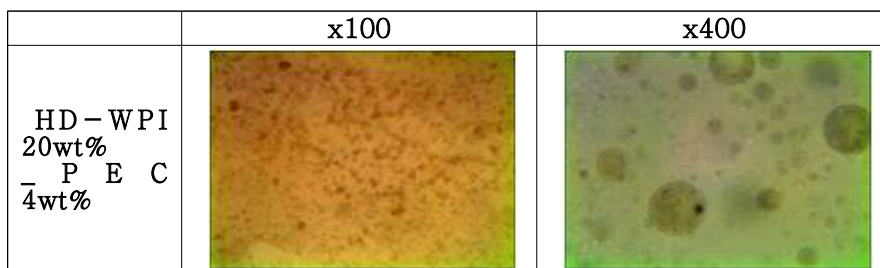


Figure 3.2.126 Microscopic observation of W/W emulsion depending on HD-WPI concentration at 20 wt% pectin 4 wt% (magnification  $\times 100$  and 400).

(2) O/W emulsion 입자크기 측정 및 zeta-potential 측정

Fish oil nanoemulsion을 제조하기 위해, 유화제인 Tween 20을 선택하여 주어 입자를 제조하였다. Table 3.2.61에 따르면, 유화제 농도별로 입자 크기를 관찰해 보면, 유화제 8% 첨가해 준 경우 입자의 크기는 416 nm로 감소하였다. zeta-potential의 경우, 0~-3 mV이하의 음전하를 띠었다. 이는 유화제 첨가량이 증가할수록 전하 값은 중성을 띠게 되는데 Tween 20이 비이온성 유화제여서 중성으로 전하 값이 변한 것으로 사료된다.

Table 3.2.61 Physical properties of O/W emulsion depending on Tween 20 concentration

DA	Tween 20	d(nm)	PDI	zeta potential(mV)
1%	1%	879.47±130.406	0.37±0.209	-3.70±0.423
8%	8%	416.53±34.461	0.86±0.207	-0.33±0.448

NS	Tween 20	d(nm)	PDI	zeta potential(mV)
1%	1%	849.67±45.129	0.39±0.095	-2.45±0.173
8%	8%	575.83±17.886	0.45±0.187	-1.58±1.075

(3) Oil in water in water emulsion (O-liquid/W-protein/W-polysaccharide)

준비된 W/W emulsion에 red oil이 코팅된 유화제 농도, Fish oil 농도별로 제조된 fish oil 나노 입자를 넣어 O/W/W을 제조하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 처리구간 morphology 간의 차이는 DA와 NS에 각각 유화제 농도 1% 첨가한 경우 morphology안 fish oil이 포집되어 있는 것을 알 수 있었으나 8%의 경우 입자의 형태가 일정하지 않으며 fish oil이 분산되어 있는 것을 볼 수 있었다.

(4) Heating 처리 - (O-gel/W-protein/W-polysaccharide)

O/W/W을 열처리 하여 WPI droplet을 gel화 시켰다. 열처리 온도는 80°C 에서 물중탕으로 실시해 주었다. 전체적으로 pectin에 일부 녹아있는 WPI가 열변성으로 응고되어 전체적인 배경에 작은 점들이 형성되어 응집되어 있는 것을 볼 수 있었다.

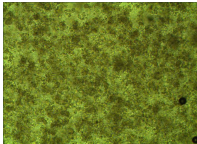
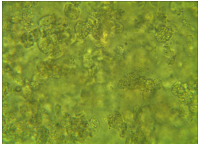
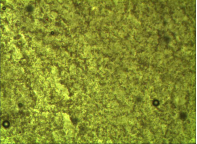
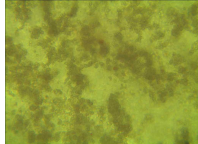
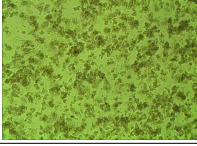
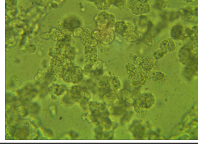
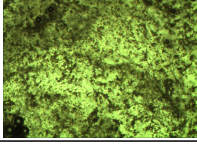
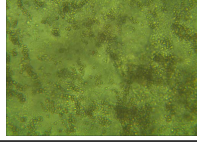
	Fish oil	Tween 20	x100	x400
HD - WPI 20 wt% _PEC 4 wt%	DA 1%	1%		
	DA 8%	8%		
	NS 1%	1%		
	NS 8%	8%		

Figure 3.2.127 Microscopic observation of O/W/W emulsion depending on HD-WPI concentration at 20 wt% pectin 4 wt%. (magnification  $\times 100$  and  $\times 400$ ).

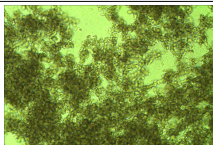
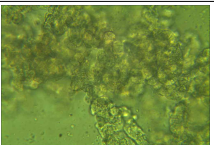
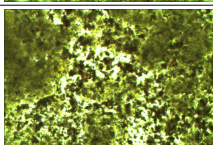
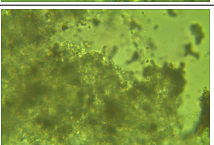
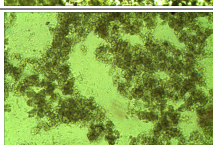
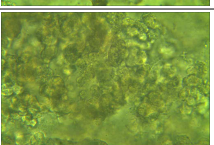
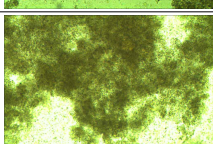
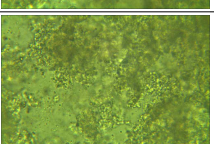
	Fish oil	Tween 20	x100	x400
HD-WPI 20 wt% _PEC 4 wt%	DA 1%	1%		
	DA 8%	8%		
	NS 1%	1%		
	NS 8%	8%		

Figure 3.2.128 Microscopic observation of O/W/W emulsion depending on HD-WPI concentration and heating temperature. (magnification  $\times 100$  and 400).

마. 시그마알드리치코리아 (Sigma-Aldrich Chemical Company, St Louis, MO, USA) 에서 제공된 오일을 이용한 Fish oil 코팅 기술

본 연구에서 사용된 어유는 20~31% 오메가-3를 함유하고 있는 오일로서 시그마 알드리치 코리아에서 구입하여 사용하였다.

(1) 서로 다른 전하를 가진 바이오폴리머를 이용한 multilayered fish oil 에멀전 제조기술의 최적화

○ 1차 에멀전 제조 및 유화제의 최적화 농도 결정

본 연구에서 어유를 함유한 나노에멀전 제조를 위해 사용된 유화제는 Tween 20 (0.1~3.0%)이며, Tween 20의 CMC 농도를 결정하기 위하여 입자크기 및 제타전위를 측정하였다 (Figure 3.2.129). 또한 추후 어유의 off-flavor를 마스킹 하기위하여 시나몬오일(cinnamon oil; CO)를 첨가한 에멀전을 제조하여 Tween 20의 농도를 결정하였다. 이 때, 시나몬 오일은 어유의 5%로 첨가 되었다. 그 결과, Tween 20의 최적농도는 1.25%이며, 이때의 제타 전위값은 시나몬 오일이 첨가되지 않을 경우 -10.93 mV, 시나몬 오일이 첨가될 경우 -9.13 mV로 나타났으며, 입자크기는 135 nm, 128 nm로 측정되었다. 또한 입자분산도는 0.4 이하로 낮게 나타났으므로 안정한 입자크기를 유지함을 확인할 수 있었다.

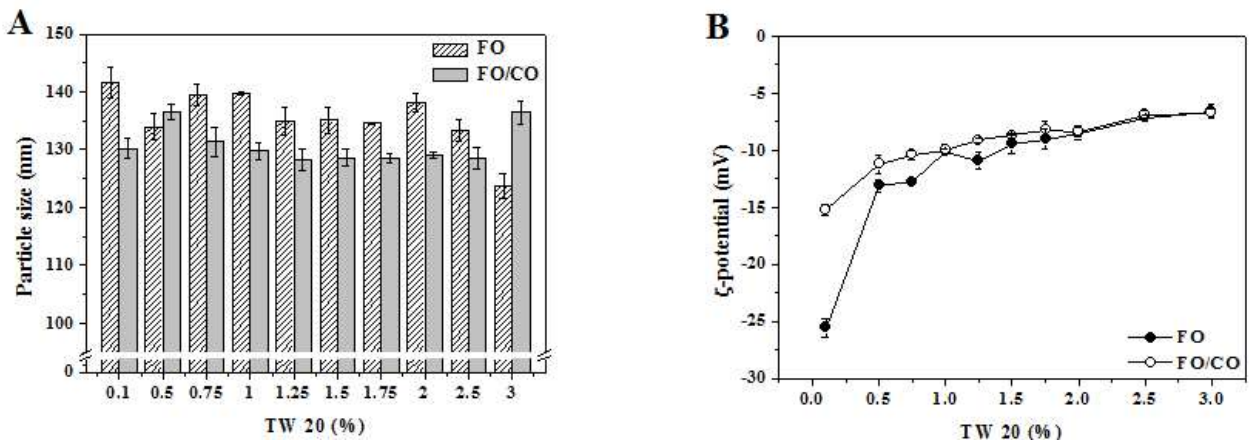


Figure 3.2.129. Particle size (A) and z-potential (B) of primary emulsion without or with CO.

○ 2차 에멀전 제조 및 키토산의 최적화 농도 결정

2차 에멀전을 제조하기 위하여 다양한 농도의 키토산 용액(0.001~0.4%)를 첨가하였다. 키토산은 양전하를 띠고 있기 때문에 2차 레이어로써 적절하다고 판단되어 2차 레이어 막으로 선택하였다. 2차 에멀전 제조는 1차 에멀전에서 최적화된 1.25% Tween 20을 함유한 어유 에멀전과 키토산 용액을 1:1로 혼합하여 생산하였다. 제조된 2차에멀전의 입자크기와 제타전위를 Figure 3.2.130에 나타내었다. 키토산의 최적농도는 0.1%로 결정되었으며, 이때의 제타전위 값은 시나몬 오일이 첨가되지 않을 경우 11.93 mV, 시나몬 오일이 첨가된 경우 11.33 mV로 나타났다. 또한 0.002%~0.004% 범위의 키토산 농도에서는 제타전위값이 음전하에서 양전하로 바뀌는 구간으로 보여 지고 있으며 이때는 입자간의 응집이 서로 발생하는 경향을 나타내었다(not shown). 그리고 입자크기는 130 nm에서 450 nm로 증가하는 경향을 보였으나, 입자분산도는 0.6이하로 입자는 대체적은 안정한 상태를 유지하였다.



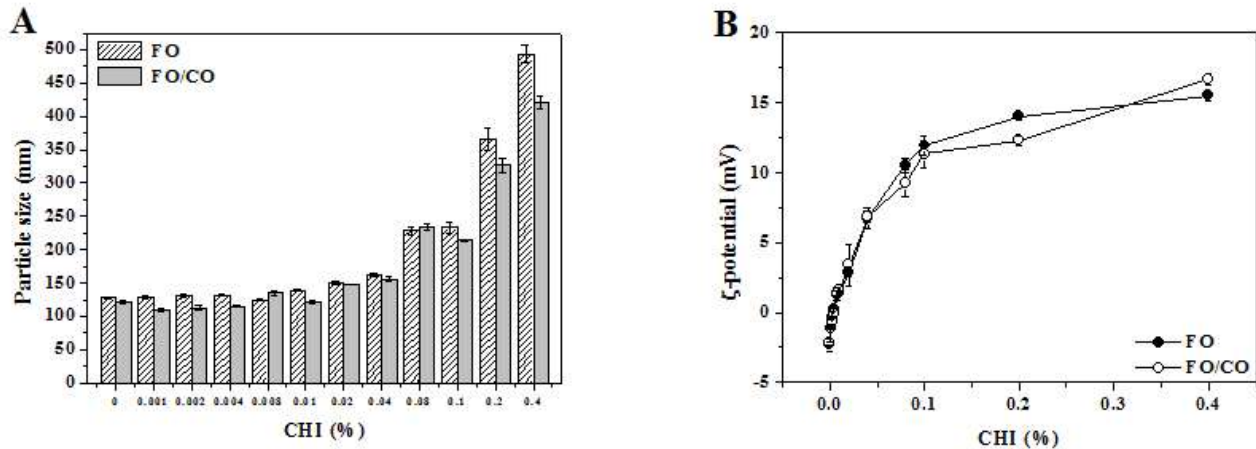


Figure 3.2.130 Particle size (A) and z-potential (B) of secondary emulsion without or with CO.

○ 3차 에멀전 제조 및 펙틴의 최적화 농도 결정

3차 에멀전을 제조하기 위하여 위의 최적 2차 에멀전에 다양한 농도의 펙틴용액(0.01~2%)를 첨가하였다. 펙틴은 음전하를 띄고 있어 3차 레이어로 판단되었으며, 2차 에멀전과 펙틴용액을 1:1로 혼합하여 실험을 진행하였다. 이때의 최소 펙틴농도는 제타전위 값으로 알 수 있었으며, 그 값은 시나몬 오일이 첨가되지 않은 경우 -11.55 mV이며, 시나몬 오일이 첨가된 경우 -14.13 mV로 나타났다. 또한 Figure 3.2.131A와 같이 펙틴 농도가 증가 할수록 입자 분산도(PDI)값은 증가하는 경향을 보였으며, 최적 펙틴농도에서의 입자 크기 값은 시나몬 오일이 첨가되지 않은 경우 200 nm, 시나몬 오일이 첨가된 경우 200 nm으로 안정된 입자크기를 나타내었다.

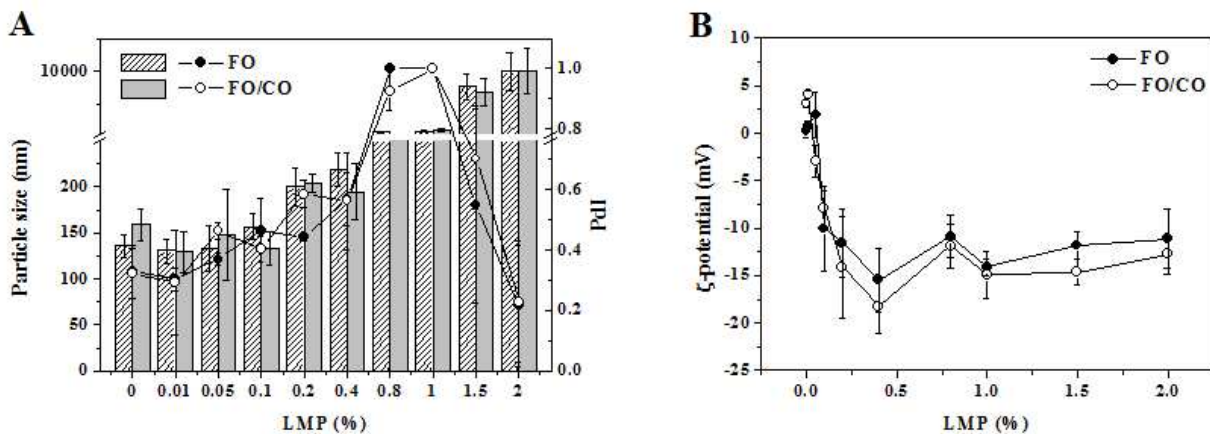


Figure 3.2.131 Particle size, PDI (A), and z-potential (B) of tertiary emulsion without or with CO.

Particle size and PDI are expressed by column/bar and line/symbol, respectively.

○ 어유의 포집효율 및 릴리즈 효과

어유의 포집효율은 앞서 설명한 바와 같이 indirect 방법을 이용하였으며, free 어유를 측정함으로써 간접적으로 실제 레이어 막에 포집된 어유값을 상대적으로 측정할 수 있었다. 위의 어유 입자의 생성공정에서 최적화된 1,2,3차 레이어 에멀전의 입자의 포집효율은 Figure 3.2.132에 나타내었다. 그 결과 70%이상으로 높은 포집효율을 나타내고 있으며, 시나몬 첨가에 따른 효과는 크게 나타나지 않았다. 1, 2차 에멀전은 85% 이상의 높은 포집효율을 나타내고 있다. 어유의 릴리즈 효과는 포집효율테스트와 동일한 방법으로 산출되었으며, 각 에멀전은 37°C, 120 rpm의 shaking 속도로 2일간 진

행하면서 포집되어 있는 어유의 양을 계산하였다. 그 결과, 레이어 수가 증가할수록 릴리즈 된 어유의 양이 증가되는 경향을 보였으며, 1,2차 에멀전과 같은 경우에는 시나몬 오일이 첨가된 에멀전의 릴리즈 속도가 더 높게 나타났으며, 시나몬 오일이 첨가된 에멀전은 약 20%이내로 릴리즈 되는 효과를 볼 수 있었다. 그러나 3차 에멀전의 경우에는 시나몬이 첨가되지 않은 경우는 약 64%, 시나몬이 첨가된 경우에는 약 50%의 릴리즈 효과를 2일 후 확인하였다.

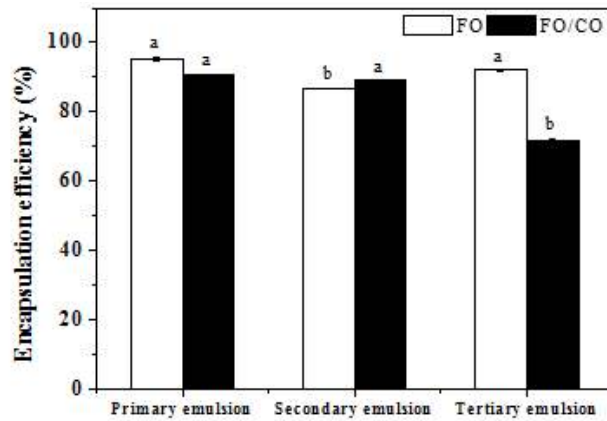


Figure 3.2.132 Encapsulation efficiency (EE %) of FO emulsions without or with CO. Optimal FO emulsions were prepared with 1.25% Tween 20 (primary layer), 0.1% CHI (secondary layer), 0.2% LMP (tertiary layer), respectively.

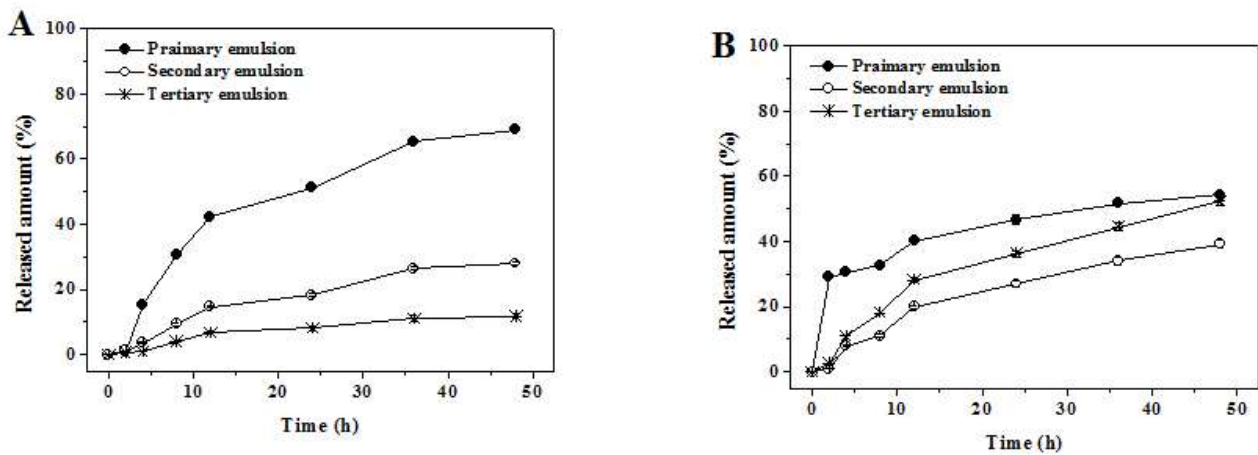


Figure 3.2.133 Released amount (%) of FO emulsions without CO (A) or with CO (B) for 48 h at 37°C. Optimal FO emulsions were prepared with 1.25% Tween 20 (primary layer), 0.1% CHI (secondary layer), 0.2% LMP (tertiary layer), respectively.

#### ○ 저장기간 동안의 입자크기 변화

본 연구는 위의 제조공정에서 생성된 최적의 에멀전을 28일 동안 상온에서 보관하면서 입자의 크기 변화를 관찰하였다(Figure 3.2.134). 연구 결과, 1,2,3차 에멀전 모두 저장기간 동안 입자크기 변화가 나타나지 않았으므로 매우 안정한 입자형태를 지니고 있음을 확인할 수 있었다.

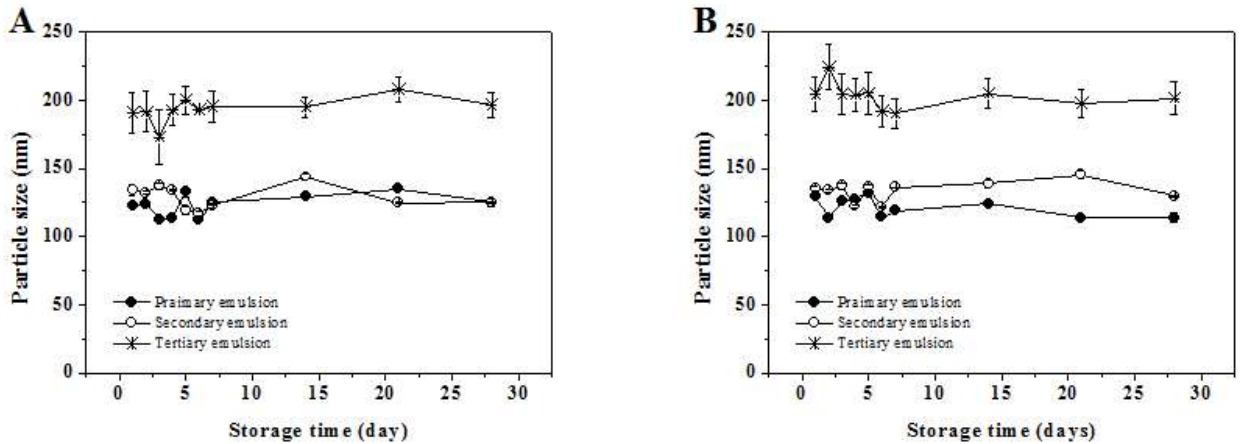


Figure 3.2.134 Physical stability of FO emulsions without CO (A) or with CO (B) for 28 d at 25°C. Optimal FO emulsions were prepared with 1.25% Tween 20 (primary layer), 0.1% CHI (secondary layer), 0.2% LMP (tertiary layer), respectively.

○ 저장기간 동안의 산화안정성 테스트

본 연구는 위의 제조공정에서 생성된 최적의 에멀전을 28일 동안 상온에서 보관하면서 입자의 산화안정성을 측정된 결과이며, 산화안정성은 TBARS로 측정되었다(Figure 3.2.135). 본 연구결과에서 알 수 있듯이 시나몬의 효과는 크게 나타나지 않았으나 레이어 막에 대한 효과는 상당히 나타났다. 즉, 레이어 막이 많을수록 산화도는 속도가 매우 낮게 나타났으며, 약 7일 까지는 급격한 유지의 산화가 나타났으나 그 이후로는 감소하는 양상을 보여주고 있다. 그 이유는 7일 이후부터 또 다른 산화부산물을 형태가 생성되었기 때문이라 사료된다.

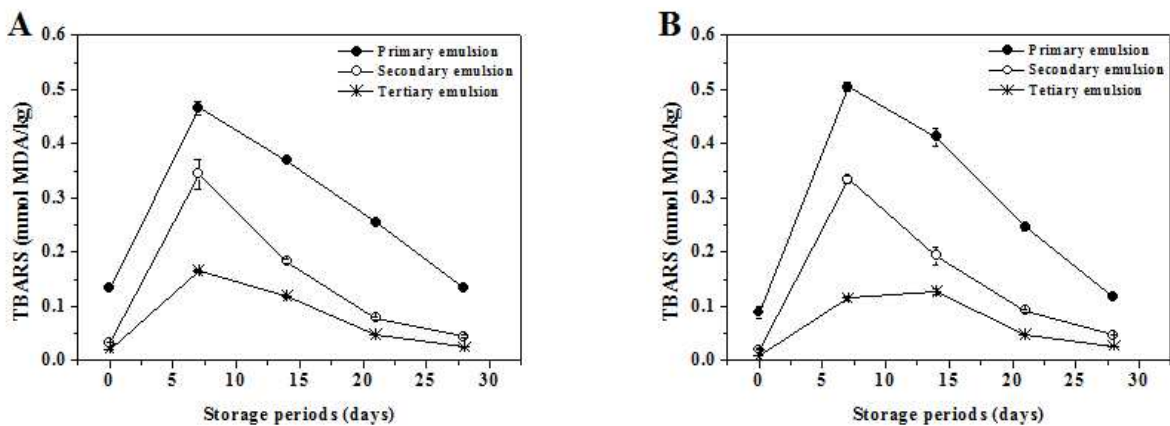


Figure 3.2.135 Oxidation stability of FO emulsions without CO (A) or with CO (B) for 28 d at 25°C. Optimal FO emulsions were prepared with 1.25% Tween 20 (primary layer), 0.1% CHI (secondary layer), 0.2% LMP (tertiary layer), respectively.

바. 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 공정 개발

(1) 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 공정 수립 및 최적화

고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제조를 위한 공정 수립을 위하여 하기의 Figure 3.2.136과 같은 제조 단계를 고안하였다. 캡슐화 제형의 심제로써 Oil soluble mixture는 고도불포화 지방산 함유 지질과 두산 독자 항산화제 formula를 사용하였고, 벽제로써 전분, 검, 당알콜, 젤라틴 등을 사용하여 최적 기제의 선정을 위한 연구를 진행하였다. 또한 심제와 벽제의 유화를 위하여 Rough emulsion 제조를 위한 Homo-mixing과 이들의 Fine-emulsion 제조를 위하여 고압유화를 진행하였다. 마지막으로 유화액의 미세 분말화를 위하여 분무건조 및 유동층 건조 과정을 탐색하였으나, 유동층 건조의 경우 과립의 사이즈가 크고, 고도불포화 지방산 특유의 취가 강하여, 분무건조를 분말화 공정으로 수립하였다.

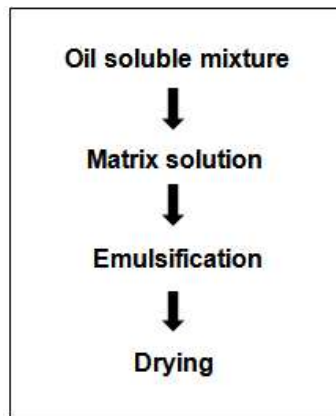


Figure 3.2.136 microencapsulation process of polyunsaturated fatty acid-containing lipid.

상기에 명시한 심제와 벽제의 기제 물질별 특성 및 이들의 최적 배합 조건 탐색을 위하여 124회의 배합 스크리닝을 아래의 Figure 3.2.137~150와 같이 실시하였으며, 실험에 사용된 벽제는 변성 전분, 젤라틴, 검, 덱스트린 등을 사용하였으며, Surfactant로써 레시틴과 글리세린 지방산 에스터 등을 사용하였다. 이들을 사용하여 제조한 미세캡슐 배합 조건별 봉입도 평가를 위하여 Soxhlet 추출을 통한 Surface oil량 측정을 진행하였으며, Surface oil 함량이 1% 미만 제형의 경우 측정상의 편차 및 오류 가능성을 방지하기 위하여 재현성 실험을 실행하였다.

No.	1	2	3	4	5	6	7
DHA oil	100	100	100	100	100	100	100
Antioxidants	0.03	0.03	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin	40						
Na-caseinate	40	38	40	50	40	30	20
DPP	10	10	9.5				
TSP							
Gum Arabic	40	10	10				
Na-ascorbate			15	15	15	15	15
Soy lecithin							
Glycerin fatty acid ester							
Sugar ester							
Water		400	600	600	600	600	600
Gelatin		30	30	30	40	50	60
Na-caseinate							
Lactose		45	45	120	120	120	120
Sucrose	24.1						
Glucose							
Starch		60	65				
Dextrin	15.9	18					
Water	1000	300	300	300	300	300	300
<b>surface oil(%)</b>	11.3	5.0	5.0	6.3	4.8	3.5	6.6

Figure 3.2.137 Optimizing process of microencapsulation-1.

	8	9	10	11	12	13	14	15
DHA oil	100	100	100	100	100	100	100	100
Antioxidants	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin			50					
Na-caseinate	40	30		30	30	30	30	30
DPP								
TSP								
Gum arabic								
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy lecithin	2	2	2	2	4	2	2	2
Glycerin fattyacid ester								
Sugar ester								
Water	600	600	600		600	600	600	600
Gelatin	40			50	50	40	30	50
Na-caseinate			30					
Lactose	120	170	120	120	120	130	140	80
Sucrose								40
Glucose								
Starch								
Dextrin								
Water	300	300	300	300	300	300	300	300
<b>surface oil(%)</b>	2.7	4.3	4.2	6.2	2.1	1.7	2.8	1.6

Figure 3.2.138 Optimizing process of microencapsulation-2.

	16	17	18	19	20	21	22	23	24
DHA oil	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antioxidants	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin									
Na-caseinate	30	30	30	30	40	30	30	30	30
Starch									
DPP									10
TSP									
Gum arabic								50	
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy lecithin	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Glycerin fattyacid ester									
Sugar ester									
Water	600	600	600	600	600	600	600	600	600
Gelatin	50	40	70	70	60	50	50	50	50
Na-caseinate									
Lactose		100	100	100	100	120	120	70	110
Sucrose	120								
Glucose		30							
Starch									
Dextrin									
Water	300	300	300	300	300	300	300	300	300
<b>surface oil(%)</b>	5.3	4.42	4.2	3.14	5.5	2.05	3.28	6.9	1.6
			(pH 6.5)	(pH 5.5)	(pH 6.5)	(pH 6.5)	(pH 5.5)	(pH 5.0)	(pH 7.0)

Figure 3.2.139 Optimizing process of microencapsulation-3.

	25	26	27	28	29	30	31	32	33
DHA oil	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antioxidants	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin									
Na-caseinate	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Starch									
DPP						10	10	10	10
TSP	3	3	3	1	1				
Gum arabic			20		10	10	10		
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy lecithin	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Glycerin fattyacid ester									1
Sugar ester									
Water	600	600	600	600	600	600	600	600	600
Gelatin	50	50	50	50	50	50	50	40	40
Na-caseinate									
Lactose	120		100	120	110	100		120	120
Sucrose		120							
Glucose									
Starch									
Dextrin									
Water	300	300	300	300	300	300	100	300	300
<b>surface oil(%)</b>	2.05	10.54	2.43	3.8	3.19	2.61	5.2	2.45	3.46
	(pH 8.0)	(pH 8.0)	(pH 8.0)						

Figure 3.2.140 Optimizing process of microencapsulation-4.

DHA oil	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Antioxidants	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin		10			30	30			
Na-caseinate	30	30	30	30			30	30	30
Starch									
DPP	10	10	10	10					
TSP									4
Gum arabic									
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy lecithin	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Glycerin fatty acid ester						1			
Sugar ester									
Water	300	600	600	600	600	600	600	600	600
Gelatin	50	40	50	50	50	50	50	50	50
Na-caseinate									
Lactose	110	110	110		120	120	110	100	100
Sucrose				110					
Glucose									
Starch									
Dextrin									
Water	200	300	600	600	600	600	600	600	600
Sodium sulfate							10	20	20
Water									
<b>surface oil(%)</b>	2.96	2.1	1.6	2.1	2.45	2.6	1.5	1.2	1.6

Figure 3.2.141 Optimizing process of microencapsulation-5.

DHA oil	43	44	45	46	47	48	49	50	51
Antioxidants	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin					10				
Na-caseinate	30	30	30	30	20	30	30	30	30
Starch									
DPP									
TSP									
Gum arabic									
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy lecithin	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Glycerin fatty acid ester									
Sugar ester									
Water	600	600	600	600	600	600	600	600	600
Gelatin	50	50	50	50	50	50	80	50	50
Na-caseinate									
Lactose	90	120	100	110	120	120	90	120	120
Sucrose									
Glucose									
Starch									
Dextrin									
Water	600	600	600	600	600	600	600	600	600
Sodium sulfate	30		20	10		0.5	0.5		
Water									
<b>surface oil(%)</b>	3.14	1	1.6	2.3	2.8	2.97	1.4	3.3	1.5

Figure 3.2.142 Optimizing process of microencapsulation-6.

DHA oil	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Antioxidants	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin									
Na-caseinate	30	30							
Starch			100	100	100	100	80	60	70
DPP									
TSP									
Gum arabic									
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy lecithin	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Glycerin fatty acid ester					1				
Sugar ester									
Water	600	600							
Gelatin	50	80							
Na-caseinate									
Lactose	90	90							
Sucrose			100	100	100	100	120	140	130
Glucose									
Starch	30								
Dextrin									
Water	600	600	600	600	600	600	600	600	600
<b>surface oil(%)</b>	3	4	1.2	10.2	0.65	0.83	0.48	0.58	0.41

Figure 3.2.143 Optimizing process of microencapsulation-7.

	61	62	63	64	65	66	67	68	69
DHA oil	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antioxidants	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin	30		60	60	50		40	40	40
Na-caseinate	40	40	40	40	40	40	40	40	40
DPP	9.5								
Gum arabic	10	80							
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Water	600								
Lactose	45	80	100	100	110	120	80	80	80
Sucrose							40		
Fructose								40	40
Glucose									
Starch	65					40			
Water	300	315.1							
<b>surface oil(%)</b>	5.0	5.0	150	2.0	0.63	7.4	140	2.3	3.5

Figure 3.2.144 Optimizing process of microencapsulation-8.

	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
DHA oil	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antioxidants	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin	30	60	40	40	50	50	50	50	30	40	40
Na-caseinate	50	20	40	40	30	30	30	30	30	30	30
DPP											
Gum arabic											
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy lecithin				2		2	2	2	2	2	2
Water											
Lactose	120	120	120	120	120	120	80		140	130	100
Sucrose							40	120			
Fructose											
Glucose											30
Starch											
Water											
<b>surface oil(%)</b>	6.3	6.6	4.8	2.70	3.5	2.1	16	5.3	2.8	1.72	4.42

Figure 3.2.145 Optimizing process of microencapsulation-9.

	81	82	83	84	85	86	87	88	89
DHA oil	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antioxidants	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin	50	50	50	50	40	50	50	50	50
Na-caseinate	30	30	30	30	30	30	30	30	30
DPP			10	10	10	10	10	10	10
TSP	1	1							
Gum arabic		10	10	10					
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy lecithin	2	2	2	2	2	2	4	2	2
Water						300		600	
Lactose	120	110	100		120	110	110	110	
Sucrose									110
Maltodextrin				100					
Starch									
Water						200		600	600
<b>surface oil(%)</b>	3.8	3.19	2.61	5.2	2.45	2.96	2.1	1.60	2.1

Figure 3.2.146 Optimizing process of microencapsulation-10.

	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101
DHA oil	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antioxidants	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Na-caseinate			30	30	30	30					10	
Starch							30	30	30	20	30	30
Arabic gum												
DPP												
TSP					4							
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy lecithin	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Glycerin fatty acid ester		1										
Water	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
Sucrose												
Lactose	120	120	110	100	100	90	120	100	110	120	120	90
Gelatin	30+50	30+50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	80
Glycerol												
Water	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
Na2SO4			10	20	20	30		20	10		0.5	0.5
<b>surface oil(%)</b>	2.45	2.6	1.50	1.2	1.6	3.14	1	1.6	2.3	2.80	2.97	1.4

Figure 3.2.147 Optimizing process of microencapsulation-11.

	102	103	104	105	106		107	108	109	110	
DHA oil	100	100	100	100	100		DHA oil	100	100	100	
Antioxidants	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		Antioxidants	0.1	0.1	0.1	
Na-caseinate				30	30		Na-caseinate	30			
Starch	30	30	30				Starch	100	200	100	
Arabic gum							Na-ascorbate	15	15	15	
DPP							Soy lecithin	2	2	2	
TSP							Water	600	600	600	
Na-ascorbate	15	15	15	15	15		Lactose	110			
Soy lecithin	2	2	2	2	2		Sucrose		100	70	
Water	600	600	600	600	600		Gelatin	50			
Sucrose							Starch				
Lactose	120	120	100	90	90		HM pectin(alginate)	10		30	
Gelatin	50	50	50	50	80		Na-caseinate				
Starch				30			Water	600		300	
HM pectin			20				CaCl2 2(H2O)	0.5			
Na2SO4							Water	50			
Water	600	600	600	600	600		Na2SO4				
<b>surface oil(%)</b>	3.3	1.5	too much	3.00	4		<b>surface oil(%)</b>	3.7	1.20	too much	too much

Figure 3.2.148 Optimizing process of microencapsulation-12.

	111	112	113	114	115	116	117	118
DHA oil	100	100	100	100	100	100	100	100
Antioxidants	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin						70		
Na-caseinate						70		200
Starch	100	100	80	60			200	
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15	15	15
Glycerin fatty acid ester	1							
Soy lecithin	2							
Sucrose	100	100	120	140	130	130		
Lactose								
Maltodextrin								
Water	600	600	600	600	600	600	800	600
<b>surface oil(%)</b>	too much	0.65	0.48	0.58	0.78	2.5	1.85	5.6

Figure 3.2.149 Optimizing process of microencapsulation-13.



	119	120	121	122	123	124
DHA oil	100	100	100	100	100	100
Antioxidants	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Gelatin						
Na-caseinate						
Starch	70	50	40	30	32	70
Na-ascorbate	15	15	15	15	15	15
Glycerin fatty acid ester						
Soy lecithin						
Sucrose						
Lactose						
Maltodextrin	30	50	60	70	43	130
Water	600	600	600	600	600	600
surface oil(%)	2.9	0.87	0.73	0.93	2.2	0.4

Figure 3.2.150 Optimizing process of microencapsulation-14.

최적화 공정은 위의 Figure 3.2.148의 149번 조건으로 선정되었으며, 해당 제형의 Surface oil 함량은 0.4%로 측정되었고 재현성 테스트 결과 또한 일치하였다. 최종 수립된 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐화 공정은 아래의 Figure.3.2.151과 같다.

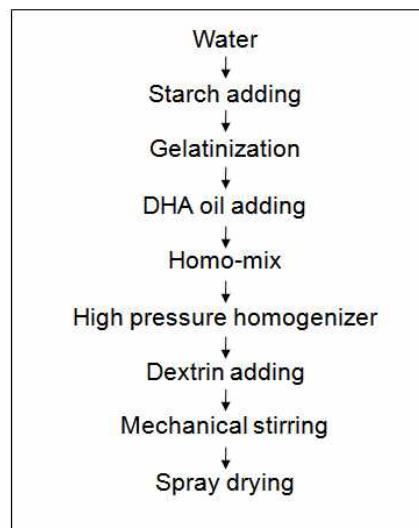


Figure 3.2.151 Optimized microencapsulation process.

사. 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 특성 분석 및 안정성 테스트

(1) 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐의 산화 안정성 테스트

본 실험을 위하여, 최적화된 공정을 통하여 제조된 Surface oil 함량 0.4% 미세캡슐제형과 5% 미세캡슐제형을 이용하여 40℃의 가혹조건 하에서 일정 시간 경과에 따른 Peroxide value(POV) 증가도를 측정하였다.

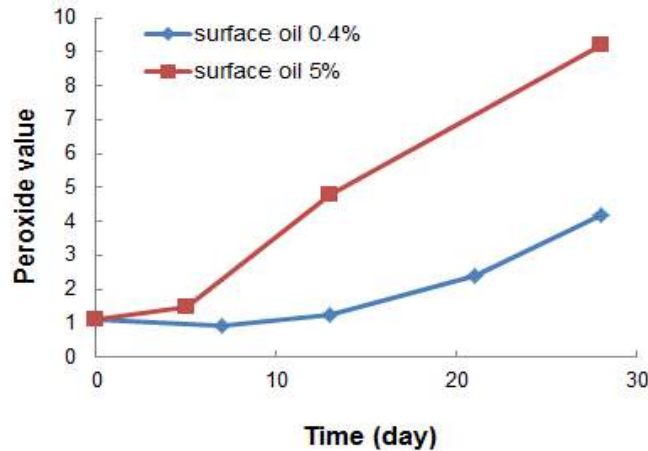


Figure 3.2.152 Comparison of oxidation stability according to surface oil content.

위의 Figure 3.2.152 과 같이 Surface oil 함량 0.4% 의 미세캡슐 제형은 12일차까지 안정한 것을 보이며, 그 이후 점차적으로 산화 안정성이 떨어지는 것을 보이는 반면 5% 제형은 5일차 이후 급격히 산화 안정성이 떨어지는 것을 확인하였다. 이로 인해 Surface oil 함량 0.4%의 제형이 산화 안정성이 높다는 것을 확인할 수 있었으며, 캡슐제형의 산화 안정도에 봉입효율이 중요한 지표임을 알 수 있었다.

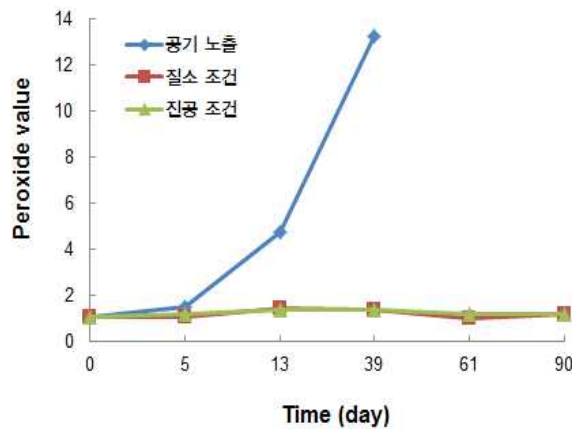


Figure 3.2.153 Comparison of oxidation stability according to air-exposure conditions.

또한 Surface oil 함량 0.4% 의 제형을 이용하여 공기 노출 환경별 산화 안정성 비교 실험을 진행하였다. 그 결과 위의 Figure.3.2.153과 같이 5일차 이후 공기 노출 조건이 질소 조건 및 진공 조건보다 산화 안정성이 떨어지는 현상을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 미세캡슐 제형 보관 시 공기 노출 환경이 산화 안정성 확보에 중요한 요소임을 확인할 수 있었다.

## (2) Fish oil을 함유한 미세캡슐(파우더)의 입자특성 분석

○ 고도불포화 지방산 함유 지질을 함유한 미세캡슐의 입자크기 및 제타전위

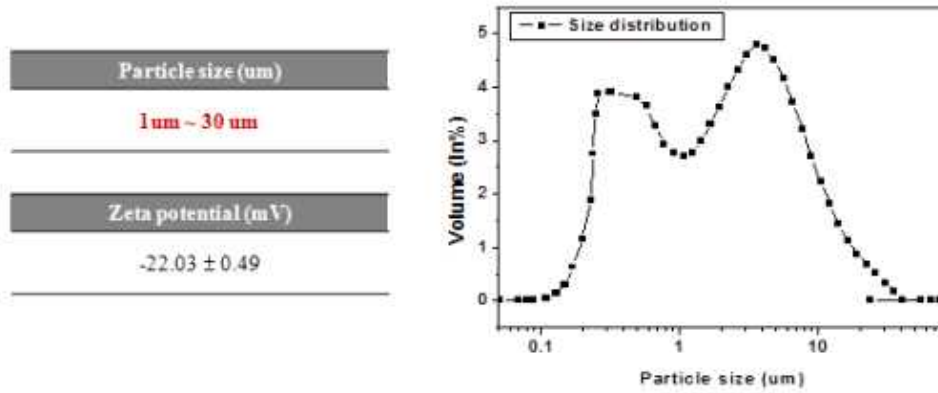


Figure 3.2.154 Particle size and zeta potential measurement.

본 연구는 두산글로넛으로부터 제공받은 어유코팅 파우더 제형의 입도분석 측정결과이다(Figure 3.2.154). Spray dryer를 이용하여 파우더 제형을 제조하였으며 약 30% 어유함량을 가진 샘플이다. 제공받은 파우더 제형을 이용하여 입자크기는 마스터사이저, 제타전위는 마스터사이저를 이용하여 분석되었다. 입자크기 및 제타전위를 측정하기 위해 파우더 제형을 0.02% 농도로 조절하여 증류수에 분산시켜 이용하였다. 입자크기 분포는 약 1  $\mu\text{m}$ 이상에서 30  $\mu\text{m}$ 이하의 범위이며, 다분산상 형태를 나타내고 있다. 제타사이저를 이용하여 제타전위를 측정한 결과, 약 -22 mV의 수치를 나타내었다. 비교적 안정한 상태로 어유가 포집되었음을 알 수 있었다. 입자 크기는 마스터사이저 뿐만 아니라, SEM측정을 통해서도 확인할 수 있었다.

○ 분말화 된 파우더 제형의 SEM 관찰

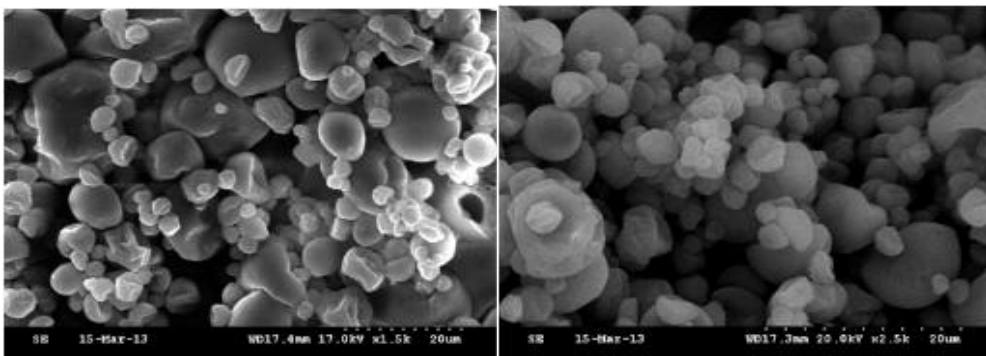


Figure 3.2.155 SEM measurements.

Figure 3.2.155은 파우더 제형을 충분히 데시케이터에서 건조시킨 후 골드코팅을 하여 전자현미경을 통해 확인한 결과이다. 제타사이저를 통해 입자크기를 측정한 결과와 유사하게 1  $\mu\text{m}$ ~30  $\mu\text{m}$  사이의 다양한 범위에서의 입자를 확인할 수 있었다.

○ 입자코팅효율 측정

두산글로넛으로부터 제공받은 어유코팅 파우더 제형의 코팅효율을 알아보기 위하여 본 실험에서는 indirect 측정방법을 이용하였다. 이 방법은 코팅 되지 않은 free 어유를 측정함으로써 실제 wall material에 포집되어있는 어유량을 산출하는 방식이다. 두 가지 방법으로 실험을 진행하였다. 첫 번

째는 제공된 파우더에 유기용매를 직접 분산시킨 후 free 어유를 측정하는 방법이고, 두 번째 방법은 파우더를 증류수에 분산시켜 습식조건을 만든 후 다시 유기용매를 이용하여 어유를 추출하는 방식이다. Figure 3.2.156는 파우더제형과 재분산 된 파우더의 코팅효율을 나타낸 그래프이다. 그 결과 파우더자체의 코팅효율이 재분산 된 코팅효율보다 크게 나타났다. 그 이유는 어유 파우더가 다시 증류수에 재분산 되면서 증류수에 입자가 골고루 분산되었기 때문에 free 어유 추출이 더 쉬웠을 것이라 사료된다. 이에 반해 파우더 자체는 파우더 입자끼리 서로 뭉쳐 있기 때문에 입자-입자 사이에 free 어유가 포집되어 추출이 어려웠을 것이라 판단되었다.

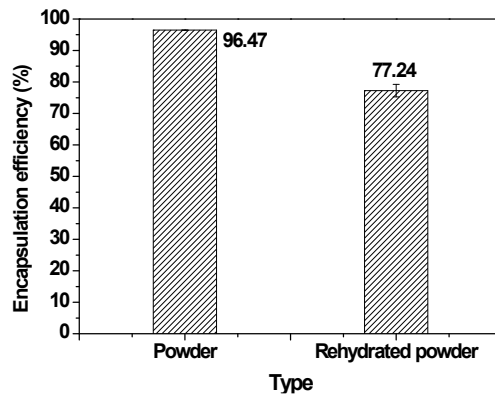


Figure 3.2.156 Encapsulation efficiency of fish oil powder.

