

콜드젤 기술을 이용한 유청 단백질 나노담체 함유 기능성 유제품 가공 기술 개발

(Development of functional dairy products
containing whey protein nano-carrier
made by cold-induced gelation)

유청 단백질 나노담체 제조공정 개발 및 기능적 유용성 연구
(Functional study of whey protein nano-carrier)

나노담체 및 나노담체 함유 유용물질의 대량 스크리닝 시스템 개발
(Development of secreting system for nano-carrier
containing bioactive compounds)

나노담체 함유 고기능성 유제품 생산 공정 개발 및 제품 적성 평가
(Development of processing procedures for functional dairy
products including nano-carrier and its application)

경상대학교 동물생명과학과

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “콜드젤 기술을 이용한 유청 단백질 나노담체 함유 기능성유제품 가공 기술 개발” 과제 (세부과제 “유청 단백질 나노담체 제조 공정 개발 및 기능적 유용성 연구, 나노담체 및 나노담체 함유 유용물질의 대량 스크리닝 시스템 개발, 나노담체 함유 고기능성 유제품 생산 공정 개발 및 제품 적성 평가”)의 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월 26 일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 이 원 재

협동연구기관명 : 명가유업 (주)

협동연구책임자 : 서 재 경

협동연구기관명 : 한국식품연구원

협동연구책임자 : 박 동 준

참 여 기 업 : 명가유업 (주)

요 약 문

I. 제 목

콜드젤 기술을 이용한 유청 단백질 나노담체 함유 기능성 유제품 가공 기술 개발

Development of functional dairy products containing whey protein nano-carrier made by cold-induced gelation

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 나노기술을 접목해 고부가가치 기능성 나노식품을 개발하는 연구는 생명공학 기술과 함께 중요한 제품 개발 기술의 하나가 되고 있음. 2004년 ‘헬무트카이저 컨설턴시’ 보고서에 따르면 세계 나노식품 시장은 올해 26억 달러에서 2010년 204억 달러로 빠른 성장세를 지속할 것으로 추정됨.
- 21세기 나노 바이오 시대를 맞이하여 유청 단백질 나노담체 기술 개발 및 고기능성 유제품 산업화로 다가오는 FTA 시대를 대비하여, 유가공 산업에서 우위를 점할 필요성이 있음.
- 나노담체 (Nano-carrier or nanoparticle)는 기존 기능성 유제품 생산에 이용되었던 미세캡슐 (Microparticle)(입자크기 $> \sim 10 \mu\text{m}$)과 비교 하여, 입자의 크기가 매우 작아 (10-1000 nm) 표면적을 급격히 증가시킴으로써 장내 상피 세포와의 상호작용을 극대화 할 수 있으며, 미세한 capillary를 통하여 체내 흡수가 용이하다. 또한, 장에서 체류하는 시간을 연장할 수 있어 유용성분의 흡수의 측면에서 많은 장점을 가질 수 있음
- 식품 내에서 중요한 영양원인 식품 단백질들의 다양한 기능성 중에서 젤 형성 능력 (gel forming property)은 많은 관심의 대상이 되어 왔음. 이로 인해 이들은 bioactive compounds를 encapsulation 할 수 있는 이상적인 물질로서 작용할 수 있음. 최근 globular whey protein과 soybean protein을 미리 가열하여 단백질 suspension을 제조한 후 칼슘 이온을 첨가함으로써 냉각 콜드젤화 (cold-induced gelation)가 가능하다는 보고가 있음.
- 콜드젤 기법 (cold-induced gelation)을 이용한 유청 단백질 나노담체 제조는 기존 미세 캡슐 제조에 이용 되는 열처리 공정이나 가교제로서 글루타르알데히드 등의 유해물질을 사용하지않아, 열처리에

민감한 기능성 물질들 (엽산)의 유제품 내 이용 효율성을 극대화 할 수 있고 환경 친화적임.

- 콜드젤 기법 (cold-induced gelation)에 의해 gel의 미세 구조 및 기능성을 조절하게 되면 nutraceutical 및 functional food system에 대한 water-soluble delivery device의 제조가 가능함.
- Food protein을 nutraceutical delivery system에 사용하였을 경우 food texture를 안정화시킬 수 있어 식품 제조에 있어서 매우 바람직한 특성을 나타냄.
- 식품 단백질 특히 globular protein (egg white, soybean, and whey protein 등)을 gelation 시키게 되면 물리화학적 혹은 산업적 중요성이 높아지기 때문에 지난 수년간 많은 관심의 대상이 되어왔음.
- 유제품에서 유청 단백질 나노담체 이용은 고부가가치 제품군으로서, 유가공산업의 부산물인 유청 (whey)의 가치를 높일 수 있음.
- 식품단백질은 새로운 GRAS (Generally recognized As Safe) 물질로서 개발에 있어서 많은 잠재성을 띠고 있음.
- 나노담체의 유용물질로 활용할 엽산 (Folic Acid)은 우유 중의 부족한 영양성분으로 유제품 가공공정인 열처리에 민감하며, 또한 우유에 직접 첨가 시 우유 단백질과 반응하여 응고 되는 문제점이 있어 이에 대한 해결책이 필요함.
- 식품에서의 낮은 엽산의 bioavailability으로 인해 엽산을 encapsulation한 나노담체 이용은 유용성분의 흡수 측면에서 많은 장점을 가질 수 있음.
- 본 연구에서는 나노담체 제조공정 요인 등이 나노담체의 물리 화학적 특성과 안정성에 미치는 영향을 평가하고 궁극적으로 경제적이고 기능성 물질의 효율을 극대화할 유청 단백질 나노담체를 개발하고자 함.
- 전달 시스템으로서 위장관에서의 나노담체 방출기작과 장내 흡착 및 전달 기작을 연구하고, 엽산을 encapsulation 한 나노담체의 세포생리학적 특성을 규명함으로써 효과적인 bioactive delivery system을 구축하고자 함.
- 나노담체의 유제품 내 적용 공정을 개발하고, 최종적으로 나노담체 함유 기능성 유제품의 적성을 평가하고 제품 생산에 적용 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
유청 단백질 나노담체 제조공정 개발 및 기능적 유용성 연구	<ul style="list-style-type: none"> · 유청 단백질 나노담체 제조 공정 개발 및 공정요인과 나노입자 상관성 연구 · 유청 단백질 나노담체와 기능성 물질의 물리 화학적 상호작용 연구 · 유제품 저장 과정 중의 나노담체 물리 화학적 저장 안정성 평가 및 안정화 기술 개발
나노담체 및 나노담체 함유 유용물질의 대량 스크리닝 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> · 제 1 세부과제에서 사용될 유청 단백질 성분 및 엽산 (folic acid)의 세포 내 생리활성의 특성 규명 · 유청 단백질 나노담체의 세포생리학적 특성 규명 · 세포 내 나노담체 함유 folic acid의 세포생리학적 특성 규명
나노담체 함유 고기능성 유제품 생산 공정 개발 및 제품 적성 평가	<ul style="list-style-type: none"> · 유제품 생산 공정 조건에 따른 유청 단백질 나노담체의 특성 분석 · Bioactive carrier로서 나노담체의 기능성 평가 · 유제품별 나노담체 특성 분석 및 용도 개발

IV. 연구개발결과

세부과제명	연구 결과
유청 단백질 나노담체 제조공정 개발 및 기능적 유용성 연구	<p>콜드젤 기술을 이용하여 유청 단백질 나노담체를 제조한 결과, 100-150 nm의 나노담체가 형성되었으며 소수성 상호작용 및 sulfhydryl interaction이 형성에 관여하였음. 제조 공정 요인인 열처리 온도, CaCl₂ 농도가 증가함에 따라 나노입자의 크기와 zeta-potential이 증가하였음. 또한, 나노담체의 입자 크기와 zeta-potential 값은 엽산의 encapsulation efficiency와 양의 상관관계를 가졌음. 기능성 물질의 전달체로 β-Ig 나노담체는 resveratrol을, β-Ig/알긴산 나노담체는 엽산을, β-Ig 나노에멀전으로 ascorbic acid를 성공적으로 포집하였음. 분말화 된 유청 단백질 나노담체는 치즈 제조 및 숙성기간과 요구르트 저장 기간 동안 형태 및 포집 안정성을 유지하여 기능성 물질 전달시스템으로서 유제품 제조에 적용 될 수 있음.</p>
나노담체 및 나노담체 함유 유용물질의 대량 스크리닝 시스템 개발	<p>나노담체 및 나노담체 함유 유용물질의 대량 스크리닝 시스템 개발하기 위하여 Korean cell line bank (KCLB)에서 분양받은 사람의 장내 세포주로 MTT assay를 이용하여 적정 세포수를 확립하였음. 사람의 세포내 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 uptake 최적화 조건을 규명 하였</p>

<p>나노담체 및 나노담체 함유 유용물질의 대량 스크리닝 시스템 개발</p>	<p>고, 세포내로의 나노담체의 uptake의 가장 적합한 조건이 위, 대장 세포의 경우에는 0.05 mg/ml로 6시간 처리한 경우가 가장 적합함. 또한, 100 nm 가량의 유청 단백질 나노담체는 사람의 위와 대장 세포에 독성의 영향이나 세포의 성장에 영향을 주지 않았음. Folic acid 유청 단백질 나노담체가 release 및 retention 일어나는 최적조건은 처리 이후 6시간 이 후 임을 알 수 있었고, 이를 통해 사람의 세포 내에서 folic acid 유청 단백질 나노담체의 release와 retention 작용의 최적의 조건을 찾을 수 있었음. Folic acid 유청단백질 나노담체 역시 세포에 독성의 영향을 주지 않았음. 유청 단백질 나노담체를 처리한 군과 folic acid 유청 단백질 나노담체를 처리한 군의 유전자 발현을 비교하였을 때 folic acid 유청 단백질을 처리한 군에서 더 높은 유전자 발현이 나타났으며, 나노담체에 folic acid를 첨가하여 유제품을 생산하였을 경우 장내 대사에 좋은 효과를 볼 수 있을 것 이라 생각됨.</p>
<p>나노담체 함유 고기능성 유제품 생산 공정 개발 및 제품 적성 평가</p>	<p>유제품 생산 공정 조건에 따른 유청 단백질 나노담체의 특성을 분석하기 위해 pH, 열처리 온도, folic acid 농도, WPI 농도, CaCO₃ 농도, aqueous phase와 organic phase의 비율, polymer 종류 (alignate, pectin, gelatine, i-carrageenan, k-carrageenan)를 달리하여 나노담체를 제조하였음. 열처리 온도가 높아질수록 입자의 크기가 증가하였고, WPI농도가 0.2%에서 0.6%로 증가할수록 입자의 크기가 증가하였음. CaCO₃ 농도가 증가할 수록 나노담체의 입도가 증가하였으며, WPI 1%에서는 CaCO₃ 농도가 5 mM일 경우 가장 작은 입자크기 (317 nm)를 지님. Polymer 종류에 따른 입도분석 결과 alginate를 사용한 경우 317nm로 입자크기가 가장 작았음. 용출실험 결과, pH 7.4에서 2시간 이내에 대부분의 포집된 엽산이 용출된 반면, pH 1.2에서는 6시간 이상 용출이 지연되는 것을 확인하였음. 유제품별 나노담체 특성 분석 및 용도개발을 위해 나노담체를 첨가한 요구르트를 제조한 결과, 대조군과 비슷한 pH 및 생균수를 나타내었으며 나노담체 첨가가 요구르트 발효에 큰 영향을 주지 않았음. 동적 점탄 특성 결과, WPI 1% 담체를 첨가한 요구르트의 경우 CaCO₃ 농도가 증가함에 따라 높은 G'을 나타냄.</p>

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구개발 수행 결과 콜드젤 기술을 이용하여 100-150 nm 크기의 유청 단백질 나노담체 제조 공정이 개발되었으며 열에 민감한 수용성 생리활성 물질 (엽산과 ascorbic acid)과 지용성 생리활성 물질 (resveratrol)의 전달 시스템으로서 가능성이 입증되었다. 또한 위장관 조건하에서의 나노담체로부터 생리활성 물질의 방출기작과 장내 흡착 및 전달 기작이 연구되었으며 엽산을 encapsulation 한 나노담체의 세포생리학적 특성을 규명함으로써 유식품 유래 고부가가치 전달체 제조 기술을 확보하였다. 특히 다자간 FTA 에 따른 유식품 산업의 경쟁력 확보를 위한 대응방안 중 하나로 고부가가치 발효 유제품개발을 위해 유청 단백질 나노담체의 발효 유제품 내 적용 공정을 개발하고, 나노담체 함유 기능성 유제품의 적성을 평가하였다.

연구개발과정 동안 유청 단백질 나노담체 제조 및 물리화학적 특성과 관련하여 2편의 논문이 SCI 및 KSC급 논문으로 게재되었으며 유청 단백질 나노담체 관련 교육 지도를 통해 나노유식품 기술을 산업체 및 학교 관계자들에게 소개하는 기회를 가졌다. 2010년 현재 콜드젤 기술 이용 유청 단백질 나노담체의 물리 화학적 상호 작용과 관련 하여 2건의 특허 출원 및 SCI급 논문 게재가 준비 중에 있으며, 엽산 함유 유청 단백질 나노담체가 세포의 성장 및 독성에 미치는 영향 분석결과에 관하여 특허 출원 및 SCI급 논문 1부 이상 게재를 계획 하고 있다.

유청 단백질 나노담체에 Folic acid(엽산) 외 다른 유용물질을 encapsulation 하여 체내로의 전달실험을 진행 계획에 있고 이는 엽산 함유 유청 단백질 나노담체뿐만 아니라 다른 유용물질을 함유한 유청 단백질 나노담체를 개발하여 이후 또 다른 특허 및 논문 게재를 계획 하고 있으며 개발된 유청 단백질 나노담체를 이용하여 특정 유용물질을 캡슐화 하여 약물 전달 물질 뿐 아니라 다른 산업 분야나 가정용 기술로도 응용 및 적용 계획에 있다.

본 연구를 통해 개발 되고 평가 확보 된 기술은 논문 및 특허출원과 함께 향후 국내 관련 업체로의 기술 이전을 포함한 산업화/실용화를 추진 할 계획이며, 과제 종료이후에도 본 기술들이 고부가가치 유제품 생산에 적용될 수 있도록 노력하여 궁극적으로 우리 낙농산업의 내수시장 확대와 수출 효과 극대화를 통해, 다자간 FTA에 따른 국내 낙농산업의 국제 경쟁력을 높일 수 있을 것으로 기대한다.

SUMMARY

Whey proteins, especially beta-lactoglobulin (β -lg), are widely used as functional ingredients in dairy food industry because of high nutritional value and GRAS (generally recognized as safe). Whey proteins can make an ideal material for the encapsulation of bioactive compounds due to its ability to form gel, emulsions, hydrogel, biodegradability and biocompatibility. A number of techniques including spray-drying and coacervation have been developed to prepare protein-based micro and sub-micro particles. In these methods, high heat treatments or residual organic compounds, which would negatively affect heat-sensitive compounds and provide toxicity problems, were used. In this study, cold-induced self-assembly method was used to prepare whey protein nano-carrier.

The overall objectives of this research were to 1) develop whey protein based nano-delivery system using cold gelation techniques; 2) understand structural, chemical, and functional properties of whey protein nano-carriers on various production variables; 3) develop secreting systems of nano-carriers; 4) analyze bioavailability of nano-carriers; and 4) develop of processing steps for milk products containing whey protein nano-carriers.

Around 100-150 nm size of whey protein (β -lactoglobulin) nano-carriers were successfully obtained using cold gelation method. Hydrophobic attractions and intermolecular disulfide interactions can contribute to formation of whey protein nano-carrier. The size and zeta-potential of nano-carriers increased with an increase in heating temperatures and cross-linking agent such as CaCl_2 concentrations. There were positive correlations between the size and zeta-potential of nano-carriers and folic acid encapsulation efficiency. Increasing heating temperature and CaCl_2 concentrations resulted in an increase in the encapsulation efficiency of hydrophobic- and hydrophilic- bioactive compounds, respectively. Whey protein nano-carriers could withstand during cheese making process. Morphological properties and release profiles during cheese ripening and yogurt storage periods showed bioactive compound loaded whey protein nano-carrier can be used as a delivery systems in fermented dairy products.

In this research, secreting system of whey protein nano-carriers was developed. Whey protein nano-carriers were nontoxic to cell activity into intestinal cells. We confirmed that whey-protein based nano-particle containing folic-acid were nontoxic to cell activity, and release

and retention of folic acids into intestinal cells were comparable to those of folic acid alone.

Folic acid loaded WPI (whey protein isolate) nano-carrier were formed. Increased heating temperature, WPI concentration, and CaCO₃ concentrations resulted in an increase in the size of nano-carrier. When K-carrageenan was used to prepare nano-carrier, the largest particles were obtained while the use of alginate resulted in the production of the smallest particles. The release experiments of nano-carrier in simulated gastric conditions indicate that WPI nano-carriers can be useful to encapsulate bioactive compounds and used as a delivery system. Folic acid loaded WPI nano-carrier could not disturb yogurt fermentation.

In conclusions, key processing parameters, which affected the formation and physical, chemical properties of whey protein nano-carriers, were heating temperature, cross-linking agents, and WPI concentrations. Whey protein nano-carriers that were nontoxic to cell activity into intestinal cells were developed. Whey protein nano-carrier may provide a powerful tool as a safe and useful bioactive compound delivery system for fermented dairy products.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	1
1. Justification of research	1
2. Objectives	2
Chapter 2. Current status of technology development in local and abroad	4
Chapter 3. Contents and results	6
1 Methods	6
2 Results	18
Chapter 4. Expected accomplishment and contributions of the research	93
Chapter 5. Future plans and application of the results	97
Chapter 6. Information of international	98
Chapter 7. References	99

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 1 절	연구개발의 필요성	1
제 2 절	연구개발의 목적	2
제 2 장	국내외 기술개발 현황	4
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	6
제 1 절	연구수행방법	6
제 2 절	연구수행결과	18
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	93
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	97
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	98
제 7 장	참고문헌	99

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

21세기 나노 바이오 시대를 맞이하여 10억분의 1m인 나노 단위에서 조작하는 첨단 나노기술을 접목하고부가가치 기능성 나노식품을 개발하는 연구가 생명공학 기술과 함께 중요한 제품 개발 기술의 하나가 되고 있다. ‘헬무트카이저 컨설턴시’ 보고서에 따르면 세계 나노식품 시장은 2004년 26억 달러에서 2010년 204억 달러로 빠른 성장세를 지속할 것으로 추정된다. 또한 다가온 FTA 시대를 대비하여 유식품 산업의 경쟁력 확보를 위한 대응방안 중 하나로 고부가가치 유식품 소재 개발이 필요한 실정이다.

나노담체 (Nano-carrier or nanoparticle)는 기존 기능성 유제품 생산에 이용되었던 미세 캡슐(Microparticle)(입자크기 $> \sim 10 \mu\text{m}$)과 비교 하여, 입자의 크기가 매우 작아 (10-1000 nm) 표면적을 급격히 증가시킴으로써 장내 상피 세포와의 상호작용을 극대화 할 수 있으며, 미세한 capillary를 통하여 체내 흡수가 용이하다. 또한, 장에서 체류하는 시간을 연장할 수 있어 유용 성분의 흡수의 측면에서 많은 장점을 가질 수 있다 (Fig. 1).

식품 내에서 중요한 영양원인 유청 단백질은 새로운 GRAS (Generally recognized As Safe) 물질로서 개발에 있어서 많은 잠재성을 띠고 있다. 특히 젤 형성 능력 (gel forming property)은 많은 관심의 대상이 되어 왔으며, 이로 인해 이들은 bioactive compounds를 encapsulation 할 수 있는 이상적인 물질로서 작용할 수 있다. 최근 연구보고에 의하면 globular whey protein과 soybean protein을 미리 가열하여 단백질 suspension을 제조한 후 칼슘이온을 첨가함으로써 냉각 콜드젤화 (cold-induced gelation)가 가능하다는 보고가 있으며, 콜드젤 기법 (cold-induced gelation)에 의해 유청 단백질 gel의 미세 구조 및 기능성을 조절하게 되면 nutraceutical 및 functional food system에 대한 water-soluble delivery device의 제조가 가능하며 유청 단백질을 기능성 물질의 전달체로 사용하였을 경우 food texture를 안정화시킬 수 있어 유식품 제조에 있어서 매우 바람직한 특성을 나타낼 것으로 사료된다.

나노담체의 유용물질로 활용할 엽산 (Folic Acid)은 우유 중의 부족한 영양성분으로 유제품 가공공정인 열처리에 민감하며, 또한 우유에 직접 첨가 시 우유 단백질과 반응하여 응고되는 문제점이 있어 이에 대한 해결책이 필요하다. 콜드젤 기법 (cold-induced gelation)을 이용한 유청 단백질 나노담체 제조는 기존 미세 캡슐 제조에 이용 되는 고온 열처리 공정이나 가교제로서 글루타르알데히드 등의 유해물질을 사용하지 않아, 열처리에 민감한 기능성 물질들

(예를 들면, 엽산이나 ascorbic acid)의 유제품 내 이용 효율성을 극대화 할 수 있고 환경 친화적이다. 식품에서의 낮은 엽산의 bioavailability으로 인해 엽산을 encapsulation한 나노담체 이용은 유용성분의 흡수 측면에서 많은 장점을 가질 수 있으며, 또한 유제품에서 유청 단백질 나노담체 이용은 고부가가치 제품군으로서, 유가공산업의 부산물인 유청 (whey)의 가치를 높일 수 있다.

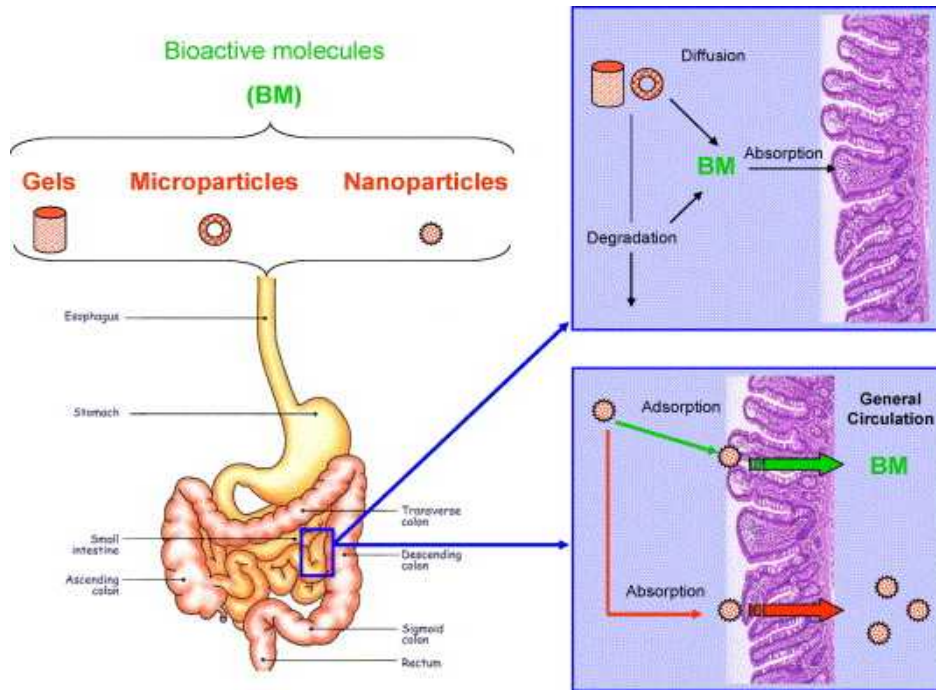


Fig. 1. Schematic representation of different absorption mechanisms of bioactive molecule (Chen et al., 2006)

제 2 절 연구개발의 목적

본 연구에서는 콜드젤 기법 (cold-induced gelation)을 이용하여 기능성 물질 함유 유청 단백질 나노담체를 제조하고 이를 이용한 기능성 유제품을 개발하고자 하였으며 연구의 목적 달성을 위한 세부 연구목적을 다음과 같이 정하였다.

1. 나노담체 제조공정 요인 등이 나노담체의 물리 화학적 특성과 안정성에 미치는 영향을 평가하고 궁극적으로 경제적이고 기능성 물질의 효율을 극대화할 유청 단백질 나노담체를 개발하고자 함.

2. 전달 시스템으로서 위장관에서의 나노담체 방출기작과 장내 흡착 및 전달 기작을 연구하고, 엽산을 encapsulation 한 나노담체의 세포생리학적 특성을 규명함으로써 효과적인 bioactive delivery system을 구축하고자 함.

3. 나노담체의 유제품 내 적용 공정을 개발하고, 최종적으로 나노담체 함유 기능성 유제품의 적성을 평가하고 제품 생산에 적용 함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

유청 단백질 나노담체 제조는 선진국에서도 개발 초기 단계이며, 2006년 Trends in Food Science and Technology 연구저널에서 캐나다 라발 대학교의 Subirade 교수는 생리활성물질의 전달 시스템으로서 고기능성 식품 개발에 이용 할 수 있는 GRAS (Generally Recognized As Safe)한 유단백질 나노 담체의 효용성을 발표하여 많은 주목을 받고 있다. 이와 같이 미래 식품 산업을 주도할 나노기술 개발을 위해 선진국들은 경쟁적으로 연구개발을 진행하고 있는데, 특히 미국의 경우 가공치즈로 유명한 세계 2위의 식품회사인 Kraft Foods 회사는 2000년 15개 대학과 연구소로 구성된 NanoteK Research Consortium을 구성해서 나노 기술을 이용한 고기능성 식품소재에 대한 연구를 활발히 진행하고 있다.

식품소재, 특히 유가공산업의 부산물인 유청 (whey)의 가치를 높일 수 있는 유청 단백질을 이용한 나노 전달시스템 제조는 선진국에서도 개발 초기 단계이며, 생리활성물질의 전달시스템으로서 고기능성 식품 개발에 이용 할 수 있는 GRAS (Generally Recognized As Safe)한 유청 단백질 나노담체의 효용성에 대한 관심이 증가되고 있는 실정이다 (Chen et al., 2006). 국내의 경우, 미세캡슐화 (microencapsulation) (입자크기 $> \sim 10 \mu\text{m}$) 연구는 많이 진행되어 왔으나, 콜드젤 기술을 이용한 유청 단백질 나노 담체 (입자크기 $< \sim 100 \text{nm}$) 연구는 전무한 실정이다. 또한 유가공 공정 시의 나노 전달 시스템으로서 유청 단백질 나노담체의 물리 화학적 특성 연구와 유청 단백질 나노담체의 유제품내 적용공정 연구는 매우 미미한 실정이다.

기존의 미세캡슐 제조 방법은 주로 탄수화물 소재를 이용하여 고온을 이용한 분무건조방법을 사용하여 왔다. 따라서 영양학적 기능학적 효용성이 뛰어나고 biodegradable한 단백질 소재를 이용하고 열처리에 민감한 기능성 물질들의 유제품 내 이용 효용성을 극대화 하기위해, 콜드젤 기법(cold-induced gelation)을 사용한 유청 단백질 나노담체 제조가 요구된다. 최근의 연구는 well being 시대 소비자들의 요구에 부합하기 위해 기존 미세 캡슐 제조에 사용 되었던 화학 물질을 사용하지 않고 안전성이 확보되는 GRAS한 천연 원료를 중심으로 하여 진행되고 있다.

본 연구를 통해 개발될 유청 단백질 나노담체의 생산은 보다 생리활성물질이 타겟에 보다 쉽게 적용될 수 있을 것으로 기대되어지며 적용의 범위 또한 유제품에 한정되지 않고 식품 첨가물이나 화장품으로의 개발이 가능할 것으로 생각된다. 이와 같은 조사결과를 근거로 할 때, 생리활성물질의 전달체로서 유청 단백질 나노담체의 기능성에 관한 연구는 매우 미흡한 실정으로서 유가공산업의 발전을 위한 관련 기술의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
University of Laval	β -lactoglobulin을 이용한 나노 입자의 제조와 특성연구	유제품을 포함한 식품내 적용 연구는 진행되지 않음.
Kraft Food Company	NanoteK consortium을 구성하여 나노캡슐의 식품이용성 연구	현재까지 상업화 되지 못함.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행방법

제1세부과제 (경상대학교) : 유청 단백질 나노담체 제조공정 개발 및 기능적 유용성 연구

1. 유청 단백질 (β -lactoglobulin) 나노담체 제조

나노담체 제조를 위해 다음과 같은 방법이 이용되었다. 먼저 1차 증류수 19.8 g 에 β -lactoglobulin (β -lg) 0.2 g 을 넣어 1% (w/w) β -lg 수용액을 준비한 후, 가교제 역할을 할 CaCl_2 (calcium chloride, SIGMA-ALDRICH, Inc., USA)용액을 1% β -lg (w/w) 용액에 각각 1, 2, 3, 4, 또는 5 mM 처리 한 다음 교반기를 이용해 약 5분간 교반하였다. 그런 다음 pH를 1 mg/mL NaOH (Yakri Pure Chemical, Inc., JAPAN)용액을 사용하여 9.5로 조정하였다. 그 후 항온수조 (WISECIRCU, DAIHAN SCIENTIFIC, Inc., KOREA)에서 55, 65, 75, 85°C로 10분간 열처리를 하였다.

2. 엽산 (Folic acid) 함유 유청 단백질 알긴산 (β -lactoglobulin/alginate) 나노담체 제조

엽산이 포집된 β -lg/alginate (Al) 나노담체는 기존의 콜드젤 기법을 이용하여 제조하였다. 1.6 mg/L 농도의 엽산 수용액에 β -lg와 Al 파우더를 각각 9.9 : 0.1, 9.5 : 0.5 (% , w/w)의 비율로 혼합해 완전히 용해시킨 후, 4 mM CaCl_2 을 첨가하고 교반기를 이용해 5분간 교반 한 다음 1 mg/mL NaOH 용액을 사용하여 pH 9.5로 조정하였다. 그 후 β -lg/Al 수용액을 각각 10, 20°C의 온도에서 30분간 저온 배양기 (Wise Cube BOD Incubator, Daihan Scientific, Inc., Korea)를 이용해 incubation 한 후, 항온수조에서 55, 65, 75°C로 10분간 열처리 한 다음, 얼음 물에서 상온 (~20°C)으로 냉각하였다.

3. Resveratrol 함유 유청 단백질 나노담체 제조

Resveratrol이 함유된 나노담체는 기존의 콜드젤 기법 이용해 제조하였다. 1% (w/w) 농도의 β -lg 수용액 9.9 mL에 20 mg/mL 농도의 resveratrol 에탄올 용액을 0.1 mL 첨가한 후

4 mM CaCl₂를 처리한 뒤 교반기를 이용해 5분간 교반하였다. 그런 다음 pH를 1 mg/mL NaOH 용액을 사용하여 9.5로 조정한 다음 항온수조에서 55, 65, 75, 85°C로 10분간 열처리 한 다음, 얼음물에서 상온(~20°C)으로 냉각하였다.

4. Ascorbic acid 함유 유청 단백질 (β -lg) 나노에멀전 제조

Ascorbic acid 함유 나노에멀전 제조를 위해 다음과 같은 방법이 이용되었다. 먼저 0.98% β -lg (w/v) 수용액을 항온수조에서 65°C로 10분간 열처리를 한 후 얼음물에서 5°C로 냉각시켰다. Ascorbic acid의 캡슐화를 위하여 β -lg 수용액에 ascorbic acid를 1 mg/mL 농도로 첨가하여 용해시킨 뒤, 계면활성제인 Tween 80 (polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate, SIGMA-ALDRICH inc., USA)과 포도씨유를 첨가하였다. 균질기 (Homogrmizer, DAIHAN scientific Co., Ltd, korea)를 이용하여 600 rpm에서 5분간 균질한 후, sonicator (BANDELIN electronic Co., Ltd, Germany)를 이용하여 3분간 sonication하였다. 그런 다음, 가교제인 CaCl₂를 각각 2, 3, 4 mM 처리하고 교반기를 이용해 5분간 교반 하였다.

5. 유청 단백질 나노담체의 동결건조

나노담체의 유제품 적용 연구를 위하여 엽산 함유 β -lg/Al 및 resveratrol 함유 β -lg 나노담체를 다음과 같은 방법을 이용하여 동결건조 시켰다. 나노담체 수용액에 동결방지제인 glucose를 5% (w/v) 농도로 첨가 한 뒤 -80°C에 48시간 동안 동결시킨 후, 동결건조기 (Freeze dryer, EYELA, FD-1000, Tokyo Rikakikai Co., LTD.)를 이용하여 동결건조 시켰다.

6. 유청 단백질 나노담체 형성 관련 화학적 반응 특성

유청 단백질 나노입자 형성에 어떠한 화학적 작용이 관련되어 있는지 알아보기 위하여 분광 광도계 (GENESYS 10-S spectrophotometer, Thermo, Inc, USA)를 사용하여 480 nm에서 측정하였다. 유청 단백질 나노입자 형성에 electrostatic interaction이 관련되어 있는지 유추해 내기 위해 Ca²⁺를 처리하지 않고 측정하였다. 또한 SDS (0.1%), NEM (5 mM), urea (0.2 M)는 유청 단백질 나노입자 형성에 각각 hydrophobic interaction, sulfhydryl oxidation, hydrogen interaction 의 관련성을 연구하기 위해 1% β -lg + CaCl₂용액에 첨가 되었다.

7. 유청 단백질 free sulfhydryl group 화학적 변화 측정

열처리 온도 관련 β -lg의 free sulfhydryl group 화학적 변화는 0.133 g 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) 시약을 1 mM EDTA를 함유한 Tris-buffer (pH 8.0) 에 첨가한 후 용해시킨 다음, 열처리 한 1% (w/w) β -lg수용액과 혼합후 분광 광도계를 이용하여 측정하였다.

8. 제조 공정 요인에 따른 유청 단백질 나노담체 Turbidity 측정

분광 광도계를 이용하여 나노담체 제조 공정 요인 중 하나인 CaCl_2 농도와 β -lg 나노담체 형성 관계를 연구하였다 (Bryant 등, 2000). 1% (w/w) β -lg수용액에 각각 1, 2, 3, 4 mM, CaCl_2 용액을 첨가한 후 65°C에서 10분간 열처리 하고 600 nm wavelength에서 β -lg 나노담체 turbidity를 측정하였다.

9. 유청 단백질 나노담체의 입자크기 및 Zeta potential 측정

나노담체의 입도 분포 및 크기, 표면 전하 및 정전기적 상호 작용을 평가하기 위해 전기영동 광산란 측정기 (electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-8000, Otuska Electronics, Japan)을 사용하여 측정하였다.

10. 유청 단백질 나노담체의 물리화학적 안정성 및 형태학적 구조 연구

유청 단백질 나노담체의 형성 여부와 형성된 나노담체의 형태학적 구조 및 물리 화학적 안정성을 알아보기 위해 분광 광도계전자현미경 (transmission electron microscope, TEM, Phillips Tecnai 12, 120 kV)을 이용하여 나노담체 형태의 변화를 관찰하였다.

11. 유청 단백질 나노담체의 conformational property 와 surface hydrophobicity study

기능성 물질 함유 나노담체의 구조적 기능성을 연구하기 위해 Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer (vertex 80 V spectrometer, Bruker optics, Germany)을 사용하여 4000~400 cm^{-1} 범위의 스펙트럼을 분석하였고, 열처리 온도에 따른 β -lg의 surface hydrophobicity 변화에 관한 연구는 소수성 fluorescent probe인 8-anilino-1-naphtalenesulfonic acid (ANS) (SIGMA-ALDRICH. Inc., USA)를 샘플에 첨가하여 multi-spectrophotometer (TECAN,

Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 excitation wavelength 370 nm, emission wavelength 471 nm에서 fluorescence intensity를 측정하였다.

12. 유청 단백질 나노담체의 encapsulation efficiency 측정

유청 단백질 나노담체에 포집된 수용성 및 지용성 물질 (예를 들면, 엽산과 resveratrol)의 encapsulation efficiency는 Das 등 (2009)과 Chen & Subirade (2005)의 방법을 참조하여 high performance liquid chromatography (HPLC, Waters 515, Waters Technologies Co. Ltd.)를 이용하여 측정하였다. 먼저 기능성물질이 포집된 나노담체를 초고속원심분리기 (Optima XL-100K, Beckman Coulter, USA)를 사용하여 $30,000 \times g$, 20°C 에서 30분간 원심분리하였다. 엽산 측정의 경우 나노담체 수용액 상층액을 filter한 뒤 상층액 내의 엽산 농도를 Akhtar 등 (1997)의 방법을 이용하여 HPLC로 측정하였다. 지용성 물질인 resveratrol의 경우 methanol을 첨가한 다음 30초간 vortexing 후 다시 원심분리 하여 상층액의 농도를 He 등 (2006)의 방법을 이용하여 HPLC로 측정하였다 (Tables 1 and 2). 기능성 물질의 encapsulation efficiency는 아래의 식을 이용하여 측정하였다.

Encapsulation efficiency (%)

$$= \frac{\text{Total amount of bioactive compound} - \text{bioactive compound in supernatant}}{\text{Total amount of bioactive compound}} \times 100$$

Table 1. HPLC method for analysis of folic acid.

Column	Waters XBridge™ C ₁₈ (150mm x 4.6mm, 3.5μm)
Detector	UV/VIS, 280 nm
Mobile phase	A (24%): methanol
	B (76%): potassium phosphate buffer (pH 6.75)
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	20 μl

Table 2. HPLC method for analysis of resveratrol.

Column	Waters XBridge™ C ₁₈ (150mm x 4.6mm, 3.5μm)
Detector	UV/VIS, 303 nm
Mobile phase	A (52%): 0.5% acetic acid in methanol B (48%): deionized water
Flow rate	0.7 mL/min
Injection volume	20 μl

13. 유청 단백질 나노에멀전의 encapsulation efficiency 측정

Beta-lactoglobulin 나노에멀전에 포집된 ascorbic acid의 encapsulation efficiency는 Laridi & Kheadr (2003)의 방법을 참조하여 측정하였다. 먼저 기능성물질이 포집된 나노에멀전을 초고속원심분리기를 사용하여 40,000 rpm, 20°C에서 1시간 동안 원심분리 하였다. Ascorbic acid의 경우 상층액 중 oil층 아래의 수용액 층을 추출한 뒤 Desai & Park (2006)의 방법을 이용하여 분광 광도계로 농도를 측정하였다. 기능성 물질의 encapsulation efficiency는 아래의 식을 이용하여 측정하였다.

Encapsulation efficiency (%)

$$= \frac{\text{Total amount of bioactive compound} - \text{bioactive compound in supernatant}}{\text{Total amount of bioactive compound}} \times 100$$

14. 치즈 제조 공정에 따른 엽산 함유 유청 단백질/알긴산 나노담체의 morphology 변화 평가

치즈 제조 공정 시 나노담체의 형태학적 변화연구는 Larid 등 (2003)의 체다 치즈 제조 공정 연구를 참고하여 수행하였으며, 치즈 제조공정 과정 중의 엽산 함유 β-Ig/Al 나노담체의 morphology는 TEM을 이용하여 관찰하였다. 먼저 동결건조 된 엽산 함유 β-Ig/Al 나노담체를 1 mg/mL 농도로 reconstitution 시킨 다음, 0.2 M HCl을 이용하여 pH를 5.4로 조절한 후 32°C에서 90분간 incubation 하였다. 이후 39°C에 도달할 때 까지 매 5분마다 1°C씩 온도를 상승시킨 후 39°C에서 90분간 incubation한 다음, 8°C로 냉각시켰다. 엽산 함유 β-Ig/Al 나노담체의 morphology 변화 측정은 TEM을 이용하여 32°C와 39°C에서의 incubation 및 8°C로 냉각 단계 후 수행되었다.

15. 치즈 숙성 및 저장요인에 따른 resveratrol 함유 유청 단백질 (β -lg) 나노담체의 morphology 변화 및 resveratrol의 leakage 평가

치즈 숙성 및 저장기간 동안 resveratrol 함유 β -lg 나노담체의 morphology 변화는 TEM을 이용하여 관찰하였으며, resveratrol의 leakage 분석은 HPLC를 이용하여 수행하였다. 동결건조된 resveratrol 함유 β -lg 나노담체를 1 mg/mL 농도로 reconstitution 시킨 다음, 0.2 M HCl을 이용하여 pH를 5.4로 조절한 후 8°C에서 15일간 보관하였다. 나노담체의 morphogology 변화는 숙성 후 1, 5, 10, 15일째의 나노담체를 이용하여 비교하였고, resveratrol의 leakage는 숙성기간 (3, 6, 9, 13, 16일) 동안 나노담체를 수집하여 초고속 원심분리 후 HPLC를 이용하여 측정하였다.

16. 요구르트 저장요인에 따른 resveratrol 함유 유청 단백질 (β -lg) 나노담체의 morphology 변화 및 resveratrol의 leakage 평가

요구르트 저장기간 동안 resveratrol 함유 β -lg 나노담체의 morphology는 TEM을 이용하여 관찰하였으며, resveratrol의 leakage는 HPLC를 이용하여 측정하였다. 동결건조된 resveratrol 함유 β -lg 나노담체를 1 mg/mL 농도로 reconstitution 시킨 다음, 0.2 M HCl을 이용하여 pH를 4.6으로 조절한 후 8°C에서 15일간 저장하였다. 나노담체의 morphogology변화는 저장 후 1, 3, 5, 7일째의 나노담체를 수집한 후 TEM을 이용하여 비교하였고, resveratrol의 leakage는 저장기간 (1, 3, 5, 7일) 동안 나노담체를 수집하여 초고속 원심분리 후 HPLC를 이용하여 측정하였다.

제1 협동과제 (명가유업 주식회사) : 나노담체 및 나노담체 함유 유용물질의 대량 스크리닝 시스템 개발

1. 유청 단백질의 생리활성 특성 규명: 사람의 위, 대장 및 소장 유래 세포주를 이용하여 유청 단백질의 독성 및 세포활성 특성 규명

실험에 사용된 세포주는 ATCC (American type culture collection) 및 Korean cell line bank (KCLB)에서 분양받은 사람의 장내 세포주로 실험을 수행하였다. 세포의 종류에 따라 각기 다른 배지 (Table 1.)를 이용해 5% CO₂의 incubator에서 배양하고, 2일에 한 번씩 배지를 교환해 주었다. 모든 세포주는 DMSO와 FBS가 혼합된 저장용액에 혼합하였고, 이것을 vial에

분주하여 질소탱크에 보관하면서 실험을 수행하였다. 배양 조건을 확립한 후 각 세포 별로 1×10^4 cells/well 의 밀도로 96 well plate에 분주한 후 1/2씩 희석하면서 접종을 실시하였다. 4 일간 배양 후 MTT assay를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 1. List of selected human-derived cell lines in this study

Cell Line	Source	Media
AGS	Human stomach	Ham's F12
MKN-1	Human stomach	RPMI1640
SNU-484	Human stomach	RPMI1640
HT-29	Human Colon	RPMI1640

2. 엽산 (folic acid)의 세포내 uptake 조건의 최적화 실험을 통한 세포내의 생리활성 특성 규명

유청 단백질과 엽산(folic acid)이 인간 유래 세포주의 성장에 미치는 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다.

3. 대표적인 target 유전자의 발현 조건을 확립

사람의 장내 세포주를 이용하여 96 well plate에 1×10^5 cells/well 의 밀도로 seeding 한 후 유청 단백질 나노담체를 24시간 처리 한 후 배양한다. 배양 종료 된 후 세포를 얻어 total RNA를 추출한 후 추출한 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

4. 대표적인 target 유전자의 발현 조건을 확립함으로써 2-3차년도 부터 활용될 유청 단백질의 나노담체에 의한 GI track에서의 생리활성 측정 기반 구축

유청 단백질이 장내 유전자의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 HT-29 세포주를 이용하여 실험에서 확립된 유청 단백질의 적정 농도 (1×10^2 M)를 이용하여 시간별 target 유전자의 발현에 미치는 효과를 RT-PCR을 통해 측정하였다. 유전자의 발현이 적정 RNA를 이용하여 측정하였는지를 알아보기 위해 GAPDH라는 유전자를 internal control로 사용하였다.

5. 사람의 위와 대장 세포에서 유청 단백질 나노담체가 세포의 성장 및 독성에 미치는 영향 분석

ATCC (American type culture collection) 및 Korean cell line bank (KCLB)에서 분양받

은 사람의 장내 세포주를 이용하여 96 well plate에 1×10^5 cells/well 의 밀도로 seeding 한 후 유청 단백질 나노담체를 24시간 처리 한 후 배양한다. 배양 종료 된 후 세포의 모습과 상태를 현미경을 이용해 확인 한다.

6. 나노담체의 In vitro cellular uptake 측정

본 실험에 사용 될 인간 유래 위, 대장 및 소장의 세포주를 사용한다. 선택 된 세포주를 이용하여 1×10^5 cells 세포를 세포배양 용기에 seeding 한 후 24시간 배양 한다. 배양이 종료 된 후 다양한 농도의 나노담체 및 유청 단백질을 세포에 첨가 한 후 일정시간이 경과한 뒤에 첨가물을 회수 한 후, 회수 된 양을 측정하여 손실 된 양을 산출한다. 또한 세포내의 나노담체 및 유청 단백질의 양을 측정하기 위해 위의 실험이 종료된 후, 세포를 고정한 후 면역조직학적 방법을 통해 세포내의 나노담체 및 유청 단백질의 존재를 측정한다.

7. 나노담체의 In vitro release 조건 및 retention 조건 규명

본 실험에 사용 될 인간 유래 위, 대장 및 소장의 세포주를 사용한다. 선택 된 세포주를 이용하여 1×10^5 cells 세포를 세포배양 용기에 seeding 한 후 24시간 배양 한다. 배양이 종료 된 후 다양한 농도의 나노담체 및 유청 단백질을 세포에 첨가 한 후, 일정시간이 경과한 뒤에 첨가물을 회수 한 후 세포 배양액으로 교체 한 후 6시간 ~ 12시간 후 배양액을 측정하여 release 및 retention 양을 산출한다.

제 2 협동과제 (한국식품연구원) : 나노담체 함유 고기능성 유제품 생산 공정 개발 및 제품 적성 평가

1. Folic acid 함유 β -lactoglobulin 나노담체의 제조

먼저 1% (w/w) β -lg (Sigma, USA)수용액을 제조 후 CaCl_2 (calcium chloride, Sigma, USA)용액을 1% (w/w) β -lg 수용액에 첨가한다. 5분간 교반한 후, 5에서 45°C 온도에서 30분간 유지한 후 0.025 N NaOH (Sigma, USA) 및 0.1 N HCl (Showa, Japan)용액을 사용하여 pH를 3.5에서 9.5까지 조정 하였다. 그 후 β -lg 수용액을 항온수조 (Shaking water bath JSSB-30T, JS Research INC., Korea)에서 10분간 열처리 한 후, 얼음물에서 상온 ($\sim 20^\circ\text{C}$)으로 냉각시켰다. 열처리 온도, pH 등의 조건을 변화시킴으로써 입도 변화를 관찰하고자 하였으

며, 조건은 아래의 표 1-2와 같다.

표 1. 열처리 온도에 따른 나노담체의 제조

No.	β -lg	CaCl ₂	pH	처리 온도
1				55℃
2	1%	4 mM	9.5	65℃
3				75℃
4				85℃

표 2. pH에 따른 나노담체의 제조

No.	β -lg	CaCl ₂	pH	처리 온도
1			3.5	
2			5.5	
3	1%	4 mM	7.5	65℃
4			9.5	
5			11.5	

아래의 그림과 같이 β -lg 수용액을 제조한 후 적절한 folic acid (Sigma, USA) solution (4-20 ug/g)과 4 mM CaCl₂ 용액을 1% (w/w) β -lg 수용액에 순서대로 첨가한 다음 교반기를 이용하여 각각 5분간 교반하였으며, 0.025 N NaOH 용액을 사용하여 pH 9.5로 조정하였다. 그 후 β -lg 수용액을 항온수조에서 65℃로 10분간 열처리 한 후, 얼음물에서 상온 (~20℃)으로 냉각시켰다. Cold-gelation 방법은 유기 용매가 필요하지 않으며, mild한 조건에서 encapsulation이 가능하기 때문에 core 물질인 nutraceutical compound의 파괴도 최소화할 수 있다는 장점이 있다. 더욱 중요한 것은 pH, 이온세기 및 온도 등의 다양한 조건에 따라 denature, dissociate 및 aggregate되기 쉽기 때문에 다양한 입도를 가지는 particle의 제조가 가능하다.

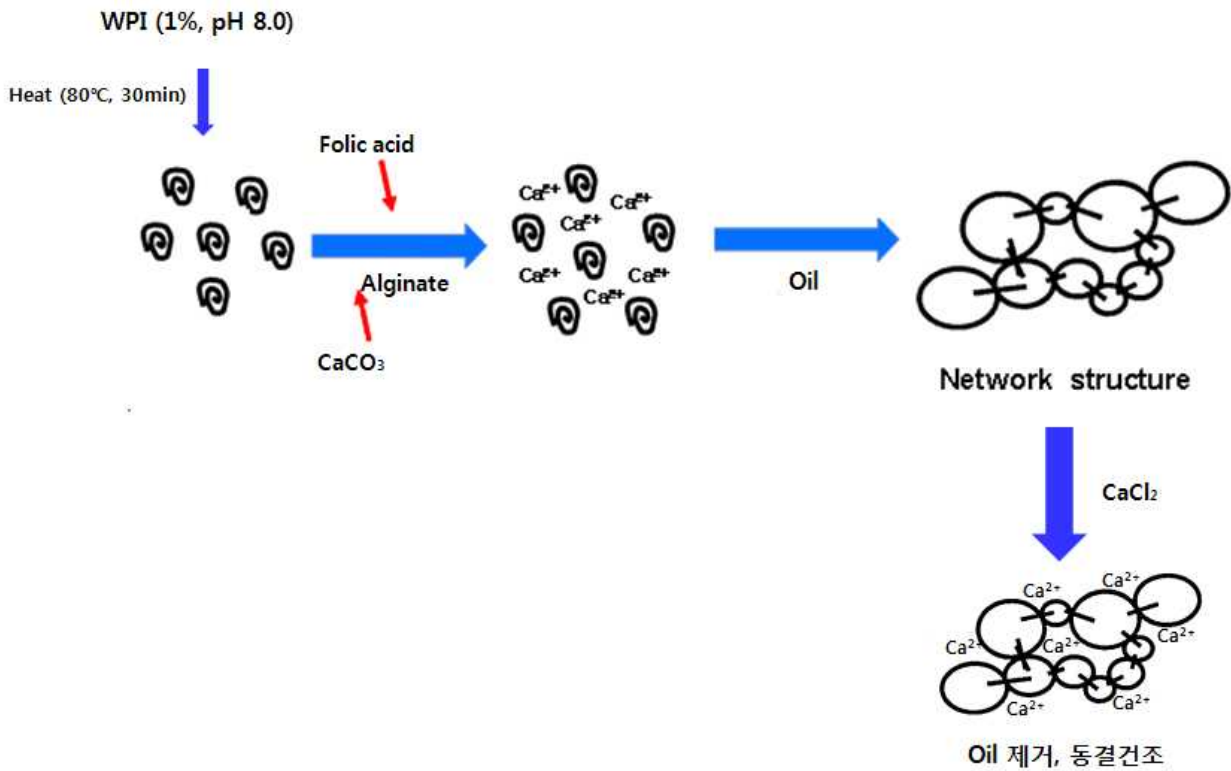


그림 1. Folic acid 함유 나노담체 제조과정

2. Folic acid 함유 WPI 나노담체의 제조

Sodium alginate 1% (w/v) 용액을 실험 전날 제조하여 실온에서 하루 동안 용해시킨 후 실험 당일 사용 하였다. WPI (w/v) 용액은 농도는 1%, 2%, 4%를 사용하였으며 용해 후 pH 8.0으로 조정하여 80°C에서 30분간 열처리하였다. WPI-alginate-CaCO₃-folic acid mixture (WPI:alginate=9:1)를 제조한 다음 1% span 80이 함유된 soybean oil에 넣고 10,000rpm에서 5분간 교반하면서 glacial acetic acid 40 uL를 첨가하였다. 상온에서 이 에멀전을 20분간 방치한 후, 50 mM CaCl₂ 150 mL에 넣은 다음 천천히 교반하였다. 물과 oil층으로 완전히 분리된 후 oil은 제거하고 감압하여 걸러주었다. 1% Tween 80용액으로 세척하고 hexane으로 다시 세척하여 oil 층을 완전히 제거하였다. Oil 제거된 분획은 동결건조 하여 시료로 사용하였다. WPI의 농도, CaCO₃ (5 mM, 10 mM, 20 mM)의 농도 조건을 변화시켜 release test의 유리된 folic acid의 함량을 역으로 환산하여 loading efficiency를 계산하고, 각 조건에 따라 제조한 folic acid 담체를 요구르트에 첨가하여 나타나는 동적 점탄성의 차이를 비교하였다.

3. 나노담체의 입도 측정

제조된 나노담체의 크기를 측정하기 위하여 입도 분석기 (Microtrac nanotrac 250, Microtrac Inc., USA)를 사용하였으며, folic acid가 첨가된 나노담체의 크기를 측정하였다. 입도 측정 전 수용액상의 거품을 제거한 후 분석하였다.

4. Release test

시험액으로 release media (PBS, pH 7.4)를 사용하고, 시료는 동결건조 된 나노담체 시료를 사용하였다. 용출법은 권 (1995)의 방법을 참고하여 액온은 37±2℃, 회전수는 100 rpm으로 했다. 용출액은 시간대별로 1 mL를 취해 syringe filter를 사용하여 여과하였다.

5. Loading efficiency 분석

Release test를 통해 얻은 시료는 여과 (Nylon 66 syringe filter, Whatman)하여 Alaburda 등(2008)의 방법에 의해 HPLC (JASCO PU-980, UV-975 detector, Japan)로 분석 (표 3)하였으며 기울기 용리조건 (gradient system)을 이용하여 분석하였다 (표 4), 표준시료는 folic acid를 이용하였다. loading efficiency의 경우 유리된 folic acid 함량을 역으로 환산하여 계산하였다.

$$\text{Loading efficiency (\%)} = \frac{(\text{총 folic acid 함량} - \text{유리된 folic acid 함량})}{\text{총 folic acid 함량}} \times 100$$

표 3. HPLC에 의한 folic acid의 분석 조건

Column	Phenomenex Luna C ₁₈ (250mm x 4.6mm, 5µm)
Detector	UV/VIS, 280nm
Mobile phase	A: 1% acetic acid B: 100% acetonitrile
Flow rate	0.7 ml/min
Injection volume	10 µl

표 4. HPLC 시스템의 이동상 조성

Time (min)	Composition of mobile phase (%)	
	A	B
0	92	8
10	74	26
15	74	26
21	50	50
30	92	8
40	92	8

A: 1% acetic acid

B: 100% acetonitrile

6. 주사전자현미경 (SEM)에 의한 표면 분석

주사전자현미경 (S-2380N, Hitachi, Japan)을 이용하여 나노담체의 표면을 측정하였다. 양면테이프를 알맞은 크기로 잘라 표본대에 부착한 후 그 위에 관찰하고자하는 시료를 붙였다. 준비된 표본은 SEM ion sputter coater를 이용하여 gold-palladium 층으로 진공상태에서 60초간 코팅시켰다. 표본의 형태는 18 kV의 accelerating voltage에서 관찰하였으며, 대표적인 화상을 출력하여 나타내었다.

7. 요구르트 제조

10% (w/v)탈지분유 배지를 제조 후 autoclave를 사용하여 80°C에서 30분간 살균하였다. 살균이 끝난 뒤 상온에서 냉각 후 유산균 (YC-380, CHR HANSEN) 0.04%를 접종하여 42°C incubator에서 6시간동안 발효하였다. 발효 중 시간별로 pH meter(Thermo Orion, USA)를 이용하여 pH를 측정하였고, 발효시간별 균수의 변화 측정은 42°C에서 48시간 후 MRS배지에서 생성된 균수를 측정하였다.

8. 담체 첨가한 요구르트 제조

10% 탈지분유 배지에 WPI와 CaCO₃의 농도별로 제조한 각각의 나노담체를 1% 농도가 되도록 첨가하였다. 유산균 (YC-380, CHR HANSEN) 균주를 접종 후 42°C incubator에서 6시간동안 발효하였다.

9. 동적 점탄성 측정

동적 점탄성 분석은 25°C로 설정된 rheometer (AR 2000, TA Instruments)의 Cone plate system (angle 1°, 직경 40 mm)을 사용하여 1% strain에서 진동수 (frequency) 6.3~62.8 rad/sec 범위에서 저장 탄성율 (storage modulus, G') 및 손실 탄성율 (loss modulus, G'')을 측정하였다.

제 2 절 연구수행결과

제1 세부과제 (경상대학교) : 유청 단백질 나노담체 제조공정 개발 및 기능적 유용성 연구

○ 유청 단백질 (β -lactoglobulin) 나노담체 제조

나노담체 제조를 위해 다음과 같은 방법이 이용되었다. 먼저 1차 증류수 19.8 g 에 β -lactoglobulin (β -lg) 0.2 g 을 넣어 1% (w/w) β -lg 수용액을 준비한 후, 가교제 역할을 할 CaCl₂ (calcium chloride, SIGMA-ALDRICH, Inc., USA)용액을 1% β -lg (w/w) 용액에 각각 1, 2, 3, 4, 또는 5 mM 처리 한 다음 교반기를 이용해 약 5분간 교반하였다 (Table. 1). 그런 다음 pH를 1 mg/mL NaOH (Yakri Pure Chemical, Inc., JAPAN)용액을 사용하여 9.5로 조정하였다. 그 후 항온수조 (WISECIRCU, DAIHAN SCIENTIFIC, Inc., KOREA)에서 55, 65, 75, 85°C로 10분간 열처리를 하였다.

Table 1. Experimental conditions to study the effects of CaCl₂ concentrations on the formation of β-Ig nanoparticles.

No.	β-Ig	CaCl ₂	pH	처리 온도
1		1 mM		
2	1%	2 mM	9.5	65°C
3		4 mM		
4		5 mM		

○ 유청 단백질 나노입자 형성 관련 화학적 반응 특성

유청 단백질 나노입자 형성에 어떠한 화학적 작용이 관련되어 있는지 알아보기 위하여 분광 광도계 (GENESYS 10-S spectrophotometer, Thermo, Inc, USA)를 사용하여 480 nm에서 측정하였다. 유청 단백질 나노입자 형성에 electrostatic interaction이 관련되어 있는지 유추해 내기 위해 Ca²⁺를 처리하지 않고 측정하였다. 또한 SDS (0.1%), NEM (5 mM), urea (0.2 M)는 유청 단백질 나노입자 형성에 각각 hydrophobic interaction, sulfhydryl oxidation, hydrogen interaction 의 관련성을 연구하기 위해 1% β-Ig + CaCl₂ 용액에 첨가 되었다. 그 결과 Fig. 1 에서 확인 할 수 있듯이 β-Ig에 Ca²⁺을 처리한 control은 1.754 ± 0.148 absorbance값을 가졌고, 나노입자가 생성되었음을 알 수 있었다. Control에 CaCl₂를 제거 한 후 흡광도 값을 측정해 본 결과, 0.003 ± 0.001값이 측정되었는데, 이 말은 β-Ig 나노입자 형성이 미비 하였고, 결과적으로 Ca²⁺의한 electrostatic interaction이 β-Ig 나노입자 형성에 관여함을 알 수 있었다. 또한 hydrophobic interaction inhibitor 역할을 하는 SDS를 control에 첨가한 후, 측정 해 본 결과 control에 비해 상당히 낮은 0.005 ± 0.001의 수치가 나왔다. 이 또한 나노입자 형성이 거의 되지 않았고, 나노입자 형성에 hydrophobic interaction이 관련됨을 알 수 있었다. 나노입자 형성에 sulfhydryl oxidation이 관여 하는지 알아보기 위해 control에 NEM을 처리하여 측정 했을 때는 그 수치가 2.952 ± 0.023가 나왔고, hydrogen interaction 영향이 있는지 알아보기 위해 control에 hydrogen interaction inhibitor인 urea를 처리하여 그 수치를 관찰한 결과 1.096 ± 0.433 수치가 측정되었다 (Fig. 1). 결론적으로 유청 단백질 나노입자 형성에 electrostatic interaction과 hydrophobic interaction, sulfhydryl oxidation 과 같은 화학적 상호작용이 관련되어 있음을 알 수 있었고, 특히 Ca²⁺에 의한 electrostatic interaction과 단백질 간의 hydrophobic interaction이 가장 큰 요인임을 이 실험을 통해 알 수 있었다.

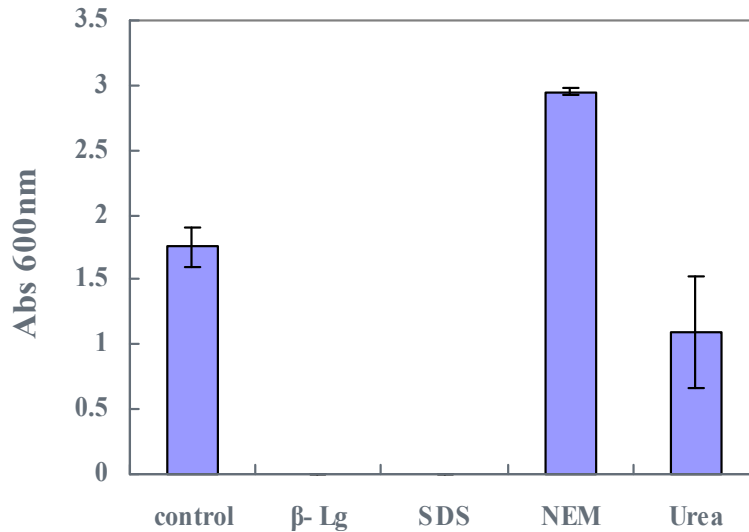


Fig. 1. Chemical interaction related with the formation of β -lg nanoparticles.

○ CaCl_2 농도 변화에 따른 β -lg 나노담체 Turbidity

분광 광도계를 이용하여 나노담체 제조 공정 요인 중 하나인 CaCl_2 농도와 β -lg 나노담체 형성 관계를 연구하였다 (Bryant 등, 2000). 1% (w/w) β -lg 수용액에 각각 1, 2, 3, 4 mM CaCl_2 용액을 첨가한 후 65°C에서 10분간 열처리 하고 600 nm wavelength에서 β -lg 나노담체 turbidity를 측정 한 결과 CaCl_2 농도가 1 mM에서 4 mM로 증가함에 따라 나노담체의 turbidity 값은 $0.003 \pm 0.001A$ 에서 $1.839 \pm 0.173A$ 로 증가하였음을 알 수 있었다 (Fig. 2).

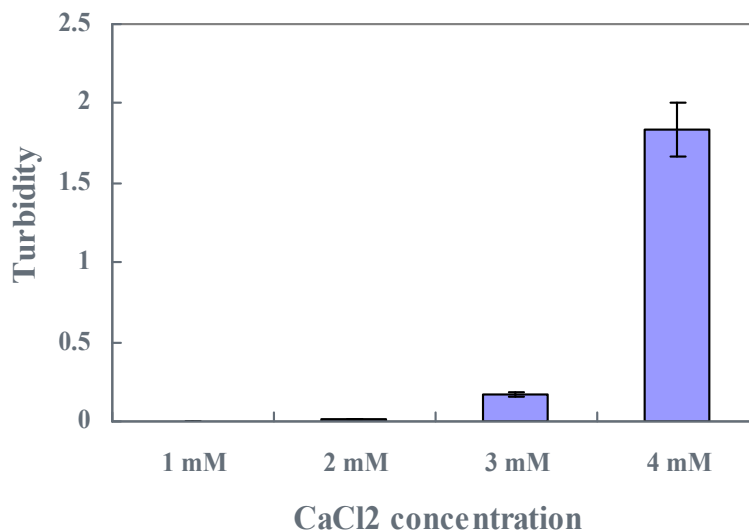


Fig. 2. Effects of CaCl_2 concentrations on the extent of aggregation determined by measuring turbidity.

○ CaCl₂ 농도 변화에 따른 β -lg 나노담체의 형태학적 구조 평가

나노담체 생성 요인인 가교제 CaCl₂ 농도에 따른 β -lg 나노담체의 구조 및 형태학적 특성을 비교 분석 및 평가 하기위해 투과전자현미경 (TEM)을 이용하여 나노담체를 관찰하였다. 유청 단백질 나노담체 제조 공정 조건하에 준비된 sample을 carbon을 입힌 grid (TED PELLA INC, USA)에 마이크로 피펫을 사용하여 20 μ l를 적정 하여 grid에 위치시킨 후, 2% uranyl acetate로 negative straining을 한 다음 건조기에서 약 10분간 건조 한 후, TEM에 삽입하여 나노담체 형성 여부를 확인 하였다. 그 결과 Ca²⁺농도가 증가 할수록 나노입자의 크기가 증가되는 것을 TEM (Fig 3)에서 관찰 할 수 있었다. 1 mM Ca²⁺로 처리된 TEM 사진 (Fig. 3a)에서는 나노입자가 관찰 되지 않았고, 4 mM 의 Ca²⁺를 첨가 하였을 때는 50 nm 크기의 나노입자를 관찰 할 수 있었다 (Fig. 3c). 5 mM의 Ca²⁺를 첨가했을 때는 100 nm 크기의 나노입자가 형성되어 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3d).

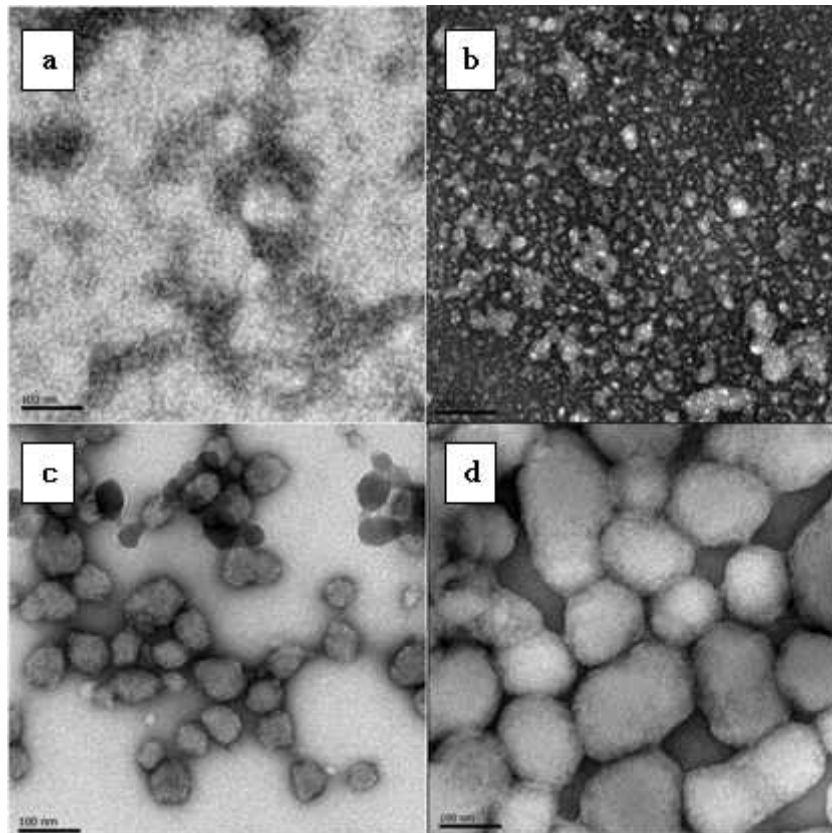


Fig. 3. Transmission electron micrographs of β -lactoglobulin nanoparticles treated from different Ca²⁺ concentrations. Beta-lactoglobulin solutions (1% ,w/w) were treated with CaCl₂ concentration at (a) 1 mM, (b) 2 mM, (c) 4 mM, and (d) 5 mM and were heated 65°C at pH 9.5. Scale bar = 100 nm.

○ CaCl₂ 농도에 따른 나노담체의 입도 분석

Fig. 4는 β -lg 나노담체 제조 시 CaCl₂ 농도에 따른 나노담체의 입도 분포 및 크기는 입도 분석기 (Microtrac nanotrac 250, Microtrac Inc., USA)를 사용하여 측정된 결과이다. CaCl₂ 농도가 1-5 mM까지 증가시킬수록 입자의 크기도 증가하는 것을 알 수 있으며, CaCl₂ 농도가 5 mM일 경우 입도는 221 nm를 나타내었다. CaCl₂의 농도가 1, 2, 4, 5 mM일 경우 나노담체의 형성은 가능하였으나 1, 2 mM일 경우 14, 15 nm로 입도가 작아 입도가 큰 particles보다 빠르게 core 물질을 용출시키는 문제점을 가질 수 있고 5 mM일 경우 오랜 시간동안 천천히 core 물질을 용출시킬 수 있지만 입자 형성시 몽침현상을 보이며 입도가 큰 결과를 보였다. 이상의 결과를 근거로 입도가 59 nm인 4 mM을 β -lg 나노담체 제조에 사용하였다.

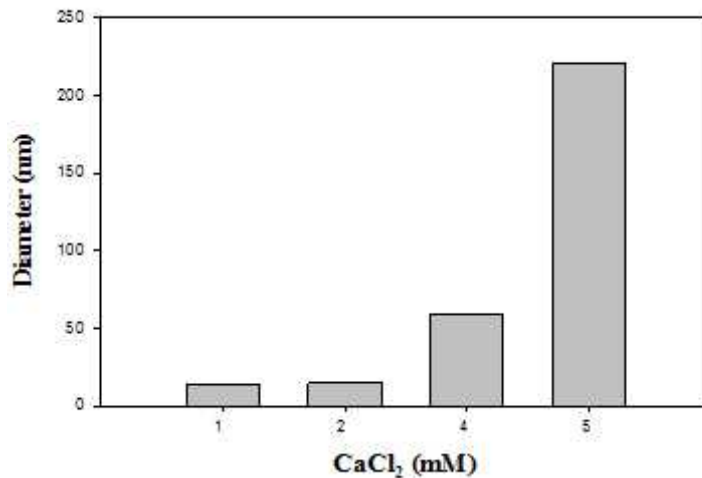


Fig. 4. The effects of CaCl₂ concentrations on the size of β -lactoglobulin nanoparticles.

○ 열처리 온도에 따른 β -lg의 free sulfhydryl group 활성화도 평가

열처리 온도 관련 β -lg의 free sulfhydryl group 화학적 변화는 0.133g DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) 시약을 1 mM EDTA를 함유한 Tris-buffer (pH 8.0)에 첨가한 후 용해시킨 다음, 열처리 한 1% (w/w) β -lg 수용액과 혼합후 분광 광도계를 이용하여 측정하였다 (Ellmann, 1959; Phillips 등, 1967; Beveridge 등, 1974). 열처리 온도에 따른 β -lg의 free sulfhydryl group 활성화도의 UV측정 결과 열처리 온도가 45°C에서 85°C로 증가함에 따라 β -lg 흡광도는 $0.094 \pm 0.004A$ (absorbance value)에서 $0.217 \pm 0.003A$ (absorbance value)로 증가 하였다. 즉, free sulfhydryl group의 반응성이 증가했음을 알 수 있었다 (Fig. 5).

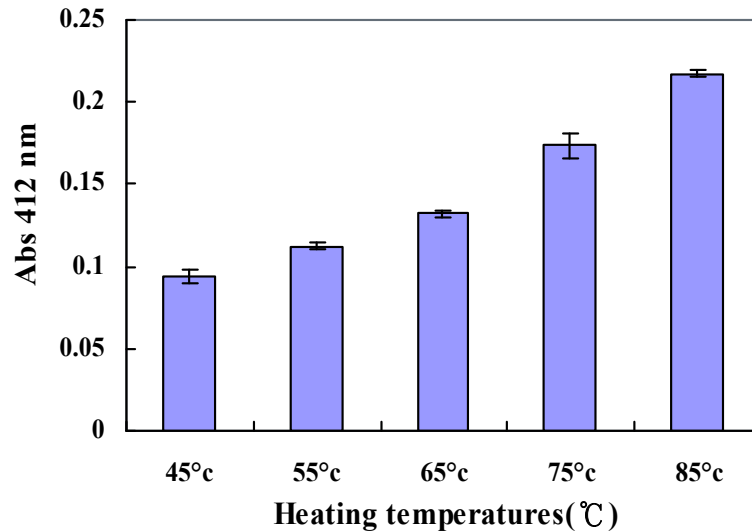


Fig. 5. Effects of pre-heating temperature on the extent of reaction of free sulfhydryl groups. Beta-lactoglobulin solution (1%, w/w) were treated with 4 mM CaCl₂ at pH 9.5 and heated at 45, 55, 65, 75, and 85°C. Results were the mean of three replicates.

○ 열처리 온도에 변화에 따른 β -lg 나노담체의 형태학적 구조 비교 및 평가

열처리 온도 변화에 따른 β -lg 나노담체의 형태학적 구조를 비교 분석 하기위해 TEM을 이용하여 β -lg 나노담체의 생성 및 형태학적 구조를 관찰하였다. Fig. 6는 나노입자 제조공정인 pre-heating 온도가 나노입자의 형성과 크기에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 그 결과 pre-heating 온도가 55°C에서 85°C로 증가함에 따라 형성된 나노입자의 크기가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6). 65, 75°C와 85°C로 처리된 나노입자의 전자현미경 사진 (Figs. 6b, c, and b)에서는 100-150 nm의 크기의 나노입자가 형성되었음을 관찰 할 수 있었고, 반면 55°C 열처리된 sample에서는 나노입자 형성이 미미하였다 (Fig. 6a).

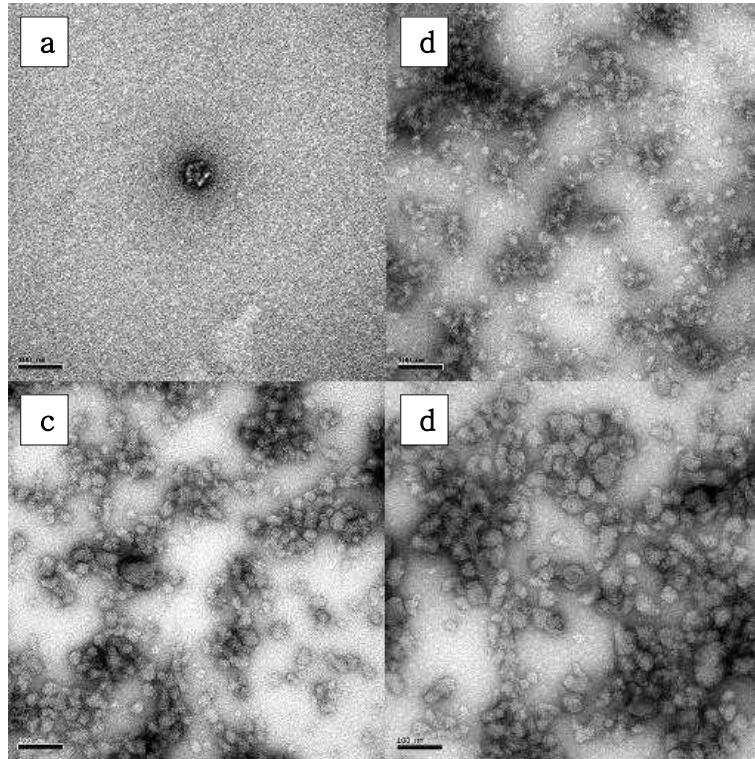


Fig. 6. Transmission electron micrographs of β -lactoglobulin nanoparticles treated from different heating temperatures. Beta-lactoglobulin solutions (1%, w/w) were treated with 4mM CaCl₂ at pH 9.5 and were heated at (a) 55°C, (b) 65°C, (c) 75°C, and (d) 85°C. Scale bar = 100 nm.

○ 엽산이 포집된 유청 단백질/알긴산 (β -lg/Al) 나노담체의 입자크기 및 Zeta-potential 측정

엽산과 나노담체 입자 크기, 표면 특성 및 정전기적 상호 작용을 평가하기 위해 엽산이 포집된 β -lg/Al 나노담체의 크기와 표면전하는 전기영동 광산란 측정기를 사용하여 측정하였다. 앞에서 제조된 β -lg/Al (9.9:0.1, 9.5:0.5 (% w/w)) 나노담체 용액 1 mL를 분취하여 4 mL의 증류수로 희석한 다음, scattering 각을 입자의 크기는 90°, 표면전하는 20° 로 고정하고 He-Ne 레이저로 측정하였다. 그 결과 9.9% β -lg 와 0.1% Al로 구성된 나노담체에서 heating 온도가 55°C에서 75°C로 증가함에 따라 나노담체 입자 크기가 증가하였다 (Fig. 7). 또한 55, 65°C 열처리 조건에서 나노담체의 배양온도 (incubation temperature)가 10°C에서 20°C로 증가함에 따라 나노담체 입자 크기가 증가했음을 알 수 있었다 (Fig. 7). 9.5% β -lg 와 0.5% Al로 구성된 나노담체 경우 heating 온도가 65°C에서 75°C로 증가함에 따라 나노담체의 입자 크기가 증가하였고 65°C 와 75°C 열처리 된 나노담체에서 incubation 온도가 10°C에서 20°C로 증가함에 따라 나노담체 입자 크기가 증가했음을 알 수 있었다 (Fig. 8). 열처리 온도의 증가가 β -lg의 conformational property 에 영향을 주어 β -lg 상호간 결합을 증가시켜 입자크기에 영향

을 준다고 사료된다.

열처리 온도와 배양온도가 나노담체의 제타전위 (zeta-potential)에 미치는 영향을 측정하기 위해 실험이 수행되었다. 실험 결과 Al 농도가 0.1%에서 0.5%로 증가함에 따라 zeta potential 값이 증가하였다 (Figs. 9 and 10). 9.9% β -lg 와 0.1% Al로 구성된 나노담체에서 55°C에서 75°C로 열처리 온도를 증가시키기에 따라 나노담체의 zeta-potential 값이 증가하였고 (Fig. 9), 또한 10°C에서 20°C로 나노담체의 배양온도 (incubation temperature)가 증가함에 따라 나노담체의 zeta-potential 값도 증가했음을 알 수 있었다 (Fig. 9). 9.5% β -lg 와 0.5% Al로 구성된 나노담체 경우 열처리온도가 55°C에서 75°C로 증가함에 따라 나노담체의 zeta-potential 값이 증가하였고 55°C 와 65°C에서 열처리 된 나노담체에서 incubation 온도가 10°C에서 20°C로 증가함에 따라 나노담체의 zeta-potential 값이 증가했음을 알 수 있었다 (Fig. 10). 즉, β -lg/Al 나노담체의 크기 및 표면 특성과 정전기적 상호작용에는 incubation 온도와 heating 온도 및 Al 비율이 영향이 있음을 알 수 있었다.