○ 고도 불포화 지방산 함유 유지 미세 캡슐의 재수화 시 입자의 유리속도  
 - pH 조건 및 온도조건에 따른 오일 유리속도

pH 조건(pH 3, pH 7)에 대한 오일 유리속도 측정은 파우더 제형을 pH 용액에 재분산 시킨 후 실험을 진행하였다 (Figure 3.2.157). 0.25 g 어유 파우더와 pH용액을 서로 혼합한 후에 20°C와 40°C에 약 7일간 저장하면서 매 시간마다 유출되는 free 어유량을 산출하여 실제적으로 릴리즈되는 양을 계산하였다. 그 결과, pH 용액뿐만 아니라, 온도변화에 따른 릴리즈속도는 현저한 차이를 보였다. 20°C에서 pH 7 용액에 분산된 샘플은 약 2~3일 정도까지 릴리즈속도가 증가하는 반면, 3일 이후에는 더 이상 릴리즈 되지 않았다. 그러나 40°C에 저장된 샘플인 경우에는 계속적으로 릴리즈속도가 증가하는 경향을 나타내었다. 그리고 pH 3용액에 분산된 샘플은 온도변화에 관계없이 2일 후부터는 릴리즈속도가 증가하지 않고 파우더의 어유 분자가 안정적으로 포집한 상태를 유지하였다.

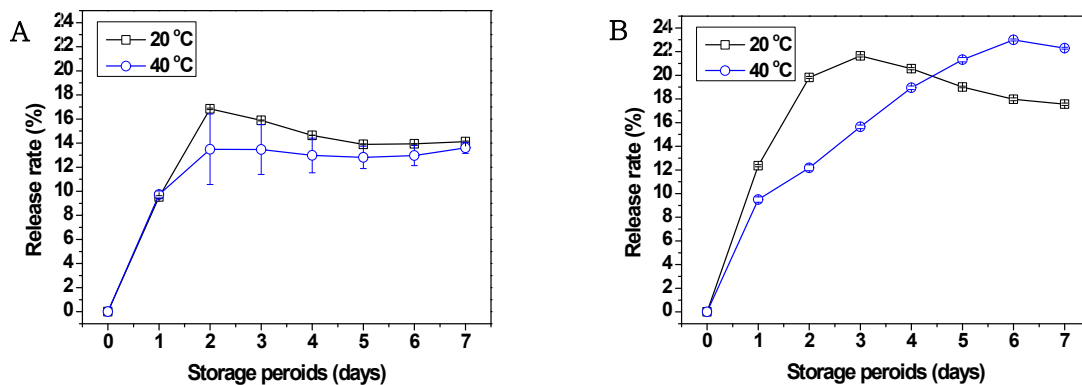


Figure 3.2.157 Release of fish oil powder dispersed pH 3 (A) and pH 7 (B) solutions.

- 염 종류에 따른 오일 유리 속도

염 종류에 대한 오일 유리속도 측정은 어유 파우더 제형을 각 염용액에 재분산 시킨 후 실험을 진행하였다(Figure 3.2.158). 본 연구에 사용된 염용액은 50 mM NaCl 용액과 50 mM CaCl<sub>2</sub> 용액을 이용하여 각 온도(20°C, 40°C)에서 7일 동안 저장하면서 유리되는 릴리즈 양을 계산하였다. 그 결과, 염 종류에 따른 효과는 거의 보이지 않았으며, 온도에 따른 변화만 관찰되었다. 두 염용액 모두 20°C에 저장된 파우더 제형일 경우에는 약 2일 동안 증가하다가 유지되는 경향을 보였으나, 40°C에 저장된 경우에는 꾸준한 증가추세를 보였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, pH용액, 염용액에 따른 차이보다는 온도변화에 따른 차이가 어유 릴리즈 속도에 더 관련한다는 것을 알 수 있었다.

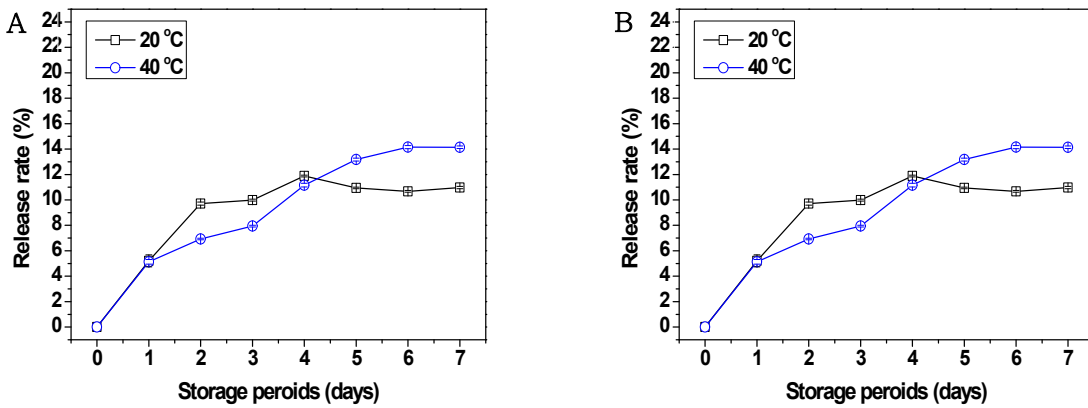


Figure 3.2.158 Release of fish oil powder dispersed pH 3 (A) and pH 7 (b) solutions.

○ 고도 불포화 지방산 함유 유지 미세 캡슐의 재수화 시 입자의 산화안정성

- pH 조건 및 온도조건에 따른 산화안정성

pH 조건(pH 3, pH 7) 및 온도 조건(20°C, 40°C)에 따른 산화안정성 실험은 TBARS 로 진행되었으며 그 결과는 Figure 3.2.159에 제시하였다. 본 실험은 두산글로벳에서 제공한 어유 파우더를 이용하여 각 용액에 분산시킨 후 저장온도별로 보관하면서 21일간 진행하였다. 그 결과, pH 조건별 비교 시에 pH 3 용액보다는 pH 7 용액에 더욱 산화안정성이 높았으며, 온도 조건별 비교 시에는 저장온도가 높을수록 산화가 더 빨리 진행되었다.

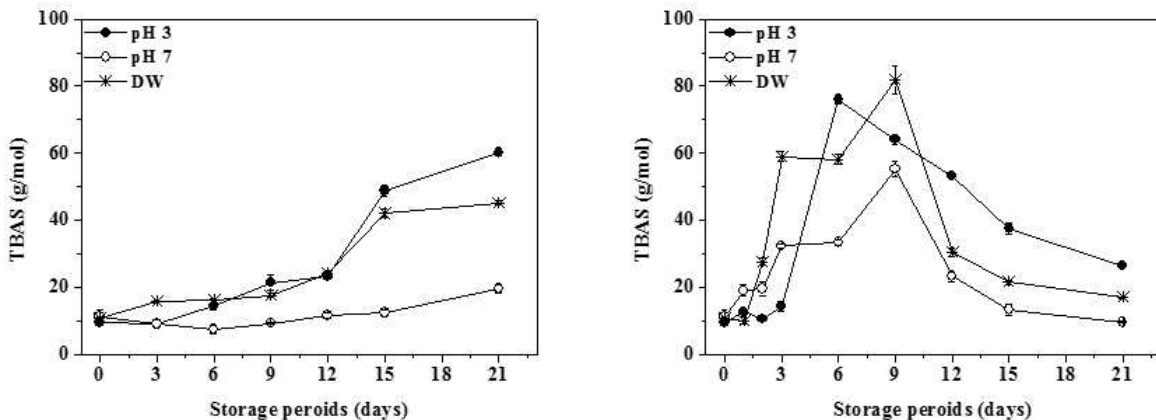


Figure. 3.2.159 Oxidation stability of fish oil powder dispersed pH 3 or pH 7 solution at (A) 20°C (B) 40°C for 3 weeks.

- 염종류, 염농도 및 온도조건에 따른 산화안정성

본 연구는 어유 파우더를 습식조건인 염용액에 분산시킨 후 입자의 산화안정성을 측정한 결과이다(Figure 3.2.160, Figure 3.2.161). 본 실험은 1가 양이온인 NaCl용액과 2가 양이온인 CaCl<sub>2</sub>를 염농도별로 제조하여 20°C와 40°C에 각각 저장하면서 21일간 실험을 진행하였다. 연구 결과, 염종류에 따른 효과는 나타나지 않았으며, 전체적으로 염의 첨가가 입자의 산화를 방지해주는 역할을 함을 알 수 있었다. 20°C에서 샘플을 보관할 경우에 특히 염이 첨가되지 않는 경우에는 9일 이전까지는 점차 산화도가 증가하다가 12일 이후 급격히 산화가 진행됨을 알 수 있었으며, 40°C 샘플일 경우에는 즉시 산화가 진행됨을 확인할 수 있었다. 그러나 염이 첨가된 경우, 20°C에서는 21일 동안 낮은 산화도를 나타내었으며 염농도에 따른 효과는 알 수 없었다.

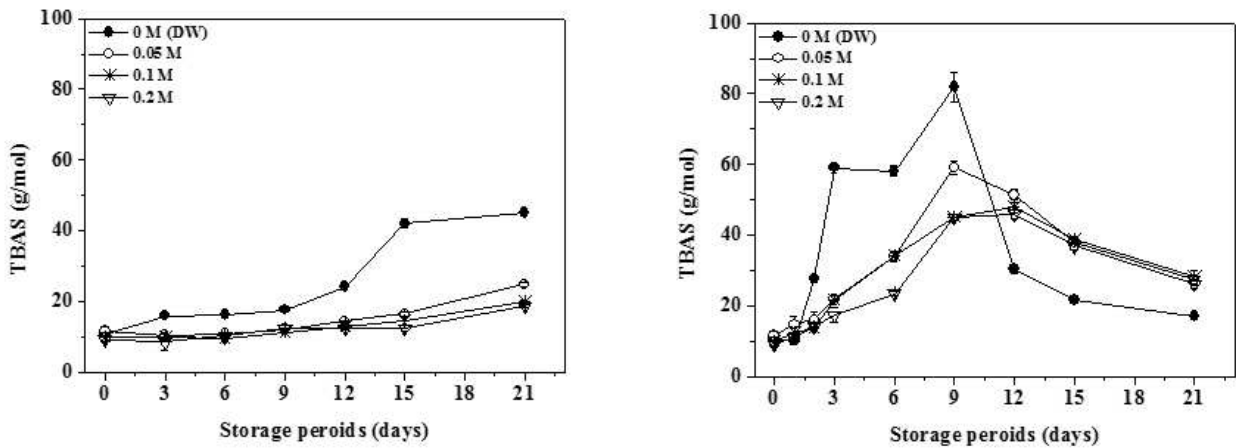


Figure 3.2.160. Oxidation stability of fish oil powder dispersed NaCl solution at (A) 20°C (B) 40°C for 3 weeks.

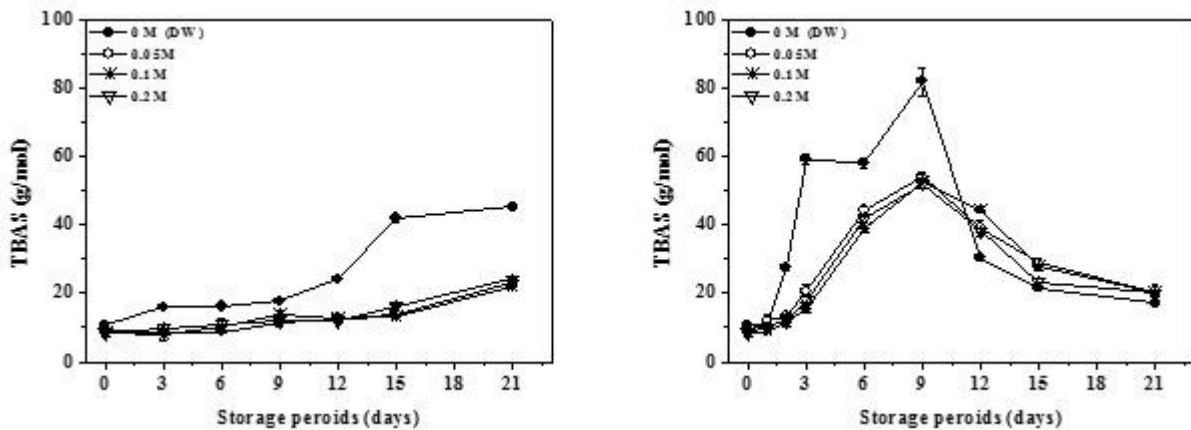


Figure 3.2.161 Oxidation stability of fish oil powder dispersed CaCl<sub>2</sub> solution at (A) 20°C (B) 40°C for 3 weeks.

(3) 고도 불포화 지방산 함유 유지 미세 캡슐의 상대습도에 따른 수분함량 측정

본 연구는 각 온도에서 상대습도(10%, 50%, 90%)에 따른 수분함량 변화를 조사하였다(Figure

3.2.162). 상대습도 챔버를 만들기 위한 각 %별 용액제조는 10%인 경우에는 LiCl 포화염용액, 50%인 경우에는 NaBr 포화염용액, 90% 용액은 BaCl<sub>2</sub> 포화염용액을 이용하여 제조하였다. 챔버의 형태는 Figure 3.2.163에 나타내었다. 그 결과, 두 가지 온도 모두 90% 상대습도를 가진 챔버의 수분함량이 급격히 증가하였으며, 12시간 이후부터는 20°C 인 경우에는 약간 증가하는 추세를 보이거나, 40°C 인 경우에는 평형상태에 도달하였다. 그리고 10%, 50% 상대습도인 챔버는 거의 수분함량이 변화하지 않고 유지되는 경향을 알아볼 수 있었다. 본 결과를 토대로하여 오일 유리속도 및 지방산화 속도를 추후에 진행하였다.



Figure 3.2.162 Relative humidity chamber design.

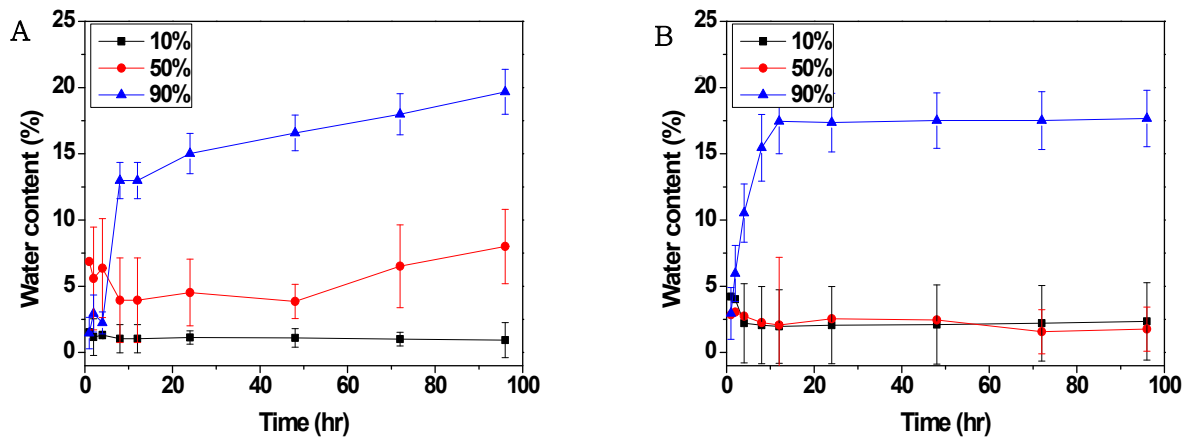


Figure 3.2.163 Water contents of fish oil powder in relative humidity at 20°C(A) and 40°C(B).

아. 고도불포화 지방산 강화 제품 개발 및 특성 분석

(1) 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형의 사양

2차년도 과제 진행사항으로 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 공정을 최적화 하였고, 이를 기반으로 고도불포화 미세캡슐에 대한 제품 사양을 아래 Table 3.2.62과 같이 설정하였다.

Table 3.2.62 Specification of microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acid

TEST ITEMS	SPECIFICATIONS
APPEARANCE	Light yellow powder
TASTE	Typical
SOLUBILITY	Cold soluble, 15°C
C22:6 DHA	n.l.t. 80 mg/g
MOISTURE	n.m.t. 5.0%
MICROBIAL CONTENT - Bacterial Count - Staph. Aureus - Escherichia coli - Salmonella	n.m.t. 10,000 CFU/g negative negative negative

(2) 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가 분유에 대한 관능검사

Fresh한 고도불포화 지방산 함유 지질 미세캡슐 제형을 첨가한 분유에 대하여 전지분유, 경쟁사 고도불포화 지방산 함유 지질(분말)을 첨가한 분유 및 제조 후 50일 경과한 미세캡슐 제형을 첨가한 분유의 차이를 비교하는 관능검사를 실시하였다. Table 3.2.63, 3.2.64에서 나타낸 바와 같이 4종의 시료를 분말 및 10% 용액으로 맛과 냄새에 대한 관능검사를 실시하였다. 관능검사는 Fresh한 고도불포화 지방산 함유 지질 미세캡슐 제형을 첨가한 분유를 기준으로 냄새 및 맛의 차이 정도에 따라 -4점에서 4점으로 평가하였다. 0점을 기준으로 점수가 낮아질수록 Fresh한 고도불포화 지방산 함유 지질 미세캡슐 제형을 첨가한 분유보다 관능의 차이가 약하다는 것을 의미하며, 점수가 높아질수록 관능의 차이가 강하다는 것을 의미하였다. 관능검사 결과에 대한 통계는 SPSS(Statistical Package for Social Science)에 의한 ANOVA 및 Duncan의 다범위 검정(Duncan's multiple range test)으로 진행하였고, 5% 수준에서 각 시료간의 유의적인 차이를 검증하였다.

Table 3.2.63 Milk powder with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acid

시료	고도불포화 지방산 함유 지질 Powder(g)	전지분유(g)
전지분유	-	50.000
Fresh 미세캡슐 제형	0.145	49.855
제조 50일 경과 후 미세캡슐 제형	0.145	49.855
Fresh 경쟁사 제형	0.165	49.835



Table 3.2.64 Milk powder solution with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acid

시료	고도불포화 지방산 함유 지질 Powder(g)	전지방분유(g)	물(g)
전지방분유	-	100	900
Fresh 미세캡슐 제형	0.29	99.71	900
제조 50일 경과 후 미세캡슐 제형	0.33	99.67	900
Fresh 경쟁사 제형	0.29	99.71	900

고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가 분유에 대한 관능 검사지는 Figure 3.2.164과 같다.

### 관능 검사지

1. DHA Powder type

기준 R1 로 표시된 표준 시료와 3개의 시료를 제공해 드립니다  
 먼저 3개의 시료 번호를 놓여져 있는 순서대로 적어주십시오  
 먼저 R1 의 냄새를 맡아보시고 R2 의 냄새와 3개의 시료의 냄새를 각각 비교해 보십시오  
 각 시료의 향취가 R 과 차이가 있는지, 있다면 그 차이의 정도가 어느 정도인지 평가해 주십시오

시료번호	R 보다		R 과 차이가			R 보다		R 보다	
	약하다	약한편이다	없다			강한편이다	강하다		
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4

3개의 시료가 냄새에서 차이가 난다면 어떤 차이가 있는지 자세하게 적어주십시오

---

2. Solution type

기준 R' 로 표시된 표준 시료와 3개의 시료를 제공해 드립니다  
 먼저 3개의 시료 번호를 놓여져 있는 순서대로 적어주십시오  
 먼저 R' 의 냄새를 맡아보시고 R' 의 냄새와 3개의 시료의 냄새를 각각 비교해 보십시오  
 각 시료의 향취가 R' 과 차이가 있는지, 있다면 그 차이의 정도가 어느 정도인지 평가해 주십시오

시료번호	R' 보다		R' 과 차이가			R' 보다		R' 보다	
	약하다	약한편이다	없다			강한편이다	강하다		
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4

R'과 3개의 시료를 순서대로 맛보신 후,

시료번호	R' 보다		R' 과 차이가			R' 보다		R' 보다	
	약하다	약한편이다	없다			강한편이다	강하다		
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4

3개의 시료가 맛과 냄새에서 차이가 난다면 어떤 차이가 있는지 자세하게 적어주십시오

Figure 3.2.164 Sensory evaluation strip of milk powder with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids

(3) 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐에 대한 관능검사 결과

고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가 분유 외 3종 분유에 대한 관능검사 결과는 Table 3.2.65, 3.2.66와 같다. Fresh 미세캡슐 제형 첨가 분유 0점을 기준으로 비교하였을 때, 3종 분유의 분말 및 용액 타입 모두 냄새와 맛의 관능적 측면에서 Fresh 미세캡슐 제형 첨가 분유 대비 유의적 차이가 없었다.

Table 3.2.65 Sensory evaluation scores of milk powder with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids

평가항목	Fresh 미세캡슐 제형 첨가 분유	전지분유	제조 50일 경과 후 미세캡슐 첨가 분유	경쟁사 제형 첨가 분유
냄새	0 <sup>a</sup>	0.25±0.9 <sup>a</sup>	0.67±1.0 <sup>a</sup>	0.67±1.0 <sup>a</sup>

동일 행 안의 문자가 같으면 유의성 없음(Duncan's multiple range test,  $\alpha=0.05$ ).평균±표준편차 (n=25)

Table 3.2.66 Sensory evaluation scores of milk powder solution with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids

평가항목	Fresh 미세캡슐 제형 첨가 분유	전지분유	제조 50일 경과 후 미세캡슐 첨가 분유	경쟁사 제형 첨가 분유
냄새	0 <sup>a</sup>	-0.08±0.5 <sup>a</sup>	-0.33±0.7 <sup>a</sup>	-0.17±0.4 <sup>a</sup>
맛	0 <sup>a</sup>	0.08±0.5 <sup>a</sup>	0.17±0.7 <sup>a</sup>	-0.17±0.4 <sup>a</sup>

동일 행 안의 문자가 같으면 유의성 없음(Duncan's multiple range test,  $\alpha=0.05$ ).평균±표준편차 (n=25)

(4) 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가 제품 개발 및 관능검사

○ 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가 제품 개발

고도불포화 지방산 강화 제품을 개발하기 위하여 1, 2차 년도에 개발한 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 우유, 요구르트, 주스, EN영양식, 커피크리머에 첨가하였다. 이는 시판되고 있는 고도불포화 지방산 DHA의 첨가 함유량을 참고하여 아래 Table 3.2.67과 같이 저 농도와 고농도로 각각 정하였다. 커피크리머를 제외한 우유, 요구르트, 주스 및 EN영양식의 액상 제품은 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 첨가한 후 Homogenizer를 통해 제조하였으며, 커피 분말 제품은 Dry-mixing으로 제조하였다.

Table 3.2.67 Content of microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids in milk, yogurt, orange juice, enteral nutrition food, and coffee creamer.

시료	고도불포화 지방산 미세캡슐 함유량	
	저농도	고농도
우유	10 mg/100 mL	15 mg/100 mL
요구르트	1 mg/100 mL	2 mg/100 mL
주스	3 mg/100 mL	6 mg/100 mL
EN 영양식	2.5 mg/100 mL	5.0 mg/100 mL
커피 크림	0.05%	0.1%

○ Encapsulation된 고도불포화 지방산 강화 제품 관능검사

Encapsulation된 고도불포화 지방산 강화 제품 제조 후 각 제품 별 관능 특성 변화가 발생하는지 확인하기 위해 관능검사가 실시되었다. 관능검사는 성인 남녀 25명을 대상으로 하여 외관의 기호도, 이미/이취의 정도, 종합선호도에 대한 5단계 평점법(1점은 매우 나쁘다, 2점은 나쁘다, 3점은 보통이다, 4점은 좋다, 5점은 매우 좋다)으로 Figure 3.2.165과 같이 평가하였다. 관능검사 결과에 대한 통계는 SPSS(Statistical Package for Social Science)에 의한 ANOVA 및 Duncan의 다범위 검정(Duncan's multiple range test)으로 진행하였고, 5% 수준에서 각 시료간의 유의적인 차이를 검증하였다.

### 관능검사지

날짜: \_\_\_\_\_ 이름: \_\_\_\_\_

앞의 놓여진 3종 시료의 맛을 본 후 각각 해당하는 점수에 체크하여 주십시오. 하나의 시료를 맛본 후 물로 입안을 헹구고 다음 시료를 평가하여 주십시오.  
(점수에 따라 1점은 매우 나쁘다, 2점은 나쁘다, 3점은 보통이다, 4점은 좋다, 5점은 매우 좋음을 의미합니다.)

**시료 1**

평가항목	1점	2점	3점	4점	5점
외관의 기호도					
이미/이취의 정도					
종합선호도					

**시료 2**

평가항목	1점	2점	3점	4점	5점
외관의 기호도					
이미/이취의 정도					
종합선호도					

**시료 3**

평가항목	1점	2점	3점	4점	5점
외관의 기호도					
이미/이취의 정도					
종합선호도					

Figure 3.2.165 Sensory evaluation strip of milk powder with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids.

○ 우유

고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 Table 3.2.67과 같이 우유 100 mL 당 10 mg, 15 mg을 각각 첨가하였고, 해당 제품에 대한 관능검사를 실시하여 Table 3.2.68과 같은 결과를 얻었다.



Figure 3.2.166 Milk with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids.

우유 100 mL당 15 mg의 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 첨가하여도 Figure 3.2.166과 같이 제품의 고유색은 변하지 않는 것을 볼 수 있다.

Table 3.2.68 Sensory evaluation scores of milk with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids

평가항목	고도불포화 지방산(DHA) 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가량 (100 mL당)		
	Control	10 mg	15 mg
외관의 기호도	4.12±0.73 <sup>a</sup>	4.04±0.68 <sup>a</sup>	4.08±0.76 <sup>a</sup>
이미/이취의 정도	3.88±0.53 <sup>a</sup>	3.88±0.44 <sup>a</sup>	3.76±0.44 <sup>a</sup>
종합선호도	4.12±0.67 <sup>a</sup>	3.96±0.61 <sup>a</sup>	3.80±0.41 <sup>a</sup>

동일 행 안의 문자가 같으면 유의성 없음(Duncan's multiple range test,  $\alpha=0.05$ ). 평균±표준편차 (n=25)

Table 3.2.68의 관능검사 결과 100 mL당 10 mg 및 15 mg의 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐이 함유된 우유는 외관의 기호도, 이미/이취 정도 및 종합 선호도 측면에서 Control 대비 유의적 차이를 보이지 않았다.

○ 요구르트

고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 Table 3.2.67과 같이 요구르트 100 mL당 1 mg, 2 mg을 각각 첨가하였고, 해당 제품에 대한 관능검사를 실시하여 Table 3.2.69과 같이 결과를 나타내었다.



Figure 3.2.167 Yogurt with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids.

요구르트 100 mL당 2 mg의 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 첨가하여도 Figure 3.2.167와 같이 제품의 고유색은 변하지 않는 것을 볼 수 있다.

Table 3.2.69 Sensory evaluation scores of yogurt with lipid microcapsule containing polyunsaturated fatty acids

평가항목	고도불포화 지방산(DHA) 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가량 (100 mL당)		
	Control	1 mg	2 mg
외관의 기호도	4.24 ± 0.60 <sup>a</sup>	4.20 ± 0.65 <sup>a</sup>	4.16 ± 0.75 <sup>a</sup>
이미/이취의 정도	4.00 ± 0.50 <sup>a</sup>	4.04 ± 0.54 <sup>a</sup>	3.96 ± 0.68 <sup>a</sup>
종합선호도	4.20 ± 0.41 <sup>a</sup>	4.28 ± 0.46 <sup>a</sup>	4.16 ± 0.62 <sup>a</sup>

동일 행 안의 문자가 같으면 유의성 없음(Duncan's multiple range test,  $\alpha = 0.05$ ). 평균 ± 표준편차 (n=25)

Table 3.2.69의 관능검사 결과 고도 불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐을 함유시킨 제품 모두 외관의 기호도, 이미/이취의 정도, 종합선호도 측면에서 Control 대비 유의적 차이를 보이지 않았다.

○ 오렌지 주스

고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 Table 3.2.67과 같이 주스 100 mL당 3 mg, 6 mg을 각각 첨가하였고, 해당 제품에 대한 관능검사를 실시하여 Table 3.2.70와 같은 결과를 나타내었다.



Figure 3.2.168 Orange juice with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids.

주스 100 mL당 6 mg의 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 첨가하여도 Figure 3.2.168와 같이 제품의 고유색은 변하지 않는 것을 볼 수 있다.

Table 3.2.70 Sensory evaluation scores of orange juice with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids

평가항목	고도불포화 지방산(DHA) 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가량 (100 mL당)		
	Control	3 mg	6 mg
외관의 기호도	4.16±0.69 <sup>a</sup>	4.20±0.71 <sup>a</sup>	4.08±0.70 <sup>a</sup>
이미/이취의 정도	3.92±0.57 <sup>a</sup>	3.88±0.60 <sup>a</sup>	3.60±0.50 <sup>a</sup>
종합선호도	4.00±0.41 <sup>a</sup>	3.96±0.35 <sup>a</sup>	3.84±0.37 <sup>a</sup>

동일 행 안의 문자가 같으면 유의성 없음(Duncan's multiple range test,  $\alpha=0.05$ ). 평균±표준편차 (n=25)

Table 3.2.69의 관능검사 결과 주스 100 mL당 3 mg 및 6 mg의 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐이 함유된 주스는 외관의 기호도, 이미/이취 정도 및 종합 선호도 측면에서 Control 대비 유의적 차이를 보이지 않았다.

○ EN 영양식

고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 Table 3.2.67과 같이 EN 영양식 100 mL당 2.5 mg, 5 mg을 각각 첨가하였고, 해당 제품에 대한 관능검사를 실시하여 Table 3.2.71과 같은 결과를 나타내었다.



Figure 3.2.169 Enteral nutrition food with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids.

EN 영양식 100 mL당 5 mg의 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 첨가하여도 Figure 3.2.169과 같이 제품의 고유색은 변하지 않는 것을 볼 수 있다.

Table 3.2.71 Sensory evaluation scores of enteral nutrition food with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids

평가항목	고도불포화 지방산(DHA) 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가량 (100 mL당)		
	Control	2.5 mg	5 mg
외관의 기호도	3.76 ± 0.66 <sup>a</sup>	3.60 ± 0.58 <sup>a</sup>	3.88 ± 0.44 <sup>a</sup>
이미/이취의 정도	3.96 ± 0.89 <sup>a</sup>	3.88 ± 1.01 <sup>a</sup>	3.52 ± 0.96 <sup>a</sup>
종합선호도	3.88 ± 0.88 <sup>a</sup>	3.68 ± 0.99 <sup>a</sup>	3.48 ± 0.82 <sup>a</sup>

동일 행 안의 문자가 같으면 유의성 없음(Duncan's multiple range test,  $\alpha=0.05$ ). 평균 ± 표준편차 (n=25)

Table 3.2.71의 관능검사 결과 EN 영양식에 고도 불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐을 함유시킨 제품 모두 외관의 기호도, 이미/이취의 정도, 종합선호도 측면에서 Control 대비 유의적 차이를 보이지 않았다.

○ 커피 크리머

고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 Table 3.2.67과 같이 커피 크리머 대비 0.05%, 0.1%를 각각 첨가하였고, 해당 제품에 대한 관능검사를 실시하여 Table 3.2.72과 같은 결과를 나타내었다.



Figure 3.2.170 Coffee creamer with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids.

커피 크리머 대비 0.1%의 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 첨가하여도 Figure 3.2.170과 같이 제품의 고유색은 변하지 않는 것을 볼 수 있다.

Table 3.2.72 Sensory evaluation scores of coffee creamer with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids

평가항목	고도불포화 지방산(DHA) 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가량 (커피크리머 분말 대비)		
	Control	0.05%	0.1%
외관의 기호도	4.04±0.79 <sup>a</sup>	4.04±0.73 <sup>a</sup>	4.12±0.67 <sup>a</sup>
이미/이취의 정도	4.08±0.76 <sup>a</sup>	3.92±0.40 <sup>a</sup>	3.72±0.74 <sup>a</sup>
종합선호도	4.00±0.65 <sup>a</sup>	3.80±0.65 <sup>a</sup>	3.64±0.70 <sup>a</sup>

동일 행 안의 문자가 같으면 유의성 없음(Duncan's multiple range test,  $\alpha=0.05$ ). 평균±표준편차 (n=25)

Table 3.2.72의 관능검사 결과 커피 크리머 대비 0.05% 및 0.1%의 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 첨가한 제품에 관해 외관의 기호도, 이미/이취의 정도 및 종합 선호도 측면에서는 Control 대비 유의적 차이를 보이지 않았다.

우유, 요쿠르트, 주스, EN영양식, 커피분말 총 5종 제품에 대한 관능검사 결과를 종합해보면, 실험 범위 내에서 고도불포화 지방산 함유 지질 미세캡슐 제형이 첨가된 모든 제품군의 외관적 특성 변화 및 고유색은 변하지 않았다. 또한 Control 대비 이미/이취 정도 및 종합선호도의 변화가 발생하지 않았다. 이러한 결과로부터 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형을 외관의 기호도, 이미/이취 정도 및 종합선호도의 관능적 변화 없이 우유, 요쿠르트, 주스, EN영양식, 커피분말 제품에 적용할 수 있음을 확인하였다.



(5) Encapsulation시킨 고도불포화 지방산 강화 제품의 안정성 테스트

각 제품의 유통기한 내 고도불포화 지방산 강화 제품의 저장 안정성을 확인하기 위하여 기간에 따른 침전 유무 및 색도 변화 여부를 관찰하였다. 각 시료 별 농도에 맞춰 고도불포화 지방산 함유 지질 미세캡슐 제형을 첨가하고(Table 3.2.73 저농도로 첨가), 요구르트를 제외한 우유, 주스 및 EN 영양식은 85°C에서 30분간 저온 살균하였다. 이 후 우유 및 요구르트는 7일, 주스는 25일, EN 영양식은 1년 동안 냉장보관 하면서 시간 경과에 따라 침전발생 및 색도 변화 여부를 확인하였다.

Table 3.2.73 Precipitation test for the products with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids during storage

제품	1일차	2일차	3일차	4일차	5일차	6일차	7일차	측정 간격
우유	×	×	×	×	×	×	×	1일
요구르트	×	×	×	×	×	×	×	1일
제품	0일차	5일차	10일차	15일차	20일차	25일차	-	측정 간격
오렌지 주스	×	×	×	×	×	×	-	5일
제품	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월	7개월	측정 간격
EN영양식	×	×	×	×	×	진행	-	1달

Table 3.2.74 Color-change test for the products with microencapsulated lipid containing polyunsaturated fatty acids during storage

제품	1일차	2일차	3일차	4일차	5일차	6일차	7일차	측정간격
우유	×	×	×	×	×	×	×	1일
요구르트	×	×	×	×	×	×	×	1일
제품	0일차	5일차	10일차	15일차	20일차	25일차	-	측정 간격
오렌지 주스	×	×	×	×	×	×	-	5일
제품	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월	7개월	측정 간격
EN영양식	×	×	×	×	×	진행	-	1달

고도불포화 지방산 함유 지질 미세캡슐 제형 첨가 우유, 요구르트 및 주스 제품에서는 냉장 저장 기간 동안 침전발생 및 색도의 변화가 관찰되지 않았으며, EN 영양식에서도 5개월의 저장 기간 동안 침전 및 색도 변화는 발생하지 않았다. 이 결과를 통하여 침전발생 및 색도 변화 측면에서 고도불포화 지방산 함유 지질 미세캡슐 제형이 제품의 저장 안정성에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

(6) Multilayered fish oil emulsions의 Pork patties 적용 시 품질 특성

본 연구는 2차 년도 연구에서 수립된 제조 조건으로 만든 1,2,3차 에멀전을 첨가하여 pork

patties를 제조함으로써 pork patties에 불포화 지방산을 함유한 기능성 패티를 제조하고 그 특성을 관찰하고자 하였다. 일반적으로 pork patties는 지방함량이 높고 특히 포화지방산 및 콜레스테롤을 많이 함유하고 있기 때문에 심장질환 및 당뇨, 비만에 매우 위험하다고 알려져 있다. 이러한 단점을 극복하고자 다가불포화지방산을 많이 함유하고 있는 어유를 첨가해줌으로써 기능성을 보유하고 좋지 않은 지방을 양질의 지방으로 대체함으로써 patties의 품질을 향상시키고자 하였다. 또한 어유의 off-flavor 및 지질의 유화능을 향상시키고자 에멀전 형태로 가용화시킨 후 patties에 첨가하였으며, patties 제조에 따른 formulation은 Table 3.2.75에 제시하였다.

Table 3.2.75 Formulation of pork meat patties with various levels of multi-layered fish oil emulsions without or with cinnamon oil

Ingredients	Control	Treatments <sup>1)</sup>					
		(Units: %)					
		F1	F2	F3	FC1	FC2	FC3
Pork meat	75	75	75	75	75	75	75
Pork fat	15	15	15	15	15	15	15
Cold water	10	8	6	2	8	6	2
Fish oil emulsions	0	2	4	8	2	4	8
salt	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

<sup>1)</sup>Control, pork patties without fish oil emulsions; F1, pork patties with primary-fish oil (1%) emulsion; F2, pork patties with secondary-fish oil (0.5%) emulsion; F3, pork patties with tertiary fish oil (0.25%) emulsion; FC1, pork patties with primary-fish oil (1%) emulsion added to cinnamon oil (0.05%); FC2, pork patties with secondary-fish oil (0.5%) emulsion added to cinnamon oil (0.025%); FC3, pork patties with tertiary-fish oil (0.25%) emulsion added to cinnamon oil (0.0125%).

○ 이화학적 특성 : 색도, pH, 보수력, 수분함량

본 연구에서는 위의 Formulation을 이용하여 어유를 함유한 pork patties를 제조한 다음 pH, 색도, 보수력, 수분함량과 같은 이화학적 품질 특성을 조사하였다(Table 3.2.76, 3.2.77). 제조된 샘플은 냉장보관하면서 20일 동안 실험을 진행하였다. 먼저 pork patties의 색도 측정 결과, 색도는 L, a, b값으로 나누어 측정하였다. pork patties의 L값은 저장기간 동안 유의적으로 증가하는 경향을 보였으나 b값은 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 a값은 육제품의 색안정도를 판단하는 기준으로 알려져 있으며, 본 연구에서 a값은 유의적으로 변화하지 않았기 때문에 어유 에멀전이 첨가하더라도 육제품에 영향을 끼치지 않았음을 확인할 수 있었다.

Table 3.2.76은 pork patties의 pH측정 결과로써 저장기간 pH는 5.60에서 5.00으로 상당히 감소하였으며, 특히 2차 에멀전을 첨가하여 제조된 pork patties는 control인 fresh patties 보다 pH값이 낮게 측정되었다.

Cooking loss의 측정결과를 살펴보면, fresh patties는 에멀전을 첨가한 다른 pork patties에 비하여 낮은 수분과 지방함량을 지니고 있기 때문에 cooking loss 값 또한 가장 낮은 수치를 나타내었다. 저장기간 동안 모든 patties는 꾸준히 증가되는 경향을 나타내었다. 그러나 보수력과 수분함량 측정값은 저장기간 동안 유의적인 차이를 보이지 않았다. cooking loss가 육제품에서 보수력과 매우 밀접한 관련 있다는 연구와, 수분함량이 color의 명도와 연관되어있음을 설명하는 연구도 있으나, 우리의 연구에서는 저장기간 동안 patties의 명도가 증가함에도 불구하고 수분함량은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러므로 multilayered FO emulsions은 육제품 품질의 손상 없이 patties와 같은 육제품에 적용가능 할 것이라고 생각하였다.

○ 물성학적 특성

제조된 pork patties의 물성학적 변화는 Table 3.2.78에 나타내었다. 물성학적 변화는 hardness, cohesiveness, springiness를 측정하였으며, 저장기간 동안 모든 patties는 유의적인 차이를 나타내어지지 않았다. 그러므로 첨가된 예멀전은 pork patties의 물성에 영향을 끼치지 않으면서 이를 육제품의 적용할 경우 물성학적 변화를 최소화한 제품을 제조할 수 있을 것이라 사료된다.

Table 3.2.76 Change in CIE color of pork patties with various levels of multi-layered fish oil emulsions during refrigerated storage

Treatments <sup>1)</sup>	Storage periods (days)									
	0		5		10		15		20	
<b>CIE L*</b>										
Control	59.48	± 0.84 <sup>Dd*</sup>	59.61	± 0.754 <sup>Dd</sup>	63.17	± 0.792 <sup>Dc</sup>	64.59	± 0.854 <sup>Db</sup>	66.53	± 0.278 <sup>Ba</sup>
F1	65.87	± 1.149 <sup>Ab</sup>	64.06	± 0.565 <sup>Cc</sup>	67.15	± 1.013 <sup>BCab</sup>	67.90	± 0.726 <sup>Bca</sup>	68.30	± 0.465 <sup>Aa</sup>
F2	64.27	± 0.653 <sup>BCd</sup>	65.89	± 0.426 <sup>Bc</sup>	67.60	± 0.65 <sup>BCb</sup>	67.34	± 0.19 <sup>Cb</sup>	69.02	± 0.652 <sup>Aa</sup>
F3	65.65	± 0.656 <sup>Abd</sup>	66.69	± 0.431 <sup>Abc</sup>	69.21	± 0.639 <sup>Ab</sup>	69.26	± 0.442 <sup>Ab</sup>	68.52	± 0.399 <sup>Aa</sup>
FC1	64.58	± 0.295 <sup>ABCc</sup>	65.91	± 0.262 <sup>Bb</sup>	66.33	± 0.838 <sup>Cb</sup>	68.23	± 0.098 <sup>ABCa</sup>	68.08	± 0.715 <sup>Aa</sup>
FC2	65.39	± 0.623 <sup>ABCc</sup>	67.27	± 0.103 <sup>Ab</sup>	67.30	± 0.835 <sup>BCb</sup>	68.58	± 0.662 <sup>ABa</sup>	69.14	± 0.798 <sup>Aa</sup>
FC3	64.22	± 0.641 <sup>Cb</sup>	66.36	± 0.44 <sup>Bc</sup>	68.59	± 0.711 <sup>ABa</sup>	68.40	± 0.407 <sup>ABa</sup>	68.50	± 1.055 <sup>Aa</sup>
<b>CIE a*</b>										
Control	7.44	± 0.298 <sup>Bb</sup>	8.60	± 0.198 <sup>Aa</sup>	7.11	± 0.395 <sup>Cb</sup>	7.83	± 0.913 <sup>ABab</sup>	7.44	± 0.298 <sup>Abb</sup>
F1	5.69	± 0.603 <sup>Db</sup>	7.73	± 0.591 <sup>Bca</sup>	7.67	± 0.213 <sup>Aba</sup>	7.85	± 0.148 <sup>Aa</sup>	7.49	± 0.322 <sup>Aa</sup>
F2	6.55	± 0.23 <sup>Cc</sup>	7.36	± 0.099 <sup>Cb</sup>	7.97	± 0.216 <sup>Aa</sup>	7.74	± 0.088 <sup>ABab</sup>	6.70	± 0.347 <sup>Bc</sup>
F3	7.50	± 0.038 <sup>Ba</sup>	7.39	± 0.384 <sup>Cab</sup>	7.36	± 0.115 <sup>BCab</sup>	6.82	± 0.372 <sup>Cc</sup>	6.98	± 0.086 <sup>ABbc</sup>
FC1	6.40	± 0.07 <sup>Cc</sup>	7.33	± 0.195 <sup>Cab</sup>	7.54	± 0.22 <sup>ABCa</sup>	7.08	± 0.437 <sup>ABCab</sup>	6.95	± 0.352 <sup>ABb</sup>
FC2	6.96	± 0.173 <sup>BCb</sup>	8.01	± 0.115 <sup>Ba</sup>	7.99	± 0.367 <sup>Aa</sup>	7.61	± 0.516 <sup>ABCa</sup>	6.68	± 0.268 <sup>Bb</sup>
FC3	8.32	± 0.591 <sup>Aa</sup>	6.40	± 0.204 <sup>Dc</sup>	7.24	± 0.127 <sup>BCb</sup>	6.94	± 0.255 <sup>BCbc</sup>	7.00	± 0.484 <sup>Abbc</sup>
<b>CIE b*</b>										
Control	8.14	± 0.038 <sup>Ba</sup>	8.18	± 0.251 <sup>Ca</sup>	5.95	± 0.229 <sup>Cc</sup>	7.10	± 0.163 <sup>Cb</sup>	6.13	± 0.378 <sup>Cc</sup>
F1	8.76	± 0.455 <sup>Ba</sup>	8.64	± 0.66B <sup>Ca</sup>	7.94	± 0.601 <sup>Ba</sup>	8.66	± 0.527 <sup>Aa</sup>	8.43	± 0.362 <sup>Aa</sup>
F2	10.28	± 0.128 <sup>Aa</sup>	9.46	± 0.411 <sup>Abb</sup>	8.14	± 0.605 <sup>Bc</sup>	8.29	± 0.132 <sup>Abc</sup>	7.90	± 0.074 <sup>Abc</sup>
F3	9.93	± 0.416 <sup>Aa</sup>	8.37	± 0.297 <sup>Cb</sup>	8.18	± 0.386 <sup>Bbc</sup>	7.72	± 0.267 <sup>BCc</sup>	7.60	± 0.146 <sup>Bbc</sup>
FC1	9.86	± 0.198 <sup>Aa</sup>	8.29	± 0.238 <sup>Cab</sup>	8.51	± 0.151 <sup>Abb</sup>	7.56	± 0.279 <sup>Cac</sup>	7.28	± 0.19 <sup>Bc</sup>
FC2	10.30	± 0.427 <sup>Aa</sup>	9.26	± 0.168 <sup>ABb</sup>	9.02	± 0.464 <sup>Ab</sup>	8.87	± 0.557 <sup>Ab</sup>	7.74	± 0.426 <sup>Bc</sup>
FC3	10.21	± 0.821 <sup>Aa</sup>	9.76	± 0.811 <sup>Aa</sup>	8.20	± 0.076 <sup>Bbc</sup>	8.65	± 0.332 <sup>Ab</sup>	7.25	± 0.596 <sup>Bc</sup>
<b>Total color difference (ΔE)</b>										
Control			1.34	0.05 <sup>Fc</sup>	4.34	0.71 <sup>Db</sup>	5.30	0.73 <sup>Db</sup>	7.35	0.36 <sup>Ba</sup>
F1	6.67	± 1.27 <sup>Ab</sup>	4.68	± 0.46 <sup>Ec</sup>	7.70	± 0.99 <sup>BCab</sup>	8.46	± 0.75 <sup>BCa</sup>	8.83	± 0.45 <sup>Aa</sup>
F2	5.34	± 0.59 <sup>Ad</sup>	6.55	± 0.49 <sup>CDc</sup>	8.16	± 0.64 <sup>BCb</sup>	7.88	± 0.19 <sup>Cb</sup>	9.58	± 0.68 <sup>Aa</sup>
F3	6.44	± 0.71 <sup>Ab</sup>	7.23	± 0.42 <sup>Bb</sup>	9.74	± 0.64 <sup>Aa</sup>	9.82	± 0.45 <sup>Aa</sup>	9.08	± 0.40 <sup>Aa</sup>
FC1	5.49	± 0.29 <sup>Ac</sup>	6.45	± 0.26 <sup>Db</sup>	6.87	± 0.83 <sup>Cb</sup>	8.79	± 0.10 <sup>BCa</sup>	8.67	± 0.68 <sup>Aa</sup>
FC2	6.34	± 0.42 <sup>Ac</sup>	7.90	± 0.09 <sup>Ab</sup>	7.91	± 0.82 <sup>BCb</sup>	9.15	± 0.64 <sup>ABa</sup>	9.71	± 0.82 <sup>Aa</sup>
FC3	5.29	± 0.87 <sup>Ac</sup>	7.18	± 0.48 <sup>BCb</sup>	9.12	± 0.71 <sup>ABa</sup>	8.96	± 0.38 <sup>ABa</sup>	9.10	± 1.03 <sup>Aa</sup>

<sup>1)</sup>Control, pork patties without fish oil emulsions; F1, pork patties with primary- fish oil (1%) emulsion; F2, pork patties with secondary- fish oil (0.5%) emulsion; F3, pork patties with tertiary fish oil (0.25%) emulsion; FC1, pork patties with primary- fish oil (1%) emulsion added to cinnamon oil (0.05%); ; FC2, pork patties with secondary- fish oil (0.5%) emulsion added to cinnamon oil (0.025%); FC3, pork patties with tertiary- fish oil (0.25%) emulsion added to cinnamon oil (0.0125%). \*Mean ± standard deviation of triplicate determinations (n=3). <sup>A-G</sup> Means with different superscripts within the same column are significantly different (p<0.05). <sup>a-e</sup> Means with different superscripts within the same row are significantly different (p<0.05).