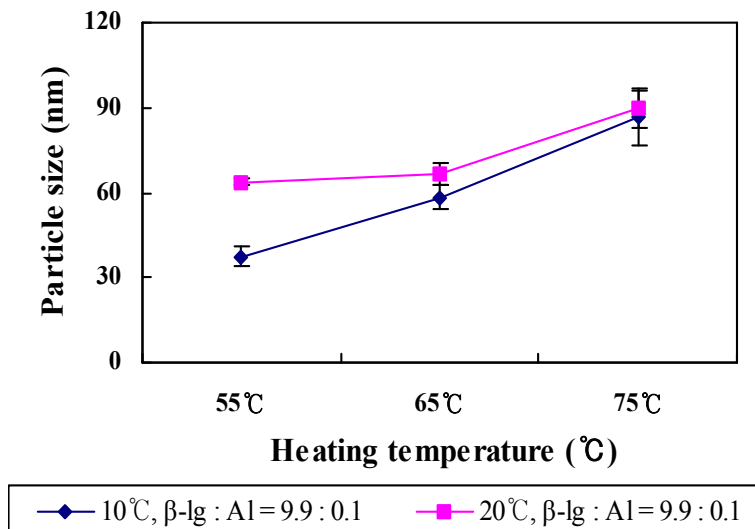


Fig. 7. Effects of heating and incubation temperatures on the particle size of β -lg/Al nanoparticles. (β -lg : Al = 9.9 : 0.1 (% , w/w), containing 1.6 mg/L folic acid)

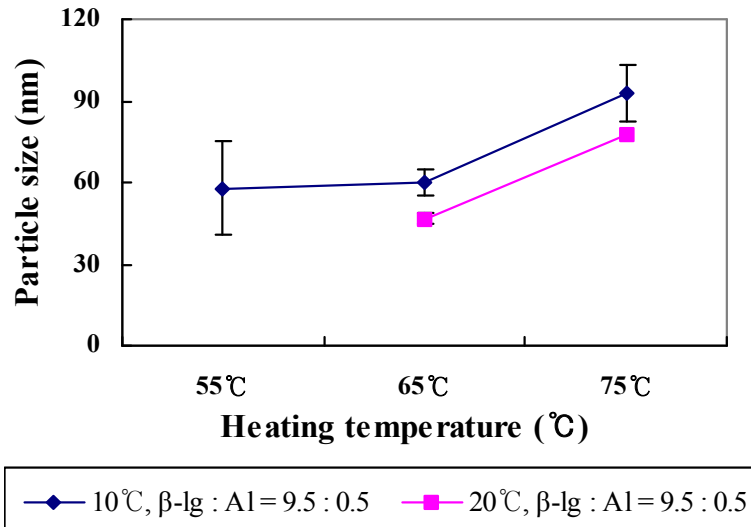


Fig. 8. Effects of heating and incubation temperatures on the particle size of β -Ig/Al nanoparticles. (β -Ig : Al = 9.5 : 0.5 (% , w/w), containing 1.6 mg/L folic acid)

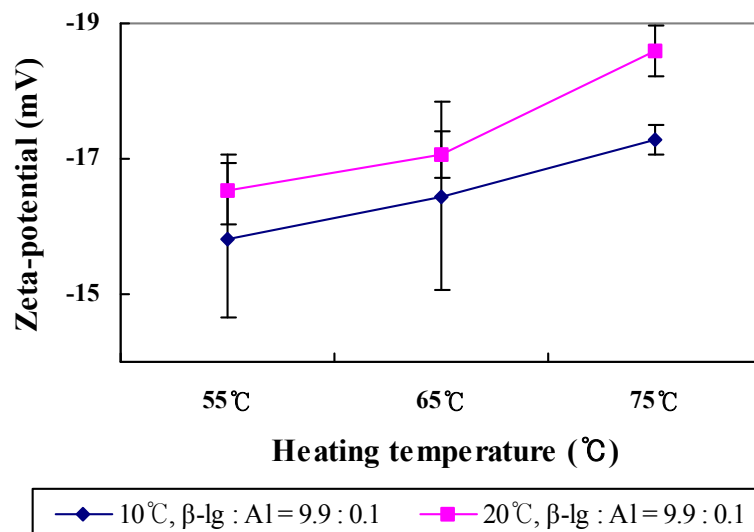


Fig. 9. Effects of heating and incubation temperatures on the zeta-potential of β -Ig/Al nanoparticles. (β -Ig : Al = 9.9 : 0.1 (% , w/w), containing 1.6 mg/L folic acid)

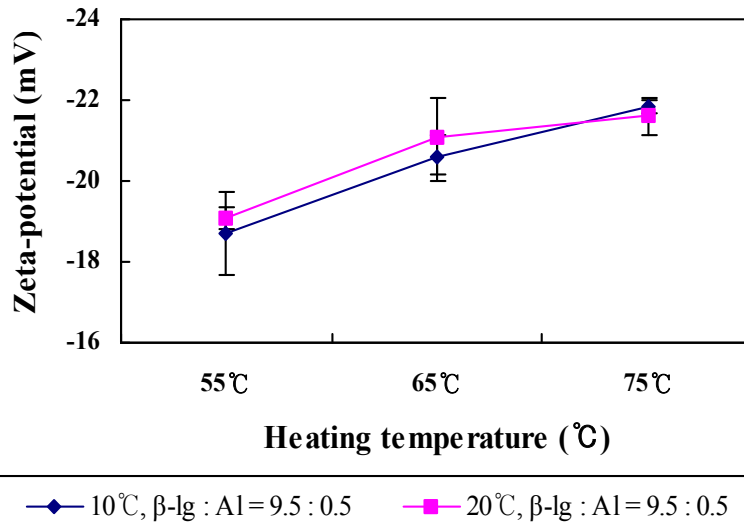


Fig. 10. Effects of heating and incubation temperatures on the zeta-potential of β -lg/Al nanoparticles. (β -lg : Al = 9.5 : 0.5 (% , w/w), containing 1.6 mg/L folic acid)

○ 열처리 온도와 유청 단백질/알긴산 (β -lg/Al) 나노담체 상대 농도 변화에 따른 나노담체 엽산의 encapsulation efficiency와 zeta-potential과의 상관관계 평가.

열처리 온도와 β -lg/Al 상대 농도 변화에 따른 엽산 함유 나노담체의 encapsulation efficiency 와 zeta-potential과의 상관관계를 분석하여 엽산과 나노담체와의 상호작용에 대해 평가해 보았다. 그 결과 0.1% (w/w)와 0.5% (w/w) Al 로 제조된 나노담체에서 zeta-potential 의 negative 값이 증가함에 따라 β -lg/Al 나노담체의 folic acid encapsulation efficiency도 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figs. 11 and 12). 즉 나노담체의 표면 전하의 증가는 수용성 성분인 엽산과의 상호 작용을 증가시켜 나노담체의 엽산 포집 능력을 증가시켰다고 사료된다.

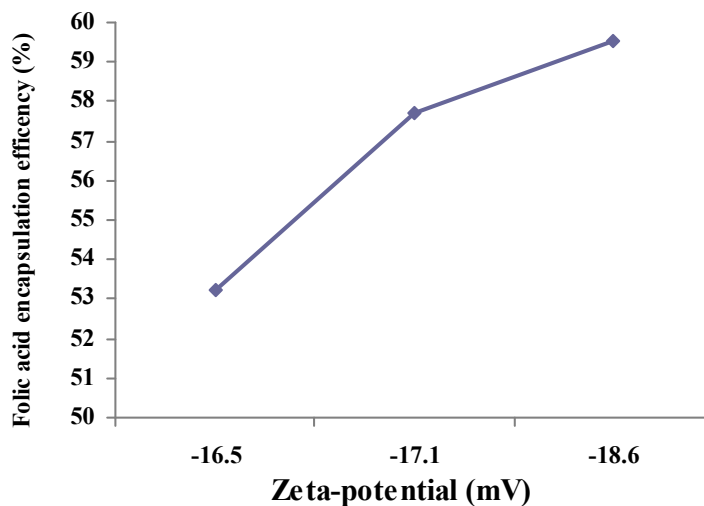


Fig. 11. Interrelations between folic acid encapsulation efficiency and zeta-potential of β -lg/Al nanoparticle (β -lg : Al = 9.9 : 0.1% (w/w) containing 1.6 mg/L folic acid).

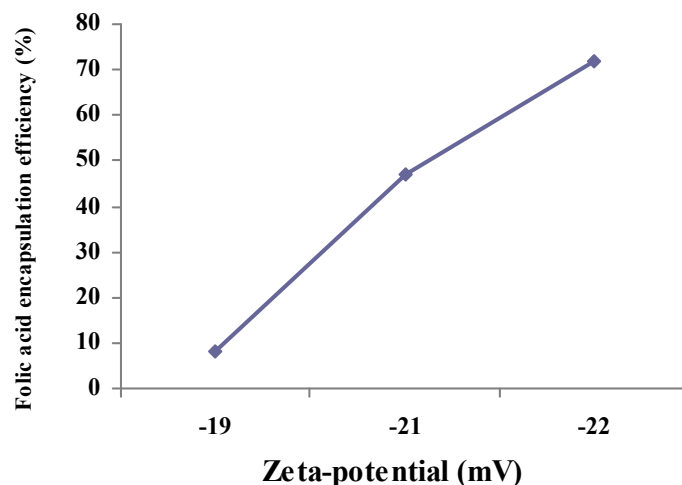


Fig. 12. Interrelations between folic acid encapsulation efficiency and zeta-potential of β -lg/Al nanoparticle (β -lg : Al = 9.5 : 0.5% (w/w) containing 1.6 mg/L folic acid).

○ 열처리 온도와 유청 단백질/알긴산 (β -lg/Al) 나노담체 상대 농도 변화에 따른 나노담체 엽산의 encapsulation efficiency 와 입자크기와의 상관관계 평가.

열처리 온도와 β -lg/Al 상대 농도에 따른 엽산 함유 나노담체의 encapsulation efficiency 와 particle size의 상관관계를 분석해본 결과 particle size의 mean size값이 증가함에 따라 β -lg/Al 나노담체의 folic acid encapsulation efficiency도 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다 (Figs. 13 and 14). 나노담체의 입자 크기가 엽산 포집 능력과 양의 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

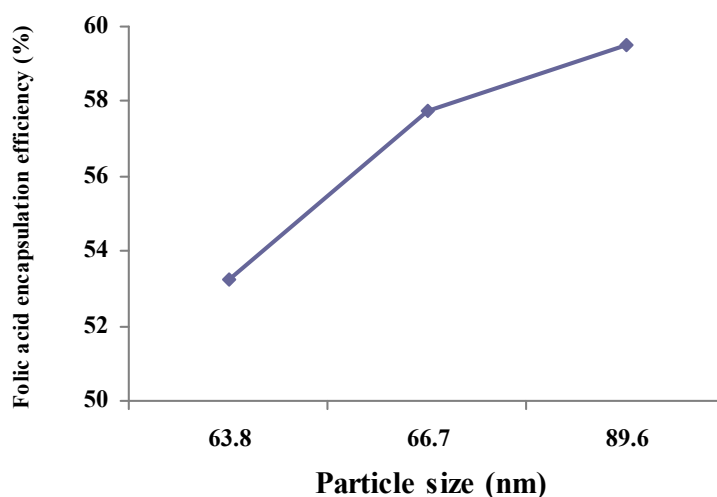


Fig. 13. Interrelations between folic acid encapsulation efficiency and particle size of β -lg/Al nanoparticle (β -lg : Al = 9.9 : 0.1% (w/w) containing 1.6 mg/L folic acid).

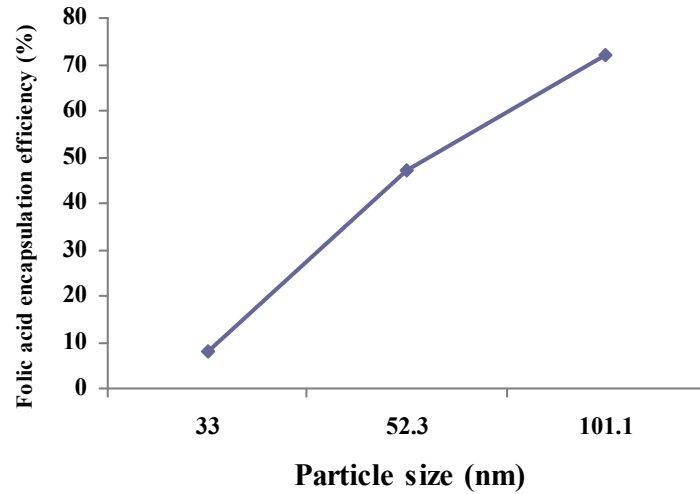


Fig. 14. Interrelations between folic acid encapsulation efficiency and particle size of β -lg/Al nanoparticle (β -lg : Al = 9.5 : 0.5% (w/w) containing 1.6 mg/L folic acid).

○ 엽산 함유 β -lg 나노담체의 conformational property

엽산이 함유된 β -lg 나노담체의 구조적 변화 및 엽산과의 상호작용을 연구하기 위해 다음과 같은 방법이 이용되었다. 먼저 엽산, β -lg 나노담체, 엽산/ β -lg 나노담체 수용액을 각각 준비 한 후 Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer (vertex 80v spectrometer, Bruker optics, Germany)을 사용하여 4000~400 cm^{-1} 범위의 스펙트럼을 분석하였다 (Fig. 15). 하지만, 엽산과 β -lg 나노담체의 conformational property를 분석할 수 없을 만큼 유사한 스펙트럼이 검출되었다.

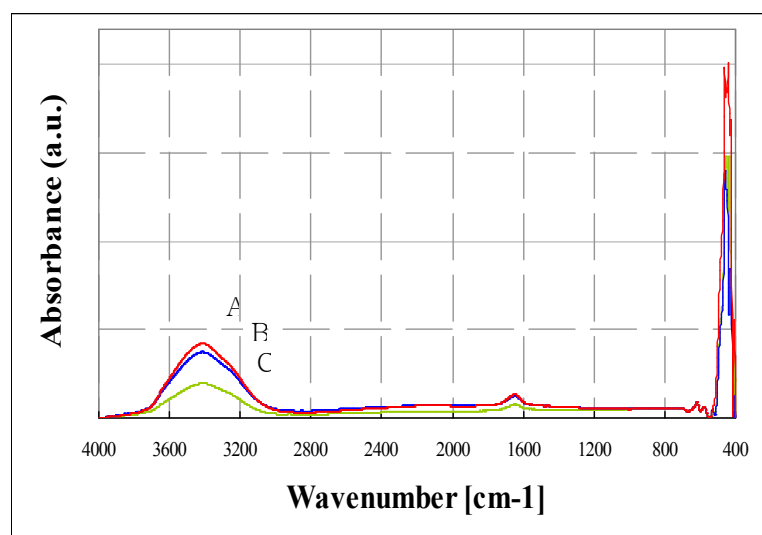


Fig. 15. FTIR spectra of (a) β -lg nanoparticles (b) folic acid-loaded β -lg nanoparticles (c) folic acid.

열처리 온도에 따른 β -lg의 surface hydrophobicity 변화에 관한 연구는 hydrophobic fluorescent probe인 8-anilino-1-naphtalenesulfonic acid (ANS, SIGMA-ALDRICH, Inc., USA)를 이용하여 진행하였다. 우선, pH 7.5의 0.1 M phosphate buffer를 사용하여 1% (w/v) β -lg 용액을 제조하고, 항온수조에서 45, 55, 65, 75, 85°C에서 각각 10분간 열처리 후 얼음물에서 20°C로 냉각하였다. 열처리 한 샘플과 열처리하지 않은 샘플을 1 mL씩 분배 후 각각 20 mM ANS를 46 μ l씩 처리하였다. 샘플을 잘 섞은 후 multi-spectrophotometer (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 excitation wavelength 370 nm, emission wavelength 471 nm에서 fluorescence intensity를 측정하였다. 열처리한 샘플 각각의 fluorescence intensity의 분석은 모두 열처리 하지 않은 샘플의 fluorescence intensity값을 subtraction한 후 실시하였다 (Fig. 16). 그 결과, 85°C heating을 제외하고는 열처리 온도가 증가할수록 fluorescence intensity가 증가함이 관찰되었다. Fluorescence intensity값이 높다는 것은 ANS가 소수성 아미노산에 많이 결합하였다는 의미이고, 이는 곧 열처리 온도가 올라갈수록 β -lg 내부에 존재하던 소수성 아미노산이 바깥으로 노출되면서 surface hydrophobicity가 증가됨을 알 수 있었다.

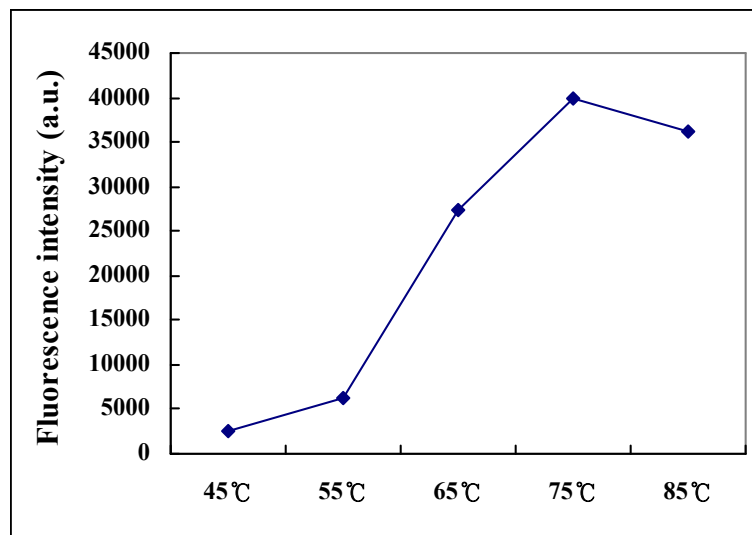


Fig. 16. Surface hydrophobicity of β -lg as different heating temperature of β -lg in phosphate buffer (pH 7.5).

○ Ascorbic acid 함유 유청 단백질 (β -lg) 나노에멀전 제조

Ascorbic acid 함유 나노에멀전 제조를 위해 다음과 같은 방법이 이용되었다. 먼저 0.98% β -lg (w/v) 수용액을 항온수조에서 65°C로 10분간 열처리를 한 후 얼음물에서 5°C로 냉각시켰다. Ascorbic acid의 캡슐화를 위하여 β -lg 수용액에 ascorbic acid를 1 mg/mL 농도로 첨가하여 용해시킨 뒤, 계면활성제인 Tween 80 (polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate,

SIGMA-ALDRICH inc., USA)과 포도씨유를 첨가하였다. 균질기 (Homogrnizer, DAIHAN scientific Co., Ltd, korea)를 이용하여 600 rpm에서 5분간 균질한 후, sonicator (BANDELIN electconic Co., Ltd, Germany)를 이용하여 3분간 sonication하였다. 그런 다음, 가교제인 CaCl₂를 각각 2, 3, 4 mM 처리하고 교반기를 이용해 5분간 교반 하였다.

○ CaCl₂ 농도에 따른 β -lg 나노에멀전의 형태학적 구조 평가

CaCl₂ 농도에 따른 β -lg 나노에멀전의 형태학적 구조는 TEM을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, 모든 처리구에서 100~300 nm 크기의 나노에멀전이 생성되었으며, CaCl₂ 농도가 2 mM에서 4 mM로 증가함에 따라 β -lg 나노에멀전의 크기도 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 6).

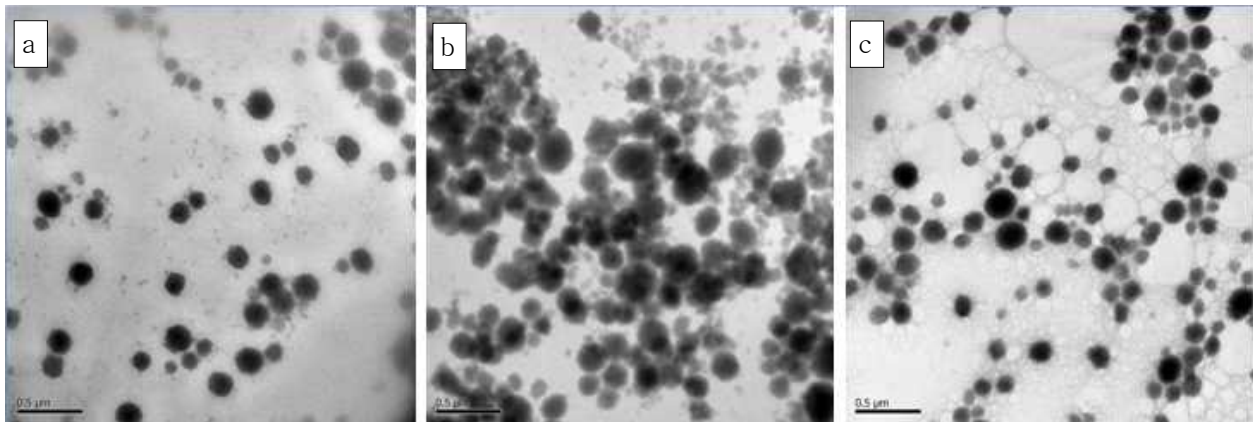


Fig. 17. Transmission electron micrographs of β -lactoglobulin nanoemulsions. Pre-heated β -lg solutions containing 0.1 mg/mL ascorbic acid were adjusted to pH 7.0 and were treated with (a) 2, (b) 3, (c) 4 mM CaCl₂. Scale bar = 0.5 μ m.

○ CaCl₂ 농도에 따른 β -lg 나노에멀전에 포집된 ascorbic acid의 encapsulation efficiency 평가

CaCl₂ 농도에 따른 β -lg 나노에멀전의 ascorbic acid encapsulation efficiency는 UV spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 그 결과, CaCl₂ 농도가 2 mM에서 4 mM로 증가함에 따라 ascorbic acid의 encapsulation efficiency는 6% 에서 51%로 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 18). 결과적으로 CaCl₂는 ascorbic acid의 β -lg 나노에멀전 포집 효율을 증가시키는 중요 요인임을 알 수 있었다.

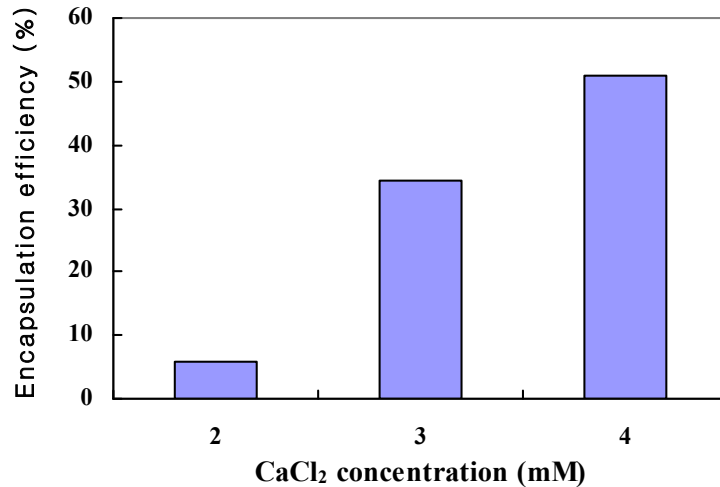


Fig. 18. Effects of CaCl₂ concentration on the encapsulation efficiency of ascorbic acid. Pre-heated β -lg solutions containing 0.1 mg/mL ascorbic acid were adjusted to pH 7.0 and were treated with 2, 3, 4 mM CaCl₂.

○ 열처리 온도에 따른 β -lg 나노담체에 포집된 resveratrol의 encapsulation efficiency 평가

열처리 온도에 따른 β -lg 나노담체의 encapsulation efficiency는 HPLC를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 열처리 온도가 55°C에서 75°C로 증가함에 따라 resveratrol의 encapsulation efficiency는 약 90%에서 97%로 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 19). 결과적으로 열처리온도는 resveratrol의 포집효율을 증가시키는 중요한 요인임을 알 수 있었다.

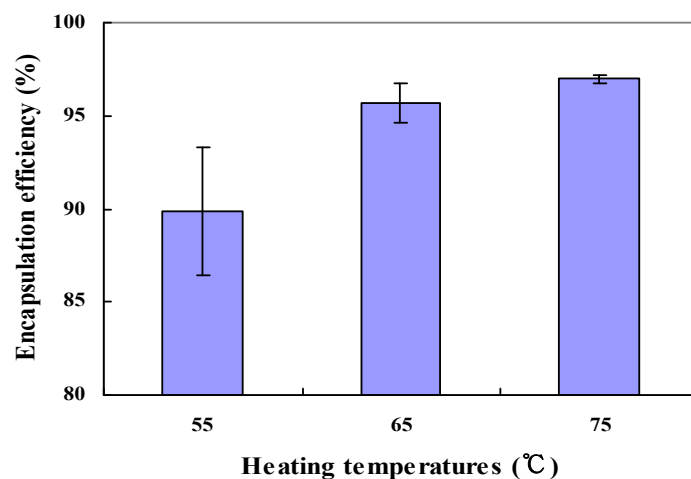


Fig. 19. Effects of heating temperatures on the encapsulation efficiency of resveratrol. Beta-lactoglobulin solutions containing 0.2mg/mL resveratrol were treated with 4 mM CaCl₂ at pH 9.5 and were heated at 55°C, 65°C, 75°C, and 85°C for 10min.

○ 엽산 함유 β -lg/Al 나노담체의 물리 화학적 안정성 및 형태학적 구조 (morphological properties) 연구

엽산 함유 β -lg/Al 나노담체의 물리 화학적 안정성 및 morphological 특징을 평가하기 위해 TEM을 이용하여 실험을 수행하였다. 동결건조된 엽산 함유 β -lg/Al 나노담체를 0.1 M HCl 또는 0.1 M NaOH 용액으로 조절된 pH 2.5, 4.5, 6.5, 수용액에 reconstitution시킨 다음, TEM을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, β -lg/Al 나노담체가 제조된 것을 관찰할 수 있었으며 (Fig. 20a), 제조과정 중 하나인 다양한 pH 조건 하에서 엽산 함유 나노담체의 안정성을 평가한 결과 pH 2.5, 4.5, 6.5 수용액에서도 엽산 함유 β -lg/Al 나노담체의 안정성이 유지되었음을 관찰할 수 있었다 (Figs. 20b, c and d). 이 결과는 엽산함유 β -lg/Al 나노담체가 다양한 pH 값을 지닌 유제품 등에 전달 시스템으로 적용될 수 있음을 보여준다.

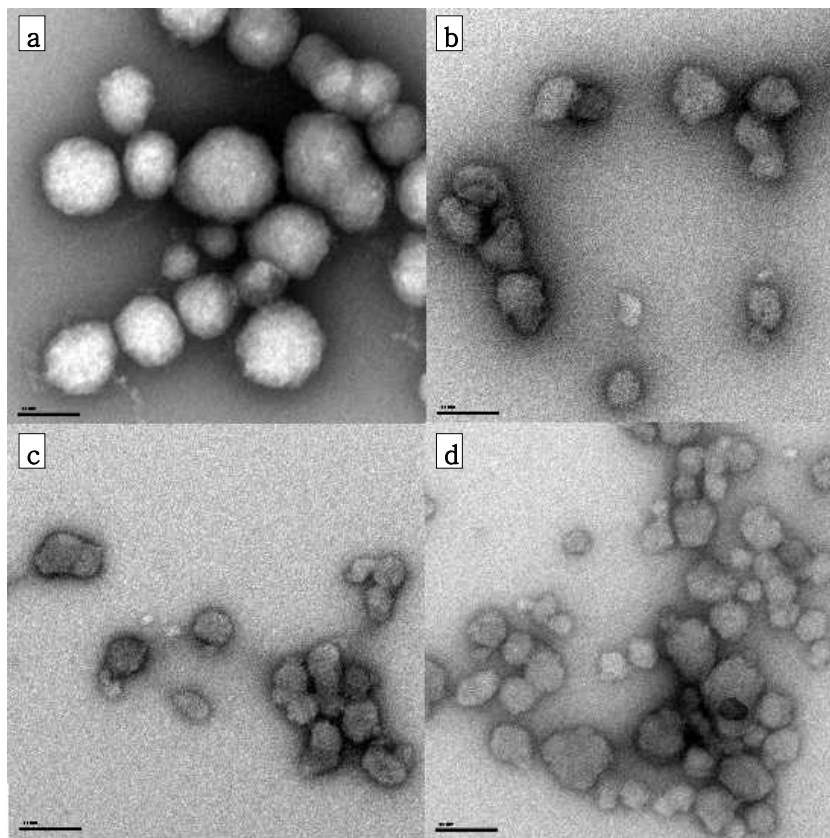


Fig. 20. Morphological stability of β -lg/Al nanoparticles at different pH conditions. Freeze-dried nanoparticles are reconstituted at (b) pH 2.5, (c) pH 4.5, and (d) pH 6.5. Scale bar = 100 nm.

○ 치즈 제조 공정에 따른 엽산 함유 β -lg/Al 나노담체의 morphology 변화 평가

치즈 제조 공정 시 나노담체의 형태학적 변화 연구는 Laridi 등 (2003)의 체다 치즈 제조 공정 연구를 참고하여 수행하였으며, 치즈 제조과정 과정 중의 엽산 함유 β -lg/Al 나노담체의

morphology는 TEM을 이용하여 관찰하였다. 먼저 동결건조 된 엽산 함유 β -lg/Al 나노담체를 1 mg/mL 농도로 reconstitution 시킨 다음, 0.2 M HCl을 이용하여 pH를 5.4로 조절한 후 32°C 에서 90분간 incubation 하였다. 이후 39°C에 도달할 때 까지 매 5분마다 1°C씩 온도를 상승시킨 후 39°C에서 90분간 incubation한 다음, 8°C로 냉각시켰다. 그 결과, 치즈 제조 공정에 따른 엽산 함유 β -lg/Al 나노담체의 형태학적 변화는 거의 없었으며 원형의 입자형태를 유지하였다 (Fig. 21). 즉, β -lg/Al 나노담체는 치즈 제조과정에서 안정성을 지니므로 기능성 물질 전달체로서 치즈에 적용 가능함을 알 수 있었다.

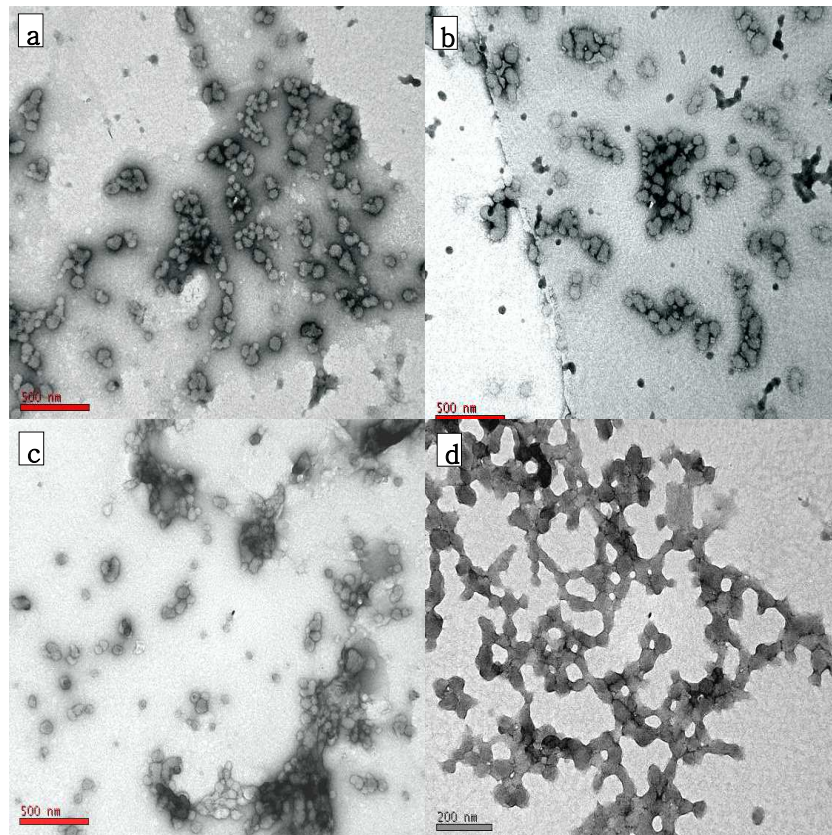


Fig. 21. Morphological stability of β -lg/Al nanoparticles in simulated Cheddar cheese temperature cycle. Freeze-dried nanoparticles are reconstituted at pH 5.4 (a), and are incubated at 32°C for 30min (b) followed by incubated at 39°C for 90min (c). Incubated nanoparticles are cooled to 8°C (d). Scale bar = 500 nm.

○ 치즈 숙성 및 저장요인에 따른 resveratrol 함유 β -lg 나노담체의 morphology 변화 평가

치즈 숙성 및 저장기간 동안 resveratrol 함유 β -lg 나노담체의 morphology 변화는 TEM을 이용하여 관찰하였다. 동결건조 된 resveratrol 함유 β -lg 나노담체를 reconstitution 시킨 다음 0.2 M HCl을 이용하여 pH를 5.4로 조절한 후 치즈 숙성 온도인 8°C에서 15일간 관찰하

였다. 나노담체의 morphology 변화는 숙성 후 1, 5, 10, 15 켤의 나노담체를 이용하여 비교하였다 (Fig. 22). 그 결과, 치즈 숙성 및 저장 기간 동안 resveratrol 함유 β -lg 나노담체의 형태학적 변화는 거의 없었으며 원형의 입자형태를 유지하였다 (Fig. 22). 즉, β -lg 나노담체는 치즈 숙성기간 동안 안정성을 지니므로 기능성 물질 전달체로서 숙성치즈에 적용 가능성을 알 수 있었다.

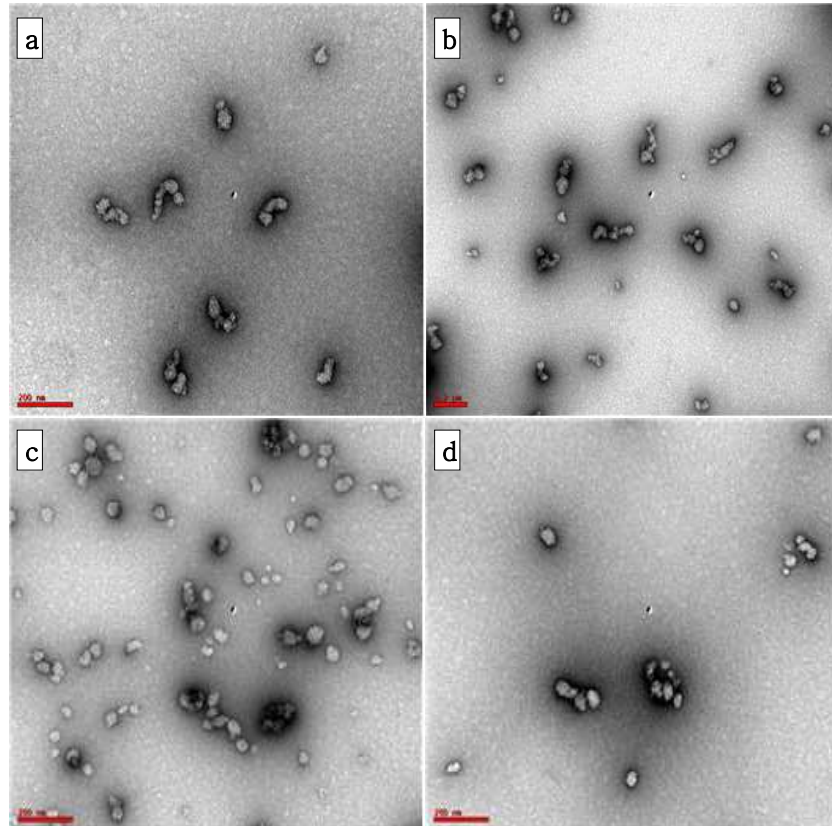


Fig. 22. Morphological stability of β -lg nanoparticles during simulated cheese ripening time. Freeze-dried nanoparticles are reconstituted at pH 5.4 (a). Reconstituted nanoparticles are stored at 8°C for 15 days. Morphology of nanoparticles ripened at 8°C for day 5 (b), 10 (c), and 15 (d). Scale bar = 200 nm

○ 요구르트 저장요인에 따른 resveratrol 함유 β -lg 나노담체의 morphology 변화 평가

요구르트 저장기간 동안 resveratrol 함유 β -lg 나노담체의 morphology는 TEM을 이용하여 관찰하였다. 동결건조 된 resveratrol 함유 β -lg 나노담체를 1 mg/mL 농도로 reconstitution 시킨 다음, 0.2 M HCl을 이용하여 pH를 4.6으로 조절한 후 4°C에서 5일간 저장하였다. 나노담체의 morphology 변화는 보관 후 1, 5일 켤의 나노담체를 수집한 후 비교하였다 (Fig. 23). 그 결과, 요구르트 저장 기간 동안 resveratrol 함유 β -lg 나노담체의 형태학적 변화는 거의 없었으며 원형의 입자형태를 유지하였다 (Fig. 22). 즉, β -lg 나노담체는 요구르트

저장기간 동안 안정성을 지니므로 기능성 물질 전달체로서 요구르트에 적용 가능성을 알 수 있었다.

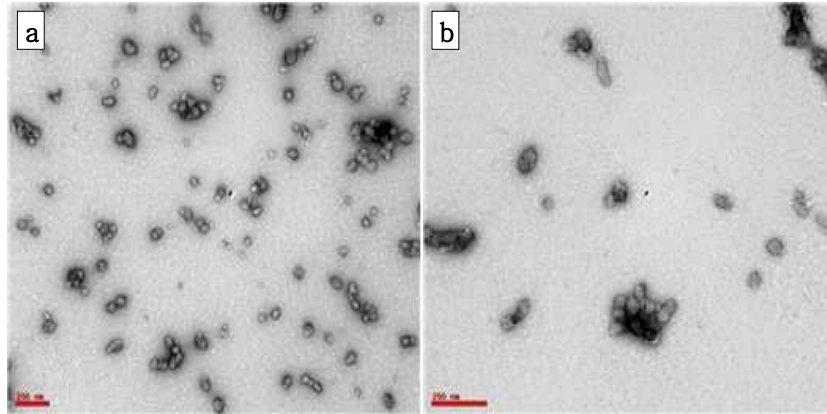


Fig. 23. Morphological stability of β -lg nanoparticles during simulated yogurt storage time. Freeze-dried nanoparticles are reconstituted at pH 4.6 (a). Morphology of nanoparticles stored at 4°C for 5 days (b). Scale bar = 200 nm.

○ 치즈 숙성 및 저장요인에 따른 β -lg 나노담체에 포집된 resveratrol의 leakage 평가

치즈 숙성 및 저장기간 동안 β -lg 나노담체에 포집된 resveratrol의 leakage는 HPLC를 이용하여 측정하였다. 65°C에서 10분간 열처리하여 제조한 뒤 동결건조시킨 resveratrol 함유 β -lg 나노담체를 1 mg/mL 농도로 reconstitution 시킨 다음, 0.2 M HCl을 이용하여 pH를 5.4로 조절한 후 8°C에서 15일간 숙성하였다. Resveratrol의 release는 숙성기간 (1, 3, 6, 9, 13, 15일) 동안 나노담체를 수집하여 초고속 원심분리 후 HPLC를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 15일간의 치즈 숙성기간 동안 포집된 resveratrol은 숙성 3일째에 약 36.75% (\pm 3.75%)가 release되었고, 3일 이후에는 추가적인 release가 되지 않은 것이 관찰되었다 (Fig. 24). 따라서, 본 연구과제를 통해 개발된 β -lg 나노담체는 동결건조를 통해 분말 형태로 제조하여 치즈와 같은 발효 유제품에 적용이 쉬울 뿐만 아니라, 치즈 숙성기간 동안에도 resveratrol의 release profile 측면에서 안정적임을 알 수 있었다.

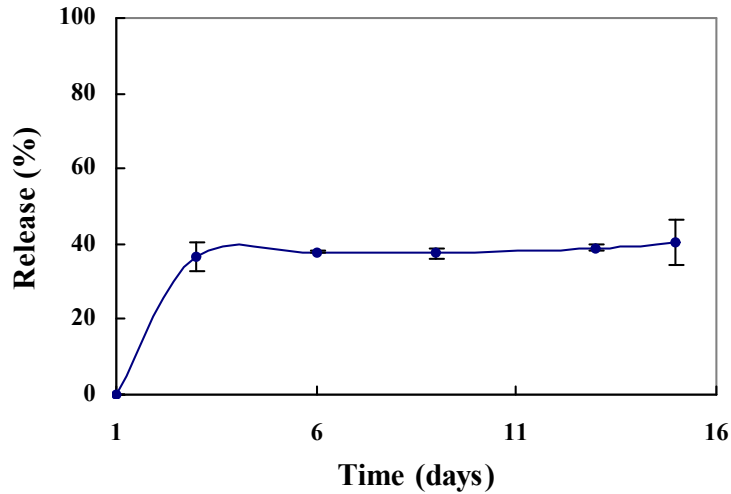


Fig. 24. Release profiles of resveratrol from β -lg nanoparticles treated at 65°C and 4 mM CaCl_2 during simulated ripening time. Reconstituted nanoparticles were stored at 8°C and pH 5.4 for 15 days.

○ 요구르트 저장요인에 따른 β -lg 나노담체에 포집된 resveratrol의 release 평가

요구르트 저장기간 동안 β -lg 나노담체에 포집된 resveratrol의 release는 HPLC를 이용하여 측정하였다. Resveratrol의 release는 요구르트 저장기간 (1, 3, 5, 7일) 동안 나노담체를 수집하여 초고속 원심분리 후 HPLC를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 저장 후 7일째에 release된 resveratrol의 함량은 55°C에서 열처리하여 제조된 나노담체의 경우 32.85% (\pm 7.0%)로 65°C 처리구 (20.75 \pm 3.61%)와 75°C 처리구 (20.35 \pm 1.49%)에 비해 많은 양이 release되었다 (Fig. 25). 즉, 55°C에서 열처리된 나노담체와 비교할때, 65°C와 75°C로 열처리된 나노담체의 resveratrol 포집 안정성이 높음을 알 수 있었다. 결과적으로 resveratrol의 release profile 측면에서, 열처리 온도는 요구르트 저장기간 동안 기능성 물질의 포집 안정성에 영향을 미치는 제조공정 요인이었다.

본 연구과제를 통해 개발된 β -lg 나노담체는 동결건조를 통해 분말 형태로 제조하여 치즈 및 요구르트와 같은 유제품에 적용이 쉬울 뿐만 아니라, 유제품의 제조, 숙성 및 저장기간 동안에도 안정적임을 알 수 있었다.

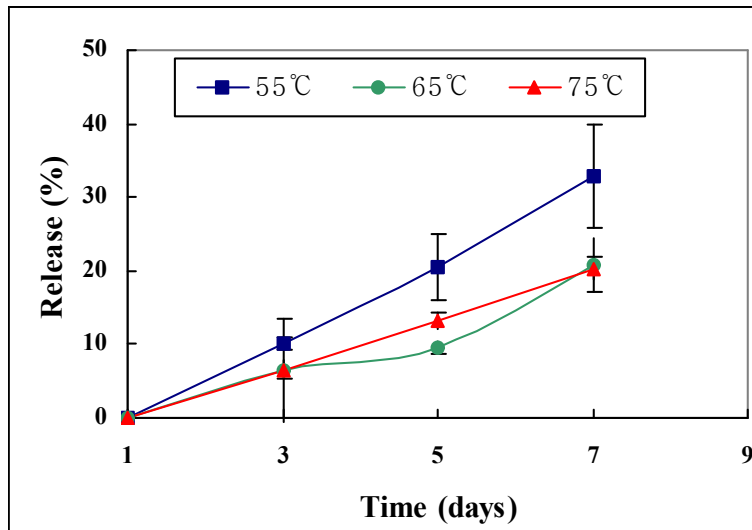


Fig. 25. Release profiles of resveratrol from β -lg nanoparticles in simulated yogurt (pH 4.6) for 7 days. Reconstituted nanoparticles were stored at 4°C for 7 days.

제1 협동과제 (명가유업 주식회사) : 나노담체 및 나노담체 함유 유용물질의 대량 스크리닝 시스템 개발

- 유청 단백질의 생리활성 특성 규명: 사람의 위, 대장 및 소장 유래 세포주를 이용하여 유청 단백질의 독성 및 세포활성 특성 규명

실험에 사용된 세포주들은 ATCC (American type culture collection) 및 Korean cell line bank (KCLB)에서 분양받은 세포주를 사용하였다. 세포의 종류에 따라 Table 1.의 배지를 이용하여 5% CO₂의 incubator에서 배양하였으며 2일에 한 번씩 배지를 교환해 주었다. 세포주의 보존을 위해 모든 세포주는 DMSO와 FBS가 혼합된 저장용액을 제조하여 혼합하였다. 이것을 vial에 분주하여 질소탱크에 보관 하면서 사용하였다.

Table 1. List of selected human-derived cell lines in this study

Cell Line	Source	Media
AGS	Human stomach	Ham's F12
MKN-1	Human stomach	RPMI1640
SNU-484	Human stomach	RPMI1640
HT-29	Human Colon	RPMI1640

위의 배양 조건을 확립한 후 세포의 morphology 는 다음과 같다.

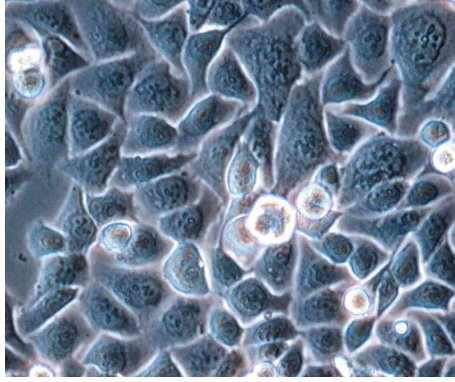


그림 1. 배양중인 AGS의 대표적인 세포의 사진

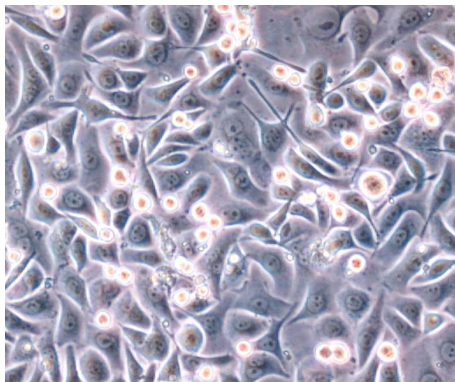


그림 2. 배양중인 MKN-1의 대표적인 세포의 사진

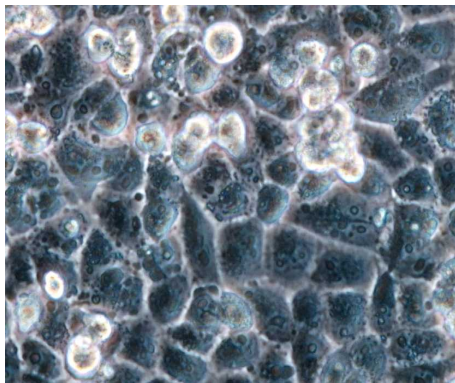


그림 3. 배양중인 SNU-484의 대표적인 세포의 사진

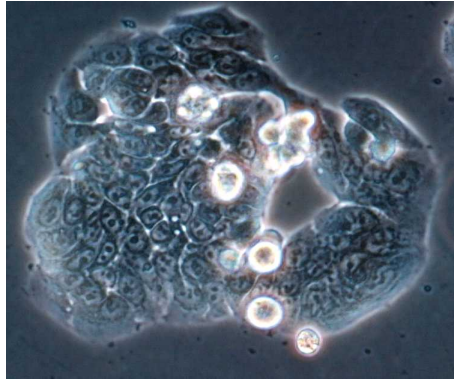


그림 4. 배양중인 HT-29의 대표적인 세포의 사진

배양조건을 확립한 후 유청 단백질이 위의 세포주의 성장 및 독성에 미치는 효과를 알아보기 위해 적정 세포수를 측정 다음과 같이 측정하였다. 우선 각 세포 별로 1×10^4 cells/ well 의 밀도로 96 well plate에 분주한 후 1/2씩 희석하면서 접종을 실시하였다. 4일간 배양 후 MTT assay를 통하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 negative control이 최적 농도인 0.7~0.9의 흡광도를 나타낼 수 있도록 각 세포 별 적정 세포수를 측정하였다.

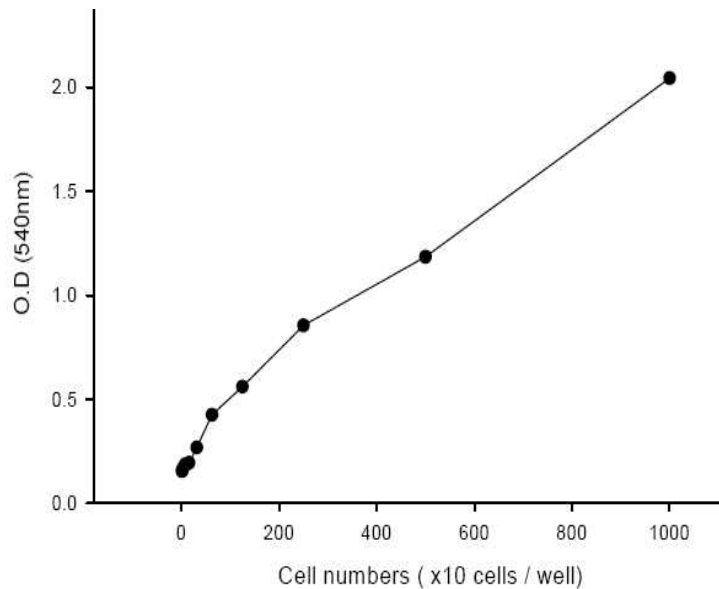


그림 5. 배양중인 HT-29의 적정 세포수를 확립하기 위해 MTT assay를 통해 성장 곡선을 표시한 그림

그림 5에서와 같이 HT-29 세포주의 적정 세포수를 MTT assay를 통해 확인하였으며 비슷한 실험을 통해 다른 3개의 세포주에 대한 적정 세포수를 확립하였다. 그 결과는 아래의 Table 2에서 보여주고 있다.

Cell line	Optimal concentration (cells/well)
AGS	2.0×10^3
MKN-1	4.0×10^3
SNU-484	2.0×10^3
HT-29	4.0×10^3

○ 엽산 (folic acid)의 세포내 uptake 조건의 최적화 실험을 통한 세포내의 생리활성 특성 규명

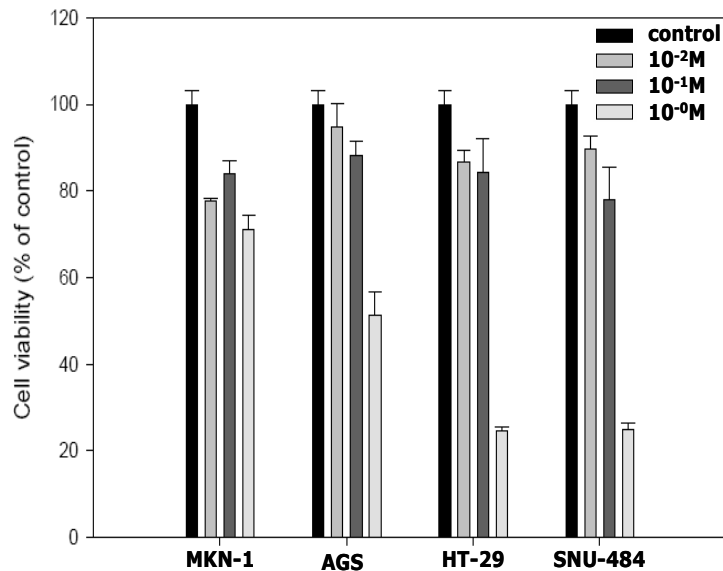


그림 6. 배양중인 세포주를 이용하여 유청 단백질의 농도별 세포의 성장에 미치는 효과를 MTT assay를 통해 확인한 그림

우선 유청 단백질이 인간 유래 세포주의 성장에 미치는 효과를 알아보기 위해 위의 조건에서 확립한 MTT assay를 수행하였다. 그림6에서와 같이 고농도의 유청 단백질은 어느 정도 세포의 성장을 저해하는 것으로 보여지고 있다. 아마도 이러한 결과가 보여지는 이유는 인간 유래 세포주에 고농도의 유청 단백질이 세포의 성장을 억제하는 것으로 사료된다. 이와 비슷한 실험을 통해 엽산이 인간 유래 세포주의 성장에 미치는 효과를 알아보기 위해 위의 조건에서 확립한 MTT assay를 수행하였다.

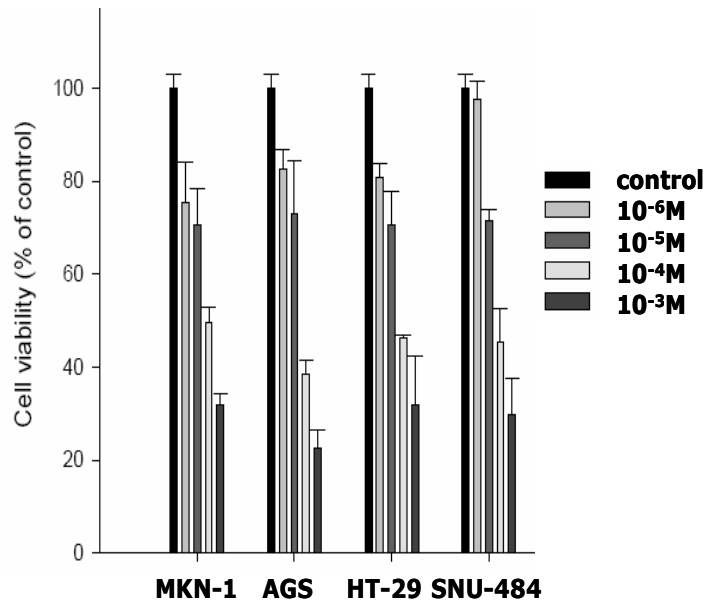


그림 7. 배양중인 세포주를 이용하여 염산의 농도별 세포의 성장에 미치는 효과를 MTT assay를 통해 확인한 그림

○ 대표적인 target 유전자의 발현 조건을 확립함으로써 2-3차년도 부터 활용될 유청 단백질의 나노담체에 의한 GI track에서의 생리활성 측정 기반 구축

우선 유청 단백질이 장내 유전자의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 HT-29 세포주를 이용하여 위의 실험에서 화립 된 유청 단백질의 적정 농도 ($1 \times 10^2 M$)를 이용하여 시간별 target 유전자의 발현에 미치는 효과를 RT-PCR을 통해 측정하였다. target 유전자의 선별은 기존의 보고에서 보여주고 있듯이 (Xiao et al., 2005, 4:1-17) Glucagon, Neu-oncogene, Mucin-3, HCNP, Itmap 5개의 유전자를 선별하여 이들 유전자가 유청 단백질에 의해 발현이 증가되는 양상을 확인하였다. 이를 위해서 HT-29 세포주를 100만개의 농도로 배양한 후 위의 농도에서 시간별로 (0-7 일간) 처리한 후 처리된 세포로부터 total RNA를 추출한 후 추출한 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 이때, 유전자의 발현이 적정 RNA를 이용하여 측정하였는지를 알아보기 위해 GAPDH라는 유전자를 internal control로 사용하였다. 그림 8에서 보여주고 있듯이 선별된 모든 유전자들은 발현의 정도에서는 약간의 차이가 보여주고 있지만 선별된 유전자들 모두가 유청단백질에 의해 유전자의 발현이 증가되고 있음을 확인하였다.

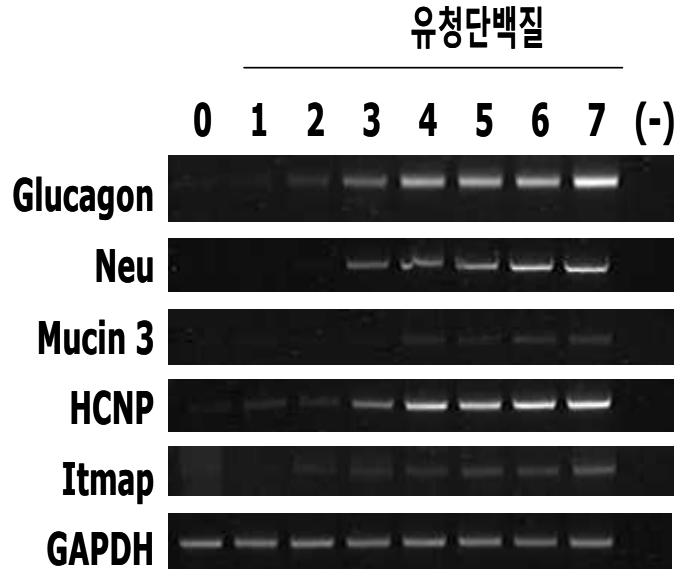


그림 8. 배양중인 HT-29 세포주를 이용하여 유청 단백질 $1 \times 10^{-2} \text{M}$ 의 농도에서 시간 의존적으로 target 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 대표적인 그림.

그림 8에서 확인된 유전자들의 발현이 다른 세포주들에서도 동일한 양상을 보여주고 있는지를 확인하기 위해 다른 3개의 세포주들을 위의 실험과 동일하게 수행하였다. 다만 시간 의존적인 실험을 수행하기 보다는 이미 확립된 조건을 이용하여 다른 3개의 세포주에서는 유청 단백질 $1 \times 10^{-2} \text{M}$ 로 처리한 후 7일간 배양하였으며 배양이 종료된 후 위의 방법과 동일하게 RT-PCR을 수행하였다.

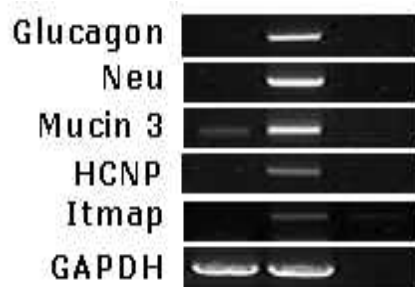


그림 9. 배양중인 AGS 세포주를 이용하여 유청 단백질 $1 \times 10^{-2} \text{M}$ 의 농도에서 7일간 처리한 후 target 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 대표적인 그림.

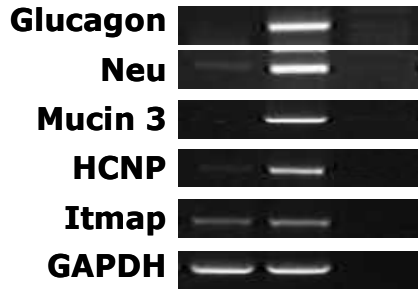


그림 10. 배양중인 MKN-1 세포주를 이용하여 유청 단백질 $1 \times 10^2 \text{M}$ 의 농도에서 7일간 처리한 후 target 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 대표적인 그림.

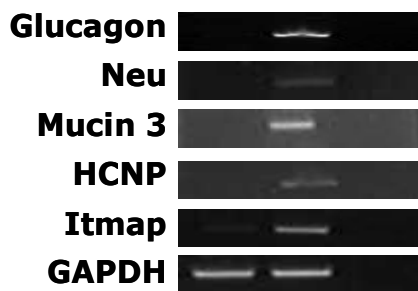


그림 11. 배양중인 SNU-484 세포주를 이용하여 유청 단백질 $1 \times 10^2 \text{M}$ 의 농도에서 7일간 처리한 후 target 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 대표적인 그림.

그림 8부터 그림 11에서 보여주고 있듯이 선별된 유전자들은 정도의 차이가 있지만 본 연구에 사용될 세포주에서 비슷한 경향으로 유청 단백질에 의해 target 유전자들의 발현이 증가되는 경향을 보여주고 있다. 향후의 연구에서는 이러한 유전자의 발현이 엽산에 의해 조절되는 지를 동일한 방식으로 수행하고자 한다. 또한 유청 단백질의 농도는 세포에 성장과 독성에 미치는 효과를 고려하여 $1 \times 10^2 \text{M}$ 에서만 확인하였으나 이 또한 농도 의존적인 유전자들의 발현을 다양한 농도와 시간에서 확인하고자 한다.

▶ 나노담체 및 나노담체 함유 유용물질의 대량 스크리닝 시스템 개발하기 위하여 Korean cell line bank (KCLB)에서 분양받은 사람의 장내 세포주를 이용하였고, MTT assay를 이용하여 적정 세포수를 확립하였고 이를 바탕으로 2차 년도에는 유청 단백질 나노담체 함유 유용물질의 장내 대사에 미치는 영향 분석 하기위한 단초가 될 것이다.

○ 사람의 위와 대장 세포에서 유청 단백질 나노담체가 세포의 성장 및 독성에 미치는 영향 분석

실험에 사용된 세포주는 1차 년도에 사용했던 사람의 위와 대장 세포주인 AGS, HT29를 사용하였으며 나노담체의 uptake를 최적화 하기위한 배양액을 선별하기위해 다음과 같은 실험을 하였다. 우선 유청 단백질 나노담체의 처리 조건을 확립하기 위해 기존에 보고된 여러 논문을 참조하여 가장 적절한 조건을 찾기 위해 세포를 12 well plate에 seeding을 하고, 80-100%되었을 때, serum이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지로 나누어서 각각 유청 단백질 나노담체를 처리하고 세포내 uptake정도를 확인하였다. 세포내로의 uptake정도는 세포의 전체 protein의 양의 변화로 확인하였다, RIPA lysis buffer를 사용하여 total protein을 얻고 bradford assay방법을 통해서 protein의 양을 확인하였다. 위와 대장의 세포주에 유청 단백질 나노담체를 0, 0.2, 1.0 mg/ml로 4시간동안 처리를 하고, 세포의 전체 protein 양을 비교하였다. 그 결과 serum이 있는 배지의 경우 전체 protein의 양에 변화가 없는 것으로 보아 uptake가 거의 되지 않는 것으로 생각할 수 있고, serum 이 없는 경우에는 세포 전체 protein양의 증가가 나타나는 결과를 보이고 있어서 나노담체가 세포내로 uptake되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 위와 대장의 세포주에서 동일한 양상을 보이고 있었다 (그림 12).

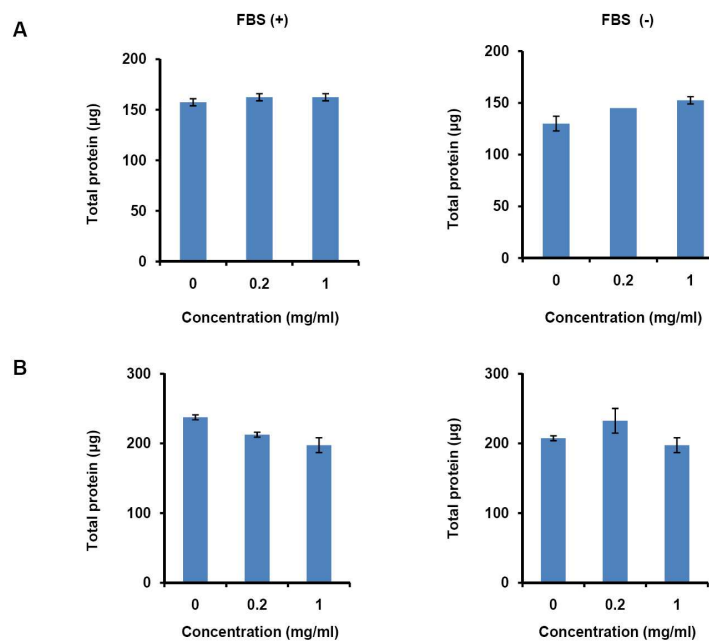


그림 12. 사람의 위와 대장의 세포주에 유청 단백질 나노담체의 처리 조건 규명. A. 사람의 위 세포주 (AGS), B. 사람의 대장 세포주 (HT29)

또한, 이 조건에서 세포의 모양을 관찰하였을 때 세포에 toxic한 영향을 보이지 않은 것을 확인할 수 있었다 (그림 13). 따라서 유청 단백질 나노담체를 serum이 없는 배지 조건에서 처리하는 것이 가장 적절하다고 판단하였다.

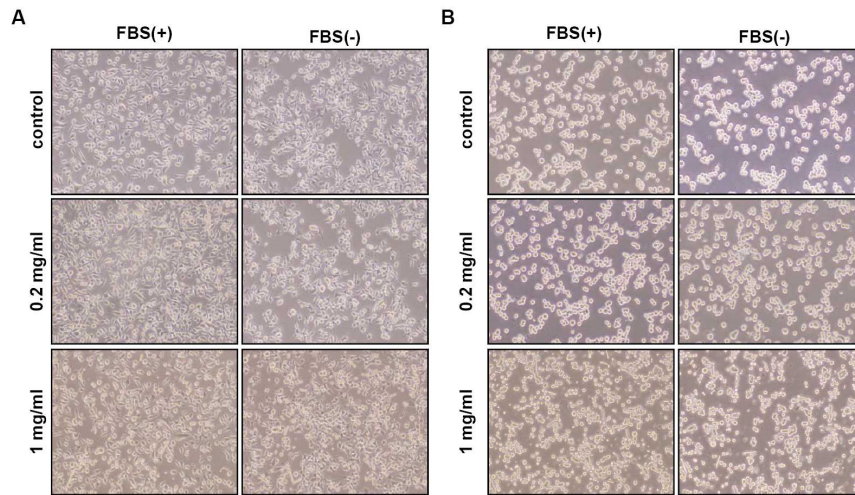


그림 13. 사람의 위와 대장의 세포에 유청 단백질 나노담체를 처리하였을 때 세포 독성에 영향을 미치는 지 확인. A. 사람의 위 세포주 (AGS), B. 사람의 대장 세포주 (HT29)

유청 단백질 나노담체를 처리할 때 pH의 영향을 보기 위해서 유청 단백질 나노담체 0.1 mg/ml을 pH 2.0, 4.0, 7.0, 8.0에서 1시간과 3시간동안 처리하였을 때 세포내로의 uptake정도를 확인하였다. 위 세포주인 AGS에 이와 같은 조건에서 실험을 한 결과 1시간동안 pH8.0에서 처리했을 때 세포내로의 uptake되는 양이 증가하는 것을 전체 protein의 양의 증가로 확인할 수 있었다. 낮은 pH의 경우에 세포내로의 uptake되는 양이 거의 없을 뿐 아니라 세포 자체에도 toxic한 영향을 주고 있는 것을 세포의 모양을 볼 때 확인할 수 있었다 (그림 14-15).

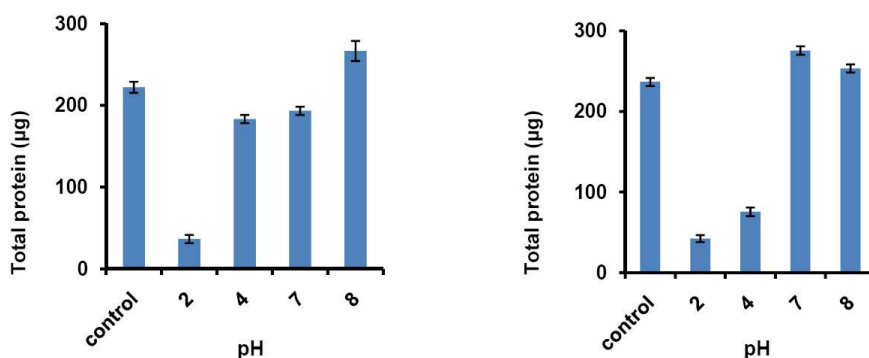


그림 14. 사람의 위 세포주에 pH에 따른 유청 단백질 나노담체의 uptake 비교. A. 유청 단백질 나노담체 1시간 처리 후에 uptake정도 비교, B. 유청 단백질 나노담체를 3시간 동안 처리한 후에 세포내 uptake정도 비교

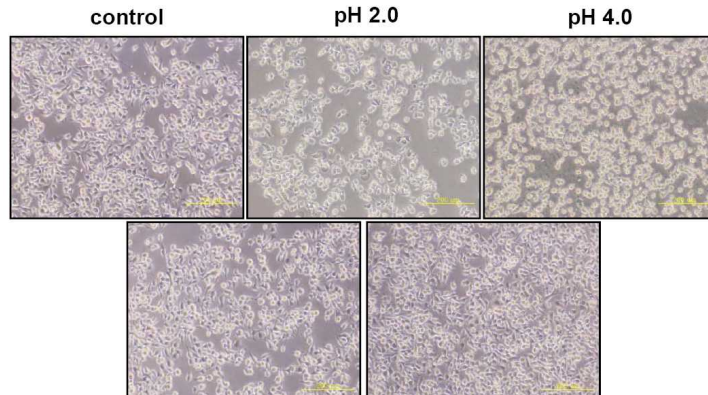


그림 15. 사람의 위 세포주에 pH에 따른 유청 단백질 나노담체 처리 후에 세포 독성에 미치는 영향 분석

이를 다시 확인하기 위해서 유청 단백질 나노담체를 처리하지 않은 세포의 전체 protein의 양을 기준으로 나노담체를 처리한 그룹의 전체 protein 양을 비교한 결과, pH 8.0에서 세포내로의 uptake가 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 3시간동안 처리했을 때도 이와 비슷하게 pH 7.0-8.0에서 세포내로의 uptake가 일어나는 것을 전체 protein의 양의 증가로 확인할 수 있었다 (그림 16). 따라서 유청 단백질 나노담체를 serum이 없는 배지에서 pH 7.0-8.0일 때, 1시간동안 처리한 그룹에서 세포내로의 uptake가 가장 잘 나타나는 것으로 보아 일반적으로 세포를 배양하는 pH 조건에서 유청 단백질 나노담체를 처리하는 것이 가장 적절하다고 결론을 내릴 수 있었다.

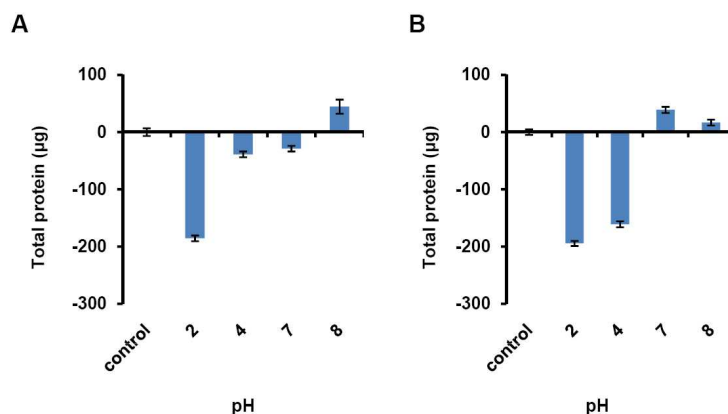


그림 16. 사람의 위 세포주에 유청 단백질 나노담체를 pH별로 처리한 후에 세포내 uptake정도를 control 기준으로 하여 시간대별로 비교 분석. A. 1시간동안 처리한 후의 uptake비교, B. 3시간동안 처리한 후의 uptake 비교

또한, 이와 같은 조건으로 대장 세포주인 HT29에도 유청 단백질 나노담체를 처리한 결과 1시간동안 처리한 그룹 중 pH 7.0-8.0에서 전체 세포의 protein양이 증가하는 것으로 보아 동일한 조건에서 세포내로의 uptake되는 현상을 확인할 수 있었다 (그림 17). 이 때 세포에도 toxic한 영향은 미치지 않는 것으로 보아 pH 7.0-8.0 조건에서 유청 단백질 나노담체를 처리하는 것이 가장 적절하다고 판단할 수 있었다 (그림 18).

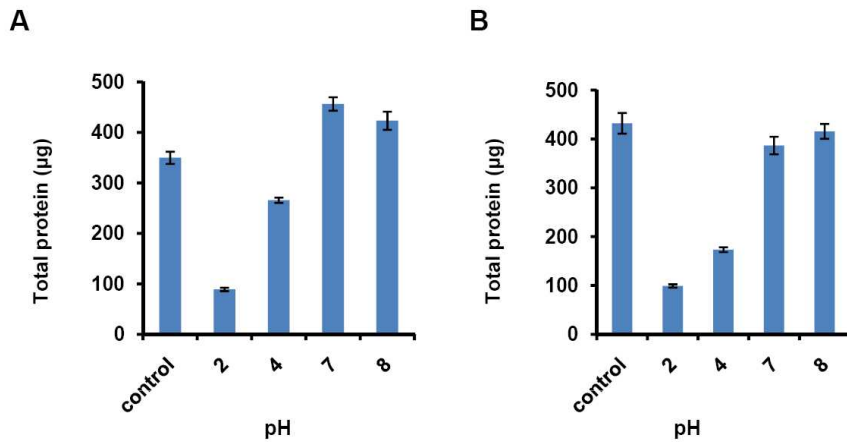


그림 17. 사람의 대장 세포주 (HT29)에 유청 단백질 나노담체를 pH별로 처리하였을 때의 세포내 uptake 정도를 시간대 별로 비교 분석, A. 1시간 동안 처리한 결과, B. 3시간 동안 처리한 후의 uptake 정도 비교

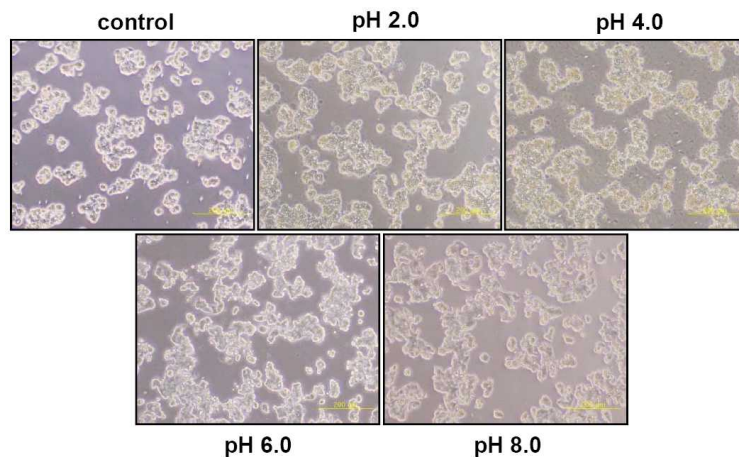


그림 18. 사람의 대장 세포주에 pH에 따른 유청 단백질 나노담체 처리 후에 세포 독성에 미치는 영향 분석

그러나 3시간동안 처리한 그룹에서는 세포내로의 uptake되는 것을 확인할 수 없어서 세

포내로의 uptake가 시작되는 시간이 1시간으로 볼 수 있었다. 이는 유청 단백질 나노담체를 처리하지 않은 세포를 기준으로 차이나는 정도를 비교한 결과 pH 7-8에서 1시간동안 처리한 그룹에서 전체 protein의 양이 유의성 있게 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 다른 pH 조건에서는 오히려 값이 떨어지는 경향을 볼 수 있었다 (그림 19). 이와 같은 결과를 토대로 하여 유청 단백질 나노담체를 사람의 위와 대장의 세포주에 처리를 할 때 pH 7.0-8.0 조건이 가장 적절하다고 결론을 내릴 수 있었고, 다음 실험을 모두 이러한 조건을 기준으로 비교하여 진행하였다.

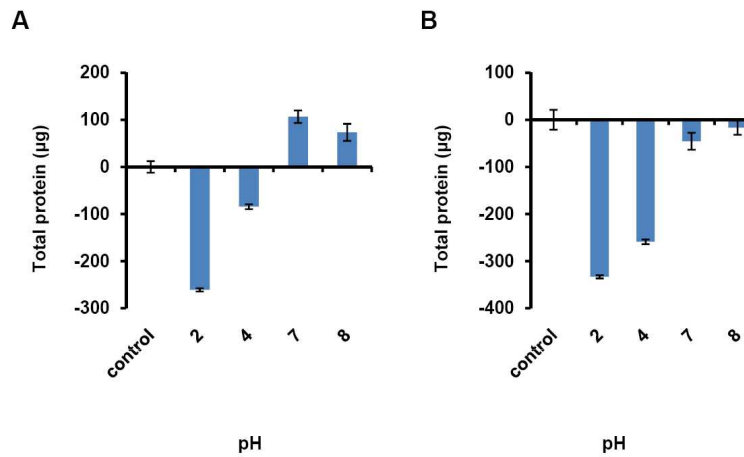


그림 19. 사람의 대장 세포주에 유청 단백질 나노담체를 pH별로 처리한 후에 세포내 uptake 정도를 control를 기준으로 시간대별로 비교 분석. A. 1시간 동안 처리한 후의 uptake 양 비교, B. 3시간 동안 처리한 후의 uptake 양을 비교 분석

유청 단백질 나노담체를 사람의 위와 대장의 세포주에 처리를 하였을 때, 세포의 성장에 영향을 미치는 지 여부를 확인하기 위해서 다양한 농도와 시간 조건에서 성장의 변화를 확인하였다. 위암 세포주인 AGS 세포주를 12 well plate에 seeding을 하고, serum이 없고 pH 7.0-8.0인 배지 조건에서 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml을 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간동안 처리를 하였을 때 세포수를 측정하여 세포의 성장 정도를 비교하였다. 각각의 농도별로 처리하고 유청 단백질 나노담체를 처리하지 않은 세포의 전체 세포주를 기준으로 비교한 결과 저 농도와 고 농도로 처리한 그룹에서 모두 성장의 차이를 보이지 않는 것을 볼 수 있었다. 또한, 24시간 처리한 그룹에서도 세포의 성장에는 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다 (그림 20).

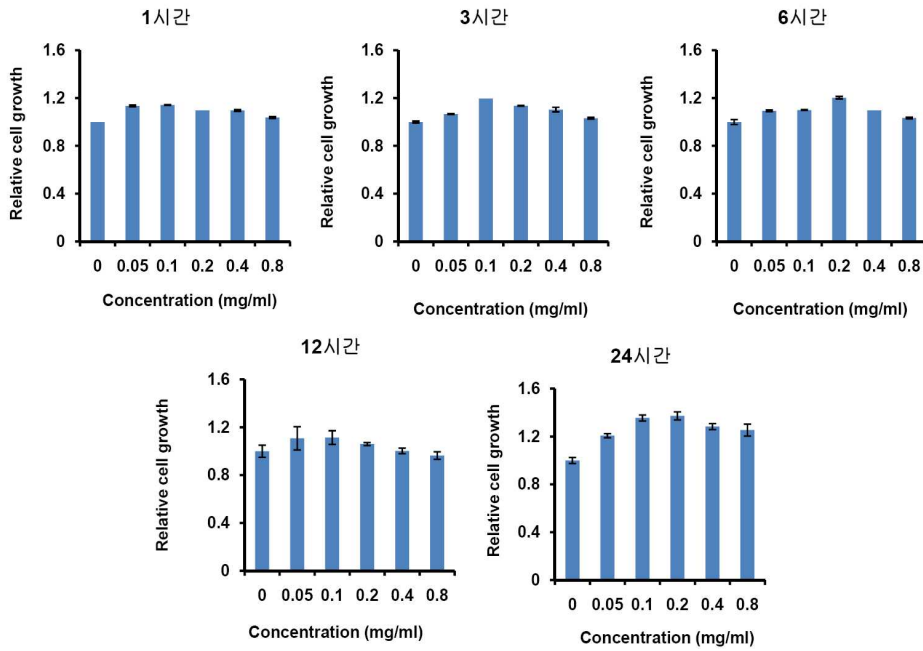


그림 20. 사람의 위 세포주에 유청 단백질 나노담체를 농도별로 시간에 따라 처리하였을 때의 세포 성장 정도 비교

이는 대장 세포주인 HT29도 동일한 경향을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 21).

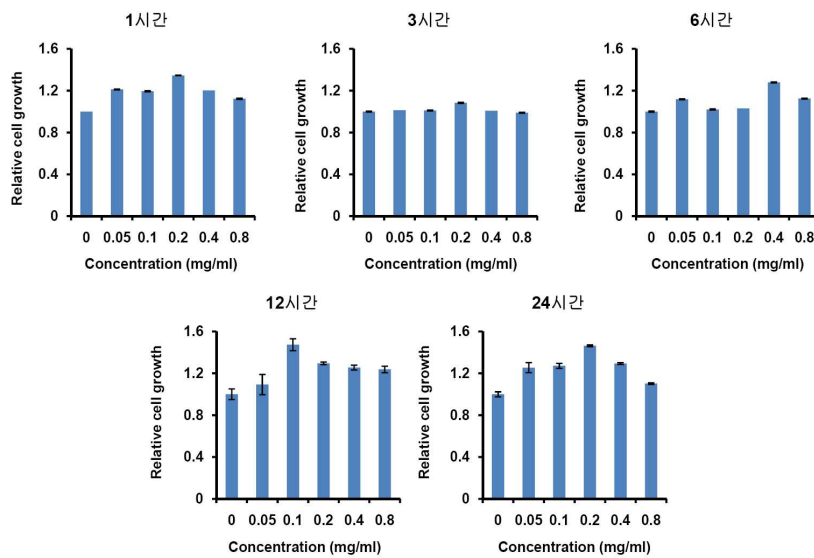


그림 21. 사람의 대장세포에 유청 단백질 나노담체를 처리하였을 때의 세포의 성장 비교

또한 위 세포주인 AGS세포에 각각의 시간에서 유청 단백질 나노담체를 시간별로 처리하고 세포의 모양을 관찰을 한 결과 세포에 독성의 영향은 주지 않는 것으로 확인할 수 있었다 (그림 21).

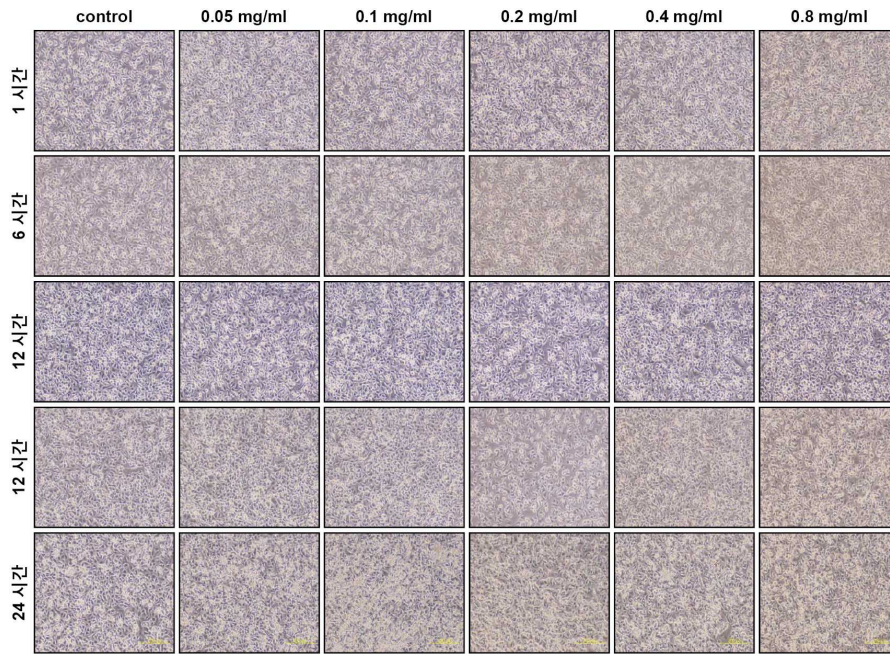


그림 22. 사람의 위 세포에 유청 단백질 나노담체를 농도별로 시간대별로 처리하였을 때의 세포의 모양 비교

이러한 결과들은 대장 세포주인 HT29에서도 동일한 결과를 볼 수 있었다. 12시간 이후에 세포의 성장이 약간 증가하는 결과를 보이고 있지만, 그 정도의 차이가 크지 않기 때문에 성장에 영향을 거의 주고 있지 않다고 할 수 있다 (그림 23).