Table 3.2.77 Change in pH, cooking loss, water holding capacity, and moisture contents value of pork patties with various levels of multi-layered fish oil emulsions during refrigerated storage

Treatments <sup>1)</sup>	Storage periods (days)									
	0		5		10		15		20	
<b>pH</b>										
Control	5.54	± 0.01 <sup>Ba*</sup>	5.46	± 0.02 <sup>Ab</sup>	5.17	± 0.02 <sup>Cc</sup>	5.05	± 0.02 <sup>Ce</sup>	5.10	± 0.03 <sup>Cd</sup>
F1	5.53	± 0.04 <sup>Ba</sup>	5.45	± 0.02 <sup>Ab</sup>	5.14	± 0.01 <sup>Cc</sup>	5.05	± 0.02 <sup>Cd</sup>	5.14	± 0.02 <sup>Dd</sup>
F2	5.49	± 0.01 <sup>Ca</sup>	5.30	± 0.01 <sup>Db</sup>	5.16	± 0.01 <sup>Cc</sup>	5.08	± 0.03 <sup>Cd</sup>	5.18	± 0.06 <sup>DCd</sup>
F3	5.58	± 0.01 <sup>Aa</sup>	5.40	± 0.01 <sup>Bb</sup>	5.25	± 0.01 <sup>Ac</sup>	5.15	± 0.03 <sup>Bd</sup>	5.19	± 0.03 <sup>ABd</sup>
FC1	5.60	± 1.09 <sup>Aa</sup>	5.40	± 0.01 <sup>Bb</sup>	5.21	± 0.00 <sup>Bc</sup>	5.15	± 0.02 <sup>Bd</sup>	5.23	± 0.08 <sup>Bd</sup>
FC2	5.46	± 0.01 <sup>Da</sup>	5.28	± 0.01 <sup>Eb</sup>	5.08	± 0.01 <sup>Dc</sup>	5.00	± 0.01 <sup>Dd</sup>	5.01	± 0.04 <sup>Ed</sup>
FC3	5.54	± 0.01 <sup>Ba</sup>	5.36	± 0.02 <sup>Cb</sup>	5.22	± 0.03 <sup>ABc</sup>	5.19	± 0.03 <sup>Ac</sup>	5.11	± 0.02 <sup>Ac</sup>
<b>Cooking loss (%)</b>										
control	15.88	± 1.93 <sup>Bc</sup>	19.48	± 1.36 <sup>Cb</sup>	17.95	± 0.29 <sup>Cbc</sup>	25.83	± 2.57 <sup>Aa</sup>	25.00	± 0.5 <sup>ABa</sup>
F1	17.22	± 0.83 <sup>ABc</sup>	18.71	± 0.17 <sup>Cbc</sup>	19.68	± 2.29 <sup>ABb</sup>	24.67	± 1.26 <sup>Aa</sup>	25.17	± 0.29 <sup>ABa</sup>
F2	19.19	± 1.01 <sup>ACc</sup>	22.06	± 0.68 <sup>ABb</sup>	23.28	± 1.48 <sup>Aab</sup>	25.17	± 1.04 <sup>Aa</sup>	25.17	± 1.04 <sup>ABa</sup>
F3	18.75	± 1.18 <sup>Ad</sup>	21.03	± 0.35 <sup>ABc</sup>	19.93	± 0.24 <sup>BCDc</sup>	26.17	± 0.76 <sup>Aa</sup>	23.17	± 1.04 <sup>Bb</sup>
FC1	18.16	± 1.46 <sup>ACc</sup>	19.53	± 1.08 <sup>Cbc</sup>	21.41	± 0.6 <sup>ABbc</sup>	25.17	± 1.26 <sup>Aa</sup>	24.50	± 0.5 <sup>ABa</sup>
FC2	18.93	± 0.61 <sup>Ab</sup>	20.93	± 0.69 <sup>Bb</sup>	19.67	± 0.89 <sup>BCb</sup>	26.33	± 3.4 <sup>Aa</sup>	25.67	± 1.04 <sup>Aa</sup>
FC3	18.47	± 0.92 <sup>Ad</sup>	22.40	± 0.25 <sup>Ac</sup>	21.99	± 0.21 <sup>ABc</sup>	25.83	± 1.26 <sup>Aa</sup>	24.33	± 0.29 <sup>ABb</sup>
<b>Water holding capacity (%)</b>										
control	79.79	± 3.01 <sup>Aab</sup>	83.48	± 5.6 <sup>Aa</sup>	81.48	± 0.63 <sup>BCab</sup>	76.04	± 5.33 <sup>Ab</sup>	74.91	± 0.83 <sup>Db</sup>
F1	80.57	± 2.97 <sup>Abc</sup>	86.10	± 3.63 <sup>Aa</sup>	82.93	± 2.47 <sup>BCab</sup>	76.23	± 0.83 <sup>Accd</sup>	74.51	± 2.33 <sup>Dd</sup>
F2	81.90	± 3.51 <sup>Aab</sup>	85.02	± 2.7 <sup>Aa</sup>	81.17	± 3.6 <sup>BCab</sup>	77.39	± 2.09 <sup>Ab</sup>	78.41	± 1.31 <sup>BCb</sup>
F3	78.82	± 5.67 <sup>Ab</sup>	88.57	± 2.48 <sup>Aa</sup>	87.00	± 1.06 <sup>Aa</sup>	85.12	± 4.28 <sup>Aab</sup>	84.98	± 0.52 <sup>Aab</sup>
FC1	81.50	± 3.51 <sup>Ab</sup>	89.20	± 1.92 <sup>Aa</sup>	84.75	± 2.32 <sup>ABab</sup>	81.46	± 1.57 <sup>Aab</sup>	83.16	± 2.54 <sup>Aab</sup>
FC2	77.24	± 4.37 <sup>Aa</sup>	85.75	± 2.28 <sup>Aa</sup>	80.53	± 0.75 <sup>Ca</sup>	78.15	± 12.15 <sup>Aa</sup>	76.80	± 0.45 <sup>CDa</sup>
FC3	81.86	± 1.31 <sup>Abc</sup>	84.95	± 2.48 <sup>Aa</sup>	82.76	± 0.23 <sup>BCab</sup>	75.51	± 1.44 <sup>Ac</sup>	79.73	± 0.71 <sup>Bc</sup>
<b>Moisture contents (%)</b>										
control	64.58	± 2.87 <sup>Aa</sup>	67.40	± 0.35 <sup>Aa</sup>	67.10	± 0.49 <sup>Aa</sup>	66.35	± 1.15 <sup>Aa</sup>	64.21	± 2.47 <sup>Aa</sup>
F1	65.42	± 2.14 <sup>Aab</sup>	66.03	± 0.9A <sup>Bab</sup>	66.40	± 0.27 <sup>ABa</sup>	65.85	± 0.08 <sup>Aab</sup>	63.96	± 1.21 <sup>Ab</sup>
F2	65.23	± 1.22 <sup>Ac</sup>	67.45	± 0.11 <sup>Aa</sup>	67.08	± 0.49 <sup>Aab</sup>	65.73	± 0.26 <sup>Abc</sup>	65.20	± 1.11 <sup>Ac</sup>
F3	65.22	± 2.25 <sup>Aa</sup>	66.23	± 0.4A <sup>Ba</sup>	66.08	± 1.32 <sup>ABCa</sup>	66.19	± 0.72 <sup>Aa</sup>	64.62	± 2.88 <sup>Aa</sup>
FC1	65.47	± 1.31 <sup>Aa</sup>	64.90	± 1.01 <sup>Ba</sup>	65.53	± 0.74 <sup>ABC</sup>	65.74	± 0.41 <sup>Aa</sup>	65.29	± 0.97 <sup>Aa</sup>
FC2	64.34	± 1.72 <sup>Aa</sup>	65.72	± 1.58 <sup>Ba</sup>	64.50	± 1.68 <sup>Ca</sup>	65.74	± 1.59 <sup>Aa</sup>	66.03	± 0.69 <sup>Aa</sup>
FC3	64.50	± 1.48 <sup>Aa</sup>	65.33	± 0.83 <sup>Ba</sup>	65.24	± 0.71 <sup>BCa</sup>	64.89	± 0.53 <sup>Aa</sup>	65.62	± 0.59 <sup>Aa</sup>

<sup>1)</sup>Control, pork patties without fish oil emulsions; F1, pork patties with primary- fish oil (1%) emulsion; F2, pork patties with secondary- fish oil (0.5%) emulsion; F3, pork patties with tertiary fish oil (0.25%) emulsion; FC1, pork patties with primary- fish oil (1%) emulsion added to cinnamon oil (0.05%); ; FC2, pork patties with secondary- fish oil (0.5%) emulsion added to cinnamon oil (0.025%); FC3, pork patties with tertiary- fish oil (0.25%) emulsion added to cinnamon oil (0.0125%). \*Mean ± standard deviation of triplicate determinations (n-3). <sup>A-G</sup> Means with different superscripts within the same column are significantly different (p<0.05). <sup>a-e</sup> Means with different superscripts within the same row are significantly different(p<0.05).

Table 3.2.78 Change in hardness, cohesiveness, and springiness of pork patties with various levels of multi-layered fish oil emulsions during refrigerated storage

Treatments <sup>1)</sup>	Storage periods (days)									
	0		5		10		15		20	
<b>Hardness (g)</b>										
Control	1532	± 29 <sup>b*</sup>	1747	± 117 <sup>a</sup>	1466	± 202 <sup>ab</sup>	1643	± 135 <sup>ab</sup>	2081	± 197 <sup>ab</sup>
F1	1467	± 134 <sup>b</sup>	1753	± 100 <sup>ab</sup>	1611	± 139 <sup>ab</sup>	1555	± 91 <sup>ab</sup>	1686	± 110 <sup>a</sup>
F2	1334	± 89 <sup>b</sup>	1540	± 121 <sup>ab</sup>	1581	± 213 <sup>b</sup>	1625	± 121 <sup>ab</sup>	1828	± 238 <sup>ab</sup>
F3	1418	± 180 <sup>a</sup>	1669	± 50 <sup>a</sup>	1467	± 190 <sup>a</sup>	1638	± 116 <sup>a</sup>	1894	± 40 <sup>a</sup>
FC1	1579	± 245 <sup>a</sup>	1621	± 152 <sup>a</sup>	1550	± 82 <sup>a</sup>	1770	± 77 <sup>a</sup>	1831	± 69 <sup>a</sup>
FC2	1290	± 166 <sup>b</sup>	1699	± 165 <sup>a</sup>	1377	± 149 <sup>b</sup>	1751	± 355 <sup>a</sup>	1722	± 348 <sup>a</sup>
FC3	1445	± 159 <sup>a</sup>	1869	± 79 <sup>a</sup>	1483	± 166 <sup>a</sup>	1828	± 79 <sup>a</sup>	1988	± 260 <sup>a</sup>
<b>Cohesiveness</b>										
Control	0.60	± 0.012 <sup>a</sup>	0.59	± 0.015 <sup>a</sup>	0.54	± 0.038 <sup>b</sup>	0.55	± 0.038 <sup>b</sup>	0.56	± 0.023 <sup>b</sup>
F1	0.58	± 0.017 <sup>a</sup>	0.58	± 0 <sup>a</sup>	0.53	± 0.017 <sup>a</sup>	0.51	± 0.046 <sup>a</sup>	0.50	± 0.02 <sup>a</sup>
F2	0.55	± 0.053 <sup>a</sup>	0.59	± 0.089 <sup>ab</sup>	0.52	± 0.015 <sup>b</sup>	0.49	± 0.049 <sup>ab</sup>	0.53	± 0.055 <sup>ab</sup>
F3	0.58	± 0.025 <sup>a</sup>	0.55	± 0.049 <sup>a</sup>	0.50	± 0.075 <sup>b</sup>	0.57	± 0.006 <sup>b</sup>	0.56	± 0.026 <sup>ab</sup>
FC1	0.58	± 0.012 <sup>a</sup>	0.61	± 0.025 <sup>a</sup>	0.51	± 0.061 <sup>a</sup>	0.51	± 0.025 <sup>a</sup>	0.56	± 0.026 <sup>a</sup>
FC2	0.55	± 0.026 <sup>a</sup>	0.59	± 0.015 <sup>ab</sup>	0.35	± 0.309 <sup>bc</sup>	0.53	± 0.053 <sup>bc</sup>	0.51	± 0.055 <sup>c</sup>
FC3	0.60	± 0.006 <sup>a</sup>	0.58	± 0.015 <sup>a</sup>	0.53	± 0.035 <sup>b</sup>	0.52	± 0.021 <sup>b</sup>	0.51	± 0.064 <sup>b</sup>
<b>Springiness (mm)</b>										
Control	3.45	± 0.112 <sup>ab</sup>	3.74	± 0.047 <sup>ab</sup>	3.32	± 0.295 <sup>b</sup>	3.67	± 0.091 <sup>ab</sup>	3.66	± 0.101 <sup>ab</sup>
F1	3.33	± 0.143 <sup>b</sup>	3.62	± 0.029 <sup>a</sup>	3.47	± 0.074 <sup>ab</sup>	3.49	± 0.068 <sup>ab</sup>	3.50	± 0.139 <sup>ab</sup>
F2	3.46	± 0.268 <sup>a</sup>	3.61	± 0.186 <sup>a</sup>	3.48	± 0.092 <sup>a</sup>	3.54	± 0.081 <sup>a</sup>	3.53	± 0.105 <sup>a</sup>
F3	3.52	± 0.121 <sup>a</sup>	3.55	± 0.084 <sup>a</sup>	3.50	± 0.24 <sup>a</sup>	3.62	± 0.2 <sup>a</sup>	3.67	± 0.096 <sup>a</sup>
FC1	3.55	± 0.121 <sup>bc</sup>	3.74	± 0.1 <sup>a</sup>	3.55	± 0.071 <sup>bc</sup>	3.49	± 0.056 <sup>c</sup>	3.69	± 0.056 <sup>ab</sup>
FC2	3.44	± 0.118 <sup>b</sup>	3.75	± 0.045 <sup>a</sup>	3.39	± 0.136 <sup>b</sup>	3.57	± 0.185 <sup>ab</sup>	3.55	± 0.159 <sup>ab</sup>
FC3	3.43	± 0.127 <sup>ab</sup>	3.64	± 0.055 <sup>a</sup>	3.36	± 0.127 <sup>b</sup>	3.69	± 0.139 <sup>a</sup>	3.50	± 0.2 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>Control, pork patties without fish oil emulsions; F1, pork patties with primary- fish oil (1%) emulsion; F2, pork patties with secondary- fish oil (0.5%) emulsion; F3, pork patties with tertiary fish oil (0.25%) emulsion; FC1, pork patties with primary- fish oil (1%) emulsion added to cinnamon oil (0.05%); ; FC2, pork patties with secondary- fish oil (0.5%) emulsion added to cinnamon oil (0.025%); FC3, pork patties with tertiary- fish oil (0.25%) emulsion added to cinnamon oil (0.0125%). \*Mean ± standard deviation of triplicate determinations (n=3). <sup>A-G</sup> Means with different superscripts within the same column are significantly different (p<0.05). <sup>a-e</sup> Means with different superscripts within the same row are significantly different(p<0.05).

○ 미생물학적 특성

Figure 3.2.171은 저장기간 동안 multilayered FO를 첨가한 pork patties의 미생물학적 변화를 측정된 그림이다. Total viable count(TCV)는 저장기간 동안 5 log CFU/g 에서 6.46 log CFU/g 으로 꾸준히 증가하는 경향을 나타내었다. 특히, 3차 에멀전을 첨가하여 제조한 pork patties의 경우 다른 샘플들에 비하여 상당히 낮은 수치를 보여주었다. 그런, 시나몬 오일 첨가에 따른 효과는 나타나지 않았다. 이는 첨가된 시나몬의 양이 매우 소량으로 첨가되었기 때문에 pork patties의 미생물학적 효과를 검증하지 못한 것으로 사료된다.

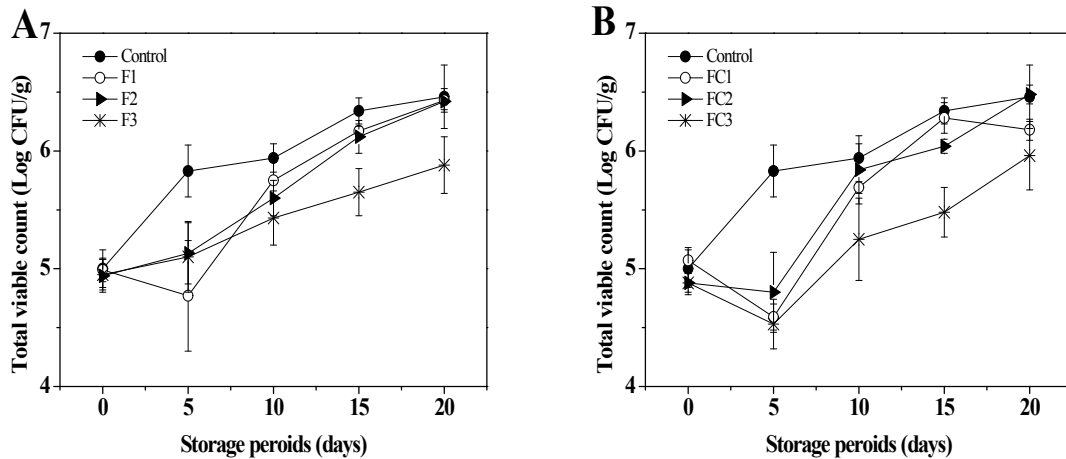


Figure 3.2.171 Change in total viable count of pork patties with various levels of multilayered fish oil emulsions during refrigerated storage.

Control, pork patties without fish oil emulsions; F1, pork patties with primary fish oil (1%) emulsion; F2, pork patties with secondary fish oil (0.5%) emulsion; F3, pork patties with tertiary fish oil (0.25%) emulsion; FC1, pork patties with primary fish oil (1%) emulsion added to cinnamon oil (0.05%); FC2, pork patties with secondary fish oil (0.5%) emulsion added to cinnamon oil (0.025%); FC3, pork patties with tertiary fish oil (0.25%) emulsion added to cinnamon oil (0.0125%).

(라) 지방산패도 측정

Figure 3.2.172는 저장기간 동안 multilayered FO를 첨가한 pork patties의 지방산패도를 나타낸 결과이다. during storage. 지방산패도는 TBARs values를 통해 측정하였다. 지방산패도 측정 결과를 살펴보면, multilayered FO를 첨가한 pork patties는 fresh pork patties 보다 TBARs 수치가 매우 높게 측정되었으며, 이는 첨가된 어유와 시나몬 오일을 영향으로 생각된다. 즉, 레이어 막에 포집되지 않은 오일들의 산패가 발생함으로써 저장기간 동안 TBARs의 수치를 증가시킨 것이라 사료된다. 또한, 본 측정 결과로부터 저장기간 동안 모든 샘플의 TBARs 수치는 증가하는 경향을 나타내었다. 20일 저장 이후, control, F1, F2, F3, FC1, FC2, FC3의 TBARs 수치는 각각 2.14, 6.53, 5.80, 4.54, 5.08, 4.85, 4.44 mg malonaldehyde/kg으로 측정되었으며, 본 연구 결과로 미루어 볼 때 코팅레이어의 수가 증가할수록 지방산패도를 저해함을 예측할 수 있었다. 즉, 코팅레이어 수가 적을수록 free 어유가 더 많이 릴리즈 되기 때문에 더 빠르게 산화를 가속화 시켰을 것이라 생각된다.

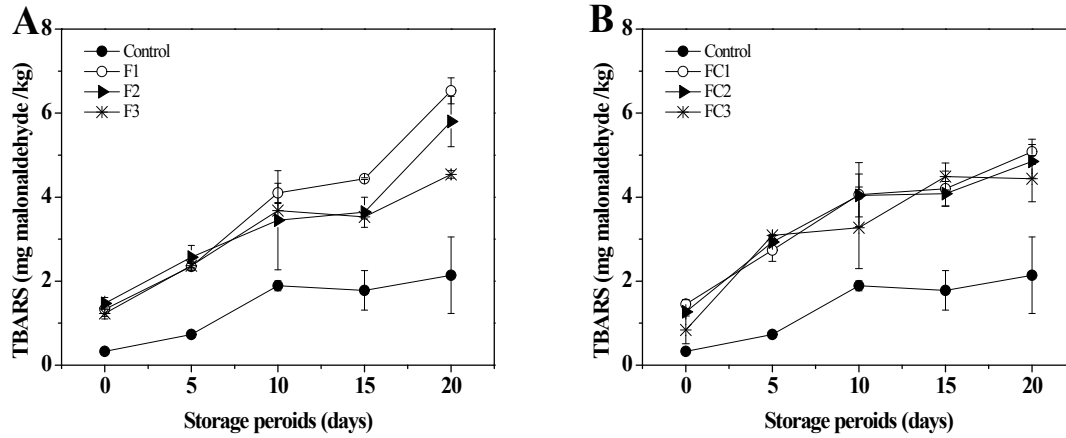


Figure 3.2.172 Change in TBARS of pork patties with various levels of multilayered fish oil emulsions during refrigerated storage. Control, pork patties without fish oil emulsions; F1, pork patties with primary fish oil (1%) emulsion; F2, pork patties with secondary fish oil (0.5%) emulsion; F3, pork patties with tertiary fish oil (0.25%) emulsion; FC1, pork patties with primary fish oil (1%) emulsion added to cinnamon oil (0.05%); FC2, pork patties with secondary fish oil (0.5%) emulsion added to cinnamon oil (0.025%); FC3, pork patties with tertiary fish oil (0.25%) emulsion added to cinnamon oil (0.0125%).



### 3. 제 3협동과제 : 난용성 소재 가용화에 따른 기능성 및 안정성 평가

#### 가. 가용화 지방산 소재의 흡수율 및 활성평가

##### (1) 가용화 지질의 흡수율 평가

###### ○ Fish oil의 혈중농도 측정

Fish oil의 혈중농도를 측정하기 위해 5주령의 수컷 SD 쥐(200±20 g)를 24시간 공복시킨 후 다섯 그룹으로 나누어 각각의 sample을 경구투여 하였다. DA1(crude한 100% oil)은 160 µl, DA5•6와 NS5•6(emulsion화된 oil)는 각각 2 mL씩 경구투여 하였다. 경구투여 0, 4, 24, 48 시간 경과 후 실험동물의 미정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리하여 serum으로 만들고 혈중 지방산 농도를 측정하기 위해 AOAC의 법으로 methylation 한 후 Gas chromatograph (Hewlett Packard 5890, USA)로 분석하였다. 시료의 특성은 Table 3.2.79과 같다.

Table 3.2.79 Sample information

No.	Sample	Concentration	Additional ingredient
<b>DA1</b>	Control (DA 100%)		-
<b>DA2</b>	DA	1.00%	Lecithin+DW
<b>DA3</b>	DA	0.33%	Lecithin+Chitosan solution
<b>DA4</b>	DA	0.17%	Lecithin+Chitosan solution+Low methoxyl pectin solution
<b>DA5</b>	DA	4%	Lecithin (0.4%)
<b>DA6</b>	DA	8%	Lecithin (0.6%)
<b>NS1</b>	Control (NS 100%)		-
<b>NS2</b>	NS	1.00%	Lecithin+DW
<b>NS3</b>	NS	0.33%	Lecithin+Chitosan solution
<b>NS4</b>	NS	0.17%	Lecithin+Chitosan solution+Low methoxyl pectin solution
<b>NS5</b>	NS	4%	Lecithin (0.4%)
<b>NS6</b>	NS	8%	Lecithin (0.6%)

###### ○ Intestine across everted intestinal sac을 이용한 장 흡수율

Fish oil의 장 흡수율은 Mahomoodally의 방법을 이용하였다. 5주령의 수컷 SD 쥐 (200±20 g)를 12시간 공복 시킨 후 diethyl ether로 마취하여 희생하고 소장을 재빨리 취해서 세척한 후 공장 시작 부분의 10 cm를 취하였다. 유리 막대를 이용하여 장을 뒤집은 후 한 쪽 끝을 수술용 실을 이용해 묶고 0.1% glucose을 함유한 Krebs-Henseleit bicarbonate (KHB) buffer (pH 7.4) 1 mL을 serosal fluid(inner compartment)로 넣은 후 다른 한 쪽을 묶어 장 주머니를 만들었다. 장 주머니를 Fish oil sample 0.5 mL와 KHB buffer 29.5 mL가 함유된 mucosal fluid(outer compartment)에 넣었다. 실험하는 동안 buffer를 400×g으로 교반하면서 water jacket을 이용해 37°C을 유지하도록 하고 5% CO<sub>2</sub>와 95% O<sub>2</sub>을 계속적으로 공급하였다. 주머니 안과 밖의 시료는 반응 후 30분에 채취하여 GC로 분석하여 농도를 계산하였다.

###### ○ Franz-type diffusion cell을 이용한 Fish oil의 피부투과율

Fish oil의 피부투과율은 Sonavan 의 방법을 이용하였다. 5주령의 수컷 SD 쥐(200±20 g)를 대

한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 제공받아 실험 전날 털을 제거한 후 diethyl ether로 마취하여 희생하고 피부를 벗겨내었다. 벗겨낸 피부를 1.5 cm로 잘라내어 Franz-type diffusion cell에 membrane으로 장착하고, Fish oil을 용해시킬 수 있는 40% ethanol 용액 4.9 mL을 receptor medium으로 넣고 donor side에 Fish oil sample을 500 µL주입하였다. 실험하는 동안 buffer를 400×g으로 교반하면서 water jacket을 이용해 37°C을 유지하도록 하였다. 0.5시간, 1~6시간 그리고 24시간에 receptor medium에서 각각 0.5 mL를 취하고 시료 채취 후 40% ethanol 0.5 mL을 즉시 receptor medium에 넣었다. 채취된 시료는 GC를 이용하여 그 농도를 계산하였다.

○ Fish oil의 혈중농도 측정 결과[흡수율 평가 결과]

Table 3.2.80는 Fish oil의 시간에 따른 지방산들의 혈중 농도를 나타낸 표이고, Figure 3.2.173은 Fish oil의 시간에 따른 혈중농도 측정 결과 중 EPA[C20:5(n-3)]와 DHA[C22:6(n-3)]의 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 혈중 지방산의 농도는(특정 지방산 함량/총 지방산 함량×100)으로 나타내었다. DA1, DA5, NS5에 비해 DA6, NS6를 투여한 경우가 투여 후 혈 중 지방산의 농도는 4시간째 급격한 차이를 보였다.

Table 3.2.80 Fatty acid composition (%) in serum

Sampl	Fatty acid	Fatty acid composition (%)				Sampl	Fatty acid	Fatty acid composition (%)			
		0 h	4 h	24 h	48 h			0 h	4 h	24 h	48 h
DA1	C14:0	3.21	2.21	1.90	1.18	NS5	C14:0	1.26	1.60	1.97	1.30
	C16:0	40.57	42.68	43.24	42.00		C16:0	41.37	40.77	60.09	41.57
	C16:1	1.24	0.78	0.59	0.74		C16:1	1.82	0.85	1.54	1.00
	C18:0	26.40	30.50	33.51	31.30		C18:0	26.18	29.52	42.90	28.07
	C18:1(n-9)c	12.86	9.25	8.89	10.35		C18:1(n-9)c	14.23	10.28	17.47	11.52
	C18:1(n-7)c	1.09	0.72	0.58	0.97		C18:1(n-7)c	1.67	0.90	1.40	1.13
	C18:2(n-6)c	10.20	8.24	7.47	9.44		C18:2(n-6)c	9.73	12.75	15.65	11.60
	C20:3(n-6)	0.45	1.94	1.67	1.26		C20:3(n-6)	0.48	0.46	3.06	0.34
	C20:5(n-3)	0.57	0.93	0.35	0.34		C20:5(n-3)	0.47	0.80	0.93	0.60
C22:6(n-3)	2.14	2.39	0.99	2.04	C22:6(n-3)	1.12	1.73	1.92	1.54		
DA5	C14:0	1.33	1.69	1.25	1.26	NS6	C14:0	0.81	1.56	1.60	0.76
	C16:0	42.54	42.89	41.61	41.62		C16:0	29.12	42.57	40.52	25.62
	C16:1	1.03	0.84	1.44	1.11		C16:1	0.80	1.56	1.12	0.72
	C18:0	29.76	33.66	27.57	25.35		C18:0	20.06	24.27	24.13	13.74
	C18:1(n-9)c	11.00	8.65	13.53	11.91		C18:1(n-9)c	7.48	14.23	13.03	9.61
	C18:1(n-7)c	0.86	0.61	1.17	1.26		C18:1(n-7)c	0.64	1.28	0.97	1.15
	C18:2(n-6)c	10.27	7.13	11.68	10.94		C18:2(n-6)c	8.02	12.25	12.94	9.98
	C20:3(n-6)	0.47	1.11	1.23	2.67		C20:3(n-6)	0.72	0.23	0.92	0.27
	C20:5(n-3)	0.73	0.91	0.76	0.68		C20:5(n-3)	0.24	2.46	0.75	0.22
C22:6(n-3)	1.70	1.70	2.30	2.35	C22:6(n-3)	0.83	5.76	1.66	1.43		
DA6	C14:0	1.30	1.15	1.43	1.46	NS6	C14:0	0.81	1.56	1.60	0.76
	C16:0	43.18	41.75	42.26	41.20		C16:0	29.12	42.57	40.52	25.62
	C16:1	0.65	0.80	0.78	1.03		C16:1	0.80	1.56	1.12	0.72
	C18:0	33.73	28.51	30.14	28.16		C18:0	20.06	24.27	24.13	13.74
	C18:1(n-9)c	8.38	10.12	10.37	12.84		C18:1(n-9)c	7.48	14.23	13.03	9.61
	C18:1(n-7)c	0.70	0.99	0.86	1.41		C18:1(n-7)c	0.64	1.28	0.97	1.15
	C18:2(n-6)c	8.47	8.79	9.34	9.53		C18:2(n-6)c	8.02	12.25	12.94	9.98
	C20:3(n-6)	1.36	1.71	1.35	0.44		C20:3(n-6)	0.72	0.23	0.92	0.27
	C20:5(n-3)	0.61	2.05	0.81	0.39		C20:5(n-3)	0.24	2.46	0.75	0.22
C22:6(n-3)	1.17	4.14	1.79	2.00	C22:6(n-3)	0.83	5.76	1.66	1.43		

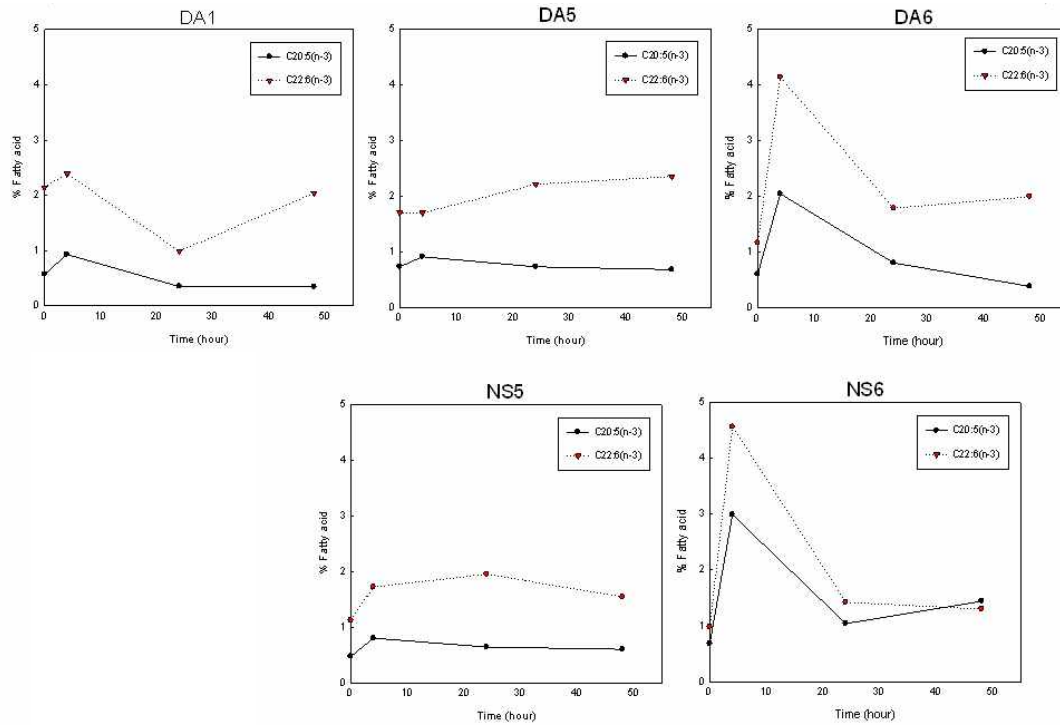


Figure 3.2.173 C20:5(n-3), C22:6(n-3) composition (%) in serum.

○ Intestine across everted intestinal sac을 이용한 장 흡수율 실험 결과

Table 3.2.81과 Figure 3.2.174는 장 흡수율 실험의 결과이다. 장 흡수율 결과로 fatty acid 함량은 주요지방산인 C14:0, C16:0, C18:0의 합으로 나타내었고 결과는  $P_{app}$ 로 나타내었으며,  $P_{app} = dQ(\text{mg/mL})/dt(\text{hr}) \times V(\text{mL})/A(\text{cm}^2) \times C_0(\text{mg/mL})$ 의 계산식으로 구한다[dQ: concentration in the inner compartment(mg/mL), dt: reaction time(hr), V: volume of the solution in the inner compartment( $\text{cm}^3$ ), A: membrane surface area( $\text{cm}^2$ ),  $C_0$ : concentration of inner and outer compartment(mg/mL)].

Crude한 oil 보다는 emulsion된 oil의 장 흡수율이 높았으며, Lecithin만 처리된 DA2(NS2)보다는 Lecithin 외에 Chitosan solution이 첨가된 DA3(NS3)나 Chitosan solution과 Low methoxyl pectin solution이 첨가된 DA4(NS4)에서 유의적으로 높은 투과율을 보였다 ( $p < 0.05$ ).

Table 3.2.81 Intestinal permeability of fish oil using the everted intestinal sac mode

	$P_{app} = dQ(\text{mg/mL})/dt(\text{hr}) * V(\text{mL})/A(\text{cm}^2) * C_0(\text{mg/mL})$	
DA1	$0.0145 \pm 0.0053^a$	NS1 $0.0066 \pm 0.0003^a$
DA2	$0.2810 \pm 0.0055^b$	NS2 $0.2644 \pm 0.0441^b$
DA3	$0.3129 \pm 0.0035^c$	NS3 $0.3180 \pm 0.0068^c$
DA4	$0.3069 \pm 0.0050^c$	NS4 $0.3474 \pm 0.0288^c$

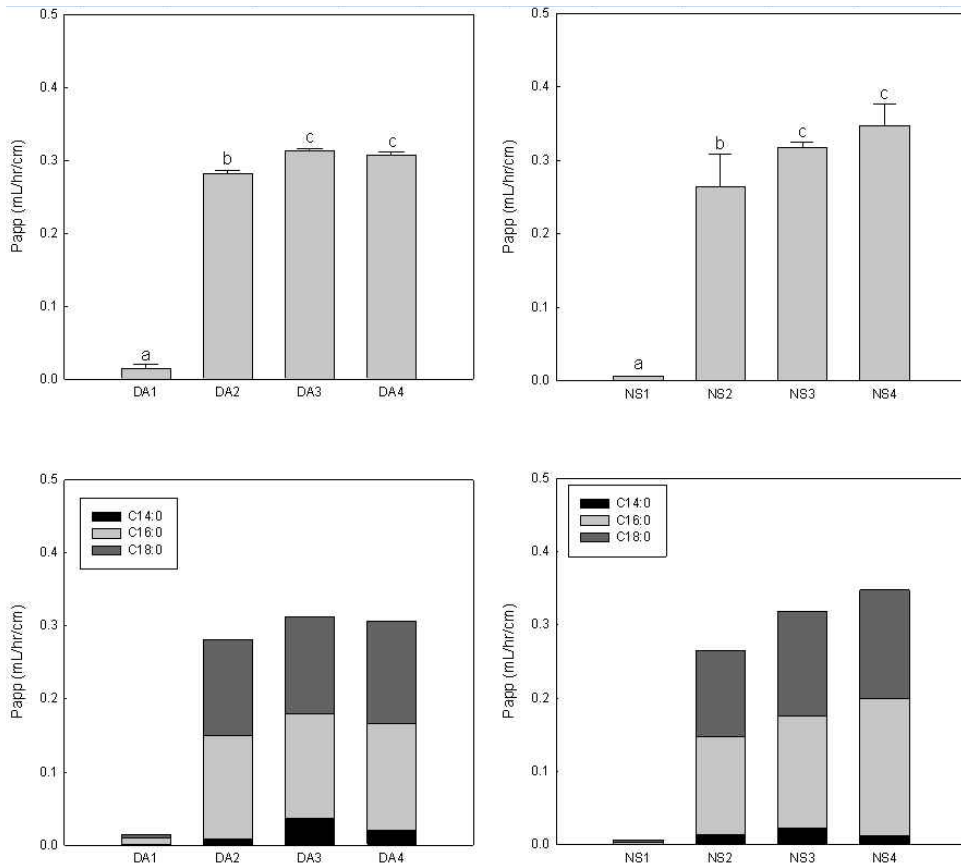


Figure 3.2.174 Intestinal permeability of fish oil using the everted intestinal sac model.

○ Franz-type diffusion cell을 이용한 Fish oil의 피부투과율

Table 3.2.82와 Figure 3.2.175은 Fish oil의 피부투과율 실험 결과이다. Fish oil의 24시간동안 피부 투과율(%)은 [Receptor부분 Fish oil sample의 fatty acid 함량(mg)/Donor부분 Fish oil sample의 fatty acid 함량(mg)×100]으로 구하였고 fatty acid 함량은 주요지방산인 C14:0, C16:0, C18:0의 합으로 각각 나타내었다. 다른 지방산에 비해 C16:0의 피부투과율이 제일 높았으며 Lecithin, Chitosan solution, Low methoxyl pectin solution이 첨가된 DA4와 NS4에서 유의적으로 가장 높은 피부투과율을 보였다 (p<0.05).

Table 3.2.82 Skin permeability of Fish oil using Franz cell model

	Franz cell	24시간동안	피부투과율(%)
DA1	0.28±0.13 <sup>a</sup>	NS1	0.07±0.01 <sup>a</sup>
DA2	7.54±0.57 <sup>a</sup>	NS2	9.13±2.71 <sup>a</sup>
DA3	18.99±3.72 <sup>a</sup>	NS3	18.43±1.07 <sup>ab</sup>
DA4	103.63±18.64 <sup>b</sup>	NS4	39.72±12.16 <sup>b</sup>

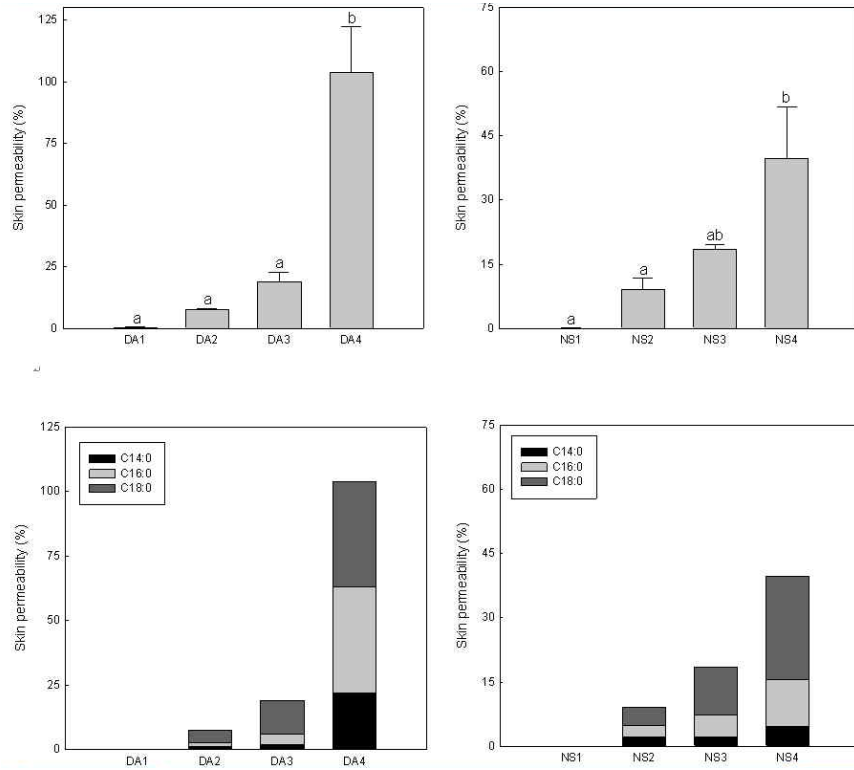


Figure 3.2.175 Skin permeability of Fish oil using Franz cell model.

나. 돼지 태반 콜라겐의 활성 및 흡수율

(1) 가수분해 콜라겐의 피부보호 효과 실험:

○ Tyrosinase 억제 실험

가수분해 콜라겐의 tyrosinase 억제 실험은 Mason & Peterson의 방법을 이용하여 96-well plate에 시행하였다. 버섯 유래의 tyrosinase는 167 units/mL이 되도록 phosphate buffer를 이용하여 희석하였으며 콜라겐을 증류수(D.W)에 다양한 농도가 되도록 희석한 후 37°C에서 5분간 pre-incubation시켰다. 100 µl의 tyrosinase 와 20 µl 그리고 3,4-dihydroxy-L-phenyl-alanine (L-DOPA) 100 µl을 37°C에서 30분간 반응시키고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\% \text{ inhibition} = [(A-B)-(C-D)]/(A-B) \times 100$$

A: OD at 492 nm with tyrosinase but without test substance; B: OD at 492 nm without test substance and tyrosinase; C: OD at 492 nm with test substance and tyrosinase; D: OD at 492 nm with/ test substance but without tyrosinase.

○ Elastase 억제 실험

콜라겐의 elastase 억제 실험은 James의 방법을 이용하여 측정하였다(Kraunsoe, Claridge & Lowe, 1996). 25°C에서 20 분간 기질인 N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide이 p-nitroaniline로 되는

것을 억제하는 정도를 알아보는 실험이다. 1 µg의 porcine pancreatic elastase type IV (PPE) 을 1 mL의 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 녹인다. 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 ppm PPE, 0.8 mm N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide 그리고 콜라젠을 섞어주고 기질을 가하여 반응시켜 준 후, 410 nm에서 흡광도를 측정하여 나타낸다.

$$\% \text{ inhibition} = [(A-B)-(C-D)]/(A - B) \times 100$$

A: OD at 410 nm with elastase but without test substance; B: OD at 410 nm without test substance and elastase; C: OD at 410 nm with test substance and elastase; D: OD at 410 nm with/test substance but without elastase.

○ Franz-type diffusion cell을 이용한 콜라젠의 피부 흡수율 실험

콜라젠의 피부 투과율은 Sonavan 의 방법을 이용하였다(Figure 3.2.176). 8주령의 수컷 SD 쥐 (200±20 g), 5마리를 대한바이오텍(Eumseong, Korea)에서 제공받아 실험 전날 털을 제거한 후 diethyl ether로 마취하여 희생하고 피부를 벗겨내었다. 벗겨낸 피부를 1.5 cm로 잘라내어 Franz-type diffusion cell에 membrane으로 장착하고 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4) 4.9 mL을 receptor medium으로 넣고 donor side에 콜라젠을 500 µl 주입하였다. 실험하는 동안 buffer를 400×g으로 교반하면서 water jacket을 이용해 37°C을 유지하도록 하였다. 0.5시간, 1~6시간 그리고 24시간에 receptor medium에서 각각 0.5 mL를 취하고 시료 채취 후 0.1 M sodium phosphate buffer 0.5 mL을 즉시 receptor medium에 넣었다. 채취된 시료는 BCA 의 방법으로 측정된 총 단백질에 의해 농도를 계산하였다.

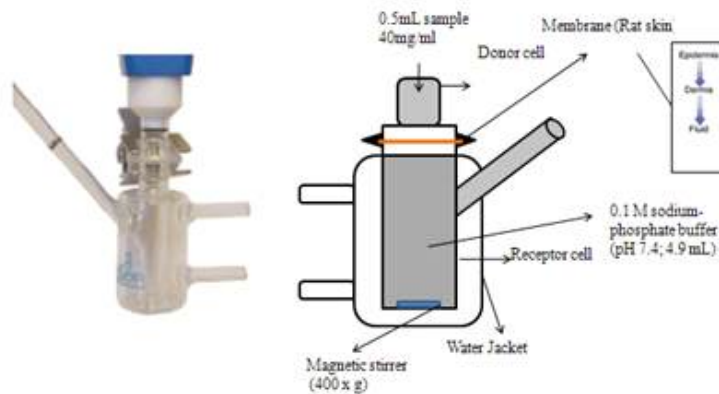


Figure 3.2.176 Franz-type diffusion cell model.

○ Intestine across intestinal sac을 이용한 장 흡수율 평가

콜라젠의 장 흡수율은 Mahomoodally의 방법을 이용하였다(Figure 3.2.177). 8주령의 수컷 SD 쥐(200±20 g)를 24시간 공복 시킨 후 diethyl ether로 마취하여 희생하고 소장을 재빨리 취해서 세척한 후 공장 시작 부분의 10 cm를 취하였다. 콜라젠 1 g을 serosal fluid(inner compartment)로 넣은 후 다른 한 쪽을 묶어 장 주머니를 만들었다. 장 주머니를 0.1% glucose 을 함유한 Krebs-Henseleit bicarbonate (KHB) buffer(pH 7.4) 20 mL가 함유된 mucosal fluid(outer compartment)에 넣었다. 실험하는 동안 buffer를 400×g으로 교반하면서 water

jacket을 이용해 37°C을 유지하도록 하고 5% CO<sub>2</sub>와 95% O<sub>2</sub>을 계속적으로 공급하였다. 주머니 밖으로 빠져나온 시료는 10, 20, 30분 그리고 1시간에 각각 채취하여 BCA와 TNBS의 방법으로 측정된 총 단백질 양 의해 농도를 계산하였으며, 이용한 주머니의 건조 중량으로 장 흡수율을 나타내었다.

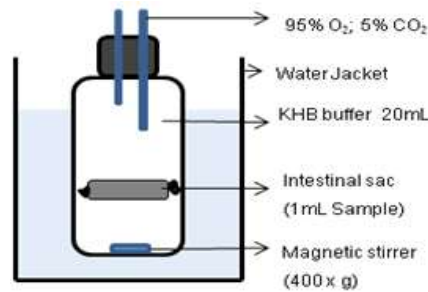


Figure 3.2.177 Intestinal sac model.

○ 가수분해 콜라겐의 단백질 함량분석

다음은 콜라겐 가수분해물의 BCA와 A-N 함량을 측정한 결과이다. 먼저 BCA의 경우 가수분해 시간이 높아짐에 따라 유의적으로 BCA함량이 줄어드는 결과를 확인할 수 있었다(Figure 3.2.179). 반면 A-N의 분석 결과의 경우 가수분해 시간이 높아짐에 따라서 유의적으로 A-N의 함량이 줄어들음을 확인 할 수 있었다. 이는 가수분해 함에 따라서 단백질이 아미노산으로 바뀌어 저서 A-N의 함량은 높아졌을 것으로 사료된다.

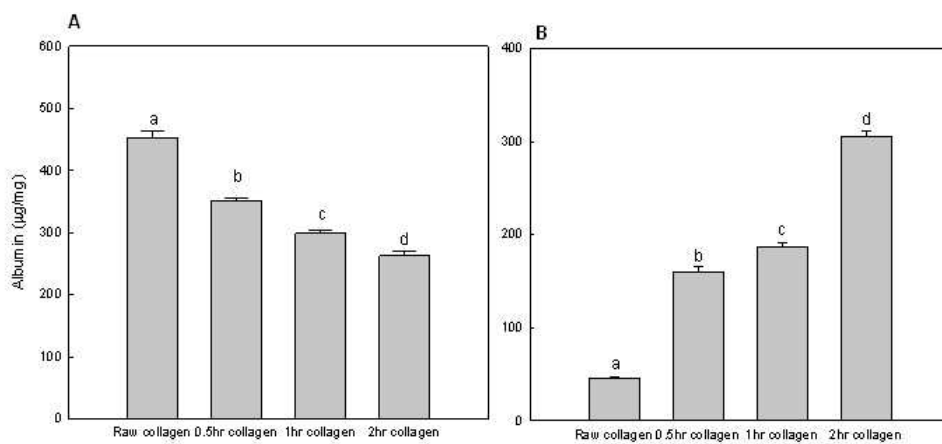


Figure 3.2.178 Protein level of Collagen. A ; Protein level of hydrolysate collagen samples are expressed as µg of total BCA compounds/mg. B ; Protein level of hydrolysate collagen samples are expressed as µg of total A-N compounds/mg. Values were analyzed with a repeated measurement ANOVA. Each bar represented mean±SD. n=3.

○ 콜라겐의 피부 보호 효과

Figure 3.2.179는 콜라겐의 Elastase 저해능력 결과이다. 먼저, tyrosinase 저해 실험 결과는 tyrosinase는 측정 결과 효과 없음으로 나타났다(data not shown). Elastase 저해 실험 결과는 가수분해를 많이 할수록 저해력이 더 높아지는 경향을 보이나 시료간의 유의적인 차이가 없음을 확인하였다.

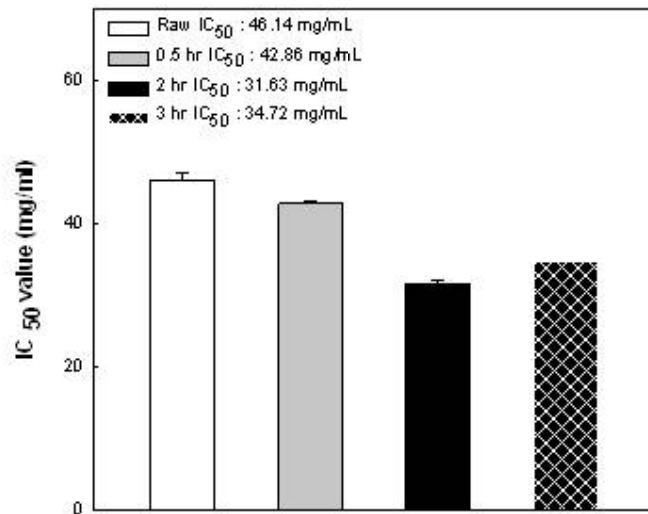


Figure 3.2.179 Elastase inhibition activity of Collagen. IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration) Values were analyzed with a repeated measurement ANOVA. Each bar represented mean±SD. n=3.

○ Franz-type diffusion cell을 이용한 피부 흡수율

콜라겐 가수분해물의 피부흡수율은 Franz diffusion cell에 쥐의 피부를 membrane으로 장착하여 실험하였으며, receptor cell에서 시간별로 채취한 시료를 가지고 protein함량을 측정하여 Figure 3.2.180에 그 결과를 나타내었다. 그 결과 protein의 함량은 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 시간이 흐를수록 콜라겐의 가수분해 시간이 많을수록 피부 투과율이 유의적으로 증가하는 결과를 얻었다.

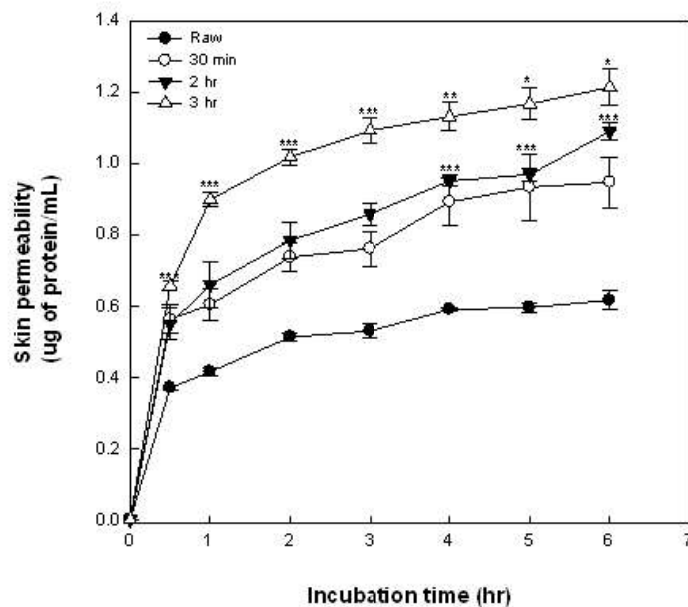


Figure 3.2.180 Skin permeability of hydrolysate collagen using Franz cell model. Values were analyzed with a repeated measurement independent t-test (\*mean p<0.05;\*\*meanp<0.01). Each point represents mean±SEM. n=3.



○ Intestine across intestinal sac을 이용한 장 흡수율

가수분해 콜라겐의 장 투과율 실험은 Intestine across intestinal sac을 이용하였으며, 채취한 시료의 Protein함량을 측정하여 Figure 3.2.181에 그 결과를 나타내었다. 가수분해 시간별 장내 흡수율을 보면 유의적으로 차이가 없다는 것을 알 수 있었다.

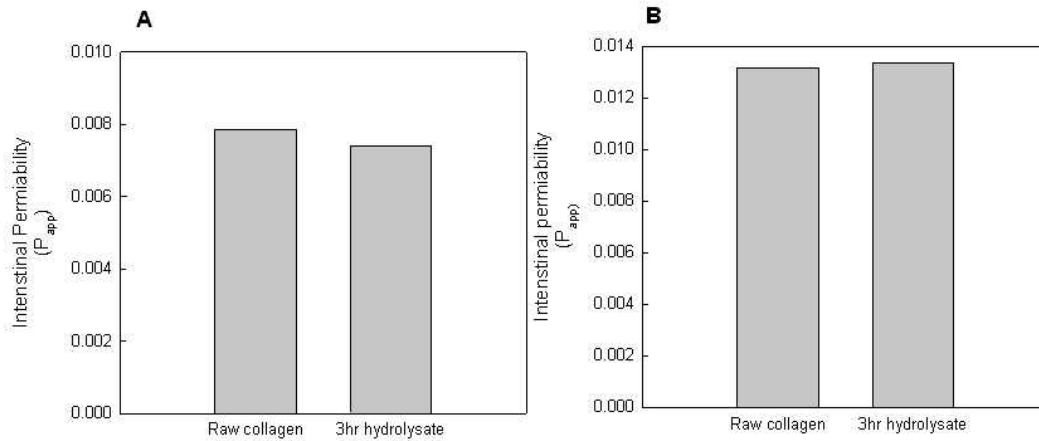


Figure 3.2.181 Intestinal permeability of Hydrolysate collagen using the intestinal sac model.

A; Intestinal transport of the hydrolysate collagen samples are expressed as P<sub>app</sub> using BCA. B; Intestinal transport of the hydrolysate collagen samples are expressed as P<sub>app</sub> using A-N. Each point represents mean ± SD. n=3.

(2) HaCaT cell을 이용한 콜라겐의 항 주름 효과

○ Cell viability

Cell viability는 Table 3.2.83와 Table 3.2.84에 나타내었다. HaCaT cell에 콜라겐 가수분해물을 먼저 UVB를 조사하지 않고 시료만 처리하여 시료 자체의 세포 독성 실험을 시행하였다. 콜라겐의 세포 독성 실험 결과 Raw 콜라겐의 경우 10 µg/mL부터 대조군에 비해 유의적으로 콜라겐 시료 처리 시 세포 독성이 나타났으며, 세 시간 가수분해 콜라겐과 세 시간 가수분해 콜라겐을 소화효소 처리한 시료의 경우 낮은 농도에서는 세포 독성이 미미하였으나 250 µg/mL의 농도를 처리 시 유의적으로 높은 독성을 나타냈다. 이 결과를 토대 삼아 농도를 조정하여 UVB를 조사한 UVB로부터의 콜라겐의 시료 보호 기능을 실험하였다. 실험 결과 Raw collagen의 경우에는 UVB를 처리하지 않은 군에서와 같이 10 µg/mL의 농도부터 세포독성이 나타났으며, 세 시간 가수분해 콜라겐과 세 시간 가수분해 콜라겐을 소화효소처리 한 군의 경우 유의적인 차이는 없지만 처치 농도가 높아질수록 UVB로부터 세포를 보호하는 경향을 보였다.

Table 3.2.83 Cell viability (without UVB irradiation)

conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	cell viability (% of normal control)		
	Without UVB irradiation		
	Raw	3 hr	3 hr + digestion
0	100.0 $\pm$ 1.9 <sup>d</sup>	100.0 $\pm$ 3.2 <sup>ns</sup>	100.0 $\pm$ 5.47 <sup>ab</sup>
1	98.1 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>	103.5 $\pm$ 0.8	104.0 $\pm$ 7.08 <sup>b</sup>
10	82.5 $\pm$ 3.3 <sup>c</sup>	106.1 $\pm$ 1.9	108.8 $\pm$ 3.89 <sup>b</sup>
50	64.1 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	105.1 $\pm$ 1.8	108.1 $\pm$ 1.73 <sup>b</sup>
100	52.4 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	102.7 $\pm$ 1.5	102.3 $\pm$ 4.98 <sup>ab</sup>
250	51.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	106.0 $\pm$ 1.5	93.1 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>

Values were analyzed with a repeated measurement ANOVA. Each contents that represents mean $\pm$ SD. n=3. Raw; Raw collagen, 3 hr; 3 hr-hydrolysate collagen, 3hr+digestion; Digested hydrolysate of collagen.

Table 3.2.84 Cell viability (with UVB irradiation)

conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	cell viability (% of normal control)		
	With UVB irradiation		
	Raw	3 hr	3 hr + digestion
0	89.2 $\pm$ 1.0 <sup>d</sup>	91.2 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	92.6 $\pm$ 5.43 <sup>a</sup>
1	91.2 $\pm$ 1.4 <sup>d</sup>	96.7 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>	104.2 $\pm$ 4.42 <sup>ab</sup>
10	82.2 $\pm$ 4.1 <sup>c</sup>	98.0 $\pm$ 3.5 <sup>ab</sup>	107.3 $\pm$ 6.55 <sup>b</sup>
25	71.6 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	96.2 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>	106.7 $\pm$ 4.61 <sup>ab</sup>
50	64.2 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	93.5 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>	106.9 $\pm$ 5.92 <sup>b</sup>
100	63.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	96.1 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	97.8 $\pm$ 3.42 <sup>ab</sup>

Values were analyzed with a repeated measurement ANOVA. Each contents that represents mean $\pm$ SD. n=3. Raw; Raw collagen, 3 hr; 3 hr-hydrolysate of collagen, 3hr+digestion; Digested hydrolysate of collagen.

### ○ MMP-2 발현 변화

피부세포에 UVB가 조사되면 ROS의 생성이 촉진된다. UVB로부터 생성된 ROS는 MMP-2의 생성을 촉진시켜 피부 광노화 유발에 매우 중요한 역할을 한다. MMP-2는 피부의 collagen을 분해하는 효소로써, 피부 주름 형성에 매우 중요한 요인이다. MTT test에서 Raw collagen이 세포 독성을 나타냈기 때문에 3 h hydrolysate collagen의 MMP-2의 발현 변화만을 관찰하였다. Figure 3.2.182을 보면 UVB 조사를 하지 않고 콜라겐 가수분해물을 처리하지 않은 대조군에 비하여 UVB를 조사하고 시료를 처리하지 않은 세포에서는 MMP-2의 발현이 약 170% 가량 크게 증가하였다. 양성 대조군으로 사용한 ATRA(all-transretinoicacid)의 경우 약간의 MMP-2 발현을 저해하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다. 콜라겐 가수분해물 처리 시, 유의적인 차이는 없으나 농도가 높아질수록 MMP-2의 발현이 감소하기 시작하여 농도 비례적으로 MMP-2의 발현을 저해하는 것을 확인하였다.

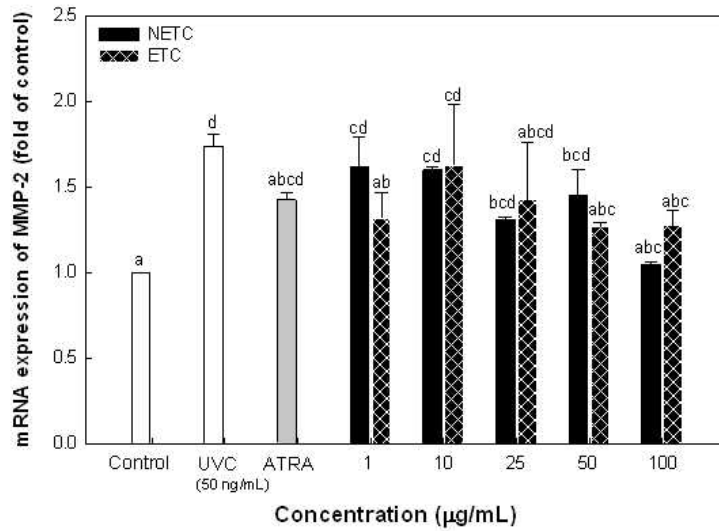
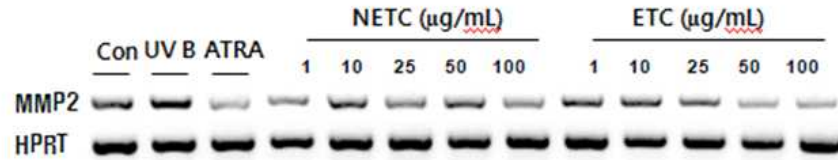


Figure 3.2.182 mRNA expression of MMP-2. Con; control, UVC; UVB Control, ATRA; Positive control (all-transretinoicacid), NETC; 3hr-hydrolysate of collagen. ETC; Digested 3hr-hydrolysate of collagen. Values were analyzed with a repeated measurement ANOVA. Each bar represents mean  $\pm$  SD. n=3.

## 다. 나노칼슘의 흡수율

### (1) 칼슘의 일반 특성

#### ○ 크기 분포 분석

입자크기분석기(Delsa Nano C, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)를 이용하여 칼슘 나노 및 마이크로분말의 크기 분포를 분석하였다. 시료 제조를 위하여 칼슘분말의 농도가 각각 0.5, 1 mg/mL가 되도록 첨가하였고 분산매로는 증류수를 사용하였다. 첨가된 칼슘분말은 교반 후 초음파분산기(VCX750, Sonic & Materials Inc., Newtown, CT, USA)로 3분간 분산시킨 후 사용하였다. 각 시료 별3회 반복 측정 하였다. 난각 칼슘을 이용하여 제조한 나노화 칼슘의 입자 크기는 난각칼슘이 2.3  $\mu$ m의 크기를 보인 반면 나노화 공정을 거친 나노-A, -B, -C는 각각 521 nm, 313 nm와 280 nm 의 크기를 보였다 (Table 3.2.85). 칼슘의 입자분포는 Figure.3.2.183과 같다.

Table 3.2.85 Average particle size of calcium and nano-calcium

칼슘	Particle size (nm)
일반난각칼슘	2280.3 ± 64.3
나노-A	521.3 ± 83.3
나노-B	313.9 ± 29.5
나노-C	280.9 ± 3.4

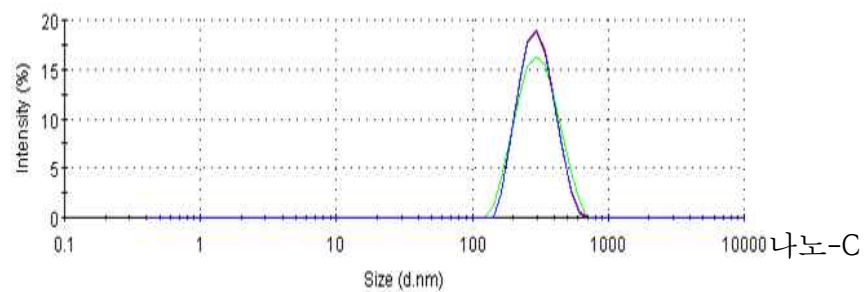
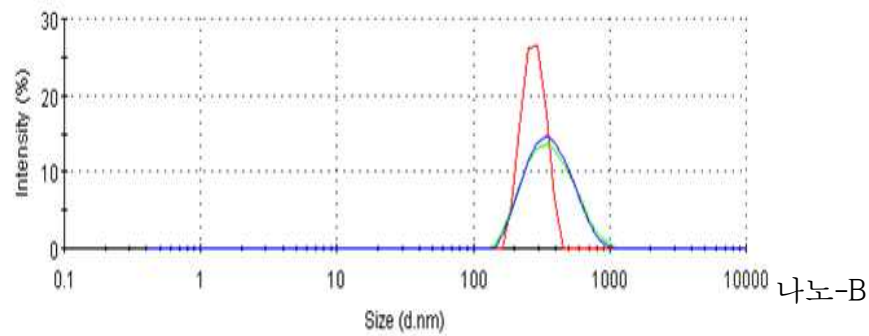
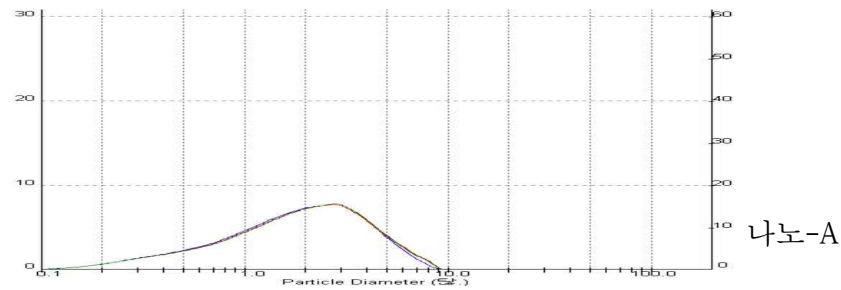
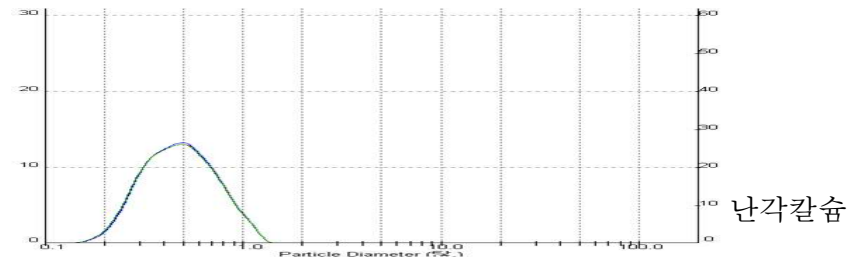


Figure 3.2.183 Particle distribution of calcium and nano-calcium.

(2) 난소절제 동물모델에서의 칼슘의 흡수율

○ 동물사육 및 실험군

10 주령 된 암컷 SD(Sprague-Dawley) 쥐를 구입하여 사용하였으며, 평균 체중이 약  $250 \pm 5$  g 되었을 때 난소 절제술을 실시하였다. 군당 8마리씩 4개군으로 분류하였다(Table 3.2.86). 실험 대조군은 실험군과 동일한 스트레스를 주기하기 위해 난소를 절제하지 않고 개복 시술만 실시하고 정상칼슘 식이(0.5% of Ca)를 급여한 Sham 대조군(Sham), 난소 절제 시술 한 뒤 시료를 처치하지 않고 저칼슘 식이(0.1% of Ca)를 급여한 무처리 음성 대조군(OVX-C)이며, 시료 처치군은 저칼슘 식이(0.1% of Ca)와 함께 시료를 처리한 패각칼슘군(OVX+OS Ca), 나노칼슘군(OVX+Nano Ca)으로 분류하였다. 패각칼슘군(OVX+OS Ca)과 나노칼슘군(OVX+Nano Ca)은 칼슘 40 mg/day을 식염수 1 mL에 분산시켜 경구 급여하였으며, 5주간 저칼슘 사료 함께 5주 동안 시료를 처치하였다.

Table 3.2.86 Experimental groups in calcium bioavailability study

Experimental group (8rats/group)	Operation	Treatment
Sham	Mock-operation	Normal Ca diet (5%)+No-treatment
OVX-C	Ovariectomy	Low Ca diet (1%)+No-treatment
OVX+OS Ca	Ovariectomy	Low Ca diet (1%)+OS Calcium
OVX+Nano Ca	Ovariectomy	Low Ca diet (1%)+Nano Calcium

Sham; sham operation and normal Ca diet (0.5%), OVX-C; no-treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+OS Ca; OS Ca treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+Nano Ca; Nano Ca treatment after ovariectomy low Ca diet (1%).

○ 혈청 및 간의 칼슘 농도

다양한 형태의 칼슘 처치에 따른 혈청 및 간의 칼슘 농도는 Figure 3.2.184에 나타내었다. 혈중 칼슘 농도는 난소 절제로 인한 차이가 나타나지 않았으나, 칼슘 섭취에 따른 증가경향을 나타내었다. 그러나 모든 군에서 통계적으로 유의한 변화는 나타나지 않았으며 모두 정상범위(7.2~13.0 mg/dL)내에 있었다. 다양한 연구에서 골다공증 모델 흰쥐에게 식이 칼슘수준을 달리하여 급여한 경우 혈청 칼슘농도가 차이 없음이 보고된 바 있으며, 이는 칼슘의 항상성이 부갑상선 호르몬 및 칼시토닌 등의 칼슘 대사 호르몬 분비에 의해서 조절되고 유지되기 때문이다.

간의 칼슘 농도는 난소 절제에 의해 약간 감소된 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의하지 않았으며, 칼슘 처치로 인해 유의적으로 증가되었는데 나노칼슘에서 가장 높은 함량을 나타내었다. 따라서 난소 절제로 인해 혈청과 간의 감소된 칼슘 농도를 칼슘 처치로 증가시킬 수 있는데 이러한 경향은 칼슘 형태에 따라 정도의 차이를 보이며 나노칼슘은 패각칼슘보다 증가 정도가 큰 경향을 나타내었으며 이러한 경향은 분자량에 따른 칼슘의 흡수율 및 생체이용률에 의한 차이로 사료된다.

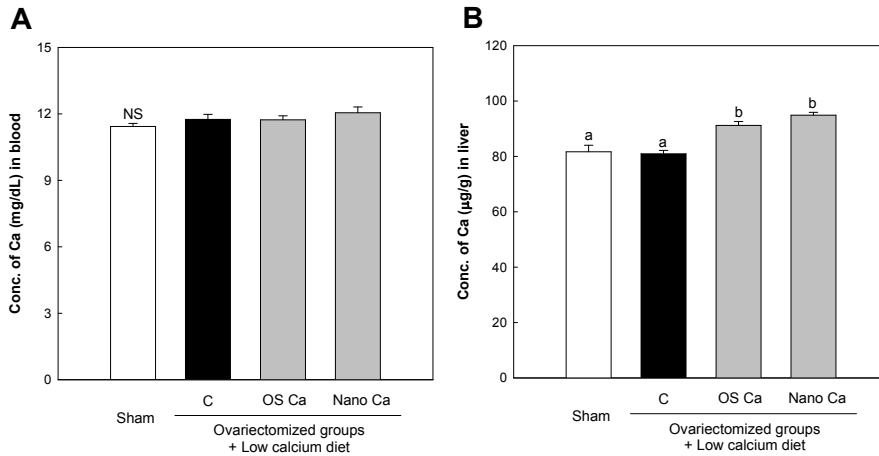


Figure 3.2.184 Calcium levels in blood (A) and liver (B) of ovariectomized SD rats treated with various calcium types for 5 weeks.

Values are mean±SEM for 5 rats. Means with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests. Sham; sham operation and normal Ca diet (0.5%), OVX-C; no-treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+OS Ca; OS Ca treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+Nano Ca; Nano Ca treatment after ovariectomy low Ca diet (1%).

### (3) Intestine across intestinal sac을 이용한 장 흡수율

칼슘의 장 흡수율은 Mahomoodally의 방법을 이용하였다(Figure 3.2.185). 8주령의 수컷 SD 쥐 ( $200 \pm 20$  g)를 24 시간 공복 시킨 후 diethyl ether로 마취하여 희생하고 소장을 재빨리 취해서 세척한 후 공장 시작 부분의 10 cm를 취하였다. 칼슘 1 mL을 serosal fluid(inner compartment)로 넣은 후 다른 한 쪽을 묶어 장 주머니를 만들었다. 장 주머니를 장내 환경별(pH 1.3 (위) - Hydrochloric Acid- Potassium Chloride Buffer, pH 4.2(십이지장)-Citrate buffer, pH 6.2 (공장)-phosphate buffer, pH 7.2(회장)-phosphate buffer)로 pH를 조절한 buffer 20 mL가 함유된 mucosal fluid(outer compartment)에 넣었다. 실험하는 동안 buffer를  $400 \times g$ 으로 교반하면서 water jacket을 이용해  $37^\circ C$ 을 유지하도록 하고 5%  $CO_2$ 와 95%  $O_2$ 을 계속적으로 공급하였다. 주머니 밖으로 빠져나온 시료는 10, 20, 30분, 1시간 그리고 2시간에 각각 채취하여 AA를 이용하여 측정하였다.

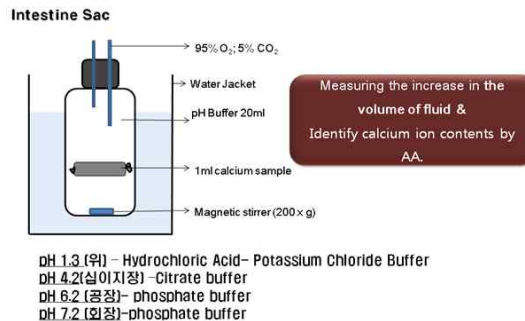


Figure 3.2.185 Intestinal sac model.

입자사이에 따라 분획한 칼슘의 장에서 투과율 실험은 Intestine across intestinal sac을 이용하였다(Figure 3.2.186,187). 장내 환경에 따른 흡수율을 보기 위하여 장내 환경별(pH 4.2(십이

지장)-Citrate buffer, pH 6.2 (공장)-phosphate buffer, pH 7.2(회장)-phosphate buffer)로 buffer 를 달리 하여 측정하여 보았다. Fig. 18을 보면 장에서의 흡수율을 보면 회장(pH 7.4)에서 흡수 율이 높은 경향을 나타냈다. 분획에 따른 칼슘시료의 흡수율을 보면, 십이지장 환경에서 입자 의 크기가 작을수록 흡수율이 높게 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

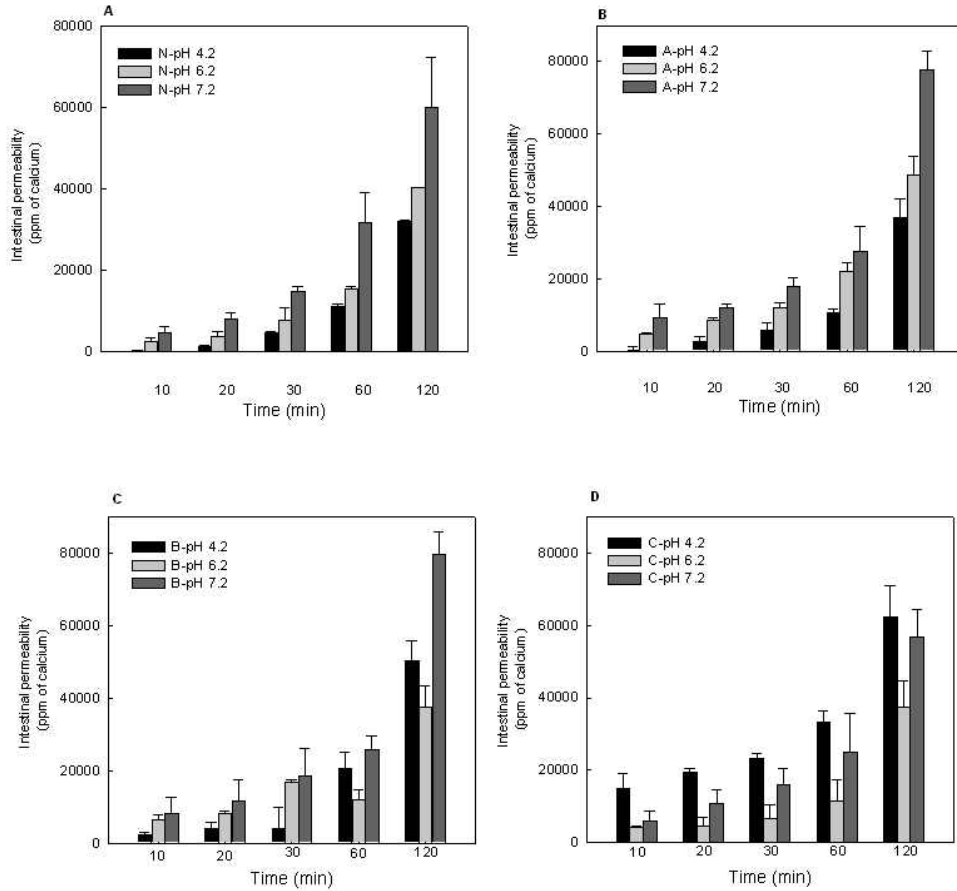


Figure 3.2.186 Intestinal permeability of normal calcium (A), calcium supernatant at 1000 rpm(B), at 2000 rpm(C), at 3000 rpm(D) using the intestinal sac model. Sample N; Normal Calcium, A; Nano-A, B; Nano-B. C; Nano-C. Each point represents mean  $\pm$  SEM. n=3.

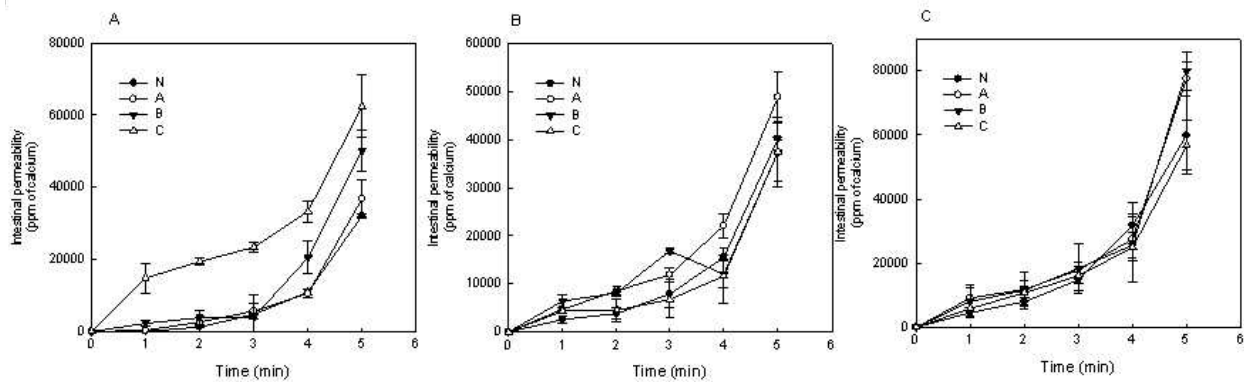


Figure 3.2.187 Intestinal permeability at pH 4.2(A), at pH 6.2(B), at pH 7.4(C) using the intestinal sac model. Sample N; Normal Calcium, A; 1000 rpm Calcium, B; 2000 rpm Calcium. C; 3000 rpm calcium. Each point represents mean  $\pm$  SEM. n=3.

라. 가용화 칼슘 활성 평가

○ 난소절제 모델을 이용한 칼슘소재의 활성 평가

평균 체중이 약  $250 \pm 5$  g 된 암컷 SD(Sprague-Dawley) 쥐를 구입하여 난소 절제술을 실시하였다. 실험 대조군은 실험군과 동일한 스트레스를 주기 위해 난소를 절제하지 않고 개복 수술만 실시하였다(Sham 대조군). 정상칼슘 식이(0.5% of Ca)를 급여한 Sham 대조군(Sham), 난소 절제 수술 한 뒤 시료를 처치하지 않고 저칼슘 식이(0.1% of Ca)를 급여한 무처치 음성 대조군(OVX-C), 시료 처치군은 저칼슘 식이(0.1% of Ca)와 함께 시료를 처리한 패각칼슘군(OVX+OS Ca), 나노칼슘군(OVX+Nano Ca) 등의 4개군으로 분류하고 군당 8수를 공시하였다(Table 3.2.87). 패각칼슘군(OVX+OS Ca)과 나노칼슘군(OVX+Nano Ca)은 칼슘 40 mg/day을 식염수 1 mL에 분산시켜 5주간 경구 투여하였다.

Table 3.2.87 Experimental groups in calcium bioavailability study

Experimental group (8 rats/group)	Operation	Treatment
Sham	Sham operation	Normal Ca diet (5%)+No-treatment
OVX-C	Ovariectomy	Low Ca diet (1%)+No-treatment
OVX+OS Ca	Ovariectomy	Low Ca diet (1%)+OS Calcium
OVX+Nano Ca	Ovariectomy	Low Ca diet (1%)+Nano Calcium

Sham; sham operation and normal Ca diet (0.5%), OVX-C; no-treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+OS Ca; OS Ca treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+Nano Ca; Nano Ca treatment after ovariectomy low Ca diet (1%).

○ 카페인, 카테킨, 식이섬유 혼합처치시의 가용성 칼슘의 활성 평가

실험에 사용된 식이는 AIN-93G 배합율에 따라 정제식으로 조제 하였다(Table 3.2.88). 실험 식이 중 칼슘급원으로는  $\text{CaCl}_2$ (Samchun Chemical Co. Ltd., Phyungtaek, Korea) 을 이용하였다. 비타민 혼합물(AIN-93-VX; Deahan Biolink Co. Ltd., Eumseong, Korea)은 구입하여 사용하였고, 칼슘을 제외한 무기질 혼합물(AIN-93G-MX-Ca free)은 조제하여 사용하였다.

Table 3.2.88 Components of experimental diets

Ingredient(g/100g)	Control group	Treatment groups
Corn starch	39.7	39.7
Casein	20	20
Sucrose	23.5	23.5
Soybean oil	7	7
Cellulose	5	5
L-methionine	0.3	0.3
Vitamin mixture <sup>1)</sup>	1	1
Mineral mixture (Ca free) <sup>2)</sup>	3.22	3.22
CaCl <sub>2</sub>	1.68	0.28
<b>Total(g)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Ca(%)</b>	<b>0.5</b>	<b>0.1</b>

<sup>1)</sup> Vitamin mixture: AIN-93G.

<sup>2)</sup> Mineral mixture (100 g):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :51.44 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :18.70 g,  $\text{NaCl}$ :9.32 g,  $\text{mgSO}_4$ :14.34 g,  $\text{ZnCO}_3$ :220 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ :240 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ :60 mg,  $\text{KI}$ :20 mg, Ironcitrate:6.36 g.



○ 체중 및 식이섭취

난소 절제 이후 다양한 형태의 칼슘 처치에 따른 체중 증가 및 식이 섭취량은 Figure 3.2.188 과 같았다. 체중 증가는 sham군에 비해 난소 절제군에서 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 이로 난소 절제로 인한 체중 증가로, 난소절제가 잘 이루어 졌음을 확인할 수 있었다. 반면에 나노칼슘군의 경우 난소 절제군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮게 나타나( $p < 0.05$ ) 나노칼슘의 섭취에 의해 체중 증가가 저해되었음을 알 수 있었다. 식이 섭취량은 Sham군(20.42 g/day)에 비해 난소절제군(21.17 g/day)과 나노칼슘군(21.61 g/day)의 일일 식이 섭취가 높은 것으로 나타났으나 통계적으로 유의하지는 않았으며, 패각칼슘군(23.22 g/day)의 식이 섭취량은 통계적으로 유의하게 증가하는 것으로 나타났다.

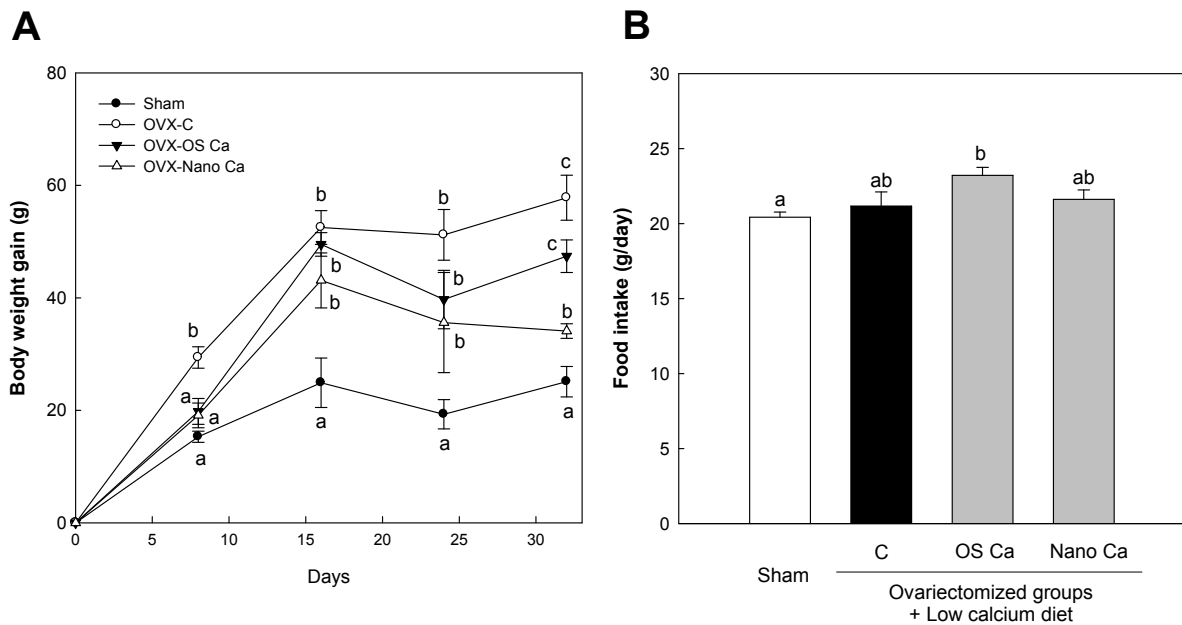


Figure 3.2.188 Body weight gain (A) and food intake (B) of experimental groups for calcium bioavailability.

Values are mean±SEM for 5 rats. Means with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests. Sham; sham operation and normal Ca diet (0.5%), OVX-C; no-treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+OS Ca; OS Ca treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+Nano Ca; Nano Ca treatment after ovariectomy low Ca diet (1%).

○ 장기무게

다양한 형태의 칼슘 처치에 따른 간, 비장 그리고 신장의 상대적인 무게는 Table 3.2.89에 나타내었다. 난소 절제 및 칼슘 처치에 의한 간과 비장의 무게는 통계적으로 유의하지 않으며, 신장의 무게는 난소 절제로 인해 약간 증가하는 경향을 보였으나 칼슘 처치 및 형태에 따른 통계적 유의한 변화는 나타내지 않았다.

Table 3.2.89 Relative internal organ weights of ovariectomized SD rats treated with various calcium types for 5 weeks.

Group	(g/100 g BW)		
	Liver	Spleen	Kidney
Sham	2.62±0.05 <sup>NS</sup>	0.23±0.01 <sup>NS</sup>	0.73±0.01 <sup>b</sup>
OVX	2.66±0.11	0.24±0.02	0.65±0.04 <sup>ab</sup>
OVX + OS Ca	2.77±0.13	0.34±0.01	0.60±0.04 <sup>a</sup>
OVX + Nano Ca	2.64±0.08	0.26±0.11	0.66±0.04 <sup>ab</sup>

Values are mean ± SEM for 5 rats. Means with different superscript letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range tests. Sham; sham operation and normal Ca diet (0.5%), OVX-C; no-treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+OS Ca; OS Ca treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+Nano Ca; Nano Ca treatment after ovariectomy low Ca diet (1%).

#### ○ 혈액분석 및 Micro-CT를 이용한 칼슘 제재로서의 활성 평가

칼슘 농도 측정은 습식분해를 이용하여 혈청, 간을 전처리 하였다. 시료 1 mL (0.25 g)에 질산 5 mL(65% HNO<sub>3</sub>)을 넣어 110°C에서 10시간 분해한 후, Optima 2100 DV ICP-OES (PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용한 모든 초자기구는 2% 질산 용액에 12시간 이상 담갔다가 3차 증류수로 세척하여 건조시킨 후 사용하였다.

혈청 alkaline phosphatase(ALP)을 이용한 골형성 측정은 혈액 자동 분석기 FUJI DRI-CHEM 3500(Fuju Photo Film Co., Osaka, Japan)을 이용하여 측정하였고, 혈중 osteocalcine은 rat osteocalcine Elisa kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)로 측정하였다. 또한 골흡수 지표인 뇨 중의 deoxypyridinoline(DPD) 측정은 rat DPD Elisa kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)로 측정하였고, creatine의 함량은 FUJI DRI-CHEM 3500(Fuju Photo Film Co., Osaka, Japan)를 이용하여 측정하였다.

골밀도 및 골함량 측정은 실험동물의 대퇴골을 GE, LUNAR(Madison, WI, USA)사의 small animal 전용 양 에너지 방사선 골밀도 측정기(dual energy x-ray absorptiometry, DEXA) PIXImus를 이용하여 골밀도(bone mineral density, BMD)와 골무기질함량(bone mineral content, BMC)을 측정하였다.

#### ○ 혈청 및 간의 칼슘 농도

다양한 형태의 칼슘 처치에 따른 혈청 및 간의 칼슘 농도는 Figure 3.2.189에 나타내었다. 난소 절제 및 칼슘 섭취에 따른 혈중 칼슘 농도는 모든 군에서 통계적으로 유의한 변화는 나타나지 않았으며 모두 정상범위(7.2~13.0 mg/dL)내에 있었다. 간의 칼슘 농도는 칼슘 처치로 인해 유의적으로 증가되었으며 나노칼슘군에서 가장 높은 함량을 나타내었다.

#### ○ 골대사 지표

Osteocalcine은 골아세포에서 형성된 후에 골기질속에 침착되며 새로이 형성되는 것의 일부는 혈액 내로 방출되므로 혈중 농도를 측정하여 골형성 정도를 평가할 수 있다. Figure 3.2.190에서는 난소 절제로 인해 골대사 이상이 유발되어 난소 절제군은 sham군에 비해 혈중 ALP와 osteocalcine의 농도가 증가되었는데 칼슘 처치로 혈중 ALP와 osteocalcine의 농도가 감소되어 정상으로 회복되는 경향이 관찰되었다.

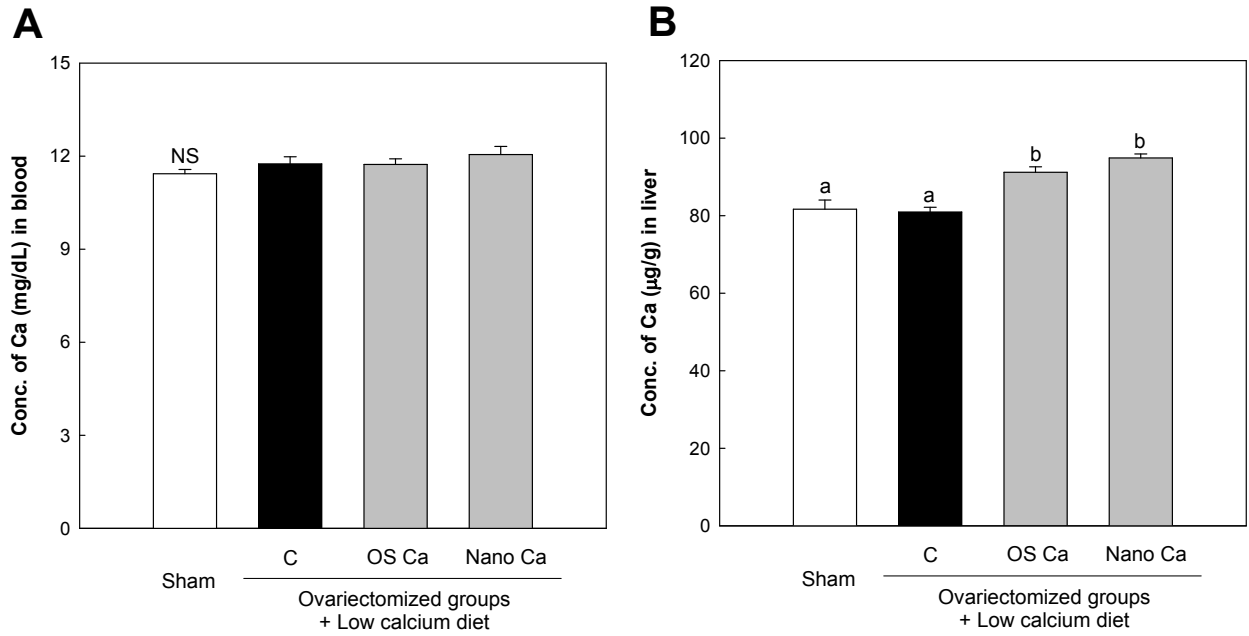


Figure 3.2.189 Calcium levels in blood (A) and liver (B) of ovariectomized SD rats treated with various calcium types for 5 weeks.

Values are mean±SEM for 5 rats. Means with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests. Sham; sham operation and normal Ca diet (0.5%), OVX-C; no-treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+OS Ca; OS Ca treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+Nano Ca; Nano Ca treatment after ovariectomy low Ca diet (1%).

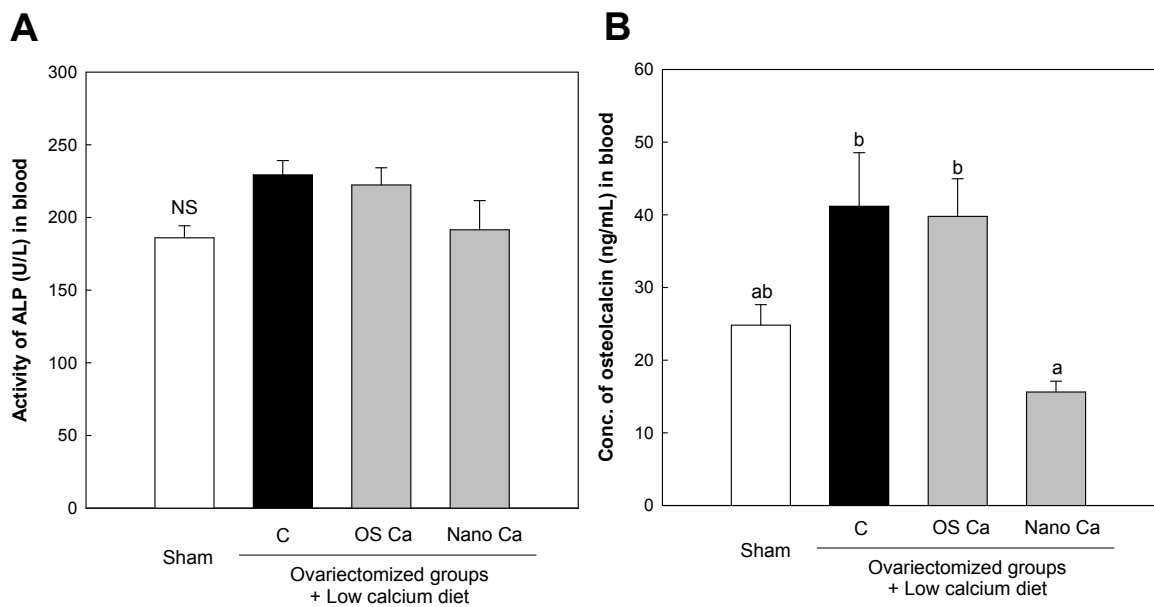


Figure 3.2.190 Bone formation biomarkers of ovariectomized SD rats treated with various calcium types for 5 weeks.

Values are mean±SEM for 5 rats. Means with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests. Sham; sham operation and normal Ca diet (0.5%), OVX-C; no-treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+OS Ca; OS Ca treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+Nano Ca; Nano Ca treatment after ovariectomy low Ca diet (1%).

골질환의 임상적 판정을 위한 지표로 이용되고 있는 DPD의 crosslink value는 뇨 중 creatinine (mm)에 대한 DPD(nm)의 비(nm/mm)로 나타내며, 뇨 중 DPD는 주로 골과 연골부위에서 발견되며, 거의 대부분 골흡수로부터 생성된 것으로 본다. 따라서 뇨 중 DPD 배설량의 증가는 파골세포의 활성화에 인한 골흡수 증가를 의미한다. Figure 3.2.191에서 보는 것 같이 난소 절제로 인해 DPD 배설량이 증가되었는데 칼슘 처치로 뇨 중 DPD 배설량이 감소되어 정상으로 회복되는 경향이 관찰되었다.