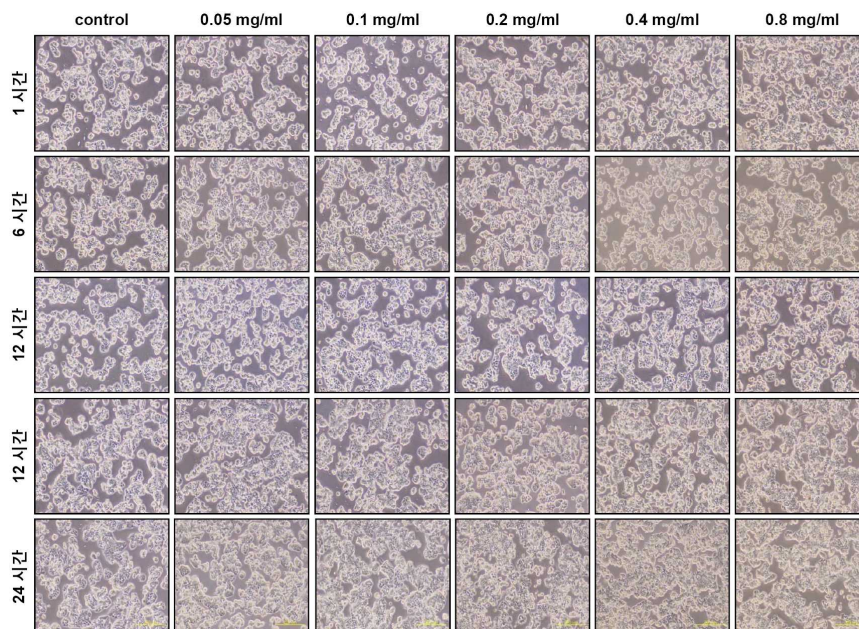


그림 23. 사람의 대장 세포에 유청 단백질 나노담체를 농도별로 시간대별로 처리하였을 때의 세포의 모양 비교

따라서 1차 년도에서 확인하였던 유청 단백질 자체가 세포에 독성의 영향을 미치지 않는 결과와 같이 유청 단백질을 이용하여 만든 나노담체를 사용하였을 때도 세포에 독성이 없는 것을 확인할 수 있었으며, 100 nm가량의 나노담체로 유청 단백질을 만들어서 처리하였을 때 그 자체에 의해 세포에 독성의 영향이나 세포의 성장에도 영향을 주지 않는 것으로 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과는 3차 년도에서 사용될 염산을 포함한 유청 단백질 나노담체의 효과를 분석하기 위한 실험을 하기 위한 기본이 되는 자료를 제공해주고 있다고 할 수 있다.

유청 단백질 나노담체를 처리하였을 때 세포의 모양이나 성장에는 크게 영향을 주지 않는 것을 확인한 결과를 토대로 이를 다시 증명하기 위해서 증식에 관여하는 유전자인 Ki-67을 염색하여 확인하였다. 유청 단백질 나노담체를 고농도로 사용하고 24시간 동안 처리를 한 결과 처리하지 않은 그룹의 세포에서와 같이 Ki-67 positive한 세포가 비슷하게 관찰이 되었고, 이는 두 가지 세포주 AGS와 HT29에서도 동일한 결과를 보이고 있었다 (그림 24). 따라서 유청 단백질 나노담체를 사람의 위와 대장의 세포에 처리하였을 때 세포의 성장에 영향을 거의 주지 않고 있다고 할 수 있고, 3차 년도에서 염산을 함유한 나노담체의 영향을 볼 때 기반이 되는 결과를 제공해주고 있다고 할 수 있다.

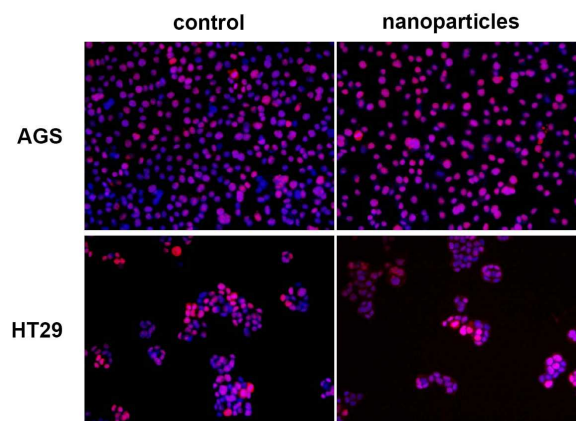


그림 24. 사람의 위와 대장의 세포주에 유청 단백질 나노담체를 처리한 후에 Ki-67로 immunofluorescence analysis 방법을 통해 나노담체 처리 유무가 세포의 증식에 영향을 없음을 증명 (red: Ki-67, blue: DAPI)

○ 사람의 세포내 유청 단백질 나노담체의 uptake 조건 규명

사람의 위와 대장에서 유청 단백질 나노담체의 uptake조건을 확립하기 위해 위의 결과를 토대로 하여 각각의 농도별과 시간별로 나노담체의 uptake되는 정도를 세포의 전체 protein양과 supernatant의 protein양을 각각 비교하여 확인해보았다. 우선, 사람의 위 세포주인 AGS 세

포에 유청 단백질 나노담체를 0, 0.5, 0.1 0.2 ,0.4, 0.8 mg/ml로 처리하고, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간동안 단백질의 양을 비교하여 확인하였다. 우선, supernatant의 단백질의 양을 분석하기 위해서 각 처리 군에 시간별로 supernatant를 취한 후에 bradford assay 방법을 통해 단백질의 양을 비교하였다. 그 결과 6시간 동안 0.05 mg/ml로 처리한 그룹에서 나노담체를 처리하지 않은 세포의 supernatant와 비교하여 차이를 보이지 않고 있었고, 이를 나노담체를 처리하지 않은 세포의 supernatant와 비교하였을 때 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과는 배양액 속에 있는 나노 담체가 세포로 uptake 되었다고 할 수 있다. 또한 같은 시간에서의 세포를 harvest한 후에 전체 protein의 양을 비교하였다. 유청 단백질 나노담체를 처리하지 않은 세포와 비교하였을 때, 전체 protein의 양도 6시간에서 증가하고 있는 것을 확인할 수 있어서 uptake에 가장 적합한 조건이 6시간 정도라고 확인할 수 있었다. 따라서, 세포내 총 단백질 양과 supernatant의 단백질 양의 비교 분석으로 세포내로 유청 단백질 나노담체가 6시간에서 uptake가 가장 잘되는 것을 확인할 수 있었다. 1시간 동안 처리했을 때도 각각의 supernatant와 전체 세포의 protein의 양을 비교한 결과 일부의 나노담체가 세포내로 uptake되고 있는 것을 확인할 수 있었으나, 3시간 정도 처리하였을 때는 일부의 나노담체가 release되거나 retention상태에 있어서 uptake에는 좋은 조건이 아니라고 판단이 되었다. 12시간과 24시간을 처리하였을 때는 uptake되는 양보다 release나 retention되는 단백질의 양이 증가하는 것으로 보여 나노담체의 uptake의 최적의 조건은 6시간으로 결론지을 수 있었다. 유청 단백질 나노담체를 농도별로 비교하여 확인하였을 때 기존의 보고에서는 나노담체의 양이 증가할수록 uptake되는 양이 증가하고 있었으나 이번에 사용한 나노담체의 경우에는 양이 증가하여도 세포내로 uptake되는 양은 증가하지 않았다. 또한 0.1 mg/ml이상의 고농도보다 오히려 낮은 농도 0.05 mg/ml에서 uptake가 더 잘 나타나고 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 25-28). 이를 나노담체를 처리하지 않은 세포를 기준으로 비교하였을 때는 이 결과를 더욱 극명하게 확인을 할 수 있어서 세포내로의 나노담체의 uptake의 가장 적합한 조건이 위 세포의 경우에는 0.05 mg/ml로 6시간 처리한 경우라고 결론을 내릴 수 있었다. 즉, 나노담체의 양을 증가하여도 실제로 세포내로 uptake되는 양은 0.05 mg/ml이하이기 때문에, 유용물질을 함유한 나노담체를 개발하였을 때에도 적은 양을 처리하는 것이 적합할 것으로 생각된다.

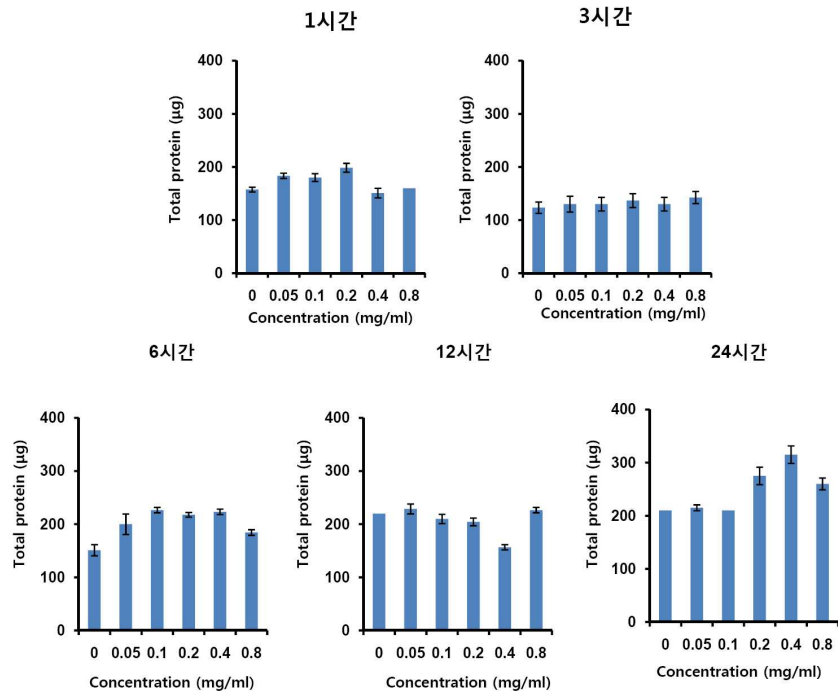


그림 25. 사람의 위 세포에 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포내 uptake 정도를 비교

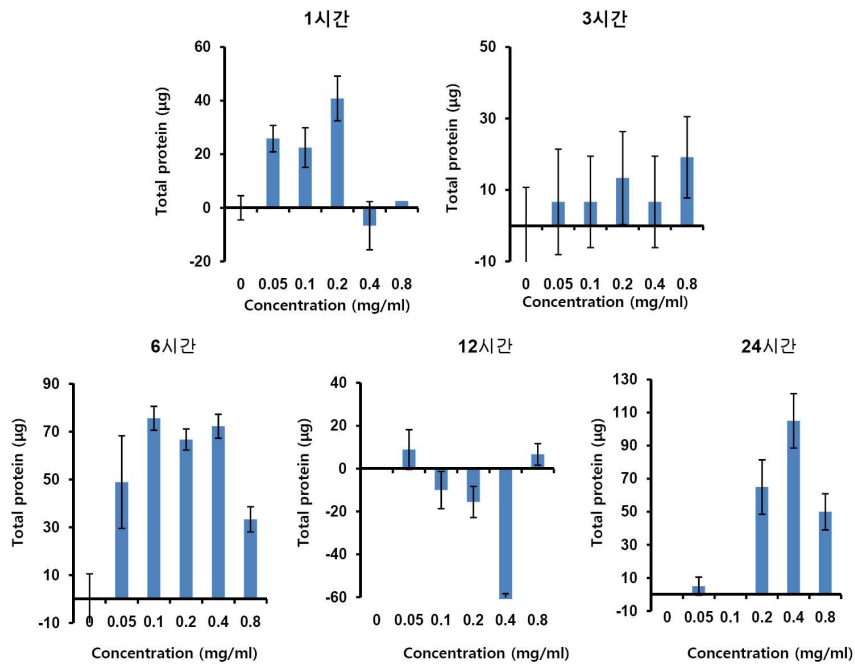


그림 26. 사람의 위 세포에 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포내 uptake 정도를 control을 기준으로 하여 차이 나는 정도를 비교

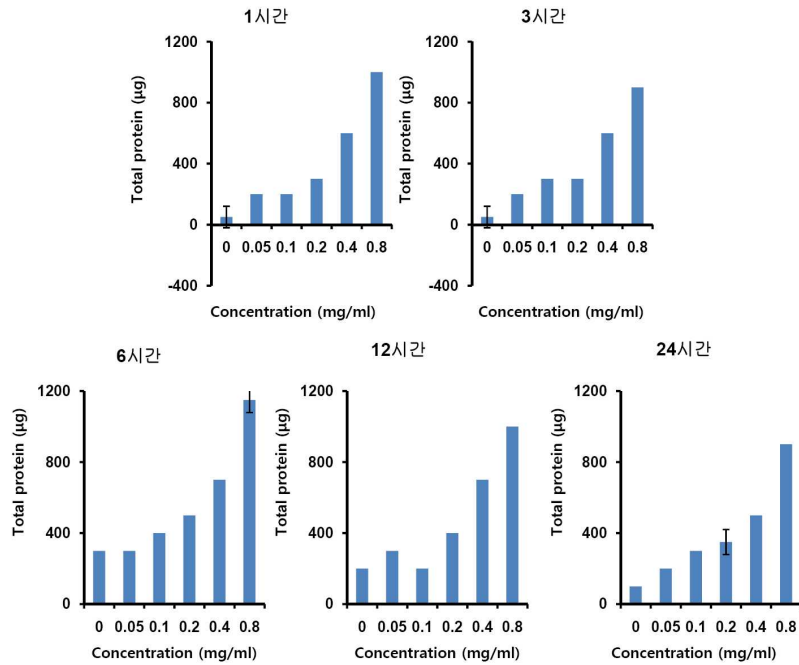


그림 27. 사람의 위 세포에 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포내 uptake 정도를 supernatant에 포함된 단백질 양을 측정하여 비교

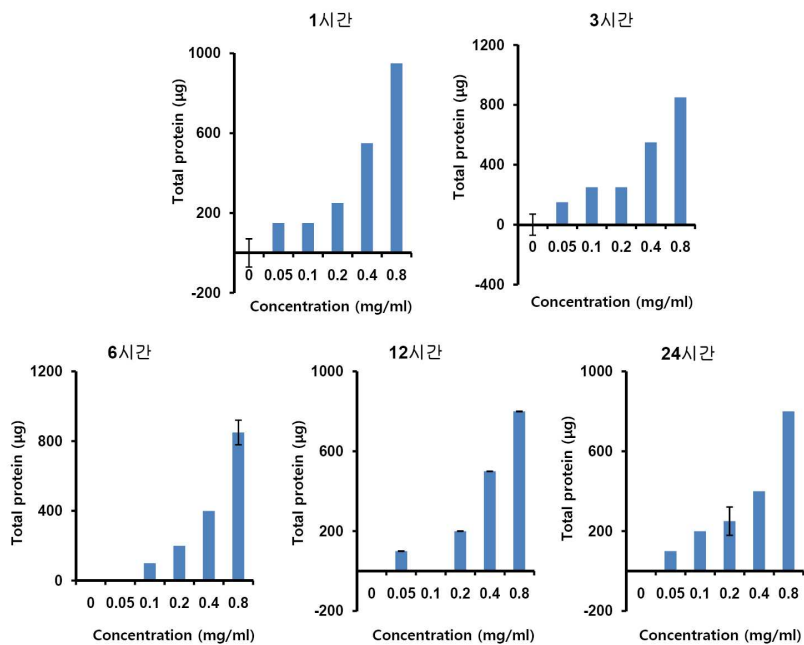


그림 28. 사람의 위 세포에 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때 세포내 uptake 정도를 supernatant에 포함된 단백질 양을 측정한 후 control과 비교해서 차이나는 정도를 비교

위의 결과를 토대로 하여 이번에는 사람의 대장 세포주인 HT29에도 동일한 방법으로 실험을 하여 확인을 해보았다. 12well plate에 seeding을 하고 세포가 80-100%정도 되었을 때 나노담체를 확립된 조건을 토대로 하여 처리를 하고 각각의 시간과 농도별로 비교하여 uptake의 최적의 조건을 찾아보았다. 각각의 농도별로 나노담체를 처리하고 시간별로 세포의 supernatant와 세포의 전체 protein의 양을 비교하여 uptake의 최적의 시간 및 농도 조건을 확인하였다. 처리한지 1시간이 되었을 때도 일부의 나노담체가 세포내로 uptake되는 것을 확인할 수 있었으나, 최적의 조건은 6시간 동안 0.05 mg/ml과 0.1 mg/ml로 처리한 그룹에서 uptake가 거의 다 일어나고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 고농도로 처리한 그룹에서 uptake되는 양이 증가하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이는 위 세포주를 가지고 실험했던 결과와 일치하는 경향을 보이고 있었다 (그림 29-32). 따라서 두 가지 사람의 세포주인 위 세포 및 대장의 세포주에 유청 단백질 나노담체를 처리한 결과 세포내로의 uptake의 가장 최적의 조건은 0.05 mg/ml로 6시간 동안 처리한 경우라고 할 수 있었다. 이 결과를 토대로 하여 3차 년도에서 엽산을 함유한 나노담체의 uptake의 최적 조건을 찾아 유용물질을 함유한 나노담체의 uptake의 최적의 조건을 확립하여 이를 유제품 개발에 이용할 수 있는 기반 자료로 활용할 계획에 있다.

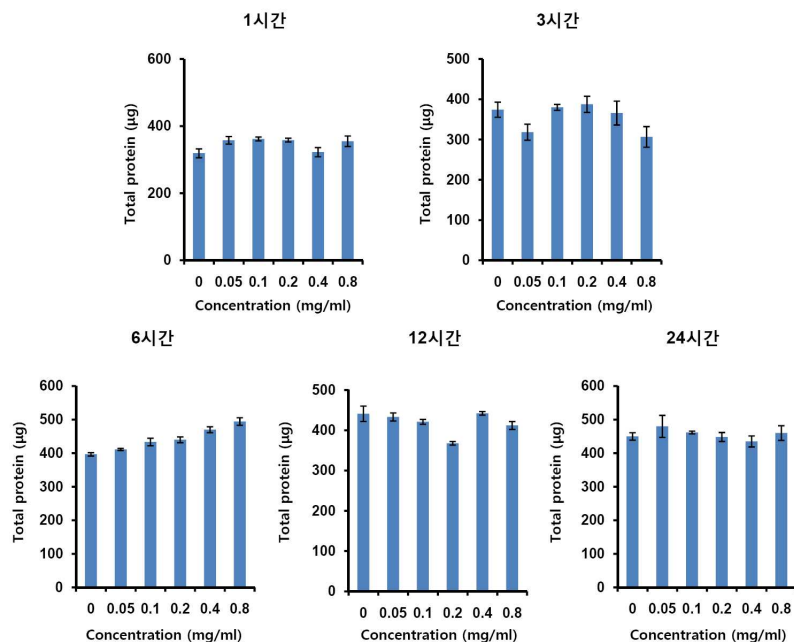


그림 29. 사람의 대장 세포에 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포 내 uptake 정도를 비교

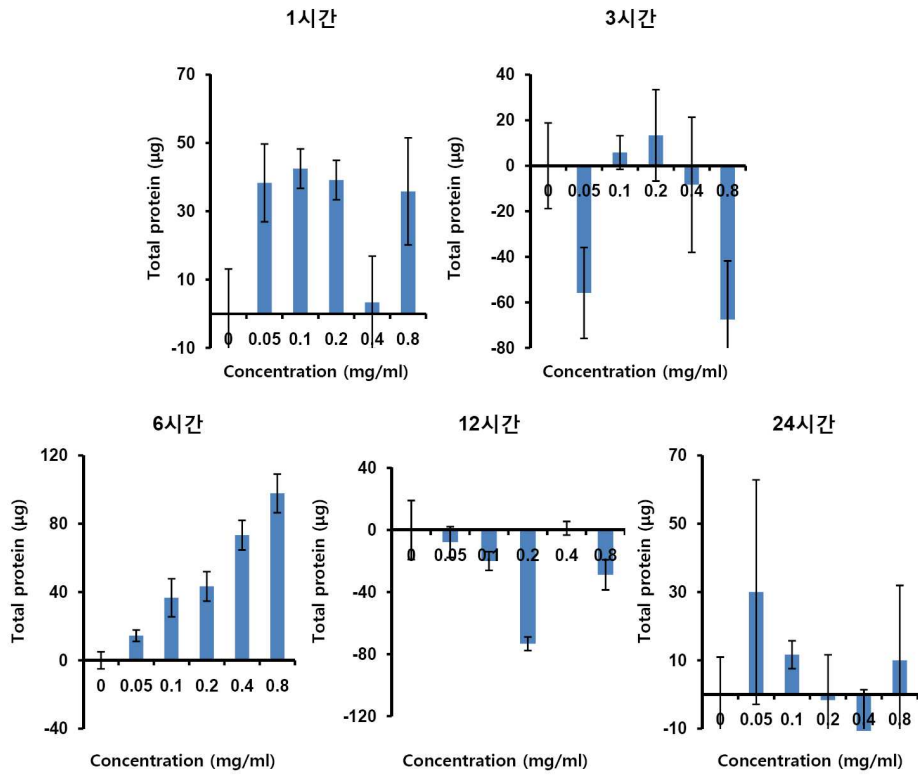


그림 30. 사람의 대장 세포에 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포 내 uptake정도를 control을 기준으로 하여 차이나는 정도를 비교

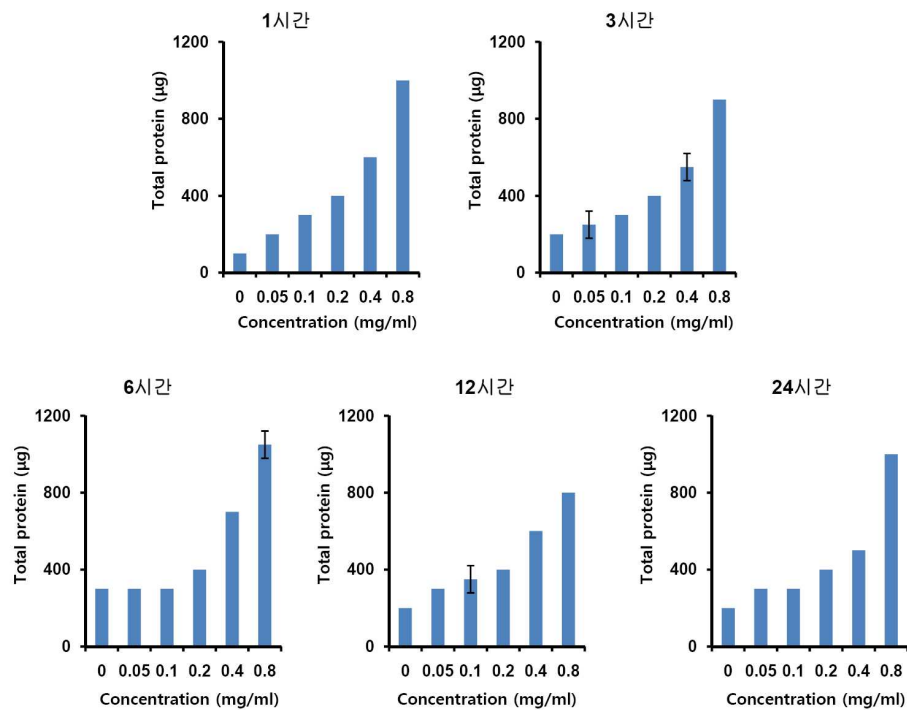


그림 31. 사람의 대장 세포에 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포 내 uptake정도를 supernatant에 포함된 단백질 양을 측정하여 비교

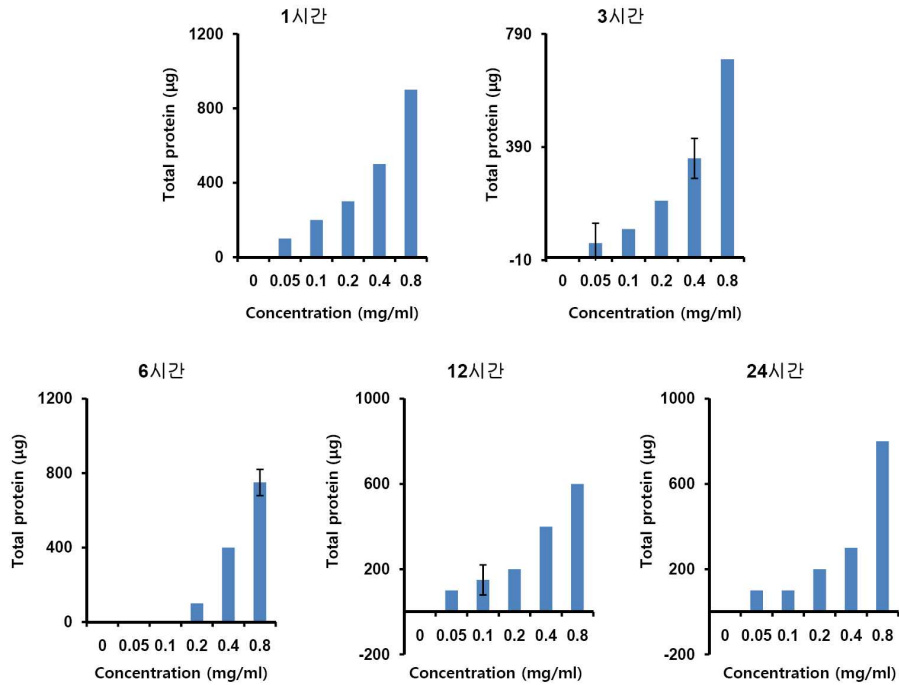


그림 32. 사람의 대장세포에 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포 내 uptake 정도를 supernatant에 포함된 단백질 양을 측정 후 control과 비교하여 차이나는 정도를 비교 분석

○ 사람의 세포내에서 유청 단백질 나노담체의 release 조건 및 retention 조건 규명

지금까지 결과를 토대로 하여 유청 단백질 나노담체의 uptake 조건을 확립하였고, 이를 토대로 하여 세포내로의 release조건 및 retention 조건을 규명하였다. 우선 세포내로의 나노담체가 uptake가 되는 초기 시점이 1시간이었기 때문에, 1시간 동안 나노담체를 처리한 후에 배지를 나노담체가 없는 배지로 바꿔준 후에 시간 별로 release되는 단백질의 양을 bradford assay 방법을 통해 측정하여 확인하였다. 1시간동안 나노담체를 처리하였을 때 세포내로 uptake되는 것을 다시 확인을 하였고, 그 후에 배지를 나노담체를 함유하지 않은 것으로 교환을 해 준 후 2시간이 되었을 때 supernatant를 취해 단백질의 양을 측정해보았다. 그 결과 나노담체를 처리하지 않은 그룹과 비교하여 차이를 보이지 않고 있었다. 그래서 시간별로 다시 확인을 해보았을 때, 일부의 나노담체가 release되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 33). 이는 두 가지 세포에서 비슷한 경향을 보이고 있는 것으로 확인이 되었고, 12시간 이후부터는 release되는 양이 증가하고 있는 것으로 확인이 되었다. 또한, 1시간부터 uptake가 되면서 3시간째에는 일부의 나노담체가 release되면서 retention도 함께 나타나고 있는 것을 볼 수 있었다. 이 결과를 통해 나노담체가 release되는 최적의 조건은 6시간 이후라고 할 수 있고,

retention은 그 전에 더 많이 일어나고 있는 것으로 확인할 수 있었다. 이를 통해 사람의 세포 내에서 유청 단백질 나노담체의 release와 retention 작용의 최적의 조건을 찾을 수 있었고, 3차년도에서 수행해야 할 실험인 엽산을 함유한 나노담체의 release와 retention조건을 찾는 데 기반이 되는 결과를 제공할 수 있다.

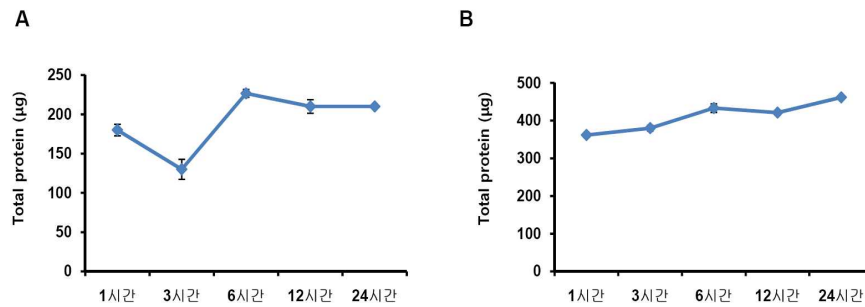


그림 33. 사람의 위 (A)와 대장 세포주 (B)에 유청 단백질 나노담체를 처리한 후에 세포내에서 release와 retention이 일어나는 최적의 조건을 규명

○ 유청 단백질 나노담체에 의한 세포내 대사 작용 규명

유청 단백질이 장내 유전자의 발현이 미치는 효과를 1차년도에서 규명을 하였고, 이를 토대로 하여 2차년도에서는 유청 단백질 나노담체를 만들어서 나노담체가 장내 유전자의 발현에 미치는 효과를 확인함으로써 세포내 대사 작용에 어떻게 관여하고 있는지를 확인하였다. 위와 대장의 세포주인 AGS와 HT29를 사용하여 위의 실험에서 확립된 조건을 토대로 하여 12시간 동안 나노담체를 처리한 후에 전체 RNA를 세포에서 extraction을 하여 각각의 유전자의 발현을 비교하여 분석하였다 (그림 34).

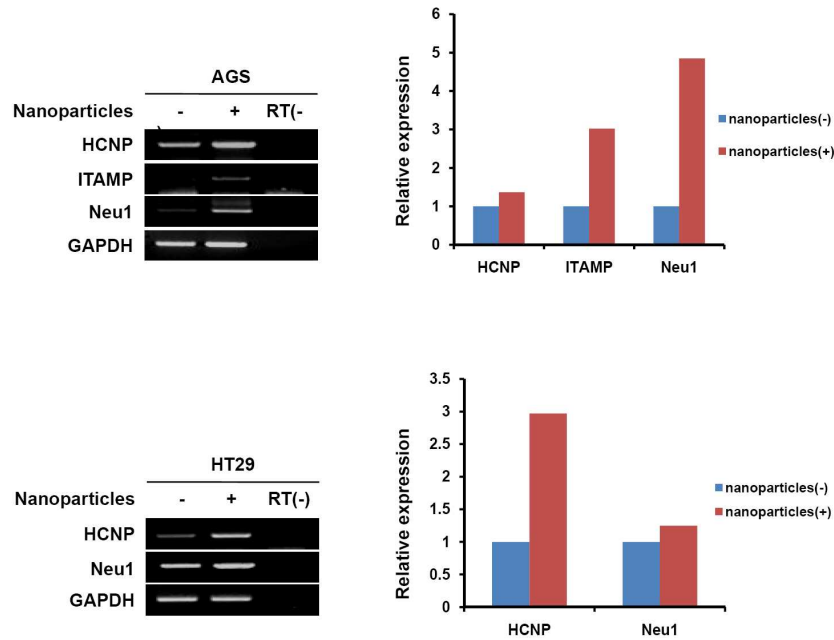


그림 34. 사람의 위 (A)와 대장의 세포주 (B) 에 유청 단백질 나노담체를 처리하였을 때의 장내 유전자들의 발현 양상 분석

Target 유전자의 선별은 1차 년도에서 확인하였던 유전자를 사용하였고, 이들 유전자의 발현이 유청 단백질 나노담체를 처리한 그룹에서 증가하고 있는지 여부를 확인하였다. 이 때, GAPDH 유전자를 internal control로 사용하였다. 몇 가지의 유전자의 발현이 유청 단백질 나노담체를 처리한 그룹에서 증가하고 있는 것을 RT-PCR을 통해 확인할 수 있었고, 이를 나노담체를 처리하지 않은 그룹의 세포를 기준으로 다시 확인을 한 결과 나노담체를 처리한 그룹에서 몇 가지의 유전자들이 확연히 증가하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 선별된 유전자들마다 발현의 정도의 차이가 약간은 차이를 보이고는 있었지만, 비슷한 경향으로 유청 단백질 나노담체를 처리한 그룹에서 증가하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

▶ 이 결과를 토대로 하여 3차 년도에서 엽산을 encapsulation 한 나노담체의 세포생리학적 특성 및 장내 대사 작용에 어떻게 관여하고 있는지를 규명하려고 한다. 2차년도 결과를 토대로 하여 3차년도에서 엽산을 함유한 나노담체를 이용하여 이를 다시 사람의 세포주인 위와 대장의 세포주에 적용을 하여 세포내로 나노담체가 uptake되는 조건과 release, retention되는 조건을 확립을 하려고 한다. 또한, 엽산을 함유한 나노담체가 장내의 대사 작용에 어떤 작용을 하는지를 규명을 하고, 이를 토대로 하여 유용물질의 효과적인 전달 시스템을 구축하여 유제품의 개발에 적용하는 기반이 되는 자료를 제공하려고 한다.

○ 사람의 위와 대장 세포에서 folic acid (엽산) 이 함유된 유청 단백질 나노담체가 세포의 성장 및 독성에 미치는 영향 분석

실험에 사용된 세포주는 2차 년도에 사용했던 사람의 위와 대장 세포주인 AGS, HT29를 사용하였으며 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 uptake를 최적화 하기위한 배양액을 선별하기위해 다음과 같은 실험을 하였다. 1차년도 유청 단백질 나노담체의 처리조건을 serum free 에서 확인을 하였기에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 uptake를 최적화 조건을 잡기 위한 실험도 serum free 조건에서 실행 하였고, 사람의 위와 대장의 세포주에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 각각 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.8 mg/ml의 농도로 각각 0, 1, 3, 6, 12, 24 시간동안 처리하여 최적의 농도와, 시간별 cell 에 미치는 영향을 Cell growth curve를 그려 살펴보았다. 이때 사람의 위와 대장의 세포주에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체 0.1 mg/ml 농도로 3시간 처리 하였을 때 세포의 성장에 좋은 영향을 미치는 것을 확인하였고 2차 년도와 비슷한 양상을 보이는 것을 알 수 있다 (그림 35).

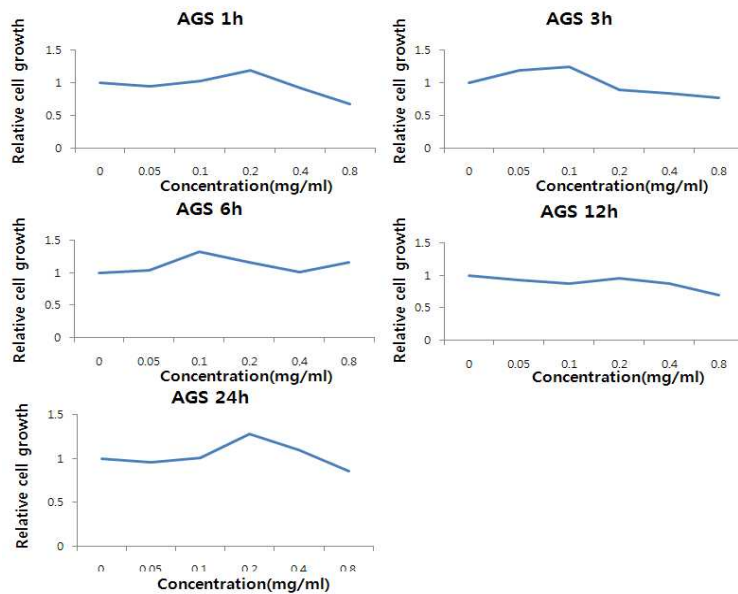


그림 35. 사람의 위와 대장의 세포주에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 처리 조건 규명. A. 사람의 위 세포주 (AGS)

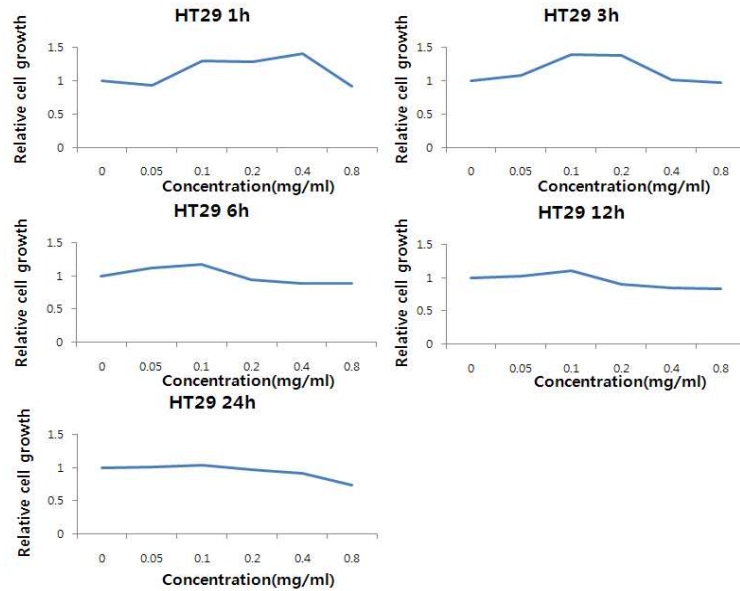


그림 36. 사람의 위와 대장의 세포주에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 처리 조건 규명. B. 사람의 대장 세포주 (HT29)

유청 단백질 나노담체를 처리할 때 pH의 영향을 살펴보았을 때 낮은 pH 에서는 cell 에 매우 toxic 한 영향을 주는 것을 확인 하였기에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 pH 영향을 살펴 보기위해서 각각 pH 7.0 과 8.0 의 조건에 가장 좋은 농도 및 시간 조건인 0.1 mg/ml 농도로 3시간 처리 후 세포 내로의 uptake 정도를 확인하였다. 사람의 위, 대장 세포에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리하지 않은 배지를 control로 잡고 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체 각각 pH 7.0 과 8.0 의 조건에서 0.1 mg/ml 농도로 3시간 처리 하였을 때 세포 내로의 uptake가 잘 이루어진다는 것을 알 수 있다 (그림 37).

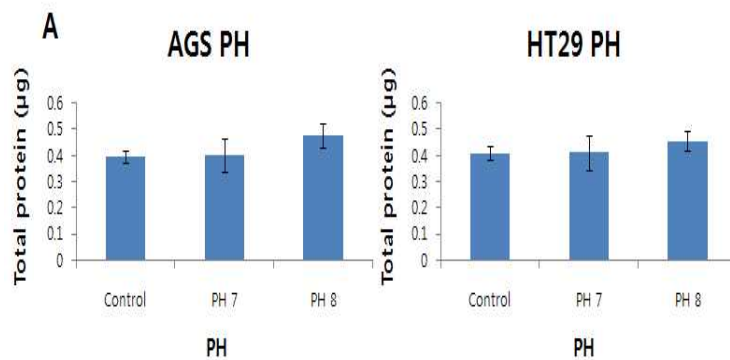


그림 37. 사람의 위, 대장 세포주에 pH에 따른 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 uptake 비교.

이를 다시 확인하기 위해서 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리하지 않은 세

포의 전체 protein의 양을 기준으로 나노담체를 처리한 그룹의 전체 protein 양을 비교한 결과, 각각 pH 7.0-8.0에 0.1 mg/ml 농도로 3시간 처리 후 세포내로의 uptake가 일어나는 것을 전체 protein의 양의 증가로 확인할 수 있었다 (그림 38). 따라서 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 serum이 없는 배지에서 pH 7.0-8.0일 때, 0.1 mg/ml 농도 3시간동안 처리한 그룹에서 세포 내로의 uptake가 가장 잘 나타나는 것으로 보아 일반적으로 세포를 배양하는 pH 조건에서 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리하는 것이 가장 적절하다고 결론을 내릴 수 있었다.

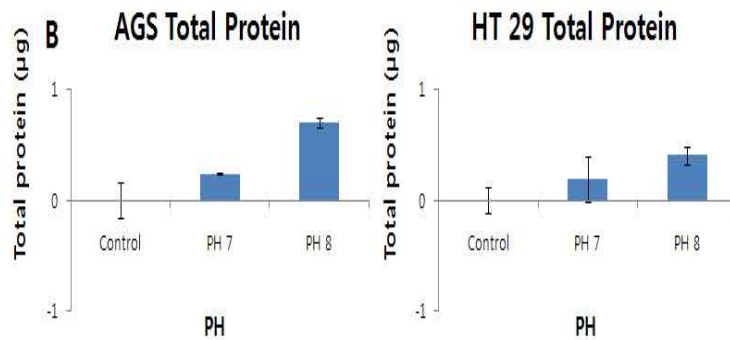


그림 38. 사람의 위, 대장 세포주에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 pH 별로 처리한 후에 세포 내 uptake 비교 분석.