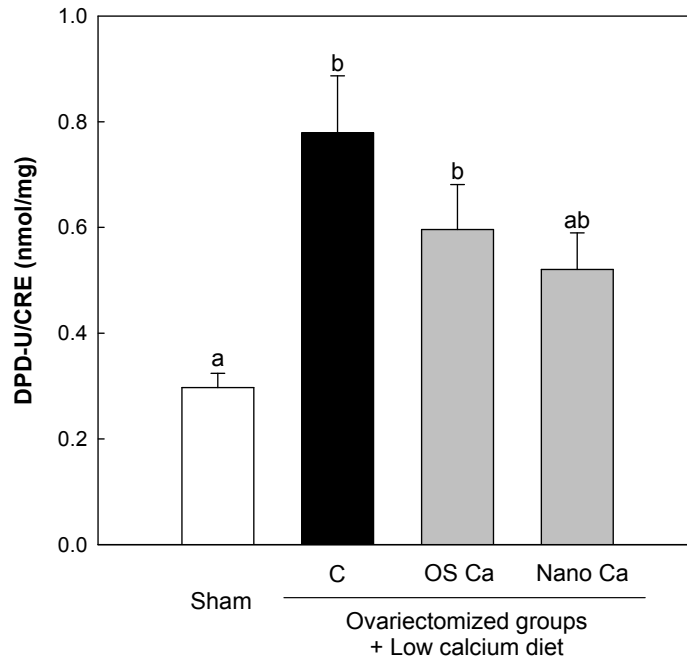


Figure 3.2.191 Bone resorption biomarkers of ovariectomized SD rats treated with various calcium types for 5 weeks.

Values are mean±SEM for 5 rats. Means with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests. Sham; sham operation and normal Ca diet (0.5%), OVX-C; no-treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+OS Ca; OS Ca treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+Nano Ca; Nano Ca treatment after ovariectomy low Ca diet (1%).

#### ○ 대퇴골의 골밀도 및 골함량

대퇴골의 BMD 및 BMC는 Figure 3.2.192와 같다. 대퇴골의 골밀도는 난소 절제 수술에 따라 통계적으로 유의하게 감소된 것으로 나타났으며( $p < 0.05$ ), 칼슘 처치에 따라 통계적으로 유의하게 증가되는 것으로 나타났다. 특히 나노칼슘을 처리한 군에서 가장 높은 수치로 나타났다. 반면에 골함량에서는 난소 절제 수술에 따라 통계적으로 유의하게 감소되는 것으로 나타났으나 칼슘 처치에 따라 증가하지는 않았다.

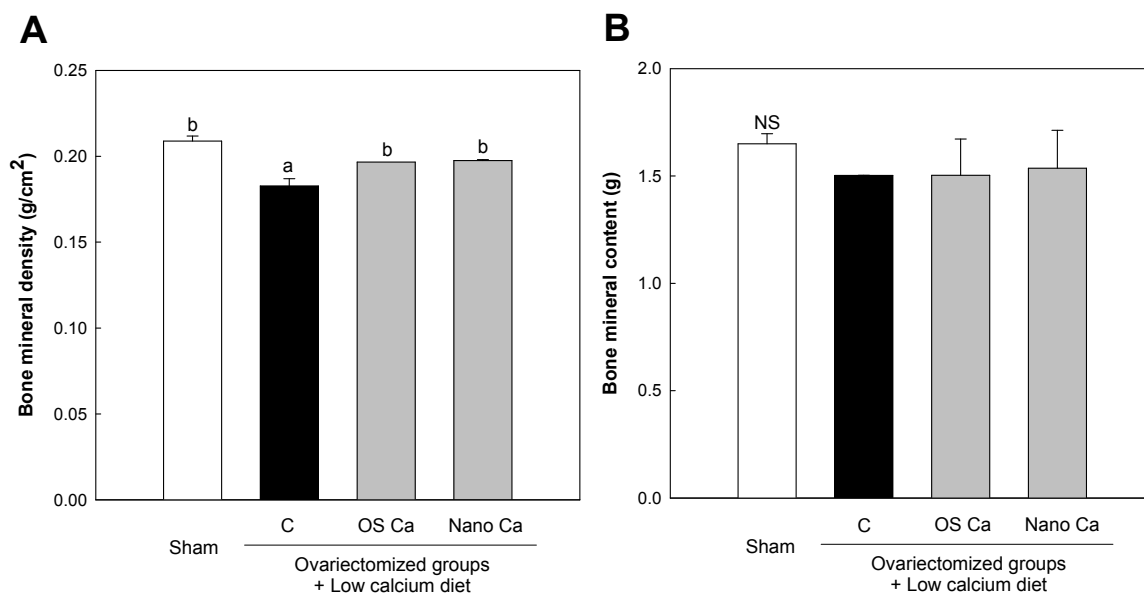


Figure 3.2.192 Femur bone mineral density (BMD) and body mineral content (BMC) of ovariectomized SD rats treated with various calcium types for 5 weeks.

Values are mean±SEM for 5 rats. Means with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests. Sham; sham operation and normal Ca diet (0.5%), OVX-C; no-treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+OS Ca; OS Ca treatment after ovariectomy and low Ca diet (1%), OVX+Nano Ca; Nano Ca treatment after ovariectomy low Ca diet (1%).

#### ○ 균주 배양을 통한 유기산 칼슘 제조

1 L를 기준으로 MRS 25.7 g, glucose 9.3 g, peptone 4.66 g, yeast extract 2.32 g, sodium citrate 0.932 g, magnesium sukfate 0.05 g(pH 6.0)를 첨가하여 배지를 준비하고, 균주 *Lactobacillus plantarum* M2 배양 시 난각칼슘을 첨가하는 시기를 나눠 실험을 실시하였다. 균주 배양 시 난각 칼슘을 첨가한 후 pH를 조정하여 배양전과 후의 pH, 건조 후 무게, 총당, 환원당, 적정 산도, 유기산 조성 및 칼슘 함량을 분석하였다. 다음으로는 균주 배양 후 난각칼슘 첨가 및 고압멸균 하여 pH, 건조 후 무게, 총당, 환원당, 적정 산도, 유기산 조성 및 칼슘 함량을 분석하였으며, 모든 실험의 난각칼슘은 배지 부피의 1%, 2%, 그리고 5% 첨가하여 실시하였다.

#### ○ 건조 후 무게 및 칼슘 함량

건조 후 무게 및 칼슘 함량에서는 균주 배양 시 난각칼슘을 첨가한 후 고압멸균 실시하였을 때 배양 후 난각칼슘을 첨가 및 고압멸균 하였을 때에 비해 높은 수치를 나타내었으며, 특히 칼슘 함량은 2%의 난각칼슘을 첨가하였을 때 가장 높게 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 3.2.193).

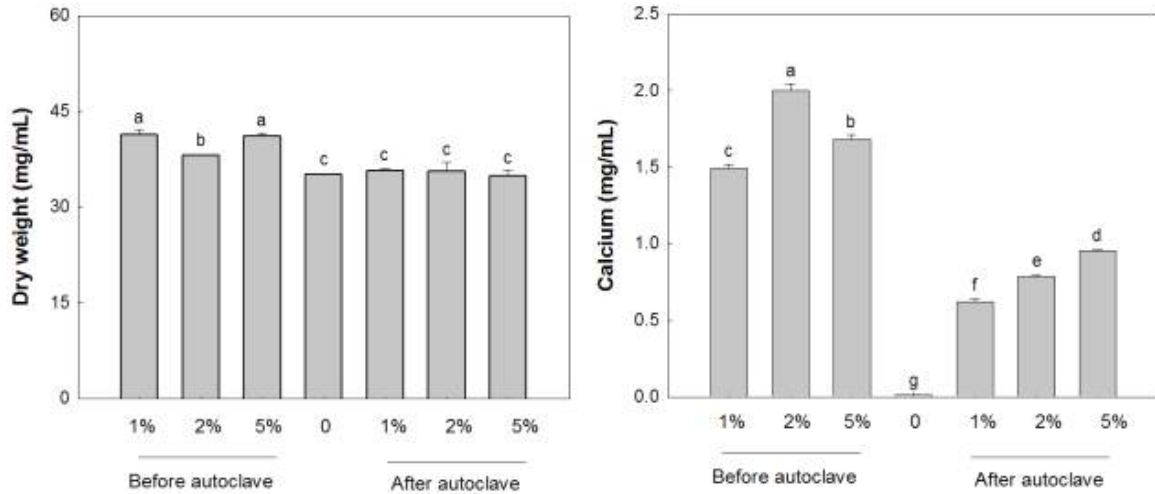


Figure 3.2.193 Change of dry weight and calcium concentration with insert time of organic calcium.

○ 환원당 및 총당 함량

환원당 함량에서는 균주 배양 시 난각칼슘을 첨가한 후 고압멸균 하였을 때 발효 후 난각칼슘을 첨가하였을 때에 비해 2%, 5%의 난각칼슘을 첨가하였을 때 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 3.2.194). 반면 총당 함량에서는 균주 배양 시 난각칼슘을 첨가한 후 고압멸균 하였을 때 함량이 감소하였다.

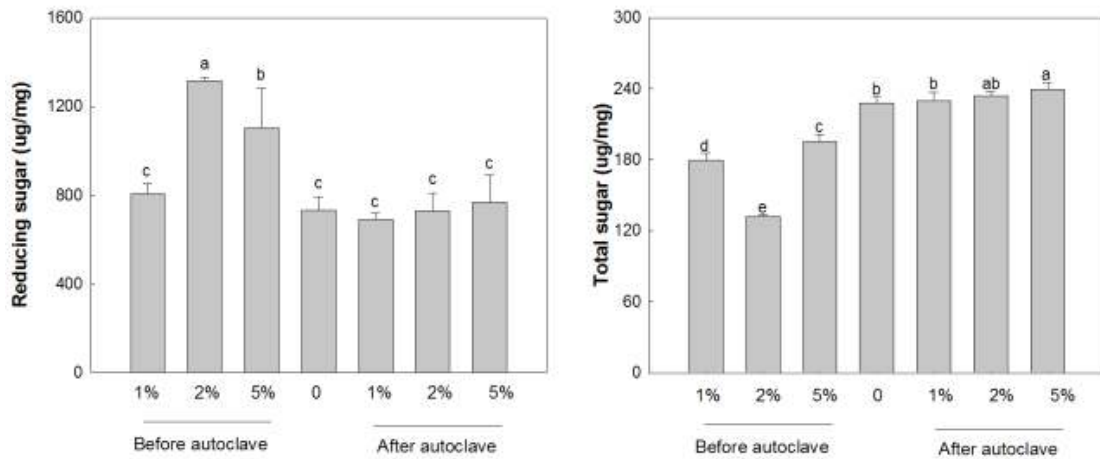


Figure 3.2.194 Changes of reducing sugar and total sugar concentration with insert time of organic calcium.

○ 발효 시간에 따른 총당 및 환원당 함량

균주 배양 시 2% 난각 칼슘을 첨가하여 고압멸균 하였을 때 칼슘함량이 가장 높은 것으로 확인되어 이를 통해 시간에 따른 총당 및 환원당의 변화량을 측정하였다. 발효시간은 총 40시간으로 하였으며, 4시간에 한번씩 sampling을 하여 함량을 측정하였으며, 시간이 지남에 따라 전체적인 총당 및 환원당의 함량이 감소됨을 확인할 수 있었다(Figure 3.2.195).

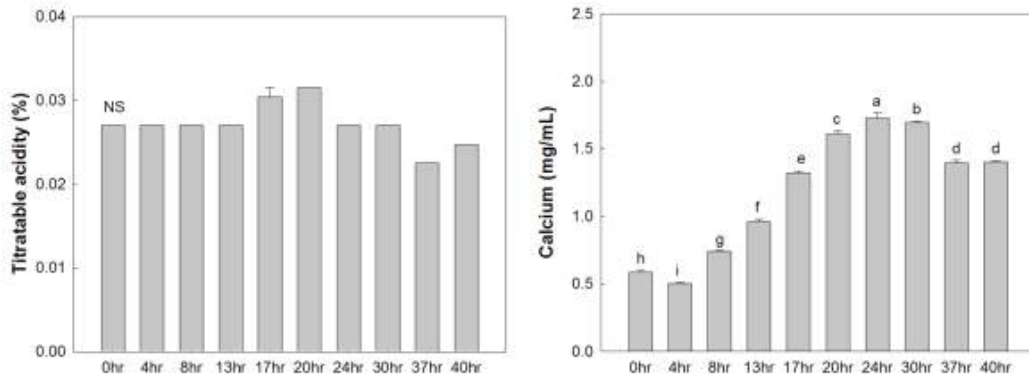


Figure 3.2.195 Changes of total sugar and reducing sugar concentration with fermentation time of organic calcium.

○ 발효 시간에 따른 적정산도 및 칼슘 함량

균주 배양 시 2% 난각 칼슘을 첨가하여 고압멸균 하였을 때 칼슘함량이 가장 높은 것으로 확인되어 이를 통해 시간에 따른 적정산도 및 칼슘 함량의 변화량을 측정하였다. 적정산도는 발효 시간의 변함에도 유의적 차이가 없는 것으로 확인되었다(Figure 3.2.196). 칼슘 함량에서는 24시간동안 배양하였을 때 가장 높은 칼슘 함량이 확인되었으며, 이를 통해 균주 배양을 이용한 유기산 칼슘 제조에 있어서 가장 높은 함량을 기대할 수 있는 배양시간으로 예상된다.

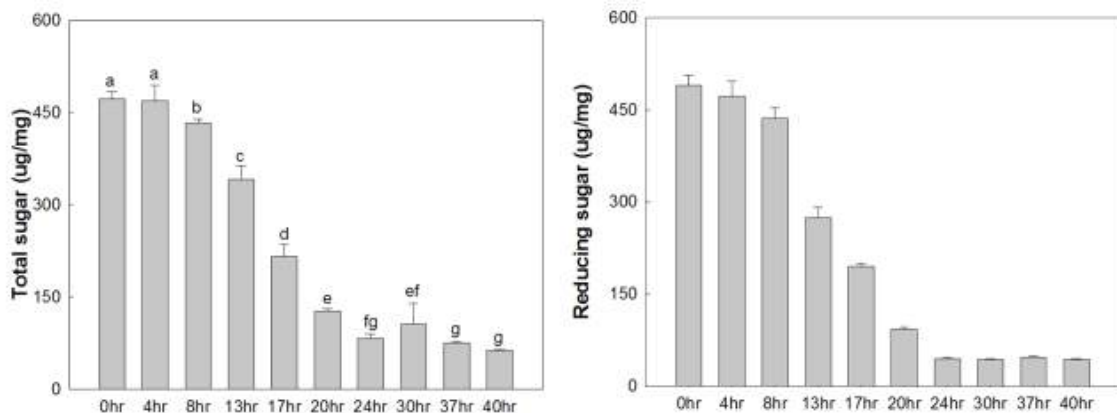


Figure 3.2.196 Changes of titratable acidity and calcium concentration with fermentation time of organic calcium.

○ 유기산 칼슘의 커피 및 우유 첨가 시 침전 발생 여부

칼슘 보강 목적으로 우유나 커피에 첨가 시 침전이 발생되게 된다. 이는 소비자로부터 제품에 대한 선호도를 감소시키는 원인이 되므로 가용화 칼슘 사용이 대안이다. 난각 칼슘을 이용하여 만든 유기산 칼슘의 경우 우유나 커피의 칼슘 보강의 목적으로 첨가 시 침전이 발생하는 여부를 확인하였다(Figure 3.2.197).

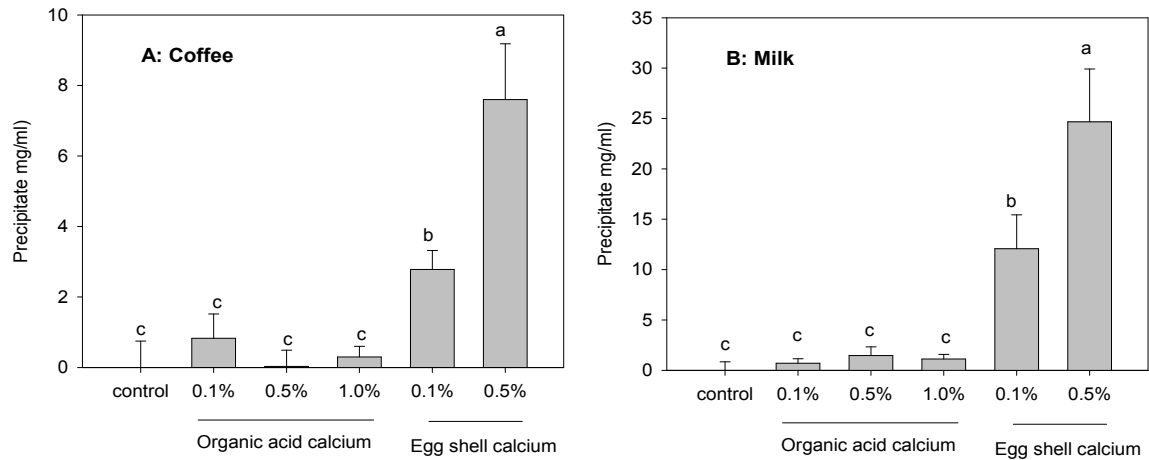


Figure 3.2.197 Precipitate in coffee and milk solution by the addition of egg shell calcium or organic acid calcium.

Figure 3.2.198에서처럼 유기산 칼슘은 0.1~1.0% 첨가 시 우유나 커피에서 침전이 생기지 않는 반면에 난각 칼슘의 경우 우유나 커피에 0.1%와 0.5% 첨가 시 침전이 발생하였으며 침전 발생량은 칼슘 첨가량에 비례하였다. Fig. 30의 사진에서 알 수 있듯이 우유나 커피에 난각 칼슘 첨가 시 침전이 생성되는 모습을 확인하였다. 그러나 유기산 칼슘의 경우 전혀 침전이 생성되지 않음에 따라 칼슘의 보강에 효과적임을 확인하였다.

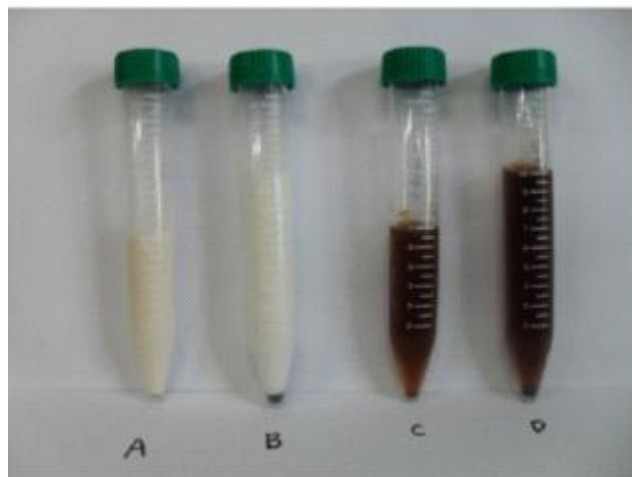


Figure 3.2.198 Photograph of precipitate in coffee and milk solution by the addition of egg shell calcium or organic acid calcium.

#### 마. 가용화 콜라겐의 활성 평가 실험

##### (1) Hairless mouse를 이용한 돈태반 가수분해 콜라겐 추출물의 광 노화 방지 효과

###### ○ Hairless mouse 사육 조건

본 시험에 사용한 동물은 건강한 6주령 수컷 SKH-1 hairless mouse(㈜ 중앙실험동물)였다. 구입하고 1주간의 적응기를 거쳐 7주령의 mouse를 실험에 이용 하였다. 사육실의 사육조건은 온



도  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50 \pm 10\%$ , 환기회수 15회/시간, 조도 150~300 Lux, 명암주기 12시간(08:00~20:00)으로 자동 유지되도록 하였다. Hairless mouse는 mouse 전용 사육 케이지에서 사육 케이지 당 6마리씩 사육하였다. 실험기간동안 사료와 음수는 자유롭게 급식시켰다. 본 실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회 승인을 받은 후(승인번호 KUIACUC-20130430-2) ‘실험동물 관리 및 이용에 관한 지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NRC)’에 맞추어 관리하면서 실시하였다.

#### ○ 실험 재료

본 연구에서 사용된 돈태반 가수분해 콜라겐 추출액은 3시간 동안 아임계 추출시킨 아임계 추출액으로(SPE-3) 사용하였다. Positive control의 경우 Jellice사에서 판매되는 Hydrolyzed collagen(HACP-U2)을 사용하였다.

경피투여 시료와 사용한 화장품의 조성은 모두 크림 타입이다. 화장품 조성물의 기본이 되는 베이스 화장품(base formulation, Vehicle)은 증류수에 글리세린(3.50%), 알코올(3.00%), carbomer 용액(0.20%), 알란토인(0.10%), 메틸파라벤(0.12%), 등이 첨가되어 있고 이에 콜라겐 추출물 5%, 10% 첨가한 콜라겐 화장품을 사용하였다.

#### ○ UVB 조사

UVB lamp(280~320 nm, Sankyo Denki) 두개를 검은 아크릴 cage(90×25×50 cm)에 설치한 후 실험을 진행함에 따라 조사량을 점차적으로 늘려 실험하였다. 총 12주의 실험 기간 동안 주 3회 UVB 조사를 시행하였다. 맨 첫 주의 조사량인  $36 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 으로 시작하여, 54, 72, 108, 122, 144, 180, 198  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ 의 조사량까지 점차적으로 조사량을 늘려 hairless mouse의 등에 조사하였다.

#### ○ 돈태반 가수분해 콜라겐 추출물의 처치

돈태반 가수분해 콜라겐 추출물의 처치 역시 UVB의 조사와 마찬가지로 총 12주의 실험 기간 동안 주 3회 처치하였다. Hairless mouse는 각 군당 6마리씩으로 경구투여군, 경피투여군, 그리고 경피-경구 동시투여군(‘동시투여군’)으로 구성하였다. 모든 군은 high dosage와 low dosage, 총 두 가지 농도로 나뉘어 진행하였다. 경구투여군의 high dosage의 경우 돈태반 가수분해 콜라겐 추출물 0.1%, low dosage의 경우 0.05%의 농도로 만들어 자유 급수 하게 하였다. 경피투여군의 경우 10%와 5%의 화장품으로 만든 후, high dosage(10%)의 경우  $0.4 \text{ mg}/\text{cm}^2$ 으로, low dosage(5%)의 경우  $0.2 \text{ mg}/\text{cm}^2$ 으로 등 부위 5 cm 5 cm 부위에 UVB 조사가 끝난 직후 처치하였다. Positive control으로는 경구투여군의 경우 HYCP-U2을 0.01% 농도로 자유 급수 시켰고, 경피투여군의 경우 HYCP-U2을 1% 화장품으로 제조하여  $0.04 \text{ mg}/\text{cm}^2$ 으로 사용하였다.

#### ○ 몸무게, 장기 무게의 측정 및 혈액 분석

체중은 총 12주의 실험 기간 동안 매주 측정하였다. 마지막 주에 12시간 절식시킨 실험동물을  $\text{CO}_2$ 로 마취시켜 희생을 시키고 난 후 심장으로부터 혈액을 채취한 후 간, 비장, 심장, 신장, 폐의 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $3,000 \times g$ 에서 20분간 원심 분리하여 혈장을 취하였다. 경구투여군의 채취한 혈장은 혈액 자동 분석기(FUJI DRI-CHEM 3500, Fuju Photo

Film Co., Japan)로 LDH(Lactate dehydrogenase, U/L), ALP(Alkaline phosphate, U/L), GOT(Aspartate aminotransferase, U/L), GPT(Alanine aminotransferase, U/L)의 수치를 측정하였다.

○ 피부의 육안 관찰 및 피부 주형의 분석

주름 개선 효과의 판정을 위해 피부를 육안으로 관찰하고, Replica(Visioline VL650, Epigem, Korea)를 이용하여 피부주형을 채취하여 육안으로 관찰하였다,

○ 피부의 수분보유량, 경피 수분 손실량, 멜라닌, 홍반 측정:

피부 장벽의 파괴 여부를 판정하기 위해 피부의 수분보유량, 경피 수분 손실량, 멜라닌 수치, 홍반 수치를 측정하였다. 피부의 수분 보유량의 경우 Corneometer CM825(Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Germany)를 사용하여 측정하였다. 피부의 경피 수분 손실량의 경우 Tewameter TM 300(Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Germany)으로, 멜라닌과 홍반 수치를 Mexameter MX 18(Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Germany)을 사용하여 측정하였다. 이 모든 기기는 MPA 5(Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Germany) adapter에 연결하여 측정하였다.

○ Real-time PCR

유전자 Matrix metalloproteinases(mmPs)와 collagen의 발현을 측정하기 위해 실시간 유전자 증폭기법(Real-time quantitative PCR)을 사용하였다. 피부의 mRNA는 TRIzol reagents(Invitrogen, USA)를 넣고 Tissue Lyser II(QIAGEN, Germany)를 이용하여 분쇄시킨 후 이를 QIAshredder를 이용하여 분리하였다. cDNA 합성은 SuperScript®III First Strand Synthesis System(Invitrogen,USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 시행하였다.

Real-time PCR에서 사용한 TaqMan primer(Applied Biosystems, Foster, USA)를 이용하였다. House keeping gene으로는 GAPDH를 사용하였다.

○ 조직병리학적 관찰

CO<sub>2</sub>를 이용하여 희생시킨 Hairless mouse의 등 쪽 피부 조직을 포름 알데하이드 용액에 넣어 고정한 뒤 다음날 새로운 포름 알데하이드 용액으로 교환하여 충분히 고정시킨 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매 및 박절을 실시하였다.

그 후 피부 조직을 hematoxylin&eosin(H&E), Collagen type 1과 mmP2를 Immunohistochemistry (IHC) 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

(2) Hairless mouse를 이용한 돈태반 가수분해 콜라겐 추출물의 광 노화 방지 효과 결과

○ 체중 및 식이 섭취량

처음 몸무게와 마지막 몸무게 모두 유의적인 차이가 없었다(Table 3.2.90). Body weight gain 결과 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 급수량 또한 통계적으로 유의적인 차이가 있는 것으로 확인되었지만, UV Control에 비하여 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 3.2.90 Body weight, body weight gain and drink volume

			Initialbody weight(g)	Finalbody weight(g)	BodyWeight gain(g)	Drinkvolume (mL/day)
NC			26.89±1.63 <sup>NS</sup>	32.87±1.93 <sup>NS</sup>	6.56±1.43 <sup>d</sup>	5.41±1.98 <sup>a</sup>
UVC			27.14±1.54	32.99±0.85	5.84±0.75 <sup>bcd</sup>	6.33±2.58 <sup>ab</sup>
Base			26.80±1.43	30.90±2.43	4.10±1.70 <sup>a</sup>	6.03±2.00 <sup>ab</sup>
UVB treated group	Positive	PO	27.82±1.56	32.65±2.59	4.83±1.78 <sup>abc</sup>	6.16±2.43 <sup>ab</sup>
	control	PA	26.67±0.92	32.82±0.50	6.15±0.62 <sup>cd</sup>	6.31±2.62 <sup>ab</sup>
	Oral	OL	26.72±1.39	33.02±2.03	6.30±1.84 <sup>cd</sup>	6.64±2.58 <sup>b</sup>
	intake	OH	26.93±1.30	31.82±1.51	4.88±0.97 <sup>abc</sup>	7.35±2.38 <sup>b</sup>
	Topical	AL	26.82±2.83	31.13±2.96	4.32±0.82 <sup>ab</sup>	6.60±2.62 <sup>ab</sup>
	applied	AH	27.08±1.46	31.28±2.21	4.33±1.86 <sup>ab</sup>	6.58±2.31 <sup>ab</sup>
	Oral&	OAL	27.63±1.14	31.60±1.60	4.00±1.07 <sup>a</sup>	7.35±2.38 <sup>b</sup>
	applied	OAH	27.43±1.43	32.83±0.96	6.08±0.76 <sup>cd</sup>	8.31±2.44 <sup>b</sup>

NS; not significant. Value mean±SD. (n=6) Means with different superscript letters within a row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. UVC; UVB treated Control, Base; cosmetic base topical application treatment, PO; Positive control oral application treatment, PA; Positive control topical application, OL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment low dosage, OH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment high dosage, AL; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application low dosage, AH; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application high dosage, OAL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment low dosage, OAH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment high dosage.

○ 장기무게

시료의 처치에 따른 독성을 평가하는 방법으로 체내 이상 현상을 확인하기 위하여 장기무게를 측정 해 보았다. 시료를 처치한 군의 심장, 신장은 통계적으로 유의한 것으로 나타났으며, 간, 폐의 경우에는 유의적인 차이는 보였으나, 정상군이나 UVB Control와 비슷한 수준으로 시료의 처치로 인한 대부분의 장기 무게의 변화가 야기되지 않는 것으로 보인다(Table 3.2.91). 따라서 시료의 처치가 Hairless mouse에 이상 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 3.2.91. Organ weight

Organ Weight (g)			Heart	Kidney	Liver	Lung	Spleen
NC			0.23±0.0 <sup>NS</sup>	0.58±0.0 <sup>NS</sup>	1.42±0.1 <sup>a</sup>	0.22±0.0 <sup>a</sup>	0.11±0.0 <sup>a</sup>
UVC			0.23±0.0	0.52±0.0	1.33±0.1 <sup>ab</sup>	0.20±0.0 <sup>ab</sup>	0.09±0.0 <sup>a</sup>
Base			0.22±0.0	0.54±0.0	1.42±0.1 <sup>ab</sup>	0.22±0.0 <sup>ab</sup>	0.09±0.1 <sup>a</sup>
UVB treated group	Positive	PO	0.21±0.0	0.53±0.0	1.35±0.1 <sup>a</sup>	0.21±0.0 <sup>a</sup>	0.09±0.1 <sup>a</sup>
	Control	PA	0.24±0.0	0.58±0.0	1.50±0.1 <sup>ab</sup>	0.22±0.0 <sup>ab</sup>	0.09±0.1 <sup>a</sup>
	Oral	OL	0.21±0.0	0.52±0.0	1.32±0.1 <sup>ab</sup>	0.22±0.0 <sup>ab</sup>	0.09±0.1 <sup>a</sup>
	intake	OH	0.21±0.1	0.67±0.1	1.26±0.1 <sup>a</sup>	0.19±0.0 <sup>a</sup>	0.09±0.1 <sup>a</sup>
	Topical	AL	0.23±0.2	0.52±0.0	1.35±0.1 <sup>a</sup>	0.21±0.0 <sup>a</sup>	0.09±0.1 <sup>a</sup>
	applied	AH	0.21±0.1	0.51±0.1	1.39±0.1 <sup>ab</sup>	0.21±0.0 <sup>ab</sup>	0.18±0.1 <sup>b</sup>
	O r a l &	OAL	0.23±0.2	0.54±0.0	1.37±0.1 <sup>a</sup>	0.20±0.0 <sup>a</sup>	0.10±0.0 <sup>a</sup>
	applied	OAH	0.21±0.1	0.57±0.0	1.47±0.1 <sup>b</sup>	0.24±0.0 <sup>b</sup>	0.11±0.1 <sup>a</sup>

NS; not significant. Value mean±SD. (n=6) Means with different superscript letters within a row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. UVC; UVB treated Control, Base; cosmetic base topical application treatment, PO; Positive control oral application treatment, PA; Positive control topical application, OL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment low dosage, OH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment high dosage, AL; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application low dosage, AH; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application high dosage, OAL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment low dosage, OAH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment high dosage.

○ 혈액학적 검사

시료를 경구투여군의 독성을 알아보기 위하여, Hairless mouse의 혈액을 채취하여 혈액학적 검사를 실시하였다(Table 3.2.92). Glutamate Oxaloacetate Transaminase(GOT), Glutamic pyruvic transaminase(GPT), Alkaline Phosphatase(ALP), Lactate dehydrogenase(LDH)을 지표로써 분석하였다. GOT는 간과 심장에 고농도로 존재하고 세포장애 정도와 비교적 상관성이 좋을 뿐만 아니라 다른 골격의 근육, 신장, 췌장의 임상지표로 사용되는 지표이다. ALP는 신체내의 간이나 골질환을 확인 해 볼 수 있는 지표이다. GPT는 간세포 이상에 의해서 빠르게 증가하고 간이나 담관에 질환이 있을 시에 그 지표로 널리 이용된다. LDH는 거의 모든 조직에 분포되어 있는데, 이 효소의 활성이 증가하는 것은 생체내의 어느 장기에 세포 파괴가 있어 혈중에 유출되는 것인지를 측정하는데 이용된다. 혈액분석 모든 군의 유의적인 차이가 없는 것으로 보아, 시료의 처치로 인한 독성은 없는 것으로 사료된다.

Table 3.2.92 Blood chemistry

Organ Weight (g)	NC	UVB treated group					
		UVC	PO	Oral intake		Oral + Applied	
				OL	OH	OAL	OAH
GOT	78.0±9.5 <sup>NS</sup>	122.5±27.4	91.3±18.5	90.2±10.7	78.2±5.4	126.7±11.1	81.0±3.1
ALP	256.2±11.6 <sup>ab</sup>	235.0±19.2 <sup>a</sup>	219.5±39.0 <sup>a</sup>	257.5±11.1 <sup>ab</sup>	263.2±33.8 <sup>ab</sup>	325.5±34.9 <sup>b</sup>	227.5±32.1 <sup>a</sup>
GPT	46.2±8.3 <sup>NS</sup>	72.0±19.1	47.8±10.5	45.7±5.6	37.8±12.0	65.3±8.8	61.5±21
LDH	853.6±69.1 <sup>ab</sup>	961.3±104.3 <sup>b</sup>	932.2±97.1 <sup>b</sup>	741±98.0 <sup>b</sup>	668.8±7.5 <sup>ab</sup>	666.4±93.8 <sup>ab</sup>	562.5±63.9 <sup>a</sup>

NS; not significant. Value mean±SD. n=6 Means with different superscript letters within a row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. UVC; UVB treated Control, PO; positive control oral application treatment, OL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment low dosage, OH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment high dosage, OAL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment low dosage. OAH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment high dosage.

○ 피부의 육안 관찰 결과

12 주 동안 hairless mouse를 처치한 후 피부를 육안으로 관찰하였다. Positive control의 경우에는 UVC보다는 주름이 적게 발생하는 것을 확인 할 수 있었으며, 특히 경구투여군의 주름이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Figure 3.2.199). 시료 처치군의 경우에도 경구투여군, 경피투여군, 그리고 경피-경구 동시투여군 (‘동시투여군’) 모두 굵은 주름이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히 낮은 농도의 경피투여군의 주름이 확연히 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 따라서 시료 처치군에서 주름 발생 억제 효과를 가지고 있다고 사료된다.

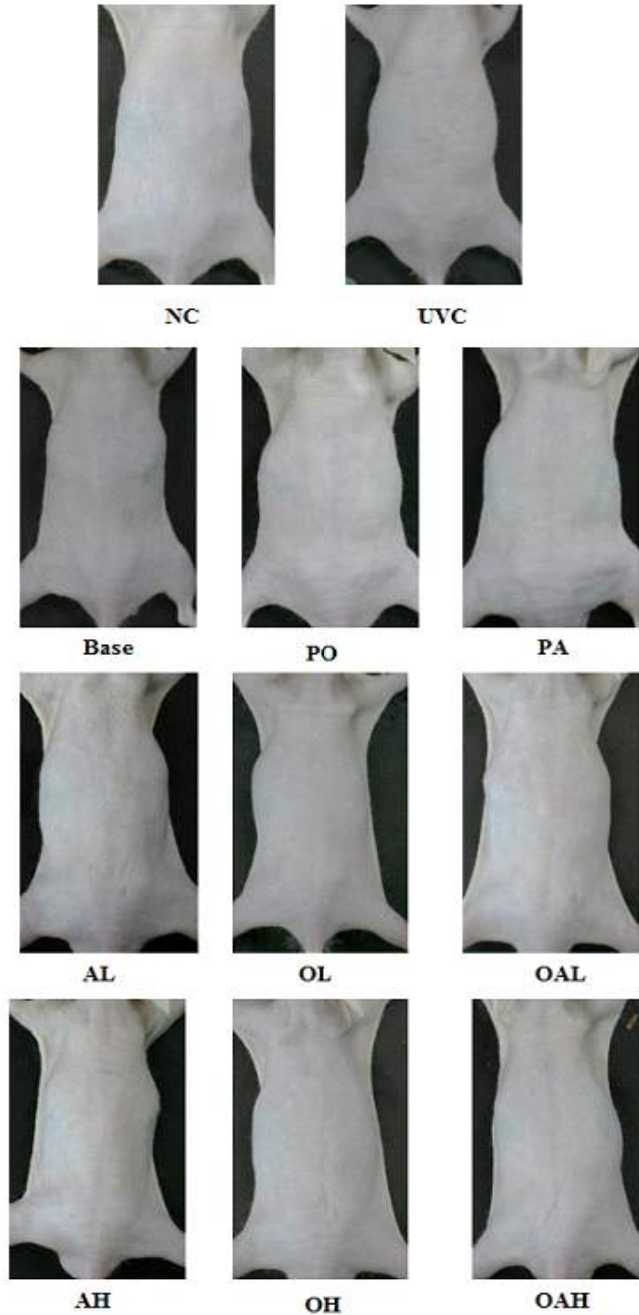


Figure 3.2.199 Photographs of dorsal skin of the mouse.

UVC; UVB treated Control, Base; cosmetic base topical application treatment, PO; Positive control oral application treatment, PA; Positive control topical application, OL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment low dosage, OH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment high dosage, AL; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application low dosage, AH; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application high dosage, OAL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment low dosage, OAH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment high dosage.

○ Hairless mouse의 피부 상태측정

- 피부 수분 보유량

피부표면(각질층 하방 일정한 깊이 10~20  $\mu\text{m}$ 이내의)의 수분함유량을 Corneometer를 이용하여 정전부하용량(Capacitance) 계측법으로 측정하였으며, 이는 수분의 함량과 정전용량은 서로

비례하는 경향이 있어 피부의 보습도가 높을수록 측정되는 수치가 높아진다.

Figure 3.2.200에서 나타난 피부 수분 보유량을 통해 경구투여군의 경우 돈태반 가수분해 콜라겐 추출물을 처치하였을 때 수분 보유량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 높은 농도와 Positive control에서 UV Control에 비하여 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 경피투여군의 경우 시료 처치군이 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 동시투여군의 경우, 높은 농도로 먹고 발랐을 때 유의하게 증가하였다(p<0.05).

피부의 수분균형을 맞춰주는 함습제는 피부의 수분을 증가시켜 유연성과 탄력성을 높이고 피부를 매끄럽고 부드럽게 하며, 다양한 외부자극으로부터 보호하는 역할을 한다. 이러한 결과는 천연초 추출물이 피부의 수분보유량을 증가시키는 효과가 있어 화장품의 함습제로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

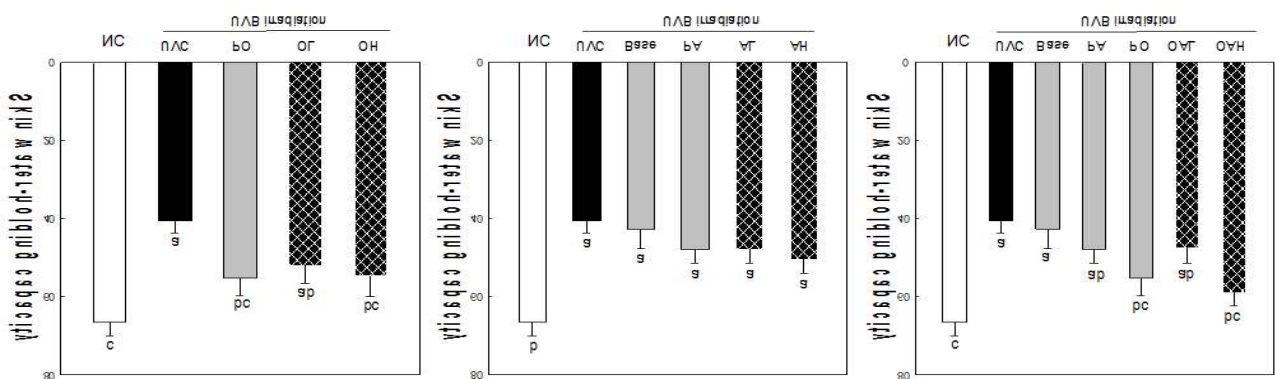


Figure 3.2.200 Skin water-holding capacity.

NS; not significant. Value mean±SEM. n=6 Means with different superscript letters within a row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. UVC; UVB treated Control, Base; cosmetic base topical application treatment, PO; Positive control oral application treatment, PA; Positive control topical application, OL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment low dosage, OH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment high dosage, AL; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application low dosage, AH; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application high dosage, OAL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment low dosage, OAH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment high dosage.

#### - 경표피수분손실량

경표피수분손실량은 피부로부터 증발하는 수분을 가리키며, 각질층에서 피부장벽기능 손상 및 회복의 생리학적 지표로 사용된다. Figure 3.2.201를 보면 가수분해 콜라겐 경구투여군에서 경표피수분손실량이 줄어든 것 경향을 확인할 수 있었으며 높은 농도에서는 유의적으로 감소하였다. 경피투여에 의해서 역시 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았으며, Positive control의 경우에는 효과가 없는 것으로 확인되었다. 경구 경피 동시투여군의 경우에서도 높은 농도에서 유의적으로 수분손실량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 보아 가수분해 콜라겐의 경구투여군의 경표피수분손실량이 감소하는 경향을 보였다. 따라서 가수분해 콜라겐의 식이가 광노화에 따른 피부장벽 기능 및 손상을 보호해 준다는 것을 확인할 수 있었다.

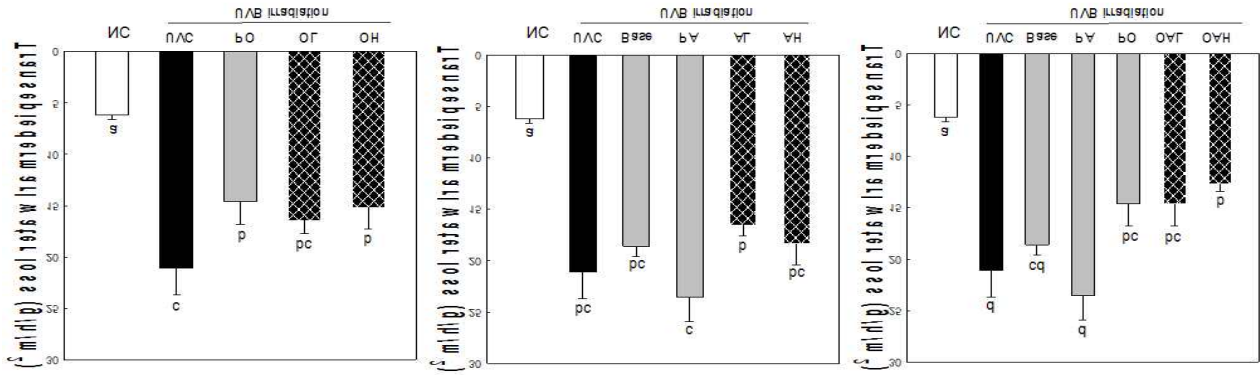


Figure 3.2.201 Transepidermal water loss.

NS; not significant. Value mean±SEM. n=6 Means with different superscript letters within a row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. UVC; UVB treated Control, Base; cosmetic base topical application treatment, PO; Positive control oral application treatment, PA; Positive control topical application, OL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment low dosage, OH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment high dosage, AL; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application low dosage, AH; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application high dosage, OAL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment low dosage, OAH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment high dosage.

- 멜라닌 홍반 지수

Figure 3.2.202 멜라닌 지수를 보면 경구투여군, 경피투여군, 동시투여군 모두 시료 처치에 따른 차이점은 없는 것으로 확인되었다. 홍반지수의 경우에도 처치군 간의 차이는 없는 것으로 확인되었다. 따라서 가수분해 콜라겐의 처치가 미백효과에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

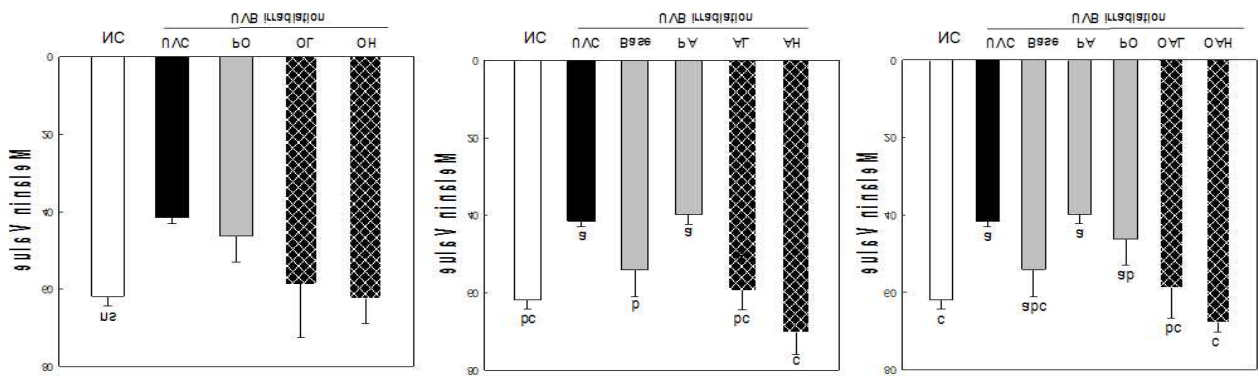


Figure 3.2.202 Mexameter value.

NS; not significant. Value mean±SEM.(n=6) Means with different superscript letters within a row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. UVC; UVB treated Control, Base; cosmetic base topical application treatment, PO; positive control oral application treatment, PA; Positive control topical application, OL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment low dosage, OH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral application treatment high dosage, AL; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application low dosage, AH; Subcritical extract of homogenate of placenta topical application high dosage, OAL; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment low dosage, OAH; Subcritical extract of homogenate of placenta oral and topical application treatment high dosage.

## 바. 폐각칼슘의 급성 및 아급성 실험을 통한 안전성 평가

### ○ 시험동물 및 사육조건

시험 동물은 대한바이오에서 생산된 SPF(특정 병원체 부재) Sprague-Dawley(SD)계 랫드를 분양받아 순화시킨 후 평균 체중에 가까운 동물을 선택하여 온도  $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\% \pm 10\%$ , 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시) 및 조도 150-600 Lux로 전 시험기간 동안 폴리 카보네이트 사육상자(240 W×390 L×175 H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로  $121^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 멸균하여 사용 하였고, 물과 사료는 자유 섭취시켰다.

### ○ 시험물질

시험물질인 폐각칼슘 시료를 건국대에서 제공 받아 사용하였다.

### ○ 급성/아급성독성 평가

급성 평가는 실험군은 4군으로 각각 무처리군, 실험평가군으로 나누었으며, 무처리군은 생리 식염수, 실험평가군은 5,000 mg/kg의 고용량을 경구투여하였다. 14일 후의 혈액학적 및 병리학 적 변화를 측정하였다.

아급성독성시험은 4군으로 나누어 진행하였다. 폐각칼슘 1,000 mg/kg 투여군, 생리식염수 투여 군으로 14일 동안 투여 후 변화를 측정하였다.

### ○ 혈액생화학적 검사

복부대동맥에서 채혈한 혈액 중 일부를 혈액학적 검사로 이용하고 나머지 혈액은  $4^{\circ}\text{C}$  냉장 보관한 후 원심 분리(3,000 rpm, 20 min)하여 자동 생화학검사기(Express 550)를 이용하여 TPROT(total protein), ALB(albumin), TBILI(total bilirubin), AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), GLU(glucose), CREAT(creatinine), BUN(blood urea nitrogen) 등을 측정하였다.

### ○ 혈액학적 검사

부검 전 1일간 절식시킨 후, ether로 마취시켜 복부 대동맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 항응고제로 EDTA-2K가 함유된 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 혈액학적 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), Hct(hematocrit), BLP(blood platelet), MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration) 등을 측정 하였다.

### ○ 체중 및 식이섭취량의 변화

폐각칼슘에 대한 독성 실험을 진행한 결과(Table 3.2.93), 체중증가량, 식이섭취의 변화에 control과 실험 평가군 사이에 유의적인 차이가 없었다.



Table 3.2.93 Body weight gain and daily intake of SD rats treated orally with 폐각칼슘 for acute/subacute toxicity test

	Group for acute toxicity <sup>a</sup>		Group for subacute toxicity <sup>b</sup>	
	Control	폐각칼슘	Control	폐각칼슘
Female				
Body weight gain (g)	66.88±5.26	50.88±8.45	35.66±15.88	48.16±14.39
Food intake (g/day)	16.97±0.95	14.87±0.64	13.18±1.01	14.77±0.81
Male				
Body weight gain (g)	112.54±10.82	113.74±11.27	108.36±9.31	109.88±13.11
Food intake (g/day)	21.37±0.63	21.98±0.52	21.46±0.81	22.10±0.74

Values are means±SD for 5 rats/group. <sup>a</sup>The group for acute toxicity was given water vehicle or 폐각칼슘 at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days. <sup>b</sup>The group for subacute toxicity was given water vehicle or 폐각칼슘 at 1,000 mg/kg daily for 14 days. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

○ 전혈에서 변화

폐각칼슘을 경구 투여후의 전혈(whole blood)에서의 혈액지표들을 평가한 결과(Table 3.2.94), 모든 Hematological parameters에서의 control과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없었다. 이러한 결과는 acute 및 subacute test에서 모두 동일하게 나타났다. 안전성이 확보되어 있음을 의미한다.

Table 3.2.94 Hematological parameters of SD rats treated orally with 폐각칼슘 for acute and subacute toxicity test

Hematological parameters	Group for acute toxicity <sup>a</sup>		Group for subacute toxicity <sup>b</sup>	
	Control	폐각칼슘	Control	폐각칼슘
Female				
RBC (×10 <sup>6</sup> /μl)	7.04±0.88	7.65±1.39	7.16±0.90	7.76±0.27
WBC (×10 <sup>3</sup> /μl)	6.62±2.33	7.05±0.76	5.86±2.51	6.02±2.25
Hct (%)	44.58±5.25	46.98±8.11	43.58±5.43	48.66±1.55
Hgb (g/dl)	13.40±2.79	15.28±2.12	14.16±1.56	14.30±2.15
MCV (fl)	63.34±1.25	61.54±0.99	60.86±1.16	62.70±1.06
MCH (pg)	18.96±3.10	20.14±1.95	19.88±1.83	18.36±2.45
MCHC (g/dl)	29.96±5.23	32.78±3.19	32.64±3.01	29.32±3.97
Platelets (×10 <sup>3</sup> /μl)	1044.40±285.98	1100.20±227.56	1173.80±99.42	1098.20±234.01
Male				
RBC (×10 <sup>6</sup> /μl)	6.97±0.92	7.53±0.91	6.70±0.91	8.13±0.84
WBC (×10 <sup>3</sup> /μl)	6.13±1.08	6.19±1.21	6.05±0.80	9.14±1.67
Hct (%)	45.14±7.23	49.00±6.84	43.65±5.82	52.45±4.51
Hgb (g/dl)	14.02±1.39	14.85±2.65	12.55±2.24	15.98±1.06
MCV (fl)	64.52±2.40	64.98±2.32	65.15±1.34	64.68±1.72
MCH (pg)	20.20±1.27	19.58±1.45	18.78±2.54	19.70±0.80
MCHC (g/dl)	31.40±3.23	30.15±2.38	28.85±4.36	30.50±0.65
Platelets (×10 <sup>3</sup> /μl)	1249.00±269.95	1198.50±174.73	1125.75±342.37	1298.50±244.41

Values are means±SD for 5 rats/group. <sup>a</sup>The group for acute toxicity was given water vehicle or 폐각칼슘 at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days. <sup>b</sup>The group for subacute toxicity was given water vehicle or 폐각칼슘 at 1,000 mg/kg daily for 14 days. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

○ 혈액학적 변화

폐각칼슘을 경구 투여후의 혈액에서의 glucose, BUN, total protein, AST, ALT 등을 결과(Table 3.2.95), Acute test 결과 male group에서의 Total protein의 수치에서 폐각칼슘 실험군의 수치가 control과 유의적인 차이를 보였으나, 정상범위내의 수치이므로 독성과는 무관한 듯하다. 다른 혈액학적 지표는 유의적인 차이가 없다. Subacute test에서도 모두 혈액학적 지표에서 폐각칼슘 군과 control군 사이에 유의적인 차이가 없었다. 혈액학적 지표의 경우 acute와 subacute test에서는 독성이 관찰되지 않았다.

Table 3.2.95 Blood biochemical parameters of SD rats treated orally with 폐각칼슘 for acute and subacute toxicity test.

Blood biochemical parameters	Group for acute toxicity <sup>a</sup>		Group for subacute toxicity <sup>b</sup>	
	Control	폐각칼슘	Control	폐각칼슘
Female				
Glucose (mg/dl)	72.80±9.23	71.60±11.52	115.20±48.65	82.20±11.34
BUN (mg/dl)	18.30±2.30	22.14±5.13	19.58±2.19	19.06±2.50
Creatinine (mg/dl)	0.22±0.04	0.26±0.05	0.28±0.04	0.30±0.07
Total protein (g/dl)	6.24±0.21	6.08±0.16	6.12±0.28	6.08±0.29
Albumin (g/dl)	3.98±0.24	3.80±0.07	3.78±0.40	3.92±0.24
Total bilirubin (mg/dl)	0.46±0.09	0.44±0.05	0.44±0.09	0.42±0.13
AST (U/l)	89.80±17.54	87.20±17.54	95.40±10.62	75.40±11.74
ALT (U/l)	24.40±3.13	22.80±4.76	20.20±3.90	21.60±1.95
Male				
Glucose (mg/dl)	101.40±16.07	130.80±53.37	149.80±14.52	159.40±52.80
BUN (mg/dl)	17.78±3.68	16.90±1.21	18.34±0.84	17.70±1.20
Creatinine (mg/dl)	0.18±0.04	0.16±0.05	0.16±0.05	0.18±0.08
Total protein (g/dl)	5.96±0.11	6.24±0.25	6.10±0.22	6.12±0.23
Albumin (g/dl)	3.90±0.22	4.10±0.20	4.00±0.28	3.94±0.32
Total bilirubin (mg/dl)	0.32±0.08	0.34±0.05	0.34±0.05	0.36±0.05
AST (U/l)	86.40±8.56	100.40±13.16	76.60±7.44	67.60±3.78
ALT (U/l)	30.20±4.15	29.80±3.11	28.20±1.79	28.20±3.56

Values are means±SD for 5 rats/group. <sup>a</sup>The group for acute toxicity was given water vehicle or 폐각칼슘 at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days. <sup>b</sup>The group for subacute toxicity was given water vehicle or 폐각칼슘 at 1,000 mg/kg daily for 14 days. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

○ 장기의 무게변화

폐각칼슘을 경구 투여후의 장기의 무게변화를 측정한 결과(Table 3.2.96), 간, 신장, 심장, 비장 등의 무게 변화는 control과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없었다. Male과 Female에서의 변화 역시 유의적인 차이가 없었다. 이는 폐각칼슘 안전성이 확보되어 있음을 의미한다.

Table 3.2.96 Relative organ weights of SD rats treated orally with 패각칼슘 for acute and subacute toxicity test

Relative organ weight (g/100 g of body weight)	Group for acute toxicity <sup>a</sup>		Group for subacute toxicity <sup>b</sup>	
	Control	패각칼슘	Control	패각칼슘
Female				
Liver	3.02±0.31	2.83±0.11	3.27±0.39	2.77±0.50
Kidney	0.72±0.07	0.66±0.04	0.69±0.07	0.71±0.05
Spleen	0.27±0.04	0.26±0.02	0.27±0.02	0.26±0.02
Heart	0.41±0.04	0.42±0.02	0.42±0.03	0.39±0.04
Male				
Liver	3.09±0.19	3.15±0.34	3.02±0.09	3.01±0.06
Kidney	0.69±0.04	0.74±0.05	0.73±0.06	0.73±0.04
Spleen	0.24±0.02	0.24±0.02	0.23±0.02	0.23±0.02
Heart	0.40±0.03	0.38±0.03	0.37±0.03	0.40±0.03

Values are means±SD for 5 rats/group. <sup>a</sup>The group for acute toxicity was given water vehicle or 패각칼슘 at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days. <sup>b</sup>The group for subacute toxicity was given water vehicle or 패각칼슘 at 1,000 mg/kg daily for 14days. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

이상의 결과에 의하면 패각칼슘은 기존에 식품 원료로 사용되고 있는 소재로 이미 안전성이 확보되어 있고, Acute과 subacute test 결과 독성이 없는 것으로 사료된다.

#### 사. DHA 의 급성 및 아급성 실험을 통한 안전성 평가

##### (1) 실험방법

###### ○ 시험동물 및 사육조건

시험 동물은 대한바이오에서 생산된 SPF(특정 병원체 부재) Sprague-Dawley(SD)계 랫드를 분양받아 순화시킨 후 평균 체중에 가까운 동물을 선택하여 온도 23℃±3℃, 상대습도 50%±10%, 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시) 및 조도 150-600 Lux로 전 시험기간 동안 폴리카보네이트 사육상자(240 W×390 L×175 H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121℃에서 15분간 멸균하여 사용 하였고, 물과 사료는 자유 섭취시켰다.

###### ○ 시험물질

시험물질인 DHA 시료를 두산글로벌에서 제공 받아 사용하였다.

###### ○ 급성/아급성독성 평가

급성 평가는 실험군은 4군으로 각각 무처리군, 실험평가군으로 나누었으며, 무처리군은 생리 식염수, 실험평가군은 5,000 mg/kg의 고용량을 경구투여하였다. 14일 후의 혈액학적 및 병리학 적 변화를 측정하였다.

아급성 독성시험은 4군으로 나누어 진행하였다. DHA 1,000 mg/kg 투여군, 생리식염수 투여군으로 14일 동안 투여 후 변화를 측정하였다.

○ 혈액생화학적 검사

복부대동맥에서 채혈한 혈액 중 일부를 혈액학적 검사로 이용하고 나머지 혈액은 4°C 냉장 보관한 후 원심 분리(3000 rpm, 20 min)하여 자동 생화학검사기(Express 550)를 이용하여 TPROT(total protein), ALB(albumin), TBILI(total bilirubin), AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), GLU(glucose), CREAT(creatinine), BUN(blood urea nitrogen) 등을 측정하였다.

○ 혈액학적 검사

부검 전 1일간 절식시킨 후, ether로 마취시켜 복부 대동맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 항응고제로 EDTA-2K가 함유된 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 혈액학적 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), Hct(hematocrit), BLP(blood platelet), MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration) 등을 측정 하였다.

(2) DHA의 안전성 평가 결과

○ 체중 및 식이섭취량의 변화

DHA에 대한 독성 실험을 진행한 결과(Table 3.2.97), 체중증가량, 식이섭취의 변화에 control과 실험 평가군 사이에 유의적인 차이가 없었다.

Table 3.2.97 Body weight gain and daily intake of SD rats treated orally with DHA for acute/subacute toxicity test

	Group for acute toxicity <sup>a</sup>		Group for subacute toxicity <sup>b</sup>	
	Control	DHA	Control	DHA
Female				
Body weight gain (g)	66.88±5.26	48.40±8.04	35.66±15.88	49.20±6.64
Food intake (g/day)	16.97±0.95	15.04±0.70	13.18±1.01	15.01±0.73
Male				
Body weight gain (g)	112.54±10.82	115.02±1.82	108.36±9.31	109.00±11.46
Food intake (g/day)	21.37±0.63	21.80±0.58	21.46±0.81	21.21±0.42

Values are means ± SD for 5 rats/group. <sup>a</sup>The group for acute toxicity was given water vehicle or DHA at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days. <sup>b</sup>The group for subacute toxicity was given water vehicle or DHA at 1,000 mg/kg daily for 14 days. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

○ 전혈에서 변화

DHA를 경구 투여후의 전혈(whole blood)에서의 혈액지표들을 평가한 결과(Table 3.2.98), 모든 Hematological parameters에서의 control과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없었다. 이러한 결과는 acute 및 subacute test에서 모두 동일하게 나타났다. 안전성이 확보되어 있음을 의미한다.

Table 3.2.98 Hematological parameters of SD rats treated orally with DHA for acute and subacute toxicity test

Hematological parameters	Group for acute toxicity <sup>a</sup>		Group for subacute toxicity <sup>b</sup>	
	Control	DHA	Control	DHA
Female				
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	7.04 $\pm$ 0.88	7.85 $\pm$ 0.62	7.16 $\pm$ 0.90	7.39 $\pm$ 0.80
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	6.62 $\pm$ 2.33	5.88 $\pm$ 1.45	5.86 $\pm$ 2.51	6.07 $\pm$ 1.80
Hct (%)	44.58 $\pm$ 5.25	48.68 $\pm$ 4.00	43.58 $\pm$ 5.43	46.13 $\pm$ 5.71
Hgb (g/dl)	13.40 $\pm$ 2.79	15.14 $\pm$ 1.32	14.16 $\pm$ 1.56	15.63 $\pm$ 0.57
MCV (fl)	63.34 $\pm$ 1.25	62.02 $\pm$ 1.55	60.86 $\pm$ 1.16	62.38 $\pm$ 2.33
MCH (pg)	18.96 $\pm$ 3.10	19.26 $\pm$ 0.17	19.88 $\pm$ 1.83	21.38 $\pm$ 2.49
MCHC (g/dl)	29.96 $\pm$ 5.23	31.10 $\pm$ 0.73	32.64 $\pm$ 3.01	34.20 $\pm$ 3.97
Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1044.40 $\pm$ 285.98	1121.80 $\pm$ 439.63	1173.80 $\pm$ 99.42	1167.50 $\pm$ 89.60
Male				
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	6.97 $\pm$ 0.92	7.28 $\pm$ 0.83	6.70 $\pm$ 0.91	7.96 $\pm$ 0.61
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	6.13 $\pm$ 1.08	6.82 $\pm$ 1.50	6.05 $\pm$ 0.80	7.53 $\pm$ 1.51
Hct (%)	45.14 $\pm$ 7.23	46.62 $\pm$ 4.61	43.65 $\pm$ 5.82	50.60 $\pm$ 4.60
Hgb (g/dl)	14.02 $\pm$ 1.39	15.06 $\pm$ 0.36	12.55 $\pm$ 2.24	14.95 $\pm$ 1.63
MCV (fl)	64.52 $\pm$ 2.40	64.20 $\pm$ 1.86	65.15 $\pm$ 1.34	63.58 $\pm$ 2.01
MCH (pg)	20.20 $\pm$ 1.27	20.94 $\pm$ 2.60	18.78 $\pm$ 2.54	18.75 $\pm$ 1.01
MCHC (g/dl)	31.40 $\pm$ 3.23	32.62 $\pm$ 3.58	28.85 $\pm$ 4.36	29.48 $\pm$ 1.20
Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1249.00 $\pm$ 269.95	1212.00 $\pm$ 228.28	1125.75 $\pm$ 342.37	1278.75 $\pm$ 100.19

Values are means $\pm$ SD for 5 rats/group. <sup>a</sup>The group for acute toxicity was given water vehicle or DHA at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days. <sup>b</sup>The group for subacute toxicity was given water vehicle or DHA at 1,000 mg/kg daily for 14 days. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

○ 혈액학적 변화:

DHA를 경구 투여후의 혈액에서의 glucose, BUN, total protein, AST, ALT 등을 결과 (Table 3.2.99), Acute test 결과 male group에서의 Total protein의 수치에서 DHA 실험군의 수치가 control과 유의적인 차이를 보였으나, 정상범위내의 수치이므로 독성과는 무관한 듯하다. 다른 혈액학적 지표는 유의적인 차이가 없다. Subacute test에서도 모두 혈액학적 지표에서 DHA군과 control군 사이에 유의적인 차이가 없었다. 혈액학적 지표의 경우 acute와 subacute test에서는 독성이 관찰되지 않았다.

Table 3.2.99 Blood biochemical parameters of SD rats treated orally with DHA for acute and subacute toxicity test.

Blood biochemical parameters	Group for acute toxicity <sup>a</sup>		Group for subacute toxicity <sup>b</sup>	
	Control	DHA	Control	DHA
Female				
Glucose (mg/dl)	72.80 $\pm$ 9.23	67.80 $\pm$ 13.22	115.20 $\pm$ 48.65	86.80 $\pm$ 15.48
BUN (mg/dl)	18.30 $\pm$ 2.30	19.94 $\pm$ 1.19	19.58 $\pm$ 2.19	16.16 $\pm$ 0.97
Creatinine (mg/dl)	0.22 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.08	0.28 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.05
Total protein (g/dl)	6.24 $\pm$ 0.21	6.22 $\pm$ 0.52	6.12 $\pm$ 0.28	6.06 $\pm$ 0.30
Albumin (g/dl)	3.98 $\pm$ 0.24	3.96 $\pm$ 0.32	3.78 $\pm$ 0.40	3.84 $\pm$ 0.30
Total bilirubin (mg/dl)	0.46 $\pm$ 0.09	0.54 $\pm$ 0.21	0.44 $\pm$ 0.09	0.40 $\pm$ 0.07

AST (U/l)	89.80±17.54	93.20±26.82	95.40±10.62	83.00±14.98
ALT (U/l)	24.40±3.13	25.80±6.14	20.20±3.90	22.60±2.97
Male				
Glucose (mg/dl)	101.40±16.07	115.40±16.07	149.80±14.52	152.60±37.04
BUN (mg/dl)	17.78±3.68	16.12±1.64	18.34±0.84	15.80±0.60
Creatinine (mg/dl)	0.18±0.04	0.14±0.05	0.16±0.05	0.18±0.08
Total protein (g/dl)	5.96±0.11	6.04±0.15	6.10±0.22	6.14±0.13
Albumin (g/dl)	3.90±0.22	3.76±0.21	4.00±0.28	4.10±0.27
Total bilirubin (mg/dl)	0.32±0.08	0.32±0.04	0.34±0.05	0.34±0.05
AST (U/l)	86.40±8.56	90.20±11.95	76.60±7.44	75.60±11.55
ALT (U/l)	30.20±4.15	29.00±4.18	28.20±1.79	35.00±17.32

Values are means±SD for 5 rats/group. <sup>a</sup>The group for acute toxicity was given water vehicle or DHA at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days. <sup>b</sup>The group for subacute toxicity was given water vehicle or DHA at 1,000 mg/kg daily for 14 days. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

### ○ 장기의 무게변화

DHA를 경구 투여후의 장기의 무게변화를 측정 한 결과(Table 3.2.100), 간, 신장, 심장, 비장 등의 무게 변화는 control과 실험군 사이에 유의적인 차이는 없었다. Male과 Female에서의 변화 역시 유의적인 차이가 없었다. 이는 DHA 안전성이 확보되어 있음을 의미한다.

Table 3.2.100 Relative organ weights of SD rats treated orally with DHA for acute and subacute toxicity test

Relative organ weight (g/100 g of body weight)	Group for acute toxicity <sup>a</sup>		Group for subacute toxicity <sup>b</sup>	
	Control	DHA	Control	DHA
Female				
Liver	3.02±0.31	3.17±0.30	3.27±0.39	3.08±0.22
Kidney	0.72±0.07	0.72±0.03	0.69±0.07	0.73±0.02
Spleen	0.27±0.04	0.26±0.03	0.27±0.02	0.26±0.02
Heart	0.41±0.04	0.40±0.03	0.42±0.03	0.46±0.06
Male				
Liver	3.09±0.19	3.14±0.23	3.02±0.09	3.08±0.33
Kidney	0.69±0.04	0.71±0.06	0.73±0.06	0.71±0.03
Spleen	0.24±0.02	0.24±0.02	0.23±0.02	0.24±0.03
Heart	0.40±0.03	0.41±0.04	0.37±0.03	0.36±0.03

Values are means±SD for 5 rats/group. <sup>a</sup>The group for acute toxicity was given water vehicle or DHA at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days. <sup>b</sup>The group for subacute toxicity was given water vehicle or DHA at 1,000 mg/kg daily for 14days. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

이상의 결과에 의하면 DHA는 기존에 식품 원료로 사용되고 있는 소재로 이미 안전성이 확보되어 있고, Acute과 subacute test 결과 독성이 없는 것으로 사료된다.

### ○ 혈액내의 HxPro 함량의 변화

돈테반 가수분해물을 14동안 경구투여하는 동안 1, 3, 9, 14일째의 혈액을 채취하여

HxPro(hydroxyproline)의 함량 변화를 측정 한 결과(Figure 3.2.203), 경구투여 1일 후부터 함량이 증가하는 경향을 보였으며, 3일 이후에는 함량의 변화가 거의 없었다. 이는 collagen소재를 섭취 시 3일 이후에 최고의 함량을 보이는 듯 하며, 흡수정도는 3일 이후의 큰 변화가 없는 것으로 추정 된다.

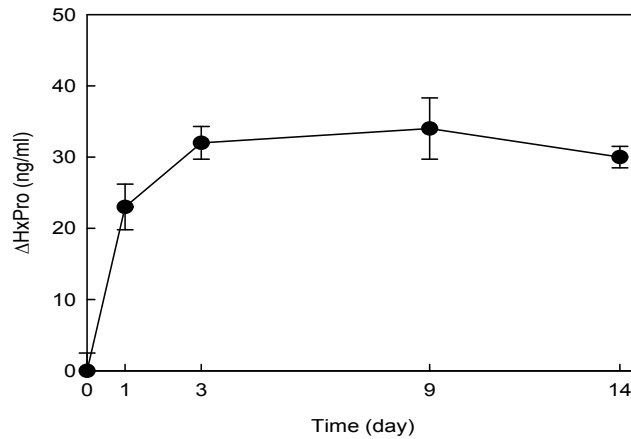


Figure 3.2.203 Changes of serum hydroxyproline (HxPro) in SD rat.

아. 가용성 콜라겐의 피부 안전성 평가(돈태반추출물에 대한 안전성 평가)

본 연구는 기능성 화장품 소재화에 있어 가장 중요한 부분인 안전성 시험을 무모취를 이용하여 자외선 B를 조사시킨 후 돼지태반추출물을 경구로 투여하거나 화장품으로 도포한 후 장기에 미치는 독성 정도를 알아보았고, 또한 자극에 의한 반응이 사람 피부와 유사한 기니피그를 이용하여 1차 피부자극 시험 및 감작성 시험을 실시하여 SPE의 기능성 및 식이 화장품 소재로서의 응용가능성을 탐색하고자 하였다.

(1) 실험 재료 및 방법

○ 재료

본 연구에 사용된 돼지태반은 sodium hydrate solution(NaOH)용액으로 깨끗이 세척한 후 1 cm 정도의 크기로 잘게 분획하였다. 그리고 얇게 썬 조직은 phosphate buffered saline(PBS) 용액에 담근 후 잔류물질을 제거하고 동결건조 시켰다. 분획된 돼지태반은 분쇄기(HR-2084, Philips Electronics N.V., Eindhoven, Netherland)로 10분 동안 균질화 시킨 후 원심분리를 하였다. 아임계 추출 시스템(DIONEX ASE 100, Dionex corporation, Sunnyvale, CA, USA)을 통해 침전물 233 g과 증류수 467 mL를 혼합한 총 700 mL를 고압용기에 넣은 후 초기 압력을 375 bar로 가한 후 온도를 200℃까지 올린 후 3시간 동안 추출하였다. 이렇게 추출한 돼지태반추출물은 2,800×g 에서 20분간 원심분리 시킨 후 상등액을 취하여 40℃에서 vacuum evaporator를 사용하여 농축시켰으며, 생산된 SPE는 동결건조 시켰다. 본 연구에 사용한 화장품의 조성은 모두 크림 타입으로 조성은 Table 3.2.101과 같다.

Table 3.2.101 Composition of cosmetic formation

Cosmetic formulation	Composition (%)		
	Vehicle <sup>1)</sup>	5% FSPE <sup>2)</sup>	10% FSPE
Deioized water	90.24	89.44	84.44
Hydroxyethylcellulose	0.09	0.09	0.09
Carbomer	0.20	0.20	0.20
Glycerin	3.50	0.50	0.50
Butylene glycol	2.00	2.00	2.00
Porcine placenta extract	-	5.00	10.00
Niacinamide	0.10	0.10	0.10
Allantoin	0.10	0.10	0.10
Panthenol	0.20	0.20	0.20
Ethanol	3.00	3.00	3.00
Triethanolamine	0.20	0.20	0.20
Methylparaben	0.12	0.12	0.12
PEG-60 Hydrogenated Caster oil	0.25	0.25	0.25
Polyacrylate-13/Polyisobuten/polysorbate-20	0.80	0.80	0.80
Total	100.00	100.00	100.00

<sup>1)</sup>Vehicle; base formulation, <sup>2)</sup>FSPE; subcritical extract of homogenate of placenta topical application treatment.

#### ○ 실험동물의 사육조건

본 연구에 사용한 동물은 건강한 6주령 수컷 SKH-1 무모쥐(Labanimal Co., Seoul, Korea)와 Hartley 기니피그(Dae Han Biolink Co., Eumseong, Korea)을 구입하여 사용하였다. 무모쥐는 구입하고 1주간의 적응기를 거쳐 7주령의 무모쥐를 실험에 이용하였다. 사육실의 사육조건은 온도 23±3℃, 습도 50±10%, 환기 횟수 15회/시간, 조도 150~300 Lux, 명암주기 12시간(08:00-20:00)으로 자동 유지되도록 하였다. 무모쥐는 사육케이지 당 6마리씩, 기니피그는 사육케이지 당 1마리씩 개별 사육하였다. 연구기간동안 사료와 음수는 자유롭게 급식시켰다. 본 실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회 승인을 받은 후(승인번호 KUIACUC-20130902-2) ‘실험동물 관리 및 이용에 관한 지침’에 맞추어 관리하면서 실시하였다.

#### ○ UVB 조사 및 돼지태반추출물의 처치:

Ultra violet(VB) lamp(280-320 nm, Sankyo Denki Co. Ltd., Tokyo, Japan) 두개를 검은 아크릴 상자(90×25×50 cm)에 설치한 후 실험을 진행함에 따라 조사량을 점차적으로 늘려 실험하였다. 총 12주의 연구기간 동안 주3회 UVB 조사를 시행하였다. 첫 주의 조사량인 36 mJ/cm<sup>2</sup>으로 시작하여, 54, 72, 108, 122, 144, 180, 그리고 198 mJ/cm<sup>2</sup>의 조사량까지 점차적으로 조사량을 늘려 무모쥐의 등에 조사하였다. 무모쥐는 각 군당 6마리씩으로 UVB를 조사하지 않고, 경구투여나 경피투여를 하지 않은(PO)군과 UVB 조사 후 아무것도 바르지 않은(NO)군과 low dosage의 경구투여(OSPE-1)군, high dosage의 경구투여(OSPE-2)군, low dosage의 경피-경구 동시투여(OSPE-1+FSPE-1)군, 그리고 high dosage의 경피-경구 동시투여(OSPE-2+FSPE-2)군으로 총 6군으로 나누어 진행하였다. 경구투여군의 low dosage의 경우 SPE 0.05 %, high dosage의 경우 0.1%의 농도로 만들어 자유 급수하게 하였다. 경피 투여군의 경우 5%와 10%의 크림 형태의 화장품으로 만든 후, low dosage(5%)의 경우 0.2 mg/cm<sup>2</sup>으로, high dosage (10%)의



경우 0.4 mg/cm<sup>2</sup>으로 무모취 등피부의 5 cm×5 cm 부위에 UVB 조사가 끝난 직후 처치하였다.

○ 몸무게, 장기 무게의 측정 및 혈액 분석

체중은 총 12주의 연구기간 동안 매주 측정하였다. 마지막 주에 12시간 절식시킨 실험동물을 CO<sub>2</sub>로 마취시켜 희생을 시키고 난 후 심장으로부터 혈액을 채취한 후 심장, 신장, 간과 비장의 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 4℃, 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 혈장을 취하였다. 채취한 혈장은 혈액자동분석기(FUJI DRI-CHEM 3500, Fuju Photo Film Co., Japan)로 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST)와 lactate dehydrogenase(LDH)의 수치를 측정하였다.

○ 1차 피부자극 시험

1차 피부자극 시험(primary skin irritation test)은 Draize 방법으로 실시하였으며, SPE의 경우 농도는 화장품 사용 예정량 1%의 10배인 10%로 하여 실시하였다. 실험 시작 24시간 전에 clipper와 일반 면도기를 이용하여 제모 하여 제모에 의한 피부자극을 안전화 시킨 후 다음날 사용하였다. 제모한 10마리의 기니피그를 이용하여 각 동물의 등 부위를 약 1.5 cm×1.5 cm 정도의 크기로 척추를 중심으로 4구획을 만들었다. 표시된 부위 중 오른쪽 부위를 주사기 바늘을 이용하여 대각선 방향으로 각질층만 손상되고 진피는 손상되지 않도록 피가 나지 않을 정도의 찰과상을 내어 비찰과 피부 2개소와 찰과 피부 2개소로 나누었다(Figure 3.2.204). Figure 3.2.206의 A와 B 구획은 대조물질(생리식염수)을, C, D 구획에는 SPE 10% 시료를 각각 0.5 mL 씩 천천히 도포하였다. 도포를 마친 후 시험부위 전체를 Tegaderm으로 덮고, 탄력붕대로 감싼 다음 3M 종이테이프(3M company, Springfield, MO, USA)로 가장자리를 잘 고정하였다. 시험물질 도포 24시간 후 거즈를 제거하고, 잔류물이 피부에 영향을 미치지 않도록 미온수로 씻어내었다. 세정을 마친 다음, 24시간 간격으로 72시간까지 관찰하면서 피부반응을 ‘의약품 등의 독성시험기준’의 피부자극반응 평가표(Table 3.2.102)에 따라 평가하여, 1차 피부자극지수(primary irritation index, P.I.I.)를 산출하였고, 자극성을 Table 3.2.103에 따라 판정하였다.

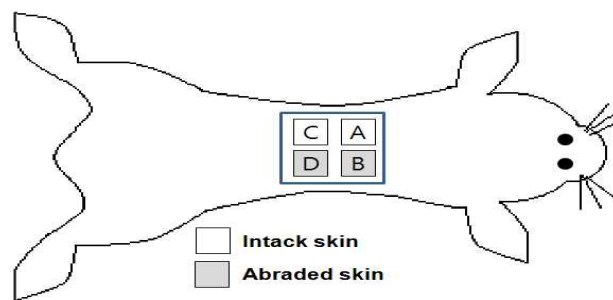


Figure 3.2.204 The evaluation on primary skin irritation of SPE. A; control site (intact skin), B; control site (abraded skin), C; treated with SPE (intact skin), D; treated with SPE (abraded skin), SPE; subcritical extract of porcine homogenate of placenta.

Table 3.2.102 Evaluation of skin reaction

Skin reaction	Score
<i>Formation of erythema and eschar formation</i>	
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4
<i>Formation of Edema</i>	
No edema	0
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edge of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (raised approximately 1 mm)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond the area of exposure)	4

Table 3.2.103 Primary irritation index (P.I.I.) according Draze method

Classification	P.I.I. <sup>1)</sup>
Pratically non-irritation	0.0-0.5
Slight irritation	0.6-2.0
Moderate irritation	2.1-5.0
Severe irritation	5.1-8.0

<sup>1)</sup>P.I.I.; primary irritation index, P.I.I. calculation= $\Sigma$  total mean score/animal Number $\times$ 4)

#### ○ 피부감작성 시험

피부감작성 시험(skin sensitization test)은 Maximization Test법으로 실시하였으며, 각 군당 기니피그 5마리씩을 사용하여, 음성대조군(생리식염수), 양성대조군(dinitrochlorobenzene, DNCB) 및 SPE 10% 처리군으로 나누어 수행하였다. 제모는 1차 피부자극시험과 동일한 방법으로 수행하였다. 1차 감작을 위해, 제모한 기니피그의 등부위 각각의 피부(2 $\times$ 4 cm)에, Freund's complete adjuvant(FCA)을 음성대조군, 양성대조군 그리고 SPE 10% 처리군에 각각 0.1 mL씩 피내로 주사하였다.

1차 및 2차 감작노출량은 화장품 사용 예정량(1%)의 10배인 10% 용액을 사용하여 감작시켰다. SDS 전처리는 1차 감작 6일 후 시험물질에 의한 감작을 증강하기 위해 10%(w/v) SDS 함유 백색 바세린 0.5 g을 도포한 다음 24시간 후 SDS를 미온수로 씻어 내고 2차 감작을 실시하였다. 2차 감작은 1차 감작 1주 후 시험물질을 피내주사 했던 부위에 시험물질을 포함하는 패취

(2×4 cm)를 부착하여 48시간 동안 폐색첵포하여 감작시켰다. 2차 감작 2주 후 야기(challenge)를 실시하였으며, Figure 3.2.205의 야기부위에 부착하여 24시간 동안 폐색첵포하여 감작을 야기시켰다. 아임계 추출 10% 돼지태반추출물처리군의 야기 농도는 화장품 사용 예정량인 1%로 하였다. 24시간 야기 후 패취를 제거한 다음 미온수로 피부에 남아 있는 시험물질을 깨끗이 닦아낸 후 72시간까지 관찰하였다. 양성 대조군인 DNCB는 감작농도는 1.0%, 야기 농도는 0.1%로 적용하였다.

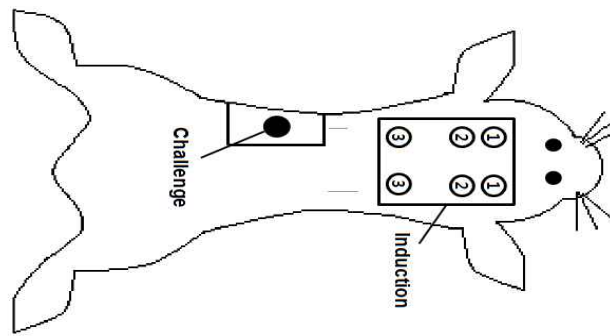


Figure 3.2.205 The evaluation of content allergenicity with maximization test. ①; intradermal injection of 0.1 mL distilled water+Freund' s complete adjuvant emulsion (1:1), ②; intradermal injection of 0.1 mL sample, ③; intradermal injection of 0.1 mL sample+Freund' s complete adjuvant emulsion (1:1).

○ 일반 증상의 관찰 및 체중측정

감작기간 중 매일 오전 10시와 오후 5시 일반적인 상태를 관찰 기록하였고, 매주 1회씩 체중을 측정하였다.

○ 피부의 관찰 및 평가방법

야기를 위해 부착했던 폐쇄첵포를 제거한 다음 24시간, 48시간 및 72시간에 ‘피부감작반응 평가표’ (Table 3.2.104)에 따라 반응을 평가하였으며, 각 군에서 반응을 보이는 개체로 양성반응율(%) [양성동물수/전체동물수×100]을 구하고 피부감작성의 정도를 평가하였다.

Table 3.2.104 Score of sensitization and maximization grade<sup>1)</sup>

Sensitization score	Erythema reaction state	Edema formation
0	No reaction	No edema
1	Scattered mild redness	Slight edema
2	Moderate and diffuse erythema	Moderate edema
3	Severe erythema with scar formation	Sever edema

<sup>1)</sup>Grade I (0~8%); weak sensitizer, Grade II(9~28%); mild sensitizer, Grade III (29~64%); moderate sensitizer, Grade IV (65~80%); strong sensitizer, Grade V (81~100%); extreme sensitizer.

## ○ 통계방법

연구결과는 SPSS 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계처리하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였다. 실험군 간의 유의성은 ANOVA test 후 구체적인 사후 검증은  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 실시하였다.

## (2) 실험결과

### ○ 체중 및 식이섭취량

총 6개로 나뉜 모든 처치군에서 처음 몸무게와 마지막 몸무게 모두 체중증가에 대한 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 음수량은 PO군과 OPSE-1군, OPSE-2군, OPSE-1+FSPE-1군과 OPS2+FSPE-2군과는 통계적으로 유의적인 차이가 있는 것으로 확인되었지만, UVB 조사에 따른 스트레스 때문으로 예상된다.

### ○ 장기무게

시료의 처치에 따른 독성을 평가하는 방법으로 체내 이상 현상을 확인하기 위하여 장기무게를 측정하였다. 12주 동안 시료를 투여하고 도포한 모든 군에서 사망 예는 없었으며, 설사, 구토, 활동상태 등의 일반증상 및 임상증상에서도 특이적인 변화는 관찰되지 않았다. 또한 시료 투여군의 모든 장기에서 육안적 소견상 특이할만한 병적소견 또한 관찰되지 않았다.

시료를 처치한 후 장기의 무게 변화는 Table 3.2.105에 나타내었다. 시료를 처치한 모든 군의 심장, 신장과 비장의 무게는 통계적으로 유의하지 않은 것으로 나타났으나, 간의 경우는 PO군과 OPSE-2+FSPE-2군에서 통계적으로 유의적인 차이를 나타내었다. 즉 시료를 low dosage로 먹이거나 바른 OPSE-1과 OPSE-1+FSPE-1군은 PO군과 간의 무게 비교에서 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, 시료를 high dosage로 먹이거나 바른 OPSE-2군, OPSE-2+FSPE-2군은 간에서 PO군과 비교하여 통계적으로 유의적인 차이를 보였다.

PO군과 OPSE-2군, OPSE-2+FSPE-2군과의 비교에서는 비장무게가 통계적으로 유의성은 없어 10%의 SPE 처치가 면역학적인 측면에서는 문제점은 없을 것으로 생각된다.

### ○ 혈액학적 검사

SPE 시료를 통한 경구와 경피투여의 독성을 알아보기 위하여, 무모쥐의 혈액을 채취하여 혈액학적 검사를 실시하였다(Table 3.2.105).

ALT는 크랩스회로(Krebs cycle)에서 아미노산으로부터 아미노기를 전위시켜 새로운 아미노산을 만드는 과정을 촉진하는 임상적으로 중요한 효소 중 하나이다. 또 다른 아미노기 전이효소(aminotransferase)인 AST와 다른 점은 ALT는 주로 간세포질 내에 풍부하며 그 외의 신장, 심장과 골격근에 분포되어 있으며, 급성 간세포 손상 시 더 예민한 지표가 된다. AST는 아미노산의 아미노기를 아미노산 잔기로 옮기는 촉매로서 임상적으로 중요한 효소 중 하나이다. 거의 모든 세포의 세포질과 미토콘드리아에서 발견되는데 주로 간장, 심장, 골격근, 신장, 췌장, 그리고 적은 양이지만 적혈구에 분포되어 있다. 이들 세포가 손상을 받으면 세포 내의 효소가 혈청 내로 유출되어서 혈청농도를 증가시켜 간 손상의 지표로 이용되는 효소이다. 세포질 내에서 LDH는 생체 내 해당계의 최종 단계에서 작용하는 효소로, L-lactate를 pyruvate로 전환하는 가

역반응을 촉매하는 효소로 세포의 손상이 있으면 혈중으로 유리되어 혈청 내에서 total LDH를 증가시켜, ALT와 AST와 같이 간질환의 지표로 사용된다.

독성물질은 체내에서 강한 독성을 유발시켜 ALT나 AST의 활성을 증가시키는 요인이 되는데, 본 연구의 결과에서는 무모취에 자외선 B를 조사시킨 후 처치한 모든 군에서 ALT와 AST의 수치는 PO군과 비교하여 통계적으로 유의적인 변화는 나타나지 않았다.

또한 본 연구에서 혈청 LDH의 수치는 OSPE-2+FSPE-2군은 562.5±63.9(U/L)로, NO군은 961.3±104.3(U/L)으로 나타나 통계적으로 유의적인 차이를 보였는데 혈청에서 LDH의 상승은 심장, 간장과 신장 등의 각종 질환과 악성종양 등에서 나타나는 것으로 알려져 있는데, UVB 조사 후 SPE를 고농도로 처치한 군에서 UVB 조사 후 아무것도 처치하지 않은 NO군에 비해 LDH의 수치가 낮아 SPE가 10%의 고농도에서도 간독성을 유발하지 않으며, UVB 조사로 생기는 산화스트레스에도 도움을 주는 것으로 생각된다.

Table 3.2.105. Effects of SPE<sup>1)</sup> intake and application on organ in growing hairless mouse

Group		Organ Weight(g)			
		Heart	Kidney	Liver	Spleen
No-UVB treated group	PO <sup>2)</sup>	0.23±0.0 <sup>NS7)</sup>	0.58±0.0 <sup>NS</sup>	1.42±0.1 <sup>ab</sup>	0.11±0.0 <sup>NS</sup>
UVB treated group	NO <sup>3)</sup>	0.23±0.0	0.52±0.0	1.33±0.1 <sup>bc</sup>	0.09±0.0
	OSPE-1 <sup>4)</sup>	0.21±0.0	0.52±0.0	1.32±0.1 <sup>ab</sup>	0.09±0.1
	OSPE-2 <sup>5)</sup>	0.21±0.1	0.67±0.1	1.26±0.1 <sup>a</sup>	0.09±0.1
	OSPE-1+FSPE-1 <sup>6)</sup>	0.23±0.2	0.54±0.0	1.37±0.1 <sup>ab</sup>	0.10±0.0
	OSPE-2+FSPE-2 <sup>7)</sup>	0.21±0.1	0.57±0.0	1.47±0.1 <sup>c</sup>	0.11±0.1

Means with different superscript letters within a row are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test. Value mean±SD (n=6). <sup>1)</sup>SPE; subcritical extract of porcine homogenate of placenta, <sup>2)</sup>PO; No-UVB treated, <sup>3)</sup>NO; only UVB treated, <sup>4)</sup>OSPE-1; subcritical extract of homogenate of placenta low dosage oral application treatment, <sup>5)</sup>OSPE-2; subcritical extract of homogenate of placenta high dosage oral application treatment, <sup>6)</sup>FSPE-1; subcritical extract of homogenate of placenta low dosage topical application treatment, <sup>7)</sup>FSPE-2; subcritical extract of homogenate of placenta high dosage topical application treatment, <sup>7)</sup>NS; not significant.

태반 추출물의 효과는 아직도 논란의 대상이다. 간 기능을 향상시켜주는 효과로 식약청에 승인받았고, 약물에 의한 간독성을 보인 쥐에서 세포질 효소(cytosolic enzyme)가 감소하고, 간 일부를 절제한 경우에는 간 재생효과를 보였다.

따라서 UVB 조사 후에 SPE 처치하여 혈중 ALT, AST 그리고 LDH의 수치변화를 관찰함으로써 돼지태반추출물 의해 유발되는 간독성에 대한 안전성 효과를 알아보았는데 PO군과 비교하여 SPE 처치 모든 군에서 유의적인 차이가 없는 것으로 보아, 시료의 처치로 인한 간독성은 없는 것으로 사료된다.

Table 3.2.106 Effects of SPE<sup>1)</sup> intake and application on biochemical markers in serum in growing hairless mouse

Group		biochemical markers (U/L)		
		ALT <sup>8)</sup>	AST <sup>9)</sup>	LDH <sup>10)</sup>
No-UVB treated group	PO <sup>2)</sup>	46.2±8.3 <sup>NS11)</sup>	78.0±9.5 <sup>NS</sup>	853.6±69.1 <sup>ab</sup>
	NO <sup>3)</sup>	72.0±19.1	122.5±27.4	961.3±104.3 <sup>b</sup>
UVB treated group	OSPE-1 <sup>4)</sup>	45.7±5.6	90.2±10.7	741.0±98.0 <sup>ab</sup>
	OSPE-2 <sup>5)</sup>	37.8±12.0	78.2±5.4	668.8±7.5 <sup>ab</sup>
	OSPE-1+FSPE-1 <sup>6)</sup>	65.3±8.8	126.7±11.1	666.4±93.8 <sup>ab</sup>
	OSPE-2+FSPE-2 <sup>7)</sup>	61.5±21.0	81.0±3.1	562.5±63.9 <sup>a</sup>

Means with different superscript letters within a row are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test. Value mean±SD (n=6). <sup>1)</sup>SPE; subcritical extract of porcine homogenate of placenta, <sup>2)</sup>PO; Not UVB treated, <sup>3)</sup>NO; only UVB treated; <sup>4)</sup>OSPE-1; subcritical extract of homogenate of placenta low dosage oral application treatment, <sup>5)</sup>OSPE-2; subcritical extract of homogenate of placenta high dosage oral application treatment, <sup>6)</sup>FSPE-1; subcritical extract of homogenate of placenta low dosage topical application treatment, <sup>7)</sup>FSPE-2; subcritical extract of homogenate of placenta low dosage topical application treatment, <sup>8)</sup>ALT; alanine aminotransferase, <sup>9)</sup>AST; aspartate aminotransferase, <sup>10)</sup>LDH; lactate dehydrogenase, <sup>11)</sup>NS; not significant.

#### ○ 일반 중독증상 평가

1차 자극을 평가하기 위하여 시험물질을 처리한 그룹의 동물에서는 시험물질에 의한 특이한 일반증상 및 사망의 예는 관찰되지 않았다. 피부감작실험을 위하여 폐색척포한 모든 개체에서 약간의 체중감소가 있었으나, 이는 고정에 의한 물리적인 스트레스에 의한 것으로 폐색척포를 제거한 후에는 정상으로 회복하였다. 그러나 피부감작성을 측정하기 위해 DNCB를 투여한 그룹에서는 피부에 중등도에 이르는 홍반과 부종이 관찰되었으며, 외부자극에 과민하게 반응하는 행동을 보였으나 이로 인한 사망은 관찰되지 않았다.

#### ○ 1차 피부자극의 평가

찰과 부위와 비찰과 부위에 24시간 폐색척포 후 척포물을 제거한 다음 24, 48, 72시간째에 관찰한 결과를 Figure 3.2.208에 나타내었다. 대조군(생리식염수)과 시험군(SPE 10%) 모두에서는 부종과 홍반이 전혀 관찰되지 않았다. Draze법에 의한 1차 피부자극지수(primary irritation index, P.I.I.)를 산출한 결과 대조군은 0.08, SPE 10%군은 0.48로 모두 practically non-irritation로 나타났다. SPE의 경우 10%의 고농도로 적용해도 P.I.I.가 0.48로 약간의 자극은 관찰되었으나 이는 비자극성에 해당하는 자극으로 특히 실제로 임상에서는 이보다 낮은 용량을 적용할 경우가 많을 것으로 피부안전성은 충분하다고 판단된다.

(SPE 10%)

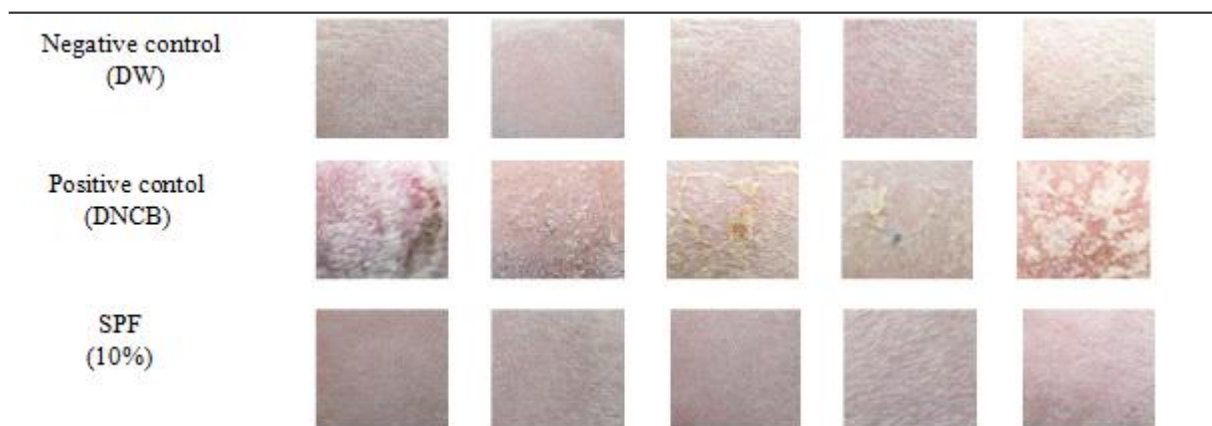
Skin reaction	h	Score of skin irritation (animal number)										Mean score	P.I.I <sup>2)</sup>			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
		Control site (DW)	Intact skin	Erythema	24	0	0	0	0	0	0			0	0	0
			72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Edema	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abraded skin	Erythema	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			72	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2
		Edema	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Treated site (SPE <sup>1)</sup> 10%)	Intact skin	Erythema	24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.1
			72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Edema	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abraded skin	Erythema	24	0	1	1	0	2	0	2	0	2	0	2	0	0.8
			72	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0.3
		Edema	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figure 3.2.206 The evaluation on primary skin irritation of SPE.