위 실험들을 선행연구를 통해 비교하여 보았을 때 사람의 위, 대장 세포에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 pH 7.0-8.0에 0.1 mg/ml 농도로 3시간 처리 한 후 전체 protein의 양이 유의성 있게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 다음 실험을 모두 위의 조건을 기준으로 진행하였다. 따라서 2차 년도에서 확인하였던 유청 단백질 자체가 세포에 독성의 영향을 미치지 않는 결과와 같이 folic acid (엽산) 유청 단백질을 이용하여 만든 나노담체를 사용하였을 때도 세포에 독성이 없는 것을 확인할 수 있었으며, folic acid (엽산) 나노담체로 유청 단백질도 나노담체 유청 단백질과 같이 그 자체에 의해 세포에 독성의 영향이나 세포의 성장에도 영향을 주지 않는 것으로 확인할 수 있었다. Folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리하였을 때 세포의 모양이나 성장에는 크게 영향을 주지 않는 것을 확인한 결과를 토대로 이를 다시 증명하기 위해서 증식에 관여하는 유전자인 Ki-67을 염색하여 확인하였다. Folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 0.1 mg/ml 농도로 3시간 처리하였고 처리하지 않은 그룹의 세포에서와 같이 Ki-67 positive한 세포가 비슷하게 관찰이 되었고, 이는 두 가지 세포주인 AGS와 HT29에서도 동일한 결과를 보이고 있었다 (그림 39). 따라서 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 사람의 위와 대장의 세포에 처리하였을 때 세포의 성장에 영향을 거의 주지 않고 있다고 할 수 있다.

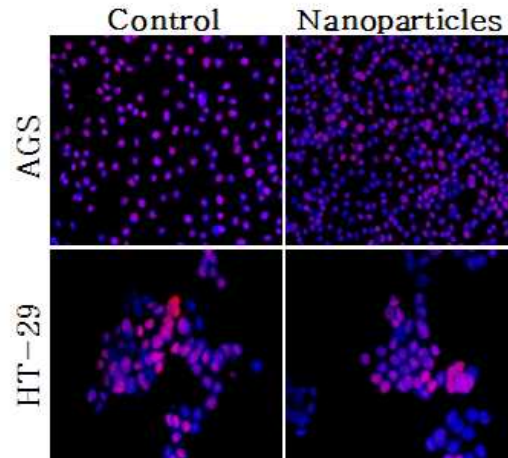


그림 39. 사람의 위와 대장의 세포주에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리한 후에 Ki-67로 immunofluorescence analysis 방법을 통해 나노담체 처리 유무가 세포의 증식에 영향이 없음을 증명 (red: Ki-67, blue: DAPI)

○ 사람의 세포 내 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 uptake 조건 규명

사람의 위와 대장 세포에서 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 uptake 조건을 확립하기 위해 위의 결과를 토대로 하여 각각의 농도별과 시간별로 나노담체의 uptake되는 정도를 세포의 전체 protein양과 supernatant의 protein양을 각각 비교하여 확인해보았다.

사람의 위와 대장 세포주에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml 농도를 시간과 6시간을 처리한 후 단백질의 양을 비교 하였다. 먼저 supernatant의 단백질의 양을 분석하기 위해서 각 처리군에 시간별로 supernatant를 취한 후에 bradford assay 방법을 통해 단백질의 양을 비교하였다. 그 결과 위 세포주에서 3시간과 6시간 처리 후 대부분 모든 농도에서 세포 내로 uptake 되지만 0.1-0.2 mg/ml 농도일 때가 가장 잘 세포내로 uptake 되는 것을 확인 할 수 있다. 2차년도 결과와 마찬가지로 많은 양을 함유 하는 것 보다는 적정 농도를 사용하는 것이 더욱 효율적이라는 것을 알 수 있다 (그림 40-43).

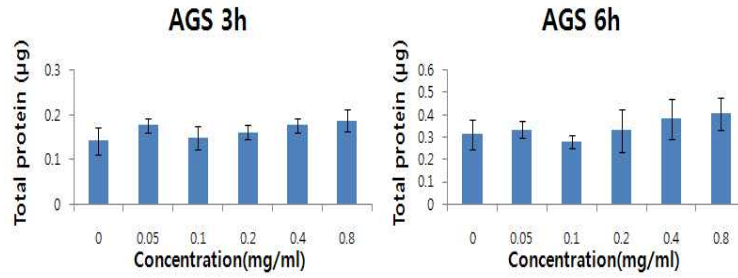


그림 40. 사람의 위 세포에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포 내 uptake 정도를 비교

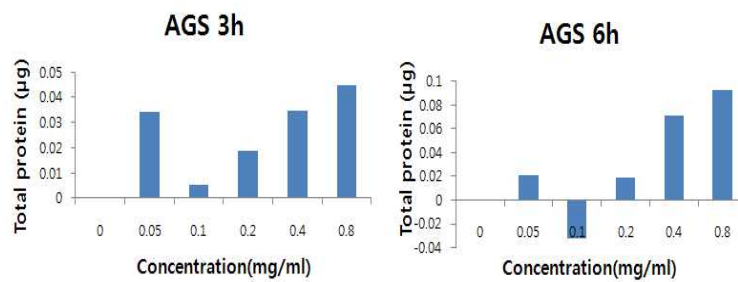


그림 41. 사람의 위 세포에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때 세포 내 uptake 정도를 supernatant에 포함된 단백질 양을 측정 후 control과 비교해서 차이 나는 정도를 비교

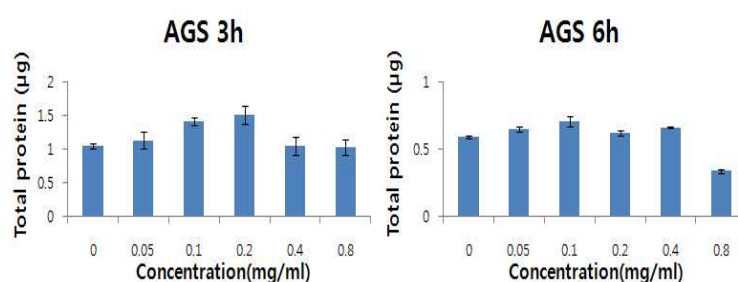


그림 42. 사람의 위 세포에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포 내 uptake 정도를 total 단백질 양을 비교

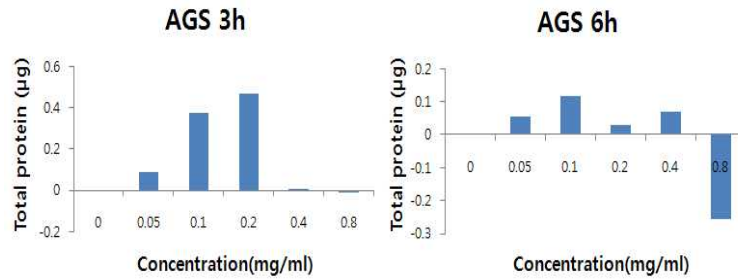


그림 43. 사람의 위 세포에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포 내 uptake 정도를 control을 기준으로 하여 차이나는 정도를 비교

위의 결과를 토대로 하여 이번에는 사람의 대장 세포주인 HT29에도 동일한 방법으로 실험을 하여 확인을 해보았다. 12well plate에 seeding을 하고 세포가 80-100%정도 되었을 때 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체 처리 최적조건을 토대로 하여 처리를 하고 각각의 시간과 농도별로 비교하여 uptake의 최적의 조건을 찾아보았다. 각각의 농도별로 나노담체를 처리하고 각각 3시간, 6시간 별로 세포의 supernatant와 세포의 전체 protein의 양을 비교하여 uptake의 최적의 시간 및 농도 조건을 확인하였다. 대장 세포 역시 3시간과 6시간 처리 후 대부분 모든 농도에서 세포 내로 uptake 되지만 0.1- 0.2 mg/ml 농도일 때가 가장 잘 세포내로 uptake 되는 것을 확인 할 수 있다. 또한, 고농도로 처리한 그룹에서 uptake되는 양이 증가하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이는 위 세포주를 가지고 실험했던 결과와 일치하는 경향을 보이고 있었다 (그림 44-47). 따라서 두 가지 사람의 세포주인 위 세포 및 대장의 세포주에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리한 결과 세포내로의 uptake의 가장 최적의 조건은 0.1-0.2 mg/ml로 3, 6시간 동안 처리한 경우 비슷한 효과를 가지는 것을 토대로 적은농도 및 적은 시간 처리인 0.1 mg/ml로 3시간 이 가장 최적의 효과를 볼 수 있다.

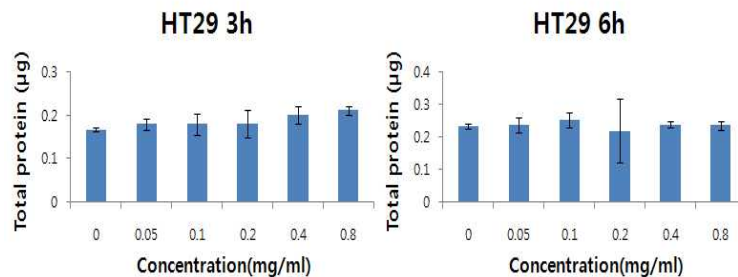


그림 44. 사람의 위 세포에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리하였을 때의 세포 내 uptake 정도를 비교

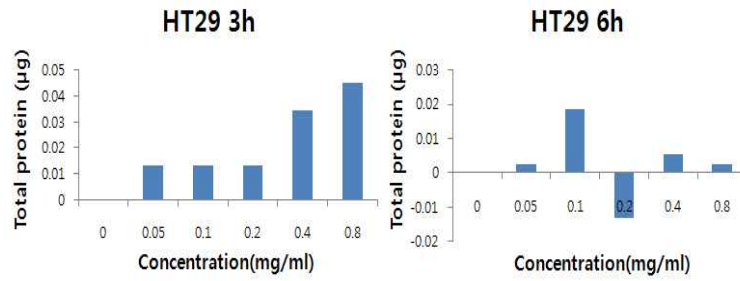


그림 45. 사람의 대장 세포에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리 하였을 때 세포 내 uptake 정도를 supernatant에 포함된 단백질 양을 측정 한 후 control과 비교해서 차이 나는 정도를 비교

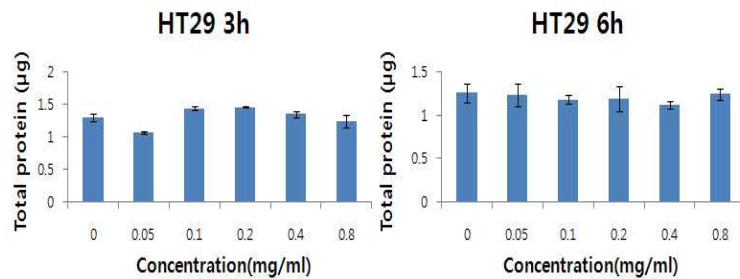


그림 46. 사람의 대장 세포에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리 하였을 때의 세포 내 uptake 정도를 total 단백질 양을 비교

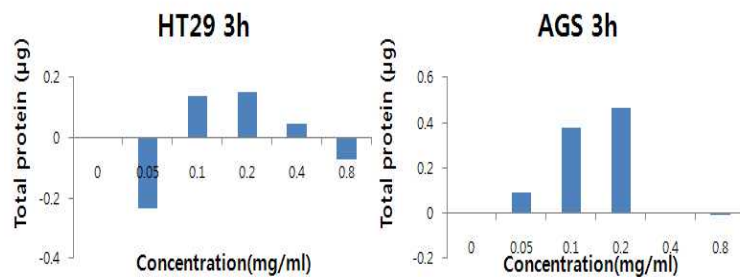


그림 47. 사람의 대장 세포에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 농도와 시간별로 처리 하였을 때의 세포 내 uptake 정도를 control을 기준으로 하여 차이 나는 정도를 비교

○ 사람의 세포내에서 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 release 조건 및 retention 조건 규명

지금까지 결과를 토대로 하여 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 uptake 조건을 확립하였고, 이를 토대로 하여 세포내로의 release 조건 및 retention 조건을 규명하였다. 위의 실험을 통해 밝혀낸 최적의 처리 조건을 토대로 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 0.1 mg/ml로 3시간 처리를 한 후에 배지를 나노담체가 없는 배지로 바꿔준 후 2차년도 실험에서 각각 6시간 이후부터 release 된 것을 확인하였기에 이번 실험에서는 6시간과 12시간 별로 release되는 단백질의 양을 bradford assay 방법을 통해 측정하여 확인하였다 (그림 48). 이때 두 가지 세포에서 비슷한 경향을 보이고 있는 것으로 확인이 되었다. 6시간 이후부터 release 되는 양이 증가하고 있는 것으로 확인 되었으며 6시간부터 12시간까지 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체가 release되면서 retention도 함께 되는 것으로 나타났다. 이 결과를 통해 실험을 통해 밝혀진 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체 최적조건 처리 6시간 이후부터는 release와 retention이 일어나는 것을 확인할 수 있고, 이를 통해 사람의 세포내에서 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체의 release와 retention작용의 최적의 조건을 찾을 수 있었다.

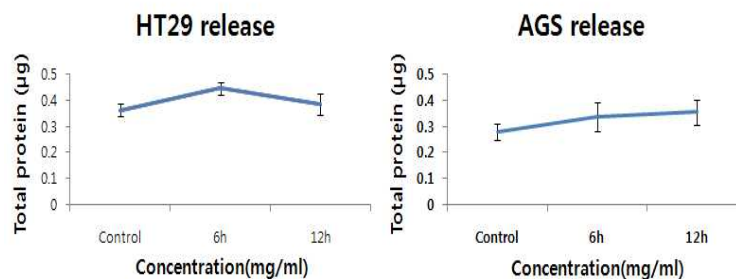


그림 48. 사람의 위 (A)와 대장 세포주 (B)에 유청 단백질 나노담체를 처리한 후에 세포내에서 release와 retention이 일어나는 최적의 조건을 규명

○ folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체에 의한 세포내 대사 작용 규명

Folic acid (엽산) 유청 단백질이 장내 유전자의 발현에 미치는 효과를 1차 년도에서 규명을 하였고, 이를 토대로 하여 2차년도 에서는 유청 단백질 나노담체를 만들어서 나노담체가 장내 유전자의 발현에 미치는 효과를 확인하였으며 위 실험을 기반으로 이번 3차 년도에는 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체가 장내 유전자의 발현에 미치는 효과를 확인함으로써 세포내 대사 작용에 어떻게 관여하고 있는 지를 확인하였다. 위와 대장의 세포주인 AGS와 HT29를 사용하여 위의 실험에서 확립된 조건을 토대로 하여 0.1 mg/ml 농도로 3시간 동안

folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리한 후에 RNA를 extraction을 하여 각각의 유전자의 발현을 비교하여 분석하였다 (그림 49).

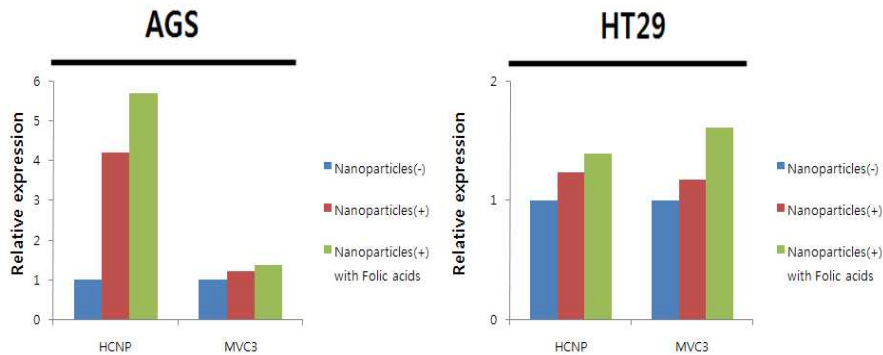


그림 49. 사람의 위 (A)와 대장의 세포주 (B) 에 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리하였을 때의 장내 유전자들의 발현 양상 분석

▶ 2차년도 결과에서 유청 단백질 나노담체를 처리한 군에서 장내 대사 작용에 영향을 미치는 유전자들의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이번 3차년도의 결과로 미루어 보아 사람의 위, 대장 세포주에 유청 단백질 나노담체를 처리 하지 않은 군, 유청 단백질 나노담체를 처리 한 군, 그리고 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리한 후, 세 군의 유전자 발현을 살펴 본 결과, 몇 가지의 유전자의 발현이 나노담체를 처리 하지 않은 군 보다 유청 단백질 나노담체 및 folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리한 그룹에서 증가하고 있는 것을 RT-PCR을 통해 확인할 수 있었다. 유청 단백질 나노담체를 처리한 군과 Folic acid (엽산) 유청 단백질 나노담체를 처리한 군을 비교 하였을 때 folic acid (엽산) 유청 단백질을 처리한 군에서 더 높은 유전자 발현이 이루어지는 것을 보아 유청 단백질 나노담체에 folic acid (엽산)를 첨가 하였을 때 사람의 위와 대장에서 대사 작용에 더 좋은 효과가 있음을 확인할 수 있다. 이는 현재 엽산 (Folic Acid)은 우유 중의 부족한 영양성분으로 유제품 가공공정인 열처리에 민감하며, 또한 우유에 직접 첨가 시 우유 단백질과 반응하여 응고되는 문제점이 있어 이에 대한 해결책이 필요한 실정이다. 이에 위의 결과로 미루어 보아 나노담체에 folic acid (엽산)를 첨가하여 유제품을 생산하였을 경우 장내 대사에 좋은 효과를 볼 수 있을 것 이라고 생각된다.

제 2 협동과제 (한국식품연구원) : 나노담체 함유 고기능성 유제품 생산 공정 개발 및
제품 적성 평가

○ pH 변화 조건에 따른 나노담체의 입도 측정

유제품 생산 공정 조건 중 하나인 pH 에 따른 나노담체의 크기를 측정하기 위하여 입도 분석기 (Microtrac nanotrac 250, Microtrac Inc., USA)를 사용하였다. 입도 측정 전 수용액상의 거품을 제거한 후 분석하였다. 아래의 그림 1은 pH에 따른 나노담체의 입도 변화를 나타낸 결과이다.

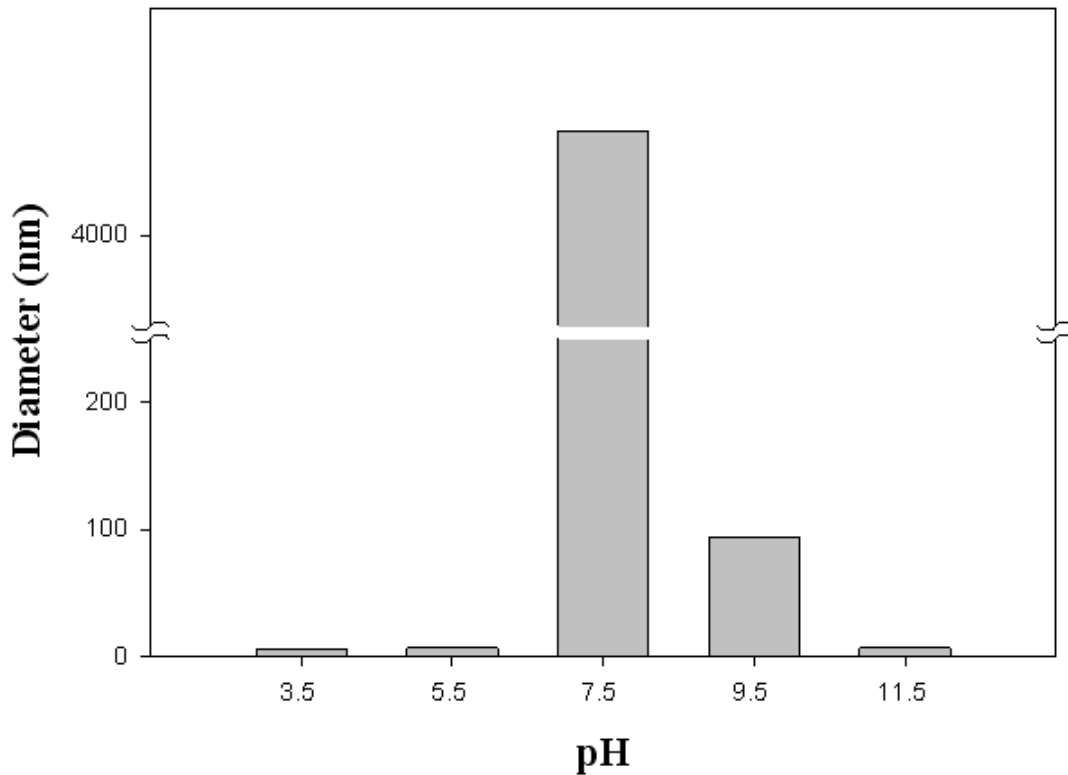


그림 1. pH에 따른 나노담체의 입도 분석.

Swelling, elasticity, deformability 및 파괴에 대한 저항성 등의 성질은 pH 및 제조 조건에 영향을 받게 되며 나노담체의 미세구조 또한 환경조건 즉, pH 및 소화효소 등에 대한 민감도 차이로 인해서 iron delivery에 주로 영향을 주게 된다. β -lg 나노담체 제조 시 pH를 조절하여 나노담체 크기에 주는 영향을 알아보았다. pH 3.5, 5.5, 11.5일 경우 입자의 크기는 모두

약 7 nm를 보였고 젤이 형성되지 않았다. 그리고 pH 7.5 (4230 nm)의 경우 pH 9.5 (93 nm)에 비해 입자의 크기가 크게 증가하였으며 응집현상을 보였다. 아래의 그림 2는 β -lg 나노담체 제조 후 다시 pH를 조절하여 입도 변화를 관찰한 결과이다. Morr and Ha (1993)는 pepsin 분해 assay를 통한 연구에서 native β -lg의 경우 denatured β -lg 혹은 칼슘 이온과 cross-linked 된 denatured β -lg에 비해서 산 혹은 pepsin에 대한 저항성이 높다고 하였다. 그림 2에서 pH 9.5에서 pH 6으로 낮아질수록 입도가 증가하는 것을 볼 수 있고 (59 nm ~ 69 nm)형성된 나노담체에 큰 영향을 주지 않는 것으로 보이나 β -lg의 pI값에 가까운 pH 4, 5의 경우에 입자의 크기가 각각 4340, 4210 nm로 크게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 pH값이 3이하로 낮아질 경우 다시 입자의 크기는 감소하는 경향을 보였으며 pH 2가 되면 입자 크기가 90 nm로 감소하였다.

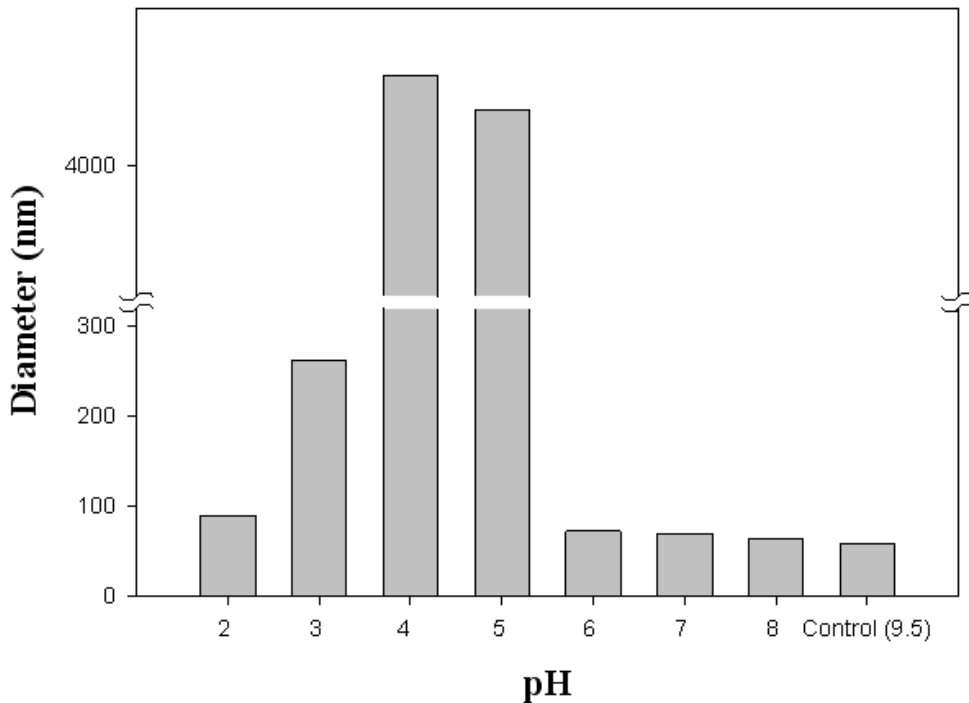


그림 2. β -lg 나노담체 제조 후 pH 변화에 따른 나노담체의 입도 분석.

아래의 그림 3은 나노담체 제조 후 다시 pH를 조절하여 색의 변화를 관찰한 결과이다. 사진 상으로는 보이지 않지만 pH 7.5의 경우 입자의 크기 변화가 육안으로 관찰되었다.



그림 3. β -lg 나노담체 제조 후 pH에 따른 색 변화.

○ pH 변화에 따른 β -lg 나노담체의 형태학적 구조 비교 및 평가

유제품 생산공정 요인인 pH 변화에 따른 β -lg 나노담체의 형태학적 구조를 비교 분석하기 위해 4 mM CaCl_2 (calcium chloride, SIGMA-ALDRICH, Inc., USA) 용액을 1% (w/w) β -lg 수용액에 첨가한 다음 교반기를 이용해 5분간 교반 한 후, 0.025 N NaOH, 0.025 N HCl 용액을 사용하여 pH 3.5, 5.5, 7.5, 9.5, 11.5로 각각 조정하였다. 그 후 β -lg 수용액을 항온수조에서 65°C로 10분간 열처리 한 후, TEM을 사용하여 나노담체 형성 및 형태학적 구조를 비교 평가하였다. 그 결과 pH가 3.5와 5.5 인 경우 매우 작은 크기의 입자가 형성 되었고 pH가 9.5로 증가함에 따라 입자 크기가 증가하였음을 알 수 있었다 (그림 4).

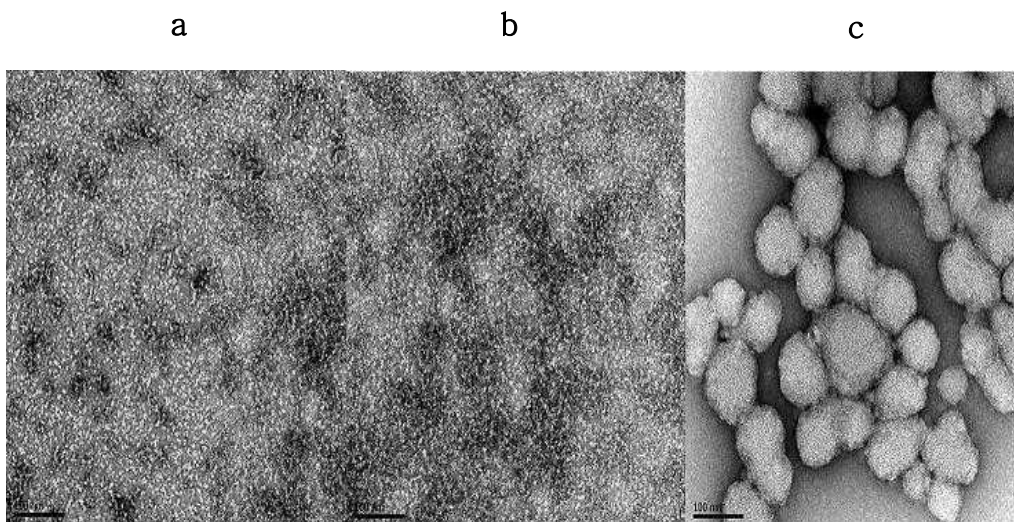


그림 4. pH 변화에 따른 나노담체의 나노구조. (a) pH 3.5, (b) pH 5.5, (c) pH 9.5. Scale bar = 100 nm.

○ Folic acid (엽산) 함유 나노담체의 입도 분석

아래의 그림 5는 folic acid를 첨가하여 형성된 나노담체의 입도의 변화를 나타낸 결과이다.

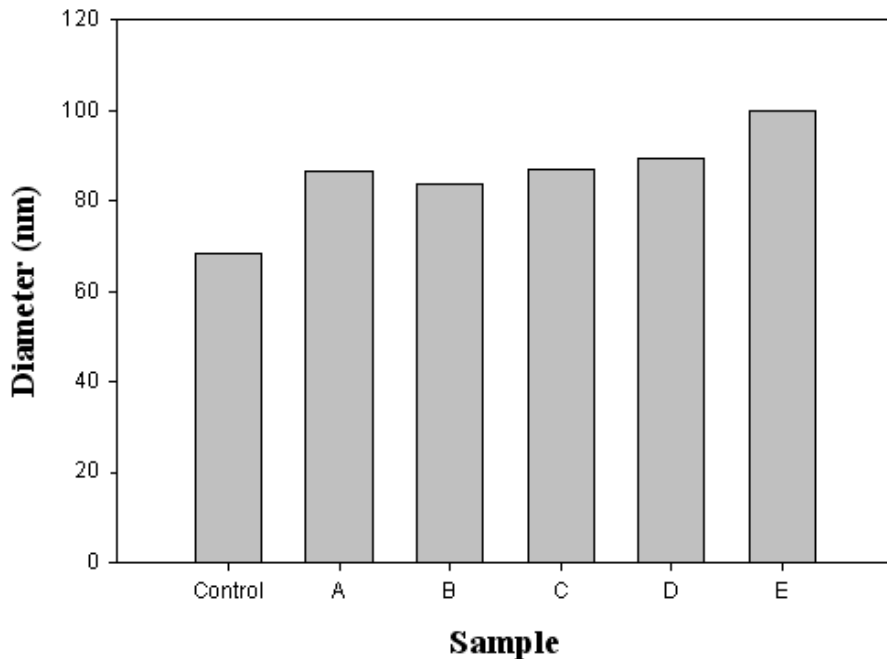


그림 5. Folic acid 농도에 따른 입도 분석. (Folic acid의 농도를 조절하여 첨가한 나노담체시료이다. Control : folic acid를 첨가하지 않은 나노담체, A : 4 ug/g, B : 8 ug/g, C : 12 ug/g, D : 16 ug/g, E : 20 ug/g).

천연 혹은 합성 고분자를 기본으로 한 나노입자 제조 시스템(nanoparticulate system)은 식품산업에서 이용 가능하며, 단백질을 기본으로 한 나노입자의 경우 많은 관심의 대상이 되어 왔는데, 이는 이들의 제조가 매우 쉽고 입도 분포를 제어할 수 있기 때문이다 (Macadam, Shafi, James, Marriot and Martin, 1997). 이들을 응용하여 다당류, 지질 또는 다른 고분자와 함께 복합분체(composite)를 제조할 수 있다 (Weyermann, Lochmanna, Georgnsa and Zimmer, 2005). 마이크로입자란 일반적으로 1000 μm 이하의 물질로서, polymer matrix 안에 solid, liquid 혹은 gaseous materials 등이 포집되어 있거나, 표면에 부착 혹은 conjugation된 것을 의미하며 (Allemann, Lerous and Gurny, 1998; Langera, Coestera, Webera, Briesenb and Kreuter, 2000). Nanotechnology란 100 nm이하의 기능성 물질을 개발하는 것을 말한다 (Lan et al., 2005; Vo-Dinh, 2005). 나노입자는 nutraceutical compounds, 특히 functional lipids (e.g. carotenoids, phytosterols, ω -3 fatty acids), 천연 향산화제 및 다양하게 식품에 사

용되는 화합물과 같은 용해도가 낮은 물질들의 생체적합성을 개선하는데 매우 유익하며, intestinal clearance mechanisms의 영향을 감소시킴으로써 GI tract 내에서의 머무름 시간 (residence time)을 지연시킬 수 있고 (Kawashim, 2001; Peppas, 1995; Arbos, Arangoa, Campanero, and Irashe, 2002), fine capillaries를 통해서 조직 깊숙한 곳까지 침투할 수 있다. 그림 5에서 나타난 바와 같이, folic acid가 첨가된 나노담체의 입자는 대조구에 비해 입자의 크기가 증가하는 경향을 보였다. 대조구는 입도는 68 nm이고 4 ug/g의 folic acid가 첨가된 시료의 입도는 86 nm이다. 또한 Folic acid의 첨가량이 20 ug/g인 경우 대조구와 비교하여 더 큰 입도의 차이를 보였다. 아래의 그림 6은 folic acid의 첨가량이 높을 경우 나노담체의 입도 변화를 나타낸 결과이다. 대조구의 입도는 68 nm이고 5 mg/g의 folic acid가 첨가된 입도는 37 nm를 나타내었다. Folic acid의 농도가 증가할수록 입도는 감소하는 경향을 보였으며 10 mg/g의 folic acid가 첨가된 나노담체의 입도는 4 nm를 나타내었다. Folic acid를 첨가할 경우 농도가 높을 경우 그림 5와는 반대로 입도는 감소하는 경향을 보였다. Folic acid의 양이 20 ug/g이 첨가된 시료의 입도는 99 nm이고 2 mg/g이 첨가된 시료의 입도는 36 nm로 그 값이 감소됨을 알 수 있다.

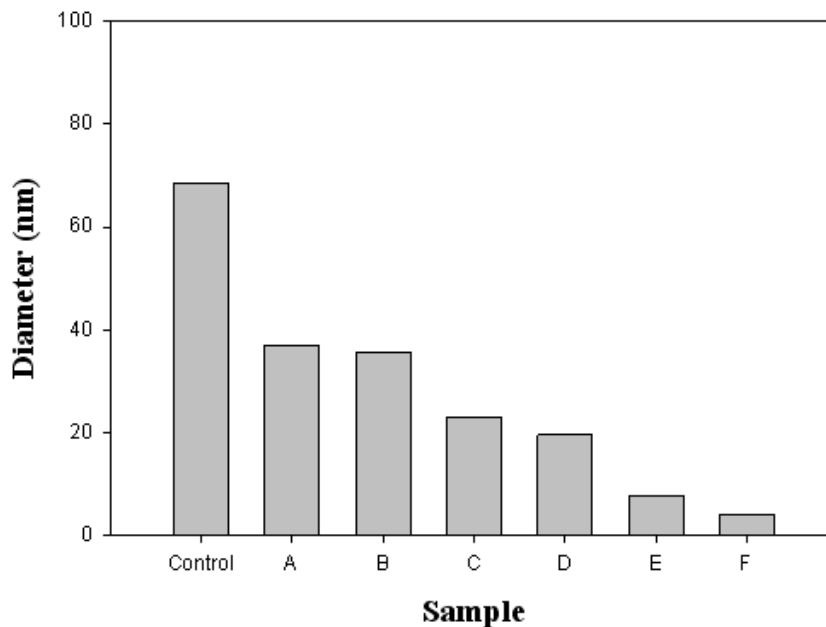


그림 6. Folic acid 농도에 따른 입도 분석. (Folic acid의 농도를 조절하여 첨가한 나노담체시료이다. Control : folic acid를 첨가하지 않은 나노담체, A : 0.5 mg/g, B : 1 mg/g, C : 2 mg/g, D : 4 mg/g, E : 5 mg/g, F : 10 mg/g)

아래의 그림 7은 Folic acid가 첨가된 나노담체의 색의 변화를 나타낸 결과이다.



그림 7. Folic acid 첨가량에 따른 나노담체의 색 변화.

첨가되는 folic acid의 양이 증가할수록 불투명한 수용액이 투명해지며 색 또한 folic acid의 색인 노란색을 나타내었다.

○ 열처리 공정에 따른 나노담체의 입도 분석

아래의 그림 8는 열처리 고정에 따른 나노담체의 입도 변화를 나타낸 결과이다. 식품 단백질 특히 globular protein을 gelation 시키게 되면 물리화학적 혹은 산업적 중요성이 높아지므로 수년간 관심의 대상이 되어 왔다. Gelation은 열처리에 의해서 제조가 가능한데, thermal gel은 polypeptide chain을 unfolding하여 속에 있던 hydrophobic amino acid residue를 노출시키고, 또 단백질 분자들 간의 self-aggregation을 통해서 생성된 three dimensional network를 형성하는데, 이 때 capillary force에 의해 내부에 물이 entrap된다 (Aguilera, 1995; Twomey, Keogh, Mehra, O'kenedy, 1997). 나노담체 제조 시 가열하게 되면 단백질이 실활되고 soluble aggregates로 변화하게 된다. 그림 8에서 나타난 바와 같이 열처리 온도가 높아질수록 입자의 크기는 증가하였으며, 85℃일 경우 입자의 크기가 814 nm로 가장 큰 값을 나타내었다. Submicron 크기의 aggregates는 55℃에서 상대적으로 낮은 칼슘 및 단백질 농도 하에서 얻어질 수 있는데, 이온도는 β -lg의 denaturation 온도 (약 74℃)보다 낮은 온도이다. 열처

리 온도가 55, 65, 75 °C일 겨우 각각 37, 59, 79 nm의 입도를 보였다. 그리고 열처리 온도, 75°C에서 나노담체의 형성은 가능하였으나 β -lg의 변성온도보다 높았기 때문에 65°C에서 열처리하여 나노담체를 제조하였다.

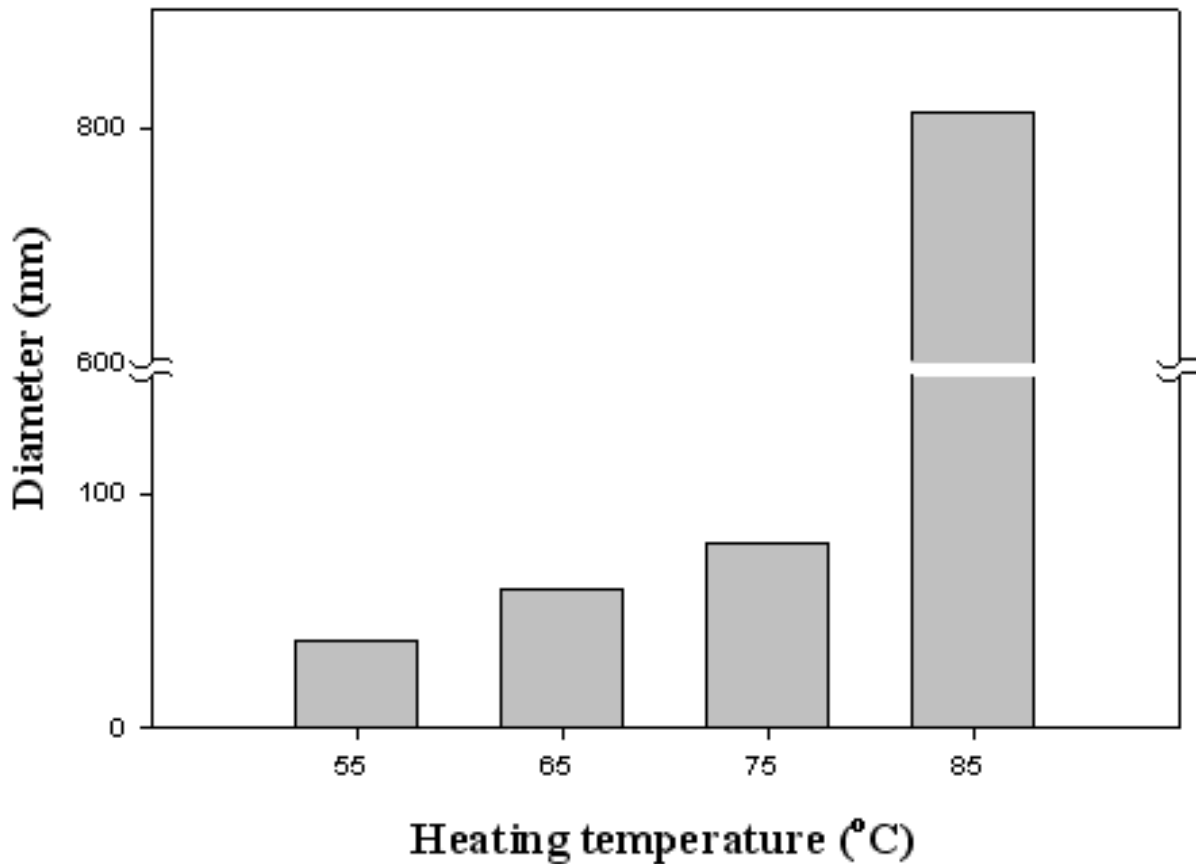


그림 8. 열처리 온도에 따른 나노담체의 입도 변화.