Mean score=total score/number of animal (10), <sup>1)</sup>SPE; subcritical extract of porcine homogenate of placenta, <sup>2)</sup>P.I.I.; primary irritation index, P.I.I. calculation= $\sum$  total mean score/animal number $\times$ 4).

### ○ 피부감작성 평가

모든 동물의 처리 부위를 시험물질을 1차 감작하고 야기처리 후 24, 48, 72시간째에 실시한 결과를 Figure 3.2.207에 나타내었다. Figure 3.2.209에 나타난 것처럼 DNCB로 처리한 양성대조군에서는 평균 감작반응 86% 정도의 홍반과 부종이 모든 동물에서 관찰되었지만, SPE로 처리한 군의 경우 약한 홍반과 부종이 관찰되기는 하였지만 평균 감작반응이 6.67%로 생리식염수로 처리한 음성대조군과 같이 grade 1으로 안전성에 문제가 없는 것으로 판단되었다. 특히 기능성이나 식이 화장품의 경우에는 효능감이 있어야 하기 때문에 사람을 통한 임상시험의 결과에 따라 효과를 판단하는 것이 원칙이다. 그러나 효능이나 부작용을 예측할 수 없는 물질을 처음부터 사람에게 적용한다는 것은 비과학적이며 비윤리적이기에 우선 동물실험을 통하여 효능을 검색하여야 할 것이다. 화장품이 갖추어야 할 여러 요소 중에서 안전성의 중요성은 아무리 강조해도 지나치지 않을 것이다. 의약품은 의사의 규제 아래에 통제가 가능하지만 화장품은 의사의 통제 없이 매일 지속적으로 사용되므로 안전성은 의약품 이상으로 중요시 되어야 한다.



Skin reaction			Sensitization score					Mean response	Sensitization rate (%)	Evaluation grade (class)	
Group	Induction	Challenge	1	2	3	4	5				
Negative control	DW <sup>2)</sup>	DW	24	0	0	0	1	1	0.2	2.22	I (weak)
			48	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0		
Positive control	1% DNCB <sup>3)</sup>	0.1% DNCB	24	3	3	3	3	3	3	86.00	V (extreme)
			48	3	3	3	3	2	2.8		
			72	1	3	2	2	2	2.0		
SPE <sup>1)</sup>	10%	1%	24	1	0	0	0	0	0.2	6.67	I (weak)
			48	1	0	0	0	0	0.2		
			72	1	0	0	0	0	0.2		

Figure 3.2.207 The evaluation of contact allergenicity with maximization test of SPE.

<sup>1)</sup>SPE; subcritical extract of porcine homogenate of placenta, <sup>2)</sup>DW; distilled water, <sup>3)</sup>DNCB; dinitrochlorobenzene.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

(1차 년도)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011- 2012)	<제1세부> 돼지태반으 로부터 콜라겐 펩타이드 추출을 위한 아임계수 추출공정 최적화	돼지태반의 성분분석(단백질, 지방, 수분, 비타민, 무기물)	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 삼우 축산에서 제공 받은 돼지태반 조성분 분석→전체 고형분 중 단백질84%, 지방9.07%, 무기물6.94% 존재함</li> <li>○ 아미노산 조성 분석을 통해 함유 되어진 아미노산 분석→Glycin의 함량이 다른 아미노산에 비해 두 배 정도 높은 것</li> </ul>
		아임계수 추출 시스템 구축(현재의 초고압장치 reactor내에 가열 및 냉각장치 설치(온도, 압력센서, heater, Cooler, by-pass valve)	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 초고압장치reactor의 온도와 압력, 시간의 관계 분석</li> <li>○ 1000bar에서 300℃~400℃사이까지 조절 가능한 reactor를 구축</li> <li>○ Cooler의 기본적인 설계를 완료</li> </ul>
		아임계수를 이용한 돼지태반의 가수분해 공정 최적화 - reactor 온도(200~400℃)와 압력(50~200 bar), 반응시간(1~20 min)에 따른 콜라겐 단백질 가수분해능 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 초고압을 이용한 태반의 가수분해→10,465 Da이던 펩타이드가 가수분해 후 5,996 Da로 분자량이 감소</li> <li>○ 압력과 온도의 시너지 효과 실험→150℃에서 진행된 경우 가장 작은4,266 Da</li> <li>○ 돼지 태반의 균질에 따른 가수분해능 분석→균질 시간이 감소할 수록 수용액 내 펩타이드 함량은 증가하는 것</li> <li>○ Zeta-potential, color, GPC, Ninhydrin, UV, Yield 분석 →태반의 아미노산 함량은 유기산을 사용한 경우 1일~2일에서 가장 높은 함량은 나타내었으나 이는 아임계 상태에서 가수분해 했을 때 보다 상대적으로 매우 낮은 수준 →아임계 상태에서 가수분해를 한 경우, 가수분해 시간과 온도가 증가함에 따라 아미노산 함량이 높게 나타났으며, 균질 시간이 증가하는 경우에는 아미노산 함량이 감소하는 것 →돼지 태반의 압력에 따라 큰 변화도는 없지만 온도와 합쳐질 때 시너지 효과를 얻을 수 있었고, 시간에 따른 변화도와 균질에 따른 가수분해능 분석</li> </ul>
		유기산 촉매제를 이용한 아임계수 가수분해 공정 최적화 - 유기산 반응촉매제(유산, 초산, 구연산), pH (4.0~7.0) 변화에 따른 콜라겐 단백질의 가수분해능 분석, 올리고 펩타이드 생성 수율분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유기산, 초산, 구연산, 염산을 이용해 pH를 조절한 후 가수분해→가수분해에 따른 수용성 펩타이드의 분자량의 변화를 측정된 결과 유기산을 사용 한 경우 분자량은 평균 1 kDa정도로 나타났다. pH 4의 경우 보다 pH 5에서 가수분해가 진행될수록 분자량이 감소</li> <li>○ Zeta-potential, color, GPC, Ninhydrin, UV, Yield 분석</li> <li>○ 기존의 초고압 데이터와 비교 분석</li> </ul>
		아미노산 및 콜라겐 펩타이드 분획 및 정제	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Dialysis kit를 통한 분자량 1000미만의 물질 분리 설계</li> </ul>

		- 아미노산 정량 및 콜라겐 펩타이드 분획 및 분자량 측정 - glycine, di-, tri-peptide 분리		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ GPC컬럼을 이용 가수분해물의 1000미만의 물질 파악</li> <li>○ 가수분해 후 3000 rpm에서 20분 간 원심분리로 불용성 펩타이드 침전물과 수용성 펩타이드 상등액을 분리하여, 분자량 20 kDa이하의 펩타이드를 얻었다. 이를 다시 Mega dialysis Kit(Pur-A-Lyzer, Sigma, USA)를 이용하여 분자량 1 kDa이하의 펩타이드만 24시간 동안 분리 및 정제</li> </ul>
고도 불포화 생리활성 지질류의 가용성 미세캡슐화 기술개발	<제1협동>	고도화 불포화 지방산 함유 지질의 가용화 저탄소·신가공 법을 이용한 고효율 추출기술 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유기용매, 초임계CO<sub>2</sub> 및 아임계CO<sub>2</sub>을 이용한 고도 불포화 지질류 최적 추출 공정개발</li> <li>○ 추출된 생리활성지질의 최적 정제기술 개발</li> <li>○ 추출된 생리활성지질의 성분분석</li> <li>○ Global sourcing 고도불포화 지방산 함유 지질의 성분분석</li> <li>○ 생리활성지질의 항산화능 개선을 위한 항산화제 개발</li> </ul>
		고도화 불포화 지방산의 가용화 미세캡슐화 기술 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생리활성지질의 안정화된 유화액 개발</li> <li>○ 전하를 갖는 바이오 폴리머(Biopolymers) Whey protein(WPI)와 Chitosan Multiple layer-by-layer 방법을 활용한 fish oil 입자 코팅기술 개발→키토산 및 펙틴으로 이루어진 3차 에멀전 제조시 가장 안정한 입자크기를 생산, 효과적인 산화안정성을 나타냄</li> <li>○ Biopolymer(WPI, pectin)의 hydrogel 입자 네 포집방법을 활용한 fish oil 입자 코팅기술 개발→O/W(WPI)/W(Pectin)시스템을 제조하여 hydrogel 형태의 입자를 생산</li> </ul>
		제품별 최적 공정조건확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 입자의 크기, zeta-potential 측정, 코팅효율, 산화안정성(불포화율), 이취 masking 효율 측정→500 nm이하의 입자크기, -10 mV의 음전하, 80% 이상의 코팅효율을 가진 입자를 생산</li> <li>○ Masking 효율증대를 위한 보조재료(레시틴) 첨가에 따른 산화안정성 연구→어유의 마스킹 효율을 증대하는 목적으로 0.05%의 시나몬 오일을 첨가함으로써 산화안정성 효과를 기대</li> <li>○ 분산매의 종류에 따른 분산정도 측정(turbidity, 가용화 정도, 색 등)→분산매에 따른 어유의 색 및 turbidity에는 큰 영향을 끼치지 않음</li> <li>○ 제품별 pilot plant type 성립 조건 기초자료 확립</li> </ul>
<제2협동> 난용성 칼슘제제의 가용화 기술		건식 나노분말화의 공정과 제품의 표준화(원재료 표준화, 공정 표준화, 완제품 표준화)	75	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 굴껍질 및 난각 전처리 과정 최적화(알칼리처리, 가열공정)→전처리를 위해 알칼리처리 및 가열처리를 하였지만 난막이 자연적으로 떨어지지 않았음</li> <li>○ 나노입자별 가공수율(95%이상), 가공시간, 가공비용→Ball milling을 이용하였지만 나노화가 불가능 하였으므로 Dry milling을 사용하는 에이펙셀에서 제공→사이즈별로 분쇄하였지만 사이즈 측정시사이즈별로 분류가 되지 않음을 확인하고 사이즈별로 분류 불가능함</li> </ul>

및 체내 흡수력이 우수한 칼슘 복합제제 개발	굴겹질과 난각을 통해 얻어진 나노분말의 특성	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 나노분말의 크기와 형태학적 분석(SEM)→일 반분말의 경우 180 μm, 나노분말의 경우는 200~300 nm의 입자를 사용하였으며 입자는 뾰족뾰족함</li> <li>○ 나노분말의 분자량 측정→나노분말의 XRD, FT-IR 등을 측정하여 나노분말의 화학구조 및 분자량이 변화지 않음을 확인</li> </ul>
	골다공증 치유를 위한 동물실험을 통한 굴겹질 및 난각나노분말의 생이용성 증진 효과 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 난소 절제수술 (5주령 흰쥐)</li> <li>○ 시료수집 (소변, 변, 혈액, 간, 신장, 뼈)</li> <li>○ 체중 성장률 측정→골다공증 유발은 쥐의 체 중은 여성호르몬이 없어서 지방이 더욱 증가 하는 경향을 볼 수 있음</li> <li>○ 혈중, 신장, 간, 대퇴골, 소변, 변에서의 칼슘 과 인의 함량 측정</li> <li>○ 생화학적 검사→혈청 내 osteocalcin의 양을 측정 시 나노분말의 식이를 한 쥐군에서 증가 하는 것으로 보아 치유효과 좋음. 소변 중 deozypyridinoline의 함량을 측정하였을 때 나노화하였을 때 감소하는 것을 보아 치유효 과 좋음</li> <li>○ 골대사검사→골체적비, 골소주두께, 골소주개 수가나노화한 분말을 식이 하였을 때 증가하 는 것을 볼 수 있었으며 골밀도의 경우는 정 상쥐와 유사한 양을 보여주므로 서 치유효과 가 있다고 사료됨</li> </ul>
<p>&lt;제3협동&gt;</p> <p>가용화 소재의 흡수율 및 생체 흡수율 및 가용화 콜라겐의 활성 평가</p>	칼슘 소재의 생체이용율 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 칼슘의 흡수율을 everted sac model을 이용 하여 평가→장(pH 7.4)에서 흡수율이 높은 경향을 나타냈다. 분획에 따른 칼슘시료의 흡 수율을 보면, 십이지장 환경에서 입자의 크기 가 작을수록 흡수율이 높게 나타낸 것을 확인</li> <li>○ 난소절제 모델을 이용하여 평가→나노칼슘 처 리군에서의 파골화 예방효과 확인</li> </ul>
	가용화 콜라겐의 흡수율 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Frantz cell model을 이용하여 평가→가수도 가 증가 할수록 흡수율 증가</li> <li>○ Everted sac model을 이용하여 평가→피부 흡수율 역시 가수분해도가 증가할수록 증가</li> </ul>
	가용화 지방산의 흡수율 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Frantz cell model을 이용하여 평가 →Lecithin+Chitosan solution+Low methoxyl pectin solution 경우흡수율 증가</li> <li>○ Rat model을 이용하여 평가→소장에서의 흡 수율 증가 확인</li> </ul>
	가용화 콜라겐의 melanocyte를 이용한 활성평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ HaCat cell에서 활성평가→UV protective effect를 확인함. MMP의 활성을 억제함에 따라 광노화 예방효과 확인</li> </ul>

(2차 년도)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012- 2013)	<제1세부>  초고압 기술을 활용하여 실버세대를 위한 혈액이행력 우수 고기능성 콜라겐 펩타이드 가공기술 개발	고압효소분해기법을 이용한 돼지 콜라겐의 가수분해능 분석 및 최적화: 단백질 분해효소 수준, 반응시간에 따른 유리아미노산, 올리고펩타이드 분석	100	○ Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin 효소별 가 수분해 정도 비교하고, 효소별로압력에 따른 차이를 GPC, 유리아미노산, 전기영동, 아미 노산 조성분을 비교 분석→Trypsin은 매우 효과적으로 사용될 수 있었고, 특히 본 연구 에서 목표로 하는 분자량 5,000 Da미만의 돼지태반 콜라겐 peptide 생산
		고압효소분해기법을 이용한 아임계수 추출물(올리고펩타이드) 의 가수분해능 분석 및 최적화: 단백질 분해효소, 압력수준, 반응시간에 따른 유리아미노산, 올리고펩타이드 분석	100	○ 아임계수 처리 후 효소처리 한 시료와 효소 처리 후 아임계수 처리 된 시료 비교 분석 ○ 아임계수 처리 된 시료에 가수분해능이 가장 좋은 Trypsin을 이용하여 반응시간에 따른 비교 분석하였다→Trypsin의 가수분해 활성 을 위한 초고압 처리 수준은 200 MPa이 가 장 효과적인 것으로 판단되었고, 가압 시간에 따른 가수분해 활성 변화는 그 효과가 압력 수준에 비하여 미약할 것으로 판단
		고압효소분해 및 아임계수 가수분해 통합 공정을 통한 돼지 태반의 가수분해능 분석 및 최적화: 최적의 고압 온도 및 효소반응시간, 아임계수 추출 온도, 시간 및 압력 산출	100	○ 아임계수 처리 후 24시간 효소 반응을 하였 을 때, 아임계수만 처리한 시료보다 저분자 펩타이드를 얻을 수 있었다→효소에 따라 차 이는 보이나 대기압 보다 그 이상의 압력 에서 더 높은 가수분해능을 보이며, 300 MPa 이상의 압력에서는 오히려 불활성 하는 경향
		초고압균질기(microfluid izer)를 이용한 콜라겐 펩타이드 추출물의 미세화	100	○ 일정량 산 가수분해 된 시료를 microfluidize 를 이용 0.1, 50, 100, 150 MPa 압력에서 처리 후 Particle size, zeta-potential분석 하였다→압력에 따른 Particle size 감소 경 향은 보이나 zeta-potential은 유의적인 차 이를 보이지 않음
		아미노산 및 콜라겐 펩타이드 분획 및 정제	100	○ Dialysis kit를 통한 분자량 1000미만의 물 질 분리 설계 하였다. ○ 아미노산 분석 결과 투석을 통해 콜라겐의 구성 아미노산인 Glycin, alanine, hydro proline, proline정제
<제1협동>  고도 불포화 생리활성	고도 불포화 생리활성 지질류 가용성 미세캡슐 공정 최적화	100	○ 고도 불포화 생리활성 지질류의 가용성 미세 캡슐화 공정 최적화 및 산화 안정성 측정 →Surface oil 함량 0.4%이며, 지질함량 약 30% 이상, DHA 함량 7~8%인 미세캡슐화 공정 수립 →1 um~30 um범위의 입자크기, -20 mv 이상의 전하를 띠 →70% 이상의 입자의 코팅 효율을 나타냄 →POV 측정 결과 Surface oil 함량 5% 미 세캡슐제형 대비 산화안정성 높음 확인 →공기 노출 조건이 질소 조건 및 진공 조건 보다 산화 안정성이 떨어지는 현상 확인	

지질류의 가용성 미세캡슐화 기술개발	미세캡슐화 된 고도 불포화 지방산의 유리속도 및 안전성 측정	90	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 습식: 분산매의 종류(pH, 카페인, 염분 등)에 따른 오일 유리 속도 및 산화안정성 측정</li> <li>○ 건식: 분말화 후 저장조건(온도, 습도 등)에 따른 오일 유리 속도 및 산화안정성 측정</li> <li>○ 재수화 된 입자의 유리속도 및 산화안정성 측정→pH 3 : 온도변화에 관계없이 2일 후 부터는 릴리즈 속도가 증가하지 않고 파우더의 어유분자가 안정적으로 포집한 상태를 유지 <ul style="list-style-type: none"> <li>→염 종류에 따른 릴리즈 효과는 거의 보이지 않았으며, 온도에 따른 변화만 관찰</li> <li>→온도가 높을수록 릴리즈 및 산화도 증가</li> <li>→pH 3 용액보다는 pH 7 용액에 더욱 산화안정성 증가</li> <li>→염종류에 따른 효과는 나타나지 않았으며, 전체적으로 염의 첨가가 입자의 산화를 방지해주는 역할</li> </ul> </li> <li>○ 습식/건식 캡슐의 동물 실험을 통한 혈행장애 능력개선 검사→흡수율 평가 제3협동 공조에 의해 진행됨</li> </ul>
<p>&lt;제2협동&gt;</p> <p>난용성 칼슘제제의 가용화 기술 및 체내 흡수력이 우수한 칼슘 복합제제 개발</p>	키 성장을 위한 동물실험	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 체중변화 측정</li> <li>○ 골성장 측정 및 성장판관찰→나노칼슘분말을 식이한 동물에서 골성장률이20% 이상 증가하였으며 성장판도 닫히지 않고 열려있음을 확인함.</li> <li>○ 혈중, 신장, 간, 대퇴골, 변에서의 칼슘과 인의 함량 측정</li> <li>○ 혈중 IGF-1 농도의 측정→성장호르몬인 IGF-1의 농도를 측정하였을 때 일반칼슘을 섭취하였을 때 보다 나노화한 분말을 식이하였을 때 호르몬이 증가하는 경향을 볼 수 있음.</li> </ul>
	나노분말의 수용화	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ PGMS의 micelle 형성분석</li> <li>○ 산성조건에서 용해도 측정</li> <li>○ 나노분말의 분산 최적 조건 확립→여러종류의유화제를 이용하여 나노분말의 분산 최적 조건을 zeta-potential을 통하여 측정하였으며 이 유화제의 농도 및 교반시간을 측정하여 0.5%의 PGMS를 이용하여 최적조건을 확립함.</li> </ul>
	가용화 칼슘 활성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 난소절제 모델을 이용한 칼슘소재의 활성 평가→난소절제모델에서의 칼슘 첨가군의골밀도 완화 억제효과 확인</li> <li>○ 카페인, 카테킨, 식이섬유 혼합 처치시의 가용성 칼슘의 활성 평가→유기화 칼슘의 경우 카페인, 카테킨과반응시 침전 발생이 되지 않음.</li> <li>○ 혈액분석 및 Micro-CT를 이용한 칼슘 제제로서의 활성 평가→대퇴골 골밀도 및 골함량은 칼슘처리에 따라 증가되는 경향을 나타냈</li> </ul>

<p>&lt;제3협동&gt;</p> <p>난용성 소재 가용화에 따른 기능성 및 안전성 평가</p>	<p>가용화 콜라겐의 활성 평가 실험</p>	<p>100</p>	<p>으며, 나노칼슘 처리 시에 가장 좋은 결과를 나타냄</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Hairless mouse에 UVB 조사 후 돈태반 가수분해 콜라겐의 경투여, 경피투여, 경구 및 경피 동시 투여를 실시하여 효능평가</li> <li>○ 피부수분보유량 증발량 측정→경구투여군에서 유의적인 효과를 나타냄. 또한 멜라닌, 홍반 측정결과 콜라겐의 미백 효과는 미미한 것으로 나타남</li> <li>○ 육안으로 Hairless mouse의 주름을 측정→시료처리군의 주름이 UVB보다 적었으며, 특히 경피투여군의 주름이 적음</li> </ul>
	<p>가용화 불포화지방의 활성 평가</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 총 콜레스테롤은 돼지기름 섭취군에서 높은 수준을 보였으며, corn oil과 fish oil을 섭취한 군에서는 유의적으로 낮은 수치를 보임</li> <li>○ 저밀도 콜레스테롤은 Corn oil과 fish oil 섭취군에서는 유의적으로 감소</li> <li>○ 분변내 총 콜레스테롤과 담즙산은 지방식에 따른 차이를 측정한 결과, Fish oil 섭취군에서의 분변내의 bile acid와 콜레스테롤의 수치가 낮은 경향</li> </ul>

(3차 년도)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2013- 2014)	<제1세부> Part 1 콜라겐 펩타이드의 기능성 분석 및 실버세대를 위한 기능성 식품 개발	실버세대용 기능성 요 구르트 개발 →초콜릿 아이스크림 대체	100	○ 시제품 제조를 위한 아임계수를 이용한 돈피 유래 가수분해물 생산 →온도 및 압력은 각각 300℃, 80 bar(아임 계수) 와 400℃, 280 bar(초임계수) → 1 kDa이하로 가수분해 되었고, 초임계수 로 처리된 가수분해물은 200<Mw<300의 평 균분자량을 나타냈고, 아임계수 처리된 돈피 가수분해물은 400<Mw<600 →Gly는 아임계수 처리된 돈피 가수분해물에서 25% 이상의 높은 조성율 ○ 콜라겐 펩타이드 첨가에 따른 요구르트 품질 변화 측정→초콜릿 아이스크림으로 변경(점 도, 색도, pH, sensory test)
		실버세대용겔타입 마 시는 콜라겐 개발	80	○ 저장조건에 따른 콜라겐 펩타이드 변화 측정 ○ 저장 안정성 실험→시제품개발은 진행했으나, 저장안정성 실험 불충분
		기능성 콜라겐 펩타이드 Sparkling water 개발 →홍삼농축액 첨가 콜 라겐 펩타이드 음료대체	100	○ 탄산가스 농도에 따른 이화학적 특성 분석 ○ 탄산가스에 따른 콜라겐 흡수력 측정 ○ →예비실험 결과 탄산가스 첨가 불가능(관능 변화) 하여 홍삼농축액 첨가 콜라겐 펩타이드 음료제조 후 물성 및 관능적 특성 평가
	<제1세부> Part 2. 나노칼슘을 이용한 식품개발 및 유기태칼슘 제조(전 제2협동)	나노칼슘을 첨가한 포켓 밀크 개발	100	○ 무기/유기 나노칼슘의 환자식, 노인식 최적 영양 조성 및 물성개발 ○ 무기/유기 나노칼슘의 환자식, 노인식 완제품 개발 →나노칼슘을 첨가한 우유 개발하여 이화학적 및 관능검사 실시하였을 때 0.5~1.0%에서는 품질에 영향을 끼치지 않음. →나노칼슘을 첨가한 요구르트 개발하여 이화 학적 및 관능검사 실시하였을 때 농도가 높으 면 whey off가 심해지므로 낮은 농도의 칼슘 을 첨가하여 개발하여야 한다고 사료됨. →나노칼슘을 첨가한 포켓밀크의 이화학적 및 관능검사 하였을 때 시판되는 것과 물성이 유 사하였으므로 시제품으로 이용 가능함.
		나노칼슘을 첨가한 우유 개발	100	○ 제품공정의 효율성 증대 ○ 제품의 가격 경제성
		나노칼슘을 첨가한 요구 르트 개발	100	○ Caco-2 cell 에 나노칼슘을 가하여서 독성확 인 (cytotoxicity analysis)→4일 동안 나노 칼슘을 CaCO <sup>-2</sup> cell에 적용하였을 때 100% 이상 나왔으므로 세포의 생존률이 높음. 따 라서 독성이 없다는 결과를 도출하였음. ○ In vitro와 In vivo를 통하여 생체이용율 확 인→나노화하였을 때 생체이용율이 30~40% 이상 증가하는 것을 확인함.
		나노칼슘의 안정성 및 생체이용율	100	
	<제1협동> 가용화된 고도 불포화 생리활성	가용화된 고도 불포화 지방산 강화 제품 개발	100	○ 환자식, 노인식 시제품 제조 후 각 제품의 외 관 특성 분석(색, 맛, 향기 등)→냄새와 맛의 관능적 측면에서 첨가 전후 및 경쟁사 제형 첨가 분유와 유의적 차이가 없었음→고도불포

지질류 강화 제품 개발			<p>화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형 첨가 우유, 요구르트, 주스, EN영양식, 커피크리머 제품에서 외관적 특성 및 제품 고유색의 변화는 없었음, 종합적 측면에서 우유 및 주스 외에 모든 제품에서 관능적 특성 변화 나타나지 않았음</p>
		100	<p>○ 저장시간에 따른 시제품 안정성 특성 ○ 시제품의 문제점 보완 및 유통기간의 안전성 검증→저장 기간 동안 침전발생 및 색도의 변화가 관찰되지 않았음 ○ 시제품의 관능검사 및 성능 실험 및 제품출시를 위한 계획 수립→저장 기간 동안 침전발생 및 색도의 변화가 관찰되지 않았음</p>
		100	<p>○ 재수화 된 입자의 유리속도 및 산화안정성 측정 (2년차 계속 완료)</p>
<제3협동> 가용성 칼슘, 불포화 지방의 안전성 평가 및 콜라겐의 피부감작 평가	칼슘 소재 급성/아급성 평가	100	<p>○ 급성독성평가(단회경구투여)→단회경구투여 시 혈액학적, 부검 시 이상소견 없음 ○ 아급성독성(14일 경구투여)→14일 반복 투여 시 이상소견 없음</p>
	불포화지방산 소재 급성/아급성 평가	100	<p>○ 1차 피부자극 실험→1차 피부자극지수(P.I.I.)가 0.48로 practically non-irritation에 해당하는 비자극성으로 나타나 피부자극이 거의 없었음 ○ 피부 감작성 실험→Maximization test법으로 피부 감작성을 확인한 결과 SPE에 의한 홍반과 부종 등이 전혀 유발되지 않음 ○ 혈액 내 콜라겐 함량 측정→경구투여 1일후부터함량이증가하는 경향을 보였으며, 3일 이후에는 함량의 변화가 거의 없었다. 이는 collagen소재를 섭취시 3일 이후에 최고의 함량을 보임</p>
	가용화 콜라겐의 피부감작	100	<p>○ 급성독성평가(단회경구투여)→단회경구투여 시 혈액학적, 부검 시 이상소견 없음 ○ 아급성독성(14일 경구투여)→14일 반복 투여 시 이상소견 없음</p>



# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 연구개발 성과

### 1. 전체 연구 성과 목표

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업 화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표													
1차 년도	목표	4		2	1								
	실적	2				5							
2차 년도	목표	4	2	7	1								
	실적	3		3		12							
3차 년도	목표	4	5	9	1								
	실적	2	2	8	2	4							
4차 년도	목표												
	실적												
5차 년도	목표												
	실적												
소 계	목표	12	7	18	3								
	실적	7	2	11	2	21							
종료1차년도													
종료2차년도													
종료3차년도													
종료4차년도													
종료5차년도													
소 계													
합 계													

### 2. 전체 연구 성과 활용 목표

구분	기술실시 (이전)	상품화	정책 자료	교육 지도	언론 홍보	기타
활용 건수	제1세부과제	2 (콜라겐펩타이드 음료 / 콜라겐펩타이드 유제품(아이스크림))	2 1	1	1	1
	제1협동과제	2 (실버용 나노지질 함유 죽개발 / 나노지질 함유 요구르트 개발)	2		1	1
	제2협동과제	1 (나노칼슘 포켓밀크 / 나노칼슘 요구르트)	2 1	1	1	1
	총계	5	6	2	3	3

### 3. 세부기관 연구개발 성과

#### 가. 제1세부과제

##### (1) 논문게재 성과

게재 연도	논문명	학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
2013	Effects of High Pressure/High Temperature Processing on the Recovery and Characteristics of Porcine Placenta Hydrolysates	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	33(4)	국내	SCI
2014	Effects of Concentration and Reaction Time of Trypsin, Pepsin, and Chymotrypsin on the Hydrolysis Efficiency of Porcine Placenta	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	34(2)	국내	SCI
2014	Effect of High Pressure on the Porcine Placental Hydrolyzing Activity of Pepsin, Trypsin and Chymotrypsin	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	34(1)	국내	SCI

##### (2) 특허성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2012	초고압 시스템에 의한 태반 추출물의 제조 방법	민상기, 이미연, 최미정, 최예철, 천지연, 홍근표	대한민국	10-2012-0108812
2012	초고압 시스템에 의해 가수분해된 태반 추출물을 포함하는 항주름용 화장료 조성물	민상기, 이미연, 최미정, 최예철, 천지연, 홍근표	대한민국	10-2012-0108821
2013	초고압 효소 처리를 통한 태반의 저분자화 방법	민상기, 최미정, 홍근표, 조연지, 정경훈, 최예철	대한민국	10-2013-0153592
2013	아임계수 및 초고압 효소 처리에 의한 태반을 저분자화하는 방법	민상기, 최미정, 홍근표, 조연지, 정경훈, 최예철	대한민국	10-2013-0153592

등록된 특허의 경우				
등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2014	초고압 시스템에 의한 태반 추출물의 제조 방법	민상기, 이미연, 최미정, 최예철, 천지연, 홍근표	대한민국	10-1442340
2014	초고압 시스템에 의해 가수분해된 태반 추출물을 포함하는 항주름용 화장료 조성물	민상기, 이미연, 최미정, 최예철, 천지연, 홍근표	대한민국	10-1414150

(3) 인력활용/양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
4	1	3	-	-	2	2	-	-	-

천지연 : 2012년 2월 박사졸업

최예철 : 2014년 2월 석사졸업

백재성 : 2014년 8월 석사졸업

정경훈 : 2014년 8월 석사졸업

(4) 학술 발표

- 돼지 태반으로부터 콜라겐 추출을 위한 아임계수 공정의 최적화((사)한국산업식품공학회, 2012.05.10.)
- Optimization of High Pressure Condition of Porcine Placenta Collagen Hydrolysis((사)한국축산식품학회, 2012.05.24.)
- Effect of high pressure condition on the porcine placenta collagen hydrolysis((사)한국식품과학회, 2012.06.13.)
- 아임계수 처리가 돼지 태반의 저분자 펩타이드 가수분해율에 미치는 효과(한국산업식품공학회, 2012.11.21.)
- The effects of high hydrostatic pressure treatment on the trypsin-mediated hydrolysis activity of porcine placenta collagen(한국축산식품공학회, 2013.08.29.)
- Effect of Super- or Sub-critical Water Treatments on Physicochemical Properties of Porcine Skin(한국식품과학회, 2014.08.27)

나. 제1협동과제

- (1) 논문게재 성과-해당사항 없음

(1) 특허성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2014	불포화지방산 및 시나몬 오일이 포집된 다중층 나노 캡슐의 제조방법	권윤중, 민상기, 최미정, 조연지	대한민국	10-2014-0089697

(3) 인력활용/양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
1	-	1	-	-	-	1	-	-	-

조연지 : 2013년 8월 석사졸업

(4) 학술 발표

- Multi-layered Encapsulation of Fish Oil through Layer-by-layer Electrostatic Interaction(한국식품과학회, 2012.06.13.)
- Production and Characterization of Fish Oil Nanoemulsions Encapsulated with Multilayered Membrane(한국산업식품공학회, 2012,11.21.)
- Encapsulation of Fish Oil through Layer-By-Layer Electrostatic Interaction by Using the Biopolymer(한국산업식품공학회, 2011.11.23.)
- Encapsulation of Fish Oil with Biopolymer through Electrostatic Interaction(한국산업식품공학회, 2012.05.10.)

다. 제2협동과제

1) 논문게재 성과

게재 연도	논문명	학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
2014	Physicochemical characterization of nanopowdered eggshell for food application	International Journal of Food Science and Technology	49:1751-1757	국외	SCI
2014	Effects of Nanopowdered Eggshell on Postmenopausal Osteoporosis: A rat study	Food Science and Biotechnology	23(5):1667-1676	국내	SCI
2014	Physicochemical, microbial, and sensory properties of nanopowdered eggshell-supplemented yogurt during storage	Journal of Dairy Science	97:3273-3280	국외	SCI
2014	Cholesterol removal from whole egg by crosslinked beta-cyclodextrin	Asian-Australasian Journal of Animal Sciences	27:537-542	국내	SCI

(2) 특허성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013	나노칼슘을 함유하는 요구르트 및 그의 제조방법	곽해수, 모하메드알미잔, 이윤경	대한민국	10-2013-0085372
2014	가용성화 나노칼슘의 제조방법 및 이를 이용한 음료	민상기, 곽해수, 이윤경, 조남영, 김태진	대한민국	10-2014-0070592

(3) 인력활용/양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
		1	-	-	1	-	1	-	-

Mohammad Al Mijan : 2013년 2월 석사졸업

이윤경 : 2015년 2월 박사졸업예정

(4) 학술 발표

- Effects of nanopowdered eggshell on postmenopausal osteoporosis: a rat study. (Pharmacy & nutrition, Singapore, 4월 16일 발표)
- Effects of nanopowdered oyster shell on osteoporosis in rats. (Pharmacy & nutrition, Singapore, 4월 16일 발표)
- Physicochemical and sensory properties of milk supplemented with dispersible nanopowdered oyster shell during storage. (American Dairy Science Association meeting, Indianapolis, 7월 10일 발표)
- Physicochemical characterization of nanopowdered eggshell (1) (제45차 한국축산식품학회 학술발표, 한국과학기술회관, 5월 23일 발표)
- Physicochemical and sensorial properties of nanopowdered eggshell-supplemented yogurt (2) (제 45차 한국축산식품학회 학술발표, 한국과학기술회관, 5월 23일 발표)
- The physicochemical properties of nanopowdered oyster shell (2013 한국식품과학회 학술발표, 천안휴라클리조트, 6월 29일 발표)
- Solubility and bioavailability of nanopowdered oyster shell in rats (2013 한국식품과학회 학술발표, 천안휴라클리조트, 6월 29일 발표)
- The effect of zinc-added nanopowdered eggshell on height growth in rats (한국식품영양과학회 학술발표, 김대중컨벤션센터, 11월 14일 발표)
- The effects of nanopowdered oyster shell on bone growth in rats (제46차 한국축산식품학회 학술발표, 서울과학기술대학교, 5월 23일 발표)

라. 제3협동과제

(1) 논문게재 성과

게재 연도	논문명	학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
2013	Skin Permeability of Porcine Placenta Extracts and Its Physiological Activities	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	Vol. 33, pp. 356~362	국내	SCI
2013	Nano-Calcium Ameliorates Ovariectomy-Induced Bone Loss in Female Rats	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	Vol. 33, pp. 515~521	국내	SCI

2014	Antioxidant Effect and Functional Properties of Hydrolysates Derived from Egg-White Protein	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	Vol. 34, pp. 362~371	국내	SCI
2014	패각 칼슘 입자 크기에 따른 흡수율	Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition	Vol. 43, 454-458	국내	비 SCI
2014	기능성 소재 개발을 위한 돼지태반추출물의 경구 및 피부 동물모델 안정성 평가	Korean Journal of Aesthetic and Cosmetology	Vol. 12	국내	비 SCI

(2) 특허성과  
해당사항 없음

(3) 인력활용/양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
		2	-	-	-	2	2	-	-

(4) 학술 발표

- Enhancement of Cosmeceutical Functionality of Swine Placental Collagen by Subcritical Extraction, 2012 한국식품영양과학회 (10/31-11/2, 제주국제컨벤션센터(ICC Jeju))
- Protective Effect of Porcine Placenta Extracts against UVB-Induced Photoaging in Hairless Mouse, 2013년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회 및 정기총회 [2013년 11월 13일 (수) - 2013년 11월 15일 (금), 김대중컨벤션센터(광주)]

#### 4. 진행중 성과물

가. 제1세부

계재연도	논문명	학술지명
계재예정 2015.02	Comparison of sub- and super-critical water treatment on physicochemical properties of porcine skin	Journal for Food Science of Animal Resources
계재예정 2015.02	Effect of Porcine Collagen Peptide on Rheological and Sensory Properties of Ice Cream	Journal for Food Science of Animal Resources
심사중	Effect of Subcritical Ethanol and Water Mixture on Characteristic of Porcine Placenta Hydrolysates	Journal for Food Science of Animal Resources

나. 제1협동

계재연도	논문명	학술지명
계재예정	Optimization of multilayered fish oil emulsion by using electrostatic deposition of charged biopolymers	International Journal of Food Engineering

게재예정 2015.02	Changes in Quality Characteristics of Pork Patties containing Multi-layered Fish Oil Emulsions during Refrigerated Storage	Journal for Food Science of Animal Resources
심사중	Effect of NaCl Concentration on Emulsion Properties of Myofibrillar Protein Stabilized Soybean Oil and Fish Oil Emulsion	Journal for Food Science of Animal Resources

다. 제2협동

게재연도	논문명	학술지명
심사중	Preparation and quality characteristics of tablet milk	International Dairy Technology
심사중	Physicochemical and sensory properties of milk fortified with Iron microencapsules prepared with W/O/W emulsion during storage	International Dairy Technology
게재예정	Evaluation of Physicochemical properties, bioavailability and toxicity of nanopowderized oyster shell	International Journal of Food Science and Technology
게재예정	Production and characteristics of tablet milk supplemented with nanopowdered eggshell or oyster shell	International Dairy Technology

라. 제3협동

게재연도	논문명	학술지명
게재예정	나노 칼슘의 급성/아급성 안전성 평가	J Korean Soc Food Sci Nutr
심사중	Influence of layer-by-layer (LbL) encapsulation of nano-emulsified fish oil on their digestibility ex vivo and skin permeability in vitro	Biotechnology and Bioprocess Engineering

## 제 2 절 성과활용 계획

### 1. 실용화 · 산업화 계획

#### (1) 난용성제제 첨가의 상품화 방안

- 본 연구에서는 난용성 물질을 가용화함으로써 흡수성 및 가공적성을 높였으며, 시제품 제조함으로써 고령화 시대에 필요한 고기능성 식품을 제조하였다. 경제적 및 산업적 측면에서 본 연구를 통하여 국내 식품시장에 고기능성 저분자 콜라겐 펩타이드 식품을 제공함으로써 국내 건강기능 식품 시장의 활성화 도모한다.
- 본 연구를 통하여 난용성 소재 중 나노글킵질 분말과 나노계란킵질 분말의 활용방안, 칼슘 흡수의 기능성이 소비자에게 주는 가치와 생산 환경 등을 분석하여 상품과 가능성을 알아본 후, 가능하다는 판단이 내려졌을 때 참여기업을 통하여 현재 시판되고 있는 유제품에 난용성 물질을 첨가하여 칼슘 첨가 유제품을 개발.
- 상품화할 경우, 건강기능성 소재가 실제로 칼슘제제 건강기능식품으로 인정받을 수 있는 방안을 모색하여 추진 예정임. (개별인정형 취득 등) 건강기능식품 인정이 어려울 경우, 소재의 가치를 부각시켜줄 수 있는 홍보 방안 마련 예정임.
- 참여기업과 특허 기술이전 기업 간 상호 업무 협약을 통하여 생산된 제품의 판로망 구축을 위하여 생산조직과 경영조직의 협조를 통한 마케팅 전략 수립.
- 궁극적으로는 우리 몸이 가진 콜라겐 생산능력을 향상시켜 자체적으로 콜라겐을 생산하게 함으로서 피부, 관절 등의 질환을 예방, 개선함으로써 국민의 건강 증진에 기여 할 수 있을 것으로 기대됨.
- 난용성물질의 해외수출 시장 개척을 위하여 여러 기관과 연계하며, 해외시장으로의 진출을 위하여 해외 주요 식품학회 와 식품박람회 에 참가하여 제품 및 기업을 홍보한다.

#### (2) 난용성제제 첨가 제품의 판매방안-제품별

- 칼슘 강화 요구르트
  - 제품의 제조: 칼슘강화 요구르트는 참여기업인 건국유업이 생산한다.
  - 소비대상: 칼슘흡수율이 떨어지는 폐경기 여성, 환자, 고령화 노인을 대상으로 하여 건강증진을 꾀한다.
  - 판매전략: 상품의 파급효과를 높이기 위해 건국유업이 구축한 판매망과 대리점을 중심으로 접근하며 이후 소비자 호응에 따라 타 유가공업체에 원료로 판매할 예정



○ 콜라겐 펩타이드 아이스크림 및 음료

- 제품의 제조: 본 연구의 참여기업인 삼우축산에서 돈피 및 돈태반을 제공받고, 건국유업이 아이스크림을 제조하는 시스템이 효과적이라 판단한다.
- 제품의 특성: 기존의 이온음료에 비해 흡수력이 뛰어난 칼슘과 콜라겐 펩타이드를 함유하였고 무엇보다도 탄산가스를 첨가하였기에 흡수력이 더욱 높을 것으로 예상.
- 소비대상: 칼슘과 펩타이드 흡수를 빠른 시간 내에 필요로 하는 운동선수나 젊은 세대 또는 청소년을 대상으로 소비를 겨냥한다.
- 판매전략: 상품의 파급효과를 높이기 위해 건국유업과 (주)두산이 구축한 판매망과 대리점을 중심으로 접근하며 이후 소비자 호응에 따라 타 음료업체에 원료로 판매할 예정

○ 칼슘 강화 포켓밀크

- 제품의 제조: 칼슘강화 포켓밀크는 참여기업인 건국유업이 생산한다.
- 소비대상: 성장기 아동과 칼슘흡수율이 떨어지는 폐경기 여성, 고령화 노인을 대상으로 하여 건강증진을 꾀한다.
- 판매전략: 상품의 파급효과를 높이기 위해 건국유업이 구축한 판매망과 대리점을 중심으로 접근하며 이후 소비자 호응에 따라 타 유가공업체에 원료로 판매할 예정

○ 오메가3-상업용 환자식

- 제품의 제조: 미세캡슐화한 오메가 3 지방산을 첨가한 죽을 제조하여 판매한다.
- 제품의 특성: 환자들이 주로 이용하는 환자식은 죽 종류이다. 죽에는 탄수화물이 주요 구성분을 이루고 있지만 영양소 면에서 불포화지방산이 부족하다. 특히 고도불포화지방산을 소재로 하는 죽의 경우 산패와 이취로 변질되어 환자들이 섭취하기 쉽지 않다. 본 제품은 이러한 문제점을 제거하고 안정적인 상태에서 오메가-3-지방산을 혼합하였기에 환자에게 필요한 생리활성이 우수한 불포화 지질을 공급할 수 있다.
- 소비대상: 음식물 섭취가 불편한 고령화 세대나 환자들에게 적합하다.
- 판매전략: 상품의 파급효과를 높이기 위해 건국유업과 (주)두산이 구축한 판매망과 대리점을 중심으로 접근하며 가급적 국내 죽 제조회사와 계약을 통해 판매하고자 한다.

○ 칼슘 강화 커피음료

- 제품의 제조: 국내 커피시장은 지속적인 성장세에 있다. 무기나노와 유기나노칼슘제제를 커피믹스에 혼합하여 제조한다.
- 제품의 특성: 우리나라 대부분은 소비자는 식사 후 커피와 차를 많이 마시는데, 커피와 차에 들어있는 카페인과 같은 유기물이 칼슘과 결합하여 흡수를 방해하는 문제점 발생. 따라서 커피음료에 나노칼슘 제제를 첨가함으로써 일상적으로 마시는 커피를 통해 칼슘 공급이 원활하게 하는 특징이 있다.
- 소비대상: 칼슘흡수율이 떨어지는 폐경기 여성, 식사를 불규칙적으로 하는 젊은 직장인, 수험생 등을 대상으로 한다.
- 판매전략: 상품의 파급효과를 높이기 위해 일차적으로 국내 커피제조회사와 접촉하여 OEM 방식으로 시제품을 제조한 후 건국유업이 구축한 판매망과 대리점을 중심으로 판매하거나 기존 커피회사들을 통해 판매하고자 한다.

○ 항노화성 피부개선제

- 제품의 제조: 국내 화장품 시장은 지속적인 성장세에 있다. 본 연구를 통해 얻어진 미세캡슐 스펡고지질과 콜라겐 펩타이드를 일정한 양으로 혼합하여 항노화성 피부개선제로 스킨로션이나 크림으로 제조한다.
- 제품의 특성: 고령화로 인해 대부분의 사람들이 젊음을 유지하고 탄력적인 피부를 원한다. 흡수력이 뛰어나고 노화개선 효과가 우수한 콜라겐 펩타이드와 스펡고지질은 화장품 소재로 최적이라 본다.
- 소비대상: 노화가 가속화되는 40대 이후 세대를 위한 피부개선제로 판매한다.
- 판매전략: (주)두산이 일차적으로 OEM방식으로 시제품을 제조한 후 자체 판매망을 이용하여 소비자에게 접근한다.

나. 경제적 및 산업적 파급효과

(1) 돼지태반 및 피부 유래 콜라겐 펩타이드

- 국내 돼지 생산에서 폐기되는 돼지 태반을 활용할 수 있어 축산농가에도 부가적인 경제적 이익을 창출할 수 있는 계기 마련하였고 돼지 태반 유래 콜라겐 펩타이드가 국내산으로 대체할 경우 우선적으로 180억 원의 수입대체효과가 있으며 축산농가에도 부가적인 경제적 이익을 창출하고, 수입에 의존하였던 돼지 태반 유래 콜라겐 펩타이드가 국내산으로 대체할 수 있으며 화장품산업의 원료로 공급 및 수출이 가능해 경제적 효과 극대화 할 수 있다.
- 폐경기 여성 및 골다공증 환자용 칼슘·콜라겐 펩타이드 강화 탄산음료개발 및 상품화 할 경우 흡수력이 뛰어나기에 건강 기능적 효과가 매우 크다.
- 기존의 단순 분산제형의 한계를 극복한 가용화 기술을 통해 투명한 음료 및 화장품(스킨 등)에 적용시켜 다양한 고부가가치 제품 개발에 적용시킬 수 있게 한다. 콜라겐 펩타이드와 미세캡슐 불포화지방산을 이용한 미용식품시장은 현재 우리나라가 연간 500억 원이다. 본 연구를 통해 개발한 미용식품의 파급효과 역시 클 것으로 예상된다.
- 기존 콜라겐 관련제품의 품질과 대비하여 기능성이 향상되고 콜라겐 관련제품의 신시장 창출이 가능하다. 특히 고령화 시대에 맞춰 골다공증 및 면역약화로 인한 질병에 적합한 기능성식품을 개발하는 소재로 활용한다.
- 체내 흡수율을 높일 수 있는 저분자화 된 콜라겐을 개발함으로써 건강보조식품 생산에 활용할 수 있다. 특히 콜라겐은 기존에 판매되는 여러 가지 건강보조식품들과 비교하였을 때 가장 급격히 성장하고 있으며, 피부뿐만 아니라 관절, 혈관, 뼈, 눈, 머리카락 등의 인체의 다양한 장기에서 중요한 탄력 및 지지 기능을 가지고 있으므로 흡수력이 빠른 콜라겐을 분말, 알약, 음료 등 다양한 건강보조식품으로 제품화 할 경우, 건강보조식품 업체로의 기업화를 기대할 수 있다.

## (2) 칼슘강화 식품

- 국내 골다공증치료제 시장은 향후 3년간 연평균 33.7%의 성장률을 보일 것으로 추정되고 있고, 또한 정부가 지난해 4월부터 골다공증치료제에 대한 보험급여 기간을 기존의 3개월에서 6개월로 연장, 이는 골다공증치료제 시장 확대에 따라 경제적 부가가치를 높이는 계기가 될 것으로 보인다.
- 요구르트의 경우 우리나라 연간 소비량이 약 1조 3000억 원이다. 또한 우리나라가 수입하고 있는 커피는 무려 4억 2천만 달러에 이르고 있어 소비가 잘 되고 있어 흡수력이 뛰어난 칼슘제제를 이용한 요구르트와 커피를 개발할 경우 커다란 market share가 발생하고 경제적 효과가 클 것으로 예상된다.
- 칼슘강화 상업용 노인식·환자식 개발할 경우 현재 우리나라가 갖는 이 분야의 시장규모는 연간 350억 원으로 시장을 선도할 수 있고 경제적 파급효과가 크다.
- 2007년 현재 7조원이 넘는 국내 기능성식품 산업에 새로운 형태의 기능성 식품이 출현함으로써 기업 간 경쟁체제가 도입되고 이에 따른 수익창출 효과를 얻을 수 있다. 또한 세계 기능성 식품시장의 70%를 미국과 일본이 독점하고 있는데, 본 연구결과의 사업화는 수입대체 효과 및 경제적 부가가치가 높아질 것으로 예상된다.
- 기능성 소재를 확보 및 산업화함으로써 일상 식사를 편리하게 하는 다양한 식품 개발, 만성 질환을 발생시키는 위험성분 감소시킨 식품 개발, 중풍, 치매, 암 환자 등 거동이 불편하거나 식품을 섭취하기 어려운 노인 대상 특수의료용도식품 개발이 가능하여 고령화 시대에 필요로 하는 막대한 사회적 비용을 줄여 경제적 가치를 높일 수 있다.

## (3) 오메가-3지질 강화 제품

- 국내 식품시장에 안정성이 향상된 지질 소재를 제공함으로써 국내 식품 시장의 활성화 도모하고 농수산물에서 오메가-3지질 등의 고도의 불포화 지질을 추출함으로써 농수산물을 고부가가치화 함으로써 농가소득증대에 기여한다.
- 인구의 고령화로 인해 수반되는 성인병의 증가가 심각한 문제로 부각되고 상업용 환자식 시장도 질환의 치료에 있어서 영양의 중요성에 대한 인식이 성숙되고 있다. 의료 기술의 선진화 추세에 맞춰 보다 다양한 제품의 욕구를 충족하고 또한 인구 노령화에 의한 노인환자의 증가와 정부의 노인요양지원 정책 등은 국내의 상업용 환자식 시장 성장의 원동력이 될 것으로 예상된다.

## 나. 연구결과의 활용방안

### (1) 교육·지도·홍보·기술 확산 계획

- 국내 나노화 기술시장 시장 개척과 활용 방안을 위하여 기술이전 및 국제논문을 제출하여 난용성제제인 나노글립질분말 및 나노계란겉질 분말의 수용성화 기술을 보급할 계획이다.
- 본 연구에서 발명된 콜라겐의 추출 및 가수분해 특허기술은 다양한 폐기 자원으로부터 콜라겐 추출에 직접적으로 응용할 수 있다. 특히 가축의 부산물을 적극 활용하여 폐자원 절감화 및 이를 토대로 고부가가치 산물의 생산에 활용할 수 있다.
- 안전성 및 기능성 향상을 통하여 화장품 및 의약품에 응용할 수 있으며, 특히 안티에이징 및 피부 미용소재로서의 활용과 바이오 의료 기구에 적용될 수 있다. 최근 한국산 화장품 판매율이 높은 아시아 지역에 기술을 이전함으로써 기술특허사용료 같은 부가적 발생수입도 얻을 수 있다.
- 기존 콜라겐 제품에 비하여 저가격 고품질의 콜라겐 제품을 공급함으로써 이들 제품을 노인층뿐만 아니라 고령 연령층에 공급할 수 있다. 또한 최근 한류 트렌드에 부응한 판매루트 확보 및 해외 시장의 개척을 통하여 콜라겐 제품 수출에 이바지 한다.
- 공정과정의 단순화 및 에너지 절감의 큰 장점을 지니고 있으며, 안전성을 확보함으로써 향후 본 연구 기술은 식품, 의약품 및 의료 기구 제작에 효과적으로 응용되리라 기대한다.
- 경쟁력 있는 고도불포화 지방산 함유 제품을 생산하여 해외 및 국내 전시회에서 지속적인 프로모션을 진행할 것이며, 해외 대리점을 통해 제품 사업화에 결실이 맺어지도록 박차를 가할 것이다.

#### 다. 추가연구 및 타연구 활용방안

##### (1) 추가연구 활용방안

##### ○ 어피 유래의 저분자 콜라겐 펩타이드 기능성 소재 및 식품 개발(대학연구)

- 국내 및 국외시장 분석결과 콜라겐 소재를 이용한 제품은 다양하다. 그러나 어피 콜라겐 펩타이드를 이용한 음료나 유가공품의 경우 전무하거나 일부 외국에서 수입하여 원료로 활용하고 있다.
- 어피 유래 콜라겐 펩타이드를 이용하여 고령화시대에 맞는 면역력이 증강되고, 칼슘흡수를 높이며, 노화를 지연시키는 콜라겐 펩타이드 소재를 개발하여 고령화 시대를 맞이하는 대비책이 될 수 있다.
- 저분자화 된 어피 콜라겐은 피부 투과용 나노 제형화 기술 개발을 통해 의약품 소재 개발이 가능하다. 본 연구에서 개발한 아임계수 및 초임계수나 초고압효소 등의 개발된 기술을 통해 생선겉질 연구소재로 활용하여 저분자 콜라겐 펩타이드를 개발할 수 있다.
- 또한 피부흡수력이 낮은 콜라겐을 저분자화 하고 리포솜에 포집함으로써 피부침투력을 향상시켜 피부에 대한 콜라겐 펩타이드의 효과(주름개선, 미백효과 등)를 증진시킬 수 있다.

다. 다중층 리포솜을 형성 기술을 통해 저장시 안정성을 증가시키는 효과를 기대할 수 있다.

- 현재 2014년 고부가가치식품기술개발사업 중 하나인 “나노식품 제조기술의 산업체 상용화 연구 및 제품개발(건국대 민상기교수)” 과제명으로 본 과제에서 개발된 신가공 기술을 활용한 후속연구를 진행 중에 있다.

- 상기의 후속연구에는 (주)오뚜기, (주) 흥국에프엔비, 에텐식품영농조합법인이 참여하여 기술 공유 및 공동연구를 진행 할 계획이다. 후속 연구에서 발생하는 새로운 기술 및 대량생산 공정의 최적화는 당 과제의 참여기업인 (주) 두산글로벌넷, 삼우축산, 케이시피드, 건국우유에 기술지원시 활용이 될 수 있으리라 사료된다.

○ 당 과제에서 도출된 기술 및 제품 활용 계획(기업계획-(주) 두산글로벌넷)

- 사업 가능성 검토가 필요하며, pilot test후 대량 생산을 위한 개발기술 최적화를 진행계획이다.
- 대량 생산 공정 설계를 진행하여 시제품 제조 및 대량 생산을 통한 개발기술 산업화를 진행하여 lab단위로 개발된 기능성 소재 및 시제품과 품질을 비교 평가한다.
- 국내/국외 전시회에 참가하여 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형 및 요구르트, 우유 등 시제품 전시한다.
- 고객사와 대리점에 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 제형 샘플 제공 및 제품 사업화 추진한다.
- 고도불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐 첨가된 EN 영양식 시제품 생산 후 고객사와 대리점에 샘플 제공 및 제품 사업화 추진한다.
- 용해도가 낮은 자사 인지질 제품에 고도 불포화 지방산 함유 지질의 미세캡슐화 기술 적용
- 도출된 기술 개선을 통한 다양한 미세캡슐화 기술 확보한다.
- 시제품에 대한 홍보자료로 활용한다.

○ 나노칼슘을 첨가한 포켓밀크 시제품(기업계획-건국유업)

- 현재 시판되고 있는 포켓밀크는 일반칼슘제제를 첨가한 것으로 1정당 90원이므로 나노칼슘을 첨가하였을 시에는 1정당 100원 정도로 단가를 조율하여야 한다.
- 이를 위해서는 첨가되는 칼슘의 단가를 맞춰야 한다. 시판되는 포켓밀크의 칼슘제제는 1 kg당 1,500~1,700원이며, 나노칼슘의 경우는 1 kg 당 8,000~10,000원으로 훨씬 가격이 높다. 하지만, 나노칼슘이 일반칼슘보다 생체 내 이용률이 40%이상 증가하므로 첨가량을 낮춰도 가능한 것을 확인할 수 있다.
- 따라서 나노칼슘의 함량을 현재 판매되고 있는 포켓밀크의 일반칼슘의 함량보다 낮춰서 첨가해야 한다. 3차 년도의 결과에서 얻었듯이 나노칼슘을 첨가한 포켓밀크의 물성과 관능검사에서는 시판포켓밀크와 유사한 것을 도출해냈으므로 소비자선호도에서 긍정적인 결과를 얻을 수 있다.
- 나노칼슘의 장점을 부각시켜 나노칼슘을 첨가한 포켓밀크의 소비를 부추하여야 한다고 사료된다.

# 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 1. Nano- or microencapsulation 기술

### 가. Encapsulation 방법

○ 식품산업에서 encapsulation 기술은 active 물질을 산소, 빛, 수분 등의 외부 환경으로부터 보호하고 관능적으로 부정적인 냄새, 맛 은폐를 위한 목적으로 이용되고 있다. 또한 취급이 간편하도록 고형화 하거나, 내용물의 용출 속도를 조절하는 등의 목적으로도 이용되고 있다.

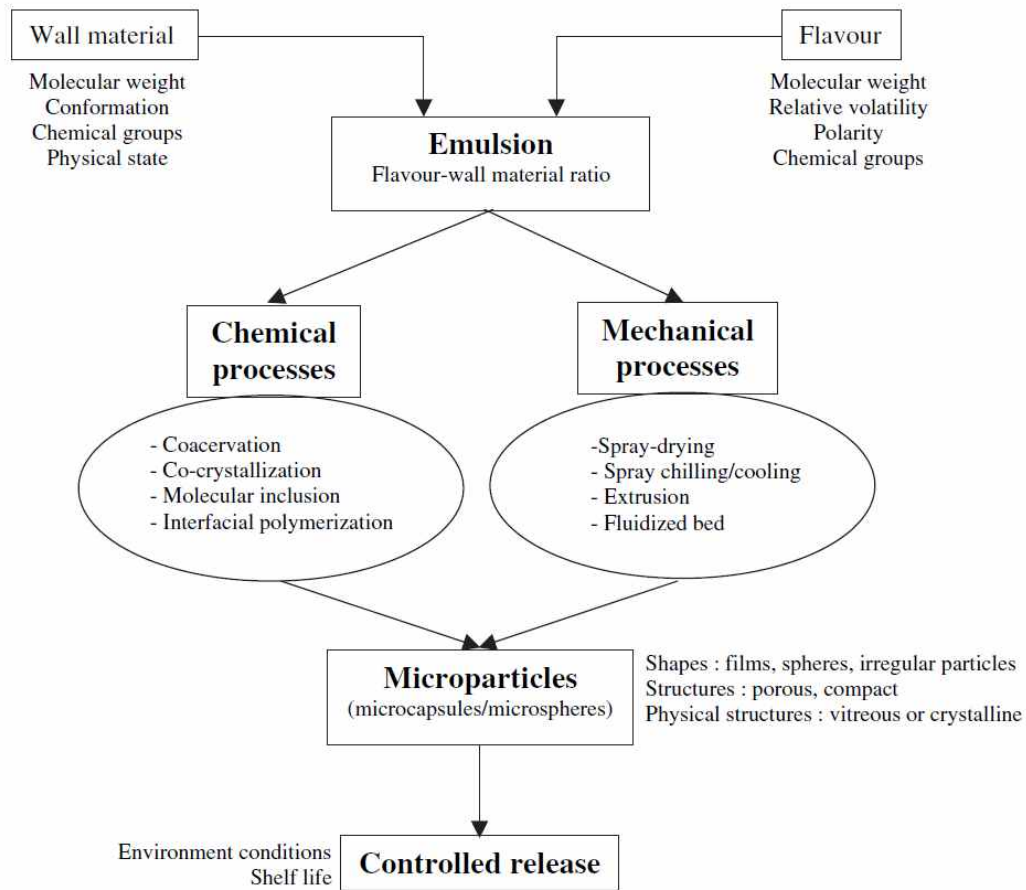


Figure 6.1.1 A schematic illustration of different processes of encapsulation of flavour compounds.

○ Encapsulation 방법으로는 Figure 6.1.1 및 Table 6.1.1에 나타난 바와 같이 Spray drying, Extrusion, Freeze drying, Coacervation 및 Adsorption 등이 있으며, 이 중 Spray drying 및 Extrusion 방법이 가장 많이 사용되고 있다.

Table 6.1.1 Applications of different encapsulation method in food industry

Encapsulation technique	Encapsulated form	Application area
Coacervation	Paste/powder/capsule	Chewing gum, toothpaste, baked foods
Spray drying	Powder	Confectionery, milk powder, instant desserts, food flavours, instant beverages.
Fluid bed drying	Powder/granule	Prepared dishes, confectionery
Spray cooling/chilling	Powder	Prepared dishes, ices
Extrusion	Powder/granule	Instant beverages, confectionery, teas
Molecular inclusion	Powder	Confectionery, instant drinks, extruded snack

나. 기능성 식품에서의 나노기술

(1) 나노에멀전(Nanoemulsion) 및 나노캡슐(Nanocapsule)

- 식품에서 비타민, 살균제, 향료 등과 같은 기능재료(Functional Ingredients)는 전달시스템으로 인캡슐레이트 되어 나오는 것이 오히려 일반 폼으로 되어있는 음식보다 더 많은 혜택이 있다. 좋은 전달시스템은 비타민이나 항산화물질과 같은 생물학적 활성성분의 저하 없이 가장 효율적일 때 몸 안의 부분에 도달할 수 있도록 한다.
- 또한 최적의 수준으로 몸에 농도를 유지하기 위해 제어된 속도로 재료를 해제하는데 도움을 준다. 다양한 나노이중캡슐(Nanocapsulation)은 이러한 기능의 많은 부분을 제공할 수 있도록 만들어졌다. 나노이중캡슐은 일반적으로 미셀(Micelle)과 에멀전(Emulsion)을 중심으로 돈다(기름물질이 물에 흩어지면서 작은 방울화(Droplet)가 형성되는 것. 작은 방울은 특정 상황에서 자발적으로 형성되기 때문에 수성환경에서 유용성(Oil-soluble)기능재료를 포함할 수 있다.
- 대부분 에멀전이 가지고 있는 문제는 그들이 상황에 따라 달라진다는 것이다(에멀전이 자발적으로 특정 조건 하에서 형성하므로 온도나 농도가 많이 변경되면 자발적으로 분리될 수 있음). 인간 소화기관의 다양한 부위를 안정적으로 유지해야 할 시스템에는 유용하지 않을 수 있다. 어떠한 물질의 안정화는 상당량의 계면활성제 또는 유화제가 추가로 필요하다. 이는 식품용이어야 하지만 음식의 맛이나 질감에 대해 나쁜 영향을 줄 수 있다.

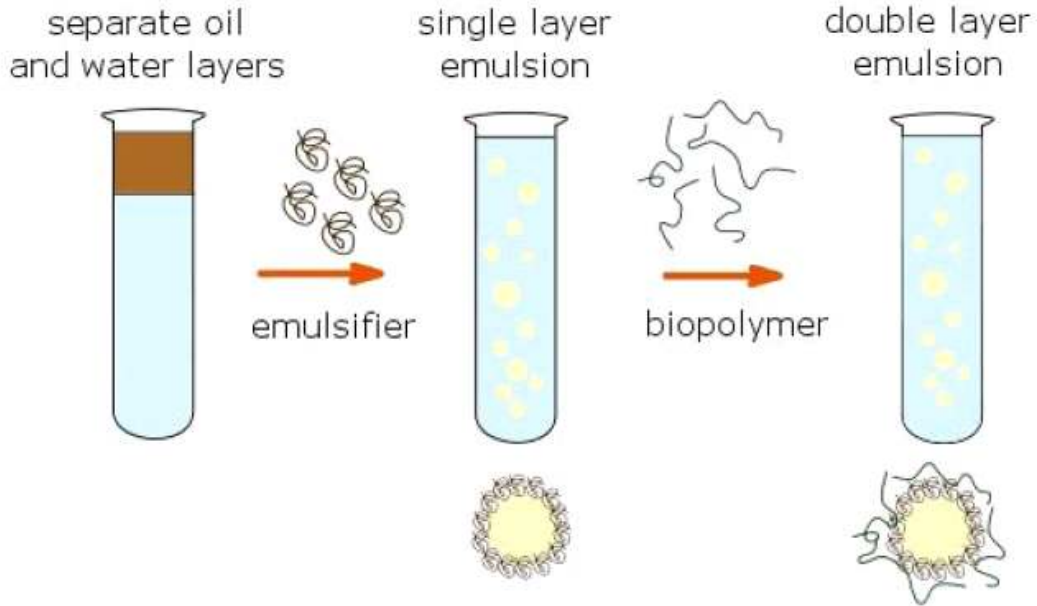


Figure 6.1.2 나노에멀전은 식품의 유효성분에 대한 전달시스템.

- 물질 범위 내에서 캡슐화(Encapsulation)의 다중 레이어(Multiple Layer)를 사용하는 것은 나노캡슐을 안정시키고 몸 안에서의 성분 분해를 제어할 수 있다. 생체에 가장 적합한 시스템은 계면활성제와 폴리머(polymer)로 여러 층을 구성하는 것(프로틴, 탄수화물 등)으로 가장 유용한 해결책이지만 또한 이는 여러 단계를 조합해야 하는 복잡한 시스템이다.
- 하지만 이와 같은 다층 에멀전을 생산하는데 필요한 제조기술은 현재 식품 가공에서 에멀전을 만들기 위해 사용하는 간단한 방법으로 이 기술의 통합은 상대적으로 쉬운 것이다. 이러한 시스템은 다양한 환경을 통해 페이로드(Payload)를 유지할 수 있고 적절한 지점에서 활성성분을 분출할 수 있게 조정, 산도(pH)나 온도와 같은 특정 환경적인 변수에 작용되도록 한다.

## (2) 나노라미네이트: 식용 코팅

- 나노스케일 범위에서의 물질 처리로 식품과학자들이 식용 라미네이트 필름을 만들 수 있게 되었다. 식용 라미네이트 필름은 다양한 재료 나노레이어로 구성되며 레이어와 그 다음 레이어 사이에 정전기적 인력을 주어 한 번에 하나를 추가한다.
- 이 Layer-by-Layer 접근방식은 나노라미네이트의 속성을 매우 세부적으로 제어할 수 있다. 이는 껌, 왁스와 같은 곳에 쓰이는 기존의 식용 코팅 장벽층(Barrier Layer)보다 수명을 연장시키는 혜택이 있다. 나노라미네이트 식품 코팅의 구성요소로 사용될 수 있는 물질은 Lipid, Clay가 있고 Moisture Barrier로는 Biopolymers같은 Carbohydrates, Oxygen과 Carbon Dioxide Barrier로써 Nanoparticulates, Emulsified Nanodroplets가 있다. 이러한 물질은 맛, 질감 및 모양을 향상시키기 위한 유효성분을 포함할 수 있다.



### (3) 나노섬유: 인공식품

- 광범위한 크기의 분포 및 속성을 가지고 있는 나노섬유를 생산하기 위한 전기방사사용의 부활은 식품기술에서 이러한 나노섬유의 사용을 논의하게 되었다. 다른 응용프로그램에서 사용되는 일렉트로스폰 섬유(Electrospun Fibres)는 합성재료로 구성되어있어 일반적으로 식품포장에 유용할 수 있다. 그러나 최근 작업은 주로 의료 응용분야인 바이오폴리머 (Biopolymer) 기술 적용부분에서 많이 이루어졌다. 일렉트로스폰 바이오폴리는 질감 수정 또는 필러로 식품에서 사용될 수 있다.

### (4) 소비자 우려와 규제현황

- Food giant Tate & Lyle은 영국에서 최초로 마이크로-또는 나노기술이 사용된 식품을 생산하기 위해 University of Nottingham 산하 ‘nanotech spin-out’ 과 협력관계를 이뤘다. Soda-Lo®은 낮은 농도의 양으로 일반 농도의 짠 맛을 제공하는 나노구조로 된 소금분말을 사용한다(질 높은 소금분말에 대한 분쟁 없이).
- 나노기술로 강화된 식품 제품 포장이 시장에 등장하기 시작하는 동안 나노기술 식품의 상업적 응용프로그램은 지난 몇 년 동안 연구의 속도에 비해 더디다. 이유는 소비자가 나노강화식품 수락에 대하여 꺼려하고 입법적인 위치에서 명확하지 않기 때문이다.
- 극동지역 소비자는 미국 및 유럽에서보다 나노기술이 들어간 식품산업에 대하여 긍정적인 움직임이 있으며, 영국에서는 제조업체, 소비자, 국회의원은 장기적으로 건강과 환경에 미치는 영향 우려로 새로운 기술 도입에 주저하고 있다.
- 하지만 업계의 주요 인물들은 더 많은 발전을 추진하고 있다. 나노기술은 식품의 유통기한을 늘릴 수 있으며 맛, 색깔, 효과를 향상시킬 수 있다. 또한 첨가제의 전체 수량을 감소시킬 수 있다. 또한 나노포플레이션(Nanoformulation) 사용으로 적은 농도로 같은 맛을 내 지방, 설탕 소금을 적게 첨가하고 나노캐리어시스템(Nano-carrier Systems)를 사용하여 기타 영양소를 사용할 수 있다. 이러한 혜택에도 불구하고, 유럽 식품산업에서는 몇 년 후가 지나서야 식품에 나노기술을 최대한 활용하기 시작할 것으로 보인다.

## 2. EU 태반이용 화장품 인증 및 관련제도 조사

### 가. 돈태반을 이용한 화장품 제조 및 판매 가능성

- 유럽의 화장품 단일규정 EC1223/2009에 따르면 인간의 세포나 조직 등을 이용한 화장품의 제조 및 판매는 금지되어 있지만, 동물의 부산물을 이용해 제작한 화장품 금지에 대한 항목은 없다.
- 2013년 7월 11일부터 시행된 EU 단일규정 EC1223/2009의 Annex II: List of Substances

Prohibited in Cosmetic Products(화장품에 금지된 재료)를 보면 416번 항목에 Cells, tissues or products of human origin이라고 명시되어 있음. 다만 화장품의 재료나 완제품에 대한 동물실험은 아주 엄격하게 금지되고 있다.

- 돈태반이 포함된 화장품을 제조하고 유럽에 유통하는 회사 JBP(Japan Bio Products)와 Plazan Cosmetics의 홈페이지에 게시된 정보를 보면, 호르몬을 사용하지 않은 돼지에게서 태반을 추출하거나 호르몬을 제거하는 과정을 거친 후 돈태반을 이용해 화장품을 제조한다고 한다.

#### 나. 일본의 돼지태반

- 식품·화장품 440억 엔 시장 피부탄력개선 등 미용, 수면개선, 항피로, 골다공증 예방 등 다양한 효능을 가진 없어서는 안 될 미용소재의 하나로 성장하였다.
- 업계 전문지 ‘헬스라이프비즈니스’에 따르면 2013년엔 건강식품·화장품의 플라센타 제품 시장은 390억 엔 규모로 추정된다.
- 올해(2014년)는 돼지, 말플라센타의 유통량이 약 50톤으로 예측되어 작년대비 약10% 증가한 것으로 조사됐다. 여기에 화장품 및 미용드링크 등에 어류 및 식물유래 플라센타 신상품도 속속 발매되어 플라센타 건강식품 및 화장품의 제품시장은 약440억 엔에 달할 것으로 추정됐다.

#### 다. 일본 주요업체 동향

- 일본바이오콤: 덴마크산 돼지플라센타와 아르헨티나산 말플라센타를 취급한다. 두 제품 모두 독자의 제법으로 플라센타 특유의 냄새를 없애고 부형제를 일절 사용하지 않은 순도 100% 추출분말이다. 모든 원료는 용해성이 뛰어난 스프레이드라이 분말로 정제 및 드링크 등 폭넓은 식품에 사용이 가능하다.
- 아오테아로아: 엄격한 품질관리시스템을 갖춘 뉴질랜드산 양플라센타의 원료공급 및 OEM을 한다. 기능성면에서는 증례사례를 풍부하게 확보하고 있는 등 골질 및 안티에이징, 면역 등과 관련하여 각종 시험결과를 취득하고 있다.
- 일본배리어프리: 연어알 난막추출물 ‘마린플라센타’를 취급한다. 히알루론산, 콘드로이친 황산, 콜라겐 등의 미용소재가 함유되어 있어 지금까지 피부미용 효과 및 안티에이징 효과 등의 특허를 취득해왔는데, 최근에는 새롭게 항산화 작용도 확인되었다. 이 소재는 색이 희고, 냄새도 적은 것이 특징으로 드링크나 캡셀뿐만 아니라 타정품에도 배합되고 있다.

- 프로모션레보: 여성용 미용·건강식품 등을 기획, 판매하는 프로모션레보는 메론플라센타 스무디를 발매하여 인기다. 제품에는 북해도산 멜론의 태반에서 채취한 식물성 플라센타를 배합했다. 식물성플라센타는 특유의 냄새가 없어 매일 지속 섭취할 수 있다는 것이 장점. 글루코만난 등을 배합하여 포만감도 얻을 수 있기 때문에 미용효과와 함께 다이어트에도 30·40대 여성에게 특히 인기가 높다.

### 3. 국외 콜라겐 개발 기술 및 제품 현황

- 기능성 소재의 제품화는 일본에서 가장 활발하게 이루어지고 있다. 마시는 콜라겐 제품의 인기와 더불어 비누, 샴푸, 커피 등에 콜라겐을 적용한 제품이 개발되면서 ‘04년 기준 약 5천억 엔의 콜라겐 제품 시장을 형성하고 있는 것으로 알려지고 있다(식품음료신문, 2004). 현재 약 30종류의 콜라겐 함유 식품이 판매되고 있고, 특히 일본 내수 침체에도 불구하고 콜라겐 시장은 젊은 여성 사이에서의 인기에 의해 여전히 확대되는 추세다. 이들 제품의 율리고 펩타이드는 종류 및 제품의 목적에 따라 분자량이 3000이하에서 다양하다.
- 현재 일본 콜라겐 시장은 시세이도가 ‘더 콜라겐’의 브랜드로 약 50%의 시장 점유율을 차지하고 있으며, 카네보 화장품은 30, 40대 여성을 대상으로 화장품 제품 및 음용 상품을 생산하고 있다. 콜라겐 식품은 판켈이 젤리음료 타입 상품을 생산하고 있으며, 메이지제과와 모리나가 유업에서도 콜라겐 식품 제조에 참여하고 있다. 아사히 음료는 콜라겐 워터를 판매하고 있으며, 라이온은 콜라겐음료인 ‘큐프룬’을 판매하는 등 다양한 형태의 콜라겐 식품이 제조되고 있다.

Table 6.1.2 이용 형태별 콜라겐 제품

	의약품 (필러)	의약품 (경구용)	식품 (분말)	식품 (젤리)	화장품 (미용)	화장품 (기능성)
제품 형태						
제품명 (제조 회사)	콜라겐필러 (로레알)	생선콜라겐 120캡슐 (네오셀)	슈퍼콜라겐분말 (네오셀)	콜라겐젤리 (마린 유타선언)	위터샤인 콜라겐 글로스 (메이블린)	아쿠아 콜라겐 아이패치 (네이처리퍼블릭)
제품 사진						
제품명 (제조 회사)	콜라겐필러 (니어스킨)	NeoCell Fish 콜라겐 HA - 120 Caps	순수 100%콜라겐 스틱	콜라겐젤리 (오르비스)	콜라겐 비비 (씨엘포)	콜라겐 에센스 마스크 (네이처리퍼블릭)

- 실제 일본 시장에서는 효능만 있으면 다소 비싼 가격에도 충성고객을 확보할 수 있는 매력 때문에 다수의 업체들이 콜라겐 제품 시장에 도전하고 있는데, 예로 메이지 제약은 2007년부터 유리병 용기 아미노콜라겐 EX를 486엔의 비싼 가격으로 출시하였지만, 연간 구매자가 2만 명을 돌파하기도 하였다.
- 일시적으로 주름을 없애는 데 사용되는 레스틸렌(Restylane)이 콜라겐의 생성 및 재생을 유도한다. 콜라겐은 피부가 젊어지도록 하는 천연물질이다. 이 결과는 수백만 명의 사람들이 주름제거를 위해 입가, 볼, 이마 주위에 주사되는 제품이 제조사가 밝히는 것 이상의 효과를 갖고 있다는 것을 의미한다고 미시간 대학의 연구진은 보고했다.

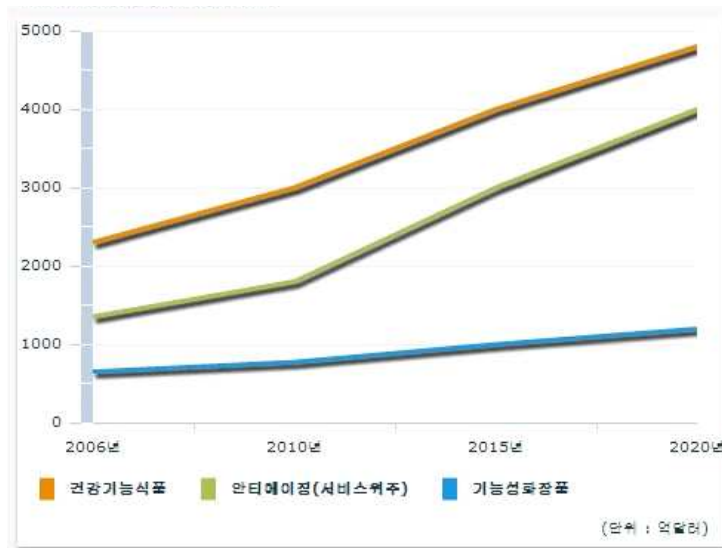


Figure 6.1.3 전 세계 안티에이징(anti-aging) 시장 규모.

- 인도 스킨케어시장에서 안티에이징제품은 2100 크로 루피(약 5040억원) 규모의 인도 스킨케어 시장에서 화이트닝 제품이 인기를 끈 이후, 최근에는 안티에이징 제품들이 빠르게 성장하고있다. P&G, 로레알, 유니레버와 니베아 등의 기업들이 안티에이징 부문을 더 확장하기 위해 신제품들을 꾸준히 출시하며 고객 소비 유도하고 있다.

Table 6.1.3 인도에 시판되는 콜라겐 화장품

브랜드	제품	특징	가격
폰즈 - 골드 레디언스		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 순금 미세입자</li> <li>- 비면포성(여드름 유발성분 없음.)</li> <li>- 피부과 전문의 테스트</li> </ul>	500~1000루피
니베아 - Q10 플러스		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Q10 성분이 주름 방지</li> <li>- 모공 관리에 효과적</li> <li>- 모든 피부용</li> </ul>	999루피

가니에르(로레알) - 링클 리프트		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주름 방지</li> <li>- 피부 탄력 회복 및 재생에 도움</li> </ul>	220루피
올레이(P&G) - 토탈 이펙트		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주름, 잡티, 보습 등 7가지 안티에이징 효과</li> <li>- 사용하기 편리한 구조</li> </ul>	599루피~

## 제 7 장 참고문헌

1. Hincke, M. T. Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix. (1995). *Connect. Tissue Res.* 31, 227-233.
2. Hincke, M. T., Gautron, J., Tsang, C. P. W., McKee, M. D., Nys, Y. (1999). Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, Ovocleidin-116. *J Biol Chem.* 274: 32915-32923.
3. Reginster J. Y., Halkin, V., Henrotin, Y., and Gosset, C. (1999). Treatment of osteoporosis: role of bone-forming agents. *Osteoporos Int.* 3: 91-96.
4. Lin, C. H., and Chowdhury, M. (2008). Using electrocapillary to measure the zeta potential of a planar hydrophobic surface in contact with water and nonionic surfactant solutions. *Langmuir.* 24(24): 14276-14281.
5. Karraker, K. A., and Radke, C. J. (2002). Disjoining pressures, zeta potentials and surface tensions of aqueous non-ionic surfactant/electrolyte solutions: theory and comparison to experiment. *Adv Coll Interface Sci.* 96(1/3): 231-264.
6. Tsai, W. T., Yang, J. M., Lai, C. W., Chang, Y. H., Lin, C. C., and Yeh, C. W. (2006). Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. *Biores. Technol.* 97 (3): 488-493.
7. Stadelman, W. J. (2000). Eggs and egg products. In: Francis, F. J. (Ed.), *Encyclopedia of Food Science and Technology*, second ed. John Wiley & Sons, New York, pp. 593-599.
8. Omi, N., and Ezawa, I. (1998). Effect of eggshell Ca on preventing of bone loss after ovariectomy. *J. Home Econ. Jpn.* 49: 277-282.
9. Rovensky, J. J., Marek, O., Schreiberova, O., Stancikova, M. (1994). Somatomadin-type activity of Biomin H. *Casopis Lekarů Ceskych.* 133: 213-214.
10. Park, J. W., Bae, S. R., Suh, J. Y., Lee, D. H., Kim, S. H., Kim, H. J., and Lee, C. S. (2008) Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft substitutes in rat calvaria: A pilot study. *J Biomed Res Mat A.* 87A (1): 203-214.
11. Schaafsma, A., and Pakan, I. (1999). Effect of a chicken egg shell powder enriched dairy product on bone mineral density in persons with osteoporosis or osteopenia. *Nutrition* 15:157.
12. Cai, Y., and Tang R. (2008). Calcium phosphate nanoparticles in biomineralization and biomaterials. *J Mater Chem.* 18: 3775-3787.
13. Ginebra, M. P., Driessens, F. C. M., Planellk, J. A. (2004). Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials.* 25 (17): 3453-3462.
14. Buxsein, M. L. (2003) Mechanisms of osteoporosis therapy: a bone strength perspective. *Clin Cornerstone Suppl.* 2:S13-S21.
15. Nam, S. H., Jeon, J. H., Che, X., Lim, K. E., Nam, H., Park, J. S., and Choi, J. Y. (2012). Topically administered Risedronate shows powerful anti-osteoporosis effect in ovariectomized mouse model. *Bone.* 50: 149-155.

16. Ishida, H., T. Uesugi, K. Hirai, T. Toda, H. Nukaya, K. Yokotsuka and K. Tsuji. (1998). Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin on bone mineral density in estrogenand/or dietary calcium-deficient rats. *Bone* 16:149-156.
17. Mori, S., Jee, W. S. S., and Li, X. J. (1992). Production of new trabecular bone in osteopenic ovariectomized rats by prostaglandin E2. *Calcif Tissue Int.* 50: 80-87.
18. Kalu, D. N., Liu, C. C., Salerno, E., Hollis, B., Econ, R., and Ray, M. (1991). Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17  $\beta$ -estradiol. *Bone and mineral.* 14 (3): 175-187.
19. Brown, J. P., Albert, C., Nassar, B. A., Adachi, J. D., Cole, D., Daviso, K. S., Dooley, K. C., Don-Wauchope, A., Douville, P., Hanley, D. A., Jamal, S. A., Josse, R., Kaiser, S., Krahn, J., Krause, R., Kremer, R., Lepage, R., Letendre, E., Morin, S., Ooi, D. S., Papaioannou, A., Ste-Marie, L-G. (2009). Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clinic. Biochem.* 42: 929-942.
20. Sahan, N., Yasar, K., and Hayaloglu, A. A. (2008). Physical, chemical and flavor quality of non-fat yogurt as affected by a  $\beta$ -glucan hydrocolloidal composite during storage. *Food Hydrocoll.* 22:1291-1297.
21. Krishna, D. S. R., Siddharta, A., Seshadri, S. K., and Kumar, T.S.S. (2007). A novel route for synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from biowaste eggshell. *J Mater. Sci: Mat Med.* 18: 1735-1743.
22. Stadelman, W. J. (2000). Eggs and egg products. In: Francis, F. J. (Ed.), *Encyclopedia of Food Science and Technology*, Second ed. John Wiley & Sons, New York, pp. 593-599.
23. Poland, A. L. and Sheldon, B. W. (2001). Altering the thermal resistance of foodborne bacterial pathogens with an eggshell membrane waste by-product. *J Food Prot.* 64: 486-492.
24. Tacon, A. G. J. (1982). Utilisation of chick hatchery waste: The nutritional characteristics of day-old chicks and eggshells. *Agric. Wasters* 4: 335-343.
25. Omi, N.; Ezawa, I. (1998). Effect of eggshell Ca on preventing of bone loss after ovariectomy. *J. Home Econ. Jpn.* 49: 277-282.
26. Schaafsma, A.; Beelen, G. M. (1999). Eggshell powder, a comparable or better source of calcium than purified calcium carbonate:piglet studies. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1-5.
27. Kumar, G. S., Thamizhavel, A., and Girija, E. K. (2012). Microwave conversion of eggshells into flower-like hydroxyapatite nanostructure for biomedical applications. *Mat. Letters.* 76:198-200.
28. Huang, S., Ching, J., Hsu, C. W., and Chang, W. H. (2009). Effects of nano calcium carbonate and nano calcium citrate on toxicity in ICR mice and on bone mineral density in an ovariectomized mice model. *Nanotechnology.* 20.
29. Preetz, C., Rube, A., Reiche, I., Hause, G., and Mader, k. (2008). Preparation and characterization of biocompatible oil-loaded polyelectrolyte nanocapsules. *Nanomed.: Nanotechnol. Bio. Med.* 4: 106-114.
30. Semo, E., Kesselman, E., Danino, D., and Livney, Y. D. (2007). Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids.* 21: 936-942.
31. Genant, H. K., Delmas, P. D., Chen, P., Jiang, Y., Eriksen, E. F., Dalsky, G. P., Markus, R., and Martin, J. S. (2007). Severity of vertebral fractures reflects deterioration of bone microarchitecture. *Osteoporos Int.* 18: 69-76.

32. Renno, A. C., de Moura, F. M., dos Santos, N. S., Tirico, R. P., Bossini, P. S., and Parizotto, N. A. (2006). Effects of 830-nm laser used in two doses on biomedical properties of osteopenic rat femora. *Photomed Laser Surg.* 24(2): 202-206.
33. Mundy, G. R. (2007). Osteoporosis and inflammation. *Nutrition Reviews.* 65(12): S147-S15.
34. Pacifici, R. (1998). Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis-The seconddecade. *Endocrinology.* 139(6): p. 2659-266136.
35. Silverberg, S. J. and Lindsay, R. (1987). Postmenopausal osteoporosis. *Medical Clinics of North America.* 71(1): 41-57.
36. Shen, Y., Li, Y. Q., Li, S. P., Ma, L., Ding, L. J., and Ji, H. (2010). Alleviation of ovariectomy induced osteoporosis in rats by *Panax notoginseng* saponins. *J Nat Med.* 64: 336-345.
37. Warensjo, E., Byberg, L., Melhus, H., Gedeberg, R., Mallmin, H., Wolk, A., and Michaelson, K. (2011). Dietary calcium intake and risk of fracture and osteoporosis. *BMJ.* 342: d1473.
38. Hirasawa, T., Omi, N., and Izawa, I. (2001). Effect of 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and egg-shell calcium on bonemetabolism in ovariectomized osteoporotic model rats. *J Bone Miner Metab.* 19: 84-88.
39. Schaafsma, A., van Doormaal, J. J., Muskiet, F. A., Hofstede, G., J., Pakan, I., and van der Veer, E. (2002). Positive effects of a chicken eggshell powder-enriched vitamin-mineral supplement on femoral neck bone mineral density in healthy late post-menopausal Dutch women. *Br J Nutr.* 87(3): 267-275.
40. Chen, H. S., Chang, J. H., and Wu, J. S. (2008). Calcium bioavailability of nanonized pearl powder for adults. *J Food Sci.* 73 (9): 246-251.
41. Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Claustrat, B., Delmas, P. D. (2000). Biochemical markers of bone turnover, endogenoushormones, and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res.* 15(8): 1526-1536.
42. Daengprok, W., Garnjanagoonchorn, W., Naivikul, O., Ponsinlpatip, P., Issigonis, K., and Mine, Y. (2003). Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in the human intestinal epithelial cells, Caco-2. *J Agric Food Chem.* 51(20): 6056-6061.
43. Seo, M. H., Lee, S. Y., Chang, Y. H., and Kwak, H., S. (2007). Physicochemical, microbial, and sensory properties of yogurt supplemented with nanopowdered chitosan during storage. *J Dairy Sci.* 92: 5907-5916.
44. Rasenack, N., and Muller, B. W. (2004). Micron-size drug particles: common and novel micronization techniques. *Pharm. Dev. Technol.* 9:1-13.
45. Ramasubramanian, L., Restuccia, C., and Deeth, H. C. (2008). Effect of calcium on the physical properties of stirred probiotic yogurt. *J Dairy Sci.* 91: 4264-4175.
46. Pirkul, T., Temiz, A., and Erden, Y. K. (1997). Fortification of yoghurt with calcium salts and its effect on starter microorganisms and yoghurt quality. *Int Dairy J.* 7: 547-552.
47. Singh, G. and Muthukumrappan, K. (2008). Influence of calcium fortification on sensory, physical, chemical and rheological characteristics of fruit yogurt. *LWT.* 41: 1145-1152.
48. Rovensky, J., Stancikova, M., Masarik, P., Svik, K., and Istok, R. (2003). Eggshell calcium in the prevention and treatment of osteoporosis. *Int J Clin Pharmacol Res.* 23(2-3): 83-92.



49. Kim, S. H., Lee, S. Y., Palanivel, G., and Kwak, H. S. (2011). Effect of *Dioscorea opposita* Thunb. (yam) supplementation on physicochemical and sensory characteristics of yogurt. *J Dairy Sci.* 94: 1705-1712.
50. Dean, J. A., 1987. In: *Lange's Handbook of Chemistry*, 13th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 4-33.
51. Busca, G., Resini, C., (2000). Vibrational spectroscopy for the analysis of geological and inorganic materials. In: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 10954-11008.
52. Davison, S., and Davis, S. R. (2003). Hormone replacement therapy: current controversies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 58(3): 249-261.
53. Devareddy, L., Khalil, D. A., Smith, B. J., Lucas, E. A., Young, D. Y., Marlow, D. D., and Arjmandi, B. H. (2006). Soy moderately improves microstructural properties without affecting bone mass in ovariectomized rat model of osteoporosis. *Bone*. 38: 686-693.
54. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington, DC: National Academy Press, (2010).
55. Hilty, F. M., Knijeneburg, J. T. N., Teleki, A., Krumeich, F., Hurrell, R. F., Pratsinis, S. E., and Zimmermann, M. B. (2011). Incorporation of Mg and Ca into nanostructured Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> improves Fe solubility in dilute acid and sensory characteristics in foods. *J Food Sci.* 76(1): N2-N10.
56. Rasenack, M., Muller, B. W. (2004). Micron sized drug particles: common and novel micronization techniques. *Pharm Dev Technol.* 9(1): 1-13.
57. Makai F, and Chudacek J. (1991). The treatment of osteoporosis with Biomin-H. *Arch Gerontol Geriatr.* 2: 487.
58. Wegorzewska, I. N., Walters, K., Weiser, M. J., Cruthirds, D. F., Ewell, E., Larco, D. O., Handa, R. J., and Wu, T. J. (2008). Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor  $\alpha$  agonist propylpyrazoletriol. *Am J Obs Gynecol.* 1: 67.e1-67.e5.
59. Namiduru, E. S., Binnur, E. A., Celik, A., Yilmaz, M., and Tarakcioglu, M. (2007). Serum prolidase activity in postmenopausal osteoporosis. *Minerva Med.* 98(6): 647-651.
60. Hilty, F. M., Arnold, Hilbe, M., Teleki, A., Knijnenberg, J. T., Ehrensperger, F., Hurrell, R. F., Pratsinis, S. E., Langhans, W., and Zimmermann, Z. B. (2010). Iron from nanocompounds containing iron and zinc is highly bioavailable in rats without tissue accumulation. *Nat Nanotechnol.* 5(5): 374-380.
61. Babaei, P., Mehdizadeh, R., Ansar, M., and Damirchi, A. (2010). Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. *Menopause Int.* 16: 100-104.
62. Ajakaiya, J. O., and A. S. Leeson. (1997). Effects of calcium source, particle size and time on in-vitro calcium solubility of some indigenous Nigerian mineral ingredients for poultry diets. *Anima. Feed Sci. Tech.* 65:293-298.
63. Ahn, Y. J., P. Ganesan, and H. S. Kwak. (2013). Effect of nanopowdered peanut sprouts on physicochemical and sensory properties of milk. *Korean J. Food Sci. An.* 33:9-15.
64. Crudden, A., D. Afoufa-Bastien, P. F. Fox, G. Brisson, and A. L. Kelly. 2005. Effect of hydrolysis of casein by plasmin on the heat stability of milk. *Int. Dairy J.* 15: 1017-1025.

65. Delisle, J., J. Amiot, and F. Dore. 1995. Biological Availability of calcium and magnesium from dairy products. *Int. Dairy J.* 5:87-96.
66. Gastaldi, E., N. Trial, C. Guillaume, E. Bourret, N. Gontard, and J. L. Cuq. 2003. Effects of controlled  $\kappa$ -casein hydrolysis on rheological properties of acid milk gels. *J. Dairy Sci.* 86: 704-711.
67. Gaucher, I., D. Molle, V. Gagnaire, and F. Gaucheron. 2008. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT-milk. *Food Hydrocoll.* 22: 130-143.
68. Wu, J., Yang, C., Rong, Y. I., and Wang, Z. (2012) Preparation and nutritional characterization of perilla chewable tablet. *Procedia Engin.* 37, 202-207.
69. Jiang, Z. Q., Zou, J. H., and Xiong, W. Y. (2007) Research on preparation technology of natto chewable tablets. *Sci. Technol. Food Ind. (Chinese Journal)*. 28, 128-130.
70. Du Y. J. (2006) Study on processing technology of oat dietary fiber chewing tablet. *Sci. Technol. Cereals, Oils and Foods (Chinese journal)* 14, 37-38.
71. Dolman (2006). Calcium gradients and the Golgi, *Cell Calcium (Cell Calcium)* 40, 505-512.
72. Lee (2006) The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. (*Biomaterials*). 27, 2865-2873.
73. Kim (2007) New Whitening Agent from *Pimpinella brachycarpa*. *J. Cosmet. Sci.*
74. P. Muralidhar (2003) Sphingolipids from marine organisms. A review., *Natural products science.* 9 117-142.
75. Glomset JA (1985) Chapter 4 Biosynthesis, function and metabolism of sterol esters. *New Comprehensive Biochemistry*, 12 95-119.
76. Hilty F (2009) Development and optimization of iron- and zinc-containing nanostructured powders for nutritional applications. *Nanotechnolog.* 20.
77. Huang S (2008) Effects of nano calcium carbonate and nano calcium citrate on toxicity in ICR mice and on bone mineral density in an ovariectomized mice model. *Nanotechnology.* 16.
78. Mahmood G (2012) Bone mineral density accrual in students with autism spectrum disorders: Effects of calcium intake and physical training. *Research in Autism Spectrum Disorders.*
79. Zimmermann M (2011) Nanocompounds of iron and zinc: their potential in nutrition. *Nanoscale* 3 2390-2398.
80. Ajakaiya J (1997) Effects of calcium source, particle size and time on in-vitro calcium solubility of some indigenous Nigerian mineral ingredients for poultry diets. *Animal Feed Science and Technology* 65 293-298.
81. Risch, S.J (1995) Encapsulation. pp. 2-7. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*. American Chemical Society symposium series 590.
82. Versic R.J (1988) Flavor Encapsulation. pp. 1-6. In: *Flavor Encapsulation*. American Chemical Society symposium series 370.
83. Atmane M (2006) Flavour encapsulation and controlled release—a review *J. International Journal of Food Science and Technology* 41 1-21.
84. Weiss J. (2006) Functional Materials in Food Nanotechnology *J. Food Sci.* DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x.
85. 구송이 등, 식품생물 산업에서의 초고압기술 응용, *식품과 산업* 9월호(2007): 23-30.
86. H.J. Vila Real et al. *Food Chemistry* 102(2007): 565-570.

87. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:en:PDF>
88. <http://www.ost-cosmetics.com/plazan-cosmeceuticals.html>
89. <http://www.ost-cosmetics.com/ostcosmetics-faq-page.html#sourceforplacent>

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.