○ WPI의 농도, pH, 열처리 온도에 따른 나노담체의 입도 분석

아래의 그림 9는 folic acid 함유 나노담체 제조 시 WPI 농도에 따른 나노담체의 입도 변화를 나타낸 결과이다.

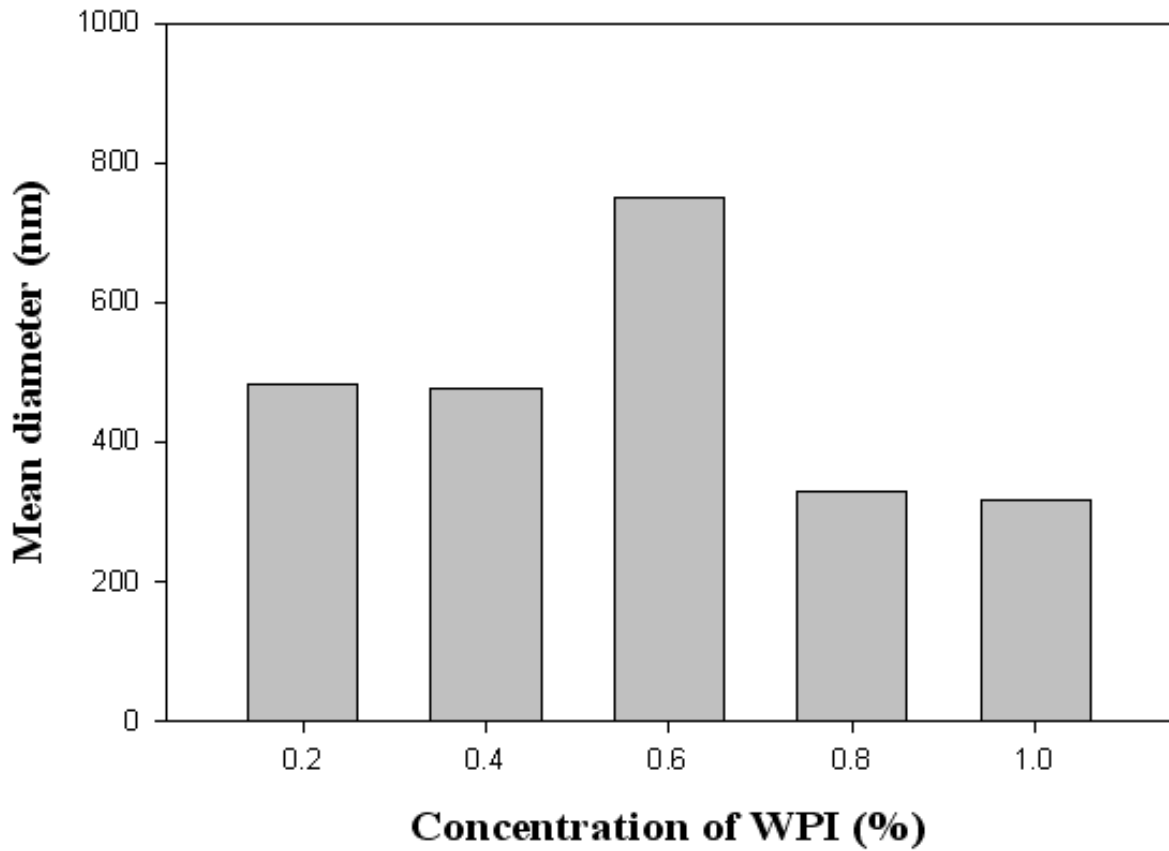


그림 9. WPI 용액의 농도에 따른 나노담체의 입도 변화.

WPI 용액 (pH 8.0, 열처리 온도 80°C), 1% alginate, 5 mM CaCO₃

WPI 농도가 0.2%에서 0.6%로 증가할수록 입도도 증가하는 경향을 보였으며 WPI가 0.8%가 되면서 입도가 다시 낮아지는 경향을 보였다. 1% WPI를 이용하여 나노담체를 제조하였을 경우 317 nm의 입도를 나타내었다. Alginate의 경우 1%보다 낮은 농도로 사용할 경우 folic acid를 모두 포집하지 못하였고 1% 이상일 경우 입자의 크기가 커져 alginate 농도는 1%로 고정하여 사용하였다. WPI 용액의 pH를 조정하여 나노담체를 제조하였으며 그 입도 분석 결과를 아래의 그림 10에 나타내었다.

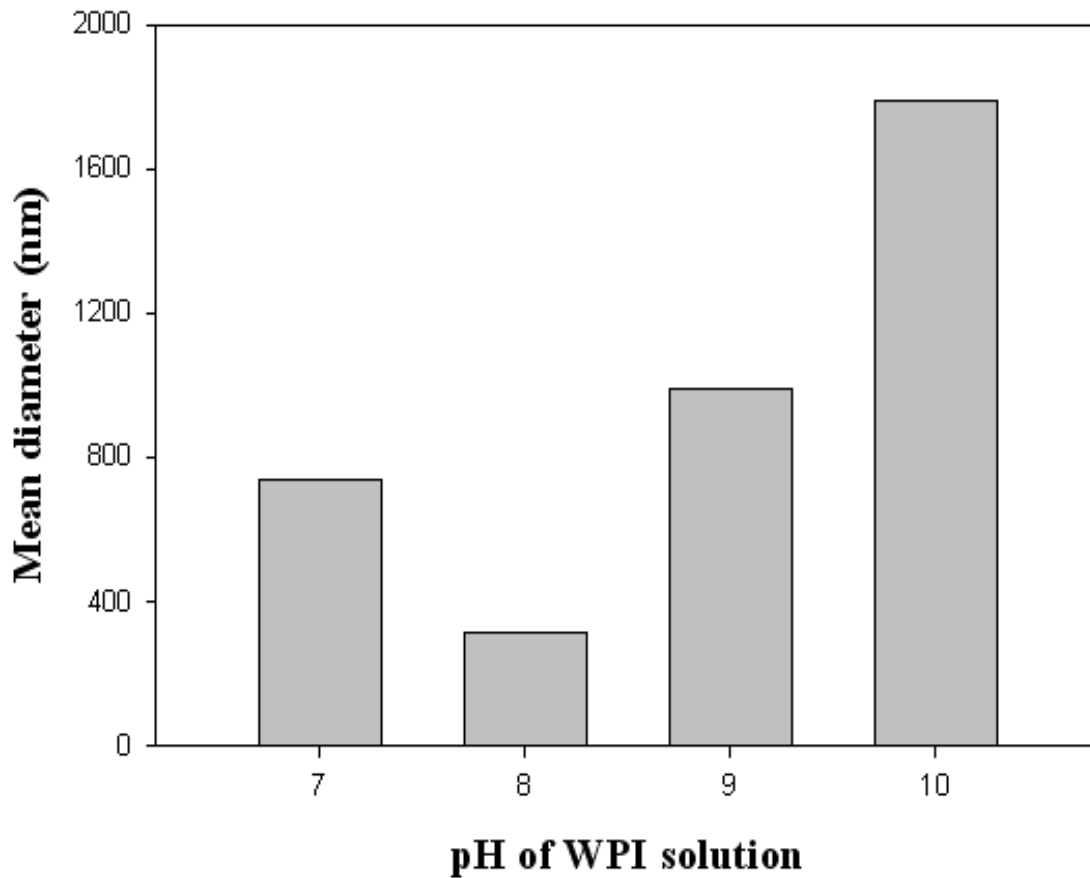


그림 10. WPI 용액의 pH에 따른 나노담체의 평균입도 변화.

WPI 용액 (1%, 열처리 온도 80°C), 1% alginate, 5 mM CaCO₃.

이 실험에 사용된 WPI 용액의 농도는 1%이고 열처리 조건은 80°C이다. pH가 6 이하에서는 WPI 용액의 경우 단백질 응고가 일어났기 때문에, pH 7이상의 범위에서만 실험을 수행하였다. pH 7인 WPI 용액을 이용하여 나노담체를 제조하였을 경우 입자의 크기는 742 nm이었으며 pH 8인 WPI 용액의 경우 317 nm의 입도를 나타내었다. WPI 용액의 pH가 9와 10으로 증가할수록 입도도 증가하는 경향을 보였으며 각각 989 nm와 1789 nm를 나타내었다. WPI 용액 (1%, pH 8)의 열처리 온도를 달리하여 나노담체를 제조하였으며 입도 분석 결과는 아래의 그림 11에 나타내었다.

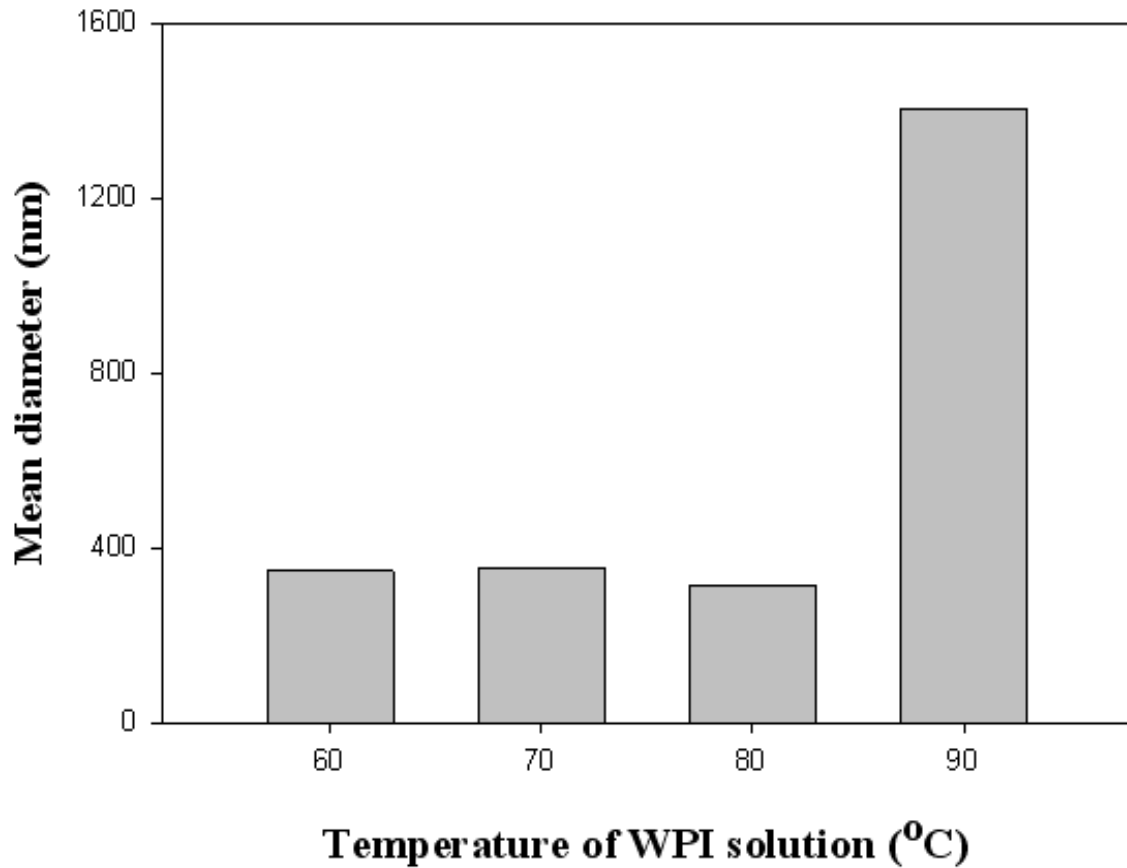


그림 11. 열처리 공정에 따른 나노담체의 평균입도 변화. WPI 용액 (1%, pH 8.0), 1% alginate, 5 mM CaCO₃.

나노담체 제조 시 가열하게 되면 단백질이 실활 되고 soluble aggregates로 변화하게 된다. 그림 4에서 나타난 바와 같이 열처리 온도가 60°C에서 80°C의 입자의 크기는 각각 348, 355, 317 nm를 나타내었으며 열처리 온도가 90°C가 되면서 입자의 크기는 1404 nm로 증가하였다.

○ CaCO₃ 농도와 WPI 농도에 따른 나노담체의 입도 분석

아래의 그림 12는 CaCO₃ 농도와 WPI 농도를 달리하여 제조된 나노담체의 입도 변화를 나타낸 것이다.

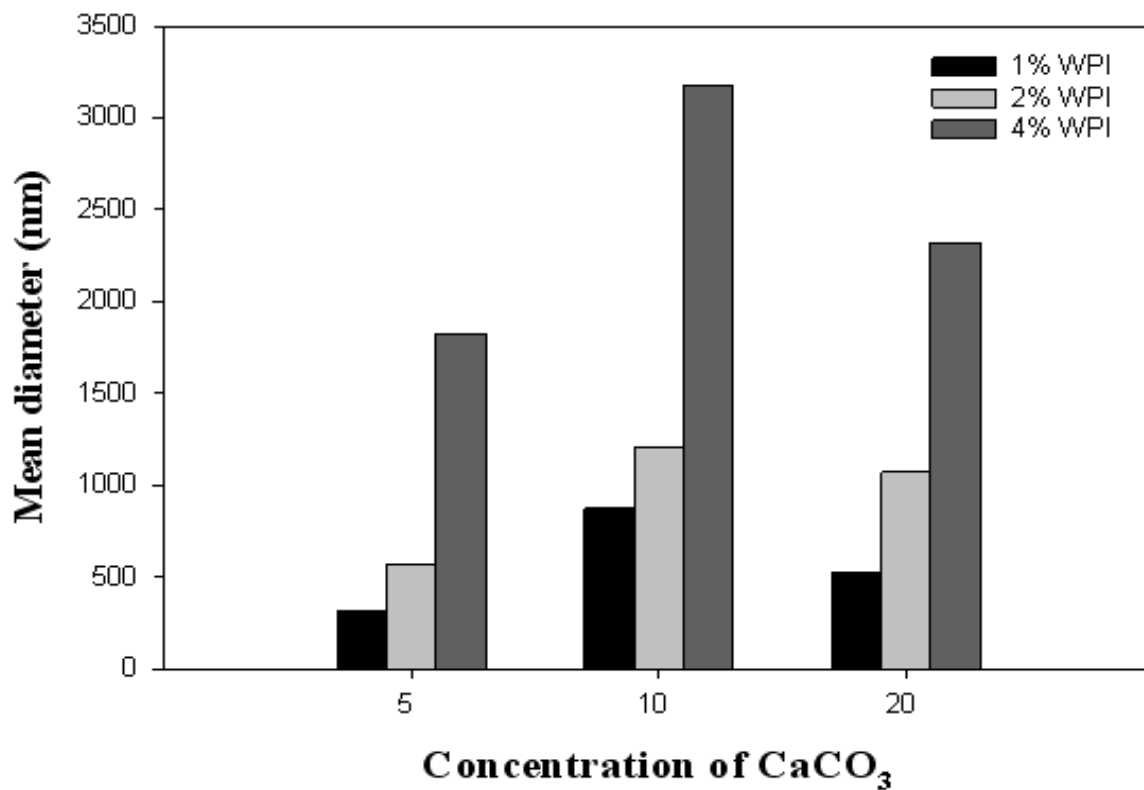


그림 12. CaCO₃ 농도와 WPI 농도에 따른 나노담체의 평균입도 변화.

CaCO₃ 농도가 증가할수록 나노담체의 입도도 증가하는 경향을 보였으며 WPI 농도에 상관없이 CaCO₃ 농도 2%일 경우 가장 큰 입자 크기를 보였다. 또한 WPI 농도와 상관없이 CaCO₃ 농도가 5 mM일 경우 가장 작은 입도를 나타내었으며 WPI 농도가 1%이고 CaCO₃ 농도가 5 mM일 경우 317 nm로 가장 작은 입도를 나타내었다.

○ Aqueous phase와 Organic phase 비율에 따른 나노담체의 입도 분석

아래의 그림 13은 w:o 비율을 달리하여 제조한 나노담체에 대한 평균입도를 나타낸다.

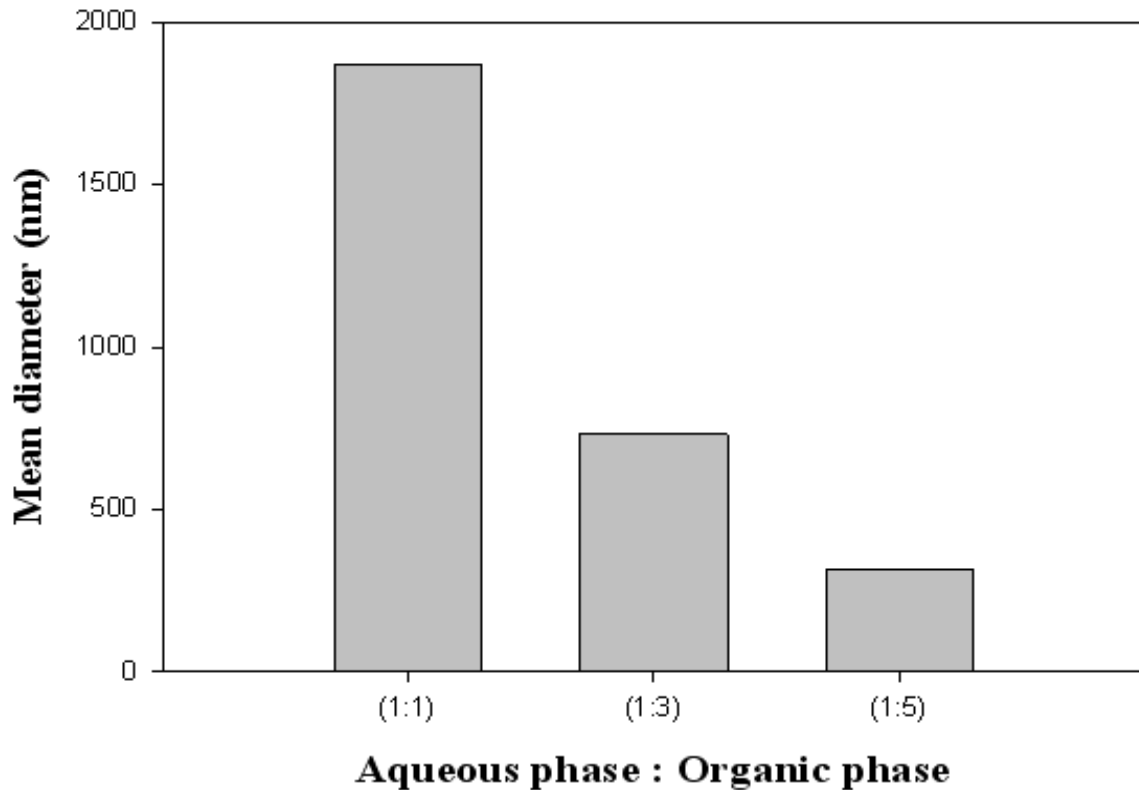


그림 13. w:o 비율에 따른 나노담체의 평균입도 변화. WPI 용액 (1%, pH 8.0, 열처리 온도 80°C), 1% alginate, 5 mM CaCO₃.

Aqueous phase와 organic phase의 비율이 증가할수록 평균입도는 감소하였으며, 1:1일 경우 1869 nm이고 1:3일 경우 732 nm를 나타내었으며 1:5일 경우 317 nm를 나타내었다.

○ Polymer 종류에 따른 나노담체의 입도 분석

아래의 그림 14는 polymer 종류에 따른 나노담체의 평균입도 분석 결과이다.

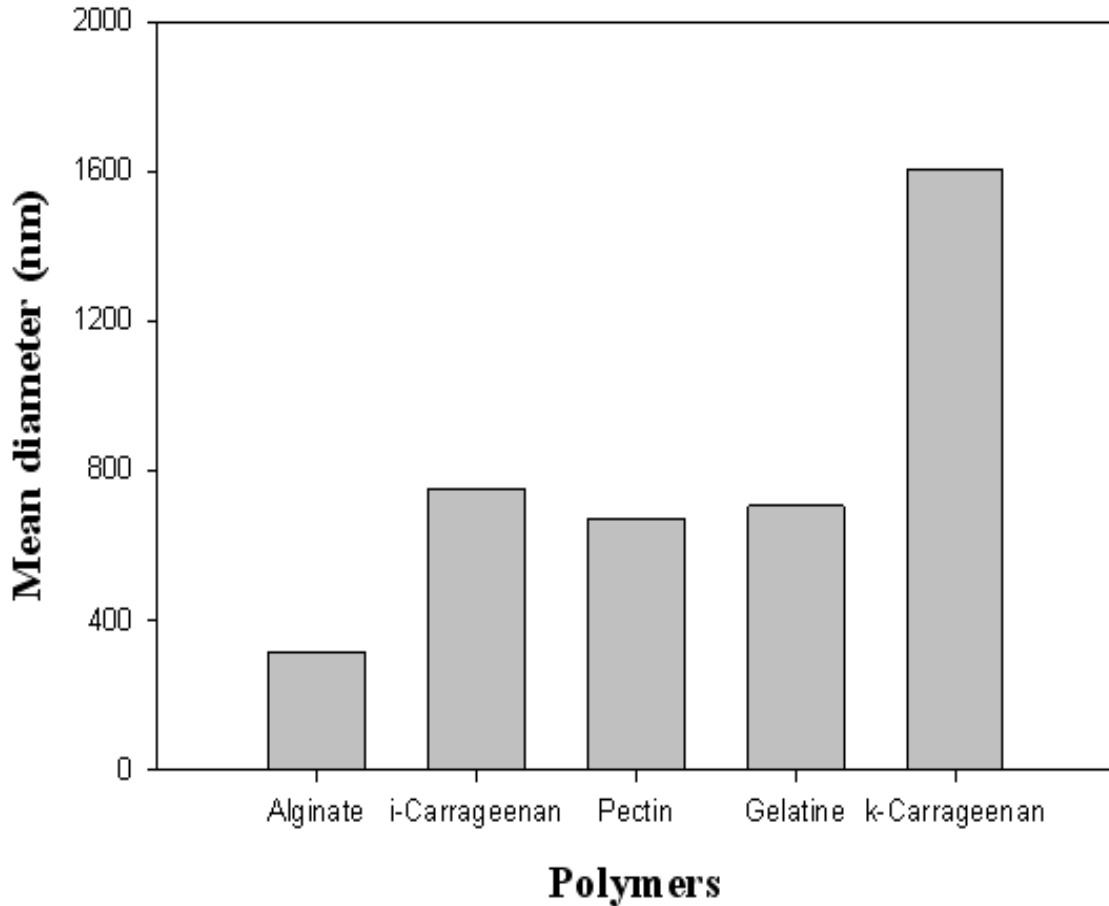


그림 14. Polymer 종류에 따른 나노담체의 평균입도 변화.

WPI 용액 (1%, pH 8.0, 열처리 온도 80°C), 5 mM CaCO₃.

Polymer의 농도는 1%로 고정하고 종류를 다르게 하여 제조된 나노담체의 입도를 측정한 결과 alginate를 이용한 경우 317 nm, i-carrageenan의 경우 754 nm, pectin의 경우 673 nm, gelatine의 경우 706 nm, k-carrageenan의 경우 1606 nm를 나타내었다.

○ Folic acid를 함유한 나노담체의 표면 관찰

아래의 그림 15는 동결 건조 후 folic acid를 함유한 나노담체의 표면을 관찰한 사진이다.

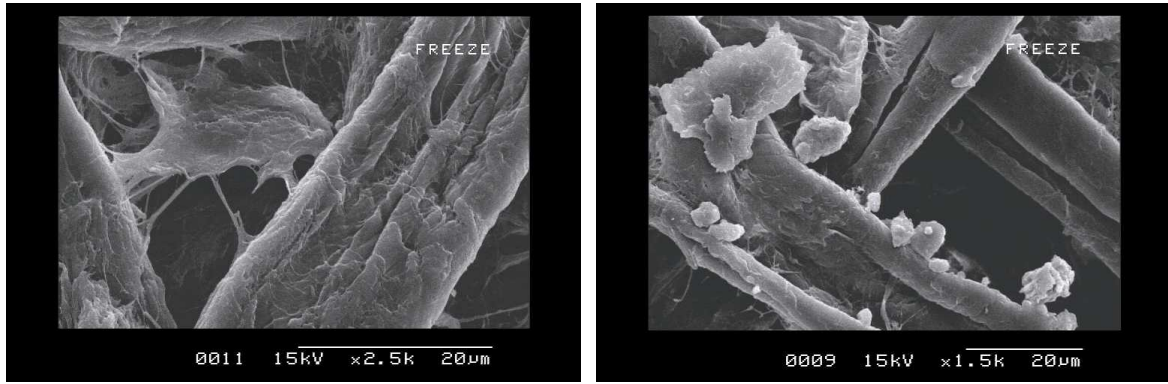


그림. 15 Folic acid 함유 나노담체의 표면 관찰 (SEM).

그림의 좌 측편은 나노담체가 없는 대조구의 사진이고 우 측편은 나노담체가 부착된 시료의 사진이다.

○ Encapsulation efficiency 및 release test

아래의 그림 16은 folic acid를 함유한 나노담체를 이용하여 용출 조건에 따른 용출 시험 결과이다. Madziva (2006) 등의 연구결과에 따르면 위에서 사용한 polymer 중 alginate의 캡슐화효율이 가장 높은 것으로 나타났으며 위의 polymer 종류에 따른 나노담체의 입도 분석 결과에서도 alginate가 가장 작은 입자 크기를 나타내어 polymer로서 alginate를 사용하였다. 위의 실험 결과에 따라 1% WPI, 5 mM CaCO₃, 1% alginate를 이용하여 나노담체를 제조하였다. 제조된 folic acid 함유 나노담체의 용출 시험 결과 HCl 용액 (pH 1.2)의 경우 용출 시간이 경과하여도 folic acid는 분석되지 않았다. 이는 folic acid가 산성 상태보다 염기성 상태에서 더 안정하기 때문이며 또한 용출되는 정도가 용액의 pH에 의해 많은 영향을 받기 때문이다 (Arcot & Shrestha, 2005). 그리고 alginate와 WPI를 이용하여 나노담체를 제조하였을 경우 위에서는 용출을 지연되고 소장에서 완전히 용출이 된다고 알려져 있다 (Chen & Subirade, 2006). PBS (pH 7.4)를 이용하여 용출 시험한 결과는 아래 그림 8에 나타내었다. PBS에 pancreatin을 넣어 사용할 경우 120분 이내에 용출이 거의 완료되었고, PBS만 사용하였을 때에는 180분 이내에 완료되었다.

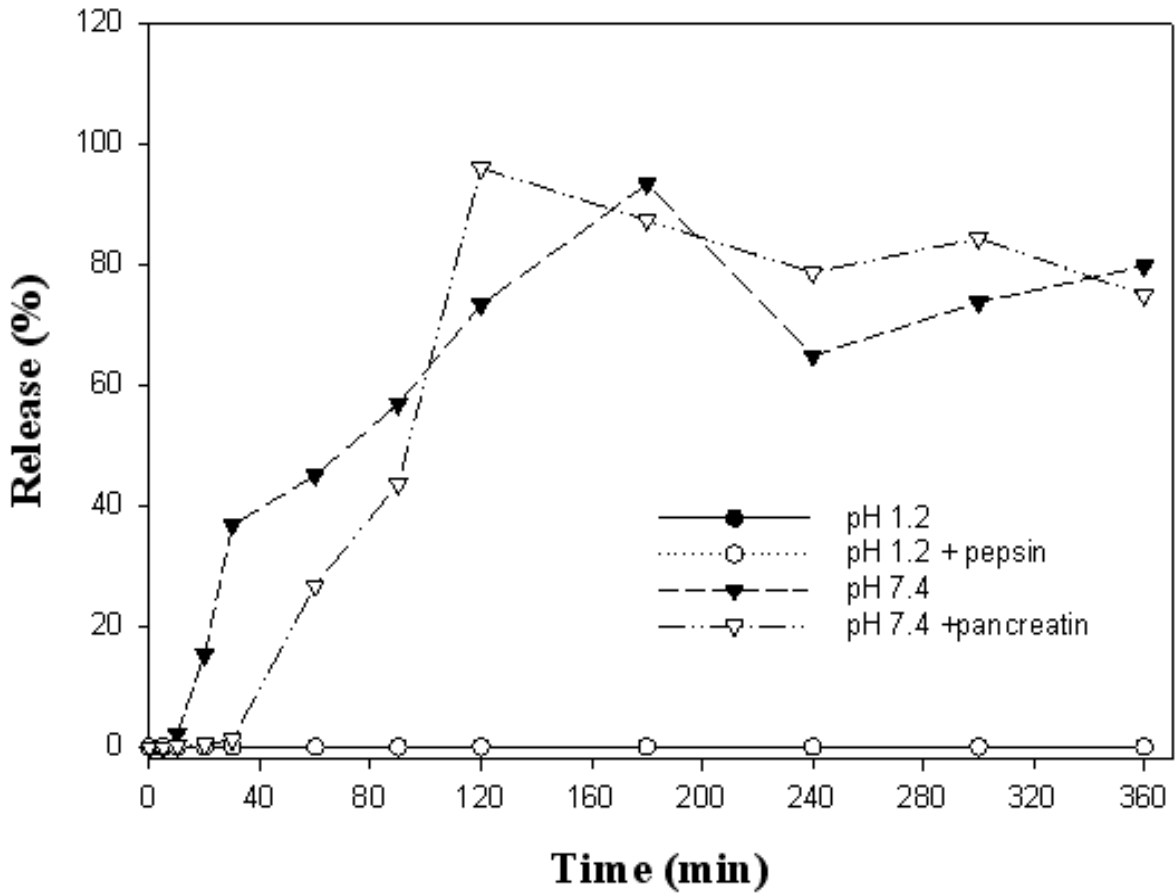


그림 16. 용출 조건에 따른 folic acid의 용출시험.

Madziva (2006) 등의 연구결과에 따르면 위에서 사용한 polymer 가운데 alginate의 캡슐 화효율이 가장 높은 것으로 나타났으며 2차 년도에 수행한 polymer 종류에 따른 나노담체의 입도 분석 결과에서도 alginate가 가장 작은 입자 크기를 나타내었던 결과를 참고하여 polymer로서 alginate를 선택하여 사용하였다. 위의 실험 결과에 따라 WPI 1%, alginate 1%를 기본 조건으로 하여 CaCO_3 농도를 5, 10, 20 mM 조건이 되도록 나노담체를 제조한 후 용출 시험 결과를 아래 그림 17에 나타내었다.

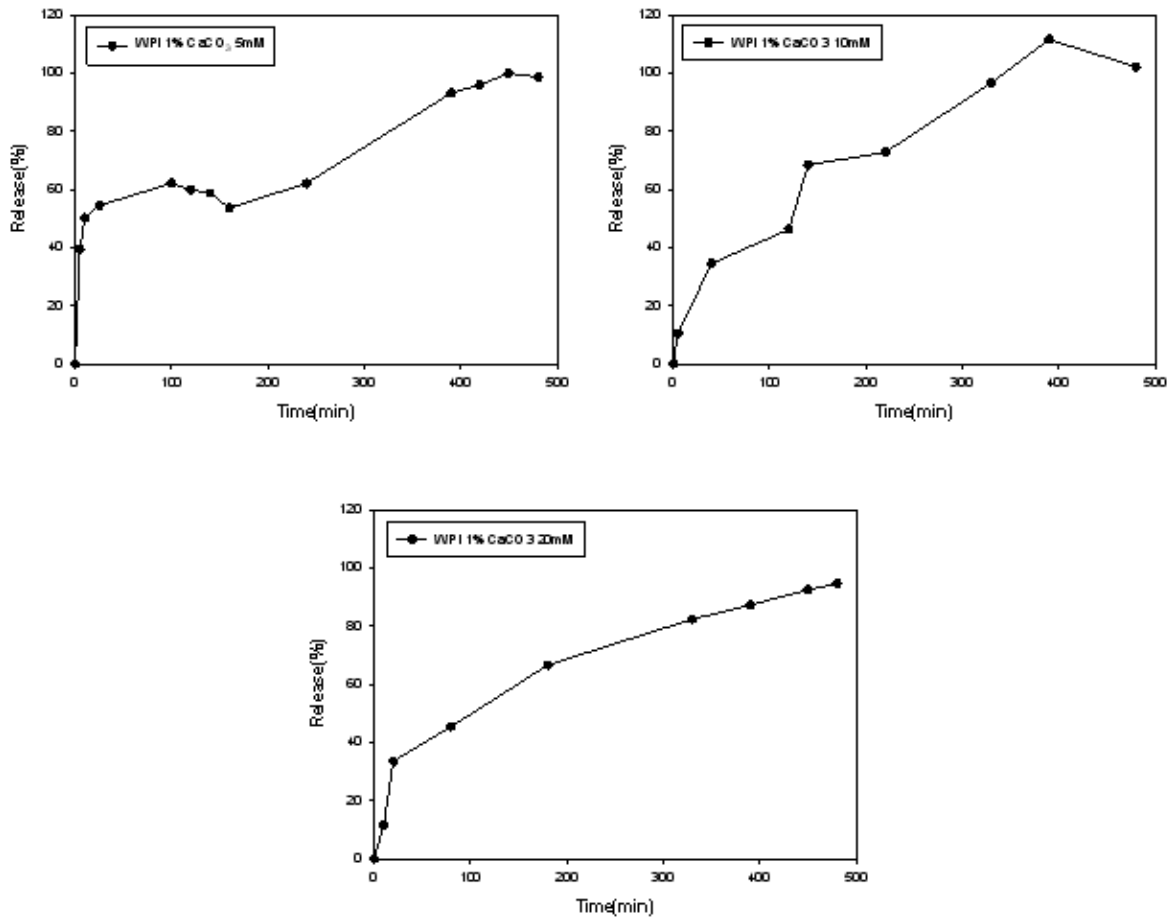


그림 17. CaCO_3 농도를 달리하여 제조한 나노 담체의 folic acid 용출 시험.

WPI 1% (pH 8.0, 열처리 온도 80°C), alginate 1%

CaCO_3 5 mM (a)의 경우 50% 용출량에 도달하는 시간이 가장 짧은 20분경으로 나타났으며, 최종적으로는 400분경에 용출이 완료되는 것으로 나타났다. CaCO_3 10 mM (b)의 경우는 50% 용출량에 도달하는 시간이 120분경이었으며 용출이 완료되는 시간은 CaCO_3 5 mM (a)과 같았다. CaCO_3 20 mM (c)의 경우는 50% 용출량에 도달하는 시간이 130분경으로 CaCO_3 10 mM (b)과 비슷하였으며, CaCO_3 5 mM (a)보다는 포집효과가 연장되게 나타났으나, 용출이 완료되는 시간은 역시 400분경으로 용출이 완료되는 시간에는 차이가 없었다. WPI의 농도를 2%로 증가시켜 제조한 담체의 용출 시험 결과는 아래의 그림과 같다 (그림 18). WPI 2%, alginate 1%를 기본 조건으로 하여 CaCO_3 농도를 5, 10, 20 mM 조건으로 나노담체를 제조하였다.

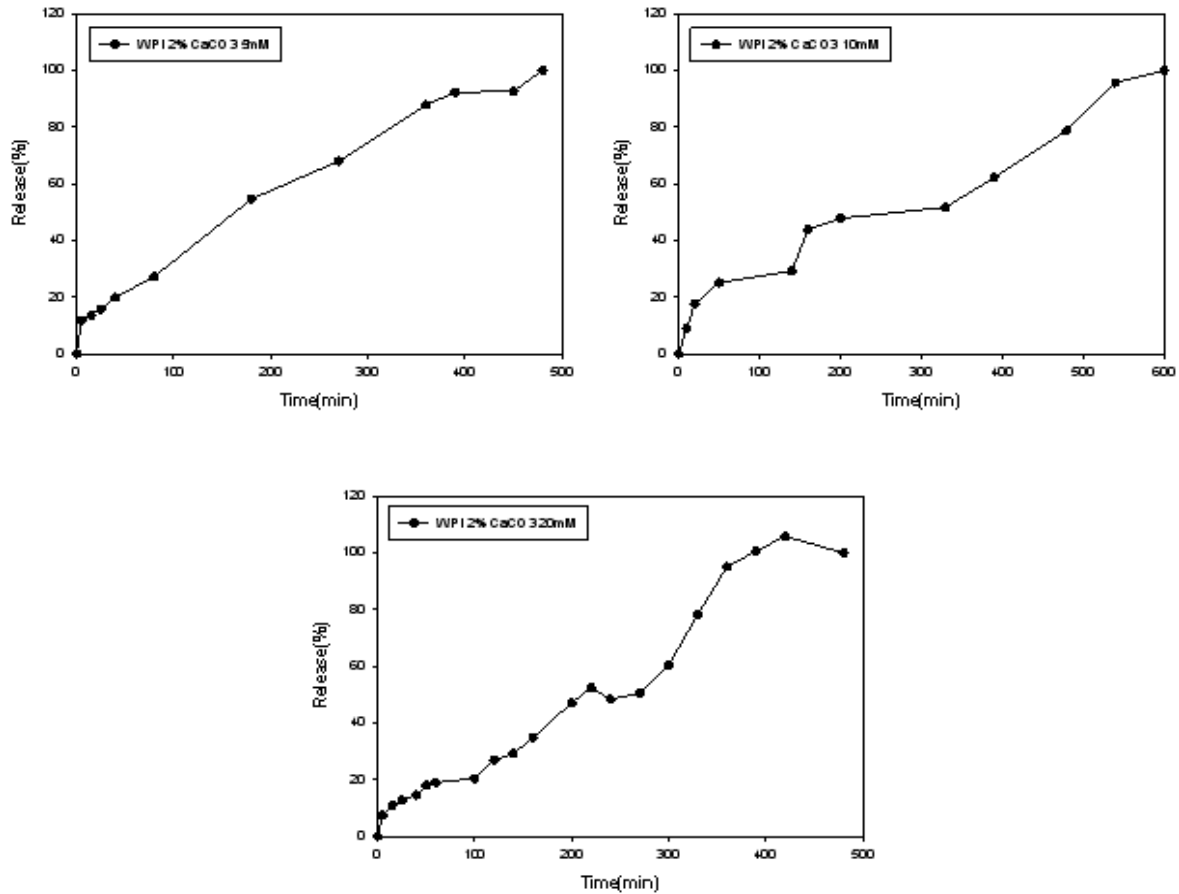


그림 18. CaCO₃ 농도를 달리하여 제조한 나노 담체의 folic acid 용출 시험.

WPI 2% (pH 8.0, 열처리 온도 80°C), alginate 1%

CaCO₃ 5 mM (a)의 경우 50% 용출량에 도달하는 시간이 150분경으로 나타났으며, 약 400분경에 용출이 완료되는 것으로 나타났다. CaCO₃ 10 mM (b)의 경우는 50% 용출량에 도달하는 시간이 200분경으로 CaCO₃ 5 mM (a) 50분가량 지연되는 것으로 나타났다. 용출이 완료되는 시간은 약 400분경으로 CaCO₃ 5 mM (a)와 비슷하게 나타났다. CaCO₃ 20 mM (c)의 경우는 50% 용출량에 도달하는 시간이 220분경으로 CaCO₃ 10 mM (b)과 비슷하였으며, CaCO₃ 5 mM (a)보다는 포집효과가 지연되는 것을 알 수 있었으며, 용출이 완료되는 시간은 역시 400분경으로 용출이 완료되는 시간에는 차이가 없었다. 하지만 CaCO₃의 농도가 증가함에 따라서 담체에서 초기에 엽산이 용출되는 양에는 차이가 있음을 확인 할 수 있었다. WPI의 농도를 4%로 증가시켜 제조한 담체의 용출시험 결과는 아래의 그림 19와 같으며 WPI 4%, alginate 1%를 기본 조건으로 하여 CaCO₃ 농도를 5, 10, 20 mM의 조건으로 나노담체를 제조하였다.

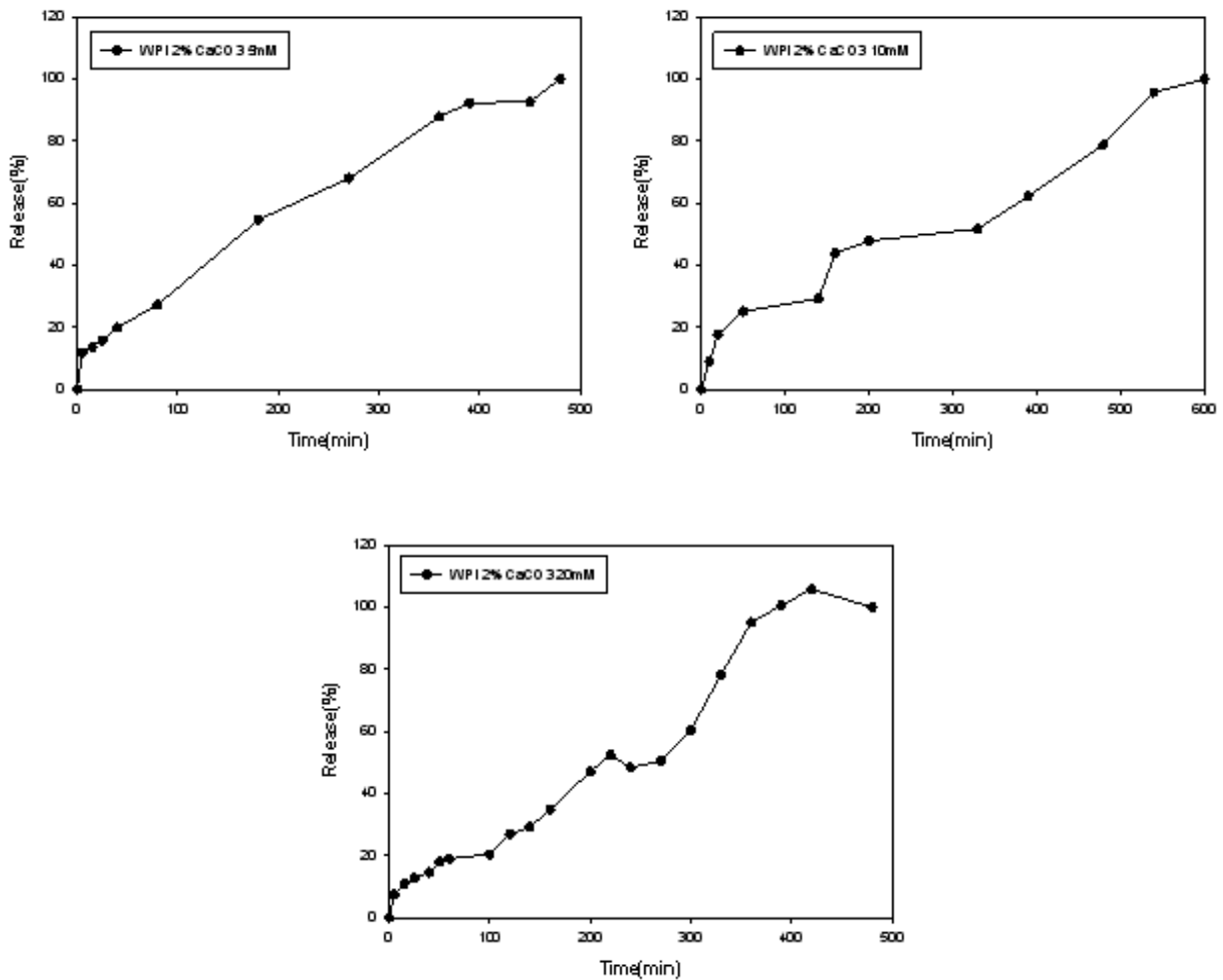


그림 19. WPI 4% 조건 나노 담체의 folic acid 용출 시험.

WPI 4% (pH 8.0, 열처리 온도 80°C), alginate 1%

CaCO₃ 5 mM (a)의 경우 50% 용출량에 도달하는 시간이 250분경으로 나타났으며, 약 450분경에 용출이 완료되는 것으로 나타났다. CaCO₃ 10 mM (b)의 경우는 50% 용출량에 도달하는 시간이 약 70분경으로 CaCO₃ 5mM (a) 250분보다 급격하게 용출되는 것으로 나타났다. 하지만 초기에 급격한 용출에 비해 용출이 완료되는 시간은 약 450분경으로 CaCO₃ 5 mM (a)와 비슷하게 나타났다. CaCO₃ 20 mM (c)의 경우는 50% 용출량에 도달하는 시간이 150분경으로 CaCO₃ 10 mM (b)보다 용출시간은 지연되었으나, CaCO₃ 5 mM (a)보다는 역시나 빠른 용출을 보였다. 용출이 완료되는 시간은 역시 470분경으로 용출이 완료되는 시간은 가장 길게 나타났다. WPI가 4% 증가함에 따라서 CaCO₃의 농도에 따른 용출 시험 결과 WPI 1, 2%의 경우 CaCO₃의 농도가 증가함에 초기 용출량 및 50% 용출도달 시간까지의 시간이 지연되는 것을 알 수 있었으나, 용출완료 시간까지는 큰 차이가 없었다. 그러나 WPI 4%의 경우 1, 2%의 결과와는 다르게 CaCO₃ 5 mM (a)의 조건에서 초기 용출량 및 50% 용출 도달 시간까지의 시간

이 지연되는 것을 확인 할 수 있었다. 용출 완료까지 도달 하는 시간은 WPI 1, 2%의 경우는 같은 그룹끼리 도달시간의 차이가 없는 것으로 나타났지만, WPI 4%의 경우 약간씩의 차이를 보였다. 이러한 용출의 결과는 folic acid가 산성 상태보다 염기성 상태에서 더 안정하기 때문이며, 또한 용출되는 정도가 담체의 포집상태에 의해 많은 영향을 받기 때문이라는 해석이 있다 (Arcot & Shrestha, 2005). 2차 년도의 pH에 따른 용출시험에서 산성조건에서 보다 높은 안전성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 실제로 중성 pH의 식품들에 적용할 수 있는 담체를 제조하기 위해 WPI, CaCO₃등의 조건을 조절하여 담체를 만들어 용출 시험을 진행한 결과, 일정한 수준까지는 용출을 지연시킬 수 있었다. 이러한 WPI, CaCO₃ 조건에 따른 결과는 alginate와 WPI를 이용하여 나노담체를 제조하였을 경우, 위에서는 용출이 지연되고 소장에서 완전히 용출이 완료된다는 이전의 결과와 일치하였다 (Chen & Subirade, 2006).

○ 요구르트 발효물의 pH 및 생균수 변화

제조된 담체를 첨가한 시제품 개발을 위해 먼저 10% 탈지분유를 이용하여 제조한 요구르트의 생균수 및 pH 변화를 아래의 그림 20에 나타내었다.

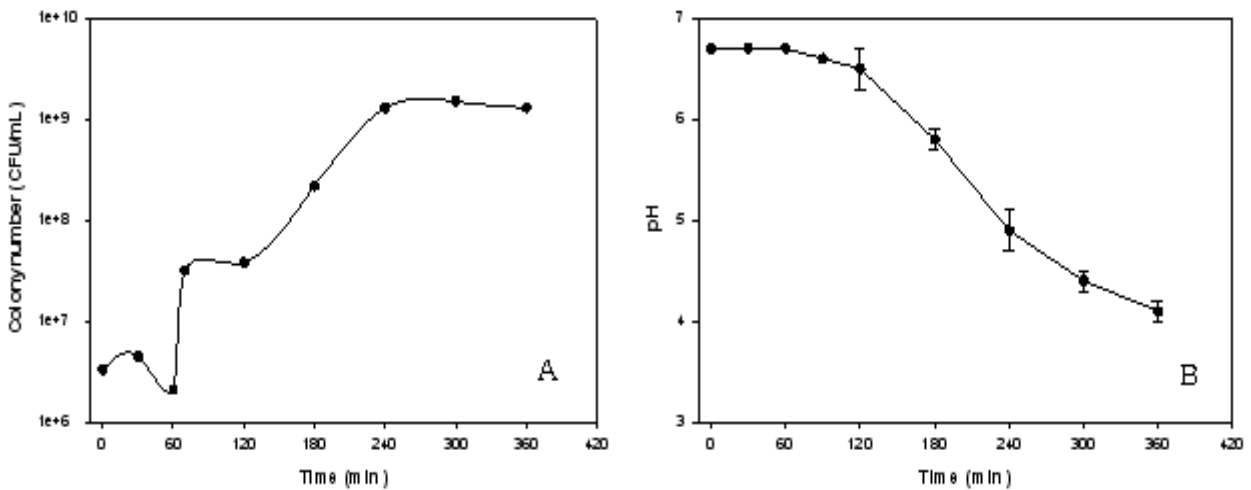


그림 20. 요구르트의 발효 시간에 따른 생균수 (A) 및 pH (B) 변화.

발효시간에 따른 균수 변화를 측정된 결과에서 60분~240분 까지 10⁶~10⁹까지 증가하는 경향을 나타내었다. 240분 이후에는 큰 변화가 일어나지 않아 발효가 종료 된 것으로 판단하였다. 특히 발효 60분 이후 젖산균 수가 급격히 증가하는 모습을 보였으며, 식품공전에 신선한 액상 및 호상요구르트의 젖산균 수는 각각 10⁷, 10⁸ 으로 CFU/mL 이상으로 규정하고 있는데

본 실험결과도 모두 적정치 범위 이상의 생균이 존재함을 알 수 있다. 발효 시간의 경과에 따른 pH의 변화는 발효 2시간 동안에는 pH 6.7~6.6으로 큰 변화를 보이지 않았지만 120분 이후 pH가 감소하였고, 300분~360분 사이에는 큰 변화를 보이지 않으며 pH 4.2 수준에서 안정화되는 경향을 보였다. 이러한 요구르트의 pH 수준은 한국인의 기호에 맞는 젖산음료의 pH가 3.7~4.2라는 이 (1972) 등의 보고와 비슷한 수준으로서, 가공식품으로 적용하기에 무리가 없을 것으로 판단되었다.

○ 나노담체 첨가 후 pH의 변화

담체가 요구르트에 발효에 미치는 영향을 확인하기 위해 담체를 첨가한 요구르트 발효물의 시간에 따른 pH 변화를 아래의 그림 21에 나타내었다.

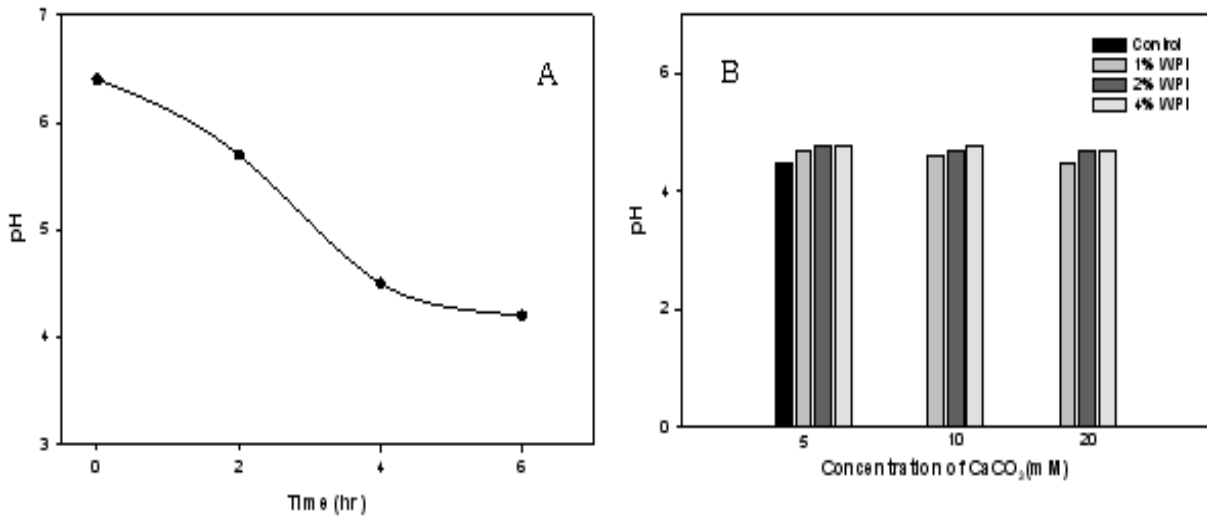


그림 21. Folic acid 나노담체 첨가 요구르트 발효물의 시간별 pH 변화.

담체의 첨가는 그림에서 나타난 바와 같이 시간에 따른 pH의 변화가 담체를 첨가하지 않은 요구르트 발효물의 시간에 따른 pH 변화와 큰 차이가 없이 비슷한 경향을 나타내었다. 또한 WPI, CaCO₃ 조건별로 제조한 나노담체를 첨가하여 제조한 요구르트 발효물의 최종 pH는 대조구와 비교하여 큰 변화가 없었다. 이러한 결과는 나노담체 첨가가 요구르트 발효에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단되며 결국, 관능적 특성이나 상품의 품질에 영향을 주지 않으면서도 기능성 식품소재를 유제품에 함유시킬 수 있다는 것을 의미한다.

○ 동적 점탄 특성결과

동적 점탄성 측정은 소진폭 진동전단 (small amplitude oscillatory shear, SAOS)에 의해 저장 탄성율 (G')과 손실 탄성율 (G'')로부터 점성과 탄성을 결정하는데 사용되어 왔으며, 이러한 측정방법은 시료의 구조를 파괴하지 않고 측정하기 때문에 생고분자 (biopolymer)의 구조분석을 위한 물리적 수단으로 유용하게 사용되고 있다. 아래의 그림 22는 WPI 1% 조건별 나노담체를 첨가한 요구르트 발효물의 frequency (rad/sec)에 따른 저장 탄성율 (G')과 손실 탄성율 (G'')의 변화를 나타낸 것이다.

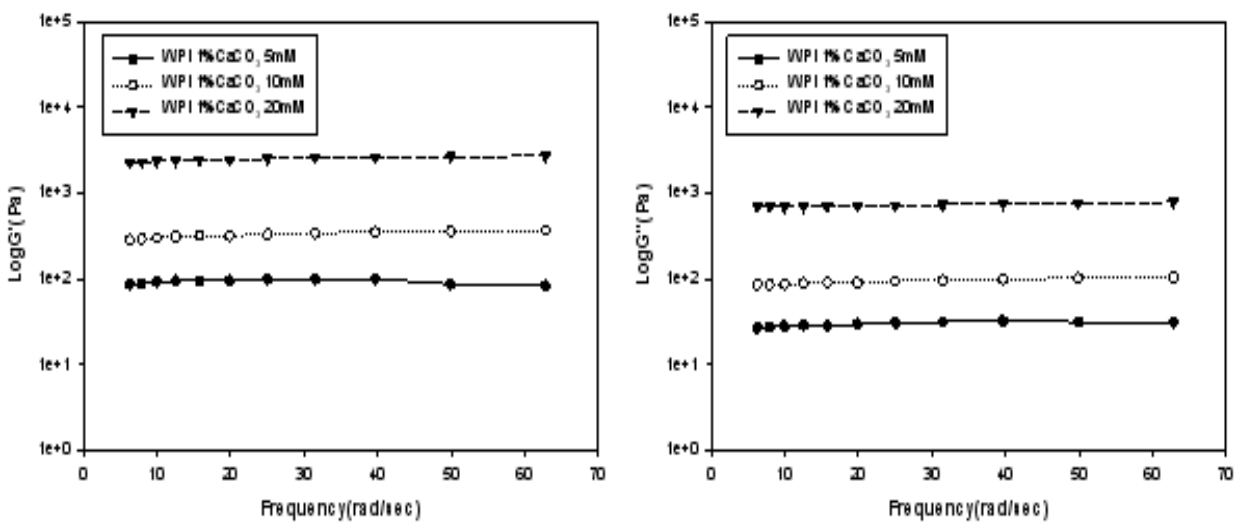


그림 22. WPI 1% 담체 첨가 요구르트의 동적 점탄성 특성.

WPI 1% 담체를 첨가한 요구르트의 경우 CaCO₃ 농도가 증가함에 따라 높은 G' 을 나타냈으며, 증가되는 frequency (rad/sec)에 대해 독립적인 것으로 나타났다. 또한 frequency (rad/sec)에 따른 G' 과 G'' 을 비교해보면 G' 이 G'' 높은 수치를 나타냈는데, 이것은 탄성적 성질이 강하다는 것을 의미한다. 시료의 점탄성을 평가하는 하나의 측정치로는 G' 과 G'' 의 비율로 표현되는 손실요인 즉 $\tan \delta$ (G''/G')가 있다. $\tan \delta$ 가 1보다 작으면 ($\tan \delta < 1.0$) 점탄성 물질에 대해 탄성적 거동이 보다 크다는 의미이고, 반대로 1보다 크면 점성적 거동이 크다는 것을 의미한다. CaCO₃의 농도에 따른 3가지 시료에 대해 6.28rad/sec에서의 $\tan \delta$ ($G''/G'=0.30-0.31$) 값은 1보다 낮은 값으로 나타났는데, 이는 점성적 성질보다 탄성적 성질이 크다는 것을 의미한다.

아래의 그림 23은 WPI 2% 조건별 나노담체를 첨가한 요구르트 발효물의 frequency (rad/sec)에 따른 저장 탄성율 (G')과 손실 탄성율 (G'')의 변화를 나타낸 것이다.

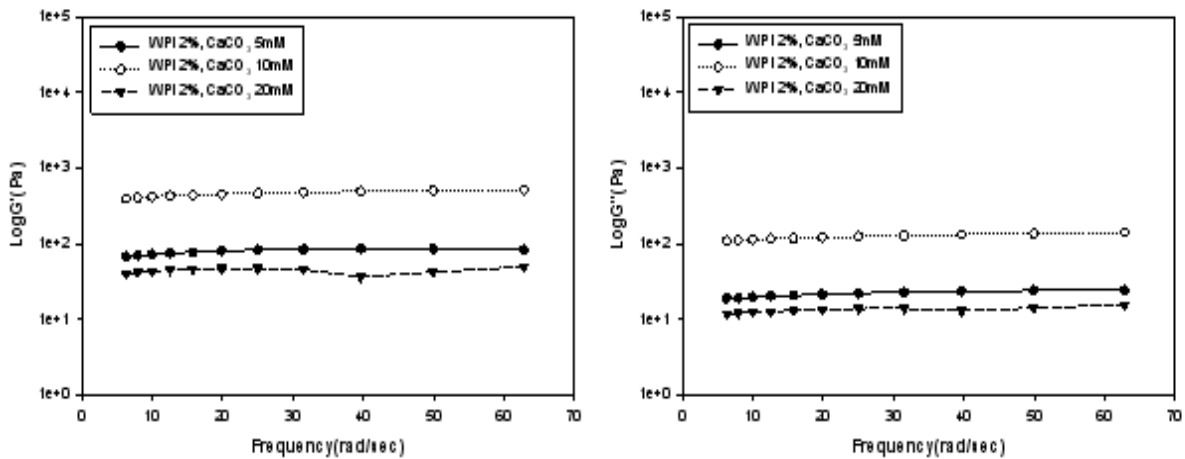


그림 23. WPI 2% 담체 첨가 요구르트의 동적 점탄성 특성.

WPI 2% 담체를 첨가한 요구르트의 경우 CaCO_3 농도가 5 mM-10 mM로 증가함에 따라 높은 G' 을 나타냈으나 20 mM의 경우는 오히려 가장 낮은 값을 나타내었다. 하지만 증가되는 frequency (rad/sec)에 대해서는 WPI 2%의 경우 WPI 1%와 마찬가지로 독립적인 것으로 나타났으며, frequency (rad/sec)에 따른 G' 과 G'' 을 비교해보면 G' 이 G'' 높은 수치를 나타냈다. WPI 2% 또한 탄성적 성질이 강한 것을 의미한다. WPI 2% 기준 담체의 CaCO_3 의 농도에 따른 3가지 시료에 대해 6.28 rad/sec에서의 $\tan \delta$ ($G''/G' = 0.28-0.30$) 값은 1보다 낮은 값으로 나타났는데 이는 WPI 1%와 마찬가지로 점성적 성질보다 탄성적 성질이 보다 우세함을 알 수 있었다. 아래의 그림 24는 WPI 4% 조건별 나노담체를 첨가한 요구르트 발효물의 frequency (rad/sec)에 따른 저장 탄성율 (G')과 손실 탄성율 (G'')의 변화를 나타낸 것이다.

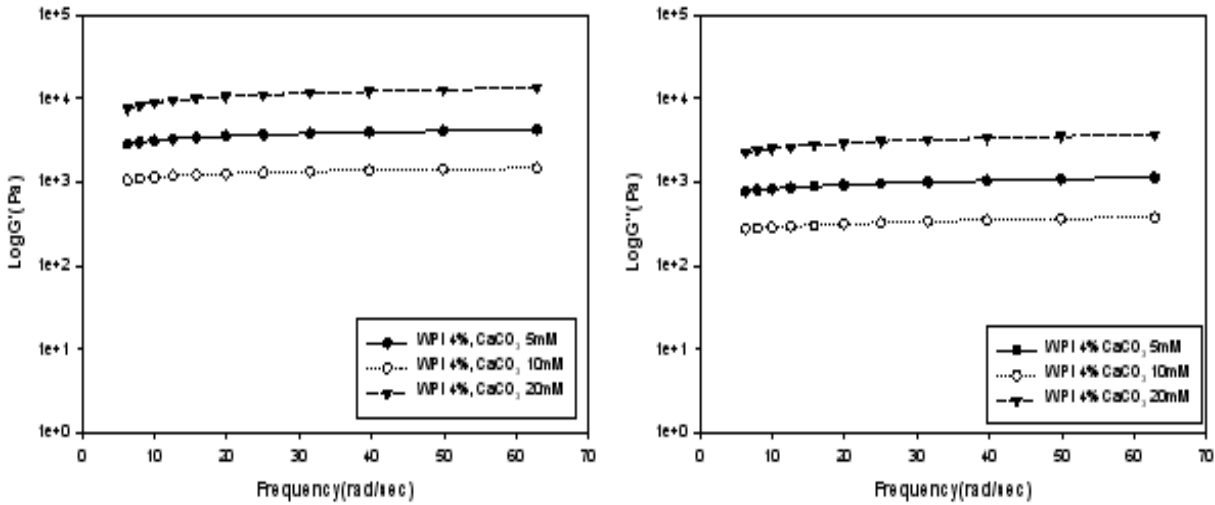


그림 24. WPI 4% 담체 첨가 요구르트의 동적 점탄성 특성.

WPI 4% 담체를 첨가한 요구르트의 경우 CaCO₃ 농도 10 mM에서 가장 낮은 G'을 나타냈으며 5 mM과 20 mM의 순서로 높은 값을 나타내었다. WPI 1, 2%의 경우와 차이는 있었지만 증가되는 frequency (rad/sec)에 대한 WPI 4%의 경우 마찬가지로 독립적인 것으로 나타났다. Frequency (rad/sec)에 따른 G'과 G''을 비교해보면 G'이 G'' 높은 수치를 나타내어 WPI 4% 또한 탄성적 성질이 강한 것을 의미하는 것을 알 수 있었다. WPI 4% 기준 담체의 CaCO₃의 농도에 따른 3가지 시료에 대해 6.28 rad/sec에서의 tan δ (G''/G'=0.26-0.30) 값은 1보다 낮은 값으로 나타났는데 이는 WPI 1, 2%와 마찬가지로 점성적 성질보다 탄성적 성질이 강하게 나타난다는 것을 알 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1세부과제 (경상대학교) : 유청 단백질 나노담체 제조공정 개발 및 기능적 유용성 연구

구분	연도	연구목표	세부연구목표	목표 달성도(%)	
1차 년도	2007 ~ 2008	유청 단백질 나노담체 제조 공정 개발 및 나노입자 상관성 연구	1) 통계적 모형을 사용하여, 물리적 안정성을 극대화한 나노담체 제조방법 정립	통계적 모형을 사용하여, 물리적 안정성을 극대화한 나노담체 제조하였음.	100%
			2) 유청 단백질의 성분조정 및 배합을 이용한 경제적, 효율적 나노담체 제조방법 정립	유청 단백질 성분조정 및 배합을 이용한 경제적, 효율적 나노담체 제조하였음.	100%
			3) 나노담체 제조공정 요인 (가교제 농도, 온도 등)에 따른 나노입자 크기와 입도분포 분석	나노담체 제조공정 요인에 따른 나노입자 크기와 입도분포 분석 하였음.	100%
2차 년도	2008 ~ 2009	유청 단백질 나노담체와 유용물질로 활용할 엽산의 물리 화학적 상호작용 연구	1) 제조공정 요인에 따른 나노담체의 구조적 기능성 (Structural Fucntuionalty) 연구	제조공정 요인에 따른 나노담체의 구조적 기능성 연구 하였음.	100%
			2) 엽산과 나노담체 표면특성 및 정전기적 상호작용 평가	엽산과 나노담체 표면특성 및 정전기적 상호작용 평가하였음.	100%
			3) 나노담체 내 엽산의 물리 화학적 안정성 평가	나노담체 내 엽산의 물리화학적 안정성 평가하였음.	100%
3차 년도	2009 ~ 2010	유제품 저장 과정 중의 나노담체 물리 화학적 저장 안정성 평가 및 안정화 기술개발	1) 유제품 숙성 및 저장중의 나노담체 morphology 변화 평가	유제품 숙성 및 저장중 나노담체 morphology 변화 평가 하였음.	100%
			2) 유제품 제조, 숙성 및 저장요인에 따른 수용성 및 지용성 물질 전달체로서 나노담체의 delivery 연구 (entrapment efficiency와 leakage 분석)	유제품 제조, 숙성 및 저장요인에 따른 수용성 및 지용성 물질 전달체로서 나노담체 delivery 연구하였음.	100%

3차 년도	2009 ~ 2010	유제품 저장 과정 중의 나노담체 물 리 화학적 저장 안정성 평가 및 안 정화 기술개 발	3) 1차년도 협동과제에서 선발된 나 노담체의 유제품 숙성 및 저장시의 안정화 기술 개발	1차년도 협동과제에 서 선발된 나노담체 의 유제품 숙성 및 저장시의 안정화 기 술 개발 하였음.	100%
----------	-------------------	---	---	---	------

제1 협동과제 (명가유업 주식회사) : 나노담체 및 나노담체 함유 유용물질의 대량
스크리닝 시스템 개발

구분	연도	연구목표	세부연구목표	목표 달성도(%)	
1차 년도	2007 ~ 2008	유청 단백질 성분 및 엽 산의 세포 내 생리활성 의 특성 규 명	1) 유청 단백질의 생리활성 특성 규명: 사람의 위, 대장 및 소장 유래 세포주를 이용 하여 유청 단백질의 독성 및 세포활성 특 성 규명	유청 단백질의 독성 및 세포 활성 특성 규명하였음.	100%
			2) 엽산 (folic acid)의 세포내 uptake 조건의 최적화 실험을 통한 세포내의 생리활성 특성 규명	엽산의 세포내 uptake 조건의 최적 화 및 생리활성 특 성 규명하였음.	100%
			3) 대표적인 target 유전자의 발현 조건을 확립함으로써 2-3차년 도부터 활용될 유청 단백질의 나노담체에 의한 GI track에서 의 생리활성 측정 기반 구축	유청 단백질의 나노 담체에 의한 GI track에서의 생리활 성 측정 기반 구축하 였음.	100%
2차 년도	2008 ~ 2009	유청 단백질 나노담체의 세포생리학 적 특성 규 명	1) 사람의 위와 대장세포에서 유청 단백질 나노담체가 세포의 성장 및 독성에 미치는 영향 분석	사람의 위와 대장세 포에서 유청 단백질 나노담체가 세포의 성장 및 독성에 미치 는 영향 분석하였음.	100%

2차 년도	2008 ~ 2009	유청 단백질 나노담체의 세포생리학 적 특성 규 명	2) 사람의 세포내 folic acid(엽산) 유청 단백질 나노담체의 uptake 조 건 규명	사람의 세포내 folic acid(엽산) 유청 단백 질 나노담체의 uptake 조건 규명하였음.	100%
			3) 사람의 세포내에서 folic acid(엽 산) 유청 단백질 나노담체의 release 조건 및 retention 조건 규 명	사람의 세포내에서 folic acid(엽산) 유청 단백질 나노담체의 release 조건 및 retention 조건 규명 하였음.	100%
			4) folic acid(엽산) 유청 단백질 나 노담체에 의한 세포내 대사 작용 규명	4) folic acid(엽산) 유청 단백질 나노담 체에 의한 세포내 대 사 작용 규명하였음.	100%
3차 년도	2009 ~ 2010	세포내 나 노담체 함유 Folic acid의 세포생리학 적 특성 규 명	1) 사람의 위와 대장세포에서 folic acid(엽산) 이 함유된 유청 단백질 나노담체가 세포의 성장 및 독성에 미치는 영향 분석	사람의 위와 대장세 포에서 유청 단백질 나노담체가 세포의 성장 및 독성에 미치 는 영향 분석하였음.	100%
			2) 사람의 세포내 folic acid(엽산) 유청 단백질 나노담체의 uptake 조 건 규명	사람의 세포내 folic acid(엽산) 유청 단백 질 나노담체의 uptake 조건 규명하 였음.	100%
			3) 사람의 세포내에서 folic acid(엽 산) 유청 단백질 나노담체의 release 조건 및 retention 조건 규 명	사람의 세포내에서 folic acid(엽산) 유청 단백질 나노담체의 release 조건 및 retention 조건 규명 하였음.	100%
			4) folic acid(엽산) 유청 단백질 나 노담체에 의한 세포내 대사 작용 규명	4) folic acid(엽산) 유청 단백질 나노담 체에 의한 세포내 대 사 작용 규명하였음.	100%

제 2 협동과제 (한국식품연구원) : 나노담체 함유 고기능성 유제품 생산 공정 개발 및
제품 적성 평가

구분	연도	연구목표	세부연구목표	목표 달성도(%)	
1차 년도	2007 ~ 2008	유제품 생산 공정 조건에 따른 유청 단 백질 나노담 체의 특성 분 석	1) 공정 조건별 나노담체의 물리 화학적 특성변화 분석	공정 조건별 나노담 체의 물리 화학적 특성변화 분석 하였 음.	100%
			2) Active compounds entrapment (encapsulation) 특성 분석	Active compounds entrapment 특성 분 석 하였음.	100%
2차 년도	2008 ~ 2009	Bioactive carrier 로서 나노담체의 기능성 평가	1) 위장관내 환경에 따른 release profile 및 용출 기작 규명	위장관내 환경에 따 른 release profile 및 용출 기작 규명하였 음.	100%
			2) Loading efficiency 증진을 위한 공정개선	Loading efficiency 증진을 위한 공정개 선 하였음.	100%
3차 년도	2009 ~ 2010	유제품별 나 노담체 특성 분석 및 용 도 개발	1) 유제품별 나노담체의 물리 화학 적 특성변화 분석	유제품별 나노담체의 물리 화학적 특성변 화 분석 하였음.	100%
			2) 나노담체의 유제품내 적용 공정 연구	나노담체의 유제품내 적용 공정 연구하였 음.	100%
			3) 나노담체 함유 시제품 생산 및 적성 평가	나노담체 함유 시제 품 생산 및 적성 평 가하였음.	100%

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구개발 수행 결과 콜드젤 기술을 이용하여 100-150 nm 크기의 유청 단백질 나노담체 제조 공정이 개발되었으며 열에 민감한 수용성 생리활성 물질 (엽산과 ascorbic acid)과 지용성 생리활성 물질 (resveratrol)의 전달 시스템으로서 가능성이 입증되었다. 또한 위장관 조건하에서의 나노담체로부터 생리활성 물질의 방출기작과 장내 흡착 및 전달 기작이 연구되었으며 엽산을 encapsulation 한 나노담체의 세포생리학적 특성을 규명함으로써 유식품 유래 고부가가치 전달체 제조 기술을 확보하였다. 특히 다자간 FTA 에 따른 유식품 산업의 경쟁력 확보를 위한 대응방안 중 하나로 고부가가치 발효 유제품개발을 위해 유청 단백질 나노담체의 발효 유제품 내 적용 공정을 개발하고, 나노담체 함유 기능성 유제품의 적성을 평가하였다.

연구개발과정 동안 유청 단백질 나노담체 제조 및 물리화학적 특성과 관련하여 2편의 논문이 SCI 및 KSC급 논문으로 게재되었으며 유청 단백질 나노담체 관련 교육 지도를 통해 나노유식품 기술을 산업체 및 학교 관계자들에게 소개하는 기회를 가졌다. 2010년 현재 콜드젤 기술 이용 유청 단백질 나노담체의 물리 화학적 상호 작용과 관련 하여 2건의 특허 출원 및 SCI급 논문 게재가 준비 중에 있으며, 엽산 함유 유청 단백질 나노담체가 세포의 성장 및 독성에 미치는 영향 분석결과에 관하여 특허 출원 및 SCI급 논문 1부 이상 게재를 계획 하고 있다.

유청 단백질 나노담체에 Folic acid(엽산) 외 다른 유용물질을 encapsulation 하여 체내로의 전달실험을 진행 계획에 있고 이는 엽산 함유 유청 단백질 나노담체뿐만 아니라 다른 유용물질을 함유한 유청 단백질 나노담체를 개발하여 이후 또 다른 특허 및 논문 게재를 계획 하고 있으며 개발된 유청 단백질 나노담체를 이용하여 특정 유용물질을 캡슐화 하여 약물 전달 물질 뿐 아니라 다른 산업 분야나 가정용 기술로도 응용 및 적용 계획에 있다.

본 연구를 통해 개발 되고 평가 확보 된 기술은 논문 및 특허출원과 함께 향후 국내 관련 업체로의 기술 이전을 포함한 산업화/실용화를 추진 할 계획이며, 과제 종료이후에도 본 기술들이 고부가가치 유제품 생산에 적용될 수 있도록 노력하여 궁극적으로 우리 낙농산업의 내수시장 확대와 수출 효과 극대화를 통해, 다자간 FTA에 따른 국내 낙농산업의 국제 경쟁력을 높일 수 있을 것으로 기대한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

기능성 물질 전달체로서의 유청 단백질의 기존에 알려진 장점 (높은 영양학적 가치, 안전성, gel이나 emulsion을 형성할 수 있는 능력) 외에도 다른 여러가지 장점을 지니고 있다. 최근 소수성의 기능성 물질들과 유청단백질의 binding에 관한 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 유청 단백질의 주요 단백질인 β -lactoglobulin (β -lg)는 lipocalin 단백질로써, 기존에 알려진 vitamin D와 retinol 외에도 omega-3 지방산인 DHA (Zimet & Liveney), 포도에 함유된 천연 항산화제인 resveratrol (Liang 등, 2008), 녹차에 함유된 천연 항산화제 epigallocatechin gallate (EGCG)와 binding 할 수 있다고 보고 되었다 (Shpigelman 등, 2009). 또한, 유청 단백질 중 하나인 α -lactalbumin도 retinol과 palmitic acid와 binding 할 수 있음이 보고 되었다. (Considine & Flanagan, 2009).

소수성 물질과 결합 능력 외에도 β -lg는 free thiol group을 지니고 있음으로써 항산화 능력을 지니는데, Liu 등 (2007)은 β -lg를 제거한 우유의 경우 항산화 능력이 50%나 감소되었다고 보고 하였다. 또한, 항산화제 (EGCG) 전달체로서의 β -lg는 포집된 항산화제를 효율적으로 보호할 수 있다고 보고 되었다 (Shpigelman 등, 2009). 이 연구에서는 pre-heated β -lg (75°C 또는 85°C에서 20분간)를 이용하여 EGCG를 포집한 뒤 실온에서 8일간 보관한 결과, EGCG의 분해를 3.2배나 늦추었다고 보고 하였다.

제 7 장 참고 문헌

1. Akhtar MJ, Khan MA, and Ahmad I. High performance liquid chromatographic determination of folic acid and its photodegradation products in the presence of riboflavin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (1997) 16, 95-99.
2. Alaburda J, de Almeida JP, Shundo L, Ruvieri V, and Sabino M. Determination of folic acid in fortified wheat flours. *Journal of Food Composition and Analysis* (2008) 21. 336-342.
3. Andrisano V, Bartolini M, Bertucci C, Cavrini V, Luppi B, Cerchiara T. Analytical methods for the determination of folic acid in a polymeric micellar carrier. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2003) 32, 983-989.
4. Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*. (2005) 16, 253-266.
5. Beveridge T, Toma SJ and Nakai S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent. *Journal of food science*.(1974) 39, 49-51.
6. Bryant CM and McClements DJ. influence of NaCl and CaCl₂ on cold-set gelation of heat-denatured whey protein. *Journal of food science*. (2000) 65, 801-804.
7. Chen L, Subirade M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials* (2006) 27, 4646-4654.
8. Chen L and Subirade M. Chitosan/ β -lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. *Journal of biomaterials*. (2005) 26, 6041-6053.
9. Cho SA and Yoo BS. Rheological properties of sweet potato starch-sucrose composite. *KOREAN Journal of FOOD SCI. TECHNOL* (2008) 40, 184-189.
10. Choi YH, Lim ST and Yoo BS. Dynamic rheological properties of gelatin. *KOREAN Journal of FOOD SCI. TECHNOL* (2002) 34, 830-834.

11. Considine T and Flanagan J. Interaction between milk proteins and micronutrients. In *Milk Proteins, from Expression to Food*, 1 edn. Edited by Thompson A, Boland MJ, Singh H, Amsterdam. Elsevier, Academic Press. (2009) 377-407.
12. Das RK, Kasoju N and Bora U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. (2009) 6, 153-160.
13. Desai KG and Park HJ. Effect of manufacturing parameters on the characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres prepared by spray-drying. *Journal of Microencapsulation*. (2006) 23(1), 91-103.
14. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* (1959) 82, 70-77.
15. He H, Chen X, Wang G, Wang J and Davey AK. High-performance liquid chromatography spectrometric analysis of trans-resveratrol in rat plasma. *Journal of chromatography B*. (2006) 832, 177-180.
16. Hélène J. Giroux, Jessica Houde, Michel Britten. Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pH-cycling treatment. *Food Hydrocolloids*. (2010), 24, 341-346
17. Hoffbrand AV and Weir DG. The history of folic acid. *Br J Haematol*. (2001) 113, 579-589.
18. Kwon SK and Seo SH. Sustained Release of ibuprofen from sodium alginate beads. *KOREAN Journal of Pharm. Sci.* (1995) 25, 153-161.
19. Kwon SS, Nam YS, Lee JS, Ku BS, Han SH, Lee JY, and Chang IS. Preparation and characterization of coenzyme Q10-loaded PMMA nanoparticles by a new emulsification process based on microfluidization, *Journal of Colloids and surfaces*, (2007) 210, 95-104.
20. Laridi R, Kheadr EE, Benech RO, Vuilleumard JC, Lacroix C and Fliss I. Liposome encapsulated nisin Z : optimization, stability and release during milk fermentation. *International dairy journal*. (2003) 13, 325-336.
21. Lee JS, Han PJ, and Suh KB. Studies on production of modified yoghurt(soy cream) from soybean milk (I) *Korean Journal of Food SCI. Technol.* (1972) 4-3.

22. Lee SM, Lim IJ and Yoo BS. Effect of mixing ratio on rheological properties of kochujang. KOREAN Journal of FOOD SCI. TECHNOL (2003) 35, 44-51.
23. Lefevre T and Subirade M. Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate β -lactoglobulin gels. Biopolymers (2000) 54, 578-586.
24. Liang L, Tajmir-Riahi HA, and Subirade M. Interaction of beta-lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. Biomacromolecules (2008) 9, 50-56.
25. Liu HC, Chen WL, and Mao SJT. Antioxidant nature of bovine milk beta-lactoglobulin. J. Dairy Sci (2007) 90, 547-555.
26. Madziva H, Kailasapathy K, and Phillips M. Evaluation of alginate-pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. LWT (2006) 39, 146-151.
27. Osseyi ES, Wehling RL, and Albrecht JA. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. Journal of Chromatography A (1998) 826, 235-240.
28. Phillips NI, Jenness R, and Kalan EB. Reactivity of sulfhydryls in several β -lactoglobulins, Journal of Arch. Biochem. Biophys. (1967) 120, 192-197.
28. Shpigelman A, Israeli G, and Livney YD. Thermally-Induced Protein-Polyphenol Co-Assemblies: Beta lactoglobulin-Based Nanocomplexes as Protective Nanovehicles for EGCG (orally presented at the "Delivery of Functionality in Complex Food Systems, 3rd International Symposium, October 18 - .21, 2009 Wageningen, The Netherlands").
29. Weyermann J, Lochmann D, Georgens C, and Zimmer A. Albumin-protamin-oligonucleotide-nanoparticles as a new antisense delivery system. Part 2: cellular uptake and effect. European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics. (2005) 59, 431-438.
30. Zhang L, Hou S, Mao S, Wei D, Song X, Lu Y. Uptake of folate-conjugated albumin nanoparticles to the SKOV3 cells. International Journal of Pharmaceutics (2004) 287, 155-162.

31. Zimet P and Livney YD. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Food hydrocolloids*. (2009) 23, 1120-1126.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.